

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7586858号
(P7586858)

(45)発行日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(24)登録日 令和6年11月11日(2024.11.11)

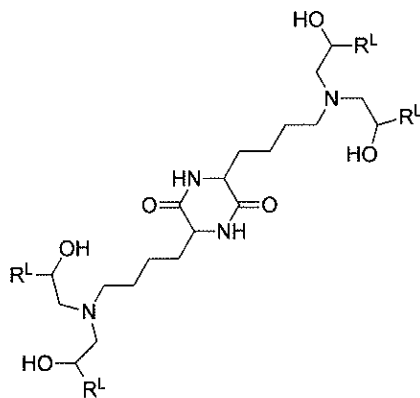
(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
請求項の数 12 外国語出願 (全79頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-103427(P2022-103427)	(73)特許権者	517316797
(22)出願日	令和4年6月28日(2022.6.28)		トランスレイト バイオ, インコーポレ
(62)分割の表示	特願2021-20597(P2021-20597)の 分割		イテッド
原出願日	平成26年10月22日(2014.10.22)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州02
(65)公開番号	特開2022-121548(P2022-121548 A)		451・ウォルサム・ウェスト・ストリ
(43)公開日	令和4年8月19日(2022.8.19)	(74)代理人	100127926
審査請求日	令和4年6月28日(2022.6.28)		弁理士 結田 純次
(31)優先権主張番号	61/894,246	(74)代理人	100216105
(32)優先日	平成25年10月22日(2013.10.22)		弁理士 守安 智
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	フランク デローザ
(31)優先権主張番号	62/020,161		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(32)優先日	平成26年7月2日(2014.7.2)	(72)発明者	421, レキシントン, シャイアー
最終頁に続く			ウェイ 300
			マイケル ハートレイン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 mRNAのCNS送達及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

中枢神経系（CNS）へのメッセンジャーRNA（mRNA）の送達の方法における使用のための組成物であって、前記組成物の投与が脳及び／または脊髄中のニューロンにおいてmRNAの細胞内送達をもたらすように、前記組成物はリポソーム内に封入されたタンパク質をコードしたmRNAを含み、前記方法は、前記組成物の送達を必要とする検体に髄腔内投与することを含み、
前記mRNAの細胞内送達は、該mRNAによってコードされるタンパク質の発現をもたらす；および
そこにおいて、前記リポソームは、陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG-修飾脂質を含み、そこにおいて、前記陽イオン性脂質は、式I-g：

【化 1】



I-g,

または薬学的に受容可能なその塩の構造を有し、式中、各 R^L は、独立して：

(i) C_{8-12} アルキル、(ii) $n-C_{8-12}$ アルキル、(iii) C_{9-11} アルキル、(iv) $n-C_{9-11}$ アルキル、(v) C_{10} アルキル、もしくは(vi) $n-C_{10}$ アルキルである、
組成物。

【請求項 2】

a) 前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、前記脊髄中の運動ニューロンを含む、または

b) 前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドログリア細胞、星状膠細胞、神経膠細胞、及びそれらの組合せから成る群から選択され、

必要に応じて、前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、脊髄前角細胞及び背根神経節を含む、

請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

前記リポソームが、一種または複数種の陽イオン性脂質、一種または複数種の中性脂質、一種または複数種のコレステロール系脂質、及び一種または複数種の PEG-修飾脂質を含む、請求項 1 または 2 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

前記一種または複数種の非陽イオン性脂質が、DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DPPC (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE (1, 2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-リン酸エタノールアミン)、DOPC (1, 2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン)、DPPE (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-リン酸エタノールアミン)、DMPE (1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エタノールアミンリン酸)、DOPG (2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-リン酸-(1'-rac-グリセロール))、スフィンゴミエリン、セラミド、セファリン、セレブロシド、ジアシルグリセロール、POPC、DOPG、DPPG、POPC、POPE、DSPE、SOP E およびスフィンゴミエリンから選択され、必要に応じて、上記一種または複数種の非陽イオン性脂質がスフィンゴミエリンを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 つに記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

前記一種または複数種の PEG-修飾脂質が、DMG-PEG、C8-PEG、DOGPEG、セラミドPEG、DSPE-PEG、及びそれらの組合せからなる群から選択され、必要に応じて、

a) 前記一種または複数種の PEG-修飾脂質が、全脂質組成において、モル比で 1～10% を構成する、または

b) 前記一種または複数種の P E G - 修飾脂質が、全脂質組成において、モル比で 5 % を構成する、

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

a) 前記一種または複数種のコレステロール系脂質が、コレステロール、または P E G 化されたコレステロールから選択される、

b) 前記リポソームが、40 ~ 100 nm の範囲の大きさを有する、

c) 前記 m R N A が、0.5 kb、1 kb、1.5 kb、2 kb、2.5 kb、3 kb、3.5 kb、4 kb、4.5 kb、または 5 kb 以上の長さを有する、

d) 前記 m R N A によってコードされた前記タンパク質が、通常、前記脳及び／または脊髄内の前記ニューロンの中で機能する、

e) 前記 m R N A によってコードされた前記タンパク質が、通常、前記脊髄内の運動ニューロンの中で機能する、

f) 前記 m R N A によってコードされた前記タンパク質が、生存運動ニューロン (S M N) タンパク質である、及び／または

g) 前記 m R N A が、コドン最適化をされており、必要に応じて、前記コドン最適化 m R N A が、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 10 または配列番号 11 を含む、または前記コドン最適化 m R N A が、配列番号 3 または配列番号 4 を含む、さらに必要に応じて、前記 m R N A が、配列番号 7 の 5' U T R 配列を含む、または前記 m R N A が、配列番号 8 または配列番号 9 の 3' U T R 配列を含む、

h) 前記 m R N A が、キャップ構造を含み、必要に応じて、

A) 前記キャップ構造が、キャップ 0、キャップ 1、またはキャップ 2 構造から選択される、または

B) 前記キャップ構造が、アンチリバースキャップアナログ (A R C A)、または、修飾された A R C A である、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

前記 m R N A によってコードされた前記タンパク質が酵素であり、必要に応じて、前記酵素がリソソーム酵素である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

a) 前記 m R N A の細胞内送達、前記ニューロンのサイトゾルの中で、前記 m R N A によってコードされた前記タンパク質の細胞内発現をもたらす、

b) 前記 m R N A の細胞内送達、前記 m R N A によってコードされた前記タンパク質の細胞内発現、及び発現後の前記ニューロンから細胞外への分泌をもたらす、

c) 前記 m R N A が、無修飾である、

d) 前記 m R N A が、一種または複数種の修飾されたヌクレオチドを含み、必要に応じて、前記一種または複数種の修飾されたヌクレオチドが、プソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオウリジン、イノシン、ピロローピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5 プロピニル-シチジン、C-5 プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O (6) -メチルグアニン、N-1-メチルプソイドウリジン、及び／または 2-チオシチジンを含む、

e) 前記 m R N A が、体重 1 kg 当たり 0.01 mg ~ 10 mg の範囲の量で送達される、

f) 前記 m R N A が、実質的毒性または免疫応答を引き起こすことなく送達される、及び／または

g) 前記検体が、前記 C N S 中の前記 m R N A によってコードされた前記タンパク質が欠乏している、

10

20

30

40

50

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 つに記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

前記メッセンジャー RNA (mRNA) が欠乏したタンパク質をコードする、中枢神経系 (CNS) における前記タンパク質の欠乏に関連する疾患、障害または異常を治療する方法における使用のための、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 つに記載の使用のための組成物であって、前記方法が、前記組成物を前記 CNS に送達することを含む、使用のための組成物。

【請求項 10】

脊髄性筋萎縮症を治療する方法における使用のための、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 つに記載の使用のための組成物であって、前記組成物の投与が前記脳及び／または脊髄中のニューロンにおいて mRNA の細胞内送達をもたらすように、前記 mRNA は、生存運動ニューロン (SMN) タンパク質をコードし、前記リポソーム内に封入され、前記方法は、治療を必要とする検体に前記組成物を髄腔内投与することを含み、必要に応じて、

a) 前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、前記脊髄中の運動ニューロンを含む、

b) 前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、脊髄前角細胞及び背根神経節を含む、及び／または

c) 前記コドン最適化 mRNA が、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 10 または配列番号 11 を含む、

使用のための組成物。

【請求項 11】

前記コドン最適化 mRNA が、配列番号 3 または配列番号 4 を含み、必要に応じて、

a) 前記 mRNA が、配列番号 7 の 5' UTR 配列を含む、または

b) 前記 mRNA が、配列番号 8 または配列番号 9 の 3' UTR 配列を含む、

請求項 10 に記載の使用のための組成物。

【請求項 12】

前記一種または複数種の非陽イオン性脂質が、スフィンゴミエリンを含む、請求項 10 または 11 に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、US 62 / 020, 161 (2014 年 7 月 2 日出願) 及び US 61 / 894, 246 (2013 年 10 月 22 日出願) に対する優先権を主張し、これらの開示は、参照することにより組み込まれる。

配列表

【0002】

本明細書は、配列表 (2014 年 10 月 22 日に「2006685-0690__SL.txt」という名前の.txt ファイルで、電子的に提出。) を参照する。この.txt ファイルは、2014 年 10 月 22 日に生成され、19, 590 バイトの大きさを有する。この配列表の全ての内容は、参照することにより組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

有効な治療が、神経細胞内のタンパク質における欠損、異常な発現または調節異常の結果として、直接的にまたは間接的に生じた疾患などの CNS 疾患に対する治療のためにさらに必要とされている。CNS 疾患のための有効な治療法を実行する上で、主に、不透過性である血液脳関門 (BBB) により、CNS の生物組織の分離及び隔離が原因である、多くの障害が存在する。

【0004】

例えば、脊髄性筋萎縮症は、タンパク質欠乏に起因した CNS 疾患である。概して、健常

10

20

30

40

50

者は、生存運動ニューロン（SMN）遺伝子、（SMN-1及びSMN-2）のそれぞれの機能のコピーを有し、この遺伝子は、ほぼ同一の配列である。脊髄性筋萎縮症と診断された患者は、概して、SMN-1タンパク質の全長を発現させることができず、SMN-2の全長の低い発現量に頼っているのみであり、この発現量は、脳内での運動ニューロンの死滅を防ぐためには、十分ではない。

近年、メッセンジャーRNA（mRNA）療法が、種々の疾患の治療、特に一種または複数種のタンパク質欠乏に関する疾患の治療において、ますます重要な選択肢になりつつある。非神経系性疾患に有望である一方、当業者は、リポソームがBBBを通過することができないこと、及び神経細胞の中へmRNAを送達するための特有の課題を課された、神経細胞の特有かつ複雑な膜の組成のために、CNS疾患を治療する方法などの実行を思いとどまった（Svennerhol et. al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1128:1-7、及びKarthigasan et. al., *Journal of Neurochemistry*, 1994, 62:1203-1213）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】Svennerhol et. al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1128:1-7

【文献】Karthigasan et. al., *Journal of Neurochemistry*, 1994, 62:1203-1213

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、特に、治療用タンパク質をコードしたmRNAをCNSのニューロン及び他の細胞型へ効率的に送達するために改善された方法及び組成物を提供する。本発明は、一部分において、mRNAがロードされた脂質またはポリマー系ナノ粒子が、直接CNSの空隙へ投与され（例えば、脊髄内投与によって）、そして神経細胞膜を有効に通過し、脳内及び／または脊髄中のニューロンにおいて、mRNAの細胞内送達をもたらすことが可能であるという驚くべき発見に基づいている。本発明以前に、神経細胞膜が非神経細胞のものとは異なる、特有かつ複雑な脂質組成物によって特徴づけられると報告された。（Svennerhol et. al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1128:1-7、及びKarthigasan et. al., *Journal of Neurochemistry*, 1994, 62:1203-1213）それゆえ、神経細胞膜は、通過するのが難しいと考えられた。核酸を非神経細胞に送達するのに有効なリポソームでさえ、神経細胞膜を通過するために効果的であるとは期待されなかった。脳と脊柱の中央部の深部に位置していて運動ニューロンに作用し難くても、本明細書に記載されている、脂質または高分子系のナノ粒子が効果的にmRNAをニューロンへ送達することが可能であることは、本当に驚きであった。従って、本発明は、改善されかつ有効なmRNAのCNS送達のための方法を提供し、そして種々のCNS疾患を治療する有効なmRNA療法が期待できる。

【0007】

よって、1つの態様において、本発明はmRNAを中枢神経（CNS）へ送達する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明による本方法は、組成物の投与が、脳内及び／または脊髄中のニューロンにおいて、mRNAの細胞内送達をもたらすような、リポソーム内に封入されたタンパク質をコードしたmRNAを含む組成物を送達する必要のある検体への髄腔内投与を含み、そこにおいて、当該リポソームは陽イオン性または非陽イオン性脂質、コレステロール系脂質、及びPEG-修飾脂質を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、mRNAは脳内に位置しているニューロンへ送達される。

いくつかの実施形態において、mRNAは脊髄内に位置しているニューロンへ送達される。いくつかの実施形態において、mRNAは、運動ニューロンへ送達される。いくつかの実施形態において、mRNAは、上位運動ニューロン及び／または下位運動ニューロンへ送達される。いくつかの実施形態において、運動ニューロンは、脊髄の前角及び／または背根神経節の中に位置している。

【0009】

いくつかの実施形態において、好適なリポソームは、一種または複数種の陽イオン性脂質、一種または複数種の中性脂質、一種または複数種のコレステロール系脂質、及び一種または複数種のPEG-修飾脂質を含む。

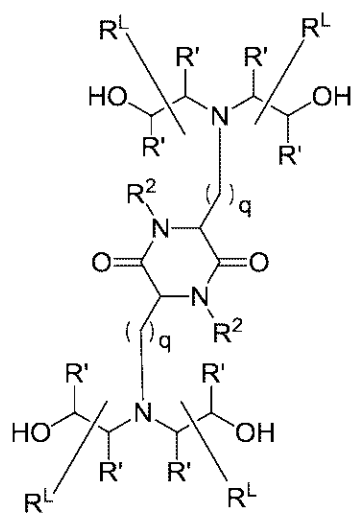
【0010】

いくつかの実施形態において、好適な陽イオン性脂質は、C12-200、MC3、DLindMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE（イミダゾール系）、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、及びDMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLindMA、CpLindMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLindAP、DLincarbDAP、DLincDAP、KLIn-K-DMA、DLIn-K-XTC2-DMA、HGT4003から成る群から選択される。いくつかの特定の実施形態において、一種または複数種の陽イオン性脂質はC12-200を含む。いくつかの特定の実施形態において、陽イオン性脂質は、DLink22DMAを含む。

【0011】

特定の実施形態において、本発明に好適な陽イオン性脂質は、式I-c1-aの構造を有し、

【化1】



I-c1-a、

または、薬学的に受容可能なそれらの塩であり、式中、
各R²は、独立に水素またはC₁-3のアルキル基であり、
各qは、独立に2～6であり、
各R'は、独立に水素またはC₁-3のアルキル基であり、
かつ各R^Lは独立にC₈-12のアルキル基である。

【0012】

特定の実施形態において、好適な陽イオン性脂質は、cKK-E12：

10

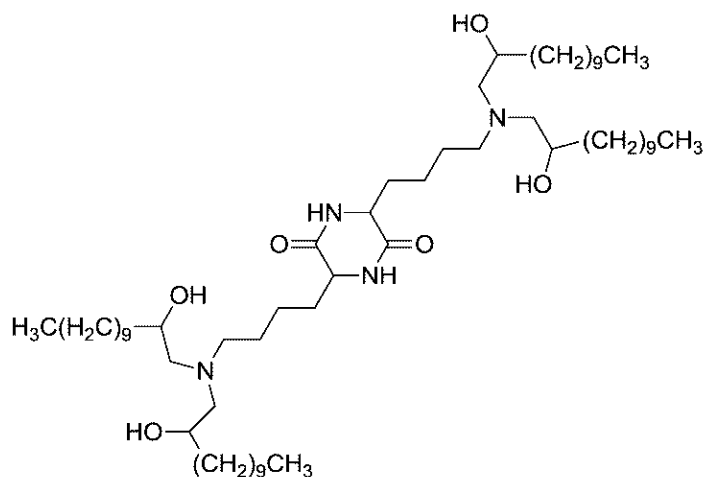
20

30

40

50

【化 2】



10

である。

【0013】

いくつかの実施形態において、好適な非陽イオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン-4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシラート（DOPE-mal）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、16-O-モノメチルポリエチレン、16-O-ジメチルポリエチレン、18-1-トランスポリエチレン、1-ステアロイル-2-オレオイルホスファチジルエタノールアミン（SOPE）、ホスファチジル脂質、またはそれらの混合物から選択される。

20

30

【0014】

いくつかの実施形態において、好適な非陽イオン性脂質は、ホスファチジル脂質である。いくつかの実施形態において、好適なホスファチジル脂質は、スフィンゴ脂質である。いくつかの特定の実施形態において、好適なスフィンゴ脂質は、スフィンゴミエリンである。

【0015】

いくつかの実施形態において、本発明に好適な、一種または複数種のコレステロール系脂質は、コレステロール、ペグ化されたコレステロール、及び／またはDC-Chol（N，N-ジメチル-N-エチルカルボキサミドコレステロール），1，4-ビス（3-N-オレイルアミノプロピル）ピペラジンから選択される。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、本発明に好適な一種または複数種のPEG-修飾脂質は、C₆～C₂₀の長さのアルキル鎖を有する脂質に共有結合をした、5 kDa以上の長さのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む。いくつかの実施形態において、好適なPEG-修飾脂質は、N-オクタノイルスフィンゴシン-1-[サクシニル（メトキシポリエチレングリコール）-2000]などの誘導体化セラミドである。いくつかの実施形態において、好適なPEG-修飾脂質またはペグ化された脂質は、ペグ化されたコレステロールまたはジミリストイルグリセロール（DMG）-PEG-2Kである。いくつかの実施形態において、一種または複数種のPEG-修飾脂質は、DMG-PEG、C₈-PEG、DOG-PEG、セラミドPEG、DSPE-PEG、及びそれらの混合物からなる群から

50

選択される。いくつかの実施形態において、一種または複数種のPEG-修飾脂質は、全脂質組成物のモル比で約1～10%（例えば、約1～8%、約1～6%、または約1～5%）を構成する。いくつかの実施形態において、一種または複数種のPEG-修飾脂質は全脂質組成物のモル比で約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10%を構成する。いくつかの特定の実施形態において、PEG-修飾脂質は全脂質組成物のモル比で少なくとも5%を構成する。

【0017】

いくつかの実施形態において、好適なリポソームは、C12-200、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG；C12-200、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；cKK-E12、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；cKK-E12、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；HGT5001、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；HGT4003、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；DLiNC2DMA、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；ICE、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K、もしくはDODMA、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；DODMA、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K、及び／またはそれらの混合物から選択された混合物を含む。

10

【0018】

いくつかの実施形態において、好適なリポソームは市販のエンハンサーを含む。いくつかの実施形態において、リポソームは生分解性脂質を含む。いくつかの実施形態において、リポソームはイオン性脂質を含む。いくつかの実施形態において、リポソームは開裂が可能な脂質を含む。

20

【0019】

いくつかの実施形態において、好適なリポソームは約250nm、200nm、150nm、125nm、110nm、100nm、95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、または50nm以下の大きさを有する。いくつかの実施形態において、好適なリポソームは、約40～100nm（例えば約40～90nm、約40～80nm、約40～70nm、または約40～60nm）の範囲の大きさを有する。本明細書で用いる場合、リポソームの大きさは、リポソーム粒子の最も大きい直径の長さで決める。

30

【0020】

いくつかの実施形態において、mRNAは約0.5kb、1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、または5kbより長い長さを有する。

【0021】

いくつかの実施形態において、mRNAによってコードされた治療用タンパク質は、サイトゾルタンパク質である。いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、分泌タンパク質である。いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、酵素である。いくつかの実施形態において、酵素はリソソーム酵素である。いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、CNS疾患に関連したタンパク質である。いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、通常脳内及び／または脊髄中のニューロンで機能する。いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、通常脊髄中の運動ニューロンで機能する。

40

【0022】

いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、生存運動ニューロンタンパク質である。いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、生存運動ニューロン-1タンパク質である。いくつかの実施形態において、mRNAにコードされた治療用タンパク質は、生存運動ニューロンタンパク質-1

50

の、スプライスアイソフォーム、断片、または欠損した異形である。いくつかの実施形態において、SMN-1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、SMN-1タンパク質をコードしたmRNAは、配列番号1の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、SMN-1タンパク質をコードしたmRNAは、コドン最適化がされており、かつ配列番号3、配列番号4、配列番号10、または配列番号11を含む。

【0023】

いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、5'UTR配列を含む。いくつかの実施形態において、5'UTR配列は配列番号7を含む。いくつかの実施形態において、mRNAは3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、3'UTRは配列番号8または配列番号9を含む。いくつかの実施形態において、mRNAはキャップ構造を含む。いくつかの実施形態において、好適なキャップ構造は、キャップ0、キャップ1、またはキャップ2の構造から選択される。いくつかの実施形態において、好適なキャップ構造は、アンチリバースキャップアナログ(ARCA)または、修飾されたARCAである。

【0024】

いくつかの実施形態において、治療用タンパク質をコードしたmRNAは、一種または複数種の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、一種または複数種のヌクレオチドは、プソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオウリジン、イノシン、ピロローピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、N-1-メチルプソイドウリジン、2-チオシチジン及びそれらの混合物からなる群から選択される。

【0025】

いくつかの実施形態において、治療用タンパク質をコードしたmRNAは、修飾されていない。

【0026】

いくつかの実施形態において、mRNAの細胞内送達は、mRNAでコードされたタンパク質の発現を起こす。いくつかの実施形態において、コードされたタンパク質は、ニューロンのサイトゾルの中で発現する。いくつかの実施形態において、コードされたタンパク質は発現して、そして発現後ニューロンから細胞外に分泌される。

【0027】

いくつかの実施形態において、mRNAは、体重1kg当たり約0.01~10.0mg、例えば、体重1kg当たり約0.01~9.0mg、0.01~8.0mg、0.01~7.0mg、0.01~6.0mg、0.01~5.0mg、0.01~4.0mg、0.01~3.0mg、0.01~2.5mg、0.01~2.0mg、0.01~1.5mg、0.01~1.0mg、0.01~0.5mg、0.01~0.25mg、0.01~0.1mg、0.1~10.0mg、0.1~5.0mg、0.1~4.0mg、0.1~3.0mg、0.1~2.0mg、0.1~1.0mg、0.1~0.5mgの範囲の服用量を投与される。いくつかの実施形態において、mRNAは体重1kg当たり約10.0mg、9.0mg、8.0mg、7.0mg、6.0mg、5.0mg、4.5mg、4.0mg、3.5mg、3.0mg、2.5mg、2.0mg、1.5mg、1.0mg、0.8mg、0.6mg、0.5mg、0.4mg、0.3mg、0.2mg、0.1mg、0.05mg、0.04mg、0.03mg、0.02mg、または0.01mg未満の服用量を投与される。

【0028】

いくつかの実施形態において、mRNAは実質的毒性または免疫応答を誘発することな

10

20

30

40

50

く送達される。

【0029】

もう1つの態様において、本明細書に記載されている方法を用いて、CNSへ欠損しているタンパク質をコードしたメッセンジャーRNA (mRNA)を送達することで、中枢神経系 (CNS) 内のタンパク質の欠乏に関する、疾患、障害、または異常を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、CNS系疾患、障害、または異常は、タンパク質の欠損の結果である。いくつかの実施形態において、CNS系疾患、障害、または異常は、運動ニューロンにおけるタンパク質の欠損の結果である。

【0030】

特に、本発明は、脊髄性筋萎縮症を治療する方法及び組成物を提供する。

10

【0031】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載されている方法を用いて、CNSへ生存運動ニューロン (SMN) タンパク質をコードしたメッセンジャーRNA (mRNA)を送達することで、脊髄性筋萎縮症を治療する方法を提供する。

【0032】

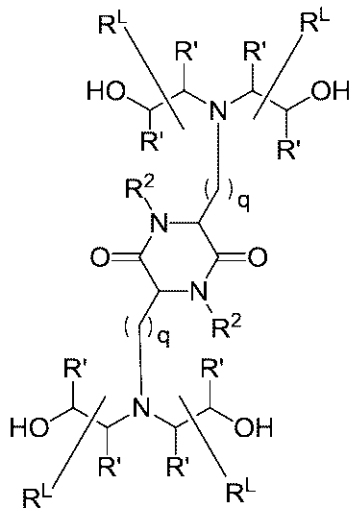
もう1つの態様において、本発明は、脊髄性筋萎縮症を治療するための組成物を提供し、リポソーム内に封入された、生存運動ニューロン (SMN) タンパク質をコードしたmRNAを含み、そこにおいて、mRNAは配列番号3、配列番号4、配列番号10、または配列番号11 (コドン最適化されたヒトSMN mRNAに相当する。)を含み、そしてさらにそこにおいて、リポソームは陽イオン性または非陽イオン性脂質、コレステロール系脂質、及びPEG-修飾脂質を含む。

20

【0033】

関連の1つの形態において、本発明は、脊髄性筋萎縮症を治療するための組成物を提供し、リポソーム内に封入された、生存運動ニューロン (SMN) タンパク質をコードしたmRNAを含み、そこにおいて、リポソームは、式I-c1-aの陽イオン性脂質を含み、

【化3】



30

I - c 1 - a、

40

または、薬学的に受容可能なそれらの塩であり、式中、各R²は、独立に水素またはC₁₋₃のアルキル基であり、各qは、独立に2~6であり、各R'は、独立に水素またはC₁₋₃のアルキル基であり、かつ各R^Lは独立にC₈₋₁₂のアルキル基である。

【0034】

いくつかの実施形態において、好適な陽イオン性脂質は、cKK-E12:

50

CCCCCCCCC(CO)CN(CCCCCCNC(=O)c1c[nH]c(=O)[nH]1)CCCCCNC(CO)CCCCCCCCC(CO)C

(項目 3)

前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドログリア細胞、星状膠細胞、神経膠細胞、及びそれらの組合せから成る群から選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、脊髄前角細胞及び背根神経節を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 5)

前記リポソームが、一種または複数種の陽イオン性脂質、一種または複数種の中性脂質、一種または複数種のコレステロール系脂質、及び一種または複数種の PEG-修飾脂質を含む、先行する項目のいずれか 1 つに記載の方法。

10

(項目 6)

一種または複数種の前記陽イオン性脂質が、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinKC2DMA、cKK-E12、ICE (イミダゾール系)、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA 及び DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、及びそれらの組合せ、から成る群から選択される、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

一種または複数種の前記陽イオン性脂質が C12-200 を含む、項目 6 に記載の方法。

20

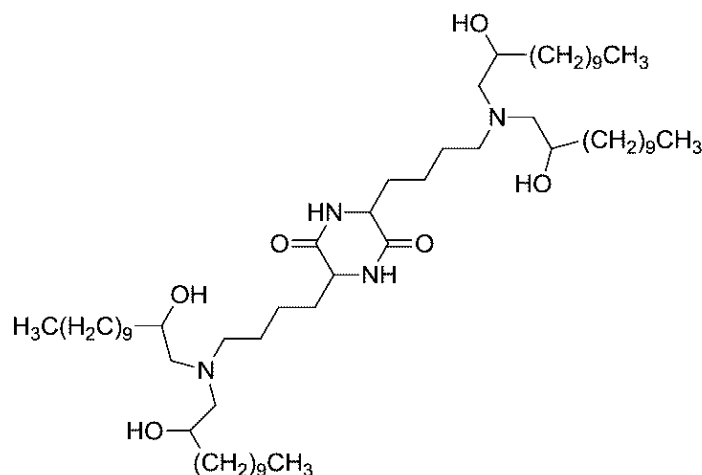
(項目 8)

一種または複数種の前記陽イオン性脂質が DLinKC2DMA を含む、項目 6 に記載の方法。

(項目 9)

前記陽イオン性脂質が、cKK-E12:

【化 8】



30

である、項目 6 に記載の方法。

(項目 10)

一種または複数種の前記非陽イオン性脂質が、DSPC (1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DPPC (1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE (1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-リン酸エタノールアミン)、DOPC (1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン)、DPPE (1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-リン酸エタノールアミン)、DMPE (1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エタノールアミ

40

50

ンリン酸)、DOPG(、2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-リン酸-(1'-rac-グリセロール))、スフィンゴミリン、セラミド、セファリン、セレブロシド、ジアシルグリセロール、POPC、DOPG、DPPG、POPC、POPE、DSPE、SOPE、スフィンゴミエリンから選択される、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目11)

一種または複数種の前記非陽イオン性脂質が、スフィンゴミエリンを含む、項目10に記載の方法。

(項目12)

一種または複数種の前記PEG-修飾脂質が、DMG-PEG、C8-PEG、DOGPPEG、セラミドPEG、DSPE-PEG、及びそれらの組合せからなる群から選択される、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

10

(項目13)

一種または複数種の前記PEG-修飾脂質が、全脂質組成において、モル比で約1~10%を構成する、項目12に記載の方法。

(項目14)

一種または複数種の前記PEG-修飾脂質が、全脂質組成において、モル比で約5%を構成する、項目12に記載の方法。

(項目15)

一種または複数種の前記コレステロール系脂質が、コレステロール、またはPEG化されたコレステロールから選択される、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

20

(項目16)

前記リポソームが、

C12-200、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMGPPEG;
C12-200、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;
cKK-E12、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;
cKK-E12、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;

HGT5001、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;

HGT4003、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;

DLinKC2DMA、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;

ICE、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;

DODMA、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;または、

DODMA、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K、

30

から選択された組合せを含む、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目17)

前記リポソームが、約40~100nmの範囲の大きさを有する、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目18)

前記mRNAが、約0.5kb、1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、または5kb位以上の長さを有する、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

40

(項目19)

前記mRNAによってコードされた前記タンパク質が、通常、前記脳内及び／または脊髄中の前記ニューロンの中で機能する、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目20)

前記mRNAでコードされた前記タンパク質が、通常、前記脊髄中の運動ニューロンの中で機能する、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目21)

前記mRNAでコードされた前記タンパク質が、生存運動ニューロン(SMN)タンパク

50

質である、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目22)

前記mRNAが、コドン最適化をされている、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目23)

前記コドン最適化mRNAが、配列番号3、配列番号4、配列番号10、または配列番号11を含む、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記コドン最適化mRNAが、配列番号3または配列番号4を含む、項目22に記載の方法。

(項目25)

前記mRNAが、配列番号7の5'UTR配列を含む、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記mRNAが、配列番号8または配列番号9の3'UTR配列を含む、項目24に記載の方法。

(項目27)

前記mRNAが、キャップ構造を含む、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目28)

前記キャップ構造が、キャップ0、キャップ1、またはキャップ2構造から選択される、項目27に記載の方法。

(項目29)

前記キャップ構造が、アンチリバースキャップアナログ(ARCA)、または、修飾されたARCAである、項目27に記載の方法。

(項目30)

前記mRNAにコードされた前記タンパク質が、酵素である、項目1~20のいずれか1つに記載の方法。

(項目31)

前記酵素が、リソソーム酵素である、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記mRNAの細胞内送達、前記ニューロンのサイトゾルの中で、前記mRNAでコードされた前記タンパク質の細胞内発現をもたらす、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目33)

前記mRNAの細胞内送達、前記mRNAでコードされた前記タンパク質の細胞内発現、及び発現後前記ニューロンから細胞外への分泌をもたらす、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目34)

前記mRNAが、一種または複数種の修飾されたヌクレオチドを含む、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目35)

一種または複数種の修飾された前記ヌクレオチドが、プソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオウリジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、N-1-メチルプソイドウリジン、及び/または、2-チオシチジンを含む、項目34に記載の方法。

(項目36)

前記mRNAが、無修飾である、項目1~33のいずれか1つに記載の方法。

(項目37)

10

20

30

40

50

前記mRNAが、体重1kg当たり約0.01mg～約10mgの範囲の量で送達される、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目38)

前記mRNAが、実質的毒性、または免疫応答を引き起こすことがなく送達される、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目39)

前記検体が、前記CNS中の前記mRNAでコードされた前記タンパク質が欠乏している、先行する項目のいずれか1つに記載の方法。

(項目40)

前記中枢神経系(CNS)で、タンパク質の欠乏に関連する、疾患、障害、または異常を治療する方法であって、先行する項目のいずれか1つによる方法を用いて、前記CNSへ欠乏した前記タンパク質をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を送達することを含む、方法。

10

(項目41)

脊髄性筋萎縮症を治療する方法であって、

前記組成物の投与が、前記脳内及び／または脊髄中のニューロンにおいて、mRNAの細胞内送達をもたらすように、リボソーム内に封入された生存運動ニューロン(SMN)タンパク質をコードしたmRNAを含む組成物を治療する必要がある検体に髄腔内投与することと、

そこにおいて、前記リボソームは、陽イオン性または非陽イオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG-修飾脂質を含む、方法。

20

(項目42)

前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、前記脊髄中の運動ニューロンを含む、項目41に記載の方法。

(項目43)

前記脳及び／または脊髄中の前記ニューロンが、脊髄前角細胞及び背根神経節を含む、項目41または42に記載の方法。

(項目44)

前記コドン最適化mRNAが、配列番号3、配列番号4、配列番号10、または配列番号11を含む、項目41～43のいずれか1つに記載の方法。

30

(項目45)

前記コドン最適化mRNAが、配列番号3、または配列番号4を含む、項目41～43のいずれか1つに記載の方法。

(項目46)

前記mRNAが、配列番号7の5'UTR配列を含む、項目45に記載の方法。

(項目47)

前記mRNAが、配列番号8、または配列番号9の3'UTR配列を含む、項目45に記載の方法。

(項目48)

一種または複数種の前記非陽イオン性脂質が、スフィンゴミエリンを含む、項目41～47のいずれか1つに記載の方法。

40

(項目49)

前記リボソームが、

C12-200、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG

G；

C12-200、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；

cKK-E12、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；

cKK-E12、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；

HGT5001、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；

50

HGT4003、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；
 DLinKC2DMA、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；
 ICE、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；
 DODMA、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K；または、
 DODMA、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K、
 から選択された組合せを含む、項目41～48のいずれか1つに記載の方法。

(項目50)

脊髄性筋萎縮症の治療のための組成物であって、

リポソームリポソーム内に封入された、前記生存運動ニューロン(SMN)タンパク質
 をコードするmRNAと、そこにおいて、前記コドン最適化mRNAが、配列番号3、配
 列番号4、配列番号10、または配列番号11を含み、
 さらに、そこにおいて、前記リポソームが、陽イオン性または非陽イオン性脂質、コレス
 テロール系脂質、及びPEG-修飾脂質を含む、組成物。

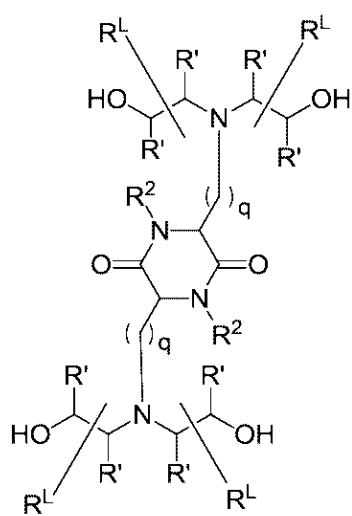
10

(項目51)

脊髄性筋萎縮症の治療のための組成物であって、

リポソーム内に封入された、前記生存運動ニューロン(SMN)タンパク質をコードする
 mRNAを含み、そこにおいて、前記リポソームが、式I-c1-aの陽イオン性脂質を
 含む、組成物であって、

【化9】



I - c 1 - a

20

30

または、薬学的に受容可能なそれらの塩であり、式中、
 各R²は、独立に水素またはC₁₋₃のアルキル基であり、
 各qは、独立に2～6であり、
 各R'は、独立に水素またはC₁₋₃のアルキル基であり、
 及び各R^Lは独立にC₈₋₁₂のアルキル基である。

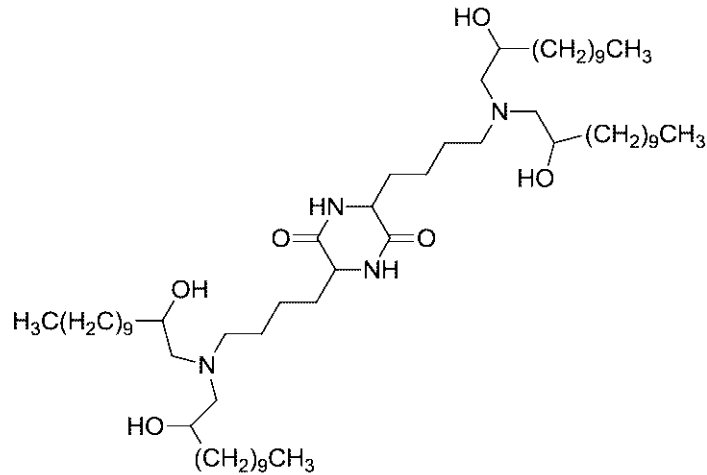
(項目52)

前記陽イオン性脂質が、cKK-E12：

40

50

【化 10】



10

である、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 5 3)

脊髄性筋萎縮症を治療のための組成物であって、

リポソーム内に封入された、前記生存運動ニューロン (SMN) タンパク質をコードする mRNA を含み、そこにおいて、前記リポソームが、

20

C 1 2 - 2 0 0、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及び DMG PEG

G ;

C 1 2 - 2 0 0、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2 K ;

c K K - E 1 2、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2 K ;

c K K - E 1 2、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG

2 K ;

HGT 5 0 0 1、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2 K ;

HGT 4 0 0 3、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2 K ;

DL i n K C 2 D M A、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2 K ;

I C E、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2 K ;

30

D O D M A、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2 K ; または、

D O D M A、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及び DMG - PEG 2

K、

から選択された組合せを含む、組成物。

【図面の簡単な説明】

【0037】

図面は例証に過ぎず、本発明を限定するものではない。

【0038】

【図 1】図 1 は、BHK-21 細胞へ遺伝子導入された外来の hSMN-1 mRNA からなるヒト SMN-1 タンパク質のウェスタンブロットによる検出を示す。ヒト SMN に特異的な種々な抗体、(A) 抗 SMN 4F11 抗体 1:1,000 希釈、(B) Pierce 社製 PA5-27309 α -SMN 抗体 1:10,000 希釈、及び (C) LSBio 社製 C138149 α -SMN 抗体 1:10,000 希釈を用いた。

40

【図 2A】図 2A~C は、リポソーム製剤 1 を用いた髄腔内送達 24 時間後の、(A) 頸部、(B) 胸部、(C) 腰椎脊髄組織について、ヒト生存運動ニューロン (hSMN-1) mRNA のマルチプレックス核酸 in situ 検出を示す。

【図 2B】図 2A~C は、リポソーム製剤 1 を用いた髄腔内送達 24 時間後の、(A) 頸部、(B) 胸部、(C) 腰椎脊髄組織について、ヒト生存運動ニューロン (hSMN-1) mRNA のマルチプレックス核酸 in situ 検出を示す。

【図 2C】図 2A~C は、リポソーム製剤 1 を用いた髄腔内送達 24 時間後の、(A) 頸

50

【図 8 A】図 8 A～C は、リポソーム製剤 7 を用いた髄腔内送達 24 時間後の、(A) 頸部、(B) 胸部、(C) 腰椎脊髄組織について、ヒト生存運動ニューロン (hSMN-1) mRNA のマルチプレックス核酸 *in situ* 検出を示す。

50

【図 13 C】図 13 A～C は、リポソーム製剤 12 を用いた髄腔内送達 24 時間後の、(A) 頸部、(B) 胸部、(C) 腰椎脊髄組織について、ヒト生存運動ニューロン (hSM

50

N-1) mRNAのマルチプレックス核酸in situ検出を示す。

【図14A】図14A～Cは、リポソーム製剤13を用いた髄腔内送達24時間後の、(A)頸部、(B)胸部、(C)腰椎脊髄組織について、ヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのマルチプレックス核酸in situ検出を示す。

【図14B】図14A～Cは、リポソーム製剤13を用いた髄腔内送達24時間後の、(A)頸部、(B)胸部、(C)腰椎脊髄組織について、ヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのマルチプレックス核酸in situ検出を示す。

【図14C】図14A～Cは、リポソーム製剤13を用いた髄腔内送達24時間後の、(A)頸部、(B)胸部、(C)腰椎脊髄組織について、ヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのマルチプレックス核酸in situ検出を示す。

【図15】図15は、担体制御の髄腔内送達24時間後の、脊髄組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。画像は倍率5倍で示されている。

【図16】図16は、担体制御の髄腔内送達24時間後の、脊髄組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。画像は倍率10倍で示されている。

【図17】図17は、担体制御の髄腔内送達24時間後の、脊髄組織中のUbC mRNAのin situ検出を示す。

【図18】図18は、担体制御の髄腔内送達24時間後の、脊髄組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。画像は倍率5倍で示されている。

【図19】図19は、髄腔内送達24時間後の、脊髄組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。画像は倍率5倍で示されている。

【図20】図20は、髄腔内送達24時間後の、脊髄組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。画像は倍率10倍で示されている。

【図21】図21は、髄腔内送達24時間後の、脊髄組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。画像は倍率10倍及び20倍で示されている。

【図22】図22は、ヒトSMN-1 mRNAがロードされた脂質ナノ粒子の脊髄内投与後24時間における、ラットの脊髄中で生成したヒトSMN-1タンパク質の陽性検出を示す。抗ヒトSMN 4F11抗体を1:2500希釈して使用した。パネルAは、処置したラットの脊髄組織を表し、パネルBは、未処理のラットの脊髄組織を表す。

【図23A】図23A～Cは、髄腔内送達30分後の、脳組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。脳(A)のin situ検出では、脳の灰白質及び白質内の両方で観測された強いシグナルを示している。脳(B)のセクション1及び脳(C)のセクション2の2つの領域は、より詳細な分析のために、拡大している。

【図23B】図23A～Cは、髄腔内送達30分後の、脳組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。脳(A)のin situ検出では、脳の灰白質及び白質内の両方で観測された強いシグナルを示している。脳(B)のセクション1及び脳(C)のセクション2の2つの領域は、より詳細な分析のために、拡大している。

【図23C】図23A～Cは、髄腔内送達30分後の、脳組織中のヒト生存運動ニューロン(hSMN-1)mRNAのin situ検出を示す。脳(A)のin situ検出では、脳の灰白質及び白質内の両方で観測された強いシグナルを示している。脳(B)のセクション1及び脳(C)のセクション2の2つの領域は、より詳細な分析のために、拡大している。

【発明を実施するための形態】

【0039】

定義

10

20

30

40

50

本発明をより容易に理解するために、まず一定の用語を以下で定義する。以下の用語及び他の用語に関する付加的な定義は、本明細書全体を通して記述されている。

【0040】

「アルキル」 本明細書で用いる場合、「アルキル」という用語は、1～15の炭素原子を有する直鎖の遊離基、または分岐状飽和炭化水素基（「C₁₋₁₅アルキル」）を指す。いくつかの実施形態において、アルキル基は1～3の炭素原子（「C₁₋₃アルキル」）を有する。C₁₋₃のアルキル基の例には、メチル（C₁）、エチル（C₂）、n-プロピル（C₃）、及びイソプロピル（C₃）を含む。いくつかの実施形態において、アルキル基は、8～12の炭素原子（「C₈₋₁₂アルキル」）を有する。C₈₋₁₂のアルキル基の例には、n-オクチル（C₈）、n-ノニル（C₉）、n-デシル（C₁₀）、n-ウンデシル（C₁₁）、n-ドデシル（C₁₂）などを含むが、特に制限されない。接頭辞「n-」（normal）は、分岐していないアルキル基を指す。例えば、n-C₈アルキルは、(CH₂)₇CH₃を指し、n-C₁₀アルキルは、(CH₂)₉CH₃などを示す。

10

【0041】

「およそ」または「約」 本明細書で用いる場合、「およそ」または「約」という用語は、1つ以上の当該値に適用される場合、記述参照値と類似する値を指す。ある実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別記しない限り、あるいは本文から明らかな場合を除き（このような数が、可能な値の100%を超える場合を除く）、記述参照値の（より大きいまたはより小さい）いずれかの方向で、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれ以下に収まる値の範囲を指す。

20

【0042】

「改善」 本明細書で用いる場合、「改善」という用語は、ある状態の防止、低減または緩和、あるいは検体の状態の改善を意味する。改善は、疾患状態の完全回復または完全防止を含むが、必要とするわけではない。いくつかの実施形態において、改善は、関連疾患組織中に欠けている関連タンパク質またはその活性のレベルを増大することを含む。

【0043】

「アミノ酸」 本明細書で用いる場合、「アミノ酸」という用語は、最も広義には、ポリペプチド鎖に取り込まれることが可能な任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態において、アミノ酸は一般構造H₂N-C(H)(R)-COOHを有する。いくつかの実施形態において、アミノ酸は自然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態において、アミノ酸は合成アミノ酸であり、いくつかの実施形態において、アミノ酸はD-アミノ酸であり、いくつかの実施形態において、アミノ酸はL-アミノ酸である。「標準アミノ酸」は、自然に存在するペプチドによく見られる、任意の20の標準L-アミノ酸を指す。「非標準アミノ酸」は、それが合成されたか、天然物から得られたかどうかに関わらず、標準アミノ酸以外の、任意のアミノ酸を指す。本明細書で用いる場合、「合成アミノ酸」は、化学的に修飾されたアミノ酸を包含し、塩、アミノ酸誘導体（アミドなど）、及び／または置換体を含むが、限定されない。ペプチドのカルボキシー及び／またはアミノ-末端アミノ酸を含むアミノ酸は、それらの活性に不利に影響することなく、ペプチドの半減期を変えることが可能な、他の化学基とのメチル化、アミド化、アセチル化、保護基、及び／または、置換によって修飾され得る。アミノ酸は、ジスルフィド結合に関与してもよい。アミノ酸は、一種または複数種の化学物質（例えば、メチル基、酢酸基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ビオチン部分、など）との会合などを1つまたは翻訳後修飾を含んでもよい。「アミノ酸」という用語は、「アミノ酸残基」と互換的に用いられ、そして遊離アミノ酸及び／または、ペプチドのアミノ酸残基を指してもよい。遊離アミノ酸か、ペプチドの残基を示すのかどうかは、当該用語が用いられる文脈から明らかになるだろう。

30

40

【0044】

50

「動物」 本明細書で用いる場合、「動物」という用語は、動物界の任意の一員を示す。いくつかの実施形態において、「動物」は、発達の任意の段階にある、ヒトを指す。いくつかの実施形態において、「動物」は、発達の任意の段階にある、ヒトではない動物を指す。特定の実施形態においては、ヒトではない動物は、哺乳動物（齧歯動物、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び／またはブタなど）である。いくつかの実施形態において、動物は、哺乳動物、鳥類、は虫類、両生類、魚類、虫類、及び／または蠕虫類を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、動物は、遺伝子導入された動物、遺伝子組換え動物、及び／またはクローンでもよい。

【0045】

「生物学的に活性な」 本明細書で用いる場合、「生物学的に活性な」という語句は、生物学的系において、特に生物体において活性を有する任意の作用物質の特徴を指す。例えば、生物体に投与された場合、その生物体に及ぼす生物学的作用を有する作用物質は、生物学的に活性であるとみなされる。タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性である特定の実施形態では、当該タンパク質またはポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を共有するそのタンパク質またはポリペプチドの一部分は、概して「生物学的活性」部分として言及される。

【0046】

「送達」 「送達」という用語は、CNS送達と関連して用いられる場合は、mRNAがニューロン中で細胞内送達され、コードされたタンパク質がニューロンの中で発現して保持する状態と、mRNAがニューロン中で細胞内送達され、コードされたタンパク質が、CSFなどに発現し分泌され、他のニューロンによって提供される状態を包含する。

【0047】

「発現」 本明細書で用いる場合、核酸配列の「発現」は、以下の1つ以上の事象を指す。(1) DNA配列からRNA鋳型の生成（例えば、転写による）、(2) RNA転写物の処理（スプライシング、エディティング、5'キャップ形成、及び／または、3'キャップ形成など）、(3) ポリペプチドまたはタンパク質へのRNA翻訳、及び／または(4) ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後の修飾。本願では、「発現」及び「生成」という用語ならびに文法的に等価であるものは、区別なく用いられる。

【0048】

「断片」 本明細書で用いる場合、「断片」という用語は、ポリペプチドを指し、そのポリペプチドに特有であるか特徴的である、特定のポリペプチドにおいて任意の分離した部分として定義される。本明細書で用いる場合、当該用語は、全長ポリペプチドの少なくとも一部の活性を保持する、特定のポリペプチドの任意である分離した部分も示す。好ましくは、保持される活性部分は、少なくとも全長ポリペプチドの活性の10%である。より好ましくは、保持される活性部分は、全長ポリペプチドの活性の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%である。さらにより好ましくは、保持される活性部分は、全長ポリペプチドの活性の少なくとも95%、96%、97%、98%または99%である。最も好ましくは、保持される活性部分は、全長ポリペプチドの活性の100%である。本明細書で用いる場合、当該用語は、少なくとも、全長ポリペプチドで見つかる確立した配列要素を含む、特定のポリペプチドのいかなる部分も意味する。好ましくは、配列要素は、少なくとも4〜5、より好ましくは、全長ポリペプチドの少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50以上のアミノ酸に及ぶ。

【0049】

「機能的な」 本明細書で用いる場合、「機能的な」生体分子は、それが特徴づけられる特性及び／または活性を示す形の生体分子である。

【0050】

「半減期」 本明細書で用いる場合、「半減期」という用語は、核酸またはタンパク質の、濃度または活性などの量が、ある期間の最初に測定した値の半分に下がるために必要と

10

20

30

40

50

する時間のことである。

【0051】

「改善する」、「増加する」、または「減少する」 本明細書で用いる場合、「改善する」、「増加する」、または「減少する」という用語、あるいは文法的等価物は、基線測定値、例えば本明細書中に記載される処置の開始前の同一個体における測定値、または本明細書中に記載される処置の非存在下で、対照検体（または複数の対照検体）における測定値と比較した場合の値を示す。「対照検体」は、治療を受けている検体と同じ形の疾患に苦しめられていて、治療を受けている検体とほぼ同年齢の検体である。

【0052】

「In Vitro」 本明細書で用いる場合、「in vitro」という用語は、10 人工の環境において起こる現象を指し、多細胞生物体中というよりは、例えば試験管の中、または反応器中、細胞培養液中などである。

【0053】

「In Vivo」 本明細書で用いる場合、「in vivo」という用語は、ヒト及びヒト以外の動物などの多細胞生物体中で起こる現象を指す。細胞ベースのシステムという文脈において、当該用語は、生細胞（例えば、in vitroシステムと対照的に）の中で起こる現象を指すために用いてもよい。

【0054】

「髄腔内投与」 本明細書で用いる場合、「髄腔内投与」または「髄腔内注射」という用語は、脊柱管（脊髄周囲の髄腔内空隙）への注射を指す。穿頭孔、大槽、または腰椎穿刺などを通した、外側脳室注射を含む種々の技法が用いられてもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明による「髄腔内投与」または「髄腔内送達」は、腰椎部または領域を介した、IT投与または送達、すなわち、腰椎IT投与または送達を指す。本明細書で用いる場合、「腰部領域」または「腰椎域」という用語は、第三及び第四腰椎（背中下部）の間の区域、さらに包括的には、脊椎のL2～S1領域を指す。20

【0055】

「下位運動ニューロン」 本明細書で用いる場合、「下位運動ニューロン」という用語は、脳幹及び脊髄を筋繊維へ接続する運動ニューロンを指す。言い換えれば、下位運動ニューロンは上位運動ニューロンから筋肉へ神経衝動をもたらす。概して、下位運動ニューロンの軸索は、エフェクター（筋肉）で終止する。下位運動ニューロンは、「脊髄ニューロン」及び「脊髄前角細胞」を含む。30

【0056】

「リソソーム酵素」 本明細書で用いる場合、「リソソーム酵素」という用語は、哺乳類のリソソーム中の蓄積物質を減少し得るか、あるいは一種または複数種のリソソーム蓄積症の症状から救出するか、または改善し得る、任意の酵素を指す。本発明に好適なリソソーム酵素は、野生型または修飾されたリソソーム酵素両方を含み、遺伝子組換え方法及び合成方法を用いて生成すること、または天然物から精製することが可能である。リソソーム酵素の例は、表2に列挙されている。

【0057】

「リソソーム酵素欠乏症」 本明細書で用いる場合、「リソソーム酵素欠乏症」は、リソソーム中で高分子（例えば酵素基質）をペプチド、アミノ酸、単糖、核酸、及び脂肪酸に分解するために必要な酵素のうちの少なくとも1つにおける欠乏に起因する遺伝性障害の一群を指す。その結果、リソソーム酵素欠乏症に罹患している個体は、種々の生物組織（例えば、CNS、肝臓、脾臓、腸、血管壁及びその他の器官）中に物質を蓄積している。40

【0058】

「リソソーム蓄積症」 本明細書で用いる場合、「リソソーム蓄積症」という用語は、天然高分子を代謝するために必要な一種または複数種のリソソーム酵素の欠乏に起因する任意の疾患を指す。概して、これらの疾患では、リソソーム中に未分解分子の蓄積を生じ

50

て、貯蔵顆粒（貯蔵小胞とも呼ばれる）の数を増大する。これらの疾患及び種々の例は、以下で詳細に記載される。

【0059】

「メッセンジャーRNA（mRNA）」 本明細書で用いる場合、「メッセンジャーRNA（mRNA）」は、少なくとも一種のポリペプチドでコードされたポリヌクレオチドを指す。本明細書で用いられるmRNAは、修飾されたRNA及び無修飾のRNAの両方を包含する。mRNAは、一種または複数種のコード領域及びノンコーディング領域を含み得る。mRNAは、天然物から精製されたり、組み換え発現システムを用いて生成されて任意で精製されたり、化学的に合成されたりされ得る。必要に応じて、例えば、化学的に合成された分子の場合、mRNAは化学的に修正された、塩基または糖、骨格修飾などを有する類似体のようなヌクレオシド類似体を含み得る。mRNA配列は、別に指示がない限り、5'から3'の方向で存在している。いくつかの実施形態において、mRNAは天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン）、ヌクレオシド類似体（2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-ブROMOURIDIN、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O（6）-メチルグアニン、及び2-チオシチジン）、化学修飾塩基、生物学的に修飾された塩基（例えば、メチル化された塩基）、介在塩基、改質糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース及びヘキソース）、及び／または改質リン酸基（例えば、ホスホロチオネート及び5'-N-ホスホラミダイト結合）も含む。

【0060】

「核酸」 本明細書で用いる場合、「核酸」という用語は、最も広義には、ポリヌクレオチド鎖へ組み込まれ得る、任意の化合物、及び／または物質を指す。いくつかの実施形態において、核酸は、ホスホジエステル結合を介してポリヌクレオチド鎖へ組み込まれ得る化合物、及び／または物質である。いくつかの実施形態において、「核酸」は、個体の核酸残基（例えば、ヌクレオチド、及び／またはヌクレオシド）を指す。いくつかの実施形態において、「核酸」は、個体の核酸残基を含む、ポリヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態において、「核酸」は、RNA、ならびに1本鎖及び／または2本鎖DNA、及び／またはcDNA、を包含する。

【0061】

「患者」 本明細書で用いる場合、「患者」または「検体」という用語は、例えば実験上の、診断上の、予防の、装飾上の、及び／または治療上の目的で、提供される組成物を投与し得る、任意の生物体を指す。典型的な患者は、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒト以外の霊長類、及び／またはヒトなどの哺乳類）を含む。いくつかの実施形態において、患者はヒトである。ヒトは、出生前、及び出生後の形態を含む。

【0062】

「薬学的に受容可能な」 本明細書で用いる場合、「薬学的に受容可能な」という用語は、健全な医療判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題、または合併症がない、ヒト及び動物の生物組織に接する利用に好適で、妥当な利益／危険の比に相当する、物質を指す。

【0063】

「薬学的に受容可能な塩」 薬学的に受容可能な塩は、当技術分野で既知である。例えば、S. M. Bergeらは、薬学的に受容可能な塩について詳細にJ. Pharmaceutical Sciences（1977）66：1-19で述べている。本発明において化合物の薬学的に受容可能な塩は、好適な無機、及び有機酸、ならびに有機塩に由来するものを含む。薬学的に受容可能で、毒性のない酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、及び過塩素酸などの無機酸、または、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、

酒石酸、クエン酸、コハク酸もしくはマロン酸などの有機酸、または、イオン交換などの従来技術において使用する他の方法を用いて形成された、アミノ群の塩である。その他の薬学的に受容可能な塩は、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホナート、安息香酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酢酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素塩、2-ヒドロキシー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、ペルオキソ硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p-ートルエンスルホン酸塩、ウンデカノアート、吉草酸塩、などを含む。適切な塩基から得た塩は、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム、及び $N^+(C_{1-4} \text{アルキル})_4$ 塩を含む。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。さらに薬学的に受容可能な塩は、適切な場合に、非毒性アンモニウム塩、四級アンモニウム、及び、例えば、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、スルホン酸塩、及びアリアルスルホナート、などの対イオンを用いて形成されるアミンカチオン、を含む。さらに薬学的に受容可能な塩は、例えば、四級アルキルアミノ基を含む塩を形成するハロゲン化アルキルなどの適切な求電子剤を使用したアミンの四級化で形成された塩を含む。

【0064】

「検体」 本明細書で用いる場合、「検体」という用語は、ヒト、またはヒト以外の任意の動物を（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または霊長類）を指す。ヒトは、出生前、及び出生後の形態を含む。多くの実施形態において、検体はヒトである。「検体」は、患者であってもよく、疾病の診断または治療のために、医療提供者に見せるヒトを指す。本明細書では、「検体」という用語は、「個体」または「患者」と区別なく用いられる。検体は、疾患や障害に苦しめられたり、または影響を受けたりし得るが、疾患や障害の症候を見せる場合も見せない場合もある。

【0065】

「治療の有効量」 本明細書中で用いる場合、治療薬の「治療的有效量」という用語は、疾患、障害、及び／または異常の兆候の開始を治療、診断、予防、及び／または遅らせるために、疾患、障害、及び／または異常に罹っている、または感染しやすい検体へ投与するときに、十分な量を指す。治療的有效量は概して、少なくとも1単位用量を含む投薬計画によって投与される量であることは、当業者によって、理解されるだろう。

【0066】

「治療」 本明細書で用いる場合、「治療」（「治療する」または「治療すること」も同様）という用語は、特定の疾患、障害、及び／または異常（例えば、インフルエンザ）の1つ以上の症候、特徴、及び／または原因の罹患率を、部分的または完全に緩和する、改善する、生き返る、抑制する、発生を遅らせる、深刻さを低減する、及び／または、減らす物質（例えば、提供された組成物）の任意の投与を指す。当該治療は、関連の疾患、障害、及び／または異常の兆候を示さない検体、及び／または疾患、障害、及び／または異常の、早期の兆候のみを示す検体に関してもよい。これに代え又はこれに加えて、当該治療は、関連の疾患、障害、及び／または異常の1つ以上の確証された兆候を示す検体に関してもよい。いくつかの実施形態において、治療は、関連の疾患、障害、及び／または異常に罹っていると診断されている検体に関してもよい。いくつかの実施形態において、治療は、関連の疾患、障害、及び／または異常について発生の恐れが増大していることと統計的に相関がある、1つ以上の感受性因子を有していると考えられる検体に関してもよい。

【0067】

「上位運動ニューロン」 本明細書で用いる場合、「上位運動ニューロン」及び「皮質脊髄ニューロン」という用語は、大脳皮質の運動野、もしくは脳幹で生じて、最終共通路に至るまで運動情報を伝える運動ニューロンを指す同義語として用いられる。概して、上位運動ニューロンは、目的とする筋肉を刺激する直接の原因ではない任意の運動ニューロンを指す。

詳細な説明

【0068】

本発明は、特に、メッセンジャーRNA (mRNA) を中枢神経系 (CNS) へ効率的に送達する、方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、組成物の投与が、脳内及び／または脊髄中のニューロンにおいて、mRNAの細胞内送達をもたらすような、リポソーム内に封入されたタンパク質をコードしたmRNAを含む組成物を送達する必要のある対象への髄腔内投与の方法及び組成物を提供する。本発明は、脊髄性筋萎縮症などのCNS系疾患、障害、または異常の治療に特に有用である。本明細書で用いる場合、「リポソーム」という用語は、任意の、層状、多層状、または固形状の、脂質ナノ粒子小胞を指す。概して、本明細書で用いられるリポソームは、一種または複数種の脂質を混合することで、または一種または複数種の脂質とポリマーを混合することで、形成され得る。従って、本明細書で用いられる「リポソーム」という用語は、脂質とポリマー系両方のナノ粒子を含む。いくつかの実施形態において、本発明に好適なりポソームは、陽イオン性または非陽イオン性脂質、コレステロール系脂質、及びPEG-修飾脂質を含む。

【0069】

本発明の種々な態様は、以下の節で詳細に記載される。節の記載内容は、本発明を限定するものではない。各節は、本発明の任意の態様に適用し得る。この出願において、「または」は、別記しない限り「及び／または」を意味する。

CNS疾患、障害、または異常に関連するmRNA

【0070】

本発明は、中枢神経系へ任意のmRNAを送達するために用いられ得る。特に、本発明は、CNS疾患、障害、または異常に関連する、または関連づけられる、タンパク質をコードするmRNAを送達するのに有用である。本明細書で用いる場合、「CNS疾患、障害、または異常」は、中枢神経系（すなわち、脳及び／または脊髄）の1つ以上の神経機能に影響する、疾患、障害、または異常を指す。いくつかの実施形態において、CNS疾患、障害、または異常は、CNS（すなわち、脳及び／または脊髄）のニューロン中で、タンパク質の欠乏または機能障害によって引き起こされ得る。

【0071】

典型的なCNS疾患、障害、または異常は、酸性リパーゼ欠損症、酸性マルターゼ欠損症、後天性てんかん性失語、急性散在性脳脊髄炎、多動症候群、アディー瞳孔、アディー症候群、副腎白質ジストロフィー、失認、アイカルディ症候群、エカルディ-グティエール症候群障害、アレキサンダー病、アルパース病、交代性片麻痺、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、無脳症、動脈瘤、アンジェルマン症候群、血管腫症、無酸素症、抗リン脂質抗体症候群、失語症、失行、クモ膜炎、アーノルド・キアリ奇形、アスペルガー症候群、運動失調、毛細血管拡張性運動失調症、運動失調及び小脳または脊髄小脳変性症、注意欠陥・多動性障害、自閉症、自律神経機能障害、バース症候群、バッテン病、ベッカーミオトニー、ベーチェット病、ベル麻痺、ベルナル・ロス症候群、ビンズワンガー病、色素失調症、ブラッドベリ・エグルストン症候群、脊髄性片麻痺、球脊髄性筋萎縮症、カダシル、カナバン病、灼熱痛、海綿腫、海綿状血管腫、中心性頸髄症候群、脊髄中心症候群、橋中心髄鞘崩壊症、セラミダーゼ欠損症、小脳変性症、小脳低形成、脳脚気、脳性巨人症、脳性麻痺、脳眼顔骨症候群 (COFS)、コレステロールエステル蓄積症、舞蹈病、舞蹈病-有棘赤血球症、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP)、慢性起立性調節障害、コケイン症候群II型、コッフィン・ラウリー症候群、コルボセファリー、先天性筋無力症、大脳皮質基底核変性症、頭蓋動脈炎、クリー脳炎、クロイツ

フェルト・ヤコブ症候群、クッシング症候群、巨大細胞封入体病、ダンシングアイズ・ダンス足症候群、ダンディー・ウォーカー症候群、ドーソン病、中隔視神経形成異常症、デジェリナー・クルンブケ麻痺、歯状核小脳萎縮、歯状核赤核萎縮症、皮膚筋炎、発達統合運動障害、視神経脊髄炎、びまん性硬化症、乳児重症ミオクロニーてんかん、自律神経障害、書字障害、読字障害、嚥下障害、行為障害、ミオクロニー性小脳性協働収縮異常症、進行性小脳性共同運動障害、ファブリー病、ファール病、家族性自律神経異常症、家族性血管腫、特発性家族性大脳基底核石灰化症、家族性周期性四肢麻痺、家族痙性麻痺、ファーバー病、線維筋異形成症、フィッシャー症候群、筋緊張低下児候群、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、全身性ガングリオシド症、ゲルストマン症候群、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候群、巨大軸索ニューロパチー、巨細胞動脈炎、巨大細胞封入病、グロバイド細胞白質ジストロフィー、舌咽神経痛、糖原病、ギラン・バレー症候群、ハレルフォルデン・スパッツ病、持続性片側頭痛、交叉性片麻痺、遺伝性痙性対麻痺、多発神経炎型遺伝性運動失調症、ホームズ・アディー症候群、全前脳症、ヒューズ症候群、ハンチントン病、水無脳症、水脊髄症、コルチゾン過剰症、免疫介在、脳脊髄炎、封入体筋炎、色素失調症、小児筋緊張低下、乳児神経軸索ジストロフィー、酸蓄積症、後頭孔脳脱出、アイザック症候群、ジュベール症候群、カーンズ・セイヤー症候群、ケネディ病、K i n s b o u r n e 症候群、クライン・レビン症候群、クリッペル・フェール症候群、クリッペル・トレノノーニ症候群（K T S）、クリューバー・ビュシー症候群、コルサコフ健忘症候群、クラッペ病、クーゲル・ウェランダー病、ランバート・イートン筋無力症候群、ランドウ・クレフナー症候群、外側大腿皮神経エントラップメント、延髄外側症候群、リー病、レノックス・ガストー症候群、レッシュ・ナイハン症候群、レヴァイン・クリッチュリー症候群、レヴィ小体型認知症、リポイドタンパク症、滑脳症、閉じ込め症候群、ルー・ゲーリッグ病、ループス神経後遺症、ライム病、マシャド・ジョセフ病、大頭脳症、メルカーソン・ローゼンタール症候群、メンケス病、知覚異常性大腿痛、異染性白質ジストロフィー、小頭症、ミラー・フィッシャー症候群、メビウス症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、重症筋無力症、ミエリノクラスチックびまん性硬化症、ナルコレプシー、神経有棘赤血球症、神経線維腫症、神経遮断薬による悪性症候群、神経サルコイドーシス、ニーマン・ピック病、大田原症候群、オリーブ橋小脳萎縮症、オプソクロヌス・ミオクロヌス、オサリバン・マクラウド症候群、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、傍腫瘍性症候群、感覚異常、パーキンソン病、発作性舞踏アテトーシス、発作性片側頭痛、パリー・ロンバーグ、ペリツェウス・メルツバッハー病、ペナショッカーⅠⅠ症候群、脳室周囲白質軟化症、フィタン酸蓄積症、ピック病、梨状筋症候群、多発性筋炎、ポンペ病、ポストポリオ症候群、原発歯状萎縮症、原発性側索硬化症、原発性進行性失語症、プリオン病、進行性顔面片側萎縮症、進行性歩行運動失調、進行性多巣性白質脳症、進行性硬化性ポリオジストロフィー、進行性核上性麻痺、相貌失認、ラムゼイ・ハント症候群Ⅰ、ラムゼイ・ハント症候群ⅠⅠ、ラスムッセン脳炎、レフサム病、レット症候群、ライ症候群、ライリー・デイ症候群、サンドホフ病、シルダー病、ザイテルベルゲル病、乳児重症ミオクロニーてんかん（S M E I）、シャイ・ドレーガー症候群、シェーグレン症候群、痙性、二分脊椎、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳萎縮症、脊髄小脳変性症、スティール・リチャードソン・オルゼウスキー症候群、線条体黒質変性症、スタージ・ウェーバー症候群、遅発性ジスキネジア、テイ・サックス病、胸郭出口症候群、甲状腺中毒ミオパチー、疼痛性チック、トッド麻痺、三叉神経痛、熱帯性痙性不全対麻痺症、トロイヤー症候群、フォン・エコーノモ病、フォンヒッペル・リンダウ病（V H L）、フォンレックリングハウゼン病、ワーレンベルグ症候群、ウェルドニッヒ・ホフマン病、ウェルニッケ・コルサコフ症候群、ウェスト症候群、ウィップル病、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ウォルマン病、X連鎖性球脊髄性筋萎縮症及びツェルヴェーガー症候群を含むが、限定されない。

運動ニューロン疾患

【0072】

いくつかの実施形態において、C N S 疾患、障害、または異常は、運動ニューロンの1つ

10

20

30

40

50

以上の機能に影響する、疾患、障害、または異常であり、運動ニューロン疾患ともいう。いくつかの実施形態において、運動ニューロン疾患は、CNS（すなわち、脳及び／または脊髄）の運動ニューロン中で、タンパク質の欠乏または機能障害によって引き起こされ得る。本明細書で用いる場合、「運動ニューロン」という用語は、随意筋の活性を制御するそれらのニューロンを指す。概して、運動ニューロンは、上位運動ニューロン及び下位運動ニューロンを含む。本明細書で用いる場合、「上位運動ニューロン」は、大脳皮質の運動野、または脳幹で生じて、そして最終共通路に至るまで、運動情報を伝える、運動ニューロンを指す。上位運動ニューロンは、「皮質脊髄ニューロン」ともいう。概して、上位運動ニューロンは、目的とする筋肉を刺激する直接の原因ではない、任意の運動ニューロンを指す。本明細書で用いる場合、「下位運動ニューロン」という用語は、脳幹及び脊髄を筋繊維へ接続する運動ニューロンを指す。言い換えれば、下位運動ニューロンは上位運動ニューロンから筋肉へ神経衝動をもたらす。概して、下位運動ニューロンの軸索は、エフェクター（筋肉）で終止する。下位運動ニューロンは、「脊髄ニューロン」及び「脊髄前角細胞」を含む。

【0073】

典型的な運動ニューロン疾患、障害、または異常は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、原発性側索硬化症（PLS）、偽性球麻痺、遺伝性痙性対麻痺、進行性筋萎縮症（PMA）、進行性球麻痺（PBP）、遠位遺伝性運動ニューロパチー、及び脊髄性筋萎縮症を含むが、特に限定されない。

【0074】

いくつかの実施形態において、運動ニューロン疾患、障害、または異常は、脊髄性筋萎縮症の一形態である。脊髄性筋萎縮症の一群は、下位運動ニューロンの退化で特徴付けられる、珍しい消耗性疾患の遺伝子的に及び臨床的に不均一な群である。脊髄の脊髄前角としても知られる、下位運動ニューロン内の細胞の退化は、体内にある種々の筋肉群の萎縮及び過度の消耗をもたらす、運動機能の低下を引き起こす。当該一群を含む疾病は、基部、末端、常染色体劣性基部及び局部的脊髄性筋萎縮症へ分けることができる。しかし、タンパク質欠乏は種々の形態の脊髄性筋萎縮症において主要な原因であることを考慮し、各疾病の要素は、通常、異常に関連する遺伝子により分類される。下の表1に、脊髄性筋萎縮症の主要な6つの群を記載する。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

脊髄性筋萎縮症の代表的な分類

分類	名称	遺伝子	遺伝
SMA	脊髄性筋萎縮症 (SMA)	SMN-1	常染色体劣性
XL SMA	X連鎖脊髄性筋萎縮症 1 型 (SMA X 1)	NR3C4	X連鎖劣性
	X連鎖脊髄性筋萎縮症 2 型 (SMA X 2)	UBA1	X連鎖劣性
	X連鎖脊髄性筋萎縮症 3 型 (SMA X 3)	ATP7A	X連鎖劣性
DSMA	遠位脊髄性筋萎縮症 1 型 (DSMA 1)	IGHMBP2	常染色体劣性
	遠位脊髄性筋萎縮症 2 型 (DSMA 2)		常染色体劣性
	遠位脊髄性筋萎縮症 3 型 (DSMA 3)		常染色体劣性
	遠位脊髄性筋萎縮症 4 型 (DSMA 4)	PLEKHG5	常染色体劣性
	遠位脊髄性筋萎縮症 5 型 (DSMA 5)	DNAJB2	常染色体劣性
	遠位脊髄性筋萎縮症 VA (DSMA VA)	GARS	常染色体優性
	遠位脊髄性筋萎縮症 VB (DSMA VA)	REEP1	常染色体優性
	遠位脊髄性筋萎縮症—声帯麻痺	SLC5A7	常染色体優性

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

A D S M A	常染色体優性遠位脊髄性筋萎縮症	H S P B 8	常染色体優性
	常染色体優性若年性遠位脊髄性筋萎縮症		常染色体優性
N T M A	先天性遠位脊髄性筋萎縮症	T R P V 4	常染色体優性
	肩甲腓骨脊髄性筋萎縮症 (S P S M A)	T R P V 4	常染色体優性 またはX連鎖性優性
	若年性分節脊髄性筋萎縮症 (J S S M A)		
	フィンケル型近位脊髄性筋萎縮症 (S M A - F K)	V A P B	常染色体優性
	ジョケラ型脊髄性筋萎縮症 (S M A - J)		常染色体優性
	下肢優位性に伴う脊髄性筋萎縮症 (S M A - L E D)	D Y N C 1 H 1	常染色体優性
	進行性ミオクロームスでんかんに伴う脊髄性筋萎縮症 (S M A - P M E)	A S A H 1	常染色体劣性
	先天性骨折に伴う脊髄性筋萎縮症 (S M A - C B F)		常染色体劣性
P C H	橋小脳形成不全に伴う脊髄性筋萎縮症 (S M A - P C H)	V R K 1	常染色体優性
M M A	若年性非対称分節脊髄性筋萎縮症 (J A S S M A)		

C N S 構成成分に関する疾患

【0075】

いくつかの実施形態において、C N S 疾患、障害、または異常は、C N S 構成成分に関する疾患である。概して、C N S 構成成分に関する疾患は、体内の、C N S と末梢組織の両方を含み、一種または複数種の生物組織、1つまたは複数のC N S の病因及び／または症状が生じる、タンパク質欠乏によって起こる。例えば、いくつかの実施形態において、タンパク質欠乏は、細胞内及び／または細胞外構成成分、例えば、グルコサミノグリカン (G A G)、脂質、斑 (すなわち、β-アミロイド)、またはタンパク質などの、過度の蓄積という結果になり得る。従って、いくつかの実施形態において、C N S 構成成分に関する疾患は、リソソーム酵素の欠乏によって起こるリソソーム蓄積症であり、これによりC N S と末梢組織の両方の中でグルコサミノグリカン (G A G) の過度の蓄積が生じるものである。

【0076】

いくつかの実施形態において、C N S の病因及び／または症状を有するリソソーム蓄積症は、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステロールエステル蓄積症、ウォルマン病、シスチン症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、ファーバー病、フコース蓄積症、ガラクトシアリドーシスI型／II型、ゴーシェ病I型／II型／III型、グロバイド細胞白質ジストロフィー、クラッペ病、糖原病II、ポンペ病、GM1ガングリオシドーシスタイプI型／II型／III型、GM2ガングリオシドーシスI型、テイ・サックス病、GM2ガングリオシドーシスII型、サンドホフ病、GM2ガングリオシドーシス、α-マンノース蓄積症I型／II型、β-マンノース蓄積症、異染性白質ジストロフィー、ムコリピドーシスI型、シアリドーシスI型／II型、ムコリピドーシスII

【表 2 - 2】

ニーマン・ピック病D型	不明	スフィンゴミエリン
ファーパー病	酸性セラミダーゼ	セラミド
ウォルマン病	酸性リパーゼ	コレステリルエステル
ハーラー症候群 (MPS IH)	α -L-イズロニダーゼ	ヘパラン及びデルマタン 硫酸塩
シャイエ症候群 (MPS IS)	α -L-イズロニダーゼ	ヘパラン及びデルマタン 硫酸塩
ハーラー・シャイエ症候 群 (MPS IH/S)	α -L-イズロニダーゼ	ヘパラン及びデルマタン 硫酸塩
ハンター症候群 (MPS II)	イズロン酸スルファターゼ	ヘパラン及びデルマタン 硫酸塩
サンフィリポA (MPS IIIA)	ヘパランN-スルファター ゼ	ヘパラン硫酸塩
サンフィリポB (MPS IIIB)	α -N-アセチルグルコサ ミニダーゼ	ヘパラン硫酸塩
サンフィリポC (MPS IIIC)	アセチル-C ₆ A- グルコサミニド アセチルトランスフェラー ゼ	ヘパラン硫酸塩
サンフィリポD (MPS IIID)	N-アセチルグルコサミン -6-スルファターゼ	ヘパラン硫酸塩
モルキオB (MPS IVB)	β -ガラクトシダーゼ	ケラタン硫酸塩
マロトー・ラミー症候群 (MPS VI)	アリアルスルファターゼB	デルマタン硫酸塩
スライ症候群 (MPS VII)	β -グルクロニダーゼ	
α -マンノース蓄積症	α -マンノシダーゼ	マンノース/オリゴ糖
β -マンノース蓄積症	β -マンノシダーゼ	マンノース/オリゴ糖
フコース蓄積症	α -L-フコシダーゼ	フコシル/オリゴ糖
アスパルチルグルコサミ ン尿症	N-アスパルチル β - グルコサミニダーゼ	アスパルチルグルコサミ ン アスパラギン
シアリドーシス (ムコリビドーシスI)	α -ノイラミニダーゼ	シアリルオリゴ糖
ガラクトシアリドーシス (ゴールドバーグ症候 群)	リソソーム保護タンパク欠 損症	シアリルオリゴ糖
シンドラー病	α -N-アセチル ガラクトサミニダーゼ	

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

ムコリピドーシス I I (I-細胞病)	N-アセチルグルコサミン -1-ホスホトランスフェ ラーゼ	ヘパラン硫酸塩
ムコリピドーシス I I I (偽ハーラー多発性ジス トロフィー)	ML I I と同様	
シスチン症	シスチン輸送タンパク質	遊離シスチン
サラ病	シアル酸輸送タンパク質	遊離シアル酸及びグルク ロン酸
乳児シアル酸蓄積症	シアル酸輸送タンパク質	遊離シアル酸及びグルク ロン酸
乳児神経セロイドリポフ スチン症	パルミトイルタンパク質チ オエステラーゼ	リポ فسチン
ムコリピドーシス I V	不明	ガングリオシド及びヒア ルロン酸
プロサポシン	サポシン A、B、C または D	

10

20

【0078】

種々の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されている、任意の CNS 系疾患、障害、または異常において、欠損しているタンパク質をコードした mRNA を送達するために用いられてもよい。いくつかの実施形態において、本発明は、運動ニューロン疾患、例えば表 1 に示す運動ニューロン疾患において、欠損しているタンパク質をコードした mRNA を送達するために用いられてもよい。特定の実施形態において、本発明は、脊髄性筋萎縮症 (SMA)、例えば、以下に詳細に記載されている SMN1 において欠損しているタンパク質をコードした mRNA を送達するために用いられてもよい。いくつかの実施形態において、本発明は、CNS 構成成分でリソソーム蓄積症において、欠損しているリソソーム酵素をコードした mRNA を送達するために用いられてもよい。いくつかの実施形態において、本発明は、表 2 から選択されたリソソーム酵素をコードした mRNA を送達するために用いられてもよい。いくつかの実施形態において、本発明において好適な mRNA は、野生型または自然に存在する、アミノ酸配列をコードしてもよい。いくつかの実施形態において、本発明において好適な mRNA は、野生型または自然に存在する、アミノ酸配列であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明において好適な mRNA は、コドン最適化された配列であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明において好適な mRNA は、実質的ホモロジーを有するアミノ酸配列をコードし、または野生型または自然に存在する、アミノ酸タンパク質配列 (例えば、野生型または自然に存在するアミノ酸配列と、少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、一致する配列を有する) を同定し得る。

30

40

生存運動ニューロン

【0079】

いくつかの実施形態において、本発明によって提供される本方法及び組成物は、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の治療のために、CNS へ生存運動ニューロンタンパク質をコードした mRNA を送達するために用いられる。

【0080】

好適な SMN mRNA は、自然に存在する SMN タンパク質の活性の代わりになることもでき、または、脊髄性筋萎縮症に関連する、1 つ以上の表現型もしくは症状を救出する

50

こともできる、任意のSMNタンパク質の全長、断片、または一部をコードする。ヒト生存運動ニューロン-1 (hSMN-1) のmRNA配列、及び典型的な野生型または自然に存在するhSMN-1タンパク質の対応するアミノ酸配列を、表3に示す。

【表3-1】

ヒトSMN-1

ヒトSMN-1 (mRNA)	GGGGACCCGCGGGUUUGCUAUGGCGAUGAG	
	CAGCGGCGGCAGUGGUGGCGGCGUCCCGGA	
	GCAGGAGGAUUCGUGCUGUUCGCGCGCGG	
	CACAGGCCAGAGCGAUGAUUCUGACAUAUUG	10
	GGAUGAUACAGCACUGAUAAAAGCAUAUGA	
	UAAAGCUGUGGCUUCAUUUAAGCAUGCUCU	
	AAAGAAUGGUGACAUAUUGUGAAACUUCGGG	
	UAAACCAAAAACCACACCUAAAAGAAAACC	
	UGCUAAGAAGAAUAAAAGCCAAAAGAAAGAA	
	UACUGCAGCUUCCUUACAACAGUGGAAAGU	
	UGGGGACAAAUGUUCUGCCAUAUUGGUCAGA	
	AGACGGUUGCAUUUACCCAGCUACCAUUGC	
	UUCAAUUGAUUUUAAGAGAGAAACCUGUGU	20
	UGUGGUUUACACUGGAUAUGGAAAUAGAGA	
	GGAGCAAAAUCUGUCCGAUCUACUUUCCCC	
	AAUCUGUGAAGUAGCUAAUAAUAUAGAACA	
	AAAUGCUCAAGAGAAUGAAAAUGAAAGCCA	
	AGUUUCAACAGAUGAAAGUGAGAACUCCAG	
	GUCUCCUGGAAAUAAAUCAGAUACAUCAA	
	GCCCCAAUUCUGCUCCAUGGAACUCUUUUUCU	
	CCCUCCACCACCCCCCAUGCCAGGGCCAAG	
	ACUGGGACCAGGAAAGCCAGGUCUAAAAUU	30
	CAAUGGGCCCACCACCGCCACCGCCACCACC	
	ACCACCCCACUUAUAUCAUGCUGGCUGCC	
	UCCAUAUUCUUCUGGACCACCAAUAAUUC	
	CCCACCACCUCCCAUAUGUCCAGAUUCUCU	
	UGAUGAUGCUGAUGCUUUGGGAAGUAUGUU	
	AAUUUCAUGGUACAUGAGUGGCUAUCAUAC	
	UGGCUAUUAUAUGGGUUUCAGACAAAUAUA	
	AAAAGAAGGAAGGUGCUCACAUUCCUUAUA	
	UUAAGGAGAAAUGCUGGCAUAGAGCAGCAC	40
	UAAAUGACACCACUAAAGAAACGAUCAGAC	
	AGAUCUGGAAUGUGAAGCGUUAUAGAAGAU	

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	AACUGGCCUCUAUUUCUUCAAAAUAUCAAGU GUUGGGAAAGAAAAAAGGAAGUGGAAUGGG UACUCUCUUCUUGAUUAAAAGUU AUGUAAUA ACCAA AUGCAAUGUGAAAUAUUUUACUGGA CUCUAUUUUGAAAAACCAUCUGUAAAAGAC UGGGGUGGGGGUGGGAGGCCAGCACGGUGG UGAGGCAGUUGAGAAAAUUUGAAUGUGGAU UAGA UUUUGAAUGAU AUUGGAUAAUUAUUG GUA AUUUUUAUGAGCUGUGAGAAGGGUGUU GUAGUUUAUAAAAGACUGUCUUA AUUUGCA UACUUAAGCAUUUAGGAAUGAAGUGUUAGA GUGUCUUA AAAAUGUUUCAAAUGGUUUAACA AAAUGUAUGUGAGGCGUAUGUGGCAAAAUG UUACAGAAUCUAACUGGUGGACAUGGCUGU UCAUUGUACUGUUUUUUUCUAUCUUCUAUA UGUUUAAAAGUAUAUAAUAAAAAUUUUAA UUUUUUUUUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACA AAAAAAAAAAAA (配列番号 1)
ヒト SMN- 1 (アミノ酸 配列)	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDD SDIWDDTALIKAYDKAVASFHALKNGDIC ETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQ QWKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKR ETCVVVYTGYGNREEQNLSDLLSPICEVAN NIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKS DN IKPKSAPWNSFLPPPPMPGPRLGPGKP GLKFNGPPPPPPPPPPHLLSCWLPPFPSPGP PIIPPPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMS GYHTGYMGRFRQNGKEGRCSHSLN (配列番号 2)

【0081】

従って、いくつかの実施形態において、本発明において好適な mRNA は、野生型 h SMN-1 mRNA 配列 (配列番号 1) である。いくつかの実施形態において、好適な mRNA は、(配列番号 3) で表される、コドン最適化された h SMN-1 mRNA 配列であってよい。

AUGGCCAUGAGCAGCGGAGGCAGCGGCGGAGGAGUGCCC
GAGCAGGAGGACAGCGUGCUGUUCAGGAGAGGCACCGGCC
AGAGCGAUGACAGCGAUUUCUGGGACGAUACCGCUCUGAU
CAAGGCCUACGACAAGGCCGUGGGCAGCUUCAAGCACGCC
CUGAAAAACGGCGACAUCUGCGAGACCAGCGGCAAGCCCA
AGACAACCCCCAAGAGAAAGCCCGCCAAGAAGAAUAAGAG
CCAGAAAAAGAACACCGCCGCCAGCCUGCAGCAGUGGAAG
GUGGGCGACAAGUGCAGCGCCAUCUGGAGCGAGGACGGCU
GCAUCUACCCCGCCACCAUCGCCAGCAUCGACUUCAAGAG
AGAGACCUGCGUGGUCGUGUACACCGGCUACGGCAACAGA
GAGGAGCAGAACCUAGAGCGACCUGCUGAGCCCCAUUUGUG
AGGUGGCCAAUAACAUCGAACAGAACGCCCCAGGAGAACGA

G A A U G A A A G C C A G G U G A G C A C C G A C G A G A G C G A G A A C A G C
A G A U C U C C U G G C A A C A A G A G C G A C A A C A U C A A G C C U A A G U
C U G C C C C U U G G A A C A G C U U C C U G C C C C U C C U C C A C C C A U
G C C C G G A C C C A G A C U G G G A C C C G G A A A A C C U G G C C U G A A G
U U C A A C G G A C C A C C U C C C C C U C C A C C U C C U C C C C C A C C U C
A U C U C C U G A G C U G C U G G C U G C C A C C C U U C C C C A G C G G A C C
C C C U A U C A U C C C A C C A C C C C C U C C C A U C U G C C C C G A C A G C
C U G G A C G A C G C C G A U G C C C U G G G C A G C A U G C U G A U C A G C U
G G U A C A U G A G C G G C U A C C A C A C A G G A U A C U A C A U G G G C U U
C A G A C A G A A C C A G A A G G A G G G C A G A U G C U C C C A C U C C C U G
A A C U G A

10

【0082】

あるいは、いくつかの実施形態において、好適なmRNAは（配列番号4）で表される、コドン最適化されたhSMN-1 mRNA配列であり得る。

A U G G C C A U G A G C A G C G G A G G A A G C G G A G G A G G A G U G C C A
G A A C A G G A A G A U A G C G U G C U G U U U C G C C G G G G C A C C G G A C
A A U C G G A C G A C A G C G A U A U U U G G G A C G A C A C U G C G C U C A U
C A A G G C C U A C G A C A A G G C G G U G G C U U C G U U C A A G C A C G C U
C U G A A G A A C G G G G A U A U C U G U G A A A C C A G C G G U A A A C C A A
A A A C U A C G C C G A A A A G G A A A C C C G C C A A A A A G A A C A A G U C
A C A G A A G A A G A A U A C C G C U G C G A G C U U G C A G C A G U G G A A G
G U G G G C G A C A A G U G C U C C G C G A U U U G G U C G G A A G A U G G U U
G C A U C U A C C C G G C A A C C A U C G C C U C C A U C G A C U U U A A G C G
G G A G A C U U G C G U C G U G G U C U A C A C C G G A U A C G G C A A U A G A
G A G G A A C A G A A U C U G U C A G A C C U U C U G U C G C C A A U C U G C G
A G G U C G C C A A C A A U A U C G A A C A A A A C G C C C A A G A G A A C G A
G A A U G A G U C C C A A G U G U C C A C G G A C G A A U C G G A A A A C U C A
C G G U C C C C U G G G A A C A A G U C A G A U A A C A U C A A G C C U A A A U
C G G C A C C A U G G A A C U C C U U C C U G C C G C C U C C G C C U C C G A U
G C C G G G C C C G C G C C U G G G A C C G G G U A A A C C C G G G C U C A A G
U U C A A U G G A C C G C C A C C C C C A C C C C C G C C A C C G C C G C C C C
A C C U C C U C U C G U G C U G G C U G C C G C C G U U C C C U U C C G G A C C
G C C U A U C A U U C C G C C A C C U C C A C C U A U C U G C C C A G A C A G C
C U G G A U G A U G C C G A C G C A U U G G G C U C C A U G C U C A U C U C A U
G G U A C A U G U C G G G A U A C C A U A C U G G G U A U U A C A U G G G C U U
C A G A C A G A A C C A G A A G G A A G G A C G C U G U U C C C A U A G C C U G
A A C U A G

20

30

【0083】

いくつかの実施形態において、好適なmRNAは、ヒト生存運動ニューロン-2（hSMN-2）タンパク質の、全長、断片、または一部をコードする。hSMN-2及び、典型的な野生型または自然に存在するhSMN-2タンパク質のアミノ酸配列に対応する、mRNA配列を表4に示す。

40

【表 4－1】

ヒト SMN－2

ヒト SMN－ 2 (mRNA)	GGGGCCCCACGCGCGCACCCGCGGGUUU	
	GCUAUGGCGAUGAGCAGCGGCGGCAGUGG	
	UGGCGGGCGUCCCGGAGCAGGAGGAUUCCG	
	UGCUGUUCGCGCGGCACAGGCCAGAGC	
	GAUGAUUCUGACAUUUGGGAUGAUACAGC	
	ACUGAUAAAAGCAUAUGAUAAAGCUGUGG	
	CUUCAUUUAAGCAUGCUCUAAAGAAUGGU	
	GACAUUUGUGAAACUUCGGGUAAACCAAA	10
	AACCACACC UAAAAGAAAACCUGCUAAGA	
	AGAAUAAAAGCCAAAAGAAAGAAUACUGCA	
	GCUUCCCUUACAACAGUGGAAAGUUGGGGA	
	CAAAUGUUCUGCCA UUGGUCAGAAGACG	
	GUUGCAUUUACCCAGCUACCAUUGCUUCA	
	AUUGAUUUUAAGAGAGAAACCUGUGUUGU	
	GGUUUACACUGGAUAUGGAAAUAGAGAGG	
	AGCAAAAUCUGUCCGAUCUACUUUCCCCA	
	AUCUGUGAAGUAGCUAAUAAUAUAGAACAA	20
	GAAUGCUCAAGAGAAUGAAAAUGAAAGCC	
	AAGUUUCAACAGAUGAAAGUGAGAACUCC	
	AGGUCUCCUGGAAAUAAAUCAGAUAAACAU	
	CAAGCCCCAAAUCUGCUCCAUGGAACUCUU	
	UUCUCCCCUCCACCACCCCCCAUGCCAGGG	
	CCAAGACUGGGACCAGGAAAGCCAGGUCU	
	AAAAUUCAAUGGCCACCACCGCCACCGC	
	CACCACCACCACCCACUUAUCUAUGC	
	UGGCUGCCUCCA UUUCCUUCUGGACCACC	
	AAUAAUCCCCCACCACCUCCCAUAUGUC	30
	CAGAUUCUCUUGAUGAUGCUGAUGCUUUG	
	GGAAGUAUGUUA AUUUUCAUGGUACAUGAG	
	UGGCUAUCAUACUGGCUAUUAUAUGGAAA	
	UGCUGGCAUAGAGCAGCACUAAAUGACAC	
	CACUAAAGAAACGAUCAGACAGAUUCUGGA	
	AUGUGAAGCGUUAUAGAAGAUAAACUGGCC	
	UCAUUUCUUCAAA AUUCAAGUGUUGGGA	
	AAGAAAAAAGGAAGUGGAAUGGGUAACUC	
	UUCUUGAUUAAAAGUUAUGUAAUAACCAA	
	AUGCAAUGUGAAAU AUUUUACUGGACUCU	40

10

20

30

40

50

【表 4－2】

	A U U U U G A A A A A C C A U C U G U A A A A G A C U G A G G U G G G G G U G G G A G G C C A G C A C G G U G G U G A G G C A G U U G A G A A A A U U U G A A U G U G G A U U A G A U U U U G A A U G A U A U U G G A U A A U U A U U G G U A A U U U U A U G A G C U G U G A G A A G G G U G U U G U A G U U U A U A A A A G A C U G U C U U A A U U U G C A U A C U U A A G C A U U U A G G A A U G A A G U G U U A G A G U G U C U U A A A A A U G U U U C A A A U G G U U U A A C A A A A U G U A U G U G A G G C G U A U G U G G C A A A A U G U U A C A G A A U C U A A C U G G U G G A C A U G G C U G U U C A U U G U A C U G U U U U U U U C U A U C U U C U A U A U G U U U A A A A G U A U A U A A U A A A A A U A U U U A A U U U U U U U U U A A A A A (配列番号5)
ヒトSMN－ 2 (アミノ酸 配列)	M A M S S G G S G G G V P E Q E D S V L F R R G T G Q S D D S D I W D D T A L I K A Y D K A V A S F K H A L K N G D I C E T S G K P K T T P K R K P A K K N K S Q K K N T A A S L Q Q W K V G D K C S A I W S E D G C I Y P A T I A S I D F K R E T C V V V Y T G Y G N R E E Q N L S D L L S P I C E V A N N I E Q N A Q E N E N E S Q V S T D E S E N S R S P G N K S D N I K P K S A P W N S F L P P P P P M P G P R L G P G K P G L K F N G P P P P P P P P P P H L L S C W L P P F P S G P P I I P P P P P I C P D S L D D A D A L G S M L I S W Y M S G Y H T G Y Y M E M L A (配列番号6)

【0084】

従って、いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、野生型hSMN－2 mRNA配列（配列番号5）である。いくつかの実施形態において、好適なmRNAは、コドン最適化されたhSMN－1 mRNA配列であり得る。

【0085】

いくつかの実施形態において、好適なmRNA配列は、ヒトSMN－1（配列番号2）またはヒトSMN－2（配列番号6）の相同物または類似体をコードしたmRNA配列であり得る。例えば、ヒトSMN－1もしくはSMN－2、タンパク質の相同物または類似体は、重要なSMN－1またはSMN－2タンパク質の活性を保持して、野生型または自然に存在するヒトSMN－1タンパク質（例えば配列番号2）、またはヒトSMN－2タンパク質（例えば配列番号6）と比較すると、1種又は複数種のアミノ酸の置換、欠損及び／または挿入を含む、修飾されたヒトSMN－1もしくはSMN－2、タンパク質であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、配列番号2もしくは配列番号6と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上に相同な、アミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、ヒトSMN－1タンパク質（配列番号2）または、ヒトSMN－2タンパク質（配列番号6）と、実質的に同一のタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、配列番号2または配列番号6と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上一致したアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態に

において、本発明において好適なmRNAは、ヒトSMN-1タンパク質またはヒトSMN-2タンパク質の断片または一部をコードし、そこにおいて、当該タンパク質の断片または一部は、当該それぞれの野生型タンパク質の活性と同様である、SMN-1またはSMN-2の活性を保持したままである。いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号5に、少なくとも、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一のヌクレオチド配列を含む。

【0086】

ヒトSMN-1遺伝子は、選択的プロセッシング及び転写修飾を経て、選択的スプライスアイソフォームを生成する。例えば、5つの既知であるhSMN-1スプライスアイソフォームである、hSMN-1アイソフォームb、c、e、f、及びgがある。ヒトSMN-2遺伝子も、選択的プロセッシング及び転写修飾を経て、選択的スプライスアイソフォームを生成する。4つの既知であるhSMN-2スプライスアイソフォームである、hSMN-2アイソフォームa、b、c、及びdが存在する。いくつかの実施形態において、本発明はhSMN-1アイソフォーム（例えばアイソフォームb、c、e、f、またはg）をコードするmRNAを送達するために用いられる。いくつかの実施形態において、本発明はhSMN-2アイソフォーム（例えばアイソフォームa、b、c、またはd）をコードするmRNAを送達するために用いられる。hSMN-1及びhSMN-2のアイソフォームのヌクレオチド及びアミノ酸配列は、当技術分野で既知である。従って、いくつかの実施形態において、本発明は、hSMN-1アイソフォーム、またはhSMN-2タンパク質、またはそれらのアイソフォームをコードしたmRNAを送達するために用いられ得る。いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、野生型または自然に存在する、hSMN-1またはhSMN-2アイソフォーム配列であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、コドン最適化された、hSMN-1またはhSMN-2アイソフォーム配列であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明において好適なmRNAは、実質的ホモロジーを有するアミノ酸配列をコードし、または野生型または自然に存在する、hSMN-1またはhSMN-2アイソフォーム配列（例えば、野生型または自然に存在するhSMN-1またはhSMN-2アイソフォーム配列と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%の配列相同性を有する）を同定し得る。

mRNAの合成

【0087】

本発明によるmRNAは、任意である種々の既知の方法により、合成され得る。例えば、本発明によるmRNAは、*in vitro*転写反応（IVT）によって、合成され得る。簡潔に言えば、IVTは、概して、プロモーター、リボヌクレオチド三リン酸のプール、DTT及びマグネシウムイオンを含みうるバッファースystem、ならびに適切なRNAポリメラーゼ（例えば、T3、T7、またはSP6RNAポリメラーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼI、ピロホスファターゼ、及び／またはリボヌクレアーゼインヒビターを含む、線状または環状DNAテンプレートを用いて行われる。正確な条件は、具体的な用途により変わるであろう。

【0088】

いくつかの実施形態において、本発明によるmRNAの調製のために、DNAテンプレートは、*in vitro*で転写される。好適なDNAテンプレートは、概して、所望のmRNA及び終結シグナルに適した所望のヌクレオチド配列に続く、*in vitro*転写のための、例えば、T3、T7、またはSP6プロモーターのようなプロモーターを有する。

【0089】

本発明による所望のmRNA配列は、標準的な手法を用いたDNAテンプレートへ、測定され、組み込まれる。例えば、所望のアミノ酸配列（例えば酵素配列）から開始し、実質

10

20

30

40

50

上の逆転写が、変質した遺伝情報に基づき実行される。最適化されたアルゴリズムが、好適なコドンの選択のために用いられ得る。概して、G/C含量は、一方では、最良のG/C含量を達成するために最適化され得るが、その他方で、コドン使用頻度に応じたtRNAの頻度を最大限考慮に入れている。最適化されたRNA配列は、例えば、適切な表示装置の助けによって、そして本来の（野生型）配列と比較されながら、確認され、かつ発現され得る。二次構造についてもまた、RNAの、安定化する及び不安定化する特性、またはそれぞれの領域を確かめながら分析され得る。

修飾されたmRNA

【0090】

いくつかの実施形態において、本発明によるmRNAは、無修飾または修飾されたmRNAとして合成され得る。概して、mRNAは安定性を強化するために、修飾される。mRNAの修飾は、例えばRNAのヌクレオチドの修飾を含み得る。従って、本発明により修飾されたmRNAは、例えば、骨格修飾、糖修飾、または塩基修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、mRNAは、プリン（アデニン（A）、グアニン（G））、もしくはピリミジン（チミン（T）、シトシン（C）、ウラシル（U））、を含むが限定されない天然に存在するヌクレオチド及び／またはヌクレオチド類似体（修飾されたヌクレオチド）から、1-メチル-アデニン、2-メチル-アデニン、2-メチルチオ-N-6-イソペンテニルアデニン、N-6-メチルアデニン、N-6-イソペンテニルアデニン、2-チオ-シトシン、3-メチルシトシン、4-アセチルシトシン、5-メチルシトシン、2,6-ジアミノプリン、1-メチルグアニン、2-メチルグアニン、2,2-ジメチルグアニン、7-メチルグアニン、イノシン、1-メチルイノシン、シュードウラシル（5-ウラシル）、ジヒドロウラシル、2-チオ-ウラシル、4-チオ-ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウラシル、5-（カルボキシヒドロキシメチル）-ウラシル、5-フルオロ-ウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウラシル、5-メチル-2-チオ-ウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチルアミノメチル-ウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオ-ウラシル、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシ-ウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（V）、1-メチルシュードウラシル、キューオシン、β-D-マンノシル-キューオシン、ワイプトキソシン、及びホスホロアミド酸、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホン酸、7-デアザグアノシン、5-メチルシトシン及びイノシンなどの、プリン及びピリミジンの修飾されたヌクレオチド類似体または誘導体として合成され得るが、これらに限定されない。当該類似体の調製は、例えば、US 4,373,071、US 4,401,796、US 4,415,732、US 4,458,066、US 4,500,707、US 4,668,777、US 4,973,679、US 5,047,524、US 5,132,418、US 5,153,319、US 5,262,530、及びUS 5,700,642などが当業者には知られており、これらの開示は、その全体が参照として組み込まれる。

【0091】

いくつかの実施形態において、mRNAはRNA骨格修飾を含んでもよい。概して、骨格修飾とは、RNAに含まれるヌクレオチドのリン酸塩骨格が化学的に修飾される、修飾である。典型的な骨格修飾は、概して、メチルホスホン酸、メチルホスホロアミド酸、ホスホロアミド酸、ホスホロチオエート（例えば、シチジン5'-O-（1-チオホスフェート））、ボラノリン酸、正に荷電したグアニジウム基からなる群からの修飾を含むが、限定されず、これは他のアニオン性、カチオン性、または中性の基によって、ホスホジエステル結合を入れ替えることを意味する。

【0092】

いくつかの実施形態において、mRNAは糖修飾を含んでもよい。典型的な糖修飾は、2'-デオキシ-2'-フルオロオリゴリボヌクレオチド（2'-フルオロ-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）

10

20

30

40

50

、2'-デオキシ-2'-デアミン-オリゴリボヌクレオチド（2'-アミノ-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-アミノ-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）、2'-O-アルキルオリゴリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-C-アルキルオリゴリボヌクレオチド（2'-O-メチルシチジン5'-三リン酸、2'-メチルウリジン5'-三リン酸）、2'-C-アルキルオリゴリボヌクレオチド、及びそれら（2'-アラシチジン5'-三リン酸、2'-アラウリジン5'-トリホスフェート）、またはアジド三リン酸（2'-アジド-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-アジド-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）の異性体、からなる群から選択される糖修飾を含む、ヌクレオチドの糖の化学修飾であるが、限定されない。

【0093】

いくつかの実施形態において、mRNAはヌクレオチドの塩基の修飾（塩基修飾）を含み得る。塩基修飾を含む修飾されたヌクレオチドは、塩基修飾ヌクレオチドとも言われる。当該塩基修飾ヌクレオチドは、2'-アミノ-6-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、2'-アミノアデノシン5'-三リン酸、2'-チオシチジン5'-三リン酸、2'-チオウリジン5'-三リン酸、4'-チオウリジン5'-三リン酸、5'-アミノアシルシチジン5'-三リン酸、5'-アミノアシルウリジン5'-三リン酸、5'-プロモシチジン5'-三リン酸、5'-プロモウリジン5'-三リン酸、5'-ヨードシチジン5'-三リン酸、5'-ヨードウリジン5'-三リン酸、5'-メチルシチジン5'-三リン酸、5'-メチルウリジン5'-三リン酸、6'-アザシチジン5'-三リン酸、6'-アザウリジン5'-三リン酸、6'-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、7'-デアザアデノシン5'-三リン酸、7'-デアザグアノシン5'-三リン酸、8'-アザアデノシン5'-三リン酸、8'-アジドアデノシン5'-三リン酸、ベンズイミダゾールリボシド5'-三リン酸、N1-メチルアデノシン5'-三リン酸、N1-メチルグアノシン5'-三リン酸、N6-メチルアデノシン5'-三リン酸、O6-メチルグアノシン5'-三リン酸、プソイドウリジン5'-三リン酸、ピューロマイシン5'-三リン酸またはキサントシン5'-三リン酸、を含むが、限定されない。

【0094】

概して、mRNA合成は、N末端（5'）に「キャップ」を、そしてC末端（3'）に「テール」を付加することを含む。キャップの存在は、ほとんどの真核細胞で見られるヌクレアーゼに耐性を付与するために重要である。「テール」の存在は、mRNAをエキソヌクレアーゼ分解から保護するために役立つ。

キャップ構造

【0095】

いくつかの実施形態において、mRNAは、5'キャップ構造を含む。概して、5'キャップは以下のように付加される。始めに、RNA末端のリン酸塩が、5'ヌクレオチドから、1つの末端リン酸塩を取り除き、2つの末端リン酸塩を脱離する。そして、グアニリルトランスフェラーゼによって、グアノシン三リン酸（GTP）を末端リン酸塩へ加え、5'5'5'三リン酸結合を生成する。そして、次いでグアニンの7-窒素は、メチルトランスフェラーゼによりメチル化される。キャップ構造の例は、m7G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')A、及びG(5')ppp(5')Gを含むが、これに限定されない。

【0096】

自然に存在するキャップ構造は、三リン酸の架橋によって、第一に転写されたヌクレオチドの5'末端へ結合し、m7G(5')ppp(5')Nのジヌクレオチドキャップを得る、7-メチルグアノシンを含み、このNは任意のヌクレオチドである。In vivoでは、キャップは酵素として付加される。キャップは、核の中に付加され、そして酵素であるグアニリルトランスフェラーゼによって、触媒される。RNAの5'末端へのキャップの付加が、転写の開始直後に起こる。末端ヌクレオチドは、概してグアノシンであり、他の全てのヌクレオチド、すなわち、G(5')ppp(5')GpNpNpとは逆向きである。

【0097】

in vitro 転写によって生成された mRNA の通常のキャップは、 $m^7G(5')ppp(5')G$ であり、これは 5' 末端にキャップ構造を有する RNA を得るための、T7 または SP6 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写においてジヌクレオチドキャップとして利用される。キャッピングされた mRNA の *in vitro* 合成の一般的な方法は、転写のイニシエーターとして、 $m^7G(5')ppp(5')G$ ($\gamma GpppG$) の形態をもつ、前もって形成したジヌクレオチドを用いる。

【0098】

現在のところ、*in vitro* 翻訳実験で用いる合成ジヌクレオチドキャップの通常の形態は、アンチリバースキャップアナログ（「ARCA」）または、修飾された ARCA で、これは一般に 2' または 3' の OH 基が、 OC_3H_7 に替わった、修飾されるキャップ類似体である。

【0099】

付加的なキャップ類似体は、 m^7GpppG 、 m^7GpppA 、 m^7GpppC ；非メチル化キャップ類似体（例えば、 $GpppG$ ）；ジメチル化キャップ類似体（例えば、 $m^2, ^7GpppG$ ）；トリメチル化キャップ類似体（例えば、 $m^2, ^2, ^7GpppG$ ）、ジメチル化シンメトリカルキャップ類似体（例えば、 m^7Gpppm^7G ）、またはアンチリバースキャップ類似体（例えば、ARCA； $m^7, ^2'OmeGpppG$ 、 $m^7, ^2'dGpppG$ 、 $m^7, ^3'OmeGpppG$ 、 $m^7, ^3'dGpppG$ 、及びそれらの四リン酸誘導体）から成る群から選択される化学構造を含むが、限定されない。（例えば、Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9:1108-1122 (2003) を参照のこと）。

【0100】

いくつかの実施形態において、好適なキャップは、三リン酸の架橋によって、第一に転写されたヌクレオチドの 5' 末端へ結合し、 $m^7G(5')ppp(5')N$ を得る、7-メチルグアニル酸（「 m^7G 」）であり、このとき、N は任意のヌクレオチドである。本発明の実施例において利用した、 m^7G キャップの好ましい実施形態は $m^7G(5')ppp(5')G$ である。

【0101】

いくつかの実施形態において、キャップは、キャップ 0 構造である。キャップ 0 構造は、塩基 1 及び 2 へ付属するリボースの 2'-O-メチル残渣が欠損している。いくつかの実施形態において、キャップは、キャップ 1 構造である。キャップ 1 構造は、塩基 2 に、2'-O-メチル残渣を有している。いくつかの実施形態において、キャップはキャップ 2 構造である。キャップ 2 構造は、塩基 2 と塩基 3 の両方に付属する、2'-O-メチル残渣を有している。

【0102】

種々の m^7G キャップ類似体は、当技術分野で知られており、その多くは、市販されている。それらは、上に記載した m^7GpppG を含み、ARCA 3'- OC_3H_7 及び 2'- OC_3H_7 キャップ類似体も同様である（Jemielity, J. et al., RNA, 9:1108-1122 (2003)）。本発明の実施形態において用いる付加的なキャップ類似体は、N7-ベンジル化ジヌクレオチド四リン酸類似体（Grudzien, E. et al., RNA, 10:1479-1487 (2004) に記載）、ホスホリチオネートキャップ類似体（Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13:1745-1755 (2007) に記載）、US 8,093,367 及び US 8,304,529 に記載されるテールキャップ類似体（ビオチン化キャップ類似体を含む）を含み、ここに参照として組み込まれる。

テール構造

【0103】

10

20

30

40

50

概して、「テール」の存在は、mRNAをエキソヌクレアーゼ分解から保護するために役立つ。ポリAテールは、天然メッセンジャー及び合成の、センスRNAを安定化すると考えられる。それゆえ、一定の実施形態においては、長いポリAテールはmRNA分子へ加えられて、そうしてRNAをより安定させることが可能である。ポリAテールは、種々の当該技術分野において承認されている技術を用いて加えられ得る。例えば、長いポリAテールは、ポリAポリメラーゼを用いて、合成した、または*in vitro*で転写された、RNAへ加えられ得る(Yokoe, et al. *Nature Biotechnology*, 1996; 14: 1252-1256)。転写ベクターも、長いポリAテールをコードすることができる。さらに、ポリAテールは、PCR生成物から直接転写することで、加えることもできる。ポリAもまた、RNAリガーゼでセンスRNAの3'端へ結合され得る(Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991 edition)などを参照のこと)。

【0104】

いくつかの実施形態において、mRNAは、3'ポリ(A)テール構造を含む。概して、ポリAテールの長さは、少なくとも約10、50、100、200、300、400、または500のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、概して、mRNAの3'端のポリAテールは、約10~300のアデノシンヌクレオチド(例えば約10~200のアデノシンヌクレオチド、約10~150のアデノシンヌクレオチド、約10~100のアデノシンヌクレオチド、約20~70のアデノシンヌクレオチド、または約20~60のアデノシンヌクレオチド)を含む。いくつかの実施形態において、mRNAは3'ポリ(C)テール構造を含む。概して、mRNAの3'端のポリCテールは、約10~200のシトシンヌクレオチド(例えば、約10~150のシトシンヌクレオチド、約10~100のシトシンヌクレオチド、約20~70のシトシンヌクレオチド、約20~60のシトシンヌクレオチド、または約10~40のシトシンヌクレオチド)を含む。ポリCテールは、ポリAテールへ加えられてもよく、またはポリAテールを置換してもよい。

【0105】

いくつかの実施形態において、ポリAまたはポリCテールの長さは、本発明の修飾センスmRNA分子の安定性、及び、つまりタンパク質の転写を制御するように調節される。例えば、ポリAテールの長さは、センスmRNA分子の半減期に影響し得るので、ポリAテールの長さは、ヌクレアーゼに対するmRNAの耐性水準を変更するために調節することも可能であり、標的細胞内で、ポリヌクレオチドの発現、及び／またはポリペプチドの生成の経過時間を制御することも可能である。

5'及び3'の非翻訳領域

【0106】

いくつかの実施形態において、mRNAは、5'及び／または3'の非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態において、5'非翻訳領域は、mRNAの安定性または翻訳、例えば鉄反応エレメントなどに影響する、1つ以上のエレメントを含む。いくつかの実施形態において、5'非翻訳領域は、長さが約50~500の間のヌクレオチドであってもよい。

【0107】

いくつかの実施形態において、3'非翻訳領域は、1つ以上のポリアデニル化シグナル、細胞内におけるmRNAの位置安定性に影響するタンパク質の結合部位、または1つ以上のマイクロRNA用の結合部位を含む。いくつかの実施形態において、3'非翻訳領域は、長さが約50~500の間、またはそれ以上のヌクレオチドであってもよい。

【0108】

典型的な3'及び／または5'UTR配列は、安定である(例えば、グロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路酵素)mRNA分子から得ることが可能であり、センスmRNA分子の安定性を増加する。例えば、5'UTR配列

は、CMV前初期1 (IE1) 遺伝子の部分配列、またはそれらの断片を含んでもよく、ヌクレアーゼ耐性の改善、及び／または、ポリヌクレオチドの半減期の改善をする。また、ヒト成長ホルモン (hGH) またはそれらの断片を、ポリヌクレオチド (例えばmRNA) の、3' 端または非翻訳領域へコードする配列の包含も意図され、さらにポリヌクレオチドを安定化させる。一般に、これらの修飾は、これらの無修飾である同等物と比較して、ポリヌクレオチドの安定性及び／または薬物動態的特性 (例えば、半減期) を改善し、そして例えば、in vivoヌクレアーゼ分解に対する当該ポリヌクレオチドの耐性を改善するために行われる修飾も含む。

送達担体

【0109】

本発明によると、mRNAは、むき出しのRNA (パッケージされていない) として、または送達担体によって、CNSへ送達され得る。本明細書で用いる場合、「送達担体」、「転写担体」、「ナノ粒子」、または文法的に等価である、用語は、区別なく用いられる。

【0110】

いくつかの実施形態において、mRNAは、単一の送達担体を介して送達され得る。いくつかの実施形態において、mRNAは、それぞれ異なる組成物である、一種または複数種の送達担体を介して、送達され得る。種々の実施形態によると、好適な送達担体は、ポリエチレンイミン (PEI)、脂質ナノ粒子及びリポソーム、ナノリポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、プロテオリポソーム、天然及び合成的に誘導されたエキソソーム、天然、合成、及び半合成の層状体、ナノ微粒子、カルシウムケイ酸塩蛍光体ナノ粒子、リン酸カルシウムナノ粒子、二酸化ケイ素ナノ粒子、ナノ結晶性微粒子、半導体ナノ粒子、ポリ (D-アルギニン)、ゾル-ゲル、ナノデンドリマー、デンプン系送達システム、ミセル、エマルジョン、ニオソーム、マルチドメインブロックポリマー (ビニルポリマー、ポリプロピルアクリル酸ポリマー、動的ポリ抱合体)、乾燥粉末製剤、プラスミド、ウイルス、リン酸カルシウムヌクレオチド、アプタマー、ペプチド及び、そのほかのベクトルタグなどのポリマー系キャリアを含むが、限定されない。

リポソーム送達担体

【0111】

いくつかの実施形態において、好適な送達担体は、例えば、脂質ナノ粒子などのリポソーム送達担体である。本明細書で用いる場合、脂質ナノ粒子などのリポソーム送達担体は、通常、一種または複数種の2分子膜によって外側の培地から隔離された内側の水のある部分を有する、極微の小胞として特徴づけられる。リポソームの2分子膜は、概して、空間的に分離された、親水性及び疎水性の部位を含む、合成のまたは天然由来の脂質などの両親媒性分子によって形成される (Lasica, Trends Biotechnol., 16:307-321, 1998)。概して、本発明において好適なリポソーム送達担体 (例えば、脂質ナノ粒子またはリポソーム) は、一種または複数種の異なる脂質及び／またはポリマーを組み合わせることで、形成される。いくつかの実施形態において、リポソーム送達担体 (例えば脂質ナノ粒子または、リポソーム) は、一種または複数種の陽イオン性脂質、一種または複数種の非陽イオン性／ヘルパー脂質、一種または複数種のコレステロール系脂質、及び／または一種または複数種のPEG化された脂質を含む。

陽イオン性脂質

【0112】

いくつかの実施形態において、好適な送達担体は、陽イオン性脂質を含む。本明細書で用いる場合、「陽イオン性脂質」という表現は、生理学的pHなどの選択されたpHに正味の正電荷を有する、任意である多数の脂質種を指す。特に、滴定できる、またはpH滴定ができる陽イオン性脂質として知られる、一部の陽イオン性脂質は、mRNAの送達に特に有効である。種々の陽イオン性 (例えば、滴定ができる) 脂質が、文献に記載されており、その多くは、市販されている。本発明の組成物及び方法で用いる、特に好適な陽イオン性脂質は、WO2010/053572 (そして特にCI2-200は、段落[002

10

20

30

40

50

25]に記載されている)、及びWO2012/170930に記載されており、その両方が、参照することにより、組み込まれる。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質である、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N-トリメチルアンモニウム塩化物、または「DOTMA」が用いられる(Feigner et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987)、US4, 897, 355)。DOTMAは、単独で組み立てられるか、または中性脂質、ジオレオイルフォスファチジル-エタノールアミン、もしくは「DOPE」、または他の陽イオン性もしくは非陽イオン性脂質をリポソーム転写担体もしくは脂質ナノ粒子へ結合され得る、そして当該リポソームは、標的細胞への核酸の送達を向上させるために用いられ得る。他の好適な陽イオン性脂質には、例えば、5-カルボキシスベリミルグリシンジオクタデシルアミド、または、「DOGS」、2,3-ジオレオイルオキシ-N-[2(スベルミン-カルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパニウム、または、「DOSPA」(Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989)及び、US5, 171, 678、US5, 334, 761)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン、または「DODAP」、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン、または「DOTAP」を含む。意図する陽イオン性脂質は、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン、もしくは「DSDMA」、1,2-ジオレオイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン、もしくは「DODMA」、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン、もしくは「DLinDMA」、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン、もしくは「DLenDMA」、N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロライド、もしくは「DODAC」、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド、もしくは「DDAB」、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、もしくは「DMRIE」、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(シス,シス,-9,12-オクタデカジエノキシ)プロパン、もしくは「CLinDMA」、2-[5'-(コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-1-(シス,シス-9',1'-2'-オクタデカジエノキシ)プロパン、もしくは「CpLinDMA」、N,N-ジメチル-3,4-ジオレオイルオキシベンジルアミン、もしくは「DMOBA」、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン、もしくは「DOcarbDAP」、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン、もしくは「DLinDAP」、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン、もしくは「DLincarbDAP」、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン、もしくは「DLinCDAP」、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン、もしくは「DLin-DMA」、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン、もしくは「DLIN-K-XTC2-DMA」、及び2-(2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12,ジエン-1-イル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)-N,N-ジメチルエタンアミン(DLIN-KC2-DMA))(WO2010/042877、Semple et al., Nature Biotech. 28:172-176 (2010)を参照のこと)、またはそれらの混合物も含む(Heyes, J., et al., J Controlled Release 107:276-287 (2005)、Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8):1003-1007 (2005)、PCT Publication WO2005/121348A1)。

【0113】

いくつかの実施形態において、このような組成物中に存在する、一種または複数種の陽イオン性脂質は、XTC(2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-1-[1,3]-ジオキソラン)、MC3((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンター

10

20

30

40

50

6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート)、ALNY-100((3aR, 5s, 6aS)-N, N-ジメチル-2, 2-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1, 3]ジオキソール-5-アミン)、NC98-5(4, 7, 13-トリス(3-オキソ-3-(ウンデシルアミノ)プロピル)-N1, N16-ジウデシル-4, 7, 10, 13-テトラアザヘキサデカン-1, 16-ジアミド)、DODAP(1, 2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン)、HGT4003(WO2012/170889、この教示は、その全体が明細書に参照として組み込まれる)、ICE(WO2011/068810、この教示は、その全体が明細書に参照として組み込まれる)から選択される。

10

【0114】

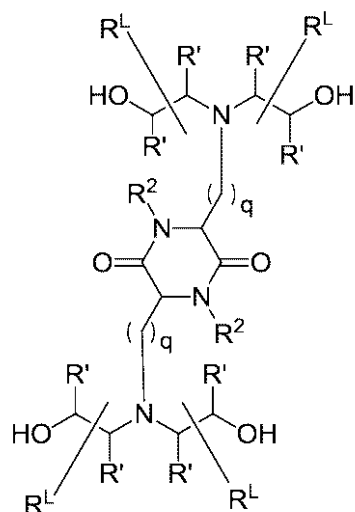
特定の実施形態においては、本発明の組成物及び方法は、2012年3月29日に出願された、US61/617, 468(本明細書に参照として組み込まれる)に記載されている、イオン性陽イオン性脂質、例えば、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-yl)テトラコサ-15, 18-ジエン-1-アミン(HGT5000)、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-4, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5001)、及び(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-yl)テトラコサ-5, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5002)などを含む、脂質ナノ粒子を用いる。

20

【0115】

いくつかの実施形態において、提供されるリボソームは、WO2013063468及び、本出願と同日同時に、アメリカで仮出願された「Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA」で記載された陽イオン性脂質を含み、その両方が参照することにより組み込まれる。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質は、式I-c1-aの化合物を含み、

【化5】



30

I - c 1 - a、

40

または、薬学的に受容可能なそれらの塩であり、式中、各 R^2 は、独立に水素または C_{1-3} のアルキル基であり、各 q は、独立に2~6であり、各 R' は、独立に水素または C_{1-3} のアルキル基であり、かつ各 R^L は独立に C_{8-12} のアルキル基である。

【0116】

いくつかの実施形態において、各 R^2 は、独立に、水素、メチル、またはエチルである。

50

いくつかの実施形態において、各 R^2 は、独立に水素またはメチルである。いくつかの実施形態において、各 R^2 は水素である。

【0117】

いくつかの実施形態において、各 q は、独立に 3～6 である。いくつかの実施形態において、各 q は、独立に 3～5 である。いくつかの実施形態において、各 q は 4 である。

【0118】

いくつかの実施形態において、各 R' は、独立に水素、メチル、またはエチルである。いくつかの実施形態において、各 R' は、独立に水素、またはメチルである。いくつかの実施形態において、各 R' は、独立に水素である。

【0119】

いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に C_{8-12} アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に $n-C_{8-12}$ アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に C_{9-11} アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に $n-C_{9-11}$ アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に C_{10} アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に $n-C_{10}$ アルキルである。

【0120】

いくつかの実施形態において、各 R^2 は、独立に水素、またはメチルであり、各 q は独立に 3～5 であり、各 R' は、独立に水素またはメチルであり、かつ各 R^L は、独立に C_{8-12} アルキルである。

【0121】

いくつかの実施形態において、各 R^2 は、水素であり、各 q は独立に 3～5 であり、各 R' は、水素であり、かつ各 R^L は、独立に C_{8-12} アルキルである。

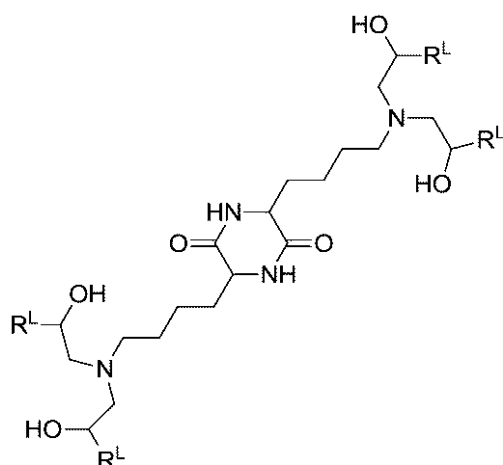
【0122】

いくつかの実施形態において、各 R^2 は、水素であり、各 q は 4 であり、各 R' は、水素であり、かつ各 R^L は、独立に C_{8-12} アルキルである。

【0123】

いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質は、式 I-g の化合物を含み、

【化6】



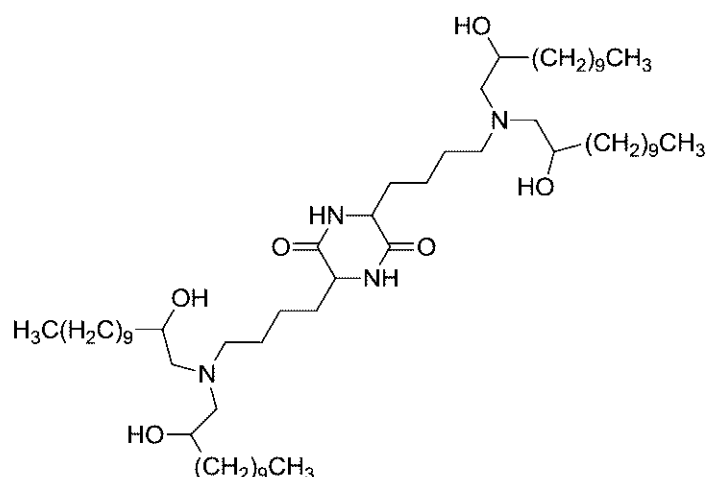
I - g、

または、それらの薬学的に受容可能な塩であり、式中各 R^L は独立に C_{8-12} アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に $n-C_{8-12}$ アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に C_{9-11} アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に $n-C_{9-11}$ アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に C_{10} アルキルである。いくつかの実施形態において、各 R^L は、独立に $n-C_{10}$ アルキルである。

【0124】

特定の実施形態において、提供されるリポソームは、陽イオン性脂質 c K K - E 1 2、または (3, 6-ビス(4-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)ブチル)ピペラジーン-2, 5-ジオン)を含む。c K K - E 1 2の構造を以下に示す。

【化7】



10

【0125】

いくつかの実施形態において、本発明における好適な脂質ナノ粒子は、次に述べる陽イオン性脂質のうち、少なくとも1つを含む： C 1 2 - 2 0 0、D L i n - K C 2 - D M A、c K K - E 1 2、R e - 1、D O D M A、D O D A P、H G T 4 0 0 3、I C E、X T C、D S P C、M C 3、H G T 5 0 0 0、または H G T 5 0 0 1。

20

【0126】

いくつかの実施形態において、リポソーム内の陽イオン性脂質の割合は、モル比で、約10%より大きくても、約20%より大きくても、約30%より大きくても、約40%より大きくても、約50%より大きくても、約60%より大きくても、または約70%より大きくても、よい。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質は、モル比で、リポソームの、約30~50% (例えば、約30~45%、約30~40%、約35~50%、約35~45%または、約35~40%) を構成する。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質は、モル比で、リポソームの、約30%、約35%、約40%、約45%、または約50%を構成する。

30

非陽イオン性／ヘルパー脂質

【0127】

いくつかの実施形態において、提供されるリポソームは、一種または複数種の非陽イオン性(ヘルパー)脂質を含む。本明細書で用いる場合、「非陽イオン性脂質」という表現は、任意の中性、双性イオン、または陰イオン性脂質を指す。本明細書で用いる場合、「陰イオン性脂質」は、生理学的pHなどの選択されたHに正味の負電荷を輸送する、任意である多数の脂質種を指す。いくつかの実施形態において、非陽イオン性脂質は、中性脂質であり、すなわち、当該組成物が組み立てられたり、及び／または投与されたりする条件下で、正味の電荷を運ばない脂質である。非陽イオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(D S P C)、ジオレオイルホスファチジルコリン(D O P C)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(D P P C)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(D O P G)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(D P P G)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(D O P E)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(P O P C)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン(P O P E)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシラート(D O P E - m a l)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(D M P E)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(D S P E)、16-O-モ

40

50

ノメチルポリエチレン、16-オージメチルポリエチレン、18-1-トランスポリエチレン、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)、またはそれらの混合物を含むが、限定されない。

【0128】

いくつかの実施形態において、好適な非陽イオン性(ヘルパー)脂質は、一種または複数種のホスファチジル脂質、例えばホスファチジル化合物(例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルエタノールアミン)を含む。

【0129】

いくつかの実施形態において、好適な非陽イオン性(ヘルパー)脂質は、一種または複数種のスフィンゴ脂質、例えば、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴミエリン、セレブロシド、及びガングリオシドを含む。

【0130】

いくつかの実施形態において、非陽イオン性(ヘルパー)脂質は、モル比で、リポソーム中に存在する全脂質の約5%~約90%(例えば、約10~80%、10~70%、10~60%、10~50%、10~40%、10~30%、または10~20%)を構成しうる。いくつかの実施形態において、リポソーム中の非陽イオン性(ヘルパー)脂質の割合は、モル比で、約5%より大きくても、約10%より大きくても、約15%より大きくても、約20%より大きくても、約25%より大きくても、約30%より大きくても、約35%より大きくても、または約40%より大きくてもよい。

コレステロール系脂質

【0131】

いくつかの実施形態において、提供されるリポソームは、一種または複数種のコレステロール系脂質を含む。例えば、好適なコレステロール系陽イオン性脂質は、例えば、コレステロール、PEG化されたコレステロール、DC-CHOi(N,N-ジメチル-N-エチルカルボキサミドコレステロール)、1,4-ビス(3-N-オレイルアミノ-プロピル)ピペラジン(Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. Bio Techniques 23, 139 (1997)、US 5,744,335)、またはICEを含む。いくつかの実施形態において、コレステロール系脂質は、モル比で、リポソーム中に存在する全脂質に対して、約2%~約30%、または約5%~20%を構成し得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子中のコレステロール系脂質の割合は、モル比で5%より多くても、10%より多くても、20%より多くても、30%より多くても、または40%より多くてもよい。

PEG化された脂質

【0132】

いくつかの実施形態において、提供される脂質ナノ粒子は、一種または複数種のPEG化された脂質を含む。例えば、ポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質及び、N-オクタノイル-スフィンゴシン-1-[サクシニル(メトキシポリエチレングリコール)-2000](C8PEG-2000セラミド)を含む、誘導体化されたセラミド(PEG-CER)などの誘導体化された脂質の使用は、一種または複数種の陽イオン性脂質、及びいくつかの実施形態においては、他の脂質と混合物により本発明によって意図される。いくつかの実施形態において、好適なPEG化された脂質は、短いアシル鎖(例えば、C₁₄またはC₁₈)を有する、PEG-セラミドを含む。いくつかの実施形態において、PEG化された脂質DSPE-PEG-マレイミド-レクチンが、用いられ得る。他の意図される、PEG-修飾脂質は、C₆~C₂₀のアルキル鎖を有する脂質に共有結合をした、5kDa以上の長さのポリエチレングリコール鎖を含むが、限定されない。特定の理論に縛られることを望むものではないが、これは、PEG化された脂質の付加が、複雑な凝集を防ぎ、そして標的細胞へmRNAを封入したリポソームの送達を促進して、循環寿命を増加しえることが意図される。

10

20

30

40

50

【0133】

いくつかの実施形態において、PEG-修飾リン脂質及び／または、誘導体化された脂質は、モル比で、リポソーム中に存在する全脂質に対して、約0%～約20%、約0%～約15%、約0%～約10%、約1%～約10%、約1%～約8%、約1%～約6%、約1%～約5%、約2%～約10%、約4%～約10%より構成し得る。いくつかの実施形態において、PEG-修飾リン脂質及び／または、誘導体化された脂質の割合は、モル比で、リポソーム中に存在する全脂質に対して、約20%、約15%、約10%、約9%、約8%、約7%、約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%以下であり得る。いくつかの実施形態において、PEG-修飾リン脂質及び／または、誘導体化された脂質の割合は、モル比で、リポソーム中に存在する全脂質に対して、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、または、約20%以上であり得る。

10

ポリマー

【0134】

いくつかの実施形態において、好適な送達担体は、担体としてポリマーを用いて、単独で、または本明細書に記載されている種々の脂質を含む、他の担体と組み合わせることで、組み立てられる。従って、いくつかの実施形態において、リポソーム送達担体は、本明細書で用いられる場合、ナノ粒子を含むポリマーも包含する。好適なポリマーは、例えば、ポリアクリレート、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリラクチド、ポリラクチド-ポリグリコリド共重合体、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギン酸塩、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、プロタミン、PEG化プロタミン、PLL、PEG化されたPLL及びポリエチレンイミン(PEI)を含み得る。PEIが存在する場合、それは、10～40kDaの範囲の分子量である、直鎖または分枝PEI、例えば、25kDa分枝PEI(シグマ社408727番)であってもよい。

20

【0135】

種々の実施形態において、好適な送達担体(例えば、脂質ナノ粒子)は、本明細書に記載されている、一種または複数種の脂質及び／またはポリマー構成要素を組み合わせる事で、調製される。例えば、脂質ナノ粒子は、C12-200、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMGPEG;またはC12-200、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;またはcKK-E12、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;またはcKK-E12、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;またはHGT5001、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;またはHGT4003、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;またはDLinKC2DMA、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K;またはICE、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K;またはDODMA、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K;またはDODMA、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、及びDMG-PEG2K;またはRe-1、DOPE、コレステロール、DMG-PEG2K;またはcKK-EE12、DOPE、コレステロール、DMG-PEG2K及び／またはDSPE-PEG-マイレミド-レクチンの混合物で調製され得る。

30

40

【0136】

種々の実施形態において、陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、コレステロール、及び／またはPEG-修飾脂質は、種々な相対的なモル比で、組み合わせられ得る。例えば、陽イオン性脂質(例えば、cKK-E12、C12-200など)の、非陽イオン性脂質(例えば、DOPE、スフィンゴミエリンなど)と、コレステロール系脂質(例えば、コレステロール)と、PEG化された脂質(例えば、DMG-PEG2K)とに対する割合は、それぞれ約30～60:25～35:20～30:1～15の間であってもよい。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質(例えば、cKK-E12、C12-200など)の、非陽イオン性脂質(例えば、DOPE、スフィンゴミエリンなど)と、コレステロール系脂質(例えば、コレステロール)と、PEG化された脂質(例えば、DMG-PEG

50

G 2 K) とに対する割合は、それぞれおよそ 40 : 30 : 20 : 10 である。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0 など）の、非陽イオン性脂質（例えば、D O P E、スフィンゴミエリンなど）と、コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）と、P E G 化された脂質（例えば、D M G - P E G 2 K）とに対する割合は、それぞれおよそ 40 : 30 : 25 : 5 である。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0 など）の、非陽イオン性脂質（例えば、D O P E、スフィンゴミエリンなど）と、コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）と、P E G 化された脂質（例えば、D M G - P E G 2 K）とに対する割合は、それぞれおよそ 40 : 32 : 25 : 3 である。いくつかの実施形態において、陽イオン性脂質（例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0 など）の、非陽イオン性脂質（例えば、D O P E、スフィンゴミエリンなど）と、コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）と、P E G 化された脂質（例えば、D M G - P E G 2 K）とに対する割合は、それぞれおよそ 50 : 25 : 20 : 5 である。

脂質ナノ粒子の調製

【0137】

本発明で用いる、脂質ナノ粒子などの送達担体は、現在当技術分野で周知の種々の技術を用いて調製され得る。多重層リポソーム (M L V) は、従来技術によって調製され得る。例えば、適切な溶媒で脂質を溶解させて、好適なコンテナまたは容器の内壁に選択した脂質を沈着させた後、当該溶媒を蒸発させるか、または、噴霧乾燥させることで、容器の内側に薄膜を残存させる。それから、水相をボルテックスしたまま当該容器に加えて、M L V を形成する。次いで、単層リポソーム (U L V) は、多重層リポソームの、均質化、超音波処理、または押し出し成形によって形成され得る。さらに、単層リポソームは、洗剤除去技術によって形成され得る。

【0138】

この発明の特定の実施形態において、本発明の組成物は、転写担体を含み、そこにおいて m R N A は、転写担体の両表面に関連し、同じ転写担体の中で封入される。例えば、本発明の組成物の調製をする間に、陽イオン性脂質は、静電相互作用を介して m R N A と関連され得る。

【0139】

リポソームの 2 分子膜は、両親媒性ポリマー及び表面活性物質（例えば、ポリマーソーム、ニオソーム、など）によっても形成され得る。リポソームへの、所望の m R N A の結合工程は、しばしば「ローディング」という。典型的な方法は、L a s i c, e t a l., F E B S L e t t., 312:255-258, 1992 で記載されており、ここに参照することにより組み込まれる。リポソームが組み込まれた核酸は、リポソームの 2 分子膜内のリポソーム内部空間に、完全にまたは部分的に位置してもよく、またはリポソーム膜の外部表面と結合してもよい。リポソームへの核酸の取り込みは、ここでは、「封入」ともいい、そこにおいて、核酸はリポソームの内部空間内に完全に含まれている。リポソームなどの転写担体へ m R N A を取り込む目的は、核酸及び／もしくは系、または、核酸の速い分泌を引き起こすレセプターを劣化させるような酵素もしくは化学物質を含む環境から、しばしば核酸を守るためである。従って、いくつかの実施形態において、好適な送達担体は、そこに含まれる m R N A の安定性を向上することができ、及び／または、標的 C N S 細胞もしくは生物組織への m R N A 送達を促進する。

【0140】

本発明による好適なリポソーム送達担体は、種々の大きさで作成されてもよい。いくつかの実施形態において、リポソームの大きさは、リポソーム粒子の最も大きい直径の長さで決める。いくつかの実施形態において、好適なリポソーム送達担体は、約 250 nm 以下（例えば、約 225 nm、200 nm、175 nm、150 nm、125 nm、100 nm、90 nm、80 nm、70 nm、60 nm、50 nm、または 40 nm 以下）の大きさを有する。いくつかの実施形態において、好適なリポソーム送達担体は、約 40 ~ 100 nm（例えば、約 40 ~ 90 nm、約 40 ~ 80 nm、約 40 ~ 70 nm、約 40 ~ 6

0 nm、約40～50 nm、約50～100 nm、約50～90 nm、約50～80 nm、約50～70 nm、約50～60 nm、約60～100 nm、約60～90 nm、約60～80 nm、約60～70 nm、約70～100 nm、約70～90 nm、約70～80 nm、約80～100 nm、約80～90 nm、または約90～100 nmの範囲)の範囲の大きさを有する。

【0141】

当技術分野において既知である種々の方法が、リポソーム転写担体の集合のサイジングに利用できる。そのようなサイジング方法の1つが、US 4, 737, 323に記載されており、ここに参照することにより組み込まれる。槽またはプローブのどちらかの超音波処理によって、リポソーム懸濁液を超音波処理することで、所望の小さいULVに至るまで、大きさの減少を進行して、生成することができる。均質化は、大きいリポソームを小さい物へ断片化するためのせん断エネルギーに頼る、別の方法である。典型的な均質化の手順では、MLVが選択したリポソームの大きさになるまで、標準的なエマルジョンホモジナイザーで、再循環される。リポソーム担体の大きさは、Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421-150 (1981)に記載されているように、準弾性光散乱法(QELS)で決定することができ、ここに参照することにより組み込まれる。標準的なリポソームの直径は、形成したリポソームを超音波処理することで、減らすことができる。効率的なリポソーム合成へ導くために、断続的な超音波処理サイクルを、QELS評価と交互に行っても良い。

CNS送達

【0142】

本明細書に記載されているように、mRNAまたは、送達担体を含むmRNA(例えばmRNAがロードされた脂質ナノ粒子)は、CNS送達に好適である。いくつかの実施形態において、mRNAがロードされた脂質ナノ粒子は、実質内、脳内、脳室内大脳(ICV)、髄腔内(例えば、IT-腰椎、IT-大槽)投与、及びCNS及び/またはCSFへ直接もしくは間接注射する任意の他の技術及び経路を含む、種々の技術及び経路によって、CNSへ送達され得るが、これらに限定されない。

髄腔内送達

【0143】

いくつかの実施形態において、mRNAがロードされた脂質ナノ粒子は、治療に必要な検体の脳脊髄液(CSF)へ注射されることでCNSへ送達される。いくつかの実施形態において、脊髄内投与は、mRNA、またはmRNAがロードされたナノ粒子をCSFへ注射するために用いられる。本明細書で用いる場合、脊髄内投与(脊髄内注射ともいう)は、脊柱管(脊髄を取り囲む髄腔内空隙)への注射を指す。穿頭孔、大槽、または腰椎穿刺などを通した、外側脳室注射を含む種々の技法が用いられてもよいが、これらに限定されない。典型的な方法が、Lazorthes et al. *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143-192、及びOmayya et al., *Cancer Drug Delivery*, 1: 169-179に記載されており、これらの内容が、参照することにより組み込まれる。

【0144】

本発明によると、mRNAまたはmRNAがロードされたナノ粒子は、脊柱管を取り囲む任意の領域へ注入され得る。いくつかの実施形態において、mRNAもしくはmRNAがロードされたナノ粒子は、腰部領域、もしくは大槽へ注射されるか、または脳室空間に脳室内注射される。本明細書で用いる場合、「腰部領域」または「腰椎域」という用語は、第三及び第四腰椎(背中下部)の間の区域、さらに包括的には、脊椎のL2～S1領域を指す。概して、腰部領域または腰椎域を介した髄腔内注射は、「腰椎IT送達」または「腰椎IT投与」ともいう。「大槽」という用語は、頭蓋骨と脊椎上部との間の開口部を通した、小脳の周囲及び下の空隙を指す。概して、大槽を介した髄腔内注射は、「大槽送達」ともいう。「脳室」という用語は、脊髄の中心管と連続した脳内の腔を指す。概して、

脳室腔を介した注射を、脳室内（ＩＣＶ）送達という。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、本発明による「髄腔内投与」または「髄腔内送達」は、例えば、第三及び第四腰椎（背中下部）間、さらに包括的には、脊椎のＬ２～Ｓ１領域に送達される腰椎ＩＴ投与または送達を指す。

【０１４６】

いくつかの実施形態において、脊髄内投与は、腰椎穿刺（すなわち緩徐ボラス）かポート・カテーテル送達系（すなわち、注入または、ボラス）のどちらかで行われ得る。いくつかの実施形態において、カテーテルは腰椎の薄板間に挿入され、先端は、包膜空隙に所望のレベル（一般的にＬ３～Ｌ４）に突き通される。

投与

【０１４７】

本発明は、本明細書中に記載されるｍＲＮＡまたはｍＲＮＡがロードされたナノ粒子の治療的有効量の単回ならびに多数回投与を意図する。ｍＲＮＡまたはｍＲＮＡがロードされたナノ粒子は、検体のＣＮＳ疾患または状態の、性質、重症度及び程度によって、一定間隔で投与され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡまたはｍＲＮＡがロードされたナノ粒子の治療的有効量は、一定間隔で（例えば、年１回、６カ月に１回、５カ月に１回、３カ月に１回、隔月（２カ月に１回）、毎月（１カ月に１回）、隔週（２週間に１回）、毎週、毎日または連続的に）、定期的に髄腔内投与され得る。

【０１４８】

いくつかの実施形態において、ＣＮＳ疾患は、周辺症状に関連する。従って、いくつかの実施形態において、脊髄内投与は、他の投与経路（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、腸管外、経皮的、または経粘膜的（例えば、経口的または経鼻的に）に）と共同で用いられ得る。

【０１４９】

本明細書で用いる場合、「治療的有効量」という用語は、主として、本発明の薬学的組成物中に含有されるｍＲＮＡの総量に基づいて確定される。一般に、治療的有効量は、検体に対して意義のある利益（例えば、根元的疾患または症状を治療し、調整し、治癒し、予防し、及び／または寛解させること）を達成するのに十分である。例えば、治療的有効量は、所望の治療的及び／または予防的作用を達成するのに十分な量であり得る。一般に、それらを必要とする検体に投与されるｍＲＮＡの量は、検体の特徴に依存するであろう。このような特徴には、検体の症状、疾患の重症度、全身の健康状態、年齢、性別及び体重が含まれる。当業者は、これらとその他の関連因子によって、適切な投与量を容易に決定し得る。さらに、最適な投与量範囲を決めるために、客観的及び主観的試験が任意に用いられ得る。

【０１５０】

いくつかの実施形態において、治療的有効量は体重１ｋｇ当たり約０．００１ｍｇ～１０ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．００５ｍｇ～約１０ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約１０ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～９ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約８ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約７ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約６ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約５ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約４ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約３ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約２ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約１ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約０．５ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．１ｍｇ～約１０ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．１ｍｇ～約５ｍｇまで、体重１ｋｇ当たり約０．５ｍｇ～約１０ｍｇまで、または体重１ｋｇ当たり約０．５ｍｇ～約５ｍｇの範囲である。

【０１５１】

いくつかの実施形態において、治療的有効量は、脳重量１ｋｇ当たり約０．００１ｍｇ～１００ｍｇまで、脳重量１ｋｇ当たり約０．００１ｍｇ～９０ｍｇまで、脳重量１ｋｇ当

10

20

30

40

50

たり約0.001mg～80mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～70mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～60mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～50mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～40mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～30mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～20mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～10mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～5mgまで、脳重量1kg当たり約0.001mg～1mgまで、脳重量1kg当たり約0.01mg～100mgまで、脳重量1kg当たり約0.05mg～100mgまで、脳重量1kg当たり約0.1mg～100mgまで、または脳重量1kg当たり約0.5mg～100mgまで、の範囲である。

【0152】

脳重量及び体重は相関し得ることは、当業者は理解し得るだろう（Dekaban A S. “Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights,” Ann Neurol 1978; 4:345-56）。従って、いくつかの実施形態において、投与量は、表5に示されるように換算され得る。

【表5】

男性の脳重量、体重及び年齢の間の相互関係		
年齢（年）	脳重量（kg）	体重（kg）
3（31～43カ月）	1.27	15.55
4～5	1.30	19.46

脳内及び／または脊髄中のニューロン及び他の細胞型への送達

【0153】

本発明による本方法が、脳内及び／または脊髄中の種々のニューロン及び他の細胞型内で、mRNAの送達をもたらす。いくつかの実施形態において、治療用タンパク質をコードするmRNAは、ニューロン、神経膠細胞、血管周囲の細胞、及び／または髄膜の細胞を含むが、これに限定されない脳内の種々の細胞へ送達される。特に、本発明による本方法は、CNS疾患及び／または欠陥に影響を受ける種々のニューロン及びその他の細胞型内、または、CNS疾患に関連する欠損したタンパク質が、通常発現される種々のニューロン及び他の細胞型内でmRNAの送達をもたらす。いくつかの実施形態において、本発明による本方法は、例えばリソソーム蓄積症を患っているか、または影響を受けやすい患者が生物組織の細胞のリソソーム中に蓄えている、検知可能もしくは異常に多い量の酵素基質が存在するCNS内の種々のニューロン及び他の細胞型においてmRNA送達をもたらすものである。いくつかの実施形態において、本発明による本方法は疾患に関連する病理、症状または特徴を示すような種々のニューロン及びその他の細胞型で、mRNAの送達をもたらす。例えばmRNAは、精神変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、及びハンチントン病）に関連するそれらのニューロンもしくは非神経細胞、または運動ニューロン疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、原発性側索硬化症（PLS）、偽性球麻痺、遺伝性痙攣性対麻痺、進行性筋萎縮症（PMA）、進行性球麻痺（PBP）、遠位遺伝性運動ニューロパチー、及び脊髄性筋萎縮症）と関連のある運動ニューロン、などのアポトーシスを悪化させたり、退化させたり、経たりするニューロンまたはその他の細胞型へ送達され得る。

【0154】

いくつかの実施形態において、mRNAは脳内に位置しているニューロン及び／または非ニューロン細胞へ送達される。いくつかの実施形態において、mRNAは脊髄内に位置しているニューロン及び／または非ニューロン細胞へ送達される。いくつかの実施形態において、mRNAは、運動ニューロンへ送達される。いくつかの実施形態において、mRNAは、上位運動ニューロン及び／または下位運動ニューロンへ送達される。いくつかの実

施形態において、運動ニューロンは、脊髄の脊髄前角及び／または背根神経節の中に位置している。

【0155】

いくつかの実施形態において、mRNAは脳内及び／または脊髄中の、種々のニューロン及び他の細胞型内で、細胞内に送達される。いくつかの実施形態において、mRNAはニューロンの軸索に送達される。いくつかの実施形態において、本発明によるmRNA送達は、ニューロンのサイトゾルの中で、mRNAによってコードされたタンパク質の細胞内発現をもたらす。いくつかの実施形態において、本発明によるmRNA送達は、ニューロンの細胞内コンパートメント、例えばリソソーム、ミトコンドリア、膜内外、などの中のmRNAによってコードされたタンパク質の、細胞内発現をもたらす。いくつかの実施形態において、本発明によるmRNA送達は、mRNA及びニューロンにコードされたタンパク質の細胞内発現及びニューロンから細胞外への分泌をもたらす。

10

【0156】

脳内及び／または脊髄中の、さらに例示的なニューロン及びその他の細胞型は、以下に例示される。

脳

【0157】

概して、本発明による本方法は、脳の種々の領域におけるニューロン及びその他の細胞型へ、mRNA及びコードされたタンパク質を送達するために用いられ得る。概して、脳は、別々の領域、層、及び生物細胞に分けられ得る。例えば、髄膜の生物組織は、脳を含む中枢神経系を包囲する膜系である。髄膜は、硬膜、クモ膜、及び軟膜を含む3つの層を含有する。概して、髄膜及び脳脊髄液の第1機能は、中枢神経系を保護することである。いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、髄膜の一種または複数種の層内のニューロンまたは非神経細胞へ送達される。

20

【0158】

脳は、大脳、小脳、及び脳幹を含む、3つの区分を有する。大部分の他の脳構造の上に位置している、大脳半球は、皮質で覆われている。大脳の下には脳幹が横たわり、この脳幹は莖に似ており、その上に大脳が取り付けられている。脳の後部、大脳の下及び脳幹の背後には、小脳がある。

【0159】

脳の正中線近く及び中脳の上に位置している間脳は、視床、視床後部、視床下部、視床上部、腹側視床及び視蓋腹部を含有する。中脳(mesencephalon)は、中脳(midbrain)とも呼ばれ、視蓋、被蓋、中脳水道、及び、大脳脚、赤核及び第3脳神経核を含有する。中脳は、視覚、聴覚、運動制御、睡眠／覚醒、警戒及び温度調節に関連する。

30

【0160】

いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、小脳の一種または複数種の生物組織内のニューロン及び／または非神経細胞へ送達される。特定の実施形態においては、標的である小脳の一種または複数種の生物組織が、分子層の生物組織、プルキニエ細胞層の生物組織、顆粒細胞層の生物組織、小脳脚、及びそれらの組合せから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、プルキニエ細胞層の生物組織、顆粒細胞層の生物組織、深部小脳白質の生物組織(例えば、顆粒細胞層に対して深部)、及び深部小脳核の生物組織を含むが、それらに限定されない小脳の一種または複数種の深部組織へ送達される。

40

【0161】

いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、脳幹の一種または複数種の生物組織に送達される。

【0162】

いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、灰白質、白質、脳室周囲域、軟膜ーくも膜、髄膜、新皮質、小脳、大脳皮質の深部組織、分子層、尾状核

50

／被殻領域、中脳、脳橋または延髄の深部領域、及びそれらの組合せを含むが、これらに限定されない、種々の脳組織へ送達される。いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、深部白質のオリゴデンドロサイトへ送達される。

脊髄

【0163】

いくつかの実施形態において、本発明による本方法は、脊髄の種々の領域におけるニューロン及びその他の細胞型へ、mRNA、及びコードされたタンパク質を送達するために用いられ得る。概して、脊髄の領域または生物組織は、その生物組織の深さに基づいて、特徴づけることができる。例えば、脊髄組織は、表面または浅在組織、中深部組織、及び／または深部組織として特徴づけることができる。

10

【0164】

いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、脊髄の一種または複数種の表面または浅在組織に送達される。いくつかの実施形態において、脊髄の標的表面または浅在組織は、軟膜及び／または白質路を含有する。

【0165】

いくつかの実施形態において、mRNA及びコードされたタンパク質は、脊髄の一種または複数種の深部組織に送達される。いくつかの実施形態において、脊髄の標的深部組織は、脊髄灰白質及び／または上衣細胞を含有する。

【0166】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、さらに十分に理解されるであろう。しかしながら、それらは本発明の範囲を限定するよう意図されるべきでない。全ての文献引用が、参照によって組み込まれる。

20

【実施例】

【0167】

実施例1

製剤及びメッセンジャーRNA物質

本実施例は、CNSにおけるmRNAの効果的な送達及び発現のための典型的なリソソーム製剤を提供する。概して、本明細書に記載されている製剤は、種々の核酸系物質を被包するように設計された、一種または複数種の陽イオン性脂質、中性脂質、コレステロール及び／またはPEG化された脂質の使用比率を変えた、多成分性脂質混合物を含有する。

30

メッセンジャーRNA物質

【0168】

コドン最適化ヒト生存運動ニューロン-1 (hSMN-1) メッセンジャーRNAは、遺伝子をコードしたプラスミドDNAテンプレートから *in vitro* 転写によって合成され、続いて、5' キャップ構造 (キャップ1) (Fechter, P.; Brownlee, G. G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249)、及び、ゲル電気泳動で決定した長さが約250ヌクレオチドの3' ポリ (A) テールを付加した。各mRNA生成物に存在する5' 及び3' 非翻訳領域は、X及びYでそれぞれ表され、述べる通りに定義される。

40

生存運動ニューロン (hSMN-1) mRNA

X - 配列番号3 - Y

5' 及び3' UTR 配列

X (5' UTR 配列) =

GGACAGAUCCGCCUGGAGACGCCAUCACGCUGUUUUGAC
CUCCAUAAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCC
GGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCGUGCCAAGAG
UGACUCACCGUCCUUGACACG (配列番号7)

Y (3' UTR 配列) =

50

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCU
GGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUC
CUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU (配列番号 8)

または

GGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUG
GGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUCC
UAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU (配列番号 9)

【0169】

例えば、コドン最適化ヒト生存運動ニューロン-1 (hSMN-1) メッセンジャーRNAは、以下を含み、

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGAC
CUCCAUAAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCC
GGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCGUGCCAAGAG
UGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGCCAUGAGCAGCGGAG
GCAGCGGCGGAGGAGUGCCCGAGCAGGAGGACAGCGUGCU
GUUCAGGAGAGGGCACCGGCCAGAGCGAUGACAGCGAUUAUC
UGGGACGAUAACCGCUCUGAUCAAGGCCUACGACAAGGCCG
UGGCCAGCUUCAAGCACGCCUGAAAAACGGCGACAUCUG
CGAGACCAAGCGGCAAGCCCAAGACAAACCCCAAGAGAAAG
CCCGCCAAAGAAGAAUAAGAGCCAGAAAAAGAACACCGCCG
CCAGCCUGCAGCAGUGGAAGGUGGGCGACAAGUGCAGCGC
CAUCUGGAGCGAGGACGGCUGCAUCUACCCCGCCACCAUC
GCCAGCAUCGACUUCAAGAGAGAGACCUGCGUGGUGCGUGU
ACACCGGCUACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCUAGCGGA
CCUGCGUGAGCCCCAUUUGUGAGGUGGCCAAUAACAUCGAA
CAGAACGCCCCAGGAGAACGAGAAUGAAAGCCAGGUGAGCA
CCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAUCCUGGCAACAAGAG
CGACAACAUCAAGCCUAAGUCUGCCCCUUGGAACAGCUUC
CUGCCCCCUCCUCCACCCAUUGCCCGGACCCAGACUGGGAC
CCGGAAAAACUGGCCUGAAGUUCAACGGACCAACUCCCC
UCCACCUCCUCCCCCACCUCAUCUCCUGAGCUGCUGGCUG
CCACCCUUC CCGAGCGGACCCCUAUAUCCCAACACCC
CUCCCAUCUGCCCCGACAGCCUGGACGACGCCGAUGCCCU
GGGCAGCAUGCUGAUCAAGCUGGUACAUGAGCGGCUACCAC
ACAGGAUAUAUAUGGGCUUCAGACAGAACCAAGAGGAGG
GCAGAUUCUCCACUCCUGAACUGACGGGUGGCAUCCCU
GUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGC
CACUCCAGUGCCCAACAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGU
UGCAUCAAGCU (配列番号 10)

または、コドン最適化ヒト生存運動ニューロン-1 (hSMN-1) メッセンジャーRNAは、

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGAC
CUCCAUAAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCC
GGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCGUGCCAAGAG
UGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGCCAUGAGCAGCGGAG
GCAGCGGCGGAGGAGUGCCCGAGCAGGAGGACAGCGUGCU
GUUCAGGAGAGGGCACCGGCCAGAGCGAUGACAGCGAUUAUC
UGGGACGAUAACCGCUCUGAUCAAGGCCUACGACAAGGCCG
UGGCCAGCUUCAAGCACGCCUGAAAAACGGCGACAUCUG
CGAGACCAAGCGGCAAGCCCAAGACAAACCCCAAGAGAAAG

10

20

30

40

50

CCCGCCAAGAAAGAAUAAGAGGCCAGAAAAAGAACACCGCCG
CCAGCCUGCAGCAGUGGAAGGUGGGCGACAAGUGCAGCGC
CAUCUGGAGCGAGGACGGCUGCAUCUACCCCGCCACCAUC
GCCAGCAUCGACUUCAAGAGAGAGACCUGCGUGGUGUGU
ACACCGGCUACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCCUGAGCGA
CCUGCUGAGCCCCAUUUGUGAGGUGGCCAAUAACAUCGAA
CAGAACGCCCCAGGAGAACGAGAAUGAAAGCCAGGUGAGCA
CCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAUCCUGGCAACAAGAG
CGACAACAUCAAGCCUAAGUCUGCCCCUUGGAACAGCUUC
CUGCCCCCUCCUCCACCCAUGCCCCGGACCCAGACUGGGAC
CCGGAAAACCUGGCCUGAAGUUCAACGGACCAACCUC
UCCACCUCUCCUCCCCACCUCAUCUCCUGAGCUGCUGGCUG
CCACCCUUCUCCCCAGCGGACCCCCUAUCAUCCACCA
CUCCCAUCUGCCCCGACAGCCUGGACGACGCCGAUGCCCU
GGGCAGCAUGCUGAUCAGCUGGUACAUGAGCGGCUACAC
ACAGGAUACUACAUGGGCUUCAGACAGAACCAGAAAGGAGG
GCAGAUGCUCCCCACUCCCUGAACUGAGGGUGGCAUCCUG
UGACCCCUCCCCAGUGCCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUU
GCAUCAAAAGCU (配列番号11)を含む。

10

20

典型的な製造手順

【0170】

脂質ナノ粒子 (LNP) は、標準的なエタノール注入法によって形成される (Ponsa, M.; Foradada, M.; Estelrich, J. “Liposomes obtained by the ethanol injection method” Int. J. Pharm. 1993, 95, 51–56)。種々の脂質構成成分に対して、50mg/mlのエタノール原液を調製して、そして−20℃で保管した。下の表5に載せた各典型的な製剤の調製において、示した脂質構成成分をエタノール溶液へ加え、所定の終濃度及びモル比を達成して3mlのエタノール最終量を調製した。別々に、hSMN-1 mRNAの水性緩衝液 (10mMクエン酸/150mM NaCl、pH4.5) を、1mg/ml原液から調製した。脂質溶液を、手作業かシリンジ・ポンプどちらかで、迅速に水性mRNA溶液へ注入し、そして振り混ぜることで最終の20%エタノール懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液を、ろ過して、1倍のPBS (pH7.4) に対して透析して、濃縮して、そして2~8℃の間で保管した。SMN-1 mRNA濃縮液をRibogreen (登録商標) (Invitrogen社) 分析で測定した。mRNAの封入では、0.1%のTriton (登録商標) -X100の存在の有無についてRibogreen分析を実施することで、判断した。粒子の大きさ (動的光散乱法 (DLS)) 及びゼータ電位は、1倍PBS及び1mM KCl溶液のそれぞれで、マルバーンのゼータサイザー装置を用いて、決定した。

30

40

50

【表 6－1】

典型的な脂質ナノ粒子の製剤

製剤	構成成分	脂質のモル比	mRNA の終濃度	ゼータパラメータ
1	C12-200	40：30：2 5：5	2.5mg／ ml	$Z_{ave}=82\text{ nm}$
	DOPE			$Dv_{(50)}=53\text{ nm}$
	コレステロール			$Dv_{(90)}=97\text{ nm}$
	DMG-PEG2K			
	hSMN-1 mRNA			
2	C12-200	40：15：2	1.28mg	$Z_{ave}=90\text{ nm}$

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

	スフィンゴミエリン	0 : 2 0 : 5	／m l	m ; D v (5 0) = 7 5 n m ; D v (9 0) = 1 0 4 n m
	DOPE			
	コレステロール			
	DMG - PEG - 2 K			
	h SMN - 1 mRN A			
3	D L i n - K C 2 - D MA	4 0 : 3 0 : 2 5 : 5	2 . 0 5 m g ／m l	Z a v e = 7 2 n m ; D v (5 0) = 4 8 n m ; D v (9 0) = 8 5 n m
	DOPE			
	コレステロール			
	DMG - PEG - 2 K			
	h SMN - 1 mRN A			
4	c K K - E 1 2	4 0 : 3 0 : 2 5 : 5	1 . 8 5 m g ／m l	Z a v e = 7 1 n m ; D v (5 0) = 4 4 n m ; D v (9 0) = 9 3 n m
	DOPE			
	コレステロール			
	DMG - PEG - 2 K			
	h SMN - 1 mRN A			
5	c K K - E 1 2	4 0 : 3 0 : 2 5 : 5	1 . 8 m g ／m l	Z a v e = 7 2 n m ; D v (5 0) = 4 9 n m ; D v (9 0) = 9 0 n m
	DOPE			
	コレステロール			
	DMG - PEG - 5 K			
	h SMN - 1 mRN A			
6	R e - 1	4 0 : 3 0 : 2 5 : 5	1 . 8 m g ／m l	Z a v e = 8 1 n m ; D v (5 0) = 6 6 n m ; D v (9 0) = 9 7 n m
	DOPE			
	コレステロール			
	DMG - PEG - 5 K			
	h SMN - 1 mRN A			
7	H G T 5 0 0 1	4 0 : 3 0 : 2 5 : 5	1 . 5 m g ／m l	Z a v e = 8 2 n m ; D v (5 0) = 5 3 n m ; D v (9 0) = 9 9 n m
	DOPE			
	コレステロール			
	DMG - PEG - 5 K			
	h SMN - 1 mRN A			
8	I C E	4 0 : 3 0 : 2 5 : 5	1 . 9 6 m g ／m l	Z a v e = 6 3 n m ; D v (5 0) = 4 1
	DOPE			
	コレステロール			

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

	DMG-PEG-5K			nm ;
	hSMN-1 mRNA			Dv (90) = 83 nm
9	HGT4003	40 : 30 : 2 5 : 5	1.5 mg / ml	Zave = 82 nm ;
	DOPE			Dv (50) = 53 nm ;
	コレステロール			Dv (90) = 99 nm
	DMG-PEG-5K			
	hSMN-1 mRNA			
10	DODMA	40 : 30 : 2 5 : 5	1.6 mg / ml	Zave = 78 nm ;
	DOPE			Dv (50) = 49 nm ;
	コレステロール			Dv (90) = 96 nm
	DMG-PEG-5K			
	hSMN-1 mRNA			
11	cKK-EE12	40 : 30 : 2 5 : 2 : 3	1.4 mg / ml	Zave = 95 nm ;
	DOPE			Dv (50) = 72 nm ;
	コレステロール			Dv (90) = 103 nm
	DMG-PEG-2K			
	DSPE-PEG-マレイミド-レクチン			
	hSMN-1 mRNA			
12	C12-200	40 : 30 : 2 5 : 5	1.2 mg / ml	Zave = 74 nm ;
	DOPE			Dv (50) = 50 nm ;
	コレステロール			Dv (90) = 93 nm
	DOG-PEG-2K			
	hSMN-1 mRNA			
13	cKK-EE12	40 : 15 : 2 0 : 20 : 5	1.6 mg / ml	Zave = 74 nm ;
	スフィンゴミエリン			Dv (50) = 41 nm ;
	DOPE			Dv (90) = 90 nm
	コレステロール			
	DMG-PEG-2K			
	hSMN-1 mRNA			

実施例 2

mRNA がロードされたリポソームナノ粒子の脊髄内投与

【0171】

本実施例は、mRNA がロードされたリポソームナノ粒子を髄腔内投与する典型的な方法、及びニューロン内へ送達された mRNA を分析する方法を示す。

【0172】

全ての研究は、各実験の開始時に、約 6 ～ 8 週齢であるラットかマウスどちらかで実施した。実験の開始時に、各動物を吸入によりイソフルランで（1 ～ 3 % で影響）麻酔をした。一度麻酔をすると、各動物は、的確な注射部位（L4 ～ L5、または L5 ～ L6）の体

毛をそり落とした。注射針の挿入に続き、反射的な尾のフリックを、硬膜への穿刺を示すため、そして髄腔内の配置を確認するために用いた。各動物は、表6に載せた、試験製剤の1つについて単一のボラス脊髄内注射を受けた。全ての動物は、注射後24時間で犠牲となり、生理食塩水で灌流された。

分析用臓器組織の単離

【0173】

全ての動物は、全脳及び脊髄を摘出された。脳を長軸方向に切り、一動物につき1つの組織カセットに置いた。全脊髄を70%細胞組織用グレードアルコール溶液へ移す前に、10%中性緩衝ホルマリン(NBF)を入れた15ml管の環境内で、24時間以上72時間以下の間、保管した。各脊髄サンプルを頸部、胸部、そして腰椎部分へ切り込んだ。各脊髄部分を半分に切り、両半分を各部位(頸部、胸部、及び腰椎)について、処理するために、別々のカセットに置いた。三つのカセットを全て、動物ごとに1つのパラフィンブロックへと包埋した。適用できる場合は、脳と脊髄の一部を、急速凍結し、-80℃で保管した。

hSMN-1ウェスタンブロット分析

【0174】

通常のウェスタンブロットの手順に続いて、(A)抗SMN 4F11抗体1:1000希釈、(B)Pierce社製PA5-27309 a-SMN抗体1:1,000希釈、及び(C)LSBio社製C138149 a-SMN抗体1:1,000希釈などの、hSMN-1タンパク質を認識する種々の抗体が用いられる。各実験において、hSMN mRNAの1マイクログラムは、リポフェクタミン2000(登録商標)を用いて、 $\sim 1 \times 10^6$ のBHK-21細胞へ遺伝子導入した。細胞は、OptiMem(登録商標)で処理して、16~18時間遺伝子導入後回収した。細胞可溶化物を回収して、処理して、そして8~16%のトリス・グリシン・ゲルにロードした。このゲルを、PVDF膜を用いて転写し、それぞれ一次抗体で処理した。ヤギ抗マウスHRP抗体を、室温、45分間1:10,000で希釈した二次抗体として用いてその後に洗浄して、測定した。データは、各試験した抗体が未処理のBHK細胞には、交差反応性シグナルが見られないことが示すように、hSMN-1に強いシグナルを示し、そしてヒトSMNに特異的であることを示している(図1)。

in situハイブリダイゼーション(IISH)分析

【0175】

各代表サンプルの生物組織を2つの異なるin situハイブリダイゼーション法を用いて、hSMN-1 mRNAを測定した。第1のアプローチとして、手作業によるin situハイブリダイゼーションをRNAscope(登録商標)(Advanced Cell Diagnostics社)ZZプローブ技術を用いて、実施した。プローブは、ヒトSMNメッセンジャーRNAのコドン最適化配列(配列番号3)に基づいて、作成した。手短に言えば、RNAscope(登録商標)アッセイは、スライドに載せた、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織中の細胞につき単一のRNA分子を可視化するためにデザインされた、in situハイブリダイゼーションアッセイである。埋め込まれた各組織サンプルは、メーカーのプロトコルによって前処理を施して、標的である特異的なhSMN-1 RNAプローブでインキュベートした。hSMN-1プローブは、ヒトSMN-1に特異的であることと、マウスまたはラットのSMN-1には交差反応性がないことを示した。1度結合したあと、hSMN-1プローブは、6周連続した一連の増幅を通して、シグナル増幅分子のカスケードへハイブリダイズした。次いで、当該サンプルをシグナル増幅カセットに特異的なHRP標識プローブで処理して、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)を用いた、色の可視化によりアッセイした。ユビキチンCに特異的なプローブを、陽性対照として用いた。陽性のSMNシグナルを、未処理のもの及び、担体制御の処理をしたラットまたはマウスの組織と比較した。着色したサンプルを、標準的な明視野顕微鏡で見た。

【0176】

10

20

30

40

50

第2のアプローチとして、完全自動化 *in situ* ハイブリダイゼーション分析を *Leica Bond Rx* 検出システムで実施した。プローブは、ヒト SMN メッセンジャー RNA のコドン最適化配列（配列番号 3）に基づいて、作成した。手短に言えば、埋め込まれた各組織サンプルは、メーカーのプロトコルによって前処理を施して、標的である特異的な HRP 標識 hSMN-1 RNA プローブでインキュベートした。ユビキチン C プローブは、陽性対照として用い（図 18）、そして DapB プローブを陰性対照プローブとして用いた（図 17）。アルカリフォスファターゼ染色基質である、ファストレッドを用いてハイブリダイゼーションをアッセイした。

免疫組織化学的分析

【0177】

ヒト SMN-1 mRNA がロードされた脂質ナノ粒子は、脊髄内注射によって、ラットに投与され、組織サンプルを回収し、上に記載した方法により、投与して 24 時間後に処理した。次いで、ラットの脊髄組織サンプルを hSMN-1 タンパク質の発現用にアッセイをした。手短に言えば、パラフィンに包埋した固定組織を、処理して、スライドに載せた。当該スライドを、脱脂して、再水和して、そして、クエン酸緩衝液と圧力鍋を用いて、抗原回復を実施した。種々のブロッキングバッファーを用い、続いて 4F11 抗体を 1:2500 希釈で用いて、一晩の間、4℃にて一次抗体インキュベーションを行った。得られたスライドを、洗浄して、二次抗体ポリマーによって周囲温度でインキュベートし、続いて洗浄し、発色現像した。データは、hSMN-1 mRNA の脊髄内投与わずか 24 時間で、未処理の対照と比較すると、ヒト SMN-1 タンパク質の染色が認められることを示している（図 22）。これは、脊髄組織への hSMN-1 mRNA の送達を証明する、先の知見を裏付けるものである。さらに、このデータは、1 度 hSMN-1 細胞へ送達されると、mRNA は、効率的に hSMN-1 タンパク質を生成するために発現するというを示す。

実施例 3

ニューロン中での mRNA の有効な細胞内送達

【0178】

本実施例で示されるデータは、hSMN-1 mRNA がロードされたリポソーム（脂質またはポリマー系ナノ粒子）の脊髄内投与は、前角細胞及び背根神経節などの細胞に作用し難いものを含む、脳及び脊髄中のニューロンにおいて、mRNA の細胞内送達に成功している、ということを示す。

【0179】

この結果は、脂質ナノ粒子内に封入された mRNA は、脊髄内投与の結果、CNS の種々の細胞組織へと効率的に送達されることができていることを示している。表 6 で開示した 13 の異なる製剤を用いることで、mRNA は、2 つの独立した *in situ* ハイブリダイゼーションアッセイによって証明された様に、脊髄の種々のニューロン（図 2A～14C）の中に効率的に送達されて、内在化した。驚くべきことに、脊柱の生物組織内の深部に位置している、到達が難しい脊髄前角の神経細胞部位にて細胞内 mRNA 送達を実証され、タンパク質として発現された（図 19～22）。マウスまたはラットの SMN-1 において、バックグラウンドは皆無またはほとんど認められず、ヒト SMN-1 プローブに特異的であることを示すものであった（図 15～17）。陽性の SMN シグナルを、未処理、及び担体制御の処理をしたラットまたはマウスの組織と比較した。着色したサンプルを、標準的な明視野顕微鏡で見た。

【0180】

これらのデータは、本明細書に記載されている mRNA 送達手法に基づく、脂質またはナノ粒子が、複雑かつ高密度である脊髄ニューロンの細胞膜をうまく通過すること、及びニューロン内のコードされたタンパク質の生成のために、mRNA のペイロードを送達することが可能であることを示している。本明細書に記載されている mRNA 送達手法によって、前角細胞及び背根神経節などのニューロンを作用し難いそれらの通過も同様に成功したことは、特に驚くべきことである。従って、本明細書で提示したデータは、mRNA 送

達方法に基づく脂質またはポリマーナノ粒子が、CNS疾患の治療のための有望な選択肢であることを示している。特に、本発明は、hSMN mRNAがロードされたナノ粒子が、SMNタンパク質の生成、及び脊髄性筋萎縮症の治療のために、脊髄の運動ニューロンを作用し難いものを含むニューロンへ、効率的に送達され得ることを示している。

実施例 4

脳の灰白質及び白質内のmRNAの有効な細胞内送達

【0181】

本実施例で提示したデータは、hSMN-1 mRNAがロードされたリポソーム（例えば、脂質またはポリマー系ナノ粒子）の脊髄内投与が、白質などの脳内深部に位置する、扱い難い組織を含む、脳内のニューロンにおいて、mRNAの細胞内送達に成功している、ということを示している。

10

【0182】

この研究は、上に記載した方法と技術を用いて、各実験の開始時に、約6～8週齢であるラットで実施された。手短に言えば、実験の開始時に、各動物を吸入によりイソフルランで（1～3%で影響）麻酔した。一度麻酔をすると、各動物について、的確な注射部位（L4～L5、またはL5～L6）の体毛をそり落とした。注射針の挿入に続き、反射的な尾のフリックを、硬膜への穿刺を示すため、そして髄腔内の配置を確認するために用いた。各動物は、表6に載せた1つの試験製剤について単一のボーラス脊髄内注射を受けた。全ての動物は、注射後24時間のうち30分で犠牲となり、生理食塩水で灌流された。実施例4で示したデータが、上の表6の製剤13を用いたmRNA送達の結果を説明している。

20

in situハイブリダイゼーション (ISH) 分析

【0183】

ヒトSMN-1 mRNAがロードされた脂質ナノ粒子を、脊髄内注射によってラットに投与して、組織サンプルを30分で集め、投与から24時間後、上に記載したように、RNA scope（登録商標）（Advanced Cell Diagnostic社）ZZプローブ技術を用いたhSMN-1 mRNAで処理し、アッセイした。埋め込まれた各組織サンプルは、メーカーのプロトコルによって前処理を施して、標的である特異的なhSMN-1 RNAプローブでインキュベートした。データは、hSMN-1 mRNAの脊髄内投与わずか30分で、未処理の対照（図23A）と比較すると、脳組織の至る所で染色が認められた。これは先の知見を裏付け、mRNA送達方法の速さと有効性を強調するものであり、この方法はIT送達後わずか30分でmRNAを送達する。さらにこのデータは、本発明によるmRNA送達が、灰白質組織（脳の外周部に位置している）及び白質組織（脳内の深部に位置している）の両方へ効率的にmRNA送達をするという、驚くべきかつ予想外の発見であることを示している。従って、本手法は、脳内の到達しがたい白質組織内の深部に位置する細胞の調節異常の結果として発症した、神経系または神経筋の疾患を治療する、実現可能な治療法として役立つことが可能である。

30

均等物

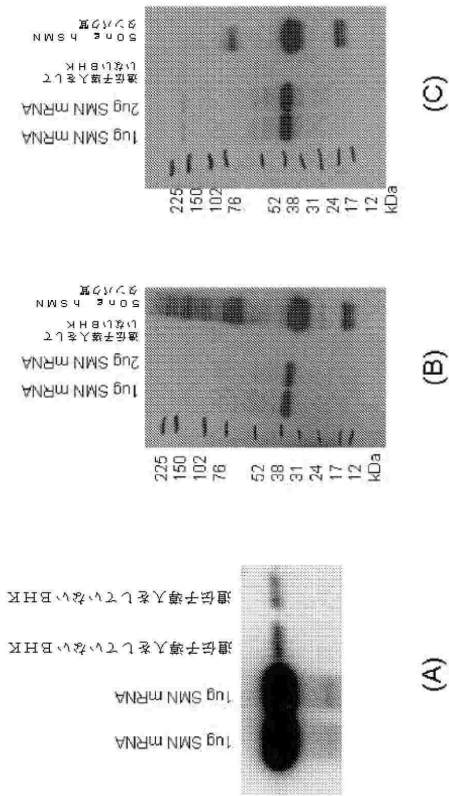
【0184】

当業者は、慣例の実験法、本明細書に記載されている本発明の特定の実施形態について、多くの均等物を用いて、理解しまたは確認し得るだろう。本発明の範囲は、前述の説明に限定するものではなく、むしろ以下の請求項で記載する。

40

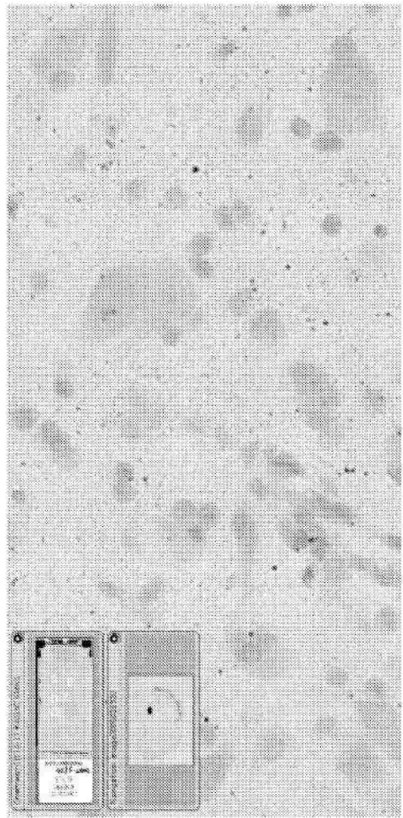
【図面】
【図 1】

遺伝子導入したBHK-21細胞中の
h SMN-1タンパク質の検出



【図 2 A】

脊髄組織中の h SMN-1 mRNA の検出



10

20

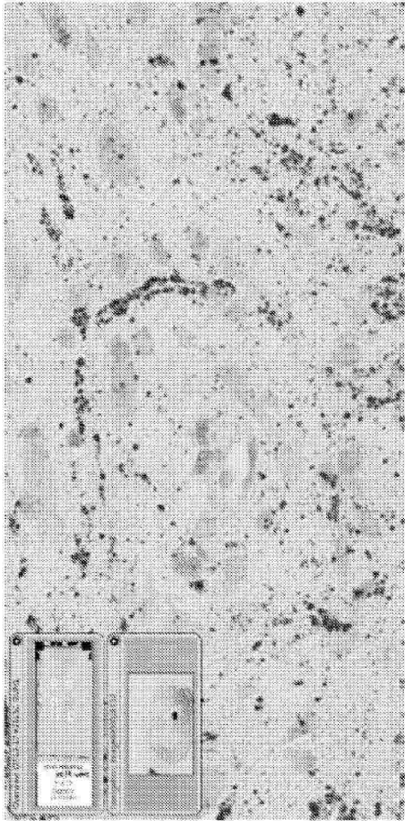
30

40

50

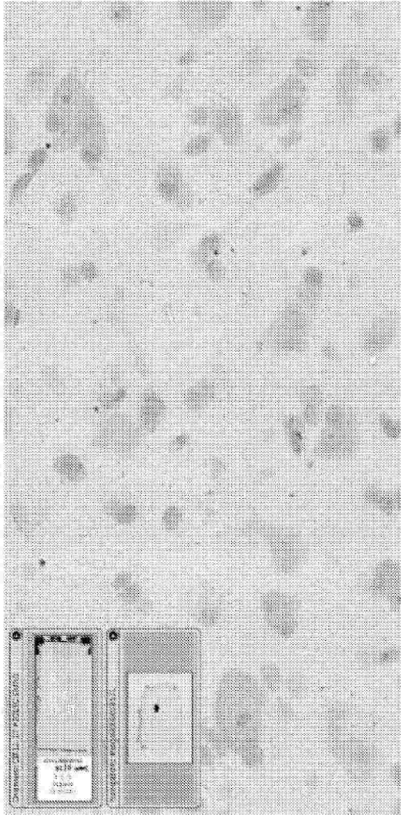
【図 2 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 2 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

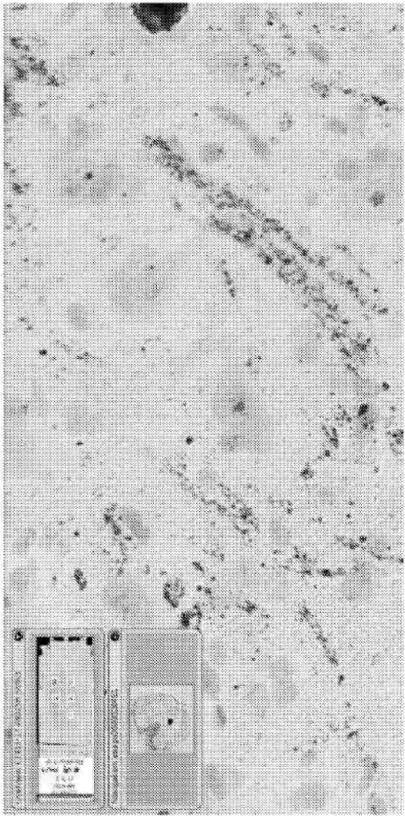


10

20

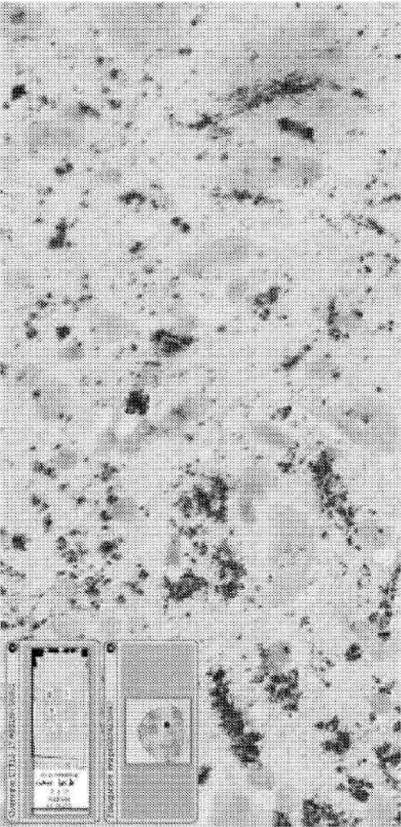
【図 3 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 3 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



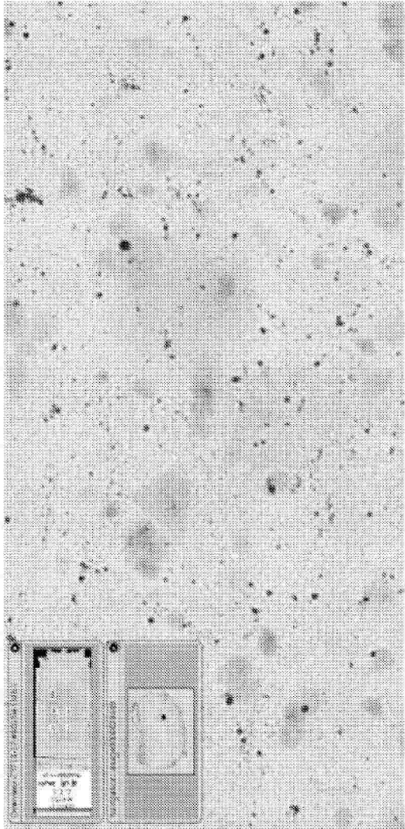
30

40

50

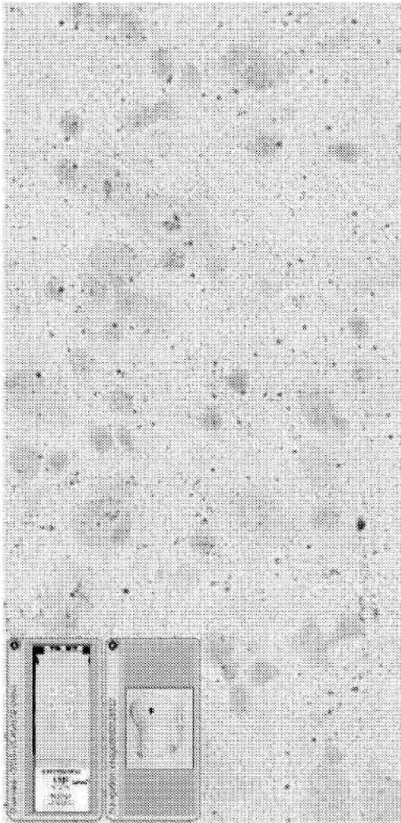
【図 3 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 4 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

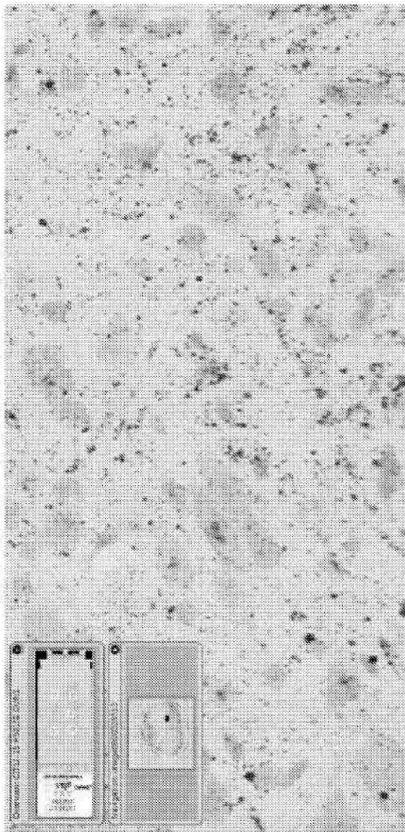


10

20

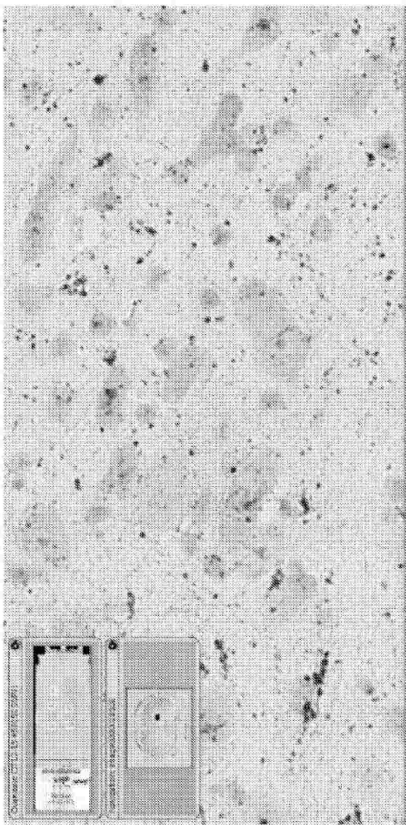
【図 4 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 4 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



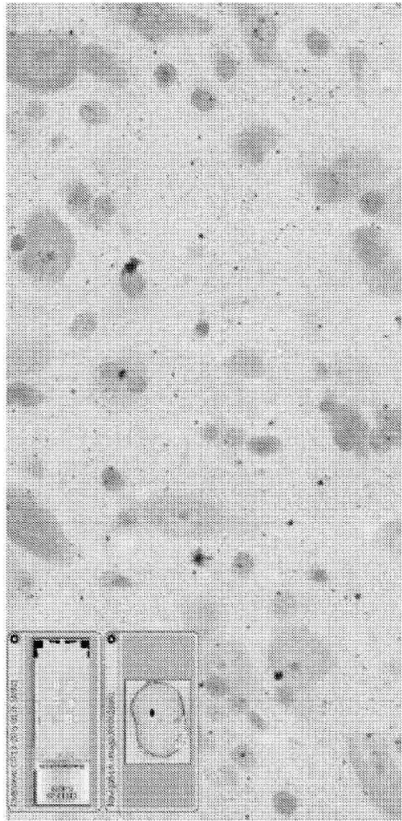
30

40

50

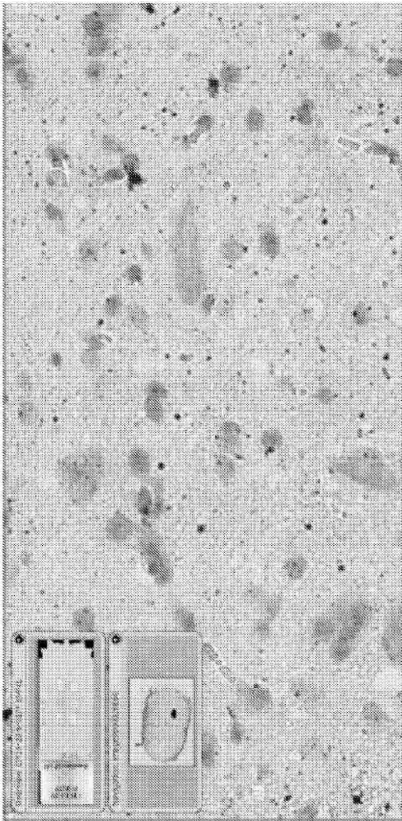
【図 5 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 5 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

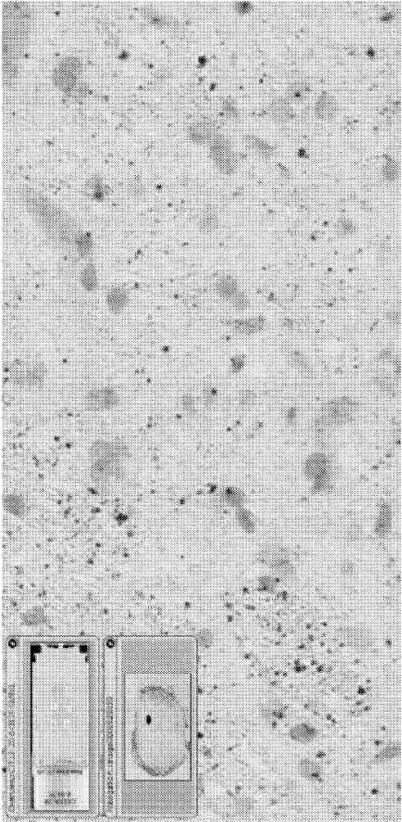


10

20

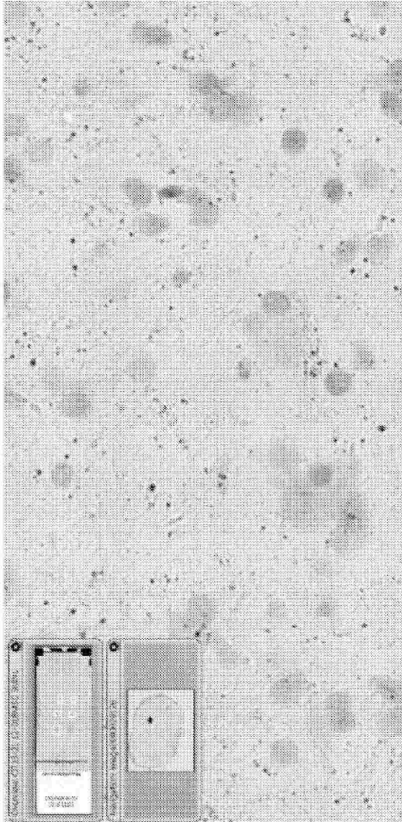
【図 5 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 6 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



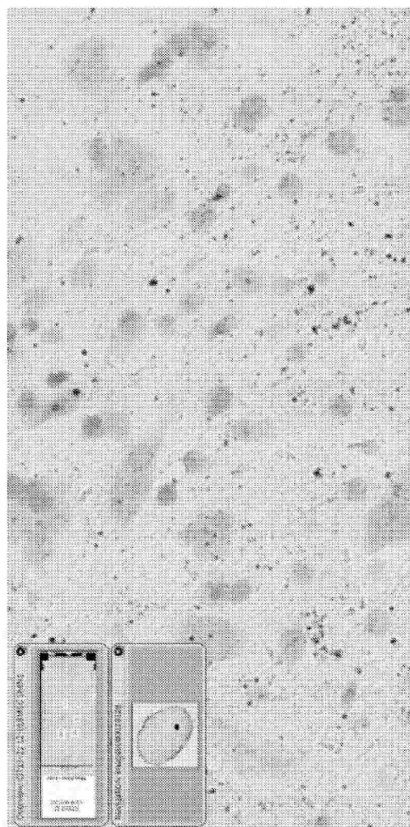
30

40

50

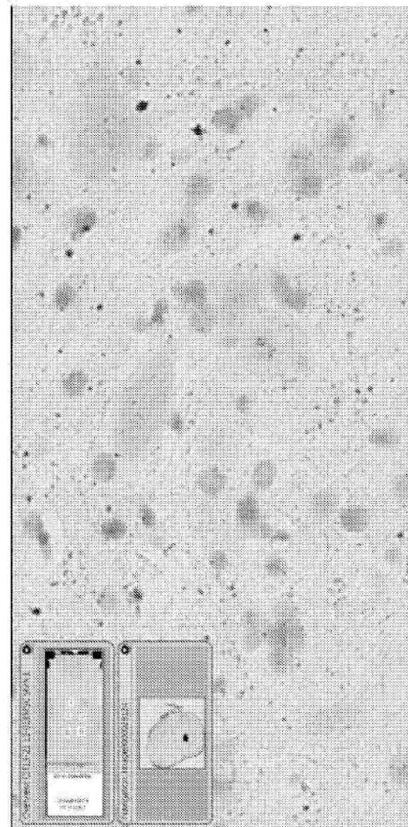
【図 6 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 6 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

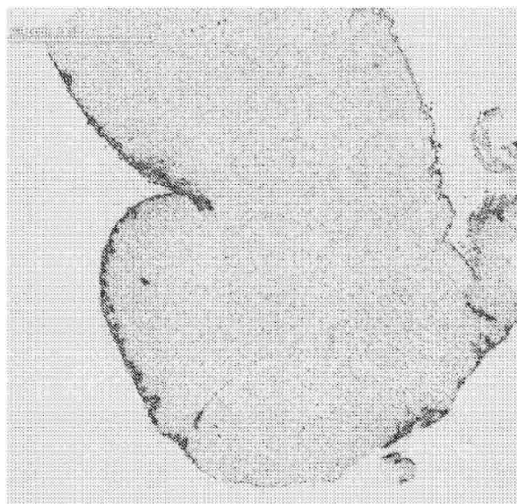


10

20

【図 7 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 7 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



30

40

50

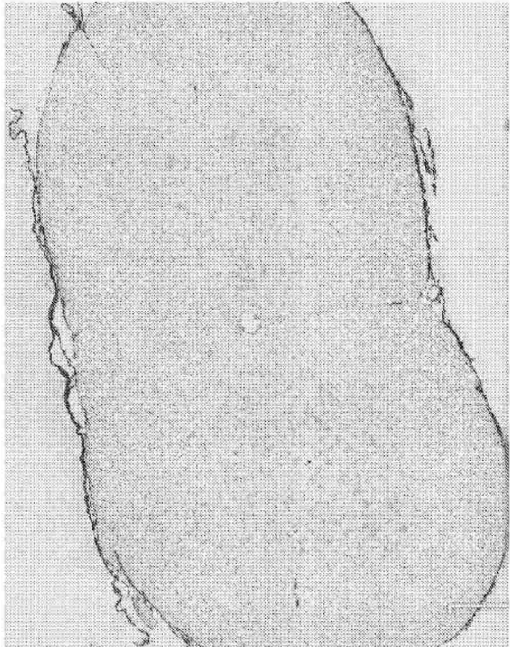
【図 7 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 8 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

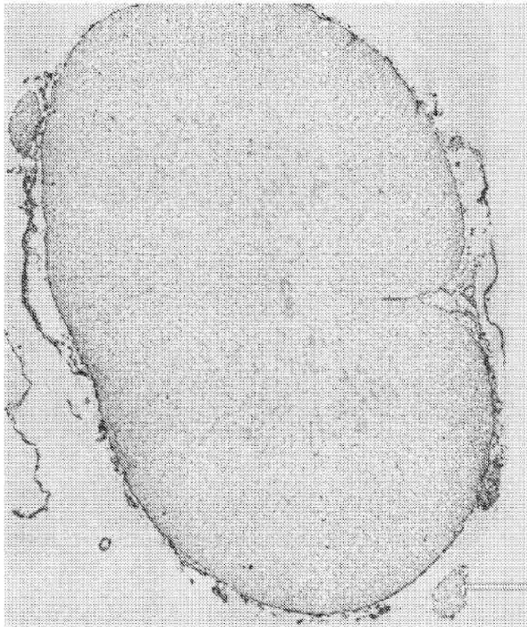


10

20

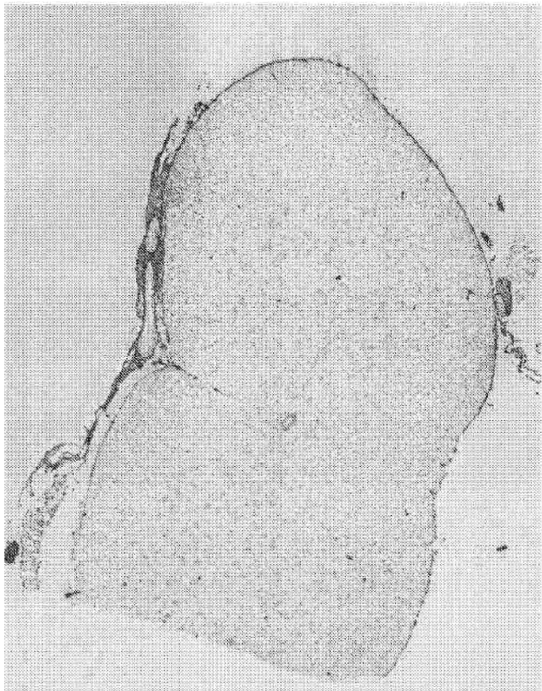
【図 8 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 8 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



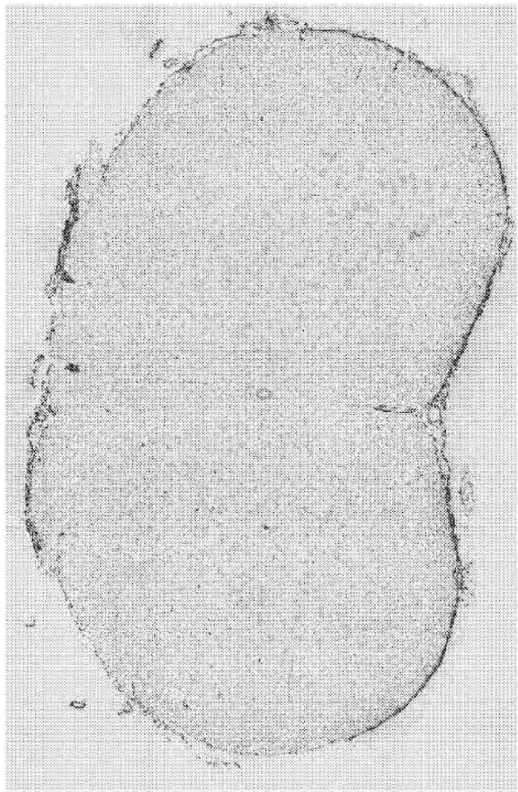
30

40

50

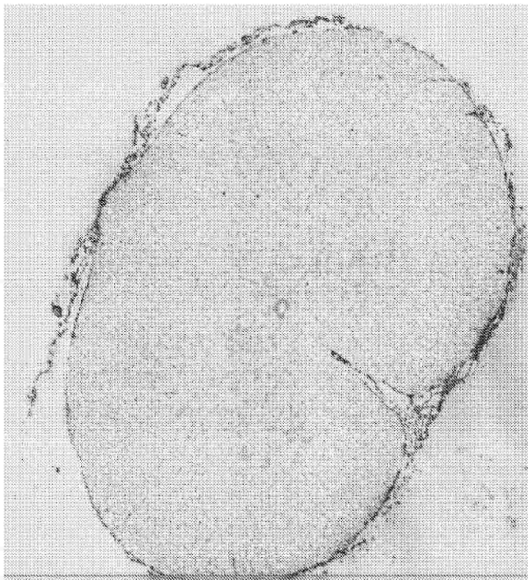
【図 9 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 9 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

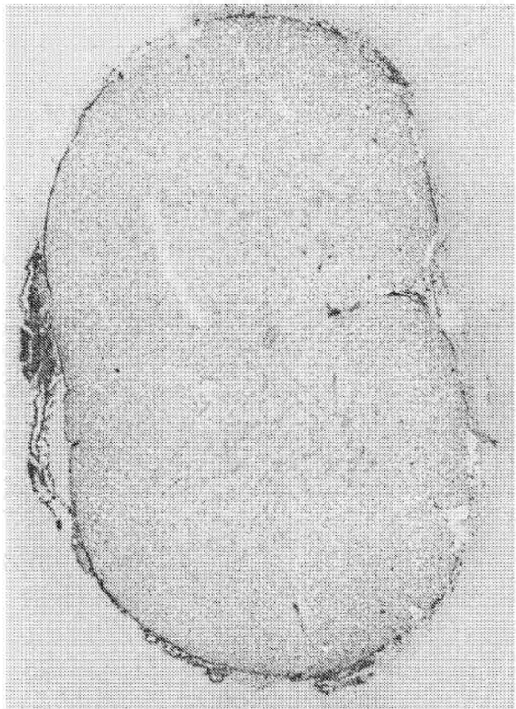


10

20

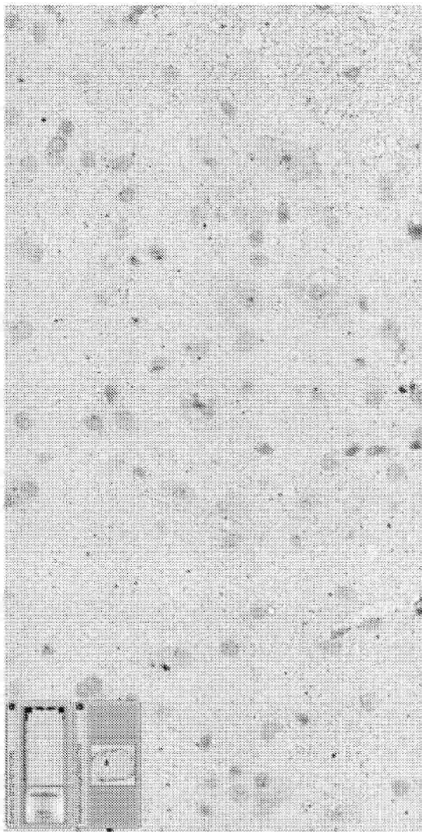
【図 9 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 10 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



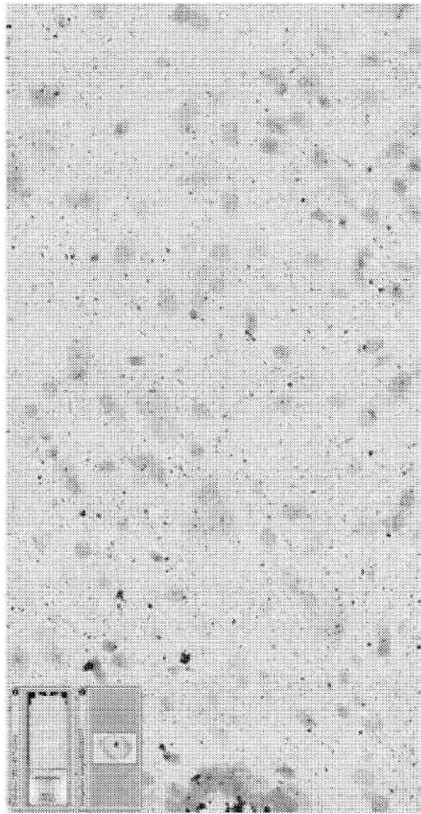
30

40

50

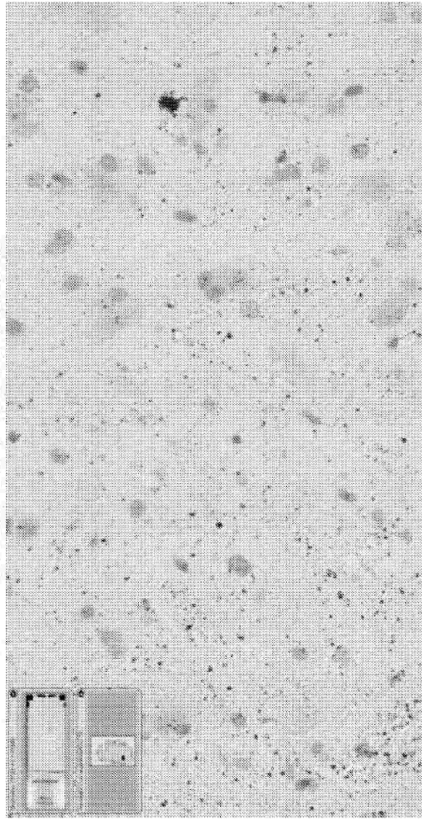
【図 10 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 10 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

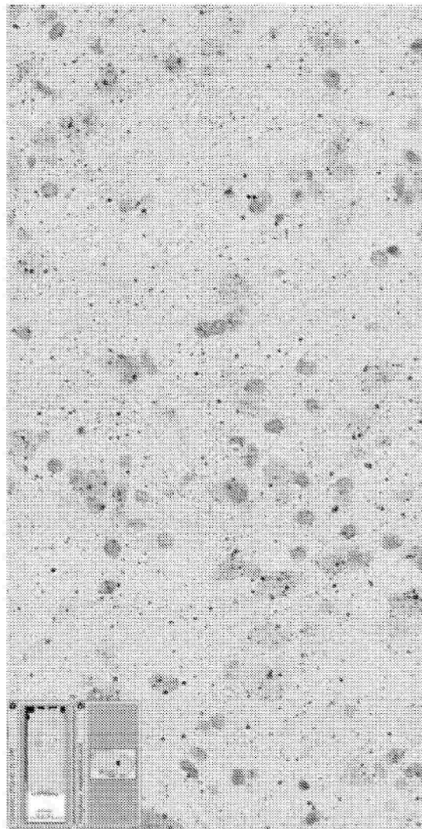


10

20

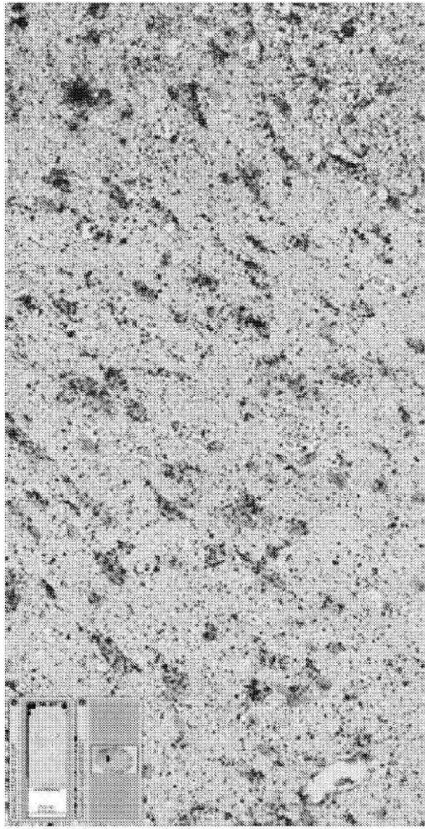
【図 11 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 11 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



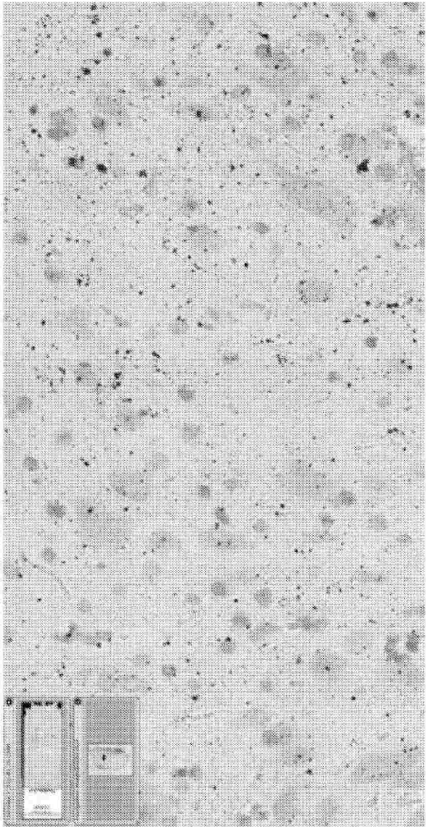
30

40

50

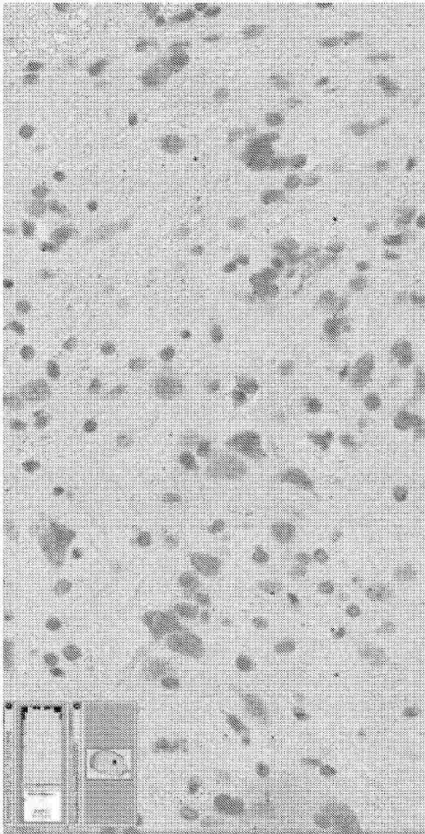
【図 1 1 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 1 2 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

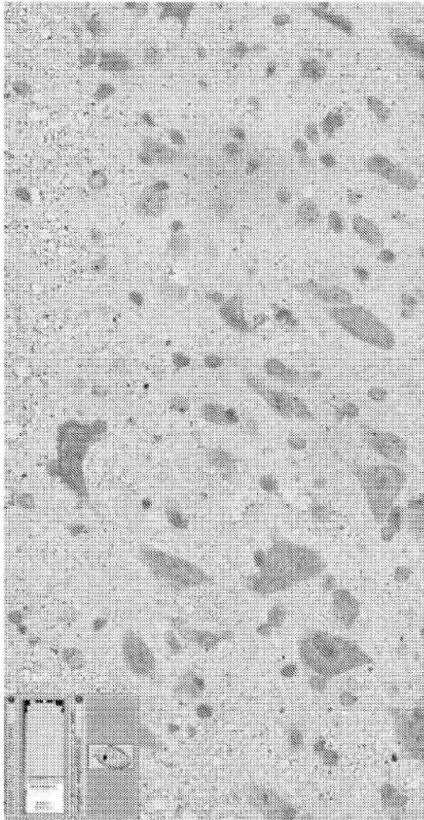


10

20

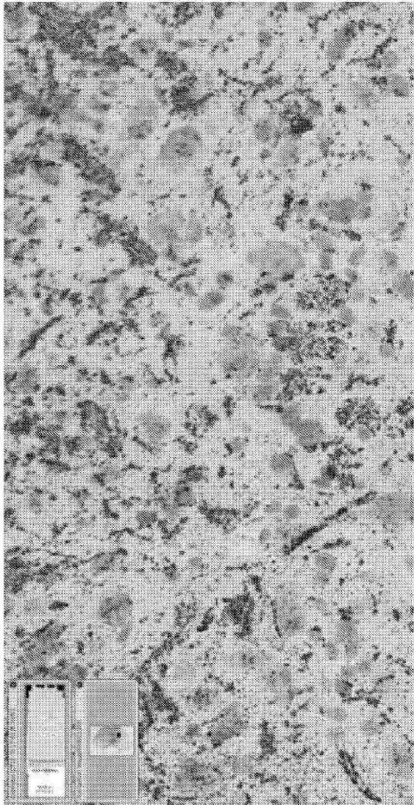
【図 1 2 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 1 2 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



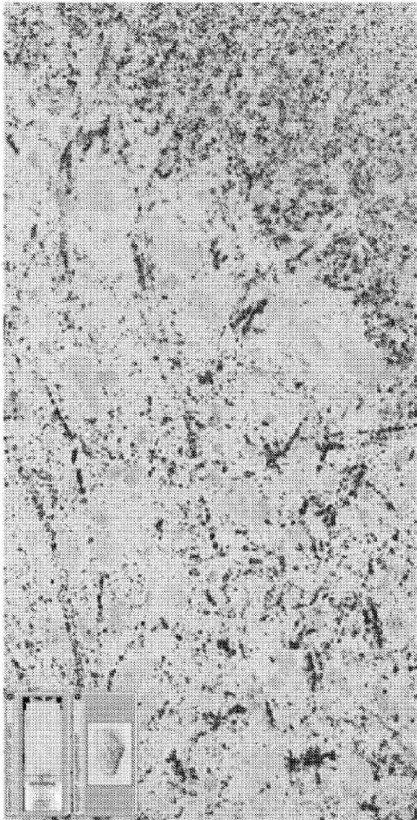
30

40

50

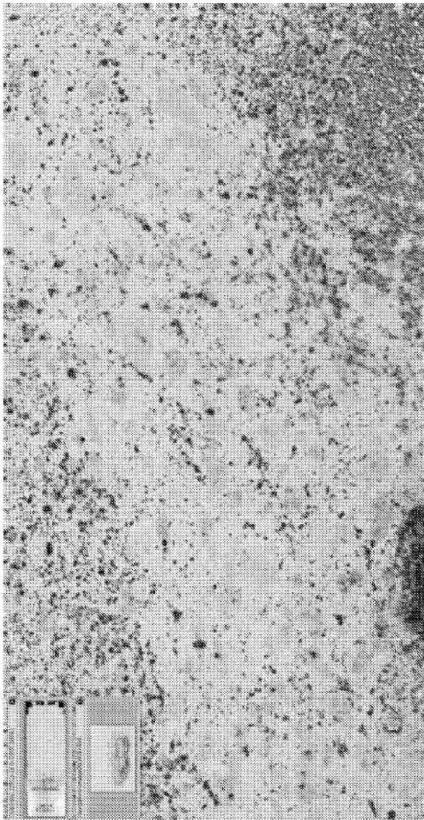
【図 1 3 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 1 3 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

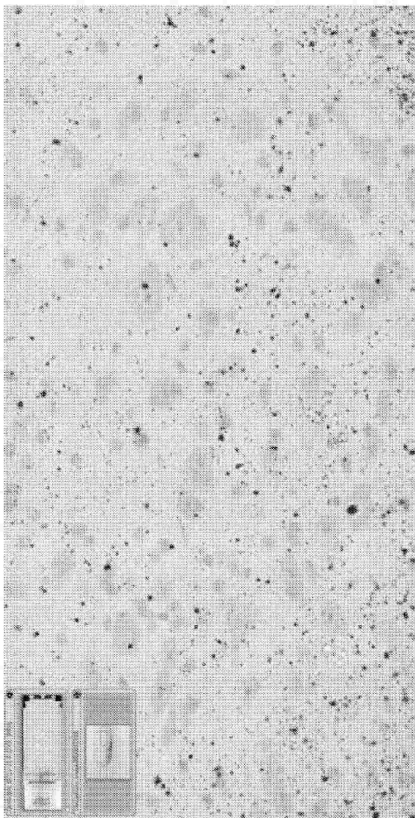


10

20

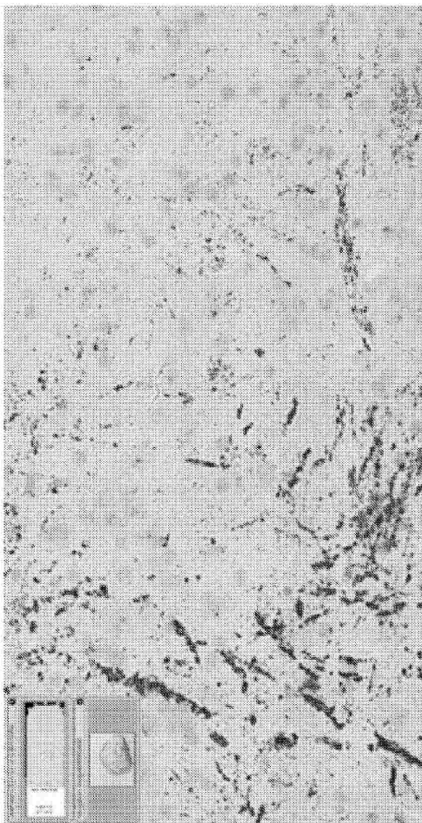
【図 1 3 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 1 4 A】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



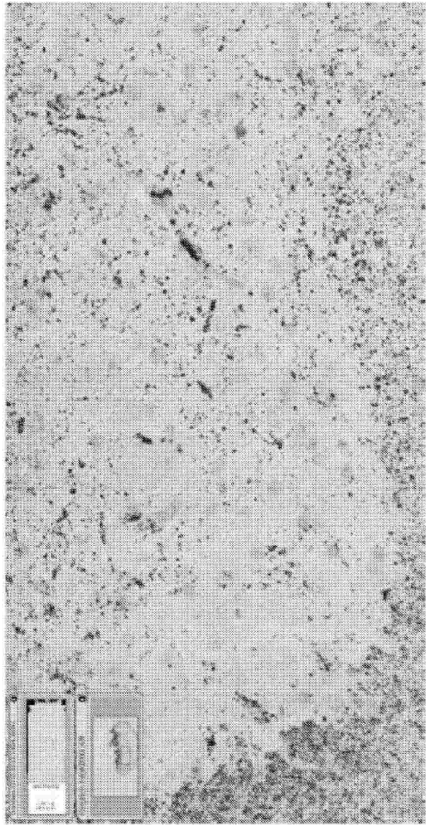
30

40

50

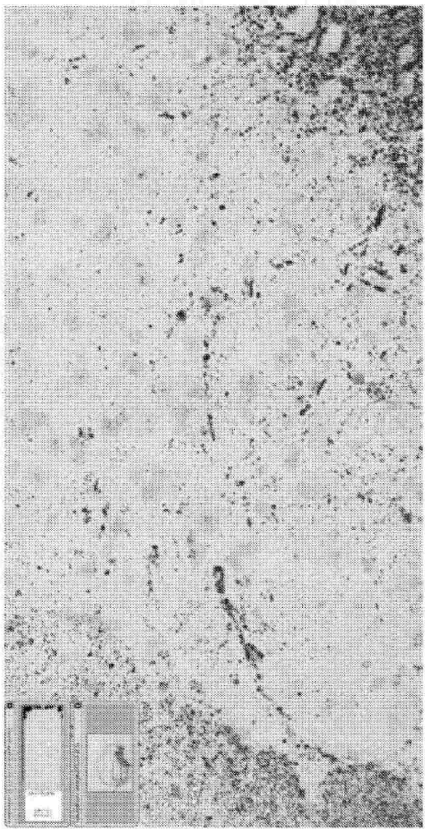
【図 1 4 B】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出



【図 1 4 C】

脊髄組織中の hSMN-1 mRNA の検出

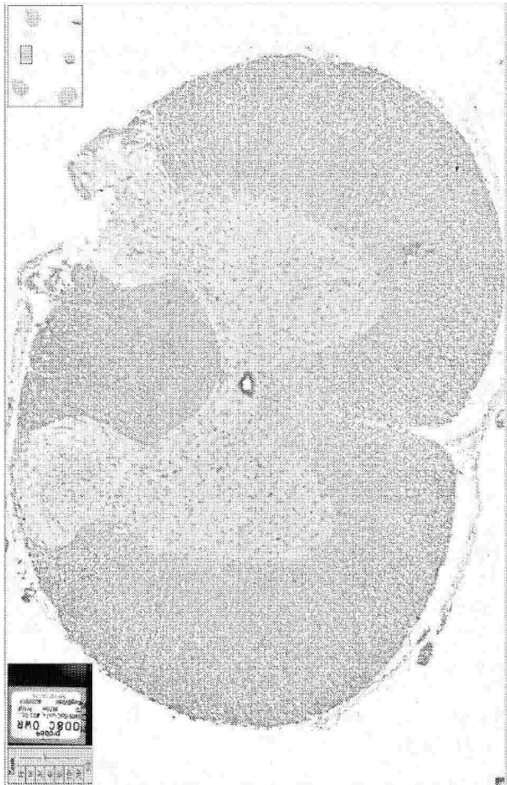


10

20

【図 1 5】

未処理 (陰性対照)



【図 1 6】

未処理 (陰性対照)



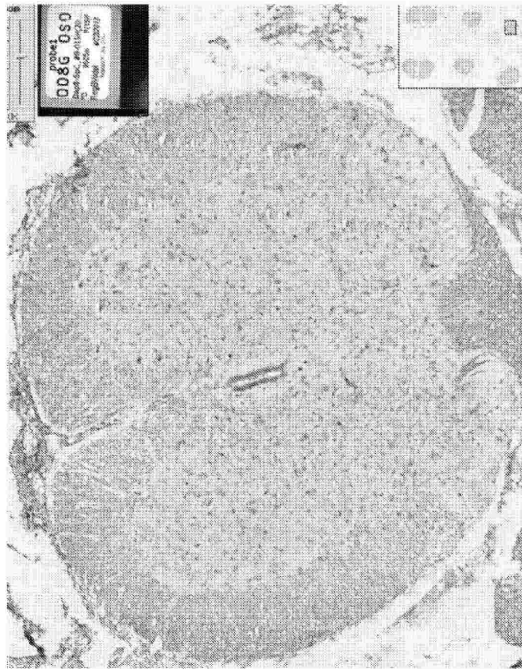
30

40

50

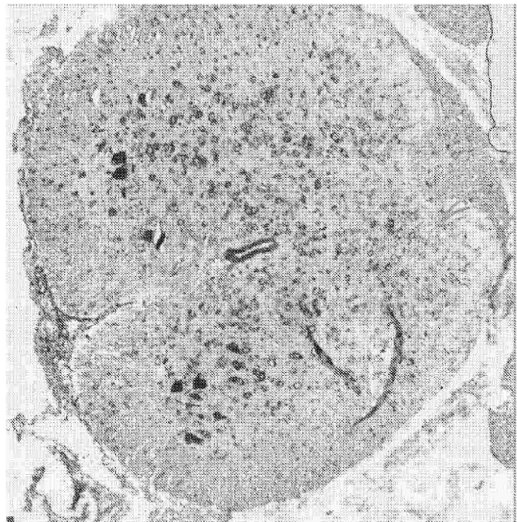
【図 17】

脊髄組織中の D a p B の染色 (プロンプ対照)



【図 18】

脊髄組織中の U b C の染色 (陽性対照)

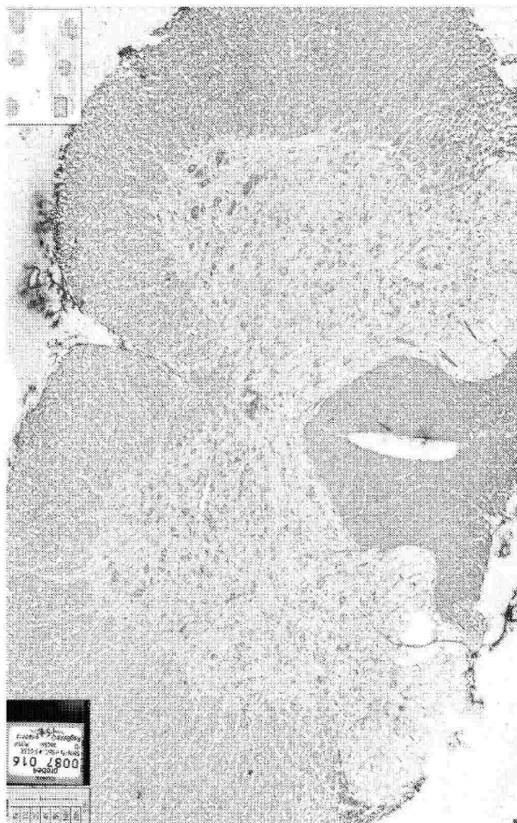


10

20

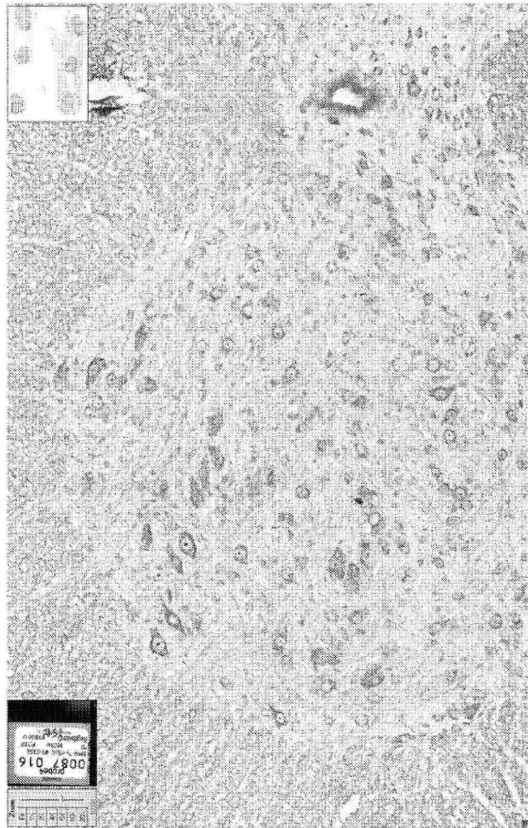
【図 19】

脊髄組織中の h S M N - 1 m R N A の検出



【図 20】

脊髄組織中の h S M N - 1 m R N A の検出

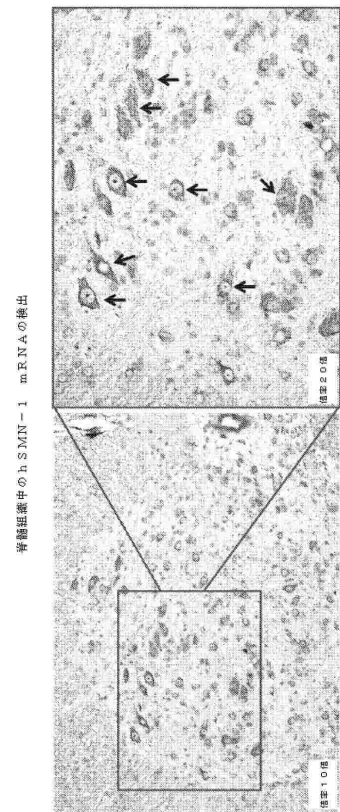


30

40

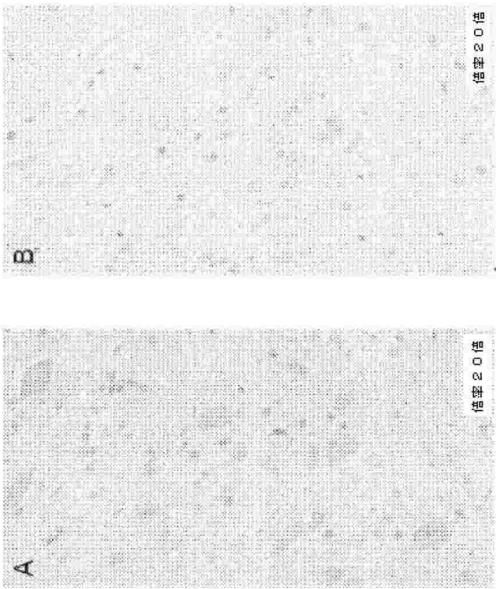
50

【図 2 1】

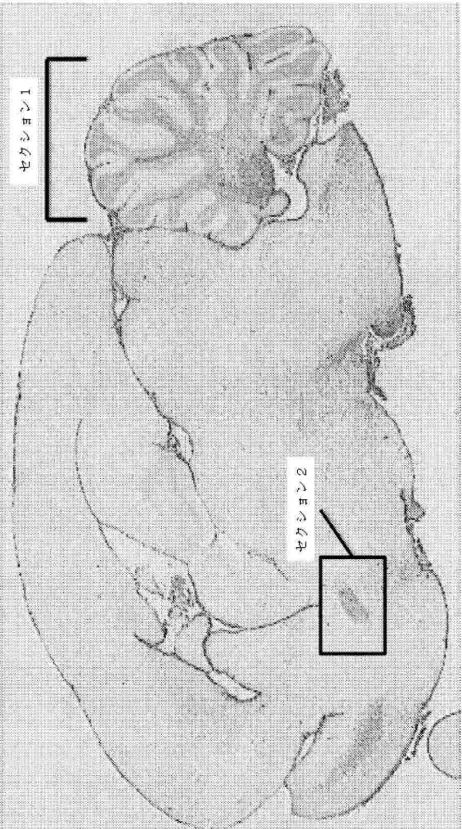


【図 2 2】

ラットの脊髄組織中の hSMN-1 タンパク質の検出



【図 2 3 A】



【図 2 3 B】

セクション 1 の拡大



10

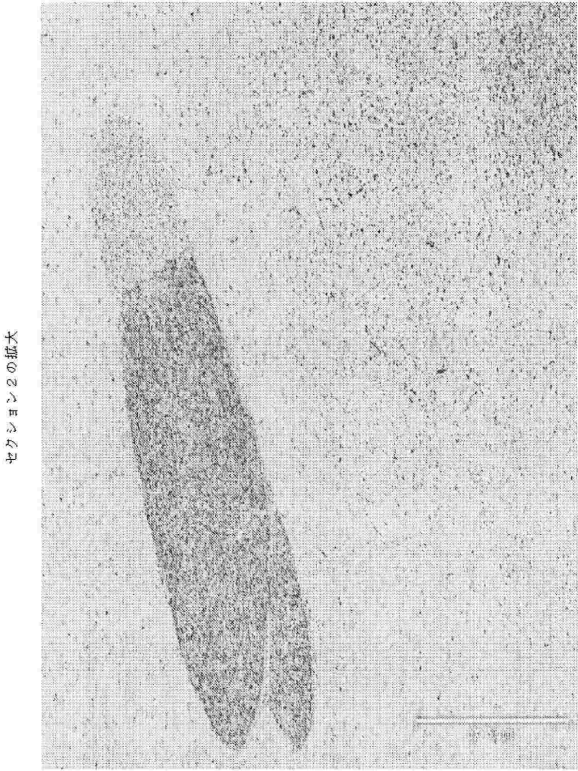
20

30

40

50

【図 2 3 C】



【配列表】

0007586858000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 47/34 (2017.01)
A 6 1 K 47/24 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 P 21/00 (2006.01)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)

F I

A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/24
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 21/00
C 1 2 N 15/11
C 1 2 N 15/12

Z Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(72)発明者 シュリラン カーブ

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

審査官 愛清 哲

(56)参考文献

国際公開第2 0 1 2 / 1 7 0 8 8 9 (WO, A 1)

国際公開第2 0 1 3 / 0 6 3 4 6 8 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 8 / 0 0
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 P 2 1 / 0 0 - 2 1 / 0 6
A 6 1 P 2 5 / 0 0 - 2 5 / 3 6
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)