

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-552815

(P2023-552815A)

(43)公表日 令和5年12月19日(2023.12.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16	4 C 0 7 6
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127	4 C 0 8 4
A 6 1 K	47/06 (2006.01)	A 6 1 K	47/06	4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/10 (2017.01)	A 6 1 K	47/10	
		審査請求	未請求	予備審査請求 未請求 (全74頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-534898(P2023-534898)			(71)出願人 509012625
(86)(22)出願日	令和3年12月8日(2021.12.8)			ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年8月2日(2023.8.2)			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(86)国際出願番号	PCT/US2021/062344			ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(87)国際公開番号	WO2022/125622			ウェイ 1
(87)国際公開日	令和4年6月16日(2022.6.16)			(74)代理人 110002077
(31)優先権主張番号	63/123,343			園田・小林弁理士法人
(32)優先日	令和2年12月9日(2020.12.9)			(72)発明者 ファン, ユイチェン
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			8 0 - 4 9 9 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
				(72)発明者 イェン, チューンワン
				アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂質ナノ粒子を調製するためのハイスループット方法及びその使用

(57)【要約】

様々な脂質ナノ粒子 (L N P) 組成物を最適化及び製造するためのハイスループット方法及びその使用が本明細書で提供される。例えば、いくつかの実施形態では、本開示は、L N P 組成物を製造するためのハイスループットスクリーニング方法であって、ペイロードと自己集合することができる複数の分子とを含む少なくとも2つの混合可能な溶液を得ることと、一連の制御された条件下で前記少なくとも2つの溶液を混合することを含み、それによって注入順序、速度、体積、相比及び混合持続時間が変動する、ハイスループットスクリーニング方法を提供する。様々な実施形態において、本開示は、最適な封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性を決定することを可能にする。本明細書に開示される方法は、L N P ベースの治療薬を調製するための製造条件の効率的な最適化を可能にする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質ナノ粒子（LNP）調製物を製造するための最適化されたハイスループットスクリーニング方法であって、

- a. 水相を含む第 1 の溶液を得ること；
 - b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第 2 の溶液を得ることであって、前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液が混合可能である、第 2 の溶液を得ること；
 - c. 少なくとも 1 つのペイロード分子を前記第 1 の溶液又は前記第 2 の溶液のいずれかに溶解すること；
 - d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；
 - e. 前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液を混合して、LNP 形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及び pH の選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも 1 つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；
 - f. 前記 LNP の封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも 1 つを測定すること；
 - g. 前記 LNP 調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；並びに
 - h. 前記最適なパラメータに基づいて前記 LNP 調製物を製造すること
- を含む、最適化されたハイスループットスクリーニング方法。

10

20

【請求項 2】

前記ペイロードがオリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記オリゴヌクレオチドがアンチセンス分子である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチドが siRNA である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドが shRNA である、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドが約 10 ～ 約 30 ヌクレオチド長である、請求項 2 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ペイロードが mRNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

mRNA のサイズが約 500 ～ 約 3000 ヌクレオチド長である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ペイロードがポリペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記ポリペプチドが約 1,000 Da ～ 約 10,000 Da である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ペイロードが小分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記小分子が約 100 Da ～ 1000 Da である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ペイロードが前記第 1 の溶液に溶解される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記ペイロードが前記第 2 の溶液に溶解される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 1 の溶液が水性緩衝液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 の溶液が、pH 調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 2 の溶液の前記有機相がメタノールを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 2 の溶液の前記有機相がエタノールを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記自己集合性分子が、少なくとも 1 種の脂質分子から構成される少なくとも 1 つの脂質成分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記少なくとも 1 種の脂質分子が、カチオン性脂質種、イオン化可能な脂質種、非カチオン性脂質種、リン脂質種、及び非リン脂質種からなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 2 の溶液が、2 種類以上の脂質を含む、請求項 19 又は 20 に記載の方法。

【請求項 22】

20

脂質の総濃度が変動する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

脂質の総濃度が約 0.4 ～ 約 4 mM の間で変動する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

PEG 化されている脂質のパーセンテージが変動する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

PEG 化されている脂質のパーセンテージが、全脂質組成の約 0.5 % ～ 約 5 % の間で変動する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ペイロードの N : P 比が変動する、請求項 2 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記 N : P 比が約 0.5 ～ 約 5 の間で変動する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 LNP がポリマー脂質ナノ粒子である、請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 LNP がリボソームである、請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 LNP がリボタンパク質ナノ粒子である、請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 31】

前記第 1 の溶液が、前記第 2 の溶液に注入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 2 の溶液が、前記第 1 の溶液に注入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

前記最適なパラメータが、80 % を超える前記ペイロードの封入効率をもたらすパラメータである、請求項 1 ～ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記最適なパラメータが、単峰性サイズ分布及び約 30 % 未満の多分散性を有する、80 ～ 200 nm の平均直径を有する LNP をもたらすパラメータである、請求項 1 ～ 32

50

のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記 LNP が、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

脂質ナノ粒子 (LNP) 調製物を製造するための方法を最適化するためのハイスループット方法であって、

- a. 水相を含む第1の溶液を得ること；
 - b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；
 - c. 少なくとも1つのペイロード分子を前記第1の溶液又は前記第2の溶液のいずれかに溶解すること；
 - d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；
 - e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP 形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及び pH の選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；
 - f. 前記 LNP の封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；
 - g. 前記 LNP 調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；並びに
 - h. 前記最適なパラメータに基づいて前記 LNP 調製物を製造すること
- を含む、ハイスループット方法。

10

20

【請求項 37】

前記ペイロードがオリゴヌクレオチドである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記オリゴヌクレオチドがアンチセンス分子である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記オリゴヌクレオチドが siRNA である、請求項 37 に記載の方法。

30

【請求項 40】

前記オリゴヌクレオチドが shRNA である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

前記オリゴヌクレオチドが約 10～約 30 ヌクレオチド長である、請求項 37～42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記ペイロードが mRNA である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 43】

mRNA のサイズが約 1 kb～約 2 kb である、請求項 42 に記載の方法。

40

【請求項 44】

前記ペイロードがポリペプチドである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 45】

前記ポリペプチドが約 1,000 Da～約 10,000 Da である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 46】

前記ペイロードが小分子である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 47】

前記小分子が約 100 Da～1000 Da である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

50

- 前記ペイロードが前記第 1 の溶液に溶解される、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 4 9】
- 前記ペイロードが前記第 2 の溶液に溶解される、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 5 0】
- 前記第 1 の溶液が水性緩衝液である、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 5 1】
- 前記第 1 の溶液が、p H 調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 5 2】
- 前記第 2 の溶液の前記有機相がメタノールを含む、請求項 3 6 に記載の方法。 10
- 【請求項 5 3】
- 前記第 2 の溶液の前記有機相がエタノールを含む、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 5 4】
- 前記自己集合性分子が、少なくとも 1 種の脂質分子から構成される少なくとも 1 つの脂質成分を含む、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 5 5】
- 前記少なくとも 1 種の脂質分子が、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。
- 【請求項 5 6】
- 前記第 2 の溶液が、2 種類以上の脂質を含む、請求項 5 4 又は 5 5 に記載の方法。 20
- 【請求項 5 7】
- 脂質の総濃度が変動する、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 5 8】
- 脂質の総濃度が約 0 . 4 ～約 4 m M の間で変動する、請求項 5 7 に記載の方法。
- 【請求項 5 9】
- P E G 化されている脂質のパーセンテージが変動する、請求項 5 4 又は 5 5 に記載の方法。
- 【請求項 6 0】
- P E G 化されている脂質のパーセンテージが、全脂質組成の約 0 . 5 % ～約 5 % の間で変動する、請求項 5 9 に記載の方法。 30
- 【請求項 6 1】
- 前記ペイロードの N : P 比が変動する、請求項 3 7 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 6 2】
- 前記 N : P 比が約 0 . 5 ～約 5 の間で変動する、請求項 6 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 3】
- 前記 L N P がポリマー脂質ナノ粒子である、請求項 3 6 ～ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 6 4】
- 前記 L N P がリポソームである、請求項 3 6 ～ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。 40
- 【請求項 6 5】
- 前記 L N P がリボタンパク質ナノ粒子である、請求項 3 6 ～ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 6 6】
- 前記第 1 の溶液が、前記第 2 の溶液に注入される、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 6 7】
- 前記第 2 の溶液が、前記第 1 の溶液に注入される、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 6 8】
- 前記最適なパラメータが、8 0 % を超える前記ペイロードの封入効率をもたらすパラメータである、請求項 3 6 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 69】

前記最適なパラメータが、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである、請求項36～67のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記LNPが、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する、請求項36～67のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

脂質ナノ粒子（LNP）調製物にペイロードを封入するための最適化されたハイスループット方法であって、

- a. 水相を含む第1の溶液を得ること；
 - b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；
 - c. 少なくとも1つのペイロード分子を前記第1の溶液又は前記第2の溶液のいずれかに溶解すること；
 - d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；
 - e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；
 - f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；
 - g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；並びに
 - h. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造すること
- を含む、最適化されたハイスループット方法。

【請求項 72】

前記ペイロードがオリゴヌクレオチドである、請求項71に記載の方法。

【請求項 73】

前記オリゴヌクレオチドがアンチセンス分子である、請求項72に記載の方法。

【請求項 74】

前記オリゴヌクレオチドがsiRNAである、請求項73に記載の方法。

【請求項 75】

前記オリゴヌクレオチドがshRNAである、請求項73に記載の方法。

【請求項 76】

前記オリゴヌクレオチドが約10～約30ヌクレオチド長である、請求項72～75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記ペイロードがmRNAである、請求項71に記載の方法。

【請求項 78】

mRNAのサイズが約1kb～約2kbである、請求項77に記載の方法。

【請求項 79】

前記ペイロードがポリペプチドである、請求項71に記載の方法。

【請求項 80】

前記ポリペプチドが約1,000Da～約10,000Daである、請求項79に記載の方法。

【請求項 81】

前記ペイロードが小分子である、請求項71に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 8 2】
前記小分子が約 1 0 0 D a ～ 1 0 0 0 D a である、請求項 8 1 に記載の方法。
- 【請求項 8 3】
前記ペイロードが前記第 1 の溶液に溶解される、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 8 4】
前記ペイロードが前記第 2 の溶液に溶解される、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 8 5】
前記第 1 の溶液が水性緩衝液である、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 8 6】
前記第 1 の溶液が、p H 調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む、
請求項 7 1 に記載の方法。 10
- 【請求項 8 7】
前記第 2 の溶液の前記有機相がメタノールを含む、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】
前記第 2 の溶液の前記有機相がエタノールを含む、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 8 9】
前記自己集合性分子が、少なくとも 1 種の脂質分子から構成される少なくとも 1 つの脂
質成分を含む、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 9 0】
前記少なくとも 1 種の脂質分子が、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン
脂質種から選択される、請求項 8 9 に記載の方法。 20
- 【請求項 9 1】
前記第 2 の溶液が、2 種類以上の脂質を含む、請求項 8 9 又は 9 0 に記載の方法。
- 【請求項 9 2】
脂質の総濃度が変動する、請求項 8 9 又は 9 0 に記載の方法。
- 【請求項 9 3】
脂質の総濃度が約 0 . 4 ～約 4 m M の間で変動する、請求項 9 2 に記載の方法。
- 【請求項 9 4】
P E G 化されている脂質のパーセンテージが変動する、請求項 8 9 又は 9 0 に記載の方
法。 30
- 【請求項 9 5】
P E G 化されている脂質のパーセンテージが、全脂質組成の約 0 . 5 % ～約 5 % の間で
変動する、請求項 9 4 に記載の方法。
- 【請求項 9 6】
前記ペイロードの N : P 比が変動する、請求項 7 2 ～ 7 8 のいずれか一項に記載の方法
。
- 【請求項 9 7】
前記 N : P 比が約 0 . 5 ～約 5 の間で変動する、請求項 9 6 に記載の方法。
- 【請求項 9 8】
前記 L N P がポリマー脂質ナノ粒子である、請求項 7 1 ～ 9 7 のいずれか一項に記載の
方法。 40
- 【請求項 9 9】
前記 L N P がリボソームである、請求項 7 1 ～ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 1 0 0】
前記 L N P がリボタンパク質ナノ粒子である、請求項 7 1 ～ 9 7 のいずれか一項に記載
の方法。
- 【請求項 1 0 1】
前記第 1 の溶液が、前記第 2 の溶液に注入される、請求項 7 1 に記載の方法。
- 【請求項 1 0 2】
前記第 2 の溶液が、前記第 1 の溶液に注入される、請求項 7 1 に記載の方法。 50

【請求項 103】

前記最適なパラメータが、80%を超える前記ペイロードの封入効率をもたらすパラメータである、請求項71～102のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

前記最適なパラメータが、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである、請求項71～102のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

前記LNPが、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する、請求項71～102のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 106】

LNP調製物を、それを必要とする患者に投与する方法であって、前記LNP調製物が、

- a. 水相を含む第1の溶液を得ること；
- b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；
- c. 少なくとも1つのペイロード分子を前記第1の溶液又は前記第2の溶液のいずれかに溶解すること；

d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；

20

e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；

f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；

g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；並びに

h. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造すること

30

によって製造される、方法。

【請求項 107】

前記ペイロードがオリゴヌクレオチドである、請求項106に記載の方法。

【請求項 108】

前記オリゴヌクレオチドがアンチセンス分子である、請求項107に記載の方法。

【請求項 109】

前記オリゴヌクレオチドがsiRNAである、請求項108に記載の方法。

【請求項 110】

前記オリゴヌクレオチドがshRNAである、請求項108に記載の方法。

【請求項 111】

前記オリゴヌクレオチドが約10～約30ヌクレオチド長である、請求項107～110のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 112】

前記ペイロードがmRNAである、請求項106に記載の方法。

【請求項 113】

mRNAのサイズが約1kb～約2kbである、請求項112に記載の方法。

【請求項 114】

前記ペイロードがポリペプチドである、請求項106に記載の方法。

【請求項 115】

前記ポリペプチドが約1,000Da～約10,000Daである、請求項114に記

50

載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記ペイロードが小分子である、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記小分子が約 1 0 0 D a ～ 1 0 0 0 D a である、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記ペイロードが前記第 1 の溶液に溶解される、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記ペイロードが前記第 2 の溶液に溶解される、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記第 1 の溶液が水性緩衝液である、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記第 1 の溶液が、pH 調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記第 2 の溶液の前記有機相がメタノールを含む、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記第 2 の溶液の前記有機相がエタノールを含む、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記自己集合性分子が、少なくとも 1 種の脂質分子から構成される少なくとも 1 つの脂質成分を含む、請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記少なくとも 1 種の脂質分子が、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記第 2 の溶液が、2 種類以上の脂質を含む、請求項 1 2 4 又は 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

脂質の総濃度が変動する、請求項 1 2 4 又は 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

脂質の総濃度が約 0 . 4 ～ 約 4 m M の間で変動する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

P E G 化されている脂質のパーセンテージが変動する、請求項 1 2 4 又は 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

P E G 化されている脂質のパーセンテージが、全脂質組成の約 0 . 5 % ～ 約 5 % の間で変動する、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記ペイロードの N : P 比が変動する、請求項 1 0 7 ～ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記 N : P 比が約 0 . 5 ～ 約 5 の間で変動する、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記 L N P がポリマー脂質ナノ粒子である、請求項 1 0 6 ～ 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記 L N P がリボソームである、請求項 1 0 6 ～ 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記 L N P がリボタンパク質ナノ粒子である、請求項 1 0 6 ～ 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

10

20

30

40

50

前記第 1 の溶液が、前記第 2 の溶液に注入される、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 137】

前記第 2 の溶液が、前記第 1 の溶液に注入される、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 138】

前記最適なパラメータが、80%を超える前記ペイロードの封入効率をもたらすパラメータである、請求項 106～137 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 139】

前記最適なパラメータが、単峰性サイズ分布及び約 30%未満の多分散性を有する、80～200 nm の平均直径を有する LNP をもたらすパラメータである、請求項 106～137 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 140】

前記 LNP が、4℃の溶液中での保存下で少なくとも 1 ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する、請求項 106～137 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 141】

脂質ナノ粒子（LNP）調製物を製造するための最適化されたハイスループットスクリーニング方法であって、

a. 水相を含む第 1 の溶液を得ること；

b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第 2 の溶液を得ることであって、前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液が混合可能である、第 2 の溶液を得ること；

c. 少なくとも 1 つのペイロード分子を前記第 1 の溶液又は前記第 2 の溶液のいずれかに溶解すること；

d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；

e. 前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液を混合して、LNP 形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及び pH の選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも 1 つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；

f. 前記 LNP の封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも 1 つを測定すること；

g. 前記 LNP 調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；並びに

h. 前記最適なパラメータに基づいて前記 LNP 調製物を製造することを含む、最適化されたハイスループットスクリーニング方法。

20

30

【請求項 142】

前記ペイロードがオリゴヌクレオチドである、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 143】

前記オリゴヌクレオチドがアンチセンス分子である、請求項 142 に記載の方法。

【請求項 144】

前記オリゴヌクレオチドが siRNA である、請求項 142 に記載の方法。

40

【請求項 145】

前記オリゴヌクレオチドが shRNA である、請求項 142 に記載の方法。

【請求項 146】

前記オリゴヌクレオチドが約 10～約 30 ヌクレオチド長である、請求項 142～145 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 147】

前記ペイロードが mRNA である、請求項 141 に記載の方法。

【請求項 148】

mRNA のサイズが約 1 kb～約 2 kb である、請求項 147 に記載の方法。

【請求項 149】

50

前記ペイロードがポリペプチドである、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記ポリペプチドが約 1 , 0 0 0 D a ~ 約 1 0 , 0 0 0 D a である、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記ペイロードが小分子である、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記小分子が約 1 0 0 D a ~ 1 0 0 0 D a である、請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記ペイロードが前記第 1 の溶液に溶解される、請求項 1 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 5 4】

前記ペイロードが前記第 2 の溶液に溶解される、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

前記第 1 の溶液が水性緩衝液である、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

前記第 1 の溶液が、p H 調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

前記第 2 の溶液の前記有機相がメタノールを含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

20

前記第 2 の溶液の前記有機相がエタノールを含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記自己集合性分子が、少なくとも 1 種の脂質分子から構成される少なくとも 1 つの脂質成分を含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

前記少なくとも 1 種の脂質分子が、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される、請求項 1 5 9 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記第 2 の溶液が、2 種類以上の脂質を含む、請求項 1 5 9 又は 1 6 0 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

30

脂質の総濃度が変動する、請求項 1 5 9 又は 1 6 0 に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

脂質の総濃度が約 0 . 4 ~ 約 4 m M の間で変動する、請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

P E G 化されている脂質のパーセンテージが変動する、請求項 1 5 9 又は 1 6 0 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

P E G 化されている脂質のパーセンテージが、全脂質組成の約 0 . 5 % ~ 約 5 % の間で変動する、請求項 1 6 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

40

前記ペイロードの N : P 比が変動する、請求項 1 4 2 ~ 1 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記 N : P 比が約 0 . 5 ~ 約 5 の間で変動する、請求項 1 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記 L N P がポリマー脂質ナノ粒子である、請求項 1 4 1 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

前記 L N P がリボソームである、請求項 1 4 1 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

50

前記 L N P がリボタンパク質ナノ粒子である、請求項 1 4 1 ～ 1 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 1】

前記第 1 の溶液が、前記第 2 の溶液に注入される、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 7 2】

前記第 2 の溶液が、前記第 1 の溶液に注入される、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 7 3】

前記最適なパラメータが、80%を超える前記ペイロードの封入効率をもたらすパラメータである、請求項 1 4 1 ～ 1 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 4】

前記最適なパラメータが、単峰性サイズ分布及び約 30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有する L N P をもたらすパラメータである、請求項 1 4 1 ～ 1 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 5】

前記 L N P が、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する、請求項 1 4 1 ～ 1 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 6】

以下の工程：

a．水相を含む第 1 の溶液を得ること；

b．有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第 2 の溶液を得ることであって、前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液が混合可能である、第 2 の溶液を得ること；

c．少なくとも1つのペイロード分子を前記第 1 の溶液又は前記第 2 の溶液のいずれかに溶解すること；

d．ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；

e．前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液を混合して、L N P 形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及び pH の選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；

f．前記 L N P の封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；

g．前記 L N P 調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；並びに

h．前記最適なパラメータに基づいて前記 L N P 調製物を製造することを含む方法によって製造される、最適化された脂質ナノ粒子（L N P）。

【請求項 1 7 7】

前記ペイロードがオリゴヌクレオチドである、請求項 1 7 6 に記載の方法。

【請求項 1 7 8】

前記オリゴヌクレオチドがアンチセンス分子である、請求項 1 7 7 に記載の方法。

【請求項 1 7 9】

前記オリゴヌクレオチドが s i R N A である、請求項 1 7 8 に記載の方法。

【請求項 1 8 0】

前記オリゴヌクレオチドが s h R N A である、請求項 1 7 8 に記載の方法。

【請求項 1 8 1】

前記オリゴヌクレオチドが約 10 ～ 約 30 ヌクレオチド長である、請求項 1 7 7 ～ 1 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8 2】

前記ペイロードが m R N A である、請求項 1 7 6 に記載の方法。

【請求項 1 8 3】

10

20

30

40

50

mRNAのサイズが約1 kb～約2 kbである、請求項182に記載の方法。

【請求項184】

前記ペイロードがポリペプチドである、請求項176に記載の方法。

【請求項185】

前記ポリペプチドが約1,000 Da～約10,000 Daである、請求項184に記載の方法。

【請求項186】

前記ペイロードが小分子である、請求項176に記載の方法。

【請求項187】

前記小分子が約100 Da～1000 Daである、請求項186に記載の方法。

10

【請求項188】

前記ペイロードが前記第1の溶液に溶解される、請求項176に記載の方法。

【請求項189】

前記ペイロードが前記第2の溶液に溶解される、請求項176に記載の方法。

【請求項190】

前記第1の溶液が水性緩衝液である、請求項176に記載の方法。

【請求項191】

前記第1の溶液が、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む、請求項176に記載の方法。

【請求項192】

前記第2の溶液の前記有機相がメタノールを含む、請求項176に記載の方法。

20

【請求項193】

前記第2の溶液の前記有機相がエタノールを含む、請求項176に記載の方法。

【請求項194】

前記自己集合性分子が、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む、請求項176に記載の方法。

【請求項195】

前記少なくとも1種の脂質分子が、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される、請求項194に記載の方法。

【請求項196】

前記第2の溶液が、2種類以上の脂質を含む、請求項194又は195に記載の方法。

30

【請求項197】

脂質の総濃度が変動する、請求項194又は195に記載の方法。

【請求項198】

脂質の総濃度が約0.4～約4 mMの間で変動する、請求項197に記載の方法。

【請求項199】

PEG化されている脂質のパーセンテージが変動する、請求項194又は195に記載の方法。

【請求項200】

PEG化されている脂質のパーセンテージが、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する、請求項199に記載の方法。

40

【請求項201】

前記ペイロードのN:P比が変動する、請求項177～183のいずれか一項に記載の方法。

【請求項202】

前記N:P比が約0.5～約5の間で変動する、請求項201に記載の方法。

【請求項203】

前記LNPがポリマー脂質ナノ粒子である、請求項176～202のいずれか一項に記載の方法。

【請求項204】

50

前記 L N P がリボソームである、請求項 1 7 6 ～ 2 0 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0 5】

前記 L N P がリボタンパク質ナノ粒子である、請求項 1 7 6 ～ 2 0 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0 6】

前記第 1 の溶液が、前記第 2 の溶液に注入される、請求項 1 7 6 に記載の方法。

【請求項 2 0 7】

前記第 2 の溶液が、前記第 1 の溶液に注入される、請求項 1 7 6 に記載の方法。

【請求項 2 0 8】

前記最適なパラメータが、80%を超える前記ペイロードの封入効率をもたらすパラメータである、請求項 1 7 6 ～ 2 0 7 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 2 0 9】

前記最適なパラメータが、単峰性サイズ分布及び約 30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有する L N P をもたらすパラメータである、請求項 1 7 6 ～ 2 0 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 0】

前記 L N P が、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する、請求項 1 7 6 ～ 2 0 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 1】

L N P 形成のための複数のパラメータの H T S スクリーニングのためのワークフローであって、 20

(i) ロボット液体ハンドラ；

(i i) 所望の L N P 特性を測定することができる少なくとも1つの機器；及び

(i i i) 複数のマイクロウェルを含む少なくとも1つのマイクロプレート、を含み、前記ロボット液体ハンドラは、前記マイクロウェルの各々に複数の溶液を注入することができ；

前記パラメータは、マイクロウェル間で系統的に変動し；及び

前記所望の L N P 特性は、各マイクロウェルについて測定することができる、ワークフロー。

【請求項 2 1 2】

前記複数のパラメータが、総脂質含有量、自己集合分子のタイプ；前記自己集合分子の組成比；前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度；相、緩衝液タイプ及び p H の選択、注入順序、体積及び速度、並びに混合持続時間から選択される、請求項 2 1 1 に記載の方法。 30

【請求項 2 1 3】

前記所望の L N P 特性が、平均粒径、粒径分布、封入効率及び粒子安定性からなる群から選択される、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 1 4】

前記機器が、動的光散乱 (D L S) 、紫外可視 (U V - V i s) 分光法又は蛍光分光法のいずれかが可能である、請求項 2 1 1 に記載のワークフロー。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2020年12月9日に出願された米国仮特許出願第 63 / 123, 343 号の優先権及び利益を主張し、その全内容は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

脂質ナノ粒子（LNP）は、生体適合性で安定な医薬送達プラットフォームとして広く開発されてきた。脂質ナノ粒子を調製するために使用される脂質は、通常、低毒性の生理学的脂質（生体適合性及び生分解性）である。脂質の物理化学的多様性及び生体適合性、並びに薬物の経口バイオアベイラビリティを高めるそれらの能力は、脂質ナノ粒子を薬物送達にとって非常に魅力的な担体に行っている。さらに、脂質ベースの製剤は、可溶化能力の増加、腸希釈に対する薬物沈殿の防止、膜透過性の増強、排出輸送体の阻害、CYP酵素の減少、カイロミクロン産生及びリンパ輸送の増強を含むいくつかの方法で薬物吸収にプラスの影響を及ぼすことができる。LNPは、siRNA送達のための主要な非ウイルス担体であり、2019年の時点でナノ医薬臨床試験の70%で使用されている。Ans elmo S et al., 2019, Bioeng. Transl. Med. 4 (3) : e10143.

10

【0003】

脂質系ナノキャリアは、その複雑な物理化学的特性に部分的に起因して、薬物製品の品質管理においてさらなる課題をもたらす。米国FDAによって最近公表されたリポソーム薬物製品に関するガイダンスによれば、これらの製剤は、粒子構造及びサイズ分布、粒子表面の物理化学的特性、脂質含有量、遊離APIの量及び封入効率、並びに物理的及び化学的安定性を含む品質属性について指定されるべきである。異なる調製条件及びパラメータは、LNP製剤の品質属性に影響を及ぼし得る。例えば、脂質組成、特に異なる量及び／又は分子量のPEG化脂質の組み込みは、リポソームのコロイド安定性、細胞取り込み、及び薬物動態に有意に影響を及ぼしたが（例えばAllen et al., 1991, Biochem Biophys Acta, 1066 (1) : 29-36; Garbuzenko et al., 2005, Chem Phys Lipids, 135 (2) : 117-29; Immordino et al., Int J Nanomedicine 1 (3) (2006) 297-315を参照）、siRNA又はASO負荷は、カチオン性脂質との電荷媒介性相互作用によって調整され得る。Schroeder et al., 2010, J Intern Med 267 (1) : 9-21; Cullis et al., 2017, Mol Ther 25 (7) : 1467-1475。LNPの下流性能もまた、それらの品質属性によって高度に左右される。したがって、様々なレベルのこれらのパラメータのスクリーニングは、容易な手順及び複数の分析出力を有するハイスループットアプローチを非常に必要とする。

20

30

【発明の概要】

【0004】

発明の概要

脂質ベースのナノ医薬のスクリーニング及び最適化の必要性に対処するために、本開示は、様々な治療ペイロードを封入するそのような脂質ベースのナノ粒子を調製するためのハイスループットスクリーニング（HTS）ワークフローを提供する。様々な実施形態において、本発明は、ロボット液体ハンドラを使用してLNPの容易な自己集合のための最適化された溶媒注入方法を提供する。様々な実施形態において、最適な脂質組成、総脂質濃度、及びペイロードの負荷量が記載される。

【0005】

40

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子（LNP）調製物を製造するための最適化されたハイスループットスクリーニング方法に関し、本方法は、a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度

50

、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f．前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g．前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh．前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む。

【0006】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは、約500～3000ヌクレオチドである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000Da～約10,000Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da～1000Daである。

【0007】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

【0008】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性又はイオン化可能な脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4～約4mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

【0009】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリボソームである。様々な実施形態において、LNPはリボタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

【0010】

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子(LNP)調製物を製造するための方法を最適化するためのハイスループット方法に関し、本方法は、a．水相を含む第1の溶液を得ること；b．有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c．少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれ

10

20

30

40

50

かに溶解すること；d．ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e．前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f．前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g．前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh．前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む。

10

【0011】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1kb～約2kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000Da～約10,000Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da～1000Daである。

20

【0012】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

【0013】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4～約4mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

30

【0014】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリボソームである。様々な実施形態において、LNPはリポタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

40

【0015】

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子（LNP）調製物中にペイロードを

50

封入するための最適化されたハイスループット方法に関し、本方法は、a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む。

10

【0016】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1kb～約2kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000Da～約10,000Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da～1000Daである。

20

【0017】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

30

【0018】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4～約4mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

40

【0019】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリボソームである。様々な実施形態において、LNPはリボタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有するLNPをも

50

たらずパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

【0020】

様々な実施形態において、本開示は、LNP調製物を、それを必要とする患者に投与する方法に関し、前記LNP調製物は、a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することによって製造される。

10

20

【0021】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1kb～約2kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000Da～約10,000Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da～1000Daである。

30

【0022】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

【0023】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4～約4mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

40

【0024】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリボソームである。様々な実施形態において、LNPはリポタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入され

50

る。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80~200nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

【0025】

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子（LNP）調製物中にペイロードを封入するための最適化されたハイスループット方法に関し、本方法は、a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む。

【0026】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10~約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1kb~約2kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000Da~約10,000Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da~1000Daである。

【0027】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

【0028】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4~約4mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%~約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5~約5の間で変動する。

10

20

30

40

50

【0029】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリボソームである。様々な実施形態において、LNPはリボタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80~200nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

10

【0030】

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子（LNP）調製物を製造するための最適化されたハイスループットスクリーニング方法に関し、本方法は、a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む。

20

【0031】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10~約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1kb~約2kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000Da~約10,000Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da~1000Daである。

30

【0032】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

40

【0033】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4~約4mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテ

50

ージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

【0034】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリポソームである。様々な実施形態において、LNPはリポタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

10

【0035】

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子(LNP)調製物中にペイロードを封入するための最適化されたハイスループット方法に関し、本方法は、a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む。

20

30

【0036】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1kb～約2kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000Da～約10,000Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da～1000Daである。

40

【0037】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

【0038】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分

50

子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4～約4 mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

【0039】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリボソームである。様々な実施形態において、LNPはリポタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200 nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

【0040】

様々な実施形態において、本開示は、以下の工程：a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む方法によって製造された、最適化された脂質ナノ粒子（LNP）に関する。

【0041】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1 kb～約2 kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000 Da～約10,000 Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100 Da～1000 Daである。

【0042】

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメ

タノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

【0043】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4～約4 mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

10

【0044】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリボソームである。様々な実施形態において、LNPはリポタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200 nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

20

【0045】

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子(LNP)調製物中にペイロードを封入するための最適化されたハイスループット方法に関し、本方法は、a. 水相を含む第1の溶液を得ること；b. 有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；c. 少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；d. ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；e. 前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボット液体ハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；f. 前記LNPの封入効率、粒径分布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；g. 前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；及びh. 前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む。

30

【0046】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはshRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10～約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、mRNAのサイズは約1 kb～約2 kbである。様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、前記ポリペプチドは、約1,000 Da～約10,000 Daである。様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100 Da～1000 Daである。

40

【0047】

50

様々な実施形態において、ペイロードは第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、第1の溶液は水性緩衝液である。様々な実施形態において、第1の溶液は、pH調整済み緩衝液及び重量オスモル濃度調整済み緩衝液を含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はメタノールを含む。様々な実施形態において、第2の溶液の有機相はエタノールを含む。

【0048】

様々な実施形態において、自己集合性分子は、少なくとも1種の脂質分子から構成される少なくとも1つの脂質成分を含む。様々な実施形態において、少なくとも1種の脂質分子は、カチオン性脂質種、非カチオン性脂質種、及びリン脂質種から選択される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、脂質の総濃度は変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4～約4 mMの間で変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは変動する。様々な実施形態において、PEG化されている脂質のパーセンテージは、全脂質組成の約0.5%～約5%の間で変動する。様々な実施形態において、ペイロードのN:P比は変動する。様々な実施形態において、N:P比は、約0.5～約5の間で変動する。

【0049】

様々な実施形態において、LNPはポリマー脂質ナノ粒子である。様々な実施形態において、LNPはリポソームである。様々な実施形態において、LNPはリポタンパク質ナノ粒子である。様々な実施形態において、前記第1の溶液は、前記第2の溶液に注入される。様々な実施形態において、前記第2の溶液は、前記第1の溶液に注入される。様々な実施形態において、最適なパラメータは、80%を超えるペイロードの封入効率をもたらすパラメータである。様々な実施形態において、最適なパラメータは、単峰性サイズ分布及び約30%未満の多分散性を有する、80～200 nmの平均直径を有するLNPをもたらすパラメータである。様々な実施形態において、LNPは、4℃の溶液中での保存下で少なくとも1ヶ月間、同様のサイズ分布及びペイロード封入を維持する。

【0050】

様々な実施形態において、本開示は、LNP形成についての複数のパラメータのHTSスクリーニングのためのワークフローであって、(i) ロボット液体ハンドラ；(ii) 所望のLNP特性を測定することができる少なくとも1つの機器；及び；(iii) 複数のマイクロウェルを含む少なくとも1つのマイクロプレート、を含み、前記ロボット液体ハンドラは、前記マイクロウェルの各々に複数の溶液を注入することができ；前記パラメータは、マイクロウェル間で系統的に変動し；前記所望のLNP特性は、各マイクロウェルについて測定することができる、ワークフローに関する。

【0051】

様々な実施形態において、複数のパラメータは、総脂質含有量、自己集合分子のタイプ；前記自己集合分子の組成比；前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度；相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、体積及び速度、並びに混合持続期間から選択される。様々な実施形態において、所望のLNP特性は、平均粒径、粒径分布、封入効率及び粒子安定性からなる群から選択される。様々な実施形態において、機器は、動的光散乱(DLS)、紫外可視(UV-Vis)分光法又は蛍光分光法のいずれかが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1A-1F】 高速のエタノール-緩衝液注入とそれに続く複数回の混合により生成された、ASO負荷が高い均一なLNPのデータを示す。0.4 μ molの総脂質及び1.5 mol%のDSPC-PEG2000で構成されるLNPを、異なる混合条件を使用して1のN/P比の下でASO-1と混合した。TECANロボットを使用して、0.1、0.5、又は0.9 ml/sの速度での逆の注入順序(エタノール-緩衝液又は緩衝液-エタノール)とそれに続く10回の混合反復(図1A～1C)、又は0.5又は0.9 m

l / s の速度でのエタノール-緩衝液注入とそれに続く10又は20回の混合反復（図1D～1F）を調査した。粒径（図1A及び1D）及び多分散性（図1B及び1E）を動的光散乱（DLS）によって測定した。遊離ASO-1をOD260によって測定し、封入効率について計算した（図1C及び1F）。結果は平均±SD、n=3であり；ns、有意ではない、****P<0.0001、（図1A～1C）二元配置又は一元配置（図1D～1F）ANOVA、引き続いてTukeyの多重比較によって分析した。

【0053】

【図2】ASO負荷LNP製剤のHTSワークフローを示す。TECAN（登録商標）液体ハンドラを使用する自動溶媒注入法によって、4レベルの脂質組成、2レベルの総脂質濃度、及び4レベルのASO負荷量で変動する96個の試料（32条件、n=3）を調製し、続いて、260nmでの吸光度によるDLS及びASO封入による粒径分布の特性評価を行った。代表的なLEA（Laboratory Execution and Analysis）Library Studio設計レイアウトを試料プレートについて示した。

10

【0054】

【図3A～3E】ASO-1負荷LNP製剤のHTS分析である。図3Aは、スクリーニング設計を示す画像である。全脂質濃度（2レベル）脂質組成に組み込まれたPEG化脂質含有量（4レベル）、及びASOの負荷比（4レベル）を含む製剤パラメータを、各条件について3回反復して96ウェルプレートでスクリーニングした。図3B～3Dは、試料をPBSで希釈し、DLSによって粒径分布について特徴付けたことを示す。図3Bは、代表的なサイズ分布を示すグラフであり、脂質組成中に添加されたPEG化脂質の量が増加した小粒子集団を示した。図3C～3Dは、「範囲外」の黒い点によって示されるように、DSPE-PEG2000が脂質組成に組み込まれなかった場合の多峰性サイズ分布を有する大きな凝集体（500～1500nmの直径）を除いて、LNPが45～145nmの平均直径及び10～50%の%PDを有したことを示すヒートマップである。2mMの総脂質濃度を有する試料についても定量分析を示した。図3Eは、封入効率を計算するためにOD260によって非封入量のASOについて測定された試料アリコート（2mMの総脂質濃度）を示す棒グラフである。結果は平均±SD、n=3であり；ns、有意ではない、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、及び****P<0.0001（二元配置ANOVA、引き続いてTukeyの多重比較によって分析）。このデータはLCによって確認された。

20

30

【0055】

【図4】PEG化脂質なしで調製したLNPが大きな凝集体を産生したことを示す棒グラフである。DSPE-PEG2000なしで調製したASO-1負荷LNP（スクリーニングされた条件を図3C～3Dの列A及びEに示す）の平均粒径を平均±SDとして示す、n=3；ns、有意でない、*P<0.05、及び***P<0.001（二元配置ANOVA、引き続いてSidakの多重比較によって分析）。

【0056】

【図5A～5C】ASO-1負荷カチオン性LNP製剤のHTS分析である。スクリーニングしたカチオン性LNPは、60～120nmの平均直径（図5A）、10～50%の多分散性（図5B）、及びPEG化脂質の量の増加に関してMC3 LNPと同様の傾向を示した。DSPE-PEG2000を存在しない場合、「範囲外」の黒い点又は白い点によって示される不完全な測定（大きな凝集体のため）によって示されるように、多峰性のサイズ分布を持つ大きな凝集体が生成された。2mMの総脂質濃度を有する試料についても定量分析を示した。（図5C）OD260によって非封入ASOの量について試料を測定して、封入効率を計算した。結果は平均±SD、n=3であり；ns、有意ではない、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、及び****P<0.0001（二元配置ANOVA、引き続いてTukey（図5A～5B）又はSidak（図5C）の多重比較によって分析）。

40

【0057】

50

【図 6 A - 6 C】2 mM の総脂質濃度、異なる量の D S P E - P E G 2 0 0 0、及び異なるオリゴヌクレオチド負荷下でイオン化可能な脂質と製剤化された A S O - 2 負荷 L N P の H T S 分析である。結果は、A S O の粒径（図 6 A）、多分散性（図 6 B）、及び封入効率（図 6 C）に関して、A S O - 1 負荷 L N P（図 3 A ~ 3 E）と同様の傾向を示した。結果は平均 ± S D、n = 3 であり；n s、有意ではない、* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001、及び**** P < 0.0001（二元配置 A N O V A、引き続いて T u k e y の多重比較によって分析）。

【0058】

【図 7 A - 7 E】N a n o A s s e m b l e r（登録商標）を使用したマイクロ流体調製からの結果と相関する H T S 分析結果である。図 7 A は、P E G 化脂質の量の増加に伴う粒径の減少及び多分散性の増加の相関を示すグラフである。L N P は、異なるモル比の D S P E - P E G 2 0 0 0 及び固定 N / P 比 2 で調製した。図 7 B は、高い総脂質濃度下で粒径が安定であったことを示すグラフである。L N P は、0.4、0.7、1、又は 2 mM の総脂質濃度、1.5 mol % の固定 D S P E - P E G 2 0 0 0、及び N / P 比 2 の下で調製した。図 7 C ~ 図 7 D は、粒径（図 7 C）が安定していた一方で、A S O（図 7 D）の % E E が高及び過剰の A S O 負荷下で減少したことを示す。L N P は、N / P 比 = 5、2、1、又は 0.5、及び 1.5 mol % の D S P E - P E G 2 0 0 0 下で調製した。図 7 E ナノアセンブリ又は異なる製剤パラメータを用いたハイスループット溶媒注入によって調製された A S O - 1 負荷 L N P の代表的な c r y o - T E M 画像。拡大画像は、2 つのアプローチを使用して同じ製剤パラメータで調製された代表的な L N P（青色矢印で示す）の同様の構造パターンを示した。パネル（図 7 A、7 C、7 D）における H T S の結果は、図 3 に示される同じスクリーニング実験からのものである。結果は平均 ± S D であり、図 7 D のマイクロ流体結果について n = 1 を除いて n = 3 である。

【0059】

【図 8 A - 8 B】ハイスループット溶媒注入法又は N a n o A s s e m b l e r（登録商標）によって調製された A S O - 1 負荷 M C 3 L N P の 4 ° C で 2 週間の安定性を示す。図 8 A は、平均粒径を示し、図 8 B は、2 週間にわたる多分散性を示すグラフである。総脂質濃度は 2 mM であり、N / P 比は 1（H T S 試料）又は 0.5（N a n o A s s e m b l e r（登録商標）試料）であり、P E G 量は 1.5 から 5 mol % まで変動した。結果は平均 ± S D であり、n = 3；* P < 0.05 及び ** P < 0.01 対各群の 0 日目の結果（一元配置 A N O V A、引き続いて D u n n e t t の多重比較によって分析）。その後の研究（図示せず）は、4 ° C で 1 ヶ月貯蔵した後に同様の結果を示した。

【0060】

【図 9】図 8 A ~ 8 B に示される H T S L N P の 4 0 ° C での 2 週間にわたる安定性を示すグラフである。結果は平均 ± S D であり、n = 3；* P < 0.05 対各群の 0 日目の結果（一元配置 A N O V A、引き続いて D u n n e t t の多重比較によって分析）。

【0061】

【図 10】4 0 ° C での L N P からの A S O 漏出を示すグラフである。2 週間以内に L N P から放出された A S O - 1 を O D 2 6 0 によって測定した。結果は平均 ± S D、n = 3 であり；* P < 0.05 及び n s、1.5 mol % D S P E - P E G 2 0 0 0 群に対して有意ではない（二元配置 A N O V A、引き続いて T u r k e y の多重比較によって分析）。

【0062】

【図 11】H T S アプローチが、A S O 負荷 L N P のマイクロ流体調製と比較して、原材料を有意に節約し、分析出力を改善したことを示す。1.5 モル % の D S P E - P E G 2 0 0 0 及び N / P 比（M C 3 及び A S O - 1 に基づく）1 を含有する 2 mM の総脂質を有する典型的な試料について、必要とされる材料を計算した。

【0063】

【図 12 A - 12 B】A S O 封入の定量化の代替方法を示す。図 12 A は、ワークフローの概略図である。A S O 負荷 L N P をハイスループット溶媒注入法によって調製し、蛍光プローブ S y b r - 金と混合し、続いて蛍光プレートリーダー（E x / E m = 4 9 5 / 5

50 nm) を使用して定量した。図 12B は、異なる N/P 比の下で調製された 2 つの異なる LNP 製剤の同等の封入効率 % を示すグラフである。結果は平均 ± SD、n = 2 であり; ns、有意ではない。

【0064】

【図 13A】 HiBiT ペプチド負荷リボソーム製剤の HTS ワークフローを示す。96 ウェルプレート形式でのハイスループットゲル濾過及び透析を含む 2 つの精製方法を比較した。LNP をハイスループット溶媒注入法によって合成し、続いて DLS による粒径分布及び UV-Vis、発光及び蛍光による遊離カーゴ量の特性評価を行った。次いで、ハイスループットゲル濾過又は透析のいずれかを使用して LNP を精製し、続いて UV-Vis、蛍光及び DLS をそれぞれ使用して、精製効率、粒子回収及び粒径安定性の分析を行った。

10

【0065】

【図 13B】 スクリーニング設計を示す画像である。MC3 を含まない DPPC LNP、MC3 を含む DPPC LNP、MC3 を含まない DSPC LNP、及びアジドとコンジュゲートした遮蔽ペグ化脂質及びペグ化脂質の両方を含む MC3 を含む DSPC LNP を含む製剤パラメータを、各条件について 3 連で 96 ウェルプレートでスクリーニングした。

【0066】

【図 13C】 「範囲外」の黒い点によって示されるように、DSPE-PEG2000 が脂質組成に組み込まれなかった場合の多峰性サイズ分布を有する大きな凝集体を除いて、LNP が 50 ~ 200 nm の平均直径を有したことを示すヒートマップである。

20

【0067】

【図 13D-13F】 精製前 (図 13D) 及び精製後の遊離ペプチド濃度の定量を示す表である。ゲル濾過及び透析は、それぞれ約 98 % (図 13E) 及び約 61 % (図 13F) の平均精製効率をもたらした。40 kD の MWCO を有する 96 の小さいカラムプレートをゲル濾過及び PBS による溶出のために使用した。10 kD の MWCO を有する 96 ウェル透析プレートを、3 L の PBS における透析のために一晩使用し、3 回の培地交換を行った。透析後のデータ点の喪失は、試料回収が低いためであった。

【0068】

【図 13G-13H】 ゲル濾過による精製後の粒子回収率及びサイズの定量化を示すデータである。(図 13G) 回収率は、ペグ化脂質なしで調製された凝集試料のための低い値を除いて、一般に 80 ~ 120 % の間であった。(図 13H) 粒径分布は、ゲル濾過による精製後も一定のままであった。

30

【発明を実施するための形態】

【0069】

詳細な説明

薬物送達のための脂質ナノ粒子 (LNP) 製造は、様々な製剤パラメータの影響を受ける複雑な物理化学的特性のために困難である。LNP 製造における粒子構造及びサイズ分布、粒子表面の物理化学的特性、脂質含有量、遊離 API の量及び封入効率、並びに物理的及び化学的安定性の制御は困難かつ複雑である。従来のバッチ法による、脂質種、パーセンテージ、濃度及び薬物負荷を含む LNP 製剤パラメータのスクリーニングは、かなりの時間及び原材料を必要とする。したがって、最小の材料入力並びに効率的な調製及び分析出力を有するハイスループットスクリーニングアプローチが、最適な品質属性を有するリード製剤候補を決定するために好ましいであろう。ロボット液体ハンドラは、主に液体の添加及び移送に使用されており、精密に調整された機器パラメータを有する LNP 製剤化装置としては使用されていない。さらに、LNP 調製及び分析の両方を統合した合理化されたハイスループットワークフローが不足している。本明細書では、注入ベースの LNP 形成のためのロボット液体ハンドラを使用して、所望の特性に基づいて LNP 製造を最適化するためのハイスループット方法が提供される。最適化された LNP 粒子及びそれらの製造方法を、本明細書中にさらに提供する。

40

50

【0070】

本明細書の説明は例示的かつ説明的なものにすぎず、特許請求される本発明を限定するものではないことが理解されよう。本出願では、特に明記しない限り、単数形の使用は複数形を含む。

【0071】

本明細書で使用されるいかなる項目の見出しも、構成上の目的のみのためであり、記載される主題を限定するものと解釈されるべきではない。本出願で引用された全ての文書、又は文書の一部（特許、特許出願、記事、書籍、及び論文）は、任意の目的のためにその全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。本開示に従って利用される場合、以下の用語は、他に別段の指示がない限り、以下の意味を有するものと理解すべきである。

【0072】

本出願では、「又は」の使用は、特に明記しない限り、「及び／又は」を意味する。さらに、「含む (including)」という用語、並びに「含む (includes)」及び「含まれる (included)」などの他の形態の使用は限定的ではない。また、「要素」又は「構成成分」などの用語は、特に明記しない限り、1つの単位を含む要素及び構成成分と、1つよりも多くのサブユニットを含む要素及び構成成分の両方を包含する。

【0073】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、特定の処置のレシピエントとなるヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含むがこれらに限定されない任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。典型的には、「対象」及び「患者」という用語は、ヒト対象に関して本明細書では交換可能に使用される。

【0074】

「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、又は「核酸」という用語は、一本鎖及び二本鎖の両方のヌクレオチドポリマーを含む。ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチド、又はいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾形態であり得る。前記修飾としては、プロモウリジン及びイノシン誘導体などの塩基修飾、2', 3'-ジデオキシリボースなどのリボース修飾、並びにホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート及びホスホロアミデートなどのヌクレオチド間結合修飾が挙げられる。

【0075】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、200個以下のヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを指す。オリゴヌクレオチドは、例えば突然変異遺伝子の構築に使用するために、一本鎖又は二本鎖であり得る。オリゴヌクレオチドは、センスオリゴヌクレオチド又はアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。オリゴヌクレオチドは、検出アッセイのために、放射性標識、蛍光標識、ハプテン又は抗原標識を含む標識を含むことができる。オリゴヌクレオチドは、例えば、PCRプライマー、クローニングプライマー又はハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。

【0076】

「ポリペプチド」又は「タンパク質」という用語は、天然配列の1つ又は複数のアミノ酸の欠失、付加、及び／又は置換を含む、タンパク質のアミノ酸配列を有する高分子を指す。「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、抗原結合タンパク質の1つ又は複数のアミノ酸の欠失、付加、及び／又は置換を有する抗原結合分子、抗体、又は配列を特に包含する。「ポリペプチド断片」という用語は、全長天然タンパク質と比較して、アミノ末端欠失、カルボキシル末端欠失、及び／又は内部欠失を有するポリペプチドを指す。そのような断片はまた、天然タンパク質と比較して修飾アミノ酸を含むことができる。有用なポリペプチド断片には、抗原結合分子の免疫学的に機能的な断片が含まれる。

【0077】

「単離された」という用語は、(i) 通常見られる少なくともいくつかの他のタンパク

10

20

30

40

50

質を含まない；(i i) 同じ供給源、例えば同じ種からの他のタンパク質を本質的に含まない；(i i i) 自然界で関連しているポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、又は他の材料の少なくとも約50%から分離されている；(i v) 自然界で関連していないポリペプチドと(共有結合又は非共有結合相互作用によって)作動可能に関連している；又は(v) 自然界では存在しないことを意味する。

【0078】

ポリペプチド(例えば、抗原結合分子)の「バリエーション」は、1つ以上のアミノ酸残基が別のポリペプチド配列と比較してアミノ酸配列に挿入、欠失及び／又は置換されているアミノ酸配列を含む。バリエーションには、例えば、融合タンパク質が含まれる。

【0079】

「同一性」という用語は、配列をアライメントして比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド分子又は2つ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。「同一性パーセント」は、比較される分子中のアミノ酸又はヌクレオチド間の同一の残基のパーセントを意味し、比較される分子の最小のサイズに基づいて計算される。これらの計算のために、アライメントにおけるギャップ(存在する場合)は、好ましくは、特定の数学的モデル又はコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)によって対処される。

【0080】

同一性パーセントを計算するために、比較される配列は、典型的には、配列間の最大一致を与えるようにアライメントされる。同一性パーセントを決定するために使用され得るコンピュータプログラムの一例は、GAPを含むGCGプログラムパッケージ(Devreux et al., Nucl. Acid Res., 1984, 12, 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)である。コンピュータアルゴリズムGAPは、パーセント配列同一性が決定される2つのポリペプチド又はポリヌクレオチドをアライメントするために使用される。配列は、それらのそれぞれのアミノ酸又はヌクレオチドの最適なマッチングのためにアライメントされる(アルゴリズムによって決定される「一致スパン」)。特定の実施形態では、標準的な比較行列もアルゴリズムによって使用される(例えば、PAM 250比較マトリックスについては、Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352を参照し；BLO-SUM 62比較行列についてはHenikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 10915-10919を参照のこと)。

【0081】

「誘導体」という用語は、アミノ酸(又は核酸)の挿入、欠失、又は置換以外の化学修飾を含む分子を指す。特定の実施形態において、誘導体は、限定されないが、ポリマー、脂質、又は他の有機若しくは無機部分との化学結合を含む共有結合修飾を含む。特定の実施形態において、化学的に修飾された抗原結合分子は、化学的に修飾されていない抗原結合分子よりも大きい循環半減期を有することができる。いくつかの実施形態において、誘導体抗原結合分子は、限定されないが、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、又はポリプロピレングリコールを含む1つ以上の水溶性ポリマー付着を含むように共有結合的に修飾される。

【0082】

ペプチド類似体は、テンプレートペプチドの特性と類似の特性を有する非ペプチド薬物として製薬業界で一般的に使用されている。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣物」又は「ペプチド模倣薬」と呼ばれる。任意の目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Fauchere, J. L., 1986, Adv. Drug Res., 1986, 15, 29; Veber, D. F. & Freidinger, R. M., 1985, Trends in Neuroscience, 8, 392-396; 及びEvans, B. E., et al., 1987, J. Med. Chem., 30, 1229-1239。

10

20

30

40

50

【0083】

「治療有効量」という用語は、哺乳動物において治療応答を生じるように決定された免疫細胞又は他の治療剤の量を指す。そのような治療有効量は、当業者によって容易に確認される。

【0084】

「患者」及び「対象」という用語は互換的に使用され、ヒト及び非ヒト動物対象、並びに正式に診断された障害を有する対象、正式に認識された障害を有しない対象、医学的注意を受けている対象、障害を発症するリスクがある対象などを含む。

【0085】

「処置する (treat)」及び「処置 (treatment)」という用語は、治療的処置、予防的処置、及び対象が障害又は他の危険因子を発症するリスクを低下させる適用を含む。処置は、障害の完全な治療を必要とせず、症候又は根底にある危険因子を軽減する実施形態を包含する。「防止する」という用語は、事象の可能性を100%排除することを必要としない。むしろ、これは、化合物又は方法の存在下で事象の発生の可能性が低下したことを示す。

【0086】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、並びに組織培養及び形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）には、標準的な技術を使用することができる。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様に従って、又は当技術分野で一般的に達成されるように、又は本明細書に記載されるように実施することができる。前述の技術及び手順は、一般に、当技術分野で周知の従来方法に従って、本明細書を通して引用及び議論される様々な一般的及びより具体的な参考文献に記載されているように実行することができる。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) を参照のこと。任意の目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0087】

本明細書で使用される場合、「実質的に」又は「本質的に」という用語は、基準量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量又は長さと比較して約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%高い量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量又は長さを指す。一実施形態において、「本質的に同じ」又は「実質的に同じ」という用語は、基準量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量又は長さとはほぼ同じ量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量又は長さの範囲を指す。

【0088】

本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」及び「本質的に含まない」という用語は互換的に使用され、細胞集団又は培養培地等の組成物を説明するために使用される場合、特定の物質を含まない、例えば95%含まない、96%含まない、97%含まない、98%含まない、99%含まない、又は従来手段で測定して検出不能な組成物を指す。同様の意味は、組成物の特定の物質又は成分の非存在を指す「非存在」という用語にも適用することができる。

【0089】

本明細書で使用される場合、「認識できる」という用語は、量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量若しくは長さの範囲、又は1つ以上の標準的な方法によって容易に検出可能な事象を指す。「認識不可能」及び「認識できない」という用語及び等価物は、量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量若しくは長さの範囲、又は標準的な方法では容易に検出できない若しくは検出不能な事象を指す。一実施形態において、事象は、それが5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.001%、又はそれ未満の時間で発生する場合、認識できない。

【0090】

本明細書を通して、文脈上別段の要求がない限り、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」及び「含む (comprising)」という語は、記載された工程若しくは要素又は工程若しくは要素の群を含むが、任意の他の工程若しくは要素又は工程若しくは要素の群を除外しないことを意味すると理解される。特定の実施形態では、「含む (include)」、「有する (has)」、「含有する (contains)」、及び「含む (comprise)」という用語は同義的に使用される。

【0091】

本明細書で使用される場合、「からなる (consisting of)」は、「からなる (consisting of)」という語句に続くものを含み、それに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であり、他の要素が存在し得ないことを示す。

【0092】

「から本質的になる (consisting essentially of)」とは、語句の後に列挙された任意の要素を含むことを意味し、列挙された要素について本開示で指定された活性又は作用に干渉又は寄与しない他の要素に限定される。したがって、「から本質的になる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であるが、他の要素は任意ではなく、列挙された要素の活性又は作用に影響を及ぼすか否かに応じて存在してもしなくてもよいことを示す。

【0093】

本明細書を通して、「一実施形態」、「実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「特定の実施形態」、「追加の実施形態」、又は「さらなる実施形態」、又はそれらの組み合わせへの言及は、実施形態に関連して説明される特定の特徴、構造、又は特性が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体の様々な箇所における前述の語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を参照しているわけではない。さらにまた、特定の特徴、構造、又は特性は、1つ又は複数の実施形態において、任意の適切な方法で組み合わせられることができる。

【0094】

本明細書で使用される場合、「約」又は「およそ」という用語は、基準の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量又は長さに対して30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1%変動する量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量又は長さを指す。特定の実施形態では、数値に先行する場合の「約」又は「およそ」という用語は、15%、10%、5%若しくは1%の範囲、又はそれらの任意の介在範囲をプラス又はマイナスした値を示す。

【0095】

脂質ナノ粒子の製造を最適化するためのハイスループットスクリーニング方法

脂質ベースのナノ医薬のスクリーニング及び最適化の必要性に対処するために、本明細書の開示は、脂質ナノ粒子の調製のための、並びにそれらの粒径分布及びペイロード封入の特徴付けのためのハイスループットスクリーニング (HTS) ワークフローを提供する。

【0096】

様々な実施形態において、本開示は、脂質ナノ粒子 (LNP) の製造を最適化するためのハイスループットスクリーニング方法に関する。様々な実施形態において、本明細書に開示される方法は、(i) ロボット液体ハンドラと、(ii) 所望のLNP特性を測定することができる少なくとも1つの機器と、(iii) 複数のマイクロウェルを含む、少なくとも1つのマイクロプレートとを含むハイスループットスクリーニング (HTS) スクリーニングワークフローを利用する。様々な実施形態では、LNPは、溶媒注入法を使用して上記のHTSスクリーニングワークフローによって形成される。例えば、Gentile et al., 2012, J Liposome Res. 22, 18-30; Schubert and Muller-Goymann, 2003, Eur. J. Ph

10

20

30

40

50

arm. Biopharm. 55, 125-131を参照のこと。

【0097】

様々な実施形態において、HTSワークフローは、所望のLNP特性を測定することができる機器を含む。そのような特性には、封入効率、平均粒径、及び粒径分布が含まれる。物理的安定性はまた、貯蔵後の異なる時点で粒径及びペイロード放出を測定することによって決定することができる。そのような分析技術は当技術分野で公知であり、走査／透過型電子顕微鏡法（SEM／TEM）、原子間力顕微鏡法（AFM）分析超遠心分離（AUC）、動的光散乱（DLS）、紫外線（UV）分光法、及び流れ場分画（FFF）を含む。様々な実施形態において、HTSワークフローは、DLS、UV-Vis又は蛍光分光法が可能な機器を含む。様々な実施形態において、本明細書に開示される方法は、（i）ロボット液体ハンドラと、（ii）DLSを実行することができる機器と、（iii）試料に対するUV-Vis又は蛍光分光法が可能な機器と、（iv）複数のマイクロウェルを含む少なくとも1つのマイクロプレートとを含むハイスループットスクリーニング（HTS）スクリーニングワークフローを利用する。

10

【0098】

様々な実施形態において、HTSワークフローは、溶媒注入システムを使用してLNP製造を最適化する方法を提供する。本明細書で使用される場合、「溶媒注入システム」は、脂質含有自己集合性分子を含む第1の溶液を第2の溶液に迅速に注入することを意味する。様々な実施形態において、溶液は混合可能又は混和性である。様々な実施形態において、第1の溶液は水混和性溶媒である。様々な実施形態において、少なくとも1つの溶液は有機相溶媒である。アセトン、エタノール、イソプロパノール及びメタノールは全て、LNP調製に適した溶媒である。様々な実施形態において、第1の溶液はアルコールである。様々な実施形態において、第1の溶液はエタノールである。様々な実施形態において、第1の溶液はメタノールである。

20

【0099】

様々な実施形態において、LNPによって封入されるペイロードは、前記第2の溶液に溶解される。様々な実施形態において、LNPによって封入されるペイロードは、前記第1の溶液に溶解される。様々な実施形態において、ペイロードは、第3の水混和性溶媒によって封入される。

30

【0100】

様々な実施形態において、溶液の少なくとも2つは異なる相である。様々な実施形態において、3つの溶液が互いに注入される。様々な実施形態において、少なくとも4つの溶液が互いに注入される。様々な実施形態において、少なくとも1つの有機相及び少なくとも1つの水相が存在する。

【0101】

様々な実施形態において、溶液の1つは水性溶媒を含む。様々な実施形態において、水性溶媒は水性緩衝液である。

【0102】

一方の溶液の他方の溶液への注入は、ロボット液体ハンドラによって制御される。本明細書で使用される場合、「ロボット液体ハンドラ」という用語は、液体を複数のウェル、マイクロウェル、又は他の液体リザーバに並列に自動的にピペティング、移送、及び混合することができる装置を意味する。様々な実施形態において、ロボット液体ハンドラは、異なる組成又は異なる量の液体を異なるウェル、マイクロウェル又は液体リザーバに並行して送達することができる。様々な実施形態において、ロボット液体ハンドラは、液体を異なるウェル、マイクロウェル又は液体リザーバに、様々な速度又は持続時間で並行してピペティング、移送及び混合することができる。

40

【0103】

様々な実施形態において、前記一方の溶液を前記第2の溶液に注入した後、ロボット液体ハンドラは前記溶液を繰り返し取り上げて再注入し、それによって少なくとも2つの溶液を混合する。様々な実施形態において、この注入及び／又は混合の速度及び持続時間を

50

変化させて、LNP形成の最適なパラメータを決定する。様々な実施形態において、注入及び／又は混合の速度は、 $0.1\text{ ml/s} \sim 0.9\text{ ml/s}$ で変動する。様々な実施形態において、初期注入速度（すなわち、液体の第1の注入）は、 $0.1\text{ ml/s} \sim 0.9\text{ ml/s}$ の速度で行われる。図1を参照されたい。様々な実施形態において、その後の注入／混合は、 $1 \sim 10$ 秒間にわたって行われる（ $0.1\text{ ml/秒} \sim 0.9\text{ ml/秒}$ で $10 \times$ 混合）。

【0104】

様々な実施形態において、LNP形成は、少なくとも1つのマイクロプレートで完了する。様々な実施形態では、マイクロプレートは複数のマイクロウェルで構成され、形成条件（例えば、脂質種、脂質組成、総脂質濃度、ペイロード、ペイロード負荷比、相種）はマイクロウェル間で変動する。マイクロプレートは、任意のサイズであり得、任意の数のマイクロウェルを含み得る。様々な実施形態において、マイクロプレートは、4、6、8、12、24、48、96、384、1536個のマイクロウェルを含む。

10

【0105】

本明細書で提供されるHTS方法の1つの利点は、LNP形成が少量の溶液中で迅速に起こり得ることである。本明細書に開示される方法は、材料消費を10倍減少させ、処理出力を100倍改善する（図11参照）。マイクロウェルにおけるLNP形成は、例えばマイクロ流体ベースの調製物を使用して形成されたLNPよりかなり少ない材料を使用する。様々な実施形態において、マイクロウェルは、体積が約 $10\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $20\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $30\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $40\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $50\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $60\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $70\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $80\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $90\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $125\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $150\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $175\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $200\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $250\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $350\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $360\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $400\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $500\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $1000\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $2000\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $3000\text{ }\mu\text{L}$ 、約 $4000\text{ }\mu\text{L}$ である。

20

【0106】

脂質ナノ粒子（LNP）

本明細書では、最適化された脂質ナノ粒子、並びにこれらの脂質ナノ粒子「LNP」の製造を最適化する方法が提供される。本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」又は「LNP」という用語は、(i)複数の自己集合性分子（前記自己集合性分子は脂質成分を含む）及び(ii)ペイロードを含む組成物を指す。本発明を使用して製造が最適化されたLNPは、任意の目的に使用することができる。様々な実施形態において、最適化されたLNPは、ワクチンを送達するために使用され得る。様々な実施形態において、最適化されたLNPは、薬物を、それを必要とする患者に送達するために使用され得る。LNPは、核酸、ペプチド、タンパク質及び小分子を含むがこれらに限定されない任意のペイロードを担持し得る。さらに、LNPは、脂質（例えば、リポソーム）のみからなってもよく、又は自己集合が可能なポリマー若しくはタンパク質などの他の成分を含んでもよい。

30

【0107】

様々な実施形態において、LNPは、上記の技術を使用して製造された最適化されたLNPである。様々な実施形態において、最適化されたLNPは、以下の工程：(i)水相を含む第1の溶液を得ること、(ii)有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；(iii)少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；(iv)ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；(v)前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボットハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることであって、以下の条件：自己集合分子のタイプ、前記自己集合分子の組成比、前記自己集合分子の前記ペイロードに対する比及び／又は濃度、相、緩衝液タイプ及びpHの選択、注入順序、注入速度、混合速度、体積、相比、注入持続時間、並びに混合持続時間のうちの少なくとも1つが、異なるウェル間で変動する、脂質ナノ粒子を得ること；(vi)前記LNPの封入効率、粒径分

40

50

布、精製及び粒子回収率、並びに製剤安定性のうちの少なくとも1つを測定すること；（v i i）前記LNP調製物を製造するための最適なパラメータを決定すること；並びに（v i i i）前記最適なパラメータに基づいて前記LNP調製物を製造することを含む方法によって製造される。

【0108】

様々な実施形態において、本発明は、ハイスループット方法を使用してLNPを製造する方法に関し、その方法は以下の工程：（i）水相を含む第1の溶液を得ること、（i i）有機相と自己集合することができる複数の分子とを含む第2の溶液を得ることであって、前記第1の溶液及び前記第2の溶液が混合可能である、第2の溶液を得ること；（i i i）少なくとも1つのペイロード分子を第1の溶液又は第2の溶液のいずれかに溶解すること；（i v）ロボット液体ハンドラを使用して、様々な組成を有する前記相を調製し、複数のウェルに分注すること；（v）前記第1の溶液及び前記第2の溶液を混合して、LNP形成に適した条件下で前記ロボットハンドラを使用して前記ペイロードを封入する脂質ナノ粒子を得ることを含む。

10

【0109】

自己集合性分子

本明細書で使用される場合、「自己集合性分子」という用語は、外部供給源からの案内又は管理なしに定義された配置が可能な任意の分子を指す。最適化されたLNPは、単一の自己集合性分子から構成され得るか、又は複数種の自己集合性分子から構成され得る。様々な実施形態において、最適化されたLNPは、少なくとも1種の脂質分子を有する脂質成分を含む。様々な実施形態において、LNPは、ポリマー分子及び／又はタンパク質／ペプチド分子を含み得る。様々な実施形態において、LNPの自己集合性分子は、脂質分子のみを含み得る。

20

【0110】

脂質成分は、単一の脂質種を含んでもよく、又は2種類以上の脂質を含んでもよい。本発明の様々な実施形態において、LNP調製物中の脂質の相対組成は変動する。様々な実施形態において、所与のLNP製剤の製造のための最適パラメータを考慮する場合、異なる脂質種又は異なる脂質種の組み合わせが評価される。様々な実施形態において、少なくとも1つの脂質分子がペグ化される。様々な実施形態において、脂質成分は、リン脂質を含み得る。

30

【0111】

様々な実施形態において、LNP製剤は、1つ又は複数のカチオン性又はイオン化可能な脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のカチオン性脂質は、c K K-E12、OF-02、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinC2DMA、ICE（イミダゾール系）、HGT5000、HGT5001、HGT4003、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA及びDMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、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）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並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される。

40

【0112】

いくつかの実施形態において、1つ又は複数のカチオン性又はイオン化可能な脂質はアミノ脂質である。様々な実施形態において、アミノ脂質は、第一級、第二級、第三級、第四級アミン、ピロリジン又はピペリジンである。本発明での使用に適したアミノ脂質には

50

、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2017180917号に記載されているものが含まれる。国際公開第2017180917号における例示的なアミノ脂質には、段落

【0113】

に記載されるもの、例えば、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) 及び化合物18が含まれる。他のアミノ脂質としては、化合物2、化合物23、化合物27、化合物10及び化合物20が挙げられる。本発明での使用に適したさらなるアミノ脂質には、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2017112865号に記載されているものが含まれる。国際公開第2017112865号の例示的なアミノ脂質には、式(I)、(Ia1)-(Ia6)、(Ib)、(II)、(Ila)、(III)、(Ili a)、(IV)、(17-1)、(19-1)、(19-11)、及び(20-1)の1つによる化合物、並びに段落[00185]、[00201]、[0276]の化合物が含まれる。いくつかの実施形態において、本発明での使用に適したカチオン性脂質には、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016118725号に記載されているものが含まれる。国際公開第2016118725号の例示的なカチオン性脂質には、KL22及びKL25などが含まれる。いくつかの実施形態において、本発明での使用に適したカチオン性脂質には、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016118724号に記載されているものが含まれる。国際公開第2016118725号における例示的なカチオン性脂質には、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) 及びKL25などが含まれる。

10

20

【0114】

いくつかの実施形態において、LNP製剤は、1つ又は複数の非カチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態において、1つ又は複数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。

30

【0115】

いくつかの実施形態において、LNP製剤は、1つ又は複数のPEG修飾脂質を含む。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のPEG修飾脂質は、C₆-C₂₀ 長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した5 kDaまでの長さのポリ(エチレン)グリコール鎖を含む。PEG脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、nad PEG修飾ジアルキルグリセロールからなる非限定的な群から選択され得る。例えば、PEG脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC又はPEG-DSPC脂質であり得る。

40

【0116】

様々な実施形態において、LNP中のPEG化されている脂質のパーセンテージ(すなわち、PEG密度)は変動する。LNP中のポリエチレングリコール(PEG)密度は、粒径、表面電荷及び安定性に影響を及ぼすことが分かっている。様々な実施形態において、PEG密度は、約0.1%~約10%の間で変動する。様々な実施形態において、PEG密度は、約0.2%~約9%の間で変動する。様々な実施形態において、PEG密度は、約0.3%~約8%の間で変動する。様々な実施形態において、PEG密度は、約0.4%~約7%の間で変動する。様々な実施形態において、PEG密度は、約0.5%~約6%の間で変動する。様々な実施形態において、PEG密度は、約0.5%~約5%の間で変動する。

50

【0117】

様々な実施形態において、LNP調製のための溶液中に存在する脂質成分の総濃度は、任意の所与のLNPの最適な特性を達成するために変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.1mM～約8mMの間で変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.2mM～約7mMの間で変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.3mM～約6mMの間で変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.4mM～約4mMの間で変動する。様々な実施形態において、脂質の総濃度は、約0.5mM～約3mMの間で変動する。

【0118】

様々な実施形態において、LNPは、2種類以上の脂質を含む。様々な実施形態において、LNPは、少なくとも2種類の脂質を含む。様々な実施形態において、LNPは、少なくとも3種類の脂質を含む。様々な実施形態において、LNPは、少なくとも4種類の脂質を含む。様々な実施形態において、LNPは、少なくとも5種類の脂質を含む。様々な実施形態において、LNPは、少なくとも6種類の脂質を含む。様々な実施形態において、LNPは、少なくとも7種類の脂質を含む。

10

【0119】

ナノ粒子組成物の脂質成分は、1つ又は複数の構造脂質を含み得る。本発明のナノ粒子組成物は、構造脂質（例えば、コレステロールフェコステロール、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸又はアルファートコフェロール）を含み得る。

20

【0120】

ナノ粒子組成物の脂質成分は、1つ以上のリン脂質、例えば1つ又は複数の（ポリ）不飽和脂質を含み得る。一般に、そのような脂質は、リン脂質部分及び1つ又は複数の脂肪酸部分を含み得る。

【0121】

リン脂質部分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。脂肪酸部分は、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。分岐、酸化、環化、及びアルキンを含む修飾及び置換を有する天然種を含む非天然種も企図される。

30

【0122】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、又はDSPCとDOPEの両方を含み得る。本発明の組成物及び方法において有用なリン脂質は、DSPC、DOPE、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DLPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DUPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、1,2-ジオ-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(18:0ジエーテルPC)、1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(OChemSPC)、1-ヘキサデシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(C16LysPC)、1,2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(ME16.0PE)、1,2-

40

50

ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジリノレノイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジリノレノイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジアラキドノイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジドコサヘキサエノイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジオレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホ-*r a c*-(1-グリセロール)ナトリウム塩(DOPG)及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。

【0123】

LNP組成物は、前のセクションで説明したものに加えて、1つ又は複数の成分を含んでもよい。例えば、ナノ粒子組成物は、ビタミン(例えば、ビタミンA又はビタミンE)又はステロールなどの1つ又は複数の疎水性小分子を含み得る。

10

【0124】

LNP組成物はまた、1つ又は複数の透過性増強分子、炭水化物、ポリマー、治療薬、表面変化剤、又は他の成分を含み得る。透過性亢進分子は、例えば、米国特許出願公開第2005/0222064号に記載されている分子であり得る。炭水化物は、単糖(例えば、グルコース)及び多糖(例えば、グリコーゲン及びその誘導体及び類似体)を含み得る。

【0125】

ポリマーは、LNP組成物に含まれてもよく、及び／又はLNP組成物を封入又は部分的に封入するために使用されてもよい。ポリマーは、生分解性及び／又は生体適合性であり得る。ポリマーは、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、及びポリアリレートから選択され得るが、これらに限定されない。例えば、ポリマーとしては、ポリ(カプロラクトン)(PCL)、エチレンビニルアセテートポリマー(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-コ-グリコール酸)(PLGA)、ポリ(L-乳酸-コ-グリコール酸)(PLLG A)、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-コ-カプロラクトン)、ポリ(D, L-ラクチド-コ-カプロラクトン-コ-グリコリド)、ポリ(D, L-ラクチド-コ-PEO-コ-D, L-ラクチド)、ポリ(D, L-ラクチド-コ-D, L-ラクチド)、ポリアルキルシアノクラレート、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、ポリプロピレンなどのポリアルキレン、ポリ(エチレングリコール)(EVA)などのポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド(PEO)、ポリ(エチレンテレフタレート)など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)などのポリビニルエステル、ポリ(塩化ビニル)(PVC)などのポリハロゲン化ビニル、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などの誘導体化セルロース、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、アクリル酸のポリマー、例えばポリ(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)及びそれらのコポリマー及び混合物、ポリジオキサノン及びそのコポ

20

30

40

50

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レート、ポリオキシメチレン、ポロキサマー、ポリオキサミン、ポリ（オルソ）エステル、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド-コ-カプロラクトン）及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得る。

【0126】

治療剤には、細胞傷害剤、化学療法剤、及び他の治療剤が含まれ得るが、これらに限定されない。細胞傷害性薬剤としては、例えば、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シンジオン、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、グルココルチコイド、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、メイタンシノイド、ラケマイシン及びそれらの類似体が挙げられ得る。放射性イオンも治療薬として使用することができ、例えば、放射性ヨウ素、ストロンチウム、リン、パラジウム、セシウム、イリジウム、コバルト、イットリウム、サマリウム、及びプラセオジウムを含んでもよい。他の治療薬としては、例えば、代謝拮抗剤（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、シタラビン及び5-フルオロウラシル、並びにデカルバジン）、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、ラケマイシン、メルファラン、カルムスチン、ロムスチン、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、及びシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）、及びシスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン及びドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ミトラマイシン及びアントラマイシン）、及び抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、タキソール及びメイタンシノイド）が挙げられ得る。

【0127】

表面変化剤には、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ロミドなどのカチオン性界面活性剤）、糖又は糖誘導体（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及びポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、アセチルシステイン、ヨモギ、プロメライン、パパイン、クレロデンドラム、プロムヘキシン、カルボシステイン、エブラジノン、メスナ、アンブロキシソール、ソブレロール、ドミドール、レトスチン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、チモシン134、ドルナーゼアルファ、ネルテネキシン及びエルドステイン）及びDNase（例えば、rhDNAアーゼ）が含まれ得るが、これらに限定されない。表面改質剤は、LNP内及び／又はLNP組成物の表面上に（例えば、コーティング、吸着、共有結合、又は他のプロセスによって）配置され得る。

【0128】

これらの成分に加えて、本発明のLNP組成物は、医薬組成物に有用な任意の物質を含み得る。例えば、LNP組成物は、1つ又は複数の薬学的に許容され得る賦形剤又は補助成分、例えば限定されないが、1つ又は複数の溶媒、分散媒、希釈剤、分散助剤、懸濁助剤、造粒助剤、崩壊剤、充填剤、流動促進剤、液体ビヒクル、結合剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤又は乳化剤、緩衝剤、潤滑剤、油、保存剤及び他の種を含み得る。ワックス、バター、着色剤、コーティング剤、香味料、及び芳香剤などの賦形剤も含まれ得る。薬学的に許容され得る賦形剤は、当技術分野で周知である（例えば、Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006）。

【0129】

希釈剤の例としては、限定されないが、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、スクロース、セルロース、微結晶セルロース、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、コーンスターチ、粉糖及び／又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。造粒剤及び分散剤は、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、柑橘類パルプ、寒天、ベントナイト、セルロース及び木材製品、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）（クロスボリドン）、カルボキシメチルスターチナトリウム（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、アルファ化デンプン（デンプン 1500）、微結晶デンプン、水不溶性デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、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、及び／又はそれらの組み合わせからなる非限定的なリストから選択され得る。

10

【0130】

界面活性剤及び／又は乳化剤としては、限定されないが、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、トラガカント、軟骨、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、羊毛脂肪、コレステロール、ワックス及びレシチン）、コロイド粘土（例えば、ベントナイト〔ケイ酸アルミニウム〕及び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、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及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、及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、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート〔TWEEN（登録商標）20〕、ポリオキシエチレンソルビタン〔TWEEN（登録商標）60〕、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔TWEEN（登録商標）80〕、ソルビタンモノパルミテート〔SPAN（登録商標）40〕、ソルビタンモノステアレート〔SPAN（登録商標）60〕、ソルビタントリステアレート〔SPAN（登録商標）65〕、グリセリルモノオレエート、ソルビタンモノオレエート〔SPAN（登録商標）80〕）、ポリオキシエチレンエステル（例えば、ポリオキシエチレンモノステアレート〔MYRJ（登録商標）45〕、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリオキシメチレンステアレート及びSOLUTOL（登録商標））、スクロース脂肪酸エステル、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）、ジエチレングリコールモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート、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、ラウリン酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、PLURONIC（登録商標）F 68、POLOXAMER（登録商標）188、セトリモニウムプロミド、セチルピリジニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ドクサートナトリウム及び／又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。

20

30

40

【0131】

結合剤はデンプン（例えばコーンスターチ及びデンプンペースト）；ゼラチン；糖（例えば、スクロース、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）；天然及び合成ゴム（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、ガティガム、イサポールハスクの粘液、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

50

、微結晶性セルロース、酢酸セルロース、ポリ（ビニルーピロリドン）、ケイ酸マグネシウムアルミニウム（VEEGUM（登録商標））、及びカラスムギのアラビアガム）；アルギネート；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；及びそれらの組み合わせ、又は任意の他の適切な結合剤であり得る。

【0132】

防腐剤としては、限定されないが、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、及び／又は他の防腐剤が挙げられる。酸化防止剤としては、限定されないが、アルファトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アコルビル、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、及び／又は亜硫酸ナトリウムが挙げられる。キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸（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、及び／又はエデト酸三ナトリウムが挙げられる。抗菌防腐剤としては、限定されないが、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、プロノポール、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、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジン、イミドウレア、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、及び／又はチメロサルが挙げられる。抗真菌性防腐剤としては、限定されないが、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及び／又はソルビン酸が挙げられる。アルコール保存剤の例としては、エタノール、ポリエチレングリコール、フェノール、ベンジルアルコール、フェノール化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシベンゾエート及び／又はフェニルエチルアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。酸性保存剤の例としては、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、デヒドロアスコルビン酸、アスコルビン酸、ソルビン酸及び／又はフィチン酸が挙げられるが、これらに限定されない。他の防腐剤としては、限定されないが、トコフェロール、酢酸トコフェロール、デスルホキシムメシラート、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（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、亜硫酸カリウム、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）及び／又はEUXYL（登録商標）が挙げられる。

【0133】

緩衝剤の例としては、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、グルコン酸カルシウム、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、ラクトビオン酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、二塩基性リン酸カルシウム、リン酸、三塩基性リン酸カルシウム、水酸化リン酸カルシウム、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、二塩基性リン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、アミノスルホン酸緩衝剤（例えばHEPES）、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、パイロジェンフリー水、等張性生理食塩水、リンゲル液、エチルアルコール、及び／又はそれらの組み合わせが挙げられる。潤滑剤は、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、及びそれらの組み合わせからなる非限定的な群から選択され得る。

【0134】

油の例としては、限定されないが、アーモンド、アプリコット穀粒、アボガド、ババス、ベルガモット、黒カウ種子、ポリジ、ケード、カモミール、キャノーラ、キャラウェイ、カルナウバ、ヒマシ、シナモン、ココアバター、ココナッツ、タラの肝臓、コーヒー、コーン、綿実種、エムー、ユーカリ、月見草、魚、亜麻仁、ゲラニオール、ひょうたん、グレープ種子、ヘーゼルナッツ、ヒソップ、ミリスチン酸イソプロピル、ホホバ、クク落花生、ラバンジン、ラベンダー、レモン、リシークベバ、マカデミアナッツ、マロウ、マンゴー種子、メドウフォーム種子、ミンク、ナツメグ、オリーブ、オレンジ、オレンジラフィー、パーム、パーム核、トウニン、ピーナッツ、ケシ種子、カボチャ種子、ナタネ、米ぬか、ローズマリー、ベニバナ、ビャクダン、サスカナ、セイボリー、シーバックソーン、ゴマ、シアバター、シリコーン、ダイズ、ヒマワリ、ティーツリー、アザミ、ツバキ、ベチバー、クルミ、及び小麦胚芽油、並びにステアリン酸ブチル、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、シメチコン、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、及び／又はそれらの組み合わせが挙げられる。

【0135】

様々な実施形態において、LNPはリポソームであり得る。様々な実施形態では、LNPはポリマー脂質ナノ粒子であり得る。様々な実施形態において、LNPは、追加のタンパク質又はペプチド分子を含み得る。

【0136】

ペイロード

本発明のLNPは、ペイロードを封入するために製造される。「ペイロード」という用語は、本開示に記載される脂質ナノ粒子製剤と複合体を形成する任意の化学的実体、医薬、薬物（そのような薬物は、小分子、無機固体、ポリマー、又はバイオポリマーであり得るが、これらに限定されない）、小分子、核酸（例えば、DNA、RNA、siRNAなど）、タンパク質、ペプチドなどを指す。ペイロードはまた、身体機能の疾患、病気、病い、又は障害を処置又は予防するための候補（例えば、未知の構造及び／又は機能）を包含し、公知の治療化合物及び潜在的な治療化合物の両方である試験化合物を含むが、これらに限定されない。試験化合物は、本開示のスクリーニング方法を用いたスクリーニングによって治療的であると決定することができる。

【0137】

様々な実施形態において、ペイロードは1つ又は複数のヌクレオチドからなる。例えば、様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、そのようなペイロード封入LNPは、N：P比によって特徴付けられ得る。本明細書で使用される場合、「N／P比」は、正に帯電したポリマーアミン（N＝窒素）基対負に帯電した核酸リン酸（P）基の比を指す。N／P比は、細胞内ペイロード送達において重要な役割を果たす。様々な実施形態において、ペイロードのN：P比は変動する。様々な実施形態において、N：P比は、約0.5～約5の間で変動する。様々な実施形態において、N：P比は、約0.25～約10の間で変動する。様々な実施形態において、N：P比は、約0.1、約0.2、約0.25、約0.5、約1、約1.5、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約6、約7、約8、約9、又は約10である。

【0138】

様々な実施形態において、ペイロードはオリゴヌクレオチドである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドはs

hRNAである。オリゴヌクレオチドは、様々な長さのものであり得る。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39又は約40ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約2～約40ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約4～約35ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約10及び約30ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、オリゴヌクレオチドは、約12～約17ヌクレオチド長である。

10

【0139】

様々な実施形態において、ペイロードはmRNAである。様々な実施形態において、そのmRNAは、約500～3000ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、mRNAは、500ヌクレオチド、1000ヌクレオチド、1500ヌクレオチド、2000ヌクレオチド、2500ヌクレオチド、3000ヌクレオチド長である。様々な実施形態において、mRNAは抗原ペプチドをコードする。様々な実施形態において、mRNAはワクチンの一部である。

【0140】

様々な実施形態では、ペイロードはポリペプチドである。様々な実施形態において、ポリペプチドは、約1,000～10,000Daである。様々な実施形態において、ポリペプチドは、約500Da、約600Da、約700Da、約800Da、約900Da、約1,000Da、約1,500Da、約2,000Da、約2,500Da、約3,000Da、約3,500Da、約4,000Da、約4,500Da、約5,000Da、約5,500Da、約6,000Da、約6,500Da、約7,000Da、約7,500Da、約8,000Da、約8,500Da、約9,000Da、約9,500Da、約10,000Da、約15,000Da又は約20,000Daである。

20

【0141】

様々な実施形態において、ペイロードは小分子である。様々な実施形態において、小分子は、約100Da～1000Daである。様々な実施形態において、小分子は、約50Da、約60Da、約70Da、約80Da、約90Da、約100Da、約150Da、約200Da、約250Da、約300Da、約350Da、約400Da、約450Da、約500Da、約550Da、約600Da、約650Da、約700Da、約750Da、約800Da、約850Da、約900Da、約950Da、約1,000Da、約1,500Da又は約2,000Daである。

30

【0142】

医薬製剤

様々な実施形態において、最適化された脂質ナノ粒子は、医薬製剤として全体的又は部分的に製剤化され得る。本発明の医薬製剤は、1つ又は複数のナノ粒子組成物を含み得る。例えば、医薬組成物は、1つ又は複数の異なるペイロードを含む1つ又は複数のナノ粒子組成物を含み得る。本発明の医薬組成物は、1つ又は複数の薬学的に許容され得る賦形剤又は本明細書に記載されるものなどの補助成分をさらに含み得る。医薬組成物及び薬剤の製剤化及び製造のための一般的なガイドラインは、例えば、Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006で利用可能である。従来の賦形剤及び補助成分は、任意の従来の賦形剤又は補助成分が本発明のナノ粒子組成物の1つ又は複数の成分と不適合であり得る限りを除いて、本発明の任意の医薬組成物に使用され得る。賦形剤又は補助成分は、その成分との組み合わせが任意の望ましくない生物学的効果又は他の有害な効果をもたらし得る場合、ナノ粒子組成物の成分と不適合であり得る。

40

50

【0143】

いくつかの実施形態において、1つ又は複数の賦形剤又は補助成分は、本発明のナノ粒子組成物を含む医薬組成物の総質量又は体積の50%超を構成し得る。例えば、1つ又は複数の賦形剤又は補助成分は、薬学的慣例の50%、60%、70%、80%、90%又はそれよりも多くを構成し得る。いくつかの実施形態において、薬学的に許容され得る賦形剤は、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%、又は100%純粋である。いくつかの実施形態において、賦形剤は、ヒトにおける使用及び獣医学的使用のために承認されている。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によって承認されている。いくつかの実施形態において、賦形剤は医薬品グレードである。いくつかの実施形態において、賦形剤は、米国薬局方（USP）、欧州薬局方（EP）、英国薬局方及び／又は国際薬局方の基準を満たす。

10

【0144】

本開示による医薬組成物中の1つ又は複数のナノ粒子組成物、1つ又は複数の薬学的に許容され得る賦形剤、及び／又は任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズ、及び／又は症状に応じて、さらに組成物が投与される経路に応じて、変動する。例として、医薬組成物は、0.1%～100%（wt/wt）の1つ又は複数のナノ粒子組成物を含み得る。

【0145】

1つ又は複数のナノ粒子組成物を含むナノ粒子組成物及び／又は医薬組成物は、mRNAを1つ又は複数の特定の細胞、組織、器官、又はその系若しくは群、例えば腎臓系に送達することによって提供される治療効果から利益を得ることができる患者又は対象を含む任意の患者又は対象に投与することができる。本明細書で提供されるナノ粒子組成物及びナノ粒子組成物を含む医薬組成物の説明は、主にヒトへの投与に適した組成物に関するものであるが、そのような組成物は一般に任意の他の哺乳動物への投与に適していることが当業者によって理解されるであろう。組成物を様々な動物への投与に適したものにするためのヒトへの投与に適した組成物の改変は十分に理解されており、当業者の獣医学薬理学者は、仮にあるとしても単なる通常の実験でそのような改変を設計及び／又は実施することができる。組成物の投与が企図される対象には、ヒト、他の霊長類、並びにウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス及び／又はラットなどの商業的に関連する哺乳動物を含む他の哺乳動物が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0146】

1つ又は複数のナノ粒子組成物を含む医薬組成物は、薬理学の分野で公知の又は今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、そのような調製方法は、活性成分を賦形剤及び／又は1つ若しくは複数の他の補助成分と会合させ、次いで、所望又は必要に応じて、製品を所望の単回又は複数回投与単位に分割、成形及び／又は包装することを含む。

【0147】

本開示による医薬組成物は、バルクで、単一単位用量として、及び／又は複数の単一単位用量として調製、包装、及び／又は販売され得る。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、所定量の活性成分を含む医薬組成物（例えば、ナノ粒子組成物）の離散量である。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与量及び／又はそのような投与量の好都合な割合、例えばそのような投与量の半分又は1/3に等しい。

40

【0148】

本発明の医薬組成物は、様々な投与経路及び投与方法に適した様々な形態で調製され得る。例えば、本発明の医薬組成物は、液体剤形（例えば、エマルジョン、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、及びエリキシル）、注射剤形、固体剤形（例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、粉末及び顆粒）、局所及び／又は経皮投与用の剤形（例えば、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、吸入剤及びパッチ）、懸濁液、粉末、及び他の形態で調製され得る。

【0149】

50

経口及び非経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容され得るエマルジョン、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及び／又はエリキシルが挙げられるが、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、又はエチルアルコール、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、油類（特に綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル等のその他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤並びにこれらの混合物等の、当技術分野において一般的に使用される不活性希釈剤を含んでもよい。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味剤、香味剤及び／又は芳香剤など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特定の実施形態では、組成物は、Cremophor（登録商標）、アルコール、油、改質油、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、及び／又はそれらの組み合わせなどの可溶化剤と混合される。

10

【0150】

注射用製剤、例えば、滅菌注射用水性又は油性懸濁液は、適切な分散剤、湿潤剤、及び／又は懸濁化剤を使用する既知の技術に従って製剤化されうる。滅菌注射用製剤は、無毒の非経口的に許容され得る希釈剤及び／又は溶媒中の、滅菌注射用溶液、懸濁液、及び／又はエマルジョンであってもよく、例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液である。利用され得る許容され得る賦形剤及び溶媒には、水、リンゲル液、USP、及び等張性塩化ナトリウム溶液がある。滅菌不揮発性油は、溶媒又は懸濁媒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又は合成ジグリセリドを含む任意の無刺激不揮発性油を用い得る。オレイン酸といった脂肪酸が、注射物の調製に使用することができる。

20

【0151】

注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通した濾過により、及び／又は使用前に滅菌水又は他の滅菌注射用媒体に溶解するか又は分散させることのできる滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことにより、滅菌することができる。

【0152】

有効成分の効果を延長するために、皮下注射又は筋肉内注射からの有効成分の吸収を遅らせることがしばしば望ましい。これは、水溶度の低い結晶性又は非晶性の材料の液体懸濁液を使用することにより、達成可能である。次いで、薬物の吸収速度は、薬物の溶解速度に依存し、次いで、溶解速度は、結晶の大きさ及び結晶形態に依存し得る。あるいは、非経口投与された薬物形態の遅延吸収は、油ビヒクル中に薬物を溶解又は懸濁することによって達成される。注射用デポー形態は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中に薬物の微量封入マトリックスを形成することによって生成される。薬物とポリマーとの比及び使用される具体的なポリマーの性質に応じて、薬物放出速度は制御することができる。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルソエステル）及びポリ（無水物）が含まれる。デポー注射用製剤は、身体組織と適合性のリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬物を封入することによって調製される。

30

【0153】

直腸投与又は腔内投与のための組成物は、典型的には、組成物を、ココアバター、ポリエチレングリコール又は坐剤用蠟等の適切な非刺激性賦形剤又は担体であって、周囲温度では固体であるが体温では液体であり、それゆえ直腸又は腔内で融解し、活性成分を放出する賦形剤と混合することによって調製することができる坐剤である。

40

【0154】

経口投与用の固体剤形としては、カプセル剤、錠剤、丸剤、フィルム剤、散剤及び顆粒剤が挙げられる。そのような固体剤形において、活性成分は、少なくとも1つの不活性な薬学的に許容され得る賦形剤、例えばクエン酸ナトリウム若しくはリン酸二カルシウム及び／又は充填剤若しくは増量剤（例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール及びケイ酸）、結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギ

50

ネート、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース及びアカシア）、湿潤剤（例えばグリセロール）、崩壊剤（例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム）、溶液遅延剤（例えば、パラフィン）、吸収促進剤（例えば、第4級アンモニウム化合物）、湿潤剤（例えば、セチルアルコール及びグリセロールモノステアレート）、吸収剤（例えば、カオリン及びベントナイト粘土、ケイ酸塩）及び潤滑剤（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）、並びにそれらの混合物と混合される。カプセル剤、錠剤及び丸剤の場合、剤形は緩衝剤を含んでもよい。

【0155】

このような賦形剤をラクトース（すなわち乳糖）として使用し、並びに高分子量ポリエチレングリコールなども使用することで、類似タイプの固体組成物を、ソフトゼラチンカプセル及びハードゼラチンカプセルの充填剤として使用することができる。錠剤、糖衣錠、カプセル、丸薬、及び顆粒の固体投薬形態は、腸溶性コーティング、及び製剤技術分野において既知の他のコーティングなどのコーティング及びシェルにより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1つ又は複数の活性成分を、腸管の特定の部分にのみ、又は優先的に、任意選択的に遅延させて、放出する組成物のものとすることもできる。使用可能な埋め込み組成物の例としては、ポリマー物質及び蠟が挙げられる。このような賦形剤をラクトース（すなわち乳糖）として使用し、並びに高分子量ポリエチレングリコールなども使用することで、類似タイプの固体組成物を、ソフトゼラチンカプセル及びハードゼラチンカプセルの充填剤として使用することができる。

【0156】

組成物の局所投与及び／又は経皮投与のための剤形には、軟膏、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ジェル剤、散剤、液剤、スプレー剤、吸入剤及び／又はパッチ剤が含まれ得る。一般に、活性成分は、滅菌条件下で薬学的に許容され得る賦形剤及び／又は必要に応じて任意の必要な保存剤及び／又は緩衝剤と混合される。さらに、本開示は、身体への化合物の制御された送達を提供するというさらなる利点を有することが多い経皮パッチの使用を企図する。そのような剤形は、例えば、化合物を適切な媒体に溶解及び／又は分注することによって調製され得る。代替的又は追加的に、速度制御膜を提供することによって、及び／又は化合物をポリマーマトリックス及び／又はゲルに分散させることによって、速度を制御することができる。

【0157】

本明細書中に記載される皮内医薬組成物を送達する際に使用するための好適な装置としては、短針装置、例えば、米国特許第4,886,499号；米国特許第5,190,521号；米国特許第5,328,483号；米国特許第5,527,288号；米国特許第4,270,537号；米国特許第5,015,235号；米国特許第5,141,496号；及び米国特許第5,417,662号に記載されるものが挙げられる。皮内組成物は、皮膚への針の有効な貫通長さを制限する装置、例えば、国際公開第99/34850号に記載されているもの及びその機能的等価物によって投与され得る。液体ジェット注射器を介して、及び／又は角質層を穿刺し、真皮に到達するジェットを生成する針を介して、真皮に液体組成物を送達するジェット注射装置が適している。ジェット噴射装置は、例えば、米国特許第5,480,381号；米国特許第5,599,302号；米国特許第5,334,144号；米国特許第5,993,412号；米国特許第5,649,912号；米国特許第5,569,189号；米国特許第5,704,911号；米国特許第5,383,851号；米国特許第5,893,397号；米国特許第5,466,220号；米国特許第5,339,163号；米国特許第5,312,335号；米国特許第5,503,627号；米国特許第5,064,413号；米国特許第5,520,639号；米国特許第4,596,556号；米国特許第4,790,824号；米国特許第4,941,880号；米国特許第4,940,460号；並びに国際公開第97/37705号及び国際公開第97/13537号に記載されている。圧縮ガスを使用して粉

末形態のワクチンを皮膚の外層を通して真皮まで加速する弾道粉末／粒子送達装置が適している。代替的又は追加的に、従来のシリンジは、皮内投与の古典的なマントー法で使用されてもよい。

【0158】

局所投与に適した製剤には、液体及び／又は半液体製剤、例えば、リニメント、ローション、水中油及び／又は油中水エマルジョン、例えば、クリーム、軟膏及び／又はペースト、並びに／あるいは溶液及び／又は懸濁液が含まれるが、これらに限定されない。局所投与可能な製剤は、例えば、約1%～約10% (wt/wt) の活性成分を含み得るが、活性成分の濃度は、溶媒中の活性成分の溶解限界と同じくらい高くてもよい。局所投与のための製剤は、本明細書中に記載される1つ又は複数の追加の成分をさらに含み得る。

10

【0159】

医薬組成物は、口腔を介した肺投与に適した製剤で調製、包装、及び／又は販売され得る。そのような製剤は、活性成分を含んでおり約0.5 nm～約7 nm又は約1 nm～約6 nmの範囲の直径を有する乾燥粒子を含み得る。そのような組成物は、粉末を分散させるために推進剤の流れが導かれ得る乾燥粉末リザーバを含む装置を使用して、及び／又は密封容器内の低沸点推進剤に溶解及び／又は懸濁された活性成分を含む装置などの自己推進溶媒／粉末分配容器を使用して投与するための乾燥粉末の形態であることが好都合である。このような粉末は、粒子の少なくとも98% (重量基準) が0.5 nmを超える直径を有し、粒子の少なくとも95% (数基準) が7 nm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% (重量基準) が1 nmを超える直径を有し、粒子の少なくとも90% (数基準) が6 nm未満の直径を有する。乾燥粉末組成物は、糖などの固体微粉末希釈剤を含んでもよく、単位用量形態で好都合に提供される。

20

【0160】

低沸点噴射剤は、一般に、大気圧で65 °F未満の沸点を有する液体噴射剤を含む。一般に、噴射剤は、組成物の50%～99.9% (wt/wt) を構成し得、活性成分は、組成物の0.1%～20% (wt/wt) を構成し得る。噴射剤は、液体非イオン性及び／又は固体アニオン性界面活性剤及び／又は固体希釈剤 (活性成分を含む粒子と同じ程度の粒径を有し得る) などの追加の成分をさらに含み得る。

【0161】

肺送達用に製剤化された医薬組成物は、溶液及び／又は懸濁液の液滴の形態の活性成分を提供し得る。そのような製剤は、活性成分を含む水性及び／又は希釈アルコール溶液及び／又は懸濁液 (任意に滅菌) として調製、包装及び／又は販売され得、任意の噴霧化及び／又は霧化装置を使用して好都合に投与され得る。そのような製剤は、サッカリンナトリウムなどの香味剤、揮発性油、緩衝剤、界面活性剤、及び／又はヒドロキシ安息香酸メチルなどの防腐剤を含むがこれらに限定されない1つ又は複数の追加の成分をさらに含み得る。この投与経路によって提供される液滴は、約1 nm～約200 nmの範囲の平均直径を有し得る。

30

【0162】

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、医薬組成物の鼻腔内送達に有用である。鼻腔内投与に適した別の製剤は、有効成分を含んでおり約0.2 µm～500 µmの平均粒子を有する粗粉末である。そのような製剤は、スナッフの服用方法で、すなわち、鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻通路を介した迅速な吸入によって投与される。

40

【0163】

経鼻投与に適した製剤は、例えば、約0.1% (wt/wt) 程度の少量から100% (wt/wt) もの活性成分を含み得、本明細書中に記載される1つ又は複数の追加の成分を含み得る。医薬組成物は、頬側投与に適した製剤で調製、包装及び／又は販売され得る。そのような製剤は、例えば、従来の方法を使用して製造された錠剤及び／又はロゼンジの形態であってもよく、例えば、0.1%～20% (wt/wt) の活性成分であってもよく、残部は、経口溶解性及び／又は分解性組成物、並びに任意に、本明細書に記載の

50

1つ又は複数の追加の成分を含む。あるいは、口腔投与に適した製剤は、活性成分を含む粉末及び／又はエアロゾル化及び／又は噴霧化溶液及び／又は懸濁液を含み得る。そのような粉末化、エアロゾル化、及び／又はエアロゾル化製剤は、分散されると、約0.1 nm～約200 nmの範囲の平均粒子及び／又は液滴サイズを有し得、本明細書に記載される任意の追加の成分のうちの1つ又は複数をさらに含み得る。

【0164】

医薬組成物は、眼科投与に適した製剤で調製、包装、及び／又は販売され得る。そのような製剤は、例えば、水性又は油性液体賦形剤中の活性成分の0.1/1.0% (wt/wt) 溶液及び／又は懸濁液を含む点眼剤の形態であり得る。そのような滴剤は、緩衝剤、塩、及び／又は本明細書に記載の任意の追加の成分のうちの1つ又は複数をさらに含み得る。有用な他の眼投与可能な製剤には、微結晶形態及び／又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。点耳剤及び／又は点眼剤は、本開示の範囲内であると考えられる。

10

【0165】

1つ又は複数のペイロードを含むナノ粒子組成物は、任意の経路によって投与され得る。いくつかの実施形態において、本発明の1つ又は複数のナノ粒子組成物を含む予防組成物、診断組成物、又はイメージング組成物を含む本発明の組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、皮下、脳室内、経皮又は真皮内、真皮間、直腸、膣内、腹腔内、局所（例えば、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション及び／又は滴剤）、粘膜、鼻、頬側、経腸、硝子体内、腫瘍内、舌下、鼻腔内を含む様々な経路の1つ又は複数によって；気管内注入、気管支注入、及び／又は吸入によって；経口スプレー及び／又は粉末、経鼻スプレー及び／又はエアロゾルとして、及び／又は門脈カテーテルを介して投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、静脈内、筋肉内、皮内、又は皮下投与され得る。しかしながら、本開示は、薬物送達の科学における可能性のある進歩を考慮した任意の適切な経路による本発明の組成物の送達を包含する。一般に、最も適切な投与経路は、1つ又は複数のmRNAを含むナノ粒子組成物の性質（例えば、血流及び消化管などの様々な身体環境におけるその安定性）、患者の症状（例えば、患者が特定の投与経路に耐えることができるかどうか）などを含む様々な因子に依存する。

20

【0166】

特定の実施形態において、本開示による組成物は、所与の用量において、約0.0001 mg/kg～約10 mg/kg、約0.001 mg/kg～約10 mg/kg、約0.005 mg/kg～約10 mg/kg、約0.01 mg/kg～約10 mg/kg、約0.1 mg/kg～約10 mg/kg、約1 mg/kg～約10 mg/kg、約2 mg/kg～約10 mg/kg、約5 mg/kg～約10 mg/kg、約0.0001 mg/kg～約5 mg/kg、約0.001 mg/kg～約5 mg/kg、約0.005 mg/kg～約5 mg/kg、約0.01 mg/kg～約5 mg/kg、約0.1 mg/kg～約10 mg/kg、約1 mg/kg～約5 mg/kg、約2 mg/kg～約5 mg/kg、約0.0001 mg/kg～約1 mg/kg、約0.001 mg/kg～約1 mg/kg、約0.005 mg/kg～約1 mg/kg、約0.01 mg/kg～約1 mg/kg、又は約0.1 mg/kg～約1 mg/kgを送達するに十分な用量レベルで投与され得、1 mg/kgの用量は、対象体重1 kgあたり1 mgの組成物を供給する。特定の実施形態では、約0.005 mg/kg～約5 mg/kgの用量の本発明のナノ粒子組成物を投与することができる。用量は、所望のレベルのmRNA発現及び／又は治療、診断、予防、若しくはイメージング効果を得るために、同じ量又は異なる量で1日に1回又は複数回投与され得る。所望の投与量は、例えば、1日3回、1日2回、1日1回、1日おき、3日おき、毎週、2週間ごと、3週間ごと、又は4週間ごとに送達され得る。ある特定の実施形態において、所望の投与量は、複数回投与（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、又はそれよりも多くの投与）を使用して送達され得る。いくつかの実施形態において、単回用量は、例えば、外科的処置の前若しくは後に、又は急性の疾患、障害、若しくは症状の場合に投与され得る。

30

40

50

【0167】

1つ又は複数のペイロードを含むナノ粒子組成物は、1つ又は複数の他の治療剤、予防剤、診断剤、又はイメージング剤と組み合わせて使用され得る。「と組み合わせて」とは、薬剤を同時に投与しなければならないこと、及び／又は一緒に送達するために製剤化しなければならないことを意味するものではないが、これらの送達方法は本開示の範囲内である。例えば、1つ又は複数の異なるmRNAを含む1つ又は複数のナノ粒子組成物を組み合わせて投与することができる。組成物は、1つ又は複数の他の所望の治療薬又は医療処置と同時に、その前に、又はその後に投与することができる。一般に、各薬剤は、その薬剤について決定された用量及び／又は時間スケジュールで投与される。いくつかの実施形態において、本開示は、バイオアベイラビリティを改善し、代謝を減少及び／若しくは改変し、排泄を阻害し、及び／又は体内での分布を改変する薬剤と組み合わせた本発明の組成物又はそのイメージング、診断若しくは予防組成物の送達を包含する。

10

【0168】

組み合わせて利用される治療的、予防的、診断的、又はイメージング活性剤は、単一の組成物と一緒に投与されてもよく、又は異なる組成物で別々に投与されてもよいことがさらに理解されるであろう。一般に、組み合わせて利用される薬剤は、それらが個別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、個別に利用されるレベルよりも低くてもよい。

【0169】

併用レジメンで使用する治療（治療薬又は手順）の特定の組み合わせは、所望の治療薬及び／又は手順の適合性及び達成される所望の治療効果を考慮に入れる。使用される治療は、同じ障害に対して所望の効果を達成し得るか（例えば、癌を処置するために有用である組成物は、化学療法剤と同時に投与され得る）、又は異なる効果（例えば、任意の有害作用の制御）を達成し得ることも理解されよう。

20

【実施例】

【0170】

実施例

以下の実施例は、限定することを意図するものではなく、本発明のさらなる情報及び支持を提供するために提示される。以下の実施例は、最適なペイロード負荷及び粒径分布のためにLNP形成を最適化するHTS方法が、マイクロ流体ベースのアプローチなどのスケールアップされた製造方法に直接変換され得ることを実証する。このHTSアプローチは、材料消費を約10倍減少させ、処理出力を約100倍改善した。これらの結果は、LNP製造を最適化するためのHTS方法のロバスト性及び有用性を示し、したがって、これらの臨床移行を促進する。

30

【0171】

材料及び方法

材料

1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジステアロイル-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](DSPE-PEG2000)、及びカチオン性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)を含む脂質を、Avanti Polar Lipids(AL, USA)から購入した。イオン化可能な脂質ジリノレイルメチル-4-ジメチルアミノ酪酸(DLin-MC3-DMA、MC3)はMCE(NJ, USA)から、コレステロールはSigma(MO, USA)から入手した。2つのモデルASO、ASO-1(13マー、Na塩形態)及びASO-2(16マー、Na塩形態)を社内で合成した。他の全ての試薬は、少なくとも試薬グレードであり、DNase/RNaseを含まなかった。

40

【0172】

ASO負荷LNPのハイスループット調製

LEA Library Studioソフトウェア(Unchained Labs

50

、CA, USA) を使用して、96 ウェルプレートマトリックスで設計された様々な脂質組成、総脂質濃度、及びASO 負荷量について、LNP 製剤をスクリーニングした。ASO-1 負荷MC3 LNP の典型的なスクリーニングでは、ASO をクエン酸緩衝液 (25 mM、pH 4) に5、2、1、及び0.5 のN/P 比に相当する濃度で溶解し、ロボット液体ハンドラ (TECAN (登録商標) Freedom EVO, NC, USA) を使用して150 μ l / ウェルで96 ウェルプレート (Greiner Bio One 655101, NC, USA) に分注した。様々な総脂質量 (0.2 又は0.4 μ mol / ウェル) 及びDSPE-PEG2000 含有量 (全脂質の0、1.5、3、又は5 mol %) を有する脂質混合物を、個々の脂質ストック (エタノール中20 mg / ml) を混合し、TECAN (登録商標) ロボットを用いてエタノールで希釈することによって調製した。次いで、50 μ l の脂質を0.5 ml / s でASO プレートに迅速に分注し、続いてTECAN (登録商標) ロボットを使用して10 回のピペッティング (毎回100 μ l) によって相混合して、ASO 負荷LNP の自己集合を促進した。得られたプレートは、並行して32 の条件で変動した96 個のLNP 試料 (200 μ l / ウェル) を含有していた (4 レベルのASO 負荷、2 レベルの総脂質濃度、及び4 レベルの脂質組成、n = 3)。他の実験では、イオン化可能な脂質MC3 を永久カチオン性脂質DOTAP で置き換え、又は13 マーのASO-1 を16 マーのASO-2 で置き換え、同様の製剤パラメータについてスクリーニングした。逆の分注順序 (ASO 溶液の脂質混合物への注入) 並びに異なる混合速度及び回数も、相混合プロセスを最適化するために調査した。

10

20

30

40

50

【0173】

ASO 負荷LNP の特性評価

ASO 負荷LNP の構造を、低温透過型電子顕微鏡 (cryo-TEM) によって決定した。DLS を使用して粒径分布を測定した。手短に言えば、ASO 負荷LNP を、TECAN (登録商標) ロボットを使用して96 ウェルのガラス底マイクロプレート (Greiner Bio One 655892, NC, USA) 中のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) で40 倍希釈し、DynaPro (登録商標) プレートリーダーII (Wyatt Technology, CA, USA) を使用して平均粒径及び粒径分布 (多分散性%、PD % で表される) について分析した。60 μ l のアリコートと、15 μ l の0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加することによって中性 pH に調整し、次いで、フィルタープレート (MWCO 100 kD; AcroPrep, PALL, NY, USA) に移し、遠心分離 (2,000 x g、10 分) して濾過した。次いで、50 μ l の濾液中の未封入ASO を、UV プレートリーダー (TECAN (登録商標) Spark, NC, USA) を使用してOD₂₆₀ によって定量化し、ASO の封入効率パーセント (%EE) について計算した：

$$\%EE = \frac{\text{合計ASO量} - \text{遊離ASO量}}{\text{合計ASO量}} \times 100\%$$

【0174】

ASO 標準を同じ緩衝液中で調製し、LNP 試料と同じ濾過プロセスに供した。安定性実験のために、N/P 比1 の下で調製した60 μ l のLNP をPBS で10 倍に直接希釈し、4 又は40 °C で保存し、2 週間にわたって粒径及びASO 放出について分析した。

【0175】

ASO 負荷LNP のマイクロ流体調製

マイクロ流体アプローチを、上記のハイスループットアプローチによってスクリーニングされたASO 負荷LNP のスケールアップ調製に使用した。簡単に記載すると、種々の濃度のASO-1 (クエン酸緩衝液に溶解) と、総脂質濃度及びDSPE-PEG2000 含有量の変動する脂質 (エタノールに溶解) とを、マイクロ流体装置 (NanoAssembler (登録商標)、Precision NanoSystems, BC, Canada) によって、水性緩衝液 / エタノール相比3 / 1 及び一定の総流量12 ml / 分で

混合した。収集したLNPを遠心分離ベース（2,000×g、30分）限外濾過（MWCO 10kD; Amicon, Millipore Sigma, MA, USA）によって精製して遊離ASO及び脂質を除去し、続いてPBSと緩衝液交換した。LNPを、親水性相互作用液体クロマトグラフィ（HILIC）によるDLS及びASO封入によって粒径分布について分析した。簡単に記載すると、0.75% Triton溶液に溶解することによって、精製LNPから封入ASOを抽出した。HILICカラム（Waters ACQUITY UPLC BEH Amide, 130 Å, 1.7 µm, 3mm×50mm）、移動相A（80/20（v/v）のアセトニトリル/水中25mM酢酸アンモニウム）、及び移動相B（40/60（v/v）のアセトニトリル/水中25mM酢酸アンモニウム）を、10分以内に、0.8ml/分の流速、40℃のカラム温度、及び260nmの検出波長で、相Bの0～100%からの勾配溶出に使用した。

10

【0176】

統計分析

全ての結果を平均±SDとして示す（n=3）。データを、一元配置分散分析又は二元配置分散分析（ANOVA）の後、Prism 8.0（GraphPad Software）を使用して複数の群を比較するためのTurkey、Sidak又はDunnettの事後検定によって分析した。0.05未満のP値を統計学的に有意とみなした。

【0177】

実施例 1

ロボット液体ハンドラによる相混合プロセスの最適化

LNP調製のためのハイスループット溶媒注入方法を開発するために、粒径及びASO封入に対する相混合の効果を最初に調べた。ASO-1を、0.4 µmolの総脂質及び1.5 mol%のDSPE-PEG2000から構成されるLNPに、N/P比1の下で電荷媒介錯化によって負荷した。脂質を含有するエタノール相を分注し、TECAN（登録商標）液体ハンドラを使用して、機器の設定に従って最小0.1ml/sから最大0.9ml/sの範囲の異なるピペット操作速度で水性ASO相と混合し、逆も同様に行った。エタノール-緩衝液注入は、注入とそれに続く10回の混合のための低速、中速、又は高速下で、平均直径約145nm（図1A）、%PD約18%（図1B）、及びASOの%EE約83%（図1C）を有する同様のLNPを生成した。対照的に、低速（0.1ml/s）での緩衝液-エタノール注入は、より低い%EE（約43%）でより大きな（平均直径約220nm）及びより多分散（%PD約41%）粒子を生成した（図1A～1C）。しかしながら、注入速度を増加させると、エタノール-緩衝液注入と同様のLNPが生成され、ASO負荷LNPの形成には水性緩衝液中の濃縮脂質の迅速な消散が必要であることが示唆された。次に、LNPをエタノール-緩衝液注入下で調製し、続いて異なるピペッティング回数及び速度で相混合した。中速（0.5ml/s）及び10回の混合は、高いASO負荷で均一なLNPを生成するのに十分であったが、混合速度又は回数のさらなる増加は、粒径及び%EEに影響しなかった（図1D～1F）。したがって、以下の研究のために、エタノール-緩衝液注入とそれに続く0.5ml/sでの10回の混合の条件を選択した。

20

30

【0178】

実施例 2

ASO負荷LNP製剤のHTS

LNPの主要な品質属性に対する製剤パラメータの影響を調査するために、これらの製剤の合理化された調製及び特性評価を可能にするHTSワークフローを設計した（図2）。ASOを最初に、脂質が正電荷を帯びて電荷媒介錯化を促進するように、MC3のpKa（6.4）より低いpH4.0のクエン酸緩衝液に溶解した。次いで、溶液のpHをリン酸緩衝液によって中性に調整した後、分析を行った。

40

【0179】

典型的なスクリーニングのために、2つのレベルの総脂質濃度、N/P比によって調整される4つのレベルのASO負荷、及び4つのレベルのPEG化脂質含有量で変動する3

50

2の異なる試料（それぞれ3つの反復）を、96ウェルプレートで並行してスクリーニングした（図3A）。調査した3つの製剤パラメータの中で、PEG化脂質は、脂質組成にPEGが組み込まれていない場合に多峰性の大きな凝集体が生成されたため、LNP形成に不可欠であった（図3C～3D、図4）。PEG化脂質含有量を有意に増加させると（ $P < 0.0001$ ）、平均粒径が減少した、すなわち、1.5、3、及び5mol%のDSPE-PEG2000を含有する脂質は、それぞれ約120、約80、及び約60nmのLNP直径をもたらした（図3C～3D）。しかし、多分散性も増加し、5mol%のDSPE-PEG2000は、おそらく小さなDSPE-PEG2000ミセルの形成に起因して、亜集団を生成しさえした（図3C）。例えば、Johnsson et al., 2003, Biophys J 85 (6): 3839-47; Gill et al., 2015, J Drug Target 23 (3): 222-31を参照のこと。

10

【0180】

一方、ASOの%EEは、主にN/P比によって決定された。MC3中の過剰な錯化部位を有する1より高いN/P比は、80%超の%EEをもたらした。一方、充電バランス点を超える2倍過剰量のASO-1は、%EEを約50%まで有意に減少させた（図3E）。MC3を別のカチオン性脂質DOTAP（図5A～5C）で置き換えた場合、又はASO-1をASO-2（図6A～6C）で置き換えた場合にも同様の結果が見られ、HTS結果のロバスト性が実証された。

【0181】

実施例3

20

スケールアップLNP調製によるHTS結果の検証

次いで、スクリーニングされた製剤パラメータのLNP品質属性への影響を、HTSアプローチからの結果をマイクロ流体製剤化装置からの結果と比較することによって検証した。2つの方法は同様の結果を示した：（1）PEG含有量が増加すると、LNPサイズは減少したが、多分散性は増加した（図7A）；（2）LNPサイズは、2mMまでの全脂質濃度の増加に伴って安定していた（図7B）；（3）N/P比<2の場合、LNPサイズは安定したままであった（図7C）；（4）過剰なASO負荷（N/P比<1）は、%EEの有意な減少をもたらした（図7D）；及び（5）LNPは、同じN/P比及びPEG化脂質含有量で調製された同様の構造を示した（図7E）。さらに、HTSアプローチは、線形回帰 $R^2 > 0.9$ （図7A）との強い相関によって示される、PEG化脂質含有量に対する粒径及び多分散性の依存性を首尾よく予測した。

30

【0182】

実施例4

ASO負荷LNPの安定性スクリーニング

製剤安定性に対する異なる粒径の影響をさらに調査するために、様々なPEG含有量で調製したASO-1負荷LNPをPBSで10倍希釈し、4℃又は40℃でインキュベートし、2週間にわたる粒径分布を監視した。N/P比は1以上に保たれ、ASOの%EEは約90%であったので、安定性試験中のLNPからのASO漏出を定量化することができた。図8A～図8Bに示すように、1.5又は3mol%のDSPE-PEG2000を含むハイスループット溶媒注入又はNanoAssembler（登録商標）によって調製されたLNPも同様に、4℃でのインキュベーション中、それらの初期平均粒径（図8A）及び多分散性（図8B）のままであった。40℃で、1.5mol%のDSPE-PEG2000を含有するLNPは、1週間後に粒径の増加を示したが、一定の多分散性（図9）のままであった。1.5mol%のDSPE-PEG2000を含むLNPもまた、最初の3日以内に最小のASO漏出を示したが、2週間後に3及び5mol%のDSPE-PEG2000を含むLNPと同様のレベルのASO漏出を示した（図10）。4℃でのASO漏出は1ヶ月にわたって検出されなかった。

40

【0183】

LNP製剤のハイスループット調製のための溶媒注入法は、相混合プロセスがロボット液体ハンドラによって実行され得るので選択された。手動ピペティングと比較して、マ

50

ルチチャネル液体ハンドラは、96個の試料のハイスループット並列処理を可能にし、ウェル全体で均一な液体分注及び混合を達成した。重要なプロセスは、球状脂質層及びナノ粒子構造への脂質の自己集合を促進するために、相互混和相、例えば脂質を溶解するエタノールと核酸を溶解する水性緩衝液との迅速かつ徹底的な混合を伴った。この方法は、リポソームを調製するために広く使用されており、エタノール相を50体積%未満に調整すると均一なナノ粒子を生成した。エタノール相比及び／又は脂質濃度を増加させると、低速の緩衝液－エタノール注入（図1A～1B）の結果によっても示されるように、おそらく非効率的な相混合のために大きな粒子又は凝集体が生成された。液体ハンドラによる自動混合プロセスからの知見は、マイクロ流体法によって調製されたLNPの結果と高度に相関していた。流量比（FRR、水性対有機流量）は、マイクロ流体調製中の重要な製剤パラメータの1つであり、低いFRRはより大きな粒子を生成する。低速での緩衝液－エタノール注入は、低いFRRの状態を示した。したがって、自動化された混合条件を最適化し、エタノール－緩衝液注入を1／3のエタノール／水性体積比（25体積%のエタノール）の下で0.5ml／sに設定し、続いて10回ピペッティングして効率的な相混合を達成し、高い封入効率で均一な粒子を生成した。

10

20

30

40

50

【0184】

次に、ASO負荷LNPの最適な品質属性について、総脂質濃度、脂質組成、及びASO負荷量を含む製剤変数をスクリーニングするための合理化されたワークフローを開発した。この目的のために、ASOの粒径分布及び%EEをそれぞれハイスループットDLS及びOD₂₆₀によって測定して、高いASO負荷量で均一なナノ粒子を生成することができる条件を決定した。スクリーニング結果は、PEG化脂質含有量が粒径分布に有意に影響を及ぼすことを示した（図3B～3D、5A～5B、6A～6B）。総脂質の1.5mol%で組み込まれたDSPE-PEG₂₀₀₀は、約120nmの平均直径を有する単峰性ナノ粒子を産生したが、より多くのPEGは多分散性を増加させた。第三級アミン構造からなるイオン化可能な脂質は、ヌクレオチドのための脂質ベースの送達システムにますます使用されており、永続的に荷電したカチオン性脂質よりも良好な細胞内送達効率及び低い細胞傷害性を示す。例えば、Cullis & Hope, 2017, Mol. Ther. 25 (7): 1467–1475, Sabnis et al., 2018, Mol. Ther. 26 (6): 1509–1519; Semple et al., 2010, Nature Biotechnology, 28 (2): 172–176を参照のこと。電荷媒介錯化の負荷機構と一致して、スクリーニング結果はN／P比によって決定されるASO封入を示し、N／P比＝1で約90%の%EEを示し（図3E、5C、6C）、0.29mgのRTR3833／mg脂質の負荷能力に対応した（1.5mol%のDSPE-PEG₂₀₀₀を含む2mMの総脂質）。

【0185】

重要なことに、HTSアプローチからの結果は、スケーラブルな生産を伴うナノ粒子製剤を調製するためにますます利用されているマイクロ流体製剤化装置からの結果を首尾よく予測した。例えば、Belliveau et al., 2012, Mol. Ther. Nucleic Acids, 1, e37; van Swaay & deMellow, 2013, Lab Chip 13 (5): 752–67を参照のこと。両方の方法は、PEG化脂質含有量（図7A）、総脂質濃度（図7B）、及びN／P比（図7C）に対するLNPサイズの同様の依存性を示し、ASOの%EEは、N／P比によって同様に調整された（図7D）。2つの方法はまた、同じ製剤パラメータ（図7E）下で類似の構造を有するLNPを生成した。さらに、これらのASO負荷LNPは、安定した粒径分布（図8A～8B）及び40℃で2週間の貯蔵にわたって封入ASOの約20%の漏出を示した（図10）。しかしながら、マイクロ流体調製と比較して、HTSアプローチは、調製及び分析出力を約100倍増加させながら、原料を約10倍節約することにおいて有意な利点を示した（単一のマイクロ流体実行と比較して、マイクロプレート内の96個の試料を並列処理することから、初期段階の製剤スクリーニングの大きな可能性が示された（図11）。スクリーニング結果に基づいて、1.5mol%のDSPE-PEG₂₀₀₀

及び N/P 比 ≥ 1 は、均一で安定した粒径並びに高い ASO 負荷を有する最適な LNP 製剤を生成することが決定された。HTS システムに異なる脂質及び他の ASO を導入した後も、同じ意見が依然として有効であり、このスクリーニングプラットフォームが $siRNA$ 及び単一ガイド RNA などの様々な種類の担体及びカーゴへの適用を拡大できることを示唆した。

【0186】

HTS スクリーニングアプローチは、 LNP を調製するための再現性のある製剤プラットフォームを実証した。自動注入プラットフォームからマイクロ流体調製物への変換可能な結果は、スクリーニング及びスケールアップ製剤をサポートするためのシームレスなワークフローを作り出し、製剤の不整合から生じるブリッジ研究を回避した。次なるステップは、現在のワークフローを下流のインビトロスクリーニングと統合して、 ASO 負荷 LNP の物理化学的屬性を治療有効性と相関させることである。さらに、ゼータ電位及び液体クロマトグラフィー戦略による API 及び賦形剤の両方の同時定量化などのより多くの製剤属性に対処するために、ワークフローをさらに改善することができる。Yamamoto et al., 2011 J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 879 (20), 3620–5, Liet al., 2019, J Chromatogr A 1601: 145–154。

【0187】

この実施例では、製剤パラメータをスクリーニングし、 ASO 負荷 LNP の品質属性に対処するためのハイスループットアプローチが開発された。自動化された液体の分注及び混合から始まり、続いてハイスループットな粒径及び ASO 封入の分析の合理化されたワークフローは、 PEG 化脂質含有量及び N/P 比がそれぞれ粒径分布及び封入効率の主要な決定因子であることを同定した。さらに、HTS の結果は、マイクロ流体を用いたスケールアップ調製からの結果を首尾よく予測した。ロバストなスクリーニング結果、並びに材料の大幅な節約及び分析出力の改善は、脂質ベースのナノ粒子製剤の開発を進めるためのこのアプローチの大きな将来性を示唆している。

【0188】

実施例 5

ASO 封入の定量化の代替方法

ASO 封入の定量化を、蛍光プレートリーダーを使用して決定した。手短に言えば、ハイスループット溶媒注入法によって ASO 負荷 LNP を調製し、次いで、TE 緩衝液で 50 倍希釈し、等体積の 5000 倍希釈蛍光プローブ Sybr-gold と混合し、蛍光プレートリーダー ($Ex/Em = 495/550\text{ nm}$) を使用して非封入 ASO を定量した。次いで、 LNP を、1 体積 % Triton TE 中の等体積の 10000 倍希釈 Sybr-gold (すなわち、最終プローブ希釈を 10000 倍に保ち、Triton 濃度を 0.5 体積 % にした) の直接添加によって破壊した (図 12 A)。次いで、蛍光測定を行い、総 ASO を定量した。封入効率 (% EE) を以下のように計算した：

$$\%EE = \frac{\text{合計}ASO\text{量} - \text{遊離}ASO\text{量}}{\text{合計}ASO\text{量}} \times 100\%$$

【0189】

計算は、蛍光法及び UV-Vis 法を使用して異なる N/P 比で調製された 2 つの異なる LNP 製剤について同等の % EE 結果を示した (図 12 B)。結果は平均 $\pm$ SD、 $n = 2$ として表され； ns 、有意ではない (二元配置 ANOVA、続いて Sidak の多重比較によって分析)。

【0190】

実施例 6

H i B i T ペプチド負荷 LNP 製剤の HTS

リボソームの主要な品質属性に対する製剤パラメータの影響を調査するために、これら

の製剤の合理化された調製及び特性評価を可能にするHTSワークフローを設計した。HiBiTを最初に、150mM NaCl (pH 5.5)を補充した20mMヒスチジン酢酸緩衝液に溶解し、ロボット液体ハンドラを使用してマイクロウェルプレートに分注した。実施例2と同様に脂質混合物を調製した(図13A)。

【0191】

典型的なスクリーニングのために、4種類のLNP製剤並びにPEG化脂質、遮蔽PEG化脂質及びアジドとコンジュゲートしたPEG化脂質の8つの組み合わせで変動する32個の異なる試料(それぞれ3つの反復)を、96ウェルプレートで並行してスクリーニングした(図13B)。調査した8つの製剤パラメータの中で、PEG化脂質は、脂質組成にPEGが組み込まれていない場合に多峰性の大きな凝集体が生成されたため、LNP形成に必要であった(図13C)。精製前後の遊離ペプチド濃度の定量により、ゲル濾過及び透析についてそれぞれ約98%及び約61%の平均精製効率を得られた(図13D~13F)。粒子回収率は、PEG化脂質なしで調製された凝集試料のための低い値を除いて、一般に80~120%の間であった(図13G)。さらに、粒径分布は、ゲル濾過による精製後も一定のままであった(図13H)。

参考文献

K. Sridharan, N. J. Gogtay, Therapeutic nucleic acids: current clinical status, Br J Clin Pharmacol 82 (3) (2016) 659-72.

A. Goyon, P. Yehl, K. Zhang, Characterization of therapeutic oligonucleotides by liquid chromatography, J Pharm Biomed Anal 182 (2020) 113105.

C. Chakraborty, A. R. Sharma, G. Sharma, C. G. P. Doss, S. S. Lee, Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine, Mol Ther Nucleic Acids 8 (2017) 132-143.

C. I. E. Smith, R. Zain, Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art, Annu Rev Pharmacol Toxicol 59 (2019) 605-630.

D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W. D. O'Riordan, C. C. Yang, M. Ueda, A. V. Kristen, I. Tournev, H. H. Schmidt, T. Coelho, J. L. Berk, K. P. Lin, G. Vita, S. Attarian, V. Plante-Bordeneuve, M. M. Mezei, J. M. Campistol, J. Buades, T. H. Brannagan, 3rd, B. J. Kim, J. Oh, Y. Parman, Y. Sekijima, P. N. Hawkins, S. D. Solomon, M. Polydefkis, P. J. Dyck, P. J. Gandhi, S. Goyal, J. Chen, A. L. Strahs, S. V. Nochur, M. T. Sweetser, P. P. Garg, A. K. Vaishnaw, J. A. Gollob, O. B. Suhr, Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis, N Engl J Med 379 (1) (2018) 11-21.

U. Sahin, K. Kariko, O. Tureci, mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs, Nat Rev Drug Discov 13 (10) (2014) 759-80.

U. Sahin, E. Derhovannessian, M. Miller, B. P. K. Locke, P. Simon, M. Lower, V. Bukur, A. D. Tadmor,

10

20

30

40

50

U. Luxemburger, B. Schrörs, T. Omokoko, M. Vormehr, C. Albrecht, A. Paruzynski, A. N. Kuhn, J. Buck, S. Heesch, K. H. Schreeb, F. Müller, I. Ortsiefer, I. Vogler, E. Godehardt, S. Attig, R. Rae, A. Breitzkreuz, C. Tolliver, M. Suchan, G. Martić, A. Hohberger, P. Sorn, J. Diekmann, J. Ciesla, O. Waksman, A. K. Bruck, M. Witt, M. Zillgen, A. Rothermel, B. Kasemann, D. Langer, S. Bolte, M. Diken, S. Kreiter, R. Nemecek, C. Gebhardt, S. Grabbe, C. Holler, J. Utikal, C. Huber, C. Loquai, O. Tureci, Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer, *Nature* 547 (7662) (2017) 222–226.

10

N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman, mRNA vaccines—a new era in vaccinology, *Nat Rev Drug Discov* 17 (4) (2018) 261–279.

K. A. Dowd, S. Y. Ko, K. M. Morabito, E. S. Yang, R. S. Pelc, C. R. DeMasos, L. R. Castilho, P. Abbink, M. Boyd, R. Nityanandam, D. N. Gordon, J. R. Gallagher, X. Chen, J. P. Todd, Y. Tsybovsky, A. Harris, Y. S. Huang, S. Higgs, D. L. Vanlandingham, H. Andersen, M. G. Lewis, R. De La Barrera, K. H. Eckels, R. G. Jarman, M. C. Nason, D. H. Barouch, M. Roederer, W. P. Kong, J. R. Mascola, T. C. Pierson, B. S. Graham, Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus, *Science* 354 (6309) (2016) 237–240.

20

J. M. Richner, S. Himansu, K. A. Dowd, S. L. Butler, V. Salazar, J. M. Fox, J. G. Julander, W. W. Tang, S. Shrestha, T. C. Pierson, G. Ciaramella, M. S. Diamond, Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection, *Cell* 168 (6) (2017) 1114–1125 e10.

30

A. Patel, E. L. Reuschel, K. A. Kraynyak, T. Racine, D. H. Park, V. L. Scott, J. Audet, D. Amante, M. C. Wise, A. A. Keaton, G. Wong, D. O. Villarreal, J. Walters, K. Muthumani, D. J. Shedlock, M. A. de La Vega, R. Plyler, J. Boyer, K. E. Broderick, J. Yan, A. S. Khan, S. Jones, A. Bello, G. Soule, K. N. Tran, S. He, K. Tierney, X. Qiu, G. P. Koberinger, N. Y. Sardesai, D. B. Weiner, Protective Efficacy and Long-Term Immunogenicity in Cynomolgus Macaques by Ebola Virus Glycoprotein Synthetic DNA Vaccines, *J Infect Dis* 219 (4) (2019) 544–555.

40

M. D. Shin, S. Shukla, Y. H. Chung, V. Beiss, S. K. Chan, O. A. Ortega-Rivera, D. M. Wirth, A. Chen, M. Sack, J. K. Pokorski, N. F. Steinmetz, COVID-19 vaccine development and a potential

50

nanomaterial path forward, *Nat Nanotechnol* (2020).

J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, J. L. Au, Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers, *The AAPS journal* 12 (4) (2010) 492–503.

M. Durymanov, J. Reineke, Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers, *Front Pharmacol* 9 (2018) 971.

A. Akinc, M. A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X. Du, M. J. Hope, T. D. Madden, B. L. Mui, S. C. Semple, Y. K. Tam, M. Ciufolini, D. Witzigmann, J. A. Kulka
rni, R. van der Meel, P. R. Cullis, The Onpatt
ro story and the clinical translation of
nanomedicines containing nucleic acid-ba
sed drugs, *Nat Nanotechnol* 14 (12) (2019) 10
84–1087.

A. C. Anselmo, S. Mitragotri, Nanoparticles
in the clinic: An update, *Bioeng Transl Med* 4 (3) (2019) e10143.

Liposome drug products: chemistry, manufa
cturing, and controls; human pharmacokinet
ics and bioavailability; and labeling doc
umentation, U. S. Food and Drug Administrat
ion, 2018.

T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann,
A. Yau-Young, Liposomes containing synthet
ic lipid derivatives of poly(ethylene gl
ycol) show prolonged circulation half-liv
es in vivo, *Biochim Biophys Acta* 1066 (1) (1991) 29–36.

O. Garbuzenko, Y. Barenholz, A. Priev, Effect
of grafted PEG on liposome size and on co
mpressibility and packing of lipid bilay
er, *Chem Phys Lipids* 135 (2) (2005) 117–29.

M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattell, Stealth
liposomes: review of the basic science, ra
tionale, and clinical applications, existi
ng and potential, *Int J Nanomedicine* 1 (3)
(2006) 297–315.

A. Schroeder, C. G. Levins, C. Cortez, R. Lange
r, D. G. Anderson, Lipid-based nanotherapeut
ics for siRNA delivery, *J Intern Med* 267 (1) (2010) 9–21.

P. R. Cullis, M. J. Hope, Lipid Nanoparticle
Systems for Enabling Gene Therapies, *Mol
Ther* 25 (7) (2017) 1467–1475.

M. Johnsson, K. Edwards, Liposomes, disks, an
d spherical micelles: aggregate structure

10

20

30

40

50

in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids, *Biophys J* 85 (6) (2003) 3839-47.

K. K. Gill, A. Kaddoumi, S. Nazzal, PEG-lipid micelles as drug carriers: physicochemical attributes, formulation principles and biological implication, *J Drug Target* 23 (3) (2015) 222-31.

K. Yang, J. T. Delaney, U. S. Schubert, A. Fahr, Fast high-throughput screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method, *J Liposome Res* 22 (1) (2012) 31-41.

10

M. A. Schubert, C. C. Muller-Goymann, Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles—evaluation of the method and process parameters, *Eur J Pharm Biopharm* 55 (1) (2003) 125-31.

A. A. Mokhtarieh, J. Lee, S. Kim, M. K. Lee, Preparation of siRNA encapsulated nanoliposomes suitable for siRNA delivery by simply discontinuous mixing, *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860 (6) (2018) 1318-1325.

20

C. Jaafar-Maalej, R. Diab, V. Andrieu, A. Elaissari, H. Fessi, Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation, *J Liposome Res* 20 (3) (2010) 228-43.

I. V. Zhigaltsev, N. Belliveau, I. Hafez, A. K. Leung, J. Huft, C. Hansen, P. R. Cullis, Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing, *Langmuir* 28 (7) (2012) 3633-40.

30

S. Sabnis, E. S. Kumarasinghe, T. Salerno, C. Mihai, T. Ketova, J. J. Senn, A. Lynn, A. Bulychiev, I. McFadyen, J. Chan, O. Almarsson, M. G. Stanton, K. E. Benenato, A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates, *Mol Ther* 26 (6) (2018) 1509-1519.

40

S. C. Semple, A. Akin, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Sah, D. Stebbing, E. J. Crossley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Kl

50

imuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougères, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. J. Hope, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, Nature biotechnology 28 (2) (2010) 172–6.

N. M. Belliveau, J. Huft, P. J. Lin, S. Chen, A. K. Leung, T. J. Leaver, A. W. Wild, J. B. Lee, R. J. Taylor, Y. K. Tam, C. L. Hansen, P. R. Cullis, Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA, Mol Ther Nucleic Acids 1 (2012) e37.

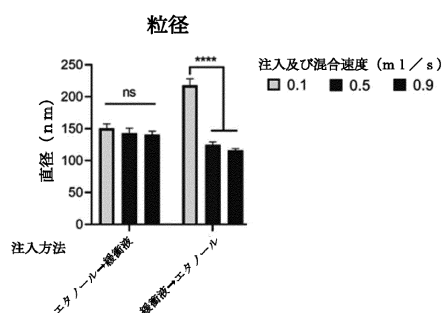
D. van Swaay, A. deMello, Microfluidic methods for forming liposomes, Lab Chip 13 (5) (2013) 752–67.

E. Yamamoto, K. Hyodo, N. Ohnishi, T. Suzuki, H. Ishihara, H. Kikuchi, N. Asakawa, Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated and released drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 879 (30) (2011) 3620–5.

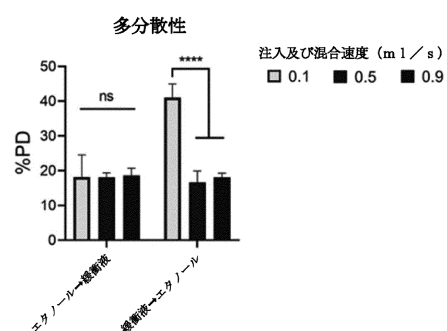
L. Li, J. P. Foley, R. Helmy, Simultaneous separation of small interfering RNA and lipids using ion-pair reversed-phase liquid chromatography, J Chromatogr A 1601 (2019) 145–154.

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

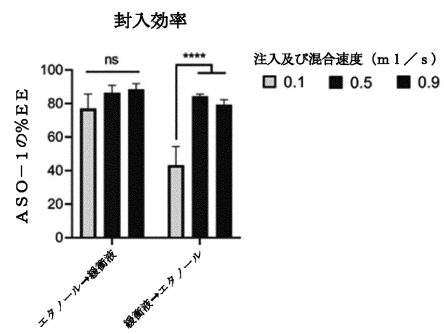
20

30

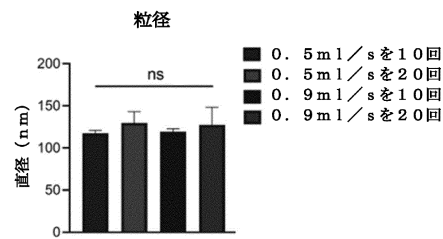
40

50

【図 1 C】

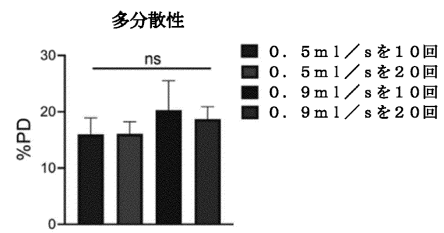


【図 1 D】

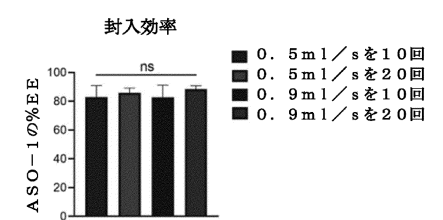


10

【図 1 E】



【図 1 F】



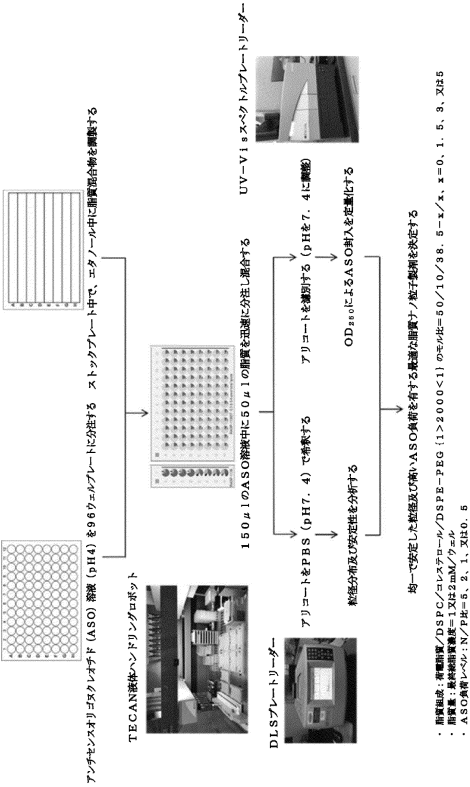
20

30

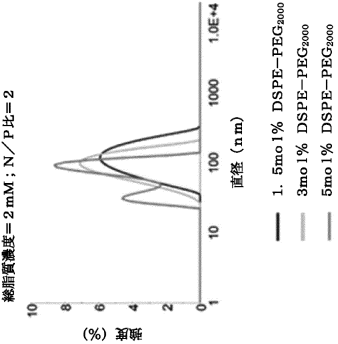
40

50

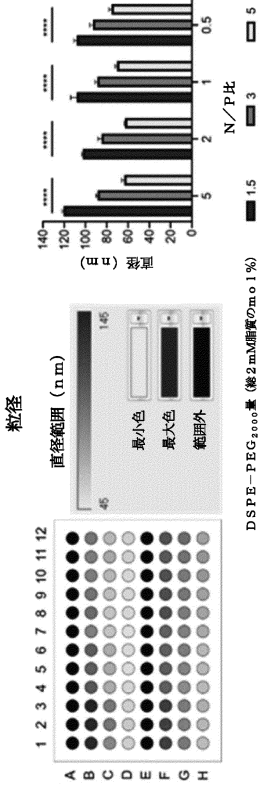
【図 2】



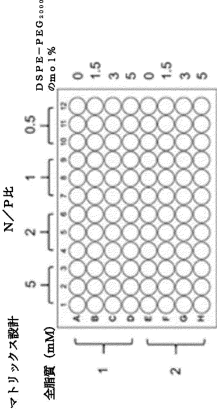
【図 3 B】



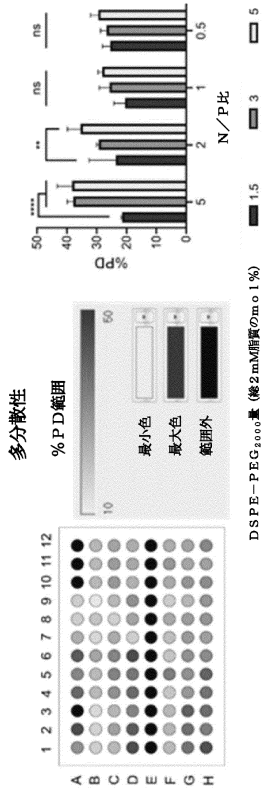
【図 3 C】



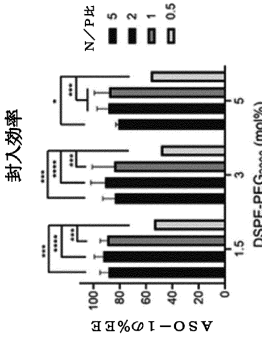
【図 3 A】



【図 3 D】



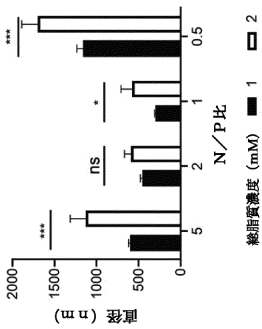
【図 3 E】



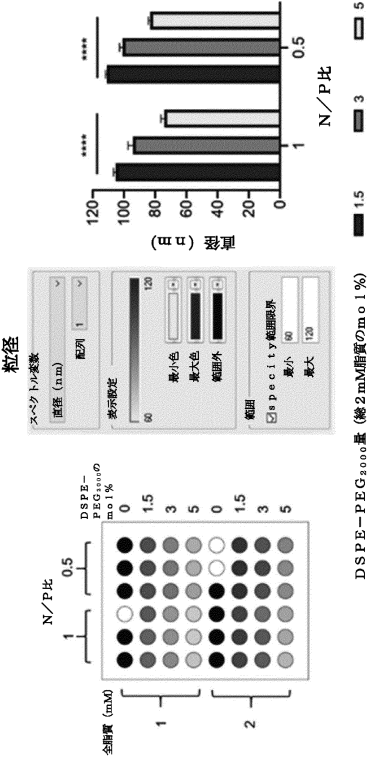
10

20

【図 4】



【図 5 A】

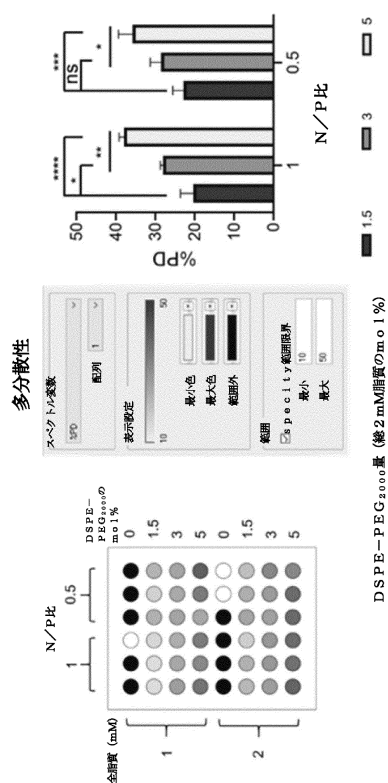


30

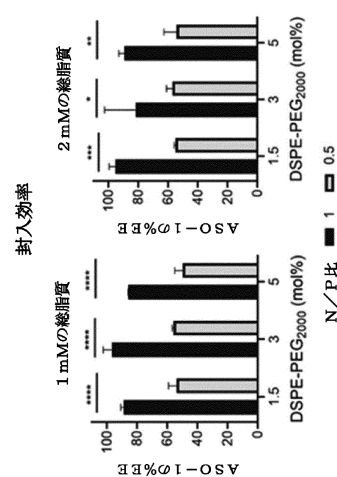
40

50

【図 5 B】



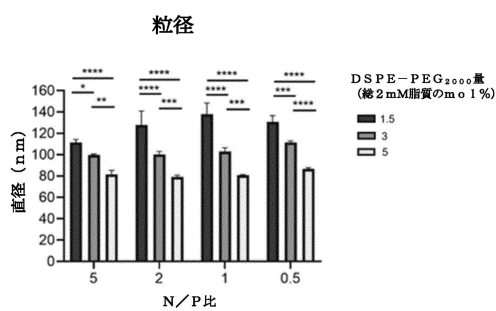
【図 5 C】



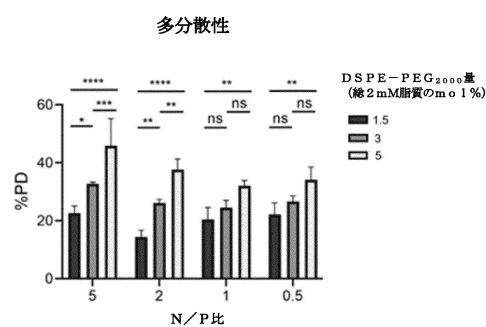
10

20

【図 6 A】



【図 6 B】

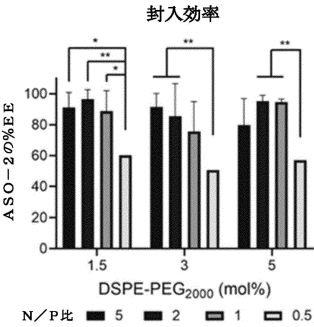


30

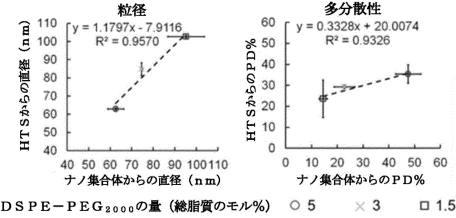
40

50

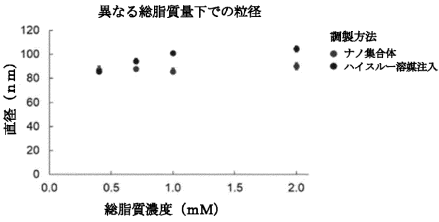
【図 6 C】



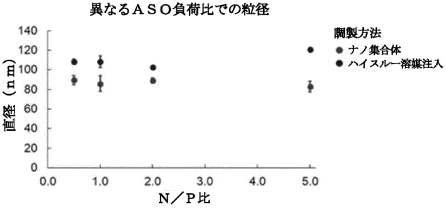
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】



10

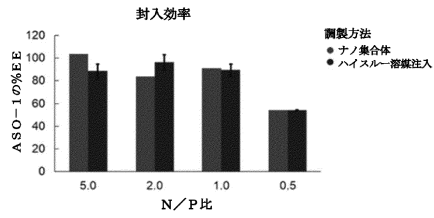
20

30

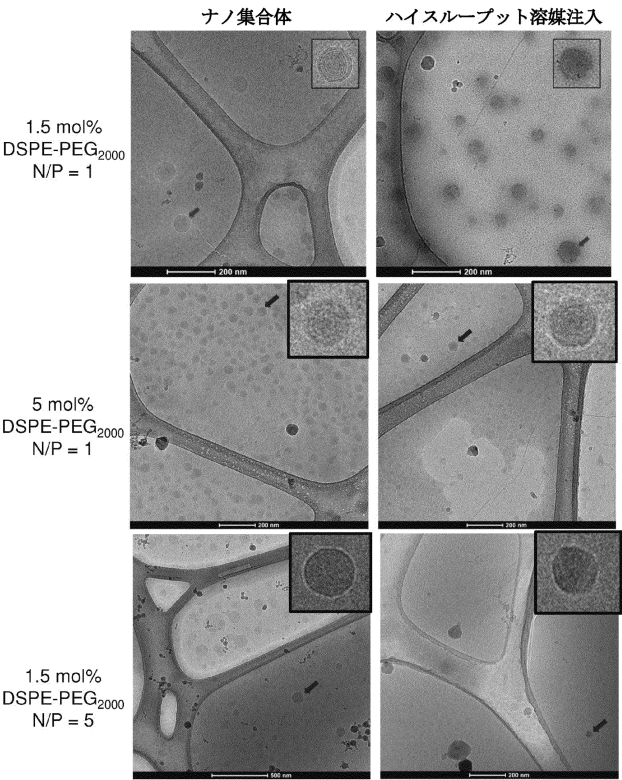
40

50

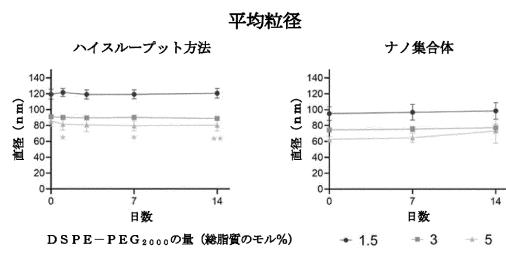
【図 7 D】



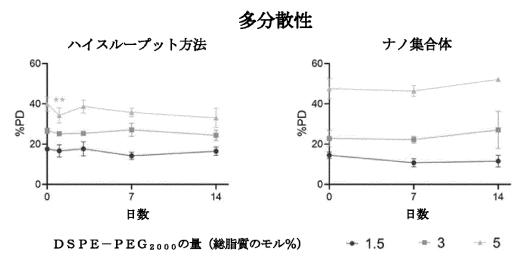
【図 7 E】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

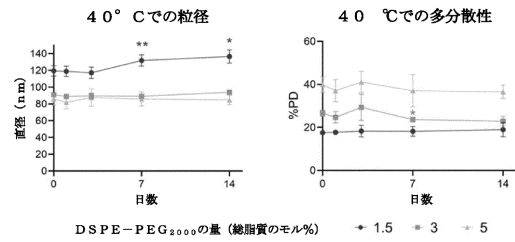
20

30

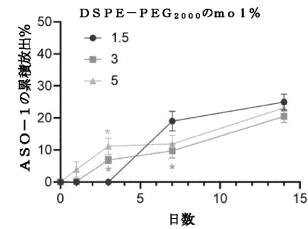
40

50

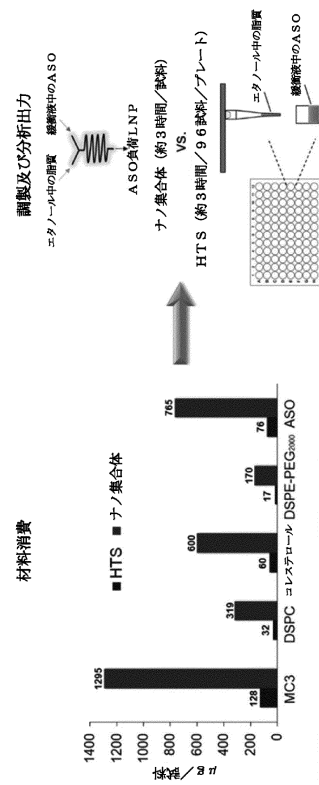
【図 9】



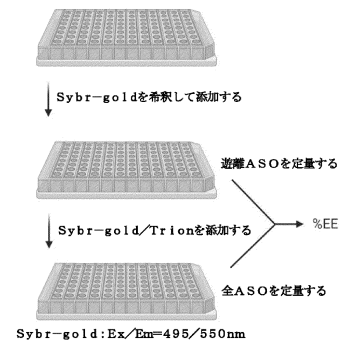
【図 1 0】



【図 1 1】



【図 1 2 A】



10

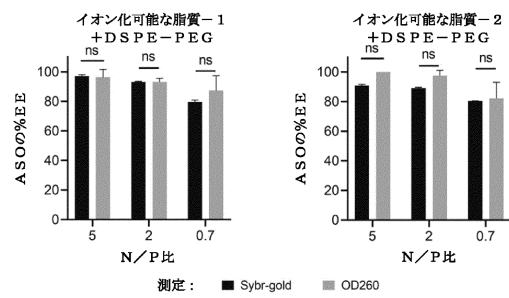
20

30

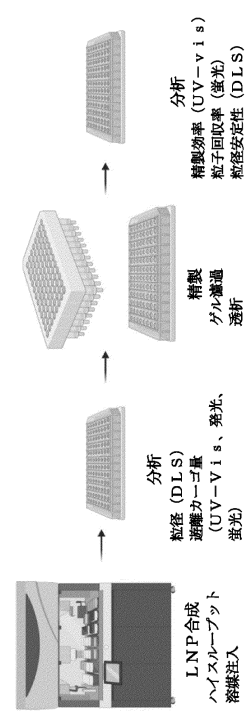
40

50

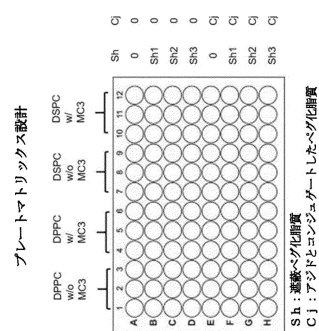
【図 1 2 B】



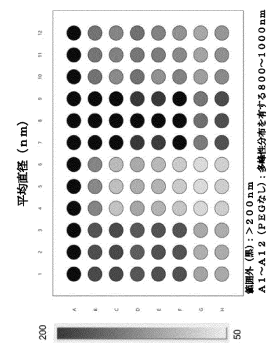
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



10

20

30

40

50

【図 1 3 D】

精製前の遊離ペプチド濃度												
遊離HPLC濃度 (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.35	1.42	1.43	1.43	1.41	1.41	1.41	1.46	1.42	1.47	1.48	1.48
B	1.07	1.39	1.35	1.36	1.34	1.33	1.31	1.31	1.31	1.29	1.34	1.27
C	1.51	1.33	1.36	1.41	1.34	1.30	1.34	1.36	1.23	1.42	1.40	1.35
D	1.13	1.31	1.36	1.37	1.32	1.30	1.32	1.30	1.29	1.31	1.28	1.55
E	1.60	1.35	1.34	1.38	1.38	1.32	1.30	1.35	1.31	1.33	1.32	1.26
F	1.09	1.37	1.36	1.48	1.41	1.39	1.32	1.35	1.34	1.39	1.30	1.74
G	1.88	1.38	1.37	1.33	1.29	1.32	1.32	1.32	1.42	1.36	1.39	1.34
H	1.40	1.37	1.45	1.40	1.42	1.37	1.40	1.38	1.30	1.45	1.36	1.67

【図 1 3 E】

ゲル濾過後の遊離ペプチド濃度												
SEC後のHPLC濃度 (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.027	0.000	0.030	0.027	0.032	0.034	0.026	0.000	0.027	0.032	0.028	0.030
B	0.033	0.031	0.033	0.043	0.030	0.037	0.056	0.036	0.049	0.070	0.028	0.032
C	0.035	0.026	0.029	0.028	0.026	0.029	0.036	0.037	0.033	0.035	0.036	0.036
D	0.028	0.029	0.000	0.000	0.026	0.028	0.032	0.043	0.028	0.030	0.030	0.032
E	0.000	0.037	0.027	0.027	0.064	0.029	0.041	0.062	0.027	0.036	0.048	0.035
F	0.032	0.028	0.032	0.032	0.027	0.036	0.034	0.045	0.039	0.030	0.032	0.135
G	0.034	0.032	0.030	0.027	0.029	0.040	0.033	0.030	0.039	0.029	0.031	0.047
H	0.036	0.037	0.035	0.034	0.032	0.033	0.033	0.031	0.000	0.038	0.034	0.029

【図 1 3 F】

透析後の遊離ペプチド濃度												
透析後のHPLC濃度 (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.093	0.096	0.140	0.113	0.101	0.115	0.121	0.104	0.121	0.121	0.112	0.116
B	0.106	0.104	0.087	0.100	0.117	0.102	0.104	0.094	0.112	0.080	0.098	0.100
C	0.099	0.070	0.093	0.108	0.105	0.111	0.102	0.075	0.094	0.085	0.105	0.103
D	0.096	0.101	0.099	0.102	0.094	0.110	0.108	0.100	0.104	0.113	0.094	0.103
E	0.081	0.088	0.105	0.114	0.105	0.114	0.103	0.103	0.103	0.107	0.099	0.103
F	0.096	0.096	0.109	0.100	0.100	0.101	0.102	0.091	0.100	0.090	0.090	0.100
G	0.084	0.089	0.118	0.091	0.107	0.118	0.105	0.107	0.111	0.117	0.121	0.119
H		0.106	0.100	0.116	0.114	0.124		0.104	0.112	0.116	0.109	0.111

【図 1 3 G】

ゲル濾過後の粒子回収率												
SEC後の電子回収率 (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	72.3	70.9	62.6	47.8	55.2	50.9	41.3	47.4	19.8	42.8	46.1	39.5
B	127.3	109.8	102.6	102.7	102.7	112.6	111.1	97.1	83.7	94.1	75.2	75.2
C	117.3	108.8	97.5	113.4	112.6	111.1	97.1	93.7	98.4	130.4	110.3	109.7
D	107.2	88.8	53.5	89.7	80.7	90.4	81.4	92.9	86.0	106.6	78.7	99.5
E	92.8	108.1	48.7	99.5	108.5	101.2	93.0	83.1	89.7	109.7	132.0	84.3
F	102.3	97.0	104.1	96.6	105.5	109.0	86.6	84.9	87.5	90.5	93.3	108.2
G	115.1	117.8	108.1	120.4	135.1	112.6	125.8	98.3	111.3	99.9	120.5	88.9
H	117.3	93.0	89.4	126.7	82.6	88.6	76.0	93.6	76.7	105.2	99.8	99.8

10

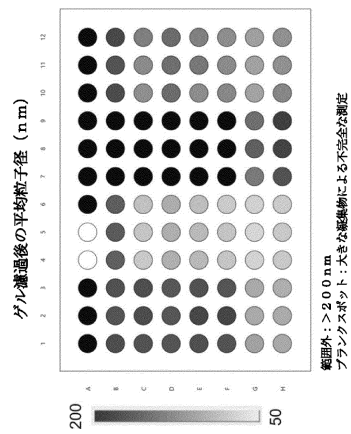
20

30

40

50

【図 1 3 H】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/062344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/127 A61K9/51 A61K31/7105 A61K31/713 A61K38/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/223135 A1 (MODERNATX INC [US]) 28 December 2017 (2017-12-28) page 1, line 21 - page 3, line 28 page 6, line 39 - page 7, line 13 page 8, line 15 - page 15, line 8 page 19, lines 21-31 page 20, line 24 - page 32, line 11 claims 1-30 ----- -/-	1-11, 13, 15-46, 48, 50-81, 83, 85-116, 118, 120-151, 153, 155-186, 188, 190-214
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 March 2022		Date of mailing of the international search report 07/04/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gómez Gallardo, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/062344

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG KEWEI ET AL: "Fast high-throughput screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method", JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol. 22, no. 1, 20 June 2011 (2011-06-20), pages 31-41, XP055903740, cited in the application the whole document -----	1, 11, 12, 14-16, 18-36, 46, 47, 49-51, 53-71, 81, 82, 84-86, 88-106, 116, 117, 119-121, 123-141, 151, 152, 154-156, 158-176, 186, 187, 189-191, 193-214
X	CASCHERA FILIPPO ET AL: "Automated Discovery of Novel Drug Formulations Using Predictive Iterated High Throughput Experimentation", PLOS ONE, [Online] vol. 5, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01) , page e8546, XP055904025, DOI: 10.1371/journal.pone.0008546 internet Retrieved from the Internet: URL:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008546?nosfx=y> abstract page 6, left-hand column, paragraph 3 - page 7, left-hand column, paragraph 2 -----	211-214
A	FAN YUCHEN ET AL: "Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, ELSEVIER B.V, AMSTERDAM, NL, vol. 192, 19 September 2020 (2020-09-19), page 113642, XP086412882, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/J.JPBA.2020.113642 abstract page 17, left-hand column, paragraphs 3,4 ----- -/--	1-214

International application No
PCT/US2021/062344

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHUBERT M A ET AL: "Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - evaluation of the method and process parameters", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 125-131, XP004404967, ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/S0939-6411(02)00130-3 cited in the application the whole document -----	1-214
A	US 2019/117572 A1 (TASCIOTTI ENNIO [US] ET AL) 25 April 2019 (2019-04-25) claims 1-43 -----	1-214
A	US 2015/115488 A1 (HOOD RENEE [US] ET AL) 30 April 2015 (2015-04-30) claims 1-26 -----	1-214
X,P	FAN YUCHEN ET AL: "Automated high-throughput preparation and characterization of oligonucleotide-loaded lipid nanoparticles", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER, NL, vol. 599, 25 February 2021 (2021-02-25), XP086531592, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2021.120392 the whole document -----	1-3, 6, 11, 13, 15, 16, 18-27, 31-38, 41, 46, 48, 50, 51, 53-62, 66-73, 76, 81, 83, 85, 86, 88-97, 101-108, 111, 116, 118, 120, 121, 123-132, 136-143, 146, 151, 153, 155, 156, 158-167, 171-178, 181, 186, 188, 190, 191, 193-202, 206-214

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/062344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017223135 A1	28-12-2017	US 2020315967 A1 WO 2017223135 A1	08-10-2020 28-12-2017
US 2019117572 A1	25-04-2019	EP 3419602 A1 US 2019117572 A1 US 2019167589 A1 WO 2017147215 A1	02-01-2019 25-04-2019 06-06-2019 31-08-2017
US 2015115488 A1	30-04-2015	US 2015115488 A1 US 2017181972 A1	30-04-2015 29-06-2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 38/04 (2006.01)	A 6 1 K 38/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

8 0 - 4 9 9 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー／オー ジェネ
ンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 チャン, コー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 - 4 9 9 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエ
ヌエー ウェイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA31 DD33 DD63 EE23
4C084 AA03 AA17 BA03 NA10 ZB211
4C086 AA01 EA16 MA02 MA05 MA41 NA10 ZB21