(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6430552号
(P6430552)
(45)発行日　平成30年11月28日(2018.11.28)　(24)登録日　平成30年11月9日(2018.11.9)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/11	(2006.01)	C12N	15/11	ZNAZ
C12N 15/19	(2006.01)	C12N	15/19	
C12N 15/88	(2006.01)	C12N	15/88	

請求項の数 10　外国語出願　(全 666 頁)

(21)出願番号	特願2017-18370(P2017-18370)
(22)出願日	平成29年2月3日(2017.2.3)
(62)分割の表示	特願2015-504565(P2015-504565)の分割
原出願日	平成25年3月9日(2013.3.9)
(65)公開番号	特開2017-121244(P2017-121244A)
(43)公開日	平成29年7月13日(2017.7.13)
審査請求日	平成29年2月24日(2017.2.24)
(31)優先権主張番号	61/618,862
(32)優先日	平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	61/618,866
(32)優先日	平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　513084469
モデルナティエックス　インコーポレイテッド
ＭｏｄｅｒｎａＴＸ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国　０２１３９　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　テクノロジースクエア　２００
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100142907
弁理士　本田　淳
(74)代理人　100152489
弁理士　中村　美樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト疾患に関連する生物製剤およびタンパク質の産生のための修飾ポリヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）分泌タンパク質をコードするオープンリーディングフレームであって、修飾されたウリジン、シチジン、アデノシン、およびグアノシンのヌクレオチドからなり、前記修飾ウリジンが、Ｎ１－メチル－シュードウリジンである、前記オープンリーディングフレームと、
（ｂ）コザック配列を含む５’－ＵＴＲと、
（ｃ）少なくとも１つの５’キャップ構造と、
（ｄ）３’－ＵＴＲと、
（ｅ）結合ヌクレオシドの３’尾部配列と
を含む、ポリヌクレオチド。
【請求項２】
請求項１に記載のポリヌクレオチドを封入する複数の脂質ナノ粒子を含む、組成物。
【請求項３】
哺乳動物細胞に投与されると、ウラシル、シトシン、アデニン、およびグアニンを含むヌクレオチドからなるオープンリーディングフレームを含む対応するポリヌクレオチドと比較して、前記ポリヌクレオチドは、前記コードされたポリペプチドの増加された発現を有する、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
前記複数の脂質ナノ粒子が、８０ｎｍ～１６０ｎｍの平均粒径、０．０２～０．２の平

均ＰＤＩ、および１０～２０の脂質：ポリヌクレオチドの平均比（重量／重量）を有する、請求項２または３に記載の組成物。
【請求項５】
前記脂質ナノ粒子が、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、ＤＳＤＭＡ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ｒｅＬＮＰ、ＰＬＧＡ、またはＰＥＧ化脂質を含む、請求項２～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
前記分泌タンパク質がサイトカインである、請求項２～５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記結合ヌクレオシドの３’尾部配列が、１６０個のヌクレオチドのポリＡ尾部およびポリＡ－Ｇ四重鎖からなる群から選択される、請求項２～６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記少なくとも１つの５’末端キャップが、キャップ０、キャップ１、ＡＲＣＡ、イノシン、１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、および２－アジド－グアノシンからなる群から選択される、請求項２～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記オープンリーディングフレームが、コドン最適化されてＧＣ含量を偏らせている、請求項２～８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
哺乳動物細胞内でポリペプチドを発現させる方法に使用するための、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド、または請求項２～９のいずれか一項に記載の組成物であって、
前記方法が、前記ポリヌクレオチドまたは前記組成物を細胞に接触させることを含む、ポリヌクレオチドまたは組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表の参照
本出願は、配列表とともに電子書式で出願されている。Ｍ３００＿ＰＣＴＳＱＬＳＴ．ｔｘｔと題される配列表ファイルは、２０１３年３月９日に作成され、４９，４１７，３１５バイトの大きさである。この配列表の電子書式での情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，７４２号、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，２２４号、表題「Ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ Ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ ＲＮＡｓ」、２０１２年１２月１４日出願の国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／０６９６１０号、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ，ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８６２号、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６４５号、表題「Ｍｏｄｉｆｉ

ed Polynucleotides for the Production of Biologics」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１３０号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Biologics」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８６６号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６４７号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１３４号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Antibodies」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８６８号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６４８号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１３５号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Vaccines」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８７０号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６４９号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１３９号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Therapeutic Proteins and Peptides」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８７３号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６５０号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１４７号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Secreted Proteins」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８７８号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６５４号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１５２号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Plasma Membrane Proteins」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８８５号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６５８号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１５５号、表題「Modified Polynucleotid

es for the Production of Cytoplasmic and Cytoskeletal Proteins」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，８９６号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins」、２０１２年７月５日出願の米国仮特許出願第６１／６６８，１５７号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６６１号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１６０号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Intracellular Membrane Bound Proteins」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，９１１号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６６７号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１６８号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Nuclear Proteins」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，９２２号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６７５号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１７４号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，９３５号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６８７号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１８４号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，９４５号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease」、２０１２年８月１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，６９６号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，１９１号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，９５３号、表題「Modified Polynucleotides for the Production of Proteins Associated with Human Disease」、２０１２年８月

１０日出願の米国仮特許出願第６１／６８１，７０４号、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｄｉｓｅａｓｅ」、２０１２年１２月１４日出願の米国仮特許出願第６１／７３７，２０３号、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｄｉｓｅａｓｅ」、２０１２年４月２日出願の米国仮特許出願第６１／６１８，９６１号、表題「Ｄｏｓｉｎｇ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｍＲＮＡ」、２０１２年５月１７日出願の米国仮特許出願第６１／６４８，２８６号、表題「Ｄｏｓｉｎｇ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｍＲＮＡ」に対する優先権を主張するものであり、これら各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００３】

本出願は、２０１２年１０月３日出願の国際公開第ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／５８５１９号、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，ａｎｄ Ｕｓｅｓ Ｔｈｅｒｅｏｆ」、および２０１２年１２月１４日出願の国際公開第ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／６９６１０号、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ，ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ」にも関連する。

【０００４】

本出願は、同時係属出願にも関連し、それぞれ、２０１３年３月９日に本出願と共に同時に出願され、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ」の代理人整理番号Ｍ３０１．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｅｃｒｅｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」の代理人整理番号Ｍ３０４．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」の代理人整理番号Ｍ３０５．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ａｎｄ Ｃｙｔｏｓｋｅｌｅｔａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」の代理人整理番号Ｍ３０６．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」の代理人整理番号Ｍ３０８．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」の代理人整理番号Ｍ３０９．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｄｉｓｅａｓｅ」の代理人整理番号Ｍ３１０．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｏｓｍｅｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」の代理人整理番号ＭＮＣ１．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）、および表題「Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」の代理人整理番号ＭＮＣ２．２０（ＰＣＴ／ＵＳ１３／ＸＸＸＸＸ）を有し、これら各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００５】

発明の分野

本発明は、ポリヌクレオチド、一次構築物、および修飾ｍＲＮＡ分子（ｍｍＲＮＡ）の組成、これらの設計、調製、製造、および／または製剤化の方法、プロセス、キット、ならびにデバイスに関する。

【背景技術】
【０００６】
タンパク質発現を生じさせる従前の方法には多くの問題がある。例えば、導入されたＤＮＡは、ある頻度で宿主細胞ゲノムＤＮＡに組み込まれて、宿主細胞ゲノムＤＮＡの変性および／または損傷をもたらし得る。あるいは、細胞に導入された異種デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）は、娘細胞（異種ＤＮＡが染色体に組み込まれたか否かにかかわらず）に、または子孫に継承され得る。
加えて、適切に送達され、かつ宿主ゲノムの損傷も組み込みもないと仮定して、コードされたタンパク質が作製される前に生じなければならないステップが多く存在する。いったん細胞内に入ると、ＤＮＡは、それがＲＮＡ転写される核内に輸送されなければならない。その後、ＤＮＡから転写されたＲＮＡは、それがタンパク質に翻訳される細胞質に入らなければならない。投与されたＤＮＡからタンパク質までの複数の処理ステップが機能タンパク質の生成前に時間差を生み出すだけでなく、各ステップは、細胞のエラーおよび損傷の機会にもなる。さらに、ＤＮＡが頻繁に細胞に入るが、発現されないか、または妥当な速度もしくは濃度で発現されないため、細胞におけるＤＮＡ発現を達成することが困難であることが知られている。これは、ＤＮＡが一次細胞または修飾細胞株に導入されるときに特に問題になり得る。
【０００７】
１９９０年代初めに、Ｂｌｏｏｍおよび同僚は、インビトロで転写されたバソプレシンｍＲＮＡを視床下部に注入することによってバソプレシン欠乏ラットの救助に成功した（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５５：９９６－９９８；１９９２）。しかしながら、低レベルの翻訳および分子の免疫原性が治療薬としてのｍＲＮＡの開発を妨害し、それ以来、むしろこれらの落とし穴を利用し得る代替用途、すなわち、癌抗原をコードするｍＲＮＡでの免疫化に労力を集中させている。
【０００８】
他者は、目的とするポリペプチドを送達するためのｍＲＮＡの使用を研究しており、ｍＲＮＡ分子のある特定の化学修飾、具体的には、シュードウリジンおよび５－メチル－シトシンが免疫刺激作用を低下させたことを示している。
【０００９】
これらの研究は、例えば、Ｒｉｂｏｓｔｅｍ　Ｌｉｍｉｔｅｄの２００３年７月９日に出願され、現在は放棄されている英国特許出願第０３１６０８９．２号、国際公開第ＷＯ２００５００５６２２号として公開されている２００４年７月９日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＧＢ２００４／００２９８１号、米国特許第ＵＳ２００６０２４７１９５号として公開され、現在は放棄されている２００６年６月８日出願の米国特許出願国内段階登録第１０／５６３，８９７号、および欧州特許ＥＰ１６４６７１４号として公開され、現在撤回されている２００４年７月９日出願の欧州特許出願国内段階登録第ＥＰ２００４７４３３２２号；Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ，Ｉｎｃ．の国際公開第ＷＯ２００８１４０６１５号として公開された２００７年１２月１９日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００７／８８０６０号、米国特許第ＵＳ２０１０００２８９４３号として公開された２００９年７月２日出願の米国特許出願国内段階登録第１２／５２０，０７２号、および欧州特許第ＥＰ２１０４７３９号として公開された２００９年７月７日出願の欧州特許出願国内段階登録第ＥＰ２００７８７４３７６号；ロチェスター大学の国際公開第ＷＯ２００７０６４９５２号として公開された２００６年１２月４日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００６／４６１２０号、および米国特許第ＵＳ２００７０１４１０３０号として公開された２００６年１２月１日出願の米国特許出願第１１／６０６，９９５号；ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＡＧの２００７年１２月１４日に出願され、現在は放棄されている欧州特許出願第ＥＰ２００７０２４３１２号、国際公開第ＷＯ２００９０７７１３４号として公開された２００８年１２月１２日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＥＰ２００８／０１０５９号、欧州特許第ＥＰ２２４０５７２号として公開された２０１０年６月２日出願の欧州特許出願国内段階登録第ＥＰ２００８８６１４２３号、米国特許第ＵＳ２０１１００６５１０３号として公開された

２０１０年１１月２４日出願の米国特許出願国内段階第１２／，７３５，０６０号、２００５年９月２８日出願の独国特許出願第ＤＥ　１０　２００５　０４６　４９０号、国際公開第ＷＯ２００７０３６３６６号として公開された２００６年９月２８日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＥＰ２００６／０４４８号、２０１２年３月２１日出願の国内段階欧州特許第１９３４３４５号、および第２０１００１２９８７７号として公開された２００９年８月１４日出願の国内段階米国特許出願第１１／９９２，６３８号；Ｉｍｍｕｎｅ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｉｎｃ．の米国特許第ＵＳ２０１２００４６３４６号として公開された２０１１年４月１５日出願の米国特許出願第１３／０８８，００９号および国際公開第ＷＯ２０１１０１３０６２４号として公開された２０１１年４月１５日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／３２６７９号；Ｓｈｉｒｅ　ＨｕｍａｎＧｅｎｅｔｉｃ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓの米国特許第ＵＳ２０１１０２４４０２６号として公開された２０１０年１１月２０日出願の米国特許出願第１２／９５７，３４０号；Ｓｅｑｕｉｔｕｒ　Ｉｎｃ．の国際公開第ＷＯ１９９９０１４３４６号として公開された１９９８年９月１８日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ１９９８／０１９４９２号；Ｔｈｅ　Ｓｃｒｉｐｐｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅの国際公開第ＷＯ２０１００９８８６１号として公開された２０１０年２月２４日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／００５６７号、および米国特許第ＵＳ２０１２００５３３３３号として公開された２０１１年１１月３日出願の米国特許出願国内段階登録第１３／２０３，２２９号；ルートヴィヒ・マクシミリアン大学の国際公開第ＷＯ２０１１０１２３１６号として公開された２０１０年７月３０日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＥＰ２０１０／００４６８１号；Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ　Ｉｎｃ．の２００８年６月３０日に出願され、２０１１年１０月１８日に許可された米国特許第８，０３９，２１４号、米国特許第ＵＳ２０１１０１４３４３６号として公開された２０１０年１２月７日出願の米国特許出願第１２／９６２，４９８号、米国特許第ＵＳ２０１１０１４３３９７号として公開された２０１０年１２月７日出願の同第１２／９６２，４６８号、米国特許第ＵＳ２０１２０００９６４９号として公開された２０１１年９月２０日出願の同第１３／２３７，４５１号、ならびに国際公開第ＷＯ２０１１０７１９３１号として公開された２０１０年１２月７日出願のＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／５９３０５、および国際公開第ＷＯ２０１１０７１９３６号として公開された２０１０年１２月７日出願の同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１０／５９３１７号；ペンシルベニア大学理事会の国際公開第ＷＯ２００７０２４７０８号として公開された２００６年８月２１日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００６／３２３７２号、および米国特許第ＵＳ２００９０２８６８５２号として公開された２００９年３月２７日出願の米国特許出願国内段階第１１／９９０，６４６号；Ｃｕｒｅｖａｃ　ＧＭＢＨの２００１年６月５日出願の独国特許出願第ＤＥ１０　２００１　０２７　２８３．９号、２００１年１２月１９日出願の同第ＤＥ１０　２００１　０６２　４８０．８号、および２００６年１０月３１日出願の同第ＤＥ　２０　２００６　０５１　５１６号（これらすべて放棄されている）、２００５年３月３０日に許可された欧州特許第ＥＰ１３９２３４１号、および２００８年１月２日に許可された欧州特許第ＥＰ１４５８４１０号、国際公開第ＷＯ２００２０９８４４３号として公開された２００２年６月５日出願のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＥＰ２００２／０６１８０号、国際公開第ＷＯ２００３０５１４０１号として公開された２００２年１２月１９日出願の同第ＰＣＴ／ＥＰ２００２／１４５７７号、国際公開第ＷＯ２００８０５２７７０号として公開された２００７年１２月３１日出願の同第ＰＣＴ／ＥＰ２００７／０９４６９号、国際公開第ＷＯ２００９１２７２３０号として公開された２００８年４月１６日出願の同第ＰＣＴ／ＥＰ２００８／０３０３３号、国際公開第ＷＯ２００６１２２８２８号として公開された２００５年５月１９日出願の同第ＰＣＴ／ＥＰ２００６／００４７８４号、国際公開第ＷＯ２００８０８３９４９号として公開された２００７年１月９日出願の同第ＰＣＴ／ＥＰ２００８／０００８１号、ならびに米国特許第ＵＳ２００５００３２７３０号として公開された２００３年１２月５日出願の米国特許出願第１０／７２９，８３０号、米国特許第ＵＳ２００５００５９６２４号として公開された２００４年６月１８日出願の同第１０／８７０，１１０号、米国特許第ＵＳ２００８０２６

７８７３号として公開された２００８年７月７日出願の同第１１／９１４，９４５号、米国特許第ＵＳ２０１００４７２６１号として公開され、現在は放棄されている２００９年１０月２７日出願の同第１２／４４６，９１２号、米国特許第ＵＳ２０１００１８９７２９号として公開された２０１０年１月４日出願の同第１２／５２２，２１４号、米国特許第ＵＳ２０１１００７７２８７号として公開された２０１０年５月２６日出願の同第１２／７８７，５６６号、米国特許第ＵＳ２０１００２３９６０８号として公開された２０１０年５月２６日出願の同第１２／７８７，７５５号、米国特許第ＵＳ２０１１０２６９９５０号として公開された２０１１年７月１８日出願の同第１３／１８５，１１９号、および米国特許第ＵＳ２０１１０３１１４７２号として公開された２０１１年５月１２日出願の同第１３／１０６，５４８号に記載されており、これらはすべて、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００１０】

シュードウリジンおよび５－メチル－シトシンを含む化学修飾の選択に限定されているこれらの報告書にもかかわらず、細胞内翻訳の効果的な調節およびポリペプチドまたはその断片をコードする核酸の処理を取り巻く無数の障壁に対処する治療法が当技術分野において依然として必要とされている。

【００１１】

この目的を達成するために、本発明者らは、ある特定の修飾ｍＲＮＡ配列が、単に免疫応答を逃れるか、回避するか、または低減させるだけではない利点を有する治療薬としての可能性を有することを示した。そのような研究は、公開された同時係属出願である、２０１１年８月５日出願の国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４６８６１号および２０１１年１０月３日出願の同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０５４６３６号、２０１１年１０月３日出願の国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０５４６１７号に詳述されており、これらの内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００１２】

本発明は、目的とするポリペプチド（例えば、修飾ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ）をコードし、当技術分野における課題のうちの１つ以上を回避する構造的および／または化学的特徴、例えば、構造的および機能的完全性を保持し、発現の閾値を克服し、発現速度、半減期、および／またはタンパク質濃度を改善し、タンパク質局在化を最適化し、かつ免疫応答等の有害な生物応答および／または分解経路を回避しながら、核酸系治療薬の製剤化および送達の最適化に有用な特徴を有する核酸系化合物またはポリヌクレオチドを提供することによって、この必要性に対処する。

【発明の概要】

【００１３】

修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）分子の組成、修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）分子の設計、調製、製造、および／または製剤化方法、プロセス、キット、ならびにデバイスが本明細書に記載される。

【００１４】

本発明の様々な実施形態の詳細が、以下の発明を実施するための形態において説明される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、発明を実施するための形態および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかになる。

【００１５】

前述および他の目的、特徴、および利点は、添付の図面に図示されるように、本発明の特定の実施形態の以下の記述から明らかになり、その図面において、同様の参照文字は、異なる図面を通して同一の部分を指す。図面は、必ずしも原寸に比例しておらず、むしろ、本発明の様々な実施形態の原理を例示説明することに重点が置かれている。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１】本発明の一次構築物の概略図である。

【図２－１】本発明において有用な先行技術における脂質構造を図示する。９８Ｎ１２－

５（ＴＥＴＡ５－ＬＡＰ）、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ（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）、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、およびＣ１２－２００の構造を示す。
【図２－２】同上。
【図３】本明細書に教示されるＩＶＴ反応において有用な代表的なプラスミドである。このプラスミドは、本発明者らによって設計された挿入物６４８１８を含有する。
【図４】ＰＬＧＡマイクロスフェアにカプセル封入された修飾ｍＲＮＡのゲルプロファイルである。
【図５】第ＩＸ因子タンパク質産生ＰＬＧＡ製剤第ＩＸ因子修飾ｍＲＮＡのヒストグラムである。
【図６－１】様々な用量での修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のヒトケラチノサイト細胞におけるＶＥＧＦタンパク質産生を示すヒストグラムである。図６Ａは、天然ヌクレオシドトリホスフェート（ＮＴＰ）を含む修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のタンパク質産生を示す。
【図６－２】様々な用量での修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のヒトケラチノサイト細胞におけるＶＥＧＦタンパク質産生を示すヒストグラムである。図６Ｂは、シュードウリジン（シュードＵ）および５－メチルシトシン（５ｍＣ）で完全に修飾された修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のタンパク質産生を示す。
【図６－３】様々な用量での修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のヒトケラチノサイト細胞におけるＶＥＧＦタンパク質産生を示すヒストグラムである。図６Ｃは、Ｎ１－メチル－シュードウリジン（Ｎ１－メチル－シュードＵ）および５－メチルシトシン（５ｍＣ）で完全に修飾された修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のタンパク質産生を示す。
【図７】ＨＥＫ２９３細胞におけるＶＥＧＦタンパク質産生のヒストグラムである。
【図８－１】末梢血単核球（ＰＢＭＣ）におけるＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のＶＥＧＦ発現およびＩＦＮ－α誘導のヒストグラムである。図８Ａは、ＶＥＧＦ発現を示す。
【図８－２】末梢血単核球（ＰＢＭＣ）におけるＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のＶＥＧＦ発現およびＩＦＮ－α誘導のヒストグラムである。図８Ｂは、ＩＦＮ－α誘導を示す。
【図９】ＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡからのＨｅＬａ細胞におけるＶＥＧＦタンパク質産生のヒストグラムである。
【図１０】マウスにおけるリポプレックス化ＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡからのＶＥＧＦタンパク質産生のヒストグラムである。
【図１１】Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡからのＨｅＬａ細胞におけるＧ－ＣＳＦタンパク質産生のヒストグラムである。
【図１２】マウスにおけるリポプレックス化Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡからのＧ－ＣＳＦタンパク質生成の表すヒストグラムである。
【図１３】ＨｅＬａ細胞上清における第ＩＸ因子修飾ｍＲＮＡからの第ＩＸ因子タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図１４】ＨｅＬａ細胞におけるＡＰＯＡ１野生型修飾ｍＲＮＡ、ＡＰＯＡ１　Ｍｉｌａｎｏ修飾ｍＲＮＡまたはＡＰＯＡ１　Ｐａｒｉｓ修飾ｍＲＮＡからのＡＰＯＡ１タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図１５】ＡＰＯＡ１野生型修飾ｍＲＮＡ由来のＡＰＯＡ１タンパク質のゲルプロファイルである。
【図１６】ＡＰＯＡ１　Ｐａｒｉｓ修飾ｍＲＮＡ由来のＡＰＯＡ１タンパク質のゲルプロファイルである。
【図１７】ＡＰＯＡ１　Ｍｉｌａｎｏ修飾ｍＲＮＡ由来のＡＰＯＡ１タンパク質のゲルプロファイルである。
【図１８】フィブリノーゲンα（ＦＧＡ）修飾ｍＲＮＡ由来のＦＧＡタンパク質のゲルプ

ロファイルである。
【図１９】ＨｅＬａ細胞上清におけるプラスミノーゲン修飾ｍＲＮＡからのプラスミノーゲンタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図２０】プラスミノーゲン修飾ｍＲＮＡ由来のプラスミノーゲンタンパク質のゲルプロファイルである。
【図２１】ガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（ＧＡＬＴ）修飾ｍＲＮＡ由来のＧＡＬＴタンパク質のゲルプロファイルである。
【図２２】アルギニノコハク酸リアーゼ（ＡＳＬ）修飾ｍＲＮＡ由来のＡＳＬタンパク質のゲルプロファイルである。
【図２３】チロシンアミノトランスフェラーゼ（ＴＡＴ）修飾ｍＲＮＡ由来のＴＡＴタンパク質のゲルプロファイルである。
【図２４】グルカン（１，４－α－）、分枝酵素１（ＧＢＥ１）修飾ｍＲＮＡ由来のＧＢＥ１タンパク質のゲルプロファイルである。
【図２５】ＨｅＬａ細胞上清におけるプロトロンビン修飾ｍＲＮＡからのプロトロンビンタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図２６】ＨｅＬａ細胞上清におけるプロトロンビン修飾ｍＲＮＡからのプロトロンビンタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図２７】セルロプラスミン（ＣＰまたはＣＬＰ）修飾ｍＲＮＡ由来のＣＰタンパク質のゲルプロファイルである。
【図２８】ＨｅＬａ細胞上清におけるトランスフォーミング成長因子β１（ＴＧＦ－β１）修飾ｍＲＮＡからのＴＧＦ－β１タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図２９】オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ（ＯＴＣ）修飾ｍＲＮＡ由来のＯＴＣタンパク質のゲルプロファイルである。
【図３０】低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）修飾ｍＲＮＡのフローサイトメトリープロットである。
【図３１】ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１（ＵＧＴ１Ａ１）修飾ｍＲＮＡ由来のＵＧＴ１Ａ１タンパク質のゲルプロファイルである。
【図３２】ＨＥＫ２９３細胞における第ＸＩ因子タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図３３】アクアポリン－５修飾ｍＲＮＡ由来のアクアポリン－５タンパク質のゲルプロファイルである。
【図３４】ＨｅＬａ細胞における第ＶＩＩ因子修飾ｍＲＮＡからの第ＶＩＩ因子タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図３５】ＨｅＬａ細胞におけるインスリングラルギン修飾ｍＲＮＡからのインスリングラルギンタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図３６】ＨｅＬａ細胞における組織因子修飾ｍＲＮＡからの組織因子タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図３７】ＨｅＬａ細胞における第ＸＩ因子修飾ｍＲＮＡからの第ＸＩ因子タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図３８】ＨｅＬａ細胞上清における第因子ＸＩ因子修飾ｍＲＮＡからの第ＸＩ因子タンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図３９】インスリンアスパルト修飾ｍＲＮＡからのインスリンアスパルトタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図４０】ＨｅＬａ細胞におけるインスリンリスプロ修飾ｍＲＮＡからのインスリンリスプロタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図４１】ＨｅＬａ細胞におけるインスリングルリジン修飾ｍＲＮＡからのインスリングルリジンタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図４２】ＨｅＬａ細胞におけるヒト成長ホルモン修飾ｍＲＮＡからのヒト成長ホルモンタンパク質生成を表すヒストグラムである。
【図４３】腫瘍タンパク質５３（ｐ５３）修飾ｍＲＮＡ由来のｐ５３タンパク質のゲルプ

ロファイルである。図４３Ａはｐ５３の予測サイズを示す。図４３Ｂはｐ５３の予測サイズを示す。
【図４４】タフテリン（ＴＵＦＴ１）修飾ｍＲＮＡ由来のＴＵＦＴ１タンパク質のゲルプロファイルである。
【図４５】ガラクトキナーゼ１（ＧＡＬＫ１）修飾ｍＲＮＡ由来のＧＡＬＫ１タンパク質のゲルプロファイルである。図４５ＡはＧＡＬＫ１の予測サイズを示す。図４５ＢはＧＡＬＫ１の予測サイズを示す。
【図４６】デフェンシン、β１０３Ａ（ＤＥＦＢ１０３Ａ）修飾ｍＲＮＡ由来のＤＥＦＢ１０３Ａタンパク質のゲルプロファイルである。
【図４７】ＬＤＬＲ修飾ｍＲＮＡのフローサイトメトリープロットである。
【図４８】ＨｅＬａにおける血管内皮成長因子発現を表すヒストグラムである。
【図４９】血管内皮成長因子ｍＲＮＡをトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞の細胞生存能を表すヒストグラムである。
【図５０】インスリンアスパルトタンパク質発現を表すヒストグラムである。
【図５１】インスリングラルギンタンパク質発現を表すヒストグラムである。
【図５２】インスリングルリジンタンパク質発現を表すヒストグラムである。
【図５３】インターロイキン７（ＩＬ－７）タンパク質発現を表すヒストグラムである。
【図５４】エリスロポエチン（ＥＰＯ）タンパク質発現を表すヒストグラムである。
【図５５】リソソーム酸リパーゼ修飾ｍＲＮＡ由来のリソソーム酸リパーゼタンパク質のゲルプロファイルである。
【図５６】グルコセレブロシダーゼ修飾ｍＲＮＡ由来のグルコセレブロシダーゼタンパク質のゲルプロファイルである。
【図５７】イズロン酸－２－スルファターゼ修飾ｍＲＮＡ由来のイズロン酸－２－スルファターゼタンパク質のゲルプロファイルである。
【図５８】ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ由来のルシフェラーゼタンパク質のゲルプロファイルである。
【図５９】哺乳動物における製剤化ハーセプチン修飾ｍＲＮＡ投与後のＩｇＧ濃度を表すヒストグラムである。
【図６０】ハーセプチン修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後のＩｇＧ濃度（ｎｇ／ｍｌ）を表すヒストグラムである。
【図６１】ハーセプチン修飾ｍＲＮＡ由来のハーセプチンタンパク質のゲルプロファイルである。
【図６２】グルコセレブロシダーゼ酵素活性のヒストグラムである。
【図６３】リソソーム酸リパーゼ酵素活性のヒストグラムである。
【図６４】第ＶＩＩＩ因子タンパク質発現を表すヒストグラムである。
【図６５】第ＶＩＩＩ因子の発色活性を表すヒストグラムである。
【図６６－１】ＬＤＬＲ発現を表すグラフである。図６６ＡはＬＤＬＲ　ｍＲＮＡの添加に対する細胞のＬＤＬ受容体発現を示す。
【図６６－２】ＬＤＬＲ発現を表すグラフである。図６６Ｂはトランスフェクション後の細胞のＬＤＬ受容体発現を示す。
【図６６－３】ＬＤＬＲ発現を表すグラフである。図６６ＣはＢＯＤＩＰＹ（登録商標）標識ＬＲＬの飽和を示す。
【図６６－４】ＬＤＬＲ発現を表すグラフである。図６６ＤはＢＯＤＩＰＹ－ＬＤＬの細胞に対する結合親和性を示す。
【図６７】ＵＧＴ１Ａ１発現が陽性である細胞のパーセントを示すグラフである。
【図６８】ＵＧＴ１Ａ１タンパク質の蓄積を示すグラフである。
【図６９】ＵＧＴ１Ａ１修飾ｍＲＮＡまたはＯＴＣ修飾ｍＲＮＡ由来のＵＧＴ１Ａ１タンパク質およびＯＴＣのゲルプロファイルである。
【図７０】ＰＡｈまたはＵＧＴ１Ａ１をトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞のフローサイトメトリープロットである。

【図７１】ＵＧＴ１Ａ１修飾ｍＲＮＡ由来のＵＧＴ１Ａ１タンパク質のゲルプロファイルである。
【図７２】ＵＧＴ１Ａ１を含有するＬＮＰで処置したマウスのミクロソーム抽出物のゲルプロファイルである。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
治療薬、診断、試薬の分野、および生物学的アッセイにおいて、例えば、核酸の細胞内翻訳およびコードされた目的とするポリペプチドの産生を引き起こすために、インビトロ、インビボ、インサイツ、またはエクスビボにかかわらず、細胞内に核酸、例えば、リボ核酸（ＲＮＡ）を送達することができることは大変興味深いことである。非組み込みポリヌクレオチドの送達および機能が特に重要である。
【００１８】
１個以上の目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの組成物（薬学的組成物を含む）、ならびにその設計、調製、製造、および／または製剤化方法が本明細書に記載される。本明細書に記載の目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを選択、設計、および／または利用するためのシステム、プロセス、デバイス、およびキットも提供される。
【００１９】
本発明に従って、これらのポリヌクレオチドは、好ましくは、当技術分野の他のポリペプチドをコードする分子の欠陥を回避するように修飾される。したがって、これらのポリヌクレオチドは、修飾ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡと称される。
【００２０】
抗体、ウイルス、獣医学における適用の分野、および様々なインビボ環境における修飾ポリヌクレオチドの使用が本発明者らによって研究されており、これらの研究は、例えば、同時係属および共同所有の、ｍｍＲＮＡのインビボ適用を教示する２０１１年３月３１日出願の米国仮特許出願第６１／４７０，４５１号；抗体ポリペプチドの産生のために操作された核酸を教示する２０１１年４月２６日出願の同第６１／５１７，７８４号；ｍｍＲＮＡ技術の獣医学における適用を教示する２０１１年５月１７日出願の同第６１／５１９，１５８号；ｍｍＲＮＡ技術の抗菌剤における適用を教示する２０１１年９月１２日出願の同第６１／５３３，５３７号；ｍｍＲＮＡ技術のウイルス適用を教示する２０１１年９月１２日出願の同第６１／５３３，５５４号；ｍｍＲＮＡ技術で用いる様々な化学修飾を教示する２０１１年１０月３日出願の同第６１／５４２，５３３号；ｍｍＲＮＡ技術の作製および使用で用いるモバイルデバイスを教示する２０１１年１２月１４日出願の同第６１／５７０，６９０号；救急治療状況下でのｍｍＲＮＡの使用を教示する２０１１年１２月１４日出願の同第６１／５７０，７０８号；ｍｍＲＮＡの末端修飾構造を教示する２０１１年１２月１６日出願の同第６１／５７６，６５１号；リピドイドを用いたｍｍＲＮＡの送達方法を教示する２０１１年１２月１６日出願の同第６１／５７６，７０５号；ｍｍＲＮＡを用いて器官または組織の生存率を増加させるための方法を教示する２０１１年１２月２１日出願の同第６１／５７８，２７１号；細胞透過性ペプチドをコードするｍｍＲＮＡを教示する２０１１年１２月２９日出願の同第６１／５８１，３２２号；ｍｍＲＮＡへの細胞傷害性ヌクレオシドの組み込みを教示する２０１１年１２月２９日出願の同第６１／５８１，３５２号；および血液脳関門を横断するためにｍｍＲＮＡを用いる方法を教示する２０１２年１月１０日出願の同６１／６３１，７２９号に開示されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【００２１】
組織における安定性および／もしくは排除、受容体の取り込みおよび／もしくは動態、組成物による細胞到達、翻訳機構との関わり、ｍＲＮＡ半減期、翻訳の効率、免疫回避、タンパク質産生能力、分泌の効率（適用される場合）、血液循環への到達可能性、タンパク質半減期、ならびに／または細胞の状態、機能、および／もしくは活性の調節のうちの１つ以上を改善するように設計された、目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレ

オチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡが本明細書の一部分に提供される。

【００２２】

Ｉ．本発明の組成物（ｍｍＲＮＡ） 本発明は、１個以上の目的とするポリペプチドをコードする核酸分子、具体的には、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを提供する。「核酸」という用語は、その最も広い意味において、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物および／または物質を含む。これらのポリマーは、多くの場合、ポリヌクレオチドと称される。本発明の例示の核酸またはポリヌクレオチドには、リボ核酸（ＲＮＡ）、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、グリコール核酸（ＧＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ、β－Ｄ－リボ配置を有するＬＮＡ、α－Ｌ－リボ配置を有するα－ＬＮＡ（ＬＮＡのジアステレオマー）、２’－アミノ官能化を有する２’－アミノ－ＬＮＡ、および２’－アミノ官能化を有する２’－アミノ－α－ＬＮＡを含む）、またはこれらのハイブリッドが含まれるが、これらに限定されない。

【００２３】

好ましい実施形態において、核酸分子は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である。本明細書で使用するとき、「メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）」という用語は、目的とするポリペプチドをコードし、かつ翻訳されてインビトロ、インビボ、インサイツ、またはエクスビボで、コードされた目的とするポリペプチドを産生することができる任意のポリヌクレオチドを指す。

【００２４】

従来、ｍＲＮＡ分子の主要成分には、少なくともコーディング領域、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、５’キャップ、およびポリＡ尾部が含まれる。この野生型モジュール構造を基に、本発明は、モジュール組織を維持するが、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドが導入される部分への細胞の自然免疫応答の実質的な誘導の欠如を含む、有用な特性をポリヌクレオチドに付与する１つ以上の構造および／もしくは化学修飾または改変を含むポリヌクレオチドまたは一次ＲＮＡ構築物を提供することによって従来のｍＲＮＡ分子の機能の範囲を拡大する。したがって、本発明の修飾ｍＲＮＡ分子は、「ｍｍＲＮＡ」と称される。本明細書で使用するとき、「構造的」特徴または修飾は、２個以上の結合ヌクレオチドが、ヌクレオチド自体への著しい化学修飾なく、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡにおいて挿入、欠失、複製、反転、またはランダム化される特徴または修飾である。化学結合が必然的に破壊および再形成されて構造修飾をもたらすため、構造修飾は、化学的性質のものであり、したがって、化学修飾である。しかしながら、構造修飾は、異なるヌクレオチド配列をもたらす。例えば、ポリヌクレオチド「ＡＴＣＧ」は、「Ａ－Ｔ－５ｍｅＣ－Ｇ」に化学修飾され得る。同一のポリヌクレオチドは、「ＡＴＣＧ」から「ＡＴＣＣＣＧ」に構造修飾され得る。ここで、ジヌクレオチド「ＣＣ」が挿入されており、ポリヌクレオチドへの構造修飾をもたらす。

【００２５】

ｍｍＲＮＡ構造

本発明のｍｍＲＮＡは、本明細書で証明されるように核酸系治療薬を用いた効果的なポリペプチド産生の既存の問題の打開に役立つそれらの機能的および／または構造的設計特徴において野生型ｍＲＮＡと区別される。

【００２６】

図１は、本発明の代表的なポリヌクレオチド一次構築物１００を示す。本明細書で使用するとき、「一次構築物」または「一次ｍＲＮＡ構築物」という用語は、１個以上の目的とするポリペプチドをコードし、その中でコードされる目的とするポリペプチドが翻訳されることを可能とするのに十分な構造的および／または化学的特徴を保持する、ポリヌクレオチド転写物を指す。一次構築物は、本発明のポリヌクレオチドであり得る。構造または化学修飾された場合、一次構築物は、ｍｍＲＮＡと称され得る。

【００２７】

図１を参照して、ここで、一次構築物１００は、第１の隣接領域１０４および第２の隣

接領域１０６に隣接する結合ヌクレオチド１０２の第１の領域を含有する。本明細書で使用するとき、「第１の領域」は、「コーディング領域」もしくは「コード領域」、または単に「第１の領域」と称され得る。この第１の領域は、コードされた目的とするポリペプチドを含み得るが、これに限定されない。目的とするポリペプチドは、その５’末端に、シグナル配列領域１０３によってコードされた１つ以上のシグナル配列を含み得る。隣接領域１０４は、１つ以上の完全または不完全な５’ＵＴＲ配列を含む結合ヌクレオチドの領域を含み得る。隣接領域１０４は、５’末端キャップ１０８も含み得る。第２の隣接領域１０６は、１つ以上の完全または不完全な３’ＵＴＲを含む結合ヌクレオチドの領域を含み得る。隣接領域１０６は、３’尾部配列１１０も含み得る。

【００２８】

第１の領域１０２と第１の隣接領域１０４の５’末端の架橋は、第１の操作領域１０５である。従来、この操作領域は、開始コドンを含む。あるいは、この操作領域は、開始コドンを含む任意の翻訳開始配列またはシグナルを含み得る。

【００２９】

第１の領域１０２と第２の隣接領域１０６の３’末端の架橋は、第２の操作領域１０７である。従来、この操作領域は、終止コドンを含む。あるいは、この操作領域は、終止コドンを含む任意の翻訳開始配列またはシグナルを含み得る。本発明に従って、複数の連続終止コドンも使用され得る。

【００３０】

概して、本発明の一次構築物の第１の領域の最短の長さは、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、またはデカペプチドをコードするのに十分な核酸配列の長さであり得る。別の実施形態において、この長さは、２～３０個のアミノ酸、例えば、５～３０、１０～３０、２～２５、５～２５、１０～２５、または１０～２０個のアミノ酸のペプチドをコードするのに十分であり得る。この長さは、少なくとも１１、１２、１３、１４、１５、１７、２０、２５、もしくは３０個のアミノ酸のペプチド、または４０個のアミノ酸より長くないペプチド、例えば、３５、３０、２５、２０、１７、１５、１４、１３、１２、１１、もしくは１０個のアミノ酸より長くないペプチドをコードするのに十分であり得る。ポリヌクレオチド配列がコードし得るジペプチドの例には、カルノシンおよびアンセリンが挙げられるが、それらに限定されない。

【００３１】

概して、本発明の目的とするポリペプチドをコードする第１の領域の長さは、約３０ヌクレオチド長を超える（例えば、少なくとも、約３５、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、１，１００、１，２００、１，３００、１，４００、１，５００、１，６００、１，７００、１，８００、１，９００、２，０００、２，５００、および３，０００、４，０００、５，０００、６，０００、７，０００、８，０００、９，０００、１０，０００、２０，０００、３０，０００、４０，０００、５０，０００、６０，０００、７０，０００、８０，０００、９０，０００、もしくは１００，０００ヌクレオチド長（１００，０００を含む）まで、またはそれらを超える）。本明細書で使用するとき、「第１の領域」は、「コーディング領域」もしくは「コード領域」、または単に「第１の領域」と称され得る。

【００３２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、約３０～約１００，０００個のヌクレオチド（例えば、３０～５０、３０～１００、３０～２５０、３０～５００、３０～１，０００、３０～１，５００、３０～３，０００、３０～５，０００、３０～７，０００、３０～１０，０００、３０～２５，０００、３０～５０，０００、３０～７０，０００、１００～２５０、１００～５００、１００～１，０００、１００～１，５００、１００～３，０００、１００～５，０００、１００～７，０００、１００～１０，０００、１００～２５，０００、１００～５０，０００、１００～

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

【００３３】

本発明に従って、第１および第２の隣接領域は、独立して、１５～１，０００ヌクレオチド長の範囲（例えば、３０、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、および９００を超えるヌクレオチド長、または少なくとも３０、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、および１，０００ヌクレオチド長）であり得る。

【００３４】

本発明に従って、尾部配列は、０～５００ヌクレオチド長の範囲（例えば、少なくとも６０、７０、８０、９０、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、または５００ヌクレオチド長）であり得る。尾部領域がポリＡ尾部である場合、長さは、ポリＡ結合タンパク質結合の単位で、またはその関数として決定され得る。この実施形態において、ポリＡ尾部は、ポリＡ結合タンパク質の少なくとも４個の単量体に結合するのに十分な長さである。ポリＡ結合タンパク質の単量体は、一続きの約３８個のヌクレオチドに結合する。したがって、約８０個のヌクレオチドおよび１６０個のヌクレオチドのポリＡ尾部が機能的であることが観察されている。

【００３５】

本発明に従って、キャッピング領域は、単一のキャップまたはキャップを形成する一連のヌクレオチドを含み得る。この実施形態において、キャッピング領域は、１～１０、例えば、２～９、３～８、４～７、１～５、５～１０、または少なくとも２、もしくは１０以下のヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態において、キャップは不在である。

【００３６】

本発明に従って、第１および第２の操作領域は、３～４０、例えば、５～３０、１０～２０の範囲、１５、または少なくとも４、もしくは３０以下のヌクレオチド長であり得、開始コドンおよび／または終止コドンに加えて、１つ以上のシグナルおよび／または制限配列を含み得る。

【００３７】

環状ｍｍＲＮＡ

本発明に従って、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、環化またはコンカテマー化されて翻訳コンピテント分子を生成し、ポリＡ結合タンパク質と５’末端結合タンパク質との間の相互作用を補助し得る。環化またはコンカテマー化の機構は、少なくとも３つの異なる経路、すなわち１）化学的経路、２）酵素的経路、および３）リボザイム触媒経路を通って生じ得る。新たに形成された５’／３’連結は、分子内または分子間であり得る。

【００３８】

第１の経路において、核酸の５’末端および３’末端は、接近しているときに分子の５’末端と３’末端との間に新たな共有結合を形成する化学反応基を含有する。有機溶媒中

で、合成ｍＲＮＡ分子の３’末端上の３’－アミノ末端ヌクレオチドが５’－ＮＨＳ－エステル部分上で求核攻撃を経て新たな５’／３’アミド結合を形成するように、５’末端は、ＮＨＳ－エステル反応基を含有し得、３’末端は、３’－アミノ末端ヌクレオチドを含有し得る。

【００３９】

第２の経路において、Ｔ４　ＲＮＡリガーゼを用いて、５’－リン酸化核酸分子を核酸の３’－ヒドロキシル基に酵素結合させて、新たなホスホロジエステル結合を形成することができる。反応の例において、１μｇの核酸分子が、製造業者のプロトコルに従って、１～１０単位のＴ４　ＲＮＡリガーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）と３７℃で１時間インキュベートされる。連結反応が、５’領域および３’領域の両方と並んで塩基対合して、酵素的連結反応を補助することができる分裂したオリゴヌクレオチドの存在下で生じ得る。

【００４０】

第３の経路において、ｃＤＮＡ鋳型の５’末端または３’末端のいずれかは、インビトロ転写中に、結果として生じる核酸分子が核酸分子の５’末端を核酸分子の３’末端に連結することができる活性リボザイム配列を含有し得るように、リガーゼリボザイム配列をコードする。リガーゼリボザイムは、Ｉ群イントロン、Ｉ群イントロン、デルタ肝炎ウイルス、ヘアピンリボザイムに由来し得るか、またはＳＥＬＥＸ（試験管内進化法、ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ　ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　ｏｆ　ｌｉｇａｎｄｓ　ｂｙ　ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）によって選択され得る。リボザイムリガーゼ反応は、０～３７℃の温度で１～２４時間かかり得る。

【００４１】

ｍｍＲＮＡ多量体

本発明に従って、複数のはっきりと異なるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、３’末端で修飾されたヌクレオチドを用いて３’末端を介して結合され得る。化学的複合体形成を用いて、細胞への送達の化学量論を制御することができる。例えば、グリオキシル酸回路酵素、イソクエン酸リアーゼ、およびリンゴ酸シンターゼは、ＨｅｐＧ２細胞に１：１の比率で供給されて細胞脂肪酸の代謝を変化させ得る。この比率は、一方のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ種に３’－アジド末端ヌクレオチドを用い、かつ反対側のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ種にＣ５－エチニルまたはアルキニル含有ヌクレオチドを用いて化学結合ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを化学結合させることによって制御され得る。この修飾されたヌクレオチドは、製造業者のプロトコルに従って末端トランスフェラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）を用いて転写後に添加される。３’末端修飾ヌクレオチドの添加後、これら２個のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ種は、銅の存在下または不在下において水溶液中で合わせられて、文献内に記載のクリック化学機構を介して新たな共有結合を形成し得る。

【００４２】

別の例において、３個以上のポリヌクレオチドが官能化リンカー分子を用いて結合され得る。例えば、官能化サッカリド分子は、複数の化学反応基（ＳＨ－、NH_2－、N_3等）を含有して３’－官能化ｍＲＮＡ分子上の同族部分（すなわち、３’－マレイミドエステル、３’－ＮＨＳ－エステル、アルキニル）と反応するように化学修飾され得る。この修飾されたサッカリド上の反応基の数は、化学量論的様式で制御されて、複合体化されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの化学量論比を直接制御し得る。

【００４３】

ｍｍＲＮＡ複合体および組み合わせ

タンパク質産生をさらに亢進するために、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、他のポリヌクレオチド、染料、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、プソラレン、マイトマイシンＣ）、ポルフィリン（ＴＰＰＣ４、テキサフィリン、サフィリン）、多環芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレア

ーゼ（例えば、ＥＤＴＡ）、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、ＰＥＧ（例えば、ＰＥＧ－４０Ｋ）、ＭＰＥＧ、［ＭＰＥＧ］$_2$、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンＥ、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ、タンパク質、例えば、糖タンパク質、またはペプチド、例えば、コリガンドに特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞、または骨細胞等の特定の細胞型に結合する抗体、ホルモンおよびホルモン受容体、非ペプチド種、例えば、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、共同因子、または薬物と複合体化されるように設計され得る。

【００４４】

複合体化は、安定性および／または半減期の増加をもたらし得、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを、細胞、組織、または生物体の特定の部位に標的化するときに特に有用であり得る。

【００４５】

本発明に従って、ｍｍＲＮＡまたは一次構築物は、ＲＮＡｉ剤、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ結合部位、アンチセンスＲＮＡ、リボザイム、触媒ＤＮＡ、ｔＲＮＡ、三重らせん形成を誘導するＲＮＡ、アプタマー、もしくはベクター等のうちの１つ以上とともに投与され得るか、またはこれらをさらにコードし得る。

【００４６】

二機能性ｍｍＲＮＡ

本発明の一実施形態は、二機能性ポリヌクレオチド（例えば、二機能性一次構築物または二機能性ｍｍＲＮＡ）である。その名称が示すように、二機能性ポリヌクレオチドは、少なくとも２つの機能を有するか、または少なくとも２つの機能の能力があるポリヌクレオチドである。これらの分子は、慣例により、多機能性とも称され得る。

【００４７】

二機能性ポリヌクレオチドの複数の機能は、ＲＮＡによってコードされ得る（この機能は、コードされた産物が翻訳されるまで現れ得ない）か、またはポリヌクレオチド自体の特性であり得る。これは、構造的または化学的であり得る。二機能性修飾ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドと共有結合的または静電的に関連した機能を含み得る。さらに、これら２つの機能は、ｍｍＲＮＡおよび別の分子の複合体との関連において提供され得る。

【００４８】

二機能性ポリヌクレオチドは、抗増殖性ペプチドをコードし得る。これらのペプチドは、線状、環状、拘束、またはランダムコイルであり得る。これらは、アプタマー、シグナル伝達分子、リガンド、またはこれらの模倣物もしくはミメティックとして機能し得る。抗増殖性ペプチドは、翻訳されると、３～５０アミノ酸長であり得る。それらは、５～４０、１０～３０、または約１５アミノ酸長であり得る。それらは、一本鎖、多本鎖、または分岐鎖であり得、翻訳されると、複合体、凝集体、または任意の多ユニット構造を形成し得る。

【００４９】

非コードポリヌクレオチドおよび一次構築物

本明細書に記載されるように、部分的または実質的に翻訳可能ではない配列、例えば、非コード領域を有するポリヌクレオチドおよび一次構築物が提供される。そのような非コード領域は、一次構築物の「第１の領域」であり得る。あるいは、非コード領域は、第１の領域以外の領域であり得る。そのような分子は、通常翻訳されないが、リボソームタンパク質または転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）等の１つ以上の翻訳機構成分への結合および隔離のうちの１つ以上によってタンパク質産生に影響を及ぼし、それによって、細胞におけるタンパク質発現を効果的に低下させるか、細胞における１つ以上の経路またはカスケードを調節し得、それが次いでタンパク質レベルを変化させる。ポリヌクレオチドまたは一次構築物は、１個以上の長い非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡもしくはｌｉｎｃＲＮＡ）もしくはその部分、低分子核ＲＮＡ（ｓｎｏ－ＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分

子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、またはＰｉｗｉ干渉ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）を含有し得るか、あるいはこれらをコードし得る。

【００５０】

目的とするポリペプチド

本発明に従って、一次構築物は、１個以上の目的とするポリペプチドまたはその断片をコードするように設計される。目的とするポリペプチドは、全ポリペプチド、複数のポリペプチド、またはポリペプチドの断片を含み得るが、これらに限定されず、これらは、独立して、１個以上の核酸、複数の核酸、核酸の断片、または前述のうちのいずれかの変異形によってコードされ得る。本明細書で使用するとき、「目的とするポリペプチド」という用語は、選択されて本発明の一次構築物においてコードされる任意のポリペプチドを指す。本明細書で使用するとき、「ポリペプチド」とは、ほとんどの場合ペプチド結合によって結合されるアミノ酸残基（天然または非天然）のポリマーを意味する。この用語は、本明細書で使用するとき、任意の大きさ、構造、または機能を有するタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドを指す。いくつかの例において、コードされたポリペプチドが約５０個のアミノ酸よりも小さい場合、このポリペプチドは、ペプチドと称される。ポリペプチドがペプチドである場合、これは、少なくとも約２、３、４、または少なくとも５アミノ酸残基長である。したがって、ポリペプチドは、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、相同体、オルソログ、パラログ、前述の断片および他の等価物、変異形、ならびに類似体を含む。ポリペプチドは、単一の分子であり得るか、または二量体、三量体、もしくは四量体等の多分子複合体であり得る。それらは、抗体またはインスリン等の一本鎖または多本鎖ポリペプチドも含み得、会合または結合され得る。ほとんどの場合、ジスルフィド結合が多本鎖ポリペプチドに見られる。「ポリペプチド」という用語は、１個以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学的類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用され得る。

【００５１】

「ポリペプチド変異形」という用語は、それらのアミノ酸配列が天然配列または参照配列とは異なる分子を指す。アミノ酸配列変異形は、天然配列または参照配列と比較して、アミノ酸配列内のある特定の位置に置換、欠失、および／または挿入を有し得る。通常、変異形は、天然配列または参照配列と少なくとも約５０％の同一性（相同性）を有し、好ましくは、それらは、天然配列または参照配列と少なくとも約８０％、より好ましくは、少なくとも約９０％同一（相同）である。

【００５２】

いくつかの実施形態において、「変異形模倣物」が提供される。本明細書で使用するとき、「変異形模倣物」という用語は、活性化配列を模倣する１個以上のアミノ酸を含有するものである。例えば、グルタミン酸塩は、ホスホロ－トレオニンおよび／またはホスホロ－セリンの模倣物の役割を果たし得る。あるいは、変異形模倣物は、その模倣物を含有する産物の失活または不活性化をもたらし得、例えば、フェニルアラニンは、チロシンの不活性化置換としての機能を果たし得るか、またはアラニンは、セリンの不活性化置換としての機能を果たし得る。

【００５３】

「相同性」は、アミノ酸配列に適用されるとき、最大の相同パーセントを得るために、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後の第２の配列のアミノ酸配列内の残基と同一の候補アミノ酸配列内の残基の割合（％）と定義される。整列させるための方法およびコンピュータプログラムは、当技術分野で周知である。相同性が同一性パーセントの計算に依存するが、計算に導入されるギャップおよびペナルティのため値が異なり得ることが理解される。

【００５４】

「相同体」とは、ポリペプチド配列に適用されるとき、第２の種の第２の配列に対してかなりの割合の同一性を有する他の種の対応する配列を意味する。

【００５５】

「類似体」は、親または出発ポリペプチドの特性のうちの１つ以上を依然として維持する、１つ以上のアミノ酸改変、例えば、アミノ酸残基の置換、付加、または欠失によって異なるポリペプチド変異形を含むよう意図される。

【００５６】

本発明は、変異形および誘導体を含むポリペプチド系のいくつかの種類の組成物を企図する。これらは、置換、挿入、欠失、および共有結合変異形および誘導体を含む。「誘導体」という用語は、「変異形」という用語と同義に使用されるが、概して、任意の方法で参照分子または出発分子に対して修飾され、かつ／または変化した分子を指す。

【００５７】

したがって、参照配列、具体的には、本明細書に開示のポリペプチド配列に対して置換、挿入および／または付加、欠失、ならびに共有結合修飾を含有するポリペプチドをコードするｍｍＲＮＡが、本発明の範囲内に包含される。例えば、配列タグまたはアミノ酸、例えば、１個以上のリジンが、本発明のペプチド配列に付加され得る（例えば、Ｎ末端またはＣ末端で）。配列タグは、ペプチド精製または局在化に使用され得る。リジンを用いて、ペプチド溶解度を増加させるか、またはビオチン化を可能にする。あるいは、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシおよびアミノ末端領域に位置するアミノ酸残基が任意に欠失されて、切断配列を提供し得る。あるいは、ある特定のアミノ酸（例えば、Ｃ末端またはＮ末端残基）は、配列の使用に応じて、例えば、可溶性のより大きい配列の一部として配列の発現時に欠失され得るか、または固体支持体に結合され得る。

【００５８】

「置換変異形」とは、ポリペプチドについて言及するとき、天然配列または出発配列内の少なくとも１個のアミノ酸残基が除去され、その場所の同一の位置に異なるアミノ酸が挿入されたものである。これらの置換は、単一置換であり、分子中の１個のアミノ酸のみが置換されたものであり得、またはこれらの置換は、多置換であり、同一の分子中の２個以上のアミノ酸が置換されたものであり得る。

【００５９】

本明細書で使用するとき、「保存アミノ酸置換」という用語は、配列に通常存在するアミノ酸を、同様の大きさ、電荷、または極性を有する異なるアミノ酸で置換することを指す。保存置換の例には、イソロイシン、バリン、およびロイシン等の非極性（疎水性）残基の別の非極性残基との置換が挙げられる。同様に、保存置換の例には、アルギニンとリジン、グルタミンとアスパラギン、およびグリシンのセリン等の極性（親水性）残基の別の残基との置換が挙げられる。さらに、リジン、アルギニン、もしくはヒスチジン等の塩基性残基の別の塩基性残基との置換、またはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸等のある酸性残基の別の酸性残基との置換が、保存置換のさらなる例である。非保存置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニン等の非極性（疎水性）アミノ酸残基の、システイン、グルタミン、グルタミン酸、もしくはリジン等の極性（親水性）残基との置換、および／または極性残基の非極性残基との置換が挙げられる。

【００６０】

「挿入変異形」とは、ポリペプチドについて言及するとき、１個以上のアミノ酸が天然配列または出発配列内の特定の位置のアミノ酸にすぐ隣接して挿入されたものである。アミノ酸に「すぐ隣接した」とは、アミノ酸のα－カルボキシ官能基またはα－アミノ官能基のいずれかに連結されていることを意味する。

【００６１】

「欠失変異形」とは、ポリペプチドについて言及するとき、天然アミノ酸配列または出発アミノ酸配列内の１個以上のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失変異形は、１個以上のアミノ酸を分子の特定の領域で欠失させる。

【００６２】

「共有結合誘導体」は、ポリペプチドについて言及するとき、有機タンパク質性もしくは非タンパク質性誘導体化剤での天然タンパク質もしくは出発タンパク質の修飾、および／または翻訳後修飾を含む。共有結合修飾は、従来、タンパク質の標的アミノ酸残基を、

選択された側鎖または末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって、または選択された組換え宿主細胞において機能する翻訳後修飾の機構を利用することによって導入される。結果として生じる共有結合誘導体は、組換え糖タンパク質の免疫親和性精製のための抗タンパク質抗体の生物学的活性、免疫学的アッセイ、または調製に重要な残基の特定を目的としたプログラムにおいて有用である。そのような修飾は、当技術分野の技術の範囲内であり、過度の実験なく行われる。

【００６３】

ある特定の翻訳後修飾は、発現ポリペプチドにおける組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、高い頻度で、翻訳後に対応するグルタミルおよびアスパルチル残基に脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれかの形態も、本発明に従って産生されたポリペプチドに存在し得る。

【００６４】

他の翻訳後修飾は、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化を含む（Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ＆Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ｐｐ．７９－８６（１９８３））。

【００６５】

「特徴」は、ポリペプチドについて言及するとき、分子のはっきりと異なるアミノ酸配列に基づく成分と定義される。本発明のｍｍＲＮＡによってコードされるポリペプチドの特徴には、表面出現、局所立体配座形状、折り畳み、ループ、半ループ、ドメイン、半ドメイン、部位、末端、またはこれらの任意の組み合わせが含まれる。

【００６６】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「表面出現」という用語は、タンパク質のポリペプチド系成分が最も外側の表面に現れることを指す。

【００６７】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「局所立体配座形状」という用語は、タンパク質の定義可能な空間内に位置するタンパク質のポリペプチド系構造の出現を意味する。

【００６８】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「折り畳み」という用語は、エネルギー最小化時のアミノ酸配列の結果として生じる立体構造を指す。折り畳みは、折り畳みプロセスの二次または三次レベルで生じ得る。二次レベルの折り畳みの例には、βシートおよびαヘリックスが挙げられる。三次レベルの折り畳みの例には、エネルギー力の凝集または分離が原因で形成されるドメインおよび領域を含む。このようにして形成された領域は、疎水性および親水性ポケット等を含む。

【００６９】

本明細書で使用する「回転」という用語は、タンパク質構造に関するとき、ペプチドまたはポリペプチドの骨格の方向を変化させる屈曲を意味し、１、２、または３個以上のアミノ酸残基が関与し得る。

【００７０】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「ループ」という用語は、ペプチドまたはポリペプチドの骨格の方向を逆転させる役目を果たし得るポリペプチドの構造的特徴を指す。ループがポリペプチドで見つけられ、かつ骨格の方向のみを変化させる場合、これは、４個以上のアミノ酸残基を含み得る。Ｏｌｉｖａらは、少なくとも５つのクラスのタンパク質ループを特定している（Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６６（４）：８１４－８３０；１９９７）。ループは、開ループまたは閉ループであり得る。閉ループまたは「環状」ループは、架橋部分の間に２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個以上のアミノ酸を含み得る。そのような架橋部分は、ジスルフィド架橋を有するポリペプ

チドにおいて典型的なシステイン－システイン架橋（Ｃｙｓ－Ｃｙｓ）を含み得るか、またはあるいは架橋部分は、本明細書で用いられるジブロモジルイル剤（ｄｉｂｒｏｍｏｚｙｌｙｌ　ａｇｅｎｔ）等の非タンパク質系のものであり得る。

【００７１】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「半ループ」という用語は、それが由来するループとして特定されたアミノ酸残基の少なくとも半数を有するループの部分を指す。ループが必ずしも偶数のアミノ酸残基を含有するわけではないことが理解される。したがって、ループが奇数のアミノ酸を含有するか、または奇数のアミノ酸を含むと特定された場合において、奇数のループの半ループは、ループの整数部分または次の整数部分（ループのアミノ酸の数／２＋／－０．５個のアミノ酸）を含む。例えば、７アミノ酸ループと特定されたループは、３個のアミノ酸または４個のアミノ酸（７／２＝３．５＋／－０．５で３または４になる）の半ループをもたらし得る。

【００７２】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「ドメイン」という用語は、１つ以上の特定可能な構造または機能特徴または特性（例えば、結合能力、タンパク質間の相互作用の部位としての役割を果たす）を有するポリペプチドのモチーフを指す。

【００７３】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「半ドメイン」という用語は、それが由来するドメインとして特定されたアミノ酸残基の少なくとも半数を有するドメインの部分を意味する。ドメインが必ずしも偶数のアミノ酸残基を含有するわけではないことが理解される。したがって、ドメインが奇数のアミノ酸を含有するか、または奇数のアミノ酸を含むと特定された場合において、奇数のドメインの半ドメインは、ドメインの整数部分または次の整数部分（ドメインのアミノ酸の数／２＋／－０．５個のアミノ酸）を含む。例えば、７アミノ酸ドメインと特定されたドメインは、３個のアミノ酸または４個のアミノ酸（７／２＝３．５＋／－０．５で３または４になる）の半ドメインをもたらし得る。サブドメインがドメインまたは半ドメイン内で特定され得、これらのサブドメインが、それらが由来するドメインまたは半ドメインで特定された構造特性または機能特性のすべてに満たない構造特性または機能特性を有することも理解される。本明細書のドメイン型のうちのいずれを含むアミノ酸もポリペプチドの骨格に沿って隣接している必要はない（すなわち、非隣接アミノ酸が構造的に折り畳まれて、ドメイン、半ドメイン、またはサブドメインをもたらし得る）ことも理解される。

【００７４】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「部位」という用語は、アミノ酸系の実施形態に関するとき、「アミノ酸残基」および「アミノ酸側鎖」と同義に使用される。部位は、本発明のポリペプチド系分子内で修飾、操作、改変、誘導体化、または変更され得るペプチドまたはポリペプチド内の位置を表す。

【００７５】

本明細書で使用され、ポリペプチドについて言及するとき、「末端（ｔｅｒｍｉｎｉ）」または「末端（ｔｅｒｍｉｎｕｓ）」という用語は、ペプチドまたはポリペプチドの端を指す。そのような端は、ペプチドまたはポリペプチドの第１または最終部位に限定されるだけでなく、末端領域にさらなるアミノ酸も含み得る。本発明のポリペプチド系分子は、Ｎ末端（アミノ酸によって遊離アミノ基（ＮＨ２）で終端する）もＣ末端（アミノ酸によって遊離カルボキシル基（ＣＯＯＨ）で終端する）もいずれも有することを特徴とし得る。本発明のタンパク質は、ある場合には、ジスルフィド結合または非共有結合力（多量体、オリゴマー）によって結び付けられた複数のポリペプチド鎖から成り得る。これらの種類のタンパク質は、複数のＮ末端およびＣ末端を有する。あるいは、ポリペプチドの末端は、それらが場合によって有機複合体等の非ポリペプチド系部分で始まるか、または終了するように修飾され得る。

【００７６】

これらの特徴のうちのいずれかが本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡによってコード

されるポリペプチドの所望の成分であると特定または定義されると、これらの特徴のいくつかの操作および／または修飾のうちのいずれも、移動、交換、反転、欠失、ランダム化、または複製によって行われ得る。さらに、特徴の操作が本発明の分子に対する修飾と同一の結果をもたらすことが理解される。例えば、ドメインの欠失を伴う操作は、全長分子未満をコードする核酸の修飾のような分子の長さの改変をもたらす。

【００７７】

修飾および操作は、部位特異的変異誘発等であるが、これに限定されない当技術分野で既知の方法によって達成され得る。その後、結果として生じる修飾された分子は、本明細書に記載のアッセイ等のインビトロまたはインビボアッセイ、または当技術分野で既知の任意の他の好適なスクリーニングアッセイを用いて活性について試験され得る。

【００７８】

本発明に従って、ポリペプチドは、一連の実験によって発見されるコンセンサス配列を含み得る。本明細書で使用するとき、「コンセンサス」配列とは、１つ以上の部位で可変性を可能にする配列の集合集団を表す単一配列である。

【００７９】

当業者によって認識されるように、タンパク質断片、機能的タンパク質ドメイン、および相同タンパク質も、本発明の目的とするポリペプチドの範囲内であると見なされる。例えば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、または１００を超えるアミノ酸長の参照タンパク質の任意のタンパク質断片（少なくとも１個のアミノ酸残基が参照ポリペプチド配列よりも短いが、他の点では同一であるポリペプチド配列を意味する）が本明細書に提供される。別の例において、本明細書に記載の配列のうちのいずれかと約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、または約１００％同一の一続きの約２０、約３０、約４０、約５０、または約１００個のアミノ酸を含む任意のタンパク質が本発明に従って利用され得る。ある特定の実施形態において、本発明に従って利用されるポリペプチドは、本明細書に提供または参照される配列のうちのいずれかに示される２、３、４、５、６、７、８、９、１０以上の変異を含む。

【００８０】

コードされたポリペプチド

本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、生物製剤、抗体、ワクチン、治療用タンパク質もしくはペプチド、細胞透過性ペプチド、分泌タンパク質、原形質膜タンパク質、細胞質もしくは細胞骨格タンパク質、細胞内膜結合タンパク質、核タンパク質、ヒト疾患に関連したタンパク質、標的部分、またはいかなる治療指標も特定されていないにもかかわらず、研究および発見の分野において有用性を有するヒトゲノムによってコードされたタンパク質を含むが、これらに限定されないいくつかの標的カテゴリーのうちのいずれかから選択される目的とするポリペプチドをコードするように設計され得る。

【００８１】

一実施形態において、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、参照ポリペプチド配列とある特定の同一性を有する変異形ポリペプチドをコードし得る。本明細書で使用するとき、「参照ポリペプチド配列」は、出発ポリペプチド配列を指す。参照配列は、別の配列の設計において参照される野生型配列または任意の配列であり得る。「参照ポリペプチド配列」は、例えば、本明細書に開示の配列番号７６９～１３９２のうちのいずれか１つ、例えば、配列番号７６９、７７０、７７１、７７２、７７３、７７４、７７５、７７６、７７７、７７８、７７９、７８０、７８１、７８２、７８３、７８４、７８５、７８６、７８７、７８８、７８９、７９０、７９１、７９２、７９３、７９４、７９５、７９６、７９７、７９８、７９９、８００、８０１、８０２、８０３、８０４、８０５、８０６、８０７、８０８、８０９、８１０、８１１、８１２、８１３、８１４、８１５、８１６、８１７、８１８、８１９、８２０、８２１、８２２、８２３、８２４、８２５、８２６、８２７、８２８、８２９、８３０、８３１、８３２、８３３、８３４、８３５、８３６、８３７、８３８、８３９、８４０、８４１、８４２、８４３、８４４、８４５、８４６、８４７、８４８、８４９、８５０、８５１、８５２、８５３、８５４、８５５、８５６、８５７、

858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、
868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、
878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、
888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、
898、899、900、901、902、903、904、905、906、907、
908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、
918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、
928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、
938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、
948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、
958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、
968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、
978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、
988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、
998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、10
06、1007、1008、1009、1010、1011、1012、1013、10
14、1015、1016、1017、1018、1019、1020、1021、10
22、1023、1024、1025、1026、1027、1028、1029、10
30、1031、1032、1033、1034、1035、1036、1037、10
38、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、10
46、1047、1048、1049、1050、1051、1052、1053、10
54、1055、1056、1057、1058、1059、1060、1061、10
62、1063、1064、1065、1066、1067、1068、1069、10
70、1071、1072、1073、1074、1075、1076、1077、10
78、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、10
86、1087、1088、1089、1090、1091、1092、1093、10
94、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、11
02、1103、1104、1105、1106、1107、1108、1109、11
10、1111、1112、1113、1114、1115、1116、1117、11
18、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、11
26、1127、1128、1129、1130、1131、1132、1133、11
34、1135、1136、1137、1138、1139、1140、1141、11
42、1143、1144、1145、1146、1147、1148、1149、11
50、1151、1152、1153、1154、1155、1156、1157、11
58、1159、1160、1161、1162、1163、1164、1165、11
66、1167、1168、1169、1170、1171、1172、1173、11
74、1175、1176、1177、1178、1179、1180、1181、11
82、1183、1184、1185、1186、1187、1188、1189、11
90、1191、1192、1193、1194、1195、1196、1197、11
98、1199、1200、1201、1202、1203、1204、1205、12
06、1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、12
14、1215、1216、1217、1218、1219、1220、1221、12
22、1223、1224、1225、1226、1227、1228、1229、12
30、1231、1232、1233、1234、1235、1236、1237、12
38、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、12
46、1247、1248、1249、1250、1251、1252、1253、12
54、1255、1256、1257、1258、1259、1260、1261、12
62、1263、1264、1265、1266、1267、1268、1269、12
70、1271、1272、1273、1274、1275、1276、1277、12
78、1279、1280、1281、1282、1283、1284、1285、12

８６、１２８７、１２８８、１２８９、１２９０、１２９１、１２９２、１２９３、１２９４、１２９５、１２９６、１２９７、１２９８、１２９９、１３００、１３０１、１３０２、１３０３、１３０４、１３０５、１３０６、１３０７、１３０８、１３０９、１３１０、１３１１、１３１２、１３１３、１３１４、１３１５、１３１６、１３１７、１３１８、１３１９、１３２０、１３２１、１３２２、１３２３、１３２４、１３２５、１３２６、１３２７、１３２８、１３２９、１３３０、１３３１、１３３２、１３３３、１３３４、１３３５、１３３６、１３３７、１３３８、１３３９、１３４０、１３４１、１３４２、１３４３、１３４４、１３４５、１３４６、１３４７、１３４８、１３４９、１３５０、１３５１、１３５２、１３５３、１３５４、１３５５、１３５６、１３５７、１３５８、１３５９、１３６０、１３６１、１３６２、１３６３、１３６４、１３６５、１３６６、１３６７、１３６８、１３６９、１３７０、１３７１、１３７２、１３７３，、１３７４、１３７５、１３７６、１３７７、１３７８、１３７９、１３８０、１３８１、１３８２、１３８３、１３８４、１３８５、１３８６、１３８７、１３８８、１３８９、１３９０、１３９１、１３９２のうちのいずれかであり得る。

【００８２】

当技術分野で既知の「同一性」という用語は、配列を比較することによって決定される２個以上のペプチドの配列間の関係を指す。当技術分野において、同一性は、２個以上のアミノ酸残基のストリング間のマッチ数によって決定されるペプチド間の配列関連性の程度も意味する。同一性は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって処理されるギャップアライメント（存在する場合）を有する２つ以上の配列のうちのより小さい配列間の同一のマッチの割合（％）を測定する。関連ペプチドの同一性は、既知の方法によって容易に計算され得る。そのような方法には、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８、Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ，Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９３、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ １，Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，１９９４、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ，Ｇ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８７、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ，Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｄｓ．，Ｍ．Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９１、およびＣａｒｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，ＳＩＡＭ Ｊ．Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．４８，１０７３（１９８８）に記載の方法が含まれるが、これらに限定されない。

【００８３】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド変異形は、参照ポリペプチドと同一または同様の活性を有し得る。あるいは、変異形は、参照ポリペプチドと比較して変化（例えば、増加または減少）した活性を有し得る。概して、本発明の特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異形は、本明細書に記載され、かつ当業者に既知の配列アライメントプログラムおよびパラメータによって決定されるように、特定の参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異形と少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有する。そのようなアライメントのツールは、ＢＬＡＳＴプログラム一式を含む（Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ，Ａｌｅｊａｎｄｒｏ Ａ．Ｓｃｈ艚・・・秩ＣＪｉｎｇｈｕｉ Ｚｈａｎｇ，Ｚｈｅｎｇ Ｚｈａｎｇ，Ｗｅｂｂ Ｍｉｌｌｅｒ，ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９９７），“Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂｅｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ”，Ｎｕｃｌｅｉ

ｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）。他のツールは、本明細書、具体的には、「同一性」の定義に記載される。

【００８４】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムの初期設定パラメータは、例えば、予測閾値１０、ワードサイズ２８、マッチ／ミスマッチスコア１、－２、線形ギャップコストを含む。任意のフィルター、ならびに種特異的繰り返し配列、例えば、ヒト特異的繰り返し配列の選択が適用され得る。

【００８５】

生物製剤

本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、１つ以上の生物製剤をコードし得る。本明細書で使用するとき、「生物製剤」は、本明細書に提供される方法によって産生され、かつ重病もしくは命にかかわる疾患または病状を治療、治癒、軽減、予防、または診断するために用いられ得るポリペプチド系分子である。生物製剤には、本発明に従って、アレルゲン抽出物（例えば、アレルギー注射および試験用）、血液成分、遺伝子治療産物、移植に用いられるヒト組織または細胞産物、ワクチン、モノクローナル抗体、サイトカイン、成長因子、酵素、血栓溶解剤、ならびに免疫調節因子等が含まれるが、これらに限定されない。

【００８６】

本発明に従って、現在販売されているか、または開発中の１つ以上の生物製剤が、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによってコードされ得る。理論によって束縛されることを望まないが、少なくとも部分的には、特異性、純度、および／または構築物設計の選択性により、既知の生物製剤をコードするポリヌクレオチドの本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡへの組み込みが治療効果の改善をもたらすと考えられる。

【００８７】

抗体

本明細書に開示の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、１個以上の抗体またはその断片をコードし得る。「抗体」という用語は、モノクローナル抗体（免疫グロブリンＦｃ領域を有する全長抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、二特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）、および一本鎖分子）、ならびに抗体断片を含む。「免疫グロブリン（Ｉｇ）」という用語は、本明細書において「抗体」と同義に使用される。本明細書で使用するとき、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体集団から得られる抗体、すなわち、少量で存在し得る可能性のある天然に存在する変異および／または翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）を除いて同一であるその集団を含む個々の抗体を指す。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の抗原部位に対して指向される。

【００８８】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、それらが所望の生物学的活性を呈する限り、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一もしくは相同である一方で、鎖（複数可）の残りの部分が、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一もしくは相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびにそのような抗体の断片を明確に含む。本明細書における目的とするキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿等）由来の可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体が含まれるが、これに限定されない。

【００８９】

「抗体断片」は、無傷抗体の一部、好ましくは、無傷抗体の抗原結合および／または可変領域を含む。抗体断片の例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖ断片；二特異性抗体；線形抗体；ナノボディ；一本鎖抗体分子；および抗体断片から形成された多特異性抗体が挙げられる。

【００９０】

α、δ、ε、γ、およびμと指定される重鎖を含む、それぞれ、免疫グロブリン、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭの５つのクラスのうちのいずれかが本発明のｍｍＲＮＡによってコードされ得る。サブクラス、γおよびμをコードするポリヌクレオチド配列も含まれる。したがって、以下のサブクラス：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２を含む抗体のサブクラスのうちのいずれかが、部分的または全体的にコードされ得る。

【００９１】

本発明に従って、現在販売されているか、または開発中の１個以上の抗体または断片が、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによってコードされ得る。理論によって束縛されることを望まないが、少なくとも部分的に、特異性、純度、およびｍｍＲＮＡ設計の選択性により、本発明の一次構築物への組み込みが治療効果の改善をもたらすと考えられる。

【００９２】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡにおいてコードされる抗体を利用して、血液、心臓血管、ＣＮＳ、中毒（抗毒素を含む）、皮膚科学、内分泌学、胃腸、医療画像、筋骨格、腫瘍学、免疫学、呼吸器、知覚、および抗感染等であるが、これらに限定されない多くの治療分野における状態または疾患を治療することができる。

【００９３】

一実施形態において、本明細書に開示の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、モノクローナル抗体および／またはその変異形をコードし得る。抗体の変異形には、置換変異形、保存アミノ酸置換、挿入変異形、欠失変異形、および／または共有結合誘導体も含まれ得るが、これらに限定されない。一実施形態において、本明細書に開示の一次構築物および／またはｍｍＲＮＡは、免疫グロブリンＦｃ領域をコードし得る。別の実施形態において、一次構築物および／またはｍｍＲＮＡは、変異形免疫グロブリンＦｃ領域をコードし得る。非限定的な例として、一次構築物および／またはｍｍＲＮＡは、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２１７，１４７号に記載の変異形免疫グロブリンＦｃ領域を有する抗体をコードし得る。

【００９４】

ワクチン

本明細書に開示の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、１個以上のワクチンをコードし得る。本明細書で使用するとき、「ワクチン」は、特定の疾患または感染体に対する免疫を高める生物学的調製物である。本発明に従って、現在販売されているか、または開発中の１個以上のワクチンが、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによってコードされ得る。理論によって束縛されることを望まないが、少なくとも部分的に、特異性、純度、および構築物設計の選択性により、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡへの組み込みが治療効果の改善をもたらすと考えられる。

【００９５】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡにおいてコードされるワクチンを利用して、心臓血管、ＣＮＳ、皮膚科学、内分泌学、腫瘍学、免疫学、呼吸器、および抗感染等であるが、これらに限定されない多くの治療分野における状態または疾患を治療することができる。

【００９６】

治療用タンパク質またはペプチド

本明細書に開示の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、１個以上の有効なまたは「試験用の」治療用タンパク質またはペプチドをコードし得る。

【００９７】

本発明に従って、現在販売されているか、または開発中の１個以上の治療用タンパク質またはペプチドが、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによってコードされ得る。理論によって束縛されることを望まないが、少なくとも部分的に、特異性、純度、および構築物設計の選択性により、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡへの

組み込みが治療効果の改善をもたらすと考えられる。

【００９８】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡにおいてコードされる治療用タンパク質およびペプチドを利用して、血液、心臓血管、ＣＮＳ、中毒（抗毒素を含む）、皮膚科学、内分泌学、遺伝学、泌尿生殖器、胃腸、筋骨格、腫瘍学、および免疫学、呼吸器、知覚、および抗感染等であるが、これらに限定されない多くの治療分野における状態または疾患を治療することができる。

【００９９】

細胞透過性ポリペプチド

本明細書に開示の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、１個以上の細胞透過性ポリペプチドをコードし得る。本明細書で使用するとき、「細胞透過性ポリペプチド」またはＣＰＰは、分子の細胞取り込みを促進し得るポリペプチドを指す。本発明の細胞透過性ポリペプチドは、１つ以上の検出可能な標識を含有し得る。ポリペプチドは、部分的に標識化され得るか、または完全に全体を通して標識化され得る。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、検出可能な標識を完全にコードし得るか、部分的にコードし得るか、または全くコードし得ない。細胞透過性ペプチドは、シグナル配列も含み得る。本明細書で使用するとき、「シグナル配列」は、タンパク質翻訳中に新生タンパク質のアミノ末端に結合されるアミノ酸残基の配列を指す。シグナル配列を用いて、細胞透過性ポリペプチドの分泌をシグナル伝達することができる。

【０１００】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、融合タンパク質もコードし得る。融合タンパク質は、荷電タンパク質を治療用タンパク質に動作可能に結合させることによって作成され得る。本明細書で使用するとき、「動作可能に結合する」とは、治療用タンパク質および荷電タンパク質が細胞に導入されたときに複合体の発現を可能にするような形で結合していることを指す。本明細書で使用するとき、「荷電タンパク質」は、正電荷、負電荷、または全体的に中性の電荷を持つタンパク質を指す。好ましくは、治療用タンパク質は、融合タンパク質の形成時に荷電タンパク質に共有結合され得る。全アミノ酸または表面アミノ酸に対する表面電荷の比率は、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、または０．９であり得る。

【０１０１】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによってコードされる細胞透過性ポリペプチドは、翻訳された後に複合体を形成し得る。この複合体は、細胞透過性ポリペプチドに結合、例えば、共有結合された荷電タンパク質を含み得る。「治療用タンパク質」は、細胞に投与されたときに、治療、診断、および／もしくは予防効果を有し、かつ／または所望の生物学的および／もしくは薬理学的効果を誘発するタンパク質を指す。

【０１０２】

一実施形態において、細胞透過性ポリペプチドは、第１のドメインおよび第２のドメインを含み得る。第１のドメインは、超荷電ポリペプチドを含み得る。第２のドメインは、タンパク質結合パートナーを含み得る。本明細書で使用するとき、「タンパク質結合パートナー」は、抗体およびその機能的断片、足場タンパク質、またはペプチドを含むが、これらに限定されない。細胞透過性ポリペプチドは、タンパク質結合パートナーの細胞内結合パートナーをさらに含み得る。細胞透過性ポリペプチドは、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが導入され得る細胞から分泌されることができ得る。細胞透過性ポリペプチドは、第１の細胞に浸透することもでき得る。

【０１０３】

さらなる実施形態において、細胞透過性ポリペプチドは、第２の細胞に浸透することができる。第２の細胞は、第１の細胞と同一の領域に由来し得るか、または異なる領域に由来し得る。この領域は、組織および器官を含み得るが、これらに限定されない。第２の細胞は、第１の細胞の近位にあるか、またはその遠位にあり得る。

【０１０４】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、タンパク質結合パートナーを含み得る細胞透過性ポリペプチドをコードし得る。タンパク質結合パートナーは、抗体、超荷電抗体、または機能的断片を含み得るが、これらに限定されない。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、タンパク質結合パートナーを含む細胞透過性ポリペプチドが導入される細胞に導入され得る。

【０１０５】

分泌タンパク質

ヒトおよび他の真核細胞は、膜によって多くの機能的にはっきりと異なる区画に細分される。各膜結合型区画、または小器官は、小器官の機能に必須の異なるタンパク質を含有する。この細胞は、タンパク質内に位置するアミノ酸モチーフである「選別シグナル」を用いて、タンパク質を特定の細胞小器官に標的化する。

【０１０６】

シグナル配列、シグナルペプチド、またはリーダー配列と呼ばれる一種の選別シグナルは、タンパク質のクラスを小胞体（ＥＲ）と呼ばれる小器官に指向する。

【０１０７】

シグナル配列によってＥＲに標的化されたタンパク質は、分泌タンパク質として細胞外空間に放出され得る。同様に、細胞膜上に存在するタンパク質は、タンパク質を膜に保持する「リンカー」のタンパク質分解切断によって細胞外空間に分泌され得る。理論によって束縛されることを望まないが、上述の細胞輸送を利用するために本発明の分子が用いられ得る。したがって、本発明のいくつかの実施形態において、分泌タンパク質を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。分泌タンパク質は、本明細書または米国特許公開第２０１００２５５５７４号に記載のものから選択され得、その内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１０８】

一実施形態において、これらは、大量の有益なヒト遺伝子産物の製造時に用いられ得る。

【０１０９】

原形質膜タンパク質

本発明のいくつかの実施形態において、原形質膜のタンパク質を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。

【０１１０】

細胞質または細胞骨格タンパク質

本発明のいくつかの実施形態において、細胞質または細胞骨格タンパク質を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。

【０１１１】

細胞内膜結合タンパク質

本発明のいくつかの実施形態において、細胞内膜結合タンパク質を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。

【０１１２】

核タンパク質

本発明のいくつかの実施形態において、核タンパク質を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。

【０１１３】

ヒト疾患に関連したタンパク質

本発明のいくつかの実施形態において、ヒト疾患に関連したタンパク質を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。

【０１１４】

種々のタンパク質

本発明のいくつかの実施形態において、現在未知の治療的機能を有するタンパク質を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。

【０１１５】
標的部分
本発明のいくつかの実施形態において、標的部分を発現するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。これらには、インビボもしくはインビトロのいずれかで、細胞を特定の組織空間に標的化するか、または特定の部分と相互作用する働きをする細胞の表面上のタンパク質結合パートナーまたは受容体が含まれる。好適なタンパク質結合パートナーには、抗体およびその機能的断片、足場タンパク質、またはペプチドが含まれるが、これらに限定されない。さらに、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いて、脂質、炭水化物、または他の生物学的部分もしくは生体分子の合成および細胞外局在化を指向することができる。

【０１１６】
ポリペプチドライブラリ
一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いて、ポリペプチドライブラリを生成することができる。これらのライブラリは、それぞれ、様々な構造または化学修飾設計を有する、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの集団の生成から生じ得る。この実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの集団は、本明細書に教示されるか、または当技術分野で既知の抗体もしくは抗体断片、タンパク質結合パートナー、足場タンパク質、および他のポリペプチドを含むが、これらに限定されない複数のコードされたポリペプチドを含み得る。好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、その後にコードされたポリペプチドを合成し得る標的細胞または培養物への直接導入に好適であり得るｍｍＲＮＡを含む本発明の一次構築物である。

【０１１７】
ある特定の実施形態において、それぞれ異なるアミノ酸修飾（複数可）を有するタンパク質の複数の変異形は、薬物動態、安定性、生体適合性、および／もしくは生物学的活性、または発現レベル等の生物物理学的特性の点で最善の変異形を決定するために、産生および試験され得る。そのようなライブラリは、１０、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、または10^9を超える可能な変異形（１個以上の残基の置換、欠失、および１個以上の残基の挿入を含むが、これらに限定されない）を含有し得る。

【０１１８】
抗菌性および抗ウイルス性ポリペプチド
本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、１個以上の抗菌性ペプチド（ＡＭＰ）または抗ウイルス性ペプチド（ＡＶＰ）をコードするように設計され得る。ＡＭＰおよびＡＶＰは、微生物、無脊椎動物、植物、両生類、鳥類、魚、および哺乳動物等であるが、これらに限定されない様々な動物から単離され、説明されている（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００９；３７（データベース刊行）：Ｄ９３３－７）。例えば、抗菌性ポリペプチドは、抗菌性ペプチドデータベース（ｈｔｔｐ：／／ａｐｓ．ｕｎｍｃ．ｅｄｕ／ＡＰ／ｍａｉｎ．ｐｈｐ；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００９；３７（データベース刊行）：Ｄ９３３－７）、ＣＡＭＰ：Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｔｉ－Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｃｎｉｒｒｈ．ｒｅｓ．ｉｎ／ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ／）；Ｔｈｏｍａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１０；３８（データベース刊行）：Ｄ７７４－８０）、米国特許第ＵＳ５２２１７３２号、同第ＵＳ５４４７９１４号、同第ＵＳ５５１９１１５号、同第ＵＳ５６０７９１４号、同第ＵＳ５７１４５７７号、同第ＵＳ５７３４０１５号、同第ＵＳ５７９８３３６号、同第ＵＳ５８２１２２４号、同第ＵＳ５８４９４９０号、同第ＵＳ５８５６１２７号、同第ＵＳ５９０５１８７号、同第ＵＳ５９９４３０８号、同第ＵＳ５９９８３７４号、同第ＵＳ６１０７４６０号、同第ＵＳ６１９１２５４号、同第ＵＳ６２１１１４８号、同第ＵＳ６３００４８９号、同第ＵＳ６３２９５０４号、同第ＵＳ６３９９

３７０号、同第ＵＳ６４７６１８９号、同第ＵＳ６４７８８２５号、同第ＵＳ６４９２３２８号、同第ＵＳ６５１４７０１号、同第ＵＳ６５７３３６１号、同第ＵＳ６５７３３６１号、同第ＵＳ６５７６７５５号、同第ＵＳ６６０５６９８号、同第ＵＳ６６２４１４０号、同第ＵＳ６６３８５３１号、同第ＵＳ６６４２２０３号、同第ＵＳ６６５３２８０号、同第ＵＳ６６９６２３８号、同第ＵＳ６７２７０６６号、同第ＵＳ６７３０６５９号、同第ＵＳ６７４３５９８号、同第ＵＳ６７４３７６９号、同第ＵＳ６７４７００７号、同第ＵＳ６７９０８３３号、同第ＵＳ６７９４４９０号、同第ＵＳ６８１８４０７号、同第ＵＳ６８３５５３６号、同第ＵＳ６８３５７１３号、同第ＵＳ６８３８４３５号、同第ＵＳ６８７２７０５号、同第ＵＳ６８７５９０７号、同第ＵＳ６８８４７７６号、同第ＵＳ６８８７８４７号、同第ＵＳ６９０６０３５号、同第ＵＳ６９１１５２４号、同第ＵＳ６９３６４３２号、同第ＵＳ７００１９２４号、同第ＵＳ７０７１２９３号、同第ＵＳ７０７８３８０号、同第ＵＳ７０９１１８５号、同第ＵＳ７０９４７５９号、同第ＵＳ７１６６７６９号、同第ＵＳ７２４４７１０号、同第ＵＳ７３１４８５８号、および同第ＵＳ７５８２３０１号に記載されており、これらの内容は、参照によりこれらの全体が組み込まれる。

【０１１９】

本明細書に記載の抗菌性ポリペプチドは、１個以上のエンベロープウイルス（例えば、ＨＩＶ、ＨＣＶ）に よる細胞融合および／またはウイルス侵入をブロックし得る。例えば、抗菌性ポリペプチドは、ある領域、例えば、ウイルスエンベロープタンパク質、例えば、ＨＩＶ－１ ｇｐ１２０またはｇｐ４１の膜貫通サブユニットの少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、もしくは６０個のアミノ酸の連続配列に対応する合成ペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。ＨＩＶ－１ ｇｐ１２０またはｇｐ４１のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、例えば、Ｋｕｉｋｅｎ ｅｔ ａｌ.，（２００８）“ＨＩＶ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ，”Ｌｏｓ Ａｌａｍｏｓ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙに記載される。

【０１２０】

いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、対応するウイルスタンパク質配列に対して少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％の配列相同性を有し得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、対応するウイルスタンパク質配列に対して少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の配列相同性を有し得る。

【０１２１】

他の実施形態では、抗菌性ポリペプチドは、ある領域、例えば、カプシド結合タンパク質の結合ドメインの少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、もしくは６０個のアミノ酸の連続配列に対応する合成ペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、カプシド結合タンパク質の対応する配列に対して少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の配列相同性を有し得る。

【０１２２】

本明細書に記載の抗菌性ポリペプチドは、プロテアーゼ二量体化をブロックし、機能的タンパク質へのウイルスプロタンパク質（例えば、ＨＩＶ Ｇａｇ－ｐｏｌ処理）の切断を阻害し、それによって、１個以上のエンベロープウイルス（例えば、ＨＩＶ、ＨＣＶ）の放出を阻止し得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、対応するウイルスタンパク質配列に対して少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％の配列相同性を有し得る。

【０１２３】

他の実施形態では、抗菌性ポリペプチドは、ある領域、例えば、プロテアーゼ結合タンパク質の結合ドメインの少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、もしくは６０個のアミノ酸の連続配列に対応する合成ペプチドを含み得るか、またはそれからなり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは

、プロテアーゼ結合タンパク質の対応する配列に対して少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％の配列相同性を有し得る。

【０１２４】

本明細書に記載の抗菌性ポリペプチドは、ウイルス性病原体に対して指向されるインビトロで進化したポリペプチドを含み得る。

【０１２５】

抗菌性ポリペプチド

抗菌性ポリペプチド（ＡＭＰ）は、細菌、ウイルス、真菌、原虫、寄生虫、プリオン、および腫瘍／癌細胞を含むが、これらに限定されない様々な微生物に対して広域活性を有する可変長、可変配列、および可変構造の小ペプチドである（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｚａｉｏｕ，Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ，２００７；８５：３１７を参照のこと）。ＡＭＰが広範囲の迅速に発生する殺活性を有し、低レベルの誘導耐性および同時に起こる広範囲の抗炎症作用を有する可能性があることが示されている。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、１０ｋＤａ未満、例えば、８ｋＤａ、６ｋＤａ、４ｋＤａ、２ｋＤａ、または１ｋＤａ未満であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、約６～約１００個のアミノ酸、例えば、約６～約７５個のアミノ酸、約６～約５０個のアミノ酸、約６～約２５個のアミノ酸、約２５～約１００個のアミノ酸、約５０～約１００個のアミノ酸、または約７５～約１００個のアミノ酸からなる。ある特定の実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、約１５～約４５個のアミノ酸からなり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、実質的にカチオン性である。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、実質的に両親媒性であり得る。ある特定の実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、実質的にカチオン性および両親媒性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、グラム陽性細菌に対して細胞増殖抑制性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、グラム陽性細菌に対して細胞傷害性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、グラム陽性細菌に対して細胞増殖抑制性および細胞傷害性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、グラム陰性細菌に対して細胞増殖抑制性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、グラム陰性細菌に対して細胞傷害性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、グラム陽性細菌に対して細胞増殖抑制性および細胞傷害性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、ウイルス、真菌、原生動物、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせに対して細胞増殖抑制性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、ウイルス、真菌、原生動物、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせに対して細胞傷害性であり得る。ある特定の実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、ウイルス、真菌、原生動物、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせに対して細胞増殖抑制性および細胞傷害性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、腫瘍または癌細胞（例えば、ヒト腫瘍および／または癌細胞）に対して細胞傷害性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、腫瘍または癌細胞（例えば、ヒト腫瘍および／または癌細胞）に対して細胞増殖抑制性であり得る。ある特定の実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、腫瘍または癌細胞（例えば、ヒト腫瘍または癌細胞）に対して細胞傷害性および細胞増殖抑制性であり得る。いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）は、分泌ポリペプチドであり得る。

【０１２８】
いくつかの実施形態において、抗菌性ポリペプチドは、デフェンシンを含むか、またはそれからなる。例示のデフェンシンには、α－デフェンシン（例えば、好中球デフェンシン１、デフェンシンα１、好中球デフェンシン３、好中球デフェンシン４、デフェンシン５、デフェンシン６）、β－デフェンシン（例えば、β－デフェンシン１、β－デフェンシン２、β－デフェンシン１０３、β－デフェンシン１０７、β－デフェンシン１１０、β－デフェンシン１３６）、およびθ－デフェンシンが含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態では、抗菌性ポリペプチドは、カテリシジン（例えば、ｈＣＡＰ１８）を含むか、またはそれからなる。

【０１２９】
抗ウイルス性ポリペプチド
抗ウイルス性ポリペプチド（ＡＶＰ）は、様々なウイルスに対して広域活性を有する可変長、可変配列、および可変構造の小ペプチドである。例えば、Ｚａｉｏｕ，Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ，２００７；８５：３１７を参照されたい。ＡＶＰ広範囲の迅速に発生する殺活性を有し、低レベルの誘導耐性および同時に起こる広範囲の抗炎症作用を有する可能性があることが示されている。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、１０ｋＤａ未満、例えば、８ｋＤａ、６ｋＤａ、４ｋＤａ、２ｋＤａ、または１ｋＤａ未満である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、約６～約１００個のアミノ酸、例えば、約６～約７５個のアミノ酸、約６～約５０個のアミノ酸、約６～約２５個のアミノ酸、約２５～約１００個のアミノ酸、約５０～約１００個のアミノ酸、または約７５～約１００個のアミノ酸を含むか、またはこれらからなる。ある特定の実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、約１５～約４５個のアミノ酸を含むか、またはこれからなる。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、実質的にカチオン性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、実質的に両親媒性である。ある特定の実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、実質的にカチオン性および両親媒性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、ウイルスに対して細胞増殖抑制性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、ウイルスに対して細胞傷害性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、ウイルスに対して細胞増殖抑制性および細胞傷害性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、細菌、真菌、原生動物、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせに対して細胞増殖抑制性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、細菌、真菌、原生動物、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせに対して細胞傷害性である。ある特定の実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、細菌、真菌、原生動物、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせに対して細胞増殖抑制性および細胞傷害性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、腫瘍または癌細胞（例えば、ヒト癌細胞）に対して細胞傷害性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、腫瘍または癌細胞（例えば、ヒト癌細胞）に対して細胞増殖抑制性である。ある特定の実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、腫瘍または癌細胞（例えば、ヒト癌細胞）細胞傷害性およびに対して細胞増殖抑制性である。いくつかの実施形態において、抗ウイルス性ポリペプチドは、分泌ポリペプチドである。

【０１３０】
細胞傷害性ヌクレオシド
一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、１個以上の細胞傷害性ヌクレオシドを組み込み得る。例えば、細胞傷害性ヌクレオシドは、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ、例えば、二機能性修飾ＲＮＡまたはｍＲＮＡに組み込まれ得る。細胞傷害性ヌクレオシド抗癌剤には、アデノシンアラビノシド、シタラビン、シトシンアラビノシド、５－フルオロウラシル、フルダラビン、フロキシウリジン、ＦＴＯＲＡＦＵＲ（登録商標）（テガフールおよびウラシルの組み合わせ）、テガフール（（ＲＳ）－５－フルオロ－１－（テトラヒドロフラン－２－イル）ピリ

ミジン－２，４（１Ｈ，３Ｈ）－ジオン）、および６－メルカプトプリンが含まれるが、これらに限定されない。

【０１３１】

いくつかの細胞傷害性ヌクレオシド類似体は、臨床で用いられているか、または抗癌剤として臨床試験の対象になっている。そのような類似体の例には、シタラビン、ゲムシタビン、トロキサシタビン、デシタビン、テザシタビン、２’－デオキシ－２’－メチリデンシチジン（ＤＭＤＣ）、クラドリビン、クロファラビン、５－アザシチジン、４’－チオ－アラシチジン、シクロペンテニルシトシン、および１－（２－Ｃ－シアノ－２－デオキシ－β－Ｄ－アラビノ－ペントフラノシル）－シトシンが含まれるが、これらに限定されない。そのような化合物の別の例には、リン酸フルダラビンがある。これらの化合物は、全身投与され得、正常細胞の増殖時の腫瘍細胞に対する特異性がほとんどまたは全くないといった副作用等であるが、これに限定されない細胞傷害性薬剤の典型的な副作用を有し得る。

【０１３２】

細胞傷害性ヌクレオシド類似体のいくつかのプロドラッグも当技術分野において報告されている。例には、Ｎ４－ベヘノイル－１－β－Ｄ－アラビノフラノシルシトシン、Ｎ４－オクタデシル－１－β－Ｄ－アラビノフラノシルシトシン、Ｎ４－パルミトイル－１－（２－Ｃ－シアノ－２－デオキシ－β－Ｄ－アラビノ－ペントフラノシル）シトシン、およびＰ－４０５５（シタラビン５’－エライジン酸エステル）が含まれるが、これらに限定されない。概して、これらのプロドラッグは、主に肝臓および体循環において活性薬物に変換され、腫瘍組織における活性薬物の選択的放出をほとんどまたは全く呈しない。例えば、５’－デオキシ－５－フルオロシチジン（最終的に、５－フルオロウラシル）のプロドラッグであるカペシタビンは、肝臓および腫瘍組織で代謝される。「生理学的条件下で容易に加水分解可能なラジカル」を含有する一連のカペシタビン類似体は、Ｆｕｊｉｕら（米国特許第４，９６６，８９１号）によって特許請求されており、参照により本明細書に組み込まれる。Ｆｕｊｉｕによって説明されるこの一連のカペシタビン類似体は、５’－デオキシ－５－フルオロシチジンのＮ４アルキルおよびアラルキルカルバミン酸塩を含み、これらの化合物が正常な生理学的条件下で加水分解によって活性化されて、５’－デオキシ－５－フルオロシチジンをもたらすことを暗示する。

【０１３３】

一連のシタラビンＮ４－カルバミン酸塩が、Ｆａｄｌら（参照により本明細書に組み込まれる、Ｐｈａｒｍａｚｉｅ．１９９５，５０，３８２－７）によって報告されており、そこで、化合物は、肝臓および血漿においてシタラビンに変換するように設計された。参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００４／０４１２０３号は、ゲムシタビンのプロドラッグを開示しており、そこで、プロドラッグのうちのいくつかは、Ｎ４－カルバミン酸塩である。これらの化合物は、ゲムシタビンの胃腸毒性を克服するように設計されており、無傷プロドラッグを胃腸管から吸収した後に、肝臓および血漿における加水分解放出によってゲムシタビンを提供するよう意図された。Ｎｏｍｕｒａら（参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｉｏｏｒｇ　Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００３，１１，２４５３－６１）は、生体内還元時に酸性条件下でさらなる加水分解を必要とした中間体を産生して、細胞傷害性ヌクレオシド化合物を産生した１－（３－Ｃ－エチニル－β－Ｄ－リボ－ペントファラノシル）シトシンのアセタール誘導体を説明している。

【０１３４】

化学療法薬であり得る細胞傷害性ヌクレオチドには、ピラゾロ［３，４－Ｄ］－ピリミジン、アロプリノール、アザチオプリン、カペシタビン、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メルカプトプリン、６－チオグアニン、アシクロビル、アラ－アデノシン、リバビリン、７－デアザ－アデノシン、７－デアザ－グアノシン、６－アザ－ウラシル、６－アザ－シチジン、チミジンリボヌクレオチド、５－ブロモデオキシウリジン、２－クロロ－プリン、およびイノシン、またはこれらの組み合わせも含まれるが、これらに限定されない。

【０１３５】
隣接領域：非翻訳領域（ＵＴＲ）
遺伝子の非翻訳領域（ＵＴＲ）は、転写されるが、翻訳されない。５’ＵＴＲが転写開始部位で始まり開始コドンに続くが、開始コドンを含まない一方で、３’ＵＴＲは、終止コドンの直後に始まり、転写終結シグナルまで続く。核酸分子および翻訳の安定性においてＵＴＲが果たす制御的役割についての報告が相次いでいる。ＵＴＲの制御特徴は、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡに組み込まれて、分子の安定性を高め得る。特定の特徴も組み込まれて、万が一それらが望ましくない器官部位に誤指向される場合には転写物の制御された下方制御を確保することができる。
【０１３６】
５’ＵＴＲおよび翻訳開始
天然５’ＵＴＲは、翻訳開始に関与する特徴を有する。それらは、リボソームが多くの遺伝子の翻訳を開始するプロセスに関与することで一般に知られているコザック配列のような特徴を有する。コザック配列は、コンセンサスＣＣＲ（Ａ／Ｇ）ＣＣＡＵＧＧを有し、式中、Ｒは、開始コドン（ＡＵＧ）の３塩基上流のプリン（アデニンまたはグアニン）であり、この後に別の「Ｇ」が続く。５’ＵＴＲは、伸長因子結合に関与する二次構造を形成することも知られている。
【０１３７】
特定の標的器官の多量に発現した遺伝子において典型的に見られる特徴を操作することによって、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの安定性およびタンパク質産生を高めることができる。例えば、アルブミン、血清アミロイドＡ、アポリポタンパク質Ａ／Ｂ／Ｅ、トランスフェリン、αフェトタンパク質、エリスロポエチン、または第ＶＩＩＩ因子等の肝臓で発現したｍＲＮＡの５’ＵＴＲ導入を用いて、肝細胞株または肝臓でのｍｍＲＮＡ等の核酸分子の発現を高めることができる。同様に、他の組織特異的ｍＲＮＡからの５’ＵＴＲを用いてその組織での発現を高めることは、筋肉（ＭｙｏＤ、ミオシン、ミオグロビン、ミオゲニン、ヘルクリン（Ｈｅｒｃｕｌｉｎ））、内皮細胞（Ｔｉｅ－１、ＣＤ３６）、骨髄細胞（Ｃ／ＥＢＰ、ＡＭＬ１、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＣＤ１１ｂ、ＭＳＲ、Ｆｒ－１、ｉ－ＮＯＳ）、白血球（ＣＤ４５、ＣＤ１８）、脂肪組織（ＣＤ３６、ＧＬＵＴ４、ＡＣＲＰ３０、アディポネクチン）、および肺上皮細胞（ＳＰ－Ａ／Ｂ／Ｃ／Ｄ）において可能である。
【０１３８】
他の非ＵＴＲ配列が、５’ＵＴＲ（または３’ＵＴＲ）に組み込まれ得る。例えば、イントロンまたはイントロン配列の一部は、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの隣接領域に組み込まれ得る。イントロン配列の組み込みは、タンパク質産生、ならびにｍＲＮＡレベルを増加させ得る。
【０１３９】
３’ＵＴＲおよびＡＵ豊富な要素
３’ＵＴＲは、それらに包理される一続きのアデノシン（Ａｄｅｎｏｓｉｎｅ）およびウリジン（Ｕｒｉｄｉｎｅ）を有することで知られている。これらのＡＵ豊富な特徴は、特に高代謝回転率を有する遺伝子においてよく見られる。それらの配列特徴および機能特性に基づいて、ＡＵ豊富な要素（ＡＲＥ）は、３つのクラスに分類され得る（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ，１９９５）：クラスＩのＡＲＥは、Ｕ豊富な領域内にＡＵＵＵＡモチーフのいくつかの分散したコピーを含有する。Ｃ－ＭｙｃおよびＭｙｏＤは、クラスＩのＡＲＥを含有する。クラスＩＩのＡＲＥは、２個以上の重複したＵＵＡＵＵＵＡ（Ｕ／Ａ）（Ｕ／Ａ）九量体を有する。この種のＡＲＥを含有する分子は、ＧＭ－ＣＳＦおよびＴＮＦ－ａを含む。クラスＩＩＩのＡＲＥは、あまり明確にされていない。これらのＵ豊富な領域は、ＡＵＵＵＡモチーフを含有しない。Ｃ－Ｊｕｎおよびミオゲニンが、十分に研究されたこのクラスの例の２つである。ＡＲＥに結合する大半のタンパク質がメッセンジャーを不安定にすることで知られているが、ＥＬＡＶファミリーのメンバー、中でも注目すべきＨｕＲがｍＲＮＡの安定性を向上させることが実証されている。ＨｕＲは、これら３つの

クラスのＡＲＥに結合する。ＨｕＲ特異的結合部位を操作して核酸分子の３’ＵＴＲに入れることで、ＨｕＲ結合、ひいてはインビボでのメッセージの安定化につながる。

【０１４０】

３’ＵＴＲのＡＵ豊富な要素（ＡＲＥ）の導入、除去、または修飾を用いて、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの安定性を調節することができる。特定のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを操作するとき、ＡＲＥの１つ以上のコピーが導入されて、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの安定性を低下させ、それによって、結果として生じるタンパク質の翻訳を抑制し、その産生を低減させ得る。同様に、ＡＲＥは、特定および除去されるか、または変異されて、細胞内安定性を向上させ、ひいては結果として生じるタンパク質の翻訳および産生を増加させることができる。本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いたトランスフェクション実験を関連細胞株において行うことができ、タンパク質産生をトランスフェクション後の様々な時点でアッセイすることができる。例えば、細胞を、異なるＡＲＥ操作分子でトランスフェクトすることができ、関連タンパク質に対してＥＬＩＳＡキットを用いてトランスフェクション後６時間、１２時間、２４時間、４８時間、および７日時点で産生されたタンパク質をアッセイすることができる。

【０１４１】

マイクロＲＮＡ結合部位の組み込み

マイクロＲＮＡ（またはｍｉＲＮＡ）は、核酸分子の３’ＵＴＲに結合し、かつ核酸分子安定性を低下させるか、または翻訳を阻害するかのいずれかによって遺伝子発現を下方制御する１９～２５ヌクレオチド長の非コードＲＮＡである。本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、１つ以上のマイクロＲＮＡ標的配列、マイクロＲＮＡ配列、またはマイクロＲＮＡ種を含み得る。そのような配列は、米国特許公開第ＵＳ２００５／０２６１２１８号および米国特許公開第ＵＳ２００５／００５９００５号に教示されるもの等の任意の既知のマイクロＲＮＡに対応し得、これらの内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４２】

マイクロＲＮＡ配列は、「種」領域、すなわち、成熟マイクロＲＮＡの２～８位の領域における配列を含み、この配列は、ｍｉＲＮＡ標的配列に対して完全なワトソン・クリック相補性を有する。マイクロＲＮＡ種は、成熟マイクロＲＮＡの２～８位または２～７位を含み得る。いくつかの実施形態において、マイクロＲＮＡ種は、７個のヌクレオチド（例えば、成熟マイクロＲＮＡのヌクレオチド２～８位）を含み得、対応するｍｉＲＮＡ標的におけるこの種相補的部位は、マイクロＲＮＡ１位と反対のアデニン（Ａ）に隣接する。いくつかの実施形態において、マイクロＲＮＡ種は、６個のヌクレオチド（例えば、成熟マイクロＲＮＡのヌクレオチド２～７位）を含み得、対応するｍｉＲＮＡ標的における種相補的部位は、マイクロＲＮＡ１位と反対のアデニン（Ａ）に隣接する。例えば、Ｇｒｉｍｓｏｎ Ａ，Ｆａｒｈ ＫＫ，Ｊｏｈｎｓｔｏｎ ＷＫ，Ｇａｒｒｅｔｔ－Ｅｎｇｅｌｅ Ｐ，Ｌｉｍ ＬＰ，Ｂａｒｔｅｌ ＤＰ；Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２００７ Ｊｕｌ ６；２７（１）：９１－１０５を参照されたく、それぞれ、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。マイクロＲＮＡ種の塩基は、標的配列と完全な相補性を有する。マイクロＲＮＡ標的配列を操作して、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの３’ＵＴＲに入れることによって、分解または翻訳減少のためにこの分子を標的化することができるが、但し、問題のマイクロＲＮＡが利用可能であることを条件とする。このプロセスは、核酸分子送達時のオフターゲット効果の危険を低下させる。マイクロＲＮＡ、マイクロＲＮＡ標的領域、およびそれらの発現パターンの特定、ならびに生物学におけるそれらの役割が報告されている（それぞれ、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｂｏｎａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ ２０１０ １１：９４３－９４９、Ａｎａｎｄ ａｎｄ Ｃｈｅｒｅｓｈ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ ２０１１ １８：１７１－１７６、Ｃｏｎｔｒｅｒａｓ ａｎｄ Ｒａｏ Ｌｅｕｋｅｍｉａ ２０１２ ２６：４０４－４１３（２０１１ Ｄｅｃ ２０

．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｌｅｕ．２０１１．３５６）、Ｂａｒｔｅｌ Ｃｅｌｌ ２００９ １３６：２１５－２３３、Ｌａｎｄｇｒａｆ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，２００７ １２９：１４０１－１４１４）。

【０１４３】

例えば、核酸分子がｍＲＮＡであり、肝臓に送達されることが意図されないが、そこで落ち着く場合、肝臓中に豊富なマイクロＲＮＡであるｍｉＲ－１２２が、ｍｉＲ－１２２の１つまたは複数の標的部位が操作されて、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの３’ＵＴＲに入れられると、目的とする遺伝子の発現を阻害することができる。異なるマイクロＲＮＡの１つまたは複数の結合部位の導入を操作して、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの長寿命、安定性、およびタンパク質翻訳をさらに減少させることができる。

【０１４４】

本明細書で使用するとき、「マイクロＲＮＡ部位」という用語は、マイクロＲＮＡ標的部位もしくはマイクロＲＮＡ認識部位、またはマイクロＲＮＡが結合もしくは会合する任意のヌクレオチド配列を指す。「結合」は、従来のワトソン・クリックハイブリダイゼーション規則に従い得るか、あるいはマイクロＲＮＡ部位に、またはマイクロＲＮＡ部位に隣接して標的配列を有するマイクロＲＮＡの任意の安定した会合を示し得ることを理解されたい。

【０１４５】

逆に、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの目的のために、特定の組織でのタンパク質発現を増加させるために自然に生じるマイクロＲＮＡ結合部位を操作して配列から出す（すなわち、配列から除去する）ことができる。例えば、ｍｉＲ－１２２結合部位が除去されて、肝臓でのタンパク質発現を改善することができる。複数の組織での発現の制御は、１つまたはいくつかのマイクロＲＮＡ結合部位の導入または除去によって達成され得る。

【０１４６】

マイクロＲＮＡがｍＲＮＡを制御し、その結果タンパク質発現を制御することで知られている組織の例には、肝臓（ｍｉＲ－１２２）、筋肉（ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－２０８）、内皮細胞（ｍｉＲ－１７－９２、ｍｉＲ－１２６）、骨髄細胞（ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７）、脂肪組織（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－３０ｃ）、心臓（ｍｉＲ－１ｄ、ｍｉＲ－１４９）、腎臓（ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９４、ｍｉＲ－２０４）、および肺上皮細胞（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－１２６）が挙げられるが、これらに限定されない。マイクロＲＮＡは、血管新生（ｍｉＲ－１３２）等の複雑な生物学的プロセスも制御し得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｎａｎｄ ａｎｄ Ｃｈｅｒｅｓｈ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ ２０１１ １８：１７１－１７６）。本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡにおいて、そのようなプロセスに関与するマイクロＲＮＡの結合部位は、生物学的に関連した細胞型に対して、または関連生物学的プロセスに関連してポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの発現を調整するために除去または導入され得る。マイクロＲＮＡ、ｍｉＲ配列、およびｍｉＲ結合部位の一覧が、２０１３年１月１７日出願の米国特許仮出願第６１／７５３，６６１号の表９、２０１３年１月１８日出願の米国特許仮出願第６１／７５４，１５９号の表９、および２０１３年１月３１日出願の米国特許仮出願第６１／７５８，９２１号の表７に列記されており、それぞれ、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４７】

最後に、異なる細胞型におけるマイクロＲＮＡの発現パターンの理解を通じて、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、特定の細胞型におけるより標的化された発現または特定の生物学的条件下のみでのより標的化された発現のために操作され得る。組織特異的マイクロＲＮＡ結合部位の導入によって、組織でのタンパク質発現または生物

学的条件に関連したタンパク質発現に最適なポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが設計され得る。組織または疾患特異的遺伝子発現を駆動するためのマイクロＲＮＡの使用例が列記されている（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｅｔｎｅｒ　ａｎｄ　Ｎａｌｄｉｎｉ，Ｔｉｓｓｕｅ　Ａｎｔｉｇｅｎｓ．２０１２，８０：３９３－４０３）。加えて、マイクロＲＮＡ種部位は、ｍＲＮＡに組み込まれてある特定の細胞における発現を低下させ得、これは、生物学的改善をもたらす。これについての例は、ｍｉＲ－１４２部位のＵＧＴ１Ａ１発現レンチウイルスベクターへの組み込みである。ｍｉＲ－１４２種部位の存在が造血細胞での発現を低下させ、結果として抗原提示細胞での発現を低下させ、ウイルスによって発現したＵＧＴ１Ａ１に対する免疫応答の不在をもたらした（いずれも参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｓｃｈｍｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ　２０１０；１３９：９９９－１００７、Ｇｏｎｚａｌｅｚ－Ａｓｅｑｕｉｎｏｌａｚａ　ｅｔ　ａｌ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ　２０１０，１３９：７２６－７２９）。ｍｉＲ－１４２部位の修飾ｍＲＮＡへの組み込みが、造血細胞でのコードされたタンパク質の発現を低下させることができただけでなく、ｍＲＮＡでコードされたタンパク質に対する免疫応答を低下または無効にすることもできた。ｍｉＲ－１４２種部位（１つまたは複数）のｍＲＮＡへの組み込みは、完全なタンパク質欠乏症を有する患者（Ｉ型ＵＧＴ１Ａ１、ＬＤＬＲ欠損患者、ＣＲＩＭ陰性Ｐｏｍｐｅ患者等）の治療時に重要である。

【０１４８】

操作されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いたトランスフェクション実験を関連細胞株において行うことができ、タンパク質産生をトランスフェクション後の様々な時点でアッセイすることができる。例えば、細胞を、異なるマイクロＲＮＡ結合部位操作ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡでトランスフェクトすることができ、関連タンパク質に対してＥＬＩＳＡキットを用いてトランスフェクション後６時間、１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、および７日時点で産生されたタンパク質をアッセイすることができる。マイクロＲＮＡ結合部位操作分子を用いたインビボ実験を行って、製剤化されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの組織特異的発現の変化を試験することもできる。

【０１４９】

５’キャッピング

ｍＲＮＡの５’キャップ構造は、核外輸送に関与し、ｍＲＮＡの安定性を向上させ、ｍＲＮＡキャップ結合タンパク質（ＣＢＰ）に結合し、これは、ＣＢＰのポリ（Ａ）結合タンパク質との会合を介して細胞におけるｍＲＮＡ安定性および翻訳適格性に関与し、成熟環状ｍＲＮＡ種を形成する。このキャップはさらに、ｍＲＮＡスプライシング中に５’近位のイントロンの除去を支援する。

【０１５０】

内因性ｍＲＮＡ分子は、５’末端キャップされて、末端グアノシンキャップ残基とｍＲＮＡ分子の５’末端転写センスヌクレオチドとの間に５’－ｐｐｐ－５’－トリホスフェート結合をもたらし得る。その後、この５’－グアニル酸キャップがメチル化されて、Ｎ７－メチル－グアニル酸残基を生成し得る。ｍＲＮＡの５’末端の末端および／または前末端転写ヌクレオチドのリボース糖も、任意に２’－Ｏ－メチル化され得る。グアニル酸キャップ構造の加水分解および切断を介する５’デキャッピングは、分解するためにｍＲＮＡ分子等の核酸分子を標的とし得る。

【０１５１】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡの修飾は、デキャッピングを阻止する非加水分解性のキャップ構造を生成し、その結果ｍＲＮＡの半減期を増加させ得る。キャップ構造の加水分解が５’－ｐｐｐ－５’ホスホロジエステル結合の切断を必要とするため、修飾ヌクレオチドが、キャッピング反応中に用いられ得る。例えば、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）のワクシニアキャッピング酵素を製造業者の指示に従ってα－チオ－グアノシンヌクレオチドとともに用いて、５

’－ｐｐｐ－５’キャップにおけるホスホロチオエート結合を引き起こすことができる。α－メチル－ホスホネートおよびセレノ－ホスフェートヌクレオチド等のさらなる修飾グアノシンヌクレオチドを用いることができる。

【０１５２】

さらなる修飾には、糖環の２’－ヒドロキシル基におけるｍＲＮＡの５’末端および／または５’前末端ヌクレオチドのリボース糖の２’－Ｏ－メチル化（上述のもの）が含まれるが、これに限定されない。複数のはっきりと異なる５’－キャップ構造を用いて、ｍＲＮＡ分子等の核酸分子の５’キャップを生成することができる。

【０１５３】

本明細書において合成キャップ類似体、化学キャップ、化学キャップ類似体、または構造もしくは機能キャップ類似体とも称されるキャップ類似体は、それらの化学構造の点で天然の（すなわち、内因性、野生型、または生理学的）５’キャップとは異なるが、キャップ機能は保持する。キャップ類似体は、化学的（すなわち、非酵素的）もしくは酵素的に合成され、かつ／または核酸分子に結合され得る。

【０１５４】

例えば、反逆方向キャップ類似体（ＡＲＣＡ）キャップは、５’－５’－トリホスフェート基によって結合される２個のグアニンを含有し、一方のグアニンは、Ｎ７メチル基、ならびに３’－Ｏ－メチル基（すなわち、Ｎ７，３’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－５’－トリホスフェート－５’－グアノシン（ｍ^{7}Ｇ－３’ｍｐｐｐ－Ｇ、これは同等に３’Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇと指定され得る）を含有する。他方の未修飾グアニンの３’－Ｏ原子は、キャップされた核酸分子（例えば、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ）の５’末端ヌクレオチドに結合される。Ｎ７－および３’－Ｏ－メチル化グアニンは、キャップされた核酸分子（例えば、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ）の末端部分を提供する。

【０１５５】

別の例示のキャップには、ｍＣＡＰがあり、これは、ＡＲＣＡと同様であるが、グアノシン上に２’－Ｏ－メチル基（すなわち、Ｎ７，２’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－５’－トリホスフェート－５’－グアノシン、ｍ^{7}Ｇｍ－ｐｐｐ－Ｇ）を有する。

【０１５６】

キャップ類似体がインビトロ転写反応において同時に起こる核酸分子のキャッピングを可能にする一方で、転写物の最大２０％がキャップされないままであり得る。これ、ならびに内因性細胞転写機構によって産生される核酸の内因性５’－キャップ構造とのキャップ類似体の構造差は、翻訳適格性の低下および細胞安定性の低下をもたらし得る。

【０１５７】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、より真正の５’－キャップ構造を生成するために、酵素を用いて転写後にもキャップされ得る。本明細書で使用するとき、「より真正の」という表現は、構造的または機能的のいずれかで内因性または野生型特徴を酷似させるか、または模倣する特徴を指す。すなわち、「より真正の」特徴は、先行技術の合成特徴もしくは類似体等と比較して、より良好に内因性、野生型、天然、もしくは生理学的細胞機能および／もしくは構造を表しているか、またはこれは、対応する内因性、野生型、天然または生理学的特徴を１つ以上の点においてしのぐ。本発明のより真正の５’キャップ構造の非限定的な例には、当技術分野で既知の合成５’キャップ構造（または野生型、天然、または生理学的５’キャップ構造）と比較して、とりわけ、強化されたキャップ結合タンパク質の結合、増加した半減期、低下した５’エンドヌクレアーゼに対する感受性、および／または低下した５’デキャッピングを有するものがある。例えば、組換えワクシニアウイルスキャッピング酵素および組換え２’－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ酵素は、ｍＲＮＡの５’末端ヌクレオチドとグアニンキャップヌクレオチドとの間に基準の５’－５’－トリホスフェート結合を生成し得、キャップグアニンは、Ｎ７メチル化を含有、ｍＲＮＡの５’末端ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチルを含有する。そのような構造は、キャップ１構造と称される。このキャップは、例えば、当技術分

野で既知の他の５’キャップ類似体構造と比較して、より高い翻訳適格性および細胞安定性、ならびに細胞炎症誘発性サイトカインの活性化の低下をもたらす。キャップ構造には、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｎ，ｐＮ２ｐ（キャップ０）、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）ＮｌｍｐＮｐ（キャップ１）、および７ｍＧ（５’）－ｐｐｐ（５’）ＮｌｍｐＮ２ｍｐ（キャップ２）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１５８】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが転写後にキャップされ得、かつこのプロセスがより効率的であるため、ほぼ１００％のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡがキャップされ得る。これは、キャップ類似体がインビトロ転写反応の過程でｍＲＮＡに結合されるときの約８０％とは大いに異なる。

【０１５９】

本発明に従って、５’末端キャップは、内因性キャップまたはキャップ類似体を含み得る。本発明に従って、５’末端キャップは、グアニン類似体を含み得る。有用なグアニン類似体には、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、および２－アジド－グアノシンが含まれるが、これらに限定されない。

【０１６０】

ウイルス配列

大麦縞萎縮ウイルス（ＢＹＤＶ－ＰＡＶ）の翻訳エンハンサー配列、ヤーグジークテヒツジレトロウイルス（ＪＳＲＶ）、および／または地方病性鼻腫瘍ウイルス（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２１２９６４８号を参照のこと）等であるが、これらに限定されないさらなるウイルス配列は、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの３’ＵＴＲに操作および挿入され得、インビトロおよびインビボで構築物の翻訳を刺激し得る。トランスフェクション実験を関連細胞株において行うことができ、ＥＬＩＳＡによってタンパク質産生をトランスフェクション後１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、および７日時点でアッセイすることができる。

【０１６１】

ＩＲＥＳ配列

さらに、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含有し得るポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。最初に特徴的なピコルナウイルスＲＮＡと特定されたＩＲＥＳは、５’キャップ構造の不在下でタンパク質合成を開始するときに重要な役割を果たす。ＩＲＥＳは、ｍＲＮＡの唯一のリボソーム結合部位として働き得るか、または複数のリボソーム結合部位のうちの１つの役割を果たし得る。２個以上の機能的リボソーム結合部位を含有するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、リボソーム（「多シストロン性核酸分子」）によって独立して翻訳されるいくつかのペプチドまたはポリペプチドをコードし得る。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡにＩＲＥＳが提供されるとき、第２の翻訳可能な領域がさらに任意に提供される。本発明に従って用いられ得るＩＲＥＳ配列の例には、制限なく、ピコルナウイルス（例えば、ＦＭＤＶ）、ペストウイルス（ＣＦＦＶ）、ポリオウイルス（ＰＶ）、脳心筋炎ウイルス（ＥＣＭＶ）、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、豚コレラウイルス（ＣＳＦＶ）、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、またはコオロギ麻痺ウイルス（ＣｒＰＶ）由来のものが挙げられる。

【０１６２】

ポリＡ尾部

ＲＮＡ処理中、長いアデニンヌクレオチド鎖（ポリＡ尾部）が、安定性を向上させるためにｍＲＮＡ分子等のポリヌクレオチドに付加され得る。転写直後、転写物の３’末端が切断されて３’ヒドロキシルを遊離させ得る。その後、ポリＡポリメラーゼは、アデニンヌクレオチド鎖をＲＮＡに付加する。ポリアデニル化と呼ばれるこのプロセスは、例えば、約１００～２５０残基長であり得るポリＡ尾部を付加する。

【０１６３】
特有のポリＡ尾部の長さが、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡにある特定の利点を提供することが見出されている。
【０１６４】
概して、本発明のポリＡ尾部の長さは、３０ヌクレオチド長を超える。別の実施形態において、ポリＡ尾部は、３５ヌクレオチド長を超える（例えば、少なくとも約３５、４０、４５、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、１，１００、１，２００、１，３００、１，４００、１，５００、１，６００、１，７００、１，８００、１，９００、２，０００、２，５００、および３，０００ヌクレオチド長であるか、またはこれらを超える）。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、約３０～約３，０００個のヌクレオチド（例えば、３０～５０、３０～１００、３０～２５０、３０～５００、３０～７５０、３０～１，０００、３０～１，５００、３０～２，０００、３０～２，５００、５０～１００、５０～２５０、５０～５００、５０～７５０、５０～１，０００、５０～１，５００、５０～２，０００、５０～２，５００、５０～３，０００、１００～５００、１００～７５０、１００～１，０００、１００～１，５００、１００～２，０００、１００～２，５００、１００～３，０００、５００～７５０、５００～１，０００、５００～１，５００、５００～２，０００、５００～２，５００、５００～３，０００、１，０００～１，５００、１，０００～２，０００、１，０００～２，５００、１，０００～３，０００、１，５００～２，０００、１，５００～２，５００、１，５００～３，０００、２，０００～３，０００、２，０００～２，５００、および２，５００～３，０００個）を含む。
【０１６５】
一実施形態において、ポリＡ尾部は、全体のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの長さに対して設計される。この設計は、コーディング領域の長さ、特定の特徴もしくは領域の長さ（第１もしくは隣接領域等）に基づき得るか、またはポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡから発現した最終産物の長さに基づき得る。
【０１６６】
この文脈において、ポリＡ尾部は、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡ、またはその特徴よりも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくは１００％長い長さであり得る。ポリＡ尾部は、それが属するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの画分としても設計され得る。この文脈において、ポリＡ尾部は、構築物の全長または構築物の全長からポリＡ尾部を差し引いた長さの１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％以上であり得る。さらに、結合部位の操作、およびポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのポリＡ結合タンパク質への複合体化は、発現を高め得る。
【０１６７】
さらに、複数のはっきりと異なるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ポリＡ尾部の３’末端で修飾されたヌクレオチドを用いて３’末端を介してＰＡＢＰ（ポリＡ結合タンパク質）に結合され得る。トランスフェクション実験を関連細胞株において行うことができ、ＥＬＩＳＡによってタンパク質産生をトランスフェクション後１２時間、２４時間、４８時間、７２時間、および７日時点でアッセイすることができる。
【０１６８】
一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド一次構築物は、ポリＡ～Ｇ四重項を含むように設計される。Ｇ四重項は、ＤＮＡおよびＲＮＡの両方においてＧ豊富な配列によって形成され得る４個のグアニンヌクレオチドの環状水素結合アレイである。この実施形態において、Ｇ四重項は、ポリＡ尾部の終端に組み込まれる。結果として生じるｍｍＲＮＡ構築物は、安定性、タンパク質産生、および様々な時点での半減期他のパラメータについてアッセイされる。ポリＡ～Ｇ四重項が、１２０個のヌクレオチドのポリＡ尾部を単独

で用いてもたらされるタンパク質産生の少なくとも７５％に相当するタンパク質産生をもたらすことが見出されている。

【０１６９】

定量化

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、１つ以上の体液由来のエクソソームにおいて定量化され得る。本明細書で使用するとき、「体液」には、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液（ＣＳＦ）、痰、唾液、骨髄、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、クーパー腺液または射精前液、汗、糞便、毛髪、涙液、嚢胞液、胸膜および腹水、心嚢液、リンパ液、粥状液、乳糜、胆汁、間質液、帯下、膿汁、皮脂、嘔吐物、膣分泌物、粘膜分泌物、水便、膵液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引物、胚盤胞腔液、および臍帯血が含まれる。あるいは、エクソソームは、肺、心臓、膵臓、胃、腸、膀胱、腎臓、卵巣、睾丸、皮膚、結腸、乳房、前立腺、脳、食道、肝臓、および胎盤からなる群から選択される器官から回収され得る。

【０１７０】

定量化方法において、２ｍＬ未満の試料が対象から得られ、エクソソームが、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分画遠心分離、ナノ膜限外濾過、免疫吸収捕獲、親和性精製、微小流体分離、またはこれらの組み合わせによって単離される。分析において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのレベルまたは濃度は、投与された構築物の発現レベル、存在、不在、切断、または改変であり得る。このレベルを１つ以上の臨床表現型またはヒト疾患バイオマーカーについてのアッセイと相関させることは、有利である。このアッセイが、構築物特異的プローブ、サイトメトリー、ｑＲＴ－ＰＣＲ、実時間ＰＣＲ、ＰＣＲ、フローサイトメトリー、電気泳動、質量分析、またはこれらの組み合わせを用いて行われ得る一方で、エクソソームは、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）等の免疫組織化学法を用いて単離され得る。エクソソームは、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分画遠心分離、ナノ膜限外濾過、免疫吸収捕獲、親和性精製、微小流体分離、またはこれらの組み合わせによっても単離され得る。

【０１７１】

これらの方法は、残存しているか、または送達されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのレベルをリアルタイムで監視する能力を研究者に提供する。これは、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが構造または化学修飾に起因して内因性形態とは異なるといった理由から、可能である。

【０１７２】

ＩＩ．ｍｍＲＮＡの設計および合成

本発明に従って用いるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、化学合成、一般にインビトロ転写（ＩＶＴ）と称される酵素合成、またはより長い前駆体の酵素的もしくは化学的切断等を含むが、これらに限定されない任意の利用可能な技法に従って調製され得る。ＲＮＡを合成する方法は、当技術分野において既知である（例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれる、Ｇａｉｔ，Ｍ．Ｊ．（ｅｄ．）Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｏｘｆｏｒｄ［Ｏｘｆｏｒｄｓｈｉｒｅ］，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ：ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，１９８４、およびＨｅｒｄｅｗｉｊｎ，Ｐ．（ｅｄ．）Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖ．２８８（Ｃｌｉｆｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．）Ｔｏｔｏｗａ，Ｎ．Ｊ．：Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，２００５を参照のこと）。

【０１７３】

本発明の一次構築物の設計および合成のプロセスは、概して、遺伝子構築ステップ、ｍＲＮＡ産生ステップ（修飾を伴うか、または伴わない）、および精製ステップを含む。酵素合成方法において、目的とするポリペプチドをコードする標的ポリヌクレオチド配列が

、増幅されてｃＤＮＡ鋳型を産生するベクターへの組み込みのために最初に選択される。任意に、標的ポリヌクレオチド配列および／または任意の隣接配列は、コドン最適化され得る。その後、ｃＤＮＡ鋳型を用いて、インビトロ転写（ＩＶＴ）によってｍＲＮＡを産生する。産生後、ｍＲＮＡは、精製および浄化プロセスを経り得る。これらのステップは、以下でより詳細に提供される。

【０１７４】

遺伝子構築

遺伝子構築ステップは、遺伝子合成、ベクター増幅、プラスミド精製、プラスミド線形化および浄化、ならびにｃＤＮＡ鋳型合成および浄化を含み得るが、これらに限定されない。

【０１７５】

遺伝子合成

目的とするポリペプチドまたは標的が産生のために選択された時点で、一次構築物が設計される。一次構築物内で、目的とするポリペプチドをコードする結合ヌクレオシドの第１の領域は、選択された核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）転写物のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を用いて構築され得る。ＯＲＦは、野生型ＯＲＦ、アイソフォーム、変異形、またはその断片を含み得る。本明細書で使用するとき、「オープンリーディングフレーム」または「ＯＲＦ」は、目的とするポリペプチドをコードすることができる核酸配列（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を指すよう意図される。ＯＲＦは、多くの場合、開始コドンＡＴＧで始まり、ナンセンスまたは終止コドンもしくはシグナルで終わる。

【０１７６】

さらに、第１の領域のヌクレオチド配列は、コドン最適化され得る。コドン最適化方法は、当技術分野において既知であり、いくつかの目標のうちの１つ以上を達成する取り組みにおいて有用であり得る。これらの目標には、標的および宿主生物体におけるコドン頻度を一致させて適切な折り畳みを確実にすること、ＧＣ含量を付勢させてｍＲＮＡの安定性を高めるか、または二次構造を減少させること、遺伝子構築または発現を障害し得る縦列反復コドンまたは塩基泳動を最小限に抑えること、転写および翻訳制御領域をカスタマイズすること、タンパク質輸送配列を挿入または除去すること、コードされたタンパク質における翻訳後修飾部位（例えば、グリコシル化部位）を除去／付加すること、タンパク質ドメインを付加、除去、または組み替えること、制限部位を挿入するか、または欠失させること、リボソーム結合部位およびｍＲＮＡ分解部位を修飾すること、翻訳速度を調節してタンパク質の様々なドメインの適切な折り畳みを可能にすること、あるいはｍＲＮＡ内の問題の二次構造を減少させるか、または排除することが含まれる。コドン最適化ツール、アルゴリズム、およびサービスは、当技術分野において既知であり、非限定的な例には、ＧｅｎｅＡｒｔのサービス（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ　ＣＡ）、および／または所有権を有する方法が挙げられる。一実施形態において、ＯＲＦ配列は、最適化アルゴリズムを用いて最適化される。各アミノ酸のコドン選択肢が表１に提供される。

表１．コドン選択肢

【表０００１】

アミノ酸	一文字表記	コドン選択肢
イソロイシン	I	ATT、ATC、ATA
ロイシン	L	CTT、CTC、CTA、CTG、TTA、TTG
バリン	V	GTT、GTC、GTA、GTG
フェニルアラニン	F	TTT、TTC
メチオニン	M	ATG
システイン	C	TGT、TGC
アラニン	A	GCT、GCC、GCA、GCG
グリシン	G	GGT、GGC、GGA、GGG
プロリン	P	CCT、CCC、CCA、CCG
トレオニン	T	ACT、ACC、ACA、ACG
セリン	S	TCT、TCC、TCA、TCG、AGT、AGC
チロシン	Y	TAT、TAC
トリプトファン	W	TGG
グルタミン	Q	CAA、CAG
アスパラギン	N	AAT、AAC
ヒスチジン	H	CAT、CAC
グルタミン酸	E	GAA、GAG
アスパラギン酸	D	GAT、GAC
リジン	K	AAA、AAG
アルギニン	R	CGT、CGC、CGA、CGG、AGA、AGG
セレノシステイン	Sec	セレノシステイン挿入エレメント(SECIS)が存在するmRNA中でUGA
停止コドン	Stop	TAA、TAG、TGA

【０１７７】

本発明のいくつかの実施形態において有益であると見なされ得る特徴は、一次構築物によってコードされ得、第１または第２の隣接領域としてＯＲＦに隣接し得る。この隣接領域は、ＯＲＦの最適化前および／または後に一次構築物に組み込まれ得る。一次構築物が５’隣接領域と３’隣接領域の両方を含有する必要はない。そのような特徴の例には、非翻訳領域（ＵＴＲ）、コザック配列、オリゴ（ｄＴ）配列、および検出可能なタグが挙げられるが、これらに限定されず、ＸｂａＩ認識を有し得る複数のクローニング部位も挙げられ得る。

【０１７８】

いくつかの実施形態において、５’ＵＴＲおよび／または３’ＵＴＲが、隣接領域として提供され得る。複数の５’または３’ＵＴＲが、隣接領域に含まれ得、同一または異なる配列であり得る。隣接領域の任意の部分（そのような部分がない場合を含み）が、コドン最適化され得、それらのいずれも、独立して、コドン最適化の前および／または後に１つ以上の異なる構造または化学修飾を含有し得る。特徴の組み合わせは、第１および第２の隣接領域に含まれ得、他の特徴内に含有され得る。例えば、ＯＲＦは、ポリＡ尾部の鋳型付加のために、強力なコザック翻訳開始シグナルを含有し得る５’ＵＴＲおよび／またはオリゴ（ｄＴ）配列を含み得る３’ＵＴＲに隣接し得る。参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１００２９３６２５号に記載の５’ＵＴＲ等の５’ＵＴＲは、同一および／または異なる遺伝子由来の第１のポリヌクレオチド断片および第２のポリヌクレオチド断片を含み得る。

【０１７９】

表２および３は、隣接領域として本発明の一次構築物において利用され得る例示のＵＴＲの一覧を提供する。本発明の５’非翻訳領域の一覧が表２に示される。Ａ、Ｔ、Ｃ、も

しくはＧを含む１個以上のヌクレオチドが末端に付加されるか、または末端から除去される５’ＵＴＲの変異形が利用され得る。

表２．５’非翻訳領域

【表０００２】

5’ UTR 識別名	名称/説明	配列	配列番号
5UTR-001	上流 UTR	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC	1
5UTR-002	上流 UTR	GGGAGATCAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC	2
5UTR-003	上流 UTR	GGAATAAAAGTCTCAACACAACATATACAAAACAAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTCTATTGCAGCAATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCAAAAGCAATTTTCTGAAAATTTTCACCATTTACGAACGATAGCAAC	3
5UTR-004	上流 UTR	GGGAGACAAGCUUGGCAUUCCGGUACUGUUGGUAAAGCCACC	4

【０１８０】

本発明の３’非翻訳領域の代表的な一覧が表３に示される。Ａ、Ｔ、Ｃ、もしくはＧを含む１個以上のヌクレオチドが末端に付加されるか、または末端から除去される３’ＵＴＲの変異形が利用され得る。

表３．３’非翻訳領域

【表０００３－１】

3′ UTR 識別名	名称／説明	配列	配列番号
3UTR-001	クレアチンキナーゼ	GCGCCTGCCCACCTGCCACCGACTGCTGGAACCCAGCCAGT GGGAGGGCCTGGCCCACCAGAGTCCTGCTCCCTCACTCCTC GCCCCGCCCCCTGTCCCAGAGTCCCACCTGGGGGCTCTCTC CACCCTTCTCAGAGTTCCAGTTTCAACCAGAGTTCCAACCA ATGGGCTCCATCCTCTGGATTCTGGCCAATGAAATATCTCC CTGGCAGGGTCCTCTTCTTTTCCCAGAGCTCCACCCCAACC AGGAGCTCTAGTTAATGGAGAGCTCCCAGCACACTCGGAGC TTGTGCTTTGTCTCCACGCAAAGCGATAAATAAAAGCATTG GTGGCCTTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTA GA	5
3UTR-002	ミオグロビン	GCCCCTGCCGCTCCCACCCCCACCCATCTGGGCCCCGGGTT CAAGAGAGAGCGGGGTCTGATCTCGTGTAGCCATATAGAGT TTGCTTCTGAGTGTCTGCTTTGTTTAGTAGAGGTGGGCAGG AGGAGCTGAGGGGCTGGGGCTGGGGTGTTGAAGTTGGCTTT GCATGCCCAGCGATGCGCCTCCCTGTGGGATGTCATCACCC TGGGAACCGGGAGTGGCCCTTGGCTCACTGTGTTCTGCATG GTTTGGATCTGAATTAATTGTCCTTTCTTCTAAATCCCAAC CGAACTTCTTCCAACCTCCAAACTGGCTGTAACCCCAAATC CAAGCCATTAACTACACCTGACAGTAGCAATTGTCTGATTA ATCACTGGCCCCTTGAAGACAGCAGAATGTCCCTTTGCAAT GAGGAGGAGATCTGGGCTGGGCGGGCCAGCTGGGGAAGCAT TTGACTATCTGGAACTTGTGTGTGCCTCCTCAGGTATGGCA GTGACTCACCTGGTTTTAATAAAACAACCTGCAACATCTCA TGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGA	6
3UTR-003	α-アクチン	ACACACTCCACCTCCAGCACGCGACTTCTCAGGACGACGAA TCTTCTCAATGGGGGGGCGGCTGAGCTCCAGCCACCCCGCA GTCACTTTCTTTGTAACAACTTCCGTTGCTGCCATCGTAAA CTGACACAGTGTTTATAACGTGTACATACATTAACTTATTA CCTCATTTTGTTATTTTTCGAAACAAAGCCCTGTGGAAGAA AATGGAAAACTTGAAGAAGCATTAAAGTCATTCTGTTAAGC TGCGTAAATGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTA GA	7
3UTR-004	アルブミン	CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGA GAAAGAAAATGAAGATCAAAAGCTTATTCATCTGTTTTTCT TTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATA AATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAAT TAATAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGTGGTACAGCACT GTTATTTTTCAAAGATGTGTTGCTATCCTGAAAATTCTGTA GGTTCTGTGGAAGTTCCAGTGTTCTCTCTTATTCCACTTCG GTAGAGGATTTCTAGTTTCTTGTGGGCTAATTAAATAAATC ATTAATACTCTTCTAATGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG GAAGTCTAGA	8
3UTR-005	α-グロビ	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTT	9

【表０００３－２】

	ン	CTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCC TGAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA	
3UTR-006	G-CSF	GCCAAGCCCTCCCCATCCCATGTATTTATCTCTATTTAATA TTTATGTCTATTTAAGCCTCATATTTAAAGACAGGGAAGAG CAGAACGGAGCCCCAGGCCTCTGTGTCCTTCCCTGCATTTC TGAGTTTCATTCTCCTGCCTGTAGCAGTGAGAAAAAGCTCC TGTCCTCCCATCCCCTGGACTGGGAGGTAGATAGGTAAATA CCAAGTATTTATTACTATGACTGCTCCCCAGCCCTGGCTCT GCAATGGGCACTGGGATGAGCCGCTGTGAGCCCCTGGTCCT GAGGGTCCCCACCTGGGACCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCC ACGTGGGAGACAAGAAATCCCTGTTTAATATTTAAACAGCA GTGTTCCCCATCTGGGTCCTTGCACCCCTCACTCTGGCCTC AGCCGACTGCACAGCGGCCCCTGCATCCCCTTGGCTGTGAG GCCCCTGGACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGG CCCTGGGGTCCCACGAATTTGCTGGGGAATCTCGTTTTTCT TCTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTGACTCCCGAACATCAC CGACGCGTCTCCTGTTTTTCTGGGTGGCCTCGGGACACCTG CCCTGCCCCCACGAGGGTCAGGACTGTGACTCTTTTTAGGG CCAGGCAGGTGCCTGGACATTTGCCTTGCTGGACGGGGACT GGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAGGAATCATGTCAGGC CTGTGTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCACCCTCCACCTCTT CACCCCCCACTCACCAGTGTCCCCTCCACTGTCACATTGTA ACTGAACTTCAGGATAATAAAGTGTTTGCCTCCATGGTCTT TGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCA TCTAGA	10
3UTR-007	Colla2；コラーゲン、Ｉ型、α２	ACTCAATCTAAATTAAAAAAGAAAGAAATTTGAAAAAACTT TCTCTTTGCCATTTCTTCTTCTTCTTTTTTAACTGAAAGCT GAATCCTTCCATTTCTTCTGCACATCTACTTGCTTAAATTG TGGGCAAAAGAGAAAAAGAAGGATTGATCAGAGCATTGTGC AATACAGTTTCATTAACTCCTTCCCCCGCTCCCCCAAAAAT TTGAATTTTTTTTTCAACACTCTTACACCTGTTATGGAAAA TGTCAACCTTTGTAAGAAAACCAAAATAAAAATTGAAAAAT AAAAACCATAAACATTTGCACCACTTGTGGCTTTTGAATAT CTTCCACAGAGGGAAGTTTAAAACCCAAACTTCCAAAGGTT TAAACTACCTCAAAACACTTTCCCATGAGTGTGATCCACAT TGTTAGGTGCTGACCTAGACAGAGATGAACTGAGGTCCTTG TTTTGTTTTGTTCATAATACAAAGGTGCTAATTAATAGTAT TTCAGATACTTGAAGAATGTTGATGGTGCTAGAAGAATTTG AGAAGAAATACTCCTGTATTGAGTTGTATCGTGTGGTGTAT TTTTTAAAAAATTTGATTTAGCATTCATATTTTCCATCTTA TTCCCAATTAAAAGTATGCAGATTATTTGCCCAAATCTTCT TCAGATTCAGCATTTGTTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCT TCTTCCATGGTTCCACAGAAGCTTTGTTTCTTGGGCAAGCA GAAAAATTAAATTGTACCTATTTTGTATATGTGAGATGTTT AAATAAATTGTGAAAAAAATGAAATAAAGCATGTTTGGTTT TCCAAAAGAACATAT	11
3UTR-008		CGCCGCCGCCCGGGCCCCGCAGTCGAGGGTCGTGAGCCCAC	12

【表０００３－３】

	Col6a2;コラーゲン、VI型、α2	CCCGTCCATGGTGCTAAGCGGGCCCGGGTCCCACACGGCCA GCACCGCTGCTCACTCGGACGACGCCCTGGGCCTGCACCTC TCCAGCTCCTCCCACGGGGTCCCCGTAGCCCCGGCCCCCGC CCAGCCCCAGGTCTCCCCAGGCCCTCCGCAGGCTGCCCGGC CTCCCTCCCCCTGCAGCCATCCCAAGGCTCCTGACCTACCT GGCCCCTGAGCTCTGGAGCAAGCCCTGACCCAATAAAGGCT TTGAACCCAT	
3UTR-009	RPN1;リボホリンI	GGGGCTAGAGCCCTCTCCGCACAGCGTGGAGACGGGGCAAG GAGGGGGGTTATTAGGATTGGTGGTTTTGTTTTGCTTTGTT TAAAGCCGTGGGAAAATGGCACAACTTTACCTCTGTGGGAG ATGCAACACTGAGAGCCAAGGGGTGGGAGTTGGGATAATTT TTATATAAAAGAAGTTTTTCCACTTTGAATTGCTAAAAGTG GCATTTTTCCTATGTGCAGTCACTCCTCTCATTTCTAAAAT AGGGACGTGGCCAGGCACGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCA GCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCGGCTCACGAGGTCAGGA GATCGAGACTATCCTGGCTAACACGGTAAAACCCTGTCTCT ACTAAAAGTACAAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGTGGGCAC CTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAAGG CATGAATCCAAGAGGCAGAGCTTGCAGTGAGCTGAGATCAC GCCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGTGTTAAGACTCTGT CTCAAATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAAT AAAAATAAAGCGAGATGTTGCCCTCAAA	13
3UTR-010	LRP1;低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1	GGCCCTGCCCCGTCGGACTGCCCCCAGAAAGCCTCCTGCCC CCTGCCAGTGAAGTCCTTCAGTGAGCCCCTCCCCAGCCAGC CCTTCCCTGGCCCCGCCGGATGTATAAATGTAAAAATGAAG GAATTACATTTTATATGTGAGCGAGCAAGCCGGCAAGCGAG CACAGTATTATTTCTCCATCCCCTCCCTGCCTGCTCCTTGG CACCCCCATGCTGCCTTCAGGGAGACAGGCAGGGAGGGCTT GGGGCTGCACCTCCTACCCTCCCACCAGAACGCACCCCACT GGGAGAGCTGGTGGTGCAGCCTTCCCCTCCCTGTATAAGAC ACTTTGCCAAGGCTCTCCCCTCTCGCCCCATCCCTGCTTGC CCGCTCCCACAGCTTCCTGAGGGCTAATTCTGGGAAGGGAG AGTTCTTTGCTGCCCCTGTCTGGAAGACGTGGCTCTGGGTG AGGTAGGCGGGAAAGGATGGAGTGTTTTAGTTCTTGGGGGA GGCCACCCCAAACCCCAGCCCCAACTCCAGGGGCACCTATG AGATGGCCATGCTCAACCCCCCTCCCAGACAGGCCCTCCCT GTCTCCAGGGCCCCCACCGAGGTTCCCAGGGCTGGAGACTT CCTCTGGTAAACATTCCTCCAGCCTCCCCTCCCCTGGGGAC GCCAAGGAGGTGGGCCACACCCAGGAAGGGAAAGCGGGCAG CCCCGTTTTGGGGACGTGAACGTTTTAATAATTTTTGCTGA ATTCCTTTACAACTAAATAACACAGATATTGTTATAAATAA AATTGT	14
3UTR-011	Nnt1;カルジオトロフィン様サイトカ	ATATTAAGGATCAAGCTGTTAGCTAATAATGCCACCTCTGC AGTTTTGGGAACAGGCAAATAAAGTATCAGTATACATGGTG ATGTACATCTGTAGCAAAGCTCTTGGAGAAAATGAAGACTG AAGAAAGCAAAGCAAAAACTGTATAGAGAGATTTTTCAAAA GCAGTAATCCCTCAATTTTAAAAAAGGATTGAAAATTCTAA	15

【表０００３－４】

	イン因子１	ATGTCTTTCTGTGCATATTTTTTGTGTTAGGAATCAAAAGT ATTTTATAAAAGGAGAAAGAACAGCCTCATTTTAGATGTAG TCCTGTTGGATTTTTTATGCCTCCTCAGTAACCAGAAATGT TTTAAAAAACTAAGTGTTTAGGATTTCAAGACAACATTATA CATGGCTCTGAAATATCTGACACAATGTAAACATTGCAGGC ACCTGCATTTTATGTTTTTTTTTTCAACAAATGTGACTAAT TTGAAACTTTTATGAACTTCTGAGCTGTCCCCTTGCAATTC AACCGCAGTTTGAATTAATCATATCAAATCAGTTTTAATTT TTTAAATTGTACTTCAGAGTCTATATTTCAAGGGCACATTT TCTCACTACTATTTTAATACATTAAAGGACTAAATAATCTT TCAGAGATGCTGGAAACAAATCATTTGCTTTATATGTTTCA TTAGAATACCAATGAAACATACAACTTGAAAATTAGTAATA GTATTTTTGAAGATCCCATTTCTAATTGGAGATCTCTTTAA TTTCGATCAACTTATAATGTGTAGTACTATATTAAGTGCAC TTGAGTGGAATTCAACATTTGACTAATAAAATGAGTTCATC ATGTTGGCAAGTGATGTGGCAATTATCTCTGGTGACAAAAG AGTAAAATCAAATATTTCTGCCTGTTACAAATATCAAGGAA GACCTGCTACTATGAAATAGATGACATTAATCTGTCTTCAC TGTTTATAATACGGATGGATTTTTTTTCAAATCAGTGTGTG TTTTGAGGTCTTATGTAATTGATGACATTTGAGAGAAATGG TGGCTTTTTTTAGCTACCTCTTTGTTCATTTAAGCACCAGT AAAGATCATGTCTTTTTATAGAAGTGTAGATTTTCTTTGTG ACTTTGCTATCGTGCCTAAAGCTCTAAATATAGGTGAATGT GTGATGAATACTCAGATTATTTGTCTCTCTATATAATTAGT TTGGTACTAAGTTTCTCAAAAAATTATTAACACATGAAAGA CAATCTCTAAACCAGAAAAAGAAGTAGTACAAATTTTGTTA CTGTAATGCTCGCGTTTAGTGAGTTTAAAACACACAGTATC TTTTGGTTTTATAATCAGTTTCTATTTTGCTGTGCCTGAGA TTAAGATCTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGTTTGT GTGTTAAAGCAGAAAAGACTTTTTTAAAAGTTTTAAGTGAT AAATGCAATTTGTTAATTGATCTTAGATCACTAGTAAACTC AGGGCTGAATTATACCATGTATATTCTATTAGAAGAAAGTA AACACCATCTTTATTCCTGCCCTTTTTCTTCTCTCAAAGTA GTTGTAGTTATATCTAGAAAGAAGCAATTTTGATTTCTTGA AAAGGTAGTTCCTGCACTCAGTTTAAACTAAAAATAATCAT ACTTGGATTTTATTTATTTTTGTCATAGTAAAAATTTTAAT TTATATATATTTTTATTTAGTATTATCTTATTCTTTGCTAT TTGCCAATCCTTTGTCATCAATTGTGTTAAATGAATTGAAA ATTCATGCCCTGTTCATTTTATTTTACTTTATTGGTTAGGA TATTTAAAGGATTTTTGTATATATAATTTCTTAAATTAATA TTCCAAAAGGTTAGTGGACTTAGATTATAAATTATGGCAAA AATCTAAAAACAACAAAAATGATTTTTATACATTCTATTTC ATTATTCCTCTTTTTCCAATAAGTCATACAATTGGTAGATA TGACTTATTTTATTTTTGTATTATTCACTATATCTTTATGA TATTTAAGTATAAATAATTAAAAAAATTTATTGTACCTTAT AGTCTGTCACCAAAAAAAAAAAATTATCTGTAGGTAGTGAA ATGCTAATGTTGATTTGTCTTTAAGGGCTTGTTAACTATCC	

【表０００３－５】

		TTTATTTTCTCATTTGTCTTAAATTAGGAGTTTGTGTTTAA ATTACTCATCTAAGCAAAAAATGTATATAAATCCCATTACT GGGTATATACCCAAAGGATTATAAATCATGCTGCTATAAAG ACACATGCACACGTATGTTTATTGCAGCACTATTCACAATA GCAAAGACTTGGAACCAACCCAAATGTCCATCAATGATAGA CTTGATTAAGAAAATGTGCACATATACACCATGGAATACTA TGCAGCCATAAAAAAGGATGAGTTCATGTCCTTTGTAGGGA CATGGATAAAGCTGGAAACCATCATTCTGAGCAAACTATTG CAAGGACAGAAAACCAAACACTGCATGTTCTCACTCATAGG TGGGAATTGAACAATGAGAACACTTGGACACAAGGTGGGGA ACACCACACACCAGGGCCTGTCATGGGGTGGGGGGAGTGGG GAGGGATAGCATTAGGAGATATACCTAATGTAAATGATGAG TTAATGGGTGCAGCACACCAACATGGCACATGTATACATAT GTAGCAAACCTGCACGTTGTGCACATGTACCCTAGAACTTA AAGTATAATTAAAAAAAAAAAGAAAACAGAAGCTATTTATA AAGAAGTTATTTGCTGAAATAAATGTGATCTTTCCCATTAA AAAAATAAAGAAATTTTGGGGTAAAAAAACACAATATATTG TATTCTTGAAAAATTCTAAGAGAGTGGATGTGAAGTGTTCT CACCACAAAAGTGATAACTAATTGAGGTAATGCACATATTA ATTAGAAAGATTTTGTCATTCCACAATGTATATATACTTAA AAATATGTTATACACAATAAATACATACATTAAAAAATAAG TAAATGTA	
3UTR-012	Col6a1；コラーゲン、VI型、α1	CCCACCCTGCACGCCGGCACCAAACCCTGTCCTCCCACCCC TCCCCACTCATCACTAAACAGAGTAAAATGTGATGCGAATT TTCCCGACCAACCTGATTCGCTAGATTTTTTTTAAGGAAAA GCTTGGAAAGCCAGGACACAACGCTGCTGCCTGCTTTGTGC AGGGTCCTCCGGGGCTCAGCCCTGAGTTGGCATCACCTGCG CAGGGCCCTCTGGGGCTCAGCCCTGAGCTAGTGTCACCTGC ACAGGGCCCTCTGAGGCTCAGCCCTGAGCTGGCGTCACCTG TGCAGGGCCCTCTGGGGCTCAGCCCTGAGCTGGCCTCACCT GGGTTCCCCACCCCGGGCTCTCCTGCCCTGCCCTCCTGCCC GCCCTCCCTCCTGCCTGCGCAGCTCCTTCCCTAGGCACCTC TGTGCTGCATCCCACCAGCCTGAGCAAGACGCCCTCTCGGG GCCTGTGCCGCACTAGCCTCCCTCTCCTCTGTCCCCATAGC TGGTTTTTCCCACCAATCCTCACCTAACAGTTACTTTACAA TTAAACTCAAAGCAAGCTCTTCTCCTCAGCTTGGGGCAGCC ATTGGCCTCTGTCTCGTTTTGGGAAACCAAGGTCAGGAGGC CGTTGCAGACATAAATCTCGGCGACTCGGCCCCGTCTCCTG AGGGTCCTGCTGGTGACCGGCCTGGACCTTGGCCCTACAGC CCTGGAGGCCGCTGCTGACCAGCACTGACCCCGACCTCAGA GAGTACTCGCAGGGGCGCTGGCTGCACTCAAGACCCTCGAG ATTAACGGTGCTAACCCCGTCTGCTCCTCCCTCCCGCAGAG ACTGGGGCCTGGACTGGACATGAGAGCCCCTTGGTGCCACA GAGGGCTGTGTCTTACTAGAAACAACGCAAACCTCTCCTTC CTCAGAATAGTGATGTGTTCGACGTTTTATCAAAGGCCCCC TTTCTATGTTCATGTTAGTTTTGCTCCTTCTGTGTTTTTTT CTGAACCATATCCATGTTGCTGACTTTTCCAAATAAAGGTT	16

【表０００３－６】

		TTCACTCCTCTC	
3UTR-013	Calr;カルレティキュリン	AGAGGCCTGCCTCCAGGGCTGGACTGAGGCCTGAGCGCTCC TGCCGCAGAGCTGGCCGCGCCAAATAATGTCTCTGTGAGAC TCGAGAACTTTCATTTTTTTCCAGGCTGGTTCGGATTTGGG GTGGATTTTGGTTTTGTTCCCCTCCTCCACTCTCCCCCACC CCCTCCCCGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACTGGTATT TTATCTTTGATTCTCCTTCAGCCCTCACCCCTGGTTCTCAT CTTTCTTGATCAACATCTTTTCTTGCCTCTGTCCCCTTCTC TCATCTCTTAGCTCCCCTCCAACCTGGGGGGCAGTGGTGTG GAGAAGCCACAGGCCTGAGATTTCATCTGCTCTCCTTCCTG GAGCCCAGAGGAGGGCAGCAGAAGGGGGTGGTGTCTCCAAC CCCCCAGCACTGAGGAAGAACGGGGCTCTTCTCATTTCACC CCTCCCTTTCTCCCCTGCCCCCAGGACTGGGCCACTTCTGG GTGGGGCAGTGGGTCCCAGATTGGCTCACACTGAGAATGTA AGAACTACAAACAAAATTTCTATTAAATTAAATTTTGTGTC TCC	17
3UTR-014	Collal;コラーゲン、Ｉ型、α１	CTCCCTCCATCCCAACCTGGCTCCCTCCCACCCAACCAACT TTCCCCCCAACCCGGAAACAGACAAGCAACCCAAACTGAAC CCCCTCAAAAGCCAAAAAATGGGAGACAATTTCACATGGAC TTTGGAAAATATTTTTTTCCTTTGCATTCATCTCTCAAACT TAGTTTTTATCTTTGACCAACCGAACATGACCAAAAACCAA AAGTGCATTCAACCTTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAA TAAATAAATAACTTTTTAAAAAAGGAAGCTTGGTCCACTTG CTTGAAGACCCATGCGGGGGTAAGTCCCTTTCTGCCCGTTG GGCTTATGAAACCCCAATGCTGCCCTTTCTGCTCCTTTCTC CACACCCCCCTTGGGGCCTCCCCTCCACTCCTTCCCAAATC TGTCTCCCCAGAAGACACAGGAAACAATGTATTGTCTGCCC AGCAATCAAAGGCAATGCTCAAACACCCAAGTGGCCCCCAC CCTCAGCCCGCTCCTGCCCGCCCAGCACCCCCAGGCCCTGG GGGACCTGGGGTTCTCAGACTGCCAAAGAAGCCTTGCCATC TGGCGCTCCCATGGCTCTTGCAACATCTCCCCTTCGTTTTT GAGGGGGTCATGCCGGGGGAGCCACCAGCCCCTCACTGGGT TCGGAGGAGAGTCAGGAAGGGCCACGACAAAGCAGAAACAT CGGATTTGGGGAACGCGTGTCAATCCCTTGTGCCGCAGGGC TGGGCGGGAGAGACTGTTCTGTTCCTTGTGTAACTGTGTTG CTGAAAGACTACCTCGTTCTTGTCTTGATGTGTCACCGGGG CAACTGCCTGGGGGCGGGGATGGGGGCAGGGTGGAAGCGGC TCCCCATTTTATACCAAAGGTGCTACATCTATGTGATGGGT GGGGTGGGGAGGGAATCACTGGTGCTATAGAAATTGAGATG CCCCCCCAGGCCAGCAAATGTTCCTTTTTGTTCAAAGTCTA TTTTTATTCCTTGATATTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GTGGATGGGGACTTGTGAATTTTTCTAAAGGTGCTATTTAA CATGGGAGGAGAGCGTGTGCGGCTCCAGCCCAGCCCGCTGC TCACTTTCCACCCTCTCTCCACCTGCCTCTGGCTTCTCAGG CCTCTGCTCTCCGACCTCTCTCCTCTGAAACCCTCCTCCAC AGCTGCAGCCCATCCTCCCGGCTCCCTCCTAGTCTGTCCTG CGTCCTCTGTCCCCGGGTTTCAGAGACAACTTCCCAAAGCA	18

【表０００３－７】

		CAAAGCAGTTTTTCCCCCTAGGGGTGGGAGGAAGCAAAAGA CTCTGTACCTATTTTGTATGTGTATAATAATTTGAGATGTT TTTAATTATTTTGATTGCTGGAATAAAGCATGTGGAAATGA CCCAAACATAATCCGCAGTGGCCTCCTAATTTCCTTCTTTG GAGTTGGGGGAGGGGTAGACATGGGGAAGGGGCTTTGGGGT GATGGGCTTGCCTTCCATTCCTGCCCTTTCCCTCCCCACTA TTCTCTTCTAGATCCCTCCATAACCCCACTCCCCTTTCTCT CACCCTTCTTATACCGCAAACCTTTCTACTTCCTCTTTCAT TTTCTATTCTTGCAATTTCCTTGCACCTTTTCCAAATCCTC TTCTCCCCTGCAATACCATACAGGCAATCCACGTGCACAAC ACACACACACACTCTTCACATCTGGGGTTGTCCAAACCTCA TACCCACTCCCCTTCAAGCCCATCCACTCTCCACCCCCTGG ATGCCCTGCACTTGGTGGCGGTGGGATGCTCATGGATACTG GGAGGGTGAGGGGAGTGGAACCCGTGAGGAGGACCTGGGGG CCTCTCCTTGAACTGACATGAAGGGTCATCTGGCCTCTGCT CCCTTCTCACCCACGCTGACCTCCTGCCGAAGGAGCAACGC AACAGGAGAGGGGTCTGCTGAGCCTGGCGAGGGTCTGGGAG GGACCAGGAGGAAGGCGTGCTCCCTGCTCGCTGTCCTGGCC CTGGGGGAGTGAGGGAGACAGACACCTGGGAGAGCTGTGGG GAAGGCACTCGCACCGTGCTCTTGGGAAGGAAGGAGACCTG GCCCTGCTCACCACGGACTGGGTGCCTCGACCTCCTGAATC CCCAGAACACAACCCCCCTGGGCTGGGGTGGTCTGGGGAAC CATCGTGCCCCCGCCTCCCGCCTACTCCTTTTTAAGCTT	
3UTR-015	Plod1;プロコラーゲン-リジン、2-オキソグルタル酸5-ジオキシゲナーゼ1	TTGGCCAGGCCTGACCCTCTTGGACCTTTCTTCTTTGCCGA CAACCACTGCCCAGCAGCCTCTGGGACCTCGGGGTCCCAGG GAACCCAGTCCAGCCTCCTGGCTGTTGACTTCCCATTGCTC TTGGAGCCACCAATCAAAGAGATTCAAAGAGATTCCTGCAG GCCAGAGGCGGAACACACCTTTATGGCTGGGGCTCTCCGTG GTGTTCTGGACCCAGCCCCTGGAGACACCATTCACTTTTAC TGCTTTGTAGTGACTCGTGCTCTCCAACCTGTCTTCCTGAA AAACCAAGGCCCCCTTCCCCCACCTCTTCCATGGGGTGAGA CTTGAGCAGAACAGGGGCTTCCCCAAGTTGCCCAGAAAGAC TGTCTGGGTGAGAAGCCATGGCCAGAGCTTCTCCCAGGCAC AGGTGTTGCACCAGGGACTTCTGCTTCAAGTTTTGGGGTAA AGACACCTGGATCAGACTCCAAGGGCTGCCCTGAGTCTGGG ACTTCTGCCTCCATGGCTGGTCATGAGAGCAAACCGTAGTC CCCTGGAGACAGCGACTCCAGAGAACCTCTTGGGAGACAGA AGAGGCATCTGTGCACAGCTCGATCTTCTACTTGCCTGTGG GGAGGGGAGTGACAGGTCCACACACCACACTGGGTCACCCT GTCCTGGATGCCTCTGAAGAGAGGGACAGACCGTCAGAAAC TGGAGAGTTTCTATTAAAGGTCATTTAAACCA	19
3UTR-016	Nucb1;ヌクレオバインディン1	TCCTCCGGGACCCCAGCCCTCAGGATTCCTGATGCTCCAAG GCGACTGATGGGCGCTGGATGAAGTGGCACAGTCAGCTTCC CTGGGGGCTGGTGTCATGTTGGGCTCCTGGGGCGGGGGCAC GGCCTGGCATTTCACGCATTGCTGCCACCCCAGGTCCACCT GTCTCCACTTTCACAGCCTCCAAGTCTGTGGCTCTTCCCTT CTGTCCTCCGAGGGGCTTGCCTTCTCTCGTGTCCAGTGAGG	20

【表０００３－８】

		TGCTCAGTGATCGGCTTAACTTAGAGAAGCCCGCCCCCTCC CCTTCTCCGTCTGTCCCAAGAGGGTCTGCTCTGAGCCTGCG TTCCTAGGTGGCTCGGCCTCAGCTGCCTGGGTTGTGGCCGC CCTAGCATCCTGTATGCCCACAGCTACTGGAATCCCCGCTG CTGCTCCGGGCCAAGCTTCTGGTTGATTAATGAGGGCATGG GGTGGTCCCTCAAGACCTTCCCCTACCTTTTGTGGAACCAG TGATGCCTCAAAGACAGTGTCCCCTCCACAGCTGGGTGCCA GGGGCAGGGGATCCTCAGTATAGCCGGTGAACCCTGATACC AGGAGCCTGGGCCTCCCTGAACCCCTGGCTTCCAGCCATCT CATCGCCAGCCTCCTCCTGGACCTCTTGGCCCCCAGCCCCT TCCCCACACAGCCCCAGAAGGGTCCCAGAGCTGACCCCACT CCAGGACCTAGGCCCAGCCCCTCAGCCTCATCTGGAGCCCC TGAAGACCAGTCCCACCCACCTTTCTGGCCTCATCTGACAC TGCTCCGCATCCTGCTGTGTGTCCTGTTCCATGTTCCGGTT CCATCCAAATACACTTTCTGGAACAAA	
3UTR-017	α－グロビン	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTC CCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC	21

【０１８１】

先の表に列記されるものは例であり、任意の遺伝子由来の任意のＵＴＲが一次構築物のそれぞれの第１または第２の隣接領域に組み込まれ得ることを理解されたい。さらに、任意の既知の遺伝子の複数の野生型ＵＴＲが利用され得る。野生型遺伝子の変異形ではない人工ＵＴＲを提供することも本発明の範囲内である。これらのＵＴＲもしくはその部分は、それらが選択され得る転写物のＵＴＲもしくはその部分と同一の配向で配置され得るか、または配向もしくは位置を変更し得る。したがって、５’または３’ＵＴＲは、反転し、短縮され、延長され、１つ以上の他の５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲでキメラにされ得る。本明細書で使用する「変更される」という用語は、ＵＴＲ配列に関するとき、ＵＴＲが参照配列との関連である点において変化したことを意味する。例えば、３’または５’ＵＴＲは、上で教示される配向もしくは位置の変化によって野生型または天然ＵＴＲに対して変更され得るか、またはさらなるヌクレオチドの包含、ヌクレオチドの欠失、ヌクレオチドの交換もしくは転置によって変更され得る。「変更された」ＵＴＲ（３’または５’にかかわらず）をもたらすこれらの変化のうちのいずれかは、変異形ＵＴＲを含む。

【０１８２】

一実施形態において、５’または３’ＵＴＲ等の二重、三重、または四重ＵＴＲが用いられ得る。本明細書で使用するとき、「二重」ＵＴＲは、同一のＵＴＲの２つのコピーが連続して、または実質的に連続してのいずれかでコードされるものである。例えば、内容が参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２０１００１２９８７７号に記載の二重β－グロビン３’ＵＴＲが用いられ得る。

【０１８３】

パターン化されたＵＴＲを有することも本発明の範囲内である。本明細書で使用するとき、「パターン化されたＵＴＲ」は、１回、２回、または３回以上繰り返された繰り返しまたは交互のパターン、例えば、ＡＢＡＢＡＢもしくはＡＡＢＢＡＡＢＢＡＡＢＢもしくはＡＢＣＡＢＣＡＢＣまたはその変異形を示すＵＴＲである。これらのパターンにおいて、各文字、Ａ、Ｂ、またはＣは、ヌクレオチドレベルでの異なるＵＴＲを表す。

【０１８４】

一実施形態において、隣接領域は、そのタンパク質が共通の機能、構造、特性特徴を共有する転写物のファミリーから選択される。例えば、目的とするポリペプチドは、特定の細胞、組織で発現するか、または発生中のある時点で発現するタンパク質のファミリーに

属し得る。これらの遺伝子のうちのいずれのＵＴＲも、同一または異なるタンパク質ファミリーの任意の他のＵＴＲと交換されて、新たなキメラ一次転写物を作成し得る。本明細書で使用するとき、「タンパク質のファミリー」は、最も広い意味において、少なくとも１つの機能、構造、特徴、局在化、起源、または発現パターンを共有する２個以上の目的とするポリペプチドの群を指すために用いられる。

【０１８５】

最適化後（所望の場合）、一次構築物成分は、プラスミド、ウイルス、コスミド、および人工染色体等であるが、これらに限定されないベクターに再構築および変換され得る。例えば、最適化された構築物は、化学的にコンピテントな大腸菌、酵母、アカパンカビ、トウモロコシ、ショウジョウバエ等に再構築および変換され得、高コピー数のプラスミド様または染色体構造は、本明細書に記載の方法によって生じる。

【０１８６】

非翻訳領域は、翻訳エンハンサー要素（ＴＥＥ）も含み得る。非限定的な例として、ＴＥＥには、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願第２００９０２２６４７０号に記載のＴＥＥ、および当技術分野で既知のＴＥＥが含まれ得る。

【０１８７】

終止コドン

一実施形態において、本発明の一次構築物は、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）の前に少なくとも２つの終止コドンを含み得る。終止コドンは、ＴＧＡ、ＴＡＡ、およびＴＡＧから選択され得る。一実施形態において、本発明の一次構築物は、終止コドンＴＧＡおよびもう１つの終止コドンを含む。さらなる実施形態において、もう１つの終止コドンは、ＴＡＡであり得る。別の実施形態において、本発明の一次構築物は、３つの終止コドンを含む。

【０１８８】

ベクター増幅

一次構築物を含有するベクターは、その後、増幅され、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＨｉＰｕｒｅ　Ｍａｘｉｐｒｅｐキット（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いたマキシプレップ等であるが、これらに限定されない当技術分野で既知の方法を用いてプラスミドが単離および精製される。

【０１８９】

プラスミド線形化

プラスミドは、その後、制限酵素および緩衝液の使用等であるが、これらに限定されない当技術分野で既知の方法を用いて線形化され得る。線形化反応物は、例えば、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＰＣＲ　Ｍｉｃｒｏキット（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、ならびに強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、および疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）等であるが、これらに限定されないＨＰＬＣに基づく精製方法、ならびにＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎの標準ＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＰＣＲキット（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を含む方法を用いて精製され得る。精製方法は、もたらされた線形化反応物の大きさに応じて修正され得る。その後、線形化されたプラスミドを用いて、インビトロ転写（ＩＶＴ）反応のためのｃＤＮＡを生成する。

【０１９０】

ｃＤＮＡ鋳型合成

ｃＤＮＡ鋳型は、線形化されたプラスミドにポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を経させることによって合成され得る。表４は、本発明のＰＣＲ反応において有用であり得るプライマーおよびプローブの一覧である。この一覧が網羅的ではなく、任意の増幅のためのプライマー－プローブ設計が当技術分野の技術の範囲内であることを理解されたい。プローブは、標的分子に対する塩基対合忠実性および塩基対合強度を高めるように化学的に修飾された塩基も含有し得る。そのような修飾には、５－メチル－シチジン、２、６－ジ－アミノ－プリン、２’－フルオロ、ホスホロ－チオエート、またはロックド核酸が含まれ得る。

表４．プライマーおよびプローブ
【表０００４】

プライマー/プローブ識別名	配列(5’-3’)	ハイブリダイゼーション標的	配列番号
UFP	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG	cDNA 鋳型	22
URP	T_{x160}CTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA	cDNA 鋳型	23
GBA1	CCTTGACCTTCTGGAACTTC	酸性グルコセレブロシダーゼ	24
GBA2	CCAAGCACTGAAACGGATAT	酸性グルコセレブロシダーゼ	25
LUC1	GATGAAAAGTGCTCCAAGGA	ルシフェラーゼ	26
LUC2	AACCGTGATGAAAAGGTACC	ルシフェラーゼ	27
LUC3	TCATGCAGATTGGAAAGGTC	ルシフェラーゼ	28
GCSF1	CTTCTTGGACTGTCCAGAGG	G-CSF	29
GCSF2	GCAGTCCCTGATACAAGAAC	G-CSF	30
GCSF3	GATTGAAGGTGGCTCGCTAC	G-CSF	31

＊ＵＦＰはユニバーサル順方向プライマーであり、ＵＲＰはユニバーサル逆方向プライマーである。
【０１９１】
一実施形態において、ｃＤＮＡは、転写を経る前に配列決定分析のために提出され得る。
【０１９２】
ｍＲＮＡ産生
ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ産生のプロセスは、インビトロ転写、ｃＤＮＡ鋳型除去およびＲＮＡ浄化、ならびにｍＲＮＡキャッピングおよび／またはテーリング反応を含み得るが、これらに限定されない。
【０１９３】
インビトロ転写
先のステップで産生されたｃＤＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）系を用いて転写され得る。この系は、典型的には、転写緩衝液、ヌクレオチドトリホスフェート（ＮＴＰ）、ＲＮａｓｅ阻害剤、およびポリメラーゼを含む。ＮＴＰは、自家で製造され得るか、供給業者から選択され得るか、または本明細書に記載されるように合成され得る。ＮＴＰは、天然および非天然（修飾された）ＮＴＰを含む本明細書に記載のＮＴＰから選択され得るが、これらに限定されない。ポリメラーゼは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３　ＲＮＡポリメラーゼ、および修飾された核酸を組み込むことができるポリメラーゼ等であるが、これらに限定されない変異体ポリメラーゼから選択され得るが、これらに限定されない。
【０１９４】
ＲＮＡポリメラーゼ
任意の数のＲＮＡポリメラーゼまたは変異形が本発明の一次構築物の設計において用いられ得る。

【０１９５】
ＲＮＡポリメラーゼは、ＲＮＡポリメラーゼ配列のアミノ酸を挿入するか、または欠失させることによって修飾され得る。非限定的な例として、ＲＮＡポリメラーゼは、未修飾ＲＮＡポリメラーゼと比較して、２’－修飾ヌクレオチドトリホスフェートを組み込む能力の向上を示すように修飾され得る（参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００８０７８１８０号および米国特許第８，１０１，３８５号を参照のこと）。
【０１９６】
変異形は、ＲＮＡポリメラーゼを進化させ、ＲＮＡポリメラーゼアミノ酸および／または核酸配列を最適化し、かつ／または当技術分野で既知の他の方法を用いることによって得られ得る。非限定的な例として、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ変異形は、Ｅｓｖｅｌｔら（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｎａｔｕｒｅ（２０１１）４７２（７３４４）：４９９－５０３）によって立案された連続指向進化システムを用いて進化させられ得、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼのクローンは、９３位のリジンがトレオニンで置換された変異（Ｋ９３Ｔ）、Ｉ４Ｍ、Ａ７Ｔ、Ｅ６３Ｖ、Ｖ６４Ｄ、Ａ６５Ｅ、Ｄ６６Ｙ、Ｔ７６Ｎ、Ｃ１２５Ｒ、Ｓ１２８Ｒ、Ａ１３６Ｔ、Ｎ１６５Ｓ、Ｇ１７５Ｒ、Ｈ１７６Ｌ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８２Ｌ、Ｌ１９６Ｆ、Ｇ１９８Ｖ、Ｄ２０８Ｙ、Ｅ２２２Ｋ、Ｓ２２８Ａ、Ｑ２３９Ｒ、Ｔ２４３Ｎ、Ｇ２５９Ｄ、Ｍ２６７Ｉ、Ｇ２８０Ｃ、Ｈ３００Ｒ、Ｄ３５１Ａ、Ａ３５４Ｓ、Ｅ３５６Ｄ、Ｌ３６０Ｐ、Ａ３８３Ｖ、Ｙ３８５Ｃ、Ｄ３８８Ｙ、Ｓ３９７Ｒ、Ｍ４０１Ｔ、Ｎ４１０Ｓ、Ｋ４５０Ｒ、Ｐ４５１Ｔ、Ｇ４５２Ｖ、Ｅ４８４Ａ、Ｈ５２３Ｌ、Ｈ５２４Ｎ、Ｇ５４２Ｖ、Ｅ５６５Ｋ、Ｋ５７７Ｅ、Ｋ５７７Ｍ、Ｎ６０１Ｓ、Ｓ６８４Ｙ、Ｌ６９９Ｉ、Ｋ７１３Ｅ、Ｎ７４８Ｄ、Ｑ７５４Ｒ、Ｅ７７５Ｋ、Ａ８２７Ｖ、Ｄ８５１Ｎ、またはＬ８６４Ｆ等であるが、これらに限定されない少なくとも１つの変異をコードし得る。別の非限定的な例として、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ変異形は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２０１００１２００２４号および同第２００７０１１７１１２号に記載の少なくとも１つの変異をコードし得る。ＲＮＡポリメラーゼの変異形には、置換変異形、保存アミノ酸置換、挿入変異形、欠失変異形、および／または共有結合誘導体も含まれ得るが、これらに限定されない。
【０１９７】
一実施形態において、一次構築物は、野生型または変異形ＲＮＡポリメラーゼによって認識されるように設計され得る。そうすることで、一次構築物は、野生型または親一次構築物由来の配列変化部位または領域を含有するように修飾され得る。
【０１９８】
一実施形態において、一次構築物は、５’ＵＴＲ内、５’ＵＴＲの前、および／または５’ＵＴＲの後に、少なくとも１つの置換および／または挿入を、一次構築物のＲＮＡポリメラーゼ結合または認識部位の上流、ＲＮＡポリメラーゼ結合または認識部位の下流、ＴＡＴＡボックス配列の上流、ＴＡＴＡボックス配列の下流であるが、一次構築物のコーディング領域の上流に含むように設計され得る。
【０１９９】
一実施形態において、一次構築物の５’ＵＴＲは、同一の塩基のヌクレオチドの少なくとも１つの領域および／またはストリングの挿入によって置換され得る。ヌクレオチドの領域および／またはストリングは、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、または少なくとも８個のヌクレオチドを含み得るが、これらに限定されず、このヌクレオチドは、天然および／または非天然であり得る。非限定的な例として、このヌクレオチド基は、５～８個のアデニン、シトシン、チミン、本明細書に開示の他のヌクレオチドのうちのいずれかのストリング、および／またはこれらの組み合わせを含み得る。
【０２００】
一実施形態において、一次構築物の５’ＵＴＲは、アデニン、シトシン、チミン、本明細書に開示の他のヌクレオチドのうちのいずれか、および／またはこれらの組み合わせ等

であるが、これらに限定されない２つの異なる塩基のヌクレオチドの少なくとも２つの領域および／またはストリングの挿入によって置換され得る。例えば、５’ＵＴＲは、５～８個のアデニン塩基を挿入し、その後、５～８個のシトシン塩基を挿入することによって置換され得る。別の例において、５’ＵＴＲは、５～８個のシトシン塩基を挿入し、その後、５～８個のアデニン塩基を挿入することによって置換され得る。

【０２０１】

一実施形態において、一次構築物は、ＲＮＡポリメラーゼによって認識され得る転写開始部位の下流に少なくとも１つの置換および／または挿入を含み得る。非限定的な例として、少なくとも１つの置換および／または挿入は、転写開始部位のすぐ下流（＋１～＋６等であるが、これらに限定されない）の領域内の少なくとも１個の核酸を置換することによって転写開始部位の下流で生じ得る。転写開始部位のすぐ下流のヌクレオチド領域を変化させることにより、開始速度に影響を及ぼし、見かけ上のヌクレオチドトリホスフェート（ＮＴＰ）反応一定値を増加させ、かつ初期転写物を硬化させることによる転写複合体からの短い転写物の解離を高め得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｂｒｉｅｂａ　ｅｔ　ａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（２００２）４１：５１４４－５１４９）。少なくとも１個の核酸の修飾、置換、および／または挿入は、核酸配列のサイレント変異を引き起こし得るか、またはアミノ酸配列における変異を引き起こし得る。

【０２０２】

一実施形態において、一次構築物は、転写開始部位の下流で、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、または少なくとも１３個のグアニン塩基の置換を含み得る。

【０２０３】

一実施形態において、一次構築物は、転写開始部位のすぐ下流の領域において、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、または少なくとも６個のグアニン塩基の置換を含み得る。非限定的な例として、その領域内のヌクレオチドがＧＧＧＡＧＡであるとき、グアニン塩基は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、または少なくとも４個のアデニンヌクレオチドによって置換され得る。別の非限定的な例において、その領域内のヌクレオチドがＧＧＧＡＧＡであるとき、グアニン塩基は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、または少なくとも４個のシトシン塩基によって置換され得る。別の非限定的な例において、その領域内のヌクレオチドがＧＧＧＡＧＡであるとき、グアニン塩基は、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、もしくは少なくとも４個のチミン、および／または本明細書に記載のヌクレオチドのうちのいずれかによって置換され得る。

【０２０４】

一実施形態において、一次構築物は、開始コドンの上流に少なくとも１つの置換および／または挿入を含み得る。明確化のために、当業者は、開始コドンがタンパク質コーディング領域の第１のコドンである一方で、転写開始部位が転写が始まる部位であることを理解する。一次構築物は、ヌクレオチド塩基の少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、もしくは少なくとも８つの置換および／または挿入を含み得るが、これらに限定されない。ヌクレオチド塩基は、開始コドンの上流の１つ、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４、もしくは少なくとも５つの位置に挿入または置換され得る。挿入および／または置換されたヌクレオチドは、同一の塩基（例えば、すべてＡもしくはすべてＣもしくはすべてＴもしくはすべてＧ）、２個の異なる塩基（例えば、ＡおよびＣ、ＡおよびＴ、もしくはＣおよびＴ）、３個の異なる塩基（例えば、Ａ、Ｃ、およびＴ、もしくはＡ、Ｃ、およびＴ）、または少なくとも４個の異なる塩基であり得る。非限定的な例として、一次構築物内のコーディング領域の上流のグアニン塩基は、アデニン、シトシン、チミン、または本明細書に記載のヌクレオチドのうちのいずれかで置換され得る。別の非限定的な例において、一次構築物におけるグアニン塩基の置換は、転写開始部位の下流で

あり、かつ開始コドンの前の領域に１個のグアニン塩基を残すように設計され得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｅｓｖｅｌｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ（２０１１）４７２（７３４４）：４９９－５０３を参照のこと）。非限定的な例として、少なくとも５個のヌクレオチドは、転写開始部位の下流および開始コドンの上流の１つの位置に挿入され得、少なくとも５個のヌクレオチドは、同一の塩基型であり得る。

【０２０５】

ｃＤＮＡ鋳型除去および浄化

ｃＤＮＡ鋳型は、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ　Ｉ）での処理等であるが、これに限定されない当技術分野で既知の方法を用いて除去され得る。ＲＮＡ浄化は、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ（Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）のＡＧＥＮＣＯＵＲＴ（登録商標）ＣＬＥＡＮＳＥＱ（登録商標）システム；強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、および疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）等であるが、これらに限定されないＨＰＬＣに基づく精製方法等であるが、これらに限定されない精製方法も含み得る。

【０２０６】

キャッピングおよび／またはテーリング反応

一次構築物またはｍｍＲＮＡは、キャッピングおよび／またはテーリング反応も経り得る。キャッピング反応は、５’キャップを一次構築物の５’末端に付加する当技術分野で既知の方法を用いて行われ得る。キャッピングのための方法には、ワクシニアキャッピング酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）の使用が含まれるが、これに限定されない。

【０２０７】

ポリＡテーリング反応は、２’Ｏ－メチルトランスフェラーゼおよび本明細書に記載の方法等であるが、これらに限定されない当技術分野で既知の方法を用いて行われ得る。ｃＤＮＡから生成された一次構築物がポリＴを含まない場合、一次構築物が浄化される前にポリＡテーリング反応を行うことは有益であり得る。

【０２０８】

ｍＲＮＡ精製

一次構築物またはｍｍＲＮＡ精製は、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ浄化、品質保証、および品質管理を含み得るが、これらに限定されない。ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ浄化は、ＡＧＥＮＣＯＵＲＴ（登録商標）ビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）；ポリＴビーズ；ＬＮＡ（商標）オリゴＴ捕捉プローブ（ＥＸＩＱＯＮ（登録商標）Ｉｎｃ、Ｖｅｄｂａｅｋ，Ｄｅｎｍａｒｋ）；または強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、および疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）等であるが、これらに限定されないＨＰＬＣに基づく精製方法等であるが、これらに限定されない当技術分野で既知の方法を用いて行われ得る。「精製されたｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡ」等の「精製された」という用語は、ポリヌクレオチドとの関連で用いられるとき、少なくとも１つの混入物質から分離されるものを指す。本明細書で使用するとき、「混入物質」とは、別の物質を不適切、不純、または劣性にする任意の物質である。したがって、精製されたポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡ）は、天然に見られる形態もしくは環境とは異なる形態もしくは環境、またはそれを処理もしくは精製方法に供する前に存在した形態もしくは環境とは異なる形態もしくは環境において存在する。

【０２０９】

品質保証および／または品質管理検査は、ゲル電気泳動、紫外線吸収、または分析的ＨＰＬＣ等であるが、これらに限定されない方法を用いて行われ得る。

【０２１０】

別の実施形態において、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡは、逆転写ＰＣＲを含むが、これに限定されない方法を用いて配列決定され得る。

【０２１１】

一実施形態において、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡは、紫外可視分光法（ＵＶ／Ｖｉｓ）等であるが、これに限定されない方法を用いて定量化され得る。ＵＶ／Ｖｉｓ分光計の非限定的な例には、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（登録商標）分光計（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）がある。定量化されたｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡは、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡが適切な大きさであり得るかを決定し、ｍＲＮＡまたはｍｍＲＮＡの分解が生じていないことを確認するために分析され得る。ｍＲＮＡおよび／またはｍｍＲＮＡの分解は、アガロースゲル電気泳動；強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、および疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）等であるが、これらに限定されないＨＰＬＣに基づく精製方法；液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣＭＳ）；キャピラリー電気泳動（ＣＥ）；ならびにキャピラリーゲル電気泳動（ＣＧＥ）等であるが、これらに限定されない方法を用いて確認され得る。

【０２１２】

シグナル配列

一次構築物またはｍｍＲＮＡは、ポリペプチドの治療関連部位への輸送を促進するさらなる特徴もコードし得る。タンパク質輸送を支援するそのような特徴の１つに、シグナル配列がある。本明細書で使用するとき、「シグナル配列」または「シグナルペプチド」とは、それぞれ、コーディング領域またはコードされたポリペプチドの５’（またはＮ末端）に組み込まれる、それぞれ、約９～２００ヌクレオチド長（３～６０アミノ酸長）のポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。これらの配列の付加は、１つ以上の分泌経路を通るコードされたポリペプチドの小胞体への輸送をもたらす。いくつかのシグナルペプチドは、タンパク質が輸送された後にシグナルペプチダーゼによってタンパク質から切断される。

【０２１３】

表５は、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡをコードするために組み込まれ得るタンパク質シグナル配列の代表的な一覧である。

表５．シグナル配列

【表０００５－１】

識別名	説明	ヌクレオチド配列（5’-3’）	配列番号	コードされたペプチド	配列番号
SS-001	α-1-抗トリプシン	ATGATGCCATCCTCAGTCTCATGGGGTATTTTGCTCTTGGCGGGTCTGTGCTGTCTCGTGCCGGTGTCGCTCGCA	32	MMPSSVSWGILLAGLCCLVPVSLA	94
SS-002	G-CSF	ATGGCCGGACCGGCGACTCAGTCGCCCATGAAACTCATGGCCCTGCAGTTGTTGCTTTGGCACTCAGCCCTCTGGACCGTCCAAGAGGCG	33	MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEA	95
SS-003	第IX因子	ATGCAGAGAGTGAACATGATTATGGCCGAGTCCCCATCGCTCATCACAATCTGCCTGCTTGGTACCTGCTTTCCGCCGAATGCACTGTCTTTCTGGATCACGAGAATGCGAATAAGATCTTGAACCGACCCAAACGG	34	MQRVNMIMAESPSLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR	96
SS-004	プロラクチン	ATGAAAGGATCATTGCTGTTGCTCCTCGTGTCGAACCTTCTGCTTTGCCAGTCCGTAGCCCCC	35	MKGSLLLLLVSNLLLCQSVAP	97
SS-005	アルブミン	ATGAAATGGGTGACGTTCATCTCACTGTTGTTTTTGTTCTCGTCCGCCTACTCCAGGGGAGTATTCCGCCGA	36	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR	98
SS-006	HMMSP38	ATGTGGTGGCGGCTCTGGTGGCTGCTCCTGTTGCTCCTCTTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCA	37	MWWRLWWLLLLLLLLPMWA	99
MLS-001	オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ	TGCTCTTTAACCTCCGCATCCTGTTGAATAACGCTGCGTTCCGAAATGGGCATAACTTCATGGTACGCAACTTCAGATGCGGCCAGCCACTCCAG	38	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMVRNFRCGQPLQ	100
MLS-002	シトクロムＣオキシダーゼサブユニット8A	ATGTCCGTCTTGACACCCCTGCTCTTGAGAGGGCTGACGGGGTCCGCTAGACGCCTGCCGGTACCGCGAGCGAAGATCCACTCCCTG	39	MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSL	101
MLS-003	シトクロムＣオキシダーゼサブユニット8A	ATGAGCGTGCTCACTCCGTTGCTTCTTCGAGGGCTTACGGGATCGGCTCGGAGGTTGCCCGTCCCGAGAGCGAAGATCCATTCGTTG	40	MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSL	102
SS-007	III型、細菌性	TGACAAAAATAACTTTATCTCCCCAGAATTTTAGAATCCAAAAACAGGAAACCA	41	MVTKITLSPQNFRIQKQETTLLKEKST	103

【表０００５－２】

		AAAATTCTTTAGCAAAAAGTATTCTCG CAGTAAAAATCACTTCATCGAATTAAG GTCAAAATTATCGGAACGTTTTATTTC GCATAAGAACACT		EKNSLAKSILAVK NHFIELRSKLSER FISHKNT	
SS-008	ウイルス性	ATGCTGAGCTTTGTGGATACCCGCACC CTGCTGCTGCTGGCGGTGACCAGCTGC CTGGCGACCTGCCAG	42	MLSFVDTRTLLLL AVTSCLATCQ	104
SS-009	ウイルス性	ATGGGCAGCAGCCAGGCGCCGCGCATG GGCAGCGTGGGCGGCCATGGCCTGATG GCGCTGCTGATGGCGGGCCTGATTCTG CCGGGCATTCTGGCG	43	MGSSQAPRMGSVG GHGLMALLMAGLI LPGILA	105
SS-010	ウイルス性	ATGGCGGGCATTTTTTATTTTCTGTTT AGCTTTCTGTTTGGCATTTGCGAT	44	MAGIFYFLFSFLF GICD	106
SS-011	ウイルス性	ATGGAAAACCGCCTGCTGCGCGTGTTT CTGGTGTGGGCGGCGCTGACCATGGAT GGCGCGAGCGCG	45	MENRLLRVFLVWA ALTMDGASA	107
SS-012	ウイルス性	ATGGCGCGCCAGGGCTGCTTTGGCAGC TATCAGGTGATTAGCCTGTTTACCTTT GCGATTGGCGTGAACCTGTGCCTGGGC	46	MARQGCFGSYQVI SLFTFAIGVNLCL G	108
SS-013	バシラス属	ATGAGCCGCCTGCCGGTGCTGCTGCTG CTGCAGCTGCTGGTGCGCCCGGGCCTG CAG	47	MSRLPVLLLLQLL VRPGLQ	109
SS-014	バシラス属	ATGAAACAGCAGAAACGCCTGTATGCG CGCCTGCTGACCCTGCTGTTTGCGCTG ATTTTTCTGCTGCCGCATAGCAGCGCG AGCGCG	48	MKQQKRLYARLLT LLFALIFLLPHSS ASA	110
SS-015	分泌シグナル	ATGGCGACGCCGCTGCCTCCGCCCTCC CCGCGGCACCTGCGGCTGCTGCGGCTG CTGCTCTCCGCCCTCGTCCTCGGC	49	MATPLPPPSPRHL RLLRLLLSG	111
SS-016	分泌シグナル	ATGAAGGCTCCGGGTCGGCTCGTGCTC ATCATCCTGTGCTCCGTGGTCTTCTCT	50	MKAPGRLVLIILC SVVFS	112
SS-017	分泌シグナル	ATGCTTCAGCTTTGGAAACTTGTTCTC CTGTGCGGCGTGCTCACT	51	MLQLWKLLCGVLT	113
SS-018	分泌シグナル	ATGCTTTATCTCCAGGGTTGGAGCATG CCTGCTGTGGCA	52	MLYLQGWSMPAVA	114
SS-019	分泌シグナル	ATGGATAACGTGCAGCCGAAAATAAAA CATCGCCCCTTCTGCTTCAGTGTGAAA GGCCACGTGAAGATGCTGCGGCTGGAT ATTATCAACTCACTGGTAACAACAGTA TTCATGCTCATCGTATCTGTGTTGGCA CTGATACCA	53	MDNVQPKIKHRPF CFSVKGHVKMLRL DIINSLVTTVFML IVSVLALIP	115
SS-020	分泌シグナル	ATGCCCTGCCTAGACCAACAGCTCACT GTTCATGCCCTACCCTGCCCTGCCCAG CCCTCCTCTCTGGCCTTCTGCCAAGTG GGGTTCTTAACAGCA	54	MPCLDQQLTVHAL PCPAQPSSLAFCQ VGFLTA	116

【表０００５－３】

SS-021	分泌シグナル	ATGAAAACCTTGTTCAATCCAGCCCCTGCCATTGCTGACCTGGATCCCCAGTTCTACACCCTCTCAGATGTGTTCTGCTGCAATGAAAGTGAGGCTGAGATTTTAACTGGCCTCACGGTGGGCAGCGCTGCAGATGCT	55	MKTLFNPAPAIADLDPQFYTLSDVFCCNESEAEILTGLTVGSAADA	117
SS-022	分泌シグナル	ATGAAGCCTCTCCTTGTTGTGTTTGTCTTTCTTTTCCTTTGGGATCCAGTGCTGGCA	56	MKPLLVVFVFLFLWDPVLA	118
SS-023	分泌シグナル	ATGTCCTGTTCCCTAAAGTTTACTTTGATTGTAATTTTTTTTTACTGTTGGCTTTCATCCAGC	57	MSCSLKFTLIVIFFTCTLSSS	119
SS-024	分泌シグナル	ATGGTTCTTACTAAACCTCTTCAAAGAAATGGCAGCATGATGAGCTTTGAAAATGTGAAAGAAAAGAGCAGAGAAGGAGGGCCCCATGCACACACACCCGAAGAAGAATTGTGTTTCGTGGTAACACACTACCCTCAGGTTCAGACCACACTCAACCTGTTTTTCCATATATTCAAGGTTCTTACTCAACCACTTTCCCTTCTGTGGGGT	58	MVLTKPLQRNGSMMSFENVKEKSREGGPHAHTPEEELCFVVTHTPQVQTTLNLFFHIFKVLTQPLSLLWG	120
SS-025	分泌シグナル	ATGGCCACCCCGCCATTCCGGCTGATAAGGAAGATGTTTTCCTTCAAGGTGAGCAGATGGATGGGGCTTGCCTGCTTCCGGTCCCTGGCGGCATCC	59	MATPPFRLIRKMFSPKVSRWMGLACFRSLAAS	121
SS-026	分泌シグナル	ATGAGCTTTTTCCAACTCCTGATGAAAAGGAAGGAACTCATTCCCTTGGTGGTGTTCATGACTGTGGCGGCGGGTGGAGCCTCATCT	60	MSFFQLLMKRKELIPLVVFMTVAAGGASS	122
SS-027	分泌シグナル	ATGGTCTCAGCTCTGCGGGGAGCACCCCTGATCAGGGTGCACTCAAGCCCTGTTTCTTCTCCTTCTGTGAGTGGACCACGGAGGCTGGTGAGCTGCCTGTCATCCCAAAGCTCAGCTCTGAGC	61	MVSALRGAPLIRVHSSPVSSPSVSGPAALVSCLSSQSSALS	123
SS-028	分泌シグナル	ATGATGGGGTCCCCAGTGAGTCATCTGCTGGCCGGCTTCTGTGTGTGGGTCGTCTTGGGC	62	MMGSPVSHLLAGFCVWVVLG	124
SS-029	分泌シグナル	ATGGCAAGCATGGCTGCCGTGCTCACCTGGGCTCTGGCTCTTCTTTCAGCGTTTTCGGCCACCCAGGCA	63	MASMAAVLTWALALLSAFSATQA	125
SS-030	分泌シグナル	ATGGTGCTCATGTGGACCAGTGGTGACGCCTTCAAGACGGCCTACTTCCTGCTGAAGGGTGCCCCTCTGCAGTTCTCCGTGTGCGGCCTGCTGCAGGTGCTGGTGGACCTGGCCATCCTGGGGCAGGCCTACGCC	64	MVLMWTSGDAFKTAYFLLKGAPLQFSVCGLLQVLVDLAILGQATA	126
SS-031	分泌シグナル	ATGGATTTTGTCGCTGGAGCCATCGGAGGCGTCTGCGGTGTTGCTGTGGGCTACCCCCTGGACACGGTGAAGGTCAGGATC	65	MDFVAGAIGGVCGVAVGYPLDTVKVRIQTEPLYTGIWHC	127

【表０００５－４】

		CAGACGGAGCCAAAGTACACAGGCATC TGGCACTGCGTCCGGGATACGTATCAC CGAGAGCGCGTGTGGGGCTTCTACCGG GGCCTCTCGCTGCCCGTGTGCACGGTG TCCCTGGTATCTTCC		VRDTYHRERVWGF YRGLSLPVCTVSL VSS	
SS-032	分泌シグナル	ATGGAGAAGCCCCTCTTCCCATTAGTG CCTTTGCATTGGTTTGGCTTTGGCTAC ACAGCACTGGTTGTTTCTGGTGGGATC GTTGGCTATGTAAAAACAGGCAGCGTG CCGTCCCTGGCTGCAGGGCTGCTCTTC GGCAGTCTAGCC	66	MEKPLFPLVPLHW FGFGYTALVVSGG IVGYVKTGSVPSL AAGLLFGSLA	128
SS-033	分泌シグナル	ATGGGTCTGCTCCTTCCCCTGGCACTC TGCATCCTAGTCCTGTGC	67	MGLLLPLALCILV LC	129
SS-034	分泌シグナル	ATGGGGATCCAGACGAGCCCCGTCCTG CTGGCCTCCCTGGGGGTGGGGCTGGTC ACTCTGCTCGGCCTGGCTGTGGGC	68	MGIQTSPVLLASL GVGLVTLLGLAVG	130
SS-035	分泌シグナル	ATGTCGGACCTGCTACTACTGGGCCTG ATTGGGGGCCTGACTCTCTTACTGCTG CTGACGCTGCTAGCCTTTGCC	69	MSDLLLLGLIGGL TLLLLLTLLAFA	131
SS-036	分泌シグナル	ATGGAGACTGTGGTGATTGTTGCCATA GGTGTGCTGGCCACCATGTTTCTGGCT TCGTTTGCAGCCTTGGTGCTGGTTTGC AGGCAG	70	METVVIVAIGVLA TIFLASFAALVLV CRQ	132
SS-037	分泌シグナル	ATGCGCGGCTCTGTGGAGTGCACCTGG GGTTGGGGGCACTGTGCCCCCAGCCCC CTGCTCCTTTGGACTCTACTTCTGTTT GCAGCCCCATTTGGCCTGCTGGGG	71	MAGSVECTWGWGH CAPSPLLLWTLLL FAAPFGLLG	133
SS-038	分泌シグナル	ATGATGCCGTCCCGTACCAACCTGGCT ACTGGAATCCCCAGTAGTAAAGTGAAA TATTCAAGGCTCTCCAGCACAGACGAT GGCTACATTGACCTTCAGTTTAAGAAA ACCCCTCCTAAGATCCCTTATAAGGCC ATCGCACTTGCCACTGTGCTGTTTTTG ATTGGCGCC	72	MMPSRTNLATGIP SSKVKYSRLSSTD DGYIDLQFKKTPP KIPYKAIALATVL FLIGA	134
SS-039	分泌シグナル	ATGGCCCTGCCCCAGATGTGTGACGGG AGCCACTTGGCCTCCACCCTCCGCTAT TGCATGACAGTCAGCGGCACAGTGGTT CTGGTGGCCGGGACGCTCTGCTTCGCT	73	MALPQMCDGSHLA STLRYCMTVSGTV VLVAGTLCFA	135
SS-041	Vrg-6	TGAAAAAGTGGTTCGTTGCTGCCGGCA TCGGCGCTGCCGGACTCATGCTCTCCA GCGCCGCCA	74	MKKWFVAAGIGAG LLMLSSAA	136
SS-042	PhoA	ATGAAACAGAGCACCATTGCGCTGGCG CTGCTGCCGCTGCTGTTTACCCCGGTG ACCAAAGCG	75	MKQSTIALALLPL LFTPVTKA	137
SS-043	OmpA	ATGAAAAAAACCGCGATTGCGATTGCG GTGGCGCTGGCGGGCTTTGCGACCGTG GCGCAGGCG	76	MKKTAIAIAVALA GFATVAQA	138

【表０００５－５】

SS-044	STI	ATGAAAAAACTGATGCTGGCGATTTTTTTAGCGTGCTGAGCTTTCCGAGCTTTAGCCAGAGC	77	MKKLMLAIFFSVLSFPSFSQS	139
SS-045	STII	ATGAAAAAAAACATTGCGTTTCTGCTGGCGAGCATGTTTGTGTTTAGCATTGCGACCAACGCGTATGCG	78	MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYA	140
SS-046	アミラーゼ	ATGTTTGCGAAACGCTTTAAAACCAGCCTGCTGCCGCTGTTTGCGGGCTTTCTGCTGCTGTTTCATCTGGTGCTGGCGGGCCCGGCGGCGGCGAGC	79	MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAAS	141
SS-047	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCGCGGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	80	MRFPSIFTAVLFAASSALA	142
SS-048	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCACCGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	81	MRFPSIFTTVLFAASSALA	143
SS-049	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCAGCGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	82	MRFPSIFTSVLFAASSALA	144
SS-050	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCCATGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	83	MRFPSIFTHVLFAASSALA	145
SS-051	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCATTGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	84	MRFPSIFTIVLFAASSALA	146
SS-052	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCTTTGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	85	MRFPSIFTFVLFAASSALA	147
SS-053	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCGAAGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	86	MRFPSIFTEVLFAASSALA	148
SS-054	α因子	ATGCGCTTTCCGAGCATTTTTACCGGCGTGCTGTTTGCGGCGAGCAGCGCGCTGGCG	87	MRFPSIFTGVLFAASSALA	149
SS-055	エンドグルカナーゼV	ATGCGTTCCTCCCCCCTCCTCCGCTCCGCCGTTGTGGCCGCCCTGCCGGTGTTGGCCCTTGCC	88	MRSSPLLRSAVVAALPVLALA	150
SS-056	分泌シグナル	ATGGGCGCGGCGGCCGTGCGCTGGCACTTGTGCGTGCTGCTGGCCCTGGGCACACGCGGGCGGCTG	89	MGAAAVRWHLCVLLALGTRGRL	151
SS-057	真菌性	ATGAGGAGCTCCCTTGTGCTGTTCTTTGTCTCTGCGTGGACGGCCTTGGCCAG	90	MRSSLVLFFVSAWTALA	152
SS-058	フィブロネクチン	ATGCTCAGGGGTCCGGGACCCGGGCGGCTGCTGCTGCTAGCAGTCCTGTGCCTGGGGACATCGGTGCGCTGCACCGAAACCGGGAAGAGCAAGAGG	91	MLRGPGPGRLLLLAVLCLGTSVRCTETGKSKR	153

【表０００５－６】

SS-059	フィブロネクチン	ATGCTTAGGGGTCCGGGGCCCGGGCTGCTGCTGCTGGCCGTCCAGCTGGGGACAGCGGTGCCCTCCACG	92	MLRGPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGA	154
SS-060	フィブロネクチン	ATGCGCCGGGGGGCCCTGACCGGGCTGCTCCTGGTCCTGTGCCTGAGTGTTGTGCTACGTGCAGCCCCCTCTGCAACAAGCAAGAAGCGCAGG	93	MRRGALTGLLLVLCLSVVLRAAPSATSKKRR	155

【０２１４】

この表において、ＳＳは分泌シグナルであり、ＭＬＳはミトコンドリアリーダーシグナルである。本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、配列番号９４～１５５のシグナル配列のうちのいずれか、またはその断片もしくは変異形をコードするように設計され得る。これらの配列は、ポリペプチドコーディング領域の最初、中間、もしくは最後に含まれ得るか、またはあるいは隣接領域に含まれ得る。さらに、本発明のポリヌクレオチド一次構築物のうちのいずれかは、配列番号３２～９３によって定義される配列のうちの１つ以上も含み得る。これらは、第１の領域またはいずれかの隣接領域に存在し得る。

【０２１５】

本発明において利用され得るさらなるシグナル配列は、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｉｇｎａｌｐｅｐｔｉｄｅ．ｄｅ／またはｈｔｔｐ：／／ｐｒｏｌｉｎｅ．ｂｉｃ．ｎｕｓ．ｅｄｕ．ｓｇ／ｓｐｄｂ／で見出されるデータベース等のデータベースに教示さ

れるシグナル配列を含む。米国特許第８，１２４，３７９号、同第７，４１３，８７５号、および同第７，３８５，０３４号に記載のものも本発明の範囲内であり、これら各々の内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０２１６】

標的選択

本発明に従って、一次構築物は、少なくとも１つの目的とするポリペプチドをコードする結合ヌクレオシドの少なくとも１つの第１の領域を含む。本発明の目的とするポリペプチドまたは「標的」が表６に列記される。目的とするポリペプチドをコードする遺伝子の名称および説明に加えて、ＥＮＳＥＭＢＬ転写物配列番号（ＥＮＳＴ）、ＥＮＳＥＭＢＬタンパク質配列番号（ＥＮＳＰ）、および利用可能な場合には、最適化された転写配列番号（ＯＰｔｉｍ　Ｔｒａｎｓ配列番号）または最適化されたオープンリーディングフレーム配列番号（ＯｐｔｉｍＯＲＦ配列番号）も表６に示される。任意の特定の遺伝子について、１つ以上の変異形またはアイソフォームが存在し得る。これらが存在する場合、それらも同様に表に示される。当業者であれば、表に開示されるものが可能性のある隣接領域であることを理解する。これらは、各ＥＮＳＴ転写物におけるＯＲＦまたはコーディング領域の５’（上流）または３’（下流）のいずれかにコードされる。コーディング領域は、ＥＮＳＰ配列を教示することによって断定的かつ具体的に開示される。その結果として、タンパク質をコードする隣接する教示の配列が隣接領域と見なされる。１つ以上の利用可能なデータベースまたはアルゴリズムを利用することによって５’および３’隣接領域をさらに特徴付けることも可能である。データベースは、ＥＮＳＴ転写物の隣接領域に含有される特徴に注釈を付けており、これらは、当技術分野において利用可能である。

表６．標的

【表０００６－１】

標的番号	標的説明	ENST	転写産物の配列番号	ENSP	ペプチド配列番号	Optim ORFの配列番号	Optim Transの配列番号
1	４－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ	289004	156	289004	769	1673, 2293, 2913, 3533, 4153, 5433-5519	
2	４－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ	543163	157	441677	770	1674, 2294, 2914, 3534, 4154	
3	４－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ	545969	158	437419	771	1675, 2295, 2915, 3535, 4155	
4	６－ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素	280362	159	280362	772	1676, 2296, 2916, 3536, 4156, 4773, 5103, 5520-5606	1609
5	トロンボスポンジンモチーフ１３アイソフォーム１プレプロタンパク質を有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ	563979	160	456186	773	1677, 2297, 2917, 3537, 4157, 4774, 5104, 5607-5693	1609
6	活性依存性神経保護因子ホメオボックス	349014	161	342905	774	1678, 2298, 2918, 3538, 4158, 4775, 5105, 5694-5780	
7	活性依存性神経保護因子ホメオボックス	371602	162	360662	775	1679, 2299, 2919, 3539, 4159,	

【表０００６－２】

						4776, 5106	
8	活性依存性神経保護因子ホメオボックス	396029	163	379346	776	1680, 2300, 2920, 3540, 4160, 4777, 5107	
9	活性依存性神経保護因子ホメオボックス	396032	164	379349	777	1681, 2301, 2921, 3541, 4161, 4778, 5108	
10	活性依存性神経保護因子ホメオボックス	534467	165	436181	778	1682, 2302, 2922, 3542, 4162, 4779, 5109	
11	トロンボスポンジン１型モチーフ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ	338351	166	345120	779	1683, 2303, 2923, 3543, 4163, 4780, 5110	
12	トロンボスポンジン１型モチーフ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ	355699	167	347927	780	1393, 1684, 2304, 2924, 3544, 4164, 4781, 5111	
13	トロンボスポンジン１型モチーフ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ	356589	168	348997	781	1394, 1685, 2305, 2925, 3545, 4165, 4782, 5112	
14	トロンボスポンジン１型モチーフ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ	371910	169	360978	782	1395, 1686, 2306, 2926, 3546, 4166, 4783, 5113	
15	トロンボスポンジン１型モチーフ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ	371911	170	360979	783	1396, 1687, 2307, 2927, 3547, 4167, 4784, 5114	
16	トロンボスポンジン１型モチーフ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ	371916	171	360984	784	1397, 1688, 2308, 2928, 3548, 4168, 4785, 5115	
17	トロンボスポンジン１型モチー	371929	172	360997	785	1398, 1689, 2309, 2929,	1610

【表０００６－３】

	フ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ					3549, 4169, 4786, 5116	
18	トロンボスポンジン１型モチーフ１３を有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ	536611	173	444504	786	1399, 1690, 2310, 2930, 3550, 4170, 4787, 5117	
19	ＡＩＦｓｈ						
20	アルビグルチド；アルビグルチド						
21	アルドラーゼＡ、フルクトース二リン酸	563060	174	455800	787	1691, 2311, 2931, 3551, 4171	
22	アルドラーゼＡ、フルクトース二リン酸	564546	175	455917	788	1692, 2312, 2932, 3552, 4172	
23	アルドラーゼＡ、フルクトース二リン酸	564595	176	457468	789	1693, 2313, 2933, 3553, 4173	
24	アルドラーゼＡ、フルクトース二リン酸	338110	177	336927	790	1694, 2314, 2934, 3554, 4174	
25	アルドラーゼＡ、フルクトース二リン酸	395240	178	378661	791	1695, 2315, 2935, 3555, 4175	
26	アルドラーゼＡ、フルクトース二リン酸	395248	179	378669	792	1696, 2316, 2936, 3556, 4176, 5781-5867	
27	アルドラーゼＡ、フルクトース二リン酸	412304	180	400452	793	1697, 2317, 2937, 3557, 4177	
28	アメロブラスチン（エナメル基質タンパク質）	322937	181	313809	794	1698, 2318, 2938, 3558, 4178, 4788, 5118, 5868-5954	1611
29	アメロブラスチン（エナメル基質タンパク質）	449493	182	391234	795	1699, 2319, 2939, 3559, 4179, 4789, 5119	1611
30	アメロブラスチン（エナメル基質タンパク質）	538728	183	445605	796	1700, 2320, 2940, 3560, 4180, 4790,	1611

【表０００６－４】

						5120	
31	アメロゲニン、X連鎖	348912	184	335312	797	1701, 2321, 2941, 3561, 4181, 4791, 5121	
32	アメロゲニン、X連鎖	380712	185	370088	798	1702, 2322, 2942, 3562, 4182, 4792, 5122, 5955-6041	
33	アメロゲニン、X連鎖	380714	186	370090	799	1703, 2323, 2943, 3563, 4183, 4793, 5123	
34	アメロゲニン、Y連鎖	215479	187	215479	800	1704, 2324, 2944, 3564, 4184	1612
35	アメロゲニン、Y連鎖	383036	188	372505	801	1705, 2325, 2945, 3565, 4185	1612
36	アメロゲニン、Y連鎖	383037	189	372506	802	1706, 2326, 2946, 3566, 4186	1612
37	アミロ－α－１，６－グルコシダーゼ、４－α－グルカノトランスフェラーゼ	294724	190	294724	803	1707, 2327, 2947, 3567, 4187	
38	アミロ－α－１，６－グルコシダーゼ、４－α－グルカノトランスフェラーゼ	361302	191	354971	804	1708, 2328, 2948, 3568, 4188	
39	アミロ－α－１，６－グルコシダーゼ、４－α－グルカノトランスフェラーゼ	361522	192	354635	805	1709, 2329, 2949, 3569, 4189	
40	アミロ－α－１，６－グルコシダーゼ、４－α－グルカノト	361915	193	355106	806	1710, 2330, 2950, 3570, 4190, 6042-6128	

【表０００６－５】

	ランスフェラーゼ						
41	アミロ－α－１，６－グルコシダーゼ、４－α－グルカノトランスフェラーゼ	370161	194	359180	807	1711, 2331, 2951, 3571, 4191	
42	アミロ－α－１，６－グルコシダーゼ、４－α－グルカノトランスフェラーゼ	370163	195	359182	808	1712, 2332, 2952, 3572, 4192	
43	アミロ－α－１，６－グルコシダーゼ、４－α－グルカノトランスフェラーゼ	370165	196	359184	809	1713, 2333, 2953, 3573, 4193	
44	アミロイドP成分、血清	255040	197	255040	810	1714, 2334, 2954, 3574, 4194, 6129-6215	
45	アンジオテンシンＩ変換酵素（ペプチジル－ジペプチダーゼＡ）２	252519	198	252519	811	1715, 2335, 2955, 3575, 4195, 6216-6302	
46	アンジオテンシンＩ変換酵素（ペプチジル－ジペプチダーゼＡ）２	427411	199	389326	812	1716, 2336, 2956, 3576, 4196	
47	抗ＴＮＦα（ＴＮＦＲ融合；Ｅｎｂｒｅｌ）						
48	ＡＰＯＡ１ Ｍｉｌａｎｏ；ａｐｏ Ａ－Ｉ（Ｒ１７３Ｃ）Ｍｉｌａｎｏ，ＥＴＣ－２１６				813	1400, 1717, 2337, 2957, 3577, 4197, 4794, 5124	1613
49	ＡＰＯＡ１ Ｐａｒｉｓ；ａ				814	1401, 1718, 2338, 2958,	

【表０００６－６】

	ｐｏ　Ａ－Ｉ（Ｒ１５１Ｃ）Ｐａｒｉｓ					3578, 4198, 4795, 5125	
50	ＡｐｏＡ－ａ至適化ｍＲＮＡ						1614
51	アポリポタンパク質Ａ－Ｉ	236850	200	236850	815	1402, 1719, 2339, 2959, 3579, 4199, 4796, 5126, 6303-5363	1615
52	アポリポタンパク質Ａ－Ｉ	359492	201	352471	816	1720, 2340, 2960, 3580, 4200, 4797, 5127	1615
53	アポリポタンパク質Ａ－Ｉ	375320	202	364469	817	1721, 2341, 2961, 3581, 4201, 4798, 5128	1615
54	アポリポタンパク質Ａ－Ｉ	375323	203	364472	818	1722, 2342, 2962, 3582, 4202, 4799, 5129	1615
55	アポリポタンパク質Ｂ（Ａｇ（ｘ）抗原を含む）	233242	204	233242	819	1723, 2343, 2963, 3583, 4203	
56	アポリポタンパク質Ｂ（Ａｇ（ｘ）抗原を含む）	535079	205	439731	820	1724, 2344, 2964, 3584, 4204	
57	アクアポリン５	293599	206	293599	821	1725, 2345, 2965, 3585, 4205, 4800, 5130, 6564-6650	1616
58	アルギナーゼ、肝臓	356962	207	349446	822	1726, 2346, 2966, 3586, 4206,	
59	アルギナーゼ、肝臓	368087	208	357066	823	1727, 2347, 2967, 3587, 4207, 6651-6737	
60	アルギナーゼ、肝臓	476845	209	417694	824	1728, 2348, 2968, 3588, 4208	

【表０００６－７】

61	アルギニノコハク酸リアーゼ	304874	210	307188	825	1729, 2349, 2969, 3589, 4209, 6738-6876	
62	アルギニノコハク酸リアーゼ	380839	211	370219	826	1730, 2350, 2970, 3590, 4210	
63	アルギニノコハク酸リアーゼ	395331	212	378740	827	1731, 2351, 2971, 3591, 4211	
64	アルギニノコハク酸リアーゼ	395332	213	378741	828	1732, 2352, 2972, 3592, 4212	
65	アルギニノコハク酸リアーゼ	502022	214	441778	829	1733, 2353, 2973, 3593, 4213	
66	アルギニノコハク酸合成酵素１	334909	215	361470	830	1403, 1734, 2354, 2974, 3594, 4214	
67	アルギニノコハク酸合成酵素１	352480	216	253004	831	1735, 2355, 2975, 3595, 4215, 6877-6963	
68	アルギニノコハク酸合成酵素１	372386	217	361461	832	1404, 1736, 2356, 2976, 3596, 4216	
69	アルギニノコハク酸合成酵素１	372393	218	361469	833	1737, 2357, 2977, 3597, 4217	
70	アルギニノコハク酸合成酵素１	372394	219	361471	834	1738, 2358, 2978, 3598, 4218	
71	アルギニノコハク酸合成酵素１	422569	220	394212	835	1405, 1739, 2359, 2979, 3599, 4219	
72	アルギニノコハク酸合成酵素１	443588	221	397785	836	1406, 1740, 2360, 2980, 3600, 4220	
73	アルテミン	372354	222	361429	837	1741, 2361, 2981, 3601, 4221, 4801, 5131, 6964-7050	
74	アルテミン	372359	223	361434	838	1742, 2362, 2982, 3602, 4222, 4802, 5132	

【表０００６－８】

75	アルテミン	414809	224	387435	839	1743, 2363, 2983, 3603, 4223, 4803, 5133	
76	アルテミン	471394	225	435804	840	1744, 2364, 2984, 3604, 4224, 4804, 5134	
77	アルテミン	474592	226	434856	841	1745, 2365, 2985, 3605, 4225, 4805, 5135	
78	アルテミン	477048	227	434784	842	1746, 2366, 2986, 3606, 4226, 4806, 5136	
79	アルテミン	491846	228	436149	843	1747, 2367, 2987, 3607, 4227, 4807, 5137	
80	アルテミン	498139	229	436727	844	1748, 2368, 2988, 3608, 4228, 4808, 5138	
81	アリールスルファターゼB	264914	230	264914	845	1749, 2369, 2989, 3609, 4229, 4809, 5139, 7051-7137	1617
82	アリールスルファターゼB	264914	231	264914	846	1750, 2370, 2990, 3610, 4230, 4810, 5140	1617
83	アリールスルファターゼB	396151	232	379455	847	1751, 2371, 2991, 3611, 4231, 4811, 5141	1617
84	アリールスルファターゼB	521117	233	428611	848	1752, 2372, 2992, 3612, 4232, 4812, 5142	1617
85	アスパラギナーゼホモログ（出芽酵母）	299234	234	299234	849	1753, 2373, 2993, 3613, 4233, 4813, 5143	

【表０００６－９】

86	アスパラギナーゼホモログ（出芽酵母）	455920	235	389003	850	1754, 2374, 2994, 3614, 4234, 4814, 5144	
87	アスパラギナーゼホモログ（出芽酵母）	550583	236	446856	851	1755, 2375, 2995, 3615, 4235, 4815, 5145	
88	アスパラギナーゼホモログ（出芽酵母）	551177	237	450040	852	1756, 2376, 2996, 3616, 4236, 4816, 5146	
89	アスパルトアシラーゼ	263080	238	263080	853	1757, 2377, 2997, 3617, 4237	
90	アスパルトアシラーゼ	456349	239	409976	854	1758, 2378, 2998, 3618, 4238, 7138–7224	
91	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	283684	240	283684	855	1407, 1759, 2379, 2999, 3619, 4239, 7225–7398	
92	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	536015	241	445359	856	1760, 2380, 3000, 3620, 4240	
93	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	242839	242	242839	857	1761, 2381, 3001, 3621, 4241, 4817, 5147, 7399–7485	1618
94	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	344297	243	342559	858	1762, 2382, 3002, 3622, 4242, 4818, 5148	1618
95	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	400366	244	383217	859	1763, 2383, 3003, 3623, 4243, 4819, 5149	1618
96	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラス	400370	245	383221	860	1764, 2384, 3004, 3624, 4244, 4820,	1618

【表０００６－１０】

	Ｉ、タイプ８Ｂ、メンバー１					5150	
97	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	417240	246	390360	861	1765, 2385, 3005, 3625, 4245, 4821, 5151	
98	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	418097	247	393343	862	1766, 2386, 3006, 3626, 4246, 4822, 5152	1618
99	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	448424	248	416738	863	1767, 2387, 3007, 3627, 4247, 4823, 5153	1618
100	ＡＴＰａｓｅ、アミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１	542656	249	443128	864	1768, 2388, 3008, 3628, 4248, 4824, 5154	
101	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー１１	263817	250	263817	865	1408, 1769, 2389, 3009, 3629, 4249	
102	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー４	265723	251	265723	866	1409, 1770, 2390, 3010, 3630, 4250, 7486-7659	
103	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー４	358400	252	351172	867	1410, 1771, 2391, 3011, 3631, 4251	
104	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー４	359206	253	352135	868	1411, 1772, 2392, 3012, 3632, 4252	
105	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、	417608	254	394511	869	1412, 1773, 2393, 3013, 3633, 4253	

【表０００６－１１】

	メンバー４						
106	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー４	453593	255	392983	870	1774, 2394, 3014, 3634, 4254	
107	ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー４	545634	256	437465	871	1775, 2395, 3015, 3635, 4255	
108	殺菌性／透過性増強タンパク質	262865	257	262865	872	1776, 2396, 3016, 3636, 4256, 7660-7746	
109	ベーシックヘリックスループヘリックスファミリー、メンバーｅ４１	242728	258	242728	873	1413, 1777, 2397, 3017, 3637, 4257, 7747-7833	
110	ベーシックヘリックスループヘリックスファミリー、メンバーｅ４１	540731	259	437369	874	1778, 2398, 3018, 3638, 4258	
111	骨形成タンパク質２	378827	260	368104	875	1414, 1779, 2399, 3019, 3639, 4259, 7834-7920	
112	骨形成タンパク質７	395863	261	379204	876	1415, 1780, 2400, 3020, 3640, 4260, 4825, 5155, 7921-8007	
113	骨形成タンパク質７	395864	262	379205	877	1416, 1781, 2401, 3021, 3641, 4261, 4826, 5156	
114	Ｃａｐ１８						
115	カルバモイルリン酸合成酵素１、ミトコンドリア	233072	263	233072	878	1417, 1782, 2402, 3022, 3642, 4262	
116	カルバモイルリン酸合成酵素	417946	264	388496	879	1418, 1783, 2403, 3023,	

【表０００６－１２】

	１、ミトコンドリア					3643, 4263	
117	カルバモイルリン酸合成酵素１、ミトコンドリア	430249	265	402608	880	1419, 1784, 2404, 3024, 3644, 4264, 8008-8146	
118	カルバモイルリン酸合成酵素１、ミトコンドリア	451903	266	406136	881	1420, 1785, 2405, 3025, 3645, 4265	
119	カルバモイルリン酸合成酵素１、ミトコンドリア	518043	267	430697	882	1786, 2406, 3026, 3646, 4266,	
120	カルバモイルリン酸合成酵素１、ミトコンドリア	536125	268	445539	883	1787, 2407, 3027, 3647, 4267	
121	カルバモイルリン酸合成酵素１、ミトコンドリア	539150	269	444139	884	1788, 2408, 3028, 3648, 4268	
122	カルバモイルリン酸合成酵素１、ミトコンドリア	544169	270	442790	885	1789, 2409, 3029, 3649, 4269	
123	カルジオトロフィン１	279804	271	279804	886	1790, 2410, 3030, 3650, 4270, 8147-8233	
124	カルジオトロフィン１	395019	272	378465	887	1791, 2411, 3031, 3651, 4271	
125	カテリシジン抗菌性ペプチド	296435	273	296435	888	1792, 2412, 3032, 3652, 4272, 4827, 5157, 8234-8407	1619
126	カテリシジン抗菌性ペプチド	576243	274	458149	889	1793, 2413, 3033, 3653, 4273, 4828, 5158	
127	Ｇｌｕ／Ａｓｐリッチカルボキシ末端ドメイン４を有するＣｂ	372638	275	361721	890	1421, 1794, 2414, 3034, 3654, 4274, 8408-8494	

【表０００６－１３】

	ｐ／ｐ３００－相互作用トランスアクチベーター						
128	セルロプラスミン（フェロキシダーゼ）	264613	276	264613	891	1422, 1795, 2415, 3035, 3655, 4275, 4829, 5159, 8495-8581	1620
129	チータープログラム２；ヒアルロニダーゼ（ヒト）；インスリンリスプロ						
130	毛様体神経栄養因子	361987	277	355370	892	1796, 2416, 3036, 3656, 4276	
131	凝固第ＩＩ因子（トロンビン）	311907	278	308541	893	1423, 1797, 2417, 3037, 3657, 4277, 4830, 5160, 8582-8668	
132	凝固第ＩＩ因子（トロンビン）	446804	279	406403	894	1798, 2418, 3038, 3658, 4278, 4831, 5161	
133	凝固第ＩＩ因子（トロンビン）	530231	280	433907	895	1424, 1799, 2419, 3039, 3659, 4279, 4832, 5162	
134	凝固第ＩＩＩ因子（トロンボプラスチン、組織因子）	334047	281	334145	896	1425, 1800, 2420, 3040, 3660, 4280, 8669-8755	
135	凝固第ＩＩＩ因子（トロンボプラスチン、組織因子）	370207	282	359226	897	1426, 1801, 2421, 3041, 3661, 4281, 8756-8842	
136	凝固第ＩＸ因子	218099	283	218099	898	1427, 1802, 2422, 3042, 3662, 4282, 8843-9016	1621
137	凝固第ＩＸ因子	394090	284	377650	899	1428, 1803, 2423, 3043, 3663, 4283, 4833, 5163	1621

【表０００６－１４】

138	凝固第Ｖ因子（プロアクセレリン、不安定因子）	367796	285	356770	900	1429, 1804, 2424, 3044, 3664, 4284	
139	凝固第Ｖ因子（プロアクセレリン、不安定因子）	367797	286	356771	901	1430, 1805, 2425, 3045, 3665, 4285, 9017-9155	
140	凝固第Ｖ因子（プロアクセレリン、不安定因子）	546081	287	439664	902	1431, 1806, 2426, 3046, 3666, 4286	
141	凝固第ＶＩＩ因子（血清プロトロンビン変換促進因子）	346342	288	329546	903	1432, 1807, 2427, 3047, 3667, 4287, 4834, 5164	1622
142	凝固第ＶＩＩ因子（血清プロトロンビン変換促進因子）	375581	289	364731	904	1433, 1808, 2428, 3048, 3668, 4288, 4835, 5165, 9156-9242	1622
143	凝固第ＶＩＩ因子（血清プロトロンビン変換促進因子）	541084	290	442051	905	1434, 1809, 2429, 3049, 3669, 4289, 4836, 5166	1622
144	凝固第ＶＩＩＩ因子、プロコアグラント成分	330287	291	327895	906	1810, 2430, 3050, 3670, 4290, 4837, 5167	
145	凝固第ＶＩＩＩ因子、プロコアグラント成分	360256	292	353393	907	1435, 1811, 2431, 3051, 3671, 4291, 4838, 5168	1623
146	凝固第Ｘ因子	375551	293	364701	908	1436, 1812, 2432, 3052, 3672, 4292, 4839, 5169	
147	凝固第Ｘ因子	375559	294	364709	909	1437, 1813, 2433, 3053, 3673, 4293, 4840, 5170, 9243-9381	
148	凝固第Ｘ因子	409306	295	387092	910	1438, 1814, 2434, 3054, 3674, 4294, 4841, 5171	

【表０００６－１５】

149	凝固第ＸＩ因子	264692	296	264692	911	1439, 1815, 2435, 3055, 3675, 4295, 4842, 5172	1624
150	凝固第ＸＩ因子	403665	297	384957	912	1440, 1816, 2436, 3056, 3676, 4296, 4843, 5173, 9382-9468	1624
151	凝固第ＸＩ因子	452239	298	397401	913	1441, 1817, 2437, 3057, 3677, 4297, 4844, 5174,	
152	凝固第ＸＩＩＩ因子、Ａ１ポリペプチド	264870	299	264870	914	1442, 1818, 2438, 3058, 3678, 4298, 9469-9555	
153	凝固第ＸＩＩＩ因子、Ａ１ポリペプチド	414279	300	413334	915	1443, 1819, 2439, 3059, 3679, 4299	
154	凝固第ＸＩＩＩ因子、Ａ１ポリペプチド	441301	301	416127	916	1820, 2440, 3060, 3680, 4300	
155	ＶＩＩ型コラーゲン、α１	328333	302	332371	917	1821, 2441, 3061, 3681, 4301, 4845, 5175, 9556-9642	1625
156	ＶＩＩ型コラーゲン、α１	454817	303	412569	918	1822, 2442, 3062, 3682, 4302, 4846, 5176,	
157	コロニー刺激因子２（顆粒球－マクロファージ）	296871	304	296871	919	1823, 2443, 3063, 3683, 4303, 4847, 5177, 9643-9781	1626
158	コロニー刺激因子３（顆粒球）	225474	305	225474	920	1824, 2444, 3064, 3684, 4304, 9782-9868	1627
159	コロニー刺激因子３（顆粒球）	331769	306	327766	921	1825, 2445, 3065, 3685, 4305, 4848, 5178, 9869-9955	

【表０００６－１６】

160	コロニー刺激因子３（顆粒球）	394148	307	377704	922	1826, 2446, 3066, 3686, 4306, 4849, 5179,	1627
161	コロニー刺激因子３（顆粒球）	394149	308	377705	923	1827, 2447, 3067, 3687, 4307, 4850, 5180, 9956-10042	1627
162	補体H因子	367429	309	356399	924	1444, 1828, 2448, 3068, 3688, 4308, 4851, 5181	1627
163	補体H因子	391986	310	375846	925	1829, 2449, 3069, 3689, 4309, 4852, 5182	
164	補体H因子	439155	311	402656	926	1445, 1830, 2450, 3070, 3690, 4310, 4853, 5183	
165	銅代謝（Ｍｕｒ１）ドメイン含有１	311832	312	308236	927	1446, 1831, 2451, 3071, 3691, 4311, 10043-10129	
166	銅代謝（Ｍｕｒ１）ドメイン含有１	427417	313	413207	928	1447, 1832, 2452, 3072, 3692, 4312	
167	銅代謝（Ｍｕｒ１）ドメイン含有１	444166	314	410050	929	1448, 1833, 2453, 3073, 3693, 4313	
168	銅代謝（Ｍｕｒ１）ドメイン含有１	458337	315	401236	930	1834, 2454, 3074, 3694, 4314	
169	銅代謝（Ｍｕｒ１）ドメイン含有１	538736	316	438961	931	1449, 1835, 2455, 3075, 3695, 4315	
170	副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン	276571	317	276571	932	1836, 2456, 3076, 3696, 4316, 4854, 5184	
171	ＣＴＬＡ４－Ｉｇ（オレンシア）						

【表０００６－１７】

172	嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＣ、メンバー７）	3084	318	3084	933	1450, 1837, 2457, 3077, 3697, 4317, 4855, 5185, 10130-10216	1628
173	嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＣ、メンバー７）	426809	319	389119	934	1451, 1838, 2458, 3078, 3698, 4318, 4856, 5186	
174	嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＣ、メンバー７）	454343	320	403677	935	1452, 1839, 2459, 3079, 3699, 4319, 4857, 5187	1628
175	嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＣ、メンバー７）	468795	321	419254	936	1453, 1840, 2460, 3080, 3700, 4320, 4858, 5188	
176	シスチノシン、リソソームシスチン輸送体	381870	322	371294	937	1841, 2461, 3081, 3701, 4321	
177	シスチノシン、リソソームシスチン輸送体	46640	323	46640	938	1454, 1842, 2462, 3082, 3702, 4322, 4859, 5189, 10217-10355	
178	シスチノシン、リソソームシスチン輸送体	414524	324	395471	939	1455, 1843, 2463, 3083, 3703, 4323	
179	シスチノシン、リソソームシスチン輸送体	441220	325	411465	940	1456, 1844, 2464, 3084, 3704, 4324	
180	シスチノシン、リソソームシスチン輸送体	452111	326	408652	941	1457, 1845, 2465, 3085, 3705, 4325	

【表０００６－１８】

181	デフェンシン、β１０３Ａ	314357	327	320951	942	1846, 2466, 3086, 3706, 4326, 4860, 5190	1629
182	デフェンシン、β１０３Ｂ	318124	328	324633	943	1847, 2467, 3087, 3707, 4327, 4861, 5191, 10356-10442	1630
183	デフェンシン、β４Ａ	302247	329	303532	944	1848, 2468, 3088, 3708, 4328, 4862, 5192, 10443-10529	1631
184	デフェンシン、β４Ｂ	318157	330	424598	945	1849, 2469, 3089, 3709, 4329, 4863, 5193	1632
185	デグルデクプラス；インスリンアスパルト；インスリンデグルデク						
186	デオキシリボヌクレアーゼＩ	246949	331	246949	946	1850, 2470, 3090, 3710, 4330, 4864, 5194, 10530-10616	1633
187	デオキシリボヌクレアーゼＩ	407479	332	385905	947	1851, 2471, 3091, 3711, 4331, 4865, 5195	1633
188	デオキシリボヌクレアーゼＩ	414110	333	416699	948	1852, 2472, 3092, 3712, 4332, 4866, 5196	
189	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	258104	334	258104	949	1458, 1853, 2473, 3093, 3713, 4333, 4867, 5197	
190	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	394120	335	377678	950	1459, 1854, 2474, 3094, 3714, 4334, 4868, 5198, 10617-10703	1634
191	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	409366	336	386512	951	1460, 1855, 2475, 3095, 3715, 4335, 4869, 5199	

【表０００６－１９】

192	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	409582	337	386547	952	1461, 1856, 2476, 3096, 3716, 4336, 4870, 5200	
193	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	409651	338	386683	953	1462, 1857, 2477, 3097, 3717, 4337, 4871, 5201	
194	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	409744	339	386285	954	1463, 1858, 2478, 3098, 3718, 4338, 4872, 5202	
195	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	409762	340	387137	955	1464, 1859, 2479, 3099, 3719, 4339, 4873, 5203	
196	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	410020	341	386881	956	1465, 1860, 2480, 3100, 3720, 4340, 4874, 5204	
197	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	410041	342	386617	957	1466, 1861, 2481, 3101, 3721, 4341, 4875, 5205	
198	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	413539	343	407046	958	1467, 1862, 2482, 3102, 3722, 4342, 4876, 5206	
199	ジスフェリン、肢帯筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性）	429174	344	398305	959	1468, 1863, 2483, 3103, 3723, 4343, 4877, 5207	
200	エクトジスプラシンＡ	338901	345	340611	960	1864, 2484, 3104, 3724, 4344, 4878, 5208	
201	エクトジスプラシンＡ	374552	346	363680	961	1865, 2485, 3105, 3725, 4345, 4879, 5209	
202	エクトジスプラシンＡ	374553	347	363681	962	1866, 2486, 3106, 3726, 4346, 4880, 5210, 10704-10790	1635

【表０００６－２０】

203	エクトジスプラシンA	525810	348	434195	963	1867, 2487, 3107, 3727, 4347, 4881, 5211	
204	エクトジスプラシンA	524573	349	432585	964	1868, 2488, 3108, 3728, 4348, 4882, 5212	
205	エクトジスプラシンA	527388	350	434861	965	1869, 2489, 3109, 3729, 4349, 4883, 5213	
206	エナメリン	396073	351	379383	966	1870, 2490, 3110, 3730, 4350, 4884, 5214	1636
207	エリスロポエチン	252723	352	252723	967	1871, 2491, 3111, 3731, 4351, 4885, 5215, 10791-11051	1637
208	エクセナチド				968	1872, 2492, 3112, 3732, 4352, 4886, 5216	
209	配列類似性９８を有するファミリー、メンバーC	252530	353	252530	969	1873, 2493, 3113, 3733, 4353	
210	配列類似性９８を有するファミリー、メンバーC	343358	354	340348	970	1874, 2494, 3114, 3734, 4354	
211	フィブリノーゲンα鎖	302053	355	306361	971	1469, 1875, 2495, 3115, 3735, 4355, 11052-11190	
212	フィブリノーゲンα鎖	403106	356	385981	972	1470, 1876, 2496, 3116, 3736, 4356	
213	フィブリノーゲンα鎖	457487	357	407891	973	1877, 2497, 3117, 3737, 4357	
214	フィブリノーゲンβ鎖	302068	358	306099	974	1471, 1878, 2498, 3118, 3738, 4358, 11191-11329	

【表０００６－２１】

215	フィブリノーゲンβ鎖	537843	359	437727	975	1879, 2499, 3119, 3739, 4359	
216	フィブリノーゲンγ鎖	336098	360	336829	976	1472, 1880, 2500, 3120, 3740, 4360, 11330-11468	
217	フィブリノーゲンγ鎖	404648	361	384860	977	1473, 1881, 2501, 3121, 3741, 4361	
218	線維芽細胞成長因子２１	222157	362	222157	978	1474, 1882, 2502, 3122, 3742, 4362	
219	線維芽細胞成長因子２１	593756	363	471477	979	1883, 2503, 3123, 3743, 4363, 11469-11555	
220	フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン含有５	373470	364	362569	980	1884, 2504, 3124, 3744, 4364,	
221	フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン含有５	373471	365	362570	981	1885, 2505, 3125, 3745, 4365, 11556-11642	
222	卵胞刺激ホルモン、βポリペプチド	254122	366	254122	982	1886, 2506, 3126, 3746, 4366, 4887, 5217, 11643-11729	
223	卵胞刺激ホルモン、βポリペプチド	417547	367	416606	983	1887, 2507, 3127, 3747, 4367, 4888, 5218	
224	卵胞刺激ホルモン、βポリペプチド	533718	368	433424	984	1888, 2508, 3128, 3748, 4368, 4889, 5219	
225	フマリルアセト酢酸加水分解酵素（フマリルアセトアセターゼ）	261755	369	261755	985	1475 , 1889, 2509, 3129, 3749, 4369	
226	フマリルアセト酢酸加水分解酵素（フマリルアセトアセターゼ）	407106	370	385080	986	1890, 2510, 3130, 3750, 4370, 11730-11868	

【表０００６－２２】

227	フマリルアセト酢酸加水分解酵素（フマリルアセトアセターゼ）	561421	371	453347	987	1891, 2511, 3131, 3751, 4371	
228	ガラクトキナーゼ１	225614	372	225614	988	1892, 2512, 3132, 3752, 4372	
229	ガラクトキナーゼ１	375188	373	364334	989	1893, 2513, 3133, 3753, 4373	
230	ガラクトキナーゼ１	437911	374	406305	990	1894, 2514, 3134, 3754, 4374	
231	ガラクトキナーゼ１	588479	375	465930	991	1895, 2515, 3135, 3755, 4375, 11869-11955	
232	ガラクトサミン（Ｎ－アセチル）－６－硫酸スルファターゼ	268695	376	268695	992	1476, 1896, 2516, 3136, 3756, 4376, 4890, 5220, 11956-12042	1638
233	ガラクトサミン（Ｎ－アセチル）－６－硫酸スルファターゼ	439266	377	402127	993	1897, 2517, 3137, 3757, 4377, 4891, 5221	
234	ガラクトサミン（Ｎ－アセチル）－６－硫酸スルファターゼ	542788	378	438197	994	1477, 1898, 2518, 3138, 3758, 4378, 4892, 5222	
235	ガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ	378842	379	368119	995	1899, 2519, 3139, 3759, 4379, 12043-12181	
236	ガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ	450095	380	401956	996	1900, 2520, 3140, 3760, 4380	
237	ガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ	554550	381	451435	997	1901, 2521, 3141, 3761, 4381	
238	ガラクトシダーゼ、α	218516	382	218516	998	1902, 2522, 3142, 3762, 4382, 12182-12268	1639

【表０００６－２３】

239	ガレクチン３阻害剤（Ａ９）		383		999		1640
240	ガレクチン３阻害剤（Ｃ１２）		384		1000		1641
241	グリア細胞由来神経栄養因子	326524	385	317145	1001	1903, 2523, 3143, 3763, 4383, 4893, 5223	
242	グリア細胞由来神経栄養因子	344622	386	339703	1002	1904, 2524, 3144, 3764, 4384, 4894, 5224	
243	グリア細胞由来神経栄養因子	427982	387	409007	1003	1905, 2525, 3145, 3765, 4385, 4895, 5225, 12269-12355	1642
244	グリア細胞由来神経栄養因子	502572	388	423557	1004	1906, 2526, 3146, 3766, 4386, 4896, 5226	
245	グリア細胞由来神経栄養因子	510177	389	424592	1005	1907, 2527, 3147, 3767, 4387, 4897, 5227	
246	グリア細胞由来神経栄養因子	515058	390	425928	1006	1908, 2528, 3148, 3768, 4388, 4898, 5228	
247	グリア細胞由来神経栄養因子	381826	391	371248	1007	1909, 2529, 3149, 3769, 4389, 4899, 5229	
248	ＧＬＰ－１　Ｆｃ；デュラグルチド						
249	グルカゴン	375497	392	364647	1008	1910, 2530, 3150, 3770, 4390, 4900, 5230	1643
250	グルカゴン	418842	393	387662	1009	1911, 2531, 3151, 3771, 4391, 4901, 5231, 12356-12703	1643

【表０００６－２４】

251	グルカン（１，４－α－）、分枝酵素１	264326	394	264326	1010	1912, 2532, 3152, 3772, 4392	
252	グルカン（１，４－α－）、分枝酵素１	429644	395	410833	1011	1478, 1913, 2533, 3153, 3773, 4393, 12704-12842	
253	グルカン（１，４－α－）、分枝酵素１	536832	396	445365	1012	1914, 2534, 3154, 3774, 4394	
254	グルコース－６－ホスファターゼ、触媒サブユニット	253801	397	253801	1013	1915, 2535, 3155, 3775, 4395, 12843-12981	
255	グルコシダーゼ、α；酸性	302262	398	305692	1014	1916, 2536, 3156, 3776, 4396, 4902, 5232, 12982-13155	1644
256	グルコシダーゼ、α；酸性	390015	399	374665	1015	1917, 2537, 3157, 3777, 4397, 4903, 5233	1644
257	グルコシダーゼ、β、酸性	327247	400	314508	1016	1918, 2538, 3158, 3778, 4398, 4904, 5234	1645
258	グルコシダーゼ、β、酸性	368373	401	357357	1017	1919, 2539, 3159, 3779, 4399, 4905, 5235	1645
259	グルコシダーゼ、β、酸性	402928	402	385813	1018	1920, 2540, 3160, 3780, 4400, 4906, 5236	1645
260	グルコシダーゼ、β、酸性	427500	403	402577	1019	1921, 2541, 3161, 3781, 4401, 4907, 5237	1645
261	グルコシダーゼ、β、酸性	428024	404	397986	1020	1922, 2542, 3162, 3782, 4402, 4908, 5238	1645
262	グルコシダーゼ、β、酸性	536555	405	446457	1021	1923, 2543, 3163, 3783, 4403, 4909, 5239	1645

【表０００６－２５】

263	グルコシダーゼ、β、酸性	536770	406	445560	1022	1924, 2544, 3164, 3784, 4404, 4910, 5240	1645
264	グリコーゲン合成酵素２（肝臓）	261195	407	261195	1023	1925, 2545, 3165, 3785, 4405, 13156-13242	
265	糖タンパク質ホルモン、αポリペプチド	369582	408	358595	1024	1926, 2546, 3166, 3786, 4406, 4911, 5241, 13243-13329	1646
266	ＧＰ２０１３；リツキシマブ						
267	グラニュリシン９ｋＤａ（非分泌型）					1479	
268	グラニュリシン９ｋＤａ（分泌型）					1480	
269	成長ホルモン１	323322	409	312673	1025	1927, 2547, 3167, 3787, 4407, 4912, 5242, 13330-13416	1647
270	成長ホルモン１	342364	410	339278	1026	1928, 2548, 3168, 3788, 4408, 4913, 5243	1647
271	成長ホルモン１	351388	411	343791	1027	1929, 2549, 3169, 3789, 4409, 4914, 5244	1647
272	成長ホルモン１	458650	412	408486	1028	1930, 2550, 3170, 3790, 4410, 4915, 5245	1647
273	成長ホルモン２	332800	413	333157	1029	1931, 2551, 3171, 3791, 4411, 4916, 5246	
274	成長ホルモン２	423893	414	409294	1030	1932, 2552, 3172, 3792, 4412, 4917, 5247	

【表０００６－２６】

275	成長ホルモン２	449787	415	410618	1031	1933, 2553, 3173, 3793, 4413, 4918, 5248	
276	成長ホルモン２	456543	416	394122	1032	1934, 2554, 3174, 3794, 4414, 4919, 5249	
277	ＧＴＰシクロヒドロラーゼ１	395514	417	378890	1033	1935, 2555, 3175, 3795, 4415, 4920, 5250, 13417-13503	1648
278	ＧＴＰシクロヒドロラーゼ１	395524	418	378895	1034	1936, 2556, 3176, 3796, 4416, 4921, 5251	
279	ＧＴＰシクロヒドロラーゼ１	491895	419	419045	1035	1937, 2557, 3177, 3797, 4417, 4922, 5252	1649
280	ＧＴＰシクロヒドロラーゼ１	536224	420	445246	1036	1938, 2558, 3178, 3798, 4418, 4923, 5253	
281	ＧＴＰシクロヒドロラーゼ１	543643	421	444011	1037	1939, 2559, 3179, 3799, 4419, 4924, 5254	
282	ヘモクロマトーシス	309234	422	311698	1038	1940, 2560, 3180, 3800, 4420	
283	ヘモクロマトーシス	317896	423	313776	1039	1941, 2561, 3181, 3801, 4421	
284	ヘモクロマトーシス	336625	424	337819	1040	1942, 2562, 3182, 3802, 4422	
285	ヘモクロマトーシス	349999	425	259699	1041	1943, 2563, 3183, 3803, 4423	
286	ヘモクロマトーシス	352392	426	315936	1042	1944, 2564, 3184, 3804, 4424	
287	ヘモクロマトーシス	353147	427	312342	1043	1945, 2565, 3185, 3805, 4425	

【表０００６－２７】

288	ヘモクロマトーシス	357618	428	417404	1044	1946, 2566, 3186, 3806, 4426	
289	ヘモクロマトーシス	397022	429	380217	1045	1947, 2567, 3187, 3807, 4427	
290	ヘモクロマトーシス	461397	430	420802	1046	1948, 2568, 3188, 3808, 4428	
291	ヘモクロマトーシス	470149	431	419725	1047	1949, 2569, 3189, 3809, 4429	
292	ヘモクロマトーシス	488199	432	420559	1048	1950, 2570, 3190, 3810, 4430	
293	ヘモクロマトーシス	535098	433	445872	1049	1951, 2571, 3191, 3811, 4431	
294	ヘモクロマトーシス	539147	434	445098	1050	1952, 2572, 3192, 3812, 4432	
295	ヘモクロマトーシス２型（若年性）	336751	435	337014	1051	1481, 1953, 2573, 3193, 3813, 4433, 4925, 5255, 13504-13590	
296	ヘモクロマトーシス２型（若年性）	357836	436	350495	1052	1482, 1954, 2574, 3194, 3814, 4434, 4926, 5256	
297	ヘモクロマトーシス２型（若年性）	421822	437	411863	1053	1483, 1955, 2575, 3195, 3815, 4435, 4927, 5257	
298	ヘモクロマトーシス２型（若年性）	475797	438	425716	1054	1484, 1956, 2576, 3196, 3816, 4436, 4928, 5258	
299	ヘモクロマトーシス２型（若年性）	497365	439	421820	1055	1957, 2577, 3197, 3817, 4437, 4929, 5259	
300	ヘモクロマトーシス２型（若年性）	577520	440	463276	1056	1958, 2578, 3198, 3818, 4438	

【表０００６－２８】

301	ヘモクロマトーシス２型（若年性）	580693	441	464413	1057	1959, 2579, 3199, 3819, 4439	
302	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	222390	442	222390	1058	1960, 2580, 3200, 3820, 4440, 13591-13677	
303	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	354224	443	346164	1059	1961, 2581, 3201, 3821, 4441	
304	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	394769	444	378250	1060	1962, 2582, 3202, 3822, 4442	
305	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	412881	445	396307	1061	1963, 2583, 3203, 3823, 4443	
306	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	421558	446	388592	1062	1964, 2584, 3204, 3824, 4444	
307	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	423064	447	413829	1063	1965, 2585, 3205, 3825, 4445	
308	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	444829	448	389854	1064	1966, 2586, 3206, 3826, 4446	
309	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	453411	449	408270	1065	1967, 2587, 3207, 3827, 4447	
310	肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；分散因子）	457544	450	391238	1066	1968, 2588, 3208, 3828, 4448	
311	ヘプシジン抗菌性ペプチド	222304	451	222304	1067	14851969, 2589, 3209, 3829, 4449	
312	ヘプシジン抗菌性ペプチド	598398	452	471894	1068	1970, 2590, 3210, 3830, 4450, 13678-13764	
313	ハーセプチン重鎖				1069	1971, 2591, 3211, 3831, 4451, 4930, 5260	
314	ハーセプチン軽鎖				1070	1972, 2592, 3212, 3832, 4452, 4931, 5261	

【表０００６－２９】

315	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ１	298556	453	298556	1071	1486, 1973, 2593, 3213, 3833, 4453, 4932, 5262, 13765-13851	1650
316	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ１	370796	454	359832	1072	1974, 2594, 3214, 3834, 4454, 4933, 5263	
317	イデグリラ；インスリンデグルデク；リラグルチド						
318	イズロン酸－２－スルファターゼ	340855	455	339801	1073	1975, 2595, 3215, 3835, 4455, 4934, 5264	1651
319	イズロン酸－２－スルファターゼ	370441	456	359470	1074	1976, 2596, 3216, 3836, 4456, 4935, 5265	1651
320	イズロン酸－２－スルファターゼ	370443	457	359472	1075	1977, 2597, 3217, 3837, 4457, 4936, 5266	1651
321	イズロン酸－２－スルファターゼ	428056	458	390241	1076	1978, 2598, 3218, 3838, 4458, 4937, 5267	1651
322	イズロン酸－２－スルファターゼ	521702	459	429745	1077	1979, 2599, 3219, 3839, 4459, 4938, 5268	1651
323	イズロン酸－２－スルファターゼ	537071	460	440324	1078	1980, 2600, 3220, 3840, 4460, 4939, 5269	1651
324	イズロン酸－２－スルファターゼ	541269	461	441261	1079	1981, 2601, 3221, 3841, 4461, 4940, 5270	1651
325	ズロニダーゼ、α－Ｌ－	247933	462	247933	1080	1982, 2602, 3222, 3842, 4462, 4941, 5271, 13852-13938	1652

【表０００６－３０】

326	ズロニダーゼ、α－Ｌ－	453894	463	396458	1081	1983, 2603, 3223, 3843, 4463, 4942, 5272	1652
327	ＩｇＭ重						
328	ＩｇＭ軽						
329	ＩＮＳ－ＩＧＦ２リードスルー	397270	464	380440	1082	1984, 2604, 3224, 3844, 4464, 4943, 5273	
330	インスリン	250971	465	250971	1083	1985, 2605, 3225, 3845, 4465, 4944, 5274, 13939-14286	1653
331	インスリン	381330	466	370731	1084	1986, 2606, 3226, 3846, 4466, 4945, 5275	1653
332	インスリン	397262	467	380432	1085	1987, 2607, 3227, 3847, 4467, 4946, 5276, 14287-14373	1653
333	インスリン	512523	468	424008	1086	1988, 2608, 3228, 3848, 4468, 4947, 5277	
334	インスリンアスパルト				1087	1989, 2609, 3229, 3849, 4469, 4948, 5278	
335	インスリングラルギン				1088	1990, 2610, 3230, 3850, 4470, 4949, 5279	
336	インスリングルリジン				1089	1991, 2611, 3231, 3851, 4471, 4950, 5280	
337	インスリンリスプロ				1090	1992, 2612, 3232, 3852, 4472, 4951, 5281	
338	インターフェロン、α１０	357374	469	369566	1091	1993, 2613, 3233, 3853,	

【表０００６－３１】

						4473, 4952, 5282	
339	インターフェロン、α１３	449498	470	394494	1092	1994, 2614, 3234, 3854, 4474, 4953, 5283	
340	インターフェロン、α１４	380222	471	369571	1093	1995, 2615, 3235, 3855, 4475, 4954, 5284	
341	インターフェロン、α１６	380216	472	369564	1094	1996, 2616, 3236, 3856, 4476, 4955, 5285	
342	インターフェロン、α１７	413767	473	411940	1095	1997, 2617, 3237, 3857, 4477, 4956, 5286	
343	インターフェロン、α２	380206	474	369554	1096	1998, 2618, 3238, 3858, 4478, 4957, 5287, 14374-14460	1654
344	インターフェロン、α２１	380225	475	369574	1097	1999, 2619, 3239, 3859, 4479, 4958, 5288	
345	インターフェロン、α４	421715	476	412897	1098	2000, 2620, 3240, 3860, 4480, 4959, 5289	
346	インターフェロン、α５	259555	477	259555	1099	2001, 2621, 3241, 3861, 4481, 4960, 5290	
347	インターフェロン、α６	380210	478	369558	1100	2002, 2622, 3242, 3862, 4482, 4961, 5291	
348	インターフェロン、α７	239347	479	239347	1101	2003, 2623, 3243, 3863, 4483, 4962, 5292	
349	インターフェロン、α８	380205	480	369553	1102	2004, 2624, 3244, 3864, 4484, 4963,	

【表０００６－３２】

						5293	
350	インターフェロン、β１、線維芽細胞	380232	481	369581	1103	2005, 2625, 3245, 3865, 4485, 4964, 5294, 14461-14547	1655
351	インターロイキン１０	423557	482	412237	1104	1487, 2006, 2626, 3246, 3866, 4486, 14548-14634	
352	インターロイキン２１	264497	483	264497	1105	2007, 2627, 3247, 3867, 4487, 14635-14721	
353	インターロイキン７	263851	484	263851	1106	1488, 2008, 2628, 3248, 3868, 4488, 4965, 5295, 14722-14860	1656
354	インターロイキン７	379113	485	368408	1107	1489, 2009, 2629, 3249, 3869, 4489, 4966, 5296	1656
355	インターロイキン７	379114	486	368409	1108	2010, 2630, 3250, 3870, 4490, 4967, 5297	
356	インターロイキン７	518982	487	430272	1109	2011, 2631, 3251, 3871, 4491, 4968, 5298	
357	インターロイキン７	520215	488	428364	1110	1490, 2012, 2632, 3252, 3872, 4492, 4969, 5299	
358	インターロイキン７	520269	489	427750	1111	1491, 2013, 2633, 3253, 3873, 4493, 4970, 5300	
359	インターロイキン７	520317	490	427800	1112	2014, 2634, 3254, 3874, 4494, 4971, 5301	
360	インターロイキン７	541183	491	438922	1113	1492, 2015, 2635, 3255,	

【表０００６－３３】

						3875, 4495, 4972, 5302	
361	ＫＩＴリガンド	228280	492	228280	1114	2016, 2636, 3256, 3876, 4496, 14861-14947	
362	ＫＩＴリガンド	347404	493	54216	1115	2017, 2637, 3257, 3877, 4497	
363	ＫＩＴリガンド	537835	494	438889	1116	2018, 2638, 3258, 3878, 4498	
364	クロトー	380099	495	369442	1117	1493, 2019, 2639, 3259, 3879, 4499, 14948-15347	
365	クロトー	426690	496	399513	1118	14942020, 2640, 3260, 3880, 4500	
366	クルッペル様因子４（消化管）	374672	497	363804	1119	2021, 2641, 3261, 3881, 4501	
367	クルッペル様因子４（消化管）	411706	498	399921	1120	2022, 2642, 3262, 3882, 4502	
368	クルッペル様因子４（消化管）	420475	499	404922	1121	2023, 2643, 3263, 3883, 4503	
369	クルッペル様因子４（消化管）	439281	500	396294	1122	2024, 2644, 3264, 3884, 4504	
370	レシチン－コレステロールアシルトランスフェラーゼ	264005	501	264005	1123	1495, 2025, 2645, 3265, 3885, 4505, 15348-15434	
371	レクチン、ガラクトシド結合性、可溶性、３	254301	502	254301	1124	2026, 2646, 3266, 3886, 4506, 15435-15521	
372	ｌｉｎ－２８ホモログＡ（線虫）	254231	503	254231	1125	2027, 2647, 3267, 3887, 4507	
373	ｌｉｎ－２８ホモログＡ（線虫）	326279	504	363314	1126	2028, 2648, 3268, 3888, 4508, 15522-15608	

【表０００６－３４】

374	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	282673	505	282673	1127	1496，2029，2649，3269，3889，4509，4973，5303	
375	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	336233	506	337354	1128	1497，2030，2650，3270，3890，4510，4974，5304，15609-15782	1657
376	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	354621	507	360895	1129	2031，2651，3271，3891，4511，4975，5305	
377	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	371829	508	360894	1130	2032，2652，3272，3892，4512，4976，5306	1657
378	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	371837	509	360903	1131	1498，2033，2653，3273，3893，4513，4977，5307	
379	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	425287	510	392037	1132	1499，2034，2654，3274，3894，4514，4978，5308	
380	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	428800	511	388415	1133	1500，2035，2655，3275，3895，4515，4979，5309	1657
381	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	456827	512	413019	1134	2036，2656，3276，3896，4516，4980，5310	1657
382	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	540050	513	439727	1135	2037，2657，3277，3897，4517，4981，5311	
383	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	541980	514	438127	1136	2038，2658，3278，3898，4518，4982，5312	1657
384	リパーゼA、リソソーム酸、コレステロールエステラーゼ	542307	515	437564	1137	1501，2039，2659，3279，3899，4519，4983，5313	1657

【表０００６－３５】

385	リポタンパク質リパーゼ	311322	516	309757	1138	1502, 2040, 2660, 3280, 3900, 4520, 4984, 5314, 15783-15869	
386	リポタンパク質リパーゼ	520959	517	428496	1139	1503, 2041, 2661, 3281, 3901, 4521, 4985, 5315	
387	リポタンパク質リパーゼ	522701	518	428557	1140	1504, 2042, 2662, 3282, 3902, 4522, 4986, 5316	
388	リポタンパク質リパーゼ	524029	519	428237	1141	1505, 2043, 2663, 3283, 3903, 4523, 4987, 5317	
389	リポタンパク質リパーゼ	535763	520	438606	1142	2044, 2664, 3284, 3904, 4524, 4988, 5318	
390	リポタンパク質リパーゼ	538071	521	439407	1143	2045, 2665, 3285, 3905, 4525, 4989, 5319	
391	リラグルチド天然７－３７					1506	
392	リラグルチド天然７－３７－Ａ８Ｇ					1507	
393	リラグルチド天然７－３７－Ａ８Ｇ－１０Ｘ					1508	
394	リラグルチド；ＧＬＰ１；ビクトーザ					1509	
395	ＬＬ－３７；カテリシジン抗菌性ペプチド				1144		1620
396	低密度リポタンパク質受容体	455727	522	397829	1145	1510, 2046, 2666, 3286, 3906, 4526	
397	低密度リポタンパク質受容体	535915	523	440520	1146	1511, 2047, 2667, 3287, 3907, 4527	

【表０００６－３６】

398	低密度リポタンパク質受容体	545707	524	437639	1147	1512, 2048, 2668, 3288, 3908, 4528	
399	低密度リポタンパク質受容体	558013	525	453346	1148	1513, 2049, 2669, 3289, 3909, 4529	
400	低密度リポタンパク質受容体	558518	526	454071	1149	1514 , 2050, 2670, 3290, 3910, 4530, 15870-16478	
401	低密度リポタンパク質受容体	561343	527	454147	1150	2051, 2671, 3291, 3911, 4531	
402	低密度リポタンパク質受容体	252444	528	252444	1151	2052, 2672, 3292, 3912, 4532	
403	黄体形成ホルモンβポリペプチド	221421	529	221421	1152	2053, 2673, 3293, 3913, 4533	
404	黄体形成ホルモンβポリペプチド	391870	530	375743	1153	2054, 2674, 3294, 3914, 4534, 4990, 5320,	
405	ＬＹ２９６３０１６；インスリングラルギン						
406	Ｌｙ６／神経毒１	317543	531	319846	1154	2055, 2675, 3295, 3915, 4535	
407	マブセラ、皮下；リツキシマブ						
408	マンノシダーゼ、α、クラス２Ｂ、メンバー１	221363	532	221363	1155	2056, 2676, 3296, 3916, 4536	
409	マンノシダーゼ、α、クラス２Ｂ、メンバー１	433513	533	390583	1156	1515, 2057, 2677, 3297, 3917, 4537	
410	マンノシダーゼ、α、クラス２Ｂ、メンバー１	456935	534	395473	1157	1516, 2058, 2678, 3298, 3918, 4538, 16479-16565	
411	マンノシダーゼ、α、クラス２Ｂ、メンバー	536796	535	438266	1158	2059, 2679, 3299, 3919, 4539	

【表０００６－３７】

	1						
412	メテオリン、グリア細胞分化制御因子	568223	536	455068	1159	2060, 2680, 3300, 3920, 4540, 16566-16652	
413	メテオリン、グリア細胞分化制御因子	219542	537	219542	1160	2061, 2681, 3301, 3921, 4541	
414	メチルマロニルＣｏＡムターゼ	274813	538	274813	1161	1517, 2062, 2682, 3302, 3922, 4542, 4991, 5321, 16653-16739	1658
415	メチルマロニルＣｏＡムターゼ	540138	539	445535	1162	2063, 2683, 3303, 3923, 4543, 4992, 5322,	
416	クロソームトリグリセリド輸送タンパク質	265517	540	265517	1163	1518, 2064, 2684, 3304, 3924, 4544, 16740-16878	
417	クロソームトリグリセリド輸送タンパク質	457717	541	400821	1164	2065, 2685, 3305, 3925, 4545	
418	クロソームトリグリセリド輸送タンパク質	506883	542	426755	1165	1519, 2066, 2686, 3306, 3926, 4546	
419	クロソームトリグリセリド輸送タンパク質	538053	543	437358	1166	2067, 2687, 3307, 3927, 4547	
420	Ｎ－アセチルグルコサミン－１－リン酸トランスフェラーゼ、αおよびβサブユニット	299314	544	299314	1167	1520, 2068, 2688, 3308, 3928, 4548, 16879-17017	
421	Ｎ－アセチルグルコサミン－１－リン酸トランスフェラーゼ、αおよびβサブユニット	549940	545	449150	1168	1521, 2069, 2689, 3309, 3929, 4549	
422	Ｎ－アセチルグルタミン酸合成酵素	293404	546	293404	1169	2070, 2690, 3310, 3930, 4550, 17018-	

【表０００６－３８】

						17156	
423	Ｎ－アセチルグルタミン酸合成酵素	541745	547	441262	1170	2071, 2691, 3311, 3931, 4551	
424	Ｎ－アシルスフィンゴシンアミド加水分解酵素（酸性セラミダーゼ）１	262097	548	262097	1171	1522, 2072, 2692, 3312, 3932, 455217157-17295	
425	Ｎ－アシルスフィンゴシンアミド加水分解酵素（酸性セラミダーゼ）１	314146	549	326970	1172	1523, 2073, 2693, 3313, 3933, 4553	
426	Ｎ－アシルスフィンゴシンアミド加水分解酵素（酸性セラミダーゼ）１	381733	550	371152	1173	1524 , 2074, 2694, 3314, 3934, 4554	
427	Ｎ－アシルスフィンゴシンアミド加水分解酵素（酸性セラミダーゼ）１	417108	551	394125	1174	1525 , 2075, 2695, 3315, 3935, 4555	
428	Ｎ－アシルスフィンゴシンアミド加水分解酵素（酸性セラミダーゼ）１	520781	552	427751	1175	1526, 2076, 2696, 3316, 3936, 4556	
429	ナトリウム利尿ペプチドＢ	376468	553	365651	1176	2077, 2697, 3317, 3937, 4557, 4993, 5323,	
430	神経成長因子（βポリペプチド）	369512	554	358525	1177	2078, 2698, 3318, 3938, 4558, 4994, 5324, 17296-17382	
431	ニューレグリン１	287840	555	287840	1178	2079, 2699, 3319, 3939, 4559	
432	ニューレグリン１	287842	556	287842	1179	2080, 2700, 3320, 3940, 4560, 17383-17469	

【表０００６－３９】

433	ニューレグリン1	287845	557	287845	1180	2081, 2701, 3321, 3941, 4561	
434	ニューレグリン1	338921	558	343395	1181	2082, 2702, 3322, 3942, 4562	
435	ニューレグリン1	341377	559	340497	1182	2083, 2703, 3323, 3943, 4563	
436	ニューレグリン1	356819	560	349275	1183	2084, 2704, 3324, 3944, 4564	
437	ニューレグリン1	405005	561	384620	1184	2085, 2705, 3325, 3945, 4565	
438	ニューレグリン1	519301	562	429582	1185	2086, 2706, 3326, 3946, 4566	
439	ニューレグリン1	520407	563	434640	1186	2087, 2707, 3327, 3947, 4567, 17470-17556	
440	ニューレグリン1	520502	564	433289	1187	2088, 2708, 3328, 3948, 4568	
441	ニューレグリン1	521670	565	428828	1188	2089, 2709, 3329, 3949, 4569	
442	ニューレグリン1	539990	566	439276	1189	2090, 2710, 3330, 3950, 4570	
443	ニューレグリン1	523079	567	430120	1190	2091, 2711, 3331, 3951, 4571	
444	OMOMYC				1191	1527, 17557-17643	
445	OMOMYC９０（９０AA短縮ドメイン）					1528, 17644-17784	
446	オレンシア、皮下；アバタセプト						
447	オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ	39007	568	39007	1192	1529, 2092, 2712, 3332, 3952, 4572, 4995, 5325,	1659

【表０００６－４０】

						17785-17871	
448	副甲状腺ホルモン	282091	569	282091	1193	2093, 2713, 3333, 3953, 4573, 4996, 5326	
449	副甲状腺ホルモン	529816	570	433208	1194	2094, 2714, 3334, 3954, 4574, 4997, 5327	
450	ＰＢＯ－３２６；リツキシマブ						
451	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	546844	571	446658	1195	1530, 2095, 2715, 3335, 3955, 4575, 4998, 5328	
452	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	551337	572	447620	1196	1531, 2096, 2716, 3336, 3956, 4576, 4999, 5329	
453	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	553106	573	448059	1197	1532, 2097, 2717, 3337, 3957, 4577, 5000, 5330, 17872-17958	1660
454	ホスホリラーゼキナーゼβ	566044	574	456729	1198	2098, 2718, 3338, 3958, 4578	
455	ホスホリラーゼキナーゼγ２（精巣）	563588	575	455607	1199	2099, 2719, 3339, 3959, 4579, 17959-18045	
456	ホスホリラーゼキナーゼ、α２（肝臓）	379942	576	369274	1200	2100, 2720, 3340, 3960, 4580, 18046-18132	
457	ホスホリラーゼキナーゼ、β	299167	577	299167	1201	2101, 2721, 3341, 3961, 4581	
458	ホスホリラーゼキナーゼ、β	323584	578	313504	1202	2102, 2722, 3342, 3962, 4582, 18133-18219	

【表０００６－４１】

459	ホスホリラーゼキナーゼ、β	455779	579	414345	1203	2103, 2723, 3343, 3963, 4583	
460	ホスホリラーゼキナーゼ、γ２（精巣）	328273	580	329968	1204	2104, 2724, 3344, 3964, 4584	
461	ホスホリラーゼキナーゼ、γ２（精巣）	424889	581	388571	1205	2105, 2725, 3345, 3965, 4585	
462	ホスホリラーゼ、グリコーゲン、肝臓	216392	582	216392	1206	2106, 2726, 3346, 3966, 4586	
463	ホスホリラーゼ、グリコーゲン、肝臓	544180	583	443787	1207	2107, 2727, 3347, 3967, 4587	
464	プラスミノーゲン	308192	584	308938	1208	1533, 2108, 2728, 3348, 3968, 4588, 18220-18271	
465	プラスミノーゲン	316325	585	321466	1209	2109, 2729, 3349, 3969, 4589	
466	プラスミノーゲン	366924	586	355891	1210	1534, 2110, 2730, 3350, 3970, 4590	
467	プラスミノーゲン活性化因子、組織	220809	587	220809	1211	1535, 2111, 2731, 3351, 3971, 4591, 18272-18358	1661
468	プラスミノーゲン活性化因子、組織	270189	588	270189	1212	1536, 2112, 2732, 3352, 3972, 4592, 5001, 5331	1661
469	プラスミノーゲン活性化因子、組織	352041	589	270188	1213	1537, 2113, 2733, 3353, 3973, 4593, 5002, 5332	1661
470	プラスミノーゲン活性化因子、組織	429089	590	392045	1214	2114, 2734, 3354, 3974, 4594, 5003, 5333	1661
471	プラスミノーゲン活性化因子、組織	429710	591	407861	1215	1538, 2115, 2735, 3355, 3975, 4595, 5004, 5334	

【表０００６－４２】

472	プラスミノーゲン活性化因子、組織	519510	592	428886	1216	1539, 2116, 2736, 3356, 3976, 4596, 5005, 5335	
473	プラスミノーゲン活性化因子、組織	520523	593	428797	1217	1540, 2117, 2737, 3357, 3977, 4597, 5006, 5336	1661
474	プラスミノーゲン活性化因子、組織	521694	594	429801	1218	1541, 2118, 2738, 3358, 3978, 4598, 5007, 5337	1661
475	プラスミノーゲン活性化因子、組織	524009	595	429401	1219	1542, 2119, 2739, 3359, 3979, 4599, 5008, 5338	
476	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	259915	596	259915	1220	2120, 2740, 3360, 3980, 4600	
477	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	376243	597	365419	1221	2121, 2741, 3361, 3981, 4601	
478	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	383524	598	373016	1222	2122, 2742, 3362, 3982, 4602	
479	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	412166	599	387646	1223	2123, 2743, 3363, 3983, 4603	
480	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	419095	600	413622	1224	2124, 2744, 3364, 3984, 4604	
481	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	429603	601	392877	1225	2125, 2745, 3365, 3985, 4605	
482	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	433063	602	405041	1226	2126, 2746, 3366, 3986, 4606	
483	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	433348	603	412665	1227	2127, 2747, 3367, 3987, 4607	
484	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	434616	604	388842	1228	2128, 2748, 3368, 3988, 4608, 18359-18445	
485	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	448657	605	416165	1229	2129, 2749, 3369, 3989, 4609	

【表０００６－４３】

486	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	451077	606	391507	1230	2130, 2750, 3370, 3990, 4610	
487	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	454714	607	400047	1231	2131, 2751, 3371, 3991, 4611	
488	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	546505	608	448154	1232	2132, 2752, 3372, 3992, 4612	
489	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	547234	609	449442	1233	2133, 2753, 3373, 3993, 4613	
490	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	547658	610	446962	1234	2134, 2754, 3374, 3994, 4614	
491	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	548682	611	446815	1235	2135, 2755, 3375, 3995, 4615	
492	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	550059	612	447874	1236	2136, 2756, 3376, 3996, 4616	
493	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	550521	613	447969	1237	2137, 2757, 3377, 3997, 4617	
494	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	550572	614	448254	1238	2138, 2758, 3378, 3998, 4618	
495	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	553069	615	448231	1239	2139, 2759, 3379, 3999, 4619	
496	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	553206	616	446757	1240	2140, 2760, 3380, 4000, 4620	
497	プロタンパク質転換酵素スブチリシン／ケキシン９型	302118	617	303208	1241	2141, 2761, 3381, 4001, 4621	
498	プロタンパク質転換酵素スブチリシン／ケキシン９型	452118	618	401598	1242	2142, 2762, 3382, 4002, 4622	
499	プロタンパク質転換酵素スブチリシン／ケキシン９型	543384	619	441859	1243	2143, 2763, 3383, 4003, 4623	

【表０００６－４４】

500	プロテインＣ（凝固第Ｖａ因子および第ＶＩＩＩａ因子の失活因子）	234071	620	234071	1244	2144, 2764, 3384, 4004, 4624	
501	プロテインＣ（凝固第Ｖａ因子および第ＶＩＩＩａ因子の失活因子）	409048	621	386679	1245	2145, 2765, 3385, 4005, 4625, 5009, 5339	
502	プロテインＣ（凝固第Ｖａ因子および第ＶＩＩＩａ因子の失活因子）	422777	622	409543	1246	2146, 2766, 3386, 4006, 4626, 5010, 5340	
503	プロテインＣ（凝固第Ｖａ因子および第ＶＩＩＩａ因子の失活因子）	427769	623	406295	1247	2147, 2767, 3387, 4007, 4627, 5011, 5341	
504	プロテインＣ（凝固第Ｖａ因子および第ＶＩＩＩａ因子の失活因子）	429925	624	412697	1248	2148, 2768, 3388, 4008, 4628, 5012, 5342	
505	プロテインＣ（凝固第Ｖａ因子および第ＶＩＩＩａ因子の失活因子）	453608	625	404030	1249	2149, 2769, 3389, 4009, 4629, 5013, 5343	
506	プロテインＣ（凝固第Ｖａ因子および第ＶＩＩＩａ因子の失活因子）	537436	626	442106	1250	2150, 2770, 3390, 4010, 4630, 5014, 5344	
507	リラキシン２	308420	627	308018	1251	2151, 2771, 3391, 4011, 4631	
508	リラキシン２	381627	628	371040	1252	2152, 2772, 3392, 4012, 4632, 18446-18532	
509	リバースカスパーゼ（Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｃａｓｐａｓｅ）３（切断型）					1543	

【表０００６－４５】

510	リバースカスパーゼ（Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｃａｓｐａｓｅ）３（非切断型）					1544	
511	リバースカスパーゼ（Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｃａｓｐａｓｅ）６					1545	
512	ロドプシン	296271	629	296271	1253	2153, 2773, 3393, 4013, 4633, 5015, 5345, 18533-18619	
513	リツキシマブ；リツキシマブ						
514	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	355814	630	348068	1254	2154, 2774, 3394, 4014, 4634, 5016, 5346, 18620-18706	1662
515	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	393087	631	376802	1255	2155, 2775, 3395, 4015, 4635, 5017, 5347	1662
516	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	393088	632	376803	1256	2156, 2776, 3396, 4016, 4636, 5018, 5348	1662
517	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	402629	633	386094	1257	2157, 2777, 3397, 4017, 4637, 5019, 5349	
518	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α	404814	634	385960	1258	2158, 2778, 3398, 4018, 4638, 5020,	1662

【表０００６－４６】

	－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１					5350	
519	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	437397	635	408474	1259	2159, 2779, 3399, 4019, 4639, 5021, 5351	1662
520	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	440909	636	390299	1260	2160, 2780, 3400, 4020, 4640, 5022, 5352	1662
521	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	448921	637	416066	1261	2161, 2781, 3401, 4021, 4641, 5023, 5353	1662
522	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	449399	638	416354	1262	2162, 2782, 3402, 4022, 4642, 5024, 5354	1662
523	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	553327	639	452480	1263	2163, 2783, 3403, 4023, 4643, 5025, 5355, 18707-18793	
524	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	556091	640	452169	1264	2164, 2784, 3404, 4024, 4644, 5026, 5356	

【表０００６－４７】

525	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードA（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	556955	641	451098	1265	2165, 2785, 3405, 4025, 4645, 5027, 5357	
526	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードA（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	557118	642	451826	1266	2166, 2786, 3406, 4026, 4646, 5028, 5358	
527	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードA（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１	557492	643	452452	1267	2167, 2787, 3407, 4027, 4647, 5029, 5359	
528	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードC（アンチトロンビン）、メンバー１	351522	644	307953	1268	2168, 2788, 3408, 4028, 4648, 5030, 5360	
529	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードC（アンチトロンビン）、メンバー１	367698	645	356671	1269	1546, 2169, 2789, 3409, 4029, 4649, 5031, 5361, 18794-18932	
530	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードF（α－２抗プラスミン因子、色素上皮由来因子）、メンバー２	324015	646	321853	1270	1547, 2170, 2790, 3410, 4030, 4650	
531	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードF（α－２抗プラスミン因子、色素上皮由来因子）、メンバー２	382061	647	371493	1271	2171, 2791, 3411, 4031, 4651, 18933-19071	

【表０００６－４８】

532	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＦ（α－２抗プラスミン因子、色素上皮由来因子）、メンバー２	450523	648	403877	1272	1548, 2172, 2792, 3412, 4032, 4652	
533	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＦ（α－２抗プラスミン因子、色素上皮由来因子）、メンバー２	453066	649	402286	1273	1549 , 2173, 2793, 3413, 4033, 4653	
534	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＧ（Ｃ１阻害剤）、メンバー１	278407	650	278407	1274	1550, 2174, 2794, 3414, 4034, 4654, 5032, 5362, 19072-19210	
535	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＧ（Ｃ１阻害剤）、メンバー１	378323	651	367574	1275	1551 , 2175, 2795, 3415, 4035, 4655, 5033, 5363	
536	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＧ（Ｃ１阻害剤）、メンバー１	378324	652	367575	1276	1552, 2176, 2796, 3416, 4036, 4656, 5034, 5364	
537	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＧ（Ｃ１阻害剤）、メンバー１	405496	653	384561	1277	1553, 2177, 2797, 3417, 4037, 4657, 5035, 5365	
538	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＧ（Ｃ１阻害剤）、メンバー１	433668	654	399800	1278	2178, 2798, 3418, 4038, 4658, 5036, 5366	
539	サーチュイン１	212015	655	212015	1279	1554, 2179, 2799, 3419, 4039, 4659 , 19211-19297	1663
540	サーチュイン１	403579	656	384063	1280	1555, 2180, 2800, 3420, 4040, 4660, 5037, 5367	

【表０００６－４９】

541	サーチュイン１	406900	657	384508	1281	2181, 2801, 3421, 4041, 4661, 5038, 5368	
542	サーチュイン１	432464	658	409208	1282	1556, 2182, 2802, 3422, 4042, 4662, 5039, 5369	1664
543	サーチュイン６	305232	659	305310	1283	1557, 2183, 2803, 3423, 4043, 4663, 5040, 5370	
544	サーチュイン６	337491	660	337332	1284	1558, 2184, 2804, 3424, 4044, 4664, 5041, 5371, 19298-19384	1665
545	サーチュイン６	381935	661	371360	1285	1559, 2185, 2805, 3425, 4045, 4665, 5042, 5372	
546	溶質輸送体ファミリー２（促進性グルコース輸送体）、メンバー２	314251	662	323568	1286	1560, 2186, 2806, 3426, 4046, 4666, 19385-19523	
547	溶質輸送体ファミリー２（促進性グルコース輸送体）、メンバー２	382808	663	372258	1287	1561, 2187, 2807, 3427, 4047, 4667	
548	溶質輸送体ファミリー３７（グルコース－６－リン酸輸送体）メンバー４	577093	664	461344	1288	2188, 2808, 3428, 4048, 4668, , 19524-19610	
549	溶質輸送体ファミリー３７（グルコース－６－リン酸輸送体）メンバー４	590663	665	464769	1289	2189, 2809, 3429, 4049, 4669	
550	溶質輸送体ファミリー４０（鉄制御輸送体）、メンバー１	261024	666	261024	1290	2190, 2810, 3430, 4050, 4670	

【表０００６－５０】

551	溶質輸送体ファミリー４０（鉄制御輸送体）、メンバー１	427241	667	390005	1291	2191, 2811, 3431, 4051, 4671	
552	溶質輸送体ファミリー４０（鉄制御輸送体）、メンバー１	427419	668	392730	1292	2192, 2812, 3432, 4052, 4672	
553	溶質輸送体ファミリー４０（鉄制御輸送体）、メンバー１	440626	669	396134	1293	2193, 2813, 3433, 4053, 4673	
554	溶質輸送体ファミリー４０（鉄制御輸送体）、メンバー１	455320	670	413549	1294	2194, 2814, 3434, 4054, 4674	
555	溶質輸送体ファミリー４０（鉄制御輸送体）、メンバー１	481497	671	446069	1295	2195, 2815, 3435, 4055, 4675	
556	溶質輸送体ファミリー４０（鉄制御輸送体）、メンバー１	544056	672	444582	1296	2196, 2816, 3436, 4056, 4676	
557	ソルチリン１	256637	673	256637	1297	1562, 2197, 2817, 3437, 4057, 4677, 5043, 5373	
558	ソルチリン１	538502	674	438597	1298	1563 , 2198, 2818, 3438, 4058, 4678, 5044, 5374, 19611-19697	
559	精子接着分子１（ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ、透明帯結合性）	223028	675	223028	1299	2199, 2819, 3439, 4059, 4679	
560	精子接着分子１（ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ、透明帯結合性）	340011	676	345849	1300	2200, 2820, 3440, 4060, 4680, 5045, 5375	
561	精子接着分子１（ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ、透明帯結合	402183	677	386028	1301	2201, 2821, 3441, 4061, 4681, 5046, 5376	

【表０００６－５１】

	性）						
562	精子接着分子１（ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ、透明帯結合性）	413927	678	391491	1302	2202, 2822, 3442, 4062, 4682, 5047, 5377	
563	精子接着分子１（ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ、透明帯結合性）	439500	679	402123	1303	2203, 2823, 3443, 4063, 4683, 5048, 5378	
564	精子接着分子１（ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ、透明帯結合性）	460182	680	417934	1304	2204, 2824, 3444, 4064, 4684, 5049, 5379	
565	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム性	299397	681	299397	1305	1564, 2205, 2825, 3445, 4065, 4685, 5050, 5380,	
566	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム性	342245	682	340409	1306	1565, 2206, 2826, 3446, 4066, 4686, 5051, 5381, 19698-19784	1666
567	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム性	356761	683	349203	1307	1566, 2207, 2827, 3447, 4067, 4687, 5052, 5382	
568	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム性	527275	684	435350	1308	1567, 2208, 2828, 3448, 4068, 4688, 5053, 5383	
569	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム性	533123	685	435950	1309	1568, 2209, 2829, 3449, 4069, 4689, 5054, 5384	
570	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム	534405	686	434353	1310	1569, 2210, 2830, 3450, 4070, 4690, 5055, 5385	

【表０００６－５２】

	性						
571	ＳＲＹ（性決定領域Ｙ）－ボックス２	325404	687	323588	1311	2211, 2831, 3451, 4071, 4691	
572	ＳＲＹ（性決定領域Ｙ）－ボックス２	431565	688	439111	1312	2212, 2832, 3452, 4072, 4692, 19785-19871	
573	皮下ハーセプチン；トラスツズマブ						
574	サーファクタントタンパク質Ｂ	393822	689	377409	1313	2213, 2833, 3453, 4073, 4693	
575	サーファクタントタンパク質Ｂ	409383	690	386346	1314	2214, 2834, 3454, 4074, 4694	
576	サーファクタントタンパク質Ｂ	441838	691	395757	1315	2215, 2835, 3455, 4075, 4695	
577	サーファクタントタンパク質Ｂ	519937	692	428719	1316	2216, 2836, 3456, 4076, 4696	
578	シナジス						
579	トロンボモジュリン	377103	693	366307	1317	1570, 2217, 2837, 3457, 4077, 4697, 19872-19958	
580	トロンボモジュリン	503590	694	440119	1318	2218, 2838, 3458, 4078, 4698	
581	トロンボポエチン	204615	695	204615	1319	1571, 2219, 2839, 3459, 4079, 4699, 5056, 5386, 19959-20045	1667
582	トロンボポエチン	353488	696	341335	1320	2220, 2840, 3460, 4080, 4700, 5057, 5387	
583	トロンボポエチン	421442	697	411704	1321	1572, 2221, 2841, 3461, 4081, 4701, 5058, 5388	

【表０００６－５３】

584	トロンボポエチン	445696	698	410763	1322	1573, 2222, 2842, 3462, 4082, 4702, 5059, 5389	
585	ＴＬ０１１；リツキシマブ						
586	トランスフェリン受容体２	223051	699	223051	1323	2223, 2843, 3463, 4083, 4703	
587	トランスフェリン受容体２	431692	700	413905	1324	2224, 2844, 3464, 4084, 4704	
588	トランスフェリン受容体２	462107	701	420525	1325	2225, 2845, 3465, 4085, 4705	
589	トランスフェリン受容体２	544242	702	443656	1326	2226, 2846, 3466, 4086, 4706	
590	トランスフォーミング成長因子、β１	221930	703	221930	1327	2227, 2847, 3467, 4087, 4707，20046-20132	1668
591	トランスフォーミング成長因子、β２	366929	704	355896	1328	2228, 2848, 3468, 4088, 4708	
592	トランスフォーミング成長因子、β２	366930	705	355897	1329	2229, 2849, 3469, 4089, 4709	
593	トランスフォーミング成長因子、β３	238682	706	238682	1330	2230, 2850, 3470, 4090, 4710, 5060, 5390, 20133-20219	
594	トランスフォーミング成長因子、β３	556285	707	451110	1331	2231, 2851, 3471, 4091, 4711, 5061, 5391	
595	トランスサイレチン	237014	708	237014	1332	2232, 2852, 3472, 4092, 4712, 20220-20358	
596	トランスサイレチン	432547	709	396762	1333	2233, 2853, 3473, 4093, 4713	
597	トランスサイレチン	541025	710	442134	1334	2234, 2854, 3474, 4094, 4714	

【表０００６－５４】

598	タフテリン１	353024	711	343781	1335	2235, 2855, 3475, 4095, 4715, 5062, 5392	1669
599	タフテリン１	368848	712	357841	1336	2236, 2856, 3476, 4096, 4716, 5063, 5393	1669
600	タフテリン１	368849	713	357842	1337	2237, 2857, 3477, 4097, 4717, 5064, 5394, 20359-20445	1669
601	タフテリン１	507671	714	443643	1338	2238, 2858, 3478, 4098, 4718, 5065, 5395	1669
602	タフテリン１	538902	715	437997	1339	2239, 2859, 3479, 4099, 4719, 5066, 5396	
603	タフテリン１	544350	716	441557	1340	2240, 2860, 3480, 4100, 4720, 5067, 5397	1669
604	腫瘍タンパク質ｐ５３	269305	717	269305	1341	1574, 2241, 2861, 3481, 4101, 4721, 5068, 5398, 20446-20532	1670
605	腫瘍タンパク質ｐ５３	359597	718	352610	1342	1575, 2242, 2862, 3482, 4102, 4722, 5069, 5399	
606	腫瘍タンパク質ｐ５３	396473	719	379735	1343	2243, 2863, 3483, 4103, 4723, 5070, 5400	
607	腫瘍タンパク質ｐ５３	413465	720	410739	1344	1576, 2244, 2864, 3484, 4104, 4724, 5071, 5401	
608	腫瘍タンパク質ｐ５３	414315	721	394195	1345	2245, 2865, 3485, 4105, 4725, 5072, 5402	

【表０００６－５５】

609	腫瘍タンパク質ｐ５３	419024	722	402130	1346	2246, 2866, 3486, 4106, 4726, 5073, 5403	
610	腫瘍タンパク質ｐ５３	420246	723	391127	1347	1577, 2247, 2867, 3487, 4107, 4727, 5074, 5404	
611	腫瘍タンパク質ｐ５３	445888	724	391478	1348	2248, 2868, 3488, 4108, 4728, 5075, 5405	1670
612	腫瘍タンパク質ｐ５３	455263	725	398846	1349	1578, 2249, 2869, 3489, 4109, 4729, 5076, 5406	
613	腫瘍タンパク質ｐ５３	503591	726	426252	1350	1579 , 2250, 2870, 3490, 4110, 4730, 5077, 5407	
614	腫瘍タンパク質ｐ５３	508793	727	424104	1351	1580, 2251, 2871, 3491, 4111, 4731, 5078, 5408	
615	腫瘍タンパク質ｐ５３	509690	728	425104	1352	1581, , 2252, 2872, 3492, 4112, 4732, 5079, 5409	
616	腫瘍タンパク質ｐ５３	514944	729	423862	1353	1582, 2253, 2873, 3493, 4113, 4733, 5080, 5410	
617	腫瘍タンパク質ｐ５３	545858	730	437792	1354	2254, 2874, 3494, 4114, 4734, 5081, 5411	
618	チロシナーゼ（眼皮膚白皮症ＩＡ）	263321	731	263321	1355	2255, 2875, 3495, 4115, 4735, , , 20533-20619	
619	チロシンアミノトランスフェラーゼ	355962	732	348234	1356	1583, 2256, 2876, 3496, 4116, 4736, , , 20620-20758	

【表０００６－５６】

620	ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１	305208	733	304845	1357	1584, 2257, 2877, 3497, 4117, 4737, , , 20759-20845	
621	ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１	360418	734	353593	1358	1585, 2258, 2878, 3498, 4118, 4738	
622	ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１０	344644	735	343838	1359	2259, 2879, 3499, 4119, 4739	
623	ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ３	482026	736	418532	1360	2260, 2880, 3500, 4120, 4740	
624	ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１	513300	737	427404	1361	2261, 2881, 3501, 4121, 4741, 5082, 5412	
625	ＵＤＰグリコシルトランスフェラーゼ３ファミリー、ポリペプチドＡ２	282507	738	282507	1362	2262, 2882, 3502, 4122, 4742, 5083, 5413	1671
626	ＵＤＰグリコシルトランスフェラーゼ３ファミリー、ポリペプチドＡ２	515131	739	420865	1363	2263, 2883, 3503, 4123, 4743, 5084, 5414	
627	ＵＤＰグリコシルトランスフェラーゼ３ファミリー、ポリペプチドＡ２	545528	740	445367	1364	2264, 2884, 3504, 4124, 4744, 5085, 5415	
628	血管内皮成長因子Ａ	230480	741	230480	1365	1586, 2265, 2885, 3505, 4125, 4745	
629	血管内皮成長因子Ａ	324450	742	317598	1366	1587, 2266, 2886, 3506, 4126, 4746, 5086, 5416	

【表０００６－５７】

630	血管内皮成長因子Ａ	372055	743	361125	1367	1588, 2267, 2887, 3507, 4127, 4747, 5087, 5417	
631	血管内皮成長因子Ａ	372064	744	361134	1368	1589, 2268, 2888, 3508, 4128, 4748, 5088, 5418	
632	血管内皮成長因子Ａ	372067	745	361137	1369	1590, 2269, 2889, 3509, 4129, 4749, 5089, 5419, 20846-20932	1672
633	血管内皮成長因子Ａ	372077	746	361148	1370	1591, 2270, 2890, 3510, 4130, 4750, 5090, 5420	
634	血管内皮成長因子Ａ	413642	747	389864	1371	1592, 2271, 2891, 3511, 4131, 4751, 5091, 5421	
635	血管内皮成長因子Ａ	417285	748	388663	1372	1593, 2272, 2892, 3512, 4132, 4752, 5092, 5422	
636	血管内皮成長因子Ａ	425836	749	388465	1373	1594, 2273, 2893, 3513, 4133, 4753, 5093, 5423	
637	血管内皮成長因子Ａ	457104	750	409911	1374	1595, 2274, 2894, 3514, 4134, 4754, 5094, 5424	
638	血管内皮成長因子Ａ	482630	751	421561	1375	1596, 2275, 2895, 3515, 4135, 4755, 5095, 5425	
639	血管内皮成長因子Ａ	518689	752	430829	1376	1597, 2276, 2896, 3516, 4136, 4756, 5096, 5426	
640	血管内皮成長因子Ａ	518824	753	430002	1377	1598, 2277, 2897, 3517, 4137, 4757, 5097, 5427	

【表０００６－５８】

641	血管内皮成長因子Ａ	519767	754	430594	1378	1599, 2278, 2898, 3518, 4138, 4758, 5098, 5428	
642	血管内皮成長因子Ａ	520948	755	428321	1379	1600, 2279, 2899, 3519, 4139, 4759, 5099, 5429	
643	血管内皮成長因子Ａ	523125	756	429008	1380	1601, 2280, 2900, 3520, 4140, 4760, 5100, 5430	
644	血管内皮成長因子Ａ	523873	757	430479	1381	1602, 2281, 2901, 3521, 4141, 4761, 5101, 5431	
645	血管内皮成長因子Ａ	523950	758	429643	1382	1603, 2282, 2902, 3522, 4142, 4762, 5102, 5432	
646	血管内皮成長因子Ｃ	280193	759	280193	1383	1604, 2283, 2903, 3523, 4143, 4763, 20933-21019	
647	血管作動性腸ペプチド	367243	760	356212	1384	1605, 2284, 2904, 3524, 4144, 4764	
648	血管作動性腸ペプチド	367244	761	356213	1385	1606, 2285, 2905, 3525, 4145, 4765, 21020-21106	
649	血管作動性腸ペプチド	431366	762	410356	1386	1607, 2286, 2906, 3526, 4146, 4766	
650	ｖ－ｍｙｃ骨髄球腫症ウイルス発癌遺伝子ホモログ（鳥類）	259523	763	259523	1387	2287, 2907, 3527, 4147, 4767	
651	ｖ－ｍｙｃ骨髄球腫症ウイルス発癌遺伝子ホモログ（鳥類）	377970	764	367207	1388	2288, 2908, 3528, 4148, 4768, 21107-21110	
652	ｖ－ｍｙｃ骨髄球腫症ウイルス発癌遺伝子ホモログ（鳥類）	454617	765	405312	1389	2289, 2909, 3529, 4149, 4769	

【表０００６－５９】

653	ｖ－ｍｙｃ骨髄球腫症ウイルス発癌遺伝子ホモログ（鳥類）	524013	766	430235	1390	2290, 2910, 3530, 4150, 4770, 21111-21284	
654	フォン・ヴィルブランド因子	261405	767	261405	1391	1608, 2291, 2911, 3531, 4151, 4771, 21285-21423	
655	亜鉛フィンガー、ＧＡＴＡ様タンパク質１	403903	768	384434	1392	2292, 2912, 3532, 4152, 4772	

【０２１７】

タンパク質切断シグナルおよび部位

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、少なくとも１個のタンパク質切断部位を含有する少なくとも１個のタンパク質切断シグナルを含み得る。タンパク質切断部位は、Ｎ末端とＣ末端の真ん中、Ｎ末端と中間点との間、中間点とＣ末端との間、およびこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されないＮ末端とＣ末端との間の任意の空間で、Ｎ末端、Ｃ末端に位置し得る。

【０２１８】

本発明のポリペプチドは、プロタンパク質コンバターゼ（またはプロホルモンコンバターゼ）、トロンビン、または第Ｘａ因子タンパク質切断シグナルを含み得るが、これらに限定されない。プロタンパク質コンバターゼは、プロホルモンコンバターゼ１／３（ＰＣ１／３）、ＰＣ２、フーリン、ＰＣ４、ＰＣ５／６、対合塩基性アミノ酸切断酵素４（Ｐ

ＡＣＥ４）、およびＰＣ７として既知の酵母ケキシンに関連した７個の塩基性アミノ酸特異的サブチリシン様セリンプロテイナーゼと、サブチリシンケキシンアイソザイム１（ＳＫＩ－１）およびプロタンパク質コンバターゼサブチリシンケキシン９（ＰＣＳＫ９）と呼ばれる非塩基性残基で切断する他の２個のサブチラーゼを含む９個のプロテイナーゼのファミリーである。タンパク質切断シグナルアミノ酸配列の非限定的な例が表７に列記される。表７において、「Ｘ」は、任意のアミノ酸を指し、「ｎ」は、０、２、４、または６個のアミノ酸であり得、「＊」は、タンパク質切断部位を指す。表７において、配列番号２１４２６は、ｎが４であるときを指し、配列番号２１４２７は、ｎが６であるときを指す。

表７．タンパク質切断部位配列

【表０００７】

タンパク質切断シグナル	アミノ酸切断配列	配列番号
プロタンパク質コンバターゼ	R-X-X-R*	21424
	R-X-K/R-R*	21425
	K/R-Xn-K/R*	21426 または 21427
トロンビン	L-V-P-R*-G-S	21428
	L-V-P-R*	21429
	A/F/G/I/L/T/V/M-A/F/G/I/L/T/V/W-P-R*	21430
第 Xa 因子	I-E-G-R*	21431
	I-D-G-R*	21432
	A-E-G-R*	21433
	A/F/G/I/L/T/V/M-D/E-G-R*	21434

【０２１９】

一実施形態において、本発明の一次構築物およびｍｍＲＮＡは、一次構築物またはｍｍＲＮＡが少なくとも１個のコードされたタンパク質切断シグナルを含有するように操作され得る。コードされたタンパク質切断シグナルは、開始コドンの前、開始コドンの後、コーディング領域の前、コーディング領域内に位置し得、例えば、コーディング領域の中間、開始コドンと中間点との間、中間点と終止コドンとの間、コーディング領域の後、終止コドンの後、２つの終止コドンの間、終止コドンの後、およびこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されない。

【０２２０】

一実施形態において、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１個のタンパク質切断部位を含有する少なくとも１個のコードされたタンパク質切断シグナルを含み得る。コードされたタンパク質切断シグナルは、プロタンパク質コンバターゼ（もしくはプロホルモンコンバターゼ）、トロンビン、および／または第Ｘａ因子タンパク質切断シグナルを含み得るが、これらに限定されない。当業者であれば、上の表１または他の既知の方法を用いて、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡに含める適切なコードされたタンパク質切断シグナルを決定することができる。例えば、表７のシグナルから始め、表１のコドンを考慮して、結果として生じるポリペプチドにおいてタンパク質シグナルを生成し得る一次構築物のシグナルを設計することができる。

【０２２１】

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、少なくとも１個のタンパク質切断シグナルおよび／または部位を含む。

【０２２２】

非限定的な例として、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，３７４，９３０号および米国特許公開第２００９０２２７６６０号は、フーリン切断部位を用いて、発現産物におけるＧＬＰ－１のＮ末端メチオニンをその細胞のゴルジ装置から切断する。一実施形態において、本発明のポリペプチドは、少なくとも１個のタンパク質切断シグナルおよび／または部位を含むが、但し、ポリペプチドがＧＬＰ－１ではないことを条件とする。

【０２２３】

一実施形態において、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１個のコードされたタンパク質切断シグナルおよび／または部位を含む。

【０２２４】

一実施形態において、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１個のコードされたタンパク質切断シグナルおよび／または部位を含むが、但し、一次構築物またはｍｍＲＮＡがＧＬＰ－１をコードしないことを条件とする。

【０２２５】

一実施形態において、本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡは、２つ以上のコーディング領域を含み得る。複数のコーディング領域が本発明の一次構築物またはｍｍＲＮＡに存在する場合、複数のコーディング領域は、コードされたタンパク質切断部位によって分離され得る。非限定的な例として、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、順序付けられたパターンで書き込まれ得る。そのようなパターンは、ＡＸＢＹ形態に従い、式中、ＡおよびＢは、同一もしくは異なるコーディング領域であり得、かつ／または同一もしくは異なるポリペプチドをコードし得るコーディング領域であり、ＸおよびＹは、同一もしくは異なるタンパク質切断シグナルをコードし得るコードされたタンパク質切断シグナルである。第２のそのようなパターンは、ＡＸＹＢＺ形態に従い、式中、ＡおよびＢは、同一もしくは異なるコーディング領域であり得、かつ／または同一もしくは異なるポリペプチドをコードし得るコーディング領域であり、Ｘ、Ｙ、およびＺは、同一もしくは異なるタンパク質切断シグナルをコードし得るコードされたタンパク質切断シグナルである。第３のパターンは、ＡＢＸＣＹ形態に従い、Ａ、Ｂ、およびＣは、同一もしくは異なるコーディング領域であり得、かつ／または同一もしくは異なるポリペプチドをコードし得るコーディング領域であり、ＸおよびＹは、同一もしくは異なるタンパク質切断シグナルをコードし得るコードされたタンパク質切断シグナルである。

【０２２６】

一実施形態において、ポリペプチド、一次構築物および、ｍｍＲＮＡは、ポリペプチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡがタンパク質切断部位に特異的なプロテアーゼでの処理によって担体領域または融合パートナーから放出され得るように、前述のタンパク質切断部位をコードする配列も含有し得る。

【０２２７】

一実施形態において、本発明のポリペプチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、２Ａペプチドをコードする配列を含み得る。一実施形態において、この配列を用いて、２個以上の目的とするポリペプチドのコーディング領域を分離することができる。非限定的な例として、２Ａペプチドをコードする配列は、コーディング領域Ａとコーディング領域Ｂとの間に存在し得る（Ａ－２Ａｐｅｐ－Ｂ）。２Ａペプチドの存在は、１個の長いタンパク質のタンパク質Ａ、タンパク質Ｂ、および２Ａペプチドへの切断をもたらす。タンパク質Ａおよびタンパク質Ｂは、同一または異なる目的とするポリペプチドであり得る。別の実施形態において、２Ａペプチドを本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡで用いて、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個以上のタンパク質を産生することができる。

【０２２８】

転写後制御調節因子の組み込み

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１つの転写後制御調節因子を含み得る。これらの転写後制御調節因子は、小分子、化合物、および制御配列であり得るが、これらに限定されない。非限定的な例として、転写後制御は、ＧＥＭＳ（商標）（小分子による遺伝子発現調節（Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｂｙ Ｓｍａｌｌ－Ｍｏｌｅｃｌｕｅｓ））スクリーニング技術を用いてＰＴＣ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｉｎｃ.（Ｓｏｕｔｈ Ｐｌａｉｎｆｉｅｌｄ，ＮＪ）によって特定された小分子を用いて達成され得る。

【０２２９】

転写後制御調節因子は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００６０２２７１２号に詳述される方法によってスクリーニングされる遺伝子発現調節因子、またはこれに記載の遺伝子発現調節因子であり得る。翻訳制御に関与するＲＮＡ制御配列を特定する方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００４０６７７２８号に記載されており、遺伝子の非翻訳領域依存的発現を調節する化合物を特定する方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００４０６５５６１号に記載されている。

【０２３０】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡの５’および／または３’非翻訳領域に位置する少なくとも１つの転写後制御調節因子を含み得る。

【０２３１】

別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、未熟な翻訳終結を調節するために少なくとも１つの転写後制御調節因子を含み得る。転写後制御調節因子は、それぞれ、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００４０１０１０６号、同第ＷＯ２００６０４４４５６号、同第ＷＯ２００６０４４６８２号、同第ＷＯ２００６０４４５０３号、および同第ＷＯ２００６０４４５０５号に記載の化合物、またはこれらに概説の方法によって見出される化合物であり得る。非限定的な例として、この化合物は、未熟な翻訳終結を調節するために、２８Ｓリボソームの領域に結合し得る（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００４０１０１０６号を参照のこと）。

【０２３２】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、タンパク質発現を変化させるために少なくとも１つの転写後制御調節因子を含み得る。非限定的な例として、ＶＥＧＦの発現は、それぞれ、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００５１１８８５７号、同第ＷＯ２００６０６５４８０号、同第ＷＯ２００６０６５４７９号、および同第ＷＯ２００６０５８０８８号に記載の化合物、またはこれらに記載の方法によって見出され得る化合物を用いて制御され得る。

【０２３３】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、翻訳を制御するために少なくとも１つの転写後制御調節因子を含み得る。一実施形態において、転写後制御調節因子は、ＲＮＡ制御配列であり得る。非限定的な例として、ＲＮＡ制御配列は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００６０７１９０３号に記載の方法によって特定され得る。

【０２３４】

ＩＩＩ．修飾

本明細書におけるポリヌクレオチド（一次構築物またはｍＲＮＡ分子等）において、「修飾」または必要に応じて「修飾された」という用語は、Ａ、Ｇ、Ｕ、またはＣリボヌクレオチドに対する修飾を指す。概して、本明細書において、これらの用語は、天然に存在する５’末端ｍＲＮＡキャップ部分におけるリボヌクレオチド修飾を指すようには意図されていない。ポリペプチドにおいて、「修飾」という用語は、基準の組の２０個のアミノ

酸（部分）と比較した修飾を指す。

【０２３５】

この修飾は、様々なはっきりと異なる修飾であり得る。いくつかの実施形態において、コーディング領域、隣接領域、および／または末端領域は、１つ、２つ、または２つ以上の（任意に異なる）ヌクレオシドまたはヌクレオチド修飾を含有し得る。いくつかの実施形態において、細胞に導入された修飾ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、未修飾ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと比較して、細胞における分解の減少を呈し得る。

【０２３６】

ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、糖、核酸塩基、またはヌクレオシド間結合（例えば、結合リン酸／ホスホジエステル結合／ホスホジエステル骨格への）等に対する任意の有用な修飾を含み得る。ピリミジン核酸塩基の１個以上の原子は、任意に置換されたアミノ、任意に置換されたチオール、任意に置換されたアルキル（例えば、メチルもしくはエチル）、またはハロ（例えば、クロロもしくはフルオロ）と置き換えれ得るか、またはこれらで置換され得る。ある特定の実施形態において、修飾（例えば、１つ以上の修飾）は、糖およびヌクレオシド間結合の各々において存在する。本発明に従う修飾は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、グリコール核酸（ＧＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、またはこれらのハイブリッド）に対するリボ核酸（ＲＮＡ）の修飾であり得る。さらなる修飾が本明細書に記載される。

【０２３７】

本明細書に記載されるように、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、ｍＲＮＡが導入される細胞の自然免疫応答を実質的に誘導しない。誘導された自然免疫応答の特徴には、１）炎症誘発性サイトカインの発現の増加、２）細胞内ＰＲＲ（ＲＩＧ－Ｉ、ＭＤＡ５等の活性化、および／または３）タンパク質翻訳の終結もしくは減少が含まれる。

【０２３８】

ある特定の実施形態において、細胞に導入された修飾核酸分子を細胞内で分解することが望ましくあり得る。例えば、修飾核酸分子の分解は、タンパク質産生の正確なタイミングが所望される場合に好ましくあり得る。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、指向された様式で細胞内で作用され得る、分解ドメインを含有する修飾核酸分子を提供する。別の態様において、本開示は、ポリヌクレオチドとの主溝相互作用（例えば、結合）パートナーの結合を攪乱し得るヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する（例えば、修飾ヌクレオチドは、未修飾ヌクレオチドと比較して、主溝相互作用パートナーに対して低下した結合親和性を有する場合）。

【０２３９】

ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、他の作用物質（例えば、ＲＮＡｉ誘導剤、ＲＮＡｉ剤、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、リボザイム、触媒ＤＮＡ、ｔＲＮＡ、三重らせん形成を誘導するＲＮＡ、アプタマー、ベクター等）を任意に含み得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、１個以上のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）および１個以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチド（例えば、ｍｍＲＮＡ分子）を含み得る。これらのポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡについての詳細は、以下に続く。

【０２４０】

ポリヌクレオチドおよび一次構築物

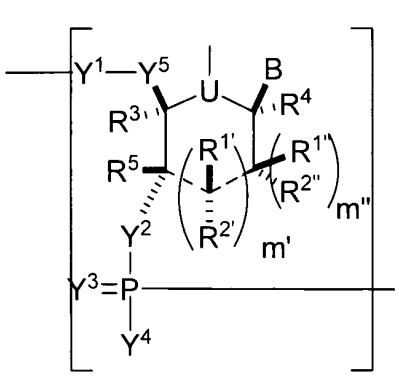
本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、目的とするポリペプチドをコードする結合ヌクレオシドの第１の領域、第１の領域の５’末端に位置する第１の隣接領域、および第１の領域の３’末端に位置する第２の隣接領域を含む。

【０２４１】

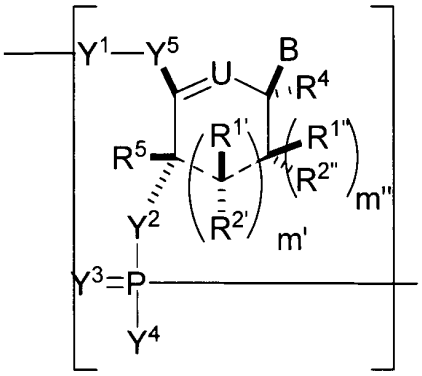
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例

えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（Ｉａ）もしくは式（Ｉａ－１）：

【化１】



（Ｉａ）



（Ｉａ－１）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０２４２】

式中、

【０２４３】

Ｕが、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｒ^{U}）$_{nu}$、またはＣ（Ｒ^{U}）$_{nu}$であり、式中、ｎｕが、０～２の整数であり、各Ｒ^{U}が、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルであり、

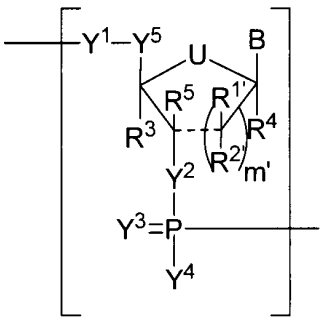
【０２４４】

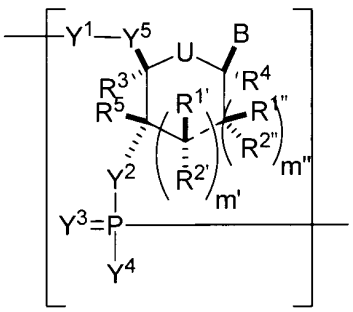
－－－が、一重結合であるか、または不在であり、

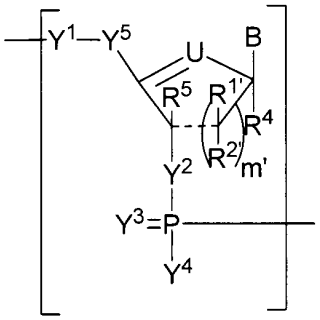
【０２４５】

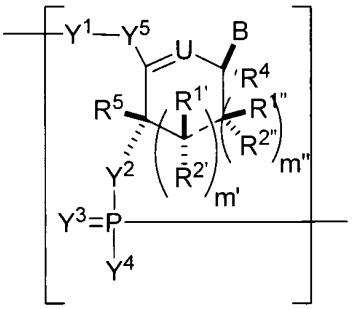
Ｒ$^{1'}$、Ｒ$^{2'}$、Ｒ$^{1''}$、Ｒ$^{2''}$、Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、およびＲ^{5}の各々が、独立して、存在する場合、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニルであるか、または不在であり、Ｒ３と、Ｒ１’、Ｒ１”、Ｒ２’、Ｒ２”、またはＲ５のうちの１つ以上との組み合わせ（例えば、Ｒ１’とＲ３の組み合わせ、Ｒ１”とＲ３の組み合わせ、Ｒ２’とＲ３の組み合わせ、Ｒ２”とＲ３の組み合わせ、またはＲ５とＲ３の組み合わせ）が一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し得、および、それらが結合する炭素と一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、二環式、三環式、または四環式ヘテロシクリル）を提供し得、Ｒ５と、Ｒ１’、Ｒ１”、Ｒ２’、またはＲ２”のうちの１つ以上との組み合わせ（例えば、Ｒ１’とＲ５の組み合わせ、Ｒ１”とＲ５の組み合わせ、Ｒ２’とＲ５の組み合わせ、またはＲ２”とＲ５の組み合わせ）が一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し得、および、それらが結合する炭素と一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、二環式、三環式、または四環式ヘテロシクリル）を提供し得、Ｒ^{4}と、Ｒ$^{1'}$、Ｒ$^{1''}$、Ｒ$^{2'}$、Ｒ$^{2''}$、Ｒ^{3}、またはＲ^{5}のうちの１つ以上との組み合わせが一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し得、および、それらが結合する炭素と一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、二環式、三環式、または四環式ヘテロシクリル）を提供し得、ｍ’およびｍ”の各々が、独立して、０～３（例えば、０～２、０～１、１～３、または１～２）の整数であり、

【０２４６】
Y^1、Y^2、およびY^3の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｓｅ、－NR^{N1}－、任意に置換されたアルキレン、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、式中、R^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリールであるか、または不在であり、
【０２４７】
各Y^4が、独立して、Ｈ、ヒドロキシ、チオール、ボラニル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、
【０２４８】
各Y^5が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｓｅ、任意に置換されたアルキレン（例えば、メチレン）、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、
【０２４９】
ｎが、１～１００，０００の整数であり、
【０２５０】
Ｂが、核酸塩基（例えば、プリン、ピリミジン、またはこれらの誘導体）であり、Ｂと$R^{1\prime}$の組み合わせ、Ｂと$R^{2\prime}$の組み合わせ、Ｂと$R^{1\prime\prime}$の組み合わせ、もしくはＢと$R^{2\prime\prime}$の組み合わせが、それらが結合する炭素と一緒になって、二環式基（例えば、二環式ヘテロシクリル）を任意に形成し得るか、またはＢ、$R^{1\prime\prime}$、およびR^3の組み合わせ、もしくはＢ、$R^{2\prime\prime}$、およびR^3の組み合わせが、三環式もしくは四環式基（例えば、本明細書の式（ＩＩｏ）－（ＩＩｐ）等の三環式または四環式ヘテロシクリル）を任意に形成し得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、修飾リボースを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（Ｉａ－２）～（Ｉａ－５）を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含む。
【化２】


（Ｉａ－２）、


（Ｉａ－３）、

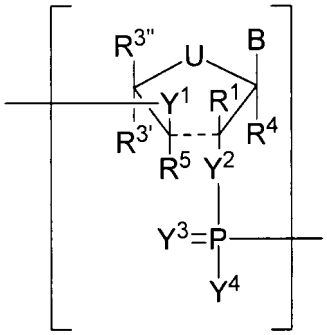

（Ｉａ－４）、


（Ｉａ－５）

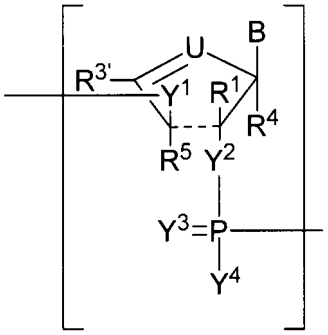
【０２５１】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（Ｉｂ）もしくは式

（Ｉｂ－１）：

【化３】



（Ｉｂ）、



（Ｉｂ－１）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０２５２】

式中、

【０２５３】

Ｕが、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｒ^{U}）$_{nu}$、またはＣ（Ｒ^{U}）$_{nu}$であり、式中、ｎｕが、０～２の整数であり、各Ｒ^{U}が、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルであり、

【０２５４】

－－－が、一重結合であるか、または不在であり、

【０２５５】

Ｒ^{1}、Ｒ$^{3'}$、Ｒ$^{3''}$、およびＲ^{4}の各々が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニルであるか、または不在であり、Ｒ^{1}とＲ$^{3'}$の組み合わせまたはＲ^{1}とＲ$^{3''}$の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し得（例えば、ロックド核酸を産生するために）、

【０２５６】

各Ｒ^{5}が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシであるか、または不在であり、

【０２５７】

Ｙ^{1}、Ｙ^{2}、およびＹ^{3}の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｓｅ、－ＮＲ^{N1}－、任意に置換されたアルキレン、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、式中、Ｒ^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり、

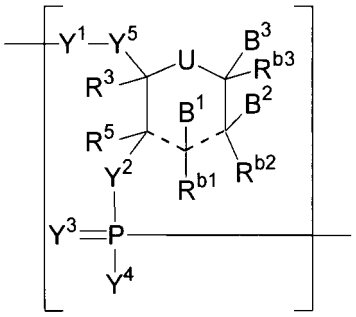
【０２５８】

各Ｙ^{4}が、独立して、Ｈ、ヒドロキシ、チオール、ボラニル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、

【０２５９】

ｎが、１～１００，０００の整数であり、

【０２６０】
Ｂが、核酸塩基である。
【０２６１】
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（Ｉｃ）：
【化４】



（Ｉｃ）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、
【０２６２】
式中、
【０２６３】
Ｕが、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｒ^{U}）$_{nu}$、またはＣ（Ｒ^{U}）$_{nu}$であり、式中、ｎｕが、０～２の整数であり、各Ｒ^{U}が、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルであり、
【０２６４】
－－－が、一重結合であるか、または不在であり、
【０２６５】
Ｂ^{1}、Ｂ^{2}、およびＢ^{3}の各々が、独立して、核酸塩基（例えば、本明細書に記載のプリン、ピリミジン、またはその誘導体）、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルであり、Ｂ^{1}、Ｂ^{2}、およびＢ^{3}のうちの１つのみが核酸塩基であり、
【０２６６】
Ｒ^{b1}、Ｒ^{b2}、Ｒ^{b3}、Ｒ^{3}、およびＲ^{5}の各々が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルであり、
【０２６７】
Ｙ^{1}、Ｙ^{2}、およびＹ^{3}の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｓｅ、－ＮＲ^{N1}－、任意に置換されたアルキレン、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、式中、Ｒ^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり、
【０２６８】

各Y^4が、独立して、H、ヒドロキシ、チオール、ボラニル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、

【０２６９】

各Y^5が、独立して、O、S、Se、任意に置換されたアルキレン（例えば、メチレン）、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、

【０２７０】

nが、１～１００，０００の整数であり、

【０２７１】

Uを含む環が、１つ以上の二重結合を含み得る。

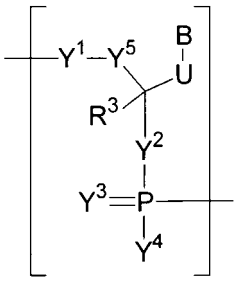
【０２７２】

特定の実施形態において、Uを含む環は、U－C$B^3$$R^{b3}$間またはC$B^3$$R^{b3}$－C$B^2$$R^{b2}$間に二重結合を有しない。

【０２７３】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはmmRNA（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（Ｉｄ）：

【化５】



（Ｉｄ）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０２７４】

式中、

【０２７５】

Uが、O、S、N（R^U）$_{nu}$、またはC（R^U）$_{nu}$であり、式中、nuが、０～２の整数であり、各R^Uが、独立して、H、ハロ、または任意に置換されたアルキルであり、

【０２７６】

各R^3が、独立して、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルであり、

【０２７７】

Y^1、Y^2、およびY^3の各々が、独立して、O、S、Se、－NR^{N1}－、任意に置換されたアルキレン、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、式中、R^{N1}が、H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり、

【０２７８】

各Ｙ^{4}が、独立して、Ｈ、ヒドロキシ、チオール、ボラニル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、

【０２７９】

各Ｙ^{5}が、独立して、Ｏ、Ｓ、任意に置換されたアルキレン（例えば、メチレン）、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、

【０２８０】

ｎが、１～１００，０００の整数であり、

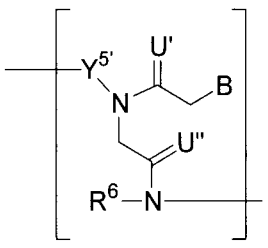
【０２８１】

Ｂが、核酸塩基（例えば、プリン、ピリミジン、またはその誘導体）である。

【０２８２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（Ｉｅ）：

【化６】



（Ｉｅ）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０２８３】

式中、

【０２８４】

Ｕ’およびＵ”の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｒ^{U}）$_{nu}$、またはＣ（Ｒ^{U}）$_{nu}$であり、式中、ｎｕが、０～２の整数であり、各Ｒ^{U}が、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルであり、

【０２８５】

各Ｒ^{6}が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルであり、

【０２８６】

各Ｙ$^{5'}$が、独立して、Ｏ、Ｓ、任意に置換されたアルキレン（例えば、メチレンもしくはエチレン）、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、

【０２８７】

ｎが、１～１００，０００の整数であり、

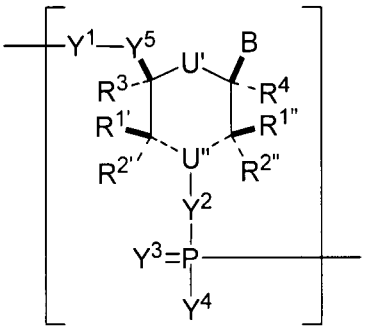
【０２８８】

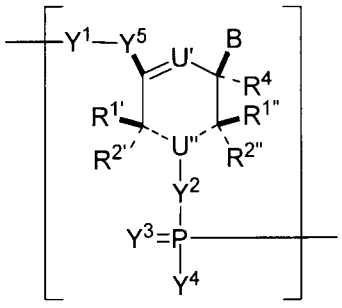
Ｂが、核酸塩基（例えば、プリン、ピリミジン、またはその誘導体）である。

【０２８９】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（Ｉｆ）もしくは（

Ｉｆ－１）：
【化７】


（Ｉｆ）、


（Ｉｆ－１）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、
【０２９０】
式中、
【０２９１】
Ｕ’およびＵ”の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ、Ｎ（R^U）$_{nu}$、またはＣ（R^U）$_{nu}$であり、式中、ｎｕが、０～２の整数であり、各R^Uが、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルであり（例えば、Ｕ’がＯであり、Ｕ”がＮである）、
【０２９２】
－－－が、一重結合であるか、または不在であり、
【０２９３】
$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{1''}$、$R^{2''}$、R^3、およびR^4の各々が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニルであるか、または不在であり、$R^{1'}$とR^3の組み合わせ、$R^{1''}$とR^3の組み合わせ、$R^{2'}$とR^3の組み合わせ、または$R^{2''}$とR^3の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し得（例えば、ロックド核酸を産生するため）、ｍ’およびｍ”の各々が、独立して、０～３（例えば、０～２、０～１、１～３、または１～２）の整数であり、
【０２９４】
Y^1、Y^2、およびY^3の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｓｅ、－NR^{N1}－、任意に置換されたアルキレン、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、式中、R^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリールであるか、または不在であり、
【０２９５】
各Y^4が、独立して、Ｈ、ヒドロキシ、チオール、ボラニル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、
【０２９６】
各Y^5が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｓｅ、任意に置換されたアルキレン（例えば、メチレン）、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、
【０２９７】

ｎが、１～１００，０００の整数であり、

【０２９８】

Ｂが、核酸塩基（例えば、プリン、ピリミジン、またはその誘導体）である。

【０２９９】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）、（Ｉａ－１）～（Ｉａ－３）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ）、および（ＩＩａ）～（ＩＩｐ））、Ｕを含む環は、１つまたは２つの二重結合を有する。

【０３００】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、R^{1}、$R^{1'}$、および$R^{1''}$の各々は、存在する場合、Ｈである。さらなる実施形態において、R^{2}、$R^{2'}$、および$R^{2''}$の各々は、存在する場合、独立して、Ｈ、ハロ（例えば、フルオロ）、ヒドロキシ、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシもしくはエトキシ）、または任意に置換されたアルコキシアルコキシである。特定の実施形態において、アルコキシアルコキシは、$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$であり、式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’が、Ｈまた$C_{1\sim20}$アルキルである。いくつかの実施形態において、ｓ２は０であり、ｓ１は１または２であり、ｓ３は０または１であり、Ｒ’は$C_{1\sim6}$アルキルである。

【０３０１】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、R^{2}、$R^{2'}$、および$R^{2''}$の各々は、存在する場合、Ｈである。さらなる実施形態において、R^{1}、$R^{1'}$、および$R^{1''}$の各々は、存在する場合、独立して、Ｈ、ハロ（例えば、フルオロ）、ヒドロキシ、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシまたはエトキシ）、または任意に置換されたアルコキシアルコキシである。特定の実施形態において、アルコキシアルコキシは、$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$であり、式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’が、Ｈまた$C_{1\sim20}$アルキルである。いくつかの実施形態において、ｓ２は０であり、ｓ１は１または２であり、ｓ３は０または１であり、Ｒ’は$C_{1\sim6}$アルキルである。

【０３０２】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、R^{3}、R^{4}、およびR^{5}の各々は、独立して、Ｈ、ハロ（例えば、フルオロ）、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシもしくはエトキシ）、または任意に置換されたアルコキシアルコキシである。特定の実施形態において、R^{3}がＨであり、R^{4}がＨであり、R^{5}がＨであるか、またはR^{3}、R^{4}、およびR^{5}のすべてがＨである。特定の実施形態において、R^{3}が$C_{1\sim6}$アルキルであり、R^{4}が$C_{1\sim6}$アルキルであり、R^{5}が$C_{1\sim6}$アルキルであるか、またはR^{3}、R^{4}、およびR^{5}のすべてが$C_{1\sim6}$アルキルである。特定の実施形態において、R^{3}もR^{4}もいずれもＨであり、R^{5}は$C_{1\sim6}$アルキルである。

【０３０３】
ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、R^3およびR^5が一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し、かつそれらが結合する炭素と一緒になって、トランス－３’，４’類似体等の任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、二環式、三環式、または四環式ヘテロシクリル）を提供し、R^3およびR^5が一緒になって、ヘテロアルキレンを形成する（例えば、－$(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}$－であって、式中、ｂ１、ｂ２、およびｂ３の各々が、独立して、０～３の整数である）。

【０３０４】
ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、R^3と、$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$、$R^{2''}$、またはR^5のうちの１つ以上が一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し、それらが結合する炭素と一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、二環式、三環式、または四環式ヘテロシクリル）を提供し、R^3と、$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$、$R^{2''}$、またはR^5のうちの１つ以上が一緒になって、ヘテロアルキレンを形成する（例えば、－$(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}$－であって、式中、ｂ１、ｂ２、およびｂ３の各々が、独立して、０～３の整数である）。

【０３０５】
ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、R^5と、$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$、または$R^{2''}$のうちの１つ以上が一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し、それらが結合する炭素と一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、二環式、三環式、または四環式ヘテロシクリル）を提供し、R^5と、$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{2'}$、または$R^{2''}$のうちの１つ以上が一緒になって、ヘテロアルキレンを形成する（例えば、－$(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}$－であって、式中、ｂ１、ｂ２、およびｂ３の各々が、独立して、０～３の整数である）。

【０３０６】
ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、各Y^2は、独立して、Ｏ、Ｓ、または－NR^{N1}－であり、式中、R^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールである。特定の実施形態において、Y^2は、NR^{N1}－であり、式中、R^{N1}が、Ｈまたは任意に置換されたアルキル（例えば、$C_{1\sim6}$アルキル、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、またはｎ－プロピル）である。

【０３０７】
ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、各Y^3は

、独立して、ＯまたはＳである。

【０３０８】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、R^1は、Ｈであり、各R^2は、独立して、Ｈ、ハロ（例えば、フルオロ）、ヒドロキシ、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシもしくはエトキシ）、または任意に置換されたアルコキシアルコキシであり（例えば、－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$であり、式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’が、Ｈまた$C_{1\sim20}$アルキルであり、例えば、式中、ｓ２が０であり、ｓ１が１または２であり、ｓ３が０または１であり（例えば、Ｒ’が、$C_{1\sim6}$アルキルであり）、各Y^2は、独立して、Ｏまたは－NR^{N1}－であり、式中、R^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり（例えば、式中、R^{N1}が、Ｈまたは任意に置換されたアルキル（例えば、$C_{1\sim6}$アルキル、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、またはｎ－プロピル）であり）、各Y^3は、独立して、ＯまたはＳ（例えば、Ｓ）である。さらなる実施形態において、R^3は、Ｈ、ハロ（例えば、フルオロ）、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシもしくはエトキシ）、または任意に置換されたアルコキシアルコキシである。なおさらなる実施形態において、各Y^1は、独立して、Ｏまたは－NR^{N1}－であり、式中、R^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり（例えば、式中、R^{N1}が、Ｈまたは任意に置換されたアルキル（例えば、$C_{1\sim6}$アルキル、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、またはｎ－プロピル）であり）、各Y^4は、独立して、Ｈ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、または任意に置換されたアミノである。

【０３０９】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（Ｉａ）～（Ｉａ－５）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ－１）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、各R^1は、独立して、Ｈ、ハロ（例えば、フルオロ）、ヒドロキシ、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシもしくはエトキシ）、または任意に置換されたアルコキシアルコキシであり（例えば、－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$であり、式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、Ｈまた$C_{1\sim20}$アルキルであり（例えば、式中、ｓ２が０であり、ｓ１が１または２であり、ｓ３が０または１であり、Ｒ’が$C_{1\sim6}$アルキルであり）、R^2がＨであり、各Y^2は、独立して、Ｏまたは－NR^{N1}－であり、式中、R^{N1}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり（例えば、式中、R^{N1}が、Ｈまたは任意に置換されたアルキル（例えば、$C_{1\sim6}$アルキル、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、またはｎ－プロピル）であり）、各Y^3は、独立して、ＯまたはＳ（例えば、Ｓ）である。さらなる実施形態において、R^3は、Ｈ、ハロ（例えば、フルオロ）、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシもしくはエトキシ）、または任意に置換されたアルコキシアルコキシである。なおさらなる実施形態において、各Y^1は、独立して、Ｏまたは－NR^{N1}－であり、式中

、R^{N1}が、H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり（例えば、式中、R^{N1}が、Hまたは任意に置換されたアルキル（例えば、$C_{1\sim6}$アルキル、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、またはｎ－プロピル）であり）、各Y^4は、独立して、H、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、または任意に置換されたアミノである。

【０３１０】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（ＩＡ）～（ＩＡ－５）、（ＩＢ）～（ＩＦ－１）、（ＩＩＡ）～（ＩＩＰ）、（ＩＩＢ－１）、（ＩＩＢ－２）、（ＩＩＣ－１）－（ＩＩＣ－２）、（ＩＩＮ－１）、（ＩＩＮ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、Ｕを含む環は、β－Ｄ（例えば、β－Ｄ－リボ）配置である。

【０３１１】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（ＩＡ）～（ＩＡ－５）、（ＩＢ）～（ＩＦ－１）、（ＩＩＡ）～（ＩＩＰ）、（ＩＩＢ－１）、（ＩＩＢ－２）、（ＩＩＣ－１）～（ＩＩＣ－２）、（ＩＩＮ－１）、（ＩＩＮ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、Ｕを含む環は、α－Ｌ（例えば、α－Ｌ－リボ）配置である。

【０３１２】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（ＩＡ）～（ＩＡ－５）、（ＩＢ）～（ＩＦ－１）、（ＩＩＡ）～（ＩＩＰ）、（ＩＩＢ－１）、（ＩＩＢ－２）、（ＩＩＣ－１）～（ＩＩＣ－２）、（ＩＩＮ－１）、（ＩＩＮ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、１つ以上のＢがシュードウリジン（ψ）または５－メチル－シチジン（m^5C）であることはない。いくつかの実施形態において、ｎ個のＢ核酸塩基の約１０％～約１００％は、ψでもm^5Cでもない（例えば、ｎ個のＢの１０％～２０％、１０％～３５％、１０％～５０％、１０％～６０％、１０％～７５％、１０％～９０％、１０％～９５％、１０％～９８％、１０％～９９％、２０％～３５％、２０％～５０％、２０％～６０％、２０％～７５％、２０％～９０％、２０％～９５％、２０％～９８％、２０％～９９％、２０％～１００％、５０％～６０％、５０％～７５％、５０％～９０％、５０％～９５％、５０％～９８％、５０％～９９％、５０％～１００％、７５％～９０％、７５％～９５％、７５％～９８％、７５％～９９％、および７５％～１００％は、ψでもm^5Cでもない）。いくつかの実施形態において、Ｂは、ψでもm^5Cでもない。

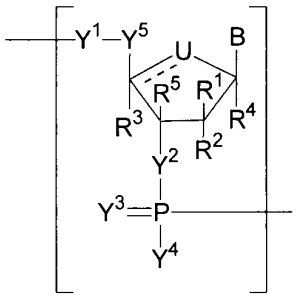
【０３１３】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいくつかの実施形態において（例えば、式（ＩＡ）～（ＩＡ－５）、（ＩＢ）～（ＩＦ－１）、（ＩＩＡ）～（ＩＩＰ）、（ＩＩＢ－１）、（ＩＩＢ－２）、（ＩＩＣ－１）～（ＩＩＣ－２）、（ＩＩＮ－１）、（ＩＩＮ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ））、Ｂが、シトシン、グアニン、ウラシル、およびアデニンから選択される未修飾核酸塩基であるとき、Y^1、Y^2、またはY^3のうちの少なくとも１つは、Ｏではない。

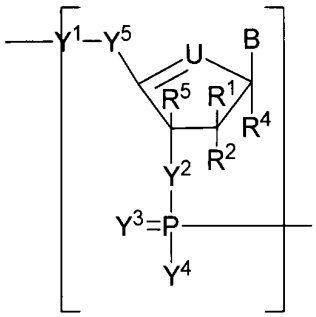
【０３１４】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、修飾リボースを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（ＩＩＡ）～（ＩＩＣ）：

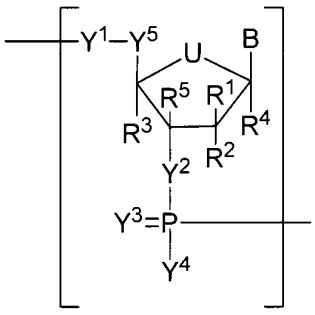
【化８】



（ＩＩａ）、



（ＩＩｂ）、もしくは



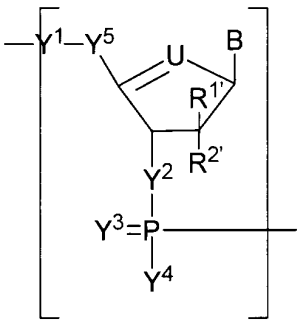
（ＩＩｃ）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含む。特定の実施形態において、Ｕは、ＯまたはＣ（Ｒ^{U}）$_{nu}$であり、式中、ｎｕが、０～２の整数であり、各Ｒ^{U}が、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルである（例えば、Ｕが、－ＣＨ$_{2}$－または－ＣＨ－である）。他の実施形態では、Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、およびＲ^{5}の各々は、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニルであるか、または不在であり（例えば、各Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシであり、各Ｒ^{3}およびＲ^{4}は、独立して、Ｈまたは任意に置換されたアルキルであり、Ｒ^{5}は、Ｈまたはヒドロキシであり）、－－－は、一重結合または二重結合である。

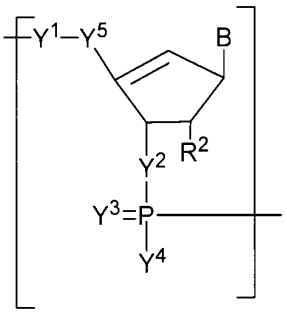
【０３１５】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドまたはｍｍＲＮＡは、式（ＩＩｂ－１）～（ＩＩｂ－２）：

【化９】



（ＩＩｂ－１）もしくは



（ＩＩｂ－２）

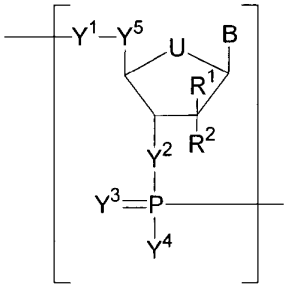
を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含む。いくつかの実施形態において、Ｕは、ＯまたはＣ（Ｒ^{U}）$_{nu}$であり、式中、ｎ

ｕが、０～２の整数であり、各Ｒ^{U}が、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルである（例えば、Ｕは、－ＣＨ$_{2}$－または－ＣＨ－である）。他の実施形態では、Ｒ^{1}およびＲ^{2}　の各々は、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニルであるか、または不在である（例えば、各Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシ、例えば、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、アルキル、またはアルコキシである）。特定の実施形態において、Ｒ^{2}は、ヒドロキシまたは任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、または本明細書に記載のいずれか）である。

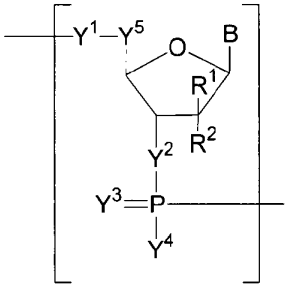
【０３１６】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、式（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－４）：

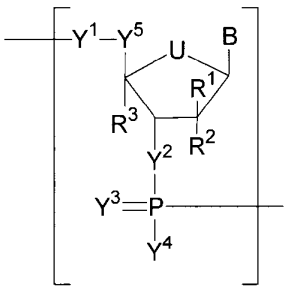
【化１０】



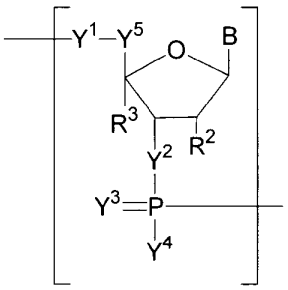
（ＩＩｃ－１）、



（ＩＩｃ－２）、



（ＩＩｃ－３）、もしくは



（ＩＩｃ－４）

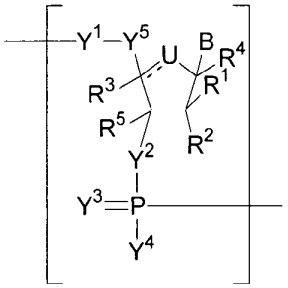
を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含む。いくつかの実施形態において、Ｕは、ＯまたはＣ（Ｒ^{U}）$_{nu}$であり、式中、ｎｕが、０～２の整数であり、各Ｒ^{U}が、独立して、Ｈ、ハロ、または任意に置換されたアルキルである（例えば、Ｕが、－ＣＨ$_{2}$－または－ＣＨ－である）。いくつかの実施形態において、Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、およびＲ^{3}の各々は、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたヒドロキシアルコキシ、任意に置換されたアミノ、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニルであるか、または不在である（例えば、各Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシ、例えば、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、アルキル、またはアルコキシであり、各Ｒ^{3}は、独立して、Ｈまたは任意に置

換されたアルキル）である）。特定の実施形態において、R^2は、任意に置換されたアルコキシ（例えば、メトキシもしくはエトキシ、または本明細書に記載のいずれか）である。特定の実施形態において、R^1は、任意に置換されたアルキルであり、R^2は、ヒドロキシである。他の実施形態では、R^1は、ヒドロキシであり、R^2は、任意に置換されたアルキルである。さらなる実施形態において、R^3は、任意に置換されたアルキルである。

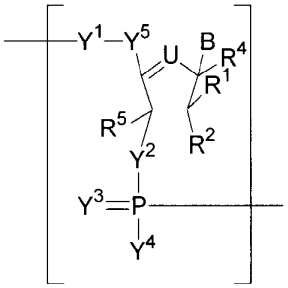
【０３１７】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、非環式修飾リボースを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（ＩＩｄ）～（ＩＩｆ）：

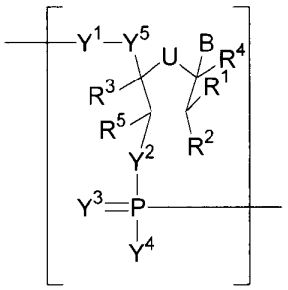
【化１１】



（ＩＩｄ）、



（ＩＩｅ）、もしくは



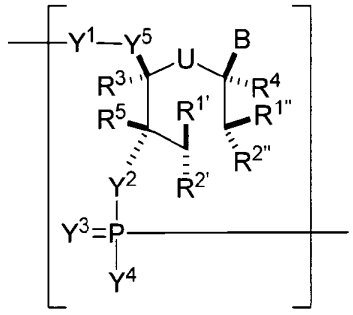
（ＩＩｆ）

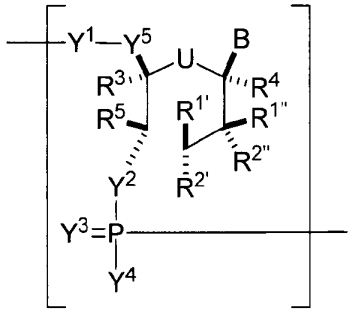
を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含む。

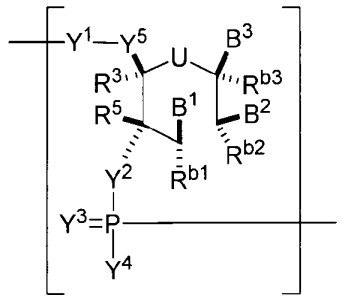
【０３１８】

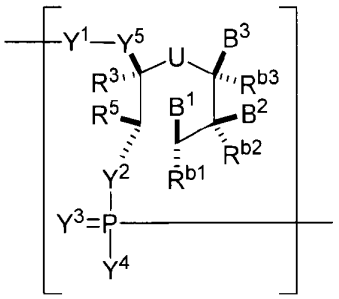
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、非環式修飾ヘキシトールを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（ＩＩｇ）～（ＩＩｊ）：

【化１２】


（ＩＩｇ）、


（ＩＩｈ）、


（ＩＩｉ）、もしくは


（ＩＩｊ）

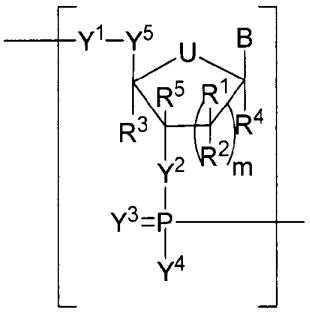
のｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含む。

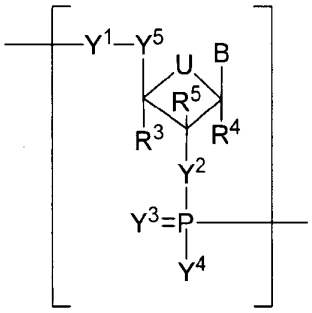
【０３１９】

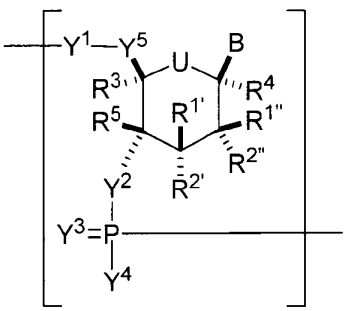
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、短縮または延長したリボース環を有する糖部分を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式

（ＩＩｋ）～（ＩＩｍ）：

【化１３】


（ＩＩｋ）、


（ＩＩｌ）、もしくは


（ＩＩｍ）

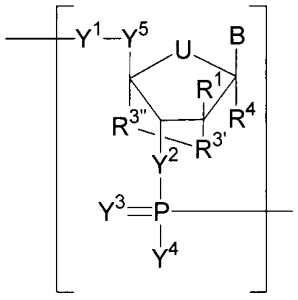
を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、式中、Ｒ$^{1'}$、Ｒ$^{1''}$、Ｒ$^{2'}$、およびＲ$^{2''}$の各々が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換され

たアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシであるか、または不在であり、$R^{2'}$とR^3の組み合わせまたは$R^{2''}$とR^3の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたアルキレンまたは任意に置換されたヘテロアルキレンを形成し得る。

【０３２０】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ロックド修飾リボースを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（ＩＩｎ）：

【化１４】



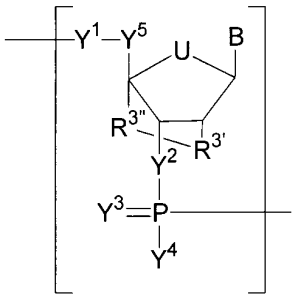
（ＩＩｎ）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、式中、$R^{3'}$が、Ｏ、Ｓ、または－ＮＲ^{Ｎ１}－であり、式中、$R^{Ｎ１}$が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり、$R^{3''}$が、任意に置換されたアルキレン（例えば、－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－、もしくは－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－）または任意に置換されたヘテロアルキレン（例えば、－ＣＨ$_2$ＮＨ－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ－、－ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_2$－、もしくは－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_2$－）である（例えば、$R^{3'}$がＯであり、$R^{3''}$が任意に置換されたアルキレン（例えば、－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－、もしくは－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－）である）。

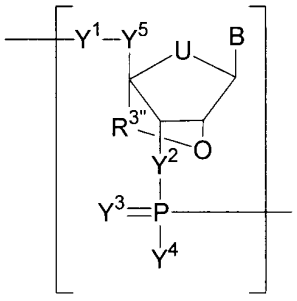
【０３２１】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、式（ＩＩｎ－１）～（ＩＩ－ｎ２）：

【化１５】



（ＩＩｎ－１）もしくは



（ＩＩｎ－２）

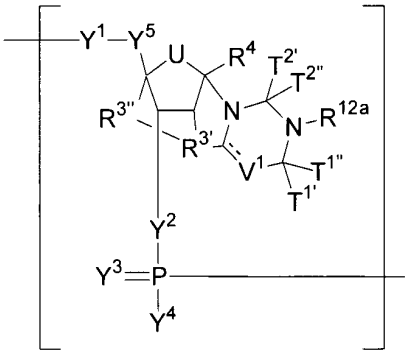
を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、式中、$R^{3'}$が、Ｏ、Ｓ、または－ＮＲ^{Ｎ１}－であり、式中、$R^{Ｎ１}$が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたアリールであり、$R^{3''}$が、任意に置換されたアルキレン（例えば、－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－、もしくは－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－）または任意に置換されたヘテロアルキレン（例えば、－ＣＨ$_2$ＮＨ－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ－、－ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_2$－、もしくは－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_2$－）である（例えば、$R^{3'}$がＯであり、

$R^{3"}$が任意に置換されたアルキレン（例えば、－CH_2－、－CH_2CH_2－、もしくは－$CH_2CH_2CH_2$－）である）。

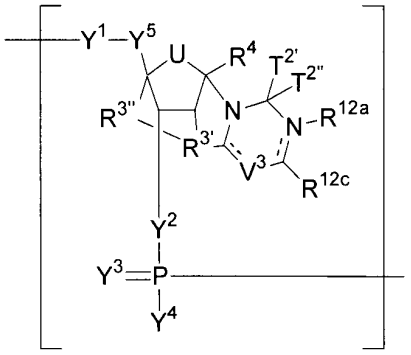
【０３２２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、四環式ヘテロシクリルを形成するロックド修飾リボースを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）は、式（ＩＩｏ）：

【化１６】



（ＩＩｏ）もしくは



（ＩＩｐ）

を有するｎ個の結合ヌクレオシド、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、式中、R^{12a}、R^{12c}、$T^{1'}$、$T^{1"}$、$T^{2'}$、$T^{2"}$、V^1、およびV^3は、本明細書に記載の通りである。

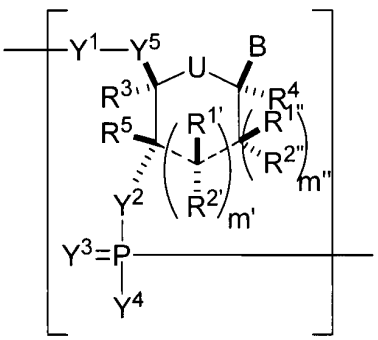
【０３２３】

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの式のうちのいずれかは、本明細書に記載の１個以上の核酸塩基（例えば、式（ｂ１）～（ｂ４３））を含み得る。

【０３２４】

一実施形態において、本発明は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを調製する方法を提供し、このポリヌクレオチドは、本明細書で定義される式（Ｉａ）：

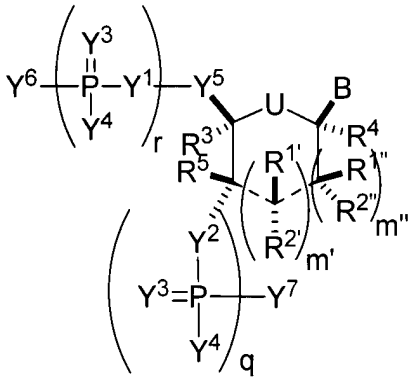
【化１７】



（Ｉａ）

を有するｎ個のヌクレオシドを含み、この方法は、本明細書で定義される式（ＩＩＩａ）：

【化１８】



（ＩＩＩａ）

の化合物を、ＲＮＡポリメラーゼおよびｃＤＮＡ鋳型と反応させることを含む。

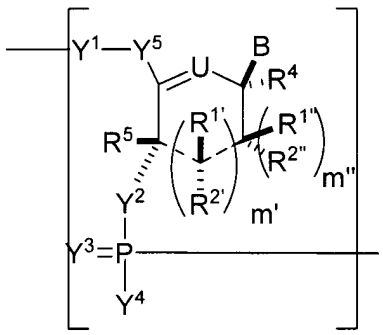
【０３２５】

さらなる実施形態において、本発明は、少なくとも１個のヌクレオチド（例えば、ｍｍＲＮＡ分子）を含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを増幅する方法を提供し、この方法は、本明細書で定義される式（ＩＩＩａ）の化合物を、プライマー、ｃＤＮＡ鋳型、およびＲＮＡポリメラーゼと反応させることを含む。

【０３２６】

一実施形態において、本発明は、少なくとも１個のヌクレオチド（例えば、ｍｍＲＮＡ分子）を含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを調製する方法を提供し、このポリヌクレオチドは、本明細書で定義される式（Ｉａ）：

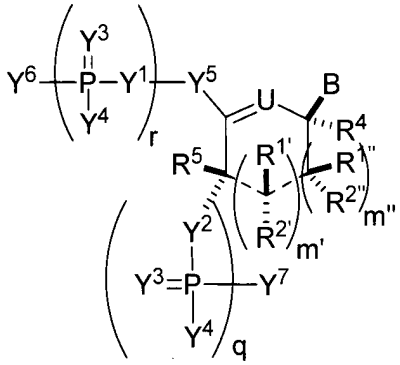
【化１９】



（Ｉａ－１）

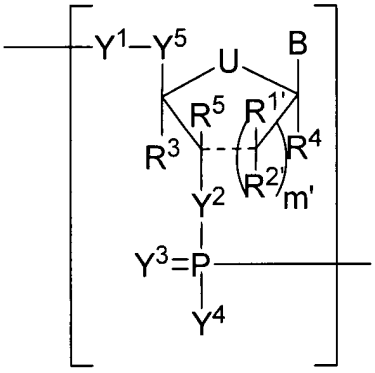
を有するｎ個のヌクレオシドを含み、この方法は、本明細書で定義される式（ＩＩＩａ－１）：

【化２０】



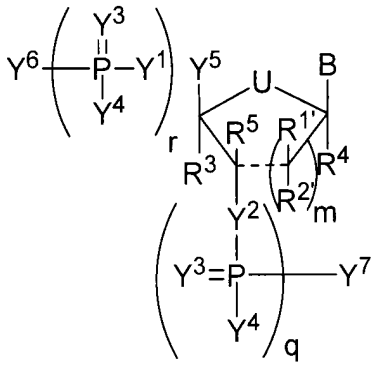
（ＩＩＩａ－１）

の化合物を、ＲＮＡポリメラーゼおよびｃＤＮＡ鋳型と反応させることを含む。
【０３２７】
さらなる実施形態において、本発明は、少なくとも１個のヌクレオチド（例えば、ｍｍＲＮＡ分子）を含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを増幅する方法を提供し、この方法は、
【０３２８】
本明細書で定義される式（ＩＩＩａ－１）の化合物を、プライマー、ｃＤＮＡ鋳型、およびＲＮＡポリメラーゼと反応させることを含む。
【０３２９】
一実施形態において、本発明は、少なくとも１個のヌクレオチド（例えば、ｍｍＲＮＡ分子）を含む修飾ｍＲＮＡを調製する方法を提供し、このポリヌクレオチドは、本明細書で定義される式（Ｉａ－２）：
【化２１】



（Ｉａ－２）

を有するｎ個のヌクレオシドを含み、この方法は、本明細書で定義される式（ＩＩＩａ－２）：
【化２２】



（ＩＩＩａ－２）

の化合物を、ＲＮＡポリメラーゼおよびｃＤＮＡ鋳型と反応させることを含む。
【０３３０】
さらなる実施形態において、本発明は、少なくとも１個のヌクレオチド（例えば、ｍｍＲＮＡ分子）を含む修飾ｍＲＮＡを増幅する方法を提供し、この方法は、
【０３３１】
本明細書で定義される式（ＩＩＩａ－２）の化合物を、プライマー、ｃＤＮＡ鋳型、およびＲＮＡポリメラーゼと反応させることを含む。
【０３３２】
いくつかの実施形態において、反応は、１～約７，０００回繰り返され得る。本明細書の実施形態のうちのいずれかにおいて、Ｂは、式（ｂ１）～（ｂ４３）の核酸塩基であり

得る。

【０３３３】

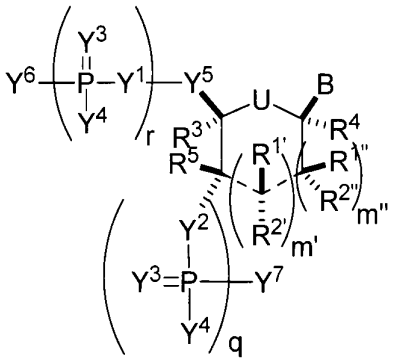
ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、本明細書に記載の５’および／または３’隣接領域を任意に含み得る。

【０３３４】

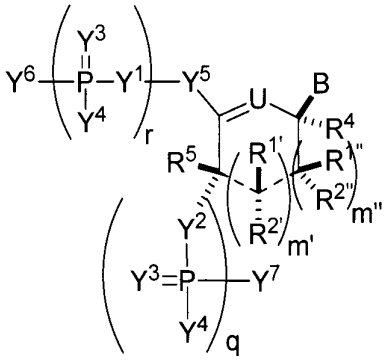
修飾ＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）分子

本発明は、修飾ＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）分子のビルディングブロック、例えば、修飾リボヌクレオシド、修飾リボヌクレオチドも含む。例えば、これらのビルディングブロックは、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの調製に有用であり得る。いくつかの実施形態において、ビルディングブロック分子は、式（ＩＩＩａ）もしくは（ＩＩＩａ－１）：

【化２３】



（ＩＩＩａ）、



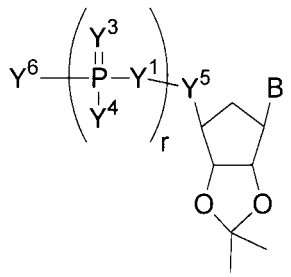
（ＩＩＩａ－１）

、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、置換基は、本明細書に記載のもの（例えば、式（Ｉａ）および（Ｉａ－１））であり、Ｂが、シトシン、グアニン、ウラシル、およびアデニンから選択される未修飾核酸塩基であるとき、Y^1、Y^2、またはY^3のうちの少なくとも１つは、Ｏではない。

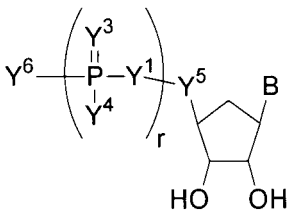
【０３３５】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、式（ＩＶａ）～（ＩＶｂ）：

【化２４】



（ＩＶａ）もしくは



（ＩＶｂ）、

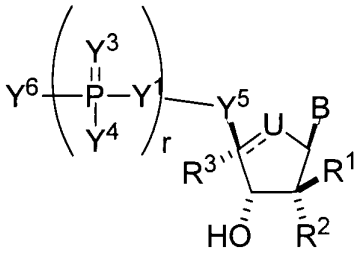
またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、Ｂは、本明細書に記載のもの（例えば、（ｂ１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）である。特定の実施形態において、式（ＩＶａ）または（ＩＶｂ）は、修飾ウラシル（例えば、式（ｂ１）～（ｂ９）、（ｂ２１）～（ｂ２３）、および（ｂ２８）～（ｂ３１）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１）、（ｂ８）、（ｂ２８）、（ｂ２９）、または（ｂ３０））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＶａ）または（ＩＶｂ）は、修飾シトシン（例えば、式（ｂ１０）～（ｂ１４）、（ｂ２４）、（ｂ２５）、および（ｂ３２）～

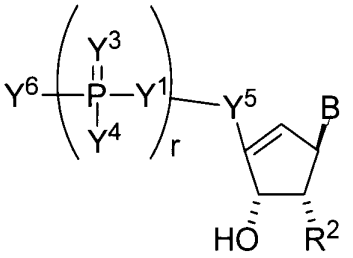
（ｂ３６）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１０）または（ｂ３２））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＶａ）または（ＩＶｂ）は、修飾グアニン（例えば、式（ｂ１５）～（ｂ１７）および（ｂ３７）～（ｂ４０）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＶａ）または（ＩＶｂ）は、修飾アデニン（例えば、式（ｂ１８）～（ｂ２０）および（ｂ４１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。

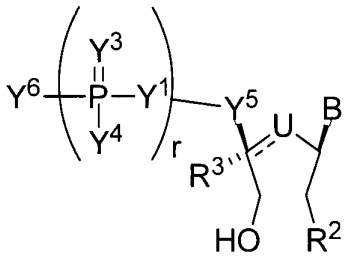
【０３３６】

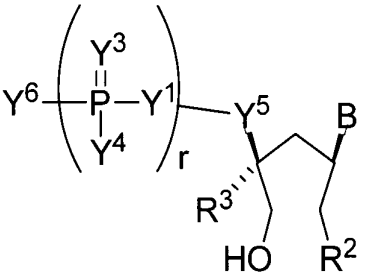
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、式（ＩＶｃ）～（ＩＶｋ）：

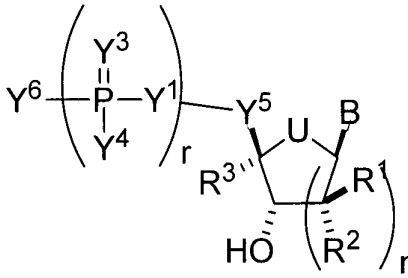
【化２５】

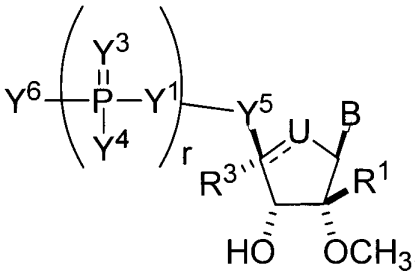

（ＩＶｃ）、

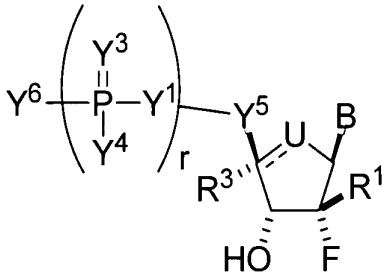

（ＩＶｄ）、

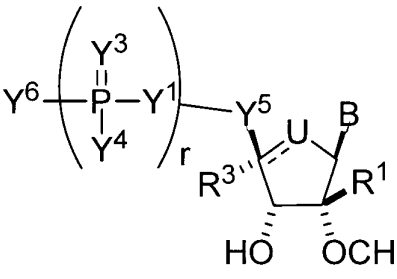

（ＩＶｅ）、

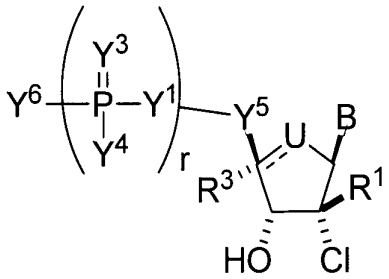

（ＩＶｆ）、

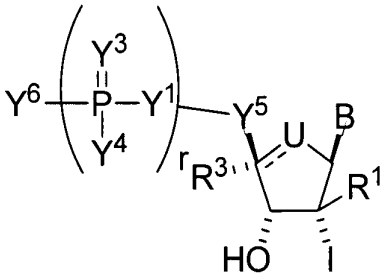

（ＩＶｇ）、


（ＩＶｈ）、


（ＩＶｉ）、


（ＩＶｊ）、


（ＩＶｋ）、もしくは

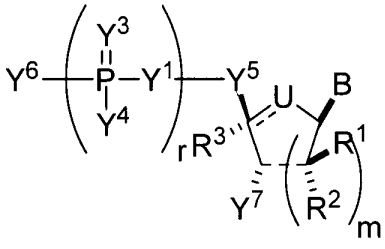

（ＩＶｌ）、

またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、Ｂは、本明細書に記載のもの（例えば、（ｂ１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）である。特定の実施形態において、式（ＩＶｃ）～（ＩＶｋ）のうちの１つは、修飾ウラシル（例えば、式（ｂ１）～（ｂ９）、（ｂ２１）～（ｂ２３）、および（ｂ２８）～（ｂ３１）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１）、（ｂ８）、（ｂ２８）、（ｂ２９）、または（ｂ３０））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＶｃ）～（ＩＶｋ）のうちの１つは、修飾シトシン（例えば、式（ｂ１０）～（ｂ１４）、（ｂ２４）、（ｂ２５）、および（ｂ３２）～（ｂ３６）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１０）または（ｂ３２））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＶｃ）～（ＩＶｋ）のうちの１つは、修飾グアニン（例えば、式（ｂ１５）～（ｂ１７）および（ｂ３７）～（ｂ４０）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＶｃ）～（ＩＶｋ）のうちの１つは、修飾アデニン（例えば、式（ｂ１８）～（ｂ２０）および（ｂ４１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。

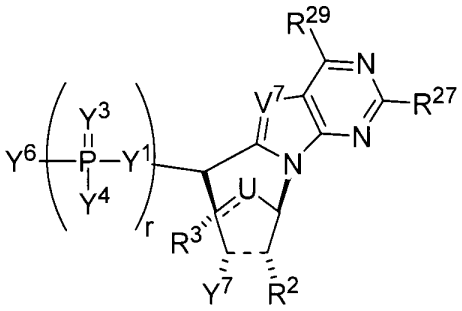
【０３３７】

他の実施形態では、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、式（Ｖａ）もしくは（Ｖｂ）：

【化２６】



（Ｖａ）もしくは



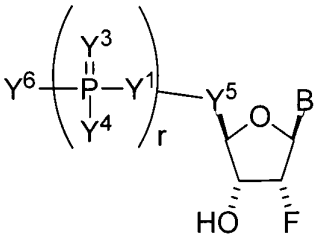
（Ｖｂ）、

またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、Ｂは、本明細書に記載のもの（例えば、（ｂ１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）である。

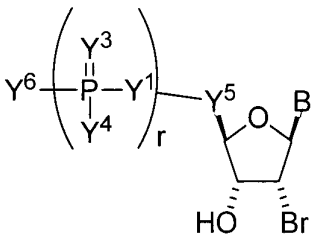
【０３３８】

他の実施形態では、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、式（ＩＸａ）～（ＩＸｄ）：

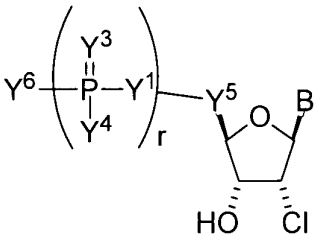
【化２７】



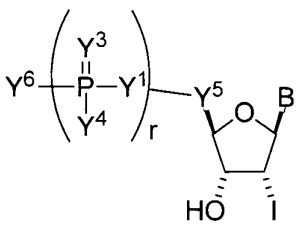
（ＩＸａ）、



（ＩＸｂ）、



（ＩＸｃ）、もしくは



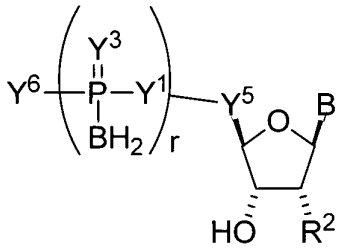
（ＩＸｄ）、

またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、Ｂは、本明細書に記載のもの（例えば、（ｂ１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）である。特定の実施形態において、式（ＩＸａ）～（ＩＸｄ）のうちの１つは、修飾ウラシル（例えば、式（ｂ１）～（ｂ９）、（ｂ２１）～（ｂ２３）、および（ｂ２８）～（ｂ３１）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１）、（ｂ８）、（ｂ２８）、（ｂ２９）、または（ｂ３０））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸａ）～（ＩＸｄ）のうちの１つは、修飾シトシン（例えば、式（ｂ１０）～（ｂ１４）、（ｂ２４）、（ｂ２５）、および（ｂ３２）～（ｂ３６）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１０）または（ｂ３２））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸａ）～（ＩＸｄ）のうちの１つは、修飾グアニン（例えば、式（ｂ１５）～（ｂ１７）および（ｂ３７）～（ｂ４０）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸａ）～（ＩＸｄ）のうちの１つは、修飾アデニン（例えば、式（ｂ１８）～（ｂ２０）および（ｂ４１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。

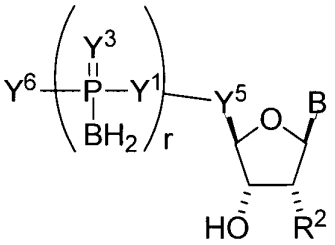
【０３３９】

他の実施形態では、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、式（ＩＸｅ）～（ＩＸｇ）：

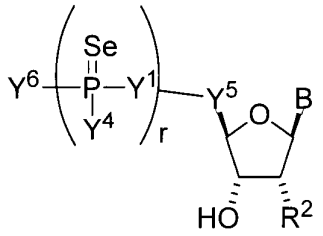
【化２８】



（ＩＸｅ）、



（ＩＸｆ）、もしくは



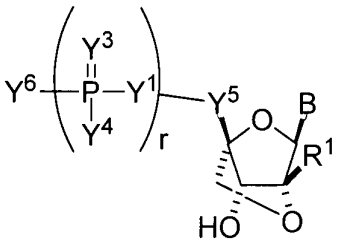
（ＩＸｇ）、

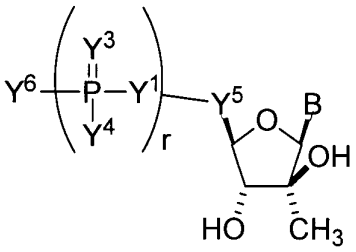
またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、Ｂは、本明細書に記載のもの（例えば、（ｂ１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）である。特定の実施形態において、式（ＩＸｅ）～（ＩＸｇ）のうちの１つは、修飾ウラシル（例えば、式（ｂ１）～（ｂ９）、（ｂ２１）～（ｂ２３）、および（ｂ２８）～（ｂ３１）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１）、（ｂ８）、（ｂ２８）、（ｂ２９）、または（ｂ３０））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｅ）～（ＩＸｇ）のうちの１つは、修飾シトシン（例えば、式（ｂ１０）～（ｂ１４）、（ｂ２４）、（ｂ２５）、および（ｂ３２）～（ｂ３６）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１０）または（ｂ３２））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｅ）～（ＩＸｇ）のうちの１つは、修飾グアニン（例えば、式（ｂ１５）～（ｂ１７）および（ｂ３７）～（ｂ４０）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｅ）～（ＩＸｇ）のうちの１つは、修飾アデニン（例えば、式（ｂ１８）～（ｂ２０）および（ｂ４１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。

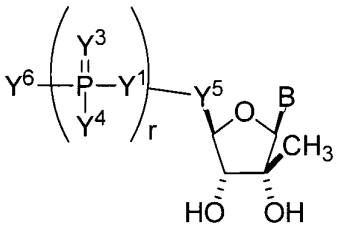
【０３４０】

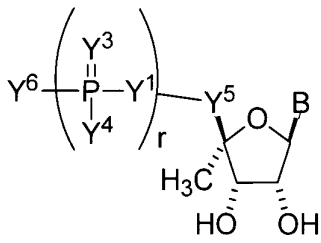
他の実施形態では、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、式（ＩＸｈ）～（ＩＸｋ）：

【化２９】


（ＩＸｈ）、


（ＩＸｉ）、


（ＩＸｊ）、もしくは

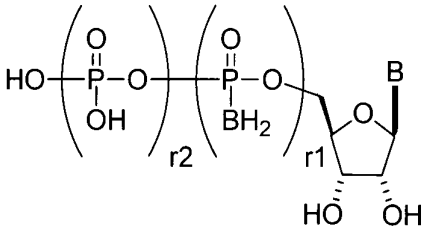

（ＩＸｋ）、

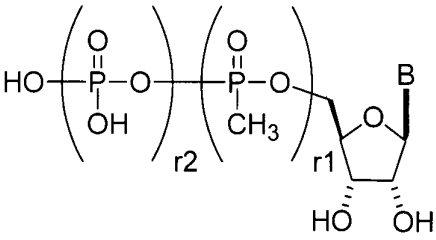
またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、Ｂは、本明細書に記載のもの（例えば、（ｂ１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）である。特定の実施形態において、式（ＩＸｈ）～（ＩＸｋ）のうちの１つは、修飾ウラシル（例えば、式（ｂ１）～（ｂ９）、（ｂ２１）～（ｂ２３）、および（ｂ２８）～（ｂ３１）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１）、（ｂ８）、（ｂ２８）、（ｂ２９）、または（ｂ３０））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｈ）～（ＩＸｋ）のうちの１つは、修飾シトシン（例えば、式（ｂ１０）～（ｂ１４）、（ｂ２４）、（ｂ２５）、および（ｂ３２）～（ｂ３６）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１０）または（ｂ３２））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｈ）～（ＩＸｋ）のうちの１つは、修飾グアニン（例えば、式（ｂ１５）～（ｂ１７）および（ｂ３７）～（ｂ４０）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｈ）～（ＩＸｋ）のうちの１つは、修飾アデニン（例えば、式（ｂ１８）～（ｂ２０）および（ｂ４１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。

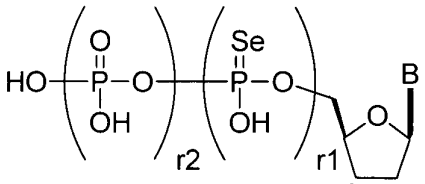
【０３４１】

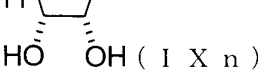
他の実施形態では、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、式（ＩＸｌ）～（ＩＸｒ）：

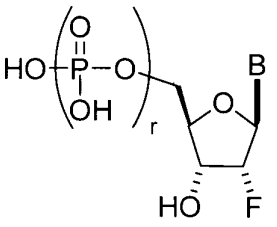
【化３０】

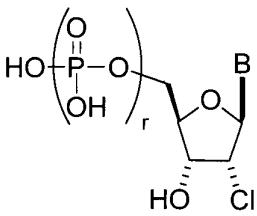

（ＩＸｌ）、

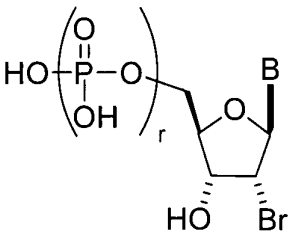

（ＩＸ

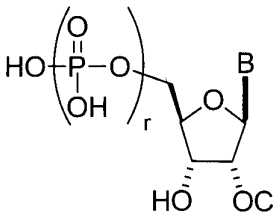

ｍ）、


（ＩＸｎ）、


（ＩＸｏ）、


（ＩＸｐ）、


（ＩＸｑ）、もしくは

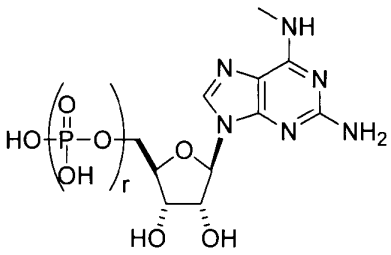

（ＩＸｒ）

またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を有し、式中、各ｒ１およびｒ２は、独立して、０～５（例えば、０～３、１～３、または１～５）の整数であり、Ｂは、本明細書に記載のもの（例えば、（ｂ１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）である。特定の実施形態において、式（ＩＸｌ）～（ＩＸｒ）のうちの１つは、修飾ウラシル（例えば、式（ｂ１）～（ｂ９）、（ｂ２１）～（ｂ２３）、および（ｂ２８）～（ｂ３１）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１）、（ｂ８）、（ｂ２８）、（ｂ２９）、または（ｂ３０））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｌ）～（ＩＸｒ）のうちの１つは、修飾シトシン（例えば、式（ｂ１０）～（ｂ１４）、（ｂ２４）、（ｂ２５）、および（ｂ３２）～（ｂ３６）のうちのいずれか１つ、例えば、式（ｂ１０）または（ｂ３２））と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｌ）～（ＩＸｒ）のうちの１つは、修飾グアニン（例えば、式（ｂ１５）～（ｂ１７）および（ｂ３７）～（ｂ４０）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。特定の実施形態において、式（ＩＸｌ）～（ＩＸｒ）のうちの１つは、修飾アデニン（例えば、式（ｂ１８）～（ｂ２０）および（ｂ４１）～（ｂ４３）のうちのいずれか１つ）と組み合わせられる。

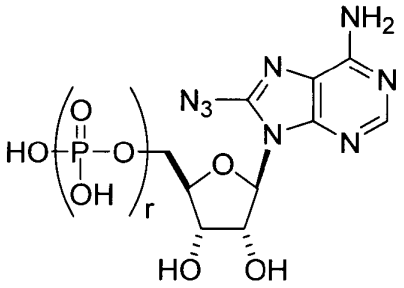
【０３４２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、

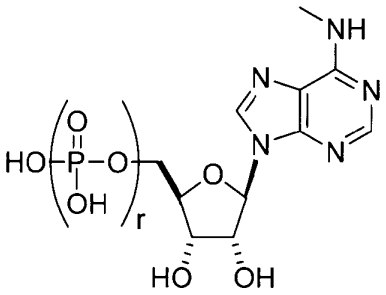
【化３１】



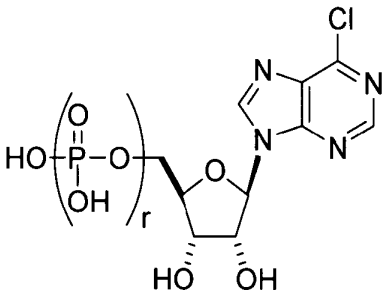
（ＢＢ－１）、



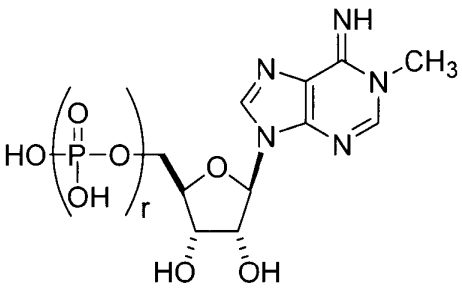
（ＢＢ－２）、



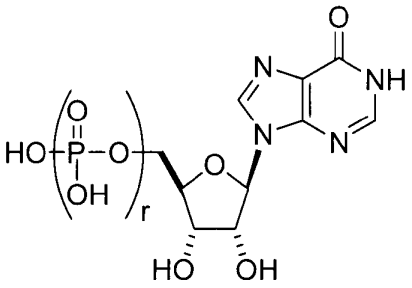
（ＢＢ－３）、



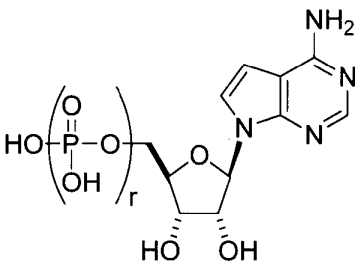
（ＢＢ－４）、



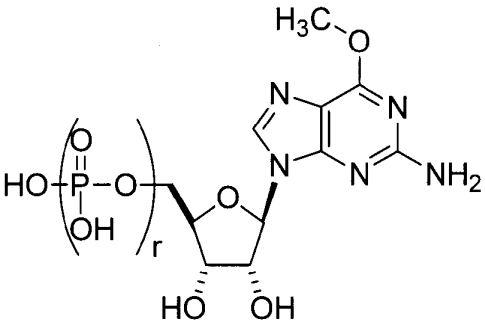
（ＢＢ－５）、

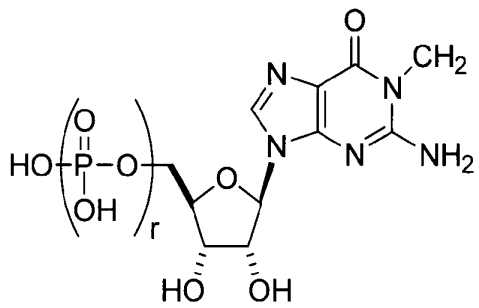


（ＢＢ－６）、

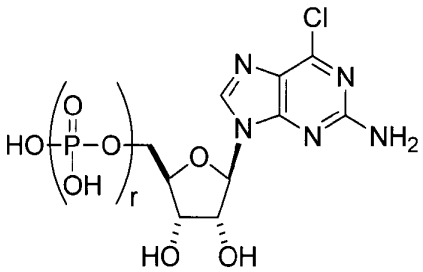


（ＢＢ－７）、

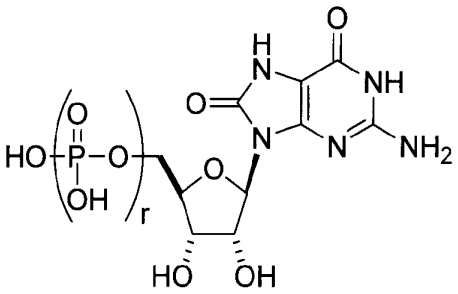




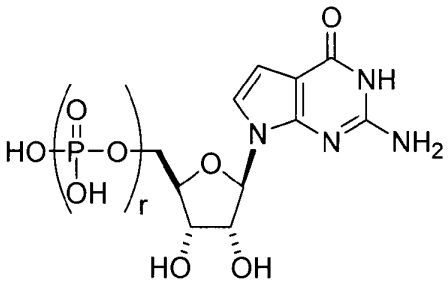
（ＢＢ－８）、



（ＢＢ－９）、



（ＢＢ－１０）、



（ＢＢ－１１）、および

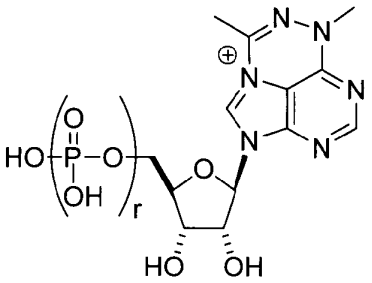
（ＢＢ－１２）、

またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体からなる群から選択され得、式中、各ｒは、独立して、０～５（例えば、０～３、１～３、または１～５）の整数である。

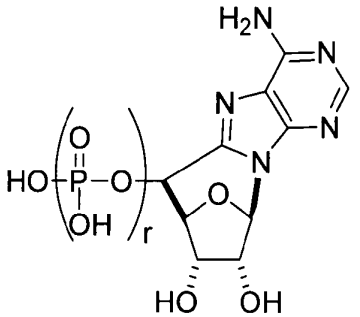
【０３４３】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、

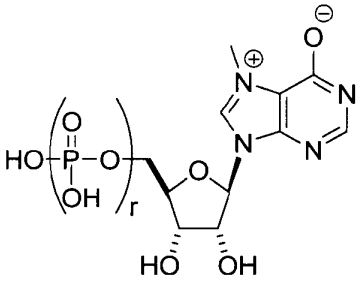
【化３２】



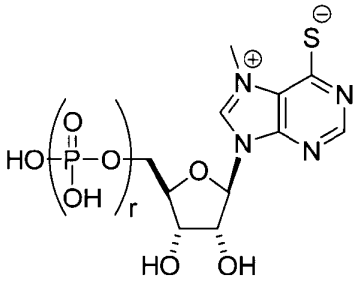
（ＢＢ－１３）、



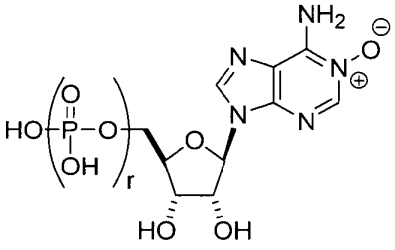
（ＢＢ－１４）、



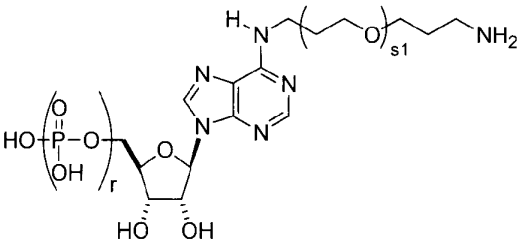
（ＢＢ－１５）、



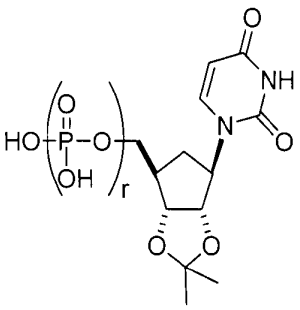
（ＢＢ－１６）、



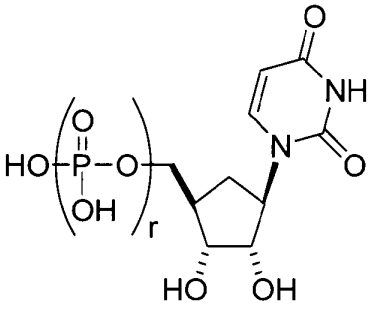
（ＢＢ－１７）、



（ＢＢ－１８）、



（ＢＢ－１９）、および



（ＢＢ－２０）

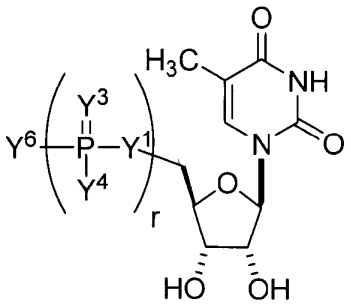
、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体からなる群から選択され得、式中、各ｒは、独立して、０～５（例えば、０～３、１～３、または１～５）の整数であり、ｓ１は、本明細書に記載の通りである。

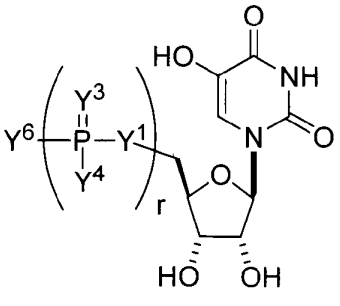
【０３４４】

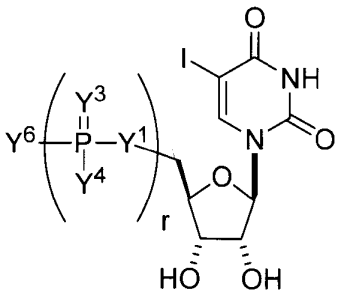
いくつかの実施形態において、核酸（例えば、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ）に組み込まれ得るビルディングブロック分子は、修飾ウリジンである（例えば、以下からなる群から選択されるもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり、式中、Y^1、Y^3、Y^4、Y^6、およびｒは、本明細

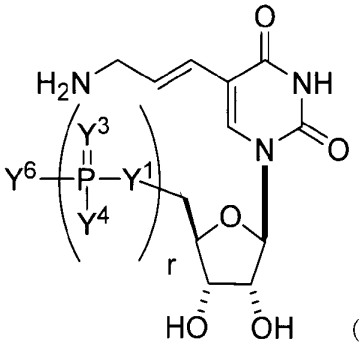
書に記載の通りである（例えば、各ｒは、独立して、０～５、例えば、０～３、１～３、または１～５の整数である）：

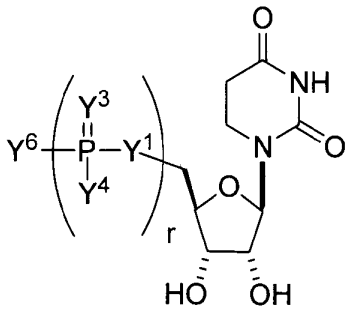
【化３３】

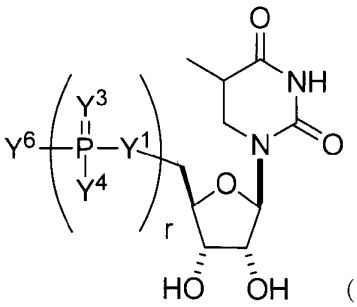

（ＢＢ－２１）、

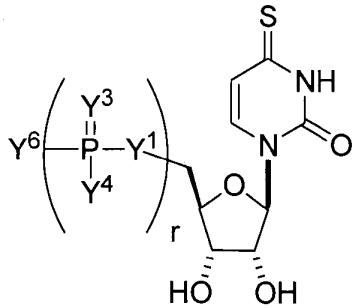

（ＢＢ－２２）、

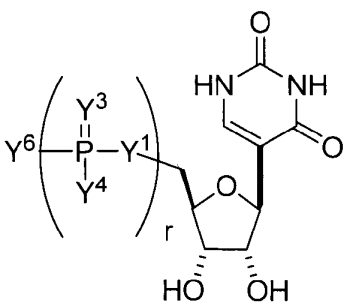

（ＢＢ－２３）、

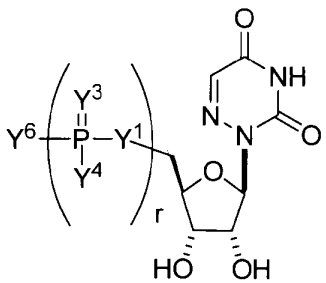

（ＢＢ－２４）、

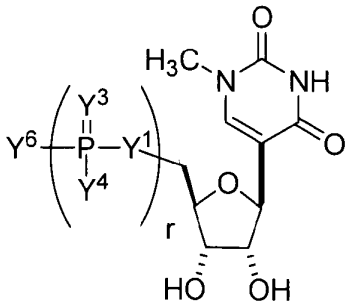

（ＢＢ－２５）、


（ＢＢ－２６）、

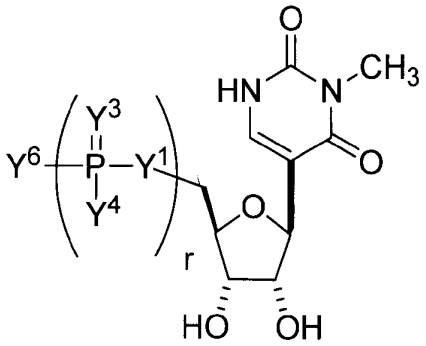

（ＢＢ－２７）、


（ＢＢ－２８）、

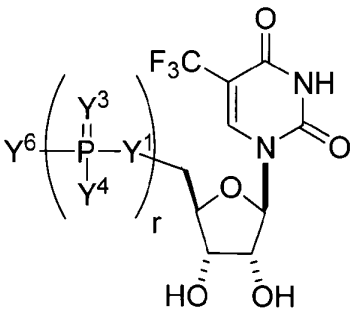

（ＢＢ－２９）、



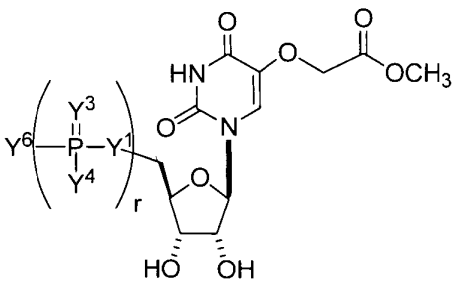
（ＢＢ－３０）、



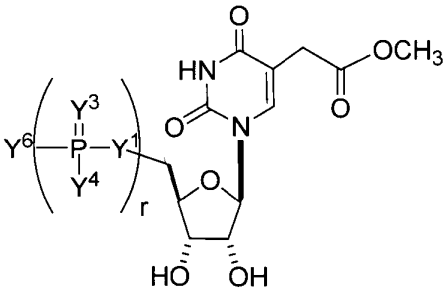
（ＢＢ－３１）、



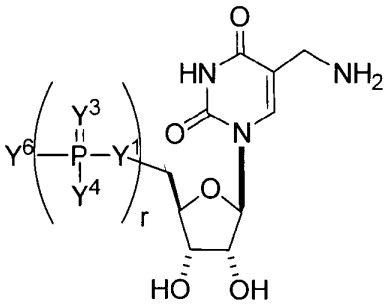
（ＢＢ－３２）、



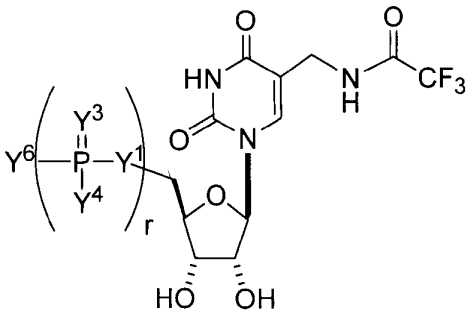
（ＢＢ－３３）、



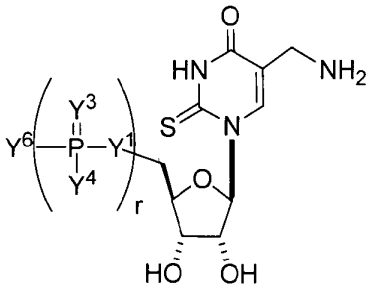
（ＢＢ－３４）、



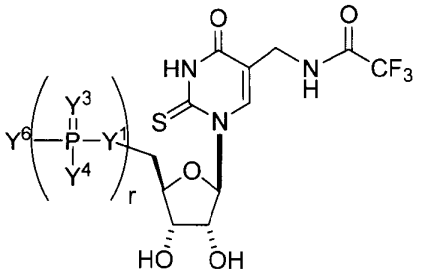
（ＢＢ－３５）、



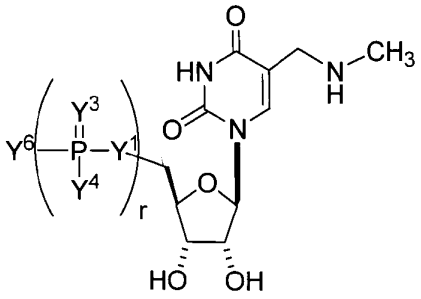
（ＢＢ－３６）、



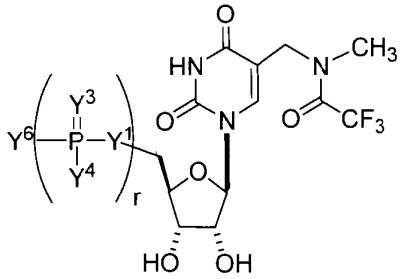
（ＢＢ－３７）、



（ＢＢ－３８）、

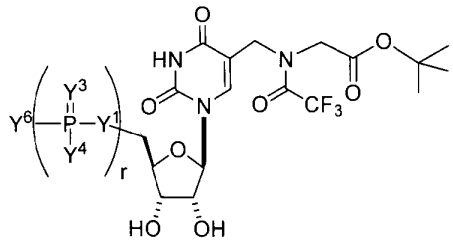


（Ｂ

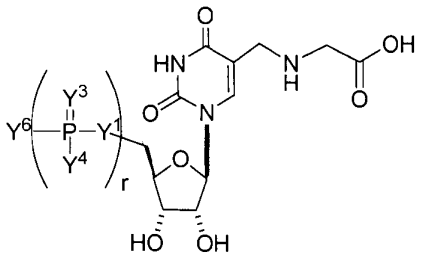


Ｂ－３９）、

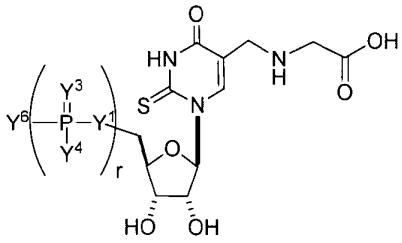
（ＢＢ－４０）、



（ＢＢ－４１）、

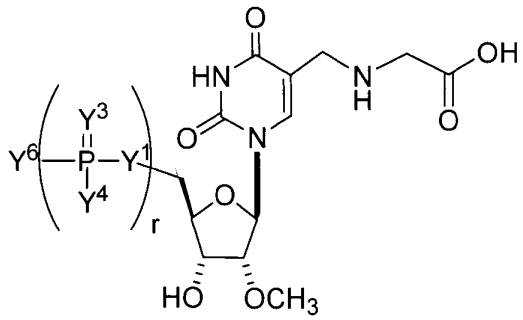


（Ｂ

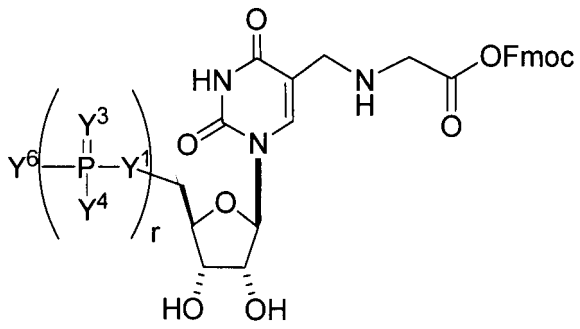


Ｂ－４２）、

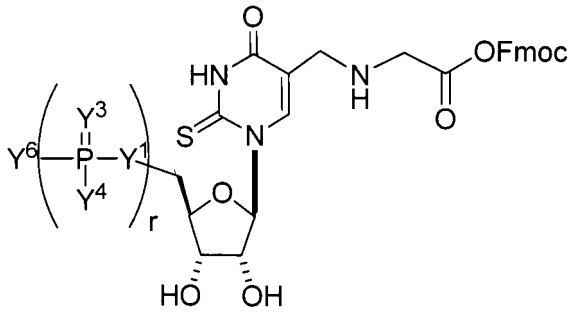
（ＢＢ－４３）、



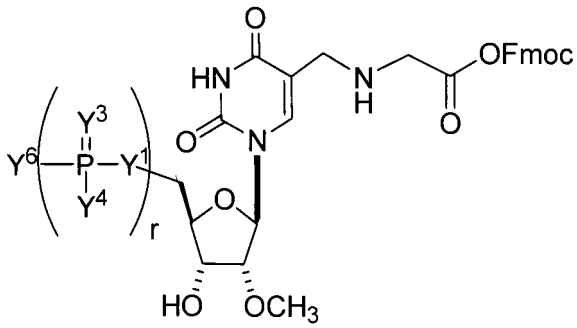
（ＢＢ－４４）、



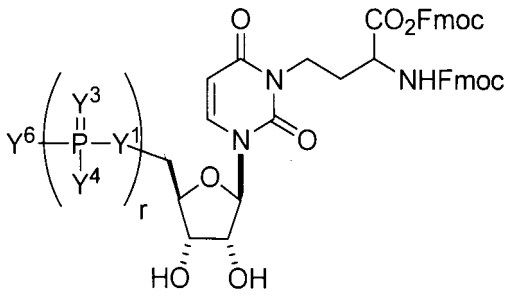
（ＢＢ－４５）、



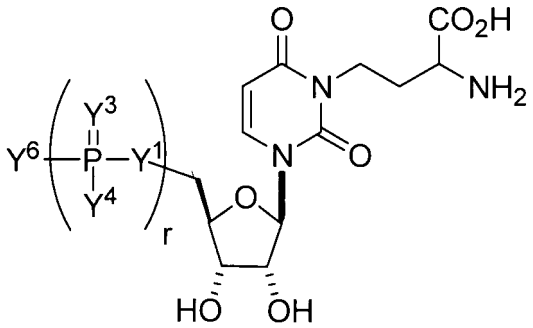
（ＢＢ－４６）、



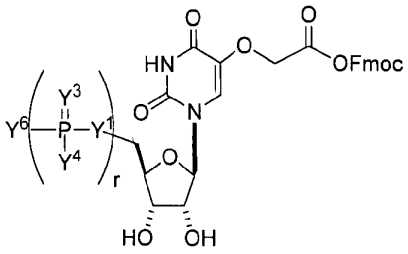
（ＢＢ－４７）、



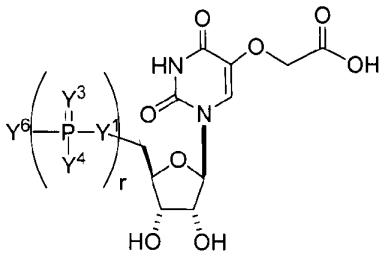
（ＢＢ－４８）、



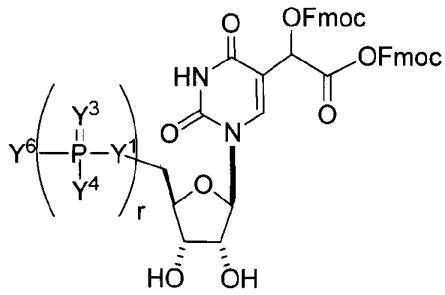
（ＢＢ－４９）、



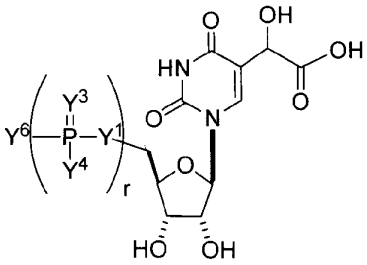
（ＢＢ－５０）、



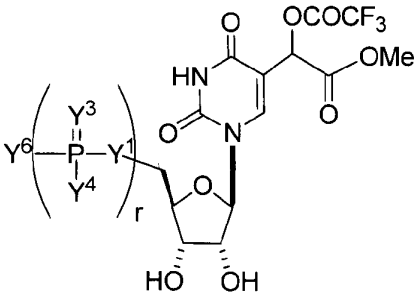
（ＢＢ－５１）、



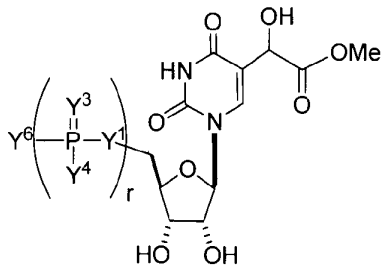
（ＢＢ－５２）、



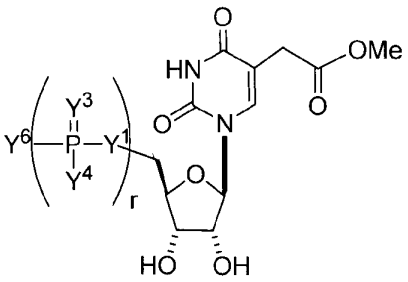
（ＢＢ－５３）、



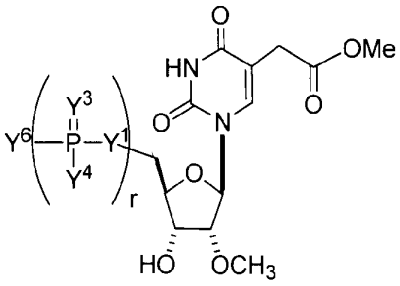
（ＢＢ－５４）、



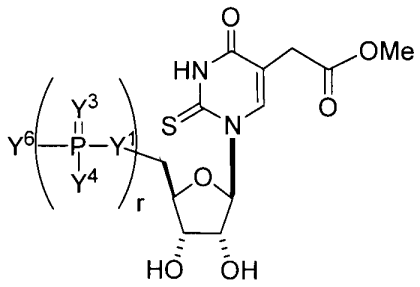
（ＢＢ－５５）、



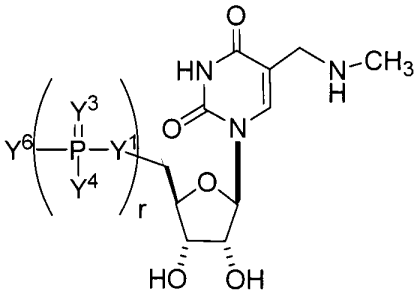
（ＢＢ－５６）、



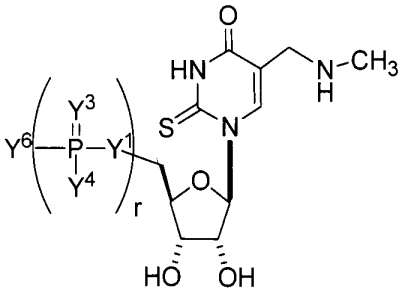
（ＢＢ－５７）



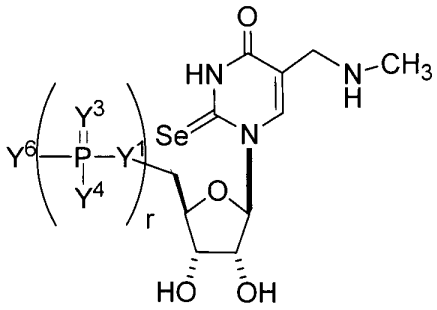
（ＢＢ－５７）、



（ＢＢ－５８）、

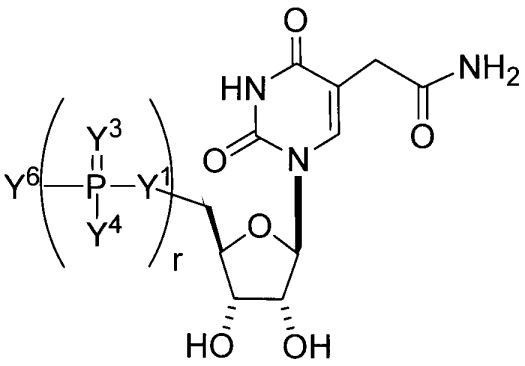


（ＢＢ－５９）、

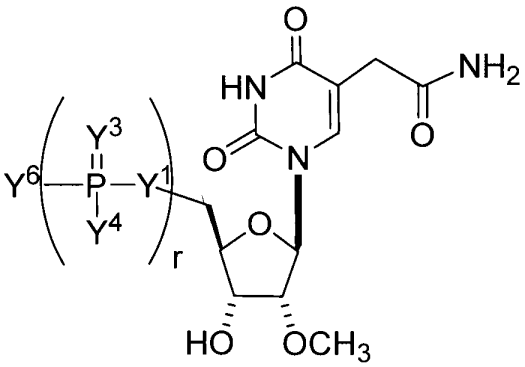


（ＢＢ－６０）、

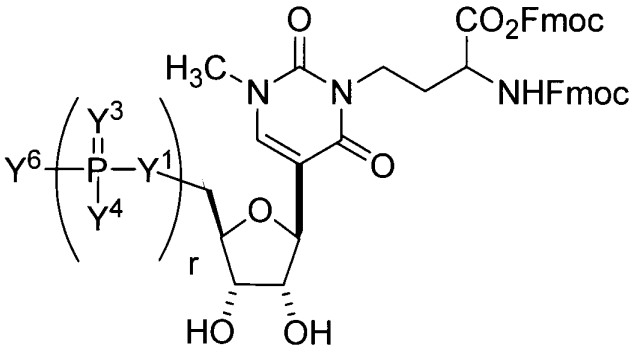
（ＢＢ－６１）、



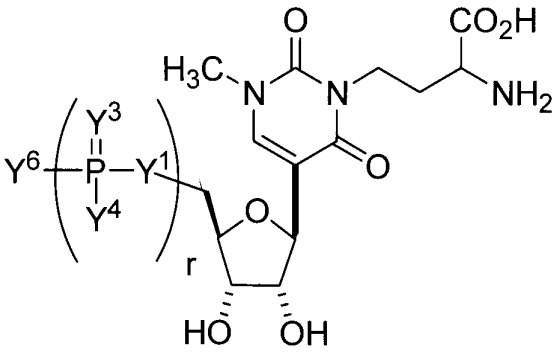
（ＢＢ－６２）、



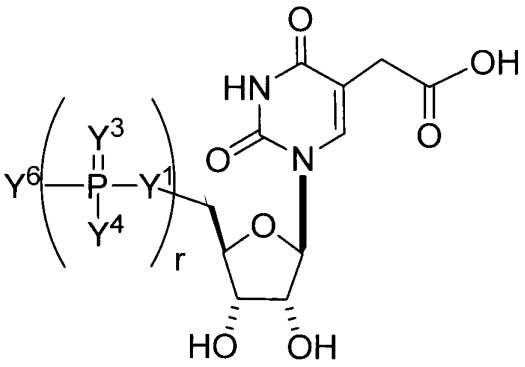
（ＢＢ－６３）、



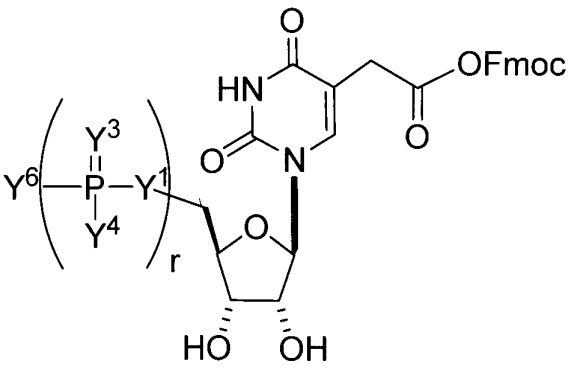
（ＢＢ－６４）、



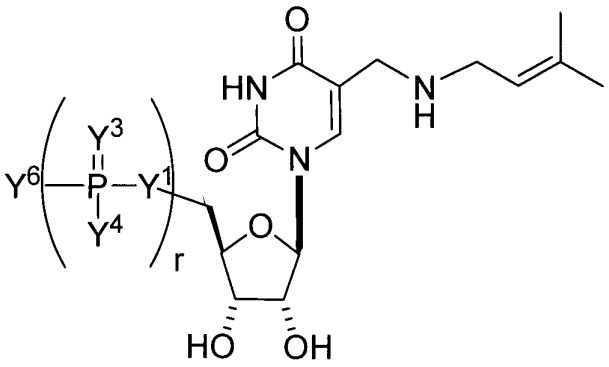
（ＢＢ－６５）、



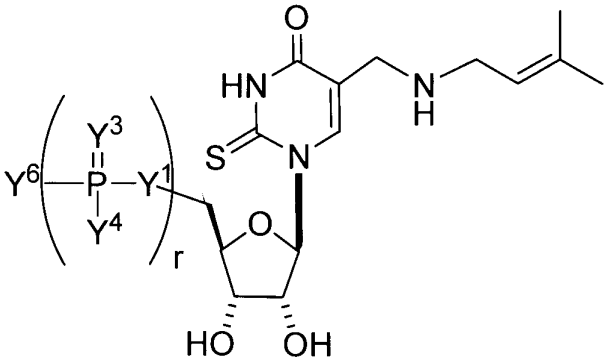
（ＢＢ－６６）、



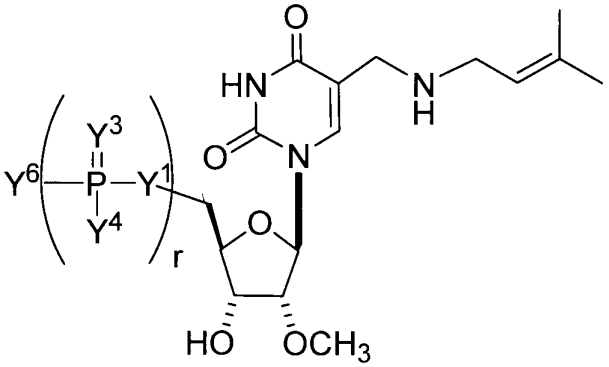
（ＢＢ－６７）、



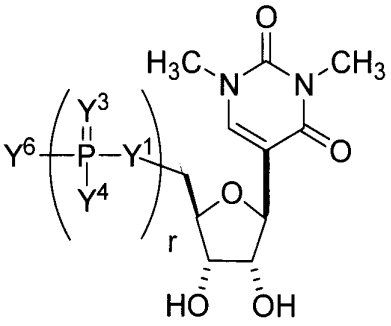
（ＢＢ－６８）、



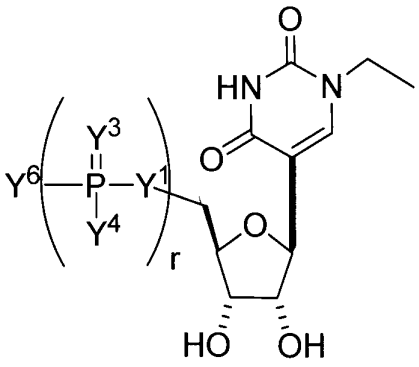
（ＢＢ－６９）、



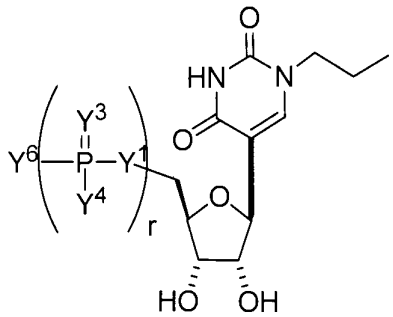
（ＢＢ－７０）、



（ＢＢ－７１）、

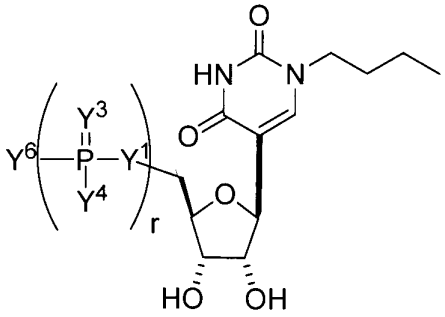


（ＢＢ

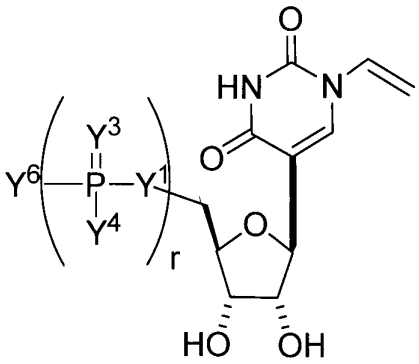


－７２）、

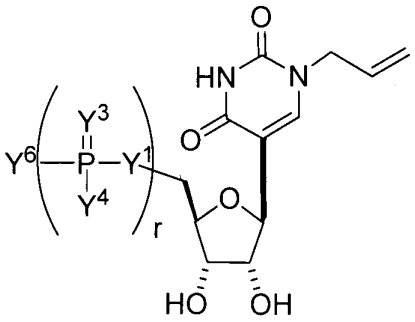
（ＢＢ－７３）、



（ＢＢ－７４）、

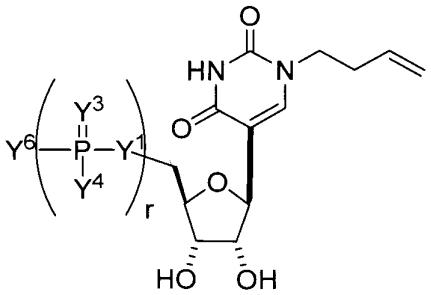


（Ｂ

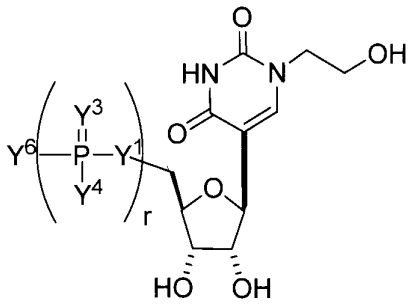


Ｂ－７５）、

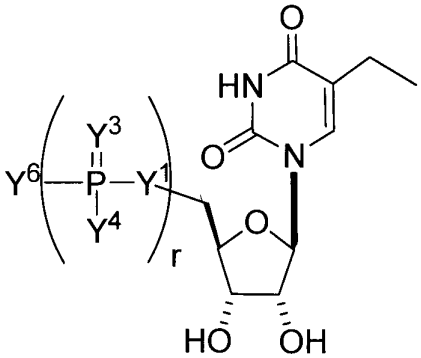
（ＢＢ－７６）、



（ＢＢ－７７）、

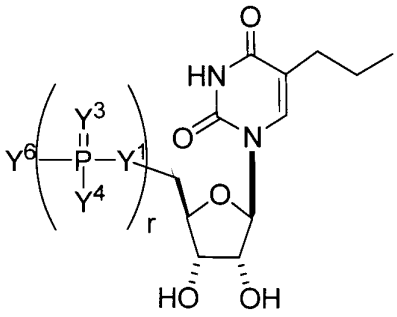


（Ｂ

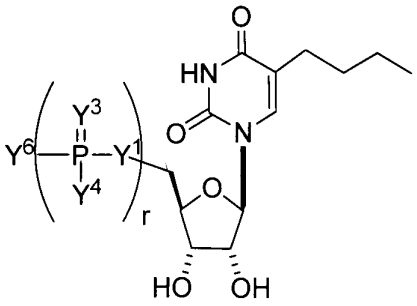


Ｂ－７８）、

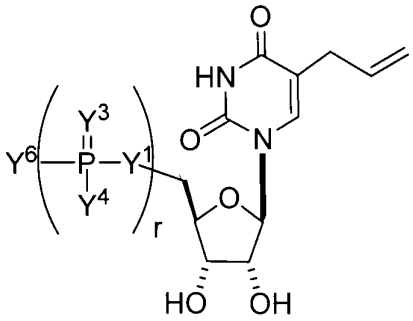
（ＢＢ－７９）、



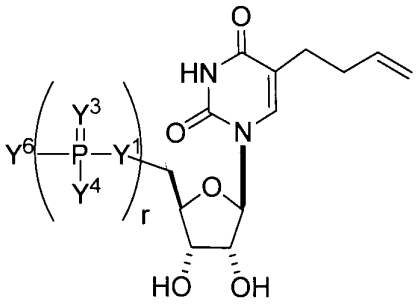
（ＢＢ－８０）、



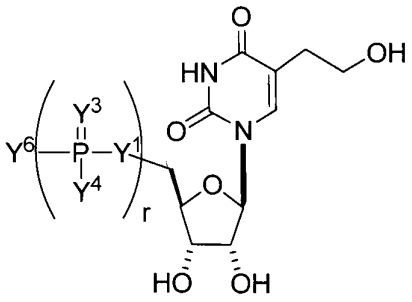
（ＢＢ－８１）、



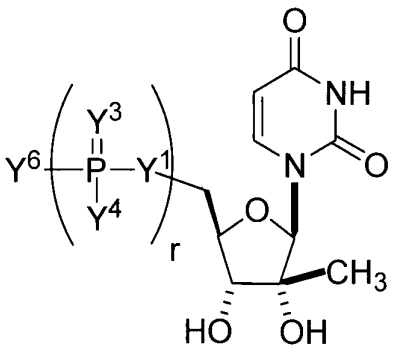
（ＢＢ－８２）、



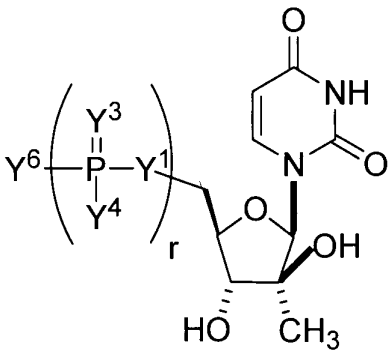
（ＢＢ－８３）、



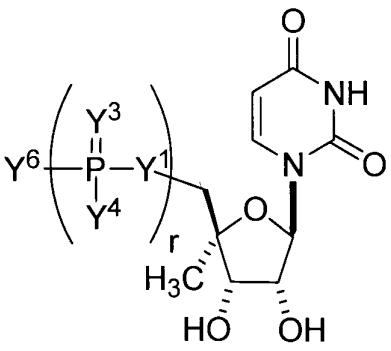
（ＢＢ－８４）、



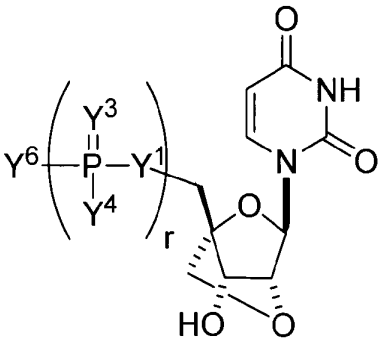
（ＢＢ－８５）、



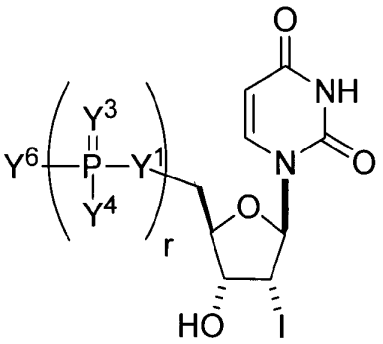
（ＢＢ－８６）、



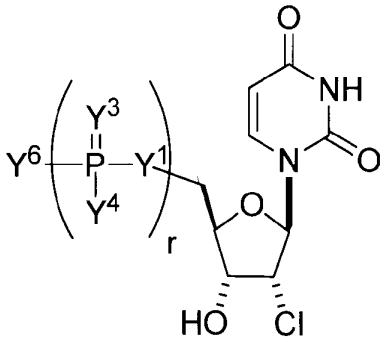
（ＢＢ－



８７）、

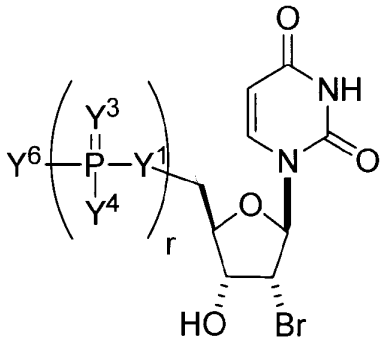


（ＢＢ－８８）、

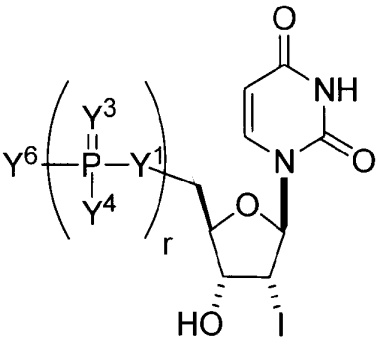


（ＢＢ－８９）、

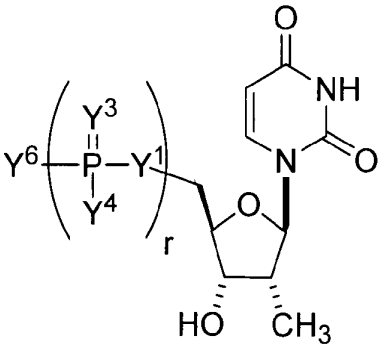
（ＢＢ－９０）、



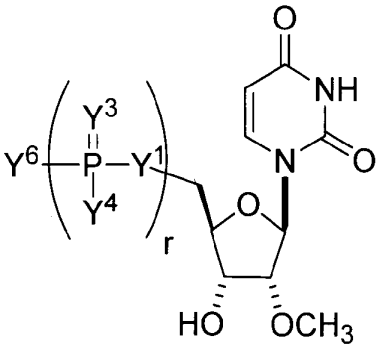
（ＢＢ－９１）、



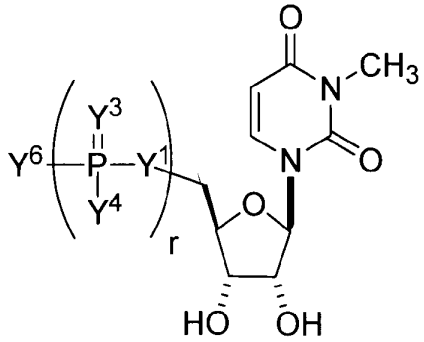
（ＢＢ－



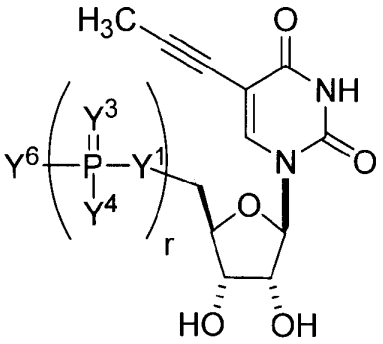
９２）、



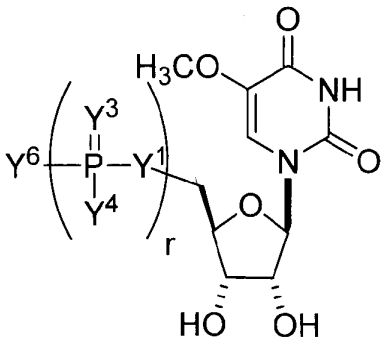
（ＢＢ－９３）、



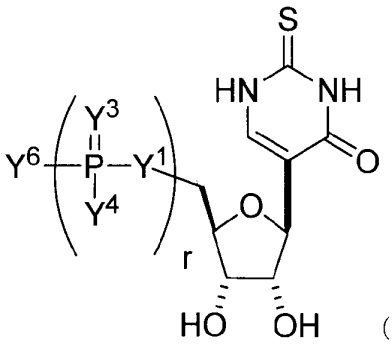
（ＢＢ－９４）、



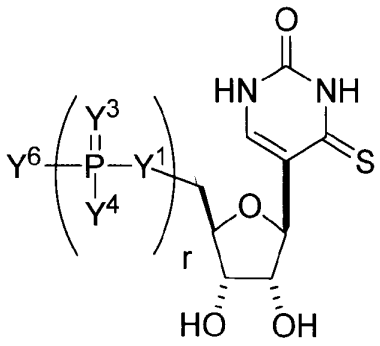
（ＢＢ－９５）、



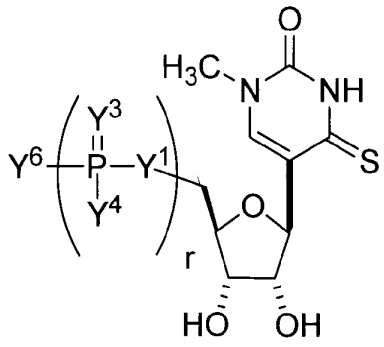
（ＢＢ－９６）、



（ＢＢ－９７）、

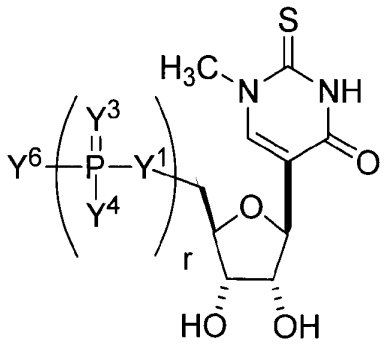


（ＢＢ－９８）、

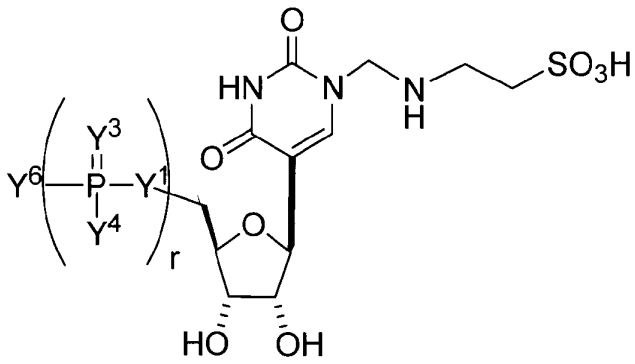


（ＢＢ－９９）、

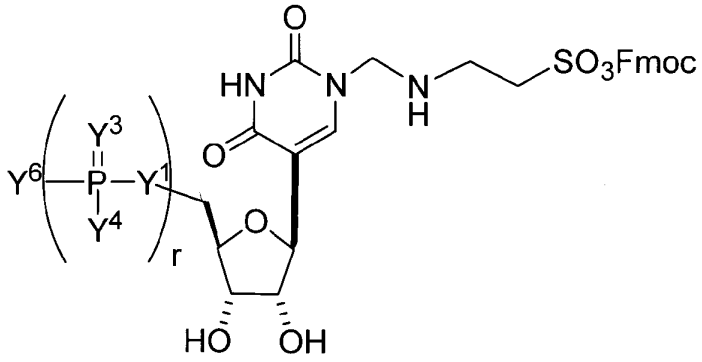
（ＢＢ－１００）、



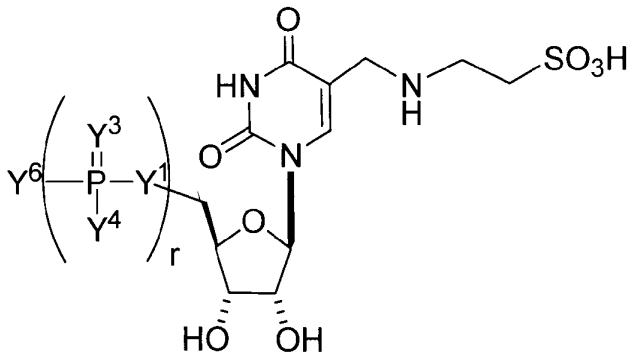
（ＢＢ－１０１）、



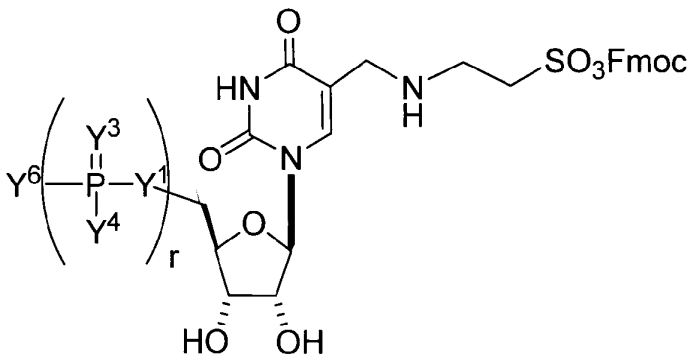
（ＢＢ－１０２）、



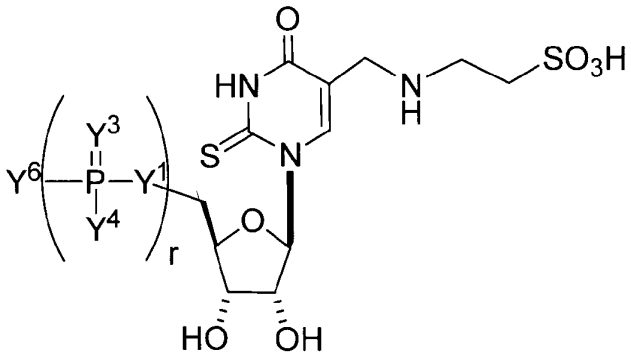
（ＢＢ－１０３）、



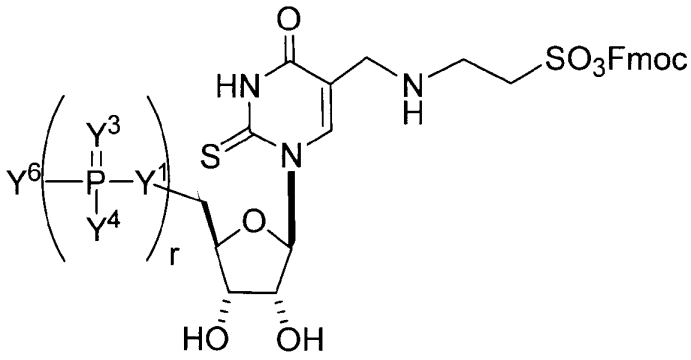
（ＢＢ－１０４）、



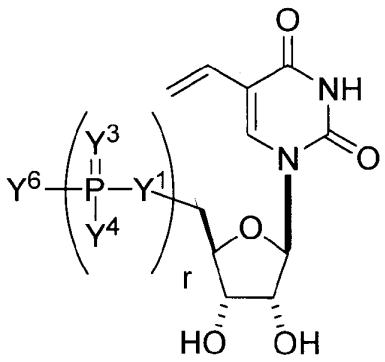
（ＢＢ－１０５）、



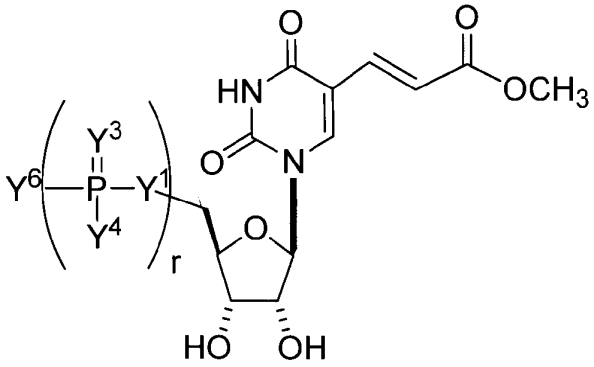
（ＢＢ－１０６）、



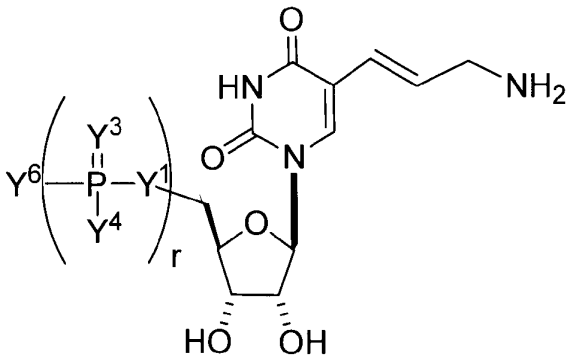
（ＢＢ－１０７）、



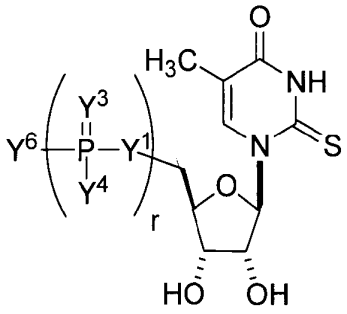
（ＢＢ－１０８）、



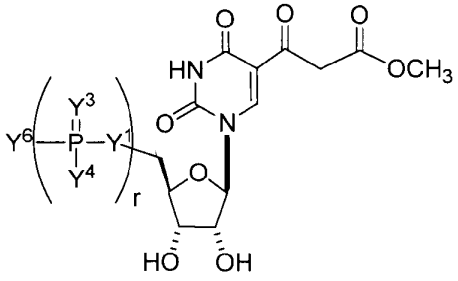
（ＢＢ－１０９）、



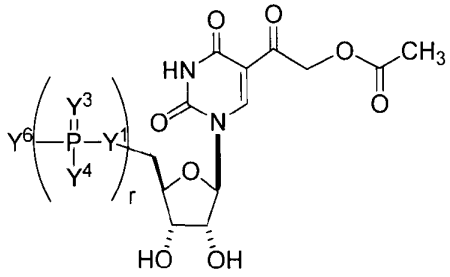
（ＢＢ－１１０）、



（ＢＢ－１１１）、

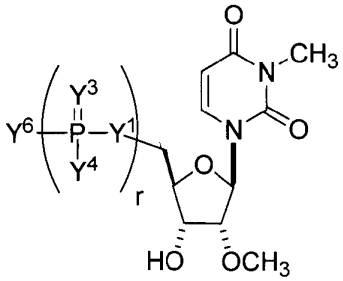


（Ｂ

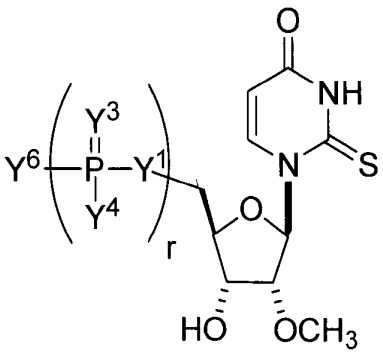


Ｂ－１１２）、

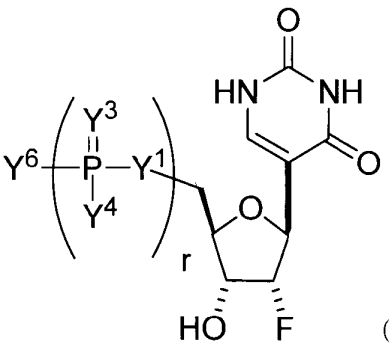
（ＢＢ－１１３）、



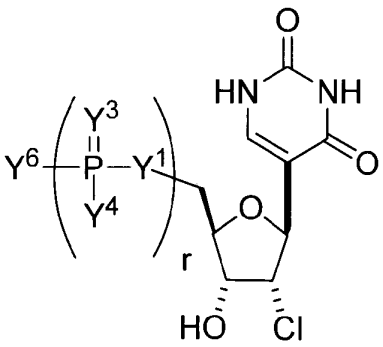
（ＢＢ－１１４）、



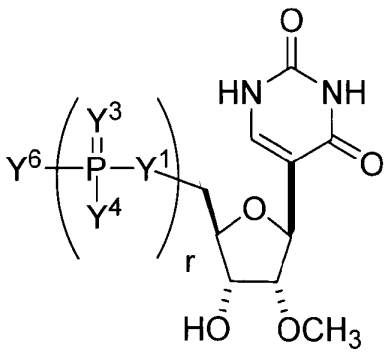
（ＢＢ－１１５）、



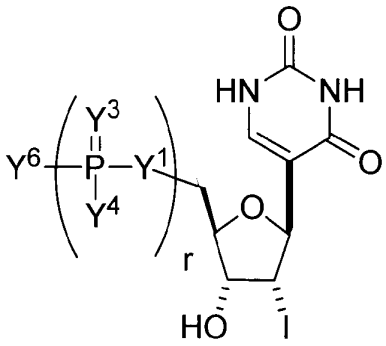
（ＢＢ－１１６）、



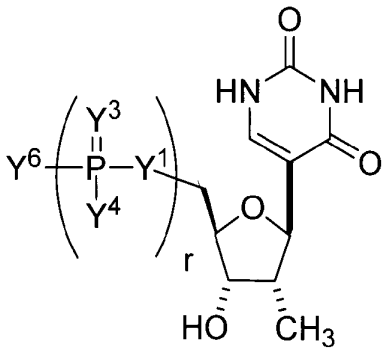
（ＢＢ－１１７）、



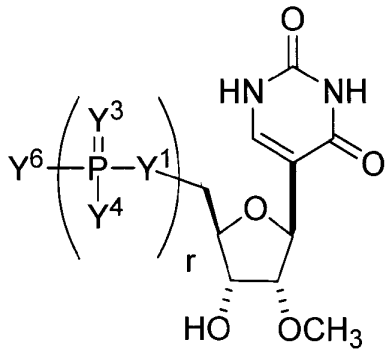
（ＢＢ－１１８）、



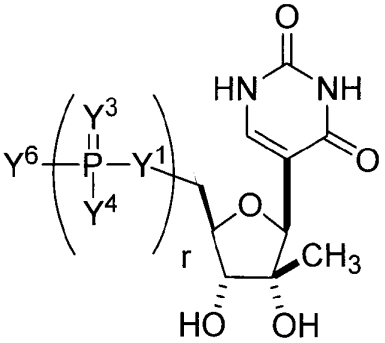
（ＢＢ－１１９）、



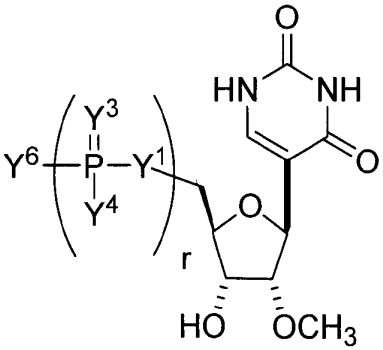
（ＢＢ



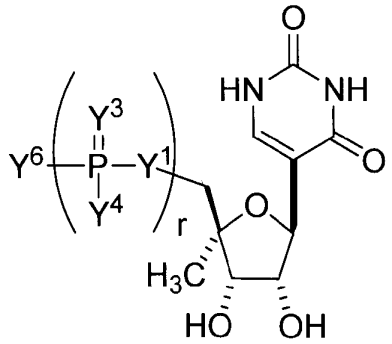
－１２０）、



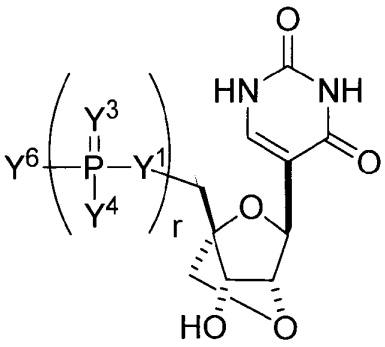
（ＢＢ－１２１）、



（ＢＢ－１２２）、



（ＢＢ－１２３）、



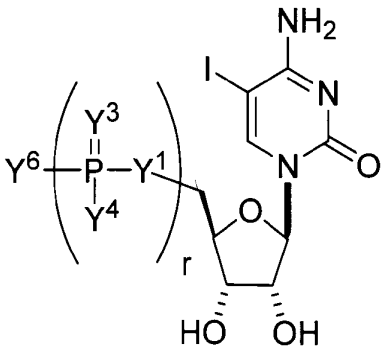
（ＢＢ－１２４）、および

（ＢＢ－１２５））。

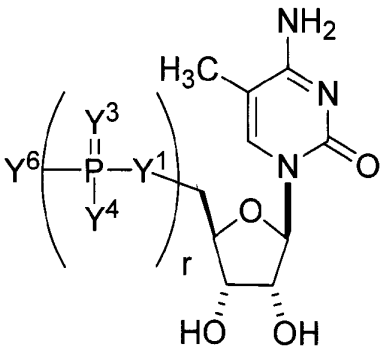
【０３４５】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、修飾シチジンである（例えば、以下からなる群から選択されるもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり、式中、Y^1、Y^3、Y^4、Y^6、およびｒは、本明細書に記載の通りである（例えば、各ｒは、独立して、０～５、例えば、０～３、１～３、または１～５の整数である）：

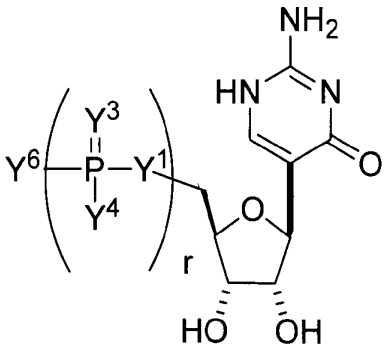
【化３４】



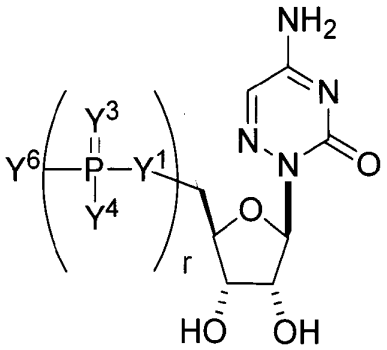
（ＢＢ－１２６）、



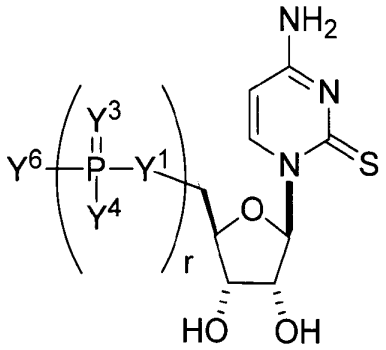
（ＢＢ－１２７）、



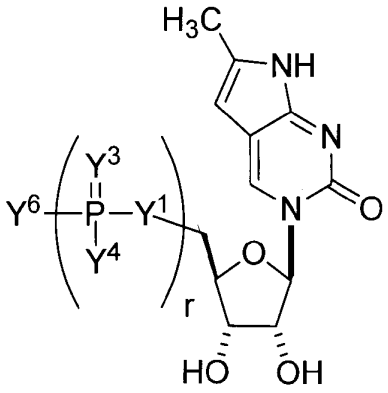
（ＢＢ－１２８）、



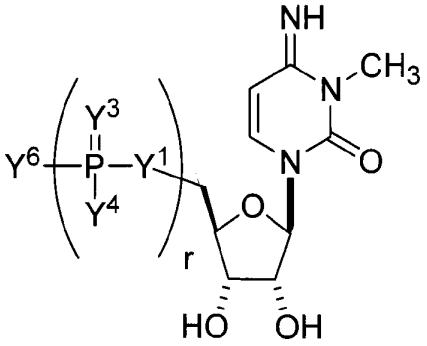
（ＢＢ－１２９）、



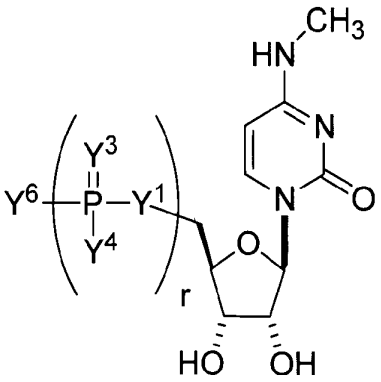
（ＢＢ－１３０）、



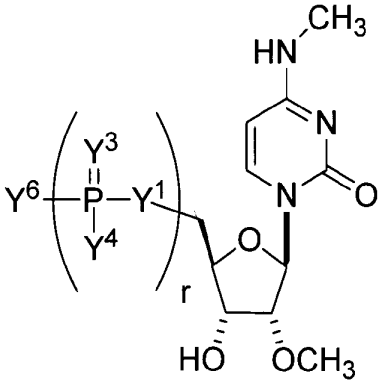
（ＢＢ－１３１）、



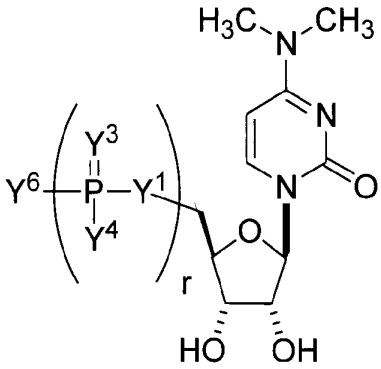
（ＢＢ－１３２）、



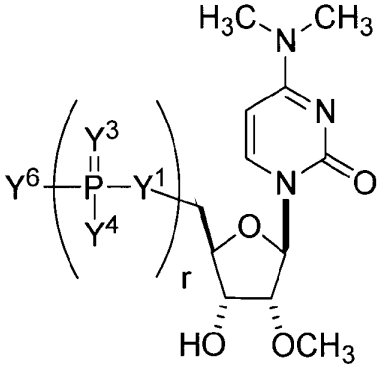
（ＢＢ－１３３）、



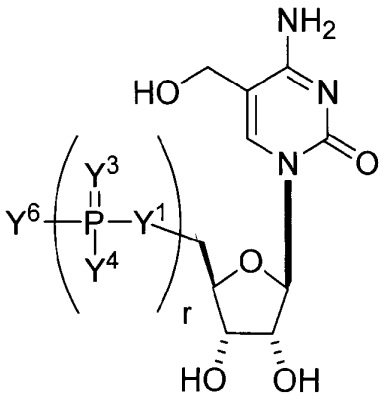
（ＢＢ－１３４）、



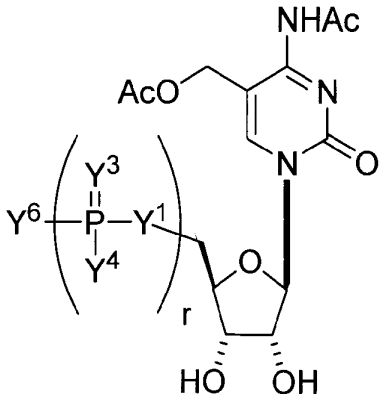
（ＢＢ－１３５）、



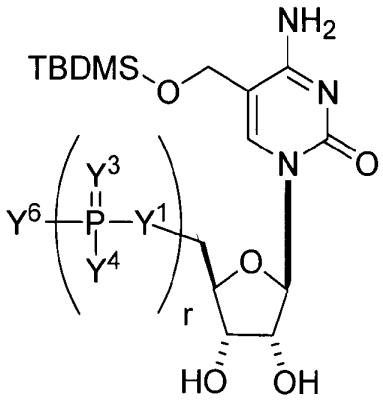
（ＢＢ－１３６）、



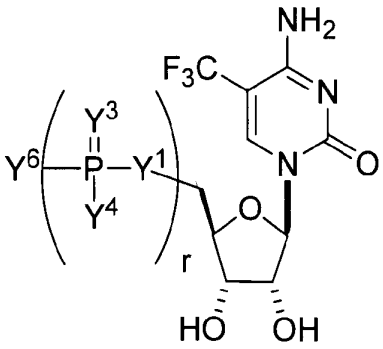
（ＢＢ－１３７）、



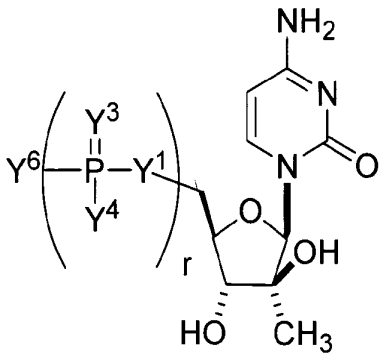
（ＢＢ－１３８）、



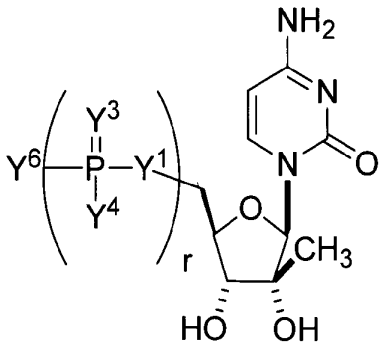
（ＢＢ－１３９）、



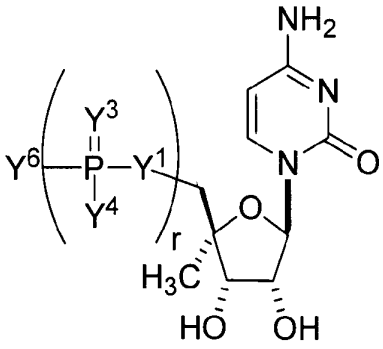
（ＢＢ－１４０）、



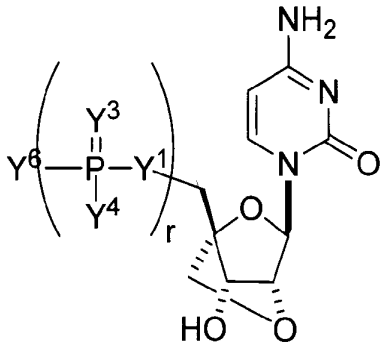
（ＢＢ－１４１）、



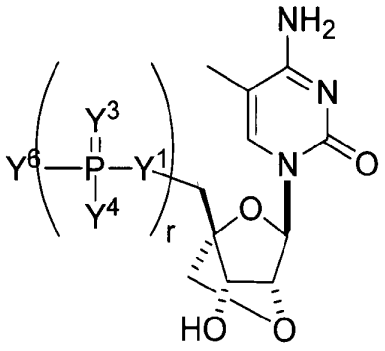
（ＢＢ－１４２）、



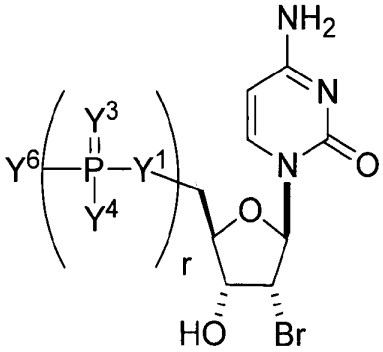
（ＢＢ－１４３）、



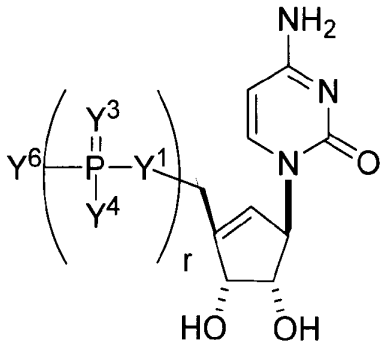
（ＢＢ－１４４）、



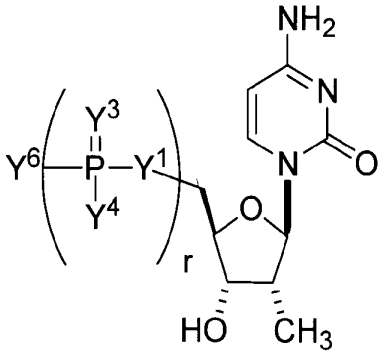
（ＢＢ－１４５）、



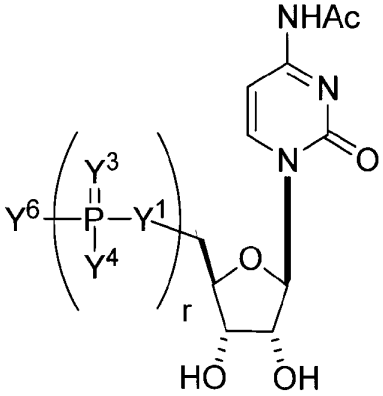
（ＢＢ－１４６）、



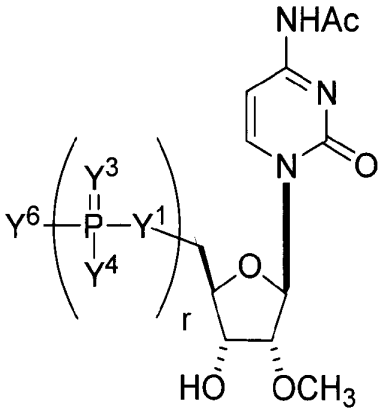
（ＢＢ－１４７）、



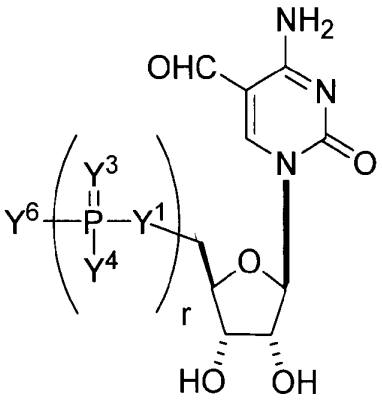
（ＢＢ－１４８）、



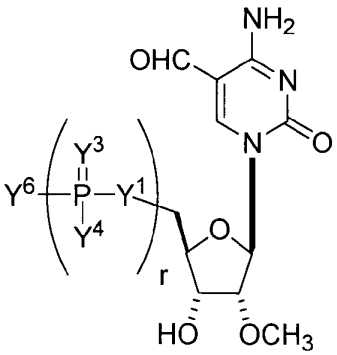
（ＢＢ－１４９）、



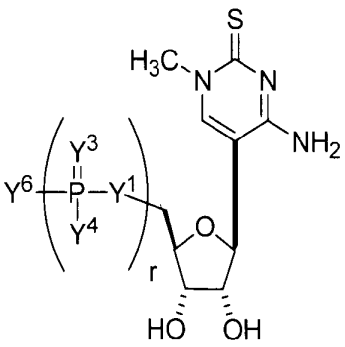
（ＢＢ－１５０）、



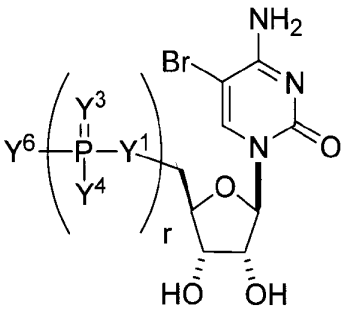
（ＢＢ－１５１）、



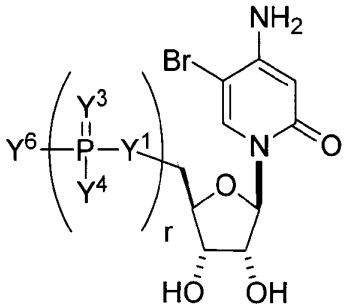
（ＢＢ－１５２）、



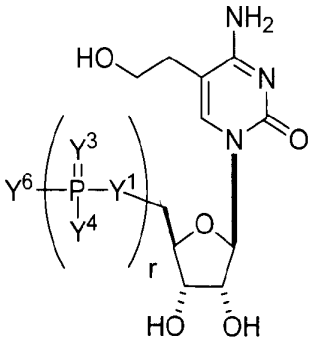
（ＢＢ－１５３）、



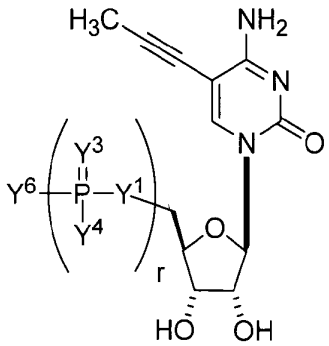
（ＢＢ－１５４）、



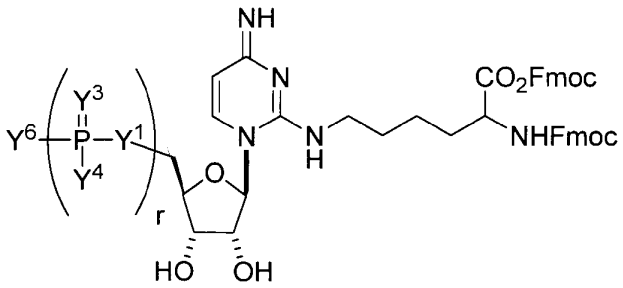
（ＢＢ－１５５）、



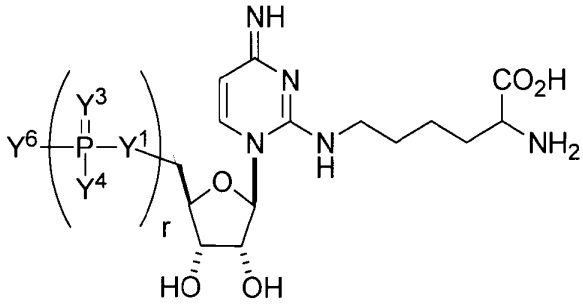
（ＢＢ－１５



６）、



（ＢＢ－１５７）、

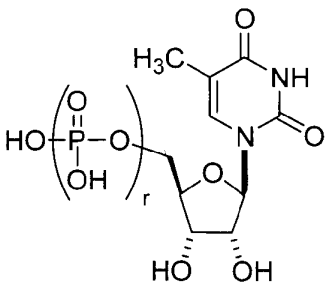


（ＢＢ－１５８）、および

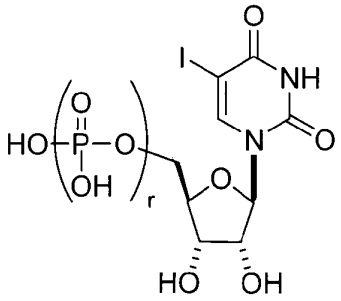
（ＢＢ－１５９））。

例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、

【化３５】



（ＢＢ－１６０）もしくは



（ＢＢ－１６１）

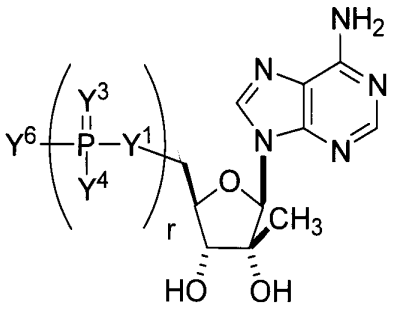
、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり得、式中、各ｒは、独立して、０～５（例えば、０～３、１～３、または１～５）の整数である。

【０３４６】

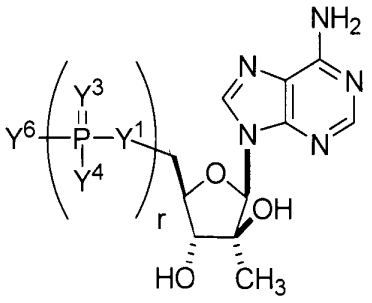
いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、修飾アデノシンである（例えば、以下からなる群から選択されるもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり、式中、Y^1、Y^3、Y^4、Y^6、およびｒは、本明細書に記載の通りである（例えば、各

ｒは、独立して、０～５、例えば、０～３、１～３、または１～５の整数である）：

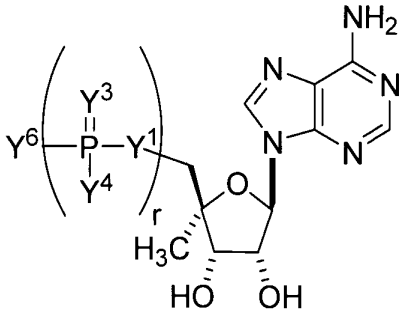
【化３６】



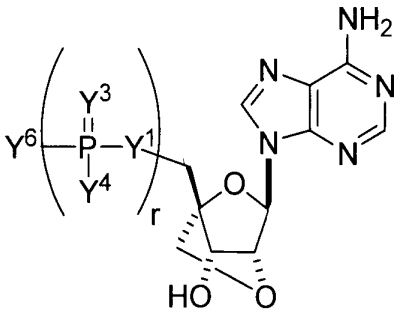
（ＢＢ－１６２）、



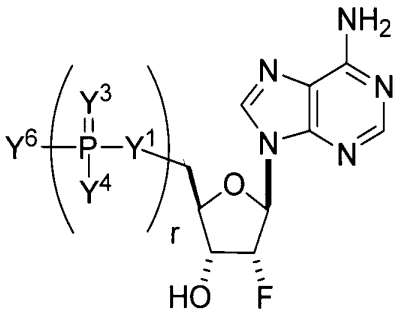
（ＢＢ－１６３）、



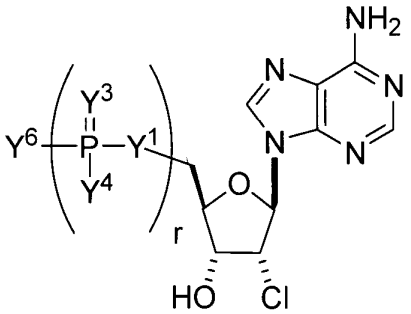
（ＢＢ－１６４）、



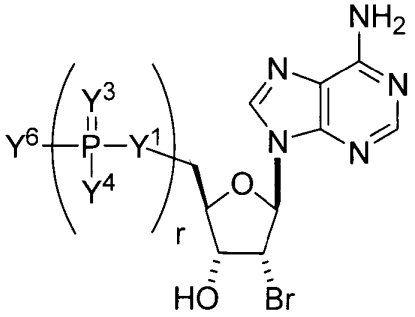
（ＢＢ－１６５）、



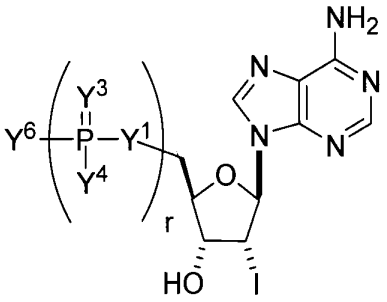
（ＢＢ－１６６）、



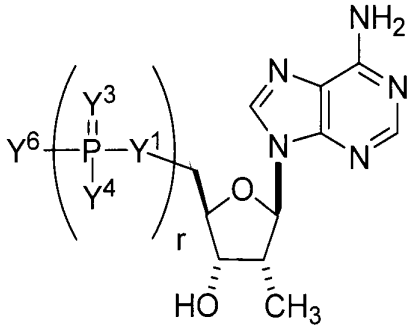
（ＢＢ－１６７）、



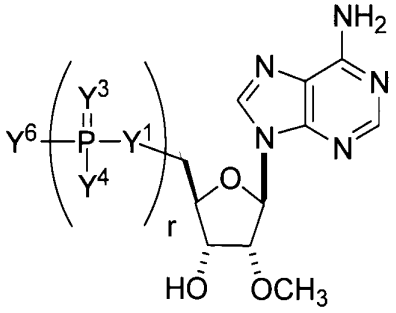
（ＢＢ－１６８）、



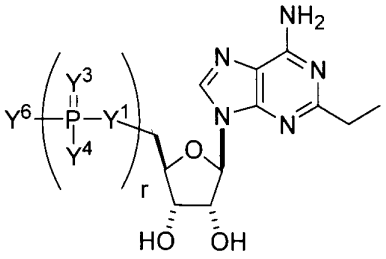
（Ｂ



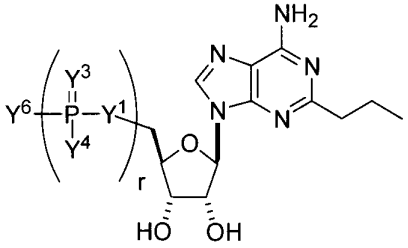
Ｂ－１６９）、



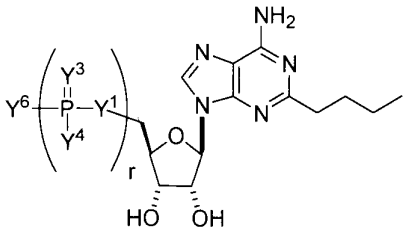
（ＢＢ－１７０）、



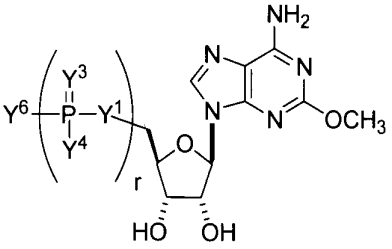
（ＢＢ－１７１）、



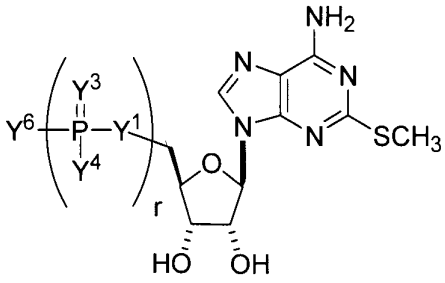
（ＢＢ－１７２）、



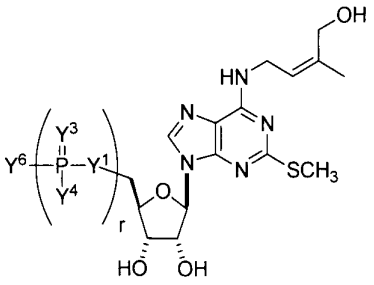
（ＢＢ－１７３）、



（ＢＢ－１７４）、

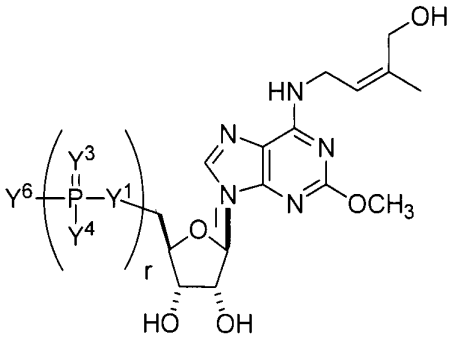


（ＢＢ－１７５）、



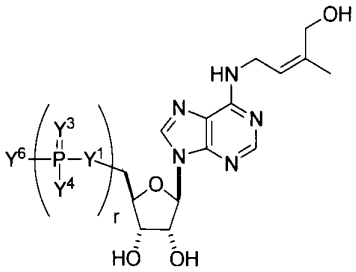
（ＢＢ－１７６）、

（Ｂ

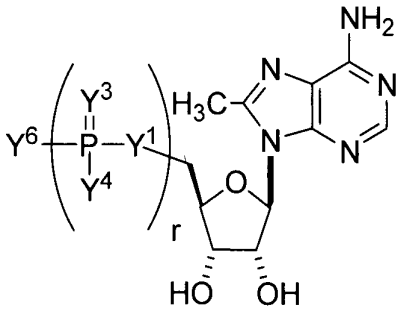


Ｂ－１７７）、

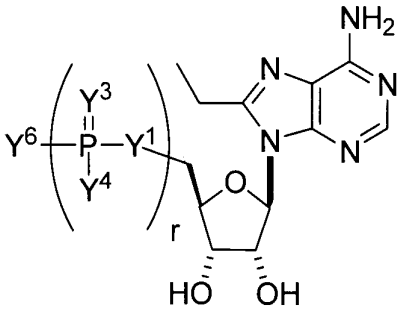
（ＢＢ－１７８）、



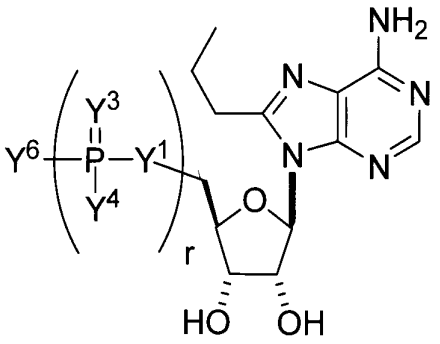
（ＢＢ－１７９）、



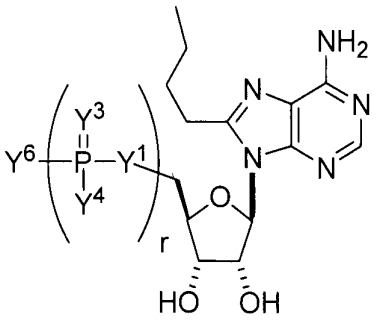
（ＢＢ－１８０）、



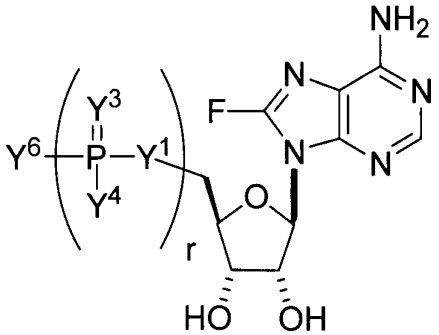
（ＢＢ－１８１）、



（ＢＢ－１８２）、

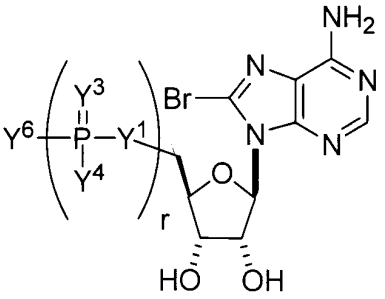


（Ｂ

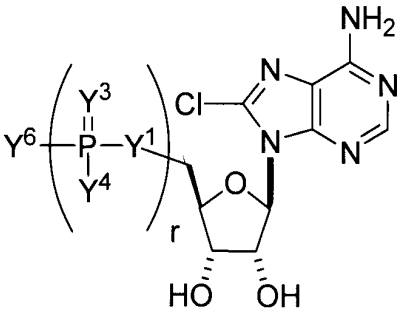


Ｂ－１８３）、

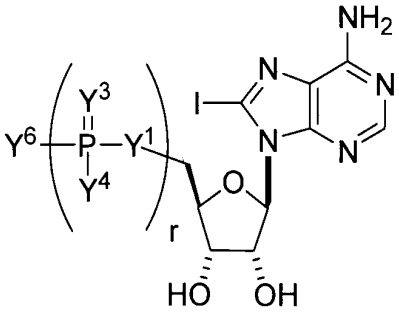
（ＢＢ－１８４）、



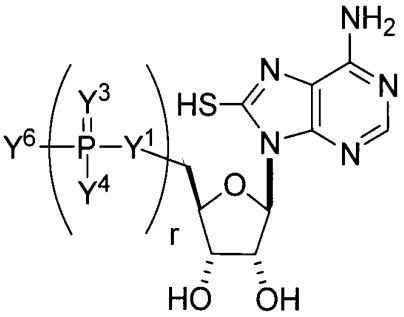
（ＢＢ－１８５）、



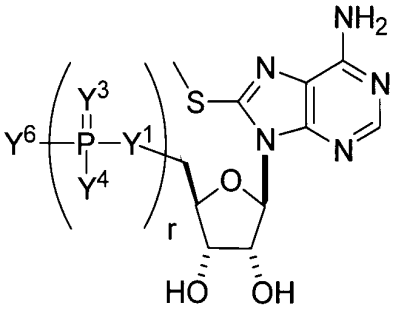
（ＢＢ－１８６）、



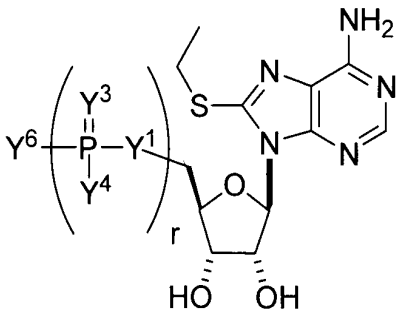
（ＢＢ－１８７）、



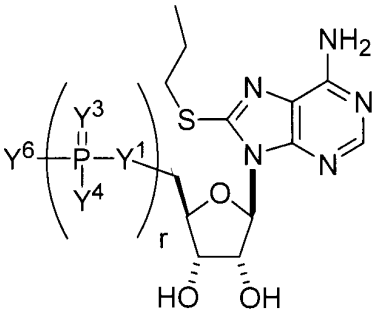
（ＢＢ－１８８）、



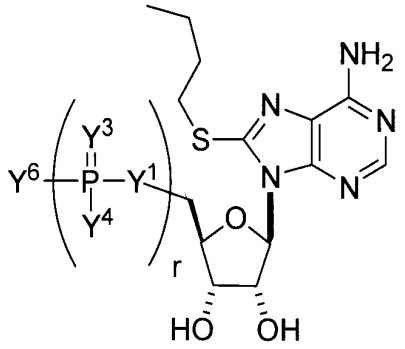
（ＢＢ－１８９）、



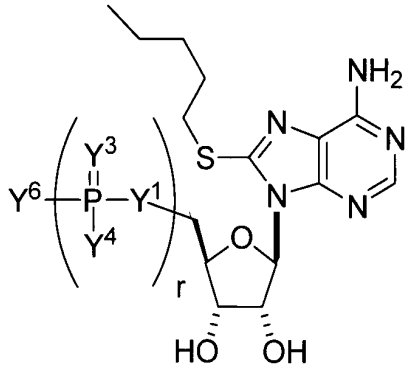
（ＢＢ－１９０）、



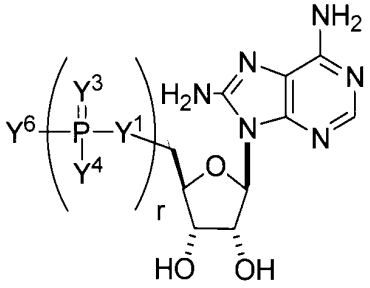
（ＢＢ－１９１）、



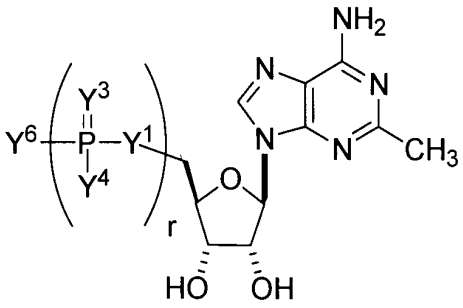
（ＢＢ



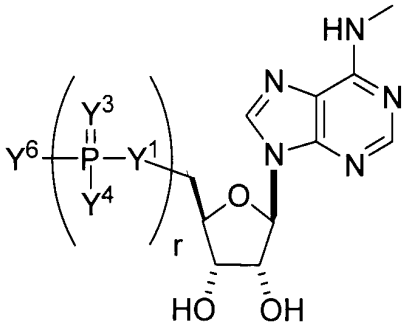
－１９２）、



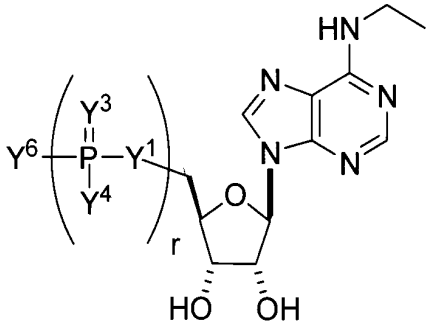
（ＢＢ－１９４）、



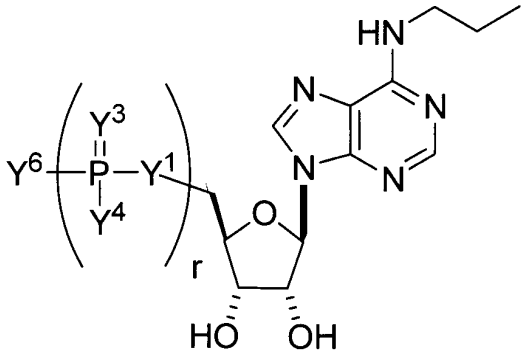
（Ｂ



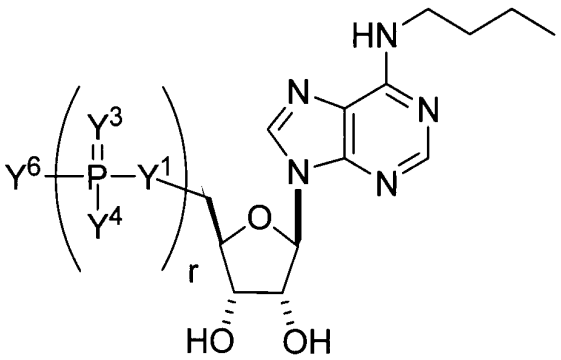
Ｂ－１９５）、



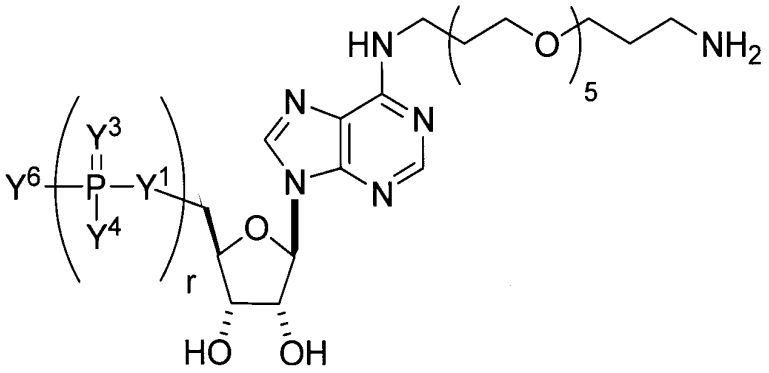
（ＢＢ－１９７）、



（ＢＢ－１９８）、



（ＢＢ－１９９）、および

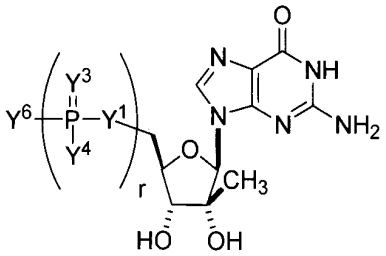


（ＢＢ－２００））。

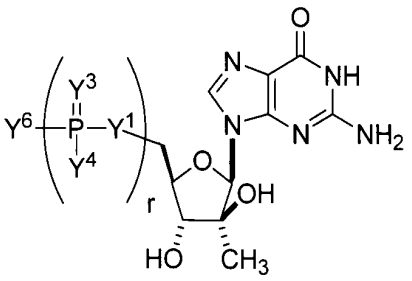
【０３４７】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、修飾グアノシンである（例えば、以下からなる群から選択されるもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり、式中、Y^1、Y^3、Y^4、Y^6、およびｒは、本明細書に記載の通りである（例えば、各ｒは、独立して、０～５、例えば、０～３、１～３、または１～５の整数である）：

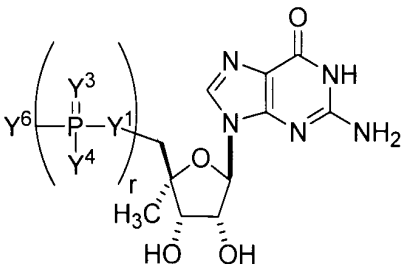
【化３７】



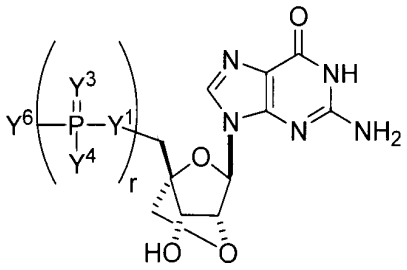
（ＢＢ－２０１）、



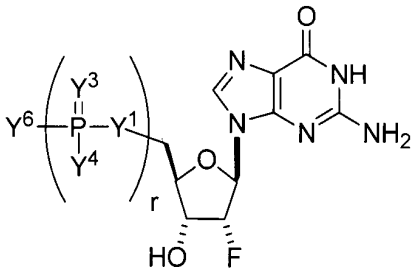
（ＢＢ－２０２）、



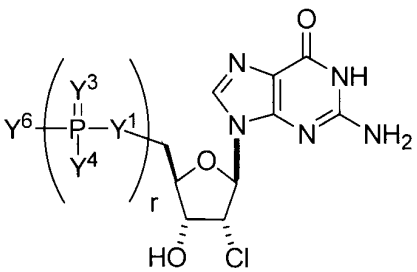
（ＢＢ－２０３）、



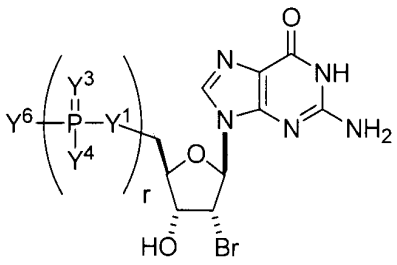
（ＢＢ－２０４）、



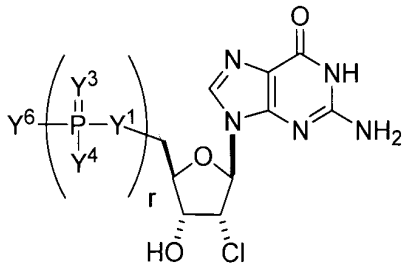
（ＢＢ－２０５）、



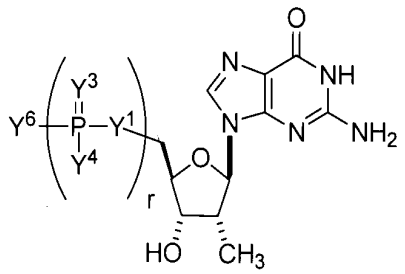
（ＢＢ－２０６）、



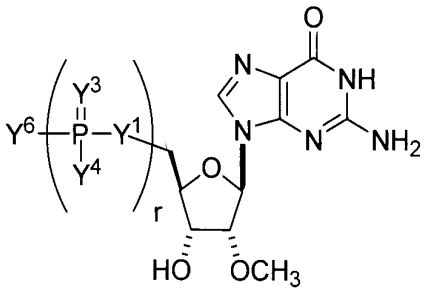
（ＢＢ－２０７）、



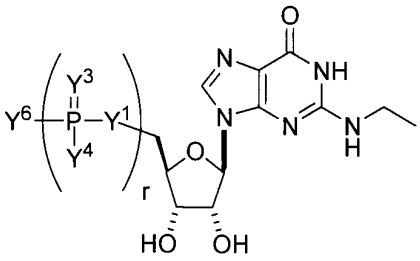
（ＢＢ－２０８）、



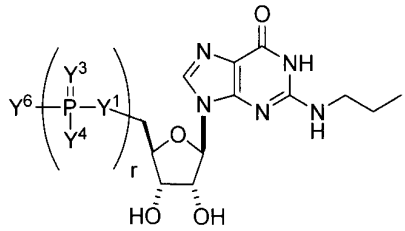
（ＢＢ－２０９）、



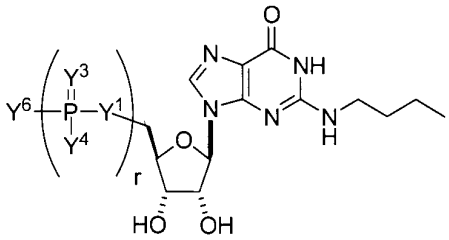
（ＢＢ－２１０）、



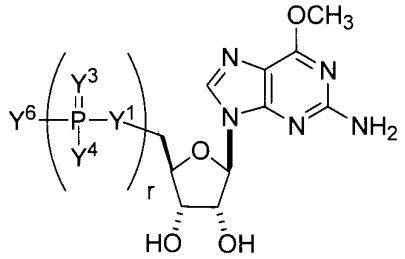
（ＢＢ－２１１）、



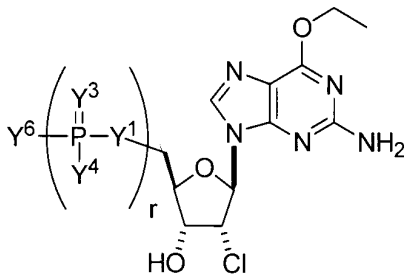
（ＢＢ－２１２）、



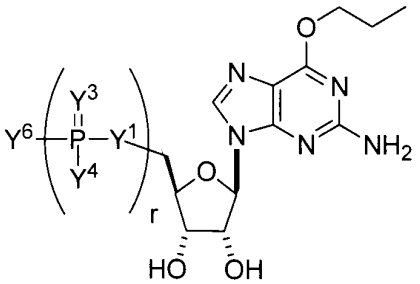
（ＢＢ－２１３）、



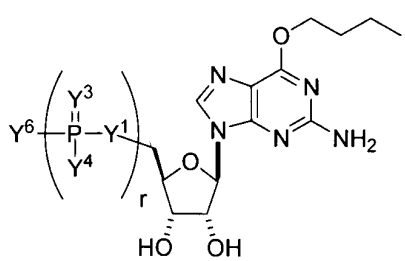
（ＢＢ－２１４）、



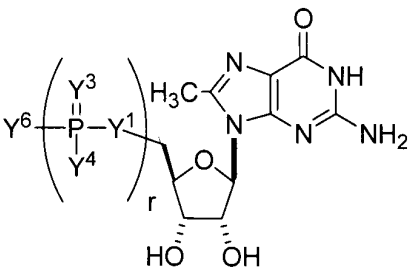
（ＢＢ－２１５）、

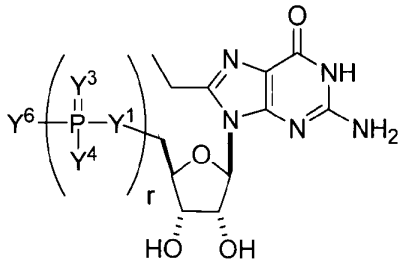


（ＢＢ－２１６）、



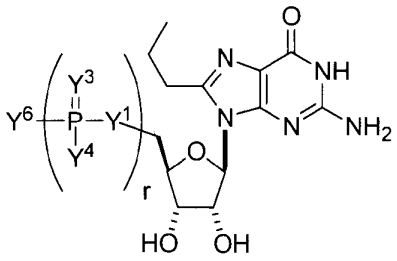
（ＢＢ－２１７）、



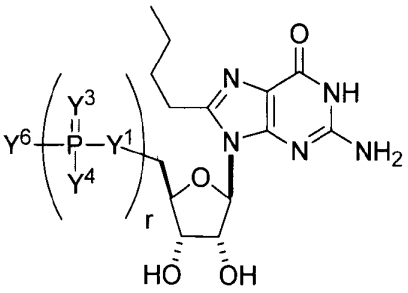


Ｂ－２１８）、

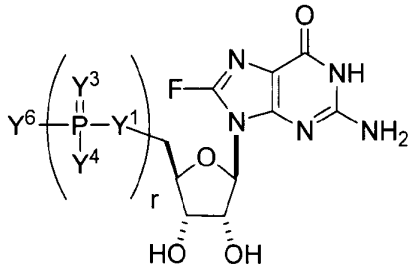
（ＢＢ－２１９）、



（ＢＢ－２２０）、

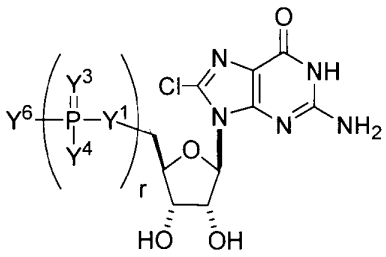


（Ｂ

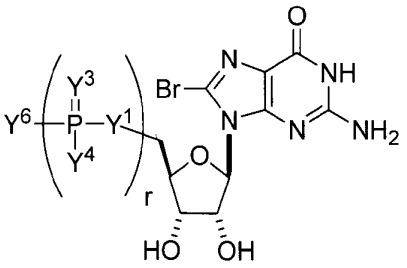


Ｂ－２２１）、

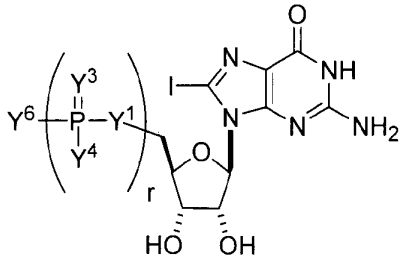
（ＢＢ－２２２）、



（ＢＢ－２２３）、

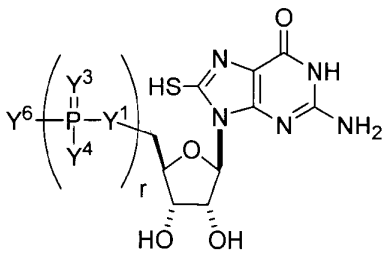


（Ｂ

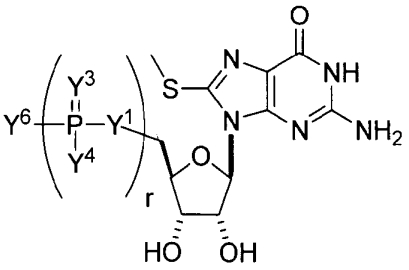


Ｂ－２２４）、

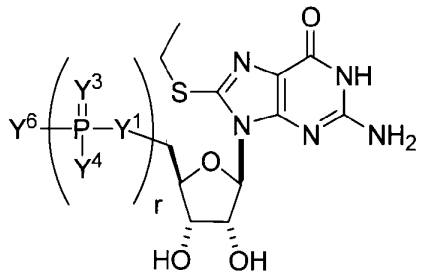
（ＢＢ－２２５）、



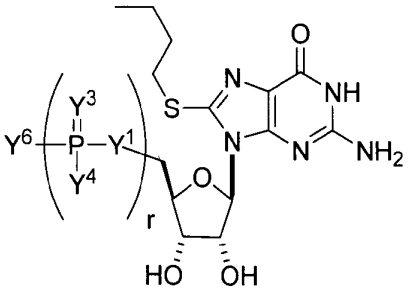
（ＢＢ－２２６）、



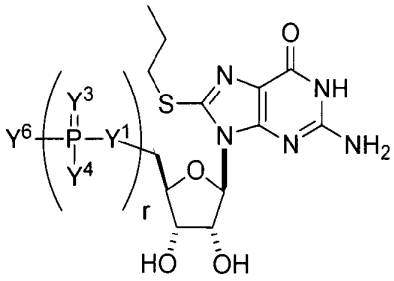
（Ｂ



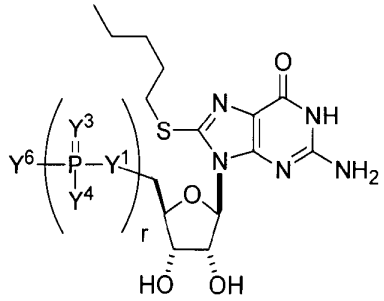
（ＢＢ－２２７）、



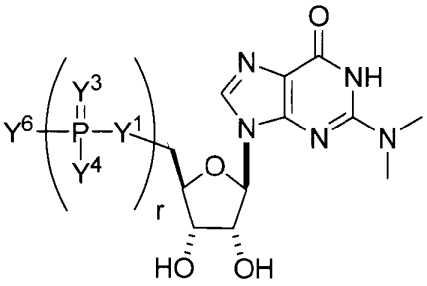
（ＢＢ－２２８）、



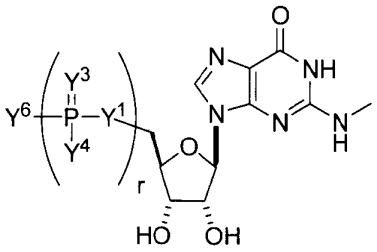
（ＢＢ－２２９）、



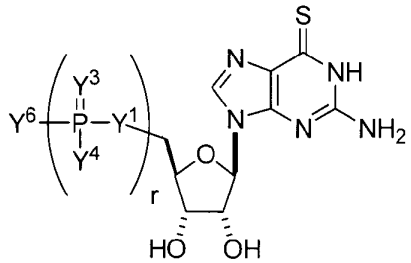
（ＢＢ－２３０）、



（ＢＢ－２３１）、

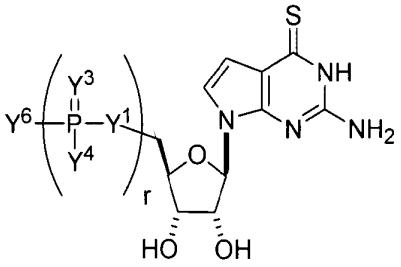


（ＢＢ－２３２）、

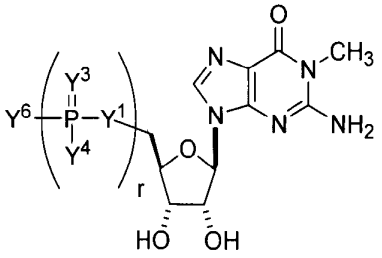


（ＢＢ－２３３）、

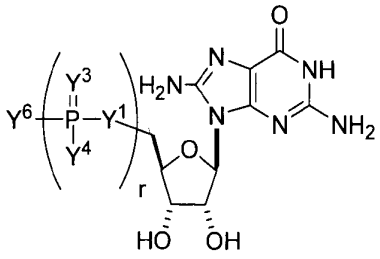
（ＢＢ－２３４）、



（ＢＢ－２３５）、



（Ｂ



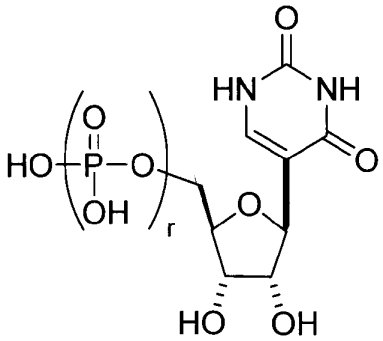
Ｂ－２３６）、および

（ＢＢ－２３７））。

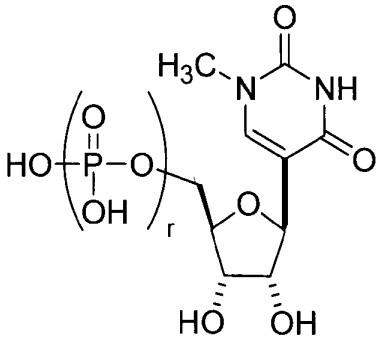
【０３４８】

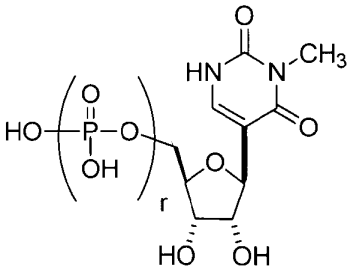
いくつかの実施形態において、化学修飾は、（例えば、ピリミジンヌクレオシド、例えば、シトシンまたはウラシルの）環のＣ－５のＣ基のＮとの置換（例えば、Ｃ－５の＞ＣＨ基の＞ＮＲ^{N1}基との置換（式中、Ｒ^{N1}は、Ｈまたは任意に置換されたアルキルである））を含み得る。例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、

【化３８】



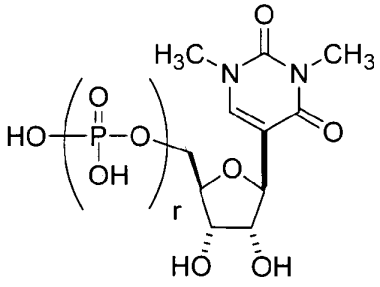
（ＢＢ－２３８）もしくは





（ＢＢ－２３９）もしくは

（ＢＢ－２４０）もしくは



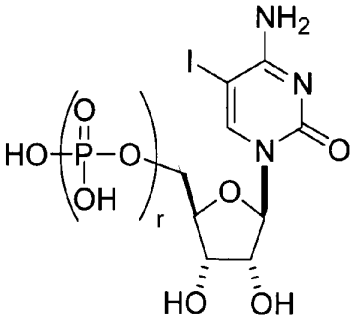
（ＢＢ－２４１）

、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり得、式中、各ｒは、独立して、０～５（例えば、０～３、１～３、または１～５）の整数である。

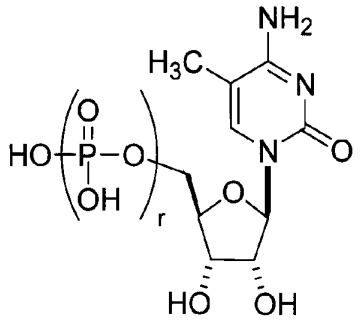
【０３４９】

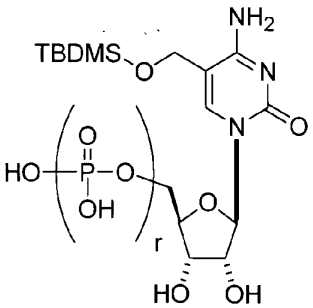
別の実施形態において、化学修飾は、シトシンのＣ－５の水素のハロ（例えば、Ｂｒ、Ｃｌ、Ｆ、もしくはＩ）または任意に置換されたアルキル（例えば、メチル）との置換を含み得る。例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、

【化３９】



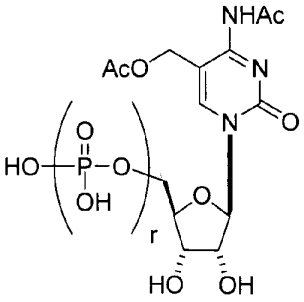
（ＢＢ－２４２）もしくは





（ＢＢ－２４３）もしくは

（ＢＢ－２４４）もしくは



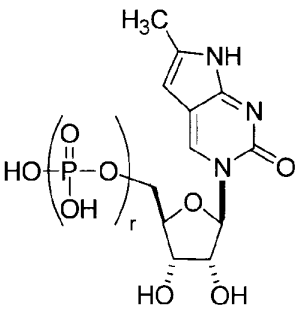
（ＢＢ－２４５）

、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり得、式中、各ｒは、独立して、０～５（例えば、０～３、１～３、または１～５）の整数である。

【０３５０】

なおさらなる実施形態において、化学修飾は、Ｃ－４位でNH_2によって、かつＣ－５位で炭素原子によって形成される縮合環を含み得る。例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに組み込まれ得るビルディングブロック分子は、

【化４０】



（ＢＢ－２４６）

、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であり得、式中、各ｒは、独立して、０～５（例えば、０～３、１～３、または１～５）の整数である。

【０３５１】

糖における修飾

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、本明細書に記載のＲＮＡまたはｍＲＮＡ）に組み込まれ得る修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチド（例えば、ビルディングブロック分子）は、リボ核酸の糖において修飾され得る。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）は、いくつかの異なる置換基で修飾または置換され得る。２’位での例示の置換には、Ｈ、ハロ、任意に置換された$C_{1\sim6}$アルキル、任意に置換された$C_{1\sim6}$アルコキシ、任意に置換された$C_{6\sim10}$アリールオキシ、任意に置換された$C_{3\sim8}$シクロアルキル、任意に置換された$C_{3\sim8}$シクロアルコキシ、任意に置換された$C_{6\sim10}$アリールオキシ、任意に置換された$C_{6\sim10}$アリール－$C_{1\sim6}$アルコキシ、任意に置換された$C_{1\sim12}$（ヘテロシクリル）オキシ、糖（例えば、リボース、ペントース、または本明細書に記載のいずれか）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、－Ｏ（$CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$（式中、ＲがＨまたは任意に置換されたアルキルであり、ｎが０～２０（例えば、０～４、０～８、０～１０、０～１６、１～４、１～８、１～１０、１～１６、１～２０、２～４、２～８、２～１０、２～１６、２～２０、４～８、４～１０、４～１６、および４～２０）の整数である）、２’－ヒドロキシルが$C_{1\sim6}$アルキレンまたは$C_{1\sim6}$ヘテロアルキレン架橋によって同一のリボース糖の４’－炭素に結合される「ロックド」核酸（ＬＮＡ）（例示の架橋には、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋が挙げられる）、本明細書で定義されるアミノアルキル、本明細書で定義されるアミノアルコキシ、本明細書で定義されるアミノ、および本明細書で定義されるアミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。概して、ＲＮＡは、酸素を有する５員環の糖類リボースを含む。非限定的な例示の修飾ヌクレオチドには、リボースの酸素の（例えば、Ｓ、Ｓｅ、またはアルキレン、例えば、メチレンまたはエチレンとの）置換、二重結合の付加（例えば、リボースをシクロペンテニルまたはシクロヘキセニルと置換するため）、リボースの環縮小（例えば、シクロブタンまたはオキセタンの４員環を形成するため）、リボースの環拡大（例えば、無水ヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル、およびホスホラミデート骨格も有するモルホリノ等のさらなる炭素またはヘテロ原子を有する６または７員環を形成するため）、多環式形態（例えば、トリシクロ、および「アンロックド」形態、例えば、グリコール核酸（ＧＮＡ）（例えば、Ｒ－ＧＮＡまたはＳ－ＧＮＡ、リボースがホスホジエステル結合に結合するグリコール単位で置換される部分）、トレオース核酸（ＴＮＡ、リボースがα－Ｌ－トレオフラノシル－（３’→２’）で置換される部分）、ならびにペプチド核酸（ＰＮＡ、２－アミノ－エチル－グリシン結合がリボースおよびホスホジエステル骨格を置換する部分）が挙げられる。糖基は、リボースの対応する炭素の立体化学配置とは逆の立体化学配置を有する１個以上の炭素も含有し得る。したがって、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ分子は、糖として、例えば、アラビノースを含有するヌクレオチドを含み得る。

【０３５２】

核酸塩基における修飾

本開示は、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドを提供する。本明細書に記載の「ヌクレオシド」は、有機塩基（例えば、プリンもしくはピリミジン）またはその誘導体（本明細書において「核酸塩基」とも称される）と組み合わせて糖分子（例えば、ペントースもしくはリボース）またはその誘導体を含有する化合物と定義される。本明細書に記載される「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオシドと定義される。修飾ヌクレオチドは、（１個以上の修飾または非天然ヌクレオシドを含めるために、例えば、化学的、酵素的、または組換え的に）本明細書に記載の任意の有用な方法によって合成され得る。

【０３５３】

修飾ヌクレオチド塩基対合は、標準のアデノシン－チミン、アデノシン－ウラシル、ま

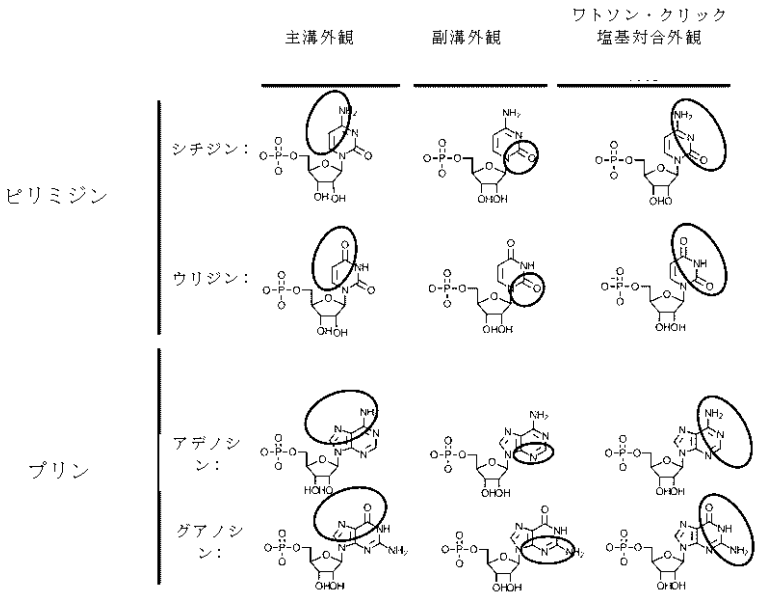
たはグアノシン－シトシン塩基対のみならず、非標準塩基または修飾塩基を含むヌクレオチド間および／または修飾ヌクレオチド間に形成される塩基対も包含し、水素結合ドナーおよび水素結合受容体の配置は、非標準塩基および標準塩基間または２つの相補的非標準塩基構造間の水素結合を可能にする。そのような非標準塩基対合の一例は、修飾ヌクレオチドイノシンと、アデニン、シトシン、またはウラシルとの間の塩基対合である。

【０３５４】

修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含み得る。ＲＮＡに見られる核酸塩基の例には、アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルが挙げられるが、これらに限定されない。ＤＮＡに見られる核酸塩基の例には、アデニン、グアニン、シトシン、およびチミンが挙げられるが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾または完全に置換されて、強化された特性、例えば、主溝結合パートナーの結合の破壊によるヌクレアーゼへの耐性を有するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ分子を提供し得る。以下の表８は、各基準のヌクレオチドの化学的外観を特定する。円は、それぞれの化学領域を含む原子を特定する。

表８

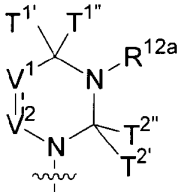
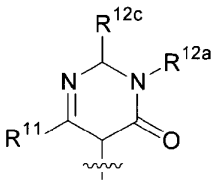
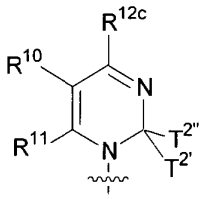
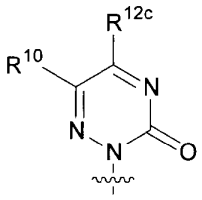
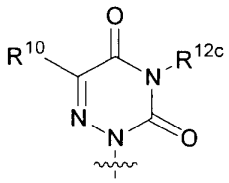
【表０００８】



【０３５５】

いくつかの実施形態において、Ｂは、修飾ウラシルである。例示の修飾ウラシルは、式（ｂ１）～（ｂ５）：

【化４１－１】


（ｂ１）、

（ｂ２）、

（ｂ３）、

（ｂ４）、もしくは

（ｂ５）

を有するもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０３５６】

式中、

【０３５７】

【化４１－２】



が、一重または二重結合であり、

【０３５８】

Ｔ$^{1'}$、Ｔ$^{1''}$、Ｔ$^{2'}$、およびＴ$^{2''}$の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、もしくは任意に置換されたチオアルコキシであるか、またはＴ$^{1'}$とＴ$^{1''}$の組み合わせもしくはＴ$^{2'}$とＴ$^{2''}$の組み合わせが一緒になって（例えば、Ｔ^{2}にあるような）、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、もしくはＳｅ（セレノ）を形成し、

【０３５９】

Ｖ^{1}およびＶ^{2}の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｒ^{Vb}）$_{nv}$、またはＣ（Ｒ^{Vb}）$_{nv}$であり、式中、ｎｖが、０～２の整数であり、各Ｒ^{Vb}が、独立して、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたハロアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチルで置換されたもの）、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアシルアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチルで置換されたもの）、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、または任意に置換されたアルキニルオキシ（例えば、本明細書に記載のいずれかの置換基、例えば、アルキルの（１）～（２１）から選択された置換基で任意に置換されたもの）であり、

【０３６０】

Ｒ^{10}が、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアミノ酸、ヒドロキシ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたア

ミノアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキルであり、

【０３６１】

R^{11}が、Ｈまたは任意に置換されたアルキルであり、

【０３６２】

R^{12a}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたカルボキシアルキル（例えば、ヒドロキシで任意に置換されたもの）、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアミノアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキルであり、

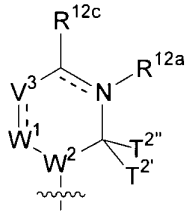
【０３６３】

R^{12c}が、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアミノ、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルである。

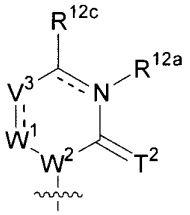
【０３６４】

他の例示の修飾ウラシルは、式（ｂ６）～（ｂ９）：

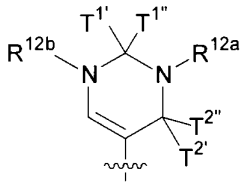
【化４２－１】



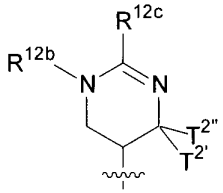
（ｂ６）、



（ｂ７）、



（ｂ８）、もしくは



（ｂ９）

を有するもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０３６５】

式中、

【０３６６】

【化４２－２】



が、一重または二重結合であり、

【０３６７】
$T^{1'}$、$T^{1''}$、$T^{2'}$、および$T^{2''}$の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、もしくは任意に置換されたチオアルコキシであるか、または$T^{1'}$と$T^{1''}$の組み合わせが一緒になって（例えば、T^{1}にあるような）、または$T^{2'}$と$T^{2''}$の組み合わせが一緒になって（例えば、T^{2}にあるような）、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、もしくはＳｅ（セレノ）を形成するか、または各T^{1}およびT^{2}が、独立して、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、もしくはＳｅ（セレノ）であり、
【０３６８】
W^{1}およびW^{2}の各々が、独立して、$N(R^{Wa})_{nw}$または$C(R^{Wa})_{nw}$であり、式中、ｎｗが、０～２の整数であり、各R^{Wa}が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシであり、
【０３６９】
各V^{3}が、独立して、Ｏ、Ｓ、$N(R^{Va})_{nv}$、または$C(R^{Va})_{nv}$であり、式中、ｎｖが、０～２の整数であり、各R^{Va}が、独立して、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、または任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチル、もしくはスルホアルキルで置換されたもの）、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアシルアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチルで置換されたもの）、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアシル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルキル（例えば、ヒドロキシおよび／もしくはＯ－保護基で任意に置換されたもの）、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアミノアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキル（例えば、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、アルキルの（１）～（２１）から選択される置換基で任意に置換されたもの）であり、R^{Va}およびR^{12c}が、それらが結合する炭素原子と一緒になって、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアリール、または任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、５もしくは６員環）を形成し得、
【０３７０】
R^{12a}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたカルボキシアルキル（例えば、ヒドロキシおよび／もしくはＯ－保護基で任意に置換されたもの）、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアミノアルキル、任意に置換されたカルバモイルアルキルであるか、または不在であり、
【０３７１】
R^{12b}は、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアルキルアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルコキシカルボニルアシル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたアルコキ

シカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルキル（例えば、ヒドロキシおよび／もしくはＯ－保護基で任意に置換されたもの）、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアミノアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキルであり、

【０３７２】

R^{12b}と$T^{1'}$の組み合わせまたはR^{12b}とR^{12c}の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリルを形成し得、

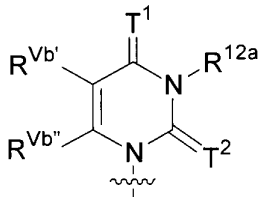
【０３７３】

R^{12c}は、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアミノ、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルである。

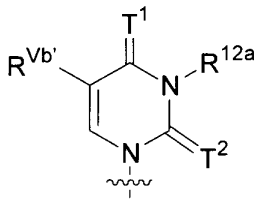
【０３７４】

さらなる例示の修飾ウラシルは、式（ｂ２８）～（ｂ３１）：

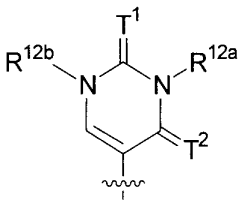
【化４３】

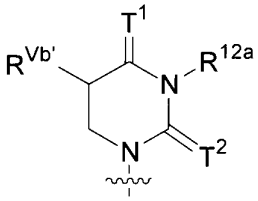


（ｂ２８）、



（ｂ２９）、





（ｂ３０）、もしくは （ｂ３１）

を有するもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０３７５】

式中、

【０３７６】

T^1およびT^2の各々が、独立して、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、またはＳｅ（セレノ）であり、

【０３７７】

各$R^{Vb'}$および$R^{Vb''}$が、独立して、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたハロアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチル、もしくはスルホアルキルで置換されたもの）、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアシルアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチルで置換されたもの）、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアシル、任意に置換さ

れたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルキル（例えば、ヒドロキシおよび／もしくはＯ－保護基で任意に置換されたもの）、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアミノアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキル（例えば、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、アルキルの（１）～（２１）から選択される置換基で任意に置換されたもの）であり（例えば、$R^{Vb'}$が、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキル、例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチル、もしくはスルホアルキルで置換されたものであり）、

【０３７８】

R^{12a}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたカルボキシアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルキル（例えば、例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチル、もしくはスルホアルキルで置換されたもの）、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルであり、

【０３７９】

R^{12b}が、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル（例えば、例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチル、もしくはスルホアルキルで置換されたもの）、

【０３８０】

任意に置換されたアルコキシカルボニルアシル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキルである。

【０３８１】

特定の実施形態において、T^1は、Ｏ（オキソ）であり、T^2は、Ｓ（チオ）またはＳｅ（セレノ）である。他の実施形態では、T^1は、Ｓ（チオ）であり、T^2は、Ｏ（オキソ）またはＳｅ（セレノ）である。いくつかの実施形態において、$R^{Vb'}$は、Ｈ、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシである。

【０３８２】

他の実施形態では、各R^{12a}およびR^{12b}は、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、または任意に置換されたヒドロキシアルキルである。特定の実施形態において、R^{12a}は、Ｈである。他の実施形態では、R^{12a}もR^{12b}もいずれもＨである。

【０３８３】

いくつかの実施形態において、R^{12b}の各$R^{Vb'}$は、独立して、任意に置換されたアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチル、もしくはスルホアルキルで置換されたもの）、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、または任意に置換されたアシルアミノアルキル（例えば、Ｎ－保護基、例えば、本明細書に記載のいずれか、例えば、トリフルオロアセチルで置換されたもの）である。いくつかの実施形態において、任意に置換されたアミノアルキルのアミノおよび／またはアルキルは、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたスルホアルキル、任意に置換されたカルボキシ（例えば、Ｏ－保護基で置換されたもの）、任意に置換されたヒドロキシ（例えば、Ｏ－保護基で置換されたもの）、任意に置換されたカルボキシアルキル（例えば、Ｏ－保護基で置換されたもの）、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル（例えば、

Ｏ－保護基で置換されたもの）、またはＮ－保護基のうちの１つ以上で置換される。いくつかの実施形態において、任意に置換されたアミノアルキルは、任意に置換されたスルホアルキルまたは任意に置換されたアルケニルで置換される。特定の実施形態において、R^{12a}も$R^{Vb''}$もいずれもＨである。特定の実施形態において、T^{1}は、Ｏ（オキソ）であり、T^{2}は、Ｓ（チオ）またはＳｅ（セレノ）である。

【０３８４】

いくつかの実施形態において、$R^{Vb'}$は、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキルまたは任意に置換されたカルバモイルアルキルである。

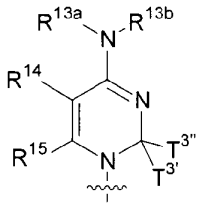
【０３８５】

特定の実施形態において、R^{12a}、R^{12b}、R^{12c}、またはR^{Va}の任意の置換基は、ポリエチレングリコール基（例えば、－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$であり、式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６もしくは１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、もしくは１～１０）の整数であり、Ｒ’が、Ｈもしくは$C_{1\sim20}$アルキルである）、またはアミノ－ポリエチレングリコール基（例えば、$-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$であり、式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６もしくは１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、もしくは１～１０）の整数であり、各R^{N1}が、独立して、水素もしくは任意に置換された$C_{1\sim6}$アルキルである）である。

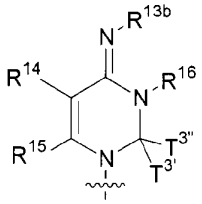
【０３８６】

いくつかの実施形態において、Ｂは、修飾シトシンである。例示の修飾シトシンは、式（ｂ１０）～（ｂ１４）：

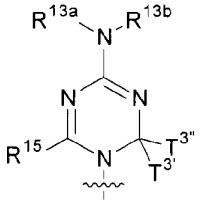
【化４４】



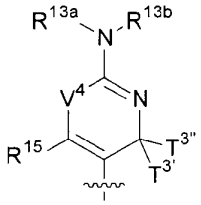
（ｂ１０）、



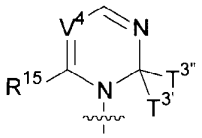
（ｂ１１）、



（ｂ１２）、



（ｂ１３）、もしくは



（ｂ１４）

の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

式中、

【０３８７】

$T^{3'}$および$T^{3''}$の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、もしくは任意に置換されたチオアルコキシであるか、または$T^{3'}$と$T^{3''}$の組み合わせが一緒になって（例えば、T^{3}にあるような）、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、もしくはＳｅ（セレノ）を形成し、

【０３８８】

各V^{4}が、独立して、Ｏ、Ｓ、$N(R^{Vc})_{nv}$、または$C(R^{Vc})_{nv}$であり、式中、ｎｖが、０～２の整数であり、各R^{Vc}が、独立して、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に

置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、または任意に置換されたアルキニルオキシ（例えば、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、アルキルの（１）～（２１）から選択される置換基で任意に置換されたもの）であり、R^{13b}とR^{Vc}の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリルを形成し得、

【０３８９】

各V^5が、独立して、N（R^{Vd}）$_{nv}$、またはC（R^{Vd}）$_{nv}$であり、式中、ｎｖが、０～２の整数であり、各R^{Vd}が、独立して、H、ハロ、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、または任意に置換されたアルキニルオキシ（例えば、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、アルキルの（１）～（２１）から選択される置換基で任意に置換されたもの）であり（例えば、V^5が、－ＣＨまたはＮであり）、

【０３９０】

R^{13a}およびR^{13b}の各々が、独立して、H、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアシルオキシアルキル、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシであり、R^{13b}とR^{14}の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリルを形成し得、

【０３９１】

各R^{14}が、独立して、H、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたハロアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル（例えば、Ｏ－保護基で置換されたもの）、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたアシルオキシアルキル、任意に置換されたアミノ（例えば、－ＮＨＲ（式中、Ｒが、Ｈ、アルキル、アリール、もしくはホスホリルである））、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキルであり、

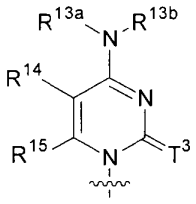
【０３９２】

R^{15}およびR^{16}の各々が、独立して、H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、または任意に置換されたアルキニルである。

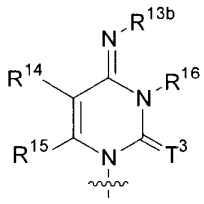
【０３９３】

さらなる例示の修飾シトシンは、式（ｂ３２）～（ｂ３５）：

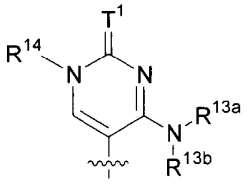
【化４５】



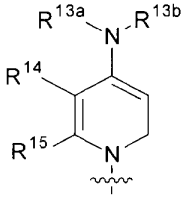
（ｂ３２）、



（ｂ３３）、

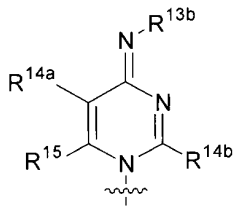


（ｂ３４）、もしくは



（ｂ３５）

を有するもの、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、
【０３９４】
式中、
【０３９５】
T^1およびT^3の各々が、独立して、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、またはＳｅ（セレノ）であり、
【０３９６】
R^{13a}およびR^{13b}の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアシルオキシアルキル、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシであり、R^{13b}とR^{14}の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリルを形成し得、
【０３９７】
各R^{14}が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたハロアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル（例えば、Ｏ－保護基で置換されたもの）、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたアシルオキシアルキル、任意に置換されたアミノ（例えば、－ＮＨＲ（式中、Ｒが、Ｈ、アルキル、アリール、もしくはホスホリルである）、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、任意に置換されたアミノアルキル（例えば、ヒドロキシアルキル、アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル）、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルであり、
【０３９８】
R^{15}およびR^{16}の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、または任意に置換されたアルキニルである（例えば、R^{15}が、Ｈであり、R^{16}が、Ｈまたは任意に置換されたアルキルである）。
【０３９９】
いくつかの実施形態において、R^{15}は、Ｈであり、R^{16}は、Ｈまたは任意に置換されたアルキルである。特定の実施形態において、R^{14}は、Ｈ、アシル、またはヒドロキシアルキルである。いくつかの実施形態において、R^{14}は、ハロである。いくつかの実施形態において、R^{14}もR^{15}もいずれもＨである。いくつかの実施形態において、R^{15}もR^{16}もいずれもＨである。いくつかの実施形態において、R^{14}およびR^{15}およびR^{16}の各々は、Ｈである。さらなる実施形態において、R^{13a}およびR^{13b}の各々は、独立して、Ｈまたは任意に置換されたアルキルである。
【０４００】
修飾シトシンのさらなる非限定的な例には、式（ｂ３６）：
【化４６】



（ｂ３６）

の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体が挙げられ、
【０４０１】

式中、

【０４０２】

各Ｒ^{13b}が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアシルオキシアルキル、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシであり、Ｒ^{13b}とＲ^{14b}の組み合わせが一緒になって、任意に置換されたヘテロシクリルを形成し得、

【０４０３】

各Ｒ^{14a}およびＲ^{14b}が、独立して、Ｈ、ハロ、ヒドロキシ、チオール、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたハロアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル（例えば、Ｏ－保護基で置換されたもの）、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、任意に置換されたアルキニルオキシ、任意に置換されたアミノアルコキシ、任意に置換されたアルコキシアルコキシ、任意に置換されたアシルオキシアルキル、任意に置換されたアミノ（例えば、－ＮＨＲ（式中、Ｒが、Ｈ、アルキル、アリール、ホスホリル、任意に置換されたアミノアルキル、もしくは任意に置換されたカルボキシアミノアルキルである））、アジド、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、または任意に置換されたアミノアルキニルであり、

【０４０４】

Ｒ^{15}の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、または任意に置換されたアルキニルである。

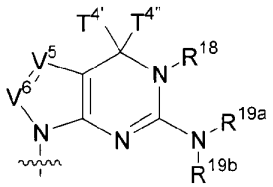
【０４０５】

特定の実施形態において、Ｒ^{14b}は、任意に置換されたアミノ酸（例えば、任意に置換されたリジン）である。いくつかの実施形態において、Ｒ^{14a}は、Ｈである。

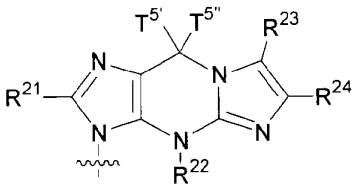
【０４０６】

いくつかの実施形態において、Ｂは、修飾グアニンである。例示の修飾グアニンは、式（ｂ１５）～（ｂ１７）：

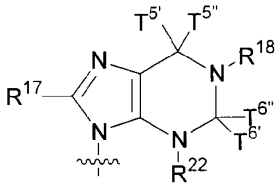
【化４７】



（ｂ１５）、



（ｂ１６）、もしくは



（ｂ１７）

の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０４０７】

式中、

【０４０８】

Ｔ$^{4'}$、Ｔ$^{4''}$、Ｔ$^{5'}$、Ｔ$^{5''}$、Ｔ$^{6'}$、およびＴ$^{6''}$の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシであり、Ｔ$^{4'}$とＴ$^{4''}$の組み合わせ（例えば、Ｔ^{4}にあるような）またはＴ$^{5'}$とＴ$^{5''}$の組み合わせ（例えば、Ｔ^{5}にあるような）またはＴ$^{6'}$とＴ$^{6''}$の組み合わせ（例えば、Ｔ^{6}にあるような）が

一緒になって、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、またはＳｅ（セレノ）を形成し、

【０４０９】

Ｖ^{5}およびＶ^{6}の各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ（Ｒ^{Ｖｄ}）$_{ｎｖ}$、またはＣ（Ｒ^{Ｖｄ}）$_{ｎｖ}$であり、式中、ｎｖが、０～２の整数であり、各Ｒ^{Ｖｄ}が、独立して、Ｈ、ハロ、チオール、任意に置換されたアミノ酸、シアノ、アミジン、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、または任意に置換されたアルキニルオキシ（例えば、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、アルキルの（１）～（２１）から選択される置換基で任意に置換されたもの）、任意に置換されたチオアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、

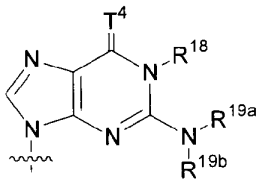
【０４１０】

Ｒ^{17}、Ｒ^{18}、Ｒ^{19a}、Ｒ^{19b}、Ｒ^{21}、Ｒ^{22}、Ｒ^{23}、およびＲ^{24}の各々が、独立して、Ｈ、ハロ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアミノ、または任意に置換されたアミノ酸である。

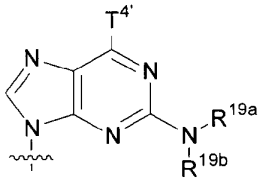
【０４１１】

例示の修飾グアノシンは、式（ｂ３７）～（ｂ４０）：

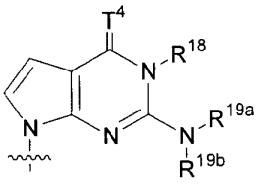
【化４８】



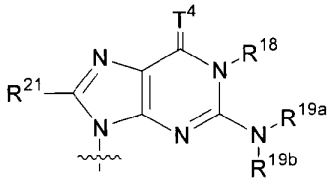
（ｂ３７）、



（ｂ３８）、



（ｂ３９）、もしくは



（ｂ４０）

の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０４１２】

式中、

【０４１３】

Ｔ$^{4'}$の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、または任意に置換されたアルコキシであり、各Ｔ^{4}が、独立して、Ｏ（オキソ）、Ｓ（チオ）、またはＳｅ（セレノ）であり、

【０４１４】

Ｒ^{18}、Ｒ^{19a}、Ｒ^{19b}、およびＲ^{21}の各々が、独立して、Ｈ、ハロ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたチオアルコキシ、任意に置換されたアミノ、または任意に置換されたアミノ酸である。

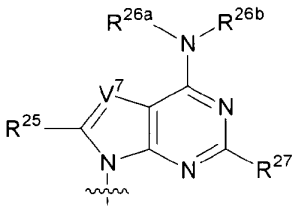
【０４１５】

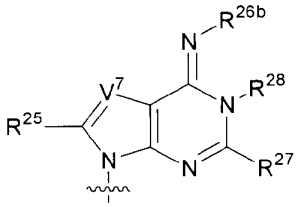
いくつかの実施形態において、Ｒ^{18}は、Ｈまたは任意に置換されたアルキルである。さらなる実施形態において、Ｔ^{4}は、オキソである。いくつかの実施形態において、Ｒ^{19a}およびＲ^{19b}の各々は、独立して、Ｈまたは任意に置換されたアルキルである。

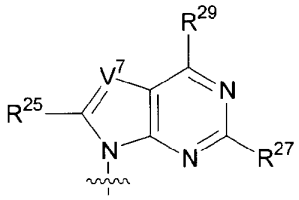
【０４１６】

いくつかの実施形態において、Ｂは、修飾アデニンである。例示の修飾アデニンは、式

（ｂ１８）～（ｂ２０）：
【化４９】


（ｂ１８）、


（ｂ１９）、もしくは


（ｂ２０）

の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、式中、各V^7が、独立して、Ｏ、Ｓ、Ｎ（R^{Ve}）$_{nv}$、またはＣ（R^{Ve}）$_{nv}$であり、式中、ｎｖが、０～２の整数であり、各R^{Ve}が、独立して、Ｈ、ハロ、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルケニルオキシ、または任意に置換されたアルキニルオキシ（例えば、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、アルキルの（１）～（２１）から選択される置換基で任意に置換されたもの）であり、

【０４１７】

各R^{25}が、独立して、Ｈ、ハロ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたチオアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、

【０４１８】

R^{26a}およびR^{26b}の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたカルバモイルアルキル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、またはポリエチレングリコール基（例えば、－（CH_2）$_{s2}$（OCH_2CH_2）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$ＯＲ’（式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’が、ＨまたはＣ$_{1\sim20}$アルキル）である））、またはアミノポリエチレングリコール基（例えば、－ＮＲ^{N1}（CH_2）$_{s2}$（CH_2CH_2O）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$ＮＲ^{N1}（式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}が、独立して、水素または任意に置換されたＣ$_{1\sim6}$アルキルである））であり、

【０４１９】

各R^{27}が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、

【０４２０】

各R^{28}が、独立して、Ｈ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、または任意に置換されたアルキニルであり、

【０４２１】

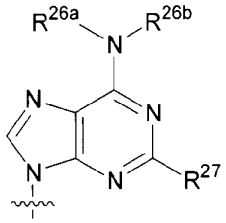
各R^{29}が、独立して、H、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたカルバモイルアルキル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたアルコキシ、または任意に置換されたアミノである。

【０４２２】

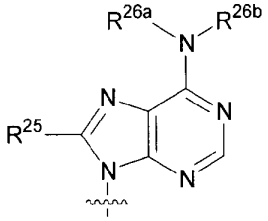
例示の修飾アデニンは、式（ｂ４１）～（ｂ４３）：

【０４２３】

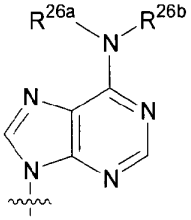
【化５０】



（ｂ４１）、



（ｂ４２）、もしくは



（ｂ４３）

の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは立体異性体を含み、

【０４２４】

式中、

【０４２５】

各R^{25}が、独立して、H、ハロ、チオール、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたチオアルコキシ、または任意に置換されたアミノであり、

【０４２６】

R^{26a}およびR^{26b}の各々が、独立して、H、任意に置換されたアシル、任意に置換されたアミノ酸、任意に置換されたカルバモイルアルキル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたヒドロキシアルキル、任意に置換されたヒドロキシアルケニル、任意に置換されたヒドロキシアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、またはポリエチレングリコール基（例えば、－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$（式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’が、ＨまたはC$_{1\sim20}$アルキルである））、またはアミノポリエチレングリコール基（例えば、－$NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$（式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}が、独立して、水素または任意に置換されたC$_{1\sim6}$アルキルである））であり、

【０４２７】

各R^{27}が、独立して、H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、または任意に置換されたアミノである。

【０４２８】

いくつかの実施形態において、R^{26a}は、Hであり、R^{26b}は、任意に置換されたアルキルである。いくつかの実施形態において、R^{26a}およびR^{26b}の各々は、独立して、任意に置換されたアルキルである。特定の実施形態において、R^{27}は、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、または任意に置換されたチオアルコキ

シである。他の実施形態では、R^{25}は、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、または任意に置換されたチオアルコキシである。

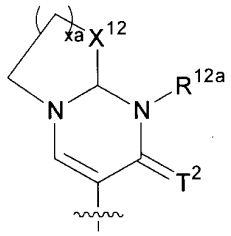
【０４２９】

特定の実施形態において、R^{26a}、R^{26b}、またはR^{29}の任意の置換基は、ポリエチレングリコール基（例えば、－（CH_2）$_{s2}$（OCH_2CH_2）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$ＯＲ’（式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’が、ＨまたはＣ$_{1～20}$アルキルである））、またはアミノポリエチレングリコール基（例えば、－NR^{N1}（CH_2）$_{s2}$（CH_2CH_2O）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}$$NR^{N1}$（式中、ｓ１が、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々が、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}が、独立して、水素または任意に置換されたＣ$_{1～6}$アルキルである））である。

【０４３０】

いくつかの実施形態において、Ｂは、式（ｂ２１）：

【化５１】



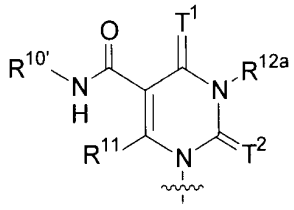
（ｂ２１）

を有し得、式中、X^{12}は、独立して、Ｏ、Ｓ、任意に置換されたアルキレン（例えば、メチレン）、または任意に置換されたヘテロアルキレンであり、ｘａは、０～３の整数であり、R^{12a}およびT^2は、本明細書に記載の通りである。

【０４３１】

いくつかの実施形態において、Ｂは、式（ｂ２２）：

【化５２】



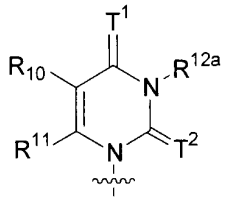
（ｂ２２）

を有し得、式中、$R^{10'}$は、独立して、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキルであり、R^{11}、R^{12a}、T^1、およびT^2は、本明細書に記載の通りである。

【０４３２】

いくつかの実施形態において、Ｂは、式（ｂ２３）：

【化５３】

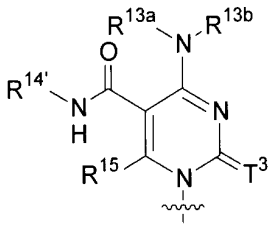


（ｂ２３）

を有し得、式中、R^{10}は、任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、任意に置換されたフリル、任意に置換されたチエニル、もしくは任意に置換されたピロリル）、任意に置換されたアリール（例えば、任意に置換されたフェニルもしくは任意に置換されたナフチル）、または本明細書に記載の任意の置換基（例えば、R^{10}のもの）であり、R^{11}（例えば、Hまたは本明細書に記載の任意の置換基）、R^{12a}（例えば、Hまたは本明細書に記載の任意の置換基）、T^1（例えば、オキソまたは本明細書に記載の任意の置換基）、およびT^2（例えば、オキソまたは本明細書に記載の任意の置換基）は、本明細書に記載の通りである。

いくつかの実施形態において、Bは、式（ｂ２４）：

【化５４】



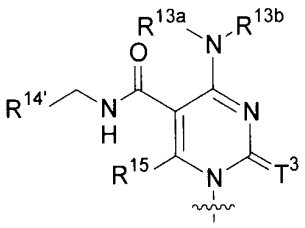
（ｂ２４）

を有し得、式中、$R^{14'}$は、独立して、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアルキルアリール、任意に置換されたアルキルヘテロシクリル、任意に置換されたアミノアルキル、任意に置換されたアミノアルケニル、任意に置換されたアミノアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルケニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキニル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルキル、任意に置換されたアルコキシカルボニルアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルコキシ、任意に置換されたカルボキシアルキル、または任意に置換されたカルバモイルアルキルであり、R^{13a}、R^{13b}、R^{15}、およびT^3は、本明細書に記載の通りである。

【０４３３】

いくつかの実施形態において、Bは、式（ｂ２５）：

【化５５】



（ｂ２５）

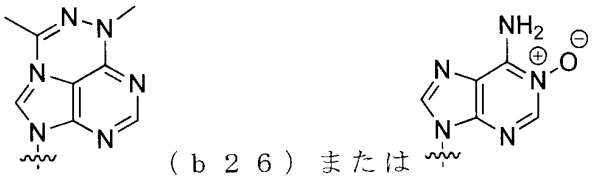
を有し得、式中、$R^{14'}$は、任意に置換されたヘテロシクリル（例えば、任意に置換さ

れたフリル、任意に置換されたチエニル、もしくは任意に置換されたピロリル）、任意に置換されたアリール（例えば、任意に置換されたフェニルもしくは任意に置換されたナフチル）、または本明細書に記載の任意の置換基（例えば、R^{14}または$R^{14'}$のもの）であり、R^{13a}（例えば、Hまたは本明細書に記載の任意の置換基）、R^{13b}（例えば、Hまたは本明細書に記載の任意の置換基）、R^{15}（例えば、Hまたは本明細書に記載の任意の置換基）、およびT^3（例えば、オキソまたは本明細書に記載の任意の置換基）は、本明細書に記載の通りである。

【０４３４】

いくつかの実施形態において、Ｂは、シトシン、グアニン、アデニン、およびウラシルからなる群から選択される核酸塩基である。いくつかの実施形態において、Ｂは、

【化５６】



（ｂ２６）または （ｂ２７）

であり得る。

【０４３５】

いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾ウラシルである。修飾ウラシルを有する例示の核酸塩基およびヌクレオシドには、シュードウリジン（ψ）、ピリジン－４－オンリボヌクレオシド、５－アザ－ウリジン、６－アザ－ウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－ウリジン（s^2U）、４－チオ－ウリジン（s^4U）、４－チオ－シュードウリジン、２－チオ－シュードウリジン、５－ヒドロキシ－ウリジン（ho^5U）、５－アミノアリル－ウリジン、５－ハロ－ウリジン（例えば、５－ヨード－ウリジンまたは５－ブロモ－ウリジン）、３－メチル－ウリジン（m^3U）、５－メトキシ－ウリジン（mo^5U）、ウリジン５－オキシ酢酸（cmo^5U）、ウリジン５－オキシ酢酸メチルエステル（$mcmo^5U$）、５－カルボキシメチル－ウリジン（cm^5U）、１－カルボキシメチル－シュードウリジン、５－カルボキシヒドロキシメチル－ウリジン（chm^5U）、５－カルボキシヒドロキシメチル－ウリジンメチルエステル（$mchm^5U$）、５－メトキシカルボニルメチル－ウリジン（mcm^5U）、５－メトキシカルボニルメチル－２－チオ－ウリジン（mcm^5s^2U）、５－アミノメチル－２－チオ－ウリジン（nm^5s^2U）、５－メチルアミノメチル－ウリジン（mnm^5U）、５－メチルアミノメチル－２－チオ－ウリジン（mnm^5s^2U）、５－メチルアミノメチル－２－セレノ－ウリジン（mnm^5se^2U）、５－カルバモイルメチル－ウリジン（ncm^5U）、５－カルボキシメチルアミノメチル－ウリジン（$cmnm^5U$）、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオ－ウリジン（$cmnm^5s^2U$）、５－プロピニル－ウリジン、１－プロピニル－シュードウリジン、５－タウリノメチル－ウリジン（τm^5U）、１－タウリノメチル－シュードウリジン、５－タウリノメチル－２－チオ－ウリジン（τm^5s^2U）、１－タウリノメチル－４－チオ－シュードウリジン、５－メチル－ウリジン（m^5U、すなわち、核酸塩基デオキシチミンを有するもの）、１－メチルシュードウリジン（$m^1\psi$）、５－メチル－２－チオ－ウリジン（m^5s^2U）、１－メチル－４－チオ－シュードウリジン（$m^1s^4\psi$）、４－チオ－１－メチル－シュードウリジン、３－メチル－シュードウリジン（$m^3\psi$）、２－チオ－１－メチル－シュードウリジン、１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、ジヒドロウリジン（D）、ジヒドロシュードウリジン、５，６－ジヒドロウリジン、５－メチル－ジヒドロウリジン（m^5D）、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－メトキシ－ウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリ

ジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン（１－メチルシュードウリジン（ｍ^{1}ψ）としても既知のもの）、３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウリジン（ａｃｐ^{3}Ｕ）、１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）シュードウリジン（ａｃｐ^{3}ψ）、５－（イソペンテニルアミノメチル）ウリジン（ｉｎｍ^{5}Ｕ）、５－（イソペンテニルアミノメチル）－２－チオ－ウリジン（ｉｎｍ^{5}ｓ^{2}Ｕ）、α－チオ－ウリジン、２’－Ｏ－メチル－ウリジン（Ｕｍ）、５，２’－Ｏ－ジメチル－ウリジン（ｍ^{5}Ｕｍ）、２’－Ｏ－メチル－シュードウリジン（ψｍ）、２－チオ－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｓ^{2}Ｕｍ）、５－メトキシカルボニルメチル－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｍｃｍ^{5}Ｕｍ）、５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｎｃｍ^{5}Ｕｍ）、５－カルボキシメチルアミノメチル－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｃｍｎｍ^{5}Ｕｍ）、３，２’－Ｏ－ジメチル－ウリジン（ｍ^{3}Ｕｍ）、５－（イソペンテニルアミノメチル）－２’－Ｏ－メチル－ウリジン（ｉｎｍ^{5}Ｕｍ）、１－チオ－ウリジン、デオキシチミジン、２’－Ｆ－アラ－ウリジン、２’－Ｆ－ウリジン、２’－ＯＨ－アラ－ウリジン、５－（２－カルボメトキシビニル）ウリジン、および５－［３－（１－Ｅ－プロペニルアミノ）ウリジンが挙げられる。

【０４３６】

いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾シトシンである。修飾シトシンを有する例示の核酸塩基およびヌクレオシドには、５－アザ－シチジン、６－アザ－シチジン、シュードイソシチジン、３－メチル－シチジン（ｍ^{3}Ｃ）、Ｎ４－アセチル－シチジン（ａｃ^{4}Ｃ）、５－ホルミル－シチジン（ｆ^{5}Ｃ）、Ｎ４－メチル－シチジン（ｍ^{4}Ｃ）、５－メチル－シチジン（ｍ^{5}Ｃ）、５－ハロ－シチジン（例えば、５－ヨード－シチジン）、５－ヒドロキシメチル－シチジン（ｈｍ^{5}Ｃ）、１－メチル－シュードイソシチジン、ピロロ－シチジン、ピロロ－シュードイソシチジン、２－チオ－シチジン（ｓ^{2}Ｃ）、２－チオ－５－メチル－シチジン、４－チオ－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、ゼブラリン、５－アザ－ゼブラリン、５－メチル－ゼブラリン、５－アザ－２－チオ－ゼブラリン、２－チオ－ゼブラリン、２－メトキシ－シチジン、２－メトキシ－５－メチル－シチジン、４－メトキシ－シュードイソシチジン、４－メトキシ－１－メチル－シュードイソシチジン、リシジン（ｋ$_{2}$Ｃ）、α－チオ－シチジン、２’－Ｏ－メチル－シチジン（Ｃｍ）、５，２’－Ｏ－ジメチル－シチジン（ｍ^{5}Ｃｍ）、Ｎ４－アセチル－２’－Ｏ－メチル－シチジン（ａｃ^{4}Ｃｍ）、Ｎ４，２’－Ｏ－ジメチル－シチジン（ｍ^{4}Ｃｍ）、５－ホルミル－２’－Ｏ－メチル－シチジン（ｆ^{5}Ｃｍ）、Ｎ４，Ｎ４，２’－Ｏ－ｔｒｉメチル－シチジン（ｍ$^{4}{}_{2}$Ｃｍ）、１－チオ－シチジン、２’－Ｆ－アラ－シチジン、２’－Ｆ－シチジン、および２’－ＯＨ－アラ－シチジンが挙げられる。

【０４３７】

いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾アデニンである。修飾アデニンを有する例示の核酸塩基およびヌクレオシドには、２－アミノ－プリン、２、６－ジアミノプリン、２－アミノ－６－ハロ－プリン（例えば、２－アミノ－６－クロロ－プリン）、６－ハロ－プリン（例えば、６－クロロ－プリン）、２－アミノ－６－メチル－プリン、８－アジド－アデノシン、７－デアザ－アデニン、７－デアザ－８－アザ－アデニン、７－デアザ－２－アミノ－プリン、７－デアザ－８－アザ－２－アミノ－プリン、７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２，６－ジアミノプリン、１－メチル－アデノシン（ｍ^{1}Ａ）、２－メチル－アデニン（ｍ^{2}Ａ）、Ｎ６－メチル－アデノシン（ｍ^{6}Ａ）、２－メチルチオ－Ｎ６－メチル－アデノシン（ｍｓ^{2}ｍ^{6}Ａ）、Ｎ６－イソペンテニル－アデノシン（ｉ^{6}Ａ）、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニル－アデノシン（ｍｓ^{2}ｉ^{6}Ａ）、Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン（ｉｏ^{6}Ａ）、２－メチルチオ－Ｎ６－（ｃｉｓ－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン（ｍｓ^{2}ｉｏ^{6}Ａ）、Ｎ６－グリシニルカルバモイル－アデノシン（ｇ^{6}Ａ）、Ｎ６－トレオニルカルバモイル－アデノシン（ｔ^{6}Ａ）、Ｎ６－メチル－Ｎ６－トレオニルカルバモ

イル－アデノシン（m^6t^6A）、２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニルカルバモイル－アデノシン（ms^2g^6A）、Ｎ６，Ｎ６－ジメチル－アデノシン（$m^6{}_2A$）、Ｎ６－ヒドロキシノルバリルカルバモイル－アデノシン（hn^6A）、２－メチルチオ－Ｎ６－ヒドロキシノルバリルカルバモイル－アデノシン（ms^2hn^6A）、Ｎ６－アセチル－アデノシン（ac^6A）、７－メチル－アデニン、２－メチルチオ－アデニン、２－メトキシ－アデニン、α－チオ－アデノシン、２’－Ｏ－メチル－アデノシン（Ａｍ）、Ｎ６，２’－Ｏ－ジメチル－アデノシン（m^6Am）、Ｎ６，Ｎ６，２’－Ｏ－ｔｒｉメチル－アデノシン（$m^6{}_2Am$）、１，２’－Ｏ－ジメチル－アデノシン（m^1Am）、２’－Ｏ－リボシルアデノシン（ホスフェート）（Ａｒ（ｐ））、２－アミノ－Ｎ６－メチル－プリン、１－チオ－アデノシン、８－アジド－アデノシン、２’－Ｆ－アラ－アデノシン、２’－Ｆ－アデノシン、２’－ＯＨ－アラ－アデノシン、およびＮ６－（１９－アミノ－ペンタオキサノナデシル）－アデノシンが挙げられる。

【０４３８】

いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、修飾グアニンである。修飾グアニンを有する例示の核酸塩基およびヌクレオシドには、イノシン（Ｉ）、１－メチル－イノシン（m^1I）、ワイオシン（ｉｍＧ）、メチルワイオシン（ｍｉｍＧ）、４－デメチル－ワイオシン（ｉｍＧ－１４）、イソワイオシン（ｉｍＧ２）、ワイブトシン（ｙＷ）、ペルオキシワイブトシン（o_2yW）、ヒドロキシワイブトシン（ＯＨｙＷ）、未修飾ヒドロキシワイブトシン（ＯＨｙＷ＊）、７－デアザ－グアノシン、クエオシン（Ｑ）、エポキシクエオシン（ｏＱ）、ガラクトシル－クエオシン（ｇａｌＱ）、マンノシル－クエオシン（ｍａｎＱ）、７－シアノ－７－デアザ－グアノシン（$preQ_0$）、７－アミノメチル－７－デアザ－グアノシン（$preQ_1$）、アルカエオシン（G^+）、７－デアザ－８－アザ－グアノシン、６－チオ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－８－アザ－グアノシン、７－メチル－グアノシン（m^7G）、６－チオ－７－メチル－グアノシン、７－メチル－イノシン、６－メトキシ－グアノシン、１－メチル－グアノシン（m^1G）、Ｎ２－メチル－グアノシン（m^2G）、Ｎ２，Ｎ２－ジメチル－グアノシン（$m^2{}_2G$）、Ｎ２，７－ジメチル－グアノシン（$m^{2,7}G$）、Ｎ２、Ｎ２，７－ジメチル－グアノシン（$m^{2,2,7}G$）、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、１－メチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２－メチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチル－６－チオ－グアノシン、α－チオ－グアノシン、２’－Ｏ－メチル－グアノシン（Ｇｍ）、Ｎ２－メチル－２’－Ｏ－メチル－グアノシン（m^2Gm）、Ｎ２，Ｎ２－ジメチル－２’－Ｏ－メチル－グアノシン（$m^2{}_2Gm$）、１－メチル－２’－Ｏ－メチル－グアノシン（m^1Gm）、Ｎ２，７－ジメチル－２’－Ｏ－メチル－グアノシン（$m^{2,7}Gm$）、２’－Ｏ－メチル－イノシン（Ｉｍ）、１，２’－Ｏ－ジメチル－イノシン（m^1Im）、および２’－Ｏ－リボシルグアノシン（ホスフェート）（Ｇｒ（ｐ））が挙げられる。

【０４３９】

ヌクレオチドの核酸塩基は、プリン、ピリミジン、プリン、またはピリミジン類似体から独立して選択され得る。例えば、核酸塩基はそれぞれ、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、またはヒポキサンチンから独立して選択され得る。別の実施形態において、核酸塩基には、例えば、ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－プロピニルウラシルおよびシトシン、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（シュードウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ（例えば、８－ブロモ）、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に、５－ブロモ、５－トリフルオロメチルおよび他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、デアザグアニ

ン、７－デアザグアニン、３－デアザグアニン、デアザアデニン、７－デアザアデニン、３－デアザアデニン、ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン、イミダゾ［１，５－ａ］１，３，５トリアジノン、９－デアザプリン、イミダゾ［４，５－ｄ］ピラジン、チアゾロ［４，５－ｄ］ピリミジン、ピラジン－２－オン、１，２，４－トリアジン、ピリダジン、および１，３，５トリアジンを含む塩基の天然に存在する合成誘導体も含み得る。ヌクレオチドがＡ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、またはＵの略語を用いて示されるとき、各文字は、代表的な塩基および／またはその誘導体を指し、例えば、Ａは、アデニン、または、例えば、７－デアザアデニンのようなアデニン類似体を含む。

【０４４０】

ヌクレオシド間結合における修飾

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ分子に組み込まれ得る修飾ヌクレオチドは、ヌクレオシド間結合（例えば、リン酸骨格）において修飾され得る。本明細書において、ポリヌクレオチド骨格との関連で、「リン酸塩」および「ホスホジエステル」という表現は、同義に使用される。骨格リン酸基は、酸素原子のうちの１個以上を異なる置換基で置換することによって修飾され得る。さらに、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、未修飾リン酸塩部分の別の本明細書に記載のヌクレオシド間結合との大規模な置換を含み得る。修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレナート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロラミデート、ホスホロジアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルが挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロジチオエートは、硫黄で置換された両方の非結合酸素を有する。リン酸リンカーは、結合酸素の窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）での置換によっても修飾され得る。

【０４４１】

α－チオ置換リン酸部分は、非天然ホスホロチオエート骨格結合を介してＲＮＡおよびＤＮＡポリマーに安定性を付与するように提供される。ホスホロチオエートＤＮＡおよびＲＮＡは、ヌクレアーゼ耐性の増加、続いて細胞環境においてより長い半減期を有する。ホスホロチオエート結合ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ分子は、細胞の自然免疫分子のより弱い結合／活性化によって自然免疫応答も低下させることが見込まれている。

【０４４２】

特定の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、α－チオ－ヌクレオシド（例えば、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－アデノシン、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－シチジン（α－チオ－シチジン）、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－グアノシン、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－ウリジン、または５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－シュードウリジン）を含む。

【０４４３】

リン原子を含有しないヌクレオシド間結合を含む本発明に従って用いられ得る他のヌクレオシド間結合は、以下の本明細書に記載される。

【０４４４】

修飾糖、核酸塩基、およびヌクレオシド間結合の組み合わせ

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、糖、核酸塩基、および／またはヌクレオシド間結合への修飾の組み合わせを含み得る。これらの組み合わせは、本明細書に記載のいずれか１つ以上の修飾を含み得る。例えば、式（Ｉａ）、（Ｉａ－１）～（Ｉａ－３）、（Ｉｂ）～（Ｉｆ）、（ＩＩａ）～（ＩＩｐ）、（ＩＩｂ－１）、（ＩＩｂ－２）、（ＩＩｃ－１）～（ＩＩｃ－２）、（ＩＩｎ－１）、（ＩＩｎ－２）、（ＩＶａ）～（ＩＶｌ）、および（ＩＸａ）～（ＩＸｒ）における本明細書に記載のヌクレオチドのうちのいずれかは、本明細書に記載の核酸塩基のうちのいずれ（例えば、式（ｂ１）～（ｂ４３）または本明細書に記載の任意の他のもの）とも組み合わせられ得る。

【０４４５】

ポリペプチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ分子の合成

本発明に従って用いるポリペプチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ分子は、本明細書に記載の任意の有用な技法に従って調製され得る。本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ分子の合成において用いられる修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、以下の一般的な方法および手順を用いて容易に入手可能な出発物質から調製され得る。典型的なプロセス条件または好ましいプロセス条件（例えば、反応温度、時間、反応物質のモル比、溶媒、圧力等）が提供される場合、当業者であれば、さらなるプロセス条件を最適化および開発することができるであろう。最適な反応条件は、用いる特定の反応物または溶媒によって異なり得るが、そのような条件は、日常的な最適化手順を用いて当業者によって決定され得る。

【０４４６】

本明細書に記載のプロセスは、当技術分野で既知の任意の好適な方法に従って監視され得る。例えば、産物形成は、核磁気共鳴分光学（例えば、^{1}Ｈもしくは^{13}Ｃ）、赤外線分光学、分光測光（例えば、紫外線可視）、もしく質量分析等の分光学的手段、または高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）もしくは薄層クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーによって監視され得る。

【０４４７】

本発明のポリペプチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ分子の調製は、様々な化学基の保護および脱保護を伴い得る。保護および脱保護の必要性、ならびに適切な保護基の選択は、当業者によって容易に決定され得る。保護基の化学は、例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｒｅｅｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，２ｄ．Ｅｄ．，Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，１９９１において見出され得る。

【０４４８】

本明細書に記載のプロセスの反応は、有機合成分野の技術者によって容易に選択され得る好適な溶媒において行われ得る。好適な溶媒は、反応が行われる温度、すなわち、溶媒の凍結温度から溶媒の沸点の範囲であり得る温度で、出発物質（反応物）、中間体、または産物とは実質的に非反応性であり得る。所与の反応は、１つの溶媒または２つ以上の溶媒の混合物において行われ得る。特定の反応ステップに応じて、特定の反応ステップに好適な溶媒が選択され得る。

【０４４９】

修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドのラセミ混合物の分解は、当技術分野で既知の多数の方法のうちのいずれかによって行われ得る。方法の例には、光学活性の塩形成有機酸である「キラル分解酸」を用いた分別再結晶が挙げられる。分別再結晶法に好適な分解酸には、例えば、酒石酸、ジアセチル酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、マンデル酸、リンゴ酸、乳酸、または様々な光学活性カンファースルホン酸のＤおよびＬ形態等の光学活性酸がある。ラセミ混合物の分解は、光学活性分解剤（例えば、ジニトロベンゾイルフェニルグリシン）を充填したカラム上での溶出によっても行われ得る。好適な溶出溶媒組成物は、当業者によって決定され得る。

修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチド（例えば、ビルディングブロック分子）は、各々が参照によりそれらの全体が組み込まれる、Ｏｇａｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．７４：２５８５－２５８８（２００９）、Ｐｕｒｍａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２２（１）：７２－７８，（１９９４）、Ｆｕｋｕｈａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１（４）：５６３－５６８（１９６２）、およびＸｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，４８（９）：１７２９－１７４０（１９９２）に記載の合成方法に従って調製され得る。

【０４５０】

本発明のポリペプチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、分子の全長に沿って均一に修飾されてもされなくてもよい。例えば、１種類以上またはすべての種類のヌクレオチド（例えば、プリンもしくはピリミジン、またはＡ、Ｇ、Ｕ、Ｃのうちのいずか１つ以上も

しくはすべて）は、本発明のポリヌクレオチドまたはその所与の既定の配列領域（例えば、図１に表される配列領域のうちの１つ以上）において均一に修飾されてもされなくてもよい。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド（またはその所与の配列領域）におけるすべてのヌクレオチドＸが修飾され、ここでＸは、ヌクレオチドＡ、Ｇ、Ｕ、Ｃのうちのいずれか１つ、または組み合わせＡ＋Ｇ、Ａ＋Ｕ、Ａ＋Ｃ、Ｇ＋Ｕ、Ｇ＋Ｃ、Ｕ＋Ｃ、Ａ＋Ｇ＋Ｕ、Ａ＋Ｇ＋Ｃ、Ｇ＋Ｕ、もしくはＡ＋Ｇ＋Ｃのうちのいずれか１つであり得る。

【０４５１】

異なる糖修飾、ヌクレオチド修飾、および／またはヌクレオシド間結合（例えば、骨格構造）は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの様々な位置で存在し得る。当業者であれば、ヌクレオチド類似体または他の修飾（複数可）が、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの機能が実質的に低下するように、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの任意の位置（複数可）に位置し得ることを認識する。修飾は、５’または３’末端修飾でもあり得る。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、約１％～約１００％の修飾ヌクレオチド（全ヌクレオチド含量または１種類以上のヌクレオチド、すなわち、Ａ、Ｇ、Ｕ、もしくはＣのうちのいずれか１つ以上のいずれかと関連したもの）または任意の中間の割合（例えば、１％～２０％、１％～２５％、１％～５０％、１％～６０％、１％～７０％、１％～８０％、１％～９０％、１％～９５％、１０％～２０％、１０％～２５％、１０％～５０％、１０％～６０％、１０％～７０％、１０％～８０％、１０％～９０％、１０％～９５％、１０％～１００％、２０％～２５％、２０％～５０％、２０％～６０％、２０％～７０％、２０％～８０％、２０％～９０％、２０％～９５％、２０％～１００％、５０％～６０％、５０％～７０％、５０％～８０％、５０％～９０％、５０％～９５％、５０％～１００％、７０％～８０％、７０％～９０％、７０％～９５％、７０％～１００％、８０％～９０％、８０％～９５％、８０％～１００％、９０％～９５％、９０％～１００％、および９５％～１００％）を含有し得る。

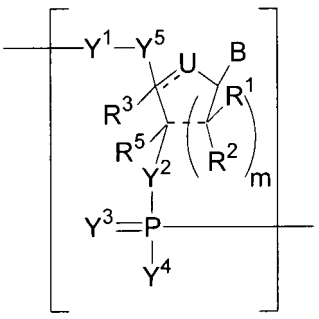
【０４５２】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、修飾ピリミジン（例えば、修飾ウラシル／ウリジン／Ｕまたは修飾シトシン／シチジン／Ｃ）を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ分子中のウラシルまたはウリジン（概して、Ｕ）は、約１％～約１００％の修飾ウラシルまたは修飾ウリジン（例えば、１％～２０％、１％～２５％、１％～５０％、１％～６０％、１％～７０％、１％～８０％、１％～９０％、１％～９５％、１０％～２０％、１０％～２５％、１０％～５０％、１０％～６０％、１０％～７０％、１０％～８０％、１０％～９０％、１０％～９５％、１０％～１００％、２０％～２５％、２０％～５０％、２０％～６０％、２０％～７０％、２０％～８０％、２０％～９０％、２０％～９５％、２０％～１００％、５０％～６０％、５０％～７０％、５０％～８０％、５０％～９０％、５０％～９５％、５０％～１００％、７０％～８０％、７０％～９０％、７０％～９５％、７０％～１００％、８０％～９０％、８０％～９５％、８０％～１００％、９０％～９５％、９０％～１００％、および９５％～１００％の修飾ウラシルまたは修飾ウリジン）と置換され得る。修飾ウラシルまたはウリジンは、単一の固有の構造を有する化合物または異なる構造（例えば、本明細書に記載の２、３、４つ以上の固有の構造）を有する複数の化合物に置換され得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ分子中のシトシンまたはシチジン（概して、Ｃ）は、約１％～約１００％の修飾シトシンまたは修飾シチジン（例えば、１％～２０％、１％～２５％、１％～５０％、１％～６０％、１％～７０％、１％～８０％、１％～９０％、１％～９５％、１０％～２０％、１０％～２５％、１０％～５０％、１０％～６０％、１０％～７０％、１０％～８０％、１０％～９０％、１０％～９５％、１０％～１００％、２０％～２５％、２０％～５０％、２０％～６０％、２０％～７０％、２０％～８０％、２０％～９０％、２０％～９５％、２０％～１００％、５０％～６０％、５０％～７０％、５０％～

８０％、５０％～９０％、５０％～９５％、５０％～１００％、７０％～８０％、７０％～９０％、７０％～９５％、７０％～１００％、８０％～９０％、８０％～９５％、８０％～１００％、９０％～９５％、９０％～１００％、および９５％～１００％の修飾シトシンまたは修飾シチジン）と置換され得る。修飾シトシンまたはシチジンは、単一の固有の構造を有する化合物または異なる構造（例えば、本明細書に記載の２、３、４つ以上の固有の構造）を有する複数の化合物に置換され得る。

いくつかの実施形態において、本開示は、式（Ｉａ－１）：

【化５７】

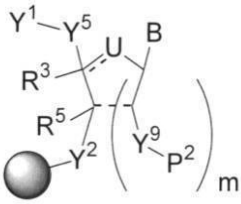


（Ｉａ－１）

を有するｎ個の結合ヌクレオシドを含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ（例えば、第１の領域、第１の隣接領域、または第２の隣接領域）を合成する方法を提供し、この方法は、

ａ）式（ＩＶ－１）：

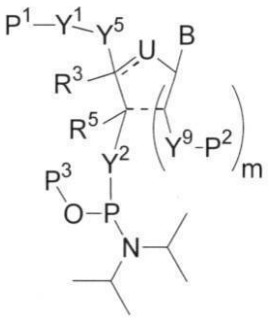
【化５８】



（ＩＶ－１）

のヌクレオチドを、式（Ｖ－１）：

【化５９－１】



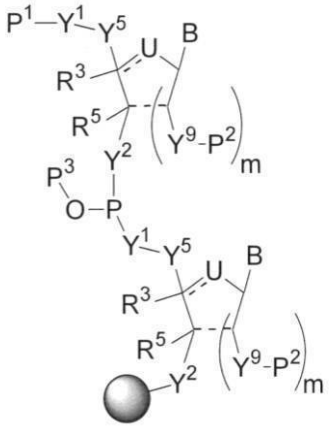
（Ｖ－１）

のホスホラミダイト化合物と反応させて（式中、Y^9が、Ｈ、ヒドロキシ、ホスホリル、ピロリン酸塩、硫酸塩、アミノ、チオール、任意に置換されたアミノ酸、またはペプチド（例えば、２～１２個のアミノ酸を含む）であり、各P^1、P^2、およびP^3が、独立して、好適な保護基であり、

【化５９－２】

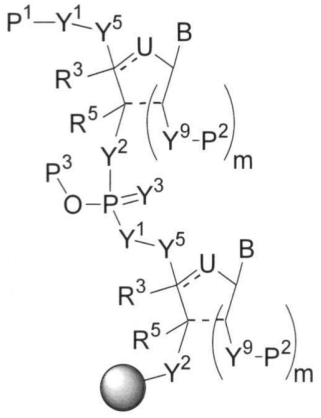


が、固体支持体を示す）、
式（ＶＩ－１）のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを提供することと、
【化６０】



（ＶＩ－１）

、および
ｂ）式（Ｖ）のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを酸化または硫化して、式（ＶＩＩ－１）のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを産出することと、
【化６１】



（ＶＩＩ－１）

、および
ｃ）保護基を除去して、式（Ｉａ）のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを産出することとを含む。
【０４５３】
いくつかの実施形態において、ステップａ）およびｂ）は、１～約１０，０００回繰り返される。いくつかの実施形態において、この方法は、Ａ、Ｃ、Ｇ、およびＵ（アデノシン、シトシン、グアノシン、およびウラシル）からなる群から選択されるヌクレオチド（例えば、ｍｍＲＮＡ分子）をさらに含む。いくつかの実施形態において、核酸塩基は、ピリミジンまたはその誘導体であり得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド

、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、翻訳可能であり得る。

【０４５４】

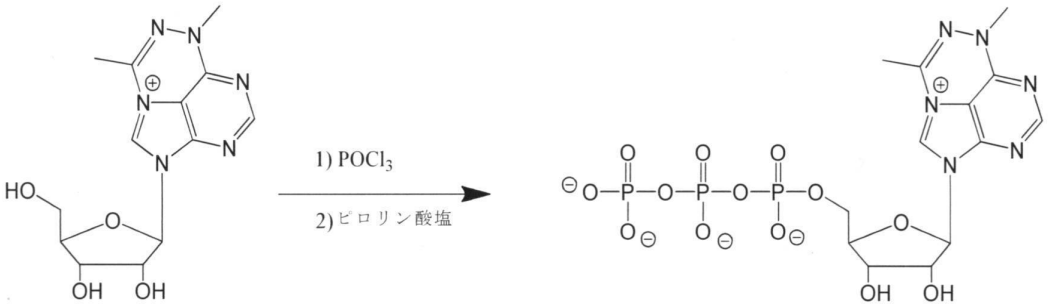
ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡの他の成分は任意であり、いくつかの実施形態において有益である。例えば、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および／または３’ＵＴＲが提供され、これらのいずれか、または両方ともに、独立して、１つ以上の異なるヌクレオチド修飾を含有し得る。そのような実施形態において、ヌクレオチド修飾は、翻訳可能な領域においても存在し得る。コザック配列を含有するポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡも提供される。

【０４５５】

修飾核酸またはｍｍＲＮＡ、例えば、ＲＮＡまたはｍＲＮＡに組み込まれる修飾ヌクレオチドの例示の合成は、以下のスキーム１～スキーム１１で提供される。スキーム１は、修飾ヌクレオシドを含むヌクレオシドのリン酸化の一般的な方法を提供する。

スキーム１

【化６２】

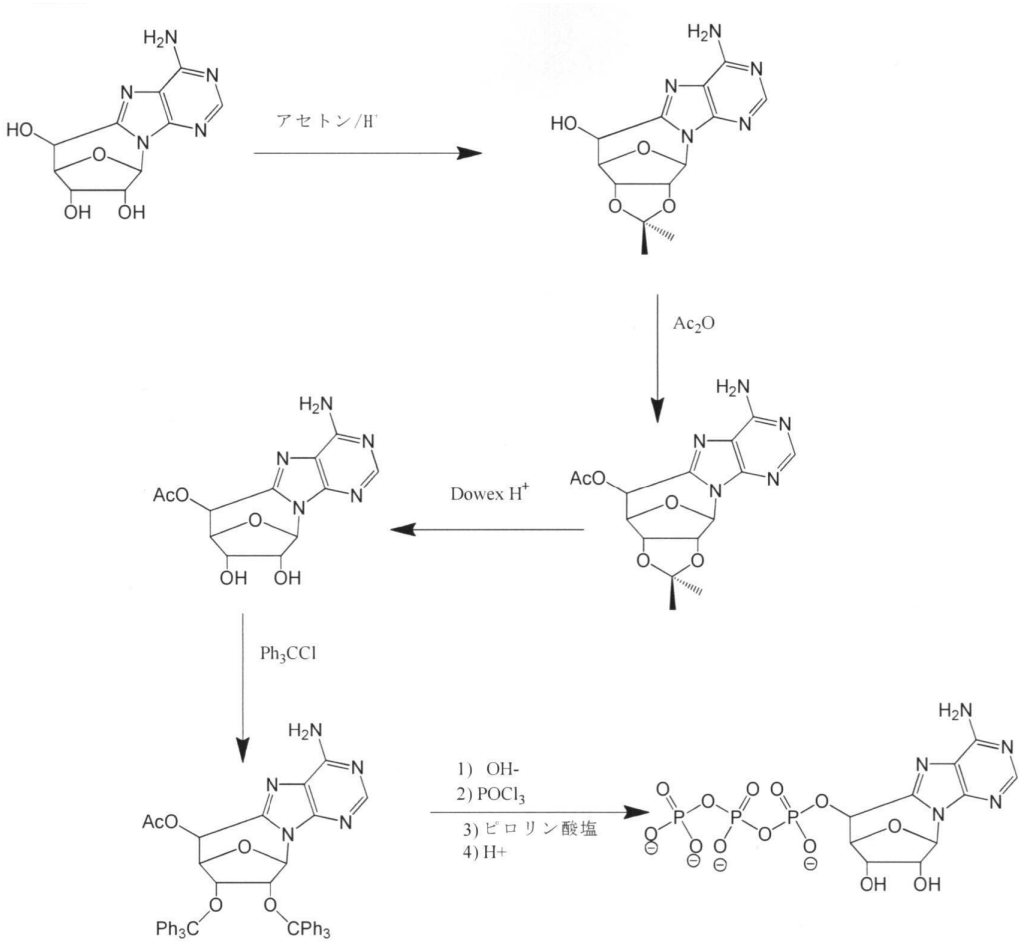


【０４５６】

様々な保護基を用いて、反応を制御することができる。例えば、スキーム２は、２’および３’ヒドロキシル基ではなく、糖の５’位のリン酸化を促進するための複数の保護ステップおよび脱保護ステップの使用を提供する。

スキーム２

【化６３】

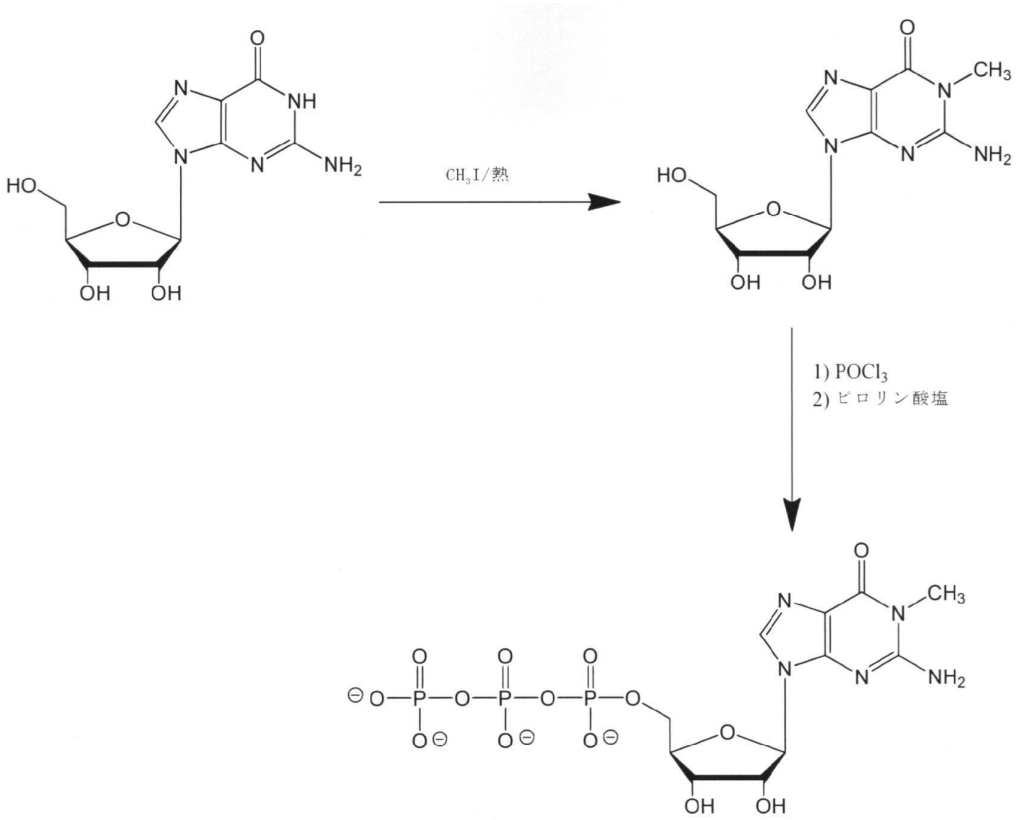


【０４５７】

修飾ヌクレオチドは、任意の有用な方法で合成され得る。スキーム３、４、および７は、修飾プリン核酸塩基を有する修飾ヌクレオチドを合成するための例示の方法を提供し、スキーム５および６は、それぞれ、修飾シュードウリジンまたはシュードイソシチジンを有する修飾ヌクレオチドを合成するための例示の方法を提供する。

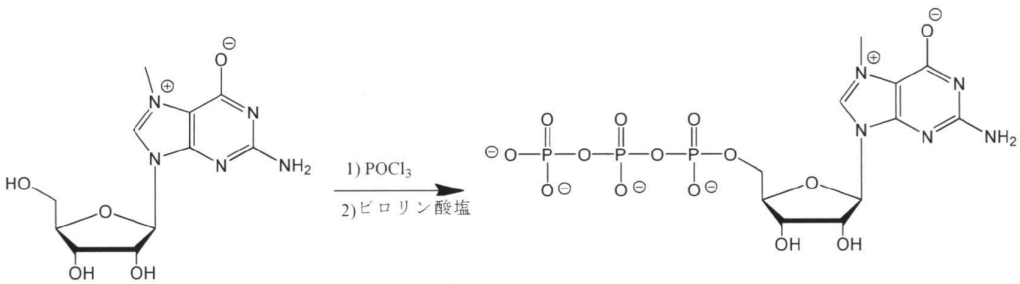
スキーム３

【化６４】



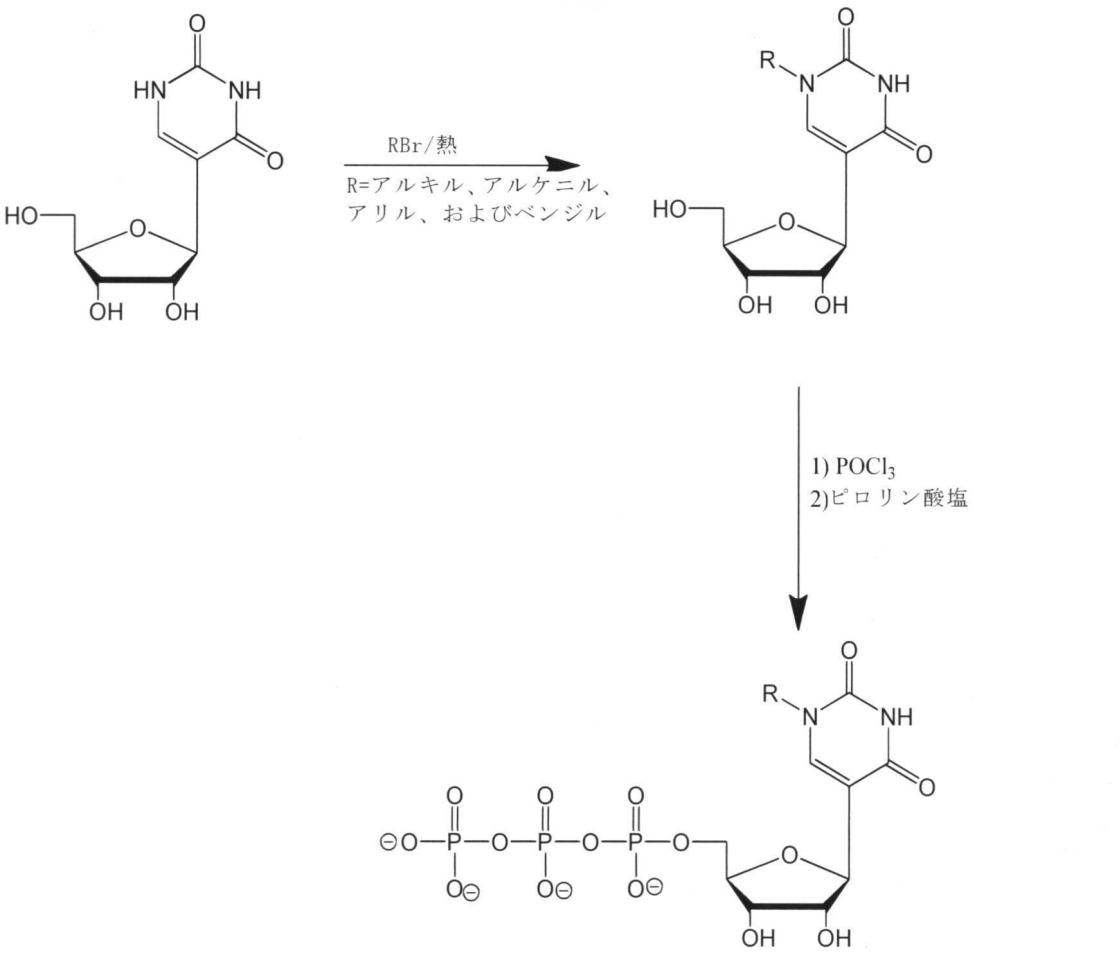
スキーム４

【化６５】



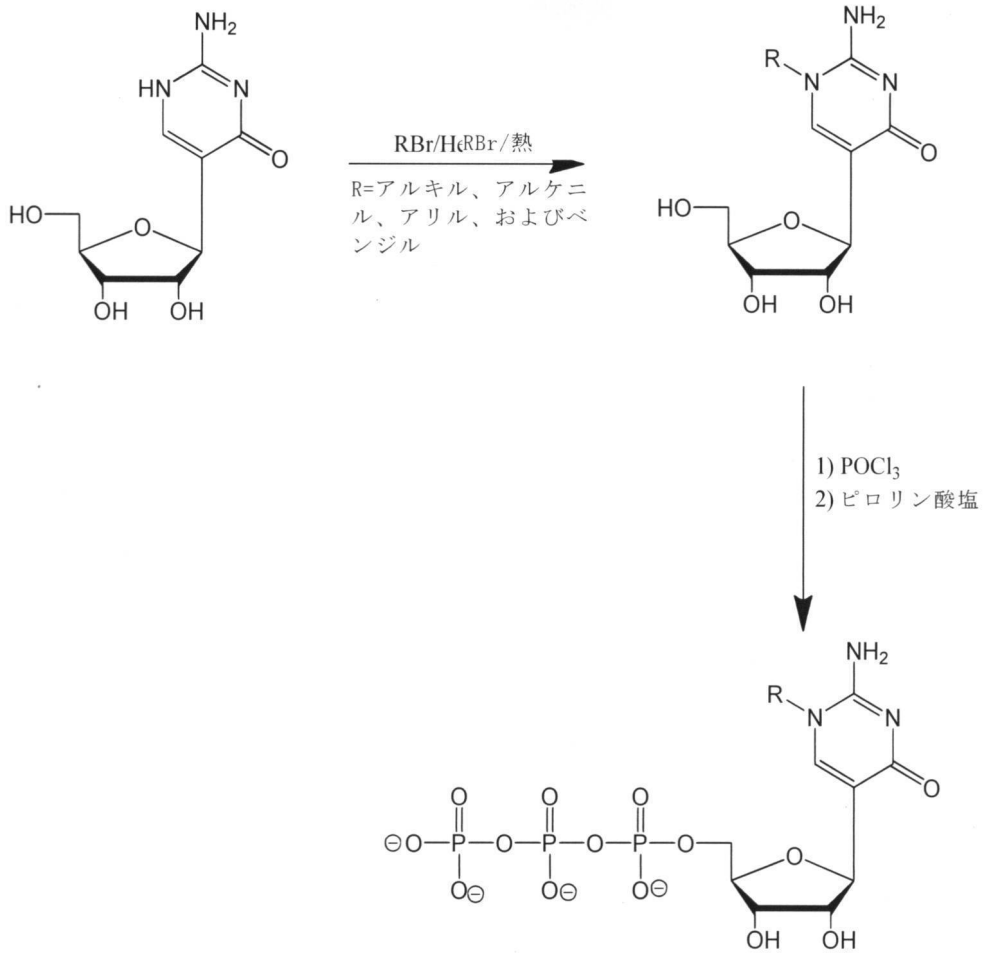
スキーム５

【化６６】

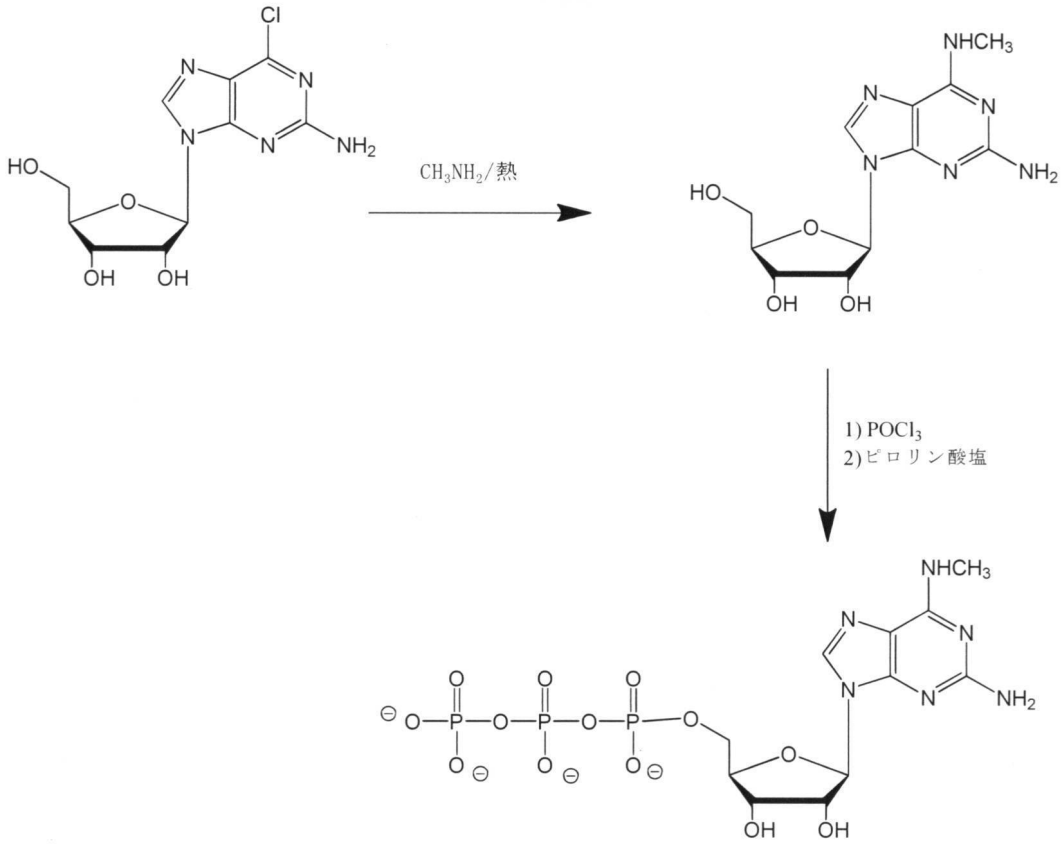


スキーム６

【化６７】


NH2
HN
N
O
HO
O
OH
OH
RBr/HClRBr/熱
R=アルキル、アルケニル、アリル、およびベンジル
NH2
R
N
N
O
HO
O
OH
OH
1) POCl3
2) ピロリン酸塩
NH2
R
N
N
O
O
O

【化６８】

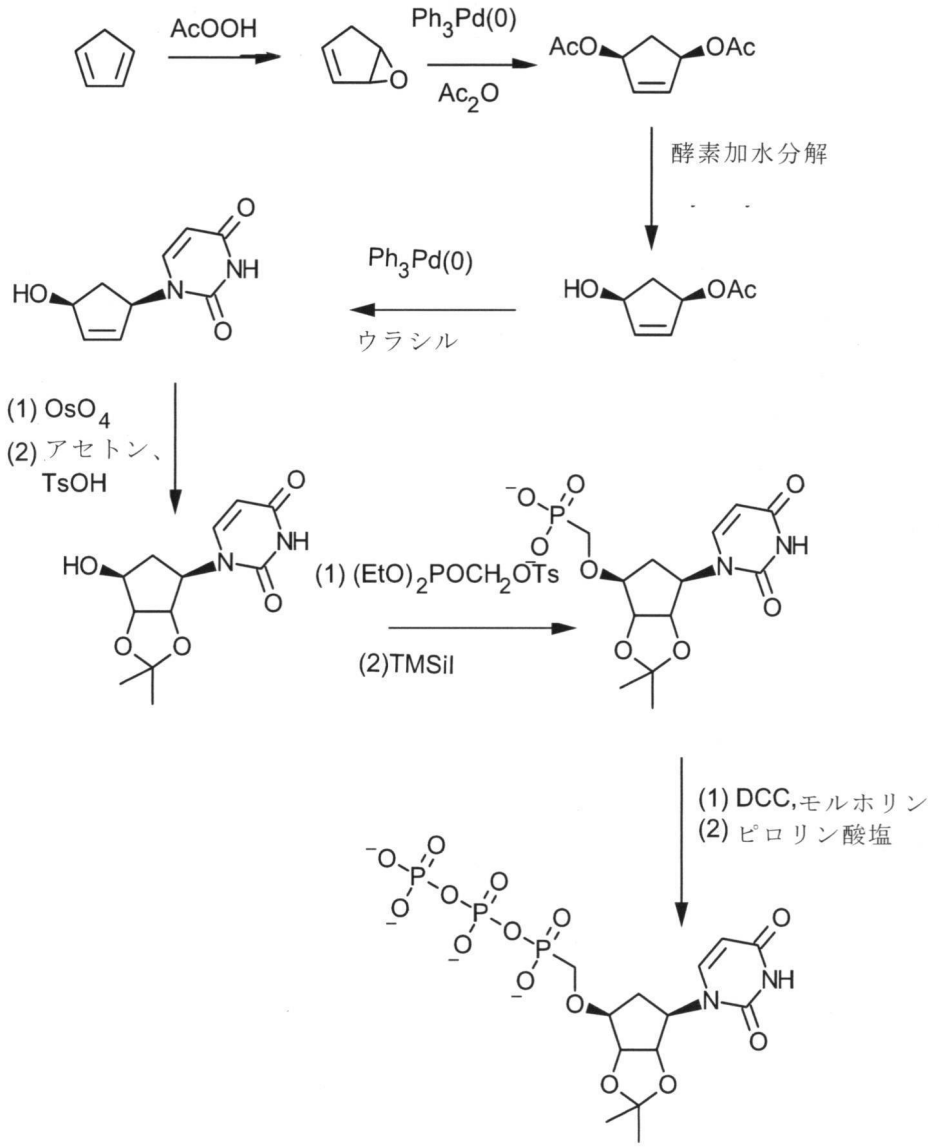


【０４５８】

スキーム８および９は、修飾ヌクレオチドの例示の合成を提供する。スキーム１０は、ヌクレオチドを産生するための非限定的な生体触媒方法を提供する。

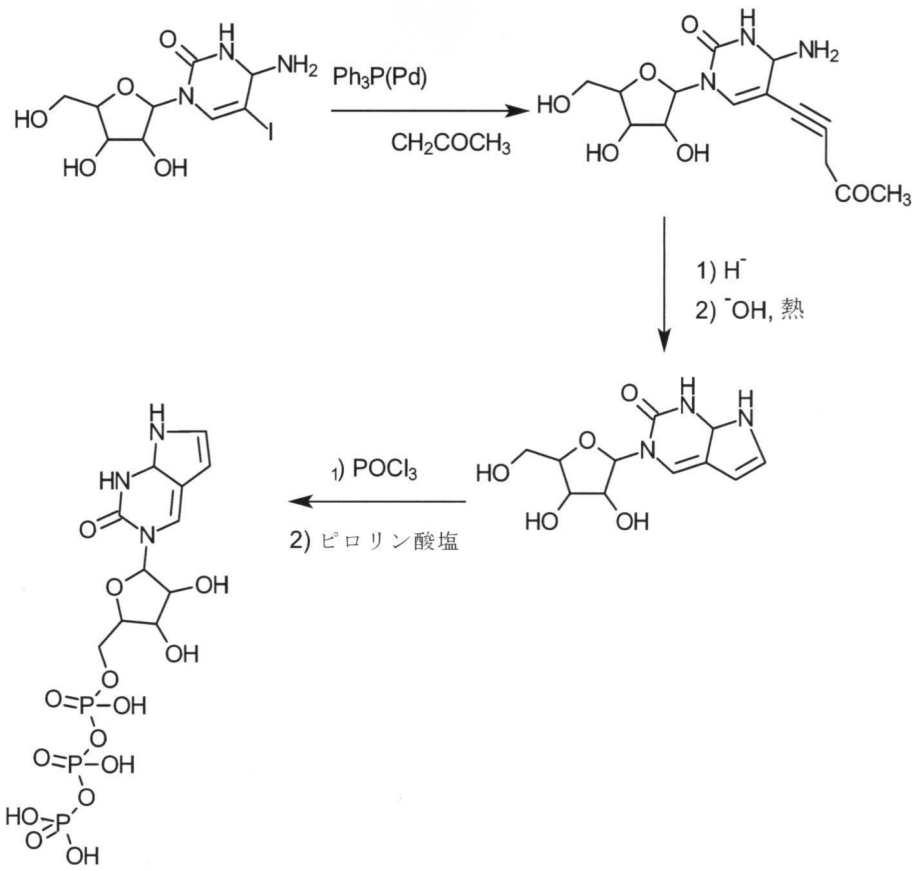
スキーム８

【化６９】


AcOOH
Ph3Pd(0)
Ac2O
AcO
OAc
酵素加水分解
HO
OAc
Ph3Pd(0)
ウラシル
HO
NH
(1) OsO4
(2) アセトン、
TsOH
(1) (EtO)2POCH2OTs
(2)TMSiI
(1) DCC,モルホリン
(2) ピロリン酸塩

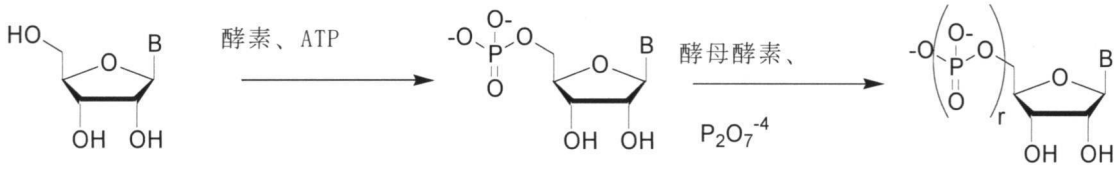
スキーム９

【化７０】



スキーム１０

【化７１】

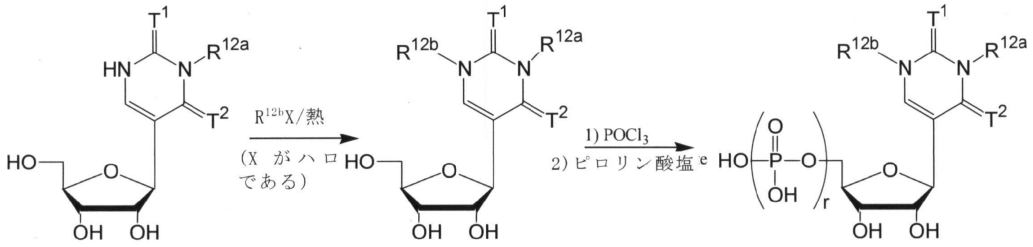


【０４５９】

スキーム１１は、修飾ウラシルの例示の合成を提供し、そこでは、Ｎ１位は、他の箇所で提供されるように、Ｒ^{12b}で修飾され、リボースの５’位は、リン酸化される。Ｔ^{1}、Ｔ^{2}、Ｒ^{12a}、Ｒ^{12b}、およびｒは、本明細書に提供される通りである。この合成ならびにその最適化されたバージョンを用いて、他のピリミジン核酸塩基およびプリン核酸塩基（例えば、式（ｂ１）～（ｂ４３）を参照のこと）を修飾し、かつ／または１個以上のリン酸基を（例えば、糖の５’位に）導入することができる。このアルキル化反応を用いて、本明細書に記載の任意の核酸塩基における任意の反応基（例えば、アミノ基）（例えば、シトシン、ウラシル、アデニン、およびグアニンのワトソン・クリック塩基対合面のアミノ基）に１個以上の任意に置換されたアルキル基を含むこともできる。

スキーム１１

【化７２】



【０４６０】

ｍｍＲＮＡにおけるヌクレオチドの組み合わせ

修飾ヌクレオチドと修飾ヌクレオチドの組み合わせのさらなる例が以下の表９に提供される。修飾ヌクレオチドのこれらの組み合わせを用いて、本発明のポリペプチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを形成することができる。別途述べられない限り、修飾ヌクレオチドは、本発明の修飾核酸またはｍｍＲＮＡの天然ヌクレオチドと完全に置換され得る。非限定的な例として、天然ヌクレオチドウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドで置換され得る。別の非限定的な例において、天然ヌクレオチドウリジンは、本明細書に開示の修飾ヌクレオシドのうちの少なくとも１つで部分的に置換され得る（例えば、約０．１％、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９．９％）。

表９

【表０００９－１】

修飾ヌクレオチド	修飾ヌクレオチドの組み合わせ
α-チオ-シチジン	α-チオ-シチジン/5-ヨード-ウリジン
	α-チオ-シチジン/N1-メチル-シュードウリジン
	α-チオ-シチジン/α-チオ-ウリジン
	α-チオ-シチジン/5-メチル-ウリジン
	α-チオ-シチジン/シュードウリジン
	シトシンの約50%がα-チオ-シチジンである
シュードイソシチジン	シュードイソシチジン/5-ヨード-ウリジン
	シュードイソシチジン/N1-メチル-シュードウリジン
	シュードイソシチジン/α-チオ-ウリジン
	シュードイソシチジン/5-メチル-ウリジン
	シュードイソシチジン/シュードウリジン
	シトシンの約25%がシュードイソシチジンである
	シュードイソシチジン/ウリジンの約50%がN1-メチル-シュードウリジンであり、ウリジンの約50%がシュードウリジンである
	シュードイソシチジン/ウリジンの約25%がN1-メチル-シュードウリジンであり、ウリジンの約25%がシュードウリジンである
ピロロ-シチジン	ピロロ-シチジン/5-ヨード-ウリジン
	ピロロ-シチジン/N1-メチル-シュードウリジン
	ピロロ-シチジン/α-チオ-ウリジン
	ピロロ-シチジン/5-メチル-ウリジン
	ピロロ-シチジン/シュードウリジン
	シトシンの約50%がピロロ-シチジンである
5-メチル-シチジン	5-メチル-シチジン/5-ヨード-ウリジン
	5-メチル-シチジン/N1-メチル-シュードウリジン
	5-メチル-シチジン/α-チオ-ウリジン
	5-メチル-シチジン/5-メチル-ウリジン

【表０００９－２】

	5-メチル-シチジン/シュードウリジン
	シトシンの約 25%が 5-メチル-シチジンである
	シトシンの約 50%が 5-メチル-シチジンである
	5-メチル-シチジン/5-メトキシ-ウリジン
	5-メチル-シチジン/5-ブロモ-ウリジン
	5-メチル-シチジン/2-チオ-ウリジン
	5-メチル-シチジン/ウリジンの約 50%が 2-チオ-ウリジンである
	ウリジンの約 50%が 5-メチル-シチジンである/ウリジンの約 50%が 2-チオ-ウリジンである
N4-アセチル-シチジン	N4-アセチル-シチジン/5-ヨード-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/N1-メチル-シュードウリジン
	N4-アセチル-シチジン/α-チオ-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/5-メチル-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/シュードウリジン
	シトシンの約 50%が N4-アセチル-シチジンである
	シトシンの約 25%が N4-アセチル-シチジンである
	N4-アセチル-シチジン/5-メトキシ-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/5-ブロモ-ウリジン
	N4-アセチル-シチジン/2-チオ-ウリジン
	シトシンの約 50%が N4-アセチル-シチジンである/ウリジンの約 50%が 2-チオ-ウリジンである

【０４６１】

修飾ヌクレオチドの組み合わせのさらなる例が以下の表１０に提供される。修飾ヌクレオチドのこれらの組み合わせを用いて、本発明のポリペプチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを形成することができる。

表１０

【表００１０】

修飾ヌクレオチド	修飾ヌクレオチドの組み合わせ
式(b10)の１個以上の核酸塩基を有する修飾シチジン	(b10)を有する修飾シチジン/シュードウリジン
	(b10)を有する修飾シチジン/N1-メチル-シュードウリジン
	(b10)を有する修飾シチジン/5-メトキシ-ウリジン
	(b10)を有する修飾シチジン/5-メチル-ウリジン
	(b10)を有する修飾シチジン/5-ブロモ-ウリジン
	(b10)を有する修飾シチジン/2-チオ-ウリジン
	シチジンの約 50%が修飾シチジン(b10)で置換される/ウリジンの約 50%が 2-チオ-ウリジンである
式(b32)の１個以上の核酸塩基を有する修飾シチジン	(b32)を有する修飾シチジン/シュードウリジン
	(b32)を有する修飾シチジン/N1-メチル-シュードウリジン
	(b32)を有する修飾シチジン/5-メトキシ-ウリジン
	(b32)を有する修飾シチジン/5-メチル-ウリジン
	(b32)を有する修飾シチジン/5-ブロモ-ウリジン
	(b32)を有する修飾シチジン/2-チオ-ウリジン
	シチジンの約 50%が修飾シチジン(b32)で置換される/ウリジンの約 50%が 2-チオ-ウリジンである
式(b1)の１個以上の核酸塩基を有する修飾ウリジン	(b1)を有する修飾ウリジン/N4-アセチル-シチジン
	(b1)を有する修飾ウリジン/5-メチル-シチジン
式(b8)の１個以上の核酸塩基を有する修飾ウリジン	(b8)を有する修飾ウリジン/N4-アセチル-シチジン
	(b8)を有する修飾ウリジン/5-メチル-シチジン
式(b28)の１個以上の核酸塩基を有する修飾ウリジン	(b28)を有する修飾ウリジン/N4-アセチル-シチジン
	(b28)を有する修飾ウリジン/5-メチル-シチジン
式(b29)の１個以上の核酸塩基を有する修飾ウリジン	(b29)を有する修飾ウリジン/N4-アセチル-シチジン
	(b29)を有する修飾ウリジン/5-メチル-シチジン
式(b30)の１個以上の核酸塩基を有する修飾ウリジン	(b30)を有する修飾ウリジン/N4-アセチル-シチジン
	(b30)を有する修飾ウリジン/5-メチル-シチジン

【０４６２】

いくつかの実施形態において、シトシンの少なくとも２５％は、式（ｂ１０）～（ｂ１４）の化合物に置換される（例えば、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または約１００％）。

【０４６３】

いくつかの実施形態において、ウラシルの少なくとも２５％は、式（ｂ１）～（ｂ９）の化合物に置換される（例えば、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも

約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または約１００％）。

【０４６４】

いくつかの実施形態において、シトシンの少なくとも２５％は、式（ｂ１０）～（ｂ１４）に化合物に置換され、ウラシルの少なくとも２５％は、式（ｂ１）～（ｂ９）の化合物に置換される（例えば、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または約１００％）。

【０４６５】

ＩＶ．薬学的組成物

製剤化、投与、送達、および投薬

本発明は、１つ以上の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせたポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡの組成物および複合体を提供する。薬学的組成物は、任意に、１つ以上のさらなる活性物質、例えば、治療上および／または予防上活性物質を含んでもよい。医薬品の製剤および／または製造における一般の考慮事項は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　２１^{ｓｔ}　ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，２００５において見出され得る。

【０４６６】

いくつかの実施形態において、組成物は、ヒト、すなわちヒト患者または対象に投与される。本開示の目的のために、「活性成分」という表現は、一般に、本明細書に記載の送達対象のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを指す。

【０４６７】

本明細書に提供される薬学的組成物の説明は、原則的に、ヒトへの投与に好適である薬学的組成物を対象とするが、そのような組成物は一般に、任意の他の動物への、例えば、非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物への投与に好適であることが当業者によって理解されるであろう。組成物を種々の動物への投与に好適であるようにするための、ヒトへの投与に好適な薬学的組成物の修飾は、よく理解されており、獣医薬理学の専門家は、たとえ用いるとしても単なる通常の実験法を用いて、そのような修飾を設計および／または実施することができる。薬学的組成物の投与が企図される対象には、ヒトおよび／もしくは他の霊長類；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス、および／もしくはラット等の商業的に関連性のある哺乳動物を含む哺乳動物；ならびに／または家禽類、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、および／もしくはシチメンチョウ等の商業的に適切な鳥類を含む鳥類が含まれるが、これらに限定されない。

【０４６８】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬理学の技術分野で既知であるか今後開発される、任意の方法によって調製されて得る。一般に、そのような調製方法は、活性成分を賦形剤および／または１つ以上の他の副成分と混合し、次いで、必要かつ／または望ましい場合、生成物を所望の単回または複数回用量単位へと分割、成形、および／またはパッケージ化するステップを含む。

【０４６９】

本発明に従う薬学的組成物は、バルクで、１つの単回単位用量として、および／または複数の単回単位用量として、調製され、パッケージ化され、かつ／または販売され得る。本明細書で使用されるとき、「単位用量」は、既定量の活性成分を含む、薬学的組成物の個別的な量である。活性成分の量は一般に、対象に投与されるであろう活性成分の投薬量、および／または例えば、そのような投薬量の２分の１もしくは３分の１等の、そのような投薬量の好都合な分率に等しい。

【０４７０】

本発明に従う薬学的組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、および／または任意のさらなる成分の相対的な量は、治療される対象の素性、大きさ、および／または状態に応じて変化し、組成物が投与されるべき経路に応じてさらに変化するあろう。例として、組成物は、０．１％～１００ｗ／ｗ％、例えば、０．５～５０ｗ／ｗ％、１～３０ｗ／ｗ％、５～８０ｗ／ｗ％、少なくとも８０ｗ／ｗ％の活性成分を含み得る。

【０４７１】

製剤化

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、：（１）安定性を増加させ、（２）細胞トランスフェクションを増加させ、（３）（例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのデポー製剤からの）持続放出もしくは遅延放出を可能にし、（４）生体分布を変化させ（例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの標的を特定の組織または細胞型に定める）、（５）コードされたタンパク質の翻訳をインビボで増加させ、かつ／または（６）コードされたタンパク質の放出プロファイルをインビボで変化させるために、１つ以上の賦形剤を用いて製剤化することができる。ありとあらゆる溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散もしくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤もしくは乳化剤、防腐剤等の伝統的な賦形剤に加えて、本発明の賦形剤は、制限なく、リピドイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コアーシェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡ（例えば、対象への移植のために）でトランスフェクトされた細胞、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣体、およびこれらの組み合わせを含むことができる。したがって、本発明の製剤は、１つ以上の賦形剤を含むことができ、各々は一緒にポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡの安定性を増加させる、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡによる細胞トランスフェクションを増加させる、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡによりコードされるタンパク質の発現を増加させる、および／またはポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡによりコードされるタンパク質の放出プロファイルを変化させる量である。さらに、本発明の一次構築物およびｍｍＲＮＡは、自己集合性核酸ナノ粒子を用いて製剤化されてもよい。

【０４７２】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬理学の技術分野で既知であるか今後開発される、任意の方法によって調製され得る。一般に、そのような調製方法は、活性成分を賦形剤および／または１つ以上の他の副成分と混合するステップを含む。

【０４７３】

本開示による薬学的組成物は、バルクで、１つの単回単位用量として、および／または複数の単回単位用量として、調製され、パッケージ化され、かつ／または販売されてもよい。本明細書で使用されるとき、「単位用量」は、既定量の活性成分を含む、薬学的組成物の個別的な量を指す。活性成分の量は一般に、対象に投与されるであろう活性成分の投薬量、および／または例えば、そのような投薬量の２分の１もしくは３分の１を含むが、これらに限定されない、そのような投薬量の好都合な分率に等しい。

【０４７４】

本開示による薬学的組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、および／または任意のさらなる成分の相対的な量は、治療されている対象の素性、サイズ、および／または状態に応じて変化し、組成物が投与されるべき経路に応じてさらに変化するであろう。例えば、組成物は、０．１ｗ／ｗ％～９９％の活性成分を含み得る。

【０４７５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の製剤は、少なくとも１つのｍｍＲＮＡを含有し得る。非限定的な例として、製剤は、１、２、３、４、または５つのｍｍＲＮＡを含有してもよい。一実施形態において、製剤は、ヒトタンパク質、獣医学的タンパク質（ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ）、細菌タンパク質、生体タンパク質、抗体、免疫原性タンパク質、治療的ペプチドおよびタンパク質、分泌タンパク質、原形質膜タ

ンパク質、細胞質および細胞骨格タンパク質、細胞内（ｉｎｔｒａｎｃｅｌｌｕｌａｒ）膜結合タンパク質、核タンパク質、ヒト疾患に関連したタンパク質および／または非ヒト疾患に関連したタンパク質等であるが、これらに限定されないカテゴリーから選択されるタンパク質をコードする修飾ｍＲＮＡを含有し得る。一実施形態において、製剤は、少なくとも３つの修飾ｍＲＮＡがコードするタンパク質を含有する。一実施形態において、製剤は、少なくとも５つの修飾ｍＲＮＡがコードするタンパク質を含有する

【０４７６】

薬学的製剤は、所望される特定の剤形に適している、本明細書で使用されるときにありとあらゆる溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散もしくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤もしくは乳化剤、防腐剤等を含むが、これらに限定されない、薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでもよい。薬学的組成物を製剤化するための種々の賦形剤および組成物を調製するための技法は、当技術分野で知られている（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ，２００６を参照のこと）。任意の従来の賦形剤媒体が任意の望ましくない生体影響を引き起こすか、またはさもなければ薬学的組成物の任意の他の構成成分（複数可）と有害な様態で相互作用するといった、物質またはその誘導体と不適合性である場合を除いて、その使用が本開示の範囲内で企図され得る。

【０４７７】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子の粒径は、増加および／または減少し得る。粒径の変化は、炎症等であるが、これらに限定されない生体反応に対抗する一助となることが可能であり得るか、または哺乳動物に送達される修飾ｍＲＮＡの生体効果を増加させ得る。

【０４７８】

薬学的組成物の製造に使用される薬学的に許容される賦形剤には、不活性希釈剤、界面活性剤および／もしくは乳化剤、防腐剤、緩衝剤、滑沢剤、ならびに／または油が含まれるが、これらに限定されない。そのような賦形剤が任意に本発明の薬学的製剤に含まれてもよい。

【０４７９】

リピドイド

リピドイドの合成が詳細に記載されており、これらの化合物を含有する製剤は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの送達に特に適している（これらすべてが参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｍａｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ Ｃｈｅｍ．２０１０ ２１：１４４８－１４５４、Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ．２０１０ ２６７：９－２１、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８ ２６：５６１－５６９、Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１０ １０７：１８６４－１８６９、Ｓｉｅｇｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１１１０８：１２９９６－３００１を参照のこと）。

【０４８０】

これらのリピドイドを用いて、齧歯類および非ヒト霊長類において２本鎖低分子干渉ＲＮＡが有効に送達されているが（これらすべて、それらの全体が本明細書に組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８ ２６：５６１－５６９、Ｆｒａｎｋ－Ｋａｍｅｎｅｔｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００８ １０５：１１９１５－１１９２０、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９、Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１０ １０７：１８６４－１８６９、Ｌｅｕｓｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１ ２９：１００５－１０１０を参照のこと）、本開示は、１本鎖ポリヌクレオチド、一

次構築物、またはｍｍＲＮＡを送達することにおけるそれらの製剤化および使用を記載する。これらのリピドイドを含有する複合体、ミセル、リポソーム、または粒子が調製され得、したがって、局所および／または全身投与経路を介したリピドイド製剤の注入後に、コードされたタンパク質の産生によって判定するとき、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの有効な送達をもたらすことができる。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのリピドイド複合体は、静脈内、筋肉内、または皮下経路を含むが、これらに限定されない、種々の手段によって投与することができる。

【０４８１】

核酸のインビボ送達は、製剤組成、粒子ＰＥＧ化の性質、負荷の程度、オリゴヌクレオチド対脂質比を含むが、これらに限定されない多くのパラメータ、および粒径等であるが、これらに限定されない生物物理学的パラメータによって影響を受け得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９）。例として、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）脂質のアンカー鎖長のわずかな変化が、インビボ有効性に対する大きな効果をもたらし得る。ペンタ［３－（１－ラウリルアミノプロピオニル）］－トリエチレンテトラミン塩酸塩（ＴＥＴＡ－５ＬＡＰ（９８Ｎ１２－５としても知られる）、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｍｕｒｕｇａｉａｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４０１：６１（２０１０）を参照のこと）、Ｃ１２－２００（誘導体および変異形を含む）、およびＭＤ１を含むが、これらに限定されない、異なるリピドイドを有する製剤がインビボ活性について試験され得る。

【０４８２】

本明細書において「９８Ｎ１２－５」と称されるリピドイドは、参照によりその全体が組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９（図２を参照のこと）によって開示されている（図２を参照のこと）。

【０４８３】

本明細書において「Ｃ１２－２００」と称されるリピドイドは、両方ともに参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１０ １０７：１８６４－１８６９（図２を参照のこと）およびＬｉｕ ａｎｄ Ｈｕａｎｇ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ．２０１０ ６６９－６７０（図２を参照のこと）によって開示されている。リピドイド製剤は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに加えて、３つもしくは４つのいずれかまたはそれよりも多い構成成分を含む粒子を含むことができる。例として、ある特定のリピドイドを有する製剤は、９８Ｎ１２－５を含むが、これらに限定されず、４２％リピドイド、４８％コレステロール、および１０％ＰＥＧ（Ｃ１４アルキル鎖長）を含有してもよい。別の例として、ある特定のリピドイドを有する製剤は、Ｃ１２－２００を含むが、これらに限定されず、５０％リピドイド、１０％ジステアロイルホスファチジル（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ）コリン、３８．５％コレステロール、および１．５％ＰＥＧ－ＤＭＧを含有してもよい。

【０４８４】

一実施形態において、全身静脈内投与のためにリピドイドとともに製剤化されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、肝臓を標的とすることができる。例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを使用し、４２％の９８Ｎ１２－５、４８％のコレステロール、および１０％のＰＥＧ－脂質の脂質モル組成を含み、約７．５～１の総脂質対ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの最終重量比、およびＰＥＧ脂質上のＣ１４アルキル鎖長を有し、概ね５０～６０ｎｍの平均粒径を有する、最終的な最適化された静脈内製剤は、肝臓への９０％超の製剤の分布をもたらし得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９を参照のこと）。別の例において、Ｃ１２－２００（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国仮出願第６１／１７５，７７０号および公開された国際出願第ＷＯ２０１０１２９７０９号を参照のこと）リピド

イドを使用し、５０／１０／３８．５／１．５のＣ１２－２００／ジステアロイルホスファチジル（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ）コリン／コレステロール／ＰＥＧ－ＤＭＧのモル比を有し得、７対１の総脂質対ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの重量比、および８０ｎｍの平均粒径を有する静脈内製剤が、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを肝細胞に送達するのに有効であり得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｌｏｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１０ １０７：１８６４－１８６９を参照のこと）。別の実施形態において、ＭＤ１リピドイド含有製剤を用いて、インビボでポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを肝細胞に有効に送達し得る。筋肉内または皮下経路のために最適化されたリピドイド製剤の特性は、標的細胞型、および製剤が細胞外マトリックスを介して血流中に拡散する能力に応じて大きく異なり得る。内皮窓（ｆｅｎｅｓｔｒａｅ）のサイズに起因して、１５０ｎｍ未満の粒径が有効な肝細胞送達のために所望され得るが（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００９ １７：８７２－８７９を参照のこと）、製剤を、内皮細胞、骨髄細胞、および筋肉細胞を含むが、これらに限定されない他の細胞型に送達するためのリピドイド製剤化ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの使用は、同様にサイズ制限されない場合がある。ｓｉＲＮＡをインビボで骨髄細胞および内皮等の他の非肝細胞細胞に送達するためのリピドイド製剤の使用が報告されている（各々が参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８ ２６：５６１－５６９、Ｌｅｕｓｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１ ２９：１００５－１０１０、Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．Ａｄｖ．Ｆｕｎｃｔ．Ｍａｔｅｒ．２００９ １９：３１１２－３１１８、８ｔｈ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｕｄａｈ Ｆｏｌｋｍａｎ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ Ｏｃｔｏｂｅｒ ８－９，２０１０を参照のこと）。単球等の骨髄細胞への有効な送達、リピドイド製剤は、同様の構成成分モル比を有し得る。リピドイドと、ジステアロイルホスファチジル（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ）コリン、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧを含むが、これらに限定されない他の構成成分との異なる比率を用いて、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの製剤を、肝細胞、骨髄細胞、筋肉細胞等を含むが、これらに限定されない異なる細胞型への送達のために最適化し得る。例えば、構成成分モル比は、５０％のＣ１２－２００、１０％のジステアロイルホスファチジル（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ）コリン、３８．５％のコレステロール、および１．５％のＰＥＧ－ＤＭＧを含み得るが、これらに限定されない（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｌｅｕｓｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１１ ２９：１００５－１０１０を参照のこと）。皮下送達または筋肉内送達のいずれかを介した、核酸の細胞（脂肪細胞および筋肉細胞等であるが、これらに限定されない）への局所送達のためのリピドイド製剤の使用は、全身送達に所望される製剤構成成分のすべてを必要とするわけではない場合があり、したがって、リピドイドおよびポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのみを含んでもよい。

【０４８５】

リピドイドは、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによる細胞トランスフェクションを増加させ、かつ／またはコードされたタンパク質の翻訳を増加させることが可能であり得るため、異なるリピドイドの組み合わせを用いて、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの指示によるタンパク質産生の有効性を改善し得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１１，１９：１６８８－１６９４を参照のこと）。

【０４８６】

リポソーム、リポプレックス、および脂質ナノ粒子

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、１つ以上のリポソーム、リポプレックス、または脂質ナノ粒子を用いて製剤化することができる。一実施形態に

おいて、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの薬学的組成物は、リポソームを含む。リポソームは、主に脂質二重層から構成され得、栄養素および薬学的製剤の投与のための送達ビヒクルとして使用され得る、人工的に調製された小胞である。リポソームは、直径数百ナノメートルであり得、かつ狭い水性の区画によって分離される一連の同心状二重層を含有し得る多層小胞（ＭＬＶ）、直径５０ｎｍよりも小さい場合がある小さい単細胞小胞（ＳＵＶ）、および直径５０～５００ｎｍであり得る大きい単層小胞（ＬＵＶ）等であるが、これらに限定されない、異なるサイズのものであり得る。リポソーム設計は、不健康な組織へのリポソームの結合を改善するため、またはエンドサイトーシス等であるが、これらに限定されない事象を活性化するための、オプソニンまたはリガンドを含むが、これらに限定されない。リポソームは、薬学的製剤の送達を改善するために低ｐＨまたは高ｐＨを含有してもよい。

【０４８７】

リポソームの形成は、封入される薬学的製剤およびリポソーム成分、脂質小胞が分散される媒体の性質、封入される物質の有効濃度およびその潜在的な毒性、小胞の適用および／または送達中に伴われる任意のさらなるプロセス、意図される適用のための小胞の最適化サイズ、多分散性、および貯蔵寿命、ならびに安全かつ効率的なリポソーム生成物のバッチ間の再現性および大規模産生の可能性等であるが、これらに限定されない、物理化学特性に依存し得る。

【０４８８】

一実施形態において、本明細書に記載の薬学的組成物は、制限なく、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）リポソーム、Ｍａｒｉｎａ Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ）によるＤｉＬａ２リポソーム、１，２－ジリノレイルオキシ（ｄｉｌｉｎｏｌｅｙｌｏｘｙ）－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、およびＭＣ３（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２０１００３２４１２０号）から形成されるもの等のリポソーム、ならびにＪａｎｓｓｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．（Ｈｏｒｓｈａｍ、ＰＡ）によるＤＯＸＩＬ（登録商標）等であるが、これらに限定されない小分子薬物を送達し得るリポソームを含んでもよい。

【０４８９】

一実施形態において、本明細書に記載の薬学的組成物は、制限なく、以前に記載されており、インビトロおよびインビボでのオリゴヌクレオチド送達に好適であることが示された、安定化プラスミド－脂質粒子（ＳＰＬＰ）または安定化核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）の合成から形成されるもの等のリポソームを含んでもよい（これらすべてが参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｗｈｅｅｌｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．１９９９ ６：２７１－２８１、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．１９９９ ６：１４３８－１４４７、Ｊｅｆｆｓ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．２００５ ２２：３６２－３７２、Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２：１００２－１００７、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２００６ ４４１：１１１－１１４、Ｈｅｙｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２００５ １０７：２７６－２８７、Ｓｅｍｐｌｅ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０ ２８：１７２－１７６、Ｊｕｄｇｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００９ １１９：６６１－６７３、ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓＨｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２を参照のこと）。Ｗｈｅｅｌｅｒらによる元の製造方法は、洗浄剤透析法（ｄｅｔｅｒｇｅｎｔ ｄｉａｌｙｓｉｓ ｍｅｔｈｏｄ）であり、それは後にＪｅｆｆｓらによって改善され、自発的小胞形成法（ｓｐｏｎｔａｎｅｏｕｓ ｖｅｓｉｃｌｅ ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ）と称される。リポソーム製剤は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに加えて、３～４つの脂質構成成分から構成される。例としてリポソームは、Ｊｅｆｆｓらによって記載されるように、５５％のコレステロール、２０％のジ

ステアロイルホスファチジル（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ）コリン（ＤＳＰＣ）、１０％のＰＥＧ－Ｓ－ＤＳＧ、および１５％の１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）を含有することができるが、これらに限定されない。別の例として、ある特定のリポソーム製剤は、Ｈｅｙｅｓらによって記載されるように、４８％のコレステロール、２０％のＤＳＰＣ、２％のＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ、および３０％のカチオン性脂質を含有してもよいが、これらに限定されず、このカチオン性脂質は、１，２－ジステアリルオキシ（ｄｉｓｔｅａｒｌｏｘｙ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）、ＤＯＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、または１，２－ジリノレニルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）であり得る。

【０４９０】

一実施形態において、薬学的組成物は、少なくとも１つの免疫原をコードし得るｍｍＲＮＡを送達するために形成され得る、リポソームを含んでもよい。ｍｍＲＮＡは、リポソームによってカプセル封入されてもよく、かつ／またはそれは、水性コアに含有されてもよく、それが次いでリポソームによってカプセル封入されてもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０３１０４６号、同第ＷＯ２０１２０３１０４３号、同第ＷＯ２０１２０３０９０１号、および同第ＷＯ２０１２００６３７８号を参照のこと）。別の実施形態において、免疫原をコードし得るｍｍＲＮＡは、カチオン性水中油型エマルション中で製剤化されてもよく、そのエマルション粒子は、ｍｍＲＮＡと相互作用して分子をエマルション粒子に固着させることができる油中子およびカチオン性脂質を含む（参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２００６３８０号を参照のこと）。さらに別の実施形態において、脂質製剤は、トランスフェクションを向上させ得る脂質である少なくともカチオン性脂質、および脂質部分に連結された親水性頭頂基を含有する少なくとも１つの脂質を含んでもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１０７６８０７号および米国公開第２０１１０２００５８２号を参照のこと）。別の実施形態において、免疫原をコードするポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、官能化脂質二重層の間に架橋を有し得る脂質小胞中に製剤化されてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０１７７７２４号を参照のこと）。

【０４９１】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、官能化脂質二重層の間に架橋を有し得る脂質小胞中に製剤化されてもよい。

【０４９２】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、カチオン性脂質を含むリポソーム中に製剤化されてもよい。リポソームは、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１３００６８２５号に記載されるように、１：１～２０：１のカチオン性脂質中の窒素原子：ＲＮＡ中のリン酸塩（Ｎ：Ｐ比）のモル比を有し得る。別の実施形態において、リポソームは、２０：１超または１：１未満のＮ：Ｐ比を有し得る。

【０４９３】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、脂質－ポリカチオン複合体中に製剤化されてもよい。脂質－ポリカチオン複合体の形成は、当技術分野で既知の方法によって、および／または参照により全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２０１２０１７８７０２号に記載されるように遂行されてもよい。非限定的な例として、ポリカチオンには、ポリリジン、ポリオルニチン、および／またはポリアルギニン等であるが、これらに限定されないカチオン性ペプチドまたはポリペプチド、ならびに参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１２０１３３２６号に記載のカチオン性ペプチドが含まれてもよい。別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、コレステロールまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）等であるが、これらに限定されない中性脂質をさらに含み得る、脂質－ポリカチオン複合体中に製剤化されてもよい。

【０４９４】
リポソーム製剤は、カチオン性脂質構成成分の選択、カチオン性脂質飽和の程度、ＰＥＧ化の性質、すべての構成成分の比率、およびサイズ等の生物物理学的パラメータによって影響を受け得るが、これらに限定されない。Ｓｅｍｐｌｅら（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｓｅｍｐｌｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０　２８：１７２－１７６）による一例において、リポソーム製剤は、５７．１％のカチオン性脂質、７．１％のジパルミトイルホスファチジルコリン、３４．３％のコレステロール、および１．４％のＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡから構成された。別の例として、カチオン性脂質の組成を変化させることにより、ｓｉＲＮＡを種々の抗原提示細胞により有効に送達することができた（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｂａｓｈａ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．２０１１　１９：２１８６－２２００）。

【０４９５】
いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤中のＰＥＧの比率は、増加もしくは減少し得、かつ／またはＰＥＧ脂質の炭素鎖長がＣ１４からＣ１８に修飾されて、ＬＮＰ製剤の薬物動態および／もしくは生体分布を変化させ得る。非限定的な例として、ＬＮＰ製剤は、カチオン性脂質、ＤＳＰＣ、およびコレステロールと比較して、１～５％の脂質モル比のＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧを含有してもよい。別の実施形態において、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧは、ＰＥＧ－ＤＳＧ（１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）またはＰＥＧ－ＤＰＧ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）等であるが、これらに限定されないＰＥＧ脂質と置き換えられてもよい。カチオン性脂質は、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、Ｃ１２－２００、およびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ等であるが、これらに限定されない、当技術分野で既知の任意の脂質から選択されてもよい。

【０４９６】
一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１２１７０９３０号に記載の脂質ナノ粒子等に製剤化されてもよい。

【０４９７】
一実施形態において、カチオン性脂質は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０４０１８４号、同第ＷＯ２０１１１５３１２０号、同第ＷＯ２０１１１４９７３３号、同第ＷＯ２０１１０９０９６５号、同第ＷＯ２０１１０４３９１３号、同第ＷＯ２０１１０２２４６０号、同第ＷＯ２０１２０６１２５９号、同第ＷＯ２０１２０５４３６５号、同第ＷＯ２０１２０４４６３８号、同第ＷＯ２０１００８０７２４号、同第ＷＯ２０１０２１８６５号、および同第ＷＯ２００８１０３２７６号、米国特許第７，８９３，３０２号、同第７，４０４，９６９号、および同第８，２８３，３３３号、ならびに米国特許公開第ＵＳ２０１０００３６１１５号、および同第ＵＳ２０１２０２０２８７１号に記載のカチオン性脂質から選択されてもよいが、これらに限定されない。別の実施形態において、カチオン性脂質は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０４０１８４号、同第ＷＯ２０１１１５３１２０号、同第ＷＯ２０１１１４９７３３号、同第ＷＯ２０１１０９０９６５号、同第ＷＯ２０１１０４３９１３号、同第ＷＯ２０１１０２２４６０号、同第ＷＯ２０１２０６１２５９号、同第ＷＯ２０１２０５４３６５号、および同第ＷＯ２０１２０４４６３８号に記載の式Ａから選択されてもよいが、これらに限定されない。さらに別の実施形態において、カチオン性脂質は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００８１０３２７６号の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＩＸ、米国特許第７，８９３，３０２号の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＩＸ、米国特許第７，４０４，９６９号の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＸＸＩＩ、および米国特許公開第ＵＳ２０１０００３６１１５号の式Ｉ－ＶＩから選択されてもよいが、これらに限定されない。非限定的な例として、カチオン性脂質は、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ（ｄｉｍｅｍｙｌｈｅｘａｃ

ｏｓａ）－１７，２０－ジエン－９－アミン、（１Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ５Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－８－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルドコサ－１３，１６－ジエン－５－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘニコサ－１２，１５－ジエン－４－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－６－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－７－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－１０－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－５－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－４－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ（ｄｉｍｅｉｈｙｌｏｃｔａｃｏｓａ）－１９，２２－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ，２１　Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－８－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－７－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－６－アミン、（２２Ｚ，２５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンタ－２２，２５－ジエン－１０－アミン、（２１Ｚ，２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリアコンタ－２１，２４－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ（ｄｉｍｅｔｙｌｈｅｐｔａｃｏｓ）－１８－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７－エン－９－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－７－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサン－１０－アミン、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ－エチル－Ｎ－メチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－１－ノニルイコサ－１１，１４－ジエン－１－イル］ピロリジン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－２０－エン－１０－アミン、（１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエプタコサ（ｅｐｔａｃｏｓ）－１５－エン－１０－アミン、（１４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１４－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１７－エン－１０－アミン、（２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリトリアコンタ－２４－エン－１０－アミン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０－エン－１０－アミン、（２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンタ－２２－エン－１０－アミン、（１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６－エン－８－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ノニルヘニコサ－１２，１５－ジエン－１－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３，１６－ジエン－１－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］エプタデカン（ｅｐｔａｄｅｃａｎ）－８－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－ヘキシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘニコサン－１０－アミン，Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン，Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘキサデカン－８－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ウンデシルシクロプロピル］テトラデカン－５－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－｛７－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘプチル｝ドデカン－１－アミン、１－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ヘプチルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタデカン－９－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－デシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタデカン－６－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ペンタデカン－８－アミン、Ｒ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、Ｓ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝ピロリジン、（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオ

キシ］－３－［（５Ｚ）－オクター５－エン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝アゼチジン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘプチルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（ノニルオキシ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン；（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（６Ｚ，９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－６，９，１２－トリエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（ペンチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－３－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ）－ドコサ－１３－エン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ）－ドコサ－１３－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（９Ｚ）－ヘキサデカ－９－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｈ（１－メトイルオクチル）オキシ］－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－１－［（３，７－ジメチルオクチル）オキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（オクチルオキシ）－３－（｛８－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］オクチル｝オキシ）プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－｛［８－（２－オクチルシクロプロピル）オクチル］オキシ｝－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、および（１１Ｅ，２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１１，２０，２－トリエン－１０－アミン、またはそれらの薬学的に許容される塩もしくは立体異性体から選択されてもよい。

【０４９８】

一実施形態において、脂質は、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１２１７０８８９号に記載の脂質等の切断可能な脂質であってもよい。

【０４９９】

一実施形態において、カチオン性脂質は、当技術分野で既知の方法によって、かつ／または各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０４０１８４号、同第ＷＯ２０１１１５３１２０号、同第ＷＯ２０１１１４９７３３号、同第ＷＯ２０１１０９０９６５号、同第ＷＯ２０１１０４３９１３号、同第ＷＯ２０１１０２２４６０号、同第ＷＯ２０１２０６１２５９号、同第ＷＯ２０１２０５４３６５号、同第ＷＯ２０１２０４４６３８号、同第ＷＯ２０１００８０７２４号、および同第ＷＯ２０１０２１８６５号に記載されるように合成されてもよい。

【０５００】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡのＬＮＰ製剤は、３％脂質モル比でＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧを含有してもよい。別の実施形態において、ＬＮＰ製剤ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、１．

５％脂質モル比でＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧを含有してもよい。

【０５０１】

一実施形態において、薬学的の組成物ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１２０９９７５５号に記載のＰＥＧ化脂質のうちの少なくとも１つを含んでもよい。

【０５０２】

一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、ＰＥＧ－ＤＭＧ　２０００（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－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００）を含有してもよい。一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、当技術分野で既知のカチオン性脂質であるＰＥＧ－ＤＭＧ　２０００および少なくとも１つの他の構成成分を含有してもよい。別の実施形態において、ＬＮＰ製剤は、当技術分野で既知のカチオン性脂質であるＰＥＧ－ＤＭＧ　２０００、ＤＳＰＣ、およびコレステロールを含有してもよい。非限定的な例として、ＬＮＰ製剤は、ＰＥＧ－ＤＭＧ　２０００、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、およびコレステロールを含有してもよい。別の非限定的な例として、ＬＮＰ製剤は、２：４０：１０：４８のモル比で、ＰＥＧ－ＤＭＧ　２０００、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、およびコレステロールを含有してもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｅａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｏｎｖｉｒａｌ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　ｓｅｌｆ－ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ　ＲＮＡ　ｖａｃｃｉｎｅｓ，ＰＮＡＳ　２０１２；ＰＭＩＤ：２２９０８２９４を参照のこと）。別の非限定的な例として、本明細書に記載の修飾ＲＮＡは、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２０１２０２０７８４５号に記載されるように、非経口経路によって送達されるナノ粒子中に製剤化されてもよい。

一実施形態において、ＬＮＰ製剤は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１１２７２５５号または同第ＷＯ２００８１０３２７６号に記載の方法によって製剤化されてもよい。非限定的な例として、本明細書に記載の修飾ＲＮＡは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１１１２７２５５号および／または同第ＷＯ２００８１０３２７６号に記載されるように、ＬＮＰ製剤中にカプセル封入されてもよい。

一実施形態において、本明細書に記載のＬＮＰ製剤は、ポリカチオン性組成物を含んでもよい。非限定的な例として、ポリカチオン性組成物は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第ＵＳ２００５０２２２０６４号の式１～６０から選択されてもよい。別の実施形態において、ポリカチオン性組成物を含むＬＮＰ製剤は、本明細書に記載の修飾ＲＮＡのインビボおよび／またはインビトロでの送達に使用されてもよい。

【０５０３】

一実施形態において、本明細書に記載のＬＮＰ製剤は、透過性促進剤分子をさらに含んでもよい。非限定的な透過性促進剤分子は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第ＵＳ２００５０２２２０６４号に記載されている。

【０５０４】

一実施形態において、薬学的組成物は、ＤｉＬａ２リポソーム（Ｍａｒｉｎａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ）、ＳＭＡＲＴＩＣＬＥＳ（登録商標）（Ｍａｒｉｎａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ）、中性ＤＯＰＣ（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）系リポソーム（例えば、卵巣癌に対するｓｉＲＮＡ送達（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｌａｎｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｙ　２００６　５（１２）１７０８－１７１３））、およびヒアルロナンコーティングリポソーム（Ｑｕｉｅｔ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｓｒａｅｌ）等であるが、これらに限定されないリポソーム中に製剤化されてもよい。

【０５０５】

ナノ粒子製剤は、炭水化物担体および修飾核酸分子（例えば、ｍｍＲＮＡ）を含む、炭水化物ナノ粒子であってもよい。非限定的な例として、炭水化物担体は、無水物で修飾された植物グリコーゲンまたはグリコーゲン型材料、植物グリコーゲン（ｐｈｔｏｇｌｙｃ

ｏｇｅｎ）オクテニルコハク酸塩、植物グリコーゲンβ－デキストリン、無水物で修飾された植物グリコーゲンβ－デキストリンを含んでもよいが、これらに限定されない。（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２１０９１２１号を参照のこと）。

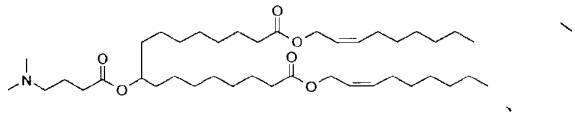
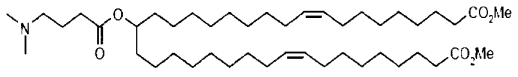
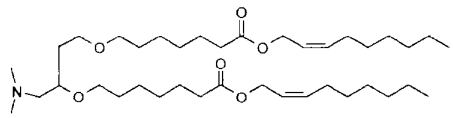
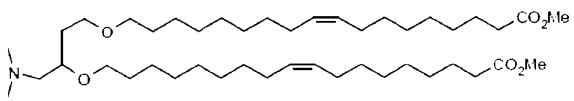
【０５０６】

脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質を、急速排出（ｒａｐｉｄｌｙ　ｅｌｉｍｉｎａｔｅｄ）脂質ナノ粒子（ｒｅＬＮＰ）として知られている生分解性カチオン性脂質と置き換えることによって改善されてもよい。ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、およびＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ等であるが、これらに限定されない、イオン化できるカチオン性脂質は、時間とともに血漿および組織中に蓄積することが示されてきており、潜在的な毒性の源であり得る。急速排出脂質の急速な代謝は、ラットにおいて１ｍｇ／ｋｇ用量～１０ｍｇ／ｋｇ用量の１桁分、脂質ナノ粒子の耐性および治療指数を改善することができる。酵素的に分解されるエステル結合の組み込みは、ｒｅＬＮＰ製剤の活性を依然として維持しながら、カチオン性構成成分の分解および代謝プロファイルを改善することができる。エステル結合は、脂質鎖の内部に位置することができるか、またはそれは、脂質鎖の末端において末端に位置してもよい。内部エステル結合は、脂質鎖内の任意の炭素を置き換えてもよい。

【０５０７】

一実施形態において、内部エステル結合は、飽和炭素のいずれの側に位置してもよい。ｒｅＬＮＰの非限定的な例としては、

【化７３】


、

、

および


が挙げられる。

【０５０８】

一実施形態において、免疫応答が、ナノ化学種、ポリマー、および免疫原を含み得る脂質ナノ粒子を送達することによって、誘発され得る。（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０１８９７００号および国際公開第ＷＯ２０１２０９９８０５号）。ポリマーは、ナノ化学種をカプセル封入しても、ナノ化学種を部分的にカプセル封入してもよい。免疫原は、本明細書に記載の組換えタンパク質、修飾ＲＮＡ、および／または一次構築物であってもよい。一実施形態において、脂質ナノ粒子は、病原体に対するもの等であるが、これらに限定されないワクチンにおいて使用するために製剤化されてもよい。

【０５０９】

脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子が粘膜関門を透過するように、粒子の表面特性を変化させるように操作されてもよい。粘液は、口腔（例えば、周口膜および食道膜ならびに扁桃組織）、眼、胃腸（例えば、胃、小腸、大腸、結腸、直腸）、鼻、呼吸器（例えば、経鼻、咽頭、気管、および気管支膜）、生殖器（例えば、膣内、子宮頚部、および尿道膜）上に位置する粘膜組織等であるが、これらに限定されない。より高い薬物カプセル封入効率

および幅広い薬物の持続送達を提供する能力のために好ましい１０～２００ｎｍよりも大きいナノ粒子、は、粘膜関門を通って急速に拡散するには大きすぎると考えられている。粘液は、継続的に分泌され、脱落し、破棄されるかまたは消化され、再生されるため、捕捉された粒子のほとんどは、数秒または数時間以内に粘膜（ｍｕｃｏｓｌａ）組織から除去され得る。低分子量ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）で密にコーティングされた大きいポリマーナノ粒子（直径２００ｎｍ～５００ｎｍ）は、水中で拡散している同じ粒子よりもわずか４～６倍低く、粘液を通って拡散した（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｌａｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２００７　１０４（５）：１４８２－４８７、Ｌａｉ　ｅｔ　ａｌ．Ａｄｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ　Ｒｅｖ．２００９　６１（２）：１５８－１７１）。ナノ粒子の輸送は、蛍光退色後回復測定（ＦＲＡＰ）および高解像度多数粒子追跡（ＭＰＴ）を含むが、これらに限定されない、透過速度および／または蛍光顕微鏡技法を用いて決定され得る。非限定的な例として、粘膜関門を透過し得る組成物は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，２４１，６７０号に記載されるように作製されてもよい。

【０５１０】

粘液を透過するように操作された脂質ナノ粒子は、ポリマー材料（すなわちポリマーコア）および／またはポリマー－ビタミン複合体および／またはトリブロックコポリマーを含んでもよい。ポリマー材料には、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリ尿素、ポリカーボネート、ポリ（スチレン）、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、およびポリアリレートが含まれてもよいが、これらに限定されない。ポリマー材料は、生分解性および／または生体適合性であってもよい。ポリマー材料は、さらに照射されてもよい。非限定的な例として、ポリマー材料は、γ照射されてもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際出願第ＷＯ２０１２８２１６５号を参照のこと）。具体的なポリマーの非限定的な例としては、ポリ（カプロラクトン）（ＰＣＬ）、エチレン酢酸ビニルポリマー（ＥＶＡ）、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）、ポリ（Ｌ－乳酸）（ＰＬＬＡ）、ポリ（グリコール酸）（ＰＧＡ）、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、ポリ（Ｌ－乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＬＧＡ）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド）（ＰＤＬＡ）、ポリ（Ｌ－ラクチド）（ＰＬＬＡ）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン－ｃｏ－グリコリド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－ＰＥＯ－ｃｏ－Ｄ，Ｌ－ラクチド）、ポリ（Ｄ，Ｌ－ラクチド－ｃｏ－ＰＰＯ－ｃｏ－Ｄ，Ｌ－ラクチド）、ポリアルキルシアノアクリレート（ａｃｒａｌａｔｅ）、ポリウレタン、ポリ－Ｌ－リジン（ＰＬＬ）、ヒドロキシプロピルメタクリレート（ＨＰＭＡ）、ポリエチレングリコール、ポリ－Ｌ－グルタミン酸、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリ（エステルアミド）、ポリアミド、ポリ（エステルエーテル）、ポリカーボネート、ポリエチレンおよびポリプロピレン等のポリアルキレン、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）、ポリアルキレンオキシド（ＰＥＯ）等のポリアルキレングリコール、ポリ（エチレンテレフタレート）等のポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリビニルエーテル、ポリ（酢酸ビニル）等のポリビニルエステル、ポリ（塩化ビニル）（ＰＶＣ）等のハロゲン化ポリビニル、ポリビニルピロリドン、ポリシロキサン、ポリスチレン（ＰＳ）、ポリウレタン、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース等の誘導体化セルロース、ポリ（メチル（メタ）アクリレート）（ＰＭＭＡ）、ポリ（エチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソブチル（メタ）アクリレート）、ポリ（ヘキシル（メタ）アクリレート）、ポリ（イソデシル（メタ）アクリレート）、ポリ（ラウリル（メタ）アクリレート）、ポリ（フェニル（メタ）アクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）等の

アクリル酸のポリマー、ならびにそのコポリマーおよび混合物、ポリジオキサノンおよびそのコポリマー、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリプロピレンフマル酸塩、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポリ（オルト）エステル、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－カプロラクトン）、およびトリメチレンカーボネート、ポリビニルピロリドンが挙げられる。脂質ナノ粒子は、ブロックコポリマー（参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１３０１２４７６号に記載の分岐状ポリエーテル－ポリアミドブロックコポリマー等）、および（ポリ（エチレングリコール）－（ポリ（プロピレンオキシド）－（ポリ（エチレングリコール）トリブロックコポリマー（例えば、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０１２１７１８号および米国公開２０１００００３３３７号ならびに米国特許第８，２６３，６６５号を参照のこと）等であるが、これらに限定されない、コポリマーでコーティングされるか、またはそれと会合されてもよい。コポリマーは、一般に安全と認められる（ＧＲＡＳ）ポリマーであってもよく、脂質ナノ粒子の形成は、新たな化学実体が何ら作り出されないような方式であってもよい。例えば、脂質ナノ粒子は、新たな化学実体を形成することなく、依然としてヒト粘液に急速に透過可能である、ポロキサマーコーティングＰＬＧＡナノ粒子を含んでもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２０１１　５０：２５９７－２６００）。

【０５１１】

ポリマー－ビタミン複合体のビタミンは、ビタミンＥであってもよい。この複合体のビタミン部分は、ビタミンＡ、ビタミンＥ、他のビタミン、コレステロール、他の界面活性剤の疎水性部分または疎水性構成成分（例えば、ステロール鎖、脂肪酸、炭化水素鎖、およびアルキレンオキシド鎖）等であるが、これらに限定されない他の好適な構成成分で置換されてもよい。

【０５１２】

粘液に透過するように操作された脂質ナノ粒子には、ｍｍＲＮＡ、アニオン性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、ジメチルジオクタデシル－アンモニウムブドミド等の、例えば、カチオン性界面活性剤）、糖または糖誘導体（例えば、シクロデキストリン）、核酸、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレングリコール、およびポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、Ｎ－アセチルシステイン、餅草、ブロメライ、パパイン、クレロデンドロン、アセチルシステイン、ブロムヘキシン、カルボシステイン、エプラジノン、メスナ、アンブロキソール、ソブレロール、ドミオドール、レトステイン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、サイモシンβ４ドルナーゼα、ネルテネキシン、エルドステイン）、およびｒｈＤＮａｓｅを含む種々のＤＮａｓｅ等であるが、これらに限定されない表面変質剤が含まれてもよい。表面変質薬剤は、粒子の表面に包埋されるもしくは絡ませられるか、または脂質ナノ粒子の表面上に（例えば、コーティング、吸着、共有結合、または他のプロセスによって）配置されてもよい。（例えば、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開２０１００２１５５８０号および米国公開２００８０１６６４１４号を参照のこと）。

【０５１３】

粘液透過性脂質ナノ粒子は、本明細書に記載の少なくとも１つのｍｍＲＮＡを含んでもよい。ｍｍＲＮＡは、脂質ナノ粒子中にカプセル封入され、かつ／または粒子の表面上に配置されてもよい。ｍｍＲＮＡは、脂質ナノ粒子に共有結合されてもよい。粘液透過性脂質ナノ粒子の製剤は、複数のナノ粒子を含んでもよい。さらに、製剤は、粘液と相互作用し、周囲の粘液の構造特性および／または付着特性を、粘膜付着を減少させるように変質させ得、それにより粘液透過性脂質ナノ粒子の粘膜組織への送達を増加させ得る、粒子を含有してもよい。

【０５１４】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、制限なく、Ｓｉｌｅｎｃｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｌｏｎｄｏｎ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇ

ｄｏｍ）によるＡＴＵＰＬＥＸ（商標）系、ＤＡＣＣ系、ＤＢＴＣ系、および他のｓｉＲＮＡ－リポプレックス技術、ＳＴＥＭＧＥＮＴ（登録商標）（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）によるＳＴＥＭＦＥＣＴ（商標）、ならびにポリエチレンイミン（ＰＥＩ）またはプロタミンベースの標的を定めたおよび標的を定めない核酸送達等の、リポプレックスとして製剤化される（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｌｅｋｕ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００８ ６８：９７８８－９７９８、Ｓｔｒｕｍｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ２０１２ ５０：７６－７８、Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１２２２－１２３４、Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１３６０－１３７０、Ｇｕｔｂｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｕｌｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１０ ２３：３３４－３４４、Ｋａｕｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ Ｒｅｓ ２０１０ ８０：２８６－２９３Ｗｅｉｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９ ３２：４９８－５０７、Ｗｅｉｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８ ３１：１８０－１８８、Ｐａｓｃｏｌｏ Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．４：１２８５－１２９４、Ｆｏｔｉｎ－Ｍｌｅｃｚｅｋ ｅｔ ａｌ．，２０１１ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３４：１－１５、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５，２３：７０９－７１７、Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ ６；１０４：４０９５－４１００、ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓＨｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２）。

【０５１５】

一実施形態において、そのような製剤は、それらが受動的または能動的に、肝細胞、免疫細胞、腫瘍細胞、内皮細胞、抗原提示細胞、および白血球を含むが、これらに限定されない異なる細胞型をインビボで指向するようにも構築され得るか、または組成を変化し得る（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：７０９－７１７、Ｊｕｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００９ １１９：６６１－６７３、Ｋａｕｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ Ｒｅｓ ２０１０ ８０：２８６－２９３、Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１２２２－１２３４、Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１３６０－１３７０、Ｇｕｔｂｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｕｌｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１０ ２３：３３４－３４４、Ｂａｓｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１１ １９：２１８６－２２００、Ｆｅｎｓｋｅ ａｎｄ Ｃｕｌｌｉｓ，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２００８ ５：２５－４４、Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００８ ３１９：６２７－６３０、Ｐｅｅｒ ａｎｄ Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１ １８：１１２７－１１３３）。肝臓細胞に対する製剤の受動的な標的化の一例としては、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、およびＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡベースの脂質ナノ粒子製剤が挙げられ、それらはアポリポタンパク質Ｅに結合し、インビボでこれらの製剤の結合および肝細胞中への取り込みを促進することが示されている（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４）。製剤は、葉酸塩、トランスフェリン、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）、および抗体で標的を定めるアプローチにより例として示されるが、これらによって限定されない、それらの表面上の異なるリガンドの発現を介して選択的に標的を定めることもできる（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｋｏｌｈａｔｋａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１ ８：１９７－２０６、Ｍｕｓａｃｃｈｉｏ ａｎｄ Ｔｏｒｃｈｉｌｉｎ，Ｆｒｏｎｔ Ｂｉｏｓｃｉ．２０１１ １６：１３８８－１４１２、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｍｅｍｂｒ Ｂｉｏｌ．２０１０ ２７：２８６－２９８、Ｐａｔｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｔｈｅｒ

Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．２００８ ２５：１－６１、Ｂｅｎｏｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１ １２：２７０８－２７１４、Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２００８ ５：３０９－３１９、Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４、Ｓｒｉｎｉｖａｓａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ８２０：１０５－１１６、Ｂｅｎ－Ａｒｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ７５７：４９７－５０７、Ｐｅｅｒ ２０１０ Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２０：６３－６８、Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：４０９５－４１００、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１１ ７２１：３３９－３５３、Ｓｕｂｒａｍａｎｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：２０２８－２０３７、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：７０９－７１７、Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００８ ３１９：６２７－６３０、Ｐｅｅｒ ａｎｄ Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１ １８：１１２７－１１３３）。

【０５１６】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、固体脂質ナノ粒子として製剤化される。固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）は、平均直径が１０～１０００ｎｍの球状であり得る。ＳＬＮは、親油性分子を可溶化することができ、界面活性剤および／または乳化剤により安定化され得る、固体脂質コアマトリックスを有する。さらなる実施形態において、脂質ナノ粒子は、自己集合性脂質－ポリマーナノ粒子であってもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ，２００８，２（８），ｐｐ １６９６－１７０２を参照のこと）。

【０５１７】

リポソーム、リポプレックス、または脂質ナノ粒子は、これらの製剤が、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡによる細胞トランスフェクションを増加させ、かつ／またはコードされたタンパク質の翻訳を増加させることが可能であり得るため、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの指示によるタンパク質産生の有効性を改善するために使用されてもよい。１つのそのような例は、ポリプレックスプラスミドＤＮＡの有効な全身送達を可能にするための脂質カプセル封入の使用を伴う（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｈｅｙｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００７ １５：７１３－７２０）。リポソーム、リポプレックス、または脂質ナノ粒子は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの安定性を増加させるためにも使用され得る。

【０５１８】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、制御放出および／または標的を定めた送達のために製剤化することができる。本明細書で使用されるとき、「制御放出」は、特定の放出パターンに適合して治療成果をもたらす、薬学的組成物または化合物放出プロファイルを指す。一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、制御放出および／または標的を定めた送達のために、本明細書に記載され、かつ／または当技術分野で既知の送達剤中にカプセル封入されてもよい。本明細書で使用されるとき、「カプセル封入」という用語は、封入する、包囲する、または包み込むことを意味する。それが本発明の化合物の製剤に関するとき、カプセル封入は、実質的、完全、または部分的であってもよい。「実質的にカプセル封入される」という用語は、本発明の薬学的組成物または化合物の少なくとも５０％超、６０％超、７０％超、８０％超、８５％超、９０％超、９５％超、９６％超、９７％超、９８％超、９９％超、９９．９％超、９９．９％超、または９９．９９９％超が、送達剤内に封入される、包囲される、または包み込まれることを意味する。「部分的カプセル封入」は、本発明の薬学的組成物または化合物の１０未満、１０、２０、３０、４０、５０以下が、送達剤内に封入される、包囲される、または包み込まれることを意味する。有

利なことに、カプセル封入は、蛍光および／または電子顕微鏡写真を用いて、本発明の薬学的組成物または化合物の脱出または活性を測定することによって決定されてもよい。例えば、本発明の薬学的組成物または化合物の少なくとも１、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、９９．９、９９．９９、または９９．９９％超が、送達剤中にカプセル封入される。

【０５１９】

一実施形態において、制御放出製剤は、トリブロックコポリマーを含んでもよいが、これらに限定されない。非限定的な例として、製剤は、２つの異なる種類のトリブロックコポリマーを含んでもよい（各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２１３１１０４号および同第ＷＯ２０１２１３１１０６号）。

【０５２０】

別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、脂質ナノ粒子または急速排出脂質ナノ粒子中にカプセル封入されてもよく、脂質ナノ粒子または急速排出脂質ナノ粒子は次いで、本明細書に記載され、かつ／または当技術分野で既知のポリマー、ヒドロゲル、および／または手術用シーリング材中にカプセル封入されてもよい。非限定的な例として、ポリマー、ヒドロゲル、または手術用シーリング材は、ＰＬＧＡ、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡｃ）、ポロキサマー、ＧＥＬＳＩＴＥ（登録商標）（Ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．Ａｌａｃｈｕａ，ＦＬ）、ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）（Ｈａｌｏｚｙｍｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ　ＣＡ）、フィブリノーゲンポリマー（Ｅｔｈｉｃｏｎ　Ｉｎｃ．Ｃｏｒｎｅｌｉａ、ＧＡ）、ＴＩＳＳＥＬＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｉｎｃ　Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ、ＩＬ）、ＰＥＧベースのシーリング材、およびＣＯＳＥＡＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ　Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）等の手術用シーリング材であってもよい。

【０５２１】

別の実施形態において、脂質ナノ粒子は、対象に注入されるとゲルを形成し得る、当技術分野で既知の任意のポリマー中にカプセル封入されてもよい。別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、生分解性であり得るポリマーマトリックス中にカプセル封入されてもよい。

【０５２２】

一実施形態において、制御放出および／または標的を定めた送達のためのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ製剤は、少なくとも１つの制御放出コーティング剤も含んでもよい。制御放出コーティング剤には、ＯＰＡＤＲＹ（登録商標）、ポリビニルピロリドン／酢酸ビニルコポリマー、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ＥＵＤＲＡＧＩＴ　ＲＬ（登録商標）、ＥＵＤＲＡＧＩＴ　ＲＳ（登録商標）、およびエチルセルロース水性分散液（ＡＱＵＡＣＯＡＴ（登録商標）およびＳＵＲＥＬＥＡＳＥ（登録商標））等のセルロース誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【０５２３】

一実施形態において、制御放出および／または標的を定めた送達製剤は、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも１つの分解性ポリエステルを含んでもよい。分解性（Ｄｅｇｒａｄｅａｂｌｅ）ポリエステルには、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リジン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態において、分解性ポリエステルは、ＰＥＧ化ポリマーを形成するためのＰＥＧ複合体化を含んでもよい。

【０５２４】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、治療的ナノ粒子中にカプセル封入されてもよい。治療的ナノ粒子は、本明細書に記載の方法、ならびに各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１０００５７４０号、同第ＷＯ２０１００３０７６３号、同第ＷＯ２０１０

００５７２１号、同第ＷＯ２０１０００５７２３号、同第ＷＯ２０１２０５４９２３号、米国公開第第ＵＳ２０１１０２６２４９１号、同第ＵＳ２０１００１０４６４５号、同第ＵＳ２０１０００８７３３７号、同第ＵＳ２０１０００６８２８５号、同第ＵＳ２０１１０２７４７５９号、同第ＵＳ２０１０００６８２８６号、および同第ＵＳ２０１２０２８８５４１、ならびに米国特許第８，２０６，７４７号、同第８，２９３，２７６号、同第８，３１８，２０８号、および同第８，３１８，２１１号等であるが、これらに限定されない当技術分野で既知の方法によって製剤化されてもよい。別の実施形態において、治療的ポリマーナノ粒子は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第ＵＳ２０１２０１４０７９０号に記載の方法によって特定されてもよい。

【０５２５】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、持続放出のために製剤化されてもよい。本明細書で使用されるとき、「持続放出」は、特定の一定期間にわたる放出速度に適合する薬学的組成物または化合物を指す。一定期間は、数時間、数日間、数週間、数ヶ月間、および数年間を含んでもよいが、これらに限定されない。非限定的な例として、持続放出ナノ粒子は、ポリマー、ならびに本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ等であるが、それらに限定されない治療剤を含んでもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１００７５０７２号、ならびに米国公開第ＵＳ２０１００２１６８０４号、同第ＵＳ２０１１０２１７３７７号、および同第ＵＳ２０１２０２０１８５９号を参照のこと）。

【０５２６】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、標的特異的となるように製剤化されてもよい。非限定的な例として、治療的（ｔｈｅｒｅａｐｅｕｔｉｃ）ナノ粒子は、コルチコステロイドを含んでもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１０８４５１８号を参照のこと）。一実施形態において、治療的ナノ粒子は、癌特異的となるように製剤化されてもよい。非限定的な例として、治療的ナノ粒子は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００８１２１９４９号、同第ＷＯ２０１０００５７２６号、同第ＷＯ２０１０００５７２５号、同第ＷＯ２０１１０８４５２１号、ならびに米国公開第ＵＳ２０１０００６９４２６号、同第ＵＳ２０１２０００４２９３号、および同第ＵＳ２０１００１０４６５５号に記載のナノ粒子に製剤化されてもよい。

【０５２７】

一実施形態において、本発明のナノ粒子は、ポリマーマトリックスを含んでもよい。非限定的な例として、ナノ粒子は、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート（ｆｕｍｅｒａｔｅ）、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リジン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）またはこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されない２つ以上のポリマーを含んでもよい。

【０５２８】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、ジブロックコポリマーを含む。一実施形態において、ジブロックコポリマーには、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート（ｆｕｍｅｒａｔｅ）、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リジン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）

またはこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されないポリマーと組み合わせたＰＥＧが含まれてもよい。

【０５２９】

非限定的な例として、治療的ナノ粒子は、ＰＬＧＡ－ＰＥＧブロックコポリマーを含む（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第ＵＳ２０１２００４２９３号および米国特許第８，２３６，３３０号を参照のこと）。別の非限定的な例において、治療的ナノ粒子は、ＰＥＧとＰＬＡまたはＰＥＧとＰＬＧＡのジブロックコポリマーを含む、ステルスナノ粒子である（各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２４６，９６８号および国際公開第ＷＯ２０１２１６６９２３号を参照のこと）。

【０５３０】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、マルチブロックコポリマーを含んでもよい（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２６３，６６５号および同第８，２８７，９１０号を参照のこと）。

【０５３１】

一実施形態において、本明細書に記載のブロックコポリマーは、非ポリマーミセルおよびブロックコポリマーを含む、ポリイオン複合体に含まれてもよい。（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２００７６８３６号を参照のこと）。

【０５３２】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、少なくとも１つのアクリルポリマーを含んでもよい。アクリルポリマーには、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸とのコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレート、ならびにこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０５３３】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、本明細書に記載され、かつ／または当技術分野で既知の少なくとも１つのカチオン性ポリマーを含んでもよい。

【０５３４】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ（アミドアミン）デンドリマー、ポリ（β－アミノエステル）（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２８７，８４９号を参照のこと）、およびこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されない少なくとも１つのアミン含有ポリマーを含んでもよい。

【０５３５】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも１つの分解性ポリエステルを含んでもよい。分解性（Ｄｅｇｒａｄｅａｂｌｅ）ポリエステルには、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リジン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態において、分解性ポリエステルは、ＰＥＧ化ポリマーを形成するためのＰＥＧ複合体化を含んでもよい。

【０５３６】

別の実施形態において、治療的ナノ粒子は、少なくとも１つの標的化リガンドの複合体化を含んでもよい。標的化リガンドは、モノクローナル抗体等であるが、これらに限定されない、当技術分野で既知の任意のリガンドであってもよい。（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｋｉｒｐｏｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２００６　６６：６７３２－６７４０）。

【０５３７】

一実施形態において、治療的ナノ粒子は、水溶液中で製剤化されてもよく、それを用い

て癌を標的としてもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１０８４５１３号および米国公開第ＵＳ２０１１０２９４７１７号を参照のこと）。

【０５３８】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、合成ナノ担体中にカプセル封入され、それと連結され、かつ／またはそれと会合されてもよい。合成ナノ担体には、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１０００５７４０号、同第ＷＯ２０１００３０７６３号、同第ＷＯ２０１２１３５０１号、同第ＷＯ２０１２１４９２５２号、同第ＷＯ２０１２１４９２５５号、同第ＷＯ２０１２１４９２５９号、同第ＷＯ２０１２１４９２６５号、同第ＷＯ２０１２１４９２６８号、同第ＷＯ２０１２１４９２８２号、同第ＷＯ２０１２１４９３０１号、同第ＷＯ２０１２１４９３９３号、同第ＷＯ２０１２１４９４０５号、同第ＷＯ２０１２１４９４１１号、同第ＷＯ２０１２１４９４５４号、および同第ＷＯ２０１３０１９６６９号、ならびに米国公開第ＵＳ２０１１０２６２４９１号、同第ＵＳ２０１００１０４６４５号、同第ＵＳ２０１０００８７３３７号、および同第ＵＳ２０１２０２４４２２２号に記載の合成ナノ担体が含まれるが、これらに限定されない。合成ナノ担体は、当技術分野で既知のおよび／または本明細書に記載の方法を用いて製剤化され得る。非限定的な例として、合成ナノ担体は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１０００５７４０号、同第ＷＯ２０１００３０７６３号、および同第ＷＯ２０１２１３５０１号、ならびに米国公開第ＵＳ２０１１０２６２４９１号、同第ＵＳ２０１００１０４６４５号、同第ＵＳ２０１０００８７３３７号、および同第ＵＳ２０１２０２４４２２２号に記載の方法によって製剤化され得る。別の実施形態において、合成ナノ担体製剤は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１０７２２１８号および米国特許第８，２１１，４７３号に記載の方法によって凍結乾燥させ得る。

【０５３９】

一実施形態において、合成ナノ担体は、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを放出するための反応性基を含有してもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０９５２５５２号および米国公開第ＵＳ２０１２０１７１２２９号を参照のこと）。

【０５４０】

一実施形態において、合成ナノ担体は、合成ナノ担体の送達による免疫応答を向上させるための免疫刺激性薬剤を含有してもよい。非限定的な例として、合成ナノ担体は、免疫系のＴｈ１ベースの応答を向上させ得るＴｈ１免疫刺激性薬剤を含んでもよい（各々が参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１０１２３５６９号および米国公開第ＵＳ２０１１０２２３２０１号を参照のこと）。

【０５４１】

一実施形態において、合成ナノ担体は、標的を定めた放出のために製剤化されてもよい。一実施形態において、合成ナノ担体は、指定されるｐＨで、かつ／または所望の時間間隔の後にポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを放出するように製剤化される。非限定的な例として、合成ナノ粒子は、２４時間後にかつ／または４．５のｐＨでポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを放出するように製剤化されてもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１０１３８１９３号、および同第ＷＯ２０１０１３８１９４号、ならびに米国公開第ＵＳ２０１１００２０３８８号、および同第ＵＳ２０１１００２７２１７号を参照のこと）。

【０５４２】

一実施形態において、合成ナノ担体は、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡの制御放出および／または持続放出のために製剤化されてもよい。非限定的な例として、持続放出のための合成ナノ担体は、当技術分野で既知であ

り、本明細書に記載され、かつ／または各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１０１３８１９２および米国公開第２０１００３０３８５０号に記載の方法によって製剤化されてもよい。

【０５４３】

一実施形態において、合成ナノ担体は、ワクチンとして使用するために製剤化されてもよい。一実施形態において、合成ナノ担体は、少なくとも１つの抗原をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡをカプセル封入してもよい。非限定的な例として、合成ナノ担体は、少なくとも１つの抗原およびワクチン剤形のため賦形剤を含んでもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１１５０２６４号および米国公開第ＵＳ２０１１０２９３７２３号を参照のこと）。別の非限定的な例として、ワクチン剤形が、同じまたは異なる抗原を有する少なくとも２つの合成ナノ担体、および賦形剤を含んでもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１１５０２４９号および米国公開第ＵＳ２０１１０２９３７０１号を参照のこと）。ワクチン剤形は、本明細書に記載され、当技術分野で既知であり、かつ／または各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１１５０２５８号および米国公開第ＵＳ２０１２００２７８０６号に記載の方法によって、選択されてもよい。

【０５４４】

一実施形態において、合成ナノ担体は、少なくとも１つのアジュバントをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを含んでもよい。非限定的な例として、アジュバントは、ジメチルジオクタデシルアンモニウム－ブロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウム－クロリド、ジメチルジオクタデシルアンモニウム－リン酸塩、またはジメチルジオクタデシルアンモニウム－酢酸塩（ＤＤＡ）、およびマイコバクテリウム属の総脂質抽出物の無極性画分または該無極性画分の一部を含んでもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２４１，６１０号を参照のこと）。別の実施形態において、合成ナノ担体は、少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡ、ならびにアジュバントを含んでもよい。非限定的な例として、アジュバントを含む合成ナノ担体は、各々が参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１１５０２４０号および米国公開第ＵＳ２０１１０２９３７００号に記載の方法によって製剤化されてもよい。

【０５４５】

一実施形態において、合成ナノ担体は、ウイルス由来のペプチド、断片、または領域をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡをカプセル封入してもよい。非限定的な例として、合成ナノ担体には、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０２４６２１号、同第ＷＯ２０１２０２６２９号、同第ＷＯ２０１２０２４６３２号、ならびに米国公開第ＵＳ２０１２００６４１１０号、同第ＵＳ２０１２００５８１５３号、および同第ＵＳ２０１２００５８１５４号に記載のナノ担体が含まれるが、これらに限定されない。

【０５４６】

一実施形態において、合成ナノ担体は、体液性応答および／または細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答を触発することが可能であり得るポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに連結されてもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１３０１９６６９号を参照のこと）。

【０５４７】

一実施形態において、ナノ粒子は、経口投与のために最適化されてもよい。ナノ粒子は、キトサンまたはその誘導体等であるが、これらに限定されない少なくとも１つのカチオン性バイオポリマーを含んでもよい。非限定的な例として、ナノ粒子は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０２８２３４３号に記載の方法によって製剤化されてもよい。

【０５４８】

ポリマー、生分解性ナノ粒子、およびコアーシェルナノ粒子

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、天然および／または合成ポリマーを用いて製剤化することができる。送達に使用され得るポリマーの非限定的な例としては、ＭＩＲＵＳ（登録商標）Ｂｉｏ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）およびＲｏｃｈｅ Ｍａｄｉｓｏｎ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）によるＤＹＮＡＭＩＣ ＰＯＬＹＣＯＮＪＵＧＡＴＥ（登録商標）（Ａｒｒｏｗｈｅａｄ Ｒｅａｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐ．，Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ）製剤、制限なく、ＳＭＡＲＴＴ ＰＯＬＹＭＥＲ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ（商標）（ＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標）、Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）等のＰＨＡＳＥＲＸ（商標）ポリマー製剤、ＤＭＲＩ／ＤＯＰＥ、ポロキサマー、Ｖｉｃａｌ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）によるＶＡＸＦＥＣＴＩＮ（登録商標）アジュバント、キトサン、Ｃａｌａｎｄｏ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ）によるシクロデキストリン、デンドリマーおよびポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）ポリマー、ＲＯＮＤＥＬ（商標）（ＲＮＡｉ／オリゴヌクレオチドナノ粒子送達）ポリマー（Ａｒｒｏｗｈｅａｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ）、ならびにＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標）（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）等であるが、これらに限定されないｐＨ応答性ブロックコポリマー（ｃｏ－ｂｌｏｃｋ ｐｏｌｙｍｅｒｓ）が挙げられる。

【０５４９】

キトサン製剤の非限定的な例としては、正電荷性のキトサンのコア、ならびに負電荷性の基質の外側部分が挙げられる（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０２５８１７６号）。キトサンには、Ｎ－トリメチルキトサン、モノ－Ｎ－カルボキシメチルキトサン（ＭＣＣ）、Ｎ－パルミトイルキトサン（ＮＰＣＳ）、ＥＤＴＡ－キトサン、低分子量キトサン、キトサン誘導体、またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０５５０】

一実施形態において、本発明において使用されるポリマーは、細菌等であるが、これらに限定されない望ましくない物質のポリマーの表面への結合を低減し、かつ／または阻害するためのプロセシングを経ている。ポリマーは、当技術分野で既知であり、かつ／または当技術分野で記載され、かつ／または参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２１５０４６７号に記載の方法によって処理されてもよい。

【０５５１】

ＰＬＧＡ製剤の非限定的な例としては、ＰＬＧＡ注入用デポーが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、ＰＬＧＡを、６６％のＮ－メチル－２－ピロリドン（ＮＭＰ）中に溶解させることによって形成され、残りの部分が水性溶媒およびロイプロリドである、ＥＬＩＧＡＲＤ（登録商標）。一旦注入されると、ＰＬＧＡおよびロイプロリドペプチドは、皮下腔に沈殿する）。

【０５５２】

これらのポリマーアプローチのうちの多くは、インビボでオリゴヌクレオチドを細胞の細胞質中に送達することにおいて有効性を実証している（参照により全体が本明細書に組み込まれる、ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２において概説される）。核酸（この実例では小分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を用いて）の強固なインビボ送達をもたらした２つのポリマーアプローチは、動的ポリ複合体（ｐｏｌｙｃｏｎｊｕｇａｔｅ）およびシクロデキストリンベースのナノ粒子である。これらの送達アプローチのうちの第１のアプローチは、動的ポリ複合体を使用し、マウスにおいてインビボでｓｉＲＮＡを有効に送達し、肝細胞内で内因性標的ｍＲＮＡをサイレンシングすることが示されている（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｏｚｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：１２９８２－１２８８７）。この特定のアプローチは、多成分ポリマー系であり、その主要な特長として、核酸（この実例ではｓｉＲＮＡ）がジスルフィド結合を介して共有結合され、ＰＥＧ（電荷遮蔽のため）基およびＮ－アセチルガラクトサミン（

肝細胞標的化のため）基の両方がｐＨ感受性結合を介して連結される、膜活性ポリマーが含まれる（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｏｚｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：１２９８２－１２８８７）。肝細胞に結合し、エンドソームに進入すると、ポリマー複合体は、低ｐＨ環境において解体し、このポリマーがその陽電荷を露出して、エンドソームからの脱出、およびポリマーから細胞質へのｓｉＲＮＡの放出をもたらす。Ｎ－アセチルガラクトサミン基の、マンノース基との置き換えを介して、アシアロ糖タンパク質受容体を発現する肝細胞から、類洞内皮細胞およびクッパー細胞へと標的合わせを変化させ得ることが示された。別のポリマーアプローチは、トランスフェリンを標的とするシクロデキストリン含有ポリカチオンナノ粒子を使用することを伴う。これらのナノ粒子は、トランスフェリン受容体を発現するユーイング肉腫腫瘍細胞において、ＥＷＳ－ＦＬＩ１遺伝子産物の標的を定めたサイレンシングを実証してきており（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｈｕ－Ｌｉｅｓｋｏｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００５ ６５：８９８４－８９８２）、これらのナノ粒子中に製剤化されたｓｉＲＮＡは、非ヒト霊長類において耐性が良好であった（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｈｅｉｄｅｌｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ２００７ １０４：５７１５－２１）。これらの送達戦略の両方は、標的を定めた送達機構およびエンドソームからの脱出機構の両方を用いた合理的なアプローチを組み込む。

【０５５３】

ポリマー製剤は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの持続放出または遅延放出を可能にし得る（例えば、筋肉内または皮下注入後に）。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡについての変化した放出プロファイルは、例えば、長期間にわたってコードされたタンパク質の翻訳をもたらすことができる。ポリマー製剤をまた使用して、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの安定性を増加させ得る。生分解性ポリマーが、ｍｍＲＮＡ以外の核酸を分解から保護するために以前に使用されており、インビボでペイロードの持続放出をもたらすことが示されている（各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｏｚｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：１２９８２－１２８８７、Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２０１０ ７：１４３３－１４４６、Ｃｏｎｖｅｒｔｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１０ Ｏｃｔ １、Ｃｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｃ Ｃｈｅｍ Ｒｅｓ．２０１２ Ｊａｎ １３、Ｍａｎｇａｎｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２０１２ ３３：２３０１－２３０９、Ｂｅｎｏｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１ １２：２７０８－２７１４、Ｓｉｎｇｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒ．２０１１ ２：１３３－１４７、ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２、Ｓｃｈａｆｆｅｒｔ ａｎｄ Ｗａｇｎｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １６：１１３１－１１３８、Ｃｈａｔｕｒｖｅｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２０１１ ８：１４５５－１４６８、Ｄａｖｉｓ、Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２００９ ６：６５９－６６８、Ｄａｖｉｓ，Ｎａｔｕｒｅ ２０１０ ４６４：１０６７－１０７０）。

【０５５４】

一実施形態において、薬学的組成物は、持続放出製剤であってもよい。さらなる実施形態において、持続放出製剤は、皮下送達のためであってもよい。持続放出製剤には、ＰＬＧＡミクロスフェア、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡｃ）、ポロキサマー、ＧＥＬＳＩＴＥ（登録商標）（Ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．Ａｌａｃｈｕａ，ＦＬ）、ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）（Ｈａｌｏｚｙｍｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ）、フィブリノーゲンポリマー（Ｅｔｈｉｃｏｎ Ｉｎｃ．Ｃｏｒｎｅｌｉａ，ＧＡ）、ＴＩＳＳＥＬＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）、ＰＥＧベースのシーリング材、およびＣＯ

ＳＥＡＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）等の手術用シーリング材が含まれ得る。

【０５５５】

非限定的な例として、修飾ｍＲＮＡは、調整可能な放出速度を有する（例えば、数日間および数週間）ＰＬＧＡミクロスフェアを調製し、修飾ｍＲＮＡを、カプセル封入プロセス中に修飾ｍＲＮＡの完全性を維持しながら、ＰＬＧＡミクロスフェア中にカプセル封入することによって、ＰＬＧＡミクロスフェア中に製剤化されてもよい。ＥＶＡｃは、前臨床の持続放出埋込物適用において広範に使用される、非生分解性（ｎｏｎ－ｂｉｏｄｅｇｒａｄｅａｂｌｅ）の、生体適合性ポリマーである（例えば、緑内障に対するピロカルピン眼内挿入物である持続放出製品Ｏｃｕｓｅｒｔまたは持続放出プロゲステロン子宮内器具であるＰｒｏｇｅｓｔａｓｅｒｔ；経皮送達系Ｔｅｓｔｏｄｅｒｍ、Ｄｕｒａｇｅｓｉｃ、およびＳｅｌｅｇｉｌｉｎｅ；カテーテル）。ポロキサマー Ｆ－４０７ ＮＦは、５℃未満の温度で低粘度を有する、親水性の非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレン－ポリオキシエチレンのトリブロックコポリマーであり、１５℃を超える温度で固体ゲルを形成する。ＰＥＧベースの手術用シーリング材は、１分間で調製することができ、３分間でシーリングし、３０日以内に再吸収される、送達デバイスにおいて混合された２つの合成ＰＥＧ構成成分を含む。ＧＥＬＳＩＴＥ（登録商標）および天然ポリマーは、投与部位におけるインサイツのゲル化が可能である。それらは、イオン性相互作用（ｉｎｅｒａｃｔｉｏｎ）を介してタンパク質およびペプチド治療候補と相互作用して、安定化効果を提供することが示されている。

【０５５６】

ポリマー製剤は、葉酸塩、トランスフェリン、およびＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）により例として示されるが、これらによって限定されない異なるリガンドの発現を介して選択的に標的を定めることもできる（各々が参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｂｅｎｏｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１ １２：２７０８－２７１４、Ｒｏｚｅｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ １０４：１２９８２－１２８８７、Ｄａｖｉｓ，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２００９ ６：６５９－６６８、Ｄａｖｉｓ，Ｎａｔｕｒｅ ２０１０ ４６４：１０６７－１０７０）。

【０５５７】

本発明の修飾核酸、およびｍｍＲＮＡは、ポリマー化合物とともにまたはポリマー化合物中に製剤化されてもよい。ポリマーには、ポリエテン（ｐｏｌｙｅｔｈｅｎｅｓ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（ｌ－リジン）（ＰＬＬ）、ＰＬＬにグラフトされたＰＥＧ、カチオン性リポポリマー、生分解性カチオン性リポポリマー、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、架橋分岐状ポリ（アルキレンイミン）、ポリアミン誘導体、修飾ポロキサマー、生分解性ポリマー、弾力のある生分解性ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルブロックランダムコポリマー、マルチブロックコポリマー、線状生分解性コポリマー、ポリ［α－（４－アミノブチル）－Ｌ－グリコール酸）（ＰＡＧＡ）、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー、ポリカーボネート、ポリ無水物、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート（ｆｕｍｅｒａｔｅ）、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリジン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リジン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）、アクリルポリマー、アミン含有ポリマー、デキストランポリマー、デキストランポリマー誘導体またはこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されない少なくとも１つのポリマーが含まれてもよい。

【０５５８】

非限定的な例として、本発明の修飾核酸またはｍｍＲＮＡは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第６，１７７，２７４号に記載のＰＬＬでグラフトされたＰＥＧのポリマー化合物とともに製剤化されてもよい。製剤は、インビトロで細胞をトランスフェクトするため、または修飾核酸およびｍｍＲＮＡのインビボ送達のために使用されてもよい。別の例において、修飾核酸およびｍｍＲＮＡは、カチオン性ポリマーを含む溶液もしくは媒体中に、乾燥した薬学的組成物中に、または各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２００９００４２８２９号および同第２００９００４２８２５号に記載の乾燥させることができる溶液中に懸濁させてもよい。

【０５５９】

別の非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ＰＬＧＡ－ＰＥＧブロックコポリマー（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第ＵＳ２０１２０００４２９３号および米国特許第８，２３６，３３０号を参照のこと）またはＰＬＧＡ－ＰＥＧ－ＰＬＧＡブロックコポリマー（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，００４，５７３号を参照のこと）とともに製剤化されてもよい。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ＰＥＧとＰＬＡまたはＰＥＧとＰＬＧＡのジブロックコポリマーとともに製剤化されてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２４６，９６８号を参照のこと）。

【０５６０】

ポリアミン誘導体を用いて、核酸を送達するか、または疾患を治療および／もしくは予防するか、または埋込型もしくは注入型デバイスに含めてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１００２６０８１７号）。非限定的な例として、薬学的組成物は、修飾核酸およびｍｍＲＮＡ、ならびに内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２０１００２６０８１７号に記載のポリアミン誘導体を含んでもよい。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、炭水化物ジアジドモノマーを、オリゴアミンを含むジルキン（ｄｉｌｋｙｎｅ）単位と組み合わせることによって調製される１，３－双極性付加ポリマーを含むポリマー等であるが、これらに限定されない、ポリアミドポリマーを用いて送達されてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２３６，２８０号）。

【０５６１】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１１１５８６２号、同第ＷＯ２０１２０８２５７４号、および同第ＷＯ２０１２０６８１８７号、ならびに米国公開第２０１２０２８３４２７号に記載の少なくとも１つのポリマーおよび／またはその誘導体とともに製剤化されてもよい。別の実施形態において、本発明の修飾核酸またはｍｍＲＮＡは、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１１１１５８６２号に記載の式Ｚのポリマーとともに製剤化されてもよい。さらに別の実施形態において、修飾核酸またはｍｍＲＮＡは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０８２５７４号または同第ＷＯ２０１２０６８１８７号および米国公開第２０１２０２８３４２号に記載の式Ｚ、Ｚ’、またはＺ’’のポリマーとともに製剤化されてもよい。本発明の修飾ＲＮＡとともに製剤化されるポリマーは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０８２５７４号または同第ＷＯ２０１２０６８１８７号に記載の方法によって合成されてもよい。

【０５６２】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１つのアクリルポリマーとともに製剤化されてもよい。アクリルポリマーには、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸とのコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、ポリシアノアクリレー

ト、ならびにこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０５６３】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの製剤は、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ（アミドアミン）デンドリマー、またはこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されない少なくとも１つのアミン含有ポリマーを含んでもよい。

【０５６４】

例えば、本発明の修飾核酸またはｍｍＲＮＡは、ポリ（アルキレンイミン）、生分解性カチオン性リポポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ポリマー、もしくは生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、生分解性ポリエステルランダムコポリマー、線状生分解性コポリマー、ＰＡＧＡ、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー、またはこれらの組み合わせを含む薬学的化合物中に製剤化されてもよい。生分解性カチオン性リポポリマーは、当技術分野で既知の方法、ならびに／または各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，６９６，０３８号、米国出願第２００３００７３６１９号、および同第２００４０１４２４７４号に記載の方法によって作製されてもよい。ポリ（アルキレンイミン）は、当技術分野で既知の方法、および／または参照により全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２０１００００４３１５号に記載の方法を用いて作製されてもよい。生分解性（ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂａｌｅ）ポリマー、生分解性ブロックコポリマー、生分解性ランダムコポリマー、生分解性ポリエステルブロックコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、または生分解性ポリエステルランダムコポリマーは、当技術分野で既知の方法、ならびに／または内容がそれぞれ参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，５１７，８６９号および同第６，２６７，９８７号に記載の方法を用いて作製されてもよい。線状生分解性コポリマーは、当技術分野で既知であり、かつ／または米国特許第６，６５２，８８６号に記載の方法を用いて作製されてもよい。ＰＡＧＡポリマーは、当技術分野で既知の方法、ならびに／または参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第６，２１７，９１２号に記載の方法を用いて作製されてもよい。ＰＡＧＡポリマーは、共重合して、ポリ－Ｌ－リジン、ポリアルギン（ｐｏｌｙａｒｇｉｎｅ）、ポリオルニチン、ヒストン、アビジン、プロタミン、ポリラクチド、およびポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）等であるが、これらに限定されないポリマーとともにコポリマーまたはブロックコポリマーを形成してもよい。生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマーは、当技術分野で既知の方法、ならびに／または各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，０５７，８２１もしくは米国公開第２０１２００９１４５号に記載の方法によって作製されてもよい。例えば、マルチブロックコポリマーは、分岐状ポリエチレンイミンと比較して明確に異なるパターンを有する線状ポリエチレンイミン（ＬＰＥＩ）ブロックを用いて合成されてもよい。さらに、組成物または薬学的組成物は、当技術分野で既知の方法、本明細書に記載の方法、または各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１００００４３１５号もしくは米国特許第６，２６７，９８７号および同第６，２１７，９１２号に記載の方法によって作製されてもよい。

【０５６５】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、ポリカチオン性側鎖を含有し得る少なくとも１つの分解性ポリエステルとともに製剤化されてもよい。分解性（Ｄｅｇｒａｄｅａｂｌｅ）ポリエステルには、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－Ｌ－リジン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態において、分解性ポリエステルは、ＰＥＧ化ポリマーを形成するためのＰＥＧ複合体化を含んでもよい。

【０５６６】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、ｍｍＲＮＡは、少なくとも１つの架橋性ポリエステルとともに製剤化されてもよい。架橋性ポリエステルは、当技術分野で既知であり、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２０１２０２６９７６１号に記載

の架橋性ポリエステルを含む。

【０５６７】

一実施形態において、本明細書に記載のポリマーは、脂質末端を有する（ｌｉｐｉｄ－ｔｅｒｍｉｎａｔｉｎｇ）ＰＥＧに複合体化されてもよい。非限定的な例として、ＰＬＧＡは、脂質末端を有するＰＥＧに複合体化されて、ＰＬＧＡ－ＤＳＰＥ－ＰＥＧを形成してもよい。別の非限定的な例として、本発明とともに使用するためのＰＥＧ複合体は、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２００８１０３２７６号に記載されている。ポリマーは、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，２７３，３６３号に記載の複合体等であるが、これらに限定されないリガンド複合体を用いて接合されてもよい。

【０５６８】

一実施形態において、本明細書に記載の修飾ＲＮＡは、別の化合物と複合体化されてもよい。複合体の非限定的な例は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，９６４，５７８号および同第７，８３３，９９２号に記載されている。別の実施形態において、本発明の修飾ＲＮＡは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，９６４，５７８号および同第７，８３３，９９２号に記載の式１～１２２の複合体と複合体化されてもよい。本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、金等であるが、これらに限定されない金属と複合体化されてもよい。（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｉｌｊｏｈａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｊｏｕｒｎ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２００９　１３１（６）：２０７２－２０７３を参照のこと）。別の実施形態において、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、金ナノ粒子中と複合体化および／またはカプセル封入されてもよい。（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２１６２６９号および米国公開第２０１２０３０２９４０号）。

【０５６９】

参照により全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２０１００００４３１３号に記載されるように、遺伝子送達組成物は、ヌクレオチド配列およびポロキサマーを含んでもよい。例えば、本発明（ｐｒｅｓｅｎｔ　ｉｎｖｅｉｔｉｏｎ）の修飾核酸およびｍｍＲＮＡは、米国公開第２０１００００４３１３号に記載のポロキサマーを含む遺伝子送達組成物において使用されてもよい。

【０５７０】

一実施形態において、本発明のポリマー製剤は、カチオン性担体を含み得るポリマー製剤を、コレステロール基およびポリエチレングリコール基に共有結合され得るカチオン性リポポリマーと接触させることによって、安定化されてもよい。ポリマー製剤は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国公開第２００９００４２８２９号に記載の方法を用いてカチオン性リポポリマーと接触させてもよい。カチオン性担体には、ポリエチレンイミン、ポリ（トリメチレンイミン）、ポリ（テトラメチレンイミン）、ポリプロピレンイミン、アミノグリコシド－ポリアミン、ジデオキシ－ジアミノ－ｂ－シクロデキストリン、スペルミン、スペルミジン、ポリ（２－ジメチルアミノ）エチルメタクリレート、ポリ（リジン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（アルギニン）、カチオン化ゼラチン、デンドリマー、キトサン、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、１－［２－（オレオイルオキシ）エチル］－２－オレイル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリニウムクロリド（ＤＯＴＩＭ）、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トリフルオロ酢酸塩（ＤＯＳＰＡ）、３Ｂ－［Ｎ-（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロール塩酸塩（ＤＣ－コレステロールＨＣｌ）ジヘプタデシルアミドグリシルスペルミジン（ＤＯＧＳ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（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ミド（ＤＭＲＩＥ）、Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチル塩化アンモニウムＤＯＤＡＣ）、およびこれらの組み合わせが含まれてもよいが、これらに限定されない。

【０５７１】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、１つ以上のポリマーのポリプレックス中に製剤化されてもよい（各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０２３７５６５号および同第２０１２０２７０９２７号）。一実施形態において、ポリプレックスは、２つ以上のカチオン性ポリマーを含む。カチオン性（ｃａｔｉｏｉｎｉｃ）ポリマーは、線状ＰＥＩ等のポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）を含んでもよい。

【０５７２】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、ポリマー、脂質、および／またはリン酸カルシウム等であるが、これらに限定されない他の生分解性薬剤の組み合わせを用いてナノ粒子として製剤化することもできる。構成成分は、ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡの送達が向上し得るようにナノ粒子の微調整を可能にするために、コアーシェル、ハイブリッド、および／または交互積層アーキテクチャとして組み合わされてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍａｔｅｒ．２００６ ５：７９１－７９６、Ｆｕｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２００８ ２９：１５２６－１５３２、ＤｅＫｏｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２０１１ ６３：７４８－７６１、Ｅｎｄｒｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２０１１ ３２：７７２１－７７３１、Ｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２０１１ Ｊｕｎ ６；８（３）：７７４－８７）。非限定的な例として、ナノ粒子は、親水性－疎水性ポリマー（例えば、ＰＥＧ－ＰＬＧＡ）、疎水性ポリマー（例えば、ＰＥＧ）、および／または親水性ポリマー等であるが、これらに限定されない複数のポリマーを含んでもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０２２５１２９号）。

【０５７３】

脂質および／またはポリマーと組み合わせた生分解性リン酸カルシウムナノ粒子は、インビボでポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを送達することが示されている。一実施形態において、アニスアミド等の標的化リガンドもまた含有し得る、脂質でコーティングされたリン酸カルシウムナノ粒子を用いて、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを送達してもよい。例えば、マウス転移性肺モデルにおいてｓｉＲＮＡを有効に送達するために、脂質でコーティングされたリン酸カルシウムナノ粒子が使用された（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２０１０ １４２：４１６－４２１、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２０１２ １５８：１０８－１１４、Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１２ ２０：６０９－６１５）。この送達系は、ｓｉＲＮＡの送達を改善するために、標的を定めたナノ粒子と、エンドソームからの脱出を向上させるための構成成分リン酸カルシウムとの両方を組み合わせる。

【０５７４】

一実施形態において、ＰＥＧ－ポリアニオンブロックコポリマーとともにリン酸カルシウムを用いて、ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを送達してもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｋａｚｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２００４ ９７：３４５－３５６、Ｋａｚｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ．２００６ １１１：３６８－３７０）。

【０５７５】

一実施形態において、ＰＥＧ電荷変換型ポリマー（Ｐｉｔｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２０１１ ３２：３１０６－３１１４）を用いて、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを送達するためのナノ粒子を形成しても

よい。ＰＥＧ電荷変換型ポリマーは、酸性ｐＨでポリカチオンへと切断され、それ故に、エンドソームからの脱出を向上させることによって、ＰＥＧ－ポリアニオンブロックコポリマーを改善し得る。

【０５７６】

コアーシェルナノ粒子の使用は、カチオン性架橋ナノゲルコアおよび種々のシェルを合成するための高処理アプローチにさらに焦点を当てている（Ｓｉｅｇｗａｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０１１　１０８：１２９９６－１３００１）。ポリマーナノ粒子の複合体形成、送達、および内在化は、ナノ粒子のコア構成成分およびシェル構成成分の両方の化学組成を変化させることによって精密に制御することができる。例えば、コアーシェルナノ粒子は、コレステロールをナノ粒子に共有結合させた後に、ｓｉＲＮＡをマウス肝細胞に効率的に送達し得る。

【０５７７】

一実施形態において、中間のＰＬＧＡ層およびＰＥＧを含有する外側の中性脂質層を含む、中空の脂質コアを用いて、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを送達してもよい。非限定的な例として、ルシフェラーゼ（ｌｕｃｉｆｅｒｅａｓｅ）発現腫瘍を担持するマウスにおいて、脂質－ポリマー－脂質ハイブリッドナノ粒子が、従来のリポプレックスと比較して、ルシフェラーゼ発現を有意に抑制することが確認された（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ，Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ．２０１１　５０：７０２７－７０３１）。

【０５７８】

一実施形態において、脂質ナノ粒子は、本明細書に開示の修飾核酸分子のコア、およびポリマーシェルを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載され、かつ当技術分野で既知のポリマーのうちのいずれでもあり得る。さらなる実施形態において、ポリマーシェルを用いて、コアにおける修飾核酸を保護し得る。

【０５７９】

本発明の修飾核酸分子とともに使用するためのコアーシェルナノ粒子が記載されており、これは、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，３１３，７７７号に記載の方法によって形成されてもよい。

【０５８０】

一実施形態において、コアーシェルナノ粒子は、本明細書に開示の修飾核酸分子のコア、およびポリマーシェルを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載され、かつ当技術分野で既知のポリマーのうちのいずれでもあり得る。さらなる実施形態において、ポリマーシェルを用いて、コアにおける修飾核酸分子を保護し得る。非限定的な例として、コアーシェルナノ粒子を用いて、眼疾患または障害を治療し得る（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０３２１７１９号を参照のこと）。

【０５８１】

一実施形態において、本明細書に記載の製剤とともに使用されるポリマーは、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１１１２００５３号に記載の修飾ポリマー（修飾ポリアセタール等であるが、これらに限定されない）であってもよい。

【０５８２】

ペプチドおよびタンパク質

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによる細胞のトランスフェクションを増加させるために、ペプチドおよび／またはタンパク質とともに製剤化することができる。一実施形態において、細胞透過性ペプチドならびに細胞内送達を可能にするタンパク質およびペプチド等であるが、これらに限定されないペプチドを用いて、薬学的製剤を送達してもよい。本発明の薬学的製剤とともに使用され得る細胞透過性ペプチドの非限定的な例としては、細胞内空間への送達を容易にする、ポリカチオンに結合した細胞透過性ペプチド配列、例えば、ＨＩＶ由来ＴＡＴペプチド、ペネトラチン、トランスポータン、またはｈＣＴ由来細胞透過性ペプチドである（例えば、すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｃａｒ

on et al.,Mol.Ther.3(3):310-8(2001)、Langel,Cell-Penetrating Peptides:Processes and Applications(CRC Press,Boca Raton FL,2002)、El-Andaloussi et al.,Curr.Pharm.Des.11(28):3597-611(2003)、およびDeshayes et al.,Cell.Mol.Life Sci.62(16):1839-49(2005)を参照のこと)。組成物は、組成物の細胞内空間への送達を向上させる細胞透過性薬剤、例えば、リポソームを含むように製剤化することもできる。本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびmmRNAは、細胞内送達を可能にするために、Aileron Therapeutics(Cambridge,MA)およびPermeon Biologics(Cambridge,MA)によるペプチドおよび/またはタンパク質等であるが、これらに限定されない、ペプチドおよび/またはタンパク質に複合体形成されてもよい(すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Cronican et al.,ACS Chem.Biol.2010 5:747-752、McNaughton et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2009 106:6111-6116、Sawyer,Chem Biol Drug Des.2009 73:3-6、Verdine and Hilinski,Methods Enzymol.2012;503:3-33)。

【0583】

一実施形態において、細胞透過性ポリペプチドは、第1のドメインおよび第2のドメインを含み得る。第1のドメインは、超荷電ポリペプチドを含み得る。第2のドメインは、タンパク質結合パートナーを含み得る。本明細書で使用されるとき、「タンパク質結合パートナー」には、抗体およびその機能的断片、足場タンパク質、またはペプチドが含まれるが、これらに限定されない。細胞透過性ポリペプチドは、タンパク質結合パートナーのための細胞内結合パートナーをさらに含み得る。細胞透過性ポリペプチドは、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはmmRNAが導入され得る細胞から分泌されることが可能であり得る。

【0584】

ペプチドまたはタンパク質を含む製剤を用いて、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはmmRNAによる細胞トランスフェクションを増加させ、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはmmRNAの生体分布を変化させ(例えば、具体的な組織または細胞型を標的とすることによって)、かつ/またはコードされたタンパク質の翻訳を増加させることができる。(例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第WO2012110636号を参照のこと)。

【0585】

細胞

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびmmRNAは、エクスビボで細胞中にトランスフェクトすることができ、それがその後、対象に移植される。非限定的な例として、薬学的組成物は、修飾RNAを肝臓および骨髄細胞に送達するための赤血球、修飾RNAをウイルス様粒子(VLP)中で送達するためのビロソーム、ならびにMAXCYTE(登録商標)(Gaithersburg,MD)による細胞、およびERYTECH(登録商標)(Lyon,France)による細胞等であるが、これらに限定されない、修飾RNAを送達するためのエレクトロポレーション処理された細胞を含んでもよい。mmRNA以外のペイロードを送達するための赤血球、ウイルス粒子、およびエレクトロポレーション処理された細胞の使用例が、文書化されている(すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Godfrin et al.,Expert Opin Biol Ther.2012 12:127-133、Fang et al.,Expert Opin Biol Ther.2012 12:385-389、Hu et al.,Proc Natl Acad Sci USA.2011 108:10980-10985、Lund et al.,Pharm Res.2010 27:4

００－４２０、Ｈｕｃｋｒｉｅｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｒｅｓ．２００７；１７：３９－４７、Ｃｕｓｉ，Ｈｕｍ Ｖａｃｃｉｎ．２００６ ２：１－７、ｄｅ Ｊｏｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００６ １３：４００－４１１）。

【０５８６】

ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１１０８５２３１号および米国公開第２０１１０１７１２４８号に記載の方法によって合成される合成ＶＬＰ中で送達されてもよい。

【０５８７】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡの細胞ベースの製剤を用いて、細胞トランスフェクションを確実にし（例えば、細胞担体中の）、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡの生体分布を変化させ（例えば、細胞担体の標的を具体的な組織または細胞型に定めることによって）、かつ／またはコードされたタンパク質の翻訳を増加させてもよい。

【０５８８】

ウイルスおよび非ウイルス媒介性技法を含む、核酸の細胞内への導入に好適である多様な方法が当技術分野で知られている。典型的な非ウイルス媒介性技法の例としては、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム媒介性移入、ヌクレオフェクション、ソノポレーション、熱ショック、マグネトフェクション、リポソーム媒介性移入、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクタイル媒介性移入（ナノ粒子）、カチオン性ポリマー媒介性移入（ＤＥＡＥ－デキストラン、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等）、または細胞融合が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５８９】

ソノポレーション、または細胞超音波処理の技法は、細胞原形質膜の透過性修飾するために音（例えば、超音波周波数）を使用するものである。ソノポレーション法は、当業者に知られており、インビボで核酸を送達するために使用される（すべて参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｙｏｏｎ ａｎｄ Ｐａｒｋ，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２０１０ ７：３２１－３３０、Ｐｏｓｔｅｍａ ａｎｄ Ｇｉｌｊａ，Ｃｕｒｒ Ｐｈａｒｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００７ ８：３５５－３６１、Ｎｅｗｍａｎ ａｎｄ Ｂｅｔｔｉｎｇｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００７ １４：４６５－４７５）。ソノポレーション法は、当技術分野で知られており、また、例えば、それが細菌に関する場合には、米国特許公開第２０１００１９６９８３号において、それが他の細胞型に関する場合には、例えば、米国特許公開２０１０００００９４２４号において教示され、これらの各々は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０５９０】

エレクトロポレーション技法もまた、当技術分野で周知であり、インビボでおよび臨床的に核酸を送達するために使用される（すべて参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｎｄｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１０ １０：２６７－２８０、Ｃｈｉａｒｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１０ １０：２８１－２８６、Ｈｏｊｍａｎ，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１０ １０：１２８－１３８）。一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、実施例８に記載されるようにエレクトロポレーションによって送達され得る。

【０５９１】

ヒアルロニダーゼ

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの筋肉内または皮下局所注入は、ヒアルロナンの加水分解を触媒する、ヒアルロニダーゼを含むことができる。介在性の関門の構成物質であるヒアルロナンの加水分解を触媒することによって、ヒアルロニダーゼは、ヒアルロナンの粘度を低下させて、それによって組織透過性を増加させる（参

照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｆｒｏｓｔ，Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．（２００７）４：４２７－４４０）。それらの分散およびトランスフェクトされた細胞によって産生されるコードされたタンパク質の全身への分布を加速することが有用である。あるいは、ヒアルロニダーゼを用いて、筋肉内にまたは皮下に投与された本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに曝露される細胞の数を増加させることができる。

【０５９２】

ナノ粒子模倣体

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ナノ粒子模倣体内にカプセル封入されかつ／またはそれに吸収され得る。ナノ粒子模倣体は、病原体、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、および細胞等であるが、これらに限定されない、生物または粒子の送達機能を模倣することができる。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ウイルスの送達機能を模倣することができる非バイロン（ｖｉｒｏｎ）粒子中にカプセル封入されてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２００６３７６号を参照のこと）。

【０５９３】

ナノチューブ

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ロゼットナノチューブ、リンカーを用いたツイン塩基（ｔｗｉｎ　ｂａｓｅｓ）を有するロゼットナノチューブ、カーボンナノチューブおよび／または単層カーボンナノチューブ等であるが、これらに限定されない、少なくとも１つのナノチューブに付着または結合され得る。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、立体（ｓｔｅｒｉｃ）力、イオン力、共有結合力、および／または他の力等であるが、これらに限定されない力を介してナノチューブに結合され得る。

【０５９４】

一実施形態において、ナノチューブは、１つ以上のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを細胞内に放出することができる。少なくとも１つのナノチューブのサイズおよび／または表面構造を、体内でナノチューブの相互作用を制御し、かつ／または本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡに付着または結合するように変化させることができる。一実施形態において、少なくとも１つのナノチューブのビルディングブロックおよび／またはそのビルディングブロックに結合される官能基を、ナノチューブの寸法および／または特性を調整するように変化させることができる。非限定的な例として、ナノチューブの長さは、ナノチューブが正常な血管の壁の穴を通過するのを妨害するが、依然として腫瘍組織の血管におけるより大きい穴を通過するのに十分に小さくあるように変化させてもよい。

【０５９５】

一実施形態において、少なくとも１つのナノチューブは、ポリエチレングリコール等であるが、これらに限定されないポリマーを含む送達向上化合物でコーティングされてもよい。別の実施形態において、少なくとも１つのナノチューブおよび／またはポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、薬学的に許容される賦形剤および／または送達ビヒクルと混合されてもよい。

【０５９６】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１つのロゼットナノチューブに付着および／または結合される。ロゼットナノチューブは、当技術分野で既知のプロセスによって、かつ／または参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１２０９４３０４号に記載のプロセスによって形成され得る。少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１２０９４３０４号に記載のプロセスによって、少なくとも１つのロゼットナノチューブに付着および／または結合されてもよく、ここでロゼットナノチューブまたはロゼットナノチューブを形成するモジュ

ールは、水性媒体中で、少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡがロゼットナノチューブに付着または結合するようになり得る条件下で、少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡと混合される。

【０５９７】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１つのカーボンナノチューブに付着および／または結合されてもよい。非限定的な例として、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、連結剤に結合されてもよく、この連結された薬剤が、カーボンナノチューブに結合されてもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２４６，９９５号を参照のこと）。カーボンナノチューブは、単層ナノチューブであってもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２４６，９９５号を参照のこと）。

【０５９８】

複合体

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、担体もしくは標的化基に共有結合された、または一緒に融合タンパク質を産生する２つのコード領域を含む（例えば、標的化基および治療的タンパク質またはペプチドを担持する）、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ等の複合体を含む。

【０５９９】

本発明の複合体は、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、低比重リポタンパク質（ＬＤＬ）、高比重リポタンパク質（ＨＤＬ）、またはグロブリン）、炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸）、または脂質等の、天然に生じる物質を含む。リガンドは、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）等の組換えまたは合成分子であってもよい。ポリアミノ酸の例としては、ポリアミノ酸は、ポリリジン（ＰＬＬ）、ポリＬ－アスパラギン酸、ポリＬ－グルタミン酸、スチレン－マレイン酸無水物コポリマー、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド（ｇｌｙｃｏｌｉｅｄ））コポリマー、ジビニルエーテル－マレイン無水物コポリマー、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（ＨＭＰＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリウレタン、ポリ（２－エチルアクリル（ａｃｒｙｌｌｉｃ）酸）、Ｎ－イソプロピルａｃｒｙｌアミドポリマー、またはポリホスファゼン（ｐｏｌｙｐｈｏｓｐｈａｚｉｎｅ）が挙げられる。ポリアミンの例としては、ポリエチレンイミン、ポリリジン（ＰＬＬ）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド－ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、αヘリックスペプチドが挙げられる。

【０６００】

ポリヌクレオチド複合体の調製、特にＲＮＡへのの調製を教示する、代表的な米国特許には、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第４，８２８，９７９号、同第４，９４８，８８２号、同第５，２１８，１０５号、同第５，５２５，４６５号、同第５，５４１，３１３号、同第５，５４５，７３０号、同第５，５５２，５３８号、同第５，５７８，７１７号、５，５８０，７３１号、同第５，５９１，５８４号、同第５，１０９，１２４号、同第５，１１８，８０２号、同第５，１３８，０４５号、同第５，４１４，０７７号、同第５，４８６，６０３号、同第５，５１２，４３９号、同第５，５７８，７１８号、同第５，６０８，０４６号、同第４，５８７，０４４号、同第４，６０５，７３５号、同第４，６６７，０２５号、同第４，７６２，７７９号、同第４，７８９，７３７号、同第４，８２４，９４１号、同第４，８３５，２６３号、同第４，８７６，３３５号、同第４，９０４，５８２号、同第４，９５８，０１３号、同第５，０８２，８３０号、同第５，１１２，９６３号、同第５，２１４，１３６号、同第５，０８２，８３０号、同第５，１１２，９６３号、同第５，２１４，１３６号、同第５，２４５，０２２号、同第５，２５４，４６９号、同第５，２５８，５０６号、同第５，２６２，

５３６号、同第５，２７２，２５０号、同第５，２９２，８７３号、同第５，３１７，０９８号、同第５，３７１，２４１号、同第５，３９１，７２３号、同第５，４１６，２０３号、同第５，４５１，４６３号、同第５，５１０，４７５号、同第５，５１２，６６７号、同第５，５１４，７８５号、同第５，５６５，５５２号、同第５，５６７，８１０号、同第５，５７４，１４２号、同第５，５８５，４８１号、同第５，５８７，３７１号、同第５，５９５，７２６号、同第５，５９７，６９６号、同第５，５９９，９２３号、同第５，５９９，９２８号および同第５，６８８，９４１号、同第６，２９４，６６４号、同第６，３２０，０１７号、同第６，５７６，７５２号、同第６，７８３，９３１号、同第６，９００，２９７号、同第７，０３７，６４６号が含まれるが、これらに限定されない。

【０６０１】

一実施形態において、本発明の複合体は、本発明の修飾核酸およびｍｍＲＮＡのための担体として機能し得る。複合体は、ポリ（エチレングリコール）でグラフトされ得る、ポリアミン、ポリリジン、ポリアルキレンイミン、およびポリエチレンイミン等であるが、これらに限定されないカチオン性ポリマーを含んでもよい。非限定的な例として、複合体は、ポリマー複合体と同様であってもよく、ポリマー複合体を合成する方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第６，５８６，５２４号に記載されている。

【０６０２】

複合体は、標的化基、例えば、細胞または組織標的化薬剤、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質、またはタンパク質、例えば、腎臓細胞等の指定される細胞型に結合する抗体も含み得る。標的化基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質Ａ、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸塩、ポリアスパラギン酸塩、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンＢ１２、ビオチン、ＲＧＤペプチド、ＲＧＤペプチド模倣体、またはアプタマーであり得る。

【０６０３】

標的化基は、タンパク質、例えば、糖タンパク質、またはペプチド、例えば、コリガンド（ｃｏ－ｌｉｇａｎｄ）に対する特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞、もしくは骨細胞等の指定される細胞型に結合する抗体であり得る。標的化基には、ホルモンおよびホルモン受容体も含まれ得る。それらには、等の脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン多価マンノース、多価フコース、またはアプタマー等の非ペプチド種も含まれ得る。リガンドは、例えば、リポ多糖、またはｐ３８ＭＡＰキナーゼの活性化因子であり得る。

【０６０４】

標的化基は、具体的な受容体を標的とすることが可能な任意のリガンドであり得る。例としては、制限なく、葉酸塩、ＧａｌＮＡｃ、ガラクトース、マンノース、マンノース－６Ｐ、アプタマー（ａｐａｔａｍｅｒｓ）、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、ＰＳＭＡ、エンドセリン、ＧＣＰＩＩ、ソマトスタチン、ＬＤＬ、およびＨＤＬリガンドが挙げられる。特定の実施形態において、標的化基は、アプタマーである。アプタマーは、修飾されていないことも、本明細書に開示の修飾の任意の組み合わせを有することもあり得る。

【０６０５】

一実施形態において、本発明の薬学的組成物は、ロックト核酸と同様の修飾等であるが、これらに限定されない化学修飾を含んでもよい。

【０６０６】

Ｓａｎｔａｒｉｓによるもの等のロックト核酸（ＬＮＡ）の調製を教示する、代表的な米国特許には、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，２

６８，４９０号、同第６，６７０，４６１号、同第６，７９４，４９９号、同第６，９９８，４８４号、同第７，０５３，２０７号、同第７，０８４，１２５号、および同第７，３９９，８４５号が含まれるが、これらに限定されない。

【０６０７】

ＰＮＡ化合物の調製を教示する、代表的な米国特許には、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，５３９，０８２号、同第５，７１４，３３１号、および同第５，７１９，２６２号が含まれるが、これらに限定されない。ＰＮＡ化合物のさらなる教示は、例えば、Ｎｉｅｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９１，２５４，１４９７－１５００において見出すことができる。

【０６０８】

本発明の特色をなすいくつかの実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ、ならびに他の修飾骨格、特に、上に参照される米国特許第５，４８９，６７７号の－－CH_2－－ＮＨ－－CH_2－－、－－CH_2－－Ｎ（CH_3）－－Ｏ－－CH_2－－［メチレン（メチルイミノ）またはＭＭＩ骨格として知られている］、－－CH_2－－Ｏ－－Ｎ（CH_3）－－CH_2－－、－－CH_2－－Ｎ（CH_3）－－Ｎ（CH_3）－－CH_2－－、および－－Ｎ（CH_3）－－CH_2－－CH_2－－［式中、天然ホスホジエステル骨格は、－－Ｏ-Ｐ（Ｏ）$_2$－－Ｏ－－CH_2－－として表される］、および上に参照される米国特許第５，６０２，２４０号のアミド骨格を有する、オリゴヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、本明細書の特色をなすポリヌクレオチド（ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｔｏｔｉｄｅｓ）は、上に参照される米国特許第５，０３４，５０６号のモルホリノ骨格構造を有する。

【０６０９】

２’位における修飾もまた、送達を補助し得る。好ましくは、２’位における修飾は、ポリペプチドコード配列には位置しない、すなわち、翻訳可能領域にない。２’位における修飾は、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、および／または尾部領域に位置してもよい。２’位における修飾は、２’位において次のうちの１つを含むことができる：Ｈ（すなわち、２’－デオキシ）；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－、もしくはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキル（式中、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換または非置換C_1～C_{10}アルキルまたはC_2～C_{10}アルケニルおよびアルキニルであってもよい。例示の好適な修飾には、Ｏ［（CH_2）$_n$Ｏ］$_m$$CH_3$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$OCH_3$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$NH_2$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$CH_3$、Ｏ（$CH_2$）$_n$$ONH_2$、およびＯ（$CH_2$）$_n$ＯＮ［（$CH_2$）$_n$$CH_3$）］$_2$が含まれ、式中、ｎおよびｍは、１～約１０である。他の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、２’位において次のうちの１つを含む：C_1～C_{10}低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリール、アラルキル、Ｏ－アルカリールもしくはＯ－アラルキル、ＳＨ、SCH_3、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、薬物動態特性を改善するための基、または薬力学特性を改善するための基、および同様の特性を有する他の置換基。いくつかの実施形態において、修飾は、２’－メトキシエトキシ（２’－Ｏ－－$CH_2CH_2OCH_3$（２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）または２’－ＭＯＥ）としても知られている）（Ｍａｒｔｉｎｅｔ　ａｌ．，Ｈｅｌｖ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ，１９９５，７８：４８６－５０４）すなわち、アルコキシ－アルコキシ基を含む。別の例示の修飾は、本明細書の以下の実施例に記載の２’－ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、Ｏ（CH_2）$_2$ＯＮ（CH_3）$_2$基（２’－ＤＭＡＯＥとしても知られている）、および同様に本明細書の以下の実施例に記載の２’－ジメチルアミノエトキシ（当技術分野で２’－Ｏ－ジメチルアミノエトキシエチルまたは２’－ＤＭＡＥＯＥとしても知られる）、すなわち、２’－Ｏ－－CH_2－－Ｏ－－CH_2－－Ｎ（CH_2）$_2$である。他の修飾は、２’－メトキシ（２’－OCH_3）、２’－アミノプロポキシ（２’－ＯＣ

$H_2CH_2CH_2NH_2$）、および２’－フルオロ（２’－Ｆ）を含む。同様の修飾は、他の位置、特に３’末端ヌクレオチド上の糖の３’位で、または２’－５’結合ｄｓＲＮＡにおいて、および５’末端ヌクレオチドの５’位で行われてもよい。本発明のポリヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分等の糖模倣体を有してもよい。そのような修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第４，９８１，９５７号、同第５，１１８，８００号、同第５，３１９，０８０号、同第５，３５９，０４４号、同第５，３９３，８７８号、同第５，４４６，１３７号、同第５，４６６，７８６号、同第５，５１４，７８５号、同第５，５１９，１３４号、同第５，５６７，８１１号、同第５，５７６，４２７号、同第５，５９１，７２２号、同第５，５９７，９０９号、同第５，６１０，３００号、同第５，６２７，０５３号、同第５，６３９，８７３号、同第５，６４６，２６５号、同第５，６５８，８７３号、同第５，６７０，６３３号、および同第５，７００，９２０号が含まれるが、これらに限定されない。

【０６１０】

依然として他の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、細胞透過性ポリペプチドに共有結合的に複合体化される。細胞透過性ペプチドは、シグナル配列も含み得る。本発明の複合体は、増加した安定性、増加した細胞トランスフェクション、および／または変化した生体分布（例えば、具体的な組織または細胞型に標的を定められる）を有するように設計することができる。

【０６１１】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、送達を向上させるための薬剤に複合体化されてもよい。非限定的な例として、薬剤は、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１１０６２９６５号に記載の標的化ブロックを有する標的化モノマーまたはポリマー等のモノマーまたはポリマーであってもよい。別の非限定的な例において、薬剤は、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに共有結合された輸送剤であってもよい（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，８３５．３９３号および同第７，３７４，７７８号を参照のこと）。さらに別の非限定的な例において、薬剤は、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，７３７，１０８号および同第８，００３，１２９号に記載される薬剤等の膜関門輸送向上剤であってもよい。

【０６１２】

別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ＳＭＡＲＴＴ　ＰＯＬＹＭＥＲ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ（登録商標）（ＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標），Ｉｎｃ．Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）に複合体化されてもよい。

【０６１３】

自己集合性ナノ粒子

核酸自己集合性ナノ粒子

自己集合性ナノ粒子は、核酸鎖が容易にリプログラミング可能であり得るように精密に制御され得る、明確に定義されたサイズを有する。例えば、２０ｎｍ超の直径が、向上した透過性および保持効果により腎クリアランスを回避し、ある特定の腫瘍への送達を向上させるため、癌標的化ナノ送達担体のために最適な粒径は、２０～１００ｎｍである。自己集合性核酸ナノ粒子を用いて、向上した送達のために癌標的化リガンドの精密に制御された空間定位および密度を有する、サイズおよび形が均一な単一の集団。非限定的な例として、オリゴヌクレオチドナノ粒子が、短いＤＮＡ断片および治療的ｓｉＲＮＡのプログラミング可能な自己集合を用いて調製された。これらのナノ粒子は、制御可能な粒径ならびに標的リガンド箇所および密度を有して、分子的に同一である。ＤＮＡ断片およびｓｉＲＮＡは、１ステップ反応へと自己集合して、標的を定めたインビボ送達のためにＤＮＡ／ｓｉＲＮＡ四面体ナノ粒子を生成した。（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０１２　７：３８９－３９３）。

【０６１４】
一実施形態において、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、自己集合性ナノ粒子として製剤化され得る。非限定的な例として、核酸を用いて、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡのための送達系に使用され得るナノ粒子を作製してもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２１２５９８７号を参照のこと）。
【０６１５】
一実施形態において、核酸自己集合性ナノ粒子は、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのコア、およびポリマーシェルを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に記載され、かつ当技術分野で既知のポリマーのうちのいずれかであり得る。さらなる実施形態において、ポリマーシェルを用いて、コアにおけるポリヌクレオチド、一次構築物（ｃｏｎｔｒｕｃｔｓ）、およびｍｍＲＮＡを保護してもよい。
【０６１６】
ポリマーベースの自己集合性ナノ粒子
ポリマーを用いて、ナノ粒子へと自己集合したシートを形成してもよい。これらのナノ粒子を用いて、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを送達してもよい。一実施形態において、これらの自己集合性ナノ粒子は、マイクロスポンジへと自己集合する前に結晶質の「ひだ状」のシートを形成するＲＮＡヘアピンの長いポリマーで形成される、マイクロスポンジであってもよい。これらのマイクロスポンジは、効率的な担体として機能し得、積荷を細胞に送達することが可能であり得る、密に充填されたスポンジ様の微粒子である。マイクロスポンジは、直径１μｍ～３００ｎｍであり得る。マイクロスポンジは、当技術分野で既知の他の薬剤と複合体形成されて、より大きいマイクロスポンジを形成することができる。非限定的な例として、マイクロスポンジは、ポリカチオンポリエチレンイミン（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｅ）（ＰＥＩ）等の、細胞取り込みを促進するための外側層を形成する薬剤と複合体形成され得る。この複合体は、高温（１５０℃）で安定したままであり得る、２５０ｎｍ直径の粒子を形成することができる（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｒａｂｏｗ ａｎｄ Ｊａｅｇａｒ，Ｎａｔｕｒｅ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１２，１１：２６９－２６９）。さらにこれらのマイクロスポンジは、リボヌクレアーゼによる分解からの並外れた保護度を示すことが可能であり得る。
【０６１７】
別の実施形態において、マイクロスポンジ等であるが、これらに限定されないポリマーベースの自己集合性ナノ粒子は、完全にプログラミング可能なナノ粒子であり得る。ナノ粒子の形状、サイズ、および化学量を、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡ等であるが、これらに限定されない積荷の送達に最適なナノ粒子を作り出すために、精密に制御することができる。
【０６１８】
一実施形態において、ポリマーベースのナノ粒子は、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡのコア、ならびにポリマーシェルを含み得る。ポリマーシェルは、本明細書に記載され、かつ当技術分野で既知のポリマーのうちのいずれかであり得る。さらなる実施形態において、ポリマーシェルを用いて、コアにおけるポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを保護してもよい。
【０６１９】
さらに別の実施形態において、ポリマーベースのナノ粒子は、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１３００９７３６号に記載されるモノマー等の複数の不均一なモノマーを含む非核酸ポリマーを含んでもよい。
【０６２０】
無機ナノ粒子
本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、無機ナノ粒子中に製剤化されてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第８，２

５７，７４５号）。無機ナノ粒子は、水膨潤性である粘土物質を含んでもよいが、これらに限定されない。非限定的な例として、無機ナノ粒子は、単純なケイ酸塩から作製される合成スメクタイト粘土を含んでもよい（例えば、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第５，５８５，１０８号および同第８，２５７，７４５号を参照のこと）。

【０６２１】

一実施形態において、無機ナノ粒子は、本明細書に開示の修飾核酸のコア、およびポリマーシェルを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に記載され、かつ当技術分野で既知のポリマーのうちのいずれかであり得る。さらなる実施形態において、ポリマーシェルを用いて、コアにおける修飾核酸を保護してもよい。

【０６２２】

半導性および金属性ナノ粒子

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、半導性または金属性材料を含む水分散性ナノ粒子中に製剤化されるか（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０２２８５６５号）、または磁性ナノ粒子中に形成されてもよい（各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０２６５００１号および同第２０１２０２８３５０３号）。水分散性ナノ粒子は、疎水性ナノ粒子であっても親水性ナノ粒子であってもよい。

【０６２３】

一実施形態において、半導性および／または金属性ナノ粒子は、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡのコア、ならびにポリマーシェルを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に記載され、かつ当技術分野で既知のポリマーのうちのいずれかであり得る。さらなる実施形態において、ポリマーシェルを用いて、コアにおけるポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを保護してもよい。

【０６２４】

ゲルおよびヒドロゲル

一実施形態において、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、対象に注入されるとゲルを形成し得る、当技術分野で既知の任意のヒドロゲル中にカプセル封入されてもよい。ヒドロゲルは、親水性であり、ときには、水が分散媒体であるコロイド状ゲルとして見出される、ポリマー鎖のネットワークである。ヒドロゲルは、高度に吸収性の（それらは、９９％超の水を含有することができる）天然または合成ポリマーである。ヒドロゲルは、それらのかなりの含水量のため、天然組織と非常に類似した柔軟度も有する。本明細書に記載のヒドロゲルを用いて、生体適合性、生分解性、かつ／または多孔質である脂質ナノ粒子をカプセル封入してもよい。

【０６２５】

非限定的な例として、ヒドロゲルは、アプタマー官能化ヒドロゲルであってもよい。アプタマー官能化ヒドロゲルは、核酸ハイブリダイゼーションを用いて１つ以上のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを放出するようにプログラミングされてもよい。（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｂａｔｔｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃｉｅｔｙ．２０１２ １３４：１２４１０－１２４１３）。

【０６２６】

別の非限定的な例として、ヒドロゲルは、反転オパールとして成形されてもよい。オパールヒドロゲルは、より高い膨潤率を示し、その膨潤速度もまた１桁分より速い。オパールヒドロゲルを生成する方法およびオパールヒドロゲルの説明は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１２１４８６８４号に記載されている。

【０６２７】

さらに別の非限定的な例において、ヒドロゲルは、抗菌性ヒドロゲルであってもよい。抗細菌性ヒドロゲルは、医薬品等級および／または医療等級の銀塩およびアロエベラゲルもしくは抽出物等であるが、これらに限定されない、薬学的許容される塩または有機材料

を含んでもよい。（参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２１５１４３８号）。

【０６２８】

一実施形態において、修飾ｍＲＮＡは、脂質ナノ粒子中にカプセル封入されてもよく、次いでこの脂質ナノ粒子が、ヒドロゲル（ｈｙｒｄｏｇｅｌ）中にカプセル封入されてもよい。

【０６２９】

一実施形態において、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、当技術分野で既知の任意のゲル中にカプセル封入されてもよい。非限定的な例として、ゲルは、フルオロウラシル注入用ゲル、または当技術分野で既知の化学化合物および／もしくは薬物を含有するフルオロウラシル注入用ゲルであってもよい。別の例として、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、エピネフリンを含有するフルオロウラシルゲル中にカプセル封入されてもよい（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｔｙ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，１９９９ ４４（４）：２６７－２７４を参照のこと）。

【０６３０】

一実施形態において、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、フィブリンゲル、フィブリンヒドロゲル、またはフィブリン糊中にカプセル封入されてもよい。別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、フィブリンゲル、フィブリンヒドロゲル、またはフィブリン糊中にカプセル封入される前に、脂質ナノ粒子または急速排出脂質ナノ粒子中に製剤化されてもよい。さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、フィブリンゲル、ヒドロゲル、またはフィブリン糊中にカプセル封入される前に、リポプレックスとして製剤化されてもよい。フィブリンゲル、ヒドロゲル、および糊は、２つの構成成分、すなわちフィブリノーゲン溶液およびカルシウムが豊富であるトロンビン溶液を含む（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｓｐｉｃｅｒ ａｎｄ Ｍｉｋｏｓ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１０．１４８：４９－５５、Ｋｉｄｄ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１２．１５７：８０－８５を参照のこと）。フィブリンゲル、ヒドロゲル、および／または糊の構成成分の濃度は、フィブリンゲル、ヒドロゲル、および／または糊の放出特性を変更すること等であるが、これらに限定されない、ゲル、ヒドロゲル、および／または糊の特性、ネットワークメッシュサイズ、および／または分解特性を変更するように変化させることができる。（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｓｐｉｃｅｒ ａｎｄ Ｍｉｋｏｓ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１０．１４８：４９－５５、Ｋｉｄｄ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１２．１５７：８０－８５、Ｃａｔｅｌａｓ ｅｔ ａｌ．Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ２００８．１４：１１９－１２８を参照のこと）。この特長は、本明細書に開示の修飾ｍＲＮＡを送達するために使用されるときに有利であり得る。（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｋｉｄｄ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１２．１５７：８０－８５、Ｃａｔｅｌａｓ ｅｔ ａｌ．Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ２００８．１４：１１９－１２８を参照のこと）。

【０６３１】

カチオンおよびアニオン

本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡの製剤は、カチオンまたはアニオンを含んでもよい。一実施形態において、製剤は、Ｚｎ２＋、Ｃａ２＋、Ｃｕ２＋、Ｍｇ＋、およびこれらの組み合わせ等であるが、これらに限定されない金属カチオンを含む。非限定的な例として、製剤は、ポリマー、ならびに金属カチオン

と錯化されたポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを含んでもよい（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第６，２６５，３８９号および同第６，５５５，５２５号を参照のこと）。

【０６３２】

成形されたナノ粒子および微粒子

本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、ナノ粒子および／または微粒子中に製剤化されてもよい。これらのナノ粒子および／または微粒子は、任意のサイズ形および化学組成へと成形され得る。例として、ナノ粒子および／または微粒子は、ＬＩＱＵＩＤＡ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ（登録商標）（Ｍｏｒｒｉｓｖｉｌｌｅ，ＮＣ）によるＰＲＩＮＴ（登録商標）技術を用いて作製することができる（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２００７０２４３２３号を参照のこと）。

【０６３３】

一実施形態において、成形されたナノ粒子は、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡのコア、ならびにポリマーシェルを含んでもよい。ポリマーシェルは、本明細書に記載され、かつ当技術分野で既知のポリマーのうちのいずれかであり得る。さらなる実施形態において、ポリマーシェルを用いて、コアにおけるポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを保護してもよい。

【０６３４】

ナノジャケット（ＮａｎｏＪａｃｋｅｔｓ）およびナノリポソーム（ＮａｎｏＬｉｐｏｓｏｍｅｓ）

本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、Ｋｅｙｓｔｏｎｅ　Ｎａｎｏ（Ｓｔａｔｅ　Ｃｏｌｌｅｇｅ，ＰＡ）によるナノジャケットおよびナノリポソーム中に製剤化されてもよい。ナノジャケットは、体内で自然に見つけられ、カルシウム、リン酸塩を含み、また少量のケイ酸塩も含み得る、化合物で作製される。ナノジャケットは、サイズが５～５０ｎｍの範囲であり得、これを用いて、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡ等であるが、これらに限定されない親水性および疎水性化合物を送達することができる。

【０６３５】

ナノリポソームは、体内で天然に生じる脂質等であるが、これらに限定されない脂質で作製される。ナノリポソームは、サイズが６０～８０ｎｍの範囲であり得、これを用いて、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡ等であるが、これらに限定されない親水性および疎水性化合物を送達することができる。一態様において、本明細書に開示のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、セラミドナノリポソーム等であるが、これらに限定されないナノリポソーム中に製剤化される。

【０６３６】

賦形剤

薬学的製剤は、本明細書で使用されるとき、所望される特定の剤形に適している、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散もしくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤もしくは乳化剤、防腐剤、固体結合剤、滑沢剤等を含む、薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでもよい。参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ，２００６は、薬学的組成物を製剤化するのに使用される種々の賦形剤およびこれらの調製のための既知の技法を開示する。任意の従来の賦形剤媒体が任意の望ましくない生体影響を引き起こすか、またはさもなければ薬学的組成物の任意の他の構成成分（複数可）と有害な様態で相互作用するといった、物質またはその誘導体と不適合性である場合を除いて、その使用が本開示の範囲内で企図される。

【０６３７】

いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％純粋である。いくつかの実施形態において、賦形剤は、ヒトにおける使用および獣医学的使用に対して認可されている。いくつかの実施形態において、賦形剤は、米国食品医薬品局（Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって認可されている。いくつかの実施形態において、賦形剤は、医薬品等級である。いくつかの実施形態において、賦形剤は、米国薬局方（Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ（ＵＳＰ））、欧州薬局方（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ（ＥＰ））、英国薬局方（Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ）、および／または国際薬局方（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａ）の基準を満たしている。

【０６３８】

薬学的組成物の製造に使用される薬学的に許容される賦形剤には、不活性希釈剤、分散化剤および／もしくは造粒剤、界面活性剤および／もしくは乳化剤、崩壊剤、結合剤、防腐剤、緩衝剤、滑沢剤、ならびに／または油が含まれるが、これらに限定されない。そのような賦形剤が任意に薬学的組成物中に含まれてもよい。

【０６３９】

例示の希釈剤には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、ショ糖、セルロース、微小結晶セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、トウモロコシデンプン、粉糖等、および／またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０６４０】

例示の造粒剤および／または分散化剤には、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン、タピオカデンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、粘土、アルギン酸、グアーガム、柑橘パルプ、寒天、ベントナイト、セルロースおよび木質製品、天然スポンジ、カチオン交換樹脂、炭酸カルシウム、ケイ酸塩、炭酸ナトリウム、架橋ポリ（ビニル－ピロリドン）（クロスポビドン）、ナトリウムカルボキシメチルデンプン（デンプングリコール酸ナトリウム）、カルボキシメチルセルロース、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（クロスカルメロース）、メチルセルロース、α化デンプン（デンプン１５００）、微小結晶デンプン、水不溶性デンプン、カルシウムカルボキシメチルセルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（ＶＥＥＧＵＭ（登録商標））、ラウリル硫酸ナトリウム、第四級アンモニウム化合物等、ならびに／またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０６４１】

例示の界面活性剤および／または乳化剤には、天然乳化剤（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガント、コンドラックス（ｃｈｏｎｄｒｕｘ）、コレステロール、キサンタン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス、およびレシチン）、コロイド状粘土（例えば、ベントナイト［ケイ酸アルミニウム］およびＶＥＥＧＵＭ（登録商標）［ケイ酸アルミニウムマグネシウム］）、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール（例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、モノステアリン酸トリアセチン（ｔｒｉａｃｅｔｉｎ ｍｏｎｏｓｔｅａｒａｔｅ）、ジステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸グリセリル、およびモノステアリン酸プロピレングリコール、ポリビニルアルコール）、カルボマー（例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸ポリマー、およびカルボキシビニルポリマー）、カラギーナン、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末化セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース）、ソルビタン脂肪酸エステル（例えば、モノラウリル酸ポリオキシエチレンソルビタン［ＴＷＥＥＮ（登録商標）２０］、ポリオキシエチレンソルビタン［ＴＷＥＥＮｎ（登録

商標）６０］、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン［ＴＷＥＥＮ（登録商標）８０］、モノパルミチン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）４０］、モノステアリン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）６０］、トリステアリン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）６５］、モノオレイン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン［ＳＰＡＮ（登録商標）８０］）、ポリオキシエチレンエステル（例えば、モノステアリン酸ポリオキシエチレン［ＭＹＲＪ（登録商標）４５］、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシル化（ｐｏｌｙｅｔｈｏｘｙｌａｔｅｄ）ヒマシ油、ステアリン酸ポリオキシメチレン、およびＳＯＬＵＴＯＬ（登録商標））、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル（例えば、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標））、ポリオキシエチレンエーテル、（例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル［ＢＲＩＪ（登録商標）３０］）、ポリ（ビニル－ピロリドン）、モノラウリル酸ジエチレングリコール、オレイン酸トリエタノールアミン、オレイン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム、オレイン酸エチル、オレイン酸、ラウリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ＰＬＵＯＲＩＮＣ（登録商標）Ｆ　６８、ＰＯＬＯＸＡＭＥＲ（登録商標）１８８、臭化セトリモニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、ドキュセートナトリウム等、ならびに／またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０６４２】

例示の結合剤には、デンプン（例えば、トウモロコシデンプンおよびデンプンペースト）；ゼラチン；糖類（例えば、ショ糖、グルコース、デキストロース、デキストリン、糖蜜、ラクトース、ラクチトール、マンニトール、）；天然および合成ガム（例えば、アカシア、アルギン酸ナトリウム、アイリッシュ・モスの抽出物、パンワールガム（ｐａｎｗａｒ　ｇｕｍ）、ガッチガム（ｇｈａｔｔｉ　ｇｕｍ）、イサポール皮（ｉｓａｐｏｌ　ｈｕｓｋ）の粘液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微小結晶セルロース、酢酸セルロース、ポリ（ビニル－ピロリドン）、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（Ｖｅｅｇｕｍ（登録商標））、およびカラマツアラビノガラクタン（ｌａｒｃｈ　ａｒａｂｏｇａｌａｃｔａｎ））；アルギン酸塩；ポリエチレンオキシド；ポリエチレングリコール；無機カルシウム塩；ケイ酸；ポリメタクリレート；ワックス；水；アルコール等；ならびにこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０６４３】

例示の防腐剤には、酸化防止剤、キレート剤、抗菌性防腐剤、抗真菌性防腐剤、アルコール防腐剤、酸性防腐剤、および／または他の防腐剤が含まれ得るが、これらに限定されない。例示の酸化防止剤には、αトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル（ａｓｃｏｒｂｉｃ）、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、メタ重亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、および／または硫酸ナトリウムが含まれるが、これらに限定されない。例示のキレート剤には、エチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、エデト酸二カリウム、エデト酸、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸、および／またはエデト酸三ナトリウムが含まれる。例示の抗菌性防腐剤には、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、ブロノポール、セトリミド、塩化セチルピリジニウム、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロキシレノール（ｃｈｌｏｒｏｘｙｌｅｎｏｌ）、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジ、イミド尿素、フェノール、フェノキシエタノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、プロピレングリコール、および／またはチメロサールが含まれるが、これらに限定されない。例示の抗真菌性防腐剤には、ブチルパラベン、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、および／またはソルビン酸が含まれるが、これらに限定されない。例示のアルコール防

腐剤には、エタノール、ポリエチレングリコール、フェノール、フェノール系化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシ安息香酸塩、および／またはフェニルエチルアルコールが含まれるが、これらに限定されない。例示の酸性防腐剤には、ビタミンＡ、ビタミンＣ、ビタミンＥ、β－カロテン、クエン酸、酢酸、ジヒドロ酢酸、アスコルビン酸、ソルビン酸、および／またはフィチン酸が含まれるが、これらに限定されない。他の防腐剤には、トコフェロール、酢酸トコフェロール、メシル酸デテロキシム（ｄｅｔｅｒｏｘｉｍｅ　ｍｅｓｙｌａｔｅ）、セトリミド、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ｈｙｄｒｏｘｙｔｏｌｕｅｎｅｄ）（ＢＨＴ）、エチレンジアミン、ラウリル硫酸ナトリウム（ＳＬＳ）、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム（ＳＬＥＳ）、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、ＧＬＹＤＡＮＴ　ＰＬＵＳ（登録商標）、ＰＨＥＮＯＮＩＰ（登録商標）、メチルパラベン、ＧＥＲＭＡＬＬ（登録商標）１１５、ＧＥＲＭＡＢＥＮ（登録商標）ＩＩ、ＮＥＯＬＯＮＥ（商標）、ＫＡＴＨＯＮ（商標）、および／またはＥＵＸＹＬ（登録商標）が含まれるが、これらに限定されない。

【０６４４】

例示の緩衝剤には、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプチン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、ｄ－グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、第二リン酸カルシウム、リン酸、第三リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、第二リン酸カリウム、第一リン酸カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、二炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、第二リン酸ナトリウム、第一リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、発熱性物質除去水、等張食塩水、リンゲル液、エチルアルコール等、および／またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０６４５】

例示の滑沢剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、麦芽、ベヘン酸（ｂｅｈａｎａｔｅ）グリセリル、水素化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ラウリル硫酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム等、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０６４６】

例示の油には、アーモンド油、杏仁油、アボカド油、ババス油、ベルガモット油、ブラックカラント種子油、カデ油、カモミール油、キャノーラ油、キャラウェイ油、カルナウバ油、ヒマシ油、桂皮油、ココアバター油、ココナッツ油、タラの肝油、コーヒー油、トウモロコシ油、綿実油、エミュー油、ユーカリ油、月見草油、魚油、亜麻仁油、ゲラニオール油、ヒョウタン油、ブドウ種子油、ヘーゼルナッツ油、ヒソップ油、ミリスチン酸イソプロピル油、マンゴー種子油、メドウフォーム種子油、ミンク油、ナツメグ油、オリーブ油、オレンジ油、オレンジラフィー油、パーム油、パーム核油、桃仁油、ピーナッツ油、ケシ油、カボチャ種子油、菜種油、コメヌカ油、ローズマリー油、ベニバナ油、ビャクダン油、サスクアナ（ｓａｓｑｕａｎａ）油、セボリー、シーバックソーン油、ゴマ油、シアバター油、シリコーン油、大豆油、ヒマワリ油、ティーツリー油、アザミ油、ツバキ油、ベチバー油、胡桃油、および小麦胚芽油が含まれるが、これらに限定されない。例示の油には、ブチルステアリン酸、カプリル酸トリグリセリド、カプリン酸トリグリセリド、シクロメチコン、セバシン酸ジエチル、ジメチコン３６０、ミリスチン酸イソプロピル、鉱油、オクチルドデカノール、オレイルアルコール、シリコーン油、および／またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【０６４７】

調合者の判断に従って、ココアバターおよび坐剤ワックス、着色剤、コーティング剤、

甘味剤、香味剤、ならびに／または芳香剤等の賦形剤が、組成物中に存在し得る。

【０６４８】

送達

本開示は、薬物送達の科学進展の見込みを考慮した任意の適切な経路による、治療目的、薬学目的、診断目的、または撮像目的のうちのいずれのためのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの送達をも包含する。送達は、ネイキッドであっても製剤化されてもよい。

【０６４９】

ネイキッド送達

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ネイキッドで細胞に送達されてもよい。本明細書で使用されるとき、「ネイキッド」とは、トランスフェクションを促進する薬剤を用いずにポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを送達することを指す。例えば、細胞に送達されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、修飾を全く含有しない場合がある。ネイキッドポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、細胞に、当技術分野で既知であり、かつ本明細書に記載の投与経路を用いて送達されてもよい。

【０６５０】

製剤化された送達

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、本明細書に記載の方法を用いて製剤化されてもよい。製剤は、修飾されているかつ／または修飾されていない場合があるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有してもよい。製剤は、細胞透過剤、薬学的に許容される担体、送達剤、生崩壊性または生体適合性ポリマー、溶媒、および持続放出送達デポーをさらに含むことができるが、これらに限定されない。製剤化されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、細胞に、当技術分野で既知であり、かつ本明細書に記載の投与経路を用いて送達されてもよい。

【０６５１】

組成物は、直接浸水または浸漬、カテーテルを介して、ゲル、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、および／または液滴によって、組成物でコーティングまたは含浸された織物または生分解性材料等の基質を使用することによって等を含むが、これらに限定されない当技術分野におけるいくつかの方法のうちのいずれかにおける器官または組織への直接送達のためにも製剤化され得る。

【０６５２】

投与

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、治療上有効成果をもたらす任意の経路によって投与されてもよい。これらには、経腸、経胃腸、硬膜外、経口、経皮、硬膜外（硬膜上）、脳内（大脳の中へ）、脳室内（脳室の中へ）、皮膚上（皮膚上への適用）、皮内、（皮膚自体の中へ）、皮下（皮膚の下）、経鼻投与（鼻を介して）、静脈内（静脈の中へ）、動脈内（動脈の中へ）、筋肉内（筋肉の中へ）、心臓内（心臓の中へ）、骨内輸注（骨髄の中へ）、髄腔内（脊柱管の中へ）、腹腔内（腹腔の中への輸注または注入）、膀胱内輸注、硝子体内（眼を介して）、空洞内注入（陰茎基部の中へ）、膣内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身への分布のための無傷の皮膚（ｉｎｔａｃｔ　ｓｋｉｎ）を介した拡散）、経粘膜（粘膜を介した拡散）、ガス注入（鼻からの吸引）、舌下、口唇下、浣腸、点眼（結膜上に）、または点耳におけるもの含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、組成物は、それらが血液－脳関門、血管関門、または他の上皮関門を横断することを可能にするような方式で投与されてもよい。本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのための非限定的な投与経路が以下に記載される。

【０６５３】

非経口および注入による投与

非経口投与のための液体剤形には、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマル

ション、溶液、懸濁液、シロップ、および／またはエリキシルが含まれるが、これらに限定されない。活性成分に加えて、液体剤形は、例えば、水または他の溶媒、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、ベンジル安息香酸塩、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（具体的には、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ソルビタンのポリエチレングリコールおよび脂肪酸エステル等の可溶化剤および乳化剤、ならびにこれらの混合物等の、当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤を含んでもよい。不活性希釈剤の他に、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、甘味剤、香味剤、および／または芳香剤等のアジュバントを含むことができる。非経口投与のためのある特定の実施形態において、組成物は、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）、アルコール、油、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、および／またはこれらの組み合わせ等の可溶化剤と混合される。

【０６５４】

注入用調製物、例えば、滅菌注入用水性または油性懸濁液は、既知の技術に従って、好適な分散化剤、湿潤剤、および／または懸濁化剤を用いて製剤化されてもよい。滅菌注入用調製物は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤および／または溶媒中の、滅菌注入用溶液、懸濁液、および／またはエマルション、例えば、１，３－ブタンジオール中の溶液としてのものであってもよい。用いられ得る許容されるビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンゲル液、Ｕ．Ｓ．Ｐ．、および等張塩化ナトリウム溶液がある。無刺激の固定油が溶媒または懸濁化媒体として慣習的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の無菌性の固定油が用いられ得る。オレイン酸等の脂肪酸が注入物の調製において使用され得る。

【０６５５】

注入用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通した濾過によって、かつ／または使用前に滅菌水または他の滅菌注射用媒体中に溶解もしくは分散させることができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって、滅菌することができる。

【０６５６】

活性成分の効果を延長するために、皮下または筋肉内注入からの活性成分の吸収を緩徐化することがしばしば望ましい。これは、水への溶解度が低い結晶質または非晶質材料の液体懸濁液の使用によって遂行されてもよい。薬物の吸収速度は次いで、その溶解速度に依存し、溶解速度が今度は、結晶サイズおよび結晶形に依存し得る。あるいは、非経口的に投与される薬物形態の遅延吸収は、薬物を油性ビヒクル中に溶解させるまたは懸濁させることによって遂行される。注入用デポー形態は、薬物のマイクロカプセルマトリックス（ｍｉｃｒｏｅｎｃａｐｓｕｌｅ　ｍａｔｒｉｃｅｓ）を、ポリラクチド－ポリグリコライド等の生分解性ポリマー中に形成することによって作製される。薬物対ポリマーの比および用いられる特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出の速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が挙げられる。デポー注入用製剤は、薬物を、身体組織と適合性のリポソームまたはマイクロエマルション中に封入することによって調製される。

【０６５７】

直腸および膣内投与

直腸または膣内投与のための組成物は、典型的に坐剤であり、それは組成物を、周囲温度では固体であるが、体温では液体であり、したがって直腸または膣腔で溶解して活性成分を放出する、ココアバター、ポリエチレングリコール、または坐剤ワックス等の好適な非刺激性賦形剤と混合することによって調製することができるる。

【０６５８】

経口投与

経口投与のための液体剤形には、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、および／またはエリキシルが含まれるが、これらに限定

されない。活性成分に加えて、液体剤形は、例えば、水または他の溶媒等、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、ベンジル安息香酸塩、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ソルビタンのポリエチレングリコールおよび脂肪酸エステル等の可溶化剤および乳化剤、ならびにこれらの混合物等の、当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤を含んでもよい。不活性希釈剤の他に、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、甘味剤、香味剤、および／または芳香剤等のアジュバントを含むことができる。非経口投与のためのある特定の実施形態において、組成物は、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）、アルコール、油、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、および／またはこれらの組み合わせ等の可溶化剤と混合される。

【０６５９】

経口投与のための固体剤形には、カプセル、錠剤、丸薬、粉剤、および顆粒が含まれる。そのような固体剤形において、活性成分は、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カルシウム等の少なくとも１つの不活性な薬学的に許容される賦形剤、および／または充填剤もしくは増量剤（例えば、デンプン、ラクトース、ショ糖、グルコース、マンニトール、およびケイ酸）、結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、ショ糖、およびアカシア）、保水剤（例えば、グリセロール）、崩壊剤（例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム）、溶解遅延剤（ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｒｅｔａｒｄｉｎｇ　ａｇｅｎｔｓ）（例えば、パラフィン）、吸収促進剤（例えば、第四級アンモニウム化合物）、湿潤剤（例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール）、吸収剤（例えば、カオリンおよびベントナイト粘土）、ならびに滑沢剤（例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム）、ならびにこれらの混合物と混合される。カプセル、錠剤、および丸薬の場合、剤形は、緩衝剤も含んでもよい。

【０６６０】

局所または経皮投与

本明細書に記載されるように、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有する組成物は、局所的な投与のために製剤化されてもよい。皮膚は、それが容易に接触可能であるため、送達に理想的な標的であり得る。遺伝子発現は、皮膚に対してのみ制限され、非特異的な毒性を回避する可能性があるだけでなく、皮内の特定の層および細胞型にも制限され得る。

【０６６１】

送達された組成物の皮膚発現の部位は、核酸送達の経路に依存する。次の３つの経路がポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを皮膚へと送達するために考慮される：（ｉ）局所適用（例えば、局所／局部治療および／または美容用途のため）、（ｉｉ）経皮注入（例えば、局所／局部治療および／または美容用途のため）、ならびに（ｉｉｉ）全身送達（例えば、皮膚領域および皮膚外領域の両方を侵す皮膚疾患の治療のため）。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、当技術分野で既知のいくつかの異なるアプローチによって皮膚に送達することができる。非カチオン性リポソーム－ＤＮＡ複合体、カチオン性リポソーム－ＤＮＡ複合体の局所適用、粒子媒介性（遺伝子銃）、穿刺媒介性遺伝子トランスフェクション、およびウイルス送達アプローチ等であるが、これらに限定されない、ほとんどの局所送達アプローチが、ＤＮＡの送達に有効であることが示されている。核酸の送達後に、遺伝子産物が、基底角化細胞、皮脂腺細胞、真皮線維芽細胞、および真皮マクロファージを含むが、これらに限定されない、いくつかの異なる皮膚細胞型において検出されている。

【０６６２】

一実施形態において、本発明は、本発明の方法を好都合にかつ／または有効に行うため

の多様なドレッシング（例えば、創傷ドレッシング）または包帯（例えば、粘着包帯）を提供する。典型的に、ドレッシングまたは包帯は、使用者が対象（複数可）の複数の治療を行うことを可能にするために、本明細書に記載の十分な量の薬学的組成物および／またはポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡを含むことができる。

【０６６３】

一実施形態において、本発明は、１回を超える注入で送達されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ組成物を提供する。

【０６６４】

一実施形態において、局所および／または経皮投与の前に、皮膚等の少なくとも１つの組織の領域が、透過性を増加させ得るデバイスおよび／または溶液に供されてもよい。一実施形態において、組織は、皮膚の透過性を増加させるために、研磨デバイスに供されてもよい（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２００８０２７５４６８号を参照のこと）。別の実施形態において、組織は、超音波強化デバイスに供されてもよい。超音波強化デバイスには、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２００４０２３６２６８号ならびに米国特許第６，４９１，６５７号および同第６，２３４，９９０号に記載のデバイスが含まれてもよいが、これらに限定されない。組織の透過性を向上させる方法は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２００４０１７１９８０号および同第２００４０２３６２６８号ならびに米国特許第６，１９０，３１５号に記載されている。

【０６６５】

一実施形態において、デバイスを用いて、本明細書に記載の修飾ｍＲＮＡ製剤を送達する前に組織の透過性を増加させてもよい。皮膚の透過性は、当技術分野で既知の方法、および／または参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第６，１９０，３１５号に記載の方法によって測定することができる。非限定的な例として、修飾ｍＲＮＡ製剤は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第６，１９０，３１５号に記載の薬物送達方法によって送達されてもよい。

【０６６６】

別の非限定的な例において、組織は、透過性を増加させ得るデバイスに組織が供され得る前、その間および／またはその後に、局所麻酔薬の共融混合物（ＥＭＬＡ）クリームで処理されてもよい。Ｋａｔｚら（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ａｎｅｓｔｈ　Ａｎａｌｇ（２００４）；９８：３７１－７６）は、ＥＭＬＡクリームを低エネルギーと組み合わせて使用して、表在性皮膚鎮痛の発生が低エネルギー超音波での前処理の早くも５分後に見られたことを示した。

【０６６７】

一実施形態において、透過性を増加させるために組織が処理される前、その間、および／またはその後に、促進剤が組織に適用されてもよい。促進剤には、輸送促進剤、物理的促進剤、および空洞形成（ｃａｖｉｔａｔｉｏｎ）促進剤が含まれるが、これらに限定されない。促進剤の非限定的な例は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第６，１９０，３１５号に記載されている。

【０６６８】

一実施形態において、デバイスを用いて、免疫応答を呼び起こす物質をさらに含有し得る、本明細書に記載の修飾ｍＲＮＡの製剤を送達する前に、組織の透過性を増加させてもよい。別の非限定的な例において、免疫応答を呼び起こす物質を含有する製剤は、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２００４０１７１９８０号および同第２００４０２３６２６８号に記載の方法によって送達されてもよい。

【０６６９】

組成物の局所および／または経皮投与のための剤形には、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー、吸入剤、および／またはパッチが含まれてもよい。一般に、活性成分は、滅菌条件下で、必要とされ得る通りに薬学的に許容される賦形剤ならびに／または任意の必要とされる防腐剤および／もしくは緩衝液と混和される。

【０６７０】
さらに、本発明は、経皮パッチの使用を企図し、それはしばしば、身体への化合物の制御送達を提供するという追加の利点を有し得る。そのような剤形は、例えば、化合物を適正な媒体中に溶解させるおよび／または分与することによって、調製することができる。あるいは、またはさらに、速度は、速度制御膜を提供することかつ／または化合物をポリマーマトリックスおよび／もしくはゲル中に分散させることによってのいずれかで制御することができる。
【０６７１】
局所投与に好適な製剤には、リニメント剤、ローション等の液体および／もしくは半液体調製物、クリーム、軟膏、および／もしくはペースト等の水中油型および／もしくは油中水型エマルション、ならびに／または溶液および／もしくは懸濁液が含まれるが、これらに限定されない。
【０６７２】
局所的に投与可能な製剤は、例えば、約０．１ｗ／ｗ％～約１０ｗ／ｗ％の活性成分を含み得るが、活性成分の濃度は、最大で溶媒中の活性成分の可溶性の限度まで高くてもよい。局所投与のための製剤は、本明細書に記載のさらなる成分のうちの１つ以上をさらに含んでもよい。
【０６７３】
デポー投与
本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態において、組成物は、持続放出のためのデポー中に製剤化される。一般に、具体的な器官または組織（「標的組織」）が、投与のための標的とされる。
【０６７４】
本発明のいくつかの態様において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、標的組織内またはその近位で空間的に保持される。標的組織（１つ以上の標的細胞を含有する）を組成物と、組成物、特に組成物の核酸構成成分（複数可）が標的組織内に実質的に保持される、つまり、組成物の少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、９９．９、９９．９９、または９９．９９％超が標的組織内に保持されるような条件下で接触させることによって、組成物を哺乳類対象の標的組織に提供する方法が提供される。有利なことに、保持は、１つ以上の標的細胞に進入する、組成物中に存在する核酸の量を測定することによって決定される。例えば、投与の一定期間後に、対象に投与される核酸の少なくとも１、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、９９．９、９９．９９、または９９．９９％超が、細胞内に存在する。例えば、哺乳類対象への筋肉内注入が、リボ核酸およびトランスフェクション試薬を含有する水性組成物を用いて行われ、組成物の保持は、筋肉細胞内に存在するリボ核酸の量を測定することによって決定される。
【０６７５】
本発明の態様は、標的組織（１つ以上の標的細胞を含有する）を組成物と、組成物が標的組織内に実質的に保持されるような条件下で接触させることによって、組成物を哺乳類対象の標的組織に提供する方法を対象とする。組成物は、目的とするポリペプチドが少なくとも１つの標的細胞内で産生されるように、有効量のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有する。組成物は一般に、細胞透過剤、および薬学的に許容される担体を含有するが、「ネイキッド」核酸（細胞透過剤または他の薬剤を含まない核酸等）もまた企図される。
【０６７６】
いくつかの状況において、組織内の細胞によって産生されるタンパク質の量は、望ましくは増加される。好ましくは、タンパク質産生のこの増加は、標的組織内の細胞に空間的に制限される。したがって、哺乳類対象の組織内における目的とするタンパク質の産生を増加させる方法が提供される。標的組織の既定体積内に含有される細胞の実質的な割合（

%）において目的とするポリペプチドを産生するように組成物の単位量が決定されていることで特徴付けられる、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有する組成物が提供される。

【０６７７】

いくつかの実施形態において、組成物は、複数の異なるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含み、このポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのうちの１つ以上が目的とするポリペプチドをコードする。任意に、組成物は、組成物の細胞内送達を補助するための細胞透過剤も含有する。標的組織の既定体積内に含有される細胞のかなりの割合（％）において目的とするポリペプチドを産生する（一般に、既定体積に隣接した、または標的組織に遠位の組織において、目的とするポリペプチドの大幅な産生を誘導することなく）のに必要とされる組成物の用量の決定が行われる。この決定に次いで、決定された用量が哺乳類対象の組織に直接導入される。

【０６７８】

一実施形態において、本発明は、１回を超える注入でまたは分割用量注入によって送達される対象となるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを提供する。

【０６７９】

一実施形態において、本発明は、小型の使い捨て薬物リザーバ、パッチポンプ、または浸透圧ポンプを用いて、標的組織の付近で保持されてもよい。パッチポンプの非限定的な例としては、ＢＤ（登録商標）（Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）、Ｉｎｓｕｌｅｔ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）、ＳｔｅａｄｙＭｅｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、Ｍｅｄｔｒｏｎｉｃ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）（例えば、ＭｉｎｉＭｅｄ）、ＵｎｉＬｉｆｅ（Ｙｏｒｋ，ＰＡ）、Ｖａｌｅｒｉｔａｓ（Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ，ＮＪ）、およびＳｐｒｉｎｇＬｅａｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）によって製造および／または販売されるものが挙げられる。浸透圧ポンプの非限定的な例としては、ＤＵＲＥＣＴ（登録商標）（Ｃｕｐｅｒｔｉｎｏ，ＣＡ）（例えば、ＤＵＲＯＳ（登録商標）およびＡＬＺＥＴ（登録商標））によって製造されるものが挙げられる。

【０６８０】

肺投与

薬学的組成物は、?腔を介した肺投与に好適な製剤中に調製され、パッケージ化され、かつ／または販売されてもよい。そのような製剤は、活性成分を含み、かつ約０．５ｎｍ～約７ｎｍまたは約１ｎｍ～約６ｎｍの範囲の直径を有する、乾燥粒子を含んでもよい。そのような組成物は、好適には、噴射剤の流れが粉末を分散するようにそこに向けられ得る乾燥粉末リザーバを含むデバイスを用い、かつ／または密封容器中の低沸点噴射剤中に溶解および／もしくは懸濁させた活性成分を含むデバイス等の自己噴射溶媒／粉末分与容器を用いた投与のために、乾燥粉末の形態にある。そのような粉末は、粒子の少なくとも９８重量％が０．５ｎｍ超の直径を有し、粒子の少なくとも９５％（数量）が７ｎｍ未満の直径を有する、粒子を含む。あるいは、粒子の少なくとも９５重量％は、１ｎｍ超の直径を有し、粒子の少なくとも９０％（数量）は、６ｎｍ未満の直径を有する。乾燥粉末組成物は、糖等の固体微粉末希釈剤を含んでもよく、それは単位用量形態で好都合に提供される。

【０６８１】

低沸点噴射剤には一般に、大気圧で６５°Ｆ（約１８．３℃）を下回る融点を有する液体噴射剤が含まれる。一般に、噴射剤は、組成物の５０ｗ／ｗｖ％～９９．９ｗ／ｗｖ％を構成し得、活性成分は、組成物の０．１ｗ／ｗ％～２０ｗ／ｗ％を構成し得る。噴射剤は、液体非イオン性および／もしくは固体アニオン性界面活性剤ならびに／または固体希釈剤（活性成分を含む粒子と同じ規模の粒径を有し得る）等のさらなる成分をさらに含んでもよい。

【０６８２】

非限定的な例として、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、および／また

はｍｍＲＮＡは、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，２５７，６８５号に記載の方法によって肺送達のために製剤化されてもよい。

【０６８３】

肺送達のために製剤化される薬学的組成物は、溶液および／または懸濁液の液滴の形態で活性成分を提供してもよい。そのような製剤は、任意に滅菌された、活性成分を含む、水性および／または希釈アルコール溶液および／または懸濁液として調製され、パッケージ化され、かつ／または販売されてもよく、好都合に、任意の噴霧および／または微粒化デバイスを用いて投与され得る。そのような製剤は、サッカリンナトリウム等の香味剤、揮発性油、緩衝剤、界面活性剤、および／または安息香酸メチルヒドロキシ等の防腐剤を含むが、これらに限定されない１つ以上のさらなる成分をさらに含んでもよい。この投与経路によって提供される液滴は、約０．１ｎｍ～約２００ｎｍの範囲の平均直径を有し得る。

【０６８４】

鼻腔内、経鼻、および頬側投与

肺送達に有用であるとして本明細書に記載される製剤は、薬学的組成物の鼻腔内送達に有用である。鼻腔内投与に好適な別の製剤は、活性成分を含み、約０．２μｍ～５００μｍの平均粒子を有する、粗粉である。そのような製剤は、鼻からの吸入が行われる様態で、すなわち、鼻に近接して保持された粉末の容器からの鼻孔を通じた急速な吸入によって、投与される。

【０６８５】

経鼻投与に好適な製剤は、例えば、最少約０．１ｗ／ｗ％～最大１００ｗ／ｗｖ％の活性成分を含んでもよく、本明細書に記載のさらなる成分のうちの１つ以上を含んでもよい。薬学的組成物は、頬側投与に好適な製剤中に調製され、パッケージ化され、かつ／または販売されてもよい。そのような製剤は、例えば、従来の方法を用いて作製される錠剤および／またはロゼンジの形態にあってもよく、また、例えば、０．１ｗ／ｗ％～２０ｗ／ｗ％の活性成分であってもよく、残りが経口的に溶解性および／または分解性の組成物、ならびに任意に、本明細書に記載のさらなる成分のうちの１つ以上を含む。代わりに、頬側投与に好適な製剤は、活性成分を含む、粉末ならびに／またはエアロゾル化および／もしくは微粒化溶液および／もしくは懸濁液を含んでもよい。そのような粉末化、エアロゾル化、および／またはエアロゾル化製剤は、分散されるとき、約０．１ｎｍ～約２００ｎｍの範囲の平均粒径および／または液滴径を有し得、本明細書に記載の任意のさらなる成分のうちの１つ以上をさらに含んでもよい。

【０６８６】

眼内投与

薬学的組成物は、眼内投与に好適な製剤中に調製され、パッケージ化され、かつ／または販売されてもよい。そのような製剤は、例えば、水性または油性液体賦形剤中に、例えば、０．１／１．０ｗ／ｗ％の活性成分の溶液および／または懸濁液を含む、点眼の形態にあってもよい。そのような液滴は、緩衝剤、塩、および／または本明細書に記載の任意のさらなる成分のうちのもう１つ以上をさらに含んでもよい。有用である他の眼内投与可能な製剤には、微小結晶形態でおよび／またはリポソーム調製物中に活性成分を含むものが含まれる。点耳および／または点眼は、本発明の範囲内にあるものとして企図される。眼および／または包囲組織への送達のために、多層薄膜デバイスが、薬学的組成物を含有するように調製されてもよい。

【０６８７】

ペイロード投与：検出可能な薬剤および治療剤

本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、物質（「ペイロード」）の生体標的への送達、例えば、標的の検出のための検出可能な物質の送達、または治療剤の送達が所望される、いくつかの異なるシナリオにおいて使用することができる。検出方法には、インビトロ画像法およびインビボ画像法の両方、例えば、免疫組織化学、生物発光画像法（ＢＬＩ）、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、ポジトロン放出断層撮影法

（ＰＥＴ）、電子顕微鏡法、Ｘ線コンピュータ断層撮影法、ラマン画像法、光干渉断層撮影法、吸収画像法、熱画像法、蛍光反射画像法、蛍光顕微鏡法、蛍光分子トモグラフィー画像法、核磁気共鳴画像法、Ｘ線画像法、超音波画像法、光音響画像法、研究室アッセイ、またはタギング／染色／画像法が必要とされる任意の状況における方法が含まれ得るが、これらに限定されない。

【０６８８】

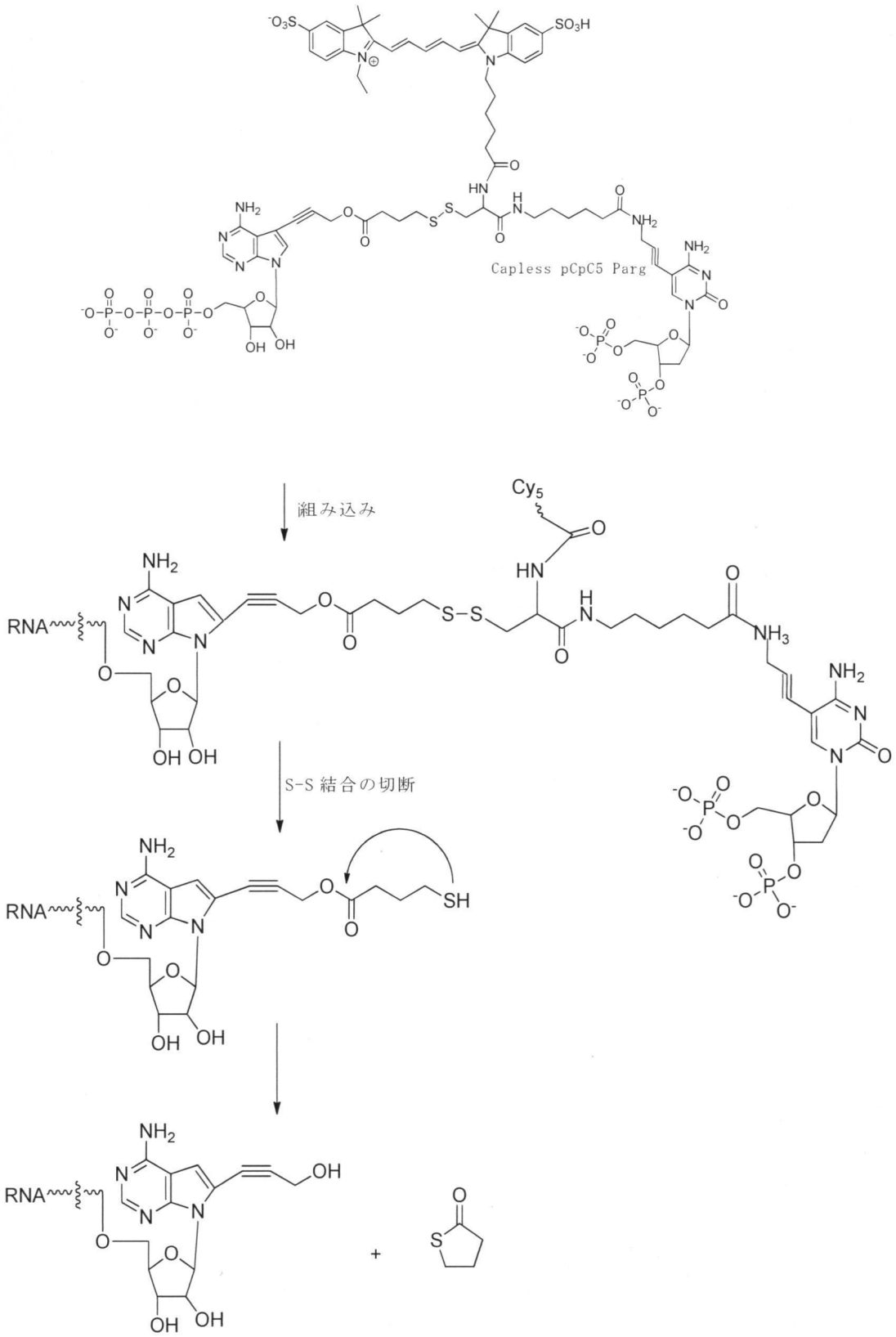
ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、任意の有用な定位でリンカーおよびペイロードの両方を含むように設計することができる。例えば、２つの末端を有するリンカーを用いて、デアザ－アデノシンもしくはデアザ－グアノシンのＣ－７もしくはＣ－８位において、またはシトシンもしくはウラシルのＮ－３もしくはＣ－５位に等、一方の末端がペイロードに、および他方の末端が核酸塩基に結合される。本発明のポリヌクレオチドは、１つを超えるペイロード（例えば、標識および転写阻害剤）、ならびに切断可能リンカーを含むことができる。一実施形態において、修飾ヌクレオチドは、切断可能リンカーの一方の末端が７－デアザ－アデニンのＣ７位に結合され、リンカーの他方の末端が阻害剤（例えば、シチジン上の核酸塩基のＣ５位）に結合され、標識（例えば、Ｃｙ５）がリンカーの中心に結合される、修飾７－デアザ－アデノシン三リン酸塩である（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９９４，３０４号の図５におけるＡ＊ｐＣｐ　Ｃ５　Ｐａｒｇ　Ｃａｐｌｅｓｓの化合物１ならびに第９および１０欄を参照のこと）。修飾７－デアザ－アデノシン三リン酸塩がコード領域へと組み込まれると、結果として生じる切断可能リンカーを有するポリヌクレオチドは、標識および阻害剤（例えば、ポリメラーゼ阻害剤）に結合される。リンカーが切断されると（例えば、切断可能ジスルフィド部分を有するリンカーを還元するための還元条件により）、標識および阻害剤が放出される。さらなるリンカーおよびペイロード（例えば、治療剤、検出可能な標識、および細胞透過性ペイロード）が本明細書に記載される。

【０６８９】

下記のスキーム１２は、核酸塩基であるアデニンが７－デアザアデニンのＣ－７炭素においてリンカーに結合される、例示の修飾ヌクレオチドを描写する。さらに、スキーム１２は、リンカーおよびペイロード、例えば、検出可能な薬剤がｍＲＮＡの３’末端上に組み込まれた、修飾ヌクレオチドを描写する。ジスルフィド切断およびプロパルギルエステル上へのチオール基の１，２－付加により、検出可能な薬剤が放出される。残りの構造（例えば、スキーム１２におけるｐＡｐＣ５Ｐａｒｇとして描写される）は、阻害剤である。修飾ヌクレオチドの構造に対する理論的根拠は、係留された阻害剤が、第２の塩基を組み込むポリメラーゼの能力を立体的に干渉することである。したがって、係留物がこの機能に影響を及ぼすのに十分に長いこと、および阻害剤（ｉｎｈｉｂｉｔｅｒ）が、第２かつ後続のヌクレオチドが伸長しているポリヌクレオチド鎖へと加わることを阻害するまたは禁止する立体化学的定位にあることが必要不可欠である。

スキーム１２

【化７４】



【０６９０】

例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）を再プログラミングするのに使用することができ、それによりクラスター中の総細胞と比較して、トランスフェクトされる細胞を直接追跡することができる。別の例において、リンカーを介してポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍ

ＲＮＡに結合され得、また蛍光標識され得る薬物を用いて、薬物をインビボで、例えば、細胞内で追跡することができる。他の例としては、細胞内への可逆的な薬物送達におけるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【０６９１】

本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ペイロード、例えば、検出可能な薬剤または治療剤の、特定の細胞小器官への細胞内標的化において使用することができる。例示の細胞内標的には、高度なｍＲＮＡプロセシングのための核局在化、または阻害剤を含有するｍＲＮＡに連結された核局在化配列（ＮＬＳ）が含まれ得るが、これらに限定されない。

【０６９２】

さらに、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いて、例えば、生存動物において、治療剤を細胞または組織に送達することができる。例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いて、癌細胞を死滅させるために高極性化学療法剤を送達することができる。リンカーを介して治療剤に結合されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、部材の透過を容易にすることにより、治療剤が細胞内に移動して細胞内標的に到達することを可能にし得る。

【０６９３】

一例において、リンカーは、リボース環の２’位においてならびに／またはポリヌクレオチド、一次構築物ｍｍＲＮＡの３’および／もしくは５’位において結合される（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０３０６８３号を参照のこと）。リンカーは、本明細書に開示され、当技術分野で既知であり、かつ／または参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１２０３０６８３号に開示の任意のリンカーであってもよい。

【０６９４】

別の例において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、切断可能リンカーを介してポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡウイルス阻害性ペプチド（ＶＩＰ）に結合され得る。切断可能リンカーは、ＶＩＰおよび色素を細胞内に放出することができる。別の例において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、リンカーを介して、コレラ毒素、ジフテリア毒素、および百日咳毒素等のいくつかの細菌毒素の作用に関与する、ＡＤＰ－リボシレートに結合され得る。これらの毒素タンパク質は、ヒト細胞において標的タンパク質を修飾するＡＤＰ－リボシルトランスフェラーゼである。例えば、コレラ毒素ＡＤＰ－リボシレートＧタンパク質は、致命的な下痢をもたらす、小腸の内壁からの大量の体液分泌を引き起こすことによって、ヒト細胞を変性させる。

【０６９５】

いくつかの実施形態において、ペイロードは、細胞毒、放射性イオン、化学療法剤、または他の治療剤等の治療剤であってもよい。細胞毒または細胞傷害性薬剤には、細胞に有害であり得るいずれの薬剤も含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン（ｄｉｈｙｄｒｏｘｙａｎｔｈｒａｃｉｎｅｄｉｏｎｅ）、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン（ｄｅｈｙｄｒｏｔｅｓｔｏｓｔｅｒｏｎｅ）、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、マイタンシノイド、例えば、マイタンシノール（参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第５，２０８，０２０号）、ラケルマイシン（ＣＣ－１０６５、すべてが参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，４７５，０９２号、同第５，５８５，４９９号、および同第５，８４６，５４５号を参照のこと）、ならびにこれらの類似体または相同体が挙げられるが、これらに限定されない。放射性イオンには、ヨウ素（例えば、ヨウ素１２５またはヨウ

素１３１）、ストロンチウム８９、リン、パラジウム、セシウム、イリジウム、リン酸塩、コバルト、イットリウム９０、サマリウム１５３、およびプラセオジミウムが含まれるが、これらに限定されない。他の治療剤には、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルダカルバジン（ｄｅｃａｒｂａｚｉｎｅ））、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、ラケルマイシン（ＣＣ－１０６５）、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびｃｉｓ－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（かつてはダウノマイシン）およびｄオキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（かつてはアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（ＡＭＣ））、および抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、タキソール、およびマイタンシノイド）が含まれるが、これらに限定されない。

【０６９６】

いくつかの実施形態において、ペイロードは、種々の有機小分子、無機化合物、ナノ粒子、酵素もしくは酵素基質、蛍光物質、発光物質（例えば、ルミノール）、生物発光物質（例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびイクオリン）、化学発光物質、放射性物質（例えば、^{18}Ｆ、^{67}Ｇａ、^{81m}Ｋｒ、^{82}Ｒｂ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{133}Ｘｅ、^{201}Ｔｌ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、^{3}Ｈ、または^{99m}Ｔｃ（例えば、過テクネチウム酸塩（テクネチウム酸塩（ＶＩＩ）、TcO_4^-として）、および造影剤（例えば、金（例えば、金ナノ粒子）、ガドリニウム（例えば、キレート化Ｇｄ）、酸化鉄（例えば、超常磁性酸化鉄（ＳＰＩＯ）、単結晶酸化鉄ナノ粒子（ＭＩＯＮ）、および極小超常磁性酸化鉄（ＵＳＰＩＯ）、マンガンキレート（例えば、Ｍｎ－ＤＰＤＰ）、硫酸バリウム、ヨード系造影剤媒体（イオヘキソール（Ｉｏｈｅｘｏｌ））、微小気泡、またはペルフルオロ炭素）等の検出可能な薬剤であり得る。そのような光検出可能な標識には、例えば、制限なく、４－アセトアミド－４’－イソチオシアン酸スチルベン－２，２’ジスルホン酸；アクリジンおよび誘導体（例えば、アクリジンおよびアクリジンイソチオシアネート）；５－（２’－アミノエチル）アミノナフタレン－１－スルホン酸（ＥＤＡＮＳ）；４－アミノ－Ｎ－［３－ビニルスルホニル）フェニル］ナフタルイミド－３，５ジスルホン酸塩；Ｎ－（４－アニリノ－１－ナフチル）マレイミド；アントラニルアミド；ＢＯＤＩＰＹ；ブリリアントイエロー；クマリンおよび誘導体（例えば、クマリン、７－アミノ－４－メチルクマリン（ＡＭＣ、クマリン１２０）、および７－アミノ－４－トリフルオロメチルクマリン（クマリン１５１）；シアニン色素；シアノシン；４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）；５’５”－ジブロモピロガロール－スルホナフタレン（ｎａｐｈｔｈａｌｅｉｎ）（ブロモピロガロールレッド）；７－ジエチルアミノ－３－（４’－イソチオシアン酸フェニル）－４－メチルクマリン；ジエチレントリアミン五酢酸塩；４，４’－ジイソチオシアン酸ジヒドロ－スチルベン－２，２’－ジスルホン酸；４，４’－ジイソチオシアン酸スチルベン－２，２’－ジスルホン酸；５－［ジメチルアミノ］－ナフタレン－１－スルホニルクロリド（ＤＮＳ、ダンシルクロリド）；４－ジメチルアミノフェニルアゾフェニル－４’－イソチオシアネート（ＤＡＢＩＴＣ）；エオシンおよび誘導体（例えば、エオシンおよびエオシンイソチオシアネート）；エリスロシンおよび誘導体（例えば、エリスロシンＢおよびエリスロシンイソチオシアネート）；エチジウム；フルオロセインおよび誘導体（例えば、５－カルボキシフルオロセイン（ＦＡＭ）、５－（４，６－ジクロロトリアジン－２－イル）アミノフルオロセイン（ＤＴＡＦ）、２’，７’－ジメトキシ－４’５’－ジクロロ－６－カルボキシフルオロセイン、フルオロセイン、フルオロセインイソチオシアネート、Ｘ－ローダミン－５－（および－６）－イソチオシアネート（ＱＦＩＴＣまたはＸＲＩＴＣ）、およびフルオレスカミン）；２－［２－［３－［［１，３－ジヒドロ－１，１－ジメチル－３－（３－スルホプロピル）－２Ｈ－ベンズ［ｅ］インドール－２－イリデン］エチリデン］－２－［４－（エトキシカルボニル）－１－ピペラジニル］－１－シクロペンテン－１－イル

］エテニル］－１，１－ジメチル－３－（３－スルホプロピル（ｓｕｌｆｏｒｐｒｏｐｙｌ））－１Ｈ－ベンズ［ｅ］インドリウム水酸化物、分子内塩、ｎ，ｎ－ジエチルエタンアミン（１：１）（ＩＲ１４４）との化合物；５－クロロ－２－［２－［３－［（５－クロロ－３－エチル－２（３Ｈ）－ベンゾチアゾール－イリデン）エチリデン］－２－（ジフェニルアミノ）－１－シクロペンテン－１－イル］エテニル］－３－エチルベンゾチアゾリウム過塩素酸塩（ＩＲ１４０）；マラカイトグリーンイソチオシアネート；４－メチルウンベリフェロンオルトクレゾールフタレイン；ニトロチロシン；パラローザニリン；フェノールレッド；Ｂ－フィコエリトリン；ｏ－フタルジアルデヒド；ピレンおよび誘導体（例えば、ピレン、酪酸ピレン、およびスクシンイミジル１－ピレン）；酪酸塩量子ドット；リアクティブレッド４（ＣＩＢＡＣＲＯＮ（商標）ブリリアントレッド３Ｂ－Ａ）；ローダミンおよび誘導体（例えば、６－カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、６－カルボキシローダミン（Ｒ６Ｇ）、リサミンローダミンＢスルホニルクロリドローダミン（ｒｈｏｄａｒｎｉｎｅ）（Ｒｈｏｄ）、ローダミンＢ、ローダミン１２３、ローダミンＸイソチオシアネート、スルホローダミンＢ、スルホローダミン１０１、スルホローダミン１０１のスルホニルクロリド誘導体（テキサスレッド）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’テトラメチル－６－カルボキシローダミン（ＴＡＭＲＡ）テトラメチルローダミン、およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）；リボフラビン；ロゾール酸；テルビウムキレート誘導体；シアニン－３（Ｃｙ３）；シアニン－５（Ｃｙ５）；シアニン－５．５（Ｃｙ５．５）、シアニン－７（Ｃｙ７）；ＩＲＤ　７００；ＩＲＤ　８００；Ａｌｅｘａ　６４７；Ｌａ　Ｊｏｌｔａ　Ｂｌｕｅ；フタロシアニン；ならびにナフタロシアニンが含まれる。

【０６９７】

いくつかの実施形態において、検出可能な薬剤は、活性化されると検出可能となる、検出不可能な前駆体（例えば、蛍光発生テトラジン－フルオロフォア構築物（例えば、テトラジン－ＢＯＤＩＰＹ　ＦＬ、テトラジン－オレゴングリーン４８８、またはテトラジン－ＢＯＤＩＰＹ　ＴＭＲ－Ｘ）、または酵素により活性化可能な蛍光発生剤（例えば、ＰＲＯＳＥＮＳＥ（登録商標）（ＶｉｓＥｎ　Ｍｅｄｉｃａｌ））であってもよい。酵素標識組成物が使用され得るインビトロアッセイには、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光法、酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、およびウエスタンブロット分析が含まれるが、これらに限定されない。

【０６９８】

組み合わせ

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、１つ以上の他の治療剤、予防剤、診断剤、または撮像剤と組み合わせて使用されてもよい。「と組み合わせて」とは、薬剤が同時に投与されるかつ／または一緒に送達するために製剤化される必要があることを暗示するようには意図さないが、これらの送達方法は、本開示の範囲内にある。組成物は、１つ以上の他の所望の治療薬または医療処置と並行して、その前に、またはその後に投与することができる。一般に、各薬剤は、その薬剤のために決定された用量でおよび／または時間スケジュールに基づいて投与されるであろう。いくつかの実施形態において、本開示は、薬学的、予防的、診断的、または撮像組成物を、それらの生体利用能を改善し、それらの代謝を低減および／もしくは修飾し、それらの排泄を阻害し、かつ／またはそれらの体内分布を修飾し得る薬剤と組み合わせて、送達することを包含する。非限定的な例として、核酸またはｍｍＲＮＡは、癌の治療のためまたは過剰増殖性細胞を制御するための医薬品と組み合わせて使用されてもよい。参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第７，９６４，５７１号において、リポポリマーとともにインターロイキン－１２をコードするＤＮＡプラスミドを含む薬学的組成物を使用し、また少なくとも１つの抗癌剤または化学療法剤を投与する、原発性または転移性固形腫瘍の治療のための併用療法が記載される。さらに、抗増殖性分子をコードする本発明の核酸およびｍｍＲＮＡは、リポポリマーとともに薬学的組成物中にあってもよい（例えば、抗増殖性分子をコードするＤＮＡプラスミドおよびリポポリマーを含む薬学的組成物を特許請求する、参照により全体

が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１１０２１８２３１号を参照のこと）、それは少なくとも１つの化学療法剤または抗癌剤とともに投与され得る。

【０６９９】

組み合わせて利用される治療上、予防上、診断上、または撮像活性剤は、単一の組成物中で一緒に投与されても、異なる組成物中で別個に投与されもよいことがさらに理解されよう。一般に、組み合わせて利用される薬剤は、それらが個々に利用されるレベルを超えないレベルで利用されることが予想される。いくつかの実施形態において、組み合わせて利用されるレベルは、個々に利用されるレベルよりも低いであろう。一実施形態において、組み合わせは、各々または一緒に、本明細書に記載の分割投薬レジメンに従って投与されてもよい。

【０７００】

投薬

本発明は、本発明に従う修飾ｍＲＮＡおよびそれらのコードされたタンパク質または複合体をそれを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。核酸、タンパク質、もしくは複合体、またはその薬学的、画像化、診断的、もしくは予防的組成物は、疾患、障害、および／または状態（例えば、記憶障害の取り組みに関連した疾患、障害、および／または状態）の予防、治療、診断、または画像化に有効な任意の量および任意の投与経路を用いて対象に投与することができる。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢、および全身状態、疾患の重症度、特定の組成物、その投与方法、その活性方法等に応じて、対象によって異なる。本発明に従う組成物は、投与を容易にし、かつ投薬量を均一にするために、典型的には、単位剤形で製剤化される。しかしながら、本発明の組成物の総１日使用量は、適切な医学的判断の範囲内で担当医によって決定されてもよいことが理解される。任意の特定の患者の特定の治療上有効、予防上有効、または適切な画像化用量レベルは、治療される障害および障害の重症度；用いられる特定の化合物の活性；用いられる特定の組成物；患者の年齢、体重、全体的な健康状態、性別、および食生活；投与時間、投与経路、および用いられる特定の化合物の排泄速度；治療の持続期間；用いられる特定の化合物と組み合わせて、またはそれと同時に使用される薬物；医学分野で周知の要素等を含む様々な要素に依存する。

【０７０１】

ある特定の実施形態において、本発明に従う組成物は、所望の治療的、診断的、予防的、または画像効果を得るために、１日当たり約０．０００１ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、約０．００１ｍｇ／ｋｇ～約０．０５ｍｇ／ｋｇ、約０．００５ｍｇ／ｋｇ～約０．０５ｍｇ／ｋｇ、約０．００１ｍｇ／ｋｇ～約０．００５ｍｇ／ｋｇ、約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約０．５ｍｇ／ｋｇ、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約４０ｍｇ／ｋｇ、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約３０ｍｇ／ｋｇ、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、または約１ｍｇ／ｋｇ～約２５ｍｇ／ｋｇ（対象の体重）を１日１回以上送達するのに十分な投薬量レベルで投与され得る。所望の投薬量は、１日３回、１日２回、１日１回、１日おきに、２日おきに、週１回、２週間に１回、３週間に１回、または４週間に１回送達されてもよい。ある特定の実施形態において、所望の投薬量は、複数回の投与（例えば、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、１０回、１１回、１２回、１３回、１４回以上の投与）によって送達されてもよい。複数回の投与が用いられるとき、本明細書に記載の分割投薬レジメン等の分割投薬レジメンが使用され得る。

【０７０２】

本発明に従って、分割用量レジメンでのｍｍＲＮＡの投与が哺乳類対象においてより高いレベルのタンパク質を産生することが見出されている。本明細書で使用されるとき、「分割用量」とは、単回単位用量または総１日用量の２つ以上の用量、例えば、単回単位用量の２回以上の投与への分割である。本明細書で使用されるとき、「単回単位用量」とは、１回用量で／一度に／単一経路で／単一接触点で、すなわち、単回投与事象で投与される任意の治療薬の用量である。本明細書で使用されるとき、「総１日用量」は、２４時間

内に所与または処方される量である。これは、単回単位用量として投与されてもよい。一実施形態において、本発明のｍｍＲＮＡは、分割用量で対象に投与される。ｍｍＲＮＡは、緩衝液のみまたは本明細書に記載の製剤中で製剤化されてもよい。

【０７０３】

剤形

本明細書に記載の薬学的組成物は、局所、鼻腔内、気管内、または注入用（例えば、静脈内、眼内、硝子体内、筋肉内、心臓内、腹腔内、皮下）等の本明細書に記載の剤形に製剤化され得る。

【０７０４】

液体剤形

非経口投与用の液体剤形には、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、および／またはエリキシルが含まれるが、これらに限定されない。活性成分に加えて、液体剤形は、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（具体的には、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ソルビタンポリエチレングリコールおよび脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物を含むが、これらに限定されない当技術分野で一般に使用される不活性希釈剤を含んでもよい。非経口投与についてのある特定の実施形態において、組成物は、可溶化剤、例えば、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）、アルコール、油、修飾油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、および／またはこれらの組み合わせと混合されてもよい。

【０７０５】

注入物

注入用調製物、例えば、滅菌注入用水性または油性懸濁液は、既知の技術に従って製剤化されてもよく、好適な分散化剤、湿潤剤、および／または懸濁化剤を含んでもよい。滅菌注入用調製物は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤および／または溶媒、例えば、１，３－ブタンジオール溶液中の滅菌注入用溶液、懸濁液、および／またはエマルションであり得る。用いられ得る許容されるビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンガー溶液、Ｕ．Ｓ．Ｐ．、および等張性塩化ナトリウム溶液が含まれるが、これらに限定されない。無刺激固定油が溶媒または懸濁化媒体として慣習的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激固定油が用いられ得る。オレイン酸等の脂肪酸が注入物の調製において使用され得る。注入用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通した濾過によって、かつ／または使用前に滅菌剤を滅菌水または他の滅菌注入用媒体中に溶解もしくは分散され得る滅菌固体組成物の形態で組み込むことによって滅菌され得る。長活性成分の効果を長引かせるために、皮下または筋肉内注入からの活性成分の吸収を遅延させることが所望され得る。これは、水への溶解度が低い結晶質または非晶質材料の液体懸濁液の使用によって遂行されてもよい。その後、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの吸収速度は、その溶解速度に依存し、次いで、結晶の大きさおよび結晶形態に依存し得る。あるいは、非経口的に投与されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの遅延吸収は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを油ビヒクル中に溶解または懸濁させることによって遂行され得る。注入用デポー形態は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのマイクロカプセルマトリックスを、ポリラクチド－ポリグリコリド等の生分解性ポリマー中に形成することによって作製される。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡとポリマーとの比率、および用いられる特定のポリマーの性質に応じて、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの放出速度を調節することができる。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が挙げられるが、これらに限定されない。デポー注入用製剤は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを、身体組織と

適合性のリポソームまたはマイクロエマルション中に封入することによって調製されてもよい。

【０７０６】

肺

肺送達に有用であるとして本明細書に記載される製剤は、薬学的組成物の鼻腔内送達にも使用され得る。鼻腔内投与に好適な別の製剤は、活性成分を含み、約０．２μｍ～５００μｍの平均粒子を有する粗粉であってもよい。そのような製剤は、鼻からの吸入が行われる様態で、すなわち鼻に近接して保持された粉末の容器からの鼻孔を通じた急速な吸入によって投与されてもよい。

【０７０７】

経鼻投与に好適な製剤は、例えば、最少約０．１ｗ／ｗ％～最大１００ｗ／ｗ％の活性成分を含んでもよく、本明細書に記載のさらなる成分のうちの１つ以上を含んでもよい。薬学的組成物は、頬側投与に好適な製剤中に調製され、パッケージ化され、かつ／または販売されてもよい。そのような製剤は、例えば、従来の方法を用いて作製される錠剤および／またはロゼンジの形態であってもよく、例えば、約０．１ｗ／ｗ％～２０ｗ／ｗ％の活性成分を含有してもよく、この平衡物は、経口溶解性および／または分解性組成物と、任意に、本明細書に記載のさらなる成分のうちの１つ以上とを含んでもよい。代わりに、頬側投与に好適な製剤は、活性成分を含む、粉末ならびに／またはエアロゾル化および／もしくは微粒化溶液および／もしくは懸濁液を含んでもよい。そのような粉末化、エアロゾル化、および／またはエアロゾル化製剤は、分散されるとき、約０．１ｎｍ～約２００ｎｍの範囲の平均粒径および／または液滴径を有し得、本明細書に記載の任意のさらなる成分のうちの１つ以上をさらに含んでもよい。

【０７０８】

医薬品の製剤および／または製造における一般の考慮事項は、例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ２１ｓｔｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，２００５において見出され得る。

【０７０９】

コーティング剤またはシェル

錠剤、糖衣錠、カプセル、丸剤、および顆粒の固体剤形を、コーティング剤およびシェル、例えば、腸溶性コーティング剤および医薬品製剤化分野で周知の他のコーティング剤で調製することができる。それらは、任意に、乳白剤を含んでもよく、それらが、腸管のある特定の部分において、任意に、遅延様式で、活性成分（複数可）のみを放出するか、またはそれを優先的に放出する組成物であり得る。使用することができる包埋組成物の例としては、ポリマー物質およびワックスが挙げられる。同様の種類の固体組成物は、そのような賦形剤をラクトースまたは乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコール等として使用した軟質および硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤として用いてもよい。

【０７１０】

薬学的組成物の特性

本明細書に記載の薬学的組成物は、生物学的利用能、治療域、および／または分布量のうちの１つ以上によって特徴付けられ得る。

【０７１１】

生物学的利用能

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、本明細書に記載の送達剤で組成物に製剤化されるとき、本明細書に記載の送達剤を欠いた組成物と比較して、生物学的利用能の増加を呈し得る。本明細書で使用されるとき、「生物学的利用能」という用語は、哺乳動物に投与されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの所与の量の全身利用能を指す。生物学的利用能は、化合物を哺乳動物に投与した後に、変化していない形態の化合物の曲線下面積（ＡＵＣ）または最大血清または血漿濃度（C_{max}）を測定することによって評価され得る。ＡＵＣは、縦座標（Ｙ軸）に沿った化合物の血清または

血漿濃度を横座標（Ｘ軸）に沿った時間に対してプロットした曲線下面積の決定である。一般に、特定の化合物のＡＵＣは、当業者に既知の方法、および参照により全体が本明細書に組み込まれるＧ．Ｓ．Ｂａｎｋｅｒ，Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ，Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ｖ．７２，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｉｎｃ．，１９９６に記載の方法を用いて算出され得る。

【０７１２】

C_{max}値は、化合物を哺乳動物に投与した後に哺乳動物の血清または血漿において達成される化合物の最大濃度である。特定の化合物のC_{max}値は、当業者に既知の方法を用いて測定され得る。「生物学的利用能の増加」または「薬物動態の改善」という表現は、哺乳動物においてＡＵＣ、C_{max}、またはC_{min}として測定された第１のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの全身利用能が、本明細書に記載の送達剤と共投与された場合、本明細書に記載の送達剤との共投与が行われない場合よりも高いことを意味する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの生物学的利用能は、少なくとも約２％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または約１００％増加し得る。

【０７１３】

治療域

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、本明細書に記載の送達剤で組成物に製剤化されるとき、本明細書に記載の送達剤を欠いた投与されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ組成物の治療域と比較して、投与されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ組成物の治療域の増加を呈し得る。本明細書で使用されるとき、「治療域」は、治療的効果を誘発する可能性の高い、血漿濃度の範囲、または作用部位における治療上活性物質のレベルの範囲を指す。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの治療域は、本明細書に記載の送達剤と共投与されるとき、少なくとも約２％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または約１００％増加し得る。

【０７１４】

分布量

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、本明細書に記載の送達剤で組成物に製剤化されるとき、本明細書に記載の送達剤を欠いた組成物と比較して、分布量（V_{dist}）の改善、例えば、低減または標的化を呈し得る。分布量（Ｖｄｉｓｔ）は、体内の薬物の量を血液または血漿中の薬物の濃度と関連付ける。本明細書で使用されるとき、「分布量」という用語は、血液または血漿中の濃度と同一の濃度で体内の薬物の総量を含有するよう要求される液量を指し、V_{dist}は、体内の薬物の量／血液または血漿中の薬物の濃度に等しい。例えば、用量１０ｍｇおよび血漿濃度１０ｍｇ／Ｌの場合、分布量は、１リットルである。分布量は、薬物が血管外組織に存在する程度を反映する。大量の分布量は、血漿タンパク質結合と比較して組織構成成分に結合する化合物の傾向を反映する。臨床現場において、V_{dist}を用いて負荷用量を決定し、定常状態濃度を達成することができる。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの分布量は、本明細書に記載の送達剤と共投与されるとき、少なくとも約２％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、

少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％減少し得る。

【０７１５】

生物学的効果

一実施形態において、動物に送達される修飾ｍＲＮＡの生物学的効果は、動物におけるタンパク質発現を分析することによって分類され得る。タンパク質発現は、本発明の修飾ｍＲＮＡを投与した哺乳動物から収集された生体試料を分析することによって決定され得る。一実施形態において、哺乳動物に投与される修飾ｍＲＮＡによってコードされた少なくとも５０ｐｇ／ｍＬの発現タンパク質が好ましくあり得る。例えば、哺乳動物に送達される修飾ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質の５０～２００ｐｇ／ｍＬの発現タンパク質が、哺乳動物における治療上有効量のタンパク質と見なされ得る。

【０７１６】

質量分析による修飾核酸の検出

質量分析（ＭＳ）は、分子のイオン変換後の分子の構造質量および分子量／濃度情報を提供することができる分析的技法である。分子は、最初に、イオン化されて正電荷または負電荷を得て、次いで、それらは、質量分析器を通って移動して、それらの質量／電荷（ｍ／ｚ）比に従って検出器の異なる領域に到達する。

【０７１７】

質量分析は、分画された試料をイオン化し、かつさらなる分析のために荷電分子を作成するためのイオン源を含む質量分析計を用いて行われる。例えば、試料のイオン化は、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）、大気圧化学イオン化（ＡＰＣＩ）、光イオン化、電子イオン化高速原子衝撃（ＦＡＢ）／液体二次イオン化（ＬＳＩＭＳ）、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化（ＭＡＬＤＩ）、電界イオン化、電界脱離、サーモスプレー／血漿スプレーイオン化、および粒子ビームイオン化によって実施され得る。当業者であれば、イオン化方法の選択が、測定される分析物、試料の種類、検出器の種類、正モードと負モードの選択等に基づいて決定され得ることを理解する。

【０７１８】

試料がイオン化された後、その結果作成される正電荷イオンまたは負電荷イオンが分析されて、質量対電荷比（すなわち、ｍ／ｚ）を決定することができる。質量対電荷比の決定に好適な分析器には、四重極分析器、イオントラップ分析器、および飛行時間分析器が含まれる。イオンは、いくつかの検出モードを用いて検出され得る。例えば、選択されたイオンは、検出され得る（すなわち、選択的イオン監視モード（ＳＩＭ）を用いて）か、またはあるいは、イオンは、走査モード、例えば、多重反応監視（ＭＲＭ）もしくは選択反応監視（ＳＲＭ）を用いて検出され得る。

【０７１９】

ペプチド標準物の安定した同位体標識化希釈と連動した液体クロマトグラフィー－多重反応監視（ＬＣ－ＭＳ／ＭＲＭ）が、タンパク質の検証に有効な方法であることが示されている（例えば、これらの各々が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｋｅｓｈｉｓｈｉａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ ２００９ ８：２３３９－２３４９、Ｋｕｈｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍ ２００９ ５５：１１０８－１１１７、Ｌｏｐｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍ ２０１０ ５６：２８１－２９０）。バイオマーカー発見の研究で頻繁に用いられる標的化されていない質量分析とは異なり、標的化されたＭＳ方法は、計器の完全な分析能力を複合体混合物中の何十～何百もの選択されたペプチドに集中させるＭＳのペプチド配列に基づくモードである。検出および断片化を目的とするタンパク質に由来するペプチドのみに制限することによって、感受性および再現性は、発見モードのＭＳ方法と比較して劇的に改善される。このタンパク質の質量分析に基づく多重反応監視（ＭＲＭ）定量化方法は、臨床試料の迅速な標的化された多重化タンパク質発現プロファイリングを介してバイオマーカーの発見および定量化に劇的に影響を与えることができる。

【０７２０】
一実施形態において、本発明の少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡによってコードされる少なくとも１つのタンパク質を含有し得る生体試料は、ＭＲＭ－ＭＳ法によって分析され得る。生体試料の定量化は、内部標準物として同位体標識ペプチドまたはタンパク質をさらに含むことができるが、これらに限定されない。
【０７２１】
本発明に従って、生体試料は、対象から得られた時点で、酵素消化に供されてもよい。本明細書で使用されるとき、「消化」という用語は、より短いペプチドに分裂することを意味する。本明細書で使用されるとき、「タンパク質を消化するために試料を処理する」という表現は、試料中のタンパク質を解体するような方法で試料を操作することを意味する。これらの酵素には、トリプシン、エンドプロテイナーゼＧｌｕ－Ｃ、およびキモトリプシンが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、本発明の少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡによってコードされる少なくとも１つのタンパク質を含有し得る生体試料は、酵素を用いて消化され得る。
【０７２２】
一実施形態において、本発明の修飾ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料は、エレクトロスプレーイオン化を用いてタンパク質について分析され得る。エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）質量分析（ＥＳＩＭＳ）は、それらが質量分析によって分析される前に溶液から気相へのイオンの移動を支援するために電気的エネルギーを用いる。試料は、当技術分野で既知の方法を用いて分析され得る（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｒｅｖ．２００３　２４（１）：３－１２）。溶液に含有されるイオン種は、液滴の微粒スプレーを分散させ、溶媒を蒸発させ、高度に帯電した液滴の噴霧を生成するためにイオンを液滴から排出させることによって気相に移動し得る。高度に帯電した液滴の噴霧は、四重極質量分析器等であるが、これに限定されない、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、または少なくとも４つの質量分析器を用いて分析され得る。さらに、質量分析法には、精製ステップが含まれ得る。非限定的な例として、第１の四重極は、単一ｍ／ｚ比を選択するように設定されてもよく、従って、異なるｍ／ｚ比を有する他の分子イオンを濾去することができ、これは、ＭＳ分析前に複雑で時間のかかる試料精製手順を排除し得る。
【０７２３】
一実施形態において、本発明の修飾ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料は、タンデムＥＳＩＭＳ系（例えば、ＭＳ／ＭＳ）において、タンパク質について分析され得る。非限定的な例として、液滴は、産物スキャン（もしくは娘スキャン）、前駆体スキャン（親スキャン）、中性損失、または多重反応監視を用いて分析され得る。
【０７２４】
一実施形態において、本発明の修飾ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料は、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化（ＭＡＬＤＩ）質量分析（ＭＡＬＤＩＭＳ）を用いて分析され得る。ＭＡＬＤＩは、タンパク質等の巨大分子および小分子の両方の非破壊蒸発およびイオン化を提供する。ＭＡＬＤＩ分析において、分析物は、最初に、紫外線吸収弱有機酸も含み得るが、これに限定されない高モル過剰のマトリックス化合物と共結晶化される。ＭＡＬＤＩに用いられるマトリックスの非限定的な例としては、α－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸、３，５－ジメトキシ－４－ヒドロキシ桂皮酸、および２，５－ジヒドロキシ安息香酸がある。分析物－マトリックス混合物のレーザー放射は、マトリックスおよび分析物の蒸発をもたらし得る。レーザー誘起脱離は、無傷の分析物の高イオン収率を提供し、高精度の化合物の測定を可能にする。試料は、当技術分野で既知の方法を用いて分析され得る（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｌｅｗｉｓ，Ｗｅｉ　ａｎｄ　Ｓｉｕｚｄａｋ，Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ　ｏｆ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２０００：５８８０－５８９４）。非限定

的な例として、ＭＡＬＤＩ分析に用いられる質量分析器には、線形飛行時間（ＴＯＦ）、ＴＯＦリフレクトロン、またはフーリエ変換質量分析器が含まれ得る。

【０７２５】

一実施形態において、分析物－マトリックス混合物は、乾燥液滴法を用いて形成され得る。生体試料は、マトリックスと混合されて飽和マトリックス溶液を作成し、マトリックスと試料の比率は、およそ５０００：１である。その後、一定分量（およそ０．５～２．０μＬ）の飽和マトリックス溶液が、乾燥させられて分析物－マトリックス混合物を形成する。

【０７２６】

一実施形態において、分析物－マトリックス混合物は、薄層法を用いて形成され得る。マトリックス均質薄膜が最初に形成され、その後、その試料が適用され、マトリックスによって吸収されて分析物－マトリックス混合物を形成し得る。

【０７２７】

一実施形態において、分析物－マトリックス混合物は、厚層法を用いて形成され得る。マトリックス均質薄膜は、ニトロ－セルロースマトリックス添加剤で形成される。均一なニトロ－セルロースマトリックス層が得られた時点で、試料が適用され、マトリックスに吸収されて、分析物－マトリックス混合物を形成する。

【０７２８】

一実施形態において、分析物－マトリックス混合物は、サンドイッチ法を用いて形成され得る。マトリックス結晶の薄層が、薄層法にあるように調製され、その後、水性トリフルオロ酢酸、試料、およびマトリックスの液滴が添加される。その後、試料はマトリックスに吸収されて、分析物－マトリックス混合物を形成する。

【０７２９】

Ｖ．本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡの使用

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、好ましい実施形態において、免疫応答および／もしくは分解経路等の有害な生体応答の回避（ａｖｏｉｄａｎｃｅ）もしくは回避（ｅｖａｓｉｏｎ）、発現の閾値の克服および／もしくはタンパク質産生能力の改善、改善された発現率もしくは翻訳効率、改善された薬物もしくはタンパク質半減期および／もしくはタンパク質濃度、最適化されたタンパク質局在化を提供して、組織内の安定性および／もしくはクリアランス、受容体による取り込みおよび／もしくは動態、組成物による細胞到達、翻訳機構との関わり、分泌効率（該当する場合）、血液循環への到達可能性、ならびに／または細胞の状態、機能、および／もしくは活性の調節のうちの１つ以上を改善するように設計される。

【０７３０】

治療薬

治療剤

本明細書に記載される、修飾核酸および修飾ＲＮＡ等の本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ、ならびにそれらから翻訳されるタンパク質は、治療剤または予防剤として使用することができる。それらは、医薬において使用するために提供される。例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、対象に投与することができ、このポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、インビボで翻訳されて、対象において治療的または予防的ポリペプチドを産生する。ヒトおよび他の哺乳動物における疾患または状態の診断、治療、または予防のための組成物、方法、キット、および試薬が提供される。本発明の活性治療剤は、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡ、ポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡを含有する細胞、またはポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡから翻訳されるポリペプチドを含む。

【０７３１】

ある特定の実施形態において、抗体依存性細胞傷害性を誘導するタンパク質とともに、哺乳類対象の免疫性を後押しするタンパク質（単数または複数）をコードする翻訳可能領

域を含有する、１つ以上のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有する、組み合わせ治療薬が本明細書に提供される。例えば、トラスツズマブおよび顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）をコードする１つ以上の核酸を含有する治療薬が本明細書に提供される。具体的には、そのような組み合わせ治療薬は、トラスツズマブへの誘導耐性を発達するＨｅｒ２＋乳癌患者において有用である。（例えば、Ａｌｂｒｅｃｈｔ，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．２（６）：７９５－８（２０１０）を参照のこと）。

【０７３２】

本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いて、細胞集団内で組換えポリペプチドの翻訳を誘導する方法が、本明細書に提供される。そのような翻訳は、インビボ、エクスビボ、培養下、またはインビトロであり得る。細胞集団は、少なくとも１つのヌクレオシド修飾および組換えポリペプチドをコードする翻訳可能領域を有する核酸を含有する有効量の組成物と接触させられる。集団は、核酸が細胞集団の１つ以上の細胞内に局在化され、組換えポリペプチドが細胞内で核酸から翻訳されるような条件下で接触させられる。

【０７３３】

組成物の「有効量」は、少なくとも部分的に、標的組織、標的細胞型、投与手段、核酸の物理的特徴（例えば、サイズ、および修飾ヌクレオシドの程度）、および他の決定因子に基づいて提供される。一般に、有効量の組成物は、細胞内での効率的な、好ましくは対応する未修飾核酸を含有する組成物よりも効率的な、タンパク質産生を提供する。増加した効率は、増加した細胞トランスフェクション（すなわち、核酸でトランスフェクトされた細胞の割合（％））、核酸からの増加したタンパク質翻訳、減少した核酸分解（例えば、修飾核酸からのタンパク質翻訳の増加した持続期間によって実証される）、または宿主細胞の低減された自然免疫応答によって実証され得る。

【０７３４】

本発明の態様は、必要性のある哺乳類対象において組換えポリペプチドのインビボ翻訳を誘導する方法を対象とする。その中で、少なくとも１つの構造修飾または化学修飾および組換えポリペプチドをコードする翻訳可能領域を有する核酸を含有する、有効量の組成物が、本明細書に記載の送達方法を用いて対象に投与される。核酸は、核酸が対象の細胞内に局在化され、組換えポリペプチドが細胞内で核酸から翻訳されるような量および他の条件下で提供される。核酸が局在化される細胞、または細胞が存在する組織は、１周期以上の核酸投与により標的とされ得る。

【０７３５】

ある特定の実施形態において、投与されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、組換えポリペプチドが翻訳される細胞、組織、または生物内で実質的に不在である機能的活性を提供する、１つ以上の組換えポリペプチドの産生を指示する。例えば、欠損した機能的活性は、酵素的活性、構造的活性、または遺伝子調節活性の性質を有し得る。関連する実施形態において、投与されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、組換えポリペプチドが翻訳される細胞内に存在しているが、実質的に不全である機能的活性を増加させる（例えば、相乗的に）、１つ以上の組換えポリペプチドの産生を指示する。

【０７３６】

他の実施形態において、投与されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、組換えポリペプチドが翻訳される細胞内で実質的に不在である１つのポリペプチド（または複数のポリペプチド）を置き換える、１つ以上の組換えポリペプチドの産生を指示する。そのような不在性は、コード遺伝子の遺伝子突然変異またはその調節経路に起因し得る。いくつかの実施形態において、組換えポリペプチドは、細胞内の内因性タンパク質のレベルを所望のレベルまで増加させ、そのような増加は、内因性タンパク質のレベルを正常未満のレベルから正常なレベルへと、または正常なレベルから過正常なレベルへと至らせ得る。

【０７３７】

あるいは、組換えポリペプチドは、細胞内に存在する、最上の表面上にある、または細胞から分泌される内因性タンパク質の活性に拮抗するように機能する。通常、内因性タンパク質の活性は、例えば、内因性タンパク質の突然変異が変化した活性または局在化をもたらすことに起因して、対象に有害である。さらに、組換えポリペプチドは、細胞内に存在する、最上の表面上にある、または細胞から分泌される生体部分の活性に、直接的または間接的に拮抗する。拮抗対象の生体部分の例としては、脂質（例えば、コレステロール）、リポタンパク質（例えば、低比重リポタンパク質）、核酸、炭水化物、志賀毒素および破傷風毒素等のタンパク質毒素、またはボツリヌス毒素、コレラ毒素、およびジフテリア毒素等の小分子毒素が挙げられる。さらに、拮抗対象の生物学的分子は、細胞傷害性活性または細胞増殖抑制性活性等の望ましくない活性を示す内因性タンパク質である場合がある。

【０７３８】

本明細書に記載の組換えタンパク質は、細胞内、可能性としては核等の特定の区画内での局在化のために操作されてもよく、または細胞からの分泌もしくは細胞の原形質膜への移行のために操作される。

【０７３９】

いくつかの実施形態において、本発明に従う修飾ｍＲＮＡおよびそれらのコードされたポリペプチドは、次のうちの１つ以上を含むが、これらに限定されない多様な疾患、障害、および／または状態のいずれの治療に使用されてもよい：自己免疫障害（例えば、糖尿病、狼瘡、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ）；炎症性障害（例えば、関節炎、骨盤内炎症性疾患）；感染性疾患（例えば、ウイルス感染（例えば、ＨＩＶ、ＨＣＶ、ＲＳＶ）、細菌感染、真菌感染、敗血症）；神経障害（例えば、アルツハイマー病、ハンチントン病；自閉症；デュシェンヌ型筋ジストロフィー）；心血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、血栓、凝固障害、血管新生障害等の黄斑変性）；増殖性障害（例えば、癌、良性新生物）；呼吸器障害（例えば、慢性閉塞性肺疾患）；消化器障害（例えば、炎症性腸疾患、胃潰瘍）；筋骨格障害（例えば、線維筋痛症、関節炎）；内分泌、代謝、および栄養障害（例えば、糖尿病、骨粗鬆症）；泌尿器障害（例えば、腎疾患）；精神的障害（例えば、うつ病、統合失調症）；皮膚障害（例えば、創傷、湿疹）；血液およびリンパ系障害（例えば、貧血症、血友病）等。

【０７４０】

機能不全のまたは異常なタンパク質活性によって特徴付けられる疾患には、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血症、表皮水疱症、筋萎縮性側索硬化症、およびグルコース－６－リン酸脱水素酵素欠損症が含まれる。本発明は、本明細書に提供されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有する核酸または細胞ベースの治療薬導入することによって、対象においてそのような状態または疾患を治療するための方法を提供し、このポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、対象の細胞内に存在する異常なタンパク質活性に拮抗するか、またはそれに打ち勝つタンパク質をコードする。機能不全のタンパク質の具体的な例としては、嚢胞性線維症を引き起こすＣＦＴＲタンパク質の機能不全のタンパク質変異形を産生する、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子（ＣＦＴＲ）遺伝子のミスセンス突然変異変異形が挙げられる。

【０７４１】

欠損した（または適正な（正常なまたは生理学的タンパク質機能が生じないほどに実質的に低下した）タンパク質活性によって特徴付けられる疾患には、嚢胞性線維症、ニーマン・ピック病Ｃ型、重症型βサラセミア、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ハーラー症候群、ハンター症候群、および血友病Ａが含まれる。そのようなタンパク質は、存在しない場合があるか、または本質的に非機能的である。本発明は、本明細書に提供されるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有する核酸または細胞ベースの治療薬導入することによって、対象においてそのような状態または疾患を治療するための方法を提供し、このポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、対象の標的細胞から欠損したタンパク質活性を置き換える。機能不全のタンパク質の具体的な例としては、嚢

胞性線維症を引き起こすＣＦＴＲタンパク質の非機能的なタンパク質変異形を産生する、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子（ＣＦＴＲ）遺伝子のナンセンス突然変異変異形が挙げられる。

【０７４２】

したがって、対象の細胞を、有効量のＣＴＦＲポリペプチドが細胞内に存在するような条件下で、機能的ＣＦＴＲポリペプチドをコードする翻訳可能領域を有するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触させることによって、哺乳類対象において嚢胞性線維症を治療する方法が提供される。好ましい標的細胞は、肺等の上皮、内皮、および中皮細胞であり、投与方法は、標的組織を考慮して決定され、すなわち、肺送達に関して、ＲＮＡ分子は、吸入による投与のために製剤化される。

【０７４３】

別の実施形態において、本発明は、対象の細胞集団に、ゲノム研究によって最近特徴付けられたタンパク質であるＳｏｒｔｉｌｉｎをコードする修飾ｍＲＮＡ分子を用いて導入し、それによって対象において高脂血症を寛解させることによって、対象において高脂血症を治療するための方法を提供する。ＳＯＲＴ１遺伝子は、Ｓｏｒｔｉｌｉｎと呼ばれるトランスゴルジ網（ＴＧＮ）膜貫通タンパク質をコードする。遺伝子研究は、５人に１人の個人が、ＳＯＲＴ１遺伝子の１ｐ１３遺伝子座において、低レベルの低比重リポタンパク質（ＬＤＬ）および超低比重リポタンパク質（ＶＬＤＬ）の素因を付与する一塩基多型ｒｓ１２７４０３７４を有することを示している。人々の約３０％において存在するこのマイナー対立遺伝子の各コピーは、ＬＤＬコレステロールを８ｍｇ／ｄＬだけ変化させる一方で、集団の約５％において存在するこのマイナー対立遺伝子の２つのコピーは、ＬＤＬコレステロールを１６ｍｇ／ｄＬ低下させる。このマイナー対立遺伝子の保因者は、心筋梗塞の４０％減少した危険性を有することも示されている。マウスにおける機能的インビボ研究は、マウス肝臓組織内のＳＯＲＴ１の過剰発現が、最大８０％より低い、有意により低いＬＤＬ－コレステロールレベルをもたらし、ＳＯＲＴ１のサイレンシングがＬＤＬコレステロールをおよそ２００％増加させることを記載する（Ｍｕｓｕｎｕｒｕ Ｋｅｔ ａｌ．Ｆｒｏｍ ｎｏｎｃｏｄｉｎｇ ｖａｒｉａｎｔ ｔｏ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ ｖｉａ ＳＯＲＴ１ ａｔ ｔｈｅ １ｐ１３ ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ ｌｏｃｕｓ．Ｎａｔｕｒｅ２０１０；４６６：７１４－７２１）。

【０７４４】

別の実施形態において、本発明は、造血障害、心血管疾患、腫瘍学（ｏｎｃｏｌｏｇｙ）、糖尿病、嚢胞性線維症、神経疾患、先天性代謝異常、皮膚および全身障害、ならびに失明を治療するための方法を提供する。これらの具体的な疾患を治療するための分子標的が記載されている（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｔｅｍｐｌｅｔｏｎ ｅｄ．，Ｇｅｎｅ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｂｏｔａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ：ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ）。

【０７４５】

感染および／または敗血症を発症する危険性がある対象において感染および／または敗血症を予防するための方法が本明細書に提供され、本方法は、そのような予防を必要とする対象に、感染および／または敗血症を予防するのに十分な量で、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）、またはその部分的もしくは完全にプロセシングされた形態をコードするポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡ前駆体を含む組成物を投与することを含む。ある特定の実施形態において、感染および／または敗血症を発症する危険性がある対象は、癌患者であり得る。ある特定の実施形態において、癌患者は、前処置レジメンを経た場合がある。いくつかの実施形態において、前処置統制（ｒｅｇｉｍｅｎｔ）は、化学療法、放射線療法、または両方を含むが、これらに限定されない。非限定的な例として、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、プロテインＣ、そのチモーゲンもしくはプレプロタンパク質、またはプロテインＣの活性化型（ＡＰＣ）もしくはプロテインＣの変異形をコードし得、それらは当技術分野で知られている。

ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、化学修飾され、細胞に送達されてもよい。本発明の化学修飾されたｍＲＮＡ内でコードされ得るポリペプチドの非限定的な例としては、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第７，２２６，９９９号、同第７，４９８，３０５号、同第６，６３０，１３８号に教示されるものが挙げられる。これらの特許は、プロテインＣ様分子、変異形、および誘導体を教示し、これらのうちのいずれも、本発明の化学修飾された分子内でコードされ得る。

【０７４６】

対象において感染および／または敗血症を治療するための方法が本明細書にさらに提供され、本方法は、そのような治療を必要とする対象に、感染および／または敗血症を治療するのに十分な量で、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）、例えば、本明細書に記載の抗菌性ポリペプチド、またはその部分的もしくは完全にプロセシングされた形態をコードするポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡ前駆体を含む組成物を投与することを含む。ある特定の実施形態において、治療を必要とする対象は、癌患者である。ある特定の実施形態において、癌患者は、前処置レジメンを経ている。いくつかの実施形態において、前処置統制（ｒｅｇｉｍｅｎｔ）は、化学療法、放射線療法、または両方を含むが、これらに限定されない。

【０７４７】

ある特定の実施形態において、対象は、急性または慢性微生物感染（例えば、細菌感染）を呈する場合がある。ある特定の実施形態において、対象は、治療を受けた場合があるか、または受けている場合がある。ある特定の実施形態において、治療には、放射線療法、化学療法、ステロイド、紫外線放射、またはこれらの組み合わせが含まれ得るが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、患者は、微小血管障害を患っている場合がある。いくつかの実施形態において、微小血管障害は、糖尿病であり得る。ある特定の実施形態において、患者は、創傷を有し得る。いくつかの実施形態において、創傷は、潰瘍であり得る。具体的な実施形態において、創傷は、糖尿病性足部潰瘍であり得る。ある特定の実施形態において、対象は、１つ以上の熱傷創を有し得る。ある特定の実施形態において、投与は、局所であっても全身であってもよい。ある特定の実施形態において、投与は、皮下であってもよい。ある特定の実施形態において、投与は、静脈内であってもよい。ある特定の実施形態において、投与は、経口であってもよい。ある特定の実施形態において、投与は、局所であってもよい。ある特定の実施形態において、投与は、吸入によるものであってもよい。ある特定の実施形態において、投与は、直腸であってもよい。ある特定の実施形態において、投与は、膣内であってもよい。

【０７４８】

本開示の他の態様は、哺乳類対象への、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有する細胞の移植に関する。哺乳類対象への細胞の投与は、当業者に知られており、局所（局所）移植（例えば、局所（ｔｏｐｉｃａｌ）または皮下投与）、器官送達または全身埋込（例えば、静脈内注入または吸入）、および薬学的に許容される担体中の細胞の製剤を含むが、これらに限定されない。ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含有するそのような組成物は、筋肉内に、経動脈的に、腹腔内に、静脈内に、鼻腔内に、皮下に、内視鏡的に、経皮的に、または髄腔内に投与するために製剤化することができる。いくつかの実施形態において、組成物は、持続放出のために製剤化されてもよい。

【０７４９】

治療剤が投与され得る対象は、疾患、障害、または有害な状態を患うか、またはそれを発症する危険性があり得る。これらに基づいて、対象を特定する、診断する、および分類する方法が提供され、それは臨床診断、バイオマーカーレベル、全ゲノム相関解析（ＧＷＡＳ）、および当技術分野で既知の他の方法を含んでもよい。

【０７５０】

稀な肝疾患または肝障害

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症（ＰＦＩＣ）

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いて進行性家族性肝内胆汁うっ滞症（ＰＦＩＣ）を治療し得る。本明細書に使用される「進行性家族性肝内胆汁うっ滞症」または「ＰＦＩＣ」という用語は、肝不全を来たし得る肝障害を指す。ＰＦＩＣは常染色体劣性の胆汁生成欠陥および肝細胞性胆汁うっ滞を特徴とする。本明細書に使用される「肝細胞性」は肝臓細胞（肝細胞とも呼ばれる）に影響を及ぼすかこれに関連する事柄を記載するために使用される用語である。本明細書に使用される「胆汁うっ滞（症）」という用語は、肝臓からの胆汁の流れが遅くなったり妨げられたりすることを特徴とする病態を指す。本明細書に使用される「胆汁」という用語は、肝臓によって生成され、水、胆汁酸塩、粘液、脂肪、無機塩およびコレステロールを含み、食餌脂肪の乳化および消化を助ける液状物質を指す。

【０７５１】

ＰＦＩＣには３種類あることが知られており（ＰＦＩＣ－１、ＰＦＩＣ－２およびＰＦＩＣ－３）、３種類とも肝細胞輸送系および胆汁生成に関与するタンパク質をコードする遺伝子の変異に原因があるとされている。

【０７５２】

ＰＦＩＣ－１およびＰＦＩＣ－２は通常、幼児期に診断されるが、出生前期または新生児期に診断されることもある。本明細書に使用される「出生前」という用語は、生物の一生のうち出生前の一定時期を指す。本明細書に使用される「新生児」という用語は、生物の一生のうち出生後の一定期間を指す。ヒトでは、新生児期は出生から生後約１か月、約３か月または約６か月までの時期を含み得る。本明細書に使用される「幼児期」という用語は、生物の一生のうち出生から小児期までの間の一定期間を指す。ヒトでは、幼児期は出生から生後約１年、約２年、約３年または約４年までの時期を含み得る。

【０７５３】

ＰＦＩＣ－３は出生前期、新生児期、幼児期のいずれかで診断され得る。いくつかの場合には、ＰＦＩＣ－３が小児期または青年期まで診断を免れることもある。本明細書に使用される「小児期」という用語は、生物の一生のうち幼児期から青年期までの期間を指す。ヒトでは、小児期は生後約２年から生後約１０年まで、生後約３年から生後約１１年まで、生後約４年から生後約１２年までまたは生後約５年から生後約１３年までの期間を含み得る。本明細書に使用される「青年期」という用語は、生物の一生のうち小児期から成人期までの期間を指す。ヒトでは、青年期は生後約１０年から生後約１６年まで、生後約１１年から生後約１７年まで、生後約１２年から生後約１８年まで、生後約１３年から生後約１９年までおよび生後約１４年から生後約２０年までの時期を含み得る。

【０７５４】

ＰＦＩＣの臨床症状としては、特に限定されないが、そう痒、胆汁うっ滞および黄疸が挙げられる。本明細書に使用される「そう痒」という用語は、体の罹患部分を掻いたり擦ったりしたい衝動を生じさせる不快な感覚を指す。本明細書に使用される「黄疸」という用語は、ビリルビンの蓄積に起因する黄染した皮膚、眼球および／または粘膜を特徴とする病態を指す。

【０７５５】

ＰＦＩＣの患者のほとんどが成人期までに線維症が発現し、肝不全に陥る。ＰＦＩＣに罹患した個体は臨床症状観察、胆管造影、肝超音波検査、肝組織学検査臓および遺伝子検査によって診断することができる。小児胆汁うっ滞症を来たす他の障害を除外するため、また別の検査法を実施する場合もある。

【０７５６】

３種類の異なる細胞輸送体のうちの１つが機能不全に陥ることにより、ＰＦＩＣ１型、２型および３型のそれぞれが発症する。細胞輸送体はそれぞれ脂質輸送に関与し、それぞれが肝臓からの胆汁分泌に極めて重要な役割を果たしている。ＰＦＩＣ１型は、ＡＴＰａｓｅアミノリン脂質輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１（ＡＴＰ８Ｂ１）の機能不全をもたらす遺伝子変異が原因である。ＡＴＰ８Ｂ１は、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルエタノールアミンをリン脂質二重層の一方の側から他の側へ移動させるよ

う機能する。ＰＦＩＣ－２およびＰＦＩＣ－３はともに、ＡＴＰ結合カセット（ＡＢＣ）輸送体の機能に影響を及ぼす変異によって引き起こされる。ＡＢＣ、サブファミリーＢ、メンバー１１（ＡＢＣＢ１１）輸送体は、タウロコール酸をはじめとするコール酸結合化合物を肝細胞から胆汁中に輸送することによって胆汁生成を補助する。ＡＢＣＢ１１機能に欠陥があるとＰＦＩＣ－２を来たす。ＡＢＣ、サブファミリーＢ、メンバー４（ＡＢＣＢ４）はリン脂質、好ましくはホスファチジルコリンを胆汁中に取り込ませるために肝細胞膜を横切って輸送する。ＡＢＣＢ４の機能不全もたらす遺伝子変異がＰＦＩＣ－３の原因となる（Ｄａｖｉｔ－Ｓｐｒａｕｌら，Ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｖｅ ｆａｍｉｌｉａｌ ｉｎｔｒａｈｅｐａｔｉｃ ｃｈｏｌｅｓｔａｓｉｓ．Ｏｒｐｈａｎｅｔ Ｊ Ｒａｒｅ Ｄｉｓ．２００９ Ｊａｎ ８；４：１；Ｄｅｇｉｏｒｇｉｏ，Ｄ．ら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ ２５ ｎｅｗ ＡＢＣＢ４ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｖｅ ｆａｍｉｌｉａｌ ｉｎｔｒａｈｅｐａｔｉｃ ｃｈｏｌｅｓｔａｓｉｓ ｔｙｐｅ ３（ＰＦＩＣ３）．Ｅｕｒ Ｊ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ．２００７ Ｄｅｃ；１５（１２）：１２３０－８；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７５７】

一実施形態では、ＰＦＩＣの患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないが、ＡＴＰ結合カセット、サブファミリー（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー４（ＡＢＣＢ４）、ＡＴＰ結合カセット、サブファミリー（ＭＤＲ／ＴＡＰ、メンバー１１（ＡＢＣＢ１１）およびＡＴＰａｓｅ、アミノホホリピッド（ａｍｉｎｏｐｈｏｐｈｏｌｉｐｉｄ）輸送体、クラスＩ、タイプ８Ｂ、メンバー１（ＡＴＰ８Ｂ１）などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７５８】

一実施形態では、ＡＴＰ８Ｂ１のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＰＦＩＣ－１を治療し得る。別の実施形態では、配列番号８５５または８５６を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＰＦＩＣ－１を治療し得る。

【０７５９】

一実施形態では、ＡＢＣＢ１１のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＰＦＩＣ－２を治療し得る。別の実施形態では、配列番号８６５を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを含む本発明の組成物を投与することによってＰＦＩＣ－２を治療し得る。

【０７６０】

一実施形態では、ＡＢＣＢ４のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＰＦＩＣ－３を治療し得る。別の実施形態では、配列番号８６６～８７１を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＰＦＩＣ－３を治療し得る。

【０７６１】

家族性高コレステロール血症

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いて家族性高コレステロール血症（ＦＨ）を治療し得る。本明細書に使用される「家族性高コレステロール血症」または「ＦＨ」という用語は、血漿中の低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）関連コレステロールの濃度上昇を特徴とする遺伝性障害を指す。ＦＨの患者または対象では、若年で心血管疾患のリスクが増大し得る。いくつかの実施形態では、このような個体の血中ＬＤＬ濃度の上昇は、ＬＤＬ受容体をコードする遺伝子の変異に起因し得る。決して限定されるわけではないが、ＬＤＬ受容体が循環血中のＬＤＬと結合し、その受容体を発現する細胞内へのＬＤＬのエンドサイトーシスを促進すると考えられている。この受容体が機能不全に陥ると、循環血中ＬＤＬ濃度が上昇したままになり、アテローム性動脈硬化症の発現が促進される。ＦＨの個体は、ＦＨ関連遺伝子変異がヘテロ接合型でもホモ接合型でもあり得る。ホモ接合型の個体の症状の方が重症となり得る。黄色腫（脂肪を多量に含む皮膚の成長）を明らかにする理学検査を含めた当該技術分野で公知の方法によって、小児期または青年期に診断することが可能である。家族歴および遺伝子の分析により比較的早い段階でＦＨを診断することができる（Ｓｊｏｕｋｅ，Ｂ．ら，Ｆａｍｉｌｉａｌ ｈｙｐｅｒｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌｅｍｉａ：ｐｒｅｓｅｎｔ ａｎｄ ｆｕｔｕｒｅ ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ．Ｃｕｒｒ Ｃａｒｄｉｏｌ Ｒｅｐ．２０１１ Ｄｅｃ；１３（６）：５２７－３６；Ａｖｉｓ，Ｈ．Ｊ．ら，Ａ ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ ｒｅｖｉｅｗ ａｎｄ ｍｅｔａ－ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｓｔａｔｉｎ ｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ ｃｈｉｌｄｒｅｎ ｗｉｔｈ ｆａｍｉｌｉａｌ ｈｙｐｅｒｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌｅｍｉａ．Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ．２００７ Ａｕｇ；２７（８）：１８０３－１０；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７６２】

一実施形態では、ＦＨの患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないが、低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）、アポリポタンパク質Ｂ（ＡＰＯＢ）およびプロタンパク質転換酵素スブチリシン／ケキシン９型（ＰＣＳＫ９）などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７６３】

一実施形態では、ＬＤＬＲのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＦＨを治療し得る。別の実施形態では、配列番号１１４５～１１５１を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＦＨを治療し得る。

【０７６４】

一実施形態では、ＡＰＯＢのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＦＨを治療し得る。別の実施形態では、配列番号８１９または８１９を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＦＨを治療し得る。

【０７６５】

一実施形態では、ＰＣＳＫ９のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＦＨを治療し得る。別の実施形態では、配列番号１２４１～１２４３を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＦＨを治療し得る。

【０７６６】
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症
一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症（ＯＴＣＤ）を治療し得る。本明細書に使用される「オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症」または「ＯＴＣＤという用語は、酵素オルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）をコードする遺伝子の変異に起因する尿素合成の遺伝性障害を指す。このような変異は高アンモニア血症、神経学的問題および死亡率の上昇をもたらし得る。ＯＴＣは尿素回路の重要な要素であり、カルバモイルリン酸およびオルニチンからのシトルリン生成を触媒する。この過程は、体から過剰なアンモニアを除去するのに極めて重要である。ＯＴＣの遺伝子はＸ染色体上にあるため、ＯＴＣＤはＸ連鎖性障害である。ほとんどのＸ連鎖性障害と同じように、ＯＴＣＤは主として雄が罹患し、雌は保因者となる。ＯＴＣＤの重症度は遺伝子の変異の性質に左右される。非機能的ＯＴＣをもたらす遺伝子変異があると、その個体は通常、生後１か月以内に死亡する。このような変異は、ＯＴＣＤに罹患している疑いのある個体の遺伝子解析によって発見することができる。様々な程度の酵素機能をもたらす遺伝子変異のある個体では、比較的生存期間が長く、疾患の作用を軽減する治療が奏効する場合がある。症状を観察し、尿中に高濃度のアンモニアおよびオロト酸を検出した後にＯＴＣＤの診断を下すことができる（Ｂｒｕｎｅｔｔｉ－Ｐｉｅｒｒｉ，Ｎ．ら，Ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ｃｏｒｒｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｏｒｎｉｔｈｉｎｅ ｔｒａｎｓｃａｒｂａｍｙｌａｓｅ ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｕｓｉｎｇ ｌｏｗ ｄｏｓｅ ｈｅｌｐｅｒ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ．Ｊ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．２００８ Ａｕｇ；１０（８）：８９０－６；Ｗｉｌｍｓｌｏｗ，Ｕ．Ｋ．，Ｏｒｎｉｔｈｉｎｅ ｔｒａｎｓｃａｒｂａｍｙｌａｓｅ ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ：ａ ｕｒｅａ ｃｙｃｌｅ ｄｅｆｅｃｔ．Ｅｕｒ Ｊ Ｐａｅｄｉａｔｒ Ｎｅｕｒｏｌ．２００３；７（３）：１１５－２１；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７６７】
一実施形態では、ＯＴＣの患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ（ＯＴＣ）などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７６８】
一実施形態では、ＯＴＣのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＯＴＣＤを治療し得る。別の実施形態では、配列番号１１９２を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＯＴＣＤを治療し得る。

【０７６９】
クリグラー・ナジャー症候群
一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてクリグラー・ナジャー症候群を治療し得る。本明細書に使用される「クリグラー・ナジャー症候群」という用語は、酵素ビリルビン－ウリジン二リン酸グルクロノシルトランスフェラーゼの１Ａ１アイソフォーム（ＵＧＴ１Ａ１）の機能に影響を及ぼす先天異常を指す。ＵＧＴ１Ａ１は有毒なヘム分解副生成物、疎水性ビリルビンの解毒作用に極めて重要である。ＵＧＴ１Ａ１は、疎水性ビリルビンとグルコロン酸（ｇｌｕｃｏｒｏｎｉｃ ａｃｉｄ）とを結合させ胆汁中に排泄することによって機能すると考えられている。クリグラー・ナジャー症候群に罹患している個体には、非抱合型高ビリルビン血症（または循環血中の過剰な疎水性ビリルビン）が発現して神経学的障害を来たし、患者の加齢とともに効果が低下する定期的な光線療法が必要となる場合がある。クリグ

ラー・ナジャー症候群の診断は通常、幼児の黄疸の観察から始まり、次いで当該技術分野で公知の酵素および肝臓のアッセイによって酵素機能が評価され得る（Ｌｙｓｙ，Ｐ．Ａ．ら，Ｌｉｖｅｒ ｃｅｌｌ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃｒｉｇｌｅｒ－Ｎａｊｊａｒ ｓｙｎｄｒｏｍｅ ｔｙｐｅ Ｉ：ｕｐｄａｔｅ ａｎｄ ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ．Ｗｏｒｌｄ Ｊ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．２００８ Ｊｕｎ １４；１４（２２）：３４６４－７０；Ｓｕｇａｔａｎｉ，Ｊ．，Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，ｇｅｎｅｔｉｃ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ，ａｎｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ＵＤＰ－ｇｌｕｃｕｒｏｎｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ（ＵＧＴ）１Ａ１．Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔ．２０１２ Ｏｃｔ ２３．［印刷前電子出版］；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７７０】

一実施形態では、クリグラー・ナジャー症候群の患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがＵＧＴ１Ａ１などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７７１】

一実施形態では、ＵＧＴ１Ａ１のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってクリグラー・ナジャー症候群を治療し得る。別の実施形態では、配列番号１３５７または１３５８を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってクリグラー・ナジャー症候群を治療し得る。

【０７７２】

無セルロプラスミン血症

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いて無セルロプラスミン血症を治療し得る。本明細書に使用される「無セルロプラスミン血症」という用語は、セルロプラスミン（ＣＰ）遺伝子の遺伝子変異によりＣＰに欠陥があり、かつ／またはＣＰが機能不全に陥っている疾患を指す。ＣＰは鉄を細胞から毛細血管内に輸送することに関与する輸送タンパク質であると考えられている。鉄は毛細血管内に入るとフェリチン結合することができ、血流に入る。機能するＣＰがないと、細胞内に鉄が蓄積し、血清中フェリチン濃度が上昇する（Ｏｇｉｍｏｔｏ，Ｍ．ら，Ｃｒｉｔｅｒｉａ ｆｏｒ ｅａｒｌｙ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａｃｅｒｕｌｏｐｌａｓｍｉｎｅｍｉａ．Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ．２０１１；５０（１３）：１４１５－８；Ｍｉｙａｊｉｍａ，Ｈ．，Ａｃｅｒｕｌｏｐｌａｓｍｉｎｅｍｉａ．ＧｅｎｅＲｅｖｉｅｗｓ［インターネット］．Ｓｅａｔｔｌｅ（ＷＡ）：Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｓｅａｔｔｌｅ；２００３ Ａｕｇ １２［２０１１年2月１７日更新］；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７７３】

鉄の蓄積量は肝臓ならびに眼球、脳および膵臓で特に高くなり得る。ＣＰ遺伝子の遺伝的欠陥により生じる無セルロプラスミン血症は常染色体劣性障害である。本明細書に使用される「常染色体劣性」という用語は、原因遺伝子がホモ接合型の者に影響を及ぼし得る疾患、障害、形質または表現型を指す。この疾患の症状は通常、２５～６０歳の間に発現する。セルロプラスミンおよび鉄濃度の血清分析または鉄蓄積を探索する脳のＭＲＩ解析によって、この疾患に罹患していると考えられる個体の診断を下すことができる。

【０７７４】

一実施形態では、無セルロプラスミン血症の患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得

る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがＣＰなどのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７７５】

一実施形態では、ＣＰのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによって無セルロプラスミン血症を治療し得る。別の実施形態では、配列番号８９１を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによって無セルロプラスミン血症を治療し得る。

【０７７６】

α－マンノース症

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてα－マンノース症を治療し得る。本明細書に使用される「α－マンノース症」という用語は、欠陥のあるおよび／または機能不全に陥ったα－Ｄ－マンノシダーゼ酵素活性を原因とし、リソソーム蓄積症を引き起こす障害を指す。ＭＡＮ２Ｂ１遺伝子（α－Ｄ－マンノシダーゼをコードする）の遺伝的欠陥により生じるα－マンノース症は常染色体劣性障害である。α－マンノース症に罹患している者の特徴としては、特に限定されないが、免疫不全、顔面および骨格の異常、聴覚障害および知的障害が挙げられる。診断は、特に限定されないが表現型の特徴ならびに肝および脾機能不全の解析を含めた当該技術分野で公知の方法を用いて、幼児期という早期に下すことができる。比較的軽症の疾患であれば小児期および青年期の間にも診断されない場合がある。疾患の診断は通常、全血液細胞のα－Ｄ－マンノシダーゼ酵素活性の測定によって確定される（Ｍａｌｍ，Ｄ．ら，Ａｌｐｈａ－ｍａｎｎｏｓｉｄｏｓｉｓ．Ｏｒｐｈａｎｅｔ Ｊ Ｒａｒｅ Ｄｉｓ．２００８ Ｊｕｌ ２３；３：２１；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７７７】

一実施形態では、α－マンノース症の患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがＭＡＮ２Ｂ１などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７７８】

一実施形態では、ＭＡＮ２Ｂ１のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってα－マンノース症を治療し得る。別の実施形態では、配列番号１１５６～１１５８を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってα－マンノース症を治療し得る。

【０７７９】

チロシン血症

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてチロシン血症を治療し得る。本明細書に使用される「チロシン血症」という用語は、血中チロシンおよび／またはチロシン副生成物の濃度の上昇を特徴とする障害および／または病態を指す。いくつかの実施形態では、チロシン血症は、チロシン分解に必要な酵素の欠陥および／または機能不全をもたらす遺伝子変異を原因とする。症状としては、特に限定されないが、成長障害、下痢、嘔吐、黄疸、鼻出血傾向の増大、小頭症、振戦、運動失調、自傷行為、微細協調運動障害、言語障害、痙攣および／または

キャベツ様臭が挙げられる（Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｋ．ら，Ａｎｉｍａｌ ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ ｔｙｒｏｓｉｎｅｍｉａ．Ｊ Ｎｕｔｒ．２００７ Ｊｕｎ；１３７（６ Ｓｕｐｐｌ １）：１５５６Ｓ－１５６０Ｓ；ｄｉｓｃｕｓｓｉｏｎ １５７３Ｓ－１５７５Ｓ；Ｂｅｒｇｅｒｏｎ，Ａ．ら，Ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ ｔｙｒｏｓｉｎｅｍｉａ：ａｎ ｅｎｄｏｐｌａｓｍｉｃ ｒｅｔｉｃｕｌｕｍ ｓｔｒｅｓｓ ｄｉｓｏｒｄｅｒ？ Ｍｅｄ Ｓｃｉ（Ｐａｒｉｓ）．２００３ Ｏｃｔ；１９（１０）：９７６－８０；Ｍｅｈｅｒｅ，Ｐ．ら，Ｔｙｒｏｓｉｎｅ ａｍｉｎｏｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ：ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ａｎｄ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｙｎａｍｉｃｓ ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎｓ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｅｌｌ．２０１０ Ｎｏｖ；１（１１）：１０２３－３２；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７８０】

１型チロシン血症はフマリルアセト酢酸加水分解酵素（ＦＡＨ）活性の欠如を原因とする障害型を指す。１型チロシン血症におけるＦＡＨ活性の欠如によって代謝産物フマリルアセト酢酸が蓄積し、アポトーシス、変異誘発、異数性誘発および有糸分裂誘発などの細胞活性を引き起こす。

【０７８１】

２型チロシン血症はチロシンアミノトランスフェラーゼ（ＴＡＴ）活性の欠如を原因とする障害型を指す。ＴＡＴは、チロシンおよび特に限定されないがｐ－ヒドロキシフェニルピルビン酸（ｐＨＰＰ）を含めたその他の芳香族アミノ酸の可逆的アミノ基転移に関与する。

【０７８２】

一実施形態では、チロシン血症の患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがＦＡＨまたはＴＡＴなどのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７８３】

一実施形態では、ＦＡＨのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによって１型チロシン血症を治療し得る。別の実施形態では、配列番号９８５～９８７を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチドを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによって１型チロシン血症を治療し得る。

【０７８４】

一実施形態では、ＴＡＴのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによって２型チロシン血症を治療し得る。別の実施形態では、配列番号１３５６を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによって２型チロシン血症を治療し得る。

【０７８５】

ヘモクロマトーシス

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてヘモクロマトーシスを治療し得る。本明細書に使用される「ヘモクロマトーシス」という用語は、遺伝的欠陥に起因し得る鉄過剰症を特徴とする障害または病態を指す。ヘモクロマトーシスの症状としては、特に限定されないが、肝硬変、色素沈着過剰、下垂体機能低下、糖尿病および／または関節炎が挙げられる。ヘモクロマトーシスを引き起こす遺伝的欠陥を用いて疾患の型を特徴付ける。ヘモクロマトーシス１型は

ＨＦＥ遺伝子の遺伝子変異を原因とするものである。２Ａ型および２Ｂ型は、それぞれＨＦＥ２遺伝子およびＨＡＭＰ遺伝子の変異によるものである。ヘモクロマトーシス１型の症状が通常、成人期までみられるのに対して、ヘモクロマトーシス２Ａ型および２Ｂ型の症状は通常、小児期にみられる（Ｐａｐａｎｉｋｏｌａｏｕ，Ｇ．ら，Ｈｅｐｃｉｄｉｎ ｉｎ ｉｒｏｎ ｏｖｅｒｌｏａｄ ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ．Ｂｌｏｏｄ．２００５ Ｍａｙ １５；１０５（１０）：４１０３－５；Ｎａｎｄａｒ，Ｗ．ら，ＨＦＥ ｇｅｎｅ ｖａｒｉａｎｔｓ ａｆｆｅｃｔ ｉｒｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｂｒａｉｎ．Ｊ Ｎｕｔｒ．２０１１ Ａｐｒ １；１４１（４）：７２９Ｓ－７３９Ｓ；Ｗａｌｌａｃｅ，Ｄ．Ｆ．ら，Ｎｏｎ－ＨＦＥ ｈａｅｍｏｃｈｒｏｍａｔｏｓｉｓ．Ｗｏｒｌｄ Ｊ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．２００７ Ｓｅｐ ２１；１３（３５）：４６９０－８；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７８６】

一実施形態では、ヘモクロマトーシスの患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないが、ＨＦＥ２、ＨＡＭＰ、溶質輸送体ファミリー４０、メンバー１（ＳＬＣ４０Ａ１）およびトランスフェリン受容体２（ＴＦＲ２）などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７８７】

一実施形態では、ＨＦＥのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってヘモクロマトーシス１型を治療し得る。別の実施形態では、配列番号１０３８～１０５０を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってヘモクロマトーシス１型を治療し得る。

【０７８８】

一実施形態では、ＨＦＥ２またはＨＡＭＰのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってヘモクロマトーシス２型を治療し得る。別の実施形態では、配列番号１０５１～１０５７、１０６７または１０６８を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってヘモクロマトーシス２型を治療し得る。

【０７８９】

一実施形態では、ＴＦＲ２またはＳＬＣ４０Ａ１のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってヘモクロマトーシスを治療し得る。別の実施形態では、配列番号１２９０～１２９６または１３２３～１３２６を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってヘモクロマトーシスを治療し得る。

【０７９０】

糖原病

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてＩＶ型糖原病を治療し得る。本明細書に使用される「糖原病」または「ＧＳＤ」という用語は、グリコーゲンの合成および／または分解の欠陥を特徴とする生物の障害を指す。いくつかの実施形態では、ＧＳＤとして、特に限定されないが、アンダーソン病としても知られる４型ＧＳＤ、分枝酵素欠損症、アミロペクチン症およびグリコーゲン分枝酵素欠損症が挙げられる。ＩＶ型ＧＳＤはＧＢＥ１遺伝子によってコード

されるグリコーゲン分枝酵素（ＧＢＥ）の欠損に起因し、細胞傷害性になり得る異常なグリコーゲンの生成を引き起こす。組織特異的アイソフォームの発現による変動が存在するものの、古典的な肝ＩＶ型ＧＳＤの患者は出生時に健常に見えるが、生後間もなく肝硬変が生じ、通常、生後５か月までに肝不全を来たす（Ｏｚｅｎ，Ｈ．，Ｇｌｙｃｏｇｅｎ ｓｔｏｒａｇｅ ｄｉｓｅａｓｅｓ：ｎｅｗ ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ．Ｗｏｒｌｄ Ｊ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．２００７ Ｍａｙ １４；１３（１８）：２５４１－５３；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７９１】

一実施形態では、ＧＳＤの患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがグルカン（１，４－α－）、分枝酵素１（ＧＢＥ１）などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７９２】

一実施形態では、ＧＢＥ１のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＩＶ型ＧＳＤを治療し得る。別の実施形態では、配列番号１０１０～１０１２を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってＩＶ型ＧＳＤを治療し得る。

【０７９３】

ファンコニシスチン症

一実施形態では，本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてファンコニシスチン症を治療し得る。本明細書に使用される「シスチン症」という用語は、リソソーム内へのシスチンの異常な蓄積を特徴とする疾患を指す。代謝産物の血流中への再吸収を阻害し、代わりに尿中へ通過させる腎疾患がファンコニ症候群の最もよくみられる原因である。シスチンは２つのシステイン残基間のジスルフィド結合を介して生成される。リソソームは加水分解によってタンパク質が消化される部位であり、リソソーム内へのシスチン蓄積はシスチンを放出する輸送体仲介による輸送に依存している。ＣＴＮＳ遺伝子によってコードされるシスチノシンは、リソソーム内でシスチンと結合する７回膜貫通タンパク質であり、他のタンパク質と協働してリソソームからのシスチン除去を促進する。シスチノシン機能に重度の欠陥のある個体は生後６か月から１２か月の間に罹患し、水分および電解質の喪失をはじめとする腎および代謝合併症を来たす。通常、１０歳までに腎不全がみられる。現在用いられている治療法は、シスチン分子を切断してリソソームから除去することができる薬物、システアミンを用いるものである（Ｋａｌａｔｚｉｓ，Ｖ．ら，Ｃｙｓｔｉｎｏｓｉｓ：ｆｒｏｍ ｇｅｎｅ ｔｏ ｄｉｓｅａｓｅ．Ｎｅｐｈｒｏｌ Ｄｉａｌ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．２００２ Ｎｏｖ；１７（１１）：１８８３－６；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７９４】

一実施形態では、ヘモクロマトーシスの患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがシスチノシン、リソソームシステイン輸送体（ＣＴＮＳ）などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７９５】

一実施形態では、ＣＴＮＳのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってファンコニシスチン症を治療し得る。別の実施形態では、配列番号９３８～９４１を含むペプチド、タンパク質またはそのフラ

グメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってファンコニシスチン症を治療し得る。

【０７９６】

ファーバー脂肪肉芽腫症

一実施形態では、本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを用いてファーバー脂肪肉芽腫症を治療し得る。本明細書に使用される「ファーバー脂肪肉芽腫症（Ｆａｒｂｅｒ ｌｉｐｏｇｒａｎｕｌｏｍａｔｏｓｉｓ、Ｆａｒｂｅｒ’ｓ ｌｉｐｏｇｒａｎｕｌｏｍａｔｏｓｉｓ）」または「ファーバー病」は、１９５７年にＳｉｄｎｅｙ Ｆａｒｂｅｒによって同定されたリソソーム蓄積症を指す。この疾患は、Ｎ－アシルスフィンゴシンアミド加水分解酵素（酸性セラミダーゼ）１（ＡＳＡＨ１）遺伝子によってコードされる酵素、酸性セラミンダーゼ（ｃｅｒａｍｉｎｄａｓｅ）の欠陥を原因とする。この酵素が欠損すると、細胞内のセラミドが正常にスフィンゴシンと脂肪酸に分解されず、セラミドの異常な蓄積が起こり、疾患症状を来たす。症状は通常、幼児期の早期にみられるが、それ以降ににみられる場合もある。この疾患の典型的な型では、生後数週間以内に症状が発現し、関節の奇形、皮下小結節の存在および嗄声がみられる。患者にはこのほか、神経学的障害が認められる場合があり、通常、幼児期に死亡する。軽度の神経学的障害がある患者は４０代まで生存する場合がある。現時点でファーバー脂肪肉芽腫症に用いることができる治療法はない（Ｅｋｉｃｉ，Ｂ．ら，Ｆａｒｂｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ：Ａ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ．Ｊ Ｐｅｄｉａｔｒ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０１２ Ｍａｙ；７（２）：１５４－５；Ｆａｒｂｅｒ，Ｓ．ら，Ｌｉｐｏｇｒａｎｕｌｏｍａｔｏｓｉｓ；ａ ｎｅｗ ｌｉｐｏ－ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ ｓｔｏｒａｇｅ ｄｉｓｅａｓｅ．Ｊ Ｍｔ Ｓｉｎａｉ Ｈｏｓｐ ＮＹ．１９５７ Ｎｏｖ－Ｄｅｃ；２４（６）：８１６－３７；それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０７９７】

一実施形態では、ヘモクロマトーシスの患者に本発明の稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む組成物を投与し得る。稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡは、特に限定されないがＮ－アシルスフィンゴシンアミド加水分解酵素（酸性セラミダーゼ）１（ＡＳＡＨ１）などのペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードするものであり得る。

【０７９８】

一実施形態では、ＡＳＡＨ１のペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってファーバー脂肪肉芽腫症を治療し得る。別の実施形態では、配列番号１１７１～１１７５を含むペプチド、タンパク質またはそのフラグメントをコードする稀な肝疾患または肝障害のポリヌクレオチド、一次構築物またはｍｍＲＮＡを少なくとも１つ含む本発明の組成物を投与することによってファンコニシスチン症を治療し得る。

【０７９９】

創傷管理

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、創傷治療、例えば、治癒の遅延を呈する創傷の治療に使用されてもよい。創傷の治療を管理するためにポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの投与を含む方法が本明細書に提供される。本明細書における方法は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの投与の前、それと同時、またはその後のいずれかに行われるステップをさらに含んでもよい。例えば、創傷床は、創傷治癒を容易にし、望ましくは創傷の閉鎖を得るために、清浄にされ、準備される必要があり得る。創傷治癒を促進し、創傷閉鎖を達成するために、次のものを含むが、これらに限定されない、いくつかの戦略が使用され得る：（ｉ）壊死組織除去（任

意に反復される）、鋭利な壊死組織除去（死滅または感染組織の創傷からの外科的除去）、任意に、壊死組織を除去するための酵素等の化学的壊死組織除去剤、（ｉｉ）創傷に湿潤した温暖な環境を提供し、組織修復および治癒を促進するための創傷ドレッシング。

【０８００】

創傷ドレッシングを製剤化する際に使用される材料の例としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：ヒドロゲル（例えば、ＡＱＵＡＳＯＲＢ（登録商標）；ＤＵＯＤＥＲＭ（登録商標））、ヒドロコロイド（例えば、ＡＱＵＡＣＥＬ（登録商標）；ＣＯＭＦＥＥＬ（登録商標））、泡状物質（例えば、ＬＹＯＦＯＡＭ（登録商標）；ＳＰＹＲＯＳＯＲＢ（登録商標））、およびアルギン酸塩（例えば、ＡＬＧＩＳＩＴＥ（登録商標）；ＣＵＲＡＳＯＲＢ（登録商標））、（ｉｉｉ）細胞分裂および増殖を刺激し、創傷治癒を促進するためのさらなる成長因子、例えば、神経障害性足部潰瘍の治療のためにＦＤＡによって認可されているヒト組換え血小板由来成長因子である、ベカプレルミン（ＲＥＧＲＡＮＥＸゲル（登録商標））、（ｉｖ）清浄な、治癒していない創傷の被覆を得るために、軟組織創傷被覆、すなわち皮膚移植片が必要であり得る。軟組織被覆に使用され得る皮膚移植片の例としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：自家皮膚移植片、屍体皮膚移植片、生物工学によって作られた代用皮膚（例えば、ＡＰＬＩＧＲＡＦ（登録商標）；ＤＥＲＭＡＧＲＡＦＴ（登録商標））。

【０８０１】

ある特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡには、ヒドロゲル（例えば、ＡＱＵＡＳＯＲＢ（登録商標）；ＤＵＯＤＥＲＭ（登録商標））、ヒドロコロイド（例えば、ＡＱＵＡＣＥＬ（登録商標）；ＣＯＭＦＥＥＬ（登録商標））、泡状物質（例えば、ＬＹＯＦＯＡＭ（登録商標）；ＳＰＹＲＯＳＯＲＢ（登録商標））、および／またはアルギン酸塩（例えば、ＡＬＧＩＳＩＴＥ（登録商標）；ＣＵＲＡＳＯＲＢ（登録商標））がさらに含まれてもよい。ある特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、自家皮膚移植片、屍体皮膚移植片、または生物工学によって作られた代用皮膚（例えば、ＡＰＬＩＧＲＡＦ（登録商標）；ＤＥＲＭＡＧＲＡＦＴ（登録商標））を含むが、これらに限定されない皮膚移植片とともに使用されてもよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、創傷（ｗｏｕｌｄ）ドレッシング製剤および／もしくは皮膚移植片とともに適用されてもよく、またはそれはた、浸漬もしくは散布等であるが、これらに限定されない方法を除いて別個に適用されてもよい。

【０８０２】

いくつかの実施形態において、創傷管理のための組成物は、抗菌性ポリペプチド（例えば、抗細菌性ポリペプチド）および／または抗ウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含んでもよい。抗菌性ポリペプチドの前駆体または部分的もしくは完全にプロセシングされた形態がコードされてもよい。組成物は、包帯（例えば、粘着包帯）を用いた投与のために製剤化されてもよい。抗菌性ポリペプチドおよび／または抗ウイルス性ポリペプチドは、ドレッシング組成物と相互混合されてもよく、または別個に、例えば、浸漬もしくは散布によって適用されてもよい。

【０８０３】

抗体の産生

本発明の一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、抗体およびそのような抗体の断片をコードし得る。これらは、本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つによって産生されてもよい。抗体は、ＩｇＡ、ＩｇＧ、もしくはＩｇＭ等であるが、これらに限定されない、免疫グロブリンの異なるサブクラスまたはアイソタイプのうちのいずれか、または他のサブクラスのうちのいずれかであってもよい。本発明に従って調製され得る例示の抗体分子および断片には、免疫グロブリン分子、実質的に無傷の免疫グロブリン分子、およびパラトープを含有し得る免疫グロブリン分子の部分が含まれるが、これらに限定されない。パラトープを含有し得る抗体のそのような部分には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆ（ｖ）および当技術分野で既知の部分が含まれる

が、これらに限定されない。

【０８０４】

本発明のポリヌクレオチドは、参照ポリペプチド配列とある特定の同一性を有し得るか、または参照ポリペプチド配列と似ているもしくは似ていない結合特徴を有し得る、変異形抗体ポリペプチドをコードし得る。

【０８０５】

本発明の方法によって得られる抗体は、免疫された動物に由来する非ヒト抗体由来可変領域（複数可）配列、およびヒト抗体由来定常領域（複数可）配列を含む、キメラ抗体であってもよい。加えて、それらは、免疫された動物に由来する非ヒト抗体の相補的（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ）決定領域（ＣＤＲ）ならびにヒト抗体に由来するフレームワーク領域（ＦＲ）および定常領域を含む、ヒト化抗体でもあり得る。別の実施形態において、本明細書に提供される方法は、細胞培養プロセスにおいて抗体タンパク質産物の収率を向上させるために有用であり得る。

【０８０６】

感染を管理する

一実施形態において、抗菌性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを投与することによって、対象において、微生物感染（例えば、細菌感染）および／または微生物またはウイルス感染に関連した疾患、障害、もしくは状態、またはその症状を治療するまたは予防するための方法が提供される。該投与は、抗菌性薬剤（例えば、抗細菌剤）、例えば、本明細書に記載の抗菌性ポリペプチドまたは小分子抗菌性化合物と組み合わせられてもよい。抗菌性薬剤には、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗原虫薬剤、抗寄生虫剤、および抗プリオン剤が含まれるが、これらに限定されない。

【０８０７】

薬剤は、同時に、例えば、組み合わせた単位用量（例えば、両方の薬剤の同時送達を提供する）で投与することができる。薬剤は、数分間、数時間、数日間、または数週間の間隔等であるが、これらに限定されない、指定される時間間隔で投与することもできる。一般に、薬剤は、対象において、並行して生物学的に利用可能、例えば、検出可能であり得る。いくつかの実施形態において、薬剤は、本質的に同時に、例えば、同時に投与される２つの単位投薬量、または２つの薬剤の組み合わせた単位投薬量で、投与されてもよい。他の実施形態において、薬剤は、別個の単位投薬量で送達されてもよい。薬剤は、任意の順序で、または２つ以上の薬剤を含む１つ以上の調製物により、投与されてもよい。好ましい実施形態において、薬剤のうちの１つ、例えば、第１の薬剤の、少なくとも１回の投与は、他方の薬剤、例えば、第２の薬剤の数分、１、２、３、もしくは４時間以内に、またはさらに１日もしくは２日以内に行われてもよい。いくつかの実施形態において、組み合わせは、相乗的結果、例えば、相加的結果を超える、例えば、相加的結果の少なくとも２５、５０、７５、１００、２００、３００、４００、または５００％超を達成することができる。

【０８０８】

細菌感染に関連した状態

細菌感染に関連し得る疾患、障害、または状態には、膿瘍、放線菌症、急性前立腺炎、エロモナス・ハイドロフィラ、一年生草ライグラス中毒、炭疽病、桿菌性紫斑症、菌血症、細菌性胃腸炎、細菌性髄膜炎、細菌性肺炎、細菌性膣症、細菌関連皮膚状態、バルトネラ症、ＢＣＧ腫、ボトリオミセス症、ボツリヌス症、ブラジル紫斑熱、ブローディー膿瘍、ブルセラ症、ブルーリ潰瘍、カンピロバクター症、カリエス、カリオン病、ネコひっかき病、蜂窩織炎、クラミジア感染、コレラ、慢性細菌性前立腺炎、慢性再発性多巣性骨髄炎、クロストリジウム壊死性腸炎、歯周－歯内病変（ｃｏｍｂｉｎｅｄ ｐｅｒｉｏｄｏｎｔｉｃ－ｅｎｄｏｄｏｎｔｉｃ ｌｅｓｉｏｎｓ）、牛肺疫、ジフテリア、ジフテリア性口内炎、エーリキア症、丹毒、喉頭蓋炎（ｐｉｇｌｏｔｔｉｔｉｓ）、丹毒、フィッツ・ヒュー・カーチス症候群、ノミ媒介性斑点熱、腐蹄症（感染性足皮膚炎）、Ｇａｒｒｅ

硬化性骨髄炎、淋病、鼠径肉芽腫、ヒト顆粒球性アナプラズマ症、ヒト単球向性エーリキア症、百日咳（ｈｕｎｄｒｅｄ ｄａｙｓ’ｃｏｕｇｈ）、膿痂疹、晩期先天性梅毒性眼病、レジオネラ症、レミエール症候群、ライ病（ハンセン病）、レプトスピラ症、リステリア症、ライム病、リンパ節炎、類鼻疽、髄膜炎菌性疾患、髄膜炎菌性敗血症、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）感染、マイコバクテリウム複合体（ＭＡＩ）、マイコプラズマ肺炎、壊死性筋膜炎、ノカルジア症、水癌（ｎｏｍａ）（水癌（ｃａｎｃｒｕｍ ｏｒｉｓ）または壊疽性口内炎）、臍炎、眼窩蜂巣炎、骨髄炎、脾臓摘出後重症感染（ＯＰＳＩ）、ヒツジブルセラ症、パスツレラ病、眼窩周囲蜂巣炎、百日咳（ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）（百日咳（ｗｈｏｏｐｉｎｇ ｃｏｕｇｈ））、ペスト、肺炎球菌肺炎、ポット病、直腸炎、シュードモナス感染、オウム病、膿血症、化膿性筋炎、Ｑ熱、再帰熱（回帰熱）、リウマチ熱、ロッキー山斑点熱（ＲＭＳＦ）、リケッチア症、サルモネラ症、猩紅熱、敗血症、セラチア感染、細菌性赤痢、南部ダニ紅斑病（ｓｏｕｔｈｅｒｎ ｔｉｃｋ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｒａｓｈ ｉｌｌｎｅｓｓ）、ブドウ球菌性皮膚剥脱症候群、連鎖球菌咽頭炎、プール肉芽腫、ブタブルセラ症、梅毒、梅毒性大動脈炎、破傷風、毒素性ショック症候群（ＴＳＳ）、トラコーマ、塹壕熱、熱帯性潰瘍、結核、野兎病、腸チフス、発疹チフス、尿路性器結核、尿路感染、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染、ウォーターハウス・フリードリヒセン症候群、偽性結核（エルシニア）症、およびエルシニア症のうちの１つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。細菌感染に関連した他の疾患、障害、および／または状態は、例えば、アルツハイマー病、神経性食欲不振症、喘息、アテローム性動脈硬化症、注意欠陥多動性障害、自閉症、自己免疫疾患、双極性障害、癌（例えば、結腸直腸癌、胆嚢癌、肺癌、膵臓癌、および胃癌）、慢性疲労症候群、慢性閉塞性肺疾患、クローン病、冠動脈心疾患、認知症、うつ病、ギラン・バレー症候群、内臓脂肪症候群、多発性硬化症、心筋梗塞、肥満、強迫障害、パニック障害、乾癬、関節リウマチ、サルコイドーシス、統合失調症、脳卒中、閉塞性血栓血管炎（バージャー病）、およびトゥレット症候群を含むことができる。

【０８０９】

細菌性病原体

本明細書に記載の細菌は、グラム陽性菌またはグラム陰性菌であり得る。細菌性病原体には、アシネトバクター・バウマンニ、バチルス・アントラシス、バチルス・スブチリス、ボルデテラ・パータシス、ボレリア・ブルグドルフェリ、ブルセラ・アボルタス、ブルセラ・カニス、ブルセラ・メリテンシス、ブルセラ・スイス、カンピロバクター・ジェジュニ、クラミジア・ニューモニエ、クラミジアトラコーマｔｉｓ、クラミドフィラ・シタッシ、クロストリジウムボツリヌス、クロストリジウム・ディフィシル、クロストリジウム・パーフリンジェンス、クロストリジウムテタニ、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌、コリネバクテリウムジフテリア、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、大腸菌、腸内毒素原性大腸菌（ＥＴＥＣ）、腸管病原性大腸菌、大腸菌Ｏ１５７：Ｈ７、エンテロバクター種、フランシセラ・ツラレンシス、ヘモフィルス・インフルエンザエ、ヘリコバクター・ピロリ、クレブシエラ・ニューモニエ、レジオネラ・ニューモフィラ、レプトスピラ・インテロガンス、リステリア・モノサイトゲネス、モラクセラ・カタラーリス（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｃａｔａｒｒａｌｉｓ）、マイコバクテリウム・レプレ、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコプラズマ・ニューモニエ、ナイセリア・ゴノレー、ナイセリア・メニンギティディス、プレテウス・ミラビリス（Ｐｒｅｔｅｕｓ ｍｉｒａｂｉｌｉｓ）、プロテウス属、シュードモナス・エルジノーサ、リケッチア・リケッチイ、サルモネラ・チフィ、サルモネラ・チフィリウム、セラチア・マルセセンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｅｎｓ）、シゲラ・フレックスネリ、シゲラ・ソネイ、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミデス、スタフィロコッカス・サプロフィチカス、ストレプトコッカス・アガラクチア、ストレプトコッカス・ミュータンス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・ピオゲネス、トレポネーマー・パリダム、ビブリオ・コレラエ、およびエルシニア・ペスチスが挙げられるが、これらに限定されない。細菌性病原体は、耐性菌感染を引き起こす細菌、

例えば、クリンダマイシン耐性クロストリジウム・ディフィシル、フルオロキノロン耐性クロストリジウム・ディフィシル、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（ＭＲＳＡ）、多剤耐性エンテロコッカス・フェカリス、多剤耐性エンテロコッカス・フェシウム、多剤耐性シュードモナス・エルジノーサ、多剤耐性アシネトバクター・バウマンニ、およびバンコマイシン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（ＶＲＳＡ）も含み得る。

【０８１０】

抗生物質の組み合わせ

一実施形態において、本発明の修飾ｍＲＮＡは、１つ以上の抗生物質と組み合わせて投与され得る。これらには、アクニロックス、アムビゾーム、アモキシシリン、アンピシリン、オーグメンチン、アベロックス、アジスロマイシン、バクトロバン、ベタジン、ベトノベート、ブレファミド（Ｂｌｅｐｈａｍｉｄｅ）、セファクロル、セファドロキシル、セフジニル、セフェピム、セフィックス（Ｃｅｆｉｘ）、セフィキシム、セフォキシチン、セフポドキシム、セフプロジル、セフロキシム、セフジル（Ｃｅｆｚｉｌ）、セファレキシン、セファゾリン（Ｃｅｐｈａｚｏｌｉｎ）、セプタズ（Ｃｅｐｔａｚ）、クロラムフェニコール、クロルヘキシジン、クロロマイセチン、クローシグ（Ｃｈｌｏｒｓｉｇ）、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダゲル（Ｃｌｉｎｄａｇｅｌ）、クリンダマイシン、クリンダテック（Ｃｌｉｎｄａｔｅｃｈ）、クロキサシリン、コリスチン、コトリモキサゾール、デメクロサイクリン、ジクロシル（Ｄｉｃｌｏｃｉｌ）、ジクロキサシリン、ドキシサイクリン、デュリセフ（Ｄｕｒｉｃｅｆ）、エリスロマイシン、フラマジン（Ｆｌａｍａｚｉｎｅ）、フロキシン（Ｆｌｏｘｉｎ）、フラミセチン、フシジン（Ｆｕｃｉｄｉｎ）、フラダンチン、フシジック（Ｆｕｓｉｄｉｃ）、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、ゲミフロキサシン、イロソン、ヨード、ラバキン（Ｌｅｖａｑｕｉｎ）、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、マクサクイン（Ｍａｘａｑｕｉｎ）、メフォキシン、メロネム、ミノサイクリン、モキシフロキサシン、ミヤンブトール（Ｍｙａｍｂｕｔｏｌ）、マイコスタチン、ネオスポリン、ネトロマイシン（Ｎｅｔｒｏｍｙｃｉｎ）、ニトロフラントイン、ノルフロキサシン、ノリレット（Ｎｏｒｉｌｅｔ）、フロキサシン、オムニカフ（Ｏｍｎｉｃｅｆ）、オスパモックス（Ｏｓｐａｍｏｘ）、オキシテトラサイクリン、パラキシン（Ｐａｒａｘｉｎ）、ペニシリン、ニューモバックス、ポリファックス（Ｐｏｌｙｆａｘ）、ポビドン、リファジン、リファンピン、リファキシミン、リファナフ（Ｒｉｆｉｎａｈ）、リマクタン、ロセフィン、ロキシスロマイシン、セロマイシン、ソフラマイシン（Ｓｏｆｒａｍｙｃｉｎ）、スパルフロキサシン、スタフレックス（Ｓｔａｐｈｌｅｘ）、タゴシッド、テトラサイクリン、テトラドックス（Ｔｅｔｒａｄｏｘ）、テトラリサル（Ｔｅｔｒａｌｙｓａｌ）、トブラマイシン（ｔｏｂｒａｍｙｃｉｎ）、トブラマイシン（Ｔｏｂｒａｍｙｃｉｎ）、トレケーター（Ｔｒｅｃａｔｏｒ）、タイガシル、バンコシン、ベロセフ（Ｖｅｌｏｓｅｆ）、ビブラマイシン、キファサン（Ｘｉｆａｘａｎ）、ザガム（Ｚａｇａｍ）、ジトロテク（Ｚｉｔｒｏｔｅｋ）、ゾデルム（Ｚｏｄｅｒｍ）、ジマー（Ｚｙｍａｒ）、およびザイボックスが挙げられるが、これらに限定されない。

【０８１１】

抗細菌剤

例示の抗細菌剤には、アミノグリコシド（例えば、アミカシン（ＡＭＩＫＩＮ（登録商標））、ゲンタマイシン（ＧＡＲＡＭＹＣＩＮ（登録商標））、カナマイシン（ＫＡＮＴＲＥＸ（登録商標））、ネオマイシン（ＭＹＣＩＦＲＡＤＩＮ（登録商標））、ネチルマイシン（ＮＥＴＲＯＭＹＣＩＮ（登録商標））、トブラマイシン（ＮＥＢＣＩＮ（登録商標））、パロモマイシン（ＨＵＭＡＴＩＮ（登録商標））、アンサマイシン（例えば、ゲルダナマイシン、ハービマイシン）、カルバセフェム（例えば、ロラカルベフ（ＬＯＲＡＢＩＤ（登録商標））、カルバペネム（例えば、エルタペネム（ＩＮＶＡＮＺ（登録商標））、ドリペネム（ＤＯＲＩＢＡＸ（登録商標））、イミペネム／シラスタチン（ＰＲＩＭＡＸＩＮ（登録商標））、メロペネム（ＭＥＲＲＥＭ（登録商標））、セファロスポリン類（第１世代）（例えば、セファドロキシル（ＤＵＲＩＣＥＦ（登録商標））、セファ

ゾリン（ＡＮＣＥＦ（登録商標））、セファロチンまたはセファロチン（ｃｅｆａｌｏｔｈｉｎ）（ＫＥＦＬＩＮ（登録商標））、セファレキシン（ＫＥＦＬＥＸ（登録商標））、セファロスポリン類（第２世代）（例えば、セファクロル（ＣＥＣＬＯＲ（登録商標））、セファマンドール（ＭＡＮＤＯＬ（登録商標））、セフォキシチン（ＭＥＦＯＸＩＮ（登録商標））、セフプロジル（ＣＥＦＺＩＬ（登録商標））、セフロキシム（ＣＥＦＴＩＮ（登録商標）、ＺＩＮＮＡＴ（登録商標））、セファロスポリン類（第３世代）（例えば、セフィキシム（ＳＵＰＲＡＸ（登録商標））、セフジニル（ＯＭＮＩＣＥＦ（登録商標）、ＣＥＦＤＩＥＬ（登録商標））、セフジトレン（ＳＰＥＣＴＲＡＣＥＦ（登録商標））、セフォペラゾン（ＣＥＦＯＢＩＤ（登録商標））、セフォタキシム（ＣＬＡＦＯＲＡＮ（登録商標））、セフポドキシム（ＶＡＮＴＩＮ（登録商標））、セフタジジム（ＦＯＲＴＡＺ（登録商標））、セフチブテン（ＣＥＤＡＸ（登録商標））、セフチゾキシム（ＣＥＦＩＺＯＸ（登録商標））、セフトリアクソン（ＲＯＣＥＰＨＩＮ（登録商標））、セファロスポリン類（第４世代）（例えば、セフェピム（ＭＡＸＩＰＩＭＥ（登録商標））、セファロスポリン類（第５世代）（例えば、セフトビプロール（ＺＥＦＴＥＲＡ（登録商標））、グリコペプチド（例えば、テイコプラニン（ＴＡＲＧＯＣＩＤ（登録商標））、バンコマイシン（ＶＡＮＣＯＣＩＮ（登録商標））、テラバンシン（ＶＩＢＡＴＩＶ（登録商標））、リンコサミド系（例えば、クリンダマイシン（ＣＬＥＯＣＩＮ（登録商標））、リンコマイシン（ＬＩＮＣＯＣＩＮ（登録商標））、リポペプチド（例えば、ダプトマイシン（ＣＵＢＩＣＩＮ（登録商標））、マクロライド系（例えば、アジスロマイシン（ＺＩＴＨＲＯＭＡＸ（登録商標）、ＳＵＭＡＭＥＤ（登録商標）、ＺＩＴＲＯＣＩＮ（登録商標））、クラリスロマイシン（ＢＩＡＸＩＮ（登録商標））、ジリスロマイシン（ＤＹＮＡＢＡＣ（登録商標））、エリトロマイシン（ＥＲＹＴＨＯＣＩＮ（登録商標）、ＥＲＹＴＨＲＯＰＥＤ（登録商標））、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン（ＴＡＯ（登録商標））、テリスロマイシン（ＫＥＴＥＫ（登録商標））、スペクチノマイシン（ＴＲＯＢＩＣＩＮ（登録商標））、モノバクタム系（例えば、アズトレオナム（ＡＺＡＣＴＡＭ（登録商標））、ニトロフラン（例えば、フラゾリドン（ＦＵＲＯＸＯＮＥ（登録商標））、ニトロフラントイン（ＭＡＣＲＯＤＡＮＴＩＮ（登録商標）、ＭＡＣＲＯＢＩＤ（登録商標））、ペニシリン系（例えば、アモキシシリン（ＮＯＶＡＭＯＸ（登録商標）、ＡＭＯＸＩＬ（登録商標））、アンピシリン（ＰＲＩＮＣＩＰＥＮ（登録商標））、アズロシリン、カルベニシリン（ＧＥＯＣＩＬＬＩＮ（登録商標））、クロキサシリン（ＴＥＧＯＰＥＮ（登録商標））、ジクロキサシリン（ＤＹＮＡＰＥＮ（登録商標））、フルクロキサシリン（ＦＬＯＸＡＰＥＮ（登録商標））、メズロシリン（ＭＥＺＬＩＮ（登録商標））、メチシリン（ＳＴＡＰＨＣＩＬＬＩＮ（登録商標））、ナフシリン（ＵＮＩＰＥＮ（登録商標））、オキサシリン（ＰＲＯＳＴＡＰＨＬＩＮ（登録商標））、ペニシリンＧ（ＰＥＮＴＩＤＳ（登録商標））、ペニシリンＶ（ＰＥＮ－ＶＥＥ－Ｋ（登録商標））、ピペラシリン（ＰＩＰＲＡＣＩＬ（登録商標））、テモシリン（ＮＥＧＡＢＡＮ（登録商標））、チカルシリン（ＴＩＣＡＲ（登録商標））、ペニシリンの組合せ（例えば、アモキシシリン／クラブラン酸（ＡＵＧＭＥＮＴＩＮ（登録商標））、アンピシリン／スルバクタム（ＵＮＡＳＹＮ（登録商標））、ピペラシリン／タゾバクタム（ＺＯＳＹＮ（登録商標））、チカルシリン／クラブラネート（ＴＩＭＥＮＴＩＮ（登録商標））、ポリペプチド（例えば、バシトラシン、コリスチン（ＣＯＬＹ－ＭＹＣＩＮ－Ｓ（登録商標））、ポリミキシンＢ、キノロン系（例えば、シプロフロキサシン（ＣＩＰＲＯ（登録商標）、ＣＩＰＲＯＸＩＮ（登録商標）、ＣＩＰＲＯＢＡＹ（登録商標））、エノキサシン（ＰＥＮＥＴＲＥＸ（登録商標））、ガチフロキサシン（ＴＥＱＵＩＮ（登録商標））、レボフロキサシン（ＬＥＶＡＱＵＩＮ（登録商標））、ロメフロキサシン（ＭＡＸＡＱＵＩＮ（登録商標））、モキシフロキサシン（ＡＶＥＬＯＸ（登録商標））、ナリジクス酸（ＮＥＧＧＲＡＭ（登録商標））、ノルフロキサシン（ＮＯＲＯＸＩＮ（登録商標））、オフロキサシン（ＦＬＯＸＩＮ（登録商標）、ＯＣＵＦＬＯＸ（登録商標））、トロバフロキサシン（ＴＲＯＶＡＮ（登録商標））、グレパフロキサシン（ＲＡＸＡＲ（登録商標））、スパルフロキサシン（ＺＡＧＡＭ（登録商標））、テマフロキサシン

（ＯＭＮＩＦＬＯＸ（登録商標））、スルホンアミド類（例えば、マフェニド（ＳＵＬＦＡＭＹＬＯＮ（登録商標））、スルホンアミドクリソイジン（ＰＲＯＮＴＯＳＩＬ（登録商標））、スルファセタミド（ＳＵＬＡＭＹＤ（登録商標）、ＢＬＥＰＨ－１０（登録商標））、スルファジアジン（ＭＩＣＲＯ－ＳＵＬＦＯＮ（登録商標））、スルファジアジン銀（ＳＩＬＶＡＤＥＮＥ（登録商標））、スルファメチゾール（ＴＨＩＯＳＵＬＦＩＬ　ＦＯＲＴＥ（登録商標））、スルファメトキサゾール（ＧＡＮＴＡＮＯＬ（登録商標））、スルファニルイミド（ｓｕｌｆａｎｉｌｉｍｉｄｅ）、スルファサラジン（ＡＺＵＬＦＩＤＩＮＥ（登録商標））、スルファフラゾール（ＧＡＮＴＲＩＳＩＮ（登録商標））、トリメトプリム（ＰＲＯＬＯＰＲＩＭ（登録商標））、ＴＲＩＭＰＥＸ（登録商標））、トリメトプリム－スルファメトキサゾール（コトリモキサゾール）（ＴＭＰ－ＳＭＸ）（ＢＡＣＴＲＩＭ（登録商標）、ＳＥＰＴＲＡ（登録商標））、テトラサイクリン系（例えば、デメクロサイクリン（ＤＥＣＬＯＭＹＣＩＮ（登録商標））、ドキシサイクリン（ＶＩＢＲＡＭＹＣＩＮ（登録商標））、ミノサイクリン（ＭＩＮＯＣＩＮ（登録商標））、オキシテトラサイクリン（ＴＥＲＲＡＭＹＣＩＮ（登録商標））、テトラサイクリン（ＳＵＭＹＣＩＮ（登録商標）、ＡＣＨＲＯＭＹＣＩＮ（登録商標）Ｖ、ＳＴＥＣＬＩＮ（登録商標））、マイコバクテリアに対する薬物（例えば、クロファジミン（ＬＡＭＰＲＥＮＥ（登録商標））、ダプソン（ＡＶＬＯＳＵＬＦＯＮ（登録商標））、カプレオマイシン（ＣＡＰＡＳＴＡＴ（登録商標））、サイクロセリン（ＳＥＲＯＭＹＣＩＮ（登録商標））、エタンブトール（ＭＹＡＭＢＵＴＯＬ（登録商標））、エチオナミド（ＴＲＥＣＡＴＯＲ（登録商標））、イソニアジド（Ｉ．Ｎ．Ｈ．（登録商標））、ピラジナミド（ＡＬＤＩＮＡＭＩＤＥ（登録商標））、リファンピン（ＲＩＦＡＤＩＮ（登録商標）、ＲＩＭＡＣＴＡＮＥ（登録商標））、リファブチン（ＭＹＣＯＢＵＴＩＮ（登録商標））、リファペンチン（ＰＲＩＦＴＩＮ（登録商標））、ストレプトマイシン）、ならびにその他（例えば、アルスフェナミン（ＳＡＬＶＡＲＳＡＮ（登録商標））、クロラムフェニコール（ＣＨＬＯＲＯＭＹＣＥＴＩＮ（登録商標））、ホスホマイシン（ＭＯＮＵＲＯＬ（登録商標））、フシジン酸（ＦＵＣＩＤＩＮ（登録商標））、リネゾリド（ＺＹＶＯＸ（登録商標））、メトロニダゾール（ＦＬＡＧＹＬ（登録商標））、ムピロシン（ＢＡＣＴＲＯＢＡＮ（登録商標））、プラテンシマイシン、キヌプリスチン／ダルホプリスチン（ＳＹＮＥＲＣＩＤ（登録商標））、リファキシミン（ＸＩＦＡＸＡＮ（登録商標））、チアンフェニコール、チゲサイクリン（ＴＩＧＡＣＹＬ（登録商標））、チニダゾール（ＴＩＮＤＡＭＡＸ（登録商標）、ＦＡＳＩＧＹＮ（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８１２】

ウイルス感染に関連した状態

別の実施形態において、抗ウイルス剤、例えば、本明細書に記載の抗ウイルス性ポリペプチドまたは小分子抗ウイルス剤と組み合わせて、一次構築物をコードするポリヌクレオチド、またはｍｍＲＮＡ抗ウイルス性ポリペプチド、例えば、本明細書に記載の抗ウイルス性ポリペプチドを投与することによって、対象において、ウイルス感染および／もしくはウイルス感染に関連した疾患、障害、または状態、またはそれらの症状を治療するか、または予防する方法が提供される。

【０８１３】

ウイルス感染に関連した疾患、障害、または状態には、急性熱性咽頭炎、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、乳児胃腸炎、コクサッキー感染、感染性単核球症、バーキットリンパ腫、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、一次ＨＳＶ－１感染（例えば、小児における歯肉口内炎、成人における扁桃炎および咽頭炎、角結膜炎）、潜在性ＨＳＶ－１感染（例えば、口唇ヘルペスおよび単純ヘルペス）、一次ＨＳＶ－２感染、潜在性ＨＳＶ－２感染、無菌性髄膜炎、感染性単核球症、巨細胞封入体症、カポジ肉腫、多中心性キャッスルマン病、原発性体液性リンパ腫、ＡＩＤＳ、インフルエンザ、ライ症候群、麻疹、感染後脳脊髄炎、流行性耳下腺炎、過形成性上皮性病変（例えば、尋常性、扁平、足底および肛門性器疣贅、喉頭乳頭腫、疣贅状表皮発育異常症）、子宮頸癌、扁平上皮癌、クループ、肺

炎、細気管支炎、感冒、灰白髄炎、狂犬病、細気管支炎、肺炎、インフルエンザ様症候群、肺炎を伴う重症細気管支炎、ドイツ麻疹、先天性風疹、水痘およびヘルペス帯状疱疹が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８１４】

ウイルス性病原体

ウイルス性病原体には、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、脳炎ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス１型、単純ヘルペスウイルス２型、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス８型、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒトパピローマウイルス、パラインフルエンザ、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、風疹ウイルス、水痘－帯状疱疹ウイルス、西ナイルウイルス、および黄熱病ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルス性病原体は、耐性ウイルス感染を引き起こすウイルスも含む。

【０８１５】

抗ウイルス剤

例示の抗ウイルス剤には、アバカビル（ＺＩＡＧＥＮ（登録商標））、アバカビル／ラミブジン／ジドブジン（ｔｒｉｚｉｖｉｒ（登録商標））、アシクロビル（ａｃｉｃｌｏｖｉｒ）またはアシクロビル（ａｃｙｃｌｏｖｉｒ）（ＣＹＣＬＯＶＩＲ（登録商標）、ＨＥＲＰＥＸ（登録商標）、ＡＣＩＶＩＲ（登録商標）、ＡＣＩＶＩＲＡＸ（登録商標）、ＺＯＶＩＲＡＸ（登録商標）、ＺＯＶＩＲ（登録商標））、アデフォビル（Ｐｒｅｖｅｏｎ（登録商標）、Ｈｅｐｓｅｒａ（登録商標））、アマンタジン（ＳＹＭＭＥＴＲＥＬ（登録商標））、アンプレナビル（ＡＧＥＮＥＲＡＳＥ（登録商標））、アンプリゲン（ａｍｐｌｉｇｅｎ）、アルビドール、アタザナビル（ＲＥＹＡＴＡＺ（登録商標））、ボセプレビル、シドフォビル、ダルナビル（ＰＲＥＺＩＳＴＡ（登録商標））、デラビルジン（ＲＥＳＣＲＩＰＴＯＲ（登録商標））、ジダノシン（ＶＩＤＥＸ（登録商標））、ドコサノール（ＡＢＲＥＶＡ（登録商標））、エドクスジン、エファビレンツ（ＳＵＳＴＩＶＡ（登録商標）、ＳＴＯＣＲＩＮ（登録商標））、エムトリシタビン（ＥＭＴＲＩＶＡ（登録商標））、エムトリシタビン／テノホビル／エファビレンツ（ＡＴＲＩＰＬＡ（登録商標））、エンフビルチド（ＦＵＺＥＯＮ（登録商標））、エンテカビル（ＢＡＲＡＣＬＵＤＥ（登録商標）、ＥＮＴＡＶＩＲ（登録商標））、ファムシクロビル（ＦＡＭＶＩＲ（登録商標））、ホミビルセン（ＶＩＴＲＡＶＥＮＥ（登録商標））、ホスアンプレナビル（ＬＥＸＩＶＡ（登録商標）、ＴＥＬＺＩＲ（登録商標））、ホスカルネット（ＦＯＳＣＡＶＩＲ（登録商標））、ホスホネット、ガンシクロビル（ＣＹＴＯＶＥＮＥ（登録商標）、ＣＹＭＥＶＥＮＥ（登録商標）、ＶＩＴＲＡＳＥＲＴ（登録商標））、ＧＳ９１３７（ＥＬＶＩＴＥＧＲＡＶＩＲ（登録商標））、イミキモド（ＡＬＤＡＲＡ（登録商標）、ＺＹＣＬＡＲＡ（登録商標）、ＢＥＳＥＬＮＡ（登録商標））、インジナビル（ＣＲＩＸＩＶＡＮ（登録商標））、イノシン、イノシンプラノベクス（ＩＭＵＮＯＶＩＲ（登録商標））、Ｉ型インターフェロン、ＩＩ型インターフェロン、ＩＩＩ型インターフェロン、クタプレシン（ｋｕｔａｐｒｅｓｓｉｎ）（ＮＥＸＡＶＩＲ（登録商標））、ラミブジン（ＺＥＦＦＩＸ（登録商標）、ＨＥＰＴＯＶＩＲ（登録商標）、ＥＰＩＶＩＲ（登録商標））、ラミブジン／ジドブジン（ＣＯＭＢＩＶＩＲ（登録商標））、ロピナビル、ロビライド（ｌｏｖｉｒｉｄｅ）、マラビロク（ＳＥＬＺＥＮＴＲＹ（登録商標）、ＣＥＬＳＥＮＴＲＩ（登録商標））、メチサゾン、ＭＫ－２０４８、モロキシジン、ネルフィナビル（ＶＩＲＡＣＥＰＴ（登録商標））、ネビラピン（ＶＩＲＡＭＵＮＥ（登録商標））、オセルタミビル（ＴＡＭＩＦＬＵ（登録商標））、ペグインターフェロンα－２ａ（ＰＥＧＡＳＹＳ（登録商標））、ペンシクロビル（ＤＥＮＡＶＩＲ（登録商標））、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン（ＣＯＮＤＹＬＯＸ（登録商標））、ラルテグラビル（ＩＳＥＮＴＲＥＳＳ（登録商標））、リバビリン（ＣＯＰＥＧＵｓ（登録商標）、ＲＥＢＥＴＯＬ（登録商標）、ＲＩＢＡＳＰＨＥＲＥ（登録商標）、ＶＩＬＯＮＡ（登録商標）ＡＮＤＶＩＲＡＺＯＬＥ（登録商標））、リマンタジン（ＦＬＵＭＡＤＩＮＥ（

登録商標））、リトナビル（ＮＯＲＶＩＲ（登録商標））、ピラミジン（ｐｙｒａｍｉｄｉｎｅ）、サクイナビル（ＩＮＶＩＲＡＳＥ（登録商標）、ＦＯＲＴＯＶＡＳＥ（登録商標））、スタブジン、ティーツリーオイル（メラレウカ（ｍｅｌａｌｅｕｃａ）油）、テノホビル（ＶＩＲＥＡＤ（登録商標））、テノホビル／エムトリシタビン（ＴＲＵＶＡＤＡ（登録商標））、チプラナビル（ＡＰＴＩＶＵＳ（登録商標））、トリフルリジン（ＶＩＲＯＰＴＩＣ（登録商標））、トロマンタジン（ＶＩＲＵ－ＭＥＲＺ（登録商標））、バラシクロビル（ＶＡＬＴＲＥＸ（登録商標））、バルガンシクロビル（ＶＡＬＣＹＴＥ（登録商標））、ビクリビロック、ビダラビン、ビラミジン（ｖｉｒａｍｉｄｉｎｅ）、ザルシタビン、ザナミビル（ＲＥＬＥＮＺＡ（登録商標））、ならびにジドブジン（アジドミジン（ＡＺＴ）、ＲＥＴＲＯＶＩＲ（登録商標）、ＲＥＴＲＯＶＩＳ（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８１６】

真菌感染に関連した状態

真菌感染に関連した疾患、障害、または状態には、アスペルギルス症、ブラストミセス症、カンジダ症、コクシジオイデス症、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ症、菌腫、パラコクシジオイデス症、および足白癬が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、免疫不全を有する人は、アスペルギルス、カンジダ、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｃｏｃｕｓ）、ヒストプラズマ、およびニューモシスチス等の真菌属による疾患に特に罹患しやすい。他の真菌は眼、爪、髪、および特に皮膚を攻撃し得る、いわゆる皮膚糸状真菌（ｄｅｒｍａｔｏｐｈｙｔｉｃ　ｆｕｎｇｉ）および好角質性真菌と呼ばれ、それは足部白癬等の環蠕虫が一般的である多様な状態を引き起こす。菌類胞子もまた、アレルギーの主要な原因であり、異なる分類群からの幅広い真菌が、一部の人々にアレルギー反応を誘起し得る。

【０８１７】

真菌性病原体

真菌性病原体には、子嚢菌門（例えば、フザリウムオキシスポルム、ニューモシスチス・ジロベシ、アスペルギルス属、コクシジオイデス・イミチス／ポサダシ、カンジダ・アルビカンス）、担子菌門（例えば、フィロバジエラ・ネオフォルマンス、トリコスポロン）、微胞子虫門（例えば、エンセファリトゾーン・クニクリ、エンテロシトゾーン・ビエヌーシ）、およびケカビ亜門（例えば、ムコール・シルシネロイデス（Ｍｕｃｏｒ　ｃｉｒｃｉｎｅｌｌｏｉｄｅｓ）、リゾプス・オリーゼ、Ｌｉｃｈｔｈｅｉｍｉａ　ｃｏｒｙｍｂｉｆｅｒａ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８１８】

抗真菌剤

例示の抗真菌剤には、ポリエン抗真菌薬（例えば、ナタマイシン、リモシジン（ｒｉｍｏｃｉｄｉｎ）、フィリピン、ナイスタチン、アンホテリシンＢ、カンジシン（ｃａｎｄｉｃｉｎ）、ハマイシン）、イミダゾール抗真菌薬（例えば、ミコナゾール（ＭＩＣＡＴＩＮ（登録商標）、ＤＡＫＴＡＲＩＮ（登録商標））、ケトコナゾール（ＮＩＺＯＲＡＬ（登録商標）、ＦＵＮＧＯＲＡＬ（登録商標）、ＳＥＢＩＺＯＬＥ（登録商標））、クロトリマゾール（ＬＯＴＲＩＭＩＮ（登録商標）、ＬＯＴＲＩＭＩＮ（登録商標）ＡＦ、ＣＡＮＥＳＴＥＮ（登録商標））、エコナゾール、オモコナゾール、ビホナゾール、ブトコナゾール、フェンチコナゾール、イソコナゾール、オキシコナゾール、セルタコナゾール（ＥＲＴＡＣＺＯ（登録商標））、スルコナゾール、チオコナゾール）、トリアゾール抗真菌薬（例えば、アルバコナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾール、イサブコナゾール、ラブコナゾール、ポサコナゾール、ボリコナゾール、テルコナゾール）、チアゾール抗真菌薬（例えば、アバファンギン（ａｂａｆｕｎｇｉｎ））、アリルアミン（例えば、テルビナフィン（ＬＡＭＩＳＩＬ（登録商標））、ナフチフィン（ＮＡＦＴＩＮ（登録商標））、ブテナフィン（ＬＯＴＲＩＭＩＮ（登録商標）ウルトラ）、エキノキャンディン（例えば、アニデュラファンギン、カスポファンギン、ミカファンギン）、およびその他（例えば、ポリゴジアール、安息香酸、シクロピロックス、トルナフテート（ＴＩＮＡ

ＣＴＩＮ（登録商標）、ＤＥＳＥＮＥＸ（登録商標）、ＡＦＴＡＴＥ（登録商標））、ウンデシレン酸、フルシトシンまたは５－フルオロシトシン、グリセオフルビン、ハロプロジン、炭酸水素ナトリウム、アリシン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８１９】

原虫感染に関連した状態

原虫感染に関連した疾患、障害、または状態には、アメーバ症、ジアルジア症、トリコモナス症、アフリカ睡眠病、アメリカ睡眠病、リーシュマニア症（カラアザール）、バランチジウム症、トキソプラズマ症、マラリア、アカントアメーバ角膜炎、およびバベシア症が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８２０】

原虫病原体

原虫性病原体には、赤痢アメーバ、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ　ｌａｍｂｉｌａ）、膣トリコモナス、トリパノソーマ・ブルセイ、クルーズトリパノソーマ、ドノバンリーシュマニア、大腸バランチジウム、トキソプラズマ・ゴンディ、プラスモジウム属、およびネズミババベシアが挙げられるが、これらに限定されない。

【０８２１】

抗原虫剤

例示の抗原虫剤には、エフロールニチン、フラゾリドン（ＦＵＲＯＸＯＮＥ（登録商標）、ＤＥＰＥＮＤＡＬ－Ｍ（登録商標））、メラルソプロール、メトロニダゾール（ＦＬＡＧＹＬ（登録商標））、オルニダゾール、パロモマイシン硫酸塩（ＨＵＭＡＴＩＮ（登録商標））、ペンタミジン、ピリメタミン（ＤＡＲＡＰＲＩＭ（登録商標））、およびチニダゾール（ＴＩＮＤＡＭＡＸ（登録商標）、ＦＡＳＩＧＹＮ（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８２２】

寄生虫感染に関連した状態

寄生虫感染に関連した疾患、障害、または状態には、アカントアメーバ角膜炎、アメーバ症、回虫症、ババベシア症、バランチジウム症、ベイリスアスカリス症（ｂａｙｌｉｓａｓｃａｒｉａｓｉｓ）、シャガス病、肝吸虫症、コクリオミイヤ、クリプトスポリジウム症、裂頭条虫症、メジナ虫症、エキノコックス症、象皮病、蟯虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、ジアルジア症、顎口虫症、膜様条虫症、イソスポラ症、片山熱、リーシュマニア症、ライム病、マラリア、横川吸虫症、ハエ幼虫症、オンコセルカ症、シラミ寄生症、疥癬、住血吸虫症、睡眠病、糞線虫症、条虫症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、施毛虫症、および鞭虫症が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８２３】

寄生虫性病原体

寄生虫性病原体には、アカントアメーバ、アニサキス、回虫、ウシバエ、大腸バランチジウム、南京虫、条虫、恙虫、コクリオミイヤ・ホミニボラキス（Ｃｏｃｈｌｉｏｍｙｉａ　ｈｏｍｉｎｉｖｏｒａｘ）、赤痢アメーバ、肝蛭ランブル鞭毛虫、鉤虫、リーシュマニア、鼻腔舌虫、肝吸虫、ロア糸状虫、肺吸虫、蟯虫、熱帯熱マラリア原虫、住血吸虫、糞線虫、ダニ、サナダムシ、トキソプラズマ原虫、トリパノソーマ、鞭虫、バンクロフト糸状虫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８２４】

抗寄生虫剤

例示の抗寄生虫剤には、抗線虫薬（ａｎｔｉｎｅｍａｔｏｄｅｓ）（例えば、メベンダゾール、ピランテルパモ酸塩、チアベンダゾール、ジエチルカルバマジン、イベルメクチン）、抗条虫薬（ａｎｔｉｃｅｓｔｏｄｅｓ）（例えば、ニクロサミド、プラジカンテル、アルベンダゾール）、抗吸虫薬（ａｎｔｉｔｒｅｍａｔｏｄｅｓ）（例えば、プラジカンテル）、抗アメーバ薬（ａｎｔｉａｍｏｅｂｉｃｓ）（例えば、リファンピン、アンホテリシンＢ）、および抗原虫薬（例えば、メラルソプロール、エフロールニチン、メトロニダゾール、チニダゾール）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８２５】
プリオン感染に関連した状態
プリオン感染に関連した疾患、障害、または状態には、クロイツフェルト・ヤコブ病（ＣＪＤ）、医原性クロイツフェルト・ヤコブ病（ｉＣＪＤ）、異型クロイツフェルト・ヤコブ病（ｖＣＪＤ）、家族性クロイツフェルト・ヤコブ病（ｆＣＪＤ）、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病（ｓＣＪＤ）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群（ＧＳＳ）、致死性家族性不眠症（ＦＦＩ）、クールー病、スクラピー、ウシ海綿状脳症（ＢＳＥ）、狂牛病、伝達性ミンク脳症（ＴＭＥ）、慢性消耗病（ＣＷＤ）、ネコ海綿状脳症（ＦＳＥ）、外来性有蹄類脳症（ＥＵＥ）、および海綿状脳症が挙げられるが、これらに限定されない。
【０８２６】
抗プリオン剤
例示の抗プリオン剤には、フルピルチン、ペントサンポリ硫酸（ｐｅｎｔｏｓａｎ　ｐｏｌｙｓｕｐｈａｔｅ）、キナクリン、およびテトラ環状化合物が挙げられるが、これらに限定されない。
【０８２７】
免疫応答の調節
免疫応答の回避（ａｖｏｉｄａｎｃｅ）
本明細書に記載されるように、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの有用な特長は、細胞の自然免疫応答を低減させるか、逃れるか、または回避する能力である。一態様において、細胞に送達されるとき、参照化合物、例えば、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡ、または本発明の異なるポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡに対応する未修飾ポリヌクレオチドによって誘起される応答と比較して、低減された宿主からの免疫応答をもたらす、目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが本明細書に提供される。本明細書で使用されるとき、「参照化合物」は、哺乳動物に投与されるとき、既知の程度、レベル、または量の免疫刺激を有する自然免疫応答をもたらす任意の分子または物質である。参照化合物は、核酸分子である必要はなく、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのいずれかである必要もない。よって、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡによる免疫応答の誘起の回避（ａｖｏｉｄａｎｃｅ）、回避（ｅｖａｓｉｏｎ）、または失敗の測定は、そのような応答を誘起することが知られている任意の化合物または物質と比較することで示され得る。
【０８２８】
「自然免疫応答」という用語は、一般的にはウイルス起源または細菌起源の外因性一本鎖核酸に対する細胞応答を含み、これは、サイトカイン、特にインターフェロンの発現および放出、ならびに細胞死の誘導を含む。本明細書で使用されるとき、自然免疫応答またはインターフェロン応答は、サイトカイン発現、サイトカイン放出、タンパク質合成の全般的阻害、細胞ＲＮＡの全般的破壊、主要な組織適合性分子の上方制御、および／またはアポトーシス死の誘導、アポトーシス、抗成長、ならびに自然および適応免疫細胞活性化に関与する遺伝子の遺伝子転写の誘導を引き起こす単細胞レベルで機能する。Ｉ型ＩＦＮによって誘導されるいくつかの遺伝子には、ＰＫＲ、ＡＤＡＲ（ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ）、ＯＡＳ（２’，５’－オリゴアデニル酸シンテターゼ）、ＲＮａｓｅ　Ｌ、およびＭｘタンパク質が挙げられる。ＰＫＲおよびＡＤＡＲは、それぞれ、翻訳開始およびＲＮＡ編集の阻害をもたらす。ＯＡＳは、ｓｓＲＮＡを分解するためのエンドリボヌクレアーゼＲＮａｓｅ　Ｌを活性化するｄｓＲＮＡ依存性シンテターゼである。
【０８２９】
いくつかの実施形態において、自然免疫応答は、Ｉ型またはＩＩ型インターフェロンの発現を含み、そのＩ型またはＩＩ型インターフェロンの発現は、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触していない細胞からの参照と比較して２倍を超えては増加されない。

【０８３０】
いくつかの実施形態において、自然免疫応答は、１つ以上のＩＦＮシグネチャー遺伝子の発現を含み、その１つ以上のＩＦＮシグネチャー遺伝子は、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触していない細胞からの参照と比較して３倍を超えては増加しない。
【０８３１】
いくつかの状況では、細胞内の自然免疫応答を排除することは利益であり得るが、本発明は、投与すると、そのような応答を完全には排除することなく、実質的に低減された（著しく低い）インターフェロンシグナル伝達を含む免疫応答をもたらすポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを提供する。
【０８３２】
いくつかの実施形態において、免疫応答は、参照化合物に誘導される免疫応答と比較して１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、または９９．９％超低い。免疫応答自体は、１型インターフェロンの発現または活性のレベル、またはトール様受容体（例えば、ＴＬＲ７およびＴＬＲ８）等のインターフェロン制御遺伝子の発現を決定することにより測定され得る。自然免疫応答の低減は、細胞集団への１つ以上の投与に従って減少された細胞死のレベルを測定することによっても測定され得る。例えば、細胞死は、参照化合物で観察された細胞死頻度よりも１０％、２５％、５０％、７５％、８５％、９０％、９５％、または９５％超少ない。さらに、細胞死は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触した細胞の５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％、または０．０１％未満に影響し得る。
【０８３３】
別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、同じ配列を有する未修飾インビトロ合成ＲＮＡ分子ポリヌクレオチドもしくは一次構築物、または参照化合物よりも著しく低い免疫原性である。本明細書で使用されるとき、「著しく低い免疫原性」とは、免疫原性の検出可能な減少を指す。別の実施形態では、本用語は、免疫原性における倍数減少を指す。別の実施形態において、本用語は、有効量のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが検出可能な免疫応答を誘起することなく投与され得るような減少を指す。別の実施形態において、本用語は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが、組換えタンパク質の発現を検出可能に低減させるのに十分な免疫応答を誘発することなく繰り返し投与され得るような減少を指す。別の実施形態において、この減少は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが、組換えタンパク質の検出可能な発現を排除するのに十分な免疫応答を誘発することなく繰り返し投与され得るような減少である。
【０８３４】
別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、その未修飾対応物または参照化合物よりも２倍低い免疫原性である。別の実施形態において、免疫原性は、３倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、５倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、７倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、１０倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、１５倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、ある倍数だけ低減する。別の実施形態において、免疫原性は、５０倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、１００倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、２００倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、５００倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、１０００倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、２０００倍低減する。別の実施形態において、免疫原性は、別の倍数だけ低減する。
【０８３５】
免疫原性を決定する方法は、当技術分野でよく知られており、例えば、サイトカイン（例えば、ＩＬ－１２、ＩＦＮα、ＴＮＦ－α、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰ－１αもしくはβ、

ＩＬ－６、ＩＦＮ－β、またはＩＬ－８）の分泌を測定すること、ＤＣ活性化マーカー（例えば、ＣＤ８３、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ８０、およびＣＤ８６）の発現を測定すること、または適応免疫応答のアジュバントとして作用する能力を測定すること、が挙げられる。

【０８３６】

本明細書で教示される修飾の組み合わせを含む本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、それらを治療法としてより好適にする優れた特性を有し得る。

【０８３７】

当技術分野における「全か無か」のモデルは、修飾ｍＲＮＡの治療有用性に関連した生物学的現象を説明するのにひどく不十分であることが確定されている。本発明者らは、タンパク質産生を改善するためには、特定の修飾ｍＲＮＡの効果およびリスクプロファイルを判定するように、修飾もしくは修飾の組み合わせの性質、修飾の割合（％）を考慮し、１つを超えるサイトカインもしくは測定基準を検査し得ることを確認した。

【０８３８】

本発明の一態様において、未修飾と比較して修飾ｍＲＮＡの有効性を決定する方法は、その発現が本発明の外因性核酸の投与によって誘起される１つ以上のサイトカインの測定および分析を含む。これらの値は、未修飾核酸の投与と、またはサイトカイン応答、ポリＩＣ、Ｒ－８４８等の標準的な測定基準もしくは当技術分野で既知の他の標準と比較される。

【０８３９】

本明細書で開発される標準的な測定基準の１つの例は、細胞、組織、または生物内で産生されるコードされたポリペプチド（タンパク質）のレベルまたは量の、修飾核酸の投与または修飾核酸との接触の結果として、その発現が細胞、組織、または生物内で誘起されるサイトカインの１つ以上のレベルまたは量（またはパネル）に対する比率の測定である。そのような比率は、本明細書において、タンパク質：サイトカイン比または「ＰＣ」比と称される。ＰＣ比が高いほど、修飾核酸（測定されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド）の効果がより高い。本発明のサイトカインによる好ましいＰＣ比は、１を超える、１０を超える、１００を超える、１０００を超える、１０，０００を超える、またはそれ以上であり得る。異なるまたは未修飾の構築物の修飾核酸よりも高いＰＣ比を有する修飾核酸が、好ましい。

【０８４０】

ＰＣ比は、ポリヌクレオチドに存在する修飾の割合（％）によってさらに評価され得る。例えば、１００％修飾された核酸に対して正規化され、サイトカイン（もしくはリスク）の機能またはサイトカインプロファイルとしてのタンパク質産生が、判定され得る。

【０８４１】

一実施形態において、本発明は、修飾核酸（ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ）のＰＣ比を比較することで、化学、サイトカイン、または修飾の割合（％）にわたって、任意の特定の修飾ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの相対的効果を決定するための方法を提供する。

【０８４２】

増加したタンパク質産生および減少した免疫刺激可能性を維持する、様々なレベルの核酸塩基置換を含有するｍｍＲＮＡが産生され得る。任意の修飾ヌクレオチドのその天然に生じるヌクレオチド対応物に対する相対的割合（％）は、ＩＶＴ反応中に変化し得る（例えば、１００、５０、２５、１０、５、２．５、１、０．１、０．０１％の５メチルシチジン使用対シチジン；１００、５０、２５、１０、５、２．５、１、０．１、０．０１％のシュードウリジンまたはＮ１－メチル－シュードウリジン使用対ウリジン）。また、２つ以上の異なるヌクレオチドを同じ塩基に対して使用することによる異なる比率（例えば、シュードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの異なる比率）を利用するｍｍＲＮＡを作製することもできる。ｍｍＲＮＡは、同時に、５メチルシチジン／シチジンおよびシュードウリジン／Ｎ１－メチル－シュードウリジン／ウリジンの比率等の１つを超える「塩基」位置における混合した比率で作製されることもできる。修飾ヌクレオチド

の変化した比率で修飾ｍＲＮＡを使用することは、化学的修飾ヌクレオチドへの可能な曝露の低減において、有益であり得る。最後に、タンパク質産生もしくは免疫刺激可能性のいずれか、またはその両方を調節するｍｍＲＮＡへの修飾ヌクレオチドの位置的な導入もまた可能である。これらの改善された特性を実証するそのようなｍｍＲＮＡの能力を、（本明細書に記載のＰＢＭＣアッセイ等のアッセイを用いて）インビトロで評価することができ、また、ｍｍＲＮＡでコードされたタンパク質の産生およびサイトカイン等の自然免疫認識のメディエーターの両方の測定を通してインビボで評価することもできる。

【０８４３】

別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと、その未修飾対応物との相対的免疫原性は、未修飾ヌクレオチドまたは参照化合物の所与の量と同じ程度の上記応答のうちの１つを誘発するのに必要とされるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの量を決定することによって、決定することができる。例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡよりも２倍多いポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが同じ応答を誘発するために必要とされる場合、そのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、未修飾ヌクレオチドまたは参照化合物よりも２倍低い免疫原性である。

【０８４４】

別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと、その未修飾対応物との相対的免疫原性は、同じ量の未修飾ヌクレオチドまたは参照化合物に対するポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの投与に応じて分泌されるサイトカイン（例えば、ＩＬ－１２、ＩＦＮα、ＴＮＦ－α、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰ－１αもしくはβ、ＩＬ－６、ＩＦＮ－β、またはＩＬ－８）の量を決定することによって、決定される。例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの２分の１のサイトカインが分泌される場合、そのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、未修飾ヌクレオチドよりも２倍低い免疫原性である。別の実施形態において、刺激のバックグラウンドレベルは、上記の方法において免疫原性を算出する前に減算する。

【０８４５】

細胞内、または細胞の集団における免疫応答の滴定、低減、または排除を実施するための方法がまた本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、細胞は異なる用量の同じポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触させられ、用量応答が評価される。いくつかの実施形態において、細胞は、同じまたは異なる用量でいくつかの異なるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触させられ、所望の効果をもたらすための最適な組成物を決定する。免疫応答に関して、所望の効果は、細胞の免疫応答を回避すること、逃れること、または低減させることであり得る。所望の効果は、タンパク質産生の効率を変化させることでもあり得る。

【０８４６】

本発明のポリヌクレオチド、一時構築物および／またはｍｍＲＮＡは、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際公開第ＷＯ２０１３００３４７５号に記載の方法を用いて免疫応答を低減するために使用されてもよい。

【０８４７】

免疫応答の活性化：ワクチン

さらに、ある特定の修飾ヌクレオシド、またはその組み合わせは、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡに導入されると、自然免疫応答を活性化する。そのような活性化分子は、ポリペプチドおよび／または他のワクチンと組み合わせられる場合、アジュバントとして有用である。ある特定の実施形態において、活性化分子は、ワクチンとして有用であるポリペプチド配列をコードする翻訳可能領域を含有し、このようにして、自己アジュバントとなる能力を提供する。

【０８４８】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、免疫原をコードし得る。免疫原をコードするポリヌクレオチド、一次構築物、お

よび／またはｍｍＲＮＡの送達は、免疫応答を活性化し得る。非限定的な例として、免疫原をコードするポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、複数の自然応答経路を誘起するように細胞へ送達され得る（参照により全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２００６３７７号を参照のこと）。別の非限定的な例として、免疫原をコードする本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、脊椎動物に対する免疫原性となるのに十分に大きい投与量で脊椎動物に送達され得る（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２００６３７２号および同第ＷＯ２０１２００６３６９号を参照のこと）。

【０８４９】

本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、ワクチンのためのポリペプチド配列をコードし得、それは阻害剤をさらに含んでもよい。阻害剤は、抗原提示を損なうか、および／または当技術分野で既知の様々な経路を阻害し得る。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、抗原提示を損なうことができる阻害剤と組み合わせてワクチンに使用されてもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０８９２２５号および同第ＷＯ２０１２０８９３３８号を参照のこと）。

【０８５０】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、自己複製ＲＮＡであり得る。自己複製ＲＮＡ分子は、ＲＮＡ送達の効率および封入された遺伝子産物の発現を向上させることができる。一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、本明細書に記載され、かつ／または当技術分野で既知の少なくとも１つの修飾を含み得る。一実施形態において、自己複製ＲＮＡは、自己複製ＲＮＡが感染性ウイルス粒子の産生を誘導しないように設計され得る。非限定的な例として、自己複製ＲＮＡは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第ＵＳ２０１１０３００２０５号および国際公開第ＷＯ２０１１００５７９９号に記載の方法によって設計されてもよい。

【０８５１】

一実施形態において、本発明の自己複製ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、免疫応答を生じさせ得るタンパク質をコードし得る。非限定的な例として、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、少なくとも１つの抗原をコードし得る自己複製ｍＲＮＡであり得る（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第ＵＳ２０１１０３００２０５号、ならびに国際公開第ＷＯ２０１１００５７９９号、同第ＷＯ２０１３００６８３８号、および同第ＷＯ２０１３００６８４２号を参照のこと）。

【０８５２】

一実施形態において、本発明の自己複製ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、本明細書に記載されるか、または当技術分野で既知の方法を用いて製剤化することができる。非限定的な例として、自己複製ＲＮＡは、Ｇｅａｌｌ　ｅｔ　ａｌ（Ｎｏｎ　ｖｉｒａｌ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　ｓｅｌｆ－ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ　ＲＮＡ　ｖａｃｃｉｎｅｓ，ＰＮＡＳ　２０１２；ＰＭＩＤ：２２９０８２９４）に記載の方法によって送達用に製剤化されてもよい。

【０８５３】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、両親媒性および／または免疫原性の両親媒性ペプチドをコードし得る。

【０８５４】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの製剤は、両親媒性および／または免疫原性の両親媒性ペプチドをさらに含んでもよい。非限定的な例として、両親媒性および／または免疫原性の両親媒性ペプチドを含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第ＵＳ２０１１０２５０２３７号、ならびに国際公開第ＷＯ２０

１０００９２７７号および同第ＷＯ２０１０００９０６５号に記載されるように製剤化されてもよい。

【０８５５】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、免疫刺激性であり得る。非限定的な例として、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、陽性センスまたは陰性センス鎖ＲＮＡウイルスゲノムのすべてまたは一部をコードし得る（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０９２５６９号および米国公開第ＵＳ２０１２０１７７７０１号を参照のこと）。別の非限定的な例において、本発明の免疫刺激性ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、本明細書に記載され、かつ／または当技術分野で既知の投与用賦形剤を用いて製剤化されてもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０６８２９５号および米国公開第ＵＳ２０１２０２１３８１２号を参照のこと）。

【０８５６】

一実施形態において、本明細書に記載の方法によって製剤化されたワクチンの応答は、治療的効果を誘導するための様々な化合物の添加によって向上され得る。非限定的な例として、ワクチン製剤は、ＭＨＣＩＩ結合ペプチドまたはＭＨＣＩＩ結合ペプチドと類似の配列を有するペプチドを含んでもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０２７３６５号、同第ＷＯ２０１１０３１２９８号、および米国公開第ＵＳ２０１２００７０４９３号、同第ＵＳ２０１１０１１０９６５号を参照のこと）。別の例として、ワクチン製剤は、対象においてニコチン残基に対する抗体応答を生成し得る修飾ニコチン化合物を含んでもよい（各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第ＷＯ２０１２０６１７１７号および米国公開第ＵＳ２０１２０１１４６７７号を参照のこと）。

【０８５７】

天然に生じる変異体

別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡを用いて、増加した生物学的活性、改善された患者予後、または保護機能等を含む、改善された疾患修飾活性を有する天然に生じるタンパク質の変異形を発現することができる。多くのそのような修飾遺伝子が、哺乳動物において記載されている（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｎａｄｅａｕ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ＆Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ２００３ １３：２９０－２９５；Ｈａｍｉｌｔｏｎ ａｎｄ Ｙｕ，ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ．２０１２；８：ｅ１００２６４４；Ｃｏｒｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １９９４ ７：１８０－１８４）。ヒトにおける例には、アポＥ２タンパク質、アポＡ－Ｉ変異形タンパク質（アポＡ－Ｉ Ｍｉｌａｎｏ、アポＡ－Ｉ Ｐａｒｉｓ）、機能亢進性第ＩＸ因子タンパク質（第ＩＸ因子Ｐａｄｕａ Ａｒｇ３３８Ｌｙｓ）、トランスサイレチン変異体（ＴＴＲ Ｔｈｒ１１９Ｍｅｔ）が挙げられる。アポＥ２（ｃｙｓ１１２、ｃｙｓ１５８）の発現は、アルツハイマー病および心血管疾患等の可能性のある他の状態に対する易罹患性を低減することによって、他のアポＥアイソフォーム（アポＥ３（ｃｙｓ１１２、ａｒｇ１５８）およびアポＥ４（ａｒｇ１１２、ａｒｇ１５８））と比較して保護を与えることが示されている（すべてが参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｃｏｒｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １９９４ ７：１８０－１８４、Ｓｅｒｉｐａ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｊｕｖｅｎａｔｉｏｎ Ｒｅｓ．２０１１ １４：４９１－５００、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｎｅｕｒｏｌ．２０１３ ９：１０６－１１８）。アポＡ－Ｉ変異形の発現は、低減されたコレステロールを伴った（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、ｄｅＧｏｍａ ａｎｄ Ｒａｄｅｒ，２０１１ Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｃａｒｄｉｏｌ ８：２６６－２７１、Ｎｉｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００３ ＪＡＭＡ ２９０：２２９２－２３００）。ある特定の集団におけるアポＡ－Ｉのアミノ酸配列は、アポＡ－Ｉ Ｍｉｌａｎｏにおいて（Ａｒｇ１７３が

Ｃｙｓに変更された）、およびアポＡ－Ｉ Ｐａｒｉｓにおいて（Ａｒｇ１５１がＣｙｓに変更された）、システインに変更された。位置Ｒ３３８Ｌ（ＦＩＸ Ｐａｄｕａ）における第ＩＸ因子突然変異は、約１０倍に増加された活性を有する第ＩＸ因子タンパク質をもたらす（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｓｉｍｉｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．２００９ ３６１：１６７１－１６７５、Ｆｉｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１２ １２０：４５２１－４５２３、Ｃａｎｔｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１２ １２０：４５１７－２０）。位置１０４または１１９（Ａｒｇ１０４Ｈｉｓ、Ｔｈｒ１１９Ｍｅｔ）におけるトランスサイレチンの突然変異は、疾患をもたらすＶａｌ３０Ｍｅｔ突然変異も有する患者に保護を提供することも示されている（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｓａｒａｉｖａ，Ｈｕｍ Ｍｕｔａｔ．２００１ １７：４９３－５０３、ＤＡＴＡ ＢＡＳＥ ＯＮ ＴＲＡＮＳＴＨＹＲＥＴＩＮ ＭＵＴＡＴＩＯＮＳ ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｂｍｃ．ｕｐ．ｐｔ／ｍｊｓａｒａｉｖａ／ｔｔｒｍｕｔ．ｈｔｍｌ）。それぞれ、Ｍｅｔ１１９およびＨｉｓ１０４突然変異体を有するポルトガル人および日本人のＭｅｔ３０患者における臨床所見および症状の重症度の差異が、分子にさらなる安定性を与える非病原性変異体によって発現される明らかな保護作用を伴い観察される（すべてが参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｃｏｅｌｈｏ ｅｔ ａｌ．１９９６ Ｎｅｕｒｏｍｕｓｃｕｌａｒ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ（Ｓｕｐｐｌ）６：Ｓ２０、Ｔｅｒａｚａｋｉ ｅｔ ａｌ．１９９９．Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２６４：３６５－３７０）。これらの保護ＴＴＲ対立遺伝子をコードする修飾ｍＲＮＡは、ＴＴＲアミロイド症患者において発現され得、それにより病原性変異体ＴＴＲタンパク質の効果を低減させる。

【０８５８】

主溝相互作用パートナー

本明細書に記載されるように、「主溝相互作用パートナー」という表現は、ヌクレオチドまたは核酸の主溝の面との相互作用、例えば結合を通して、ＲＮＡリガンドを検出し、それに応答するＲＮＡ認識受容体を指す。したがって、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ等の修飾ヌクレオチドまたは核酸を含むＲＮＡリガンドは、主溝結合パートナーとの相互作用を減少させ、ゆえに、自然免疫応答を減少させる。

【０８５９】

例示の主溝相互作用、例えば結合パートナーには、以下のヌクレアーゼおよびヘリカーゼを含むが、これらに限定されない。膜内において、ＴＬＲ（トール様受容体（（Ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ））３、７、および８は、一本鎖および二重鎖ＲＮＡに応答することができる。細胞質内において、ＤＥＸ（Ｄ／Ｈ）ヘリカーゼおよびＡＴＰアーゼのスーパーファミリー２クラスのメンバーは、抗ウイルス応答を開始するＲＮＡを感知することができる。これらのヘリカーゼには、ＲＩＧ－Ｉ（レチノイン酸誘導性遺伝子（ｒｅｔｉｎｏｉｃ ａｃｉｄ－ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ ｇｅｎｅ）ＩおよびＭＤＡ５（メラノーマ分化関連遺伝子（ｍｅｌａｎｏｍａ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ）５）を含む。他の例には、遺伝学と生理学の研究所（ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｏｆｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ）２（ＬＧＰ２）、ＨＩＮ－２００ドメイン含有するタンパク質、またはヘリカーゼドメイン含有タンパク質が挙げられる。

【０８６０】

病原性生物または疾患細胞の標的化

細胞増殖抑制性または細胞傷害性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いて、細菌、酵母、原虫、蠕虫等の病原性微生物または癌細胞等の疾患細胞を標的化するための方法が本明細書に提供される。好ましくは、導入されるｍＲＮＡは、治療の見込まれるオフターゲット効果を低減させるために、標的病原性生物において排他的または優先的に翻訳された修飾ヌクレオシドまたは他の核酸配列修飾を

含む。そのような方法は、血液、精液、卵子、ならびに胚、組織、および器官を含む移植材料を含む任意の生体材料で見られる病原性生物を除去するか、または疾患細胞を死滅させるのに有用である。

【０８６１】

バイオプロセシング

本明細書に提供される方法は、細胞培養プロセスにおけるタンパク質産物収率を向上させるのに有用であり得る。複数の宿主細胞を含有する細胞培養において、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの導入は、対応する未修飾核酸と比べて増加したタンパク質産生効率をもたらす。そのような増加したタンパク質産生効率は、例えば、増加した細胞トランスフェクション、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡからの増加したタンパク質翻訳、減少した核酸分解、および／または低減された宿主細胞の自然免疫応答を示すことによって実証することができる。タンパク質産生は酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって測定することができ、タンパク質活性は当技術分野で既知の様々な機能的アッセイによって測定することができる。タンパク質産生は、連続的または流加（ｂａｔｃｈ－ｆｅｄ）哺乳類プロセスにおいて生成され得る。

【０８６２】

さらに、潜在的対象の細胞株または細胞株の収集物において、特定のポリペプチド、特に既知の活性を有する参照タンパク質のタンパク質変異形等の目的とするポリペプチドの発現を最適化することは有用である。一実施形態において、複数の標的細胞型を提供することによって、および独立して、その複数の標的細胞型のそれぞれと目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡとを接触させることによって、標的細胞において目的とするポリペプチドの発現を最適化する方法が提供される。細胞は、同時にまたは順次に、２つ以上のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡでトランスフェクトされ得る。

【０８６３】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法の複数ラウンドを用いて、目的とする１つ以上の核酸またはタンパク質の増加した発現を有する細胞を得ることができる。例えば、細胞は、目的とする核酸またはタンパク質をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡでトランスフェクトされてもよい。細胞は、再び単離される前に目的とする核酸またはタンパク質をコードする１つ以上の他の核酸によるトランスフェクションのさらなるラウンドに供される前に、本明細書に記載の方法に従って単離されてもよい。この方法は、タンパク質の複合体、同じまたは関連する生体経路中の核酸またはタンパク質、互いの上流または下流で作用する核酸またはタンパク質、互いに調節、活性化、または抑制機能を有する核酸またはタンパク質、機能または活性に関して互いに依存する核酸またはタンパク質、あるいは相同性を共有する核酸またはタンパク質の増加した発現を有する細胞を生成するのに有用であり得る。

【０８６４】

さらに、培養条件を変化させ、タンパク質産生効率を増加させることができる。続いて、複数の標的細胞型における目的とするポリペプチドの存在および／またはレベルを検出および／または定量し、ポリペプチドの発現に関する効率的な標的細胞および細胞培養条件の選択により、その最適化を可能にする。そのような方法は、しばしば効率的なタンパク質産生を複雑化する状況である、ポリペプチドが１つ以上の翻訳後修飾を含有するか、または実質的な三次構造を有する場合に、特に有用である。

【０８６５】

一実施形態において、本発明の方法で用いられる細胞は、培養され得る。細胞は、懸濁液中で、または接着培養物として培養され得る。細胞は、バイオリアクター、細胞バッグ、ウェーブバッグ、培養プレート、フラスコ、および当業者に周知の他の容器を含むが、これらに限定されない、様々な容器内で培養され得る。細胞は、ＩＭＤＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１２４４０－５３）または既知組成培地配合物を含む、これらに

限定されない任意の他の好適な培地内で培養され得る。また、温度や大気組成等の細胞培養に好適な周囲条件は、当業者によく知られている。本発明の方法は、タンパク質産生に使用するのに好適な任意の細胞で使用することができる。

【０８６６】

本発明は、例えば、インビトロ、エクスビボ、インサイツ、またはインビボで修飾核酸の標的細胞集団への反復導入（例えば、トランスフェクション）を提供する。例えば、同じ細胞集団への接触が、１回以上（２、３、４、５、または５回を超える等）反復され得る。いくつかの実施形態において、細胞集団をポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触するステップは、細胞集団におけるタンパク質翻訳の既定の効率を達成するのに十分であるように数回反復される。標的細胞集団の頻繁に低減された細胞傷害性を核酸修飾によって提供したと仮定すると、本明細書に提供されるように、反復トランスフェクションが多様な一連の細胞型において、および多様な組織内で達成可能である。

【０８６７】

一実施形態において、本発明のバイオプロセシング方法を用いて、抗体またはその機能的断片を産生することができる。機能的断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖドメイン、ｓｃＦｖ、または二特異性抗体を含み得る。それらは、相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む任意の領域において可変であり得る。一実施形態において、ＣＤＲ３領域には完全な多様性がある。別の実施形態において、抗体は、ＣＤＲ３領域内を除いて実質的に保存される。

【０８６８】

起源がヒト病原性であるか非ヒトであるかにかかわらず、任意の生体分子に結合するか、またはそれに会合する抗体が作製され得る。病原体は、非ヒト哺乳動物、臨床標本、または化粧品または医薬品材料等の市販製品に存在し得る。それらは、臨床標本または任意の生物からの組織試料を含む任意の標本または試料にも結合し得る。

【０８６９】

いくつかの実施形態において、接触ステップは、６時間時間、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、７２時間、８４時間、９６時間、および１０８時間からなる群から選択される頻度で、ならびに２０ｎＭ未満、５０ｎＭ未満、８０ｎＭ未満、または１００ｎＭ未満の濃度で、複数回反復される。組成物は、１ｍＭ未満、５ｍＭ未満、１０ｍＭ未満、１００ｍＭ未満、または５００ｍＭ未満でも投与され得る。

【０８７０】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、細胞当たり５０分子、１００分子／細胞、２００分子／細胞、３００分子／細胞、４００分子／細胞、５００分子／細胞、６００分子／細胞、７００分子／細胞、８００分子／細胞、９００分子／細胞、１０００分子／細胞、２０００分子／細胞、または５０００分子／細胞の量で添加される。

【０８７１】

他の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、０．０１ｆｍｏｌ／１０６細胞、０．１ｆｍｏｌ／１０６細胞、０．５ｆｍｏｌ／１０６細胞、０．７５ｆｍｏｌ／１０６細胞、１ｆｍｏｌ／１０６細胞、２ｆｍｏｌ／１０６細胞、５ｆｍｏｌ／１０６細胞、１０ｆｍｏｌ／１０６細胞、２０ｆｍｏｌ／１０６細胞、３０ｆｍｏｌ／１０６細胞、４０ｆｍｏｌ／１０６細胞、５０ｆｍｏｌ／１０６細胞、６０ｆｍｏｌ／１０６細胞、１００ｆｍｏｌ／１０６細胞、２００ｆｍｏｌ／１０６細胞、３００ｆｍｏｌ／１０６細胞、４００ｆｍｏｌ／１０６細胞、５００ｆｍｏｌ／１０６細胞、７００ｆｍｏｌ／１０６細胞、８００ｆｍｏｌ／１０６細胞、９００ｆｍｏｌ／１０６細胞、および１ｐｍｏｌ／１０６細胞からなる群から選択される濃度で添加される。

【０８７２】

いくつかの実施形態において、そこでの生体産物の産生は、細胞密度、ｐＨ、酸素レベル、グルコースレベル、乳酸レベル、温度、およびタンパク質産生からなる群から選択されるパラメータ等の１つ以上の測定可能なバイオプロセスパラメータを監視することによ

って検出される。タンパク質産生を比生産性（ＳＰ）（溶液中で非相同的に発現されるポリペプチド等の産物の濃度）として測定することができ、ｍｇ／Ｌまたはｇ／Ｌで示すことができ、別の方法として、比生産性をｐｇ／細胞／日で示してもよい。ＳＰの増加は、２つの既定の条件下（例えば、修飾ｍＲＮＡ（複数可）で処理されていない対照と比較した場合）で産生される産物の濃度の絶対的または相対的増加を指すことができる。

【０８７３】

細胞

一実施形態において、細胞は、哺乳類細胞、細菌性細胞、植物、微生物、藻類および真菌細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ウサギ、ハムスター、またはウシ細胞等であるが、これらに限定されない、哺乳類細胞である。さらなる実施形態において、細胞は、ＨｅＬａ、ＮＳ０、ＳＰ２／０、ＫＥＫ　２９３Ｔ、Ｖｅｒｏ、Ｃａｃｏ、Ｃａｃｏ－２、ＭＤＣＫ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－７、Ｋ５６２、ジャーカット、ＣＨＯ－Ｋ１、ＤＧ４４、ＣＨＯＫ１ＳＶ、ＣＨＯ－Ｓ、Ｈｕｖｅｃ、ＣＶ－１、Ｈｕｈ－７、ＮＩＨ３Ｔ３、ＨＥＫ２９３、２９３、Ａ５４９、ＨｅｐＧ２、ＩＭＲ－９０、ＭＣＦ－７、Ｕ－２０Ｓ、Ｐｅｒ．Ｃ６、ＳＦ９、ＳＦ２１、またはチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞が挙げられるが、これらに限定されない株化細胞に由来し得る。

【０８７４】

ある特定の実施形態において、細胞は、クリソスポリウム細胞、アスペルギルス細胞、トリコデルマ細胞、ディクチオステリウム細胞、カンジダ細胞、サッカロミセス細胞、シゾサッカロミセス細胞、およびペニシリウム細胞等であるが、これらに限定されない、真菌細胞である。

【０８７５】

ある特定の実施形態において、細胞は、大腸菌、枯草菌、またはＢＬ２１細胞等であるが、これらに限定されない、細菌性細胞である。本発明の方法によってトランスフェクトされる一次および二次細胞を多様な組織から得ることができ、培養下で維持され得るすべての細胞型を含むが、これらに限定されない。例えば、本発明の方法によってトランスフェクトされ得る一次および二次細胞には、線維芽細胞、ケラチノサイト、上皮細胞（例えば、乳腺上皮細胞、腸上皮細胞）、内皮細胞、グリア細胞、神経細胞、血液の形成要素（例えば、リンパ球、骨髄細胞）、筋肉細胞、およびこれらの体細胞型の前駆体が挙げられるが、これらに限定されない。また、一次細胞を同種または別の種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、トリ、ヒツジ、ヤギ、ウマ）の供与体から得ることもできる。

【０８７６】

精製および単離

当業者であれば、培養細胞から目的とするタンパク質を精製または単離するために使用する方法を決定できるはずである。一般に、これは、親和性結合または非親和性精製を使用する捕獲法を通して行われる。目的とするタンパク質が培養細胞によって分泌されない場合、次いで、精製または単離の前に培養細胞の溶解が行われるべきである。本発明中の細胞培養培地構成成分ならびに消泡化合物および他の栄養剤および栄養補助剤等の細胞培養添加物、細胞、細胞残屑、宿主細胞タンパク質、ＤＮＡ、ウイルス等とともに目的とするタンパク質を含有する清浄にされていない細胞培養液を用いてもよい。プロセスは、バイオリアクター自体において行われ得る。流体は、ｐＨ、温度、もしくは他の刺激特徴等の所望の刺激に予め調整されるか、もしくは流体は、ポリマー（複数可）の添加に応じて調整されるかのいずれかであってもよく、またはポリマー（複数可）が、ポリマーを流体中で可溶化するために必要とされる刺激条件に必要なパラメータに適正に調整された担体液体に添加されてもよい。流体を用いてポリマーを完全に循環させることができ、次いで、刺激を適用し（ｐＨ、温度、塩濃度等の変化）、所望のタンパク質およびポリマー（複数可）沈殿物を溶液中から取り出すことができる。ポリマーおよび所望のタンパク質（複数可）を残りの流体から分離することができ、任意に１回以上洗浄し、任意の捕捉された

、または緩く結合された混入物質を除去してもよい。次いで、所望のタンパク質が、例えば溶出等によってポリマー（複数可）から回収される。好ましくは、溶出は、所望のタンパク質の選択された溶出中、ポリマーがその沈殿形態中に残存し、任意の不純物をそこに保持するような条件下で行われ得る。ポリマーおよびタンパク質ならびに任意の不純物は、水または緩衝液等の新たな流体中に可溶化されてもよく、タンパク質は、ポリマーまたは不純物のものを上回るタンパク質の優先性および選択性を有する親和性、イオン交換、疎水性、またはいくつかの他の種類のクロマトグラフィー等によって回収され得る。次いで、溶出されたタンパク質が回収され、適切な場合、バッチ様（ｂａｔｃｈ　ｌｉｋｅ）ステップまたは連続フロースルーステップのいずれかのさらなるプロセシングステップに供され得る。

【０８７７】

別の実施形態において、潜在的対象の細胞株または細胞株の収集物において、特定のポリペプチド、特に既知の活性を有する参照タンパク質のタンパク質変異形等の目的とするポリペプチドの発現を最適化することは有用であり得る。一実施形態において、複数の標的細胞型を提供することによって、および独立して、その複数の標的細胞型のそれぞれとポリペプチドをコードする修飾ｍＲＮＡとを接触させることによって、標的細胞において目的とするポリペプチドの発現を最適化する方法が提供される。さらに、培養条件を変化させ、タンパク質産生効率を増加させることができる。続いて、複数の標的細胞型における目的とするポリペプチドの存在および／またはレベルを検出および／または定量し、目的とするポリペプチドの発現に関する効率的な標的細胞および細胞培養条件の選択により、その最適化を可能にする。そのような方法は、しばしば効率的なタンパク質産生を複雑化する、目的とするポリペプチドが１つ以上の翻訳後修飾を含有するか、または実質的な三次構造を有する場合に、有用であり得る。

【０８７８】

タンパク質回収

目的とするタンパク質は、好ましくは、分泌されるポリペプチドとして培養培地から回収され得るか、または分泌シグナルを伴わずに発現される場合、宿主細胞ライセートから回収され得る。目的とするタンパク質の実質的に均一の調節物が得られる方法で、目的とするタンパク質を他の組換えタンパク質および宿主細胞タンパク質から精製しなければならない場合がある。細胞および／または粒状細胞残屑は、培養培地またはライセートから除去され得る。次いで、例えば、免疫親和性またはイオン交換カラム上の分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（登録商標）クロマトグラフィー、シリカ上またはＤＥＡＥ等のカチオン交換樹脂上でのクロマトグラフィーによって、目的とする産物を混入物質可溶性タンパク質、ポリペプチドおよび核酸から精製することができる。宿主細胞によって非相同的に発現されるタンパク質の精製方法は、当技術分野でよく知られている。

【０８７９】

本明細書に記載の方法および組成物を用いて、哺乳類対象において、内因性アゴニスト生物応答を減弱するか、もしくは遮断する、および／または受容体もしくはシグナル伝達分子を拮抗することができるタンパク質を産生することができる。例えば、ＩＬ－１２およびＩＬ－２３受容体シグナル伝達が、多発性硬化症等の慢性自己免疫障害ならびに関節リウマチ、乾癬、狼瘡エリテマトーデス、強直性脊椎炎、およびクローン病（Ｃｈｒｏｎ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）等の炎症性疾患において増強され得る（Ｋｉｋｌｙ　Ｋ，Ｌｉｕ　Ｌ，Ｎａ　Ｓ，Ｓｅｄｇｗｉｃｈ　ＪＤ（２００６）Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８（６）：６７０－５）。別の実施形態において、核酸は、ケモカイン受容体のアンタゴニストをコードする。ケモカイン受容体ＣＸＣＲ－４およびＣＣＲ－５が、ＨＩＶが宿主細胞内に進入するために必要とされる（Ａｒｅｎｚａｎａ－Ｓｅｉｓｄｅｄｏｓ　Ｆ　ｅｔ　ａｌ，（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ．Ｏｃｔ　３；３８３（６５９９）：４００）。

【０８８０】

遺伝子サイレンシング

本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、細胞集団における１つ以上の標的遺伝子の発現を発現停止させる（すなわち、予防するか、または大幅に低減させる）ために有用である。配列特異的ヒストンＨ３メチル化を指示することができる目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが、ポリペプチドが翻訳され、ヒストンＨ３メチル化および続ヘテロクロマチン形成を介して標的遺伝子の遺伝子転写が低減されるような条件下の集団における細胞内に導入される。いくつかの実施形態において、サイレンシング機構は、哺乳類対象中に存在する細胞集団上で行われる。非限定的な例として、有用な標的遺伝子は、その中で哺乳類対象が、異常なキナーゼ活性の結果である骨髄増殖性疾患から被る変異体標的遺伝子を発現する、変異ヤヌスキナーゼ－２ファミリーメンバーである。

【０８８１】

ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡとＲＮＡｉ薬剤との同時投与もまた、本明細書に提供される。

【０８８２】

生体経路の調節

細胞内に導入される急速翻訳ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡは、標的生体経路を調節する所望の機構を提供する。そのような調節には、所与の経路のアンタゴニズムまたはアゴニズムが含まれる。一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡが細胞内に局在化され、ポリペプチドが、ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡから細胞内で翻訳されることができ、そのポリペプチドが、生体経路におけるポリペプチド機能の活性を阻害するような条件下で、細胞を目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含む有効量の組成物と接触させることによって、細胞内の生体経路を拮抗するための方法が、提供される。例示の生体経路は、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、狼瘡エリテマトーデス、強直性脊椎炎、大腸炎、またはクローン病等の自己免疫または炎症性障害において欠損しているものである。特に、ＩＬ－１２およびＩＬ－２３シグナル伝達経路のアンタゴニズムは、特に有用性がある（Ｋｉｋｌｙ Ｋ，Ｌｉｕ Ｌ，Ｎａ Ｓ，Ｓｅｄｇｗｉｃｋ ＪＤ（２００６）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８（６）：６７０－５）を参照のこと）。

【０８８３】

さらに、ケモカイン受容体のアンタゴニストをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。ケモカイン受容体ＣＸＣＲ－４およびＣＣＲ－５は、例えば、ＨＩＶが宿主細胞内に進入するために必要とされる（Ａｒｅｎｚａｎａ－Ｓｅｉｓｄｅｄｏｓ Ｆ ｅｔ ａｌ，（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ．Ｏｃｔ ３；３８３（６５９９）：４００）。

【０８８４】

あるいは、核酸が細胞内に局在化され、組換えポリペプチドが核酸から細胞内で翻訳されることができ、その組換えポリペプチドが、生体経路のおけるポリペプチド機能の活性を誘導するような条件下で、細胞を組換えポリペプチドをコードする有効量のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと接触させることによって、細胞内の生体経路を刺激する方法が提供される。例示の刺激された生体経路には、細胞運命決定を調節する経路を含む。そのような刺激化（ａｇｏｎｉｚａｔｉｏｎ）は、可逆性であるか、または不可逆性である。

【０８８５】

細胞表面上でのリガンドまたは受容体の発現

本明細書に記載のいくつかの態様および態様の実施形態において、本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを用いて、細胞の表面上（例えば、ホーミング部分）でリガンドまたはリガンド受容体を発現することができる。細胞表面に結合されるリガンドまたはリガンド受容体部分は、細胞がインビボで組織または薬剤との所望

の生物相互作用を有することを可能にする。リガンドは、抗体、抗体断片、アプタマー、ペプチド、ビタミン、炭水化物、タンパク質またはポリペプチド、受容体、例えば細胞表面受容体、接着分子、糖タンパク質、糖残基、治療剤、薬物、グリコサミノグリカン、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。例えば、リガンドは、癌細胞特異的抗原を認識する抗体であってもよく、腫瘍細胞と優先的に相互作用することができる細胞を与え、修飾細胞の腫瘍特異的局在化を可能にする。好ましいリガンドは治療される組織の外側の面で標的分子と相互作用することができるため、リガンドは、細胞組成物の治療される組織内で蓄積する能力を与えることができる。他の組織との制限された交差反応性を有するリガンドが、一般的に好ましい。

【０８８６】

いくつかの場合において、リガンドは、細胞が特定の組織を標的化するか、または特定のリガンドと相互作用することを可能にするホーミング部分として作用することができる。そのようなホーミング部分には、：Ｆｖ断片、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、単一ドメイン抗体、ラクダ化抗体および抗体断片、ヒト化抗体および抗体断片、および前述の多価の別形態が挙げられるが、これらに限定されない、特異的結合ペア、抗体、モノクローナル抗体、または誘導体またはそれらの類似体の任意のメンバー：ジスルフィド安定化Ｆｖ断片、ｓｃＦｖタンデム（（ＳＣＦＶ）２断片）等の単一特異性または二重特異性抗体、典型的には、共有結合されるか、または安定化される（すなわち、ロイシンジッパーまたはヘリックス安定化されている）ｓｃＦｖ断片である二特異性抗体、三特異性抗体（ｔｒｉｂｏｄｉｅｓ）、または四特異性抗体（ｔｅｔｒａｂｏｄｉｅｓ）が挙げられるが、これらに限定されない、多価結合試薬；ならびに例えば、アプタマー、受容体、および融合タンパク質を含む、他のホーミング部分を含み得るが、これらに限定されない。

【０８８７】

いくつかの実施形態において、ホーミング部分は、細胞標的化特異性の調整を可能にすることができる表面結合抗体であり得る。これは、高度特異的抗体が、所望の標的化部位の目的とするエピトープに対して産生され得るため、特に有用である。一実施形態において、複数の抗体が、細胞の表面上に発現され、各抗体は所望の標的に対する異なる特異性を有することができる。そのような手法は、ホーミング相互作用の結合力および特異性を増加させることができる。

【０８８８】

当業者であれば、細胞の所望の局在化または機能に基づいて任意のホーミング部分を選択することができ、例えば、タモキシフェン等のエストロゲン受容体リガンドは、細胞を細胞表面上に増加したエストロゲン受容体数を有するエストロゲン依存乳癌細胞に標的化することができる。リガンド／受容体相互作用の他の非限定的な例としては、ＣＣＲＩ（例えば、関節リウマチおよび／または多発性硬化症における炎症した関節組織または脳の治療のため）、ＣＣＲ７、ＣＣＲ８（例えば、リンパ節組織を標的化する）、ＣＣＲ６、ＣＣＲ９、ＣＣＲ１０（例えば、腸組織に標的化するため）、ＣＣＲ４、ＣＣＲ１０（例えば、皮膚を標的化するため）、ＣＸＣＲ４（例えば、一般的に向上された遊出のため）、ＨＣＥＬＬ（例えば、炎症および炎症性障害、骨髄の治療のため）、α４β７（例えば、腸粘膜標的化のため）、ＶＬＡ－４／ＶＣＡＭ－１（例えば、内皮を標的化する）が挙げられる。一般に、標的化（例えば、癌転移）に関与する任意の受容体は、本明細書に記載の方法および組成物の用途において利用され得る。

【０８８９】

細胞系譜の調節

標的哺乳類細胞における細胞運命の変化を誘導する方法が提供される。標的哺乳類細胞は前駆体細胞であってもよく、変化は分化を系譜内に推進すること、またはそのような分化を遮断することを含み得る。あるいは、標的哺乳類細胞は分化細胞であってもよく、細胞運命変化は、脱分化を多能性前駆体細胞内に推進すること、または癌幹細胞への癌細胞の脱分化等のそのような脱分化を遮断することを含む。細胞運命の変化が望まれる状況に

おいて、細胞運命誘導性ポリペプチドをコードする有効量のｍＲＮＡが、細胞運命の変化が誘導されるような条件下で標的細胞に導入される。いくつかの実施形態において、修飾ｍＲＮＡは、第１の表現型から第２の表現型へ細胞の亜集団を再プログラムするのに有用である。そのような再プログラミングは、一時的または永久的であってもよい。任意に、再プログラミングは、中間表現型を装うように標的細胞を誘導する。

【０８９０】

さらに、本発明の方法は、高い効率のトランスフェクション、細胞を再トランスフェクトする能力、および標的細胞内で産生される組換えポリペプチドの量の妥当性によって、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）を生成するのに特に有用である。さらに、本明細書に記載の方法を用いて生成されたｉＰＳ細胞の使用は、テラトーマ形成の低減された発生率を有することが予期される。

【０８９１】

標的細胞集団における細胞分化を低減する方法もまた提供される。例えば、ポリペプチドが翻訳され、かつ前駆体細胞の分化を低減するような条件下で、１つ以上の前駆体細胞型を含有する標的細胞集団を、ポリペプチドをコードする有効量のポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡを有する組成物と接触する。非限定的な実施形態において、標的細胞集団は、哺乳類対象における損傷組織または外科的処置を受けた組織を含む。前駆体細胞は、例えば、間質前駆体細胞、神経前駆体細胞、または間葉系前駆体細胞である。

【０８９２】

具体的な実施形態において、１つ以上の分化因子Ｇａｔａ４、Ｍｅｆ２ｃ、およびＴｂｘ４をコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが提供される。これらのｍＲＮＡ生成因子が、線維芽細胞内に導入され、再プログラミングを心筋細胞に推進する。そのような再プログラミングは、ｍＲＮＡ含有パッチまたは他の材料を損傷された心臓組織と接触することによってインビボで行われ、心臓の再分化を容易にすることができる。そのようなプロセスは、線維症とは対照的に心筋細胞発生を促進する。

【０８９３】

細胞死の媒介

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ組成物を用いて、細胞死受容体、細胞死受容体リガンド、またはこれらの組み合わせの発現を増加させることによって、細胞（例えば、癌細胞）内のアポトーシスを誘導することができる。この方法は、任意の所望の細胞における細胞死を誘導するために使用することができ、細胞が天然のアポトーシスシグナルを逃れる癌の治療において特に有用性を有する。

【０８９４】

アポトーシスは、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体／リガンドスーパーファミリーに属する、いくつかの「細胞死受容体」とそれらのリガンドとの間の複数の相互作用からなる最終エフェクター機構に応じて収束する複数の独立したシグナル伝達経路によって誘導され得る。最もよく特徴がわかっている細胞死受容体は、ＣＤ９５（「Ｆａｓ」）、ＴＮＦＲＩ（ｐ５５）、細胞死受容体３（ＤＲ３またはアポ３／ＴＲＡＭＯ）、ＤＲ４、およびＤＲ５（アポ２－ＴＲＡＩＬ－Ｒ２）である。アポトーシスの最終エフェクター機構は、カスパーゼとして設計された一連のプロテイナーゼの活性化であり得る。これらのカスパーゼの活性化は、一連の生命細胞タンパク質の切断および細胞死をもたらす。細胞死受容体／リガンド誘導性アポトーシスの分子機構は、当技術分野でよく知られている。例えば、Ｆａｓ／ＦａｓＬ媒介性アポトーシスは、Ｃ末端デスドメイン（ＤＤ）を介してＦａｓ受容体の三量体形成を誘導する３つのＦａｓＬ分子の結合によって誘導され、それは次に、アダプタータンパク質ＦＡＤＤ（デスドメインを持つＦａｓ関連タンパク質）およびカスパーゼ－８を動員する。この三分子複合体、Ｆａｓ／ＦＡＩＤＤ／カスパーゼ８のオリゴマー形成は、酵素前駆体カスパーゼ８の活性カスパーゼ８へのタンパク質分解性切断をもたらし、これは次に、タンパク質分解を通してカスパーゼ３を含む他の下流カスパーゼを活性化することによって、アポトーシスプロセスを開始する。デスリガンドは、一般的に

は、三量体またはより高次の構造内に形成されるときに、アポトーシス性である。単量体に関しては、それらは、細胞死受容体と結合するための三量体と競合することによって、抗アポトーシス性薬剤として役立ち得る。

【０８９５】

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ組成物は、細胞死受容体（例えば、Ｆａｓ、ＴＲＡＩＬ、ＴＲＡＭＯ、ＴＮＦＲ、ＴＬＲ等）をコードする。ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡのトランスフェクションによって、細胞死受容体を発現するように作製される細胞は、その受容体を活性化するリガンドによって誘導される細胞死の影響をうけやすくなる。同様に、例えば、その表面上にデスリガンドを発現するように作製される細胞は、トランスフェクトされた細胞を標的細胞と接触するとき、受容体で細胞の死を誘導する。別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ組成物は、細胞死受容体リガンド（例えば、ＦａｓＬ、ＴＮＦ等）をコードする。別の実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ組成物は、カスパーゼ（例えば、カスパーゼ３、カスパーゼ８、カスパーゼ９等）をコードする。癌細胞が非増殖性または制御された増殖性形態への適正な分化の失敗をしばしば示す場合、別の実施形態において、合成ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ組成物は、細胞死受容体およびその適切な活性化リガンドの両方をコードする。別の実施形態において、合成ポリヌクレオチド、一次構築物、およびｍｍＲＮＡ組成物は、癌幹細胞等の癌細胞内で発現されるとき、細胞を非病原性もしくは非自己再生性表現型（例えば、低減された細胞成長速度、低減された細胞分裂等）に分化するように誘導するか、または細胞を休眠細胞期（例えば、G_0休止期）に誘導する分化因子をコードする。

【０８９６】

当業者であれば、アポトーシス誘導技術の使用は、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが、望ましくない広範囲に及ぶ細胞死を防ぐように、例えば腫瘍細胞に適切に標的化されることを必要とし得ることを理解されよう。したがって、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡが癌細胞内でのみ発現するように、癌抗原を認識する送達機構（例えば、リポソーム等を標的とする結合リガンドまたは抗体）を用いることができる。

【０８９７】

美容用途

一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、および／またはｍｍＲＮＡは、美容的状態の治療、寛解、または予防に使用され得る。そのような状態には、挫瘡、酒さ、瘢痕、皺、湿疹、帯状疱疹、乾癬、加齢によるシミ、母斑、乾燥肌、たこ、発疹（例えば、おむつかぶれ、あせも）、疥癬、蕁麻疹、疣贅、虫刺され、白斑、フケ、そばかす、および老化の一般的な兆候が挙げられる。

【０８９８】

ＶＩ．キットおよびデバイス

キット

本発明は、好都合におよび／または効果的に本発明の方法を行うための多様なキットを提供する。典型的には、キットは、使用者が対象の（複数可）複数の治療を実施する、および／または複数の実験を実施することを可能にするのに十分な量および／または数の構成成分を含む。

【０８９９】

一態様において、本発明は、本発明の分子（ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ）を含むキットを提供する。一実施形態において、キットは、１つ以上の機能的抗体またはその機能断片を含む。

【０９００】

そのキットは、翻訳可能領域を含む第１のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを含む、タンパク質産生のためのものであり得る。キットは、製剤組成物を形成す

るための包装および説明書ならびに／または送達剤をさらに含んでもよい。送達剤は、本明細書で開示される食塩水、緩衝液、リピドイド（ｌｉｐｉｄｏｉｄ）、または任意の送達剤を含んでもよい。

【０９０１】

一実施形態において、緩衝液には、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸塩、および／またはＥＤＴＡが含まれてもよい。別の実施形態において、緩衝液は、食塩水、２ｍＭカルシウムを含有する食塩水、５％ショ糖、２ｍＭカルシウムを含有する５％ショ糖、５％マンニトール、２ｍＭカルシウムを含有する５％マンニトール、Ｒｉｎｇｅｒの乳酸塩、塩化ナトリウム、２ｍＭカルシウムおよびマンノースを含有する塩化ナトリウムを含み得るが、これらに限定されない（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国公開第２０１２０２５８０４６号を参照のこと）。さらなる実施形態において、緩衝液は沈殿されてもよく、または凍結乾燥されてもよい。各構成成分の量は、一貫した、再現性のある高濃度食塩水または単純緩衝製剤を可能にするように変更され得る。構成成分は、一定期間にわたって、および／または多様な条件下での緩衝液中における修飾ＲＮＡの安定性を増加させるようにも変更され得る。一態様において、本発明は、標的細胞内に導入されるとき、所望の量の翻訳可能領域によってコードされるタンパク質を産生するのに有効な量で提供される、翻訳可能領域を含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと、細胞の自然免疫応答を実質的に阻害するのに有効な量で提供される、阻害性核酸を含む第２のポリヌクレオチドと、包装および説明書と、を含む、タンパク質産生のためのキットを提供する。

【０９０２】

一態様において、本発明は、ポリヌクレオチドが細胞ヌクレアーゼによる低減された分解を示す、翻訳可能領域を含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと、包装および説明書と、を含む、タンパク質産生のためのキットを提供する。

【０９０３】

一態様において、本発明は、そのポリヌクレオチドが細胞ヌクレアーゼによる低減された分解を示す、翻訳可能領域を含むポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと、第１の核酸の翻訳可能領域の翻訳に適した哺乳類細胞と、を含む、タンパク質産生のためのキットを提供する。

【０９０４】

一実施形態において、プロテインＣのレベルは、イムノアッセイによって測定され得る。アッセイは購入されてもよく、ＢｉｏＭｅｒｉｅｕｘ，Ｉｎｃ．（Ｄｕｒｈａｍ，ＮＣ）、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ，ＩＬ）、Ｓｉｅｍｅｎｓ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ ＵＳＡ，Ｉｎｃ．（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＰＡ）、ＢＩＯＰＯＲＴＯ（登録商標）Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ａ／Ｓ（Ｇｅｎｔｏｆｔｅ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＵＳＣＮ（登録商標）Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｉｎｃ．（Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ）、またはＲｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を含む、任意のいくつかの供給元から利用可能である。この実施形態において、アッセイは、修飾ｍＲＮＡ分子として、もしくはその投与に応答して、送達されるプロテインＣまたはその活性型もしくは変異形のレベルを評価するために使用され得る。

【０９０５】

デバイス

本発明は、目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを組み込み得るデバイスを提供する。これらのデバイスは、安定した製剤中に、ヒト患者等のそれを必要とする対象に即時に送達されることができる製剤中にポリヌクレオチドを合成するための試薬を含有する。そのような目的とするポリペプチドの非限定的な例としては、創傷治癒のための成長因子および／または血管形成刺激因子、感染制御を容易にするためのペプチド抗細菌剤、ならびに新たに確認されたウイルスに対する免疫応答を急速に刺激するための抗原が挙げられる。

【０９０６】
デバイスを本発明とともに使用することもできる。一実施形態において、デバイスは、修飾ｍＲＮＡの形態で投与されたタンパク質のレベルを評価するために使用される。デバイスは、血液、尿、または他の生物流体（ｂｉｏｆｌｕｉｄｉｃ）検査を含んでもよい。それは自動化セントラルラボプラットフォームを含むほどの大型、または小分散化卓上デバイスであり得る。それはポイントオブケアまたは手持ち式デバイスであり得る。この実施形態において、例えば、プロテインＣまたはＡＰＣは、プロテインＣ（そのチモーゲン）、ＡＰＣ、またはそれらの任意の変異形をコードする修飾ｍＲＮＡを用いた治療の前、治療中、または治療後に定量され得る。オートプロトロンビンＩＩＡおよび血液凝固第ＸＩＶ因子としても知られているプロテインＣは、血液凝固の制御およびインビボでの線維素溶解活性の発生において重要な役割を果たすセリンプロテアーゼのチモーゲンまたは前駆体である。それは一本鎖ポリペプチドとして肝臓で合成されるが、二本鎖中間体を生じさせる翻訳後プロセシングを経る。プロテインＣのその中間形態は、重鎖のアミノ末端から分子のアミノ末端に１２残基ペプチドのトロンビン媒介性切断を介して、「活性化タンパク質Ｃ」（ＡＰＣ）として知られる活性型に変換される。デバイスは、敗血症または重度の敗血症等のプロテインＣまたはＡＰＣ治療に関連したコンパニオン診断検査として、創薬努力において有用であり得る。初期研究において、ＡＰＣが重度の敗血症における死亡率を低下させる能力を有したことが示唆された。この研究路線に従って、臨床研究は、１つの化合物、活性化ドロトレコギンアルファ（組換えタンパク質Ｃ）のＦＤＡ認可を導いた。しかしながら、２０１１年の終わりに、敗血症性ショックの患者おける２８日間の全死因死亡率において統計的に有意な低下の主要評価項目を満たなかったことを示したＰＲＯＷＥＳＳ－ＳＨＯＣＫ試験の結果を受けて、この薬物はすべての市場から回収された。本発明は、哺乳動物におけるタンパク質発現効率の増加に関連した先の課題または問題を克服する、敗血症、重度の敗血症、および敗血症（ｓｅｐｔｉｃｅｍｉａ）の診断および治療に使用され得る修飾ｍＲＮＡ分子を提供する。

【０９０７】
いくつかの実施形態において、デバイスは、自己完結型であり、任意に、生成されたポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの合成および／または分析のための指示を得るための無線遠隔通信が可能である。デバイスは、少なくとも１つのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ、および好ましくは無制限の異なるポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのモバイル合成が可能である。ある特定の実施形態において、デバイスは、１または少数の個体によって輸送されることができる。他の実施形態において、デバイスは、卓上または机に合うように調整される。他の実施形態において、デバイスは、スーツケース、バックパック、または同様の大きさの対象に収まるように調整される。別の実施形態において、デバイスは、ポイントオブケアまたは手持ち式デバイスであってもよい。さらなる実施形態において、デバイスは、乗用車、運搬車、もしくは救急車等の自動車、または戦車もしくは兵員輸送車等の軍用車両に収まるように調整される。目的とするポリペプチドをコードする修飾ｍＲＮＡ生成するために必要な情報は、デバイスに存在するコンピュータ可読媒体内に存在する。

【０９０８】
一実施形態において、デバイスは、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの形態で投与されたタンパク質のレベルを評価するために使用され得る。デバイスは、血液、尿、または他の生物流体（ｂｉｏｆｌｕｉｄｉｃ）検査を含んでもよい。

【０９０９】
いくつかの実施形態において、デバイスは、核酸およびポリペプチド配列のデータベースを用いて通信（例えば、無線通信）が可能である。デバイスは、１つ以上の試料容器を挿入するための少なくとも１つの試料ブロックを含む。そのような試料容器は、テンプレートＤＮＡ、ヌクレオチド、酵素、緩衝剤、および他の試薬等の任意の数の材料の液体または他の形態を受け入れることが可能である。試料容器は、試料ブロックとの接触によって加熱または冷却されることも可能である。試料ブロックは、一般的に、少なくとも１つ

の試料ブロックのための１つ以上の電子制御装置を有するデバイス基部と通信している。試料ブロックは、好ましくは、試料容器およびその構成要素を約－２０℃～＋１００℃を超える温度に加熱および／または冷却することができるような加熱モジュールである、加熱モジュールを含む。デバイス基部は、電池または外部電圧源等の電圧源と通信している。デバイスは、ＲＮＡ合成のための材料を貯蔵および分配するための手段も含む。

【０９１０】

任意に、試料ブロックは、合成された核酸を分離するためのモジュールを含む。あるいは、デバイスは、試料ブロックに作動可能に連結される分離モジュールを含む。好ましくは、デバイスは、合成された核酸を分析するための手段を含む。そのような分析には、配列同一性（ハイブリダイゼーション等によって実証される）、望ましくない配列の不在、合成されたｍＲＮＡの完全性の測定（分光光度法と組み合わせた微小流体粘度測定によるもの等）、ならびに修飾ＲＮＡの濃度および／または効力（分光光度法によるもの等）が挙げられる。

【０９１１】

ある特定の実施形態において、デバイスは、対象から得られた生物材料中に存在する病原体の検出のための手段、例えば、微生物同定用のＩＢＩＳ　ＰＬＥＸ－ＩＤシステム（Ａｂｂｏｔｔ，Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，ＩＬ）と組み合わせられる。

【０９１２】

本明細書に記載の薬学的組成物を皮内送達する際に用いるのに適したデバイスには、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第４，８８６，４９９号、同第５，１９０，５２１号、同第５，３２８，４８３号、同第５，５２７，２８８号、同第４，２７０，５３７号、同第５，０１５，２３５号、同第５，１４１，４９６号、および同第５，４１７，６６２号に記載のデバイス等の短針デバイスが挙げられる。皮内組成物は、参照により全体が本明細書に組み込まれるＰＣＴ公開第ＷＯ９９／３４８５０号に記載のデバイスおよびその機能的等価物等の皮膚の中への針の有効な貫通長さを制限するデバイスによって投与され得る。液体ジェット式注入器を介して、および／または角質層に穴を開ける針を介して、液体組成物を真皮に送達し、真皮に到達するジェットを生じるジェット式注入デバイスが好適である。ジェット式注入デバイスは、例えば、各々が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第５，４８０，３８１号、同第５，５９９，３０２号、同第５，３３４，１４４号、同第５，９９３，４１２号、同第５，６４９，９１２号、同第５，５６９，１８９号、同第５，７０４，９１１号、同第５，３８３，８５１号、同第５，８９３，３９７号、同第５，４６６，２２０号、同第５，３３９，１６３号、同第５，３１２，３３５号、同第５，５０３，６２７号、同第５，０６４，４１３号、同第５，５２０，６３９号、同第４，５９６，５５６号、同第４，７９０，８２４号、同第４，９４１，８８０号、同第４，９４０，４６０号、ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ９７／３７７０５号および同第ＷＯ９７／１３５３７号に記載されている。圧縮ガスを用いて、粉末形態にあるワクチンを加速させ、皮膚の外層を通して真皮に到達させる弾道粉末／粒子送達デバイスが、好適である。あるいは、またはさらに、従来のシリンジを皮内投与の古典的なマントゥー法で用いることができる。

【０９１３】

いくつかの実施形態において、デバイスは、ポンプであってもよく、または血液脳関門を横断する本発明の化合物または組成物の投与用のカテーテルを含む。そのようなデバイスには、加圧嗅覚送達デバイス、イオン泳動デバイス、多層微小流体デバイス等が挙げられるが、これらに限定されない。そのようなデバイスは、携帯型または固定型であってもよい。それらは、身体に埋め込み可能であるか、または身体に外的に係留されるか、またはそれらの組み合わせであってもよい。

【０９１４】

投与用デバイスを用いて、本発明で教示される単回、複数回、または分割投薬レジメンに従って、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡを送達してもよい。そのようなデバイスは、以下に記載される。

【０９１５】
細胞、器官、および組織への複数回投与のための当技術分野で既知の方法およびデバイスは、本発明の実施形態として本明細書で開示される方法および組成物とともに使用されることが企図される。これらには、例えば、複数の針、例えば、ルーメンまたはカテーテルを用いるハイブリッドデバイスならびに熱、電流、または放射線駆動機構を利用するデバイスを有する方法およびデバイスが挙げられる。
【０９１６】
本発明に従って、これらの複数回投与デバイスを利用して、本明細書で企図される単回用量、複数回用量、または分割された用量が送達されてもよい。
【０９１７】
治療剤を固体組織に送達するための方法は、Ｂａｈｒａｍｉらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１１０２３０８３９号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｂａｈｒａｍｉによると、一連の針はデバイス内に組み込まれ、各針の長さに沿ってその固体組織内の任意の箇所で実質的に同量の流体を送達する。
【０９１８】
生物組織を横断して生物材料を送達するためのデバイスは、Ｋｏｄｇｕｌｅらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１１０１７２６１０号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｋｏｄｇｕｌｅによると、１つ以上の金属から作製され、かつ約２００ミクロン～約３５０ミクロンの外径および少なくとも１００ミクロンの長さを有する複数の中空型マイクロニードルがデバイス内に組み込まれ、ペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸分子、脂質、および他の薬学的に有効な成分またはそれらの組み合わせを送達する。
【０９１９】
治療剤の組織への送達のための送達プローブは、Ｇｕｎｄａｙらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１１０２７０１８４号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｇｕｎｄａｙによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、デバイスは、付加されたカプセルを作動位置と非作動位置との間で移動させ、その針を通してカプセルの外に薬剤を出させる。
【０９２０】
複数回注入医療器具が、Ａｓｓａｆによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１１０２１８４９７号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ａｓｓａｆによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、デバイスは、その針のうちの１つ以上に接続するチャンバと、各注入の後、連続的にそのチャンバに医療用流体を補充する手段と、を有する。
【０９２１】
一実施形態において、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、少なくとも３つの針を介して皮下にまたは筋肉内に、同時または６０分以内に３つの異なる、任意に隣接した部位へ投与される（例えば、同時または６０以内に４、５、６、７、８、９、または１０個の部位への投与）。分割された用量は、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第２０１１０２３０８３９号および同第２０１１０２１８４９７号に記載のデバイスを用いて、同時に隣接した組織に投与され得る。
【０９２２】
物質を患者の身体に注入するための少なくとも部分的に埋め込み可能なシステム、具体的には陰茎勃起刺激システムが、Ｆｏｒｓｅｌｌによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１１０１９６１９８号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｆｏｒｓｅｌｌによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、デバイスは、患者の左および右の陰核海綿体に隣接する１つ以上の筐体とともに埋め込まれる。また、針を通して薬物を供給するためにリザーバおよびポンプも埋め込まれる。

【０９２３】
治療的有効量の鉄分の経皮送達のための方法が、Ｂｅｒｅｎｓｏｎによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１００１３０９１０号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｂｅｒｅｎｓｏｎによると、複数の針を用いて、イオン泳動パッチ上のイオン性鉄分の経皮送達を強化するために角質層内に複数のマイクロチャネルを作製することができる。
【０９２４】
生物組織を横断する生物材料の送達のための方法が、Ｋｏｄｇｕｌｅらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１１０１９６３０８号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｋｏｄｇｕｌｅによると、治療的活性成分を含む複数の生分解性マイクロニードルがデバイスに組み込まれ、タンパク質、炭水化物、核酸分子、脂質、および他の薬学的活性成分、またはそれらの組み合わせを送達する。
【０９２５】
ボツリヌス毒素組成物を含む経皮パッチが、Ｄｏｎｏｖａｎによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００８０２２００２０号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｄｏｎｏｖａｎによると、複数の針がパッチ内に組み込まれ、血液を破裂させることなく、皮膚の角質層を通して突出するその針を通してボツリヌス毒素を角質層下に送達する。
【０９２６】
およそ０．２～１５ｍＬの液体製剤を保持することができる小さい使い捨ての薬物リザーバ、またはパッチポンプを皮膚上に配置し、製剤を細い針（例えば、２６～３４ゲージ）を用いて連続的に皮下に送達することができる。非限定的な例として、パッチポンプは、３０～３４ゲージ針を有するばね式の５０ｍｍ×７６ｍｍ×２０ｍｍ（ＢＤ（商標），Ｍｉｃｒｏｉｎｆｕｓｅｒ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ ＮＪ）、インスリン等の薬物送達に使用される２ｍＬリザーバを有する４１ｍｍ×６２ｍｍ×１７ｍｍ（ＯＭＮＩＰＯＤ（登録商標），Ｉｎｓｕｌｅｔ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）、または０．５～１０ｍＬリザーバを有する４３～６０ｍｍ直径、１０ｍｍ厚（ＰＡＴＣＨＰＵＭＰ（登録商標），ＳｔｅａｄｙＭｅｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）であってもよい。さらに、パッチポンプは、電池式および／または充電式であり得る。
【０９２７】
低温治療の箇所への活性剤の投与用の凍結探針が、Ｔｏｕｂｉａによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００８０１４００６１号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｔｏｕｂｉａによると、複数の針がプローブ内に組み込まれ、プローブは、チャンバ内への活性剤を受容し、薬剤を組織に投与する。
【０９２８】
炎症を治療するか、もしくは予防し、または健常な関節を促進するための方法が、Ｓｔｏｃｋらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００９０１５５１８６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｓｔｏｃｋによると、複数の針がデバイスに組み込まれ、シグナル伝達調節因子化合物を含有する組成物を投与する。
【０９２９】
多部位注入システムが、Ｋｉｍｍｅｌｌらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２０１００２５６５９４号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｋｉｍｍｅｌｌによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、その針を通して薬物を角質層内に送達する。
【０９３０】
インターフェロンを皮内区画に送達するための方法が、Ｄｅｋｋｅｒらによって説明さ

れており、例えば、米国特許公開第２００５０１８１０３３号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｄｅｋｋｅｒによると、０～１ｍｍの露出された高さを持つ放出口を有する複数の針がデバイス内に組み込まれ、それが０．３ｍｍ～２ｍｍの深さで物質を送達することによって、薬物動態およびバイオアベイラビリティを改善する。

【０９３１】

遺伝子、酵素、および生物薬剤を組織細胞に送達するための方法が、Ｄｅｓａｉによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００３００７３９０８号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｄｅｓａｉによると、複数の針が体内に挿入されるデバイス内に組み込まれ、その針を通して薬物流体を送達する。

【０９３２】

線維芽細胞を用いて不整脈を治療するための方法が、Ｌｅｅらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００４０００５２９５号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｌｅｅによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、線維芽細胞を組織の局所的領域に送達する。

【０９３３】

磁力制御されたポンプ使用して脳腫瘍を治療するための方法が、Ｓｈａｃｈａｒらによって説明されており、例えば、米国特許第７７９９０１２号（方法）および同第７７９９０１６号（デバイス）に教示され、それらの内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｓｈａｃｈａｒによると、複数の針がポンプに組み込まれ、ポンプは、制御された速度でその針を通して薬物治療剤を押す。

【０９３４】

雌哺乳類における膀胱の機能的障害を治療する方法が、Ｖｅｒｓｉらによって説明されており、例えば、米国特許第８，０２９，４９６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｖｅｒｓｉによると、一連のマイクロニードルがデバイス内に組み込まれ、その針を通して直接膀胱の膀胱三角部内に治療剤を送達する。

【０９３５】

マイクロニードル経皮輸送デバイスが、Ａｎｇｅｌらによって説明されており、例えば、米国特許第７，３６４，５６８号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ａｎｇｅｌによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、デバイスは、異なる方向から表面内に挿入されるその針を通して物質を体表内に輸送する。マイクロそのニードル経皮輸送デバイスは、中実型マイクロニードルシステムまたは中空型マイクロニードルシステムであってもよい。非限定的な例として、中実型マイクロニードルシステムは、薬物で被覆された約１５０～７００μｍの高さの、ｃｍ^{2}当たり３００～１５００の中実マイクロニードルを伴う最大０．５ｍｇの容量を有し得る。マイクロニードルは、角質層に透過し、短い持続期間（例えば、２０秒間～１５分間）、皮膚に残存する。別の例において、中空型マイクロニードルシステムは、最大３ｍＬの容量を有し、およそ９５０μｍの高さであるｃｍ^{2}当たり１５～２０マイクロニードルを用いて液体製剤を送達する。マイクロニードルは皮膚に透過し、液体製剤がデバイスから皮膚内に流れることを可能にする。中空型マイクロニードルシステムは、製剤体積および粘度に応じて、１～３０分間で消耗し得る。

【０９３６】

皮下輸注用デバイスが、Ｄａｌｔｏｎらによって説明されており、例えば、米国特許第７，１５０，７２６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｄａｌｔｏｎによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、その針を通して流体を皮下組織に送達する。

【０９３７】

マイクロカニューレを通したワクチンおよび遺伝子治療剤の皮内送達用デバイスおよび方法が、Ｍｉｋｓｚｔａらによって説明されており、例えば、米国特許第７，４７３，２

４７号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｍｉｔｓｚｔａによると、少なくとも１つの中空型マイクロニードルがデバイス内に組み込まれ、０．０２５ｍｍ～２ｍｍの深さでワクチンを対象の皮膚に送達する。

【０９３８】

インスリンを送達する方法が、Ｐｅｔｔｉｓらによって説明されており、例えば、米国特許第７，７２２，５９５号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｐｅｔｔｉｓによると、２つの針はデバイス内に組み込まれ、第１の針はインスリンを皮内区画に送達するように２．５ｍｍ未満の深さで、第２の針はインスリンを皮内区画に送達するように２．５ｍｍ超えかつ５．０ｍｍ未満の深さで、両方の針は基本的に同時に皮膚内に挿入される。

【０９３９】

吸引下での皮膚注入送達が、Ｋｏｃｈａｍｂａらによって説明されており、例えば、米国特許第６，８９６，６６６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｋｏｃｈａｍｂａによると、互いに比較的に隣接した複数の針がデバイス内に組み込まれ、皮膚層の下に流体を注入する。

【０９４０】

皮膚を通して物質を取り除くか、または送達するためのデバイスが、Ｄｏｗｎらによって説明されており、例えば、米国特許第６，６０７，５１３号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｄｏｗｎによると、複数の皮膚透過メンバーがデバイス内に組み込まれ、約１００ミクロンから約２０００ミクロンの長さを有し、約３０～５０ゲージである。

【０９４１】

物質を皮膚に送達するためのデバイスが、Ｐａｌｍｅｒらによって説明されており、例えば、米国特許第６，５３７，２４２号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｐａｌｍｅｒによると、一連のマイクロニードルがデバイス内に組み込まれ、その針と皮膚との接触を強化するために引っ張りアセンブリを使用し、物質のより均一な送達をもたらす。

【０９４２】

局所薬物送達のための灌流デバイスが、Ｚａｍｏｙｓｋｉによって説明されており、例えば、米国特許第６，４６８，２４７号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｚａｍｏｙｓｋｉによると、複数の皮下針が、皮下注射器が後退するときに皮下注射器の内容物を組織内に注入するデバイス内に組み込まれる。

【０９４３】

マイクロニードルおよびヒト皮膚との間の相互作用を改善することによる組織を横断する薬物および生体分子の増強された輸送のための方法が、Ｐｒａｕｓｎｉｔｚらによって説明されており、例えば、米国特許第６，７４３，２１１号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｐｒａｕｓｎｉｔｚによると、複数のマイクロニードルがデバイス内に組み込まれ、デバイスは、そこにマイクロニードルが適用される、より強固で、より変形しにくい表面を示すことができる。

【０９４４】

医薬剤の器官内投与のためのデバイスが、Ｔｉｎｇらによって説明されており、例えば、米国特許第６，０７７，２５１号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｔｉｎｇによると、増強投与のための側面開口部を有する複数の針がデバイス内に組み込まれ、デバイスは、その針を針チャンバからおよび針チャンバ中へ伸長および後退することによって医薬剤をリザーバからその針の中へ押し進め、その医薬剤を標的器官に注入する。

【０９４５】

複数の持針器および皮下多重チャネル輸注ポートが、Ｂｒｏｗｎによって説明されており、例えば、米国特許第４，６９５，２７３号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｂｒｏｗｎによると、持針器上の複数の針が輸注ポ

ートの中隔を通して挿入され、その輸注ポート内の単離されたチャンバと連通する。
【０９４６】
二重皮下シリンジが、Ｈｏｒｎによって説明されており、例えば、米国特許第３，５５２，３９４号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｈｏｒｎによると、デバイス内に組み込まれる２つの針が、６８ｍｍ未満の間隔で離間され、異なるスタイルおよび長さであってもよく、このため注入が異なる深さで行われることを可能にする。
【０９４７】
複数の針および複数の流体区画を有するシリンジが、Ｈｅｒｓｈｂｅｒｇによって説明されており、例えば、米国特許第３，５７２，３３６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｈｅｒｓｈｂｅｒｇによると、複数の針が複数の流体区画を有するシリンジ内に組み込まれ、１つの注入に混合することができない相性の悪い薬物を同時に投与することができる。
【０９４８】
流体の皮内の注入のための外科用器具が、Ｅｌｉｓｃｕらによって説明されており、例えば、米国特許第２，５８８，６２３号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｅｌｉｓｃｕによると、複数の針がその器具内に組み込まれ、流体を皮内により幅広い分散で注入する。
【０９４９】
複数の乳房内の乳管への物質の同時送達のための装置が、Ｈｕｎｇによって説明されており、例えば、欧州特許第１８１８０１７号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｈｕｎｇによると、複数のルーメンがデバイス内に組み込まれ、乳管網のオリフィスを通して挿入し、流体を乳管網に送達する。
【０９５０】
心臓または他の器官の組織への薬物の導入のためのカテーテルが、Ｔｋｅｂｕｃｈａｖａによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２００６１３８１０９号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｔｋｅｂｕｃｈａｖａによると、平坦な軌道で器官壁に進入する２つの湾曲針が組み込まれる。
【０９５１】
医薬剤を送達するためのデバイスが、Ｍｃｋａｙらによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２００６１１８８０４号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｍｃｋａｙによると、各針上に複数のオリフィスを有する複数の針がデバイス内に組み込まれ、脊髄円板の内部円板空間等の組織への局部送達を容易にする。
【０９５２】
哺乳類皮膚内の皮内空間内に免疫調節物質を直接送達するための方法が、Ｐｅｔｔｉｓによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２００４０２００１４号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｐｅｔｔｉｓによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、針を通して物質を０．３ｍｍ～２ｍｍの深さに送達する。
【０９５３】
全身性吸収および改善された薬物動態のための皮膚の少なくとも２つの区画内へ物質を投与するための方法およびデバイスが、Ｐｅｔｔｉｓらによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２００３０９４９９５号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｐｅｔｔｉｓによると、約３００μｍ～約５ｍｍの長さを有する複数の針がデバイス内に組み込まれ、皮内および皮下組織区画へ同時に送達する。
【０９５４】
針およびローラーを有する薬物送達デバイスが、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎらによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２０１２００６２５９号に教示され、この内容は、参

照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｚｉｍｍｅｒｍａｎによると、ローラー内に位置する複数の中空針がデバイス内に組み込まれ、ローラーが回転すると、針を通してリザーバ内の内容物を送達する。

【０９５５】

当技術分野で既知のステント等の薬物送達デバイスが、例えば、米国特許第８，３３３，７９９号、米国公開第ＵＳ２００６００２０３２９号、同第ＵＳ２００４０１７２１２７号、および同第ＵＳ２０１００１６１０３２号に教示され、これらの各々の内容は、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載のポリヌクレオチド、一次構築物、ｍｍＲＮＡの製剤は、ステントを用いて送達され得る。さらに、本明細書で使用されるステントは、同じか、または異なる送達速度で複数のポリヌクレオチド、一次構築物、および／もしくはｍｍＲＮＡならびに／または製剤を送達することができる。ステントの製造業者の非限定的な例としては、ＣＯＲＤＩＳ（登録商標）（Ｍｉａｍｉ，ＦＬ）（ＣＹＰＨＥＲ（登録商標））、Ｂｏｓｔｏｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｎａｔｉｃｋ，ＭＡ）（ＴＡＸＵＳ（登録商標））、Ｍｅｄｔｒｏｎｉｃ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）（ＥＮＤＥＡＶＯＵＲ（登録商標））、およびＡｂｂｏｔｔ（Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，ＩＬ）（ＸＩＥＮＣＥ　Ｖ（登録商標））が挙げられる。

【０９５６】

カテーテルおよび／またはルーメンを利用する方法およびデバイス

カテーテルおよびルーメンを使用する方法およびデバイスを用いて、単回、複数回、または分割された投薬スケジュールにおいて本発明のｍｍＲＮＡを投与することができる。そのような方法およびデバイスを、以下に記載する。

【０９５７】

骨格筋芽細胞から損傷された心臓の心筋へのカテーテルベースの送達が、Ｊａｃｏｂｙらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００６０２６３３３８号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｊａｃｏｂｙによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、その少なくとも一部が血管内に挿入され、針を通して細胞組成物を対象の心臓の局所領域に送達する。

【０９５８】

神経毒素を用いて喘息を治療するための装置が、Ｄｅｅｍらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００６０２２５７４２号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｄｅｅｍによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、その針を通して神経毒素を気管支組織内に送達する。

【０９５９】

複数成分療法を施すための方法が、Ｎａｙａｋによって説明されており、例えば、米国特許第７，６９９，８０３号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｎａｙａｋによると、複数の注入カニューレがデバイス内に組み込まれてもよく、深さを制御するための深度スロットが含まれてもよく、治療用物質はそこで組織内に送達される。

【０９６０】

チャネルを切断し、少なくとも１つの治療剤を組織の所望の領域内に送達するための外科用デバイスが、ＭｃＩｎｔｙｒｅらによって説明されており、例えば、米国特許第８，０１２，０９６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。ＭｃＩｎｔｙｒｅによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、これはチャネルを取り囲む組織の領域内に治療剤を分注し、特に経心筋血行再建手術によく適している。

【０９６１】

雌哺乳類における膀胱の機能的障害を治療する方法が、Ｖｅｒｓｉらによって説明されており、例えば、米国特許第８，０２９，４９６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｖｅｒｓｉによると、一連のマイクロニードルがデバイス内に組み込まれ、その針を通して直接膀胱の膀胱三角部内に治療剤を送達する

。

【０９６２】

流体を柔軟な生体バリアーに送達するためのデバイスおよび方法が、Ｙｅｓｈｕｒｕｎらによって説明されており、例えば、米国特許第７，９９８，１１９号（デバイス）および同第８，００７，４６６（方法）号に教示され、それらの内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｙｅｓｈｕｒｕｎによると、デバイス上のマイクロニードルが柔軟な生体バリアーに透過および伸長し、流体は中空型マイクロニードルの孔を通して注入される。

【０９６３】

心外膜表面を有し、心外膜を有する心臓の組織の領域に物質を介して注入するための、胴体内に配置される方法が、Ｂｏｎｎｅｒらによって説明されており、例えば、米国特許第７，６２８，７８０号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｂｏｎｎｅｒによると、デバイスは、針を組織内に操縦し、その針を通して医薬剤を組織内に注入するための細長いシャフトおよび遠位注入ヘッドを有する。

【０９６４】

穿刺創を密封するためのデバイスが、Ｎｉｅｌｓｅｎらによって説明されており、例えば、米国特許第７，９７２，３５８号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｎｉｅｌｓｅｎによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、穿刺路を取り囲む組織内に閉鎖剤を送達する。

【０９６５】

筋形成および血管形成のための方法が、Ｃｈｉｕらによって説明されており、例えば、米国特許第６，５５１，３３８号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｃｈｉｕによると、少なくとも１．２５ｍｍの最大直径と、６～２０ｍｍの穿刺深度を提供するのに有効な長さと、を有する５～１５の針がデバイス内に組み込まれ、心筋近くに挿入し、外因性血管新生または筋原性因子をその針の少なくとも一部の中にある導管を通してその心筋に供給する。

【０９６６】

前立腺組織の治療ための方法が、Ｂｏｌｍｓｊらによって説明されており、例えば、米国特許第６，５２４，２７０号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｂｏｌｍｓｊによると、尿道を通して挿入されるカテーテルを含むデバイスが、周囲の前立腺組織内に伸長可能な少なくとも１つの中空端を有する。収斂薬および鎮痛薬は、その端部を通してその前立腺組織内に投与される。

【０９６７】

流体を骨内部位に輸注する方法が、Ｆｉｎｄｌａｙらによって説明されており、例えば、米国特許第６，７６１，７２６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｆｉｎｄｌａｙによると、軟質材料の層で覆われた材料の硬質殻を貫通することが可能な複数の針がデバイス内に組み込まれ、その材料の硬質殻から下へ規定の距離で流体を送達する。

【０９６８】

薬物を血管壁内に注入するためのデバイスが、Ｖｉｇｉｌらによって説明されており、例えば、米国特許第５，７１３，８６３号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｖｉｇｉｌによると、複数の注入器がデバイス内の可撓管のそれぞれの上に設置され、血管壁内への輸注のためにマルチルーメンカテーテルを通してその可撓管の中へ、およびその注入器の外へ薬物流体を導入する。

【０９６９】

治療用および／または診断用薬剤を身体通路を取り囲む組織に送達するためのカテーテルが、Ｆａｘｏｎらによって説明されており、例えば、米国特許第５，４６４，３９５号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｆａｘｏｎによると、少なくとも１つの針カニューレがカテーテル内に組み込まれ、カテーテルの外部へ突出するその針を通して所望の薬剤を組織に送達する。

【０９７０】
治療剤を送達するためのバルーンカテーテルが、Ｏｒｒによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２０１００２４８７１号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｏｒｒによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、治療剤を組織内の異なる深さに送達する。別の態様において、薬物溶出バルーンを用いて、本明細書に記載の製剤を送達してもよい。薬物溶出バルーンは、蛇行血管内の病変、分岐病変、大腿／膝窩病変、および膝の下の病変を治療するステント内再狭窄等であるが、これらに限定されない標的病変への適用において使用され得る。
【０９７１】
治療剤（例えば、ポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡ）をルーメン周囲に配置された組織に送達するためのデバイスが、Ｐｅｒｒｙらによって説明されており、例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１００１２５２３９号に教示され、これらの内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｐｅｒｒｙによると、カテーテルはバルーンを有し、それは当技術分野で既知の、およびＰｅｒｒｙによって記載される方法によって治療剤で被覆され得る。バルーンが膨張すると、治療剤が周辺組織に接触する。デバイスは、治療剤（ｔｈｅｒｅａｐｅｕｔｉｃ　ａｇｅｎｔ）を組織に放出するようにバルーン上のコーティングの温度を変化するための熱源をさらに有してもよい。
【０９７２】
電流を利用する方法およびデバイス
本明細書に教示される単回、複数回、または分割された投薬レジメンに従って、電流を利用する方法およびデバイスを用いて、本発明のｍｍＲＮＡを送達することができる。そのような方法およびデバイスが、以下に記載される。
【０９７３】
電気コラーゲン誘導治療デバイスが、Ｍａｒｑｕｅｚによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００９０１３７９４５号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｍａｒｑｕｅｚによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、皮膚を繰り返し穿刺し、最初に皮膚に適用される物質の一部を皮膚部分に引き込む。
【０９７４】
動電システムが、Ｅｔｈｅｒｅｄｇｅらによって説明されており、例えば、米国特許公開第２００７０１８５４３２号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｅｔｈｅｒｅｄｇｅによると、マイクロニードルがデバイス内に組み込まれ、電流によって、針を通して薬物を標的とされる治療部位に推進する。
【０９７５】
イオン泳動デバイスが、Ｍａｔｓｕｍｕｒａらによって説明されており、例えば、米国特許第７，４３７，１８９号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｍａｔｓｕｍｕｒａによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、イオン化可能薬物をより速い速度で、またはより高効率で生体内に送達することができる。
【０９７６】
無針注入およびエレクトロポレーションによる生物活性剤の皮内送達が、Ｈｏｆｆｍａｎｎらによって説明されており、例えば、米国特許第７，１７１，２６４号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｈｏｆｆｍａｎｎによると、１つ以上の無針注入器がエレクトロポレーションデバイスに組み込まれ、無針注入とエレクトロポレーションとの組み合わせは、薬剤を皮膚、筋肉、または粘膜の細胞内に導入するのに十分である。
【０９７７】
電気透過化処理（ｅｌｅｃｔｒｏｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）を介した細胞内送達のための方法が、Ｌｕｎｄｋｖｉｓｔらによって説明されており、例えば、米国特許第６，６２５，４８６号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に

組み込まれる。Ｌｕｎｄｋｖｉｓｔによると、一対の針電極がカテーテル内に組み込まれる。そのカテーテルは体内ルーメン内に位置し、そのルーメンを取り囲む組織内に透過させるためのその針電極が続く。次いでデバイスは、その針電極のうちの少なくとも１つを通して薬剤を導入し、その針電極で電界をかけ、その薬剤が細胞膜を通して治療部位の細胞内へ通過することを可能にする。

【０９７８】

経皮免疫化のための送達システムが、Ｌｅｖｉｎらによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２００６００３６５９号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｌｅｖｉｎによると、複数の電極がデバイス内に組み込まれ、電気エネルギーを電極間に印加し、経皮送達を容易にするためのマイクロチャネルを皮膚内に生成する。

【０９７９】

ＲＦエネルギーを皮膚の中へ送達するための方法が、Ｓｃｈｏｍａｃｋｅｒによって説明されており、例えば、国際公開第ＷＯ２０１１１６３２６４号に教示され、この内容は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。Ｓｃｈｏｍａｃｋｅｒによると、複数の針がデバイス内に組み込まれ、針がＲＦエネルギーをプレート上の孔を通して皮膚に挿入し、送達するように、皮膚をプレートとの接触に誘引するために減圧する。

【０９８０】

ＶＩＩ．定義

本明細書中の種々の箇所で、本開示の化合物の置換基が、群においてまたは範囲において開示される。本開示は、そのような群および範囲のメンバーのありとあらゆる個々の部分的組み合わせを含むことが具体的に意図される。例えば、「C_{1-6}アルキル」という用語は、メチル、エチル、C_3アルキル、C_4アルキル、C_5アルキル、およびC_6アルキルを個々に開示することが具体的に意図される。

【０９８１】

約：本明細書で使用されるとき、「約」という用語は、列挙される値の＋／－１０％を意味する。

【０９８２】

組み合わせて投与される：本明細書で使用されるとき、「組み合わせて投与される」または「組み合わせた投与」という用語は、２つ以上の薬剤が、同時にまたは患者に対する各薬剤の効果の重複があるような間隔内で、対象に投与されることを意味する。いくつかの実施形態において、それらは、互いの約６０、３０、１５、１０、５、または１分以内に投与される。いくつかの実施形態において、薬剤の投与は、組み合わせ（例えば、相乗的）効果が達成されるように、互いに十分に近接して間隔を置かれる。

【０９８３】

動物：本明細書で使用されるとき、「動物」という用語は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態において、「動物」は、任意の発達段階にあるヒトを指す。いくつかの実施形態において、「動物」は、任意の発達段階にある非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態において、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、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、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、サカナ、および蠕虫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作動物、またはクローンである。

【０９８４】

目的とする抗原または所望の抗原：本明細書で使用されるとき、「目的とする抗原」または「所望の抗原」という用語は、本明細書に記載の抗体、ならびにそれらの断片、変異体、変異形、および改変体によって免疫特異的に結合される、本明細書に提供されるタンパク質および他の生体分子を含む。目的とする抗原の例としては、インスリン、インスリン様成長因子、ｈＧＨ、ｔＰＡ、インターロイキン（ＩＬ）、例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－

１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、インターフェロン（ＩＦＮ）α、ＩＦＮβ、ＩＦＮγ、ＩＦＮω、またはＩＦＮτ、ＴＮＦαおよびＴＮＦβ、ＴＮＦγ、ＴＲＡＩＬ等の腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）；Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、ＭＣＰ－１、およびＶＥＧＦ等のサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない。

【０９８５】

およそ：本明細書で使用されるとき、目的とする１つ以上の値に適用される「およそ」または「約」という用語は、定められる参照値と同様である値を指す。ある特定の実施形態において、「およそ」または「約」という用語は、別途定められるか、または文脈から別途明白でない限り、定められる参照値のいずれかの方向（それよりも大きいまたはそれよりも小さい）における、２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ未満の内に該当する値の範囲を指す（そのような数字が可能な値の１００％を超えるような場合を除く）。

【０９８６】

と会合される：本明細書で使用されるとき、２つ以上の部分に関して使用される際、「と会合される」、「複合体化される」、「連結される」、「結合される」、および「係留される」という用語は、直接、または連結剤としての役目を果たす１つ以上のさらなる部分を介してのいずれかで、その部分が互いに物理的に会合されるか、または結合されて、その部分が、構造が使用される条件下、例えば、生理的条件下で、物理的に会合されたままであるように十分に安定した構造を形成することを意味する。「会合」は、厳密に直接的な共有化学結合を経る必要はない。それは、「会合した」実体が物理的に会合したままであるように十分に安定したイオン結合もしくは水素結合またはハイブリダイゼーションベースの結合性も示唆し得る。

【０９８７】

二機能性：本明細書で使用されるとき、「二機能性」という用語は、少なくとも２つの機能を維持することが可能である任意の物質、分子、または部分を指す。この機能は、同じ結果または異なる結果を達成してもよい。この機能をもたらす構造は、同じであることも、異なることもある。例えば、本発明の二機能性修飾ＲＮＡが、細胞傷害性ペプチド（第１の機能）をコードし得る一方で、コードＲＮＡを含むヌクレオシドは、それ自体として、細胞傷害性（第２の機能）である。この例において、癌細胞への二機能性修飾ＲＮＡの送達は、癌を寛解させ得るまたは治療し得るペプチドまたはタンパク質分子をもたらすだけでなく、万一、修飾ＲＮＡの翻訳の代わりに分解が生じることがあった場合、ヌクレオシドの細胞傷害性ペイロードを細胞に送達するであろう。

【０９８８】

生体適合性：本明細書で使用されるとき、「生体適合性」という用語は、損傷、毒性、または免疫系による拒絶の危険性をほとんどもしくは全くもたらさず、生細胞、組織、器官、または系と適合性であることを意味する。

【０９８９】

生分解性：本明細書で使用されるとき、「生分解性」という用語は、生き物の作用によって無害の生成物へと分解されることが可能であることを意味する。

【０９９０】

生物学的に活性：本明細書で使用されるとき、「生物学的に活性」という表現は、生体系および／または生物において活性を有する任意の物質の特徴を指す。例えば、生物に投与されるときに、その生物に対して生物学的効果を有する物質は、生物学的に活性であると見なされる。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡは、そのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのほんの一部分でも、生物学的に活性であるか、生物学的に関連性があると見なされる活性を模倣する場合、生物学的に活性であると見なされ得る。

【０９９１】

化学用語：以下は、「アシル」から「チオール」までの種々の化学用語の定義を提供する。

【０９９２】

本明細書で使用されるとき、「アシル」という用語は、本明細書に定義されるカルボニル基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義される水素またはアルキル基（例えば、ハロアルキル基）を表し、ホルミル（すなわち、カルボキシアルデヒド基）、アセチル、プロピオニル、ブタノイル等により例として示される。例示の非置換アシル基は、１～７、１～１１、または１～２１個の炭素を含む。いくつかの実施形態において、アルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換される。

【０９９３】

本明細書で使用されるとき、「アシルアミノ」という用語は、本明細書に定義されるアミノ基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるアシル基を表す（すなわち、－Ｎ（$Ｒ^{Ｎ１}$）－Ｃ（Ｏ）－Ｒであり、式中、Ｒは、Ｈであるか、または任意に置換される$Ｃ_{１－６}$、$Ｃ_{１－１０}$、もしくは$Ｃ_{１－２０}$アルキル基であり、$Ｒ^{Ｎ１}$は、本明細書に定義される通りである）。例示の非置換アシルアミノ基は、１～４１個の炭素（例えば、１～７、１～１３、１～２１、２～７、２～１３、２～２１、または２～４１個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、アルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、もしくは４個の置換基でさらに置換され、かつ／またはアミノ基は、－$ＮＨ_{２}$もしくは－ＮＨ$Ｒ^{Ｎ１}$であり、式中、$Ｒ^{Ｎ１}$は、独立して、ＯＨ、$ＮＯ_{２}$、$ＮＨ_{２}$、$ＮＲ^{Ｎ２}{}_{２}$、$ＳＯ_{２}ＯＲ^{Ｎ２}$、$ＳＯ_{２}Ｒ^{Ｎ２}$、$ＳＯＲ^{Ｎ２}$、アルキル、またはアリールであり、各$Ｒ^{Ｎ２}$は、Ｈ、アルキル、またはアリールであり得る。

【０９９４】

本明細書で使用されるとき、「アシルオキシ」という用語は、酸素原子を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるアシル基を表す（すなわち、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｒであり、式中、Ｒは、Ｈであるか、または任意に置換される$Ｃ_{１－６}$、$Ｃ_{１－１０}$、もしくは$Ｃ_{１－２０}$アルキル基である）。例示の非置換アシルオキシ基は、１～２１個の炭素（例えば、１～７または１～１１個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、アルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、もしくは４個の置換基でさらに置換され、かつ／またはアミノ基は、－$ＮＨ_{２}$もしくは－ＮＨ$Ｒ^{Ｎ１}$であり、式中、$Ｒ^{Ｎ１}$は、独立して、ＯＨ、$ＮＯ_{２}$、$ＮＨ_{２}$、$ＮＲ^{Ｎ２}{}_{２}$、$ＳＯ_{２}ＯＲ^{Ｎ２}$、$ＳＯ_{２}Ｒ^{Ｎ２}$、$ＳＯＲ^{Ｎ２}$、アルキル、またはアリールであり、各$Ｒ^{Ｎ２}$は、Ｈ、アルキル、またはアリールであり得る。

【０９９５】

本明細書で使用されるとき、「アルカリール（ａｌｋａｒｙｌ）」という用語は、本明細書に定義されるアルキレン基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるアリール基を表す。例示の非置換アルカリール基は、７～３０個の炭素（例えば、$Ｃ_{１－６}$アルク－$Ｃ_{６－１０}$アリール、$Ｃ_{１－１０}$アルク－$Ｃ_{６－１０}$アリール、または$Ｃ_{１－２０}$アルク－$Ｃ_{６－１０}$アリール等の、７～１６または７～２０個の炭素）である。いくつかの実施形態において、アルキレンおよびアリールは各々、それぞれの基について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。接頭辞「アルク－」に続く他の基は、同じように定義され、ここで「アルク」は、別途注記のない限り、$Ｃ_{１－６}$アルキレンを指し、結合される化学構造は、本明細書に定義される通りである。

【０９９６】

「アルクシクロアルキル（ａｌｋｃｙｃｌｏａｌｋｙｌ）」という用語は、本明細書に定義されるアルキレン基（例えば、１～４、１～６、１～１０、または１～２０個の炭素のアルキレン基）を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるシクロアルキル基を表す。いくつかの実施形態において、アルキレンおよびシクロアルキルは各々、それぞれの基について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【０９９７】

本明細書で使用されるとき、「アルケニル」という用語は、別途明記されない限り、１つ以上の炭素－炭素二重結合を含有する、２～２０個の炭素（例えば、２～６または２～１０個の炭素）の、一価の直鎖または分岐鎖基を表し、エテニル、１－プロペニル、２－プロペニル、２－メチル－１－プロペニル、１－ブテニル、２－ブテニル等により例として示される。アルケニルは、シスおよびトランス異性体の両方を含む。アルケニル基は、本明細書に定義されるアミノ、アリール、シクロアルキル、もしくはヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）から独立して選択される１、２、３、もしくは４個の置換基、または本明細書に記載の例示のアルキル置換基のうちのいずれかで、任意に置換されてもよい。

【０９９８】

「アルケニルオキシ」という用語は、式－ＯＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、別途明記されない限り、C_{2-20}アルケニル基（例えば、C_{2-6}またはC_{2-10}アルケニル）である。例示のアルケニルオキシ基には、エテニルオキシ、プロペニルオキシ等が含まれる。いくつかの実施形態において、アルケニル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換され得る。

【０９９９】

「アルクヘテロアリール」という用語は、本明細書に定義されるアルキレン基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるヘテロアリール基を指す。例示の非置換アルクヘテロアリール基は、２～３２個の炭素（例えば、C_{1-6}アルク－C_{1-12}ヘテロアリール、C_{1-10}アルク－C_{1-12}ヘテロアリール、またはC_{1-20}アルク－C_{1-12}ヘテロアリール等の、２～２２、２～１８、２～１７、２～１６、３～１５、２～１４、２～１３、または２～１２個の炭素）である。いくつかの実施形態において、アルキレンおよびヘテロアリールは各々、それぞれの基について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。アルクヘテロアリール基は、アルクヘテロシクリル基の部分集合である。

【１０００】

「アルクヘテロシクリル」という用語は、本明細書に定義されるアルキレン基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるヘテロシクリル基を表す。例示の非置換アルクヘテロシクリル基は、２～３２個の炭素（例えば、C_{1-6}アルク－C_{1-12}ヘテロシクリル、C_{1-10}アルク－C_{1-12}ヘテロシクリル、またはC_{1-20}アルク－C_{1-12}ヘテロシクリル等の、２～２２、２～１８、２～１７、２～１６、３～１５、２～１４、２～１３、または２～１２個の炭素）である。いくつかの実施形態において、アルキレンおよびヘテロシクリルは各々、それぞれの基について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１００１】

「アルコキシ」という用語は、式－ＯＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、別途明記されない限り、C_{1-20}アルキル基（例えば、C_{1-6}またはC_{1-10}アルキル）である。例示のアルコキシ基には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ（例えば、ｎ－プロポキシおよびイソプロポキシ）、ｔ－ブトキシ等が含まれる。いくつかの実施形態において、アルキル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシまたはアルコキシ）でさらに置換され得る。

【１００２】

「アルコキシアルコキシ」という用語は、アルコキシ基で置換されるアルコキシ基を表す。例示の非置換アルコキシアルコキシ基は、２～４０個の炭素（例えば、C_{1-6}アルコキシ－C_{1-6}アルコキシ、C_{1-10}アルコキシ－C_{1-10}アルコキシ、またはC_{1-20}アルコキシ－C_{1-20}アルコキシ等の、２～１２または２～２０個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、各アルコキシ基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１００３】

「アルコキシアルキル」という用語は、アルコキシ基で置換されるアルキル基を表す。

例示の非置換アルコキシアルキル基は、２～４０個の炭素（例えば、C_{1-6}アルコキシ－C_{1-6}アルキル、C_{1-10}アルコキシ－C_{1-10}アルキル、またはC_{1-20}アルコキシ－C_{1-20}アルキル等の、２～１２または２～２０個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、アルキルおよびアルコキシは各々、それぞれの基について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１００４】

本明細書で使用されるとき、「アルコキシカルボニル」という用語は、カルボニル原子を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるアルコキシを表す（例えば、－Ｃ（Ｏ）－ＯＲであり、式中、Ｒは、Ｈであるか、または任意に置換されるC_{1-6}、C_{1-10}、もしくはC_{1-20}アルキル基である）。例示の非置換アルコキシカルボニルは、１～２１個の炭素（例えば、１～１１または１～７個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、アルコキシ基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換される。

【１００５】

本明細書で使用されるとき、「アルコキシカルボニルアルコキシ」という用語は、本明細書に定義されるアルコキシカルボニル基で置換される、本明細書に定義されるアルコキシ基を表す（例えば、－Ｏ－アルキル－Ｃ（Ｏ）－ＯＲであって、式中、Ｒは、任意に置換されるC_{1-6}、C_{1-10}、またはC_{1-20}アルキル基である）。例示の非置換アルコキシカルボニルアルコキシは、３～４１個の炭素（例えば、C_{1-6}アルコキシカルボニル－C_{1-6}アルコキシ、C_{1-10}アルコキシカルボニル－C_{1-10}アルコキシ、またはC_{1-20}アルコキシカルボニル－C_{1-20}アルコキシ等の、３～１０、３～１３、３～１７、３～２１、または３～３１個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、各アルコキシ基は、独立して、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換される。

【１００６】

本明細書で使用されるとき、「アルコキシカルボニルアルキル」という用語は、本明細書に定義されるアルコキシカルボニル基で置換される、本明細書に定義されるアルキル基を表す（例えば、－アルキル－Ｃ（Ｏ）－ＯＲであって、式中、Ｒは、任意に置換されるC_{1-20}、C_{1-10}、またはC_{1-6}アルキル基である）。例示の非置換アルコキシカルボニルアルキルは、３～４１個の炭素（例えば、C_{1-6}アルコキシカルボニル－C_{1-6}アルキル、C_{1-10}アルコキシカルボニル－C_{1-10}アルキル、またはC_{1-20}アルコキシカルボニル－C_{1-20}アルキル等の、３～１０、３～１３、３～１７、３～２１、または３～３１個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、各アルキルおよびアルコキシ基は、独立して、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換される。

【１００７】

本明細書で使用されるとき、「アルキル」という用語は、別途明記されない限り、１～２０個（例えば、１～１０または１～６個）の炭素の直鎖および分岐鎖両方の飽和基を含む。アルキル基は、メチル、エチル、ｎ－およびイソ－プロピル、ｎ－、ｓｅｃ－、イソ－、およびｔｅｒｔ－ブチル、ネオペンチル等により例として示され、次のものからなる群から独立して選択される１、２、３個の置換基で、または２個以上の炭素のアルキル基の場合には４個の置換基で、任意に置換されてもよい：（１）C_{1-6}アルコキシ；（２）C_{1-6}アルキルスルフィニル；（３）本明細書に定義されるアミノ（例えば、非置換アミノ（すなわち、$-NH_2$）または置換アミノ（すなわち、$-N(R^{N1})_2$、式中、R^{N1}は、アミノについて定義される通りである）；（４）C_{6-10}アリール－C_{1-6}アルコキシ；（５）アジド；（６）ハロ；（７）（C_{2-9}ヘテロシクリル）オキシ；（８）ヒドロキシ；（９）ニトロ；（１０）オキソ（例えば、カルボキシアルデヒドまたはアシル）；（１１）C_{1-7}スピロシクリル；（１２）チオアルコキシ；（１３）チオール；（１４）$-CO_2R^{A'}$（式中、$R^{A'}$は、（ａ）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、（ｂ）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（

ｃ）C_{6-10}アリール、（ｄ）水素、（ｅ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、（ｆ）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ）－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはC_{1-20}アルキルである）、および（ｈ）－$NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるC_{1-6}アルキルである）からなる群から選択される）；（１５）－Ｃ（Ｏ）$NR^{B'}R^{C'}$（式中、$R^{B'}$および$R^{C'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）C_{1-6}アルキル、（ｃ）C_{6-10}アリール、および（ｄ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリールからなる群から選択される）；（１６）－$SO_2R^{D'}$（式中、$R^{D'}$は、（ａ）C_{1-6}アルキル、（ｂ）C_{6-10}アリール、（ｃ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、および（ｄ）ヒドロキシからなる群から選択される）；（１７）－$SO_2NR^{E'}R^{F'}$（式中、$R^{E'}$および$R^{F'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）C_{1-6}アルキル、（ｃ）C_{6-10}アリール、および（ｄ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリールからなる群から選択される）；（１８）－Ｃ（Ｏ）$R^{G'}$（式中、$R^{G'}$は、（ａ）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、（ｂ）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（ｃ）C_{6-10}アリール、（ｄ）水素、（ｅ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、（ｆ）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ）－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはC_{1-20}アルキルである）、および（ｈ）－$NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるC_{1-6}アルキルである）からなる群から選択される）；（１９）－$NR^{H'}C(O)R^{I'}$（式中、$R^{H'}$は、（ａ１）水素および（ｂ１）C_{1-6}アルキルからなる群から選択され、$R^{I'}$は、（ａ２）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、（ｂ２）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（ｃ２）C_{6-10}アリール、（ｄ２）水素、（ｅ２）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、（ｆ２）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ２）－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはC_{1-20}アルキルである）、および（ｈ２）－$NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるC_{1-6}アルキルである）からなる群から選択される）；（２０）－$NR^{J'}C(O)OR^{K'}$（式中、$R^{J'}$は、（ａ１）水素および（ｂ１）C_{1-6}アルキルからなる群から選択され、$R^{K'}$は、（ａ２）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、（ｂ２）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（ｃ２）C_{6-10}アリール、（ｄ２）水素、（ｅ２）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、（ｆ２）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ２）－$(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、

１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはC_{1-20}アルキルである）、および（ｈ２）－$NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるC_{1-6}アルキルである）からなる群から選択される）；ならびに（２１）アミジン。いくつかの実施形態において、これらの基の各々は、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。例えば、C_1－アルカリールのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれのアリーロイル（ａｒｙｌｏｙｌ）置換基をもたらすことができる。

【１００８】

本明細書で使用されるとき、「アルキレン」および接頭辞「アルク－」という用語は、２つの水素原子の除去によって直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素に由来する、飽和二価炭化水素基を表し、メチレン、エチレン、イソプロピレン等により例として示される。「C_{x-y}アルキレン」および接頭辞「C_{x-y}アルク－」という用語は、ｘ～ｙ個の炭素を有するアルキレン基を表す。ｘに関する例示の値は、１、２、３、４、５、および６であり、ｙに関する例示の値は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、または２０である（例えば、C_{1-6}、C_{1-10}、C_{2-20}、C_{2-6}、C_{2-10}、またはC_{2-20}アルキレン）。いくつかの実施形態において、アルキレンは、アルキル基について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１００９】

本明細書で使用されるとき、「アルキルスルフィニル」という用語は、－Ｓ（Ｏ）－基を介して親分子基に結合されるアルキル基を表す。例示の非置換アルキルスルフィニル基は、１～６、１～１０、または１～２０個の炭素である。いくつかの実施形態において、アルキル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０１０】

本明細書で使用されるとき、「アルキルスルフィニルアルキル」という用語は、アルキルスルフィニル基によって置換された、本明細書に定義されるアルキル基を表す。例示の非置換アルキルスルフィニルアルキル基は、２～１２、２～２０、または２～４０個の炭素である。いくつかの実施形態において、各アルキル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０１１】

本明細書で使用されるとき、「アルキニル」という用語は、炭素－炭素三重結合を含有する、２～２０個の炭素原子（例えば、２～４、２～６、または２～１０個の炭素）の、一価の直鎖または分岐鎖基を表し、エチニル、１－プロピニル等により例として示される。アルキニル基は、本明細書に定義されるアリール、シクロアルキル、またはヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）から独立して選択される１、２、３、もしくは４個の置換基、または本明細書に記載の例示のアルキル置換基のうちのいずれかで、任意に置換されてもよい。

【１０１２】

「アルキニルオキシ」という用語は、式－ＯＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、別途明記されない限り、C_{2-20}アルキニル基（例えば、C_{2-6}またはC_{2-10}アルキニル）である。例示のアルキニルオキシ基には、エチニルオキシ、プロピニルオキシ等が含まれる。いくつかの実施形態において、アルキニル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基（例えば、ヒドロキシ基）でさらに置換され得る。

【１０１３】

本明細書で使用されるとき、「アミジン」という用語は、－Ｃ（＝ＮＨ）NH_2基を表

す。

【１０１４】

本明細書で使用されるとき、「アミノ」という用語は、－Ｎ（R^{N1}）$_2$を表し、式中、各R^{N1}は、独立して、Ｈ、ＯＨ、NO_2、Ｎ（R^{N2}）$_2$、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、Ｎ－保護基、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルカリール、シクロアルキル、アルクシクロアルキル、カルボキシアルキル、スルホアルキル、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、またはアルクヘテロシクリル（例えば、アルクヘテロアリール）であり、これらの列挙されるR^{N1}基の各々は、各基について本明細書に定義されるように任意に置換され得るか、または２つのR^{N1}が組み合わさって、ヘテロシクリルもしくはＮ保護基を形成し、各R^{N2}は、独立して、Ｈ、アルキル、またはアリールである。本発明のアミノ基は、非置換アミノ（すなわち、－NH_2）または置換アミノ（すなわち、－Ｎ（R^{N1}）$_2$）であり得る。好ましい実施形態において、アミノは、－NH_2または－NHR^{N1}であり、式中、R^{N1}は、独立して、ＯＨ、NO_2、NH_2、$NR^{N2}{}_2$、SO_2OR^{N2}、SO_2R^{N2}、SOR^{N2}、アルキル、カルボキシアルキル、スルホアルキル、またはアリールであり、各R^{N2}は、Ｈ、C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、またはC_{6-10}アリールであり得る。

【１０１５】

本明細書に記載の「アミノ酸」という用語は、側鎖、アミノ基、および酸性基（例えば、－CO_2Hのカルボキシ基または－SO_3Hのスルホ基）を有する分子を指し、このアミノ酸は、側鎖、アミノ基、または酸性基（例えば、側鎖）によって親分子基に結合される。いくつかの実施形態において、アミノ酸は、カルボニル基によって親分子基に結合され、この側鎖またはアミノ基は、カルボニル基に結合される。例示の側鎖には、任意に置換されるアルキル、アリール、ヘテロシクリル、アルカリール、アルクヘテロシクリル、アミノアルキル、カルバモイルアルキル、およびカルボキシアルキルが含まれる。例示のアミノ酸には、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシノルバリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、ピロリジン、セレノシステイン、セリン、タウリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンが含まれる。アミノ酸基は、次のものからなる群から独立して選択される１、２、３個の置換基で、または２個以上の炭素のアミノ酸基の場合には４個の置換基で、任意に置換されてもよい：（１）C_{1-6}アルコキシ；（２）C_{1-6}アルキルスルフィニル；（３）本明細書に定義されるアミノ（例えば、非置換アミノ（すなわち、－NH_2）または置換アミノ（すなわち、－Ｎ（R^{N1}）$_2$（式中、R^{N1}は、アミノについて定義される通りである））；（４）C_{6-10}アリール－C_{1-6}アルコキシ；（５）アジド；（６）ハロ；（７）（C_{2-9}ヘテロシクリル）オキシ；（８）ヒドロキシ；（９）ニトロ；（１０）オキソ（例えば、カルボキシアルデヒドまたはアシル）；（１１）C_{1-7}スピロシクリル；（１２）チオアルコキシ；（１３）チオール；（１４）－$CO_2R^{A'}$（式中、$R^{A'}$は、（ａ）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル）、（ｂ）C_{2-20}アルケニル（例えば、C_{2-6}アルケニル）、（ｃ）C_{6-10}アリール、（ｄ）水素、（ｅ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、（ｆ）アミノ－C_{1-20}アルキル、（ｇ）－（CH_2）$_{s2}$（OCH_2CH_2）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}OR'$のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはC_{1-20}アルキルである）、および（ｈ）－NR^{N1}（CH_2）$_{s2}$（CH_2CH_2O）$_{s1}$（CH_2）$_{s3}NR^{N1}$のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各R^{N1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるC_{1-6}アルキルである）からなる群か

ら選択される）；（１５）－Ｃ（Ｏ）ＮＲ$^{Ｂ'}$Ｒ$^{Ｃ'}$（式中、Ｒ$^{Ｂ'}$およびＲ$^{Ｃ'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｃ）Ｃ$_{6-10}$アリール、および（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（１６）－ＳＯ$_2$Ｒ$^{Ｄ'}$（式中、Ｒ$^{Ｄ'}$は、（ａ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｃ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリール、および（ｄ）ヒドロキシからなる群から選択される）；（１７）－ＳＯ$_2$ＮＲ$^{Ｅ'}$Ｒ$^{Ｆ'}$（式中、Ｒ$^{Ｅ'}$およびＲ$^{Ｆ'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｃ）Ｃ$_{6-10}$アリール、および（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（１８）－Ｃ（Ｏ）Ｒ$^{Ｇ'}$（式中、Ｒ$^{Ｇ'}$は、（ａ）Ｃ$_{1-20}$アルキル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル）、（ｂ）Ｃ$_{2-20}$アルケニル（例えば、Ｃ$_{2-6}$アルケニル）、（ｃ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｄ）水素、（ｅ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｆ）アミノ－Ｃ$_{1-20}$アルキル、（ｇ）－（ＣＨ$_2$）$_{s2}$（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_{s1}$（ＣＨ$_2$）$_{s3}$ＯＲ’のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはＣ$_{1-20}$アルキルである）、および（ｈ）－ＮＲ^{Ｎ1}（ＣＨ$_2$）$_{s2}$（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{s1}$（ＣＨ$_2$）$_{s3}$ＮＲ^{Ｎ1}のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各Ｒ^{Ｎ1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるＣ$_{1-6}$アルキルである）からなる群から選択される）；（１９）－ＮＲ$^{Ｈ'}$Ｃ（Ｏ）Ｒ$^{Ｉ'}$（式中、Ｒ$^{Ｈ'}$は、（ａ１）水素および（ｂ１）Ｃ$_{1-6}$アルキルからなる群から選択され、Ｒ$^{Ｉ'}$は、（ａ２）Ｃ$_{1-20}$アルキル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル）、（ｂ２）Ｃ$_{2-20}$アルケニル（例えば、Ｃ$_{2-6}$アルケニル）、（ｃ２）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｄ２）水素、（ｅ２）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｆ２）アミノ－Ｃ$_{1-20}$アルキル、（ｇ２）－（ＣＨ$_2$）$_{s2}$（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_{s1}$（ＣＨ$_2$）$_{s3}$ＯＲ’のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはＣ$_{1-20}$アルキルである）、および（ｈ２）－ＮＲ^{Ｎ1}（ＣＨ$_2$）$_{s2}$（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{s1}$（ＣＨ$_2$）$_{s3}$ＮＲ^{Ｎ1}のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各Ｒ^{Ｎ1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるＣ$_{1-6}$アルキルである）からなる群から選択される）；（２０）－ＮＲ$^{Ｊ'}$Ｃ（Ｏ）ＯＲ$^{Ｋ'}$（式中、Ｒ$^{Ｊ'}$は、（ａ１）水素および（ｂ１）Ｃ$_{1-6}$アルキルからなる群から選択され、Ｒ$^{Ｋ'}$は、（ａ２）Ｃ$_{1-20}$アルキル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル）、（ｂ２）Ｃ$_{2-20}$アルケニル（例えば、Ｃ$_{2-6}$アルケニル）、（ｃ２）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｄ２）水素、（ｅ２）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｆ２）アミノ－Ｃ$_{1-20}$アルキル、（ｇ２）－（ＣＨ$_2$）$_{s2}$（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_{s1}$（ＣＨ$_2$）$_{s3}$ＯＲ’のポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、Ｒ’は、ＨまたはＣ$_{1-20}$アルキルである）、および（ｈ２）－ＮＲ^{Ｎ1}（ＣＨ$_2$）$_{s2}$（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{s1}$（ＣＨ$_2$）$_{s3}$ＮＲ^{Ｎ1}のアミノ－ポリエチレングリコール（式中、ｓ１は、１～１０（例えば、１～６または１～４）の整数であり、ｓ２およびｓ３の各々は、独立して、０～１０（例えば、０～４、０～６、１～４、１～６、または１～１０）の整数であり、各Ｒ^{Ｎ1}は、独立して、水素であるか、または任意に置換されるＣ$_{1-6}$アルキルである）からなる群から選択される）；ならびに（２１）アミジン。いくつかの実施形態において、これらの基の各々は、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。

【１０１６】

本明細書で使用されるとき、「アミノアルコキシ」という用語は、本明細書に定義されるアミノ基によって置換された、本明細書に定義されるアルコキシ基を表す。アルキルおよびアミノは各々、それぞれの基について本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基（例えば、$CO_2R^{A'}$（式中、$R^{A'}$は、（ａ）C_{1-6}アルキル、（ｂ）C_{6-10}アリール、（ｃ）水素、および（ｄ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、例えば、カルボキシからなる群から選択される））でさらに置換され得る。

【１０１７】

本明細書で使用されるとき、「アミノアルキル」という用語は、本明細書に定義されるアミノ基によって置換された、本明細書に定義されるアルキル基を表す。アルキルおよびアミノは各々、それぞれの基について本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基（例えば、$CO_2R^{A'}$（式中、$R^{A'}$は、（ａ）C_{1-6}アルキル、（ｂ）C_{6-10}アリール、（ｃ）水素、および（ｄ）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール、例えば、カルボキシからなる群から選択される））でさらに置換され得る。

【１０１８】

本明細書で使用されるとき、「アリール」という用語は、１つまたは２つの芳香族環を有する単環式、二環式、または多環式の炭素環式環系を表し、フェニル、ナフチル、１，２－ジヒドロナフチル、１，２，３，４－テトラヒドロナフチル、アントラセニル、フェナントレニル、フルオレニル、インダニル、インデニル等により例として示され、次のものからなる群から独立して選択される１、２、３、４、または５個の置換基で任意に置換されてもよい：（１）C_{1-7}アシル（例えば、カルボキシアルデヒド）；（２）C_{1-20}アルキル（例えば、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ－C_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルキルスルフィニル－C_{1-6}アルキル、アミノ－C_{1-6}アルキル、アジド－C_{1-6}アルキル、（カルボキシアルデヒド）－C_{1-6}アルキル、ハロ－C_{1-6}アルキル（例えば、ペルフルオロアルキル）、ヒドロキシ－C_{1-6}アルキル、ニトロ－C_{1-6}アルキル、またはC_{1-6}チオアルコキシ－C_{1-6}アルキル）；（３）C_{1-20}アルコキシ（例えば、ペルフルオロアルコキシ等のC_{1-6}アルコキシ）；（４）C_{1-6}アルキルスルフィニル；（５）C_{6-10}アリール；（６）アミノ；（７）C_{1-6}アルク－C_{6-10}アリール；（８）アジド；（９）C_{3-8}シクロアルキル；（１０）C_{1-6}アルク－C_{3-8}シクロアルキル；（１１）ハロ；（１２）C_{1-12}ヘテロシクリル（例えば、C_{1-12}ヘテロアリール）；（１３）（C_{1-12}ヘテロシクリル）オキシ；（１４）ヒドロキシ；（１５）ニトロ；（１６）C_{1-20}チオアルコキシ（例えば、C_{1-6}チオアルコキシ）；（１７）－（CH_2）$_q$$CO_2R^{A'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{A'}$は、（ａ）$C_{1-6}$アルキル、（ｂ）$C_{6-10}$アリール、（ｃ）水素、および（ｄ）$C_{1-6}$アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（１８）－（$CH_2$）$_q$$CONR^{B'}R^{C'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{B'}$および$R^{C'}$は、（ａ）水素、（ｂ）$C_{1-6}$アルキル、（ｃ）$C_{6-10}$アリール、および（ｄ）$C_{1-6}$アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から独立して選択される）；（１９）－（CH_2）$_q$$SO_2R^{D'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{D'}$は、（ａ）アルキル、（ｂ）$C_{6-10}$アリール、および（ｃ）アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（２０）－（$CH_2$）$_q$$SO_2NR^{E'}R^{F'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{E'}$および$R^{F'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）$C_{1-6}$アルキル、（ｃ）$C_{6-10}$アリール、および（ｄ）$C_{1-6}$アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（２１）チオール；（２２）C_{6-10}アリールオキシ；（２３）C_{3-8}シクロアルコキシ；（２４）C_{6-10}アリール－C_{1-6}アルコキシ；（２５）C_{1-6}アルク－C_{1-12}ヘテロシクリル（例えば、C_{1-6}アルク－C_{1-12}ヘテロアリール）；（２６）C_{2-20}アルケニル；ならびに（２７）C_{2-20}アルキニル。いくつかの実施形態において、これらの基の各々は、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。例えば、C_1－アルカリールまたはC_1－アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれのアリーロイルおよび（ヘテロシクリル）オイル置換基をもたらすことができる。

【１０１９】
本明細書で使用されるとき、「アリールアルコキシ」という用語は、酸素原子を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるアルカリール基を表す。例示の非置換アルコキシアルキル基は、７～３０個の炭素（例えば、C_{6-10}アリール－C_{1-6}アルコキシ、C_{6-10}アリール－C_{1-10}アルコキシ、またはC_{6-10}アリール－C_{1-20}アルコキシ等の、７～１６または７～２０個の炭素）を含む。いくつかの実施形態において、アリールアルコキシ基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基で置換され得る。
【１０２０】
「アリールオキシ」という用語は、式－ＯＲ’の化学置換基を表し、式中、Ｒ’は、別途明記されない限り、６～１８個の炭素のアリール基である。いくつかの実施形態において、アリール基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基で置換され得る。
【１０２１】
本明細書で使用されるとき、「アリーロイル」という用語は、カルボニル基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるアリール基を表す。例示の非置換アリーロイル基は、７～１１個の炭素のものである。いくつかの実施形態において、アリール基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基で置換され得る。
【１０２２】
「アジド」という用語は、$-N_3$基を表し、それは、－Ｎ＝Ｎ＝Ｎとしても表され得る。
【１０２３】
本明細書で使用されるとき、「二環式」という用語は、芳香族でも非芳香族でもあり得る２つの環を有する構造を指す。二環式構造には、本明細書に定義されるスピロシクリル基、および１つ以上の架橋を共有する２つの環が含まれ、そのような架橋は、１個の原子、または２個、３個、もしくはそれよりも多い原子を含む鎖を含むことができる。例示の二環式基には、二環式カルボシクリル基（その第１および第２の環は、本明細書に定義されるカルボシクリル基である）；二環式アリール基（その第１および第２の環は、本明細書に定義されるアリール基である）；二環式ヘテロシクリル基（その第１の環は、ヘテロシクリル基であり、第２の環は、カルボシクリル（例えば、アリール）またはヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）基である）；および二環式ヘテロアリール基（その第１の環は、ヘテロアリール基であり、第２の環は、カルボシクリル（例えば、アリール）またはヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）基である）が含まれる。いくつかの実施形態において、二環式基は、シクロアルキル、ヘテロシクリル、およびアリール基について本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基で置換され得る。
【１０２４】
本明細書で使用されるとき、「炭素環式」および「カルボシクリル」という用語は、芳香族でも非芳香族でもあり得る環が炭素原子によって形成される、任意に置換されるC_{3-12}単環式、二環式、または三環式構造を指す。炭素環式構造には、シクロアルキル、シクロアルケニル、およびアリール基が含まれる。
【１０２５】
本明細書で使用されるとき、「カルバモイル」という用語は、－Ｃ（Ｏ）－Ｎ（R^{N1}）$_2$を表し、式中、各R^{N1}の意味は、本明細書に提供される「アミノ」の定義において見出される。
【１０２６】
本明細書で使用されるとき、「カルバモイルアルキル」という用語は、本明細書に定義されるカルバモイル基によって置換された、本明細書に定義されるアルキル基を表す。アルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。
【１０２７】
本明細書で使用されるとき、「カルバミル」という用語は、構造－NR^{N1}Ｃ（＝Ｏ）

ＯＲまたは－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（R^{N1}）$_2$を有するカルバメート基を指し、式中、各R^{N1}の意味は、本明細書に提供される「アミノ」の定義において見出され、Ｒは、本明細書に定義されるアルキル、シクロアルキル、アルクシクロアルキル、アリール、アルカリール、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、またはアルクヘテロシクリル（例えば、アルクヘテロアリール）である。

【１０２８】

本明細書で使用されるとき、「カルボニル」という用語は、Ｃ（Ｏ）基を表し、それは、Ｃ＝Ｏとしても表され得る。

【１０２９】

「カルボキシアルデヒド」という用語は、構造－ＣＨＯを有するアシル基を表す。

【１０３０】

本明細書で使用されるとき、「カルボキシ」という用語は、－ＣＯ$_2$Ｈを意味する。

【１０３１】

本明細書で使用されるとき、「カルボキシアルコキシ」という用語は、本明細書に定義されるカルボキシ基によって置換された、本明細書に定義されるアルコキシ基を表す。アルコキシ基は、アルキル基について本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０３２】

本明細書で使用されるとき、「カルボキシアルキル」という用語は、本明細書に定義されるカルボキシ基によって置換された、本明細書に定義されるアルキル基を表す。アルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０３３】

本明細書で使用されるとき、「シアノ」という用語は、－ＣＮ基を表す。

【１０３４】

「シクロアルコキシ」という用語は、式－ＯＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、別途明記されない限り、本明細書に定義されるＣ$_{3-8}$シクロアルキル基である。シクロアルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。例示の非置換シクロアルコキシ基は、３～８個の炭素である。いくつかの実施形態において、シクロアルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０３５】

本明細書で使用されるとき、「シクロアルキル」という用語は、別途明記されない限り、３～８個の炭素の一価の飽和または不飽和非芳香族環状炭化水素基を表し、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、ビシクロ［２．２．１．］ヘプチル等により例として示される。シクロアルキル基が１つの炭素－炭素二重結合を含むとき、シクロアルキル基は、「シクロアルケニル」基と称され得る。例示のシクロアルケニル基には、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等が含まれる。本発明のシクロアルキル基は、次のもので任意に置換され得る：（１）Ｃ$_{1-7}$アシル（例えば、カルボキシアルデヒド）；（２）Ｃ$_{1-20}$アルキル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-6}$アルキルスルフィニル－Ｃ$_{1-6}$アルキル、アミノ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、アジド－Ｃ$_{1-6}$アルキル、（カルボキシアルデヒド）－Ｃ$_{1-6}$アルキル、ハロ－Ｃ$_{1-6}$アルキル（例えば、ペルフルオロアルキル）、ヒドロキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、ニトロ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、またはＣ$_{1-6}$チオアルコキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル）；（３）Ｃ$_{1-20}$アルコキシ（例えば、ペルフルオロアルコキシ等のＣ$_{1-6}$アルコキシ）；（４）Ｃ$_{1-6}$アルキルスルフィニル；（５）Ｃ$_{6-10}$アリール；（６）アミノ；（７）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリール；（８）アジド；（９）Ｃ$_{3-8}$シクロアルキル；（１０）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{3-8}$シクロアルキル；（１１）ハロ；（１２）Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル（例えば、Ｃ$_{1-12}$ヘテロアリール）；（１３）（Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル）オキシ；（１４）ヒドロキシ；（１５）ニトロ；（１６）Ｃ$_{1-20}$チオアルコキシ（例えば、Ｃ$_{1-6}$チオアルコキシ）；（１７）－

（CH_2）$_q$$CO_2R^{A'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{A'}$は、（ａ）$C_{1-6}$アルキル、（ｂ）$C_{6-10}$アリール、（ｃ）水素、および（ｄ）$C_{1-6}$アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（１８）－（$CH_2$）$_q$$CONR^{B'}R^{C'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{B'}$および$R^{C'}$は、（ａ）水素、（ｂ）$C_{6-10}$アルキル、（ｃ）$C_{6-10}$アリール、および（ｄ）$C_{1-6}$アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から独立して選択される）；（１９）－（CH_2）$_q$$SO_2R^{D'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{D'}$は、（ａ）$C_{6-10}$アルキル、（ｂ）$C_{6-10}$アリール、および（ｃ）$C_{1-6}$アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（２０）－（$CH_2$）$_q$$SO_2NR^{E'}R^{F'}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、$R^{E'}$および$R^{F'}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）$C_{6-10}$アルキル、（ｃ）$C_{6-10}$アリール、および（ｄ）$C_{1-6}$アルク－$C_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（２１）チオール；（２２）C_{6-10}アリールオキシ；（２３）C_{3-8}シクロアルコキシ；（２４）C_{6-10}アリール－C_{1-6}アルコキシ；（２５）C_{1-6}アルク－C_{1-12}ヘテロシクリル（例えば、C_{1-6}アルク－C_{1-12}ヘテロアリール）；（２６）オキソ；（２７）C_{2-20}アルケニル；ならびに（２８）C_{2-20}アルキニル。いくつかの実施形態において、これらの基の各々は、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。例えば、C_1－アルカリールまたはC_1－アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれのアリーロイルおよび（ヘテロシクリル）オイル置換基をもたらすことができる。

【１０３６】

本明細書で使用されるとき、「ジアステレオマー」という用語は、互いの鏡像でなく、互いの上に重ね合わせ不可能である、立体異性体を意味する。

【１０３７】

本明細書で使用されるとき、本明細書で使用される薬剤の「有効量」は、有益なまたは所望の結果、例えば、臨床結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、それが適用されている前後関係に依存する。例えば、癌を治療する薬剤を投与することの前後関係において、有効量の薬剤は、例えば、薬剤の投与を伴わずに得られる反応と比較して、本明細書に定義される癌の治療を達成するのに十分な量である。

【１０３８】

本明細書で使用されるとき、「鏡像異性体」という用語は、少なくとも８０％（すなわち、一方の鏡像異性体が少なくとも９０％および他方の鏡像異性体が多くても１０％）、好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９８％の光学純度または鏡像異性体過剰率（当技術分野で標準の方法によって決定するとき）を有する、本発明の化合物の各個々の光学活性型を意味する。

【１０３９】

本明細書で使用されるとき、「ハロ」という用語は、臭素、塩素、ヨウ素、またはフッ素から選択されるハロゲンを表す。

【１０４０】

本明細書で使用されるとき、「ハロアルコキシ」という用語は、ハロゲン基（すなわち、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、またはＩ）によって置換された、本明細書に定義されるアルコキシ基を表す。ハロアルコキシは、１、２、３個のハロゲンで、または２個以上の炭素のアルキル基の場合には４個のハロゲンで置換されてもよい。ハロアルコキシ基には、ペルフルオロアルコキシ（例えば、－OCF_3）、－$OCHF_2$、－OCH_2F、－$OCCl_3$、－OCH_2CH_2Br、－$OCH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$、および－$OCHICH_3$が含まれる。いくつかの実施形態において、ハロアルコキシ基は、アルキル基について本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０４１】

本明細書で使用されるとき、「ハロアルキル」という用語は、ハロゲン基（すなわち、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、またはＩ）によって置換された、本明細書に定義されるアルキル基を表す。ハロアルキルは、１、２、３個のハロゲンで、または２個以上の炭素のアルキル基の

場合には４個のハロゲンで置換されてもよい。ハロアルキル基には、ペルフルオロアルキル（例えば、－ＣＦ$_3$）、－ＣＨＦ$_2$、－ＣＨ$_2$Ｆ、－ＣＣｌ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｂｒ、－ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｂｒ）ＣＨ$_3$、および－ＣＨＩＣＨ$_3$が含まれる。いくつかの実施形態において、ハロアルキル基は、アルキル基について本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０４２】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロアルキレン」という用語は、構成炭素原子のうちの１個または２個が各々、窒素、酸素、または硫黄によって置き換えらた、本明細書に定義されるアルキレン基を指す。いくつかの実施形態において、ヘテロアルキレン基は、アルキレン基について本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０４３】

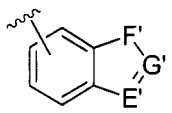
本明細書で使用されるとき、「ヘテロアリール」という用語は、芳香族である、本明細書に定義されるヘテロシクリルの部分集合を表し、すなわち、それらは単環式または多環式環系内に４ｎ＋２個のπ電子を含有する。例示の非置換ヘテロアリール基は、１～１２個（例えば、１～１１、１～１０、１～９、２～１２、２～１１、２～１０、または２～９個）の炭素ものもである。いくつかの実施形態において、ヘテロアリールは、ヘテロシクリル基について定義される１、２、３、または４個の置換基で置換される。

【１０４４】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロシクリル」という用語は、別途明記されない限り、窒素、酸素、および硫黄からなる群から独立して選択される１、２、３、または４個のヘテロ原子を含有する、５、６、または７員環を表す。５員環は、０～２つの二重結合を有し、６および７員環は、０～３つの二重結合を有する。例示の非置換ヘテロシクリル基は、１～１２個（例えば、１～１１、１～１０、１～９、２～１２、２～１１、２～１０、または２～９個）の炭素のものである。「ヘテロシクリル」という用語は、１個以上の炭素および／またはヘテロ原子が単環式環の２つの隣接していない員を架橋する、架橋多環式構造を有する複素環式化合物、例えば、キヌクリジニル基も表す。「ヘテロシクリル」という用語は、上記の複素環式環のうちのいずれかが１、２、もしくは３つの炭素環式環、例えば、アリール環、シクロヘキサン環、シクロヘキセン環、シクロペンタン環、シクロペンテン環、またはインドリル、キノリル、イソキノリル、テトラヒドロキノリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル等の別の単環式の複素環式環に縮合される、二環式、三環式、および四環式基を含む。縮合ヘテロシクリルの例としては、トロパンおよび１，２，３，５，８，８ａ－ヘキサヒドロインドリジンが挙げられる。複素環には、ピロリル、ピロリニル、ピロリジニル、ピラゾリル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピリジル、ピペリジニル、ホモピペリジニル、ピラジニル、ピペラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアゾリル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソチアゾリジニル、インドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、キノキサリニル、ジヒドロキノキサリニル、キナゾリニル、シノリニル、フタラジニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアジアゾリル、フリル、チエニル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサジアゾリル（例えば、１，２，３－オキサジアゾリル）、プリニル、チアジアゾリル（例えば、１，２，３－チアジアゾリル）、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロインドリル、ジヒドロキノリル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、ジヒドロイソキノリル、ピラニル、ジヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンゾチエニル等が含まれ、１つ以上の二重結合が還元され、水素と置き換えられる、それらのジヒドロおよびテトラヒドロ形態を含む。さらに他の例示のヘテロシクリルには、２，３，４，５－テトラヒドロ－２－オキソ－オキサゾリル；２，３－ジヒドロ－２－オキソ－１Ｈ－イミダゾリル；２，３，４，５－テトラヒドロ－５－オキソ

－１Ｈ－ピラゾリル（例えば、２，３，４，５－テトラヒドロ－２－フェニル－５－オキソ－１Ｈ－ピラゾリル）；２，３，４，５－テトラヒドロ－２，４－ジオキソ－１Ｈ－イミダゾリル（例えば、２，３，４，５－テトラヒドロ－２，４－ジオキソ－５－メチル－５－フェニル－１Ｈ－イミダゾリル）；２，３－ジヒドロ－２－チオキソ－１，３，４－オキサジアゾリル（例えば、２，３－ジヒドロ－２－チオキソ－５－フェニル－１，３，４－オキサジアゾリル）；４，５－ジヒドロ－５－オキソ－１Ｈ－トリアゾリル（例えば、４，５－ジヒドロ－３－メチル－４－アミノ５－オキソ－１Ｈ－トリアゾリル）；１，２，３，４－テトラヒドロ－２，４－ジオキソピリジニル（例えば、１，２，３，４－テトラヒドロ－２，４－ジオキソ－３，３－ジエチルピリジニル）；２，６－ジオキソ－ピペリジニル（例えば、２，６－ジオキソ－３－エチル－３－フェニルピペリジニル）；１，６－ジヒドロ－６－オキソピリジミニル；１，６－ジヒドロ－４－オキソピリミジニル（例えば、２－（メチルチオ）－１，６－ジヒドロ－４－オキソ－５－メチルピリミジン－１－イル）；１，２，３，４－テトラヒドロ－２，４－ジオキソピリミジニル（例えば、１，２，３，４－テトラヒドロ－２，４－ジオキソ－３－エチルピリミジニル）；１，６－ジヒドロ－６－オキソ－ピリダジニル（例えば、１，６－ジヒドロ－６－オキソ－３－エチルピリダジニル）；１，６－ジヒドロ－６－オキソ－１，２，４－トリアジニル（例えば、１，６－ジヒドロ－５－イソプロピル－６－オキソ－１，２，４－トリアジニル）；２，３－ジヒドロ－２－オキソ－１Ｈ－インドリル（例えば、３，３－ジメチル－２，３－ジヒドロ－２－オキソ－１Ｈ－インドリルおよび２，３－ジヒドロ－２－オキソ－３，３’－スピロプロパン－１Ｈ－インドール－１－イル）；１，３－ジヒドロ－１－オキソ－２Ｈ－イソ－インドリル；１，３－ジヒドロ－１，３－ジオキソ－２Ｈ－イソ－インドリル；１Ｈ－ベンゾピラゾリル（例えば、１－（エトキシカルボニル）－１Ｈ－ベンゾピラゾリル）；２，３－ジヒドロ－２－オキソ－１Ｈ－ベンズイミダゾリル（例えば、３－エチル－２，３－ジヒドロ－２－オキソ－１Ｈ－ベンズイミダゾリル）；２，３－ジヒドロ－２－オキソ－ベンゾオキサゾリル（例えば、５－クロロ－２，３－ジヒドロ－２－オキソ－ベンゾオキサゾリル）；２，３－ジヒドロ－２－オキソ－ベンゾオキサゾリル；２－オキソ－２Ｈ－ベンゾピラニル；１，４－ベンゾジオキサニル；１，３－ベンゾジオキサニル；２，３－ジヒドロ－３－オキソ，４Ｈ－１，３－ベンゾチアジニル；３，４－ジヒドロ－４－オキソ－３Ｈ－キナゾリニル（例えば、２－メチル－３，４－ジヒドロ－４－オキソ－３Ｈ－キナゾリニル）；１，２，３，４－テトラヒドロ－２，４－ジオキソ－３Ｈ－キナゾリル（例えば、１－エチル－１，２，３，４－テトラヒドロ－２，４－ジオキソ－３Ｈ－キナゾリル）；１，２，３，６－テトラヒドロ－２，６－ジオキソ－７Ｈ－プリニル（例えば、１，２，３，６－テトラヒドロ－１，３－ジメチル－２，６－ジオキソ－７Ｈ－プリニル）；１，２，３，６－テトラヒドロ－２，６－ジオキソ－１Ｈ－プリニル（例えば、１，２，３，６－テトラヒドロ－３，７－ジメチル－２，６－ジオキソ－１Ｈ－プリニル）；２－オキソベンズ［ｃ，ｄ］インドリル；１，１－ジオキソ－２Ｈ－ナフト［１，８－ｃ，ｄ］イソチアゾリル；および１，８－ナフチレンジカルボキサミドが含まれる。さらなる複素環には、３，３ａ，４，５，６，６ａ－ヘキサヒドロ－ピロ［３，４－ｂ］ピロ－（２Ｈ）－イル、および２，５－ジアザビシクロ［２．２．１］ヘプタン－２－イル、ホモピペラジニル（またはジアゼパニル）、テトラヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、オキセパニル、チエパニル、アゾカニル、オキセカニル、およびチオカニルが含まれる。複素環基は、式：

【化７５】



の基も含み、式中、

【１０４５】
Ｅ’は、－Ｎ－および－ＣＨ－からなる群から選択され、Ｆ’は、－Ｎ＝ＣＨ－、－ＮＨ－ＣＨ$_2$－、－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－、－ＮＨ－、－ＣＨ＝Ｎ－、－ＣＨ$_2$－ＮＨ－、－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－、－ＣＨ＝ＣＨ－、－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$Ｏ－、－ＯＣＨ$_2$－、－Ｏ－、および－Ｓ－からなる群から選択され、Ｇ’は、－ＣＨ－および－Ｎ－からなる群から選択される。本明細書で言及されるヘテロシクリル基のうちのいずれかは、次のものからなる群から独立して選択される１、２、３、４、または５個の置換基で任意に置換されてもよい：（１）Ｃ$_{1-7}$アシル（例えば、カルボキシアルデヒド）；（２）Ｃ$_{1-20}$アルキル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-6}$アルコキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、Ｃ$_{1-6}$アルキルスルフィニル－Ｃ$_{1-6}$アルキル、アミノ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、アジド－Ｃ$_{1-6}$アルキル、（カルボキシアルデヒド）－Ｃ$_{1-6}$アルキル、ハロ－Ｃ$_{1-6}$アルキル（例えば、ペルフルオロアルキル）、ヒドロキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、ニトロ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、またはＣ$_{1-6}$チオアルコキシ－Ｃ$_{1-6}$アルキル）；（３）Ｃ$_{1-20}$アルコキシ（例えば、ペルフルオロアルコキシ等のＣ$_{1-6}$アルコキシ）；（４）Ｃ$_{1-6}$アルキルスルフィニル；（５）Ｃ$_{6-10}$アリール；（６）アミノ；（７）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリール；（８）アジド；（９）Ｃ$_{3-8}$シクロアルキル；（１０）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{3-8}$シクロアルキル；（１１）ハロ；（１２）Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル（例えば、Ｃ$_{2-12}$ヘテロアリール）；（１３）（Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル）オキシ；（１４）ヒドロキシ；（１５）ニトロ；（１６）Ｃ$_{1-20}$チオアルコキシ（例えば、Ｃ$_{1-6}$チオアルコキシ）；（１７）－（ＣＨ$_2$）$_q$ＣＯ$_2$Ｒ$^{A’}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、Ｒ$^{A’}$は、（ａ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アリール、（ｃ）水素、および（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（１８）－（ＣＨ$_2$）$_q$ＣＯＮＲ$^{B’}$Ｒ$^{C’}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、Ｒ$^{B’}$およびＲ$^{C’}$は、（ａ）水素、（ｂ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｃ）Ｃ$_{6-10}$アリール、および（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から独立して選択される）；（１９）－（ＣＨ$_2$）$_q$ＳＯ$_2$Ｒ$^{D’}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、Ｒ$^{D’}$は、（ａ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｂ）Ｃ$_{6-10}$アリール、および（ｃ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（２０）－（ＣＨ$_2$）$_q$ＳＯ$_2$ＮＲ$^{E’}$Ｒ$^{F’}$（式中、ｑは、０～４の整数であり、Ｒ$^{E’}$およびＲ$^{F’}$の各々は、独立して、（ａ）水素、（ｂ）Ｃ$_{1-6}$アルキル、（ｃ）Ｃ$_{6-10}$アリール、および（ｄ）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{6-10}$アリールからなる群から選択される）；（２１）チオール；（２２）Ｃ$_{6-10}$アリールオキシ；（２３）Ｃ$_{3-8}$シクロアルコキシ；（２４）アリールアルコキシ；（２５）Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル（例えば、Ｃ$_{1-6}$アルク－Ｃ$_{1-12}$ヘテロアリール）；（２６）オキソ；（２７）（Ｃ$_{1-12}$ヘテロシクリル）イミノ；（２８）Ｃ$_{2-20}$アルケニル；ならびに（２９）Ｃ$_{2-20}$アルキニル。いくつかの実施形態において、これらの基の各々は、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。例えば、Ｃ$_1$－アルカリールまたはＣ$_1$－アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれのアリーロイルおよび（ヘテロシクリル）オイル置換基をもたらすことができる。

【１０４６】
本明細書で使用されるとき、「（ヘテロシクリル）イミノ」という用語は、イミノ基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるヘテロシクリル基を表す。いくつかの実施形態において、ヘテロシクリル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基で置換され得る。

【１０４７】
本明細書で使用されるとき、「（ヘテロシクリル）オキシ」という用語は、酸素原子を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるヘテロシクリル基を表す。いくつかの実施形態において、ヘテロシクリル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基で置換され得る。

【１０４８】

本明細書で使用されるとき、「（ヘテロシクリル）オイル」という用語は、カルボニル基を介して親分子基に結合される、本明細書に定義されるヘテロシクリル基を表す。いくつかの実施形態において、ヘテロシクリル基は、本明細書に定義される１、２、３、または４個の置換基で置換され得る。

【１０４９】

本明細書で使用されるとき、「炭化水素」という用語は、炭素および水素原子のみからなる基を表す。

【１０５０】

本明細書で使用されるとき、「ヒドロキシ」という用語は、－ＯＨ基を表す。

【１０５１】

本明細書で使用されるとき、「ヒドロキシアルケニル」という用語は、１～３個のヒドロキシ基によって置換された、本明細書に定義されるアルケニル基を表すが、但し、１個を超えるヒドロキシ基がアルキル基の単一の炭素原子に結合することはないことを条件とし、それはジヒドロキシプロペニル、ヒドロキシイソペンテニル等により例として示される。

【１０５２】

本明細書で使用されるとき、「ヒドロキシアルキル」という用語は、１～３個のヒドロキシ基によって置換された、本明細書に定義されるアルキル基を表すが、但し、１個を超えるヒドロキシ基が、アルキル基の単一の炭素原子に結合することはないことを条件とし、それはヒドロキシメチル、ジヒドロキシプロピル等により例として示される。

【１０５３】

本明細書で使用されるとき、「異性体」という用語は、本発明の化合物のいずれかの任意の互変異性体、立体異性体、鏡像異性体、またはジアステレオマーを意味する。本発明の化合物は、１つ以上のキラル中心および／または二重結合を有することができ、したがって、二重結合異性体（すなわち、幾何Ｅ／Ｚ異性体）またはジアステレオマー（例えば、鏡像異性体（すなわち、（＋）または（－））またはシス／トランス異性体）等の立体異性体として存在し得ることが認識される。本発明に従って、本明細書に描写される化学構造、したがって本発明の化合物は、対応する立体異性体のすべて、つまり、立体異性的に純粋な形態（例えば、幾何的に純粋、鏡像異性的に純粋、またはジアステレオマー的に純粋）と、鏡像異性体混合物および立体異性体混合物、例えば、ラセミ体との両方を包含する。本発明の化合物の鏡像異性体混合物および立体異性体混合物は、キラル相ガスクロマトグラフィー、キラル相高性能液体クロマトグラフィー、キラル塩錯体としての化合物の結晶化、またはキラル溶媒中の化合物の結晶化等の周知の方法によって、典型的にそれらの構成要素の鏡像異性体または立体異性体へと分解することができる。鏡像異性体および立体異性体は、周知の不斉合成法によって、立体異性的または鏡像異性的に純粋な中間体、試薬、および触媒からも得ることができる。

【１０５４】

本明細書で使用されるとき、「Ｎ保護アミノ」という用語は、本明細書に定義される１つまたは２つのＮ保護基に結合している、本明細書に定義されるアミノ基を指す。

【１０５５】

本明細書で使用されるとき、「Ｎ保護基」という用語は、合成手順中に、望ましくない反応に対してアミノ基を保護するよう意図される基を表す。一般的に使用されるＮ保護基は、参照により本明細書に組み込まれる、Ｇｒｅｅｎｅ，“Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，” ３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９９）に開示されている。Ｎ保護基には、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ピバロイル、ｔ－ブチルアセチル、２－クロロアセチル、２－ブロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、ｏ－ニトロフェノキシアセチル、α－クロロブチリル、ベンゾイル、４－クロロベンゾイル、４－ブロモベンゾイル、４－ニトロベンゾイル等の、アシル、アリーロイル、またはカルバミル基、および保護されたまたは保護されいないＤ、Ｌ、またはＤ

等のキラル助剤、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン等のＬ－アミノ酸；ベンゼンスルホニル、ｐ－トルエンスルホニル等のスルホニル含有基；ベンジルオキシカルボニル、ｐ－クロロベンジルオキシカルボニル、ｐ－メトキシベンジルオキシカルボニル、ｐ－ニトロベンジルオキシカルボニル、２－ニトロベンジルオキシカルボニル、ｐ－ブロモベンジルオキシカルボニル、３，４－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、３，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、２，４－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、４－メトキシベンジルオキシカルボニル、２－ニトロ－４，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、３，４，５－トリメトキシベンジルオキシカルボニル、１－（ｐ－ビフェニルｙｌ）－１－メチルエトキシカルボニル、α，α－ジメチル－３，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル、ベンズヒドリルオキシカルボニル、ｔ－ブチルオキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、エトキシカルボニル、メトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、２，２，２，－トリクロロエトキシカルボニル、フェノキシカルボニル、４－ニトロフェノキシカルボニル、フルオレニル－９－メトキシカルボニル、シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、フェニルチオカルボニル等のカルバメート形成基、ベンジル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシメチル等のアルカリール基、ならびにトリメチルシリル等のシリル基が含まれる。好ましいＮ保護基は、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、ピバロイル、ｔ－ブチルアセチル、アラニル、フェニルスルホニル、ベンジル、ｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）、およびベンジルオキシカルボニル（Ｃｂｚ）である。

【１０５６】

本明細書で使用されるとき、「ニトロ」という用語は、－NO_2基を表す。

【１０５７】

本明細書で使用されるとき、「オキソ」という用語、＝Ｏを表す。

【１０５８】

本明細書で使用されるとき、「ペルフルオロアルキル」という用語は、アルキル基に結合した各水素ラジカルがフッ化物ラジカルによって置き換えられた、本明細書に定義されるアルキル基を表す。ペルフルオロアルキル基は、トリフルオロメチル、ペンタフルオロエチル等により例として示される。

【１０５９】

本明細書で使用されるとき、「ペルフルオロアルコキシ」という用語は、アルコキシ基に結合した各水素ラジカルがフッ化物ラジカルによって置き換えられた、本明細書に定義されるアルコキシ基を表す。ペルフルオロアルコキシ基は、トリフルオロメトキシ、ペンタフルオロエトキシ等により例として示される。

【１０６０】

本明細書で使用されるとき、「スピロシクリル」という用語は、その両端が親基の同じ炭素原子に結合してスピロ環式基を形成するC_{2-7}アルキレンジラジカル、およびまた、その両端が同じ炭素原子に結合するC_{1-6}ヘテロアルキレンジラジカルを表す。スピロシクリル基を形成するヘテロアルキレンラジカルは、窒素、酸素、および硫黄からなる群から独立して選択される１、２、３、または４個のヘテロ原子を含有することができる。いくつかの実施形態において、スピロシクリル基は、そのジラジカルが結合する炭素原子を除いて、１～７個の炭素を含む。本発明のスピロシクリル基は、シクロアルキル基および／またはヘテロシクリル基に対する任意の置換基として本明細書に提供される１、２、３、または４個の置換基で任意に置換されてもよい。

【１０６１】

本明細書で使用されるとき、「立体異性体」という用語は、化合物（例えば、本明細書に記載の任意の式の化合物）が有し得るすべての可能性のある様々な異性型ならびに立体配座型、特にすべての可能性のある立体化学的および立体配座的異性型、基本的な分子構造のすべてのジアステレオマー、鏡像異性体、および／または配座異性体を指す。本発明のいくつかの化合物は、異なる互変異性型として存在してもよく、後者のすべてが本発明

の範囲内に含まれる。

【１０６２】

本明細書で使用されるとき、「スルホアルキル」という用語は、－ＳＯ$_3$Ｈのスルホ基によって置換された、本明細書に定義されるアルキル基を表す。いくつかの実施形態において、アルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０６３】

本明細書で使用されるとき、「スルホニル」という用語は、－Ｓ（Ｏ）$_2$－基を表す。

【１０６４】

本明細書で使用されるとき、「チオアルカリール」という用語は、式－ＳＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、アルカリール基である。いくつかの実施形態において、アルカリール基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０６５】

本明細書で使用されるとき、「チオアルクヘテロシクリル」という用語は、式－ＳＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、アルクヘテロシクリル基である。いくつかの実施形態において、アルクヘテロシクリル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０６６】

本明細書で使用されるとき、「チオアルコキシ」という用語は、式－ＳＲの化学置換基を表し、式中、Ｒは、本明細書に定義されるアルキル基である。いくつかの実施形態において、アルキル基は、本明細書に記載の１、２、３、または４個の置換基でさらに置換され得る。

【１０６７】

「チオール」という用語は、－ＳＨ基を表す。

化合物：本明細書で使用されるとき、「化合物」という用語は、描写される構造のすべての立体異性体、幾何異性体、互変異性体、および同位体を含むことが意図される。

【１０６８】

本明細書に記載の化合物は、不斉であり得る（例えば、１つ以上の立体中心を有する）。別途指定されない限り、鏡像異性体およびジアステレオマー等の、すべての立体異性体が意図される。不斉置換炭素原子を含有する本開示の化合物は、光学活性型またはラセミ型で単離することができる。光学活性型を光学活性の出発物質からどのように調製するかに関する方法は、ラセミ混合物の分解によって、または立体選択的合成によって等、当技術分野で知られている。オレフィンの多くの幾何異性体、Ｃ＝Ｎ二重結合等もまた、本発明に記載の化合物中に存在することができ、すべてのそのような安定な異性体が本開示において企図される。本開示の化合物のシスおよびトランス幾何異性体が記載され、それは異性体の混合物としてまたは分離した異性型として単離され得る。

【１０６９】

本開示の化合物は、互変異性型も含む。互変異性型は、単結合の隣位二重結合との交換、およびプロトンの付随する移動からもたらされる。互変異性型は、同じ実験式および総電荷を有する異性体プロトン化状態である、プロトン互変異性体（ｐｒｏｔｏｔｒｏｐｉｃ　ｔａｕｔｏｍｅｒｓ）を含む。例示のプロトン互変異性体には、ケトン－エノール対、アミド－イミド酸対、ラクタム－ラクチム対、アミド－イミド酸対、エナミン－イミン対、およびプロトンが複素環式系の２つ以上の位置を占有し得る環状型、例えば、１Ｈ－および３Ｈ－イミダゾール、１Ｈ－、２Ｈ－、および４Ｈ－１，２，４－トリアゾール、１Ｈ－および２Ｈ－イソインドール、ならびに１Ｈ－および２Ｈ－ピラゾールが含まれる。互変異性型は、平衡し得るか、または適切な置換によって１つの形態へと立体的に固定され得る。

【１０７０】

本開示の化合物は、中間体または最終化合物中で生じる原子の同位体もすべて含む。「同位体」は、同じ原子番号を有するが、核内の中性子の数が異なることに起因して異なる

質量数を有する、原子を指す。例えば、水素の同位体には、トリチウムおよびジュウテリウムが含まれる。

【１０７１】

本開示の化合物および塩は、通例の方法によって、溶媒または水分子と組み合わせて溶媒和物および水和物を形成することにより調製することができる。

【１０７２】

保存される：本明細書で使用されるとき、「保存される」という用語は、比較されている２つ以上の配列の同じ位置において変化することなく生じる残基である、それぞれ、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のヌクレオチド残基またはアミノ酸残基を指す。比較的保存されているヌクレオチドまたはアミノ酸は、配列内の他の箇所に現れるヌクレオチドまたはアミノ酸よりも関連した配列の間で保存されているものである。

【１０７３】

いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、それらが互いに１００％同一である場合、「完全に保存される」と言われる。いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、それらが互いに少なくとも７０％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも９０％同一、または少なくとも９５％同一である場合、「高度に保存される」と言われる。いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、それらが互いに約７０％同一、約８０％同一、約９０％同一、約９５％、約９８％、または約９９％同一である場合、「高度に保存される」と言われる。いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、それらが互いに少なくとも３０％同一、少なくとも４０％同一、少なくとも５０％同一、少なくとも６０％同一、少なくとも７０％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも９０％同一、または少なくとも９５％同一である場合、「保存される」と言われる。いくつかの実施形態において、２つ以上の配列は、それらが互いに約３０％同一、約４０％同一、約５０％同一、約６０％同一、約７０％同一、約８０％同一、約９０％同一、約９５％同一、約９８％同一、または約９９％同一である場合、「保存される」と言われる。配列の保存は、オリゴヌクレオチドまたはポリペプチドの全長に適用してもよく、またはその一部分、領域、または特長に適用してもよい。

【１０７４】

制御放出：本明細書で使用されるとき、「制御放出」という用語は、治療成果をもたらすために特定の放出パターンに適合する、薬学的組成物または化合物の放出プロファイルを指す。

【１０７５】

環状または環化：本明細書で使用されるとき、「環状」という用語は、連続ループの存在を指す。環状分子は、円形である必要はなく、単に連結してサブユニットの途切れのない鎖を形成すればよい。本発明の操作されたＲＮＡまたはｍＲＮＡ等の環状分子は、単一ユニットであっても多量体であってもよく、または複合体もしくは高次構造の１つ以上の構成要素を含んでもよい。

【１０７６】

細胞増殖抑制性：本明細書で使用されるとき、「細胞増殖抑制性」は、細胞（例えば、哺乳類細胞（例えば、ヒト細胞）、細菌、ウイルス、真菌、原虫、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせの成長、分裂、または増殖を阻害する、低減する、抑制することを指す。

【１０７７】

細胞傷害性：本明細書で使用されるとき、「細胞傷害性」は、細胞（例えば、哺乳類細胞（例えば、ヒト細胞）、細菌、ウイルス、真菌、原虫、寄生虫、プリオン、またはこれらの組み合わせを死滅させるか、あるいはそれらに有害、有毒、または致命的な影響を引き起こすことを指す。

【１０７８】

送達：本明細書で使用されるとき、「送達」は、化合物、物質、実体、部分、積荷、またはペイロードを送達する作用または様態を指す。

【１０７９】
送達剤：本明細書で使用されるとき、「送達剤」は、標的とされる細胞へのポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのインビボ送達を少なくとも部分的に容易にする、任意の物質を指す。
【１０８０】
不安定化される：本明細書で使用されるとき、「不安定な」、「不安定化する」、または「不安定化領域」という用語は、同じ領域または分子の出発形態、野生型、または天然型よりも安定性が低い領域または分子を意味する。
【１０８１】
検出可能な標識：本明細書で使用されるとき、「検出可能な標識」は、放射線写真撮影、蛍光、化学発光、酵素的活性、吸光等を含む当技術分野で既知の方法によって容易に検出される別の実体と結合されるか、それとともに組み込まれるか、またはそれと会合される１つ以上のマーカー、シグナル、または部分を指す。検出可能な標識には、放射性同位体、フルオロフォア、発色団、酵素、色素、金属イオン、リガンド、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンおよびハプテン、量子ドット等が含まれる。検出可能な標識は、本明細書に開示のペプチドまたはタンパク質における任意の位置に位置してもよい。それらは、アミノ酸、ペプチド、もしくはタンパク質の内にあっても、またはＮ末端もしくはＣ末端に位置してもよい。
【１０８２】
消化：本明細書で使用されるとき、「消化」という用語は、より小さい片または構成成分へと分解することを意味する。ポリペプチドまたはタンパク質に言及するとき、消化は、ペプチドの産生をもたらす。
【１０８３】
遠位：本明細書で使用されるとき、「遠位」という用語は、中心ら離れて、または目的とする点もしくは領域から離れて位置することを意味する。
【１０８４】
投薬レジメン：本明細書で使用されるとき、「投薬レジメン」は、投与のスケジュール、または医師によって決定された治療、予防、もしくは緩和ケアのレジメンである。
【１０８５】
用量分割係数（ＤＳＦ）－用量分割治療のＰＵＤを、総１日用量または単回単位用量のＰＵＤで割った比率。値は、投薬レジメンの群の比較から導出される。
【１０８６】
カプセル封入：本明細書で使用されるとき、「カプセル封入」という用語は、封入する、包囲する、または包み込むことを意味する。
【１０８７】
コードされたタンパク質の切断シグナル：本明細書で使用されるとき、「コードされたタンパク質の切断シグナル」は、タンパク質切断シグナルをコードするヌクレオチド配列を指す。
【１０８８】
操作：本明細書で使用されるとき、本発明の実施形態は、それらが、構造的であろうと化学的であろうと、出発点分子、野生型分子、または天然分子から異なる特長または特性を有するように設計されるとき、「操作」される。
【１０８９】
エクソソーム：本明細書で使用されるとき、「エクソソーム」は、哺乳類細胞によって分泌される小胞、またはＲＮＡ分解に関与する複合体である。
【１０９０】
発現：本明細書で使用されるとき、核酸配列の「発現」は、次の事象のうちの１つ以上を指す：（１）ＤＮＡ配列からのＲＮＡテンプレートの生成（例えば、転写による）、（２）ＲＮＡ転写のプロセシング（例えば、スプライシング、編集、５’キャップ形成、および／または３’末端プロセシングによる）、（３）ＲＮＡのポリペプチドまたはタンパ

ク質への翻訳、および（４）ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾。
【１０９１】
特長：本明細書で使用されるとき、「特長」は、特徴、特性、または特有の要素を指す。
【１０９２】
製剤：本明細書で使用されるとき、「製剤」は、少なくともポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡと、送達剤とを含む。
【１０９３】
断片：本明細書で使用されるとき、「断片」は、一部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養細胞から単離された完全長タンパク質を消化することによって得られる、ポリペプチドを含み得る。
【１０９４】
機能的：本明細書で使用されるとき、「機能的」生体分子は、それが特徴付けられる特性および／または活性を示す形態にある、生体分子である。
【１０９５】
相同性：本明細書で使用されるとき、「相同性」という用語は、ポリマー分子間、例えば、核酸分子（例えば、ＤＮＡ分子および／またはＲＮＡ分子）間、および／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。いくつかの実施形態において、ポリマー分子は、それらの配列が少なくとも２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一または同様である場合、互いと「相同」であると見なされる。「相同」という用語は必然的に、少なくとも２つの配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列）間の比較を指す。本発明に従って、２つのポリヌクレオチド配列は、それらがコードするポリペプチドが、少なくとも約２０アミノ酸の少なくとも一続きにわたって少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはさらに９９％である場合、相同であると見なされる。いくつかの実施形態において、相同ポリヌクレオチド配列は、少なくとも４～５つの固有に指定されるアミノ酸の一続きをコードする能力によって特徴付けられる。６０ヌクレオチド長未満のポリヌクレオチド配列について、相同性は、少なくとも４～５つの固有に指定されるアミノ酸の一続きをコードする能力によって特徴付けられる。本発明に従って、２つのタンパク質配列は、タンパク質が、少なくとも約２０アミノ酸の少なくとも一続きにわたって少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一である場合、相同であると見なされる。
【１０９６】
同一性：本明細書で使用されるとき、「同一性」という用語は、ポリマー分子間、例えば、オリゴヌクレオチド分子（例えば、ＤＮＡ分子および／またはＲＮＡ分子）間、および／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。２つのポリヌクレオチド配列の同一性パーセントの算出は、例えば、最適な比較目的のために２つの配列を整列させることによって行うことができる（例えば、最適なアライメントのために第１および第２の核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較目的のために非同一配列を無視することができる）。ある特定の実施形態において、比較目的のために整列される配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％である。対応するヌクレオチド位置におけるヌクレオチドが次いで比較される。第１の配列内の位置が、第２の配列内の対応する位置と同じヌクレオチドによって占有されるとき、その分子は、その位置で同一である。２つの配列間の同一性パーセントは、２つの配列の最適なアライメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れながら、配列によって共有される同一位置の数の関数である。２つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて遂行することができる。例えば、２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、各々が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ

Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８；Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ，Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９３、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ，Ｇ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８７、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ Ｉ，Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ，１９９４、およびＳｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ，Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｄｓ．，Ｍ Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９１に記載の方法の等を用いて決定することができる。例えば、２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、ＭｅｙｅｒｓおよびＭｉｌｌｅｒ（ＣＡＢＩＯＳ，１９８９，４：１１－１７）のアルゴリズムを用いて決定することができ、それはＰＡＭ１２０重量残基表、１２のギャップ長ペナルティ、および４のギャップペナルティを用いてＡＬＩＧＮプログラム（第２．０版）に組み込まれている。２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、あるいは、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリックスを使用するＧＣＧソフトウェアパッケージにおけるＧＡＰプログラムを用いて決定することができる。配列間の同一性パーセントを決定するために一般的に用いられる方法には、参照により本明細書に組み込まれるＣａｒｉｌｌｏ，Ｈ．，ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，Ｄ．，ＳＩＡＭ Ｊ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．，４８：１０７３（１９８８）に開示の方法が含まれるが、これらに限定されない。同一性を決定するための技法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにおいて成文化されている。２つの配列間の相同性を決定するための例示のコンピュータソフトウェアには、ＧＣＧプログラムパッケージ、Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１２（１），３８７（１９８４））、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、およびＦＡＳＴＡ、Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ ｅｃ．Ｂｉｏｌ．、２１５、４０３（１９９０））が含まれるが、これらに限定されない。

【１０９７】

遺伝子の発現を阻害する：本明細書で使用されるとき、「遺伝子の発現を阻害する」という表現は、遺伝子の発現産物の量の低減を引き起こすことを意味する。発現産物は、遺伝子から転写されたＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）、または遺伝子から転写されたｍＲＮＡから翻訳されたポリペプチドであり得る。典型的に、ｍＲＮＡのレベルの低減は、そこから翻訳されたポリペプチドのレベルの低減をもたらす。発現のレベルは、ｍＲＮＡまたはタンパク質を測定するための標準的な技法を用いて決定されてもよい。

【１０９８】

インビトロ：本明細書で使用されるとき、「インビトロ」という用語は、生物（例えば、動物、植物、または微生物）内ではなく、例えば、試験管または反応槽中、細胞培養物中、ペトリ皿中等の、人工的な環境で生じる事象を指す。

【１０９９】

インビボ：本明細書で使用されるとき、「インビボ」という用語は、生物（例えば、動物、植物、もしくは微生物、またはその細胞もしくは組織）内で生じる事象を指す。

【１１００】

単離された：本明細書で使用されるとき、「単離された」という用語は、それが会合された（自然にであるか、実験的設定であるかにかかわらず）構成成分のうちの少なくとも一部から分離された物質または実体を指す。単離された物質は、それが会合した物質に関して様々なレベルの純度を有し得る。単離された物質および／または実体は、それらが最初に会合されたその他の構成成分の少なくとも約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、またはそれよりも多くから分離され得る。いくつかの実施形態において、単離された薬剤は、約８０％超、約８５％超、

約９０％超、約９１％超、約９２％超、約９３％超、約９４％超、約９５％超、約９６％超、約９７％超、約９８％超、約９９％超、または約９９％超純粋である。本明細書で使用されるとき、物質は、他の構成成分が実質的にない場合、「純粋」である。実質的に単離される：「実質的に単離される」とは、化合物が、それが形成されたまたは検出された環境から実質的に分離されることを意味する。部分的分離には、例えば、本開示の化合物を豊富に含んだ組成物が含まれ得る。実質的な分離には、少なくとも約５０重量％、少なくとも約６０重量％、少なくとも約７０重量％、少なくとも約８０重量％、少なくとも約９０重量％、少なくとも約９５重量％、少なくとも約９７重量％、または少なくとも約９９重量％の本開示の化合物、またはその塩を含有する組成物が含まれ得る。化合物およびそれらの塩を単離するための方法は、当技術分野で通例である。

【１１０１】

リンカー：本明細書で使用されるとき、リンカーは、例えば、１０～１，０００原子の原子団を指し、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニル、およびイミン等であるが、これらに限定されない、原子または群からなり得る。リンカーは、第１の末端で核酸塩基または糖部分上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドに、および第２の末端でペイロード、例えば、検出可能な薬剤または治療剤に、結合され得る。リンカーは、核酸配列への組み込みを干渉しないような十分な長さものもであり得る。リンカーは、任意の有用な目的のため、例えば、ｍｍＲＮＡ多量体（例えば、２つ以上のポリヌクレオチド、一次構築物、もしくはｍｍＲＮＡ分子の連鎖を介して）またはｍｍＲＮＡ複合体を形成するため、かつ本明細書に記載のペイロードを投与するために使用することができる。リンカーに組み込むことができる化学基の例としては、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリール、またはヘテロシクリルが挙げられるが、これらに限定されず、これらの各々は、本明細書に記載されるように任意に置換され得る。リンカーの例としては、不飽和アルカン、ポリエチレングリコール（例えば、エチレンまたはプロピレングリコールモノマー単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、またはテトラエチレングリコール）、ならびにデキストランポリマーおよびそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。他の例としては、還元剤または光分解を用いて切断され得る、例えば、ジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）またはアゾ結合（－Ｎ＝Ｎ－）等の、リンカー内の切断可能部分が挙げられるが、これらに限定されない。選択的に切断可能な結合の非限定的な例としては、例えば、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、または他の還元剤および／もしくは光分解の使用によって切断され得る、アミド結合、ならびに例えば、酸性または塩基性加水分解によって切断され得る、エステル結合が挙げられる。

【１１０２】

マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合部位：本明細書で使用されるとき、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合部位は、ｍｉＲＮＡの少なくとも「シード」領域が結合する、核酸転写物のヌクレオチド箇所または領域を表す。

【１１０３】

修飾された：本明細書で使用されるとき、「修飾された」とは、本発明の分子の変化した状態または構造を指す。分子は、化学的、構造的、および機能的修飾を含む、多くの方式で修飾されてもよい。一実施形態において、本発明のｍＲＮＡ分子は、例えば、それが天然リボヌクレオチドＡ、Ｕ、Ｇ、およびＣに関わるとき、非天然ヌクレオシドおよび／またはヌクレオチドの導入によって修飾される。キャップ構造等の非標準のヌクレオチドは、それらがＡ、Ｃ、Ｇ、Ｕリボヌクレオチドの化学構造とは異なっていても「修飾される」と見なされない。

【１１０４】

粘液：本明細書で使用されるとき、「粘液」は、粘性であり、ムチン糖タンパク質を含む、天然物質を指す。

【１１０５】
天然に生じる：本明細書で使用されるとき、「天然に生じる」は、人工的補助を伴わずに自然界に存在することを意味する。
【１１０６】
非ヒト脊椎動物：本明細書で使用されるとき、「非ヒト脊椎動物」には、野生種および家畜化された種を含む、ホモサピエンスを除くすべての脊椎動物が含まれる。非ヒト脊椎動物の例としては、アルパカ、バンテン、バイソン、ラクダ、ネコ、ウシ、シカ、イヌ、ロバ、ガヤル、ヤギ、モルモット、ウマ、ラマ、ラバ、ブタ、ウサギ、トナカイ、ヒツジ、水牛、およびヤク等の哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されない。
【１１０７】
オフターゲット：本明細書で使用されるとき、「オフターゲット」は、任意の１つ以上の標的、遺伝子、または細胞転写物への任意の意図されない効果を指す。
【１１０８】
オープンリーディングフレーム：本明細書で使用されるとき、「オープンリーディングフレーム」または「ＯＲＦ」は、所与のリーディングフレーム内に終止コドンを含有しない配列を指す。
【１１０９】
作動可能に連結される：本明細書で使用されるとき、「作動可能に連結される」という表現は、２つ以上の分子、構築物、転写物、実体、部分等の間の機能的結合を指す。
【１１１０】
任意に置換される：本明細書において、「任意に置換されるＸ」（例えば、任意に置換されるアルキル）という形態の語句は、「Ｘであって、式中、Ｘは、任意に置換される」（例えば、「アルキル、式中、該アルキルは、任意に置換される」）と同等であることが意図される。特長「Ｘ」（例えば、アルキル）自体が任意であることを意味することは意図されない。
【１１１１】
ペプチド：本明細書で使用されるとき、「ペプチド」は、５０アミノ酸長以下、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０アミノ酸長である。
【１１１２】
パラトープ：本明細書で使用されるとき、「パラトープ」は、抗体の抗原結合部位を指す。
【１１１３】
患者：本明細書で使用されるとき、「患者」は、治療を求め得るもしくは治療を必要とし得る、治療を要する、治療を受けている、治療を受けることになる、または特定の疾患もしくは状態のために訓練を受けた専門家の看護下にある、対象を指す。
【１１１４】
薬学的に許容される：「薬学的に許容される」という表現は、本明細書で、健全な医療判断の範囲内で、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伴わずにヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに好適であり、妥当な便益／危険性比率に見合った、化合物、材料、組成物、および／または剤形を指すように用いられる。
【１１１５】
薬学的に許容される賦形剤：本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される賦形剤」という表現は、本明細書に記載の化合物以外のものであり（例えば、活性化合物を懸濁させるまたは溶解させることが可能なビヒクル）、かつ患者において実質的に非毒性および非炎症性である特性を有する、任意の成分を指す。賦形剤には、例えば、粘着防止剤（ａｎｔｉａｄｈｅｒｅｎｔｓ）、酸化防止剤、結合剤、コーティング剤、圧縮助剤（ｃｏｍｐｒｅｓｓｉｏｎ　ａｉｄｓ）、崩壊剤、色素（色）、軟化剤、乳化剤、充填剤（希釈剤）、薄膜形成剤またはコーティング剤、香味剤、着香剤、流動促進剤（流動性促進剤）、滑沢剤、防腐剤、印刷インキ、吸着剤、懸濁化剤または分散化剤、甘味剤、および水和

水が含まれてもよい。例示の賦形剤には、次のものが含まれるが、これらに限定されない：ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（第二）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋結合ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微小結晶セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、α化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、シェラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、ショ糖、タルク、二酸化チタン、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＣ、およびキシリトール。

【１１１６】

薬学的に許容される塩：本開示は、本明細書に記載の化合物の薬学的に許容される塩も含む。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される塩」は、既存の酸または塩基部分をその塩形態に変換する（例えば、遊離塩基を好適な有機酸と反応させることによって）ことによって親化合物が修飾される、開示される化合物の誘導体を指す。薬学的に許容される塩の例としては、アミン等の塩基性残基の鉱酸塩または有機酸塩、カルボン酸等の酸性残基のアルカリ塩または有機塩等が挙げられるが、これらに限定されない。代表的な酸付加塩には、酢酸塩、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、重硫酸塩、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、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素、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、ラウリル酸塩、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、ペクチニン酸塩（ペクチンａｔｅ）、過硫酸塩、３－フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアネート、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩等が含まれる。代表的なアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等、ならびにアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン等を含むが、これらに限定されない、非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンが含まれる。本開示の薬学的に許容される塩には、例えば、非毒性無機酸または有機酸から形成される、親化合物の従来の非毒性塩が含まれる。本開示の薬学的に許容される塩は、従来の化学方法によって、塩基性または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。一般に、そのような塩は、これらの化合物の遊離酸型または遊離塩基型を、化学量論的量の適切な塩基または酸と、水中もしくは有機溶媒中で、またはその２つの混合物中で反応させることによって調製することができ、一般に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、またはブタノール）、またはアセトニトリル等の非水性媒体が好ましい。好適な塩の一覧は、各々が参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８５，ｐ．１４１８、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ：Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅ，Ｐ．Ｈ．Ｓｔａｈｌ ａｎｄ Ｃ．Ｇ．Ｗｅｒｍｕｔｈ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ，２００８、およびＢｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，６６，１－１９（１９７７）において見出される。

【１１１７】

薬学的に許容される溶媒和物：本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される溶媒和物」という用語は、好適な溶媒の分子が結晶格子に組み込まれる、本発明の化合物を意味する。好適な溶媒は、投与される投薬量で生理学的に耐性がある。例えば、溶媒和物は、結晶化、再結晶化、または沈殿によって、有機溶媒、水、またはそれらの混合物を含む溶液から調製されてもよい。好適な溶媒の例としては、エタノール、水（例えば、一、二、および三水和物）、Ｎ－メチルピロリジノン（ＮＭＰ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）、１，３－ジメチル－２－イミダゾリジノン（ＤＭＥＵ）、１，３－ジメチル－３，４，５，６－テトラヒドロ－２－（１Ｈ）－ピリミジノン（ＤＭＰＵ）、アセトニトリル（ＡＣＮ）、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、２－ピロリドン、ベンジル安息香酸塩等が挙げられる。水が溶媒であるとき、その溶媒和物は、「水和物」と称される。

【１１１８】

薬物動態：本明細書で使用されるとき、「薬物動態」は、生存生物に投与される物質の運命の決定に関わるような、分子または化合物の任意の１つ以上の特性を指す。薬物動態は、吸収、分布、代謝、および排泄の程度および速度を含む、いくつかの領域に分割される。これは、一般的に、ＡＤＭＥと称され、ここで（Ａ）吸収は、物質が血液循環に進入するプロセスであり、（Ｄ）分布は、身体の流体および組織全体にわたる物質の分散または散布であり、（Ｍ）代謝（または生体内変換）は、親化合物の娘代謝産物への不可逆的な変換であり、（Ｅ）排泄（または排除）は、身体からの物質の排除を指す。まれな場合において、いくつかの薬物は、身体組織内に不可逆的に蓄積する。

【１１１９】

物理化学：本明細書で使用されるとき、「物理化学」は、物理特性および／または化学特性のものまたはそれに関わることを意味する。

【１１２０】

単位薬物当たりのポリペプチド（ＰＵＤ）：本明細書で使用されるとき、ＰＵＤまたは単位薬物当たり生成物は、通常は体液中の測定値で割ったｐｍｏｌ／ｍＬ、ｍｍｏｌ／ｍＬ等の濃度単位で定義される、体液または組織内で測定するときの、生成物（ポリペプチド等）の総１日用量の細分割された部分（通常は１ｍｇ、ｐｇ、ｋｇ等）として定義される。

【１１２１】

予防する：本明細書で使用されるとき、「予防する」という用語は、感染、疾患、障害、および／もしくは状態の発症を部分的もしくは完全に遅延させること；特定の感染、疾患、障害、および／もしくは状態の１つ以上の症状、特長、もしくは臨床徴候の発症を部分的もしくは完全に遅延させること；特定の感染、疾患、障害、および／もしくは状態の１つ以上の症状、特長、もしくは徴候の発症を部分的もしくは完全に遅延させること；感染からの、特定の疾患、障害、および／もしくは状態の進行を部分的もしくは完全に遅延させること；ならびに／または感染、疾患、障害、および／もしくは状態に関連した病理を発症する危険性を減少さることを指す。

【１１２２】

プロドラッグ：本開示は、本明細書に記載の化合物のプロドラッグも含む。本明細書で使用されるとき、「プロドラッグ」は、化学的または物理的変化を経ると治療薬として作用する物質、分子、または実体に属する形態にある、任意の物質、分子、または実体を指す。プロドラッグは、何らかの方式で共有結合されるかまたは隔離され得、哺乳類対象に投与される前、投与されると、または投与された後に、活性薬物を放出するか、または活性薬物部分に変換される。プロドラッグは、化合物中に存在する官能基を、修飾部分が通例の操作でまたはインビボでのいずれかで親化合物へと切断されるような方式で修飾することによって、調製することができる。プロドラッグは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、またはカルボキシル基が任意の基に結合される化合物であり、それは哺乳類対象に投与されると、切断されてそれぞれ遊離ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ま

たはカルボキシル基を形成する。プロドラッグの調製および使用は、両方とも参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｔ．Ｈｉｇｕｃｈｉ ａｎｄ Ｖ．Ｓｔｅｌｌａ，“Ｐｒｏ－ｄｒｕｇｓ ａｓ Ｎｏｖｅｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，”Ｖｏｌ．１４ ｏｆ ｔｈｅ Ａ．Ｃ．Ｓ．Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓに、およびＢｉｏｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，ｅｄ．Ｅｄｗａｒｄ Ｂ．Ｒｏｃｈｅ，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，１９８７で論じられている。

【１１２３】

増殖する：本明細書で使用されるとき、「増殖する」という用語は、成長する、拡大する、もしくは増加する、または急速な成長、拡大、もしくは増加を引き起こすことを意味する。「増殖性」は、増殖する能力を有することを意味する。「抗増殖性」は、増殖特性に反するか、または増殖特性に不適切である特性を有することを意味する。

【１１２４】

タンパク質切断部位：本明細書で使用されるとき、「タンパク質切断部位」は、化学的、酵素的、または光化学的手段によってアミノ酸鎖の制御された切断が遂行される部位を指す。

【１１２５】

タンパク質切断シグナル：本明細書で使用されるとき、「タンパク質切断シグナル」は、切断のためにポリペプチドにフラグまたはマークを付ける少なくとも１つのアミノ酸を指す。

【１１２６】

目的とするタンパク質：本明細書で使用されるとき、「目的とするタンパク質」または「所望のタンパク質」という用語は、本明細書に提供されるもの、ならびにそれらの断片、変異体、変異形、および改変体を含む。

【１１２７】

近位：本明細書で使用されるとき、「近位」という用語は、中心の、または目的とする点もしくは領域のより近くに位置することを意味する。

【１１２８】

シュードウリジン：本明細書で使用されるとき、シュードウリジンは、ヌクレオシドウリジンのＣ－グリコシド異性体を指す。「シュードウリジン類似体」は、シュードウリジンの任意の修飾、変異形、アイソフォーム、または誘導体である。例えば、シュードウリジン類似体には、１－カルボキシメチル－シュードウリジン、１－プロピニル－シュードウリジン、１－タウリノメチル－シュードウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－シュードウリジン、１－メチルシュードウリジン（$m^1\psi$）、１－メチル－４－チオ－シュードウリジン（$m^1s^4\psi$）、４－チオ－１－メチル－シュードウリジン、３－メチル－シュードウリジン（$m^3\psi$）、２－チオ－１－メチル－シュードウリジン、１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、ジヒドロシュードウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－メトキシウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）シュードウリジン（$acp^3\psi$）、および２’－Ｏ－メチル－シュードウリジン（ψｍ）が含まれるが、これらに限定されない。

【１１２９】

精製される：本明細書で使用されるとき、「精製する」、「精製される」、「精製」は、実質的に純粋にするか、または望ましくない構成成分、汚染材料、混和物、もしくは不完全性を取り除くことを意味する。

【１１３０】

試料：本明細書で使用されるとき、「試料」または「生体試料」という用語は、その組織、細胞、または構成部分の部分集合（例えば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液

、唾液、羊水、臍帯血、尿、膣液、および精液を含むが、これらに限定されない体液）を指す。試料には、例えば、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚の外部切片、呼吸器管、腸管、および尿生殖器管、涙液、唾液、乳、血液細胞、腫瘍、器官を含むが、これらに限定されない、全生物、またはその組織、細胞、もしくは構成部分の部分集合、またはその画分もしくは一部分から調製される、ホモジネート、可溶化液、または抽出物がさらに含まれ得る。試料はさらに、タンパク質または核酸分子等の細胞構成成分を含有し得る、栄養ブロスまたはゲル等の培地を指す。

【１１３１】

シグナル配列：本明細書で使用されるとき、「シグナル配列」という表現は、タンパク質の輸送または局在化を指示することができる配列を指す。

【１１３２】

単回単位用量：本明細書で使用されるとき、「単回単位用量」は、１回用量／一度に／単一経路／単一接触点、すなわち、単一の投与事象において投与される、任意の治療薬の用量である。

【１１３３】

類似性：本明細書で使用されるとき、「類似性」という用語は、ポリマー分子間、例えば、ポリヌクレオチド分子（例えば、ＤＮＡ分子および／またはＲＮＡ分子）間、および／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。ポリマー分子の互いとの類似性パーセントの算出は、同一性パーセントの算出と同様に行うことができるが、当技術分野で理解されるように、類似性パーセントの算出が保存的置換を考慮に入れることを除く。

【１１３４】

分割用量：本明細書で使用されるとき、「分割用量」は、単回単位用量または総１日用量の、２つ以上の用量への分割である。

【１１３５】

安定した：本明細書で使用されるとき、「安定した」は、反応混合物から有用な純度で単離後に残存するのに十分に強固であり、好ましくは効果的な治療剤へと製剤可能である、化合物を指す。

【１１３６】

安定化される：本明細書で使用されるとき、「安定化」、「安定化される」、「安定化領域」という用語は、安定させるまたは安定となることを意味する。

【１１３７】

対象：本明細書で使用されるとき、「対象」または「患者」という用語は、本発明に従う組成物が、例えば、実験、診断、予防、および／または治療目的のために投与され得る、任意の生物を指す。典型的な対象には、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒト等の哺乳動物）および／または植物が含まれる。

【１１３８】

実質的に：本明細書で使用されるとき、「実質的に」という用語は、目的とする特徴または特性の全範囲もしくは程度またはほぼ全範囲もしくは程度を示す、定性的状態を指す。生物学技術分野の専門家であれば、生物学的および化学的現象が、完了するかつ／もしくは完了まで進行する、または絶対的な結果を達成するもしくはそれを回避することは、あってもまれであることを理解するであろう。「実質的に」という用語は、したがって、多くの生物学的および化学的現象に本来的に存在するの完全性の潜在的な欠如を捕捉するように本明細書で使用される。

【１１３９】

実質的に等しい：それが用量間の時差に関するように本明細書で使用されるとき、この用語は、プラス／マイナス２％を意味する。

【１１４０】

実質的に同時に：本明細書で使用され、かつそれが複数の用量に関するとき、この用語は、２秒以内を意味する。

【１１４１】

を患う：疾患、障害、および／または状態「を患う」個体は、疾患、障害、および／もしくは状態であると診断されているか、または疾患、障害、および／もしくは状態の１つ以上の症状を呈する。

【１１４２】

に罹患しやすい：疾患、障害、および／または状態「に罹患しやすい」個体は、疾患、障害、および／もしくは状態であると診断されておらず、かつ／または疾患、障害、および／もしくは状態の症状を呈しないことがあるが、疾患もしくはその症状を発症する傾向を内部に持つ。いくつかの実施形態において、疾患、障害、および／または状態（例えば、癌）に罹患しやすい個体は、次のうちのうちの１つ以上によって特徴付けられ得る：（１）疾患、障害、および／または状態の発症に関連した遺伝子突然変異、（２）疾患、障害、および／または状態の発症に関連した遺伝子多型、（３）疾患、障害、および／または状態に関連したタンパク質および／または核酸の増加したおよび／または減少した発現および／または活性、（４）疾患、障害、および／または状態の発症に関連した習慣および／または生活様式、（５）疾患、障害、および／または状態の家族歴、ならびに（６）疾患、障害、および／または状態の発症に関連した微生物への曝露および／またはその微生物への感染。いくつかの実施形態において、疾患、障害、および／または状態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害、および／または状態を発症することになる。いくつかの実施形態において、疾患、障害、および／または状態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害、および／または状態を発症することにはならない。

【１１４３】

持続放出：本明細書で使用されるとき、「持続放出」という用語は、特定の一定期間にわたる放出速度に適合する、薬学的組成物または化合物放出プロファイルを指す。

【１１４４】

合成：「合成」という用語は、人間の手によって生成される、調製される、および／または製造されることを意味する。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは他の分子の合成は、化学的であっても酵素的であってもよい。

【１１４５】

標的とされる細胞：本明細書で使用されるとき、「標的とされる細胞」は、目的とする任意の１つ以上の細胞を指す。この細胞は、インビトロで、インビボで、インサイツで、または生物の組織もしくは器官内で見つけられ得る。生物は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト、最も好ましくは患者であり得る。

【１１４６】

治療剤：「治療剤」という用語は、対象に投与されたときに、治療、診断、および／もしくは予防効果を有し、かつ／または所望の生物学的および／もしくは薬理学的効果を誘発する、任意の薬剤を指す。

【１１４７】

治療上有効量：本明細書で使用されるとき、「治療上有効量」という用語は、感染、疾患、障害、および／または状態を患うか、またはそれらに罹患しやすい対象に投与されたときに、感染、疾患、障害、および／または状態を治療する、その症状を改善する、診断する、予防する、かつ／またはその発症を遅延させるのに十分である、送達対象の薬剤（例えば、核酸、薬物、治療剤、診断剤、予防剤等）の量を意味する。

【１１４８】

治療上有効成果：本明細書で使用されるとき、「治療上有効成果」という用語は、感染、疾患、障害、および／または状態を患うか、またはそれらに罹患しやすい対象において、感染、疾患、障害、および／または状態を治療し、その症状を改善し、診断し、予防し、かつ／またはその発症を遅延させるのに十分である成果を意味する。

【１１４９】

総１日用量：本明細書で使用されるとき、「総１日用量」は、２４時間の期間に与えられるまたは処方される量である。それは、単回単位用量として投与されてもよい。

【１１５０】

転写因子：本明細書で使用されるとき、「転写因子」という用語は、例えば、転写の活性化または抑制によって、ＤＮＡのＲＮＡへの転写を調節する、ＤＮＡ結合タンパク質を指す。いくつかの転写因子は、転写の調節を単独でもたらす一方で、他の転写因子は、他のタンパク質と協働して作用する。いくつかの転写因子は、ある特定の条件下で、転写の活性化および抑制の両方を行うことができる。一般に、転写因子は、標的遺伝子の調節領域内の特定のコンセンサス配列に非常に類似した、特定の標的配列（単数または複数）に結合する。転写因子は、標的遺伝子の転写を単独でまたは他の分子と複合して調節し得る。

【１１５１】

治療する：本明細書で使用されるとき、「治療する」という用語は、特定の感染、疾患、障害、および／もしくは状態の１つ以上の症状または特徴を、部分的にまたは完全に緩和すること、寛解させること、改善すること、軽減すること、その発症を遅延させること、その進行を阻害すること、その重症度を低減すること、および／またはその発生率を低減することを指す。例えば、癌を「治療する」とは、腫瘍の生存、成長、および／または転移を阻害することを指し得る。治療は、疾患、障害、および／または状態に関連した病理を発症する危険性を減少させる目的のために、疾患、障害、および／もしくは状態の徴候を呈しない対象に、ならびに／または疾患、障害、および／もしくは状態の早期徴候のみを呈する対象に投与されてもよい。

【１１５２】

未修飾：本明細書で使用されるとき、「未修飾」は、任意の方式で変化させられる前の任意の物質、化合物、または分子を指す。未修飾は、生体分子の野生型または天然型を指し得るが、必ずしもそうとは限らない。分子は、一連の修飾を経てもよく、それによって各修飾分子は、その後の修飾のための「未修飾」出発分子としての役目を果たし得る。

【１１５３】

均等物および範囲

当業者であれば、ほんの日常的な実験を用いて、本明細書に記載の本発明に従う具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識するか、解明することができる。本発明の範囲は、上記の説明に限定されるようには意図されず、むしろ添付の特許請求の範囲に記載されるように限定されることが意図される。

【１１５４】

特許請求の範囲において、「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」等の冠詞は、それとは反対の指定があるか、または文脈から別途明白でない限り、１つまたは２つ以上を意味し得る。群の１つ以上の構成員の間に「または」を含む特許請求項または記述は、それとは反対の指定があるか、または文脈から別途明白でない限り、その群の構成員のうちの１つ、２つ以上、またはすべてが、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、それにおいて用いられるか、あるいはそれと関連性がある場合、満たされると見なされる。本発明は、群の厳密に１つの構成員が所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、それにおいて用いられるか、あるいはそれと関連性のある実施形態を含む。本発明は、群の構成員のうちの１つを超えるものまたはすべてが所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、それにおいて用いられるか、あるいはそれと関連性のある実施形態を含む。

【１１５５】

また、「含む」という用語は、制限がないことが意図され、さらなる要素またはステップの組み込みを許容するが、それを必要とするわけではないことに留意する。「含む」という用語が本明細書で使用されるとき、「からなる」という用語もそれ故に包含され、開示される。

【１１５６】

範囲が与えられる場合、端点が含まれる。さらに、別途指定されるか、または文脈および当業者の理解から別途明白でない限り、範囲として表される値は、文脈上、そうでないとする明確な指示がない限り、本発明の異なる実施形態において定められる範囲内で、その範囲の下限の単位の１０分の１までの任意の具体的な値または部分範囲をとることがで

きることを理解されたい。

【１１５７】

さらに、先行技術の範囲内に該当する本発明の任意の特定の実施形態が、請求項のうちの任意の１つ以上から明示的に除外されてもよいことを理解されたい。そのような実施形態は当業者に既知であるとされるため、その除外が本明細書に明示的に記載されないとしても、それらは除外されてもよい。本発明の組成物の任意の特定の実施形態（例えば、任意の核酸またはそれによってコードされるタンパク質、任意の産生方法、任意の使用方法等）が、先行技術の存在に関連するか否かに関わらず、任意の理由で、任意の１つ以上の請求項から除外され得る。

【１１５８】

すべての引用される情報源、例えば、参考文献、刊行物、データベース、データベースエントリ、および本明細書に引用される技術は、引用文に明示的に述べられないとしても、参照により本出願に組み込まれる。引用される情報源および本出願の相反する記述がある場合には、本出願における記述が優先されるものとする。

【１１５９】

節および表の見出しは、限定するようには意図されない。

【実施例】

【１１６０】

実施例１．修飾ｍＲＮＡの産生

本発明に従う修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）は、標準的な実験室方法および材料を用いて作製することができる。目的とする遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、ポリＡ尾部の鋳型付加のために、強力なコザック翻訳開始シグナルを含有し得る５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および／またはオリゴ（ｄＴ）配列を含み得るα－グロビン３’ＵＴＲに隣接し得る。修飾ｍＲＮＡは、細胞の自然免疫応答を低減させるように修飾され得る。細胞の応答を低減させる修飾には、シュードウリジン（ψ）および５－メチル－シチジン（５ｍｅＣ、５ｍｃ、またはｍ^{5}Ｃ）が含まれ得る（それぞれ、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｋａｒｉｋｏ Ｋ ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２３：１６５－７５（２００５）、Ｋａｒｉｋｏ Ｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １６：１８３３－４０（２００８）、Ａｎｄｅｒｓｏｎ ＢＲ ｅｔ ａｌ．ＮＡＲ（２０１０）を参照のこと）。

【１１６１】

ＯＲＦは、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，ＣＡ）等であるが、これに限定されない最適化サービスから購入することができる、様々な上流または下流付加（β－グロビン、タグ等であるがこれらに限定されない）も含み得、ＸｂａＩ認識を有し得る複数のクローニング部位も含有し得る。構築物を受容すると、それが再構築され、化学的にコンピテントな大腸菌に変換され得る。

【１１６２】

本発明には、ＮＥＢ ＤＨ５－αコンピテント大腸菌を使用する。変換は、ＮＥＢの指示に従って、１００ｎｇのプラスミドを用いて行う。プロトコルは次の通りである。

１ 氷上のＮＥＢ ５－αコンピテント大腸菌細胞の管を１０分間解凍する。

２ １ｐｇ～１００ｎｇのプラスミドＤＮＡを含有する１～５μＬを細胞混合物に添加する。管を慎重に４～５回振り、細胞とＤＮＡを混合する。ボルテックスしないこと。

３ 混合物を３０分間氷上に置く。混ぜないこと。

４ ４２℃で正確に３０秒間熱ショックを与える。混ぜないこと。

５ ５分間氷上に置く。混ぜないこと。

６ 室温のＳＯＣを９５０μＬピペットで混合物に入れる。

７ ３７℃で６０分間置く。激しく振盪させる（２５０ｒｐｍ）か、または回転させる。

８ 選択プレートを３７℃に温める。

９ 管を振り、逆さにすることによって完全に細胞を混合する。

【１１６３】
５０～１００μＬの各希釈物を選択プレートに広げ、３７℃で一晩インキュベートする。あるいは、３０℃で２４～３６時間または２５℃で４８時間インキュベートする。
【１１６４】
次いで、単一コロニーを使用し、適切な抗生物質を用いて５ｍＬのＬＢ成長培地を接種し、５時間成長させる（２５０ＲＰＭ、３７℃）。次いで、これを使用して、２００ｍＬの培養培地を接種し、同じ条件下で一晩成長させる。
【１１６５】
プラスミドを単離するために（最大８５０μｇ）、製造業者の指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＨｉＰｕｒｅ　Ｍａｘｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いてマキシプレップを行う。
【１１６６】
インビトロ転写（ＩＶＴ）のためのｃＤＮＡを生成するために、プラスミド（この例は図３に示される）を、ＸｂａＩ等の制限酵素を用いてまず線形化する。ＸｂａＩでの典型的な制限消化には、以下が含まれる：プラスミド１．０μｇ；１０倍緩衝液１．０μＬ；ＸｂａＩ１．５μＬ；ｄＨ$_2$０最大１０μＬ；３７℃で１時間のインキュベーション。実験室規模（５μｇ未満）で行う場合、製造業者の指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＰＣＲ　Ｍｉｃｒｏ　Ｋｉｔ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて、反応物を浄化する。より大規模な精製は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎの標準的ＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＰＣＲ　Ｋｉｔ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）等、より大きな充填容量を有する製品を用いて行う必要があり得る。浄化した後、線形化されたベクターを、ＮａｎｏＤｒｏｐを用いて定量化し、アガロースゲル電気泳動を用いて分析して線形化を確認する。
【１１６７】
本明細書に記載の修飾ｍＲＮＡ作製方法を用いて、長い分子を含むすべての大きさの分子を産生することができる。記載の方法を用いて、酸性αグルコシダーゼ（ＧＡＡ）（３．２ｋｂ）、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）（４．７ｋｂ）、第ＶＩＩ因子（７．３ｋｂ）、リソソーム酸リパーゼ（４５．４ｋＤａ）、グルコセレブロシダーゼ（５９．７ｋＤａ）、およびイズロン酸２－スルファターゼ（７６ｋＤａ）を含む異なる大きさの分子の修飾ｍＲＮＡが作製された。
【１１６８】
非限定的な例として、Ｇ－ＣＳＦは、目的とするポリペプチドを表し得る。実施例１～５に概説されるステップに使用される配列を、表１１に示す。開始コドン（ＡＴＧ）は、表１１の各配列中に下線で示されていることに留意されたい。
表１１．Ｇ－ＣＳＦの配列

【表００１１－１】

配列番号	説明
21435	cDNA配列: ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTG CAGGAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATC CAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGA CACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTC CATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACA CTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCC ACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGC TTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTGA
21436	T7ポリメラーゼ部位、AfeIおよびXba制限部位を有するcDNA: TAATACGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTG CAGGAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATC CAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGA CACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTC CATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACA CTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCC ACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGC TTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTGA AGCGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAA AGCCTGAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
21437	T7ポリメラーゼ部位、AfeIおよびXba制限部位を含有する最適化された配列 TAATACGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC ATGGCCGGTCCCGCGACCCAAAGCCCCATGAAACTTATGGCCCTGCAGTTGCTGCTTTGGCACTCGGCCCTCTGGACAGTC CAAGAAGCGACTCCTCTCGGACCTGCCTCATCGTTGCCGCAGTCATTCCTTTTGAAGTGTCTGGAGCAGGTGCGAAAGATT CAGGGCGATGGAGCCGCACTCCAAGAGAAGCTCTGCGCGACATACAAACTTTGCCATCCCGAGGAGCTCGTACTGCTCGGG CACAGCTTGGGGATTCCCTGGGCTCCTCTCTCGTCCTGTCCGTCGCAGGCTTTGCAGTTGGCAGGGTGCCTTTCCCAGCTC CACTCCGGTTTGTTCTTGTATCAGGGACTGCTGCAAGCCCTTGAGGGAATCTCGCCAGAATTGGGCCCGACGCTGGACACG TTGCAGCTCGACGTGGCGGATTTCGCAACAACCATCTGGCAGCAGATGGAGGAACTGGGGATGGCACCCGCGCTGCAGCCC ACGCAGGGGCAATGCCGGCCTTTGCGTCCGCGTTTCAGCGCAGGGCGGGTGGAGTCCTCGTAGCGAGCCACCTTCAATCA TTTTTGGAAGTCTCGTACCGGGTGCTGAGACATCTTGCGCAGCCGTGA AGCGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAA AGCCTGAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
21438	mRNA配列(転写されたもの) GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC AUGGCCGGUCCCGCGACCCAAAGCCCCAUGAAACUUAUGGCCCUGCAGUUGCUGCUUUGGCACUCGGCCCUCUGGACAGUC CAAGAAGCGACUCCUCUCGGACCUGCCUCAUCGUUGCCGCAGUCAUUCCUUUUGAAGUGUCUGGAGCAGGUGCGAAAGAUU

10

20

30

【表００１１－２】

	CAGGGCGAUGGAGCCGCACUCCAAGAGAAGCUCUGCGCGACAUACAAACUUUGCCAUCCCGAGGAGCUCGUACUGCUCGGG CACAGCUUGGGGAUUCCCUGGGCUCCUCUCUCGUCCUGUCCGUCGCAGGCUUUGCAGUUGGCAGGGUGCCUUUCCCAGCUC CACUCCGUUUGUUCUUGUAUCAGGGACUGCUGCAAGCCCUUGAGGGAAUCUCGCCAGAAUUGGGCCCGACGCUGGACACG UUGCAGCUCGACGUGGCGGAUUUCGCAACAACCAUCUGGCAGCAGAUGGAGGAACUGGGGAUGGCACCCGCGCUGCAGCCC ACGCAGGGGGCAAUGCCGGCCUUUGCGUCCGCGUUUCAGCGCAGGGCGGGUGGAGUCCUCGUAGCGAGCCACCUUCAAUCA UUUUUGGAAGUCUCGUACCGGGUGCUGAGACAUCUUGCGCAGCCGUGA AGCGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAA AGCCUGAGUAGGAAG

【１１６９】

実施例２：ｃＤＮＡ産生のためのＰＣＲ

ｃＤＮＡの調製のためのＰＣＲ手順を、Ｋａｐａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）による２×ＫＡＰＡ　ＨＩＦＩ（商標）ＨｏｔＳｔａｒｔ　ＲｅａｄｙＭｉｘを用いて行う。このシステムには、２×ＫＡＰＡ　ＲｅａｄｙＭｉｘ１２．５μＬ、順方向プライマー（１０ｕＭ）０．７５μＬ、逆方向プライマー（１０ｕＭ）０．７５μＬ、鋳型ｃＤＮＡ１００ｎｇ、および２５．０μＬに希釈したｄＨ$_2$０が含まれる。反応条件は、９５℃で５分間、９８℃で２０秒間を２５サイクル、その後５８℃で１５秒間、続いて７２℃で４５秒間、次いで７２℃で５分間、次いで４℃で終了までである。

【１１７０】

本発明の逆方向プライマーは、ｍＲＮＡにおけるポリＡ$_{120}$のためのポリＴ$_{120}$を組み込む。より長いかまたは短いポリ（Ｔ）路を有する他の逆方向プライマーを使用して

、ｍＲＮＡにおけるポリ（Ａ）尾部の長さを調節することができる。
【１１７１】
反応物を、製造業者の指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＰＣＲ　Ｍｉｃｒｏ　Ｋｉｔ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて浄化する（５μｇまで）。より大規模な反応は、より大容量の製品を用いて浄化する必要がある。浄化した後、ｃＤＮＡを、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（商標）を用いて定量化し、アガロースゲル電気泳動によって分析して、ｃＤＮＡが予測した大きさであることを確認する。次いで、ｃＤＮＡを、シークエンシング分析に出した後に、インビトロ転写反応を進める。
【１１７２】
実施例３．インビトロ転写（ＩＶＴ）
インビトロ転写反応により、修飾ヌクレオチドまたは修飾ＲＮＡを含有するｍＲＮＡを生成する。投入するヌクレオチドトリホスフェート（ＮＴＰ）混合物は、天然および非天然のＮＴＰを用いてで自家作製したものである。
【１１７３】
典型的なインビトロ転写反応物には、次のものが含まれる。
１　鋳型ｃＤＮＡ　１．０μｇ
２　１０倍転写緩衝液（４００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．０、１９０ｍＭ　ＭｇＣｌ２、５０ｍＭ　ＤＴＴ、１０ｍＭスペルミジン）　２．０μＬ
３　カスタムＮＴＰ（２５ｍＭずつ）　７．２μＬ
４　ＲＮａｓｅ阻害剤　２０Ｕ
５　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ　３０００Ｕ
６　ｄＨ２０　最大２０．０μＬ
７　３７℃で３時間～５時間のインキュベーション。
【１１７４】
粗製ＩＶＴ混合物を、翌日の浄化のために４℃で一晩保管され得る。次いで、１ＵのＲＮａｓｅ不含ＤＮａｓｅを使用して、元の鋳型を消化させる。３７℃で１５分間のインキュベーションの後、ｍＲＮＡを、製造業者の指示に従ってＡｍｂｉｏｎのＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）Ｋｉｔ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）を用いて精製する。このキットは、最大５００μｇのＲＮＡを精製することができる。浄化させた後、ＲＮＡを、ＮａｎｏＤｒｏｐを用いて定量化し、アガロースゲル電気泳動によって分析して、ＲＮＡが適正な大きさであること、およびＲＮＡの分解が生じていないことを確認する。
【１１７５】
実施例４．ｍＲＮＡの酵素キャッピング
ｍＲＮＡのキャッピングを、次のように行い、混合物には、ＩＶＴ　ＲＮＡが６０μｇ～１８０μｇおよびｄＨ$_2$０が最大７２μＬ含まれる。混合物を、６５℃で５分間インキュベートしてＲＮＡを変性させ、その後すぐに氷上に移す。
【１１７６】
このプロトコルは、次いで、１０倍キャッピング緩衝液（０．５Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、６０ｍＭ　ＫＣｌ、１２．５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$）（１０．０μＬ）、２０ｍＭ　ＧＴＰ（５．０μＬ）、２０ｍＭ　Ｓ－アデノシルメチオニン（２．５μＬ）、ＲＮａｓｅ阻害剤（１００Ｕ）、２’－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（４００Ｕ）、ワクシニアキャッピング酵素（グアニリルトランスフェラーゼ）（４０Ｕ）、ｄＨ$_2$０（２８μＬまで）、および６０μｇのＲＮＡについては３７℃で３０分間のインキュベーションまたは１８０μｇのＲＮＡでは最大２時間のインキュベーションを伴う。
【１１７７】
次いで、ｍＲＮＡを、製造業者の指示に従ってＡｍｂｉｏｎのＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）Ｋｉｔ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）を用いて精製する。浄化させた後、ＲＮＡを、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いて定量化し、アガロースゲル電気泳動によって分析して、ＲＮＡが適正な大きさであること、およびＲＮＡの分解が生じていないことを確認する。また、配列決定のためのｃＤＮＡを生

成するために、ＲＮＡ産物に、逆転写ＰＣＲを実行して配列決定を行ってもよい。

【１１７８】

実施例５．ポリＡテーリング反応

ｃＤＮＡにポリＴがない場合、最終産物を浄化する前に、ポリＡテーリング反応を行う必要がある。これは、キャップされたＩＶＴ　ＲＮＡ（１００μＬ）、ＲＮａｓｅ阻害剤（２０Ｕ）、１０倍テーリング緩衝液（０．５Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、２．５Ｍ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　$MgCl_2$）（１２．０μＬ）、２０ｍＭ　ＡＴＰ（６．０μＬ）、ポリＡポリメラーゼ（２０Ｕ）、dH_2O最大１２３．５μＬを混合し、３７℃で３０分間インキュベートすることによって行う。ポリＡ尾部が既に転写物中に存在する場合、テーリング反応を省略し、直接ＡｍｂｉｏｎのＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）ｋｉｔ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）（最大５００μｇ）での浄化に進んでもよい。ポリＡポリメラーゼは、好ましくは、酵母に発現される組み換え酵素である。

【１１７９】

本明細書において実行および記載される研究においては、ポリＡ尾部は、１６０ヌクレオチド長を含むように、ＩＶＴ鋳型にコードされる。しかしながら、ポリＡテーリング反応の進行性または完全性は、常に正確に１６０個のヌクレオチドをもたらすわけではないことを理解されたい。したがって、約１６０ヌクレオチド、例えば、約１５０～１６５、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、または１６５のポリＡ尾部は、本発明の範囲内である。

【１１８０】

実施例６．天然の５’キャップおよび５’キャップ類似体

修飾ＲＮＡの５’キャッピングは、製造業者のプロトコルに従って、次の化学的ＲＮＡキャップ類似体を用いたインビトロ転写反応の際に付随して完了し得、５’グアノシンキャップ構造が生成される：３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ［ＡＲＣＡキャップ］、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ，Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）。修飾ＲＮＡの５’キャッピングは、ワクシニアウイルスキャッピング酵素を用いて転写後に完了し、「キャップ０」構造：ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ，Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）を生成し得る。キャップ１構造は、ワクシニアウイルスキャッピング酵素および２’－Ｏメチルトーランスフェラーゼの両方を用いて生成され得、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ－２’－Ｏ－メチルが得られる。キャップ２構造は、２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼを用いて、５’末端から３番目のヌクレオチドの２’－Ｏ－メチル化の後に、キャップ１構造から生成され得る。キャップ３構造は、２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼを用いて、５’末端から４番目のヌクレオチドの２’－Ｏ－メチル化の後に、キャップ２構造から生成され得る。酵素は、好ましくは組み換え源に由来する。

【１１８１】

哺乳動物細胞にトランスフェクトする場合、修飾ｍＲＮＡは、１２～１８時間、または１８時間を超える、例えば、２４、３６、４８、６０、７２、もしくは７２時間を超える安定性を有する。

【１１８２】

実施例７．キャッピング

Ａ．タンパク質発現アッセイ

ＡＲＣＡ（３’Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ）キャップ類似体またはキャップ１構造を含有する、ヒトＧ－ＣＳＦをコードする合成ｍＲＮＡ（ｃＤＮＡは配列番号１６０９９に示され、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾されたｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示され、約１６０ヌクレオチド（ｎｕｃｌｅｔｏｉｄｉｅ）長のポリＡ尾部は配列内には示されない）を、等濃度でヒト初代ケラチノサイトにトランスフェクトすることができる。トランスフェクションの６、１２、２４、および３６時間後に、培養培地に分泌されたＧ

－ＣＳＦの量を、ＥＬＩＳＡによってアッセイすることができる。培地中により高レベルのＧ－ＣＳＦを分泌する合成ｍＲＮＡは、より高度は翻訳的にコンピテントなキャップ構造を有する合成ｍＲＮＡに対応する。

【１１８３】

Ｂ．純度分析合成

ＡＲＣＡキャップ類似体またはキャップ１構造の粗製合成産物を含有する、ヒトＧ－ＣＳＦをコードする合成ｍＲＮＡ（ｃＤＮＡは配列番号１６０９９に示され、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾されたｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示され、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない）を、変性アガロース－尿素ゲル電気泳動またはＨＰＬＣ分析を用いて、純度について比較することができる。電気泳動により単一の集約された帯域を有する合成ｍＲＮＡは、複数の帯域または筋状の帯域を有する合成ｍＲＮＡと比較して、より高い純度の産物に対応する。単一のＨＰＬＣピークを有する合成ｍＲＮＡもより高い純度の産物に対応する。より高効率のキャッピング反応により、より純粋なｍＲＮＡ集団が得られる。

【１１８４】

Ｃ．サイトカイン分析

ＡＲＣＡキャップ類似体またはキャップ１構造を含有する、ヒトＧ－ＣＳＦをコードする合成ｍＲＮＡ（ｃＤＮＡは配列番号１６０９９に示され、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換により完全に修飾されたｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示され、約１６０ヌクレオチド長のポリＡ尾部は配列内に示されない）を、複数の濃度でヒト初代ケラチノサイトにトランスフェクトすることができる。トランスフェクションの６、１２、２４、および３６時間後に、培養培地に分泌されたＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－β等の炎症促進性サイトカインの量を、ＥＬＩＳＡによってアッセイすることができる。培地中により高レベルの炎症促進性サイトカインを分泌する合成ｍＲＮＡは、免疫活性化キャップ構造を有する合成ｍＲＮＡに対応する。

【１１８５】

Ｄ．キャッピング反応効率

ＡＲＣＡキャップ類似体またはキャップ１構造を含有する、ヒトＧ－ＣＳＦをコードする合成ｍＲＮＡ（ｃＤＮＡは配列番号１６０９９に示される、５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換により完全に修飾されたｍＲＮＡ配列は各シトシンにおける配列番号２１４３８に示され、約１６０ヌクレオチド長のポリＡ尾部は、配列内に示されない）を、キャップされたｍＲＮＡのヌクレアーゼ処理の後に、ＬＣ－ＭＳによってキャッピング反応効率について分析することができる。キャップされたｍＲＮＡのヌクレアーゼ処理により、ＬＣ－ＭＳによって検出可能な遊離ヌクレオチドとキャップされた５’－５－トリホスフェートキャップ構造の混合物が得られる。ＬＣ－ＭＳスペクトル上のキャップされた生成物の量は、反応からの全ｍＲＮＡの割合として表すことができ、キャッピング反応効率に対応するであろう。より高いキャッピング反応効率を有するキャップ構造は、ＬＣ－ＭＳにより、より高い量のキャップされた生成物を有するであろう。

【１１８６】

実施例８．修飾ＲＮＡまたはＲＴ　ＰＣＲ産物のアガロースゲル電気泳動

個々の修飾ＲＮＡ（２０μＬ体積中２００～４００ｎｇ）または逆転写されたＰＣＲ産物（２００～４００ｎｇ）を、非変性１．２％アガロースＥ－ゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のウェルに充填し、製造業者のプロトコルに従って１２～１５分間泳動させる。

【１１８７】

実施例９．Ｎａｎｏｄｒｏｐ修飾ＲＮＡの定量化およびＵＶスペクトルデータ

ＴＥ緩衝液（１μＬ）中の修飾ＲＮＡを、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　ＵＶ吸光読み取りに使用して、インビトロ転写反応からの各ＲＮＡの収率を定量化する。

【１１８８】
実施例１０．リピドイドを用いた修飾ｍＲＮＡの製剤化
修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）を、細胞に添加する前に、設定された比率でｍｍＲＮＡとリピドイドとを混合することによってインビトロでの実験用に製剤化する。インビボ製剤は、身体全体への循環を促進するために、追加の成分の添加を要する場合がある。インビボでの働きに好適な粒子を形成するこれらのリピドイドの能力を試験するために、ｓｉＲＮＡ－リピドイド製剤に使用される標準的な製剤化プロセスを、起始点として使用した。初期ｍｍＲＮＡ－リピドイド製剤は、４２％リピドイド、４８％コレステロール、および１０％ＰＥＧから構成される粒子からなり得、比率のさらなる最適化が可能である。粒子の形成後にｍｍＲＮＡを添加し、複合体と一体化させる。カプセル封入効率を、標準的な色素排除アッセイを用いて判定する。
【１１８９】
実施例１１～１５の材料および方法
Ａ．脂質合成
６つの脂質、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、およびＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡを、修飾ＲＮＡとともに製剤化するために、当技術分野で概説される方法によって合成した。ＤＬｉｎ－ＤＭＡおよび前駆体を、Ｈｅｙｅｓ　ｅｔ．ａｌ，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ，２００５，１０７，２７６－２８７に記載されるように合成した。ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡおよびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ならびに前駆体を、Ｓｅｍｐｌｅ　ｅｔ．ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０１０，２８，１７２－１７６に記載されるように合成した。９８Ｎ１２－５および前駆体を、Ａｋｉｎｃ　ｅｔ．ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２００８，２６，５６１－５６９に記載されるように合成した。
【１１９０】
Ｃ１２－２００および前駆体を、Ｌｏｖｅ　ｅｔ．ａｌ，ＰＮＡＳ，２０１０，１０７，１８６４－１８６９に概説される方法に従って合成した。２－エポキシドデカン（５．１０ｇ、２７．７ｍｍｏｌ、８．２当量）を、Ａｍｉｎｅ　２００（０．７２３ｇ、３．３６ｍｍｏｌ、１当量）および撹拌子を含有するバイアルに添加した。バイアルを密封し、８０℃に温めた。反応物を、８０℃で４日間撹拌した。次いで、混合物を、純粋ジクロロメタン（ＤＣＭ）からＤＣＭ：ＭｅＯＨ　９８：２の勾配を用いてシリカゲルクロマトグラフィーによって精製した。標的化合物をＲＰ－ＨＰＬＣによってさらに精製して、所望の化合物を得た。
【１１９１】
ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡおよび前駆体を、参照により全体が本明細書に組み込まれるＷＯ２０１００５４４０１号に記載の手順に従って合成した。１０ｍＬのＤＭＦ中のジリノレイルメタノール（１．５ｇ、２．８ｍｍｏｌ、１当量）、Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ酪酸（１．５ｇ、２．８ｍｍｏｌ、１当量）、ＤＩＰＥＡ（０．７３ｍＬ、４．２ｍｍｏｌ、１．５当量）、およびＴＢＴＵ（１．３５ｇ、４．２ｍｍｏｌ、１．５当量）の混合物を、室温で１０時間撹拌した。次いで、反応混合物をエーテル中に希釈し、水で洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物を、ＤＣＭからＤＣＭ：ＭｅＯＨ　９８：２の勾配を用いてシリカゲルクロマトグラフィーによって精製した。続いて、標的化合物を、さらなるＲＰ－ＨＰＬＣ精製に供し（これはＹＭＣ-Ｐａｃｋ　Ｃ４カラムを用いて行った）、標的化合物を得た。
【１１９２】
Ｂ．修飾ＲＮＡナノ粒子の製剤化
合成脂質、１，２－ジステアロイル－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ）、コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｔａｕｆｋｉｒｃｈｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、およびα－［３’－（１，２－ジミリストイル－３－プロパノキシ）－カルボキサミド－プロピル］－

ω－メトキシ－ポリオキシエチレン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）（ＮＯＦ，Ｂｏｕｗｅｌｖｅｎ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）の溶液を、エタノール中５０ｍＭの濃度で調製し、－２０℃で保管した。脂質を合わせて、５０：１０：３８．５：１．５（脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）のモル比を得、２５ｍＭの最終脂質濃度までエタノールで希釈した。水中１～２ｍｇ／ｍＬの濃度の修飾ｍＲＮＡの溶液を、ｐＨ３で５０ｍＭのクエン酸ナトリウム緩衝液中に希釈して、修飾ｍＲＮＡのストック溶液を形成した。合成脂質溶液と修飾ｍＲＮＡ溶液を、１０：１、１５：１、２０：１、および３０：１の総脂質対修飾ｍＲＮＡの重量比で合わせることによって、脂質および修飾ｍＲＮＡの製剤を調製した。脂質エタノール溶液を、修飾ｍＲＮＡ水溶液に迅速に注入して、３３％のエタノールを含有する懸濁液を得た。溶液は、手動（ＭＩ）またはシリンジポンプ（ＳＰ）を用いてのいずれかで注入した（Ｈａｒｖａｒｄ Ｐｕｍｐ ３３ Ｄｕａｌ Ｓｙｒｉｎｇｅ Ｐｕｍｐ Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓ Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ）。

【１１９３】

エタノールを除去し、緩衝液交換を達成するために、製剤を、１０ｋＤの分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）で、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒカセット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を用いて、一次産物の２００倍の体積でｐＨ７．４においてリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に対して２回透析した。１回目の透析は、室温で３時間行い、次いで、製剤を４℃で一晩透析した。結果として得られたナノ粒子懸濁液を、０．２μｍの滅菌フィルター（Ｓａｒｓｔｅｄｔ，Ｎ・高ｂ窒・モ・煤ＣＧｅｒｍａｎｙ）を通して濾過してガラスバイアルに入れ、圧着密閉した。

【１１９４】

Ｃ．製剤の特徴付け

Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｌｔｄ，Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）を使用して、修飾ｍＲＮＡナノ粒子の粒径、多分散指標（ＰＤＩ）、およびゼータ電位を、粒径の判定時は１倍ＰＢＳ中、およびゼータ電位の判定時は１５ｍＭのＰＢＳ中において、判定した。

【１１９５】

紫外可視分光法を用いて、修飾ｍＲＮＡナノ粒子製剤の濃度を判定した。１倍ＰＢＳ中に希釈した１００μＬの製剤を、９００μＬの４：１（ｖ／ｖ）のメタノールとクロロホルムの混合物に添加した。混合した後、溶液の吸光度スペクトルを、ＤＵ ８００分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｅａ，ＣＡ）において、２３０ｎｍ～３３０ｎｍで記録した。ナノ粒子製剤中の修飾ＲＮＡの濃度を、製剤に使用した修飾ＲＮＡの減衰係数および２６０ｎｍの波長での吸光度と３３０ｎｍの波長でのベースラインとの間の差に基づいて計算した。

【１１９６】

ＱＵＡＮＴ－ＩＴ（商標）ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）ＲＮＡアッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて、ナノ粒子による修飾ＲＮＡのカプセル封入を評価した。試料を、ＴＥ緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）中約５μｇ／ｍＬの濃度に希釈した。５０μＬの希釈試料を、ポリスチレン９６ウェルプレートに移し、次いで、５０μＬのＴＥ緩衝液または５０μＬの２％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００溶液のいずれかを添加した。プレートを３７℃の温度で１５分間インキュベートした。ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）試薬を、ＴＥ緩衝液中１：１００で希釈し、１００μＬのこの溶液を、各ウェルに添加した。蛍光強度を、約４８０ｎｍの励起波長および約５２０ｎｍの発光波長で、蛍光プレートリーダー（Ｗａｌｌａｃ Ｖｉｃｔｏｒ １４２０ Ｍｕｌｔｉｌａｂｌｅｌ Ｃｏｕｎｔｅｒ；Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いて測定した。試薬ブランクの蛍光値を、各試料のそれぞれのものから差し引き、遊離修飾ＲＮＡの割合（％）は、無傷な試料（Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００の添加なし）の蛍光強度を分断した試料（Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１０の添加によって引き起こされた）の蛍光値で除すことによって判定した

。

【１１９７】

Ｄ．インビトロインキュベーション

ヒト胎児腎臓上皮（ＨＥＫ２９３）および肝細胞癌上皮（ＨｅｐＧ２）細胞（ＬＧＣ ｓｔａｎｄａｒｄｓ ＧｍｂＨ，Ｗｅｓｅｌ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を、９６－ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｂｉｏ－ｏｎｅ ＧｍｂＨ，Ｆｒｉｃｋｅｎｈａｕｓｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に播種し、ＨＥＫ２９３細胞のプレートは１型コラーゲンで事前コーティングされていた。１００μＬの細胞培養培地中、ＨＥＫ２９３は１ウェル当たり３０，０００細胞の密度で播種し、ＨｅｐＧ２は３５，０００細胞の密度で播種した。ＨＥＫ２９３については、細胞培養培地は、２ｍＭのＬ－グルタミン、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、および１ｘ非必須アミノ酸（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、ならびに１．２ｍｇ／ｍＬの重炭酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｕｎｉｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加した、ＤＭＥＭ、１０％ＦＣＳであり、ＨｅｐＧ２については、培養培地は、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１ｍＭ ピルビン酸ナトリウム、および１ｘ非必須アミノ酸（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙを添加した、ＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、１０％ＦＣＳであった。ｍＣｈｅｒｒｙ ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、細胞を播種した直後に四重に添加し、インキュベートした。インビトロ転写（ＩＶＴ）に使用される、Ｔ７プロモーター、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、および３’ＵＴＲを有するｍＣｈｅｒｒｙ ｃＤＮＡを、配列番号２１４４０に示す。ｍＣｈｅｒｒｙ ｍＲＮＡを、各シトシンにおける５ｍｅＣおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で修飾した。

【１１９８】

培養培地上清を９６ウェルＰｒｏ－Ｂｉｎｄ Ｕ底プレート（Ｂｅｃｋｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＧｍｂＨ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に移すことによって、細胞を収集した。細胞を、半量のトリプシン／ＥＤＴＡ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）でトリプシン化し、それぞれの上清とともにプールし、１回量のＰＢＳ／２％ＦＣＳ（いずれもＢｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）／０．５％ホルムアルデヒド（Ｍｅｒｃｋ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加することによって固定した。次いで、試料を、ＬＳＲＩＩサイトメーター（Ｂｅｃｋｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＧｍｂＨ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）において、５３２ｎｍの励起レーザーおよびＰＥ－Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ用の６１０／２０フィルターを用いてフローサイトメーター測定にかけた。すべてのイベントの平均蛍光強度（ＭＦＩ）および４つの独立したウェルの標準偏差を、分析した試料について提示する。

【１１９９】

実施例１１．ナノ粒子製剤の精製

ＨＥＫ２９３およびＨｅｐＧ２においてＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡおよび９８Ｎ１２－５のナノ粒子製剤を試験し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）が脂質と修飾ＲＮＡの比、および／または精製に依存するかどうかを判定した。ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡの３つの製剤と９８Ｎ１２－５の２つの製剤を、シリンジポンプを用いて表１２に記載される仕様に生成した。精製試料は、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ－２５ ＤＮＡグレード（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｓｗｅｄｅｎ）によって精製した。精製の前および後（ａＰ）の各製剤を、２４ウェルプレートにおいて、１ウェル当たり２５０ｎｇの修飾ＲＮＡの濃度で試験した。各製剤およびバックグラウンド試料についてフローサイトメーターによって分析したときにＦＬ４チャネルのマーカーが陽性である細胞の割合（ＦＬ４陽性％）、ならびに各製剤およびバックグラウンド試料についてのＦＬ４チャネルのマーカーのＭＦＩを、表１３に示す。精製されている製剤は、精製前に試験した製剤よりもわずかに高いＭＦＩを有した。

表１２．製剤

【表００１２】

製剤番号	脂質	脂質/RNA 重量/重量	平均粒径 (nm)
NPA-001-1	DLin-KC2-DMA	10	155 nm PDI: 0.08
NPA-001-1 aP	DLin-KC2-DMA	10	141 nm PDI: 0.14
NPA-002-1	DLin-KC2-DMA	15	140 nm PDI: 0.11
NPA-002-1 aP	DLin-KC2-DMA	15	125 nm PDI: 0.12
NPA-003-1	DLin-KC2-DMA	20	114 nm PDI: 0.08
NPA-003-1 aP	DLin-KC2-DMA	20	104 nm PDI: 0.06
NPA-005-1	98N12-5	15	127 nm PDI: 0.12
NPA-005-1 aP	98N12-5	15	134 nm PDI: 0.17
NPA-006-1	98N12	20	126 nm PDI: 0.08
NPA-006-1 aP	98N12	20	118 nm PDI: 0.13

表１３．ＨＥＫ２９３およびＨｅｐＧ２、２４ウェル、２５０ｎｇの修飾ＲＮＡ／ウェル

【表００１３】

製剤	FL4 陽性%		FL4 MFI	
	HEK293	HepG2	HEK293	HepG2
未処理	0.33	0.40	0.25	0.30
NPA-001-1	62.42	5.68	1.49	0.41
NPA-001-ap	87.32	9.02	3.23	0.53
NPA-002-1	91.28	9.90	4.43	0.59
NPA-002-ap	92.68	14.02	5.07	0.90
NPA-003-1	87.70	11.76	6.83	0.88
NPA-003-ap	88.88	15.46	8.73	1.06
NPA-005-1	50.60	4.75	1.83	0.46
NPA-005-ap	38.64	5.16	1.32	0.46
NPA-006-1	54.19	13.16	1.30	0.60
NPA-006-ap	49.97	13.74	1.27	0.61

【１２００】

実施例１２．濃度応答曲線

９８Ｎ１２－５（ＮＰＡ－００５）およびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（ＮＰＡ－００３）のナノ粒子製剤を、種々の濃度で試験して、広範な濃度にわたり、ＦＬ４またはｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシ

ュードウリジンで完全に修飾）のＭＦＩを判定した。試験した製剤を表１４に概要説明する。９８Ｎ１２－５のナノ粒子製剤の最適な濃度を判定するために、様々な濃度の製剤化された修飾ＲＮＡ（１ウェル当たり１００ｎｇ、１０ｎｇ、１．０ｎｇ、０．１ｎｇ、および０．０１ｎｇ）を、２４ウェルプレートのＨＥＫ２９３において試験し、各用量のＦＬ４　ＭＦＩの結果を表１５に示す。同様に、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡのナノ粒子製剤の最適な濃度を判定するために、様々な濃度の製剤化された修飾ＲＮＡ（１ウェル当たり２５０ｎｇ　１００ｎｇ、１０ｎｇ、１．０ｎｇ、０．１ｎｇ、および０．０１ｎｇ）を、２４ウェルプレートのＨＥＫ２９３において試験し、各用量のＦＬ４　ＭＦＩの結果を表１６に示す。ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡのナノ粒子製剤も、様々な濃度の製剤化された修飾ＲＮＡ（１ウェル当たり２５０ｎｇ、１００ｎｇ、および３０ｎｇ）で２４ウェルプレートのＨＥＫ２９３において試験し、ＦＬ４　ＭＦＩの結果を表１７に示す。９８Ｎ１２－５については１ｎｇ／ウェルの用量、およびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡについては１０ｎｇ／ウェルの用量が、バックグランドのＦＬ４　ＭＦＩに類似していることがわかった。

【１２０１】

濃度がバックグラウンドにどの程度類似しているかを判定するために、ｍＣｈｅｒｒｙ発現の検出用に最適化されたフィルターセットを有するフローサイトメーターを利用し、バックグラウンドレベルと比較して増加した感受性で結果を得ることができた。２５ｎｇ／ウェル、０．２５ｎｇ／ウェル、０．０２５ｎｇ／ウェル、および０．００２５ｎｇ／ウェルの用量を、９８Ｎ１２－５（ＮＰＡ－００５）およびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（ＮＰＡ－００３）について分析して、ｍＣｈｅｒｒｙのＭＦＩを判定した。表１８に示されるように、０．０２５ｎｇ／ウェルおよびそれ以下の濃度は、約３８６．１２５であるｍＣｈｅｒｒｙのバックグラウンドＭＦＩレベルに類似している。

表１４．製剤

【表００１４】

製剤番号	NPA-003	NPA-005
脂質	DLin-KC2-DMA	98N12-5
脂質/RNA 重量/重量	20	15
平均粒径	114nm PDI:0.08	106nm PDI: 0.12

表１５．ＨＥＫ２９３、ＮＰＡ－００５、２４ウェル、ｎ＝４

【表００１５】

製剤	FL4 MFI
未処理対照	0.246
NPA-005 100 ng	2.2175
NPA-005 10 ng	0.651
NPA-005 1.0 ng	0.28425
NPA-005 0.1 ng	0.27675
NPA-005 0.01 ng	0.2865

表１６．ＨＥＫ２９３、ＮＰＡ－００３、２４ウェル、ｎ＝４

【表００１６】

製剤	FL4 MFI
未処理対照	0.3225
NPA-003 250 ng	2.9575
NPA-003 100 ng	1.255
NPA-003 10 ng	0.40025
NPA-003 1 ng	0.33025
NPA-003 0.1 ng	0.34625
NPA-003 0.01 ng	0.3475

表１７．ＨＥＫ２９３、ＮＰＡ－００３、２４ウェル、ｎ＝４

【表００１７】

製剤	FL4 MFI
未処理対照	0.27425
NPA-003 250 ng	5.6075
NPA-003 100 ng	3.7825
NPA-003 30 ng	1.5525

表１８．濃度およびＭＦＩ

【表００１８】

	MFI mCherry	
製剤	NPA-003	NPA-005
25ng/ウェル	11963.25	12256.75
0.25ng/ウェル	1349.75	2572.75
0.025ng/ウェル	459.50	534.75
0.0025ng/ウェル	310.75	471.75

【１２０２】

実施例１３．手動注入およびシリンジポンプ製剤

ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡおよび９８Ｎ１２－５の２つの製剤を、手動注入（ＭＩ）およびシリンジポンプ注入（ＳＰ）によって調製し、バックグラウンド試料とともに分析して、異なる製剤のｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）のＭＦＩを比較した。表１９は、シリンジポンプ製剤が、同じ脂質および脂質／ＲＮＡ比の手動注入製剤と比較して、高いＭＦＩを有したことを示す。

表１９．製剤およびＭＦＩ

【表００１９】

製剤番号	脂質	脂質/RNA 重量/重量	平均粒径(nm)	製剤化の方法	MFI
未処理対照	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	674.67
NPA-002	DLin-KC2-DMA	15	140nm PDI:0.11	MI	10318.25
NPA-002-2	DLin-KC2-DMA	15	105nm PDI:0.04	SP	37054.75
NPA-003	DLin-KC2-DMA	20	114nm PDI:0.08	MI	22037.5
NPA-003-2	DLin-KC2-DMA	20	95nm PDI:0.02	SP	37868.75
NPA-005	98N12-5	15	127nm PDI:0.12	MI	11504.75
NPA-005-2	98N12-5	15	106nm PDI:0.07	SP	9343.75
NPA-006	98N12-5	20	126nm PDI:0.08	MI	11182.25
NPA-006-2	98N12-5	20	93nm PDI:0.08	SP	5167

【１２０３】

実施例１４．脂質ナノ粒子製剤

ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、およびＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡの製剤を、ＨＥＫ２９３のプレートでは６０ｎｇ／ウェルまたは６２．５ｎｇ／ウェルの濃度で、ＨｅｐＧ２細胞のプレートでは６２．５ｎｇ／ウェルの濃度で、２４時間インキュベートして、各製剤についてｍＣｈｅｒｒｙ（配列は配列番号２１４３９；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）のＭＦＩを判定した。試験した製剤を、以下の表２０に概略説明する。６０ｎｇ／ウェルについては表２１に、６２．５ｎｇ／ウェルについては表２２、２３、２４、および２５に示されるように、ＮＰＡ－００３およびＮＰＡ－０１８の製剤が、最も高いｍＣｈｅｒｒｙ　ＭＦＩを有し、ＮＰＡ－００８、ＮＰＡ－０１０、およびＮＰＡ－０１３の製剤は、バックグラウンド試料のｍＣｈｅｒｒｙ　ＭＦＩ値に最も類似している。

表２０．製剤

【表００２０】

製剤番号	脂質	脂質/RNA(重量/重量)	平均粒径(nm)
NPA-001	DLin-KC2-DMA	10	155nm PDI:0.08
NPA-002	DLin-KC2-DMA	15	140nm PDI:0.11
NPA-002-2	DLin-KC2-DMA	15	105nm PDI:0.04
NPA-003	DLin-KC2-DMA	20	114nm PDI:0.08
NPA-003-2	DLin-KC2-DMA	20	95nm PDI:0.02
NPA-005	98N12-5	15	127nm PDI:0.12
NPA-006	98N12-5	20	126nm PDI:0.08
NPA-007	DLin-DMA	15	148nm PDI:0.09
NPA-008	DLin-K-DMA	15	121nm PDI:0.08
NPA-009	C12-200	15	138nm PDI:0.15
NPA-010	DLin-MC3-DMA	15	126nm PDI:0.09
NPA-012	DLin-DMA	20	86nm PDI:0.08
NPA-013	DLin-K-DMA	20	104nm PDI:0.03
NPA-014	C12-200	20	101nm PDI:0.06
NPA-015	DLin-MC3-DMA	20	109nm PDI:0.07

表２１．ＨＥＫ２９３、９６ウェル、６０ｎｇの修飾ＲＮＡ／ウェル

【表００２１】

製剤	MFI mCherry
未処理	871.81
NPA-001	6407.25
NPA-002	14995
NPA-003	29499.5
NPA-005	3762
NPA-006	2676
NPA-007	9905.5
NPA-008	1648.75
NPA-009	2348.25
NPA-010	4426.75
NPA-012	11466
NPA-013	2098.25
NPA-014	3194.25
NPA-015	14524

表２２．ＨＥＫ２９３、６２．５ｎｇ／ウェル

【表００２２】

製剤	MFI mCherry
未処理	871.81
NPA-001	6407.25
NPA-002	14995
NPA-003	29499.5
NPA-005	3762
NPA-006	2676
NPA-007	9905.5
NPA-008	1648.75
NPA-009	2348.25
NPA-010	4426.75
NPA-012	11466
NPA-013	2098.25
NPA-014	3194.25
NPA-015	14524

表２３．ＨＥＫ２９３、６２．５ｎｇ／ウェル

【表００２３】

製剤	MFI mCherry
未処理	295
NPA-007	3504
NPA-012	8286
NPA-017	6128
NPA-003-2	17528
NPA-018	34142
NPA-010	1095
NPA-015	5859
NPA-019	3229

表２４．ＨｅｐＧ２、６２．５ｎｇ／ウェル

【表００２４】

製剤	MFI mCherry
未処理	649.94
NPA-001	6006.25
NPA-002	8705
NPA-002-2	15860.25
NPA-003	15059.25
NPA-003-2	28881
NPA-005	1676
NPA-006	1473
NPA-007	15678
NPA-008	2976.25
NPA-009	961.75
NPA-010	3301.75
NPA-012	18333.25
NPA-013	5853
NPA-014	2257
NPA-015	16225.75

表２５．ｅｐＧ２、６２．５ｎｇ／ウェル

【表００２５】

製剤	MFI mCherry
未処理対照	656
NPA-007	16798
NPA-012	21993
NPA-017	20377
NPA-003-2	35651
NPA-018	40154
NPA-010	2496
NPA-015	19741
NPA-019	16373

【１２０４】
実施例１５．インビボ製剤研究
齧歯動物（ｎ＝５）に、修飾ｍＲＮＡおよび脂質を含有する製剤の単回用量を、静脈内、皮下、または筋肉内投与する。齧歯動物に投与する修飾ｍＲＮＡは、Ｇ－ＣＳＦ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、第ＩＸ因子（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、またはｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）から選択される。インビトロ転写（ＩＶＴ）に使用される、Ｔ７プロモーター、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、および３’ＵＴＲを有するエリスロポエチンｃＤＮＡを、配列番号２１４４１および配列番号２１４４２に示す。
【１２０５】
各製剤はまた、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ｒｅＬＮＰ、ＡＴＵＰＬＥＸ（登録商標）、ＤＡＣＣ、およびＤＢＴＣのうちの１つから選択される脂質を含有する。齧歯動物に、１００μｇ、１０μｇ、または１μｇの製剤化された修飾ｍＲＮＡを注入し、試料を指定時間間隔で採取する。
【１２０６】
ヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡを含有する製剤を投与した齧歯動物からの血清を、特異的Ｇ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡによって測定し、ヒト第ＩＸ因子修飾ＲＮＡを投与したマウスからの血清を、特異的第ＩＸ因子ＥＬＩＳＡまたは発色アッセイによって分析する。ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡを投与したマウスからの肝臓および脾臓を、免疫組織化学（ＩＨＣ）または蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって分析する。対照として、１つのマウス群にはいずれの製剤も注入せずに、それらの血清および組織を採取し、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、および／またはＩＨＣによって分析する。
【１２０７】
Ａ．経時変化
齧歯動物に、少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡを含有する製剤を投与して、投与した製剤のタンパク質発現の経時変化を研究する。齧歯動物に、修飾ｍＲＮＡ製剤の投与の前後に指定時間間隔で採血を行って、タンパク質発現および全血球数を判定する。試料を、修飾ｍＲＮＡ製剤を皮下または筋肉内投与した齧歯動物の投与部位からも採取して、組織内のタンパク質発現を判定する。
【１２０８】
Ｂ．用量応答
齧歯動物に、少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡを含有する製剤を投与して、各製剤の用量応答を判定する。齧歯動物に、修飾ｍＲＮＡ製剤の投与の前後に指定時間間隔で採血を行って、タンパク質発現および全血球数を判定する。さらに、齧歯動物を屠殺して、修飾ｍＲＮＡ製剤の内部組織への作用を分析する。試料を、修飾ｍＲＮＡ製剤を皮下または筋肉内投与した齧歯動物の投与部位からも採取して、組織内のタンパク質発現を判定する。
【１２０９】
Ｃ．毒性
齧歯動物に、少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡを含有する製剤を投与して、各製剤の毒性を研究する。齧歯動物に、修飾ｍＲＮＡ製剤の投与の前後に指定時間間隔で採血を行って、タンパク質発現および全血球数を判定する。さらに、齧歯動物を屠殺して、修飾ｍＲＮＡ製剤の内部組織への作用を分析する。試料を、修飾ｍＲＮＡ製剤を皮下または筋肉内投与した齧歯動物の投与部位からも採取して、組織内のタンパク質発現を判定する。
【１２１０】

実施例１６．ＰＬＧＡマイクロスフェア製剤

ＰＬＧＡマイクロスフェアの製剤化に使用されるパラメータの最適化により、マイクロスフェアにカプセル封入された修飾ＲＮＡの完全性を維持すると同時に、調整可能な放出速度および高いカプセル封入効率を可能にすることができる。粒径、回収率、およびカプセル封入効率等であるがこれらに限定されないパラメータを最適化して、最適な製剤を達成することができる。

【１２１１】

Ａ．ＰＬＧＡマイクロスフェアの合成

ポリ乳酸グリコール酸（ＰＬＧＡ）マイクロスフェアを、ＰＬＧＡ（Ｌａｃｔｅｌ、カタログ番号Ｂ６０１０－２、固有粘度０．５５～０．７５、５０：５０のＬＡ：ＧＡ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号３４８４０６－２５Ｇ、ＭＷ　１３－２３ｋ）、ジクロロメタン、および水を使用して、当技術分野で既知の水／油／水の二重乳化法を用いて合成した。手短に、０．１ｍＬの水（Ｗ１）を、ＰＬＧＡの濃度範囲５０～２００ｍｇ／ｍＬで、ジクロロメタン（ＤＣＭ）（Ｏ１）中に溶解させた２ｍＬのＰＬＧＡに添加した。Ｗ１／Ｏ１エマルションを、速度４（約１５，０００ｒｐｍ）で３０秒間均質化させた（ＩＫＡ　Ｕｌｔｒａ－Ｔｕｒｒａｘ　Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ，Ｔ１８）。次いで、Ｗ１／Ｏ１エマルションを１００～２００ｍＬの０．３～１％のＰＶＡ（Ｗ２）に添加し、種々の速度で１分間均質化させた。製剤をそのまま３時間撹拌させ、次いで、遠心分離により洗浄した（２０～２５分間、４，０００ｒｐｍ、４℃）。上清を廃棄し、ＰＬＧＡのペレットを５～１０ｍＬの水に再懸濁させ、これを２回繰り返した。各製剤の平均粒径（２０～３０個の粒子を表す）を、洗浄後の顕微鏡検査により判定した。表２６は、ＰＬＧＡ濃度の増加が、より大きな粒径のマイクロスフェアをもたらしたことを示す。２００ｍｇ／ｍＬのＰＬＧＡ濃度は、１４．８μｍの平均粒径をもたらし、１００ｍｇ／ｍＬでは８．７μｍであり、５０ｍｇ／ｍＬのＰＬＧＡでは４．０μｍの平均粒径をもたらした。

表２６．ＰＬＧＡ濃度の変化

【表００２６】

試料識別子	O1体積(mL)	PLGA濃度(mg/mL)	W2体積(mL)	PVA濃度(%)	速度	平均粒径(μm)
1	2	200	100	0.3	5	14.8
2	2	100	100	0.3	5	8.7
3	2	50	100	0.3	5	4.0

【１２１２】

表２７は、５（約２０，０００ｒｐｍ）から速度４（約１５，０００ｒｐｍ）への均質化速度の減少により、１４．８μｍから２９．７μｍへの粒径増加がもたらされたことを示す。

表２７．均質化速度の変化

【表００２７】

試料識別子	O1体積(mL)	PLGA濃度(mg/mL)	W2体積(mL)	PVA濃度(%)	速度	平均粒径(μm)
1	2	200	100	0.3	5	14.8
4	2	200	100	0.3	4	29.7

【１２１３】

表２８は、Ｗ２の体積を増加させること（すなわち、Ｗ２：Ｏ１の比を５０：１から１

００：１に増加させること）により、平均粒径がわずかに減少したことを示す。０．３から１重量％へのＰＶＡ濃度の変化は、ＰＬＧＡマイクロスフェアの大きさにほとんど影響を及ぼさなかった。

表２８．Ｗ２の体積および濃度の変化

【表００２８】

試料識別子	01体積(mL)	PLGA濃度(mg/mL)	W2体積(mL)	PVA濃度(%)	速度	平均粒径(μm)
1	2	200	100	0.3	5	14.8
5	2	200	200	0.3	5	11.7
6	2	200	190	0.3	5	11.4
7	2	200	190	1.0	5	12.3

【１２１４】

Ｂ．修飾ｍＲＮＡのカプセル封入

修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、２ｍｇ／ｍＬ（Ｗ３）の濃度で水中に溶解させた。３つのバッチのＰＬＧＡマイクロスフェア製剤を、次のパラメータに従って上述のように作製した：２ｍｇ／ｍＬで０．１ｍＬのＷ３、２００ｍｇ／ｍＬで１．６ｍＬのＯ１、１％で１６０ｍＬのＷ２、ならびに第１のエマルション（Ｗ３／Ｏ１）は速度３で均質化、および第２のエマルション（Ｗ３／Ｏ１／Ｗ２）は速度５で均質化。遠心分離によって洗浄した後、製剤を液体窒素中で凍結させ、次いで３日間凍結乾燥させた。製剤のカプセル封入効率を試験するために、凍結乾燥材料を、ＤＣＭ中で６時間脱製剤化（ｄｅｆｏｒｍｕｌａｔｅｄ）させた後、一晩水中に抽出した。次いで、試料中の修飾ＲＮＡの濃度をＯＤ２６０によって判定した。カプセル封入効率は、修飾ＲＮＡの実際の量を取得し、修飾ＲＮＡの開始時の量で除すことによって計算した。試験した３つのバッチでは、５９．２、４９．８、および６１．３のカプセル封入効率であった。

【１２１５】

Ｃ．ＰＬＧＡマイクロスフェアにカプセル封入された修飾ｍＲＮＡの完全性

修飾第ＩＸ因子ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、種々の濃度で水中に溶解させて（Ｗ４）製剤中の充填重量パーセント（ｍｇ　修飾ＲＮＡ／ｍｇ　ＰＬＧＡ＊１００）を変化させ、カプセル封入効率を判定した。表２９のパラメータを使用して、第１のエマルション（Ｗ４／Ｏ１）は均質化速度４で、第２のエマルション（Ｗ４／Ｏ１／Ｗ２）は均質化速度５で、４つの異なるバッチのＰＬＧＡマイクロスフェア製剤を作製した。

表２９．第ＩＸ因子ＰＬＧＡマイクロスフェア製剤のパラメータ

【表００２９】

識別子	W4体積（μＬ）	第IX因子濃度（mg/mL）	第IX因子の量（μg）	O1体積（mL）	PLGA濃度（mg/mL）	W2体積（mL）	PVA濃度（%）	重量%（wt%）充填量
A	100	2.0	200.0	2.0	200	200	1.0	0.05
B	100	4.0	400.0	2.0	200	200	1.0	0.10
C	400	2.0	800.0	2.0	200	200	1.0	0.20
D	400	4.0	1600.0	2.0	200	200	1.0	0.40

【１２１６】

凍結乾燥させた後、ＰＬＧＡマイクロスフェアを、約１０μｇの修飾ＲＮＡに対応するように２ｍＬのエッペンドルフ管に計量した。凍結乾燥は、ＰＬＧＡマイクロスフェアの全体的な構造を破壊しないことがわかった。ＰＬＧＡマイクロスフェアの充填重量パーセント（重量％）を増加させるために、漸増量の修飾ＲＮＡを試料に添加した。１．０ｍＬのＤＣＭを各管に添加し、次いで試料を６時間振盪させることによって、ＰＬＧＡマイクロスフェアを脱製剤化した。修飾ＲＮＡの抽出のために、０．５ｍＬの水を各試料に添加し、試料を一晩振盪させた後、試料中の修飾ＲＮＡの濃度をＯＤ２６０によって判定した。抽出プロセスの回収率を判定するために、製剤化されていない第ＩＸ因子修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）（脱製剤化対照）をＤＣＭ中に添加し、脱製剤化プロセスに供した。表３０は、試料の充填およびカプセル封入効率を示す。すべてのカプセル封入効率試料を、脱製剤化対照に対して正規化した。

表３０．充填重量パーセントおよびカプセル封入効率

【表００３０】

識別子	理論上の修飾RNA充填（重量%）	実際の修飾RNA充填（重量%）	カプセル封入効率（%）
A	0.05	0.06	97.1
B	0.10	0.10	85.7
C	0.20	0.18	77.6
D	0.40	0.31	68.1
対照	–	–	100.0

Ｄ．ＰＬＧＡマイクロスフェアにカプセル封入された修飾ｍＲＮＡの放出研究

【１２１７】

第ＩＸ因子修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）とともに製剤化したＰＬＧＡマイクロスフェアを、上述のように脱製剤化し、抽出された修飾ＲＮＡの完全性を自動化電気泳動（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｅｘｐｅｒｉｏｎ）によって判定した。抽出した修飾ｍＲＮＡを、カプセル封入された修飾ｍＲＮＡの完全性を研究するために、製剤化されていない修飾ｍＲＮＡおよび脱製剤化対照に対して比較した。図４に示されるように、修飾ＲＮＡの大半が、バッチ識別子Ａ、Ｂ、Ｃ、およびＤ、脱製剤化した対照（脱製剤化対照）、ならびに製剤化されていない対照（非製剤化対照）について、無傷であった。

【１２１８】
Ｅ．ＰＬＧＡマイクロスフェアにカプセル封入された修飾ｍＲＮＡのタンパク質発現
第ＩＸ因子修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）とともに製剤化されたＰＬＧＡマイクロスフェアを、上述のように脱製剤化し、抽出された修飾ＲＮＡのタンパク質発現をインビトロトランスフェクションアッセイによって判定した。ＨＥＫ２９３細胞に、ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と複合体形成した２５０ｎｇの第ＩＸ因子修飾ＲＮＡを、三重に逆トランスフェクトした。

【１２１９】
第ＩＸ因子修飾ＲＮＡをヌクレアーゼ不含水中で２５ｎｇ／μＬの濃度に希釈し、ＲＮＡｉＭＡＸを血清不含ＥＭＥＭ中で１３．３倍希釈した。等体積の希釈修飾ＲＮＡおよび希釈ＲＮＡｉＭＡＸを、一緒に混合し、２０～３０分間室温に置いた。続いて、２５０ｎｇの第ＩＸ因子修飾ＲＮＡを含有する２０μＬのトランスフェクション混合物を、３０，０００の細胞を含有する８０μＬの細胞懸濁液に添加した。細胞を、加湿３７℃／５％ＣＯ２の細胞培養インキュベーターで１６時間インキュベートした後、細胞培養上清を収集した。細胞上清中の第ＩＸ因子のタンパク質発現を、特に第ＩＸ因子用のＥＬＩＳＡキット（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎｓ、カタログ番号ＨＦＩＸＫＴ－ＴＯＴ）によって分析し、タンパク質発現を表３１および図５に示す。試験したすべてのＰＬＧＡマイクロスフェアバッチにおいて、第ＩＸ因子修飾ＲＮＡは活性なままであり、ＰＬＧＡマイクロスフェアへの製剤化および続く脱製剤化の後に、第ＩＸ因子タンパク質を発現した。

表３１．タンパク質発現

【表００３１】

試料	第 IX 因子タンパク質発現(ng/mL)
バッチ A	0.83
バッチ B	1.83
バッチ C	1.54
バッチ D	2.52
脱製剤化対照	4.34
非製剤化対照	3.35

【１２２０】
Ｆ．ＰＬＧＡマイクロスフェアにカプセル封入された修飾ｍＲＮＡの放出研究
第ＩＸ因子修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）とともに製剤化されたＰＬＧＡマイクロスフェアを、２４ｍｇ／ｍＬのＰＬＧＡマイクロスフェア濃度まで水中に再懸濁した。再懸濁した後、１５０μＬのＰＬＧＡマイクロスフェア懸濁液を、エッペンドルフ管にアリコート化した。試料を、研究過程の間、３７℃でインキュベートおよび振盪し続けた。三連の試料を、０．２、１、２、８、１４、および２１日で取り出した。ＰＬＧＡマイクロスフェアから放出された修飾ＲＮＡの量を判定するために、試料を遠心分離し、上清を除去し、上清中の修飾ＲＮＡの濃度をＯＤ２６０によって判定した。表３２に示される放出パーセントは、各試料中の総修飾ＲＮＡ量に基づいて計算した。３１日後、第ＩＸ因子修飾ＲＮＡの９６％が、ＰＬＧＡマイクロスフェア製剤から放出された。

表３２．放出パーセント

【表００３２】

時間（日数）	放出％
0	0.0
0.2	27.0
1	37.7
2	45.3
4	50.9
8	57.0
14	61.8
21	75.5
31	96.4

【１２２１】

Ｇ．ＰＬＧＡマイクロスフェアの粒径再現性

３つのバッチの第ＩＸ因子修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）ＰＬＧＡマイクロスフェアを、表２９に示されるバッチＤに関して記載のものと同じ条件を用いて作製した（４ｍｇ／ｍＬで０．４ｍＬのＷ４、２００ｍｇ／ｍＬで２．０ｍＬのＯ１、１％で２００ｍＬのＷ２、およびＷ４／Ｏ１／Ｗ２エマルションは速度５で均質化）。ＰＬＧＡマイクロスフェア懸濁液の均質性を改善するために、遠心分離の前に濾過を組み込んだ。３時間撹拌した後、遠心分離の前に、すべての製剤化材料を１００μｍのナイロンメッシュ篩（Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔｒａｉｎｅｒ、カタログ番号２２－３６３－５４９）に通して大きな凝集物を取り除いた。水で洗浄し、再懸濁した後、１００～２００μＬのＰＬＧＡマイクロスフェア試料を、レーザー回折による製剤の粒径測定に使用した（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｍａｓｔｅｒｓｉｚｅｒ２０００）。試料の粒径を表３３に示す。

表３３．粒径の要約

【表００３３】

識別子	D10(μm)	D50(μm)	D90(μm)	体積荷重平均(μm)	濾過
対照	19.2	62.5	722.4	223.1	なし
A	9.8	31.6	65.5	35.2	あり
B	10.5	32.3	66.9	36.1	あり
C	10.8	35.7	79.8	41.4	あり

【１２２２】

濾過を用いた３つのＰＬＧＡマイクロスフェアバッチの結果を、濾過なしの同じ条件下で作製したＰＬＧＡマイクロスフェアバッチと比較した。洗浄前に濾過ステップを組み込むことで、平均粒径が減少し、３つのＰＬＧＡマイクロスフェアバッチ間で一貫した粒径分布が示された。

【１２２３】

Ｈ．第ＩＸ因子ＰＬＧＡマイクロスフェアの血清安定性

緩衝液（ＴＥ）もしくは９０％血清（Ｓｅ）中の第ＩＸ因子ｍＲＮＡ　ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）、または緩衝液、９０％血清、もしくは１％血清中のＰＬＧＡ中の第ＩＸ因子ｍＲＮＡを、緩衝液、９０％血清、または１％血清中において、総体積７０μＬ中５０ｎ

ｇ／μＬのｍＲＮＡ濃度でインキュベートした。試料を、０、３０、６０、または１２０分で取り出した。２５μＬの４倍プロテイナーゼＫ緩衝液（０．４ｍＬの１Ｍ　ＴＲＩＳ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、０．１ｍＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡ、０．１２ｍＬの５Ｍ　ＮａＣｌ、および０．４ｍＬの１０％ＳＤＳ）および８μＬのプロテイナーゼＫを２０ｍｇ／ｍＬで添加することによって、ＲＮａｓｅを５５℃で２０分間プロテイナーゼＫ消化により不活性化した。バイオアナライザーで分析する前に、第ＩＸ因子ｍＲＮＡを、沈殿させた（２５０μＬの９５％エタノールを１時間添加し、１３ｋｒｐｍで１０分間遠心分離し、上清を除去し、２００μＬの７０％エタノールをペレットに添加し、１３ｋｒｐｍで５分間再度遠心分離し、上清を除去し、ペレットを７０μＬの水中に再懸濁させた）か、またはＰＬＧＡマイクロスフェアから抽出した（１３ｋｒｐｍで５分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットを１ｍＬの水で洗浄し、１３ｋｒｐｍで５分間遠心分離し、上清を除去し、２８０μＬのジクロロメタンをペレットに添加し、１５分間振盪させ、７０μＬの水を添加し、次いで２時間振盪させ、水相を除去した）。ＰＬＧＡマイクロスフェアは、２時間にわたり、第ＩＸ因子修飾ｍＲＮＡを９０％および１％の血清中での分解から保護する。第ＩＸ因子修飾ｍＲＮＡは、開始時点で９０％の血清中で完全に分解される。

【１２２４】

実施例１７．脂質ナノ粒子のインビボ研究

Ｇ－ＣＳＦ（インビトロ転写に使用される、Ｔ７プロモーター、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、および３’ＵＴＲを有するｃＤＮＡは配列番号２１４３７に示される。ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）および第ＩＸ因子（インビトロ転写に使用される、Ｔ７プロモーター、５’ＵＴＲ、および３’ＵＴＲを有するｃＤＮＡは配列番号２１４４３に示される。ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）修飾ｍＲＮＡを、シリンジポンプ法を用いて脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化した。ＬＮＰは、最終的な脂質モル比５０：１０：３８．５：１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）で、総脂質と修飾ｍＲＮＡの重量比２０：１で製剤化した。表３４に列挙される製剤を、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入によって特徴付けた。

表３４．製剤

【表００３４】

製剤番号	NPA-029-1	NPA-030-1
修飾 mRNA	第ＩＸ因子	G-CSF
平均粒径	91 nm PDI: 0.04	106 nm PDI: 0.06
pH7.4 でのゼータ	1.8 mV	0.9 mV
カプセル封入 (RiboGr)	92%	100%

【１２２５】

ＬＮＰ製剤を、１００、１０、または１μｇの修飾ｍＲＮＡ用量でマウス（ｎ＝５）に静脈内投与した。マウスを投薬の８時間後に屠殺した。血清を、心穿刺によってＧ－ＣＳＦまたは第ＩＸ因子修飾ｍＲＮＡ製剤を投与したマウスから採取した。タンパク質発現をＥＬＩＳＡによって判定した。

【１２２６】
Ｇ－ＣＳＦまたは第ＩＸ因子の投与群に、有意な体重減少はなかった（５％未満）。Ｇ－ＣＳＦまたは第ＩＸ因子の投与群のタンパク質発現を、ＥＬＩＳＡによって標準曲線から判定した。血清試料を希釈して（Ｇ－ＣＳＦについては約２０～２５００倍および第ＩＸ因子については約１０～２５０倍）、試料が確実に標準曲線の線形範囲内に入るようにした。表３５に示されるように、ＥＬＩＳＡによって判定されたＧ－ＣＳＦタンパク質発現は、それぞれ、１、１０、および１００μｇの用量群について、約１７、１２００、および４７００ｎｇ／ｍＬであった。表３６に示されるように、ＥＬＩＳＡによって判定された第ＩＸ因子タンパク質発現は、それぞれ、１、１０、および１００μｇの用量群について、約３６、３８０、および３０００～１１０００ｎｇ／ｍＬであった。

表３５．Ｇ－ＣＳＦタンパク質発現

【表００３５】

用量(μg)	濃度(ng/mL)	希釈係数	試料体積
1	17.73	20倍	5μL
10	1204.82	2500倍	0.04μL
100	4722.20	2500倍	0.04μL

表３６．第ＩＸ因子タンパク質発現

【表００３６】

用量(μg)	濃度(ng/mL)	希釈係数	試料体積
1	36.05	10倍	5μL
10	383.04	10倍	5μL
100*	3247.75	50倍	1μL
100*	11177.20	250倍	0.2μL

【１２２７】
表３７に示されるように、上述のＬＮＰ製剤は、同じ投薬量の修飾ｍＲＮＡの静脈内（ＩＶ）リポプレックス製剤の投与、および生理食塩水中の同じ用量の修飾ｍＲＮＡの筋肉内（ＩＭ）または皮下（ＳＣ）投与と比較して、タンパク質産生に約１０，０００～１００，０００倍の増加を有する。表３７に使用される際、記号「約（～）」は、約を意味する。

表３７．タンパク質産生

【表００３７】

G-CSF	用量(μg)	血清濃度(pg/mL) 投与の8～12時間後
IM	100	～20～80
SC	100	～10～40
IV(リポプレックス)	100	～30
IV(LNP)	100	～5,000,000
IV(LNP)	10	～1,000,000
IV(LNP)	1	～20,000
第IX因子	用量(μg)	血清濃度(ng/mL) 投与の8～12時間後
IM	2x100	～1.6ng/mL
IV(LNP)	100	～3,000～10,000ng/mL
IV(LNP)	10	～400ng/mL
IV(LNP)	1	～40ng/mL

【１２２８】

実施例１８～２３の材料および方法

Ｇ－ＣＳＦ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチド（ｎｕｌｃｅｏｔｉｄｅ）のポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）およびＥＰＯ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）修飾ｍＲＮＡを、シリンジポンプ法を用いて脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化した。ＬＮＰは、最終的な脂質モル比５０：１０：３８．５：１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）で、総脂質と修飾ｍＲＮＡの重量比２０：１で製剤化した。表３８に列挙される製剤を、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入によって特徴付けた。

表３８．製剤

【表００３８】

製剤番号	NPA-030-2	NPA-060-1
修飾 mRNA	G-CSF	EPO
平均粒径	84nm PDI:0.04	85nm PDI:0.03
pH7.4でのゼータ	0.8mV	1.5mV
カプセル封入(RiboGreen)	95%	98%

【１２２９】

実施例１８．修飾ｍＲＮＡを用いた脂質ナノ粒子のインビボ研究

表３８（上述）に示されるＬＮＰ製剤を、０．０５ｍｇ／ｋｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量で、ラット（ｎ＝５）に静脈内（ＩＶ）、筋肉内（ＩＭ）、または皮下（ＳＣ）投与した。対照群のラット（ｎ＝４）は未処理であった。ラットに、２時間、８時間、２４時間、４８時間、および９６時間、ならびにそれらにＧ－ＣＳＦまたはＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した後に採血を行って、ＥＬＩＳＡによってタンパク質発現を判定した。ＥＰＯ修飾ｍＲＮＡを静脈内投与したラットを７日目にも採血した。

【１２３０】

表３９に示されるように、修飾ＥＰＯｍＲＮＡを静脈内投与したラットにおけるＥＰＯタンパク質発現は、５日に達するまで検出可能であった。修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡを静脈内投与したラットにおけるＧ－ＣＳＦは、７日まで検出可能であった。ＥＰＯ修飾ｍＲＮＡの皮下および筋肉内投与は、少なくとも２４時間まで検出可能であり、Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡは、少なくとも８時間まで検出可能であった。表３９において、「ＯＳＣ」は標準曲線の外側であった値を指し、「ＮＴ」は未試験を意味する。

表３９．Ｇ－ＣＳＦおよびＥＰＯのタンパク質発現

【表００３９】

経路	時間	EPO 血清濃度 (pg/mL)	G-CSF 血清濃度 (pg/mL)
IV	2 時間	36,981.0	31,331.9
IV	8 時間	62,053.3	70,532.4
IV	24 時間	42,077.0	5,738.6
IV	48 時間	5,561.5	233.8
IV	5 日	0.0	60.4
IV	7 日	0.0	NT
IM	2 時間	1395.4	1620.4
IM	8 時間	8974.6	7910.4
IM	24 時間	4678.3	893.3
IM	48 時間	NT	OSC
IM	5 日	NT	OSC
SC	2 時間	386.2	80.3
SC	8 時間	985.6	164.2
SC	24 時間	544.2	OSC
SC	48 時間	NT	OSC
SC	5 日	NT	OSC
未処理	全採血	0	0

【１２３１】

実施例１９．経時的インビボ研究

表３８（上述）に示されるＬＮＰ製剤を、０．５、０．０５、または０．００５ｍｇ／ｋｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量で、マウス（ｎ＝５）に静脈内（ＩＶ）投与した。マウスに、Ｇ－ＣＳＦまたはＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した８時間、２４時間、７２時間、および６日後に採血を行って、ＥＬＩＳＡを用いてタンパク質発現を判定した。

【１２３２】

表４０に示されるように、修飾ｍＲＮＡを静脈内投与したマウスにおけるＥＰＯおよびＧ－ＣＳＦタンパク質発現は、０．００５ｍｇ／ｋｇおよび０．０５ｍｇ／ｋｇの修飾ｍＲＮＡを投与したマウスでは７２時間に達するまで、かつＥＰＯ修飾ｍＲＮＡを投与したマウスでは６日に達するまで検出可能であった。表４０において、「＞」は、それよりも大きいことを意味し、「ＮＤ」は検出されなかったことを意味する。

表４０．タンパク質発現

【表００４０】

用量 (mg/kg)	時間	EPO 血清濃度 (pg/mL)	G-CSF 血清濃度 (pg/mL)
0.005	8 時間	12,508.3	11,550.6
0.005	24 時間	6,803.0	5,068.9
0.005	72 時間	ND	ND
0.005	6 日	ND	ND
0.05	8 時間	92,139.9	462,312.5
0.05	24 時間	54,389.4	80,903.8
0.05	72 時間	ND	ND
0.05	6 日	ND	ND
0.5	8 時間	498,515.3	>1,250,000
0.5	24 時間	160,566.3	495,812.5
0.5	72 時間	3,492.5	1,325.6
0.5	6 日	21.2	ND

【１２３３】

実施例２０．齧歯動物におけるＬＮＰ製剤のインビボ研究

Ａ．マウスにおけるＬＮＰ製剤

表３８（上述）に示されるＬＮＰ製剤を、０．０５ｍｇ／ｋｇまたは０．００５ｍｇ／ｋｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量で、マウス（ｎ＝４）に静脈内（ＩＶ）投与した。未処理の対照マウス群（ｎ＝４）も３つ存在した。マウスに、Ｇ－ＣＳＦまたはＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した２時間、８時間、２４時間、４８時間、および７２時間後に採血を行って、タンパク質発現を判定した。Ｇ－ＣＳＦおよびＥＰＯのタンパク質発現を、ＥＬＩＳＡを用いて判定した。

【１２３４】

表４１に示されるように、マウスにおけるＥＰＯおよびＧ－ＣＳＦのタンパク質発現は、０．００５ｍｇ／ｋｇの用量の修飾ＲＮＡを受容したマウスでは少なくとも４８時間に達するまで、および０．０５ｍｇ／ｋｇの用量の修飾ＲＮＡを受容したマウスでは７２時間まで、検出可能であった。表４１において、「ＯＳＣ」は標準曲線の外側であった値を指し、「ＮＴ」は未試験を意味する。

表４１．マウスにおけるタンパク質発現

【表００４１】

用量(mg/kg)	時間	EPO血清濃度(pg/mL)	G-CSF血清濃度(pg/mL)
0.005	2時間	OSC	3,447.8
0.005	8時間	1,632.8	11,454.0
0.005	24時間	1,141.0	4,960.2
0.005	48時間	137.4	686.4
0.005	72時間	0	NT
0.05	2時間	10,027.3	20,951.4
0.05	8時間	56,547.2	70,012.8
0.05	24時間	25,027.3	19,356.2
0.05	48時間	1,432.3	1,963.0
0.05	72時間	82.2	47.3

【１２３５】

Ｂ．齧歯動物におけるＬＮＰ製剤

表３８（上述）に示されるＬＮＰ製剤を、０．０５ｍｇ／ｋｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量で、ラット（ｎ＝４）に静脈内（ＩＶ）投与する。未処理の対照ラット群（ｎ＝４）も存在する。ラットに、Ｇ－ＣＳＦまたはＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した２時間、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、および１４日後に採血を行って、タンパク質発現を判定する。Ｇ－ＣＳＦおよびＥＰＯのタンパク質発現を、ＥＬＩＳＡを用いて判定する。

【１２３６】

実施例２１．ＬＮＰの早期経時的研究

表３８（上述）に示されるＬＮＰ製剤を、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、または０．００５ｍｇ／ｋｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量で、哺乳動物に静脈内（ＩＶ）、筋肉内（ＩＭ）、または皮下（ＳＣ）投与する。対照哺乳動物群は未処理である。哺乳動物に、修飾ｍＲＮＡ　ＬＮＰ製剤を投与した５分、１０分、２０分、３０分、４５分、１時間、１．５時間、および／または２時間後に、採血を行って、ＥＬＩＳＡを用いてタンパク質発現を判定する。さらに、哺乳動物に採血を行い、顆粒球レベルおよび赤血球数等の全血球数を判定する。

【１２３７】

実施例２２．非ヒト霊長類のインビボ研究。

表３８（上述）に示されるＬＮＰ製剤を、必要に応じてシリンジ／ａｂｂｏｃａｔｈまたはバタフライに取り付けることができる皮下注射針を用いて約３０秒間にわたる静脈内ボーラス注入（ＩＶ）として非ヒト霊長類（ＮＨＰ）（カニクイザル）（ｎ＝２）に投与した。ＮＨＰに、０．５ｍＬ／ｋｇの投薬量で、０．０５ｍｇ／ｋｇのＥＰＯもしくはＧ－ＣＳＦ、または０．００５ｍｇ／ｋｇのＥＰＯの単回修飾ｍＲＮＡ　ＩＶ用量を投与した。ＮＨＰに、修飾ｍＲＮＡ　ＬＮＰ製剤を投薬する５～６日前に採血を行って、血清中のタンパク質発現およびベースラインの全血球数を判定した。修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した後、８、２４、４８、および７２時間でＮＨＰに採血を行い、タンパク質発現を判定した。投与の２４および７２時間後には、ＮＨＰの全血球数もまた判定した。Ｇ－ＣＳＦお

よびＥＰＯのタンパク質発現をＥＬＩＳＡによって判定した。ＮＨＰの尿を、実験の全過程にわたり採取し、分析して臨床的安定性を評価した。ＮＨＰにＧ－ＣＳＦまたはＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した後に、それらから試料を採取して、ＥＬＩＳＡを用いてタンパク質発現を判定した。非ヒト霊長類の臨床化学、血液学、尿検査、およびサイトカインについても分析した。

【１２３８】

表４２に示されるように、０．０５ｍｇ／ｋｇを投与したＮＨＰにおけるＥＰＯタンパク質発現は、７２時間に達するまで検出可能であり、０．００５ｍｇ／ｋｇのＥＰＯ製剤の投薬では、４８時間に達するまで検出可能である。表４２において、「＜」は、所与の値未満であることを意味する。Ｇ－ＣＳＦタンパク質発現は、修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した２４時間後まで見られた。予備的に、顆粒球および網状赤血球のレベルの増加が、修飾ｍＲＮＡ製剤の投与後にＮＨＰに見られた。

表４２．非ヒト霊長類におけるタンパク質発現

【表００４２】

修飾 mRNA	用量 (mg/kg)	時間	雌 NHP の血清濃度 (pg/mL)	雄 NHP の血清濃度 (pg/mL)	平均血清濃度 (pg/mL)
G-CSF	0.05	採血前	0	0	0
		8 時間	3289	1722	2,506
		24 時間	722	307	515
		48 時間	0	0	0
		72 時間	0	0	0
EPO	0.05	採血前	0	0	0
		8 時間	19,858	7,072	13,465
		24 時間	18,178	4,913	11,546
		48 時間	5,291	498	2,895
		72 時間	744	60	402
EPO	0.005	採血前	0	0	0
		8 時間	523	250	387
		24 時間	302	113	208
		48 時間	<7.8	<7.8	<7.8
		72 時間	0	0	0

【１２３９】

実施例２３．Ｇ－ＣＳＦおよびＥＰＯに関する非ヒト霊長類のインビボ研究

表３８（上述）に示されるＬＮＰ製剤を、静脈内注入（ＩＶ）として、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）（カニクイザル）（ｎ＝２）に投与した。ＮＨＰに、０．５ｍＬ／ｋｇの投薬量で、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、または０．００５ｍｇ／ｋｇのＧ－ＣＳＦまたはＥＰＯの単回修飾ｍＲＮＡ　ＩＶ用量を投与した。ＮＨＰに、修飾ｍＲＮＡ　ＬＮＰ製剤を投薬する前に採血を行って、血清中のタンパク質発現およびベースラインの全血球数を判定した。Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した後、８、２４、４８、および７２時間でＮＨＰに採血を行い、タンパク質発現を判定した。ＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した後、８、２４、４８、７２時間、および７日でＮＨＰに採血を行い、タンパク質発現を判定した。

【１２４０】

ＮＨＰにＧ－ＣＳＦまたはＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した後に採取した試料を、ＥＬＩＳＡによって分析してタンパク質発現を判定した。好中球および網状赤血球の数も、Ｇ－ＣＳＦまたはＥＰＯ製剤の投与前、投与の２４時間、３日、７日、１４日、および１８日後に判定した。

【１２４１】
表４３に示されるように、Ｇ－ＣＳＦタンパク質発現は、７２時間を超えると検出されなかった。表４３において、「＜３９」とは、検出下限である３９ｐｇ／ｍＬよりも低い値を指す。
表４３．Ｇ－ＣＳＦタンパク質発現
【表００４３】

修飾 mRNA	用量 (mg/kg)	時間	雌 NHP の血清 G-CSF 濃度 (pg/mL)	雄 NHP の血清 G-CSF 濃度 (pg/mL)
G-CSF	0.5	採血前	<39	<39
		8 時間	43,525	43,594
		24 時間	11,374	3,628
		48 時間	1,100	833
		72 時間	<39	306
G-CSF	0.05	採血前	<39	<39
		8 時間	3,289	1,722
		24 時間	722	307
		48 時間	<39	<39
		72 時間	<39	<39
G-CSF	0.005	採血前	<39	<39
		8 時間	559	700
		24 時間	155	<39
		48 時間	<39	<39
		72 時間	<39	<39

【１２４２】
表４４に示されるように、ＥＰＯタンパク質発現は、７日を超えると検出されなかった。表４４において、「＜７．８」とは、検出下限である７．８ｐｇ／ｍＬよりも低い値を指す。
表４４．ＥＰＯタンパク質発現

【表００４４】

修飾ｍＲＮＡ	用量 (mg/kg)	時間	雌 NHP の血清 EPO 濃度 (pg/mL)	雄 NHP の血清 EPO 濃度 (pg/mL)
EPO	0.5	採血前	<7.8	<7.8
		8 時間	158,771	119,086
		24 時間	133,978	85,825
		48 時間	45,250	64,793
		72 時間	15,097	20,407
		7 日	<7.8	<7.8
EPO	0.05	採血前	<7.8	<7.8
		8 時間	19,858	7,072
		24 時間	18,187	4,913
		48 時間	5,291	498
		72 時間	744	60
		7 日	<7.8	<7.8
EPO	0.005	採血前	<7.8	<7.8
		8 時間	523	250
		24 時間	302	113
		48 時間	11	29
		72 時間	<7.8	<7.8
		7 日	<7.8	<7.8

【１２４３】

表４５に示されるように、すべてのＧ－ＣＳＦ群で、投薬前のレベルと比較して、好中球の増加があった。

表４５．ＮＨＰにおけるＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００４５】

用量 (mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF)の好中球 (10^9/L)	雌 NHP(G-CSF)の好中球 (10^9/L)	雄 NHP(EPO)の好中球 (10^9/L)	雌 NHP(EPO)の好中球 (10^9/L)
0.5	投薬前	1.53	1.27	9.72	1.82
	24時間	14.92	13.96	7.5	11.85
	3日	9.76	13.7	11.07	5.22
	7日	2.74	3.81	11.8	2.85
	14/18日	2.58	1.98	7.16	2.36
0.05	投薬前	13.74	3.05	0.97	2.15
	24時間	19.92	29.91	2.51	2.63
	3日	7.49	10.77	1.73	4.08
	7日	4.13	3.8	1.23	2.77
	14/18日	3.59	1.82	1.53	1.27
0.005	投薬前	1.52	2.54	5.46	5.96
	24時間	16.44	8.6	5.37	2.59
	3日	3.74	1.78	6.08	2.83
	7日	7.28	2.27	3.51	2.23
	14/18日	4.31	2.28	1.52	2.54

【１２４４】

表４６に示されるように、すべてのＥＰＯ群で、投薬の２４時間後の網状赤血球レベルと比較して、投薬の３日～１４／１８日後の網状赤血球の増加があった。

表４６．好中球数に対するＥＰＯ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００４６】

用量 (mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF)の好中球 (10^{12}/L)	雌 NHP(G-CSF)の好中球 (10^{12}/L)	雄 NHP(EPO)の好中球 (10^{12}/L)	雌 NHP(EPO)の好中球 (10^{12}/L)
0.5	投薬前	0.067	0.055	0.107	0.06
	24時間	0.032	0.046	0.049	0.045
	3日	0.041	0.017	0.09	0.064
	7日	0.009	0.021	0.35	0.367
	14/18日	0.029	0.071	0.066	0.071
0.05	投薬前	0.055	0.049	0.054	0.032
	24時間	0.048	0.046	0.071	0.04
	3日	0.101	0.061	0.102	0.105
	7日	0.157	0.094	0.15	0.241
	14/18日	0.107	0.06	0.067	0.055
0.005	投薬前	0.037	0.06	0.036	0.052
	24時間	0.037	0.07	0.034	0.061
	3日	0.037	0.054	0.079	0.118
	7日	0.046	0.066	0.049	0.087
	14/18日	0.069	0.057	0.037	0.06

【１２４５】

表４７～４９に示されるように、ＥＰＯ修飾ＲＮＡの投与は、ヘモグロビン（ＨＧＢ）、ヘマトクリット（ＨＣＴ）、および赤血球（ＲＢＣ）数を含む、他の赤血球形成パラメータに対して効果を有した。

表４７．ヘモグロビンに対するＥＰＯ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００４７】

用量 (mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF) の HGB(g/L)	雌 NHP(G-CSF) の HGB(g/L)	雄 NHP(EPO)の HGB(g/L)	雌 NHP(EPO) の HGB(g/L)
0.5	投薬前	133	129	134	123
	24 時間	113	112	127	108
	3 日	118	114	126	120
	7 日	115	116	140	134
	14/18 日	98	113	146	133
0.05	投薬前	137	129	133	133
	24 時間	122	117	123	116
	3 日	126	115	116	120
	7 日	126	116	126	121
	14/18 日	134	123	133	129
0.005	投薬前	128	129	132	136
	24 時間	117	127	122	128
	3 日	116	127	125	130
	7 日	116	129	119	127
	14/18 日	118	129	128	129

表４８．ヘマトクリットに対するＥＰＯ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００４８】

用量 (mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF)の HCT(L/L)	雌 NHP(G-CSF)の HCT(L/L)	雄 NHP(EPO)の HCT(L/L)	雌 NHP(EPO)の HCT(L/L)
0.5	投薬前	0.46	0.43	0.44	0.4
	24 時間	0.37	0.38	0.4	0.36
	3 日	0.39	0.38	0.41	0.39
	7 日	0.39	0.38	0.45	0.45
	14/18 日	0.34	0.37	0.48	0.46
0.05	投薬前	0.44	0.44	0.45	0.43
	24 時間	0.39	0.4	0.43	0.39
	3 日	0.41	0.39	0.38	0.4
	7 日	0.42	0.4	0.45	0.41
	14/18 日	0.44	0.4	0.46	0.43
0.005	投薬前	0.42	0.42	0.48	0.45
	24 時間	0.4	0.42	0.42	0.43
	3 日	0.4	0.41	0.44	0.42
	7 日	0.39	0.42	0.41	0.42
	14/18 日	0.41	0.42	0.42	0.42

表４９．赤血球に対するＥＰＯ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００４９】

用量 (mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF)の RBC(10^{12}/L)	雌 NHP(G-CSF)の RBC(10^{12}/L)	雄 NHP(EPO)の RBC(10^{12}/L)	雌 NHP(EPO)の RBC(10^{12}/L)
0.5	投薬前	5.57	5.57	5.43	5.26
	24時間	4.66	4.96	5.12	4.69
	3日	4.91	4.97	5.13	5.15
	7日	4.8	5.04	5.55	5.68
	14/18日	4.21	4.92	5.83	5.72
0.05	投薬前	5.68	5.64	5.57	5.84
	24時間	4.96	5.08	5.25	5.18
	3日	5.13	5.04	4.81	5.16
	7日	5.17	5.05	5.37	5.31
	14/18日	5.43	5.26	5.57	5.57
0.005	投薬前	5.67	5.36	6.15	5.72
	24時間	5.34	5.35	5.63	5.35
	3日	5.32	5.24	5.77	5.42
	7日	5.25	5.34	5.49	5.35
	14/18日	5.37	5.34	5.67	5.36

【１２４６】

表５０および５１に示されるように、修飾ＲＮＡの投与は、アラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ（ＡＳＴ）を含む血清化学パラメータに対して効果を有した。

表５０．アラニントランスアミナーゼに対するＥＰＯ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００５０】

用量(mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF)の ALT(U/L)	雌 NHP(G-CSF)の ALT(U/L)	雄 NHP(EPO)の ALT(U/L)	雌 NHP(EPO)の ALT(U/L)
0.5	投薬前	29	216	50	31
	2日	63	209	98	77
	4日	70	98	94	87
	7日	41	149	60	59
	14日	43	145	88	44
0.05	投薬前	58	53	56	160
	2日	82	39	95	254
	4日	88	56	70	200
	7日	73	73	64	187
	14日	50	31	29	216
0.005	投薬前	43	51	45	45
	2日	39	32	62	48
	4日	48	58	48	50
	7日	29	55	21	48
	14日	44	46	43	51

表５１．アスパラギン酸トランスアミナーゼに対するＥＰＯ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００５１】

用量 (mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF)の AST(U/L)	雌 NHP(G-CSF)の AST(U/L)	雄 NHP(EPO)の AST(U/L)	雌 NHP(EPO)の AST(U/L)
0.5	投薬前	32	47	59	20
	2日	196	294	125	141
	4日	67	63	71	60
	7日	53	68	56	47
	14日	47	67	82	44
0.05	投薬前	99	33	74	58
	2日	95	34	61	80
	4日	69	42	48	94
	7日	62	52	53	78
	14日	59	20	32	47
0.005	投薬前	35	54	39	40
	2日	70	34	29	25
	4日	39	36	43	55
	7日	28	31	55	31
	14日	39	20	35	54

【１２４７】

表５２に示されるように、高用量（０．５ｍｇ／ｋｇ）での脂質ナノ粒子－製剤化修飾ＲＮＡの投与は、修飾ｍＲＮＡの投与後に、サイトカインすなわちインターフェロンα（ＩＦＮ－α）の増加を引き起こした。

表５２．アラニントランスアミナーゼに対するＥＰＯ　ｍＲＮＡの薬理学的効果

【表００５２】

用量 (mg/kg)	時間	雄 NHP(G-CSF)の IFN-α (pg/mL)	雌 NHP(G-CSF)の IFN-α (pg/mL)	雄 NHP(EPO)の IFN-α (pg/mL)	雌 NHP(EPO)の IFN-α (pg/mL)
0.5	投薬前	0	0	0	0
	1日目+8時間	503.8	529.2	16.79	217.5
	4日	0	0	0	0
0.05	投薬前	0	0	0	0
	1日目+8時間	0	0	0	0
	4日	0	0	0	0
0.005	投薬前	0	0	0	0
	1日目+8時間	0	0	0	0
	4日	0	0	0	0

【１２４８】

実施例２４．非ヒト霊長類における筋肉内および／または皮下投与の研究

生理食塩水中に修飾ＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）またはＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を含有する製剤を、非ヒト霊長類（カニクイザル）（ＮＨＰ）に筋肉内（ＩＭ）または皮下（ＳＣ）投与した。０．０５ｍｇ／ｋｇまたは０．００５ｍｇ／ｋｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量は、０．５ｍＬ／ｋｇの投薬量でのものであった。非ヒト霊長類に、投薬の５～６日前に採血を行って、血清タンパク質濃度およびベースラインの全血球数を判定する。修飾ｍＲＮＡ製剤を投与した後、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、７日、および１４日でＮＨＰに採血を行い、タンパク質発現を判定する。Ｇ－ＣＳＦおよびＥＰＯのタンパク質発現を、ＥＬＩＳＡによって判定する。投与の２４時間、７２時間、７日、および１４日後に、ＮＨＰの全血球数もまた判定する。全実験過程にわたってＮＨＰから尿を採取し、分析して臨床的安定性を評価する。注入部位付近の組織もまた採取し、分析してタンパク質発現を判定する。

【１２４９】

実施例２５．修飾ｍＲＮＡの輸送

修飾ｍＲＮＡの局在化および／または輸送を判定するために、次のように研究を行うことができる。

【１２５０】

ｓｉＲＮＡおよび修飾ｍＲＮＡのＬＮＰ製剤を、当技術分野で既知および／または本明細書に記載の方法に従って製剤化する。ＬＮＰ製剤には、Ｇ－ＣＳＦ、ＥＰＯ、第ＶＩＩ因子等のタンパク質、および／または本明細書に記載の任意のタンパク質をコードし得る少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡが含まれ得る。製剤は、筋肉内または皮下注入を用いて、哺乳動物の筋肉内に局所投与することができる。修飾ｍＲＮＡの用量およびＬＮＰの大きさは、哺乳動物の身体への輸送を判定するため、および／または炎症等であるがこれに限定されない生物学的反応に対する影響を評価するために、多様であり得る。哺乳動物に、異なる時点で採血を行って、血清中に存在する投与されたｍＲＮＡによってコードされるタンパク質の発現を判定する、および／または哺乳動物における全血球数を判定することができる。

【１２５１】

例えば、肝臓内で発現し血清中に分泌される第ＶＩＩ因子をコードする修飾ｍＲＮＡを、筋肉内および／または皮下投与することができる。修飾ｍＲＮＡ投与と同時かまたはその前に、ｓｉＲＮＡを投与して、内因性第ＶＩＩ因子をノックアウトする。血液中の修飾ｍＲＮＡの筋肉内および／または皮下注入により生じる第ＶＩＩ因子を投与し、測定する。さらに、注入部位付近の組織における第ＶＩＩ因子のレベルも測定する。第ＶＩＩ因子が血液中に発現する場合、修飾ｍＲＮＡの輸送が存在する。第ＶＩＩ因子が組織中に発現するが血液中には発現しない場合、第ＶＩＩ因子の局所発現のみが存在する。

【１２５２】

実施例２６．複数の修飾ｍＲＮＡの製剤

修飾ｍＲＮＡのＬＮＰ製剤を、当技術分野で既知および／または本明細書に記載もしくは当技術分野で既知の方法に従って製剤化する。ＬＮＰ製剤には、Ｇ－ＣＳＦ、ＥＰＯ、トロンボポエチン等のタンパク質、および／または本明細書に記載の任意のタンパク質をコードし得る、少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡが含まれ得る。少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡには、１、２、３、４、または５つの修飾ｍＲＮＡ分子が含まれ得る。少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡを含有する製剤は、単回または複数回の投薬レジメンで、静脈内、筋肉内、または皮下投与することができる。血液および／または血清等であるがこれらに限定されない生体試料を、少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡ製剤の投与の前および／後の様々な時点で採取し、分析することができる。タンパク質をコードする少なくとも１つの修飾ｍＲＮＡを含有する製剤を哺乳動物に投与した後、５０～２００ｐｇ／ｍＬの生体試料にお

ける前記タンパク質の発現は、生物学的に有効であると考えられるであろう。

【１２５３】

実施例２７．ポリエチレングリコール比の研究

Ａ．ＰＥＧ　ＬＮＰの製剤化および特徴付け

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を、シリンジポンプ法を用いて製剤化した。ＬＮＰを、総脂質と修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）の重量比２０：１で製剤化した。製剤のモル比範囲を、表５３に示す。

表５３．モル比

【表００５３】

	DLin-KC2-DMA	DSPC	コレステロール	PEG-c-DOMG
モルパーセント(mol%)	50.0	10.0	37～38.5	1.5～3

【１２５４】

２種類のＰＥＧ脂質、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＮＯＦカタログ番号ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）ＧＭ－０２０）および１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＳＧ、ＮＯＦカタログ番号ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）ＧＳ－０２０）を、１．５または３．０ｍｏｌ％で試験した。ＬＮＰの形成および修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡのカプセル封入の後、ＬＮＰ製剤を、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入率によって特徴付けし、結果を表５４に示す。

表５４．ＬＮＰ製剤の特徴付け

【表００５４】

製剤番号	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1
脂質	PEG-DMG 1.5%	PEG-DMG 3%	PEG-DSA 1.5%	PEG-DSA 3%
平均粒径	95nm PDI:0.01	85nm PDI:0.06	95nm PDI:0.08	75nm PDI:0.08
pH7.4でのゼータ	-1.1mV	-2.6mV	1.7mV	0.7mV
カプセル封入(RiboGreen)	88%	89%	98%	95%

Ｂ．ＰＥＧ　ＬＮＰのインビボスクリーニング

【１２５５】

表５５に記載のＰＥＧ　ＬＮＰの製剤を、０．５ｍｇ／ｋｇの用量で、マウス（ｎ＝５）に静脈内投与した。血清を、製剤を投与した２時間、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、および８日後にマウスから採取した。血清をＥＬＩＳＡによって分析してＧ－ＣＳＦのタンパク質発現を判定し、発現レベルを表５５に示す。ＰＥＧ－ＤＭＧを用いたＬＮＰ製剤は、実質的にＰＥＧ－ＤＳＡを用いたＬＮＰ製剤よりも高いレベルのタンパク質発現を呈した。

表５５．タンパク質発現

【表００５５】

脂質	製剤番号	時間	タンパク質発現 (pg/ml)
PEG-DMG, 1.5%	NPA-071-1	2時間	114,102
		8時間	357,944
		24時間	104,832
		48時間	6,697
		72時間	980
		8日	0
PEG-DMG, 3%	NPA-072-1	2時間	154,079
		8時間	354,994
		24時間	164,311
		48時間	13,048
		72時間	1,182
		8日	13
PEG-DSA, 1.5%	NPA-073-1	2時間	3,193
		8時間	6,162
		24時間	446
		48時間	197
		72時間	124
		8日	5
PEG-DSA, 3%	NPA-074-1	2時間	259
		8時間	567
		24時間	258
		48時間	160
		72時間	328
		8日	33

【１２５６】

実施例２８．カチオン性脂質製剤研究

Ａ．カチオン性脂質ナノ粒子の製剤化および特徴付け

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を、シリンジポンプ法を用いて製剤化した。ＬＮＰを、２０：１の総脂質と修飾ｍＲＮＡの重量比で製剤化した。カチオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧの最終的な脂質のモル比範囲を、表５６に概略説明する。

表５６．モル比

【表００５６】

	カチオン性脂質	DSPC	コレステロール	PEG-c-DOMG
モルパーセント(mol%)	50.0	10.0	38.5	1.5

【１２５７】

エタノール中２５ｍＭの脂質溶液およびｐＨ３で５０ｍＭのクエン酸塩中の修飾ＲＮＡ

を混合して、自発的小胞形成をもたらした。小胞をエタノール中で安定化させた後に、エタノールを除去し、透析による緩衝液交換を行った。次いで、ＬＮＰを、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入率によって特徴付けた。表５７は、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、またはＣ１２－２００をカチオン性脂質として使用して、ＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）またはＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチド（ｎｕｃｌｅｏｔｄｉｅ）のポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）をカプセル封入したＬＮＰの特徴付けについて記載する。

表５７．カチオン性脂質製剤の特徴付け

【表００５７】

製剤番号.	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1	NPA-075-1	NPA-076-1
脂質	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-DMA	DLin-DMA	C12-200	C12-200
修飾 RNA	EPO	G-CSF	EPO	G-CSF	EPO	G-CSF
平均粒径	89 nm PDI: 0.07	96 nm PDI: 0.08	70 nm PDI: 0.04	73 nm PDI: 0.06	97 nm PDI: 0.05	103 nm PDI: 0.09
pH7.4 でのゼータ	-1.1 mV	-1.4 mV	-1.6 mV	-0.4 mV	1.4 mV	0.9 mV
カプセル封入(RiboGreen)	100%	100%	99%	100%	88%	98%

【１２５８】

Ｂ．カチオン性ＬＮＰ製剤のインビボスクリーニング

表５７に記載されるカチオン性脂質製剤の製剤を、０．５ｍｇ／ｋｇの用量で、マウス（ｎ＝５）に静脈内投与した。血清を、製剤を投与した２時間、２４時間、７２時間、および／または７日後にマウスから採取した。血清をＥＬＩＳＡによって分析してＥＰＯまたはＧ－ＣＳＦのタンパク質発現を判定し、発現レベルを表５８に示す。

表５８．タンパク質発現

【表００５８】

修飾 mRNA	製剤番号	時間	タンパク質発現 (pg/ml)
EPO	NPA-071-1	2 時間	304,190.0
		24 時間	166,811.5
		72 時間	1,356.1
		7 日	20.3
EPO	NPA-073-1	2 時間	73,852.0
		24 時間	75,559.7
		72 時間	130.8
EPO	NPA-075-1	2 時間	413,010.2
		24 時間	56,463.8
G-CSF	NPA-072-1	2 時間	62,113.1
		24 時間	53,206.6
G-CSF	NPA-074-1	24 時間	25,059.3
G-CSF	NPA-076-1	2 時間	219,198.1
		24 時間	8,470.0

【１２５９】

カチオン性脂質Ｃ１２－２００（ＮＰＡ－０７５－１およびＮＰＡ－０７６－１）を用いたＬＮＰ製剤を投与したマウスに毒性が確認され、これらは、矮小な被毛、萎縮挙動、および１０％を上回る体重減少といった症状を示したため、２４時間で屠殺した。Ｃ１２－２００は、より毒性であると予測されていたが、短期間で高レベルの発現も有した。カチオン性脂質ＤＬｉｎ－ＤＭＡ（ＮＰＡ－０７３－１およびＮＰＡ－０７４－１）は、試験した３つのカチオン性脂質の中で最も低い発現を有した。ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＮＰＡ－０７１－１およびＮＰＡ－０７２－１）は、３日目まで良好な発現を示し、ＥＰＯ製剤については７日に達するまでバックグラウンド試料を上回った。

【１２６０】

実施例２９．タンパク質発現のスクリーニング方法

Ａ．エレクトロスプレーイオン化

対象に投与した修飾ＲＮＡによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料を調製し、１、２、３、または４個の質量分析器を用いて、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）のための製造業者のプロトコルに従って分析する。生体試料はまた、タンデムＥＳＩ質量分析システムを用いて分析することもできる。

タンパク質断片のパターン、または総タンパク質を、所与のタンパク質について既知の対照と比較し、素性を比較により判定する。

【１２６１】

Ｂ．マトリックス支援レーザー脱離／イオン化

対象に投与した修飾ＲＮＡによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料を調製し、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化（ＭＡＬＤＩ）のための製造業者のプロトコルに従って分析する。

【１２６２】

タンパク質断片のパターン、または総タンパク質を、所与のタンパク質について既知の対照と比較し、素性を比較により判定する。

【１２６３】

Ｃ．液体クロマトグラフィータンデム質量分析（Ｌｉｑｕｉｄ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ－Ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ－Ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ）

修飾ＲＮＡをによってコードされるタンパク質を含有し得る生体試料を、トリプシン酵素で処理して、中に含有されるタンパク質を消化させる。結果として得られるペプチドを、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）によって分析する。ペプチドを断片化して質量分析計に入れ、コンピュータアルゴリズムを介してタンパク質配列のデータベースとマッチさせることが可能な特徴的なパターンを生成する。消化した試料を希釈して、所与のタンパク質について１ｎｇ以下の出発物質を得ることができる。単純な緩衝液のバックグラウンド（例えば、水または揮発性塩）を含有する生体試料は、直接的な溶液中での消化に適しており、より複雑なバックグラウンド（例えば、界面活性剤、不揮発性塩、グリセロール）は、試料分析を容易にするための追加の浄化ステップを要する。

【１２６４】

タンパク質断片のパターン、または総タンパク質を、所与のタンパク質について既知の対照と比較し、素性を比較により判定する。

【１２６５】

実施例３０．脂質ナノ粒子のインビボ研究

ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４４に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、シリンジポンプ法を用いて脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化した。ＬＮＰは、最終的な脂質のモル比５０：１０：３８．５：１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）で、総脂質と修飾ｍＲＮＡの重量比２０：１で製剤化した。表５９に列挙されるｍＣｈｅｒｒｙ製剤を、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入によって特徴付けた。

表５９．ｍＣｈｅｒｒｙ製剤

【表００５９】

製剤番号	NPA-003-5
修飾 mRNA	mCherry
平均粒径	105nm PDI:0.09
pH7.4 でのゼータ	1.8mV
カプセル封入 (RiboGr)	100%

【１２６６】

ＬＮＰ製剤を、１００μｇの修飾ｍＲＮＡ用量で、マウス（ｎ＝５）に静脈内投与した。マウスを投薬の２４時間後に屠殺した。ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与したマウスからの肝臓および脾臓を、免疫組織化学（ＩＨＣ）、ウエスタンブロット、または蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって分析した。

【１２６７】

肝臓の組織学は、切片全体で均一なｍＣｈｅｒｒｙ発現を示したが、未処理の動物はｍＣｈｅｒｒｙを発現しなかった。また、ウエスタンブロットを使用して、処理動物におけるｍＣｈｅｒｒｙの発現を確認したが、ｍＣｈｅｒｒｙは未処理動物には検出されなかった。チューブリンを対照マーカーとして使用し、これは処理および未処理の両方のマウスに検出され、肝細胞における正常なタンパク質発現は影響を受けていなかったことが示された。

【１２６８】

さらに、ＦＡＣＳおよびＩＨＣもｍＣｈｅｒｒｙおよび未処理のマウスの脾臓に行った。ＦＡＣＳ分析により、すべての白血球細胞集団がｍＣｈｅｒｒｙ発現において陰性であった。また、ＩＨＣにより、ｍＣｈｅｒｒｙ処理マウスと未処理マウスとの間で、脾臓に

おいて脾臓において観察できる差は存在しなかった。

【１２６９】

実施例３１．シリンジポンプインビボ研究

ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、シリンジポンプ法を用いて脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化する。ＬＮＰは、最終的な脂質のモル比５０：１０：３８．５：１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）で、総脂質と修飾ｍＲＮＡの重量比２０：１で製剤化する。ｍＣｈｅｒｒｙ製剤を、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入によって特徴付ける。

【１２７０】

ＬＮＰ製剤を、１０または１００μｇの修飾ｍＲＮＡ用量でマウス（ｎ＝５）に静脈内投与する。マウスを投薬の２４時間後に屠殺する。ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ製剤を投与したマウスからの肝臓および脾臓を、免疫組織化学（ＩＨＣ）、ウエスタンブロット、および／または蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって分析する。

【１２７１】

実施例３２．インビトロおよびインビボ発現

Ａ．リピドイド製剤を用いたヒト細胞におけるインビトロ発現

インビトロトランスフェクションについて試験するために使用されるｍｍＲＮＡとリピドイドの比を、異なるリピドイド：ｍｍＲＮＡ比で実験的に試験する。ｓｉＲＮＡおよびリピドイドを用いた以前の研究では、２．５：１、５：１、１０：１、および１５：１のリピドイド：ｓｉＲＮＡの重量：重量比を用いていた。ｓｉＲＮＡと比較してｍｍＲＮＡの長さがより長いことを考慮すると、より低いリピドイドとｍｍＲＮＡの重量：重量比が有効であり得る。さらに、比較のために、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）またはＴＲＡＮＳＩＴ－ｍＲＮＡ（Ｍｉｒｕｓ　Ｂｉｏ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）カチオン性脂質送達ビヒクルを用いたｍｍＲＮＡもまた製剤化した。

【１２７２】

所望のタンパク質産物を発現する、リピドイド製剤化したルシフェラーゼ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される通り；ｍＲＮＡ配列は　配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４７に示される通り；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４８に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）、Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、およびＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）の能力を、ルシフェラーゼ発現については発光、ＧＦＰ発現についてはフローサイトメトリー、ならびにＧ－ＣＳＦおよびエリスロポエチン（ＥＰＯ）の分泌についてはＥＬＩＳＡによって、確認することができる。

【１２７３】

Ｂ．静脈内注入後のインビボ発現

製剤の全身静脈内投与を、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、およびＭＤ１を含むがこれらに限定されない種々の異なるリピドイドを用いて行う。

【１２７４】

ｍｍＲＮＡを含有するリピドイド製剤を、動物に静脈内注入する。修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）によりコードされるタンパク質の発現を、動物から採取した血液ならびに／また

は肝臓および脾臓といった他の器官の試料において評価する。単回静脈内投与研究の実施は、所望される生成物の発現の規模、用量応答性、および有効期間の評価を可能にするであろう。

【１２７５】

一実施形態において、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＭＤ１、および他のリピドイドのリピドイド系製剤を、動物へのルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ｍＣｈｅｒｒｙ蛍光タンパク質、分泌されたアルカリホスファターゼ（ｓＡＰ）、ヒトＧ－ＣＳＦ、ヒト第ＩＸ因子、またはヒトエリスロポエチン（ＥＰＯ）ｍｍＲＮＡの送達に使用する。前述のように、脂質を用いてｍｍＲＮＡを製剤化した後、動物を群に分け、生理食塩水製剤、またはルシフェラーゼ、ＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｓＡＰ、ヒトＧ－ＣＳＦ、ヒト第ＩＸ因子、およびヒトＥＰＯから選択される様々なｍｍＲＮＡのうちの１つを含有するリピドイド製剤のいずれかを受容させる。動物に注入する前に、ｍｍＲＮＡ含有リピドイド製剤をＰＢＳ中に希釈する。次いで、動物に、１０ｍｇ／ｋｇの用量から１ｎｇ／ｋｇと同程度に低い用量範囲、好ましくは１０ｍｇ／ｋｇ～１００ｎｇ／ｋｇの範囲の単回用量の製剤化ｍｍＲＮＡを投与し、ｍｍＲＮＡの用量は、２０グラムのマウスは最大で０．２ｍＬの製剤を受容する等、動物の体重に依存する（投薬は、体重１ｋｇ当たりのｍｍＲＮＡに基づく）。ｍｍＲＮＡ－リピドイド製剤を投与した後に、血清、組織、および／または組織ライセートを取得し、ｍｍＲＮＡによりコードされる生成物のレベルを、単一および／またはある範囲の時間間隔で判定する。所望のタンパク質産物を発現するリピドイド製剤化ルシフェラーゼ、ＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｓＡＰ、Ｇ－ＣＳＦ、第ＩＸ因子、およびＥＰＯ　ｍｍＲＮＡの能力を、ルシフェラーゼの発現については発光、ＧＦＰの発現およびｍＣｈｅｒｒｙ発現についてはフローサイトメトリー、ｓＡＰについては酵素活性、またはＧ－ＣＳＦ、第ＩＸ因子、および／もしくはＥＰＯの分泌についてはＥＬＩＳＡによって確認する。

【１２７６】

また、複数回用量レジメンに関するさらなる研究を行って、ｍｍＲＮＡの最大発現を判定し、ｍｍＲＮＡに駆動される発現の飽和性を評価し（対照および活性なｍｍＲＮＡ製剤を同時または順次に与えることによって）、反復薬物投与の実行可能性を判定する（数週または数ヶ月離れた投与でｍｍＲＮＡを与え、次いで、発現レベルが免疫原性等の要因によって影響を受けるかどうかを判定することによって）。Ｇ－ＣＳＦおよびＥＰＯ等のタンパク質の生理学的機能の評価も、試験した動物に由来する試料の分析、ならびに顆粒球および赤血球数それぞれの増加を検出することによって判定する。第ＩＸ因子等の発現したタンパク質産物の動物における活性も、第ＩＸ因子酵素活性（活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイ）および凝固時間の影響の分析を介して評価することができる。

【１２７７】

Ｃ．筋肉内および／皮下注入後のインビトロ発現

ｍＲＮＡを含むオリゴヌクレオチドを筋肉内注入経路または皮下注入経路を介して送達するためにリピドイド製剤を使用することは、これまでに報告されていないため、評価する必要がある。ｍｍＲＮＡの筋肉内および／または皮下注入を評価して、ｍｍＲＮＡ含有リピドイド製剤が、所望されるタンパク質の局所的および全身的発現の両方をもたらすことができるかどうかを判定する。

【１２７８】

ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ｍＣｈｅｒｒｙ蛍光タンパク質、分泌されたアルカリホスファターゼ（ｓＡＰ）、ヒトＧ－ＣＳＦ、ヒト第ＩＸ因子、またはヒトエリスロポエチン（ＥＰＯ）ｍｍＲＮＡから選択されるｍｍＲＮＡを含有する、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、およびＭＤ１のリピドイド製剤を、動物に筋肉内および／または皮下注入する。ｍｍＲＮＡによりコードされるタンパク質の発現を、筋肉または皮下組織内、ならびに血液および他の組織、例えば肝臓および脾臓において全身的にの両方で、評価する。単回投与研究は、所望される生成物の発現の規模、用量応答性、および有効期間の評価を可能にする。

【１２７９】
動物を群に分け、生理食塩水製剤または修飾ｍＲＮＡを含有する製剤のいずれかを受容させる。注入の前に、ｍｍＲＮＡ含有リピドイド製剤をＰＢＳ中に希釈する。動物に、５０ｍｇ／ｋｇから１ｎｇ／ｋｇという低い用量の範囲、好ましくは１０ｍｇ／ｋｇ～１００ｎｇ／ｋｇの範囲の単回筋肉内用量の製剤化ｍｍＲＮＡを投与する。マウスの筋肉内投与の最大用量は、マウスの後肢への筋肉内注入では概ね１ｍｇのｍｍＲＮＡまたは０．０２ｎｇという低いｍｍＲＮＡである。皮下投与については、動物に、４００ｍｇ／ｋｇから１ｎｇ／ｋｇという低い用量範囲、好ましくは８０ｍｇ／ｋｇ～１００ｎｇ／ｋｇの範囲の単回皮下用量の製剤化ｍｍＲＮＡを投与する。マウスの皮下投与の最大用量は、概ね８ｍｇのｍｍＲＮＡまたは０．０２ｎｇという低いｍｍＲＮＡである。

【１２８０】
２０グラムのマウスでは、単回筋肉内注入の量は最大で０．０２５ｍＬであり、単回皮下注入では最大で０．２ｍＬである。投与されるｍｍＲＮＡの最適な用量は、動物の体重から計算する。ｍｍＲＮＡ－リピドイドを投与した後、種々の時点で、血清、組織、および組織ライセートを取得し、ｍｍＲＮＡによりコードされる生成物のレベルを判定する。所望のタンパク質産物を発現する、リピドイド製剤化ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ｍＣｈｅｒｒｙ蛍光タンパク質、分泌されたアルカリホスファターゼ（ｓＡＰ）、ヒトＧ－ＣＳＦ、ヒト第ＩＸ因子、またはヒトエリスロポエチン（ＥＰＯ）ｍｍＲＮＡの能力を、ルシフェラーゼ発現については発光、ＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙ発現についてはフローサイトメトリー、ｓＡＰについては酵素活性、ならびにＧ－ＣＳＦ、第ＩＸ因子、およびエリスロポエチン（ＥＰＯ）の分泌についてはＥＬＩＳＡによって確認する。

【１２８１】
また、複数回用量レジメンに関するさらなる研究を行って、ｍｍＲＮＡを用いた最大発現を判定し、ｍｍＲＮＡに駆動される発現の飽和性を評価し（対照および活性なｍｍＲＮＡ製剤を同時または順次に与えることによって達成される）、反復薬物投与の実行可能性を判定する（数週または数ヶ月離れた投与でｍｍＲＮＡを与え、次いで、発現レベルが免疫原性等の要因によって影響を受けるかどうかを判定することによって）。１回で複数の皮下または筋肉内注入を用いる研究も、さらにｍｍＲＮＡの薬物曝露を増加させ、タンパク質産生を改善するために利用される。ＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｓＡＰ、ヒトＧ－ＣＳＦ、ヒト第ＩＸ因子、およびヒトＥＰＯ等のタンパク質の生理学的機能の評価を、試験した動物に由来する試料を分析し、顆粒球および／または赤血球数における変化を検出することによって判定する。第ＩＸ因子等の発現したタンパク質産物の動物における活性も、第ＩＸ因子酵素活性（活性化部分トロンボプラスチン時間アッセイ）および凝固時間の影響の分析を介して評価することができる。

【１２８２】
実施例３３．二機能性ｍｍＲＮＡ
本明細書に記載の教示および合成方法を使用して、修飾ＲＮＡを、二機能性であり、それによって１つ以上の細胞傷害性タンパク質分子をコードし、同様に細胞傷害性ヌクレオシドを用いて合成されるように、設計および合成する。

【１２８３】
二機能性修飾ｍＲＮＡの投与は、生理食塩水または脂質担体のいずれかを用いて達成する。投与されると、二機能性修飾ｍＲＮＡは、翻訳されて、コードされた細胞傷害性ペプチドを産生する。送達された修飾ｍＲＮＡが分解されると、これもまた対象に治療的利益をもたらす細胞傷害性ヌクレオシドが放出される。

【１２８４】
実施例３４．修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション
Ａ．逆トランスフェクション
２４ウェルのコラーゲンコーティング組織培養プレートで行われる実験については、ケラチノサイトを1×10^{5}の細胞密度で播種する。９６ウェルのコラーゲンコーティング

組織培養プレートで行われる実験については、ケラチノサイトを０．５×１０^{5}の細胞密度で播種する。トランスフェクトする各修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）のために、記載されるように修飾ｍＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）を調製し、細胞が組織培養プレートに付着する前に、細胞番種期間内、例えば６時間以内に、マルチウェルプレートで細胞と混合する。

【１２８５】

Ｂ．順トランスフェクション

２４ウェルのコラーゲンコーティング組織培養プレートにおいて、ケラチノサイトを０．７×１０^{5}の細胞密度で播種する。９６ウェルのコラーゲンコーティング組織培養プレートについては、ケラチノサイトを０．３×１０^{5}の細胞密度で播種する。ケラチノサイトを、２４時間にわたり、７０％を上回るコンフルエンシーに成長させる。トランスフェクトする各修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）のために、記載されるように修飾ｍＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）を調製し、細胞の播種および組織培養プレートへの付着後に、２４時間にわたりマルチウェルプレートにおいて細胞にトランスフェクトする。

【１２８６】

Ｃ．修飾ｍＲＮＡの翻訳スクリーニング：Ｇ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡ

ケラチノサイトを、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　Ｓ７を有するＥＰＩＬＩＦＥ培地において、７０％を上回るコンフルエンスで成長させる。ケラチノサイトに、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した３００ｎｇの化学修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）を逆トランスフェクトした。別のセットのケラチノサイトに、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した３００ｎｇの修飾ｍＲＮＡを順トランスフェクトした。修飾ｍＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）の複合体は、まず、ＲＮＡを、５倍体積希釈物中、補充物質不含のＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに室温で１０分間インキュベートすることによって形成する。

【１２８７】

第２のバイアルにおいて、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）試薬を、１０倍体積希釈物中、補充物質不含のＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに室温で１０分間インキュベートした。次いで、ＲＮＡのバイアルをＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のバイアルと混合し、室温で２０～３０分間インキュベートした後、滴下方式で細胞に添加した。培養培地中に分泌されたヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）の濃度を、化学修飾ｍＲＮＡのそれぞれについて、トランスフェクションの１８時間後に三重に測定する。

【１２８８】

トランスフェクトを行ったヒトケラチノサイトからのヒトＧ－ＣＳＦの分泌を、製造業者が推奨する指示に従って、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎまたはＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）からのＥＬＩＳＡキットを用いて定量化する。

Ｄ．修飾ｍＲＮＡの用量および持続期間：Ｇ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡ

【１２８９】

ケラチノサイトを、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　Ｓ７を有するＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地において、７０％を上回るコンフルエンスで成長させる。ケラチノサイトに、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した、０ｎｇ、４６．８７５ｎｇ、９３．７５ｎｇ、１８７．５ｎｇ、３７５ｎｇ、７５０ｎｇ、または１５００ｎｇのいずれかの修飾ｍＲＮＡを逆トランスフェクトする。修飾ｍＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体を、記載のように形成する。培養培地中に分泌されたヒトＧ－ＣＳＦの濃度を、各修飾ｍＲＮＡの各濃度について、トランスフェクションの０、６、１２、２４、および４８時間後に三重に測定する。トランスフェクトを行ったヒトケラチノサイトからのヒトＧ－ＣＳＦの分泌を、製造業者が推奨する指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎまたはＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓからの ＥＬＩＳＡキットを用いて定量化する。

【１２９０】

実施例３５．分割用量研究

１回で複数の皮下または筋肉内注入部位を用いる研究を設計して実行し、ｍｍＲＮＡの薬物曝露を増加させ、タンパク質産生を改善する手段について調べた。発現したタンパク質産物の検出に加えて、タンパク質の生理学的機能の評価も、試験した動物に由来する試料の分析を介して判定した。

【１２９１】

驚くべきことに、ｍｍＲＮＡの分割投薬は、単回単位投薬または複数回投薬スキームによりもたらされるものよりも高いタンパク質産生および表現型応答をもたらすことがわかった。

【１２９２】

単回単位用量、複数回用量、および分割用量実験の設計は、緩衝液単独中で投与されるヒトエリスロポエチン（ＥＰＯ）ｍｍＲＮＡ（ｍＲＮＡは配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）の使用を伴った。投薬ビヒクル（Ｆ緩衝液）は、１５０ｍＭのＮａＣｌ、２ｍＭのＣａＣｌ$_2$、２ｍＭのＮａ$^+$－ホスフェート（１．４ｍＭの第一リン酸ナトリウム；０．６ｍＭの第二リン酸ナトリウム）、および０．５ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ６．５からなった。ｐＨは水酸化ナトリウムを用いて調節し、最終的な溶液を濾過滅菌した。ｍｍＲＮＡを、各シトシンにおける５ｍｅＣおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で修飾した。

【１２９３】

動物（ｎ＝５）に、１００μｇの単回単位用量をＩＭ（筋肉内）注入した。複数回投薬については、１００μｇの３用量および１００μｇの６用量という２つのスケジュールを用いた。分割投薬スキームについては、３３．３μｇで３用量、および１６．５μｇのｍｍＲＮＡの６用量という２つのスケジュールを用いた。対照投薬は、６用量で緩衝液のみの使用を伴った。対照ｍｍＲＮＡは、１００μｇで６回投薬されるルシフェラーゼｍｍＲＮＡ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）の使用を伴った。血液および筋肉組織を、注入の１３時間後に評価した。

【１２９４】

ヒトＥＰＯタンパク質を、緩衝液中のＥＰＯ　ｍｍＲＮＡの単回、複数回、または分割筋肉内投薬の１３時間後にマウス血清において測定した。７つの群のマウス（１群当たりｎ＝５マウス）に処理を行い、評価した。結果を表６０に示す。

表６０．分割用量研究

【表００６０】

群	処理	MRNAの用量	総用量	平均ヒトEPO pmol/mL	単位薬物当たりのポリペプチド (pmol/μg)	用量分割係数
1	ヒトEPO mmRNA	1 x 100 ug	100 ug	14.3	.14	1
2	ヒトEPO mmRNA	3 x 100 ug	300 ug	82.5	.28	2
3	ヒトEPO mmRNA	6 x 100 ug	600 ug	273.0	.46	3.3
4	ヒトEPO mmRNA	3 x 33.3 ug	100 ug	104.7	1.1	7.9
5	ヒトEPO mmRNA	6 x 16.5 ug	100 ug	127.9	1.3	9.3
6	ルシフェラーゼmmRNA	6 x 100 ug	600 ug	0	--	--
7	緩衝液単独	--	--	0	--	--

【１２９５】

分割係数は、単位薬物当たりの単回用量生成物（ＰＵＤ）で除した単位薬物当たりの生成物として定義される。例えば、処理群２では、単位薬物（ｍｍＲＮＡ）当たりの生成物（ＥＰＯ）の値０．２８を、単位薬物当たりの単回用量生成物０．１４で除す。結果は２である。同様に、例えば、処理群４については、単位薬物（ｍｍＲＮＡ）当たりの生成物（ＥＰＯ）の値１．１を、単位薬物当たりの単回用量生成物０．１４で除す。結果は７．９である。結果として、用量分割係数（ＤＳＦ）は、分割用量レジメンの有効性の指標として使用することができる。総１日用量のいずれの単回投与についても、ＤＳＦは１と等しくなるはずである。したがって、分割用量レジメンにおいてこの値よりも大きいいずれのＤＳＦも、向上した有効性を示す。

【１２９６】

用量応答傾向、注入部位の影響、および注入のタイミングの影響を判定するために、研究を行う。これらの研究において、１μｇ、５μｇ、１０μｇ、２５μｇ、５０μｇ、およびこれら間の値である様々な用量を用いて、用量応答結果を判定する。１００μｇの総用量の分割投薬には、１．６μｇ、４．２μｇ、８．３μｇ、１６．６μｇ、または選択された総用量の投与に等しい値および総用量の３または６回用量が含まれる。

【１２９７】

注入部位は、四肢または注入に好適な十分な面積を呈する任意の体表面から選択される。これはまた、真皮（皮内）、上皮（表皮）、皮下組織（ＳＣ）、または筋肉（ＩＭ）を標的とするための注入深度の選択も含み得る。注入角度は、標的とされる送達部位に基づいて多様であり、皮内部位を標的とする注入は皮膚表面の面から１０～１５度の角度であり、皮下注入については皮膚表面の面から２０～４５度であり、実質的に筋肉内への注入については６０～９０度の角度である。

【１２９８】

実施例３６．エクソソームにおける定量化

本発明のｍｍＲＮＡの数および局在化は、単離エクソソーム中の量（初期、経時、または残留ベースで）を測定することによって判定することができる。この研究では、ｍｍＲＮＡが、典型的にはコドン最適化されており、配列が内因性ｍＲＮＡとははっきりと異なるため、ｍｍＲＮＡのレベルを、その内容が参照により全体が本明細書に組み込まれるＧ

ｉｂｂｉｎｇｓのＰＣＴ／ＩＢ２００９／００５８７８号の方法を用いて、天然または野生型のｍＲＮＡの内因性レベルと比較して定量化する。

【１２９９】

これらの研究において、この方法は、まず、エクソソームまたは小胞を、好ましくは既に本発明のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡの治療を受けた患者の体液から単離し、次いで、ｍＲＮＡマイクロアレイ、ｑＲＴ－ＰＣＲ、または好適な抗体もしくは免疫組織化学の方法を含む当技術分野におけるＲＮＡ測定のための他の方法のうちの１つによって、前記エクソソーム中のポリヌクレオチド、一次構築物、またはｍｍＲＮＡのレベルを測定することによって行われる。

【１３００】

実施例３７．細胞生存率、細胞傷害性、およびアポトーシスに対する修飾ｍＲＮＡの効果

この実験により、ヒトケラチノサイト細胞にインビトロでトランスフェクトした、はっきりと異なる修飾ｍＲＮＡの細胞生存率、細胞傷害性、およびアポトーシスを示す。ケラチノサイトを、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのヒドロコルチゾンを含まないヒトケラチノサイト成長補充物質を有するＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地において、７０％を上回るコンフルエンスで成長させる。ケラチノサイトに、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した０ｎｇ、４６．８７５ｎｇ、９３．７５ｎｇ、１８７．５ｎｇ、３７５ｎｇ、７５０ｎｇ、１５００ｎｇ、３０００ｎｇ、または６０００ｎｇの修飾ｍＲＮＡを逆トランスフェクトする。修飾ｍＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体を形成する。培養培地中に分泌されたヒトＧ－ＣＳＦの濃度を、各修飾ｍＲＮＡの各濃度について、トランスフェクションの０、６、１２、２４、および４８時間後に三重に測定する。トランスフェクトを行ったヒトケラチノサイトからのヒトＧ－ＣＳＦの分泌を、製造業者が推奨する指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎまたはＲ＆Ｄ　ＳｙｓｔｅｍｓからのＥＬＩＳＡキットを用いて定量化する。

【１３０１】

細胞生存率、細胞傷害性、およびアポトーシスを、製造業者の指示に従ってＰｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）からのＡＰＯＴＯＸ－ＧＬＯ（商標）キットを用いて、トランスフェクションの０、１２、４８、９６、および１９２時間後に測定する。

【１３０２】

実施例３８．ＥＬＩＳＡアッセイを用いた修飾ｍＲＮＡに対する細胞の自然免疫応答の検出

インビトロでトランスフェクションを行ったヒトケラチノサイト細胞から分泌されるヒト腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、ヒトインターフェロンβ（ＩＦＮ－β）、およびヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）の酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を、細胞の自然免疫応答の検出について試験する。ケラチノサイトを、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのヒドロコルチゾンを含まないヒトケラチノサイト成長補充物質を有するＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地において、７０％を上回るコンフルエンスで成長させる。分泌されたＴＮＦ－αケラチノサイトに、記載されるように、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した０ｎｇ、９３．７５ｎｇ、１８７．５ｎｇ、３７５ｎｇ、７５０ｎｇ、１５００ｎｇ、または３０００ｎｇの化学修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）を、三重に逆トランスフェクトする。培養培地中に分泌されたＴＮＦ－αを、製造業者のプロトコルに従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＥＬＩＳＡキットを用いて、化学修飾ｍＲＮＡのそれぞれについて、トランスフェクションの２４時間後に測定する。

【１３０３】

同じ培養培地中に分泌されたＩＦＮ－βを、製造業者のプロトコルに従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＥＬＩＳＡキットを用いて、化学修飾ｍＲＮＡのそれぞれについて、トランスフェクションの２４時間後に測定する。同じ培養培地中に分泌されたヒトＧ－ＣＳＦの濃度を、化学修飾ｍＲＮＡのそれぞれについて、トランスフェクションの２４時間後

に測定する。トランスフェクションを行ったヒトケラチノサイトからのヒトＧ－ＣＳＦの分泌を、製造業者が推奨する指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎまたは Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）からのＥＬＩＳＡキットを用いて定量化する。これらのデータは、例示的な１型サイトカインであるＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－βを測定することによって、どの修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）が、天然および他の化学修飾ポリヌクレオチドまたは参照化合物と比較して、細胞の自然免疫応答の低下を誘発することができるかを示す。

【１３０４】

実施例３９．ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）修飾ｍＲＮＡに誘導される細胞増殖のアッセイ

ヒトケラチノサイトを、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ Ｓ７を有するＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地において、２４ウェルのコラーゲンコーティングＴＲＡＮＳＷＥＬＬ（登録商標）（Ｃｏｍｉｎｇ，Ｌｏｗｅｌｌ，ＭＡ）共培養組織培養プレート中で、７０％を上回るコンフルエンスで成長させる。ケラチノサイトに、記載されるように、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＲＮＡＩＭＡＸと複合体形成した、７５０ｎｇの示される化学修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）を逆トランスフェクトする。修飾ｍＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ複合体を、記載のように形成する。ケラチノサイトの培地を、トランスフェクションの６～８時間後に交換する。トランスフェクションの４２時間後に、０．４μｍ細孔の半透過性ポリエステル膜を有する２４ウェルのＴＲＡＮＳＷＥＬＬ（登録商標）プレート挿入物を、ヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡをトランスフェクトしたケラチノサイトを含有する培養プレートに入れる。

【１３０５】

ヒト骨髄芽球細胞であるＫａｓｕｍｉ－１細胞またはＫＧ－１（０．２×10^5細胞）を挿入ウェルに播種し、細胞増殖を、９６ウェルプレートにおいて１００～１２０μＬ体積で、ＣｙＱｕａｎｔ Ｄｉｒｅｃｔ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて共培養開始４２時間後に定量化する。ヒトＧ－ＣＳＦをコードする修飾ｍＲＮＡに誘導される骨髄芽球細胞増殖を、トランスフェクトされていないケラチノサイト／骨髄芽球の共培養対照ウェルに対して正規化した細胞増殖パーセントとして表す。ケラチノサイトおよび骨髄芽球の両方の挿入共培養ウェルにおいて分泌されたヒトＧ－ＣＳＦの濃度を、各修飾ｍＲＮＡについて、共培養開始４２時間後に二重に測定する。ヒトＧ－ＣＳＦの分泌を、製造業者が推奨する指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＥＬＩＳＡキットを用いて定量化する。

【１３０６】

ヒトケラチノサイトフィーダー細胞にトランスフェクトしたヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡおよびトランスフェクトされていないヒト骨髄芽球細胞を、ＲＴ －ＰＣＲにより検出する。試料細胞からの全ＲＮＡを、製造業者の指示に従ってＲＮＥＡＳＹ（登録商標）キット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を用いて抽出し、溶解する。抽出した全ＲＮＡを、ヒトＧ－ＣＳＦ特異的プライマーを用いて、製造業者の指示に従ってＰＲＯＴＯＳＣＲＩＰＴ（登録商標）Ｍ－ＭｕＬＶ Ｔａｑ ＲＴ－ＰＣＲキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ，Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）を用いて、修飾ｍＲＮＡ－Ｇ－ＣＳＦの特異的増幅のためにＲＴ－ＰＣＲにかける。ＲＴ－ＰＣＲ産物を、１．２％アガロースゲル電気泳動によって可視化させる。

【１３０７】

実施例４０：共培養アッセイ

ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）をコードする、化学的にはっきりと異なるヌクレオチドから構成される修飾ｍＲＮＡは、共培養環境においてトランスフェクション非コンピテント細胞の細胞増殖を刺激することができる。共培養には、ヒトケラチノサイト等の高度にトランスフェクト可能な細胞型と、白血球（ＷＢＣ）等のトランスフェクション非コンピテントな細胞型とが含まれる。Ｇ－ＣＳＦをコードする修飾ｍＲＮＡを、高度にトランスフェクト可能な細胞にトランスフェクトし、Ｇ－ＣＳＦタンパク質の産生お

よび細胞外環境への分泌を可能にし、ここで、Ｇ－ＣＳＦは、パラクリン様の方式で、Ｇ－ＣＳＦ受容体を発現する白血球を刺激して増殖させるように作用する。拡大したＷＢＣ集団を使用して、免疫が低下した患者を治療するか、または免疫抑制された患者のＷＢＣ集団を部分的に再構築し、そうすることで日和見感染症の危険性を低減することができる。別の実施例では、線維芽細胞等の高度にトランスフェクト可能な細胞に、難トランスフェクト性の胚幹細胞または誘導型多能性幹細胞の成長、維持、または分化を支持および刺激する、ある特定の成長因子をトランスフェクトする。

【１３０８】

実施例４１：ヒトＩｇＧ抗体の検出アッセイ

Ａ．ヒトＩｇＧ抗体のＥＬＩＳＡ検出

この実施例は、ヒトＩｇＧ修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）をトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）およびヒト胎児腎臓（ＨＥＫ、ＨＥＲ－２陰性）２９３細胞に由来するヒトＩｇＧのＥＬＩＳＡについて説明する。ヒト胎児胎児腎臓（ＨＥＫ）２９３を、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＬ－グルタミンの補充物質を有するＣＤ２９３培地において、８０～９０％のコンフルエントに達するまで成長させる。ＣＨＯ細胞を、Ｌ－グルタミン、ヒポキサンチン、およびチミジンの補充物質を有するＣＤ　ＣＨＯ培地において成長させる。一態様において、２×１０６細胞に、７ｍＬの培地中、Ｃｏｒｎｉｎｇからの７５ｃｍ２の培養フラスコにおいて、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した２４μｇの修飾ｍＲＮＡをトランスフェクトする。別の態様では、８０，０００の細胞に、２４ウェルプレートにおいて、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した１μｇの修飾ｍＲＮＡをトランスフェクトする。修飾ｍＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体は、ｍｍＲＮＡを、５倍体積希釈物中、ＣＤ２９３またはＣＤ　ＣＨＯいずれかの培地とともに室温で１０分間バイアルにおいてインキュベートすることによって形成する。第２のバイアルにおいて、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）試薬を、１０倍体積希釈物中、ＣＤ２９３培地またはＣＤ　ＣＨＯ培地とともに室温で１０分間インキュベートする。次いで、ｍｍＲＮＡのバイアルをＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のバイアルと混合し、室温で２０～３０分間インキュベートした後、滴下方式でＣＨＯまたはＨＥＫ細胞に添加する。培養上清を摂氏４度で保管する。２４μｇのｍｍＲＮＡトランスフェクションでは、培養培地中に分泌されたヒトＩｇＧの濃度をトランスフェクションの１２、２４、３６時間後に測定し、１μｇのｍｍＲＮＡトランスフェクションは、３６時間で測定する。トランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞からのトラスツズマブの分泌を、製造業者が推奨する指示に従ってＡｂｃａｍ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）からのＥＬＩＳＡキットを用いて定量化する。データは、ヒト化ＩｇＧ抗体（トラスツズマブ等）のｍｍＲＮＡがＨＥＫ細胞において翻訳され得ること、およびトラスツズマブが細胞から分泌され、細胞外環境に放出されることを示す。さらに、データは、分泌タンパク質の産生のためにトラスツズマブをコードするｍｍＲＮＡを細胞にトランスフェクトすることが、バイオリアクターまたは大規模な細胞培養条件に拡大可能であることを示す。

【１３０９】

Ｂ．修飾ｍＲＮＡにより産生されたヒトＩｇＧ抗体のウエスタン検出

ウエスタンブロットのＣＨＯ－Ｋ１細胞に、トラスツズマブ修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）の重鎖および軽鎖をそれぞれ１μｇずつ共トランスフェクトする。ＣＨＯ細胞を、２４－ウェルプレートにおいて標準的なプロトコルを用いて増殖させる。細胞上清または細胞ライセートを、トランスフェクションの２４時間後に採取し、１２％ＳＤＳ－Ｐａｇｅゲルで分離させ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）によるＩＢＯＴ（登録商標）を用いてニトロセルロース膜上に移す。細胞を、ウサギポリクローナル抗体とＤＹＬＩＧＨＴ５９４（ａｂ９６９０４，ａｂｃａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）に接合されるヒトＩｇＧとの第１の複合体、およびヤギポリクローナル抗体とアルカリホスファターゼと接合されるＲｂ　ＩｇＧとの第２の複合体とともにインキュベートする。インキュベーションの後、抗体を、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）によるＮｏｖｅｘ（登録商標）アルカリホスファターゼ発色基質を用いて検出する。

【１３１０】
Ｃ．修飾ｍＲＮＡにより産生されるトラスツズマブおよびリツキシマブの細胞免疫染色
ＣＨＯ－Ｋ１細胞に、トラスツズマブまたはリツキシマブいずれかの重鎖および軽鎖をそれぞれ１０ｎｇずつ共トランスフェクトする。細胞を、ＧＩＢＣＯ（登録商標）（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）からのＦ－１２Ｋ培地および１０％ＦＢＳにおいて増殖させる。細胞を、ＰＢＳ中の４％パラホルムアルデヒドで固定し、ＰＢＳ中の０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で５～１０分間室温で透過性にさせ、細胞を室温のＰＢＳで３回洗浄する。トラスツズマブおよびリツキシマブの染色を、製造業者が推奨する希釈に従ってＤＹＬＩＧＨＴ（登録商標）５９４（ａｂ９６９０４，ａｂｃａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）に接合されたヒトＩｇＧに対するウサギポリクローナル抗体を用いて行う。核ＤＮＡ染色を、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのＤＡＰＩ色素を用いて行う。トラスツズマブおよびリツキシマブのタンパク質は、修飾ｍＲＮＡのトランスフェクション後に翻訳され、細胞質に局在化される。トランスフェクションの１３時間後に写真を撮影する。

【１３１１】
Ｄ．修飾ｍＲＮＡにより産生されるトラスツズマブおよびリツキシマブの結合免疫ブロットアッセイ
トラスツズマブおよびリツキシマブを、結合免疫ブロット検出アッセイを用いて検出する。種々の濃度（１００ｎｇ／μＬ～０ｎｇ／μＬ）のＥｒＢ２ペプチド（ａｂ４００４８，ａｂｅａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）、トラスツズマブおよびＣＤ２０ペプチドの抗原（ａｂ９７３６０，ａｂｅａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）、リツキシマブの抗原を、１２％ＳＤＳ－Ｐａｇｅゲル上で泳動させ、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのｉＢｌｏｔを用いて膜に移す。膜を、トラスツズマブまたはリツキシマブいずれかの重鎖および軽鎖をそれぞれ５００ｎｇずつ共トランスフェクトしたＣＨＯ－Ｋ１細胞からの、それぞれの細胞上清とともに１時間インキュベートする。膜を１％ＢＳＡでブロッキングし、アルカリホスファターゼ（ａｂｃａｍ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）と接合した二次抗ヒトＩｇＧ抗体を添加する。抗体検出を、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）によるＮＯＶＥＸアルカリホスファターゼ発色基質を用いて行う。データは、修飾ｍＲＮＡから生成されたヒト化ＩｇＧ抗体が、それらのそれぞれの抗原を認識し、そこに結合することができることを示す。

【１３１２】
Ｅ．細胞増殖アッセイ
ＨＥＲ２／ｎｅｕ受容体を過剰発現する、ヒト乳腺癌由来の付着細胞であるＳＫ－ＢＲ－３細胞株を使用して、修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）により生成されたトラスツズマブの抗増殖特性を比較することができる。修飾ｍＲＮＡから生成された種々の濃度の精製トラスツズマブおよびトラスツズマブを、細胞培養液に添加し、細胞増殖に及ぼすそれらの作用を、三連の細胞傷害性および生存率アッセイで評価する。

【１３１３】
実施例４２：細胞培養液への修飾ｍＲＮＡのバルクトランスフェクション
Ａ．カチオン性脂質送達ビヒクル
ＲＮＡトランスフェクションを、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）またはＴＲＡＮＳＩＴ－ｍＲＮＡ（Ｍｉｒｕｓ　Ｂｉｏ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）カチオン性脂質送達ビヒクルを用いて実行する。ＲＮＡおよび試薬を、まず、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）中に希釈する。１００ｎｇ／μＬのＲＮＡを５倍希釈し、ＲＮＡ１μｇ当たり５μＬのＲＮＡＩＭａｘを１０倍希釈する。希釈した成分をプールし、室温で１５分間インキュベートした後、培養培地に分注する。ＴＲＡＮＳＩＴ－ｍＲＮＡのトランスフェクションについては、１００ｎｇ／μＬのＲＮＡをＯｐｔｉ－ＭＥＭ中に１０倍希釈し、ＢＯＯＳＴ試薬を添加し（ＲＮＡ１μｇ当たり２μＬの濃度で）、ＴＲＡＮＳＩＴ－ｍＲＮＡを添加し（ＲＮＡ１μｇ当たり２μＬの濃度で）、次いで、ＲＮＡ－脂質複合体を、室温で２分間イ

ンキュベートした後、培養培地に送達する。ＲＮＡのトランスフェクションは、ＲｉＰＳの誘導についてはＮｕｔｒｉｓｔｅｍ ｘｅｎｏｆｒｅｅ ｈＥＳ培地（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）において、ケラチノサイトの実験についてはＤｅｒｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ ｐｌｕｓ Ｋｅｒａｔｉｎｏｃｙｔｅ Ｇｒｏｗｔｈ Ｋｉｔを加えたＤｅｒｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｂａｓａｌ培地（ＡＴＣＣ）において、そしてすべての他の実験については２％ＦＢＳを加えたＯｐｔｉ－ＭＥＭにおいて行う。宿主細胞への修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）の導入の成功は、蛍光マーカー、例えば緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）等、様々な既知の方法を用いて監視することができる。修飾ｍＲＮＡのトランスフェクションの成功はまた、例えば、ウエスタンブロットまたは免疫細胞化学により標的ポリペプチドのタンパク質発現レベルを測定することによっても判定することができる。同様の方法が、同様のＲＮＡ－脂質複合体比に従って複数リットル（５～１０，０００Ｌ）の培養形式に拡大した大規模なものにも適用され得る。

【１３１４】

Ｂ．外因性合成ｍＲＮＡ転写物のエレクトロポレーション送達

エレクトロポレーションのパラメータを、ＭＲＣ－５線維芽細胞にインビトロ合成修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）転写物をトランスフェクトし、特に外因性転写物を検出するように設計されたプライマーを用いた定量的ＲＴ－ＰＣＲによりトランスフェクト効率を測定することによって、最適化する。２ｍｍのギャップを有する標準的なエレクトロポレーションキュベットにおいて、Ｆに蓄電した１５０μＦのコンデンサを５０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）中に懸濁させた２．５ｘ10^6の細胞に放電することは、高い生存率（７０％超）を維持しながら、標準曲線法を用いて判定される細胞当たり１０，０００コピーを超える修飾ｍＲＮＡ転写物の反復送達に十分である。さらなる実験により、細胞にｍｍＲＮＡ転写物を効率よくトランスフェクトするために必要な電圧が、エレクトロポレーション時の細胞密度に依存し得ることが明らかになり得る。細胞密度は、１ｘ10^6細胞ｌ／５０μＬから２．５ｘ10^6細胞／５０μＬの密度まで多様であり、細胞当たりの転写物コピーで測定される同様の効率で細胞をトランスフェクトするには１１０Ｖ～１４５Ｖが必要である。大規模な流動エレクトロポレーション戦略に類似し、上述の制約で説明された方法に類似した大規模な複数リットル（５～１０，０００Ｌ）のエレクトロポレーションを行うことができる（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２００２、Ｇｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。

【１３１５】

実施例４３：リポプレックスを用いたインビボ送達

Ａ．ヒトＥＰＯ修飾ＲＮＡのリポプレックス

１００μｇの修飾ヒトエリスロポエチンｍＲＮＡ（ｍＲＮＡは配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）（ＥＰＯ；完全修飾５－メチルシトシン；Ｎ１－メチル－シュードウリジン）を含有する製剤を、５０～７０μＬ中３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成させ（リポプレックス－ｈ－Ｅｐｏ－４６；２世代目またはＧｅｎ２）、４匹のＣ５７／ＢＬ６マウスに筋肉内送達した。他の群は、１００μｇの修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを含有する対照群として機能し、３０体積％のＲＮＡｉＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成したリポプレックス化修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（リポプレックス－ｌｕｃ）（ＩＶＴ ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）の注入を受容するマウス、または６５μＬの投薬量で陰性対照として製剤緩衝液の注入を受容するマウスから構成された。筋肉内注入の１３時間後、血清を各マウスから採取して、ヒトＥＰＯ ＥＬＩＳＡによりマウス血清中のヒトＥＰＯタンパク質の量を測定し、結果を表６１に示す。

表６１．ヒトＥＰＯ産生（筋肉内注入経路）

【表００６１】

製剤	平均
リポプレックス-h-Epo-46	251.95
リポプレックス-Luc	0
製剤緩衝液	0

【１３１６】

Ｂ．ヒトＧ－ＣＳＦ修飾ＲＮＡリポプレックス

修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）（５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ）または５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ－Ｎ１）の２つの形態のうちの１つを１００μｇ含有する製剤を、３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成させ、Ｃ５７／ＢＬ６マウスに、１５０μＬを筋肉内（Ｉ．Ｍ）、１５０μＬを皮下（Ｓ．Ｃ）、および２２５μＬを静脈内（Ｉ．Ｖ）送達した。

【１３１７】

３つの対照群に、１００μｇの修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に置換）を筋肉内（Ｌｕｃ－ｕｎｓｐ　Ｉ．Ｍ．）、または１５０μｇの修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを静脈内（Ｌｕｃ－ｕｎｓｐ　Ｉ．Ｖ．）、または１５０μＬの製剤緩衝液を筋肉内（緩衝液Ｉ．Ｍ．）のいずれかで、投与した。製剤を投与した６時間後に、血清を各マウスから採取して、ヒトＧ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡによりマウス血清中のヒトＧ－ＣＳＦタンパク質を測定し、結果を表６２に示す。

【１３１８】

これらの結果は、５－メチルシトシン／シュードウリジンおよび５－メチルシトシン／Ｎ１－メチル－シュードウリジンの両方の修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡが、リポプレックス製剤で静脈内または筋肉内の投与経路を介して送達した場合に、血清中で特異的なヒトＧ－ＣＳＦタンパク質発現をもたらし得ることを示す。

表６２．血清中のヒトＧ－ＣＳＦ（Ｉ．Ｍ．、Ｉ．Ｖ．、Ｓ．Ｃ．注入経路）

【表００６２】

製剤	経路	G-CSF (pg/ml)
G-CSF	I.M.	85.6
G-CSF N1	I.M.	40.1
G-CSF	S.C.	3.9
G-CSF N1	S.C.	0.0
G-CSF	I.V.	31.0
G-CSF N1	I.V.	6.1
Luc-unsp	I.M.	0.0
Luc-unsp	I.V.	0.0
緩衝液	I.M.	0.0

【１３１９】

Ｃ．ヒトＧ－ＣＳＦ修飾ＲＮＡリポプレックスの比較

５－メチルシトシン（５ｍｃ）およびシュードウリジン（ψ）修飾を有する３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ－Ｇｅｎ１－リポプレックス）、生理食塩水中の５ｍｃおよびψ修飾を有する修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ－Ｇｅｎ１－生理食塩水）、３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成したＮ１－５－メチルシトシン（Ｎ１－５ｍｃ）およびψ修飾を有する修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ－Ｇｅｎ２－リポプレックス）、生理食塩水中のＮ１－５ｍｃおよびψ修飾を有する修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ－Ｇｅｎ２－生理食塩水）、３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した５ｍｃおよびψ修飾を有する修飾ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ－リポプレックス）、または生理食塩水中の５ｍｃおよびψ修飾を有する修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（Ｌｕｃ－生理食塩水）のいずれかを１００μｇ含有する製剤を、筋肉内（Ｉ．Ｍ．）または皮下（Ｓ．Ｃ．）送達し、各投与方法の対照群には、８０μＬの用量の製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）をＣ５７／ＢＬ６マウスに与えた。注入の１３時間後に、注入部位からの血清および組織をマウスから採取し、Ｇ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡによって分析して、ヒトＧ－ＣＳＦタンパク質レベルを比較した。筋肉内投与から得られたマウス血清中のヒトＧ－ＣＳＦタンパク質の結果、および皮下投与の結果を、表６３に示す。

【１３２０】

これらの結果は、５－メチルシトシン／シュードウリジンおよび５－メチルシトシン／Ｎ１－メチル－シュードウリジン修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡが、生理食塩水製剤かリポプレックス製剤かにかかわらず、筋肉内または皮下の投与経路で送達した場合に、血清中に特異的なヒトＧ－ＣＳＦタンパク質発現をもたらし得ることを示す。表６３に示されるように、５－メチルシトシン／Ｎ１－メチル－シュードウリジン修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡは、概して、５－メチルシトシン／シュードウリジン修飾ヒトＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡと比較して、増加したヒトＧ－ＣＳＦタンパク質産生を示す。

表６３．マウス血清におけるヒトＧ－ＣＳＦタンパク質

【表００６３】

製剤	G-CSF (pg/ml)	
	I.M. 注入経路	S.C. 注入経路
G-CSF-Gen1-リポプレックス	13.988	42.855
G-CSF-Gen1-生理食塩水	9.375	4.614
G-CSF-Gen2-リポプレックス	75.572	32.107
G-CSF-Gen2-生理食塩水	20.190	45.024
Luc リポプレックス	0	3.754
Luc 生理食塩水	0.0748	0
F 緩衝液	4.977	2.156

【１３２１】

Ｄ．ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ＲＮＡリポプレックスの比較

筋肉内および皮下投与

３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した修飾ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）または生理食塩水中の修飾ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡのいずれかを１００μｇ含有する製剤を、マウスに筋肉内および皮下送達する。製剤緩衝液も、筋肉内または皮下のいずれかで対照マウス群に投与する。マウスへの注入部位を、切片化のために注入の１７時間後に採取して、タンパク質の産生

に関与する細胞型（複数可）を判定する。

【１３２２】

硝子体内投与

ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した修飾ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡ、製剤緩衝液中の修飾ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡ、ＲＮＡＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ、製剤緩衝液中の修飾ルシフェラーゼのいずれかを１０μｇ含有する製剤を、５μＬ／眼の投薬量でラットに硝子体内注入（ＩＶＴ）により投与することができる。製剤緩衝液も、５μＬ／眼の投薬量で対照ラット群にＩＶＴにより投与する。処理を受けたラットの眼を、切片化および溶解のために注入の１８時間後に採取して、ｍｍＲＮＡが、インビボで眼に効果的に送達され、タンパク質産生をもたらし得るかどうかを判定し、さらに、インビボでのタンパク質の産生に関与する細胞型（複数可）を判定することができる。

【１３２３】

鼻腔内投与

３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した修飾ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡ、生理食塩水中の修飾ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡ、３０体積％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ、または生理食塩水中の修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡのいずれかを１００μｇ含有する製剤を、鼻腔内送達する。製剤緩衝液も対照群に鼻腔内投与する。点滴注入の約１３時間後に、切片化（ｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡを受容したものについて）または均質化（ルシフェラーゼｍＲＮＡを受容したものについて）のために肺を採取することができる。これらの試料を用いて、ｍｍＲＮＡが、インビボで肺に効果的に送達され、タンパク質産生をもたらし得るかどうかを判定し、さらに、インビボでのタンパク質の産生に関与する細胞型（複数可）を判定することができる。

【１３２４】

実施例４４：種々の脂質比を使用したインビボ送達

修飾ｍＲＮＡを、Ｃ５７／ＢＬ６マウスに送達して、種々の脂質比および結果として得られるタンパク質発現を評価した。１０％、３０％、もしくは５０％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した１００μｇの修飾ヒトＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡは配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）、１０％、３０％、もしくは５０％のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）とリポプレックス形成した１００μｇの修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）、または製剤緩衝液の製剤を、単回７０μＬ用量で、マウスに筋肉内投与した。血清を、注入の１３時間後に採取し、ヒトＥＰＯ　ＥＬＩＳＡを行って、各マウスにおけるヒトＥＰＯタンパク質レベルを判定した。表６４に示されるヒトＥＰＯ　ＥＬＩＳＡの結果は、筋肉内で発現された修飾ヒトＥＰＯが、異なる割合のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のそれぞれについて、血清中に分泌されることを示す。

表６４．マウス血清中のヒトＥＰＯタンパク質（ＩＭ注入経路）

【表００６４】

製剤	EPO(pg/mL)
Epo+10%RNAiMAX	11.4
Luc+10%RNAiMAX	0
Epo+30%RNAiMAX	27.1
Luc+30%RNAiMAX	0
Epo+50%RNAiMAX	19.7
Luc+50%RNAiMAX	0
Ｆ緩衝液	0

【１３２５】

実施例４５：哺乳動物における筋肉内および皮下インビボ送達

製剤緩衝液中に製剤化された修飾ヒトＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、Ｃ５７／ＢＬ６マウスまたはスプラーグドーリーラットのいずれかに送達して、ヒトＥＰＯ産生への用量依存性を評価した。ラットに、表６５の投薬表に記載されるように、５０μＬの修飾ヒトＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｈ－ＥＰＯ）、修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（Ｌｕｃ）（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号１２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）、または製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）を筋肉内注入した。

【１３２６】

マウスに、表６６の投薬表に記載されるように、５０μＬの修飾ヒトＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｈ－ＥＰＯ）、修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（Ｌｕｃ）、または製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）を筋肉内または皮下注入した。注入した１３時間後に、血液を採取し、血清を分析して、各マウスまたはラットのヒトＥＰＯ量を判定した。ラットの研究についてのｐｇ／ｍＬ単位での平均および幾何平均も表６５に示す。

表６５．ラット研究

【表００６５】

	群	用量（ug）	平均 pg/mL	幾何平均 pg/mL
h-EPO	G#1	150	67.7	67.1
h-EPO	G#2	100	79.4	66.9
h-EPO	G#3	50	101.5	85.4
h-EPO	G#4	10	46.3	31.2
h-EPO	G#5	1	28.7	25.4
Luc	G#6	100	24.5	22.4
Ｆ緩衝液	G#7	-	18.7	18.5

表６６．マウス研究

【表００６６】

経路	処理	群	用量	平均血清中レベルpg/mL
IM	h-EPO	1	100μg	96.2
IM	h-EPO	2	50μg	63.5
IM	h-EPO	3	25μg	18.7
IM	h-EPO	4	10μg	25.9
IM	h-EPO	5	1μg	2.6
IM	Luc	6	100μg	0
IM	F緩衝液	7	-	1.0
SC	h-EPO	1	100μg	72.0
SC	Luc	2	100μg	26.7
SC	F緩衝液	3	--	17.4

【１３２７】

実施例４６：筋肉内インビボ送達後の活性持続期間

製剤緩衝液中に製剤化された修飾ヒトＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、スプラーグドーリーラットに送達して、用量応答の持続期間を判定した。ラットに、表６７の投薬表に記載されるように、５０μＬの修飾ヒトＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｈ－ＥＰＯ）、修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）（Ｌｕｃ）、または製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）を筋肉内注入した。ラットに、筋肉内注入の２、６、１２、２４、４８、および７２時間後に採血を行って、所与の時点での血清中のヒトＥＰＯの濃度を判定した。この研究についてのｐｇ／ｍＬ単位での平均および幾何平均も表６７に示す。

表６７．投薬表

【表００６７】

	群	用量(ug)	平均pg/mL	幾何平均(pg/mL)
h-EPO	2時間	100	59.6	58.2
h-EPO	6時間	100	68.6	55.8
h-EPO	12時間	100	87.4	84.5
h-EPO	24時間	100	108.6	95.3
h-EPO	48時間	100	77.9	77.0
h-EPO	72時間	100	80.1	75.8
Luc	24、48 、および72時間	100	37.2	29.2
F緩衝液	24、48 、および72時間	-	48.9	10.4

【１３２８】

実施例４７：投与の経路

さらなる研究を行って、異なる投与経路を使用した投薬について調べた。実施例３５に

概説したプロトコルに従って、１群当たり４匹のマウスに、表６８に概説される投薬表に従って筋肉内（Ｉ．Ｍ．）、静脈内（ＩＶ）、または皮下（Ｓ．Ｃ．）投薬を行った。血清を注入の１３時間後にすべてのマウスから採取し、組織を筋肉内および皮下投与群の注入部位から採取し、脾臓、肝臓、および腎臓を静脈内群から採取した。筋肉内群および皮下群からの結果を、表６９に示す。

表６８．投薬表

【表００６８】

群	治療薬	経路	ｍｍＲＮＡの投与量	総投与量	投与媒体
１	リポプレックス－ヒトＥＰＯｍｍＲＮＡ	筋肉内	4×100ug+30%リポプレックス	4×70ul	リポプレックス
２	リポプレックス－ヒトＥＰＯｍｍＲＮＡ	筋肉内	4×100ug	4×70ul	緩衝液
３	リポプレックス－ヒトＥＰＯｍｍＲＮＡ	皮下	4×100ug+30%リポプレックス	4×70ul	リポプレックス
４	リポプレックス－ヒトＥＰＯｍｍＲＮＡ	皮下	4×100ug	4×70ul	緩衝液
５	リポプレックス－ヒトＥＰＯｍｍＲＮＡ	静脈内	200ug+30%リポプレックス	140ul	リポプレックス
６	リポプレックス化ルシフェラーゼ　ｍｍＲＮＡ	筋肉内	100ug+30%リポプレックス	4x70ul	リポプレックス
７	リポプレックス化ルシフェラーゼ　ｍｍＲＮＡ	筋肉内	100ug	4×70ul	緩衝液
８	リポプレックス化ルシフェラーゼ　ｍｍＲＮＡ	皮下	100ug+30%リポプレックス	4×70ul	リポプレックス
９	リポプレックス化ルシフェラーゼ　ｍｍＲＮＡ	皮下	100ug	4×70ul	緩衝液
１０	リポプレックス化ヒトＥＰＯｍｍＲＮＡ	静脈内	200ug+30%リポプレックス	140ul	リポプレックス
１１	製剤緩衝液	筋肉内	4回の反復投与	4×70ul	緩衝液

表６９．マウス血清中のヒトＥＰＯタンパク質（Ｉ．Ｍ．注入経路）

【表００６９】

製剤	EPO(pg/mL)	
	I.M.注入経路	S.C.注入経路
Epo-リポプレックス	67.115	2.154
Luc-リポプレックス	0	0
Epo-生理食塩水	100.891	11.37
Luc-生理食塩水	0	0
製剤緩衝液	0	0

【１３２９】

実施例４８．急速排出脂質ナノ粒子（ｒｅＬＮＰ）の研究

Ａ．修飾ＲＮＡ　ｒｅＬＮＰの製剤化

合成脂質、１，２－ジステアロイル－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ）、コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｔａｕｆｋｉｒｃｈｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、およびα－［３’－（１，２－ジミリストイル－３－プロパノキシ）－カルボキサミド－プロピル］－ω－メトキシ－ポリオキシエチレン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）（ＮＯＦ，Ｂｏｕｗｅｌｖｅｎ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）の溶液を調製し、－２０℃で保管する。合成脂質は、内部エステルを有するＤＬｉｎ－ＤＭＡ、末端エステルを有するＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ－内部エステル、および末端エステルを有するＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡから選択される。ｒｅＬＮＰを、５０：１０：３８．５：１．５（ｒｅＬＮＰ：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ）のモル比が得られるように合わせる。脂質溶液と修飾ｍＲＮＡ溶液とを１０：１、１５：１、２０：１、および３０：１の総脂質対修飾ｍＲＮＡの重量比で合わせることによって、ｒｅＬＮＰおよび修飾ｍＲＮＡの製剤を調製する。

【１３３０】

Ｂ．製剤の特徴付け

Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ，Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）を用いて、修飾ｍＲＮＡナノ粒子の粒径、多分散指標（ＰＤＩ）、およびゼータ電位を、粒径の判定時は１倍ＰＢＳ中、およびゼータ電位の判定時は１５ｍＭ　ＰＢＳ中において、判定する。

【１３３１】

紫外可視分光法を用いて、修飾ｍＲＮＡナノ粒子製剤の濃度を判定する。混合した後、溶液の吸光度スペクトルを、ＤＵ　８００分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｅａ，ＣＡ）において、２３０ｎｍ～３３０ｎｍで記録する。ナノ粒子製剤中の修飾ＲＮＡの濃度を、製剤中に使用した修飾ＲＮＡの減衰係数および２６０ｎｍの波長での吸光度と３３０ｎｍの波長でのベースラインとの間の差に基づいて、計算する。

【１３３２】

ＱＵＡＮＴ－ＩＴ（商標）ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）ＲＮＡアッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ　Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて、ナノ粒子による修飾ＲＮＡのカプセル封入を評価する。試料を希釈し、ポリスチレン９６ウェルプレートに移し、次いで、ＴＥ緩衝液または２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００溶液のいずれかを添加する。プレートをインキュベートし、ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）試薬をＴＥ緩衝液中に希釈し、この溶液を各ウェルに添加する。蛍光強度を、蛍光プレートリーダー（Ｗａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ　１４２０　Ｍｕｌｔｉｌａｂｌｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いて測定する　試薬ブランクの蛍光値を、試料のそれぞれから差し引き、遊離修飾ＲＮＡの割合を、無傷な試料の蛍光強度を分断された試料の蛍光値で除すことによって判定する。

【１３３３】
Ｃ．インビトロインキュベーション
ヒト胎児腎臓上皮（ＨＥＫ２９３）および肝細胞癌上皮（ＨｅｐＧ２）細胞（ＬＧＣ ｓｔａｎｄａｒｄｓ ＧｍｂＨ，Ｗｅｓｅｌ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を、９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｂｉｏ－ｏｎｅ ＧｍｂＨ，Ｆｒｉｃｋｅｎｈａｕｓｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に播種し、ＨＥＫ２９３細胞のプレートを、１型コラーゲンで事前コーティングする。１００μＬの細胞培養培地中、ＨＥＫ２９３は１ウェル当たり約３０，０００の細胞密度、ＨｅｐＧ２は約３５，０００の細胞密度で、播種する。ｍＣｈｅｒｒｙ ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、細胞を播種した直後に添加し、インキュベートする。インビトロ転写（ＩＶＴ）に使用される、Ｔ７プロモーター、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、および３’ＵＴＲを有するｍＣｈｅｒｒｙ ｃＤＮＡを、配列番号２１４４０に示す。
【１３３４】
培養培地上清を９６ウェルＰｒｏ－Ｂｉｎｄ Ｕ底プレート（Ｂｅｃｋｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＧｍｂＨ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に移すことによって、細胞を収集する。細胞を、半量のトリプシン／ＥＤＴＡ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）でトリプシン化し、それぞれの上清とともにプールし、１回量のＰＢＳ／２％ＦＣＳ（いずれもＢｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）／０．５％ホルムアルデヒド（Ｍｅｒｃｋ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加することによって固定する。次いで、試料を、ＬＳＲＩＩサイトメーター（Ｂｅｃｋｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＧｍｂＨ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）において、励起レーザーおよびＰＥ－Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ用のフィルターを用いてフローサイトメーター測定にかける。すべてのイベントの平均蛍光強度（ＭＦＩ）および４つの独立したウェルの標準偏差を、分析した試料について提示する。
【１３３５】
Ｄ．インビボ製剤研究
マウスに、修飾ｍＲＮＡおよびｒｅＬＮＰを含有する製剤の単回用量を静脈内投与する。マウスに投与する修飾ｍＲＮＡは、Ｇ－ＣＳＦ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、第ＩＸ因子（ｍＲＮＡは配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、またはｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）から選択される。
【１３３６】
マウスに、１００μｇ、１０μｇ、または１μｇの製剤化修飾ｍＲＮＡを注入し、製剤を投与した８時間後に屠殺する。ヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡを含有する製剤を投与したマウスからの血清を、特異的Ｇ－ＣＳＦ ＥＬＩＳＡによって測定し、ヒト第ＩＸ因子修飾ＲＮＡを投与したマウスからの血清を、特異的第ＩＸ因子ＥＬＩＳＡまたは発色アッセイによって分析する。ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡを投与したマウスからの肝臓および脾臓を、免疫組織化学（ＩＨＣ）または蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって分析する。対照として、１つのマウス群にはいずれの製剤も注入せずに、それらの血清および組織を採取し、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、および／またはＩＨＣによって分析する。
【１３３７】
実施例４９．ＶＥＧＦ－Ａのインビトロトランスフェクション
ヒト血管内皮成長因子アイソフォームＡ（ＶＥＧＦ－Ａ）修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６７２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、２４マルチウェルプレートにおいて、逆トランスフェクションを介してヒトケラチノサイト細胞にトランスフェクトした。ヒトケラチノサイト細胞を、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのＳｕｐｐｌｅｍｅｎ

ｔ　Ｓ７を有するＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地において、５０～７０％のコンフルエンスに達するまで増殖させた。細胞に、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体形成した、０、４６．８７５、９３．７５、１８７．５、３７５、７５０、および１５００ｎｇのＶＥＧＦ－Ａをコードする修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）をトランスフェクトした。ＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体は、まず、ＲＮＡを、５倍体積希釈物中、補充物質不含のＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに室温で１０分間インキュベートすることによって形成した。第２のバイアルにおいて、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）試薬を、１０倍体積希釈物中、補充物質不含のＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに室温で１０分間インキュベートした。次いで、ＲＮＡのバイアルをＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のバイアルと混合し、室温で２０～３０分間インキュベートした後、滴下方式で細胞に添加した。

【１３３８】

ヒトケラチノサイト細胞にトランスフェクトした、完全に最適化されたＶＥＧＦ－ＡをコードするｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６７２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）には、翻訳時の修飾、例えば、天然ヌクレオシドトリホスフェート（ＮＴＰ）、各ウリジン部位におけるシュードウリジンおよび各シトシン部位における５－メチルシトシン（シュード－Ｕ／５ｍＣ）、ならびに各ウリジン部位におけるＮ１－メチル－シュードウリジンおよび各シトシン部位における５－メチルシトシン（Ｎ１－メチル－シュード－Ｕ／５ｍＣ）が含まれた。細胞に、ＶＥＧＦ－ＡをコードするｍｍＲＮＡをトランスフェクトし、培養培地中に分泌されたＶＥＧＦ－Ａの濃度（ｐｇ／ｍＬ）を、製造業者が推奨する指示に従ってＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）からのＥＬＩＳＡキットを用いて、濃度のそれぞれについて、トランスフェクションの６、１２、２４、および４８時間後に測定した。表７０および図６Ａ、６Ｂ、および６Ｃに示されるこれらのデータは、ＶＥＧＦ－Ａをコードする修飾ｍＲＮＡがヒトケラチノサイト細胞において翻訳され得ること、およびＶＥＧＦ－Ａが細胞から輸送され、細胞外環境に放出されることを示す。

表７０．ＶＥＧＦ－Ａの投薬およびタンパク質の分泌

【表００７０】

天然のNTPを含有するVEGF-Aの用量				
用量 (ng)	6時間 (pg/mL)	12時間 (pg/mL)	24時間 (pg/mL)	48時間 (pg/mL)
46.875	10.37	18.07	33.90	67.02
93.75	9.79	20.54	41.95	65.75
187.5	14.07	24.56	45.25	64.39
375	19.16	37.53	53.61	88.28
750	21.51	38.90	51.44	61.79
1500	36.11	61.90	76.70	86.54
シュード-U/5mCを含有するVEGF-Aの用量				
用量 (ng)	6時間 (pg/mL)	12時間 (pg/mL)	24時間 (pg/mL)	48時間 (pg/mL)
46.875	10.13	16.67	33.99	72.88
93.75	11.00	20.00	46.47	145.61
187.5	16.04	34.07	83.00	120.77
375	69.15	188.10	448.50	392.44
750	133.95	304.30	524.02	526.58
1500	198.96	345.65	426.97	505.41
N1-メチル-シュード-U/5mCを含有するVEGF-Aの用量				
用量 (ng)	6時間 (pg/mL)	12時間 (pg/mL)	24時間 (pg/mL)	48時間 (pg/mL)
46.875	0.03	6.02	27.65	100.42
93.75	12.37	46.38	121.23	167.56
187.5	104.55	365.71	1025.41	1056.91
375	605.89	1201.23	1653.63	1889.23
750	445.41	1036.45	1522.86	1954.81
1500	261.61	714.68	1053.12	1513.39

【１３３９】

実施例５０．第ＩＸ因子のインビボ研究

製剤緩衝液中に製剤化したヒト第ＩＸ因子ｍｍＲＮＡ（Ｇｅｎ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、筋肉内注入を介してマウスに送達した。結果は、投与の１３時間後に測定したとき、血清中の第ＩＸ因子タンパク質が上昇していたことを示す。

【１３４０】

この研究において、マウス（第ＩＸ因子についてはＮ＝５、ルシフェラーゼまたは緩衝液対照についてはＮ＝３）に、２ｘ１００μｇ／マウスで、５０μＬの第ＩＸ因子ｍｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、ルシフェラーゼ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）、または製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）を筋肉内注射した。マウスに、筋肉内注射の１３時間後に採血を行って、ｐｇ／ｍＬ単位での血清中のヒトポリペプチドの濃度を判定した。結果は、第ＩＸ因子ｍｍＲＮＡの投与が、ルシフェラーゼまたは緩衝液対照のいずれかの投与による１００ｐｇ／ｍＬ未満の第ＩＸ因子と比較して、１３時間で、１６００ｐｇ／ｍＬのレベルをもたらしたことを明らかにした。

【１３４１】

実施例５１．複数部位の投与：筋肉内および皮下

Ｇｅｎ１またはＧｅｎ２（５－メチルシトシン（５ｍｃ）およびシュードウリジン（ψ）修飾、Ｇ－ＣＳＦ－Ｇｅｎ１；またはＮ１－５－メチルシトシン（Ｎ１－５ｍｃ）およびψ修飾、Ｇ－ＣＳＦ－Ｇｅｎ２）のいずれかとして修飾された、製剤緩衝液中に製剤化されたヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、筋肉内（ＩＭ）または皮下（ＳＣ）注入を介してマウスに送達した。３日間（２４時間間隔）、１日４用量または２×５０μｇ（２つの部位）の注入を行った。４用量は、血液採取およびＣＢＣ分析の６時間前に投与した。対照には、ルシフェラーゼ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号１２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）、または製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）が含まれた。マウスに、１回目のｍＲＮＡ注入の７２時間後（最後の修飾ｍＲＮＡ投薬の６時間後）に採血を行って、好中球数に対するｍＲＮＡにコードされるヒトＧ－ＣＳＦの作用を判定した。投薬レジメンを表７１に示し、結果として得られた好中球数も同様に示す（１０００単位／μＬ）。表７１において、アスタリスク（＊）は、ｐ＜０．０５での統計的有意性を示す。

【１３４２】

筋肉内投与については、データは、Ｇｅｎ１　Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡでは３日目の時点で対照を上回る４倍、Ｇｅｎ２　Ｇ－ＣＳＦ　ｍｍＲＮＡでは２倍の好中球数の増加を示す。皮下投与については、データは、Ｇｅｎ２　Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡでは３日目の時点で対照を上回る２倍の好中球数の増加を示す。

【１３４３】

これらのデータは、５－メチルシチジン／シュードウリジンおよび５－メチルシチジン／Ｎ１－メチル－シュードウリジン－修飾ｍＲＮＡのいずれも、血中好中球数における特異的な増加から明らかなように、生物学的に活性であり得ることを示す。

表７１．投薬レジメン

【表００７１】

群	処理	経路	N=	用量(μg/マウス)	用量体積(μL/マウス)	投薬ビヒクル	好中球1000単位/μL
1	G-CSF (Gen1)	I.M	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	840*
2	G-CSF (Gen1)	S.C	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	430
3	G-CSF (Gen2)	I.M	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	746*
4	G-CSF (Gen2)	S.C	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	683
5	Luc (Gen1)	I.M.	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	201
6	Luc (Gen1)	S.C.	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	307
7	Luc (Gen2)	I.M	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	336
8	Luc (Gen2)	S.C	5	2x50μg (4用量)	50	F緩衝液	357
9	F緩衝液	I.M	4	0 (4用量)	50	F緩衝液	245
10	F緩衝液	S.C.	4	0 (4用量)	50	F緩衝液	509
11	未処理	-	4			-	312

【１３４４】

実施例５２．静脈内投与

５－メチルシトシン（５ｍｃ）およびシュードウリジン（ψ）修飾（Ｇｅｎ１）で修飾されたか、または修飾を有さない、１０％リポプレックス（ＲＮＡｉＭａｘ）中に製剤化されたヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、５０μｇのＲＮＡの用量および１００μＬ体積で静脈内（ＩＶ）注入を介して、０、２、および４日目にマウスに送達した。好中球を、１、５、および８日目に測定した。対照には、非特異的哺乳動物ＲＮＡまたは製剤緩衝液単独（Ｆ緩衝液）が含まれた。マウスに、１、５、および８日目に採血を行って、好中球数を増加させる修飾ｍＲＮＡによりコードされるヒトＧ－ＣＳＦの作用を判定した。投薬レジメンを表７２に示し、結果として得られた好中球数も同様に示す（１０００単位／μＬ、Ｋ／μＬ）。

【１３４５】

静脈内投与については、データは、Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡでは５日目の時点で対照を上回る４～５倍の好中球数の増加を示すが、未修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡまたは非特異的対照では示さない。血球数は、最後の注入の４日後にベースラインに戻った。白血球集団に他の変化は観察されなかった。

【１３４６】

表７２において、アスタリスク（＊）は、緩衝液と比較して、ｐ＜０．００１での統計的有意性を示す。

【１３４７】

これらのデータは、リポプレックス製剤化５－メチルシチジン／シュードウリジン－修飾ｍＲＮＡが、血中好中球数における特異的な増加にから明らかなように、静脈内の投与経路を通じて送達した場合に、生物学的に活性であり得ることを示す。他の細胞サブセッ

トは、有意に変化されなかった。同様に投与された未修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡは、好中球数に対する薬理学的効果を示さなかった。

表７２．投薬レジメン

【表００７２】

群	日	処理	N=	用量 体積（μμ マウス）	投薬 ビヒクル	好中球 K/μL
1	1	G-CSF　(Gen1)	5	100	10%リポプレックス	2.91
2	5	G-CSF　(Gen1)	5	100	10%リポプレックス	5.32*
3	8	G-CSF　(Gen1)	5	100	10%リポプレックス	2.06
4	1	G-CSF(修飾なし)	5	100	10%リポプレックス	1.88
5	5	G-CSF(修飾なし)	5	100	10%リポプレックス	1.95
6	8	G-CSF(修飾なし)	5	100	10%リポプレックス	2.09
7	1	RNA 対照	5	100	10%リポプレックス	2.90
8	5	RNA 対照	5	100	10%リポプレックス	1.68
9	8	RNA 対照	4	100	10%リポプレックス	1.72
10	1	F 緩衝液	4	100	10%リポプレックス	2.51
11	5	F 緩衝液	4	100	10%リポプレックス	1.31
12	8	F 緩衝液	4	100	10%リポプレックス	1.92

【１３４８】

実施例５３．生理食塩水製剤：筋肉内投与

Ａ．タンパク質発現

ヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）とヒトＥＰＯ　ｍｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（５－メチルシトシン（５ｍｃ）およびシュードウリジン（ψ）で修飾）とＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ（Ｎ１－５－メチルシトシン（Ｎ１－５ｍｃ）およびψ修飾で修飾）を、製剤緩衝液（１５０ｍＭの塩化ナトリウム、２ｍＭの塩化カルシウム、２ｍＭのリン酸塩、０．５ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ６．５で）中で製剤化し、１００μｇの用量で筋肉内（ＩＭ）注入を介してマウスに送達した。

【１３４９】

対照には、ルシフェラーゼ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ　配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）または製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）が含まれた。マウスに、注入の１３時間後に採血を行って、ｐｇ／ｍＬ単位

で血清中のヒトポリペプチドの濃度を判定した。（Ｇ－ＣＳＦ群では、マウス血清中のヒトＧ－ＣＳＦを測定し、ＥＰＯ群では、マウス血清中のヒトＥＰＯを測定した）。データを表７３に示す。

表７３．投薬レジメン

【表００７３】

群	処理	N=	用量体積(μL/マウス)	投薬ビヒクル	平均タンパク質産物pg/mL血清
G-CSF	G-CSF	5	50	生理食塩水	19.8
G-CSF	ルシフェラーゼ	5	50	生理食塩水	0.5
G-CSF	F緩衝液	5	50	F緩衝液	0.5
EPO	EPO	5	50	生理食塩水	191.5
EPO	ルシフェラーゼ	5	50	生理食塩水	15.0
EPO	F緩衝液			F緩衝液	4.8

【１３５０】

Ｂ．用量応答

ヒトＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、製剤緩衝液中に製剤化し、筋肉内（ＩＭ）注入を介してマウスに送達した。

【１３５１】

対照には、ルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）または製剤緩衝液（Ｆ緩衝液）が含まれた。マウスに、注入の１３時間後に採血を行って、ｐｇ／ｍＬ単位で血清中のヒトポリペプチドの濃度を判定した。用量および発現を表７４に示す。

表７４．投薬レジメンおよび発現

【表００７４】

処理	用量体積（μL/ウス）	平均タンパク質産物pg/mL血清
EPO	100	96.2
EPO	50	63.5
EPO	25	18.7
EPO	10	25.9
EPO	1	2.6
ルシフェラーゼ	100	0.0
F緩衝液	100	1.0

【１３５２】

実施例５４．ＥＰＯ複数回用量／複数回投与

１回で複数の筋肉内注入部位を用いる研究を設計し、実行した。

【１３５３】

単一の複数回用量実験の設計は、製剤緩衝液で投与されるヒトエリスロポエチン（ＥＰＯ）ｍｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）またはＧ－ＣＳＦ　ｍｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）の使用を伴った。投薬ビヒクル（Ｆ緩衝液）を対照として用いた。ＥＰＯおよびＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡを、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で修飾した。

【１３５４】

動物（ｎ＝５）、すなわちスプラーグドーリーラットに、１００μｇの単回単位用量（１つの大腿に送達）をＩＭ（筋肉内）注射した。複数回投薬については、１００μｇの６用量（２つの大腿に送達）を、ＥＰＯおよびＧ－ＣＳＦ　ｍｍＲＮＡの両方に用いた。対照への投薬には、単回用量で緩衝液の使用が含まれた。ヒトＥＰＯの血液レベルを、注入の１３時間後に評価した。

【１３５５】

ヒトＥＰＯタンパク質を、筋肉内注入の１３時間後にラットの血清において測定した。５つの群のラットを処理し、評価した。結果を表７５に示す。

表７５．複数回用量研究

【表００７５】

群	処理	MRNA の用量	総用量	平均 Pg/mL ヒト EPO、血清
1	ヒト EPO mmRNA	1 x 100 ug	100 ug	143
2	ヒト EPO mmRNA	6 x 100 ug	600 ug	256
3	G-CSF mmRNA	1 x 100 ug	100 ug	43
4	G-CSF mmRNA	6 x 100 ug	600 ug	58
5	緩衝液単独	--	--	20

【１３５６】

実施例５５．シグナル配列交換研究

ヒト顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）をコードするｍｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）の複数の変異体を、修飾ヌクレオチドシュードウリジンおよび５－メチルシトシン（シュード－Ｕ／５ｍＣ）を用いて合成した。これらの変異体には、野生型Ｎ末端分泌シグナルペプチド配列（ＭＡＧＰＡＴＱＳＰＭＫＬＭＡＬＱＬＬＬＷＨＳＡＬＷＴＶＱＥＡ；配列番号９５）、または非分泌シグナルペプチド配列、または他のｍＲＮＡから得た分泌シグナルペプチド配列のいずれかをコードするＧ－ＣＳＦ構築物が含まれた。これらは、野生型Ｇ－ＣＳＦシグナルペプチド配列がヒトα－１－抗トリプシン（ＡＡＴ）（ＭＭＰＳＳＶＳＷＧＩＬＬＬＡＧＬＣＣＬＶＰＶＳＬＡ；配列番号９４）、ヒト第ＩＸ因子（ＦＩＸ）（ＭＱＲＶＮＭＩＭＡＥＳＰＳＬＩＴＩＣＬＬＧＹＬＬＳＡＥＣＴＶＦＬＤＨＥＮＡＮＫＩＬＮＲＰＫＲ；配列番号９６）、ヒトプロラクチン（Ｐｒｏｌａｃ）（ＭＫＧＳＬＬＬＬＬＶＳＮＬＬＬＣＱＳＶＡＰ；配列番号９７）、またはヒトアルブミン（Ａｌｂ）（ＭＫＷＶＴＦＩＳＬＬＦＬＦＳＳＡＹＳＲＧＶＦＲＲ；配列番号９８）のいずれかのシグナルペプチド配列で置換された配列を含んでいた。

【１３５７】

各Ｇ－ＣＳＦ変異体をコードする２５０ｎｇの修飾ｍＲＮＡを、１μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、各ウェルが３００，０００の細胞を含有する２４ウェルプレートにおいてＨＥＫ２９３Ａ（表中２９３Ａ）、マウス筋芽細胞（表中ＭＭ）（Ｃ２Ｃ１２、ＣＲＬ－１７７２、ＡＴＣＣ）、およびラット筋芽細胞（表中ＲＭ）（Ｌ６株、ＣＲＬ－１４５８、ＡＴＣＣ）の細胞株にトランスフェクトした。上清を２４時間後に収集し、分泌されたＧ－ＣＳＦタンパク質を、ヒトＧ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いてＥＬＩＳＡによって分析した。表７６に示されるデータは、アルブミンシグナルペプチドをコードするＧ－ＣＳＦ　ｍｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞が、その野生型対応物よりも少なくとも１２倍多くのＧ－ＣＳＦタンパク質を分泌することを示す。

表７６．シグナルペプチド交換

【表００７６】

シグナルペプチド	293A (pg/ml)	MM (pg/ml)	RM (pg/ml)
G-CSF 天然	9650	3450	6050
α-1-抗トリプシン	9950	5000	8475
第 IX 因子	11675	6175	11675
プロラクチン	7875	1525	9800
アルブミン	122050	81050	173300
シグナルペプチドなし	0	0	0

【１３５８】

実施例５６．サイトカイン研究：ＰＢＭＣ

Ａ．ＰＢＭＣの単離および培養

２人のドナーに由来する５０ｍＬのヒト血液を、ヘパリンナトリウム管で、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂｌｏｏｄ　Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ（ロットＫＰ３０９２８およびＫＰ３０９３１）から受容した。各ドナーについて、血液をプールし、ＤＰＢＳ（ＳＡＦＣ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　５９３３１Ｃ、ロット０７１Ｍ８４０８）で７０ｍＬに希釈し、２つの５０ｍＬの円錐管に等分した。１０ｍＬのＦｉｃｏｌｌ　Ｐａｑｕｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　１７－５４４２－０３、ロット１００７４４００）を、血液層の下に静かに分注した。管を２０００ｒｐｍで３０分間、低加速および制動で遠心分離した。管を除去し、軟膜ＰＢＭＣ層を、新しい５０ｍＬの円錐管に静かに移し、ＤＰＢＳで洗浄した。管を１４５０ｒｐｍで１０分間遠心分離した。

【１３５９】

上清を吸引し、ＰＢＭＣペレットを５０ｍＬのＤＰＢＳ中に再懸濁させ、洗浄した。管を１２５０ｒｐｍで１０分間遠心分離した。この洗浄ステップを繰り返し、ＰＢＭＣペレットを１９ｍＬのＯｐｔｉｍｅｍ　Ｉ（Ｇｉｂｃｏ　１１０５８、ロット１０７２０８８）中に再懸濁させ、計数した。細胞懸濁液を３．０×１０＾６細胞／ｍＬの濃度の生細胞に調節した。

【１３６０】

次いで、これらの細胞を、１ウェル当たり５０μＬで１人のドナーにつき５つの９６ウェル組織培養処理丸底プレート（Ｃｏｓｔａｒ　３７９９）に播種した。３０分以内に、トランスフェクション混合物を１ウェル当たり５０μＬの量で各ウェルに添加した。トランスフェクションの４時間後、培地に１０μＬのウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ　１００８２、ロット１０１２３６８）を補充した。

【１３６１】

Ｂ．トランスフェクション調製物

ヒトＧ－ＣＳＦをコードするｍｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）（（１）天然のＮＴＰ、（２）５－メチルシチジンおよびシュードウリジンでの１００％置換、または（３）５－メチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンでの１００％置換いずれかを含有、ルシフェラーゼをコードするｍｍＲＮＡ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は　配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）（（１）天然のＮＴＰまたは（２）５－メチルシチジンおよびシュードウリジンでの１００％置換のいずれかを含有）、ならびにＴＬＲアゴニストＲ８４８（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ　ｔｌｒｌ－ｒ８４８）を、最終体積２５００μＬのＯｐｔｉｍｅｍ　Ｉ中、３８．４ｎｇ／μＬに希釈した。

【１３６２】
別個に、４３２μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ １１６６８－０２７、ロット１０７０９６２）を、１３．１ｍＬのＯｐｔｉｍｅｍ Ｉで希釈した。９６ウェルプレートにおいて、各ｍｍＲＮＡ、陽性対照（Ｒ－８４８）、または陰性対照（Ｏｐｔｉｍｅｍ Ｉ）の９個の１３５μＬアリコートを、１３５μＬの希釈Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００に添加した。トランスフェクトされる物質を含有するプレートを２０分間インキュベートした。次いで、トランスフェクション混合物を、１ウェル当たり５０μＬでそれぞれのヒトＰＢＭＣに移した。その後、プレートを３７℃でインキュベートした。２、４、８、２０、および４４時間で、各プレートをインキュベーターから取り出し、上清を凍結させた。

【１３６３】
最後のプレートを取り出した後、上清を、ヒトＧ－ＣＳＦ ＥＬＩＳＡキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＫＨＣ２０３２）およびヒトＩＦＮ－α ＥＬＩＳＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ４１１０５－２）を用いてアッセイした。各条件は、二重に行われた。

【１３６４】
Ｃ．結果
コードされたタンパク質を産生する未修飾および修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）の能力を経時的に評価し（Ｇ－ＣＳＦ産生）、インターフェロンα産生により測定される自然免疫認識を引き起こすｍＲＮＡの能力も同様に評価した。インビトロＰＢＭＣ培養物の使用は、オリゴヌクレオチドの免疫刺激能を測定する一般的な方法である（参照により全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｏｂｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ２００９ １９：８９－１０２）。

【１３６５】
結果を、４パラメータのロジスティック曲線適合を用いて、各ＥＬＩＳＡプレートの標準曲線に対して補間した。特定のＥＬＩＳＡによって測定される経時的なＧ－ＣＳＦおよびＩＦＮ－α産生の２人の別個のＰＢＭＣドナーからの平均を表７７および７８に示す。

【１３６６】
Ｇ－ＣＳＦ ＥＬＩＳＡでは、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００未処理条件によるバックグラウンドシグナルを、各時点で差し引いた。データは、ヒト末梢血単核によるヒトＧ－ＣＳＦタンパク質の特異的産生が、天然のＮＴＰ、５－メチルシチジンおよびシュードウリジンでの１００％置換、または５－メチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンでの１００％置換を含有するＧ－ＣＳＦ ｍＲＮＡで見られることを示した。Ｇ－ＣＳＦの産生は、修飾ｍＲＮＡの使用により未修飾ｍＲＮＡと比較して有意に増加し、５－メチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンを含有するＧ－ＣＳＦ ｍｍＲＮＡが、最も高いＧ－ＣＳＦ産生を示した。自然免疫認識に関して、未修飾ｍＲＮＡは、かなりのＩＦＮ－α産生をもたらしたが、修飾ｍＲＮＡは、インターフェロンα産生を大きく阻止した。５－メチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ ｍＲＮＡは、サイトカインを実質的に増加させなかったが、５－メチルシチジンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ ｍＲＮＡは、ＩＦＮ－α、ＴＮＦ－α、およびＩＰ１０を誘導した。多数の他のサイトカインは、いずれの修飾にも影響を受けなかった。

表７７．Ｇ－ＣＳＦシグナル

【表００７７】

G-CSF シグナル-2 人のドナーの平均					
pg / mL	2 時間	4 時間	8 時間	20 時間	44 時間
G-CSF(5mC/シュードウリジン)	120.3	136.8	421.0	346.1	431.8
G-CSF(5mC/N1-メチル-シュードウリジン)	256.3	273.7	919.3	1603.3	1843.3
G-CSF(天然-未修飾)	63.5	92.6	129.6	258.3	242.4
ルシフェラーゼ(5mC/シュードウリジン)	4.5	153.7	33.0	186.5	58.0

表７８．ＩＦＮ－αシグナル

【表００７８】

IFN-α シグナル-2 人のドナーの平均					
pg / mL	2 Hr	4 Hr	8 Hr	20 Hr	44 Hr
G-CSF (5mC/シュードウリジン)	21.1	2.9	3.7	22.7	4.3
G-CSF(5mC/N1-メチル-シュードウリジン)	0.5	0.4	3.0	2.3	2.1
G-CSF(天然)	0.0	2.1	23.3	74.9	119.7
ルシフェラーゼ (5mC/シュードウリジン)	0.4	0.4	4.7	1.0	2.4
R-848	39.1	151.3	278.4	362.2	208.1
Lpf.2000 対照	0.8	17.2	16.5	0.7	3.1

【１３６７】

実施例５７．修飾ｍＲＮＡの化学修飾の範囲

化学修飾５－メチルシトシンおよびシュードウリジン等であるがこれらに限定されない修飾ヌクレオチドは、哺乳動物細胞において、自然免疫応答を低下させ、ＲＮＡの発現を増加させることが示されている。驚くべきことであり、またこれまでに知られていないことには、化学修飾の量が１００％未満である場合、化学修飾が呈する効果を滴定することができる。以前は、完全な修飾が、化学修飾の有益な効果を誘発するのに必要かつ十分であり、ｍＲＮＡの１００％未満の修飾は、効果がほとんどないと考えられていた。しかしながら、今では、化学修飾の利益が、完全に満たない修飾により誘導され得、その効果は、標的、濃度、および修飾に依存することが示された。

【１３６８】

Ａ．ＰＢＭＣにトランスフェクトした修飾ＲＮＡ

９６０ｎｇの５－メチルシトシン（５ｍＣ）およびシュードウリジン（シュードＵ）で修飾されたＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡまたは未修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡを、０．８μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて３人の正常な血液ドナー（Ｄ１、Ｄ２、Ｄ３）からの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）にトランスフェクトした。Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、５ｍＣおよびシュードＵで完全に修飾した（１００％修飾）、５ｍＣおよびシュードＵで修飾しなかった（０％修飾）、またはｍＲＮＡが５０％修飾、２５％修飾、１０％修飾、５％修飾、１％修飾、もしくは０．１％修飾を含有するように５ｍＣおよびシュードＵで部分的に修飾した。対照試料であ

るルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５ｍｅＣおよびシュードＵで完全に修飾）もＧ－ＣＳＦ発現について分析した。ＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－αの対照試料であるＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００、ＬＰＳ、Ｒ－８４８、ルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５ｍＣおよびシュードで完全に修飾）、およびＰ（Ｉ）Ｐ（Ｃ）も分析した。上清を、トランスフェクションの２２時間後に収集してＥＬＩＳＡを行い、タンパク質発現を判定した。Ｇ－ＣＳＦの発現を表７９に示し、ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αの発現を表８０に示す。ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αの発現は、Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡのトランスフェクションによる二次的影響であり得る。表７９および８０は、ｍＲＮＡが完全に修飾されていない場合に、Ｇ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－α、およびＴＮＦ－αの化学修飾の量を滴定することができ、滴定可能傾向は各対象で同じではないことを示す。

表７９．Ｇ－ＣＳＦ発現

【表００７９】

	G-CSF 発現(pg/mL)		
	D1	D2	D3
100%修飾	270.3	151.6	162.2
50%修飾	45.6	19.8	26.3
25%修飾	23.6	10.8	8.9
10%修飾	39.4	12.9	12.9
5%修飾	70.9	26.8	26.3
1 %修飾	70.3	26.9	66.9
0.1 %修飾	67.5	25.2	28.7
ルシフェラーゼ	14.5	3.1	10.0

表８０．ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αの発現

【表００８０】

	IFN-α 発現(pg/mL)			TNF-α 発現(pg/mL)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100%修飾	76.8	6.8	15.1	5.6	1.4	21.4
50%修飾	22.0	5.5	257.3	4.7	1.7	12.1
25%修飾	64.1	14.9	549.7	3.9	0.7	10.1
10%修飾	150.2	18.8	787.8	6.6	0.9	13.4
5%修飾	143.9	41.3	1009.6	2.5	1.8	12.0
1 %修飾	189.1	40.5	375.2	9.1	1.2	25.7
0.1 %修飾	261.2	37.8	392.8	9.0	2.	13.7
0% modification	230.3	45.1	558.3	10.9	1.4	10.9
LF 200	0	0	1.5	45.8	2.8	53.6
LPS	0	0	1.0	114.5	70.0	227.0
R-848	39.5	11.9	183.5	389.3	256.6	410.6
ルシフェラーゼ	9.1	0	3.9	4.5	2.7	13.6
P(I)P(C)	1498.1	216.8	238.8	61.2	4.4	69.1

【１３６９】

Ｂ．ＨＥＫ２９３にトランスフェクトした修飾ＲＮＡ

ヒト胎児腎臓上皮（ＨＥＫ２９３）細胞を、１００μＬの細胞培養培地中、１ウェル当たり３０，０００細胞の密度で、９６ウェルプレートに播種した。ＲＮＡｉＭＡＸ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて製剤化された２５０ｎｇの修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、ウェルに添加した。Ｇ－ＣＳＦを、５ｍＣおよびシュードＵで完全に修飾した（１００％修飾）、５ｍＣおよびシュードＵで修飾しなかった（０％修飾）、またはｍＲＮＡが７５％修飾、５０％修飾、もしくは２５％修飾を含有するように、５ｍＣおよびシュードＵで部分的に修飾した。対照試料（ＡＫ　５／２、ｍＣｈｅｒｒｙ（配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５ｍＣおよびシュードＵで完全に修飾）、ならびに未処理）もまた分析した。５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡの半減期は、約８～１０時間である。上清を１６時間後に収集し、分泌されたタンパク質をＥＬＩＳＡによって分析する。表８１は、ｍＲＮＡが完全に修飾されていない場合に、Ｇ－ＣＳＦの化学修飾の量を滴定することができることを示す。

表８１．Ｇ－ＣＳＦ発現

【表００８１】

	G-CSF 発現 (ng/mL)
100%修飾	118.4
75%修飾	101.9
50%修飾	105.7
25%修飾	231.1
0%修飾	270.9
AK 5/2	166.8
mCherry	0
未処理	0

【１３７０】

実施例５８：修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）のインビボ送達

修飾ＲＮＡを、Ｃ５７／ＢＬ６マウスに筋肉内、皮下、または静脈内送達し、ルシフェラーゼを用いて修飾ＲＮＡの生体分布を評価した。すべての送達方法で使用した製剤緩衝液は、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、２ｍＭの塩化カルシウム、２ｍＭのＮａ＋－リン酸塩（１．４ｍＭの一塩基リン酸ナトリウムおよび０．６ｍＭの二塩基リン酸ナトリウムを含む）、ならびに０．５ｍＭのエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）を含有し、水酸化ナトリウムを用いて最終ｐＨ６．５に達するように調節した後、濾過して滅菌した。１倍濃度を送達緩衝液として用いた。マウスに送達するリポプレックス化溶液を作製するために、１つのバイアルにおいて、５０μｇのＲＮＡを室温で１０分間送達緩衝液中で平衡化させ、２つ目のバイアルでは１０μＬのＲＮＡｉＭＡＸ（商標）を室温で１０分間送達緩衝液中で平衡化させた。平衡化の後、バイアルを合わせ、１００μＬの最終体積に達するまで送達緩衝液を添加し、これを、次いで室温で２０分間インキュベートした。ルシフェリンを、１５０ｍｇ／ｋｇで各マウスに腹腔内注入（ＩＰ）で投与した後、ルシフェリン曝露曲線のプラトー期の間に撮像し、これは１５～３０分間であった。ルシフェリンを作製するために、１ｇのＤ－ルシフェリンカリウムまたはナトリウム塩を、Ｍｇ２＋またはＣａ２＋を含有しない６６．６ｍＬの蒸留リン酸緩衝溶液（ＤＰＢＳ）中に溶解して、１５ｍｇ／ｍＬの溶液を得た。溶液を静かに混合し、０．２μｍのシリンジフィルタを通した後、窒素パージを行い、アリコート化し、可能な限り光を遮断しながら－８０℃で保管した。投薬の日に、温浴を用いて溶液を解凍し、ルシフェリンが溶解されていなかった場合

は静かに混合し、氷上に保った。

【１３７１】

投薬の２、８、および２４時間後に、各マウスの全身画像を撮影した。組織画像および血清を、投薬の２４時間後にマウスから収集した。用量を静脈内投与されたマウスは、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、腎周囲脂肪組織、および胸腺を撮像した。用量を筋肉内または皮下投与されたマウスは、肝臓、脾臓、腎臓、肺、腎周囲脂肪組織、および注入部位の筋肉を有した。全身画像から、各投与経路および投薬レジメンについて、１秒当たりの光子数単位で生物発光を測定した。

【１３７２】

Ａ．筋肉内投与

マウスに、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ネイキッド－Ｌｕｃ）、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたリポプレックス化修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（リポプレックス－ｌｕｃ）（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は　配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）、リポプレックス化修飾顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）（リポプレックス－サイトカイン）、または製剤緩衝液のいずれかを、各製剤について５０μＬの注入量で５０μｇの単回修飾ＲＮＡ用量で右後肢に、５０μＬの注入量で５μｇの単回修飾ＲＮＡ用量で左後肢に、筋肉内（Ｉ．Ｍ．）投与した。投薬の２、８、および２４時間後の各群のルシフェラーゼ発現シグナルの生物発光平均を、表８２に示す。生物発光は、注入部位において、リポプレックス含有および非含有の５μｇおよび５０μｇの修飾ＲＮＡ製剤の陽性シグナルを示した。

表８２．インビボ生物光子撮像（Ｉ．Ｍ．注入経路）

【表００８２】

製剤	用量(μg)	生物発光(光子/秒)		
		2時間	8時間	24時間
ネイキッド-Luc	5	224,000	683,000	927,000
リポプレックス-Luc	5	579,000	639,000	186,000
リポプレックス-G-CSF	5	64,600	85,600	75,100
製剤緩衝液	5	102,000	86,000	90,700
ネイキッド-Luc	50	446,000	766,000	509,000
リポプレックス-Luc	50	374,000	501,000	332,000
リポプレックス-G-CSF	50	49,400	74,800	74,200
製剤緩衝液	50	59,300	69,200	63,600

【１３７３】

Ｂ．皮下投与

マウスに、修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ネイキッド－Ｌｕｃ）、リポプレックス化修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（リポプレックス－ｌｕｃ）、リポプレックス化修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（リポプレックス－Ｇ－ＣＳＦ）、または製剤緩衝液のいずれかを、各製剤について１００μＬの注入量で５０μｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量で皮下（Ｓ．Ｃ．）投与

した。投薬の２、８、および２４時間後の各群のルシフェラーゼ発現シグナルの生物発光平均を、表８３に示す。生物発光は、注入部位で、リポプレックス含有および非含有の５μｇおよび５０μｇの修飾ｍＲＮＡ製剤の陽性シグナルを示した。

表８３．インビボ生物光子撮像（Ｓ．Ｃ．注入経路）

【表００８３】

製剤	生物発光（光子/秒）		
	2時間	8時間	24時間
ネイキッド-Luc	3,700,000	8,060,000	2,080,000
リポプレックス-Luc	3,960,000	1,700,000	1,290,000
リポプレックス-G-CSF	123,000	121,000	117,000
製剤緩衝液	116,000	127,000	123,000

【１３７４】

Ｃ．静脈内投与

マウスに、修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ネイキッド－Ｌｕｃ）、リポプレックス化修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（リポプレックス－ｌｕｃ）、リポプレックス化修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（リポプレックス－Ｇ－ＣＳＦ）、または製剤緩衝液のいずれかを、各製剤について１００μＬの注入量で５０μｇの単回修飾ｍＲＮＡ用量で静脈内（Ｉ．Ｖ．）投与した。投薬の２時間後の各群からの脾臓のルシフェラーゼ発現シグナルの生物発光平均を、表８４に示す。生物発光は、脾臓において、リポプレックスを含有する５０μｇの修飾ｍＲＮＡ製剤の陽性シグナルを示した。

表８４．インビボ生物光子撮像（Ｉ．Ｖ．注入経路）

【表００８４】

製剤	脾臓の生物発光（光子/秒）
ネイキッド-Luc	58,400
リポプレックス-Luc	65,000
リポプレックス-G-CSF	57,100
製剤緩衝液	58,300

【１３７５】

実施例５９．緩衝液製剤研究

緩衝溶液中のＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；Ｎ１－シュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾）または第ＩＸ因子修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；Ｎ１－シュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾）を、表８５に記載されるように、５０μＬの注入量で、ラット１匹当たり２００μｇの修飾ｍＲＮＡ用量でラットに筋肉内投与する（ｎ＝５）。修飾ｍＲＮＡは、１～２日間水中で凍結乾燥させる。次いで、以下に列挙される緩衝液中で６ｍｇ／ｍＬの目標濃度に再構築する。濃度は、ＯＤ　２６０によって判定する。試料を、投薬前に適切な緩衝液中で４ｍｇ／ｍＬに希釈する。

【１３７６】

修飾ｍＲＮＡを沈殿させるために、ｐＨ５．５の３Ｍの酢酸ナトリウムおよび純粋エタ

ノールを、それぞれ、修飾ｍＲＮＡの総体積の１／１０および４倍で添加する。材料を、最低１時間－８０℃に置く。次いで、材料を、４０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離する。上清を除去し、ペレットを遠心分離し、７５％エタノールで３回洗浄する。最後に、ペレットを緩衝液で６ｍｇ／ｍＬの目標濃度に再構築する。濃度は、ＯＤ　２６０によって判定する。試料を、投薬前に適切な緩衝液中で４ｍｇ／ｍＬに希釈する。すべての試料は、以下に明記されない限り、凍結乾燥によって調製する。

表８５．緩衝液投薬群

【表００８５】

群	処理	緩衝液	用量(μg/rat)
1	G-CSF	0.9%生理食塩水	200
	第 IX 因子	0.9%生理食塩水	200
2	G-CSF	0.9%生理食塩水+2mM カルシウム	200
	第 IX 因子	0.9%生理食塩水+2mM カルシウム	200
3	G-CSF	乳酸化リンガー液	200
	第 IX 因子	乳酸化リンガー液	200
4	G-CSF	5%ショ糖	200
	第 IX 因子	5%ショ糖	200
5	G-CSF	5%ショ糖+2mM カルシウム	200
	第 IX 因子	5%ショ糖+2mM カルシウム	200
6	G-CSF	5%マンニトール	200
	第 IX 因子	5%マンニトール	200
7	G-CSF	5%マンニトール+2mM カルシウム	200
	第 IX 因子	5%マンニトール+2mM カルシウム	200
8	G-CSF	0.9% 生理食塩水(沈殿)	200
	第 IX 因子	0.9% 生理食塩水(沈殿)	200

【１３７７】

血清試料を、種々の時間間隔でラットから採取し、Ｇ－ＣＳＦおよび第ＩＸ因子ＥＬＩＳＡを用いてＧ－ＣＳＦまたは第ＩＸ因子タンパク質発現について分析する。

【１３７８】

実施例６０．複数回用量研究

スプラーグドーリーラット（ｎ＝８）に、２８日間にわたり８回（週２回）静脈内注入を行う。ラットに、脂質ナノ粒子中に製剤化された０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、０．００５ｍｇ／ｋｇ、または０．０００５ｍｇ／ｋｇのルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡのヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ、生理食塩水中の０．５ｍｇ／ｋｇのヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ、脂質ナノ粒子中に製剤化された０．２ｍｇ／ｋｇのヒトＧ－ＣＳＦタンパク質Ｎｅｕｐｏｇｅｎまたは翻訳可能でないヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡを、注入する。血清を、既定の時間間隔で採取して、Ｇ－ＣＳＦタンパク質発現（その週の１回目の投薬の８、２４、および７２時間後）、全血球数および白血球数（その週の１回目の投薬の２４および７２時間後）、ならびに臨床化学（その週の１回目の投薬の２４および７２時間後）を評価する。ラットを、最後の投薬の４日後である２９日目に屠殺して、全血球数、白

血球数、臨床科学、タンパク質発現を評価し、組織病理学および解剖により主要器官への作用を評価する。さらに、２９日目に、マウスに抗体アッセイを行った。

【１３７９】

実施例６１．ＬＮＰインビボ研究

ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾を、シリンジポンプ法を用いて脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化した。ＬＮＰを、最終的な脂質のモル比５０：１０：３８．５：１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ＤＭＧ）で、総脂質と修飾ｍＲＮＡの重量比２０：１で製剤化した。表８６に示されるように、ルシフェラーゼＬＮＰ製剤を、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入によって特徴付けた。

表８６．ルシフェラーゼ製剤

【表００８６】

製剤	NPA-098-1
修飾 mRNA	ルシフェラーゼ
平均粒径	135nm
	PDI:0.08
pH7.4 でのゼータ	-0.6mV
カプセル封入 (RiboGr)	91%

【１３８０】

表８７に概要説明されるように、ルシフェラーゼＬＮＰ製剤を、Ｂａｌｂ－Ｃマウス（ｎ＝３）に筋肉内、静脈内、および皮下投与し、ＰＢＳ中に製剤化されたルシフェラーゼ修飾ＲＮＡを、マウスに静脈内投与した。

表８７．ルシフェラーゼ製剤

【表００８７】

製剤	ビヒクル	経路	濃度 (mg/mL)	注入量 (μL)	修飾 RNA の量(μg)	用量 (mg/kg)
Luc-LNP	PBS	IV	0.20	50	10	0.50
Luc-LNP	PBS	IM	0.20	50	10	0.50
Luc-LNP	PBS	SC	0.20	50	10	0.50
Luc-PBS	PBS	IV	0.20	50	10	0.50

【１３８１】

ルシフェラーゼＬＮＰ製剤を静脈内および筋肉内投与したマウスを、２、８、２４、４８、１２０、および１９２時間で撮像し、ルシフェラーゼＬＮＰ製剤を皮下投与したマウスを、２、８、２４、４８、および１２０時間で撮像して、表８８に示されるルシフェラーゼ発現を判定した。表８８において、「ＮＴ」は未試験を意味する。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。

表８８．ルシフェラーゼ発現

【表００８８】

製剤	投与の経路	平均発現（光子/秒）					
		2時間	8時間	24時間	48時間	120時間	192時間
Luc-LNP	IV	1.62E+08	3.00E+09	7.77E+08	4.98E+08	1.89E+08	6.08E+07
Luc-LNP	IM	4.85E+07	4.92E+08	9.02E+07	3.17E+07	1.22E+07	2.38E+06
Luc-LNP	SC	1.85E+07	9.79E+08	3.09E+08	4.94E+07	1.98E+06	NT
Luc-PBS	IV	3.61E+05	5.64E+05	3.19E+05	NT	NT	NT

【１３８２】

ＬＮＰ製剤を静脈内投与した１匹のマウスを、８時間で屠殺し、肝臓および脾臓におけるルシフェラーゼ発現を判定した。さらに、ＬＮＰ製剤を筋肉内投与した１匹のマウスを、８時間で屠殺して、注入部位周辺の筋肉ならびに肝臓および膵臓におけるルシフェラーゼ発現を判定する。表８９に示されるように、静脈内および筋肉内投与後の肝臓および脾臓の両方、ならびに筋肉内注入部位周辺の筋肉に、発現が見られた。

表８９．組織のルシフェラーゼ発現

【表００８９】

ルシフェラーゼ LNP:IV投与	発現（光子/秒）
肝臓	7.984E+08
脾臓	3.951E+08
ルシフェラーゼ LNP:IM投与	発現（光子/秒）
注入部位周辺の筋肉	3.688E+07
肝臓	1.507E+08
脾臓	1.096E+07

【１３８３】

実施例６２．サイトカイン研究：ＰＢＭＣ

Ａ．ＰＢＭＣの単離および培養

２人のドナーに由来する５０ｍＬのヒト血液を、ヘパリンナトリウム管で、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂｌｏｏｄ　Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ（ロットＫＰ３０９２８およびＫＰ３０９３１）から受容した。各ドナーについて、血液をプールし、ＤＰＢＳ（ＳＡＦＣ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　５９３３１Ｃ、ロット０７１Ｍ８４０８）で７０ｍＬに希釈し、２つの５０ｍＬの円錐管に等分した。１０ｍＬのＦｉｃｏｌｌ　Ｐａｑｕｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　１７－５４４２－０３、ロット１００７４４００）を、血液層の下に静かに分注した。管を２０００ｒｐｍで３０分間、低加速および制動で遠心分離した。管を除去し、軟膜ＰＢＭＣ層を、新しい５０ｍＬの円錐管に静かに移し、ＤＰＢＳで洗浄した。管を１４５０ｒｐｍで１０分間遠心分離した。

【１３８４】

上清を吸引し、ＰＢＭＣペレットを５０ｍＬのＤＰＢＳ中に再懸濁させ、洗浄した。管を１２５０ｒｐｍで１０分間遠心分離した。この洗浄ステップを繰り返し、ＰＢＭＣペレットを１９ｍＬのＯｐｔｉｍｅｍ　Ｉ（Ｇｉｂｃｏ　１１０５８、ロット１０７２０８８）中に再懸濁させ、計数した。細胞懸濁液を３．０×１０＾６細胞／ｍＬの濃度の生細胞に調節した。

【１３８５】

次いで、これらの細胞を、１ウェル当たり５０μＬで１人のドナーにつき５つの９６ウ

ェル組織培養処理丸底プレート（Ｃｏｓｔａｒ　３７９９）に播種した。３０分以内に、トランスフェクション混合物を１ウェル当たり５０μＬの量で各ウェルに添加した。トランスフェクションの４時間後、培地に１０μＬのウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ　１００８２、ロット１０１２３６８）を補充した。

【１３８６】

Ｂ．トランスフェクション調製物

ヒトＧ－ＣＳＦをコードする修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）（（１）天然のＮＴＰ、（２）５－メチルシチジンおよびシュードウリジンでの１００％置換、または（３）５－メチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンでの１００％置換のいずれかを含有、ルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡ（ＩＶＴ　ｃＤＮＡ配列は配列番号２１４４５に示される；ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される、約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１、各シトシンにおける５－メチルシトシンおよび各ウリジン部位におけるシュードウリジン置換で完全に修飾）（（１）天然のＮＴＰまたは（２）５－メチルシチジンおよびシュードウリジンで１００％置換のいずれかを含有）、ならびにＴＬＲアゴニストＲ８４８（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ　ｔｌｒｌ－ｒ８４８）を、最終体積２５００μＬのＯｐｔｉｍｅｍ　Ｉ中、３８．４ｎｇ／μＬに希釈した。

【１３８７】

別個に、１１０μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１１６６８－０２７、ロット１０７０９６２）を、６．７６ｍＬのＯｐｔｉｍｅｍ　Ｉで希釈した。９６ウェルプレートにおいて、各ｍＲＮＡ、陽性対照（Ｒ－８４８）、または陰性対照（Ｏｐｔｉｍｅｍ　Ｉ）の９個の１３５μＬアリコートを、１３５μＬの希釈Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００に添加した。トランスフェクトされる物質を含有するプレートを２０分間インキュベートした。次いで、トランスフェクション混合物を、１ウェル当たり５０μＬでそれぞれのヒトＰＢＭＣに移した。その後、プレートを３７℃でインキュベートした。２、４、８、２０、および４４時間で、各プレートをインキュベーターから取り出し、上清を凍結させた。

【１３８８】

最後のプレートを取り出した後、上清を、ヒトＧ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＫＨＣ２０３２）およびヒトＩＦＮ－α　ＥＬＩＳＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　４１１０５－２）を用いてアッセイした。各条件は、二重に行われた。

【１３８９】

Ｃ．タンパク質および自然免疫応答分析

コードされたタンパク質を産生する未修飾および修飾ｍＲＮＡの能力を経時的に評価し（Ｇ－ＣＳＦ産生）、インターフェロンα産生により測定される自然免疫認識を引き起こすｍＲＮＡの能力も同様に評価した。インビトロＰＢＭＣ培養物の使用は、オリゴヌクレオチドの免疫刺激能を測定する一般的な方法である（Ｒｏｂｂｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　２００９　１９：８９－１０２）。

【１３９０】

結果を、４パラメータのロジスティック曲線適合を用いて、各ＥＬＩＳＡプレートの標準曲線に対して補間した。特異的ＥＬＩＳＡによって測定される経時的なＧ－ＣＳＦ、インターフェロンα（ＩＦＮ－α）、および腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）産生の３人の別個のＰＢＭＣドナーの平均を表９０および９１に示す。

【１３９１】

Ｇ－ＣＳＦ　ＥＬＩＳＡでは、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬＦ２０００）未処理条件によるバックグラウンドシグナルを、各時点で差し引いた。データは、ヒト末梢血単核によるヒトＧ－ＣＳＦタンパク質の特異的産生が、天然のＮＴＰ、５－メチルシチジンおよびシュードウリジンでの１００％置換、または５－メチルシチジンおよびＮ

１－メチル－シュードウリジンでの１００％置換を含有するＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡで見られることを示した。Ｇ－ＣＳＦの産生は、５－メチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン修飾ｍＲＮＡの使用により、５－メチルシチジンおよびシュードウリジン修飾ｍＲＮＡと比較して有意に増加した。

【１３９２】

自然免疫認識に関して、いずれの修飾ｍＲＮＡの化学組成も、陽性対照（Ｒ８４８、ｐ（Ｉ）ｐ（Ｃ））と比較してＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α産生を大幅に阻止したが、化学組成間の有意差は存在した。５－メチルシチジンおよびシュードウリジン修飾ｍＲＮＡは、低いが検出可能なレベルのＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α産生をもたらしたが、一方で５－メチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン修飾ｍＲＮＡは、検出可能なＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α産生をもたらさなかった。

【１３９３】

結果として、自然免疫応答の活性化の１つを上回るサイトカインマーカーを考察する必要性に加えて、意外にも修飾の組み合わせにより異なるレベルの細胞応答（タンパク質産生および免疫活性化）がもたらされることが見出されたことが断定されている。修飾、すなわちＮ１－メチル－シュードウリジンは、この研究において、標準的な５－メチルシチジン／シュードウリジンの組み合わせよりも強化された保護をもたらし、結果として２倍多いタンパク質およびほぼ１５０倍の免疫応答の低減（ＴＮＦ－α）をもたらしことが示された。

【１３９４】

ＰＢＭＣが多数の自然免疫ＲＮＡ認識センサを含有し、さらにタンパク質翻訳が可能であることを考えると、これは、これらの２つの経路の相互依存性を試験するのに有用な系を提供する。ｍＲＮＡ翻訳はそのような自然免疫経路の活性化によって悪影響を受ける可能性があることが既知である（Ｋａｒｉｋｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（２００５）２３：１６５－１７５、Ｗａｒｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ（２０１０）７：６１８－６３０）。ＰＢＭＣをインビトロアッセイ系として使用することで、翻訳（この場合、Ｇ－ＣＳＦタンパク質産生）とサイトカイン産生（この場合、ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αのタンパク質産生に例示される）との間の相関性を確立することが可能である。より良好なタンパク質産生は、より低い自然免疫活性化経路の誘導と相関しており、新たな化学組成を、この比率に基づいて有利に判断することができる（表９２）。

【１３９５】

この研究において、いずれも５－メチルシトシンを伴う、シュードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンという２つの化学修飾のＰＣ比は、サイトカインＩＦＮ－αの９９４４／１＝９９４４と比較して、４７４２／１４１＝３４であった。サイトカインＴＮＦ－αについては、２つの化学組成は、１５３および１２４３のＰＣ比を有し、それぞれ、いずれのサイトカインについても、Ｎ１－メチル－シュードウリジンが、より優れた修飾であることを示唆する。表９０および９１において、「ＮＴ」は未試験を意味する。

表９０．Ｇ－ＣＳＦ

【表００９０】

G-CSF:3人のドナーの平均(pg/mL)	
G-CSF 5-メチルシトシン/シュードウリジン	4742
G-CSF 5-メチルシトシン/ N1-メチル-シュードウリジン	9944
ルシフェラーゼ	18
LF2000	16

表９１．ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α

【表００９１】

	IFN-α:3人のドナーの平均(pg/mL)	TNF-α:3人のドナーの平均(pg/mL)
G-CSF 5-メチルシトシン/シュードウリジン	141	31
G-CSF 5-メチルシトシン/ N1-メチル-シュードウリジン	1	8
P(I)P(C)	1104	NT
R-848	NT	1477
LF2000	17	25

表９２．Ｇ－ＣＳＦとサイトカインの比率

【表００９２】

	G-CSF/IFN-α（比）		G-CSF/TNF-α（比）	
	5-メチルシトシン/シュードウリジン	5-メチルシトシン/ N1-メチル-シュードウリジン	5-メチルシトシン/シュードウリジン	5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン
PC比	34	9944	153	1243

【１３９６】

実施例６３．インビトロＰＢＭＣ研究：修飾パーセント

４８０ｎｇの５－メチルシトシン（５ｍＣ）およびシュードウリジン（シュードＵ）で修飾したＧ－ＣＳＦ ｍＲＮＡまたは未修飾Ｇ－ＣＳＦ ｍＲＮＡを、０．４μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００を用いて正常な血液ドナー（Ｄ１、Ｄ２、およびＤ３）からの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）にトランスフェクトした。Ｇ－ＣＳＦ ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、５ｍＣおよびシュードＵで完全に修

飾した（１００％修飾）、５ｍＣおよびシュードＵで修飾しなかった（０％修飾）、またはｍＲＮＡが７５％修飾、５０％修飾、もしくは２５％修飾を含有するように５ｍＣおよびシュードＵで部分的に修飾した。対照試料であるルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５ｍｅＣおよびシュードＵで完全に修飾）もＧ－ＣＳＦ発現について分析した。ＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－αの対照試料であるＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００、ＬＰＳ、Ｒ－８４８、ルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５ｍＣおよびシュードで完全に修飾）、およびＰ（Ｉ）Ｐ（Ｃ）も分析した。上清を、トランスフェクションの２２時間後に収集してＥＬＩＳＡを行い、タンパク質発現を判定した。Ｇ－ＣＳＦの発現を表９３に示し、ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αの発現を表９４に示す。ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αの発現は、Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡのトランスフェクションによる二次的影響であり得る。表９３および９４は、ｍＲＮＡが完全に修飾されていない場合に、Ｇ－ＣＳＦ、インターフェロンα（ＩＦＮ－α）、および腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）の化学修飾の量を滴定することができ、滴定可能傾向は、各対象で同じではないことを示す。

【１３９７】

ＰＢＭＣをインビトロアッセイ系として使用することにより、翻訳（この場合、Ｇ－ＣＳＦ　タンパク質産生）とサイトカイン産生（この場合、ＩＦＮ－αタンパク質産生に例示される）との間の相関性を確立することが可能である。より良好なンパク質産生は、より低い自然免疫活性化経路の誘導と相関しており、化学組成の修飾率は、この比率に基づいて有利に判断することができる（表９５）。表９３および９４から計算され、表９５に示されるように、５－メチルシチジンおよびシュードウリジンでの完全な修飾は、いずれの修飾も有さないもの（天然Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ）よりも良好なタンパク質／サイトカイン産生比を示す（ＩＦＮ－αについては１００倍、およびＴＮＦ－αについては２７倍）。部分的修飾は、修飾がより少なくなるにつれてより低いタンパク質／サイトカイン比がもたらされる、線形関係を示す。

表９３．Ｇ－ＣＳＦ発現

【表００９３】

	G-CSF 発現(pg/mL)		
	D1	D2	D3
100%修飾	1968.9	2595.6	2835.7
75%修飾	566.7	631.4	659.5
50%修飾	188.9	187.2	191.9
25%修飾	139.3	126.9	102.0
0%修飾	194.8	182.0	183.3
ルシフェラーゼ	90.2	0.0	22.1

表９４．ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αの発現

【表００９４】

	IFN-α 発現(pg/mL)			TNF-α 発現(pg/mL)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100%修飾	336.5	78.0	46.4	115.0	15.0	11.1
75%修飾	339.6	107.6	160.9	107.4	21.7	11.8
50%修飾	478.9	261.1	389.7	49.6	24.1	10.4
25%修飾	564.3	400.4	670.7	85.6	26.6	19.8
0%修飾	1421.6	810.5	1260.5	154.6	96.8	45.9
LPS	0.0	0.6	0.0	0.0	12.6	4.3
R-848	0.5	3.0	14.1	655.2	989.9	420.4
P(I)P(C)	130.8	297.1	585.2	765.8	2362.7	1874.4
脂質のみ	1952.2	866.6	855.8	248.5	82.0	60.7

表９５．ＰＣ比および修飾率の影響

【表００９５】

%修飾	平均 G-CSF(pg/mL)	平均 IFN-a(pg/mL)	平均 TNF-a(pg/mL)	G-CSF/IFN-α (PC 比)	G-CSF/TNF-α (PC 比)
100	2466	153	47	16	52
75	619	202	47	3.1	13
50	189	376	28	0.5	6.8
25	122	545	44	0.2	2.8
0	186	1164	99	0.16	1.9

【１３９８】

実施例６４．ＰＢＭＣにトランスフェクトした修飾ＲＮＡ

５００ｎｇの５－メチルシトシン（５ｍＣ）およびシュードウリジン（シュードＵ）で修飾したＧ－ＣＳＦ ｍＲＮＡまたは未修飾Ｇ－ＣＳＦ ｍＲＮＡを、０．４μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００を用いて正常な血液ドナー（Ｄ１、Ｄ２、およびＤ３）からの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）にトランスフェクトした。Ｇ－ＣＳＦ ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、５ｍＣおよびシュードＵで完全に修飾した（１００％修飾）、５ｍＣおよびシュードＵで修飾しなかった（０％修飾）、またはｍＲＮＡが５０％修飾、２５％修飾、１０％修飾、５％修飾、１％修飾、もしくは０．１％修飾を含有するように５ｍＣおよびシュードＵで部分的に修飾した。対照試料であるｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５ｍｅＣおよびシュードウリジンで完全に修飾）、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ（対照Ｇ－ＣＳＦ）、ならびに未処理対照も、Ｇ－ＣＳＦ、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、およびインターフェロンα（ＩＦＮ－α）の発現について分析した。上清を、トランスフェクションの６時間後および１８時間後に収集し、ＥＬＩＳＡを実行してタンパク質発現を判定した。ドナー１のＧ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－α、およびＴＮＦ－αの発現を表９６に示し、ドナー２を表９７に示し、ドナー３を表９８に示す。

【１３９９】

５－メチルシチジンおよびシュードウリジンでの完全な１００％修飾は、３人すべての

ヒトＰＢＭＣドナーにわたり、最も高いタンパク質翻訳（Ｇ－ＣＳＦ）および産生される最も少ない量のサイトカインをもたらした。修飾の量を減少させることにより、より高いサイトカイン産生（ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α）がもたらされ、したがって、サイトカインを減少させ、タンパク質翻訳を向上させるためには、（本明細書においてＧ－ＣＳＦ産生により証明されるように）完全な修飾が重要であることがさらに強調される。

表９６．ドナー１

【表００９６】

	G-CSF(pg/mL)		IFN-α（pg/mL）		TNF-α（pg/mL）	
	6時間	18時間	6時間	18時間	6時間	18時間
100%修飾	1815	2224	1	13	0	0
75%修飾	591	614	0	89	0	0
50%修飾	172	147	0	193	0	0
25%修飾	111	92	2	219	0	0
10%修飾	138	138	7	536	18	0
1%修飾	199	214	9	660	18	3
0.1%修飾	222	208	10	597	0	6
0%修飾	273	299	10	501	10	0
対照G-CSF	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
未処理	該当なし	該当なし	0	0	1	1

表９７．ドナー２

【表００９７】

	G-CSF(pg/mL)		IFN-α（pg/mL）		TNF-α（pg/mL）	
	6時間	18時間	6時間	18時間	6時間	18時間
100%修飾	2184	2432	0	7	0	11
75%修飾	935	958	3	130	0	0
50%修飾	192	253	2	625	7	23
25%修飾	153	158	7	464	6	6
10%修飾	203	223	25	700	22	39
1%修飾	288	275	27	962	51	66
0.1%修飾	318	288	33	635	28	5
0%修飾	389	413	26	748	1	253
対照G-CSF	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
未処理	該当なし	該当なし	1	0	0	0

表９８．ドナー３

【表００９８】

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alpha (pg/mL)		TNF-alpha (pg/mL)	
	6時間	18時間	6時間	18時間	6時間	18時間
100%修飾	6086	7549	7	658	11	11
75%修飾	2479	2378	23	752	4	35
50%修飾	667	774	24	896	22	18
25%修飾	480	541	57	1557	43	115
10%修飾	838	956	159	2755	144	123
1%修飾	1108	1197	235	3415	88	270
0.1%修飾	1338	1177	191	2873	37	363
0%修飾	1463	1666	215	3793	74	429
対照 G-CSF	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
未処理	N/A	N/A	1	1	0	8

【１４００】

実施例６５．ＢＪ線維芽細胞における自然免疫応答研究

Ａ．単一のトランスフェクション

ヒト初代包皮線維芽細胞（ＢＪ線維芽細胞）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（カタログ番号ＣＲＬ－２５２２）から入手し、５％CO_2下、３７℃で、１０％ウシ胎児血清を補充したイーグル最小必須培地（ＡＴＣＣ、カタログ番号３０－２００３）において増殖させた。ＢＪ線維芽細胞を、０．５ｍＬの培養培地中、１ウェル当たり３００，０００の細胞密度で２４ウェルプレートに播種した。キャップ０を有するか、キャップ１を有するか、またはキャップを有さない５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された（Ｇｅｎ１）か、あるいは５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された（Ｇｅｎ２）、２５０ｎｇの修飾Ｇ－ＣＳＦ ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、製造業者のプロトコルに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１１６６８－０１９）を用いてトランスフェクトした。対照試料であるポリＩ：Ｃ（ＰＩＣ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｌｉｐｏ）、天然ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）、および天然Ｇ－ＣＳＦ ｍＲＮＡもトランスフェクトした。細胞を１８時間後に収集し、全ＲＮＡを単離し、製造業者のプロトコルに従ってＲＮｅａｓｙマイクロキット（カタログ番号７４００４）を用いてＤＮＡＳＥ（登録商標）処理した。１００ｎｇの全ＲＮＡを、製造業者のプロトコルに従ってＨｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号４３６８８１４）を用いてｃＤＮＡ合成に使用した。次いで、ｃＤＮＡを、製造業者のプロトコルに従ってＢｉｏｒａｄ ＣＦＸ ３８４機器においてＳｙｂｒＧｒｅｅｎを用いた定量的リアルタイムＰＣＲによって自然免疫応答遺伝子の発現について分析した。表９９は、ハウスキーピング遺伝子ＨＰＲＴ（ヒポキサンチンホスホリボシトランスフェラーゼ（ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｂｏｓｙｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ））と比較した自然免疫応答転写物の発現レベルを示し、これは、ＨＰＲＴと比較した倍誘導として表される。この表で、標準的測定基準のパネルには、次のものが含まれる：ＲＩＧ－Ｉはレチノイン酸誘導遺伝子１であり、ＩＬ６はインターロイキン－６であり、ＯＡＳ－１はオリゴアデニル酸シンターゼ１であり、ＩＦＮｂはインターフェロンβであり、ＡＩＭ２はメラノーマ－２の不在であり、ＩＦＩＴ－１はテトラリコペプチド反復を有するインターフェロン誘導型タン

パク質１であり、ＰＫＲはタンパク質キナーゼＲであり、ＴＮＦａは腫瘍壊死因子αであり、ＩＦＮａはインターフェロンαである。

表９９．自然免疫応答転写物レベル

【表００９９】

製剤	RIG-I	IL6	OAS-1	IFNb	AIM2	IFIT-1	PKR	TNFa	IFNa
天然ルシフェラーゼ	71.5	20.6	20.778	11.404	0.251	151.218	16.001	0.526	0.067
天然G-CSF	73.3	47.1	19.359	13.615	0.264	142.011	11.667	1.185	0.153
PIC	30.0	2.8	8.628	1.523	0.100	71.914	10.326	0.264	0.063
G-CSF Gen1-UC	0.81	0.22	0.080	0.009	0.008	2.220	1.592	0.090	0.027
G-CSF Gen1-キャップ０	0.54	0.26	0.042	0.005	0.008	1.314	1.568	0.088	0.038
G-CSF Gen1-キャップ１	0.58	0.30	0.035	0.007	0.006	1.510	1.371	0.090	0.040
G-CSF Gen2-UC	0.21	0.20	0.002	0.007	0.007	0.603	0.969	0.129	0.005
G-CSF Gen2-キャップ０	0.23	0.21	0.002	0.0014	0.007	0.648	1.547	0.121	0.035
G-CSF Gen2-キャップ１	0.27	0.26	0.011	0.004	0.005	0.678	1.557	0.099	0.037
Lipo	0.27	0.53	0.001	0	0.007	0.954	1.536	0.158	0.064

【１４０１】

Ｂ．反復トランスフェクション

ヒト初代包皮線維芽細胞（ＢＪ線維芽細胞）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（カタログ番号ＣＲＬ－２５２２）から入手し、５％CO_2下、３７℃で、１０％ウシ胎児血清を補充したイーグル最小必須培地（ＡＴＣＣ、カタログ番号３０－２００３）において増殖させた。ＢＪ線維芽細胞を、０．５ｍＬの培養培地中、１ウェル当たり３００，０００の細胞密度で２４ウェルプレートに播種した。未修飾、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された（Ｇｅｎ１）、または５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された（Ｇｅｎ２）、２５０ｎｇの修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、製造業者のプロトコルに従って５日間毎日トランスフェク

トした。対照試料であるＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌ２０００）およびｍＣｈｅｒｒｙ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシチジンおよびシュードウリジンで完全に修飾）も５日間毎日トランスフェクトした。結果を表１００に示す。

【１４０２】

未修飾ｍＲＮＡは、１日以降にインターフェロンβ（ＩＦＮ－β）およびインターロイキン－６（ＩＬ－６）においてサイトカイン応答を示した。少なくともシュードウリジンで修飾されたｍＲＮＡは、２～３日以降にサイトカイン応答を示したが、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで修飾されたｍＲＮＡは、３～５日以降に応答の低減を示した。

表１００．サイトカイン応答

【表０１００－１】

製剤	トランスフェクション	IFN-β（pg/mL）	IL-6(pg/mL)
未修飾G-CSF	6時間	0	3596
	1日目	1363	15207
	2日目	238	12415
	3日目	225	5017
	4日目	363	4267
	5日目	225	3094
G-CSF Gen1	6時間	0	3396
	1日目	38	3870
	2日目	1125	16341
	3日目	100	25983
	4日目	75	18922
	5日目	213	15928
G-CSF Gen2	6時間	0	3337

【表０１００－２】

	1日目	0	3733
	2日目	150	974
	3日目	213	4972
	4日目	1400	4122
	5日目	350	2906
mCherry	6時間	0	3278
	1日目	238	3893
	2日目	113	1833
	3日目	413	25539
	4日目	413	29233
	5日目	213	20178

【表０１００－３】

L2000	6時間	0	3270
	1日目	13	3933
	2日目	388	567
	3日目	338	1517
	4日目	475	1594
	5日目	263	1561

【１４０３】

実施例６６．自然免疫応答のインビボ検出

インビボタンパク質産生およびインビボサイトカイン応答に対するｍＲＮＡの様々な化学修飾の重要性を区別する目的で、雌ＢＡＬＢ／Ｃマウス（ｎ＝５）に、５’キャップがキャップ１であるＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ未修飾）（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない）、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ　５ｍｃ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された５’キャップありのＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ　５ｍｃ／Ｎ１ｐＵ）もしくは５’キャップなしのＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ　５ｍｃ／Ｎ１　ｐＵキャップなし）、またはＲ８４８もしくは５％ショ糖のいずれかである対照を、表１０１に記載されるように、筋肉内注入する。

表１０１．投薬表

【表０１０１】

製剤	経路	用量(μg/マウス)	用量(μL)
G-CSF mRNA 未修飾	I.M.	200	50
G-CSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50
G-CSF mRNA 5mc/N1pU	I.M.	200	50
G-CSF mRNA 5mc/N1pU キャップなし	I.M.	200	50
R848	I.M.	75	50
5%ショ糖	I.M.	-	50
未処理	I.M.	-	-

【１４０４】
血液を、投薬の８時間後に採取する。ＥＬＩＳＡを用いて、Ｇ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α、およびＩＦＮ－αのタンパク質レベルをＥＬＩＳＡにより判定する。投薬の８時間後に、筋肉を注射部位から採取し、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ＱＰＣＲ）を用いて、筋肉内のＲＩＧ－Ｉ、ＰＫＲ、ＡＩＭ－２、ＩＦＩＴ－１、ＯＡＳ－２、ＭＤＡ－５、ＩＦＮ－β、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、Ｇ－ＣＳＦ、ＣＤ４５のｍＲＮＡレベルを判定する。
【１４０５】
実施例６７．自然免疫応答のインビボ検出研究
雌ＢＡＬＢ／Ｃマウス（ｎ＝５）に、５’キャップがキャップ１であるＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ未修飾）（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない）、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ　５ｍｃ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された５’キャップを有するＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ　５ｍｃ／Ｎ１ｐＵ）もしくは５’キャップなしのＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ　５ｍｃ／Ｎ１　ｐＵキャップなし）、またはＲ８４８もしくは５％ショ糖のいずれかである対照を、表１０２に記載されるように、筋肉内注入した。血液を投薬の８時間後に採取し、ＥＬＩＳＡを用いてＧ－ＣＳＦおよびインターフェロン－α（ＩＦＮ－α）のタンパク質レベルをＥＬＩＳＡによって判定し、表１０２に示す。
【１４０６】
表１０２に示されるように、未修飾、５ｍｃ／ｐＵ、および５ｍｃ／Ｎ１ｐＵ修飾のＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡは、マウス血清におけるヒトＧ－ＣＳＦ発現をもたらした。キャップなしの５ｍＣ／Ｎ１ｐＵ修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡは血清中にヒトＧ－ＣＳＦ発現を示さず、５’キャップ構造を有することがタンパク質翻訳に重要であることを協調する。
【１４０７】
予測した通り、Ｒ８４８、５％ショ糖のみ、および未処理の群ではヒトＧ－ＣＳＦタンパク質は発現しなかった。重要なことに、血清中のマウスＩＦＮ－αによって測定されるサイトカイン産生に有意差が見られた。予測した通り、未修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡは、インビボで強固なサイトカイン応答を示した（Ｒ８４８陽性対照よりも高い）。５ｍｃ／ｐＵの未修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡは、インビボで低いが検出可能なサイトカイン応答を示したが、５ｍｃ／Ｎ１ｐＵ修飾ｍＲＮＡは、血清中に検出可能なＩＦＮ－αを示さなかった（ビヒクルおよび未処理動物も同じであった）。
【１４０８】
さらに、５ｍｃ／Ｎ１ｐＵ修飾ｍＲＮＡの応答は、キャップを有するかどうかにかかわらず、同じであった。これらのインビボ結果は、１）未修飾ｍＲＮＡが強固な自然免疫応答を生成すること、２）これは、５ｍｃ／ｐＵ修飾の１００％組み込みにより低減されるが、廃止されないこと、および３）５ｍｃ／Ｎ１ｐＵ修飾の組み込みは、検出可能なサイトカイン応答をもたらさないこと、という結論を強める。
【１４０９】
最後に、これらの注入が５％ショ糖（それ自体は作用を全く有さない）においてであることを考えると、これらの結果は、これらの修飾の免疫刺激能を正確に反映しているはずである。
【１４１０】
このデータから、Ｎ１ｐＵ修飾分子は、より多くのタンパク質を産生するが、ＩＦＮ－α発現に対する作用をほとんど有さないか、または全く有さないことが明らかである。この化学修飾については、キャッピングがタンパク質産生に必要であることもまた明らかである。未修飾ｍＲＮＡのＰＣ比（ＰＣ＝９）と比較して７４８のタンパク質：サイトカイン比は、この化学修飾が、ＩＦＮ－αに関連する作用または生物学的意義に関して、はるかに優れていることを意味する。

表１０２．血清中のヒトＧ－ＣＳＦおよびマウスＩＦＮ－α

【表０１０２】

製剤	経路	用量(μg/マウス)	用量(μL)	G-CSFタンパク質(pg/mL)	IFN-α発現(pg/mL)	PC比
G-CSF mRNA未修飾	I.M.	200	50	605.6	67.01	9
G-CSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50	356.5	8.87	40
G-CSF mRNA5mc/N1pU	I.M.	200	50	748.1	0	748
G-CSF mRNA5mc/N1pU キャップなし	I.M.	200	50	6.5	0	6.5
R848	I.M.	75	50	3.4	40.97	.08
5%ショ糖	I.M.	-	50	0	1.49	0
未処理	I.M.	-	-	0	0	0

【１４１１】

実施例６８：修飾ＲＮＡのインビボ送達

修飾ｍＲＮＡのタンパク質産生を、修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡまたは修飾第ＩＸ因子ｍＲＮＡを雌スプラーグドーリーラット（ｎ＝６）に送達することによって評価した。ラットに、５％ショ糖中の凍結乾燥形態から再構築した、１００μＬ中４００μｇの５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）（Ｇ－ＣＳＦ　Ｇｅｎ１）、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（Ｇ－ＣＳＦ　Ｇｅｎ２）、または５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された第ＩＸ因子ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）（第ＩＸ因子Ｇｅｎ１）を注入した。血液を注入の８時間後に採取し、血清中のＧ－ＣＳＦタンパク質レベルをＥＬＩＳＡによって測定した。表１０３は、８時間後の血清中のＧ－ＣＳＦタンパク質レベルを示す。

【１４１２】

これらの結果は、Ｇ－ＣＳＦ　Ｇｅｎ１およびＧ－ＣＳＦ　Ｇｅｎ２修飾ｍＲＮＡの両方が、単回筋肉内注入後にラットにおいてヒトＧ－ＣＳＦタンパク質をもたらし得ること、ならびにヒトＧ－ＣＳＦタンパク質産生が、Ｇｅｎ１化学組成よりもＧｅｎ２化学組成を使用した場合に向上することを示す。

表１０３．ラット血清におけるＧ－ＣＳＦタンパク質（Ｉ．Ｍ．注入経路）

【表０１０３】

製剤	G-CSFタンパク質(pg/mL)
G-CSF Gen1	19.37
G-CSF Gen2	64.72
第IX因子 Gen1	2.25

【１４１３】

実施例６９．化学修飾：インビトロ研究

Ａ．ＰＢＭＣにおけるインビトロスクリーニング

表１０４および１０５に概要説明される化学修飾で完全に修飾された、５００ｎｇのＧ－ＣＳＦ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリ

Ａ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）ｍＲＮＡを、０．４μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて３人の正常な血液ドナーからの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）にトランスフェクトした。対照試料であるＬＰＳ、Ｒ８４８、Ｐ（Ｉ）Ｐ（Ｃ）、およびｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない、５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）もまた分析した。上清を収集し、Ｇ－ＣＳＦタンパク質発現、ならびにサイトカインインターフェロンα（ＩＦＮ－α）および腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）の誘導を判定するためにＥＬＩＳＡによって分析するまで凍結保存した。Ｇ－ＣＳＦのタンパク質発現を表１０４に示し、ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αの発現を表１０５に示す。

【１４１４】

表１０４のデータは、すべてではないが多くの化学修飾が、ＰＢＭＣでのヒトＧ－ＣＳＦの生産的生成に使用可能であることを示す。注目すべきことに、１００％のＮ１－メチル－シュードウリジン置換が、最も高いレベルのヒトＧ－ＣＳＦ産生（シュードウリジン自体よりもほぼ１０倍高い）を示す。Ｎ１－メチル－シュードウリジンを、５－メチルシチジンと組み合わせて用いることでも、高いレベルのヒトＧ－ＣＳＦタンパク質が産生される（これもシュードウリジンを５メチルシチジンと組み合わせた場合よりも高い）。

【１４１５】

ＰＢＭＣにおけるタンパク質産生とサイトカインとの逆相関を考慮すると、同様の傾向が表１０５においても確認され、ここで、Ｎ１－メチル－シュードウリジンでの１００％置換は、サイトカイン誘導を全くもたらさず（トランスフェクションのみの対照に類似）、シュードウリジンは、バックグラウンドよりも高い検出可能なサイトカイン誘導を見せる。

【１４１６】

Ｎ６－メチルアデノシンおよびα－チオシチジン等の他の修飾は、サイトカイン刺激を増加させるようである。

表１０４．化学修飾およびＧ－ＣＳＦタンパク質発現

【表０１０４】

化学修飾	G-CSFタンパク質発現(pg/mL)		
	ドナー1	ドナー2	ドナー3
シュードウリジン	2477	1,909	1,498
5-メチルウリジン	318	359	345
N1-メチル-シュードウリジン	21,495	16,550	12,441
2-チオウリジン	932	1,000	600
4-チオウリジン	5	391	218
5-メトキシウリジン	2,964	1,832	1,800
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第１のセット)	2,632	1,955	1,373
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジン(第１のセット)	10,232	7,245	6,214
2’フルオログアノシン	59	186	177
2’フルオロウリジン	118	209	191
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第２のセット)	1,682	1,382	1,036
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジン(第２のセット)	9,564	8,509	7,141
5-ブロモウリジン	314	482	291
5-(2-カルボメトキシビニル)ウリジン	77	286	177
5-[3(1-E-プロペニルアミノ)ウリジン	541	491	550
α-チオシチジン	105	264	245
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第３のセット)	1,595	1,432	955
N1-メチルアデノシン	182	177	191
N6-メチルアデノシン	100	168	200
5-メチルシチジン	291	277	359
N4-アセチルシチジン	50	136	36
5-ホルミルシチジン	18	205	23
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第４のセット)	264	350	182
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジン(第４のセット)	9,505	6,927	5,405
LPS	1,209	786	636
mCherry	5	168	164
R848	709	732	636
P(I)P(C)	5	186	182

表１０５．化学修飾およびサイトカイン発現

【表０１０５－１】

化学修飾	IFN-α 発現(pg/mL)			TNF-α 発現(pg/mL)		
	ドナー1	ドナー2	ドナー3	ドナー1	ドナー2	ドナー3
シュードウリジン	120	77	171	36	81	126
5-メチルウリジン	245	135	334	94	100	157
N1-メチル-シュードウリジン	26	75	138	101	106	134
2-チオウリジン	100	108	154	133	133	141
4-チオウリジン	463	258	659	169	126	254
5-メトキシウリジン	0	64	133	39	74	111
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第１のセット)	88	94	148	64	89	121
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジン(第１のセット)	0	60	136	54	79	126
2’フルオログアノシン	107	97	194	91	94	141
2’フルオロウリジン	158	103	178	164	121	156
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第２のセット)	133	92	167	99	111	150
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジン(第２のセット)	0	66	140	54	97	149
5-ブロモウリジン	95	86	181	87	106	157
5-(2-カルボメトキシビニル)ウリジン	0	61	130	40	81	116
5-[3(1-E-プロペニルアミノ)ウリジン	0	58	132	71	90	119
α-チオシチジン	1,138	565	695	300	273	277
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第３のセット)	88	75	150	84	89	130
N1-メチルアデノシン	322	255	377	256	157	294

【表０１０５－２】

N6-メチルアデノシン	1,935	1,065	1,492	1,080	630	857
5-メチルシチジン	643	359	529	176	136	193
N4-アセチルシチジン	789	593	431	263	67	207
5-ホルミルシチジン	180	93	88	136	30	40
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(第４のセット)	131	28	18	53	24	29
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジン(第４のセット)	0	0	0	36	14	13
LPS	0	67	146	7,004	3,974	4,020
mCherry	100	75	143	67	100	133
R848	674	619	562	11,179	8,546	9,907
P(I)P(C)	470	117	362	249	177	197

【１４１７】

Ｂ．ＨｅＬａ細胞におけるインビトロスクリーニング

トランスフェクションの前日に、２０，０００のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を、５％CO_2雰囲気下で一晩、３７ｏＧで成長させた。翌日、表１０６に記載の化学修飾を有する８３ｎｇのルシフェラーゼ修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。

【１４１８】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。

【１４１９】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。ライセートの体積を、最も強いシグナルを生成する試料について１ウェル当たり

２百万を超える相対発光量（ＲＬＵ）が検出されなくなるまで調節または希釈し、試験した各化学組成を、表１０６に示す。プレートリーダーは、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約２００の相対発光量であった。

【１４２０】

これらの結果は、すべてではないが多くの化学修飾が、ＨｅＬａ細胞でのヒトＧ－ＣＳＦの生産的生成に使用可能であることを示す。注目すべきことに、１００％のＮ１－メチル－シュードウリジン置換が、最も高いレベルのヒトＧ－ＣＳＦ産生を示す。

表１０６．ルシフェラーゼの相対発光量

【表０１０６】

化学修飾	RLU
N6-メチルアデノシン(m6a)	534
5-メチルシチジン(m5c)	138,428
N4-アセチルシチジン(ac4c)	235,412
5-ホルミルシチジン(f5c)	436
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験A1	48,659
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験A1	190,924
シュードウリジン	655,632
1-メチルシュードウリジン(m1u)	1,517,998
2-チオウリジン(s2u)	3387
5-メトキシウリジン(mo5u)	253,719
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験B1	317,744
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験B1	265,871
5-ブロモ-ウリジン	43,276
5(2カルボビニル)ウリジン	531
5(3-1Eプロペニルアミノ)ウリジン	446
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験A2	295,824
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験A2	233,921
5-メチルウリジン	50,932
α-チオ-シチジン	26,358
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験B2	481,477
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験B2	271,989
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験A3	438,831
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験A3	277,499
未修飾ルシフェラーゼ	234,802

【１４２１】

Ｃ．ウサギ網状赤血球ライセートにおけるインビトロスクリーニング

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、表１０７に列挙される化学修飾で修飾し、滅菌のヌクレアーゼ不含水中で１０μＬ中２５０ｎｇの最終量に希釈した。希釈したルシフェラーゼを、４０・kの新たに調製したウサギ網状

赤血球ライセートに添加し、インビトロ翻訳反応を、乾式加熱ブロックにおいて３０℃で標準的な１．５ｍＬのポリプロピレン反応管（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）中で行った。翻訳アッセイを、製造業者の指示に従ってＲａｂｂｉｔ　Ｒｅｔｉｃｕｌｏｃｙｔｅ　Ｌｙｓａｔｅ（ヌクレアーゼ処理）キット（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いて行った。反応緩衝液に、提供されたロイシンまたはメチオニンのいずれかが欠けたアミノ酸ストック溶液の１対１混合物を補充し、結果的に両方のアミノ酸を十分な量で含有する反応混合物が効果的なインビトロ翻訳を行えるようにした。

【１４２２】

６０分間のインキュベーションの後、反応管を氷上に置くことによって反応を停止させた。ルシフェラーゼ修飾ＲＮＡを含有するインビトロ翻訳反応物のアリコートを、白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。インビトロ翻訳反応物の体積を、最も強いシグナルを生成する試料について１ウェル当たり２百万を超える相対発光量（ＲＬＵ）が検出されなくなるまで調節または希釈し、試験した各化学組成のＲＬＵを表１０７に示す。プレートリーダーはＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約２００の相対発光量であった。

【１４２３】

これらの細胞不含翻訳の結果は、ＨｅＬａ細胞におけるタンパク質産生結果と非常によく相関し、同じ修飾が通常いずれの系においても機能するかまたは機能しない。１つの注目すべき例外は、５－ホルミルシチジン修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡであり、これは、細胞不含翻訳系では機能したが、ＨｅＬａ細胞に基づくトランスフェクション系では機能しなかった。２つのアッセイ間の同様の差が、５－ホルミルシチジン修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡでも見られた。

表１０７．ルシフェラーゼの相対発光量

【表０１０７】

化学修飾	RLU
N6-メチルアデノシン(m6a)	398
5-メチルシチジン(m5c)	152,989
N4-アセチルシチジン(ac4c)	60,879
5-ホルミルシチジン(f5c)	55,208
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験A1	349,398
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験A1	205,465
シュードウリジン	587,795
1-メチルシュードウリジン(m1u)	589,758
2-チオウリジン(s2u)	708
5-メトキシウリジン(mo5u)	288,647
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験B1	454,662
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験B1	223,732
5-ブロモ-ウリジン	221,879
5(2カルボビニル)ウリジン	225
5(3-1Eプロペニルアミノ)ウリジン	211
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験A2	558,779
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験A2	333,082
5-メチルウリジン	214,680
α-チオ-シチジン	123,878
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験B2	487,805
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験B2	154,096
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験A3	413,535
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験A3	292,954
未修飾ルシフェラーゼ	225,986

【１４２４】

実施例７０．化学修飾：インビボ研究

Ａ．Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡのインビボスクリーニング

Ｂａｌｂ－Ｃマウス（ｎ＝４）に、表１０８に概要説明される化学修飾で完全に修飾された、１倍ＰＢＳ中に製剤化された修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、各脚に筋肉内注入する。対照であるルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；シュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾）およびＰＢＳ対照もまた試験する。８時間後に血清を採取して、ＥＬＩＳＡによりＧ－ＣＳＦタンパク質レベル、サイトカインレベルを判する。

表１０８．Ｇ－ＣＳＦ

【表０１０８】

mRNA	化学修飾
G-CSF	シュードウリジン
G-CSF	5-メチルウリジン
G-CSF	2-チオウリジン
G-CSF	4-チオウリジン
G-CSF	5-メトキシウリジン
G-CSF	2’-フルオロウリジン
G-CSF	5-ブロモウリジン
G-CSF	5-[3(1-E-プロペニルアミノ)ウリジン)
G-CSF	α-チオ-シチジン
G-CSF	5-メチルシチジン
G-CSF	N4-アセチルシチジン
G-CSF	シュードウリジンおよび 5-メチルシトシン
G-CSF	N1-メチル-シュードウリジンおよび 5-メチルシトシン
ルシフェラーゼ	シュードウリジンおよび 5-メチルシトシン
PBS	なし

【１４２５】

Ｂ．ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡのインビボスクリーニング

Ｂａｌｂ－Ｃマウス（ｎ＝４）に、表１０９に概説される化学修飾で完全に修飾された、１倍ＰＢＳ中に製剤化された４２～１０３μｇの修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を含有する２００μＬを皮下注入した。ＰＢＳ対照もまた試験した。修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡの投薬量も表１０９に概略説明する。投薬の８時間後に、マウスを撮像してルシフェラーゼ発現を判定した。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。

【１４２６】

表１０９に示されるように、２’－フルオロウリジンを例外として、すべてのルシフェラーゼｍＲＮＡ修飾化学組成がインビボ活性を示した。さらに、１－メチルシュードウリジン修飾ｍＲＮＡは、非常に高いルシフェラーゼ発現を示した（シュードウリジン含有ｍＲＮＡよりも５倍高い発現）。

表１０９．ルシフェラーゼスクリーニング

【表０１０９】

mRNA	化学修飾	mRNAの用量(μg)	投薬量(mL)	ルシフェラーゼ発現(光子/秒)
ルシフェラーゼ	5-メチルシチジン	83	0.72	1.94E+07
ルシフェラーゼ	N4-アセチルシチジン	76	0.72	1.11E07
ルシフェラーゼ	シュードウリジン	95	1.20	1.36E+07
ルシフェラーゼ	1-メチルシュードウリジン	103	0.72	7.40E+07
ルシフェラーゼ	5-メトキシウリジン	95	1.22	3.32+07
ルシフェラーゼ	5-メチルウリジン	94	0.86	7.42E+06
ルシフェラーゼ	5-ブロモウリジン	89	1.49	3.75E+07
ルシフェラーゼ	2'-フルオログアノシン	42	0.72	5.88E+05
ルシフェラーゼ	2'-フルオロシチジン	47	0.72	4.21E+05
ルシフェラーゼ	2'-フルオロウリジン	59	0.72	3.47E+05
PBS	なし	-	0.72	3.16E+05

【１４２７】

実施例７１．組み合わせルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡのインビボスクリーニング

Ｂａｌｂ－Ｃマウス（ｎ＝４）に、表１１０に概要説明される化学修飾で完全に修飾された、１倍ＰＢＳ中に製剤化された１００μｇの修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５'キャップ、キャップ１）を２００μＬ皮下注入した。ＰＢＳ対照もまた試験した。投薬の８時間後に、マウスを撮像してルシフェラーゼ発現を判定した。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａ ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。

【１４２８】

表１１０に示されるように、すべてのルシフェラーゼｍＲＮＡ修飾化学組成（組み合わせで）が、インビボ活性を示した。さらに、修飾ｍＲＮＡ（Ｎ４－アセチルシチジンまた

は５メチルシチジンを有する）におけるＮ１－メチル－シュードウリジンの存在は、シュードウリジンを有するものを用いて試験した同じ組み合わせよりも高い発現を示した。総合すると、これらのデータは、Ｎ１－メチル－シュードウリジン含有ルシフェラーゼｍＲＮＡが、単独で使用される（表１０９）か、または他の修飾ヌクレオチドと組み合わせて使用される（表１１０）かにかかわらず、インビボでのタンパク質発現の向上をもたらすことを示す。

表１１０．ルシフェラーゼスクリーニングの組み合わせ

【表０１１０】

mRNA	化学修飾	ルシフェラーゼ発現(光子/秒)
ルシフェラーゼ	N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	4.18E+06
ルシフェラーゼ	N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	2.88E+07
ルシフェラーゼ	5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	3.48E+07
ルシフェラーゼ	5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	1.44E+07
ルシフェラーゼ	5-メチルシチジン/ウリジンの50%が2-チオウリジンで置換されている	2.39E+06
ルシフェラーゼ	5-メチルシチジン/シュードウリジン	2.36E+07
ルシフェラーゼ	5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	4.15E+07
PBS	なし	3.59E+05

【１４２９】

実施例７２．ＢＪ線維芽細胞における自然免疫応答

ヒト初代包皮線維芽細胞（ＢＪ線維芽細胞）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（カタログ番号ＣＲＬ－２５２２）から入手し、５％ＣＯ２下において３７℃で１０％ウシ胎児血清を補充したイーグル最小必須培地（ＡＴＣＣ、カタログ番号３０－２００３）で成長させる。ＢＪ線維芽細胞を、０．５ｍＬの培養培地中、１ウェル当たり１３０，０００の細胞密度で２４ウェルプレートに播種する。５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された（Ｇｅｎ１）か、または５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された（Ｇｅｎ２）、２５０ｎｇの修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、製造業者のプロトコルに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１１６６８－０１９）を用いてトランスフェクトする。対照試料であるＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００および未修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（天然のＧ－ＣＳＦ）もトランスフェクトする。細胞は、５日間連続でトランスフェクトする。トランスフェクション複合体を、各回のトランスフェクションの４時間に取り出す。

【１４３０】

培養上清を、製造業者のプロトコルに従って毎日ＥＬＩＳＡによりトランスフェクション後に、分泌されたＧ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログＤＣＳ５０）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、およびインターフェロンα（ＩＦＮ－αについてアッセイする。細胞を、初回トランスフェクションの６時間および１８時間後に、ならびにその後は１日おきに、ＣＥＬＬ　ＴＩＴＥＲ　ＧＬＯ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番

号Ｇ７５７０）用いて生存率について分析する。収集した細胞と同時に、全ＲＮＡを単離し、製造業者のプロトコルに従ってＲＮＡＥＡＳＹマイクロキット（カタログ番号７４００４）を用いてＤＮＡＳＥ（登録商標）で処理する。１００ｎｇの全ＲＮＡを、製造業者のプロトコルに従ってＨｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号４３６８８１４）を用いてｃＤＮＡ合成に使用する。次いで、ｃＤＮＡを、製造業者のプロトコルに従ってＢｉｏｒａｄ ＣＦＸ ３８４機器においてＳｙｂｒＧｒｅｅｎを用いて定量的リアルタイムＰＣＲによって自然免疫応答遺伝子の発現について分析する。

【１４３１】

実施例７３．野生型Ｔ７ポリメラーゼによるインビトロ転写

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）およびＧ－ＣＳＦ ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、前述のように野生型Ｔ７ポリメラーゼを用いて表１１１～１１４に列挙される異なる化学組成および化学組成の組み合わせで完全に修飾した。

【１４３２】

翻訳反応物質の収率を、分光光度測定（ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｍｅｔｒｉｃ ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ）（ＯＤ２６０）によって判定し、ルシフェラーゼの収率を表１１１に示し、Ｇ－ＣＳＦを表１１３に示す。

【１４３３】

ルシフェラーゼおよびＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡを酵素キャッピング反応に供し、各修飾ｍＲＮＡのキャッピング反応を分光光度測定（ＯＤ２６０）により収量を評価し、正確な大きさを、バイオアナライザーを用いて評価した。ルシフェラーゼのキャッピング反応による収率を表１１２に示し、Ｇ－ＣＳＦは表１１４に示す。

表１１１．ルシフェラーゼのインビトロ転写化学組成

【表０１１１】

化学修飾	収　量(mg)
N6-メチルアデノシン	0.99
5-メチルシチジン	1.29
N4-アセチルシチジン	1.0
5-ホルミルシチジン	0.55
シュードウリジン	2.0
N1-メチル-シュードウリジン	1.43
2-チオウリジン	1.56
5-メトキシウリジン	2.35
5-メチルウリジン	1.01
α-チオ-シチジン	0.83
5-Br-ウリジン(5Bru)	1.96
5(2カルボメトキシビニル)ウリジン	0.89
5(3-1Eプロペニルアミノ)ウリジン	2.01
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	1.34
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1.26
5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	1.38
5-メチルシチジン/5-ブロモウリジン	0.12
5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	2.97
5-メチルシチジン/ウリジンの半分が 2-チオウリジンで修飾されている	1.59
5-メチルシチジン/2-チオウリジン	0.90
5-メチルシチジン/シュードウリジン	1.83
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1.33

表１１２．ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡのキャッピング化学組成および収量

【表０１１２】

化学修飾	収　　量(mg)
5-メチルシチジン	1.02
N4-アセチルシチジン	0.93
5-ホルミルシチジン	0.55
シュードウリジン	2.07
N1-メチル-シュードウリジン	1.27
2-チオウリジン	1.44
5-メトキシウリジン	2
5-メチルウリジン	0.8
α-チオ-シチジン	0.74
5-Br-ウリジン(5Bru)	1.29
5(2 カルボメトキシビニル)ウリジン	0.54
5(3-1E プロペニルアミノ)ウリジン	1.39
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	0.99
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1.08
5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	1.13
5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	1.08
5-メチルシチジン/ウリジンの半分が 2-チオウリジンで修飾されている	1.2
5-メチルシチジン/2-チオウリジン	1.27
5-メチルシチジン/シュードウリジン	1.19
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1.04

表１１３．Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡのインビトロ転写化学組成および収量

【表０１１３】

化学修飾	収量(mg)
N6-メチルアデノシン	1.57
5-メチルシチジン	2.05
N4-アセチルシチジン	3.13
5-ホルミルシチジン	1.41
シュードウリジン	4.1
N1-メチル-シュードウリジン	3.24
2-チオウリジン	3.46
5-メトキシウリジン	2.57
5-メチルウリジン	4.27
4-チオウリジン	1.45
2'-F-ウリジン	0.96
α-チオ-シチジン	2.29
2'-F-グアノシン	0.6
N-1-メチルアデノシン	0.63
5-Br-ウリジン(5Bru)	1.08
5(2カルボメトキシビニル)ウリジン	1.8
5(3-1Eプロペニルアミノ)ウリジン	2.09
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	1.72
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1.37
5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	1.85
5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	1.56
5-メチルシチジン/ウリジンの半分が2-チオウリジンで修飾されている	1.84
5-メチルシチジン/2-チオウリジン	2.53
5-メチルシチジン/シュードウリジン	0.63
N4-アセチルシチジン/2-チオウリジン	1.3
N4-アセチルシチジン/5-ブロモウリジン	1.37
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1.25
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	2.24

表１１４．Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡのキャッピング化学組成および収量

【表０１１４】

化学修飾	収量(mg)
N6-メチルアデノシン	1.04
5-メチルシチジン	1.08
N4-アセチルシチジン	2.73
5-ホルミルシチジン	0.95
シュードウリジン	3.88
N1-メチル-シュードウリジン	2.58
2-チオウリジン	2.57
5-メトキシウリジン	2.05
5-メチルウリジン	3.56
4-チオウリジン	0.91
2'-F-ウリジン	0.54
α-チオ-シチジン	1.79
2'-F-グアノシン	0.14
5-Br-ウリジン(5Bru)	0.79
5(2カルボメトキシビニル)ウリジン	1.28
5(3-1Eプロペニルアミノ)ウリジン	1.78
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	0.29
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	0.33
5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	0.91
5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	0.61
5-メチルシチジン/ウリジンの半分が2-チオウリジンで修飾されている	1.24
5-メチルシチジン/シュードウリジン	1.08
N4-アセチルシチジン/2-チオウリジン	1.34
N4-アセチルシチジン/5-ブロモウリジン	1.22
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1.56

【１４３４】

実施例７４．変異体Ｔ７ポリメラーゼによるインビトロ転写

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）およびＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、変異体Ｔ７ポリメラーゼ（Ｄｕｒａｓｃｒｉｂｅ（登録商標）Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号ＤＳ０１０９２５）（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いて表１１５～１１８に列挙される異なる化学組成および化学組成の組み合わせで完全に修飾した。

【１４３５】

翻訳反応物質の収率を、分光光度測定（ＯＤ２６０）によって判定し、ルシフェラーゼの収量を表１１５に示し、Ｇ－ＣＳＦを表１１７に示す。

【１４３６】

ルシフェラーゼおよびＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡを酵素キャッピング反応に供し、各修飾ｍＲＮＡのキャッピング反応を分光光度測定（ＯＤ２６０）により収量を評価し、正確な大きさを、バイオアナライザーを用いて評価した。ルシフェラーゼのキャッピング反応による収量を表１１６に示し、Ｇ－ＣＳＦを表１１８に示す。

表１１５．ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡのインビトロ転写化学組成および収量

【表０１１５】

化学修飾	収量(μg)
2’フルオロシトシン	71.4
2’フルオロウリジン	57.5
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験 A	26.4
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 A	73.3
N1-アセチルシチジン/2-フルオロウリジン	202.2
5-メチルシチジン/2-フルオロウリジン	131.9
2-フルオロシトシン/シュードウリジン	119.3
2-フルオロシトシン/N1-メチル-シュードウリジン	107.0
2-フルオロシトシン/2-チオウリジン	34.7
2-フルオロシトシン/5-ブロモウリジン	81.0
2-フルオロシトシン/2-フルオロウリジン	80.4
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン	61.2
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン/シュードウリジン	65.0
2-フルオログアニン/5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	41.2
2-フルオログアニン/シュードウリジン	79.1
2-フルオログアニン/N1-メチル-シュードウリジン	74.6
5-メチルシチジン/シュードウリジン、試験 B	91.8
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 B	72.4
2’フルオロアデノシン	190.98

表１１６．ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡのキャッピング化学組成および収量

【表０１１６】

化学修飾	収量(μg)
2’フルオロシトシン	19.2
2’フルオロウリジン	16.7
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験 A	7.0
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 A	21.5
N1-アセチルシチジン/2-フルオロウリジン	47.5
5-メチルシチジン/2-フルオロウリジン	53.2
2-フルオロシトシン/シュードウリジン	58.4
2-フルオロシトシン/N1-メチル-シュードウリジン	26.2
2-フルオロシトシン/2-チオウリジン	12.9
2-フルオロシトシン/5-ブロモウリジン	26.5
2-フルオロシトシン/2-フルオロウリジン	35.7
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン	24.7
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン/シュードウリジン	32.3
2-フルオログアニン/5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	31.3
2-フルオログアニン/シュードウリジン	20.9
2-フルオログアニン/N1-メチル-シュードウリジン	29.8
5-メチルシチジン/シュードウリジン、試験 B	58.2
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 B	44.4

表１１７．Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡインビトロ転写化学組成および収量

【表０１１７】

化学修飾	収量(μg)
2’フルオロシトシン	56.5
2’フルオロウリジン	79.4
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験 A	21.2
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 A	77.1
N1-アセチルシチジン/2-フルオロウリジン	168.6
5-メチルシチジン/2-フルオロウリジン	134.7
2-フルオロシトシン/シュードウリジン	97.8
2-フルオロシトシン/N1-メチル-シュードウリジン	103.1
2-フルオロシトシン/2-チオウリジン	58.8
2-フルオロシトシン/5-ブロモウリジン	88.8
2-フルオロシトシン/2-フルオロウリジン	93.9
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン	97.3
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン/シュードウリジン	96.0
2-フルオログアニン/5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	82.0
2-フルオログアニン/シュードウリジン	68.0
2-フルオログアニン/N1-メチル-シュードウリジン	59.3
5-メチルシチジン/シュードウリジン、試験 B	58,7
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 B	78.0

表１１８．Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡのキャッピング化学組成および収量

【表０１１８】

化学修飾	収量(μg)
2’フルオロシトシン	16.9
2’フルオロウリジン	17.0
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験A	10.6
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験A	22.7
N1-アセチルシチジン/2-フルオロウリジン	19.9
5-メチルシチジン/2-フルオロウリジン	21.3
2-フルオロシトシン/シュードウリジン	65.2
2-フルオロシトシン/N1-メチル-シュードウリジン	58.9
2-フルオロシトシン/2-チオウリジン	41.2
2-フルオロシトシン/5-ブロモウリジン	35.8
2-フルオロシトシン/2-フルオロウリジン	36.7
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン	36.6
2-フルオログアニン/5-メチルシトシン/シュードウリジン	37.3
2-フルオログアニン/5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	30.7
2-フルオログアニン/シュードウリジン	29.0
2-フルオログアニン/N1-メチル-シュードウリジン	22.7
5-メチルシチジン/シュードウリジン、試験B	60.4
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン、試験B	33.0

【１４３７】

実施例７５．２’Ｏ－メチルおよび２’フルオロ化合物

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、表１１９の化学組成で完全に修飾された形態として生成し、変異体Ｔ７ポリメラーゼ（Ｄｕｒａｓｃｒｉｂｅ（登録商標）Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号ＤＳ０１０９２５）（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いて転写した。２’フルオロ含有ｍＲＮＡをＤｕｒａｓｃｒｉｂｅ　Ｔ７を用いて作製したが、２’Ｏメチル含有ｍＲＮＡはＤｕｒａｓｃｒｉｂｅ　Ｔ７を用いて転写することができなかった。

【１４３８】

２’Ｏメチル修飾ｍＲＮＡの組み込みは、他の変異体Ｔ７ポリメラーゼを用いて達成することが可能であり得る（それぞれの内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２００４）２２：１１５５－１１６０、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（２００２）３０：ｅ１３８）、または米国特許第７，３０９，５７０号）。あるいは、２’ＯＭｅ修飾は、酵素的手段を用いて転写後に導入することができる。

【１４３９】

糖の２’基への修飾の導入は、多数の潜在的利点を有する。２’フルオロ置換のような２’ＯＭｅ置換は、ヌクレアーゼから保護することが既知であり、また、ｓｉＲＮＡおよびアンチセンスといった他の核酸に組み込まれると、自然免疫認識を廃止することが示されている（その全体が組み込まれる、Ｃｒｏｏｋｅ，ｅｄ．Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｄｒｕｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ；Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ：ＣＲＣ　ｐｒｅｓｓ）。

【１４４０】
次いで、２’フルオロ修飾ｍＲＮＡをＨｅＬａ細胞にトランスフェクトして、細胞環境におけるタンパク質産生を評価し、同じｍＲＮＡを細胞不含ウサギ網状赤血球系においても評価した。未修飾ルシフェラーゼ（天然ルシフェラーゼ）対照を、両方の転写実験に使用し、未処理または擬似トランスフェクト（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００単独）対照もＨｅＬａトランスフェクションについて評価し、ＲＮＡなしの対照をウサギ網状ライセート（ｒｅｔｉｃｕｌｙｓａｔｅ）について分析した。
【１４４１】
ＨｅＬａトランスフェクション実験については、トランスフェクションの前日に、２０，０００のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび1倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を、５％CO_2雰囲気下で一晩、３７ｏＧで成長させた。翌日、表１１９に記載の化学修飾を有する８３ｎｇの２’フルオロ含有ルシフェラーゼ修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ1）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で5分間のインキュベーションの後、両方の溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ Ｌｙｓｉｓ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。ライセートの体積を、最も強いシグナルを生成する試料について1ウェル当たり2百万を超える発光量が検出されなくなるまで調節または希釈し、試験した各化学組成についてのＲＬＵを表１１９に示す。プレートリーダーはＢｉｏＴｅｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、1ウェル当たり約２００の相対発光量であった。
【１４４２】
ウサギ網状赤血球ライセートアッセイについては、２’－フルオロ含有ルシフェラーゼｍＲＮＡを、滅菌のヌクレアーゼ不含水中で１０μＬ中２５０ｎｇの最終量に希釈し、４０μＬの新たに調製したウサギ網状赤血球ライセートに添加し、インビトロ翻訳反応を、乾式加熱ブロックにおいて３０℃で標準的な１．５ｍＬのポリプロピレン反応管（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）中で行った。翻訳アッセイを、製造業者の指示に従ってＲａｂｂｉｔ Ｒｅｔｉｃｕｌｏｃｙｔｅ Ｌｙｓａｔｅ（ヌクレアーゼ処理）キット（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いて行った。反応緩衝液に、提供されたロイシンまたはメチオニンのいずれかが欠けたアミノ酸ストック溶液の１対１混合物を補充し、結果的に両方のアミノ酸を十分な量で含有する反応混合物が効果的なインビトロ翻訳を行えるようにした。６０分間のインキュベーションの後、反応管を氷上に置くことによって反応を停止させた。
【１４４３】
ルシフェラーゼ修飾ＲＮＡを含有するインビトロ翻訳反応物のアリコートを、白色不透明ポリスチレン９６－ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，

ＷＩ）と合わせた。インビトロ翻訳反応物の量を、最も強いシグナルを生成する試料について１ウェル当たり２百万を超える相対発光量（ＲＬＵ）が検出されなくなるまで調節または希釈し、各化学組成に対するＲＬＵを表１２０に示す。プレートリーダーは、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約１６０の相対発光量であった。

【１４４４】

表１１９および１２０に見ることができるように、複数の２’フルオロ含有化合物が、インビトロで活性であり、ルシフェラーゼタンパク質を産生する。

表１１９．ＨｅＬａ細胞

【表０１１９】

化学修飾	濃度(μg/mL)	体積(μL)	収率(μg)	RLU
2’フルオロアデノシン	381.96	500	190.98	388.5
2’フルオロシトシン	654.56	500	327.28	2420
2’フルオログアニン	541,795	500	270.90	11,705.5
2’フルオロウリジン	944.005	500	472.00	6767.5
天然ルシフェラーゼ	該当なし	該当なし	該当なし	133,853.5
擬似	該当なし	該当なし	該当なし	340
未処理	該当なし	該当なし	該当なし	238

表１２０．ウサギ網状ライセート

【表０１２０】

化学修飾	RLU
2’フルオロアデノシン	162
2’フルオロシトシン	208
2’フルオログアニン	371,509
2’フルオロウリジン	258
天然ルシフェラーゼ	2,159,968
RNA なし	156

【１４４５】

実施例７６．修飾の組み合わせを用いたＨｅＬａ細胞におけるルシフェラーゼ

他の修飾と組み合わせた２’フルオロ修飾ｍＲＮＡの使用を評価するために、一連のｍＲＮＡを、実施例７５に記載されるように、野生型Ｔ７ポリメラーゼ（フルオロ不含化合物）または変異体Ｔ７ポリメラーゼ（フルオロ（ｆｌｕｙｏｒｏ）含有化合物）のいずれかを用いて転写した。すべての修飾ｍＲＮＡを、ＨｅＬａ細胞におけるインビトロトランスフェクションによって試験した。

【１４４６】

トランスフェクションの前日に、２０，０００のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を、５％CO_2雰囲気下で一晩、３７ｏＧで成長させた。翌日、表１２１に記載の化学修飾を有する８３ｎｇのルシフェラーゼ修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。

【１４４７】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。ライセートの体積を、最も強いシグナルを生成する試料について１ウェル当たり２百万を超える発光量が検出されなくなるまで調節または希釈し、試験した各化学組成についてのＲＬＵを表１２１に示す。プレートリーダーは、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約２００の相対発光量であった。

【１４４８】

表１２１から明らかなように、すべてのフルオロ不含化合物および多数の２’フルオロ修飾を含有する組み合わせを含む、ほとんどの組み合わせの修飾が、ｍＲＮＡによる機能的ルシフェラーゼタンパク質の産生をもたらした。

表１２１．ルシフェラーゼ

【表０１２１】

化学修飾	RLU
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	113,796
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	316,326
5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	24,948
5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	43,675
5-メチルシチジン/ウリジンの半分が 50%2-チオウリジンで修飾されている	41,601
5-メチルシチジン/2-チオウリジン	1,102
5-メチルシチジン/シュードウリジン	51,035
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	152,151
N4-アセチルシチジン/2’フルオロウリジントリホスフェート	288
5-メチルシチジン/2’フルオロウリジントリホスフェート	269
2’フルオロシトシントリホスフェート/シュードウリジン	260
2’フルオロシトシントリホスフェート/N1-メチル-シュードウリジン	412
2’フルオロシトシントリホスフェート/2-チオウリジン	427
2’フルオロシトシントリホスフェート/5-ブロモウリジン	253
2’フルオロシトシントリホスフェート/2’フルオロウリジントリホスフェート	184
2’フルオログアニントリホスフェート/5-メチルシチジン	321
2’フルオログアニントリホスフェート/5-メチルシチジン/シュードウリジン	207
2’フルオログアニン/5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	235
2’フルオログアニン/シュードウリジン	218
2’フルオログアニン/N1-メチル-シュードウリジン	247
5-メチルシチジン/シュードウリジン、試験 A	13,833
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 A	598
2’フルオロシトシントリホスフェート	201
2’フルオロウリジントリホスフェート	305
5-メチルシチジン/シュードウリジン、試験 B	115,401
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 B	21,034
天然ルシフェラーゼ	30,801
未処理	344
擬似	262

【１４４９】

実施例７７．Ｇ－ＣＳＦインビトロ転写

第２のオープンリーディングフレームに関連して、すべての異なる化学修飾の活性を評価するために、ルシフェラーゼｍＲＮＡ、ヒトＧ－ＣＳＦ ｍＲＮＡを用いて既に行った実験を再現した。Ｇ－ＣＳＦ ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、野生型Ｔ７ポリメラーゼ（すべてのフルオロ不含化合物）または変異体Ｔ７ポリメラーゼ（すべてのフルオロ含有化合物）を用いて、表１２２および１２３の化学組成で完全に修飾した。変異体Ｔ７ポリメラーゼは、市販入手した（Ｄｕｒａｓｃｒｉｂｅ（登録商標）Ｔ７ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号ＤＳ０１０９２５）（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）。

【１４５０】

表１２２および１２３の修飾ＲＮＡを、示されるように、ＨｅＬａ細胞にインビトロでトランスフェクトしたか、またはウサギ網状ライセート（２５０ｎｇの修飾ｍＲＮＡ）に添加した。対照である未処理、擬似トランスフェクト（トランスフェクション試薬のみ）、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたＧ－ＣＳＦ、または５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたルシフェラーゼ対照（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）も分析した。Ｇ－ＣＳＦタンパク質の発現をＥＬＩＳＡによって判定し、値を表１２２および１２３に示す。表１２２において、「ＮＴ」は未試験を意味する。

【１４５１】

表１２３に示されるように、すべてではないが多数の化学修飾が、ヒトＧ－ＣＳＦタンパク質産生をもたらした。細胞に基づく翻訳系および細胞不含の翻訳系によるこれらの結果は、非常によく相関し、同じ修飾が通常いずれの系においても機能するかまたは機能しない。１つの注目すべき例外は、５－ホルミルシチジン修飾Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡであり、これは、細胞不含の翻訳系では機能したが、ＨｅＬａ細胞に基づくトランスフェクション系では機能しなかった。２つのアッセイ間の同様の差異が、５－ホルミルシチジン修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡでも見られた。

【１４５２】

表１２３に示されるように、すべてではないが多数のＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ修飾化学組成（組み合わせて使用する場合）が、インビボ活性を示した。さらに、修飾ｍＲＮＡ（Ｎ４－アセチルシチジンまたは５メチルシチジンを有する）におけるＮ１－メチル－シュードウリジンの存在は、シュードウリジンを有するものを用いて試験した同じ組み合わせよりも高い発現を示した。総合すると、これらのデータは、Ｎ１－メチル－シュードウリジン含有Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡが、インビトロでのタンパク質発現の向上をもたらすことを示す。

表１２２．Ｇ－ＣＳＦ発現

【表０１２２】

化学修飾	G-CSF タンパク質(pg/mL) HeLa 細胞	G-CSF タンパク質(pg/mL) ウサギ網状ライセート細胞
シュードウリジン	1,150,909	147,875
5-メチルウリジン	347,045	147,250
2-チオウリジン	417,273	18,375
N1-メチル-シュードウリジン	NT	230,000
4-チオウリジン	107,273	52,375
5-メトキシウリジン	1,715,909	201,750
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験 A	609,545	119,750
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 A	1,534,318	110,500
2'-フルオロ-グアノシン	11,818	0
2'-フルオロ-ウリジン	60,455	0
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験 B	358,182	57,875
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 B	1,568,636	76,750
5-ブロモ-ウリジン	186,591	72,000
5-(2 カルボメトキシビニル)ウリジン	1,364	0
5-[3(1-E-プロペニルアミノ)ウリジン	27,955	32,625
α-チオ-シチジン	120,455	42,625
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験 C	882,500	49,250
N1-メチル-アデノシン	4,773	0
N6-メチル-アデノシン	1,591	0
5-メチル-シチジン	646,591	79,375
N4-アセチルシチジン	39,545	8,000
5-ホルミル-シチジン	0	24,000
5-メチルシトシン/シュードウリジン、試験 D	87,045	47,750
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、試験 D	1,168,864	97,125
擬似	909	682
未処理	0	0
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、対照	1,106,591	NT
ルシフェラーゼ対照	NT	0

表１２３．ＨｅＬａ細胞における組み合わせ化学組成

【表０１２３－１】

化学修飾	G-CSF タンパク質(pg/mL) HeLa 細胞
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	537,273
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	1,091,818
5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	516,136
5-メチルシチジン/5-ブロモウリジン	48,864
5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	207,500
5-メチルシチジン/2-チオウリジン	33,409
N4-アセチルシチジン/5-ブロモウリジン	211,591
N4-アセチルシチジン/2-チオウリジン	46,136
5-メチルシトシン/シュードウリジン	301,364
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン	1,017,727
N4-アセチルシチジン/2'フルオロウリジントリホスフェート	62,273
5-メチルシチジン/2'フルオロウリジントリホスフェート	49,318
2'フルオロシトシントリホスフェート/シュードウリジン	7,955
2'フルオロシトシントリホスフェート/N1-メチル-シュードウリジン	1,364
2'フルオロシトシントリホスフェート/2-チオウリジン	0
2'フルオロシトシントリホスフェート/5-ブロモウリジン	1,818
2'フルオロシトシントリホスフェート/2'フルオロウリジントリホスフェート	909
2'フルオログアニントリホスフェート/5-メチルシチジン	0
2'フルオログアニントリホスフェート/5-メチルシチジン/シュードウリジン	0
2'フルオログアニントリホスフェート/5-メチルシチジン/N1 メチルシュードウリジン	1,818
2'フルオログアニントリホスフェート/シュードウリジン	1,136
2'フルオログアニントリホスフェート/2' フルオロシトシントリホスフェート/N1-メチル-シュードウリジン	0
5-メチルシチジン/シュードウリジン	617,727
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	747,045
5-メチルシチジン/シュードウリジン	475,455
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	689,091

【表０１２３－２】

5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、対照１	848,409
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン、対照２	581,818
擬似	682
未処理	0
ルシフェラーゼ2'フルオロシトシントリホスフェート	0
ルシフェラーゼ2'フルオロウリジントリホスフェート	0

【１４５３】

実施例７８．化学組成のスクリーニング

以下に列挙される表（表１２４～１２６）は、前述の実施例に提示された様々な化合物を用いたインビトロおよびインビトロのスクリーニングデータの大部分を要約する。良好な相関性が、細胞に基づく翻訳アッセイと細胞不含の翻訳アッセイとの間に存在する。同じ化学置換は、通常、ルシフェラーゼまたはＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡについて試験したかにかかわらず、良好な一致性を示す。最後に、Ｎ１－メチル－シュードウリジン含有ｍＲＮＡは、インビトロおよびインビボで、検出可能なサイトカイン刺激をほとんどまたは全く伴わずに、非常に高いレベルのタンパク質発現を示し、インビトロおよびインビボの両方で、シュードウリジンを含有するｍＲＮＡよりも優れている。

【１４５４】

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）およびＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、表１２４および１２５に記載の天然もしくは非天然の化学組成、または表１２６に記載の化学組成の組み合わせで修飾し、本明細書に記載の方法を用いて試験した。

【１４５５】

表１２５および１２６において、「＊」は変異体Ｔ７ポリメラーゼ（Ｄｕｒａｓｃｒｉｂｅ（登録商標）Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号ＤＳ０１０９２５）（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いたインビトロ転写反応を指す；「＊＊」は変異体Ｔ７ポリメラーゼ（Ｄｕｒａｓｃｒｉｂｅ（登録商標）Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号ＤＳ０１０９２５）（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いたインビトロ転写反応の第２の結果を指す；「＊＊＊」は細胞不含翻訳（ウサギ網状赤血球ライセート）で見られた産生を指す；ＨｅＬａのタンパク質産生は、「＋」、「＋／－」、および「－」で判定する；Ｇ－ＣＳＦ　ＰＢＭＣについて言及する場合、「＋＋＋＋」は、６，０００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋＋＋」は、３，０００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋＋」は１，５００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋」は３００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋／－」は１５０～３００ｐｇ／ｍＬのＧ－ＣＳＦを意味し、バックグラウンドは、約１１０ｐｇ／ｍＬであった；サイトカインＰＢＭＣについて言及する場合、「＋＋＋＋」は１，０００ｐｇ／ｍＬを上回るインターフェロンα（ＩＦＮ－α）を意味し、「＋＋＋」は６００ｐｇ／ｍＬを上回るＩＦＮ－αを意味し、「＋＋」は３００ｐｇ／ｍＬを上回るＩＦＮ－αを意味し、「＋」は１００ｐｇ／ｍＬを上回るＩＦＮ－αを意味し、「－」は１００ｐｇ／ｍＬに満たないことを意味し、バックグラウンドは約７０ｐｇ／ｍＬであった；ならびに「ＮＴ」は未試験を意味する。表１２５において、タンパク質産生を、変異体Ｔ７ポリメラーゼ（Ｄｕｒａｓｃｒｉｂ

e（登録商標）Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号ＤＳ０１０９２５）（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いて評価した。

表１２４．天然

【表０１２４－１】

一般名(符号)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	タンパク質 (Luc;HeLa)	タンパク質 (G-CSF;HeLa)	タンパク質 (G-CSF;PBMC)	サイトカイン (G-CSF;PBMC)	インビボタンパク質 (Luc)	インビボタンパク質 (G-CSF)
1-メチルアデノシン (m1A)	失敗	成功	NT	-	+/-	++	NT	NT
N6-メチルアデノシン (m^6A)	成功	成功	-	-	+/-	++++	NT	NT
2'-O-メチルアデノシン (Am)	失敗*	実行せず	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-メチルシチジン (m^5C)	成功	成功	+	+	+	++	+	NT
2'-O-メチルシチジン (Cm)	失敗*	実行せず	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-チオシチジン (s2C)	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
N4-アセチルシチジン (ac^4C)	成功	成功	+	+	+/-	+++	+	NT
5-ホルミルシチジン (f^5C)	成功	成功	-***	-***	-	+	NT	NT
2'-O-メチルグアノシン (Gm)	失敗*	実行せず	NT	NT	NT	NT	NT	NT
inosine (I)	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT

【表０１２４－２】

シュードウリジン(Y)	成功	成功	+	+	++	+	+	NT
5-メチルウリジン(m^5U)	成功	成功	+	+	+/-	+	NT	NT
2'-O-メチルウリジン(Um)	失敗*	実行せず	NT	NT	NT	NT	NT	NT
1-メチルシュードウリジン(m1Y)	成功	成功	+	実行せず	++++	-	+	NT
2-チオウリジン(s^2U)	成功	成功	-	+	+	+	NT	NT
4-チオウリジン(s^4U)	失敗	成功		+	+/-	++	NT	NT
5-メトキシウリジン(mo^5U)	成功	成功	+	+	++	-	+	NT
3-メチルウリジン(m3U)	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT

表１２５．非天然

【表０１２５－１】

一般名	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	タンパク質 (Luc;HeLa)	タンパク質 (G-CSF;HeLa)	タンパク質 (G-CSF;PBMC)	サイトカイン (G-CSF;PBMC)	インビボタンパク質 (Luc)	インビボタンパク質 (G-CSF)
2'-F-アラ-グアノシン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-アラ-アデノシン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-アラ-シチジン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-アラ-ウリジン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-グアノシン	失敗/成功**	成功/失敗**	+**	+/-	-	+	+	NT
2'-F-アデノシン	失敗/成功**	失敗/失敗**	-**	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-シチジン	失敗/成功**	失敗/成功**	+**	NT	NT	NT	+	NT
2'-F-ウリジン	失敗/成功**	成功/成功**	+**	+	+/-	+	-	NT
2'-OH-アラ-グアノシン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-アラ-アデノシン	実行せず	実行せず	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-アラ-シチジン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-アラ-ウリジン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-Br-ウリジン	成功	成功	+	+	+	+	+	
5(2 カルボメトキシビニル)ウリジン	成功	成功	-	-	+/-	-		

【表０１２５－２】

5-[3-(1-E-プロペニルアミノ)ウリジン(Chem 5としても知られる)	成功	成功	-	+	+	-		
N6-(19- アミノ-ペンタオキサノナデシル)A	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-ジメチルアミノグアノシン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-アザ-シチジン	失敗	失敗	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-チオ-シチジン	成功	成功	+	+	+/-	+++	NT	NT
シュード-イソシチジン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-ヨード-ウリジン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-チオ-ウリジン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-アザ-ウリジン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
デオキシ-チミジン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-チオグアノシン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8-オキソ-グアノシン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
O6-メチル-グアノシン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-デアザ-グアノシン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-クロロ-プリン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-チオ-アデノシン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-デアザ-アデノシン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-ヨード-シチジン	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

【１４５６】

表１２６において、ＨｅＬａのタンパク質産生は「＋」、「＋／－」、および「－」によって判定する；Ｇ－ＣＳＦ　ＰＢＭＣに言及する際、「＋＋＋＋」は６，０００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋＋＋」は３，０００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋＋」は１，５００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋」は３００ｐｇ／ｍＬを上回るＧ－ＣＳＦを意味し、「＋／－」は１５０～３００ｐｇ／ｍＬのＧ－ＣＳＦを意味し、バックグラウンドは約１１０ｐｇ／ｍＬであった；サイトカインＰＢＭＣに言及する際、「＋＋＋＋」は１，０００ｐｇ／ｍＬを上回るインターフェロンα（ＩＦＮ－α）を意味し、「＋＋＋」は６００ｐｇ／ｍＬを上回るＩＦＮ－αを意味し、「＋＋」は３００ｐｇ／ｍＬを上回るＩＦＮ－αを意味し、「＋」は１００ｐｇ／ｍＬを上回るＩＦＮ－αを意味し、「－」は１００ｐｇ／ｍＬ未満を意味し、バックグラウンドは約７０ｐｇ／ｍＬであった；「ＷＴ」は野生型Ｔ７ポリメラーゼをさし、「ＭＴ」は変異体Ｔ７ポリメラーゼ（Ｄｕｒａｓｃｒｉｂｅ（登録商標）Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（カタログ番号ＤＳ０１０９２５）（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ（登録商標），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を指し、「ＮＴ」は未試験を意味する。

表１２６．組み合わせの化学組成

【表０１２６－１】

シチジン類似体	ウリジン類似体	プリン	IVT Luc	IVT (G-CSF)	タンパク質 (Luc;HeLa)	タンパク質 (G-CSF;HeLa)	タンパク質 (G-CSF;PBMC)	サイトカイン (G-CSF;PBMC)	インビボタンパク質 (Luc)
N4-アセチルシチジン	シュードリジン	A、G	成功WT	成功WT	+	+	NT	NT	+
N4-アセチルシチジン	N1-メチル-シュードリジン	A、G	成功WT	成功WT	+	+	NT	NT	+
5-メチルシチジン	5-メキトシウリジン	A、G	成功WT	成功WT	+	+	NT	NT	+
5-メチルシチジン	5-ブロモリジン	A、G	成功WT	成功WT	実行せず	+	NT	NT	
5-メチルシチジン	5-メチルリジン	A、G	成功WT	成功WT	+	+	NT	NT	+
5-メチルシチジン	50% 2-チオウジリン；50% uridine	A、G	成功WT	成功WT	+	NT	NT	NT	+
5-メチルシチジン	100% 2-チオウジリン	A、G	成功WT	成功WT	−	+	NT	NT	
5-メチルシチジン	シュードリジン	A、G	成功WT	成功WT	+	+	++	+	+
5-メチルシチジン	N1-メチル-シュードリジン	A、G	成功WT	成功WT	+	+	++++	−	+

【表０１２６－２】

N4-アセチルシチジン	2-チオウリジン	A、G	実行せず	成功 WT	実行せず	+	NT	NT	NT
N4-アセチルシチジン	5-ブロモウリジン	A、G	実行せず	成功 WT	実行せず	+	NT	NT	NT
N4-アセチルシチジン	2フルオロウリジントリホスフェート	A、G	成功	成功	-	+	NT	NT	NT
5-メチルシチジン	2フルオロウリジントリホスフェート	A、G	成功	成功	-	+	NT	NT	NT
2フルオロシトシントリホスフェート	シュードウリジン	A、G	成功	成功	-	+	NT	NT	NT
2フルオロシトシントリホスフェート	N1-メチル-シュードウリジン	A、G	成功	成功	-	+/-	NT	NT	NT
2フルオロシトシントリホスフェート	2-チオウリジン	A、G	成功	成功	-	-	NT	NT	NT
2フルオロシトシントリホスフェート	5-ブロモウリジン	A、G	成功	成功	-	+/-	NT	NT	NT
2フルオロシトシントリホスフェート	2フルオロウリジントリホスフェート	A、G	成功	成功	-	+/-	NT	NT	NT
5-メチルシチジン	ウリジン	A、2フルオロGTP	成功	成功	-	-	NT	NT	NT
5-メチルシチジン	シュードウリジン	A、2フルオロ	成功	成功	-	-	NT	NT	NT

【表０１２６－３】

		GTP							
5-メチルシチジン	N1-メチル-シュードウリジン	A、2フルオロGTP	成功	成功	-	+/-	NT	NT	NT
2フルオロシトシントリホスフェート	シュードウリジン	A、2フルオロGTP	成功	成功	-	+/-	NT	NT	NT
2フルオロシトシントリホスフェート	N1-メチル-シュードウリジン	A、2フルオロGTP	成功	成功	-	-	NT	NT	NT

【１４５７】

実施例７９．ＰＢＭＣにおける２’フルオロ化学

Ｇ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１に示されない）の自然免疫応答を誘起する能力を、インターフェロン－α（ＩＦＮ－α）および腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）産生を測定することによって判定した。インビトロＰＢＭＣ培養の使用は、オリゴヌクレオチドの免疫刺激可能性を測定する一般的な方法であり（Ｒｏｂｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ２００９ １９：８９－１０２）、トランスフェクション方法を本明細書に記載する。特異的ＥＬＩＳＡによって測定した経時的なインターフェロン－α（ＩＦＮ－α）および腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）産生の２または３人の別個のＰＢＭＣドナーからの平均を表１２７に示す。対照のＲ８４８、Ｐ（Ｉ）Ｐ（Ｃ）、ＬＰＳ、およびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（

Ｌ２０００）も分析した。

【１４５８】

自然免疫認識に関して、いずれの修飾ｍＲＮＡ化学組成も、陽性対照（Ｒ８４８、Ｐ（Ｉ）Ｐ（Ｃ））と比較してＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α産生を大幅に阻止したが、２’フルオロ化合物は、他の組み合わせと比べてもより低くＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α産生を低減させ、Ｎ４－アセチルシチジンの組み合わせは、サイトカインプロファイルを上昇させた。

表１２７．ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－α

【表０１２７－１】

	IFN-α： 3ドナー平均 (pg/mL)	TNF-α： 2ドナー平均 (pg/mL)
L2000	1	361
P(I)P(C)	482	544
R848	45	8,235
LPS	0	6,889
N4-アセチルシチジン/シュードウリジン	694	528
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	307	283
5-メチルシチジン/5-メトキシウリジン	0	411
5-メチルシチジン/5-ブロモウリジン	0	270
5-メチルシチジン/5-メチルウリジン	456	428
5-メチルシチジン/2-チオウリジン	274	277
N4-アセチルシチジン/2-チオウリジン	0	285
N4-アセチルシチジン/5-ブロモウリジン	44	403
5-メチルシチジン/シュードウリジン	73	332
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	31	280
N4-アセチルシチジン/2’フルオロウリジントリホスフェート	35	32
5-メチルシトジン(methylcytodine)/2’フルオロウリジントリホスフェート	24	0
2’フルオロシチジントリホスフェート/N1-メチル-シュードウリジン	0	11
2’フルオロシチジントリホスフェート/2-チオウリジン	0	0
2’フルオロシチジン/トリホスフェート5-ブロモウリジン	12	2
2’フルオロシチジントリホスフェート/2’フルオロウリジントリホスフェート	11	0
2’フルオロシチジントリホスフェート/5-メチルシチジン	14	23
2’フルオロシチジントリホスフェート/5-メチルシチジン/シュードウリジン	6	21
2’フルオロシチジントリホスフェート/5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	3	15
2’フルオロシチジントリホスフェート/シュードウリジン	0	4

【表０１２７－２】

2’フルオロシチジントリホスフェート/N1-メチル-シュードウリジン	6	20
5-メチルシチジン/シュードウリジン	82	18
5-メチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	35	3

【１４５９】
実施例８０．タバコエッチ病ウイルス５’ＵＴＲを有する修飾ｍＲＮＡ
５’非翻訳領域（ＵＴＲ）は、隣接領域として提供され得る。複数の５’ＵＴＲは、隣接領域に含まれ得、同一または異なる配列であり得る。隣接領域の任意の部分（隣接領域を含なまい任意の部分を含む）は、コドン最適化され得、それらのいずれかは、独立して、コドン最適化の前および／または後に１つ以上の異なる構造または化学修飾を含有し得る。
【１４６０】
５’ＵＴＲは、タバコエッチ病ウイルス（ＴＥＶ）からの５’ＵＴＲを含み得る。Ａ、Ｔ、Ｃ、もしくはＧを含む１つ以上のヌクレオチドが末端に付加されるか、または末端から除去される５’ＵＴＲの変異形が利用され得る。
【１４６１】

実施例８１．ＰＬＧＡ製剤化ｍＲＮＡの発現

Ａ．ルシフェラーゼＰＬＧＡマイクロスフェアの合成および特徴付け

５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、２－チオウリジンで置換されたウリジンで２５％および５－メチルシトシンで置換されたシトシンで２５％修飾されたか、Ｎ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、またはシュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１倍ＴＥ緩衝液中で再構築し、次いでＰＬＧＡマイクロスフェア中で製剤化した。ＰＬＧＡマイクロスフェアを、ＰＬＧＡエステルキャップ（Ｌａｃｔｅｌ、カタログ番号Ｂ６０１０－２、固有粘度０．５５～０．７５、５０：５０のＬＡ：ＧＡ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号３４８４０６－２５Ｇ、ＭＷ　１３－２３ｋ）、ジクロロメタン、および水を使用して、当技術分野で既知の水／油／水の二重乳化法を用いて合成した。手短に、４ｍｇ／ｍＬのＴＥ緩衝液（Ｗ１）中の０．４ｍＬのｍＲＮＡを、２００ｍｇ／ｍＬのＰＬＧＡの濃度で、ジクロロメタン（ＤＣＭ）（Ｏ１）中に溶解させた２ｍＬのＰＬＧＡに添加した。Ｗ１／Ｏ１エマルションを、速度５（約１９，０００ｒｐｍ）で３０秒間均質化させた（ＩＫＡ　Ｕｌｔｒａ－Ｔｕｒｒａｘ　Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ，Ｔ１８）。次いで、Ｗ１／Ｏ１エマルションを２５０ｍＬの１％のＰＶＡ（Ｗ２）に添加し、速度５（約１９，０００ｒｐｍ）で１分間均質化させた。製剤をそのまま３時間撹拌させ、次いで、１００μｍのナイロンメッシュ篩（Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔｒａｉｎｅｒ、カタログ番号２２－３６３－５４９）に通し、最後に遠心分離により洗浄した（１０分間、９，２５０ｒｐｍ、４℃）。上清を廃棄し、ＰＬＧＡのペレットを５～１０ｍＬの水に再懸濁させ、これを２回繰り返した。水で洗浄し、再懸濁した後、１００～２００μｌのＰＬＧＡマイクロスフェア試料を、レーザー回折による製剤の粒径測定に使用した（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｍａｓｔｅｒｓｉｚｅｒ２０００）。洗浄した製剤を液体窒素中で凍結させ、次いで２～３日間凍結乾燥させた。

【１４６２】

凍結乾燥させた後、約１０ｍｇのＰＬＧＡ　ＭＳを２ｍＬのエッペンドルフ管に計量し、１ｍＬのＤＣＭを添加することにより脱製剤化し、試料を２～６時間振盪させた。ｍＲＮＡを０．５ｍＬの水を添加することによって脱製剤化ＰＬＧＡマイクロスフェアから抽出し、試料を一晩振盪した。トランスフェクションアッセイにおける対照として使用するために、ＴＥ緩衝液中の製剤化していないルシフェラーゼｍＲＮＡ（非製剤化対照）をＤＣＭ中に添加し、脱製剤化プロセスに供した（脱製剤化対照）。カプセル封入効率、充填される重量パーセント、および粒径を表１２８に示す。カプセル封入効率を、製剤に添加されるｍＲＮＡの初期量で除したＰＬＧＡマイクロスフェアの脱製剤からのｍＲＮＡのｍｇとして計算した。製剤中に充填される重量パーセントを、製剤に添加されるＰＬＧＡの初期量で除したＰＬＧＡマイクロスフェアの脱製剤からのｍＲＮＡのｍｇとして計算した。

表１２８．ＰＬＧＡ特性

【表０１２８】

化学修飾	試料 ID	カプセル封入効率(%)	理論上のmRNA充填(重量%)	実際のmRNA充填(重量%)	粒径(D50、um)
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジンで完全に修飾	43-66A	45.8	0.4	0.18	33.4
	43-66B	29.6		0.12	27.7
	43-66C	25.5		0.10	27.1
2-チオウリジンで置換されたウリジンで25%および5-メチルシトシンで置換されたシトシンで25%	43-67A	34.6	0.4	0.14	29.9
	43-67B	22.8		0.09	30.2
	43-67C	23.9		0.10	25.1
N1-メチル-シュードウリジンで完全に修飾	43-69A	55.8	0.4	0.22	40.5
	43-69B	31.2		0.12	41.1
	43-69C	24.9		0.10	46.1
シュードウリジンで完全に修飾	43-68-1	49.3	0.4	0.20	34.8
	43-68-2	37.4		0.15	35.9
	43-68-3	45.0		0.18	36.5

【１４６３】

Ｂ．ＰＬＧＡマイクロスフェアにカプセル封入された修飾ｍＲＮＡのタンパク質発現

トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のＣＯ２雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、８３ｎｇの脱製剤化ルシフェラーゼｍＲＮＡ　ＰＬＧＡマイクロスフェア試料、脱製剤化ルシフェラーゼｍＲＮＡ対照（脱製剤化対照）、または非製剤化ルシフェラーゼｍＲＮＡ対照（非製剤化対照）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加した。次いで、プレートを前述のようにインキュベートした。

【１４６４】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業

者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ Ｌｙｓｉｓ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約２００の相対発光量であった。プレートリーダーは、ＢｉｏＴｅｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。

【１４６５】

細胞を収集し、各試料に対する（相対発光量、ＲＬＵにおける）生物発光を表１２９に示す。これらの試料のトランスフェクションは、ルシフェラーゼｍＲＮＡの種々の化学組成がＰＬＧＡマイクロスフェア製剤化の後に依然としてルシフェラーゼタンパク質を発現できることを確認した。

表１２９．化学修飾

【表０１２９】

化学修飾	試料ＩＤ	生物発光(RLU)
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジンで完全に修飾	脱製剤化対照	164266.5
	非製剤化対照	113714
	43-66A	25174
	43-66B	25359
	43-66C	20060
2-チオウリジンで置換されたウリジンで25%および5-メチルシトシンで置換されたシトシンで25%	脱製剤化対照	90816.5
	非製剤化対照	129806
	43-67A	38329.5
	43-67B	8471.5
	43-67C	10991.5
N1-メチル-シュードウリジンで完全に修飾	脱製剤化対照	928093.5
	非製剤化対照	1512273.5
	43-69A	1240299.5
	43-69B	748667.5
	43-69C	1193314
シュードウリジンで完全に修飾	脱製剤化対照	154168
	非製剤化対照	151581
	43-68-1	120974.5
	43-68-2	107669
	43-68-3	97226

【１４６６】

実施例８２．第ＩＸ因子のインビトロ研究

Ａ．無血清培地

ヒト第ＩＸ因子ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）無血清培地内にトランスフェクトした。細胞培養上清を採取し、ペプチドの二次元ＨＰＬＣ分離を経る前にトリプシン消化に供した。マトリックス支援レーザー脱離／イオン化を使用して、ペプチドを検出した。８

個のペプチドが検出され、検出されたペプチドのうちの７個が第ＩＸ因子に特有である。この結果は、無血清培地へトランスフェクトしたｍＲＮＡが完全長第ＩＸ因子タンパク質を発現できたことを示す。

【１４６７】

Ｂ．ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）２９３Ａ細胞

２５０ｎｇのコドン最適化ヒト第ＩＸ因子ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０％ＦＢＳの存在下でＤＭＥＭにおいてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いてＨＥＫ２９３Ａ細胞（１５０，０００細胞／ウェル）内にトランスフェクトした。トランスフェクションの３時間後、トランスフェクション複合体を取り出した。トランスフェクションの３、６、９、１２、２４、４８、および７２時間後、細胞を収集した。全ＲＮＡを単離し、ｃＤＮＡ合成に使用した。コドン最適化第ＩＸ因子特異的プライマーセットを使用して、そのｃＤＮＡを定量的リアルタイムＰＣＲによる分析に供した。ヒトヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ１（ＨＰＲＴ）レベルを正規化に使用した。データは検出可能なｍＲＮＡの割合としてプロットされ、ｍＲＮＡレベルは３時間時点で１００％と見なされる。ヒト胎児腎臓２９３（ＨＥＫ２９３）細胞における５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された第ＩＸ因子修飾ｍＲＮＡの半減期は、約８～１０時間である。

【１４６８】

実施例８３．生理食塩水製剤：皮下投与

ヒトＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）ならびにヒトＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾）を、生理食塩水中で製剤化し、１００μｇの用量で筋肉内（ＩＭ）注入を介してマウスに送達した。

【１４６９】

対照には、ルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）またはその製剤緩衝液（Ｆ．Ｂｕｆｆｅｒ）が含まれた。マウスに、注入の１３時間後に採血を行って、ｐｇ／ｍＬ単位で血清中のヒトポリペプチドの濃度を判定した。（Ｇ－ＣＳＦ群では、マウス血清中のヒトＧ－ＣＳＦを測定し、ＥＰＯ群では、マウス血清中のヒトＥＰＯを測定した）。データを表１３０に示す。

【１４７０】

製剤化されない場合、ｍＲＮＡは血清中で急速に分解し、それは系中でより長く持続するｍＲＮＡを送達する最良の方法が、ｍＲＮＡを製剤化することによるものであることを示唆する。表１３０に示されるように、ｍＲＮＡは緩衝製剤のみを使用して皮下に送達されてもよい。

表１３０．投薬レジメン

【表０１３０】

群	処理	用量 体積(μl/マウス)	投薬 ビヒクル	平均 タンパク質 産生 pg/mL、 血清
G-CSF	G-CSF	100	F緩衝液	45
G-CSF	ルシフェラーゼ	100	F緩衝液	0
G-CSF	F緩衝液	100	F緩衝液	2.2
EPO	EPO	100	F緩衝液	72.03
EPO	ルシフェラーゼ	100	F緩衝液	26.7
EPO	F緩衝液	100	F緩衝液	13.05

【１４７１】

実施例８４．硝子体内送達

ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３９に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）、およびルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を、生理食塩水中で製剤化し、表１３１に記載されるようにラットの硝子体内に送達した。試料を硝子体内に送達された生理食塩水のみの対照に対して比較した。

表１３１．投薬チャート

【表０１３１】

群番号	用量レベル (μg 修飾RNA/眼)	投与量 (μL/眼)	処理	
			右眼 (OD)	左眼 (OS)
対照	0	5	送達緩衝液のみ	送達緩衝液のみ
送達緩衝液中の修飾RNA	10	5	mCherry	ルシフェラーゼ

【１４７２】

１日目に、動物に麻酔をかけている間に各動物の左または右眼に製剤を投与する。投与の前の日に、ゲンタマイシン眼内軟膏または溶液を両眼に２回適用した。ゲンタマイシン眼内軟膏または溶液を、注入の直後および注入の翌日に適用した。投薬の前に、散瞳点眼剤（１％トロピカミドおよび／または２．５％フェニレフリン）をそれぞれの眼に適用する。

【１４７３】

投薬の１８時間後、ｍＣｈｅｒｒｙの用量および送達緩衝液を受容した眼を摘出し、室

温で一晩、組織固定のためにそれぞれの眼を１０ｍＬの４％パラホルムアルデヒドを含む管に別々に置いた。その翌日、眼を１０ｍＬの３０％のショ糖（ｓｕｃｕｒｏｓｅ）を含む管に別々に写し、それらが処理され、切片化されるまで２１℃で保管した。異なる切片から作製されたスライドをＦ－顕微鏡検査で評価した。ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡを投与された眼から作製されたスライドでは陽性発現が見られ、対照は発現を示さなかった。

【１４７４】

実施例８５．インビボサイトカイン発現研究

５’キャップ、キャップ１で修飾されていないか（未修飾）、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンならびに５’キャップ、キャップ１で完全に修飾されたか（Ｇｅｎ１）、または５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンならびに５’キャップ、キャップ１で完全に修飾されたか（Ｇｅｎ２キャップ）、あるいはキャップがない（Ｇｅｎ２キャップされない）、２００μｇのＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない）をマウスに筋肉内注入した。対照のＲ－８４８、５％ショ糖、および未処理のマウスも分析した。８時間後、マウスから血清を採取し、インターフェロン－α（ＩＦＮ－α）発現について分析した。その結果を表１３２に示す。

表１３２．ＩＦＮ－α発現

【表０１３２】

製剤	IFN-α (pg/mL)
未修飾 G-CSF	67.012
G-CSF Gen1	8.867
G-CSF Gen2 キャップ	0
G-CSF Gen2 キャップされない	0
R-848	40.971
5% ショ糖	1.493
未処理	0

【１４７５】

実施例８６．ＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡのインビトロ発現

ＨＥＫ２９３細胞に、表１３３に示される濃度で、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００を用いて複合体形成している修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）ＶＥＧＦ－Ａ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６７２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）をトランスフェクトした。タンパク質発現をＥＬＩＳＡによって検出し、そのタンパク質（ｐｇ／ｍＬ）を表１３３および図７に示す。

表１３３．タンパク質発現

【表０１３３】

トランスフェクトした量	10ng	2.5ng	625pg	156pg	39pg	10pg	2pg	610fg
タンパク質 (pg/mL)	10495	10038	2321.23	189.6	0	0	0	0

【１４７６】

実施例８７．ＧＦＰのＨｅＬａ細胞におけるインビトロスクリーニング

トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ

－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のCO_2雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、表１３４に記載の化学修飾を有する、３７．５ｎｇまたは７５ｎｇの緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。

【１４７７】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。各化学組成に対する中央蛍光強度（ＭＦＩ）を判定し、表１３４に示す。

【１４７８】

この結果は、Ｎ１－メチル－シュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾されたＧＦＰが、他の化学組成と比較してＨｅＬａ細胞中でよりタンパク質を産生することを実証する。加えて、細胞に投与されるより高用量のＧＦＰは、より高いＭＦＩ値をもたらした。

表１３４．平均蛍光強度

【表０１３４】

化学組成	37.5ng	75ng
	MFI	MFI
修飾なし	97400	89500
5-メチルシトシン/シュードウリジン	324000	715000
5-メチルシトシン/N1-メチル-シュードウリジン	643000	1990000

【１４７９】

実施例８８．均質化

異なるルシフェラーゼｍＲＮＡ溶液（表１３５に記載され、「Ｘ」は、その成分を含有する溶液を指す）（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を評価し、異なる溶液の収量パーセント、バイオアナライザーによってｍＲＮＡの完全性、ならびにインビトロトランスフェクションによるｍＲＮＡのタンパク質発現を試験した。表１３５に示されるように、水、４ｍｇ／ｍＬの１倍ＴＥ緩衝液中で、ｍＲＮＡ溶液を調製し、０．８ｍｇ／ｍＬの最終ｍＲＮＡ濃度を実現するために、ジクロロメタン（ＤＣＭ）または２００ｍｇ／ｍＬのポリ（乳酸－コ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）（Ｌａｃｔｅｌ、カタログ番号Ｂ６０１０－２、固有粘度０．５５－０．７５、５０：５０のＬＡ：ＧＡ）を含有するＤＣＭのいずれかに添加した。均質化を必要とする溶液を速度５（約１９，０００ｒｐｍ）で３０秒間均質化させ

た（ＩＫＡ　Ｕｌｔｒａ－Ｔｕｒｒａｘ　Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ，Ｔ１８）。水、ジクロロメタン（ｄｉｃｌｏｒｏｍｅｔｈａｎｅ）、およびポリ（乳酸－コ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）中のｍＲＮＡ試料は、回収不能（ＮＲ）であった。ＮＲ試料を除くすべての試料が、バイオアナライザー（Ｂｉｏ－ｒａｄ　Ｅｘｐｅｒｉｏｎ）で判定されるようにｍＲＮＡの完全性を維持した。

【１４８０】

トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のＣＯ２雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、回収可能な試料からの２５０ｎｇのルシフェラーゼｍＲＮＡを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加した。次いで、プレートを前述のようにインキュベートした。対照ルシフェラーゼｍＲＮＡ（生理食塩水中で製剤化されたルシフェラーゼｍＲＮＡ）（対照）および未処理細胞（未処理）も評価した。細胞を収集し、各シグナルに対するその生物発光平均（光子／秒で）（生物発光（ｐ／ｓ））もまた表１３５に示す。分析した際、回収可能な試料はすべて、ルシフェラーゼｍＲＮＡの活性を示した。

【１４８１】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約２００の相対発光量であった。プレートリーダーは、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。

【１４８２】

細胞を収集し、その生物発光平均（相対発光量、ＲＬＵで）（生物発光（ＲＬＵ））もまた表１３５に示す。分析した際、回収可能な試料はすべて、ルシフェラーゼｍＲＮＡの活性を示した。

表１３５．溶液

【表０１３５】

溶液番号	水	1倍TE緩衝液	DCM	DCM/PLGA	Homogenizer	収率(%)	生物発光(RLU)
1	X					96	5423780
2		X			X	95	4911950
3	X				X	92	2367230
4		X			X	90	4349410
5	X		X		X	66	4145340
6		X	X		X	71	3834440
7	X			X	X	NR	n/a
8		X		X	X	24	3182080
9	X			X		NR	n/a
10		X		X		79	3276800
11	X		X			79	5563550
12		X	X			79	4919100
対照							2158060
未処理							3530

【１４８３】

実施例８９．ＴＥ緩衝液および水の評価

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を、表１３６に概要説明されるように水またはＴＥ緩衝液中に再構築し、次いで、ＰＬＧＡマイクロスフェア中で製剤化した。ＰＬＧＡマイクロスフェアを、ＰＬＧＡ（Ｌａｃｔｅｌ、カタログ番号Ｂ６０１０－２、固有粘度０．５５～０．７５、５０：５０のＬＡ：ＧＡ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号３４８４０６－２５Ｇ、ＭＷ　１３－２３ｋ）、ジクロロメタン、および水を使用して、当技術分野で既知の水／油／水の二重乳化法を用いて合成した。手短に、水または２～６ｍｇ／ｍＬの濃度のＴＥ緩衝液（Ｗ１）中の０．２～０．６ｍＬのｍＲＮＡを、１００ｍｇ／ｍＬのＰＬＧＡの濃度でジクロロメタン（ＤＣＭ）（Ｏ１）中に溶解させた２ｍＬのＰＬＧＡに添加した。Ｗ１／Ｏ１エマルションを、速度５（約１９，０００ｒｐｍ）で３０秒間均質化させた（ＩＫＡ　Ｕｌｔｒａ－Ｔｕｒｒａｘ　Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ，Ｔ１８）。次いで、Ｗ１／Ｏ１エマルションを２５０ｍＬの１％のＰＶＡ（Ｗ２）に添加し、速度５（約１９，０００ｒｐｍ）で１分間均質化させた。

【１４８４】

製剤をそのまま３時間撹拌させ、次いで、１００μｍのナイロンメッシュ篩（Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔｒａｉｎｅｒ、カタログ番号２２－３６３－５４９）に通し、最後に遠心分離により洗浄した（１０分間、９，２５０ｒｐｍ、４℃）。上清を廃棄し、ＰＬＧＡのペレットを５～１０ｍＬの水に再懸濁させ、これを２回繰り返した。洗浄した製剤を液体窒素中で凍結させ、次いで２～３日間凍結乾燥させた。凍結乾燥させた後、約１０ｍｇのＰＬＧＡ　ＭＳを２ｍＬのエッペンドルフ管に計量し、１ｍＬのＤＣＭを添加することにより脱製剤化し、試料を２～６時間振盪させた。ｍＲＮＡを０．５ｍＬの水を添加することによって脱製剤化ＰＬＧＡマイクロスフェアから抽出し、試料を一晩振盪した。トランスフェクションアッセイにおける対照として使用するために、水またはＴＥ緩衝液中の製剤化していないルシフェラーゼｍＲＮＡ（脱製剤化対照）をＤＣＭ中に添加し、脱製剤化プロセスに供した。

【１４８５】
トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のＣＯ２雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、１００ｎｇの脱製剤化ルシフェラーゼｍＲＮＡ試料を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加した。次いで、プレートを前述のようにインキュベートした。

【１４８６】
１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約２００の相対発光量であった。プレートリーダーは、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。各製剤からのルシフェラーゼｍＲＮＡの活性度を判定するために、各製剤に対する相対発光量（ＲＬＵ）を適切なｍＲＮＡ脱製剤化対照（水またはＴＥ緩衝液中のｍＲＮＡ）のＲＬＵで除した。表１３６は、ルシフェラーゼｍＲＮＡの活性度を示す。ＰＬＧＡマイクロスフェア製剤（製剤）中のルシフェラーゼｍＲＮＡの活性度は、水と比べて、ＴＥ緩衝液中で製剤化することによって大幅に改善された。

表１３６．製剤

【表０１３６】

形態	mRNA濃度(mg/mL)	W1溶媒体積(μL)	全mRNA(μg)	T理論上のmRNA充填（重量%)	実際のmRNA充填（重量%)	W1溶媒	活性度(脱製剤化対照の%)
PLGA A	4	400	1600	0.80	0.14	水	12.5%
PLGA B	4	200	800	0.40	0.13	水	1.3%
PLGA C	4	600	2400	1.20	0.13	水	12.1%
PLGA D	2	400	800	0.40	0.07	水	1.3%
PLGA E	6	400	2400	1.20	0.18	TE緩衝液	38.9%
PLGA F	4	400	1600	0.80	0.16	TE緩衝液	39.7%
PLGA G	4	400	1600	0.80	0.10	TE緩衝液	26.6%

【１４８７】
実施例９０．ｍＲＮＡ上の化学修飾

トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のCO_2雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、表１３７に記載の化学修飾を有する８３ｎｇのルシフェラーゼ修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。

【１４８８】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ルシフェラーゼを発現する細胞を、製造業者の指示に従って１００μＬのＰａｓｓｉｖｅ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）で溶解した。ライセートのアリコートを白色不透明ポリスチレン９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）に移し、１００μＬの完全ルシフェラーゼアッセイ溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）と合わせた。ライセートの体積を、最も強いシグナルを生成する試料について１ウェル当たり２百万を超える相対発光量（ＲＬＵ）が検出されなくなるまで調節または希釈し、試験した各化学組成についてのＲＬＵを、表１３７に示す。プレートリーダーは、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）であった。試薬を用いないプレートのバックグラウンドシグナルは、１ウェル当たり約２００の相対発光量であった。

表１３７．化学修飾

【表０１３７】

試料	RLU
未処理	336
未修飾ルシフェラーゼ	33980
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン	1601234
5-メチルシトシンおよびN1-メチル-シュードウリジン	421189
5-メチルシトシンで置換されたシトシン25%および2-チオウリジンで置換されたウリジン25%	222114
N1-メチル-シュードウリジン	3068261
シュードウリジン	140234
N4-アセチルシチジン	1073251
5-メトキシウリジン	219657
5-ブロモウリジン	6787
N4-アセチルシチジンおよびN1-メチル-シュードウリジン	976219
5-メチルシトシンおよび5-メトキシウリジン	66621
5-メチルシトシンおよび2’フルオロウリジン	11333

【１４８９】

実施例９１．修飾ｍＲＮＡの筋肉内および皮下投与

ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中で製剤化された、５－メチルシトシンおよびシュードウリジン（５ｍＣ／ｐＵ）で完全に修飾されたか、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン（５ｍＣ／Ｎ１ｍｐＵ）で完全に修飾されたか、シュードウリジン（ｐＵ）で完全に修飾されたか、Ｎ１－メチル－シュードウリジン（Ｎ１ｍｐＵ）で完全に修飾されたか、または５－メチルシトシンで置換されたシトシンで２５％および２－チオウリジンで置換されたウリジンで２５％修飾された（５ｍＣ／ｓ２Ｕ）、ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、２．５ｍｇ／ｋｇの用量で筋肉内または皮下にＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。マウスを、筋肉内送達の場合、２時間、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、１２０時間、および１４４時間、ならびに皮下送達の場合、２時間、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、９６時間、および１２０時間時点で撮像した。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。筋肉内投与に対する平均全光束（光子／秒）を表１３８に示し、皮下投与に対する平均全光束（光子／秒）を表１３９に示す。バックグラウンドシグナルは、３．７９Ｅ＋０５（ｐ／ｓ）であった。筋肉内投与に対するピーク発現は、すべての化学組成おいて２４時間から４８時間の間に見られ、発現は１４４時間時点でも依然として検出された。皮下送達の場合、ピーク発現は２時間から８時間の間に見られ、発現は７２時間時点でも検出された。

表１３８．筋肉内投与

【表０１３８】

	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U	pU	N1mpU
	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)
2時間	1.98E+07	4.65E+06	4.68E+06	2.33E+06	3.66E+07
8時間	1.42E+07	3.64E+06	3.78E+06	8.07E+06	7.21E+07
24時間	2.92E+07	1.22E+07	3.35E+07	1.01E+07	1.75E+08
48時間	2.64E+07	1.01E+07	5.06E+07	7.46E+06	3.42E+08
72時間	2.18E+07	8.59E+06	3.42E+07	4.08E+06	5.83E+07
96時間	2.75E+07	2.70E+06	2.38E+07	4.35E+06	7.15E+07
120時間	2.19E+07	1.60E+06	1.54E+07	1.25E+06	3.87E+07
144時間	9.17E+06	2.19E+06	1.14E+07	1.86E+06	5.04E+07

表１３９．皮下投与

【表０１３９】

	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U	pU	N1mpU
	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）
2時間	5.26E+06	4.54E+06	9.34E+06	2.43E+06	2.80E+07
8時間	2.32E+06	8.75E+05	8.15E+06	2.12E+06	3.09E+07
24時間	2.67E+06	5.49E+06	3.80E+06	2.24E+06	1.48E+07
48時間	1.22E+06	1.77E+06	3.07E+06	1.58E+06	1.24E+07
72時間	1.12E+06	8.00E+05	8.53E+05	4.80E+05	2.29E+06
96時間	5.16E+05	5.33E+05	4.30E+05	4.30E+05	6.62E+05
120時間	3.80E+05	4.09E+05	3.21E+05	6.82E+05	5.05E+05

【１４９０】

実施例９２．浸透圧ポンプ研究

埋込の前に、浸透圧ポンプ（ＡＬＺＥＴ（登録商標）浸透圧ポンプ２００１Ｄ，ＤＵＲＥＣＴ　Ｃｏｒｐ．Ｃｕｐｅｒｔｉｎｏ，ＣＡ）を０．２ｍＬの１倍ＰＢＳ（ｐＨ７．４）（ＰＢＳ充填ポンプ）または１倍ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中１ｍｇ／ｍＬで０．２ｍＬのルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）（ルシフェラーゼ充填ポンプ）に充填し、３７℃で一晩、１倍ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中でインキュベートする。

【１４９１】

Ｂａｌｂ－Ｃマウス（ｎ＝３）にＰＢＳ充填ポンプまたはルシフェラーゼ充填ポンプのいずれかを皮下に埋め込み、２時間、８時間、２４時間時点で撮像する。対照として、ＰＢＳ充填ポンプを皮下に埋め込み、マウスに１倍ＰＢＳ中のルシフェラーゼ修飾を皮下に注入するか（ＰＢＳ充填ポンプ；ＳＣルシフェラーゼ）か、または浸透圧ポンプを埋め込まず、マウスに１倍ＰＢＳ中のルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡを皮下に注入する（ＳＣルシフェラーゼ）。ルシフェラーゼ製剤を表１４０に概略説明する。

表１４０．ルシフェラーゼ製剤

【表０１４０】

群	ビヒクル	濃度（mg/mL）	注入体積（μL）	量（μg）	用量（mg/kg）
PBS充填ポンプ;SCルシフェラーゼ	PBS	1.00	50	50	2.5
ルシフェラーゼ充填ポンプ	PBS	1.00	–	200	10.0
PBS充填ポンプ	PBS	–	–	–	–
SCルシフェラーゼ	PBS	1.00	50	50	2.5

【１４９２】

実施例９３．外部浸透圧ポンプ研究

外部浸透圧ポンプ（ＡＬＺＥＴ（登録商標）浸透圧ポンプ２００１Ｄ、ＤＵＲＥＣＴ　Ｃｏｒｐ．Ｃｕｐｅｒｔｉｎｏ，ＣＡ）を０．２ｍＬの１倍ＰＢＳ（ｐＨ７．４）（ＰＢＳ充填ポンプ）または１倍ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中１ｍｇ／ｍＬで０．２ｍＬのルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）（ルシフェラーゼ充填ポ

ンプ）に充填し、３７℃で一晩１倍、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中でインキュベートする。

【１４９３】

外部ＰＢＳ充填ポンプまたはルシフェラーゼ充填ポンプに接続されたカテーテルを使用して、Ｂａｌｂ－Ｃマウス（ｎ＝３）に製剤を投与する。マウスを、２時間、８時間、および２４時間時点で撮像する。対照として、外部ＰＢＳ充填ポンプを使用し、マウスに１倍ＰＢＳ中のルシフェラーゼ修飾を皮下に注入するか（ＰＢＳ充填ポンプ；ＳＣルシフェラーゼ）か、または外部ポンプを使用せず、マウスに１倍ＰＢＳ中のルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡを皮下に注入のみ行う（ＳＣルシフェラーゼ）。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入する。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａ ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得する。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定する。ルシフェラーゼ製剤を表１４１に概説し、平均全光束（光子／秒）。

表１４１．ルシフェラーゼ製剤

【表０１４１】

群	ビヒクル	濃度 (mg/mL)	注入体積 (μL)	量 (μg)	用量 (mg/kg)
PBS 充填ポンプ;SC ルシフェラーゼ	PBS	1.00	50	50	2.5
ルシフェラーゼ充填ポンプ	PBS	1.00	–	200	10.0
PBS 充填ポンプ	PBS	–	–	–	–
SC ルシフェラーゼ	PBS	1.00	50	50	2.5

【１４９４】

実施例９４．フィブリンシーラント研究

Ｔｉｓｓｅｅｌ（Ｂａｘｔｅｒ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｃｏｒｐ．，Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）等のフィブリンシーラントは、二連式シリンジ中のフィブリノーゲンおよびトロンビンから成る。混合されると、フィブリノーゲンはフィブリンに変換され、約１０～３０秒でフィブリン血餅を形成する。この血餅は、身体の天然の凝血機構を模倣することができる。加えて、フィブリンハイドロゲルは、持続放出送達において使用され得る可能性のある三次元構造である。現在、フィブリンシーラントは、縫合、結紮、および焼灼等の従来の外科技法に代わる止血および封着の用途として認められている。

【１４９５】

トロンビンおよびフィブリノーゲン成分を二連式シリンジ中に別々に充填した。Ｂａｌｂ－Ｃマウス（ｎ＝３）に５０μＬのフィブリノーゲン、５０μＬのトロンビンを皮下に注入し、また同じ部位に修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）（Ｔｉｓｓｅｅｌ＋ルシフェラーゼ）か、５０μＬのフィブリノーゲンおよび５０μＬのトロンビン（Ｔｉｓｓｅｅｌ）か、または修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ルシフェラーゼ）を注入した。フィブリノーゲンおよびトロンビンの注入は、二連式シリンジを使用して同時に完了した。ルシフェラーゼのＳＣ注入は、フィブリンハイドロゲルが重合することを可能にするように、フィブリノーゲン／トロンビン注入の１５分後に完了した（Ｔｉｓｓｅｅｌ＋ルシフェラーゼ群）。未処理マウスの対照群も評価した。マウスを５時間および２４時間時点で撮像した。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａ ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。ルシフェラーゼ製剤を表１４２に概要説明し、平均全光束（光子／秒）を表１４３に示す。フィブリンシーラントは撮像を

妨げないことが見出され、ルシフェラーゼおよびＴｉｓｓｅｅｌの注入は、ルシフェラーゼの発現を示した。

表１４２．ルシフェラーゼ製剤

【表０１４２】

群	ビヒクル	濃度（mg/mL）	注入体積（μL）	量（μg）	用量（mg/kg）
Tisseel+ルシフェラーゼ	PBS	1.00	50	50	2.5
Tisseel	－	－	－	－	－
ルシフェラーゼ	PBS	1.00	50	50	2.5
未処理	－	－	－	－	－

表１４３．全光束

【表０１４３】

群	5時間	24時間
	光束（p/s）	光束（p/s）
Tisseel+ルシフェラーゼ	4.59E+05	3.39E+05
Tisseel	1.99E+06	1.06E+06
ルシフェラーゼ	9.94E+05	7.44E+05
未処理	3.90E+05	3.79E+05

【１４９６】

実施例９５．ｍＲＮＡ含有フィブリンシーラント研究

Ａ．修飾ｍＲＮＡおよび塩化カルシウム

再構築の前に、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、またはＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を塩化カルシウムに添加する。次いで、その塩化カルシウムを使用して、トロンビンを再構築する。フィブリノーゲンを、製造業者の指示に従って線溶阻害剤溶液で再構築する。修飾ｍＲＮＡを含有する再構築されたトロンビンおよびフィブリノーゲンを二連式シリンジ中に充填する。マウスに、修飾ｍＲＮＡを含有する５０μＬのフィブリノーゲンおよび５０μＬのトロンビンを皮下に注入するか、または等価用量の修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを含有する５０μＬのＰＢＳを注入した。未処理マウスの対照群も評価する。平均全光束（光子／秒）を判定するために、マウスを既定の間隔で撮像する。

【１４９７】

Ｂ．脂質ナノ粒子で製剤化される修飾ｍＲＮＡおよび塩化カルシウム

再構築の前に、脂質ナノ粒子中で製剤化される、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、またはＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を塩化カルシウムに添加する。次いで、その塩化カルシウムを使用して、トロンビンを再構築する。フィブリノーゲンを、製造業者の指示に従って線溶阻害剤溶液で再構築する。修飾ｍＲＮＡを含有する再構築されたトロンビンおよびフィブリノーゲンを二連式シリンジ中に充填する。マウスに、５０μＬのフィブリノーゲンおよび修飾ｍＲＮＡを含有する５０μＬのトロンビンを皮下に注入するか、または等価用量の修飾ルシフェラーゼ

ｍＲＮＡを含有する５０μＬのＰＢＳを注入した。未処理マウスの対照群も評価する。平均全光束（光子／秒）を判定するために、マウスを既定の間隔で撮像する。

【１４９８】

Ｃ．修飾ｍＲＮＡおよびフィブリノーゲン

再構築の前に、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、またはＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を線溶阻害剤溶液に添加する。次いで、その線溶阻害剤溶液を使用して、フィブリノーゲンを再構築する。トロンビンを、製造業者の指示に従って塩化カルシウム溶液で再構築する。修飾ｍＲＮＡを含有する再構築されたフィブリノーゲンおよびトロンビンを二連式シリンジ中に充填する。マウスに、５０μＬのトロンビンおよび修飾ｍＲＮＡを含有する５０μＬのフィブリノーゲンを皮下に注入するか、または等価用量の修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを含有する５０μＬのＰＢＳを注入した。未処理マウスの対照群も評価する。平均全光束（光子／秒）を判定するために、マウスを既定の間隔で撮像する。

【１４９９】

Ｄ．脂質ナノ粒子で製剤化される修飾ｍＲＮＡおよびフィブリノーゲン

再構築の前に、脂質ナノ粒子中で製剤化された、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、またはＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を線溶阻害剤溶液に添加する。次いで、その線溶阻害剤溶液を使用して、フィブリノーゲンを再構築する。トロンビンを、製造業者の指示に従って塩化カルシウム溶液で再構築する。修飾ｍＲＮＡを含有する再構築されたフィブリノーゲンおよびトロンビンを二連式シリンジ中に充填する。マウスに、５０μＬのトロンビンおよび修飾ｍＲＮＡを含有する５０μＬのフィブリノーゲンを皮下に注入するか、または等価用量の修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを含有する５０μＬのＰＢＳを注入した。未処理マウスの対照群も評価する。平均全光束（光子／秒）を判定するために、マウスを既定の間隔で撮像する。

【１５００】

Ｅ．修飾ｍＲＮＡおよびトロンビン

再構築の前に、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、またはＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、製造業者の指示に従って塩化カルシウムで再構築された後の、その再構築されたトロンビンに添加する。次いで、線溶阻害剤溶液を使用して、製造業者の指示に従ってフィブリノーゲンを再構築する。再構築されたフィブリノーゲンおよび修飾ｍＲＮＡを含有するトロンビンを二連式シリンジ中に充填する。マウスに、修飾ｍＲＮＡを含有する５０μＬのトロンビンおよび５０μＬのフィブリノーゲンを皮下に注入するか、または等価用量の修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを含有する５０μＬのＰＢＳを注入した。未処理マウスの対照群も評価する。平均全光束（光子／秒）を判定するために、マウスを既定の間隔で撮像する。

【１５０１】

Ｆ．脂質ナノ粒子で製剤化される修飾ｍＲＮＡおよびトロンビン

再構築の前に、脂質ナノ粒子中で製剤化された、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、またはＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、製造業者の指示に従って塩化カルシウムで再構築された後のその再構築されたトロンビンに添加する。次いで、線溶阻害剤溶液を使用して、製造業者の指示に従ってフィブリノーゲンを再構築する。再構築されたフィブリノーゲンおよび修飾ｍＲＮＡを含有

するトロンビンを二連式シリンジ中に充填する。マウスに、修飾ｍＲＮＡを含有する５０μＬのトロンビンおよび５０μＬのフィブリノーゲンを皮下に注入するか、または等価用量の修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを含有する５０μＬのＰＢＳを注入した。未処理マウスの対照群も評価する。平均全光束（光子／秒）を判定するために、マウスを既定の間隔で撮像する。

【１５０２】

実施例９６．５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン修飾ｍＲＮＡのカチオン性脂質製剤

５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、表１４４に記載されるようにカチオン性脂質中で製剤化した。その製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、または皮下に（Ｓ．Ｃ．）、０．０５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

表１４４．カチオン性脂質製剤

【表０１４４】

製剤	NPA-126-1	NPA-127-1	NPA-128-1	NPA-129-1	111612-B
脂質	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
脂質/mRNA 比(重量/重量)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
平均粒径	122 nm PDI: 0.13	114 nm PDI: 0.10	153 nm PDI: 0.17	137 nm PDI: 0.09	223.2 nm PDI: 0.142
pH7.4 でのゼータ	-1.4 mV	-0.5 mV	-1.4 mV	2.0 mV	-3.09 mV
カプセル封入(RiboGr)	95%	77%	69%	80%	64%

【１５０３】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、８時間、および２４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。背景光束は、約４．１７Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１４５に示す。表１４５において、「ＮＴ」は、試験されなかったことを示す。

表１４５．光束

【表０１４５】

経路	時点	DLin-MC3-DMA 光束（p/s）	DLin-KC2-DMA 光束（p/s）	C12-200 光束（p/s）	DLinDMA 光束（p/s）	DODMA 光束（p/s）
I.V.	2時間	1.92E+08	2.91E+08	1.08E+08	2.53E+07	8.40E+06
I.V.	8時間	1.47E+08	2.13E+08	3.72E+07	3.82E+07	5.62E+06
I.V.	24時間	1.32E+07	2.41E+07	5.35E+06	4.20E+06	8.97E+05
I.M.	2時間	8.29E+06	2.37E+07	1.80E+07	1.51E+06	NT
I.M.	8時間	5.83E+07	2.12E+08	2.60E+07	1.99E+07	NT
I.M.	24時間	4.30E+06	2.64E+07	3.01E+06	9.46E+05	NT
S.C.	2時間	1.90E+07	5.16E+07	8.91E+07	4.66E+06	9.61E+06
S.C.	8時間	7.74E+07	2.00E+08	4.58E+07	9.67E+07	1.90E+07
S.C.	24時間	7.49E+07	2.47E+07	6.96E+06	6.50E+06	1.28E+06

【１５０４】

実施例９７．脂質ナノ粒子静脈内研究

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を、表１４６に記載されるように５０％のＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡまたはＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、３８．５％のコレステロール、１０％のＤＳＰＣ、および１．５％のＰＥＧを含有する脂質ナノ粒子中で製剤化した。製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、０．００５ｍｇ／ｋｇ、または０．０００５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。

表１４６．製剤

【表０１４６】

製剤	NPA-098-1	NPA-100-1
脂質	DLin-KC2-DMA	DLin-MC3-DMA
脂質/mRNA比（重量/重量）	20:1	20:1
平均粒径	135nm PDI:0.08	152nm PDI:0.08
pH7.4でのゼータ	-0.6mV	-1.2mV
カプセル封入(RiboGr)	91%	94%

【１５０５】

ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡの場合、マウスを投薬の２時間、８時間、２４時間、７２時間、９６時間、および１６８時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。背景光束は、約３．６６Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１４７に示す。臓器を８時間時点で撮像し、平均全光束（光子／秒）を肝臓、脾臓、肺、および腎臓について測定した。各臓器に対する対照も分析した。その結果を表１４７に示す。すべての用量レベルに対するピークシグナルは、投与の８時間後であった。種々の臓器（肝臓、脾臓、肺、および腎臓）への分布は、ＬＮＰ用量を増加させるか、または減少させることによって制御され得る可能性もある。

表１４７．光束

【表０１４７】

時点	0.5mg/kg 光束(p/s)	0.05mg/kg 光束(p/s)	0.005mg/kg 光束(p/s)	0.0005mg/kg 光束(p/s)
2時間	3.54E+08	1.75E+07	2.30E+06	4.09E+05
8時間	1.67E+09	1.71E+08	9.81E+06	7.84E+05
24時間	2.05E+08	2.67E+07	2.49E+06	5.51E+05
72時間	8.17E+07	1.43E+07	1.01E+06	3.75E+05
96時間	4.10E+07	9.15E+06	9.58E+05	4.29E+05
168時間	3.42E+07	9.15E+06	1.47E+06	5.29E+05

表１４８．臓器の光束

【表０１４８】

	肝臓 光束(p/s)	脾臓 光束(p/s)	肺 光束(p/s)	腎臓 光束(p/s)
0.5 mg/kg	1.42E+08	4.86E+07	1.90E+05	3.20E+05
0.05 mg/kg	7.45E+06	4.62E+05	6.86E+04	9.11E+04
0.005 mg/kg	3.32E+05	2.97E+04	1.42E+04	1.15E+04
0.0005 mg/kg	2.34E+04	1.08E+04	1.87E+04	9.78E+03
未処理	1.88E+04	1.02E+04	1.41E+04	9.20E+03

【１５０６】

ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡの場合、マウスを投薬の２時間、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、および１４４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。背景光束は、約４．５１Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１４９に示す。臓器を８時間時点で撮像し、平均全光束（光子／秒）を肝臓、脾臓、肺、および腎臓について測定した。各臓器に対する対照も分析した。その結果を表１５０に示す。すべての用量レベルに対するピークシグナルは、投与の８時間後であった。種々の臓器（肝臓、脾臓、肺、および腎臓）への分布は、ＬＮＰ用量を増加させるか、または減少させることによって制御され得る可能性もある。

表１４９．光束

【表０１４９】

時点	0.5mg/kg 光束(p/s)	0.05mg/kg 光束(p/s)	0.005mg/kg 光束(p/s)	0.0005mg/kg 光束(p/s)
2時間	1.23E+08	7.76E+06	7.66E+05	4.88E+05
8時間	1.05E+09	6.79E+07	2.75E+06	5.61E+05
24時間	4.44E+07	1.00E+07	1.06E+06	5.71E+05
48時間	2.12E+07	4.27E+06	7.42E+05	4.84E+05
72時間	1.34E+07	5.84E+06	6.90E+05	4.38E+05
144時間	4.26E+06	2.25E+06	4.58E+05	3.99E+05

表１５０．臓器の光束

【表０１５０】

	肝臓	脾臓	肺	腎臓
	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)
0.5mg/kg	1.19E+08	9.66E+07	1.19E+06	1.85E+05
0.05mg/kg	1.10E+07	1.79E+06	7.23E+04	5.82E+04
0.005mg/kg	3.58E+05	6.04E+04	1.33E+04	1.33E+04
0.0005mg/kg	2.25E+04	1.88E+04	2.05E+04	1.65E+04
未処理	1.91E+04	1.66E+04	2.63E+04	2.14E+04

【１５０７】

実施例９８．脂質ナノ粒子皮下研究

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を、表１５１に記載されるように５０％のＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、３８５％のコレステロール、１０％のＤＳＰＣ、および１．５％のＰＥＧを含有する脂質ナノ粒子中で製剤化した。製剤を皮下に（Ｓ．Ｃ．）０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、または０．００５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

表１５１．ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ製剤

【表０１５１】

製剤	NPA-098-1
脂質	DLin-KC2-DMA
脂質/mRNA比(重量/重量)	20:1
平均粒径	135nm PDI:0.08
pH7.4でのゼータ	-0.6mV
カプセル封入(RiboGr)	91%

【１５０８】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、および１４４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。検出下限は、約３Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１５２に示す。臓器を８時間時点で撮像し、平均全光束（光子／秒）を肝臓、脾臓、肺、および腎臓について測定した。各臓器に対する対照も分析した。その結果を表１５３に示す。すべての用量レベルに対するピークシグナルは、投与の８時間後であった。種々の臓器（肝臓、脾臓、肺、および腎臓）への分布は、ＬＮＰ用量を増加させるか、または減少させることによって制御され得る可能性もある。高用量では、高いレベルのルシフェラーゼ発現が肝臓、脾臓、肺、および腎臓において検出されたので、ＬＮＰ製剤は皮下注入部位の外側に移動する。

表１５２．光束

【表０１５２】

時点	0.5 mg/kg 光束 (p/s)	0.05 mg/kg 光束 (p/s)	0.005 mg/kg 光束 (p/s)
2 時間	3.18E+07	7.46E+06	8.94E+05
8 時間	5.15E+08	2.18E+08	1.34E+07
24 時間	1.56E+08	5.30E+07	7.16E+06
48 時間	5.22E+07	8.75E+06	9.06E+05
72 時間	8.87E+06	1.50E+06	2.98E+05
144 時間	4.55E+05	3.51E+05	2.87E+05

表１５３．臓器の光束

【表０１５３】

	肝臓 光束 (p/s)	脾臓 光束 (p/s)	肺 光束 (p/s)	腎臓 光束 (p/s)
0.5 mg/kg	1.01E+07	7.43E+05	9.75E+04	1.75E+05
0.05 mg/kg	1.61E+05	3.94E+04	4.04E+04	3.29E+04
0.005 mg/kg	2.84E+04	2.94E+04	2.42E+04	9.79E+04
未処理	1.88E+04	1.02E+04	1.41E+04	9.20E+03

【１５０９】

実施例９９．カチオン性脂質ナノ粒子皮下研究

ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を、５０％のＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、３８．５％のコレステロール、１０％のＤＳＰＣ、および１．５％のＰＥＧを含有する脂質ナノ粒子中で製剤化する。製剤を皮下に（Ｓ．Ｃ．）０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、または０．００５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与する。

【１５１０】

マウスを投薬の２時間、８時間、２４時間、４８時間、７２時間、および１４４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。臓器を８時間時点で撮像し、平均全光束（光子／秒）を肝臓、脾臓、肺、および腎臓について測定する。各臓器に対する対照も分析する。

【１５１１】

実施例１００．ルシフェラーゼリポプレックス研究

リポプレックス形成したルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾したか（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾したか（５ｍＣ／Ｎ１ｍｐＵ）、または５－メチルシトシンで置換されたシトシンで２５％および２－チオウリジンで置換されたウリジン（５ｍＣ／ｓ２Ｕ）で２５％修飾した。製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、または皮下に（Ｓ．Ｃ．）０．１０ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

【１５１２】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋ

ｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の８時間、２４時間、および４８時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路および化学修飾について測定した。バックグラウンドシグナルは、約３．９１Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１５４に示す。臓器を６時間時点で撮像し、平均全光束（光子／秒）を肝臓、脾臓、肺、および腎臓について測定した。各臓器に対する対照も分析した。その結果を表１５５に示す。

表１５４．光束

【表０１５４】

経路	時点	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U
		光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)
I.V.	8時間	5.76E+06	1.78E+06	1.88E+06
I.V.	24時間	1.02E+06	7.13E+05	5.28E+05
I.V.	48時間	4.53E+05	3.76E+05	4.14E+05
I.M.	8時間	1.90E+06	2.53E+06	1.29E+06
I.M.	24時間	9.33E+05	7.84E+05	6.48E+05
I.M.	48時間	8.51E+05	6.59E+05	5.49E+05
S.C.	8時間	2.85E+06	6.48E+06	1.14E+06
S.C.	24時間	6.66E+05	7.15E+06	3.93E+05
S.C.	48時間	3.24E+05	3.20E+06	5.45E+05

表１５５．臓器に対する光束

【表０１５５】

経路	化学組成	肝臓	脾臓	肺	腎臓	注入部位
		光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)
I.V.	5mC/pU	5.26E+05	2.04E+07	4.28E+06	1.77E+04	該当なし
I.V.	5mC/N1mpU	1.48E+05	5.00E+06	1.93E+06	1.77E+04	該当なし
I.V.	5mC/s2U	2.14E+04	3.29E+06	5.48E+05	2.16E+04	該当なし
I.M.	5mC/pU	2.46E+04	1.38E+04	1.50E+04	1.44E+04	1.15E+06
I.M.	5mC/N1mpU	1.72E+04	1.76E+04	1.99E+04	1.56E+04	1.20E+06
I.M.	5mC/s2U	1.28E+04	1.36E+04	1.33E+04	1.07E+04	7.60E+05
S.C.	5mC/pU	1.55E+04	1.67E+04	1.45E+04	1.69E+04	4.46E+04
S.C.	5mC/N1mpU	1.20E+04	1.46E+04	1.38E+04	1.14E+04	8.29E+04
S.C.	5mC/s2U	1.22E+04	1.31E+04	1.45E+04	1.08E+04	5.62E+04
	未処理	2.59E+04	1.34E+04	1.26E+04	1.22E+04	該当なし

【１５１３】

実施例１０１．修飾ｍＲＮＡのカチオン性脂質製剤

５－メチルシトシンで置換されたシトシンで２５％および２－チオウリジンで置換されたウリジンで２５％（５ｍＣ／ｓ２Ｕ）修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、表１５６に記載されるようにカチオン性脂質中で製剤化した。その製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、または皮下に（Ｓ．Ｃ．）、０．０５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

表１５６．カチオン性脂質製剤

【表０１５６】

製剤	NPA-130-1	NPA-131-1	NPA-132-1	NPA-133-1	111612-C
脂質	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
脂質/mRNA比（重量/重量）	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
平均粒径	120 nm PDI: 0.10	105 nm PDI: 0.11	122 nm PDI: 0.13	105 nm PDI: 0.14	221.3 nm PDI: 0.063
pH7.4でのゼータ	0.2 mV	-0.6 mV	-0.5 mV	-0.3 mV	-3.10 mV
カプセル封入(RiboGr)	100%	100%	93%	93%	60%

【１５１４】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、８時間、および２４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。背景光束は、約３．３１Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１５７に示す。表１５７において、「ＮＴ」は、試験されなかったことを示す。未処理マウスは、２時間時点で３．１４Ｅ＋０５、８時間時点で３．３３Ｅ＋０５、および２４時間時点で３．４６Ｅ＋０５の平均光束を示した。ピーク発現は、８時間時点で試験された３つの経路すべてにおいて見られた。ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡは、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡよりも優れた発現を有し、ＤＯＤＭＡは評価された経路すべてにおいて発現を示した。

表１５７．光束

【表０１５７】

経路	時点	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
		光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）
I.V.	2時間	9.88E+06	6.98E+07	9.18E+06	3.98E+06	5.79E+06
I.V.	8時間	1.21E+07	1.23E+08	1.02E+07	5.98E+06	6.14E+06
I.V.	24時間	2.02E+06	1.05E+07	1.25E+06	1.35E+06	5.72E+05
I.M.	2時間	6.72E+05	3.66E+06	3.25E+06	7.34E+05	4.42E+05
I.M.	8時間	7.78E+06	2.85E+07	4.29E+06	2.22E+06	1.38E+05
I.M.	24時間	4.22E+05	8.79E+05	5.95E+05	8.48E+05	4.80E+05
S.C.	2時間	2.37E+06	4.77E+06	4.44E+06	1.07E+06	1.05E+06
S.C.	8時間	3.65E+07	1.17E+08	3.71E+06	9.33E+06	2.57E+06
S.C.	24時間	4.47E+06	1.28E+07	6.39E+05	8.89E+05	4.27E+05

【１５１５】

実施例１０２．５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン修飾ｍＲＮＡの製剤

５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）をＰＢＳ（７．４

のｐＨ）中で製剤化した。その製剤を筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）または皮下に（Ｓ．Ｃ．）、２．５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

【１５１６】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の５分、３０分、６０分、および１２０分後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。背景光束は、約３．７８Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１５８に示す。ルシフェラーゼの発現は、送達の両経路において３０分時点で既に見られた。皮下投与からのピーク発現は、３０分から６０分の間に出現する。筋肉内発現は、１２０分時点でも依然として増加していた。

表１５８．光束

【表０１５８】

経路	時点	PBS (pH 7.4)
		光束 (p/s)
I.M.	5 分	4.38E+05
I.M.	30 分	1.09E+06
I.M.	60 分	1.18E+06
I.M.	120 分	2.86E+06
S.C.	5 分	4.19E+05
S.C.	30 分	6.38E+06
S.C.	60 分	5.61E+06
S.C.	120 分	2.66E+06

【１５１７】

実施例１０３．化学修飾ｍＲＮＡの筋肉内および皮下投与

Ｎ４－アセチルシチジンで完全に修飾されたか、５－メトキシウリジンで完全に修飾されたか、Ｎ４－アセチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか、または５－メチルシトシンおよび５－メトキシウリジンで完全に修飾された、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中で製剤化されたルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、筋肉内または皮下に２．５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを２時間、８時間、および２４時間時点で撮像した。筋肉内投与に対する平均全光束（光子／秒）を表１５９に示し、皮下投与に対する平均全光束（光子／秒）を表１６０に示す。バックグラウンドシグナルは、３．８４Ｅ＋０５（ｐ／ｓ）であった。筋肉内投与に対するピーク発現は、すべての化学組成において２４時間から４８時間の間に見られ、発現は１２０時間時点でも依然として検出された。皮下送達の場合、ピーク発現は２時間から８時間の間に見られ、発現は７２時間時点でも検出された。

表１５９．筋肉内投与

【表０１５９】

	2時間	8時間	24時間
	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）
N4-アセチルシチジン	1.32E+07	2.15E+07	4.01E+07
5-メトキシウリジン	4.93E+06	1.80E+07	4.53E+07
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	2.02E+07	1.93E+07	1.63E+08
5-メチルシトシン/5-メトキシウリジン	6.79E+06	4.55E+07	3.44E+07

表１６０．皮下投与

【表０１６０】

	2時間	8時間	24時間
	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）
N4-アセチルシチジン	3.07E+07	1.23E+07	1.28E+07
5-メトキシウリジン	7.10E+06	9.38E+06	1.32E+07
N4-アセチルシチジン/N1-メチル-シュードウリジン	7.12E+06	3.07E+06	1.03E+07
5-メチルシトシン/5-メトキシウリジン	7.15E+06	1.25E+07	1.11E+07

【１５１８】

実施例１０４．インビボ研究

少なくとも１つの化学修飾を含むルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡをシリンジポンプ法を用いて脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化し、粒径、ゼータ電位、およびカプセル封入によって特徴付ける。

【１５１９】

表１６１に概要説明されるように、ルシフェラーゼＬＮＰ製剤を筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、および皮下に（Ｓ．Ｃ．）、Ｂａｌｂ－Ｃマウスに投与する。対照として、ＰＢＳ中で製剤化されるルシフェラーゼ修飾ＲＮＡを静脈内にマウスに投与する。

表１６１．ルシフェラーゼ製剤

【表０１６１】

製剤	ビヒクル	経路	濃度 (mg/mL)	注入量 (μL)	修飾 RNA の量(μg)	用量 (mg/kg)
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.2000	50	10	0.5000
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.0200	50	1	0.0500
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.0020	50	0.1	0.0050
Luc-LNP	PBS	S.C.	0.0002	50	0.01	0.0005
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.2000	50	10	0.5000
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.0200	50	1	0.0500
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.0020	50	0.1	0.0050
Luc-LNP	PBS	I.V.	0.0002	50	0.01	0.0005
Luc-LNP	PBS	I.M.	0.2000	50	10	0.5000
Luc-LNP	PBS	I.M.	0.0200	50	1	0.0500
Luc-LNP	PBS	I.M.	0.0020	50	0.1	0.0050
Luc-LNP	PBS	I.M.	0.0002	50	0.01	0.0005
Luc-PBS	PBS	I.V.	0.20	50	10	0.50

【１５２０】

マウスを２、８、２４、４８、１２０、および１９２時間時点で撮像し、（全マウスの全光束（光子／秒）として測定される）生物発光を判定する。８時間または１９２時間時点で、肝臓、脾臓、腎臓、ならびに皮下および筋肉内投与の注入部位を撮像し、生物発光を判定する。

【１５２１】

実施例１０５．化学修飾ｍＲＮＡのカチオン性脂質製剤研究

５－メチルシトシンおよびシュードウリジン（５ｍＣ／ｐＵ）、シュードウリジン（ｐＵ）、またはＮ１－メチル－シュードウリジン（Ｎ１ｍｐＵ）で完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を表１６２に記載されるようにカチオン性脂質中で製剤化した。その製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、または皮下に（Ｓ．Ｃ．）、０．０５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

表１６２．カチオン性脂質製剤

【表０１６２】

製剤	NPA-137-1	NPA-134-1	NPA-135-1	NPA-136-1	111612-A
脂質	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DODMA
脂質/mRNA比(重量/重量)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
平均粒径	111nm PDI:0.15	104nm PDI:0.13	95nm PDI:0.11	143nm PDI:0.12	223.2nm PDI:0.142
pH7.4でのゼータ	-4.1mV	-1.9mV	-1.0mV	0.2mV	-3.09mV
カプセル封入(RiboGr)	97%	100%	100%	78%	64%
化学組成	pU	N1mpU	N1mpU	N1mpU	5mC/pU

【１５２２】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、８時間、および２４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。背景光束は、約４．１１Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１６３に示す。ピーク発現は、８時間時点で試験された３つの経路すべてにおいて見られた。

表１６３．光束

【表０１６３】

経路	時点	DLin-MC3-DMA (pU)	DLin-MC3-DMA (N1mpU)	DLin-KC2-DMA (N1mpU)	C12-200 (N1mpU)	DODMA (5mC/pU)
		光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）
I.V.	2時間	3.21E+08	1.24E+09	1.01E+09	9.00E+08	3.90E+07
I.V.	8時間	1.60E+09	3.22E+09	2.38E+09	1.11E+09	1.17E+07
I.V.	24時間	1.41E+08	3.68E+08	3.93E+08	8.06E+07	1.11E+07
I.M.	2時間	2.09E+07	3.29E+07	8.32E+07	9.43E+07	4.66E+06
I.M.	8時間	2.16E+08	6.14E+08	1.00E+09	8.77E+07	7.05E+06
I.M.	24時間	1.23E+07	1.40E+08	5.09E+08	1.36E+07	1.14E+06
S.C.	2時間	2.32E+07	3.60E+07	2.14E+08	1.01E+08	3.11E+07
S.C.	8時間	5.55E+08	9.80E+08	4.93E+09	1.01E+09	8.04E+07
S.C.	24時間	1.81E+08	2.74E+08	2.12E+09	4.74E+07	1.34E+07

【１５２３】

実施例１０６．化学修飾ｍＲＮＡの研究

Ｎ４－アセチルシチジン（Ｎ４－アセチル）で完全に修飾されたか、５－メトキシウリジン（５ｍｅｔｈ）で完全に修飾されたか、Ｎ４－アセチルシチジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン（Ｎ４－アセチル／Ｎ１ｍｐＵ）で完全に修飾されたか、または５－メチルシトシンおよび５－メトキシウリジン（５ｍＣ／５－ｍｅｔｈ）で完全に修飾された、ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、表１６４に記載されるようにＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ中で製剤化した。

【１５２４】

製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、または皮下に（Ｓ．Ｃ．）０．０５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

表１６４．カチオン性脂質製剤

【表０１６４】

製剤	NPA-141-1	NPA-142-1	NPA-143-1	NPA-144-1
脂質	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA
脂質/mRNA比(重量/重量)	20:1	20:1	20:1	20:1
平均粒径	138nm PDI:0.16	116nm PDI:0.15	144nm PDI:0.15	131nm PDI:0.15
pH7.4でのゼータ	-2.8mV	-2.8mV	-4.3mV	-5.0mV
カプセル封入(RiboGr)	97%	100%	75%	72%
化学組成	N4-アセチル	5meth	N4-アセチル/N1mpU	5mC/5-meth

【１５２５】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、６時間、および２４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を各投与経路およびカチオン性脂質製剤について測定した。背景光束は、約２．７０Ｅ＋０５ｐ／ｓであった。撮像の結果を表１６５に示す。

表１６５．光束

【表０１６５】

経路	時点	N4-アセチル	5meth	N4-アセチル/N1mpU	5mC/5-meth
		光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)	光束(p/s)
I.V.	2時間	9.17E+07	3.19E+06	4.21E+07	1.88E+06
I.V.	6時間	7.70E+08	9.28E+06	2.34E+08	7.75E+06
I.V.	24時間	6.84E+07	1.04E+06	3.55E+07	3.21E+06
I.M.	2時間	8.59E+06	7.86E+05	5.30E+06	5.11E+05
I.M.	6時間	1.27E+08	8.88E+06	3.82E+07	3.17E+06
I.M.	24時間	4.46E+07	1.38E+06	2.00E+07	1.39E+06
S.C.	2時間	1.83E+07	9.67E+05	4.45E+06	1.01E+06
S.C.	6時間	2.89E+08	1.78E+07	8.91E+07	1.29E+07
S.C.	24時間	6.09E+07	6.40E+06	2.08E+08	6.63E+06

【１５２６】

実施例１０７．複数の修飾ｍＲＮＡを含有する脂質ナノ粒子

ＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）と、Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）と、第ＩＸ因子ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配

列番号１６２２に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）と、を表１６６に記載されるようにＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ中で製剤化する。製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ．）、筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、または皮下に（Ｓ．Ｃ．）０．０５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与する。１つのｍＲＮＡのみを含有する対照ＬＮＰ製剤も等価用量で投与する。

表１６６．ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ製剤

【表０１６６】

製剤	NPA-157-1
脂質	DLin-MC3-DMA
脂質/mRNA 比（重量/重量）	20:1
平均粒径	89nm PDI:0.08
pH7.4 でのゼータ	1.1mV
カプセル封入(RiboGr)	97%

【１５２７】

血清を、製剤を投与した８時間、２４時間、７２時間、および／または７日後にマウスから採取する。血清をＥＬＩＳＡによって分析し、ＥＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、および第ＩＸ因子のタンパク質発現を判定する。

【１５２８】

実施例１０８．５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン修飾ｍＲＮＡのカチオン性脂質製剤研究

ＥＰＯ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）またはＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）を、表１６７に記載されるようにＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡおよびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ中で製剤化する。製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ）、筋肉内に（Ｉ．Ｍ．）、または皮下に（Ｓ．Ｃ．）０．０５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与する。

表１６７．ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡおよびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ製剤

【表０１６７】

製剤	NPA-147-1	NPA-148-1	NPA-150-1	NPA-151-1
mRNA	EPO	EPO	G-CSF	G-CSF
脂質	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA
脂質/mRNA比(重量/重量)	20:1	20:1	20:1	20:1
平均粒径	117nm PDI:0.14	82nm PDI:0.08	119nm PDI:0.13	88nm PDI:0.08
pH7.4でのゼータ	-1.7mV	0.6mV	3.6mV	2.2mV
カプセル封入(RiboGr)	100%	96%	100%	100%

【１５２９】

血清を、製剤を投与した８時間、２４時間、７２時間、および／または７日後にマウスから採取する。血清をＥＬＩＳＡによって分析し、ＥＰＯおよびＧ－ＣＳＦのタンパク質発現を判定する。

【１５３０】

実施例１０９．インビトロＶＥＧＦ　ＰＢＭＣ研究

５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾されたか（ＶＥＧＦ　５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾されたか（ＶＥＧＦ　５ｍＣ／Ｎ１ｍｐＵ）、または未修飾の（ＶＥＧＦ　ｕｎｍｏｄ）、５００ｎｇのＶＥＧＦ　ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６７２に示される約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００，０．４ｕｌを用いて正常な血液ドナー（Ｄ１、Ｄ２、およびＤ３）からの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）にトランスフェクトした。細胞はまた、対照として各ドナーに対して処理されなかった。上清を、トランスフェクションの２２時間後に収集してＥＬＩＳＡを行い、タンパク質発現およびサイトカイン誘導を判定した。ＶＥＧＦの発現およびＩＦＮ－α誘導を表１６８ならびに図８Ａおよび８Ｂに示す。

表１６８．タンパク質およびサイトカインレベル

【表０１６８】

	VEGF発現(pg/mL)			IFN-α誘導(pg/mL)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
VEGF unmod	2	0	0	5400	3537	4946
VEGF 5mC/pU	424	871	429	145	294	106
VEGF 5mC/N1mpU	5088	10331	6183	205	165	6

【１５３１】

実施例１１０．修飾ｍＲＮＡのインビトロ発現

ＨＥＫ２９３細胞に、ＥＰＯ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）をトランスフェクトし、ＨｅＬａ細胞に、トランスフォーミング成長因子β（ＴＧＦ－β）修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６６８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列

内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を順方向トランスフェクトし、ならびにＨｅｐＧ２細胞に、殺菌性／透過性増強タンパク質（ｒＢＰＩ－２１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４４９；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）をトランスフェクトし、それらは、本明細書に記載の手順を使用して、表１６９、１７０、および１７１に示される濃度で、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００を用いて複合体形成していた。タンパク質発現をＥＬＩＳＡによって検出し、そのタンパク質（ｐｇ／ｍＬ）も表１６９、１７０、および１７１に示す。表１６９において、「＞」は、それよりも大きいことを意味する。ＴＧＦβの場合、対照の未処理細胞およびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００の偽のトランスフェクションも試験した。

表１６９．ＥＰＯタンパク質発現

【表０１６９】

トランスフェクトした量	5ng	1ng	200pg	40pg	8pg	1.6pg	320fg	64fg
タンパク質(pg/mL)	>2000	609.486	114.676	0	0	0	0	0

表１７０．ＴＧＦβタンパク質発現

【表０１７０】

トランスフェクトした量	750ng	250ng	83ng	偽	未処理
タンパク質(pg/mL)	5058	4325	3210	2	0

表１７１．ｒＢＰＩ－２１タンパク質発現

【表０１７１】

トランスフェクトした量	2μg	400ng		80ng	16ng	3.2ng	640pg	128pg	26pg
タンパク質(pg/mL)	20.683	9.269		4.768	0	0	0	0	0

【１５３２】

実施例１１１．バイシストロン性修飾ｍＲＮＡ

ヒト胎児腎臓上皮（ＨＥＫ２９３）を９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－ｏｎｅ　ＧｍｂＨ，Ｆｒｉｃｋｅｎｈａｕｓｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に播種した、ＨＥＫ２９３を１００μｌの細胞培養培地（２ｍＭのＬ－グルタミン、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、および１倍非必須アミノ酸（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、ならびに１．２ｍｇ／ｍＬの重炭酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｕｎｉｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加したＤＭＥＭ、１０％ＦＣＳ）中に３０，０００の密度で播種した、７５ｎｇのバイシストロン性修飾ｍＲＮＡ（ｍＣｈｅｒｒｙ－２Ａ－ＧＦＰ）（配列番号２１４５０；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示され

ない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）、ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列番号２１４３９；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）、または緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾された）を細胞を播種した後に添加し、インキュベートした。対照の未処理細胞も評価した。ｍＣｈｅｒｒｙ－２Ａ－ＧＦＰは、ｍＣｈｅｒｒｙのコード領域、２Ａペプチド、およびＧＦＰのコード領域を含む修飾ｍＲＮＡ配列を指す。

【１５３３】

培養培地上清を、９６ウェルＰｒｏ－Ｂｉｎｄ　Ｕ底プレート（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＧｍｂＨ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に移すことによって収集した。細胞を、半量のトリプシン／ＥＤＴＡ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）でトリプシン化し、それぞれの上清とともにプールし、１回量のＰＢＳ／２％ＦＣＳ（いずれもＢｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）／０．５％ホルムアルデヒド（Ｍｅｒｃｋ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加することによって固定した。次いで、試料を、ＬＳＲＩＩサイトメーター（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＧｍｂＨ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）において、５３２ｎｍの励起レーザーおよびＰＥ－Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ用の６１０／２０フィルターを用いてフローサイトメーター測定にかけた。全事象の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を表１７２に示す。バイシストロン性修飾ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞は、ｍＣｈｅｒｒｙおよびＧＦＰの両方を発現することが可能であった。

表１７２．修飾ｍＲＮＡのＭＦＩ

【表０１７２】

修飾 mRNA	mCherry MFI	GFP MFI
mCherry	17746	427
GFP	427	20019
mCherry-2A-GFP	5742	6783
未処理	427	219

【１５３４】

実施例１１２．抗体を産生するための５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジン修飾ｍＲＮＡのカチオン性脂質製剤研究

ハーセプチン重鎖（ＨＣ）ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４５１に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）ならびにハーセプチン軽鎖（ＬＣ）（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４５２に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に修飾された）を、表１７３に記載されるようにＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡおよびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ中で製剤化する。製剤を静脈内に（Ｉ．Ｖ）０．５００、０．０５０、および０．００５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与する。

表１７３．ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡおよびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ製剤

【表０１７３】

製剤	NPA-158-1	NPA-159-1
ハーセプチン HC:LC 比(重量/重量)	2:1	2:1
脂質	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA
脂質/全 mRNA 比(重量/重量)	20:1	20:1
平均粒径	129nm PDI:0.14	100nm PDI:0.10
pH7.4 でのゼータ	0.9mV	1.9mV
カプセル封入 (RiboGr)	100%	100%

【１５３５】

血清を、製剤を投与した８時間、２４時間、７２時間、および／または７日間後にマウスから採取した。血清をＥＬＩＳＡによって分析し、ハーセプチンのタンパク質発現を判定した。

【１５３６】

実施例１１３．シュードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの対象のＳＡＲ

ピリミジンヌクレオシドシュードウリジンへの最近の注目に伴い、一連の構造活性研究は、シュードウリジンまたはＮ１－メチル－シュードウリジン（ｐｓｅｕｄｏｕｒｄｉｎｅ）への修飾を含むｍＲＮＡを研究するように設計された。

【１５３７】

本研究は、Ｎ１位、Ｃ６位、２－位、４－位において、およびリン酸骨格上で修飾が行われる場合の、鎖長の効果、増加した親油性、環構造の存在、および疎水性または親水性相互作用の変化を調査するために設計された。安定性も研究する。

【１５３８】

この目的のため、アルキル化、シクロアルキル化、アルキル－シクロアルキル化、アリール化、アルキル－アリール化、アミノ基を有するアルキル化部分、カルボン酸基を有するアルキル化部分、ならびにアミノ酸荷電部分を含むアルキル化部分、を含む修飾を研究する。アルキル化の程度は、概して、C_1～C_6である。化学修飾の例には、表１７４および表１７５に示されるものが挙げられる。

表１７４．シュードウリジンおよびＮ１－メチルシュードウリジンＳＡＲ

【表０１７４】

化学修飾	化合物番号	天然に生じる
N1-修飾		
N1-エチル-シュード-UTP	1	N
N1-プロピル-シュード-UTP	2	N
N1-イソ-プロピル-シュード-UTP	3	N
N1-(2,2,2-トリフルオロエチル)-シュード-UTP	4	N
N1-シクロプロピル-シュード-UTP	5	N
N1-シクロプロピルメチル-シュード-UTP	6	N
N1-フェニル-シュード-UTP	7	N
N1-ベンジル-シュード-UTP	8	N
N1-アミノメチル-シュード-UTP	9	N
シュード-UTP-N1-2-エタン酸	10	N
N1-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)シュード-UTP	11	N
N1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)シュード-UTP	12	Y
C-6 修飾		
6-メチル-シュード-UTP	13	N
6-トリフルオロメチル-シュード-UTP	14	N
6-メトキシ-シュード-UTP	15	N
6-フェニル-シュード-UTP	16	N
6-ヨード-シュード-UTP	17	N
6-ブロモ-シュード-UTP	18	N
6-クロロ-シュード-UTP	19	N
6-フルオロ-シュード-UTP	20	N
2-または 4-位修飾		
4-チオ-シュード-UTP	21	N
2-チオ-シュード-UTP	22	N
リン酸骨格修飾		
α-チオ-シュード-UTP	23	N
N1-Me-α-チオ-シュード-UTP	24	N

表１７５．シュードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンＳＡＲ

【表０１７５－１】

化学修飾	化合物番号	天然に生じる
N1-メチル-シュード-UTP	1	Y
N1-ブチル-シュード-UTP	2	N
N1-*tert*-ブチル-シュード-UTP	3	N
N1-ペンチル-シュード-UTP	4	N
N1-ヘキシル-シュード-UTP	5	N
N1-トリフルオロメチル-シュード-UTP	6	Y
N1-シクロブチル-シュード-UTP	7	N
N1-シクロペンチル-シュード-UTP	8	N
N1-シクロヘキシル-シュード-UTP	9	N
N1-シクロヘプチル-シュード-UTP	10	N
N1-シクロオクチル-シュード-UTP	11	N
N1-シクロブチルメチル-シュード-UTP	12	N
N1-シクロペンチルメチル-シュード-UTP	13	N
N1-シクロヘキシルメチル-シュード-UTP	14	N
N1-シクロヘプチルメチル-シュード-UTP	15	N
N1-シクロオクチルメチル-シュード-UTP	16	N
N1-*p*-トリル-シュード-UTP	17	N
N1-(2,4,6-トリメチル-フェニル)シュード-UTP	18	N
N1-(4-メトキシ-フェニル)シュード-UTP	19	N
N1-(4-アミノ-フェニル)シュード-UTP	20	N
N1(4-ニトロ-フェニル)シュード-UTP	21	N
シュード-UTP-N1-*p*-安息香酸	22	N
N1-(4-メチル-ベンジル)シュード-UTP	24	N
N1-(2,4,6-トリメチル-ベンジル)シュード-UTP	23	N
N1-(4-メトキシ-ベンジル)シュード-UTP	25	N
N1-(4-アミノ-ベンジル)シュード-UTP	26	N
N1-(4-ニトロ-ベンジル)シュード-UTP	27	N
シュード-UTP-N1-メチル-p-	28	N

【表０１７５－２】

安息香酸		
N1-(2-アミノ-エチル)シュード-UTP	29	N
N1-(3-アミノ-プロピル)シュード-UTP	30	N
N1-(4-アミノ-ブチル)シュード-UTP	31	N
N1-(5-アミノ-ペンチル)シュード-UTP	32	N
N1-(6-アミノ-ヘキシル)シュード-UTP	33	N
シュード-UTP-N1-3-プロピオン酸	34	N
シュード-UTP-N1-4-ブタン酸	35	N
シュード-UTP-N1-5-ペンタン酸	36	N
シュード-UTP-N1-6-ヘキサン酸	37	N
シュード-UTP-N1-7-ヘプタン酸	38	N
N1-(2-アミノ-2-カルボキシエチル)シュード-UTP	39	N
N1-(4-アミノ-4-カルボキシブチル)シュード-UTP	40	N
N3-アルキル-シュード-UTP	41	N
6-エチル-シュード-UTP	42	N
6-プロピル-シュード-UTP	43	N
6-イソ-プロピル-シュード-UTP	44	N
6-ブチル-シュード-UTP	45	N
6-tert-ブチル-シュード-UTP	46	N
6-(2,2,2-トリフルオロエチル)-シュード-UTP	47	N
6-エトキシ-シュード-UTP	48	N
6-トリフルオロメトキシ-シュード-UTP	49	N
6-フェニル-シュード-UTP	50	N
6-(置換-フェニル)-シュード-UTP	51	N
6-シアノ-シュード-UTP	52	N
6-アジド-シュード-UTP	53	N
6-アミノ-シュード-UTP	54	N

【表０１７５－３】

6-エチルカルボキシレート-シュード-UTP	54b	N
6-ヒドロキシ-シュード-UTP	55	N
6-メチルアミノ-シュード-UTP	55b	N
6-ジメチルアミノ-シュード-UTP	57	N
6-ヒドロキシアミノ-シュード-UTP	59	N
6-ホルミル-シュード-UTP	60	N
6-(4-モルホリノ)-シュード-UTP	61	N
6-(4-チオモルホリノ)-シュード-UTP	62	N
N1-Me-4-チオ-シュード-UTP	63	N
N1-Me-2-チオ-シュード-UTP	64	N
1,6-ジメチル-シュード-UTP	65	N
1-メチル-6-トリフルオロメチル-シュード-UTP	66	N
1-メチル-6-エチル-シュード-UTP	67	N
1-メチル-6-プロピル-シュード-UTP	68	N
1-メチル-6-イソ-プロピル-シュード-UTP	69	N
1-メチル-6-ブチル-シュード-UTP	70	N
1-メチル-6-tert-ブチル-シュード-UTP	71	N
1-メチル-6-(2,2,2-トリフルオロエチル)シュード-UTP	72	N
1-メチル-6-ヨード-シュード-UTP	73	N
1-メチル-6-ブロモ-シュード-UTP	74	N
1-メチル-6-クロロ-シュード-UTP	75	N
1-メチル-6-フルオロ-シュード-UTP	76	N
1-メチル-6-メトキシ-シュード-UTP	77	N
1-メチル-6-エトキシ-シュード-UTP	78	N
1-メチル-6-トリフルオロメトキシ-シュード-UTP	79	N

【表０１７５－４】

1-メチル-6-フェニル-シュードUTP	80	N
1-メチル-6-(置換フェニル)シュードUTP	81	N
1-メチル-6-シアノ-シュードUTP	82	N
1-メチル-6-アジド-シュードUTP	83	N
1-メチル-6-アミノ-シュードUTP	84	N
1-メチル-6-エチルカルボキシレート-シュードUTP	85	N
1-メチル-6-ヒドロキシ-シュードUTP	86	N
1-メチル-6-メチルアミノ-シュードUTP	87	N
1-メチル-6-ジメチルアミノ-シュードUTP	88	N
1-メチル-6-ヒドロキシアミノ-シュードUTP	89	N
1-メチル-6-ホルミル-シュードUTP	90	N
1-メチル-6-(4-モルホリノ)-シュードUTP	91	N
1-メチル-6-(4-チオモルホリノ)-シュードUTP	92	N
1-アルキル-6-ビニル-シュードUTP	93	N
1-アルキル-6-アリル-シュードUTP	94	N
1-アルキル-6-ホモアリル-シュードUTP	95	N
1-アルキル-6-エチニル-シュードUTP	96	N
1-アルキル-6-(2-プロピニル)-シュードUTP	97	N
1-アルキル-6-(1-プロピニル)-シュードUTP	98	N

【１５３９】

実施例１１４．天然および非天然ヌクレオシドの組み込み

天然および非天然ヌクレオシドを、目的とするポリペプチドをコードするｍＲＮＡ内に組み込む。これらの例を表１７６および１７７に示す。ある特定の市販のヌクレオシドトリホスフェート（ＮＴＰ）を本発明のポリヌクレオチド中で研究する。これらの選択肢を表１７６に示す。次いで、結果として得られるｍＲＮＡを、タンパク質を産生する、サイトカインを誘導する、および／または治療的成果を生じるその能力について検査する。

表１７６．天然および非天然ヌクレオシド

【表０１７６】

化学修飾	化合物番号	天然に生じる
N4-メチル-シトシン	1	Y
N4,N4-ジメチル-2’-OMe-シトシン	2	Y
5-オキシ酢酸-メチルエステル-ウリジン	3	Y
N3-メチル-シュード-ウリジン	4	Y
5-ヒドロキシメチル-シトシン	5	Y
5-トリフルオロメチル-シトシン	6	N
5-トリフルオロメチル-ウリジン	7	N
5-メチル-アミノ-メチル-ウリジン	8	Y
5-カルボキシ-メチル-アミノ-メチル-ウリジン	9	Y
5-カルボキシメチルアミノメチル-2’-OMe-ウリジン	10	Y
5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン	11	Y
5-メチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン	12	Y
5-メトキシ-カルボニル-メチル-ウリジン	13	Y
5-メトキシ-カルボニル-メチル-2’-OMe-ウリジン	14	Y
5-オキシ酢酸-ウリジン	15	Y
3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)-ウリジン	16	Y
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル	17	Y
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン	18	Y

表１７７．非天然ヌクレオシドトリホスフェート

【表０１７７】

化学修飾	化合物番号	天然に生じる
N1-Me-GTP	1	N
2’-OMe-2-アミノ-ATP	2	N
2’-OMe-シュード-UTP	3	Y
2’-OMe-6-Me-UTP	4	N
2’-アジド-2’-デオキシ-ATP	5	N
2’-アジド-2’-デオキシ-GTP	6	N
2’-アジド-2’-デオキシ-UTP	7	N
2’-アジド-2’-デオキシ-CTP	8	N
2’-アミノ-2’-デオキシ-ATP	9	N
2’-アミノ-2’-デオキシ-GTP	10	N
2’-アミノ-2’-デオキシ-UTP	11	N
2’-アミノ-2’-デオキシ-CTP	12	N
2-アミノ-ATP	13	N
8-アザ-ATP	14	N
キサントシン-5’-TP	15	N
5-ブロモ-CTP	16	N
2’-F-5-メチル-2’-デオキシ-UTP	17	N
5-アミノアリル-CTP	18	N
2-アミノ-リボシド-TP	19	N

【１５４０】

実施例１１５．核酸塩基および炭水化物（糖）に対する修飾の組み込み

天然および非天然ヌクレオシドを、目的とするポリペプチドをコードするｍＲＮＡ内に組み込む。核酸塩基および炭水化物（糖）の両方に対する修飾を有する市販のヌクレオシドおよびＮＴＰを、ｍＲＮＡ内に組み込まれ、タンパク質を産生し、サイトカインを誘導し、かつ／または治療的成果を生み出すその能力について検査する。これらのヌクレオシドの例を表１７８および１７９に示す。

表１７８．組み合わせ修飾

【表０１７８】

化学修飾	化合物番号
5-ヨード-2’-フルオロ-デオキシウリジン	1
5-ヨード-シチジン	6
2’-ブロモ-デオキシウリジン	7
8-ブロモ-アデノシン	8
8-ブロモ-グアノシン	9
2,2’-アンヒドロ-シチジン塩酸塩	10
2,2’-アンヒドロ-ウリジン	11
2’-アジド-デオキシウリジン	12
2-アミノ-アデノシン	13
N4-ベンゾイル-シチジン	14
N4-アミノ-シチジン	15
2’-O-メチル-N4-アセチル-シチジン	16
2’フルオロ-N4-アセチル-シチジン	17
2’フルオル（Fluor）-N4-Bz-シチジン	18
2’O-メチル-N4-Bz-シチジン	19
2’O-メチル-N6-Bz-デオキシアデノシン	20
2’フルオロ-N6-Bz-デオキシアデノシン	21
N2-イソブチル-グアノシン	22
2’フルロ（Fluro）-N2-イソブチル-グアノシン	23
2’O-メチル-N2-イソブチル-グアノシン	24

表１７９．天然に生じる組み合わせ

【表０１７９】

名称	化合物番号	天然
5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン TP	1	Y
5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン TP	2	Y
5-カルバモイルメチルウリジン TP	3	Y
5-カルバモイルメチル-2'-0-メチルウリジン TP	4	Y
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)シュードウリジン TP	5	Y
5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン TP	6	Y
5-カルボキシメチルウリジン TP	7	Y
5-メチルジヒドロウリジン TP	8	Y
リシジン TP	9	Y
5-タウリノメチルウリジン TP	10	Y
5-タウリノメチル-2-チオウリジン TP	11	Y
5-(イソ-ペンテニルアミノメチル)ウリジン TP	12	Y
5-(イソ-ペンテニルアミノメチル)-2-チオウリジン TP	13	Y
5-(イソ-ペンテニルアミノメチル)-2'-0-メチルウリジン TP	14	Y
N4-アセチル-2'-0-メチルシチジン TP	15	Y
N4,2'-0-ジメチルシチジン TP	16	Y
5-ホルミル-2'-0-メチルシチジン TP	17	Y
2'-0-メチルシュードウリジン TP	18	Y
2-チオ-2'-0-メチルウリジン TP	19	Y
3,2'-0-ジメチルウリジン TP	20	Y

【１５４１】

本表内において、「ＵＴＰ」はウリジントリホスフェートの略であり、「ＧＴＰ」はグアノシントリホスフェートの略であり、「ＡＴＰ」はアデノシントリホスフェートの略であり、「ＣＴＰ」はシトシントリホスフェートの略であり、「ＴＰ」はトリホスフェートの略であり、「Ｂｚ」はベンジルの略である。

【１５４２】

実施例１１６．ＨｅＬａ細胞における血管内皮成長因子のタンパク質産生

トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体

積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のCO_2雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、表１８０に記載の化学修飾を有する２５０ｎｇの血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６７２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００の０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。また上述の手順に従って、ＶＥＧＦ ｍＲＮＡで第２の組のＨｅＬａ細胞も評価した。第１の組のＨｅＬａ細胞に対して、対照の未処理細胞およびｌｉｐｏｆｅｃａｔａｍｉｎｅ ２０００でのみ処理された細胞も分析した。

【１５４３】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ＶＥＧＦを発現する細胞の細胞培養上清を採取し、２分間１０．０００ｒｃｆで遠心分離した。次いで、製造業者の指示に従ってＶＥＧＦ特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を用いて、澄んだ上清を分析した。全試料を、判定された値がＥＬＩＳＡ標準曲線の線形範囲内に入るまで希釈した。産生されたタンパク質の量を表１８０に示す。

【１５４４】

これらの結果は、１－メチルシュードウリジンで完全に修飾されたＶＥＧＦが、他の化学組成と比較してＨｅＬａ細胞内でより多くのタンパク質を産生したことを実証する。

表１８０．タンパク質産生

【表０１８０】

試料	VEGF 組 1(pg/mL)	VEGF 組 2(pg/mL)
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(5mC および pU)	25,455	50,341
5-メチルシトシンおよび 1-メチルシュードウリジン(5mC および 1mpU)	5,795	8,523
2-チオウリジンで修飾されたウリジンで 25%および 5-メチルシトシンで修飾されたシトシンで 25%(s2U および 5mC)	27,045	27,045
シュードウリジン(pU)	216,023	345,114
1-メチルシュードウリジン(1mpU)	32,614	38,523
未修飾	409,318	447,273
Lipofectamine 2000(L2000)	0	該当なし
未処理	0	該当なし

【１５４５】

実施例１１７．ＨｅＬａ細胞における化学修飾血管内皮成長因子のタンパク質産生の比較

トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のCO_2雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、表１８１に記載

の化学修飾を有する２５０ｎｇの血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６７２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００の０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。対照の未処理細胞も分析した。

【１５４６】

１８～２２時間のインキュベーションの後、ＶＥＧＦを発現する細胞の細胞培養上清を採取し、２分間１０．０００ｒｃｆで遠心分離した。次いで、製造業者の指示に従ってＶＥＧＦ特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を用いて、澄んだ上清を分析した。全試料を、判定された値がＥＬＩＳＡ標準曲線の線形範囲内に入るまで希釈した。産生されたタンパク質の量を表１８１および図９に示す。

【１５４７】

この結果は、１－メチルシュードウリジンで完全に修飾されたＶＥＧＦが、他の化学組成と比較してＨｅＬａ細胞内でより多くのタンパク質を産生したことを実証する。

表１８１．タンパク質産生

【表０１８１】

試料	VEGF (pg/mL)
未修飾	121,176
5-メチルシトシンおよび 1-メチルシュードウリジン(5mC および 1mpU)	760,000
1-メチルシュードウリジン(1mpU)	1,393,824
未処理	0

【１５４８】

実施例１１８．哺乳動物における血管内皮成長因子タンパク質の産生

リポプレックス形成した血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６７２に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、修飾しなかったか、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾たか（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルシュードウリジンで完全に修飾したか（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、５－メチルシトシンで置換されたシトシンで２５％および２－チオウリジンで置換されたウリジンで２５％修飾したか（５ｍＣ／ｓ２Ｕ）、１－メチルシュードウリジンで完全に修飾したか（１ｍｐＵ）、またはシュードウリジン（ｐＵ）で完全に修飾した。その製剤を、静脈内に１マウス当たり２μｇのｍＲＮＡの用量でマウスに投与した。対照として、マウスの１群を未処理とした。マウスからの血清を、投与の３時間後にＶＥＧＦタンパク質発現について特異的ＶＥＧＦ　ＥＬＩＳＡによって測定する。その結果を表１８２および図１０に示す。

表１８２．タンパク質産生

【表０１８２】

試料	VEGF (pg/mL)
未修飾	34
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(5mC および pU)	40
5-メチルシトシンおよび 1-メチルシュードウリジン(5mC および 1mpU)	11
2-チオウリジンで修飾されたウリジンで 25%および 5-メチルシトシンで修飾されたシトシンで 25%(s2U および 5mC)	53
シュードウリジン(pU)	86
1-メチル-シュードウリジン(1mpU)	51
未処理	0

【１５４９】

実施例１１９．ＨｅＬａ細胞内の顆粒球コロニー刺激因子のタンパク質産生

トランスフェクションの前日に、２０，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５％のCO_2雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、表１８３に記載の化学修飾を有する２５０ｎｇの顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４３８に示される；約１６０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００の０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。対照の未処理細胞およびｌｉｐｏｆｅｃａｔａｍｉｎｅ　２０００でのみ処理された細胞も分析した。

【１５５０】

１８～２２時間のインキュベーションの後、Ｇ－ＣＳＦを発現する細胞の細胞培養上清を採取し、２分間１０．０００ｒｃｆで遠心分離した。次いで、製造業者の指示に従ってＧ－ＣＳＦ特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を用いて、澄んだ上清を分析した。全試料を、判定された値がＥＬＩＳＡ標準曲線の線形範囲内に入るまで希釈した。産生されたタンパク質の量を表１８３および図１１に示す。

表１８３．タンパク質産生

【表０１８３】

試料	G-CSF(pg/mL)
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(5mC および pU)	704,250
5-メチルシトシンおよび 1-メチルシュードウリジン(5mC および 1mpU)	1,523,750
2-チオウリジンで修飾されたウリジンで 25%および 5-メチルシトシンで修飾されたシトシンで 25%(s2U および 5mC)	89,000
シュードウリジン(pU)	408,250
1-メチルシュードウリジン(1mpU)	1,391,250
Lipofectamine 2000(L2000)	0
未処理	0

【１５５１】

実施例１２０．哺乳動物における顆粒球コロニー刺激因子タンパク質の生成

５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾された顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／ｓ２Ｕ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）。製剤をマウス１匹当たりｍＲＮＡ２ｕｇおよびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｌ２０００）２ｕｌの投与量でマウス（ＣＤ１）（ｎ＝３）に静脈内投与した。対照として１グループのマウスを未処置とした。投与６時間後、特異的Ｇ－ＣＳＦ ＥＬＩＳＡによりマウス血清をＧ－ＣＳＦタンパク質発現について測定した。その結果を表１８４および図１２に示す。

表１８４．タンパク質生成

【表０１８４】

試料	G-CSF(pg/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	3,800
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	22,868
ウリジン２５％を２－チオウリジンで修飾、シトシンの２５％を５－メチルシトシンで修飾（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	1,386
プソイドウリジン（ｐＵ）	7,579
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	25,882
未処置	0

【１５５２】

実施例１２１．ＨｅＬａ細胞上清における化学修飾第ＩＸ因子のタンパク質産生

トランスフェクションの前日に、１５，０００個のＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）を、トリプシン－エチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）での処理によって収集し、２４ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）においてウェル毎に総体積１００μＬのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１倍Ｇｌｕｔａｍａｘを補充）に播種した。細胞を５

％のCO_2雰囲気下で一晩、３７℃で成長させた。翌日、５－メチルシトシンおよびシュードウリジンで完全に修飾させたか（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルシュードウリジンで完全に修飾されたか（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、５－メチルシトシンで置換されたシトシンで２５％および２－チオウリジンで置換されたウリジンで２５％修飾されたか（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルシュードウリジンで完全に修飾さたか（１ｍｐＵ）、またはシュードウリジンで完全に修飾された（ｐＵ）、２５０ｎｇの第ＩＸ因子修飾ＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号１６２２に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００の０．２μＬを１０μＬの最終体積のＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）中に希釈した。室温で５分間のインキュベーションの後、両方の溶液を混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、２０μＬの合わせた溶液を、ＨｅＬａ細胞を含有する１００μＬの細胞培養培地に添加し、室温でインキュベートした。未処理の対照も分析した。

【１５５３】

１８時間のインキュベーションの後、Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）の免疫沈殿（ＩＰ）緩衝液で溶解した細胞によって、第ＩＸ因子を発現する細胞の細胞培養上清を採取し、２分間１０．０００ｒｃｆで遠心分離した。澄んだ上清を１：２（１ｍＬのライセート／２ウェル／２４ウェルプレート）または１：５（１ｍＬのライセート／５ウェル／２４ウェルプレート）に希釈し、次いで、製造業者の指示に従って第ＩＸ因子特異的ＥＬＩＳＡキットを用いて分析した。全試料を、判定された値がＥＬＩＳＡ標準曲線の線形範囲内に入るまで希釈した。両方の研究において産生されたタンパク質の量を表１８５および図１３に示す。

表１８５．タンパク質産生

【表０１８５】

試料	第 IX 因子 (ng/mL)
5-メチルシトシンおよびシュードウリジン(5mC/pU)	45.8
5-メチルシトシンおよび 1-メチルシュードウリジン(5mC/1mpU)	147.1
５－メチルシトシンで置換されたシトシンで 25%および２－チオウリジンで置換されたウリジンで 25%修飾された(s2U/5mC)	7.4
シュードウリジン(pU)	17.0
1-メチルシュードウリジン(1mpU)	32.0
未処理	0

【１５５４】

実施例１２２．ＨｅＬａ細胞におけるアポリポタンパク質Ａ－Ｉのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）２０，０００個を収集し、２４ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血

清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアポリポタンパク質Ａ－Ｉ野生型（ＡＰＯＡ１ｗｔ）修飾ＲＮＡ（配列番号２１４５３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアポリプロプロテイン（ａｐｏｌｉｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ）Ａ１　Ｐａｒｉｓ（ＡＰＯＡ１　Ｐａｒｉｓ）修飾ＲＮＡ（配列番号２１４５４で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）または５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアポリプロプロテイン（ａｐｏｌｉｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ）Ａ１　Ｍｉｌａｎｏ（ＡＰＯＡ１　Ｍｉｌａｎｏ）修飾ＲＮＡ（配列番号２１４５５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。ほかにも、ｌｉｐｏｆｅｃａｔａｍｉｎｅ　２０００のみで処理した細胞の対照を分析した。

【１５５５】

１８時間のインキュベーション後、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社の免疫沈降（ＩＰ）緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）で細胞を溶解することにより、ＡＰＯＡ１ｗｔ、ＡＰＯＡ１　ＰａｒｉｓまたはＡＰＯＡ１　Ｍｉｌａｎｏを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。清澄化した上清を１：２（可溶化液１ｍｌ／２ウェル／２４ウェルプレート）または１：５（可溶化液１ｍｌ／５ウェル／２４ウェルプレート）に希釈した後、ＡＰＯＡ１特異的ＥＬＩＳＡキットで製造業者の指示書に従い分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。この試験を再度実施し、両試験で生成したタンパク質の量を表１８６および図１４に示す。

【１５５６】

表１８６．タンパク質生成

【表０１８６】

試料	タンパク質(ng/ml)
ＡＰＯＡ１ｗｔ １：２希釈	8
ＡＰＯＡ１ｗｔ １：２希釈、２回目	6
ＡＰＯＡ１ Ｍｉｌａｎｏ １：２希釈	7
ＡＰＯＡ１ Ｍｉｌａｎｏ １：２希釈、２回目	7
ＡＰＯＡ１ Ｐａｒｉｓ １：２希釈	10
ＡＰＯＡ１ Ｐａｒｉｓ １：２希釈、２回目	10
ＡＰＯＡ１ｗｔ １：５希釈	9
ＡＰＯＡ１ｗｔ １：５希釈、２回目	9
ＡＰＯＡ１ Ｍｉｌａｎｏ １：５希釈	8
ＡＰＯＡ１ Ｍｉｌａｎｏ １：５希釈、２回目	6
ＡＰＯＡ１ Ｐａｒｉｓ １：５希釈	12
ＡＰＯＡ１ Ｐａｒｉｓ １：５希釈、２回目	11
Ｃｏｎｔｒｏｌ １：２希釈	0
Ｃｏｎｔｒｏｌ １：２希釈、２回目	0
Ｃｏｎｔｒｏｌ １：５希釈	0
Ｃｏｎｔｒｏｌ １：５希釈、２回目	0

【１５５７】

実施例１２３．アポリポタンパク質Ａ－Ｉ野生型タンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアポリプロプロテイン（Ａｐｏｌｉｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ）Ａ－Ｉ（ＡＰＯＡ１）野生型ｍＲＮＡ（配列番号２１４５３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１５５８】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ １ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ ５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１

．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。
【１５５９】
３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。
【１５６０】
Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。
【１５６１】
既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。
【１５６２】
泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。
【１５６３】
転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＡＰＯＡ１に対するＡｐｏＡ１ウサギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＡｐｏＡ１ウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。種々の化学修飾を含むＡＰＯＡ１野生型ｍＲＮＡ由来のＡＰＯＡ１タンパク質のＨｅＬａ細胞溶解物におけるウエスタンブロット検出の結果を図１５に示す。
【１５６４】
実施例１２４．アポリポタンパク質Ａ－Ｉ　Ｐａｒｉｓタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアポリプロプロテイン（Ａｐｏｌｉｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ）（ＡＰＯＡ１）Ｐａｒｉｓ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４５４で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１５６５】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１５６６】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１５６７】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１５６８】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌに

するＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１５６９】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１５７０】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＡＰＯＡ１に対するＡｐｏＡ１ウサギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＡｐｏＡ１ウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。種々の化学修飾を含むＡＰＯＡ１　Ｐａｒｉｓ　ｍＲＮＡ由来のＡＰＯＡ１タンパク質のＨｅＬａ細胞溶解物におけるウエスタンブロット検出の結果を図１６に示す。

【１５７１】

実施例１２５．アポリポタンパク質Ａ－Ｉ　Ｍｉｌａｎｏタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアポリプロプロテイン（Ａｐｏｌｉｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ）（ＡＰＯＡ１）Ｍｉｌａｎｏ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４５５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１５７２】
１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。
【１５７３】
３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。
【１５７４】
Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。
【１５７５】
既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。
【１５７６】
泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。
【１５７７】
転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＡＰＯＡ１に対するＡｐｏＡ１ウサギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＡｐｏＡ１ウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。種々の化学修飾を含むＡＰＯＡ１　Ｍｉｌａｎｏ　ｍＲＮＡ由来のＡＰＯＡ１タン

パク質のＨｅＬａ細胞溶解物におけるウエスタンブロット検出の結果を図１７に示す。

【１５７８】

実施例１２６．フィブリノーゲンＡタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されたフィブリノーゲンＡ（ＦＧＡ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４５６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／１ｍｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１５７９】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１５８０】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１５８１】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１５８２】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））

が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１５８３】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１５８４】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。フィブリノーゲンＡに対するフィブリノーゲンＡヤギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ロバ抗ヤギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、フィブリノーゲンＡヤギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図１８の四角で囲まれた部分に示される通り、フィブリノーゲンＡのウエスタンブロット検出の結果は予測サイズ９５ｋｄに近いものであった。

【１５８５】

実施例１２７．ＨｅＬａ細胞上清における化学的に修飾されたプラスミノーゲンのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）２０，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されたプラスミノーゲン修飾ＲＮＡ（配列番号２１４５７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００ ０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、エリスロポエチン（ＥＰＯ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）の対照および未処置細胞を分析した。

【１５８６】

１８～２２時間のインキュベーション後、プラスミノーゲンを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をプラスミノーゲン特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｒ ＆ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）で製造業者の指示書に従い分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。生成したタンパク質の量を表１８７および

図１９に示す。

【１５８７】

表１８７．タンパク質生成

【表０１８７】

試料	プラスミノーゲン(ng/ml)
プラスミノーゲン	10
ＥＰＯ	1.1
未処置	0.8

【１５８８】

実施例１２８．プラスミノーゲンタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されたプラスミノーゲンｍＲＮＡ（配列番号２１４５７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／１ｍｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１５８９】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１５９０】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１５９１】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されている

もの）に溶かした。

【１５９２】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１５９３】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１５９４】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。プラスミノーゲンに対するプラスミノーゲンヤギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ロバヤギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、プラスミノーゲンヤギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図２０は、プラスミノーゲンが予測サイズ９５ｋｄ付近で検出されたことを示している。

【１５９５】

実施例１２９．ガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（ＧＡＬＴ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４５８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。　室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間

インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１５９６】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１５９７】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１５９８】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１５９９】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１６００】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１６０１】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＧＡＬＴに対するＧＡＬＴマウスモノクローナル抗体（Ｎｏｖｕｓ　ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ　ＣＯ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ロバ抗マウスＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＧＡＬＴマウスモノクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体

を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図２１の四角で囲まれた部分に示される通り、ＧＡＬＴのウエスタンブロット検出の結果は約４２ｋｄであった。

【１６０２】

実施例１３０．アルギニノスクシナーゼ酸リアーゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアルギニノスクシナーゼ酸リアーゼ（ＡＳＬ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４５９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１６０３】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１６０４】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１６０５】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１６０６】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌ

に調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１６０７】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１６０８】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＡＳＬに対するＡＳＬマウスモノクローナル抗体（Ｎｏｖｕｓ　ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ、ＣＯ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ロバ抗マウスＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＡＳＬマウスモノクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図２２の四角で囲まれた部分に示される通り、ＡＳＬのウエスタンブロット検出の結果は約５０ｋｄであった。

【１６０９】

実施例１３１．チロシンアミノトランスフェラーゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されたチロシンアミノトランスフェラーゼ（ＴＡＴ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４６０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／１ｍｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１６１０】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１

．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。
【１６１１】
３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。
【１６１２】
Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。
【１６１３】
既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。
【１６１４】
泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。
【１６１５】
転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＴＡＴに対するＴＡＴウサギポリクローナル抗体（Ｎｏｖｕｓ　ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＴＡＴウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図２３の四角で囲まれた部分に示される通り、ＴＡＴのウエスタンブロット検出の結果は、白く示される化学発光バンドの約５０ｋｄであった。
【１６１６】
実施例１３２．１，４－α－グルカン－分枝酵素タンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された１，４－α－グルカン－分枝酵素（ＧＢＥ１）ｍＲＮＡ（配列番号２１４６１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／１ｍｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１６１７】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１６１８】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１６１９】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１６２０】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった

。

【１６２１】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１６２２】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＧＢＥ１に対するＧＢＥ１ウサギポリクローナル抗体（Ｎｏｖｕｓ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ、ＣＯ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＧＢＥ１ウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図２４の四角で囲まれた部分に示される通り、ＧＢＥ１のウエスタンブロット検出の結果は予測サイズ７０ｋｄ前後であった。

【１６２３】

実施例１３３．ＨｅＬａ細胞上清におけるプロトロンビンのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）２０，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されたプロトロンビン修飾ＲＮＡ（配列番号２１４６２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００ ０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、エリスロポエチン（ＥＰＯ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）の対照および未処置細胞を分析した。

【１６２４】

１８～２２時間のインキュベーション後、プラスミノーゲンを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をプロトロンビン－特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｒ ＆ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）で製造業者の指示書に従い分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。生成したタンパク質の量を表１８８および図２５に示す。

【１６２５】

表１８８．タンパク質生成

【表０１８８】

試料	プロトロンビン(ng/ml)
プロトロンビン	31
ＥＰＯ	2.5
未処置	2

【１６２６】

実施例１３４．ＨｅＬａ細胞上清における化学的に修飾されたプロトロンビンのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、２４ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたプロトロンビン修飾ＲＮＡ（配列番号２１４６２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ＲＮＡ（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（ｐＵ）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置対照を分析した。

【１６２７】

１８時間のインキュベーション後、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社の免疫沈降法（ＩＰ）緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）で細胞を溶解することにより、プロトロンビンを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。清澄化した上清を１：２（可溶化液１ｍｌ／２ウェル／２４ウェルプレート）または１：５（可溶化液１ｍｌ／５ウェル／２４ウェルプレート）に希釈した後、プロトロンビン特異的ＥＬＩＳＡキットで製造業者の指示書に従い分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。両試験で生成したタンパク質の量を表１８９および図２６に示す。

【１６２８】

表１８９．タンパク質生成

【表０１８９】

試料	プロトロンビン(ng/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣ／ｐＵ）	68
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣ／１ｍｐＵ）	210
５－メチルシトシンで置換された２５％のシトシンおよび２－チオウリジンで置換された２５％のウリジン（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）	25
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	277
プソイドウリジン（ｐＵ）	30
未処置	7.5

【１６２９】

実施例１３５．セルロプラスミンタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されたセルロプラスミン（ＣＰまたはＣＬＰ）ｍＲＮＡ（配列番号１６２１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／１ｍｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１６３０】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１６３１】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１６３２】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１６３３】

既製の１．５mmビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１６３４】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１６３５】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＣＰタンパク質に対するセルロプラスミンウサギポリクローナル抗体（Ｎｏｖｕｓ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ、ＣＯ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、セルロプラスミンウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図２７の四角で囲まれた部分に示される通り、セルロプラスミン（ＣＬＰ）のウエスタンブロット検出の結果は約１４８ｋｄであった。

【１６３６】

実施例１３６．ＨｅＬａ細胞上清におけるトランスフォーミング成長因子β１のタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）２０，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたトランスフォーミング成長因子β１（ＴＧＦ－β１）修飾ＲＮＡ（配列番号１６６８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）８３ｎｇ、２５０ｎｇまたは７５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフ

ェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、ｌｉｐｏｆｅｃａｔｍｉｎｅ　２０００処置細胞の対照（Ｌ２０００）および未処置細胞を分析した。

【１６３７】

１８～２２時間のインキュベーション後、ＴＧＦ－β１を発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をＴＧＦ－β１－特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｒ　＆　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）で製造業者の指示書に従い分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。生成したタンパク質の量を表１９０および図２８に示す。

【１６３８】

表１９０．タンパク質生成

【表０１９０】

試料	TGF-β1(pg/ml)
TGF-β1(83ng)	3210
TGF-β1(250ng)	4325
TGF-β1(750ng)	5058
L2000	2
未処置	0

【１６３９】

実施例１３７．オルニチントランスカルバモイラーゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたオルニチントランスカルバモイラーゼ（ＯＴＣ）ｍＲＮＡ（配列番号１６５９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１６４０】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１６４１】
３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１６４２】
Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１６４３】
既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１６４４】
泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１６４５】
転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＯＴＣタンパク質に対するＯＴＣウサギポリクローナル抗体（Ｎｏｖｕｓ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ、ＣＯ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＯＴＣウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図２９の四角で囲まれた部分に示される通り、ＯＴＣのウエスタンブロット検出の結果は予測サイズ４０ｋｄ前後であった。

【１６４６】
実施例１３８．哺乳動物におけるＬＤＬＲのｉｎ ｖｉｖｏ試験
低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）受容体（ＬＤＬＲ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４６３で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャ

ップ、キャップ１；配列中に示されない１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）８．０ｕｇとダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）とを混合して最終体積０．２ｍＬにすることにより、同ｍＲＮＡとＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００との複合体を形成させた。

【１６４７】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００をＤＭＥＭで１２．５倍に希釈し、同体積の希釈ＬＤＬ受容体ｍＲＮＡ溶液と混合した。試料を室温で５分間インキュベートし、複合体を形成したｍＲＮＡ混合物０．１ｍＬをＣ５７ＢＬ／６マウス３匹の各個体の各尾静脈に注射した。総投与量２．０ｕｇのＬＤＬ受容体ｍＲＮＡを各個体に投与した。６時間後、マウスを屠殺し、脾臓を摘出した。標準的な方法（予め赤血球を溶解しない）に従って脾細胞を単離し、等量のヒトＬＤＬ受容体特異的ＩｇＧまたは対照の非免疫ＩｇＧで染色した。

【１６４８】

ＣＤ１１ｂ＋脾細胞集団にゲートをかけたフローサイトメトリーによりＬＤＬ受容体の発現を評価した。図３０に示される通り、非免疫ＩｇＧ（非免疫ＩｇＧ）で染色された細胞と比較して、ＬＤＬ受容体ＩｇＧで染色された右側に移動したピーク（ＬＤＬＲ　ＩｇＧ）が存在することによって、３匹の個々のマウスにおいてｉｎ　ｖｉｖｏのＣＤ１１ｂ＋脾細胞集団におけるＬＤＬ受容体の発現が明らかであった。

【１６４９】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅのみで処置したマウスには、ＬＤＬ受容体に特異的なピークは観察されず、染色は非免疫ＩｇＧに観察されたものとほぼ同じであった。

【１６５０】

実施例１３９．修飾ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡの試験

標準的な方法に従って、１０％ウシ胎仔血清を含有するＤＭＥＭにＨＥＫ２９３細胞を５００，０００細胞／６ウェルプレートの密度で播き、細胞を一晩培養した。翌日、ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１（ＵＧＴ１Ａ１）ｍＲＮＡ（配列番号２１４６４で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１；配列中に示されない１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）８００ｎｇを至適緩衝液０．３ｍＬで希釈し、同様にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００の試料４．０ｕＬを至適緩衝液０．３ｍＬで希釈し、この２つの溶液を混合することによってｍＲＮＡとＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００との複合体を形成させた。

【１６５１】

室温で１５分間インキュベートした後、細胞にＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡ／Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００混合物をトランスフェクトした。３７℃で１８時間インキュベートした後、培地を吸引し、細胞をＰＢＳで洗浄した。細胞をセルリフターで擦り取って収集し、細胞を３０００ｒｐｍで３分間遠心分離した。細胞ペレットをＰＢＳで洗浄し、記載した通りに遠心分離し、プロテアーゼインヒビターカクテルを添加したＲＩＰＡ緩衝液０．２５ｍＬを加えて細胞ペレットを溶解した。細胞抽出物を１２，２１０ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上清画分（可溶化液）を－８０℃で凍結させた。

【１６５２】

Ｓｉｍｐｌｅ　Ｓｉｍｏｎ　Ｗｅｓｔｅｒｎキャピラリー電気泳動装置を用い、ヒトＵＧＴ１Ａ１特異的抗体を使用してウエスタンブロット法を実施した。可溶化液の試料０．００５ｍｇを三重反復で泳動した。図３１に示される通り、ＵＧＴ１Ａ１が約６０ｋＤａの単一バンドとして検出された。これに対して、無関係なｍＲＮＡでトランスフェクトした対照細胞の可溶化液を用いてもバンドは検出されなかった。

【１６５３】

実施例１４０．マウスにおけるＬＤＬＲのｉｎ　ｖｉｖｏ発現

ＬＤＬＲ－／－マウスを用いてＬＤＬＲ　ｍｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ発現を試験する。ＬＤＬＲ－／－マウスにＬＤＬ　ｍｍＲＮＡを注射により投与する。ＬＤＬＲ発現につ

いてマウスの組織を検討した。マウス組織のウエスタンブロット解析を実施し、ＬＤＬＲ
ｍｍＲＮＡ投与の結果生じたＬＤＬＲタンパク質発現の有無を調べる。マウス組織にリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを実施し、ＬＤＬＲ遺伝子発現の有無を調べる。

【１６５４】

実施例１４１．哺乳動物におけるＬＤＬＲの生成

オルニチントランスカルバモイラーゼ（ＯＴＣ）は核ゲノム内にコードされるミトコンドリアタンパク質である。ＯＴＣの欠損はアンモニアの毒性蓄積を特徴とし、尿素回路障害を来たす。

【１６５５】

実施例１４０に記載したマウスにＯＴＣをコードする修飾ｍＲＮＡを投与する。タンパク質発現を判定するため、種々の時点で血清、組織および／または器官を採取する。

【１６５６】

さらに、実施例１４０のマウスにＬＤＬＲ修飾ｍＲＮＡを投与する試験も実施する。タンパク質発現を判定するため、種々の時点で血清、組織および／または器官を採取する。

【１６５７】

実施例１４２．ＨＥＫ２９３細胞における化学的に修飾された第ＸＩ因子の生成

１型コラーゲンでプレコートした２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－ｏｎｅ　ＧｍｂＨ、Ｆｒｉｃｋｅｎｈａｕｓｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）にヒト胎児腎上皮細胞（ＨＥＫ２９３）（ＬＧＣ　ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ＧｍｂＨ、Ｗｅｓｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を播く。ＨＥＫ２９３は細胞培養培地１００ｕｌに約１００，０００細胞／ウェルの密度で播く。細胞を播種した後、第ＸＩ因子ｍＲＮＡ（ｍｏｄＲＮＡ　ＦＸＩ）（配列番号１６２５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）３５０ｎｇまたは７５０ｎｇを含有する製剤を直接加え、インキュベートする。このほか、未処置細胞の対照を評価した。

【１６５８】

培養培地の上清を９６ウェルＰｒｏ－Ｂｉｎｄ　Ｕ底プレート（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＧｍｂＨ、Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）に移すことにより細胞を収集する。細胞を１／２体積のトリプシン／ＥＤＴＡ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ、Ｂｅｒｌｉｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）でトリプシン処理し、それぞれの上清でプールし、１体積のＰＢＳ／２％ＦＣＳ（ともにＢｉｏｃｈｒｏｍ　ＡＧ、Ｂｅｒｌｉｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）／０．５％ホルムアルデヒド（Ｍｅｒｃｋ、Ｄａｒｍｓｔａｄｔ、Ｇｅｒｍａｎｙ）の添加により固定する。１２時間のインキュベーション後、第ＸＩ因子を発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清を第ＸＩ因子特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｎｏｖｉ、ＭＩ）で製造業者に従って分析した。生成したタンパク質の量を図３２に示す。

【１６５９】

実施例１４３．アクアポリン－５タンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアクアポリン－５　ｍＲＮＡ（配列番号１６１７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）

、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。 Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を評価した。

【１６６０】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ １ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ ５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１６６１】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１６６２】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１６６３】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１６６４】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１６６５】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。アクアポリン－５タンパク質に対するアクアポリン－５ウサギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、アクアポリン－５ウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図３３の四角で囲まれた部分に示される通り、ウエスタンブロットにより、評価した各化学反応でタンパク質が検出された。

【１６６６】

実施例１４４．ＨｅＬａ細胞における第ＶＩＩ因子のタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、表１９１に記載される化学修飾を有する第ＶＩＩ因子修飾ＲＮＡ（配列番号１６２３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を分析した。

【１６６７】

１８～２２時間のインキュベーション後、第ＶＩＩ因子を発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をＨｙｐｈｅｎ　Ｂｉｏｍｅｄ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃキット（Ａｎｉａｒａ、Ｗｅｓｔ　Ｃｈｅｓｔｅｒ　ＯＨ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。未処置試料と比較される生成したタンパク質の量を表１９１および図３４に示す。

【１６６８】

表１９１．タンパク質生成

【表０１９１】

試料	未処置に対する増加(pg/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	1.236
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	1.270
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	1.299
プソイドウリジン（ｐＵ）	1.276
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	1.224
未処置	1

【１６６９】

実施例１４５．ＨｅＬａ細胞上清における化学的に修飾されたインスリングラルギンのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、２４ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたインスリングラルギン修飾ＲＮＡ（配列番号２１４６５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ＲＮＡ（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（ｐＵ）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。（登録商標）。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置の対照を分析した。

【１６７０】

１８時間のインキュベーション後、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社の免疫沈降法（ＩＰ）緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）で溶解することによって、インスリングラルギンを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。清澄化した上清を１：２（可溶化液１ｍｌ／２ウェル／２４ウェルプレート）または１：５（可溶化液１ｍｌ／５ウェル／２４ウェルプレート）に希釈した後、インスリン特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｍｅｒｃｏｄｉａ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。両試験で生成したタンパク質の量を表１９２および図３５に示す。表１９２では、「＞」は上回ることを意味する。

【１６７１】
表１９２．タンパク質生成
【表０１９２】

試料	インスリングラルギン(mIU/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン(５ｍＣ／ｐＵ)	22.7
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣ／１ｍｐＵ）	85.3
５－メチルシトシンで置換された２５％のシトシンおよび２－チオウリジンで置換された２５％のウリジン（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）	44.2
プソイドウリジン（ｐＵ）	42.0
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	>105
未処置	0

【１６７２】
実施例１４６．ＨｅＬａ細胞における組織因子（因子３）のタンパク質生成
トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、表１９３に記載される化学修飾を有する組織因子（因子３）修飾ＲＮＡ（配列番号２１４６６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を分析した。
【１６７３】
１８～２２時間のインキュベーション後、組織因子を発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をＨｙｐｈｅｎ　Ｂｉｏｍｅｄ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃキット（Ａｎｉａｒａ、Ｗｅｓｔ　Ｃｈｅｓｔｅｒ　ＯＨ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。未処置試料と比較される生成したタンパク質の量を表１９３および図３６に示す。表１９３では、「＞」は上回ることを意味する。
【１６７４】
表１９３．タンパク質生成

【表０１９３】

試料	組織因子タンパク質(pg/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	＞2,500
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	＞2,500
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	669
プソイドウリジン（ｐＵ）	＞2,500
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	＞2,500
未処置	3.1

【１６７５】

実施例１４７．ＨｅＬａ細胞における化学的に修飾された第ＸＩ因子のタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、表１９４に記載される化学修飾を有する第ＸＩ因子修飾ＲＮＡ（配列番号１６２５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を分析した。

【１６７６】

１８～２２時間のインキュベーション後、第ＸＩ因子を発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清を第ＸＩ因子特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｎｏｖｉ、ＭＩ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。未処置試料と比較される生成したタンパク質の量を表１９４および図３７に示す。表１９４では、「＞」は上回ることを意味する。

【１６７７】

表１９４．タンパク質生成

【表０１９４】

試料	第ＸＩ因子タンパク質(ng/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	＞500
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	＞500
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	42
プソイドウリジン（ｐＵ）	＞500
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	＞500
未処置	9

【１６７８】

実施例１４８．ＨｅＬａ細胞上清における第ＸＩ因子のタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）２０，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された第ＸＩ因子修飾ＲＮＡ（配列番号１６２５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、エリスロポエチン（ＥＰＯ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；キャップ、キャップ１、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）および未処置細胞の対照を分析した。

【１６７９】

１８～２２時間のインキュベーション後、プラスミノーゲンを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清を第ＸＩ因子特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｎｏｖｉ、ＭＩ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。生成したタンパク質の量を表１９５および図３８に示す。

【１６８０】

表１９５．タンパク質生成

【表０１９５】

試料	第ＸＩ因子タンパク質(ng/ml)
第ＸＩ因子	105
ＥＰＯ	0.3
未処置	1.2

【１６８１】

実施例１４９．ＨｅＬａ細胞におけるインスリンアスパルトのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、表１９６に記載される化学修飾を有するインスリンアスパルト修飾ＲＮＡ（配列番号２１４６７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を分析した。

【１６８２】

１８～２２時間のインキュベーション後、インスリンを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をインスリン特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｍｅｒｃｏｄｉａ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。未処置試料と比較される生成したタンパク質の量を表１９６および図３９に示す。表１９６では、「＞」は上回ることを意味する。

【１６８３】

表１９６．タンパク質生成

【表０１９６】

試料	インスリンアスパルト(mIU/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン(５ｍＣおよびｐＵ)	＞500
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	＞500
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	＞500
プソイドウリジン（ｐＵ）	＞500
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	＞500
未処置	0

【１６８４】

実施例１５０．ＨｅＬａ細胞におけるインスリンリスプロのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、表１９７に記載される化学修飾を有するインスリンリスプロ修飾ＲＮＡ（配列番号２１４６８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を分析した。

【１６８５】

１８～２２時間のインキュベーション後、インスリンリスプロを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をインスリン特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｍｅｒｃｏｄｉａ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。未処置試料と比較される生成したタンパク質の量を表１９７および図４０に示す。表１９７では、「＞」は上回ることを意味する。

【１６８６】

表１９７．タンパク質生成

【表０１９７】

試料	インスリンアスパルト(mIU/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	＞500
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	＞500
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	＞500
プソイドウリジン（ｐＵ）	＞500
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	＞500
未処置	0

【１６８７】

実施例１５１．ＨｅＬａ細胞におけるインスリングルリジンのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、表１９８に記載される化学修飾を有するインスリングルリジン修飾ＲＮＡ（配列番号２１４６９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ

１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を分析した。

【１６８８】

１８～２２時間のインキュベーション後、インスリンリスプロを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をインスリン特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｍｅｒｃｏｄｉａ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。未処置試料と比較される生成したタンパク質の量を表１９８および図４１に示す。表１９８では、「＞」は上回ることを意味する。

【１６８９】

表１９８．タンパク質生成

【表０１９８】

試料	インスリン(mIU/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	＞500
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	＞500
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	＞500
プソイドウリジン（ｐＵ）	＞500
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	＞500
未処置	0

【１６９０】

実施例１５２．ＨｅＬａ細胞におけるヒト成長ホルモンのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、表１９９に記載される化学修飾を有するヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）修飾ＲＮＡ（配列番号１６４８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を分析した。

【１６９１】

１８～２２時間のインキュベーション後、ヒト成長ホルモンを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をヒト成長ホルモンＥＬＩＳＡキット（Ｃａｔ．Ｎｏ．ＤＧＨ００；Ｒ＆Ｄ　ＳＹＳＴＥＭＳ（登録商標）、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。未処置試料と比較される生成したタンパク質の量を表１９９および図４２に示す。表１９９では、「＞」は上回ることを意味する。

【１６９２】

表１９９．タンパク質生成

【表０１９９】

試料	hGH(pg/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	＞8,000
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	＞8,000
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	＞8,000
プソイドウリジン（ｐＵ）	＞8,000
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	＞8,000
未処置	0

【１６９３】

実施例１５３．腫瘍タンパク質５３タンパク質の検出：ウエスタンブロット

ＣＤ１マウス（Ｈａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓｏｕｔｈ　Ｅａｓｔｏｎ、ＭＡ）に５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたリポプレックス化腫瘍タンパク質５３（ＴＰ５３またはｐ５３）ｍＲＮＡ（配列番号１６７０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）を静脈内投与した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）２ｕｌと複合体を形成したｍＲＮＡ　２ｕｇを滅菌ＤＭＥＭ基本培地（ｗ／ｏ添加剤、ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）１００ｕｌに溶かしたものをマウスに投与した。

【１６９４】

６時間後、マウスを屠殺し、血清および脾臓を採取した。脾臓を６ウェルプレートに移し、ＰＢＳ　１ｍｌの存在下、氷上に保持した。１つの脾臓を解剖用メスで数回切り、細胞遊離によってＰＢＳが濁るまでゴム製セルスクレーパーで脾細胞を絞り出した。

【１６９５】

線維性成分を残して１２ウェル細胞培養プレートの上にある１００ｕｍのセルストレーナー（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＣＡ）に細胞を移した。重力によりセルストレーナーに細胞を通過させ、下にある１２ウェル培養皿に回収した。ＰＢＳ　１ｍｌを浮遊している脾細胞とともにエッペンドルフ管に移し、２０００ｒｐｍで５分間回転させた。ＰＢＳを捨て、細胞ペレットと新たなＰＢＳ　５００ｕｌとを合わせた。２０００ｒｐｍで５分間、短時間ボルテックスすることにより、脾細胞を再懸濁させた。ＰＢＳを捨て、細胞ペレットにＢＤ　Ｐｈａｒｍｌｙｓｅ　１ｍｌを加えた。短時間のボルテックスにより脾細胞を再懸濁させた。細胞を室温で３分間インキュベートした後、２００ｒｐｍで５分間回転させた。細胞をＰＢＳ　５００ｕｌで２回洗浄し、上記の通りに回転させた。細胞をＰＢＳ　５００ｕｌに再懸濁させ、記載される通りに回転させた。

【１６９６】
脾細胞２５０ｕｌを１×Ｐｈａｒｍｌｙｓｅ緩衝液と合せ、短時間ボルテックスするか、ピペットで再懸濁させた後、２０００ｒｐｍで２分間回転させた。
【１６９７】
１つの管に哺乳動物細胞用のプロテアーゼインヒビターカクテル（ＢｏｓｔｏｎＢｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ）を含むＲＩＰＡ緩衝液５００ｕｌに細胞ペレットを再懸濁させ、可溶化液を凍結させるか、そのまま引き続いてＢＣＡアッセイに供する。２つ目の管にＦＡＣＳ染色キット固定液（４％ホルムアルデヒド；Ｒ　ａｎｄ　ＤＳｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）２５０ｕｌを加え、次いで、室温で１０分間インキュベートする。細胞をＰＢＳ　５００ｕｌで２回洗浄し、上記の通りに回転させた。細胞ペレットを５００　ＰＢＳに再懸濁させ、４℃で保管した。
【１６９８】
既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。
【１６９９】
泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。
【１７００】
転写後、膜を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。標的タンパク質に対する一次抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。二次抗体［［どちらの抗体？？］］を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、一次抗体［［どちらの抗体？？］］と結合する。二次抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。一次抗体および二次抗体はＡｂｃａｍ社（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）、Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ社（Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ、ＣＯ）、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）またはＲ　ａｎｄ　Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＤ）から購入した。
【１７０１】
インキュベーション時間終了時、膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。膜を指示通りにＰｉｅｒｃｅ　ＷｅｓｔＰｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）５ｍｌ中で発光させた。
【１７０２】
図４３Ａおよび４３Ｂの四角で囲まれた部分に示される通り、ウエスタンブロットにより、各化学反応について評価した２つの試料にそれぞれ予測サイズ５３ｋｄ前後のタンパ

ク質が検出された。

【１７０３】

実施例１５４．タフテリン１タンパク質の検出：ウエスタンブロット

ヒト胎児腎上皮細胞（ＨＥＫ２９３）を９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｂｉｏ－ｏｎｅ ＧｍｂＨ、Ｆｒｉｃｋｅｎｈａｕｓｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）に播き、ＨＥＫ２９３細胞用のプレートは１型コラーゲンでプレコートしたものであった。ＨＥＫ２９３を細胞培養培地（ＤＭＥＭ、１０％ＦＣＳ、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１ｍＭ ピルビン酸ナトリウムおよび１×非必須アミノ酸（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ ＡＧ、Ｂｅｒｌｉｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）ならびに１．２ｍｇ／ｍｌ重炭酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｍｕｎｉｃｈ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加）１００ｕｌ中３５，０００個の密度で播いた。

【１７０４】

トランスフェクトした細胞を２０ｕｌ／ウェルの試料緩衝液（２０％グリセロール、４％ＳＤＳ、１００ｍＭトリス－ＨＣｌ ｐＨ６．８、０．２％ブロモフェノールブルー、５％β－メルカプトエタノール）で溶解した。上清を４体積の氷冷アセトンで沈殿させ、試料緩衝液に溶かした。試料を９５℃で５分間加熱し、１０％アクリルアミドを含有するＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルで泳動させた。

【１７０５】

タンパク質をセミドライブロッティングによりニトロセルロース膜に転写した。５％脱脂粉乳を含有するＴＢＳで膜をブロッキングし、次いで、１：５００希釈のＴＵＦＴ１ウサギポリクローナル抗体（Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、カタログ番号ＮＢＰ１－８７４４６）とともにインキュベートした。ロバ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート二次抗体（Ｓｔ．Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）およびＳｕｐｅｒ Ｓｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ検出試薬（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いてシグナルを検出した。図４４に示される通り、ウエスタンブロットにより、２ｕｇ（レーン２）および２００ｎｇ（レーン３）の試料にタンパク質が検出された。図４４では、レーン１はマーカーである。

【１７０６】

実施例１５５．ガラクトキナーゼ１タンパク質の検出：ウエスタンブロット

ＣＤ１マウス（Ｈａｒｌａｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓｏｕｔｈ Ｅａｓｔｏｎ、ＭＡ）に５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたリポプレックス化ガラクトキナーゼ１（ＧＡＬＫ１）ｍＲＮＡ（配列番号２１４７０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）を静脈投与した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）２ｕｌと複合体を形成したｍＲＮＡ ２ｕｇを滅菌ＤＭＥＭ基本培地（ｗ／ｏ添加剤、ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）１００ｕｌに溶かしたものをマウスに投与した。

【１７０７】

６時間後、マウスを屠殺し、血清および脾臓を採取した。脾臓を６ウェルプレートに移し、ＰＢＳ １ｍｌの存在下、氷上に保持した。１つの脾臓を解剖用メスで数回切り、細胞遊離によってＰＢＳが濁るまでゴム製セルスクレーパーで脾細胞を絞り出した。

【１７０８】

線維性成分を残して１２ウェル細胞培養プレートの上にある１００ｕｍのセルストレーナー（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）に細胞を移した。重力によりセルストレーナーに細胞を通過させ、下にある１２ウェル培養皿に回収した。重力によりセルストレーナーに細胞を通過させ、下にある１２ウェル培養皿に回収した。ＰＢ

Ｓ　１ｍｌを浮遊している脾細胞とともにエッペンドルフ管に移し、２０００ｒｐｍで５分間回転させた。ＰＢＳを捨て、細胞ペレットと新たなＰＢＳ　５００ｕｌとを合わせた。２０００ｒｐｍで５分間、短時間ボルテックスすることにより、脾細胞を再懸濁させた。ＰＢＳを捨て、細胞ペレットにＢＤ　Ｐｈａｒｍｌｙｓｅ　１ｍｌを加えた。短時間のボルテックスにより脾細胞を再懸濁させた。細胞を室温で３分間インキュベートした後、２００ｒｐｍで５分間回転させた。細胞をＰＢＳ　５００ｕｌで２回洗浄し、上記の通りに回転させた。細胞をＰＢＳ　５００ｕｌに再懸濁させ、記載される通りに回転させた。

【１７０９】

脾細胞２５０ｕｌを１×Ｐｈａｒｍｌｙｓｅ緩衝液と合せ、短時間ボルテックスするか、ピペットで再懸濁させた後、２０００ｒｐｍで２分間回転させた。

【１７１０】

１つの管に哺乳動物細胞用のプロテアーゼインヒビターカクテル（ＢｏｓｔｏｎＢｉｏ ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ）を含むＲＩＰＡ緩衝液５００ｕｌに細胞ペレットを再懸濁させ、可溶化液を凍結させるか、そのまま引き続いてＢＣＡアッセイに供する。２つ目の管にＦＡＣＳ染色キット固定液（４％ホルムアルデヒド；Ｒ　ａｎｄ　Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）２５０ｕｌを加え、次いで、室温で１０分間インキュベートする。細胞をＰＢＳ　５００ｕｌで２回洗浄し、上記の通りに回転させた。細胞ペレットを５００　ＰＢＳに再懸濁させ、４℃で保管した。

【１７１１】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１７１２】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１７１３】

転写後、膜を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＧＡＬＫ１タンパク質に対するＧＡＬＫ１ウサギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ヤギ抗ウサギＨＲＰコンジュゲート（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ＭＡ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＧＡＬＫ１ウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。一次抗体および二次抗体はＡｂｃａｍ社（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）、Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ社（Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ、ＣＯ）、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）またはＲ　ａｎｄ　Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＤ）から購入した。

【１７１４】
インキュベーション時間終了時、膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。膜を指示通りにＰｉｅｒｃｅ　ＷｅｓｔＰｉｃｏ　Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｓｕｂｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）５ｍｌ中で発光させた。
【１７１５】
図４５Ａおよび４５Ｂの四角で囲まれた部分に示される通り、ウエスタンブロットにより、各化学反応について評価した２つの試料にそれぞれ予測サイズ３０ｋｄおよび４２ｋｄ前後のタンパク質が検出された。
【１７１６】
実施例１５６．デフェンシン、β１０３Ａタンパク質の検出：ウエスタンブロット
トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたデフェンシング（ｄｅｆｅｎｓｉｎｇ）、β１０３Ａ（ＤＥＦＢ１０３Ａ）ｍＲＮＡ（配列番号１６３１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）１２５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。このほか、未処置細胞の対照を評価した。
【１７１７】
１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。
【１７１８】
３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。
【１７１９】
Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されている

もの）に溶かした。

【１７２０】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１７２１】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１７２２】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。ＤＥＦＢ１０３Ａタンパク質に対するＤＥＦＢ１０３Ａウサギポリクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ＭＡ）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。ロバ抗ウサギＮＬ５５７コンジュゲート（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、ＤＥＦＢ１０３Ａウサギポリクローナル抗体と結合する。コンジュゲートした抗体を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図４６の四角で囲まれた部分に示される通り、ウエスタンブロットにより、評価した各化学反応でタンパク質が検出された。

【１７２３】

実施例１５７．ペプチドの素性の確認

ペプチドの素性を確認するため、液体クロマトグラフィー質量分析と質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）を連動させて用いる定量的ＬＣ多重反応モニタリング（ＭＲＭ）によりタンパク質を評価することができる。

【１７２４】

液体クロマトグラフィー質量分析と質量分析（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）を連動させて用いる定量的ＬＣ多重反応モニタリング（ＭＲＭ）法（Ｂｉｏｇｎｏｓｙｓ　ＡＧ、Ｓｃｈｌｉｅｒｅｎ　Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により、本明細書に記載される任意のタンパク質標的の素性を評価することができる。細胞溶解物中のペプチドの素性を確認するため、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを用いる定量的ＬＣ－ＭＲＭアッセイ（Ｂｉｏｇｎｏｓｙｓ、Ｓｃｈｌｉｅｒｅｎ　Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により、修飾ｍＲＮＡから発現したタンパク質を含有するＨｅＬａ細胞溶解物を評価する。当該技術分野で知られているおよび／または記載されている方法を用いて、同定されたペプチドフラグメントとアイソフォームを含めた既知のタンパク質とを比較する。

【１７２５】

Ａ．試料の調製

５ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）とともに３７℃で１時

間インキュベートすることにより、溶解緩衝液中の各試料中のタンパク質を還元する。暗所、室温下で３０分間、１０ｍＭヨードアセトアミドを用いてアルキル化を実施する。トリプシン（シークエンスグレード、ＰｒｏｍｅｇａＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）をプロテアーゼとタンパク質の比１：５０で用いて、タンパク質をペプチドに消化する。消化は３７℃で一晩実施する（総消化時間を１２時間とする）。製造業者の指示書に従いＣ１８スピンカラム（Ｔｈｅ Ｎｅｓｔ Ｇｒｏｕｐ、Ｓｏｕｔｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＭＡ）を用いて質量分析を実施するためにペプチドをクリーンアップする。ペプチドを完全に乾燥させ、ＬＣ溶媒Ａ（１％アセトニトリル、０．１％ギ酸（ＦＡ））に再懸濁させる。溶媒はすべてＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ（登録商標）社（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）のＨＰＬＣグレードのものとし、化学製品はすべて、特に明記されない限りＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ（登録商標）社（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から購入する。

【１７２６】

Ｂ．ＬＣ－ＭＳ／ＭＳおよびＬＣ－ＭＲＭ

いずれの質量分析でもＰｒｏｘｅｏｎ Ｅａｓｙ ｎＬＣナノ液体クロマトグラフィーシステムの充填Ｃ１８カラム（Ｍａｇｉｃ ＡＱ、粒子径３ｕｍ、細孔径２００Å、Ｍｉｃｈｒｏｍ Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒｃｅｓ、Ｉｎｃ（Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）；カラム長１１ｃｍ、内径７５ｕｍ、Ｎｅｗ Ｏｂｊｅｃｔｉｖｅ（Ｗｏｂｕｒｎ、ＭＡ））にペプチドを注入する。ＬＣ溶媒をＡ：０．１％ＦＡを含有する１％アセトニトリル水溶液；Ｂ：０．１％ＦＡを含有する３％水アセトニトリル溶液とする。ショットガン分析のＬＣ勾配は、５～３５％の溶媒Ｂで１２０分間、次いで３５～１００％の溶媒Ｂで２分間、１００％の溶媒Ｂで８分間（勾配時間は計１３０分）とする。標準的なナノエレクトロスプレー源を備えたＴｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）Ｑ Ｅｘａｃｔｉｖｅ質量分析計でペプチド発見のためのＬＣ－ＭＳ／ＭＳショットガン分析を実施する。ＬＣ－ＭＲＭのＬＣ勾配は、５～３５％の溶媒Ｂで３０分間、次いで３５～１００％の溶媒Ｂで２分間、１００％の溶媒Ｂで８分間（勾配時間は計４０分）とする。Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）ＴＳＱ Ｖａｎｔａｇｅ三連四重極型質量分析計は標準的なナノエレクトロスプレー源を備えたものである。再校正の非スケジュール化ＭＲＭモードでは、それを１遷移当たり２０ｍｓの滞留時間で作動させる。試料間のペプチドの相対定量では、ＴＳＱ Ｖａｎｔａｇｅを取得ウィンドウ長４分のスケジュール化ＭＲＭモードで作動させる。ＬＣ溶離液を１．９ｋＶでエレクトロスプレーし、Ｑ１ピーク幅０．７Ｄａを用いてＭＲＭ分析を実施する。業者の仕様書に従って直線回帰により、ＴＳＱ Ｖａｎｔａｇｅの衝突エネルギーを計算する。

【１７２７】

Ｃ．アッセイデザイン、データ処理および解析

ＬＣ－ＭＲＭアッセイの作成には、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析で得られる最も強い１２のフラグメントイオンを非スケジュール化ＬＣ－ＭＲＭモードで測定し、ｍＰｒｏｐｈｅｔ（Ｒｅｉｔｅｒら，ｍＰｒｏｐｈｅｔ：Ａｕｔｏｍａｔｅｄ ｄａｔａ ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ａｎｄ ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ ｖａｌｉｄａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｌａｒｇｅ－ｓｃａｌｅ ＳＲＭ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０１１（８），４３０－４３５；その内容が参照により本明細書に組み込まれる）のスコアリング部分、ＭＱＵＥＳＴ（登録商標）（Ｃｌｕｅｔｅｃ、Ｋａｒｌｓｒｕｈｅ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いてデータを処理した。手動でアッセイの有効性を検証し、正確なフラグメント強度を決定し、ｉＲＴ（インデックス化された保持時間）をＢｉｏｇｎｏｓｙｓ社のｉＲＴ－ペプチド（Ｅｓｃｈｅｒら，Ｕｓｉｎｇ ｉＲＴ，ａ ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ ｔｉｍｅ ｆｏｒ ｍｏｒｅ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ，２０１２（１２），１１１１－１１２１；その内容が参照により本明細書に組み込まれる）に対して割り当てる。

【１７２８】

試料シリーズ間のペプチドの相対定量では、各アッセイのうち最も強い８つの遷移を測定する。ＳｐｅｃｔｒｏＤｉｖｅ（商標）（Ｂｉｏｇｎｏｓｙｓ、Ｓｃｈｌｉｅｒｅｎ Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いてデータ解析を実施する。選択されたペプチドについてピーク総面積を比較し、偽発見率０．０５を適用する。Ｑ値が０．０５未満のペプチドは除外し、各試料中に検出されなかったものと見なす。

【１７２９】

実施例１５８．化学修飾を含む修飾ｍＲＮＡ由来のペプチドの素性の確認

低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ（ＯＴＣ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）、野生型アポリポタンパク質Ａ－Ｉ（ＡＰＯＡ１ｗｔ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４５３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）、ヘプシジン（ＨＥＰＣ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４７１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾）、ヘモクロマトーシス２型（ＨＦＥ２）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４７２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾）またはフマリルアセト酢酸加水分解酵素（ＦＡＨ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４７３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾）から生成したタンパク質を含有する細胞溶解物を、実施例１５７に記載される通りにＬＣ－ＭＳ／ＭＳを用いて定量的ＬＣ－ＭＲＭで評価した。評価したタンパク質で同定されたペプチドフラグメントを表２００に示す。いずれのペプチドも親タンパク質に特異的であり、ＬＤＬＲおよびＨＦＥ２は親タンパク質とそのアイソフォームに特異的であった。表２００では、「Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ」は、ペプチドフラグメント配列をデータベース内の全閲覧タンパク質に対してｂｌａｓｔ検索したときのＵｎｉＰｒｏｔのタンパク質識別子を指す。細胞溶解物中のタンパク質の評価に用いたハウスキーピングタンパク質を表２０１に示す。

【１７３０】

表２００．タンパク質およびペプチドフラグメントの配列

【表０２００－１】

タンパク質	ペプチドフラグメントの配列	ペプチドフラグメントの配列番号	Uniprot ID
APOA1	LLDNWDSVTSTFSK	21474	P02647
APOA1	WQEEMELYR	21475	P02647
APOA1	LHELQEK	21476	P02647
APOA1	VQPYLDDFQK	21477	P02647
FAH	ASSVVVSGTPIR	21478	P16930
FAH	GEGMSQAATICK	21479	P16930
FAH	HLFTGPVLSK	21480	P16930
FAH	IGVAIGDQILDLSIIK	21481	P16930
FAH	LGEPIPISK	21482	P16930
FAH	VFLQNLLSVSQAR	21483	P16930
FAH	WEYVPLGPFLGK	21484	P16930
FAH	AHEHIFGMVLMNDWSAR	21485	P16930
FAH	GTKPIDLGNGQTR	21486	P16930
FAH	HQDVFNQPTLNSFMGLGQAAWK	21487	P16930
FAH	QHATNVGIMFR	21488	P16930
HEPC	ASWMPMFQR	21489	P81172
HEPC	DTHFPICIFCCGCCHR	21490	P81172
LDLR	MICSTQLDR	21491	P01130, P01130-4, P01130-3, P01130-2
LDLR	LAHPFSLAVFEDK	21492	P01130, P01130-4, P01130-3, P01130-2
LDLR	NVVALDTEVASNR	21493	P01130, P01130-4, P01130-3, P01130-2
LDLR	TCSQDEFR	21494	P01130, P01130-4
OTC	FGMHLQAATPK	21495	P00480
OTC	KPEEVDDEVFYSPR	21496	P00480
OTC	LAEQYAK	21497	P00480
OTC	LQAFQGYQVTMK	21498	P00480
OTC	SLGMIFEK	21499	P00480
OTC	VAASDWTFLHCLPR	21500	P00480
OTC	GEYLPLLQGK	21501	P00480
OTC	GLTLSWIGDGNNILHSIMMSAAK	21502	P00480
OTC	LLLTNDPLEAAHGGNVLITDTWISMGQEEEK	21503	P00480
OTC	LSTETGFALLGGHPCGLTTQDIHLGVNESLT	21504	P00480
OTC	YMLWLSADLK	21505	P00480
HFE2	CNAEYVSSTLSLR	21506	Q6ZVN8

【表０２００－２】

HFE2	GGGVGSGGLCR	21507	Q6ZVN8
HFE2	GPALPGAGSGLPAPDPCDYEGR	21508	Q6ZVN8, Q6ZVN8-2
HFE2	AFLPDLEK	21509	Q6ZVN8, Q6ZVN8-2, Q6ZVN8-3
HFE2	LHGRPPGFLHCASFGDPHVR	21510	Q6ZVN8, Q6ZVN8-2
HFE2	NMQECIDQK	21511	Q6ZVN8, Q6ZVN8-2

【１７３１】
表２０１．ハウスキーピングタンパク質

【表０２０１】

タンパク質	ペプチドフラグメントの配列	ペプチドフラグメントの配列番号	Uniprot ID
β－アクチン（ＡＣＴＢ）	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	21512	P60709
グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｇ３Ｐ）	VVDLMAHMASK	21513	P04406
熱ショックタンパク質ＨＳＰ９０－β（ＨＳ９０Ｂ）	HLEINPDHPIVETLR	21514	P08238
熱ショックタンパク質ＨＳＰ９０－β（ＨＳ９０Ｂ）	YIDQEELNK	21515	P08238
Ｌ－乳酸デヒドロゲナーゼＡ鎖（ＬＤＨＡ）	DQLIYNLLK	21516	P00338
Ｌ－乳酸デヒドロゲナーゼＡ鎖（ＬＤＨＡ）	GEMMDLQHGSLFLR	21517	P00338
ホスホグリセリン酸キナーゼ１（ＰＧＫ１）	ALESPERPFLAILGGAK	21518	P00558
ホスホグリセリン酸キナーゼ１（ＰＧＫ１）	LGDVYVNDAFGTAHR	21519	P00558
６０S酸性リボソームタンパク質Ｐ０（ＲＬＡ０）	IIQLLDDYPK	21520	P05388

【１７３２】

実施例１５９．化学的に修飾されたｍＲＮＡ由来のペプチド素性の確認

５－メチルシトシンおよびメチルプソイドウリジンで完全に修飾された細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４（ＣＴＬＡ４）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ（α－１抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１（セルピナ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１（ＳＭＰＤ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２４で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、４－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（ＨＰＤ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、骨形成タンパク質－７（ＢＭＰ７）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、レシチン－コレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１

４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、アポトーシス誘導因子ショートアイソフォーム１（ＡＩＦｓｈ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、腫瘍タンパク質５３（ＴＰ５３またはＰ５３）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６７０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、アルギニノコハク酸合成酵素（ＡＳＳ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５２９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ＫＩＴリガンド／幹細胞因子（ＫＩＴＬＧ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ニューレグリン１、β２ａアイソフォーム（ＮＲＧ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３１で示されるｃＤＮＡ配列；配列中に示されるｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）で用いられるＴ７プロモーター、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲ）、血管作動性腸ペプチド（ＶＩＰ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、アリールスルファターゼＢ（ＡＲＳＢ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６１８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、６－ピロボイルテトラヒドロプテリン（６－ｐｙｒｏｖｏｙｌｔｅｔｒａｈｙｄｒｏｐｔｅｒｉｎ）合成酵素（ＰＴＳ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６０９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン含有タンパク質５（ＦＮＤＣ５またはイリシン）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３３で示されるｃＤＮＡ配列；配列中に示されるｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）で用いられるＴ７プロモーター、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲ）、アメロゲニン（ＡＭＥＬＹ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６１３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、アルドラーゼＡ（ＡＬＤＯＡ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３４で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、神経成長因子（ＮＧＦ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、グリコーゲン合成酵素２（ＧＹＳ２）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ＧＴＰシクロヒドロラーゼ１（ＧＣＨ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６４９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、肝細胞成長因子（ＨＧＦ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、エクトジスプラシンＡ（ＥＤＡ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６３６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、アルギナーゼ（ＡＲＧ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、血清アミロイドＰ（ＡＰＣＳ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５３９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ホスホリラーゼキナーゼ、γ２（ＰＨＫＧ２）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５４０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、６８５エオキシリボヌクレアーゼ（ｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ）Ｉ（ＤＮＡＳＥ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６３２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、エクセナチド修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５４１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャ

ップ１）、グリコゲニン１（ＰＹＧＬ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１５４２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、α－ガラクトシダーゼ（ＧＬＡ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６４０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、α－Ｌ－イズロニダーゼ（ＩＤＵＡ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたガラクトキナーゼ１（ＧＡＬＫ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４７０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣおよびｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）から生成したタンパク質を含有する細胞溶解物を、実施例１５７に記載される通りにＬＣ－ＭＳ／ＭＳを用いて定量的ＬＣ－ＭＲＭで評価した。評価したタンパク質で同定されたペプチドフラグメントを表２０２に示す。

【１７３３】

表２０２．タンパク質およびペプチドフラグメントの配列

【表０２０２－１】

	ペプチドフラグメントの配列番号	５ｍＣおよびｐＵ	５ｍＣおよび１ｍｐＵ	s2Uおよび5mC	pU	1mpU
CTLA4						
AMDTGLYICK	21543	有り	－	有り	－	有り
GIASFVCEYASPGK	21544	－	－	有り	－	－
セルピナ1						
ITPNLAEFAFSLYR	21545	－	有り	－	有り	有り
LSITGTYDLK	21546	－	有り	－	－	－
SMPD1						
IGGFYALSPYPGLR	21547	－	有り	－	有り	有り
HPRT1						
DLNHVCVISETGK	21548	有り	有り	有り	有り	有り
EMGGHHIVALCVLK	21549	有り	－	－	有り	有り
HPD						
AFEEEQNLR	21550	有り	有り	有り	有り	有り
EMGDHLVK	21551	－	有り	－	－	有り
EVVSHVIK	21552	－	有り	有り	－	有り
BMP7						
ATEVHFR	21553	有り	有り	－	有り	有り
ESDLFLLDSR	21554	－	－	－	－	有り
IPEGEAVTAAEFR	21555	有り	有り	有り	有り	有り
LCAT						
LDKPDVVNWMCYR	21556	－	有り	－	－	有り
LEPGQQEEYYR	21557	－	有り	－	有り	有り
SSGLVSNAPGVQIR	21558	－	有り	有り	有り	有り
AIFsh						
DGEQHEDLNEVAK	21559	－	－	－	－	有り
TGGLEIDSDFGGFR	21560	有り	－	－	有り	有り
P53						
ELNEALELK	21561	－	－	－	－	有り
SVTCTYSPALNK	21562	－	－	－	有り	有り
TCPVQLWVDSTPPPGTR	21563	－	－	－	－	有り
ASS1						
APNTPDILEIEPK	21564	有り	有り	－	－	有り
FAELVYTGFWHSPECEFVR	21565	有り	有り	－	有り	有り
FELSCYSLAPQIK	21566	有り	有り	有り	有り	有り
KITLG						
AVENIQINEEDNEISMLQEK	21567	有り	有り	－	有り	有り
LFTPEEFFR	21568	有り	有り	－	有り	有り
LVANLPK	21569	有り	有り	－	－	－

【表０２０２－２】

NRG1						
ASLADSGEYMCK	21570	有り	有り	有り	－	有り
VIP						
HADGVFTSDFSK	21571	有り	有り	有り	有り	有り
HSDAVFTDNYTR	21572	有り	有り	有り	有り	有り
ARSB						
ELIHISDWLPTLVK	21573	－	有り	有り	有り	有り
GVGFVASPLLK	21574	－	有り	有り	有り	－
HSVPVYFPAQDPR	21575	－	有り	有り	有り	有り
PTS						
FLSDEENLK	21576	有り	有り	有り	有り	有り
VYETDNNIVVYK	21577	有り	有り	－	有り	有り
YMEEAIMQPLDHK	21578	有り	有り	－	有り	有り
FNDC5						
SASETSTPEHQGGGLLR	21579	－	有り	－	有り	有り
AMELY						
IALVLTPLK	21580	有り	－	－	有り	有り
ALDOA						
ALANSLACQGK	21581	有り	有り	有り	有り	有り
ALQASALK	21582	有り	有り	有り	有り	有り
GILAADESTGSIAK	21583	有り	有り	有り	有り	有り
NGF						
LQHSLDTALR	21584	－	有り	－	－	有り
GYS2						
TQVEQCEPVNDAVR	21585	－	－	－	－	有り
GCH1						
AASAMQFFTK	21586	有り	有り	有り	有り	有り
IVEIYSR	21587	有り	有り	有り	有り	有り
VHIGYLPNK	21588	有り	有り	有り	有り	有り
HGF						
GEEGGPWCFTSNPEVR	21589	有り	有り	－	有り	有り
HIFWEPDASK	21590	－	－	－	－	有り
NPDGSESPWCFTTDPNIR	21591	－	有り	－	－	有り
EDA						
NDLSGGVLNDWSR	21592	－	－	有り	有り	有り
ARG1						
GGVEEGPTVLR	21593	有り	有り	有り	有り	有り
TIGIIGAPFSK	21594	有り	有り	有り	有り	有り
YFSMTEVDR	21595	有り	有り	有り	有り	有り
APCS						
IVLGQEQDSYGGK	21596	有り	有り	－	有り	有り

【表０２０２－３】

QGYFVEAQPK	21597	有り	有り	－	－	有り
VGEYSLYIGR	2158	有り	有り	－	有り	有り
PHKG2						
IMEVTAER	21599	有り	有り	有り	有り	有り
LLQVDPEAR	21600	－	有り	－	有り	有り
LSPEQLEEVR	21601	有り	有り	有り	有り	有り
DNASE1						
IAAFNIQTFGETK	21602	有り	有り	有り	有り	有り
IVVAGMLLR	21603	有り	－	－	有り	有り
YDIALVQEVR	21604	有り	有り	有り	有り	有り
エクセナチド						
LFIEWLK	21605	有り	有り	有り	－	有り
PYGL						
APNDFNLR	21606	有り	有り	有り	有り	有り
DYYFALAHTVR	21607	有り	有り	有り	有り	有り
VLYPNDNFFEGK	21608	有り	有り	有り	有り	有り
GLA						
FDGCYCDSLENLADGYK	21609	有り	有り	有り	有り	有り
NFADIDDSWK	21610	有り	有り	有り	有り	有り
SILDWTSFNQER	21611	有り	有り	有り	有り	有り
IDUA						
LDYISLHR	21612	有り	有り	有り	有り	有り
SPLSWGLLR	21613	有り	有り	有り	有り	有り
THWLLELVTTR	21614	有り	有り	有り	有り	有り
GALK1						
GHALLIDCR	21615	有り	有り	有り	有り	有り
LAVLITNSNVR	21616	有り	有り	有り	有り	有り
LQFPLPTAQR	21617	有り	有り	有り	有り	有り

【１７３４】

実施例１６０．ペプチドの素性の確認および組み換えタンパク質との比較

液体クロマトグラフィー（ＬＣ）－質量分析（ＭＳ）分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳトリプシンペプチドマッピング／シークエンシング分析および二次元蛍光ディファレンシャルゲル電気泳動（２－Ｄ　ＤＩＧＥ）を実施し、２－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ（ＯＴＣ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）または５－メチルシトシンおよびシュードウリジン又は１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されたＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１（ＵＧＴ１Ａ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６４で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１でトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞に

おける各転写産物の発現を確認した。以下の材料を用いた：ＨＰＬＣグレードの水（ＥＭＤ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｉｎｃ．、Ｇｉｂｂｓｔｏｗｎ、ＮＪ）；ギ酸（９０％）（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ、Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ、ＮＪ）；ヨードアセトアミド（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）；メタノール（ＥＭＤ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｉｎｃ．、Ｇｉｂｂｓｔｏｗｎ、ＮＪ）；トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液（ＴＣＥＰ）、０．５Ｍ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）；トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝物質（トリス緩衝液）、ｐＨ８．０（Ｆｌｕｋａ－Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）；無水塩化カルシウムＡＣＳ試薬（$CaCl_2$）（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）；ＯＴＣ参照タンパク質［精製組み換え完全長ヒトＯＴＣタンパク質（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）］；ＵＧＴ１Ａ１参照タンパク質［精製組み換えヒトＵＧＴ１Ａ１タンパク質（ＯｒｉＧｅｎｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）。

【１７３５】

ＯＴＣをコードするｍＲＮＡおよびＵＧＴ１Ａ１をコードするｍＲＮＡでＨｅｌａ細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を溶解し、遠心分離して細胞ペレットを形成した。ビシンコニン酸アッセイ（ＢＣＡアッセイ）により各試料の総タンパク質濃度を決定した。トランスフェクトしていないＨｅＬａ細胞の細胞ペレットが総タンパク質濃度１７０７μｇ／ｍＬであったのに対して、ＯＴＣでトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞およびＵＧＴ１Ａ１でトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞の細胞ペレットは、総タンパク質濃度がそれぞれ３９４７μｇ／ｍＬおよび２６０９μｇ／ｍＬであった。

【１７３６】

トリプシンペプチドマッピング／シークエンシングでは、組み換えタンパク質および細胞ペレットをトリプシンで消化した。組み換えＯＴＣおよびＵＧＴ１Ａ１を３ｍＭ塩化カルシウムを含有する１００ｍＭトリス緩衝液で調製した。タンパク質（それぞれ５μｇ）を２ｍＭ ＴＣＥＰで還元した後、１００℃で５分間変性させた。試料を室温に冷却した後、２ｍＭヨードアセトアミドでアルキル化した。アルキル化した試料を０．５ｍＭ ＴＣＥＰでさらに還元した。試料を水浴中、３７℃で一晩、トリプシンで処理した。消化した試料を水浴から取り出し、２％ギ酸水溶液で反応を停止させた。３ｍＭ塩化カルシウムを含有する１００ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ８．０）で細胞ペレットを調製した。再構成した細胞ペレットおよび上清試料（それぞれ５０μｇ）を２ｍＭ ＴＣＥＰで還元した後、１００℃で５分間変性させた。試料を室温に冷却した後、１００ｍＭヨードアセトアミドでアルキル化した。アルキル化した試料を０．５ｍＭ ＴＣＥＰでさらに還元した。試料を水浴中、３７℃で一晩、トリプシンで処理した。消化した試料を水浴から取り出し、２％ギ酸水溶液で反応を停止させた。

【１７３７】

組み換えタンパク質のトリプシンペプチド、細胞ペレットおよび上清試料を１５０×２．１ｍｍのＸｂｒｉｄｇｅ ＢＥＨ３００ Ｃ１８カラムに注入した。カラムヒーターを３５℃に設定した。移動相Ａを０．１％ギ酸水溶液とした。移動相Ｂをギ酸０．１％を含有する９０／１０のアセトニトリル／水（ｖ／ｖ）とした。ＡＢＳｃｉｅｘ ＡＰＩ ＱＳＴＡＲ ＥＬＩＴＥ四極子飛行時間型質量分析計（ＡＢ Ｓｃｉｅｘ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）で消化産物の質量スペクトルを取得した。飛行時間型（ＴＯＦ）ＭＳおよびＭＳ／ＭＳモードでポジティブエレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）を用いてデータを取得した。Ｔｕｒｂｏ ＩｏｎＳｐｒａｙインターフェースを５００℃に設定し、ターボスプレー５．０ｋＶ、デクラスタリング電位３５Ｖを維持した。４０および３５（任意の単位）に設定した噴霧器およびイオンスプレーガス（窒素）によりイオン化を補助した。データを取得し、Ａｎａｌｙｓｔ ＱＳ ２．０ソフトウェア（ＡＢ Ｓｃｉｅｘ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を用いて処理した。

【１７３８】

ＢｉｏＡｎａｌｙｓｔソフトウェア（ＡＢ Ｓｃｉｅｘ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、Ｃ

Ａ）を用いて、ＬＣ－ＭＳデータをＯＴＣおよびＵＧＴ１Ａ１タンパク質の予測／理論的トリプシン消化産物と比較した。消化細胞ペレットおよび上清のペプチドマッチングの参照ペプチドとして組み換えタンパク質の消化産物を用いた。このほか、ＬＣ－ＭＳおよびＬＣ－ＭＳ／ＭＳのデータをマッピングし、ＨｅＬａ細胞由来タンパク質の特異的トリプシン消化産物に対して配列決定した。ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる産物イオンスペクトルに基づいてトリプシンペプチのペプチド配列を確認した。

【１７３９】

ＯＴＣ　ｍＲＮＡでトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞の細胞ペレット中にはＯＴＣタンパク質が存在していた。ペプチドマッピングにより、細胞ペレットのトリプシン消化産物中に１６種類のＯＴＣペプチドが同定された。細胞由来ペプチドの産物イオンスペクトルは組み換えタンパク質とよく一致していた。ヒトタンパク質のデータベース検索により、１３種類の未修飾ペプチドの配列がヒトＯＴＣにのみ特異的であることが示された。ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡでトランスフェクトしたＨｅＬａ細胞によってＵＧＴ１Ａ１タンパク質が発現された。正確な質量数決定および組み換えＵＧＴ１Ａ１タンパク質との保持時間一致に基づいて、細胞ペレットのトリプシン消化産物中に７種類のＵＧＴ１Ａ１ペプチドが同定された。マッチしたペプチドの素性をＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより確認した。ヒトタンパク質の検索に基づいて、観察された７種類のトリプシンペプチドのうち４種類がヒトＵＧＴ１Ａタンパク質に特異的であり、観察された７種類のトリプシンペプチドのうち１種類がＵＧＴ１Ａ１にのみ特異的であった。表２０３にＵＧＴ１Ａ１修飾ｍＲＮＡのＨｅＬａ細胞溶解物から同定されたペプチドを示し、表２０４にＯＴＣ修飾ｍＲＮＡから同定されたペプチドを示す。

【１７４０】

表２０３．ＵＧＴ１Ａ１ペプチドフラグメント

【表０２０３】

ペプチドフラグメント配列	配列番号
AMAIADALGKIPQTVLWR	21618
WLPQNDLLGHPMTR	21619
IPQTVLWR	21620
TYPVPFQR	21621
AMAIADALGK	21622
ENIMR	21623
SDFVK	21624

【１７４１】

表２０４．ＯＴＣペプチドフラグメント

【表０２０４】

ペプチドフラグメント配列	配列番号
QKGEYLPLLQGK	21625
VLSSMADAVLAR	21626
FGMHLQAATPK	21627
SLVFPEAENR	21628
GEYLPLLQGK	21629
GYEPDASVTK	21630
ILLNNAAFR	21631
QSDLDTLAK	21632
NFTGEEIK	21633
SLGMIFEK	21634
GRDLLTLK	21635
LAEQYAK	21636
DLLTLK	21637

【１７４２】

細胞ペレット試料のタンパク質プロファイルを二次元蛍光ディファレンシャルゲル電気泳動によってさらに特徴付けた。被検試料を異なる蛍光色素で処理した。第一の次元に等電点電気泳動（ＩＥＦ）、第二の次元にドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を用いて試料の含有物を分離した。ＯＴＣ細胞ペレットとＵＧＴ１Ａ１細胞ペレットのタンパク質プロファイルを比較した。データ解析にはＤｅＣｙｄｅｒ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェア（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ、ＵＫ）を用いた。解析の結果によりＨｅＬａ細胞中のＯＴＣおよびＵＧＴ１Ａ１の存在を確認した。

【１７４３】

実施例１６１．化学修飾を含む修飾ｍＲＮＡ由来のペプチドの素性の確認

５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたカテリシジン抗菌性ペプチド（ＣＡＭＰ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６２１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ＣＡＰ１８修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６３９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、卵胞刺激ホルモン、βポリペプチド（ＦＳＨＢ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６４０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、インターフェロン、α２（ＩＦＮＡ２）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５４で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、インターフェロン、β１、線維芽細胞（ＩＦＮＢ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、メチルマロニルＣｏＡムターゼ、ミトコンドリア（ＭＵＴＡ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ガレクチン３（ＬＥＧ３）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６４１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、トランスフォーミング成長因子β－３（ＴＧＦＢ３）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６４２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）またはタフテリン（ＴＵＦＴ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６６９で示されるｍＲＮＡ配

列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣおよびｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）から生成したタンパク質を含有する細胞溶解物を、実施例１５７に記載される通りにＬＣ－ＭＳ／ＭＳを用いて定量的ＬＣ－ＭＲＭで評価した。評価したタンパク質で同定されたペプチドフラグメントを表２０５に示す。表２０５では、「Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ」は、ペプチドフラグメント配列をデータベース内の全閲覧タンパク質に対してｂｌａｓｔ検索したときのＵｎｉＰｒｏｔデータベースのタンパク質識別子を指す。

【１７４４】

表２０５．タンパク質およびペプチドフラグメントの配列

【表０２０５】

	ペプチドフラグメントの配列番号	5mC およびpU	5mC および1mpU	s2U および5mC	pU	1mpU	Uniprot ID
CAMP							
CMGTVTLNQAR	21643	−	有り	有り	有り	有り	P49913
FALLGDFFR	21644	−	有り	有り	有り	有り	P49913
TTQQSPEDCDFK	21645	有り	有り	有り	有り	有り	P49913
CAP18							
CVGTVILNQAR	21646	有り	有り	有り	有り	有り	NA
SSDANLYR	21647	有り	有り	有り	有り	有り	P49913
CNTF							
LQENLQAYR	21648	有り	有り	有り	有り	有り	P26441
TFHVLLAR	21649	有り	有り	有り	有り	有り	P26441
VLQELSQWTVR	21650	有り	有り	有り	有り	有り	P26441
FSHB							
CDSDSTDCTVR	21651	有り	有り	有り	有り	有り	P01225
ELVYETVR	21652	−	−	有り	−	有り	P01225
VPGCAHHADSLYTYP VATQCHCGK	21653	有り	有り	有り	有り	有り	P01225
IFNA2							
SFSLSTNLQESLR	21654	−	有り	−	有り	有り	P01563
TLMLLAQMR	21655	−	有り	−	有り	有り	P01563
YSPCAWEVVR	21656	−	−	−	−	有り	P01563
IFNB1							
LLWQLNGR	21657	−	有り	−	有り	有り	P01574
LMSSLHLK	21658	−	−	−	有り	有り	P01574
LEG3							
GNDVAFHFNPR	21659	有り	有り	有り	有り	有り	P17931
IQVLVEPDHFK	21660	有り	有り	有り	有り	有り	P17931
MLITILGTVKPNANR	21661	有り	有り	有り	有り	有り	P17931
MUTA							
LINEIEEMGGMAK	21662	有り	有り	有り	有り	有り	P22033
NTQIIIQEESGIPK	21663	有り	有り	有り	有り	有り	P22033
TGLQAGLTIDEFAPR	21664	有り	有り	有り	有り	有り	P22033
TGFB3							
ALDTNYCFR	21665	有り	有り	有り	有り	有り	P10600
GYYANFCSGPCPYLR	21666	有り	有り	−	有り	有り	P10600
VEQLSNMVVK	21667	有り	有り	有り	有り	有り	P10600
TUFT1							
EAEQSNVALQR	21668	有り	有り	有り	有り	有り	Q9NNX1
IAYLEAENLEMHDR	21669	−	有り	有り	有り	有り	Q9NNX1
SEVQYIQEAR	21670	有り	有り	有り	有り	有り	Q9NNX1

【１７４５】

実施例１６２．細胞培養における低密度リポタンパク質受容体発現の検出

Ａ．ＨｅＬａ細胞のトランスフェクション
２４ウェルディッシュ（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｔｅｗｋｓｂｕｒｙ、ＭＡ）（７．５×１０^{4}細胞／ウェル）の１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）および１×ｇｌｕｔａｍａｘ試薬（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）を添加したイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）にＨｅＬａ細胞を播き、標準的な細胞培養条件下で一晩培養した。第一の管で５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾された低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４３９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）またはルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４４６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）２５０ｎｇとＯｐｔｉ－ＭＥＭ試薬（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）５０μｌとを組み合わせ、第二の管でＬ２０００トランスフェクション試薬（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）１μｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ ５０μｌとを組み合わせることによって、処置の対象となる各ウェルに対してトランスフェクション溶液を調製した。調製後、第一および第二の管を室温で５分間インキュベートした後、それぞれの内容物を組み合わせた。組み合わせたトランスフェクション溶液を室温で１５分間インキュベートした。次いで、トランスフェクション溶液１００μｌを各ウェルに加えた。細胞をさらに１６時間培養した後、分析を進めた。

【１７４６】

Ｂ．フローサイトメトリーによるＬＤＬＲの検出
トランスフェクション後、培地を細胞から除去し、各ウェルに０．２５％トリプシン（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）６０μｌを加えた。細胞をトリプシンで２分間処理した後、２４０μｌ／ウェルのトリプシン阻害剤（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）を加えた。得られた細胞溶液を９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｔｅｗｋｓｂｕｒｙ、ＭＡ）に移し、遠心分離（８００×重力で５分間）により細胞をペレット化し、上清を捨てた。細胞ペレットをＰＢＳで洗浄し、Ｆｏｘｐ３固定／透過処理液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に４５分間再懸濁させた。細胞を遠心分離（８００×重力で５分間）により再びペレット化し、透過処理緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に１０分間再懸濁させた。細胞を遠心分離（８００×重力で５分間）により再びペレット化し、透過処理緩衝液で洗浄した。次いで、細胞をＬＤＬＲに対する一次抗体、次いでフィコエリトリン標識二次抗体で処理した。次いで、標識細胞をＦＡＣＳ緩衝液（１％ウシ血清アルブミンおよび０．１％アジ化ナトリウムを含有するＰＢＳ）と組み合わせ、クラスター管に移した。図４７に示される通り、次いでＢＤ Ａｃｃｕｒｉ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）を用いたフローサイトメトリーにより標識細胞を分析した。

【１７４７】

Ｃ．免疫蛍光法によるＬＤＬＲの検出
トランスフェクト細胞をＰＢＳで洗浄し、室温で２０分間、固定液（４％ホルムアルデヒドを含有するＰＢＳ）で処理した。次いで、細胞をＰＢＳで洗浄し、透過処理／ブロッキング液（５％ウシ血清アルブミンおよび０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するトリス緩衝生理食塩水）で処理した。細胞を室温で２時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした後、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳで３回洗浄した。次いで、細胞を室温で２時間、一次抗体（ヤギ抗ＬＤＬＲ、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏ

ｌｉｓ、ＭＮ）で処理するか、同一次抗体なしで処理するか、通常のＩｇＧ対照で処理し、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳで３回洗浄し、蛍光標識した１：２００希釈のロバ抗ヤギＩｇＧ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を含有する二次抗体溶液で処理した。０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳで細胞を再び洗浄し、蛍光顕微鏡イメージングにより観察した。ルシフェラーゼまたはｍＣｈｅｒｒｙを一過性に発現する細胞を蛍光免疫染色せずに蛍光顕微鏡法により観察した。

【１７４８】

実施例１６３．免疫蛍光法によるデフェンシン、β１０３Ａの検出

Ａ．ＨｅＬａ細胞のトランスフェクション

２４ウェルディッシュ（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｔｅｗｋｓｂｕｒｙ、ＭＡ）（７．５×１０^{4}細胞／ウェル）の１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）および１×ｇｌｕｔａｍａｘ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）を添加したイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）にＨｅＬａ細胞を播き、標準的な細胞培養条件下で一晩培養した。第一の管でデフェンシン、β１０３Ａ（ＤＥＦＢ１０３Ａ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６３１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）またはｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４３９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇとＯｐｔｉ－ＭＥＭ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）５０ｕｌとを組み合わせ、第二の管でＬ２０００トランスフェクション試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）１ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ　５０ｕｌとを組み合わせることによって、処置の対象となる各ウェルに対してトランスフェクション溶液を調製した。調製後、第一および第二の管を室温で５分間インキュベートした後、それぞれの内容物を組み合わせた。組み合わせたトランスフェクション溶液を室温で１５分間インキュベートした。次いで、トランスフェクション溶液１００ｕｌを各ウェルに加えた。細胞をさらに１６時間培養した後、分析を進めた。

【１７４９】

Ｂ．免疫蛍光法によるＤＥＦＢ１０３Ａの検出

トランスフェクト細胞をＰＢＳで洗浄し、室温で２０分間、固定液（４％ホルムアルデヒドを含有するＰＢＳ）で処理した。次いで、細胞をＰＢＳで洗浄し、透過処理／ブロッキング液（５％ウシ血清アルブミンおよび０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するトリス緩衝生理食塩水）で処理した。細胞を室温で２時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした後、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳで３回洗浄した。次いで、細胞を室温で２時間、一次抗体で処理せずにおくか、抗ＤＥＦＢ１０３Ａ一次抗体（ウサギ抗ＤＥＦＢ１０３Ａ、Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）で処理するか、通常のＩｇＧ対照抗体で処理し、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳで３回洗浄し、赤色で蛍光標識した１：２００希釈のロバ抗ヤギＩｇＧ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を含有する二次抗体溶液で処理した。０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳで細胞を再び洗浄し、蛍光顕微鏡イメージングにより観察した。ｍＣｈｅｒｒｙをコードする修飾ｍＲＮＡでトランスフェクトした細胞を免疫蛍光染色を実施せずに可視化した。

【１７５０】

実施例１６４．タンパク質発現の確認

タンパク質の発現および発現したタンパク質の長さを確認するため、表２０５に記載されるタンパク質をコードする５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾された修飾ｍＲＮＡ（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ｍ

ＲＮＡ（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）を蛍光および／またはウエスタンブロットにより分析した。修飾ｍＲＮＡ（配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）またはｃＤＮＡ（配列中に示されるｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）に用いられるＴ７プロモーター、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲ）の配列、評価した化学修飾および明らかになっている場合は長さ（塩基対数）を表２０５に記載する。

【１７５１】

表２０５．タンパク質および発現

【表０２０６－１】

タンパク質	修飾mRNAの配列番号	5mC/ pU	5mC /1mpU	s2U/5mC	pU	1mpU
ルシフェラーゼ	21446	有り	有り	有り	有り	有り
腫瘍タンパク質５３（ＰＵ３またはＴＰ５３）	1670	有り 1468 bp	有り 1468 bp	-	-	有り 1468 bp
フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）	1660	有り 1645 bp	有り 1645 bp	有り 1645 bp	-	有り 1645 bp
第ＶＩＩ因子（Ｆ７）	1623	有り 1687 bp	有り 1687 bp	有り 1687 bp	-	有り 1687 bp
デフェンシン、β１０３Ａ（ＤＥＦＢ１０３Ａ）	1631	有り 490 bp	有り 490 bp	有り 490 bp	有り 490 bp	有り 490 bp
６－ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素（ＰＴＳ）	1609	有り 724 bp	有り 724 bp	有り 724 bp	有り 724 bp	有り 724 bp
セルピナ１	21522	有り 1543 bp	有り 1543 bp	-	-	有り 1543 bp
スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム性（ＳＭＰＤ１）	21523	有り 2176 bp	有り 2176 bp	-	-	有り 2176 bp
ハーセプチン軽鎖	21452	有り 1042 bp	有り 1042 bp	有り 1042 bp	有り 1042 bp	有り 1042 bp
ハーセプチン重鎖	21451	有り 1753 bp	有り 1753 bp	有り 1753 bp	有り 1753 bp	有り 1753 bp
グリア細胞由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）	21671	有り 922 bp	有り 922 bp	有り 922 bp	-	有り 922 bp
ロドプシン（ＲＨＯ）	21672	有り 985 bp	有り 985 bp	-	-	有り 985 bp
組織プラスミノーゲン活性化因子（ＰＬＡＴ）	1661	有り 1975 bp	有り 1975 bp	有り 1975 bp	-	有り 1975 bp
アルギニノコハク酸合成酵素１（ＡＳＳ１）	21529	有り 1525 bp	有り 1525 bp	-	-	有り 1525 bp
ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチド	21464	有り 1888 bp	有り 1888 bp	-	-	有り 1888 bp

【表０２０６－２】

Ａ１（ＵＧＴ１Ａ１）						
サーチュイン６（ＳＩＲＴ６）	1665	有り 1354 bp	有り 1354 bp	有り 1354 bp	－	有り 1354 bp
トロンボポエチン（ＴＨＰＯ）	1667	有り 3088 bp	有り 3088 bp	有り 3088 bp	－	有り 3088 bp
ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ１（ＨＰＲＴ１）	21524	有り 943 bp	有り 943 bp	－	－	有り 943 bp
トロンボモジュリン（ＴＨＢＤ）	21673	有り 2014 bp	有り 2014 bp	－	－	有り 2014 bp
第ＸＩＩ因子（Ｆ１２）	21674	有り 2134 bp	有り 2134 bp	有り 2134 bp	－	有り 2134 bp
リラキシン２（ＲＬＮ２）	21675	有り 844 bp	有り 844 bp	有り 844 bp	有り 844 bp	有り 844 bp
血管作動性腸ペプチド（ＶＩＰ）	21532	有り 799 bp	有り 799 bp	有り 799 bp	有り 799 bp	有り 799 bp
レシチン－コレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）	21527	有り 1609 bp	有り 1609 bp	有り 1609 bp	－	有り 1609 bp
線維芽細胞成長因子２１	21676	有り 916 bp	有り 916 bp	有り 916 bp	－	有り 916 bp
ＯＭＯＭＹＣ	21677	有り 1623 bp	有り 1623 bp	－	－	有り 1623 bp
アポトーシス誘導因子アポトーシス促進性アイソフォーム（ＡＩＦｓｈ）	21528	有り 1089 bp	有り 1089 bp	－	－	有り 1089 bp
エリスロポエチン（ＥＰＯ）	1638	有り 868 bp	－	－	－	－
ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）	1648	有り 940 bp	有り 940 bp	有り 940 bp	有り 940 bp	有り 940 bp
グラクトシダーゼ（Ｇｌａｃｔｏｓｉｄａｓｅ）、α（ＧＬＡ）	1640	－	有り 1576 bp	有り 1576 bp	有り 1576 bp	－
アリールスルファターゼＢ	1618	－	有り 1888 bp	有り 1888 bp	有り 1888 bp	－

【表０２０６－３】

イズロニダーゼ、α－Ｌ－（ＩＤＵＡ）	1652	－	有り 2248 bp	有り 2248 bp	有り 2248 bp	－
インターフェロン、β１、線維芽細胞（ＩＦＮＢ）	1655	有り 850 bp	－	－	－	－
ＣＴＬＡ４－Ｉｇ	21521	－	有り 958 bp	有り 958 bp	有り 958 bp	－
インターフェロン、α２（ＩＦＮＡ２）	1654	有り 853 bp	－	－	－	－
第ＩＸ因子（Ｆ９）	1622	有り 1672 bp	有り 1672 bp	有り 1672 bp	－	有り 1672 bp
ＡＰＯＡ１　Ｍｉｌａｎｏ	21455	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp
第ＸＩ因子（Ｆ１１）	1625	有り 2164 bp	有り 2164 bp	有り 2164 bp	－	有り 2164 bp
ＣＡＰ１８	21638	有り 796 bp	－	－	－	－
アクアポリン５	1617	有り 1084 bp	有り 1084 bp	有り 1084 bp	有り 1084 bp	有り 1084 bp
ＡＰＯＡ１　Ｐａｒｉｓ	21454	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp
ＡＰＯＡ１	21453	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp	有り 1090 bp
卵胞刺激ホルモンβ（ＦＳＨβ）	21640	有り 673 bp	－	－	－	－
プロトロンビン	21462	有り 2155 bp	有り 2155 bp	有り 2155 bp	有り 2155 bp	有り 2155 bp
組織因子（第３因子）	21466	有り 1174 bp	有り 1174 bp	有り 1174 bp	有り 1174 bp	有り 1174 bp
ガラクトキナーゼ１（ＧＡＬＫ１）	21470	－	有り 1465 bp	－	有り 1465 bp	有り 1465 bp
４－ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（ＨＰＤ）	21525	－	－	有り 1468 bp	有り 1468 bp	有り 1468 bp
骨形成タンパク質－７（ＢＭＰ７）	21526	－	有り 1582 bp	有り 1582 bp	有り	－

【表０２０６－４】

					1582 bp	
ＫＩＴリガンド／幹細胞因子（ＫＩＴＬＧ）	21530	－	有り 1108 bp	有り 1108 bp	有り 1108 bp	－
インスリングルリジン	21469	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp
インスリンリスプロ	21468	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp
インスリンアスパルト	21467	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp
インスリングラルギン	21465	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp	有り 619 bp
ＬＬ－３７	1621	有り 796 bp	－	－	－	－
メチルマロニルＣｏＡムターゼ、ミトコンドリア（ＭＵＴＡ）	1658	有り 2539 bp	－	－	－	－
セルロプラスミン（ＣＰ）	1620	有り 3481 bp	－	－	－	－
タンパク質	cDNA配列番号	5mC/ pU	5mC /1mpU	s2U/5mC	pU	1mpU
イリシン	21532	有り 925 bp	有り 925 bp	有り 925 bp	－	有り 925 bp

【１７５２】

実施例１６５．血管内皮成長因子の発現および細胞生存能

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１００，０００個を収集し、２４ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾された血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）修飾ＲＮＡ（配列番号１６７２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、１－メチル

プソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（１ｍｐＵ）または修飾を含まない同ＲＮＡ（未修飾）６２ｎｇ、２５０ｎｇ、７５０ｎｇまたは１５００ｎｇをトランスフェクション補助剤としてのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）２ｕｌと混合し、二重反復で細胞に加えた。

【１７５３】

Ａ．血管内皮成長因子のタンパク質発現

２４時間のインキュベーション後、ＶＥＧＦを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をＶＥＧＦ－特異的ＥＬＩＳＡキット（Ｒ ＆ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）で製造業者の指示書に従い分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。このほか、未処置細胞、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾された緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６７２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）または修飾を含まない同ｍＲＮＡ（未修飾）６２ｎｇまたは７５０ｎｇにより二重反復で処置した細胞の対照およびｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４３９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇの対照を分析した。生成したＶＥＧＦの量（ｐｇ／ｍｌ）を表２０６および図４８に示す。図４８では、「ｅＧＦＰ」は緑色蛍光タンパク質修飾ｍＲＮＡを指し、「ＭＣ」はｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡを指し、「ＵＮＴ－１」は未処置細胞を指し、「Ｇ０」は修飾ｍＲＮＡが修飾を含まないことを意味し、「Ｇ１」は５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されていることを意味し、「Ｇ１」は５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されていることを意味し、「Ｇ５」は１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されていることを意味する。

【１７５４】

５－メチルシトシンおよび１－メチルプセデュオルイジン（ｍｅｔｈｙｌｐｓｅｕｄｏｕｒｉｄｉｎｅ）で完全に修飾されたＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡまたは１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡでトランスフェクトした細胞に最も高いＶＥＧＦ発現がみられた。

【１７５５】

表２０６．ＶＥＧＦタンパク質生成（ｐｇ／ｍｌ）

【表０２０７】

		5mC/pU	5mC/1mpU	1mpU	未修飾
VEGF	62 ng	220500	327409	325500	156545
	250 ng	322636	283500	168955	45818
	750 ng	1264773	2486591	3085091	107864
	1500 ng	2231727	3874500	3465955	238636
GFP	62 ng	NA	0	3818	955
	750 ng	NA	11455	1909	6682
未処置		4773			
mCherry		0			

【１７５６】

Ｂ．血管内皮成長因子

２４時間のインキュベーション後、培地を除去し、１ウェル当たり２００ｕｌのＣｅｌｌ Ｔｉｔｅｒ Ｇｌｏ（ＣＴＧ）アッセイ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉ

ｏｎ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）で細胞を溶解した。室温で１５分間インキュベートした後、各可溶化液１０ｕｌを２組ずつ白色不透明のポリスチレン製９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｔｅｗｋｓｂｕｒｙ、ＭＡ）に移した。細胞溶解物の各アリコートに再びＣｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｇｌｏアッセイ試薬１００ｕｌを加えた。総体積１１０ｕｌの試薬混合物をＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１プレートリーダーで一般的な発光プログラムを用いて分析した。未処置ＨｅＬａ細胞を参照として二重反復測定の平均値をグラフにプロットした（１．０＝生存能１００％）。このほか、二重反復の未処置細胞およびｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６７２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）２５０ｎｇで処置した細胞の対照を評価した。正規化したＡＴＰ量／細胞生存能を表２０７および図４９に示す。図４９では、「ＭＣ」はｍＣｈｅｒｒｙ修飾ｍＲＮＡを指し、「ＵＮＴ－１」および「ＵＮＴ－２」は未処置細胞を指し、「Ｇ０」は修飾ｍＲＮＡが修飾を含まないことを意味し、「Ｇ１」は５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されていることを意味し、「Ｇ１」は５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されていることを意味し、「Ｇ５」は１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾されていることを意味し、「＊」はデータ点が１つのみ得られたことを意味する。

【１７５７】

５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡまたは未修飾の同ｍＲＮＡでトランスフェクトした細胞に、細胞生存能喪失の指標となる発光活性の低下がみられた。５－メチルシオトシン（ｍｅｔｈｙｌｃｙｏｔｏｓｉｎｅ）および１－メチルプスエドウリジン（ｍｅｔｈｙｌｐｓｕｅｄｏｕｒｉｄｉｎｅ）で完全に修飾されたＶＥＧＦ修飾ｍＲＮＡまたは１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡでトランスフェクトした細胞には細胞生存能の低下がみられなかった。

【１７５８】

表２０７．正規化したＡＴＰ量／細胞生存能

【表０２０８】

	5mC/pU	5mC/1mpU	1mpU	未修飾
62 ng	1.12	1.19	1.20	1.59
250 ng	0.80	1.11	1.14	0.86
750 ng	0.64	1.01	1.04	0.38
1500 ng	0.48	0.99	0.98	0.48
未処置	0.94			
mCherry	1.04			

【１７５９】

実施例１６６．ＨｅＬａ細胞上清におけるエリスロポエチンのタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１００，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたエリスロポエチン（ＥＰＯ）修飾ＲＮＡ（配列番号１６３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（１ｍｐＵ

）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００ ０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、ｌｉｐｏｆｅｃａｔｍｉｎｅ ２０００で処置した細胞（Ｌ２０００）および未処置細胞の対照を分析した。

【１７６０】

１８～２２時間のインキュベーション後、ＥＰＯを発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をＥＰＯ ＥＬＩＳＡキット（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ Ｃａｎａｄａ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。生成したタンパク質の量を表２０８に示す。

【１７６１】

表２０８．タンパク質生成

【表０２０９】

試料	EPO(pg/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	17,900
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	81,146
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	224,195
プソイドウリジン（ｐＵ）	226,283
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	522,375
Ｌ２０００	597
未処置	0

【１７６２】

実施例１６７．インスリンアスパルト修飾ｍＲＮＡのｉｎ ｖｉｔｒｏ発現

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００と複合体を形成させた５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたインスリンアスパルト修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）で表２０９に示される濃度にて細胞をトランスフェクトした。９６ウェル当たりのトランスフェクション混合物の総体積を５０ｕｌとし、それぞれ２つの２５ｕｌアリコートに分けた。一方の２５ｕｌアリコートには各ｍｍＲＮＡ １ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ ２４ｕｌとが含まれ、他方の２５ｕｌアリコートにはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００ ０．４ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ ２４．６ｕｌとが含まれていた。必要に応じて、修飾ｍＲＮＡとＯｐｔｉ－ＭＥＭとを含有するアリコートをＯｐｔｉ－ＭＥＭで連続希釈した。両アリコートを室温で１５分間、別々にインキュベートした。次いで、両アリコートを混合し、室温でさらに２０分間インキュベートした後、最後にトランスフェクション混合物計５０ｕｌを細胞

培養培地１００ｕｌとＨＥＫ２９３細胞３５０００個とを含む９６ウェルに移した。次いで、加湿した３７℃／５％CO_2細胞培養インキュベーター内で細胞を２４時間インキュベートした後、細胞培養上清を収集するか、細胞溶解物を調製した。タンパク質発現をＥＬＩＳＡにより検出し、タンパク質（ｐｇ／ｍｌ）を図５０および表２０９に示す。表２０９では、「＞」は上回ることを意味する。

【１７６３】

表２０９．タンパク質発現

【表０２１０】

トランスフェクトした量	2 ug	400 ng	80 ng	16 ng	3.2 ng	640 pg	128 pg	26 pg
タンパク質(mU/I)	>100	>100	>100	103.0	11.4	1.3	0	0

【１７６４】

実施例１６８．インスリングラルギン修飾ｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００と複合体を形成させた５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたインスリングラルギン修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）で表２１０に示される濃度にて細胞をトランスフェクトした。９６ウェル当たりのトランスフェクション混合物の総体積を５０ｕｌとし、それぞれ２つの２５ｕｌアリコートに分けた。一方の２５ｕｌアリコートには各ｍｍＲＮＡ　１ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ　２４ｕｌとが含まれ、他方の２５ｕｌアリコートにはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００　０．４ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ　２４．６ｕｌとが含まれていた。必要に応じて、修飾ｍＲＮＡとＯｐｔｉ－ＭＥＭとを含有するアリコートをＯｐｔｉ－ＭＥＭで連続希釈した。両アリコートを室温で１５分間、別々にインキュベートした。次いで、両アリコートを混合し、室温でさらに２０分間インキュベートした後、最後にトランスフェクション混合物計５０ｕｌを細胞培養培地１００ｕｌとＨＥＫ２９３細胞３５０００個とを含む９６ウェルに移した。次いで、加湿した３７℃／５％CO_2細胞培養インキュベーター内で細胞を２４時間インキュベートした後、細胞培養上清を収集するか、細胞溶解物を調製した。タンパク質発現をＥＬＩＳＡにより検出し、タンパク質（ｐｇ／ｍｌ）を図５１および表２１０に示す。

【１７６５】

表２１０．タンパク質発現

【表０２１１】

トランスフェクトした量	2 ug	400 ng	80 ng	16 ng	3.2 ng	640 pg	128 pg	26 pg
タンパク質(mU/I)	16.7	21.8	16.4	4.7	0	0	0	0

【１７６６】

実施例１６９．インスリングルリジン修飾ｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００と複合体を形成させた５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたインスリングルリジン修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ，Ｃａｐ）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）で表２１１に示される濃度にて細胞をトランスフェクトした。９６ウェル当たりのトランスフェクション混合物の総体積を５０ｕｌとし、それぞれ2つの２５ｕｌアリコートに分けた。一方の２５ｕｌアリコートには各ｍｍＲＮＡ　１ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ　２４ｕｌとが含まれ、他方の２５ｕｌアリコートにはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００　０．４ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ　２４．６ｕｌとが含まれていた。必要に応じて、修飾ｍＲＮＡとＯｐｔｉ－ＭＥＭとを含有するアリコートをＯｐｔｉ－ＭＥＭで連続希釈した。両アリコートを室温で１５分間、別々にインキュベートした。次いで、両アリコートを混合し、室温でさらに２０分間インキュベートした後、最後にトランスフェクション混合物計５０ｕｌを細胞培養培地１００ｕｌとＨＥＫ２９３細胞３５０００個とを含む９６ウェルに移した。次いで、加湿した３７℃／５％CO_2細胞培養インキュベーター内で細胞を２４時間インキュベートした後、細胞培養上清を収集するか、細胞溶解物を調製した。タンパク質発現をＥＬＩＳＡにより検出し、タンパク質（ｐｇ／ｍｌ）を図５２および表２１１に示す。表２１１では、「＞」は上回ることを意味する。

【１７６７】

表２１１．タンパク質発現

【表０２１２】

トランスフェクトした量	2 ug	400 ng	80 ng	16 ng	3.2 ng	640 pg	128 pg	26 pg
タンパク質(mU/I)	>100	>100	>100	95.9	13.1	0	0	0

【１７６８】

実施例１７０．用量反応ならびに注射部位選択および注射のタイミング

用量反応傾向、注射部位の影響および注射のタイミングの影響を明らかにするため、実施例３５で概説したプロトコルに従って試験を実施する。この試験では、１ｕｇ、５ｕｇ、１０ｕｇ、２５ｕｇ、５０ｕｇおよびその間の値の様々な量を用いて用量反応の結果を明らかにする。合計用量１００ｕｇの分割投与には１．６ｕｇ、４．２ｕｇ、８．３ｕｇ、１６．６ｕｇまたは値が3用量もしくは6用量含まれ、合計用量は選択される合計用量の投与量に等しい。

【１７６９】

四肢または注射に適した領域が十分に得られる任意の体表から注射部位を選択する。これには真皮（真皮内）、表皮（表皮）、皮下組織（ＳＣ）または筋肉（ＩＭ）を標的とする注射深度の選択も含まれ得る。注射角度は標的とする送達部位によって異なり、真皮内の部位を標的とする注射では皮膚表面に対して１０～１５度、皮下注射では皮膚表面に対して２０～４５度、実質的な筋肉内注射では６０～９０度の角度となる。

【１７７０】

実施例１７１．ＨｅＬａ細胞上清におけるトランスフォーミング成長因子β１のタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇ

ｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１００，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたトランスフォーミング成長因子β１（ＴＧＦＢ１）修飾ＲＮＡ（配列番号１６６８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（１ｍｐＵ）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、ｌｉｐｏｆｅｃａｔｍｉｎｅ　２０００で処置した細胞（Ｌ２０００）および未処置細胞の対照を分析した。

【１７７１】

１８～２２時間のインキュベーション後、ＴＧＦＢ１を発現している細胞の細胞培養上清を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、清澄化した上清をＴＧＦＢ１　ＥＬＩＳＡキット（Ｒ　＆　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。生成したタンパク質の量を表２１２に示す。

【１７７２】

表２１２．タンパク質生成

【表０２１３】

試料	TGFB1(pg/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	704
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	1800
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	57
プソイドウリジン（ｐＵ）	743
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	2279
Ｌ２０００	4
未処置	0

【１７７３】

実施例１７２．ＨｅＬａ細胞上清におけるトランスフォーミング成長因子β１のタンパク質生成

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１００，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞

を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたトランスフォーミング成長因子β１（ＴＧＦＢ１）修飾ＲＮＡ（配列番号１６６８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ＲＮＡ（１ｍｐＵ）２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００ ０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか、ｌｉｐｏｆｅｃａｔｍｉｎｅ ２０００で処置した細胞（Ｌ２０００）および未処置細胞の対照を分析した。

【１７７４】

１８～２２時間のインキュベーション後、ＴＧＦＢ１を発現している細胞の細胞培養可溶化液を回収し、１０．０００ｒｃｆで２分間遠心分離した。次いで、細胞溶解物（７ｕｇ／ＥＬＩＳＡ）をＴＧＦＢ１ ＥＬＩＳＡキット（Ｒ ＆ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）で製造業者の指示書に従って分析した。決定値がＥＬＩＳＡ標準曲線の直線範囲内に収まるまで全試料を希釈した。生成したタンパク質の量を表２１３に示す。

【１７７５】

表２１３．タンパク質生成

【表０２１４】

試料	TGFB1(pg/ml)
５－メチルシトシンおよびプソイドウリジン（５ｍＣおよびｐＵ）	6214
５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジン（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）	9257
２－チオウリジンで修飾された２５％のウリジンおよび５－メチルシトシンで修飾された２５％のシトシン（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）	5929
プソイドウリジン（ｐＵ）	5157
１－メチルプソイドウリジン（１ｍｐＵ）	10857
Ｌ２０００	0
未処置	1043

【１７７６】

実施例１７３．修飾ｍＲＮＡ由来のペプチドの素性の確認

５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６７８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、活性依存性神経保護因子（ＡＤＮＰ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６７９で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、セプチン－４（ＡＲＴＳ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、骨形成タンパク質２（ＢＭＰ２）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポ

リーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、セルロプラスミン（ＣＰ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６２０で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、ＣＯＭＭドメイン含有タンパク質１（ＣＯＭＭＤ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、ｄｉａｂｌｏ、ＩＡＰ結合ミトコンドリアタンパク質（ＤＩＡＢＬＯまたはＳＭＡＣ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、凝固第ＸＩＩＩ因子α（Ｆ１３Ａ１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８４で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、ヘプシジン（ＨＥＰＣ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４７１で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、ＩｇＭ重鎖修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、インターロイキン－２１（ＩＬ２１）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）、Ｎ－アセチルグルタミン酸合成酵素（ＮＡＧＳ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）またはＥ３ユビキチン－タンパク質リガーゼ（ＸＩＡＰ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１６８８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリーＡテール；５’キャップ、キャップ１）（５ｍＣおよびｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣおよび１ｍｐＵ）、ウリジンの２５％が２－チオウリジンで修飾されシトシンの２５％が５－メチルシトシンで修飾されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕおよび５ｍＣ）、プソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）または１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）から生成したタンパク質を含有する細胞溶解物を、実施例１５７に記載される通りにＬＣ－ＭＳ／ＭＳを用いて定量的ＬＣ－ＭＲＭで評価した。評価したタンパク質で同定されたペプチドフラグメントを表２１４に示す。

【１７７７】

表２１４．タンパク質およびペプチドフラグメントの配列

【表０２１５－１】

	ペプチドフラグメントの配列番号	５ｍＣおよびｐＵ	５ｍＣおよび１ｍｐＵ	ｓ２Ｕおよび５ｍＣ	pU	1mpU
ACE2						
ISFNFFVTAPK	21689	－	有り	－	有り	有り
LWAWESWR	21690	－	有り	有り	有り	有り
SEPWTLALENVVGAK	21691	－	有り	有り	有り	有り
ADNP						
NVHSEDFENR	21692	－	－	－	－	有り
ARTS						
ESGTDFPIPAVPPGTDPETEK	21693	有り	有り	有り	有り	有り
FLEDTTDDGELSK	21694	有り	有り	有り	有り	有り
HAVDIEEK	21695	有り	有り	有り	有り	有り
BMP2						
NYQDMVVEGCGCR	21696	－	有り	有り	有り	有り
SFHHEESLEELPETSGK	21697	－	有り	有り	有り	有り
WESFDVTPAVMR	21698	有り	有り	有り	有り	有り
CP						
ALYLQYTDETFR	21699					
DIASGLIGPLIICK	21700					
GAYPLSIEPIGVR	21701					
COMMD1						
ESLMNQSR	21702	有り	有り	有り	有り	有り
HSAQIHTPVAIIELELGK	21703	－	－	有り	有り	有り
WNSGLR	21704	－	有り	有り	有り	有り
DIABLO						
AVYTLTSLYR	21705	有り	有り	有り	有り	有り
LAEAQIEELR	21706	有り	有り	有り	有り	有り
NHIQLVK	21707	有り	有り	有り	有り	有り
F13A1						
MYVAVWTPYGVLR	21708	有り	有り	有り	有り	有り
STVLTIPEIIIK	21709	－	有り	有り	有り	有り
VEYVIGR	21710	－	－	有り	有り	有り
HEPC						
DTHFPIBIFBBGBBHR	21711	有り	有り	有り	有り	有り
IgM 重鎖						
TSTSPIVK	21712	－	有り	－	有り	有り
WIYDTSK	21713	－	有り	有り	有り	有り
WKIDGSER	21714	有り	有り	有り	有り	有り
IL21						
IINVSIK	21715	有り	有り	－	有り	有り
LTBPSBDSYEK	21716	有り	有り	有り	有り	有り
QLIDIVDQLK	21717	有り	有り	有り	有り	有り

【表０２１５－２】

NAGS						
DLQTLFWR	21718	－	－	－	－	有り
DSYELVNHAK	21719	有り	有り	有り	有り	有り
HNAAAAVPFFGGGSVLR	21720	有り	有り	有り	有り	有り
XIAP						
AGFLYTGEGDTVR	21721	有り	有り	有り	有り	有り
DHFALDRPSETHADYLLR	21722	有り	－	－	有り	有り
IFTFGTWIYSVNK	21723	有り	有り	有り	有り	有り

【１７７８】

実施例１７４．タンパク質発現の確認

タンパク質の発現および発現したタンパク質の長さを確認するため、表２１５に記載されるタンパク質をコードする５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾された修飾ｍＲＮＡ（５ｍＣ／ｐＵ）、５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（５ｍＣ／１ｍｐＵ）、シトシンの２５％が５－メチルシトシンで置換されウリジンの２５％が２－チオウリジンで置換されて修飾された同ｍＲＮＡ（ｓ２Ｕ／５ｍＣ）、１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（１ｍｐＵ）またはプソイドウリジンで完全に修飾された同ｍＲＮＡ（ｐＵ）を蛍光および／またはウエスタンブロットにより評価した。修飾ｍＲＮＡ（配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）の配列、評価した化学修飾および明らかになっている場合は長さ（塩基対数）を表２１５に記載する。

【１７７９】
表２１５．タンパク質および発現
【表０２１６－１】

タンパク質	修飾ｍＲＮＡの配列番号	5mC/ pU	5mC /1mpU	s2U/5mC	pU	1mpU
グルカゴン（ＧＬＰ１）	21724	-	有り 451 bp	有り 451 bp	有り 451 bp	-
糖タンパク質ホルモン、αポリペプチド（ＦＳＨ－α）	21725	-	有り 634 bp	有り 634 bp	有り 634 bp	-
サーファクタントタンパク質Ｂ（ＳＦＴＰＢ）	21726	有り 1432 bp	-	-	-	-
抗腫瘍壊死因子α	21727	-	有り 1684 bp	有り 1684 bp	有り 1684 bp	-
ソルチリン１（ＳＯＲＴ１）	21728	有り 2782 bp	-	-	-	-
ＩｍＧ軽鎖	21729	有り 982 bp	-	-	-	-
サーチュイン１（ＳＩＲＴ１）	21730	有り 2530 bp	-	-	-	-
ガラクトサミン（Ｎ－アセチル）－６－硫酸スルファターゼ（ＧＡＬＮＳ）	21731	-	有り 1855 bp	有り 1855 bp	有り 1855 bp	有り 1855 bp
補体Ｈ因子（ＣＦＨ）	21732	有り 3982 bp	-	-	-	-
コロニー刺激因子２（顆粒球－マクロファージ）（ＧＭ－ＣＳＦ）	21733	有り 854 bp	-	-	-	-
クロトー（ＫＬ）	21734	有り 1933 bp	-	-	-	-
凝固第ＸＩＩＩ因子α（Ｆ１３Ａ１）	21684	有り 2485 bp	-	-	-	-
ホスホリラーゼキナーゼ、α２（ＰＨＫＡ２）	21735	有り 3994 bp	-	-	-	-
ホスホリラーゼキナーゼ、β	21736	有り 3568 bp	-	-	-	-
チロシナーゼ（ＴＹＲ）	21737	-	有り 1876 bp	-	有り 1876 bp	-
アンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）	21678	有り 2704 bp	-	-	-	-

【表０２１６－２】

ニューレグリン１	21738	－	有り 2209 bp	有り 2209 bp	有り 2209 bp	－
活性依存性神経保護因子（ＡＤＮＰ）	21679	有り 3595 bp	－	－	－	－
インターロイキン－２１（ＩＬ２１）	21686	有り 754 bp	－	－	－	－
ＣＯＭＭドメイン含有タンパク質１（ＣＯＭＭＤ１）	21682	有り 859 bp	－	－	－	－

【１７８０】

実施例１７５．カチオン性脂質ナノ粒子中で製剤化された１－メチルシュードウリジンまたは５－メチルシトシンおよび１－メチルシュードウリジン修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡの鼻腔内投与による肺送達

１－メチルシュードウリジンで完全に修飾されたか（Ｌｕｃ－Ｇ５－ＬＮＰ－ＫＣ２）、または１－メチルシュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾された（Ｌｕｃ－Ｇ２－ＬＮＰ－ＫＣ２）、ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、表２１６に記載されるようにカチオン性脂質ナノ粒子（ＬＮＰ－ＫＣ２）中で製剤化した。

表２１６．製剤

【表０２１７】

製剤	NPA-127-1	NPA-135-1
脂質	DLin-KC2-DMA	DLin-KC2-DMA
脂質/mRNA比(重量/重量)	20:1	20:1
平均粒径	114nm PDI:0.10	95nm PDI:0.11
pH7.4でのゼータ	-0.5mV	-1.0mV
カプセル封入(RiboGr)	77%	100%

【１７８１】

製剤を鼻腔内に（Ｉ．Ｎ．）０．３ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、８時間、４８、および７２時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を測定し、表２１７に示した。背景光束は、約６．３＋０５ｐ／ｓであった。Ｌｕｃ－Ｇ５－ＬＮＰ－ＫＣ２またはＬｕｃ－Ｇ５－ＬＮＰ－ＫＣ２対ビヒクルの撮像の結果を表２１７に示し、「ＮＴ」は、試験されなかったことを意味する。

表２１７．鼻腔内投薬後のルシフェラーゼ発現

【表０２１８】

経路	時点	Luc-G5-LNP-KC2	Luc-G2-LNP-KC2	ビヒクル(PBS)
		光束 (p/s)	光束 (p/s)	光束 (p/s)
I.N.	2時間	1.53E+06	5.81E+05	3.87E+05
I.N.	8時間	1.09E+07	9.35E+05	5.57E+05
I.N.	24時間	5.93E+06	5.33E+05	4.89E+05
I.N.	28時間	1.22E+06	7.63E+05	8.81E+05
I.N.	72時間	8.43E+05	NT	8.17E+05

【１７８２】

実施例１７６．Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００中でリポプレックス形成した１－メチルシュードウリジンまたは５－メチルシトシンおよび１－メチルシュードウリジン修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡの鼻腔内投与による肺送達

１－メチルシュードウリジンで完全に修飾されたか（Ｌｕｃ－Ｇ５－リポプレックス）、または１－メチルシュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾された（Ｌｕｃ－Ｇ２－リポプレックス）、ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、第１のステップが、Ｇ５またはＧ２修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡを３ｍｇ／ｍＬから１６．６μＬに１０８．５μＬのＤＭＥＭ中への希釈することであり、第２のステップが、１００μＬのＬＦ２０００を２５μＬのＤＭＥＭ中に希釈し、次いで両方を共に静かに混合して、合計２５０μＬのミキサーを作製することであった、２ステップにおいてリポプレックス形成し、それは注入の前に脂質－ｍＲＮＡ複合体を形成するように室温で５～１０分インキュベートされた。１－メチルシュードウリジンまたは１－メチルシュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾された両方のルシ

フェラーゼｍＲＮＡからのリポプレックスを、鼻腔内に（Ｉ．Ｎ．）０．５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

【１７８３】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、８時間、および２４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を測定し表２１８に示した。バックグラウンドシグナルは、約４．８＋０５ｐ／ｓであった。背景光束は、約６．３＋０５ｐ／ｓであった。Ｌｕｃ－Ｇ５－リポプレックスまたはＬｕｃ－Ｇ２－リポプレックス対ビヒクルの撮像の結果を表２１８に示す。

表２１８．鼻腔内投薬後のルシフェラーゼ発現

【表０２１９】

経路	時点	Luc-G5-リポプレックス	Luc-G2-リポプレックス	ビヒクル(PBS)
		光束（p/s）	光束（p/s）	光束（p/s）
I.N.	2時間	8.37E+05	9.58E+05	3.87E+05
I.N.	8時間	8.42E+05	7.11E+05	5.57E+05
I.N.	24時間	5.74E+05	5.53E+05	4.89E+05

【１７８４】

実施例１７７．ＰＢＳ中で製剤化された１－メチルシュードウリジンまたは５－メチルシトシンおよび１－メチルシュードウリジン修飾ルシフェラーゼｍＲＮＡの鼻腔内投与による肺送達

ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中で製剤化された、１－メチルシュードウリジンで完全に修飾されたか（Ｌｕｃ－Ｇ５－緩衝液（ＰＢＳ））、または１－メチルシュードウリジンおよび５－メチルシトシンで完全に修飾された（Ｌｕｃ－Ｇ２－緩衝液（ＰＢＳ））、ルシフェラーゼ修飾ｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ配列は配列番号２１４４６に示される；約１４０ヌクレオチドのポリＡ尾部は配列内に示されない；５’キャップ、キャップ１）を、鼻腔内に（Ｉ．Ｎ．）７．５ｍｇ／ｋｇの用量でＢａｌｂ－Ｃマウスに投与した。

【１７８５】

撮像の２０分前に、マウスにＤ－ルシフェリン溶液を１５０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注入した。次いで、動物に麻酔をかけ、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ撮像システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて画像を取得した。生物発光を、全マウスの全光束（光子／秒）として測定した。マウスを投薬の２時間、８時間、および２４時間後に撮像し、平均全光束（光子／秒）を測定し、表２１９に示した。。背景光束は、約４．８＋０５ｐ／ｓであった。背景光束は、約６．３＋０５ｐ／ｓであった。緩衝液中のＬｕｃ－Ｇ５対ビヒクルの撮像の結果を表２１９に示す。

表２１９．鼻腔内投薬後のルシフェラーゼ発現

【表０２２０】

経路	時点	緩衝液(PBS)中のLuc-G5	緩衝液(PBS)中のLuc-G2	ビヒクル(PBS)
		光束［p/s］	光束［p/s］	光束（p/s）
I.N.	2時間	4.50E+05	9.58E+05	3.87E+05
I.N.	8時間	7.12E+05	7.11E+05	5.57E+05
I.N.	24時間	4.47E+05	5.53E+05	4.89E+05

【１７８６】
実施例１７８．インターロイキン７のｉｎ　ｖｉｔｒｏトランスフェクション
２４マルチウェルプレートのヒトケラチノサイト細胞内にインターロイキン７（ＩＬ７）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）をリバーストランスフェクションによりトランスフェクトした。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　Ｓ７添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地でヒトケラチノサイト細胞を５０～７０％のコンフルエンスに達するまで増殖させた。細胞にＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体を形成させたＩＬ－７をコードする修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）０ｎｇ、４６．８７５ｎｇ、９３．７５ｎｇ、１８７．５ｎｇ、３７５ｎｇおよび７５０ｎｇをトランスフェクトした。最初にＲＮＡを室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに5倍体積希釈で１０分間インキュベートすることによりＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体を形成させた。第二のバイアルでは、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）試薬を室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに１０倍体積希釈で１０分間インキュベートした。次いで、ＲＮＡのバイアルとＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のバイアルとを混合し、室温で２０～３０分間インキュベートした後、細胞に滴加した。
【１７８７】
ＩＬ－７をコードする完全に至適化されたｍＲＮＡ（配列番号１６５６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）を５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾した。ＩＬ－７をコードするｍｍＲＮＡを細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの６時間後および１２時間後、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＥＬＩＳＡキットを用いて製造業者が推奨する指示に従い各濃度について培養培地中のＩＬ－７濃度（ｐｇ／ｍｌ）を測定した。図５３に示されるこれらのデータは、３７５ｎｇおよび７５０ｎｇの量において、ＩＬ－７をコードする修飾ｍＲＮＡがヒトケラチノサイト細胞内で翻訳可能であることを示している。
【１７８８】
実施例１７９．エリスロポエチンのｉｎ　ｖｉｔｒｏトランスフェクション
２４マルチウェルプレートのヒトケラチノサイト細胞内にエリスロポエチン（ＥＰＯ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）をリバーストランスフェクションによりトランスフェクトした。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　Ｓ７添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地でヒトケラチノサイト細胞を５０～７０％のコンフルエンスに達するまで増殖させた。細胞にＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体を形成させたＥＰＯをコードする修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）４６．８７５ｎｇ、９３．７５ｎｇ、１８７．５ｎｇ、３７５ｎｇおよび７５０ｎｇをトランスフェクトした。最初にＲＮＡを室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに5倍体積希釈で１０分間インキュベートすることによりＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体を形成させた。第二のバイアルでは、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）試薬を室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに１０倍体積希釈で１０分間インキュベートした。次いで、ＲＮＡのバイアルとＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のバイアルとを混合し、室温で２０～３０分間インキュベートした後、細胞に滴加した。
【１７８９】
ＥＰＯをコードする完全に至適化されたｍＲＮＡ（配列番号１６３８で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）を５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾した。ＥＰＯをコードするｍｍＲＮＡを細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの６時間後および１２時間後、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＥＬＩＳＡキ

ットを用いて製造業者が推奨する指示に従い各濃度について培養培地中のＥＰＯ濃度（ｐｇ／ｍｌ）を測定した。図５４に示されるこれらのデータは、ＥＰＯをコードする修飾ｍＲＮＡがヒトケラチノサイト細胞内で翻訳可能であることを示している。

【１７９０】

実施例１８０．リソソーム酸リパーゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％ＣＯ２雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたリソソーム酸リパーゼ（ＬＡＬ）ｍＲＮＡ（配列番号１６５７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）７５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１７９１】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１７９２】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１７９３】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１７９４】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌに

するＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１７９５】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１７９６】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。標的タンパク質に対する一次抗体（抗リソソーム酸リパーゼ抗体；Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ８９７７１）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。二次抗体（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｒｅｅｚｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、一次抗体と結合する。５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで二次抗体を１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図５５に示される通り、ＬＡＬのウエスタンブロット検出が４５．４ｋＤａ付近に見られた。図５５では、レーン１および２は修飾ｍＲＮＡを示し、レーン３および４は投与溶媒のみを示している。

【１７９７】

実施例１８１．グルコセレブロシダーゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％ＣＯ２雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたグルコセレブロシダーゼｍＲＮＡ（配列番号１６４５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）７５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１７９８】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１７９９】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１８００】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１８０１】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１８０２】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１８０３】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。標的タンパク質に対する一次抗体（抗ＧＢＡ抗体；Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ５５０８０およびＳｉｇｍａ、カタログ番号Ｇ４０４６）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。二次抗体（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｒｅｅｚｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、一次抗体と結合する。５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで二次抗体を１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図５６に示される通り、グルコセレブロシダーゼのウエスタンブロット検出が５９．７ｋＤａ付近に見られた。図５６では、レーン１および２は修飾ｍＲＮＡを示し、レーン３および４は投与溶媒のみを示している。

【１８０４】

実施例１８２．イズロン酸－２－スルファターゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット

トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（

ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％ＣＯ２雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたイズロン酸－２－スルファターゼｍＲＮＡ（配列番号１６５２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）７５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。

【１８０５】

１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ　１ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ　５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。

【１８０６】

３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カットオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１８０７】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１８０８】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１８０９】
泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。
【１８１０】
転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。標的タンパク質に対する一次抗体（抗イズロン酸２スルファターゼ抗体；Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ７００２５およびＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＡＦ２４４９）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。二次抗体（Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｒｅｅｚｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、二次抗体と結合する。５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで二次抗体を１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図５７に示される通り、イズロン酸－２－スルファターゼのウエスタンブロット検出が７６ｋＤａ付近に見られた。図５７では、レーン１および２は修飾ｍＲＮＡを示し、レーン３および４は投与溶媒のみを示している。
【１８１１】
実施例１８３．ルシフェラーゼタンパク質の検出：ウエスタンブロット
トランスフェクション前日、トリプシン－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）７５０，０００個を収集し、６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積３ｍｌのイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）（１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）および１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％ＣＯ２雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたルシフェラーゼｍＲＮＡ（配列番号２１４４６で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）７５０ｎｇを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、５．５ｕｌを最終体積２５０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（登録商標）（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液５００ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地３ｍｌに加えた。次いで、上に記載した通りにプレートをインキュベートした。
【１８１２】
１６～１８時間のインキュベーション後、培地を除去し、ＰＢＳ １ｍｌで細胞を洗浄した。ＰＢＳを完全に除去した後、新たなＰＢＳ ５００ｕｌを加えた。細胞をセルスクレーパーで擦り取って収集した。次いで、同じｍＲＮＡで処理し収集した細胞を１本の１．５ｍｌエッペンドルフ管に合わせて入れた。
【１８１３】
３，０００ｒｐｍ、２分間の遠心分離により細胞をペレット化した。ＰＢＳを除去し、穏やかなピペット操作により細胞を放射性免疫沈降法（ＲＩＰＡ）緩衝液（ＰＭＳＦと真核生物プロテアーゼ阻害剤の混合物を含有する）（以上、ＢｏｓｔｏｎＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ））２５０ｕｌに溶解した。１０，０００ｒｐｍ、４°Ｇ、１０分間の遠心分離により可溶化液を清澄化した。清澄化した可溶化液を分子量カッ

トオフ１０，０００ｋｄのＡｍｉｃｏｎフィルター（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）に移し、１２，０００ｒｐｍ、４°Ｇで２０分間回転させた。逆向きにしたフィルターを未使用の１．５ｍｌエッペンドルフ管に入れ、３，０００ｒｐｍで１分間回転させることにより、濃縮されたタンパク質可溶化液を回収した。可溶化液の最終体積は２５～４０ｕｌであった。

【１８１４】

Ｐｉｅｒｃｅ社のマイクロタイタープレート用ＢＣＡキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を用いてタンパク質濃度を決定した。滴定曲線の標準タンパク質を希釈緩衝液ではなくＲＩＰＡ緩衝液（細胞溶解物作製について記載されているもの）に溶かした。

【１８１５】

既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６ｕｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４ｕｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０ｕｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１８１６】

泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１８１７】

転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。標的タンパク質に対する一次抗体（抗ルシフェラーゼ、ＡｂＣａｍ、カタログ番号ａｂ２１１７６）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００～１：２０００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。膜を１×ＴＢＳ／０．１％Ｔｗｅｅｎで５分間、毎回穏やかに攪拌しながら３回洗浄した。二次抗体（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｒｅｅｚｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、一次抗体と結合する。５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳで二次抗体を１：１０００～１：５０００に希釈し、室温で３時間インキュベートした。図５８に示される通り、ルシフェラーゼのウエスタンブロット検出が６０．７ｋＤａ付近に見られた。図５８では、レーン１および２は修飾ｍＲＮＡを示し、レーン３および４は投与溶媒のみを示している。

【１８１８】

実施例１８４．ハーセプチンのｉｎ　ｖｉｖｏ試験

ハーセプチン重鎖（ＨＣ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４５１；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾）およびハーセプチン軽鎖（ＬＣ）修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４５２；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾）を表２２０に記載される通りにＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡおよびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡで製剤化した。

【１８１９】

表２２０．ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡおよびＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ製剤
【表０２２１】

製剤	NPA-159-1
ハーセプチンＨＣ：ＬＣ比（ｗｔ／ｗｔ）	2:1
脂質	DLin-KC2-DMA
脂質／総ｍＲＮＡ比（ｗｔ／ｗｔ）	20:1
平均粒子径	100 nm PDI:0.10
ｐＨ７．４でのゼータ電位	1.9mV
カプセル化率（ＲｉｂｏＧｒ）	100%

【１８２０】
表Ｘ１に記載されるハーセプチン製剤をマウス（ＣＤ１）に０．５ｍｇ／ｋｇの投与量で静脈内投与した。このほか、ルシフェラーゼｍＲＮＡの対照を評価した（図５９のＬｕｃ）。ハーセプチン投与後８時間、２４時間、４８時間、９６時間、１６８時間（７日）、３３６時間（１４日）、５０４時間（２１日）にマウスから採血し、ＥＬＩＳＡ（ＡＢＣＡＭ（登録商標）、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ＭＡによる全ヒトＩｇＧ検出キット）により血清中ＩｇＧ濃度を決定した。対照ルシフェラーゼを注射した個体については８時間の時点でのみ採血した。結果を表２２２および図５９に示す。
【１８２１】
表２２２．ハーセプチン製剤
【表０２２２】

ｍＲＮＡ	経路	注射量(ul)	修飾RNAの量(ug)	投与量(mg/kg)	投与後の採血(時間)	ヒトIgG(ng/ml)
ハーセプチン（ＬＣ＋ＨＣ）	静脈内	100	10	0.5	8	39.4
ハーセプチン（ＬＣ＋ＨＣ）	静脈内	100	10	0.5	24	56.1
ハーセプチン（ＬＣ＋ＨＣ）	静脈内	100	10	0.5	48	43.8
ハーセプチン（ＬＣ＋ＨＣ）	静脈内	100	10	0.5	96	56.7
ハーセプチン（ＬＣ＋ＨＣ）	静脈内	100	10	0.5	168	31.7
ハーセプチン（ＬＣ＋ＨＣ）	静脈内	100	10	0.5	336	17.6
ハーセプチン（ＬＣ＋ＨＣ）	静脈内	100	10	0.5	504	3
ルシフェラーゼ	静脈内	100	10	0.5	8	0.57

【１８２２】

実施例１８５．ハーセプチンのｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験

トランスフェクション前日、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）による処理によりＨｅＬａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２；Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）１５，０００個を収集し、９６ウェル細胞培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）の１ウェル当たり総体積１００ｕｌのＥＭＥＭ培地（１０％ＦＣＳおよび１×Ｇｌｕｔａｍａｘを添加）に播いた。細胞を５％CO_2雰囲気下、３７℃で一晩培養した。翌日、ハーセプチン重鎖（ＨＣ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４５１；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプスエドウリジン（ｍｅｔｈｙｌｐｓｕｅｄｏｕｒｉｄｉｎｅ）で完全に修飾）１５０ｎｇまたはハーセプチン軽鎖（ＬＣ）（配列番号２１４５２；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプスエドウリジン（ｍｅｔｈｙｌｐｓｕｅｄｏｕｒｉｄｉｎｅ）で完全に修飾された）７５ｎｇまたはハーセプチンＨＣ　５００ｎｇ／ハーセプチンＬＣ　２５０ｎｇを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で希釈した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）をトランスフェクション試薬として使用し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００　０．２ｕｌを最終体積１０ｕｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭで希釈した。室温で５分間インキュベートした後、両溶液を合わせ、室温でさらに１５分間インキュベートした。次いで、合わせた溶液２０ｕｌをＨｅＬａ細胞を含有する細胞培養培地１００ｕｌに加え、室温でインキュベートした。このほか対照として、組み換えヒトＩｇＧ（Ｈｕ　ＩｇＧ対照）、アッセイ緩衝液およびアッセイ緩衝液が存在する未処置ウェルの培養培地（アッセイ緩衝液＋対照培地）を分析した。

【１８２３】

１８～２２時間のインキュベーション後、ハーセプチン重鎖または軽鎖を発現している細胞の細胞培養上清を回収し、全ヒトＩｇＧ　ＥＬＩＳＡキット（ＡＢＣＡＭ（登録商標）、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ＭＡ）により製造業者の指示書に従って分析した。生成したＩｇＧの量を表２２３および図６０に示す。表Ｘ３では、「ＯＴＣ」はグラフに収まらない値であることを意味する。

【１８２４】

表２２３．ハーセプチン試験

【表０２２３】

試料	IgG(ng/ml)
組み換えヒトＩｇＧ	OTC
ハーセプチン重鎖	12
ハーセプチン軽鎖	0
ハーセプチン重鎖＋軽鎖	348
アッセイ緩衝液	9
アッセイ緩衝液＋対照培地	12

【１８２５】

実施例１８６．ハーセプチンのｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験：イムノブロッティングによるｉｎ　ｖｉｔｒｏの抗体生成の確認

ＨｅＬａ細胞を血清の非存在下、実施例１８５に記載される通りにハーセプチン重鎖および軽鎖ｍＲＮＡ（ハーセプチン重鎖（ＨＣ）ｍＲＮＡ（配列番号２１４５１；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよび１－メチルプスエドウリジン（ｍｅｔｈｙｌｐｓｕｅｄｏｕｒｉｄｉｎｅ）で完全に修飾）、ハーセプチン軽鎖（ＬＣ）（配列番号２１４５２；配列中に示されない約１４０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５

－メチルシトシンおよび１－メチルプスエドウリジン（ｍｅｔｈｙｌｐｓｕｅｄｏｕｒｉｄｉｎｅ）完全に修飾）またはハーセプチンＨＣ／ＬＣ（Ｈ＆Ｌ））を用いてｉｎ ｖｉｔｒｏでトランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後、上清を回収して濃縮し、還元剤の存在下（図６１のレーン１～５）および非存在下（図６１のレーン６～１０）、４～１２％ＭＯＰＳ ＮｕＰＡＧＥゲルの各レーンにタンパク質４ｕｇを負荷して電気泳動分離を実施した。次いで、タンパク質をＰＶＤＦ膜に転写し、抗体を用いた探索によりＩｇ重鎖とＩｇ軽鎖を同時に検出した。

【１８２６】

図６１に示される通り、軽鎖のみをトランスフェクトした細胞の上清を泳動したレーンでは、還元性条件下および非還元性条件下ともに軽鎖バンドが検出された。非還元性条件では、ほかにも５０ｋＤａ付近に比較的大きなバンドが検出された。これは軽鎖のみが分泌性であるという事実を十分に裏付けるものである。重鎖ｍＲＮＡのみをトランスフェクトした細胞の上清を含有するレーンには還元剤の有無に関係なくシグナルが見られず、重鎖のみでは分泌されないことを裏付けている。重鎖および軽鎖の両ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞の上清には還元剤の有無に関係なく２本のバンドが見られた。両条件とも軽鎖に特異的なバンドが見られた。これは、還元性条件下では変性Ｉｇ分子由来の軽鎖を表し、非還元性条件下では遊離軽鎖タンパク質表すものであった。還元性条件下では、軽鎖と会合した状態でのみ分泌された重鎖が５５ｋＤａの位置に見られたのに対して、非還元性条件下では、予想通り個々の重鎖のバンドは見られなかった。このレーンでは、１６０ｋＤａの全Ｉｇのバンドが明確に検出された。このことは、軽鎖および重鎖タンパク質をコードする化学的に修飾されたｍＲＮＡをＨｅＬａ細胞にトランスフェクトしたときに生成する両タンパク質の分子的素性を裏付けている。

【１８２７】

図６１では、「ＭＷＭ」は分子量マーカーを表し、「ＬＣ」はハーセプチン軽鎖を表し、「ＨＣ」はハーセプチン重鎖を表し、「培地」は培養培地のみを表している。

【１８２８】

実施例１８７．酵素活性アッセイ

Ａ．グルコセレブロシダーゼの酵素活性

ＨＥＫ２９３細胞にＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と複合体を形成したグルコセレブロシダーゼ修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６４５で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）０ｎｇ、６２５ｎｇ、１２５ｎｇ、２５０ｎｇ、５００ｎｇ、１０００ｎｇまたは２０００ｎｇをトランスフェクトした。トランスフェクションの６時間後、１２時間後、２４時間後および４８時間後に細胞をＰＢＳで洗浄した。次いで、０．５４％タウロデオキシコール酸ナトリウムおよび１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００を含有する１００ｍＭクエン酸塩－リン酸塩緩衝液（ｐＨ５．４）に細胞を溶解した。次いで、細胞溶解物を４－メチルウンベリフェリルβ－Ｄ－ガラクトピラノシド（４－ＭＵＧ）基質０．５ｍＭの存在下、３７℃で１時間インキュベートした。１時間後、等体積の２００ｍＭ水酸化ナトリウムで反応を停止させた。プレートリーダー（Ｅｘ＝３７０ｎｍ；Ｅｍ＝４６０ｎｍ）で４－ＭＵの変換を測定した。図６２は、ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と複合体を形成したｍＲＮＡ対照トランスフェクション（イズロン酸－２－スルファターゼ（配列番号１６５２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）に対して正規化した百分率で表した酵素活性を示している。

【１８２９】

Ｂ．リソソーム酸リパーゼの酵素活性

ＨＥＫ２９３細胞にＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と複合体を形成したリソソーム酸リパーゼ修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６５７で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－

メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）０ｎｇ、６２５ｎｇ、１２５ｎｇ、２５０ｎｇ、５００ｎｇ、１０００ｎｇまたは２０００ｎｇをトランスフェクトした。トランスフェクションの６時間後、１２時間後、２４時間後および４８時間後に細胞をＰＢＳで洗浄した。次いで、０．５４％タウロデオキシコール酸ナトリウムおよび１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含有する１００ｍＭクエン酸塩－リン酸塩緩衝液（ｐＨ５．４）に細胞を溶解した。次いで、細胞溶解物を４－メチルウンベリフェリルβ－Ｄ－ガラクトピラノシド（４－ＭＵＧ）基質０．５ｍＭの存在下、３７℃で１時間インキュベートした。１時間後、等体積の２００ｍＭ水酸化ナトリウムで反応を停止させた。プレートリーダー（Ｅｘ＝３７０ｎｍ；Ｅｍ＝４６０ｎｍ）で４－ＭＵの変換を測定した。図６３は、ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と複合体を形成したｍＲＮＡ対照トランスフェクション（イズロン酸－２－スルファターゼ（配列番号１６５２で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）に対して正規化した百分率で表した酵素活性を示している。

【１８３０】

実施例１８８．第ＶＩＩＩ因子のｉｎ　ｖｉｔｒｏトランスフェクション：タンパク質検出

２４マルチウェルプレートのＨｅｐＧ２細胞内に第ＶＩＩＩ因子修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６２３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）をリバーストランスフェクションによりトランスフェクトした。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　Ｓ７添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地でＨｅｐＧ２細胞を５０～７０％のコンフルエンスに達するまで増殖させた。細胞にＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体を形成させた第ＶＩＩＩ因子をコードする修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）０ｎｇ、２５０ｎｇ、５００ｎｇ、７５０ｎｇ、１０００ｎｇをトランスフェクトした。最初にＲＮＡを室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに5倍体積希釈で１０分間インキュベートすることにより、ＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体を形成させた。第二のバイアルでは、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）試薬を室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに１０倍体積希釈で１０分間インキュベートした。次いで、ＲＮＡのバイアルとＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のバイアルとを混合し、室温で２０～３０分間インキュベートした後、細胞に滴加した。

【１８３１】

ＨｅｐＧ２細胞にトランスフェクトした第ＶＩＩＩ因子をコードする完全に至適化されたｍＲＮＡ（配列番号１６２３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）は、翻訳時に天然ヌクレオシド三リン酸（ＮＴＰ）、各ウリジン部位のプソイドウリジンおよび各シトシン部位の５－メチルシトシン（プソイド－Ｕ／５ｍＣ）ならびに各ウリジン部位のＮ１－メチル－プソイドウリジンおよび各シトシン部位の５－メチルシトシン（Ｎ１－メチル－プソイド－Ｕ／５ｍＣ）などの修飾を含むものであった。細胞に第ＶＩＩＩ因子をコードするｍｍＲＮＡをトランスフェクトし、トランスフェクションの１８時間後、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＥＬＩＳＡキットを用いて製造業者が推奨する指示に従い各濃度について培養培地中に分泌された第ＶＩＩＩ因子の濃度（ｐｇ／ｍｌ）を測定した。表２２４および図６４に示されるこれらデータは、第ＶＩＩＩ因子をコードする修飾ｍＲＮＡがＨｅｐＧ２細胞内で翻訳可能であることを示している。

【１８３２】

表２２４．第ＶＩＩＩ因子の投与およびタンパク質の分泌

【表０２２４】

天然ＮＴＰを含む第ＶＩＩＩ因子の投与	
投与量（ng）	１８時間後（IU/ml）
0	0
250	0
500	0.4
750	1.9
1000	2.1
プソイド－Ｕ／５ｍＣを含む第ＶＩＩＩ因子の投与	
投与量（ng）	１８時間後（IU/ml）
0	0
250	7.8
500	8.1
750	6.1
1000	7.8
Ｎ１－メチル－プソイド－Ｕ／５ｍＣを含む第ＶＩＩＩ因子の投与	
投与量（ng）	１８時間後（IU/ml）
0	0
250	3.5
500	4.6
750	6.2
1000	6.0

【１８３３】

実施例１８９．第ＶＩＩＩ因子のｉｎ　ｖｉｔｒｏトランスフェクション：発色活性

２４マルチウェルプレートのＨｅｐＧ２細胞内に第ＶＩＩＩ因子修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６２３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）をリバーストランスフェクションによりトランスフェクトした。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　Ｓ７添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地でＨｅｐＧ２細胞を５０～７０％のコンフルエンスに達するまで増殖させた。細胞にＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）のＲＮＡＩＭＡＸ（商標）と複合体を形成させた第ＶＩＩＩ因子をコードする修飾ｍＲＮＡ（ｍｍＲＮＡ）０ｎｇ、２５０ｎｇ、５００ｎｇ、７５０ｎｇ、１０００ｎｇをトランスフェクトした。最初にＲＮＡを室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに5倍体積希釈で１０分間インキュベートすることにより、ＲＮＡ：ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）複合体を形成させた。第二のバイアルでは、ＲＮＡＩＭＡＸ（商標）試薬を室温でＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔ無添加ＥＰＩＬＩＦＥ（登録商標）培地とともに１０倍体積希釈で１０分間インキュベートした。次いで、ＲＮＡのバイアルとＲＮＡＩＭＡＸ（商標）のバイアルとを混合し、室温で２０～３０分間インキュベートした後、細胞に滴加した。

【１８３４】

ＨｅｐＧ２細胞にトランスフェクトした第ＶＩＩＩ因子をコードする完全に至適化されたｍＲＮＡ（配列番号１６２３で示されるｍＲＮＡ配列；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）は、翻訳時に各ウリジン部位にプソイドウリジンおよび各シトシン部位に５－メチルシトシン（プソイド－Ｕ／５ｍＣ）ならびに各ウリジン部位にＮ１－メチル－プソイドウリジンおよび各シトシン部位に５－メチルシトシン（Ｎ１－メチル－プソイド－Ｕ／５ｍＣ）などの修飾を含むものであった。細胞に第ＶＩＩＩ因子をコードするｍｍＲＮＡをトランスフェクトした。第ＶＩ

ＩＩ因子がトロンビンによって活性化されると、第ＩＸａ因子、リン脂質およびカルシウムとともに酵素複合体を形成し、これが第Ｘ因子から第Ｘａ因子に活性化し、これが一定濃度で過剰にアッセイに添加された第Ｘ因子を第Ｘａ因子に活性化する。この活性は第ＶＩＩＩ因子の量と直接関係がある。

【１８３５】

トランスフェクションの１８時間後、第ＶＩＩＩ因子の活性を測定するため、４０５ｎｍにおける発色によって決定されるｐＮＡの放出量によって測定される第Ｘａ因子特異的発色基質（ＳＸａ－１１）に対する活性により、生成した第Ｘａ因子を測定した。

【１８３６】

第ＶＩＩＩ因子の活性を第ＶＩＩＩ因子２５～３０％濃縮物の対照標準に正規化した（％活性）。表２２５および図６５に示されるこれらのデータは、第ＶＩＩＩ因子をコードする修飾ｍＲＮＡがＨｅｐＧ２細胞内で翻訳可能であることを示している。

【１８３７】

表２２５．第ＶＩＩＩ因子の投与およびタンパク質の分泌

【表０２２５】

プソイド－Ｕ／５ｍＣを含む第ＶＩＩＩ因子の投与	
投与量（ng）	１８時間後（%活性）
0	0
250	31.7
500	29.2
750	26.7
1000	20.4
Ｎ１－メチル－プソイド－Ｕ／５ｍＣを含む第ＶＩＩＩ因子の投与	
投与量（ng）	１８時間後（IU/ml）
0	0
250	25.8
500	30.4
750	30.0
1000	26.7

【１８３８】

実施例１９０．低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）の発現

Ａ．ｉｎ　ｖｉｔｒｏのＬＤＬＲ発現

ヒト胎児腎上皮細胞（ＨＥＫ２９３）細胞（ＬＧＣ　ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ＧｍｂＨ、Ｗｅｓｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を６ウェルプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＵＳＡ）に播く。ＨＥＫ２９３は細胞培養培地３ｍＬに約５００，０００細胞／ウェルの密度で播く。細胞播種後、ＬＤＬＲ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４６３で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１、約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール（配列中に示されていない））または対照のＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４３８で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）を含有する製剤を１ウェル当たり４０００ｎｇ、８００ｎｇ、４００ｎｇ、４０ｎｇおよび４ｎｇの量で直接加え、インキュベートする。対照として、Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞を抗ＬＤＬＲ抗体で処理し、ＬＤＬＲをトランスフェクトした１組の細胞を通常のヤギＩｇＧで処理した。ＰＥ標識二次抗体で処理した後、結合した一次抗体をＦＡＣＳ解析により検出した。

【１８３９】

図６６Ａに示される通り、ＦＡＣＳ解析の結果は、ＬＤＬＲ　ｍＲＮＡ投与量８００ｎｇではゲートをかけた全生細胞の７４．８％にＬＤＬＲの発現が検出されたことを示している。ＬＤＬＲ　ｍＲＮＡ投与量４０ｎｇではゲートをかけた全生細胞の１１．６％にＬＤＬＲの発現が検出された。ＬＤＬＲ　ｍＲＮＡで処理し対照の非免疫ＩｇＧで染色した細胞に染色は観察されなかった。Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞にＬＤＬＲ陽性細胞は検出されなかった。

【１８４０】

Ｂ．タンパク質蓄積

ヒト胎児腎上皮細胞（ＨＥＫ２９３）細胞（ＬＧＣ　ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ＧｍｂＨ、Ｗｅｓｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を６ウェルプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＵＳＡ）に播く。ＨＥＫ２９３は細胞培養培地３ｍＬに約５００，０００細胞／ウェルの密度で播く。細胞播種後、ＬＤＬＲ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４６３で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１、約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール（配列中に示されていない））または対照のＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４３８で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）配列番号２１４３８を含有する製剤を１ウェルごとに直接加え、インキュベートする。１５時間後、トランスフェクション培地を完全培地に交換する。培地交換の０時間後、２時間後、４時間後、８時間後、２４時間後、４８時間後および７２時間後にトランスフェクト細胞を収集する。トランスフェクトした細胞をフィコエリトリン（ＰＥ）とコンジュゲートした抗ＬＤＬＲ抗体で処理し、対照として、ＬＤＬＲでトランスフェクトした１組の細胞をＰＥとコンジュゲートした通常のヤギＩｇＧで処理した。結合した一次抗体を上記の通りにＦＡＣＳ解析により検出した。

【１８４１】

図６６Ｂに示される通り、ＦＡＣＳ解析は、トランスフェクション培地を洗い流した後の０．０時間の時点（トランスフェクション後１５．０時間）で、ゲートをかけた全生細胞の約６５％にＬＤＬＲの発現が検出されたことを示している。３７℃において、陽性細胞のパーセントが時間とともに減少し、トランスフェクション培地の除去後２４時間までにはＬＤＬＲが検出されなくなった。

【１８４２】

Ｃ．ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）標識ＬＤＬＲ

発現したＬＤＬＲが機能的であるかどうかを検討するため、ＢＯＤＩＰＹ（登録商標）標識ＬＤＬを用いた。ＨＥＫ２９３細胞をＬＤＬＲ修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６３で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１、約１６個のヌクレオチドのポリ－Ａテール（配列中に示されていない））またはＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４３８で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）で一晩トランスフェクトし、細胞を洗浄し、ＢＯＤＩＰＹ－ＬＤＬの量を漸増させてインキュベートした。３７℃で１．０時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、ＦＡＣＳによりＢＯＤＩＰＹ－ＬＤＬの結合を評価した。図６６Ｃに示される通り、ＢＯＤＩＰＹ－ＬＤＬとＬＤＬＲ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞との結合は親和性が高く（Ｋｄ約６０ｎｇ／ｍＬ）、飽和性であった。

【１８４３】

競合試験では、未標識ＬＤＬによってＢＯＤＩＰＹ－ＬＤＬの結合を用量依存性に減少させることができた（図６６Ｄ）。以上のデータは、ＢＯＤＩＰＹ－ＬＤＬとＬＤＬＲ　ｍＲＮＡを発現する細胞との結合が飽和性、特異的かつ高親和性であることを示している。

【１８４４】

実施例１９１．ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１（ＵＧＴ１Ａ１）の発現

Ａ．ｉｎ　ｖｉｔｒｏのＵＧＴ１Ａ１発現

ヒト胎児腎上皮細胞（ＨＥＫ２９３）細胞（ＬＧＣ　ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ＧｍｂＨ、Ｗｅｓｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を６ウェルプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＵＳＡ）に播く。ＨＥＫ２９３は細胞培養培地３ｍＬに約５００，０００細胞／ウェルの密度で播く。細胞播種後、ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１（ＵＧＴ１Ａ１）ｍＲＮＡ（配列番号２１４６３で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１、約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール（配列中に示されていない））または対照のＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４３８で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）を含有する製剤を１ウェル当たり４０００ｎｇ、８００ｎｇ、４００ｎｇ、４０ｎｇおよび４ｎｇの量で直接加え、インキュベートする。対照として、Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞を抗ＵＧＴ１Ａ１抗体で処理し、ＵＧＴ１Ａ１をトランスフェクトした１組の細胞を通常のヤギＩｇで処理した。ＰＥ標識二次抗体で処理した後、結合した一次抗体をＦＡＣＳ解析により検出した。

【１８４５】

図６７に示される通り、ＦＡＣＳによって測定される陽性細胞のパーセントがＨＥＫ２９３細胞内にトランスフェクトしたＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡの量とともに増加し、ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡ投与量８００ｎｇにおいてゲートをかけた全生細胞７４．８％で最大値に達した。試験した最大投与量（４０００ｎｇ）ではそれ以上パーセント陽性細胞の増加が観察されなかった。以上のデータは、哺乳動物細胞におけるｍＲＮＡの送達および／または発現が飽和性であることを示している。ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡで処理し対照の非免疫ＩｇＧで染色した細胞に染色は観察されず、Ｇ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞にＵＧＴ１Ａ１陽性細胞は検出されなかった。

【１８４６】

Ｂ．ｉｎ　ｖｉｔｒｏのＵＧＴ１Ａ１発現－タンパク質蓄積

ヒト胎児腎上皮細胞（ＨＥＫ２９３）細胞（ＬＧＣ　ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ＧｍｂＨ、Ｗｅｓｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を６ウェルプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＵＳＡ）に播く。ＨＥＫ２９３は細胞培養培地３ｍＬに約５００，０００細胞／ウェルの密度で播く。細胞播種後、ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡ（配列番号２１４６で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１、約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール（配列中に示されていない））または対照のＧ－ＣＳＦ　ｍＲＮＡ（配列番号２１４３８で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）を含有する製剤を１ウェルごとに直接加え、インキュベートする。１５時間後、トランスフェクション培地を完全培地に交換する。培地交換の０時間後、２時間後、４時間後、８時間後、２４時間後、４８時間後および７２時間後にトランスフェクト細胞を収集する。トランスフェクトした細胞をフィコエリトリン（ＰＥ）とコンジュゲートした抗ＵＧＴ１Ａ１抗体で処理し、対照として、ＵＧＴ１Ａ１でトランスフェクトした１組の細胞をＰＥとコンジュゲートした通常のヤギＩｇＧで処理した。結合した一次抗体を上記の通りにＦＡＣＳ解析により検出した。

【１８４７】

図６８に示される通り、ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞におけるＵＧＴ１Ａ１タンパク質蓄積が培地交換後のインキュベーション時間とともに増加し、２４時間後に最大値に達した後、７２時間後までにベースライン値まで減少した。ここに挙げた条件下では、ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡの見かけの半減期は約４０．０時間であった。

【１８４８】
実施例１９２．ウエスタンブロットによるＵＧＴ１Ａ１およびＯＴＣの検出
［０００１８８２］ＨＥＫ２９３　ヒト胎児腎上皮細胞（ＨＥＫ２９３）細胞（ＬＧＣ　ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ＧｍｂＨ、Ｗｅｓｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を６ウェルプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＵＳＡ）に播く。ＨＥＫ２９３は細胞培養培地２．４ｍＬに約５００，０００細胞／ウェルの密度で播く。細胞播種後、ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡ（配列番号２１４６４で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１、約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール（配列中に示されていない））またはＯＴＣ　ｍＲＮＡ（配列番号１６５９で示されるｍＲＮＡ；５－メチルシトシンおよび１－メチルプソイドウリジンで完全に修飾；５’キャップ、キャップ１；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール）を含有する製剤を１ウェル当たり８００ｎｇの量で直接加え、１６時間インキュベートする。ＰＢＳ　５００ｕＬで細胞を洗浄し、細胞を擦り取ってＰＢＳ　５００ｕＬ中に収集した。細胞を２００×ｇで５分間遠心分離し、プロテアーゼ阻害剤を添加したＲＩＰＡ緩衝液２５０ｕＬに再懸濁させた。管を１４，０００×ｇで１０分間遠心分離した。上清をｃｅｎｔｒｉｆｉｃｏｎ濃縮カラムに移し、１４，０００×ｇで３０分間遠心分離し、可溶化液を濃縮した。ＢＣＡタンパク質アッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＵＳＡ）により可溶化液を定量化した。

【１８４９】
既製の１．５ｍｍビス‐トリスゲルおよび４～１２％アクリルアミドグラジエントを備え、泳動を助けるＭＯＰＳ緩衝液を入れたＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥシステム（泳動槽および電源）（以上、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））にタンパク質可溶化液を負荷した。各可溶化液試料を最終体積４０ｕｌに調製した。この試料には、体積可変のタンパク質可溶化液２５ｕｇ、体積を２６μｌにするＲＩＰＡ緩衝液、１０×還元剤４μｌおよび４×ＳＤＳローディング緩衝液１０μｌ（ともにＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ））が含まれていた。試料を９５℃で５分間加熱し、ゲルに負荷した。標準設定は製造業者によって選択されたものであり、２００Ｖ、１２０ｍＡおよび最大２５Ｗであった。泳動時間は６０分間とし、これは泳動染色剤がゲルの下端に達するよりも長い時間ではなかった。

【１８５０】
泳動終了後、プラスチックケースを分割し、ケース内のゲルを既製のニトロセルロース膜キットおよび電源（ｉＢＬＯＴ；ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）に移した。初期設定を用いて、高アンペアの電気によりタンパク質可溶化液をゲルから膜に転写した。

【１８５１】
転写後、膜を５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する１×トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）で１５分間、次いで、５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎでさらに１５分間インキュベートした。一次抗体のヤギ抗ヒトＵＧＴ１Ａ１（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）およびウサギ抗ヒトＯＴＣ（ＮＢＰ１）を５％ＢＳＡを含有する１×ＴＢＳ溶液３ｍｌ中、１：５００希釈で、オービタルシェーカーで穏やかに攪拌しながら、室温で３時間反応させた。ＯＴＣ一次抗体をＷｅｓｔｅｒｎＢｒｅｅｚｅ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃ　Ｋｉｔ－Ａｎｔｉ－Ｒａｂｂｉｔで製造業者のプロトコルに従って検出し、ＵＧＴ１Ａ１一次抗体をＷｅｓｔｅｒｎＢｒｅｅｚｅ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃ　Ｋｉｔ－Ａｎｔｉ－Ｇｏａｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）で製造業者のプロトコルに従って検出した。

【１８５２】
図６９に示される通り、ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞の可溶化液では抗ＵＧＴ１Ａ１　ＩｇＧによりＵＧＴ１Ａ１が約６０ｋＤａのバンドとして検出さ

れたが（レーン４）、ＯＴＣ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞では検出されなかった（レーン３）。同じ可溶化液を用いて、ＯＴＣ　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞の可溶化液では抗ＯＴＣ　ＩｇＧによりＯＴＣが約３９ｋＤａのバンドとして検出されたが（レーン７）、ＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞では検出されなかった（レーン８）。以上のデータは、外来性のＵＧＴ１Ａ１　ｍＲＮＡおよびＯＴＣ　ｍＲＮＡが哺乳動物細胞で同族タンパク質合成を指令することが可能であることを裏付けるものである。

【１８５３】

実施例１９３．ＰＡＨおよびＵＧＴ１Ａ１の発現および検出

Ａ．ＨＥＫ２９３細胞、マウス筋芽細胞およびラット筋芽細胞のトランスフェクション

ＨＥＫ２９３（ＬＧＣ　ｓｔａｎｄａｒｄｓ　ＧｍｂＨ、Ｗｅｓｅｌ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｃ２Ｃ１２マウス筋芽細胞系（ＡＴＣＣ）およびＬ６ラット筋芽細胞系（ＡＴＣＣ）を２４ウェルディッシュ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＵＳＡ）の１０％ウシ胎仔血清（ＡＴＣＣ）添加ＤＭＥＭ（ＡＴＣＣ）に播いた（１．５×10^5細胞／ウェル）。

【１８５４】

第一の管で５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾されたＰＡＨ修飾ｍＲＮＡ（配列番号１６６０；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１）、ＵＧＴ１Ａ１修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４６４；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）またはＧ－ＣＳＦ修飾ｍＲＮＡ（配列番号２１４３８；配列中に示されない約１６０個のヌクレオチドのポリ－Ａテール；５’キャップ、キャップ１；５－メチルシトシンおよびプソイドウリジンで完全に修飾）２５０ｎｇとＯｐｔｉ－ＭＥＭ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）５０ｕｌとを組み合わせ、第二の管でＬ２０００トランスフェクション試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）１ｕｌとＯｐｔｉ－ＭＥＭ　５０ｕｌとを組み合わせることによって、処置の対象となる各ウェルに対してトランスフェクション溶液を調製した。調製後、第一および第二の管を室温で５分間インキュベートした後、それぞれの内容物を組み合わせた。組み合わせたトランスフェクション溶液を室温で１５分間インキュベートした。次いで、トランスフェクション溶液１００ｕｌを各ウェルに加えた。細胞をさらに１４時間培養した後、分析を進めた。

【１８５５】

Ｂ．フローサイトメトリーによるＰＡＨ、ＵＧＴ１Ａ１の検出

トランスフェクション後、培地を細胞から除去し、各ウェルに０．２５％トリプシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）６０ｕｌを加えた。細胞をトリプシンで２分間処理した後、２４０ｕｌ／ウェルのトリプシン阻害剤（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）を加えた。得られた細胞溶液を９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｔｅｗｋｓｂｕｒｙ、ＭＡ）に移し、遠心分離（８００×重力で５分間）により細胞をペレット化し、上清を捨てた。細胞ペレットをＰＢＳで洗浄し、Ｆｏｘｐ３固定／透過処理液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に４５分間再懸濁させた。細胞を遠心分離（８００×重力で５分間）により再びペレット化し、透過処理緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）に１０分間再懸濁させた。細胞を遠心分離（８００×重力で５分間）により再びペレット化し、透過処理緩衝液で洗浄した。ＰＡＨをトランスフェクトした細胞をフィコエリトリン（ＰＥ）とコンジュゲートした抗ＰＡＨ抗体で処理した。染色対照として、ＰＡＨをトランスフェクトした１組の細胞をＰＥとコンジュゲートした通常のヤギＩｇＧで処理した。トランスフェクション対照として、Ｇ－ＣＳＦをトランスフェクトした１組の細胞をフィコエリトリン（ＰＥ）とコンジュゲートした抗ＰＡＨ抗体で処理した。結合した一次抗体を上記の通りにＦＡＣＳ解析によ

り検出した。次いで、標識細胞をＦＡＣＳ緩衝液（１％ウシ血清アルブミンおよび０．１％アジ化ナトリウムを含有するＰＢＳ）と組み合わせ、クラスター管に移した後、ＢＤ Ａｃｃｕｒｉ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）を用いてフローサイトメトリーにより標識細胞を解析した。図７０に示される通り、ＰＡＨをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞の１１．９％ＰＡＨの発現が検出され、ＵＧＴ１Ａ１をトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞の５８．６％にＵＧＴ１Ａ１の発現が検出された。各ｍＲＮＡについて、ラットまたはマウス筋芽細胞を用いても、陽性細胞のパーセントはＨＥＫ２９３細胞で得られた結果とほぼ同じであった。

【１８５６】

実施例１９４．直接捕捉キャピラリー電気泳動を用いるＨＥＫ２９３細胞におけるＵＧＴ１Ａ１発現

ＨＥＫ２９３細胞にＵＧＴ１Ａ１ ｍＲＮＡをトランスフェクトし、上記の通りに細胞溶解物を調製した。Ｓｉｍｐｌｅ Ｓｉｍｏｎ Ｗｅｓｔｅｒｎシステム（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｉｍｐｌｅ）を用いてウエスタン解析を実施した。図７１に示される通り、ＵＧＴ１Ａ１ ｍＲＮＡをトランスフェクトした細胞の可溶化液ではＵＧＴ１Ａ１（約６０ｋＤａのバンド）が抗ＵＧＴ１Ａ１ ＩｇＧにより検出されたが（レーン１、４および６）、同一濃度の非免疫ＩｇＧによっては検出されなかった（レーン２および５）。同様に、同量の非トランスフェクトＨｅｐ３ｂ細胞の細胞溶解物（レーン３）を用いても、ＯＴＣ ｍＲＮＡをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞の可溶化液（レーン７）でも、ＵＧＴ１Ａ１は検出されなかった。

【１８５７】

正常Ｃ５７ＢＬ６マウスにＵＧＴ１Ａ１ ｍＲＮＡを含有するＬＮＰを０．５ｍｇ／ｋｇの投与量で単回静脈内注射した。２４時間後、マウスを屠殺し、各マウスから肝臓を摘出した。Ｐｏｌｙｔｒｏｎホモジナイザーを用いてプロテアーゼ阻害剤を含有する氷冷リン酸緩衝生理食塩水（ｐＨ７．４）５．０ｍＬ中でホモジナイズすることにより、各肝臓からミクロソーム膜抽出物を調製した。組織ホモジネートと氷冷ミクロソーム緩衝液（２．６２ｍＭ KH_2PO_4、１．３８ｍＭ Ｋ２ＨＰＯ４、２％グリセロールおよび０．５ｍＭジチオスレイトール）４０ｍｌとを混合し、４℃、１２，０００×ｇで２０分間遠心分離した。次いで、上清画分を４℃、１００，０００×ｇで６０分間遠心分離した。ミクロソームペレットをミクロソーム緩衝液に再懸濁させ、ブラッドフォード法によりタンパク質濃度を測定した。抗カルネキシン抗体（Ａｓｓａｙ Ｄｅｓｉｇｎｓ、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、ＭＩ）を用いたウエスタンブロットでカルネキシンバンドを検出することにより、ミクロソーム抽出物の特徴付けを実施した。ミクロソーム抽出物をキャピラリーに約２～５μｇ加え、製造業者によって記載されている通りに電気泳動およびタンパク質固定化を実施した。図７２に示される通り、ＵＧＴ１Ａ１に特異的な抗体（上記）を用いると、ＵＧＴ１Ａ１ ｍＲＮＡを含有するＬＮＰで処置したマウスのミクロソーム抽出物にＵＧＴ１Ａ１が検出されたが（レーン２）、非特異的抗体では検出されなかった（レーン４）。マウス肝臓のＵＧＴ１Ａ１の分子量は、ＵＧＴ１Ａ１ｍＲＮＡをトランスフェクトし抗ＵＧＴ１Ａ１ ＩｇＧで探索したＨＥＫ２９３細胞の抽出物に観察されたものと同じであった（レーン３）。ＯＴＣ ｍＲＮＡをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞の抽出物にはＵＧＴ１Ａ１のバンドが検出されなかった（レーン５）。以上のデータは、ＵＧＴ１Ａ１ ｍＲＮＡを含有するＬＮＰを注射したマウスにおけるＵＧＴ１Ａ１ ｍＲＮＡのｉｎ ｖｉｖｏ発現を示している。

【１８５８】

使用した単語は、限定ではなく説明のための単語であり、その広範な態様において本発明の真の範囲と精神から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲内で変更が行われ得ることが理解される。

【１８５９】

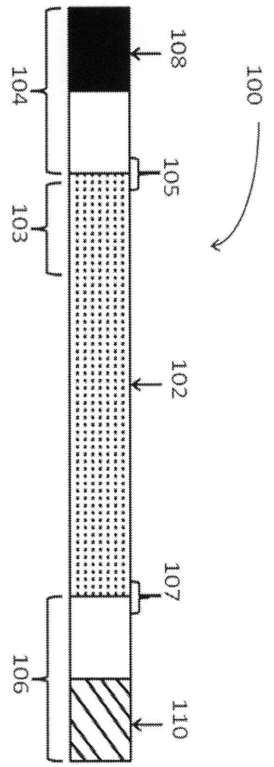
本発明は、いくつかの記載の実施形態に関してある程度詳しく具体的に記載されたが、これが任意のそのような詳細もしくは実施形態、または任意の特定の実施形態に限定され

るべきであるようには意図されず、先行技術を考慮してそのような特許請求の範囲の可能な限り広範な解釈を提供し、それにより本発明の意図される範囲を効果的に包含するように、添付の特許請求の範囲を参照して解釈されるべきである。

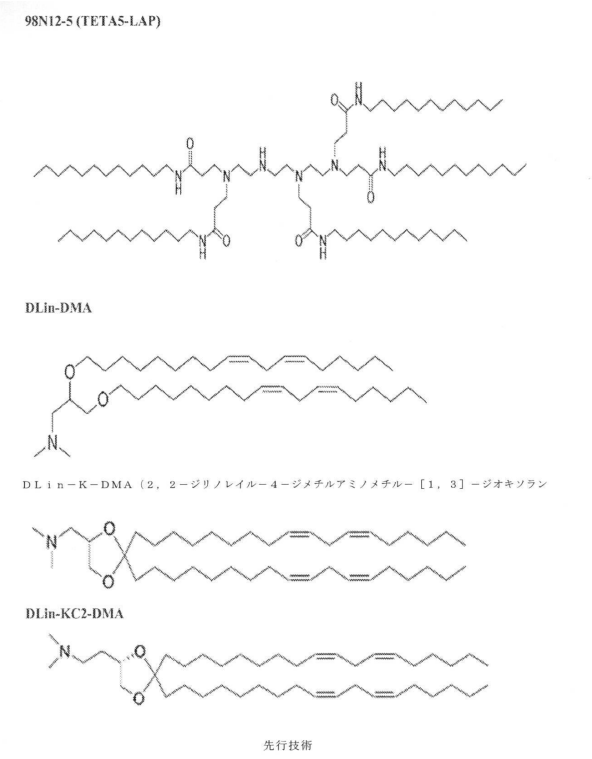
【１８６０】

本明細書に言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。矛盾が生じる場合、定義を含む本明細書が優先されるものとする。加えて、節の見出し、材料、方法、および実施例は、例示に過ぎず、限定するようには意図されない。

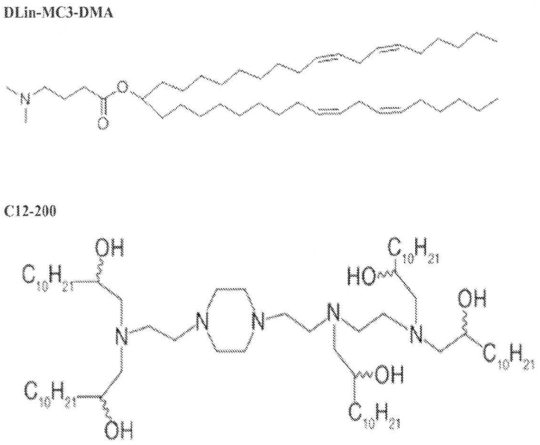
【図１】



【図２－１】

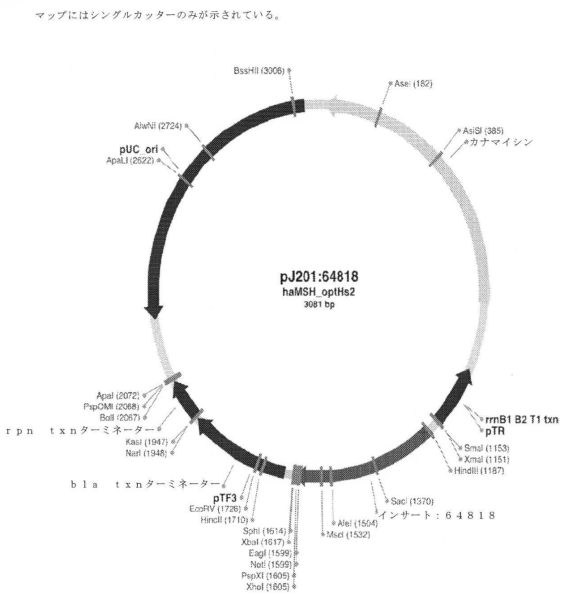


【図２－２】



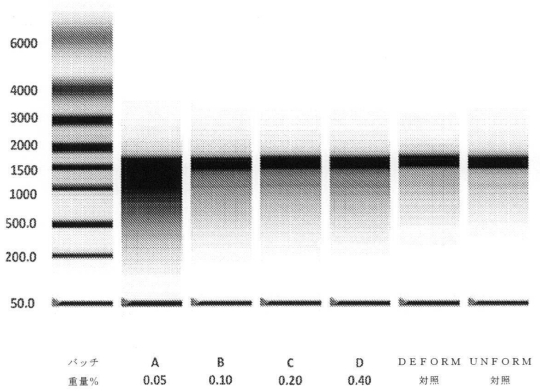
先行技術

【図３】

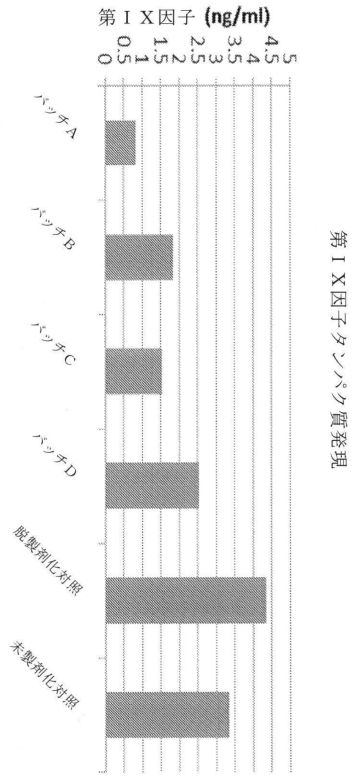


先行技術

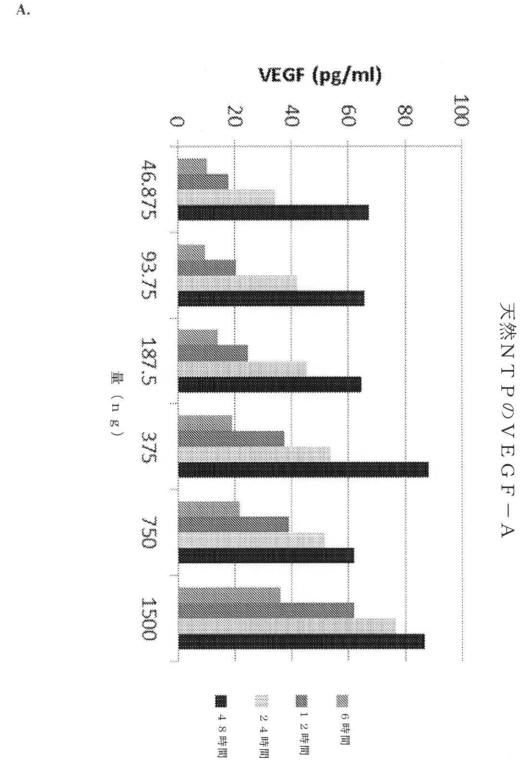
【図４】



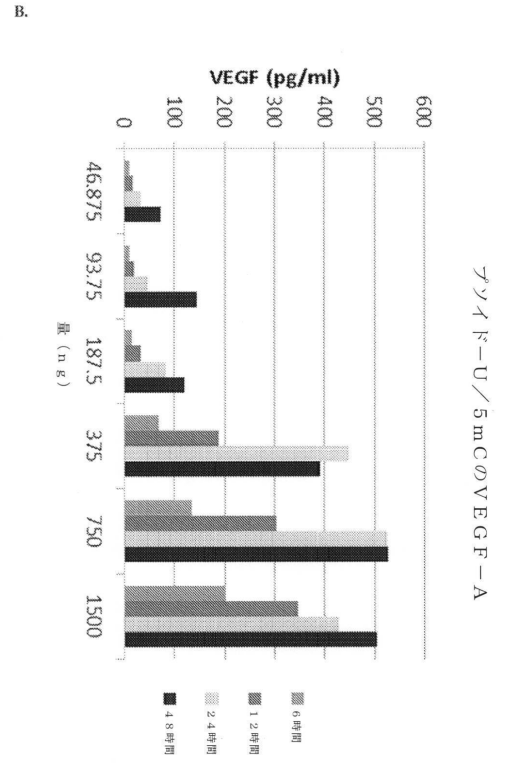
【図５】



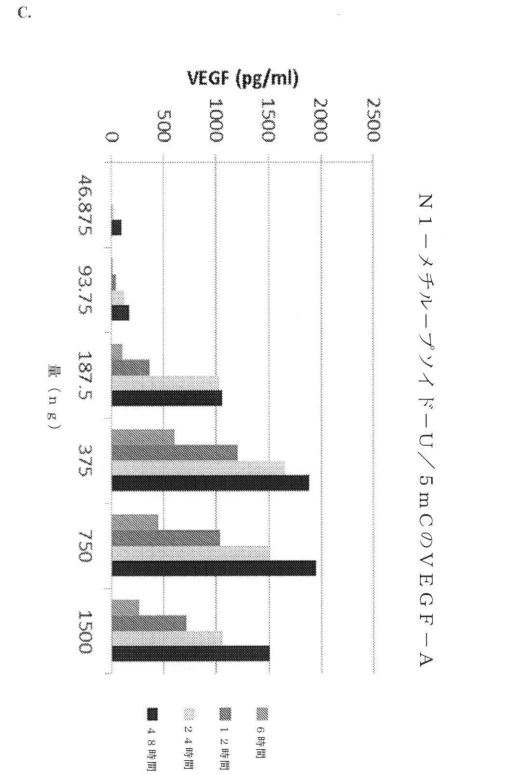
【図６－１】



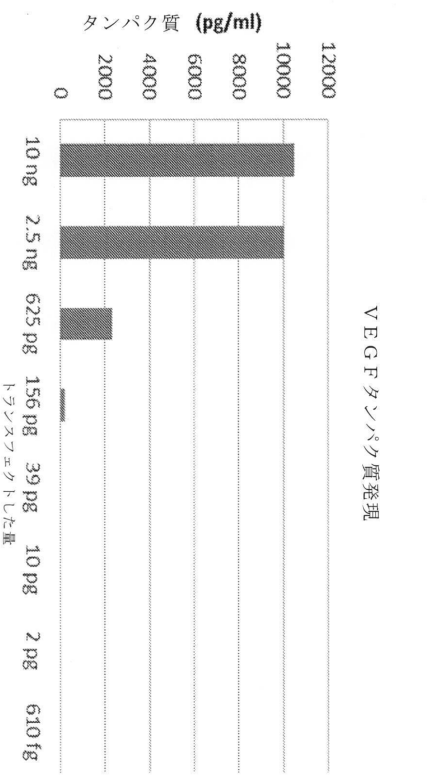
【図６－２】



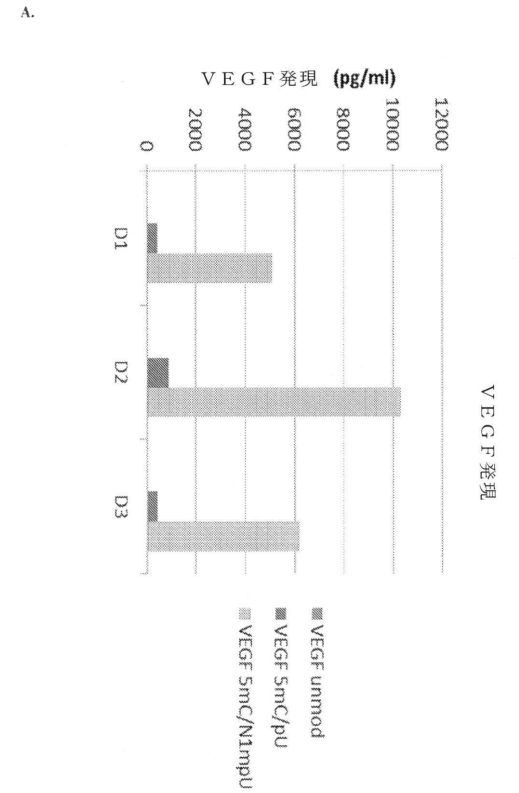
【図６－３】



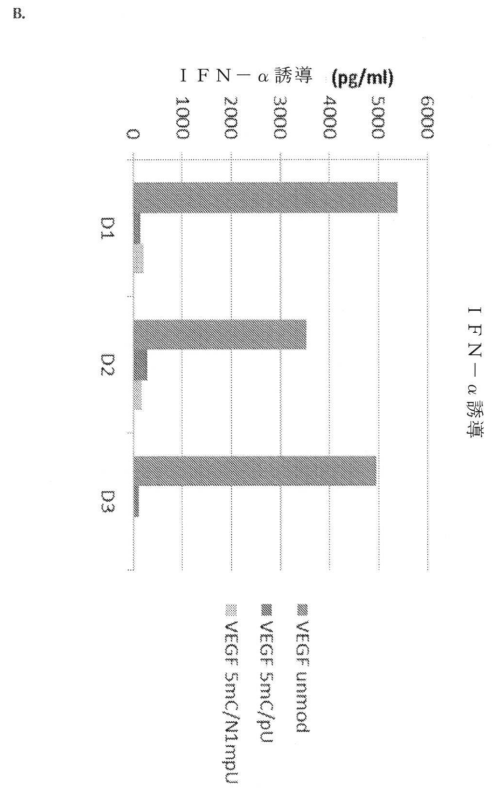
【図７】



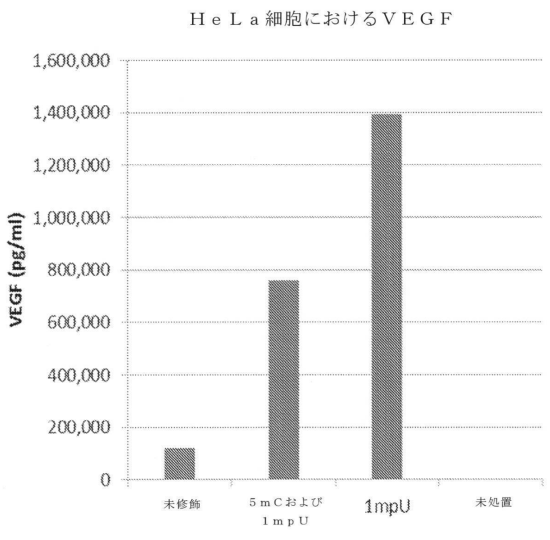
【図８－１】



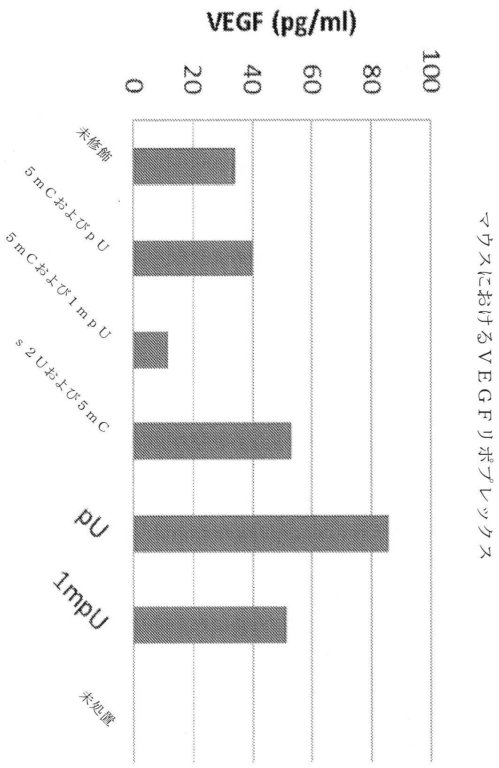
【図８－２】



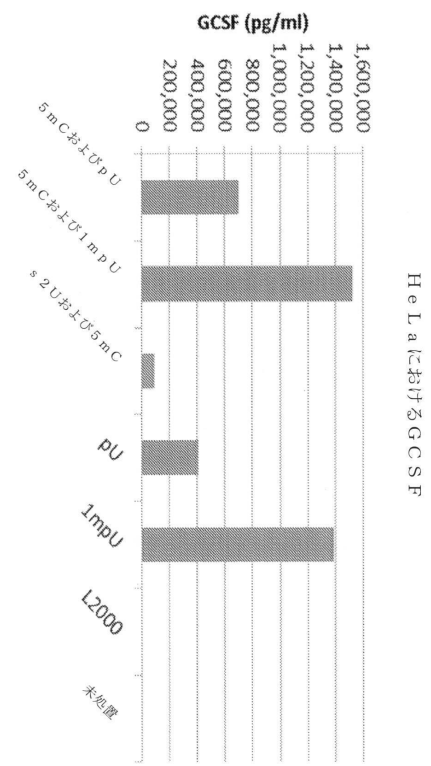
【図９】



【図１０】

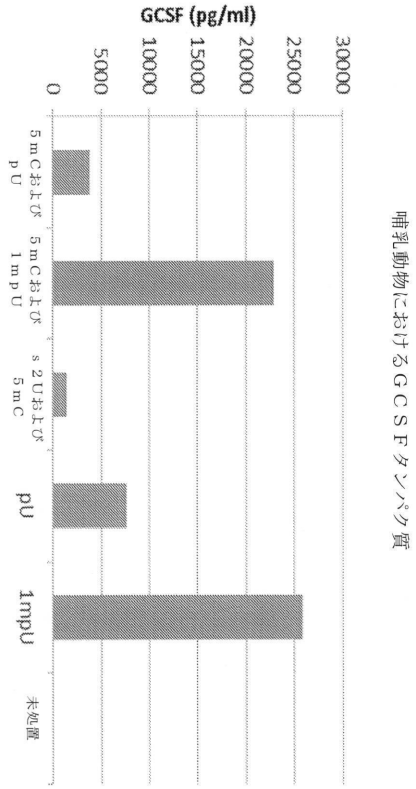


【図１１】



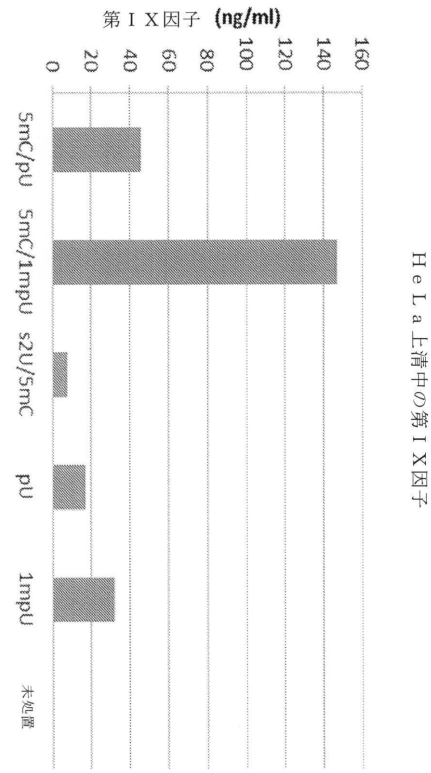
ＨｅＬａにおけるＧＣＳＦ

【図１２】



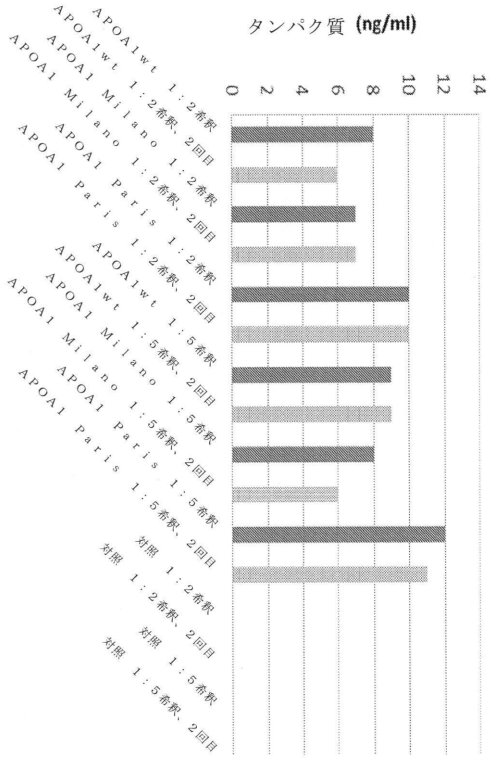
哺乳動物におけるＧＣＳＦタンパク質

【図１３】



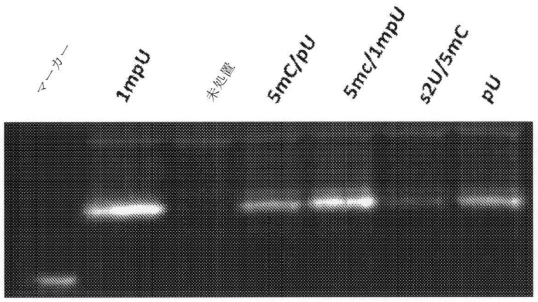
ＨｅＬａ上清中の第ＩＸ因子

【図１４】

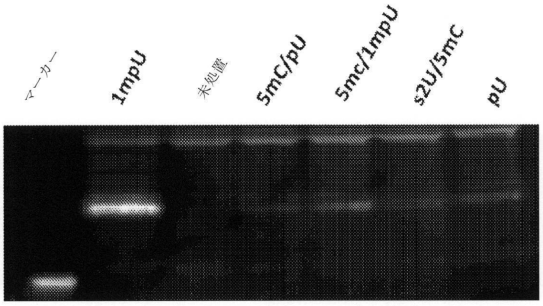


ＨｅＬａ細胞におけるヒトＡＰＯＡ１

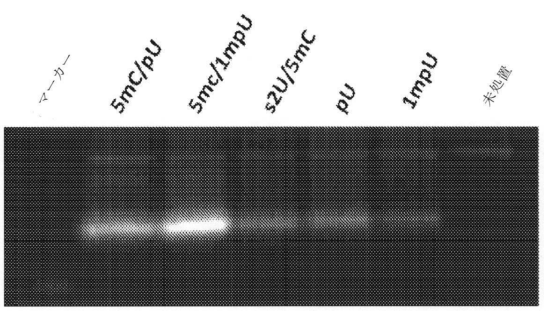
【図１５】



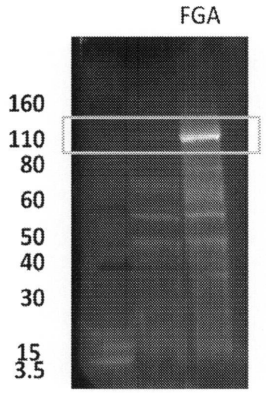
【図１６】



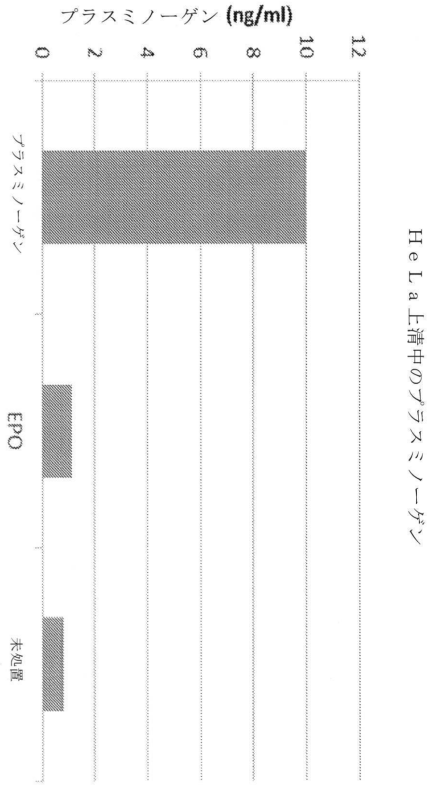
【図１７】



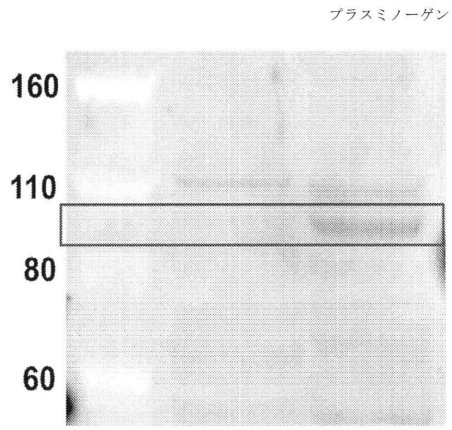
【図１８】



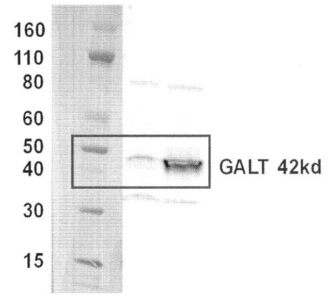
【図１９】



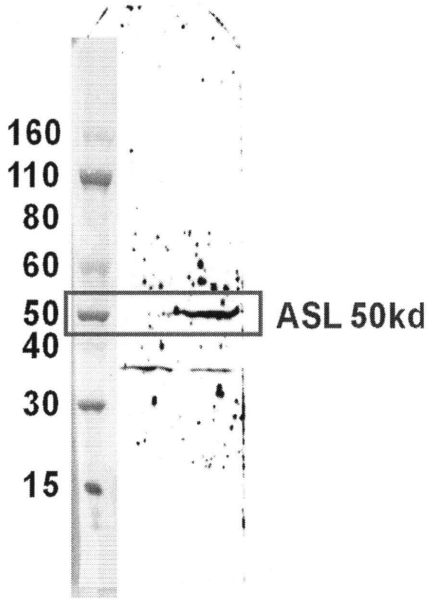
【図２０】



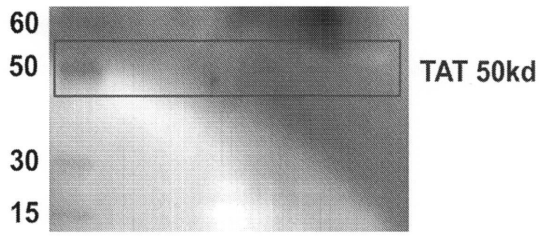
【図２１】



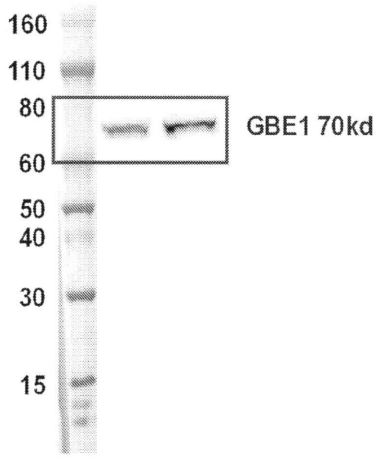
【図２２】



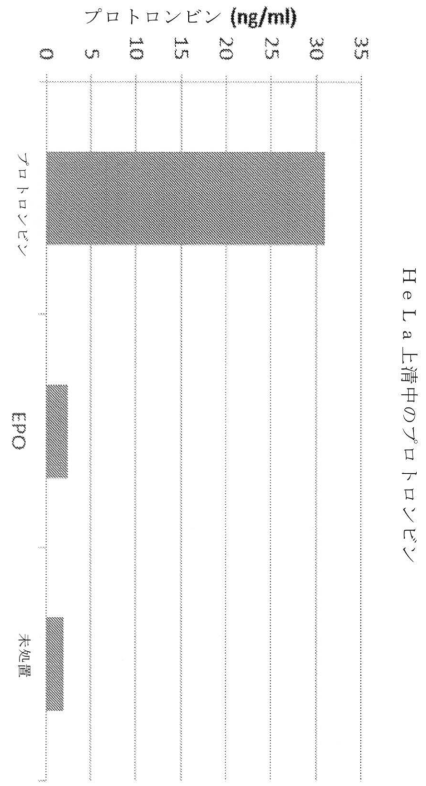
【図２３】



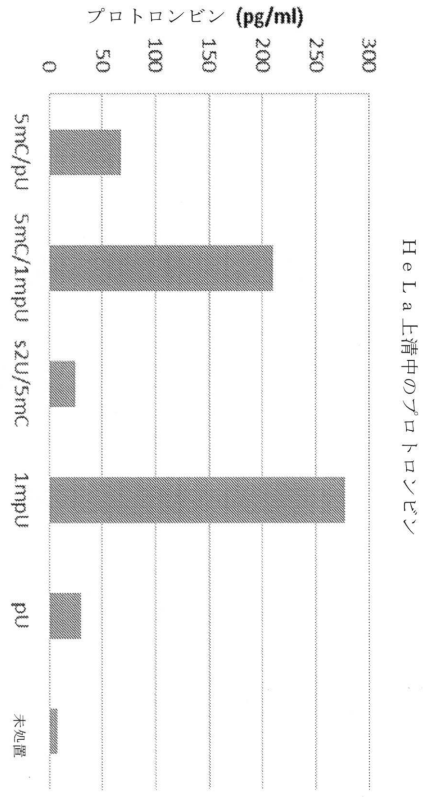
【図２４】



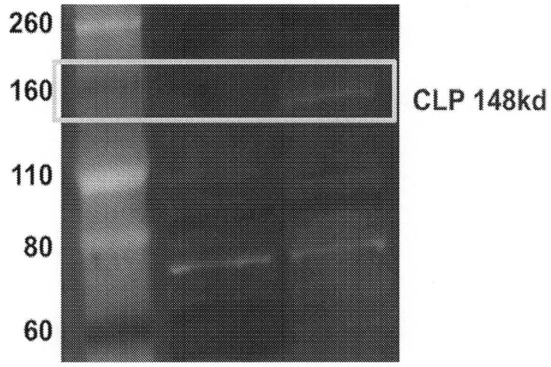
【図２５】



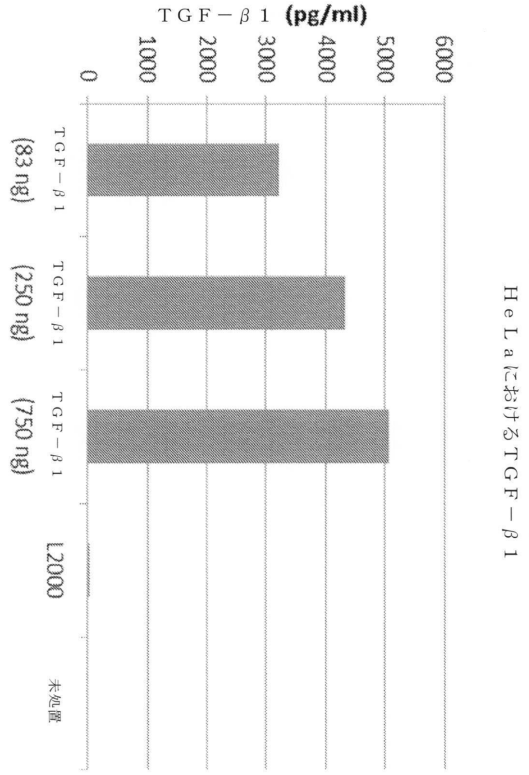
【図２６】



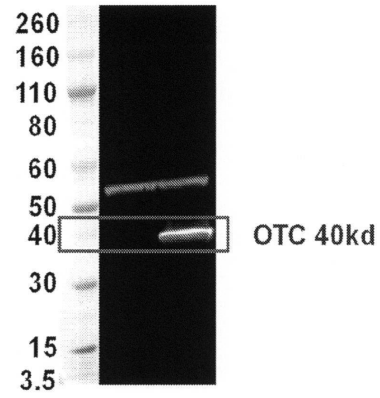
【図２７】



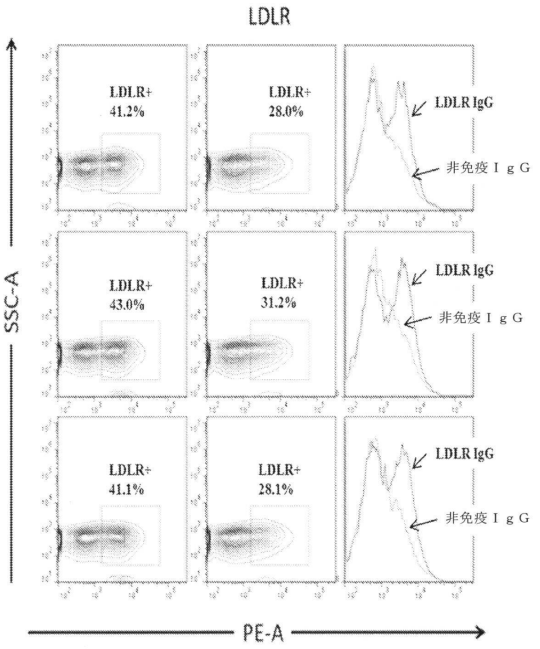
【図２８】



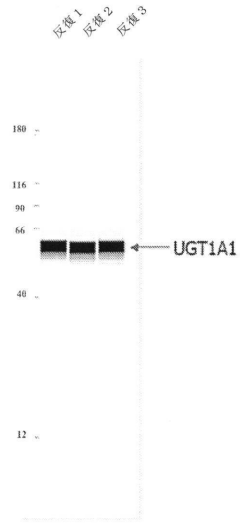
【図２９】



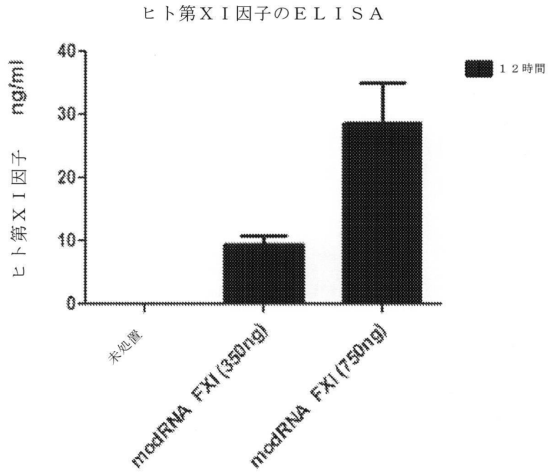
【図３０】



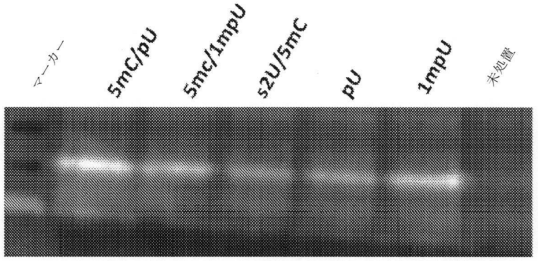
【図３１】



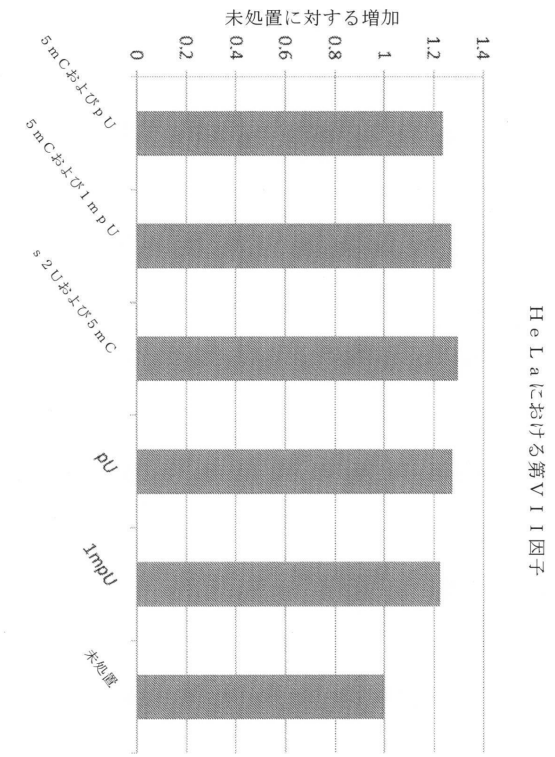
【図３２】



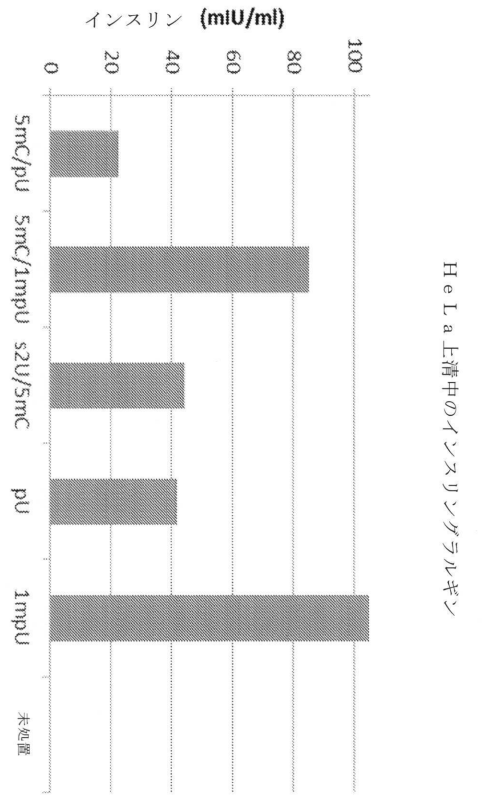
【図３３】



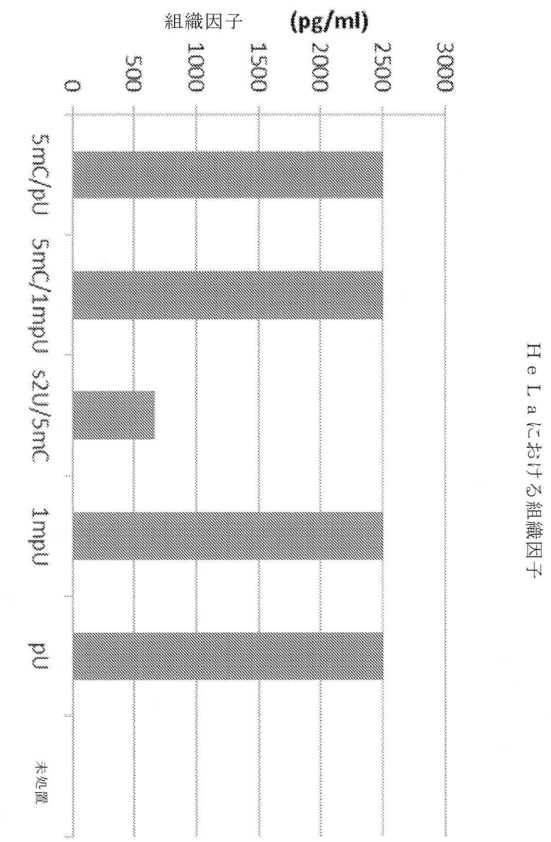
【図３４】



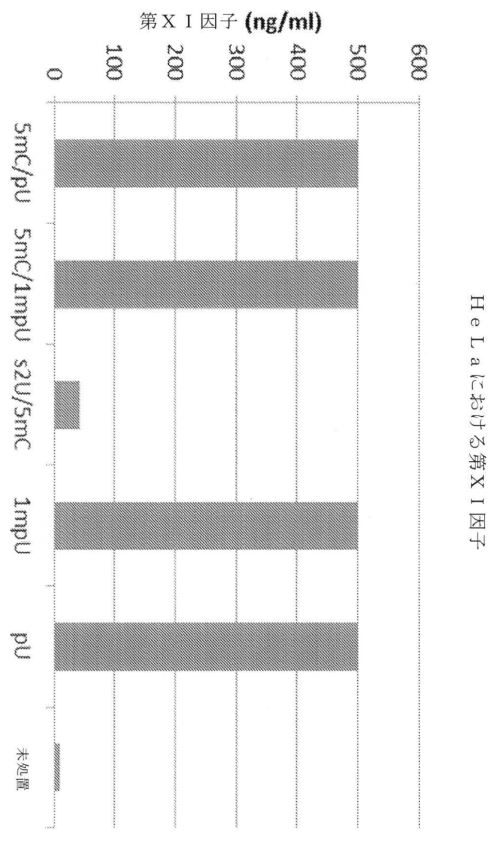
【図３５】



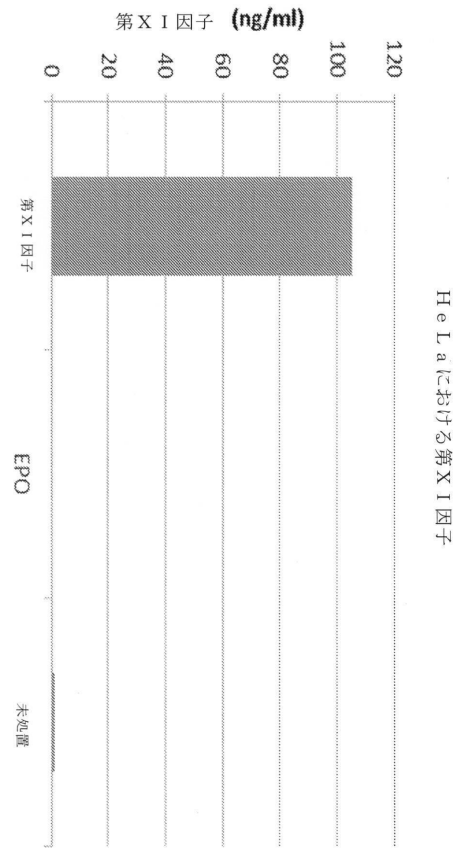
【図３６】



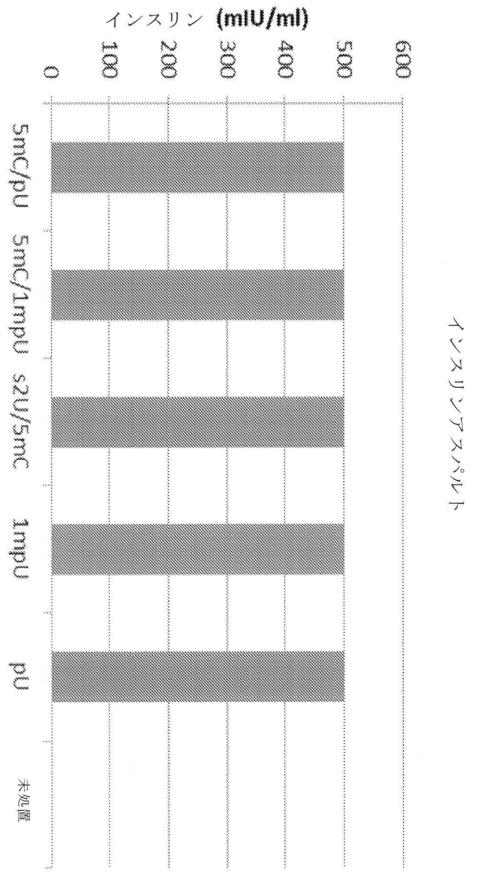
【図３７】



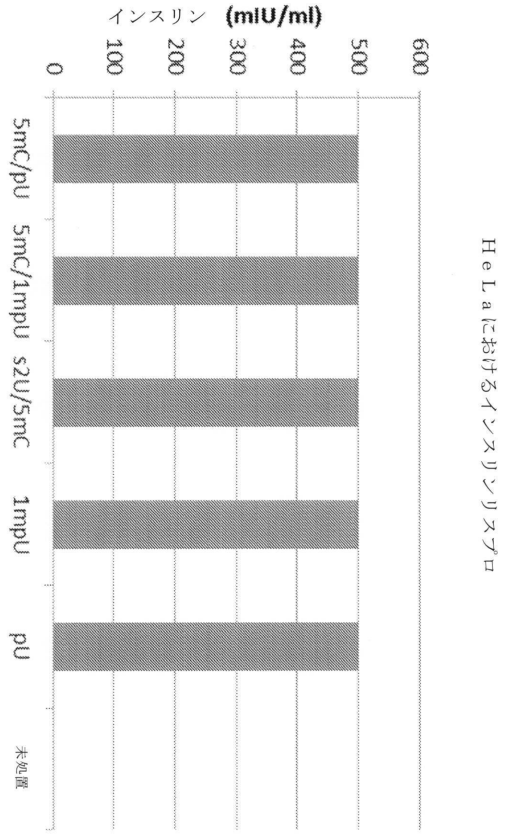
【図３８】



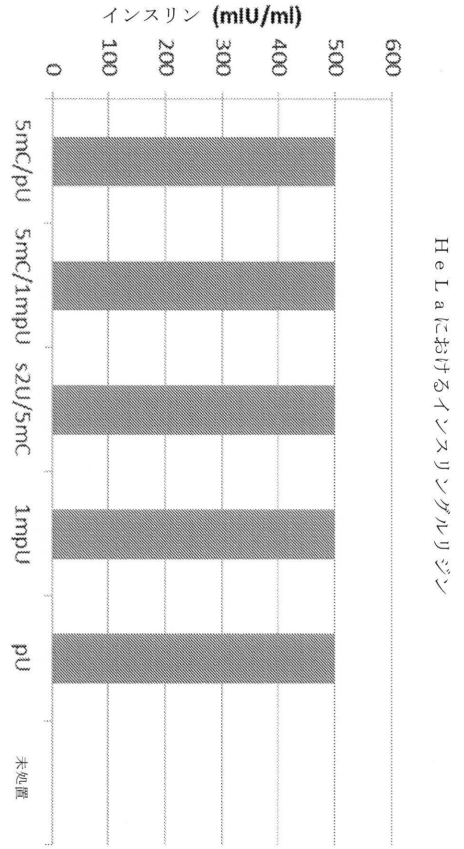
【図３９】



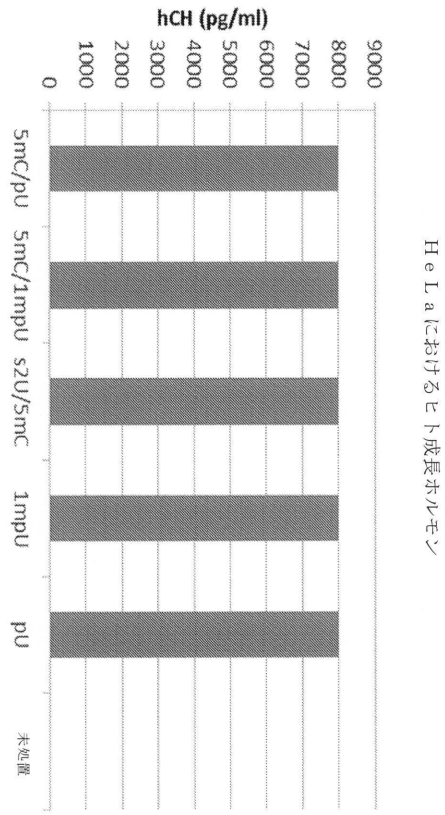
【図４０】



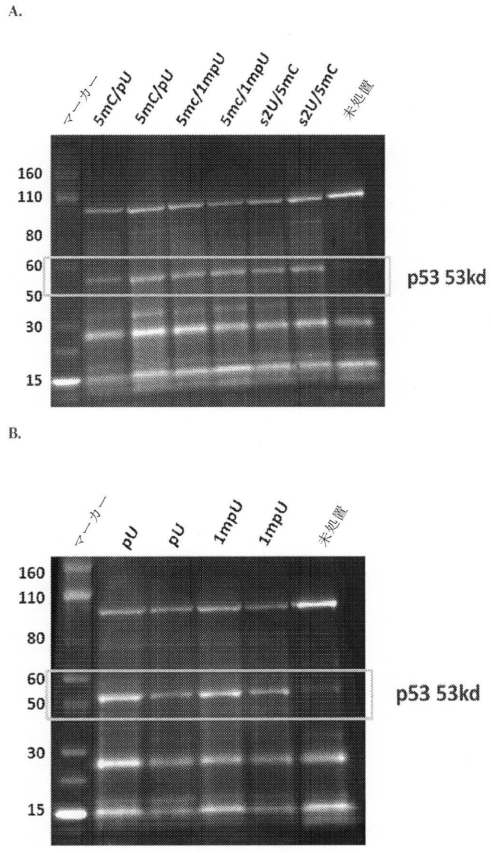
【図４１】



【図４２】



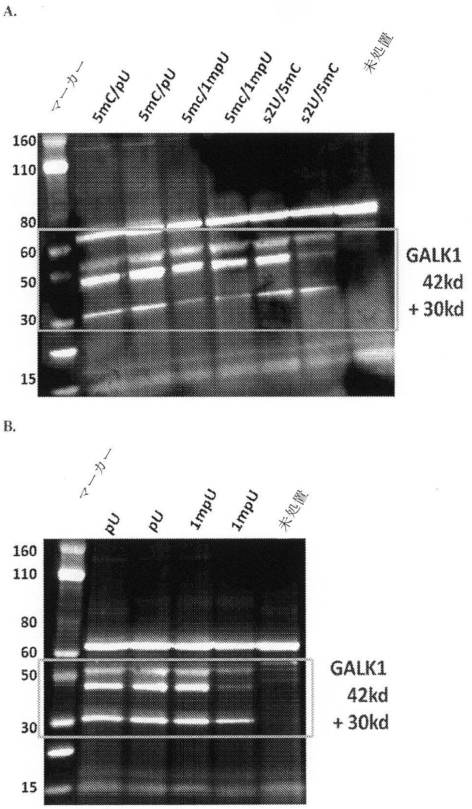
【図４３】



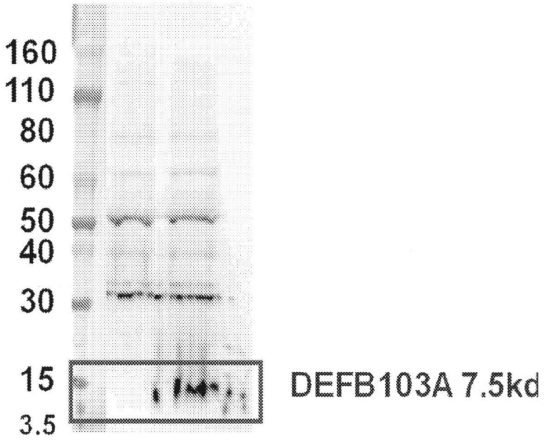
【図４４】



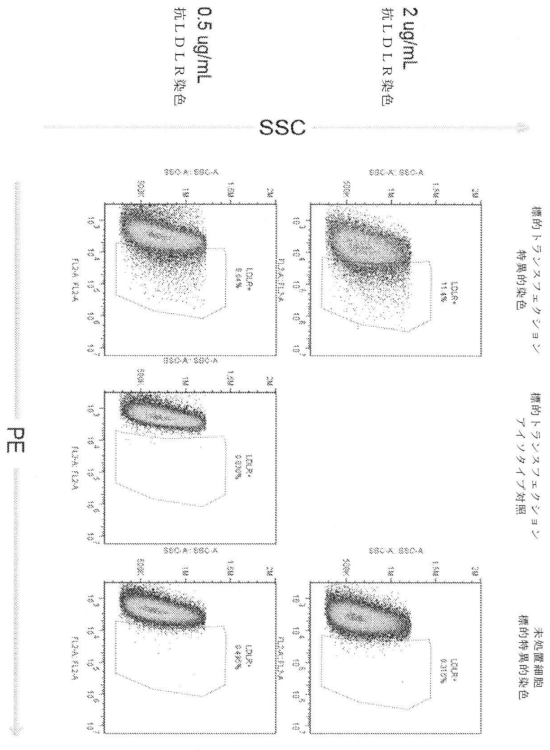
【図４５】



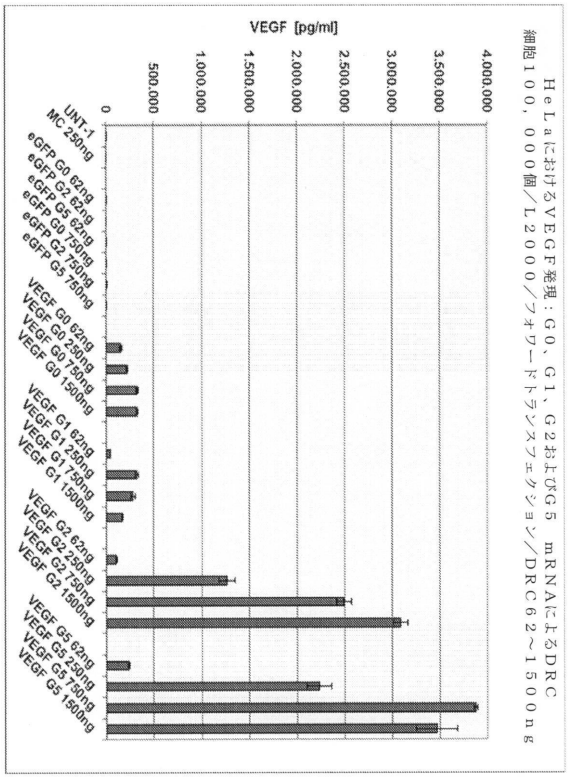
【図４６】



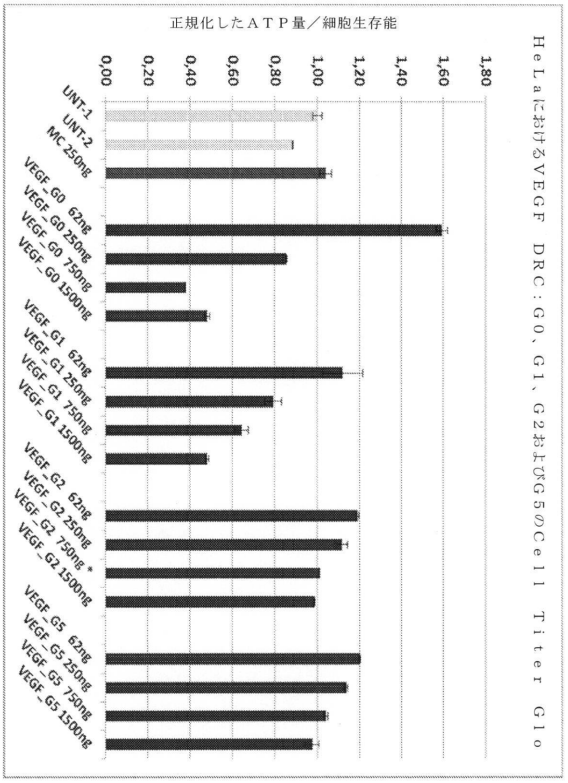
【図４７】



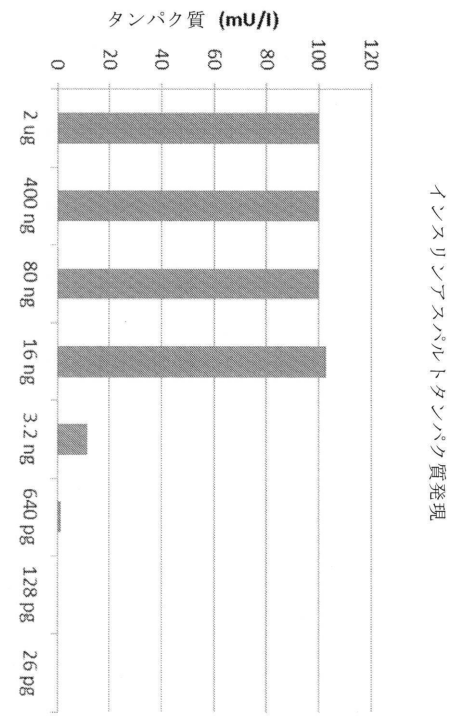
【図４８】



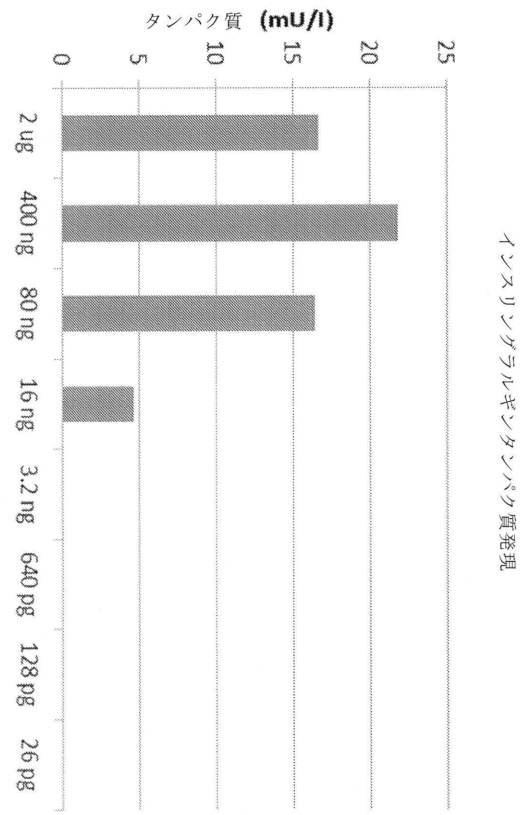
【図４９】



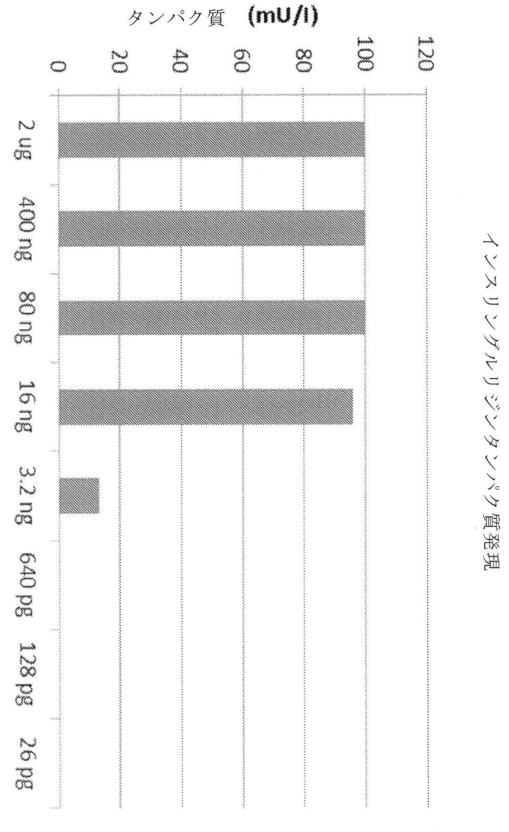
【図５０】



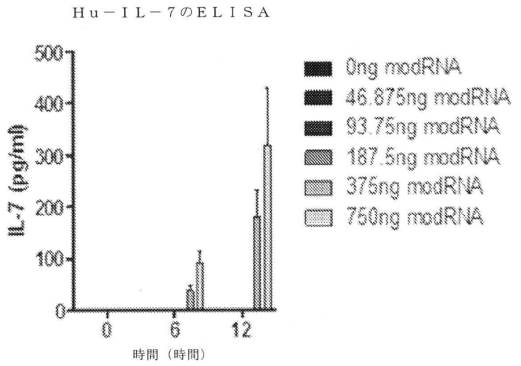
【図５１】



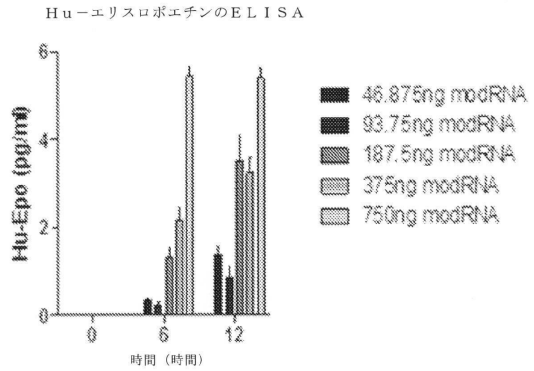
【図５２】



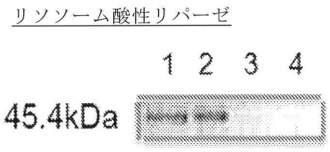
【図５３】



【図５４】



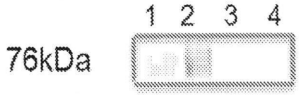
【図５５】



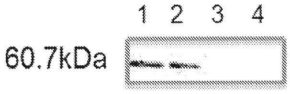
【図５６】



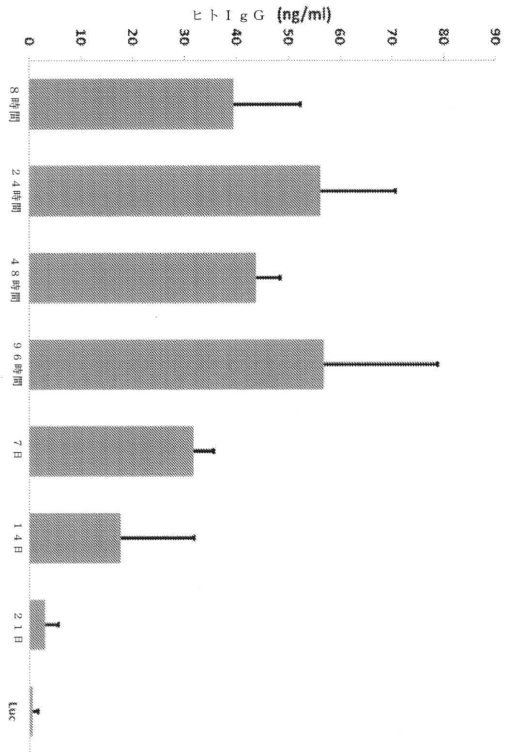
【図５７】



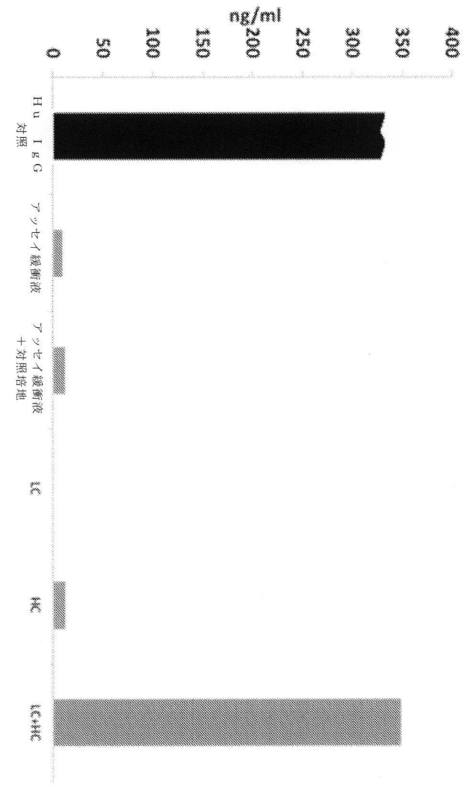
【図５８】



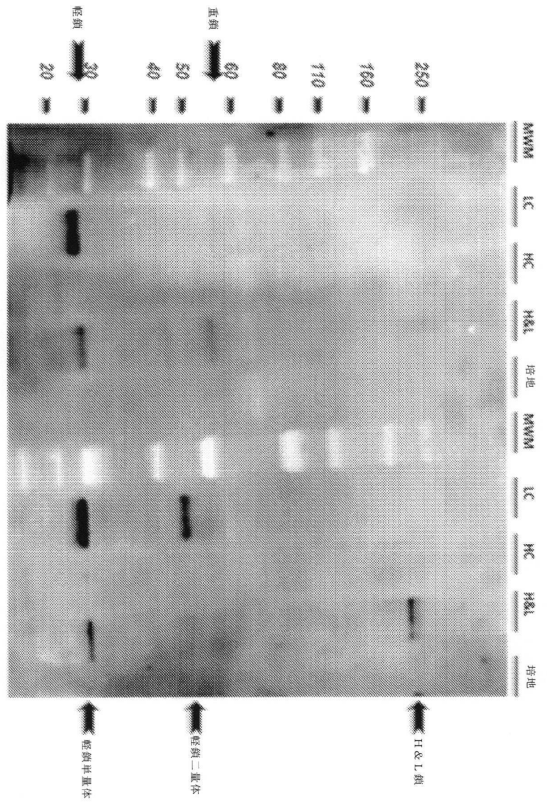
【図５９】



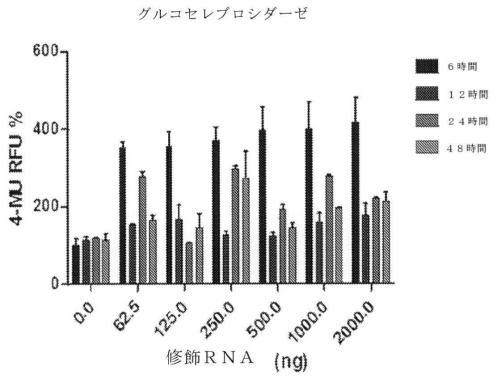
【図６０】



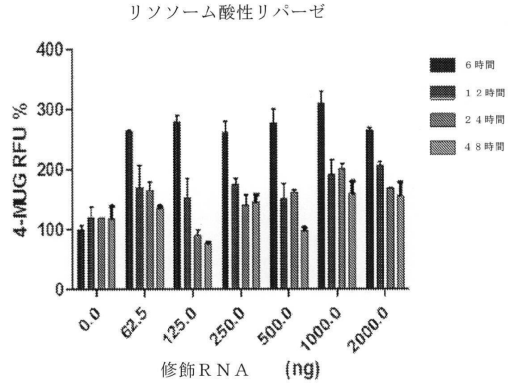
【図６１】



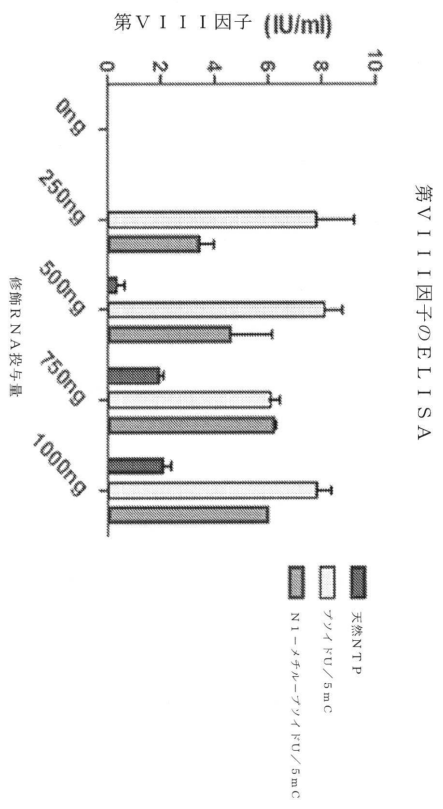
【図６２】



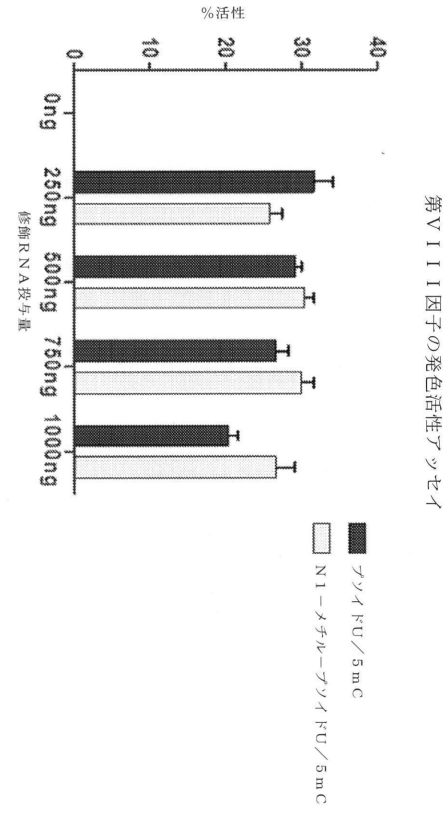
【図６３】



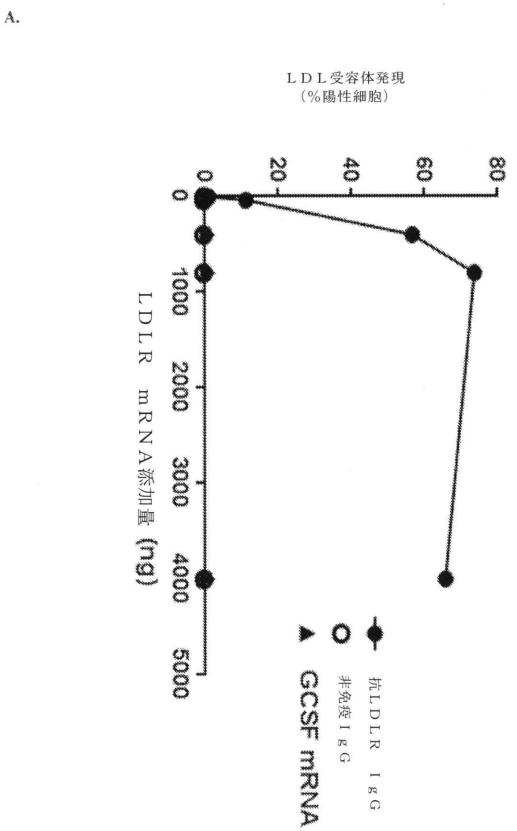
【図６４】



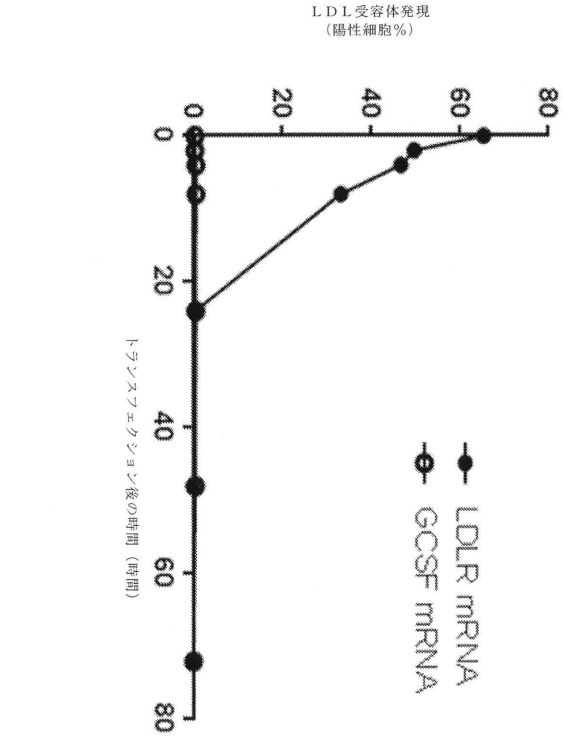
【図６５】



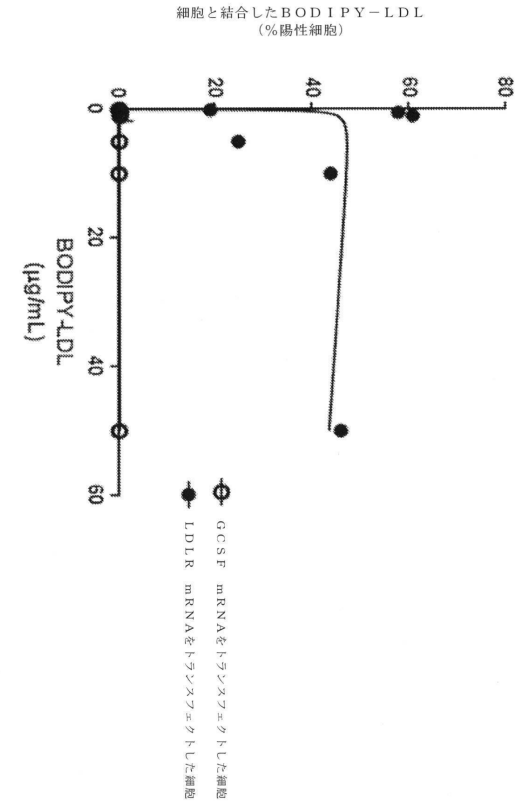
【図６６－１】



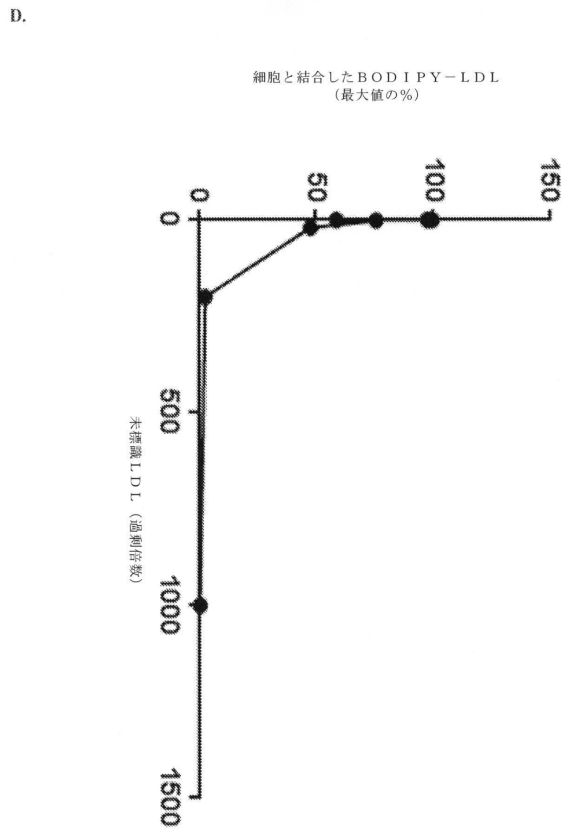
【図６６－２】



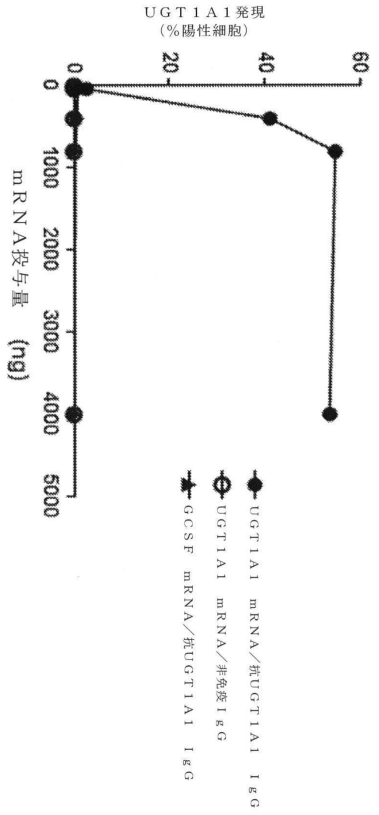
【図６６－３】



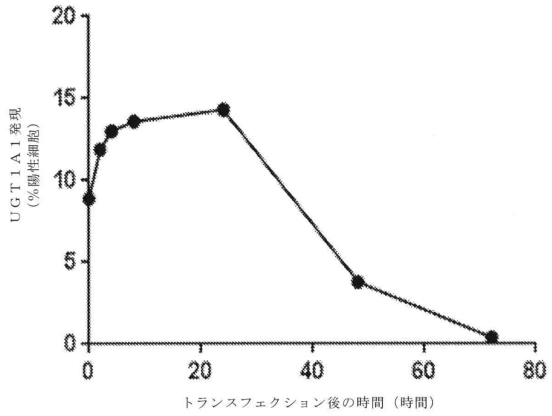
【図６６－４】



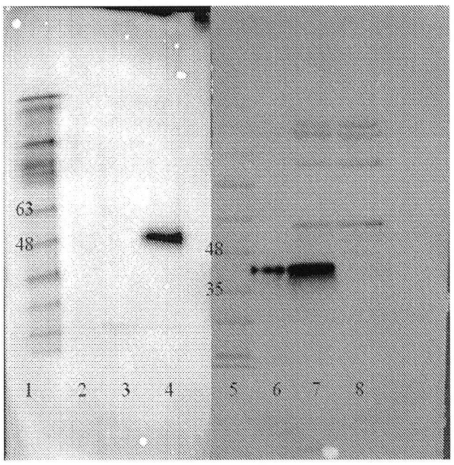
【図６７】



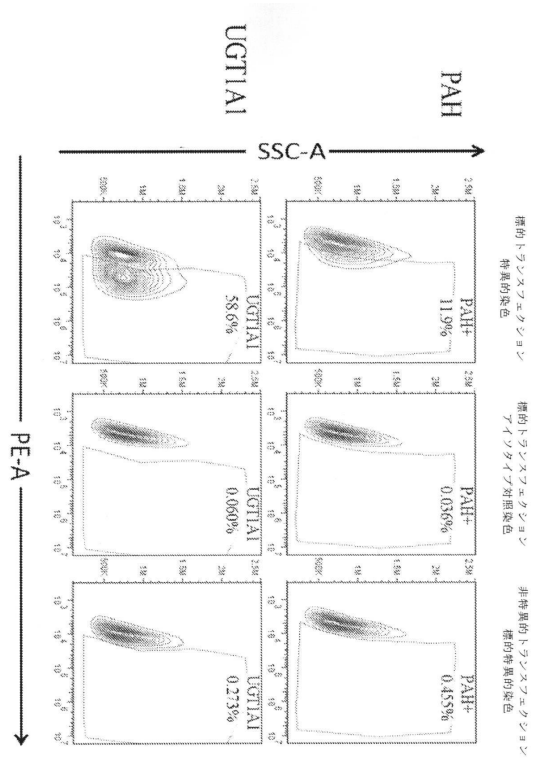
【図６８】



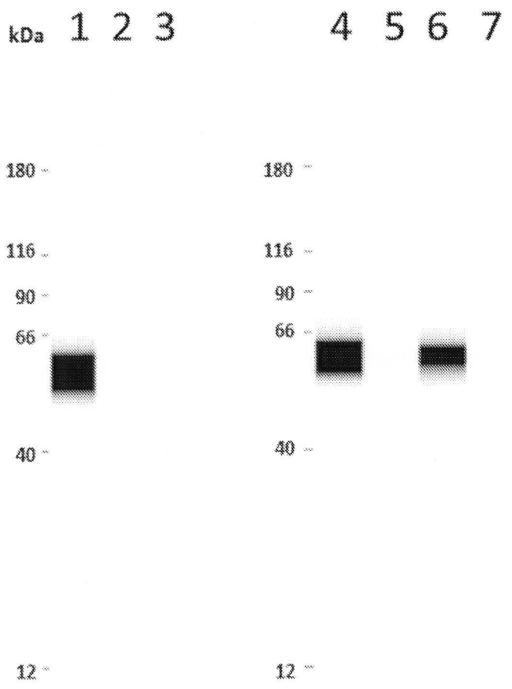
【図６９】



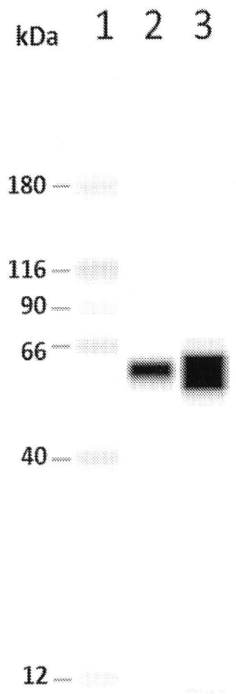
【図７０】


UGT1A1
PAH
SSC-A
PE-A
58.6%
11.9%
0.060%
0.036%
0.273%
0.459%
標的トランスフェクション
特異的染色
標的トランスフェクション
アイソタイプ対照染色
非特異的トランスフェクション
標的特異的染色

【図７１】


kDa
1 2 3
4 5 6 7
180
116
90
66
40
12

【図７２】


kDa
1 2 3 4 5
180
116
90
66
40
12

【配列表】
0006430552000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/618,868
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,870
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,873
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,878
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,885
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,896
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,911
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,922
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,953
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,961
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,957
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/618,945
(32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/648,286
(32)優先日 平成24年5月17日(2012.5.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/648,244
(32)優先日 平成24年5月17日(2012.5.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/668,157
(32)優先日 平成24年7月5日(2012.7.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,648
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/681,675
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,654
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,687
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,696
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,647
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,704
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,720
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,742
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,658
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,649
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,645
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,661
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,712
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,650
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/681,667
(32)優先日 平成24年8月10日(2012.8.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/696,381
(32)優先日 平成24年9月4日(2012.9.4)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/709,303
(32)優先日 平成24年10月3日(2012.10.3)

(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/712,490
(32)優先日　平成24年10月11日(2012.10.11)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,203
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,168
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,213
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,155
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,134
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,139
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,152
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,184
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,160
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,191
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,174
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,135
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,130
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/737,147
(32)優先日　平成24年12月14日(2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(72)発明者　バンセル、ステファヌ
アメリカ合衆国　０２１３９　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　テクノロジー　スクエア　２００

(72)発明者 チャクラボルティ、ティルタ
アメリカ合衆国 ０２１５５ マサチューセッツ州 メドフォード ウォバーン ストリート １５３
(72)発明者 ドゥ フジェローレ、アントニン
ベルギー国 １４１０ ワーテルロー アベニュー ネプテューヌ １５
(72)発明者 エルバシール、セイダ エム.
アメリカ合衆国 ０２１３８ マサチューセッツ州 ケンブリッジ グローブ ストリート １４９
(72)発明者 ジョン、マティアス
アメリカ合衆国 ０２１３９ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ハーバード ストリート ３３８ ナンバー５
(72)発明者 ロイ、アタヌ
アメリカ合衆国 ０２１８０ マサチューセッツ州 ストーンハム ヒル ストリート １１５ ナンバー９
(72)発明者 ホリスキー、スーザン
アメリカ合衆国 ０２４７８ マサチューセッツ州 ベルモント ルイーズ ロード ４７
(72)発明者 ウッド、クリスティ エム.
アメリカ合衆国 ０２１３８ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ヒューロン アベニュー ５０１ ユニット ２
(72)発明者 ハタラ、ポール
アメリカ合衆国 ０２１２４ マサチューセッツ州 チャールズタウン モニュメント ストリート ２６ ナンバー１
(72)発明者 シュラム、ジェイソン ピー.
アメリカ合衆国 １９１２７ ペンシルバニア州 フィラデルフィア フラット ロック ロード ４６０１ アパートメント ４１７
(72)発明者 エジェベ、ケネチ
アメリカ合衆国 １００２９ ニューヨーク州 ニューヨーク イースト ワンハンドレッドアンドファースト ストリート ３ アパートメント ６アイ
(72)発明者 エルスワース、ジェフ リン
アメリカ合衆国 ０２４２０ マサチューセッツ州 レキシントン メリアム ストリート ２３
(72)発明者 ギルド、ジャスティン
アメリカ合衆国 ０１７０１ マサチューセッツ州 フラミンガム エッジェル ロード ４９５

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００８／００２５９４４（ＵＳ，Ａ１）
特表２００７－５０１６１５（ＪＰ，Ａ）
特表２００８－５１３５１３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５０５２５０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１２／０１９１６８（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２００９／００９３４３３（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１１／０７１９３１（WO，Ａ２）
Curr. Opin. Mol. Ther., 2007, Vol. 9, No. 5, pp. 423-431

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）