(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7707080号
(P7707080)

(45)発行日　令和7年7月14日(2025.7.14)

(24)登録日　令和7年7月4日(2025.7.4)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｋ　47/18　(2017.01)	Ａ６１Ｋ	47/18		
Ａ６１Ｋ　47/22　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	47/22		
Ａ６１Ｋ　47/24　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	47/24		

ＦＩ

請求項の数　27　（全54頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-568011(P2021-568011)
(86)(22)出願日　令和2年5月14日(2020.5.14)
(65)公表番号　特表2022-532213(P2022-532213A)
(43)公表日　令和4年7月13日(2022.7.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/032943
(87)国際公開番号　WO2020/232276
(87)国際公開日　令和2年11月19日(2020.11.19)
審査請求日　令和5年5月12日(2023.5.12)
(31)優先権主張番号　62/847,837
(32)優先日　令和1年5月14日(2019.5.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
前置審査

(73)特許権者　517316797
トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１．ウォルサム．ウェスト・ストリート２００
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100216105
弁理士　守安 智
(72)発明者　カーブ， シュリラング
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＭＲＮＡ担持脂質ナノ粒子を調製する改善されたプロセス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入するプロセスであって、

（ａ）脂質溶液中の１つ以上の脂質を、ｍＲＮＡ溶液中の１つ以上のｍＲＮＡと混合して、ＬＮＰ形成溶液中で前記ＬＮＰ内に封入されたｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）を形成するステップであって、ここで、前記脂質溶液および／または前記ｍＲＮＡ溶液は混合前に周囲温度よりも高い第１の温度まで加熱されるステップ；

（ｂ）前記ＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換して、該医薬品製剤溶液中に前記ｍＲＮＡ－ＬＮＰを提供するステップ；および

（ｃ）前記医薬品製剤溶液を周囲温度よりも高い第２の温度まで加熱するステップを含み；

ここで、前記周囲温度よりも高い第１の温度および前記周囲温度よりも高い第２の温度はそれぞれ６０～７０℃の間であり；ならびに

ステップ（ｃ）から生じる前記ｍＲＮＡ－ＬＮＰの封入効率は、ステップ（ｂ）から生じる前記ｍＲＮＡ－ＬＮＰの前記封入効率よりも大きい、

前記プロセス。

【請求項２】

ステップ（ａ）において、前記１つ以上の脂質は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、および１つ以上のＰＥＧ修飾脂質を含む、請求項１に記載のプロセス。

【請求項３】
前記脂質は、１つ以上のコレステロール脂質（例えば、コレステロール）をさらに含む、請求項２に記載のプロセス。
【請求項４】
ステップ（ａ）において、前記１つ以上のカチオン性脂質は、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾール系）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００１、ＨＧＴ４００２、ＨＧＴ４００３、ＨＧＴ４００４、ＨＧＴ４００５、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡ、および、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項２または３に記載のプロセス。
【請求項５】
ステップ（ａ）において、前記１つ以上のヘルパー脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－ｌ－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－トランスＰＥ、ｌ－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項２～４のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項６】
ステップ（ａ）において、前記１つ以上のＰＥＧ修飾脂質は、C_6－C_{20}長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した、長さ最大２ｋＤａ、最大３ｋＤａ、最大４ｋＤａまたは最大５ｋＤａのポリエチレングリコール鎖を含む、請求項２に記載のプロセス。
【請求項７】
請求項１に記載のプロセスであって、前記１つ以上の脂質は：
（ａ）カチオン性脂質、
（ｂ）ヘルパー脂質、
（ｃ）コレステロール系脂質、および
（ｄ）ＰＥＧ修飾脂質、
からなる、前記プロセス。
【請求項８】
請求項７に記載のプロセスであって、前記カチオン性脂質対ヘルパー脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質のモル比は、２０～５０：２５～３５：２０～５０：１～５である、前記プロセス。
【請求項９】
前記脂質溶液の脂質成分が、

（ａ）カチオン性脂質、
（ｂ）ヘルパー脂質、および
（ｃ）ＰＥＧ修飾脂質、
からなる、請求項１～６のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１０】
前記カチオン性脂質が、コレステロール系脂質またはイミダゾール系カチオン性脂質である、請求項９に記載のプロセス。
【請求項１１】
前記カチオン性脂質対ヘルパー脂質対ＰＥＧ修飾脂質のモル比が、５５～６５：３０～４０：１～１５である、請求項９または１０に記載のプロセス。
【請求項１２】
前記ｍＲＮＡはタンパク質またはペプチドをコードする、請求項１～１１のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１３】
ステップ（ｃ）において、前記医薬品製剤溶液が、前記周囲温度よりも高い第２の温度で１０～２０分間維持される、請求項１～１２のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１４】
前記周囲温度よりも高い第１の温度および前記周囲温度よりも高い第２の温度が、それぞれ６５℃である、請求項１～１３のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１５】
ステップ（ｃ）後の前記封入効率が、ステップ（ｂ）後の前記封入効率から少なくとも５％以上改善される、請求項１～１４のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１６】
ステップ（ｃ）後の前記封入効率が、ステップ（ｂ）後の前記封入効率から少なくとも１０％以上改善される、請求項１～１５のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１７】
ステップ（ａ）において、前記脂質溶液が、エタノールに溶解された脂質を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１８】
ステップ（ａ）において、前記ｍＲＮＡ溶液はクエン酸緩衝液に溶解されたｍＲＮＡを含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項１９】
前記医薬品製剤溶液は、凍結保護剤を含む薬学的に許容可能な賦形剤を含む水溶液である、請求項１～１８のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２０】
前記医薬品製剤溶液は、糖を含む水溶液である、請求項１～１９のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２１】
前記糖は、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールのうちの１つ以上からなる群から選択される、請求項２０に記載のプロセス。
【請求項２２】
前記糖はトレハロースを含む、請求項２１に記載のプロセス。
【請求項２３】
ステップ（ｂ）において、前記医薬品製剤溶液は１０重量対体積％のトレハロースを含む水溶液である、請求項１～２２のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２４】
エタノールおよびクエン酸塩の両方が、前記医薬品製剤溶液に存在しない、請求項１～２３のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２５】
前記脂質溶液がエタノールを含み、前記ｍＲＮＡ溶液がクエン酸塩を含み、ならびにエ

タノールおよびクエン酸塩の両方が前記医薬品製剤溶液に存在しない、請求項１～２４のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２６】
前記ｍＲＮＡ溶液が、ｐＨ５．０未満のｐＨを有する、請求項１～２５のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２７】
前記医薬品製剤溶液が、ｐＨ５．０～ｐＨ７．０のｐＨを有する、請求項１～２６のいずれか一項に記載のプロセス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年５月１４日に出願された米国仮特許出願第６２／８４７，８３７号に対する優先権を主張するものであり、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００２】
メッセンジャーＲＮＡ療法（ＭＲＴ）は、多様な疾患の治療に対してますます重要なアプローチとなっている。ＭＲＴは、患者体内でｍＲＮＡによってコードされるタンパク質の産生のために療法を必要とする患者へのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の投与を伴う。脂質ナノ粒子は、一般的に、ｍＲＮＡの効率的なインビボ送達のためにｍＲＮＡを封入するために使用される。
【０００３】
脂質ナノ粒子送達を改善するために、多くの試みは、例えば、様々な種類の哺乳動物組織、器官および／または細胞（例えば、哺乳動物肝細胞）において、ｍＲＮＡの細胞内送達および／または発現に影響し得る新規の脂質または特定の脂質組成物を識別することに焦点を当てている。しかしながら、これらの既存のアプローチは、費用がかかり、時間がかかり、予測不可能である。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本発明は、とりわけ、ｍＲＮＡ担持脂質ナノ粒子（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）を調製するためのさらに改善されたプロセスを提供する。本発明は、脂質溶液中の１つ以上の脂質を、ｍＲＮＡ溶液中の１つ以上のｍＲＮＡと混合して、ＬＮＰ形成溶液中で、ＬＮＰ内に封入されたｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）を形成することを含む、ＬＮＰにメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入するプロセス（例えば、以下でさらに記載されるようなプロセスＡ）後に、医薬品製剤溶液のためにＬＮＰ形成溶液を交換し医薬品製剤溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱するさらなるステップは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰの封入効率、すなわち、ＬＮＰ内に封入されたｍＲＮＡの量またはパーセント（すなわち、封入速度または効率）を顕著に増加させる予想外の利益を提供するという、驚くべき発見に基づく。本発明は、従来的なアプローチと比較して、より高い封入速度または効率を有するｍＲＮＡ－ＬＮＰを製造するのに特に有用である。
【０００５】
従来的なアプローチと比較して、本明細書に記載の本発明のプロセスは、より高い封入効率を提供し、したがって、脂質ナノ粒子送達されたｍＲＮＡのより高い効力およびより良好な有効性を提供し得、それによって治療指数を正方向にシフトさせ、より低いコスト、より良好な患者コンプライアンス、およびより患者にやさしい投与計画などの追加的利点を提供する。本発明によって提供されるｍＲＮＡ担持脂質ナノ粒子製剤は、静脈内、筋肉内、関節内、くも膜下腔内、吸入（呼吸）、皮下、硝子体内、および点眼などの異なる投与経路を介して、より強力かつ有効なタンパク質発現のため、インビボで首尾よく送達

され得る。

【０００６】

本発明のプロセスは、ポンプシステムを使用して実施され得、したがって拡張可能であり、例えば、臨床試験および／または商業販売の実施に十分な量の改善された粒子形成／製剤を可能にする。パルスレスフローポンプ、ギアポンプ、蠕動ポンプ、および遠心ポンプを含むがこれらに限定されない様々なポンプシステムは、本発明を実施するために使用され得る。

【０００７】

本発明のプロセスにより、優れた封入効率および均質な粒子サイズももたらされる。

【０００８】

したがって、一態様では、本発明は、（ａ）脂質溶液中の１つ以上の脂質をｍＲＮＡ溶液中の１つ以上のｍＲＮＡと混合して、ＬＮＰ形成溶液中のＬＮＰ内に封入されたｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）を形成するステップ；（ｂ）ＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換して、医薬品製剤溶液中にｍＲＮＡ－ＬＮＰを提供するステップと、（ｃ）医薬品製剤溶液中でｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱するステップと、を含む、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入するプロセスを提供し、ステップ（ｃ）から生じるｍＲＮＡ－ＬＮＰの封入効率は、ステップ（ｂ）から生じるｍＲＮＡ－ＬＮＰの封入効率よりも大きい。

【０００９】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）において、医薬品製剤溶液は、熱源からの熱を溶液に印加することによって加熱される。

【００１０】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）において、医薬品製剤溶液は、熱源からの熱を溶液に印加することによって加熱され、溶液は、周囲温度よりも高い温度で、５秒以上、１０秒以上、２０秒以上、３０秒以上、４０秒以上、５０秒以上、１分以上、２分以上、３分以上４分以上、５分以上、１０分以上、１５分以上、２０分以上、２５分以上、３０分以上、３５分以上、４０分以上、４５分以上、５０分以上、６０分以上、７０分以上、８０分以上、９０分以上、１００分以上または１２０分以上維持される。いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）において、医薬品製剤溶液は、熱源からの熱を溶液に印加することによって加熱され、溶液は、周囲温度よりも高い温度で、１２０分未満、１００分未満、９０分未満、６０分未満、４５分未満、３０分未満、２５分未満、２０分未満、１５分未満、１０分未満、５分未満、４分未満、３分未満、２分未満、１分未満、５０秒未満、４０秒未満、３０秒未満、２０秒未満、１０秒未満、または５秒未満維持される。いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）において、医薬品製剤溶液は、熱源からの熱を溶液に印加することによって加熱され、溶液は、周囲温度よりも高い温度で１０～２０分間維持される。いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）において、医薬品製剤溶液は、熱源からの熱を溶液に印加することによって加熱され、溶液は、周囲温度よりも高い温度で２０～９０分間維持される。いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）において、医薬品製剤溶液は、熱源からの熱を溶液に印加することによって加熱され、溶液は、周囲温度よりも高い温度で３０～６０分間維持される。いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）において、医薬品製剤溶液は、熱源からの熱を溶液に印加することによって加熱され、溶液は、周囲温度よりも高い温度で約１５分間維持される。いくつかの実施形態では、医薬品製剤が加熱される（または医薬品製剤溶液が維持される）温度は、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、または７０℃以上である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液が加熱される温度は、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃、または約６０～７０℃の範囲である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液が加熱される周囲温度よりも高い温度は、約６５℃である。

【００１１】

いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）において、脂質ナノ粒子は、エタノールを含

む脂質溶液中に溶解した脂質を、ｍＲＮＡ水溶液に溶解したｍＲＮＡと混合することによって形成される。いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）において、１つ以上の脂質は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、および１つ以上のＰＥＧ修飾脂質（ＰＥＧ脂質とも呼ばれる）を含む。いくつかの実施形態では、脂質は、１つ以上のコレステロール脂質も含む。ｍＲＮＡ－ＬＮＰは、脂質溶液およびｍＲＮＡ溶液を混合することによって形成される。したがって、いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、および１つ以上のＰＥＧ脂質を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１つ以上のコレステロール脂質も含む。

【００１２】

いくつかの実施形態では、１つ以上のカチオン性脂質は、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾール系）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００３、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡおよびＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（標的２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（標的２４）、Ｎ１ＧＬ、Ｎ２ＧＬ、Ｖ１ＧＬならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【００１３】

いくつかの実施形態では、１つ以上のカチオン性脂質は、アミノ脂質である。本発明における使用に適したアミノ脂質は、ＷＯ２０１７１８０９１７に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１７１８０９１７における例示的なアミノ脂質は、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３，１６－ジエン－１－アミン（Ｌ６０８）、および化合物１８などの段落［０７４４］に記載されるものを含む。他のアミノ脂質は、化合物２、化合物２３、化合物２７、化合物１０、および化合物２０を含む。本発明における使用に適したさらなるアミノ脂質は、ＷＯ２０１７１１２８６５に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１７１１２８６５における例示的なアミノ脂質は、式（Ｉ）、（Ｉａｌ）－（Ｉａ６）、（Ｉｂ）、（ＩＩ）、（Ｉｌａ）、（ＩＩＩ）、（Ｉｌｉａ）、（ＩＶ）、（１７－１）、（１９－１）、（１９－１１）、および（２０－１）のうちの１つに従う化合物と、段落［００１８５］、［００２０１］、［０２７６］の化合物とを含む。いくつかの実施形態では、本発明における使用に適したカチオン性脂質は、ＷＯ２０１６１１８７２５に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１６１１８７２５における例示的なカチオン性脂質は、ＫＬ２２およびＫＬ２５などのものを含む。いくつかの実施形態では、本発明における使用に適したカチオン性脂質は、ＷＯ２０１６１１８７２４に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１６１１８７２５における例示的なカチオン性脂質は、ＫＬ１０、１，２－ジリノレイルオキシ（ｄｉｌｉｎｏｌｅｙｌｏｘｙ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、およびＫＬ２５などのものを含む。

【００１４】

いくつかの実施形態では、１つ以上の非カチオン性脂質は、ＤＳＰＣ（１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＯＰＥ（１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＯＰＣ（１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホチジルコリン）、ＤＰＰＥ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＭＰＥ（１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホ

スホエタノールアミン）、ＤＯＰＧ（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール））から選択される。

【００１５】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＰＥＧ修飾脂質は、C_6－C_{20}長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した、長さ最大５ｋＤａのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む。

【００１６】

いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）の後に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰは、接線流ろ過（ＴＦＦ）プロセスによって精製される。いくつかの実施形態では、精製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％は、約１５０ｎｍ未満（例えば、約１４５ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１３５ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１２５ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１００ｎｍ、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの実質的にすべては、１５０ｎｍ未満（例えば、約１４５ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１３５ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１２５ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１００ｎｍ、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、約８０ｎｍ、約７５ｎｍ、約７０ｎｍ、約６５ｎｍ、約６０ｎｍ、約５５ｎｍ、または約５０ｎｍ未満）のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％より多くは、５０～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの実質的にすべては、５０～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％より多くは、８０～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製されたナノ粒子の実質的にすべては、８０～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する。

【００１７】

いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入効率よりも少なくとも５％以上改善されるステップ（ｃ）後の封入効率をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入効率よりも少なくとも１０％以上改善されるステップ（ｃ）後の封入効率をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入効率よりも少なくとも１５％以上改善されるステップ（ｃ）後の封入効率をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入効率よりも少なくとも２０％以上改善されるステップ（ｃ）後の封入効率をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入効率よりも少なくとも２５％以上改善されるステップ（ｃ）後の封入効率をもたらす。

【００１８】

いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入からステップ（ｃ）後の封入まで、封入量を５％封入以上改善する。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入からステップ（ｃ）後の封入まで、封入量を１０％封入以上改善する。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入からステップ（ｃ）後の封入まで、封入量を１５％封入改善する。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入からステップ（ｃ）後の封入まで、封入量を２０％封入改善する。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｂ）後の封入からステップ（ｃ）後の封入まで、封入量を２５％封入改善する。

【００１９】

いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｃ）の後に、ｍＲＮＡの６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％

、９８％、または９９％を超える回収をもたらす。
【００２０】
いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、約９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超えるステップ（ｃ）後の封入率をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ステップ（ｃ）の後に、ｍＲＮＡの６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超える回収をもたらす。
【００２１】
いくつかの実施形態では、脂質溶液およびｍＲＮＡ溶液は、ポンプシステムを使用して混合される。いくつかの実施形態では、ポンプシステムは、パルスレスフローポンプを含む。いくつかの実施形態では、ポンプシステムは、ギアポンプである。いくつかの実施形態では、好適なポンプは、蠕動ポンプである。いくつかの実施形態では、好適なポンプは、遠心ポンプである。いくつかの実施形態では、ポンプシステムを使用するプロセスは、大規模で実施される。例えば、いくつかの実施形態では、プロセスは、本明細書に記載されるポンプを使用して、少なくとも約１ｍｇ、５ｍｇ、１０ｍｇ、５０ｍｇ、１００ｍｇ、５００ｍｇ、または１０００ｍｇのｍＲＮＡの溶液を、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、および１つ以上のＰＥＧ修飾脂質を含む脂質溶液と混合することを含む。いくつかの実施形態では、脂質溶液およびｍＲＮＡを混合するプロセスは、ステップ（ｃ）後に少なくとも約１ｍｇ、５ｍｇ、１０ｍｇ、５０ｍｇ、１００ｍｇ、５００ｍｇ、または１０００ｍｇの封入されたｍＲＮＡを含有する本発明に従う組成物を提供する。
【００２２】
いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流量で混合される。
【００２３】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流量で混合される。
【００２４】
いくつかの実施形態では、脂質溶液は、有機溶媒などの非水性溶媒を含む。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、アルコールを含む。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、エタノールを含む。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、最初に脂質溶液にそれまたは脂質を溶解するステップを含む。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、最初にエタノールを含む脂質溶液にそれまたは脂質を溶解するステップを含む。
【００２５】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、水溶液である。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、クエン酸塩を含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、クエ

ン酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、最初に水溶液にｍＲＮＡを溶解するステップを含む。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、最初にクエン酸塩を含む水溶液にｍＲＮＡを溶解するステップを含む。

【００２６】

いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、エタノール中に脂質を含む脂質溶液をクエン酸緩衝液に溶解したｍＲＮＡを含むｍＲＮＡ緩衝液と混合するステップを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰ形成溶液は、エタノールおよびクエン酸塩を含む。

【００２７】

いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、クエン酸緩衝液をｍＲＮＡストック溶液と混合することによってｍＲＮＡ溶液を最初に生成するステップを含む。ある特定の実施形態では、好適なクエン酸緩衝液は、約１０Ｍｍのクエン酸塩、約１５０ＭｍのＮａＣｌ、約４．５のｐＨを含む。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡストック溶液は、約１ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ、または約１００ｍｇ／ｍｌ以上の濃度でｍＲＮＡを含有する。

【００２８】

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

【００２９】

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

【００３０】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、凍結保護剤を含むがこれに限定されない、薬学的に許容可能な賦形剤を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、糖を含むがこれらに限定されない、薬学的に許容可能な賦形剤を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールのうちの１つ以上を含むがこれらに限定されない、薬学的に許容可能な賦形剤を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、トレハロースを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、スクロースを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、マンノースを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、ラクトースを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、マンニトールを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％の、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールなどの糖を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のトレハロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のスクロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のマンノースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、５重

量対体積％～２０重量対体積％のラクトースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のマンニトールを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％の、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールなどの糖を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のトレハロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のスクロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のマンノースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のラクトースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）において、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のマンニトールを含む水溶液である。

【００３１】

いくつかの実施形態では、エタノールなどの非水性溶媒およびクエン酸塩の一方または両方は、医薬品製剤溶液に存在しない（すなわち、検出可能なレベルを下回る）。いくつかの実施形態では、クエン酸塩は、医薬品製剤溶液に存在しない（すなわち、検出可能なレベルを下回る）。いくつかの実施形態では、エタノールは、医薬品製剤溶液に存在しない（すなわち、検出可能なレベルを下回る）。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、エタノールを含むが、クエン酸塩を含まない（すなわち、検出可能なレベルを下回る）。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、クエン酸塩を含むが、エタノールを含まない（すなわち、検出可能なレベルを下回る）。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、残留クエン酸塩のみを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、エタノールなどの残留非水性溶媒のみを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、１０ｍＭ未満（例えば、約９ｍＭ、約８ｍＭ、約７ｍＭ、約６ｍＭ、約５ｍＭ、約４ｍＭ、約３ｍＭ、約２ｍＭ、または約１ｍＭ未満）のクエン酸塩を含有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、約２５％未満（例えば、約２０％、約１５％、約１０％、約５％、約４％、約３％、約２％、または約１％未満）の、エタノールなどの非水性溶媒を含有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、凍結乾燥前のいかなるさらなる下流処理（例えば、緩衝液交換および／またはさらなる精製ステップ）も必要としない。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、対象への投与前のいかなるさらなる下流処理（例えば、緩衝液交換および／またはさらなる精製ステップ）も必要としない。

【００３２】

いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ４．５～ｐＨ７．５のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．０～ｐＨ７．０のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．５～ｐＨ７．０のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ４．５よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．０よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．５よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ６．０よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ６．５よりも高いｐＨを有する。

【００３３】

いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上の修飾されたヌクレオチドを含むｍＲＮＡを封入するために使用される。いくつかの実施形態では、１つ以上のヌクレオチドは、プソイドウリジンへと修飾される。いくつかの実施形態では、１つ以上のヌクレオチドは、５－メチルシチジンへと修飾される。いくつかの実施形態では、本発明は、修飾されていないｍＲＮＡを封入するために使用される。

【００３４】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるプロセスによって生成されたｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子の組成物を対象中に投与することを含む、インビボタンパク質生成のためにｍＲＮＡを送達する方法を提供し、ｍＲＮＡは、目的の１つ以上の

タンパク質またはペプチドをコードする。

【００３５】

本出願において、「または」の使用は、別段明記されない限り、「および／または」を意味する。本開示において使用される場合、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、ならびに「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」などの用語の変化形は、他の添加物、成分、整数、またはステップを除外することを意図するものではない。本出願において使用される場合、用語「約」および「およそ」は、等価物として使用される。両方の用語は、当業者によって理解される任意の通常のゆらぎを網羅することを意味する。

【００３６】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、以下の発明を実施するための形態、図面、および特許請求の範囲において明らかになる。しかしながら、以下の発明を実施するための形態、図面、および特許請求の範囲は、本発明の実施形態を示すが、限定でなく、単に例示によって与えられるものであることを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更および修正は、当業者には明らかになるであろう。

【００３７】

図面は、例示の目的のみのためであり、限定のためではない。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１】ＬＮＰ形成溶液中でｍＲＮＡ－ＬＮＰを生成するためにポンプシステムを使用して脂質溶液に溶解された脂質とｍＲＮＡ水溶液に溶解されたｍＲＮＡを混合し、次いで、ＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換することを伴う、従来的なＬＮＰ－ｍＲＮＡ封入プロセス（プロセスＡ）の概略図を示す。

【図２】ＬＮＰ形成溶液中でｍＲＮＡ－ＬＮＰを生成するためにポンプシステムを使用して脂質溶液に溶解された脂質とｍＲＮＡ水溶液に溶解されたｍＲＮＡを混合し、次いで、ＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換し、次いで、ＬＮＰ中のｍＲＮＡの封入を増加させるために医薬品製剤溶液を加熱することを伴う、本発明の例示的なＬＮＰ－ｍＲＮＡ封入プロセスの概略図を示す。

【図３】試験された１２の異なるｍＲＮＡ－ＬＮＰについて、医薬品製剤溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱する最終ステップの前および後の封入における差異を示す。

【図４】試験された１３の異なるｍＲＮＡ－ＬＮＰについて、医薬品製剤溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱する最終ステップの前および後の封入における差異を示す。

【図５】加熱ステップ後にプロセスＡによって調製された脂質ナノ粒子に封入されたｍＲＮＡの肺投与後のタンパク質発現の例示的なグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

定義

本発明がより容易に理解されるように、ある特定の用語が以下で最初に定義される。以下の用語および他の用語に対する追加の定義は、明細書全体を通して記述される。

【００４０】

アルキル：本明細書において使用される場合、「アルキル」は、１～２０個の炭素原子を有する直鎖状または分枝状の飽和炭化水素基のラジカル（「C_{1-20}アルキル」）を指す。いくつかの実施形態では、アルキル基は、１～３個の炭素原子を有する（「C_{1-3}アルキル」）。C_{1-3}アルキル基の例としては、メチル（C_1）、エチル（（C_2））、ｎ－プロピル（C_3）、およびイソプロピル（C_3）が挙げられる。いくつかの実施形態では、アルキル基は、８～１２個の炭素原子を有する（C_{8-12}アルキル）。C_{8-12}アルキル基の例としては、限定なく、ｎ－オクチル（C_8）、ｎ－ノニル（C_9）、ｎ－デシル（C_{10}）、ｎ－ウンデシル（C_{11}）、ｎ－ドデシル（C_{12}）などが挙げられる。接頭辞の“ｎ－”（直鎖状）は、非分枝状アルキル基を指す。例えば、ｎ－C_8アルキルは－（CH_2）$_7CH_3$を指し、ｎ－C_{10}アルキルは、－（CH_2）$_9CH_3$などを指す。

【００４１】
アミノ酸：本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸」は、その最も広い意味で、ポリペプチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物および／または物質を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造$H_2N-C(H)(R)-COOH$を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然に生じるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は合成アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸はｄ－アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸はｌ－アミノ酸である。「標準アミノ酸」は、天然に生じるペプチドに一般的に見られる標準ｌ－アミノ酸のうちのいずれかを指す。「非標準アミノ酸」は、合成的に調製されるか天然源から得られるかにかかわらず、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す。本明細書で使用される場合、「合成アミノ酸」は、塩、アミノ酸誘導体（アミドなど）、および／または置換を含むがこれらに限定されない化学修飾されたアミノ酸を包含する。ペプチド中のカルボキシ末端アミノ酸および／またはアミノ末端アミノ酸を含むアミノ酸は、メチル化、アミド化、アセチル化、保護基、および／またはそれらの活性に悪影響を及ぼすことなくペプチドの循環半減期を変化させることができる他の化学基との置換によって修飾され得る。アミノ酸は、ジスルフィド結合に関与し得る。アミノ酸は、１つ以上の化学的実体（例えば、メチル基、酢酸基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ビオチン部分など）との会合などの１つまたは翻訳後修飾を含み得る。用語「アミノ酸」は、「アミノ酸残基」と互換的に使用され、遊離アミノ酸および／またはペプチドのアミノ酸残基を指し得る。この用語が遊離アミノ酸を指すか、ペプチドの残基を指すかは、それが使用される文脈から明らかになるであろう。

【００４２】
動物：本明細書で使用される場合、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発育段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発育段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、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、および／またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物は、哺乳動物、鳥、爬虫類、両生類、魚、昆虫、および／または寄生虫を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、および／またはクローンであり得る。

【００４３】
およそまたは約：本明細書で使用される場合、目的の１つ以上の値に適用される用語「およそ」または「約」は、明記された参照値と同様である値を指す。ある特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、別段明記されない限り、または文脈から別段明らかでない限り（このような数が可能値の１００％を超える場合を除く）、明記された参照値のいずれかの方向（より大きいかまたは小さい）で、２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ未満の値の範囲を指す。

【００４４】
送達：本明細書で使用される場合、用語「送達」は、局所送達および全身送達の両方を包含する。例えば、ｍＲＮＡの送達は、ｍＲＮＡが標的組織に送達され、コードされたタンパク質またはペプチドが、発現され、標的組織内で保持される状況（「局所分布」もしくは「局所送達」とも称される）、およびｍＲＮＡが標的組織に送達され、コードされたタンパク質またはペプチドが、発現され、患者の循環系（例えば、血清）に分泌され、全身に分配され、他の組織によって取り込まれる状況（「全身分布」または「全身送達」とも称される）を包含する。

【００４５】
有効性：本明細書で使用される場合、用語「有効性」または文法的等価物は、関連するタンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡの送達に関連する、生物学的に関連するエンドポイントの改善を指す。いくつかの実施形態では、生物学的エンドポイントは、投

与後のある特定の時点での塩化アンモニウム負荷に対する保護である。
【００４６】
封入：本明細書で使用される場合、用語「封入」または文法的等価物は、ナノ粒子内に個々のｍＲＮＡ分子を閉じ込めるプロセスを指す。
【００４７】
発現：本明細書で使用される場合、ｍＲＮＡの「発現」は、ペプチド（例えば、抗原）、ポリペプチド、またはタンパク質（例えば、酵素）へのｍＲＮＡの翻訳を指し、また文脈によって示されるように、ペプチド、ポリペプチド、または完全に組み立てられたタンパク質（例えば、酵素）の翻訳後修飾も含み得る。本出願では、用語「発現」および「産生」、ならびに文法的等価物は、互換的に使用される。
【００４８】
改善する、増加する、または低減する：本明細書で使用される場合、用語「改善する」、「増加する」、もしくは「低減する」、または文法的等価物は、本明細書に記載される治療の開始前の同じ個体における測定値、または本明細書に記載される治療が存在しない対照試料もしくは対象（または複数の対照試料もしくは対象）における測定値などの、ベースラインの測定値に対する値を示す。「対照試料」は、試験物品を除き、試験試料と同じ条件に供された試料である。「対照対象」は、治療されている対象と同じ疾患形態に罹患しており、治療されている対象とほぼ同じ年齢である対象である。
【００４９】
不純物：本明細書で使用される場合、用語「不純物」は、限定された量の液体、気体、または固体内の物質を指し、これは標的物質または化合物の化学組成とは異なる。不純物は、混入物とも呼ばれる。
【００５０】
インビトロ：本明細書で使用される場合、用語「インビトロ」は、多細胞生物内というよりむしろ、人工環境下で、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養下などで生じる事象を指す。
【００５１】
インビボ：本明細書で使用される場合、用語「インビボ」は、ヒトおよび非ヒト動物などの多細胞生物内で生じる事象を指す。細胞ベースの系の文脈では、この用語は、（例えば、インビトロ系とは対照的に）生きている細胞内で生じる事象を指すために使用され得る。
【００５２】
単離された：本明細書で使用される場合、用語「単離された」は、（１）（自然界および／または実験的環境にかかわらず）最初に産生されたときに会合していた成分のうちの少なくともいくつかから分離しており、かつ／または（２）人工的に産生、調製、および／もしくは製造された物質および／または実体を指す。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していた他の成分の約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％超から分離され得る。いくつかの実施形態では、単離された薬剤は、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％超純粋である。本明細書で使用される場合、物質は、他の成分を実質的に含まない場合、「純粋」である。本明細書で使用される場合、単離された物質および／または実体の純度パーセントの計算は、賦形剤（例えば、緩衝液、溶媒、水など）を含むべきではない。
【００５３】
局所分布または局所送達：本明細書において使用される場合、用語「局所分布」、「局所送達」、または文法的等価物は、組織特異的な送達または分布を指す。典型的には、局所分布または局所送達は、ｍＲＮＡによってコードされるペプチドまたはタンパク質（例えば、酵素）が、細胞内でまたは患者の循環系への侵入を回避する限定された分泌物と共

に、翻訳および発現されることを必要とする。

【００５４】

メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）：本明細書で使用される場合、用語「メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）」は、少なくとも１つのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを指す。本明細書で使用されるｍＲＮＡは、修飾されたＲＮＡおよび修飾されていないＲＮＡの両方を包含する。ｍＲＮＡは、１つ以上のコード領域および非コード領域を含み得る。ｍＲＮＡは、天然供給源から精製されてもよく、組換え発現系を使用して産生されてもよく、任意選択的に精製、化学合成などをされてもよい。必要に応じて、例えば、化学的に合成された分子の場合、ｍＲＮＡは、化学修飾された塩基または糖、骨格修飾などを有する類似体などのヌクレオシド類似体を含み得る。ｍＲＮＡ配列は、別段指示されない限り、５’から３’の方向に提示される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン）、ヌクレオシド類似体（例えば、２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロ－ピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、Ｃ－５プロピニル－シチジン、Ｃ－５プロピニル－ウリジン、２－アミノアデノシン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニル－ウリジン、Ｃ５－プロピニル－シチジン、Ｃ５－メチルシチジン、２－アミノアデノシン、７－デアザアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソアデノシン、８－オキソグアノシン、Ｏ（６）－メチルグアニン、２－チオシチジン、プソイドウリジン、および５－メチルシチジン）、化学修飾された塩基、生物学的に修飾された塩基（例えば、メチル化塩基）、介在塩基（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｅｄ　ｂａｓｅ）、修飾された糖（例えば、２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）、および／もしくは修飾されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエートおよび５’－Ｎ－ホスホルアミダイト結合）であるか、またはそれを含む。

【００５５】

核酸：本明細書で使用される場合、用語「核酸」は、その最も広範な意味で、ポリヌクレオチド鎖に組み込まれるか、もしくは組み込まれ得る任意の化合物および／または物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を介してポリヌクレオチド鎖に組み込まれるか、もしくは組み込まれ得る化合物および／または物質である。いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオシド）を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むポリヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、ＲＮＡ、同様に一本鎖および／または二本鎖のＤＮＡおよび／またはｃＤＮＡを包含する。さらに、用語「核酸」、「ＤＮＡ」、「ＲＮＡ」、および／または類似の用語は、核酸類似体、すなわち、ホスホジエステル骨格以外を有する類似体を含む。

【００５６】

患者：本明細書で使用される場合、「患者」または「対象」という用語は、例えば、実験、診断、予防、美容、および／または治療目的のために、提供される組成物が投与され得る任意の生物を指す。典型的な患者は、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、および／またはヒトなどの哺乳動物）を含む。いくつかの実施形態では、患者は、ヒトである。ヒトは、出生前形態および出生後形態を含む。

【００５７】

医薬的に許容可能な：本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容可能な」は、妥当な医学的判断の範囲内で、過度な毒性、炎症刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴うことなく、合理的なベネフィット／リスクの比率に相応して、ヒトおよび動物の組織に接触させた使用に適した物質を指す。

【００５８】

薬学的に許容可能な塩：薬学的に許容可能な塩は、当該技術分野で周知である。例えば、Ｓ．Ｍ．Ｂｅｒｇｅらは、薬学的に許容可能な塩を、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９７７）６６：１－１９において詳細に記載している。本発明

の化合物の薬学的に許容可能な塩は、好適な無機酸および有機酸ならびに無機塩基および有機塩基に由来するものを含む。薬学的に許容可能な非毒性酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、および過塩素酸などの無機酸と形成されるか、または酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、もしくはマロン酸などの有機酸と形成されるか、またはイオン交換などの当該技術分野で使用される他の方法を使用して形成された、アミノ基の塩である。他の薬学的に許容可能な塩は、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、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、２－ヒドロキシ－エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、３－フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などを含む。適切な塩基に由来する塩は、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、およびN^+（C_{1-4}アルキル）$_4$塩を含む。代表的なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。さらなる薬学的に許容可能な塩は、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、スルホン酸塩、およびアリールスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成された非毒性アンモニウムカチオン、四級アンモニウムカチオン、およびアミンカチオンを含む。さらなる薬学的に許容可能な塩は、適切な求電子剤、例えば、四級化アルキル化アミノ塩を形成するためのハロゲン化アルキルを使用して、アミンの四級化から形成された塩を含む。

【００５９】

効力：本明細書で使用される場合、用語「効力」または文法的等価物は、ｍＲＮＡがコードするタンパク質もしくはペプチドの発現、および／または得られた生物学的効果を指す。

【００６０】

塩：本明細書で使用される場合、用語「塩」は、酸と塩基との間の中和反応から生じるか、または生じ得るイオン化合物を指す。

【００６１】

全身分布または全身送達：本明細書で使用される場合、用語「全身分布」、「全身送達」、または文法的等価物は、全身または生物全体に影響する送達または分布機構またはアプローチを指す。典型的には、全身分布または全身送達は、身体の循環系、例えば、血流を介して成し遂げられる。「局所分布または送達」の定義と比較される。

【００６２】

対象：本明細書で使用される際に、用語「対象」は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または霊長類）を指す。ヒトは、出生前形態および出生後形態を含む。多くの実施形態では、対象は、ヒトである。対象は、疾患の診断または治療のために医療提供者に受診するヒトを指す、患者であり得る。用語「対象」は、本明細書では「個体」または「患者」と互換的に使用される。対象は、疾患または障害に罹患し得るか、またはそれに罹り易いが、疾患または障害の症状を呈する場合も呈さない場合もある。

【００６３】

実質的に：本明細書で使用される場合、用語「実質的に」は、目的の特徴または特性のすべてまたはほぼすべての範囲または程度を呈する質的状態を指す。生物学技術分野の当業者であれば、生物学的および化学的現象が、完了すること、および／または完了に至ること、または絶対的結果を達成もしくは回避することが、仮にあったとしても稀であるこ

とを、理解するであろう。したがって、用語「実質的に」は、多くの生物学的および化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如を捕捉するために本明細書で使用される。

【００６４】

標的組織：本明細書で使用される場合、用語「標的組織」は、治療される疾患によって影響される任意の組織を指す。いくつかの実施形態では、標的組織は、疾患に関連する病態、症状、または特徴を呈するこれらの組織を含む。

【００６５】

治療すること：本明細書で使用される場合、用語「治療する」、「治療」、または「治療すること」は、特定の疾患、障害、および／もしくは状態の１つ以上の症状もしくは特徴を部分的にまたは完全に緩和する、改善する、軽減する、抑制する、予防する、その発症を遅延させる、その重症度を低減する、ならびに／またはその発生率を低減するために使用される任意の方法を指す。治療は、疾患の兆候を呈せず、かつ／または疾患の初期の兆候のみを呈する対象に、その疾患に関連する病態を発症させるリスクを減少させる目的のために投与され得る。

【００６６】

収率：本明細書で使用される場合、用語「収率」は、開始材料としての総ｍＲＮＡと比較して、封入後に回収されたｍＲＮＡのパーセンテージを指す。いくつかの実施形態では、用語「回収」は、用語「収率」と互換的に使用される。

【００６７】

本発明は、脂質ナノ粒子製剤およびｍＲＮＡ封入のための改善されたプロセスを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、（ａ）脂質溶液中の１つ以上の脂質をｍＲＮＡ溶液中の１つ以上のｍＲＮＡと混合して、ＬＮＰ形成溶液中のＬＮＰ内に封入されたｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）を形成するステップ；（ｂ）ＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換して、医薬品製剤溶液中にｍＲＮＡ－ＬＮＰを提供するステップと、（ｃ）医薬品製剤溶液中でｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱するステップと、を含む、脂質ナノ粒子にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入するプロセスを提供する。驚くべきことに、このプロセスにおけるステップ（ｃ）の含有は、ステップ（ｂ）後の同じｍＲＮＡ－ＬＮＰの封入と比較して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰの顕著により高い封入を提供することが見出された。

【００６８】

いくつかの実施形態では、新規製剤プロセスは、医薬品製剤溶液中でｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱する追加のステップ（ステップ（ｃ））なく調整された同じｍＲＮＡ製剤と比較して、潜在的により良好な忍容性を有する、インビトロおよびインビボの両方でより高い効力（ペプチドまたはタンパク質の発現）とより高い有効性（生物学的に関連性のあるエンドポイントの改善）とを有するｍＲＮＡ製剤をもたらす。このような製剤のより高い効力および／または有効性は、医薬品のより低い用量および／またはより少ない頻度の投与を提供し得る。いくつかの実施形態では、本発明は、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、およびＰＥＧ修飾脂質を含む、改善された脂質製剤を特徴とする。

【００６９】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）後のｍＲＮＡ－ＬＮＰに対する結果として生じた封入は、ステップ（ｂ）後の同じｍＲＮＡ－ＬＮＰに対する封入効率に対して１０％以上増加する。いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）後のｍＲＮＡ－ＬＮＰに対する結果として生じた封入パーセントは、ステップ（ｂ）後の同じｍＲＮＡ－ＬＮＰに対する封入パーセントよりも５パーセンテージ以上増加する。核酸の送達のため、高い封入効率を達成することは、薬物物質の保護を達成し、インビボでの活性の喪失を低減するために重要である。

【００７０】

本発明の様々な態様は、以下のセクションで詳細に記載される。セクションの使用は、本発明を限定することを意味しない。各セクションは、本発明の任意の態様に適用することができる。

【００７１】

メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）
本発明は、任意のｍＲＮＡを封入するために使用され得る。ｍＲＮＡは、ＤＮＡからリボソームに情報を運ぶＲＮＡのタイプと一般的に考えられる。典型的には、真核生物において、ｍＲＮＡプロセシングは、５’末端に「キャップ」を付加すること、および３’末端の「尾部」に不可することを含む。典型的なキャップは、７－メチルグアノシンキャップであり、これは最初に転写されたヌクレオチドに結合した５’－５’－三リン酸塩を介して連結されたグアノシンである。キャップの存在は、大半の真核細胞に見られるヌクレアーゼへの耐性を提供するのに重要である。尾部の付加は、典型的にはポリアデニル化現象であり、これによりポリアデニリル（ｐｏｌｙａｄｅｎｙｌｙｌ）部分がｍＲＮＡ分子の３’末端に加えられる。この「尾部」の存在は、エキソヌクレアーゼ分解からｍＲＮＡを保護するのに役立つ。メッセンジャーＲＮＡは、タンパク質を構成する一連のアミノ酸にリボソームによって翻訳される。

【００７２】
ｍＲＮＡは、多様な公知の方法のうちのいずれかに従い合成することができる。例えば、本発明によるｍＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）を介して合成され得る。簡潔には、ＩＶＴは、典型的には、プロモーター、リボヌクレオチド三リン酸のプール、ＤＴＴおよびマグネシウムイオンを含み得る緩衝系、ならびに適切なＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ３、Ｔ７、またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ）、ＤＮＡｓｅ　Ｉ、ピロホスファターゼ、および／またはＲＮＡｓｅ阻害剤を含む線状または環状ＤＮＡ鋳型を用いて行われる。厳密な条件は具体的な用途に従い変化するであろう。

【００７３】
いくつかの実施形態では、インビトロで合成されたｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ合成中に使用された様々な酵素および他の試薬を含む望ましくない不純物を除去するために製剤および封入前に精製され得る。

【００７４】
本発明は、多様な長さのｍＲＮＡを製剤および封入するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本発明を使用して、長さ約１ｋｂ、１．５ｋｂ、２ｋｂ、２．５ｋｂ、３ｋｂ、３．５ｋｂ、４ｋｂ、４．５ｋｂ、５ｋｂ　６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、または２０ｋｂより長いインビトロで合成されたｍＲＮＡが製剤および封入され得る。いくつかの実施形態では、本発明を使用して、長さ約１～２０ｋｂ、約１～１５ｋｂ、約１～１０ｋｂ、約５～２０ｋｂ、約５～１５ｋｂ、約５～１２ｋｂ、約５～１０ｋｂ、約８～２０ｋｂ、または約８～１５ｋｂの範囲のインビトロで合成されたｍＲＮＡが製剤および封入され得る。

【００７５】
本発明は、修飾されていないｍＲＮＡ、または典型的に安定性を強化する１つ以上の修飾を含むｍＲＮＡを製剤および封入するために使用され得る。いくつかの実施形態では、修飾は、修飾ヌクレオチド、修飾糖リン酸塩骨格、ならびに５’および／または３’非翻訳領域から選択される。

【００７６】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡの修飾は、ＲＮＡのヌクレオチドの修飾を含み得る。本発明による修飾されたｍＲＮＡは、例えば、骨格修飾、糖修飾、または塩基修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、プリン類（アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ））もしくはピリミジン類（チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）、ウラシル（Ｕ））を含むがこれらに限定されない、天然に生じるヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド類似体（修飾ヌクレオチド）から合成されてもよく、例えば、１－メチルアデニン、２－メチルアデニン、２－メチルチオ－Ｎ－６－イソペンテニル－アデニン、Ｎ６－メチル－アデニン、Ｎ６－イソペンテニル－アデニン、２－チオ－シトシン、３－メチル－シトシン、４－アセチル－シトシン、５－メチル－シトシン、２，６－ジアミノプリン、１－メチル－グアニン、２－メチル－グアニン、２，２－ジメチル－グアニン、７－メチル－グアニン、イノシン、１－メチル－イノシン、プソイドウラシル（５－ウラシル）、ジヒドロ－ウ

ラシル、２－チオ－ウラシル、４－チオ－ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオ－ウラシル、５－（カルボキシヒドロキシメチル）－ウラシル、５－フルオロ－ウラシル、５－ブロモ－ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－ウラシル、５－メチル－２－チオ－ウラシル、５－メチル－ウラシル、Ｎ－ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、５－メチルアミノメチル－ウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオ－ウラシル、５’－メトキシカルボニルメチル－ウラシル、５－メトキシ－ウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、１－メチル－プソイドウラシル、キューオシン、ベーター－Ｄ－マンノシル－キューオシン、ワイブトキソシン（ｗｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、ならびにホスホロアミデート、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート、７－デアザグアノシン、５－メチルシトシン、プソイドウリジン、５－メチルシチジンおよびイノシンなどのプリン類ならびにピリミジン類の修飾ヌクレオチド類似体または誘導体として合成されてもよい。このような類似体の調製は、例えば、米国特許第４，３７３，０７１号、米国特許第４，４０１，７９６号、米国特許第４，４１５，７３２号、米国特許第４，４５８，０６６号、米国特許第４，５００，７０７号、米国特許第４，６６８，７７７号、米国特許第４，９７３，６７９号、米国特許第５，０４７，５２４号、米国特許第５，１３２，４１８号、米国特許第５，１５３，３１９号、米国特許第５，２６２，５３０号、および同第５，７００，６４２号（その開示は参照によりその全範囲において本明細書に含まれる）から、当業者に公知である。

【００７７】

典型的には、ｍＲＮＡ合成は、５’末端への「キャップ」および３’末端への「尾部」の付加を含む。キャップの存在は、大半の真核細胞に見られるヌクレアーゼへの耐性を提供するのに重要である。「尾部」の存在は、ｍＲＮＡをエキソヌクレアーゼ分解から保護する役割を果たす。

【００７８】

したがって、いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、５’キャップ構造を含む。５’キャップは、典型的には、以下のように付加される：最初に、ＲＮＡ末端ホスファターゼが５’ヌクレオチドから末端リン酸基のうちの１つを除去して２つの末端リン酸を残し、次いで、グアノシン三リン酸（ＧＴＰ）がグアニリルトランスフェラーゼを介して末端リン酸に付加されて、５’５’５三リン酸結合をもたらし、次いで、グアニンの７－窒素がメチルトランスフェラーゼによってメチル化される。２’－Ｏ－メチル化はまた、７－メチルグアノシン三リン酸塩残基の後の第１の塩基および／または第２の塩基で生じ得る。キャップ構造の例としては、ｍ７ＧｐｐｐＮｐ－ＲＮＡ、ｍ７ＧｐｐｐＮｍｐ－ＲＮＡおよびｍ７ＧｐｐｐＮｍｐＮｍｐ－ＲＮＡ（式中、ｍは２’－Ｏメチル残基を示す）が挙げられるが、これに限定されない。

【００７９】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、５’および／または３’非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、５’非翻訳領域は、ｍＲＮＡの安定性または翻訳に影響する１つ以上の要素、例えば、鉄応答性要素を含む。いくつかの実施形態では、５’非翻訳領域は、長さ約５０～５００ヌクレオチドであり得る。

【００８０】

いくつかの実施形態では、３’非翻訳領域は、ポリアデニル化シグナル、細胞におけるｍＲＮＡの位置安定性に影響するタンパク質の結合部位、またはｍｉＲＮＡの１つ以上の結合部位のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、３’非翻訳領域は、長さ５０～５００ヌクレオチドまたはそれ以上であり得る。

【００８１】

インビトロ転写反応からもたらされたｍＲＮＡが、いくつかの実施形態で望ましい場合がある一方で、細菌、真菌、植物、および／または動物から産生されたｍＲＮＡを含む、ｍＲＮＡの他の供給源は、本発明の範囲内であると意図される。

【００８２】

本発明は、多様なタンパク質をコードするｍＲＮＡを製剤および封入するために使用され得る。本発明に適したｍＲＮＡの非限定的な例としては、脊髄運動ニューロン１（ＳＭＮ）、アルファ－ガラクトシダーゼ（ＧＬＡ）、アルギニノコハク酸シンテターゼ（ＡＳＳ１）、オルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、嚢胞性線維症膜貫通型コンダクタンス受容体（ＣＦＴＲ）およびホタルルシフェラーゼ（ＦＦＬ）をコードするｍＲＮＡが挙げられる。本明細書に開示される例示的なｍＲＮＡ配列を以下に挙げる：

コドン最適化ヒトＯＴＣコード配列

AUGCUGUUCAACCUUCGGAUCUUGCUGAACAACGCUGCGU
UCCGGAAUGGUCACAACUUCAUGGUCCGGAACUUCAGAUG
CGGCCAGCCGCUCCAGAACAAGGUGCAGCUCAAGGGGAGG
GACCUCCUCACCCUGAAAAACUUCACCGGAGAAGAGAUCA
AGUACAUGCUGUGGCUGUCAGCCGACCUCAAAUUCCGGAU
CAAGCAGAAGGGCGAAUACCUUCCUUUGCUGCAGGGAAAG
UCCCUGGGGAUGAUCUUCGAGAAGCGCAGCACUCGCACUA
GACUGUCAACUGAAACCGGCUUCGCGCUGCUGGGAGGACA
CCCCUGCUUCCUGACCACCCAAGAUAUCCAUCUGGGUGUG
AACGAAUCCCUCACCGACACAGCGCGGGUGCUGUCGUCCA
UGGCAGACGCGGUCCUCGCCCGCGUGUACAAGCAGUCUGA
UCUGGACACUCUGGCCAAGGAAGCCUCCAUUCCUAUCAUU
AAUGGAUUGUCCGACCUCUACCAUCCCAUCCAGAUUCUGG
CCGAUUAUCUGACUCUGCAAGAACAUUACAGCUCCCUGAA
GGGGCUUACCCUUUCGUGGAUCGGCGACGGCAACAACAUU
CUGCACAGCAUUAUGAUGAGCGCUGCCAAGUUUGGAAUGC
ACCUCCAAGCAGCGACCCCGAAGGGAUACGAGCCAGACGC
CUCCGUGACGAAGCUGGCUGAGCAGUACGCCAAGGAGAAC
GGCACUAAGCUGCUGCUCACCAACGACCCUCUCGAAGCCG
CCCACGGUGGCAACGUGCUGAUCACCGAUACCUGGAUCUC
CAUGGGACAGGAGGAGGAAAAGAAGAAGCGCCUGCAAGCA
UUUCAGGGGUACCAGGUGACUAUGAAAACCGCCAAGGUCG
CCGCCUCGGACUGGACCUUCUUGCACUGUCUGCCCAGAAA
GCCCGAAGAGGUGGACGACGAGGUGUUCUACAGCCCGCGG
UCGCUGGUCUUUCCGGAGGCCGAAAACAGGAAGUGGACUA
UCAUGGCCGUGAUGGUGUCCCUGCUGACCGAUUACUCCCC
GCAGCUGCAGAAACCAAAGUUCUGA（配列番号１）

コドン最適化ヒトＡＳＳ１コード配列

AUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGCG
GCCUGGACACCAGCUGCAUCCUGGUGUGGCUGAAGGAGCA
GGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUGGCCAACAUCGGCCAG
AAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAAGAAGGCCCUGAAGC
UGGGCGCCAAGAAGGUGUUCAUCGAGGACGUGAGCCGCGA
GUUCGUGGAGGAGUUCAUCUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGC
GCCCUGUACGAGGACCGCUACCUGCUGGGCACCAGCCUGG
CCCGCCCCUGCAUCGCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCCA
GCGCGAGGGCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGC
AAGGGCAACGACCAGGUGCGCUUCGAGCUGAGCUGCUACA
GCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCCUGGCGCAU
GCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUG
AUGGAGUACGCCAAGCAGCACGGCAUCCCCAUCCCCGUGA

CCCCCAAGAACCCCUGGAGCAUGGACGAGAACCUGAUGCA
CAUCAGCUACGAGGCCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAAC
CAGGCCCCCCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCG
CCAAGGCCCCCAACACCCCCGACAUCCUGGAGAUCGAGUU
CAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGUGAAGGAC
GGCACCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUCAUGUACC
UGAACGAGGUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCAUCGA
CAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCGGCAUGAAGAGCCGCGGC
AUCUACGAGACCCCCGCCGGCACCAUCCUGUACCACGCCC
ACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCG
CAAGAUCAAGCAGGGCCUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCUG
GUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCGAGUGCGAGUUCG
UGCGCCACUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGGG
CAAGGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAUC
CUGGGCCGCGAGAGCCCCCUGAGCCUGUACAACGAGGAGC
UGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAGCCCACCGA
CGCCACCGGCUUCAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAAG
GAGUACCACCGCCUGCAGAGCAAGGUGACCGCCAAGUGA（
配列番号２）

コドン最適化ヒトＣＦＴＲコード配列

【化１－１】

AUGCAACGCUCUCCUCUUGAAAAGGCCUCGGUGGUGUCCA
AGCUCUUCUUCUCGUGGACUAGACCCAUCCUGAGAAAGGG
GUACAGACAGCGCUUGGAGCUGUCCGAUAUCUAUCAAAUC
CCUUCCGUGGACUCCGCGGACAACCUGUCCGAGAAGCUCG
AGAGAGAAUGGGACAGAGAACUCGCCUCAAAGAAGAACCC
GAAGCUGAUUAAUGCGCUUAGGCGGUGCUUUUUCUGGCGG
UUCAUGUUCUACGGCAUCUUCCUCUACCUGGGAGAGGUCA
CCAAGGCCGUGCAGCCCCUGUUGCUGGGACGGAUUAUUGC
CUCCUACGACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAUCGCU
AUCUACUUGGGCAUCGGUCUGUGCCUGCUUUUCAUCGUCC
GGACCCUCUUGUUGCAUCCUGCUAUUUUCGGCCUGCAUCA
CAUUGGCAUGCAGAUGAGAAUUGCCAUGUUUUCCCUGAUC
UACAAGAAAACUCUGAAGCUCUCGAGCCGCGUGCUUGACA
AGAUUUCCAUCGGCCAGCUCGUGUCCCUGCUCUCCAACAA
UCUGAACAAGUUCGACGAGGGCCUCGCCCUGGCCCACUUC
GUGUGGAUCGCCCCUCUGCAAGUGGCGCUUCUGAUGGGCC
UGAUCUGGGAGCUGCUGCAAGCCUCGGCAUUCUGUGGGCU
UGGAUUCCUGAUCGUGCUGGCACUGUUCCAGGCCGGACUG
GGGCGGAUGAUGAUGAAGUACAGGGACCAGAGAGCCGGAA
AGAUUUCCGAACGGCUGGUGAUCACUUCGGAAAUGAUCGA
AAACAUCCAGUCAGUGAAGGCCUACUGCUGGGAAGAGGCC
AUGGAAAAGAUGAUUGAAAACCUCCGGCAAACCGAGCUGA
AGCUGACCCGCAAGGCCGCUUACGUGCGCUAUUUCAACUC
GUCCGCUUUCUUCUUCUCCGGGUUCUUCGUGGUGUUUCUC
UCCGUGCUCCCCUACGCCCUGAUUAAGGGAAUCAUCCUCA
GGAAGAUCUUCACCACCAUUUCCUUCUGUAUCGUGCUCCG
CAUGGCCGUGACCCGGCAGUUCCCAUGGGCCGUGCAGACU
UGGUACGACUCCCUGGGAGCCAUUAACAAGAUCCAGGACU
UCCUUCAAAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCU
GACUACUACCGAGGUCGUGAUGGAAAACGUCACCGCCUUU
UGGGAGGAGGGAUUUGGCGAACUGUUCGAGAAGGCCAAGC
AGAACAACAACAACCGCAAGACCUCGAACGGUGACGACUC
CCUCUUCUUUUCAAACUUCAGCCUGCUCGGGACGCCCGUG
CUGAAGGACAUUAACUUCAAGAUCGAAAGAGGACAGCUCC
UGGCGGUGGCCGGAUCGACCGGAGCCGGAAAGACUUCCCU
GCUGAUGGUGAUCAUGGGAGAGCUUGAACCUAGCGAGGGA
AAGAUCAAGCACUCCGGCCGCAUCAGCUUCUGUAGCCAGU

【化１－２】

UUUCCUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAGGAAAACAUCAU
CUUCGGCGUGUCCUACGAUGAAUACCGCUACCGGUCCGUG
AUCAAAGCCUGCCAGCUGGAAGAGGAUAUUUCAAAGUUCG
CGGAGAAAGAUAACAUCGUGCUGGGCGAAGGGGGUAUUAC
CUUGUCGGGGGGCCAGCGGGCUAGAAUCUCGCUGGCCAGA
GCCGUGUAUAAGGACGCCGACCUGUAUCUCCUGGACUCCC
CCUUCGGAUACCUGGACGUCCUGACCGAAAAGGAGAUCUU
CGAAUCGUGCGUGUGCAAGCUGAUGGCUAACAAGACUCGC
AUCCUCGUGACCUCCAAAAUGGAGCACCUGAAGAAGGCAG
ACAAGAUUCUGAUUCUGCAUGAGGGGUCCUCCUACUUUUA
CGGCACCUUCUCGGAGUUGCAGAACUUGCAGCCCGACUUC
UCAUCGAAGCUGAUGGGUUGCGACAGCUUCGACCAGUUCU
CCGCCGAAAGAAGGAACUCGAUCCUGACGGAAACCUUGCA
CCGCUUCUCUUUGGAAGGCGACGCCCCUGUGUCAUGGACC
GAGACUAAGAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCGGGGAAUUCG
GCGAAAAGAGGAAGAACAGCAUCUUGAACCCCAUUAACUC
CAUCCGCAAGUUCUCAAUCGUGCAAAAGACGCCACUGCAG
AUGAACGGCAUUGAGGAGGACUCCGACGAACCCCUUGAGA
GGCGCCUGUCCCUGGUGCCGGACAGCGAGCAGGGAGAAGC
CAUCCUGCCUCGGAUUUCCGUGAUCUCCACUGGUCCGACG
CUCCAAGCCCGGCGGCGGCAGUCCGUGCUGAACCUGAUGA
CCCACAGCGUGAACCAGGGCCAAAACAUUCACCGCAAGAC
UACCGCAUCCACCCGGAAAGUGUCCCUGGCACCUCAAGCG
AAUCUUACCGAGCUCGACAUCUACUCCCGGAGACUGUCGC
AGGAAACCGGGCUCGAAAUUUCCGAAGAAAUCAACGAGGA
GGAUCUGAAAGAGUGCUUCUUCGACGAUAUGGAGUCGAUA
CCCGCCGUGACGACUUGGAACACUUAUCUGCGGUACAUCA
CUGUGCACAAGUCAUUGAUCUUCGUGCUGAUUUGGUGCCU
GGUGAUUUUCCUGGCCGAGGUCGCGGCCUCACUGGUGGUG
CUCUGGCUGUUGGGAAACACGCCUCUGCAAGACAAGGGAA
ACUCCACGCACUCGAGAAACAACAGCUAUGCCGUGAUUAU
CACUUCCACCUCCUCUUAUUACGUGUUCUACAUCUACGUC
GGAGUGGCGGAUACCCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCAGAG
GACUGCCGCUGGUCCACACCUUGAUCACCGUCAGCAAGAU
UCUUCACCACAAGAUGUUGCAUAGCGUGCUGCAGGCCCCC
AUGUCCACCCUCAACACUCUGAAGGCCGGAGGCAUUCUGA
ACAGAUUCUCCAAGGACAUCGCUAUCCUGGACGAUCUCCU

【化１－３】

GCCGCUUACCAUCUUUGACUUCAUCCAGCUGCUGCUGAUC
GUGAUUGGAGCAAUCGCAGUGGUGGCGGUGCUGCAGCCUU
ACAUUUUCGUGGCCACUGUGCCGGUCAUUGUGGCGUUCAU
CAUGCUGCGGGCCUACUUCCUCCAAACCAGCCAGCAGCUG
AAGCAACUGGAAUCCGAGGGACGAUCCCCCAUCUUCACUC
ACCUUGUGACGUCGUUGAAGGGACUGUGGACCCUCCGGGC
UUUCGGACGGCAGCCCUACUUCGAAACCCUCUUCCACAAG
GCCCUGAACCUCCACACCGCCAAUUGGUUCCUGUACCUGU
CCACCCUGCGGUGGUUCCAGAUGCGCAUCGAGAUGAUUUU
CGUCAUCUUCUUCAUCGCGGUCACAUUCAUCAGCAUCCUG
ACUACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGUCGGAAUAAUCCUGA
CCCUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACCCUGCAGUGGGCAGU
GAACAGCUCGAUCGACGUGGACAGCCUGAUGCGAAGCGUC
AGCCGCGUGUUCAAGUUCAUCGACAUGCCUACUGAGGGAA
AACCCACUAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAAUGGCCAGCU
GAGCAAGGUCAUGAUCAUCGAAAACUCCCACGUGAAGAAG
GACGAUAUUUGGCCCUCCGGAGGUCAAAUGACCGUGAAGG
ACCUGACCGCAAAGUACACCGAGGGAGGAAACGCCAUUCU
CGAAAACAUCAGCUUCUCCAUUUCGCCGGGACAGCGGGUC
GGCCUUCUCGGGCGGACCGGUUCCGGGAAGUCAACUCUGC
UGUCGGCUUUCCUCCGGCUGCUGAAUACCGAGGGGGAAAU
CCAAAUUGACGGCGUGUCUUGGGAUUCCAUUACUCUGCAG
CAGUGGCGGAAGGCCUUCGGCGUGAUCCCCCAGAAGGUGU
UCAUCUUCUCGGGUACCUUCCGGAAGAACCUGGAUCCUUA
CGAGCAGUGGAGCGACCAAGAAAUCUGGAAGGUCGCCGAC
GAGGUCGGCCUGCGCUCCGUGAUUGAACAAUUUCCUGGAA
AGCUGGACUUCGUGCUCGUCGACGGGGGAUGUGUCCUGUC
GCACGGACAUAAGCAGCUCAUGUGCCUCGCACGGUCCGUG
CUCUCCAAGGCCAAGAUUCUGCUGCUGGACGAACCUUCGG
CCCACCUGGAUCCGGUCACCUACCAGAUCAUCAGGAGGAC
CCUGAAGCAGGCCUUUGCCGAUUGCACCGUGAUUCUCUGC
GAGCACCGCAUCGAGGCCAUGCUGGAGUGCCAGCAGUUCC
UGGUCAUCGAGGAGAACAAGGUCCGCCAAUACGACUCCAU
UCAAAAGCUCCUCAACGAGCGGUCGCUGUUCAGACAAGCU
AUUUCACCGUCCGAUAGAGUGAAGCUCUUCCCGCAUCGGA
ACAGCUCAAAGUGCAAAUCGAAGCCGCAGAUCGCAGCCUU

【化１－４】

GAAGGAAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGACACCCGGCUU
UAA（配列番号３）

比較コドン最適化ヒトＣＦＴＲ　ｍＲＮＡコード配列

【化２－１】

AUGCAGCGGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCA
AACUCUUCUUCUCAUGGACUCGGCCUAUCCUUAGAAAGGG
GUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACAUCUACCAGAUC
CCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCG
AACGGGAAUGGGACCGCGAACUCGCGUCUAAGAAAAACCC
GAAGCUCAUCAACGCACUGAGAAGGUGCUUCUUCUGGCGG
UUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGGGAGGUCA
CAAAAGCAGUCCAACCCCUGUUGUUGGGUCGCAUUAUCGC
CUCGUACGACCCCGAUAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGCG
AUCUACCUCGGGAUCGGACUGUGUUUGCUUUUCAUCGUCA
GAACACUUUUGUUGCAUCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAUCA
CAUCGGUAUGCAGAUGCGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAUC
UACAAAAAGACACUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUA
AGAUUUCCAUCGGUCAGUUGGUGUCCCUGCUUAGUAAUAA
CCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAUUUC
GUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCCUUUUGAUGGGCC
UUAUUUGGGAGCUGUUGCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCU
GGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUUCAGGCUGGGCUU
GGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUA
AAAUCUCGGAAAGACUCGUCAUCACUUCGGAAAUGAUCGA
AAACAUCCAGUCGGUCAAAGCCUAUUGCUGGGAAGAAGCU
AUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCCGCCAAACUGAGCUGA
AACUGACCCGCAAGGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUC
GUCAGCGUUCUUCUUUUCCGGGUUCUUCGUUGUCUUUCUC
UCGGUUUUGCCUUAUGCCUUGAUUAAGGGGAUUAUCCUCC
GCAAGAUUUUCACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUAUUGCG
CAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGGCCGUGCAGACA
UGGUAUGACUCGCUUGGAGCGAUCAACAAAAUCCAAGACU
UCUUGCAAAAGCAAGAGUACAAGACCCUGGAGUACAAUCU
UACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUGUGACGGCUUUU
UGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGC
AGAAUAACAACAACCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUUC
CCUGUUUUUCUCGAACUUCUCCCUGCUCGGAACACCCGUG
UUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUC
UCGCGGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCU
CUUGAUGGUGAUUAUGGGGGAGCUUGAGCCCAGCGAGGGG
AAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAUUCUGUAGCCAGU

【化２－２】

UUUCAUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAAGAGAACAUCAU
UUUCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACCGAUACAGAUCGGUC
AUUAAGGCGUGCCAGUUGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCG
CCGAGAAGGAUAACAUCGUCUUGGGAGAAGGGGGUAUUAC
AUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGCGGAUCAGCCUCGCGAGA
GCGGUAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUCAC
CGUUUGGAUACCUCGACGUAUUGACAGAAAAAGAAAUCUU
CGAGUCGUGCGUGUGUAAACUUAUGGCUAAUAAGACGAGA
AUCCUGGUGACAUCAAAAAUGGAACACCUUAAGAAGGCGG
ACAAGAUCCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUA
CGGCACUUUCUCAGAGUUGCAAAACUUGCAGCCGGACUUC
UCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCAGUUCA
GCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAAACGCUGCA
CCGAUUCUCGCUUGAGGGUGAUGCCCCGGUAUCGUGGACC
GAGACAAAGAAGCAGUCGUUUAAGCAGACAGGAGAAUUUG
GUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUAUUAACUC
AAUUCGCAAGUUCUCAAUCGUCCAGAAAACUCCACUGCAG
AUGAAUGGAAUUGAAGAGGAUUCGGACGAACCCCUGGAGC
GCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGAGCAAGGGGAGGC
CAUUCUUCCCCGGAUUUCGGUGAUUUCAACCGGACCUACA
CUUCAGGCGAGGCGAAGGCAAUCCGUGCUCAACCUCAUGA
CGCAUUCGGUAAACCAGGGGCAAAACAUUCACCGCAAAAC
GACGGCCUCAACGAGAAAAGUGUCACUUGCACCCCAGGCG
AAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUUCGC
AAGAAACCGGACUUGAGAUCAGCGAAGAAAUCAAUGAAGA
AGAUUUGAAAGAGUGUUUCUUUGAUGACAUGGAAUCAAUC
CCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUACUUGCGUUACAUCA
CGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCU
CGUGAUCUUUCUCGCUGAGGUCGCAGCGUCACUUGUGGUC
CUCUGGCUGCUUGGUAAUACGCCCUUGCAAGACAAAGGCA
AUUCUACACACUCAAGAAACAAUUCCUAUGCCGUGAUUAU
CACUUCUACAAGCUCGUAUUACGUGUUUUACAUCUACGUA
GGAGUGGCCGACACUCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCCGAG
GACUCCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGUCUCCAAGAU
UCUCCACCAUAAGAUGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCC
AUGUCCACCUUGAAUACGCUCAAGGCGGGAGGUAUUUUGA
AUCGCUUCUCAAAAGAUAUUGCAAUUUUGGAUGACCUUCU

【化２－３】

GCCCCUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGUUGUUGCUGAUC
GUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGCUGUCCUCCAGCCUU
ACAUUUUUGUCGCGACCGUUCCGGUGAUCGUGGCGUUUAU
CAUGCUGCGGGCCUAUUUCUUGCAGACGUCACAGCAGCUU
AAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUAUCUUUACGC
AUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGC
CUUUGGCAGGCAGCCCUACUUUGAAACACUGUUCCACAAA
GCGCUGAAUCUCCAUACGGCAAAUUGGUUUUUGUAUUUGA
GUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUGCGCAUUGAGAUGAUUUU
UGUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUUAUCUCCAUCUUG
ACCACGGGAGAGGGCGAGGGACGGGUCGGUAUUAUCCUGA
CACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUGCAGUGGGCAGU
GAACAGCUCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUU
UCGAGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAUGCCGACGGAGGGAA
AGCCCACAAAAAGUACGAAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUU
GAGUAAGGUAAUGAUCAUCGAGAACAGUCACGUGAAGAAG
GAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGUCAGAUGACCGUGAAGG
ACCUGACGGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAACGCAAUCCU
UGAAAACAUCUCGUUCAGCAUUAGCCCCGGUCAGCGUGUG
GGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUCAGGAAAAUCGACGUUGC
UGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAU
CCAGAUCGACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAG
CAGUGGCGGAAAGCGUUUGGAGUAAUCCCCCAAAAGGUCU
UUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGAUCCUUA
UGAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGAC
GAGGUUGGCCUUCGGAGUGUAAUCGAGCAGUUUCCGGGAA
AACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGGGGGAUGCGUCCUGUC
GCAUGGGCACAAGCAGCUCAUGUGCCUGGCGCGAUCCGUC
CUCUCUAAAGCGAAAAUUCUUCUCUUGGAUGAACCUUCGG
CCCAUCUGGACCCGGUAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGAC
ACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGGUGAUUCUCUGU
GAGCAUCGUAUCGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUC
UUGUCAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCAU
CCAGAAGCUGCUUAAUGAGAGAUCAUUGUUCCGGCAGGCG
AUUUCACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUUCCACACAGAA
AUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCGCGGCCUU

【化２－４】

GAAAGAAGAGACUGAAGAAGAAGUUCAAGACACGCGUCUU
UAA（配列番号４）

コドン最適化ヒトＰＡＨコード配列

AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGGGCCGCA
AGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGGA
CAACUGCAACCAGAACGGCGCCAUCAGCCUGAUCUUCAGC
CUGAAGGAGGAGGUGGGCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGCC

UGUUCGAGGAGAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAG
CCGCCCCAGCCGCCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCUUC
ACCCACCUGGACAAGCGCAGCCUGCCCGCCCUGACCAACA
UCAUCAAGAUCCUGCGCCACGACAUCGGCGCCACCGUGCA
CGAGCUGAGCCGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGCCCUGG
UUCCCCCGCACCAUCCAGGAGCUGGACCGCUUCGCCAACC
AGAUCCUGAGCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACCC
CGGCUUCAAGGACCCCGUGUACCGCGCCCGCCGCAAGCAG
UUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGCCACGGCCAGCCCA
UCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGAAGACCUG
GGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACC
CACGCCUGCUACGAGUACAACCACAUCUUCCCCCUGCUGG
AGAAGUACUGCGGCUUCCACGAGGACAACAUCCCCCAGCU
GGAGGACGUGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGGCUUC
CGCCUGCGCCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGCGACU
UCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGCGUGUUCCACUGCACCCA
GUACAUCCGCCACGGCAGCAAGCCCAUGUACACCCCCGAG
CCCGACAUCUGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUGU
UCAGCGACCGCAGCUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGG
CCUGGCCAGCCUGGGCGCCCCCGACGAGUACAUCGAGAAG
CUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGGCCUGU
GCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGGCCU
GCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAG
AAGCCCAAGCUGCUGCCCCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCA
UCCAGAACUACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACUA
CGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCGC
AACUUCGCCGCCACCAUCCCCCGCCCCUUCAGCGUGCGCU
ACGACCCCUACACCCAGCGCAUCGAGGUGCUGGACAACAC
CCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCCGACAGCAUCAACAGCGAG
AUCGGCAUCCUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAGUAA（配列番号５）

【００８３】

いくつかの実施形態では、本発明に適したｍＲＮＡは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、または配列番号４と少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上同一のヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明に適したｍＲＮＡは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、または配列番号４と同一のヌクレオチド配列を含む。

【００８４】

ｍＲＮＡ溶液

ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子に封入され得るように、脂質溶液と混合されるべき溶液中で提供され得る。好適なｍＲＮＡ溶液は、様々な濃度で封入されるべきｍＲＮＡを含有する任意の水溶液であり得る。例えば、好適なｍＲＮＡ溶液は、約０．０１ｍｇ／ｍｌ、０．０５ｍｇ／ｍｌ、０．０６ｍｇ／ｍｌ、０．０７ｍｇ／ｍｌ、０．０８ｍｇ／ｍｌ、０．０９ｍｇ／ｍｌ、０．１ｍｇ／ｍｌ、０．１５ｍｇ／ｍｌ、０．２ｍｇ／ｍｌ、０．３ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．７ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、０．９ｍｇ／ｍｌ、または１．０ｍｇ／ｍｌより高い濃度でｍＲＮＡを含有してもよい。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ溶液は、約０．０１～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．７ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．６ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．５ｍｇ／

ｍｌ、０．０１～０．４ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．３ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．２ｍｇ／ｍｌ、０．０１～０．１ｍｇ／ｍｌ、０．０５～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．７ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．６ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．５ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．４ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．３ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．２ｍｇ／ｍｌ、０．０５～０．１ｍｇ／ｍｌ、０．１～１．０ｍｇ／ｍｌ、０．２～０．９ｍｇ／ｍｌ、０．３～０．８ｍｇ／ｍｌ、０．４～０．７ｍｇ／ｍｌ、または０．５～０．６ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度でｍＲＮＡを含有してもよい。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡ溶液は、最高約５．０ｍｇ／ｍｌ、４．０ｍｇ／ｍｌ、３．０ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、０．０９ｍｇ／ｍｌ、０．０８ｍｇ／ｍｌ、０．０７ｍｇ／ｍｌ、０．０６ｍｇ／ｍｌ、または０．０５ｍｇ／ｍｌの濃度でｍＲＮＡを含有してもよい。

【００８５】

典型的には、好適なｍＲＮＡ溶液は、緩衝剤および／または塩も含み得る。一般に、緩衝剤は、ＨＥＰＥＳ、硫酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウムおよびリン酸ナトリウムを含み得る。いくつかの実施形態では、緩衝剤の好適な濃度は、約０．１ｍＭ～１００ｍＭ、０．５ｍＭ～９０ｍＭ、１．０ｍＭ～８０ｍＭ、２ｍＭ～７０ｍＭ、３ｍＭ～６０ｍＭ、４ｍＭ～５０ｍＭ、５ｍＭ～４０ｍＭ、６ｍＭ～３０ｍＭ、７ｍＭ～２０ｍＭ、８ｍＭ～１５ｍＭ、または９～１２ｍＭの範囲であり得る。いくつかの実施形態では、緩衝剤の好適な濃度は、約０．１ｍＭ、０．５ｍＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、４ｍＭ、６ｍＭ、８ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭ、２０ｍＭ、２５ｍＭ、３０ｍＭ、３５ｍＭ、４０ｍＭ、４５ｍＭ、または５０ｍＭ以上である。

【００８６】

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

【００８７】

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

【００８８】

本発明に適したｍＲＮＡ溶液を調製するために、様々な方法を使用してもよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、本明細書に記載される緩衝溶液中に直接溶解されてもよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、封入のために脂質溶液と混合する前に、ｍＲＮＡストック溶液を緩衝溶液と混合することにより生成され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、封入のために脂質溶液と混合する直前に、ｍＲＮＡストック溶液を緩衝溶液と混合することにより生成され得る。いくつかの実施形態では、好適なｍＲＮＡストック溶液は、約０．２ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、１．２ｍｇ／ｍｌ、１．４ｍｇ／ｍｌ、１．５ｍｇ／ｍｌ、または１．６ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌ、２．５ｍｇ／ｍｌ、３．０ｍｇ／ｍｌ、３．５ｍｇ／ｍｌ、４．０ｍｇ／ｍｌ、４．５ｍｇ／ｍｌ、または５．０ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で水中にｍＲＮＡを含有してもよい。

【００８９】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、ポンプを使用してｍＲＮＡストック溶液を緩衝溶液と混合することによって調製される。例示的なポンプは、ギアポンプ、蠕動ポンプ、および遠心ポンプを含むが、これらに限定されない。典型的には、緩衝溶液は、ｍＲＮＡストック溶液のものよりも速い速度で混合される。例えば、緩衝溶液は、ｍＲＮＡストック溶液の速度よりも少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍または２０倍の速度で混合されてもよい。いくつかの実施形態では、緩衝溶液は、約１００～６０００ｍｌ／分（例えば、約１００～３００ｍｌ／分、３００～６００ｍｌ／分、６００～１２００ｍｌ／分、１２００～２４００ｍｌ／分、２４００～３６００ｍｌ／分、３６００～４８００ｍｌ／分、４８００～６０００ｍｌ／分、または６０～４２０ｍｌ／分）の流量で混合される。いくつかの実施形態では、緩衝溶液は、約６０ｍｌ／分、１００ｍｌ／分、１４０ｍｌ／分、１８０ｍｌ／分、２２０ｍｌ／分、２６０ｍｌ／分、３００ｍｌ／分、３４０ｍｌ／分、３８０ｍｌ／分、４２０ｍｌ／分、４８０ｍｌ／分、５４０ｍｌ／分、６００ｍｌ／分、１２００ｍｌ／分、２４００ｍｌ／分、３６００ｍｌ／分、４８００ｍｌ／分、または６０００ｍｌ／分以上の流量で混合される。

【００９０】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡストック溶液は、約１０～６００ｍｌ／分（例えば、約５～５０ｍｌ／分、約１０～３０ｍｌ／分、約３０～６０ｍｌ／分、約６０～１２０ｍｌ／分、約１２０～２４０ｍｌ／分、約２４０～３６０ｍｌ／分、約３６０～４８０ｍｌ／分、または約４８０～６００ｍｌ／分）の範囲の流量で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡストック溶液は、約５ｍｌ／分、１０ｍｌ／分、１５ｍｌ／分、２０ｍｌ／分、２５ｍｌ／分、３０ｍｌ／分、３５ｍｌ／分、４０ｍｌ／分、４５ｍｌ／分、５０ｍｌ／分、６０ｍｌ／分、８０ｍｌ／分、１００ｍｌ／分、２００ｍｌ／分、３００ｍｌ／分、４００ｍｌ／分、５００ｍｌ／分、または６００ｍｌ／分以上の流量で混合される。

【００９１】
脂質溶液
本発明によれば、脂質溶液は、ｍＲＮＡの封入のために脂質ナノ粒子を形成するのに適切な脂質の混合物を含有する。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液はエタノール系である。例えば、好適な脂質溶液は、純エタノール（すなわち、１００％エタノール）に溶解された所望の脂質の混合物を含有してもよい。別の実施形態では、好適な脂質溶液はイソプロピルアルコール系である。別の実施形態では、好適な脂質溶液はジメチルスルホキシド系である。別の実施形態では、好適な脂質溶液は、エタノール、イソプロピルアルコール、およびジメチルスルホキシドを含むがこれらに限定されない好適な溶媒の混合物である。

【００９２】
好適な脂質溶液は、様々な濃度で所望の脂質の混合物を含有してもよい。例えば、好適な脂質溶液は、約０．１ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌ、３．０ｍｇ／ｍｌ、４．０ｍｇ／ｍｌ、５．０ｍｇ／ｍｌ、６．０ｍｇ／ｍｌ、７．０ｍｇ／ｍｌ、８．０ｍｇ／ｍｌ、９．０ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、１５ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、または１００ｍｇ／ｍｌ以上の総濃度の所望の脂質の混合物を含有してもよい。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、約０．１～１００ｍｇ／ｍｌ、０．５～９０ｍｇ／ｍｌ、１．０～８０ｍｇ／ｍｌ、１．０～７０ｍｇ／ｍｌ、１．０～６０ｍｇ／ｍｌ、１．０～５０ｍｇ／ｍｌ、１．０～４０ｍｇ／ｍｌ、１．０～３０ｍｇ／ｍｌ、１．０～２０ｍｇ／ｍｌ、１．０～１５ｍｇ／ｍｌ、１．０～１０ｍｇ／ｍｌ、１．０～９ｍｇ／ｍｌ、１．０～８ｍｇ／ｍｌ、１．０～７ｍｇ／ｍｌ、１．０～６ｍｇ／ｍｌ、または１．０～５ｍｇ／ｍｌの範囲の総濃度の所望の脂質を含有してもよい。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、最高約１００ｍｇ／ｍｌ、９０ｍｇ／ｍｌ、８０ｍｇ／ｍｌ、７０ｍｇ／ｍ

ｌ、６０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、または１０ｍｇ／ｍｌの総濃度の所望の脂質の混合物を含有してもよい。

【００９３】

任意の所望の脂質は、ｍＲＮＡの封入に適した任意の比で混合され得る。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、カチオン性脂質、ヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質および／もしくはコレステロール脂質）ならびに／またはＰＥＧ化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質および／またはコレステロール脂質）ならびに１つ以上のＰＥＧ化脂質を含む所望の脂質の混合物を含有する。

【００９４】

本発明での使用のための脂質の例示的な混合物は、カチオン性脂質、非カチオン性脂質（例えば、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥまたはＤＥＰＥ）、コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）およびＰＥＧ修飾脂質（例えば、ＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ）の４つの脂質成分から構成される。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対非カチオン性脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質のモル比は、それぞれ、約２０～５０：２５～３５：２０～５０：１～５であり得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対非カチオン性脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質の比は、それぞれ、およそ２０：３０：４８．５：１．５である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対非カチオン性脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質の比は、それぞれ、およそ４０：３０：２０：１０である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対非カチオン性脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質の比は、それぞれ、およそ４０：３０：２５：５である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対非カチオン性脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質の比は、およそ４０：３２：２５：３である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質対非カチオン性脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質の比は、およそ５０：２５：２０：５である。

【００９５】

いくつかの実施形態では、本発明での使用のための脂質の混合物は、３つ以下の別個の脂質成分を含み得る。いくつかの実施形態では、このような混合物中の１つの別個の脂質成分は、コレステロール系またはイミダゾール系カチオン性脂質である。脂質の例示的な混合物は、カチオン性脂質（例えば、ＩＣＥ、ＨＧＴ４００１またはＨＧＴ４００２などのコレステロール系またはイミダゾール系カチオン性脂質）、非カチオン性脂質（例えば、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥまたはＤＥＰＥ）およびＰＥＧ修飾脂質（例えば、ＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ）の３つの脂質成分から構成され得る。カチオン性脂質対非カチオン性脂質対ＰＥＧ修飾脂質のモル比は、それぞれ、約５５～６５：３０～４０：１～１５であり得る。いくつかの実施形態では、６０：３５：５のカチオン性脂質（例えば、ＩＣＥ、ＨＧＴ４００１またはＨＧＴ４００２などのコレステロール系またはイミダゾール系脂質）対非カチオン性脂質（例えば、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥまたはＤＥＰＥ）対ＰＥＧ修飾脂質（例えば、ＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ）のモル比は、本発明での使用に特に適している。

【００９６】

カチオン性脂質

本明細書で使用される場合、語句「カチオン性脂質」は、生理学的ｐＨなどの選択されたｐＨで正味の正電荷を有する多数の脂質種のうちのいずれかを指す。いくつかのカチオン性脂質は文献に記載されており、その多くは市販されている。本発明の組成物および方法における使用のための特に好適なカチオン性脂質は、ＷＯ２０１０／０５３５７２（具体的には、段落［００２２５］に記載されているＣ１２－２００）およびＷＯ２０１２／１７０９３０に記載されるものを含み、その両方は、参照により本明細書に援用される。ある特定の実施形態では、本発明の組成物および方法に適したカチオン性脂質は、例えば、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－１５，１８－ジエン－１－アミン（ＨＧＴ５０００）、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９

，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－４，１５，１８－トリエン－ｌ－アミン（ＨＧＴ５００１）、および（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－５，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００２）などの、２０１２年３月２９日に出願された米国仮特許出願第６１／６１７，４６８号（参照により本明細書に援用される）に記載のイオン化可能なカチオン性脂質を含む。

【００９７】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物および方法に適したカチオン性脂質は、３，６－ビス（４－（ビス（（９Ｚ，１２Ｚ）－２－ヒドロキシオクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン（ＯＦ－０２）などのカチオン性脂質を含む。

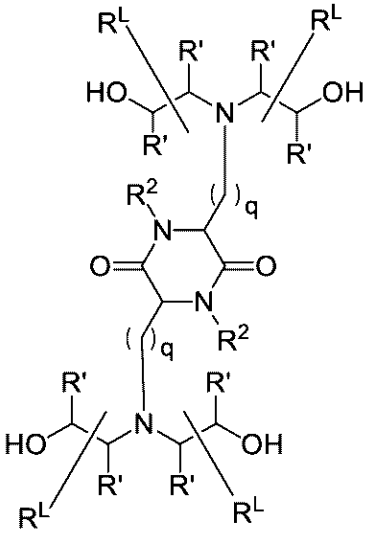
【００９８】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物および方法に適したカチオン性脂質は、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（標的２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（標的２４）などの名称「Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ｌｉｐｉｄｓ ｆｏｒ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ」のＷＯ２０１５／１８４２５６Ａ２（参照により本明細書に援用される）に記載されるカチオン性脂質を含む。

【００９９】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物および方法に適したカチオン性脂質は、名称「Ｌｉｐｉｄ Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ ＲＮＡ」のＷＯ２０１３／０６３４６８と米国仮出願に記載されるカチオン性脂質を含み、その両方は、参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式Ｉ－ｃ１－ａの化合物：

【化３】



Ｉ－ｃ１－ａ

またはその薬学的に許容可能な塩を含み、式中、
各Ｒ^{2}は、独立して、水素またはＣ$_{1-3}$アルキルであり、
各ｑは、独立して、２～６であり、
各Ｒ’は、独立して、水素またはＣ$_{1-3}$アルキルであり、
各Ｒ^{L}は、独立して、Ｃ$_{8-12}$アルキルである。

【０１００】

いくつかの実施形態では、各Ｒ^{2}は、独立して、水素、メチルまたはエチルである。い

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

【０１０１】

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

【０１０２】

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

【０１０３】

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

【０１０４】

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

【０１０５】

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

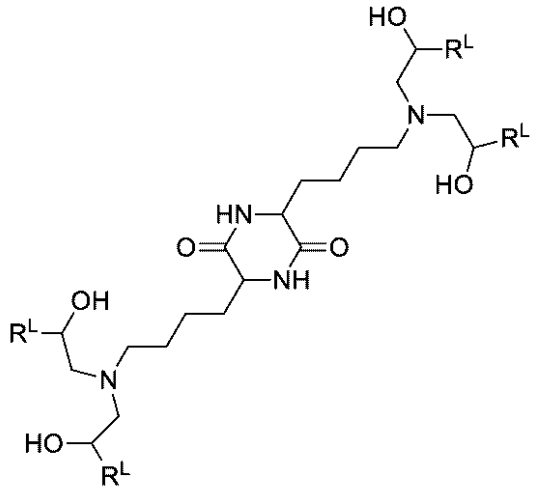
【０１０６】

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

【０１０７】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式Ｉ－ｇの化合物：

【化４】



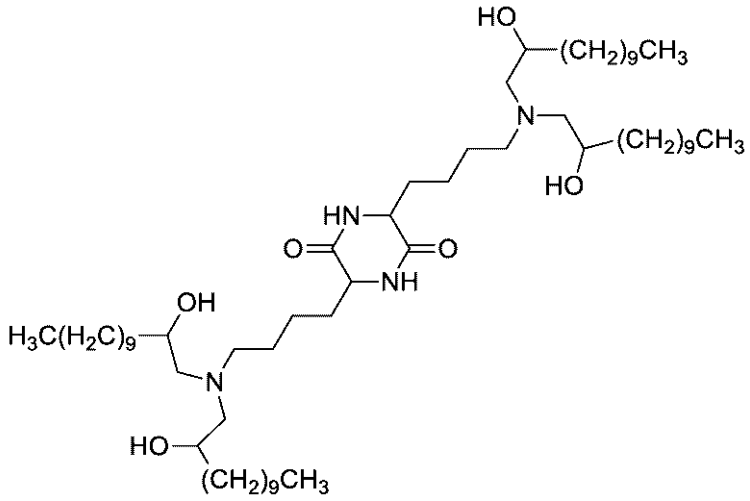
Ｉ－ｇ

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

【０１０８】

特定の実施形態では、好適なカチオン性脂質は、ｃＫＫ－Ｅ１２または（３，６－ビス（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン）である。ｃＫＫ－Ｅ１２の構造を以下に示す。

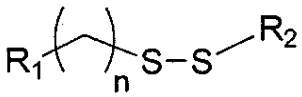
【化５】



【０１０９】

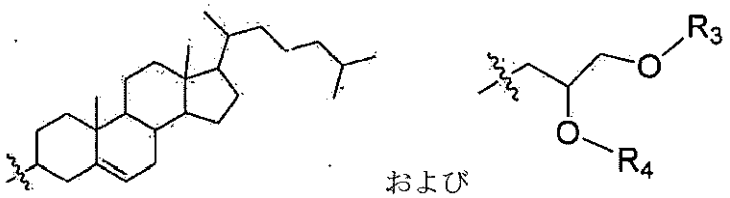
他の好適なカチオン性脂質には、参照により本明細書に援用される国際特許公開第ＷＯ２０１２／１７０８８９号に記載の切断可能カチオン性脂質が含まれる。いくつかの実施形態では、本発明の組成物および方法は、以下の式のカチオン性脂質を含み、

【化６】



式中、R_1は、イミダゾール、グアニジニウム、アミノ、イミン、エナミン、任意に置換されるアルキルアミノ（例えば、ジメチルアミノなどのアルキルアミノ）、およびピリジルからなる群から選択され、R_2は、以下の２つの式の１つからなる群から選択され、

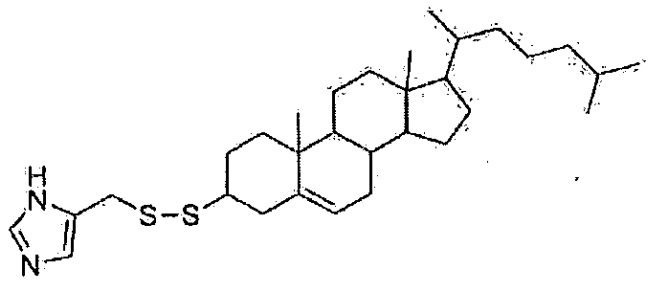
【化７】



および

式中、R_3およびR_4は各々独立して、任意選択的に置換される可変飽和または不飽和C_6－C_{20}アルキルおよび任意に置換される可変飽和または不飽和C_6－C_{20}アシルからなる群から選択され、ｎは、０または任意の正の整数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上）である。ある特定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、以下の化合物構造を有するカチオン性脂質「ＨＧＴ４００１」：

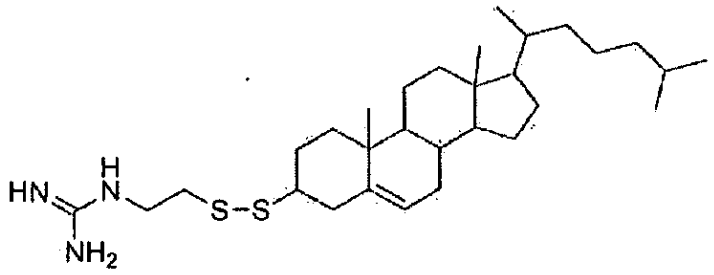
【化８】



（ＨＧＴ４００１）

およびその薬学的に許容可能な塩を含む。ある特定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、以下の化合物構造を有するカチオン性脂質「ＨＧＴ４００２」：

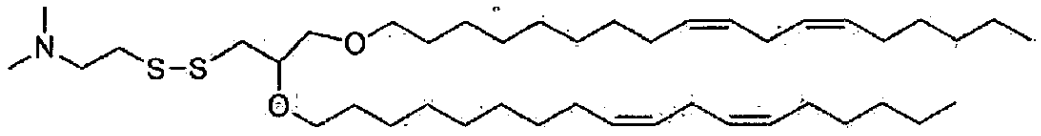
【化９】



（ＨＧＴ４００２）

およびその薬学的に許容可能な塩を含む。ある特定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、以下の化合物構造を有するカチオン性脂質「ＨＧＴ４００３」：

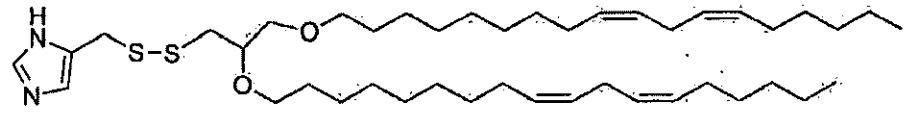
【化１０】



（ＨＧＴ４００３）

およびその薬学的に許容可能な塩を含む。ある特定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、以下の化合物構造を有するカチオン性脂質「ＨＧＴ４００４」：

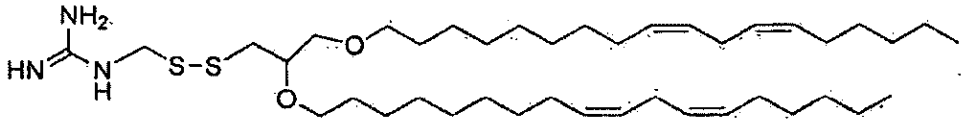
【化１１】



（ＨＧＴ４００４）

およびその薬学的に許容可能な塩を含む。ある特定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、以下の化合物構造を有するカチオン性脂質「ＨＧＴ４００５」：

【化１２】



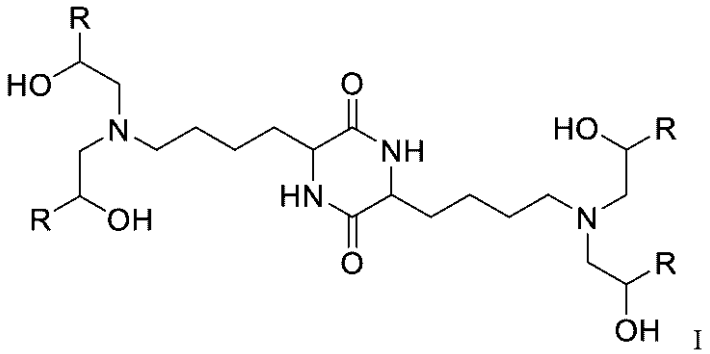
（ＨＧＴ４００５）

およびその薬学的に許容可能な塩を含む。

【０１１０】

さらなる例示的なカチオン性脂質は、式Ｉのカチオン性脂質：

【化１３】



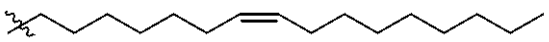
Ｉ

およびそれらの薬学的に許容される塩を含み、

式中、

Ｒは

【化１４】

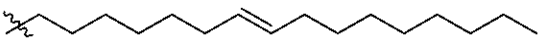


（「ＯＦ－００」）

であるか、

Ｒは

【化１５】

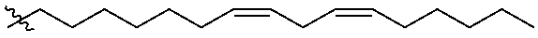


（「ＯＦ－０１」）

であるか、

Ｒは

【化１６】

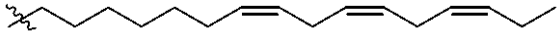


（「ＯＦ－０２」）

であるか、または

Ｒは

【化１７】



（「ＯＦ－０３」）

である

（例えば、Ｆｅｎｔｏｎ，Ｏｗｅｎ　Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．“Ｂｉｏｉｎｓｐｉｒｅｄ　Ａｌｋｅｎｙｌ　Ａｍｉｎｏ　Ａｌｃｏｈｏｌ　Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ　Ｌｉｐｉｄ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　ｆｏｒ　Ｈｉｇｈｌｙ　Ｐｏｔｅｎｔ　Ｉｎ　Ｖｉｖｏ　ｍＲＮＡ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ．”Ａｄｖａｎｃｅｄ　ｍａｔｅｒｉａｌｓ（２０１６）を参照のこと）。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、本発明に適した１つ以上のカチオン性脂質は、Ｎ－［ｌ－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド、または「ＤＯＴＭＡ」であり得る。（Ｆｅｉｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４，７４１３（１９８７）、米国特許第４，８９７，３５５号）。他の好適なカチオン性脂質は、例えば、５－カルボキシスペルミルグリジンジオクタ

デシルアミド（ｃａｒｂｏｘｙｓｐｅｒｍｙｌｇｌｙｃｉｎｅｄｉｏｃｔａｄｅｃｙｌａｍｉｄｅ）もしくは「ＤＯＧＳ」、２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ－［２（スペルミン－カルボキサミド）エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－ｌ－プロパンアミニウムもしくは「ＤＯＳＰＡ」（Ｂｅｈｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８６，６９８２（１９８９）、米国特許第５，１７１，６７８号、米国特許第５，３３４，７６１号）、ｌ，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパンもしくは「ＤＯＤＡＰ」、ｌ，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパンもしくは「ＤＯＴＡＰ」を含む。

【０１１２】

さらなる例示的なカチオン性脂質は、ｌ，２－ジステアリルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンもしくは「ＤＳＤＭＡ」、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンもしくは「ＤＯＤＭＡ」、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンもしくは「ＤＬｉｎＤＭＡ」、ｌ，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンもしくは「ＤＬｅｎＤＭＡ」、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリドもしくは「ＤＯＤＡＣ」、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミドもしくは「ＤＤＡＢ」、Ｎ－（ｌ，２－ジミリスチルオキシプロプ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミドもしくは「ＤＭＲＩＥ」、３－ジメチルアミノ－２－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシブタン－４－オキシ）－ｌ－（シス，シス－９，１２－オクタデカジエノキシ）プロパンもしくは「ＣＬｉｎＤＭＡ」、２－［５’－（コレスト－５－エン－３－ベーター－オキシ）－３’－オキサペントキシ）－３－ジメチル－ｌ－ｌ－（シス，シス－９’，ｌ－２’－オクタデカジエノキシ）プロパンもしくは「ＣｐＬｉｎＤＭＡ」、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３，４－ジオレイルオキシベンジルアミンもしくは「ＤＭＯＢＡ」、１，２－Ｎ，Ｎ’－ジオレイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパンもしくは「ＤＯｃａｒｂＤＡＰ」、２，３－ジリノレオイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルアミンもしくは「ＤＬｉｎＤＡＰ」、ｌ，２－Ｎ，Ｎ’－ジリノレイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパンもしくは「ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ」、ｌ，２－ジリノレイルカルバミル－３－ジメチルアミノプロパンもしくは「ＤＬｉｎＣＤＡＰ」、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［ｌ，３］－ジオキソランもしくは「ＤＬｉｎ－　－ＤＭＡ」、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［ｌ，３］－ジオキソランもしくは「ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ」、および２－（２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，ｌ　２－ジエン－１－イル）－ｌ，３－ジオキソラン－４－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエタンアミン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ））（ＷＯ２０１０／０４２８７７；Ｓｅｍｐｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．２８：１７２－１７６（２０１０）を参照のこと）、またはこれらの混合物を含む。（Ｈｅｙｅｓ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ　１０７：２７６－２８７（２００５）；Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ，ＤＶ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（８）：１００３－１００７（２００５）；ＰＣＴ公開第ＷＯ２００５／１２１３４８Ａ１号）。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質のうちの１つ以上は、イミダゾール部分、ジアルキルアミノ部分、またはグアニジウム部分のうちの少なくとも１つを含む。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、１つ以上のカチオン性脂質は、ＸＴＣ（２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン）、ＭＣ３（（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート）、ＡＬＮＹ－１００（（３ａＲ，５ｓ，６ａＳ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエニル）テトラヒドロ－３ａＨ－シクロペンタ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－アミン））、ＮＣ９８－５（４，７，１３－トリス（３－オキソ－３－（ウンデシルアミノ）プロピル）－Ｎ１，Ｎ１６－ジウンデシル－４，７，１０，１３－テトラアザヘキサデカン－

１，１６－ジアミド）、ＤＯＤＡＰ（１，２－ジオレイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン）、ＨＧＴ４００３（ＷＯ２０１２／１７０８８９、その教示は、その全体が参照により本明細書に援用される）、ＩＣＥ（ＷＯ２０１１／０６８８１０、その教示は、その全体が参照により本明細書に援用される）、ＨＧＴ５０００（米国仮特許出願第６１／６１７，４６８号、その教示は、その全体が参照により本明細書に援用される）またはＨＧＴ５００１（シスまたはトランス）（仮特許出願第６１／６１７，４６８号）、ＷＯ２０１０／０５３５７２に開示されるものなどのアミノアルコールリピドイド、ＤＯＴＡＰ（１，２－ジオレイル－３－トリメチルアンモニウムプロパン）、ＤＯＴＭＡ（１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン）、ＤＬｉｎＤＭＡ（Ｈｅｙｅｓ，Ｊ．；Ｐａｌｍｅｒ，Ｌ．；Ｂｒｅｍｎｅｒ，Ｋ．；ＭａｃＬａｃｈｌａｎ，Ｉ．“Ｃａｔｉｏｎｉｃ ｌｉｐｉｄ ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｓ ｉｎ ｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ”Ｊ．Ｃｏｎｔｒ．Ｒｅｌ．２００５，１０７，２７６－２８７）、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（Ｓｅｍｐｌｅ，Ｓ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．“Ｒａｔｉｏｎａｌ Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ Ｃａｔｉｏｎｉｃ Ｌｉｐｉｄｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ”Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０，２８，１７２－１７６）、Ｃ１２－２００（Ｌｏｖｅ，Ｋ．Ｔ．ｅｔ ａｌ．“Ｌｉｐｉｄ－ｌｉｋｅ ｍａｔｅｒｉａｌｓ ｆｏｒ ｌｏｗ－ｄｏｓｅ ｉｎ ｖｉｖｏ ｇｅｎｅ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ”ＰＮＡＳ ２０１０，１０７，１８６４－１８６９）、Ｎ１ＧＬ、Ｎ２ＧＬ、Ｖ１ＧＬ、およびそれらの組み合わせから選択され得る。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、１つ以上のカチオン性脂質は、アミノ脂質である。本発明における使用に適したアミノ脂質は、ＷＯ２０１７１８０９１７に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１７１８０９１７における例示的なアミノ脂質は、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３，１６－ジエン－１－アミン（Ｌ６０８）、および化合物１８などの段落［０７４４］に記載されるものを含む。他のアミノ脂質は、化合物２、化合物２３、化合物２７、化合物１０、および化合物２０を含む。本発明における使用に適したさらなるアミノ脂質は、ＷＯ２０１７１１２８６５に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１７１１２８６５における例示的なアミノ脂質は、式（Ｉ）、（Ｉａｌ）－（Ｉａ６）、（ｌｂ）、（ＩＩ）、（Ｉｌａ）、（ＩＩＩ）、（Ｉｌｉａ）、（ＩＶ）、（１７－１）、（１９－１）、（１９－１１）、および（２０－１）のうちの１つに従う化合物と、段落［００１８５］、［００２０１］、［０２７６］の化合物とを含む。いくつかの実施形態では、本発明における使用に適したカチオン性脂質は、ＷＯ２０１６１１８７２５に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１６１１８７２５における例示的なカチオン性脂質は、ＫＬ２２およびＫＬ２５などのものを含む。いくつかの実施形態では、本発明における使用に適したカチオン性脂質は、ＷＯ２０１６１１８７２４に記載されるものを含み、これは参照により本明細書に援用される。ＷＯ２０１６１１８７２５における例示的なカチオン性脂質は、ＫＬ１０、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、およびＫＬ２５などのものを含む。

【０１１５】

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

【０１１６】

非カチオン性／ヘルパー脂質

本明細書で使用される場合、語句「非カチオン性脂質」は、任意の中性脂質、両性イオン性脂質、またはアニオン性脂質を指す。本明細書で使用される場合、語句「アニオン性脂質」は、生理学的ｐＨなどの選択されたｐＨで正味の負電荷を有する多数の脂質種のうちのいずれかを指す。非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－ｌ－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－トランスＰＥ、ｌ－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、またはこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明での使用のための脂質の混合物は、非カチオン性脂質成分としてＤＳＰＣを含み得る。いくつかの実施形態では、本発明での使用のための脂質の混合物は、非カチオン性脂質成分としてＤＰＰＣを含み得る。いくつかの実施形態では、本発明での使用のための脂質の混合物は、非カチオン性脂質成分としてＤＯＰＥを含み得る。いくつかの実施形態では、本発明での使用のための脂質の混合物は、非カチオン性脂質成分としてＤＥＰＥを含み得る。

【０１１７】

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

【０１１８】

コレステロール系脂質

いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、１つ以上のコレステロール系脂質を含む。例として、好適なコレステロール系カチオン性脂質として、例えば、ＤＣ－Ｃｈｏｉ（Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－エチルカルボキサミドコレステロール）、１，４－ビス（３－Ｎ－オレイルアミノ－プロピル）ピペラジン（Ｇａｏ，ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１７９，２８０（１９９１）；Ｗｏｌｆ　ｅｔ　ａｌ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２３，１３９（１９９７）；米国特許第５，７４４，３３５号）、またはＩＣＥが挙げられる。いくつかの実施形態では、コレステロール系脂質は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、または７０％を構成する。いくつかの実施形態では、コレステロール系脂質は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の約３０～５０％（例えば、約３０～４５％、約３０～４０％、約３５～５０％、約３５～４５％、または約３５～４０％）を構成する。

【０１１９】

ＰＥＧ化脂質

いくつかの実施形態では、好適な脂質溶液は、１つ以上のＰＥＧ化脂質を含む。例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾リン脂質およびＮ－オクタノイル－スフィンゴシン－ｌ－［スクシニル（メトキシポリエチレングリコール）－２０００］（Ｃ８　ＰＥＧ－２０００セラミド）を含む誘導体化したセラミド（ＰＥＧ－ＣＥＲ）などの誘導体化した脂質の使用も、本発明によって企図される。企図されるＰＥＧ修飾脂質は、C_6－Ｃ

２０長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した、長さ最大２ｋＤａ、最大３ｋＤａ、最大４ｋＤａ、または最大５ｋＤａのポリエチレングリコール鎖を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ修飾またはＰＥＧ化脂質は、ＰＥＧ化コレステロールまたはＰＥＧ－２Ｋである。好適な脂質溶液は、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ）などのＰＥＧ修飾脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、特定の有用な交換可能な脂質は、より短いアシル鎖（例えば、Ｃ$_{14}$またはＣ$_{18}$）を有するＰＥＧセラミドである。

【０１２０】

ＰＥＧ修飾リン脂質および誘導体化した脂質は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、または７０％を構成し得る。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ修飾リン脂質および誘導体化脂質は、リポソーム輸送ビヒクル中に存在する総脂質の約０％～約２０％、約０．５％～約２０％、約１％～約１５％、約１．５％～約５％を構成する。いくつかの実施形態では、１つ以上のＰＥＧ修飾脂質は、モル比で総脂質の約１．５％、約２％、約３％、約４％、または約５％を構成する。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、重量またはモルで、好適な脂質溶液中の総脂質の約３０～５０％（例えば、約３０～４５％、約３０～４０％、約３５～５０％、約３５～４５％、または約３５～４０％）を構成する。

【０１２１】

予め形成された脂質ナノ粒子を調製するために使用でき、それらに含まれる脂質、すなわち、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、ＰＥＧ修飾脂質、および任意選択的にコレステロールの様々な組み合わせは、文献および本明細書に記載される。例えば、好適な脂質溶液は、ＣＫＫ－Ｅ１２、ＤＯＰＥ、コレステロール、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；Ｃ１２－２００、ＤＯＰＥ、コレステロールおよびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ５０００、ＤＯＰＥ、コレステロールおよびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ５００１、ＤＯＰＥ、コレステロールおよびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＰＰＣ、コレステロールおよびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；Ｃ１２－２００、ＤＰＰＣ、コレステロール、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ５０００、ＤＰＰＣ、コール（ｃｈｏｌ）、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ５００１、ＤＰＰＣ、コレステロール、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；またはＩＣＥ、ＤＯＰＥ、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋを含有してもよい。脂質のさらなる組み合わせは、当該技術分野、例えば、米国第６２／４２０，４２１号（２０１６年１１月１０日出願）、米国第６２／４２１，０２１号（２０１６年１１月１１日出願）、米国第６２／４６４，３２７号（２０１７年２月２７日出願）、および名称「Ｎｏｖｅｌ　ＩＣＥ－ｂａｓｅｄ　Ｌｉｐｉｄ　Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　ｍＲＮＡ」のＰＣＴ出願（２０１７年１１月１０日出願）に記載され、これらの開示は、それらの全範囲が、参照により本明細書に含まれる。脂質混合物を含むカチオン性脂質、非カチオン性脂質、および／またはＰＥＧ修飾脂質の選択、ならびにこのような脂質の相互の相対的モル比は、選択される脂質の特徴、ならびに封入されるべきｍＲＮＡの性質および特徴に基づく。追加の考慮すべき事項は、例えば、選択される脂質のアルキル鎖の飽和度、ならびに大きさ、電荷、ｐＨ、ｐＫａ、融合性、および毒性を含む。したがって、モル比はそれらに応じて調節され得る。

【０１２２】

ｍＲＮＡ－ＬＮＰ形成

上述のｍＲＮＡ溶液を上述の脂質溶液と混合することによってｍＲＮＡを封入するＬＮＰ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）を形成して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ形成に適したＬＮＰ形成溶液を生成するプロセスは、以前に記載されている。例えば、名称「Ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ　ＲＮＡ」の米国特許第９，６６８，９８０号は、この開示の全体が本明細書に援用され、ｍＲＮＡ溶液および脂質溶液を混合することによって脂質ナノ粒子中にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入するプロセスを提供し、ｍＲＮＡ溶液および／または脂質溶液は、混合の前に、周囲温度よりも高い予め決められた温度まで加熱されて、ｍＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子を形成する。代替的には、ｍＲＮＡ溶液およ

び脂質溶液は、ｍＲＮＡ溶液、脂質溶液、およびＬＮＰ形成溶液のうちのいずれの１つ以上も加熱することなく、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ形成を提供するＬＮＰ形成溶液中に混合され得る。

【０１２３】

ｍＲＮＡのある特定のカチオン性脂質ナノ粒子製剤については、ｍＲＮＡの封入強化を達成するために、ｍＲＮＡ溶液は、クエン酸緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、クエン酸緩衝ｍＲＮＡ溶液は、例えば、６５℃まで加熱される。それらのプロセスまたは方法では、ｍＲＮＡ溶液の脂質溶液との混合後に加熱すること（ナノ粒子の事後形成）、ＬＮＰ形成溶液の加熱は、脂質ナノ粒子におけるｍＲＮＡの封入効率を増加させないことが見出されているため、加熱することは、ｍＲＮＡ溶液を脂質溶液と混合するステップの前に生じることが必要とされる（すなわち、別個の成分を加熱する）。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液および脂質溶液の一方または両方は、周囲温度で維持および混合される。

【０１２４】

本明細書で使用される場合、用語「周囲温度」は、部屋における温度、または加熱もしくは冷却することなく目的の物体を囲む温度を指す。いくつかの実施形態では、溶液のうちの１つ以上が維持される周囲温度は、約３５℃、３０℃、２５℃、２０℃、または１６℃以下である。いくつかの実施形態では、溶液のうちの１つ以上が維持される周囲温度は、約１５～３５℃、約１５～３０℃、約１５～２５℃、約１５～２０℃、約２０～３５℃、約２５～３５℃、約３０～３５℃、約２０～３０℃、約２５～３０℃または約２０～２５℃の範囲である。いくつかの実施形態では、溶液のうちの１つ以上が維持される周囲温度は２０～２５℃である。

【０１２５】

したがって、周囲温度よりも高い予め決められた温度は、典型的には約２５℃よりも高い。いくつかの実施形態では、本発明に適した予め決められた温度は、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、または７０℃以上である。いくつかの実施形態では、本発明に適した予め決められた温度は、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃、または約６０～７０℃の範囲である。特定の実施形態では、本発明に適した予め決められた温度は、約６５℃である。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液もしくは脂質溶液、または両方は、混合前に周囲温度よりも高い予め決められた温度まで加熱され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液および脂質溶液は、混合前に別々に予め決められた温度に加熱される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液および脂質溶液は、周囲温度で混合されるが、次いで、混合後に予め決められた温度まで加熱される。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、予め決められた温度まで加熱され、周囲温度でｍＲＮＡ溶液と混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、予め決められた温度まで加熱され、周囲温度で脂質溶液と混合される。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、所望の予め決められた温度を達成するために、周囲温度にあるｍＲＮＡストック溶液を加熱された緩衝溶液に添加することによって、予め決められた温度に加熱される。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、溶解した脂質を含有する脂質溶液は、混合前に周囲温度よりも高い予め決められた温度まで加熱され得る。いくつかの実施形態では、溶解した脂質を含有する脂質溶液は、ｍＲＮＡ溶液との混合前に別々に予め決められた温度まで加熱される。いくつかの実施形態では、溶解した脂質を含有する脂質溶液は、ｍＲＮＡ溶液と周囲温度で混合されるが、次いで、混合後に予め決められた温度まで加熱される。いくつかの実施形態では、溶解した脂質を含有する脂質溶液は、予め決められた温度まで加熱され、

周囲温度で水溶液と混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液、脂質溶液、またはＬＮＰ形成溶液の加熱は、ＬＮＰ形成溶液中のＬＮＰ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）内に封入されたｍＲＮＡを形成するために脂質溶液中の１つ以上の脂質をｍＲＮＡ溶液中の１つ以上のｍＲＮＡと混合するステップの前または後には発生しない。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液および脂質溶液は、ポンプを使用して混合される。このような混合を用いる封入手段は広範囲のスケールで起こり得るため、異なるタイプのポンプが、所望のスケールに順応するために使用され得る。しかしながら、一般にはパルスレスフローポンプを使用することが望ましい。本明細書で使用される場合、パルスレスフローポンプは、安定した流量と共に連続的な流れを確立できる任意のポンプを意味する。好適なポンプのタイプは、ギアポンプおよび遠心ポンプを含み得るが、これに限定されない。例示的なギアポンプは、Ｃｏｌｅ－ＰａｒｍｅｒまたはＤｉｅｎｅｒギアポンプを含むが、これらに限定されない。例示的な遠心ポンプは、ＧｒａｉｎｇｅｒまたはＣｏｌｅ－Ｐａｒｍｅｒによって製造されるものを含むが、これらに限定されない。

【０１３０】

ｍＲＮＡ溶液および脂質溶液は、様々な流量で混合され得る。典型的には、ｍＲＮＡ溶液は、脂質溶液のものよりも速い速度で混合されてもよい。例えば、ｍＲＮＡ溶液は、脂質溶液の速度よりも少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍または２０倍の速度で混合されてもよい。

【０１３１】

混合のための好適な流量は、スケールに基づいて決定され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約４０～４００ｍｌ／分、６０～５００ｍｌ／分、７０～６００ｍｌ／分、８０～７００ｍｌ／分、９０～８００ｍｌ／分、１００～９００ｍｌ／分、１１０～１０００ｍｌ／分、１２０～１１００ｍｌ／分、１３０～１２００ｍｌ／分、１４０～１３００ｍｌ／分、１５０～１４００ｍｌ／分、１６０～１５００ｍｌ／分、１７０～１６００ｍｌ／分、１８０～１７００ｍｌ／分、１５０～２５０ｍｌ／分、２５０～５００ｍｌ／分、５００～１０００ｍｌ／分、１０００～２０００ｍｌ／分、２０００～３０００ｍｌ／分、３０００～４０００ｍｌ／分、または４０００～５０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、約２００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約１０００ｍｌ／分、約２０００ｍｌ／分、約３０００ｍｌ／分、約４０００ｍｌ／分、または約５０００ｍｌ／分の流量で混合される。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約２５～７５ｍｌ／分、２０～５０ｍｌ／分、２５～７５ｍｌ／分、３０～９０ｍｌ／分、４０～１００ｍｌ／分、５０～１１０ｍｌ／分、７５～２００ｍｌ／分、２００～３５０ｍｌ／分、３５０～５００ｍｌ／分、５００～６５０ｍｌ／分、６５０～８５０ｍｌ／分、または８５０～１０００ｍｌの範囲の流量で混合される。いくつかの実施形態では、脂質溶液は、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流量で混合される。

【０１３３】

医薬品製剤溶液

本発明は、部分的に、ｍＲＮＡ封入ＬＮＰが形成されるＬＮＰ形成溶液へのｍＲＮＡ溶液および脂質溶液の混合物、ならびに医薬品製剤溶液を構成する溶液（例えば、１０％トレハロース）へのＬＮＰ形成溶液のその後に続く交換の後、ＬＮＰにおけるｍＲＮＡの封入は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰを含む医薬品製剤溶液、同様にＬＮＰ形成溶液に封入されなかったいくらかの遊離ｍＲＮＡを加熱することによってさらに強化され得る。

【０１３４】

ＬＮＰ形成溶液から医薬品製剤溶液へのｍＲＮＡ－ＬＮＰを含む溶液の交換は、当該技術分野で公知の多様な緩衝液交換技術のうちのいずれかによって達成され得る。例えば、いくつかの実施形態では、溶液のこの交換は、透析ろ過によって達成される。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液中にｍＲＮＡ－ＬＮＰを提供するためにＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換するステップは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰの精製および／または濃縮を伴う。様々な方法を使用して、溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰの精製またはｍＲＮＡ－ＬＮＰの濃縮と共に、溶液の交換を達成してもよい。いくつかの実施形態では、溶液は交換であり、ｍＲＮＡ－ＬＮＰは、接線流ろ過を使用して精製される。クロスフローろ過とも呼ばれる接線流ろ過（ＴＦＦ）は、ろ過のタイプであり、ろ過されるべき物質は、フィルターを通り抜けるよりむしろ、その接線方向に通過する。ＴＦＦでは、望ましくない透過物はフィルターを通過し、一方で望ましい保持物はフィルターに沿って通過し、下流に収集される。望ましい物質は、典型的には、ＴＦＦにおいて保持物に含有され、従来的な全量ろ過において普通遭遇するものの反対であることに注意することが重要である。

【０１３５】

ろ過されるべき物質に応じて、ＴＦＦは通常、微量ろ過または限外ろ過のいずれかに使用される。微量ろ過は、典型的には、フィルターがすべて含んで０．０５μｍ～１．０μｍの孔径を有する場合として定義され、一方で、限外ろ過は、典型的には、０．０５μｍ未満の孔サイズを有するフィルターを伴う。孔サイズはまた、特定のフィルターについて分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）とも呼ばれる公称分画分子量（ＮＭＷＬ）を決定し、微量ろ過膜は、典型的に、１，０００キロダルトン（ｋＤａ）を超えるＮＭＷＬを有し、限外ろ過フィルターは、１ｋＤａ～１，０００ｋＤａのＮＭＷＬを有する。

【０１３６】

接線流ろ過の主な利点は、従来的な「全量」ろ過の間にフィルターに凝集してフィルターを塞ぎ、代わりにフィルターの表面に沿って運ばれる非透過性粒子（ときに、「ろ過ケーク」と呼ばれる）である。この利点により、フィルターは一般に除去および掃除される必要がないため、中断時間が顕著に低減されるので、連続的な操作を必要とする工業プロセスにおいて接線流ろ過を広く使用できるようになる。

【０１３７】

接線流ろ過は、とりわけ、溶液交換、濃縮および精製を含むいくつかの目的のために使用され得る。濃縮は、溶媒が溶液から除去される一方で溶質分子が保持される、プロセスである。試料を効果的に濃縮するために、保持されるべき溶質分子の分子量よりも実質的に小さいＮＭＷＬまたはＭＷＣＯを有する膜が使用される。一般に、当業者は、標的分子の分子量よりも３～６倍小さいＮＭＷＬまたはＭＷＣＯを有するフィルターを選択し得る。

【０１３８】

透析ろ過は分画プロセスであり、それによって小さな望ましくない粒子がフィルターを通り抜け、一方で、より大きな所望のナノ粒子は、溶液中のそれらのナノ粒子の濃度を変化させることなく、保持物内に維持される。透析ろ過は、溶液から塩または反応緩衝液を除去するためにしばしば使用される。透析ろ過は、連続または不連続のいずれかであり得る。連続透析ろ過では、透析ろ過溶液を、濾液が生成されるのと同じ速度で試料供給に添加する。不連続透析ろ過では、溶液は、まず希釈され、次いで開始濃度まで濃縮される。不連続透析ろ過は、所望のナノ粒子濃度に達するまで繰り返されてもよい。

【０１３９】

医薬品製剤溶液の組成物は、医薬品製剤中に見出される様々な成分を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、例えば、ＰＢＳなどの緩衝液を含み得る。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、緩衝剤または塩を含み得る。例示的な緩衝剤は、ＨＥＰＥＳ、硫酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウムおよびリン酸ナトリウムを含み得る。例示的な塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、および塩化カリウムを含み得る。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、凍結保護剤を含むがこれに限定されない、薬学的に許容可能な賦形剤を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールのうちの１つ以上などの糖を含むがこれらに限定されない、薬学的に許容可能な賦形剤を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、トレハロースを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、スクロースを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、マンノースを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ラクトースを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、マンニトールを含む。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールなどの５％～２０重量対体積％の糖を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のトレハロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のスクロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のマンノースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のラクトースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、５重量対体積％～２０重量対体積％のマンニトールを含む水溶液である。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールなどの約１０重量対体積％の糖を含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のトレハロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のスクロースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のマンノースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のラクトースを含む水溶液である。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、約１０重量対体積％のマンニトールを含む水溶液である。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、エタノールなどの非水性溶媒およびクエン酸塩の一方または両方は、医薬品製剤溶液に存在しない。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、残留クエン酸塩のみを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、エタノールなどの残留非水性溶媒のみを含む。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、１０ｍＭ未満（例えば、約９ｍＭ、約８ｍＭ、約７ｍＭ、約６ｍＭ、約５ｍＭ、約４ｍＭ、約３ｍＭ、約２ｍＭ、または約１ｍＭ未満）のクエン酸塩を含有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、約２５％未満（例えば、約２０％、約１５％、約１０％、約５％、約４％、約３％、約２％、または約１％未満）の、エタノールなどの非水性溶媒を含有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、凍結乾燥前のいかなるさらなる下流処理（例えば、緩衝液交換および／またはさらなる精製ステップおよび／または追加の賦形剤）も必要としない。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、バイアル、シリンジ、または他の容器中への滅菌充填への投与前に、さらなる下流処理（例えば、緩衝液交換および／またはさらなる精製ステップおよび／または追加の賦形剤）を必要としない。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、対象への投与前にさらなる下流処理（例えば、緩衝液交換および／またはさらなる精製ステップおよび／または追加の賦形剤）を必要としない。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ４．５～ｐＨ７．５のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．０～ｐＨ７．０のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．５～ｐＨ７．０のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ４．５よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．０よりも高いｐＨを有する。いくつ

かの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ５．５よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ６．０よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、ｐＨ６．５よりも高いｐＨを有する。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、加熱後の医薬品製剤溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰの封入の改善されたまたは強化された量は、医薬品製剤溶液のその後の凍結融解後に保持される。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、１０％トレハロースであり、安定的に凍結され得る。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、加熱後の医薬品製剤溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰは、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、または約５０％のトレハロース溶液中で安定的に凍結され得る（例えば、強化された封入を保持する）。いくつかの実施形態では、医薬品製剤溶液は、いかなる下流の精製または処理も必要とせず、凍結形態で安定して保存され得る。

【０１４８】

ｍＲＮＡを封入する提供されたＬＮＰ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）

本発明に従うプロセスは、より高い効力および有効性をもたらし、それによってより低い用量を可能にし、それによって治療指数を正の方向にシフトさせる。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、均質で小さな粒子サイズをもたらす。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、均質で２００ｎｍ以下の小さな粒子サイズをもたらす。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、均質で１５０ｎｍ以下の小さな粒子サイズをもたらす。いくつかの実施形態では、本発明によるプロセスは、従来の技術のプロセスと比較して、均質で小さな粒子サイズ、同様に顕著に改善された封入効率および／またはｍＲＮＡ回収率をもたらす。

【０１４９】

したがって、本発明は、本明細書に記載の精製されたｍＲＮＡ封入ナノ粒子を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物中のｍＲＮＡ封入ナノ粒子の大部分、すなわち、精製されたナノ粒子の約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％は、約１５０ｎｍ（例えば、約１４５ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１３５ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１２５ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１００ｎｍ、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、または約８０ｎｍ）のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製されたナノ粒子の実質的にすべては、約１５０ｎｍ（例えば、約１４５ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１３５ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１２５ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１００ｎｍ、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ、または約８０ｎｍ）のサイズを有する。本明細書に記載の例示的なプロセスは、脂質ナノ粒子組成物を日常的に生成し、脂質ナノ粒子は、約１５０ｎｍ以下、例えば、７５ｎｍ～１５０ｎｍ、特に１００ｎｍ～１５０ｎｍの平均サイズを有する。

【０１５０】

さらに、狭い粒子サイズ範囲を有する均質なナノ粒子は、本発明のプロセスによって達成される。例えば、本発明によって提供される組成物中の精製されたナノ粒子の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％より多くは、約７５～２００ｎｍ（例えば、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１４０ｎｍ、約７５～１３５ｎｍ、約７５～１３０ｎｍ、約７５～１２５ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、約７５～１１５ｎｍ、約７５～１１０ｎｍ、約７５～１０５ｎｍ、約７５～１００ｎｍ、約７５～９５ｎｍ、約７５～９０ｎｍ、または７５～８５ｎｍ）の範囲のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製されたナノ粒子の実質的にすべては、約７５～２００ｎｍ（例えば、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１４０ｎｍ、約７５～１３５ｎｍ、約７５～１３０ｎｍ、約７５～１２５ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、約７５～１１５ｎｍ、約７５～１１０ｎｍ、約７５～１０５ｎｍ、約７５～１００ｎｍ、約７５～９５ｎｍ、約７５～９０ｎｍ、

または７５～８５ｎｍ）の範囲のサイズを有する。
【０１５１】
いくつかの実施形態では、本発明によって提供される組成物中のナノ粒子の、分子のサイズの分散性、または不均一性の測定値（ＰＤＩ）は、約０．２３未満（例えば、約０．３、０．２、０．１９、０．１８、０．１７、０．１６、０．１５、０．１４、０．１３、０．１２、０．１１、０．１０、０．０９、または０．０８未満）である。本明細書に記載される例示的なプロセスは、約０．１５以下、例えば、約０．０１～０．１５のＰＤＩを有する脂質ナノ粒子組成物を日常的に生成する。
【０１５２】
いくつかの実施形態では、本発明によって提供される組成物中のナノ粒子の約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％より多くは、各々個別粒子内にｍＲＮＡを封入する。いくつかの実施形態では、組成物中のナノ粒子の実質的にすべては、各々個々の粒子内にｍＲＮＡを封入する。
【０１５３】
いくつかの実施形態では、本発明に従うＬＮＰは、少なくとも約１ｍｇ、５ｍｇ、１０ｍｇ、１００ｍｇ、５００ｍｇ、または１０００ｍｇの封入されたｍＲＮＡを含有する。いくつかの実施形態では、本発明に従うプロセスは、ｍＲＮＡの６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超える回収をもたらす。
【０１５４】
いくつかの実施形態では、本発明に従う組成物は、用量を対象に投与するために製剤化される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｍＲＮＡ封入ＬＮＰの組成物は、１．０ｍｇ／ｋｇ未満のｍＲＮＡ脂質ナノ粒子（例えば、０．６ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ、０．０１６ｍｇ／ｋｇ、０．０５ｍｇ／ｋｇ、および０．０１６ｍｇ／ｋｇ）の用量濃度で製剤化される。いくつかの実施形態では、用量は、より低い用量が高い効力および有効性を生じるという予想外の知見に起因し、減少される。いくつかの実施形態では、用量は、約７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％または４０％減少される。
【０１５５】
いくつかの実施形態では、本発明によって産生されたｍＲＮＡ封入ＬＮＰの効力は、ステップ（ｃ）によって調製されるとき、１００％超（すなわち、２００％超、３００％超、４００％超、５００％超、６００％超、７００％超、８００％超、または９００％超）～１０００％超強力である。
【実施例】
【０１５６】
本発明のある特定の化合物、組成物および方法は、ある特定の実施形態に従って具体的に記載されているが、一方で以下の実施例は、本発明を単に例示するという役割を果たすものであり、それを限定することを意図するものではない。
【０１５７】
脂質材料
以下の実施例に記載されている製剤は、別段規定されない限り、以前に記載されるように、様々な核酸材料を封入するよう設計された１つ以上のカチオン性脂質、ヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質および／またはコレステロール脂質）ならびにＰＥＧ化脂質を用いる、変動する割合の多成分の脂質混合物を含有する。
【０１５８】
実施例１．医薬品製剤溶液を加熱する追加のステップによる脂質ナノ粒子内のｍＲＮＡの強化され得た封入
本実施例は、プロセスＡを適用し、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰおよび遊離ｍＲＮＡを含むＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換し、その医薬品溶液を加熱することによる、脂質ナノ粒子内のｍＲＮＡの強化された封入のための、現在の例示的なプロセスを示す。本

明細書で使用される場合、プロセスＡは、例えば、第１に脂質を脂質ナノ粒子へと予め形成することなく、ｍＲＮＡを脂質の混合物と混合することによってｍＲＮＡを封入する従来的な方法を指し、全体が参照により援用される米国特許出願第ＵＳ２０１８／０００８６８０号に記載される。

【０１５９】

例示的な製剤プロセスＡは、図１に示される。本プロセスでは、いくつかの実施形態では、ＬＮＰ成分脂質が溶解される脂質溶液（例えば、エタノールを含む溶液）と、ｍＲＮＡ水溶液（ｐＨ４．５でクエン酸塩を含む）とを、別々に調製した。特に、脂質溶液（カチオン性脂質、ヘルパー脂質、両性イオン性脂質、ＰＥＧ脂質など）の溶液を、脂質をエタノールに溶解させることによって調製した。ｍＲＮＡ溶液を、ｍＲＮＡをクエン酸緩衝液に溶解させることによって調製し、４．５のｐＨのクエン酸緩衝液中のｍＲＮＡを得た。その後、混合物を、混合する前に両方６５℃まで加熱した。次いで、これらの２つの溶液をポンプシステムを使用して混合して、脂質溶液およびｍＲＮＡ溶液の混合物を含むＬＮＰ形成溶液中にｍＲＮＡ封入ＬＮＰを得た。いくつかの例では、２つの溶液を、ギアポンプシステムを使用して混合した。ある特定の実施形態では、２つの溶液を、「Ｔ」接合部（または「Ｙ」接合部）を使用して混合した。

【０１６０】

次いで、ｍＲＮＡ－ＬＮＰおよび遊離ｍＲＮＡを含むＬＮＰ形成溶液を、ＴＦＦプロセスで透析ろ過した。そのプロセスの一部として、ＬＮＰ形成溶液を、除去し、１０％トレハロースを含む医薬品製剤溶液で置換した。図２に示されるように、次いで、医薬品製剤溶液中の結果として生じたｍＲＮＡ－ＬＮＰおよび遊離ｍＲＮＡを、６５℃まで１５分間加熱した。加熱後、医薬品製剤溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰおよび遊離ｍＲＮＡを、その後の分析のために、冷却し２～８℃で保存した。

【０１６１】

図２に概説されるように、上述の封入プロセスを、以下の表１により具体的に記載されるように、１２の異なるｍＲＮＡ－ＬＮＰに対して実施した。各試験物品について、１０％トレハロースの医薬品製剤溶液中で加熱する前および後に、形成されたＬＮＰに封入されたｍＲＮＡの量を、キットＲｉｂｏＧｒｅｅｎアッセイを使用して測定して、公開された方法に従って遊離ＲＮＡを測定し、その後、封入されたｍＲＮＡを決定するための計算を行った。さらに、同じアッセイを使用して、その後の凍結融解後に形成されたＬＮＰに封入されたｍＲＮＡの量を測定し、医薬品製剤中のｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱することから観察された強化された封入が一般にｍＲＮＡ－ＬＮＰのその後の凍結融解と一定であり続けたかどうかを判定した。

【表１】

表１．本発明に従って調製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰ

試験物品	カチオン性脂質	LNP脂質比(カチオン性脂質:PEG修飾脂質:コレステロール:DOPE)	mRNA	加熱前の封入%	加熱後の封入%	凍結融解後の封入%	加熱前のサイズ(nm)/PDI	加熱後のサイズ(nm)/PDI
1	カチオン性脂質#1	40:1.5:28.5:30	FFL	31.6	78.8	未試験	220.3/0.149	236/0.129
2	カチオン性脂質#2	40:3:25:32	OTC	69.9	90.6	未試験	114.9/0.1	114.7/0.08
3	カチオン性脂質#3	20:1.5:48.5:30	EPO	75	80	未試験	134/0.378	125.1/0.213
4	カチオン性脂質#3	20:1.5:48.5:30	FFL	54	69	未試験	145.7/0.373	133.6/0.207
5	カチオン性脂質#4	20:1.5:48.5:30	EPO	35	69	未試験	125.3/0.088	130.7/0.106
6	カチオン性脂質#4	20:1.5:48.5:30	FFL	25	58	未試験	134.6/0.132	137.9/0.117
7	カチオン性脂質#5	40:3:25:32	OTC	35	91	67.7	120/0.20	118.5/0.218
8	カチオン性脂質#5	40:5:25:30	OTC	14.2	77.9	64.9	172.2/0.215	120.3/0.1
9	カチオン性脂質#6	40:5:25:30	EPO	58.5	73.1	75.3	116.3/0.173	117.3/0.15
10	カチオン性脂質#6	40:5:25:30	FFL	46.3	52.7	52.2	153.8/0.168	150.9/0.169
11	カチオン性脂質#7	20:1.5:48.5:30	EPO	29.3	77	62.8	161.9/0.035	141.2/0.024
12	カチオン性脂質#7	20:1.5:48.5:30	FFL	13.9	66	55	180.5/0.028	147.4/0.041

【０１６２】

表１および図３に示されるように、形成されたＬＮＰに封入されたｍＲＮＡの封入％は、評価されたすべての試験物品について、同じ医薬品製剤溶液中で加熱する直前と比較して、医薬品製剤溶液中で加熱した後に顕著であった。さらに、この強化された封入は、同じ医薬品製剤溶液中のｍＲＮＡ－ＬＮＰのその後の凍結融解後でさえも維持された。

【０１６３】

まとめると、本実施例のデータは、プロセスＡ、その後の医薬品製剤溶液中での加熱によって産生されたｍＲＮＡ封入脂質ナノ粒子の封入について相当な増加があることを示す。

【０１６４】

実施例２．医薬品製剤溶液を加熱した後のｍＲＮＡ－ＬＮＰによって送達されるｈＥＰＯのインビボ発現

本実施例は、プロセスＡ、その後の医薬品製剤溶液中での加熱によって産生されたｍＲＮＡ封入脂質ナノ粒子の封入において相当な増加があることを確証する。さらに、本実施例のデータは、本発明に従って調製された脂質ナノ粒子に封入されたｈＥＰＯ　ｍＲＮＡの投与後のマウスにおけるヒトＥＰＯ（ｈＥＰＯ）のインビボ発現を示す。

【０１６５】

本実施例では、ｈＥＰＯ　ｍＲＮＡは、実施例１に記載されるように、表２に示される脂質ナノ粒子に封入された。各試験物品について、形成されたＬＮＰに封入されたｍＲＮ

Ａの量を、実施例１に記載の方法を使用して、１０％スクロース中の１０ｍＭクエン酸塩の医薬品製剤溶液中での加熱の前および後に測定した。

【０１６６】

表２に示されるように、形成されたＬＮＰに封入されたｍＲＮＡの封入％は、評価されたすべての試験物品（各々は異なるカチオン性脂質を含む）について、同じ医薬品製剤溶液中で加熱する直前と比較して、医薬品製剤溶液中で加熱した後に顕著であった。

【０１６７】

次に、薬物製剤を加熱した後、マウスに、プロセスＡによって産生されたｈＥＰＯ ｍＲＮＡ封入脂質ナノ粒子の１μｇ／３０μＬでの単回用量を筋肉内経路を介して投与した。ｈＥＰＯタンパク質の血清レベルを、投与の６時間および２４時間後に測定した。

【０１６８】

治療後のマウスの血清中のｈＥＰＯタンパク質のレベルは、異なる送達方法を介したｍＲＮＡの効力を評価するために使用され得る。表２に示されるように、筋肉内注射されたｈＥＰＯ ｍＲＮＡ脂質ナノ粒子製剤は、高レベルのｈＥＰＯタンパク質をもたらした。

【表２】

表２．本発明に従って調製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの特徴およびインビボ発現

組成物	サイズ (nm)	PDI	加熱前の EE	加熱後の EE	6 時間 EPO (ng/mL)	24 時間 EPO (ng/mL)
MATE-GLA4-E16: DMG-PEG:コレステロール:DOPE 40:1.5:28.5:30	117	0.18	46%	67%	2.89±0.89	1.54±0.33
MATE-Suc2-E18:2: C8PEG2-セラミド:コレステロール:DOPE 40:1.5:28.5:30	122	0.48	50%	73%	5.20±0.39	1.17±0.21
MATE-Suc2-E14: C8PEG2-セリミド(Cerimide):コレステロール:DOPE 40:1.5:13.5:45	119	0.12	63%	75%	10.33±0.74	4.10±0.27

【０１６９】

実施例３．肺投与によって送達されるｍＲＮＡのインビボ発現

本実施例は、プロセスＡ、その後の医薬品製剤溶液中での加熱によって産生されたｍＲＮＡ封入脂質ナノ粒子の封入において相当な増加があり、多種多様なカチオン性脂質にわたって適用可能であることを確証する。さらに、本実施例のデータは、本発明に従って調製された脂質ナノ粒子に封入されたｍＲＮＡの肺投与後のマウスにおけるｍＲＮＡのインビボ発現を示す。

【０１７０】

本実施例では、ｍＲＮＡは、実施例１に記載されるように、表３に示される脂質ナノ粒子に封入された。各試験物品について、形成されたＬＮＰに封入されたｍＲＮＡの量を、実施例１に記載の方法を使用して、医薬品製剤中での加熱の前および後に測定した。

【表３】

表３．本発明に従って調製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰの特徴

試料	カチオン性脂質	組成物 (DMG-PEG2000:cat:chol:DOPE)	サイズ (nm)	PDI	加熱前のEE%	加熱後のEE%
A	VD-3-DMA	5:40:25:30	66.88	0.19	53	80.9
B	カチオン性脂質#8	5:60:0:35	68	0.127	57	92
C	カチオン性脂質#9	5:60:0:35	55	0.178	56	77
D	カチオン性脂質#10	5:40:25:30	72.09	0.13	29	93
E	カチオン性脂質#11	5:60:0:35	63	0.201	49	86
F	TL1-10D-PIP	3:40:25:32	143.2	0.244	63.8	76
G	カチオン性脂質#12	5:60:0:35	71.9	0.193	58	64
H	カチオン性脂質#13	5:60:0:35	64.8	0.152	55.0	89.4
I	カチオン性脂質#14	5:60:0:35	61.1	0.14	53.0	88.2
J	カチオン性脂質#15	5:60:0:35	55	0.224	58	68
K	カチオン性脂質#16	5:60:0:35	50	0.171	44	89
L	カチオン性脂質#17	5:40:25:30	53	0.204	59	89
M	カチオン性脂質#18	5:40:25:30	50	0.258	55	96

【０１７１】

表３および４に示されるように、形成されたＬＮＰに封入されたｍＲＮＡの封入％は、評価されたすべての試験物品（各々は異なるカチオン性脂質を含む）について、同じ医薬品製剤溶液中で加熱する直前と比較して、医薬品製剤溶液中で加熱した後に顕著であった。

【０１７２】

次に、薬物製剤を加熱した後、マウスに、プロセスＡによって調製された１０μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを肺送達を介して投与した。発現されたタンパク質の蛍光レベルを、投与２４時間後に測定した。送達されたｍＲＮＡの結果としてのタンパク質発現を、図５に示されるように、ｐ／ｓ／ｃｍ^2／ｓｒ単位で測定した。データは、肺送達によって投与されたｍＲＮＡ脂質ナノ粒子製剤が、高レベルのタンパク質発現をもたらしたことを示す。

【０１７３】

まとめると、本実施例のデータは、本発明によって調製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰが、高い封入効率をもたらし、高い発現および効力に換算されることを示す。

【０１７４】

等価物

当業者は、日常的な実験作業のみを使用して、本明細書に記載される本発明の具体的な実施形態の多くの均等物を認識するか、または確認できるであろう。本発明の範囲は、上記の記載を限定することを意図しないが、むしろ以下の特許請求の範囲に記述されるとおりである。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入するプロセスであ

って、
（ａ）脂質溶液中の１つ以上の脂質を、ｍＲＮＡ溶液中の１つ以上のｍＲＮＡと混合して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）形成溶液中の前記ＬＮＰ（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ）内に封入されたｍＲＮＡを形成するステップと、
（ｂ）前記ＬＮＰ形成溶液を医薬品製剤溶液と交換して、医薬品製剤溶液中にｍＲＮＡ－ＬＮＰを提供するステップと、
（ｃ）前記医薬品製剤溶液中で前記ｍＲＮＡ－ＬＮＰを加熱するステップと、を含み、
ステップ（ｃ）から生じる前記ｍＲＮＡ－ＬＮＰの封入効率が、ステップ（ｂ）から生じる前記ｍＲＮＡ－ＬＮＰの前記封入効率よりも大きい、プロセス。
（項目２）
ステップ（ａ）において、前記１つ以上の脂質が、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上のヘルパー脂質、および１つ以上のＰＥＧ修飾脂質を含む、項目１に記載のプロセス。
（項目３）
前記脂質が、１つ以上のコレステロール脂質（例えば、コレステロール）をさらに含む、項目２に記載のプロセス。
（項目４）
ステップ（ａ）において、前記１つ以上のカチオン性脂質が、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾール系）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００１、ＨＧＴ４００２、ＨＧＴ４００３、ＨＧＴ４００４、ＨＧＴ４００５、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡおよびＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（標的２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（標的２４）、Ｎ１ＧＬ、Ｎ２ＧＬ、Ｖ１ＧＬおよびそれらの組み合わせから選択される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目５）
ステップ（ａ）において、前記１つ以上のヘルパー脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－トランスＰＥ、１－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、またはそれらの組み合わせから選択される、項目２～４のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目６）
ステップ（ａ）において、前記１つ以上のＰＥＧ修飾脂質が、C_{6}－C_{20}長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した、長さ最大２ｋＤａ、最大３ｋＤａ、最大４ｋＤａまたは最大５ｋＤａのポリエチレングリコール鎖を含む、項目１に記載のプロセス。
（項目７）

前記脂質溶液の脂質成分が、
（ａ）カチオン性脂質、
（ｂ）ヘルパー脂質、
（ｃ）コレステロール系脂質、および
（ｄ）ＰＥＧ修飾脂質からなる、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目８）
前記カチオン性脂質対ヘルパー脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質のモル比が、約２０～５０：２５～３５：２０～５０：１～５である、項目８に記載のプロセス。
（項目９）
前記脂質溶液の脂質成分が、
（ａ）カチオン性脂質、
（ｂ）ヘルパー脂質、
（ｃ）ＰＥＧ修飾脂質からなる、項目１～６のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目１０）
前記カチオン性脂質が、コレステロール系またはイミダゾール系カチオン性脂質である、項目９に記載のプロセス。
（項目１１）
前記カチオン性脂質対ヘルパー脂質対コレステロール系脂質対ＰＥＧ修飾脂質のモル比が、約５５～６５：３０～４０：１～１５である、項目９または１０に記載のプロセス。
（項目１２）
前記ｍＲＮＡが、タンパク質またはペプチドをコードする、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目１３）
ステップ（ｃ）において、前記医薬品製剤溶液が、熱源からの熱を前記溶液に印加することによって加熱され、前記溶液が、周囲温度よりも高い温度で１０～２０分間維持される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目１４）
前記周囲温度よりも高い温度が、約６０～７０℃である、項目１３に記載のプロセス。
（項目１５）
ステップ（ｃ）後の前記封入効率が、ステップ（ｂ）後の前記封入効率を超える少なくとも５％以上を提供する、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目１６）
ステップ（ｃ）後の前記封入効率が、ステップ（ｂ）後の前記封入効率から少なくとも１０％以上改善される、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目１７）
ステップ（ａ）において、前記脂質溶液が、エタノールに溶解された脂質を含む、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目１８）
ステップ（ａ）において、前記ｍＲＮＡ溶液が、クエン酸緩衝液に溶解されたｍＲＮＡを含む、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目１９）
前記医薬品製剤溶液が、凍結保護剤を含む薬学的に許容可能な賦形剤を含む水溶液である、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２０）
前記医薬品製剤溶液が、糖を含む水溶液である、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２１）
前記糖が、トレハロース、スクロース、マンノース、ラクトース、およびマンニトールのうちの１つ以上からなる群から選択される、項目２０に記載のプロセス。
（項目２２）

前記糖が、トレハロースを含む、項目２１に記載のプロセス。
（項目２３）
ステップ（ｂ）において、前記医薬品製剤溶液が、約１０重量対体積％のトレハロースを含む水溶液である、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２４）
エタノールおよびクエン酸塩の両方が、前記医薬品製剤溶液に存在しない、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２５）
前記脂質溶液がエタノールを含み、前記ｍＲＮＡ溶液がクエン酸塩を含み、エタノールおよびクエン酸塩の両方が前記医薬品製剤溶液に存在しない、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２６）
前記ｍＲＮＡ溶液が、ｐＨ５．０未満のｐＨを有する、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
（項目２７）
前記医薬品製剤溶液が、ｐＨ５．０～ｐＨ７．０のｐＨを有する、先行項目のいずれか一項に記載のプロセス。
【図面】
【図１】

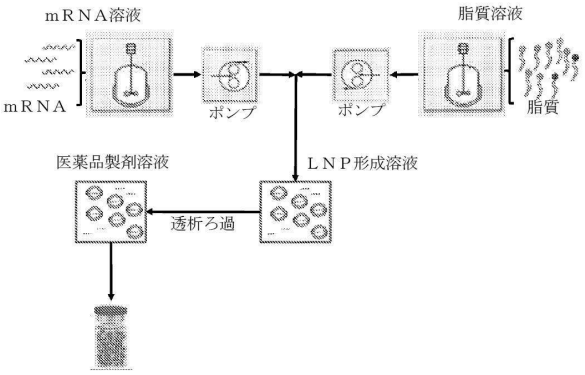


図１

【図２】

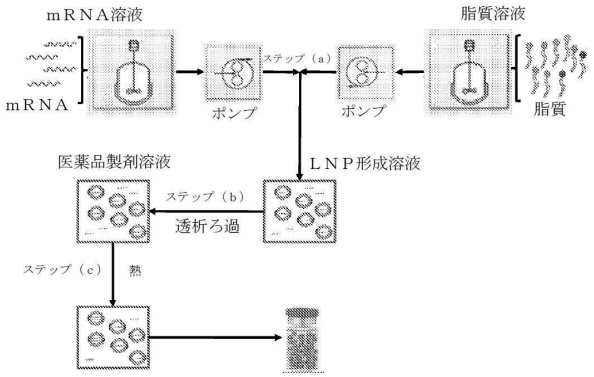


図２

【図３】

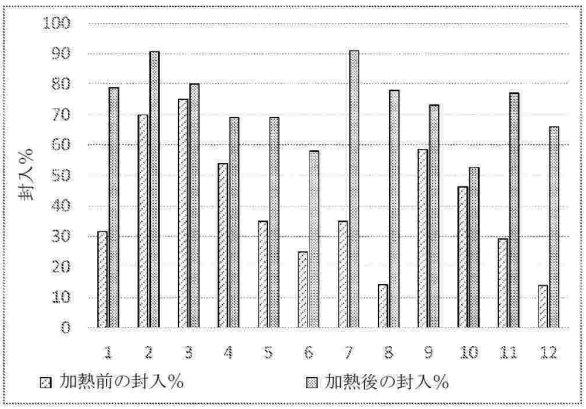


図３

【図４】

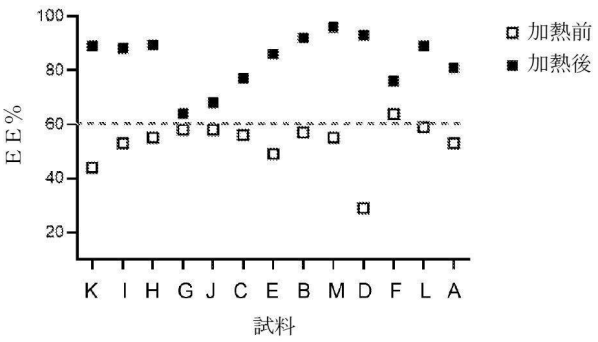


図４

【図５】

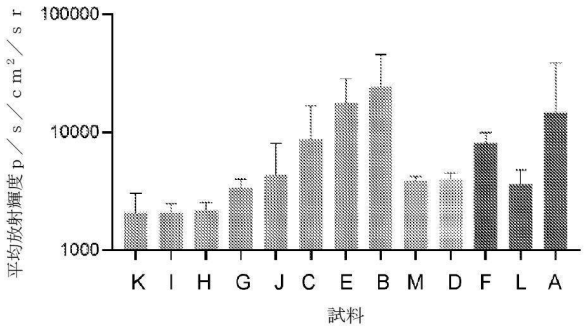


図５

【配列表】

0007707080000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
Ａ６１Ｋ	*47/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	
Ａ６１Ｋ	*47/34*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｋ	*47/26*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/26	
Ａ６１Ｋ	*9/51*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51	
Ｃ１２Ｎ	*15/88*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ ＺＮＡ

(72)発明者　デローサ， フランク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　ハートレイン， マイケル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　サロード， アシシュ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　パテル， ザルナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　ボール， レベッカ エル．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　モントーヤ， ナタリア バルガス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　パテル， プリヤル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　カンモハメド， アサド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付

審査官　長谷川 茜

(56)参考文献　国際公開第２０１８／０８９８０１（WO，Ａ１）
国際公開第２０１９／０６７９９９（WO，Ａ１）
特表２０１７－５２０５５１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）