(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-527875
(P2023-527875A)
(43)公表日　令和5年6月30日(2023.6.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/53 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/53		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*38/43 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/43	ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*3/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全230頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-573670(P2022-573670)
(86)(22)出願日　令和3年6月1日(2021.6.1)
(85)翻訳文提出日　令和5年1月30日(2023.1.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/035154
(87)国際公開番号　WO2021/247507
(87)国際公開日　令和3年12月9日(2021.12.9)
(31)優先権主張番号　63/032,875
(32)優先日　令和2年6月1日(2020.6.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(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,AT,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

(71)出願人　518216249
モダーナティエックス・インコーポレイテッド
ＭｏｄｅｒｎａＴＸ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア２００番
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田 憲史
(74)代理人　100157956
弁理士　稲井 史生
(74)代理人　100170520
弁理士　笹倉 真奈美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　フェニルアラニンヒドロキシラーゼバリアント及びその使用

(57)【要約】
所定のアミノ酸残基に置換を有するバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドを開示する。バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチド、またはバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、フェニルケトン尿症のような障害を治療する方法も開示する。
【選択図】図１

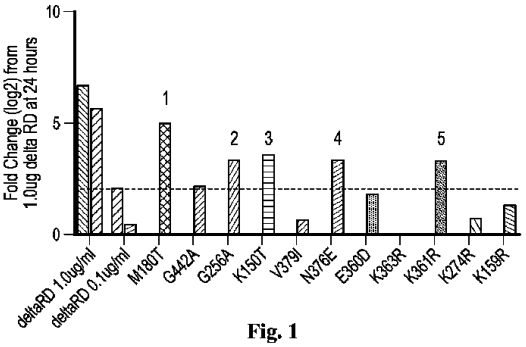


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１の１１８～４５２番目のアミノ酸と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、
（ａ）前記アミノ酸配列が、配列番号１の１８０位に対応する位置に、置換された、メチオニン以外のアミノ酸を含むか、
（ｂ）前記アミノ酸配列が、配列番号１の１５０位に対応する位置に、置換された、リシン以外のアミノ酸を含むか、
（ｃ）前記アミノ酸配列が、配列番号１の２５６位に対応する位置に、置換された、グリシン以外のアミノ酸を含むか、
（ｄ）前記アミノ酸配列が、配列番号１の３７６位に対応する位置に、置換された、アスパラギン以外のアミノ酸を含むか、または
（ｅ）前記アミノ酸配列が、配列番号１の３６１位に対応する位置に、置換された、リシン以外のアミノ酸を含み、
前記ポリペプチドが四量体化すると、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ活性を示す、前記ポリペプチド。
【請求項２】
前記配列番号１の１８０位に対応する位置のメチオニン残基が、トレオニンに置換されている、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
前記配列番号１の１５０位に対応する位置のリシン残基が、トレオニンに置換されている、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４】
前記配列番号１の２５６位に対応する位置のグリシン残基が、アラニンに置換されている、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５】
前記配列番号１の３７６位に対応する位置のアスパラギン残基が、グルタミン酸に置換されている、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記配列番号１の３６１位に対応する位置のリシン残基が、アルギニンに置換されている、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記アミノ酸配列が、配列番号１の１１８～４５２番目のアミノ酸と少なくとも９０％同一である、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項８】
前記アミノ酸配列が、配列番号１の１１８～４５２番目のアミノ酸と少なくとも９５％同一である、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項９】
前記アミノ酸配列が、配列番号１と少なくとも９０％同一である、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
前記アミノ酸配列が、配列番号１と少なくとも９５％同一である、請求項１～６のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
配列番号３に定められたアミノ酸配列含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
配列番号４に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
配列番号５に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１４】

配列番号６に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
配列番号７に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
配列番号８に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
配列番号９に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
配列番号１０に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
配列番号１１に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項２０】
配列番号１２に定められたアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか１項に記載のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むポリヌクレオチド。
【請求項２２】
請求項２１に記載のポリヌクレオチドを含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）。
【請求項２３】
前記ＯＲＦが、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１のヌクレオチド配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である、請求項２２に記載のｍＲＮＡ。
【請求項２４】
前記ＯＲＦが、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１のヌクレオチド配列と１００％同一である、請求項２２に記載のｍＲＮＡ。
【請求項２５】
配列番号５５または配列番号５６と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一な核酸配列を含む５’ＵＴＲを含む、請求項２２～２４のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項２６】
配列番号１１３、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１１２、配列番号１１４、配列番号１０９、配列番号１１０または配列番号１１１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一な核酸配列を含む３’ＵＴＲを含む、請求項２２～２５のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項２７】
配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号２５０または配列番号２５１のヌクレオチド配列を含む、請求項２２に記載のｍＲＮＡ。
【請求項２８】
５’末端キャップを含む、請求項２２～２７のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項２９】
前記５’末端キャップが、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’－フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジドグアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、５’メチルＧというキャップ、またはこれらのアナログを含む、請求項２

８に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３０】
ポリＡ領域を含む、請求項２２～２９のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３１】
前記ポリＡ領域が、少なくとも約１０ヌクレオチド長、少なくとも約２０ヌクレオチド長、少なくとも約３０ヌクレオチド長、少なくとも約４０ヌクレオチド長、少なくとも約５０ヌクレオチド長、少なくとも約６０ヌクレオチド長、少なくとも約７０ヌクレオチド長、少なくとも約８０ヌクレオチド長、少なくとも約９０ヌクレオチド長または少なくとも約１００ヌクレオチド長である、請求項３０に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３２】
前記ポリＡ領域が、少なくとも約１００ヌクレオチド長である、請求項３１に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３３】
前記ポリＡ領域に対して、前記ｍＲＮＡの３’末端に位置するＵＣＵＡＧＡＡＡ

、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である、請求項４０に記載の発現ベクター。
【請求項４２】
前記ＯＲＦが、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１のヌクレオチド配列と１００％同一である、請求項４０に記載の発現ベクター。
【請求項４３】
プラスミド、最小限免疫学的に定義された遺伝子発現（ＭＩＤＧＥ）ベクター、末端閉鎖型直鎖状２本鎖ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）またはウイルスベクターである、請求項４０～４２のいずれか１項に記載の発現ベクター。
【請求項４４】
転写調節エレメントを含む、請求項４０～４３のいずれか１項に記載の発現ベクター。
【請求項４５】
前記転写調節エレメントが、プロモーター、エンハンサーまたは終止配列である、請求項４４に記載の発現ベクター。
【請求項４６】
請求項２１に記載のポリヌクレオチド、請求項２２～３９のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ、または請求項４０～４５のいずれか１項に記載の発現ベクターを含む脂質ナノ粒子。
【請求項４７】
（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）コレステロール及び（ｉｉｉ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化合物Ｉ、
（ｉ）化合物ＶＩ、（ｉｉ）コレステロール及び（ｉｉｉ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化合物Ｉ、
（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）ＤＳＰＣもしくはＤＯＰＥ、（ｉｉｉ）コレステロール及び（ｉｖ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化合物Ｉ、
（ｉ）化合物ＶＩ、（ｉｉ）ＤＳＰＣもしくはＤＯＰＥ、（ｉｉｉ）コレステロール及び（ｉｖ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化合物Ｉ、
（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）コレステロール及び（ｉｉｉ）化合物Ｉ、または
（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）ＤＳＰＣもしくはＤＯＰＥ、（ｉｉｉ）コレステロール及び（ｉｖ）化合物Ｉ、
を含む、請求項４６に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項４８】
請求項１～２０のいずれか１項に記載のポリペプチド、請求項２１に記載のポリヌクレオチド、請求項２２～３９のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ、または請求項４０～４５のいずれか１項に記載の発現ベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。
【請求項４９】
請求項４６または４７に記載の脂質ナノ粒子含む医薬組成物。
【請求項５０】
フェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドを発現させることを必要とするヒト対象において、フェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドを発現させる方法であって、前記ヒト対象に、請求項１～２０のいずれか１項に記載のポリペプチド、請求項２１に記載のポリヌクレオチド、請求項２２～３９のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ、請求項４０～４５のいずれか１項に記載の発現ベクター、請求項４６もしくは４７に記載の脂質ナノ粒子、または請求項４８もしくは４９に記載の医薬組成物を有効量投与することを含む前記方法。
【請求項５１】
フェニルアラニンヒドロキシラーゼ活性を向上させることを必要とするヒト対象において、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ活性を向上させる方法であって、前記ヒト対象に、請求項１～２０のいずれか１項に記載のポリペプチド、請求項２１に記載のポリヌクレ

オチド、請求項２２～３９のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ、請求項４０～４５のいずれか１項に記載の発現ベクター、請求項４６もしくは４７に記載の脂質ナノ粒子、または請求項４８もしくは４９に記載の医薬組成物を有効量投与することを含む前記方法。

【請求項５２】

フェニルケトン尿症の発症及び／または進行を治療、予防または遅延することを必要とするヒト対象において、フェニルケトン尿症の発症及び／または進行を治療、予防または遅延する方法であって、前記ヒト対象に、請求項１～２０のいずれか１項に記載のポリペプチド、請求項２１に記載のポリヌクレオチド、請求項２２～３９のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ、請求項４０～４５のいずれか１項に記載の発現ベクター、請求項４６もしくは４７に記載の脂質ナノ粒子、または請求項４８もしくは４９に記載の医薬組成物を有効量投与することを含む前記方法。

【請求項５３】

フェニルアラニンレベルを低下させることを必要とするヒト対象において、フェニルアラニンレベルを低下させる方法であって、前記ヒト対象に、請求項１～２０のいずれか１項に記載のポリペプチド、請求項２１に記載のポリヌクレオチド、請求項２２～３９のいずれか１項に記載のｍＲＮＡ、請求項４０～４５のいずれか１項に記載の発現ベクター、請求項４６もしくは４７に記載の脂質ナノ粒子、または請求項４８もしくは４９に記載の医薬組成物を有効量投与することを含む前記方法。

【請求項５４】

前記フェニルアラニンレベルが、血液中、血漿中、血清中、肝臓中及び／または尿中のフェニルアラニンレベルである、請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド、前記ｍＲＮＡ、前記発現ベクター、前記脂質ナノ粒子または前記医薬組成物を静脈内投与する、請求項５０～５４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５６】

前記ポリペプチド、前記ポリヌクレオチド、前記ｍＲＮＡ、前記発現ベクター、前記脂質ナノ粒子または前記医薬組成物を皮下投与する、請求項５０～５４のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本願は、２０２０年６月１日に出願した米国特許仮出願第６３／０３２，８７５号に基づく優先権の利益を主張するものであり、その仮出願の内容は、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【０００２】

配列表

本願には、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出した配列表が含まれ、その表は、参照により、全体が本明細書に援用される。２０２１年６月１日に作成した前記ＡＳＣＩＩコピーは、４５８１７－００８８ＷＯ１＿ＳＬ．ｔｘｔという名称であり、３０５，６０８バイトのサイズである。

【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）の欠損に起因する常染色体劣性先天性代謝異常である。この疾患は、すべての民族で見られ、その発生率は、世界各国で大きく変動し、北欧での発生率が最も高い。ＰＫＵは主に、触媒活性を低下させる、ＰＡＨ遺伝子の変異を原因とし、その変異は、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）の異化経路に影響を及ぼす。ＰＡＨ酵素は、Ｐｈｅをチロシン（Ｔｙｒ）に変換するためには、補因子テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の活性を必要とする。

ＰＡＨまたはその補因子のいずれかが欠損すると、過剰なフェニルアラニンが蓄積する。これは、未治療のままにすると、重篤かつ不可逆性の知的障害が現れることがある。未治療のＰＫＵと関連する他の臨床的特色としては、自閉的行動、運動欠損、湿疹性発疹及び発作が挙げられる。行動障害及び精神障害は概ね、年齢とともに現れる。

【０００４】

現在、ＰＫＵには治療法がない。一般的な治療は主に、Ｐｈｅの摂取を、正常な成長のために必要な最小限に制限し、特別設計の医療食で補うことによるものである。しかしながら、現在の食事療法には、（ｉ）食事の不味による、食事療法コンプライアンス、（ｉｉ）早期介入にもかかわらず、根強く残る神経学的問題または精神学的問題、及びクオリティオブライフ不良、（ｉｉｉ）食事制限に起因する栄養欠乏の可能性、ならびに（ｉｖ）特別な医療食及び栄養補助剤のコストによる経済的負担という少なくとも４つの大きな問題がある。

【０００５】

補因子ＢＨ４に変異を有する高フェニルアラニン血症患者の一群には、典型的には、サプロプテリンという合成ＢＨ４アナログを治療に使用する。ＰＡＨ欠損によるＰＫＵと、ＢＨ４欠損によるＰＫＵは、ＢＨ４負荷試験によって識別できる。合成ビオプテリン化合物またはサプロプテリンによる治療は、ＢＨ４反応性ＰＫＵ患者においては、古典型ＰＫＵ患者（新生児スクリーニング（ＰＡＨｄｂ、ｐａｈｄｂ．ｍｃｇｉｌｌ．ｃａ）によって検出された患者の約５０～８０％を占める）の約９０％で、概ねうまくいっているが、ＢＨ４療法には、有益な作用はない。

【発明の概要】

【０００６】

本開示は、バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドと、そのバリアントポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを提供する。フェニルアラニンヒドロキシラーゼの所定のアミノ酸残基の置換は、タンパク質の発現及び／または生物活性を増大させることが見出されている。

【０００７】

一態様では、本発明は、配列番号１の１１８～４５２番目のアミノ酸と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド（本明細書では、「バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチド」という）を特色とし、（ａ）そのアミノ酸配列は、配列番号１の１８０位に対応する位置に、置換された、メチオニン以外のアミノ酸を含むか、（ｂ）そのアミノ酸配列は、配列番号１の１５０位に対応する位置に、置換された、リシン以外のアミノ酸を含むか、（ｃ）そのアミノ酸配列は、配列番号１の２５６位に対応する位置に、置換された、グリシン以外のアミノ酸を含むか、（ｄ）そのアミノ酸配列は、配列番号１の３７６位に対応する位置に、置換された、アスパラギン以外のアミノ酸を含むか、または（ｅ）そのアミノ酸配列は、配列番号１の３６１位に対応する位置に、置換された、リシン以外のアミノ酸を含み、そのポリペプチドは、四量体化すると、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ活性を示す。

【０００８】

バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１８０位に対応する位置のメチオニン残基は、トレオニンで置換されている。

【０００９】

バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１８０位に対応する位置のメチオニン残基は、アラニンで置換されている。

【００１０】

バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１８０位に対応する位置のメチオニン残基は、グルタミンで置換されている。

【００１１】

バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１８０位に対応する位置のメチオニン残基は、アスパラギンで置換されている。

【００１２】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１５０位に対応する位置のリシン残基は、トレオニンで置換されている。
【００１３】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１５０位に対応する位置のリシン残基は、アルギニンで置換されている。
【００１４】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１５０位に対応する位置のリシン残基は、プロリンで置換されている。
【００１５】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の１５０位に対応する位置のリシン残基は、アスパラギンで置換されている。
【００１６】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の２５６位に対応する位置のグリシン残基は、アラニンで置換されている。
【００１７】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の２５６位に対応する位置のグリシン残基は、バリンで置換されている。
【００１８】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の３７６位に対応する位置のアスパラギン残基は、グルタミン酸で置換されている。
【００１９】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の３７６位に対応する位置のアスパラギン残基は、リシンで置換されている。
【００２０】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の３６１位に対応する位置のリシン残基は、アルギニンで置換されている。
【００２１】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドの一実施形態では、配列番号１の３６１位に対応する位置のリシン残基は、グルタミン酸で置換されている。
【００２２】
本明細書に記載されているバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列は、特定された置換を含み、配列番号１の１１８～４５２番目のアミノ酸と少なくとも９０％同一である。
【００２３】
本明細書に記載されているバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列は、特定された置換を含み、配列番号１の１１８～４５２番目のアミノ酸と少なくとも９５％同一である。
【００２４】
本明細書に記載されているバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列は、特定された置換を含み、配列番号１と少なくとも９０％同一である。
【００２５】
本明細書に記載されているバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドのうちのいずれかのいくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列は、特定された置換を含み、配列番号１と少なくとも９５％同一である。
【００２６】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号３に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。

【００２７】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号４に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００２８】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号５に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００２９】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号６に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００３０】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号７に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００３１】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号８に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００３２】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号９に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００３３】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号１０に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００３４】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号１１に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００３５】
いくつかの実施形態では、そのバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドは、配列番号１２に定められたアミノ酸配列を含む（またはそのアミノ酸配列からなる）。
【００３６】
本開示は、本明細書に記載されているバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドのいずれかをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むポリヌクレオチドも特色とする。
【００３７】
本開示は、本明細書に記載されているバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドのいずれかをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドを含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）も特色とする。ｍＲＮＡ医薬は特に、ＰＫＵの治療にかなり適している。その技術は、バリアントＰＡＨをコードするｍＲＮＡを細胞内に送達させた後に、標的細胞内で、機能的なバリアントＰＡＨタンパク質をｄｅ　ｎｏｖｏ合成するからである。本発明は、（１）望ましくない免疫の活性化（例えば、外来核酸の体内への導入に伴う自然免疫応答）を最小限に抑え、（２）ｍＲＮＡのタンパク質への翻訳の効率を最適化するために、治療用ｍＲＮＡ内に、修飾ヌクレオチドを導入することを特色とする。本開示の例示的態様は、自然免疫応答を軽減するために、ヌクレオチドの改変を組み合わせるこ

と、及び配列の最適化、特には、タンパク質の発現を増強するために、バリアントＰＡＨをコードする治療用ｍＲＮＡのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）内の配列を最適化することを特色とする。

【００３８】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ＯＲＦは、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１のヌクレオチド配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である。

【００３９】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ＯＲＦは、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１のヌクレオチド配列と１００％同一である。

【００４０】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、配列番号５５または配列番号５６と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一である核酸配列を含む５’ＵＴＲを含む。

【００４１】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、配列番号１１３、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１１２、配列番号１１４、配列番号１０９、配列番号１１０または配列番号１１１の少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一である核酸配列を含む３’ＵＴＲを含む。

【００４２】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号２５０または配列番号２５１のヌクレオチド配列を含む。

【００４３】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、５’末端キャップ（例えば、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’－フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジドグアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、５’メチルＧキャップまたはこれらのアナログ）を含む。

【００４４】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ポリＡ領域を含む（例えば、ポリＡ領域は、少なくとも約１０ヌクレオチド長、少なくとも約２０ヌクレオチド長、少なくとも約３０ヌクレオチド長、少なくとも約４０ヌクレオチド長、少なくとも約５０ヌクレオチド長、少なくとも約６０ヌクレオチド長、少なくとも約７０ヌクレオチド長、少なくとも約８０ヌクレオチド長、少なくとも約９０ヌクレオチド長または少なくとも約１００ヌクレオチド長である）。いくつかの実施形態では、そのｍＲＮＡは、ポリＡ領域に対して、そのｍＲＮＡの３’末端に位置するＵＣＵＡＧＡＡＡ

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡのウラシルのすべては、Ｎ１－メチルシュードウラシルである。

【００４７】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ＯＲＦは、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１と１００％同一であり、そのｍＲＮＡは、少なくとも約１００ヌクレオチド長のポリＡ領域を含み、そのｍＲＮＡのウラシルのすべては、Ｎ１－メチルシュードウラシルである。

【００４８】

本明細書に記載されているｍＲＮＡのいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、Ｎ７のメチル化を含むグアニンキャップヌクレオチドを含む５’末端キャップを含み、そのｍＲＮＡの５’末端ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチルを含み、そのｍＲＮＡは、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号２５０または配列番号２５１のヌクレオチド配列を含み、そのｍＲＮＡは、少なくとも約１００ヌクレオチド長のポリＡ領域を含み、そのｍＲＮＡのウラシルのすべては、Ｎ１－メチルシュードウラシルである。いくつかの実施形態では、そのｍＲＮＡは、ポリＡ領域に対して、そのｍＲＮＡの３’末端に位置するＵＣＵＡＧＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ（配列番号２１１）というヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、そのｍＲＮＡは、そのｍＲＮＡの３’末端に、逆位デオキシチミジンを含む。

【００４９】

本開示は、本明細書に記載されているバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドのいずれかをコードするＯＲＦを含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターも特色とする。

【００５０】

本明細書に記載されている発現ベクターのいくつかの実施形態では、ＯＲＦは、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１のヌクレオチド配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一である。

【００５１】

本明細書に記載されている発現ベクターのいくつかの実施形態では、ＯＲＦは、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１のヌクレオチド配列と１００％同一である。

【００５２】

本明細書に記載されている発現ベクターのいくつかの実施形態では、発現ベクターは、プラスミド、最小限免疫学的に定義された遺伝子発現（ＭＩＤＧＥ）ベクター、末端閉鎖型直鎖状２本鎖ＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）またはウイルスベクターである。

【００５３】

本明細書に記載されている発現ベクターのいくつかの実施形態では、発現ベクターは、転写調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサーまたは終止配列）を含む。

【００５４】

本開示は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド、本明細書に記載されているｍＲＮＡ、または本明細書に記載されている発現ベクターを含む脂質ナノ粒子も特色とする。いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、

（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）コレステロール及び（ｉｉｉ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化合物Ｉ、

（ｉ）化合物ＶＩ、（ｉｉ）コレステロール及び（ｉｉｉ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化

合物Ｉ、
（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）ＤＳＰＣもしくはＤＯＰＥ、（ｉｉｉ）コレステロール及び（ｉｖ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化合物Ｉ、
（ｉ）化合物ＶＩ、（ｉｉ）ＤＳＰＣもしくはＤＯＰＥ、（ｉｉｉ）コレステロール及び（ｉｖ）ＰＥＧ－ＤＭＧもしくは化合物Ｉ、
（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）コレステロール及び（ｉｉｉ）化合物Ｉ、または
（ｉ）化合物ＩＩ、（ｉｉ）ＤＳＰＣもしくはＤＯＰＥ、（ｉｉｉ）コレステロール及び（ｉｖ）化合物Ｉ
を含む。

【００５５】
本開示は、本明細書に記載されているポリペプチド、本明細書に記載されているポリヌクレオチド、本明細書に記載されているｍＲＮＡ、本明細書に記載されている発現ベクター、または本明細書に記載されている脂質ナノ粒子を含む医薬組成物も特色とする。

【００５６】
本開示は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドを発現させることを必要とするヒト対象において、フェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドを発現させる方法であって、そのヒト対象に、本明細書に記載されているポリペプチド、本明細書に記載されているポリヌクレオチド、本明細書に記載されているｍＲＮＡ、本明細書に記載されている発現ベクター、本明細書に記載されている脂質ナノ粒子、または本明細書に記載されている医薬組成物を有効量投与することを含む方法も特色とする。

【００５７】
本開示は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ活性を向上させることを必要とするヒト対象において、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ活性を向上させる方法であって、そのヒト対象に、本明細書に記載されているポリペプチド、本明細書に記載されているポリヌクレオチド、本明細書に記載されているｍＲＮＡ、本明細書に記載されている発現ベクター、本明細書に記載されている脂質ナノ粒子、または本明細書に記載されている医薬組成物を有効量投与することを含む方法も特色とする。

【００５８】
本開示は、フェニルケトン尿症の発症及び／または進行を治療、予防または遅延することを必要とするヒト対象において、フェニルケトン尿症の発症及び／または進行を治療、予防または遅延する方法であって、そのヒト対象に、本明細書に記載されているポリペプチド、本明細書に記載されているポリヌクレオチド、本明細書に記載されているｍＲＮＡ、本明細書に記載されている発現ベクター、本明細書に記載されている脂質ナノ粒子、または本明細書に記載されている医薬組成物を有効量投与することを含む方法も特色とする。

【００５９】
本開示は、フェニルアラニンレベル（例えば、血中、血漿中、血清中、肝臓中及び／または尿中のフェニルアラニンレベル）を低下させることを必要とするヒト対象において、フェニルアラニンレベル（例えば、血中、血漿中、血清中、肝臓中及び／または尿中のフェニルアラニンレベル）を低下させる方法であって、そのヒト対象に、本明細書に記載されているポリペプチド、本明細書に記載されているポリヌクレオチド、本明細書に記載されているｍＲＮＡ、本明細書に記載されている発現ベクター、本明細書に記載されている脂質ナノ粒子、または本明細書に記載されている医薬組成物を有効量投与することを含む方法も特色とする。

【００６０】
本明細書に記載されている方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）、そのアナログ、テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の塩、またはそのアナログの塩をヒト対象に、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物と組み合わせて、（例えば経口で）併用投与する。いくつかの実施形態では、そのテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）ア

ナログまたはその塩は、サプロプテリン、６－ヒドロキシメチルプテリン（ＨＭＰ）、６－アセチル－７，７－ジメチル－７，８－ジヒドロプテリン（ＡＤＤＰ）またはこれらの塩である。テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）、そのアナログ、テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の塩、またはそのアナログの塩は、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子もしくは医薬組成物の投与と同時に、または本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子もしくは医薬組成物の投与の前もしくは後に投与できる。

【００６１】

いくつかの実施形態では、対象への投与は、１週間に約１回、２週間に約１回または１カ月に約１回である。

【００６２】

ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、静脈内投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～５．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～２．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～１．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～１．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。

【００６３】

ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、皮下投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～５．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～２．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～１．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～１．０ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。場合によっては、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、０．１ｍｇ／ｋｇ～０．５ｍｇ／ｋｇの用量で投与する。

【００６４】

ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物は、静脈内投与及び皮下投与する。場合によっては、本発明の方法は、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物を１回以上静脈内投与してから、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ｍＲＮＡ、発現ベクター、脂質ナノ粒子または医薬組成物を１回以上皮下投与することを含む。

【図面の簡単な説明】

【００６５】

【図１】トランケート型ＰＡＨバリアントをコードするコンストラクトをトランスフェクションした場合のＰＡＨタンパク質発現レベルであって、トランスフェクションから９６時間後のレベルを示しており、かつΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現と比較して示している棒グラフである。

【図２】トランケート型ＰＡＨバリアントをコードするコンストラクトまたはΔｒｄコン

ストラクトをトランスフェクションした場合のＰＡＨタンパク質発現レベルであって、トランスフェクションから２４時間後及び９６時間後のレベルを示しているウエスタンブロット像である。
【図３】トランケート型ＰＡＨバリアントをコードするコンストラクトをトランスフェクションした場合のＰＡＨタンパク質発現レベルであって、トランスフェクションから９６時間後のレベルを示しており、かつ完全長野生型ＰＡＨコンストラクトまたはΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現であって、トランスフェクションから２４時間後の発現と比較して示している棒グラフである。
【図４】トランケート型または完全長のＰＡＨバリアントをコードするコンストラクトをトランスフェクションした場合のＰＡＨタンパク質発現レベルであって、トランスフェクションから９６時間後のレベルを示しており、かつ完全長野生型ＰＡＨコンストラクトまたはΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現であって、トランスフェクションから２４時間後及び９６時間後の発現と比較して示しているウエスタンブロット像である。
【図５】トランケート型または完全長のＭ１８０Ｔ　ＰＡＨコンストラクト（安定テールを有する場合または有さない場合）をトランスフェクションした場合のＰＡＨタンパク質発現レベルであって、トランスフェクションから２４時間後及び９６時間後のレベルを示しており、かつ完全長野生型ＰＡＨコンストラクトまたはΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクト（安定テールを有する場合または有さない場合）をトランスフェクションした場合の発現と比較して示している棒グラフである。
【図６】トランケート型または完全長のＭ１８０Ｔ　ＰＡＨコンストラクト（安定テールを有する場合または有さない場合）をトランスフェクションした場合のＰＡＨタンパク質発現レベルであって、トランスフェクションから２４時間後及び９６時間後のレベルを示しており、かつ完全長野生型ＰＡＨコンストラクトまたはΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクト（安定テールを有する場合または有さない場合）をトランスフェクションした場合の発現と比較して示しているウエスタンブロット像である。
【図７】完全長野生型ＰＡＨコンストラクト（Ｃ１　Ａ１００）、または安定テールを含む完全長野生型ＰＡＨコンストラクト（Ｃ１　ｉｄＴ）をトランスフェクションしたホモ接合型ＰＡＨｅｎｕ２マウスにおけるＰＡＨ活性を示しており、ＰＢＳを注射したコントロールマウスにおける活性と、経時的な血中フェニルアラニンレベルを測定して比較して示しているグラフである。
【図８】トランケート型ＰＡＨバリアントをコードするコンストラクトまたはΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクトをトランスフェクションしたホモ接合型ＰＡＨｅｎｕ２マウスにおけるＰＡＨ活性を示しており、ＰＢＳを注射したコントロールマウスにおける活性と、経時的な血中フェニルアラニンレベルを測定して比較して示しているグラフである。
【図９】完全長のＭ１８０Ｔ　ＰＡＨコンストラクトもしくはＫ１５０Ｔ　ＰＡＨコンストラクト（安定テールを有する場合もしくは有さない場合）、または完全長野生型ＰＡＨコンストラクト（安定テールを有する場合もしくは有さない場合）をトランスフェクションしたホモ接合型ＰＡＨｅｎｕ２マウスにおけるＰＡＨ活性を示しており、ＰＢＳを注射したコントロールマウスにおける活性と、経時的な血中フェニルアラニンレベルを測定して比較して示しているグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００６６】
本発明は、所定のアミノ酸残基に置換を有するバリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼポリペプチドを提供する。付随の実施例に開示されているように、フェニルアラニンヒドロキシラーゼの所定のアミノ酸残基の置換により、タンパク質の発現及び／または生物活性が増大することが見出された。
【００６７】
バリアントフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）ポリペプチド
フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ、ＥＣ１．１４．１６．１）は、Ｌ－フェ

ニルアラニン（Ｌ－Ｐｈｅ）を、芳香族側鎖のパラ－ヒドロキシル化によって、Ｌ－チロシン（Ｌ－Ｔｙｒ）に変換するのを触媒する。哺乳動物では、このテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）依存性反応は、食物タンパク質由来の過剰なＬ－Ｐｈｅを分解する際の最初かつ律速の段階であり、Ｌ－Ｔｙｒは、さらに分解されて、クエン酸回路に送られる生成物となる。ＰＡＨは、食事及び生理的条件下でのタンパク質異化に由来するフェニルアラニン供給量の約７５％を消費する。

【００６８】

ＰＡＨは主に、肝臓に存在し、肝臓において、過剰なＬ－Ｐｈｅを除去することで、高フェニルアラニン血症（ＨＰＡ）の神経毒性作用を阻止する。しかしながら、Ｌ－Ｐｈｅは、タンパク質を構成する必須アミノ酸でもあるので、完全には異化されないことが重要である。過剰なＬ－Ｐｈｅを効果的に除去しながら、維持も行うというこの二重の役割を果たすために、哺乳動物ＰＡＨでは、いくつかの調節機構が発達してきた。

【００６９】

哺乳動物ＰＡＨは、５０ｋＤａのサブユニットからなるホモ四量体酵素である。各ＰＡＨサブユニットは、Ｎ末端の調節ドメイン（１～１１０番目の残基）、中央の触媒ドメイン（１１１～４１０番目の残基）及びＣ末端のオリゴマー化ドメイン（４１１～４５２番目の残基）で構成されている。Ｎ末端の調節ドメインは、触媒ドメインに、ヒンジ領域（Ａｒｇ１１１～Ｔｈｒ１１７）を介して、柔軟な形で結合している。調節ドメインは、Ｌ－Ｐｈｅによる活性化のような調節特性の発現に必要であり、調節ドメインが、Ｌ－Ｐｈｅに対するアロステリックな結合部位を含むか否かについては、議論が続いている。触媒ドメインは、鉄、補因子及び基質に対する結合部位を含む。活性部位において、鉄は、２つのヒスチジン（ｈＰＡＨではＨｉｓ２８５及びＨｉｓ２９０）、ならびにグルタミン酸（ｈＰＡＨではＧｌｕ３３０）に結合する。オリゴマー化ドメインは、二量体化を担う逆平行シート（４１１～４１４番目、４２１～４２４番目の残基）から始まり、その後に、もう一方のモノマーとのドメインスワッピング及び逆平行コイルドコイルの形成を通じて四量体化を媒介する長さ４０Åのらせん（４２８～４５２番目）が続く。

【００７０】

ヒトにおいては、ＰＡＨ遺伝子の変異により、フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）になり、大半の変異は主に、ＰＡＨのミスフォールディング及び不安定性に関連付けられている。病原性変異は、５００個を超える（ｐａｈｄｂ．ｍｃｇｉｌｌ．ｃａ及びｂｉｏｐｋｕ．ｏｒｇ）。ＰＡＨの機能不全により、血中のＬ－Ｐｈｅ濃度が上昇し、Ｌ－Ｐｈｅのフェニルピルビン酸へのアミノ基転移反応に起因する代謝産物が、尿中に現れる。これが、高フェニルアラニン血症（ＨＰＡ）の特質であり、そのうち、古典的フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）は、血漿中Ｌ－Ｐｈｅレベルが１，２００μＭ超である最も重篤な形態である。Ｌ－Ｐｈｅが蓄積し、その後、脳の神経伝達物質が障害されることにより、精神遅滞、目的のない動作及び抑うつ症状を含む神経学的症状が現れる。したがって、ＰＫＵ患者では、Ｌ－Ｐｈｅの食事摂取を厳格に管理する必要がある。

【００７１】

完全長ヒトＰＡＨのアミノ酸配列は、配列番号１に示されている。トランケート型のヒトＰＡＨ（ＰＡＨ－ΔＲＤタンパク質、ＰＡＨΔＲＤタンパク質またはΔｒｄＰＡＨタンパク質という）のアミノ酸配列は、配列番号２に示されている。このトランケート型は、３３６アミノ酸長であり、ＰＡＨの触媒ドメインを含む。かなりの数のヒトＰＡＨ変異が、触媒ドメインで見出されている。

【００７２】

本発明で開示するのは、ＰＡＨポリペプチドの所定のアミノ酸残基の１つ以上に、置換を有するバリアントＰＡＨポリペプチドである。

【００７３】

バリアントＰＡＨポリペプチドは、配列番号１と比較した場合、（ｉ）１８０位のメチオニン残基、（ｉｉ）１５０位のリシン残基、（ｉｉｉ）２５６位のグリシン残基、（ｉｖ）３７６位のアスパラギン残基または（ｖ）３６１位のリシン残基に、アミノ酸置換を

含む。別段の記載がない限り、本明細書において、位置の数字によって、ＰＡＨアミノ酸残基に言及している場合にはいずれも、配列番号１に関する残基の数字を指す。バリアントＰＡＨポリペプチドには、追加のアミノ酸置換を導入でき、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、ＰＡＨの生物活性を維持している。

【００７４】

置換について定められているＰＡＨアミノ酸残基は、非保存的アミノ酸残基または保存的アミノ酸残基に置換できる。

【００７５】

１８０位のメチオニン残基を置換できる例示的なアミノ酸としては、トレオニン、アラニン、グルタミン及びアスパラギンが挙げられる。

【００７６】

１５０位のリシン残基を置換できる例示的なアミノ酸としては、トレオニン、アルギニン、プロリン及びアスパラギンが挙げられる。

【００７７】

２５６位のグリシン残基を置換できる例示的なアミノ酸としては、アラニン及びバリンが挙げられる。

【００７８】

３７６位のアスパラギン残基を置換できる例示的なアミノ酸としては、グルタミン酸及びリシンが挙げられる。

【００７９】

３６１位のリシン残基を置換できる例示的なアミノ酸としては、アルギニン及びグルタミン酸が挙げられる。

【００８０】

特定の態様では、本開示は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ））を含むポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）を提供する。いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、１８０位のメチオニン残基のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、１５０位のリシン残基のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、２５６位のグリシン残基のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、３７６位のアスパラギン残基のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、３６１位のリシン残基のアミノ酸置換を含む。

【００８１】

いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、トランケート型のヒトバリアントＰＡＨタンパク質（例えば、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０または配列番号１２のタンパク質）である。いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、完全長ヒトバリアントＰＡＨタンパク質（例えば、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９または配列番号１１のタンパク質）である。いくつかの実施形態では、例えば局在化のために、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる配列（例えば、Ｎ末端またはＣ末端）に、配列タグまたはアミノ酸を付加できる。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドのカルボキシ末端、アミノ末端または内部領域に位置するアミノ酸残基を任意に欠失させて、断片をもたらすことができる。

【００８２】

いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、配列番号１の１１８～４５２番目のアミノ酸と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００８３】

いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００８４】
いくつかの実施形態では、そのバリアントＰＡＨポリペプチドは、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２のアミノ酸と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％同一であるアミノ酸配列を含む。
【００８５】
いくつかの実施形態では、本発明のヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含むポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、ヒトＰＡＨ配列の置換バリアントをコードし、その置換バリアントは、置換を１個、２個または３個以上含むことができる。いくつかの実施形態では、その置換バリアントは、保存的アミノ酸置換を１つ以上含むことができる。別の実施形態では、そのバリアントは、挿入バリアントである。別の実施形態では、そのバリアントは、欠失バリアントである。
【００８６】
ＰＡＨのタンパク質断片、機能的なタンパク質ドメイン、バリアント及び相同タンパク質（オルソログ）も、本開示のＰＡＨポリペプチドの範囲内である。本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの非限定的な例は、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２に示されている。
【００８７】
ポリヌクレオチド及びオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）
本発明は、ＰＫＵのような高フェニルアラニン血症の治療または予防に用いるｍＲＮＡを特色とする。本発明での使用のために特色となるｍＲＮＡは、対象に投与されて、バリアントＰＡＨタンパク質をｉｎ　ｖｉｖｏでコードする。したがって、本発明は、連結したヌクレオシドからなるオープンリーディングフレームであって、バリアントヒトＰＡＨ（例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１もしくは配列番号１２）、その機能的断片、及びバリアントＰＡＨを含む融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡに関するものである。いくつかの実施形態では、そのオープンリーディングフレームは、配列が最適化されている。
【００８８】
特定の態様では、本発明は、１つ以上のバリアントＰＡＨポリペプチド（例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２）をコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含むポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡのようなＲＮＡ）を提供する。
【００８９】
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、細胞内に導入すると、それらの細胞内のＰＡＨタンパク質発現レベル及び／または検出可能なＰＡＨ酵素活性レベルを、例えば、本発明のポリヌクレオチドの投与前の細胞内のＰＡＨタンパク質発現レベル及び／または検出可能なＰＡＨ酵素活性レベルと比べて、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも１００％上昇させる。ＰＡＨタンパク質発現レベル及び／またはＰＡＨ酵素活性は、当該技術分野で知られている方法に従って測定できる。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞に導入する。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、ｉｎ　ｖｉｖｏで細胞に導入する。
【００９０】
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントヒトＰＡＨ、例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号

６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２をコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含む。

【００９１】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、そのヌクレオチド配列は、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１の配列と少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一である。

【００９２】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、そのヌクレオチド配列は、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１からなる群から選択した配列との配列同一性が、少なくとも７０％、少なくとも７１％、少なくとも７２％、少なくとも７３％、少なくとも７４％、少なくとも７５％、少なくとも７６％、少なくとも７７％、少なくとも７８％、少なくとも７９％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％である。

【００９３】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、そのヌクレオチド配列は、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１からなる群から選択した配列との配列同一性が、７０％～１００％、７５％～１００％、８０％～１００％、８５％～１００％、７０％～９５％、８０％～９５％、７０％～８５％、７５％～９０％、８０％～９５％、７０％～７５％、７５％～８０％、８０％～８５％、８５％～９０％、９０％～９５％または９５％～１００％である。

【００９４】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦを含み、そのポリヌクレオチドは、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２からなる群から選択した配列との配列同一性が、７０％～１００％、７５％～１００％、８０％～１００％、８５％～１００％、７０％～９５％、８０％～９５％、７０％～８５％、７５％～９０％、８０％～９５％、７０％～７５％、７５％～８０％、８０％～８５％、８５％～９０％、９０％～９５％または９５％～１００％である核酸配列を含む。

【００９５】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、そのヌクレオチド配列は、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１の配列と、７０％～９０％同一であるか、７５％～８５％同一であるか、７６％～８４％同一であるか、７７％～８３％同一であるか、７７％～８２％同一であるか、または７８％～８１％同一である。

【００９６】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、非コード部位、例えばマイクロＲＮＡ結合部位である核酸配列を少なくとも１つ、さらに含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、５’ＵＴＲ（例えば、配列番号５５または配列番号５６）及び３’ＵＴＲ（例えば、配列番号１１３、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１１２、配列番号１１４、配列番号１０９、配列番号１１０、または配列番号１１１の配列から選択した３’ＵＴＲ）をさらに含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１からなる群から選択した配列を含む。さらなる実施形態では、そのポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、５’末端キャップ（例えば、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、ＡＲＣＡ、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’－フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、２－アジドグアノシン、Ｃａｐ２、Ｃａｐ４、５’メチルＧキャップまたはこれらのアナログ）及びポリＡテール領域（例えば約１００ヌクレオチド長）を含む。さらなる実施形態では、そのポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、配列番号１０７もしくは１０８、またはこれらをいずれかに組み合わせたものからなる群から選択した核酸配列を含む３’ＵＴＲを含む。いくつかの実施形態では、そのｍＲＮＡは、配列番号１１３、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１１２、配列番号１１４、配列番号１０９、配列番号１１０または配列番号１１１のうちのいずれかの核酸配列を含む３’ＵＴＲを含む。いくつかの実施形態では、そのｍＲＮＡは、ポリＡテールを含む。場合によっては、そのポリＡテールは、５０～１５０ヌクレオチド長（配列番号１９７）、７５～１５０ヌクレオチド長（配列番号１９８）、８５～１５０ヌクレオチド長（配列番号１９９）、９０～１５０ヌクレオチド長（配列番号１９２）、９０～１２０ヌクレオチド長（配列番号１９３）、９０～１３０ヌクレオチド長（配列番号１９４）または９０～１５０ヌクレオチド長（配列番号１９２）である。場合によっては、そのポリＡテールは、１００ヌクレオチド長（配列番号１９５）である。

【００９７】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、１本鎖または２本鎖である。

【００９８】

いくつかの実施形態では、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含む本発明のポリヌクレオチドは、ＤＮＡまたはＲＮＡである。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡであるか、またはｍＲＮＡとして機能する。いくつかの実施形態では、そのｍＲＮＡは、ＰＡＨポリペプチドを少なくとも１つコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｓｉｔｕまたはｅｘ ｖｉｖｏで翻訳されて、コードされたＰＡＨポリペプチドを産生できる。

【００９９】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードする配列最適化ヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）（例えば、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１）を含み、そのポリヌクレオチドは、化学修飾された核酸塩基、例えば、Ｎ１－メチルシュードウラシルまたは５－メトキシウラシルを少なくとも１つ含む。ある特定の実施形態では、そのポリヌクレオチドにおけるすべてのウラシルは、Ｎ１－メチルシュードウラシルである。別の実施形態では、そのポリヌクレオチドにおけるすべてのウラシルは、５－

メトキシウラシルである。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、ｍｉＲ－１４２に結合するｍｉＲＮＡ結合部位、及び／またはｍｉＲ－１２６に結合するｍｉＲＮＡ結合部位をさらに含む。

【０１００】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、例えば式（Ｉ）を有する化合物、例えば化合物１～２３２のいずれか、例えば化合物ＩＩ、式（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）もしくは（ＶＩ）を有する化合物、例えば化合物２３３～３４２のいずれか、例えば化合物ＶＩ、または式（ＶＩＩＩ）を有する化合物、例えば化合物４１９～４２８のいずれか、例えば化合物Ｉ、あるいはこれらをいずれかに組み合わせたものを含む送達剤とともに調合されている。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば、化合物ＩＩもしくはＶＩ（または関連する適切なアミノ脂質）約３０～約６０ｍｏｌ％（例えば、化合物ＩＩもしくはＶＩ（または関連する適切なアミノ脂質）３０～４０ｍｏｌ％、４０～４５ｍｏｌ％、４５～５０ｍｏｌ％、５０～５５ｍｏｌ％または５５～６０ｍｏｌ％）、リン脂質（または関連する適切なリン脂質もしくは「ヘルパー脂質」）約５～約２０ｍｏｌ％（例えば、リン脂質（または関連する適切なリン脂質もしくは「ヘルパー脂質」）５～１０ｍｏｌ％、１０～１５ｍｏｌ％または１５～２０ｍｏｌ％）、コレステロール（または関連するステロールもしくは「非カチオン性」脂質）約２０～約５０ｍｏｌ％（例えば、コレステロール（または関連するステロールもしくは「非カチオン性」脂質）約２０～３０ｍｏｌ％、３０～３５ｍｏｌ％、３５～４０ｍｏｌ％、４０～４５ｍｏｌ％または４５～５０ｍｏｌ％）、及びＰＥＧ脂質（またはその他の適切なＰＥＧ脂質）約０．０５～約１０ｍｏｌ％（例えば、ＰＥＧ脂質（またはその他の適切なＰＥＧ脂質）０．０５～１ｍｏｌ％、１～２ｍｏｌ％、２～３ｍｏｌ％、３～４ｍｏｌ％、４～５ｍｏｌ％、５～７ｍｏｌ％または７～１０ｍｏｌ％）という範囲のモル比で含む。例示的な送達剤は、モル比が例えば、４７．５：１０．５：３９．０：３．０または５０：１０：３８．５：１．５であることができる。特定の場合では、例示的な送達剤は、モル比が例えば、４７．５：１０．５：３９．０：３、４７．５：１０：３９．５：３、４７．５：１１：３９．５：２、４７．５：１０．５：３９．５：２．５、４７．５：１１：３９：２．５、４８．５：１０：３８．５：３、４８．５：１０．５：３９：２、４８．５：１０．５：３８．５：２．５、４８．５：１０．５：３９．５：１．５、４８．５：１０．５：３８．０：３、４７：１０．５：３９．５：３、４７：１０：４０．５：２．５、４７：１１：４０：２、４７：１０．５：３９．５：３、４８：１０．５：３８．５：３、４８：１０：３９．５：２．５、４８：１１：３９：２または４８：１０．５：３８．５：３であることができる。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩまたはＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約４７．５：１０．５：３９．０：３．０のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩまたはＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で含む。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、５’末端キャップ（例えばＣａｐ１）、５’ＵＴＲ（例えば配列番号５５または配列番号５６）、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２を含むポリペプチドをコードするＯＲＦ配列、３’ＵＴＲ（例えば、配列番号１０８、１１２、１１４または１１１）及びポリＡテール（例えば約１００ｎｔ長）を含むｍＲＮＡであり、そのポリヌクレオチドにおけるすべてのウラシルは、Ｎ１－メチルシュードウラシルである。いくつかの実施形態では、その送達剤は、イオン化可能な脂質としての化合物ＩＩまたは化合物ＶＩ、及びＰＥＧ脂質としてのＰＥ

Ｇ－ＤＭＧまたは化合物Ｉを含む。
【０１０２】
いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、５’末端キャップ（例えばＣａｐ１）、５’ＵＴＲ（例えば配列番号５５または配列番号５６）、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１からなる群から選択したＯＲＦ配列、３’ＵＴＲ（例えば、配列番号１１３、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１１２、配列番号１１４、配列番号１０９、配列番号１１０または配列番号１１１）、及びポリＡテール（例えば約１００ｎｔ長）を含むｍＲＮＡであり、そのポリヌクレオチドにおけるすべてのウラシルは、Ｎ１メチルシュードウラシルである。いくつかの実施形態では、その送達剤は、イオン化可能な脂質としての化合物ＩＩまたは化合物ＶＩ、及びＰＥＧ脂質としてのＰＥＧ－ＤＭＧまたは化合物Ｉを含む。
【０１０３】
シグナル配列
本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、コードされたポリペプチドを治療上適切な部位に輸送するように促す追加の特色をコードするヌクレオチド配列も含むことができる。タンパク質の輸送を助けるこのような特色の１つは、シグナル配列、すなわちターゲティング配列である。これらのシグナル配列によってコードされるペプチドは、ターゲティングペプチド、トランジットペプチド及びシグナルペプチドを含む様々な名称で知られている。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）であって、本明細書に記載されているＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結されたヌクレオチド配列を含む。
【０１０４】
いくつかの実施形態では、「シグナル配列」は、そのポリペプチドのコード領域の５’末端に任意に導入されている約３０～２１０ヌクレオチド長、例えば約４５～８０または１５～６０ヌクレオチド長であるポリヌクレオチドであり、「シグナルペプチド」は、そのＮ末端に任意に導入されている、例えば約２０アミノ酸長、３０アミノ酸長、４０アミノ酸長、５０アミノ酸長、６０アミノ酸長または７０アミノ酸長であるポリペプチドである。これらの配列を付加することで、コードされたポリペプチドが、１つ以上のターゲティング経路を通じて、小胞体またはミトコンドリアのような所望の部位に輸送される。そのタンパク質が所望の部位に輸送された後、いくつかのシグナルペプチドは、そのタンパク質から、例えばシグナルペプチダーゼによって切断される。
【０１０５】
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、そのヌクレオチド配列は、異種のシグナルペプチドをコードする５’核酸配列をさらに含む。
【０１０６】
融合タンパク質
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、目的のポリペプチドをコードする核酸配列（例えばＯＲＦ）を２つ以上含むことができる。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦを１つ含む。しかしながら、いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＯＲＦを２つ以上、例えば、ＰＡＨポリペプチド（目的の第１のポリペプチド）、その機能的断片またはそのバリアントをコードする第１のＯＲＦ、及び目的の第２のポリペプチドを発現する第２のＯＲＦを含むことができる。いくつかの実施形態では、目的の２つ以上のポリペプチドは、遺伝子的に融合でき、すなわち、２つ以上のポリペプチドを同じＯＲＦによってコードできる。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、目的の２つ以上のポリペプチドの間で、リンカー（例えば、Ｇ４Ｓ（配列番号２００）というペプチドリンカーまたは別の当該技術分野で知られているリンカ

ー）をコードする核酸配列を含むことができる。
【０１０７】
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、目的のポリペプチドをそれぞれ発現するＯＲＦを２個、３個または４個以上含むことができる。
【０１０８】
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、ＰＡＨポリペプチドをコードする第１の核酸配列（例えば第１のＯＲＦ）、及び目的の第２のポリペプチドをコードする第２の核酸配列（例えば第２のＯＲＦ）を含むことができる。
【０１０９】
リンカー及び切断可能なペプチド
ある特定の実施形態では、本開示のｍＲＮＡは、２個以上のＰＡＨドメイン（例えば、ＰＡＨ触媒ドメイン、ＰＡＨ四量体化ドメイン）または異種のドメインをコードし、本明細書では、多量体コンストラクトという。その多量体コンストラクトのある特定の実施形態では、ｍＲＮＡはさらに、各ドメイン間に位置するリンカーをコードする。そのリンカーは例えば、切断可能なリンカーまたはプロテアーゼ感受性リンカーであることができる。ある特定の実施形態では、そのリンカーは、Ｆ２Ａリンカー、Ｐ２Ａリンカー、Ｔ２Ａリンカー、Ｅ２Ａリンカー及びこれらを組み合わせたものからなる群から選択されている。この自己切断型ペプチドリンカーファミリー（２Ａペプチドという）は、当該技術分野において説明されている（例えば、Ｋｉｍ，Ｊ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．（２０１１）ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　６：ｅ１８５５６を参照されたい）。ある特定の実施形態では、そのリンカーは、Ｆ２Ａリンカーである。ある特定の実施形態では、そのリンカーは、ＧＧＧＳ（配列番号２０１）というリンカーである。ある特定の実施形態では、そのリンカーは、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２０２）というリンカーであり、そのｎは、２、３、４または５である。ある特定の実施形態では、その多量体コンストラクトは、介在するリンカーを有するドメインを３個含み、ドメイン－リンカー－ドメイン－リンカー－ドメイン、例えばＰＡＨドメイン－リンカー－ＰＡＨドメインという構造を有する。
【０１１０】
一実施形態では、その切断可能なリンカーは、Ｆ２Ａリンカー（例えば、ＧＳＧＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ（配列番号１８９）というアミノ酸配列を有する）である。別の実施形態では、その切断可能なリンカーは、Ｔ２Ａリンカー（例えば、ＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号１９０）というアミノ酸配列を有する）、Ｐ２Ａリンカー（例えば、ＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号１９１）というアミノ酸配列を有する）またはＥ２Ａリンカー（例えば、ＧＳＧＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ（配列番号２５５）というアミノ酸配列を有する）である。当該技術分野で認識されている他のリンカーが、本発明のコンストラクトでの使用に適する場合がある（例えば、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる場合がある）ことは当業者には明らかであろう。同様に、他のマルチシストロニックコンストラクトが、本発明での使用に適する場合があることは当業者には明らかであろう。例示的な実施形態では、このコンストラクトデザインは、本発明のコンストラクトによってコードされるほぼ等モル量のイントラボディ及び／またはそのドメインをももたらす。
【０１１１】
一実施形態では、自己切断型ペプチドは、２Ａペプチドであってよいが、これに限らない。例えば、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）２Ａペプチド、ウマ鼻炎Ａウイルス２Ａペプチド、Ｔｈｏｓｅａ　ａｓｉｇｎａウイルス２Ａペプチド及びブタテシオウイルス－１　２Ａペプチドを含め、様々な２Ａペプチドが、当該技術分野において知られているとともに、入手可能であり、それらのペプチドを使用してよい。いくつかのウイルスが、２Ａペプチドを用いて、リボソームスキップによって、１つの転写産物から２つのタンパク質を産生し、そして、２Ａペプチド配列において、通常のペプチド結合を阻害することで、１回

の翻訳イベントから２つの不連続なタンパク質が産生されるようになる。非限定的な例として、その２Ａペプチドは、配列番号１９１、その断片またはそのバリアントのタンパク質配列を有してよい。一実施形態では、その２Ａペプチドは、最後のグリシンと最後のプロリンの間で切断される。別の非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号１９１の断片またはバリアントのタンパク質配列を有する２Ａペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでよい。２Ａペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の一例は、ＧＧＡＡＧＣＧＧＡＧＣＵＡＣＵＡＡＣＵＵＣＡＧＣＣＵＧＣＵＧＡＡＧＣＡＧＧＣＵＧＧＡＧＡＣＧＵＧＧＡＧＧＡＧＡＡＣＣＣＵＧＧＡＣＣＵ（配列番号２５６）である。例示的な一実施形態では、２Ａペプチドは、５’－ＵＣＣＧＧＡＣＵＣＡＧＡＵＣＣＧＧＧＧＡＵＣＵＣＡＡＡＡＵＵＧＵＣＧＣＵＣＣＵＧＵＣＡＡＡＣＡＡＡＣＵＣＵＵＡＡＣＵＵＵＧＡＵＵＵＡＣＵＣＡＡＡＣＵＧＧＣＴＧＧＧＧＡＵＧＵＡＧＡＡＡＧＣＡＡＵＣＣＡＧＧＴＣＣＡＣＵＣ－３’（配列番号２５７）という配列によってコードされる。２Ａペプチドのポリヌクレオチド配列は、本明細書に記載されている方法及び／または当該技術分野で知られている方法によって、改変もしくはコドン最適化されていてよい。

【０１１２】

一実施形態では、この配列を用いて、目的の２つ以上のポリペプチドのコード領域を分離してよい。非限定的な例として、Ｆ２Ａペプチドをコードする配列は、第１のコード領域Ａと第２のコード領域Ｂの間に位置してよい（Ａ－Ｆ２Ａｐｅｐ－Ｂ）。Ｆ２Ａペプチドの存在により、１本の長いタンパク質が、Ｆ２Ａペプチド配列の末端のグリシンとプロリンの間で切断され（ＮＰＧＰ（配列番号２６０）が切断されて、ＮＰＧ及びＰとなる）、それにより、別個のタンパク質Ａ（Ｆ２Ａペプチドの２１個のアミノ酸が結合され、ＮＰＧで終端する）、及び別個のタンパク質Ｂ（Ｆ２Ａペプチドの１個のアミノ酸Ｐが結合されている）が作られる。同様に、他の２Ａペプチド（Ｐ２Ａ、Ｔ２Ａ及びＥ２Ａ）でも、そのペプチドが、１本の長いタンパク質に存在することにより、２Ａペプチド配列の末端のグリシンとプロリンの間で切断される（ＮＰＧＰ（配列番号２６０）が切断されて、ＮＰＧ及びＰとなる）。タンパク質Ａ及びタンパク質Ｂは、同じまたは異なる目的のペプチドまたはポリペプチド（例えば、完全長ヒトＰＡＨ、またはＰＡＨの触媒ドメイン及び四量体化ドメインを含むそのトランケート型のようなＰＡＨポリペプチド）であってよい。特定の実施形態では、タンパク質Ａ及びタンパク質Ｂは、ＰＡＨ触媒ドメイン及びＰＡＨ四量体化ドメイン（いずれかの順序）である。ある特定の実施形態では、その第１のコード領域及び第２のコード領域は、ＰＡＨ触媒ドメイン及びＢ　ＰＡＨ四量体化ドメインをいずれかの順序でコードする。

【０１１３】

ＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の配列最適化

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、配列が最適化されている。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、ＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）、任意に、別の目的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ（その５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲは任意に、マイクロＲＮＡ結合部位を少なくとも１つ含む）、任意に、リンカーをコードするヌクレオチド配列、ポリＡテール、またはこれらをいずれかに組み合わせたものを含み、そのＯＲＦ（複数可）は、配列が最適化されている。

【０１１４】

配列最適化ヌクレオチド配列、例えば、コドン最適化ｍＲＮＡ配列であって、ＰＡＨポリペプチドをコードする配列は、参照配列（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードする野生型ヌクレオチド配列）に対して、同義の核酸塩基置換を少なくとも１つ含む配列である。

【０１１５】

配列最適化ヌクレオチド配列は、参照配列とは配列が部分的または完全に異なることが

できる。例えば、ＵＣＵというコドンによって一様にコードされるポリセリンをコードする参照配列は、その核酸塩基の１００％が置換された塩基を有するようにする（各コドンにおいて、１位のＵをＡに置き換え、２位のＣをＧに置き換え、３位のＵをＣに置き換える）ことによって、配列を最適化して、ＡＧＣコドンによって一様にコードされることになるポリセリンをコードする配列をもたらすことができる。参照ポリセリン核酸配列と、配列最適化ポリセリン核酸配列との網羅的なペアワイズアラインメントから得られる配列同一率（％）は、０％となる。しかしながら、両方の配列から得られるタンパク質産物は、１００％同一となる。

【０１１６】

配列最適化（コドン最適化という場合もある）方法はいくつか、当該技術分野で知られており（下に、さらに詳細に論じられている）、所望の結果を１つ以上得るのに有用であることがある。これらの結果としては、例えば、特定の組織標的及び／または宿主生物におけるコドン頻度と適合させて、正しいフォールディングが行われるようにすること、Ｇ／Ｃ含有量を偏らせて、ｍＲＮＡの安定性を向上させるか、もしくは二次構造を低減させること、遺伝子の構築もしくは発現を損なうことのある、タンデムリピートのコドンもしくは塩基の連なりを最小限にすること、転写及び翻訳の制御領域をカスタマイズすること、タンパク質輸送配列を挿入もしくは除去すること、コードされたタンパク質における翻訳後修飾部位（例えば糖鎖付加部位）を除去／付加すること、タンパク質ドメインを付加、除去もしくはシャッフリングすること、制限部位を挿入もしくは欠失させること、リボソーム結合部位及びｍＲＮＡ分解部位を改変すること、翻訳速度を調整して、タンパク質の様々なドメインが正しくフォールディングされるようにすること、及び／またはポリヌクレオチド内において、問題の二次構造を低減もしくは排除することを挙げることができる。配列最適化のツール、アルゴリズム及びサービスは、当該技術分野で知られており、非限定的な例としては、ＧｅｎｅＡｒｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ　ＣＡ）のサービス、及び／または独自の方法が挙げられる。

【０１１７】

表１には、各アミノ酸のコドンの選択肢が示されている。

【表１】

表１．コドンの選択肢

アミノ酸	１文字表記	コドンの選択肢
イソロイシン	I	AUU、AUC、AUA
ロイシン	L	CUU、CUC、CUA、CUG、UUA、UUG
バリン	V	GUU、GUC、GUA、GUG
フェニルアラニン	F	UUU、UUC
メチオニン	M	AUG
システイン	C	UGU、UGC
アラニン	A	GCU、GCC、GCA、GCG
グリシン	G	GGU、GGC、GGA、GGG
プロリン	P	CCU、CCC、CCA、CCG
トレオニン	T	ACU、ACC、ACA、ACG
セリン	S	UCU、UCC、UCA、UCG、AGU、AGC
チロシン	Y	UAU、UAC
トリプトファン	W	UGG
グルタミン	Q	CAA、CAG
アスパラギン	N	AAU、AAC
ヒスチジン	H	CAU、CAC
グルタミン酸	E	GAA、GAG
アスパラギン酸	D	GAU、GAC
リシン	K	AAA、AAG
アルギニン	R	CGU、CGC、CGA、CGG、AGA、AGG
セレノシステイン	Sec	セレノシステイン挿入エレメント(SECIS)の存在下のmRNAにおけるUGA
終止コドン	Stop	UAA、UAG、UGA

【０１１８】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、ＰＡＨポリペプチド、その機能的断片またはそのバリアントをコードする配列最適化ヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含み、その配列最適化ヌクレオチド配列によってコードされるＰＡＨポリペプチド、その機能的断片またはそのバリアントは、（例えば、配列が最適化されていない参照ヌクレオチド配列によってコードされるＰＡＨポリペプチド、その機能的断片またはそのバリアントと比べて）特性が改善しており、例えば、ｉｎｖｉｖｏ投与後の発現効力に関する特性が改善している。このような特性としては、核酸の安定性（例えば、ｍＲＮＡの安定性）の改善、標的組織での翻訳効力の上昇、発現するトランケート型タンパク質の数の低減、発現タンパク質のフォールディングの改善もしくは発現タンパク質のミスフォールディングの予防、発現産物の毒性の軽減、発現産物を原因とする細胞死の軽減、タンパク質凝集の増加及び／または低減が挙げられるが、これらに限らない。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、本発明の配列最適化ヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）は、ヒト対象での発現に合わせて、コドンが最適化されており、当該技術分野における問題の

１つ以上を回避する構造的特色及び／または化学的特色、例えば、構造的一体性及び機能的一体性を維持したまま、核酸ベースの医薬の調合及び送達を最適化するのに有用である特色、発現の閾値を乗り越えるのに有用である特色、発現速度、半減期及び／またはタンパク質濃度を改善させるのに有用である特色、タンパク質の局在化を最適化するのに有用である特色、ならびに免疫応答のような有害な生体応答及び／または分解経路を回避するのに有用である特色を有する。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、

（ｉ）参照ヌクレオチド配列（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦ）内の少なくとも１つのコドンを代替的なコドンに置換して、ウリジン含有量を増減させて、ウリジン改変配列を作製すること、

（ｉｉ）参照ヌクレオチド配列（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦ）内の少なくとも１つのコドンを、同義コドンセットにおけるコドン頻度がもっと高い代替的なコドンに置換すること、

（ｉｉｉ）参照ヌクレオチド配列（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦ）内の少なくとも１つのコドンを代替的なコドンに置換して、Ｇ／Ｃ含有量を増加させること、または

（ｉｖ）これらを組み合わせたもの、

を含む方法に従って、配列が最適化されているヌクレオチド配列（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）、別の目的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、マイクロＲＮＡ結合部位、リンカーをコードする核酸配列、またはこれらをいずれかに組み合わせたもの）

を含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、その配列最適化ヌクレオチド配列（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦ）は、参照ヌクレオチド配列に対して、少なくとも１つの特性が改善している。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、配列の最適化方法は、マルチパラメトリックであり、本明細書に開示されている方法及び／または当該技術分野で知られているその他の最適化方法を１個、２個、３個、または４個以上含む。

【０１２３】

本発明のいくつかの実施形態で有益とみなすことができる特色は、ポリヌクレオチドの領域によって、またはその領域内でコードされることができ、そのような領域は、ＰＡＨポリペプチドをコードする領域の上流（５’）、その領域の下流（３’）またはその領域内にあることができる。これらの領域は、タンパク質コード領域またはオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の配列最適化の前及び／または後に、ポリヌクレオチドに導入できる。このような特色の例としては、非翻訳領域（ＵＴＲ）、マイクロＲＮＡ配列、Ｋｏｚａｋ配列、オリゴ（ｄＴ）配列、ポリＡテール及び検出可能なタグが挙げられるが、これらに限らないとともに、ＸｂａＩによる認識部を有することができるマルチクローニングサイトを挙げることができる。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ及び／またはマイクロＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲを２つ以上含み、それらは、同じ配列であることもできるし、または異なる配列であることもできる。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、マイクロＲＮＡ結合部位を２つ以上含み、それらは、同じ配列であることもできるし、または異なる配列であることもできる。５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ及び／またはマイクロＲＮＡ結合部位の部分のいずれも、配列を最適化でき（いずれの部分も最適化しないことも含む）、その部分は独立して、配列最適化の前及び／または後に、異なる構造

的改変または化学的修飾を１つ以上含むことができる。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、最適化後、ポリヌクレオチドを再構成し、プラスミド、ウイルス、コスミド及び人工染色体（ただし、これらに限らない）のようなベクターに導入する。例えば、最適化したポリヌクレオチドを再構成し、ケミカルコンピテントＥ．ｃｏｌｉ、酵母、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ、トウモロコシ、ショウジョウバエなどに導入でき、これらにおいて、本明細書に記載されている方法によって、高コピー数のプラスミド様構造体または染色体構造体が作られる。
【０１２６】
ＰＡＨポリペプチドをコードする配列最適化ヌクレオチド配列
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に開示されているバリアントＰＡＨポリペプチドをコードする配列最適化ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＰＡＨポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含み、そのＯＲＦは、配列が最適化されている。
【０１２７】
ヒトバリアントＰＡＨをコードする例示的な配列最適化ヌクレオチド配列は、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１として定められている。いくつかの実施形態では、配列最適化ＰＡＨ配列、その断片及びそのバリアントを用いて、本明細書に開示されている方法を実施する。
【０１２８】
いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチド、例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、５’末端から３’末端に向かって、
（ｉ）本明細書に示されている５’キャップ、例えばＣａｐ１と、
（ｉｉ）本明細書に示されている配列、例えば配列番号５５のような５’ＵＴＲと、
（ｉｉｉ）バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム、例えば、ＰＡＨをコードする配列最適化核酸配列（配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１として定められている）と、
（ｉｖ）少なくとも１つの終止コドン（３’ＵＴＲの５’末端に存在しない場合）と、
（ｖ）本明細書に示されている配列、例えば、配列番号１０７または１０８のような３’ＵＴＲと、
（ｖｉ）上に示されているポリＡテールと、
を含む。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチド、例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、５’末端から３’末端に向かって、
（ｉ）本明細書に示されている５’キャップ、例えばＣａｐ１と、
（ｉｉ）本明細書に示されている配列、例えば、配列番号５５または配列番号５６のような５’ＵＴＲと、
（ｉｉｉ）バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム、例えば、ＰＡＨをコードする配列最適化核酸配列（配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１として定められている）と、
（ｉｖ）少なくとも１つの終止コドン（３’ＵＴＲの５’末端に存在しない場合）と、
（ｖ）本明細書に示されている配列、例えば、配列番号１１３、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１１２、配列番号１１４、配列番号１０９、配列番号１１０または配列番号１１１のような３’ＵＴＲと、

（ｖｉ）上に示されているポリＡテールと、
を含む。
【０１３０】
ある特定の実施形態では、そのポリヌクレオチドにおけるすべてのウラシルは、Ｎ１－メチルシュードウラシル（Ｇ５）である。ある特定の実施形態では、そのポリヌクレオチドにおけるすべてのウラシルは、５－メトキシウラシル（Ｇ６）である。
【０１３１】
本明細書に開示されている配列最適化ヌクレオチド配列は、対応する野生型ヌクレオチド酸配列及びその他の既知の配列最適化ヌクレオチド配列とは異なっており、例えば、これらの配列最適化核酸は、特有の組成的特徴を有する。
【０１３２】
いくつかの実施形態では、配列最適化ヌクレオチド配列（例えば、ＰＡＨポリペプチド、その機能的断片またはそのバリアントをコードする配列）におけるウラシル核酸塩基またはチミン核酸塩基のパーセンテージは、参照野生型ヌクレオチド配列におけるウラシル核酸塩基またはチミン核酸塩基のパーセンテージと比べて、改変（例えば低下）されている。このような配列は、ウラシル改変配列またはチミン改変配列という。ヌクレオチド配列におけるウラシルまたはチミン含有量のパーセンテージは、配列内のウラシルまたはチミンの数を、ヌクレオチドの総数で除して、１００を乗じることによって求めることができる。いくつかの実施形態では、配列最適化ヌクレオチド配列は、ウラシル含有量またはチミン含有量が、参照野生型配列におけるウラシル含有量またはチミン含有量よりも少ない。いくつかの実施形態では、本発明の配列最適化ヌクレオチド配列におけるウラシル含有量またはチミン含有量は、参照野生型配列におけるウラシル含有量またはチミン含有量よりも多く、なおかつ、参照野生型配列と比べると、有益な作用、例えば、発現の増加作用及び／またはＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）応答の低減作用を保持している。
【０１３３】
コドン使用頻度を最適化する方法は、当該技術分野で知られている。例えば、本明細書に示されている配列のうちのいずれか１つ以上のＯＲＦが、コドン最適化されていてよい。いくつかの実施形態では、コドン最適化を用いて、標的生物及び宿主生物におけるコドン頻度と一致させて、適正なフォールディングが行われるようにしたり、ＧＣ含有量を偏らせて、ｍＲＮＡの安定性を向上させるか、もしくは二次構造を低減させたり、遺伝子の構築もしくは発現を損なうことのある、タンデムリピートのコドンもしくは塩基の連なりを最小限にしたり、転写及び翻訳の制御領域をカスタマイズしたり、タンパク質輸送配列を挿入もしくは除去したり、コードされたタンパク質における翻訳後修飾部位（例えば糖鎖付加部位）を除去／付加したり、タンパク質ドメインを付加、除去もしくはシャッフリングしたり、制限部位を挿入もしくは欠失させたり、リボソーム結合部位及びｍＲＮＡ分解部位を改変したり、翻訳速度を調整して、タンパク質の様々なドメインが正しくフォールディングされるようにしたり、またはポリヌクレオチド内において、問題の二次構造を低減もしくは排除したりしてもよい。コドン最適化のツール、アルゴリズム及びサービスは、当該技術分野で知られており、非限定的な例としては、ＧｅｎｅＡｒｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ ＣＡ）のサービス、及び／または独自の方法が挙げられる。いくつかの実施形態では、そのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）配列は、最適化アルゴリズムを用いて最適化されている。
【０１３４】
ＰＡＨポリペプチドをコードする修飾ヌクレオチド配列
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、化学修飾核酸塩基、例えば化学修飾ウラシル、例えば、シュードウラシル、Ｎ１－メチルシュードウラシル、５－メトキシウラシルなどを含む。いくつかの実施形態では、そのｍＲＮＡは、ＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦを含むウラシル改変配列であり、そのｍＲＮＡは、化学修飾核酸塩基、例えば化学修飾ウラシル、例えば、シュードウラシル、Ｎ１－メチルシュードウラシルまたは５－メトキシウラシルを含む。

【０１３５】
本発明のある特定の態様では、ポリヌクレオチドにおけるように、その修飾ウラシル塩基が、リボース糖に結合している場合には、得られる修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドは、修飾ウリジンという。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドにおけるウラシルは、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％または約１００％が修飾ウラシルである。一実施形態では、そのポリヌクレオチドにおけるウラシルは、少なくとも９５％が修飾ウラシルである。別の実施形態では、そのポリヌクレオチドにおけるウラシルは、１００％が修飾ウラシルである。

【０１３６】
そのポリヌクレオチドにおけるウラシルの少なくとも９５％が、修飾ウラシルである実施形態では、全体のウラシル含有量を調整して、免疫応答をまったくまたはほとんど誘導せずに、ｍＲＮＡが適切なタンパク質発現レベルをもたらすようにできる。いくつかの実施形態では、そのＯＲＦのウラシル含有量は、対応する野生型ＯＲＦの最小ウラシル含有量の理論値（％ＵＴＭ）の約１００％～約１５０％、約１００％～約１１０％、約１０５％～約１１５％、約１１０％～約１２０％、約１１５％～約１２５％、約１２０％～約１３０％、約１２５％～約１３５％、約１３０％～約１４０％、約１３５％～約１４５％、約１４０％～約１５０％である。別の実施形態では、そのＯＲＦのウラシル含有量は、％ＵＴＭの約１２１％～約１３６％または１２３％～１３４％である。いくつかの実施形態では、ＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦのウラシル含有量は、％ＵＴＭの約１１５％、約１２０％、約１２５％、約１３０％、約１３５％、約１４０％、約１４５％または約１５０％である。この関連においては、「ウラシル」という用語は、修飾ウラシル及び／または天然ウラシルを指すことができる。

【０１３７】
いくつかの実施形態では、本発明のバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦにおけるウラシル含有量は、そのＯＲＦにおける核酸塩基の総含有量の約３０％未満、約２５％未満、約２０％未満、約１５％未満または約１０％未満である。いくつかの実施形態では、そのＯＲＦにおけるウラシル含有量は、そのＯＲＦにおける核酸塩基の総含有量の約１０％～約２０％である。別の実施形態では、そのＯＲＦにおけるウラシル含有量は、そのＯＲＦにおける核酸塩基の総含有量の約１０％～約２５％である。一実施形態では、ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦにおけるウラシル含有量は、そのオープンリーディングフレームにおける核酸塩基の総含有量の約２０％未満である。この関連においては、「ウラシル」という用語は、修飾ウラシル及び／または天然ウラシルを指すことができる。

【０１３８】
さらなる実施形態では、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦであって、修飾ウラシルを有するとともに、ウラシル含有量が調整されているＯＲＦは、シトシン（Ｃ）含有量、グアニン（Ｇ）含有量またはグアニン／シトシン（Ｇ／Ｃ）含有量（絶対値または相対値）が増加している。いくつかの実施形態では、そのＯＲＦのＣ含有量、Ｇ含有量またはＧ／Ｃ含有量（絶対値または相対値）の全体的な増加は、野生型ＯＲＦのＧ／Ｃ含有量（絶対値または相対値）に対して、少なくとも約２％、少なくとも約３％、少なくとも約４％、少なくとも約５％、少なくとも約６％、少なくとも約７％、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４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％または少なくとも約１００％である。いくつかの実施形態では、そのＯＲＦにおけるＧ含有量、Ｃ含有量またはＧ／Ｃ含有量は、ＰＡＨポリペプチドをコードする、対応する野生型ヌクレオチド配列の最大Ｇ含有量、最大Ｃ含有量または最大Ｇ／Ｃ含有量の理論値（％ＧＴＭＸ、％ＣＴＭＸまたは％Ｇ／ＣＴＭＸ）の約１００％未満、約９０％未満、約８５％未満または約８０％未満である。いくつかの実

施形態では、本明細書に記載されている、Ｇ含有量及び／またはＣ含有量（絶対値または相対値）は、Ｇ含有量、Ｃ含有量またはＧ／Ｃ含有量の少ない同義コドンを、Ｇ含有量、Ｃ含有量またはＧ／Ｃ含有量がもっと多い同義コドンに置き換えることによって増加させることができる。別の実施形態では、Ｇ含有量及び／またはＣ含有量（絶対値または相対値）は、Ｕで終わるコドンを、ＧまたはＣで終わる同義コドンに置き換えることによって増加させることができる。

【０１３９】

さらなる実施形態では、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦは、修飾ウラシルを含み、ウラシル含有量が調節済みであり、ＰＡＨポリペプチドをコードする対応する野生型ヌクレオチド配列よりも少ないウラシルペア（ＵＵ）及び／またはウラシルトリプレット（ＵＵＵ）及び／またはウラシルクアドラプレット（ＵＵＵＵ）を含む。いくつかの実施形態では、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦは、ウラシルペア及び／またはウラシルトリプレット及び／またはウラシルクアドラプレットを含まない。いくつかの実施形態では、ウラシルペア及び／またはウラシルトリプレット及び／またはウラシルクアドラプレットが、特定の閾値よりも低減されており、例えば、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦにおいて、１個以下、２個以下、３個以下、４個以下、５個以下、６個以下、７個以下、８個以下、９個以下、１０個以下、１１個以下、１２個以下、１３個以下、１４個以下、１５個以下、１６個以下、１７個以下、１８個以下、１９個以下または２０個以下である。特定の実施形態では、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦは、フェニルアラニン以外のウラシルペア及び／またはウラシルトリプレットを２０個未満、１９個未満、１８個未満、１７個未満、１６個未満、１５個未満、１４個未満、１３個未満、１２個未満、１１個未満、１０個未満、９個未満、８個未満、７個未満、６個未満、５個未満、４個未満、３個未満、２個未満または１個未満含む。別の実施形態では、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦは、フェニルアラニン以外のウラシルペア及び／またはウラシルトリプレットを含まない。

【０１４０】

さらなる実施形態では、本発明のバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦは、修飾ウラシルを含み、ウラシル含有量が調整済みであり、ウラシルリッチクラスターが、ＰＡＨポリペプチドをコードする対応する野生型ヌクレオチド配列よりも少ない。いくつかの実施形態では、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦは、ＰＡＨポリペプチドをコードする対応する野生型ヌクレオチド配列における、対応するウラシルリッチクラスターよりも長さが短いウラシルリッチクラスターを含む。

【０１４１】

さらなる実施形態では、頻度がもっと低い代替的なコドンが用いられている。修飾ウラシルを含むｍＲＮＡのＰＡＨポリペプチドコードＯＲＦのコドンの少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％は、代替的なコドンで置換されており、代替的なコドンのそれぞれは、コドン頻度が、同義コドンセットにおけるその置換コドンのコドン頻度よりも低い。そのＯＲＦは、上記のように、ウラシル含有量も調整されている。いくつかの実施形態では、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡのＯＲＦにおける少なくとも１つのコドンは、コドン頻度が、同義コドンセットにおけるその置換コドンのコドン頻度よりも低い代替的なコドンで置換されている。

【０１４２】

ポリヌクレオチドを改変する方法

本開示には、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨ

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡ）を含む改変ポリヌクレオチドが含まれる。その改変ポリヌクレオチドは、化学的に修飾されており、及び／または構造的に改変されていることができる。本発明のポリヌクレオチドが、化学的に修飾されており、及び／または構造的に改変されている場合には、そのポリヌクレオチドは、「改変ポリヌクレオチド」ということができる。

【０１４３】

本開示は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡポリヌクレオチドのようなＲＮＡポリヌクレオチド）の修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドを提供する。「ヌクレオシド」とは、糖分子（例えば、ペントースもしくはリボース）またはその誘導体を、有機塩基（例えば、プリンもしくはピリミジン）またはその誘導体（本明細書では「核酸塩基」ともいう）と合わせて含む化合物を指す。「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオシドを指す。修飾ヌクレオチドは、修飾ヌクレオシドまたは非天然ヌクレオシドを１つ以上含めるためのいずれかの有用な方法（例えば、化学的な方法、酵素的な方法または組み換えによる方法など）によって合成できる。ポリヌクレオチドは、連結されたヌクレオシドからなる１つの領域または複数の領域を含むことができる。このような領域は、様々な主鎖結合を有することができる。その結合は、標準的なホスホジエステル結合であることができ、その場合には、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドからなる領域を含むことになる。

【０１４４】

本明細書に開示されている改変ポリヌクレオチドは、様々な別個の改変を含むことができる。いくつかの実施形態では、その改変ポリヌクレオチドは、（任意に異なる）ヌクレオシド改変部またはヌクレオチド改変部を１個または２個以上含む。いくつかの実施形態では、細胞に導入された改変ポリヌクレオチドは、１つ以上の所望の特性、例えば、非改変ポリヌクレオチドと比べて、タンパク質発現を改善する特性、免疫原性を低減する特性、またはその細胞内での分解が低減される特性を示すことができる。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、構造的に改変されている。本明細書で使用する場合、「構造的」改変は、ヌクレオチド自体には大きな化学修飾を施さずに、ポリヌクレオチドにおいて、連結したヌクレオシドを２つ以上、挿入、欠失、複製、反転またはランダム化する改変である。構造的改変を行うためには、必ず、化学結合が分断され、再形成されることになるので、構造的改変は、化学的性質の改変であり、したがって、構造的改変は、化学修飾である。しかしながら、構造的改変により、異なるヌクレオチド配列が生じる。例えば、「ＡＴＣＧ」というポリヌクレオチドは、化学修飾して、「Ａ Ｔ － ５ｍｅＣ － Ｇ」にすることができる。同じポリヌクレオチドは、構造的に改変して、「ＡＴＣＧ」から「ＡＴＣＣＣＧ」にできる。すなわち、「ＣＣ」というジヌクレオチドを挿入した結果、ポリヌクレオチドに構造的改変が行われている。

【０１４６】

本開示の治療用組成物は、いくつかの実施形態では、バリアントＰＡＨをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸（例えばＲＮＡ）（例えば、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１）を少なくとも１つ含み、その核酸は、当該技術分野で知られているように、標準的なもの（改変されていないもの）であることもできるし、または改変されていることもできるヌクレオチド及び／またはヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、本開示のヌクレオチド及びヌクレオシドは、修飾ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオシドを含む。このような修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオシドは、天然の修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオシド、または非天然の修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオシドであることができる。このような修飾としては、当該技術分野において認識されているように、ヌクレオチド及び／またはヌクレオシドの糖部分、主鎖部分または核酸塩基部分における修飾を挙げることができる。

【０１４７】
いくつかの実施形態では、本開示の天然の修飾ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドは、当該技術分野において概ね知られているかまたは認識されているようなものである。このような天然の修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオチドの非限定的な例はとりわけ、広く認識されているＭＯＤＯＭＩＣＳデータベースで見ることができる。
【０１４８】
いくつかの実施形態では、本開示の非天然の修飾ヌクレオチドまたはヌクレオシドは、当該技術分野において概ね知られているかまたは認識されているようなものである。このような非天然の修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオシドの非限定的な例はとりわけ、米国出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／０５８５１９号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７５１７７号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０５８８９７号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０５８８９１号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０４１３号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／３６７７３号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／３６７５９号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／３６７７１号または同第ＰＣＴ／ＩＢ２０１７／０５１３６７号に見ることができ、これらのいずれも、参照により、本明細書に援用される。
【０１４９】
いくつかの実施形態では、本開示の少なくとも１つのＲＮＡ（例えばｍＲＮＡ）は、化学修飾されておらず、アデノシン、グアノシン、シトシン及びウリジンからなる標準的なリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、本開示のヌクレオチド及びヌクレオシドは、転写されたＲＮＡに存在するような標準的なヌクレオシド残基（例えば、Ａ、Ｇ、ＣまたはＵ）を含む。いくつかの実施形態では、本開示のヌクレオチド及びヌクレオシドは、ＤＮＡに存在するような標準的なデオキシリボヌクレオシド（例えば、ｄＡ、ｄＧ、ｄＣまたはｄＴ）を含む。
【０１５０】
すなわち、本開示の核酸（例えば、ＤＮＡ核酸、及びｍＲＮＡ核酸のようなＲＮＡ核酸）は、標準的なヌクレオチド及びヌクレオシド、天然のヌクレオチド及びヌクレオシド、非天然のヌクレオチド及びヌクレオシド、またはこれらをいずれかに組み合わせたものを含むことができる。
【０１５１】
本開示の核酸（例えば、ＤＮＡ核酸、及びｍＲＮＡ核酸のようなＲＮＡ核酸）は、いくつかの実施形態では、様々な（２つ以上の）異なる種類の標準的なヌクレオチド及びヌクレオシド、及び／または修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、核酸の特定の領域は、１つまたは２つ以上の（任意に異なる）種類の標準的なヌクレオチド及びヌクレオシド、及び／または修飾ヌクレオチド及び修飾ヌクレオシドを含む。
【０１５２】
いくつかの実施形態では、細胞または生物に導入される改変ＲＮＡ核酸（例えば、改変ｍＲＮＡ核酸）は、標準的なヌクレオチド及びヌクレオシドを含む非改変核酸と比べて、細胞または生物内での分解が低減されている。
【０１５３】
いくつかの実施形態では、細胞または生物に導入される改変ＲＮＡ核酸（例えば、改変ｍＲＮＡ核酸）は、標準的なヌクレオチド及びヌクレオシドを含む非改変核酸と比べて、それぞれ、細胞または生物内での免疫原性が低減されていてよい（例えば、自然応答が低減されていてよい）。
【０１５４】
核酸（例えば、ｍＲＮＡ核酸のようなＲＮＡ核酸）は、いくつかの実施形態では、所望の機能または特性を実現するために、その核酸の合成中または合成後に導入される非天然の修飾ヌクレオチド含む。その修飾は、ヌクレオチド間結合、プリン塩基もしくはピリミジン塩基、または糖に存在してよい。その修飾は、化学合成またはポリメラーゼ酵素によって、その鎖の末端またはその鎖内の他の位置に導入してよい。核酸の領域のいずれかを

化学修飾してよい。

【０１５５】

本開示は、核酸（例えば、ｍＲＮＡ核酸のようなＲＮＡ核酸）の修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドを提供する。「ヌクレオシド」とは、糖分子（例えば、ペントースもしくはリボース）またはその誘導体を、有機塩基（例えば、プリンもしくはピリミジン）またはその誘導体（本明細書では「核酸塩基」ともいう）と合わせて含む化合物を指す。「ヌクレオチド」とは、リン酸基を含むヌクレオシドを指す。修飾ヌクレオチドは、修飾ヌクレオシドまたは非天然ヌクレオシドを１つ以上含めるためのいずれかの有用な方法（例えば、化学的な方法、酵素的な方法または組み換えによる方法など）によって合成してよい。核酸は、連結されたヌクレオシドからなる１つの領域または複数の領域を含むことができる。このような領域は、様々な主鎖結合を有することができる。その結合は、標準的なホスホジエステル結合であることができ、その場合には、核酸は、ヌクレオチドからなる領域を含むことになる。

【０１５６】

修飾ヌクレオチドの塩基対合には、標準的なアデノシン－チミン、アデノシン－ウラシルまたはグアノシン－シトシンの塩基対のみならず、ヌクレオチド及び／または非標準的な塩基または修飾塩基を含む修飾ヌクレオチドの間で形成される塩基対も含まれ、水素結合ドナーと水素結合アクセプターが配置されることにより、非標準的な塩基と標準的な塩基の間、または２つの相補的な非標準的塩基構造体（例えば、化学修飾を少なくとも１つ有する核酸におけるようなもの）の間で、水素結合が可能になる。このような非標準的な塩基対合の一例は、修飾ヌクレオチドのイノシンと、アデニン、シトシンまたはウラシルとの間の塩基対合である。塩基／糖またはリンカーをいずれかに組み合わせたものも、本開示の核酸に導入してよい。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、核酸（例えば、ｍＲＮＡ核酸のようなＲＮＡ核酸）における修飾核酸塩基は、Ｎ１－メチル－シュードウリジン（ｍ１ψ）、１－エチル－シュードウリジン（ｅ１ψ）、５－メトキシ－ウリジン（ｍｏ５Ｕ）、５－メチル－シチジン（ｍ５Ｃ）及び／またはシュードウリジン（ψ）を含む。いくつかの実施形態では、核酸（例えば、ｍＲＮＡ核酸のようなＲＮＡ核酸）における修飾核酸塩基は、５－メトキシメチルウリジン、５－メチルチオウリジン、１－メトキシメチルシュードウリジン、５－メチルシチジン及び／または５－メトキシシチジンを含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリリボヌクレオチドは、化学修飾体（ただし、これに限らない）を含め、上記の修飾核酸塩基のいずれかのうちの少なくとも２個（例えば、２個、３個または４個以上）を組み合わせたものを含む。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、本開示のＲＮＡ核酸は、その核酸のウリジン位の１つ以上またはすべてに、Ｎ１－メチル－シュードウリジン（ｍ１ψ）への置換を含む。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、本開示のＲＮＡ核酸は、その核酸のウリジン位の１つ以上またはすべてに、Ｎ１－メチル－シュードウリジン（ｍ１ψ）への置換を含み、その核酸のシチジン位の１つ以上またはすべてに、５－メチルシチジンへの置換を含む。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、本開示のＲＮＡ核酸は、その核酸のウリジン位の１つ以上またはすべてに、シュードウリジン（ψ）への置換を含む。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、本開示のＲＮＡ核酸は、その核酸のウリジン位の１つ以上またはすべてに、シュードウリジン（ψ）への置換を含み、その核酸のシチジン位の１つ以上またはすべてに、５－メチルシチジンへの置換を含む。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、本開示のＲＮＡ核酸は、その核酸のウリジン位の１つ以上ま

たはすべてに、ウリジンを含む。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、核酸（例えば、ｍＲＮＡ核酸のようなＲＮＡ核酸）は、特定の修飾では、一様に修飾されている（例えば、完全に修飾されている、配列全体にわたって修飾されている）。例えば、核酸は、Ｎ１－メチル－シュードウリジンで一様に修飾されていることができ、これは、ｍＲＮＡ配列内のすべてのウリジン残基が、Ｎ１－メチル－シュードウリジンに置き換えられていることを意味する。同様に、核酸は、その配列に存在するいずれかの種類のヌクレオシド残基においては、上に示した残基のような修飾残基に置き換えることによって、一様に修飾できる。

【０１６４】

本開示の核酸は、その分子の長さ全体に沿って、部分的または完全に修飾されていてもよい。例えば、本開示の核酸、またはその所定の配列領域（例えば、ポリＡテールを含むかもしくは含まないｍＲＮＡ）において、ヌクレオチドの１つ以上もしくはすべて、または所定の種類（例えば、プリンもしくはピリミジン、またはＡ、Ｇ、Ｕ、Ｃのいずれか１つ以上もしくはすべて）が、一様に改変されていてもよい。いくつかの実施形態では、本開示の核酸（またはその配列領域）におけるすべてのヌクレオチドＸが、修飾ヌクレオチドであり、そのＸは、ヌクレオチドＡ、Ｇ、Ｕ、Ｃのいずれか１つ、またはＡ＋Ｇ、Ａ＋Ｕ、Ａ＋Ｃ、Ｇ＋Ｕ、Ｇ＋Ｃ、Ｕ＋Ｃ、Ａ＋Ｇ＋Ｕ、Ａ＋Ｇ＋Ｃ、Ｇ＋Ｕ＋ＣもしくはＡ＋Ｇ＋Ｃという組み合わせのうちのいずれか１つであってよい。

【０１６５】

その核酸は、（すべてのヌクレオチドの含有量に対して、または１種以上のヌクレオチド、すなわち、Ａ、Ｇ、ＵもしくはＣのいずれか１つ以上に対して、）修飾ヌクレオチドを約１％～約１００％、またはそのいずれかの小範囲の割合（例えば、１％～２０％、１％～２５％、１％～５０％、１％～６０％、１％～７０％、１％～８０％、１％～９０％、１％～９５％、１０％～２０％、１０％～２５％、１０％～５０％、１０％～６０％、１０％～７０％、１０％～８０％、１０％～９０％、１０％～９５％、１０％～１００％、２０％～２５％、２０％～５０％、２０％～６０％、２０％～７０％、２０％～８０％、２０％～９０％、２０％～９５％、２０％～１００％、５０％～６０％、５０％～７０％、５０％～８０％、５０％～９０％、５０％～９５％、５０％～１００％、７０％～８０％、７０％～９０％、７０％～９５％、７０％～１００％、８０％～９０％、８０％～９５％、８０％～１００％、９０％～９５％、９０％～１００％及び９５％～１００％）含んでよい。残りの割合にはいずれも、修飾されていないＡ、Ｇ、ＵまたはＣが存在することになることは分かるであろう。

【０１６６】

その核酸は、修飾ヌクレオチドを最低でも１％、最高で１００％、またはそのいずれかの小範囲の割合で含んでよい（修飾ヌクレオチドを少なくとも５％、修飾ヌクレオチドを少なくとも１０％、修飾ヌクレオチドを少なくとも２５％、修飾ヌクレオチドを少なくとも５０％、修飾ヌクレオチドを少なくとも８０％、または修飾ヌクレオチドを少なくとも９０％など）。例えば、その核酸は、修飾ウラシルまたは修飾シトシンのような修飾ピリミジンを含んでよい。いくつかの実施形態では、核酸におけるウラシルの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２５％、少なくとも５０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または１００％が、修飾ウラシル（例えば５－置換ウラシル）に置き換えられている。その修飾ウラシルは、特有の構造を１つ有する化合物によって置き換えられていることもできるし、または異なる構造（例えば、２個、３個もしくは４個以上の特有の構造）を有する複数の化合物によって置き換えられていることもできる。いくつかの実施形態では、その核酸におけるシトシンの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２５％、少なくとも５０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または１００％が、修飾シトシン（例えば５－置換シトシン）に置き換えられている。その修飾シトシンは、特有の構造を１つ有する化合物によって置き換えられていることもできるし、または異なる構造（例えば、２個、３個もしくは４個以上の特有の構造）を有する複数の化合物によって

置き換えられていることもできる。

【０１６７】

非翻訳領域（ＵＴＲ）

非翻訳領域（ＵＴＲ）は、ポリヌクレオチドの核酸部分のうち、開始コドンの前の部分（５’ＵＴＲ）及び終止コドンの後の部分（３’ＵＴＲ）であって、翻訳されない部分である。いくつかの実施形態では、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含む本発明のポリヌクレオチド（例えばリボ核酸（ＲＮＡ）、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））は、ＵＴＲ（例えば、５’ＵＴＲもしくはその機能的断片、３’ＵＴＲもしくはその機能的断片、またはこれらを組み合わせたもの）をさらに含む。

【０１６８】

ＵＴＲ（例えば、５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲ）は、ポリヌクレオチド内のコード領域と同種のものであることもできるし、または異種のものであることもできる。いくつかの実施形態では、そのＵＴＲは、本発明のバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦと同種のものである。いくつかの実施形態では、そのＵＴＲは、本発明のバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするＯＲＦと異種のものである。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、５’ＵＴＲまたはその機能的断片を２つ以上含み、そのそれぞれは、同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、３’ＵＴＲまたはその機能的断片を２つ以上含み、そのそれぞれは、同じヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を有する。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲもしくはその機能的断片、３’ＵＴＲもしくはその機能的断片、またはこれらをいずれかに組み合わせたものは、配列が最適化されている。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲもしくはその機能的断片、３’ＵＴＲもしくはその機能的断片、またはこれらをいずれかに組み合わせたものは、化学修飾核酸塩基、例えば、Ｎ１－メチルシュードウラシルまたは５－メトキシウラシルを少なくとも１つ含む。

【０１７２】

ＵＴＲは、調節の役割を果たす特色、例えば、安定性、局在化及び／または翻訳効率を増減させる特色を有することができる。ＵＴＲを含むポリヌクレオチドは、細胞、組織または生物に投与でき、１つ以上の調節上の特色は、常法を用いて測定できる。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲの機能的断片は、完全長の５’ＵＴＲの調節上の特色を、３’ＵＴＲの機能的断片は、完全長の３’ＵＴＲの調節上の特色をそれぞれ１つ以上含む。

【０１７３】

天然の５’ＵＴＲは、翻訳開始の際に役割を果たす特色を有する。天然の５’ＵＴＲは、Ｋｏｚａｋ配列のように、リボソームが、多くの遺伝子の翻訳を開始するプロセスに関与することが広く知られているシグネチャーを有する。Ｋｏｚａｋ配列は、コンセンサスなＣＣＲ（Ａ／Ｇ）ＣＣＡＵＧＧ（配列番号２１４）を有し、そのＲは、開始コドン（ＡＵＧ）から３塩基上流のプリン（アデニンまたはグアニン）であり、開始コドンの後には、もう１つ「Ｇ」が続いている。５’ＵＴＲは、伸長因子の結合に関与する二次構造を形成することも知られている。

【０１７４】

所定の標的器官の、豊富に発現される遺伝子で典型的に見られる特色を操作することによって、ポリヌクレオチドの安定性及びタンパク質産生を増強できる。例えば、アルブミン、血清アミロイドＡ、アポリポタンパク質Ａ／Ｂ／Ｅ、トランスフェリン、αフェトプロテイン、エリスロポエチンまたは第ＶＩＩＩ因子のように、肝臓で発現するｍＲＮＡの５’ＵＴＲの導入によって、肝細胞株または肝臓において、ポリヌクレオチドの発現を増強できる。同様に、他の組織特異的なｍＲＮＡに由来する５’ＵＴＲを用いて、その組織

内での発現を改善するのは、筋肉（例えば、ＭｙｏＤ、ミオシン、ミオグロビン、ミオゲニン、ハーキュリン）、内皮細胞（例えば、Ｔｉｅ－１、ＣＤ３６）、骨髄系細胞（例えば、Ｃ／ＥＢＰ、ＡＭＬ１、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＣＤ１１ｂ、ＭＳＲ、Ｆｒ－１、ｉ－ＮＯＳ）、白血球（例えば、ＣＤ４５、ＣＤ１８）、脂肪組織（例えば、ＣＤ３６、ＧＬＵＴ４、ＡＣＲＰ３０、アディポネクチン）及び肺上皮細胞（例えば、ＳＰ－Ａ／Ｂ／Ｃ／Ｄ）において可能である。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、タンパク質で、共通の機能、構造、特色または特性が共有される転写産物のファミリーから選択されている。例えば、コードされたポリペプチドは、タンパク質のファミリー（すなわち、少なくとも１つの機能、構造、特色、局在化、起源または発現パターンを共有するファミリー）に属することができ、それらのポリペプチドは、特定の細胞内、組織内、または発生中のある時点に発現する。その遺伝子またはｍＲＮＡのいずれかに由来するＵＴＲを、同じまたは異なるファミリーのタンパク質の、いずれかの他のＵＴＲに置き換えて、新たなポリヌクレオチドを作製できる。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲは、異種のものであることができる。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、３’ＵＴＲとは異なる種に由来することができる。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、５’ＵＴＲとは異なる種に由来することができる。

【０１７７】

共有国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２１５２２（公開番号ＷＯ／２０１４／１６４２５３、参照により、その全体が本明細書に援用される）には、本発明のポリヌクレオチドにおいて、ＯＲＦに対するフランキング領域として利用できる例示的なＵＴＲのリストが示されている。

【０１７８】

本願のさらなる例示的なＵＴＲとしては、α－グロビンまたはβ－グロビンのようなグロビン（例えば、ツメガエルグロビン、マウスグロビン、ウサギグロビンまたはヒトグロビン）、強力なＫｏｚａｋ翻訳開始シグナル、ＣＹＢＡ（例えばヒトシトクロムｂ－２４５αポリペプチド）、アルブミン（例えばヒトアルブミン７）、ＨＳＤ１７Ｂ４（ヒドロキシステロイド（１７－β）デヒドロゲナーゼ）、ウイルス（例えば、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＶＥＥＶ）、デングウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）（例えばＣＭＶ前初期１（ＩＥ１））、肝炎ウイルス（例えばＢ型肝炎ウイルス）、シンドビスウイルスまたはＰＡＶオオムギ黄萎ウイルス）、熱ショックタンパク質（例えばｈｓｐ７０）、翻訳開始因子（例えばｅｌＦ４Ｇ）、グルコース輸送体（例えばｈＧＬＵＴ１（ヒトグルコース輸送体１））、アクチン（例えば、ヒトαアクチンまたはヒトβアクチン）、ＧＡＰＤＨ、チューブリン、ヒストン、クエン酸回路酵素、トポイソメラーゼ（例えば、５’ＴＯＰモチーフ（オリゴピリミジントラクト）を欠失したＴＯＰ遺伝子の５’ＵＴＲ）、リボソームタンパク質Ｌａｒｇｅ３２（Ｌ３２）、リボソームタンパク質（例えば、例えばｒｐｓ９のようなヒトリボソームタンパク質またはマウスリボソームタンパク質）、ＡＴＰシンターゼ（例えば、ＡＴＰ５Ａ１またはミトコンドリアＨ＋－ＡＴＰシンターゼのβサブユニット）、成長ホルモンｅ（例えば、ウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）またはヒト成長ホルモン（ｈＧＨ））、伸長因子（例えば伸長因子１α１（ＥＥＦ１Ａ１））、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ（ＭｎＳＯＤ）、筋細胞エンハンサー因子２Ａ（ＭＥＦ２Ａ）、β－Ｆ１－ＡＴＰａｓｅ、クレアチンキナーゼ、ミオグロビン、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、コラーゲン（例えば、コラーゲンＩ型、コラーゲンα２（Ｃｏｌ１Ａ２）、コラーゲンＩ型α１（Ｃｏｌ１Ａ１）、コラーゲンＶＩ型α２（Ｃｏｌ６Ａ２）、コラーゲンＶＩ型α１（Ｃｏｌ６Ａ１））、リボフォリン（例えばリボフォリンＩ（ＲＰＮＩ））、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（例えばＬＲＰ１）、カルジオトロフィン様サイトカイン因子（例えばＮｎｔ１）、カルレティキュリン（Ｃａｌｒ）、プロコラーゲン－リシン、２－オキソグルタル

酸５－ジオキシゲナーゼ１（Ｐｌｏｄ１）、及びヌクレオビンディン（例えばＮｕｃｂ１）の核酸配列に由来する１つ以上の５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲが挙げられるが、これらに限らない。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、βグロビン５’ＵＴＲ、強力なＫｏｚａｋ翻訳開始シグナルを含む５’ＵＴＲ、シトクロムｂ－２４５　αポリペプチド（ＣＹＢＡ）５’ＵＴＲ、ヒドロキシステロイド（１７－β）デヒドロゲナーゼ（ＨＳＤ１７Ｂ４）５’ＵＴＲ、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）５’ＵＴＲ、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＴＥＶ）５’ＵＴＲ、非構造タンパク質をコードする風疹ウイルス（ＲＶ）ＲＮＡの５’近位オープンリーディングフレーム、デングウイルス（ＤＥＮ）５’ＵＴＲ、熱ショックタンパク質７０（Ｈｓｐ７０）５’ＵＴＲ、ｅＩＦ４Ｇ　５’ＵＴＲ、ＧＬＵＴ１　５’ＵＴＲ、これらの機能的断片及びこれらをいずれかに組み合わせたものからなる群から選択されている。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、βグロビン３’ＵＴＲ、ＣＹＢＡ　３’ＵＴＲ、アルブミン３’ＵＴＲ、成長ホルモン（ＧＨ）３’ＵＴＲ、ＶＥＥＶ　３’ＵＴＲ、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）３’ＵＴＲ、α－グロビン３’ＵＴＲ、ＤＥＮ　３’ＵＴＲ、ＰＡＶオオムギ黄萎ウイルス（ＢＹＤＶ－ＰＡＶ）３’ＵＴＲ、伸長因子１　α１（ＥＥＦ１Ａ１）３’ＵＴＲ、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ（ＭｎＳＯＤ）３’ＵＴＲ、ミトコンドリアＨ（＋）－ＡＴＰシンターゼ（β－ｍＲＮＡ）のβサブユニットの３’ＵＴＲ、ＧＬＵＴ１　３’ＵＴＲ、ＭＥＦ２Ａ　３’ＵＴＲ、β－Ｆ１－ＡＴＰａｓｅ　３’ＵＴＲ、これらの機能的断片及びこれらを組み合わせたものからなる群から選択されている。

【０１８１】

いずれの遺伝子またはｍＲＮＡに由来する野生型ＵＴＲも、本発明のポリヌクレオチドに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、例えば、ＯＲＦに対するＵＴＲの配向もしくは位置を変更することによって、または追加のヌクレオチドを含めるか、ヌクレオチドを欠失させるか、ヌクレオチドをスワッピングもしくは転移することによって、野生型または天然型のＵＴＲに対して変更を加えて、バリアントＵＴＲを作製できる。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲのバリアント、例えば、野生型ＵＴＲの変異体、または１つ以上のヌクレオチドが、そのＵＴＲの末端に付加されているか、またはＵＴＲの末端から除去されているバリアントを使用できる。

【０１８２】

加えて、１つ以上の合成ＵＴＲを、１つ以上の非合成ＵＴＲと組み合わせて使用できる。例えば、Ｍａｎｄａｌ　ａｎｄ　Ｒｏｓｓｉ，Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３　８（３）：５６８－８２（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい。

【０１８３】

ＵＴＲまたはその一部は、その選択元である転写産物と同じ配向で配置することもできるし、または配向もしくは位置を変更することもできる。すなわち、５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲは、逆向きにしたり、短縮したり、延長したり、または１つ以上の他の５’ＵＴＲもしくは３’ＵＴＲと組み合わせたりできる。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＵＴＲを複数、例えば、５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲを二重、三重または四重に含む。例えば、二重のＵＴＲは、同じＵＴＲを２コピー、直列に、または実質的に直列に含む。例えば、二重のβ－グロビン３’ＵＴＲを使用できる（ＵＳ２０１０／０１２９８７７（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０１８５】

本発明のポリヌクレオチドは、特色を組み合わせて含むことができる。例えば、ＯＲＦは、強力なＫｏｚａｋ翻訳開始シグナルを含む５’ＵＴＲ、及び／または鋳型によるポリ

Ａテールの付加用に、オリゴ（ｄＴ）配列を含む３’ＵＴＲに挟まれていることができる。５’ＵＴＲは、同じＵＴＲ及び／または異なるＵＴＲに由来する第１のポリヌクレオチド断片及び第２のポリヌクレオチド断片を含むことができる（例えば、ＵＳ２０１０／０２９３６２５（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０１８６】

他の非ＵＴＲ配列を、本発明のポリヌクレオチド内の領域またはサブ領域として使用できる。例えば、イントロンまたはイントロン配列の一部を、本発明のポリヌクレオチドに組み込むことができる。イントロン配列を組み込むことで、タンパク質産生及びポリヌクレオチド発現レベルを向上できる。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＵＴＲの代わりに、またはＵＴＲに加えて、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）を含む（例えば、Ｙａｋｕｂｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２０１０　３９４（１）：１８９－１９３（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、５’ＵＴＲ配列の代わりに、ＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＯＲＦ及びウイルスキャプシド配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、非合成３’ＵＴＲと合わせて、合成５’ＵＴＲを含む。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、そのＵＴＲは、少なくとも１つの翻訳エンハンサーポリヌクレオチド、１つの翻訳エンハンサーエレメントまたは複数の翻訳エンハンサー（合わせて「ＴＥＥ」といい、ポリヌクレオチドから産生されるポリペプチドまたはタンパク質の量を増やす核酸配列を指す）も含むことができる。非限定的な例として、そのＴＥＥは、転写プロモーターと開始コドンの間に位置できる。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、ＴＥＥを含む。

【０１８８】

一態様では、ＴＥＥは、ＵＴＲにおける保存されたエレメントであって、キャップ依存性翻訳またはキャップ非依存性翻訳（ただし、これらに限らない）のような、核酸の翻訳活性を促進できるエレメントである。

【０１８９】

ａ．５’ＵＴＲ配列

５’ＵＴＲ配列は、リボソームをｍＲＮＡに動員するのに重要であり、翻訳の際に役割を果たすことが報告されている（Ｈｉｎｎｅｂｕｓｃｈ　Ａ，ｅｔ　ａｌ．，（２０１６）Ｓｃｉｅｎｃｅ，３５２：６２９２：１４１３－６）。

【０１９０】

本発明で開示するのはとりわけ、バリアントＰＡＨポリペプチド（例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２）をコードするオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡであり、そのポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド、またはそのポリヌクレオチド自体の半減期の延長、発現の増加及び／または活性の向上をもたらす５’ＵＴＲを有する。ある実施形態では、本明細書に開示されているポリヌクレオチドは、（ａ）５’ＵＴＲ（例えば、表２に示されている５’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片）、（ｂ）終止エレメントを含むコード領域（例えば、本明細書に記載されているような領域）、及び（ｃ）３’ＵＴＲ（例えば、本明細書に記載されているような３’ＵＴＲ）を含み、ＬＮＰ組成物が、そのポリヌクレオチドを含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、表２に示されている配列を含む５’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片（例えば、その機能的バリアントもしくは機能的断片）を含む。

【０１９１】

ある実施形態では、表２に示されている５’ＵＴＲ配列、またはそのバリアントもしくは断片を有するポリヌクレオチドでは、そのポリヌクレオチドの半減期が延長しており、

例えば、そのポリヌクレオチドの半減期が約１．５～２０倍延長している。ある実施形態では、半減期の延長は、約１．５倍以上、約２倍以上、約３倍以上、約４倍以上、約５倍以上、約６倍以上、約７倍以上、約８倍以上、約９倍以上、約１０倍以上、約１１倍以上、約１２倍以上、約１３倍以上、約１４倍以上、約１５倍以上、約１６倍以上、約１７倍以上、約１８倍以上、約１９倍以上または２０倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約１．５倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約２倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約３倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約４倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約５倍以上である。

【０１９２】

ある実施形態では、表２に示されている５’ＵＴＲ配列、またはそのバリアントもしくは断片を有するポリヌクレオチドにより、そのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び／または活性、例えば産生量が向上する。ある実施形態では、その５’ＵＴＲにより、そのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び／または活性、例えば産生量が約１．５～２０倍向上する。ある実施形態では、レベル及び／または活性の向上は、約１．５倍以上、約２倍以上、約３倍以上、約４倍以上、約５倍以上、約６倍以上、約７倍以上、約８倍以上、約９倍以上、約１０倍以上、約１１倍以上、約１２倍以上、約１３倍以上、約１４倍以上、約１５倍以上、約１６倍以上、約１７倍以上、約１８倍以上、約１９倍以上または約２０倍以上である。ある実施形態では、レベル及び／または活性の向上は、約１．５倍以上である。ある実施形態では、レベル及び／または活性の向上は、約２倍以上である。ある実施形態では、レベル及び／または活性の向上は、約３倍以上である。ある実施形態では、レベル及び／または活性の向上は、約４倍以上である。ある実施形態では、レベル及び／または活性の向上は、約５倍以上である。

【０１９３】

ある実施形態では、その向上は、５’ＵＴＲを有さないか、異なる５’ＵＴＲを有するか、あるいは表２に記載されている５’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片を有さない別段の類似のポリヌクレオチドと比較する。

【０１９４】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの半減期の延長は、ポリヌクレオチドの半減期を測定するアッセイに従って測定する。

【０１９５】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び／または活性、例えば産生量の向上は、ポリペプチドのレベル及び／または活性を測定するアッセイに従って測定する。

【０１９６】

ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、表２に示されている配列、あるいは表２に示されている５’ＵＴＲ配列、またはそのバリアントもしくは断片との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７または配列番号５８との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。

【０１９７】

ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５０との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５１との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５２との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５３との同一性が少なく

とも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５４との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５５との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５６との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５７との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５８との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。

【０１９８】

ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５８の配列を含む。ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５８の配列からなる。

【０１９９】

ある実施形態では、表２に示されている５’ＵＴＲ配列は、Ａである第１のヌクレオチドを有する。ある実施形態では、表２に示されている５’ＵＴＲ配列は、Ｇである第１のヌクレオチドを有する。

【表２－１】

表２：５’ＵＴＲ配列

配列番号	配列名	配列
50	A1	GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC
51	A5	GGAAAUCCCCACAACCGCCUCAUAUCCAGGCUCAAGAAUAGAGCUCAGUGUUUUGUUGUUUAAUCAUUCCGACGUGUUUUGCGAUAUUCGCGCAAAGCAGCCAGUCGCGCGCUUGCUUUUAAGUAGAGUUGUUUUUCCACCCGUUUGCCAGGCAUCUUUAAUUUAACAUAUUUUUAUUUUUCAGGCUAACCUACGCCGCCACC
52	A6	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAUCUCCCUGAGCUUCAGGGAGCCCCGGCGCCGCCACC
53	A7	GGAAACCCCCCACCCCCGUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAUCUCCCUGAGCUUCAGGGAGCCCCCGGCGCCGCCACC
54	A8	GGAGAACUUCCGCUUCCGUUGGCGCAAGCGCUUUCAUUUUUUCUGCUACCGUGACUAAG
55	A9	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC
56	A11(参照)	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCCGCCACC
57	A2	GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCCGCCGCC
58	A3	GGAAAUCGCAAAAUUUUCUUUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGUUUUCUUUCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCCGCCGCC
59	A4	G G A A A U C G C A A A A $(N_2)_x(N_3)_x$ C U $(N_4)_x(N_5)_x$ C G C G U U A G A U U U C U U U U A G U U U U C U N_6 N_7 C A A C U A G C A A G C U U U U U G U U C U C G C C $(N_8$ C C$)_x$ $(N_2)_x$は、ウラシルであり、xは、0～5の整数であり、例えば、xは、3または4である。 $(N_3)_x$は、グアニンであり、xは、0～1の整数である。 $(N_4)_x$は、シトシンであり、xは、0～1の整数である。 $(N_5)_x$は、ウラシルであり、xは、0～5の整数であり、例えば、xは、2または3である。 N_6は、ウラシルまたはシトシンである。 N_7は、ウラシルまたはグアニンである。 N_8は、アデニンまたはグアニンであり、xは、0～1の整数である。

【表２－２】

60	A27	GGAAAAUUUUAGCCUGGAACGUUAGAUAACUGUCCUG UUGUCUUUAUAUACUUGGUCCCCAAGUAGUUUGUCUU CCAAA
61	A12	GGAAACUUUAUUUAGUGUUACUUUAUUUUCUGUUUAU UUGUGUUUCUUCAGUGGGUUUGUUCUAAUUUCCUUGG CCGCC
62	A13	GGAAAAUCUGUAUUAGGUUGGCGUGUUCUUUGGUCGG UUGUUAGUAUUGUUGUUGAUUCGUUUGUGGUCGGUUG CCGCC
63	A14	GGAAAAUUAUUAACAUCUUGGUAUUCUCGAUAACCAU UCGUUGGAUUUUAUUGUAUUCGUAGUUUGGGUUCCUG CCGCC
64	A15	GGAAAUUAUUAUUAUUUCUAGCUACAAUUUAUCAUUG UAUUAUUUUAGCUAUUCAUCAUUAUUUACUUGGUGAU CAACA
65	A16	GGAAAUAGGUUGUUAACCAAGUUCAAGCCUAAUAAGC UUGGAUUCUGGUGACUUGCUUCACCGUUGGCGGGCAC CGAUC
66	A17	GGAAAUCGUAGAGAGUCGUACUUAGUACAUAUCGACU AUCGGUGGACACCAUCAAGAUUAUAAACCAGGCCAGA
67	A18	GGAAACCCGCCCAAGCGACCCCAACAUAUCAGCAGUUG CCCAAUCCCAACUCCCAACACAAUCCCCAAGCAACGCC GCC
68	A19	GGAAAGCGAUUGAAGGCGUCUUUUCAACUACUCGAUU AAGGUUGGGUAUCGUCGUGGGACUUGGAAAUUUGUUG UUUCC
69	A20	GGAAACUAAUCGAAAUAAAAGAGCCCCGUACUCUUUU AUUUCUAUUAGGUUAGGAGCCUUAGCAUUUGUAUCUU AGGUA
70	A21	GGAAAUGUGAUUUCCAGCAACUUCUUUUGAAUAUAUU GAAUUCCUAAUUCAAAGCGAACAAAUCUACAAGCCAU AUACC
71	A22	GGAAAUCGUAGAGAGUCGUACUUACGUGGUCGCCAUU GCAUAGCGCGCGAAAGCAACAGGAACAAGAACGCGCC
72	A23	GGAAAUCGUAGAGAGUCGUACUUAGAAUAAACAGAGU CGGGUCGACUUGUCUCUGAUACUACGACGUCACAAUC
73	A24	GGAAAAUUUGCCUUCGGAGUUGCGUAUCCUGAACUGC CCAGCCUCCUGAUAUACAACUGUUCCGCUUAUUCGGGC CGCC
74	A25	GGAAAUCUGAGCAGGAAUCCUUUGUGCAUUGAAGACU UUAGAUUCCUCUCUGCGGUAGACGUGCACUUAUAAGU AUUUG

【表２－３】

75	A26	GGAAAGCGAUUGAAGGCGUCUUUUCAACUACUCGAUU AAGGUUGGGUAUCGUCGUGGGACUUGGAAAUUUGUUG CCACC
76	A28	GGAAAUUUUUUUUUGAUAUUAUAAGAGUUUUUUUUUG AUAUUAAGAAAAUUUUUUUUUGAUAUUAGAAGAGUAA GAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCCGCCACC
77	A29	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUA AGAGCCAAAAAAAAAAAAACC
78	A30	GGAAAUCUCCCUGAGCUUCAGGGAGUAAGAGAGAAAA GAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACCCCGGCGCCGCCA CC
79	A31	GCCRCC(Rは、ＡまたはＧである)

【０２００】

ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５０のバリアントを含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、下記の式Ａの核酸配列を含み、

ＧＧＡＡＡＵＣＧＣＡＡＡＡ（Ｎ２）Ｘ（Ｎ３）ＸＣＵ（Ｎ４）Ｘ（Ｎ５）ＸＣＧＣＧＵＵＡＧＡＵＵＵＣＵＵＵＵＡＧＵＵＵＵＣＵＮ６Ｎ７ＣＡＡＣＵＡＧＣＡＡＧＣＵＵＵＵＵＧＵＵＣＵＣＧＣＣ（Ｎ８ＣＣ）ｘ（配列番号５９）

式中、

（Ｎ２）ｘは、ウラシルであり、ｘは、０～５の整数であり、例えば、ｘは、３または４であり、

（Ｎ３）ｘは、グアニンであり、ｘは、０～１の整数であり、

（Ｎ４）ｘは、シトシンであり、ｘは、０～１の整数であり、

（Ｎ５）ｘは、ウラシルであり、ｘは、０～５の整数であり、例えば、ｘは、２または３であり、

Ｎ６は、ウラシルまたはシトシンであり、

Ｎ７は、ウラシルまたはグアニンであり、

Ｎ８は、アデニンまたはグアニンであり、ｘは、０～１の整数である。

【０２０１】

ある実施形態では、（Ｎ２）ｘは、ウラシルであり、ｘは、０である。ある実施形態では、（Ｎ２）ｘは、ウラシルであり、ｘは、１である。ある実施形態では、（Ｎ２）ｘは、ウラシルであり、ｘは、２である。ある実施形態では、（Ｎ２）ｘは、ウラシルであり、ｘは、３である。ある実施形態では、（Ｎ２）ｘは、ウラシルであり、ｘは、４である。ある実施形態では、（Ｎ２）ｘは、ウラシルであり、ｘは、５である。

【０２０２】

ある実施形態では、（Ｎ３）ｘは、グアニンであり、ｘは、０である。ある実施形態では、（Ｎ３）ｘは、グアニンであり、ｘは、１である。

【０２０３】

ある実施形態では、（Ｎ４）ｘは、シトシンであり、ｘは、０である。ある実施形態では、（Ｎ４）ｘは、シトシンであり、ｘは、１である。

【０２０４】

ある実施形態では、（Ｎ５）ｘは、ウラシルであり、ｘは、０である。ある実施形態では、（Ｎ５）ｘは、ウラシルであり、ｘは、１である。ある実施形態では、（Ｎ５）ｘは、ウラシルであり、ｘは、２である。ある実施形態では、（Ｎ５）ｘは、ウラシルであり、ｘは、３である。ある実施形態では、（Ｎ５）ｘは、ウラシルであり、ｘは、４である。ある実施形態では、（Ｎ５）ｘは、ウラシルであり、ｘは、５である。

【０２０５】

ある実施形態では、Ｎ６は、ウラシルである。ある実施形態では、Ｎ６は、シトシンで

ある。
【０２０６】
ある実施形態では、Ｎ７は、ウラシルである。ある実施形態では、Ｎ７は、グアニンである。
【０２０７】
ある実施形態では、Ｎ８は、アデニンであり、ｘは、０である。ある実施形態では、Ｎ８は、アデニンであり、ｘは、１である。
【０２０８】
ある実施形態では、Ｎ８は、グアニンであり、ｘは、０である。ある実施形態では、Ｎ８は、グアニンであり、ｘは、１である。
【０２０９】
ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、配列番号５０のバリアントを含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも５０％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも６０％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも７０％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも８０％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも９０％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも９５％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも９６％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも９７％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも９８％である配列を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、配列番号５０との同一性が少なくとも９９％である配列を含む。
【０２１０】
ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％または８０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも５％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも１０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも２０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも３０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも４０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも５０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも６０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも７０％である。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ウリジン含有量が少なくとも８０％である。
【０２１１】
ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、少なくとも２連続、３連続、４連続、５連続、６連続または７連続のウリジン（例えばポリウリジントラクト）を含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントにおけるポリウリジントラクトは、少なくとも１～７連続、２～７連続、３～７連続、４～７連続、５～７連続、６～７連続、１～６連続、１～５連続、１～４連続、１～３連続、１～２連続、２～６連続または３～５連続のウリジンを含む。ある実施形態では、配列列番号５０のバリアントにおけるポリウリジントラクトは、４連続のウリジンを含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントに

おけるポリウリジントラクトは、５連続のウリジンを含む。

【０２１２】

ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ポリウリジントラクトを１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個または１５個含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ポリウリジントラクトを３個含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ポリウリジントラクトを４個含む。ある実施形態では、配列番号５０のバリアントは、ポリウリジントラクトを５個含む。

【０２１３】

ある実施形態では、ポリウリジントラクトの１つ以上は、異なるポリウリジントラクトに隣接している。ある実施形態では、ポリウリジントラクト、例えばすべてのポリウリジントラクトのそれぞれは、互いに隣接しており、例えば、ポリウリジントラクトのすべてが連続している。

【０２１４】

ある実施形態では、ポリウリジントラクトの１つ以上は、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、３０個、４０個、５０個または６０個のヌクレオチドによって隔てられている。ある実施形態では、ポリウリジントラクト、例えばすべてのポリウリジントラクトのそれぞれは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、３０個、４０個、５０個または６０個のヌクレオチドによって隔てられている。

【０２１５】

ある実施形態では、１個目のポリウリジントラクト及び２個目のポリウリジントラクトは、互いに隣接している。

【０２１６】

ある実施形態では、それ以降、例えば、３個目、４個目、５個目、６個目、７個目、８個目、９個目または１０個目のポリウリジントラクトは、１個目のポリウリジントラクト、２個目のポリウリジントラクトまたは３個目以降のポリウリジントラクトのいずれか１つと、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、３０個、４０個、５０個または６０個のヌクレオチドによって隔てられている。

【０２１７】

ある実施形態では、１個目のポリウリジントラクトは、それよりも後のポリウリジントラクト、例えば、２個目、３個目、４個目、５個目、６個目、７個目、８個目、９個目または１０個目のポリウリジントラクトと、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、３０個、４０個、５０個または６０個のヌクレオチドによって隔てられている。ある実施形態では、２個目以降のポリウリジントラクトの１つ以上は、異なるポリウリジントラクトに隣接している。

【０２１８】

ある実施形態では、その５’ＵＴＲは、Ｋｏｚａｋ配列、例えばＧＣＣＲＣＣというヌクレオチド配列（配列番号７９）を含み、そのＲは、アデニンまたはグアニンである。ある実施形態では、そのＫｏｚａｋ配列は、５’ＵＴＲ配列の３’末端に配置されている。

【０２１９】

ある態様では、バリアントＰＡＨポリペプチド（例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２）をコードするオープンリーディングフレームを含むとともに、本明細書に開示されている５’ＵＴＲ配列を含むポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ）は、ＬＮＰとして調合されている。ある実施形態では、そのＬＮＰ組成物は、（ｉ）イオン

化可能な脂質、例えばアミノ脂質、（ｉｉ）ステロールまたはその他の構造脂質、（ｉｉｉ）非カチオン性のヘルパー脂質またはリン脂質、及び（ｉｖ）ＰＥＧ－脂質を含む。

【０２２０】

別の態様では、本開示のＬＮＰ組成物は、対象において、ＰＫＵのような高フェニルアラニン血症を治療する方法で使用する。

【０２２１】

ある態様では、本明細書に開示されているポリヌクレオチドであって、例えば、本明細書に記載されているようなバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むＬＮＰ組成物は、例えば、本明細書に記載されているような追加の薬剤とともに投与できる。

【０２２２】

ｂ．３’ＵＴＲ配列

３’ＵＴＲ配列は、ｍＲＮＡの翻訳、半減期及び細胞内局在性に影響を及ぼすことが示されている（Ｍａｙｒ　Ｃ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ　Ｐｅｒｓｐ　Ｂｉｏｌ　２０１９　Ｏｃｔ１；１１（１０）：ａ０３４７２８）。

【０２２３】

本発明で開示するのはとりわけ、バリアントＰＡＨポリペプチド（例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２）をコードするオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡであり、そのポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド、またはそのポリヌクレオチド自体の半減期の延長、発現の増加及び／または活性の向上をもたらす３’ＵＴＲを有する。ある実施形態では、本明細書に開示されているポリヌクレオチドは、（ａ）５’ＵＴＲ（例えば、本明細書に記載されているような５’ＵＴＲ）、（ｂ）終止エレメントを含むコード領域（例えば、本明細書に記載されているような領域）、及び（ｃ）３’ＵＴＲ（例えば、表３に示されている３’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片）を含み、ＬＮＰ組成物が、そのポリヌクレオチドを含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、表３に示されている配列を含む３’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片を含む。

【０２２４】

ある実施形態では、表３に示されている３’ＵＴＲ配列、またはそのバリアントもしくは断片を有するポリヌクレオチドでは、そのポリヌクレオチドの半減期が延長しており、例えば、そのポリヌクレオチドの半減期が約１．５～１０倍延長している。ある実施形態では、半減期の延長は、約１．５倍以上、約２倍以上、約３倍以上、約４倍以上、約５倍以上、約６倍以上、約７倍以上、約８倍以上、約９倍以上または１０倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約１．５倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約２倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約３倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約４倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約５倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約６倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約７倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約８倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約９倍以上である。ある実施形態では、半減期の延長は、約１０倍以上である。

【０２２５】

ある実施形態では、表３に示されている３’ＵＴＲ配列、またはそのバリアントもしくは断片を有するポリヌクレオチドにより、平均半減期スコアが１０を超えるポリヌクレオチドが得られる。

【０２２６】

ある実施形態では、表３に示されている３’ＵＴＲ配列、またはそのバリアントもしくは断片を有するポリヌクレオチドにより、そのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び／または活性、例えば産生量が向上する。

【０２２７】

ある実施形態では、その向上は、３’ＵＴＲを有さないか、異なる３’ＵＴＲを有するか、あるいは表３の３’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片を有さない別段の類似のポリヌクレオチドと比較する。

【０２２８】

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、表３に示されている３’ＵＴＲ配列、または表３に示されている３’ＵＴＲ配列もしくはその断片との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１００、配列番号１０１、配列番号１０２、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号１０５、配列番号１０６、配列番号１０７、配列番号１０８、配列番号１０９、配列番号１１０、配列番号１１１、配列番号１１２、配列番号１１３、配列番号１１４または配列番号１１５との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％である配列を含む。

【０２２９】

ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１００の配列、または配列番号１００との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０１の配列、または配列番号１０１との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０２の配列、または配列番号１０２との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０３の配列、または配列番号１０３との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０４の配列、または配列番号１０４との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０５の配列、または配列番号１０５との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０６の配列、または配列番号１０６との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０７の配列、または配列番号１０７との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０８の配列、または配列番号１０８との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１０９の配列、または配列番号１０９との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１１０の配列、または配列番号１１０との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１１１の配列、または配列番号１１１との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１１２の配列、または配列番号１１２との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１１３の配列、または配列番号１１３との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１１４の配列、または配列番号１１４との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９

６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号１１５の配列、または配列番号１１５との同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である配列を含む。

【０２３０】

【表３－１】

表３：３’ＵＴＲ配列

配列番号	配列情報	配列
100	B1	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACU AUUGAGAAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUG GUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
101	B3	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCACUCUCCUCUCCAUCCCGUAU CCAGGCUGUGAAUUUUUCAAGGAAUAUAAAGAUCGGGAUG UACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
102	B4	UGAUAGUAAGCUGGAGCCUCUAGUGACGGCAACAGGGCUU GGUUUUUCCUUGUUGUGAAAUCGACAUCUCUGAAGACAGG GUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
103	B5	UGAUAGUAAGCUGGAGCCUCCUUCCAUCUAGUCACAAAGA CUCCUUCGUCCCCAGUUGCCGUCUAGGAUUGGGCCUCCCAG UACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
104	B6	UGAUAGUAAGCUGGAGCCUCCCAUAACAUGACAUAUCUGG AUUUUGUGCUUAGAACCUUAAAUUGGAAGCAUUCUUAAUU GUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
105	B7	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCCGGAAAACUAAAAUAGAGAU AUUUCAAGAUUUUAUAAUUUUCAAAGACCUUUGAAAUAUU GUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
106	B8	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCUACACAUUGCUUCUAGUUGG CAGAAAUAAUUGAUUAAAAGACCAGAAACUGUGAUAACUG GUACCCCCGUGGUCUUUAAAUAAAGUCUAAGUGGGCGGC
107	B9	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
108	B10	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
109	B11	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAA UAAAGUCUGAGUGGGCGGC
110	B12	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAA UAAAGUCUGAGUGGGCGGC
111	B13	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUG AAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC

【表３－２】

112	B14	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGA AUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
113	B15	UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGC CUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGC CCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCC**CGCAUUAUUAC UCACGGUACGA**GUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCG GC
114	B16	UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGC CUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGU AGGAAACACUACAUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGC ACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUC UUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
115	B2	CUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAUCGGAACAGC UCCUUACUCUGAGGAAGUUG
116	B17	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCUCACACACCUCUGCCCCUUGG GCCUCCCACUCCCAUGGCUCUGGGCGGUCCAGAAGGAGCGU ACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
117	B18	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCCACCGCGUUAUCCGUUCCUCG UAGGCUGGUCCUGGGGAACGGGUCGGCGGGUACCCCCGUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
118	B19	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCUGCCCGGCAACGGCCAGGUC UGUGCCAAGUGUUUGCUGACGCAACCCCCACUGGCUGGGGC UUGGUCAUGGGCCAUCAGCGCGUGCGUGGAACCUUUUCGG CUCCUCUGCCGAUCCAUACUGCGGAACUCCUAGCCGCUUGU UUUGCUCGCAGCAGGUCUGGAGCAAACAUUAUCGGGACUG AUAACUCUGUUGUCCUGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAA GUCUGAGUGGGCGGC
119	B20	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCUUCUUUUCUUUUUUU UCUUUUUUUUUUUUUCUUUCUUUUUUUCUUUUUUUUUCUUU UCUUUUUUCUUUUUUUUUUUUUUUUCCGUGGUCUUUGAAU AAAGUCUGAGUGGGCGGC
120	B21	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCC CUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCG UACCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGUGGUCUUUGAAU AAAGUCUGAGUGGGCGGC

【表３－３】

133	B22	UAAGUCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUC GGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAG GAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCCUUCCUGCAC CCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUU UGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
134	B23	UAAAGCGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUG GGCCUCCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCC CCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAA AGUCUGAGUGGGCGGC
135	B24	UAAAGCUCCCCGGGGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGC UGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAU CGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUGUCCAUAAAGUA GGAAACACUACAGUACCCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACU ACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
136	B25	UAAUAGUAAACCUCACUCACGGCCACAUUGAGUGCCAGGC UCCGGGCUGGUUUAUAGUAGUGUAGAGCAUUGCAGCACUU AGACUGGGGUGCUGUAGUCUUUAUUGUAGUCUUUCCACAU ACCUGAUAAUUCUUAGAUAAUUUCUUAUUUUAAUUCCAUA AAGUAGGAAACACUACAUAAAUCUCCAUAAAGUAGGAAAC ACUACAUAUUCUUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUAGGC U

【０２３１】

ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、例えば、本明細書に記載されているようなマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合部位であって、ヒト細胞に存在するｍｉＲに結合する部位を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、配列番号２１２、配列番号１７４、配列番号１５２またはこれらを組み合わせた配列のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。ある実施形態では、その３’ＵＴＲは、複数のｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、２個、３個、４個、５個、６個、７個または８個のｍｉＲＮＡ結合部位を含む。ある実施形態では、その複数のｍｉＲＮＡ結合部位は、同じｍｉＲＮＡ結合部位または異なるｍｉＲＮＡ結合部位を含む。

【０２３２】

ｍｉＲ１２２　ｂｓは、ＣＡＡＡＣＡＣＣＡＵＵＧＵＣＡＣＡＣＵＣＣＡ（配列番号２１２）である。

【０２３３】

ｍｉＲ－１４２－３ｐ　ｂｓは、ＵＣＣＡＵＡＡＡＧＵＡＧＧＡＡＡＣＡＣＵＡＣＡ（配列番号１７４）である。

【０２３４】

ｍｉＲ－１２６　ｂｓは、ＣＧＣＡＵＵＡＵＵＡＣＵＣＡＣＧＧＵＡＣＧＡ（配列番号１５２）である。

【０２３５】

ある態様では、本発明で開示するのは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり、そのポリヌクレオチドは、（ａ）例えば、本明細書に記載されているような５’ＵＴＲ、（ｂ）終止エレメントを含むコード領域（例えば、本明細書に記載されているような領域）、及び（ｃ）３’ＵＴＲ（例えば、本明細書に記載されているような３’ＵＴＲ）を含む。

【０２３６】

ある態様では、バリアントＰＡＨポリペプチド（例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２）をコードするオープンリーディングフレームを含むとともに、本明細書に開示されている３’ＵＴＲを含むポリヌクレオチドを含むＬＮＰ組成物は、（ｉ）イオン化可能な脂質、例えばアミノ脂質、（ｉｉ）ステロールまたはその他の構造脂

質、（ｉｉｉ）非カチオン性のヘルパー脂質またはリン脂質、及び（ｉｖ）ＰＥＧ－脂質を含む。

【０２３７】

別の態様では、本開示のＬＮＰ組成物は、対象において、ＰＫＵのような高フェニルアラニン血症を治療する方法で使用する。

【０２３８】

ある態様では、本明細書に開示されているポリヌクレオチドであって、例えば、本明細書に記載されているようなバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むＬＮＰ組成物は、例えば、本明細書に記載されているような追加の薬剤とともに投与できる。

【０２３９】

マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合部位

本発明のポリヌクレオチドは、調節エレメント、例えば、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）結合部位、転写因子結合部位、構造化ｍＲＮＡ配列及び／または構造化ｍＲＮＡモチーフ、内因性の核酸結合分子に対する偽受容体としての役割を果たすように操作した人工結合部位、ならびにこれらを組み合わせたものを含むことができる。いくつかの実施形態では、このような調節エレメントを含むポリヌクレオチドは、「センサー配列」を含むポリヌクレオチドという。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばリボ核酸（ＲＮＡ）、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））は、目的のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むとともに、ｍｉＲＮＡ結合部位を１つ以上さらに含む。ｍｉＲＮＡ結合部位（複数可）を含めたり、または組み込んだりすることで、天然のｍｉＲＮＡの組織特異的発現及び／または細胞種特異的発現に基づき、本発明のポリヌクレオチドの調節を行い、ひいては、そのポリヌクレオチドからコードされるポリペプチドの調節を行う。

【０２４１】

本発明は、上記のポリヌクレオチドのいずれかを含む医薬組成物及び製剤も提供する。いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、送達剤をさらに含む。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、本明細書に開示されている配列最適化核酸配列であって、ポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、本明細書に開示されている配列最適化核酸配列であって、ポリペプチドをコードする核酸配列との配列同一性がかなり大きいポリヌクレオチド（例えばＯＲＦ）を含むポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）を含むことができる。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、結合するｍｉＲＮＡ結合部位をさらに含む。

【０２４３】

ｍｉＲＮＡ、例えば天然のｍｉＲＮＡは、ポリヌクレオチドに結合して、そのポリヌクレオチドの安定性を低下させるか、またはそのポリヌクレオチドの翻訳を阻害するかのいずれかによって、遺伝子の発現をダウンレギュレーションする１９～２５ヌクレオチド長の非コードＲＮＡである。ｍｉＲＮＡ配列は、「シード」領域、すなわち、成熟ｍｉＲＮＡの２～８位の領域内の配列を占める。ｍｉＲＮＡシードは、成熟ｍｉＲＮＡの２～８位または２～７位を占めることができる。

【０２４４】

マイクロＲＮＡは、ＲＮＡ転写産物の領域から酵素によって抽出され、２つに折り畳まれて、ショートヘアピン構造を形成し、これは、プレｍｉＲＮＡ（前駆体ｍｉＲＮＡ）と呼ぶ場合が多い。プレｍｉＲＮＡは典型的には、その３’末端に、２ヌクレオチドのオーバーハングを有し、３’ヒドロキシル基及び５’リン酸基を有する。この前駆体ｍＲＮＡは、核内で処理された後、細胞質に輸送され、細胞質において、ダイサー（ＲＮａｓｅＩＩ

Ｉ酵素）によってさらに処理されて、およそ２２ヌクレオチドの成熟マイクロＲＮＡが形成される。続いて、成熟マイクロＲＮＡは、リボ核粒子に組み込まれて、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）が形成され、この複合体が、遺伝子サイレンシングを媒介する。成熟ｍｉＲＮＡについて、当該技術分野で認識されている命名法では、典型的には、成熟ｍｉＲＮＡの由来元であるプレｍｉＲＮＡのアームを示し、「５ｐ」は、そのマイクロＲＮＡが、プレｍｉＲＮＡのヘアピンの５プライムアームに由来することを意味し、「３ｐ」は、そのマイクロＲＮＡが、プレｍｉＲＮＡのヘアピンの３プライムエンドに由来することを意味する。本明細書において、数字によって言及されているｍｉＲは、同じプレｍｉＲＮＡの対向し合うアームに起因する２つの成熟マイクロＲＮＡのいずれか（例えば、３ｐマイクロＲＮＡまたは５ｐマイクロＲＮＡのいずれか）を指すことができる。３ｐまたは５ｐの指定によって具体的に定められている場合を除き、本明細書で言及されているすべてのｍｉＲは、３ｐ及び５ｐのアーム／配列の両方を含むように意図されている。

【０２４５】

本明細書で使用する場合、「マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡまたはｍｉＲ）結合部位」という用語は、ポリヌクレオチド内、例えば、ＤＮＡ内またはＲＮＡ転写産物内の配列（５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲ内の配列を含む）のうち、ｍｉＲＮＡの全体または領域との相補性が、そのｍｉＲＮＡと相互作用、会合または結合するのに十分である配列を指す。いくつかの実施形態では、目的のポリペプチドをコードするＯＲＦを含む本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位を１つ以上さらに含む。例示的な実施形態では、そのポリヌクレオチド（例えばリボ核酸（ＲＮＡ）、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））の５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲが、ｍｉＲＮＡ結合部位を１つ以上含む。

【０２４６】

ｍｉＲＮＡとの相補性が十分であるｍｉＲＮＡ結合部位とは、ｍｉＲＮＡの媒介による、ポリヌクレオチドの調節、例えば、ｍｉＲＮＡの媒介による、ポリヌクレオチドの翻訳抑制または分解を促すのに十分な相補性の程度であることを指す。本発明の例示的態様では、ｍｉＲＮＡとの相補性が十分であるｍｉＲＮＡ結合部位とは、ｍｉＲＮＡの媒介による、ポリヌクレオチドの分解、例えば、ｍｉＲＮＡ誘導性のＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）の媒介による、ｍＲＮＡの切断を促すのに十分な相補性の程度であることを指す。そのｍｉＲＮＡ結合部位は、例えば、１９～２５ヌクレオチド長のｍｉＲＮＡ配列、１９～２３ヌクレオチド長のｍｉＲＮＡ配列または２２ヌクレオチド長のｍｉＲＮＡ配列との相補性を有することができる。ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡの一部、例えば、完全長の天然ｍｉＲＮＡ配列の１ヌクレオチド未満、２ヌクレオチド未満、３ヌクレオチド未満もしくは４ヌクレオチド未満の部分、または天然ｍｉＲＮＡ配列よりも１ヌクレオチド未満、２ヌクレオチド未満、３ヌクレオチド未満もしくは４ヌクレオチド未満短い部分のみと相補的であることができる。所望の調節が、ｍＲＮＡの分解である場合には、十分または完全な相補性（例えば、天然ｍｉＲＮＡの長さの全体またはかなりの部分に対する十分な相補性または完全な相補性）が好ましい。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡシード配列と相補性（例えば、部分的な相補性または完全な相補性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡシード配列と完全な相補性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡ配列と相補性（例えば、部分的な相補性または完全な相補性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡ配列と完全な相補性を有する配列を含む。別の実施形態では、その配列は、完全には相補的ではない。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、１個、２個または３個のヌクレオチドの置換、末端付加及び／またはトランケーション以外は、ｍｉＲＮＡ配列との完全な相補性を有する。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、対応するｍｉＲＮＡと同じ長さ

である。別の実施形態では、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、対応するｍｉＲＮＡよりも、５’末端、３’末端またはこれらの両方において、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１１ヌクレオチドまたは１２ヌクレオチド短い。さらなる別の実施形態では、マイクロＲＮＡ結合部位は、対応するマイクロＲＮＡよりも、５’末端、３’末端またはこれらの両方において、２ヌクレオチド短い。対応するｍｉＲＮＡよりも短いｍｉＲＮＡ結合部位は、それでも、ｍｉＲＮＡ結合部位が１つ以上組み込まれているｍＲＮＡを分解したり、またはそのｍＲＮＡが翻訳されるのを阻止したりできる。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ダイサーを含む活性ＲＩＳＣの一部である対応する成熟ｍｉＲＮＡと結合する。別の実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位が、ＲＩＳＣにおける対応するｍｉＲＮＡに結合することにより、そのｍｉＲＮＡ結合部位を含むｍＲＮＡが分解されるか、そのｍＲＮＡが翻訳されるのが阻止される。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡを含むＲＩＳＣ複合体によって、ｍｉＲＮＡ結合部位を含むポリヌクレオチドが切断されるように、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、そのｍｉＲＮＡとの相補性が十分である。別の実施形態では、ｍｉＲＮＡを含むＲＩＳＣ複合体によって、ｍｉＲＮＡ結合部位を含むポリヌクレオチドが不安定になるように、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、不完全な相補性を有する。別の実施形態では、ｍｉＲＮＡを含むＲＩＳＣ複合体によって、ｍｉＲＮＡ結合部位を含むポリヌクレオチドの転写が抑制されるように、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、不完全な相補性を有する。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、対応するｍｉＲＮＡとのミスマッチを１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個または１２個有する。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、対応するｍｉＲＮＡの少なくとも約１０個、少なくとも約１１個、少なくとも約１２個、少なくとも約１３個、少なくとも約１４個、少なくとも約１５個、少なくとも約１６個、少なくとも約１７個、少なくとも約１８個、少なくとも約１９個、少なくとも約２０個または少なくとも約２１個の連続したヌクレオチドとそれぞれ相補的な少なくとも約１０個、少なくとも約１１個、少なくとも約１２個、少なくとも約１３個、少なくとも約１４個、少なくとも約１５個、少なくとも約１６個、少なくとも約１７個、少なくとも約１８個、少なくとも約１９個、少なくとも約２０個または少なくとも約２１個の連続したヌクレオチドを有する。

【０２５２】

１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位を本発明のポリヌクレオチド内に、操作して組み込むことによって、そのポリヌクレオチドは、分解または翻訳の減少の標的となることができる。ただし、該当するｍｉＲＮＡが利用可能であることを条件とする。これにより、ポリヌクレオチドの送達時に、オフターゲット作用を低減できる。例えば、本発明のポリヌクレオチドが、ある組織または細胞に送達するようには意図されていないが、前記組織または細胞に送達されてしまう場合には、その組織または細胞に多く見られるｍｉＲＮＡへの結合部位を１つまたは複数、そのポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲ内に、操作して組み込めば、そのｍｉＲＮＡによって、当該遺伝子の発現を阻害することができる。すなわち、いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位を１つ以上、本開示のｍＲＮＡに組み込むことで、核酸分子の送達時に、オフターゲット作用の危険性を低減でき、及び／またはそのｍＲＮＡによってコードされるポリペプチドの発現を組織特異的に調節可能にできる。さらに別の実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位を１つ以上、本開示のｍＲＮＡに組み込むことで、核酸のｉｎ　ｖｉｖｏ送達時に、免疫応答を調節できる。さらなる実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位を１つ以上、本開示のｍＲＮＡに組み込むことで、本明細書に記載されている脂質含有化合物及び脂質含有組成物の、血中からの急速なク

リアランス（ＡＢＣ）を調節できる。

【０２５３】

逆に、所定の組織において、タンパク質の発現を増加させるために、天然においてｍｉＲＮＡ結合部位が見られるポリヌクレオチド配列から、ｍｉＲＮＡ結合部位を除去することができる。例えば、所定のｍｉＲＮＡに対する結合部位をポリヌクレオチドから除去して、そのｍｉＲＮＡを含む組織または細胞において、タンパク質の発現を向上できる。

【０２５４】

複数の組織内での発現の調節は、１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位、例えば１つ以上の別個のｍｉＲＮＡ結合部位の導入または除去を通じて行うことができる。ｍｉＲＮＡ結合部位を除去するか、または挿入するかの判断は、発生及び／または疾患における組織及び／または細胞内でのｍｉＲＮＡ発現のパターン及び／またはプロファイリングに基づき行うことができる。ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ結合部位、ならびにそれらの発現パターン及び生物学における役割の特定は、報告されている（例えば、Ｂｏｎａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ ２０１０ １１：９４３－９４９、Ａｎａｎｄ ａｎｄ Ｃｈｅｒｅｓｈ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌ ２０１１ １８：１７１－１７６、Ｃｏｎｔｒｅｒａｓ ａｎｄ Ｒａｏ Ｌｅｕｋｅｍｉａ ２０１２ ２６：４０４－４１３（２０１１ Ｄｅｃ ２０．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｌｅｕ．２０１１．３５６）、Ｂａｒｔｅｌ Ｃｅｌｌ ２００９ １３６：２１５－２３３、Ｌａｎｄｇｒａｆ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，２００７ １２９：１４０１－１４１４、Ｇｅｎｔｎｅｒ ａｎｄ Ｎａｌｄｉｎｉ，Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ．２０１２ ８０：３９３－４０３及びその全参照文献（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される））。

【０２５５】

ｍｉＲＮＡが、ｍＲＮＡを調節することによって、タンパク質の発現を調節することが知られている組織の例としては、肝臓（ｍｉＲ－１２２）、筋肉（ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－２０８）、内皮細胞（ｍｉＲ－１７－９２、ｍｉＲ－１２６）、骨髄系細胞（ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７）、脂肪組織（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－３０ｃ）、心臓（ｍｉＲ－１ｄ、ｍｉＲ－１４９）、腎臓（ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９４、ｍｉＲ－２０４）及び肺上皮細胞（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－１２６）が挙げられるが、これらに限らない。

【０２５６】

具体的には、ｍｉＲＮＡは、抗原提示細胞（ＡＰＣ）（例えば、樹状細胞及びマクロファージ）、マクロファージ、単球、Ｂリンパ球、Ｔリンパ球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞などのような免疫細胞（造血細胞ともいう）において、示差的に発現することが知られている。免疫細胞特異的ｍｉＲＮＡは、免疫原性、自己免疫、感染、炎症に対する免疫応答、ならびに遺伝子療法及び組織移植／臓器移植後の望ましくない免疫応答に関与する。免疫細胞特異的ｍｉＲＮＡは、造血細胞（免疫細胞）の発生、増殖、分化及びアポトーシスの局面の多くも調節する。例えば、ｍｉＲ－１４２及びｍｉＲ－１４６は、免疫細胞のみで発現し、特に、骨髄樹状細胞で多く見られる。ポリヌクレオチドに対する免疫応答は、そのポリヌクレオチドの３’ＵＴＲに、ｍｉＲ－１４２結合部位を付加することによって遮断でき、それにより、より安定して、組織及び細胞内の遺伝子移入を行えるようになることが示されている。ｍｉＲ－１４２は、抗原提示細胞において、外因性ポリヌクレオチドを効率的に分解し、トランスダクションされた細胞が、細胞傷害性によって排除されるのを抑制する（例えば、Ａｎｎｏｎｉ Ａ ｅｔ ａｌ．，ｂｌｏｏｄ，２００９，１１４，５１５２－５１６１、Ｂｒｏｗｎ ＢＤ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ ｍｅｄ．２００６，１２（５），５８５－５９１、Ｂｒｏｗｎ ＢＤ，ｅｔ ａｌ．，ｂｌｏｏｄ，２００７，１１０（１３）：４１４４－４１５２（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される））。

【０２５７】

抗原媒介性免疫応答とは、外来抗原によって誘導される免疫応答を指すことができ、外来抗原は、生物に侵入すると、抗原提示細胞によって処理され、その抗原提示細胞の表面上に提示される。Ｔ細胞は、その提示された抗原を認識して、細胞傷害性によって、その抗原を発現する細胞を排除するのを誘導できる。

【０２５８】

ｍｉＲ－１４２結合部位を１つ以上（例えば、１個、２個または３個）、本発明のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲに導入することで、ｍｉＲ－１４２の媒介による分解を通じて、抗原提示細胞における遺伝子発現を選択的に抑制して、抗原提示細胞（例えば樹状細胞）における抗原提示を制限することによって、本発明のポリヌクレオチドの送達後、抗原媒介性の免疫応答を阻止できる。そして、そのポリヌクレオチドが、細胞傷害性による排除を誘導することなく、標的組織または標的細胞内で安定して発現する。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、３ｐアーム及び５ｐアームの両方とも多く見られる場合（例えば、ｍｉＲ－１４２－３ｐ及びｍｉＲ１４２－５ｐの両方とも、造血幹細胞で多く見られる場合）には、複数のｍｉＲによって、同じ種類の細胞を標的とするとともに、３ｐアーム及び５ｐアームのそれぞれに対する結合部位を組み込むのが有益であることがある。すなわち、ある特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、（ｉ）ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５及びｍｉＲ－２２３からなる群（多くの造血細胞で発現する）、もしくは（ｉｉ）ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ１５０、ｍｉＲ－１６及びｍｉＲ－２２３からなる群（Ｂ細胞で発現する）、またはｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－４５１、ｍｉＲ－２６ａ、ｍｉＲ－１６からなる群（造血前駆細胞で発現する）のｍｉＲ結合部位を２個以上（例えば、２個、３個または４個以上）含む。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、様々なｍｉＲを組み合わせて、複数の種類の目的細胞を同時に標的とようにするのが有益であることがある（例えば、多くの造血系統細胞及び内皮細胞を標的とするｍｉＲ－１４２及びｍｉＲ－１２６）。すなわち、例えば、ある特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位を２個以上（例えば、２個、３個または４個以上）含み、（ｉ）そのｍｉＲの少なくとも１つは、造血系統の細胞を標的とし（例えば、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５もしくはｍｉＲ－２２３）、そのｍｉＲの少なくとも１つは、形質細胞様樹状細胞、血小板もしくは内皮細胞を標的とするか（例えばｍｉＲ－１２６）、（ｉｉ）そのｍｉＲの少なくとも１つは、Ｂ細胞を標的とし（例えば、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ１５０、ｍｉＲ－１６もしくはｍｉＲ－２２３）、そのｍｉＲの少なくとも１つは、形質細胞様樹状細胞、血小板もしくは内皮細胞を標的とするか（例えばｍｉＲ－１２６）、（ｉｉｉ）そのｍｉＲの少なくとも１つは、造血前駆細胞を標的とし（例えば、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－４５１、ｍｉＲ－２６ａもしくはｍｉＲ－１６）、そのｍｉＲの少なくとも１つは、形質細胞様樹状細胞、血小板もしくは内皮細胞を標的とするか（例えばｍｉＲ－１２６）、あるいは（ｉｖ）そのｍｉＲの少なくとも１つは、造血系統の細胞を標的とし（例えば、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５もしくはｍｉＲ－２２３）、そのｍｉＲの少なくとも１つは、Ｂ細胞を標的とし（例えば、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ１５０、ｍｉＲ－１６もしくはｍｉＲ－２２３）、そのｍｉＲの少なくとも１つは、形質細胞様樹状細胞、血小板もしくは内皮細胞を標的とするか（例えばｍｉＲ－１２６）、またはその他、上記の４つのクラスのｍｉＲ結合部位を可能な形でいずれかに組み合わせる（すなわち、造血系統を標的とするｍｉＲ、Ｂ細胞を標的とするｍｉＲ、造血前駆細胞を標的とするｍｉＲ及び／または形質細胞様樹状細胞／血小板／内皮細胞を標的とするｍｉＲ）。

【０２６１】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、免疫応答を調節するために、従来の免疫細胞、あるいはＴＬＲ７及び／またはＴＬＲ８を発現するとともに、炎症誘発性サイト

カイン及び／またはケモカインを分泌するいずれかの細胞（例えば、末梢リンパ器官の免疫細胞及び／または脾細胞及び／または内皮細胞）で発現する１つ以上のｍｉＲに結合するｍｉＲＮＡ結合配列を１つ以上含むことができる。従来の免疫細胞、あるいはＴＬＲ７及び／またはＴＬＲ８を発現するとともに、炎症誘発性サイトカイン及び／またはケモカインを分泌するいずれかの細胞（例えば、末梢リンパ器官の免疫細胞及び／または脾細胞及び／または内皮細胞）で発現するｍｉＲを１つ以上、ｍＲＮＡに組み込むと、免疫細胞の活性化（例えば、活性化Ｂ細胞の出現頻度によって測定した場合のＢ細胞活性化）及び／またはサイトカインの産生（例えば、ＩＬ－６、ＩＦＮ－γ及び／またはＴＮＦαの産生）が低減または阻害されることが今では発見されている。さらに、従来の免疫細胞、あるいはＴＬＲ７及び／またはＴＬＲ８を発現するとともに、炎症誘発性サイトカイン及び／またはケモカインを分泌するいずれかの細胞（例えば、末梢リンパ器官の免疫細胞及び／または脾細胞及び／または内皮細胞）で発現するｍｉＲを１つ以上、ｍＲＮＡに組み込むと、そのｍＲＮＡによってコードされた目的のタンパク質に対する抗薬物抗体（ＡＤＡ）応答を低減または阻害できることが今では発見されている。

【０２６２】

別の実施形態では、脂質を含む化合物または組成物で送達したポリヌクレオチドの、血中からの急速なクリアランスを調節するために、本発明のポリヌクレオチドは、従来の免疫細胞、あるいはＴＬＲ７及び／またはＴＬＲ８を発現するとともに、炎症誘発性サイトカイン及び／またはケモカインを分泌するいずれかの細胞（例えば、末梢リンパ器官の免疫細胞及び／または脾細胞及び／または内皮細胞）で発現する１つ以上のｍｉＲＮＡに結合するｍｉＲ結合配列を１つ以上含むことができる。ｍｉＲ結合部位を１つ以上、ｍＲＮＡに組み込むと、そのｍＲＮＡを送達するのに用いる脂質含有化合物または脂質含有組成物の、血中からの急速なクリアランス（ＡＢＣ）が低減または阻害されることが今では発見されている。さらに、ｍｉＲ結合部位を１つ以上、ｍＲＮＡに組み込むと、そのｍＲＮＡを含む脂質含有化合物または脂質含有組成物の投与後、抗ＰＥＧ抗ＩｇＭの血清中レベルが低下し（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を認識するＩｇＭの、Ｂ細胞による急激な産生が低減もしくは阻害され）、及び／または形質細胞様樹状細胞の増殖及び／または活性化が低減もしく阻害されることが今では発見されている。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲ配列は、免疫細胞で発現するいずれかの既知のマイクロＲＮＡに相当するものであってよく、米国特許出願公開第２００５／０２６１２１８号及び米国特許出願公開第２００５／００５９００５号（それらの内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）で教示されているものが挙げられるが、これらに限らない。免疫細胞で発現するｍｉＲの非限定的な例としては、脾細胞、骨髄系細胞、樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞及び／またはマクロファージで発現するｍｉＲが挙げられる。例えば、ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４及びｍｉＲ－２７は、骨髄系細胞で発現し、ｍｉＲ－１５５は、樹状細胞、Ｂ細胞及びＴ細胞で発現し、ｍｉＲ－１４６は、マクロファージにおいて、ＴＬＲの刺激によりアップレギュレーションし、ｍｉＲ－１２６は、形質細胞様樹状細胞で発現する。ある特定の実施形態では、ｍｉＲ（複数可）は、免疫細胞で豊富にまたは優先的に発現する。例えば、ｍｉＲ－１４２（ｍｉＲ－１４２－３ｐ及び／またはｍｉＲ－１４２－５ｐ）、ｍｉＲ－１２６（ｍｉＲ－１２６－３ｐ及び／またはｍｉＲ－１２６－５ｐ）、ｍｉＲ－１４６（ｍｉＲ－１４６－３ｐ及び／またはｍｉＲ－１４６－５ｐ）、ならびにｍｉＲ－１５５（ｍｉＲ－１５５－３ｐ及び／またはｍｉＲ１５５－５ｐ）は、免疫細胞で豊富に発現する。これらのマイクロＲＮＡ配列は、当該技術分野で知られているので、当業者は、ワトソン・クリックの相補性に基づき、これらのマイクロＲＮＡに結合する結合配列または標的配列を容易に設計することができる。

【０２６４】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、同じｍｉＲＮＡ結合部位を３コピー含む。ある特定の実施形態では、同じｍｉＲ結合部位を３コピー用いることで、１つのｍｉ

ＲＮＡ結合部位を用いた場合と比べて、有益な特性を呈することができる。

【０２６５】

別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、免疫細胞で発現する少なくとも２つの異なるｍｉＲに対する結合部位を２コピー以上（例えば、２コピー、３コピー、４コピー）含む。

【０２６６】

別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、免疫細胞で発現するマイクロＲＮＡに対するｍｉＲ結合部位を少なくとも２つ含み、そのｍｉＲ結合部位の１つは、ｍｉＲ－１４２－３ｐに対するものである。様々な実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲ－１４２－３ｐ及びｍｉＲ－１５５（ｍｉＲ－１５５－３ｐもしくはｍｉＲ－１５５－５ｐ）、ｍｉＲ－１４２－３ｐ及びｍｉＲ－１４６（ｍｉＲ－１４６－３もしくはｍｉＲ－１４６－５ｐ）、またはｍｉＲ－１４２－３ｐ及びｍｉＲ－１２６（ｍｉＲ－１２６－３ｐもしくはｍｉＲ－１２６－５ｐ）に対する結合部位を含む。

【０２６７】

別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、免疫細胞で発現するマイクロＲＮＡに対するｍｉＲ結合部位を少なくとも２つ含み、そのｍｉＲ結合部位の１つは、ｍｉＲ－１２６－３ｐに対するものである。様々な実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲ－１２６－３ｐ及びｍｉＲ－１５５（ｍｉＲ－１５５－３ｐもしくはｍｉＲ－１５５－５ｐ）、ｍｉＲ－１２６－３ｐ及びｍｉＲ－１４６（ｍｉＲ－１４６－３ｐもしくはｍｉＲ－１４６－５ｐ）、またはｍｉＲ－１２６－３ｐ及びｍｉＲ－１４２（ｍｉＲ－１４２－３ｐもしくはｍｉＲ－１４２－５ｐ）に対する結合部位を含む。

【０２６８】

別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、免疫細胞で発現するマイクロＲＮＡに対するｍｉＲ結合部位を少なくとも２つ含み、そのｍｉＲ結合部位の１つは、ｍｉＲ－１４２－５ｐに対するものである。様々な実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲ－１４２－５ｐ及びｍｉＲ－１５５（ｍｉＲ－１５５－３ｐもしくはｍｉＲ－１５５－５ｐ）、ｍｉＲ－１４２－５ｐ及びｍｉＲ－１４６（ｍｉＲ－１４６－３もしくはｍｉＲ－１４６－５ｐ）、またはｍｉＲ－１４２－５ｐ及びｍｉＲ－１２６（ｍｉＲ－１２６－３ｐもしくはｍｉＲ－１２６－５ｐ）に対する結合部位を含む。

【０２６９】

さらに別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、免疫細胞で発現するマイクロＲＮＡに対するｍｉＲ結合部位を少なくとも２つ含み、そのｍｉＲ結合部位の１つは、ｍｉＲ－１５５－５ｐに対するものである。様々な実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲ－１５５－５ｐ及びｍｉＲ－１４２（ｍｉＲ－１４２－３ｐもしくはｍｉＲ－１４２－５ｐ）、ｍｉＲ－１５５－５ｐ及びｍｉＲ－１４６（ｍｉＲ－１４６－３もしくはｍｉＲ－１４６－５ｐ）、またはｍｉＲ－１５５－５ｐ及びｍｉＲ－１２６（ｍｉＲ－１２６－３ｐもしくはｍｉＲ－１２６－５ｐ）に対する結合部位を含む。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位を含み、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、表４から選択したヌクレオチド配列を１つ以上含む（そのｍｉＲＮＡ結合部位配列のいずれか１つ以上の１コピー以上を含む）。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、表４から選択した同じまたは異なるｍｉＲＮＡ結合部位（これらをいずれかに組み合わせたものを含む）を少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個以上、さらに含む。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１４２に結合するか、またはｍｉＲ－１４２と相補的である。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－１４２は、配列番号１７２を含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１４２－３ｐまたはｍｉＲ－１４２－５ｐに結合する。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位は、配列番号１７４を含む。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲ－１

４２－５ｐ結合部位は、配列番号２１０を含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、配列番号１７４または配列番号２１０と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％同一なヌクレオチド配列を含む。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１２６に結合するか、またはｍｉＲ－１２６と相補的である。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲ－１２６は、配列番号１５０を含む。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１２６－３ｐまたはｍｉＲ－１２６－５ｐに結合する。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲ－１２６－３ｐ結合部位は、配列番号１５２を含む。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲ－１２６－５ｐ結合部位は、配列番号１５４を含む。いくつかの実施形態では、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、配列番号１５２または配列番号１５４と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％同一なヌクレオチド配列を含む。

【０２７３】

一実施形態では、その３’ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位を２つ含み、第１のｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１４２に結合し、第２のｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１２６に結合する。

【０２７４】

【表４】

表４．ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１２６、ならびにｍｉＲ－１４２結合部位及びｍｉＲ－１２６結合部位

配列番号	明細	配列
172	miR-142	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCACUGGAGGGUGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG
173	miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
174	miR-142-3p結合部位	UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA
175	miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
210	miR-142-5p結合部位	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG
150	miR-126	CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCACGGCA
151	miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
152	miR-126-3p結合部位	CGCAUUAUUACUCACGGUACGA
153	miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG
154	miR-126-5p結合部位	CGCGUACCAAAAGUAAUAAUG

【０２７５】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、本発明のポリヌクレオチドに、そのポリヌクレオチドのいずれかの位置（例えば、５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲ）で挿入されている。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲが、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲが、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲが、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。そのポリヌクレオチドにｍｉＲＮＡ結合部位が挿入されていても、対応するｍｉＲＮＡの非存在下では、機能的ポリペプチドの翻訳が妨げられず、そのｍｉＲＮＡの存在下では、そのポリヌクレオチドにｍ

ｉＲＮＡ結合部位が挿入されており、そのｍｉＲＮＡ結合部位が、対応するｍｉＲＮＡに結合すると、そのポリヌクレオチドを分解したりまたはそのポリヌクレオチドの翻訳を阻止したりできる限りは、そのポリヌクレオチドにおける挿入部位は、そのポリヌクレオチドのいずれの位置でもあることもできる。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ＯＲＦを含む本発明のポリヌクレオチドにおいて、そのＯＲＦの終止コドンから、少なくとも約３０ヌクレオチド下流に挿入されている。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、本発明のポリヌクレオチドのＯＲＦの終止コドンから、少なくとも約１０ヌクレオチド、少なくとも約１５ヌクレオチド、少なくとも約２０ヌクレオチド、少なくとも約２５ヌクレオチド、少なくとも約３０ヌクレオチド、少なくとも約３５ヌクレオチド、少なくとも約４０ヌクレオチド、少なくとも約４５ヌクレオチド、少なくとも約５０ヌクレオチド、少なくとも約５５ヌクレオチド、少なくとも約６０ヌクレオチド、少なくとも約６５ヌクレオチド、少なくとも約７０ヌクレオチド、少なくとも約７５ヌクレオチド、少なくとも約８０ヌクレオチド、少なくとも約８５ヌクレオチド、少なくとも約９０ヌクレオチド、少なくとも約９５ヌクレオチドまたは少なくとも約１００ヌクレオチド下流に挿入されている。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、本発明のポリヌクレオチドのＯＲＦの終止コドンから、約１０ヌクレオチド～約１００ヌクレオチド、約２０ヌクレオチド～約９０ヌクレオチド、約３０ヌクレオチド～約８０ヌクレオチド、約４０ヌクレオチド～約７０ヌクレオチド、約５０ヌクレオチド～約６０ヌクレオチド、約４５ヌクレオチド～約６５ヌクレオチド下流に挿入されている。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、本発明のポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡ内のコード領域の終止コドン直後の３’ＵＴＲ内に挿入されている。いくつかの実施形態では、コンストラクトに、終止コドンが複数コピー存在する場合には、ｍｉＲＮＡ結合部位は、最後の終止コドンの直後に挿入されている。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、終止コドンのさらに下流に挿入されており、この場合には、終止コドンとｍｉＲ結合部位（複数可）の間に、３’ＵＴＲ塩基が存在する。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、１つ以上のｍｉＲＮＡ結合部位は、５’ＵＴＲ内に、１つ以上の考え得る挿入部位に位置できる。

【０２７９】

一実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、少なくとも１つのマイクロＲＮＡ結合部位が、３’ＵＴＲ内において、その終止コドンから１～１００ヌクレオチド後に位置する。一実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、免疫細胞で発現するｍｉＲに対するマイクロＲＮＡ結合部位の少なくとも１つが、３’ＵＴＲ内において、その終止コドンから３０～５０ヌクレオチド後に位置する。別の実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、免疫細胞で発現するｍｉＲに対するマイクロＲＮＡ結合部位の少なくとも１つは、３’ＵＴＲ内において、終止コドンから少なくとも５０ヌクレオチド後に位置する。別の実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、免疫細胞で発現するｍｉＲに対するマイクロＲＮＡ結合部位の少なくとも１つが、３’ＵＴＲ内において、その終止コドンの直後に位置するか、または３’ＵＴＲ内において、その終止コドンから１５～２０ヌクレオチド後に位置するか、または３’ＵＴＲ内において、その終止コドンから７０～８０ヌクレオチド後に位置する。別の実施形態では、その３’ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位を２個以上（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位を２～４個）含み、各ｍｉＲＮＡ結合部位間には、スペーサー領域（例えば、１０～１００ヌクレオチド長、２０～７０ヌクレオチド長または３０～５０ヌクレオチド長のスペーサー領域）が存在できる。別の実施形態

では、その３’ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位（複数可）の末端とポリＡテールヌクレオチドとの間に、スペーサー領域を含む。例えば、１０～１００ヌクレオチド長、２０～７０ヌクレオチド長または３０～５０ヌクレオチド長のスペーサー領域が、ｍｉＲＮＡ結合部位（複数可）の末端とポリＡテールの先頭との間にあることができる。

【０２８０】

一実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、少なくとも１つのマイクロＲＮＡ結合部位が、５’ＵＴＲ内において、その開始コドンから１～１００ヌクレオチド前（上流）に位置する。一実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、免疫細胞で発現するｍｉＲに対するマイクロＲＮＡ結合部位が少なくとも１つ、５’ＵＴＲ内において、その開始コドンから１０～５０ヌクレオチド前（上流）に位置する。別の実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、免疫細胞で発現するｍｉＲに対するマイクロＲＮＡ結合部位が少なくとも１つ、５’ＵＴＲ内において、その開始コドンから少なくとも２５ヌクレオチド前（上流）に位置する。別の実施形態では、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、免疫細胞で発現するｍｉＲに対するマイクロＲＮＡ結合部位が少なくとも１つ、５’ＵＴＲ内において、その開始コドンの直前に位置するか、５’ＵＴＲ内において、その開始コドンから１５～２０ヌクレオチド前に位置するか、または５’ＵＴＲ内において、その開始コドンから７０～８０ヌクレオチド前に位置する。別の実施形態では、その５’ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位を２個以上（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位を２～４個）含み、各ｍｉＲＮＡ結合部位間には、スペーサー領域（例えば、１０～１００ヌクレオチド長、２０～７０ヌクレオチド長または３０～５０ヌクレオチド長のスペーサー領域）が存在できる。

【０２８１】

一実施形態では、その３’ＵＴＲは、終止コドンを２個以上含み、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位が、その終止コドンの下流に位置する。例えば、３’ＵＴＲは、終止コドンを１個、２個または３個含むことができる。使用できる三重の終止コドンの非限定的な例としては、ＵＧＡＵＡＡＵＡＧ（配列番号１８２）、ＵＧＡＵＡＧＵＡＡ（配列番号１８３）、ＵＡＡＵＧＡＵＡＧ（配列番号１８４）、ＵＧＡＵＡＡＵＡＡ（配列番号１８５）、ＵＧＡＵＡＧＵＡＧ（配列番号１８６）、ＵＡＡＵＧＡＵＧＡ（配列番号１８７）、ＵＡＡＵＡＧＵＡＧ（配列番号１８８）、ＵＧＡＵＧＡＵＧＡ（配列番号１７９）、ＵＡＡＵＡＡＵＡＡ（配列番号１８０）及びＵＡＧＵＡＧＵＡＧ（配列番号１８１）が挙げられる。３’ＵＴＲ内においては、例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位、例えばｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位が１個、２個、３個または４個、終止コドン（複数可）に直接隣接して位置できるか、または最後の終止コドンから、いずれかの数のヌクレオチド分下流に位置できる。その３’ＵＴＲが、ｍｉＲＮＡ結合部位を複数含む場合には、これらの結合部位は、そのコンストラクト内で、すぐ隣同士に（すなわち順次に）位置できるか、あるいは、スペーサーヌクレオチドが、各結合部位間に位置できる。

【０２８２】

一実施形態では、その３’ＵＴＲは、終止コドンを３個含み、３個目の終止コドンの下流には、ｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位が１つ位置する。

【０２８３】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、５’ＵＴＲと、目的のポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームと、免疫細胞内で発現するｍｉＲに対するｍｉＲＮＡ結合部位を少なくとも１つ含む３’ＵＴＲと、連結されたヌクレオシドからなる３’テール領域とを含む。様々な実施形態では、その３’ＵＴＲは、免疫細胞内で発現するｍｉＲ、好ましくは免疫細胞内で豊富にまたは優先的に発現するｍｉＲに対するｍｉＲＮＡ結合部位を１～４個、少なくとも２個、１個、２個、３個または４個含む。

【０２８４】

一実施形態では、免疫細胞内で発現する少なくとも１つのｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１４２－３ｐマイクロＲＮＡ結合部位である。一実施形態では、そのｍｉＲ－１４２－３ｐマイクロＲＮＡ結合部位は、配列番号１７４に示されている配列を含む。

【０２８５】

一実施形態では、免疫細胞で発現する少なくとも１つのｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１２６マイクロＲＮＡ結合部位である。一実施形態では、そのｍｉＲ－１２６結合部位は、ｍｉＲ－１２６－３ｐ結合部位である。一実施形態では、そのｍｉＲ－１２６－３ｐマイクロＲＮＡ結合部位は、配列番号１５２に示されている配列を含む。

【０２８６】

本開示のマイクロＲＮＡ結合部位（複数可）が結合できるｍｉＲの非限定的な例示的配列としては、ｍｉＲ－１４２－３ｐ（配列番号１７３）、ｍｉＲ－１４２－５ｐ（配列番号１７５）、ｍｉＲ－１４６－３ｐ（配列番号１５５）、ｍｉＲ－１４６－５ｐ（配列番号１５６）、ｍｉＲ－１５５－３ｐ（配列番号１５７）、ｍｉＲ－１５５－５ｐ（配列番号１５８）、ｍｉＲ－１２６－３ｐ（配列番号１５１）、ｍｉＲ－１２６－５ｐ（配列番号１５３）、ｍｉＲ－１６－３ｐ（配列番号１５９）、ｍｉＲ－１６－５ｐ（配列番号１６０）、ｍｉＲ－２１－３ｐ（配列番号１６１）、ｍｉＲ－２１－５ｐ（配列番号１６２）、ｍｉＲ－２２３－３ｐ（配列番号１６３）、ｍｉＲ－２２３－５ｐ（配列番号１６４）、ｍｉＲ－２４－３ｐ（配列番号１６５）、ｍｉＲ－２４－５ｐ（配列番号１６６）、ｍｉＲ－２７－３ｐ（配列番号１６７）及びｍｉＲ－２７－５ｐ（配列番号１６８）が挙げられる。免疫細胞で発現する（例えば、免疫細胞で豊富にまたは優先的に発現する）他の適切なｍｉＲ配列は、当該技術分野において、例えば、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ＭａｎｃｈｅｓｔｅｒのマイクロＲＮＡデータベースｍｉＲＢａｓｅで知られているとともに、入手可能である上記のｍｉＲのいずれかに結合する部位は、そのｍｉＲに対するワトソン・クリックの相補性、典型的には、そのｍｉＲに対する１００％の相補性に基づき設計して、本明細書に記載されているような本開示のｍＲＮＡコンストラクトに挿入できる。

【０２８７】

別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ、例えばその３’ＵＴＲ）は、例えば、例えばＰＥＧに対するＩｇＭの、Ｂ細胞による産生を低減もしくは阻害することによって、及び／またはｐＤＣの増殖及び／または活性化を低減もしくは阻害することによって、血中からの急速なクリアランスを低減または阻害するためのｍｉＲＮＡ結合部位を少なくとも１つ含むことができるとともに、コードされる目的のタンパク質の組織での発現を調節するためのｍｉＲＮＡ結合部位を少なくとも１つ含むことができる。

【０２８８】

ｍｉＲＮＡによる遺伝子調節には、そのｍｉＲＮＡ周辺の配列（その周辺配列の生物種、配列の種類（例えば、異種配列、同種配列、外因性配列、内因性配列または人工配列）、その周辺配列内の調節エレメント、及び／またはその周辺配列内の構造エレメントなど（ただし、これらに限らない））によって影響を及ぼすことができる。ｍｉＲＮＡには、５’ＵＴＲ及び／または３’ＵＴＲによって影響を及ぼすことができる。非限定的な例として、非ヒト３’ＵＴＲは、同じ種類の配列のヒト３’ＵＴＲと比較して、ｍｉＲＮＡ配列が、目的のポリペプチドの発現に及ぼす調節作用を向上できる。

【０２８９】

一実施形態では、５’ＵＴＲの他の調節エレメント及び／または構造エレメントによって、ｍｉＲＮＡの媒介による遺伝子調節に影響を及ぼすことができる。調節エレメント及び／または構造エレメントの一例は、５’ＵＴＲ内の構造化ＩＲＥＳ（内部リボソーム侵入部位）であり、このＩＲＥＳは、翻訳伸長因子がタンパク質の翻訳を開始するのに必要となる。ｍｉＲＮＡの媒介による遺伝子発現には、ＥＩＦ４Ａ２が、５’ＵＴＲ内のこの二次構造化したエレメントに結合することが必要となる（Ｍｅｉｊｅｒ　ＨＡ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０１３，３４０，８２－８５（参照により、その全体が本明細書に援用される））。本発明のポリヌクレオチドは、マイクロＲＮＡの媒介による遺伝子

調節を増強するために、この構造化５’ＵＴＲをさらに含むことができる。

【０２９０】

少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位を、本発明のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲ内に操作して組み込むことができる。この関連では、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個または少なくとも１０個以上のｍｉＲＮＡ結合部位を、本発明のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲ内に操作して組み込むできる。例えば、１～１０個、１～９個、１～８個、１～７個、１～６個、１～５個、１～４個、１～３個、２個または１個のｍｉＲＮＡ結合部位を、本発明のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲ内に操作して組み込むできる。一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドに組み込まれたｍｉＲＮＡ結合部位は、同じｍｉＲＮＡ部位または異なるｍｉＲＮＡ部位であることができる。本発明のポリヌクレオチドに組み込まれた異なるｍｉＲＮＡ結合部位の組み合わせは、異なるｍｉＲＮＡ部位のいずれかが２コピー以上組み込まれている組み合わせを含むことができる。別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドに組み込まれたｍｉＲＮＡ結合部位は、体内の同じ組織または異なる組織を標的とできる。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲに、組織の種類、細胞の種類または疾患に特異的なｍｉＲＮＡ結合部位を導入することで、所定の種類の細胞（例えば、骨髄系細胞、内皮細胞など）での発現の程度を低減できる。

【０２９１】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの３’ＵＴＲの５’末端の近く、３’ＵＴＲの５’末端と３’末端の中間あたり、及び／または３’ＵＴＲの３’末端の近くに、ｍｉＲＮＡ結合部位を操作して組み込むことができる。非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ結合部位は、３’ＵＴＲの５’末端の近く、及び３’ＵＴＲの５’末端と３’末端の中間あたりに操作して組み込むことができる。別の非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ結合部位は、３’ＵＴＲの３’末端の近く、及び３’ＵＴＲの５’末端と３’末端の中間あたりに操作して組み込むことができる。さらに別の非限定的な例として、ｍｉＲＮＡ結合部位は、３’ＵＴＲの５’末端の近く、及び３’ＵＴＲの３’末端の近くに操作して組み込むことができる。

【０２９２】

別の実施形態では、３’ＵＴＲは、ｍｉＲＮＡ結合部位を１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個含むことができる。そのｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡシード配列、及び／またはそのシード配列を挟み込むｍｉＲＮＡ配列と相補的であることができる。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの発現は、ポリヌクレオチドにセンサー配列を少なくとも１つ組み込んで、ポリヌクレオチドを投与用に調合することによって制御できる。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位を組み込んで、イオン化可能なアミノ脂質（本明細書に記載されている脂質のいずれかを含む）を含む脂質ナノ粒子で、そのポリヌクレオチドを調合することによって、組織または細胞に標的化できる。

【０２９４】

本発明のポリヌクレオチドは、様々な組織、細胞種または生体条件におけるｍｉＲＮＡの発現パターンに基づき、所定の組織、細胞種または生体条件において、さらに標的化された発現が行われるように操作できる。組織内もしくは細胞内で、または生体条件の状況で、最適なタンパク質発現が行われるように、組織特異的なｍｉＲＮＡ結合部位を導入することで、本発明のポリヌクレオチドを設計できる。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、既知のｍｉＲＮＡシード配列との同一性が１００％であるか、またはｍｉＲＮＡシード配列との同一性が１００％未満であるｍｉＲＮＡ結合部位を組み込むように設計できる。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、既知のｍｉＲＮＡシード配列との同一性が少なくとも６０％、

６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％であるｍｉＲＮＡ結合部位を組み込むように設計できる。そのｍｉＲＮＡシード配列は、部分的に変異させて、ｍｉＲＮＡの結合親和性を低下させることができ、それにより、そのポリヌクレオチドのダウンモジュレーションが低減される。本質的に、ｍｉＲＮＡ結合部位とｍｉＲＮＡシードとのマッチ度またはミスマッチ度は、そのｍｉＲＮＡがタンパク質発現を調節する能力をさらに精密に調整する制御調整因子として機能できる。加えて、ｍｉＲＮＡ結合部位の非シード領域内の変異によっても、ｍｉＲＮＡがタンパク質発現を調節する能力に影響を及ぼすことができる。

【０２９６】

一実施形態では、ｍｉＲＮＡ配列は、ステムループのループに組み込むことができる。

【０２９７】

別の実施形態では、ｍｉＲＮＡシード配列は、ステムループのループに組み込むことができるとともに、ｍｉＲＮＡ結合部位は、ステムループの５’ステムまたは３’ステムに組み込むことができる。

【０２９８】

一実施形態では、５’ＵＴＲ内のｍｉＲＮＡ配列を用いて、本明細書に記載されている本発明のポリヌクレオチドを安定化することができる。

【０２９９】

別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドの５’ＵＴＲ内のｍｉＲＮＡ配列を用いて、開始コドン（ただし、これに限らない）のような翻訳開始部位の到達性を低減できる。例えば、Ｍａｔｓｕｄａ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１０ １１（５）：ｅ１５０５７（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい。この文献では、第１の開始コドン（ＡＵＧ）の到達性を低下させるために、アンチセンスロックト核酸（ＬＮＡ）オリゴヌクレオチドと、開始コドン周辺（ＡＵＧコドンのＡを＋１とした場合に、－４～＋３７）のエキソンジャンクション複合体（ＥＪＣ）を使用した。Ｍａｔｓｕｄａの文献では、ＬＮＡまたはＥＪＣによって、開始コドン周辺の配列が変更されると、ポリヌクレオチドの効率、長さ及び構造的安定性に影響が及ぶことが示された。本発明のポリヌクレオチドは、翻訳開始部位への到達性を低減するために、翻訳開始部位の近くに、Ｍａｔｓｕｄａらによって説明されたＬＮＡ配列またはＥＪＣ配列の代わりに、ｍｉＲＮＡ配列を含むことができる。翻訳開始部位は、ｍｉＲＮＡ配列の前、ｍｉＲＮＡ配列の後またはｍｉＲＮＡ配列内に存在できる。非限定的な例として、翻訳開始部位は、シード配列または結合部位のようなｍｉＲＮＡ配列内に位置できる。

【０３００】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、抗原提示細胞による抗原提示を抑制するために、ｍｉＲＮＡを少なくとも１つ含むことができる。そのｍｉＲＮＡは、完全ｍｉＲＮＡ配列、ｍｉＲＮＡシード配列、シードを含まないｍｉＲＮＡ配列またはこれらを組み合わせたものであることができる。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチドに組み込まれたｍｉＲＮＡは、造血システムに対して特異的であることができる。別の非限定的な例として、抗原提示を抑制する目的で、本発明のポリヌクレオチドに組み込まれたｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１４２－３ｐである。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、目的の組織内または細胞内で、コードされるポリペプチドの発現を抑制するために、ｍｉＲＮＡを少なくとも１つ含むことができる。非限定的な例として、本発明のポリヌクレオチドは、ｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４２－３ｐシード配列、シードを含まないｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４２－５ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４２－５ｐシード配列、シードを含まないｍｉＲ－１４２－５ｐ結合部位、ｍｉＲ－１４６結合部位、ｍｉＲ－１４６シード配列及び／またはシード配列を含まないｍｉＲ－１４６結合部位を少なくとも１つ含むことができる。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、免疫細胞でｍＲＮＡ医薬を選択的に分解して、医薬の送達を原因とする望ましくない免疫原性反応を抑えるために、３’ＵＴＲ内にｍｉＲＮＡ結合部位を少なくとも１つ含むことができる。非限定的な例として、そのｍｉＲＮＡ結合部位は、抗原提示細胞において、本発明のポリヌクレオチドの不安定性を増大できる。これらのｍｉＲＮＡの非限定的な例としては、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４６ａ－５ｐ及びｍｉＲ－１４６－３ｐが挙げられる。

【０３０３】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドの領域内に、ＲＮＡ結合タンパク質と相互作用できるｍｉＲＮＡ配列を少なくとも１つ含む。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、（ｉ）バリアントＰＡＨをコードする配列最適化ヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）と、（ｉｉ）ｍｉＲＮＡ結合部位（例えば、ｍｉＲ－１４２に結合するｍｉＲＮＡ結合部位）及び／またはｍｉＲ－１２６に結合するｍｉＲＮＡ結合部位を含む。

【０３０５】

５’キャップを有する領域

本開示は、５’キャップと、本発明のポリヌクレオチド（例えば、発現させたいバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）の両方を含むポリヌクレオチドも含む。

【０３０６】

天然のｍＲＮＡの５’キャップ構造は、核外輸送に関与して、ｍＲＮＡの安定性を向上させ、ｍＲＮＡキャップ結合タンパク質（ＣＢＰ）に結合し、ＣＢＰは、ポリ（Ａ）結合タンパク質との会合を通じて、細胞内でのｍＲＮＡの安定性及び翻訳能力に関与して、成熟した環状ｍＲＮＡ種を形成する。そのキャップはさらに、ｍＲＮＡスプライシングの際に、５’近位のイントロンの除去を助ける。

【０３０７】

内因性ｍＲＮＡ分子では、５’末端がキャッピングされて、末端のグアノシンキャップ残基と、ｍＲＮＡ分子の５’末端の転写済みセンスヌクレオチドとの間に、５’－ｐｐｐ－５’－という三リン酸結合を形成できる。次に、この５’－グアニル酸キャップがメチル化されて、Ｎ７－メチル－グアニル酸残基を生成することができる。ｍＲＮＡの５’末端の一番端の転写済みヌクレオチド及び／または端から２番目の転写済みヌクレオチドのリボース糖も任意に、２’－Ｏ－メチル化されることがある。グアニル酸キャップ構造の加水分解及び切断を通じて、５’－キャップを除去することにより、ｍＲＮＡ分子のような核酸分子を分解の標的とできる。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）には、キャップ部分が組み込まれている。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、非加水分解性キャップ構造を含み、キャップの除去が阻止されるので、ｍＲＮＡの半減期が延長される。キャップ構造の加水分解には、５’－ｐｐｐ－５’のホスホロジエステル結合の切断が必要となるので、キャッピング反応の際に、修飾ヌクレオチドを使用できる。例えば、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）のＶａｃｃｉｎｉａ Ｃａｐｐｉｎｇ ＥｎｚｙｍｅをＡ－チオ－グアノシンヌクレオチドとともに、メーカーの指示に従って使用して、５’－ｐｐｐ－５’キャップにおいてホスホロチオエート結合をもたらすことができる。α－メチルホスホネート型ヌクレオチド及びセレノホスフェート型ヌクレオチドなど、さらなる修飾グアノシンヌクレオチドを使用できる。

【０３１０】

さらなる修飾としては、（上記のように）ポリヌクレオチドの５’末端及び／または５’末端から２番目のヌクレオチドのリボース糖が、その糖環の２’－ヒドロキシル基において、２’－Ｏ－メチル化されることが挙げられるが、これらに限らない。別個の５’－キャップ構造を複数用いて、ｍＲＮＡ分子として機能するポリヌクレオチドのような核酸分子の５’－キャップをもたらすことができる。キャップアナログ（本明細書では、合成キャップアナログ、化学的キャップ、化学的キャップアナログ、構造的キャップアナログまたは機能的キャップアナログともいう）は、天然の５’キャップ（すなわち、内因性５’キャップ、野生型５’キャップまたは生理的な５’キャップ）とは、化学的構造が異なる一方で、キャップ機能は維持されている。キャップアナログは、化学的（すなわち非酵素的）または酵素的に合成し、及び／または本発明のポリヌクレオチドに連結することができる。

【０３１１】

例えば、アンチリバースキャップアナログ（ＡＲＣＡ）というキャップは、５’－５’－三リン酸基によって連結された２個のグアニンを含み、そのグアニンの一方は、Ｎ７メチル基及び３’－Ｏ－メチル基を含む（すなわち、Ｎ７，３’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－５’－三リン酸－５’－グアノシン（ｍ７Ｇ－３’ｍｐｐｐ－Ｇ。同義として３’Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇと称することができる）。もう一方のグアニンの３’－Ｏ原子（無修飾）は、キャッピングされたポリヌクレオチドの５’末端ヌクレオチドに連結されることになる。Ｎ７及び３’－Ｏがメチル化されたグアニンは、キャッピングされたポリヌクレオチドの末端部分となる。

【０３１２】

別の例示的なキャップは、ｍＣＡＰであり、ｍＣＡＰは、ＡＲＣＡに似ているが、グアノシンに２’－Ｏ－メチル基を有する（すなわち、Ｎ７，２’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－５’－三リン酸－５’－グアノシン、ｍ７Ｇｍ－ｐｐｐ－Ｇ）。

【０３１３】

別の例示的なキャップは、ｍ７Ｇ－ｐｐｐ－Ｇｍ－Ａ（すなわち、Ｎ７，グアノシン－５’－三リン酸－２’－Ｏ－ジメチル－グアノシン－アデノシン）である。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、キャップは、ジヌクレオチドキャップアナログである。非限定的な例として、ジヌクレオチドキャップアナログは、米国特許第８，５１９，１１０号（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）に記載されているジヌクレオチドキャップアナログのように、異なるリン酸位において、ボラノホスフェート基またはホスホロセレノエート基で修飾されていることができる。

【０３１５】

別の実施形態では、キャップは、当該技術分野で知られており及び／または本明細書に記載されているキャップアナログのＮ７－（４－クロロフェノキシエチル）置換ジヌクレオチド形態であるキャップアナログである。Ｎ７－（４－クロロフェノキシエチル）置換ジヌクレオチド形態のキャップアナログの非限定的な例としては、Ｎ７－（４－クロロフェノキシエチル）－Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ及びＮ７－（４－クロロフェノキシエチル）－ｍ３’－ＯＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇというキャップアナログが挙げられる（例えば、Ｋｏｒｅ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２０１３ ２１：４５７０－４５７４（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）に記載されている様々なキャップアナログ及びキャップアナログの合成方法を参照されたい）。別の実施形態では、本発明のキャップアナログは、４－クロロ／ブロモフェノキシエチルアナログである。

【０３１６】

本発明のポリヌクレオチドは、より忠実な５’－キャップ構造をもたらすために、製造（ＩＶＴまたは化学合成のいずれか）の後に、酵素を用いてキャッピングすることもできる。本明細書で使用する場合、「より忠実な」という語句は、構造的または機能的に内因性または野生型の特色を厳密に映し出すかまたは模倣する特色を指す。すなわち、「より忠実な」特色は、先行技術の合成の特色もしくはアナログなどよりも、内因性細胞、野生

型細胞、天然の細胞または生理学的な細胞の機能及び／または構造を表しているか、またはその対応する内因性の特色、野生型の特色、天然の特色または生物学的な特色を１つ以上の点で上回っている。本発明の、より忠実な５’キャップ構造の非限定的な例は、とりわけ、当該技術分野で知られている合成５’キャップ構造（または野生型５’キャップ構造、天然の５’キャップ構造もしくは生物学的な５’キャップ構造）と比べて、キャップ結合タンパク質の結合が増強され、半減期が延長され、５’エンドヌクレアーゼに対する感受性が低減され、及び／または５’キャップの除去が低減される構造である。例えば、組み換えワクシニアウイルスキャッピング酵素及び組み換え２’－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ酵素は、ポリヌクレオチドの５’末端ヌクレオチドと、グアニンキャップヌクレオチドの間に、カノニカルな５’－５’－三リン酸結合を作ることができ、そのキャップグアニンは、Ｎ７メチル化を含み、そのｍＲＮＡの５’末端ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチルを含む。このような構造は、Ｃａｐ１構造という。このキャップにより、翻訳能力と細胞の安定性が向上し、例えば、当該技術分野で知られている他の５’キャップアナログ構造と比べて、細胞の炎症誘発性サイトカインの活性化が低減される。キャップ構造としては、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｎ１ｐＮ２ｐ（Ｃａｐ０）、７ｍＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｎ１ｍｐＮｐ（Ｃａｐ１）及び７ｍＧ（５’）－ｐｐｐ（５’）Ｎ１ｍｐＮ２ｍｐ（Ｃａｐ２）が挙げられるが、これらに限らない。

【０３１７】

非限定的な例として、製造後のキメラポリヌクレオチドのキャッピングは、そのキメラポリヌクレオチドの１００％近くをキャッピングできるので、より効率的であることができる。これは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応の過程で、キャップアナログをキメラポリヌクレオチドに連結すると、約８０％であるのとは対照的である。

【０３１８】

本発明によれば、５’末端キャップは、内因性のキャップまたはキャップアナログを含むことができる。本発明によれば、５’末端キャップは、グアニンアナログを含むことができる。有用なグアニンアナログとしては、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン及び２－アジド－グアノシンが挙げられるが、これらに限らない。

【０３１９】

本発明で提供するのは、ＲＮＡポリメラーゼ、例えば野生型ＲＮＡポリメラーゼまたはそのバリアント（例えば、本明細書に記載されているバリアントなど）を用いて、リボ核酸（ＲＮＡ）合成の際の共転写キャッピング方法で使用できるキャップを含む例示的なキャップでもある。一実施形態では、別個のキャッピング反応を必要とせずに、「ワンポット」反応で、ＲＮＡを生成するときに、キャップを付加できる。すなわち、いくつかの実施形態では、その方法は、ＲＮＡ転写産物を生成するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応条件下で、ポリヌクレオチド鋳型をＲＮＡポリメラーゼバリアント、ヌクレオシド三リン酸及びキャップアナログと反応させることを含む。

【０３２０】

本明細書で使用する場合、「キャップ」という用語は、逆位のＧヌクレオチドを含み、逆位Ｇヌクレオチドの３’に、さらなるヌクレオチドを１つ以上含むことができ、例えば、逆位Ｇヌクレオチドの３’、かつ５’ＵＴＲ、例えば、本明細書に記載されている５’ＵＴＲの５’側に、ヌクレオチドを１個、２個または３個以上含むことができる。

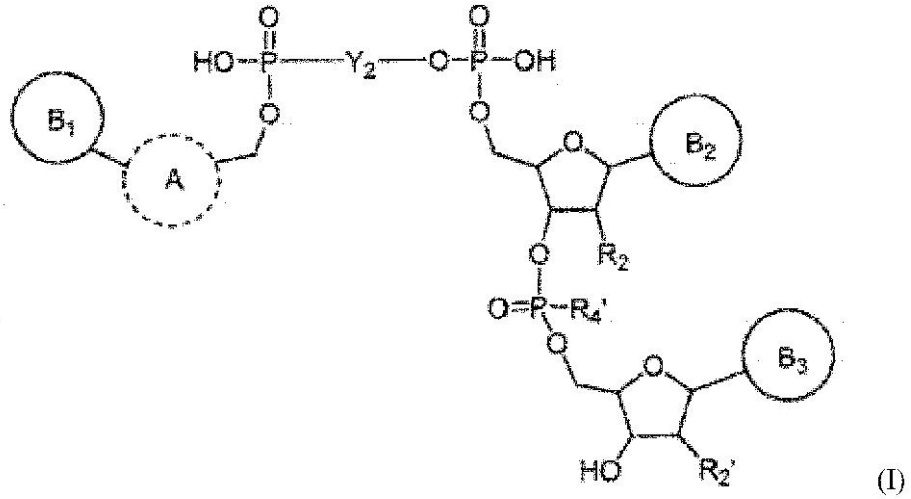
【０３２１】

例示的なキャップは、ＧＧ、ＧＡまたはＧＧＡという配列を含み、下線の付されたイタリック体のＧは、逆位Ｇヌクレオチドであり、その後に５’－５’－三リン酸基が続く。

【０３２２】

一実施形態では、キャップは、下記の式（Ｉ）の化合物、

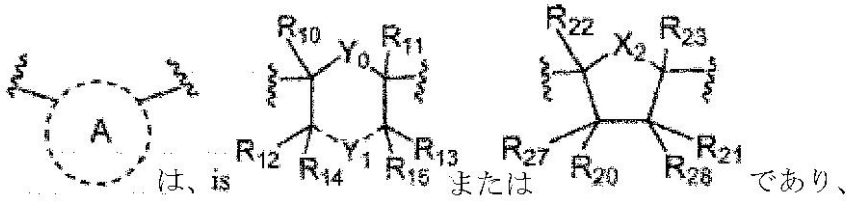
【化１】



(I)

またはその立体異性体、互変異性体もしくは塩を含み、式中、

【化２】



は、is または であり、

環Ｂ１は、修飾または未修飾グアニンであり、

環Ｂ２及び環Ｂ３は、それぞれ独立して、核酸塩基または修飾核酸塩基であり、

Ｘ２は、Ｏ、Ｓ（Ｏ）ｐ、ＮＲ２４またはＣＲ２５Ｒ２６であり、そのｐは、０、１または２であり、

Ｙ０は、ＯまたはＣＲ６Ｒ７であり、

Ｙ１は、Ｏ、Ｓ（Ｏ）ｎ、ＣＲ６Ｒ７またはＮＲ８であり、そのｎは、０、１または２であり、

各－－－は、単結合であるか、または存在せず、各－－－が単結合の場合、Ｙｉは、Ｏ、Ｓ（Ｏ）ｎ、ＣＲ６Ｒ７またはＮＲ８であり、各－－－が存在しない場合、Ｙ１は空であり、

Ｙ２は、（ＯＰ（Ｏ）Ｒ４）ｍ（そのｍは、０、１もしくは２である）、または－Ｏ－（ＣＲ４０Ｒ４１）ｕ－Ｑ０－（ＣＲ４２Ｒ４３）ｖ－（そのＱ０は、結合、Ｏ、Ｓ（Ｏ）ｒ、ＮＲ４４もしくはＣＲ４５Ｒ４６であり、ｒは、０、１もしくは２であり、ｕ及びｖのそれぞれは独立して、１、２、３もしくは４である）であり、

各Ｒ２及びＲ２’は独立して、ハロ、ＬＮＡ、またはＯＲ３であり、

各Ｒ３は独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ２－Ｃ６アルケニルまたはＣ２－Ｃ６アルキニルであり、Ｒ３は、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ２－Ｃ６アルケニルまたはＣ２－Ｃ６アルキニルである場合には、１つ以上のＯＨまたはＯＣ（Ｏ）－Ｃ１－Ｃ６アルキルで任意に置換されているハロ、ＯＨ及びＣ１－Ｃ６アルコキシルの１つ以上で任意に置換されており、

各Ｒ４及びＲ４は独立して、Ｈ、ハロ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、ＯＨ、ＳＨ、ＳｅＨまたはＢＨ３－であり、

Ｒ６、Ｒ７及びＲ８のそれぞれは独立して、－Ｑ１－Ｔ１であり、そのＱ１は、結合、またはハロ、シアノ、ＯＨ及びＣ１－Ｃ６アルコキシの１つ以上で任意に置換されたＣ１－Ｃ３アルキルリンカーであり、Ｔ１は、Ｈ、ハロ、ＯＨ、ＣＯＯＨ、シアノまたはＲｓ

１であり、そのＲｓ１は、Ｃ１－Ｃ３アルキル、Ｃ２－Ｃ６アルケニル、Ｃ２－Ｃ６アルキニル、Ｃ１－Ｃ６アルコキシル、Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ３－Ｃ８シクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、ＮＲ３１Ｒ３２、（ＮＲ３１Ｒ３２Ｒ３３）＋、４～１２員のヘテロシクロアルキル、または５もしくは６員のヘテロアリールであり、Ｒｓ１は、ハロ、ＯＨ、オキソ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、ＣＯＯＨ、Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ１－Ｃ６アルキル、シアノ、Ｃ１－Ｃ６アルコキシル、ＮＲ３１Ｒ３２、（ＮＲ３１Ｒ３２Ｒ３３）＋、Ｃ３－Ｃ８シクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、４～１２員のヘテロシクロアルキル及び５または６員のヘテロアリールからなる群から選択した１つ以上の置換基で任意に置換されており、

Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２、Ｒ１３、Ｒ１４及びＲ１５のそれぞれは独立して、－Ｑ２－Ｔ２であり、そのＱ２は、結合、またはハロ、シアノ、ＯＨ及びＣ１－Ｃ６アルコキシの１つ以上で任意に置換されたＣ１－Ｃ３アルキルリンカーであり、Ｔ２は、Ｈ、ハロ、ＯＨ、ＮＨ２、シアノ、ＮＯ２、Ｎ３、Ｒｓ２またはＯＲｓ２であり、そのＲｓ２は、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ２－Ｃ６アルケニル、Ｃ２－Ｃ６アルキニル、Ｃ３－Ｃ８シクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、ＮＨＣ（Ｏ）－Ｃ１－Ｃ６アルキル、ＮＲ３１Ｒ３２、（ＮＲ３１Ｒ３２Ｒ３３）＋、４～１２員のヘテロシクロアルキルまたは５もしくは６員のヘテロアリールであり、Ｒｓ２は、ハロ、ＯＨ、オキソ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、ＣＯＯＨ、Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ１－Ｃ６アルキル、シアノ、Ｃ１－Ｃ６アルコキシル、ＮＲ３１Ｒ３２、（ＮＲ３１Ｒ３２Ｒ３３）＋、Ｃ３－Ｃ８シクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、４～１２員のヘテロシクロアルキル及び５もしくは６員のヘテロアリールからなる群から選択した１つ以上の置換基で任意に置換されており、あるいは、Ｒ１２は、Ｒ１４と一体となってオキソであるか、またはＲ１３は、Ｒ１５と一体となってオキソであり、

Ｒ２０、Ｒ２１、Ｒ２２及びＲ２３のそれぞれは独立して、－Ｑ３－Ｔ３であり、そのＱ３は、結合、またはハロ、シアノ、ＯＨ及びＣ１－Ｃ６アルコキシの１つ以上で任意に置換されたＣ１－Ｃ３アルキルリンカーであり、Ｔ３は、Ｈ、ハロ、ＯＨ、ＮＨ２、シアノ、ＮＯ２、Ｎ３、ＲＳ３またはＯＲＳ３であり、そのＲＳ３は、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ２－Ｃ６アルケニル、Ｃ２－Ｃ６アルキニル、Ｃ３－Ｃ８シクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、ＮＨＣ（Ｏ）－Ｃ１－Ｃ６アルキル、モノ－Ｃ１－Ｃ６アルキルアミノ、ジ－Ｃ１－Ｃ６アルキルアミノ、４～１２員のヘテロシクロアルキルまたは５もしくは６員のヘテロアリールであり、Ｒｓ３は、ハロ、ＯＨ、オキソ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、ＣＯＯＨ、Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ１－Ｃ６アルキル、シアノ、Ｃ１－Ｃ６アルコキシル、アミノ、モノ－Ｃ１－Ｃ６アルキルアミノ、ジ－Ｃ１－Ｃ６アルキルアミノ、Ｃ３－Ｃ８シクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、４～１２員のヘテロシクロアルキル及び５もしくは６員のヘテロアリールからなる群から選択した１つ以上の置換基で任意に置換されており、

Ｒ２４、Ｒ２５及びＲ２６のそれぞれは独立して、ＨまたはＣ１－Ｃ６アルキルであり、

Ｒ２７及びＲ２８のそれぞれは独立して、ＨもしくはＯＲ２９であるか、またはＲ２７及びＲ２８は一体となって、Ｏ－Ｒ３０－Ｏを形成し、各Ｒ２９は独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ２－Ｃ６アルケニルまたはＣ２－Ｃ６アルキニルであり、Ｒ２９は、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ２－Ｃ６アルケニルまたはＣ２－Ｃ６アルキニルである場合には、１つ以上のＯＨまたはＯＣ（Ｏ）－Ｃ１－Ｃ６アルキルで任意に置換されているハロ、ＯＨ及びＣ１－Ｃ６アルコキシルの１つ以上で任意に置換されており、

Ｒ３０は、ハロ、ＯＨ及びＣ１－Ｃ６アルコキシルの１つ以上で任意に置換されたＣ１－Ｃ６アルキレンであり、

Ｒ３１、Ｒ３２及びＲ３３のそれぞれは独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ３－Ｃ８シクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、４～１２員のヘテロシクロアルキル、または５もしくは６員のヘテロアリールであり、

Ｒ４０、Ｒ４１、Ｒ４２及びＲ４３のそれぞれは独立して、１つ以上のＯＰ（Ｏ）Ｒ４７Ｒ４８で任意に置換されたＨ、ハロ、ＯＨ、シアノ、Ｎ３、ＯＰ（Ｏ）Ｒ４７Ｒ４８もしくはＣ１－Ｃ６アルキルであるか、または１つのＲ４１及び１つのＲ４３は、それらと

結合している炭素原子及びＱ０と一体となって、Ｃ４－Ｃ１０シクロアルキル、４～１４員のヘテロシクロアルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリールまたは５～１４員のヘテロアリールを形成し、そのシクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、フェニルまたは５～６員のヘテロアリールのそれぞれは、ＯＨ、ハロ、シアノ、Ｎ３、オキソ、ＯＰ（Ｏ）Ｒ４７Ｒ４８、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ１－Ｃ６ハロアルキル、ＣＯＯＨ、Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ１－Ｃ６アルコキシル、Ｃ１－Ｃ６ハロアルコキシル、アミノ、モノ－Ｃ１－Ｃ６アルキルアミノ及びジ－Ｃ１－Ｃ６アルキルアミノの１つ以上で任意に置換されており、

Ｒ４４は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、またはアミン保護基であり、

Ｒ４５及びＲ４６のそれぞれは独立して、Ｈ、ＯＰ（Ｏ）Ｒ４７Ｒ４８、または１つ以上のＯＰ（Ｏ）Ｒ４７Ｒ４８で任意に置換されたＣ１－Ｃ６アルキルであり、

Ｒ４７及びＲ４８のそれぞれは独立して、Ｈ、ハロ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、ＯＨ、ＳＨ、ＳｅＨまたはＢＨ３－である。

【０３２３】

本発明で提供するようなキャップアナログには、２０１７年４月２０日に公開された国際公開第２０１７／０６６７９７号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているキャップアナログのいずれかが含まれてよいことを理解されたい。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、Ｂ２の中央の位置は、アラビノースのような非リボース分子であることができる。

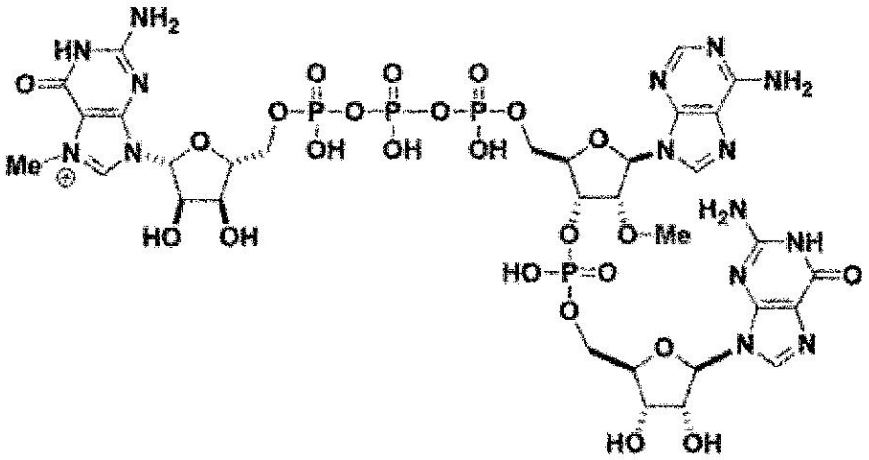
【０３２５】

いくつかの実施形態では、Ｒ２は、エチルベースである。

【０３２６】

したがって、いくつかの実施形態では、キャップは、以下の構造を有する。

【化３】

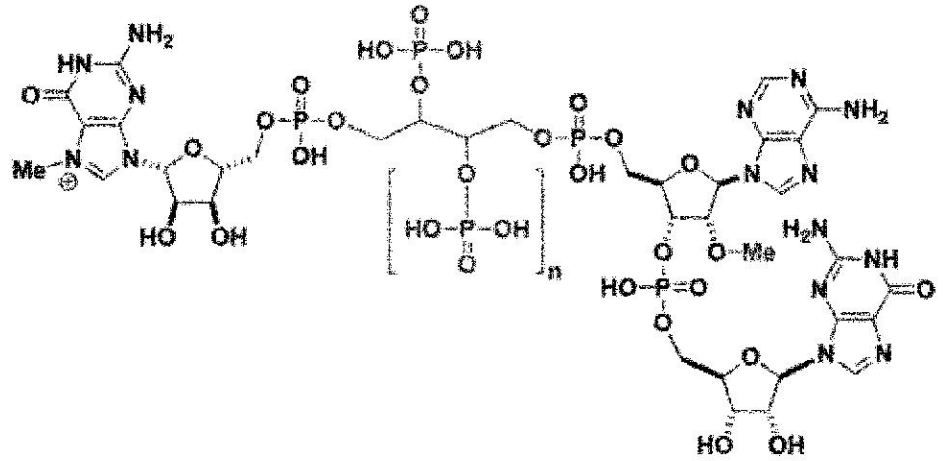


(II)

【０３２７】

別の実施形態では、キャップは、以下の構造を有する。

【化４】

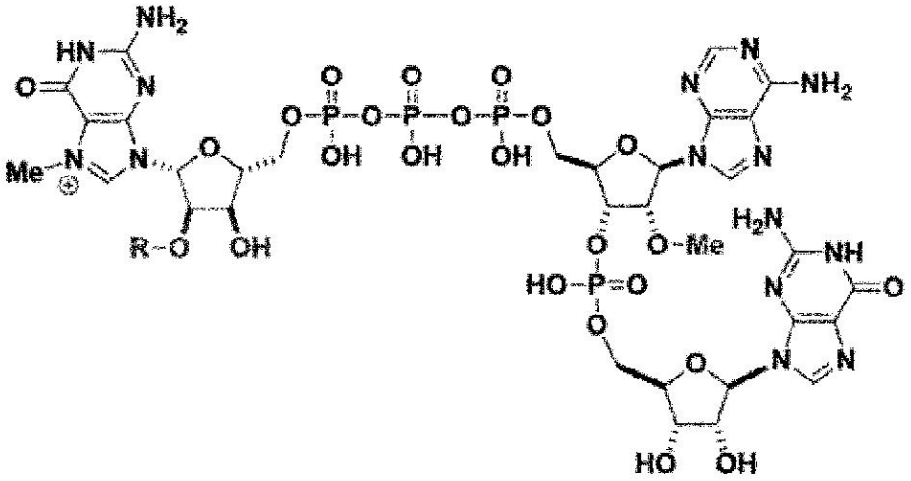


(III)

【０３２８】

さらに別の実施形態では、キャップは、以下の構造を有する。

【化５】

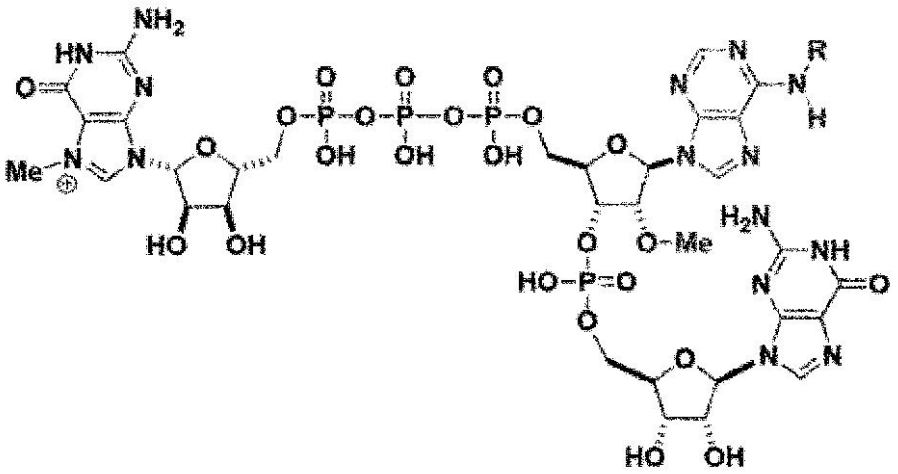


(IV)

【０３２９】

さらなる別の実施形態では、キャップは、以下の構造を有する。

【化６】



(V)

【０３３０】

いくつかの実施形態では、Ｒは、アルキル（例えばＣ１－Ｃ６アルキル）である。いくつかの実施形態では、Ｒは、メチル基（例えばＣ１アルキル）である。いくつかの実施形態では、Ｒは、エチル基（例えばＣ２アルキル）である。

【０３３１】

いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＡ、ＧＡＣ、ＧＡＧ、ＧＡＵ、ＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧ、ＧＣＵ、ＧＧＡ、ＧＧＣ、ＧＧＧ、ＧＧＵ、ＧＵＡ、ＧＵＣ、ＧＵＧ及びＧＵＵという配列から選択した配列を含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＣＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＣＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＣＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＣＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＧＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＧＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＧＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＧＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＵＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＵＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＵＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＵＵを含む。

【０３３２】

いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＵ、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＵ、ｍ７ＧｐｐｐＧｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＧｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＧｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＧｐＵ、ｍ７ＧｐｐｐＵｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＵｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＵｐＧ及びｍ７ＧｐｐｐＵｐＵという配列から選択した配列を含む。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＧｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＧｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＧｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、

ｍ７ＧｐｐｐＧｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵｐＵを含む。

【０３３４】

キャップは、いくつかの実施形態では、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＧ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＵ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＧ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＵ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＧ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＵ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＧ及びｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＵという配列から選択した配列を含む。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＵを含む。

【０３３６】

キャップは、別の実施形態では、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＵ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧ及びｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵという配列から選択した配列を含む。

【０３３７】

いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧを含む

。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵを含む。

【０３３８】

キャップは、さらなる別の実施形態では、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＵ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧ及びｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵという配列から選択した配列を含む。

【０３３９】

いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドキャップは、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵを含む。

【０３４０】

いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇｐｐｐｍ６Ａ２’ＯｍｅｐＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７Ｇｐｐｐｅ６Ａ２’ＯｍｅｐＧを含む。

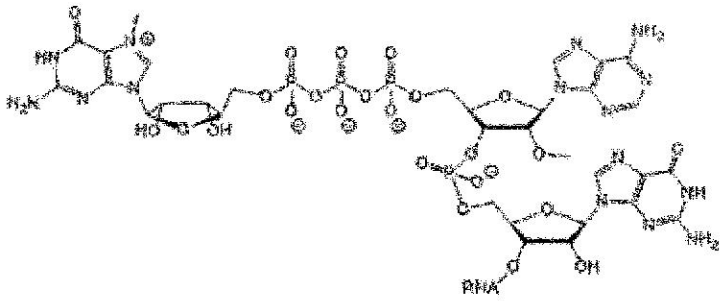
【０３４１】

いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＣＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＵＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＧＧを含む。

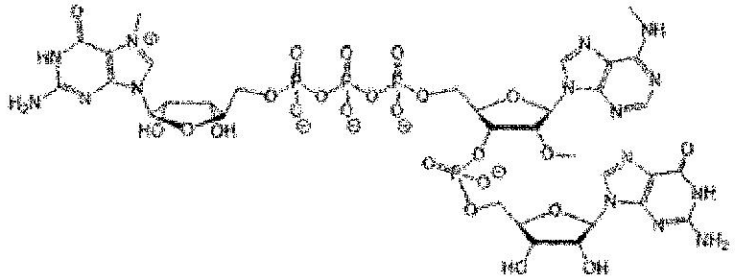
【０３４２】

いくつかの実施形態では、キャップは、

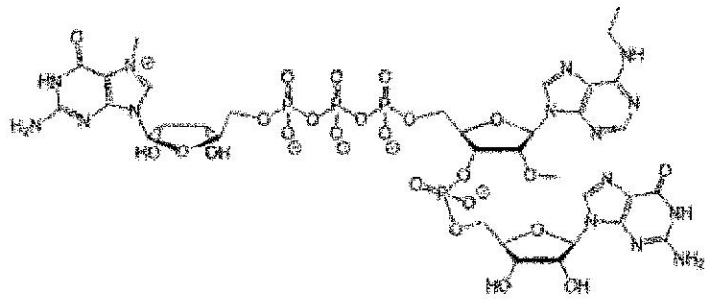
【化７】



(VI)、



(VII)または



(VIII)

という構造のいずれか１つを含む。

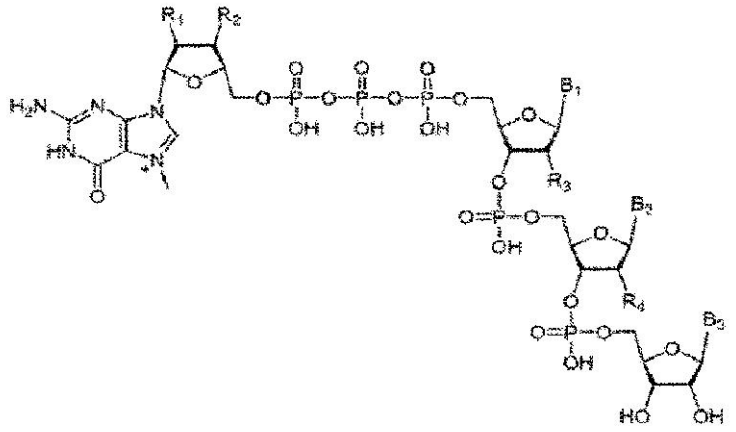
【０３４３】

いくつかの実施形態では、キャップは、ｍ７ＧｐｐｐＮ１Ｎ２Ｎ３を含み、そのＮ１、Ｎ２及びＮ３は、任意であり（すなわち、存在しないこともできるし、または１つ以上存在することもできる）、独立して、天然のヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基または非天然のヌクレオシド塩基である。いくつかの実施形態では、ｍ７Ｇはさらに、例えば３’位がメチル化されている。いくつかの実施形態では、ｍ７Ｇは、３’位にＯ－メチルを含む。いくつかの実施形態では、Ｎ１、Ｎ２及びＮ３は、存在する場合、任意に、独立して、アデニン、ウラシル、グアニジン、チミンまたはシトシンである。いくつかの実施形態では、Ｎ１、Ｎ２及びＮ３の１つ以上（またはすべて）は、存在する場合、例えば２’位がメチル化されている。いくつかの実施形態では、Ｎ１、Ｎ２及びＮ３の１つ以上（またはすべて）は、存在する場合、２’位にＯ－メチルを有する。

【０３４４】

いくつかの実施形態では、キャップは、以下の構造を含み、

【化８】



(IX)

式中、Ｂ１、Ｂ２及びＢ３は独立して、天然のヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基または非天然のヌクレオシド塩基であり、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３及びＲ４は独立して、ＯＨまたはＯ－メチルである。いくつかの実施形態では、Ｒ３は、Ｏ－メチルであり、Ｒ４は、ＯＨである。いくつかの実施形態では、Ｒ３及びＲ４は、Ｏ－メチルである。いくつかの実施形態では、Ｒ４は、Ｏ－メチルである。いくつかの実施形態では、Ｒ１は、ＯＨであり、Ｒ２は、ＯＨであり、Ｒ３は、Ｏ－メチルであり、Ｒ４は、ＯＨである。いくつかの実施形態では、Ｒ１は、ＯＨであり、Ｒ２は、ＯＨであり、Ｒ３は、Ｏ－メチルであり、Ｒ４は、Ｏ－メチルである。いくつかの実施形態では、Ｒ１及びＲ２の少なくとも１つは、Ｏ－メチルであり、Ｒ３は、Ｏ－メチルであり、Ｒ４は、ＯＨである。いくつかの実施形態では、Ｒ１及びＲ２の少なくとも１つは、Ｏ－メチルであり、Ｒ３は、Ｏ－メチルであり、Ｒ４は、Ｏ－メチルである。

【０３４５】

いくつかの実施形態では、Ｂ１、Ｂ３及びＢ３は、天然のヌクレオシド塩基である。いくつかの実施形態では、Ｂ１、Ｂ２及びＢ３の少なくとも１つは、修飾塩基または非天然の塩基である。いくつかの実施形態では、Ｂ１、Ｂ２及びＢ３の少なくとも１つは、Ｎ６－メチルアデニンである。いくつかの実施形態では、Ｂ１は、アデニン、シトシン、チミンまたはウラシルである。いくつかの実施形態では、Ｂ１は、アデニンであり、Ｂ２は、ウラシルであり、Ｂ３は、アデニンである。いくつかの実施形態では、Ｒ１及びＲ２は、ＯＨであり、Ｒ３及びＲ４は、Ｏ－メチルであり、Ｂ１は、アデニンであり、Ｂ２は、ウラシルであり、Ｂ３は、アデニンである。

【０３４６】

いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＡＡ、ＧＡＣＡ、ＧＡＧＡ、ＧＡＵＡ、ＧＣＡＡ、ＧＣＣＡ、ＧＣＧＡ、ＧＣＵＡ、ＧＧＡＡ、ＧＧＣＡ、ＧＧＧＡ、ＧＧＵＡ、ＧＵＣＡ及びＧＵＵＡという配列から選択した配列を含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＡＧ、ＧＡＣＧ、ＧＡＧＧ、ＧＡＵＧ、ＧＣＡＧ、ＧＣＣＧ、ＧＣＧＧ、ＧＣＵＧ、ＧＧＡＧ、ＧＧＣＧ、ＧＧＧＧ、ＧＧＵＧ、ＧＵＣＧ、ＧＵＧＧ及びＧＵＵＧという配列から選択した配列を含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＡＵ、ＧＡＣＵ、ＧＡＧＵ、ＧＡＵＵ、ＧＣＡＵ、ＧＣＣＵ、ＧＣＧＵ、ＧＣＵＵ、ＧＧＡＵ、ＧＧＣＵ、ＧＧＧＵ、ＧＧＵＵ、ＧＵＡＵ、ＧＵＣＵ、ＧＵＧＵ及びＧＵＵＵという配列から選択した配列を含む。いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＡＡＣ、ＧＡＣＣ、ＧＡＧＣ、ＧＡＵＣ、ＧＣＡＣ、ＧＣＣＣ、ＧＣＧＣ、ＧＣＵＣ、ＧＧＡＣ、ＧＧＣＣ、ＧＧＧＣ、ＧＧＵＣ、ＧＵＡＣ、ＧＵＣＣ、ＧＵＧＣ及びＧＵＵＣという配列から選択した配列を含む。

【０３４７】

キャップは、いくつかの実施形態では、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’

ＯＭｅｐｐｐＡｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＧｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡｐＵｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＧｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣｐＵｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＧｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧｐＵｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＧｐＮ及びｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵｐＵｐＮという配列から選択した配列を含み、そのＮは、天然のヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基または非天然のヌクレオシド塩基である。

【０３４８】

キャップは、別の実施形態では、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＵｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧｐＮ及びｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵｐＮという配列から選択した配列を含み、そのＮは、天然のヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基または非天然のヌクレオシド塩基である。

【０３４９】

キャップは、さらなる別の実施形態では、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＵｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧｐＮ及びｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵｐＮという配列から選択した配列を含み、そのＮは、天然のヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基または非天然のヌクレオシド塩基である。

【０３５０】

キャップは、別の実施形態では、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＵ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅｐＮ及びｍ７Ｇ３’ＯＭｅｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵ２’ＯＭｅｐＮという配列から選択した配列を含み、そのＮは、天然のヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基または非天然のヌクレオシド塩基である。

【０３５１】

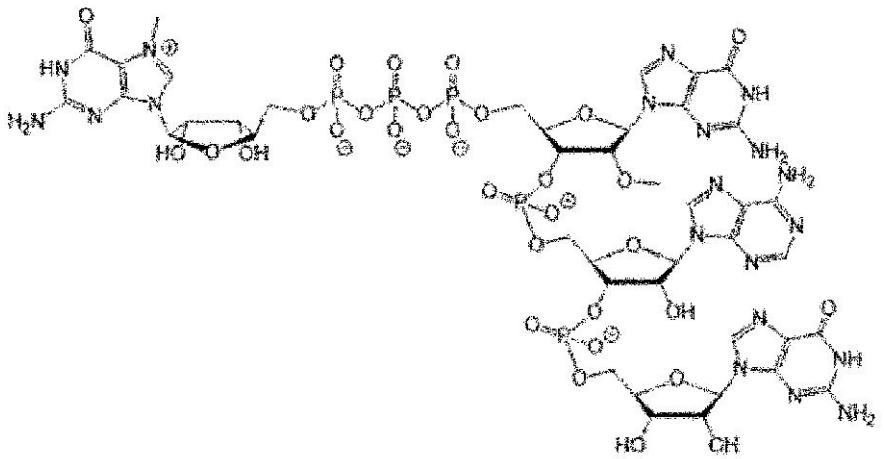
キャップは、さらなる別の実施形態では、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＡ２’ＯＭｅｐＵ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＣ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅ

ｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＧ２’ＯＭｅｐＵ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＡ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＣ２’ＯＭｅｐＮ、ｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＧ２’ＯＭｅｐＮ及びｍ７ＧｐｐｐＵ２’ＯＭｅｐＵ２’ＯＭｅｐＮという配列から選択した配列を含み、そのＮは、天然のヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基または非天然のヌクレオシド塩基である。

【０３５２】

いくつかの実施形態では、キャップは、ＧＧＡＧを含む。いくつかの実施形態では、キャップは、以下の構造を含む。

【化９】



(X)

【０３５３】

ポリＡテール

いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、ポリＡテールをさらに含む。さらなる実施形態では、安定化のために、ポリＡテールの末端基を組み込むことができる。別の実施形態では、ポリＡテールは、デス－３’ヒドロキシルテールを含む。

【０３５４】

ＲＮＡプロセッシングの際、安定性を高めるために、アデニンヌクレオチドの長い鎖（ポリＡテール）を、ｍＲＮＡ分子のようなポリヌクレオチドに付加できる。転写直後に、転写産物の３’末端を切断して、３’ヒドロキシルを遊離させることができる。続いて、ポリＡポリメラーゼが、アデニンヌクレオチドの鎖をそのＲＮＡに付加する。ポリアデニル化というプロセスが、例えば、およそ８０残基長～およそ２５０残基長（およそ８０残基長、およそ９０残基長、およそ１００残基長、およそ１１０残基長、およそ１２０残基長、およそ１３０残基長、およそ１４０残基長、およそ１５０残基長、およそ１６０残基長、およそ１７０残基長、およそ１８０残基長、およそ１９０残基長、およそ２００残基長、およそ２１０残基長、およそ２２０残基長、およそ２３０残基長、およそ２４０残基長またはおよそ２５０残基長を含む）であることができるポリＡテールを付加する。一実施形態では、ポリＡテールは、１００ヌクレオチド長（配列番号１９５）である。

【０３５５】

ポリＡテールは、コンストラクトが核から輸送された後に付加することもできる。

【０３５６】

本開示によれば、安定化のために、ポリＡテールの末端基を組み込むことができる。本発明のポリヌクレオチドは、デス－３’ヒドロキシルテールを含むことができる。本発明のポリヌクレオチドは、Ｊｕｎｊｉｅ　Ｌｉらの文献（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１５，１５０１－１５０７，Ａｕｇｕｓｔ　２３，２００５（その内容は、参

照により、全体が本明細書に援用される））によって教示されているような構造的部分または２’－Ｏメチル修飾も含むことができる。

【０３５７】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒストンｍＲＮＡを含め、代替的なポリＡテール構造を有する転写産物をコードするように設計できる。Ｎｏｒｂｕｒｙによれば、「ヒト複製依存的ヒストンｍＲＮＡでも、末端ウリジル化が検出されている。これらのｍＲＮＡのターンオーバーは、染色体ＤＮＡの複製が完了した後または阻害された後に、潜在的に毒性のあるヒストンの蓄積を阻止するのに重要であると考えられている。これらのｍＲＮＡは、３’ポリ（Ａ）テールの欠失によって識別され、その代わりに、その機能は、安定したステムループ構造と、そのコグネイトであるステムループ結合タンパク質（ＳＬＢＰ）が担っており、ＳＬＢＰは、ポリアデニル化ｍＲＮＡ上のＰＡＢＰの機能と同じ機能を果たす」（Ｎｏｒｂｕｒｙ，“Ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ＲＮＡ：ａ ｃａｓｅ ｏｆ ｔｈｅ ｔａｉｌ ｗａｇｇｉｎｇ ｔｈｅ ｄｏｇ，”Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ；ＡＯＰ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ ２９ Ａｕｇｕｓｔ ２０１３；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｒｍ３６４５）（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）。

【０３５８】

ポリＡテールの特有な長さにより、本発明のポリヌクレオチドの特定の利点が得られる。概ね、ポリＡテールが存在する場合、その長さは、３０ヌクレオチド長超である。別の実施形態では、ポリＡテールは、３５ヌクレオチド長超である（例えば、少なくとも約３５ヌクレオチド、約４０ヌクレオチド、約４５ヌクレオチド、約５０ヌクレオチド、約５５ヌクレオチド、約６０ヌクレオチド、約７０ヌクレオチド、約８０ヌクレオチド、約９０ヌクレオチド、約１００ヌクレオチド、約１２０ヌクレオチド、約１４０ヌクレオチド、約１６０ヌクレオチド、約１８０ヌクレオチド、約２００ヌクレオチド、約２５０ヌクレオチド、約３００ヌクレオチド、約３５０ヌクレオチド、約４００ヌクレオチド、約４５０ヌクレオチド、約５００ヌクレオチド、約６００ヌクレオチド、約７００ヌクレオチド、約８００ヌクレオチド、約９００ヌクレオチド、約１，０００ヌクレオチド、約１，１００ヌクレオチド、約１，２００ヌクレオチド、約１，３００ヌクレオチド、約１，４００ヌクレオチド、約１，５００ヌクレオチド、約１，６００ヌクレオチド、約１，７００ヌクレオチド、約１，８００ヌクレオチド、約１，９００ヌクレオチド、約２，０００ヌクレオチド、約２，５００ヌクレオチド及び約３，０００ヌクレオチドであるか、これらの長さを超える）。

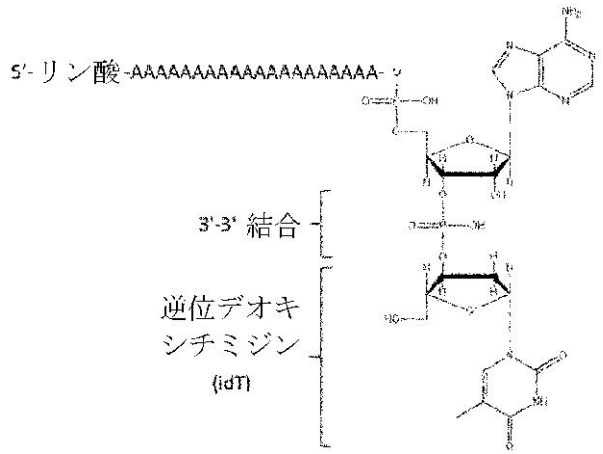
【０３５９】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドまたはその領域は、約３０～約３，０００ヌクレオチド（例えば、３０～５０ヌクレオチド、３０～１００ヌクレオチド、３０～２５０ヌクレオチド、３０～５００ヌクレオチド、３０～７５０ヌクレオチド、３０～１，０００ヌクレオチド、３０～１，５００ヌクレオチド、３０～２，０００ヌクレオチド、３０～２，５００ヌクレオチド、５０～１００ヌクレオチド、５０～２５０ヌクレオチド、５０～５００ヌクレオチド、５０～７５０ヌクレオチド、５０～１，０００ヌクレオチド、５０～１，５００ヌクレオチド、５０～２，０００ヌクレオチド、５０～２，５００ヌクレオチド、５０～３，０００ヌクレオチド、１００～５００ヌクレオチド、１００～７５０ヌクレオチド、１００～１，０００ヌクレオチド、１００～１，５００ヌクレオチド、１００～２，０００ヌクレオチド、１００～２，５００ヌクレオチド、１００～３，０００ヌクレオチド、５００～７５０ヌクレオチド、５００～１，０００ヌクレオチド、５００～１，５００ヌクレオチド、５００～２，０００ヌクレオチド、５００～２，５００ヌクレオチド、５００～３，０００ヌクレオチド、１，０００～１，５００ヌクレオチド、１，０００～２，０００ヌクレオチド、１，０００～２，５００ヌクレオチド、１，０００～３，０００ヌクレオチド、１，５００～２，０００ヌクレオチド、１，５００～２，５００ヌクレオチド、１，５００～３，０００ヌクレオチド、２，０００～３，０００ヌクレオチド、２，０００～２，５００ヌクレオチド及び２，５００～３，０

００ヌクレオチド）を含む。
【０３６０】
いくつかの実施形態では、ポリＡテールは、ポリヌクレオチド全体の長さ、またはポリヌクレオチドの特定の領域の長さに対して設計されている。この設計は、コード領域の長さ、特定の特色もしくは領域の長さに基づくか、またはポリヌクレオチドから発現する最終産物の長さに基づくことができる。
【０３６１】
この関連では、ポリＡテールは、ポリヌクレオチドまたはその特色部よりも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％または１００％長いことができる。ポリＡテールは、そのポリＡテールが属するポリヌクレオチドの一部分としても設計することもできる。この関連では、ポリＡテールは、コンストラクトの全長、コンストラクト領域、またはコンストラクト全長からポリＡテールを取り除いた長さの１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％または９０％以上であることができる。さらに、ポリＡ結合タンパク質に対する、操作済みの結合部位及びポリヌクレオチドのコンジュゲーションにより、発現を増強できる。
【０３６２】
加えて、ポリＡテールの３’末端にある修飾ヌクレオチドを用いて、ＰＡＢＰ（ポリＡ結合タンパク質）を介して、３’末端を通じて、別個のポリヌクレオチドを複数、一緒に連結できる。関連する細胞株において、トランスフェクション実験を行うことができ、トランスフェクションから１２時間後、２４時間後、４８時間後、７２時間後、７日後に、タンパク質の産生をＥＬＩＳＡによってアッセイできる。
【０３６３】
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ポリＡ－Ｇカルテット領域を含むように設計されている。Ｇ－カルテットは、４つのグアニンヌクレオチドが水素結合された環状アレイであり、ＤＮＡ及びＲＮＡの双方において、Ｇリッチな配列によって形成されることのあるアレイである。この実施形態では、Ｇ－カルテットは、ポリＡテールの末端に組み込まれている。得られたポリヌクレオチドは、安定性、タンパク質産生及びその他のパラメーター（様々な時点の半減期を含む）についてアッセイする。ポリＡ－Ｇカルテットにより、ｍＲＮＡからのタンパク質産生量が、１２０ヌクレオチドのポリＡテール（配列番号１９６）のみを用いた場合に見られる量の少なくとも７５％に相当することが発見されている。
【０３６４】
いくつかの実施形態では、ポリＡテールは、代替的なヌクレオシド、例えば逆位チミジンを含む。代替的なヌクレオシド、例えば逆位チミジンを含むポリＡテールは、本明細書に記載されているようにして生成してよい。例えば、ポリ（Ａ）テールを安定化するために、ｍＲＮＡコンストラクトをライゲーションによって修飾してよい。ライゲーションは、０．５～１．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡ（５’：Ｃａｐ１、３’：Ａ１００）、５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１０ｍＭのＭｇＣｌ２、１ｍＭのＴＣＥＰ、１０００単位／ｍＬのＴ４　ＲＮＡリガーゼ１、１ｍＭのＡＴＰ、２０％（ｗ／ｖ）のポリエチレングリコール８０００及びモル比５：１の修飾オリゴ：ｍＲＮＡを用いて行ってよい。修飾オリゴは、５’－リン酸－ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－（逆位デオキシチミジン（ｉｄＴ）（配列番号２０９））という配列を有する（下記を参照されたい）。ライゲーション反応物を混合し、室温（約２２℃）で、例えば４時間インキュベートする。安定テールを含むｍＲＮＡは、例えば、ｄＴ精製、逆相精製、ヒドロキシアパタイト精製、水中への限外ろ過及び滅菌ろ過によって精製する。得られた、安定テールを含むｍＲＮＡは、３’末端に、ポリＡ領域から始まるＡ１００－ＵＣＵＡＧＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－逆位デオキシチミジン（配列番号２５８）という構造を含む。
【０３６５】
テールを安定化するための修飾オリゴ（５’－リン酸－ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－（逆位デオキシチミジン）（配列番号２０９））は、以下のとおりである

。

【化１０】



【０３６６】

場合によっては、ポリＡテールは、Ａ１００－ＵＣＵＡＧ－Ａ２０－逆位デオキシチミジン（配列番号２５８）を含む。場合によっては、ポリＡテールは、Ａ１００－ＵＣＵＡＧ－Ａ２０－逆位デオキシチミジン（配列番号２５８）からなる。

【０３６７】

開始コドン領域

本発明は、開始コドン領域と、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）の両方を含むポリヌクレオチドも含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、開始コドン領域と類似しているか、または開始コドン領域のように機能する領域を有することができる。

【０３６８】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの翻訳は、ＡＵＧという開始コドンではないコドンで開始できる。ポリヌクレオチドの翻訳は、ＡＣＧ、ＡＧＧ、ＡＡＧ、ＣＴＧ／ＣＵＧ、ＧＴＧ／ＧＵＧ、ＡＴＡ／ＡＵＡ、ＡＴＴ／ＡＵＵ、ＴＴＧ／ＵＵＧ（ただし、これらに限らない）のような代替的な開始コドンで開始できる（Ｔｏｕｒｉｏｌ ｅｔａｌ．Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ ９５（２００３）１６９－１７８及びＭａｔｓｕｄａ ａｎｄ Ｍａｕｒｏ ＰＬｏＳ ＯＮＥ，２０１０ ５：１１（そのそれぞれの内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０３６９】

非限定的な例として、ポリヌクレオチドの翻訳は、ＡＣＧという代替的な開始コドンで開始する。別の非限定的な例として、ポリヌクレオチドの翻訳は、ＣＴＧまたはＣＵＧという代替的な開始コドンで開始する。別の非限定的な例として、ポリヌクレオチドの翻訳は、ＧＴＧまたはＧＵＧという代替的な開始コドンで開始する。

【０３７０】

開始コドンまたは代替的な開始コドン（ただし、これらに限らない）のような翻訳開始コドンを挟み込むヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの翻訳効率、長さ及び／または構造に影響を及ぼすことが知られている（例えば、Ｍａｔｓｕｄａ ａｎｄ Ｍａｕｒｏ ＰＬｏＳ ＯＮＥ，２０１０ ５：１１（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。翻訳開始コドンを挟み込むヌクレオチドのいずれかをマスキングすることを用いて、ポリヌクレオチドの翻訳開始位置、翻訳効率、長さ及び／または構造を変更できる。

【０３７１】

いくつかの実施形態では、開始コドンまたは代替的な開始コドンの近くで、マスキング剤を用いて、そのコドンをマスキングまたは遮蔽して、マスキングした開始コドンまたは

代替的な開始コドンでの翻訳開始の確率を低下させることができる。マスキング剤の非限定的な例としては、アンチセンスロックト核酸（ＬＮＡ）ポリヌクレオチド及びエキソンジャンクション複合体（ＥＪＣ）が挙げられる（例えば、マスキング剤であるＬＮＡポリヌクレオチド及びＥＪＣについて記載されているＭａｔｓｕｄａ　ａｎｄ　Ｍａｕｒｏの文献（ＰＬｏＳ　ＯＮＥ，２０１０　５：１１）（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０３７２】

別の実施形態では、マスキング剤を用いて、ポリヌクレオチドの開始コドンをマスキングして、代替的な開始コドンで翻訳が開始される可能性を高めることができる。いくつかの実施形態では、マスキング剤を用いて、第１の開始コドンまたは代替的な開始コドンをマスキングして、マスキングした開始コドンまたは代替的な開始コドンよりも下流の開始コドンまたは代替的な開始コドンで翻訳が開始される可能性を高めることができる。

【０３７３】

いくつかの実施形態では、開始コドンまたは代替的な開始コドンは、ｍｉＲＮＡ結合部位と完全に相補的な領域内に位置できる。ｍｉＲＮＡ結合部位と完全に相補的な領域は、マスキング剤と同様に、ポリヌクレオチドの翻訳、長さ及び／または構造を制御するのを助けることができる。非限定的な例として、開始コドンまたは代替的な開始コドンは、ｍｉＲＮＡ結合部位と完全に相補的な領域の中央に位置できる。その開始コドンまたは代替的な開始コドンは、１番目のヌクレオチド、２番目のヌクレオチド、３番目のヌクレオチド、４番目のヌクレオチド、５番目のヌクレオチド、６番目のヌクレオチド、７番目のヌクレオチド、８番目のヌクレオチド、９番目のヌクレオチド、１０番目のヌクレオチド、１１番目のヌクレオチド、１２番目のヌクレオチド、１３番目のヌクレオチド、１４番目のヌクレオチド、１５番目のヌクレオチド、１６番目のヌクレオチド、１７番目のヌクレオチド、１８番目のヌクレオチド、１９番目のヌクレオチド、２０番目のヌクレオチドまたは２１番目のヌクレオチドの後に位置できる。

【０３７４】

別の実施形態では、ポリヌクレオチドの開始コドンをそのポリヌクレオチド配列から除去して、開始コドンではないコドンで、ポリヌクレオチドの翻訳を開始させることができる。ポリヌクレオチドの翻訳は、除去された開始コドンの後のコドンで、または下流の開始コドンもしくは代替的な開始コドンで開始させることができる。非限定的な例では、ポリヌクレオチド配列の最初の３ヌクレオチドとして、ＡＴＧまたはＡＵＧという開始コドンを除去し、下流の開始コドンまたは代替的な開始コドンで翻訳を開始させる。開始コドンが除去されたポリヌクレオチド配列はさらに、翻訳の開始、そのポリヌクレオチドの長さ及び／またはそのポリヌクレオチドの構造を制御するか、あるいはその制御を試みるために、下流の開始コドン及び／または代替的な開始コドンに対するマスキング剤を少なくとも１つ含むことができる。

【０３７５】

ｍＲＮＡエレメントの組み合わせ

本明細書に開示されているポリヌクレオチドのいずれも、（ａ）例えば、本明細書に記載されているような５’ＵＴＲ、（ｂ）（例えば、本明細書に記載されているような）終止エレメントを含むコード領域、（ｃ）（例えば、本明細書に記載されているような）３’ＵＴＲ、及び任意に（ｄ）例えば、本明細書に記載されているような３’安定化領域というエレメントのうちの１個、２個、３個またはすべてを含むことができる。本発明で開示するのは、上記のポリヌクレオチドを含むＬＮＰ組成物でもある。

【０３７６】

ある実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、（ａ）表２に記載されている５’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片、及び（ｂ）本明細書に示されている終止エレメントを含むコード領域を含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されているようなキャップ構造、または例えば、本明細書に記載されているようなポリＡテールをさらに含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例え

ば、本明細書に記載されているような３’安定化領域をさらに含む。
【０３７７】
ある実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、（ａ）表２に記載されている５’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片、及び（ｃ）表３に記載されている３’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片を含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されているようなキャップ構造、または例えば、本明細書に記載されているようなポリＡテールをさらに含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されているような３’安定化領域をさらに含む。
【０３７８】
ある実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、（ｃ）表３に記載されている３’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片、及び（ｂ）本明細書に示されている終止エレメントを含むコード領域を含む。ある実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、表５に示されている配列を含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されているようなキャップ構造、または例えば、本明細書に記載されているようなポリＡテールをさらに含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されているような３’安定化領域をさらに含む。
【０３７９】
ある実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、（ａ）表２に記載されている５’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片、（ｂ）本明細書に示されている終止エレメントを含むコード領域、及び（ｃ）表３に記載されている３’ＵＴＲ、またはそのバリアントもしくは断片を含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されているようなキャップ構造、または例えば、本明細書に記載されているようなポリＡテールをさらに含む。ある実施形態では、そのポリヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されているような３’安定化領域をさらに含む。
【０３８０】

【表５－１】

表５：例示的な３’ＵＴＲ配列及び終止エレメント配列

配列番号	配列情報	配列
121	終止エレメント C11(下線部)を有する 3’UTR	UAGGGUUAAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
122	終止エレメント C10(下線部)を有する 3’UTR	UAAAGCUCCGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
123	終止エレメント C9(下線部)を有する 3’UTR	UAAGCCCCUGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
124	終止エレメント C8(下線部)を有する 3’UTR	UAAGCACCCGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
125	終止エレメント C7(下線部)を有する 3’UTR	UAAGCCCCUCCGGGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
126	終止エレメント C6(下線部)を有する 3’UTR	UAAGGCUAAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
127	終止エレメント C5(下線部)を有する 3’UTR	UAAGUCUCCGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
128	終止エレメント C4(下線部)を有する 3’UTR	UAAAGCUAAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
129	終止エレメント C3(下線部)を有する 3’UTR	UAAGUCUAAGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUU GCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCC UGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC

【表５－２】

130	終止エレメント C10(下線部)を有する 3'UTR	UAAAGCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAG CCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCA UAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCU CCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUAGG AAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGG GCGGC
131	終止エレメント C7(下線部)を有する 3'UTR	UAAGCCCCUCCGGGGUCCAUAAAGUAGGAAACACUA CAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCU CCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUA GGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGU GGGCGGC
132	終止エレメント C8(下線部)を有する 3'UTR	UAAAGCUCCCCCGGGGUCCAUAAAGUAGGAAACACUA CAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCCAGCCCCU CCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCUCCAUAAAGUA GGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGU GGGCGGC

【０３８１】

終止コドン領域

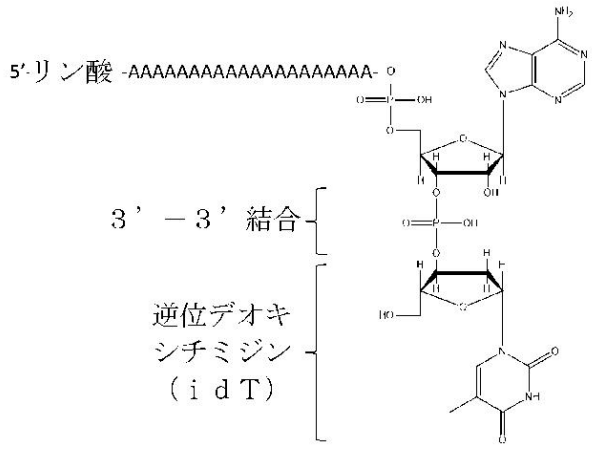
本発明は、終止コドン領域と、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）の両方を含むポリヌクレオチドも含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）の前に、終止コドンを少なくとも２つ含むことができる。終止コドンは、ＤＮＡの場合にはＴＧＡ、ＴＡＡ及びＴＡＧから、またはＲＮＡの場合にはＵＧＡ、ＵＡＡ及びＵＡＧから選択できる。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＤＮＡの場合にはＴＧＡという終止コドン、またはＲＮＡの場合にはＵＧＡという終止コドンと、追加の終止コドン１つを含む。さらなる実施形態では、その追加の終止コドンは、ＴＡＡまたはＵＡＡであることができる。別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、３つの連続する終止コドン、４つの終止コドンまたは５つ以上の連続する終止コドンを含む。

【０３８２】

安定テール

本明細書に記載されているように、ｍＲＮＡは、そのｍＲＮＡのポリＡテールを安定化するために、安定テールを任意に含むことができる。例えば、本明細書に記載されているｍＲＮＡは、安定テールとして、逆位デオキシチミジン（ｉｄＴ）を含むことができる。ｉｄＴは、下記のように、例えばライゲーション反応によって、５’－リン酸－ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－ｉｄＴ（配列番号２０９）という配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを用いて、ｍＲＮＡに結合できる。

【化１１】



【０３８３】
ＷＯ２０１７０４９２７５（参照により、その全体が本明細書に援用される）には、安定テールをｍＲＮＡに結合するための例示的な手段が記載されている。

【０３８４】
ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含むポリヌクレオチド
ある特定の実施形態では、本開示のポリヌクレオチド、例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、５’末端から３’末端に向かって、
（ｉ）上に示されている５’キャップと、
（ｉｉ）上に示されている配列のような５’ＵＴＲと、
（ｉｉｉ）バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム、例えば、本明細書に開示されているＰＡＨをコードする配列最適化核酸配列と、
（ｉｖ）少なくとも１つの終止コドンと、
（ｖ）上に示されている配列のような３’ＵＴＲと、
（ｖｉ）上に示されているポリＡテールと、
を含む。

【０３８５】
いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、ｍｉＲＮＡ－１４２に結合するｍｉＲＮＡ結合部位をさらに含む。いくつかの実施形態では、その５’ＵＴＲが、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、その３’ＵＴＲが、ｍｉＲＮＡ結合部位を含む。

【０３８６】
いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、バリアントヒトＰＡＨのタンパク質配列（例えば、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２）と少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％同一なポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【０３８７】
いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチド、例えば、ポリペプチドをコードするｍＲＮＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、（１）上に示されている５’

キャップ、例えばＣＡＰ１、（２）５’ＵＴＲ、（３）配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１からなる群から選択したＯＲＦ、（３）終止コドン、（４）３’ＵＴＲ、及び（５）上に示されているポリＡテール、例えば約１００残基のポリＡテールを含む。

【０３８８】

本明細書に記載されている例示的なバリアントＰＡＨヌクレオチドコンストラクトは、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号２５０及び配列番号２５１（それぞれ、５’末端から３’末端に向かって、５’ＵＴＲ、バリアントＰＡＨヌクレオチドＯＲＦ及び３’ＵＴＲを含む）を含む。

【０３８９】

ある特定の実施形態では、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号２５０及び配列番号２５１を含むコンストラクトでは、そのすべてのウラシルが、Ｎ１－メチルシュードウラシルに置き換えられている。

【０３９０】

いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチド、例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、（１）上に示されている５’キャップ、例えばＣＡＰ１、（２）配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号２５０及び配列番号２５１からなる群から選択したヌクレオチド配列、ならびに（３）上に示されているポリＡテール、例えば約１００残基のポリＡテールを含む。ある特定の実施形態では、そのすべてのウラシルは、Ｎ１－メチルシュードウラシルに置き換えられている。

【０３９１】

ポリヌクレオチドの作製方法

本開示は、本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）またはその相補体の作製方法も提供する。

【０３９２】

いくつかの態様では、本明細書に開示されているポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）であって、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）を用いて構築できる。別の態様では、本明細書に開示されているポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）であって、ＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成機を用いる化学合成によって構築できる。

【０３９３】

別の態様では、本明細書に開示されているポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）であって、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞を用いることによって作製する。特定の態様では、本明細書に開示されているポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）であって、ＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ＩＶＴ、化学合成、宿主細胞による発現、または当該技術分野で知られているいずれかの他の方法を１つ以上組み合わせたものによって作製する。

【０３９４】

天然のヌクレオシド、非天然のヌクレオシドまたはこれらを組み合わせたものを、候補ヌクレオチド配列に存在する天然のヌクレオシドと、完全または部分的に置き換えることができるとともに、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードする配列最適化ヌクレオチド配列（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）に組み込むことができる。続いて、得られたポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡにおいて、そのポリヌクレオチドがタンパク質を産生し及

び／または治療成果をもたらす能力を調べることができる。
【０３９５】
ａ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写／酵素的合成
本明細書に開示されている本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）システムを用いて転写できる。そのシステムは典型的には、転写緩衝液、ヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）、ＲＮａｓｅ阻害剤及びポリメラーゼを含む。ＮＴＰは、天然のＮＴＰ及び非天然のＮＴＰ（修飾ＮＴＰ）を含め、本明細書に記載されているＮＴＰ（ただし、これらに限らない）から選択できる。ポリメラーゼは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３　ＲＮＡポリメラーゼ、及び本明細書に開示されているポリヌクレオチドを組み込むことができるポリメラーゼ（ただし、それらに限らない）のような変異体ポリメラーゼ（ただし、これらに限らない）から選択できる。米国特許出願公開第２０１３０２５９９２３号（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい。
【０３９６】
本発明のポリヌクレオチドの合成の際には、いずれの数のＲＮＡポリメラーゼまたはバリアントを使用できる。ＲＮＡポリメラーゼは、そのＲＮＡポリメラーゼ配列のアミノ酸の挿入または欠失を行うことによって改変できる。非限定的な例として、ＲＮＡポリメラーゼは、非改変ＲＮＡポリメラーゼと比べて、２’－修飾ヌクレオチド三リン酸を組み込む能力の向上が見られるように改変できる（国際公開第２００８０７８１８０号及び米国特許第８，１０１，３８５号（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。
【０３９７】
バリアントは、ＲＮＡポリメラーゼを進化させること、ＲＮＡポリメラーゼのアミノ酸配列及び／または核酸配列を最適化すること、及び／または当該技術分野で知られている他の方法を用いることによって得ることができる。非限定的な例として、Ｅｓｖｅｌｔら（Ｎａｔｕｒｅ　４７２：４９９－５０３（２０１１）（参照により、その全体が本明細書に援用される））によって定められた連続的な指向性進化システムを用いて、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼバリアントを進化させることができ、この場合には、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼのクローンによって、９３位のリシンのトレオニンへの置換（Ｋ９３Ｔ）、Ｉ４Ｍ、Ａ７Ｔ、Ｅ６３Ｖ、Ｖ６４Ｄ、Ａ６５Ｅ、Ｄ６６Ｙ、Ｔ７６Ｎ、Ｃ１２５Ｒ、Ｓ１２８Ｒ、Ａ１３６Ｔ、Ｎ１６５Ｓ、Ｇ１７５Ｒ、Ｈ１７６Ｌ、Ｙ１７８Ｈ、Ｆ１８２Ｌ、Ｌ１９６Ｆ、Ｇ１９８Ｖ、Ｄ２０８Ｙ、Ｅ２２２Ｋ、Ｓ２２８Ａ、Ｑ２３９Ｒ、Ｔ２４３Ｎ、Ｇ２５９Ｄ、Ｍ２６７Ｉ、Ｇ２８０Ｃ、Ｈ３００Ｒ、Ｄ３５１Ａ、Ａ３５４Ｓ、Ｅ３５６Ｄ、Ｌ３６０Ｐ、Ａ３８３Ｖ、Ｙ３８５Ｃ、Ｄ３８８Ｙ、Ｓ３９７Ｒ、Ｍ４０１Ｔ、Ｎ４１０Ｓ、Ｋ４５０Ｒ、Ｐ４５１Ｔ、Ｇ４５２Ｖ、Ｅ４８４Ａ、Ｈ５２３Ｌ、Ｈ５２４Ｎ、Ｇ５４２Ｖ、Ｅ５６５Ｋ、Ｋ５７７Ｅ、Ｋ５７７Ｍ、Ｎ６０１Ｓ、Ｓ６８４Ｙ、Ｌ６９９Ｉ、Ｋ７１３Ｅ、Ｎ７４８Ｄ、Ｑ７５４Ｒ、Ｅ７７５Ｋ、Ａ８２７Ｖ、Ｄ８５１ＮまたはＬ８６４Ｆ（ただし、これらに限らない）のような変異を少なくとも１つコードさせることができる。別の非限定的な例として、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼバリアントによって、米国特許出願公開第２０１００１２００２４号及び同第２００７０１１７１１２号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような少なくとも変異をコードさせることができる。ＲＮＡポリメラーゼのバリアントとしては、置換バリアント、保存的アミノ酸置換バリアント、挿入バリアント及び／または欠失バリアントも挙げることができるが、これらに限らない。
【０３９８】
一態様では、そのポリヌクレオチドは、野生型またはバリアントのＲＮＡポリメラーゼによって認識されるように設計できる。そうする際には、ポリヌクレオチドを修飾して、野生型キメラポリヌクレオチドまたは親キメラポリヌクレオチドからの配列変更部位または配列変更領域を含めることができる。
【０３９９】

ポリヌクレオチドまたは核酸の合成反応は、ポリメラーゼを用いる酵素的方法によって行うことができる。ポリメラーゼは、ポリヌクレオチド鎖内または核酸鎖内で、ヌクレオチド間のホスホジエステル結合の形成を触媒する。現在知られているＤＮＡポリメラーゼは、アミノ酸配列の比較及び結晶構造分析に基づき、様々なファミリーに分類することができる。ＤＮＡポリメラーゼ　Ｉ（ｐｏｌ　Ｉ）またはＡポリメラーゼファミリー（Ｅ．ｃｏｌｉのＫｌｅｎｏｗ断片、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼＩ、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓ（Ｔａｑ）ＤＮＡポリメラーゼ、ならびにＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ及びＴ７　ＤＮＡポリメラーゼを含む）は、これらのファミリーの中でも、最も研究されている。別の大きなファミリーは、ＤＮＡポリメラーゼα（ｐｏｌ　α）またはＢポリメラーゼファミリーであり、すべての真核生物の複製ＤＮＡポリメラーゼ、ならびにＴ４ファージ及びＲＢ６９ファージのポリメラーゼが含まれる。これらのポリメラーゼファミリーでは、同様の触媒機構が採用されているが、基質特異性、基質アナログの取り込み効率、プライマー伸長の程度及び速度、ＤＮＡ合成の様式、エキソヌクレアーゼ活性及び阻害剤に対する感受性が異なる。

【０４００】

ＤＮＡポリメラーゼは、反応温度、ｐＨ、ならびに鋳型及びプライマーの濃度など、それらのポリメラーゼで必要となる最適な反応条件にも基づいて選択する。所望のＤＮＡ断片サイズ及び合成効率をもたらすために、２個以上のＤＮＡポリメラーゼを組み合わせたものを用いる場合もある。例えば、Ｃｈｅｎｇらは、クローニングしたインサート及びヒトゲノムＤＮＡから、長いターゲットを効率的に増幅するために、ｐＨを上昇させ、グリセロール及びジメチルスルホキシドを加え、変性時間を短縮し、伸長時間を増やし、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を有する二次的な耐熱性ＤＮＡポリメラーゼを用いる（Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　９１：５６９５－５６９９（１９９４）（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される））。バクテリオファージＴ３、Ｔ７及びＳＰ６由来のＲＮＡポリメラーゼは、生化学的及び生物物理学的な研究用のＲＮＡを調製するのに広く用いられてきている。ＲＮＡポリメラーゼ、キャッピング酵素及びポリＡポリメラーゼは、同時係属中の国際公開第２０１４／０２８４２９号（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）に開示されている。

【０４０１】

一態様では、本発明のポリヌクレオチドの合成に使用できるＲＮＡポリメラーゼは、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼである（Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｔ１１９３（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。最近、Ｚｈｕらにより、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼが海洋シアノファージＳｙｎ５から特徴付けられ、彼らは、そのプロモーター配列も特定した（Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。Ｚｈｕらは、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼが、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼと比べて、広範な温度及び塩度にわたって、ＲＮＡ合成を触媒することを見出した。加えて、プロモーターにおける開始ヌクレオチドの要件は、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼでは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼと比べて、ストリンジェンシーが低いことが見出され、それにより、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼは、ＲＮＡ合成用として有望となっている。

【０４０２】

一態様では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドの合成には、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを使用できる。非限定的な例として、正確な３’末端を必要とするポリヌクレオチドの合成に、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを使用できる。

【０４０３】

一態様では、ポリヌクレオチドの合成に、Ｓｙｎ５プロモーターを使用できる。非限定的な例として、Ｓｙｎ５プロモーターは、５’－ＡＴＴＧＧＧＣＡＣＣＣＧＴＡＡＧＧＧ－３’（Ｚｈｕら（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３）によって

説明されたような配列番号２５２）であることができる。
【０４０４】
一態様では、本明細書に記載されており及び／または当該技術分野で知られている化学修飾を少なくとも１つ含むポリヌクレオチドの合成に、Ｓｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを使用できる（例えば、Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３に記載されているシュードーＵＴＰ及び５Ｍｅ－ＣＴＰの導入を参照されたい）。
【０４０５】
一態様では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、Ｚｈｕらの文献（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１３）に記載されている精製手順を改変及び改善したものを用いて精製したＳｙｎ５　ＲＮＡポリメラーゼを用いて合成できる。
【０４０６】
遺伝子操作の様々なツールは、鋳型として機能する標的遺伝子を酵素によって増幅することに基づいている。目的の個々の遺伝子または特異的領域の配列の研究、及びその他の研究ニーズでは、ポリヌクレオチドまたは核酸の少量の試料から、標的遺伝子を複数コピー作製する必要がある。そのような方法を、本発明のポリヌクレオチドの製造に適用できる。
【０４０７】
例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）（転写媒介性増幅（ＴＭＡ）ともいう）及び／またはローリングサークル型増幅（ＲＣＡ）を、本発明のポリヌクレオチドの領域の１つ以上の製造に使用できる。ポリヌクレオチドまたは核酸をリガーゼによってアセンブルすることも、広く用いられている。
【０４０８】
ｂ　化学合成
標準的な方法を適用して、本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）のように、目的の単離ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド配列を合成できる。例えば、特定の単離ポリペプチドをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を含む単一のＤＮＡオリゴマーまたはＲＮＡオリゴマーを合成できる。別の態様では、所望のポリペプチドの一部分をコードする複数の短いオリゴヌクレオチドを合成してから、ライゲーションすることができる。いくつかの態様では、その個々のオリゴヌクレオチドは典型的には、相補的なアセンブルのために、５’オーバーハングまたは３’オーバーハングを含む。
【０４０９】
本明細書に開示されているポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、当該技術分野で知られている化学合成方法及び可能な核酸塩基置換を用いて、化学的に合成できる。例えば、国際公開第２０１４０９３９２４号、同第２０１３０５２５２３号、同第２０１３０３９８５７号、同第２０１２１３５８０５号、同第２０１３１５１６７１号、米国特許出願公開第２０１３０１１５２７２号、または米国特許第８９９９３８０号もしくは同第８７１０２００号（これらはいずれも、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい。
【０４１０】
ｃ．ＰＡＨをコードするポリヌクレオチドの精製
本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）の精製としては、ポリヌクレオチドのクリーンアップ、品質保証及び品質管理を挙げることができるが、これらに限らない。クリーンアップは、ＡＧＥＮＣＯＵＲＴ（登録商標）ビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）、ポリ－Ｔビーズ、ＬＮＡ（商標）オリゴ－Ｔ捕捉プローブ（ＥＸＩＱＯＮ（登録商標）Ｉｎｃ．、Ｖｅｄｂａｅｋ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、または強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬ

Ｃ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）（ただし、これらに限らない）などのＨＰＬＣベースの精製方法（ただし、これらに限らない）のように、当該技術分野において知られている方法によって行うことができる。

【０４１１】

「精製」という用語は、「精製ポリヌクレオチド」のように、ポリヌクレオチドに関して使用する場合、少なくとも１つの夾雑物から分離することを指す。本明細書で使用する場合、「夾雑物」は、他方の物質を不適合、不純または粗悪にするいずれかの物質である。すなわち、精製ポリヌクレオチド（例えばＤＮＡ及びＲＮＡ）は、天然で見られる形態もしくは状態とは異なる形態もしくは状態、または処理もしくは精製の方法を行う前に存在していた形態もしくは状態とは異なる形態もしくは状態で存在する。

【０４１２】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）の精製により、望ましくない免疫応答の低減または排除、例えば、サイトカイン活性の低減を行うことができる、不純物の除去が行われる。

【０４１３】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、投与前に、カラムクロマトグラフィー（例えば、強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）または（ＬＣＭＳ））を用いて精製する。

【０４１４】

いくつかの実施形態では、カラムクロマトグラフィー（例えば、強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ、疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）または（ＬＣＭＳ））を用いて精製した本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）では、同じ本開示のポリヌクレオチドを異なる精製方法によって精製した場合に得られる発現レベルと比べて、コードされるＰＡＨタンパク質の発現が増加する。

【０４１５】

いくつかの実施形態では、カラムクロマトグラフィー（例えば、強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）、疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）または（ＬＣＭＳ））によって精製したポリヌクレオチドは、当該技術分野で知られている点変異を１つ以上含むＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【０４１６】

いくつかの実施形態では、ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドを用いると、そのポリヌクレオチドを細胞に導入したときに、それらの細胞内でのＰＡＨタンパク質発現レベルが、ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドをその細胞に導入する前、または非ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドをその細胞に導入した後の細胞内でのＰＡＨタンパク質の発現レベルと比べて、例えば１０～１００％、すなわち、少なくとも約１０％、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９０％、少なくとも約９５％または少なくとも約１００％上昇する。

【０４１７】

いくつかの実施形態では、ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドを用いると、そのポリヌクレオチドを細胞に導入したときに、それらの細胞内での機能的なＰＡＨ活性が、ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドをその細胞に導入する前、または非ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドをその細胞に導入した後の細胞内での機能的なＰＡＨの活性レベルと比

べて、例えば１０～１００％、すなわち、少なくとも約１０％、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９０％、少なくとも約９５％または少なくとも約１００％上昇する。

【０４１８】

いくつかの実施形態では、ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドを用いると、そのポリヌクレオチドを細胞に導入したときに、それらの細胞内での検出可能なＰＡＨ活性が、ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドをその細胞に導入する前、または非ＲＰ－ＨＰＬＣ精製ポリヌクレオチドをその細胞に導入した後の細胞内での機能的なＰＡＨの活性レベルと比べて、例えば１０～１００％、すなわち、少なくとも約１０％、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９０％、少なくとも約９５％または少なくとも約１００％上昇する。

【０４１９】

いくつかの実施形態では、その精製ポリヌクレオチドは、純度が少なくとも約８０％であるか、純度が少なくとも約８５％であるか、純度が少なくとも約９０％であるか、純度が少なくとも約９５％であるか、純度が少なくとも約９６％であるか、純度が少なくとも約９７％であるか、純度が少なくとも約９８％であるか、純度が少なくとも約９９％であるか、または純度が約１００％である。

【０４２０】

品質保証及び／または品質管理のチェックは、ゲル電気泳動、ＵＶ吸光度または分析用ＨＰＬＣ（ただし、これらに限らない）のような方法を用いて行うことができる。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、逆転写酵素－ＰＣＲ（ただし、これに限らない）を含む方法によってシーケンシングできる。

【０４２１】

ｄ．ＰＡＨをコードする発現済みポリヌクレオチドの定量

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）、その発現産物、ならびに分解産物及び代謝産物を、当該技術分野で知られている方法に従って定量できる。

【０４２２】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、エクソソームにおいて、または１つ以上の体液に由来する場合に定量できる。本明細書で使用する場合、「体液」には、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液（ＣＳＦ）、痰、唾液、骨髄、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、カウパー液または射精前液、汗、糞便、毛、涙、嚢胞液、胸膜液及び腹水、心膜液、リンパ液、び汁、乳び、胆汁、間質液、月経血、膿汁、皮脂、嘔吐物、膣分泌物、粘膜分泌物、糞便水、膵液、副鼻腔洗浄液、気管支肺吸引液、胞胚腔液、ならびに臍帯血が含まれる。あるいは、エクソソームは、肺、心臓、膵臓、胃、腸、膀胱、腎臓、卵巣、精巣、皮膚、結腸、乳房、前立腺、脳、食道、肝臓及び胎盤からなる群から選択した器官から採取することができる。

【０４２３】

エクソソーム定量法では、２ｍＬ以下の試料を対象から採取し、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分別遠心分離、ナノ膜による限外ろ過、免疫吸着による捕捉、アフィニティー精製、マイクロ流体による分離またはこれらを組み合わせたものによって、エクソソームを単離する。分析の際には、ポリヌクレオチドのレベルまたは濃度は、投与したコンストラクトの発現レベル、有無、トランケーションまたは変化であることができる。そのレベルと、１つ以上の臨床表現型またはヒト疾患のバイオマーカーのアッセイ結果とを相関させるのが有益である。

【０４２４】

そのアッセイは、コンストラクト特異的なプローブ、サイトメトリー、ｑＲＴ－ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ＰＣＲ、フローサイトメトリー、電気泳動、質量分析またはこれらを組み合わせたものを用いて行うことができる一方で、エクソソームは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）法のような免疫組織化学的な方法を用いて単離できる。エクソソームは、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離、分別遠心分離、ナノ膜による限外ろ過、免疫吸着による捕捉、アフィニティー精製、マイクロ流体による分離またはこれらを組み合わせたものによっても単離できる。

【０４２５】

これらの方法により、研究者は、残存するポリヌクレオチドまたは送達されたポリヌクレオチドのレベルをリアルタイムでモニタリングする能力を得られる。これは、本発明のポリヌクレオチドが、構造的改変または化学的修飾により、内因性の形態とは異なるので可能になる。

【０４２６】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、紫外可視分光法（ＵＶ／Ｖｉｓ）（ただし、これに限らない）のような方法を用いて定量できる。ＵＶ／Ｖｉｓスペクトロメーターの非限定的な例は、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（登録商標）というスペクトロメーター（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）である。そのポリヌクレオチドが、適切なサイズのポリヌクレオチドであることができるか判断するために、定量したポリヌクレオチドを分析でき、ポリヌクレオチドの分解が生じていないことを確かめる。ポリヌクレオチドの分解は、アガロースゲル電気泳動、強アニオン交換ＨＰＬＣ、弱アニオン交換ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び疎水性相互作用ＨＰＬＣ（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）（ただし、これらに限らない）のようなＨＰＬＣベースの精製方法、液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣＭＳ）、キャピラリー電気泳動（ＣＥ）及びキャピラリーゲル電気泳動（ＣＧＥ）（ただし、これらに限らない）のような方法によって確かめることができる。

【０４２７】

遺伝子送達用のＤＮＡベクター

遺伝子を細胞に送達するために、ウイルス由来及び細菌由来の核酸ベースの遺伝子送達ベクターを含め、数多くの天然ベクター及び組み換えベクターが開発されてきている。ＤＮＡを用いて、遺伝子発現のために、目的の遺伝子を細胞に送達するいくつかのアプローチが開発されてきている。本開示は、本明細書に記載されているバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするＤＮＡを細胞に送達するための組成物及び方法に関するものである。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ分子を細胞に送達して、そのＤＮＡによってコードされる転写産物（例えば、タンパク質をコードする転写産物、または機能性ＤＮＡのような機能性核酸）を発現させる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ分子を細胞に送達して、例えば組み換えによって、天然型遺伝子を修復したり、または置き換えたりする。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ分子は、天然型遺伝子、例えば、転写レベルが低下しているか、または異常なＲＮＡもしくはタンパク質を産生する天然型遺伝子の発現を補助する導入遺伝子としての役割を果たす。いくつかの実施形態では、細胞に送達されるＤＮＡ分子は、機能性ＤＮＡであり、すなわち、そのＤＮＡは、タンパク質のｍＲＮＡを単にコードすること以外の何らかの生物学的活性を発揮できる。例えば、そのＤＮＡ分子は、他の分子に結合して、その分子の活性を変化させることができる構造にフォールディングされることができ、例えば、そのＤＮＡは、治療機能を発揮するアプタマーのようなアプタマーであることができる。

【０４２８】

例えば転写産物を発現させるために、遺伝子を細胞に移入できるいずれかのＤＮＡ分子は、本明細書に記載されている送達ビヒクル、例えば脂質ナノ粒子に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ分子は、天然由来であることができ、例えば、天然の供給源から単離できる。別の実施形態では、そのＤＮＡ分子は、合成分子、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで作製した合成ＤＮＡ分子である。いくつかの実施形態では、そのＤ

ＮＡ分子は、組み換え分子である。
【０４２９】
そのＤＮＡ分子は、２本鎖ＤＮＡ、１本鎖ＤＮＡ、または部分的に２本鎖ＤＮＡである分子、すなわち、２本鎖である部分と、１本鎖である部分を有する分子であることができる。場合によっては、そのＤＮＡ分子は、３本鎖であるか、または部分的に３本鎖であり、すなわち、３本鎖である部分と、２本鎖である部分を有する。そのＤＮＡ分子は、環状ＤＮＡ分子または直鎖状ＤＮＡ分子であることができる。
【０４３０】
本明細書に記載されているＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、多種多様な特色を含むことができる。本明細書に記載されているＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、非コードＤＮＡ配列を含むことができる。例えば、ＤＮＡ配列は、遺伝子調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、終止エレメント、ポリアデニル化シグナルエレメント、スプライシングシグナルエレメントなどを少なくとも１つ含むことができる。いくつかの実施形態では、その非コードＤＮＡ配列は、イントロンである。いくつかの実施形態では、その非コードＤＮＡ配列は、トランスポゾンである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＤＮＡ配列は、転写活性のある遺伝子に機能可能に連結されている非コードＤＮＡ配列を有することができる。別の実施形態では、本明細書に記載されているＤＮＡ配列は、遺伝子に連結されていない非コードＤＮＡ配列を有することができ、すなわち、その非コードＤＮＡは、そのＤＮＡ配列上の遺伝子を調節しない。
【０４３１】
いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、転写活性のある遺伝子、すなわち、そのコード配列を細胞内条件下で発現できる遺伝子を少なくとも１つ有する。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡベクターは、そのＤＮＡベクターが導入される特定の細胞内環境において、遺伝子を発現させるのに必要な必須の発現調節エレメントを含む。すなわち、本明細書に記載されているＤＮＡベクターは、プロモーター、エンハンサー、終止及びポリアデニル化のシグナルエレメント、スプライシングシグナルエレメントなどのような転写媒介エレメントまたは調節エレメントの少なくとも１つに機能可能に連結されている転写活性遺伝子を少なくとも１つ含む発現モジュールまたは発現カセットを含むことができる。
【０４３２】
いくつかの実施形態では、その発現モジュールまたは発現カセットは、広範な宿主で遺伝子を発現させる転写調節エレメントを含む。このようなものを様々に組み合わせたものが知られており、具体的な転写調節エレメントとしては、Ｄｉｊｋｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．（１９８５）４：７６１に記載されているようなＳＶ４０エレメント、Ｇｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ（１９８２）７９：６７７７に記載されているように、ラウス肉腫ウイルスのＬＴＲに由来する転写調節エレメント、Ｂｏｓｈａｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ（１９８５）４１：５２１に記載されているように、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のＬＴＲに由来する転写調節エレメント、ｈｓｐ７０プロモーター（Ｌｅｖｙ－Ｈｏｌｔｚｍａｎ，Ｒ．ａｎｄ　Ｉ．Ｓｃｈｅｃｈｔｅｒ（Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ（１９９５）１２６３：９６－９８）、Ｐｒｅｓｎａｉｌ，Ｊ．Ｋ．ａｎｄ　Ｍ．Ａ．Ｈｏｙ（Ｅｘｐ．Ａｐｐｌ．Ａｃａｒｏｌ．（１９９４）１８：３０１－３０８））などが挙げられる。
【０４３３】
いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列の転写活性遺伝子の少なくとも１つは、対象、例えば、ヒトのような哺乳動物対象において、治療活性を有するタンパク質または機能性核酸、例えば機能性ＤＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列の転写活性遺伝子の少なくとも１つは、真核生物のタンパク質または機能性核酸、例えば機能性ＤＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列の転写活性遺伝子の少なくとも１つは、哺乳動物のタンパク質または機能性核酸、例えば機能性ＤＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列の転写活性遺伝子の少なくとも１つは、ヒトのタンパク

質または機能性核酸、例えば機能性ＤＮＡをコードする。

【０４３４】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、少なくとも１つの非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、終止エレメント、ポリアデニル化シグナルエレメント、スプライシングシグナルエレメント及び／または宿主細胞のゲノムで相同組換えが行われる際に鋳型として機能できるイントロンを含む。いくつかの実施形態では、非コード配列の相同組換えを用いて、宿主細胞のゲノム内の変異転写エレメント、例えば、異常な遺伝子発現をもたらす変異転写結合部位を修復または回復できる。いくつかの実施形態では、非コード配列の相同組換えは、病的な表現型の原因となる、宿主細胞内の変異転写エレメントを修復または回復できる。

【０４３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、レンチウイルスのｃＰＰＴ領域及びＣＴＳ領域によって誘導される３本鎖ＤＮＡ配列である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＤＮＡ配列は、レンチウイルス、例えばＨＩＶのシス作動性配列ｃＰＰＴ及びＣＴＳを有し、その結果、３本鎖ＤＮＡ構造を有するＤＮＡ配列が得られる。いくつかの実施形態では、その３本鎖ＤＮＡ構造は、宿主細胞の核内へのＤＮＡの侵入を高い比率で誘導する。いくつかの実施形態では、その３本鎖ＤＮＡ構造は、そのＤＮＡ配列の核内移行率を上昇させることができる。いくつかの実施形態では、その３本鎖ＤＮＡ構造は、宿主細胞の核内に移行するＤＮＡ配列の量を増大できる。

【０４３６】

いくつかの実施形態では、その３本鎖ＤＮＡ配列は、目的の核酸配列、例えば、ＤＮＡベクター、導入遺伝子または非コード配列のようなＤＮＡ配列に共有結合させることができる。実施形態では、そのＤＮＡ配列は、レンチウイルスのｃＰＰＴ領域及びＣＴＳ領域によって誘導される３本鎖配列を２個以上有し、例えば、そのＤＮＡ配列は、３本鎖配列を２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個以上有することができる。

【０４３７】

場合によっては、そのＤＮＡ配列は、２本鎖ＤＮＡ分子であることができる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列はすべて、２本鎖である。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列の一部分が、２本鎖である。例えば、そのＤＮＡ配列は、部分的に２本鎖であるとともに、部分的に１本鎖であることができ、例えば、配列の５’部分及び／または３’部分に１本鎖オーバーハングを有する直鎖状の２本鎖ＤＮＡ配列であることができる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、１本鎖である。

【０４３８】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、ＤＮＡベクターである。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡベクターは、プラスミドである。ＤＮＡプラスミドを作製及び操作する方法は、当該技術分野において周知であり、非複製型の非ウイルスプラスミドＤＮＡを用いて、疾患を治療する遺伝子療法の臨床試験が数多く存在する（Ｈａｒｄｅｅ　ｅｔａｌ．，Ｇｅｎｅｓ，２０１７，８，６５）。いくつかの実施形態では、そのプラスミドは、細菌プラスミドである。いくつかの実施形態では、そのプラスミドは、超らせん状である。いくつかの実施形態では、そのプラスミドは、トポロジーが開いた環状である。いくつかの実施形態では、そのプラスミドは、直鎖状にされている。

【０４３９】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、その分子のサイズまたは長さを縮小または最小化するために改変されており、例えば、そのＤＮＡベクターは、そのサイズを低減させるために改変されているプラスミドである。例えば、細菌プラスミドの一部分を除去して、ミニプラスミドを作製してよい。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列、例えばＤＮＡプラスミドは、自然免疫応答または導入遺伝子のサイレンシングを誘発し得る、原核生物の修飾を除去するために変更されており、例えば、プラスミ

ドの配列エレメントのうち、目的の遺伝子をコードしない無関係の部分を除去できる。いくつかの実施形態では、無関係の配列エレメントをＤＮＡ配列、例えばＤＮＡプラスミドから除去することで、哺乳動物宿主において、ＤＮＡ配列の安全性が向上する。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列、例えば細菌プラスミドは、その配列内のＣｐＧジヌクレオチド数を低減するために改変されている。非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドは、哺乳動物ＤＮＡよりも、細菌ＤＮＡにおいてよく見られ、哺乳動物対象において、導入遺伝子のサイレンシング及び／または免疫応答を誘発し得る。いくつかの実施形態では、細菌プラスミドは、細菌の複製起点（ｏｒｉ）の全部または一部分を除去するために改変されている。

【０４４０】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列、例えば細菌プラスミドのようなＤＮＡベクターは、抗生物質耐性を細菌に付与するとともに、哺乳動物対象において、免疫応答を誘発し得る遺伝子を除去するために改変されている。いくつかの実施形態では、プラスミドは、プラスミドの選択用の抗生物質不含システムを含む。例えば、そのプラスミドは、ＵＳ５，９７２，７０８及びＣｒａｎｅｎｂｕｒｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２００１，２９，Ｅ２６（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているようなオペレーターリプレッサー滴定（ＯＲＴ）システムを含むことができる。ＯＲＴプラスミド（ｐＯＲＴ）は、細菌において、染色体でコードされる必須遺伝子の上流にある内因性オペレーター配列に結合する競合リプレッサータンパク質を通じて滴定するのに利用されるオペレーター配列を有する。いくつかの実施形態では、そのプラスミドは、条件的複製起点（ＣＯＲ）を有し、すなわち、そのプラスミドは、例えば、Ｓｏｕｒｂｒｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，１９９９，６：１４８２－１４８８（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているようなｐＣＯＲプラスミドである。いくつかの実施形態では、そのプラスミドは、Ｍａｒｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．，２０１０，１２：３２３－３３２（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているように、抗生物質耐性のないプラスミド（ｐＦＡＲ）である。

【０４４１】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２００３，８（３）：４９５－５００、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，２００５，１６（１）：１２６－１３１、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２０１０，２８（１２）：１２８９－１２９１、米国特許第７，８９７，３８０号及びＵＳ／２０１６／０３１２２３０（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているようなミニサークルＤＮＡベクターである。ミニサークルＤＮＡは、主に超らせん構造であり、目的の真核生物遺伝子を含み、非常に短い原核生物ＤＮＡ配列セグメントを含むか、原核生物ＤＮＡを欠失している最小限の環状２本鎖ＤＮＡベクターである。ミニサークルＤＮＡベクターにおいて、原核生物ＤＮＡが欠失していることにより、対象に投与したときに、ウイルスベクターまたはプラスミドベクターよりも、ベクターが炎症または遺伝子発現のサイレンシングを誘導する可能性が低くなる。ミニサークルＤＮＡベクターは、臨床での安全性も増強されている。細菌耐性マーカー遺伝子または複製起点を含まないからである。

【０４４２】

いくつかの実施形態では、そのミニサークルＤＮＡは、対象に投与後、コントロールベクター、例えば細菌プラスミドと比べて、外因性の導入遺伝子を長期間、持続的に発現できる。いくつかの実施形態では、そのミニサークルＤＮＡは、対象に投与後、導入遺伝子を少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも３週間、少なくとも１カ月、少なくとも６週間、少なくとも２カ月、少なくとも１０週間、少なくとも３カ月、少なくとも４カ月、少なくとも５カ月または少なくとも６カ月以上、持続的に発現する。いくつかの実施形態では、そのミニサークルＤＮＡは、対象に投与後、導入遺伝子を、対象に投与後のコントロールＤＮＡベクターよりも少なくとも約２倍長く、例えば、少なくとも２倍、少

なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍または少なくとも１０倍以上長く、持続的に発現する。

【０４４３】

本開示のいくつかの態様では、ミニサークルＤＮＡは、宿主細胞において、部位特異的な組み換えによって、親細菌プラスミドから作製する。目的の導入遺伝子を、親細菌プラスミド内の組み換え部位によって挟み込み、細菌内でプラスミドを増殖させるのに必要な配列（ｏｒｉ及び選択マーカー（例えば抗生物質耐性遺伝子）を含む）の大半または全部を、それらの組み換え部位の外側に配置する。その親細菌プラスミドを宿主細胞、例えばＥ．ｃｏｌｉ細胞に導入してから、部位特異的な組み換えを用いて、導入遺伝子を有するミニサークルであって、その親細菌プラスミドから細菌配列が欠失されているミニサークルを作製し、親プラスミドの細菌ＤＮＡ（そのプラスミドのｏｒｉ及び選択マーカーを含む）の大半またはすべてを有するミニプラスミドを破棄することができる。

【０４４４】

野生型及び変異体のファージインテグラーゼを含め、ミニサークルを作製するためのいくつかのリコンビナーゼシステムが、当該技術分野において説明されている。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、ミニサークルＤＮＡを産生する親プラスミド上の特定の組み換え部位を認識する。いくつかの実施形態では、そのリコンビナーゼは、ファージλインテグラーゼ、ｐｈｉＣ３１（ΦＣ３１）リコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＰａｒＡリゾルバーゼ、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ＴＰ９０１－１インテグラーゼ、Ａ１１８インテグラーゼ、ΦＦＣ１インテグラーゼなどであることができるが、これらに限らない（例えば、Ｇａｓｐａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２０１５，１５：３５３－３７９、Ｈａｒｄｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ，２０１７，８，６５、ＵＳ／２０１６／０３１２２３０を参照されたい）。いくつかの実施形態では、その部位特異的な組み換え部位は、ＰｈｉＣ３１の部位特異的な組み換え部位である。いくつかの実施形態では、その部位特異的な組み換え部位は、ＰａｒＡの部位特異的な組み換え部位である。いくつかの実施形態では、その部位特異的な組み換え部位は、Ｃｒｅの部位特異的な組み換え部位である。いくつかの実施形態では、そのリコンビナーゼは、一方向性の部位特異的リコンビナーゼである。

【０４４５】

いくつかの実施形態では、ミニサークルＤＮＡを作製するための部位特異的な組み換え部位は、ａｔｔＢ及びａｔｔＰであり、親細菌プラスミド内のミニサークルＤＮＡが、ａｔｔＢ部位及びａｔｔＰ部位によって挟まれるようにする。ｐｈｉＣ３１リコンビナーゼは、これらの部位を認識して、ミニサークルＤＮＡベクター及びミニプラスミドを生成させる組み換えを誘導する。

【０４４６】

いくつかの実施形態では、ミニサークルＤＮＡの作製に用いる親ベクターを増幅できるとともに、リコンビナーゼが発現したら、ミニサークルＤＮＡを作製することもできる微生物内で、ミニサークルＤＮＡを作製する。いくつかの実施形態では、その微生物は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｓｐ、とりわけＥ．ｃｏｌｉ、例えばＺＹＣＹ１０Ｐ３Ｓ２Ｔ株のような細菌である。一実施形態では、ミニサークルＤＮＡを産生する微生物は、リコンビナーゼを内因的に発現する。あるいは、ミニサークルＤＮＡを産生する微生物において、リコンビナーゼまたはリコンビナーゼをコードする遺伝子を導入して、発現させることができる。

【０４４７】

いくつかの実施形態では、ミニサークルＤＮＡの産生の際に、ミニプラスミドに導入される細菌プラスミドＤＮＡは、ＤＮＡエンドヌクレアーゼ部位、例えばＩ－ＳｃｅＩエンドヌクレアーゼ部位を少なくとも１つ含み、部位特異的な組み換えによって、ミニサークルＤＮＡが産生されたら、宿主細胞において、ミニプラスミドが、そのＤＮＡエンドヌクレアーゼによって分解されるようにできる。これにより、ミニサークルＤＮＡをさらに容易に宿主細胞から精製可能になる。

【０４４８】
いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ分子、例えばミニサークルを、脂質ナノ粒子のような送達ビヒクルに組み込む前に、当該技術分野で知られている方法を用いて、その分子を精製する。Ｈａｒｄｅｅの考察を参照されたい。
【０４４９】
いくつかの実施形態では、そのＤＮＡベクターは、例えば、Ｈａｒｄｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ，２０１７，８，６５及びＳｔｅｎｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，２０１４，２：ｅ１４０（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような「ミニベクター」または「マイクロミニサークル」である。ミニベクターは概ね、ミニサークルよりも小さく、調節ＲＮＡ、例えばｓｈＲＮＡをコードする。概ね、ミニベクターを作製する方法は、ミニサークルを作製する方法と同様または同一である。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡベクターは、ＵＳ／２０１４／００５６８６８（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような超らせんミニベクターである。
【０４５０】
いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）の共有結合性閉環状ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）、例えば、ＵＳ／２０１７／０３２７７９７及びＬｉ ｅｔ ａｌ．，２０１８，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ，６７（１）：５６－７０（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような組み換えＨＢＶ ｃｃｃＤＮＡである。ＨＢＶは、ヒト肝細胞に感染できる部分２本鎖ＤＮＡウイルスである。感染すると、ｃｃｃＤＮＡが、感染細胞の核内で形成及び維持され、その核内で、ｃｃｃＤＮＡは、安定したエピソームとして存続し、そのウイルス遺伝子の転写の際の鋳型として機能する。慢性ＨＢＶ感染の現在の治療法では、細胞内のｃｃｃＤＮＡの排除は、大きな障壁であり、ｃｃｃＤＮＡを直接標的とする新たな療法に対するニーズが存在する。しかしながら、抗ＨＢＶ薬の創薬は、生理学的に関連するｉｎ ｖｉｔｒｏモデル及びｉｎ ｖｉｖｏモデルがないことによって妨げられてきた。既存のモデルは、使用するのが困難であるか、使用するには不便であることがわかっているからである。慢性ＨＢＶのマウスモデルは、開発するのが難しく、抗ＨＢＶ薬の創薬に使用できるｃｃｃＤＮＡベースのマウスモデル、特に、ｃｃｃＤＮＡの駆動による、ＨＢＶの持続的な複製に対応できる免疫正常マウスモデルに対するニーズが存在する。
【０４５１】
いくつかの実施形態では、例えばＵＳ／２０１７／０３２７７９７に記載されているような、ミニサークルベクターを作製するための既知の方法を用いることによって、組み換えＨＢＶ ｃｃｃＤＮＡを作製する。ミニサークルＤＮＡを産生する親ベクターにおいて、完全長ＨＢＶゲノムまたはその一部分を組み換え部位、例えばａｔｔＰ部位及びａｔｔＢ部位によって挟み込み、ΦＣ３１、Ｒ４、ＴＰ９０１－１、ΦＢＴ１、Ｂｘｂ１、ＲＶ－１、ＡＡ１１８、Ｕ１５３、ΦＦＣ１などのファージインテグラーゼのようなリコンビナーゼを用いて、部位特異的な組み換えによって、組み換えＨＢＶ ｃｃｃＤＮＡを作製する。
【０４５２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＤＮＡベクターは、直鎖状ＤＮＡであることができ、すなわち、そのＤＮＡは、画定された末端を２つ有し、環状ではない。
【０４５３】
いくつかの実施形態では、そのＤＮＡベクターは、２本鎖の直鎖状ＤＮＡであり、すなわち、直鎖状２本鎖ＤＮＡである。いずれの直鎖状２本鎖ＤＮＡも、本明細書に記載されているＤＮＡ送達システム、例えば脂質ナノ粒子に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡベクターは、天然の直鎖状２本鎖ＤＮＡ、例えば、バクテリオファージもしくはウイルスに由来するＤＮＡであるか、または天然の直鎖状２本鎖ＤＮＡに由来する。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡベクターは、合成の直鎖状２本鎖ＤＮＡ

、例えば、組み換えバクテリオファージＤＮＡ、組み換えウイルスＤＮＡ、ＰＣＲ産物、エンドヌクレアーゼの制限消化処理によって作製したＤＮＡ断片、もしくは閉鎖型直鎖状ＤＮＡ分子であるか、または合成の直鎖状２本鎖ＤＮＡに由来する。

【０４５４】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ分子は、ＷＯ２０１７／１５２１４９及びＬｉ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，２０１３　８（８）：ｅ６９８７９（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような末端閉鎖型直鎖状２本鎖ＤＮＡ（「ｃｅＤＮＡ」または「ＣＥＬｉＤ　ＤＮＡ」）であることができる。ｃｅＤＮＡは、非対照な末端配列、例えば、分断された非対称な自己相補的配列に挟まれた導入遺伝子を少なくとも１つ有し、それにより、その非対称な末端配列が共有結合される。いくつかの実施形態では、そのｃｅＤＮＡは、２つの非対称な末端配列、例えば、分断された２つの非対称な自己相補的配列に挟まれた導入遺伝子で構成されている。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、その５’末端及び３’末端のそれぞれにおける非対称な末端配列に挟まれている。構造的に、ｃｅＤＮＡは、供給結合性の閉鎖型末端を有する２本鎖の直鎖状ＤＮＡである。

【０４５５】

場合によっては、「分断型自己相補的配列」は、１つ以上の非回文ポリヌクレオチド領域によって分断されている回文末端配列を有する核酸をコードするポリヌクレオチド配列であることができる。典型的には、分断された回文配列を１つ以上コードするポリヌクレオチドは、２つに折り畳まれて、ステムループ構造を形成することになる。いくつかの実施形態では、それぞれの自己相補的配列は、機能的な末端分割部位及びローリングサークル複製タンパク質結合エレメントを有する。いくつかの実施形態では、自己相補的配列は、縦方向に対称的な２つの相対するステムループを形成するクロスアーム配列によって分断されており、その縦方向に対称的な相対するステムループのそれぞれは、５～１５塩基対長の範囲であるステム部分と、不対合のデオキシリボヌクレオチドを２～５個有するループ部分を有する。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、３個以上のクロスアーム配列、例えば、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個以上のクロスアーム配列を含むことができる。

【０４５６】

いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、１つ以上のウイルスまたはウイルスセロタイプに由来する。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、パルボウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、ディペンドウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、アデノ随伴ウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、ＡＡＶ２セロタイプに由来する。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、ＡＡＶ９セロタイプに由来する。いくつかの実施形態では、第１の分断型自己相補的配列と第２の分断型自己相補的配列は、同じウイルスまたはウイルスセロタイプに由来する。いくつかの実施形態では、第１の分断型自己相補的配列は、第１のウイルスまたはウイルスセロタイプに由来し、第２の分断型自己相補的配列は、第２のウイルスまたはウイルスセロタイプに由来する。いくつかの実施形態では、それらの分断型自己相補的配列は、異なる長さである。

【０４５７】

いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、ＡＡＶ逆位末端反復（ＩＴＲ）配列である。ＡＡＶ　ＩＴＲ配列は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、非ヒト霊長類動物ＡＡＶセロタイプ（例えばＡＡＶｒｈ．ｌＯ）及びこれらのバリアント（ただし、これらに限らない）を含むいずれかのＡＡＶセロタイプの配列であることができる。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、ＡＡＶ２　ＩＴＲまたはそのバリアントである。いくつかの実施形態では、分断型自己相補的配列は、ＡＡＶ５　ＩＴＲまたはそのバリアントである。本明細書で使用する場合、ＡＡＶ　ＩＴＲの「バリアント」は、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲ配列との類似性が約７０％～約９９．９％であるポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では

、ＡＡＶ　ＩＴＲバリアントは、野生型ＡＡＶ　ＩＴＲと約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％または約９９％同一である。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ　ＩＴＲバリアントは、トランケート型ＡＡＶ　ＩＴＲ、または欠失を有するＡＡＶ　ＩＴＲである。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡの非対称な末端配列は、ＡＡＶに由来する逆方向末端反復配列であることができる。いくつかの実施形態では、ｃｅＤＮＡの非対称な末端配列は、アデノ随伴ウイルス２型に由来するＩＴＲであることができる。

【０４５８】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、１本鎖直鎖状ＤＮＡである。いずれの１本鎖直鎖状ＤＮＡも、本明細書に記載されているＤＮＡ送達システム、例えば脂質ナノ粒子に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、天然の１本鎖直鎖状ＤＮＡ、例えば、バクテリオファージまたはウイルスに由来するＤＮＡであるか、または天然の１本鎖直鎖状ＤＮＡに由来する。例えば、その１本鎖直鎖状ＤＮＡは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ＤＮＡ、例えば、アデノ随伴ウイルスに由来する１つ以上の遺伝子であることができる。ＡＡＶは、遺伝子療法用途で広範に用いられてきており、文献において周知である。

【０４５９】

いくつかの実施形態では、その１本鎖直鎖状ＤＮＡは、腫瘍溶解性ウイルスのＤＮＡであることができる。腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞だけで複製する選択性が見られるので、非がん性の細胞及び組織への被害を少なくしながら、がん細胞及び腫瘍を感染させて、それらを死滅させるのに利用できる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、腫瘍溶解性ウイルスのゲノムの全部または一部であることができる。腫瘍溶解性ウイルスＤＮＡを、本明細書に記載されているＤＮＡ送達システム、例えば脂質ナノ粒子に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、例えばＳｅｙｍｏｕｒ　ａｎｄ　Ｆｉｓｈｅｒ，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，２０１６，１１４（４）：３５７－３６１（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているように、腫瘍溶解性ウイルスＤＮＡの遺伝子を改変して、がん選択的な複製、細胞溶解及び／またはがん性細胞近傍への子孫ウイルスの拡散を向上できる。ほんの一例として、いくつかの実施形態では、宿主細胞の転写機構を複製に利用する腫瘍溶解性ウイルスを操作して、腫瘍関連転写因子に依存して、例えば、腫瘍関連プロモーターを用いて、必須ウイルス遺伝子の発現を調節することによって、ウイルスの複製を促すようにできる。いくつかの実施形態では、「武装化」腫瘍溶解性ウイルスをコードするように、腫瘍溶解性ウイルスＤＮＡの遺伝子を改変して、その腫瘍溶解性ウイルスＤＮＡが、がん細胞で選択的に発現できる抗がん剤をコードする導入遺伝子もコードするようにする（Ｓｅｙｍｏｕｒ　ａｎｄ　Ｆｉｓｈｅｒ，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，２０１６，１１４（４）：３５７－３６１を参照されたい）。いくつかの実施形態では、その抗がん剤は、治療用タンパク質または治療用核酸であることができる。いくつかの実施形態では、その治療用タンパク質は、サイトカイン、ケモカイン、酵素または抗体であることができる。いくつかの実施形態では、その治療用核酸は、ｍＲＮＡまたはｓｉＲＮＡであることができる。

【０４６０】

いくつかの実施形態では、その腫瘍溶解性ウイルスは、パルボウイルスである。パルボウイルスは、溶解性ウイルスである１本鎖ＤＮＡウイルスであり、すなわち、感染細胞を溶解することができる。パルボウイルスは、ウイルス複製の際に、宿主細胞の細胞性因子のうち、細胞周期のＳ期に発現する因子に依存する。いくつかの実施形態では、パルボウイルスは、がん細胞に感染して、その細胞を殺傷できるが、非がん性細胞は無傷のままにするか、または非がん性細胞への被害を少なくする。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、パルボウイルスであるか、またはパルボウイルスに由来し、例えばＵ．Ｓ．７，１７９，４５６及びＥＰ２５７９８８５に記載されているように、例えば、パルボウイルスに由来する１つ以上の遺伝子である。いくつかの実施形態では、そのパルボウイルスは、パルボウイルスＨ１、ＬｕＩＩＩ、マウス微小ウイルス（ＭＭＶ）、マウスパルボウ

イルス（ＭＰＶ）、ラット微小ウイルス（ＲＭＶ）、ラットパルボウイルス（ＲＰＶ）及びＲａｔウイルスである。

【０４６１】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、対象に投与しても、標的細胞のゲノムに組み込まれず、すなわち、そのＤＮＡは、対象の標的細胞内の染色体と融合しないか、または共有結合しない。むしろ、そのＤＮＡ配列は、エピソーマルに維持される。いくつかの実施形態では、そのエピソーマルなＤＮＡ配列は、対象において、持続的に発現する。いくつかの実施形態では、そのエピソーマルなＤＮＡ配列は、対象において、一過性に発現する。

【０４６２】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列（例えばＤＮＡベクター）またはそのＤＮＡ配列の一部分は、対象に投与すると、標的細胞のゲノムに組み込まれ、すなわち、そのＤＮＡは、対象の標的細胞内の染色体と融合または供給結合する。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、相同組換えによって、対象のゲノム内に組み入れられる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列、例えばＤＮＡベクターは、コード配列（例えば導入遺伝子）及び／または非コード配列（例えば転写調節エレメント）を含み、相同組換えによって、対象における標的宿主細胞のゲノムに組み入れられる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列は、ＤＮＡ配列の少なくとも一部分の相同組換えを促すように、対象における標的細胞のＤＮＡと相同な配列を含み、その相同組換えにより、コード配列（例えば導入遺伝子）及び／または非コード配列（例えば転写調節エレメント）が、標的細胞のゲノムに組み込まれる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列が、対象のゲノムに組み込まれると、そのＤＮＡ配列によってコードされる導入遺伝子が持続的に発現する。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列が、対象のゲノムに組み込まれると、そのＤＮＡ配列によってコードされる導入遺伝子が一過性に発現する。

【０４６３】

いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列が、対象のゲノムに組み込まれると、その対象において、遺伝子発現が回復し、例えば、野生型発現レベルに近い遺伝子発現レベルが回復する。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列が、対象のゲノムに組み込まれると、その対象における変異遺伝子が、修復されるか、または置き換えられる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列が、対象のゲノムに組み込まれると、その対象における変異転写調節エレメントが、修復されるか、または置き換えられる。いくつかの実施形態では、そのＤＮＡ配列が、対象のゲノムに組み込まれると、その対象における病的な表現型が治療または予防される。

【０４６４】

医薬組成物及び製剤

本発明は、上記のポリヌクレオチドのいずれかを含む医薬組成物及び製剤を提供する。いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、送達剤をさらに含む。

【０４６５】

いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、本明細書に開示されている配列最適化核酸配列であって、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、本明細書に開示されている配列最適化核酸配列であって、ＰＡＨポリペプチドをコードする核酸配列との配列同一性がかなり大きいポリヌクレオチド（例えばＯＲＦ）を含むポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）を含むことができる。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７及びｍｉＲ－２６ａと結合するｍｉＲＮＡ結合部位をさらに含む。

【０４６６】

医薬組成物または製剤は、追加の活性物質、例えば、治療上及び／または予防上活性な

物質を１つ以上、任意に含むことができる。本発明の医薬組成物または製剤は、無菌及び／またはパイロジェンフリーであることができる。医薬剤の調合及び／または製造時の一般的考慮事項は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２１ｓｔ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，２００５（参照により、その全体が本明細書に援用される）に見ることができる。いくつかの実施形態では、組成物は、ヒト、ヒトの患者または対象に投与する。本開示の目的では、「活性成分」という語句は概ね、本明細書に記載されているようにして送達するポリヌクレオチドを指す。

【０４６７】

本明細書に記載されている製剤及び医薬組成物は、薬理学の分野において知られているかまたは今後開発されるいずれかの方法によって調製できる。概ね、このような調製方法は、活性成分と、賦形剤及び／または１つ以上の他の補助成分を合わせる工程と、その後、必要な場合及び／または望ましい場合には、その生成物を分割し、成形し、及び／または所望の１回用量単位もしくは複数回用量単位に包装する工程を含む。

【０４６８】

本開示による医薬組成物または製剤は、バルクで、１回単位用量として、及び／または複数の１回単位用量として、調製、包装及び／または販売できる。本明細書で使用する場合、「単位用量」とは、活性成分を所定量含む医薬組成物の個別的な量を指す。活性成分の量は、対象に投与することになる活性成分の用量、及び／または例えば、このような用量の２分の１もしくは３分の１など、その用量を利便的な形で分割した量と概ね等しい。

【０４６９】

本開示による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤及び／またはいずれかの追加の成分の相対量は、治療を受ける対象の個性、体格及び／または状態に応じて、さらには、組成物を投与する経路に応じて変動することになる。

【０４７０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている組成物及び製剤は、本発明のポリヌクレオチドを少なくとも１つ含むことができる。非限定的な例として、その組成物または製剤は、本発明のポリヌクレオチドを１個、２個、３個、４個または５個含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている組成物または製剤は、ポリヌクレオチドを２種類以上含むことができる。いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、直鎖状及び環状のポリヌクレオチドを含むことができる。別の実施形態では、その組成物または製剤は、環状ポリヌクレオチド、及びｉｎ ｖｉｔｒｏ転写した（ＩＶＴ）ポリヌクレオチドを含むことができる。さらに別の実施形態では、その組成物または製剤は、ＩＶＴポリヌクレオチド、キメラポリヌクレオチド及び環状ポリヌクレオチドを含むことができる。

【０４７１】

本発明で提供する医薬組成物及び製剤の説明は原則として、ヒトへの投与に適する医薬組成物及び製剤に対するものであるが、そのような組成物は概ね、いずれかの他の動物、例えばヒト以外の動物、例えば非ヒト哺乳動物への投与に適することを当業者は理解するであろう。

【０４７２】

本発明は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）を含む医薬製剤を提供する。本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、（１）安定性を高めるために、（２）細胞へのトランスフェクションを増大させるために、（３）（例えば、ポリヌクレオチドのデポー製剤からの）徐放もしくは遅延放出を可能にするために、（４）生体内分布を変更するために（例えば、ポリヌクレオチドを所定の種類の組織もしくは細胞に導くために）、（５）ｉｎ ｖｉｖｏで、コードされるタンパク質の翻訳を増大させるため、及び／または（６）ｉｎ ｖｉｖｏで、コードされるタンパク質の放出プロファイルを変更するために、１つ以上の賦形剤を用いて調合できる。いくつかの実施形態では、その医

薬製剤は、例えば、式（Ｉ）を有する化合物、例えば化合物１～２３２のいずれか、例えば化合物ＩＩ、式（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）もしくは（ＶＩ）を有する化合物、例えば化合物２３３～３４２のいずれか、例えば化合物ＶＩ、または式（ＶＩＩＩ）を有する化合物、例えば化合物４１９～４２８のいずれか、例えば化合物Ｉ、あるいはこれらをいずれかに組み合わせたものを含む送達剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約５０：１０：３８．５：１．５のモル比でを含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約４７．５：１０．５：３９．０：３．０のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約４７．５：１０．５：３９．０：３．０のモル比で含む。

【０４７３】

薬学的に許容される賦形剤としては、本明細書で使用する場合、望ましい特定の剤形に適するようなあらゆる溶媒、分散媒もしくはその他の液体ビヒクル、分散補助剤、懸濁補助剤、希釈剤、顆粒化剤及び／または分散剤、表面活性剤、等張化剤、増粘剤もしくは乳化剤、保存剤、結合剤、滑沢剤もしくは油、着色剤、甘味剤もしくは香味剤、安定剤、抗酸化剤、抗微生物剤もしくは抗真菌剤、浸透圧調節剤、ｐＨ調整剤、緩衝剤、キレート剤、凍結保護剤、及び／または増量剤が挙げられるが、これらに限らない。医薬組成物を調合するための様々な賦形剤、及びその組成物を調製する技法は、当該技術分野で知られている（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ，２００６（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０４７４】

例示的な希釈剤としては、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、セルロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトールなど及び／またはこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４７５】

例示的な顆粒化剤及び／または分散剤としては、デンプン、アルファ化デンプンもしくは微結晶性デンプン、アルギン酸、グアーガム、寒天、ポリ（ビニルピロリドン）（ポビドン）、架橋ポリ（ビニルピロリドン）（クロスポビドン）、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、架橋ナトリウムカルボキシメチルセルロース（クロスカルメロース）、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（ＶＥＥＧＵＭ（登録商標））、ラウリル硫酸ナトリウムなど及び／またはこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４７６】

例示的な表面活性剤及び／または乳化剤としては、天然の乳化剤（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、紅藻類抽出物、コレステロール、キサンタン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス及びレシチン）、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］、グリセルモノオレエート、ポリオキシエチレンエステル、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］）、ＰＬＵＯＲＩＮＣ（登録商標）Ｆ６８、ＰＯＬＯＸＡＭＥＲ（登録商標）１８８など及び／またはこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らな

い。

【０４７７】

例示的な結合剤としては、デンプン、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）、アミノ酸（例えばグリシン）、天然及び合成のガム（例えば、アカシア、アルギン酸ナトリウム）、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メチルセルロースなど、及びこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４７８】

酸化は、ｍＲＮＡ、特に液体ｍＲＮＡ製剤の、起こり得る分解経路である。酸化を防ぐために、抗酸化剤をその製剤に加えることができる。例示的な抗酸化剤としては、αトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、ベンジルアルコール、ブチル化ヒドロキシアニソール、ｍ－クレゾール、メチオニン、ブチル化ヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、メタ重亜硫酸ナトリウムもしくは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など、及びこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４７９】

例示的なキレート化剤としては、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、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸、エデト酸三ナトリウムなど、及びこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４８０】

例示的な抗微生物剤または抗真菌剤としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウムもしくは安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウムもしくはソルビン酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸など、及びこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４８１】

例示的な保存剤としては、ビタミンＡ、ビタミンＣ、ビタミンＥ、βカロチン、クエン酸、アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール、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）など、及びこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４８２】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド溶液のｐＨは、安定性を高めるために、ｐＨ５～ｐＨ８に維持する。ｐＨを制御するための例示的な緩衝剤としては、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、ヒスチジン（もしくはヒスチジン－ＨＣｌ）、コハク酸ナトリウム、炭酸ナトリウムなど、及び／またはこれらを組み合わせたものを挙げることができるが、これらに限らない。

【０４８３】

例示的な滑沢剤としては、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、硬化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムまたはラウリル硫酸マグネシウムなど、及びこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４８４】

本明細書に記載されている医薬組成物または製剤は、凍結中に、本明細書に記載されているポリヌクレオチドを安定化するために、凍結保護剤を含むことができる。例示的な凍結保護剤としては、マンニトール、スクロース、トレハロース、ラクトース、グリセロール、デキストロースなど、及びこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０４８５】

本明細書に記載されている医薬組成物または製剤は、「薬学的に洗練された」ケーキを

もたらすために、凍結乾燥ポリヌクレオチド製剤中に、増量剤を含むことができ、増量剤は、その凍結乾燥ポリヌクレオチドを、長期間（例えば３６カ月）の保存中に安定化する。本発明の例示的な増量剤としては、スクロース、トレハロース、マンニトール、グリシン、ラクトース、ラフィノース及びこれらを組み合わせたものを挙げることができるが、これらに限らない。

【０４８６】

いくつかの実施形態では、その医薬組成物または製剤は、送達剤をさらに含む。本開示の送達剤としては、リポソーム、脂質ナノ粒子、リピドイド、ポリマー、リポプレックス、マイクロベシクル、エクソソーム、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドがトランスフェクションされた細胞、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣体、ナノチューブ、コンジュゲート体及びこれらを組み合わせたものを挙げることができるが、これらに限らない。

【０４８７】

送達剤

ａ．脂質化合物

本開示は、有益な特性を有する医薬組成物を提供する。本明細書に記載されている脂質組成物は有益なことに、治療剤及び／または予防剤、例えばｍＲＮＡを、哺乳動物の細胞または器官に送達するための脂質ナノ粒子組成物で用いてよい。例えば、本明細書に記載されている脂質は、免疫原性がほとんど見られないか、または免疫原性がない。例えば、本明細書に開示されている脂質化合物は、参照脂質（例えば、ＭＣ３、ＫＣ２またはＤＬｉｎＤＭＡ）と比べて、免疫原性が低い。例えば、本明細書に開示されている脂質と、治療剤または予防剤、例えばｍＲＮＡとを含む製剤は、参照脂質（例えば、ＭＣ３、ＫＣ２またはＤＬｉｎＤＭＡ）と、同じ治療剤または予防剤とを含む対応する製剤と比べて、治療指数が上昇している。

【０４８８】

ある特定の実施形態では、本開示は、

（ａ）バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、

（ｂ）送達剤と、

を含む医薬組成物を提供する。

【０４８９】

脂質ナノ粒子製剤

いくつかの実施形態では、本発明の核酸（例えばバリアントＰＡＨ　ｍＲＮＡ）を脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）中に調合する。脂質ナノ粒子は典型的には、目的の核酸カーゴとともに、イオン化可能なカチオン性脂質成分、非カチオン性脂質成分、ステロール成分及びＰＥＧ脂質成分を含む。本発明の脂質ナノ粒子は、概ね当該技術分野で知られている成分、組成物及び方法を用いて作製できる。例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０５２３５２、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０６８３００、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０３７５５１、ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０２７４００、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４７４０６、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６０００１２９、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０１４２８０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０１４２８０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０３８４２６、ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７、ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０５５３９４、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／５２１１７、ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／０６９６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０２７４９２、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０５９５７５及びＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０６９４９１（これらのいずれも、参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい。

【０４９０】

本開示の核酸（例えばバリアントＰＡＨ　ｍＲＮＡ）は典型的には、脂質ナノ粒子中に調合する。いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、少なくとも１つのイオン化可能なカチオン性脂質、少なくとも１つの非カチオン性脂質、少なくとも１つのステロール及び／または少なくとも１つのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾脂質を含む。

【０４９１】

いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、イオン化可能なカチオン性脂質を２０～６０％のモル比で含む。例えば、その脂質ナノ粒子は、イオン化可能なカチオン性脂質を２０～５０％、２０～４０％、２０～３０％、３０～６０％、３０～５０％、３０～４０％、４０～６０％、４０～５０％または５０～６０％のモル比で含んでよい。いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、イオン化可能なカチオン性脂質を２０％、３０％、４０％、５０または６０％のモル比で含む。

【０４９２】

いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、非カチオン性脂質を５～２５％のモル比で含む。例えば、その脂質ナノ粒子は、非カチオン性脂質を５～２０％、５～１５％、５～１０％、１０～２５％、１０～２０％、１０～２５％、１５～２５％、１５～２０％または２０～２５％のモル比で含んでよい。いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、非カチオン性脂質を５％、１０％、１５％、２０％または２５％のモル比で含む。

【０４９３】

いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、ステロールを２５～５５％のモル比で含む。例えば、その脂質ナノ粒子は、ステロールを２５～５０％、２５～４５％、２５～４０％、２５～３５％、２５～３０％、３０～５５％、３０～５０％、３０～４５％、３０～４０％、３０～３５％、３５～５５％、３５～５０％、３５～４５％、３５～４０％、４０～５５％、４０～５０％、４０～４５％、４５～５５％、４５～５０％または５０～５５％のモル比で含んでよい。いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、ステロールを２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％または５５％のモル比で含む。

【０４９４】

いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、ＰＥＧ修飾脂質を０．５～１５％のモル比で含む。例えば、その脂質ナノ粒子は、０．５～１０％、０．５～５％、１～１５％、１～１０％、１～５％、２～１５％、２～１０％、２～５％、５～１５％、５～１０％または１０～１５％のモル比で含んでよい。いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、ＰＥＧ修飾脂質を０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％または１５％のモル比で含む。

【０４９５】

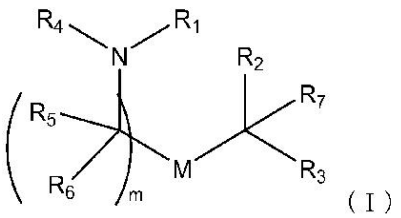
いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、イオン化可能なカチオン性脂質を２０～６０％のモル比で、非カチオン性脂質を５～２５％のモル比で、ステロールを２５～５５％のモル比で、かつＰＥＧ修飾脂質を０．５～１５％のモル比で含む。

【０４９６】

イオン化可能な脂質

いくつかの態様では、本開示のイオン化可能な脂質は、下記の式（Ｉ）の化合物、

【化１２】



（Ｉ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体の１つ以上を含んでよく、式中、

Ｒ１は、Ｃ５－３０アルキル、Ｃ５－２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”及び－Ｒ”Ｍ’Ｒ’からなる群から選択されており、

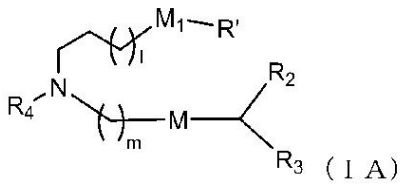
Ｒ２及びＲ３は独立して、Ｈ、Ｃ１－１４アルキル、Ｃ２－１４アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から選択されているか、またはＲ２及びＲ３は

、それらと結合している原子と一体となって、複素環もしくは炭素環を形成し、
Ｒ４は、水素、Ｃ３－６炭素環、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲ、－ＣＱ（Ｒ）２及び非置換のＣ１－６アルキルからなる群から選択されており、そのＱは、炭素環、複素環、－ＯＲ、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ、－ＣＸ３、－ＣＸ２Ｈ、－ＣＸＨ２、－ＣＮ、－Ｎ（Ｒ）２、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｒ８、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ８、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＯＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝ＮＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝ＣＨＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－Ｎ（ＯＲ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（ＯＲ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（ＯＲ）Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－Ｎ（ＯＲ）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（ＯＲ）Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（ＯＲ）Ｃ（＝ＮＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（ＯＲ）Ｃ（＝ＣＨＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－Ｃ（＝ＮＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－Ｃ（＝ＮＲ９）Ｒ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）ＯＲ及び－Ｃ（Ｒ）Ｎ（Ｒ）２Ｃ（Ｏ）ＯＲから選択されており、それぞれのｎは独立して、１、２、３、４及び５から選択されており、
それぞれのＲ５は独立して、Ｃ１－３アルキル、Ｃ２－３アルケニル及びＨからなる群から選択されており、
それぞれのＲ６は独立して、Ｃ１－３アルキル、Ｃ２－３アルケニル及びＨからなる群から選択されており、
Ｍ及びＭ’は独立して、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）－Ｍ”－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）２－、－Ｓ－Ｓ－、アリール基及びヘテロアリール基から選択されており、そのＭ”は、結合、Ｃ１－１３アルキルまたはＣ２－１３アルケニルであり、
Ｒ７は、Ｃ１－３アルキル、Ｃ２－３アルケニル及びＨからなる群から選択されており、
Ｒ８は、Ｃ３－６炭素環及び複素環からなる群から選択されており、
Ｒ９は、Ｈ、ＣＮ、ＮＯ２、Ｃ１－６アルキル、－ＯＲ、－Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｓ（Ｏ）２Ｎ（Ｒ）２、Ｃ２－６アルケニル、Ｃ３－６炭素環及び複素環からなる群から選択されており、
それぞれのＲは独立して、Ｃ１－３アルキル、Ｃ２－３アルケニル及びＨからなる群から選択されており、
それぞれのＲ’は独立して、Ｃ１－１８アルキル、Ｃ２－１８アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”及びＨからなる群から選択されており、
それぞれのＲ”は独立して、Ｃ３－１５アルキル及びＣ３－１５アルケニルからなる群から選択されており、
それぞれのＲ＊は独立して、Ｃ１－１２アルキル及びＣ２－１２アルケニルからなる群から選択されており、
それぞれのＹは独立して、Ｃ３－６炭素環であり、
それぞれのＸは独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩからなる群から選択されており、
ｍは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２及び１３から選択されており、Ｒ４が、－（ＣＨ２）ｎＱ、－（ＣＨ２）ｎＣＨＱＲ、－ＣＨＱＲまたは－ＣＱ（Ｒ）２である場合、（ｉ）ｎが、１、２、３、４もしくは５であるときには、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）２ではないか、または（ｉｉ）ｎが、１もしくは２であるときには、Ｑは、５、６もしくは７員のヘテロシクロアルキルではない。

【０４９７】

ある特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物のサブセットは、下記の式（ＩＡ）の化合物、

【化１３】



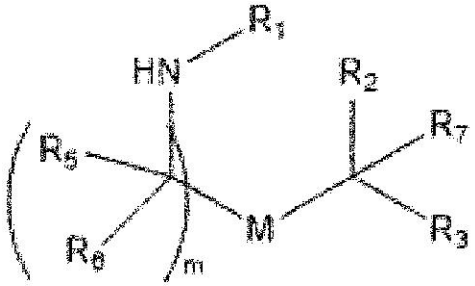
（ＩＡ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体を含み、式中、ｌは、１、２、３、４及び５から選択されており、ｍは、５、６、７、８及び９から選択されており、Ｍ１は、結合またはＭ’であり、Ｒ４は、水素、非置換のＣ１－３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、そのＱは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｒ８、－ＮＨＣ（＝ＮＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－ＮＨＣ（＝ＣＨＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）ＯＲ、ヘテロアリールまたはヘテロシクロアルキルであり、Ｍ及びＭ’は独立して、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）－Ｍ”－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、アリール基及びヘテロアリール基から選択されており、Ｒ２及びＲ３は独立して、Ｈ、Ｃ１－１４アルキル及びＣ２－１４アルケニルからなる群から選択されている。例えば、ｍは、５、７または９である。例えば、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２である。例えば、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒまたは－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒである。

【０４９８】

ある特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物のサブセットは、下記の式（ＩＢ）の化合物、

【化１４】



（ＩＢ）、

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体を含み、式中、すべての可変基は、本明細書で定義されているとおりである。例えば、ｍは、５、６、７、８及び９から選択されており、Ｒ４は、水素、非置換のＣ１－３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、そのＱは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｒ８、－ＮＨＣ（＝ＮＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－ＮＨＣ（＝ＣＨＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）ＯＲ、ヘテロアリールまたはヘテロシクロアルキルであり、Ｍ及びＭ’は独立して、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）－Ｍ”－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、アリール基及びヘテロアリール基から選択されており、Ｒ２及びＲ３は独立して、Ｈ、Ｃ１－１４アルキル及びＣ２－１４アルケニルからなる群から選択されている。

【０４９９】

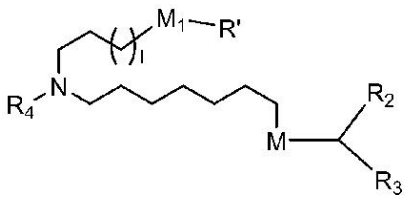
例えば、ｍは、５、７または９である。例えば、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２または－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２である。例えば、Ｑは、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒまたは

－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒである。

【０５００】

ある特定の実施形態では、式（Ｉ）の化合物のサブセットは、下記の式（ＩＩ）の化合物、

【化１５】



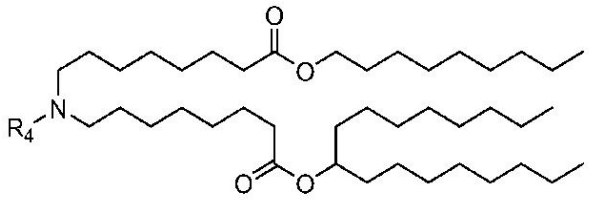
（ＩＩ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体を含み、式中、ｌは、１、２、３、４及び５から選択されており、Ｍ１は、結合またはＭ’であり、Ｒ４は、水素、非置換のＣ１－３アルキルまたは－（ＣＨ２）ｎＱであり、そのｎは、２、３または４であり、Ｑは、ＯＨ、－ＮＨＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）２、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、－Ｎ（Ｒ）Ｒ８、－ＮＨＣ（＝ＮＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－ＮＨＣ（＝ＣＨＲ９）Ｎ（Ｒ）２、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）２、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）ＯＲ、ヘテロアリールまたはヘテロシクロアルキルであり、Ｍ及びＭ’は独立して、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）－Ｍ”－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、アリール基及びヘテロアリール基から選択されており、Ｒ２及びＲ３は独立して、Ｈ、Ｃ１－１４アルキル及びＣ２－１４アルケニルからなる群から選択されている。

【０５０１】

一実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、下記の式（ＩＩａ）の化合物、

【化１６】



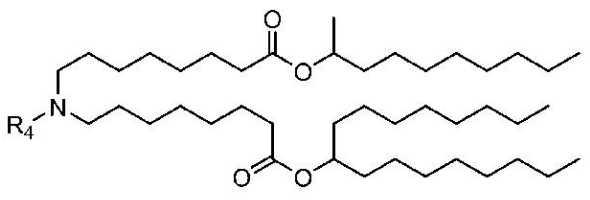
（ＩＩａ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体であり、式中、Ｒ４は、本明細書に記載されているとおりである。

【０５０２】

別の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、下記の式（ＩＩｂ）の化合物、

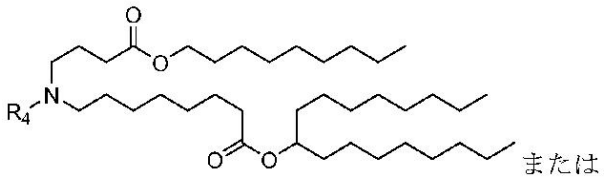
【化１７】



（ＩＩｂ）

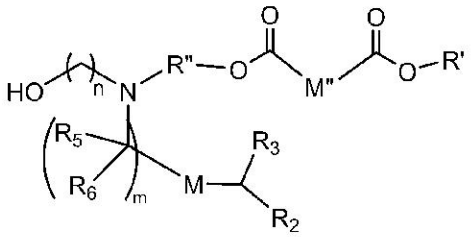
もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体であり、式中、Ｒ４は、本明細書に記載されているとおりである。

【０５０３】
別の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、下記の式（ＩＩｃ）もしくは（ＩＩｅ）の化合物、
【化１８】



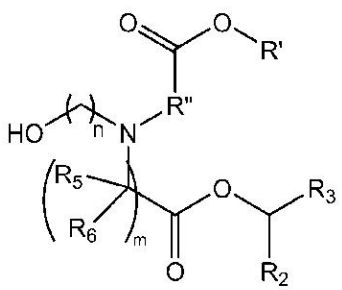
（ＩＩｃ）　　（ＩＩｅ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体であり、式中、Ｒ４は、本明細書に記載されているとおりである。
【０５０４】
別の実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、下記の式（ＩＩｆ）の化合物、
【化１９】



（ＩＩｆ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体であり、
式中、Ｍは、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－であり、Ｍ”は、Ｃ１－６アルキルまたはＣ２－６アルケニルであり、Ｒ２及びＲ３は独立して、Ｃ５－１４アルキル及びＣ５－１４アルケニルからなる群から選択されており、ｎは、２、３及び４から選択されている。
【０５０５】
さらなる実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、下記の式（ＩＩｄ）の化合物、
【化２０】



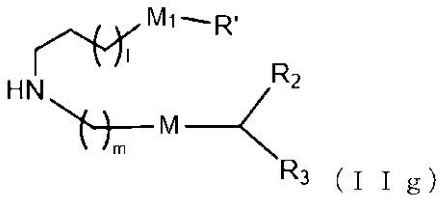
（ＩＩｄ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体であり、式中、ｎは、２、３または４であり、ｍ、Ｒ’、Ｒ”及びＲ２～Ｒ６は、本明細書に記載されているとおりである。例えば、Ｒ２及びＲ３のそれぞれは独立して、Ｃ５－１４アルキル及びＣ５－１４アルケニルからなる群から選択されていてよい。

【０５０６】

さらなる実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、下記の式（ＩＩｇ）の化合物、

【化２１】



（ＩＩｇ）

もしくはそのＮ－オキシド、またはその塩もしくは異性体であり、式中、ｌは、１、２、３、４及び５から選択されており、ｍは、５、６、７、８及び９から選択されており、Ｍ１は、結合またはＭ’であり、Ｍ及びＭ’は独立して、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）－Ｍ”－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ－Ｓ－、アリール基及びヘテロアリール基から選択されており、Ｒ２及びＲ３は独立して、Ｈ、Ｃ１－１４アルキル及びＣ２－１４アルケニルからなる群から選択されている。例えば、Ｍ”は、Ｃ１－６アルキル（例えばＣ１－４アルキル）またはＣ２－６アルケニル（例えばＣ２－４アルケニル）である。例えば、Ｒ２及びＲ３は独立して、Ｃ５－１４アルキル及びＣ５－１４アルケニルからなる群から選択されている。

【０５０７】

いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、米国特許出願第６２／２２０，０９１号、同第６２／２５２，３１６号、同第６２／２５３，４３３号、同第６２／２６６，４６０号、同第６２／３３３，５５７号、同第６２／３８２，７４０号、同第６２／３９３，９４０号、同第６２／４７１，９３７号、同第６２／４７１，９４９号、同第６２／４７５，１４０号及び同第６２／４７５，１６６号、ならびに国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０５２３５２号に記載されている化合物のうちの１つ以上である。

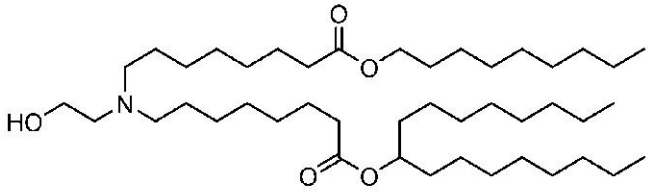
【０５０８】

いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、米国特許出願第６２／４７５，１６６号に記載されている化合物１～２８０から選択されている。

【０５０９】

いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、

【化２２】



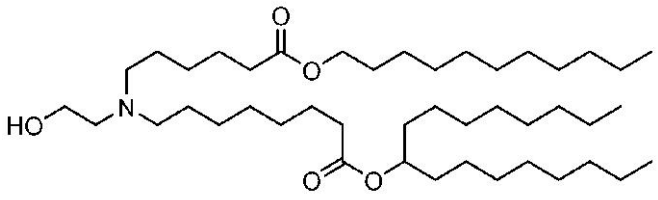
（化合物ＩＩ）

またはその塩である。

【０５１０】

いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、

【化２３】



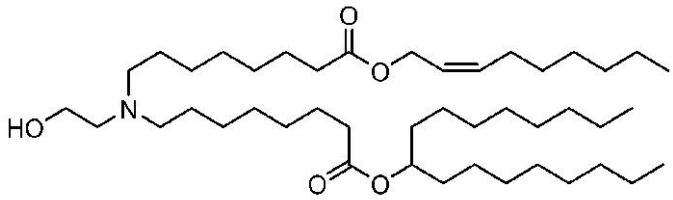
（化合物ＩＩＩ）

またはその塩である。

【０５１１】

いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、

【化２４】



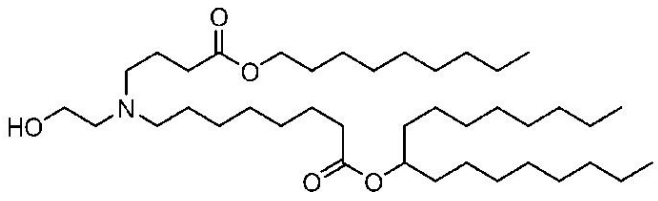
（化合物ＩＶ）

またはその塩である。

【０５１２】

いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、

【化２５】



（化合物Ｖ）

またはその塩である。

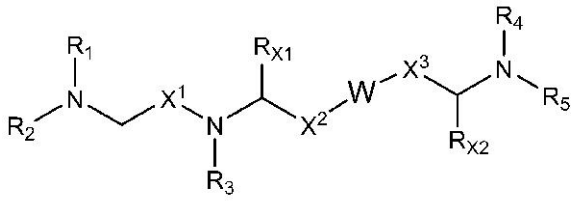
【０５１３】

式（Ｉ）、（ＩＡ）、（ＩＢ）、（ＩＩ）、（ＩＩａ）、（ＩＩｂ）、（ＩＩｃ）、（ＩＩｄ）、（ＩＩｅ）、（ＩＩｆ）または（ＩＩｇ）による脂質の中央のアミン部分は、生理的ｐＨでプロトン化し得る。したがって、脂質は、生理的ｐＨで、正電荷または部分正電荷を有してよい。このような脂質は、カチオン性（アミノ）脂質またはイオン化可能な（アミノ）脂質ということもある。脂質は、正電荷及び負電荷の両方を有する両性イオン性分子、すなわち中性分子であってもよい。

【０５１４】

いくつかの態様では、本開示のイオン化可能な脂質は、下記の式（ＩＩＩ）の化合物、

【化２６】

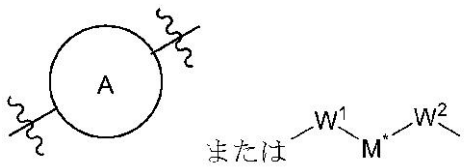


（ＩＩＩ）

またはその塩もしくは異性体の１つ以上であってもよく、式中、

Ｗは、

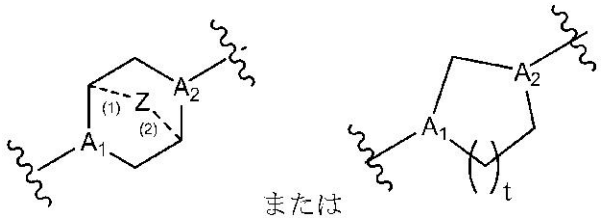
【化２７】



であり、

環Ａは、

【化２８】



であり、

ｔは、１または２であり、

Ａ１及びＡ２はそれぞれ独立して、ＣＨまたはＮから選択されており、

Ｚは、ＣＨ２であるか、または存在せず、ＺがＣＨ２であるときには、破線（１）及び（２）はそれぞれ、単結合を表し、Ｚが存在しないときには、破線（１）及び（２）はいずれも存在せず、

Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４及びＲ５は独立して、Ｃ５－２０アルキル、Ｃ５－２０アルケニル、－Ｒ”ＭＲ’、－Ｒ＊ＹＲ”、－ＹＲ”及び－Ｒ＊ＯＲ”からなる群から選択されており、

ＲＸ１及びＲＸ２はそれぞれ独立して、ＨまたはＣ１－３アルキルであり、

それぞれのＭは独立して、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）２－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｏ）－、アリール基及びヘテロアリール基からなる群から選択されており、

Ｍ＊は、Ｃ１－Ｃ６アルキルであり、

Ｗ１及びＷ２はそれぞれ独立して、－Ｏ－及び－Ｎ（Ｒ６）－からなる群から選択されており、

それぞれのＲ６は独立して、Ｈ及びＣ１－５アルキルからなる群から選択されており、

Ｘ１、Ｘ２及びＸ３は独立して、結合、－ＣＨ２－、－（ＣＨ２）２－、－ＣＨＲ－、－ＣＨＹ－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２）ｎ－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－（ＣＨ２）ｎ－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｃ（Ｓ）－及び－ＣＨ（ＳＨ）－からなる群から選択されており、

それぞれのＹは独立して、Ｃ３－６炭素環であり、

それぞれのＲ＊は独立して、Ｃ１－１２アルキル及びＣ２－１２アルケニルからなる群から選択されており、

それぞれのＲは独立して、Ｃ１－３アルキル及びＣ３－６炭素環からなる群から選択されており、

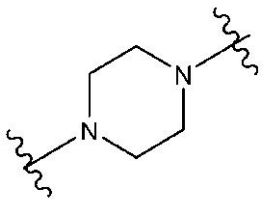
それぞれのＲ’は独立して、Ｃ１－１２アルキル、Ｃ２－１２アルケニル及びＨからなる群から選択されており、

それぞれのＲ”は独立して、Ｃ３－１２アルキル、Ｃ３－１２アルケニル及び－Ｒ＊ＭＲ’からなる群から選択されており、

ｎは、１～６の整数であり、

環Ａが

【化２９】



であるときには、

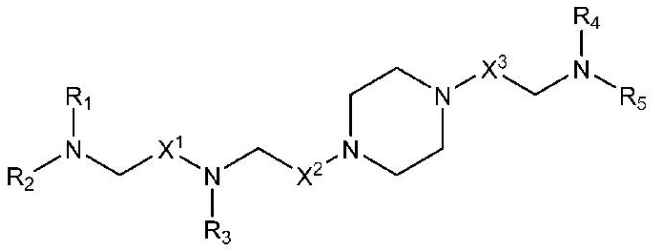
ｉ）Ｘ１、Ｘ２及びＸ３の少なくとも１つは、－ＣＨ２－ではなく、及び／または

ｉｉ）Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４及びＲ５の少なくとも１つは、－Ｒ”ＭＲ’である。

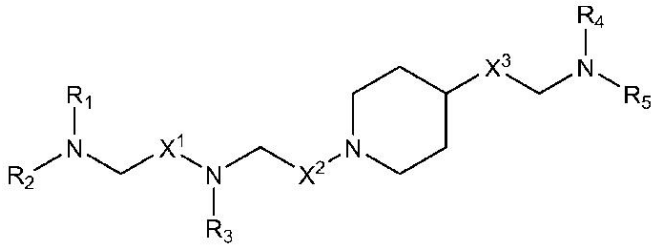
【０５１５】

いくつかの実施形態では、その化合物は、下記の式（ＩＩＩａ１）～（ＩＩＩａ８）のいずれかの化合物である。

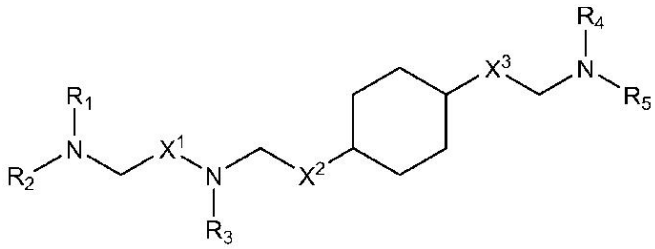
【化３０－１】



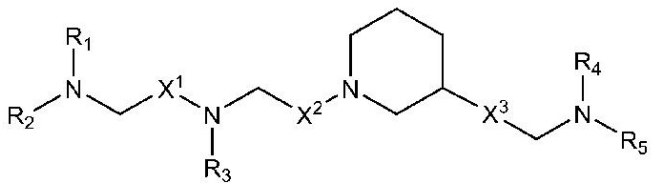
（ＩＩＩａ１）



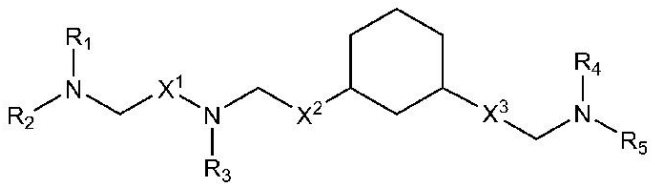
（ＩＩＩａ２）



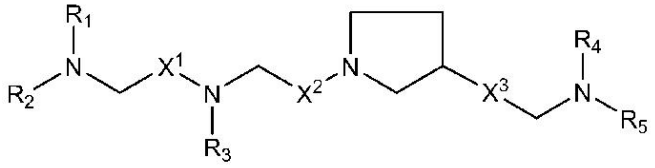
（ＩＩＩａ３）



（ＩＩＩａ４）

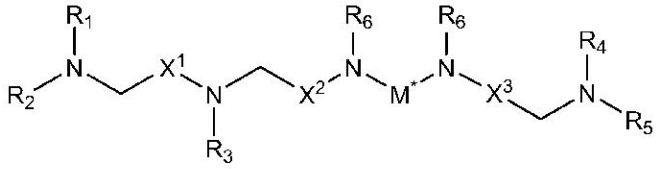


（ＩＩＩａ５’）

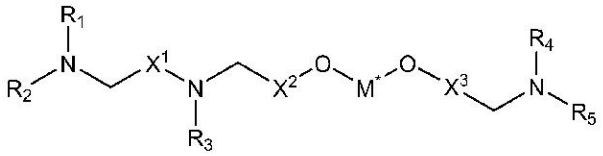


（ＩＩＩａ６）

【化３０－２】

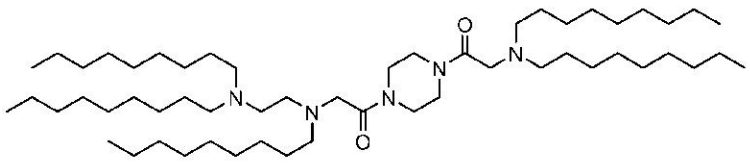


（ＩＩＩａ７）または



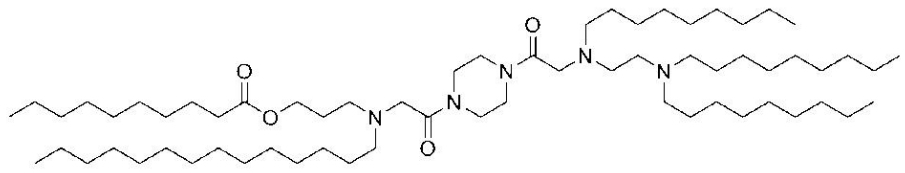
（ＩＩＩａ８）

【０５１６】
いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、米国特許出願第６２／２７１，１４６号、同第６２／３３８，４７４号、同第６２／４１３，３４５号及び同第６２／５１９，８２６号、ならびに国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０６８３００号に記載されている化合物のうちの１つ以上である。
【０５１７】
いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、米国特許出願第６２／５１９，８２６号に記載されている化合物１～１５６から選択されている。
【０５１８】
いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、米国特許出願第６２／５１９，８２６号に記載されている化合物１～１６、４２～６６、６８～７６及び７８～１５６から選択されている。
【０５１９】
いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、
【化３１】



（化合物ＶＩ）

またはその塩である。
【０５２０】
いくつかの実施形態では、そのイオン化可能な脂質は、
【化３２】



（化合物ＶＩＩ）

またはその塩である。
【０５２１】
式（ＩＩＩ）、（ＩＩＩａ１）、（ＩＩＩａ２）、（ＩＩＩａ３）、（ＩＩＩａ４）、

（ＩＩＩａ５）、（ＩＩＩａ６）、（ＩＩＩａ７）または（ＩＩＩａ８）による脂質の中央のアミン部分は、生理的ｐＨでプロトン化し得る。したがって、脂質は、生理的ｐＨで、正電荷または部分正電荷を有してよい。このような脂質は、カチオン性（アミノ）脂質またはイオン化可能な（アミノ）脂質ということもある。脂質は、正電荷及び負電荷の両方を有する両性イオン性分子、すなわち中性分子であってもよい。

【０５２２】

リン脂質

本明細書に開示されている脂質ナノ粒子組成物の脂質組成物は、リン脂質を１つ以上、例えば、飽和リン脂質もしくは（多価）不飽和リン脂質、またはこれらを組み合わせたものを１つ以上含むことができる。概ね、リン脂質は、リン脂質部分と、１つ以上の脂肪酸部分を含む。

【０５２３】

リン脂質部分は、例えば、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できる。

【０５２４】

脂肪酸部分は、例えば、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できる。

【０５２５】

特定のリン脂質は、膜への融合を促進できる。例えば、カチオン性リン脂質は、膜（例えば、細胞膜または細胞内膜）の、１つ以上の負に帯電したリン脂質と相互作用できる。リン脂質の膜への融合により、脂質含有組成物（例えばＬＮＰ）の、１つ以上のエレメント（例えば治療剤）を膜に通過させることができ、例えば、その１つ以上のエレメントの標的組織への送達が可能になる。

【０５２６】

天然種に改変及び置換（分岐化、酸化、環化及びアルキンを含む）を施したものを含め、非天然のリン脂質種も企図されている。例えば、リン脂質は、１つ以上のアルキン（例えば、１つ以上の二重結合が、三重結合に置き換えられているアルケニル基）で官能化されているか、または１つ以上のアルキンに架橋されていることができる。アルキン基は、適切な反応条件下で、アジドに暴露されると、銅触媒による付加環化を起こすことができる。このような反応は、ナノ粒子組成物の脂質二重層を機能化して、膜透過もしくは細胞認識を促すか、またはナノ粒子組成物を、標的化部分もしくはイメージング部分（例えば色素）のような有用な成分にコンジュゲートするのに有用であることがある。

【０５２７】

リン脂質としては、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、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジン酸のようなグリセロリン脂質が挙げられるが、これらに限らない。リン脂質としては、スフィンゴミエリンのようなスフィンゴリン脂質も挙げられる。

【０５２８】

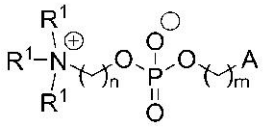
いくつかの実施形態では、本発明のリン脂質は、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＵＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－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コレステリルヘミサクシノイル－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（Ｃ１６Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、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－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－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－ｓｎ－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－ｓｎ－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－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、スフィンゴミエリン及びこれらの混合物を含む。

【０５２９】

ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、ＤＳＰＣのアナログまたはバリアントである。ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、下記の式（ＩＶ）の化合物、

【化３３】



（ＩＶ）

またはその塩であり、式中、

それぞれのＲ１は独立して、任意に置換されたアルキルであるか、あるいは、任意に２つのＲ１が、介在する原子と一体化して、任意に置換された単環式カルボシクリルもしくは任意に置換された単環式ヘテロシクリルを形成するか、または任意に、３つのＲ１が、介在する原子と一体化して、任意に置換された二環式カルボシクリルもしくは任意に置換された二環式ヘテロシクリルを形成し、

ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０であり、

ｍは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０であり、

その式のＡは、

【化３４】



であり、

Ｌ２の各事例は独立して、結合または任意に置換されたＣ１－６アルキレンであり、その任意に置換されたＣ１－６アルキレンのメチレン単位の１つは任意に、Ｏ、Ｎ（ＲＮ）、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）ＯまたはＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）に置き換えられており、

Ｒ２の各事例は独立して、任意に置換されたＣ１－３０アルキル、任意に置換されたＣ１－３０アルケニルまたは任意に置換されたＣ１－３０アルキニルであり、任意に、Ｒ２のメチレン単位の１つ以上は独立して、任意に置換されたカルボシクリレン、任意に置換

されたヘテロシクリレン、任意に置換されたアリーレン、任意に置換されたヘテロアリーレン、Ｎ（ＲＮ）、Ｏ、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｏ、Ｃ（Ｏ）Ｓ、ＳＣ（Ｏ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｓ）、Ｃ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、Ｓ（Ｏ）、ＯＳ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２Ｏ、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｏ、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）またはＮ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｏに置き換えられており、

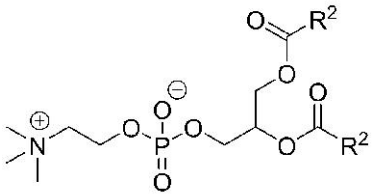
ＲＮの各事例は独立して、水素、任意に置換されたアルキルまたは窒素保護基であり、

環Ｂは、任意に置換されたカルボシクリル、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアリールまたは任意に置換されたヘテロアリールであり、

ｐは、１または２であり、

その化合物は、下記の式の化合物ではないことを条件とし、

【化３５】



式中、Ｒ２の各事例は独立して、非置換アルキル、非置換アルケニルまたは非置換アルキニルである。

【０５３０】

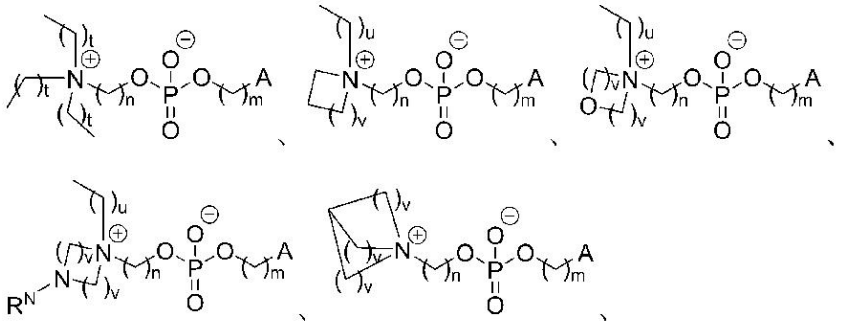
いくつかの実施形態では、そのリン脂質は、米国特許出願第６２／５２０，５３０号に記載されているリン脂質のうちの１つ以上であってよい。

【０５３１】

ｉ）リン脂質頭部の修飾

ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、修飾リン脂質頭部（例えば修飾コリン基）を含む。ある特定の実施形態では、修飾頭部を有するリン脂質は、修飾４級アミンを有するＤＳＰＣまたはそのアナログである。例えば、式（ＩＶ）の実施形態では、Ｒ１の少なくとも１つは、メチルではない。ある特定の実施形態では、Ｒ１の少なくとも１つは、水素またはメチルではない。ある特定の実施形態では、式（ＩＶ）の化合物は、下記の式のうちの１つの化合物、

【化３６】

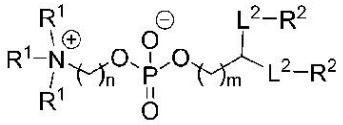


またはその塩であり、式中、
それぞれのｔは独立して、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０であり、
それぞれのｕは独立して、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０であり、
それぞれのｖは独立して、１、２または３である。

【０５３２】

ある特定の実施形態では、式（ＩＶ）の化合物は、下記の式（ＩＶ－ａ）の化合物、

【化３７】



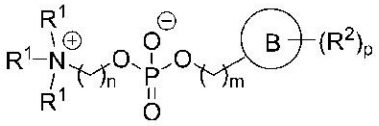
（ＩＶ－ａ）

またはその塩である。

【０５３３】

ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、グリセリド部分の代わりに、環状部分を含む。ある特定の実施形態では、本発明において有用なリン脂質は、グリセリド部分の代わりに、環状部分を有するＤＳＰＣまたはそのアナログである。ある特定の実施形態では、式（ＩＶ）の化合物は、下記の式（ＩＶ－ｂ）の化合物、

【化３８】



（ＩＶ－ｂ）

またはその塩である。

【０５３４】

（ｉｉ）リン脂質尾部の修飾

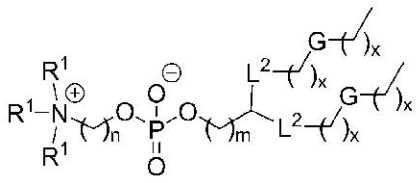
ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、修飾尾部を含む。ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、修飾尾部を有するＤＳＰＣまたはそのアナログである。本明細書に記載されているように、「修飾尾部」は、より短いかまたはより長い脂肪族鎖、分岐が導入された脂肪族鎖、置換基が導入された脂肪族鎖、１つ以上のメチレンが、環状基もしくはヘテロ原子基によって置き換えられている脂肪族鎖、またはこれらをいずれかに組み合わせたものを有する尾部であってよい。例えば、ある特定の実施形態では、（ＩＶ）の化合物は、式（ＩＶ－ａ）の化合物またはその塩であり、Ｒ２の事例の少なくとも１つは、Ｒ２の各事例は、任意に置換されたＣ１－３０アルキルであり、Ｒ２のメチレン単位の１つ以上は独立して、任意に置換されたカルボシクリレン、任意に置換されたヘテロシクリレン、任意に置換されたアリーレン、任意に置換されたヘテロアリーレン、Ｎ（ＲＮ）、Ｏ、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｏ、Ｃ（Ｏ）Ｓ、ＳＣ（Ｏ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｓ）、Ｃ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、Ｓ（Ｏ）、ＯＳ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２Ｏ、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）、Ｓ（

Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｏ、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）またはＮ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｏに置き換えられている。

【０５３５】

ある特定の実施形態では、式（ＩＶ）の化合物は、下記の式（ＩＶ－ｃ）の化合物、

【化３９】



（ＩＶ－ｃ）

またはその塩であり、式中、

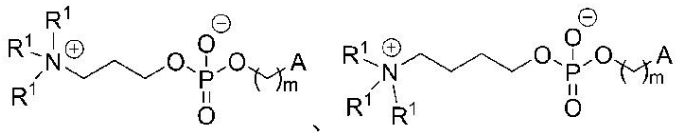
それぞれのｘは独立して、０～３０の整数（両端の数字を含む）であり、

Ｇの各事例は独立して、任意に置換されたカルボシクリレン、任意に置換されたヘテロシクリレン、任意に置換されたアリーレン、任意に置換されたヘテロアリーレン、Ｎ（ＲＮ）、Ｏ、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｏ、Ｃ（Ｏ）Ｓ、ＳＣ（Ｏ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｓ）、Ｃ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、Ｓ（Ｏ）、ＯＳ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２Ｏ、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｏ、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）またはＮ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｏからなる群から選択されている。それぞれの可能性は、本発明の別個の実施形態を表している。

【０５３６】

ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、修飾ホスホコリン部分を含み、その４級アミンをホスホリル基に連結しているアルキル鎖は、エチレンではない（例えば、ｎは、２ではない）。したがって、ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、式（ＩＶ）の化合物であり、式中、ｎは、１、３、４、５、６、７、８、９または１０である。例えば、ある特定の実施形態では、式（ＩＶ）の化合物は、下記の式のうちの１つの化合物、

【化４０】



またはその塩である。

【０５３７】

代替的な脂質

ある特定の実施形態では、本発明において有用であるか、または有用な可能性があるリン脂質は、修飾ホスホコリン部分を含み、その４級アミンをホスホリル基に連結している

アルキル鎖は、エチレンではない（例えば、ｎは、２ではない）。したがって、ある特定の実施形態では、有用なリン脂質。

【０５３８】

ある特定の実施形態では、本開示のリン脂質の代わりに、代替的な脂質が用いられている。

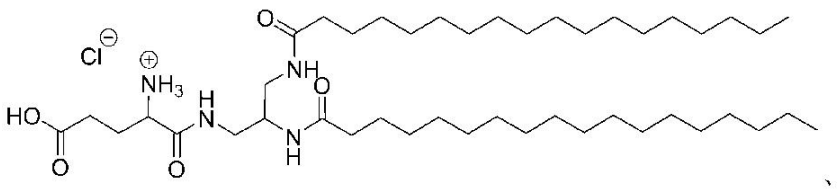
【０５３９】

ある特定の実施形態では、本発明の代替的な脂質は、オレイン酸である。

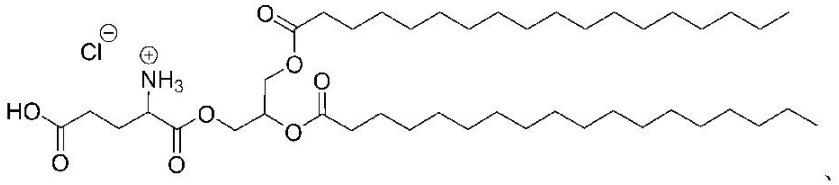
【０５４０】

ある特定の実施形態では、その代替的な脂質は、以下のうちの１つである。

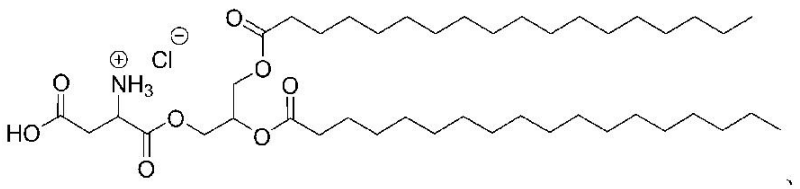
【化４１】



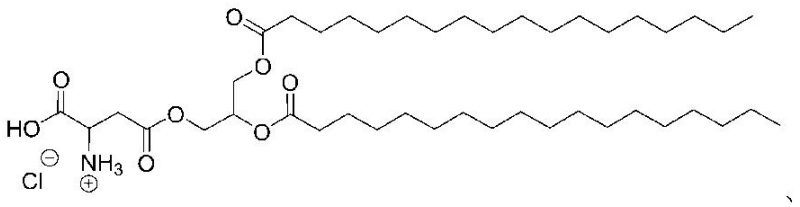
、



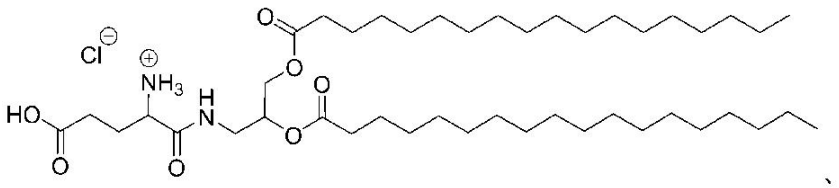
、



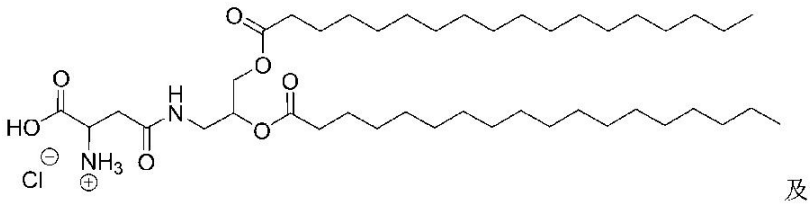
、



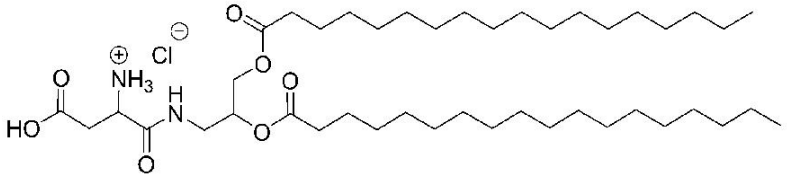
、



、



及び



【０５４１】
構造脂質
本明細書に開示されている医薬組成物の脂質組成物は、構造脂質を１つ以上含むことができる。本明細書で使用する場合、「構造脂質」という用語は、ステロールと、ステロール部分を含む脂質を指す。
【０５４２】
脂質ナノ粒子に構造脂質を組み込むことで、その粒子内の他の脂質の凝集を軽減するのを助けることができる。構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、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、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、α－トコフェロール、ホパノイド、フィトステロール、ステロイド及びこれらの混合物を含む（ただし、これらに限らない）群から選択できる。いくつかの実施形態では、その構造脂質は、ステロールである。本明細書で定義されているように、「ステロール」は、ステロイドアルコールからなる、ステロイドのサブグループである。ある特定の実施形態では、その構造脂質は、ステロイドである。ある特定の実施形態では、その構造脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態では、その構造脂質は、コレステロールのアナログである。ある特定の実施形態では、その構造脂質は、α－トコフェロールである。
【０５４３】
いくつかの実施形態では、その構造脂質は、米国特許出願第６２／５２０，５３０号に記載されている構造脂質のうちの１つ以上であってよい。
【０５４４】
ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）脂質
本明細書に開示されている医薬組成物の脂質組成物は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）脂質を１つ以上含むことができる。
【０５４５】
本明細書で使用する場合、「ＰＥＧ脂質」という用語は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾脂質を指す。ＰＥＧ脂質の非限定的な例としては、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、ＰＥＧ－セラミドコンジュゲート（例えば、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ１４またはＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０）、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン、ならびにＰＥＧ修飾１，２－ジアシルオキシプロパン－３－アミンが挙げられる。このような脂質は、ＰＥＧ化脂質ともいう。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣまたはＰＥＧ－ＤＳＰＥという脂質であることができる。
【０５４６】
いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質としては、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロールメトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）、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－［アミノ（ポリエチレングリコール）］（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）、ＰＥＧ－ジパルメトレイル、ＰＥＧ－ジオレイル、ＰＥＧ－ジステアリル、ＰＥＧ－ジアシルグリカミド（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＰＰＥ）またはＰＥＧ－１，２－ジミリスチルオキシプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ）が挙げられるが、これらに限らない。
【０５４７】
一実施形態では、その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、ＰＥＧ修飾ジアルキルグリセロール及びこれらの混合物からなる群から選択されている。
【０５４８】
いくつかの実施形態では、そのＰＥＧ脂質の脂質部分としては、約Ｃ１４～約Ｃ２２、好ましくは約Ｃ１４～約Ｃ１６の長さを有する脂質部分が挙げられる。いくつかの実施形

態では、ＰＥＧ部分、例えばｍＰＥＧ－ＮＨ２は、サイズが、約１０００ダルトン、２０００ダルトン、５０００ダルトン、１０，０００ダルトン、１５，０００ダルトンまたは２０，０００ダルトンである。一実施形態では、そのＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。

【０５４９】

一実施形態では、本明細書に記載されている脂質ナノ粒子は、非拡散性ＰＥＧであるＰＥＧ脂質を含むことができる。非拡散性ＰＥＧの非限定的な例としては、ＰＥＧ－ＤＳＧ及びＰＥＧ－ＤＳＰＥが挙げられる。

【０５５０】

ＰＥＧ脂質は、米国特許第８１５８６０１号及び国際公開第２０１５／１３０５８４Ａ２号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているＰＥＧ脂質のように、当該技術分野で知られている。

【０５５１】

概ね、本明細書に記載されている様々な式の他の脂質成分（例えばＰＥＧ脂質）のいくつかは、「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ」という標題の、２０１６年１２月１０日に出願された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０００１２９号（参照により、その全体が援用される）に記載されているようにして合成してよい。

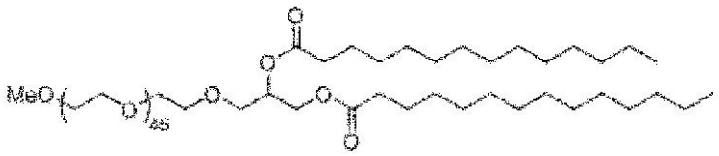
【０５５２】

脂質ナノ粒子組成物の脂質成分は、ＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質のように、ポリエチレングリコールを含む分子を１つ以上含んでよい。このような種は代わりに、ＰＥＧ化脂質ということもある。ＰＥＧ脂質は、ポリエチレングリコールで修飾された脂質である。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、ＰＥＧ修飾ジアルキルグリセロール及びこれらの混合物を含む非限定的な群から選択してよい。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣまたはＰＥＧ－ＤＳＰＥという脂質であってよい。

【０５５３】

いくつかの実施形態では、そのＰＥＧ修飾脂質は、ＰＥＧ　ＤＭＧの修飾形態である。ＰＥＧ－ＤＭＧは、以下の構造を有する。

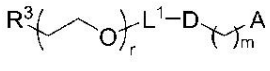
【化４２】



【０５５４】

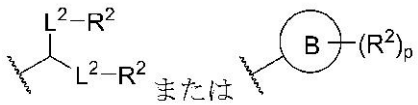
一実施形態では、本発明において有用なＰＥＧ脂質は、国際公開第２０１２０９９７５５号（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）に記載されているＰＥＧ化脂質であることができる。本明細書に記載されているこれらの例示的なＰＥＧ脂質のいずれも、そのＰＥＧ鎖上にヒドロキシル基を含むように修飾されていてもよい。ある特定の実施形態では、そのＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ＯＨ脂質である。本明細書に概ね定義されているように、「ＰＥＧ－ＯＨ脂質」（本明細書では、「ヒドロキシ－ＰＥＧ化脂質」ともいう）は、その脂質上にヒドロキシル（－ＯＨ）基を１つ以上有するＰＥＧ化脂質である。ある特定の実施形態では、そのＰＥＧ－ＯＨ脂質は、そのＰＥＧ鎖上にヒドロキシル基を１つ以上含む。ある特定の実施形態では、ＰＥＧ－ＯＨ脂質、すなわちヒドロキシ－ＰＥＧ化脂質は、そのＰＥＧ鎖の末端に、－ＯＨ基を含む。それぞれの可能性は、本発明の別個の実施形態を表している。

【０５５５】
ある特定の実施形態では、本発明において有用なＰＥＧ脂質は、式（Ｖ）の化合物である。本発明で提供するのは、下記の式（Ｖ）の化合物、
【化４３】



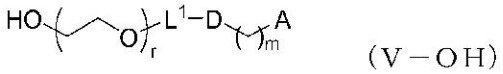
（Ｖ）

またはその塩であり、式中、
Ｒ３は、－ＯＲＯであり、
ＲＯは、水素、任意に置換されたアルキルまたは酸素保護基であり、
ｒは、１～１００の整数（両端の数字を含む）であり、
Ｌ１は、任意に置換されたＣ１－１０アルキレンであり、その任意に置換されたＣ１－１０アルキレンのメチレンの少なくとも１つは独立して、任意に置換されたカルボシクリレン、任意に置換されたヘテロシクリレン、任意に置換されたアリーレン、任意に置換されたヘテロアリーレン、Ｏ、Ｎ（ＲＮ）、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）ＯまたはＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）に置き換えられており、
Ｄは、クリックケミストリーによって得た部分、または生理的条件下で切断可能な部分であり、
ｍは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０であり、
Ａは、
【化４４】



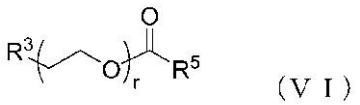
の式の化合物であり、
Ｌ２の各事例は独立して、結合または任意に置換されたＣ１－６アルキレンであり、その任意に置換されたＣ１－６アルキレンのメチレン単位の１つは任意に、Ｏ、Ｎ（ＲＮ）、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）ＯまたはＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）に置き換えられており、
Ｒ２の各事例は独立して、任意に置換されたＣ１－３０アルキル、任意に置換されたＣ１－３０アルケニルまたは任意に置換されたＣ１－３０アルキニルであり、任意に、Ｒ２のメチレン単位の１つ以上は独立して、任意に置換されたカルボシクリレン、任意に置換されたヘテロシクリレン、任意に置換されたアリーレン、任意に置換されたヘテロアリーレン、Ｎ（ＲＮ）、Ｏ、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｏ、Ｃ（Ｏ）Ｓ、ＳＣ（Ｏ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｓ）、Ｃ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、Ｓ（Ｏ）、ＯＳ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２Ｏ、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｏ、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）またはＮ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｏに置き換えられており、

ＲＮの各事例は独立して、水素、任意に置換されたアルキルまたは窒素保護基であり、
環Ｂは、任意に置換されたカルボシクリル、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたアリールまたは任意に置換されたヘテロアリールであり、
ｐは、１または２である。
【０５５６】
ある特定の実施形態では、式（Ｖ）の化合物は、ＰＥＧ－ＯＨ脂質である（すなわち、Ｒ３は、－ＯＲＯであり、ＲＯは、水素である）。ある特定の実施形態では、式（Ｖ）の化合物は、下記の式（Ｖ－ＯＨ）の化合物、
【化４５】



（Ｖ－ＯＨ）

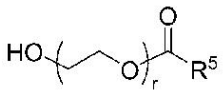
またはその塩である。
【０５５７】
ある特定の実施形態では、本発明における有用なＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ化脂肪酸である。ある特定の実施形態では、本発明における有用なＰＥＧ脂質は、式（ＶＩ）の化合物である。本発明で提供するのは、下記の式（ＶＩ）の化合物、
【化４６】



（ＶＩ）

またはその塩であり、式中、
Ｒ３は、－ＯＲＯであり、
ＲＯは、水素、任意に置換されたアルキルまたは酸素保護基であり、
ｒは、１～１００の整数（両端の数字を含む）であり、
Ｒ５は、任意に置換されたＣ１０－４０アルキル、任意に置換されたＣ１０－４０アルケニルまたは任意に置換されたＣ１０－４０アルキニルであり、任意に、Ｒ５のメチレン基の１つ以上は、任意に置換されたカルボシクリレン、任意に置換されたヘテロシクリレン、任意に置換されたアリーレン、任意に置換されたヘテロアリーレン、Ｎ（ＲＮ）、Ｏ、Ｓ、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｏ）Ｏ、Ｃ（Ｏ）Ｓ、ＳＣ（Ｏ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）、Ｃ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）、ＮＲＮＣ（＝ＮＲＮ）Ｎ（ＲＮ）、Ｃ（Ｓ）、Ｃ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）、ＮＲＮＣ（Ｓ）Ｎ（ＲＮ）、Ｓ（Ｏ）、ＯＳ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｏ、ＯＳ（Ｏ）２Ｏ、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）、Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）Ｏ、Ｓ（Ｏ）２、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２、Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、Ｎ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）、ＯＳ（Ｏ）２Ｎ（ＲＮ）またはＮ（ＲＮ）Ｓ（Ｏ）２Ｏに置き換えられており、
ＲＮの各事例は独立して、水素、任意に置換されたアルキルまたは窒素保護基である。
【０５５８】
ある特定の実施形態では、式（ＶＩ）の化合物は、下記の式（ＶＩ－ＯＨ）の化合物、

【化４７】



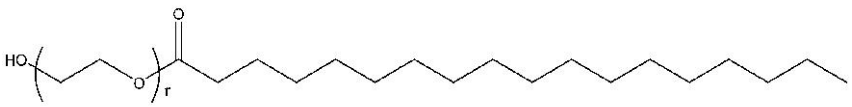
（ＶＩ－ＯＨ）

またはその塩である。一実施形態では、ｒは、１～１００の整数（両端の数字を含む）である。いくつかの実施形態では、ｒは、４５である。

【０５５９】

さらに別の実施形態では、式（ＶＩ）の化合物は、

【化４８】

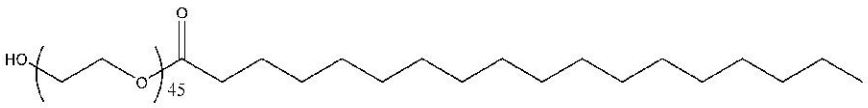


またはその塩である。

【０５６０】

一実施形態では、式（ＶＩ）の化合物は、

【化４９】



（化合物Ｉ）

である。

【０５６１】

いくつかの態様では、本明細書に開示されている医薬組成物の脂質組成物は、ＰＥＧ脂質を含まない。

【０５６２】

いくつかの実施形態では、そのＰＥＧ脂質は、米国特許出願第６２／５２０，５３０号に記載されているＰＥＧ脂質のうちの１つ以上であってよい。

【０５６３】

いくつかの実施形態では、本発明の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、ＰＥＧ修飾ジアルキルグリセロール及びこれらの混合物を含む。いくつかの実施形態では、そのＰＥＧ修飾脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ（ＰＥＧ－ＤＯＭＧともいう）、ＰＥＧ－ＤＳＧ及び／またはＰＥＧ－ＤＰＧである。

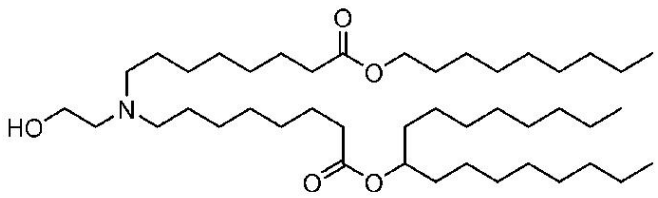
【０５６４】

いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、式Ｉ、ＩＩまたはＩＩＩのうちのいずれかのイオン化可能なカチオン性脂質、ＤＳＰＣを含むリン脂質、構造脂質、及びＰＥＧ－ＤＭＧを含むＰＥＧ脂質を含む。

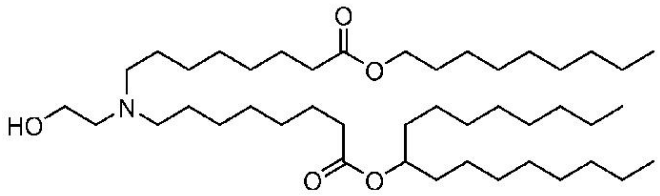
【０５６５】

いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、式Ｉ、ＩＩまたはＩＩＩのうちのいずかれのイオン化可能なカチオン性脂質、ＤＳＰＣを含むリン脂質、構造脂質、及び式ＶＩを有する化合物を含むＰＥＧ脂質を含む。

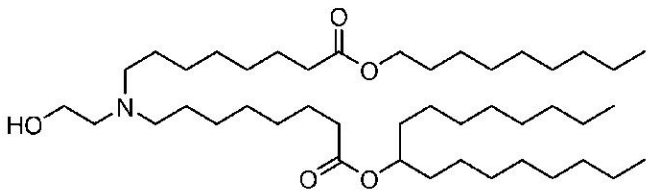
【０５６６】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、式Ｉ、ＩＩまたはＩＩＩのうちのいずかれのイオン化可能なカチオン性脂質、式ＩＶを有する化合物を含むリン脂質、構造脂質、及び式ＶまたはＶＩを有する化合物を含むＰＥＧ脂質を含む。
【０５６７】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、式Ｉ、ＩＩまたはＩＩＩのうちのいずかれのイオン化可能なカチオン性脂質、式ＩＶを有する化合物を含むリン脂質、構造脂質、及び式ＶまたはＶＩを有する化合物を含むＰＥＧ脂質を含む。
【０５６８】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、式Ｉ、ＩＩまたはＩＩＩのうちのいずかれのイオン化可能なカチオン性脂質、式ＩＶを有するリン脂質、構造脂質、及び式ＶＩを有する化合物を含むＰＥＧ脂質を含む。
【０５６９】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、
【化５０】



のイオン化可能なカチオン性脂質、及び式ＶＩを含むＰＥＧ脂質を含む。
【０５７０】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、
【化５１】

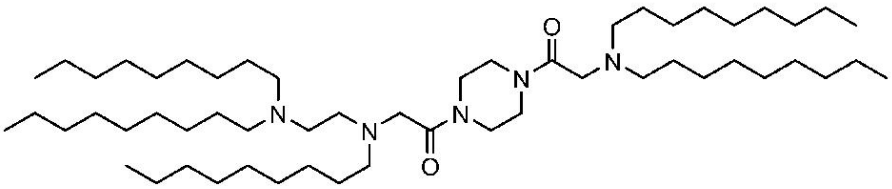


のイオン化可能なカチオン性脂質、及びオレイン酸を含む代替的な脂質を含む。
【０５７１】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、
【化５２】

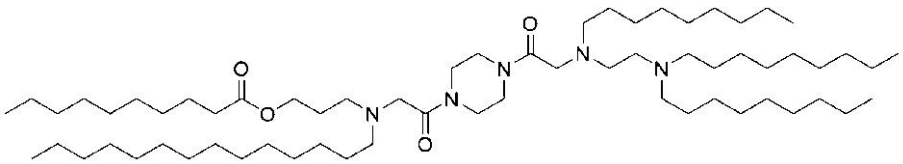


のイオン化可能なカチオン性脂質、オレイン酸を含む代替的な脂質、コレステロールを含む構造脂質、及び式ＶＩを有する化合物を含むＰＥＧ脂質を含む。
【０５７２】

いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、
【化５３】



のイオン化可能なカチオン性脂質、ＤＯＰＥを含むリン脂質、コレステロールを含む構造脂質、及び式ＶＩを有する化合物を含むＰＥＧ脂質を含む。
【０５７３】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、
【化５４】



のイオン化可能なカチオン性脂質、ＤＯＰＥを含むリン脂質、コレステロールを含む構造脂質、及び式ＶＩＩを有する化合物を含むＰＥＧ脂質を含む。
【０５７４】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、Ｎ：Ｐ比が約２：１～約３０：１である。
【０５７５】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、Ｎ：Ｐ比が約６：１である。
【０５７６】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、Ｎ：Ｐ比が約３：１である。
【０５７７】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、そのイオン化可能なカチオン性脂質成分とＲＮＡとのｗｔ／ｗｔ比が、約１０：１～約１００：１である。
【０５７８】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、そのイオン化可能なカチオン性脂質成分とＲＮＡとのｗｔ／ｗｔ比が、約２０：１である。
【０５７９】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、そのイオン化可能なカチオン性脂質成分とＲＮＡとのｗｔ／ｗｔ比が、約１０：１である。
【０５８０】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、平均直径が約５０ｎｍ～約１５０ｎｍである。
【０５８１】
いくつかの実施形態では、本発明のＬＮＰは、平均直径が約７０ｎｍ～約１２０ｎｍである。
【０５８２】
本明細書で使用する場合、「アルキル」、「アルキル基」または「アルキレン」という用語は、１つ以上の炭素原子（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８

個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個または２０個以上の炭素原子）を含む直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素であって、任意に置換されている炭化水素を意味する。「Ｃ１－１４アルキル」という表記は、炭素原子を１～１４個含む、任意に置換された直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素を意味する。別段の定めのない限り、本明細書に記載されているアルキル基は、非置換のアルキル基及び置換アルキル基の両方を指す。

【０５８３】

本明細書で使用する場合、「アルケニル」、「アルケニル基」または「アルケニレン」という用語は、２つ以上の炭素原子（例えば、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個または２０個以上の炭素原子）及び少なくとも１つの二重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素であって、任意に置換されている炭化水素を意味する。「Ｃ２－１４アルケニル」という表記は、２～１４個の炭素原子及び少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む、任意に置換された直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。アルケニル基は、炭素－炭素二重結合を１個、２個、３個または４個以上含んでよい。例えば、Ｃ１８アルケニルは、二重結合を１つ以上含んでよい。二重結合を２個含むＣ１８アルケニル基は、リノレイル基であってよい。別段の定めのない限り、本明細書に記載されているアルケニル基は、非置換アルケニル基及び置換アルケニル基の両方を指す。

【０５８４】

本明細書で使用する場合、「アルキニル」、「アルキニル基」または「アルキニレン」という用語は、２つ以上の炭素原子（例えば、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個または２０個以上の炭素原子）及び少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素であって、任意に置換されている炭化水素を意味する。「Ｃ２－１４アルキニル」という表記は、２～１４個の炭素原子及び少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を含む、任意に置換された直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。アルキニル基は、炭素－炭素三重結合を１個、２個、３個または４個以上含んでよい。例えば、Ｃ１８アルキニルは、炭素－炭素三重結合を１つ以上含んでよい。別段の定めのない限り、本明細書に記載されているアルキニル基は、非置換アルキニル基及び置換アルキニル基の両方を指す。

【０５８５】

本明細書で使用する場合、「炭素環」または「炭素環式基」という用語は、炭素原子からなる環を１つ以上含む、任意に置換された単環系または多環系を意味する。環は、３員、４員、５員、６員、７員、８員、９員、１０員、１１員、１２員、１３員、１４員、１５員、１６員、１７員、１８員、１９員または２０員の環であってよい。「Ｃ３－６炭素環」という表記は、炭素原子を３～６個有する単環を含む炭素環を意味する。炭素環は、炭素－炭素二重結合または炭素－炭素三重結合を１つ以上含んでよく、非芳香族または芳香族（例えば、シクロアルキル基またはアリール基）であってよい。炭素環の例としては、シクロプロピル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、フェニル基、ナフチル基及び１，２ジヒドロナフチル基が挙げられる。「シクロアルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、非芳香族炭素環を意味し、二重結合または三重結合のいずれも含んでも含まなくてもよい。別段の定めのない限り、本明細書に記載されている炭素環は、非置換の炭素環基及び置換された炭素環基の両方、すなわち、任意に置換された炭素環を指す。

【０５８６】

本明細書で使用する場合、「複素環」または「複素環式基」という用語は、任意に置換された単環系または環を１つ以上含む多環系であって、その少なくとも１つの環が、ヘテロ原子を少なくとも１つ含む環系を意味する。ヘテロ原子は例えば、窒素原子、酸素原子または硫黄原子であってよい。環は、３員、４員、５員、６員、７員、８員、９員、１０員、１１員、１２員、１３員または１４員の環であってよい。複素環は、二重結合または三重結合を１つ以上含んでよく、非芳香族または芳香族（例えば、ヘテロシクロアルキル

基またはヘテロアリール基）であってよい。複素環の例としては、イミダゾリル基、イミダゾリジニル基、オキサゾリル基、オキサゾリジニル基、チアゾリル基、チアゾリジニル基、ピラゾリジニル基、ピラゾリル基、イソオキサゾリジニル基、イソオキサゾリル基、イソチアゾリジニル基、イソチアゾリル基、モルホリニル基、ピロリル基、ピロリジニル基、フリル基、テトラヒドロフリル基、チオフェニル基、ピリジニル基、ピペリジニル基、キノリル基及びイソキノリル基が挙げられる。本明細書で使用する場合、「ヘテロシクロアルキル」という用語は、非芳香族複素環を意味し、二重結合または三重結合のいずれも含んでも含まなくてもよい。別段の定めのない限り、本明細書に記載されている複素環は、非置換の複素環基及び置換された複素環基の両方、すなわち、任意に置換された複素環を指す。

【０５８７】

本明細書で使用する場合、「ヘテロアルキル」、「ヘテロアルケニル」または「ヘテロアルキニル」という用語はそれぞれ、本明細書で定義されているようなアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基のうち、ヘテロ原子（例えば、酸素、硫黄、窒素、ホウ素、ケイ素、リン）を１つ以上（例えば、１個、２個、３個または４個）さらに含む基を指し、その１つ以上のヘテロ原子は、親炭素鎖内の隣接炭素原子間に挿入されており、及び／またはその１つ以上のヘテロ原子は、炭素原子及び親分子の間、すなわち結合点の間に挿入されている。別段の定めのない限り、本明細書に記載されているヘテロアルキル、ヘテロアルケニルまたはヘテロアルキニルは、非置換のヘテロアルキル、ヘテロアルケニルまたはヘテロアルキニル及び置換されたヘテロアルキル、ヘテロアルケニルまたはヘテロアルキニルの両方、すなわち、任意に置換されたヘテロアルキル、ヘテロアルケニルまたはヘテロアルキニルを指す。

【０５８８】

本明細書で使用する場合、「生分解性基」は、哺乳動物個体において、脂質代謝の加速を促進し得る基である。生分解性基は、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）－、－Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｓ）－、－ＣＨ（ＯＨ）－、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ’）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）２－、アリール基及びヘテロアリール基からなる群から選択してよいが、これらに限らない。本明細書で使用する場合、「アリール基」は、１つ以上の芳香族環を含む、任意に置換された炭素環式基である。アリール基の例としては、フェニル基及びナフチル基が挙げられる。本明細書で使用する場合、「ヘテロアリール基」は、１つ以上の芳香族環を含む、任意に置換された複素環式基である。ヘテロアリール基の例としては、ピロリル、フリル、チオフェニル、イミダゾリル、オキサゾリル及びチアゾリルが挙げられる。アリール基及びヘテロアリール基の両方とも、任意に置換されていてよい。例えば、Ｍ及びＭ’は、任意に置換されたフェニル、オキサゾール及びチアゾールからなる非限定的な群から選択できる。本発明の式では、Ｍ及びＭ’は独立して、上記の生分解性基のリストから選択できる。別段の定めのない限り、本明細書に記載されているアリール基またはヘテロアリール基は、非置換の基及び置換された基の両方、すなわち、任意に置換されたアリール基またはヘテロアリール基を指す。

【０５８９】

アルキル基、アルケニル基、ならびにシクリル基（例えば、カルボシクリル基及びヘテロシクリル基）は、別段の定めのない限り、任意に置換されていてよい。任意の置換基は、ハロゲン原子（例えば、塩化物基、臭化物基、フッ化物基またはヨウ化物基）、カルボン酸（例えばＣ（Ｏ）ＯＨ）、アルコール（例えば、ヒドロキシル、ＯＨ）、エステル（例えばＣ（Ｏ）ＯＲ、ＯＣ（Ｏ）Ｒ）、アルデヒド（例えばＣ（Ｏ）Ｈ）、カルボニル（例えば、Ｃ（Ｏ）Ｒ、あるいはＣ＝Ｏによって表される）、ハロゲン化アシル（例えば、Ｃ（Ｏ）Ｘ（そのＸは、臭化物、フッ化物、塩化物及びヨウ化物から選択したからハロゲン化物である））、炭酸塩（例えばＯＣ（Ｏ）ＯＲ）、アルコキシ（例えばＯＲ）、アセタール（例えば、Ｃ（ＯＲ）２Ｒ”””（その各ＯＲは、同じであることも、または異なることもできるアルコキシ基であり、Ｒ”””は、アルキル基またはアルケニル基である））、リ

ン酸塩（例えばＰ（Ｏ）４３－）、チオール（例えばＳＨ）、スルホキシド（例えばＳ（Ｏ）Ｒ）、スルフィン酸（例えばＳ（Ｏ）ＯＨ）、スルホン酸（例えばＳ（Ｏ）２ＯＨ）、チアール（例えばＣ（Ｓ）Ｈ）、硫酸塩（例えばＳ（Ｏ）４２－）、スルホニル（例えばＳ（Ｏ）２）、アミド（例えば、Ｃ（Ｏ）ＮＲ２またはＮ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）Ｒ）、アジド（例えばＮ３）、ニトロ（例えばＮＯ２）、シアノ（例えばＣＮ）、イソシアノ（例えばＮＣ）、アシルオキシ（例えばＯＣ（Ｏ）Ｒ）、アミノ（例えば、ＮＲ２、ＮＲＨまたはＮＨ２）、カルバモイル（例えば、ＯＣ（Ｏ）ＮＲ２、ＯＣ（Ｏ）ＮＲＨまたはＯＣ（Ｏ）ＮＨ２）、スルホンアミド（例えば、Ｓ（Ｏ）２ＮＲ２、Ｓ（Ｏ）２ＮＲＨ、Ｓ（Ｏ）２ＮＨ２、Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、Ｎ（Ｈ）Ｓ（Ｏ）２Ｒ、Ｎ（Ｒ）Ｓ（Ｏ）２ＨまたはＮ（Ｈ）Ｓ（Ｏ）２Ｈ）、アルキル基、アルケニル基、ならびにシクリル基（例えば、カルボシクリル基またはヘテロシクリル基）からなる群から選択してよいが、これらに限らない。上記のいずれにおいても、Ｒは、本明細書で定義されているようなアルキル基またはアルケニル基である。いくつかの実施形態では、置換基自体が、例えば、本明細書で定義されているような１個、２個、３個、４個、５個または６個の置換基でさらに置換されていてもよい。例えば、Ｃ１～６アルキル基は、本明細書で定義されているような１個、２個、３個、４個、５個または６個の置換基でさらに置換されていてもよい。

【０５９０】

窒素を含む本開示の化合物は、酸化剤（例えば、３－クロロペルオキシ安息香酸（ｍＣＰＢＡ）及び／または過酸化水素）で処理することによって、Ｎ－オキシドに変換して、本開示の他の化合物をもたらすことができる。したがって、価数及び構造によって認められるときには、示されているとともに、特許請求されているすべての窒素含有化合物は、示されているような化合物及びそのＮ－オキシド誘導体（Ｎ□ＯまたはＮ＋－Ｏ－として示すこともできる）の両方が含まれるものとみなす。さらに、他の事例では、本開示の化合物内の窒素をＮ－ヒドロキシ化合物またはＮ－アルコキシ化合物に変換できる。例えば、Ｎ－ヒドロキシ化合物は、ｍ　ＣＰＢＡのような酸化剤によって、親アミンを酸化することによって調製できる。価数及び構造によって認められるときには、示されているとともに、特許請求されているすべての窒素含有化合物は、示されているような化合物、ならびにそのＮ－ヒドロキシ（すなわちＮ－ＯＨ）誘導体及びＮ－アルコキシ（すなわちＮ－ＯＲ（そのＲは、置換されているかまたは非置換のＣ１－Ｃ６アルキル、Ｃ１－Ｃ６アルケニル、Ｃ１－Ｃ６アルキニル、３～１４員の炭素環または３～１４員の複素環である）誘導体の両方も網羅するものとみなす。

【０５９１】

ｂ．その他の脂質組成物成分

本明細書に開示されている医薬組成物の脂質組成物は、上記の成分に加えて、１つ以上の成分を含むことができる。例えば、その脂質組成物は、１つ以上の透過性増強剤分子、糖鎖、ポリマー、表面改質剤（例えば界面活性剤）またはその他の成分を含むことができる。例えば、透過性増強剤分子は、米国特許出願公開第２００５／０２２２０６４号によって記載されている分子であることができる。糖鎖としては、単糖（例えばグルコース）、ならびに多糖（例えば、グリコーゲン、その誘導体及びそのアナログ）を挙げることができる。

【０５９２】

ポリマーを、本明細書に開示されている医薬組成物（例えば、脂質ナノ粒子形態の医薬組成物）に含めるか、及び／またはポリマーを使用して、その医薬組成物を封入するかもしくは部分的に封入することができる。ポリマーは、生分解性及び／または生体適合性であることができる。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できるが、これらに限らない。

【０５９３】

その脂質組成物とポリヌクレオチドとの比率の範囲は、約１０：１～約６０：１（ｗｔ／ｗｔ）であることができる。

【０５９４】

いくつかの実施形態では、その脂質組成物とポリヌクレオチドとの比率は、約１０：１、約１１：１、約１２：１、約１３：１、約１４：１、約１５：１、約１６：１、約１７：１、約１８：１、約１９：１、約２０：１、約２１：１、約２２：１、約２３：１、約２４：１、約２５：１、約２６：１、約２７：１、約２８：１、約２９：１、約３０：１、約３１：１、約３２：１、約３３：１、約３４：１、約３５：１、約３６：１、約３７：１、約３８：１、約３９：１、約４０：１、約４１：１、約４２：１、約４３：１、約４４：１、約４５：１、約４６：１、約４７：１、約４８：１、約４９：１、約５０：１、約５１：１、約５２：１、約５３：１、約５４：１、約５５：１、約５６：１、約５７：１、約５８：１、約５９：１または約６０：１（ｗｔ／ｗｔ）であることができる。いくつかの実施形態では、その脂質組成物と、治療剤をコードするポリヌクレオチドとのｗｔ／ｗｔ比は、約２０：１または約１５：１である。

【０５９５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている医薬組成物は、ポリペプチドを２つ以上含むことができる。例えば、本明細書に開示されている医薬組成物は、ポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）を２つ以上含むことができる。

【０５９６】

一実施形態では、本明細書に記載されている脂質ナノ粒子は、脂質：ポリヌクレオチドの重量比が５：１、１０：１、１５：１、２０：１、２５：１、３０：１、３５：１、４０：１、４５：１、５０：１、５５：１、６０：１もしくは７０：１であるか、またはこれらの比率の範囲内もしくはいずれか（５：１～約１０：１、約５：１～約１５：１、約５：１～約２０：１、約５：１～約２５：１、約５：１～約３０：１、約５：１～約３５：１、約５：１～約４０：１、約５：１～約４５：１、約５：１～約５０：１、約５：１～約５５：１、約５：１～約６０：１、約５：１～約７０：１、約１０：１～約１５：１、約１０：１～約２０：１、約１０：１～約２５：１、約１０：１～約３０：１、約１０：１～約３５：１、約１０：１～約４０：１、約１０：１～約４５：１、約１０：１～約５０：１、約１０：１～約５５：１、約１０：１～約６０：１、約１０：１～約７０：１、約１５：１～約２０：１、約１５：１～約２５：１、約１５：１～約３０：１、約１５：１～約３５：１、約１５：１～約４０：１、約１５：１～約４５：１、約１５：１～約５０：１、約１５：１～約５５：１、約１５：１～約６０：１もしくは約１５：１～約７０：１などであるが、これらに限らない）で、ポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ）を含むことができる。

【０５９７】

一実施形態では、本明細書に記載されている脂質ナノ粒子は、ポリヌクレオチドを、およそ０．１ｍｇ／ｍｌ～２ｍｇ／ｍｌの濃度（０．１ｍｇ／ｍｌ、０．２ｍｇ／ｍｌ、０．３ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．７ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、０．９ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、１．１ｍｇ／ｍｌ、１．２ｍｇ／ｍｌ、１．３ｍｇ／ｍｌ、１．４ｍｇ／ｍｌ、１．５ｍｇ／ｍｌ、１．６ｍｇ／ｍｌ、１．７ｍｇ／ｍｌ、１．８ｍｇ／ｍｌ、１．９ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌまたは２．０ｍｇ／ｍｌ超などであるが、これらに限らない）で含むことができる。

【０５９８】

ｃ．ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている医薬組成物は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として調合されている。したがって、本開示は、（ｉ）本明細書に記載されているような化合物のような送達剤を含む脂質組成物と、（ｉｉ）バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを含むナノ粒子組成物も提供する。このようなナノ粒子組成物では、本明細書に開示されている脂質組成物は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを封入できる。

【０５９９】
ナノ粒子組成物は典型的には、マイクロメートル以下程度のサイズであり、脂質二重層を含むことができる。ナノ粒子組成物には、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム（例えば脂質ベシクル）及びリポプレックスが含まれる。例えば、ナノ粒子組成物は、直径が５００ｎｍ以下である、脂質二重層を有するリポソームであることができる。
【０６００】
ナノ粒子組成物としては例えば、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム及びリポプレックスが挙げられる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、脂質二重層を１つ以上含むベシクルである。ある特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、水性の区画によって隔てられた同心円状の二重層を２つ以上含む。脂質二重層は、互いに対して官能化及び／または架橋されていることができる。脂質二重層は、リガンド、タンパク質またはチャネルを１つ以上含むことができる。
【０６０１】
一実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン化可能な脂質、構造脂質、リン脂質及びｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、そのＬＮＰは、イオン化可能な脂質、ＰＥＧ修飾脂質、ステロール及び構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、そのＬＮＰは、イオン化可能な脂質のモル比が約２０～６０％であり、構造脂質が約５～２５％であり、ステロールが約２５～５５％であり、ＰＥＧ修飾脂質が約０．５～１５％である。
【０６０２】
いくつかの実施形態では、そのＬＮＰは、多分散性の値が０．４未満である。いくつかの実施形態では、そのＬＮＰは、中性ｐＨにおいて、実効電荷が中性である。いくつかの実施形態では、そのＬＮＰは、平均直径が５０～１５０ｎｍである。いくつかの実施形態では、そのＬＮＰは、平均直径が８０～１００ｎｍである。
【０６０３】
本明細書に概ね定義されているように、「脂質」という用語は、疎水性特性または両親媒性特性を有する小分子を指す。脂質は、天然または合成のものであってよい。脂質の種類の例としては、脂肪、ワックス、ステロール含有代謝産物、ビタミン、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロ脂質及びポリケチド、ならびにプレノール脂質が挙げられるが、これらに限らない。場合によっては、いくつかの脂質の両親媒性特性により、水性媒体内で、リポソーム、ベシクルまたは膜が形成される。
【０６０４】
いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、イオン化可能な脂質を含んでよい。本明細書で使用する場合、「イオン化可能な脂質」という用語は、当該技術分野におけるその通常の意味を有し、１つ以上の帯電部分を含む脂質を指してよい。いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、正に帯電していても、負に帯電していてもよい。イオン化可能な脂質は、正に帯電していてもよく、その場合には、「カチオン性脂質」と称することができる。ある特定の実施形態では、イオン化可能な脂質分子は、アミン基を含んでよく、「イオン化可能なアミノ脂質」と称することができる。本明細書で使用する場合、「帯電部分」は、形式電荷、例えば、一価（＋１または－１）、二価（＋２または－２）、三価（＋３または－３）などの電荷を持つ化学構造部分である。その帯電部分は、アニオン性である（すなわち、負に帯電している）か、カチオン性である（すなわち、正に帯電している）ことができる。正に帯電した部分の例としては、アミン基（例えば、１級アミン、２級アミン及び／または３級アミン）、アンモニウム基、ピリジニウム基、グアニジン基及びイミダゾリウム基が挙げられる。特定の実施形態では、その帯電部分は、アミン基を含む。負に帯電した基またはその前駆体の例としては、カルボキシレート基、スルホネート基、サルフェート基、ホスホネート基、リン酸基、ヒドロキシル基などが挙げられる。帯電部分の電荷は、場合によっては、環境条件によって変動することがあり、例えば、ｐＨの変化により、その部分の電荷が変化したり、及び／またはその部分が帯電したりもしくは帯電を解消したりすることがある。概ね、所望に応じて、その分子の電荷密度を選択してよい。

【０６０５】
「帯電した」または「帯電部分」という用語は、分子上の「部分負電荷」または「部分正電荷」を指さないことを理解されたい。「部分負電荷」及び「部分正電荷」には、当該技術分野におけるその通常の意味が与えられる。官能基が、極性を持つ結合を含み、電子密度が、その結合の原子の１つに引き寄せられて、その原子上に部分負電荷が作られるようなときに、「部分負電荷」が生じることができる。当業者は概ね、このようにして極性を持つことができる結合を認識するであろう。
【０６０６】
いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、イオン化可能なアミノ脂質であり、当該技術分野では、「イオン化可能なカチオン性脂質」と称する場合がある。一実施形態では、イオン化可能なアミノ脂質は、正に帯電した親水性頭部、及びリンカー構造によって連結されている疎水性尾部を有してよい。
【０６０７】
これらに加えて、イオン化可能な脂質は、環状アミン基を含む脂質であってもよい。
【０６０８】
一実施形態では、イオン化可能な脂質は、国際公開第２０１３０８６３５４号及び同第２０１３１１６１２６号（そのそれぞれの内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）に記載されているイオン化可能な脂質から選択してよいが、これらに限らない。
【０６０９】
さらに別の実施形態では、イオン化可能な脂質は、米国特許第７，４０４，９６９号の式ＣＬＩ～ＣＬＸＸＸＩＩ（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）から選択してよいが、これらに限らない。
【０６１０】
一実施形態では、その脂質は、国際公開第２０１２１７０８８９号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような切断可能な脂質であってもよい。一実施形態では、その脂質は、当該技術分野で知られている方法及び／または国際公開第２０１３０８６３５４号（そのそれぞれの内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）に記載されているような方法によって合成してよい。
【０６１１】
ナノ粒子組成物は、様々な方法によって特徴付けることができる。例えば、顕微鏡法（例えば、透過型電子顕微鏡法または走査型電子顕微鏡法）を用いて、ナノ粒子組成物の形態及びサイズ分布を調べることができる。動的光散乱または電位差法（例えば電位差滴定法）を用いて、ゼータ電位を測定できる。動的光散乱を用いて、粒度を求めることもできる。Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ、Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）のような計器を用いて、粒度、多分散性指数及びゼータ電位など、ナノ粒子組成物の複数の特徴を測定することもできる。
【０６１２】
ナノ粒子のサイズは、炎症（ただし、これに限らない）のような生体反応に歯止めをかけるのを助けることもできるし、または本発明のポリヌクレオチドの生体作用を高めることもできる。
【０６１３】
本明細書で使用する場合、ナノ粒子組成物との関連における「サイズ」または「平均サイズ」とは、ナノ粒子組成物の平均直径を指す。
【０６１４】
一実施形態では、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、直径が約１０～約１００ｎｍ（約１０～約２０ｎｍ、約１０～約３０ｎｍ、約１０～約４０ｎｍ、約１０～約５０ｎｍ、約１０～約６０ｎｍ、約１０～約７０ｎｍ、約１０～約８０ｎｍ、約１０～約９０ｎｍ、約２０～約３０ｎｍ、約２０～約４０ｎｍ、約２０～約５０ｎｍ、約２０～約６０ｎｍ、約２０～約７０ｎｍ、約２０～約８０ｎｍ、約２０～約９０

ｎｍ、約２０～約１００ｎｍ、約３０～約４０ｎｍ、約３０～約５０ｎｍ、約３０～約６０ｎｍ、約３０～約７０ｎｍ、約３０～約８０ｎｍ、約３０～約９０ｎｍ、約３０～約１００ｎｍ、約４０～約５０ｎｍ、約４０～約６０ｎｍ、約４０～約７０ｎｍ、約４０～約８０ｎｍ、約４０～約９０ｎｍ、約４０～約１００ｎｍ、約５０～約６０ｎｍ、約５０～約７０ｎｍ、約５０～約８０ｎｍ、約５０～約９０ｎｍ、約５０～約１００ｎｍ、約６０～約７０ｎｍ、約６０～約８０ｎｍ、約６０～約９０ｎｍ、約６０～約１００ｎｍ、約７０～約８０ｎｍ、約７０～約９０ｎｍ、約７０～約１００ｎｍ、約８０～約９０ｎｍ、約８０～約１００ｎｍ及び／または約９０～約１００ｎｍなどであるが、これらに限らない）である脂質ナノ粒子で調合する。

【０６１５】

一実施形態では、そのナノ粒子は、直径が約１０～５００ｎｍである。一実施形態では、そのナノ粒子は、直径が１００ｎｍ超、１５０ｎｍ超、２００ｎｍ超、２５０ｎｍ超、３００ｎｍ超、３５０ｎｍ超、４００ｎｍ超、４５０ｎｍ超、５００ｎｍ超、５５０ｎｍ超、６００ｎｍ超、６５０ｎｍ超、７００ｎｍ超、７５０ｎｍ超、８００ｎｍ超、８５０ｎｍ超、９００ｎｍ超、９５０ｎｍ超または１０００ｎｍ超である。

【０６１６】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の最大寸法は、１μｍ以下（例えば、１μｍ、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、１７５ｎｍ、１５０ｎｍ、１２５ｎｍ、１００ｎｍ、７５ｎｍまたは５０ｎｍ以下）である。

【０６１７】

ナノ粒子組成物は、比較的均一であることができる。多分散性指数を用いて、ナノ粒子組成物の均一性、例えば、ナノ粒子組成物の粒度分布を示すことができる。多分散性指数が低い（例えば０．３未満である）ことは概ね、粒度分布が狭いことを示す。ナノ粒子組成物は、多分散性指数が約０～約０．２５（０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４または０．２５など）であることができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子組成物の多分散性指数は、約０．１０～約０．２０であることができる。

【０６１８】

ナノ粒子組成物のゼータ電位を用いて、その組成物の界面動電位を示すことができる。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を表すことができる。電荷（正電荷または負電荷）が比較的小さいナノ粒子組成物が概ね望ましい。電荷が大きい種ほど、体内の細胞、組織及びその他の要素と、望ましくない形で相互作用することがあるからである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているナノ粒子組成物のゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋１５ｍＶまたは約＋５ｍＶ～約＋１０ｍＶであることができる。

【０６１９】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約０ｍＶ～約１００ｍＶ、約０ｍＶ～約９０ｍＶ、約０ｍＶ～約８０ｍＶ、約０ｍＶ～約７０ｍＶ、約０ｍＶ～約６０ｍＶ、約０ｍＶ～約５０ｍＶ、約０ｍＶ～約４０ｍＶ、約０ｍＶ～約３０ｍＶ、約０ｍＶ～約２０ｍＶ、約０ｍＶ～約１０ｍＶ、約１０ｍＶ～約１００ｍＶ、約１０ｍＶ～約９０ｍＶ、約１０ｍＶ～約８０ｍＶ、約１０ｍＶ～約７０ｍＶ、約１０ｍＶ～約６０ｍＶ、約１０ｍＶ～約５０ｍＶ、約１０ｍＶ～約４０ｍＶ、約１０ｍＶ～約３０ｍＶ、約１０ｍＶ～約２０ｍＶ、約２０ｍＶ～約１００ｍＶ、約２０ｍＶ～約９０ｍＶ、約２０ｍＶ～約８

０ｍＶ、約２０ｍＶ～約７０ｍＶ、約２０ｍＶ～約６０ｍＶ、約２０ｍＶ～約５０ｍＶ、約２０ｍＶ～約４０ｍＶ、約２０ｍＶ～約３０ｍＶ、約３０ｍＶ～約１００ｍＶ、約３０ｍＶ～約９０ｍＶ、約３０ｍＶ～約８０ｍＶ、約３０ｍＶ～約７０ｍＶ、約３０ｍＶ～約６０ｍＶ、約３０ｍＶ～約５０ｍＶ、約４０ｍＶ～約１００ｍＶ、約４０ｍＶ～約９０ｍＶ、約４０ｍＶ～約８０ｍＶ、約４０ｍＶ～約７０ｍＶ、約４０ｍＶ～約６０ｍＶ及び約４０ｍＶ～約５０ｍＶであることができる。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約１０ｍＶ～約５０ｍＶ、約１５ｍＶ～約４５ｍＶ、約２０ｍＶ～約４０ｍＶ及び約２５ｍＶ～約３５ｍＶであることができる。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約１０ｍＶ、約２０ｍＶ、約３０ｍＶ、約４０ｍＶ、約５０ｍＶ、約６０ｍＶ、約７０ｍＶ、約８０ｍＶ、約９０ｍＶ及び約１００ｍＶであることができる。

【０６２０】

ポリヌクレオチドの「封入効率」という用語は、調製後、ナノ粒子組成物によって封入されているポリヌクレオチドの量、またはナノ粒子組成物と別段に合わさっているポリヌクレオチドの量を、得られた初期量と比べたものを表す。本明細書で使用する場合、「封入」とは、完全、実質的または部分的に取り囲むか、閉じ込めるか、囲うかまたは包み込むことを指すことができる。

【０６２１】

封入効率が高い（例えば１００％近くである）ことが望ましい。封入効率は、例えば、ナノ粒子組成物を１つ以上の有機溶媒または洗浄剤で分解する前と分解した後に、ナノ粒子組成物を含む溶液中のポリヌクレオチドの量を比較することによって測定できる。

【０６２２】

蛍光を用いて、溶液中の遊離ポリヌクレオチドの量を測定できる。本明細書に記載されているナノ粒子組成物では、ポリヌクレオチドの封入効率は、少なくとも５０％、例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％であることができる。いくつかの実施形態では、その封入効率は、少なくとも８０％であることができる。ある特定の実施形態では、その封入効率は、少なくとも９０％であることができる。

【０６２３】

本明細書に開示されている医薬組成物に存在するポリヌクレオチドの量は、そのポリヌクレオチドのサイズ、所望の標的及び／または用途、あるいはナノ粒子組成物のその他の特性、ならびにそのポリヌクレオチドの特性のような多数の因子によって決定し得る。

【０６２４】

例えば、ナノ粒子組成物において有用なｍＲＮＡの量は、そのｍＲＮＡのサイズ（長さまたは分子量で表される）、配列及びその他の特徴によって決定し得る。ナノ粒子組成物内のポリヌクレオチドの相対量も変動し得る。

【０６２５】

本開示の脂質ナノ粒子組成物に存在する脂質組成物及びポリヌクレオチドの相対量は、有効性及び忍容性の考察に従って最適化できる。ｍＲＮＡをポリヌクレオチドとして含む組成物では、Ｎ：Ｐ比が、有用な測定基準として機能し得る。

【０６２６】

ナノ粒子組成物のＮ：Ｐ比によって、発現及び忍容性の両方が制御されるので、Ｎ：Ｐ比が低く、発現が強力であるナノ粒子組成物が望ましい。Ｎ：Ｐ比は、ナノ粒子組成物におけるＲＮＡに対する脂質の比率によって変動する。

【０６２７】

概ね、Ｎ：Ｐ比が低いほど好ましい。Ｎ：Ｐ比が約２：１～約３０：１（２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１２：１、１４：１、１６：１、１８：１、２０：１、２２：１、２４：１、２６：１、２８：１または３０：１など）になるように、１つ以上のＲＮＡ、脂質及びそれらの量を選択できる。ある特

定の実施形態では、そのＮ：Ｐ比は、約２：１～約８：１であることができる。別の実施形態では、Ｎ：Ｐ比は、約５：１～約８：１である。ある特定の実施形態では、Ｎ：Ｐ比は、５：１～６：１である。具体的な一態様では、Ｎ：Ｐ比は、約５．６７：１である。

【０６２８】

本開示は、ナノ粒子組成物を提供するのに加えて、脂質ナノ粒子の作製方法であって、ポリヌクレオチドを封入することを含む方法も提供する。このような方法は、本明細書に開示されている医薬組成物のいずれかを用いること、及び当該技術分野で知られている脂質ナノ粒子を作製する方法に従って、脂質ナノ粒子を作製することを含む。例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｗｉｔｈ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ”Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．８７：６８－８０、Ｓｉｌｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５）”Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ．Ｐａｒｔ Ｉ：Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｎｄ Ｍｉｃｒｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ”Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．１６：９４０－９５４、Ｎａｓｅｒｉ ｅｔ ａｌ．（２０１５）“Ｓｏｌｉｄ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｎｄ Ｎａｎｏｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ Ｌｉｐｉｄ Ｃａｒｒｉｅｒｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ”Ａｄｖ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．５：３０５－１３、Ｓｉｌｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５）”Ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ”Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：２９１－３０２及びこれらで引用されている参照文献を参照されたい。

【０６２９】

その他の送達剤

ａ．リポソーム、リポプレックス及び脂質ナノ粒子

いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、送達剤、例えば、リポソーム、リポプレックス、脂質ナノ粒子またはこれらをいずれかに組み合わせたものを含む。本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、リポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子を１つ以上用いて調合できる。リポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子を用いて、ポリヌクレオチドの誘導によるタンパク質産生の有効性を向上させることができる。これらの製剤は、そのポリヌクレオチドによる細胞へのトランスフェクションを増加させ、及び／またはコードされるタンパク質の翻訳を増加させることができるからである。リポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子を用いて、そのポリヌクレオチドの安定性を高めることもできる。

【０６３０】

リポソームは、人工的に調製されたベシクルであって、主に脂質二重層で構成させることができるとともに、医薬製剤の投与用の送達ビヒクルとして使用できるベシクルである。リポソームは、サイズが様々であることができる。多重膜ベシクル（ＭＬＶ）は、直径が数百ナノメートルであることができ、狭い水性区画によって隔てられた一連の同心円状の二重層を含むことができる。小型単層ベシクル（ＳＵＶ）は、直径が５０ｎｍ未満であることができ、大型単層ベシクル（ＬＵＶ）は、直径が５０～５００ｎｍであることができる。リポソームのデザインとしては、不健康な組織へのリポソームの結合を向上させるため、またはエンドサイトーシス（ただし、これに限らない）のようなイベントを活性化するためのオプソニンまたはリガンドを挙げることができるが、これらに限らない。リポソームは、医薬製剤の送達を向上させるために、ｐＨ値が低いこともできるし、または高いこともできる。

【０６３１】

リポソームの形成は、封入される医薬製剤及びリポソーム成分、脂質ベシクルが分散される媒体の性質、封入された物質の有効濃度及びその潜在的な毒性、そのベシクルの適用及び／または送達中に含まれるいずれかの追加プロセス、意図された用途用のベシクルの

最適なサイズ、多分散性及び貯蔵寿命、ならびに安全かつ効率的なリポソーム製品のバッチ間再現性及び生産規模拡大などによって決定し得る。

【０６３２】

非限定的な例として、合成膜ベシクルのようなリポソームは、米国特許出願公開第２０１３０１７７６３８号、同第２０１３０１７７６３７号、同第２０１３０１７７６３６号、同第２０１３０１７７６３５号、同第２０１３０１７７６３４号、同第２０１３０１７７６３３号、同第２０１３０１８３３７５号、同第２０１３０１８３３７３号及び同第２０１３０１８３３７２号に記載されている方法、装置及び器具によって調製できる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、例えば、国際公開第２０１２０３１０４６号、同第２０１２０３１０４３号、同第２０１２０３０９０１号、同第２０１２００６３７８及び同第２０１３０８６５２６号、ならびに米国特許出願公開第２０１３０１８９３５１号、同第２０１３０１９５９６９号及び同第２０１３０２０２６８４に記載されているように、リポソームに封入でき、及び／または後でリポソームに封入できる水性コアに含めることができる。各参照文献は、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【０６３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、カチオン性水中油型エマルジョンで調合でき、そのエマルジョン粒子は、オイルコアと、ポリヌクレオチドと相互作用して、その分子をエマルジョン粒子に固定できるカチオン性脂質とを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、親水性相が分散されている連続的な疎水性相を含む油中水型エマルジョンで調合できる。例示的なエマルジョンは、国際公開第２０１２００６３８０号及びＷＯ２０１０８７７９１号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている方法によって作製できる。

【０６３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、脂質－ポリカチオン複合体で調合できる。脂質－ポリカチオン複合体の形成は、例えば、米国特許出願公開第２０１２０１７８７０２号に記載されている方法によって行うことができる。非限定的な例として、そのポリカチオンは、国際公開第２０１２０１３３２６号または米国特許出願公開第２０１３０１４２８１８号に記載されているポリリシン、ポリオルニチン及び／またはポリアルギニン、ならびにカチオン性ペプチド（ただし、これらに限らない）のようなカチオン性ペプチドまたはポリペプチドを含むことができる。その参照文献のそれぞれは、参照により、全体が本明細書に援用される。

【０６３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、国際公開第２０１３１２３５２３号、同第２０１２１７０９３０号、同第２０１１１２７２５５号及び同第２００８１０３２７６号、ならびに米国特許出願公開第２０１３０１７１６４６号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）で調合できる。

【０６３６】

脂質ナノ粒子製剤は典型的には、脂質を１つ以上含む。いくつかの実施形態では、その脂質は、イオン化可能な脂質（例えばイオン化可能なアミノ脂質）であり、この脂質は、当該技術分野においては、「イオン化可能なカチオン性脂質」と称することもある。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、リン脂質、構造脂質、及び粒子の凝集を低減できる分子、例えば、ＰＥＧ脂質またはＰＥＧ修飾脂質を含むその他の成分をさらに含む。

【０６３７】

例示的なイオン化可能な脂質としては、本明細書に開示されている化合物１～３４２のいずれか１つ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｄ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ２－ＤＭＡ、ＤＬ

ｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ４－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｃ２Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＰ－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＤＬｉｎ－Ｃ－ＤＡＰ、ＤＬｉｎ－ＤＡＣ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＡＰ、ＤＬｉｎ－ＥＧ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－２－ＤＭＡＰ、ＫＬ１０、ＫＬ２２、ＫＬ２５、Ｏｃｔｙｌ－ＣＬｉｎＤＭＡ、Ｏｃｔｙｌ－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ）、Ｏｃｔｙｌ－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ）及びこれらをいずれかに組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。他の例示的なイオン化可能な脂質としては、（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）、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－９－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ５Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－８－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルドコサ－１３，１６－ジエン－５－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘニコサ－１２，１５－ジエン－４－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－６－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－７－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－１０－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－５－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－４－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－８－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－７－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－６－アミン、（２２Ｚ，２５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンタ－２２，２５－ジエン－１０－アミン、（２１Ｚ，２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリアコンタ－２１，２４－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコス－１７－エン－９－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－７－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサン－１０－アミン、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ－エチル－Ｎ－メチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－１－ノニルイコサ－１１，１４－ジエン－１－イル］ピロリジン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコス－２０－エン－１０－アミン、（１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエプタコス－１５－エン－１０－アミン、（１４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－１４－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－１７－エン－１０－アミン、（２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリトリアコント－２４－エン－１０－アミン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－２０－エン－１０－アミン、（２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコント－２２－エン－１０－アミン、（１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコス－１６－エン－８－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ノニルヘニコサ－１２，１５－ジエン－１－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］エプタデカン－８－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－ヘキシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘニコサン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘキサデカン－８－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ウンデシルシクロプロピル］テトラデカン－５－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－｛７－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘプチル｝ドデカン－１－アミン、１－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ヘプチルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタデカン－９－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－デシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタデカン－６－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［

（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ペンタデカン－８－アミン、Ｒ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、Ｓ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝ピロリジン、（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－［（５Ｚ）－オクト－５－エン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝アゼチジン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘプチルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（ノニルオキシ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ）－オクタデク－９－エン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（６Ｚ，９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－６，９，１２－トリエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（ペンチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－３－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン２－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン２－アミン、１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（９Ｚ）－ヘキサデク－９－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｈ（１－メチルオクチル）オキシ］－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－１－［（３，７－ジメチルオクチル）オキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（オクチルオキシ）－３－（｛８－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］オクチル｝オキシ）プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－｛［８－（２－オクチルシクロプロピル）オクチル］オキシ｝－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン及び（１１Ｅ，２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１１，２０，２－トリエン－１０－アミン、ならびにこれらをいずれかに組み合わせたものが挙げられる。

【０６３８】

リン脂質としては、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、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジン酸のようなグリセロリン脂質が挙げられるが、これらに限らない。リン脂質としては、スフィンゴミエリンのようなスフィンゴリン脂質も挙げられる。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＤＬＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＳＰＣ、ＤＵＰＣ、１８：０ジエーテルＰＣ、ＤＬｎＰＣ、ＤＡＰＣ、ＤＨＡＰＣ、ＤＯＰＥ、４ＭＥ１６：０ＰＥ、ＤＳＰＥ、ＤＬＰＥ、ＤＬｎＰＥ、ＤＡＰＥ、ＤＨＡＰＥ、ＤＯＰＧ及びこれら

をいずれかに組み合わせたものである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＭＰＰＣ、ＭＳＰＣ、ＰＭＰＣ、ＰＳＰＣ、ＳＭＰＣ、ＳＰＰＣ、ＤＨＡＰＥ、ＤＯＰＧ及びこれらをいずれかに組み合わせたものである。いくつかの実施形態では、脂質組成物中のリン脂質（例えばＤＳＰＣ）の量は、約１ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％の範囲である。

【０６３９】

本発明の構造脂質としては、ステロール、及びステロール部分を含む脂質が挙げられる。いくつかの実施形態では、構造脂質としては、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、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、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、α－トコフェロール及びこれらの混合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、構造脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態では、脂質組成物中の構造脂質（例えばコレステロール）の量は、約２０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％の範囲である。

【０６４０】

そのＰＥＧ修飾脂質としては、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－セラミドコンジュゲート（例えば、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ１４またはＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０）、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン及びＰＥＧ修飾１，２－ジアシルオキシプロパン－３－アミンが挙げられる。このような脂質は、ＰＥＧ化脂質ともいう。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ　ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣまたはＰＥＧ－ＤＳＰＥという脂質であることができる。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロールメトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）、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－［アミノ（ポリエチレングリコール）］（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）、ＰＥＧ－ジパルメトレイル、ＰＥＧ－ジオレイル、ＰＥＧ－ジステアリル、ＰＥＧ－ジアシルグリカミド（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＰＰＥ）またはＰＥＧ－１，２－ジミリスチルオキシプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ）である。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、サイズが約１０００ダルトン、約２０００ダルトン、約５０００ダルトン、約１０，０００ダルトン、約１５，０００ダルトンまたは約２０，０００ダルトンである。いくつかの実施形態では、脂質組成物中のＰＥＧ脂質の量は、約０ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％の範囲である。

【０６４１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているＬＮＰ製剤は、加えて、透過性増強分子を含むことができる。非限定的な透過性増強分子は、米国特許出願公開第２００５０２２２０６４号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【０６４２】

本発明のＬＮＰ製剤は、ホスフェートコンジュゲートをさらに含むことができる。そのホスフェートコンジュゲートは、ｉｎ　ｖｉｖｏでの循環時間を増やしたり、及び／またはナノ粒子の標的送達量を増やしたりできる。ホスフェートコンジュゲートは、例えば、国際公開第２０１３０３３４３８号または米国特許出願公開第２０１３０１９６９４８号に記載されている方法によって作製できる。本発明のＬＮＰ製剤は、例えば、米国特許出願公開第２０１３００５９３６０号、同第２０１３０１９６９４８号及び同第２０１３００７２７０９号に記載されているようなポリマーコンジュゲート（例えば水溶性コンジュゲート）も含むことができる。その参照文献のそれぞれは、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【０６４３】

本発明のＬＮＰ製剤は、対象において、本発明のナノ粒子の送達を増強するためのコンジュゲートを含むことができる。さらに、そのコンジュゲートは、対象において、そのナノ粒子が食細胞によって除去されるのを阻害できる。いくつかの実施形態では、そのコンジュゲートは、ヒト膜タンパク質ＣＤ４７から設計された「自己」ペプチド（例えば、Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０１３　３３９，９７１－９７５（

参照により、その全体が本明細書に援用される）によって記載されている「自己」粒子）であることができる。Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚらの文献に示されているように、その自己ペプチドは、マクロファージの媒介による、ナノ粒子の除去を遅らせ、それにより、そのナノ粒子の送達が増強された。

【０６４４】

本発明のＬＮＰ製剤は、糖鎖担体を含むことができる。非限定的な例として、糖鎖担体としては、無水物修飾フィトグリコーゲン型物質または無水物修飾グリコーゲン型物質、フィトグリコーゲンオクテニルサクシネート、フィトグリコーゲンβ－デキストリン、無水物修飾フィトグリコーゲンβ－デキストリン（例えば、国際公開第２０１２１０９１２１号（参照により、その全体が本明細書に援用される））を挙げることができるが、これらに限らない。

【０６４５】

本発明のＬＮＰ製剤は、その粒子の送達を向上させるために、界面活性剤またはポリマーでコーティングされていることができる。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、米国特許出願公開第２０１３０１８３２４４号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているようなＰＥＧコーティング及び／または表面電荷が中性のコーティング（ただし、これらに限らない）のような親水性コーティングでコーティングされていることができる。

【０６４６】

米国特許第８，２４１，６７０号または国際公開第２０１３１１００２８号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているように、その脂質ナノ粒子が、粘膜関門を透過できるように、本発明のＬＮＰ製剤は、粒子の表面特性を変化させるように操作されていることができる。

【０６４７】

膜を透過するように操作されたＬＮＰは、ポリマー材（すなわちポリマーコア）及び／またはポリマー－ビタミンコンジュゲート及び／またはトリブロックコポリマーを含むことができる。そのポリマー材としては、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を挙げることができるが、これらに限らない。

【０６４８】

膜を透過するように操作されたＬＮＰは、ポリヌクレオチド、アニオン性タンパク質（例えばウシ血清アルブミン）（ただし、これらに限らない）のような表面改質剤、界面活性剤（例えば、例えばジメチルジオクタデシル－アンモニウムブロミドのようなカチオン性界面活性剤）、糖または糖誘導体（例えばシクロデキストリン）、核酸、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレングリコール及びポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、Ｎ－アセチルシステイン、マグワート、ブロメライン、パパイン、クレロデンドラム、アセチルシステイン、ブロムヘキシン、カルボシステイン、エプラジノン、メスナ、アンブロキソール、ソブレロール、ドミオドール、レトステイン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、チモシンβ４、ドルナーゼアルファ、ネルテネキシン、エルドステイン）、ならびにｒｈＤＮａｓｅを含む各種ＤＮａｓｅｓも含むことができる。

【０６４９】

いくつかの実施形態では、粘液を透過するＬＮＰは、粘膜透過促進コーティングを含む低張性製剤であることができる。その製剤は、その製剤が送達される上皮に対して低張性であることができる。低張性製剤の非限定的な例は、例えば、国際公開第２０１３１１００２８号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に見ることができる。

【０６５０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、ＡＴＵＰＬＥＸＴＭシステム、ＤＡＣＣシステム、ＤＢＴＣシステム及びＳｉｌｅｎｃｅ　Ｔｈｅｒ

ａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｌｏｎｄｏｎ，Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ）のその他のｓｉＲＮＡ－リポプレックス技術、ＳＴＥＭＧＥＮＴ（登録商標）（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）のＳＴＥＭＦＥＣＴＴＭ、核酸の、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ベースまたはプロタミンベースの標的送達及び非標的送達（Ａｌｅｋｕ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００８ ６８：９７８８－９７９８、Ｓｔｒｕｍｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ２０１２ ５０：７６－７８、Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１２２２－１２３４、Ｓａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２００６ １３：１３６０－１３７０、Ｇｕｔｂｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｕｌｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１０ ２３：３３４－３４４、Ｋａｕｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ Ｒｅｓ ２０１０ ８０：２８６－２９３、Ｗｅｉｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９ ３２：４９８－５０７、Ｗｅｉｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８ ３１：１８０－１８８、Ｐａｓｃｏｌｏ Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．４：１２８５－１２９４、Ｆｏｔｉｎ－Ｍｌｅｃｚｅｋ ｅｔ ａｌ．，２０１１ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３４：１－１５、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５，２３：７０９－７１７、Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００７ ６；１０４：４０９５－４１００、ｄｅＦｏｕｇｅｒｏｌｌｅｓ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ １９：１２５－１３２（これらのいずれも、参照により、その全体が本明細書に援用される））（ただし、これらに限らない）のようなリポプレックスとして調合されている。

【０６５１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）として調合されており、そのＳＬＮは、平均直径が１０～１０００ｎｍの球状であることができる。ＳＬＮは、新油性分子を可溶化できるとともに、界面活性剤及び／または乳化剤によって安定化できる固体脂質コアマトリクスを有する。例示的なＳＬＮは、国際公開第２０１３１０５１０１号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているようなＳＬＮであることができる。

【０６５２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、制御放出及び／または標的送達用に調合できる。本明細書で使用する場合、「制御放出」とは、医薬組成物または化合物の放出特性のうち、治療成果をもたらすための特定の放出パターンに適合する放出特性を指す。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、制御放出及び／または標的送達用として、本明細書に記載されており、及び／または当該技術分野で知られている送達剤に封入できる。本明細書で使用する場合、「封入する」という用語は、取り囲むか、囲うかまたは包み込むことを意味する。本発明の化合物の製剤に関する場合には、封入は、実質的な封入、完全な封入または部分的な封入であることができる。「実質的に封入された」という用語は、本発明の医薬組成物または化合物の少なくとも５０％超、６０％超、７０％超、８０％超、８５％超、９０％超、９５％超、９６％超、９７％超、９８％超、９９％超または９９％％超をその送達剤内に取り囲むか、囲うかまたは包み込むことができることを意味する。「部分的な封入」とは、本発明の医薬組成物または化合物の１０未満、１０未満、２０未満、３０未満、４０未満、５０未満またはこれよりも少ない割合を、その送達剤内に取り囲むか、囲うかまたは包み込むことができることを意味する。

【０６５３】

有益なことに、封入度は、蛍光及び／または電子顕微鏡写真を用いて、本発明の医薬組成物または化合物の流出または活性を測定することによって求めることができる。例えば、本発明の医薬組成物または化合物の少なくとも１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．９％または９９％超が、送達剤に封入されている。

【０６５４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、治療用ナノ粒子に封入できる（本明細書では、「治療用ナノ粒子ポリヌクレオチド」という）。治療用ナノ粒子は、例えば、国際公開第２０１０００５７４０号、同第２０１００３０７６３号、同第２０１０００５７２１号、同第２０１０００５７２３号及び同第２０１２０５４９２３、米国特許出願公開第２０１１０２６２４９１号、同第２０１００１０４６４５号、同第２０１０００８７３３７号、同第２０１０００６８２８５号、同第２０１１０２７４７５９号、同第２０１０００６８２８６号、同第２０１２０２８８５４１号、同第２０１２０１４０７９０号、同第２０１３０１２３３５１号及び同第２０１３０２３０５６７、ならびに米国特許第８，２０６，７４７号、同第８，２９３，２７６号、同第８，３１８，２０８号及び同第８，３１８，２１１（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている方法によって調合できる。

【０６５５】

いくつかの実施形態では、治療用ナノ粒子ポリヌクレオチドは、徐放用に調合できる。本明細書で使用する場合、「徐放」とは、所定の期間にわたる放出速度に適合する医薬組成物または化合物を指す。その期間としては、数時間、数日、数週間、数カ月及び数年を挙げることができるが、これらに限らない。非限定的な例として、本明細書に記載されているポリヌクレオチドの徐放ナノ粒子は、国際公開第２０１００７５０７２号、ならびに米国特許出願公開第２０１００２１６８０４号、同第２０１１０２１７３７７号、同第２０１２０２０１８５９号及び同第２０１３０１５０２９５（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に開示されているようにして調合できる。

【０６５６】

いくつかの実施形態では、治療用ナノ粒子ポリヌクレオチドは、国際公開第２００８１２１９４９号、同第２０１０００５７２６号、同第２０１０００５７２５号、同第２０１１０８４５２１号及び同第２０１１０８４５１８号、ならびに米国特許出願公開第２０１０００６９４２６号、同第２０１２０００４２９３号及び同第２０１００１０４６５５号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている粒子のように、標的特異的であるように調合できる。

【０６５７】

本発明のＬＮＰは、マイクロ流体ミキサーまたはマイクロミキサーを用いて調製できる。例示的なマイクロ流体ミキサーとしては、スリットインターデジタルマイクロミキサー（Ｍｉｃｒｏｉｎｎｏｖａ（Ａｌｌｅｒｈｅｉｌｉｇｅｎ ｂｅｉ Ｗｉｌｄｏｎ，Ａｕｓｔｒｉａ）製のものが挙げられるが、これらに限らない）、及び／またはスタガーヘリンボーンマイクロミキサー（ＳＨＭ）（Ｚｈｉｇａｌｔｓｅｖｅｔ ａｌ．，“Ｂｏｔｔｏｍ－ｕｐ ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｌｉｍｉｔ ｓｉｚｅ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ ｓｙｓｔｅｍｓ ｗｉｔｈ ａｑｕｅｏｕｓ ａｎｄ ｔｒｉｇｌｙｃｅｒｉｄｅ ｃｏｒｅｓ ｕｓｉｎｇ ｍｉｌｌｉｓｅｃｏｎｄ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｍｉｘｉｎｇ”Ｌａｎｇｍｕｉｒ ２８：３６３３－４０（２０１２）、Ｂｅｌｌｉｖｅａｕ ｅｔ ａｌ．，”Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｈｉｇｈｌｙ ｐｏｔｅｎｔ ｌｉｍｉｔ－ｓｉｚｅ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｉｎ ｖｉｖｏ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｉＲＮＡ，”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．１：ｅ３７（２０１２）、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｒａｐｉｄ ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ｏｆ ｐｏｔｅｎｔ ｓｉＲＮＡ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｅｎａｂｌｅｄ ｂｙ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１３４（１６）：６９４８－５１（２０１２）（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）を挙げることができるが、これらに限らない。例示的なマイクロミキサーとしては、Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ｆｕｒ Ｍｉｋｒｏｔｅｃｈｎｉｋ Ｍａｉｎｚ ＧｍｂＨ（Ｍａｉｎｚ Ｇｅｒｍａｎｙ）のＳｌｉｔ Ｉｎｔｅｒｄｉｇｉｔａｌ Ｍｉｃｒｏｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ Ｍｉｘｅｒ（ＳＩＭＭ－Ｖ２）、Ｓｔａｎｄａｒｄ Ｓｌｉｔ Ｉｎｔｅ

ｒｄｉｇｉｔａｌ Ｍｉｃｒｏ Ｍｉｘｅｒ（ＳＳＩＭＭ）、Ｃａｔｅｒｐｉｌｌａｒ（ＣＰＭＭ）またはＩｍｐｉｎｇｉｎｇ－ｊｅｔ（ＩＪＭＭ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＳＨＭを用いてＬＮＰを作製する方法は、少なくとも２本の投入した流れを混合することをさらに含み、その混合は、微細構造の誘導によるカオス的移流（ＭＩＣＡ）によって行う。この方法に従って、流体流が、ヘリンボーンパターンで存在するチャネルの中を通り、旋回流が発生し、流体が互いに巻き合わさわる。この方法は、流体混合面も含むことができ、その面は、流体の循環中に配向を変化させる。ＳＨＭを用いてＬＮＰを作製する方法としては、米国特許出願公開第２００４０２６２２２３号及び同第２０１２０２７６２０９号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に開示されている方法が挙げられる。

【０６５８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、マイクロ流体技術を用いて、脂質ナノ粒子中に調合できる（Ｗｈｉｔｅｓｉｄｅｓ，Ｇｅｏｒｇｅ Ｍ．，“Ｔｈｅ Ｏｒｉｇｉｎｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｆｕｔｕｒｅ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ，”Ｎａｔｕｒｅ ４４２：３６８－３７３（２００６）及びＡｂｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．，”Ｃｈａｏｔｉｃ Ｍｉｘｅｒ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｃｈａｎｎｅｌｓ，”Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９５：６４７－６５１（２００２）（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓ（Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ）またはＤｏｌｏｍｉｔｅ Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ（Ｒｏｙｓｔｏｎ，ＵＫ）のマイクロミキサーチップ（ただし、これらに限らない）のようなマイクロミキサーチップを用いて、脂質ナノ粒子中に調合できる。マイクロミキサーチップは、分割して再度合流させる機構によって、２つ以上の流体流を迅速に混合するのに用いることができる。

【０６５９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、直径が約１ｎｍ～約１００ｎｍ（約１ｎｍ～約２０ｎｍ、約１ｎｍ～約３０ｎｍ、約１ｎｍ～約４０ｎｍ、約１ｎｍ～約５０ｎｍ、約１ｎｍ～約６０ｎｍ、約１ｎｍ～約７０ｎｍ、約１ｎｍ～約８０ｎｍ、約１ｎｍ～約９０ｎｍ、約５ｎｍ～約１００ｎｍ、約５ｎｍ～約１０ｎｍ、約５ｎｍ～約２０ｎｍ、約５ｎｍ～約３０ｎｍ、約５ｎｍ～約４０ｎｍ、約５ｎｍ～約５０ｎｍ、約５ｎｍ～約６０ｎｍ、約５ｎｍ～約７０ｎｍ、約５ｎｍ～約８０ｎｍ、約５ｎｍ～約９０ｎｍ、約１０～約２０ｎｍ、約１０～約３０ｎｍ、約１０～約４０ｎｍ、約１０～約５０ｎｍ、約１０～約６０ｎｍ、約１０～約７０ｎｍ、約１０～約８０ｎｍ、約１０～約９０ｎｍ、約２０～約３０ｎｍ、約２０～約４０ｎｍ、約２０～約５０ｎｍ、約２０～約６０ｎｍ、約２０～約７０ｎｍ、約２０～約８０ｎｍ、約２０～約９０ｎｍ、約２０～約１００ｎｍ、約３０～約４０ｎｍ、約３０～約５０ｎｍ、約３０～約６０ｎｍ、約３０～約７０ｎｍ、約３０～約８０ｎｍ、約３０～約９０ｎｍ、約３０～約１００ｎｍ、約４０～約５０ｎｍ、約４０～約６０ｎｍ、約４０～約７０ｎｍ、約４０～約８０ｎｍ、約４０～約９０ｎｍ、約４０～約１００ｎｍ、約５０～約６０ｎｍ、約５０～約７０ｎｍ、約５０～約８０ｎｍ、約５０～約９０ｎｍ、約５０～約１００ｎｍ、約６０～約７０ｎｍ、約６０～約８０ｎｍ、約６０～約９０ｎｍ、約６０～約１００ｎｍ、約７０～約８０ｎｍ、約７０～約９０ｎｍ、約７０～約１００ｎｍ、約８０～約９０ｎｍ、約８０～約１００ｎｍ及び／または約９０～約１００ｎｍなどであるが、これらに限らない）である脂質ナノ粒子中に調合できる。

【０６６０】

いくつかの実施形態では、その脂質ナノ粒子は、直径が約１０～５００ｎｍであることができる。一実施形態では、その脂質ナノ粒子は、直径が、１００ｎｍ超、１５０ｎｍ超、２００ｎｍ超、２５０ｎｍ超、３００ｎｍ超、３５０ｎｍ超、４００ｎｍ超、４５０ｎｍ超、５００ｎｍ超、５５０ｎｍ超、６００ｎｍ超、６５０ｎｍ超、７００ｎｍ超、７５０ｎｍ超、８００ｎｍ超、８５０ｎｍ超、９００ｎｍ超、９５０ｎｍ超または１０００ｎｍ超であることができる。

【０６６１】
いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、小さめのＬＮＰを用いて送達できる。このような粒子は、直径が０．１μｍ未満～１００ｎｍ以下（０．１μｍ未満、１．０μｍ未満、５μｍ未満、１０μｍ未満、１５ｕｍ未満、２０ｕｍ未満、２５ｕｍ未満、３０ｕｍ未満、３５ｕｍ未満、４０ｕｍ未満、５０ｕｍ未満、５５ｕｍ未満、６０ｕｍ未満、６５ｕｍ未満、７０ｕｍ未満、７５ｕｍ未満、８０ｕｍ未満、８５ｕｍ未満、９０ｕｍ未満、９５ｕｍ未満、１００ｕｍ未満、１２５ｕｍ未満、１５０ｕｍ未満、１７５ｕｍ未満、２００ｕｍ未満、２２５ｕｍ未満、２５０ｕｍ未満、２７５ｕｍ未満、３００ｕｍ未満、３２５ｕｍ未満、３５０ｕｍ未満、３７５ｕｍ未満、４００ｕｍ未満、４２５ｕｍ未満、４５０ｕｍ未満、４７５ｕｍ未満、５００ｕｍ未満、５２５ｕｍ未満、５５０ｕｍ未満、５７５ｕｍ未満、６００ｕｍ未満、６２５ｕｍ未満、６５０ｕｍ未満、６７５ｕｍ未満、７００ｕｍ未満、７２５ｕｍ未満、７５０ｕｍ未満、７７５ｕｍ未満、８００ｕｍ未満、８２５ｕｍ未満、８５０ｕｍ未満、８７５ｕｍ未満、９００ｕｍ未満、９２５ｕｍ未満、９５０ｕｍ未満または９７５ｕｍ未満などであるが、これらに限らない）であることができる。

【０６６２】
本明細書に記載されているナノ粒子及びマイクロ粒子は、幾何学的に操作して、マクロファージ応答及び／または免疫応答を調節できる。幾何学的に操作された粒子は、肺送達（ただし、これに限らない）のような標的送達用に、本明細書に記載されているポリヌクレオチドを組み込むために、様々な形状、サイズ及び／または表面変化を有することができる（例えば、国際公開第２０１３０８２１１１号（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。幾何学的に操作された粒子の他の物理的特色としては、穿孔、傾斜したアーム、非対称性及び表面粗さ、細胞と組織との相互作用を変化させることができる電荷を挙げることができるが、これらに限らない。

【０６６３】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているナノ粒子は、米国特許出願公開第２０１３０１７２４０６号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているもの（ただし、それらに限らない）のようなステルスナノ粒子または標的特異的なステルスナノ粒子である。そのステルスナノ粒子または標的特異的なステルスナノ粒子は、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリアンハイドライド、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリエステル、ポリアンハイドライド、ポリエーテル、ポリウレタン、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリシアノアクリレートまたはこれらを組み合わせたもの（ただし、これらに限らない）のようなポリマーを２つ以上含むことができるポリマーマトリックスを含むことができる。

【０６６４】
ｂ．リピドイド
いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、送達剤、例えばリピドイドを含む。本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、リピドイドとともに調合できる。複合体、ミセル、リポソームまたは粒子は、これらのリピドイドを含むように調製できるので、局所投与経路及び／または全身投与経路によって、リピドイド製剤を注射した後、コードされたタンパク質の産生によって判断する場合に、ポリヌクレオチドの有効な送達が実現される。ポリヌクレオチドのリピドイド複合体は、静脈内経路、筋肉内経路または皮下経路（ただし、これらに限らない）を含む様々な手段によって投与できる。

【０６６５】
リピドイドの合成は、文献に記載されている（Ｍａｈｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏ

ｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．２０１０　２１：１４４８－１４５４、Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ　ｅｔａｌ．，Ｊ　Ｉｎｔｅｒｎ　Ｍｅｄ．２０１０　２６７：９－２１、Ａｋｉｎｃ　ｅｔａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８　２６：５６１－５６９、Ｌｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０１０　１０７：１８６４－１８６９、Ｓｉｅｇｗａｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０１１　１０８：１２９９６－３００１（いずれも、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０６６６】

ペンタ［３－（１－ラウリルアミノプロピオニル）］－トリエチレンテトラミン塩酸塩（ＴＥＴＡ－５ＬＡＰ（９８Ｎ１２－５としても知られる）、Ｍｕｒｕｇａｉａｈ　ｅｔａｌ．，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４０１：６１（２０１０）を参照されたい）、Ｃ１２－２００（誘導体及びバリアントを含む）、ならびにＭＤ１（ただし、これらに限らない）を含む様々なリピドイドによる製剤において、ｉｎ　ｖｉｖｏ活性を試験できる。リピドイド「９８Ｎ１２－５」は、Ａｋｉｎｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．２００９　１７：８７２－８７９によって開示されている。リピドイド「Ｃ１２－２００」は、Ｌｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０１０　１０７：１８６４－１８６９及びＬｉｕ　ａｎｄ　Ｈｕａｎｇ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ．２０１０　６６９－６７０によって開示されている。その参照文献のそれぞれは、参照により、全体が本明細書に援用される。

【０６６７】

一実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、アミノアルコールリピドイドで調合できるアミノアルコールリピドイドは、米国特許第８，４５０，２９８号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている方法によって調製できる。

【０６６８】

そのリピドイド製剤は、ポリヌクレオチドに加えて、成分を３つもしくは４つのいずれか、またはそれ以上含む粒子を含むことができる。リピドイド、及びリピドイドを含むポリヌクレオチド製剤は、国際公開第２０１５０５１２１４号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【０６６９】

ｃ．ヒアルロニダーゼ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）及び注射（例えば、筋肉内注射または皮下注射）用のヒアルロニダーゼ。ヒアルロニダーゼは、間質バリアの構成物質であるヒアルロナンの加水分解を触媒する。ヒアルロニダーゼは、ヒアルロナンの粘度を低下させることによって、組織透過性を向上させる（Ｆｒｏｓｔ，Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．（２００７）４：４２７－４４０）。あるいは、ヒアルロニダーゼを用いて、筋肉内投与または皮下投与されたポリヌクレオチドに暴露される細胞の数を増やすことができる。

【０６７０】

ｄ．ナノ粒子模倣体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、ナノ粒子模倣体に封入及び／または吸収されている。ナノ粒子模倣体は、病原体、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン及び細胞（ただし、これらに限らない）のような生物または粒子の送達機能を模することができる。非限定的な例として、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、ウイルスの送達機能を模することができる非ビリオン粒子に封入することができる（例えば、国際公開第２０１２００６３７６号、ならびに米国特許出願公開第２０１３０１７１２４１号及び同第２０１３０１９５９６８号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０６７１】
ｅ．自己組織化ナノ粒子または自己組織化巨大分子
いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）を、送達のために、自己組織化ナノ粒子または両親媒性巨大分子（ＡＭ）中に含む。ＡＭは、ポリ（エチレングリコール）に共有結合したアルキル化糖骨格を有する生体適合性両親媒性ポリマーを含む。ＡＭは、水溶液中で自己組織化して、ミセルを形成する。核酸自己組織化ナノ粒子は、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０２７０７７号に記載されており、ＡＭ及びＡＭの形成方法は、米国特許出願公開第２０１３０２１７７５３号に記載されている（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）。

【０６７２】
ｆ．カチオン及びアニオン
いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）と、Ｚｎ２＋、Ｃａ２＋、Ｃｕ２＋、Ｍｇ２＋及びこれらを組み合わせたもののようなカチオンまたはアニオンを含む。例示的な製剤は、例えば、米国特許第６，２６５，３８９号及び同第６，５５５，５２５号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているように、金属カチオンと錯体を形成したポリマー及びポリヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、カチオン性ナノ粒子は、二価カチオン及び一価カチオンを組み合わせたものを含むことができる。カチオン性ナノ粒子中、またはカチオン性ナノ粒子を含む１つ以上のデポー中のポリヌクレオチドを送達すると、長時間作用するデポーとして機能し、及び／またはヌクレアーゼによる分解の速度を低下させることによって、ポリヌクレオチドのバイオアベイラビリティを高めることができる。

【０６７３】
ｇ．アミノ酸脂質
いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）のうち、アミノ酸脂質とともに調合されているポリヌクレオチドを含む。アミノ酸脂質は、アミノ酸残基と、１つ以上の新油性尾部とを含む新油性化合物である。アミノ酸脂質及びアミノ酸脂質の作成方法の非限定的な例は、米国特許第８，５０１，８２４号に記載されている。アミノ酸脂質製剤は、ポリヌクレオチドと結合して放出するアミノ酸脂質を含む放出可能な形態で、ポリヌクレオチドを送達できる。非限定的な例として、本明細書に記載されているポリヌクレオチドの放出は、例えば、米国特許第７，０９８，０３２号、同第６，８９７，１９６号、同第６，４２６，０８６号、同第７，１３８，３８２号、同第５，５６３，２５０号及び同第５，５０５，９３１（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような酸不安定リンカーによって実現できる。

【０６７４】
ｈ．高分子電解質相互複合体
いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）を高分子電解質相互複合体中に含む。高分子電解質相互複合体は、電荷が動的なポリマーを、１つ以上のアニオン性分子と複合体化すると形成される。電荷が動的なポリマーと高分子電解質相互複合体、及び高分子電解質相互複合体の作製方法の非限定的な例は、米国特許第８，５２４，３６８号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【０６７５】
ｉ．結晶性ポリマーシステム

いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）を結晶性ポリマーシステム中に含む。結晶性ポリマーシステムは、結晶性部分及び／または結晶性部分を含む末端単位を有するポリマーである。例示的なポリマーは、米国特許第８，５２４，２５９号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【０６７６】

ｊ．ポリマー、生分解性ナノ粒子及びコア－シェルナノ粒子

いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）、ならびに天然及び／または合成のポリマーを含む。そのポリマーとしては、ポリエテン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（ｌ－リシン）（ＰＬＬ）、ＰＬＬにグラフトしたＰＥＧ、カチオン性リポポリマー、生分解性カチオン性リポポリマー、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、架橋分岐鎖ポリ（アルキレンイミン）、ポリアミン誘導体、修飾ポロキサマー、弾性生分解性ポリマー、生分解性コポリマー、生分解性ポリエステルコポリマー、生分解性ポリエステルコポリマー、マルチブロックコポリマー、ポリ［α－（４－アミノブチル）－Ｌ－グリコール酸）（ＰＡＧＡ）、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマー、ポリカーボネート、ポリアンハイドライド、ポリヒドロキシ酸、ポリプロピルフマレート、ポリカプロラクトン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリ尿素、ポリスチレン、ポリアミン、ポリリシン、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（Ｌ－ラクチド－コ－Ｌ－リシン）、ポリ（４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリンエステル）、アミン含有ポリマー、デキストランポリマー、デキストランポリマー誘導体またはこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。

【０６７７】

例示的なポリマーとしては、ＤＹＮＡＭＩＣ ＰＯＬＹＣＯＮＪＵＧＡＴＥ（登録商標）（Ａｒｒｏｗｈｅａｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐ．，Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ）、ＭＩＲＵＳ（登録商標）Ｂｉｏ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）及びＲｏｃｈｅ Ｍａｄｉｓｏｎ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）の製剤、ＳＭＡＲＴＴ ＰＯＬＹＭＥＲ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ（商標）（ＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標）Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）（これらに限らない）のようなＰＨＡＳＥＲＸＴＭポリマー製剤、ＤＭＲＩ／ＤＯＰＥ、ポロキサマー、Ｖｉｃａｌ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）のＶＡＸＦＥＣＴＩＮ（登録商標）アジュバント、キトサン、Ｃａｌａｎｄｏ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ）のシクロデキストリン、デンドリマー及びポリ（乳酸－コ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）ポリマー、ＲＯＮＤＥＬＴＭ（ＲＮＡｉ／Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ）ポリマー（Ａｒｒｏｗｈｅａｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｐａｓａｄｅｎａ，ＣＡ）、及びＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標）（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）のようなｐＨ応答性コブロックポリマーが挙げられる。

【０６７８】

そのポリマー製剤により、（例えば、筋肉内注射または皮下注射後の）ポリヌクレオチドの徐放または遅延放出が可能になる。ポリヌクレオチドの放出プロファイルの変更により、例えば、コードされるタンパク質が、長期間にわたって翻訳されるようにできる。ポリマー製剤を用いて、ポリヌクレオチドの安定性を高めることもできる。徐放製剤としては、ＰＬＧＡマイクロスフェア、エチレン酢酸ビニル（ＥＶＡｃ）、ポロキサマー、ＧＥＬＳＩＴＥ（登録商標）（Ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．Ａｌａｃｈｕａ，ＦＬ）、ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）（Ｈａｌｏｚｙｍｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ）、フィブリノゲンポリマー（Ｅｔｈｉｃｏｎ Ｉｎｃ．Ｃｏｒｎｅｌｉａ，ＧＡ）のような外科用シーラント、ＴＩＳＳＥＬＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）、ＰＥＧ

ベースのシーラント及びＣＯＳＥＡＬ（登録商標）（Ｂａｘｔｅｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）を挙げることができるが、これらに限らない。

【０６７９】

非限定的な例として、放出速度を（例えば、数日及び数週間に）調節可能なＰＬＧＡマイクロスフェアを調合し、封入プロセス中に、改変ｍＲＮＡの一体性を維持したままで、改変ｍＲＮＡをそのＰＬＧＡマイクロスフェア中に封入することによって、改変ｍＲＮＡをＰＬＧＡマイクロスフェア中に調合できる。ＥＶＡｃは、臨床前の徐放インプラント用途（例えば、緑内障用の眼挿入剤ピロカルピンの徐放製品Ｏｃｕｓｅｒ、またはプロゲステロン徐放用の子宮内避妊器具プロゲスタサート、経皮送達システムＴｅｓｔｏｄｅｒｍ、Ｄｕｒａｇｅｓｉｃ及びＳｅｌｅｇｉｌｉｎｅ、カテーテル）において広範に用いられている非生分解性の生体適合性ポリマーである。ポロキサマーＦ－４０７ＮＦは、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレン－ポリオキシエチレンからなる親水性非イオン性界面活性剤トリブロックコポリマーであって、５℃未満の温度における粘度が低いポリマーであり、１５℃超の温度において、固体ゲルを形成する。

【０６８０】

非限定的な例として、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、米国特許第６，１７７，２７４号に記載されているように、ＰＬＬとグラフトされたＰＥＧのポリマー化合物とともに調合できる。別の非限定的な例として、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、ＰＬＧＡ－ＰＥＧブロックコポリマー（例えば、米国特許出願公開第２０１２０００４２９３号、ならびに米国特許第８，２３６，３３０号及び同第８，２４６，９６８号を参照されたい）、またはＰＬＧＡ－ＰＥＧ－ＰＬＧＡブロックコポリマー（例えば、米国特許第６，００４，５７３号を参照されたい）のようなブロックコポリマーとともに調合することができる。その参照文献のそれぞれは、参照により、その全体が本明細書に援用される。

【０６８１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、ポリリシン、ポリエチレンイミン、ポリ（アミドアミン）デンドリマー、ポリ（アミン－コ－エステル）またはこれらを組み合わせたもの（ただし、これらに限らない）のような少なくとも１つのアミン含有ポリマーとともに調合できる。例示的なポリアミンポリマー、及びそれらを送達剤として使用することは、例えば、米国特許第８，４６０，６９６号、同第８，２３６，２８０号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【０６８２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、例えば、米国特許第６，６９６，０３８号、同第６，５１７，８６９号、同第６，２６７，９８７号、同第６，２１７，９１２号、同第６，６５２，８８６号、同第８，０５７，８２１号及び同第８，４４４，９９２号、米国特許出願公開第２００３００７３６１９号、同第２００４０１４２４７４号、同第２０１０００００４３１５号、同第２０１２００９１４５号及び同第２０１３０１９５９２０、ならびに国際公開第２００６０６３２４９号及び同第２０１３０８６３２２号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているような生分解性カチオン性リポポリマー、生分解性ポリマー、生分解性コポリマー、生分解性ポリエステルコポリマー、生分解性ポリエステルポリマー、直鎖状生分解性コポリマー、ＰＡＧＡ、生分解性架橋カチオン性マルチブロックコポリマーまたはこれらを組み合わせたものにおいて調合できる。

【０６８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第２０１３０１８４４５３号に記載されているような少なくとも１つのシクロデキストリンポリマー中で、またはそのシクロデキストリンポリマーとともに調合できる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、国際公開第２０

１３１０６０７２号、同第２０１３１０６０７３号及び同第２０１３１０６０８６に記載されているような少なくとも１つの架橋カチオン結合ポリマー中で、またはその架橋カチオン結合ポリマーとともに調合できる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、米国特許出願公開第２０１３０２３１２８７号に記載されているような少なくともＰＥＧ化アルブミンポリマー中で、またはそのＰＥＧ化アルブミンポリマーともに調合できる。その参照文献のそれぞれは、参照により、全体が本明細書に援用される。

【０６８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているポリヌクレオチドは、ポリマー、脂質及び／または、リン酸カルシウム（これに限らない）のようなその他の生分解性物質を組み合わせたものを用いて、ナノ粒子として調合できる。成分は、コア－シェル構造、ハイブリッド構造及び／または多層構造で組み合わせて、送達に合わせて、ナノ粒子を微調整可能にできる（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍａｔｅｒ．２００６ ５：７９１－７９６、Ｆｕｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２００８ ２９：１５２６－１５３２、ＤｅＫｏｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．２０１１ ６３：７４８－７６１、Ｅｎｄｒｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２０１１ ３２：７７２１－７７３１、Ｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２０１１ Ｊｕｎ ６；８（３）：７７４－８７（参照により、その全体が本明細書に援用される））。非限定的な例として、ナノ粒子は、親水性－疎水性ポリマー（例えばＰＥＧ－ＰＬＧＡ）、疎水性ポリマー（例えばＰＥＧ）及び／または親水性ポリマー（国際公開第２０１２０２２５１２９号（参照により、その全体が本明細書に援用される））（ただし、これらに限らない）のような複数のポリマーを含むことができる。

【０６８５】

加えて、コア－シェルナノ粒子の使用では、ハイスループットなアプローチに焦点を当てて、カチオン性架橋ナノゲルコア及び各種シェルを合成する（Ｓｉｅｇｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１１ １０８：１２９９６－１３００１（参照により、その全体が本明細書に援用される））。ポリマーナノ粒子の複合体化、送達及びインターナリゼーションは、そのナノ粒子のコア成分及びシェル成分の両方の化学組成を変更することによって、精密に制御できる。例えば、コア－シェルナノ粒子は、そのナノ粒子にコレステロールを共有結合した後には、ｓｉＲＮＡをマウス肝細胞に効率的に送達できる。

【０６８６】

いくつかの実施形態では、ＰＬＧＡの中間層と、ＰＥＧを含む中性脂質の外層とを含む中空脂質コアを用いて、本明細書に記載されているようなポリヌクレオチドを送達できる。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書に開示されているポリヌクレオチドのコアと、そのコア内のポリヌクレオチドを保護する目的で使用されるポリマーシェルを含むことができる。そのポリマーシェルは、本明細書に記載されているポリマーのいずれかであることができ、当該技術分野で知られている。そのポリマーシェルを用いて、コア内のポリヌクレオチドを保護できる。

【０６８７】

本明細書に記載されているポリヌクレオチドとともに用いるコア－シェルナノ粒子は、米国特許第８，３１３，７７７号または国際公開第２０１３１２４８６７号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【０６８８】

ｋ．ペプチド及びタンパク質

いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）であって、そのポリヌクレオチドによる細胞へのトランスフェクションを増加させるため、及び／または（例えば、所定の種類の組織もしくは細胞を標的とすることによって）そのポリヌクレオチドの生体内分布を変更するため、及び／また

はコードされるタンパク質の翻訳を増加させるために、ペプチド及び／またはタンパク質（例えば、国際公開第２０１２１１０６３６号及び同第２０１３１２３２９８号）とともに調合されているポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、そのペプチドは、米国特許出願公開第２０１３０１２９７２６号、同第２０１３０１３７６４４号及び同第２０１３０１６４２１９号に記載されているペプチドであることができる。その参照文献のそれぞれは、参照により、全体が本明細書に援用される。

【０６８９】

ｌ．コンジュゲート

いくつかの実施形態では、本開示の組成物または製剤は、本明細書に記載されているポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）であって、担体もしくは標的化基に共有結合されているか、またはコンジュゲートとして、融合タンパク質（例えば、標的化基及び治療用タンパク質またはペプチドを有するタンパク質）を一緒に産生させる２つのコード領域を含むポリヌクレオチドを含む。そのコンジュゲートは、組織または生物内のニューロンに、ナノ粒子を選択的に誘導するか、または血液脳関門の通過を助けるペプチドであることができる。

【０６９０】

そのコンジュゲートは、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）もしくはグロブリン）、糖鎖（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンもしくはヒアルロン酸）、または脂質のような天然の物質を含む。そのリガンドは、合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えばアプタマー）など、組み換え分子であることも、または合成分子であることもできる。ポリアミノ酸の例としては、ポリリシン（ＰＬＬ）、ポリＬ－アスパラギン酸、ポリＬ－グルタミン酸、スチレン－無水マレイン酸コポリマー、ポリ（Ｌ－ラクチド－コ－グリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル－無水マレイン酸コポリマー、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（ＨＭＰＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリウレタン、ポリ（２－エチルアクリル酸）、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドポリマーまたはポリホスファジンが挙げられる。ポリアミンの例としては、ポリエチレンイミン、ポリリシン（ＰＬＬ）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド－ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの４級塩またはαヘリックスペプチドが挙げられる。

【０６９１】

いくつかの実施形態では、そのコンジュゲートは、本明細書に開示されているポリヌクレオチドの担体として機能できる。そのコンジュゲートは、ポリアミン、ポリリシン、ポリアルキレンイミン、及びポリ（エチレングリコール）にグラフトできるポリエチレンイミン（ただし、これらに限らない）のようなカチオン性ポリマーを含むことができる。例示的なコンジュゲート及びその調製は、米国特許第６，５８６，５２４号及び米国特許出願公開第２０１３０２１１２４９号（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されている。

【０６９２】

そのコンジュゲートは、標的化基、例えば、細胞標的化剤または組織標的化剤、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば、腎臓細胞のような所定の種類の細胞に結合する抗体も含むことができる。標的化基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質Ａ、ムチン糖鎖、多価ラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、糖化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンＢ１２、ビオチン、ＲＧＤペプチド、ＲＧＤペプチド模倣体またはアプタマーであることができる。

【０６９３】
標的化基は、タンパク質、例えば、糖タンパク質またはペプチド、例えば、補助リガンドに対する特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば、内皮細胞もしくは骨細胞のような所定の種類の細胞に結合する抗体であることができる。標的化基は、ホルモン及びホルモン受容体も含むことができる。標的化基は、脂質、レクチン、糖鎖、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン、多価マンノース、多価フコースまたはアプタマーのような非ペプチド種も含むことができる。そのリガンドは、例えば、リポ多糖またはｐ３８ＭＡＰキナーゼのアクチベーターであることができる。

【０６９４】
標的化基は、所定の受容体を標的とすることができるいずれかのリガンドであることができる。例としては、葉酸、ＧａｌＮＡｃ、ガラクトース、マンノース、マンノース－６Ｐ、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、ＰＳＭＡ、エンドセリン、ＧＣＰＩＩ、ソマトスタチン、ＬＤＬリガンド及びＨＤＬリガンドが挙げられるが、これらに限らない。特定の実施形態では、標的化基は、アプタマーである。そのアプタマーは、無修飾であることもできるし、または本明細書に開示されている修飾をいずれかに組み合わせたものを有することもできる。非限定的な例として、標的化基は、例えば、米国特許出願公開第２０１３０２１６６１０１２号（参照により、その全体が本明細書に援用される）に記載されているように、血液－中枢神経系関門を通過して標的送達させるためのグルタチオン受容体（ＧＲ）結合コンジュゲートであることができる。

【０６９５】
いくつかの実施形態では、そのコンジュゲートは、相乗的な生体分子－ポリマーコンジュゲートであることができ、治療効果を増大させるように、長期間作用する連続放出システムを含む。相乗的な生体分子－ポリマーコンジュゲートは、米国特許出願公開第２０１３０１９５７９９号に記載されているコンジュケートであることができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、国際公開第２０１２０４０５２４号に記載されているようなアプタマーコンジュゲートであることができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、米国特許第８，５０７，６５３号に記載されているようなアミン含有ポリマーコンジュゲートであることができる。その参照文献のそれぞれは、参照により、全体が本明細書に援用される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ＳＭＡＲＴＴ　ＰＯＬＹＭＥＲ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ（登録商標）（ＰＨＡＳＥＲＸ（登録商標），Ｉｎｃ．Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）にコンジュゲートできる。

【０６９６】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、細胞透過ポリペプチドに、共有結合によってコンジュゲートされており、そのポリペプチドは、シグナル配列またはターゲティング配列も含むことができる。そのコンジュゲートは、安定性が向上し、及び／または細胞へのトランスフェクションが増加し、及び／または生体内分布が変更されるように（例えば、所定の種類の組織または細胞に導かれるように）設計できる。

【０６９７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているポリヌクレオチドは、送達を増強するための物質にコンジュゲートできる。いくつかの実施形態では、その物質は、国際公開第２０１１０６２９６５号に記載されているように、標的化ブロックを有する標的化モノマーまたは標的化ポリマーのようなモノマーまたはポリマーであることができる。いくつかの実施形態では、その物質は、例えば、米国特許第６，８３５．３９３号及び同第７，３７４，７７８号に記載されているように、ポリヌクレオチドに共有結合によってカップリングされた輸送剤であることができる。いくつかの実施形態では、その物質は、米国特許第７，７３７，１０８号及び同第８，００３，１２９号に記載されているような膜障壁輸送増強剤であることができる。その参照文献のそれぞれは、参照により、全体が本明

細書に援用される。

【０６９８】

使用方法

本明細書に記載されているポリヌクレオチド、医薬組成物及び製剤は、ＰＡＨに関連する疾患、障害または状態を治療及び／または予防するために、調製、製造及び治療的用途で使用する。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、組成物及び製剤を使用して、高フェニルアラニン血症を治療及び／または予防する。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、組成物及び製剤を使用して、フェニルケトン尿症を治療及び／または予防する。

【０６９９】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物及び製剤は、それを必要とする対象において、フェニルアラニンのレベルを低下させる方法で使用する。例えば、本発明の一態様は、対象におけるＰＫＵの症状を緩和する方法であって、バリアントＰＡＨをコードするポリヌクレオチド（例えば、ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡ）を含む組成物または製剤を、その対象に投与することを含む方法を提供する。

【０７００】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物及び製剤は、フェニルアラニンのレベルを低下させるために使用し、その方法は、対象に、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有効量投与することを含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤を投与すると、フェニルアラニンのレベルが、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤の投与から短期間で（例えば、約６時間以内、約８時間以内、約１２時間以内、約１６時間以内、約２０時間以内または約２４時間以内に）、１，２００μＭ未満（例えば、１００μＭ、１２５μＭ、１５０μＭ、１７５μＭ、２００μＭ、２２５μＭ、２５０μＭ、２７５μＭ、３００μＭ、３２５μＭ、３５０μＭ、３７５μＭ、４００μＭ、４２５μＭ、４５０μＭ、４７５μＭ、５００μＭ、５２５μＭ、５５０μＭ、５７５μＭ、６００μＭ、６２５μＭ、６５０μＭ、６７５μＭ、７００μＭ、７２５μＭ、７５０μＭ、７７５μＭ、８００μＭ、８２５μＭ、８５０μＭ、８７５μＭ、９００μＭ、９２５μＭ、９５０μＭ、９７５μＭ、１０００μＭ、１０２５μＭ、１０５０μＭ、１０７５μＭ、１１００μＭ、１１２５μＭ、１１５０μＭ、１１７５μＭ）まで低下する。

【０７０１】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤を有効量投与すると、ＰＫＵのバイオマーカーのレベルが低下する。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤を投与すると、ＰＫＵのバイオマーカーの１つ以上のレベルが、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤の投与から短期間で（例えば、約６時間以内、約８時間以内、約１２時間以内、約１６時間以内、約２０時間以内または約２４時間以内に）低下する。

【０７０２】

置換療法は、ＰＫＵの潜在的な治療法である。すなわち、本発明の特定の態様では、本明細書に開示されているポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡは、ＰＫＵに対する遺伝子置換療法での使用に適するバリアントＰＡＨポリペプチドをコードする配列を１つ以上含む。いくつかの実施形態では、本開示は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡを対象に供給することによって、対象における、ＰＡＨもしくはＰＡＨ活性の欠損、またはＰＡＨ活性の低下もしくは異常を治療する。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、配列が最適化されている。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ）は、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードする核酸配列（例えばＯＲＦ）を含み、その核酸は、例えば、そのＧ／Ｃ、ウリジンもしくはチミジンの含有量を改変することによって、配列が最適化されており、及び／またはそのポリヌクレオチドは、化学修飾ヌクレオシドを少なくとも１つ含む。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、ｍｉＲＮＡ－１

４２と結合するｍｉＲＮＡ結合部位、及び／またはｍｉＲＮＡ－１２６と結合するｍｉＲＮＡ結合部位を含む。

【０７０３】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤を含む組成物または製剤を対象に投与すると、血液／血漿中のフェニルアラニンが、その組成物または製剤の投与前に観察されたレベルよりも、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％低いレベルまで減少する。

【０７０４】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤を投与すると、その対象の細胞内で、ＰＡＨが発現する。いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤を投与すると、その対象において、ＰＡＨの発現及び／または酵素活性が増大する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含む組成物または製剤を対象に投与する方法で使用し、その方法により、対象の少なくともいくつかの細胞で、ＰＡＨの発現及び／または酵素活性が増大する。

【０７０５】

いくつかの実施形態では、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードするｍＲＮＡの組成物または製剤を対象に投与すると、対象の細胞内でのＰＡＨの発現及び／または酵素活性が、正常な対象、例えば、ＰＫＵを罹患していないヒトにおいて予測される発現レベル及び／または活性レベルの少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％以上のレベルまで増大する。

【０７０６】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物または製剤を投与すると、対象の細胞の少なくともいくつかにおいて、バリアントＰＡＨタンパク質が発現し、その発現は、有意なフェニルアラニン代謝が行われるようにするのに十分な期間、持続する。

【０７０７】

いくつかの実施形態では、そのコードされるポリペプチドの発現が増加する。いくつかの実施形態では、そのポリヌクレオチドは、細胞に導入すると、それらの細胞内でのＰＡＨの発現レベル及び／または酵素活性レベルを、例えば、そのポリペプチドの細胞への導入前の細胞におけるＰＡＨの発現レベル及び／または酵素活性レベルと比べて、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％上昇させる。

【０７０８】

いくつかの実施形態では、その方法または用途は、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１または配列番号１２のバリアントＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡを投与することを含む。いくつかの実施形態では、その方法または用途は、ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡであって、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番

号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０または配列番号３１の群から選択したポリヌクレオチドとの配列類似性を有するポリヌクレオチドを投与することを含み、そのポリヌクレオチドは、バリアントＰＡＨポリペプチドをコードする。

【０７０９】

本開示の他の態様は、ポリヌクレオチドを含む細胞を哺乳動物対象に移植することに関するものである。哺乳動物対象への細胞の投与は、当業者に知られており、その投与としては、局所移植（例えば、局所投与もしくは皮下投与）、器官への送達、または全身への注入（例えば、静脈内注射もしくは吸入）、及び薬学的に許容される担体中の細胞の製剤が挙げられるが、これらに限らない。

【０７１０】

いくつかの実施形態では、本発明の方法で使用するポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ）、医薬組成物及び製剤は、本明細書に開示されているＰＡＨポリペプチドをコードするウラシル改変配列と、本明細書に開示されているｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、ｍｉＲ－１４２に結合するｍｉＲＮＡ結合部位、及び／またはｍｉＲ－１２６に結合するｍｉＲＮＡ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、ＰＡＨポリペプチドをコードするウラシル改変配列は、化学修飾核酸塩基、例えば、Ｎ１－メチルシュードウラシルまたは５－メトキシウラシルを少なくとも１つ含む。いくつかの実施形態では、本発明のＰＡＨポリペプチドをコードするウラシル改変配列内の、ある種類の核酸塩基（例えばウラシル）の少なくとも９５％が、修飾核酸塩基である。いくつかの実施形態では、ＰＡＨポリペプチドをコードするウラシル改変配列内のウラシルの少なくとも９５％は、１－Ｎ－メチルシュードウリジンまたは５－メトキシウリジンである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されているポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、例えば式（Ｉ）を有する化合物、例えば化合物１～２３２のいずれか、例えば化合物ＩＩ、式（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）もしくは（ＶＩ）を有する化合物、例えば化合物２３３～３４２のいずれか、例えば化合物ＶＩ、または式（ＶＩＩＩ）を有する化合物、例えば化合物４１９～４２８のいずれか、例えば化合物Ｉ、あるいはこれらをいずれかに組み合わせたものを含む送達剤とともに調合されている。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約４７．５：１０．５：３９．０：３．０または約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば、化合物ＩＩもしくはＶＩ（または関連する適切なアミノ脂質）約３０～約６０ｍｏｌ％（例えば、化合物ＩＩもしくはＶＩ（または関連する適切なアミノ脂質）３０～４０ｍｏｌ％、４０～４５ｍｏｌ％、４５～５０ｍｏｌ％、５０～５５ｍｏｌ％または５５～６０ｍｏｌ％）、リン脂質（または関連する適切なリン脂質もしくは「ヘルパー脂質」）約５～約２０ｍｏｌ％（例えば、リン脂質（または関連する適切なリン脂質もしくは「ヘルパー脂質」）５～１０ｍｏｌ％、１０～１５ｍｏｌ％または１５～２０ｍｏｌ％）、コレステロール（または関連するステロールもしくは「非カチオン性」脂質）約２０～約５０ｍｏｌ％（例えば、コレステロール（または関連するステロールもしくは「非カチオン性」脂質）約２０～３０ｍｏｌ％、３０～３５ｍｏｌ％、３５～４０ｍｏｌ％、４０～４５ｍｏｌ％または４５～５０ｍｏｌ％）、及びＰＥＧ脂質（またはその他の適切なＰＥＧ脂質）約０．０５～約１０ｍｏｌ％（例えば、ＰＥＧ脂質（またはその他の適切なＰＥＧ脂質）０．０５～１ｍｏｌ％、１～２ｍｏｌ％、２～３ｍｏｌ％、３～４ｍｏｌ％、４～５ｍｏｌ％、５～７ｍｏｌ％または７～１０ｍｏｌ％）という範囲のモル比で含む。例示的な送達剤は、モル比が、例えば、４７．５：１０．５：３９．０：３．０または５０：１０：３８．５：１．５であることができる。特定の場合では、例示的な送達剤は、モル比が、例えば、４７．５：１０．５：３９．０：３、４７．５：１０：３９．５：３、４７．５：１１：３９．５：２、４７．５：１０．５：３９．５：２．５、４７．５：１１：３９：２．５、４８．５：１０：３８．５：３、４８．５：１０．５：３９：２、４８．５：１０．５：３８．５：２．５、４８．５：１０．５：３９．５：１．５、４８．５：１０．５：３８．０：３、４７：１０．５：３９

．５：３、４７：１０：４０．５：２．５、４７：１１：４０：２、４７：１０．５：３９．５：３、４８：１０．５：３８．５：３、４８：１０：３９．５：２．５、４８：１１：３９：２または４８：１０．５：３８．５：３であることができる。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩまたはＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば、約４７．５：１０．５：３９．０：３．０のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩまたはＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば、約４７．５：１０．５：３９．０：３．０または約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で含む。

【０７１１】

本発明の薬物または治療の治療的効果は、対象（例えば、臨床前試験の対象（齧歯類動物、霊長類動物など）または臨床の対象（ヒト）から採取した単一または複数の試料において、コードされるタンパク質（例えば酵素）の発現のレベルを測定することによって、特徴付けるかまたは判断することができることは当業者には明らかであろう。同様に、本発明の薬物または治療の治療的効果は、対象（例えば、臨床前試験の対象（齧歯類動物、霊長類動物など）または臨床の対象（ヒト）から採取した単一または複数の試料において、コードされるタンパク質（例えば酵素）の活性のレベルを測定することによって、特徴付けるかまたは判断することができる。さらに、本発明の薬物または治療の治療的効果は、対象から採取した試料（複数可）において、適切なバイオマーカーのレベルを測定することによって、特徴付けるかまたは判断することができる。タンパク質及び／またはバイオマーカーのレベルは、本発明のｍＲＮＡ治療剤の１回用量による投与後に判断することもできるし、１回用量による投与後、複数回の時点に判断及び／またはモニタリングすることもできるし、あるいは、治療過程、例えば、複数回投与による治療の全体にわたって、判断及び／またはモニタリングすることもできる。

【０７１２】

ＰＫＵには、フェニルアラニンをチロシンに変換する能力の低下が伴う。したがって、ＰＫＵ患者では一般に、その血液中に高レベルのフェニルアラニンが見られる。

【０７１３】

ＰＫＵは、フェニルアラニンをチロシンに変換できないことによって特徴付けられる常染色体劣性先天性アミノ酸代謝異常である。したがって、ＰＫＵ患者は、その障害の無症状キャリアであることもあるし、またはその疾患と関連する様々な症状を呈することもある。ＰＫＵ患者では一般に、その血漿、血清、尿及び／または組織（例えば肝臓）において、高レベルのフェニルケトン（フェニルアラニン代謝が損なわれているときに、代替経路によって産生される）が見られる。別段の定めのない限り、本明細書に開示されている、ＰＫＵ患者またはヒト対象の治療方法には、無症状キャリア及びバイオマーカーレベルが異常な個体の両方の治療が含まれる

【０７１４】

ＰＡＨタンパク質発現レベル

本発明の特定の態様は、対象、例えば、動物（例えば、齧歯類動物、霊長類動物など）またはヒト対象におけるフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（ＰＡＨ）タンパク質の発現レベル（単数または複数）の測定、判定及び／またはモニタリングを特徴とする。動物としては、正常な動物、健常な動物または野生動物、ならびにＰＫＵの把握及びその治療の際に用いられる動物モデルが挙げられる。例示的な動物モデルとしては、齧歯類動物モデル、例えばＰＡＨ欠損マウス（ＰＡＨマウスともいう）が挙げられる。

【０７１５】

ＰＡＨタンパク質発現レベルは、当該技術分野で認識されているいずれかの方法であって、生体試料、例えば、血液試料または針生検標本に由来する試料中のタンパク質レベルを求めるための方法によって測定または判定できる。「レベル」または「タンパク質のレベル」という用語は、本明細書で使用する場合、好ましくは、試料または対象におけるタンパク質の重量、質量または濃度を意味する。特定の実施形態では、その試料に対して、例えば、精製、沈殿、分離、例えば、遠心分離及び／またはＨＰＬＣのいずれかを行った

後に、例えば、質量分析及び／または分光分析を用いて、タンパク質のレベルを求めてよいことを当業者は理解するであろう。例示的な実施形態では、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）を用いて、タンパク質発現レベルを求めることができる。別の例示的な実施形態では、本発明に従って、タンパク質のレベルを求める手段として、タンパク質の精製、分離及びＬＣ－ＭＳを用いることができる。いくつかの実施形態では、本発明のｍＲＮＡ療法剤（例えば１回静脈内用量）により、対象の肝臓組織でのＰＡＨタンパク質発現レベルが、ｍＲＮＡ療法剤の１回用量を投与後、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも４８時間、少なくとも６０時間、少なくとも７２時間、少なくとも８４時間、少なくとも９６時間、少なくとも１０８時間、少なくとも１２２時間、上昇する（例えば、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍上昇し、及び／または正常レベルの少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％もしくは少なくとも１００％まで上昇する）。いくつかの実施形態では、本発明のｍＲＮＡ療法剤（例えば１回静脈内用量）により、対象の血液、血漿または肝臓組織でのフェニルアラニン発現レベルが、１回用量のｍＲＮＡ療法剤を投与後、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも４８時間、少なくとも６０時間、少なくとも７２時間、少なくとも８４時間、少なくとも９６時間、少なくとも１０８時間、少なくとも１２２時間、（例えば、１００μＭ未満、１２５μＭ未満、１５０μＭ未満、１７５μＭ未満、２００μＭ未満、２２５μＭ未満、２５０μＭ未満、２７５μＭ未満、３００μＭ未満、３２５μＭ未満、３５０μＭ未満、３７５μＭ未満、４００μＭ未満、４２５μＭ未満、４５０μＭ未満、４７５μＭ未満、５００μＭ未満、５２５μＭ未満、５５０μＭ未満、５７５μＭ未満、６００μＭ未満、６２５μＭ未満、６５０μＭ未満、６７５μＭ未満、７００μＭ未満、７２５μＭ未満、７５０μＭ未満、７７５μＭ未満、８００μＭ未満、８２５μＭ未満、８５０μＭ未満、８７５μＭ未満、９００μＭ未満、９２５μＭ未満、９５０μＭ未満、９７５μＭ未満、１０００μＭ未満、１０２５μＭ未満、１０５０μＭ未満、１０７５μＭ未満、１１００μＭ未満、１１２５μＭ未満、１１５０μＭ未満、１１７５μＭ未満または１，２００μＭ未満）低下する。

【０７１６】

ＰＡＨタンパク質活性

ＰＫＵ患者では、ＰＡＨ酵素の活性が、正常な生理活性レベルと比べて低下する。本発明のさらなる態様は、対象、例えば、動物（例えば、齧歯類動物、霊長類動物など）またはヒト対象において、ＰＡＨタンパク質の活性レベル（複数可）（すなわち、酵素活性レベル（複数可））を測定、判定及び／またはモニタリングすることを特徴とする。活性レベルは、当該技術分野で認識されているいずれかの方法であって、生体試料における酵素活性レベルを求めるための方法によって測定または判定できる。「活性レベル」または「酵素活性レベル」という用語は、本明細書で使用する場合、好ましくは、試料または試料内の全タンパク質の体積当たり、質量当たりまたは重量当たりの酵素活性を意味する。例示的な実施形態では、「活性レベル」または「酵素活性レベル」は、流体（例えば体液、例えば、血清、血漿、尿など）１ミリリットル当たりの単位で記載されているか、または組織の重量当たりもしくは試料内のタンパク質（例えば全タンパク質）の重量当たりの単位で記載されている。酵素活性の単位（「Ｕ」）は、単位時間当たりに加水分解された基質の重量または質量で記載できる。本発明の特定の実施形態は、Ｕ／血漿１ｍｌまたはＵ／タンパク質（組織）１ｍｇで記載されているＰＡＨ活性を特徴とし、その単位（「Ｕ」）は、１時間当たりに加水分解された基質のｎｍｏｌ（すなわちｎｍｏｌ／時）で記載されている。

【０７１７】

ある特定の実施形態では、本発明のｍＲＮＡ療法は、投与してから６～１２時間後、１２～２４時間後、２４～４８時間後または４８～７２時間後（例えば、投与してから４８時間後または７２時間後）に、組織（例えば肝臓）内のＰＡＨ活性を少なくとも５Ｕ／ｍ

ｇ、少なくとも１０Ｕ／ｍｇ、少なくとも２０Ｕ／ｍｇ、少なくとも３０Ｕ／ｍｇ、少なくとも４０Ｕ／ｍｇ、少なくとも５０Ｕ／ｍｇ、少なくとも６０Ｕ／ｍｇ、少なくとも７０Ｕ／ｍｇ、少なくとも８０Ｕ／ｍｇ、少なくとも９０Ｕ／ｍｇ、少なくとも１００Ｕ／ｍｇまたは少なくとも１５０Ｕ／ｍｇとするのに有効な用量のｍＲＮＡを含む医薬組成物を特徴とする。

【０７１８】

例示的な実施形態では、本発明のｍＲＮＡ療法は、上記の活性レベルをもたらす１回静脈内用量のｍＲＮＡを含む医薬組成物を特徴とする。別の実施形態では、本発明のｍＲＮＡ療法は、１単位の静脈内用量が複数回分のｍＲＮＡであって、上記の活性レベルを維持させるｍＲＮＡを投与できる医薬組成物を特徴とする。

【０７１９】

ＰＡＨバイオマーカー

本発明のさらなる態様は、試料中で判定されるバイオマーカーのレベル（単一または複数）を、例えば、同じ患者、別の患者、コントロール及び／または同じ時点もしくは異なる時点の別の試料中の同じバイオマーカーまたは別のバイオマーカーのレベル（例えば参照レベル）、及び／または生理的レベル及び／または上昇レベル及び／または超生理学的レベル及び／またはコントロールのレベルと比較して判定することを特徴とする。当業者は、バイオマーカーの生理的レベル、例えば、正常な動物もしくは野生動物、正常もしくは健常な対象などにおけるレベル、特には、機能が健常及び／または正常である対象に特徴的なレベル（単数または複数）に精通しているであろう。本明細書で使用する場合、「上昇レベル」という語句は、正常もしくは野生の前臨床動物、または正常もしくは健常な対象、例えばヒト対象で通常見られる量を超える量を意味する。本明細書で使用する場合、「超生理的」という用語は、正常もしくは野生の前臨床動物、または正常もしくは健常な対象、例えばヒト対象で通常見られる量を超える量、任意に、生理応答を有意に増強する量を意味する。本明細書で使用する場合、「比較すること」または「～と比較して」という用語は好ましくは、例えばバイオマーカー（複数可）のレベルの、２つ以上の値の数学的な比較を意味する。したがって、そのような値の少なくとも２つを互いに比較した場合に、一方の値が、別の値または値の群に対して、高いか、低いか、または同一であるかは、当業者には容易に分かるであろう。比較することまたは～と比較することは、例えば、コントロール値との比較、例えば、投与前の前記対象（例えば、ＰＫＵを罹患している患者）または正常もしくは健常な対象の血液、血清、血漿及び／または組織（例えば肝臓）での参照フェニルアラニンレベルとの比較に関するものであることができる。比較することまたは～と比較することは、例えば、コントロール値との比較、例えば、投与前の前記対象（例えば、ＰＫＵを罹患している患者）または正常もしくは健常な対象の血液、血清、血漿及び／または組織（例えば肝臓）での参照Ｐｈｅレベルとの比較に関するものであることもできる。

【０７２０】

本明細書で使用する場合、「コントロール」は好ましくは、対象から得た試料であって、前記対象のＰＫＵの状態が既知である試料である。一実施形態では、コントロールは、健常な患者の試料である。別の実施形態では、そのコントロールは、ＰＫＵの状態が既知である少なくとも１人の対象、例えば、ＰＫＵの状態が重篤、軽度または良好である対象、例えばコントロール患者から得た試料である。別の実施形態では、そのコントロールは、ＰＫＵの治療を受けていない対象から得た試料である。さらなる実施形態では、コントロールは、１人の対象から得た試料、または異なる対象から得た試料のプール、及び／または様々な時点に対象（複数可）から採取した試料である。

【０７２１】

「レベル」または「バイオマーカーのレベル」という用語は、本明細書で使用する場合、好ましくは、試料または対象における、本発明のバイオマーカーの質量、重量または濃度を意味する。特定の実施形態では、その試料に対して、例えば、物質の精製、沈殿、分離、例えば、遠心分離及び／またはＨＰＬＣの１つ以上を行った後に、例えば、質量分析

及び／または分光分析を用いて、バイオマーカーのレベルを求めてよいことを当業者は理解するであろう。ある特定の実施形態では、本発明に従って、バイオマーカーのレベルを求める手段として、ＬＣ－ＭＳを用いることができる。

【０７２２】

バイオマーカーの「レベルを求めること」という用語は、本明細書で使用する場合、対象から得た試料、例えば、対象から得た体液（例えば、血清、血漿、尿、リンパなど）または対象の組織（例えば肝臓など）における少なくとも１つの物質の量を定量することを含む方法を意味することができる。

【０７２３】

「参照レベル」という用語は、本明細書で使用する場合、本発明のｍＲＮＡ療法剤を投与する前の対象（例えば、ＰＫＵを罹患している患者）、または正常もしくは健常な対象における（例えばバイオマーカーの）レベルを指すことができる。

【０７２４】

本明細書で使用する場合、「正常な対象」または「健常な対象」という用語は、ＰＫＵと関連する症状を呈していない対象を指す。さらに、対象は、ＰＡＨ遺伝子の機能的な部分もしくはドメインの変異がない場合、及び／またはＰＡＨ遺伝子の変異がない場合（これらの変異により、酵素ＰＡＨまたはその活性が低減または欠損することで、ＰＫＵと関連する症状が現れる）に、正常（または健常）とみなすことになる。対象から得た試料において、このようなＰＡＨ変異について遺伝子検査をすると、前記変異が検出されることになる。本発明の特定の実施形態では、健常な対象から得た試料をコントロール試料として使用するか、または健常な対象もしくは正常な対象の試料から得たバイオマーカーのレベルについて、既知の値もしくは標準化された値をコントロールとして使用する。

【０７２５】

いくつかの実施形態では、ＰＫＵの治療の必要な対象、またはＰＫＵの治療を受けている対象から得た試料中のバイオマーカーのレベルを、バイオマーカーのコントロールレベルと比較することは、対象（ＰＫＵの治療の必要な対象またはＰＫＵの治療を受けている対象）から得た試料中のバイオマーカーのレベルを、ベースラインレベルまたは参照レベルと比較することを含み、対象（ＰＫＵの治療の必要な対象またはＰＫＵの治療を受けている対象）から得た試料中のバイオマーカーのレベルが、ベースラインレベルまたは参照レベルと比べて上昇しているか、向上しているかまたは高い場合には、その対象が、ＰＫＵを罹患しており、及び／または治療が必要であることを指し、及び／または対象（ＰＫＵの治療の必要な対象またはＰＫＵの治療を受けている対象）から得た試料中のバイオマーカーのレベルが、ベースラインレベルと比べて低下しているかまたは低い場合には、その対象は、ＰＫＵを罹患していないか、ＰＫＵの治療がうまくいっているか、またはＰＫＵの治療の必要がないことを示す。特定の期間内、例えば、６時間以内、１２時間以内、２４時間以内、３６時間以内、４８時間以内、６０時間以内もしくは７２時間以内において、及び／または特定の持続期間、例えば、４８時間、７２時間、９６時間、１２０時間、１４４時間、１週間、２週間、３週間、４週間、１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月、７カ月、８カ月、９カ月、１０カ月、１１カ月、１２カ月、１８カ月、２４カ月などにわたって、バイオマーカーのレベルが低下する幅が大きいほど（例えば、少なくとも２分の１、少なくとも３分の１、少なくとも４分の１、少なくとも５分の１、少なくとも６分の１、少なくとも７分の１、少なくとも８分の１、少なくとも１０分の１、少なくとも２０分の１、少なくとも３０分の１、少なくとも４０分の１、少なくとも５０分の１に低下、及び／または少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％もしくは少なくとも１００％低下）、例えば本発明のｍＲＮＡ療法剤（例えば、１回用量または複数回レジメン）のような療法剤の成果が大きい。

【０７２６】

特に、投与から１日以内、２日以内、３日以内、４日以内、５日以内、６日または６日を超える期間以内のうちに、対象における体液（例えば、血漿、血清、尿、例えば尿沈渣

）または組織（複数可）（例えば肝臓）中のバイオマーカーのレベルが少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％または少なくとも１００％以上低下したことは、ＰＫＵの治療を成功させるの適した用量を示し、その低下は、本明細書で使用する場合、好ましくは、所定の期間の最後（例えば、例えば１回静脈内用量の投与後）に求めたバイオマーカーレベルを、前記期間の最初（例えば、前記用量の投与前）に求めた同じバイオマーカーのレベルと比較することを意味する。例示的な期間としては、投与から１２時間後、２４時間後、４８時間後、７２時間後、９６時間後、１２０時間後または１４４時間後、特には、投与から２４時間後、４８時間後、７２時間後または９６時間が挙げられる。

【０７２７】

基質レベル（例えばバイオマーカー）の低下の持続は特に、ｍＲＮＡ療法剤の用量及び／または投与レジメンが、ＰＫＵの治療を成功させるものであることを示している。このような低下の持続は、本明細書では、作用の「持続時間」ということができる。例示的な実施形態では、特に、対象における体液（例えば、血漿、血清、尿、例えば尿沈渣）または組織（複数可）（例えば肝臓）中のバイオマーカーレベルが、投与から１日以内、２日以内、３日以内、４日以内、５日以内、６日以内、７日以内、８日以内または８日を超える期間以内に、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％または少なくとも約１００％以上低下したことは、治療アプローチがうまくいっていることを示す。例示的な実施形態では、１つ以上の試料（例えば体液及び／または組織）中の基質（例えばバイオマーカー）レベルの低下が持続されるのが好ましい。例えば、バイオマーカーの減少を持続させるｍＲＮＡ療法は、任意に、少なくとも１個の組織、好ましくは、２個、３個、４個または５個以上の組織中の前記バイオマーカーの減少の持続と組み合わせて、治療がうまくいっていることを示す。

【０７２８】

いくつかの実施形態では、本発明のｍＲＮＡ療法剤の１回用量は、約０．２～約０．８ｍｐｋ、約０．３～約０．７ｍｐｋ、約０．４～約０．８ｍｐｋまたは約０．５ｍｐｋである。別の実施形態では、本発明のｍＲＮＡ療法剤の１回用量は、１．５ｍｐｋ未満、１．２５ｍｐｋ未満、１ｍｐｋ未満または０．７５ｍｐｋ未満である。

【０７２９】

使用するための組成物及び製剤

本発明の特定の態様は、上に開示されているポリヌクレオチドのいずれかを含む組成物または製剤に対するものである。

【０７３０】

いくつかの実施形態では、その組成物または製剤は、

（ｉ）バリアントＰＡＨポリペプチドをコードする配列最適化ヌクレオチド配列（例えばＯＲＦ）を含むポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）であって、そのポリヌクレオチドが、少なくとも１つの化学修飾核酸塩基、例えば、Ｎ１－メチルシュードウラシルまたは５－メトキシウラシルを含み（例えば、ウラシルの少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％または１００％が、Ｎ１－メチルシュードウラシルまたは５－メトキシウラシルである）、そのポリヌクレオチドが、ｍｉＲＮＡ結合部位、例えば、ｍｉＲ－１４２に結合するｍｉＲＮＡ結合部位（例えば、ｍｉＲ－１４２－３ｐ結合部位もしくはｍｉＲ－１４２－５ｐ結合部位）及び／またはｍｉＲ－１２６に結合するｍｉＲＮＡ結合部位（例えば、ｍｉＲ－１２６－３ｐ結合部位もしくはｍｉＲ－１２６－５ｐ結合部位）をさらに含むポリヌクレオチドと、

（ｉｉ）例えば式（Ｉ）を有する化合物、例えば化合物１～２３２のいずれか、例えば化合物ＩＩ、式（ＩＩＩ）、（ＩＶ）、（Ｖ）もしくは（ＶＩ）を有する化合物、例えば化合物２３３～３４２のいずれか、例えば化合物ＶＩ、式（ＶＩＩＩ）を有する化合物、例えば化合物４１９～４２８のいずれか、例えば化合物Ｉ、またはこれらをいずれかに組み合わせたものを含む送達剤を含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩ、化合物ＶＩ、それらの塩もしくは立体異性体、またはこれらをいずれかに組み合わせたものを含む脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約５０：１０：３８．５：１．５のモル比でを含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＩＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約４７．５：１０．５：３９．０：３．０のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で含む。いくつかの実施形態では、その送達剤は、化合物ＶＩ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及び化合物ＩまたはＰＥＧ－ＤＭＧを、例えば約４７．５：１０．５：３９．０：３．０のモル比で含む。

【０７３１】

いくつかの実施形態では、ＰＡＨポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の最小ウラシル含有量または最小チミン含有量の理論値に対する、ＯＲＦのウラシル含有量またはチミン含有量（％ＵＴＭまたは％ＴＴＭ）は、約１００％～約１５０％である。

【０７３２】

いくつかの実施形態では、上記のポリヌクレオチド、組成物または製剤を用いて、ＰＡＨに関連する疾患、障害または状態、例えばＰＫＵを治療及び／または予防する。

【０７３３】

投与形態

上に記載されている本発明のポリヌクレオチド、医薬組成物及び製剤は、治療上有効な転帰をもたらすいずれかの経路によって投与できる。これらの経路としては、経腸経路（腸内）、胃腸内経路、硬膜外経路（硬膜内）、経口経路（口腔経由）、経皮経路、硬膜周囲経路、大脳内経路（大脳中）、脳室内経路（脳室中）、経皮経路（皮膚への塗布）、皮内経路（皮膚自体の中）、皮下経路（皮膚の下）、経鼻投与経路（鼻経由）、静脈内経路（静脈中）、静脈内ボーラス経路、静脈内点滴経路、動脈内経路（動脈中）、筋肉内経路（筋肉中）、心臓内経路（心臓中）、骨内注入経路（骨髄中）、髄腔内経路（脊椎管中）、腹腔内経路（腹膜中への注入もしくは注射）、膀胱内注入経路、硝子体内経路（眼経由）、海綿体内注射経路（病的腔中）、腔内経路（陰茎部中）、膣内投与経路、子宮内経路、羊膜外投与経路、経皮経路（全身分布のために、無傷の皮膚を介して拡散）、経粘膜経路（粘膜を介して拡散）、経膣経路、通気経路（鼻からの吸引）、舌下経路、唇下経路、注腸経路、点眼経路（結膜上に投与）、点耳経路、耳介経路（耳内もしくは耳経由）、口腔内経路（頬に対して行う経路）、結膜経路、皮膚経路、歯経路（１本もしくは複数の歯への投与）、電気浸透経路、頸管内経路、洞内経路、気管内経路、体外経路、血液透析経路、浸潤経路、間質経路、腹内経路、羊膜内経路、関節内経路、胆管内経路、気管支内経路、嚢内経路、軟骨内経路（軟骨中）、仙骨内経路（馬尾中）、槽内経路（大槽中）、角膜内経路（角膜中）、歯冠内経路、冠状動脈内経路（冠状動脈中）、海綿体内経路（陰茎の海綿体の膨張性空間中）、椎間板内経路（椎間板中）、腺管内経路（腺管内中）、十二指腸内経路（十二指腸中）、硬膜内経路（硬膜中もしくは硬膜下）、表皮内経路（表皮への投与）、食道内経路（食道への投与）、胃内経路（胃中）、歯肉内経路（歯肉中）、回腸内経路（小腸の遠位部分中）、病変内経路（局在化した病変中もしくは局在化した病変への直接導入）、腔内経路（管腔中）、リンパ内経路（リンパ中）、骨髄内経路（骨の髄腔中）、髄膜内経路（髄膜中）、眼内経路（眼中）、卵巣内経路（卵巣中）、心膜内経路（心膜中）、胸膜内経路（胸膜中）、前立腺内（前立腺中）、肺内経路（肺もしくはその気管支中）、鼻腔内経路（鼻中もしくは眼窩周囲洞中）、脊髄内経路（脊柱中）、滑液嚢内経路（関節の滑液腔中）、腱内経路（腱中）、精巣内経路（精巣中）、髄腔内経路（脳

脊髄軸のいずれかのレベルの脳脊髄液中）、胸腔内経路（胸腔中）、管内経路（器官の細管中）、鼓室内経路（中耳中）、血管内経路（単一もしくは複数の血管中）、心室内経路（心室中）、イオントフォレシス経路（可溶性塩のイオンを身体の組織に移動させる電流による手段）、灌注経路（開いた傷もしくは体腔を浸したり洗い流したりする手段）、喉頭経路（喉頭上への直接投与）、経鼻胃経路（鼻を経由して胃中に投与）、閉鎖包帯技法経路（局所経路投与の後に、当該領域を閉鎖する包帯によって覆う技法）、点眼経路（外眼部への投与）、口腔咽頭経路（口腔及び咽頭への直接投与）、非経口経路、経皮経路、関節周囲経路、硬膜周囲経路、神経周囲経路、歯周経路、直腸経路、呼吸経路（局部作用もしくは全身作用のために、経口吸入もしくは経鼻吸入させることによって、気道中に投与）、眼球後経路（脳橋背後もしくは眼球背後）、心筋内経路（心筋層に入れる）、軟組織経路、クモ膜下経路、結膜下経路、粘膜下経路、局所経路、経胎盤経路（胎盤を経由もしくは通過する）、経気管経路（気管壁経由）、経鼓膜経路（鼓室を通過もしくは経由する）、尿管経路（尿管への投与）、尿道経路（尿道への投与）、膣経路、仙骨ブロック経路、診断経路、神経ブロック経路、胆管灌流経路、心臓灌流経路、フォトフェレーシス経路、または脊髄経路が挙げられるが、これらに限らない。具体的な実施形態では、組成物は、血液脳関門、血管バリアまたはその他の上皮バリアを通過させる方法で投与できる。いくつかの実施形態では、投与経路に合わせた製剤は、不活性成分を少なくとも１つ含むことができる。

【０７３４】

本発明のポリヌクレオチド（例えば、バリアントＰＡＨポリペプチド、その機能的断片またはそのバリアントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、ネイキッドな状態で、細胞に送達できる。本明細書で使用する場合、「ネイキッドな状態」とは、トランスフェクションを促す作用剤から遊離しているポリヌクレオチドを送達することを指す。ネイキッドポリヌクレオチドは、当該技術分野で知られているとともに、本明細書に記載されている投与経路を用いて、細胞に送達できる。

【０７３５】

本発明のポリヌクレオチド（例えば、ＰＡＨポリペプチド、その機能的断片またはそのバリアントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、本明細書に記載されている方法を用いて調合できる。その製剤は、改変されていることもできるし、及び／または改変されていないこともできるポリヌクレオチドを含むことができる。その製剤は、細胞透過剤、薬学的に許容される担体、送達剤、生体内分解性または生体適合性のポリマー、溶媒及び徐放性送達デポー（ただし、これらに限らない）をさらに含むことができる。その調合したポリヌクレオチドは、当該技術分野で知られているとともに、本明細書に記載されている投与経路を用いて、細胞に送達できる。

【０７３６】

非経口投与用の医薬組成物は、不活性成分を少なくとも１つ含むことができる。使用する不活性成分のいずれかは、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）から認可されていることもできるし、そのいずれも、認可されていないこともできる。非経口投与用の医薬組成物で用いる不活性成分の非網羅的なリストには、塩酸、マンニトール、窒素、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム及び水酸化ナトリウムが含まれる。

【０７３７】

既知の技術に従って、適切な分散剤、湿潤剤及び／または懸濁化剤を用いて、注射用調製物、例えば、滅菌注射用水性懸濁剤または滅菌注射用油脂性懸濁剤を調合できる。滅菌注射用調製物は、無毒性の非経口的に許容可能な希釈剤及び／または溶媒中、例えば１，３－ブタンジオール中の溶液としての滅菌用注射用液剤、滅菌用注射用懸濁剤及び／または滅菌用注射用エマルジョンであることができる。許容されるビヒクル及び溶媒のうち、使用できるのは、水、リンゲル液、Ｕ．Ｓ．Ｐ．及び等張塩化ナトリウム溶液である。滅菌固定油は従来、溶媒または懸濁媒体として使用される。この目的においては、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含むいずれかの無刺激固定油を使用できる。注射剤の調製の際には、オレイン酸のような脂肪酸を使用できる。滅菌製剤は、局所麻酔剤、保存剤

及び緩衝剤のようなアジュバントも含むことができる。

【０７３８】

注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターでろ過することによって、及び／または使用前に、滅菌水もしくはその他の滅菌注射剤用媒体に溶解もしくは分散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って滅菌できる。

【０７３９】

注射用製剤は、組織、器官及び／または対象の領域に直接注射するためのものであることができる。非限定的な例として、組織、器官及び／または対象に、虚血領域への心筋内注射によって、製剤を直接注射できる（例えば、Ｚａｎｇｉ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１３（その内容は、参照により、全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０７４０】

活性成分の作用を延長するために、皮下注射または筋肉内注射の活性成分の吸収を遅くするのが望ましい場合がある。これは、水難溶性である結晶性物質または非晶質物質の液体懸濁液を用いることによって行うことができる。そして、薬物の吸収速度は、その溶解速度によって決まり、ひいては、結晶のサイズ及び結晶の形態によって決定し得る。あるいは、非経口投与される薬物形態の吸収の遅延は、その薬物を油ビヒクルに溶解または懸濁することによって実現する。注射用デポー形態は、ポリラクチド－ポリグリコリドのような生分解性ポリマー中の薬物のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製する。薬物とポリマーとの比率、及び使用する具体的なポリマーの性質に応じて、薬物放出速度を制御できる。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）及びポリ（アンハイドライド）が挙げられる。注射用デポー製剤は、身体の組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョン内に薬物を封入することによって調製する。

【０７４１】

併用治療

本明細書に記載されている医薬組成物及びポリヌクレオチドは、ＰＫＵの治療の際に、追加の薬剤との併用治療法で使用できる。テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）は、フェニルアラニンの分解における、ＰＡＨの補因子である。本明細書に記載されている医薬組成物またはポリヌクレオチドによる治療と同時に、その治療の前に、またその治療の後に、テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）、そのアナログ、またはテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の塩もしくはそのアナログをヒト対象に投与できる。例示的なテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）アナログとしては、サプロプテリン（ＫＵＶＡＮ（登録商標）、サプロプテリンジヒドロクロリド）、６－ヒドロキシメチルプテリン（ＨＭＰ）及び６－アセチル－７，７－ジメチル－７，８－ジヒドロプテリン（ＡＤＤＰ）が挙げられる。テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）、そのアナログ、またはテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の塩もしくはそのアナログは、本明細書に記載されている医薬組成物またはポリヌクレオチドと同じ投与経路または異なる投与経路によって投与できる。例えば、テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）、そのアナログ、またはテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の塩もしくはそのアナログは、経口投与でき、本発明の医薬組成物またはポリヌクレオチドは、静脈内投与できる。別の例では、テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）、そのアナログ、またはテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）の塩もしくはそのアナログは、経口投与でき、本発明の医薬組成物またはポリヌクレオチドは、皮下投与できる。

【０７４２】

定義

本開示をさらに容易に理解できるように、まず、特定の用語を定義する。本願で使用する場合、本明細書に明示的に別段の定めがある場合を除き、下記の各用語は、以下に示す意味を有するものとする。本願の全体を通じて、追加の定義が示されている。

【０７４３】

本発明には、所定の生成物またはプロセスに、その群の構成要素のうちのきっかり１つ

が存在するか、用いられているか、または別途関連している実施形態が含まれる。本発明には、所定の生成物またはプロセスに、その群の構成要素の２個以上またはすべてが存在するか、用いられているか、または別途関連している実施形態が含まれる。

【０７４４】

本明細書及び添付の請求項では、文脈上明らかに別段に示されている場合を除き、「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」の付された単数形には、複数形の言及物が含まれる。「ａ」（または「ａｎ」）の付された用語、ならびに「１つ以上」及び「少なくとも１つ」の付された用語は、本明細書では、同義的に使用できる。特定の態様では、「ａ」または「ａｎ」という用語は、「１つ」を意味する。別の態様では、「ａ」または「ａｎ」という用語には、「２つ以上」または「複数」が含まれる。

【０７４５】

さらに、「及び／または」は、本明細書で使用する場合、２つの所定の特色または成分のそれぞれが、他方とともに、または他方の非存在下で、具体的に開示されているものとして解釈するものとする。すなわち、「及び／または」という用語は、本明細書では、「Ａ及び／またはＢ」のような言い回しで使用する場合、「Ａ及びＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」（単独）、ならびに「Ｂ」（単独）を含むように意図されている。同様に、「及び／または」という用語は、「Ａ、Ｂ及び／またはＣ」のような言い回しで使用する場合、Ａ、Ｂ及びＣ、Ａ、ＢまたはＣ、ＡまたはＣ、ＡまたはＢ、ＢまたはＣ、Ａ及びＣ、Ａ及びＢ、Ｂ及びＣ、Ａ（単独）、Ｂ（単独）、ならびにＣ（単独）という態様をそれぞれ含むように意図されている。

【０７４６】

別段に定義されている場合を除き、本明細書で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本開示が関係する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。例えば、Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｕｏ，Ｐｅｉ－Ｓｈｏｗ，２ｎｄ ｅｄ．，２００２，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、Ｔｈｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３ｒｄ ｅｄ．，１９９９，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ及びＯｘｆｏｒｄ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ Ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｒｅｖｉｓｅｄ，２０００，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓによって、当業者は、本願で用いられている多くの用語の一般的な用語説明を得られる。

【０７４７】

本明細書で、「含む」という語を用いて、態様が説明されている場合には必ず、「～からなる」及び／または「～から本質的になる」という用語で説明される別段の類似の態様も提供する。

【０７４８】

単位、接頭辞及び符号は、国際単位系（ＳＩ）で認められた形態で示されている。数値範囲には、その範囲を定義している数も含まれる。値の範囲が示されている場合、その範囲の、示されている上限値と示されている下限値の間の各整数値、及びその各端数が、そのような値の間の小範囲とともに、具体的に開示されていると理解されたい。いずれの範囲の上限及び下限も、独立して、その範囲に含めることができるし、またはその範囲から除外することができ、一方の限度値が含まれるか、限度値の両方とも含まれないか、または限度値の両方とも含まれる範囲もそれぞれ、本発明の範囲内に含まれる。値が明示的に示されている場合には、示されている値とほぼ同じ量（ｑｕａｎｔｉｔｙ）または量（ａｍｏｕｎｔ）である値も、本発明の範囲内であると理解されたい。組み合わせが開示されている場合には、その組み合わせの要素の各サブコンビネーションも、具体的に開示されているとともに、本発明の範囲内である。逆に、異なる要素または要素群が個々に開示されている場合には、これらを組み合わせたものも開示されている。発明物の要素のいずれかに、複数の代替物があると開示されている場合には、各代替物が、１つ除外されているか、他の代替物といずれかに組み合わさって除外されている発明物の例も、本発明によっ

て開示されており、発明物の要素の２個以上において、このような除外が該当することができ、このような除外が該当する要素を組み合わせたものはすべて、本発明によって開示されている。

【０７４９】

ヌクレオチドは、一般的に認められている１文字略号によって表されている。別段に示されていない限り、核酸は、左から右に、５’から３’の方向で書かれている。核酸塩基は、本明細書では、一般的に知られている１文字表記であって、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名法委員会推奨の表記によって表されている。すなわち、Ａはアデニンを表し、Ｃはシトシンを表し、Ｇはグアニンを表し、Ｔはチミンを表し、Ｕはウラシルを表す。

【０７５０】

アミノ酸は、一般的に知られている３文字表記または１文字表記であって、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名法委員会推奨の文字表記によって表されている。別段に示されていない限り、アミノ酸配列は、左から右に、アミノからカルボキシの方向で書かれている。

【０７５１】

約：「約」という用語は、本明細書及び請求項の全体にわたって、数値との関連で使用する場合、厳密値と誤差があることを指し、その誤差は、当業者にはよく知られているとともに、当業者から認められる誤差である（厳密値との誤差が±１０％であるなど）。

【０７５２】

範囲が与えられている場合には、端点値が含まれる。さらに、別段に示されていない限り、または文脈及び当業者の理解から、明らかにそうでない場合を除き、範囲として表されている値は、文脈上明らかに別段に示されている場合を除き、本発明の様々な実施形態において、その範囲の下限の単位の１０分の１まで、示されている範囲内のいずれかの具体的な値または小範囲を取ることができる。

【０７５３】

組み合わせて投与する：本明細書で使用する場合、「組み合わせて投与する」または「併用投与という用語は、２つ以上の薬剤を対象に、同時に、またはある間隔内で投与して、各薬剤がその患者に及ぼす作用が重なり合うことができるようにすることを意味する。いくつかの実施形態では、それらの薬剤は、もう一方の投与から約６０分以内、約３０分以内、約１５分以内、約１０分以内、約５分以内または約１分以内に投与する。いくつかの実施形態では、それらの薬剤の投与は、組み合わせの作用（例えば相乗作用）が得られるように、十分に近い間隔で行う。

【０７５４】

アミノ酸置換：「アミノ酸置換」という用語は、親配列または参照配列（例えば野生型ＰＡＨ配列）に存在するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置き換えることを指す。アミノ酸は、例えば、ペプチドの化学合成によって、または当該技術分野で知られている組み換え方法を通じて、親配列または参照配列（例えば野生型ＰＡＨポリペプチド配列）において置換できる。したがって、「Ｘ位における置換」という場合には、Ｘ位に存在するアミノ酸を代替的なアミノ酸残基に置換することを指す。いくつかの態様では、置換パターンは、ＡｎＹという形式に従って記載でき、そのＡは、天然においてまたは元々、ｎ位に存在するアミノ酸に対応する１文字表記であり、Ｙは、置換後のアミノ酸残基である。別の態様では、置換パターンは、Ａｎ（ＹＺ）という形式に従って記載でき、そのＡは、天然においてまたは元々、Ｘ位に存在するアミノ酸を置換するアミノ酸残基に対応する１文字表記であり、Ｙ及びＺは、置換後の代替的なアミノ酸残基である。

【０７５５】

本開示の関連では、置換（アミノ酸置換という場合でも）は、核酸レベルで行われており、すなわち、アミノ酸残基の代替的なアミノ酸残基への置換は、第１のアミノ酸をコードするコドンを、第２のアミノ酸をコードするコドンに置換することによって行う。

【０７５６】

動物：本明細書で使用する場合、「動物」という用語は、動物界のいずれかの一員を指す。いくつかの実施形態では、「動物」とは、いずれかの発達段階のヒトを指す。いくつ

かの実施形態では、「動物」とは、いずれかの発達段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、齧歯類動物、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類動物またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類及び蠕虫類が挙げられるが、これらに限らない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作動物またはクローンである。

【０７５７】

およそ：本明細書で使用する場合、「およそ」という用語は、目的の値の１つ以上に適用する場合、示されている参照値と同程度である値を指す。ある特定の実施形態では、「およそ」という用語は、別段の記載のない限り、または文脈から明らかにそうでない場合を除き、いずれかの方向（プラス方向またはマイナス方向）において、示されている参照値から２５％以内、２０％以内、１９％以内、１８％以内、１７％以内、１６％以内、１５％以内、１４％以内、１３％以内、１２％以内、１１％以内、１０％以内、９％以内、８％以内、７％以内、６％以内、５％以内、４％以内、３％以内、２％以内、１％以内または１％を下回る割合以内である値の範囲を指す（ただし、その値が、考え得る値から１００％を超える場合を除く）。

【０７５８】

～と関連する：疾患に関して本明細書で使用する場合、「～と関連する」という用語は、問題となっている症状、測定値、特徴または状態が、その疾患の診断、発現、存在または進行に結び付けられることを意味する。関連は、その疾患に原因があるとして結び付けることができるが、必ずしもそうではない。例えば、ＰＫＵの患者のクオリティオブライフを低下させる症状、後遺症またはいずれかの作用は、ＰＫＵと関連するとみなされ、本発明のいくつかの実施形態では、それらは、本発明のポリヌクレオチドを、必要とする対象に投与することによって治療、改善または予防できる。

【０７５９】

２つ以上の部分に関して使用するときには、「～と会合された」、「コンジュゲートされた」、「連結された」、「結合された」及び「係留された」という用語は、２つ以上の部分に関して使用するときには、それらの部分が、直接、または連結剤としての役割を果たす１つ以上の追加の部分を介して、もう一方と物理的に会合または連結して、十分に安定した構造を形成して、その構造を使用するときの条件下、例えば生理的条件下で、それらの部分が物理的に会合したままとなるようになっていることを意味する。「会合」は厳密には、直接、共有結合によって化学的に結合している必要はない。「会合」体が物理的に会合したままとなるほど十分に安定しているイオン結合、水素結合またはハイブリダイゼーションベースの連結性も示唆できる。

【０７６０】

二機能性：本明細書で使用する場合、「二機能性」という用語は、少なくとも２つの機能を保持できるかまたは保持するいずれかの物質、分子または部分を指す。それらの機能は、同じ結果または異なる結果をもたらすことができる。機能をもたらす構造は、同じであることもできるし、または異なることもできる。例えば、本発明の二機能性改変ＲＮＡは、ＰＡＨペプチドをコードでき（第１の機能）、その一方で、コードＲＮＡを含むヌクレオシドは、それ自体で、そのＲＮＡの半減期を延長できる（第２の機能）。この例では、タンパク質の欠損をきたしている対象に、この二機能性改変ＲＮＡを送達すれば、疾患または状態を改善または治療できるペプチド分子またはタンパク質分子が産生されるのみならず、対象に存在する改変ＲＮＡの集団が長期間維持されるであろう。別の態様では、二機能性改変ｍＲＮＡは、例えば、ＰＡＨペプチドをコードする（第１の機能）とともに、その第１のタンパク質に融合されるか、またはその第１のタンパク質と共発現される第２のタンパク質をコードするＲＮＡを含むキメラ（ｃｈｉｍｅｒｉｃ）分子またはキメラ（ｑｕｉｍｅｒｉｃ）分子であることができる。

【０７６１】

生体適合性：本明細書で使用する場合、「生体適合性」という用語は、損傷、毒性、ま

たは免疫システムによる拒絶のリスクがほとんどないかまたは全くない形で、生きている細胞、組織、器官またはシステムと適合することを意味する。

【０７６２】

生分解性：本明細書で使用する場合、「生分解性」という用語は、生物の作用によって、無害な生成物に分解できることを意味する。

【０７６３】

生物活性がある：本明細書で使用する場合、「生物活性がある」という語句は、生体システム及び／または生物において活性を持ついずれかの物質の特徴を指す。例えば、生物に投与したときに、その生物において生体作用を持つ物質は、生物活性があるとみなす。特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドの一部分に生物活性があったり、または生物学的に関連するとみなされる活性を模倣したりする場合でも、生物活性があるとみなすことができる。

【０７６４】

キメラ：本明細書で使用する場合、「キメラ」は、不一致または異種の部分または領域を２つ以上有する物体である。例えば、キメラ分子は、ＰＡＨポリペプチドを含む第１の部分と、第２の治療用タンパク質（例えば、別の酵素活性を有するタンパク質、抗原結合部分、またはＰＡＨの血漿中半減期を延長できる部分、例えば、抗体のＦｃ領域）を含む第２の部分（例えば、第１の部分と遺伝子的に融合された部分）を含むことができる。

【０７６５】

配列最適化：「配列最適化」という用語は、参照核酸配列内の核酸塩基を代替的な核酸塩基に置き換えることで、特性が改善された核酸配列、例えば、タンパク質発現が改善されたか、または免疫原性が低下した核酸配列をもたらすプロセスまたは一連のプロセスを指す。

【０７６６】

概ね、配列最適化の目標は、参照ヌクレオチド配列によってコードされるのと同じポリペプチドをコードする同義のヌクレオチド配列をもたらすことである。すなわち、（コドン最適化を行っても）、コドン最適化ヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドには、参照ヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドに対するアミノ酸置換は存在しない。

【０７６７】

コドン置換：「コドン置換」または「コドンの置き換え」という用語は、配列最適化との関連においては、参照核酸配列に存在するコドンを別のコドンに置き換えることを指す。コドンは、参照核酸配列において、例えば、ペプチドの化学合成または当該技術分野で知られている組み換え方法を通じて置換できる。したがって、核酸配列（例えばｍＲＮＡ）、または核酸配列（例えばｍＲＮＡ）の特定の領域もしくはサブ配列内の特定の位置における「置換」または「置き換え」に言及する場合には、そのような位置または領域のコドンを代替的なコドンに置換することを指す。

【０７６８】

本明細書で使用する場合、「コード領域」及び「コードする領域」という用語、ならびにこれらの文法的変形表現は、発現すると、ポリペプチドまたはタンパク質をもたらす、ポリヌクレオチド内のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を指す。

【０７６９】

化合物：本明細書で使用する場合、「化合物」という用語は、示されている構造の立体異性体及び同位体のすべてを含むように意図されている。本明細書で使用する場合、「立体異性体」という用語は、化合物の幾何異性体のいずれか（例えば、シス異性体及びトランス異性体）、エナンチオマーまたはジアステレオマーを意味する。本開示には、立体異性体的に純粋な形態（例えば、幾何学的に純粋な形態、エナンチオマー的に純粋な形態またはジアステレオマー的に純粋な形態）、エナンチオマー混合物及び立体異性体混合物、例えばラセミ体を含め、本明細書に記載されている化合物のあらゆる立体異性体が含まれる。化合物のエナンチオマー混合物及び立体異性体混合物、ならびにそれらを構成要素の

エナンチオマーまたは立体異性体に分割する手段は、周知である。「同位体」は、同じ原子数であるが、質量数が異なることにより、核内の中性子数が異なる原子を指す。例えば、水素の同位体としては、三重水素及び重水素が挙げられる。さらに、本開示の化合物、塩または複合体は、常法によって、溶媒または水分子と組み合わせて調製して、溶媒和物及び水和物を形成できる。

【０７７０】

接触させる：本明細書で使用する場合、「接触させる」という用語は、２つ以上の物体の間に物理的な連結を確立することを意味する。例えば、哺乳動物細胞をナノ粒子組成物と接触させることは、哺乳動物細胞とナノ粒子で、物理的連結を生じさせることを意味する。ｉｎ　ｖｉｖｏ及びｅｘ　ｖｉｖｏの両方で、細胞を外部の物質と接触させる方法は、生物学の分野において周知である。例えば、ナノ粒子組成物と、哺乳動物内にある哺乳動物細胞との接触は、様々な投与経路（例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路及び皮下経路）によって行うことができ、様々な量のナノ粒子組成物を含むことができる。さらに、２個以上の哺乳動物細胞をナノ粒子組成物に接触させることができる。

【０７７１】

保存的アミノ酸置換：「保存的アミノ酸置換」は、タンパク質配列内のアミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニンまたはヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）、極性無電荷側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシンまたはシステイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファン）、β分岐状側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはヒスチジン）を含め、当該技術分野において定義されている。したがって、ポリペプチド内のアミノ酸が、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸に置き換えられている場合、そのアミノ酸置換は、保存的とみなされる。別の態様では、アミノ酸鎖は、構造的に類似のアミノ酸鎖であって、側鎖ファミリーメンバーの順序及び／または組成が異なるアミノ酸鎖に保存的に置き換えることができる。

【０７７２】

非保存的アミノ酸置換：非保存的アミノ酸置換としては、（ｉ）電気的に陽性な側鎖を有する残基（例えば、Ａｒｇ、ＨｉｓまたはＬｙｓ）が、電気的に陰性な残基（例えば、ＧｌｕもしくはＡｓｐ）に、またはその残基によって置換されているか、（ｉｉ）親水性残基（例えば、ＳｅｒまたはＴｈｒ）が、疎水性残基（例えば、Ａｌａ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、ＰｈｅもしくはＶａｌ）に、またはその残基によって置換されているか、（ｉｉｉ）システインまたはプロリンが、いずれかの他の残基に、またはその残基によって置換されているか、あるいは（ｉｖ）かさ高い疎水性または芳香族の側鎖を有する残基（例えば、Ｖａｌ、Ｈｉｓ、ＩｌｅまたはＴｒｐ）が、小さめの側鎖を有する残基（例えば、ＡｌａもしくはＳｅｒ）もしくは側鎖を有さない残基（例えばＧｌｙ）に置換されているか、またはその残基によって置換されている置換が挙げられる。

【０７７３】

その他のアミノ酸置換を、当業者は容易に特定できる。例えば、アミノ酸アラニンでは、置換は、Ｄ－アラニン、グリシン、β－アラニン、Ｌ－システイン及びＤ－システインのいずれか１つから選ぶことができる。リシンでは、置換は、Ｄ－リシン、アルギニン、Ｄ－アルギニン、ホモ－アルギニン、メチオニン、Ｄ－メチオニン、オルニチンまたはＤ－オルニチンのいずか１つであることができる。概ね、機能的に重要な領域における置換のうち、単離ポリペプチドの特性の変化を誘導すると予測できる置換は、（ｉ）極性残基、例えば、セリンまたはトレオニンが、疎水性残基、例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンもしくはアラニンに（またはその残基によって）置換されているか、（ｉｉ）システイン残基が、いずれかの他の残基に（またはその残基によって）置換されているか、（ｉｉｉ）電気的に陽性な側鎖を有する残基、例えば、リシン、アルギニンもし

くはヒスチジンが、電気的に陰性な側鎖を有する残基、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸に（またはその残基によって）置換されているか、あるいは（ｉｖ）かさ高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンが、そのような側鎖を有さない残基、例えばグリシンに（またはその残基によって）置換されている置換である。上記の非保存的置換のうちの置換の１つが、そのタンパク質の機能的な特性を変更できる可能性は、そのタンパク質の機能的に重要な領域に対する、その置換の位置にも相関しており、したがって、いくつかの非保存的置換には、生物的な特性に対する作用がほとんどないか、全くないことがある。

【０７７４】

保存された：本明細書で使用する場合、「保存された」という用語は、ポリヌクレオチド配列のヌクレオチド、またはポリペプチド配列のアミノ酸残基のうち、比較対象である２つ以上の配列の同じ位置において、無変化であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基を指す。比較的保存されているヌクレオチドまたはアミノ酸は、その配列内の他の位置に見られるヌクレオチドまたはアミノ酸よりも関連性の高い配列の間で保存されているヌクレオチドまたはアミノ酸である。

【０７７５】

いくつかの実施形態では、２つ以上の配列は、互いに対して１００％同一である場合、「完全に保存されている」という。いくつかの実施形態では、２つ以上の配列は、互いに対して少なくとも７０％同一であるか、少なくとも８０％同一であるか、少なくとも９０％同一であるか、または少なくとも９５％同一である場合、「高度に保存されている」という。いくつかの実施形態では、２つ以上の配列は、互いに対して約７０％同一であるか、約８０％同一であるか、約９０％同一であるか、約９５％、約９８％または約９９％同一である場合、「高度に保存されている」という。いくつかの実施形態では、２つ以上の配列は、互いに対して少なくとも３０％同一であるか、少なくとも４０％同一であるか、少なくとも５０％同一であるか、少なくとも６０％同一であるか、少なくとも７０％同一であるか、少なくとも８０％同一であるか、少なくとも９０％同一であるか、または少なくとも９５％同一である場合、「保存されている」という。いくつかの実施形態では、２つ以上の配列は、互いに対して約３０％同一であるか、約４０％同一であるか、約５０％同一であるか、約６０％同一であるか、約７０％同一であるか、約８０％同一であるか、約９０％同一であるか、約９５％同一であるか、約９８％同一であるか、または約９９％同一である場合、「保存されている」という。配列の保存性は、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの全長に適用することもできるし、またはその一部分、領域もしくは特色に適用することもできる。

【０７７６】

制御放出：本明細書で使用する場合、「制御放出」という用語は、医薬組成物または化合物の放出プロファイルであって、治療成果を発揮するための特定の放出パターンに適合する放出プロファイルを指す。

【０７７７】

環状または環化：本明細書で使用する場合、「環状」という用語は、途切れのないループが存在することを指す。環状分子は、円状である必要はなく、結合して、サブユニットからなる切れ目のない鎖が形成されていればよい。本発明の操作済みのＲＮＡまたはｍＲＮＡのような環状分子は、単一の単位もしくは多量体であることもできるし、または複合体もしくは高次構造の成分を１つ以上含むこともできる。

【０７７８】

細胞傷害性：本明細書で使用する場合、「細胞傷害性」とは、細胞（例えば、哺乳動物細胞（例えばヒト細胞））、細菌、ウイルス、真菌、原生動物、寄生虫、プリオンもしくはこれらを組み合わせたものを殺傷するか、またはこれらに対して、有害作用、毒性作用もしくは致死的作用を及ぼすことを指す。

【０７７９】

送達：本明細書で使用する場合、「送達」という用語は、物体を目的の場所に供給する

ことを意味する。例えば、対象へのポリヌクレオチドの送達は、そのポリヌクレオチドを含むナノ粒子組成物を対象に、（例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路または皮下経路によって）投与することを伴うことができる。哺乳動物または哺乳動物細胞へのナノ粒子組成物の投与は、１つ以上の細胞をそのナノ粒子組成物と接触させることを伴うことができる。

【０７８０】

送達剤：本明細書で使用する場合、「送達剤」とは、標的細胞へのポリヌクレオチドのｉｎ　ｖｉｖｏ送達、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ送達またはｅｘ　ｖｉｖｏ送達を少なくとも部分的に促進するいずれかの物質を指す。

【０７８１】

不安定化：本明細書で使用する場合、「不安定な」、「不安定化する」または「不安定化領域」という用語は、同じ領域または同じ分子の開始時形態、野生型形態または天然型形態よりも、安定性の低い領域または分子を意味する。

【０７８２】

ジアステレオマー：本明細書で使用する場合、「ジアステレオマー」という用語は、互いの鏡像ではなく、互いに重ね合わせることができない立体異性体を意味する。

【０７８３】

消化：本明細書で使用する場合、「消化」という用語は、さらに小さい断片または成分に分解することを意味する。ポリペプチドまたはタンパク質に関するときには、消化により、ペプチドが生成される。

【０７８４】

遠位：本明細書で使用する場合、「遠位」という用語は、中心から離れた位置、または該当する位置もしくは領域から離れた位置にあることを意味する。

【０７８５】

ドメイン：本明細書で使用する場合、ポリペプチドに関するときには、「ドメイン」という用語は、ポリペプチドのモチーフのうち、特定可能である構造的または機能的な特徴または特性（例えば、結合能力、タンパク質間相互作用の部位として機能するなど）を１つ以上有するモチーフを指す。

【０７８６】

投与レジメン：本明細書で使用する場合、「投与レジメン」または「投与レジメン」は、投与スケジュール、または医師が定めた治療レジメン、予防レジメンもしくは緩和ケアレジメンである。

【０７８７】

有効量：本明細書で使用する場合、薬剤の「有効量」という用語は、有益または所望な成果、例えば、臨床成果を発揮するのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、適用される状況によって決まる。例えば、タンパク質の欠損（例えばＰＡＨ欠損）を治療する薬剤の投与との関連では、薬剤の有効量は、例えば、薬剤を投与しない場合に観察される症状の重症度と比べて、ＰＡＨ欠損と関連する症状を改善、軽減、排除または予防するのに十分なＰＡＨを発現するｍＲＮＡ量である。「有効量」という用語は、「有効な用量」、「治療上有効な量」または「治療上有効な用量」と同義的に使用できる。

【０７８８】

エナンチオマー：本明細書で使用する場合、「エナンチオマー」という用語は、本発明の化合物の個々の各光学活性体であって、（当該技術分野における標準的な方法によって求めた場合に）光学純度またはエナンチオマー過剰率が、少なくとも８０％（すなわち、一方のエナンチオマーが少なくとも９０％であり、もう一方のエナンチオマーが最大でも１０％である）、少なくとも９０％または少なくとも９８％である各光学活性体を意味する。

【０７８９】

封入する：本明細書で使用する場合、「封入する」という用語は、取り囲むか、囲うかまたは包み込むことを意味する。

【０７９０】
封入効率：本明細書で使用する場合、「封入効率」とは、ナノ粒子組成物の調製の際に使用したポリヌクレオチドの初期総量に対して、ナノ粒子組成物の一部となるポリヌクレオチドの量を指す。例えば、ナノ粒子組成物に最初に供給した総量１００ｍｇのポリヌクレオチドから、９７ｍｇのポリヌクレオチドがナノ粒子組成物に封入されたら、封入効率は、９７％とすることができる。本明細書で使用する場合、「封入」とは、完全、実質的または部分的に取り囲むか、閉じ込めるか、囲うかまたは包み込むことを指すことができる。
【０７９１】
コードされるタンパク質切断シグナル：本明細書で使用する場合、「コードされるタンパク質切断シグナル」とは、タンパク質切断シグナルをコードするヌクレオチド配列を指す。
【０７９２】
操作済み：本明細書で使用する場合、本発明の実施形態は、構造的かまたは化学的かにかかわらず、開始時点の分子、野生型分子または天然型分子から変更された特色または特性を有するように設計されているときには、「操作済み」である。
【０７９３】
送達の増強：本明細書で使用する場合、「送達の増強」という用語は、ポリヌクレオチドがコントロールナノ粒子（例えば、ＭＣ３、ＫＣ２またはＤＬｉｎＤＭＡ）によって目的の標的組織（例えば哺乳動物肝臓）に送達されるレベルよりも多く（例えば、少なくとも１．５倍以上、少なくとも２倍以上、少なくとも３倍以上、少なくとも４倍以上、少なくとも５倍以上、少なくとも６倍以上、少なくとも７倍以上、少なくとも８倍以上、少なくとも９倍以上、少なくとも１０倍以上）、ポリヌクレオチドがナノ粒子によって目的の標的組織に送達されることを意味する。特定の組織へのナノ粒子の送達レベルは、組織内で産生されたタンパク質の量を前記組織の重量と比較するか、組織中のポリヌクレオチドの量を前記組織の重量と比較するか、組織内で産生されたタンパク質の量を前記組織中の総タンパク質量と比較するか、または組織中のポリヌクレオチドの量を前記組織中の総ポリヌクレオチド量と比較することによって測定できる。標的組織へのナノ粒子の送達の増強は、治療を受けている対象において判定する必要はなく、動物モデル（例えばラットモデル）のようなサロゲートにおいて判定できることを理解されたい。
【０７９４】
エクソソーム：本明細書で使用する場合、「エクソソーム」は、哺乳動物細胞によって分泌されるベシクル、またはＲＮＡの分解に関与する複合体である。
【０７９５】
発現：本明細書で使用する場合、核酸配列の「発現」は、（１）ＤＮＡ配列から（例えば転写によって）ｍＲＮＡ鋳型が産生されるイベント、（２）（例えば、スプライシング、編集、５’キャップ形成及び／または３’末端プロセッシングによって）ｍＲＮＡ転写産物がプロセッシングされるイベント、（３）ｍＲＮＡがポリペプチドまたはタンパク質に翻訳されるイベント、及び（４）ポリペプチドまたはタンパク質が翻訳後修飾されるイベントのうちの１つ以上を指す。
【０７９６】
ｅｘ　ｖｉｖｏ：本明細書で使用する場合、「ｅｘ　ｖｉｖｏ」という用語は、生物（例えば、動物、植物もしくは微生物、またはそれらの細胞もしくは組織）の外で行うイベントを指す。ｅｘ　ｖｉｖｏでのイベントは、天然（例えばｉｎ　ｖｉｖｏ）環境からの変更が最小限の環境で行うことができる。
【０７９７】
特色：本明細書で使用する場合、「特色」とは、特徴、特性、または特有の要素を指す。ポリペプチドに言及するときには、「特色」は、分子の別個のアミノ酸配列ベース成分として定義される。本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの特色としては、表面兆候、局部的なコンホメーション形状、フォールド、ループ、ハーフルー

プ、ドメイン、ハーフドメイン、部位、末端またはこれらをいずれかに組み合わせたものが挙げられる。

【０７９８】

製剤：本明細書で使用する場合、「製剤」は、少なくともポリヌクレオチドと、担体、賦形剤及び送達剤の１つ以上とを含む。

【０７９９】

断片：「断片」とは、本明細書で使用する場合、一部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養細胞から単離した完全長タンパク質を消化することによって得られるポリペプチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、断片は、完全長タンパク質（例えばＰＡＨ）の部分配列であって、Ｎ末端及び／またはＣ末端及び／または内部の部分配列が欠失された部分配列である。本発明のいくつかの好ましい態様では、本発明のタンパク質の断片は、機能的断片である。

【０８００】

機能的：本明細書で使用する場合、「機能的な」生体分子は、その分子の特徴である特性及び／または活性を示す形態の生体分子である。すなわち、本発明のポリヌクレオチドの機能的断片は、機能的なＰＡＨ断片を発現できるポリヌクレオチドである。本明細書で使用する場合、ＰＡＨの機能的断片とは、野生型ＰＡＨの断片（すなわち、その天然アイソフォームのうちのいずれかの断片）、またはその変異体もしくはバリアントであって、その断片が、対応する完全長タンパク質の生物学的活性の少なくとも約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％を保持するものを指す。

【０８０１】

ＰＡＨ関連疾患：本明細書で使用する場合、「ＰＡＨ関連疾患」または「ＰＡＨ関連障害」という用語はそれぞれ、ＰＡＨ活性の異常（例えば、活性の低下または活性の上昇）に起因する疾患または障害を指す。非限定的な例として、ＰＫＵは、ＰＡＨ関連疾患である。

【０８０２】

「ＰＡＨ酵素活性」及び「ＰＡＨ活性」という用語は、本開示では同義的に用いられており、ＰＡＨがフェニルアラニンをチロシンに変換する能力を指す。したがって、ＰＡＨ酵素活性またはＰＡＨ活性を保持するかまたは有する断片またはバリアントは、フェニルアラニンのチロシンへの変換を触媒する測定可能な酵素活性を有する断片またはバリアントを指す。

【０８０３】

ヘルパー脂質：本明細書で使用する場合、「ヘルパー脂質」という用語は、脂質部分（脂質層、例えば脂質二重層に挿入するための部分）及び極性部分（脂質層の表面で、生理的溶液と相互作用するための部分）を含む化合物または分子を指す。典型的には、ヘルパー脂質は、リン脂質である。ヘルパー脂質の機能は、アミノ脂質を「補完して」、二重層の融合性を向上させること、及び／または例えば細胞に送達される核酸のエンドソーム脱出の促進を助けることである。ヘルパー脂質は、ＬＮＰの表面に対する重要な構造成分であるとも考えられている。

【０８０４】

相同性：本明細書で使用する場合、「相同性」という用語は、ポリマー分子間、例えば、核酸分子間（例えば、ＤＮＡ分子間及び／またはＲＮＡ分子間）及び／またはポリペプチド分子間の全体的な類縁性を指す。概ね、「相同性」という用語は、２つの分子間の進化的関係を暗示する。すなわち、相同である２つの分子は、共通する進化上の祖先を有することになる。本発明の関連では、相同性という用語には、同一性及び類似性の両方が含まれる。

【０８０５】
いくつかの実施形態では、ポリマー分子は、それらの分子におけるモノマーの少なくとも２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または９９％が、同一である（全く同じモノマーである）か、または類似のもの（保存的置換）である場合に、互いに対して「相同」であるとみなす。「相同な」という用語は必ず、少なくとも２つの配列（ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列）を比較したものを指す。
【０８０６】
同一性：本明細書で使用する場合、「同一性」という用語は、ポリマー分子間、例えば、ポリヌクレオチド分子間（例えば、ＤＮＡ分子間及び／またはＲＮＡ分子間）、及び／またはポリペプチド分子間の全体的なモノマー保存性を指す。２つのポリヌクレオチド配列の同一性パーセントの計算は、例えば、最適に比較を行う目的で、その２つの配列をアラインメントすることによって行うことができる（例えば、最適なアラインメントのために、第１の核酸配列及び第２の核酸配列の一方または両方に、ギャップを導入でき、比較のために、同一ではない配列を無視することができる）。ある特定の実施形態では、比較のためにアラインメントした配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％である。次に、対応するヌクレオチド位のヌクレオチドを比較する。第１の配列における位置が、第２の配列における対応する位置と同じヌクレオチドによって占められている場合、それらの分子は、その位置において同一である。２つの配列間の同一性パーセントは、２つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数、及びそれぞれのギャップの長さを考慮に入れた場合に、それらの配列に共通する同一な位置の数の関数である。２つの配列間での配列の比較及び同一性パーセントの判定は、数学的なアルゴリズムを用いて行うことができる。ＤＮＡとＲＮＡを比較するときには、チミン（Ｔ）及びウラシル（Ｕ）は、同等とみなすことができる。
【０８０７】
適切なソフトウェアプログラムは、様々な供給元から入手可能であり、タンパク質配列及びヌクレオチド配列のいずれのアラインメント用でも入手可能である。配列同一性パーセントを求めるための適切なプログラムの１つは、米国政府のＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ＢＬＡＳＴのウェブサイト（ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）から入手可能なプログラムのＢＬＡＳＴスイートの一部であるｂｌ２ｓｅｑである。ｂｌ２ｓｅｑは、ＢＬＡＳＴＮアルゴリズムまたはＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを用いて、２つの配列間の比較を実行する。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列を比較するのために使用し、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列を比較するために使用する。他の適切なプログラムは例えば、バイオインフォマティクスプログラムのＥＭＢＯＳＳスイートの一部であるＮｅｅｄｌｅ、Ｓｔｒｅｔｃｈｅｒ、ＷａｔｅｒｍａｎまたはＭａｔｃｈｅｒであり、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＥＢＩ）から、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｐｓａで入手可能である。
【０８０８】
配列アラインメントは、ＭＡＦＦＴ、Ｃｌｕｓｔａｌ（ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ ＸまたはＣｌｕｓｔａｌ Ｏｍｅｇａ）、ＭＵＳＣＬＥなどのように、当該技術分野で知られている方法を用いて行うことができる。
【０８０９】
１つのポリヌクレオチド標的配列またはポリペプチド標的配列内の領域であって、ポリヌクレオチド参照配列またはポリペプチド参照配列とアラインメントする異なる領域ごとに、配列同一性パーセントが独自の値である場合がある。配列同一性パーセントの値は、小数点第二位を四捨五入することに留意されたい。例えば、８０．１１、８０．１２、８０．１３及び８０．１４は、四捨五入して８０．１となり、８０．１５、８０．１６、８

０．１７、８０．１８及び８０．１９は、四捨五入して８０．２となる。長さの値は必ず、整数とすることにも留意されたい。

【０８１０】

特定の態様では、第１のアミノ酸配列（または核酸配列）の第２のアミノ酸配列（または核酸配列）との同一性パーセント「％ＩＤ」は、％ＩＤ＝１００×（Ｙ／Ｚ）として計算し、式中、Ｙは、第１の配列及び第２の配列のアラインメント（目視確認または特定の配列アラインメントプログラムによってアラインメントした場合）の際に、完全一致としてスコア化されたアミノ酸残基（または核酸塩基）の数であり、Ｚは、第２の配列内の残基の総数である。第１の配列の長さが、第２の配列よりも長い場合には、第１の配列の第２の配列に対する同一性パーセントは、第２の配列の第１の配列に対する同一性パーセントよりも高くなる。

【０８１１】

配列同一性パーセントを計算するための配列アラインメントの生成は、一次配列データのみによって導かれる、２つの配列間の比較に限らない。配列データを、構造的データ（例えば結晶学的なタンパク質構造）、機能的データ（例えば、変異の位置）または系統発生学的データのような異種のソースに由来するデータと統合することによっても、配列アラインメントを生成できることは明らかであろう。異種のデータを統合して、複数の配列のアラインメントを生成する適切なプログラムは、ｗｗｗ．ｔｃｏｆｆｅｅ．ｏｒｇで入手可能であるとともに、代わりに、例えばＥＢＩから入手可能であるＴ－Ｃｏｆｆｅｅである。配列同一性パーセントの計算に用いる最終的なアラインメントは、自動または手動のいずれかで編成できることも明らかであろう。

【０８１２】

免疫応答：「免疫応答」という用語は、例えば、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、ならびに上記細胞または肝臓によって産生される可溶性巨大分子（抗体、サイトカイン及び補体を含む）の作用であって、侵入している病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん性細胞、または自己免疫性炎症もしくは病的な炎症の場合には、正常なヒト細胞もしくはヒト組織を選択的に損傷させるか、破壊するかまたはヒトの身体から排除する作用を指す。場合によっては、脂質成分と、封入治療剤とを含むナノ粒子の投与により、免疫応答が誘発されることがあり、その免疫応答は、（ｉ）その封入治療剤（例えばｍＲＮＡ）、（ｉｉ）その封入治療剤の発現産物（例えば、そのｍＲＮＡによってコードされたポリペプチド）、（ｉｉｉ）そのナノ粒子の脂質成分、または（ｉｖ）これらを組み合わせたものを原因とし得る。

【０８１３】

炎症応答：「炎症応答」とは、特異的及び非特異的な防御システムが関与する免疫応答を指す。特異的な防御システムの反応は、抗原に対する特異的な免疫システム反応である。特異的な防御システムの反応の例としては、抗体応答が挙げられる。非特異的な防御システムの反応は、概ね免疫記憶をできない白血球、例えば、マクロファージ、好酸球及び好中球によって媒介される炎症応答である。いくつかの態様では、免疫応答には、炎症性サイトカインを分泌して、炎症性サイトカインレベルを上昇させるものが含まれる。

【０８１４】

炎症性サイトカイン：「炎症性サイトカイン」という用語は、炎症応答の際に増加するサイトカインを指す。炎症性サイトカインの例としては、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、ＣＸＣＬ１（ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）リガンド１（ＧＲＯαとしても知られる）、インターフェロン－γ（ＩＦＮγ）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターフェロンγ誘導タンパク質１０（ＩＰ－１０）または顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）が挙げられる。炎症性サイトカインという用語には、例えば、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、インターロイキン－８（ＩＬ－８）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、インターロイキン－１３（Ｉｌ－１３）、インターフェロンα（ＩＦＮ－α）など、当該技術分野で知られている、炎症応答と関連する他のサイトカインも含まれる。

【０８１５】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ：本明細書で使用する場合、「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ」という用語は、生物（例えば、動物、植物または微生物）においてではなく、人工環境、例えば、試験管もしくは反応槽、細胞培養液、ペトリ皿などにおいて行うイベントを指す。

【０８１６】

ｉｎ　ｖｉｖｏ：本明細書で使用する場合、「ｉｎ　ｖｉｖｏ」という用語は、生物（例えば、動物、植物もしくは微生物、またはそれらの細胞もしくは組織）において行うイベントを指す。

【０８１７】

挿入バリアント及び欠失バリアント：「挿入バリアント」は、ポリペプチドについて言及するときには、１つ以上のアミノ酸が、天然型配列または最初の配列における特定の位置のアミノ酸に直接隣接して挿入されたバリアントである。アミノ酸に「直接隣接して」とは、そのアミノ酸のα－カルボキシ官能基またはα－アミノ官能基のいずれかに連結していることを意味する。「欠失バリアント」は、ポリペプチドについて言及するときには、天然型アミノ酸配列または最初のアミノ酸配列における１つ以上のアミノ酸が除去されたバリアントである。通常、欠失バリアントは、その分子の特定の領域に、欠失したアミノ酸を１つ以上有することになる。

【０８１８】

インタクト：本明細書で使用する場合、ポリペプチドとの関連においては、「インタクト」という用語は、野生型タンパク質に対応するアミノ酸を保持していること、例えば、野生型アミノ酸を変異または置換していないことを意味する。逆に、核酸との関連では、「インタクト」という用語は、野生型核酸に対応する核酸塩基を保持していること、例えば、野生型核酸塩基を変異または置換していないことを意味する。

【０８１９】

イオン化可能なアミノ脂質：「イオン化可能なアミノ脂質」という用語には、１個、２個または３個以上の脂肪酸鎖または脂肪酸アルキル鎖と、ｐＨ滴定可能なアミノ頭部基（例えば、アルキルアミノ頭部基またはジアルキルアミノ頭部基）を有する脂質が含まれる。イオン化可能なアミノ脂質は典型的には、そのアミノ頭部基のｐＫａ未満のｐＨでは、プロトン化され（すなわち、正に帯電する）、そのｐＫａを上回るｐＨでは、実質的に帯電しない。このようなイオン化可能なアミノ脂質としては、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）及び（１３Ｚ，１６５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニドコサ－１３－１６－ジエン－１－アミン（Ｌ６０８）が挙げられるが、これらに限らない。

【０８２０】

単離：本明細書で使用する場合、「単離」という用語は、（天然においてか、実験設定においてかにかかわらず）その物質または物体が会合していた成分の少なくとも一部から分離した物質または物体を指す。単離物質（例えば、単離ポリヌクレオチドまたは単離ポリペプチド）は、単離する前の物質に対する純度のレベルが様々であることができる。単離物質及び／または単離物体は、その物質または物体が当初会合していた他の成分の少なくとも約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％または約９０％以上から分離していることができる。いくつかの実施形態では、単離物質は、純度が約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％超である。本明細書で使用する場合、物質は、他の成分を実質的に含まない場合、「純粋」である。

【０８２１】

実質的に単離された：「実質的に単離された」とは、その化合物を形成または検出した環境から、その化合物が実質的に分離されていることを意味する。部分的な分離には、例えば、本開示の化合物を多く含む組成物を含むことができる。実質的な分離には、本開示の化合物またはその塩を少なくとも約５０重量％、少なくとも約６０重量％、少なくとも約７０重量％、少なくとも約８０重量％、少なくとも約９０重量％、少なくとも約９５重量％、少なくとも約９７重量％または少なくとも約９９重量％含む組成物を含めることができる。

【０８２２】
本明細書に開示されているポリヌクレオチド、ベクター、ポリペプチド、細胞またはいずれかの組成物であって、「単離された」ものは、天然では見られない形態であるポリヌクレオチド、ベクター、ポリペプチド、細胞または組成物である。単離ポリヌクレオチド、単離ベクター、単離ポリペプチドまたは単離組成物には、天然で見られる形態ではなくなる程度まで精製したものが含まれる。いくつかの態様では、単離されているポリヌクレオチド、ベクター、ポリペプチドまたは組成物は、実質的に純粋である。
【０８２３】
異性体：本明細書で使用する場合、「異性体」という用語は、本発明のいずれかの化合物の互変異性体、立体異性体、エナンチオマーまたはジアステレオマーのいずれも意味する。本発明の化合物は、キラル中心及び／または二重結合を１つ以上有することができ、したがって、二重結合の異性体（すなわち、Ｅ／Ｚ型の幾何異性体）、あるいはジアステレオマー（例えば、エナンチオマー（すなわち、（＋）もしくは（－））、またはシス／トランス型異性体）のような立体異性体として存在できることが認識される。本発明によると、本明細書に示されている化学構造、すなわち本発明の化合物には、対応する立体異性体のすべて、すなわち、立体異性体的に純粋な形態（例えば、幾何学的に純粋な形態、エナンチオマー的に純粋な形態またはジアステレオマー的に純粋な形態）、ならびにエナンチオマー混合物及び立体異性体混合物、例えばラセミ体の両方が含まれる。本発明の化合物のエナンチオマー混合物及び立体異性体混合物は典型的には、キラル相ガスクロマトグラフィー、キラル相高速液体クロマトグラフィー、化合物をキラル塩複合体として結晶化する方法、または化合物をキラル溶媒中で結晶化する方法のような周知の方法によって、それらの構成要素であるエナンチオマーまたは立体異性体に分割できる。エナンチオマー及び立体異性体は、立体異性体的またはエナンチオマー的に純粋な中間体、試薬及び触媒から、周知の不斉合成法によって得ることもできる。
【０８２４】
リンカー：本明細書で使用する場合、「リンカー」とは、原子の群、例えば、１０～１，０００個の原子の群を指し、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニル及びイミン（ただし、これらに限らない）のような原子または基で構成されていることができる。本発明のリンカーは、第１の末端の核酸塩基または糖部分上の修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドと、第２の末端のペイロード、例えば、検出可能な物質または治療剤に結合できる。そのリンカーは、核酸配列への導入の妨げとならないような十分な長さであることができる。そのリンカーは、（例えば、２つ以上のキメラポリヌクレオチド分子もしくはＩＶＴポリヌクレオチドの結合を通じて）ポリヌクレオチド多量体、またはポリヌクレオチドコンジュゲートを形成するため、及び本明細書に記載されているようなペイロードを投与するためなど、いずれかの有用な目的で使用できる。リンカーに組み込むことができる化学基の例としては、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリールまたはヘテロシクリル（それぞれ、本明細書に記載されているように、任意に置換されていることができる）が挙げられるが、これらに限らない。リンカーの例としては、不飽和アルカン、ポリエチレングリコール（例えば、エチレングリコールモノマー単位またはプロピレングリコールモノマー単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコールもしくはテトラエチレングリコール）及びデキストランポリマー、ならびにこれらの誘導体が挙げられるが、これらに限らない。その他の例としては、例えば、還元剤または光分解を用いて切断できる、ジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）またはアゾ結合（－Ｎ＝Ｎ－）など、リンカー内の切断可能な部分が挙げられるが、これらに限らない。選択的に切断可能な結合の非限定的な例としては、例えば、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、あるいはその他の還元剤及び／または光分解を用いることによって切断できるアミド結合、ならびに、例えば酸性または塩基性の加水分解によって切断できるエステル結合が挙げられる。

【０８２５】
投与方法：本明細書で使用する場合、「投与方法」には、静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、または組成物を対象に送達するその他の方法を含めることができる。投与方法は、身体の所定の領域またはシステムに標的送達する（例えば、特異的に送達する）ように選択できる。
【０８２６】
改変：本明細書で使用する場合、「改変」とは、本発明の分子の状態または構造が変化したことを指す。分子は、化学的、構造的及び機能的な方法を含め、多くの方法で改変できる。いくつかの実施形態では、本発明のｍＲＮＡ分子は、例えば、天然のリボヌクレオチドＡ、Ｕ、Ｇ及びＣに関する場合、非天然のヌクレオシド及び／またはヌクレオチドを導入することによって改変されている。キャップ構造のような非カノニカルなヌクレオチドは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｕというリボヌクレオチドの化学構造とは異なるが、「改変」とはみなさない。
【０８２７】
粘液：本明細書で使用する場合、「粘液」とは、粘性があり、ムチン糖タンパク質を含む天然物質を指す。
【０８２８】
ナノ粒子組成物：本明細書で使用する場合、「ナノ粒子組成物」は、脂質を１つ以上含む組成物である。ナノ粒子組成物は典型的には、マイクロメートル以下程度のサイズであり、脂質二重層を含むことができる。ナノ粒子組成物には、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム（例えば脂質ベシクル）及びリポプレックスが含まれる。例えば、ナノ粒子組成物は、直径が５００ｎｍ以下である、脂質二重層を有するリポソームであることができる。
【０８２９】
天然：本明細書で使用する場合、「天然」とは、人工的な補助手段なしに、自然界に存在することを意味する。
【０８３０】
非ヒト脊椎動物：本明細書で使用する場合、「非ヒト脊椎動物」には、野生種及び飼育種を含め、Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ以外のあらゆる脊椎動物が含まれる。非ヒト脊椎動物の例としては、アルパカ、バンテン、バイソン、ラクダ、ネコ、ウシ、シカ、イヌ、ロバ、ガヤル、ヤギ、モルモット、ウマ、ラマ、ラバ、ブタ、ウサギ、トナカイ、ヒツジ、スイギュウ及びヤクのような哺乳動物が挙げられるが、これらに限らない。
【０８３１】
核酸配列：「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」または「ポリヌクレオチド配列」という用語は、同義的に用いられており、連続した核酸配列を指す。その配列は、１本鎖または２本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡのいずれか、例えばｍＲＮＡであることができる。
【０８３２】
「核酸」という用語には、その最も広い意味では、ヌクレオチドのポリマーを含むいずれの化合物及び／または物質も含まれる。これらのポリマーは、ポリヌクレオチドという場合が多い。本発明の例示的な核酸またはポリヌクレオチドとしては、リボ核酸（ＲＮＡ）、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、グリコール核酸（ＧＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックト核酸（ＬＮＡ、β－Ｄ－リボ構造を有するＬＮＡ、α－Ｌ－リボ構造を有するα－ＬＮＡ（ＬＮＡのジアステレオマー）、２’－アミノ官能基を有する２’－アミノ－ＬＮＡ、及び２’－アミノ官能基を有する２’－アミノ－α－ＬＮＡを含む）、エチレン核酸（ＥＮＡ）、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）、またはこれらのハイブリッドもしくはこれらを組み合わせたものが挙げられるが、これらに限らない。
【０８３３】
「コードするヌクレオチド配列」という語句は、ポリペプチドをコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ分子またはＤＮＡ分子）コード配列を指す。そのコード配列は、その核酸が

投与される個体または哺乳動物の細胞内での発現を誘導できるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに機能可能に連結された開始シグナル及び終止シグナルをさらに含むことができる。そのコード配列は、シグナルペプチドをコードする配列をさらに含むことができる。

【０８３４】

オフターゲット：本明細書で使用する場合、「オフターゲット」とは、いずれかの１つ以上の標的、遺伝子または細胞内転写産物に対する、意図していない作用のいずれかを指す。

【０８３５】

オープンリーディングフレーム：本明細書で使用する場合、「オープンリーディングフレーム」または「ＯＲＦ」とは、所定のリーディングフレーム内に終止コドンを含まない配列を指す。

【０８３６】

機能可能に連結された：本明細書で使用する場合、「機能可能に連結された」という語句は、２つ以上の分子、コンストラクト、転写産物、物体、部分などの間の機能的な連結を指す。

【０８３７】

任意に置換された：本明細書では、「任意に置換されたＸ」（例えば、任意に置換されたアルキル）という形式の語句は、Ｘが任意に置換されているＸ（例えば、「アルキルが任意に置換されている前記アルキル」）と同等であるように意図されている。特色「Ｘ」（例えば、アルキル）自体は任意ではないことを意味するように意図されている。

【０８３８】

一部分：本明細書で使用する場合、ポリヌクレオチドの「一部分」または「領域」は、ポリヌクレオチドの全長よりも短いポリヌクレオチド部分のいずれかとして定義されている。

【０８３９】

患者：本明細書で使用する場合、「患者」とは、治療を求めることができるか、治療が必要な状態であり得るか、治療を要するか、治療を受けているか、もしくは治療を受けることになっている対象、または特定の疾患もしくは状態に関する熟練の専門家によるケアを受けている対象を指す。いくつかの実施形態では、急性疾患を発症するリスクを予防するかまたは低下させるために、治療を必要とするか、要するか、または受け、すなわち、その治療は、予防的治療である。

【０８４０】

薬学的に許容される：「薬学的に許容される」という語句は、本明細書では、妥当な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答またはその他の問題もしくは合併症を伴わずに、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに適するとともに、合理的なベネフィット／リスク比に釣り合う化合物、物質、組成物及び／または剤形を指す目的で使用する。

【０８４１】

薬学的に許容される賦形剤：「薬学的に許容される賦形剤」という語句は、本明細書で使用する場合、本明細書に記載されている化合物以外の成分のうち、患者において実質的に無毒性及び非炎症性である特性を有するいずれかの成分（例えば、活性化合物を懸濁または溶解できるビヒクル）を指す。賦形剤としては例えば、抗接着剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮補助剤、崩壊剤、色素（着色剤）、軟化剤、乳化剤、充填剤（希釈剤）、フィルム形成剤またはコーティング剤、香味剤、香料、流動化剤（流動増強剤）、滑沢剤、保存剤、印刷インク、吸収剤、懸濁化剤、分散剤、甘味剤及び水和水を挙げることができる。例示的な賦形剤としては、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、炭酸カルシウム、（第二）リン酸カルシウム、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、

ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶性セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、セラック、二酸化ケイ素、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、クエン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（コーンスターチ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＣ及びキシリトールが挙げられるが、これらに限らない。

【０８４２】

薬学的に許容される塩：本開示は、本明細書に記載されている化合物の薬学的に許容される塩も含む。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される塩」は、開示されている化合物の誘導体であって、存在する酸部分または塩基部分を塩形態に変換することによって（例えば、遊離塩基基を適切な有機酸と反応させることによって）、その親化合物が改変されている誘導体を指す。薬学的に許容される塩の例としては、塩基性残基（アミンなど）の鉱酸塩もしくは有機酸塩、酸性残基（カルボン酸など）のアルカリ塩もしくは有機塩などが挙げられるが、これらに限らない。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、酢酸、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、ベンゼンスルホン酸、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、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、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩としては、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、ならびに無毒性のアンモニウム、４級アンモニウム及びアミンカチオンが挙げられ、これらとしては、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどが挙げられるが、これらに限らない。本開示の薬学的に許容される塩には、例えば無毒の無機酸または有機酸から形成される、親化合物の従来の無毒の塩が含まれる。本開示の薬学的に許容される塩は、塩基性部分または酸性部分を含む親化合物から、従来の化学的な方法によって合成できる。概ね、このような塩は、これらの化合物の遊離酸形態または遊離塩基形態を、化学量論的量の適切な塩基または酸と、水もしくは有機溶媒中で、またはこれら２つの混合物中で反応させることによって調製でき、概ね、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノールまたはアセトニトリルのような非水性媒質を使用する。適切な塩のリストは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８５，ｐ．１４１８，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ：Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅ，Ｐ．Ｈ．Ｓｔａｈｌ ａｎｄ Ｃ．Ｇ．Ｗｅｒｍｕｔｈ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ，２００８及びＢｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，６６，１－１９（１９７７）（それぞれ、参照により、その全体が本明細書に援用される）に見られる。

【０８４３】

薬学的に許容される溶媒和物：「薬学的に許容される溶媒和物」という用語は、本明細書で使用する場合、適切な溶媒の分子が結晶格子に組み込まれている本発明の化合物を意味する。適切な溶媒は、投与する用量において、生理的に耐え得るものである。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水またはそれらの混合物を含む溶液から結晶化、再結晶化または

沈殿させることによって調製できる。適切な溶媒の例は、エタノール、水（例えば、一水和物、二水和物及び三水和物）、Ｎ－メチルピロリジノン（ＮＭＰ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）、１，３－ジメチル－２－イミダゾリジノン（ＤＭＥＵ）、１，３－ジメチル－３，４，５，６－テトラヒドロ－２－（１Ｈ）－ピリミジノン（ＤＭＰＵ）、アセトニトリル（ＡＣＮ）、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、２－ピロリドン、安息香酸ベンジルなどである。水が溶媒であるときには、その溶媒和物は、「水和物」という。

【０８４４】

薬物動態：本明細書で使用する場合、「薬物動態」とは、分子または化合物の特性のうち、生物に投与した物質の末路の判定に関連する特性のいずれか１つ以上を指す。薬物動態は、吸収、分布、代謝及び排泄の程度及び速度を含むいくつかの領域に分類される。この分類は一般的に、ＡＤＭＥといい、（Ａ）吸収は、物質が血流に入るプロセスであり、（Ｄ）分布は、物質が、身体の体液及び組織に分散または拡散することであり、（Ｍ）代謝（または生体内変換）は、親化合物が娘代謝産物に不可逆的に変換されることであり、（Ｅ）排泄（または消失）は、物質が身体から消失することを指す。まれに、いくつかの薬物は、身体の組織中に不可逆的に蓄積する。

【０８４５】

物理化学的：本明細書で使用する場合、「物理化学的」とは、物理的及び／または化学的な特性を意味するか、またはそのような特性に関するものである。

【０８４６】

ポリヌクレオチド：「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用する場合、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、これらのアナログまたはこれらの混合物を含め、いずれかの長さのヌクレオチドのポリマーを指す。この用語は、一次構造の分子を指す。すなわち、この用語には、３本鎖、２本鎖及び１本鎖のデオキシリボ核酸（「ＤＮＡ」）、ならびに３本鎖、２本鎖及び１本鎖のリボ核酸（「ＲＮＡ」）が含まれる。例えば、アルキル化及び／またはキャッピングによって改変された形態のポリヌクレオチド、及び非改変の形態のポリヌクレオチドも含まれる。さらに具体的には、「ポリヌクレオチド」という用語には、スプライシングされているか、スプライシングされていないかにかかわらず、ポリデオキシリボヌクレオチド（２－デオキシ－Ｄ－リボースを含む）、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ及びｍＲＮＡを含むポリリボヌクレオチド（Ｄ－リボースを含む）、プリン塩基またはピリミジン塩基のＮ－グリコシドまたはＣ－グリコシドであるいずれかの他の種類のポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を含む他のポリマー、例えば、ポリアミド（例えば、ペプチド核酸「ＰＮＡ」）及びポリモルホリノポリマー、ならびにその他の合成の配列特異的核酸ポリマー（ただし、そのポリマーは、ＤＮＡ及びＲＮＡで見られるように、塩基対合及び塩基スタッキングが可能となる構成で、核酸塩基を含むものとする）が含まれる。特定の態様では、ポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡを含む。別の態様では、そのｍＲＮＡは、合成ｍＲＮＡである。いくつかの態様では、その合成ｍＲＮＡは、非天然の核酸塩基を少なくとも１つ含む。いくつかの態様では、特定の種類の核酸塩基はすべて、非天然の核酸塩基に置き換えられている（例えば、本明細書に開示されているポリヌクレオチドにおけるすべてのウリジンは、非天然の核酸塩基、例えば５－メトキシウリジンに置き換えられていることができる）。いくつかの態様では、ポリヌクレオチド（例えば、合成ＲＮＡまたは合成ＤＮＡ）は、天然の核酸塩基のみ、すなわち、合成ＤＮＡの場合には、Ａ（アデノシン）、Ｇ（グアノシン）、Ｃ（シチジン）及びＴ（チミジン）のみ、または合成ＲＮＡの場合には、Ａ、Ｃ、Ｇ及びＵ（ウリジン）のみを含む。

【０８４７】

本明細書に開示されているコドンマップにおけるＴ塩基は、ＤＮＡに存在し、対応するＲＮＡでは、Ｔ塩基は、Ｕ塩基に置き換えられることは当業者には明らかであろう。例えば、本明細書に開示されているコドン－ヌクレオチド配列であって、ＤＮＡ形態、例えば

、ベクターまたはｉｎ－ｖｉｔｒｏ翻訳（ＩＶＴ）の鋳型における配列は、対応する転写ｍＲＮＡにおいてはＵ塩基として転写されるＴ塩基を有することになる。この点においては、コドン最適化ＤＮＡ配列（Ｔを含む）及びそれに対応するｍＲＮＡ配列（Ｕを含む）の両方とも、本発明のコドン最適化ヌクレオチド配列とみなす。１つ以上の塩基を非天然の塩基に置き換えることによって、等価なコドンマップを作ることができることも、当業者は理解するであろう。すなわち、例えば、ＴＴＣというコドン（ＤＮＡマップ）は、ＵＵＣというコドン（ＲＮＡマップ）に対応することになり、ひいては、ΨΨＣというコドン（Ｕがシュードウリジンに置き換えられたＲＮＡマップ）に対応することになる。

【０８４８】

標準的なＡ－Ｔ及びＧ－Ｃの塩基対は、チミジンのＮ３－ＨとアデノシンのＮ１、及びチミジンのＣ４－オキシとアデノシンのＣ６－ＮＨ２の間、ならびにシチジンのＣ２－オキシとグアノシンのＣ２－ＮＨ２、シチジンのＮ３とグアノシンのＮ’－Ｈ、及びシチジンのＣ４－ＮＨ２とグアノシンのＣ６－オキシの間で水素結合が形成されるようになる条件下で形成される。すなわち、例えば、グアノシン（２－アミノ－６－オキシ－９－β－Ｄ－リボフラノシル－プリン）を改変して、イソグアノシン（２－オキシ－６－アミノ－９－β－Ｄ－リボフラノシル－プリン）を形成できる。このような改変は、標準的な塩基対をシトシンと有効には形成しなくなるヌクレオシド塩基をもたらす。しかしながら、シトシン（１－β－Ｄ－リボフラノシル－２－オキシ－４－アミノ－ピリミジン）を改変して、イソシトシン（１－β－Ｄ－リボフラノシル－２－アミノ－４－オキシ－ピリミジン－）を形成すると、グアノシンとは有効には塩基対を形成しないが、イソグアノシンと塩基対を形成する改変ヌクレオチドが得られる（Ｃｏｌｌｉｎｓらの米国特許第５，６８１，７０２号）。イソシトシンは、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）から入手可能であり、イソシチジンは、Ｓｗｉｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３２：１０４８９－１０４９６及びその参照文献によって記載されている方法によって調製でき、２’－デオキシ－５－メチル－イソシチジンは、Ｔｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１５：４４６１－４４６７及びその参照文献の方法によって調製でき、イソグアニンヌクレオチドは、Ｓｗｉｔｚｅｒらの１９９３年の上記文献及びＭａｎｔｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｂｉｏｃｈｅｍ．１４：５５９３－５６０１によって記載されている方法を用いて、またはＣｏｌｌｉｎｓらの米国特許第５，７８０，６１０号に記載されている方法によって調製できる。その他の非天然の塩基対は、２，６－ジアミノピリミジン及びその相補体（１－メチルピラゾロ－［４，３］ピリミジン－５，７－（４Ｈ，６Ｈ）－ジオン）の合成について、Ｐｉｃｃｉｒｉｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｎａｔｕｒｅ ３４３：３３－３７に記載されている方法によって合成できる。Ｌｅａｃｈ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：３６７５－３６８３及びＳｗｉｔｚｅｒらの上記文献に記載されているものなど、特有の塩基対を形成するこのような他の改変ヌクレオチド単位が知られている。

【０８４９】

ポリペプチド：「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書では、いずれかの長さのアミノ酸のポリマーを指す目的で、同義的に使用する。そのポリマーは、修飾アミノ酸を含むことができる。この用語には、天然において、または介入によって、例えば、ジスルフィド結合の形成、糖鎖付加、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションのようないずれかの他の操作もしくは修飾によって修飾されたアミノ酸ポリマーも含まれる。この定義内には、例えば、アミノ酸のアナログ（例えば、ホモシステイン、オルニチン、ｐ－アセチルフェニルアラニン、Ｄ－アミノ酸及びクレアチンのような非天然のアミノ酸を含む）、ならびに当該技術分野で知られている他の修飾を１つ以上含むポリペプチドも含まれる。

【０８５０】

この用語は、本明細書で使用する場合、いずれかのサイズ、構造または機能のタンパク質、ポリペプチド及びペプチドを指す。ポリペプチドには、コードされたポリヌクレオチ

ド産物、天然のポリペプチド、合成ポリペプチド、上記のホモログ、オルソログ、パラログ、断片及びその他の等価物、バリアント、ならびにアナログが含まれる。ポリペプチドは、単量体であることもできるし、または二量体、三量体もしくは四量体のような多分子の複合体であることもできる。ポリペプチドは、１本鎖または多重鎖のポリペプチドを含むこともできる。最も一般的なジスルフィド結合は、多重鎖ポリペプチドに見られる。ポリペプチドという用語は、１つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然のアミノ酸の人工的化学アナログであるアミノ酸ポリマーにも適用できる。いくつかの実施形態では、「ペプチド」は、５０アミノ酸長以下、例えば、約５アミノ酸長、１０アミノ酸長、１５アミノ酸長、２０アミノ酸長、２５アミノ酸長、３０アミノ酸長、３５アミノ酸長、４０アミノ酸長、４５アミノ酸長または５０アミノ酸長であることができる。

【０８５１】

ポリペプチドバリアント：本明細書で使用する場合、「ポリペプチドバリアント」という用語は、そのアミノ酸配列が、天然型配列または参照配列と異なる分子を指す。アミノ酸配列バリアントは、天然型配列または参照配列と比べて、アミノ酸配列内の特定の位置に、置換、欠失及び／または挿入を有することができる。通常、バリアントは、天然型配列または参照配列との同一性が少なくとも約５０％、同一性が少なくとも約６０％、同一性が少なくとも約７０％、同一性が少なくとも約８０％、同一性が少なくとも約９０％、同一性が少なくとも約９５％、同一性が少なくとも約９９％となる。いくつかの実施形態では、バリアントは、天然型配列または参照配列と、少なくとも約８０％または少なくとも約９０％同一となる。

【０８５２】

単位薬物量（ＰＵＤ）当たりのポリペプチド：本明細書で使用する場合、ＰＵＤまたは単位薬物量当たりの生成物は、生成物（ポリペプチドなど）の１日の総用量を小分けにした一部分、通常、１ｍｇ、１ｐｇ、１ｋｇなどを、体液中または組織中で測定したものとして定義し、通常、ｐｍｏｌ／ｍＬ、ｍｍｏｌ／ｍＬなどのように、体液中での測定値によって除した濃度で定義する。

【０８５３】

予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｎｇ）：本明細書で使用する場合、「予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｎｇ）」という用語は、感染症、疾患、障害及び／または状態の発症を部分的または完全に遅延させること、特定の感染症、疾患、障害及び／または状態の症状、特色または臨床徴候の１つ以上の発症を部分的または完全に遅延させること、特定の感染症、疾患、障害及び／または状態の症状、特色または徴候の１つ以上の発症を部分的もしくは完全に遅延させること、感染症、特定の疾患、障害及び／または状態からの進行を部分的または完全に遅延させること、及び／または感染症、疾患、障害及び／または状態と関連する病変を発現するリスクを低減することを指す。

【０８５４】

増殖する：本明細書で使用する場合、「増殖する」という用語は、成長、拡大もしくは増加するか、速やかに成長、拡大もしくは増加させることを意味する。「増殖性」とは、増殖する能力があることを意味する。「抗増殖性」とは、増殖特性に対抗するか、または増殖特性に当てはまらない特性があることを意味する。

【０８５５】

予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）：本明細書で使用する場合、「予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）」とは、疾患の拡散を予防する（ｐｒｅｖｅｎｔ）ための療法または一連の処置を指す。

【０８５６】

予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ）：本明細書で使用する場合、「予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ）」とは、健康を保つとともに、疾患の拡散を予防する（ｐｒｅｖｅｎｔ）するために講じる手段を指す。「免疫予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ）」とは、疾患の拡散を予防する（ｐｒｅｖｅｎｔ）ために、能動免疫または受動免疫を引き起こす手段を指す。

【０８５７】

タンパク質切断部位：本明細書で使用する場合、「タンパク質切断部位」とは、化学的手段、酵素的手段または光化学的手段によって、アミノ酸鎖の切断の制御を行うことができる部位を指す。

【０８５８】

タンパク質切断シグナル：本明細書で使用する場合、「タンパク質切断シグナル」とは、切断のために、ポリペプチドにフラッグ付けまたはマーク付けを行う少なくとも１つのアミノ酸を指す。

【０８５９】

目的のタンパク質：本明細書で使用する場合、「目的のタンパク質」または「所望のタンパク質」という用語には、本発明で提供するタンパク質、ならびにその断片、変異体、バリアント及び改変体が含まれる。

【０８６０】

近位：本明細書で使用する場合、「近位」という用語は、中心に近い位置、または該当する位置もしくは領域に近い位置にあることを意味する。

【０８６１】

シュードウリジン：本明細書で使用する場合、シュードウリジン（ψ）とは、ヌクレオシドであるウリジンのＣ－グリコシド異性体を指す。「シュードウリジンアナログ」は、シュードウリジンの修飾体、バリアント、アイソフォームまたは誘導体のいずれかである。例えば、シュードウリジンアナログとしては、１－カルボキシメチル－シュードウリジン、１－プロピニル－シュードウリジン、１－タウリノメチル－シュードウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－シュードウリジン、１－メチルシュードウリジン（ｍ１ψ）（Ｎ１－メチル－シュードウリジンとしても知られる）、１－メチル－４－チオ－シュードウリジン（ｍ１ｓ４ψ）、４－チオ－１－メチル－シュードウリジン、３－メチル－シュードウリジン（ｍ３ψ）、２－チオ－１－メチル－シュードウリジン、１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、ジヒドロシュードウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－メトキシウリジン、２－メトキシ－４－チオ－ウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、１－メチル－３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）シュードウリジン（ａｃｐ３ψ）及び２’－Ｏ－メチル－シュードウリジン（ψｍ）が挙げられるが、これらに限らない。

【０８６２】

精製：本明細書で使用する場合、「精製する」「精製された」、「精製」とは、望ましくない成分、汚染物質、混合物または不完全物から、実質的に純粋または清浄な状態にすることを意味する。

【０８６３】

参照核酸配列：「参照核酸配列」、「参照核酸」、「参照ヌクレオチド配列」または「参照配列」という用語は、配列を最適化できる出発核酸配列（例えばＲＮＡ配列、例えばｍＲＮＡ配列）を指す。いくつかの実施形態では、参照核酸配列は、野生型核酸配列、その断片またはそのバリアントである。いくつかの実施形態では、参照核酸配列は、以前に配列最適化された核酸配列である。

【０８６４】

塩：いくつかの態様では、本明細書に開示されている送達用医薬組成物は、その脂質構成要素のうちのいくつかの塩を含む。「塩」という用語には、いずれのアニオン性複合体及びカチオン性複合体も含まれる。アニオンの非限定的な例としては、無機アニオン及び有機アニオン、例えば、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、シュウ酸塩（例えば、ヘミシュウ酸塩）、リン酸塩、ホスホン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素、酸化物、炭酸塩、重炭酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、窒化物、重亜硫酸塩、硫化物、亜硫酸塩、重硫酸塩、硫酸塩、チオ硫酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、アクリル酸塩、ポリアクリル酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、イタコン酸塩、グリコール酸塩、グルコン酸塩、リンゴ酸塩、マンデル酸塩、チグリン酸、

アスコルビン酸塩、サリチル酸塩、ポリメタクリル酸塩、過塩素酸塩、塩素酸塩、亜塩素酸塩、次亜塩素酸塩、臭素酸塩、次亜臭素酸塩、ヨウ素酸塩、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、砒酸塩、亜砒酸塩、クロム酸塩、二クロム酸塩、シアン化物、シアン酸塩、チオシアン酸塩、水酸化物、過酸化物、過マンガン酸塩及びこれらの混合物が挙げられる。

【０８６５】

試料：本明細書で使用する場合、「試料」または「生体試料」という用語は、その組織部分、細胞部分または成分部分のサブセット（例えば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、臍帯血、尿、膣液及び精液（ただし、これらに限らない）を含む体液）を指す。試料にはさらに、生物全体、またはその組織部分、細胞部分もしくは成分部分のサブセットから調製したホモジネート、溶解液または抽出物、あるいはその画分または一部を含めることができ、例えば、血漿、血清、髄液、リンパ液、皮膚、気道、腸管及び尿生殖器管の外側部分、涙、唾液、乳汁、血液細胞、腫瘍、器官が挙げられるが、これらに限らない。試料はさらに、タンパク質または核酸分子のような細胞成分を含むことができるニュートリエントブロスまたはゲルのような培地を指す。

【０８６６】

シグナル配列：本明細書で使用する場合、「シグナル配列」、「シグナルペプチド」及び「トランジットペプチド」という語句は、同義的に用いられており、特定の細胞小器官、細胞コンパートメントへのタンパク質の輸送もしくは局在化、または細胞外への排出を誘導できる配列を指す。この用語には、シグナル配列ポリペプチド、及びシグナル配列をコードする核酸配列の両方が含まれる。すなわち、核酸との関連で、シグナル配列に言及している場合、実際には、シグナル配列ポリペプチドをコードする核酸配列を指す。

【０８６７】

シグナル伝達経路：「シグナル伝達経路」とは、シグナルを細胞の一部分から、細胞の別の部分に伝達する際に、役割を果たす様々なシグナル伝達分子間の生化学的な関係を指す。本明細書で使用する場合、「細胞表面受容体」という語句には、例えば、シグナルを受け取るとともに、そのようなシグナルを、細胞の血漿膜に通して伝達することができる分子及び分子の複合体が含まれる。

【０８６８】

類似性：本明細書で使用する場合、「類似性」という用語は、ポリマー分子間、例えばポリヌクレオチド分子間（例えば、ＤＮＡ分子間及び／またはＲＮＡ分子間）及び／またはポリペプチド分子間の全体的な類縁性を指す。互いに対するポリマー分子の類似性パーセントの計算は、同一性パーセントの計算と同じ形式で行うことができる。ただし、類似性パーセントの計算では、当該技術分野で理解されているような保存的置換を考慮に入れる。

【０８６９】

１回単位用量：本明細書で使用する場合、「１回単位用量」は、１回用量で／１度に／１つの経路で／１つの接触点で、すなわち、１回の投与イベントで投与するいずれかの治療剤の用量である。

【０８７０】

分割用量：本明細書で使用する場合、「分割用量」は、１回単位用量または１日の総用量を２回以上の用量に分けることである。

【０８７１】

特異的送達：本明細書で使用する場合、「特異的送達」「特異的に送達する」または「特異的に送達すること」という用語は、目的の標的組織（例えば、哺乳動物の肝臓）に、オフターゲット組織（例えば、哺乳動物の脾臓）よりも多く（例えば少なくとも１．５倍以上、少なくとも２倍以上、少なくとも３倍以上、少なくとも４倍以上、少なくとも５倍以上、少なくとも６倍以上、少なくとも７倍以上、少なくとも８倍以上、少なくとも９倍以上、少なくとも１０倍以上）のポリヌクレオチドをナノ粒子によって送達することを意味する。特定の組織へのナノ粒子の送達レベルは、組織内で産生されたタンパク質の量を

前記組織の重量と比較するか、組織中のポリヌクレオチドの量を前記組織の重量と比較するか、組織内で産生されたタンパク質の量を前記組織中の総タンパク質量と比較するか、または組織中のポリヌクレオチドの量を前記組織中の総ポリヌクレオチド量と比較することによって測定できる。例えば、腎血管を標的とする際には、ポリヌクレオチドの全身投与後に、肝臓または脾臓に送達されたポリヌクレオチドと比べて、組織の１ｇ当たり１．５倍、２倍、３倍、５倍、１０倍、１５倍または２０倍以上のポリヌクレオチドが腎臓に送達される場合に、ポリヌクレオチドは、肝臓及び脾臓と比べて、哺乳動物の腎臓に特異的に供給される。ナノ粒子が標的組織に特異的に送達する能力は、治療を受ける対象において求める必要はなく、動物モデル（例えばラットモデル）のようなサロゲートにおいて求めることができることは分かるであろう。

【０８７２】

安定：本明細書で使用する場合、「安定」とは、反応混合物から、有用な程度の純度まで単離するのに耐えられるほど、かつ場合によっては、有効な治療剤に調合できるほど十分にロバストである化合物を指す。

【０８７３】

安定化：本明細書で使用する場合、「安定化する」、「安定化された」、「安定化領域」という用語は、安定させるか、安定することを意味する。

【０８７４】

立体異性体：本明細書で使用する場合、「立体異性体」という用語は、あらゆる考え得る様々な異性体、及び化合物（例えば、本明細書に記載されているいずれかの式の化合物）が取ることができる立体構造的な形態、特には、その基本的な分子構造のあらゆる考え得る立体化学的及び立体構造的な異性体、すべてのジアステレオマー、エナンチオマー及び／または配座異性体を指す。本発明のいくつかの化合物は、様々な互変異性体で存在でき、それらのいずれも、本発明の範囲内に含まれる。

【０８７５】

対象：「対象」、「個体」、「動物」、「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後診断または治療が望まれるいずれの対象、特に哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象としては、ヒト、飼育動物、家畜、動物園の動物、スポーツ用の動物、ペットの動物（イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ（ｃａｔｔｌｅ）、ウシ（ｃｏｗ）など）、霊長類動物（猿人、サル、オランウータン及びチンパンジーなど）、イヌ科動物（イヌ及びオオカミなど）、ネコ科動物（ネコ、ライオン及びトラなど）、ウマ科動物（ウマ、ロバ及びシマウマなど）、クマ、食用動物（ウシ、ブタ及びヒツジなど）、有蹄類動物（シカ及びキリンなど）、齧歯類動物（マウス、ラット、ハムスター及びモルモットなど）などが挙げられるが、これらに限らない。ある特定の実施形態では、哺乳動物は、ヒト対象である。別の実施形態では、対象は、ヒト患者である。特定の実施形態では、対象は、治療の必要なヒト患者である。

【０８７６】

実質的に：本明細書で使用する場合、「実質的に」という用語は、該当する特徴または特性のすべてまたはほぼすべての範囲または程度を呈する定性的状態を指す。生物学的及び化学的な特徴は、完全な状態になったり、及び／または進行して完全な状態になったり、あるいは絶対的な結果を達成したりまたは回避したりすることは、あったとしても稀であることを、生物学分野の当業者は理解するであろう。したがって、「実質的に」という用語は、本明細書では、多くの生物学的及び化学的な特徴につきものであるように、潜在的に完全な状態がないことを把握する目的で用いられている。

【０８７７】

実質的に等しい：本明細書で使用する場合、投与時間の違いに関する場合、この用語は、±２％を意味する。

【０８７８】

実質的に同時：本明細書で使用する場合、かつ複数回投与に関する場合、この用語は、２秒以内を意味する。

【０８７９】
罹患：疾患、障害及び／または状態を罹患している個体は、その障害、疾患及び／または状態の症状の１つ以上があると診断されているか、またはその症状を示している。
【０８８０】
罹患しやすい：疾患、障害及び／または状態「に罹患しやすい」個体は、その障害、疾患及び／または状態の症状があるとは診断されておらず、及び／またはその症状を示しているとはできないが、疾患またはその症状を発現する傾向がある。いくつかの実施形態では、疾患、障害及び／または状態（例えばＰＫＵ）に罹患しやすい個体は、（１）その障害、疾患及び／または状態の発現と関連する遺伝子変異、（２）その障害、疾患及び／または状態の発現と関連する遺伝子多型、（３）その障害、疾患及び／または状態と関連するタンパク質及び／または核酸の発現及び／または活性の増大及び／または低減、（４）その障害、疾患及び／または状態の発現と関連する習慣及び／またはライフスタイル、（５）その障害、疾患及び／または状態の家族歴、ならびに（６）その障害、疾患及び／または状態の発現と関連する微生物への暴露及び／または感染のうちの１つ以上によって特徴付けることができる。いくつかの実施形態では、疾患、障害及び／または状態に罹患しやすい個体は、その障害、疾患及び／または状態を発現すると推定される。いくつかの実施形態では、疾患、障害及び／または状態に罹患しやすい個体は、その障害、疾患及び／または状態を発現しないと推定される。
【０８８１】
徐放：本明細書で使用する場合、「徐放」という用語は、医薬組成物または化合物の放出プロファイルのうち、所定の期間にわたる放出速度に適合するプロファイルを指す。
【０８８２】
合成：「合成」という用語は、人間の手によって生成、調製及び／または製造することを意味する。本発明のポリヌクレオチドまたはその他の分子の合成は、化学的または酵素的なものであることができる。
【０８８３】
標的細胞：本明細書で使用する場合、「標的細胞」とは、目的の細胞のいずれか１つ以上を指す。その細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｉｎ ｖｉｖｏ、ｉｎ ｓｉｔｕ、または生物の組織内もしくは器官内に見出すことができる。その生物は、動物、例えば、哺乳動物、ヒト、対象または患者であることができる。
【０８８４】
標的組織：本明細書で使用する場合、「標的組織」とは、ポリヌクレオチドを送達すると、所望の生物学的及び／または薬理的な作用が得られる目的の種類の組織のいずれか１つ以上を指す。目的の標的組織の例としては、特異的な組織、器官及びシステム、またはそれらの群が挙げられる。特定の用途では、標的組織は、肝臓、腎臓、肺、脾臓または血管内（例えば、冠動脈内もしくは大腿血管内）の血管内皮であることができる。「オフターゲット組織」とは、コードされるタンパク質が発現しても、所望の生物学的及び／または薬理的な作用が得られない種類の組織のいずれか１つ以上を指す。
【０８８５】
オフターゲット組織に治療剤が存在することは、（ｉ）投与部位から、拡散もしくは血流によって、末梢組織もしくは遠隔のオフターゲット組織に、ポリヌクレオチドが漏出する（例えば、特定の組織内でポリペプチドを発現させるように意図されているポリヌクレオチドが、オフターゲット組織に到達し、そのポリペプチドが、オフターゲット組織内で発現することになる）か、（ｉｉ）上記のようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの投与後に、拡散もしくは血流によって、末梢組織もしくは遠隔のオフターゲット組織に、ポリペプチドが漏出する（例えば、ポリヌクレオチドが、標的組織内でポリペプチドを発現して、そのポリペプチドが、末梢組織まで拡散することになる）ことの結果であることができる。
【０８８６】
ターゲティング配列：本明細書で使用する場合、「ターゲティング配列」という語句は

、タンパク質またはポリペプチドの輸送または局在化を誘導できる配列を指す。

【０８８７】

末端：本明細書で使用する場合、「末端（ｔｅｒｍｉｎｉ）」または「末端（ｔｅｒｍｉｎｕｓ）」という用語は、ポリペプチドに言及しているときには、ペプチドまたはポリペプチドの端を指す。このような端は、ペプチドまたはポリペプチドの最初または最後の部位のみに限らず、末端領域内の追加のアミノ酸も含むことができる。本発明のポリペプチドベースの分子は、Ｎ末端（遊離アミノ基（ＮＨ２）を有するアミノ酸によって終端する）及びＣ末端（遊離カルボキシル基（ＣＯＯＨ）を有するアミノ酸によって終端する）の両方を有するものとして特徴付けることができる。本発明のタンパク質は、場合によっては、複数のポリペプチド鎖が、ジスルフィド結合または非共有結合性の力によってつながったもので構成されている（マルチマー、オリゴマー）。これらの種類のタンパク質は、Ｎ末端及びＣ末端を複数有することになる。あるいは、場合によっては、ポリペプチドが、有機コンジュゲートのように、非ポリペプチドベースの部分で開始または終端できるように、ポリペプチドの末端を修飾できる。

【０８８８】

治療剤：「治療剤」という用語は、対象に投与したときに、治療的、診断的及び／または予防的な作用を有するか、及び／または所望の生物学的及び／または薬理的な作用を誘発する薬剤を指す。例えば、いくつかの実施形態では、ＰＡＨポリペプチドコードするｍＲＮＡが、治療剤であることができる。

【０８８９】

治療上有効な量：本明細書で使用する場合、「治療上有効な量」という用語は、送達する薬剤（例えば、核酸、薬物、治療剤、診断剤、予防剤など）の量のうち、感染症、疾患、障害及び／または状態に罹患しているか、または罹患しやすい対象に投与したときに、その感染症、疾患、障害及び／または状態を治療したり、その症状を改善したり、それを診断したり、それを予防したり、及び／またはその発症を遅延したりするのに十分である量を意味する。

【０８９０】

治療上有効な転帰：本明細書で使用する場合、「治療上有効な転帰」という用語は、感染症、疾患、障害及び／または状態に罹患しているか、または罹患しやすい対象において、感染症、疾患、障害及び／または状態を治療したり、その症状を改善したり、それを診断したり、それを予防したり、及び／またはその発症を遅延したりするのに十分である転帰を意味する。

【０８９１】

１日の総用量：本明細書で使用する場合、「１日の総用量」は、２４時間の期間に投与または処方する量である。１日の総用量は、１回単位用量または分割用量として投与できる。

【０８９２】

転写因子：本明細書で使用する場合、「転写因子」という用語は、ＤＮＡのＲＮＡへの転写を、例えば転写の活性化または抑制によって調節するＤＮＡ結合タンパク質を指す。転写因子には、転写の調節を単独で行うものもあれば、他のタンパク質と連携して作用するものもある。いくつかの転写因子は、特定の条件下で、転写の活性化及び転写の抑制の両方を行うことができる。概ね、転写因子は、特異的な標的配列、または標的遺伝子の調節領域内の特異的なコンセンサス配列との類似性の高い配列に結合する。転写因子は、標的遺伝子の転写を単独で、または他の分子との複合体で調節できる。

【０８９３】

転写：本明細書で使用する場合、「転写」という用語は、ｍＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ配列またはｍＲＮＡ鋳型）をＤＮＡ（例えば、ＤＮＡ鋳型またはＤＮＡ配列）から産生する方法を指す。

【０８９４】

トランスフェクション：本明細書で使用する場合、「トランスフェクション」は、ポリ

ヌクレオチド（例えば外因性の核酸）を細胞に導入することを指し、そのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが発現する（例えばｍＲＮＡ）か、またはそのポリペプチドが、細胞機能を調節する（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）。本明細書で使用する場合、核酸配列の「発現」とは、ポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ）がポリペプチドもしくはタンパク質に翻訳されること、及び／またはポリペプチドもしくはタンパク質の翻訳後修飾を指す。トランスフェクションの方法としては、化学的方法、物理的処理及びカチオン性脂質または混合物が挙げられるが、これらに限らない。

【０８９５】

治療する、治療、療法：本明細書で使用する場合、「治療する」、「治療」または「療法」という用語は、疾患、例えば高フェニルアラニン血症（ＰＫＵ）の症状または特色の１つ以上を部分的または完全に緩和、改善、好転、軽減するか、その発症を遅延するか、その進行を阻害するか、その重症度を低下させるか、及び／またはその発生率を低下させることを指す。例えば、ＰＫＵを「治療する」とは、その疾患と関連する症状を軽減するか、患者の寿命を延ばす（生存率を上昇させる）か、その疾患の重症度を低下させるか、その疾患の発症を予防または遅延することなどを指すことができる。治療は、疾患、障害及び／または状態の徴候を示していない対象、及び／または疾患、障害及び／または状態の初期徴候しか示していない対象に、その障害、疾患及び／または状態と関連する病変を発現するリスクを低下させる目的で行うことができる。

【０８９６】

非改変：本明細書で使用する場合、「非改変」とは、何らかの方法で変更を加える前の物質、化合物または分子のいずれかを指す。非改変は、常にそうであるわけではないが、野生型または天然型の生体分子を指す。分子には、一連の改変を加えることができ、それによって、各改変分子は、その後の改変の際に、「非改変」出発分子として機能することができる。

【０８９７】

ウラシル：ウラシルは、ＲＮＡの核酸における４つの核酸塩基のうちの１つであり、Ｕという文字によって表される。ウラシルは、リボース環に結合して、またはより具体的には、β－Ｎ１－グリコシド結合を介して、リボフラノースに結合して、ヌクレオシドウリジンをもたらすことができる。ヌクレオシドウリジンも一般に、その核酸塩基の１文字表記に従って略称される（すなわちＵ）。したがって、本開示の文脈では、ポリヌクレオチド配列内の単量体がＵであるときには、そのＵは、「ウラシル」または「ウリジン」として互換的に称される。

【０８９８】

ウリジン含有量：「ウリジン含有量」または「ウラシル含有量」という用語は、互換的であり、特定の核酸配列に存在するウラシルまたはウリジンの量を指す。ウリジン含有量またはウラシル含有量は、絶対値（配列内のウリジンもしくはウラシルの総数）、または相対値（核酸配列内の核酸塩基の総数に対する、ウリジンもしくはウラシルのパーセンテージ）として表すことができる。

【０８９９】

ウリジン改変配列：「ウリジン改変配列」という用語は、候補核酸配列のウリジン含有量及び／またはウリジンパターンと比べて、全体もしくは局部のウリジン含有量が異なる（ウリジン含有量が多いかもしくは少ない）か、ウリジンパターンが異なる（例えば、グラジエント分布もしくはクラスター化が見られる）配列最適化核酸（例えば、合成ｍＲＮＡ配列）を指す。本開示の文脈では、「ウリジン改変配列」及び「ウラシル改変配列」は、等価的及び同義的とみなす。

【０９００】

「高ウリジンコドン」は、ウリジンを２個または３個含むコドンとして定義し、「低ウリジンコドン」は、ウリジンを１個含むコドンとして定義し、「無ウリジンコドン」は、ウリジンを全く含まないコドンである。いくつかの実施形態では、ウリジン改変配列は、高ウリジンコドンの低ウリジンコドンへの置換、高ウリジンコドンの無ウリジンコドンへ

の置換、低ウリジンコドンの高ウリジンコドンへの置換、低ウリジンコドンの無ウリジンコドンへの置換、無ウリジンコドンの低ウリジンコドンへの置換、無ウリジンコドンの高ウリジンコドンへの置換、及びこれらを組み合わせたものを含む。いくつかの実施形態では、高ウリジンコドンを別の高ウリジンコドンに置き換えることができる。いくつかの実施形態では、低ウリジンコドンを別の低ウリジンコドンに置き換えることができる。いくつかの実施形態では、無ウリジンコドンを別の無ウリジンコドンに置き換えることができる。ウリジン改変配列では、ウリジンが濃縮されていることも、またはウリジンが希薄化されていることもできる。

【０９０１】

ウリジンの濃縮：本明細書で使用する場合、「ウリジンの濃縮」という用語及び文法的な変形表現は、配列最適化核酸（例えば合成ｍＲＮＡ配列）内のウリジン含有量（絶対値またはパーセンテージ値で表す）が、対応する候補核酸配列のウリジン含有量と比べて増大することを指す。ウリジンの濃縮は、候補核酸配列内のコドンを、それよりもウリジン核酸塩基の少ない同義コドンに置換することによって行うことができる。ウリジンの濃縮は、全体的（すなわち、候補核酸配列の完全長に対する濃縮）または局部的（すなわち、候補核酸配列の部分配列もしくは領域に対する濃縮）であることができる。

【０９０２】

ウリジンの希薄化：本明細書で使用する場合、「ウリジンの希薄化」という用語及び文法的な変形表現は、配列最適化核酸（例えば合成ｍＲＮＡ配列）内のウリジン含有量（絶対値またはパーセンテージ値で表す）が、対応する候補核酸配列のウリジン含有量と比べて低下することを指す。ウリジンの希薄化は、候補核酸配列内のコドンを、それよりもウリジン核酸塩基の少ない同義コドンに置換することによって行うことができる。ウリジンの希薄化は、全体的（すなわち、候補核酸配列の完全長に対する希薄化）または局部的（すなわち、候補核酸配列の部分配列もしくは領域に対する希薄化）であることができる。

【０９０３】

バリアント：「バリアント」という用語は、本開示で使用する場合、天然のバリアント（例えば、多型、アイソフォームなど）、及び天然型配列または出発配列（例えば野生型配列）内のアミノ酸残基の少なくとも１つが、除去されており、その代わりに、同じ位置に、異なるアミノ酸が挿入されている人工のバリアントの両方を指す。これらのバリアントは、「置換バリアント」として記載できる。この置換は、１つであることもできるし（その分子内の１つのアミノ酸のみが置換されている）、または複数であることもできる（同じ分子内で、２つ以上のアミノ酸が置換されている）。アミノ酸を挿入するか、または欠失させると、得られたバリアントは、それぞれ、「挿入バリアント」または「欠失バリアント」となる。

【０９０４】

開始コドン：本明細書で使用する場合、「開始（ｉｎｉｔｉａｔｉｏｎ）コドン」という用語は、「開始（ｓｔａｒｔ）コドン」という用語と同義的に用いられており、リボソームによって翻訳されるオープンリーディングフレームの最初のコドンを指し、アデニン－ウラシル－グアニンが連結した核酸塩基のトリプレットで構成される。開始コドンは、アデニン（Ａ）、ウラシル（Ｕ）及びグアニン（Ｇ）の最初の文字によって示され、簡潔に「ＡＵＧ」と書かれることが多い。天然のｍＲＮＡでは、ＡＵＧ以外のコドン（本明細書では、「代替的な開始コドン」という）が開始コドンとして使われることもあるが、本明細書に記載されているポリヌクレオチドの開始コドンでは、ＡＵＧコドンを用いる。翻訳開始プロセスの際には、リボソームが結合した開始ｔＲＮＡ（Ｍｅｔ－ｔＲＮＡｉＭｅｔ）のアンチコドンとの相補的塩基対合によって、開始コドンを含む配列が認識される。オープンリーディングフレームは、ＡＵＧ開始コドンを２個以上含むこともあり、このコドンを、本明細書では「順次的開始コドン」という。

【０９０５】

開始コドンは、翻訳開始の際に重要な役割を果たす。開始コドンは、リボソームによって翻訳されるオープンリーディングフレームの最初のコドンである。典型的には、開始コ

ドンは、ヌクレオチドトリプレットＡＵＧを含むが、場合によっては、翻訳開始は、別のヌクレオチドで構成される他のコドンで行われることもある。真核生物における翻訳の開始は、メッセンジャーＲＮＡ分子（ｍＲＮＡ）、４０Ｓリボソームサブユニット、翻訳機構の他の成分（例えば、真核生物開始因子（ｅＩＦ））の間で、多数のタンパク質－タンパク質相互作用、タンパク質－ＲＮＡ相互作用、及びＲＮＡ－ＲＮＡ相互作用を伴う多段階の生化学プロセスである。ｍＲＮＡ翻訳開始の最新モデルでは、プレ開始複合体（あるいは、「４３Ｓプレ開始複合体」。「ＰＩＣ」と略記される）が、所定の翻訳促進性ヌクレオチドコンテクスト（Ｋｏｚａｋ配列）内に存在する最初のＡＵＧコドンに遭遇するまで、ヌクレオチドを５’から３’の方向でスキャンすることによって、ｍＲＮＡ上の動員部位（典型的には５’キャップ）から開始コドンに移行すると仮定されている（Ｋｏｚａｋ（１９８９）Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １０８：２２９－２４１）。開始Ｍｅｔ－ｔＲＮＡｉＭｅｔというトランスファーＲＮＡのアンチコドンを含むヌクレオチドと、ｍＲＮＡの開始コドンを含むヌクレオチドとの間で相補的塩基対合が行われると、ＰＩＣによるスキャニングは終了する。このＡＵＧコドンと、Ｍｅｔ－ｔＲＮＡｉＭｅｔアンチコドンとの間で、産生性の塩基対合が行われると、６０Ｓリボソーム大サブユニットがＰＩＣに結合して、翻訳伸長能力のある活性リボソームの形成に至る構造的及び生化学な一連のイベントが誘発される。

【０９０６】

Ｋｏｚａｋ配列：「Ｋｏｚａｋ配列」という用語（「Ｋｏｚａｋコンセンサス配列」ともいう）は、遺伝子またはオープンリーディングフレームの発現を増強するための翻訳開始促進エレメントを指し、真核生物では、５’ＵＴＲに位置する。Ｋｏｚａｋコンセンサス配列は元々、開始コドン（ＡＵＧ）周囲の単独変異が、プレプロインスリン遺伝子の翻訳に及ぼす作用の分析後に、ＧＣＣＲＣＣ（配列番号７９）（Ｒ＝プリンである）という配列として定義された（Ｋｏｚａｋ（１９８６）Ｃｅｌｌ ４４：２８３－２９２）。本明細書に開示されているポリヌクレオチドは、Ｋｏｚａｋコンセンサス配列、またはその誘導体もしくは改変体を含む。（翻訳エンハンサー組成物及びその使用方法の例は、Ａｎｄｒｅｗｓらの米国特許第５，８０７，７０７号（参照により、その全体が本明細書に援用される）、Ｃｈｅｒｎａｊｏｖｓｋｙの米国特許第５，７２３，３３２号（参照により、その全体が本明細書に援用される）、Ｗｉｌｓｏｎの米国特許第５，８９１，６６５号（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい。）

【０９０７】

改変：本明細書で使用する場合、「改変された」または「改変」とは、ポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ）の組成または構造の変化状態または変化を指す。ポリヌクレオチドは、化学的方法、構造的方法及び／または機能的方法を含む様々な方法で改変し得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ＲＮＡエレメントが１つ以上導入することによって、構造的に改変することができ、そのＲＮＡエレメントは、１つ以上の機能（例えば翻訳調節活性）をもたらす配列及び／またはＲＮＡ二次構造（複数可）を含む。したがって、本開示のポリヌクレオチドは、１つ以上の改変で構成されていてよい（例えば、１つ以上の化学的改変、構造的改変または機能的改変（これらをいずれかに組み合わせたものを含む）を含んでよい）。

【０９０８】

核酸塩基：本明細書で使用する場合、「核酸塩基」という用語（あるいは、「ヌクレオチド塩基」または「含窒素塩基」）とは、核酸で見られるプリン複素環式化合物またはピリミジン複素環式化合物を指し、天然のプリン及びピリミジンの誘導体またはアナログであって、その核酸またはその一部分もしくはセグメントに、特性（例えば、結合親和性、ヌクレアーゼ耐性、化学的安定性）の改善をもたらすいずれの誘導体またはアナログも含む。アデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシルが、天然の核酸で主に見られる核酸塩基である。天然のもの以外には、当該技術分野で知られており、及び／または本明細書に記載されている非天然及び／または合成の核酸塩基を核酸に組み込むことができる。

【０９０９】
ヌクレオシド／ヌクレオチド：本明細書で使用する場合、「ヌクレオシド」という用語は、糖分子（例えば、ＲＮＡではリボース、もしくはＤＮＡではデオキシリボース）、またはその誘導体もしくはアナログが、核酸塩基（例えば、プリンもしくはピリミジン）、またはその誘導体もしくはアナログ（本明細書では、「核酸塩基」ともいう）に共有結合したものを含むが、ヌクレオシド間結合基（例えばリン酸基）が存在しない化合物を指す。本明細書で使用する場合、「ヌクレオチド」という用語は、ヌクレオシド間結合基（例えばリン酸基）に共有結合したヌクレオシド、あるいは核酸またはその一部分もしくはセグメントに、化学的特性及び／または機能的特性（例えば、結合親和性、ヌクレアーゼ耐性、化学的安定性）の改善をもたらすそのいずれかの誘導体、アナログまたは改変体を指す。

【０９１０】
核酸：本明細書で使用する場合、「核酸」という用語は、その最も広範な意味で用いられており、この用語には、ヌクレオチドのポリマー、またはその誘導体もしくはアナログを含むいずれかの化合物及び／または物質が含まれる。これらのポリマーは、「ポリヌクレオチド」という場合が多い。したがって、本明細書で使用する場合、「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、等価的であり、同義的に使用する。本開示の例示的な核酸またはポリヌクレオチドとしては、リボ核酸（ＲＮＡ）、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、ＲＮＡｉ誘導剤、ＲＮＡｉ剤、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍＲＮＡ、改変ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、リボザイム、触媒ＤＮＡ、三重らせんの形成を誘導するＲＮＡ、トレオース核酸（ＴＮＡ）、グリコール核酸（ＧＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックト核酸（ＬＮＡ、β－Ｄ－リボ構造を有するＬＮＡ、α－Ｌ－リボ構造を有するα－ＬＮＡ（ＬＮＡのジアステレオマー）、２’－アミノ官能基を有する２’－アミノ－ＬＮＡ、及び２’－アミノ官能基を有する２’－アミノ－α－ＬＮＡを含む）、またはこれらのハイブリッドが挙げられるが、これらに限らない。

【０９１１】
核酸構造：本明細書で使用する場合、「核酸構造」という用語（「ポリヌクレオチド構造」と同義的に使用する）は、核酸（例えばｍＲＮＡ）を構成する原子、化学的構成要素、エレメント、モチーフの配置もしくは編成、及び／または連結されたヌクレオチド、その誘導体もしくはアナログの配列を指す。この用語は、核酸の２次元状態または３次元状態も指す。したがって、「ＲＮＡ構造」という用語は、ＲＮＡ分子（例えばｍＲＮＡ）を構成する原子、化学的構成要素、エレメント、モチーフの配置もしくは編成、及び／または連結されたヌクレオチド、その誘導体もしくはそのアナログの配列を指し、及び／またはＲＮＡ分子の２次元状態及び／または３次元状態を指す。核酸構造はさらに、編成上の複雑度の上昇に基づき、本明細書において「分子構造」、「一次構造」、「二次構造」及び「三次構造」と称する４つの編成上のカテゴリーに分類できる。

【０９１２】
オープンリーディングフレーム：本明細書で使用する場合、「オープンリーディングフレーム」という用語（「ＯＲＦ」と略記される）は、ｍＲＮＡ分子のセグメントまたは領域のうち、ポリペプチドをコードするセグメントまたは領域を指す。ＯＲＦは、重複しないフレーム内コドンからなる連続的な領域を含み、開始コドンから始まって、終止コドンで終わり、リボソームによって翻訳される。

【０９１３】
プレ開始複合体（ＰＩＣ）：本明細書で使用する場合、「プレ開始複合体」という用語（あるいは、「４３Ｓプレ開始複合体」。「ＰＩＣ」と略記される）は、４０Ｓリボソームサブユニット、真核生物開始因子（ｅＩＦ１、ｅＩＦ１Ａ、ｅＩＦ３、ｅＩＦ５）及びｅＩＦ２－ＧＴＰ－Ｍｅｔ－ｔＲＮＡｉＭｅｔ三元複合体を含むリボ核タンパク質複合体であって、ｍＲＮＡ分子の５’キャップに本質的に結合でき、結合後、リボソームが５’ＵＴＲのスキャニングを行えるようにできるリボ核タンパク質複合体を指す。

【０９１４】

ＲＮＡエレメント：本明細書で使用する場合、「ＲＮＡエレメント」という用語は、ＲＮＡ分子の部分、断片またはセグメントのうち、生物学的機能をもたらし、及び／または生物学的活性（例えば翻訳調節活性）を有する部分、断片またはセグメントを指す。本明細書に記載されているようなＲＮＡエレメントを１つ以上組み込むことによって、ポリヌクレオチドを改変すると、その改変ポリヌクレオチドに、所望の機能的特性が１つ以上もたらされる。本明細書に記載されているようなＲＮＡエレメントは、天然のエレメント、非天然のエレメント、合成のエレメント、操作済みのエレメントまたはこれらをいずれかに組み合わせたものであることができる。例えば、調節活性をもたらす天然のＲＮＡエレメントとしては、ウイルス、原核生物及び真核生物（例えばヒト）のトランスクリプトームにわたって見られるエレメントが挙げられる。ＲＮＡエレメント、特に、真核生物ｍＲＮＡ及び翻訳されるウイルスＲＮＡは、細胞内の多くの機能の媒介に関与することが示されている。例示的な天然のＲＮＡエレメントとしては、翻訳開始エレメント（例えば、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）。Ｋｉｅｆｔ ｅｔ ａｌ．，（２００１）ＲＮＡ ７（２）：１９４－２０６を参照されたい）、翻訳エンハンサーエレメント（例えば、ＡＰＰ ｍＲＮＡ翻訳エンハンサーエレメント。Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４（１０）：６４２１－６４３１を参照されたい）、ｍＲＮＡ安定性エレメント（例えば、ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）。Ｇａｒｎｅａｕ ｅｔ ａｌ．，（２００７）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ８（２）：１１３－１２６を参照されたい）、翻訳抑制エレメント（例えば、Ｂｌｕｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｍｅｃｈ Ｄｅｖ １１０（１－２）：９７－１１２を参照されたい）、タンパク質結合ＲＮＡエレメント（例えば、鉄応答性エレメント。Ｓｅｌｅｚｎｅｖａ ｅｔ ａｌ．，（２０１３）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ４２５（１８）：３３０１－３３１０を参照されたい）、細胞質ポリアデニル化エレメント（Ｖｉｌｌａｌｂａ ｅｔ ａｌ．，（２０１１）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｇｅｎｅｔ Ｄｅｖ ２１（４）：４５２－４５７）及び触媒ＲＮＡエレメント（例えばリボザイム。Ｓｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，（２００９）Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １７８９（９－１０）：６３４－６４１を参照されたい）が挙げられるが、これらに限らない。

【０９１５】

滞留時間：本明細書で使用する場合、「滞留時間」という用語は、ｍＲＮＡ分子沿いの別個の位置または場所に、プレ開始複合体（ＰＩＣ）またはリボソームが留まる時間を指す。

【０９１６】

翻訳調節活性：本明細書で使用する場合、「翻訳調節活性」という用語（「翻訳調節機能」と同義的に使用する）は、ＰＩＣ及び／またはリボソームの活性を含め、翻訳機構の活性を調節する（例えば、調整する、影響を及ぼす、制御する、変化させる）生物学的な機能、機構またはプロセスを指す。いくつかの態様では、所望の翻訳調節活性は、ｍＲＮＡ翻訳の翻訳忠実度を促進及び／または増強する。いくつかの態様では、所望の翻訳調節活性は、スキャニングの漏れを低減及び／または阻害する。

【０９１７】

均等物及び範囲

当業者は、単なる慣用的な実験を用いて、本明細書に記載されている本発明による具体的な実施形態の均等物の多くを認識したり、または確認できたりするであろう。本発明の範囲は、上記明細書に限定するようには意図されておらず、むしろ、添付の請求項に定められているとおりである。

【０９１８】

請求項では、「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」のような冠詞は、特に反対の記載がない限り、または文脈から明らかにそうでない場合を除き、１つ以上を意味できる。群の、１つ以上の構成要素の間に、「または」を含む請求項または明細は、特に反対の記載がない限り、または文脈から明らかにそうでない場合を除き、その群の構成要素のうちの１個、２個以上またはすべてが、所定の生成物もしくはプロセスに存在するか、その生成物もし

くはプロセスで用いられるか、またはその生成物もしくはプロセスに別段に関係する場合、満たされているとみなす。本発明は、その群の構成要素がきっかり１つ、所定の生成物もしくはプロセスに存在するか、その所定の生成物もしくはプロセスで用いられるか、または所定の生成物もしくはプロセスと関係する実施形態を含む。本発明は、その群の構成要素の２個以上またはすべてが、所定の生成物もしくはプロセスに存在するか、その所定の生成物もしくはプロセスで用いられるか、または所定の生成物もしくはプロセスと関係する実施形態を含む。

【０９１９】

「含む」という用語は、開かれており、追加の要素またはステップの包含を許容するように意図されているが、追加の要素またはステップの包含を必須としないことにも留意されたい。したがって、「含む」という用語を本明細書で使用するときには、「～からなる」という用語も含めるとともに、開示する。

【０９２０】

範囲が与えられている場合には、端点値が含まれる。さらに、別段に示されていない限り、または文脈及び当業者の理解から明らかにそうでない場合を除き、範囲として表されている値は、文脈上明らかに別段に示されている場合を除き、本発明の様々な実施形態において、その範囲の下限の単位の１０分の１まで、示されている範囲内のいずれかの具体的な値または小範囲を取ることができることを理解されたい。

【０９２１】

加えて、先行技術の範囲内に入る、本発明の特定の実施形態のいずれも、本発明の請求項のいずれか１つ以上から、明示的に除外できることを理解されたい。このような実施形態は、当業者に既知であると認められるので、除外について本明細書に明示的に示されていなくても除外できる。本発明の組成物の特定の実施形態のいずれも（例えば、いずれかの核酸、またはそれによってコードされるいずれかのタンパク質、いずれかの作製方法、いずれかの使用方法など）、先行技術が存在するか否かにかかわらず、何らかの理由で、いずれか１つ以上の請求項から除外することができる。

【０９２２】

すべての引用元、例えば、本明細書に引用されている参照文献、刊行物、データベース、データベースエントリー及び技術は、その引用部に明示的に示されていない場合でも、参照により、本願に援用される。引用元及び本願の記述が相反する場合には、本出願の記述を優先するものとする。

【０９２３】

セクション及び表の見出しは、限定するようには意図されていない。

【０９２４】

コンストラクトの配列

「Ｇ５」とは、ｍＲＮＡにおけるすべてのウラシル（Ｕ）が、Ｎ１－メチルシュードウラシルによって置き換えられていることを意味する。

【表６－１】

	配列番号	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
			1	20	55	108	40
		SE_PAH_006_noFLAG_no_miR (完全長野生型PAH) キャップ:Cap1 ポリAテール:100nt G5	MSTAVLENPGLGRKL SDFGQETSYIEDNCN QNGAISLIFSLKEEVG ALAKVLRLFEENDVN LTHESRPSRLKKDEY EFFTHLDKRSLPALT NIIKILRHDIGATVHE LSRDKKKDTVPWFPR TIQELDRFANQILSYG AFIJDADHPGFKDPV YRARRKQIADIAYN YRHGQPIPRVEYMEE EKKTWGTVFKTLKSL YKTIIACYEYNIIFPL LEKYCGFHEDNIPQL EDVSQFLQTCTGFRL RPVAGLLSSRDFLGG LAFRVFHCTQYIRHG SKPMYTPEPDICHELL GHVPLFSDRSFAQFS QEIGLASLGAPDEYIE KLATIYWFTVEFGLC KQGDSIKAYGAGIJS SFGELQYCLSEKPKL LPLELEKTAIQNYTV TEFQPLYYVAESFND AKDKVKNFAATIPRP FSVRYDPYTQRIEVL DNTQQLKILADSINSE IGILCSALQKIK	AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCGGGCCUGG GCCGGAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACAAG CUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCC AUCAGCCUGAUCUUUUUCUCUGAAGGAGGAGGUGG GCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGCUUCGAGGA GAACGACGUGAACCUGACCACAUCGAGAGCCGG CCCAGCCGGCUGAAGAAGGACUGAGUACCGACUUCU UCACCCACCUGGACAAGCGGAGCCUGCCCGCCCUG ACCCAACAUCAUCAAGAUCCUGCGGCACGACAUCG GCGCCAGCGUGCCGAGAGCUGAGCGGGAGCAAGAA GAAGGACACCGUGCCCUGGUUCCCUCGGACCAUC CAGGAGCUGGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGA GCUACGGCGCCGACGCUGGACGCCGACCACCCGGC UUCAAGGACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGAAGC AGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGG CCAGCCCAUCCCUCGGGUGGAGUACAUGGAGGAG GAGAAGAACCUGGGGCACCCGUGUUCAAGACCC UGAAGUCUCCGUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGA GUACAACCACACAUCUUUCCUCUCCUGGAGAAGUAC UGCCGCUUCCACGAGGACAAUAUCCCUCAGCUGG AGGACGUGGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGG CUUCCGGCUGAGGCCUGUGGCCGGCUGCUGAGC AGCAGAGACUUCCUGGGCCGGCCUGGCCUUCCGGG UGUUCCACUGCACCCAGUACAUCAGACACGGGAG CAAGCCCAUGUACACUCCCGAGCCCGACAUCUGCC ACGAGUUACUGGGCCACGUGCCCUGUUCAGCGA CCGGAGCUUCGCCCAGUUCUCACAGGAGAUCGGG CUGGCAAGCCUGGGCGCUCCCGACGAGUAUAUAG AGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGA GUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAG GCUUACGGAGCUGGGCUGCUUAGCUCCUUCGGCG AGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCU GCUGCCCCUUGAGCUCGAGAAGACCGCCAUCCAG AACUCACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACU ACGUGGUCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAA GGUGCCGAACUUCCGCCUGCAACCAUCCUCAGGCCC UUCAGCGUGGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGA UCGAGGUGGCUGGACAAUACCCAGCAGCUGAAGAU CUUAGCUCACUCAAUCAACAGCGAGAUUGGCAUC CUGCUGCAGCGCCUCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGAGC CACC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUCCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号40は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号55の5'UTR、配列番号20のORF配列及び配列番号108の3'UTRからなる。

10

20

30

40

50

【表６－２】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	ニンストテクト配列
配列番号		2	21	55	112	41
	SE_PAH_027_noFLAG_miR126 (ΔRD PAH) キャップ:C1 ポリAテール:100nt G5	MVPWFPRTIQELDRF ANQILSYGAELLDADH PGFKDPVYRARRKQF ADIAYNYRHGQPIPR VEYMEEEKKTWGTV FKTLKSLYKTHACYE YNHIFPLLEKYCGFH EDNPQLEDVSQFLQ TCTGFRLRPVAGLLS SRDFLGGLAFRVFHC TQYIRHGSKPMYTPE PDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLG APDEYIEKLATIYWF TVEFGLCKQGDSIKA YGAGLLSSFGELQYC LSEKPKLLPLELEKTA IQNYTVTEFQPLYYV AESFNDAKEKVRNFA ATIPRPFSVRYDPYTQ RIEVLDNTQQLKILA DSINSEIGILCSALQK1 K	AUGGUGCCCUGGUUCCCACGGACCAUCCAGGAGC UGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGG CGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCAAG GACCCCGUGUACCGGGCCCCGGCGGAAGCAGUUCG CCGACAUCCGCCUACAACUACCGGCACGGCCAGCCC AUCCCGCGGGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGA AGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAG CCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAAC CACAUCUUCCCUCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCU UCCACGAGGACAACAUCCCGCAGCUGGAGGACGU GAGCCAGUUCCUGCAGACCUGGCACCGGCUUCCGG CUGCGGCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGGG ACUUCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGGUGUUCCA CUGCACCCAGUACAUCCGGCACGGCAGCAAGCCC AUGUACACGGCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGC UGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGGAG CUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCC AGCCUGGGCGCCCGACGAGUACAUCGAGAAGC UGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGG CCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUAC GGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGC AGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGCC CCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUAC ACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACUACGUGG CCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCG GAACUUCGCCGCCACCAUCCCCUCGGCCCUUCAGCG UGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGAUCGAGGU GCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCC GACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCA GCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGAGC CACC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCCGC AUUAUU ACUCAC GGUACG AGUGGU CUUUGA AUAAAG UCUGAG UGGGCG GC	配列番号41は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号55の5'UTR、配列番号21のORF配列及び配列番号112の3'UTRからなる。

【表６－３】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(スクリーンオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		3	22	56	108	42
	SE_PAH_006_M180T (完全長 M180T PAH) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MSTAVLENPGLGRKL SDFGQETSYIEDNCN QNGAISLIFSLKEEVG ALAKVLRLFEENDVN LTHIESRPSRLKKDEY EFFTHLDKRSLPALT NIIKILRHDIGATVHE LSRDKKKDTVPWFPR TIQELDRFANQILSYG AELDADHPGFKDPV YRARRKQFADIAYN YRHGQPIPRVEYTEE EKKTWGTVFKTLKSL YKTHACYFYNHIFPL LEKYCGFHEDNIPQL EDVSQFLQTCTGFRL RPVAGLLSSRDFLGG LAFRVFHCTQYIRHG SKPMYTPEPDICHELL GIIVPLFSDRSFAQFS QEIGLASLGAPDEYIE KLATIYWFTVEFGLC KQGDSIKAYGAGLLS SFGELQYCLSEKPKL LPLELEKTAIQNYTV TEFQPLYYVAESFND AKEKVRNFAATIPRP FSVRYDPYTQRIEVL DNTQQLKILADSINSE IGILCSALQKIK	AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGG GCCGGAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACAAG CUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCCC AUCAGCCUGAUCUUUUCUCUGAAGGAGGAGGUGUGG GCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGGCUGUUCGAGGA GAACGACGUGAACCUGACCACAUCGAGAGCCGG CCCAGCCGGCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCU UCACCCACCUGGACAAGCGGAGCCUGCCCGCCCUG ACCAACAUCAUCAAGAUCCUGCGGCACGACAUCG GCGCCACCGUGCACGAGCUGAGCCGGGACAAGAA GAAGGACACCGUGCCCUGGUUCCCUCGGACCAUC CAGGAGCUGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGA GCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCGGC UUCAAGGACCCCGUGUACCGGGCCCGGGCGGAAGC AGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGG CCAGCCCAUCCCCUCGGGUGGAGUACACCGAGGAG GAGAAGAAGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCC UGAAGUCUCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGA GUACAACCACAUCUUCCUCUCCUGGAGAAGUAC UGCGGCUUCCACGAGGACAAUAUCCCUCAGCUGG AGGACGUGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGG CUUCCGGCUGAGGCCUGUGGCCGGGCUGCUGAGC AGCAGAGACCUUCCCGGGCGGCCUGGCCUUCCGGG UGUUCCACUGCACCCAGUACAUCAGACACGGGAG CAAGCCCAUGUACACUCCCGAGCCCGACAUCUGCC ACGAGUUACUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGA CCGGAGCUUCGCCCAGUUCUCACAGGAGAUCGGG CUGGCAAGCCUGGGCGCUCCCGACGAGUAUAUAG AGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGA GUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAG GCUUACGGAGCUGGGCUGCUUAGCUCCUUCGGCG AGCUGCAGUACUGCCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCU GCUGCCCCUUGAGCUCGAGAAGACCGCCAUCCAG AACUACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACU ACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAA GGUGCGGAACUUCGCCGCAACCAUCCCUAGGCCC UUCAGCGUGCCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGA UCGAGGUGCUGGACAAUACCCAGCAGCUGAAGAU CUUAGCUGACUCAAUCAACAGCGAGAUUGGCAUC CUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGACC CCGGCG CCGCCA CC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号42は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号56の5'UTR、配列番号22のORF配列及び配列番号108の3'UTRからなる。

【表６－４】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		4	23	55	112	43
	hPAHARD_027_M180T (トランケート、型 M180T PAH) キャップ:Cl ポリA テール:100nt G5	MVPWFPRTIQELDRF ANQILSYGAELDADH PGFKDPVYRARRKQF ADIAYNYRHGQPIPR VEYTEEEKKTWGTV FKTLKSLYKTHACYE YNHIFPLLEKYCGFH EDNIPQLEDVSQFLQ TCTGFRLRPVAGLLS SRDFLGGLAFRVFHC TQYIRHGSKPMYTPE PDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLG APDEYIEKLATIYWT TVEFGLCKQGDSIKA YGAGLLSSFGELQYC LSEKPKLLPLELEKTA IQNYTVTEFQPLYYV AESFNDAKEKVRNFA ATIPRPFSVRYDPYTQ RIEVLDNTQQLKILA DSINSEIGILCSALQKI K	AUGGUGCCCUGGUUCCCACGGACCAUCCAGGAGC UGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGG CGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCAAG GACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGCAGUUCG CCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGGCCAGCCC AUCCCGCGGGUGGAGUACACGGAGGAGGAGAAGA AGACCUGGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAG CCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAAC CACAUCUUCCCCUCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCU UCCACGAGGACAACAUCCCGCAGCUGGAGGACGU GAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGGCUUCCGG CUGCGGCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGGG ACUUCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGGGUGUUCCA CUGCACCCAGUACAUCCCGGCACGGCAAGCCC AUGUACACGCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGC UGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGGAG CUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCC AGCCUGGGCGCGCCCGACGAGUACAUCGAGAAGC UGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGG CCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUAC GGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGC AGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCCAAGCUGCCUGCC CCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUAC ACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACUACGUGG CCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCG GAACUUCGCCGCCACCAUCCCUCGGCCCUUCAGCG UGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGAUCCGAGGU GCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCC GACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCA GCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGAGC CACC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCCGC AUUAUU ACUCAC GGUACG AGUGGU CUUUGA AUAAAG UCUGAG UGGGCG GC	配列番号43は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号55の5'UTR、配列番号23のORF配列及び配列番号112の3'UTRからなる。

【表６－５】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		5	24	56	108	44
	SE_PAH_006_K150T (完全長 K150T PA11) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MSTAVLENPGLGRKL SDFGQFTSYIFDNCN QNGAISLIFSLKEEVG ALAKVLRLFEENDVN LTHIESRPSRLKKDEY EFFTHLDKRSLPALT NIIKILRHDIGATVHE LSRDKKKDTVPWFPR TIQELDRFANQILSYG AELDADHPGFTDPVY RARRKQFADIAYNYR HGQPIPRVEYMEEEK KTWGTVFKTLKSLY KTHACYEYNHIFPLL EKYCGFHEDNIPQLE DVSQFLQTCTGFRLR PVAGLLSSRDFLGGL AFRVFHCTQYIRHGS KPMYTPEPDICHELL GHVPLFSDRSFAQFS QEIGLASLGAPDEYIE KLATIYWFTVEFGLC KQGDSIKAYGAGLLS SFGELQYCLSEKPKL LPLELEKTAIQNYTV TEFQPLYYVAESFND AKEKVRNFAATIPRP FSVRYDPYTQRIEVL DNTQQLKILADSINSE IGILCSALQKIK	AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGG GCCGGAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACAAG CUACAUCGAGGACAACCUGCAACCAGAACGGCGCC AUCAGCCUGAUCUUUUCUCUGAAGGAGGAGGAGGUGG GCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGGCUGUUCGAGGA GAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAGCCCG CCCAGCCGGCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCU UCACCCACCUGGACAAGCGGAGCCUGCCCGCCCUG ACCAACAUCAUCAAGAUCCUGCGGCACGACAUCG GCGCCACCGUGCACGAGCUGAGCCGGGACAAGAA GAAGGACACCGUGCCCUGGUUCCCUCGGACCAUC CAGGAGCUGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGA GCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACACCCGGC UUCACCGACCCCGUGUACCGGGCCCCGGCGGAAGC AGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGG CCAGCCCAUCCCUCGGGUGGAGUACAUGGAGGAG GAGAAGAAGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCC UGAAGUCUCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGA GUACAACCACAUCUUUCCUCCUCCUGGAGAAGUAC UGCGGCUUCCACGAGGACAAUAUCCCCCUCAGCUGG AGGACGUGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGG CUUCCGGCUGAGGCCUGUGGCCGGGCUGCUGAGC AGCAGAGACUUCCUGGGCGCCUGGCCUUCCGGG UGUUCCACUGCACCCAGUCACAUCAGACACGGGAG CAAGCCCAUGUACACUCCCGAGCCCGACAUCUGCC ACGAGUUACUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGA CCGGAGCUUCGCCCAGUUCUCACAGGAGAUCGGG CUGCCAAGCCUGGGCGCUCCCGACGAGUAUAUAG AGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGA GUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAG GCUUACGGAGCUGGGCUGCUUAGCUCCUCUUCGGCG AGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCCAAGCU GCUGCCCCUUGAGCUCGAGAAGACCGCCAUCCAG AACUACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACU ACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAA GGUGCGGAACUUCGCCGCAACCAUCCCCUAGGCCC UUCAGCGUGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGA UCGAGGUGCUGGACAAUACCCAGCAGUGAAGAU CUUAGCUGACUCAAUCAACAGCGAGAUUGGCAUC CUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAAUAU AAGACC CCGGCG CCGCCA CC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号44は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号56の5'UTR、配列番号24のORF配列及び配列番号108の3'UTRからなる。

【表６－６】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		6	25	55	112	45
	hPAHΔRD_027_K150T (トランケート型 K150T PAH) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MVPWFPRTIQELDRF ANQILSYGAELDADH PGFTDPVYRARRKQF ADIAYNYRHGQPIPR VEYMEEEKKTWGTV FKTLKSLYKTHACYF YNHIFPLLEKYCGFH FDNPQLFDVSQFLQ TCTGFRLRPVAGLLS SRDFLGGLAFRVFHC TQYIRHGSKPMYTPE PDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLG APDEYIEKLATIYWF TVEFGLCKQGDSIKA YGAGLLSSFGELQYC LSEKPKLLPLELEKTA IQNYTVTEFQPLYYV AESFNDAKEKVRNFA ATIPRPFSVRYDPYTQ RIEVLDNTQQLKILA DSINSEIGILCSALQKI K	AUGGUGCCCUGGUUCCCACGGACCAUCCAGGAGC UGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGG CGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCACGG ACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGCAGUUCGC CGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGGCCAGCCCA UCCCGCGGGUGGAGUACAUGGAGGAGAAGAA GACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAGC CUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAACC ACAUCUUCCCUCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCUC CCACGAGGACAACAUCCCGCAGCUGGAGGACGUG AGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGGCUUCCGGC UGCGGCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGGGA CUUCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGGGUGUUCCAC UGCACCCAGUACAUCCGGCACGGCAAGCCCA UGUACACGCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGCU GCUGGGCCACAUCGUGCCCCUGUUCAGCGACCGGAGC UUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCCA GCCUGGGCGCCCCGACGAGUACAUCGAGAAGCU GGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGGC CUGUGCAAGCAGGGCGACAUCAAGGCCUACG GCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGCA GUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGCCC CUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUACA CCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACUACGUGGC CGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCGG AACUUCGCCGCCACCAUCCCUCGGCCUUCAGCGU GCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGAUCGAGGUG CUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCGGCAUCCUGUGCAG ACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCAG CGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGAGC CACC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCCGC AUUAUU ACUCAC GGUACG AGUGGU CUUUGA AUAAAG UCUGAG UGGGCG GC	配列番号45は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号55の5'UTR、配列番号25のORF配列及び配列番号112の3'UTRからなる。

【表６－７】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	ニンストテクト配列
配列番号		7	26	56	108	46
	SE_PAH_006_G256A (完全長 G256A PAH) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MSTAVLENPGLGRKL SDFGQETSYIEDNCN QNGAISLIFSLKEEVG ALAKVLRLFEENDVN LTHIESRPSRLKKDEY EFFTHLDKRSLPALT NIIKLRIIDIGATVIIE LSRDKKKDTVIWFPR TIQELDRFANQILSYG AELDADHPGFKDPV YRARRKQFADIAYN YRHGQPIPRVEYMEE EKKTWGTVFKTLKSL YKTHACYEYNHITPL LEKYCGFHEDNIPQL EDVSQFLQTCTGFRL RPVAGLLSSRDFLAG LAFRVFHCTQYIRHG SKPMYTPEPDICHELL GHVPLLSDRSFAQFS QEIGLASLGAPDEYIE KLATIYWFTVEFGLC KQGDSIKAYGAGLLS SFGELQYCLSEKPKL LPLELEKTAIQNYTV TFFQPLYYVAESFND AKEKVRNFAATIPRP FSVRYDPYTQRIEVL DNTQQLKILADSINSE IGLLCSALQKIK	AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGG GCCGGAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACAAG CUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCC AUCAGCCUGAUCUUUUUCUCUGAAGGAGGAGGUGG GCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGGCUGUUCGAGGA GAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAACGCCGG CCCAGCCGGCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCU UCACCCACCUGGACAAGCGGAGCCUGCCGCCCUG ACCAACAUCAUCAAGAUCCUGGUGCUGAACGACAUCG GCGCCACCGUGCACGAGCUGAGCCGGGACAAGAA GAAGGACACCGUGCCCCUGGGUUCCCUCGGACCAUC CAGGAGCUGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGA GCUACGGCGCCGAGCUGGACUGCCGACCACACCCGGC UUCAAGGACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGC AGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGG CCAGCCCAUCCCCUCGGGUGGAGUACAUGGAGGAG GAGAAGAACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCC UGAAGUCUCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGA GUACAACCACACAUCUUUCCUCUCCUGGAGAAGUAC UGCGGCUUUCCACGAGGACAAUAUCCCUCAGCUGG AGGACGUGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGG CUUCCGGCUGAGGCCUGUGGCCGGCUGCUGAGC AGCAGAGACUUCCUGGCCGCCUGGCCUUCCGGG UGUUCCACUGCACCCAGUACAUCAGACACGGGAG CAAGCCCAUGUACACUCCCGAGCCCGACAUCUGCC ACGAGUUUACUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGA CCGCAGCUUUCGCCCAGUUCUCACAGGAGAUCGGG CUGGCAAGCCUGGGCGCCUCCCGACGAGUAUAUAG AGAAGCUGGCCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGA GUCCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAG GCUUACGGAGCUCUGGCUGCUUAGCUCCUUCGGCG AGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCU GCUGCCCUUGAGUCUCGAGAAGACCGCCAUCCAG AACUACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUCACU ACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAA GGUGCGGAACUUCCGCCGCAACCAUCCCUAGGCCC UUCAGCGUGCGGUACAAUACCCAGCAGCUGAAGAU CUUAGCUGACUCAAUCAACAGCGAGAUUGGCAUC CUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGACC CCGGCG CCGCCA CC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号46は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号56の5'UTR、配列番号26のORF配列及び配列番号108の3'UTRからなる。

【表６－８】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		8	27	55	112	47
	hPAHΔRD_027_G256A (トランケート型 G256A PAH) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MVPWFPRTIQELDRF ANQILSYGAELDADH PGFKDPVYRARRKQF ADIAYNYRHGQPIPR VEYMEEIKKTWGTV FKTLKSLYKTHACYE YNHIFPLLEKYCGFH EDNIPQLEDVSQFLQ TCTGFRLRPVAGLLS SRDFLAGLAFRVFHC TQYIRHGSKPMYTPE PDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLG APDEYIEKLATIYWF TVEFGLCKQGDSIKA YGAGLLSSFGELQYC LSEKPKLLPLELEKTA IQNYTVTEFQPLYYV AESFNDAKEKVRNFA ATIPRPFSVRYDPYTQ RIEVLDNTQQLKILA DSINSEIGILCSALQK1 K	AUGGUGCCCUGGUUCCCACGGACCAUCCAGGAGC UGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGG CGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCAAG GACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGCAGUUCG CCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGGCCAGCCC AUCCCGCGGGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGA AGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAG CCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAAC CACAUCUUCCCUCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCU UCCACGAGGACAACAUCGCGCAGCUGGAGGACGU GAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGGCUUCGG CUGCGGCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGGG ACUUCCUGGCCGGCCUGGCCUUCCGGGUGUUCCA CUGCACCCAGUACAUCCGGCACGGCAAGCCC AUGUACACGCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGC UGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGGAG CUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCC AGCCUGGGCGCGCCCGACGAGUACAUCGAGAAGC UGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGG CCUGUGCAAGACAGGGCCGACAGCAUCAAGGCCUAC GGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGC AGUACUGCCUGAGCCUGAGCCUGAGCCCCAAGCUGCUGCC CCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUAC ACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACUACGUGG CCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCG GAACUUCGCCGCCACCAUCCCUCGGCCCUUCAGCG UGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGAUCGAGGU GCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCC GACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCA GCGCCCUGGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGAGC CACC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCCGC AUUAUU ACUCAC GGUACG AGUGGU CUUUGA AUAAAG UCUGAG UGGGCG GC	配列番号47は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号55の5'UTR、配列番号27のORF配列及び配列番号112の3'UTRからなる。

【表６－９】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		9	28	56	108	48
	SE_PAH_006_N376E (完全長 N376E PAH) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MSTAVLENPGLGRKL SDFGQETSYIEDNCN QNGAISLIFSLKEEVG ALAKVLRLFEENDVN LTHIESRPSRLKKDEY EFFTHLDKRSLPALT NIIKILRHDIGAIVHE LSRDKKKDTVPWFPR TQELDRFANQILSYG AELDADHPGFKDPV YRARRKQFADIAYN YRHGQPIPRVEYMEE EKKTWGTVFKTLKSL YKTHACYEYNHIFPL LEKYCGFHEDNIPQL EDVSQFLQTCIGFRL RPVAGLLSSRDFLGG LAFRVFHCTQYIRHG SKPMYTPEPDICHELL GHVPLFSDRSFAQFS QEIGLASLGAPDEYIE KLATIYWFTVEFGLC KQGDSIKAYGAGLLS SFGELQYCLSEKPKL LPLELEKTAIQEYTVT EFQPLYYVAESFNDA KEKVRNFAATIPRPFS VRYDPYTQRIEVLDN TQQLKILADSINSEIGI LCSALQKIK	AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGG GCCGGAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACAAG CUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCC AUCAGCCUGAUCUUUUCCUGAAGGAGGAGGUGG GCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGGCUGUUCGAGGA GAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAGCCGG CCCAGCCGGCUGAAGAAGGAGCUGAGUUCU UCACCCACCUGGACAAGCGGAGCCUGCCCGCCCUG ACCAACAUCAUCAAGAUCCUGCGGCACGACAUCG GCGCCACCGUGCACGAGCUGAGCCGGGACAAGAA GAAGGACACCGUGUGCCCUGGUUCCUCCUCGGACCAUC CAGGAGCUGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGA GCUACGGCGCCGAGCUCGAGCUCGGACCACACCCUGGC UUCAAGGACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGC AGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGG CCAGCCCAUCCCUCGGGUGGAGUACAUGGAGGAG GAGAAGAAGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCC UGAAGUCUCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGA GUACAACCACAUCUUUCCUCUCCUGGAGAAGUAC UGCGGCUUCCACGAGGACAAUAUCCUCUCAGCUGG AGGACGUGAAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGG CUUCCGGCUGAAGGCCUGUGGCCGGGCUGCUGAGC AGCAGAGACUUCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGGG UGUUCCACUGCACCCAGUACAUCAGACACGGGAG CAAGCCCAUGUACACUCCCGAGCCCGACAUCUGCC ACGAGUUUACUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGA CCGGAGCUUCGCCCCAGUUCUCACAGGAGAUCGGG CUGGCAAGCCUGGGCGCUCCCGACGAGUAUAUCAG AGAAGCUGGCCUACCAUCUACUGGUUCACCGUGGA GUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAG GCUUACGGAGCUGGGCUGCUUAGCUCCUUCGGCG AGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCU GCUGCCCCUUGAGCUCGAGAAGACCGCCAUCCAG GAGUACACCGUGGACCGAGUUCCAGCCCUGUACU ACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAA GGUGCGGAACUUCGCCGCCAACCAUCCCUAGGCCC UUCAGCGUGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGA UCGAGGUGCUGGACAAUACCCAGCAGUGAAGAU CUUAGCUGACUCCAAUCAACAGCGAGAUUGGCAUC CUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGACC CCGGCG CCGCCA CC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号48は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号56の5'UTR、配列番号28のORF配列及び配列番号108の3'UTRからなる。

【表６－１０】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	ニンストラクト配列
配列番号		10	29	56	108	49
	SE_PAH_027_N_376_E (トランケート型 N376E PAH) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MVPWFPRTIQELDRF ANQILSYGAELDADH PGFKDPVYRARRKQF ADIAYNYRHGQPIPR VEYMEEEKKTWGTV FKTLKSLYKTHACYE YNHIFPLLEKYCGFH EDNIPQLEDVSQFLQ TCTGFRLRPVAGLLS SRDFLGGLAFRVFHC TQYIRHGSKPMYTPE PDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLG APDEYIEKLATIYWT TVEFGLCKQGDSIKA YGAGLLSSFGELQYC LSEKPKLLPLELEKTA IQEYTVTEFQPLYYV AESFNDAKEKVRNFA ATIPRPFSVRYDPYTQ RIEVLDNTQQLKILA DSINSEIGILCSALQKI K	AUGGUGCCCUGGUUCCCACGGACCAUCCAGGAGC UGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGG CGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCAAG GACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGCAGUUCG CCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGGCCCAGCCC AUCCCGCGGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGAAGA AGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAG CCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAAC CACAUCUUCCCUCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCU UCCACGAGGACAACAUCGCGCAGCUGGAGGACGU GAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGGCUUCCGG CUGCGGCCCGUGGCCGGCCUGAGCAGCCGGG ACUUCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGGGUGUUCCA CUGCACCCAGUACAUCCGGCACGGCAAGCCC AUGUACACGCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGC UGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGGAG CUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCC AGCCUGGGCGCCCGACGAGUACAUCGAGAAGC UGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGG CCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUAC GGCGCCGGCCUGCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGC AGUACUGCCUGAGCGAGAAGACCCAAGCUGCUGCC CCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGGAGUAC ACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACUACGUGG CCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCG GAACUUCGCCGCCACCAUCCCUCGGCCCUUCAGCG UGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGAUCGAGGU GCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCC GACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCA GCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGACC CCGGCG CCGCCA CC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号49は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号56の5'UTR、配列番号29のORF配列及び配列番号108の3'UTRからなる。

【表６－１１】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクンオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		11	30	56	108	250
	SE PAH 006 K361R (完全長K361R PAH) キャップ:C1 ポリAテール:100nt G5	MSTAVLENPGLGRKL SDFGQETSYIEDNCN QNGAISLIFSLKEEVG ALAKVLRLFEENDVN LTHIESRPSRLKKDEY EFFTHLDKRSLPALT NIIKILRHDIGATVHE LSRDKKKDTVPWFPR TIQELDRFANQILSYG AELDADHPGFKDPV YRARRKQFADIAYN YRHGQPIPRVEYMEE EKKTWGTVFKTLKSL YKTHACYEYNHIFPL LEKYCGFHEDNIPQL EDVSQFLQTCTGFRL RPVAGLLSSRDFLGG LAFRVFHCTQYIRHG SKPMYTPEPDICHELL GHVPLFSDRSFAQFS QEIGLASLGAPDEYIE KLATIYWFTVEFGLC KQGDSIKAYGAGLLS SFGELQYCLSERPKL LPLELEKTAIQNYTV TEFQPLYYVAESFND AKEKVRNFAATIPRP FSVRYDPYTQRIEVL DNTQQLKILADSINSE IGILCSALQKIK	AUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGG GCCGGAAGCUGAGCGACUUCGGCCAGGAGACAAG CUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCC AUCAGCCUGAUCUUUUCUCUGAAGGAGGAGGUGG GCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGGCUGUUCGAGGA GAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAGCCGG CCCAGCCGGCUGAAGAAGGACGAGUACGAGUUCU UCACCCACCUGGACAAGCGGAGCCUGCCCGCCCUG ACCAACAUCAUCAAGAUCCUGCGGCACGACAUCG GCGCCACCGUGCACGAGCUGAGCCGGGACAAGAA GAAGGACACCGUGCCCUGGUUCCCUCGGACCAUC CAGGAGCUGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGA GCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGC UUCAAGGACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGC AGUUCGCCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGG CCAGCCCAUCCCUCGGGUGGAGUACAUGGAGGAG GAGAAGAAGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCC UGAAGUCUCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGA GUACAACCACAUCUUUCCUCUCCUGGAGAAGUAC UGCGGCUUCCACGAGGACAAUAUCCCUCAGCUGG AGGACGUGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGG CUUCCGGCUGAGGCCUGUGGCCGGGCUGCUGAGC AGCAGAGACUUCCUGGGCGGCCUGGCCUUCCGGG UGUUCCACUGCACCCAGUACAUCAGACACGGGAG CAAGCCCAUGUACACUCCCGAGCCCGACAUCUGCC ACGAGUUACUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGA CCGGAGCUUCGCCCAGUUCUCACAGGAGAUCGGG CUGGCAAGCCUGGGCGCUCCCGACGAGUAUAUAG AGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGA GUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAG GCUUACGGAGCUGGGCUGCUUAGCUCCUUCGGCG AGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAGACCCAAGCU GCUGCCCCUUGAGCUCGAGAAGACCGCCAUCCAG AACUACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACU ACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAA GGUGCGGAACUUCGCCGCAACCAUCCCUAGGCCC UUCAGCGUGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGA UCGAGGUGCUGGACAAUACCCAGCAGCUGAAGAU CUUAGCUGACUCAAUCAACAGCGAGAUUGGCAUC CUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGACC CCGGCG CCGCCA CC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号250は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号56の5'UTR、配列番号30のORF配列及び配列番号108の3'UTRからなる。

【表６－１２】

	mRNA名	ORF配列(アミノ酸)	ORF配列(ヌクレオチド)	5'UTR配列	3'UTR配列	コンストラクト配列
配列番号		12	31	56	108	251
	SE_PAH_027_K_361_R (トランケート型 K361R PAH) キャップ:Cl ポリAテール:100nt G5	MVPWFPRTIQELDRF ANQILSYGAELDADH PGFKDPVYRARRKQF ADIAYNYRHGQPIPR VEYMEEEKKTWGTV FKLLKSLYKTHACYE YNHIFPLLEKYCGFH EDNIPQLEDVSQFLQ TCTGFRLRPVAGLLS SRDFLGGLAFRVFHC TQYIRHGSKPMYTPE PDICHELLGHVPLFSD RSFAQFSQEIGLASLG APDEYIFKLATIYWF TVEFGLCKQGDSIKA YGAGLLSSFGELQYC LSERPKLLPLELEKTA IQNYTVTEFQPLYYV AESFNDAKFKVRNFA ATIPRFSVRYDPYTQ RIEVLDNTQQLKILA DSINSEIGILCSALQKI K	AUGGUGCCCUGGUUCCCACGGACCAUCCAGGAGC UGGACCGGUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGG CGCCGAGCUGGACGCCGACCACCCCGGCUUCAAG GACCCCGUGUACCGGGCCCGGCGGAAGCAGUUCG CCGACAUCGCCUACAACUACCGGCACGGCCAGCCC AUCCCGCGGUGGAGUACAUGGAGGAGGAGGAAGA AGACCUGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAG CCUGUACAAGACCCACGCCUGCUACGAGUACAAC CACAUCUUCCCCUCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCU UCCACGAGGACAACAUCCCGCAGCUGGAGGACGU GAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACCGGCUUCCGG CUGCGGCCCGUGGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGGG ACUUCCUCGGCGCCUGGCCUUCCGGGUGUCCA CUGCACCCAGUACAUCCGGCACGGCAAGCCC AUGUACACGCCCGAGCCCGACAUCUGGCCACGAGC UGCUGGGCCACGUGCCCCUGUUCAGCGACCGGAG CUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCC AGCCUGGGCGCCCGACGAGUACAUCGAGAAGC UGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGAGUUCGG CCUGUGCAAGCAGGCGACAGCAUCAAGGCCUAC GGCGCCGCCUGAGCAGCUUCGGCGAGCUGC AGUACUGCCUGAGCGAGAGACCCAAGCUGCUGCC CCUGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUAC ACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCUGUACUACGUGG CCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCG GAACUUCGCCGCCACCAUCCCUCGGCCCUUCAGCG UGCGGUACGACCCCUACACCCAGCGGAUCGAGGU GCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCC GACAGCAUCAACAGCGAGAUCGGCAUCCUGUGCA GCGCCCUGCAGAAGAUCAAG	GGAAAU AAGAGA GAAAAG AAGAGU AAGAAG AAAUAU AAGACC CCGGCG CCGCCA CC	UGAUAA UAGGCU GGAGCC UCGGUG GCCUAG CUUCUU GCCCCU UGGGCC UCCCCCC AGCCCC UCCUCC CCUUCC UGCACC CGUACC CCCGUG GUCUUU GAAUAA AGUCUG AGUGGG CGGC	配列番号:251は、5'末端から3'末端に向かって、配列番号:56の5'UTR、配列番号:31のORF配列及び配列番号:108の3'UTRからなる。

【実施例】

【０９２５】

実施例１：キメラポリヌクレオチドの合成

Ａ．三リン酸経路

三リン酸化学反応を用いて、キメラポリヌクレオチドのうちの２つの領域または部分を連結またはライゲーションできる。この方法によると、１００ヌクレオチド以下の第１の領域または部分は、５’の一リン酸と３’末端のｄｅｓＯＨまたはブロックＯＨを有する状態で、化学的に合成できる。その領域が８０ヌクレオチドよりも長い場合には、ライゲーション用に２本の鎖として合成できる。

【０９２６】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）を用いて、第１の領域または部分を、位置が改変されない領域または部分として合成する場合には、５’のーリン酸に変換後に、３’末端のキャッピングを行うことができる。ーリン酸の保護基は、当該技術分野で知られている保護基のいずれかから選択できる。
【０９２７】
キメラポリヌクレオチドの第２の領域または部分は、化学合成法またはＩＶＴ法のいずれかを用いて合成できる。ＩＶＴ法は、修飾キャップを有するプライマーを利用できるＲＮＡポリメラーゼを含むことができる。あるいは、最大で８０ヌクレオチドのキャップを化学的に合成して、ＩＶＴ領域またはＩＶＴ部分にカップリングすることもできる。
【０９２８】
ライゲーション法では、ＤＮＡ　Ｔ４リガーゼによるライゲーション後に、ＤＮＡｓｅで処理して、連結状態を迅速に解消しなければならないことに留意されたい。
【０９２９】
リン酸－糖骨格を有する状態で、キメラポリヌクレオチド全体を製造する必要はない。その領域または部分の１つが、ポリペプチドをコードする場合に、そのような領域または部分が、リン酸－糖骨格を含むことができる。
【０９３０】
その後、いずれかの既知のクリックケミストリー、オルトクリックケミストリー、ソルリンクまたは当業者に知られているその他のバイオコンジュゲートケミストリーを用いて、ライゲーションを行うことができる。
【０９３１】
Ｂ．合成経路
本発明のキメラポリヌクレオチドは、一連の出発セグメントを用いて作製できる。このようなセグメントには、以下のものが含まれる。
（ａ）キャッピング及び保護が施された５’セグメントであって、通常の３’ＯＨを含む５’セグメント（ＳＥＧ．１）
（ｂ）ポリペプチドのコード領域を含むことができるとともに、通常の３’ＯＨを含む５’三リン酸セグメント（ＳＥＧ．２）
（ｃ）キメラポリヌクレオチドの３’末端（例えばテール）用の５’ーリン酸セグメントであって、コルジセピンを含むか、３’ＯＨを含まない５’ーリン酸セグメント（ＳＥＧ．３）
【０９３２】
合成（化学合成またはＩＶＴ）後、セグメント３（ＳＥＧ．３）をコルジセピンで処理してから、ピロホスファターゼで処理して、その５’ーリン酸を作製できる。
【０９３３】
続いて、ＲＮＡリガーゼを用いて、セグメント２（ＳＥＧ．２）をＳＥＧ．３にライゲーションできる。続いて、ライゲーションしたポリヌクレオチドを精製し、ピロホスファターゼで処理して、二リン酸を切断できる。続いて、処理したＳＥＧ．２－ＳＥＧ．３コンストラクトを精製し、ＳＥＧ．１をその５’末端にライゲーションする。そのキメラポリヌクレオチドのさらなる精製工程を行うことができる。
【０９３４】
そのキメラポリヌクレオチドが、ポリペプチドをコードする場合には、ライゲーションまたは連結したそれらのセグメントは、５’ＵＴＲ（ＳＥＧ．１）、オープンリーディングフレームまたはＯＲＦ（ＳＥＧ．２）及び３’ＵＴＲ＋ポリＡ（ＳＥＧ．３）として表すことができる。
【０９３５】
各工程の収率は、９０～９５％程度であることができる。
【０９３６】
実施例２：ｃＤＮＡ作製のためのＰＣＲ

ｃＤＮＡを調製するためのＰＣＲ手順は、Ｋａｐａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）による２×ＫＡＰＡ　ＨＩＦＩ（商標）ＨｏｔＳｔａｒｔ　ＲｅａｄｙＭｉｘを用いて行うことができる。このシステムは、２×ＫＡＰＡ　ＲｅａｄｙＭｉｘ１２．５μｌ、フォワードプライマー（１０μＭ）０．７５μｌ、リバースプライマー（１０μＭ）０．７５μｌ、鋳型ｃＤＮＡ－１００ｎｇ及び２５．０μｌに希釈したｄＨ２０を含む。ＰＣＲ反応条件は、９５℃で５分、９８℃で２０秒を２５サイクル、５８℃で１５秒、７２℃で４５秒、７２℃で５分後、終了まで４℃であることができる。

【０９３７】

本発明のリバースプライマーには、ｍＲＮＡ内のポリ－Ａ１２０（配列番号２５４）に対するポリ－Ｔ１２０（配列番号２５３）を組み込むことができる。ポリ（Ｔ）トラクトがもっと長いかまたは短い他のリバースプライマーを用いて、ポリヌクレオチドｍＲＮＡにおけるポリ（Ａ）テールの長さを調整できる。

【０９３８】

その反応物は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のＰＵＲＥＬＩＮＫ（商標）ＰＣＲ　Ｍｉｃｒｏ　Ｋｉｔをメーカーの指示に従って用いて（最大５μｇ）、クリーンアップできる。もっと大規模な反応物では、もっと容量の大きい製品を用いたクリーンアップが必要になる。クリーンアップ後、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（商標）を用いて、そのｃＤＮＡを定量して、アガロースゲル電気泳動によって分析して、ｃＤＮＡが、予測したサイズであることを確認できる。続いて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応に進む前に、シーケンシング分析のために、そのｃＤＮＡを提出することができる。

【０９３９】

実施例３：ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応によって、均一に改変されたポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを作製できる。均一に改変されたこのようなポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの領域または部分を含むことができる。投入用のヌクレオチド三リン酸（ＮＴＰ）ミックスは、天然のＮＴＰ及び非天然のＮＴＰを用いて作製できる。

【０９４０】

典型的なｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応は、以下を含むことができる。

鋳型ｃＤＮＡ－１．０μｇ

１０×転写緩衝液（４００ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１９０ｍＭのＭｇＣｌ２、５０ｍＭのＤＴＴ、１０ｍＭのスペルミジン）－２．０μｌ

カスタムＮＴＰ（それぞれ２５ｍＭ）－７．２μｌ

ＲＮａｓｅ阻害剤－２０Ｕ

Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ－３０００Ｕ

ｄＨ２０－最大２０．０μｌ

３７℃で３～５時間インキュベート

【０９４１】

粗ＩＶＴミックスは、翌日のクリーンアップに備えて、４℃で一晩保存することができる。次に、１ＵのＲＮａｓｅ無添加ＤＮａｓｅを用いて、元の鋳型を消化できる。１５分、３７℃でインキュベート後、Ａｍｂｉｏｎ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）のＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）Ｋｉｔをメーカーの指示に従って用いて、ｍＲＮＡを精製できる。このキットは、最大で５００μｇのＲＮＡを精製できる。クリーンアップ後、ＮａｎｏＤｒｏｐを用いて、ＲＮＡを定量して、アガロースゲル電気泳動によって分析して、そのＲＮＡが、適切なサイズであること、及びそのＲＮＡが分解されていないことを確認できる。

【０９４２】

実施例４：酵素的キャッピング

ＩＶＴ　ＲＮＡを６０μｇ～１８０μｇと、ｄＨ２０を最大で７２μｌ含む混合物によって、ポリヌクレオチドのキャッピングを行うことができる。その混合物を６５℃で５分インキュベートして、ＲＮＡを変性させることができ、続いて、すぐに氷に移すことができる。

【０９４３】
そのプロトコールは、続いて、１０×Ｃａｐｐｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ（０．５Ｍのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、６０ｍＭのＫＣｌ、１２．５ｍＭのＭｇＣｌ２）（１０．０μｌ）、２０ｍＭのＧＴＰ（５．０μｌ）、２０ｍＭのＳ－アデノシルメチオニン（２．５μｌ）、ＲＮａｓｅ阻害剤（１００Ｕ）、２’－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（４００Ｕ）、ワクシニアキャッピング酵素（グアニリルトランスフェラーゼ）（４０Ｕ）、ｄＨ２０（最大２８μｌ）を混合すること、及び３７℃で、６０μｇのＲＮＡの場合には３０分、１８０μｇのＲＮＡの場合には最長２時間インキュベートすることを伴うことができる。

【０９４４】
次に、Ａｍｂｉｏｎ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）のＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）Ｋｉｔをメーカーの指示に従って用いて、ポリヌクレオチドを精製できる。クリーンアップ後、ＮＡＮＯＤＲＯＰ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いて、ＲＮＡを定量して、アガロースゲル電気泳動によって分析して、そのＲＮＡが、適切なサイズであること、及びそのＲＮＡが分解されていないことを確認できる。ＲＮＡ産物は、逆転写ＰＣＲにかけて、シーケンシング用のｃＤＮＡを生成することによって、シーケンシングすることもできる。

【０９４５】
実施例５：ポリＡテーリング反応
ｃＤＮＡにポリ－Ｔがない場合には、最終生成物のクリーンアップ前に、ポリＡテーリング反応を行う必要がある。これは、キャップ構造を有するＩＶＴ ＲＮＡ（１００μｌ）、ＲＮａｓｅ阻害剤（２０Ｕ）、１０×テーリング緩衝液（０．５Ｍのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、２．５ＭのＮａＣｌ、１００ｍＭのＭｇＣｌ２）（１２．０μｌ）、２０ｍＭのＡＴＰ（６．０μｌ）、ポリＡポリメラーゼ（２０Ｕ）、ｄＨ２０（最大で１２３．５μｌ）を混合して、３７℃で３０分インキュベートすることによって行うことができる。ポリＡテールがすでに転写産物に存在する場合には、テーリング反応を省略して、Ａｍｂｉｏｎ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）のＭＥＧＡＣＬＥＡＲ（商標）キット（最大５００μｇ）を用いたクリーンアップに直接進むことができる。ポリＡポリメラーゼは、場合によっては、酵母で発現させた組み換え酵素である。

【０９４６】
ポリＡテーリング反応のプロセッシビティまたは完全性により、常に、正確なサイズのポリＡテールが得られるわけではないことを理解されたい。したがって、およそ４０～２００ヌクレオチド、例えば、約４０ヌクレオチド、約５０ヌクレオチド、約６０ヌクレオチド、約７０ヌクレオチド、約８０ヌクレオチド、約９０ヌクレオチド、約９１ヌクレオチド、約９２ヌクレオチド、約９３ヌクレオチド、約９４ヌクレオチド、約９５ヌクレオチド、約９６ヌクレオチド、約９７ヌクレオチド、約９８ヌクレオチド、約９９ヌクレオチド、約１００ヌクレオチド、約１０１ヌクレオチド、約１０２ヌクレオチド、約１０３ヌクレオチド、約１０４ヌクレオチド、約１０５ヌクレオチド、約１０６ヌクレオチド、約１０７ヌクレオチド、約１０８ヌクレオチド、約１０９ヌクレオチド、約１１０ヌクレオチド、約１５０～１６５ヌクレオチド、約１５５ヌクレオチド、約１５６ヌクレオチド、約１５７ヌクレオチド、約１５８ヌクレオチド、約１５９ヌクレオチド、約１６０ヌクレオチド、約１６１ヌクレオチド、約１６２ヌクレオチド、約１６３ヌクレオチド、約１６４ヌクレオチドまたは約１６５ヌクレオチドのポリＡテールは、本発明の範囲内である。

【０９４７】
実施例６：天然の５’キャップ及び５’キャップアナログ
３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ［ＡＲＣＡキャップ］、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ、Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）という化学的なＲＮＡキャップアナログをメーカーのプロトコールに従って用いて、５

’－グアノシンキャップ構造を作製するために、ポリヌクレオチドの５’キャッピングを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応中に同時に行うことができる。ワクシニアウイルスキャッピング酵素を用いて、改変ＲＮＡの５’キャッピングを翻訳後に行って、「Ｃａｐ０」構造、すなわち、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ、Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）を作製できる。ワクシニアウイルスキャッピング酵素及び２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼの両方を用いて、Ｃａｐ１構造を作製して、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ－２’－Ｏ－メチルを作製できる。Ｃａｐ１構造の後に、２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼを用いて、５’の終わりから３番目のヌクレオチドを２’－Ｏ－メチル化することで、Ｃａｐ２構造を作製できる。Ｃａｐ２構造の後に、２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼを用いて、５’の終わりから４番目のヌクレオチドを２’－Ｏ－メチル化することで、Ｃａｐ３構造を作製できる。酵素は、組み換え体から得ることができる。

【０９４８】

哺乳動物細胞にトランスフェクションするときには、改変ｍＲＮＡは、安定性が１２～１８時間または１８時間超、例えば、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間または７２時間超であることができる。

【０９４９】

実施例７：キャッピングアッセイ

Ａ．タンパク質発現アッセイ

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、本明細書で教示されているキャップのいずれかを含むポリヌクレオチドを、等しい濃度で細胞にトランスフェクションできる。トランスフェクションから６時間後、１２時間後、２４時間後及び３６時間後に、培養培地に分泌されたタンパク質の量をＥＬＩＳＡによってアッセイできる。高レベルのタンパク質を培地に分泌する合成ポリヌクレオチドほど、翻訳時の能力が高いキャップ構造を有する合成ポリヌクレオチドに当たることになる。

【０９５０】

Ｂ．純度分析合成

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、本明細書で教示されているキャップのいずれかを含むポリヌクレオチドは、純度について、変性アガロース－尿素ゲル電気泳動またはＨＰＬＣ分析を用いて比較できる。電気泳動によって１本の強いバンドが見られるポリヌクレオチドは、複数のバンドまたは筋状のバンドが見られるポリヌクレオチドよりも純度の高い生成物に当たる。ＨＰＬＣピークが１つである合成ポリヌクレオチドも、純度がより高い生成物に当たる。効率の高いキャッピング反応ほど、純度の高いポリヌクレオチド集団をもたらす。

【０９５１】

Ｃ．サイトカイン分析

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、本明細書で教示されているキャップのいずれかを含むポリヌクレオチドを、複数の濃度で細胞にトランスフェクションできる。トランスフェクションから６時間後、１２時間後、２４時間後及び３６時間後に、培養培地に分泌された炎症誘発性サイトカイン（ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－βなど）の量をＥＬＩＳＡによってアッセイできる。より高いレベルの炎症誘発性サイトカインを培地に分泌させるポリヌクレオチドは、免疫を活性化させるキャップ構造を含むポリヌクレオチドに当たる。

【０９５２】

Ｄ．キャッピング反応効率

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、本明細書で教示されているキャップのいずれかを含むポリヌクレオチドは、キャッピング反応効率について、ヌクレアーゼ処理後に、ＬＣ－ＭＳによって分析できる。キャッピングされたポリヌクレオチドのヌクレアーゼ処理により、遊離ヌクレオチドと、キャッピングされた５’－５－三リン酸キャップ構造との混合物であって、ＬＣ－ＭＳによって検出可能な混合物が得られることになる。ＬＣ－ＭＳスペクトルにおいて、キャッピングされた生成物の量は、反応から得ら

れる総ポリヌクレオチドに対する割合（％）として表すことができ、キャッピング反応効率に相当することになる。キャッピング反応効率の高いキャップ構造ほど、ＬＣ－ＭＳによって、キャッピングされた生成物の量が高く出る。

【０９５３】

実施例８：改変ＲＮＡまたはＲＴ　ＰＣＲ産物のアガロースゲル電気泳動

個々のポリヌクレオチド（２０μｌの体積中に２００～４００ｎｇ）または逆転写したＰＣＲ産物（２００～４００ｎｇ）を、非変性条件の１．２％Ａｇａｒｏｓｅ　Ｅ－Ｇｅｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のウェルに充填して、メーカーのプロトコールに従って、１２～１５分泳動させることができる。

【０９５４】

実施例９：Ｎａｎｏｄｒｏｐによる改変ＲＮＡの定量及びＵＶスペクトルデータ

ＮａｎｏｄｒｏｐによるＵＶ吸光度の読み取りのために、ＴＥ緩衝液（１μｌ）中の改変ポリヌクレオチドを使用して、化学合成またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応から得られた各ポリヌクレオチドの収率を定量できる。

【０９５５】

実施例１０：リピドイドを用いた、改変ｍＲＮＡの調合

細胞に加える前に、ポリヌクレオチドをリピドイドと所定の比率で混合することによって、ポリヌクレオチドをｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験用に調合できる。ｉｎ　ｖｉｖｏ製剤では、全身にわたる循環を促すために、追加の成分を加える必要がある場合がある。これらのリピドイドがｉｎ　ｖｉｖｏ作業に適する粒子を形成する能力を試験するために、ｓｉＲＮＡ－リピドイドの調合に用いられる標準的な調合プロセスを出発点として使用できる。その粒子の形成後、ポリヌクレオチドを加えて、その複合体と一体化させることができる。標準的な色素排除アッセイを用いて、封入効率を求めることができる。

【０９５６】

実施例１１：タンパク質発現のスクリーニング方法

Ａ．エレクトロスプレーイオン化法

対象に投与したポリヌクレオチドによってコードされたタンパク質を含み得る生体試料を調製して、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）に関する、メーカーのプロトコールに従って、１個、２個、３個または４個の質量分析計を用いて分析できる。タンデムＥＳＩ質量分析システムを用いて、生体試料を分析することもできる。

【０９５７】

所定のタンパク質について、タンパク質断片のパターンまたは全タンパク質を既知のコントロールと比較することができ、比較によって、同一性を求めることができる。

【０９５８】

Ｂ．マトリックス支援レーザー脱離／イオン化法

対象に投与した１つ以上のポリヌクレオチドによってコードされたタンパク質を含み得る生体試料を調製して、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化法（ＭＡＬＤＩ）に関する、メーカーのプロトコールに従って分析できる。

【０９５９】

所定のタンパク質について、タンパク質断片のパターンまたは全タンパク質を既知のコントロールと比較することができ、比較によって、同一性を求めることができる。

【０９６０】

Ｃ．液体クロマトグラフィー－質量分析－質量分析

１つ以上のポリヌクレオチドによってコードされたタンパク質を含み得る生体試料をトリプシン酵素で処理して、その試料内に含まれるタンパク質を消化できる。得られたペプチドを液体クロマトグラフィー－質量分析－質量分析（ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ）によって分析できる。そのペプチドを質量スペクトロメーター内で断片化して、コンピューターアルゴリズムを介して、タンパク質配列データベースと照合できる診断パターンをもたらすことができる。消化した試料を希釈して、所定のタンパク質の出発物質を１ｎｇ以下得ることができる。単純な緩衝液バックグラウンド（例えば、水または揮発性の塩）を含む生体試

料は、直接的な溶液中での消化の影響を受けやすく、さらに複雑なバックグラウンド（例えば、洗浄剤、不揮発性の塩、グリセロール）には、試料の分析を容易にするために、追加のクリーンアップ工程が必要となる。

【０９６１】

所定のタンパク質について、タンパク質断片のパターンまたは全タンパク質を既知のコントロールと比較することができ、比較によって、同一性を求めることができる。

【０９６２】

実施例１２：ＰＡＨをコードするｍＲＮＡの合成

実施例１～１１に記載されているようにして、ＰＡＨポリペプチドをコードする配列最適化ポリヌクレオチドを合成し、特徴付けを行う。ＰＡＨ触媒ドメイン及び四量体化ドメインを含むヒトＰＡＨ及びそのトランケート型の両方をコードするｍＲＮＡを、下記の実施例用に調製し、実施例１～１１に記載されているようにして、合成及び特徴付けを行った。

【０９６３】

ヒトＰＡＨまたはそのトランケート型をコードするｍＲＮＡは、例えば、それぞれ配列番号１または２に示されているアミノ酸配列、またはそのバリアント（例えば、配列番号３、４、５、６、７、８、９、１０、１１もしくは１２）をコードするＯＲＦを用いることによって構築できる。そのｍＲＮＡ配列は、ＯＲＦ配列（ヌクレオチド）を挟み込む５’ＵＴＲ領域及び３’ＵＴＲ領域の両方を含む。

【０９６４】

例示的なコンストラクトでは、５’ＵＴＲ配列は配列番号５５であり、３’ＵＴＲ配列は配列番号１１１である。

５’ＵＴＲ：

ＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ（配列番号５５）

３’ＵＴＲ：

ＵＧＡＵＡＡＵＡＧＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＵＡＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣＣＧＵＡＣＣＣＣＣＵＣＣＡＵＡＡＡＧＵＡＧＧＡＡＡＣＡＣＵＡＣＡＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡＧＵＧＧＧＣＧＧＣ（配列番号１１１）

【０９６５】

別の例示的なコンストラクトでは、５’ＵＴＲ配列は配列番号５５であり、３’ＵＴＲ配列は配列番号１０８である（下記を参照されたい）。

５’ＵＴＲ：

ＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ（配列番号５５）

３’ＵＴＲ：

ＵＧＡＵＡＡＵＡＧＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＵＡＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣＣＧＵＡＣＣＣＣＣＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡＧＵＧＧＧＣＧＧＣ（配列番号１０８）

【０９６６】

別の例示的なコンストラクトでは、５’ＵＴＲ配列は配列番号５６であり、３’ＵＴＲ配列は配列番号１０８である（下記を参照されたい）。

５’ＵＴＲ：

ＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＣＣＣＣＧＧＣＧＣＣＧＣＣＡＣＣ（配列番号５６）

３’ＵＴＲ：

ＵＧＡＵＡＡＵＡＧＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＵＡＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣ

ＣＧＵＡＣＣＣＣＣＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡＧＵＧＧＧＣＧＧＣ（配列番号１０８）

【０９６７】

別の例示的なコンストラクトでは、５’ＵＴＲ配列は配列番号５５であり、３’ＵＴＲ配列は配列番号１１２である（下記を参照されたい）。

５’ＵＴＲ：

ＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ（配列番号５５）

３’ＵＴＲ：

ＵＧＡＵＡＡＵＡＧＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＵＡＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣＣＧＵＡＣＣＣＣＣＣＧＣＡＵＵＡＵＵＡＣＵＣＡＣＧＧＵＡＣＧＡＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡＧＵＧＧＧＣＧＧＣ（配列番号１１２）

【０９６８】

別の例示的なコンストラクトでは、５’ＵＴＲ配列は配列番号５５であり、３’ＵＴＲ配列は配列番号１１４である（下記を参照されたい）。

５’ＵＴＲ：

ＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ（配列番号５５）

３’ＵＴＲ：

ＵＧＡＵＡＡＵＡＧＵＣＣＡＵＡＡＡＧＵＡＧＧＡＡＡＣＡＣＵＡＣＡＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＵＡＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＡＵＡＡＡＧＵＡＧＧＡＡＡＣＡＣＵＡＣＡＵＣＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣＣＧＵＡＣＣＣＣＣＵＣＣＡＵＡＡＡＧＵＡＧＧＡＡＡＣＡＣＵＡＣＡＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡＧＵＧＧＧＣＧＧＣ（配列番号１１４）

【０９６９】

別の例示的なコンストラクトでは、５’ＵＴＲ配列は配列番号５５であり、３’ＵＴＲ配列は配列番号１０７である（下記を参照されたい）。

５’ＵＴＲ：

ＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ（配列番号５５）

３’ＵＴＲ：

ＵＧＡＵＡＡＵＡＧＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＡＵＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＡＵＣＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣＣＧＵＡＣＣＣＣＣＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡＧＵＧＧＧＣＧＧＣ（配列番号１０７）

【０９７０】

ＰＡＨ　ｍＲＮＡ配列は、改変ｍＲＮＡとして調製する。具体的には、そのｍＲＮＡが、ウリジンの代わりに、１００％Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むように、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写の際に、Ｎ１－メチルシュードウリジン－５’－三リン酸を用いて、改変ｍＲＮＡを作製できる。さらに、ポリＡテールを導入するプライマーを用いて、ＰＡＨ－ｍＲＮＡを合成でき、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ－２’－Ｏ－メチルを生成するためのワクシニアウイルスキャッピング酵素及び２’－Ｏメチルトランスフェラーゼを用いて、両方のｍＲＮＡ上に、Ｃａｐ１構造を生成する。

【０９７１】

実施例１３：内因性ＰＡＨのｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現の検出

マウス及びヒトの両方の供給源に由来する様々な細胞株で、ＰＡＨ発現の特徴付けを行う。細胞を標準的な条件で培養し、その細胞を溶解緩衝液中に置くことによって、細胞抽出物を得る。比較のために、適切なコントロールも調製する。ＰＡＨの発現を分析するために、溶解試料を試験細胞から調製し、サンプルローディング緩衝液であるドデシル硫酸

リチウムと混合し、標準的なウエスタンブロット分析にかける。ＰＡＨの検出のために使用する抗体は、市販の抗ＰＡＨ抗体である。ロードコントロールの検出のために使用する抗体は、抗グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）抗体である。

【０９７２】

内因性ＰＡＨの発現をベースラインとして使用して、ＰＡＨをコードする核酸を含むｍＲＮＡのトランスフェクションに起因する、ＰＡＨ発現の変化を求めることができる。

【０９７３】

実施例１４：ナノ粒子組成物の作製

Ａ．ナノ粒子組成物の作製

２つの流体流（一方は、本発明のポリヌクレオチドを含み、もう一方は、脂質成分を有する）のマイクロフルイディクス混合及びＴ字型管による混合のような混合プロセスで、ナノ粒子を作ることができる。

【０９７４】

本明細書に開示されているイオン化可能なアミノ脂質、例えば、式（Ｉ）による脂質（化合物ＩＩなど）または式（ＩＩＩ）による脂質（化合物ＶＩなど）、リン脂質（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ（Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ）から入手可能なＤＯＰＥまたはＤＳＰＣなど）、ＰＥＧ脂質（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ（Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ）から入手可能な１，２ジミリストイルｓｎグリセロールメトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＭＧとしても知られる）など）、ならびに構造脂質（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｔａｕｆｋｉｒｃｈｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から入手可能なコレステロールまたは副腎皮質ステロイド（プレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン及びヒドロコルチゾンなど）、もしくはこれらを組み合わせたものなど）を、エタノールにおいて、濃度約５０ｍＭで合わせることによって、脂質組成物を調製する。溶液は、例えば２０℃で冷蔵保存しなければならない。脂質を合わせて、所望のモル比をもたらし、水及びエタノールで希釈して、脂質終濃度を約５．５ｍＭ及び約２５ｍＭにする。

【０９７５】

脂質組成物とポリヌクレオチドとのｗｔ：ｗｔ比が約５：１～約５０：１で、脂質溶液と、ポリヌクレオチドを含む溶液とを合わせることによって、ポリヌクレオチド及び脂質組成物を含むナノ粒子組成物を調製する。マイクロ流体ベースのシステムＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒを用いて、脂質溶液を約１０ｍｌ／分及び約１８ｍｌ／分の流速で、ポリヌクレオチド溶液に速やかに注入して、水とエタノールの比率が約１：１～約４：１である懸濁液を作製する。

【０９７６】

ＲＮＡを含むナノ粒子組成物では、０．１ｍｇ／ｍｌの濃度のＲＮＡ脱イオン水溶液を、ｐＨ３～４の５０ｍＭのクエン酸ナトリウム緩衝液で希釈して、ストック溶液を形成する。

【０９７７】

エタノールの除去及び緩衝液交換を行うために、ナノ粒子組成物を透析によって処理できる。調合物は、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒカセット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を分子量カットオフ値１０ｋＤで用いて、ｐＨ７．４のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（一次生成物の２００倍の体積）に対して２回透析する。１回目の透析は、室温で３時間行う。続いて、その調合物を一晩、４℃で透析する。得られたナノ粒子懸濁液を０．２μｍの滅菌フィルター（Ｓａｒｓｔｅｄｔ、Ｎｕｍｂｒｅｃｈｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）でガラスバイアルにろ過し、クリンプキャップで封止する。０．０１ｍｇ／ｍｌ～０．１０ｍｇ／ｍｌのナノ粒子組成物溶液を概ね得られる。

【０９７８】

上記の方法は、ナノ沈殿及び粒子の形成を誘導する。代替的なプロセス（Ｔ字型管及び

直接注入のプロセスが挙げられるが、これらに限らない）を用いて、同じナノ沈殿をもたらすことができる。

【０９７９】

Ｂ．ナノ粒子組成物の特徴付け

Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ、Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）を用いて、ナノ粒子組成物の粒度、多分散性指数（ＰＤＩ）及びゼータ電位を求めることができる（粒度を求める際には１×ＰＢＳにおいて、ゼータ電位を求める差には１５ｍＭのＰＢＳにおいて求めることができる）。

【０９８０】

紫外可視分光法を用いて、ナノ粒子組成物中のポリヌクレオチド（例えばＲＮＡ）の濃度を求めることができる。メタノールとクロロホルムの４：１（ｖ／ｖ）混合物９００μＬに、１×ＰＢＳ中の希釈調合物１００μＬを加える。混合した後、ＤＵ８００という分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．、Ｂｒｅａ，ＣＡ）で、その溶液の吸光度スペクトルを例えば２３０ｎｍ～３３０ｎｍで記録する。ナノ粒子組成物中のポリヌクレオチドの濃度は、その組成物で用いられているポリヌクレオチドの吸光係数、及び例えば２６０ｎｍの波長における吸光度と、例えば３３０ｎｍの波長におけるベースライン値との差に基づいて計算できる。

【０９８１】

ＲＮＡを含むナノ粒子組成物では、ＱＵＡＮＴ－ＩＴ（商標）ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）ＲＮＡアッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて、そのナノ粒子組成物によるＲＮＡの封入を評価できる。試料をＴＥ緩衝液溶液（１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）で、およそ５μｇ／ｍＬの濃度まで希釈する。その希釈試料５０μＬをポリスチレン製９６ウェルプレートに移し、５０μＬのＴＥ緩衝液または５０μＬの２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００溶液のいずれかをそのウェルに加える。そのプレートを３７℃の温度で１５分インキュベートする。ＲＩＢＯＧＲＥＥＮ（登録商標）という試薬をＴＥ緩衝液において１：１００で希釈し、この溶液１００μＬを各ウェルに加える。その蛍光強度は、蛍光プレートリーダー（Ｗａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ１４２０　Ｍｕｌｔｉｌａｂｌｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いて、例えば約４８０ｎｍの励起波長及び例えば約５２０ｎｍの発光波長で測定できる。試薬ブランクの蛍光値を各試料の蛍光値から減じ、インタクトな試料（Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を加えていない試料）の蛍光強度を、（Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を加えることによって）破壊した試料の蛍光値で除することによって、遊離ＲＮＡのパーセンテージを求める。

【０９８２】

ナノ粒子組成物の例示的な調合物が、下記の表６に示されている。「化合物」という語は、ＭＣ３、化合物ＩＩまたは化合物ＶＩのようなイオン化可能な脂質を指す。「リン脂質」は、ＤＳＰＣまたはＤＯＰＥであることができる。「ＰＥＧ脂質」は、ＰＥＧ－ＤＭＧまたは化合物Ｉであることができる。

【０９８３】

【表７】

表６．ナノ粒子の例示的な調合物

組成(mol%)	成分
40:20:38.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
45:15:38.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
50:10:38.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
55:5:38.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
60:5:33.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
45:20:33.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
50:20:28.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
55:20:23.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
60:20:18.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
40:15:43.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
50:15:33.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
55:15:28.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
60:15:23.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
40:10:48.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
45:10:43.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
55:10:33.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
60:10:28.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
40:5:53.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
45:5:48.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
50:5:43.5:1.5	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
40:20:40:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
45:20:35:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
50:20:30:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
55:20:25:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
60:20:20:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
40:15:45:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
45:15:40:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
50:15:35:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
55:15:30:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
60:15:25:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
40:10:50:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
45:10:45:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
50:10:40:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
55:10:35:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質
60:10:30:0	化合物:リン脂質:コレステロール:PEG脂質

【０９８４】

実施例１５：ＰＡＨタンパク質バリアントの選択

種を越えた、特定のアミノ酸残基の保存、及びアミノ酸置換が主鎖のエントロピー（安定性）または脱ユビキチン化（分解）に及ぼす作用の予測のような要因に基づき、ヒトＰＡＨの１アミノ酸バリアントを２１個設計した。トランケート型のＰＡＨバリアントコードするｍＲＮＡコンストラクトを調製し、ヒト肝臓細胞株であるＳＮＵ－４２３細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ２２３８（商標））において、そのコンストラクトがタンパク質の発現を誘導する能力について、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでスクリーニングした。

【０９８５】

１０％ウシ胎児血清を含むＲｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ １６４０ Ｍｅｄｉｕｍで、ＳＮＵ－４２３細胞をＡＴＣＣの指示に従って維持し、３７℃でインキュベートした。ＳＮＵ－４２３細胞を６ウェルプレートにおいて、１ウェル当たり５×１０５細胞で播種し、２４時間後に、０．１μｇ／ｍｌまたは１．０μｇ／ｍｌのｈＰＡＨコンストラクトまたはｅＧＦＰ ｍＲＮＡのいずれかをトランスフェクションした。トランスフェクションには、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（ＬＭＲＮＡ０１５、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ［Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ］）をメーカーの指示に従って使用した。トランスフェクションから２４時間後または９６時間後に、細胞を溶解させ、タンパク質を抽出し、ｈＰＡＨタンパク質の発現を次のとおりに測定した。トランスフェクションから２４時間後または９６時間後に、１５０ｍＭの塩化カリウム（Ｐ９３３３、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｉｎｃ．［Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ］）、１ｍＭのジチオスレイトール（２０２９１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ［Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ］）、１０ｍＭのＰｈｅ（Ｐ２１２６、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｉｎｃ．［Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ］）、５％グリセロール（ｖ／ｖ）（Ｇ９０１２、ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈ Ｉｎｃ．［Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ］）及び５０ｍＭのリン酸カリウム（ｐＨ７．０、７９５４８８、ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈ Ｉｎｃ．［Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ］）を含む溶解緩衝液に、プロテアーゼ阻害剤カクテル（１８６１２７８、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ［Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ］）を添加したものを用いて、ＳＮＵ－４２３細胞を２０分、４℃でインキュベートした。ホモジネートを回収し、１４，０００ｇで１０分遠心分離した。イムノブロッティングのために、溶解液をドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。膜をＰＡＨ抗体（抗ＰＡＨ抗体、クローン６Ｈ１０．１、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｓｉｇｍａ）及びＥＲＰ７２抗体（Ｄ７０Ｄ１２、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ［Ｄａｎｖｅｒｓ ＭＡ］）とインキュベートした。ＬＩＣＯＲというイメージングプロットフォーム（ＬＩ－ＣＯＲ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ［Ｌｉｎｃｏｌｎ，ＮＥ］）を用いて、膜をイメージングした。トランスフェクションされたＳＮＵ４２３細胞内でのＰＡＨの発現または非存在をウエスタンブロットによって確認した。ＬＩＣＯＲでのイメージングを用いて、発現レベルを定量し、ＥＲＰ７２レベルに対して正規化した。

【０９８６】

ＰＡＨバリアントをコードするコンストラクトのそれぞれを、０．１ｕｇ／ｍＬの濃度でトランスフェクションし、トランスフェクションから９６時間後に、タンパク質の発現を調べ、０．１ｕｇ／ｍＬまたは１．０ｕｇ／ｍＬのΔｒｄコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現と比較した。５つのコンストラクト（Ｍ１８０Ｔ、Ｋ１５０Ｔ、Ｇ２５６Ａ、Ｎ３７６Ｅ及びＫ３６１Ｒ）は、同じ量のΔｒｄコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現と比べて、発現の増加が見られるＰＡＨタンパク質バリアントをコードした。図１及び図２を参照されたい。しかしながら、ＰＡＨタンパク質バリアントのいくつかでは、同じ量のΔｒｄコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現と比べて、発現の低下が見られた。発現が増加したコンストラクトの中でも、Ｍ１８０Ｔ及びＫ１５０Ｔで、最も多い発現が見られた。図１に示されている１１個のＰＡＨバリアントは、ＳＮＵ－４２３細胞において、最も高いレベルのＰＡＨを発現したバリアントであった。他の１０個のバリアント（異なるアミノ酸置換を有するバリアント）では、発現レベルが、図１における１１個のバリアントよりも有意に低かった。

【０９８７】

図１のトランケート型コンストラクトΔｒｄ（デルタＲＤ）は、配列番号４１のｍＲＮＡに対応し、配列番号２のトランケート型ＰＡＨタンパク質（アミノ酸置換を含まない）をコードするものである。図１で用いたバリアントｍＲＮＡコンストラクトのオープンリーディングフレームは、アミノ酸置換に必要なコドン変化以外は、Δｒｄと配列が同一なものである。トランケート型コンストラクトＭ１８０Ｔは、配列番号４３のｍＲＮＡに対応し、配列番号４のトランケート型ＰＡＨタンパク質をコードするものである。トランケ

ート型コンストラクトＫ１５０Ｔは、配列番号４５のｍＲＮＡに対応し、配列番号６のトランケート型ＰＡＨタンパク質をコードするものである。トランケート型コンストラクトＧ２５６Ａは、配列番号４７のｍＲＮＡに対応し、配列番号８のトランケート型ＰＡＨタンパク質をコードするものである。トランケート型コンストラクトＮ３７６Ｅは、配列番号４９のｍＲＮＡに対応し、配列番号１０のトランケート型ＰＡＨタンパク質をコードするものである。トランケート型コンストラクトＫ３６１Ｒは、配列番号２５１のｍＲＮＡに対応し、配列番号１２のトランケート型ＰＡＨタンパク質をコードするものである。

【０９８８】

アミノ酸置換を１つ以上含むＰＡＨタンパク質バリアントであって、図１で、発現の増加と関連付けられた５個のＰＡＨタンパク質バリアントを、完全長形態及びトランケート型形態のそれぞれで発現させ、９６時間時点のｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現についてスクリーニングした。

【０９８９】

ＰＡＨバリアントをコードするコンストラクトのそれぞれを、上記のように、ＳＮＵ－４２３細胞において、０．１ｕｇ／ｍＬの濃度でトランスフェクションし、トランスフェクションから９６時間後に、タンパク質の発現を調べ、完全長野生型ＰＡＨコンストラクトまたはΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現と比較した。図３及び図４を参照されたい。コントロール（完全長野生型ＰＡＨまたはΔｒｄ　ＰＡＨをコードするもの）を２４時間及び９６時間の時点に回収し、０．１ｕｇ／ｍＬ及び１．０ｕｇ／ｍＬで導入した。トランケート型バリアントＰＡＨコンストラクトではいずれも、９６時間の時点に発現が見られた。図３を参照されたい。

【０９９０】

図３及び図４で用いたトランケート型ＰＡＨコンストラクトは、上に記載されている。完全長野生型（ＷＴ）ＰＡＨコンストラクトは、配列番号４０のｍＲＮＡに対応し、配列番号１の野生型ＰＡＨタンパク質をコードするものである。完全長Ｍ１８０Ｔ　ＰＡＨコンストラクトは、配列番号４２のｍＲＮＡに対応し、配列番号３のＭ１８０Ｔ　ＰＡＨタンパク質をコードするものである。完全長Ｋ１５０Ｔ　ＰＡＨコンストラクトは、配列番号４４のｍＲＮＡに対応し、配列番号５のＫ１５０Ｔ　ＰＡＨタンパク質をコードするものである。

【０９９１】

実施例１６：安定テール及びタンパク質バリアントの発現

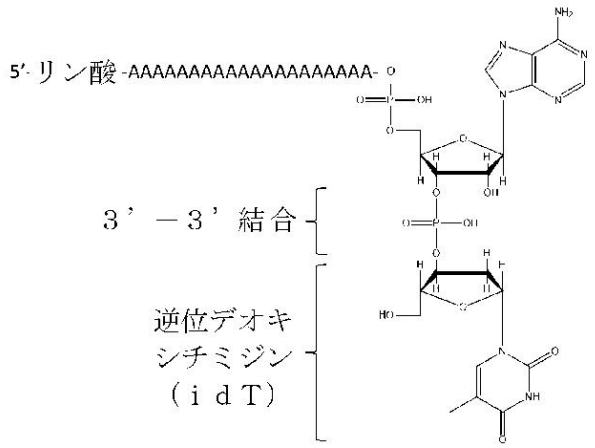
Ｍ１８０Ｔ　ＰＡＨタンパク質バリアントを、完全長形態及びトランケート形態のそれぞれで発現させ、２４時間及び９６時間の時点に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現についてスクリーニングした。所定のｍＲＮＡコンストラクトをライゲーションによって改変して、ポリ（Ａ）テールを安定化した。ライゲーションは、０．５～１．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡ（５’：Ｃａｐ１、３’：Ａ１００）、５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１０ｍＭのＭｇＣｌ２、１ｍＭのＴＣＥＰ、１０００単位／ｍＬのＴ４　ＲＮＡリガーゼ１、１ｍＭのＡＴＰ、２０％（ｗ／ｖ）のポリエチレングリコール８０００、ならびにモル比５：１の改変用オリゴ及びｍＲＮＡを用いて行った。改変用オリゴは、配列が５’－リン酸－ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－（逆位デオキシチミジン（ｉｄＴ））（配列番号２０９）であった（下記を参照されたい）。ライゲーション反応物を混合し、室温（約２２℃）で４時間インキュベートした。安定テールｍＲＮＡをｄＴ精製、逆相精製、ヒドロキシアパタイト精製、水への限外ろ過及び滅菌ろ過によって精製した。各ｍＲＮＡのライゲーション効率は、ライゲーション済みｍＲＮＡ及び未ライゲーションｍＲＮＡのＵＰＬＣ分離によってアッセイしたところ、８０％超であった。得られたｍＲＮＡであって、安定テールを含むｍＲＮＡは、３’末端に、ポリＡ領域から始まる下記の構造を含んでいた。

Ａ１００－ＵＣＵＡＧＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ（配列番号２５９）－逆位デオキシチミジン

【０９９２】

安定化されたテール（５’－リン酸－ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ－（逆位デオキシチミジン）（配列番号２０９））を有する改変用オリゴは、下に示されている。

【化５５】



【０９９３】

ＰＡＨバリアントをコードするｍＲＮＡコンストラクトのそれぞれを、上記のように、ＳＮＵ－４２３細胞において、０．１ｕｇ／ｍＬの濃度でトランスフェクションし、トランスフェクションから２４時間後及び９６時間後に、タンパク質の発現を調べ、０．１ｕｇ／ｍＬまたは１．０ｕｇ／ｍＬの完全長野生型ＰＡＨコンストラクトまたはΔｒｄ　ＰＡＨコンストラクトをトランスフェクションした場合の発現と比較した。

【０９９４】

安定テールが付加されたＭ１８０Ｔ完全長コンストラクトでは、２４時間の時点に、野生型完全長ＰＡＨタンパク質をコードする同じ用量（０．１ｕｇ／ｍＬ）のコンストラクト、及び安定テールを含むコンストラクトであって、野生型完全長ＰＡＨタンパク質をコードする同じ用量（０．１ｕｇ／ｍＬ）のコントラストと比べて、タンパク質発現の増加が見られた。図５及び図６を参照されたい。Ｍ１８０Ｔトランケート型コンストラクトでは、２４時間及び９６時間の時点に、同じ用量（０．１ｕｇ／ｍＬ）のΔｒｄコンストラクトと比べて、タンパク質の発現の増加が見られた。図５及び図６で用いたコンストラクトは、実施例１５に記載されているコンストラクトと同じであった。ただし、示されている場合には、安定テールが付加されている。

【０９９５】

実施例１７：ＰＫＵマウスモデルにおいて、安定テールが、ＰＡＨ活性の持続期間に及ぼす作用の評価

ＰＡＨをコードするｍＲＮＡに、安定テールを付加することで、ｉｎ　ｖｉｖｏで、治療上のベネフィットが得られるかを判定するために、完全長野生型ヒトＰＡＨ（配列番号１）をコードするｍＲＮＡ（配列番号４０）を１．０ｍｇ／ｋｇの１回用量で、ホモ接合型ＰＡＨｅｎｕ２マウス（ｎ＝１コンストラクト当たり８匹）に、尾静脈注射によって静脈内投与した。マウスの１群には、Ｃａｐ１　５’キャップ及び１００ヌクレオチドのポリＡ領域を有するｍＲＮＡ（Ｃ１　Ａ１００、配列番号４０）を投与した。第２の群のマウスには、Ｃａｐ１　５’キャップ及び実施例１６に記載されているような安定テールを有するｍＲＮＡ（Ｃ１　ｉｄＴ）を投与した。Ｃ１　ｉｄＴ　ｍＲＮＡは、配列番号４０の配列を有し、安定テールが付加されていた。ｍＲＮＡは、マウスへの送達用に、脂質ナノ粒子中に調合した。

【０９９６】

ｍＲＮＡの注射前（０時間）、ｍＲＮＡの注射から２４時間後、４８時間後、７２時間

後、９６時間後、１２０時間後及び１６８時間後に、血液をマウスから採取した。血液試料は、目標体積１０μＬで、顎下採血によって採取し、Ｍｉｔｒａ（登録商標）Ｍｉｃｒｏｓａｍｐｌｅｒ（Ｎｅｏｔｅｒｙｘ　Ｉｔｅｍ＃１００５）の先端に吸着させた。１匹当たり１時点当たりに２個の血液スポットを回収し、少なくとも３時間、室温で乾燥させた。乾燥血液スポット（ＤＢＳ）をアセトニトリルで抽出し、遠心分離し、分析まで４℃で保存した。高速液体クロマトグラフィー及び三連四重極型アッセイを用いた液体クロマトグラフィー－質量分析／質量分析によって、（ＰＡＨ活性のマーカーとして）循環フェニルアラニンレベルを各時点に定量した。いずれのコンストラクトでも、２４時間までに、血中フェニルアラニンレベルが有意に低下したが、安定化テール（Ｃ１　ｉｄＴ）コンストラクトの方が、時間経過に伴う、フェニルアラニンレベルの持続的な低下が有意に大きかった。図７を参照されたい。

【０９９７】

実施例１８：ＰＫＵマウスモデルにおいて、ＰＡＨタンパク質バリアントが、ＰＡＨ活性の持続時間に及ぼす作用の評価

ＰＡＨタンパク質バリアントによって、ｉｎ　ｖｉｖｏで、治療上のベネフィットが得られるかを判定するために、トランケート型ＰＡＨバリアント（タンパク質の発現の増加と関連するとして、図１で特定されたアミノ酸置換を含む）またはΔｒｄ　ＰＡＨタンパク質（配列番号２）をコードするｍＲＮＡを１．０ｍｇ／ｋｇの１回用量で、ホモ接合型ＰＡＨｅｎｕ２マウス（ｎ＝１コンストラクト当たり８匹）に、尾静脈注射によって静脈内投与した。使用したｍＲＮＡコンストラクトは、実施例１５に記載されているものと同じであった。ｍＲＮＡは、マウスへの送達用に、脂質ナノ粒子中に調合した。ｍＲＮＡの注射前（０時間）、ｍＲＮＡの注射から２４時間後、４８時間後、７２時間後及び９６時間後に、血液をマウスから採取した。（ＰＡＨ活性のマーカーとしての）血中フェニルアラニンレベルは、実施例１７に記載されているようにして、各時点で測定した。すべてのコンストラクトで、２４時間までに、血中フェニルアラニンレベルが有意に低下したが、Ｍ１８０Ｔコンストラクト及びＫ１５０Ｔコンストラクトの方が、時間経過に伴う、フェニルアラニンレベルの持続的な低下が有意に大きかった。図８を参照されたい。

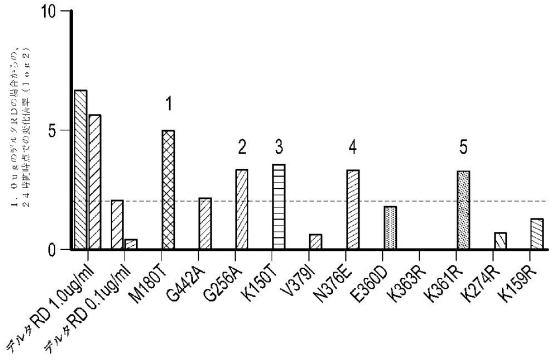
【０９９８】

実施例１９：ＰＫＵマウスモデルにおいて、安定テールと組み合わせた場合のＰＡＨタンパク質バリアントが、ＰＡＨ活性の持続時間に及ぼす作用の評価

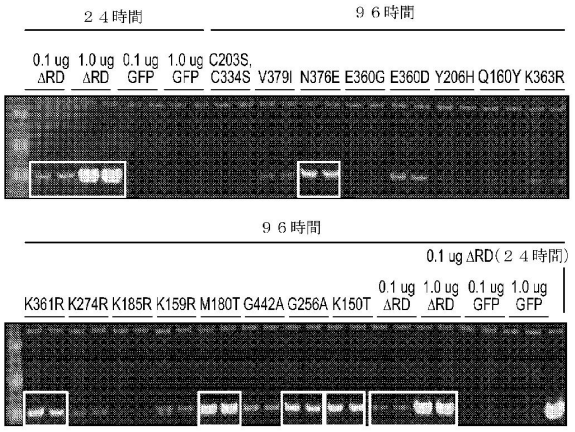
ＰＡＨバリアントをコードするｍＲＮＡに、安定テールを付加することで、ｉｎ　ｖｉｖｏで、治療上のベネフィットが得られるかを判定するために、完全長のＭ１８０Ｔ　ＰＡＨバリアントもしくはＫ１５０Ｔ　ＰＡＨバリアント（安定テールを有する場合もしくは有さない場合）、または完全長野生型ＰＡＨタンパク質（安定テールを有する場合もしくは有さない場合）をコードするｍＲＮＡを１．０ｍｇ／ｋｇの１回用量で、ホモ接合型ＰＡＨｅｎｕ２マウス（ｎ＝１コンストラクト当たり８匹）に、尾静脈注射によって静脈内投与した。使用したｍＲＮＡコンストラクトは、実施例１５及び１６に記載されているものと同じであり、示されている場合には、安定テールが付加されたものである。ｍＲＮＡは、マウスへの送達用に、脂質ナノ粒子中に調合した。ｍＲＮＡの注射前（０時間）、ｍＲＮＡの注射から２４時間後、４８時間後、７２時間後、９６時間後、１２０時間後及び１６８時間後に、血液をマウスから採取した。（ＰＡＨ活性のマーカーとしての）血中フェニルアラニンレベルは、実施例１７に記載されているようにして、各時点で測定した。すべてのコンストラクトで、２４時間までに、血中フェニルアラニンレベルが有意に低下したが、安定テールを有する完全長Ｍ１８０Ｔコンストラクト及び安定テールを有する完全長Ｋ１５０Ｔコンストラクトの方が、時間経過に伴う、フェニルアラニンレベルの持続的な低下が有意に大きかった。図９を参照されたい。

【図面】

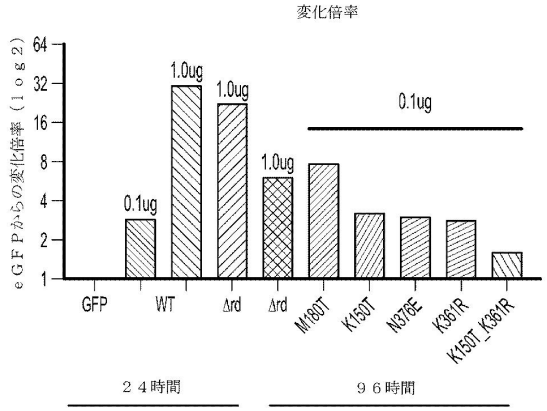
【図１】


10
5
0
1
2
3
4
5
デルタRD 1.0ug/ml
デルタRD 0.1ug/ml
M180T
G442A
G256A
K150T
V379I
N376E
E360D
K363R
K361R
K274R
K159R

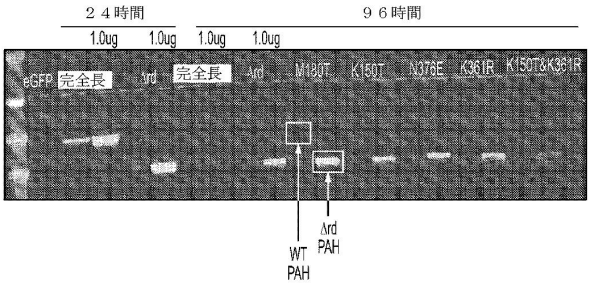
【図２】


２４時間
９６時間
0.1 ug ΔRD
1.0 ug ΔRD
0.1 ug GFP
1.0 ug GFP
C203S, C334S
V379I
N376E
E360G
E360D
Y206H
Q160Y
K363R
９６時間
0.1 ug ΔRD（２４時間）
K361R K274R K185R K159R M180T G442A G256A K150T
0.1 ug ΔRD
1.0 ug ΔRD
0.1 ug GFP
1.0 ug GFP

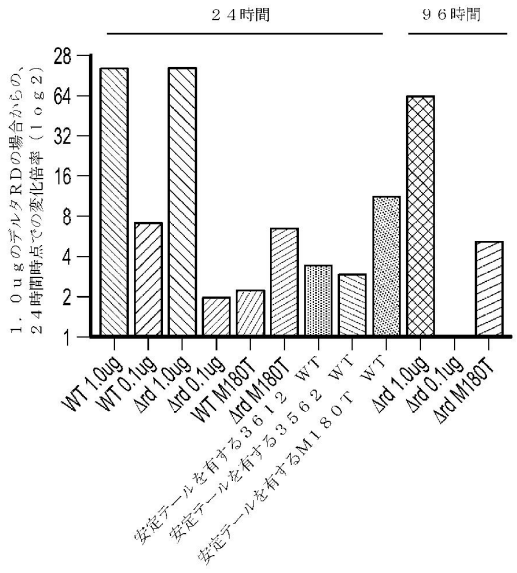
【図３】


変化倍率
ｅＧＦＰからの変化倍率（１ｏｇ２）
64
32
16
8
4
2
1
0.1ug
1.0ug
1.0ug
1.0ug
0.1ug
GFP
WT
Δrd
Δrd
M180T
K150T
N376E
K361R
K150T_K361R
２４時間
９６時間

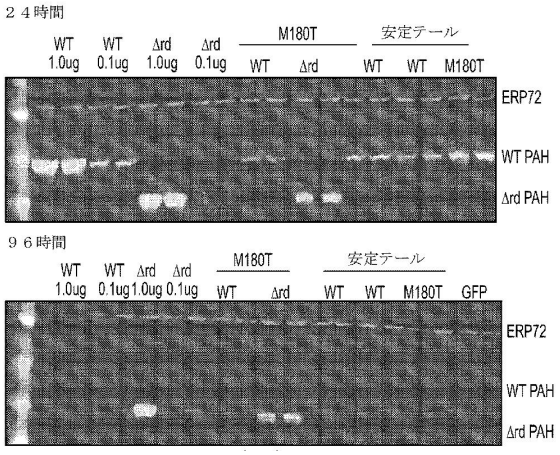
【図４】


２４時間
９６時間
1.0ug
1.0ug
1.0ug
1.0ug
eGFP
完全長
Δrd
完全長
Δrd
M180T
K150T
N376E
K361R
K150T&K361R
WT PAH
Δrd PAH

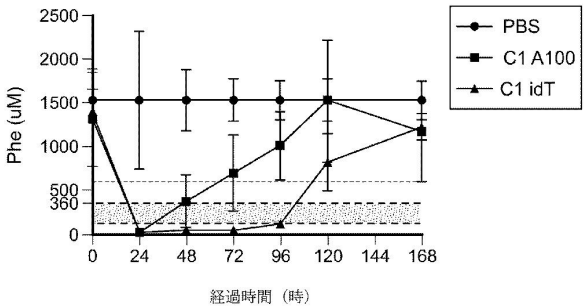
【図５】


２４時間
９６時間
１．０ｕｇのデルタＲＤの場合からの、２４時間時点での変化倍率（ｌｏｇ２）
28
64
32
16
8
4
2
1
WT 1.0ug
WT 0.1ug
Δrd 1.0ug
Δrd 0.1ug
WT M180T
Δrd M180T
安定テールを有するｈＰＡＨ３６１２
安定テールを有するｈＰＡＨ３５６２
安定テールを有するｈＰＡＨＭ１８０Ｔ
WT
WT
WT
Δrd 1.0ug
Δrd 0.1ug
Δrd M180T

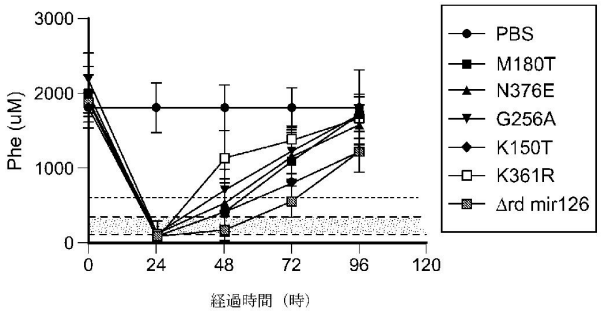
【図６】


２４時間
WT 1.0ug
WT 0.1ug
Δrd 1.0ug
Δrd 0.1ug
M180T
安定テール
WT
Δrd
WT
WT
M180T
ERP72
WT PAH
Δrd PAH
９６時間
WT 1.0ug
WT 0.1ug
Δrd 1.0ug
Δrd 0.1ug
M180T
安定テール
WT
Δrd
WT
WT
M180T
GFP
ERP72
WT PAH
Δrd PAH

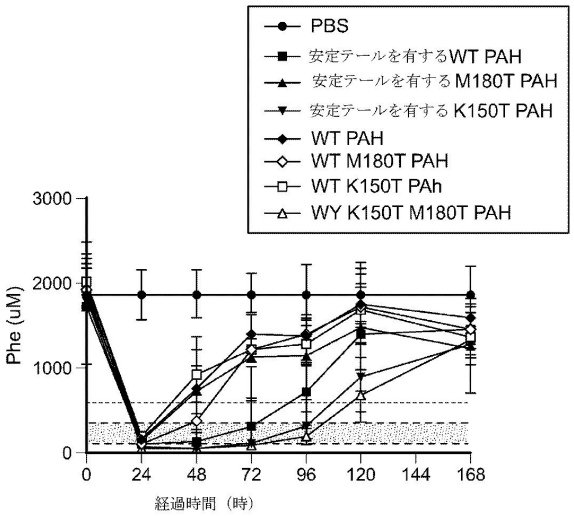
【図７】


2500
2000
1500
1000
500
360
0
Phe (uM)
0
24
48
72
96
120
144
168
経過時間（時）
PBS
C1 A100
C1 idT

【図８】


3000
2000
1000
0
Phe (uM)
0
24
48
72
96
120
経過時間（時）
PBS
M180T
N376E
G256A
K150T
K361R
Δrd mir126

【図９】



【配列表】

2023527875000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/035154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/02 C12N15/09 A61K38/44 C12N15/10
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)
C12N C40B 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, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/077250 A1 (GENZYME CORP [US]) 16 April 2020 (2020-04-16)	1,2,4,5, 7-12, 15-18, 21-56
A	sequence 1 tables 1, 2 paragraphs [0007], [0048], [0362] - [365;] figures 7, 8 variants #10, 14, 17	3,6,13, 14,19,20

X	EP 3 143 153 A1 (THE UNIV OF GEORGIA RES FOUND INC [US]) 22 March 2017 (2017-03-22) sequences 14-16	1,2, 7-12, 21-56

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	Date of mailing of the international search report
11 November 2021	24/11/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schmitz, Till

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/035154

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/167621 A1 (PFIZER [US]) 20 September 2018 (2018-09-20) sequence 1 -----	1,2, 7-12, 21-56
X	WO 2017/167866 A1 (UNIV DANMARKS TEKNISKE [DK]) 5 October 2017 (2017-10-05) sequence 63 -----	1,2, 7-12, 21-56
X	DATABASE UniProt [Online] 28 March 2018 (2018-03-28), "RecName: Full=Phe-4-monooxygenase {ECO:0000256|ARBA:ARBA00020694}; EC=1.14.16.1 {ECO:0000256|ARBA:ARBA00011995}; AltName: Full=Phenylalanine-4-hydroxylase {ECO:0000256|ARBA:ARBA00020276};", XP002804691, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A2K6G6V1 Database accession no. A0A2K6G6V1 sequence -----	1,3,7-10
X	DATABASE UniProt [Online] 5 June 2019 (2019-06-05), "RecName: Full=Phe-4-monooxygenase {ECO:0000256|ARBA:ARBA00020694}; EC=1.14.16.1 {ECO:0000256|ARBA:ARBA00011995}; AltName: Full=Phenylalanine-4-hydroxylase {ECO:0000256|ARBA:ARBA00020276};", XP002804693, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A485P1R0 Database accession no. A0A485P1R0 sequence -----	1,7-9
X	DATABASE UniProt [Online] 10 October 2018 (2018-10-10), "RecName: Full=Phe-4-monooxygenase {ECO:0000256|ARBA:ARBA00020694}; EC=1.14.16.1 {ECO:0000256|ARBA:ARBA00011995}; AltName: Full=Phenylalanine-4-hydroxylase {ECO:0000256|ARBA:ARBA00020276};", XP002804694, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A337S7G7 Database accession no. A0A337S7G7 sequence -----	1,7-9

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/035154

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/035154

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2021/035154

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2, 11, 12(completely); 1, 7-10, 21-56(partially)

Phenylalanine hydroxylase as claimed, comprising mutation M180T (SEQ ID NOs 3, 4). Furthermore polynucletides, mRNA, vectors, nanoparticles, pharmaceutical compositions, methods relating thereto.

---

2. claims: 3, 13, 14(completely); 1, 7-10, 21-56(partially)

As invention 1, but relating to K150T (SEQ ID NOs 5, 6).

---

3. claims: 4, 15, 16(completely); 1, 7-10, 21-56(partially)

As invention 1, but relating to G256A (SEQ ID NOs 7, 8).

---

4. claims: 5, 17, 18(completely); 1, 7-10, 21-56(partially)

As invention 1, but relating to N376E (SEQ ID NOs 9, 10).

---

5. claims: 6, 19, 20(completely); 1, 7-10, 21-56(partially)

As invention 1, but relating to K361R (SEQ ID NOs 11, 12).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/035154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020077250 A1	16-04-2020	AR 116700 A1	02-06-2021
		AU 2019357039 A1	03-06-2021
		BR 112021006796 A2	20-07-2021
		CA 3116283 A1	16-04-2020
		CN 113194982 A	30-07-2021
		CO 2021006060 A2	20-05-2021
		EP 3863662 A1	18-08-2021
		KR 20210076051 A	23-06-2021
		SG 11202103614R A	28-05-2021
		TW 202035439 A	01-10-2020
		US 2021348135 A1	11-11-2021
		WO 2020077250 A1	16-04-2020
EP 3143153 A1	22-03-2017	CA 2948183 A1	19-11-2015
		CN 106414755 A	15-02-2017
		EP 3143153 A1	22-03-2017
		US 2017240939 A1	24-08-2017
		US 2018282774 A1	04-10-2018
		WO 2015175793 A1	19-11-2015
WO 2018167621 A1	20-09-2018	CA 3056182 A1	20-09-2018
		EP 3596206 A1	22-01-2020
		JP 2020509763 A	02-04-2020
		US 2020056190 A1	20-02-2020
		WO 2018167621 A1	20-09-2018
WO 2017167866 A1	05-10-2017	EP 3436595 A1	06-02-2019
		WO 2017167866 A1	05-10-2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*9/51 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51		
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28		
Ａ６１Ｋ	*47/14 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/14		
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24		
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ｃ１２Ｎ	*9/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/02		
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	

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,NE,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,KE,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,NG,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．ＴＲＩＴＯＮ

(74)代理人　100221545
弁理士　白江 雄介
(72)発明者　ライス，リサ エム
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア２００
(72)発明者　フィン，パトリック
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア２００
(72)発明者　ドゥシス，アタナシオス
アメリカ合衆国０２１３９マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア２００

Ｆターム（参考）　4C076　AA65 AA95 BB11 BB13 CC21 DD46 DD63 FF70
4C084　AA13 BA01 BA08 BA22 CA18 DC25 MA38 MA66 NA13 NA14 ZC02 ZC21
4C086　AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA66 NA13 NA14 ZC02 ZC21
4C087　AA01 AA02 BC83 CA12 MA38 MA66 NA13 NA14 ZC02 ZC21