

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6506749号
(P6506749)

(45) 発行日 平成31年4月24日 (2019. 4. 24)

(24) 登録日 平成31年4月5日 (2019. 4. 5)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/7105	(2006. 01)	A 6 1 K 31/7105	Z N A
A 6 1 K 48/00	(2006. 01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 9/127	(2006. 01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 47/14	(2006. 01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/22	(2006. 01)	A 6 1 K 47/22	

請求項の数 54 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-523331 (P2016-523331)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月22日 (2014. 10. 22)
 (65) 公表番号 特表2016-535729 (P2016-535729A)
 (43) 公表日 平成28年11月17日 (2016. 11. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/061830
 (87) 国際公開番号 W02015/061491
 (87) 国際公開日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)
 審査請求日 平成29年10月23日 (2017. 10. 23)
 (31) 優先権主張番号 61/894, 303
 (32) 優先日 平成25年10月22日 (2013. 10. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507159304
 シャイアー ヒューマン ジェネティック
 セラピーズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 4 2 1 レキシントン シャイアー ウ
 ェイ 3 0 0
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フェニルケトン尿症のためのmRNA療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フェニルケトン尿症 (PKU) の治療のための組成物であって、前記組成物は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードするmRNAを含み、治療を必要とする被験体に、PKUの少なくとも1つの症状または特徴が、強度、重篤度、もしくは頻度において減少するか、または発症が遅延されるような有効用量及び投与間隔で投与されることを特徴とし、前記mRNAがコドン最適化され、前記mRNAがリボソーム内に封入され、前記リボソームが、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む、前記組成物。

【請求項 2】

前記1つ以上のカチオン性脂質が、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinC2DMA、cKK-E12、ICE (イミダゾール系)、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、及びDMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

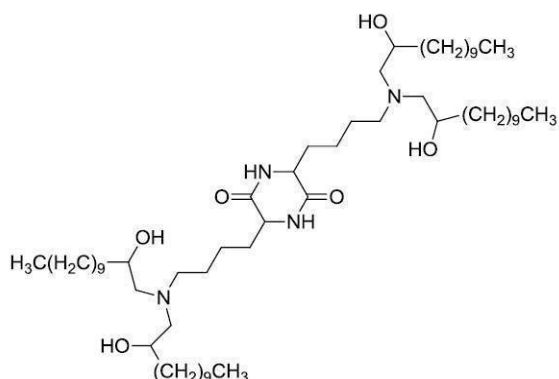
前記1つ以上のカチオン性脂質が、以下のcKK-E12を含む、請求項2に記載の組

10

20

成物。

【化 10】



10

【請求項 4】

前記 1 つ以上の非カチオン性脂質が、DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DPPC (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE (1, 2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPC (1, 2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホチジルコリン)、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、請求項 1~3 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 5】

前記 1 つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロールまたは PEG 化コレステロールである、請求項 1~4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 1 つ以上の PEG 修飾脂質が、長さが C₆ ~ C₂₀ のアルキル鎖 (複数可) を有する脂質に共有結合される、長さが最大 5 kDa のポリ (エチレン) グリコール鎖を含む、請求項 1~5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記カチオン性脂質が、モル比で前記リポソームの約 30 ~ 60 % を構成する、請求項 1~6 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 8】

前記カチオン性脂質が、モル比で前記リポソームの約 30 %、40 %、50 %、または 60 % を構成する、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG 化脂質の比率が、モル比でおよそ 40 : 30 : 20 : 10 である、請求項 1~8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG 化脂質の比率が、モル比でおよそ 40 : 30 : 25 : 5 である、請求項 1~8 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 11】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG 化脂質の比率が、モル比でおよそ 40 : 32 : 25 : 3 である、請求項 1~8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG 化脂質の比率が、モル比でおよそ 50 : 25 : 20 : 5 である、請求項 1~8 のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 13】

前記リポソームが、c K K-E 12、D O P E、コレステロール、及び D M G-P E G 2 Kを含む、請求項 1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記リポソームが、約 100 nm未満の大きさを有する、請求項 1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 m R N A が、約 0.1～3.0 mg/kg（体重）の範囲の有効用量で投与されることを特徴とする、請求項 1～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 m R N A が、約 0.1～1.0 mg/kg（体重）の範囲の有効用量で投与されることを特徴とする、請求項 1～15のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記組成物が、静脈内投与されることを特徴とする、請求項 1～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記組成物が、週に 1 回投与されることを特徴とする、請求項 1～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、2 週間に 1 回投与されることを特徴とする、請求項 1～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

前記組成物が、月に 2 回投与されることを特徴とする、請求項 1～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記組成物が、月に 1 回投与されることを特徴とする、請求項 1～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記組成物の前記投与が、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、及び血清において検出可能な P A H タンパク質の発現をもたらすことを特徴とする、請求項 1～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

前記組成物の前記投与が、約 100 ng/mg（前記肝臓中総タンパク質）以上の P A H タンパク質レベルの発現をもたらすことを特徴とする、請求項 1～22のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記組成物の前記投与が、血清 P A H タンパク質レベルの増加をもたらすことを特徴とする、請求項 1～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記組成物の前記投与が、前記治療前の基準フェニルアラニンレベルと比較して、前記血清中のフェニルアラニンレベルの減少をもたらすことを特徴とする、請求項 1～24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 26】

前記組成物の前記投与が、前記血清中約 1000 μmol/L 以下までフェニルアラニンレベルの減少をもたらすことを特徴とする、請求項 1～25のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記組成物の前記投与が、前記血清中約 500 μmol/L 以下までフェニルアラニンレベルの減少をもたらすことを特徴とする、請求項 1～26のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記組成物の前記投与が、前記血清中約 $120 \mu\text{mol/L}$ 以下までフェニルアラニンレベルの減少をもたらすことを特徴とする、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 29】

前記コドン最適化 mRNA が、配列番号 3、配列番号 7、または配列番号 8 を含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 30】

前記コドン最適化 mRNA が、配列番号 3 を含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 31】

前記 mRNA が、配列番号 4 の 5' UTR 配列を含む、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

前記 mRNA が、配列番号 5 または配列番号 6 の 3' UTR 配列を含む、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

前記 mRNA が、1 つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 34】

前記 1 つ以上の修飾ヌクレオチドが、プソイドウリジン、N-1-メチルプソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロローピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5 プロピニル-シチジン、C-5 プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C-5-プロモウリジン、C-5-フルオロウリジン、C-5-ヨードウリジン、C-5-プロピニル-ウリジン、C-5-プロピニル-シチジン、C-5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、及び/または 2-チオシチジンを含む、請求項 33 に記載の組成物。

20

【請求項 35】

前記 mRNA が、未修飾である、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 36】

フェニルケトン尿症 (PKU) を治療するための組成物であって、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードする mRNA を含み、前記 mRNA がコドン最適化され、前記リポソームが、1 つ以上のカチオン性脂質、1 つ以上の非カチオン性脂質、1 つ以上のコレステロール系脂質、及び 1 つ以上の PEG 修飾脂質を含む、前記組成物。

【請求項 37】

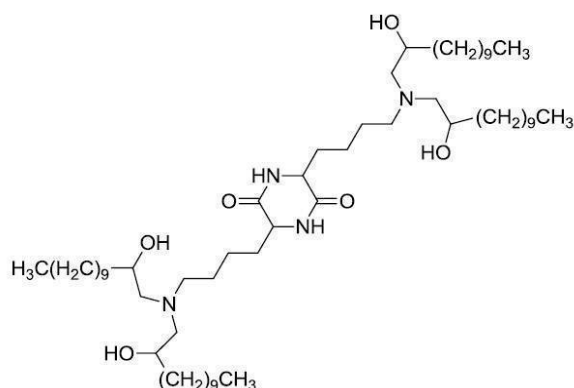
前記 1 つ以上のカチオン性脂質が、C12-200、DLinDMA、DLinC2DMA、cKK-E12、ICE (イミダゾール系)、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、及び DMDMA、DODAC、DLinDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DocarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 36 に記載の組成物。

40

【請求項 38】

前記 1 つ以上のカチオン性脂質が、以下の cKK-E12 を含む、請求項 36 または 37 に記載の組成物。

【化 1 1】



10

【請求項 3 9】

前記 1 つ以上の非カチオン性脂質が、DSPC（1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン）、DPPC（1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン）、DOPE（1，2-ジオレイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DOPC（1，2-ジオレイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホチジルコリン）、DPPE（1，2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DMPE（1，2-ジミリストイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、及びDOPG（1，2-ジオレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホ-（1'-*r a c* 20
-グリセロール））から選択される、請求項 3 6～3 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記 1 つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロールである、請求項 3 6～3 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記 1 つ以上のPEG修飾脂質が、長さがC₆～C₂₀のアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有結合される、長さが最大5 kDaのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む、請求項 3 6～4 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 2】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール系脂質：PEG修飾脂質の比率が、およそ40：30：20：10である、請求項 3 6～4 1 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 4 3】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール系脂質：PEG修飾脂質の比率が、およそ40：30：25：5である、請求項 3 6～4 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール系脂質：PEG修飾脂質の比率が、およそ40：32：25：3である、請求項 3 6～4 1 のいずれか一項に記載の組成物。 40

【請求項 4 5】

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール系脂質：PEG修飾脂質の比率が、およそ50：25：20：5である、請求項 3 6～4 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記リポソームが、cKK-E12、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG 2Kを含む、請求項 3 6～4 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 7】

前記リポソームが、約100 nm未満の大きさを有する、請求項 3 6～4 6 のいずれか一項に記載の組成物。 50

【請求項 48】

前記組成物が、静脈内投与用に製剤化される、請求項 36 ～ 47 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 49】

前記 mRNA が、配列番号 3、配列番号 7、または配列番号 8 を含む、請求項 36 ～ 48 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 50】

前記 mRNA が、配列番号 3 を含む、請求項 36 ～ 48 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 51】

前記 mRNA が、配列番号 4 の 5' UTR 配列を含む、請求項 50 に記載の組成物。

【請求項 52】

前記 mRNA が、配列番号 5 または配列番号 6 の 3' UTR 配列を含む、請求項 50 に記載の組成物。

【請求項 53】

フェニルケトン尿症 (PKU) を治療するための組成物であって、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードする mRNA を含み、前記 mRNA が、配列番号 3 を含み、

さらに、前記リポソームが、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール系脂質、及び PEG 修飾脂質 を含む、前記組成物。

【請求項 54】

フェニルケトン尿症 (PKU) を治療するための組成物であって、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードする mRNA を含み、前記 mRNA が、配列番号 7 または配列番号 8 を含み、

さらに、前記リポソームが、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール系脂質、及び PEG 修飾脂質 を含む、前記組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2013 年 10 月 22 日に提出された米国仮出願第 61/894,303 号に対する優先権を主張し、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

配列表

【0002】

本明細書は、配列表 (「2006685-0692__SL.txt」という名称の、txt ファイルとして 2014 年 10 月 22 日に電子的に提出された) を参照する。txt ファイルは、2014 年 10 月 20 日に生成され、大きさは 18,455 バイトである。配列表の全内容が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

フェニルケトン尿症 (PKU) は、肝酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) の遺伝子においてそれを機能不全にする変異を特徴とする常染色体劣性代謝遺伝障害である。PAH は、アミノ酸フェニルアラニン (Phe) をアミノ酸チロシンに代謝するために必要である。PAH の活性が減少すると、フェニルアラニンが蓄積し、フェニルピルビン酸塩 (フェニルケトンとしても知られる) に変換される。治療されないと、PKU は、知能障害、痙攣、及び他の重度の医学的問題をもたらす可能性がある。現在、疾患の治療法はなく、標準治療は、食事を管理し、大量のタンパク質を含有する食事を最小限にすることである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、特に、mRNA療法に基づくフェニルケトン尿素（phenylketonurea）（PKU）の効果的な治療のための方法及び組成物を提供する。本発明は、一部、PKU疾患モデルを使用した成功した動物試験に基づく。例えば、以下の実施例のセクションにより詳細に記載されるように、リポソーム内に封入されたヒトPAHタンパク質をコードするmRNAの投与は、血清、肝臓、及び他の臨床的に意味のある組織においてインビボで効率的なタンパク質産生をもたらした。さらに重要かつ驚いたことに、PAH mRNAを用いたPKU疾患モデルのPAHノックアウトマウスの治療は、投薬の6時間以内にフェニルアラニンのレベルを野生型レベルに効率的に引き下げることができる。よって、本発明の発明者は、本明細書に記載するmRNA療法がPKUの治療に非常に有効であり得ることを示した。

10

【0005】

一態様では、本発明は、治療を必要とする被験体に、PKUの少なくとも1つの症状または特徴が、強度、重篤度、もしくは頻度において減少するか、または発症が遅延されるような有効用量及び投与間隔でフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）をコードするmRNAを含む組成物を投与することを含む、PKUを治療する方法を提供する。

【0006】

別の態様では、本発明は、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）をコードするmRNAを含むフェニルケトン尿症（PKU）を治療するための組成物を提供する。

20

【0007】

いくつかの実施形態では、mRNAは、リポソーム内に封入される。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む。

【0008】

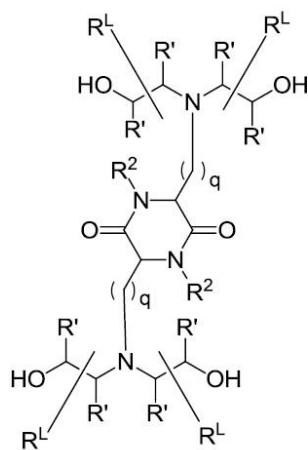
いくつかの実施形態では、1つ以上のカチオン性脂質は、C12-200、MC3、DLindMA、DLincDMA、cKK-E12、ICE（イミダゾール系）、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、及びDMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLindMA、CpLindMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLindAP、DLincarbDAP、DLincDAP、KLinc-K-DMA、DLinc-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される。

30

【0009】

いくつかの実施形態では、1つ以上のカチオン性脂質は、式I-c1-a：

【化1】



I - c 1 - a

40

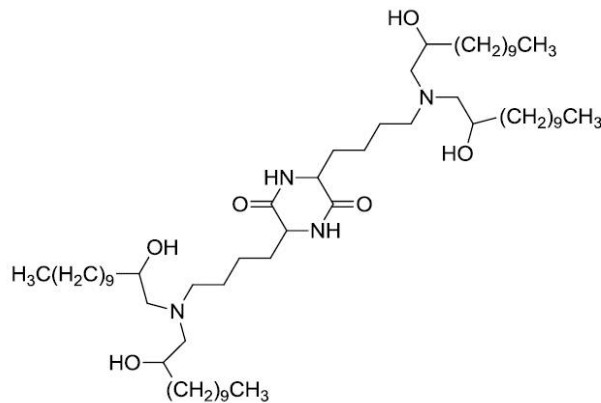
50

の化合物、またはその薬学的に許容される塩を含み、式中、
各 R^2 は、独立して、水素または $C_1 \sim 3$ アルキルであり、
各 q は、独立して、2～6であり、
各 R' は、独立して、水素または $C_1 \sim 3$ アルキルであり、
各 R^L は、独立して、 $C_8 \sim 12$ アルキルである。

【0010】

いくつかの実施形態では、1つ以上のカチオン性脂質は、以下の c K K-E 12 を含む。

【化2】



【0011】

いくつかの実施形態では、1つ以上の非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C)、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (D P P G)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (P O P C)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (P O P E)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 4- (N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (D O P E-m a l)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (D M P E)、ジステアロイルホスファチジールエタノールアミン (D S P E)、16-O-モノメチル P E、16-O-ジメチル P E、18-1-トランス P E、1-ステアロイル-2-オレオイルホスファチジエタノールアミン (S O P E)、またはこれらの混合物から選択される。

【0012】

いくつかの実施形態では、1つ以上のコレステロール系脂質は、コレステロール、P E G 化コレステロール、及び D C-Ch o l (N, N-ジメチル-N-エチルカルボキサミドコレステロール)、1, 4-ビス (3-N-オレイルアミノ-プロピル) ピペラジンから選択される。

【0013】

いくつかの実施形態では、リポソームは、1つ以上の P E G 修飾脂質をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の P E G 修飾脂質は、長さが $C_6 \sim C_{20}$ のアルキル鎖 (複数可) を有する脂質に共有結合される、長さが最大 5 k D a のポリ (エチレン) グリコール鎖を含む。いくつかの実施形態では、P E G 修飾脂質は、N-オクタノイルスフィンゴシン-1- [スクシニル (メトキシポリエチレングリコール)-2000] などの誘導体化されたセラミドである。いくつかの実施形態では、P E G 修飾または P E G 化脂質は、P E G 化コレステロールまたはジミリストイルグリセロール (D M G)-P E G-2 K である。

【0014】

いくつかの実施形態では、リポソームは、c K K-E 12、D O P E、コレステロール

10

20

30

40

50

、及びDMG-PEG2Kを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、モル比でリポソームの約30～60%（例えば、約30～55%、約30～50%、約30～45%、約30～40%、約35～50%、約35～45%、または約35～40%）を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、モル比でリポソームの約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、または約60%を構成する。

【0016】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、約30～60：25～35：20～30：1～15であり得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、およそ40：30：20：10である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、およそ40：30：25：5である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、およそ40：32：25：3である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、およそ50：25：20：5である。

【0017】

いくつかの実施形態では、リポソームの大きさは、リポソーム粒子の最大直径の長さによって決定される。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、約500nm、400nm、300nm、250nm、200nm、150nm、100nm、75nm、または50nm未満の大きさを有する。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、約100nm、90nm、80nm、70nm、または60nm未満の大きさを有する。

【0018】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、肺動脈送達を介して投与される。ある特定の実施形態では、肺動脈送達は、エアロゾル化、吸入、噴霧、または滴下により行われる。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、呼吸域粒子、噴霧可能脂質、または吸入可能乾燥粉末として製剤化される。

【0019】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、1日1回、週に1回、2週間に1回、月に2回、月に1回投与される。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、7日に1回、10日に1回、14日に1回、28日に1回、または30日に1回投与される。

【0020】

いくつかの実施形態では、mRNAは、約0.1～5.0mg/kg（体重）、例えば、約0.1～4.5、0.1～4.0、0.1～3.5、0.1～3.0、0.1～2.5、0.1～2.0、0.1～1.5、0.1～1.0、0.1～0.5、0.1～0.3、0.3～5.0、0.3～4.5、0.3～4.0、0.3～3.5、0.3～3.0、0.3～2.5、0.3～2.0、0.3～1.5、0.3～1.0、0.3～0.5、0.5～5.0、0.5～4.5、0.5～4.0、0.5～3.5、0.5～3.0、0.5～2.5、0.5～2.0、0.5～1.5、または0.5～1.0mg/kg（体重）の範囲の用量で投与される。いくつかの実施形態では、mRNAは、約5.0

10

20

30

40

50

、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.8、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、または0.1 mg/kg（体重）以下の用量で投与される。

【0021】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現は、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、血清、脳、骨格筋、リンパ節、皮膚、及び／または脳脊髄液において検出可能である。

【0022】

いくつかの実施形態では、提供される組成物の投与は、約100 ng/mg、約200 ng/mg、約300 ng/mg、約400 ng/mg、約500 ng/mg、約600 ng/mg、約700 ng/mg、約800 ng/mg、約900 ng/mg、約1000 ng/mg、約1200 ng/mgまたは約1400 ng/mg（肝臓中総タンパク質）以上のPAHタンパク質レベルの発現をもたらす。

10

【0023】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現は、投与6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、及び／または72時間後に検出可能である。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現は、投与1日、2日、3日、4日、5日、6日、及び／または7日後に検出可能である。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現は、投与1週間、2週間、3週間、及び／または4週間後に検出可能である。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の発現は、投与1ヶ月後に検出可能である。

20

【0024】

いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、血清PAHタンパク質レベルが増加する。いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、治療前の基準PAHタンパク質レベルと比較して、血清PAHタンパク質レベルが少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%増加する。

【0025】

いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、治療前の基準フェニルアラニンレベルと比較して、血清中のフェニルアラニンレベルが減少する。いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、血清または血漿中のフェニルアラニンレベルが約1500 µmol/L以下、約1000 µmol/L以下、約900 µmol/L以下、約800 µmol/L以下、約700 µmol/L以下、約600 µmol/L以下、約500 µmol/L以下、約400 µmol/L以下、約300 µmol/L以下、約200 µmol/L以下、約100 µmol/L以下、または約50 µmol/L以下に減少する。特定の実施形態では、規則的に投与された場合の治療有効用量は、血清または血漿中のフェニルアラニンレベルを約120 µmol/L以下に減少させる。

30

【0026】

いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、治療前の基準フェニルアラニンレベルと比較して、生体試料（例えば、血清、血漿、または尿試料）中のフェニルアラニンレベルが少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%減少する。

40

【0027】

いくつかの実施形態では、PAHをコードするmRNAは、コドン最適化される。いくつかの実施形態では、コドン最適化mRNAは、配列番号3（コドン最適化ヒトPAH mRNA配列に相当する）を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号4の

50

5' UTR配列 (5' UTR配列Xに相当する) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号5の3' UTR配列 (3' UTR配列Yに相当する) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号6の3' UTR配列 (3' UTR配列Yに相当する) を含む。いくつかの実施形態では、コドン最適化mRNAは、配列番号7または配列番号8 (5' UTR及び3' UTR配列を有するコドン最適化ヒトPAH mRNA配列に相当する) を含む。

【0028】

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

【0029】

特定の実施形態では、本発明は、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードするmRNAを含むフェニルケトン尿症 (PKU) を治療するための組成物を提供し、mRNAは、配列番号3を含み、さらにリポソームは、カチオン性または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質、及びPEG修飾脂質を含む。

【0030】

特定の実施形態では、本発明は、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードするmRNAを含むフェニルケトン尿症 (PKU) を治療するための組成物を提供し、mRNAは、配列番号7または配列番号8を含み、さらにリポソームは、カチオン性または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質、及びPEG修飾脂質を含む。

【0031】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以下の発明を実施するための形態、図面、及び特許請求の範囲において明らかである。しかしながら、発明を実施するための形態、図面、及び特許請求の範囲は、本発明の実施形態を示すが、単に例示のためであり、制限するものではないことを理解するべきである。本発明の範囲内の様々な変更及び修正は、当業者には明らかとなる。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

フェニルケトン尿症 (PKU) の治療方法であって、治療を必要とする被験体に、PKUの少なくとも1つの症状または特徴が、強度、重篤度、もしくは頻度において減少するか、または発症が遅延されるような有効用量及び投与間隔でフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードするmRNAを含む組成物を投与することを含む、前記方法。

(項目2)

前記mRNAが、リポソーム内に封入される、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記リポソームが、1つ以上のカチオン性脂質、1つ以上の非カチオン性脂質、1つ以上のコレステロール系脂質、及び1つ以上のPEG修飾脂質を含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記1つ以上のカチオン性脂質が、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinKC2DMA、cKK-E12、ICE (イミダゾール系)、HGT5000、HGT

10

20

30

40

50

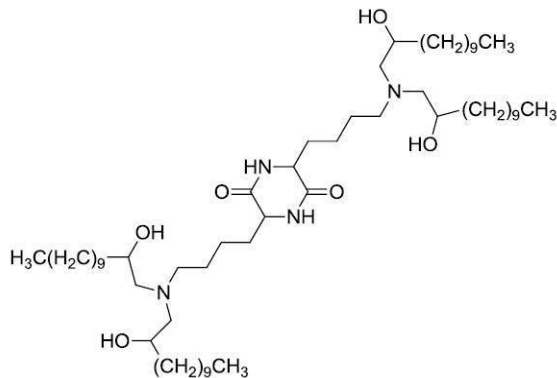
5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、及びDMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLIn-K-DMA、DLIn-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記1つ以上のカチオン性脂質が、以下のcKK-E12を含む、項目4に記載の方法

。

【化10】



10

20

(項目6)

前記1つ以上の非カチオン性脂質が、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DPPC(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPC(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホチジルコリン)、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-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール))から選択される、項目3～5のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目7)

前記1つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロールまたはPEG化コレステロールである、項目3～6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記1つ以上のPEG修飾脂質が、長さがC₆～C₂₀のアルキル鎖(複数可)を有する脂質に共有結合される、長さが最大5kDaのポリ(エチレン)グリコール鎖を含む、項目3～7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記カチオン性脂質が、モル比で前記リポソームの約30～60%を構成する、項目1～8のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目10)

前記カチオン性脂質が、モル比で前記リポソームの約30%、40%、50%、または60%を構成する、項目9に記載の方法。

(項目11)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG化脂質の比率が、モル比でおよそ40：30：20：10である、項目1～10のいずれか一項に記載の方法

。

(項目12)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG化脂質の比率が、モル比でおよそ40：30：25：5である、項目1～11のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目13)	カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG化脂質の比率が、モル比でおよそ40：32：25：3である、項目1～12のいずれか一項に記載の方法。	(項目14)
(項目14)	カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール脂質：PEG化脂質の比率が、モル比でおよそ50：25：20：5である、項目1～13のいずれか一項に記載の方法。	(項目15)
(項目15)	前記リポソームが、cKK-E12、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2Kを含む、項目1～14のいずれか一項に記載の方法。	(項目16)
(項目16)	前記リポソームが、約100nm未満の大きさを有する、項目2～15のいずれか一項に記載の方法。	(項目17)
(項目17)	前記mRNAが、約0.1～3.0mg/kg（体重）の範囲の有効用量で投与される、項目1～16のいずれか一項に記載の方法。	(項目18)
(項目18)	前記mRNAが、約0.1～1.0mg/kg（体重）の範囲の有効用量で投与される、項目1～17のいずれか一項に記載の方法。	(項目19)
(項目19)	前記組成物が、静脈内投与される、項目1～18のいずれか一項に記載の方法。	(項目20)
(項目20)	前記組成物が、週に1回投与される、項目1～19のいずれか一項に記載の方法。	(項目21)
(項目21)	前記組成物が、2週間に1回投与される、項目1～19のいずれか一項に記載の方法。	(項目22)
(項目22)	前記組成物が、月に2回投与される、項目1～19のいずれか一項に記載の方法。	(項目23)
(項目23)	前記組成物が、月に1回投与される、項目1～19のいずれか一項に記載の方法。	(項目24)
(項目24)	前記組成物の前記投与が、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、及び血清において検出可能なPAHタンパク質の発現をもたらす、項目1～23のいずれか一項に記載の方法。	(項目25)
(項目25)	前記組成物の前記投与が、約100ng/mg（前記肝臓中総タンパク質）以上のPAHタンパク質レベルの発現をもたらす、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。	(項目26)
(項目26)	前記組成物の前記投与が、血清PAHタンパク質レベルの増加をもたらす、項目1～25のいずれか一項に記載の方法。	(項目27)
(項目27)	前記組成物の前記投与が、前記治療前の基準フェニルアラニンレベルと比較して、前記血清中のフェニルアラニンレベルの減少をもたらす、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。	(項目28)
(項目28)	前記組成物の前記投与が、前記血清中約1000μmol/L以下までフェニルアラニンレベルの減少をもたらす、項目1～27のいずれか一項に記載の方法。	(項目29)
(項目29)	前記組成物の前記投与が、前記血清中約500μmol/L以下までフェニルアラニンレベルの減少をもたらす、項目1～28のいずれか一項に記載の方法。	(項目30)
(項目30)	前記組成物の前記投与が、前記血清中約120μmol/L以下までフェニルアラニンレベルの減少をもたらす、項目1～29のいずれか一項に記載の方法。	(項目31)

10

20

30

40

50

(項目 3 1)

前記 mRNA がコドン最適化される、項目 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記コドン最適化 mRNA が、配列番号 3、配列番号 7、または配列番号 8 を含む、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記コドン最適化 mRNA が、配列番号 3 を含む、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記 mRNA が、配列番号 4 の 5' UTR 配列を含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記 mRNA が、配列番号 5 または配列番号 6 の 3' UTR 配列を含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記 mRNA が、1 つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、項目 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

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

(項目 3 8)

前記 mRNA が、未修飾である、項目 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

フェニルケトン尿症 (PKU) を治療するための組成物であって、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) をコードする mRNA を含む、前記組成物。

(項目 4 0)

前記リポソームが、1 つ以上のカチオン性脂質、1 つ以上の非カチオン性脂質、1 つ以上のコレステロール系脂質、及び 1 つ以上の PEG 修飾脂質を含む、項目 3 9 に記載の組成物。

(項目 4 1)

前記 1 つ以上のカチオン性脂質が、C12-200、DLinDMA、DLinC2DMA、cKK-E12、ICE (イミダゾール系)、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、及び DMDMA、DODAC、DLinDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 4 0 に記載の組成物。

(項目 4 2)

前記 1 つ以上のカチオン性脂質が、以下の cKK-E12 を含む、項目 4 0 または 4 1 に記載の組成物。

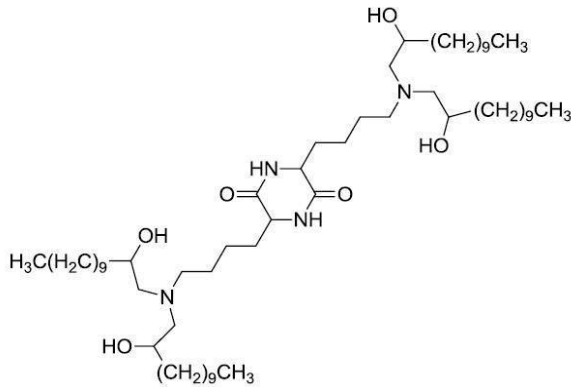
10

20

30

40

【化 1 1】



10

(項目 4 3)

前記 1 つ以上の非カチオン性脂質が、D S P C (1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 、 D P P C (1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 、 D O P E (1 , 2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン) 、 D O P C (1 , 2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホチジルコリン) 、 D P P E (1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン) 、 D M P E (1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン) 、及び D O P G (, 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - (1 ' - r a c - グリセロール)) から選択される、項目 3 9 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の組成物。

20

(項目 4 4)

前記 1 つ以上のコレステロール系脂質が、コレステロールである、項目 3 9 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 4 5)

前記 1 つ以上の P E G 修飾脂質が、長さが C ₆ ~ C ₂₀ のアルキル鎖 (複数可) を有する脂質に共有結合される、長さが最大 5 k D a のポリ (エチレン) グリコール鎖を含む、項目 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 4 6)

カチオン性脂質 : 非カチオン性脂質 : コレステロール系脂質 : P E G 修飾脂質の比率が、およそ 4 0 : 3 0 : 2 0 : 1 0 である、項目 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 4 7)

カチオン性脂質 : 非カチオン性脂質 : コレステロール系脂質 : P E G 修飾脂質の比率が、およそ 4 0 : 3 0 : 2 5 : 5 である、項目 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

カチオン性脂質 : 非カチオン性脂質 : コレステロール系脂質 : P E G 修飾脂質の比率が、およそ 4 0 : 3 2 : 2 5 : 3 である、項目 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

カチオン性脂質 : 非カチオン性脂質 : コレステロール系脂質 : P E G 修飾脂質の比率が、およそ 5 0 : 2 5 : 2 0 : 5 である、項目 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 5 0)

前記リポソームが、c K K - E 1 2 、 D O P E 、コレステロール、及び D M G - P E G 2 K を含む、項目 3 9 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 1)

前記リポソームが、約 1 0 0 n m 未満の大きさを有する、項目 3 9 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 2)

前記組成物が、静脈内投与用に製剤化される、項目 3 9 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の組成物。

50

(項目 5 3)

前記mRNAが、配列番号3、配列番号7、または配列番号8を含む、項目39～52のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 4)

前記mRNAが、配列番号3を含む、項目39～52のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5)

前記mRNAが、配列番号4の5'UTR配列を含む、項目54に記載の組成物。

(項目 5 6)

前記mRNAが、配列番号5または配列番号6の3'UTR配列を含む、項目54に記載の組成物。

(項目 5 7)

フェニルケトン尿症(PKU)を治療するための組成物であって、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)をコードするmRNAを含み、前記mRNAが、配列番号3を含み、

さらに、前記リポソームが、カチオン性または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質、及びPEG修飾脂質を含む、前記組成物。

(項目 5 8)

フェニルケトン尿症(PKU)を治療するための組成物であって、リポソーム内に封入された有効用量のフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)をコードするmRNAを含み、前記mRNAが、配列番号7または配列番号8を含み、

さらに、前記リポソームが、カチオン性または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質、及びPEG修飾脂質を含む、前記組成物。

【図面の簡単な説明】

【0032】

図面は、単に例示の目的であり、制限するためではない。

【0033】

【図1】提供されるリポソームによるトランスフェクション後のHEK293細胞における例示的なPAHタンパク質レベルを示す。

【図2】投与後の様々な時間点での、提供された脂質ナノ粒子で処置された野生型マウスの肝臓において検出されたPAHタンパク質レベルの例示的なグラフを示す。

【図3】未処置野生型マウス及び未処置PAH KOマウスと比較した、投与6、12、及び24時間後の、提供された脂質ナノ粒子で処置されたPAH KOマウスの肝臓において検出されたPAHタンパク質レベルの例示的なグラフを示す。

【図4】未処置野生型マウス及び未処置PAH KOマウスと比較した、提供された脂質ナノ粒子で処置された6、12、及び24時間後のPAH KOマウスにおける血清フェニルアラニンレベルの例示的なグラフを示す。

【図5A】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A)30分、(B)3時間、(C)6時間、(D)12時間、(E)24時間、(F)48時間、(G)72時間、または(H)7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

【図5B】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A)30分、(B)3時間、(C)6時間、(D)12時間、(E)24時間、(F)48時間、(G)72時間、または(H)7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

【図5C】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A)30分、(B)3時間、(C)6時間、(D)12時間、(E)24時間、(F)48時間、(G)72時間、または(H)7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

【図5D】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A)30分、(B)3時間、(C)6時間、(D)12時間、(E)24時間

10

20

30

40

50

、(F) 48時間、(G) 72時間、または(H) 7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

【図5E】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A) 30分、(B) 3時間、(C) 6時間、(D) 12時間、(E) 24時間、(F) 48時間、(G) 72時間、または(H) 7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

【図5F】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A) 30分、(B) 3時間、(C) 6時間、(D) 12時間、(E) 24時間、(F) 48時間、(G) 72時間、または(H) 7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

10

【図5G】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A) 30分、(B) 3時間、(C) 6時間、(D) 12時間、(E) 24時間、(F) 48時間、(G) 72時間、または(H) 7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

【図5H】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A) 30分、(B) 3時間、(C) 6時間、(D) 12時間、(E) 24時間、(F) 48時間、(G) 72時間、または(H) 7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

【図5I】1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で処置した(A) 30分、(B) 3時間、(C) 6時間、(D) 12時間、(E) 24時間、(F) 48時間、(G) 72時間、または(H) 7日後のマウス、または未処置マウス(I)からの肝臓組織におけるヒトPAH mRNAのその場検出を示す。

20

【図6】0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、または1.0mg/kgの単回投与のhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子、または生理食塩水で処置されたPAHノックアウトマウスの肝臓において検出されたヒトPAHタンパク質レベルの例示的なグラフを示す。

【図7】0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、または1.0mg/kgの単回投与のhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で、または生理食塩水で処置される前、及び処置された後のPAHノックアウトマウスの血清において検出されたフェニルアラニンレベルの例示的なグラフを示す。

30

【図8】1ヶ月間、週に1回、0.5mg/kgもしくは1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で、または1ヶ月間、隔週で、1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で、あるいは生理食塩水で処置されたPAHノックアウトマウスの肝臓において検出されたヒトPAHタンパク質レベルの例示的なグラフを示す。

【図9】1ヶ月間、週に1回、0.5mg/kgもしくは1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で、または1ヶ月間、隔週で、1.0mg/kgのhPAH mRNA装填cKK-E12系脂質ナノ粒子で、あるいは生理食塩水で処置される前、及び処置された後のPAHノックアウトマウスの血清において検出されたフェニルアラニンレベルの例示的なグラフを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0034】

定義

本発明をより容易に理解するために、ある特定の用語を以下に最初に定義する。以下の用語及び他の用語のさらなる定義は、本明細書全体を通して記載される。本発明の背景を説明し、その実践に関するさらなる詳細を提供するための本明細書に言及される刊行物及び他の参考資料は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0035】

アルキル：本明細書で使用される、「アルキル」は、1～15個の炭素原子を有する直鎖または分枝状飽和炭化水素基のラジカルを指す(「C₁～₁₅アルキル」)。いくつか

50

の実施形態では、アルキル基は、1～3個の炭素原子を有する（「C₁～₃アルキル」）。C₁～₃アルキル基の例としては、メチル（C₁）、エチル（C₂）、n-プロピル（C₃）、及びイソプロピル（C₃）が挙げられる。いくつかの実施形態では、アルキル基は、8～12個の炭素原子を有する（「C₈～₁₂アルキル」）。C₈～₁₂アルキル基の例としては、n-オクチル（C₈）、n-ノニル（C₉）、n-デシル（C₁₀）、n-ウンデシル（C₁₁）、n-ドデシル（C₁₂）などが挙げられるが、これらに限定されない。接頭辞「n-」（ノルマル）は、非分枝状アルキル基を指す。例えば、n-C₈アルキルは、 $-(CH_2)_7CH_3$ を指し、n-C₁₀アルキルは、 $-(CH_2)_9CH_3$ 等を指す。

【0036】

アミノ酸：本明細書で使用される、用語「アミノ酸」は、その最も広い意味で、ポリペプチド鎖に組み込まれ得るいずれの化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造 $H_2N-C(H)(R)-COOH$ を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、合成アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、d-アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、l-アミノ酸である。「標準的なアミノ酸」は、天然に存在するペプチドに通常見られる20個の標準的なl-アミノ酸のいずれかを指す。「非標準的なアミノ酸」は、それが合成により、または自然源から得られるか否かに関わらず、標準的なアミノ酸以外のあらゆるアミノ酸を指す。本明細書で使用される、「合成アミノ酸」は、これらに限定されないが、塩、アミノ酸誘導体（アミドなど）、及び／または置換を含む化学修飾されたアミノ酸を包含する。ペプチドにおけるカルボキシ及び／またはアミノ末端アミノ酸を含むアミノ酸は、メチル化、アミド化、アセチル化、保護基、及び／またはその活性に悪影響を及ぼすことなくペプチドの循環半減期を変更することができる他の化学基との置換により修飾され得る。アミノ酸は、ジスルフィド結合に関わる場合がある。アミノ酸は、1つ以上の化学成分（例えば、メチル基、アセテート基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ビオチン部分等）との結合など、1つまたは翻訳後の修飾を含み得る。用語「アミノ酸」は、「アミノ酸残基」と互換的に使用され、遊離アミノ酸及び／またはペプチドのアミノ酸残基を指す場合がある。これは、遊離アミノ酸またはペプチドの残基を指すか否かに関わらず、用語が使用される文脈から明らかであらう。

【0037】

動物：本明細書で使用される、用語「動物」は、動物界のいずれのメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発達のいずれかの段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発達のいずれかの段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳類（例えば、ゲッ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び／またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物は、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫、及び／または蠕虫を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子組換え動物、及び／またはクローンであり得る。

【0038】

およそまたは約：本明細書で使用される、用語「およそ」または「約」は、関心の1つ以上の値に適用される場合、記述される参照値に類似する値を指す。ある特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、特に記述されない限り、ないしは特に文脈から明らかでない限り、記述される参照値のいずれかの方向（～を超えるまたは～未満）の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下に入る値の範囲を指す（そのような数字が可能な値の100%を超える場合を除く）。

【0039】

生体活性：本明細書で使用される、句「生体活性」は、生体系、特に生物において活性

10

20

30

40

50

を有する任意の作用物質の特徴を指す。例えば、生物に投与された場合、その生物に対して生体作用を有する作用物質は、生体活性と考えられる。

【0040】

送達：本明細書で使用される、用語「送達」は、局所及び全身送達の両方を包含する。例えば、mRNAの送達は、mRNAが標的組織に送達され、コードされたタンパク質が発現し、標的組織内で保持される（「局所分布」または「局所送達」とも称される）状態、及びmRNAが標的組織に送達され、コードされたタンパク質が発現し、患者の循環系（例えば、血清）内に分泌され、系統的に分布し、他の組織によって取り込まれる（「全身分布」または「全身送達」とも称される）状態を包含する。

【0041】

発現：本明細書で使用される、核酸配列の「発現」は、mRNAのポリペプチドへの翻訳、複数のポリペプチドの無傷タンパク質（例えば、酵素）への組み立て、及び／またはポリペプチドもしくは完全に組み立てられたタンパク質（例えば、酵素）の翻訳後修飾を指す。この用途において、用語「発現」及び「産生」ならびに文法的等価物は、互換的に使用される。

【0042】

機能：本明細書で使用される、「機能」生体分子は、それが特徴付けられる特性及び／または活性を呈する形態の生体分子である。

【0043】

半減期：本明細書で使用される、用語「半減期」は、核酸またはタンパク質濃度または活性などの量が時間期間の開始時において測定されるその値の半分に下がるのに必要とされる時間である。

【0044】

改善する、増加する、または減少する：本明細書で使用される、用語「改善する」、「増加する」、もしくは「減少する」、または文法的等価物は、本明細書に記載される治療の開始前の同一個体の測定値、または本明細書に記載される治療の不在下の対照被験体（または複数の対照被験体）の測定値など、基準測定値に対する値を示す。「対照被験体」は、治療される被験体とほぼ同じ年齢の治療される被験体と同じ形態の疾患に罹患する被験体である。

【0045】

インビトロ：本明細書で使用される、用語「インビトロ」は、多細胞生物内ではなく、人工的環境、例えば、試験管または反応槽中、細胞培養物中等で生じる事象を指す。

【0046】

インビボ：本明細書で使用される、用語「インビボ」は、ヒト及び非ヒト動物などの多細胞生物内で生じる事象を指す。細胞系の文脈において、本用語は、生細胞（例えば、インビトロ系ではなく）内で生じる事象を指すように使用され得る。

【0047】

単離された：本明細書で使用される、用語「単離された」は、（１）最初に産生された（自然界及び／または実験的環境かに関わらず）ときに結合する構成成分の少なくとも一部から分離された、ならびに／または（２）人の手によって産生、調製、及び／もしくは製造された物質ならびに／または成分を指す。単離された物質及び／または成分は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超の、それらが最初に結合した他の構成成分から分離され得る。いくつかの実施形態では、単離された作用物質は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超純粋である。本明細書で使用される、物質は、他の構成成分を実質的に含まない場合、「純粋」である。本明細書で使用される、単離された物質及び／または成分のパーセント純度の計算は、賦形剤（例えば、緩衝剤、溶媒、水等）を含むべきではない。

10

20

30

40

50

【0048】

局所分布または送達：本明細書で使用される、用語「局所分布」、「局所送達」、または文法的等価物は、組織特異的送達または分布を指す。典型的には、局所分布または送達は、mRNAによってコードされるタンパク質（例えば、酵素）が細胞内でまたは患者の循環系に入るのを避ける制限された分泌で翻訳され、発現されることを必要とする。

【0049】

メッセンジャーRNA（mRNA）：本明細書で使用される、用語「メッセンジャーRNA（mRNA）」は、少なくとも1つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。本明細書で使用されるmRNAは、修飾及び未修飾の両方のRNAを包含する。mRNAは、1つ以上のコード及び非コード領域を含み得る。mRNAは、自然源から精製され得る、組換え発現系を用いて産生され、任意に精製され得る、化学合成され得る等である。適切な場合、例えば、化学合成された分子の場合、mRNAは、化学修飾された塩基または糖類、骨格修飾等を有する類似体などのヌクレオシド類似体を含み得る。mRNA配列は、特に示されない限り、5'から3'の方向に提示される。いくつかの実施形態では、mRNAは、天然のヌクレオシド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン）；ヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロローピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-ブロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O（6）-メチルグアニン、及び2-チオシチジン）；化学修飾された塩基；生体修飾された塩基（例えば、メチル化塩基）；層間塩基；修飾された糖類（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）；及び／または修飾されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエート及び5'-N-ホスホルアミダイト連結）であるか、またはこれらを含む。

【0050】

核酸：本明細書で使用される、用語「核酸」は、その最も広い意味で、ポリヌクレオチド鎖に組み込まれるか、または組み込むことができる任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル連結を介してポリヌクレオチド鎖に組み込まれるか、または組み込むことができる化合物及び／または物質である。いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチド及び／またはヌクレオシド）を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むポリヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAならびに1本鎖及び／もしくは2本鎖DNAならびに／またはcDNAを包含する。

【0051】

患者：本明細書で使用される、用語「患者」または「被験体」は、提供される組成物が、例えば、実験、診断、予防、美容、及び／または治療目的のために投与され得るあらゆる生物を指す。典型的な患者は、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及び／またはヒトなどの哺乳類）を含む。いくつかの実施形態では、患者はヒトである。ヒトは、出生前及び出生後の形態を含む。

【0052】

薬学的に許容される：本明細書で使用される、用語「薬学的に許容される」は、妥当な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なく、ヒト及び動物の組織との接触に使用するのに適し、妥当な利益／リスク比に相応する物質を指す。

【0053】

薬学的に許容される塩：薬学的に許容される塩は、当該技術分野において周知である。例えば、S. M. Bergeらは、J. Pharmaceutical Sciences（1977）66：1-19に詳細に薬学的に許容される塩を記載している。本発明の

化合物の薬学的に許容される塩は、好適な無機及び有機酸ならびに塩基に由来するものを含む。薬学的に許容される非毒性の酸添加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、及び過塩素酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、もしくはマロン酸などの有機酸を用いて、またはイオン交換などの当該技術分野において使用される他の方法を使用することにより形成されたアミノ基の塩である。他の薬学的に許容される塩は、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などを含む。適切な塩基に由来する塩は、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム、及び $N^+(C_1 \sim 4 \text{ アルキル})_4$ 塩を含む。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。さらなる薬学的に許容される塩は、適切な場合、非毒性アンモニウム、4級アンモニウム、ならびにハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、スルホン酸塩、及びアリアルスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成されたアミンカチオンを含む。さらなる薬学的に許容される塩は、4級化アルキル化アミノ塩を形成するために、適切な求電子物質、例えば、アルキルハロゲン化物を使用するアミンの4級化から形成された塩を含む。

【0054】

全身分布または送達：本明細書で使用される、用語「全身分布」、「全身送達」、または文法的等価物は、全身もしくは生物全体に影響を及ぼす送達もしくは分布メカニズムまたはアプローチを指す。典型的には、全身分布または送達は、身体の循環系、例えば、血流を介して達成される。「局所分布または送達」の定義と比較。

【0055】

被験体：本明細書で使用される、用語「被験体」は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または霊長類）を指す。ヒトは、出生前及び出生後の形態を含む。多くの実施形態では、被験体はヒトである。被験体は、患者であってよく、これは、疾患の診断または治療のために医療提供者に提示されるヒトを指す。用語「試験体」は、本明細書において「個体」または「患者」と互換的に使用される。被験体は、疾患または障害に罹患している可能性があるか、またはそれに感受性であるが、疾患または障害の症状を表していてもいなくてもよい。

【0056】

実質的に：本明細書で使用される、用語「実質的に」は、関心の特徴または特性の完全もしくはほぼ完全な範囲または程度を示す質的狀態を指す。生物分野の当業者は、生物学的及び化学的現象が、あるとしても、完結する、及び／もしくは完結に進む、または絶対的な結果を達成する、または回避することはほとんどないことを理解する。したがって、用語「実質的に」は、本明細書において、多くの生物学的及び化学的現象に固有の潜在的な完結の欠如を捕捉するために使用される。

【0057】

標的組織：本明細書で使用される、用語「標的組織」は、治療される疾患の影響を受ける任意の組織を指す。いくつかの実施形態では、標的組織は、疾患関連病態、症状、または特徴を表すそれらの組織を含む。

【0058】

治療有効量：本明細書で使用される、治療薬の「治療有効量」という用語は、疾患、障

10

20

30

40

50

害、及び／もしくは状態に罹患する、またはそれに感受性である被験体に投与される場合、疾患、障害、及び／または状態の症状（複数可）を治療する、診断する、防止する、及び／またはその開始を遅延するのに十分である量を意味する。当業者は、治療有効量が典型的には少なくとも1つの単位用量を含む投薬レジメンを介して投与されることを理解するだろう。

【0059】

治療：本明細書で使用される、用語「治療する（treat）」、「治療（treatment）」、または「治療（treating）」は、特定の疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の症状もしくは特徴を部分的にまたは完全に軽減する、寛解する、緩和する、阻害する、防止する、その開始を遅延する、その重篤度を減少させる、及び／またはその発症を減少させるために使用される任意の方法を指す。治療は、疾患に関連する病態を発達させるリスクを減少させる目的のために、疾患の兆候を呈さない、及び／または疾患の初期の兆候のみを呈する被験体に投与される場合がある。

10

【0060】

本発明は、特に、mRNA療法に基づくフェニルケトン尿症（PKU）を治療するための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、治療を必要とする被験体に、PKUの少なくとも1つの症状または特徴が、強度、重篤度、もしくは頻度において減少するか、または発症が遅延されるような有効用量及び投与間隔でフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）をコードするmRNAを含む組成物を投与することによりPKUを治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、mRNAは、リポソーム内に封入される。本明細書で使用される、用語「リポソーム」は、任意の層状、多層状、または固形脂質ナノ粒子小胞を指す。典型的には、本明細書において使用されるリポソームは、1つ以上の脂質を混合することにより、または1つ以上の脂質とポリマー（複数可）とを混合することにより形成され得る。よって、本明細書において使用される用語「リポソーム」は、脂質及びポリマー系ナノ粒子の両方を包含する。いくつかの実施形態では、本発明に好適なリポソームは、カチオン性または非カチオン性脂質（複数可）、コレステロール系脂質（複数可）、及びPEG修飾脂質（複数可）を含む。

20

【0061】

フェニルケトン尿症（PKU）

本発明は、フェニルケトン尿症（PKU）に罹患する、またはそれに感受性である被験体を治療するために使用され得る。PKUは、肝酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）の遺伝子においてそれを機能不全にする変異を特徴とする常染色体劣性代謝遺伝障害である。PAHは、アミノ酸フェニルアラニン（Phe）をアミノ酸チロシンに代謝するために必要である。PAH活性が減少すると、フェニルアラニンが蓄積し、尿において検出され得るフェニルピルビン酸塩（フェニルケトンとしても知られる）に変換される。

30

【0062】

フェニルアラニンは、大きい中性のアミノ酸（LNAA）である。LNAAは、大型中性アミノ酸輸送体（LNAA T）を介して血液脳関門（BBB）にわたって輸送を競合する。血液中の過剰なPheは、輸送体を飽和し、脳中の他のLNAAのレベルを減少させる傾向がある。これらの他のアミノ酸のいくつかはタンパク質及び神経伝達物質合成に必要であるため、Pheの蓄積は、脳の発達を妨害し、知能障害を引き起こす可能性がある。

40

【0063】

脳発達の妨害に加えて、本疾患は、臨床的に、痙攣、白化症機能亢進（albinism hyperactivity）、発育不全、皮膚発疹（湿疹）、小頭症、及び／またはケトンが産生するものの1つである）フェニルアセテートによる乳児の汗及び尿に対する「カビ」臭を含む様々な症状を提示する。未治療の小児は、典型的には、出生時には正常であるが、知的及び社会的技能が遅れ、頭部の大きさが正常を著しく下回り、また多くの場合、脳機能の進行性障害を示す。小児が成長し、発達するにつれて、機能亢進、腕ま

50

たは脚の痙攣、EEG異常、皮膚発疹、振戦、痙攣、及び重度の学習障害を含むさらなる症状が発達する傾向にある。しかしながら、PKUは、典型的には出生後2～7日後に行われる大半の国の日常的な新生児スクリーニングパネルに通常含まれる。

【0064】

PKUが十分に早期に診断される場合、影響を受けた新生児は、比較的正常な脳発達を伴って成長することができるが、食事、または食事と薬物治療との組み合わせを通してPhレベルを管理し、制御することによってのみ可能である。全てのPKU患者は、最適な脳発達のために、Phが低い特別な食事を遵守しなければならない。食事は、肉、鶏、魚、卵、ナッツ類、チーズ、豆類、牛乳、及び他の乳製品などのPhが高い食品を厳しく制限または排除することが要求される。ジャガイモ、パン、パスタ、及びトウモロコシなどのデンプン質食品は、監視されなければならない。幼児はまだ母乳の全ての利益を提供するために授乳されてよいが、その量も監視されなければならない。欠落する栄養素の補充を必要とする。アスパルテームはフェニルアラニンを含むため、多くの食品及び清涼飲料に含まれる甘味料のアスパルテームも避けなければならない。

10

【0065】

一生を通して、患者は、低フェニルアラニンの食事においてさもなければ不十分であろうアミノ酸及び他の必要な栄養素を摂取するために、補助的な乳児用調製粉乳、ピル、または特別に調製された食品を使用することができる。一部のPhは、多くのタンパク質の合成に必要であり、適切な成長に必要であるが、そのレベルはPKU患者において厳しく制御されなければならない。加えて、PKU患者は、通常フェニルアラニンに由来するチロシンのサプリメントを摂取しなければならない。他のサプリメントは、標準的なPhを含まない食事に欠落する長鎖脂肪酸に取って代わり、神経発達を改善する魚油、及び鉄またはカルニチンを含み得る。PKUの別の潜在的な療法は、特定の患者のPhの血液レベルを減少させることができるPhの酸化のための補因子であるテトラヒドロbiopterin (BH4) である。BH4療法に応答する患者は、摂ることができる天然のタンパク質の量を増加することもできる。

20

【0066】

フェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH)

いくつかの実施形態では、本発明は、フェニルケトン尿症 (PKU) の治療のために、PAHをコードするmRNAを被験体に送達するための方法及び組成物を提供する。好適なPAH mRNAは、天然に存在するPAHタンパク質の活性を置換する、かつ／またはPKUに関連する1つ以上の症状の強度、重篤度、及び／もしくは頻度を減少させることができるPAHタンパク質の任意の完全長、断片、または一部分をコードする。

30

【0067】

いくつかの実施形態では、本発明の好適なmRNA配列は、ヒトPAHタンパク質をコードするmRNA配列を含む。天然に存在するヒトPAH mRNA及び対応するアミノ酸配列は、表1に示される。

【表 1 - 1】

表 1. ヒト PAH

ヒト PAH (mRNA)	CAGCUGGGGGUAAGGGGGGCGGAUUAUUCAUUAAUUGUUAUACCAGACGG UCGCAGGCUUAGUCCAAUUGCAGAGAACUCGCUUCCCAGGCUUCUGAGAGUC CCGGAAGUGCCUAAACCUGUCUAAUCGACGGGGCUUGGGUGGCCCCGUCGCUC CCUGGCUUCUUCCCUUUACCCAGGGCGGGCAGCGAAGUGGUGCCUCCUGCGU CCCCACACCCUCCUCAGCCCCUCCUCCGGCCCCGUCCUGGGCAGGUGACC UGGAGCAUCCGGCAGGCUGCCCUGGCCUCCUGCGUCAGGACAAGCCCACGAG GGGCGUUACUGUGCGGAGAUGCACCACGCAAGAGACACCCUUUGUAAACUCUC UUCUCCUCCUAGUGCGAGGUUAAAACCUUCAGCCCCACGUGCUGUUUGCAA ACCUGCCUGUACCUGAGGCCCUAAAAGCCAGAGACCUCACUCCCGGGGAGC CAGCAUGUCCACUGCGGUCCUGGAAAACCCAGGCUUGGGCAGGAAACUCUCU GACUUUGGACAGGAAACAAGCUAUUUGAAGACAACUGCAAUAAAAUGGU GCCAUUACACUGAUCUUCUCACUCAAGAAGAAGUUGGUGCAUUGGCCAAA GUAUUGCGCUUAAUUGAGGAGAAUGAUGUAAACCUGACCCACAUUGAAUCU
---------------------	--

【表 1 - 2】

	AGACCUUCUCGUUUAAAGAAAGAUGAGUAUGAAUUUUUCACCCAUUUGGAU AAACGUAGCCUGCCUGCUCUGACAAACAUCAUCAAGAUCUUGAGGCAUGAC AUUGGUGCCACUGUCCAUGAGCUUUCACGAGAUAAAGAAGAAAGACACAGUG CCCUGGUUCCCAAGAACCAUUAAGAGCUGGACAGAUUUUGCCAAUCAGAUUC UCAGCUAUGGAGCGGAACUGGAUGCUGACCACCCUGGUUUUAAAGAUCUUG UGUACCGUGCAAGACGGAAGCAGUUUGCUGACAUUGCCUACAACUACCGCCA UGGGCAGCCCAUCCCUCGAGUGGAAUACAUGGAGGAAGAAAAGAAAACAUG GGGCACAGUGUUAAGACUCUGAAGUCCUUGUAUAAAACCCAUGCUGCUA UGAGUACAACAUUUUUUCCACUUCUUGAAAAGUACUGUGGCUUCCAUGA AGAUAAACAUUCCCCAGCUGGAAGACGUUUCUCAAUUCUGCAGACUUGCACU GGUUUCCGCCUCCGACCUGUGGCUGGCCUGCUUCCUCUCGGGAUUUCUUGG GUGGCCUGGCCUCCGAGUCUCCACUGCACACAGUACAUCAGACAUGGAUC CAAGCCCAUGUAUACCCCCGAACCUGACAUCUGCCAUGAGCUGUUGGGACAU GUGCCCUUGUUUUCAGAUUCGAGCUUUGCCCAGUUUCCCAGGAAAUUGGCC UUGCCUCUCUGGGUGCACCUGAUGAAUACAUUGAAAAGCUCGCCACAAUUU ACUGGUUUACUGUGGAGUUUGGGCUCUGCAAACAAGGAGACUCCAUAAGG CAUAUGGUGCUGGGCUCUUGUCAUCCUUGGUGAAUUACAGUACUGCUUAU CAGAGAAGCCAAAGCUUCUCCCCUGGAGCUGGAGAAGACAGCCAUCCAAAA UUACACUGUCACGGAGUCCAGCCCCUGUAUUACGUGGCAGAGAGUUUAA UGAUGCCAAGGAGAAAGUAAGGAACUUUGCUGCCACAAUACCUCGGCCCUU CUCAGUUCGCUACGACCAUACACCCAAAGGAUUGAGGUCUUGGACAAUACC CAGCAGCUUAAGAUUUUUGGCUGAUUCCAUAUACAGUGAAAUUGGAAUCCU UGCAGUGCCCUCAGAAAAUAAAGUAAAGCCAUGGACAGAAUGUGGUCUGU CAGCUGUGAAUCUGUUGAUGGAGAUCCAACUAUUUCUUUACAAGAAAAAG UCCGAAAAGCAAACCUAAAUUUGAAAUAAACAGCCUAAAUCUUUACAAGA UGGAGAAACAACAAUAAAGUCAAAAUAAUCUGAAAUGACAGGAUAUGAGUA CAUACUCAAGAGCAUAAUGGUAAAUCUUUUGGGGUCAUCUUUGAUUUAGAG AUGAUAAUCCCAUACUCUCAAUUGAGUAAAUCAGUAAUCUGCGCAUUUC UAAGAAUAAUUAUUUUUGGGACCUGCUUUAUUAAGCUUUAUUAUUAUAGC UUUGCAGAGAACUAAAGGAGCAUUAAGGCUAAAUGUAAAACACAAGA CUGUCAUUAGAAUUGAAUUAUUGGGCUAAUUAUAAAUCGUAACCUAUGAAG UUUUAUUUCUAAUUUUAGUUAACUAUGAUUCCAUAUUAUUAUUAUUAUUAU ACCUAAGUAAAUUUUUCUUUAGGUCAGAAGCCCAUUAUUUUUAGUUAACAAGCA UUGAACUUCUUUAGUAUUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU UGUAAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU CAUAAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU CACUUUGAGGACAUUUUAUGAUGCAGCAGAUUGUAGCUAAAGGCUUGGUUGG UAGAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU AGCAAAUCUGUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU AGUAGUUUA(配列番号 1)	10
	MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETSYIEDNCNQNAGISLIFSLKEEVGALAKVLRLEFEE NDVNLTHIESRPSRLKKDEYEFTHLDKRSLPALTNIIKILRHDIGATVHELSDRDKKK DTPVPWFPRITQELDRFANQILSYGAELDADHPGFKDPVYRARRKQFADIAYNRYH GQPIPRVEYMEEEKKTWGTVFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPLLEKYCGFHEDNIPQ LEDVSQFLQTCTGFRLRPVAGLLSSRDFLGGLAFRVFHTQYIRHGSKPMYTPEDI CHELLGHVPLFSDRSFAQFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATYWFTEFGLCKQGDSI KAYGAGLLSSFGEQYCLSEKPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYVVAESFNDK EKVRNFAATIPRPFVRYDPYTQRIEVLDTQQLKILADSINSEIGILCSALQKIK (配列番号 2)	40

【0068】

いくつかの実施形態では、好適な mRNA は、野生型 h PAH mRNA 配列（配列番号 1）である。いくつかの実施形態では、好適な mRNA は、以下に示される配列などのコドン最適化 h PAH mRNA 配列であってよい。

【化 3】

AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGGGCCGCAAGCUGAGCGACUUCG
GCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCCAUCAGCCU
GAUCUUCAGCCUGAAGGAGGAGGUGGGCGCCUGGCCAAGGUGCUGCGCCUGUUC
GAGGAGAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAGCCGCCCCAGCCGCCUGAAGA
AGGACGAGUACGAGUUCUUCACCCACCUGGACAAGCGCAGCCUGCCCCGCCUGAC
CAACAUCAUCAAGAUCUGCGCCACGACAUCGGCGCCACCGUGCACGAGCUGAGC
CGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGCCUGGUUCCCCCGCACCAUCCAGGAGCUGG
ACCGCUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACCC
CGGCUUCAAGGACCCCGUGUACCGCGCCCCGCCGCAAGCAGUUCGCCGACAUCGCC
UACAACUACCGCCACGGCCAGCCCAUCCCCCGGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGA
AGAAGACCUGGGGCACCGUGUUAAGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACCCACGC
CUGCUACGAGUACAACCACAUCUUCGCCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCUUCCAC
GAGGACAACAUCCCCCAGCUGGAGGACGUGAGCCAGUUCUGCAGACCUGCACCG
GCUUCCGCCUGCGCCCCGUGGCCGCCUGCUGAGCAGCCGCGACUUCUGGGCGG
CCUGGCCUUCGCGUGUUCACUGCACCCAGUACAUCGCCACGGCAGCAAGCCC
AUGUACACCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUGU
UCAGCGACCGCAGCUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCCGCCUGGCCAGCCUGGG
CGCCCCCGACGAGUACAUCGAGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUACCGUGGAG
UUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGCCUGCUGA
GCAGCUUCGGCGAGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGCCCCU
GGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUACACCGUGACCGAGUUCAGCCCCUG
UACUACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCGCAACUUCGCCG
CCACCAUCCCCCGCCCCUUCAGCGUGCGCUACGACCCUACACCCAGCGCAUCGAG
GUGCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCUGGCCGACAGCAUCAACAGCGAGA
UCGGCAUCCUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUAAGUAA(配列番号 3)

10

20

【0069】

さらなる例示的なmRNA配列は、配列番号7及び配列番号8など、実施例のセクションに記載され、その両方は、コドン最適化mRNA配列をフレームする5'及び3'非翻訳領域を含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、好適なmRNA配列は、ヒトPAHの相同体または類似体をコードするmRNA配列であってよい。本明細書で使用される、ヒトPAHタンパク質の相同体または類似体は、実質的なPAHタンパク質活性を維持するが、野生型または天然に存在するヒトPAHタンパク質と比較して、1つ以上のアミノ酸置換、欠失、及び／または挿入を含む修飾されたヒトPAHタンパク質であってよい。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、配列番号2に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上相同であるアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、ヒトPAHタンパク質に実質的に同一なタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、配列番号2に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一であるアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、ヒトPAHタンパク質の断片または一部分をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、ヒトPAHタンパク質の断片または一部分をコードし、タンパク質の断片または一部分は尚も、野生型タンパク質に類似するPAH活性を保持する。いくつかの実施形態では、本発明に適したmRNAは、配列番号1、配列番号3、配列番号7、または配列番号8に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一であるヌクレオチド配列を有する。

30

40

50

【0071】

いくつかの実施形態では、好適なmRNAは、別のタンパク質に融合した（例えば、NまたはC末端融合）PAHタンパク質の完全長、断片、または一部分を含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質の完全長、断片、または一部分をコードするmRNAに融合されたタンパク質は、シグナルまたは細胞標的配列をコードする。

【0072】

送達ビヒクル

本発明によると、本明細書に記載されるPAHタンパク質（例えば、PAHタンパク質の完全長、断片、または一部分）をコードするmRNAは、ネイキッドRNA（パッケージされない）として、または送達ビヒクルを介して送達され得る。本明細書で使用される、用語「送達ビヒクル」、「伝達ビヒクル」、「ナノ粒子」、または文法的等価物は、互換的に使用される。

10

【0073】

いくつかの実施形態では、PAHタンパク質をコードするmRNAは、単一の送達ビヒクルを介して送達され得る。いくつかの実施形態では、PAHタンパク質をコードするmRNAは、各々が異なる組成の1つ以上の送達ビヒクルを介して送達され得る。様々な実施形態によると、好適な送達ビヒクルは、ポリエチレンイミン（PEI）、脂質ナノ粒子、及びリポソームなどのポリマー系担体、ナノリポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、プロテオリポソーム、天然及び合成由来両方のエキソソーム、天然、合成、及び半合成層状体、ナノ微粒子、カルシウムリン-ケイ酸塩ナノ微粒子、リン酸カルシウムナノ微粒子、二酸化ケイ素ナノ微粒子、微結晶微粒子、半導体ナノ微粒子、ポリ（D-アルギニン）、ゾルゲル、ナノデンドリマー、デンプン系送達系、ミセル、エマルジョン、ニオソーム、多ドメインブロックポリマー（ビニルポリマー、ポリプロピルアクリル酸ポリマー、動的な多抱合体）、乾燥粉末製剤、プラスミド、ウイルス、リン酸カルシウムヌクレオチド、アプタマー、ペプチド、ならびに他の方向性タグを含むが、これらに限定されない。

20

【0074】

リポソーム送達ビヒクル

いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、リポソーム送達ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子である。本明細書で使用される、リポソーム送達ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子は、通常、1つ以上の2層の膜によって外側培地から隔離された内部水空間を有する微細小胞として特徴付けられる。リポソームの2層膜は、典型的には、空間的に離れた親水性及び疎水性ドメインを含む合成または天然起源の脂質などの両親媒性分子によって形成される（Lasic, Trends Biotechnol., 16:307-321, 1998）。リポソームの2層膜は、両染色性ポリマー及び界面活性剤（例えば、ポリマーソーム（polymerosome）、ニオソーム等）によっても形成され得る。本発明の文脈では、リポソーム送達ビヒクルは、典型的には、所望のmRNAを標的細胞または組織に輸送するのに役立つ。所望のmRNAをリポソーム内に組み込むプロセスは、多くの場合、「装填」と称される。例示的な方法は、Lasic, et al., FEB S Lett., 312:255-258, 1992に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。リポソーム組み込み核酸は、完全に、または部分的にリポソームの内部空間、リポソームの2層膜内に位置するか、またはリポソーム膜の外表面と結合し得る。核酸のリポソーム内への組み込みは、本明細書において、「封入」とも称され、核酸がリポソームの内部空間内に完全に格納される。mRNAをリポソームなどの伝達ビヒクル内に組み込む目的は、多くの場合、核酸の迅速な排出をもたらす、核酸及び／もしくは系または受容体を分解する酵素または化学物質を含み得る環境から核酸を保護することである。したがって、いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、その中に含まれるmRNAの安定性を強化することができ、かつ／またはmRNAの標的細胞もしくは組織への送達を容易にする。

30

40

【0075】

50

いくつかの実施形態では、リポソームは、1つ以上のカチオン性脂質を含み得る。本明細書で使用される、句「カチオン性脂質」は、生理学的 pH などの選択された pH で正味の正電荷を有するいくつかの脂質種のいずれかを指す。いくつかのカチオン性脂質は文献に記載されており、その多くは市販されている。本発明の組成物及び方法に使用するのに特に好適なカチオン性脂質は、国際特許公開第 WO 2010/053572 号（具体的には、段落 [00225]）に記載される CI 2-200）及び同第 WO 2012/170930 号に記載されているものを含み、その両方は、参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、例えば、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-15, 18-ジエン-1-アミン (HGT5000)、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-4, 15, 18-トリエン-1-アミン (HGT5001)、及び(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-5, 15, 18-トリエン-1-アミン (HGT5002) など、2012 年 3 月 29 日に出願された米国仮特許出願第 61/617, 468 号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるイオン化可能なカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子を採用する。

いくつかの実施形態では、提供されるリポソームは、第WO2013063468号及び「Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA」と題される、同日付けで本願と同時に出版された米国仮出願に記載されるカチオン性脂質を含み、その両方は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式I-c1-a:

[illegible]

の化合物、またはその薬学的に許容される塩を含み、式中、各 R^2 は、独立して、水素または $C_1 \sim 3$ アルキルであり、各 q は、独立して、2～6であり、各 R' は、独立して、水素または $C_1 \sim 3$ アルキルであり、各 R^L は、独立して、 $C_8 \sim 12$ アルキルである。

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

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

10

20

30

40

50

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

【0080】

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

10

【0081】

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

【0082】

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

【0083】

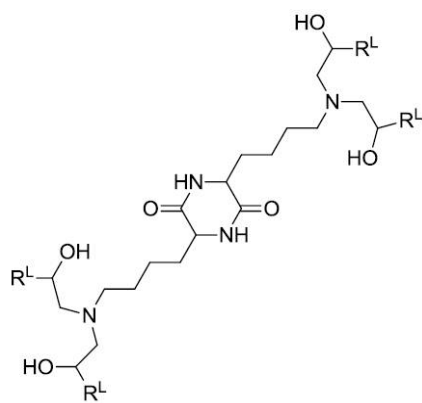
いくつかの実施形態では、各 R^2 は、水素であり、各 q は、4であり、各 R' は、水素であり、各 R^L は、独立して、 $C_{8 \sim 12}$ アルキルである。

20

【0084】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式 I - g :

【化 5】



I - g

30

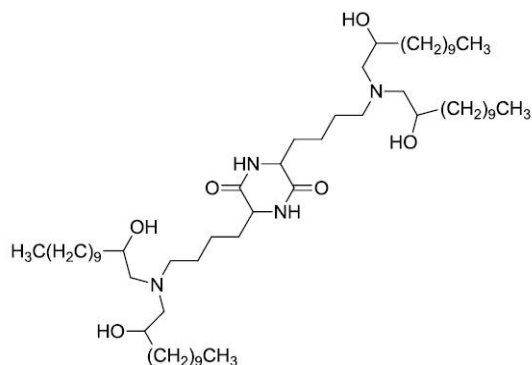
の化合物、またはその薬学的に許容される塩を含み、式中、各 R^L は、独立して、 $C_{8 \sim 12}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は、独立して、 $n-C_{8 \sim 12}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は、独立して、 $C_{9 \sim 11}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は、独立して、 $n-C_{9 \sim 11}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は、独立して、 C_{10} アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^L は、 $n-C_{10}$ アルキルである。

40

【0085】

特定の実施形態では、提供されるリポソームは、カチオン性脂質 c K K - E 1 2 または (3, 6-ビス(4-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)ブチル)ピペラジーン-2, 5-ジオン)を含む。c K K - E 1 2 の構造は、下に示される。

【化 6】



10

【0086】

以下の実施例のセクションに記載されるように、本発明の発明者は、本明細書に記載される式 I-c1-a または式 I-g の構造を有するもの（例えば、cKK-E12）など、特定のクラスのカチオン性脂質に基づくリボソームが、予想外にも、インビボでの mRNA の送達、及びコードされたタンパク質の産生に有効であることを観察した。PAH タンパク質をコードする mRNA は本出願において例として使用されるが、本明細書に記載される式 I-c1-a または式 I-g の構造を有するこのクラスのカチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は高効率及び持続的なインビボでのタンパク質（例えば治療用タンパク質）の産生のための任意の mRNA の送達に有用であり得ることが想定される。例えば、本明細書に記載される式 I-c1-a または式 I-g の構造を有するカチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、1つ以上の天然に存在するペプチドまたは1つ以上の修飾されたもしくは非天然のペプチドをコードする mRNA を送達するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される式 I-c1-a または式 I-g の構造を有するカチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、これらに限定されないが、細胞質タンパク質（例えば、シャペロンタンパク質、細胞内酵素（例えば、尿素回路またはリソソーム蓄積障害に関連する酵素をコードする mRNA））、アクチン細胞骨格に関連するタンパク質、形質膜に関連するタンパク質、核周囲タンパク質、核タンパク質（例えば、転写因子）、及び細胞代謝、DNA 修復、転写及び／または翻訳）に關与する任意の他のタンパク質を含む、細胞内タンパク質をコードする mRNA を送達するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される式 I-c1-a または式 I-g の構造を有するカチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、イオンチャネルタンパク質などの膜貫通型タンパク質をコードする mRNA を送達するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される式 I-c1-a または式 I-g の構造を有するカチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、これらに限定されないが、細胞外マトリックスに関連するタンパク質、分泌されたタンパク質（例えば、ホルモン及び／または神経伝達物質）を含む細胞外タンパク質をコードする mRNA を送達するために使用され得る。

20

30

【0087】

いくつかの実施形態では、本発明に好適な1つ以上のカチオン性脂質は、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリドまたは「DOTMA」であってよい。(Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987)、米国特許第4,897,355号)。DOTMAは、単独で製剤化されるか、または中性脂肪、ジオレイルホスファチジル-エタノールアミンもしくは「DOPE」、または他のカチオン性もしくは非カチオン性脂質と共にリボソーム伝達ビヒクルもしくは脂質ナノ粒子内にまとめることができ、そのようなリボソームは、核酸の標的細胞内への送達を強化するために使用され得る。他の好適なカチオン性脂質は、例えば、5-カルボキシスpermylグリジンジオクタデシルアミド (carboxyspermyl glycin dioctadecylamide) もしくは「DOGS」、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2 (スpermyl)-カル

40

50

ボキサミド) エチル] -N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウム、もしくは「DOS PA」(Behr et al. Proc. Nat. 'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989)、米国特許第5, 171, 678号、米国特許第5, 334, 761号)、1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパンもしくは「DODAP」、1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパンもしくは「DOTAP」を含む。

【0088】

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

【0089】

いくつかの実施形態では、1つ以上のカチオン性脂質は、XTC(2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン)、MC3(((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタノエート)、ALNY-100((3aR, 5s, 6aS)-N, N-ジメチル-2, 2-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1, 3]ジオキソール-5-アミン))、NC98-5(4, 7, 13-トリス(3-オキソ-3-(ウンデシルアミノ)プロピル)-N1, N16-ジウンデシル-4, 7, 10, 13-テトラアザヘキサデカン-1, 16-ジアミド)、DODAP(1, 2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン)、HGT4003(第WO2012/170889号、その教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、ICE(第WO2011/068810号、そ

10

20

30

40

50

の教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、HGT5000（米国仮特許出願第61/617,468号、その教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、またはHGT5001（シスまたはトランス）（仮特許出願第61/617,468号）、第WO2010/053572号に開示されるものなどのアミノアルコール脂質様（lipidoid）、DOTAP（1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン）、DOTMA（1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン）、DLinDMA（Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. 「Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids」 J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287）、DLin-KC2-DMA（Semple, S. C. et al. 「Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery」 Nature Biotech. 2010, 28, 172-176）、C12-200（Love, K. T. et al. 「Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing」 PNAS 2010, 107, 1864-1869）から選択され得る。

【0090】

いくつかの実施形態では、リポソーム中のカチオン性脂質の百分率は、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、または70%超であってよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）は、リポソームの約30～50重量%（例えば、約30～45重量%、約30～40重量%、約35～50重量%、約35～45重量%、または約35～40重量%）を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、モル比でリポソームの約30%、約35%、約40%、約45%、または約50%を構成する。

【0091】

非カチオン性／ヘルパー脂質

いくつかの実施形態では、提供されたリポソームは、1つ以上の非カチオン性（「ヘルパー」）脂質を含む。本明細書で使用される、句「非カチオン性脂質」は、任意の中性、双極性イオン、またはアニオン性脂質を指す。本明細書で使用される、句「アニオン性脂質」は、生理学的pHなどの選択されたHで正味の負電荷を保有するいくつかの脂質種のいずれかを指す。非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（DOPE-mal）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイルホスファチジルーエタノールアミン（DSPE）、16-オ-モノメチルPE、16-オ-ジメチルPE、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイルホスファチジエタノールアミン（SOPPE）、またはこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。

【0092】

いくつかの実施形態では、そのような非カチオン性脂質は、単独で使用され得るが、好ましくは他の賦形剤、例えば、カチオン性脂質と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、リポソームに存在する総脂質の約5%～約90%、または約10%～約70%のモル比を含み得る。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、中性脂質、すなわち、組成物が製剤化及び／または投与される条件下で正味の電荷

10

20

30

40

50

を保有しない脂質である。いくつかの実施形態では、リポソーム中の非カチオン性脂質の百分率は、5%超、10%超、20%超、30%超、または40%超であってよい。

【0093】

コレステロール系脂質

いくつかの実施形態では、提供されるリポソームは、1つ以上のコレステロール系脂質を含む。例えば、好適なコレステロール系カチオン性脂質は、例えば、DC-Choi (N, N-ジメチル-N-エチルカルボキサミドコレステロール)、1, 4-ビス(3-N-オレイルアミノ-プロピル) ピペラジン (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991)、Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997)、米国特許第5, 744, 335号)、またはICEを含む。いくつかの実施形態では、コレステロール系脂質は、リポソームに存在する総脂質の約2%~約30%、または約5%~約20%のモル比を含み得る。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のコレステロール系脂質の百分率は、5%超、10%超、20%超、30%超、または40%超であってよい。

【0094】

PEG化脂質

いくつかの実施形態では、提供されるリポソームは、1つ以上のPEG化脂質を含む。例えば、カチオン性脂質のうちの1つ以上、及びいくつかの実施形態では、リポソームを含む他の脂質と一緒に組み合わせた、ポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質、及びN-オクタノイルスフィンゴシン-1-〔スクシニル(メトキシポリエチレングリコール)-2000〕(C8-PEG-2000セラミド)を含む誘導体化されたセラミド(PEG-CER)などの誘導体化された脂質の使用も、本発明により想定される。想定されるPEG修飾脂質は、長さがC₆~C₂₀のアルキル鎖(複数可)を有する脂質に共有結合された長さが最大5kDaのポリエチレングリコール鎖を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、PEG修飾またはPEG化脂質は、PEG化コレステロールまたはPEG-2Kである。そのような構成成分の付加は、複合体の凝集を阻止することができ、また循環寿命を増加し、脂質-核酸組成物の標的細胞への送達を増加させるための手段も提供する(Кlibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268(1):235-237)、またはそれらは、インビボで製剤の外に迅速に交換されるように選択され得る(米国特許第5, 885, 613号を参照)。

【0095】

いくつかの実施形態では、特定の有用な交換可能な脂質は、より短いアシル鎖(例えば、C₁₄またはC₁₈)を有するPEGセラミドである。本発明のPEG修飾リン脂質及び誘導体化された脂質は、リポソームに存在する総脂質の約0%~約15%、約0.5%~約15%、約1%~約15%、約4%~約10%、または約2%のモル比を含み得る。

【0096】

ポリマー

いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、単独で、または本明細書に記載される様々な脂質を含む他の担体と組み合わせて、担体としてポリマーを使用して製剤化される。よって、いくつかの実施形態では、本明細書で使用される、リポソーム送達ビヒクルは、ナノ粒子を含むポリマーも包含する。好適なポリマーは、例えば、ポリアクリレート、ポリアルキシアノアクリレート、ポリラクチド、ポリラクチド-ポリグリコリドコポリマー、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギネート、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、プロタミン、PEG化プロタミン、PLL、PEG化PLL、及びポリエチレンイミン(PEI)を含み得る。PEIが存在する場合、10~40kDaの範囲の分子量の分枝状PEI、例えば、25kDaの分枝状PEI(Sigma #408727)であり得る。

【0097】

様々な実施形態によると、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、PEG修飾脂質、及び/または脂質ナノ粒子を含むポリマー、ならびに互いに対するそのような脂質の相対モル

10

20

30

40

50

比の選択は、選択された脂質（複数可）／ポリマーの特徴、意図する標的細胞の性質、送達されるmRNAの特徴に基づく。考慮すべき追加事項は、例えば、選択された脂質（複数可）のアルキル鎖の飽和、ならびに大きさ、電荷、pH、pKa、融合性、及び毒性を含む。よって、モル比は、それに応じて調節され得る。

【0098】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール、及び／またはPEG修飾脂質は、様々な相対モル比で組み合わせることができる。例えば、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12、C12-200等）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE等）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、約30～60：25～35：20～30：1～15であり得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12、C12-200等）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE等）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、およそ40：30：20：10である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12、C12-200等）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE等）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、およそ40：30：25：5である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12、C12-200等）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE等）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、それぞれ、およそ40：32：25：3である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12、C12-200等）：非カチオン性脂質（例えば、DOPE等）：コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）：PEG化脂質（例えば、DMG-PEG2K）の比率は、およそ50：25：20：5である。

【0099】

mRNAの合成

本発明によるmRNAは、様々な既知の方法のいずれかにより合成することができる。例えば、本発明によるmRNAは、インビトロ転写（IVT）を介して合成することができる。簡潔に、IVTは、典型的には、プロモーター、3リン酸化リボヌクレオチドのプールを含む線状または環状DNAテンプレート、DTT及びマグネシウムイオンを含み得る緩衝液系、ならびに適切なRNAポリメラーゼ（例えば、T3、T7、またはSP6 RNAポリメラーゼ）、DNase I、ピロホスファターゼ、及び／もしくはRNAse阻害剤を用いて行われる。正確な条件は、特定の用途により変動する。

【0100】

いくつかの実施形態では、本発明によるmRNAの調製に関して、DNAテンプレートは、インビトロで転写される。好適なDNAテンプレートは、典型的には、インビトロ転写に関してプロモーター、例えば、T3、T7、またはSP6プロモーター、続いて所望のmRNA及び停止シグナルに関して所望のヌクレオチド配列を有する。

【0101】

本発明による所望のmRNA配列（複数可）は、標準的な方法を使用して、決定され、DNAテンプレート内に組み込まれる。例えば、所望のアミノ酸配列（例えば、酵素配列）から開始して、変性された遺伝コードに基づき仮想逆翻訳が行われる。次いで、好適なコドンを選択するために最適化アルゴリズムが使用され得る。典型的には、G/C含量は、一方では、可能な最高のG/C含量を達成するために最適化され得、もう一方では、コドン使用によりtRNAの頻度を可能な限り最良に考慮する。最適化されたRNA配列は、例えば、適切な表示装置の補助により確立及び表示され、元（野生型）の配列と比較され得る。二次構造も、RNAの安定化及び不安定化特性、またはそれぞれ、安定化及び不安定化領域を計算するために分析され得る。

【0102】

修飾されたmRNA

いくつかの実施形態では、本発明によるmRNAは、未修飾または修飾されたmRNAとして合成することができる。典型的には、mRNAは、安定性を強化するために修飾される。mRNAの修飾は、例えば、RNAのヌクレオチドの修飾を含み得る。よって、本発明による修飾されたmRNAは、例えば、骨格修飾、糖修飾、または塩基修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、mRNAは、プリン（アデニン（A）、グアニン（G））もしくはピリミジン（チミン（T）、シトシン（C）、ウラシル（U））を含むがこれらに限定されない天然に存在するヌクレオチド及び／またはヌクレオチド類似体（修飾ヌクレオチド）から、ならびにプリン及びピリミジンの修飾ヌクレオチド類似体もしくは誘導体（例えば、1-メチル-アデニン、2-メチル-アデニン、2-メチルチオ-N-6-イソペンテニル-アデニン、N-6-メチル-アデニン、N-6-イソペンテニル-アデニン、2-チオシトシン、3-メチル-シトシン、4-アセチル-シトシン、5-メチル-シトシン、2,6-ジアミノプリン、1-メチル-グアニン、2-メチル-グアニン、2,2-ジメチル-グアニン、7-メチル-グアニン、イノシン、1-メチル-イノシン、シュードウラシル（pseudouracil）（5-ウラシル）、ジヒドロウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-（カルボキシヒドロキシメチル）-ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メチル-ウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチルアミノメチル-ウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5'-メトキシカルボニルメチル-ウラシル、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、1-メチル-シュードウラシル、キューオシン、β-D-マンノシル-キューオシン、ワイブトキソシン（wybutoxosine）、及びホスホルアミデート、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート、7-デアザグアノシン、5-メチルシトシンならびにイノシン）として合成することができる。そのような類似体の調製は、米国特許第4,373,071号、米国特許第4,401,796号、米国特許第4,415,732号、米国特許第4,458,066号、米国特許第4,500,707号、米国特許第4,668,777号、米国特許第4,973,679号、米国特許第5,047,524号、米国特許第5,132,418号、米国特許第5,153,319号、米国特許第5,262,530号、及び同第5,700,642号により当業者に公知であり、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0103】

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、PAHコードmRNA）は、RNA骨格修飾を含み得る。典型的には、骨格修飾は、RNAに含まれるヌクレオチドの骨格のリン酸塩が化学的に修飾される修飾である。例示的な骨格修飾は、典型的には、これらに限定されないが、メチルホスホネート、メチルホスホルアミデート、ホスホルアミデート、ホスホロチオエート（例えば、シチジン5'-O-（1-チオリン酸塩））、ボラノリン酸塩、正荷電グアニジウム基等からなる群からの修飾を含み、これは、ホスホジエステル連結を他のアニオン性、カチオン性、または中性基に置き換えることによることを意味する。

【0104】

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、PAHコードmRNA）は、糖修飾を含み得る。典型的な糖修飾は、糖が含有するヌクレオチドの糖の化学修飾であり、2'-デオキシ-2'-フルオロ-オリゴボヌクレオチド（2'-フルオロ-2'-デオキシシチジン5'-3リン酸塩、2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-3リン酸塩）、2'-デオキシ-2'-デアミン-オリゴボヌクレオチド（2'-アミノ-2'-デオキシシチジン5'-3リン酸塩、2'-アミノ-2'-デオキシウリジン5'-3リン酸塩）、2'-O-アルキルオリゴボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-C-アルキルオリゴボヌクレオチド（2'-O-メチルシチジン5'-3リン酸塩、2'-メチルウリジン5'-3リン酸塩）、2'-C-アルキルオリゴボヌクレオチド、及びこれ

らの異性体（2'-アラシチジン5'-3リン酸塩、2'-アラウリジン5'-3リン酸塩）、またはアジド3リン酸塩（2'-アジド-2'-デオキシシチジン5'-3リン酸塩、2'-アジド-2'-デオキシウリジン5'-3リン酸塩）からなる群から選択される糖修飾を含むが、これらに限定されない。

【0105】

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、PAHコードmRNA）は、ヌクレオチドの塩基の修飾を含み得る（塩基修飾）。塩基修飾を含む修飾されたヌクレオチドは、塩基修飾ヌクレオチドとも呼ばれる。そのような塩基修飾ヌクレオチドの例としては、2'-アミノ-6-クロロプリンリボシド5'-3リン酸塩、2'-アミノアデノシン5'-3リン酸塩、2'-チオシチジン5'-3リン酸塩、2'-チオウリジン5'-3リン酸塩、4'-チオウリジン5'-3リン酸塩、5'-アミノアリルシチジン5'-3リン酸塩、5'-アミノアリルウリジン5'-3リン酸塩、5'-ブロモシチジン5'-3リン酸塩、5'-ブロモウリジン5'-3リン酸塩、5'-ヨードシチジン5'-3リン酸塩、5'-ヨードウリジン5'-3リン酸塩、5'-メチルシチジン5'-3リン酸塩、5'-メチルウリジン5'-3リン酸塩、6'-アザシチジン5'-3リン酸塩、6'-アザウリジン5'-3リン酸塩、6'-クロロプリンリボシド5'-3リン酸塩、7'-デアザアデノシン5'-3リン酸塩、7'-デアザグアノシン5'-3リン酸塩、8'-アザアデノシン5'-3リン酸塩、8'-アジドアデノシン5'-3リン酸塩、ベンゾイミダゾールリボシド5'-3リン酸塩、N1-メチルアデノシン5'-3リン酸塩、N1-メチルグアノシン5'-3リン酸塩、N6-メチルアデノシン5'-3リン酸塩、O6-メチルグアノシン5'-3リン酸塩、プソイドウリジン5'-3リン酸塩、ピューロマイシン5'-3リン酸塩、またはキサントシン5'-3リン酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

典型的には、mRNA合成は、N末端（5'）上への「キャップ」及びC末端（3'）上への「テイル」の付加を含む。キャップの存在は、大半の真核生物細胞に見られるヌクレアーゼに対する耐性を提供するのに重要である。「テイル」の存在は、エキソヌクレアーゼ分解からmRNAを保護するのに役立つ。

【0107】

よって、いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、PAHコードmRNA）は、5'キャップ構造を含む。5'キャップは、典型的には、次のように付加される：最初に、RNA末端ホスファターゼが5'ヌクレオチドから末端リン酸塩基のうちの1つを除去して2つの末端リン酸塩を残し、次に、グアノシン3リン酸塩（GTP）がグアニリルトランスフェラーゼを介して末端リン酸塩に付加されて5'5'5'3リン酸塩連結を産生し、次いで、グアニンの7-窒素がメチルトランスフェラーゼによりメチル化される。キャップ構造の例としては、m7G（5'）ppp（5'（A，G（5'）ppp（5'）A及びG（5'）ppp（5'）Gが挙げられるが、これらに限定されない。

【0108】

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、PAHコードmRNA）は、3'ポリ（A）テイル構造を含む。mRNAの3'末端のポリ-Aテイルは、典型的には、約10～300のアデノシンヌクレオチド（配列番号9）（例えば、約10～200のアデノシンヌクレオチド、約10～150のアデノシンヌクレオチド、約10～100のアデノシンヌクレオチド、約20～70のアデノシンヌクレオチド、または約20～60のアデノシンヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、3'ポリ（C）テイル構造を含む。mRNAの3'末端の好適なポリ-Cテイルは、典型的には、約10～200のシトシンヌクレオチド（配列番号10）（例えば、約10～150のシトシンヌクレオチド、約10～100のシトシンヌクレオチド、約20～70のシトシンヌクレオチド、約20～60のシトシンヌクレオチド、または約10～40のシトシンヌクレオチド）を含む。ポリ-Cテイルは、ポリ-Aテイルに付加されるか、またはポリ-Aテイルを置換し得る。

【0109】

いくつかの実施形態では、mRNAは、5'及び／または3'非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、mRNAの安定性または翻訳に影響を及ぼす1つ以上の要素、例えば、鉄応答要素を含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、長さが約50～500ヌクレオチドであってよい。

【0110】

いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、ポリアデニル化シグナル、細胞におけるmRNAの位置の安定性に影響を及ぼすタンパク質の結合部位、またはmiRNAの1つ以上の結合部位のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、長さが約50～500ヌクレオチド、またはそれ以上であってよい。

【0111】

キャップ構造

いくつかの実施形態では、mRNAは、5'キャップ構造を含む。5'キャップは、典型的には、次のように付加される：最初に、RNA末端ホスファターゼが5'ヌクレオチドから末端リン酸塩基のうちの1つを除去して2つの末端リン酸塩を残し、次に、グアノシン3リン酸塩（GTP）がグアニリルトランスフェラーゼを介して末端リン酸塩に付加されて5'5'5'3リン酸塩連結を産生し、次いで、グアニンの7-窒素がメチルトランスフェラーゼによりメチル化される。キャップ構造の例としては、m⁷G(5')ppp(5')(A, G(5')ppp(5'))A及びG(5')ppp(5')Gが挙げられるが、これらに限定されない。

【0112】

天然に存在するキャップ構造は、3リン酸塩ブリッジを介して最初の転写ヌクレオチドの5'端に連結され、m⁷G(5')ppp(5')N（Nは任意のヌクレオシドである）のジヌクレオチドキャップをもたらす、7-メチルグアノシンを含む。インビトロにおいて、キャップは、酵素的に付加される。キャップは、核に付加され、酵素グアニリルトランスフェラーゼにより触媒される。RNAの5'末端へのキャップの付加は、転写の開始直後に生じる。末端ヌクレオシドは、典型的には、グアノシンであり、全ての他のヌクレオチドに対して逆の方向に向いている、すなわち、G(5')ppp(5')GpNpNpである。

【0113】

インビトロ転写により産生されたmRNAの一般的なキャップは、m⁷G(5')ppp(5')Gであり、これは、それらの5'末端でキャップ構造を有するRNAを得るために、インビトロでT7またはSP6 RNAポリメラーゼを用いた転写においてジヌクレオチドキャップとして使用されてきた。キャップされたmRNAのインビトロ合成のための一般的な方法は、転写の開始因子として形態m⁷G(5')ppp(5')G（「m⁷GpppG」）の予め形成されたジヌクレオチドを採用する。

【0114】

現時点でのインビトロ翻訳実験に使用される合成ジヌクレオチドキャップの通常形態は、2'または3'OH基が-OCH₃で置換される、一般的に、修飾されたキャップ類似体であるアンチリバーシキャップ類似体（「ARCA」）または修飾されたARCAである。

【0115】

さらなるキャップ類似体は、m⁷GpppG、m⁷GpppA、m⁷GpppC、非メチル化キャップ類似体（例えば、GpppG）、ジメチル化キャップ類似体（例えば、m^{2,7}GpppG）、トリメチル化キャップ類似体（例えば、m^{2,2,7}GpppG）、ジメチル化対称キャップ類似体（例えば、m⁷Gpppm⁷G）、またはアンチリバーシキャップ類似体（例えば、ARCA、m^{7,2'}Om^eGpppG、m^{7,2'}dGpppG、m^{7,3'}Om^eGpppG、m^{7,3'}dGpppG、及びそれらの4リン酸塩誘導体）からなる群から選択される化学構造を含むが、これらに限定されない（例えば、Jemielity, J. et al., 「Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational p

10

20

30

40

50

properties」, RNA, 9:1108-1122 (2003) を参照)。

【0116】

いくつかの実施形態では、好適なキャップは、3リン酸塩ブリッジを介して最初の転写ヌクレオチドの5'端に連結され、m⁷G(5')ppp(5')N(Nは任意のヌクレオシドである)もたらす、7-メチルグアニレート(「m⁷G」)である。本発明の実施形態に利用されるm⁷Gキャップの好適な実施形態は、m⁷G(5')ppp(5')Gである。

【0117】

いくつかの実施形態では、キャップは、Cap0構造である。Cap0構造は、塩基1及び2に結合されたりボースの2'-O-メチル残基を欠く。いくつかの実施形態では、キャップは、Cap1構造である。Cap1構造は、塩基2に2'-O-メチル残基を有する。いくつかの実施形態では、キャップは、Cap2構造である。Cap2構造は、塩基2及び3の両方に結合された2'-O-メチル残基を有する。

【0118】

様々なm⁷Gキャップ類似体が当該技術分野において既知であり、その多くは市販されている。これらは、上述のm⁷GpppG、ならびにARCA 3'-OCH₃及び2'-OCH₃キャップ類似体を含む(Jemielity, J. et al., RNA, 9:1108-1122 (2003))。本発明の実施形態において使用するためのさらなるキャップ類似体は、N7-ベンジル化ジヌクレオシド4リン酸塩類似体(Grudzien, E. et al., RNA, 10:1479-1487 (2004)に記載される)、ホスホロチオエートキャップ類似体(Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13:1745-1755 (2007)に記載される)、ならびに米国特許第8,093,367号及び同第8,304,529号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるキャップ類似体(ビオチニル化キャップ類似体を含む)を含む。

【0119】

テイル構造

典型的には、「テイル」の存在は、エキソヌクレアーゼ分解からmRNAを保護するのに役立つ。ポリAテイルは、天然のメッセンジャー及び合成センスRNAを安定させると考えられている。したがって、ある特定の実施形態では、長いポリAテイルは、mRNA分子に付加され、よって、RNAにより安定性を付与することができる。ポリAテイルは、様々な当該技術分野において認識される技術を使用して付加することができる。例えば、長いポリAテイルは、ポリAポリメラーゼを使用して合成またはインビトロ転写RNAに付加することができる(Yokoe, et al. Nature Biotechnology, 1996; 14:1252-1256)。転写ベクターは、長いポリAテイルもコードすることができる。加えて、ポリAテイルは、PCR産物から直接転写することによって付加することができる。ポリAは、RNAリガーゼを用いてセンスRNAの3'端に連結することもできる(例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press:1991 edition)を参照)。

【0120】

いくつかの実施形態では、mRNAは、3'ポリ(A)テイル構造を含む。典型的には、ポリAテイルの長さは、少なくとも約10、50、100、200、300、400、少なくとも500ヌクレオチド(配列番号11)であり得る。いくつかの実施形態では、mRNAの3'末端のポリ-Aテイルは、典型的には、約10~300のアデノシンヌクレオチド(配列番号9)(例えば、約10~200のアデノシンヌクレオチド、約10~150のアデノシンヌクレオチド、約10~100のアデノシンヌクレオチド、約20~70のアデノシンヌクレオチド、または約20~60のアデノシンヌクレオチド)を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、3'ポリ(C)テイル構造を含む。mRNAの

3'末端の好適なポリ-Cテイルは、典型的には、約10～200のシトシンヌクレオチド（配列番号10）（例えば、約10～150のシトシンヌクレオチド、約10～100のシトシンヌクレオチド、約20～70のシトシンヌクレオチド、約20～60のシトシンヌクレオチド、または約10～40のシトシンヌクレオチド）を含む。ポリ-Cテイルは、ポリ-Aテイルに付加されるか、またはポリ-Aテイルを置換し得る。

【0121】

いくつかの実施形態では、ポリAまたはポリCテイルの長さは、本発明の修飾されたセンスmRNA分子の安定性、よってタンパク質の転写を制御するために調節される。例えば、ポリAテイルの長さは、センスmRNA分子の半減期に影響を及ぼし得るため、ポリAテイルの長さは、ヌクレアーゼに対するmRNAの耐性のレベルを修正し、それによって、標的細胞におけるポリヌクレオチド発現及び／またはポリペプチド産生の時間経過を制御するために調節され得る。

10

【0122】

5'及び3'非翻訳領域

いくつかの実施形態では、mRNAは、5'及び／または3'非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、mRNAの安定性または翻訳に影響を及ぼす1つ以上の要素、例えば、鉄応答要素を含む。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、長さが約50～500ヌクレオチドであってよい。

【0123】

いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、ポリアデニル化シグナル、細胞におけるmRNAの位置の安定性に影響を及ぼすタンパク質の結合部位、またはmiRNAの1つ以上の結合部位のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、長さが約50～500ヌクレオチド、またはそれ以上であってよい。

20

【0124】

例示的な3'及び／または5'UTR配列は、センスmRNA分子の安定性を増加させるために、安定であるmRNA分子（例えば、グロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路酵素）に由来し得る。例えば、5'UTR配列は、ヌクレアーゼ耐性を改善するため、及び／またはポリヌクレオチドの半減期を改善するために、CMV最初期1（IE1）遺伝子またはその断片の部分配列を含み得る。ポリヌクレオチドをさらに安定させるために、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）の3'端または非翻訳領域にヒト成長ホルモン（hGH）またはその断片をコードする配列を含むことも想定される。一般に、これらの修飾は、ポリヌクレオチドの安定性及び／または薬物動態特性（例えば、半減期）を、それらの未修飾の対応物に対して改善し、例えば、インビボヌクレアーゼ消化に対するそのようなポリヌクレオチドの耐性を改善するように行われる修飾を含む。

30

【0125】

リボソームの形成

本発明に使用するためのリボソーム伝達ビヒクルは、現在当該技術分野において既知の様々な技術により調製することができる。提供される組成物に使用するためのリボソームは、現在当該技術分野において既知の様々な技術により調製することができる。例えば、多層小胞（MLV）は、適切な溶媒に脂質を溶解することにより、好適な容器または器の内壁に選択された脂質を堆積させ、次いで、溶媒を蒸発させて器の内側に薄いフィルムを残すか、噴霧乾燥させることなどによる、従来の技術により調製され得る。次いで、MLVの形成をもたらす渦動運動により水相が器に添加され得る。次いで、単層小胞（ULV）は、多層小胞の均質化、音波処理、または押し出しにより形成され得る。加えて、単層小胞は、界面活性剤除去技術により形成することができる。

40

【0126】

ある特定の実施形態では、提供される組成物は、mRNAがリボソームの表面に結合し、かつ同じリボソーム内に封入される、リボソームを含む。例えば、本発明の組成物の調製中、カチオン性リボソームは、静電相互作用によりmRNAと結合し得る。

50

【0127】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法は、リポソームに封入されたmRNAを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のmRNA種は、同じリポソームに封入され得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のmRNA種は、異なるリポソームに封入され得る。いくつかの実施形態では、mRNAは、1つ以上のリポソームに封入され、これは、それらの脂質組成物、脂質構成成分のモル比、大きさ、電荷（ゼータ電位）、標的リガンド、及び／またはこれらの組み合わせにおいて異なる。いくつかの実施形態では、1つ以上のリポソームは、カチオン性脂質、中性脂質、PEG修飾脂質、及び／またはこれらの組み合わせの異なる組成物を有し得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のリポソーム（liposomes）は、リポソームを作製するために使用されるカチオン性脂質、中性脂質、コレステロール、及びPEG修飾脂質の異なるモル比を有し得る。

10

【0128】

所望のmRNAをリポソーム内に組み込むプロセスは、多くの場合、「装填」と称される。例示的な方法は、Lasic, et al., FES Lett., 312:255-258, 1992に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。リポソーム組み込み核酸は、完全に、または部分的にリポソームの内部空間、リポソームの2層膜内に位置するか、またはリポソーム膜の外表面と結合し得る。核酸のリポソーム内への組み込みは、本明細書において、「封入」とも称され、核酸がリポソームの内部空間内に完全に格納される。mRNAをリポソームなどの伝達ビヒクル内に組み込む目的は、多くの場合、核酸の迅速な排出をもたらす、核酸及び／もしくは系または受容体を分解する酵素または化学物質を含み得る環境から核酸を保護することである。したがって、いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、その中に含まれるmRNAの安定性を強化することができ、かつ／またはmRNAの標的細胞もしくは組織への送達を容易にする。

20

【0129】

リポソームの大きさ

本発明による好適なリポソームは、様々な大きさに作製することができる。いくつかの実施形態では、提供されるリポソームは、以前に知られるmRNA封入リポソームより小さく作製され得る。いくつかの実施形態では、リポソームの大きさの減少は、mRNAのより効率的な送達に関連する。適切なリポソームの大きさの選択は、標的細胞または組織の部位、及びある程度リポソームが作製される用途を考慮し得る。

30

【0130】

いくつかの実施形態では、適切なリポソームの大きさは、mRNAによりコードされるPKUタンパク質の全身分布を容易にするように選択される。いくつかの実施形態では、ある特定の細胞または組織へのmRNAのトランスフェクションを制限することが望ましい場合がある。例えば、肝細胞を標的とするには、リポソームは、その寸法が肝臓の肝類洞を覆う内皮層の開窓より小さいように寸法決定され得、そのような場合、リポソームは、そのような内皮開窓を容易に貫通し、標的肝細胞に達することができる。

【0131】

あるいは、または加えて、リポソームは、リポソームの寸法がある特定の細胞もしくは組織内への分布を制限する、または明確に避けるために十分な直径のものであるように寸法決定され得る。例えば、リポソームは、その寸法が肝類洞を覆う内皮層の開窓より大きいように寸法決定され得、それによって、リポソームの肝細胞への分布を制限する。

40

【0132】

いくつかの実施形態では、リポソームの大きさは、リポソーム粒子の最大直径の長さによって決定される。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、約250nm以下（例えば、約225nm、200nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、または50nm以下）の大きさを有する。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、約10~250nmの範囲（例えば、約10~225nm、10~200nm、10~175nm、10~150nm、10~125nm、10~100nm、10~75nm、または10~50nmの範囲）の大きさを有する。いくつかの実施形態で

50

は、好適なリポソームは、約100～250nmの範囲（例えば、約100～225nm、100～200nm、100～175nm、100～150nmの範囲）の大きさを有する。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、約10～100nmの範囲（例えば、約10～90nm、10～80nm、10～70nm、10～60nm、または10～5nmの範囲）の大きさを有する。

【0133】

リポソーム集団の寸法決定に関して、当該技術分野において既知の様々な代替方法が利用可能である。そのような寸法決定の方法の1つは、米国特許第4,737,323号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。浴またはプローブ音波処理のいずれかによるリポソーム懸濁液の音波処理は、直径が約0.05ミクロン未満の小さいULVまで漸進的な大きさの減少をもたらす。均質化は、大きいリポソームをより小さいものに断片化するために剪断エネルギーに依存する別の方法である。典型的な均質化手順において、MLVは、選択されたリポソームの大きさ、典型的には約0.1～0.5ミクロンが観察されるまで、標準的なエマルジョンホモジナイザーを通して再循環される。リポソームの大きさは、Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-150 (1981)（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される準電気光散乱（QELS）によって決定され得る。平均リポソーム直径は、形成されたリポソームの音波処理によって減少させることができる。効率的なリポソーム合成を導くために、断続的な音波処理サイクルがQELS評価と交互に行われ得る。

【0134】

薬学的組成物

インビボでのmRNAの発現を容易にするために、リポソームなどの送達ビヒクルは、1つ以上の追加の核酸、担体、標的リガンドもしくは安定化試薬と組み合わせて、または好適な賦形剤と混合される薬理的組成物に製剤化され得る。薬物の製剤化及び投与の技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences,」 Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest editionに見出すことができる。

【0135】

提供されるリポソームにより封入された、または結合されたmRNA、及びそれを含む組成物は、現在の医療行為により投与及び投薬され、被験体の臨床状態、投与の部位及び方法、投与スケジュール、被験体の年齢、性別、体重、ならびに当該技術分野の臨床医に關係のある他の要因を考慮する。本明細書において、目的の「有効量」は、実験臨床研究、薬理学、臨床、及び医療の分野の当業者に既知である、そのような関連のある考慮すべき事項により決定され得る。いくつかの実施形態では、投与される量は、症状、及び当業者により疾患の進行、退行、または改善の適切な対策として選択される他の指標の少なくともいくつかの安定化、改善、または排除を達成するのに有効である。例えば、好適な量及び投薬レジメンは、少なくとも一時的なタンパク質（例えば、酵素）の産生をもたらすものである。

【0136】

好適な投与経路は、例えば、経口、直腸、膣、経粘膜、気管内もしくは吸入を含む肺動脈、または腸投与、皮内、経皮（局所）、筋肉内、皮下、髄内注射、ならびにくも膜下腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、もしくは鼻孔内を含む非経口送達を含む。

【0137】

代替的に、または加えて、本発明のリポソームにより封入されたmRNA及び組成物は、全身の様式ではなく、局所に、例えば、薬学的組成物の標的組織への直接注射、好ましくは持続放出性製剤で投与され得る。局所送達は、標的とされる組織により、様々な方法で影響を受け得る。例えば、本発明の組成物を含むエアロゾルは吸引され得る（鼻、気管、または気管支送達に関して）、本発明の組成物は、例えば、損傷、疾患の出現、または痛みの部位内に注射され得る、組成物は、経口、気管、または食道用途のためにロゼンジで提供され得る、胃もしくは腸への投与用に液体、錠剤、またはカプセル形態で供給され

得る、直腸もしくは腔用途のために坐剤形態で供給され得る、またはクリーム、液滴、さらには注射を使用することにより眼にさえも送達することができる。治療用分子またはリガンドと複合される提供される組成物を含む製剤は、例えば、組成物が移植の部位から周囲細胞に拡散することができるポリマーまたは他の構造もしくは物質と結合して、外科的に投与することさえもできる。あるいは、これらは、ポリマーまたは支持体を使用することなく外科的に適用され得る。

【0138】

本発明の提供される方法は、本明細書に記載される治療有効量の治療剤（例えば、PAHタンパク質をコードするmRNA）の単回ならびに複数回投与を想定する。治療剤は、被験体の状態（例えば、PKU）の性質、重篤度、及び程度により、規則的な間隔で投与され得る。いくつかの実施形態では、本発明の治療有効量の治療剤（例えば、PAHタンパク質をコードするmRNA）は、規則的な間隔で（例えば、年に1回、6ヶ月に1回、5ヶ月に1回、3ヶ月に1回、隔月（例えば、2ヶ月に1回）、毎月（例えば、毎月1回）、週2回（例えば、2週間に1回、隔週）、毎週、毎日、または連続して）、周期的に髄腔内に投与され得る。

10

【0139】

いくつかの実施形態では、提供されるリポソーム及び／または組成物は、その中に含まれるmRNAの徐放に適するように製剤化される。そのような徐放性組成物は、投薬間隔を延長して被験体に適宜投与することができる。例えば、一実施形態では、本発明の組成物は、1日2回、毎日、または1日おきに被験体に投与される。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、週に2回、週に1回、7日毎、10日毎、14日毎、28日毎、30日毎、2週間毎（例えば、隔週）、3週間毎、より好ましくは4週間毎、1ヶ月に1回、6週間毎、8週間毎、隔月、3ヶ月毎、4ヶ月毎、6ヶ月毎、8ヶ月毎、9ヶ月毎、毎年、被験体に投与される。長期間にわたってmRNAを送達または放出のいずれかを行うために、デポ投与（例えば、筋肉内、皮下）用に製剤化される組成物及びリポソームも想定される。好ましくは、採用される徐放手段は、安定性を強化するためにmRNAに行われる修飾と組み合わせられる。

20

【0140】

本明細書で使用される、用語「治療有効量」は、主として、本発明の薬学的組成物に含まれる治療剤の総量に基づき決定される。一般に、治療有効量は、被験体に対して意義のある利益を得る（例えば、PKUを治療する、調節する、治癒する、防止する、及び／または寛解させる）のに十分である。例えば、治療有効量は、所望の治療及び／または予防作用を得るのに十分な量であり得る。一般に、治療剤（例えば、PAHタンパク質をコードするmRNA）を必要とする被験体に投与されるその量は、被験体の特徴に依存する。そのような特徴は、被験体の状態、疾患の重篤度、一般的な健康状態、年齢、性別、及び体重を含む。当業者は、これらの及び他の関連する要因により適切な投薬量を容易に決定することができるだろう。加えて、最適な投薬量の範囲を特定するために、客観的及び主観的アッセイの両方が任意に採用され得る。

30

【0141】

治療有効量は、一般的に、複数単位用量を含み得る投薬レジメンで投与される。任意の特定の治療用タンパク質に関して、治療有効量（及び／または有効投薬レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の薬学的薬剤との組み合わせにより変動し得る。また、任意の特定の患者の特定の治療有効量（及び／または単位用量）は、治療される障害及び障害の重篤度、採用される特定の薬学的薬剤の活性、採用される特定の組成物、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、及び食事、投与時間、投与経路、及び／または採用される特定のタンパク質の排出または代謝速度、治療期間、ならびに医療の分野において周知の同様の要因を含む、様々な要因に依存し得る。

40

【0142】

本発明によると、提供される組成物の治療有効用量は、規則的に投与される場合、治療前の基準レベルと比較して、肝PAHタンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかの実

50

施形態では、提供される組成物の投与は、約100 ng/mg、約200 ng/mg、約300 ng/mg、約400 ng/mg、約500 ng/mg、約600 ng/mg、約700 ng/mg、約800 ng/mg、約900 ng/mg、約1000 ng/mg、約1200 ng/mgまたは約1400 ng/mg（肝臓中総タンパク質）以上のPAHタンパク質レベルの発現をもたらす。

【0143】

いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、血清PAHタンパク質レベルが増加する。いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、治療前の基準PAHタンパク質レベルと比較して、血清PAHタンパク質レベルが少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%増加する。典型的には、血清中の基準PAHタンパク質レベルは、治療直前に測定される。

10

【0144】

いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、生体試料中のフェニルアラニンレベルが減少する。好適な生体試料は、例えば、全血、血漿、血清、尿、または脳髄液を含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、治療前の基準レベルと比較して、生体試料（例えば、血清、血漿、または尿試料）中のフェニルアラニンレベルが少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%減少する。典型的には、基準フェニルアラニンレベルは、治療直前に測定される。

20

【0145】

いくつかの実施形態では、提供される組成物の治療有効用量は、規則的に投与される場合、治療直前の基準フェニルアラニンレベルと比較して、血清または血漿中のフェニルアラニンレベルの減少をもたらす。いくつかの実施形態では、提供される組成物の治療有効用量は、規則的に投与される場合、治療されない被験体の基準フェニルアラニンレベルと比較して、血清または血漿中のフェニルアラニンレベルの減少をもたらす。いくつかの実施形態では、提供される組成物の治療有効用量は、規則的に投与される場合、血清または血漿中のフェニルアラニンレベルを約1500 μmol/L以下、約1000 μmol/L以下、約900 μmol/L以下、約800 μmol/L以下、約700 μmol/L以下、約600 μmol/L以下、約500 μmol/L以下、約400 μmol/L以下、約300 μmol/L以下、約200 μmol/L以下、約100 μmol/L以下、または約50 μmol/L以下に減少させる。特定の実施形態では、規則的に投与された場合の治療有効用量は、血清または血漿中のフェニルアラニンレベルを約120 μmol/L以下に減少させる。

30

【0146】

いくつかの実施形態では、提供される組成物を投与することにより、尿中のフェニルアラニンのレベル、及び/またはフェニルアラニンの代謝産物（例えば、フェニルケトン、フェニルピルビン酸塩）が減少する。

40

【0147】

いくつかの実施形態では、治療有効用量を決定するために、1つ以上の精神神経試験が使用され得る。いくつかの実施形態では、治療前の個体、または未治療対照個体のいずれかと比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、または50%の1つ以上の精神神経試験の改善は、特定の用量が治療有効量であることを示す。いくつかの実施形態では、好適な精神神経試験は、注意欠陥及び多動性障害評価尺度（ADHD-RS）の不注意部分ならびに/または気分状態のプロファイル（POMS）であってよい。

【0148】

いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約0.005~500 mg/kg（体重）

50

、例えば、約0.005～400mg/kg（体重）、約0.005～300mg/kg（体重）、約0.005～200mg/kg（体重）、約0.005～100mg/kg（体重）、約0.005～90mg/kg（体重）、約0.005～80mg/kg（体重）、約0.005～70mg/kg（体重）、約0.005～60mg/kg（体重）、約0.005～50mg/kg（体重）、約0.005～40mg/kg（体重）、約0.005～30mg/kg（体重）、約0.005～25mg/kg（体重）、約0.005～20mg/kg（体重）、約0.005～15mg/kg（体重）、約0.005～10mg/kg（体重）の範囲である。いくつかの実施形態では、mRNAは、約0.1～5.0mg/kg（体重）、例えば、約0.1～4.5、0.1～4.0、0.1～3.5、0.1～3.0、0.1～2.5、0.1～2.0、0.1～1.5、0.1～1.0、0.1～0.5、0.1～0.3、0.3～5.0、0.3～4.5、0.3～4.0、0.3～3.5、0.3～3.0、0.3～2.5、0.3～2.0、0.3～1.5、0.3～1.0、0.3～0.5、0.5～5.0、0.5～4.5、0.5～4.0、0.5～3.5、0.5～3.0、0.5～2.5、0.5～2.0、0.5～1.5、または0.5～1.0mg/kg（体重）の範囲の用量で投与される。

10

【0149】

いくつかの実施形態では、治療有効用量は、または（or）約0.1mg/kg（体重）、約0.5mg/kg（体重）、約1.0mg/kg（体重）、約3mg/kg（体重）、約5mg/kg（体重）、約10mg/kg（体重）、約15mg/kg（体重）、約20mg/kg（体重）、約30mg/kg（体重）、約40mg/kg（体重）、約50mg/kg（体重）、約60mg/kg（体重）、約70mg/kg（体重）、約80mg/kg（体重）、約90mg/kg（体重）、約100mg/kg（体重）、約150mg/kg（体重）、約200mg/kg（体重）、約250mg/kg（体重）、約300mg/kg（体重）、約350mg/kg（体重）、約400mg/kg（体重）、約450mg/kg（体重）、または約500mg/kg（体重）以上である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.8、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、または0.1mg/kg（体重）以下の用量で投与される。

20

【0150】

本明細書に開示されるリポソームのうちの1つ以上を含む凍結乾燥された薬学的組成物、及び例えば、2011年6月8日に出願された米国仮出願第61/494,882号（その教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示される、そのような組成物を使用するための関連方法も、本明細書において想定される。例えば、本発明による凍結乾燥された薬学的組成物は、投与前に再構成されるか、またはインビボで再構成され得る。例えば、凍結乾燥された薬学的組成物は、適切な剤形（例えば、ディスク、ロッド、または膜などの皮内剤形）に製剤化され、剤形が個体の体液によってインビボで経時的に再水和されるように投与され得る。

30

【0151】

提供されるリポソーム及び組成物は、任意の所望の組織に投与され得る。いくつかの実施形態では、提供されるリポソームまたは組成物によって送達されたmRNAは、リポソーム及び／または組成物が投与された組織で発現される。いくつかの実施形態では、送達されたmRNAは、リポソーム及び／または組成物が投与された組織とは異なる組織で発現される。送達されたmRNAが送達及び／または発現され得る例示的な組織としては、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、血清、脳、骨格筋、リンパ節、皮膚、及び／または脳脊髄液が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0152】

様々な実施形態によると、送達されたmRNAの発現の時期は、特定の医学的要求に合うように調整することができる。いくつかの実施形態では、送達されたmRNAによってコードされるPAHタンパク質の発現は、提供されるリポソームまたは組成物の単回投与の1、2、3、6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、及

50

び／または72時間後に血清または標的組織において検出可能である。いくつかの実施形態では、mRNAによってコードされるPAHタンパク質の発現は、提供されたりボソームまたは組成物の単回投与の1日、2日、3日、4日、5日、6日、及び／または7日後に血清または標的組織において検出可能である。いくつかの実施形態では、mRNAによってコードされるPAHタンパク質の発現は、提供されるリボソームまたは組成物の単回投与の1週間、2週間、3週間、及び／または4週間後に血清または標的組織において検出可能である。いくつかの実施形態では、mRNAによってコードされたタンパク質の発現は、提供されるリボソームまたは組成物の単回投与の1ヶ月以上後で検出可能である。

【実施例】

【0153】

10

本発明のある特定の化合物、組成物、及び方法がある特定の実施形態により具体的に説明されてきたが、以下の実施例は、単に、本発明の化合物を例示するのに役立ち、それを制限することを意図しない。

【0154】

実施例1. hPAH mRNA送達及び発現のための例示的なリボソーム製剤

この実施例は、インビボでのhPAH mRNAの有効な送達及び発現のための例示的なリボソーム製剤を提供する。

【0155】

脂質材料

以下の実施例に記載される製剤は、特に記載しない限り、1つ以上のカチオン性脂質、ヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び／またはコレステロール脂質）、ならびにフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）mRNAを封入するように設計されたPEG化脂質を採用する様々な比率の多構成成分脂質混合物を含む。特に記載しない限り、以下の実施例において使用された多構成成分脂質混合物は、cKK-E12（カチオン性脂質）、DOPe（非カチオン性脂質）、コレステロール、及びDMG-PEG2Kのエタノール溶液であった。

20

【0156】

メッセンジャーRNA材料

コドン最適化ヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）メッセンジャーRNAは、遺伝子をコードするプラスミドDNAテンプレートからインビトロ転写により合成され、これに、5'キャップ構造（キャップ1）（Fechter, P.; Brownlee, G. G. 「Recognition of mRNA cap structure by viral and cellular proteins」J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249）、及びゲル電気泳動により決定された、長さがおおよそ250ヌクレオチド（配列番号12）の3'ポリ（A）テイルの付加が続いた。各mRNA産物に存在する5'及び3'非翻訳領域は、それぞれ、X及びYと表され、記載される通りに定義される（下記参照）。

30

【化 7】

コドン最適化ヒトフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) mRNA :

X-配列番号 3-Y

5' 及び 3' UTR 配列

X (5' UTR 配列) =

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG [配列番号 4]

Y (3' UTR 配列) =

GGGUGGCAUCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCCA
CUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAAGCU [配列
番号 5]

または

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAAGCU
(配列番号 6)

10

【0157】

例えば、コドン最適化ヒト PAH メッセンジャー RNA は、

【化 8】

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGAGCACC GCCGUGCUGGAGAACC
CCGGCCUGGGCCGCAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGGA
CAACUGCAACCAGAACGGCGCCAUCAGCCUGAUCUUCAGCCUGAAGGAGGAGGUG
GGCGCCCUUGGCCAAGGUGCUGCGCCUGUUCGAGGAGAACGACGUGAACCUGACCC
ACAUCGAGAGCCGCCCCAGCCGCCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCUUCACCCA
CCUGGACAAGCGCAGCCUGCCCGCCUGACCAACAUCAUCAAGAUCUGCGCCAC
GACAUCGGCGCCACCGUGCAGCAGCUGAGCCGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGC
CCUGGUUCCCCCGCACCAUCCAGGAGCUGGACCGCUUCGCCAACCAAGAUCCUGAG
CUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCCUUAAGGACCCCGUGUACCGC
GCCCCGCCGCAAGCAGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGCCACGGCCAGCCCA
UCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGAAGACCUGGGGCACCGUGUACA
AGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAACCACAUCUU
CCCCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCCUUCACGAGGACAACAUCCCCAGCUGGAG
GACGUGAGCCAGUUCUGCAGACCUGCACC GGCUUCGCCUGCGCCCCGUGGCCG
GCCUGCUGAGCAGCCGCGACUUCUGGGCGGCCUGGCCUUCGCGUGUUCACUG
CACCCAGUACAUCCGCCACGGCAGCAAGCCCAUGUACACCCCGAGCCCGACAUC
UGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGCAGCUUCGCCAGU
UCAGCCAGGAGAUCCGCCUGGCCAGCCUGGGCGCCCCCGACGAGUACAUCGAGAA
GCUGGCCACCAUCUACUGGUUACCGUGGAGUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGAC
AGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGCAGUACU
GCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGCCCCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCA
GAACUACACCGUGACCGAGUUCAGCCCCUGUACUACGUGGCCGAGAGCUUCAAC
GACGCCAAGGAGAAGGUGCGCAACUUCGCCGCCACCAUCCCCCGCCCCUUCAGCG
UGCGCUACGACCCCUACACCCAGCGCAUCGAGGUGCUGGACAACACCCAGCAGCU
GAAGAUCUGGCCGACAGCAUCAACAGCGAGAUCCGGAUCCUGUGCAGCGCCUG
CAGAAGAUCAAGUAAGGGUGGCAUCCCUUGUACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGG
CCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUG
CAUCAAAGCU (配列番号 7) を含んだ。

30

40

【0158】

別の例では、コドン最適化ヒト PAH メッセンジャー RNA は、

50

【化 9】

GGACAGAUCCGUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACC
CCGGCCUGGGCCGCAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGGA
CAACUGCAACCAGAACGGCGCCAUCAGCCUGAUUCUUCAGCCUGAAGGAGGAGGUG
GGCGCCUGGCCAAGGUGCUGCGCCUGUUCGAGGAGAACGACGUGAACCUGACCC
ACAUCGAGAGCCGCCCCAGCCGCCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCUUCACCCA
CCUGGACAAGCGCAGCCUGCCCGCCUGACCAACAUCAUCAAGAUCUGCGCCAC
GACAUCGGCGCCACCGUGCACGAGCUGAGCCGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGC
CCUGGUUCCCCCGCACCAUCCAGGAGCUGGACCGCUUCGCCAACCAGAUCCUGAG
CUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCAAGGACCCCGUGUACCGC
GCCCCCGCAAGCAGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGCCACGGCCAGCCCA
UCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGAAGACCUGGGGGACCGUGUUA
AGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAACCACAUCU
CCCCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCUUCCACGAGGACAACAUCCTCCAGCUGGAG
GACGUGAGCCAGUUCUGCAGACCUGCACCGGCUUCCGCCUGCGCCCCGUGGCCG
GCCUGCUGAGCAGCCGCGACUUCUGGGCGGCCUGGCCUUCGCGUGUUCACUG
CACCCAGUACAUCCGCCACGGCAGCAAGCCCAUGUACACCTCCGAGCCCGACAUC
UGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGCAGCUUCGCCAGU
UCAGCCAGGAGAUCCGGCCUGGCCAGCCUGGGCGCCCCCGACGAGUACAUCGAGAA
GCUGGCCACCAUCUACUGGUUACCGUGGAGUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGAC
AGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGCAGUACU
GCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGCCCCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCA
GAACUACACCGUGACCGAGUUCAGCCCCUGUACUACGUGGCCGAGAGCUUCAAC
GACGCCAAGGAGAAGGUGCGCAACUUCGCCGCCACCAUCCCCCGCCCCUUCAGCG
UGCGCUACGACCCCUACACCCAGCGCAUCGAGGUGCUGGACAACACCCAGCAGCU
GAAGAUCUGGCCGACAGCAUACAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCAGCGCCUG
CAGAAGAUCAAGUACGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUG
GCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUU
GCAUCAAGCU(配列番号 8)を含んだ。

10

20

【0159】

合成コドン最適化ヒト PAH mRNA は、HEK293T 細胞にトランスフェクトされ、24 時間後に分析された。細胞溶解及び処理により、ヒト PAH は、ウェスタンブロット分析を介して良好に検出された(図 1 を参照)。

30

【0160】

製剤プロトコル

50 mg/mL の cKK-E12、DOPE、コレステロール、及び DMG-PEG2K のエタノール溶液のアリコートを混合し、エタノールで 3 mL の最終容量に希釈した。別に、1 mg/mL のストックから PAH mRNA の水性緩衝溶液(10 mM のクエン酸塩/150 mM の NaCl、pH 4.5)を調製した。脂質溶液を水性 mRNA 溶液に迅速に注入し、振盪させ、20%エタノール中の最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を濾過し、1×PBS(pH 7.4)で透析濾過し、濃縮し、2~8℃で保管した。最終濃度=1.28 mg/mL PAH mRNA(封入)。Z_{平均}=79 nm; PDI=0.12。

40

【0161】

実施例 2. hPAH mRNA 装填リポソームナノ粒子の投与

本実施例は、hPAH mRNA 装填リポソームナノ粒子を投与する例示的な方法、ならびにインビボの様々な標的組織で送達された mRNA、及びその後発現した hPAH タンパク質を分析するための方法を例示する。

【0162】

全ての試験は、各実験の開始時におよそ 6~8 週齢の雄の CD-1 マウスまたは PAH ノックアウトマウスを使用して行われた。試料は、1.0 mg/kg(ないしは別の方法

50

で特定される)の当量総用量の封入されたPAH mRNAの単回ボーラス尾静脈注射により導入された。マウスは、指定された時間点で屠殺され、生理食塩水で灌流された。

【0163】

分析用の臓器組織の単離

各マウスの肝臓、脾臓、腎臓、及び心臓を採取し、個別の部分に分配し、分析用に10%の中性緩衝ホルマリン中に保管するか、または瞬間凍結し、-80℃で保管するかのいずれかであった。

【0164】

分析用の血漿の単離

全ての動物は、用量投与後の指定された時間点でCO₂致死(±5%)により安楽死され、続いて、開胸及び末端心血採取を行った。全血(最大取得可能容量)を、安楽死させた動物の心臓穿刺を介して血清分離管内に採取し、少なくとも30分間、室温で凝固させ、22℃±5℃で、10分間9300gで遠心分離し、血清を抽出した。中間採血に関して、およそ40~50μLの全血が、顔面静脈穿刺、または尾切除により採取された。未処置動物から採取された試料は、動物を試験するために、比較のための基準フェニルアラニンレベルとして使用された。

【0165】

フェニルアラニン分析

フェニルアラニンのレベルは、市販のキット(BioAssay Systems E PHE-100)を使用し、製造者のプロトコルに従い測定された。

【0166】

酵素結合免疫吸着測定(ELISA)分析-hPAH ELISA

捕捉抗体としてヤギポリクローナル抗hPAH抗体(Novus NBP1-52084)と、二次(検出)抗体としてウサギ抗hPAHポリクローナル抗体(Sigma(HPA02807))を採用する標準的なELISA手順に従った。ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)抱合ヤギ抗ウサギIgGは、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液の活性のために使用された。20分後に2N H₂SO₄を用いて反応をクエンチした。検出は、Molecular Device Flex Station機器で、吸収(450nm)を介してモニターされた。未処置マウスの肝臓及びヒトhPAHタンパク質は、それぞれ、陰性及び陽性対照として使用された。

【0167】

実施例3. インビボタンパク質産生及び臨床有効性

本実施例は、hPAH mRNAの投与がインビボで良好なタンパク質産生及び臨床有効性をもたらすことを示す。

【0168】

送達されたmRNAがインビボで良好にタンパク質に翻訳されたかを決定するために、処置されたマウスの肝臓で検出されたヒトPAHタンパク質の定量化が、ELISAに基づく方法を介して達成された(図2)。図3は、未処置の野生型マウスの肝臓により確認されたように、マウス相同体との交差反応なく、ヒトPAHタンパク質の明らかな産生が観察されたことをさらに示す。投与6~12時間後、1mg当たりおよそ300ng(試料中総タンパク質)のhPAHタンパク質が検出された(図3を参照)。

【0169】

臨床有効性を決定するために、我々は、PKU疾患モデルのPAHノックアウトマウスの血清フェニルアラニンレベルにおいて、mRNA送達の効果を評価した。未処置PAHノックアウトマウスのフェニルアラニンレベルは、野生型マウスと比較して非常に高かった(約1450μM対約50μM)。図4に示されるように、これらのノックアウトマウスをPAH mRNAで治療したとき、フェニルアラニンのレベルは、投薬の6時間以内に野生型のレベルに下がった。このデータは、hPAH mRNA療法がPKUの治療に非常に有効であることを示す。

【0170】

10

20

30

40

50

実施例 4. インビボでの hPAH mRNA の検出

本実施例は、hPAH mRNA の投与後、PAH mRNA が少なくとも 72 時間の間、マウスの肝臓において検出可能であることを示す。

【0171】

実施例 2 に上述されるように、単回用量 (1.0 mg/kg) の hPAH mRNA 装填 cKK-E12 系脂質ナノ粒子または生理食塩水 (すなわち、対照) をマウスに投与した。hPAH mRNA の投与 30 分、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、及び 7 日後にマウスを屠殺し、肝臓を採取した。hPAH mRNA の存在を検出するために、肝臓の *in situ* ハイブリダイゼーションが行われた (図 5A ~ 5I)。hPAH mRNA の存在は、投与後少なくとも 72 時間の間、観察可能であった (図 5A ~ 5G)。hPAH mRNA は、類洞細胞ならびに肝細胞において検出可能であった。これらのデータは、hPAH mRNA が投与後少なくとも 72 時間の間、肝臓において検出され得ることを示す。

10

【0172】

実施例 5. hPAH mRNA を用いた用量応答治療後の PAH ノックアウトマウスにおけるヒト PAH タンパク質レベル及び血清フェニルアラニンレベル

本実施例は、投与された hPAH mRNA の量と、肝臓において発現されたヒト PAH タンパク質及び血清フェニルアラニンレベルの両方の量との間の用量応答を示す。

【0173】

PAH ノックアウトマウスは、実施例 2 に上述されるように、 0.25 mg/kg 、 0.50 mg/kg 、 0.75 mg/kg 、または 1.0 mg/kg の単回用量の hPAH mRNA 装填 cKK-E12 系脂質ナノ粒子または生理食塩水 (すなわち、対照) を投与された。血清試料は、投薬前及び投薬 6 時間後 (すなわち、投与後) にマウスから採取された。マウスを投与 6 時間後に屠殺し、肝臓を採取した。

20

【0174】

肝臓におけるヒト PAH タンパク質レベルは、ELISA により測定された。これらのデータは、全ての用量で、対照に対して、増加したレベルの hPAH タンパク質が検出されたことを示す (図 6)。これらのデータは、投与された hPAH mRNA の量と、肝臓において発現された PAH タンパク質の量との間の用量応答を示す。例えば、 1.0 mg/kg の hPAH mRNA を投与されたマウスは、およそ 1000 ng の PAH/mg の総タンパク質を発現した一方、 0.25 mg/kg の hPAH mRNA を投与されたマウスは、およそ 200 ng の PAH/mg の総タンパク質を発現した。

30

【0175】

フェニルアラニンの血清レベルは、処置前及び処置後の試料において定量化された (図 7)。これらのデータは、投薬前対照に対して、全ての治療用量で、血清フェニルアラニンの減少ならびに用量応答を示す。例えば、 1.0 mg/kg の hPAH mRNA を投与されたマウスは、 0.25 mg/kg を投与されたもの (すなわち、 $1500 \mu\text{M}$ 未満) より低レベルのフェニルアラニン (すなわち、 $500 \mu\text{M}$ 未満) を示した。

【0176】

実施例 6. 1 ヶ月間 hPAH mRNA で処置された後の PAH ノックアウトマウスにおけるヒト PAH タンパク質及び血清フェニルアラニンレベル

40

本実施例は、1 ヶ月にわたる hPAH mRNA での処置が肝臓において hPAH タンパク質レベルの増加、及び血清フェニルアラニンレベルの減少をもたらすことを示す。

【0177】

PAH ノックアウトマウスは、実施例 2 に上述されるように、1 ヶ月間、週に 1 回、 0.5 mg/kg もしくは 1.0 mg/kg の単回用量の hPAH mRNA 装填 cKK-E12 系脂質ナノ粒子、または 1 ヶ月間、隔週で 1 回、 1.0 mg/kg の hPAH mRNA 装填 cKK-E12 系脂質ナノ粒子、または生理食塩水 (すなわち、対照) を投与された。血清は、初回投薬前 (すなわち、投薬前)、及び各投薬の 6 時間後にマウスから採取された。マウスを 29 日目の最終用量の投与 6 時間後に屠殺し、肝臓を採取した。

50

【0178】

肝臓におけるヒトPAHタンパク質レベルは、ELISAにより測定された。これらのデータは、全ての用量で、対照に対して、増加したレベルのhPAHタンパク質が検出されたことを示す（図8）。

【0179】

フェニルアラニンの血清レベルは、処置前及び処置後の試料において定量化された（図9）。これらのデータは、投薬前対照試料に対して、全ての治療用量で、血清フェニルアラニンの減少を示す。これらのデータはまた、hPAH mRNAが隔週で投与されたときでも、高用量（すなわち、 1.0 mg/kg ）が血清フェニルアラニンのレベルのより低下をもたらしたことを示す。

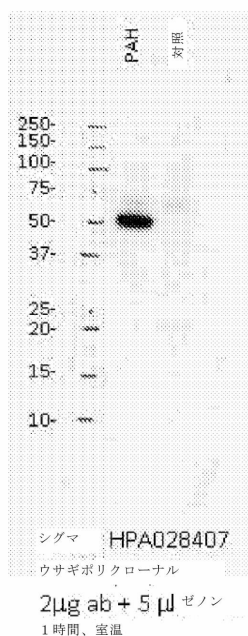
10

等価物

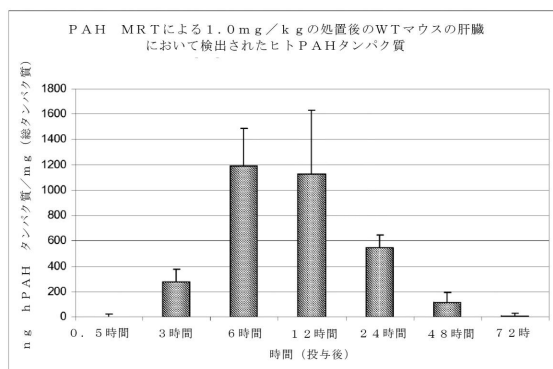
【0180】

当業者は、単なる日常的な実験を使用して、本明細書に記載される発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識する、または把握することができるだろう。本発明の範囲は、上記の説明に限定されることを意図せず、むしろ以下の特許請求の範囲に記述される通りである。

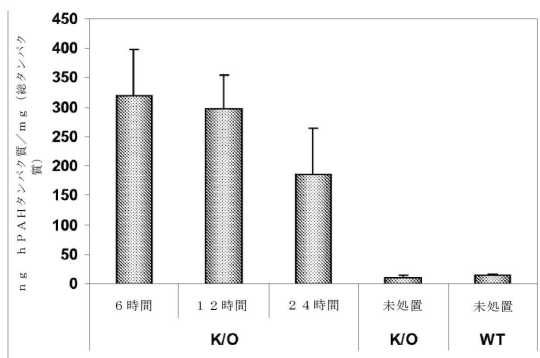
【図1】



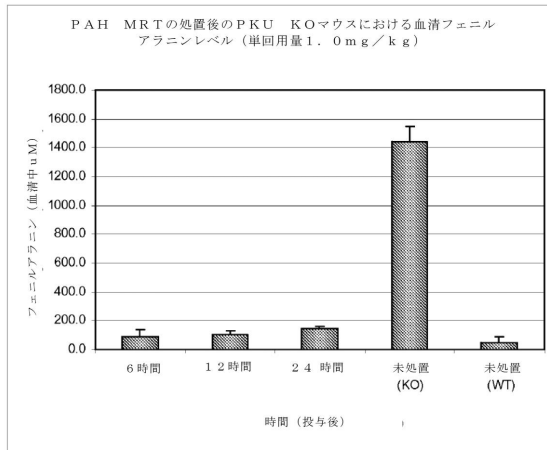
【図2】



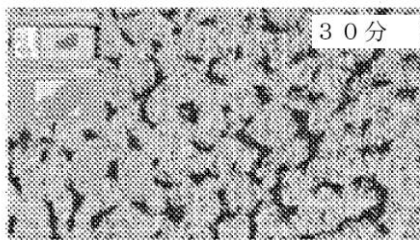
【図3】



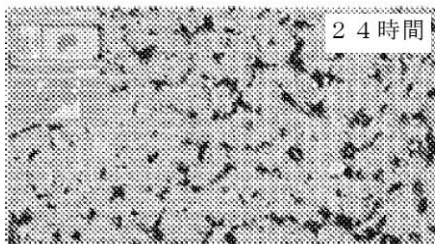
【図 4】



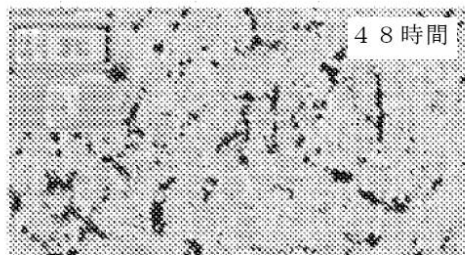
【図 5 A】



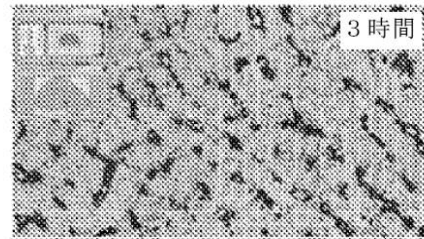
【図 5 E】



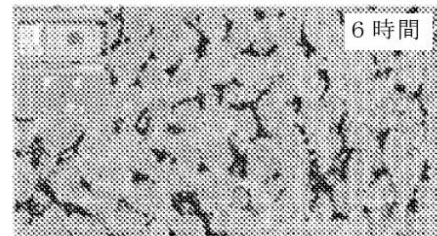
【図 5 F】



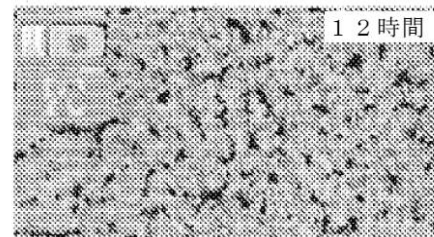
【図 5 B】



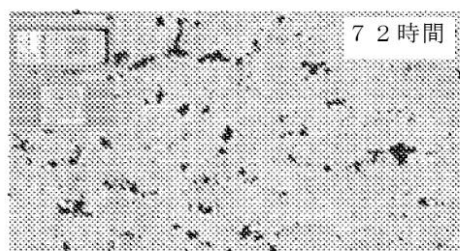
【図 5 C】



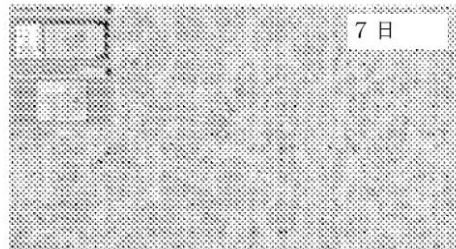
【図 5 D】



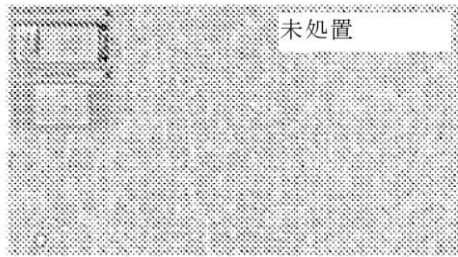
【図 5 G】



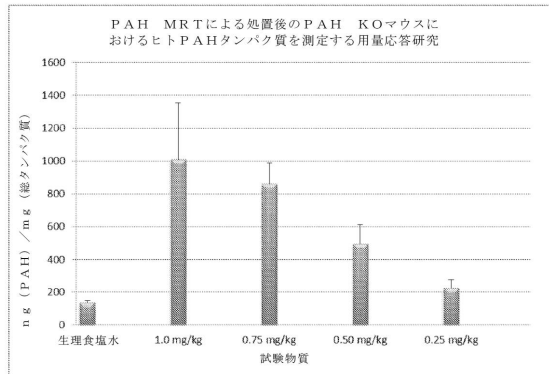
【図 5 H】



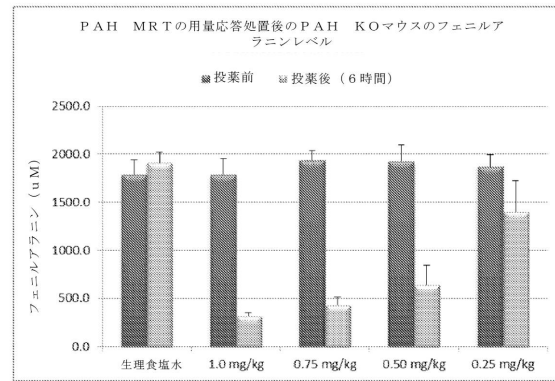
【図 5 I】



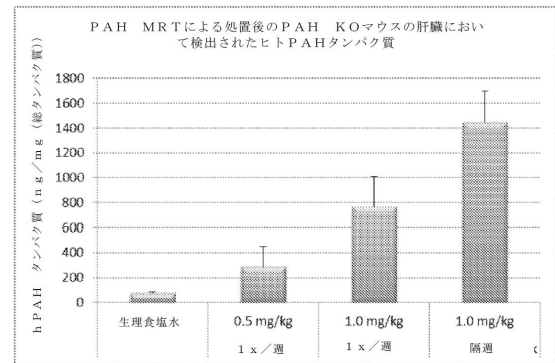
【図 6】



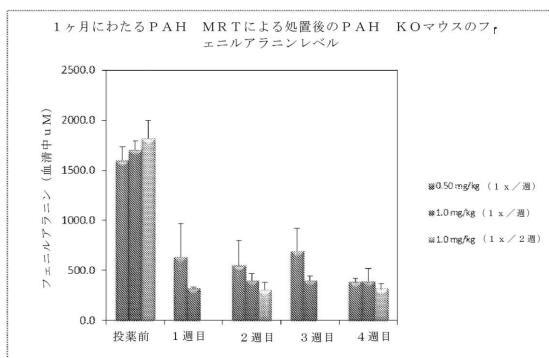
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

0006506749000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/24	(2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/28	(2006.01)	A 6 1 K 47/28
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 デローザ, フランク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0
0

(72)発明者 ハートレイン, マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0
0

(72)発明者 ディアス, アヌシャ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0
0

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 3 / 0 6 3 4 6 8 (WO, A 1)

Mol Ther, 2 0 1 3 年 5 月, Vol.21, Sup.1, S136, Abstract 354

Eur J Pharm Biopharm, 2 0 0 9 年, Vol.71, p.484-489

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

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