【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】令和2年12月17日(2020.12.17)

【公表番号】特表2019-533707(P2019-533707A)
【公表日】令和1年11月21日(2019.11.21)
【年通号数】公開・登録公報2019-047
【出願番号】特願2019-524194(P2019-524194)
【国際特許分類】
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　 9/16　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/18　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/24　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/28　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/34　(2017.01)
Ａ６１Ｋ　47/22　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/88　(2006.01)
【ＦＩ】
Ａ６１Ｋ　48/00
Ａ６１Ｐ　43/00　１１１
Ａ６１Ｋ　 9/16
Ａ６１Ｋ　47/18
Ａ６１Ｋ　47/24
Ａ６１Ｋ　47/28
Ａ６１Ｋ　47/34
Ａ６１Ｋ　47/22
Ｃ１２Ｎ　15/88　ＺＮＡＺ

【手続補正書】
【提出日】令和2年11月9日(2020.11.9)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
脂質ナノ粒子にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入する方法であって、
ｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子が形成されるように、予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを含む溶液を混合することを含む、方法。
【請求項２】
予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを含む前記溶液が、１０ｍＭ未満のクエン酸塩を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを含む前記溶液が、２５％未満の非水性溶媒を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
混合後に、前記脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを周囲温度よりも高い温度に加熱することをさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５】
前記ｍＲＮＡおよび／または前記予め形成された脂質ナノ粒子が、前記混合前に周囲温度よりも高い温度に加熱される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記温度が、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、もしくは７０℃であるか、またはそれより高い、請求項４または５に記載の方法。
【請求項７】
前記温度が、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃、または約６０～７０℃の範囲である、請求項４～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記温度が約６５℃である、請求項４～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記予め形成された脂質ナノ粒子が、エタノール中に溶解された脂質を水溶液と混合することによって形成される、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記脂質が、一種以上のカチオン性脂質、一種以上のヘルパー脂質、一種以上のコレステロール系脂質、およびＰＥＧ脂質を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記一種以上のカチオン性脂質が、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾールベース）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００３、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡおよびＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２４）、およびその組み合わせからなる群から選択される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記一種以上のカチオン性脂質がターゲット２４を含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
前記一種以上のカチオン性脂質がＩＣＥを含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
前記一種以上のカチオン性脂質が、ｃＫＫ－Ｅ１２を含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１５】
前記一種以上の非カチオン性脂質は、ＤＳＰＣ（１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＯＰＥ（１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＯＰＣ（１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホチジルコリン）ＤＰＰＥ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＭＰＥ（１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＯＰＧ（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール））から選択される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１６】
前記一種以上のＰＥＧ修飾脂質が、C_{6}－C_{20}長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した長さ最大５ｋＤａのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む、請求項１０に記載の方

法。
【請求項１７】
前記予め形成された脂質ナノ粒子が、接線流ろ過（ＴＦＦ）プロセスによって精製される、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記精製されたナノ粒子の約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％より多くが、７５～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記精製されたナノ粒子の実質的にすべてが７５～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する、請求項１７または１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記精製されたナノ粒子の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％より多くが、５０～８０ｎｍの範囲のサイズを有する、請求項１７～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記精製されたナノ粒子の実質的にすべてが７５～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する、請求項１５～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
約９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超える封入率をもたらす、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
ｍＲＮＡの約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超える回収率をもたらす、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡが、ポンプシステムを使用して混合される、請求項１～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記ポンプシステムが、パルスレスフローポンプを備える、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記ポンプがギアポンプである、請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
予め形成された脂質ナノ粒子を含む前記溶液が、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
予め形成された脂質ナノ粒子を含む前記溶液が、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流量で混合される、請求項１～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
前記ｍＲＮＡが、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、請求項１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】

前記ｍＲＮＡが、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流量で混合される、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

クエン酸緩衝液をｍＲＮＡストック溶液と混合することによってｍＲＮＡ溶液をまず生成する工程を含む、請求項１～３０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３２】

前記クエン酸緩衝液が約１０ｍＭのクエン酸塩、約１５０ｍＭ　Ｎａｃｌ、約４．５のｐＨを含む、請求項２９に記載の方法。

【請求項３３】

前記ｍＲＮＡストック溶液が、約１ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ、約１００ｍｇ／ｍｌ以上の濃度の前記ｍＲＮＡを含む、請求項２９または３０に記載の方法。

【請求項３４】

前記クエン酸緩衝液が、約１００～３００ｍｌ／分、３００～６００ｍｌ／分、６００～１２００ｍｌ／分、１２００～２４００ｍｌ／分、２４００～３６００ｍｌ／分、３６００～４８００ｍｌ／分、または４８００～６０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５】

前記クエン酸緩衝液が、約２２０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約１２００ｍｌ／分、約２４００ｍｌ／分、約３６００ｍｌ／分、約４８００ｍｌ／分、または約６０００ｍｌ／分の流量で混合される、請求項２９～３２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３６】

前記ｍＲＮＡストック溶液が、約１０～３０ｍｌ／分、約３０～６０ｍｌ／分、約６０～１２０ｍｌ／分、約１２０～２４０ｍｌ／分、約２４０～３６０ｍｌ／分、約３６０～４８０ｍｌ／分、または約４８０～６００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、請求項２９～３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３７】

前記ｍＲＮＡストック溶液が、約２０ｍｌ／分、約４０ｍｌ／分、約６０ｍｌ／分、約８０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、または約６００ｍｌ／分の流量で混合される、請求項２９～３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３８】

前記ｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子がトレハロース溶液中の前記予め形成された脂質ナノ粒子で調製される、請求項１～３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】

前記ｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子が、さらなる下流処理を必要としない、請求項１～３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４０】

請求項１～３９のいずれか一項に記載の方法により生成されたｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子の組成物。

【請求項４１】

前記ｍＲＮＡが、一個以上の修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～３９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４２】

前記ｍＲＮＡが修飾されていない、請求項１～３９および４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４３】
前記ｍＲＮＡが、一個以上の修飾ヌクレオチドを含む、請求項４０に記載の組成物。
【請求項４４】
前記ｍＲＮＡが修飾されていない、請求項４０または４３に記載の組成物。
【請求項４５】
前記ナノ粒子が約７５ｎｍ～１５０ｎｍのサイズを有する、請求項４０に記載の組成物。
【請求項４６】
前記ナノ粒子が、約０．２５未満～０．１６未満のＰｄＩを含む、請求項４０に記載の組成物。
【請求項４７】
前記投与製剤が、約０．０１６ｍｇ／ｋｇ～１．０ｍｇ／ｋｇの脂質ナノ粒子に封入されているｍＲＮＡの濃度を含む、請求項４０に記載の組成物。
【請求項４８】
ｉｎ　ｖｉｖｏタンパク質産生のためのｍＲＮＡの送達のための、請求項１～３９のいずれか一項に記載の方法により生成されたｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子を含む組成物であって、前記ｍＲＮＡが関心対象のタンパク質をコードする、組成物。
【請求項４９】
ｉｎ　ｖｉｖｏタンパク質産生のためのｍＲＮＡの送達のための、請求項４０および４３～４７のいずれか一項に記載の組成物。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４０】
本発明の他の特徴、目的、および利点は、以下の詳細な説明、図面、および特許請求の範囲において明らかになる。しかしながら、以下の詳細な説明、図面、および特許請求の範囲は、本発明の実施形態を示すが、単に例示のために与えられるものであり、制限するものではないことを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更および修正は、当業者には明らかになるであろう。
本発明は、例えば以下の項目を提供する。
（項目１）
脂質ナノ粒子にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を封入する方法であって、
ｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子が形成されるように、予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを含む溶液を混合することを含む、方法。
（項目２）
予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを含む前記溶液が、１０ｍＭ未満のクエン酸塩を含む、項目１に記載の方法。
（項目３）
予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを含む前記溶液が、２５％未満の非水性溶媒を含む、項目１に記載の方法。
（項目４）
混合後に、前記脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡを周囲温度よりも高い温度に加熱することをさらに含む、項目１に記載の方法。
（項目５）
前記ｍＲＮＡおよび／または前記予め形成された脂質ナノ粒子が、前記混合前に周囲温度よりも高い温度に加熱される、項目１に記載の方法。

（項目６）
前記温度が、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、もしくは７０℃であるか、またはそれより高い、項目４または５に記載の方法。
（項目７）
前記温度が、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃、または約６０～７０℃の範囲である、項目４～６のいずれか一項に記載の方法。
（項目８）
前記温度が約６５℃である、項目４～７のいずれか一項に記載の方法。
（項目９）
前記予め形成された脂質ナノ粒子が、エタノール中に溶解された脂質を水溶液と混合することによって形成される、項目１～８のいずれか一項に記載の方法。
（項目１０）
前記脂質が、一種以上のカチオン性脂質、一種以上のヘルパー脂質、一種以上のコレステロール系脂質、およびＰＥＧ脂質を含む、項目９に記載の方法。
（項目１１）
前記一種以上のカチオン性脂質が、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾールベース）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００３、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡおよびＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２４）、およびその組み合わせからなる群から選択される、項目１０に記載の方法。
（項目１２）
前記一種以上のカチオン性脂質がターゲット２４を含む、項目１０に記載の方法。
（項目１３）
前記一種以上のカチオン性脂質がＩＣＥを含む、項目１０に記載の方法。
（項目１４）
前記一種以上のカチオン性脂質が、ｃＫＫ－Ｅ１２を含む、項目１０に記載の方法。
（項目１５）
前記一種以上の非カチオン性脂質は、ＤＳＰＣ（１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＯＰＥ（１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＯＰＣ（１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホチジルコリン）ＤＰＰＥ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＭＰＥ（１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、ＤＯＰＧ（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール））から選択される、項目１０に記載の方法。
（項目１６）
前記一種以上のＰＥＧ修飾脂質が、C_{6}－C_{20}長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した長さ最大５ｋＤａのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む、項目１０に記載の方法。
（項目１７）
前記予め形成された脂質ナノ粒子が、接線流ろ過（ＴＦＦ）プロセスによって精製され

る、項目１～１６のいずれか一項に記載の方法。
（項目１８）
前記精製されたナノ粒子の約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％より多くが、７５～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する、項目１７に記載の方法。
（項目１９）
前記精製されたナノ粒子の実質的にすべてが７５～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する、項目１７または１８のいずれか一項に記載の方法。
（項目２０）
前記精製されたナノ粒子の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％より多くが、５０～８０ｎｍの範囲のサイズを有する、項目１７～１９のいずれか一項に記載の方法。
（項目２１）
前記精製されたナノ粒子の実質的にすべてが７５～１５０ｎｍの範囲のサイズを有する、項目１５～１８のいずれか一項に記載の方法。
（項目２２）
約９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超える封入率をもたらす、項目１～２１のいずれか一項に記載の方法。
（項目２３）
ｍＲＮＡの約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％を超える回収率をもたらす、項目１～２２のいずれか一項に記載の方法。
（項目２４）
前記予め形成された脂質ナノ粒子およびｍＲＮＡが、ポンプシステムを使用して混合される、項目１～２３のいずれか一項に記載の方法。
（項目２５）
前記ポンプシステムが、パルスレスフローポンプを備える、項目２２に記載の方法。
（項目２６）
前記ポンプがギアポンプである、項目２３に記載の方法。
（項目２７）
予め形成された脂質ナノ粒子を含む前記溶液が、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、項目１～２６のいずれか一項に記載の方法。
（項目２８）
予め形成された脂質ナノ粒子を含む前記溶液が、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流量で混合される、項目１～２７のいずれか一項に記載の方法。
（項目２９）
前記ｍＲＮＡが、約２５～７５ｍｌ／分、約７５～２００ｍｌ／分、約２００～３５０ｍｌ／分、約３５０～５００ｍｌ／分、約５００～６５０ｍｌ／分、約６５０～８５０ｍｌ／分、または約８５０～１０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、項目１～２８のいずれか一項に記載の方法。
（項目３０）
前記ｍＲＮＡが、約５０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約１５０ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約２５０ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約３５０ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約４５０ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、約５５０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約６５０

ｍｌ／分、約７００ｍｌ／分、約７５０ｍｌ／分、約８００ｍｌ／分、約８５０ｍｌ／分、約９００ｍｌ／分、約９５０ｍｌ／分、または約１０００ｍｌ／分の流量で混合される、項目１～２９のいずれか一項に記載の方法。

（項目３１）

クエン酸緩衝液をｍＲＮＡストック溶液と混合することによってｍＲＮＡ溶液をまず生成する工程を含む、項目１～３０のいずれか一項に記載の方法。

（項目３２）

前記クエン酸緩衝液が約１０ｍＭのクエン酸塩、約１５０ｍＭ　Ｎａｃｌ、約４．５のｐＨを含む、項目２９に記載の方法。

（項目３３）

前記ｍＲＮＡストック溶液が、約１ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ、約１００ｍｇ／ｍｌ以上の濃度の前記ｍＲＮＡを含む、項目２９または３０に記載の方法。

（項目３４）

前記クエン酸緩衝液が、約１００～３００ｍｌ／分、３００～６００ｍｌ／分、６００～１２００ｍｌ／分、１２００～２４００ｍｌ／分、２４００～３６００ｍｌ／分、３６００～４８００ｍｌ／分、または４８００～６０００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、項目２９～３１のいずれか一項に記載の方法。

（項目３５）

前記クエン酸緩衝液が、約２２０ｍｌ／分、約６００ｍｌ／分、約１２００ｍｌ／分、約２４００ｍｌ／分、約３６００ｍｌ／分、約４８００ｍｌ／分、または約６０００ｍｌ／分の流量で混合される、項目２９～３２のいずれか一項に記載の方法。

（項目３６）

前記ｍＲＮＡストック溶液が、約１０～３０ｍｌ／分、約３０～６０ｍｌ／分、約６０～１２０ｍｌ／分、約１２０～２４０ｍｌ／分、約２４０～３６０ｍｌ／分、約３６０～４８０ｍｌ／分、または約４８０～６００ｍｌ／分の範囲の流量で混合される、項目２９～３３のいずれか一項に記載の方法。

（項目３７）

前記ｍＲＮＡストック溶液が、約２０ｍｌ／分、約４０ｍｌ／分、約６０ｍｌ／分、約８０ｍｌ／分、約１００ｍｌ／分、約２００ｍｌ／分、約３００ｍｌ／分、約４００ｍｌ／分、約５００ｍｌ／分、または約６００ｍｌ／分の流量で混合される、項目２９～３４のいずれか一項に記載の方法。

（項目３８）

前記ｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子がトレハロース溶液中の前記予め形成された脂質ナノ粒子で調製される、項目１～３７のいずれか一項に記載の方法。

（項目３９）

前記ｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子が、さらなる下流処理を必要としない、項目１～３８のいずれか一項に記載の方法。

（項目４０）

項目１～３９のいずれか一項に記載の方法により生成されたｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子の組成物。

（項目４１）

前記ｍＲＮＡが、一個以上の修飾ヌクレオチドを含む、項目１～４０のいずれか一項に記載の方法または組成物。

（項目４２）

前記ｍＲＮＡが修飾されていない、項目１～４１のいずれか一項に記載の方法または組成物。

（項目４３）

前記ナノ粒子が約７５ｎｍ～１５０ｎｍのサイズを有する、項目３９に記載の組成物。

（項目４４）

前記ナノ粒子が、約０．２５未満～０．１６未満のＰｄＩを含む、項目３９に記載の組成物。

（項目４５）

前記投与製剤が、約０．０１６ｍｇ／ｋｇ～１．０ｍｇ／ｋｇの脂質ナノ粒子に封入されているｍＲＮＡの濃度を含む、項目３９に記載の組成物。

（項目４６）

ｉｎ　ｖｉｖｏタンパク質産生のためのｍＲＮＡの送達方法であって

項目１～３９のいずれか一項に記載の方法により生成されたｍＲＮＡを封入している脂質ナノ粒子の組成物を対象に投与することを含み、前記ｍＲＮＡが関心対象のタンパク質をコードする、方法。

（項目４７）

ｉｎ　ｖｉｖｏタンパク質産生のためのｍＲＮＡの送達方法であって

項目４０～４５のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。