

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-527939
(P2024-527939A)

(43)公表日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18		
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24		
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全130頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-504833(P2024-504833)	(71)出願人	513084469
(86)(22)出願日	令和4年7月25日(2022.7.25)		モデルナティエックス インコーポレイ
(85)翻訳文提出日	令和6年3月19日(2024.3.19)		テッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/038151		ModernaTX, Inc.
(87)国際公開番号	WO2023/009421		アメリカ合衆国02142マサチューセ
(87)国際公開日	令和5年2月2日(2023.2.2)		ッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリー
(31)優先権主張番号	63/225,815		ト325
(32)優先日	令和3年7月26日(2021.7.26)	(74)代理人	100145403
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山尾 憲人
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100156144
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 落合 康
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100221534
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 藤本 志穂
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(72)発明者	スミス, マイケル エイチ
	最終頁に続く		アメリカ合衆国02139マサチューセ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂質ナノ粒子組成物を調製するためのプロセス

(57)【要約】

例えば、mRNAなどの核酸を含む、治療剤もしくは予防剤を含む治療的または予防的脂質ナノ粒子組成物の調製に有用な、空の脂質ナノ粒子組成物、及びその調製のためのプロセスが提供される。

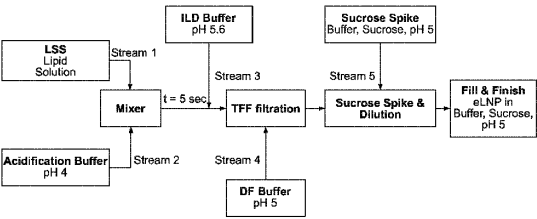


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

空の脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスであって、

(i) イオン化脂質、

(i i) リン脂質、

(i i i) 構造脂質、及び

(i v) P E G - 脂質を含む脂質溶液を

約 4 . 5 以下の p H を有する緩衝水溶液と混合すること

を含む、前記プロセス。

【請求項 2】

前記緩衝水溶液は、約 3 . 5 から約 4 . 5 の p H を有する、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 3】

前記緩衝水溶液は、約 3 0 m M 以上の緩衝液濃度を有する、請求項 1 または 2 に記載のプロセス。

【請求項 4】

前記緩衝水溶液は、約 1 5 m M 以下のイオン強度を有する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 5】

前記緩衝水溶液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、またはそれらの混合物を含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 6】

前記プロセスは、約 3 5 m V 以上のゼータ電位を特徴とする空の脂質ナノ粒子組成物を生成する、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 7】

前記プロセスは、実質的に最大のゼータ電位を有することを特徴とする空の脂質ナノ粒子組成物を生成する、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 8】

前記脂質溶液は、約 5 から約 1 0 0 m g / m L の脂質濃度を有する、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 9】

前記混合することは、マルチインレットボルテックスミキサーにおいて行われる、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 0】

前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記脂質ナノ粒子は、約 3 0 n m 以下の平均直径を有する、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 1】

前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記脂質ナノ粒子は、ペイロードを実質的に含まない、請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 2】

前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記空の脂質ナノ粒子は、安定である、請求項 1 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 3】

前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記空の脂質ナノ粒子の前記平均直径は、2 5 時間にわたり約 1 5 0 % 未満増加する、請求項 1 2 に記載のプロセス。

【請求項 1 4】

前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記脂質ナノ粒子の前記平均直径は、2 5 時間にわたり 5 0 n m 以下のままである、請求項 1 2 に記載のプロセス。

【請求項 1 5】

前記組成物を希釈緩衝液で希釈するステップ、

前記組成物の前記 pH を約 5 から約 6 の pH に調節するステップ、
前記組成物をろ過するステップ、
前記組成物を濃縮するステップ、
前記組成物の緩衝液を交換するステップ、及び
凍結保護物質を前記組成物に添加するステップから選択される 1 つ以上の追加のステップ

をさらに含む、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の追加のステップは、前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記 pH を約 5 から約 6 の pH に調節するステップである、請求項 15 に記載のプロセス。

10

【請求項 17】

前記 1 つ以上の追加のステップは、凍結保護物質を前記空の脂質ナノ粒子組成物に添加するステップである、請求項 15 に記載のプロセス。

【請求項 18】

前記凍結保護物質は、スクロースである、請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 19】

前記組成物の前記 pH を約 5 の pH に調節するステップ、及び
凍結保護物質を前記組成物に添加するステップ
を含む、請求項 15 に記載のプロセス。

20

【請求項 20】

請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載のプロセスによって調製された、空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 21】

充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスであって、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約 4.5 未満の pH を有する緩衝水溶液と混合して、空の脂質ナノ粒子組成物を得ること

30

と、
(b) 前記空の脂質ナノ粒子組成物をパイロードと混ぜ合わせて、前記充填脂質ナノ粒子組成物を形成すること

を含む、前記プロセス。

【請求項 22】

前記パイロードは、核酸を含む、請求項 21 に記載のプロセス。

【請求項 23】

前記核酸は、(i) 前記核酸及び (ii) 酸性 pH を維持することができる緩衝液を含む核酸溶液として準備される、請求項 22 に記載のプロセス。

【請求項 24】

40

前記核酸溶液は、約 3 から約 6 の pH を有する、請求項 23 に記載のプロセス。

【請求項 25】

前記核酸溶液は、約 5 mM から約 140 mM の緩衝液濃度を有する、請求項 23 または 24 に記載のプロセス。

【請求項 26】

前記核酸は、mRNA を含む、請求項 23 から 25 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 27】

前記核酸は、約 0.05 から約 5.0 mg/mL の濃度で前記核酸溶液中に存在する、請求項 23 から 26 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 28】

50

前記混ぜ合わせることは、約 5 から約 6 の pH で行われる、請求項 21 から 27 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 29】

カプセル化効率は、90%以上である、請求項 21 から 28 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 30】

前記組成物を希釈緩衝液で希釈するステップ、
前記組成物の前記 pH を約 7 から約 8 の pH に調節するステップ、
前記組成物をろ過するステップ、
前記組成物を濃縮するステップ、
前記組成物の緩衝液を交換するステップ、
界面活性剤を前記組成物に添加するステップ、及び
浸透圧調整剤を前記組成物に添加するステップ
から選択される 1 つ以上の追加のステップをさらに含む、請求項 21 から 29 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

10

【請求項 31】

前記 1 つ以上の追加のステップは、前記組成物の前記 pH を約 7 から約 8 の pH に調節するステップである、請求項 30 に記載のプロセス。

【請求項 32】

前記 1 つ以上の追加のステップは、界面活性剤を前記組成物に添加するステップである、請求項 30 または 31 に記載のプロセス。

20

【請求項 33】

前記界面活性剤は、PEG 脂質である、請求項 32 に記載のプロセス。

【請求項 34】

前記界面活性剤は、脂質アミンである、請求項 32 に記載のプロセス。

【請求項 35】

前記 1 つ以上の追加のステップは、浸透圧調整剤を前記組成物に添加するステップである、請求項 30 から 34 に記載のプロセス。

【請求項 36】

前記浸透圧調整剤は、塩化ナトリウムである、請求項 35 に記載のプロセス。

30

【請求項 37】

前記組成物の前記 pH を約 7 から約 8 の pH に調節するステップ、及び
浸透圧調整剤を前記組成物に添加するステップ
を含む、請求項 30 に記載のプロセス。

【請求項 38】

前記組成物の前記 pH を約 7 から約 8 の pH に調節するステップ、
界面活性剤を前記組成物に添加するステップ、及び
浸透圧調整剤を前記組成物に添加するステップ
を含む、請求項 30 に記載のプロセス。

【請求項 39】

前記混ぜ合わせることは、マルチインレットボルテックスミキサーにおいて行われる、請求項 21 から 38 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

40

【請求項 40】

(c) 前記組成物の前記 pH を約 7 から約 8 の pH に調節することと、
(d) 1 つ以上の界面活性剤を前記組成物に添加することと、
(e) 前記組成物を濃縮することと、
(f) 浸透圧調整剤を前記組成物に添加することと、
(g) 前記組成物を希釈することと
をさらに含む、請求項 21 に記載のプロセス。

【請求項 41】

50

請求項 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスによって調製された、充填脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 42】

以下の成分：

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む空の脂質ナノ粒子を含む空の脂質ナノ粒子組成物であって

、
前記空の脂質ナノ粒子組成物は、

10

(a) ペイロードを実質的に含まず、

(b) 約 3 から約 5 の pH を有し、

(c) 約 35 mV 以上のゼータ電位を特徴とする、

前記空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 43】

約 50 mV 以上のゼータ電位を特徴とする、請求項 42 に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 44】

3 から 6 の pH 範囲において前記組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約 25 % であるゼータ電位を特徴とする、請求項 42 に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

20

【請求項 45】

約 3.5 から約 4.5 の pH を有する、請求項 42 または 43 に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 46】

安定である、請求項 42 から 45 のいずれか 1 項に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 47】

前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記空の脂質ナノ粒子の平均直径は、25 時間にわたり約 150 % 未満増加する、請求項 46 に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 48】

30

前記空の脂質ナノ粒子組成物の前記脂質ナノ粒子の平均直径は、25 時間にわたり 50 nm 以下のままである、請求項 46 に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 49】

前記空の脂質ナノ粒子は、約 30 nm 未満の平均直径を有する、請求項 42 から 48 のいずれか 1 項に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 50】

約 1 から約 100 mg/mL の空の脂質ナノ粒子の濃度を有する、請求項 42 から 49 のいずれか 1 項に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 51】

約 1 から約 100 mM の緩衝液を含む、請求項 42 から 50 のいずれか 1 項に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

40

【請求項 52】

約 1 から約 50 重量 % のスクロースを含む、請求項 42 から 51 のいずれか 1 項に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 53】

エタノールをさらに含む、請求項 42 から 51 のいずれか 1 項に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 54】

前記エタノールは、約 25 体積 % 以下の量で存在する、請求項 53 に記載の空の脂質ナノ粒子組成物。

50

【請求項 55】

以下の成分：

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、

(iv) PEG-脂質、及び

(v) ペイロードを含む充填脂質ナノ粒子を含む充填脂質ナノ粒子組成物であって、

前記充填脂質ナノ粒子組成物は、約 4.5 から約 8 の pH を有する、前記充填脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 56】

約 7 から約 8 の pH を有する、請求項 55 に記載の充填脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 57】

ペイロードの濃度は、約 0.1 から約 10 mg/mL である、請求項 55 または 56 に記載の充填脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 58】

約 0.1 % から約 10 % w/v のスクロースをさらに含む、請求項 55 から 57 のいずれか 1 項に記載の充填脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 59】

約 5 mM から約 150 mM の NaCl をさらに含む、請求項 55 から 58 のいずれか 1 項に記載の充填脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 60】

約 5 mM から約 100 mM の緩衝液をさらに含む、請求項 55 から 59 のいずれか 1 項に記載の充填脂質ナノ粒子組成物。

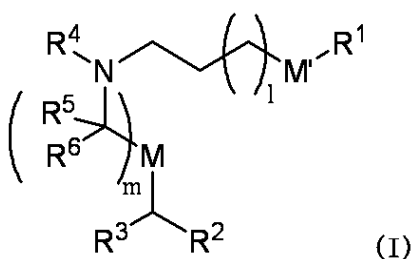
【請求項 61】

前記緩衝液は、酢酸緩衝液及び Tris 緩衝液を含む、請求項 60 に記載の充填脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 62】

前記イオン化脂質は、式 (I)：

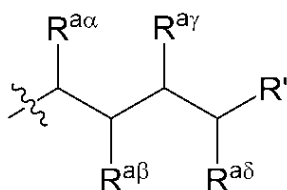
【化 1】



の化合物またはその N-オキシドもしくは塩を含み、式中、

R¹ は

【化 2】



であり、

【化 3】



10

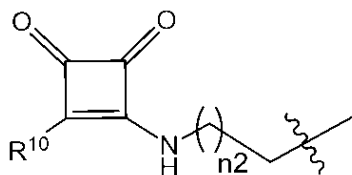
20

30

40

50

【化 4】



【化 5】



【請求項 6 3】

1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、

1, 2-ジフィタノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (ME 16 . 0 PE)、

1, 2-ジフィタノイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (4 ME 16 : 0 PC)、

1, 2-ジフィタノイル-s n-グリセロ-3-ホスホ- (1'-rac-グリセロール) (ナトリウム塩) (4 ME 16 : 0 PG)、

1, 2-ジフィタノイル-s n-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (ナトリウム塩) (4 ME 16 : 0 PS)、

1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジリノレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジリノレノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジアラキドノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジドコサヘキサエノイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール) ナトリウム塩 (DOPG)、

及びスフィンゴミエリン

から選択される、請求項 1 から 19 及び 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 20、41、及び 42 から 62 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 64】

前記構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラッシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、アルファートコフェロール、ホパノイド、フィトステロール、ステロイド、またはそれらの混合物から選択される、請求項 1 から 19 及び 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 20、41、及び 42 から 63 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 65】

前記 PEG-脂質は、PEG 修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG 修飾ホスファチジン酸、PEG 修飾セラミド、PEG 修飾ジアルキルアミン、PEG 修飾ジアシルグリセロール、PEG 修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物から選択される、請求項 1 から 19 及び 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 20、41、及び 42 から 64 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 66】

前記脂質溶液、前記空の脂質ナノ粒子組成物、または前記充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して約 30 mol % から約 60 mol % のイオン化脂質を含む、請求項 1 から 19 及び 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 20、41、及び 42 から 65 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 67】

前記脂質溶液、前記空の脂質ナノ粒子組成物、または前記充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して約 5 mol % から約 15 mol % のリン脂質を含む、請求項 1 から 19 及び 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 20、41、及び 42 から 66 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 68】

前記脂質溶液、前記空の脂質ナノ粒子組成物、または前記充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して約 30 mol % から約 50 mol % の構造脂質を含む、請求項 1 から 19 及び 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 20、41、及び 42 から 67 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 69】

前記脂質溶液、前記空の脂質ナノ粒子組成物、または前記充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して約 0.1 mol % から約 2 mol % の PEG-脂質を含む、請求項 1 から 19 及び 21 から 40 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 20、41、及び 4

10

20

30

40

50

2 から 6 8 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

【請求項 7 0】

前記脂質溶液、前記空の脂質ナノ粒子組成物、または前記充填脂質ナノ粒子組成物は、それぞれ総脂質に対して

約 4 0 m o l % から約 5 0 m o l % のイオン化脂質、

約 1 0 m o l % から約 1 2 m o l % のリン脂質、

約 3 7 m o l % から約 4 2 m o l % の構造脂質、及び

約 0 . 2 5 m o l % から約 0 . 7 5 m o l % の P E G - 脂質を含む、請求項 1 から 1 9 及び 2 1 から 4 0 のいずれか 1 項に記載のプロセスまたは請求項 2 0、4 1、及び 4 2 から 6 9 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子組成物。

10

【請求項 7 1】

請求項 4 2 から 5 4 のいずれか 1 項に記載の空の脂質ナノ粒子組成物を含む第 1 の容器と、前記第 1 の容器の前記空の脂質ナノ粒子組成物と混ぜ合わせるための治療剤または予防剤を含む溶液を含む第 2 の容器とを含む、キット。

【請求項 7 2】

前記第 1 の容器の内容物を前記第 2 の容器の内容物と混ぜ合わせることに關する説明書をさらに含む、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 3】

患者の疾患を治療または予防する方法であって、前記患者に治療有効量の請求項 5 5 から 6 1 のいずれか 1 項に記載の充填脂質ナノ粒子組成物を投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 7 4】

前記疾患は、患者におけるタンパク質またはポリペプチド活性の欠損または異常を特徴とする、請求項 7 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

空の脂質ナノ粒子組成物、ならびにその調製、及び例えば、m R N A などの核酸を含む、治療剤もしくは予防剤を含む治療的または予防的脂質ナノ粒子組成物の調製のためのプロセスが提供される。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

生物活性物質、例えば、小分子薬物、タンパク質、及び核酸の効果的な標的送達は、継続的な医療の課題である。特に、核酸の細胞への送達は、そのような種の相対的な不安定性及び低い細胞透過性により困難になる。したがって、核酸などの治療薬及び予防薬の細胞への送達を容易にする方法及び組成物を開発する必要がある。

【発明の概要】

【0 0 0 3】

本開示は、患者の予防的利益のために、核酸分子、例えば、m R N A 治療薬を送達するための L N P 分子を提供する。

40

【0 0 0 4】

特定の実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスであって、

(i) イオン化脂質、

(i i) リン脂質、

(i i i) 構造脂質、及び

(i v) P E G - 脂質を含む脂質溶液を

約 4 . 5 未満の p H を有する緩衝水溶液と混合することを含む、プロセスが本明細書で提供される。

【0 0 0 5】

特定の実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスであって、

50

(a)

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質、及び
- (iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約4.5未満のpHを有する緩衝水溶液と混合して、空の脂質ナノ粒子組成物を得ることと、

(b) 空の脂質ナノ粒子組成物をペイロードと混ぜ合わせて、充填脂質ナノ粒子組成物を形成することを含む、プロセスが本明細書で提供される。

【0006】

特定の実施形態では、本明細書で開示されるプロセスによって調製される充填脂質ナノ粒子が本明細書で提供される。

【0007】

特定の実施形態では、以下の成分：

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む空の脂質ナノ粒子を含む空の脂質ナノ粒子組成物が本明細書で提供され、

空の脂質ナノ粒子組成物は

- (a) ペイロードを実質的に含まず、
- (b) 約3から約5のpHを有し、
- (c) 約35mV以上のゼータ電位を特徴とする。

【0008】

特定の実施形態では、以下の成分：

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質
- (iv) PEG-脂質、及び

(v) ペイロードを含む充填脂質ナノ粒子を含む充填脂質ナノ粒子組成物が本明細書で提供され、

充填脂質ナノ粒子組成物は、約4.5から約8のpHを有する。

【0009】

特定の実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物を含む第1の容器と、第1の容器の空の脂質ナノ粒子組成物と混ぜ合わせるための治療剤または予防剤を含む溶液を含む第2の容器とを含むキットが本明細書で提供される。

【0010】

特定の実施形態では、患者の疾患を治療または予防する方法であって、患者に治療有効量の本明細書で開示される充填脂質ナノ粒子組成物を投与することを含む方法が本明細書で提供される。

【0011】

各制限は、様々な実施形態を包含し得る。したがって、任意の1つの要素または要素の組み合わせを伴う各制限は、記載される各態様に含まれ得ることが予期される。本発明は、その適用において、以下の説明に記載されるまたは図面に例示される構成の詳細にも構成要素の配置にも限定されるものではない。他の実施形態及び様々な方法で実施されるか、または行われる実施形態が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 pH4におけるナノ沈殿に続いてpH5まで滴定が行われる空のLNPeLNPeを調製するための一般プロセスを示す。

10

20

30

40

50

【0013】

【図2】 e L N P の平均直径 (n m) に対する p H 及び脂質溶液濃度の影響を示す。

【0014】

【図3】 e L N P の平均直径 (n m) に対する緩衝液濃度及び脂質溶液濃度の影響を示す。

【0015】

【図4】 e L N P の平均直径 (n m) に対する p H 及び緩衝液濃度の影響を示す。

【0016】

【図5】 e L N P の平均直径 (n m) に対する経時的な p H の影響を示す。

【0017】

【図6】 様々な濃度の脂質溶液 (L S S) を用いて調製した 3 7 . 5 m M 酢酸緩衝液 (左) または 7 5 m M 酢酸緩衝液 (右) を伴う e L N P のゼータ電位 (m V) を p H の関数として示す。

【0018】

【図7】 p H 4 (左) 対 p H 5 (右) で沈殿させた e L N P のクライオ E M 画像を示す。

【0019】

【図8】 p H 5 でカプセル化が行われる充填 L N P (f L N P) を調製するための一般プロセスを示す。

【0020】

【図9】 図8のプロセスにより調製された f L N P の平均粒度及び多分散指数 (P D I) を示す。

【0021】

【図10】 p H 4 で調製した e L N P 及び p H 5 で調製した e L N P の p H 5 の酢酸緩衝液を使用して行ったキャピラリーゾーン電気泳動プロットを示す。

【0022】

【図11】 p H 4 でナノ沈殿が行われる空の L N P (e L N P) を調製するための代替的な一般プロセスを示す。

【0023】

【図12】 p H 4 から p H 6 でカプセル化が行われる充填 L N P (f L N P) を調製するための代替的な一般プロセスを示す。

【0024】

【図13】 f L N P の平均直径 (n m) に対する p H の影響を示す。

【0025】

【図14】 p H 5 で調製した f L N P の平均直径 (n m) に対する p H の影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

とりわけ、特定の有利な特性を有することを特徴とする、その調製及び使用を含む、空の脂質ナノ粒子 (e L N P) 組成物が提供される。特に、いくつかの実施形態は、実質的に均一な形態及びサイズ分布の小さな平均粒度を有し、比較的高いゼータ電位を有する空の脂質ナノ粒子組成物を含む。空の脂質ナノ粒子組成物は、エタノールの存在下でも、長期間安定なままであり得る相対的な均一性及び小さいサイズに有利な条件下で形成することができ、ワークアップ及び操作を容易にする。特に、空の脂質ナノ粒子は、低 p H、低イオン強度、及び高緩衝液濃度の条件下で形成することができる。小さいサイズ、均一の形態、安定性、及び高いゼータ電位の組み合わせは、核酸または他の治療薬の事後充填 (P H L) の際の空のナノ粒子組成物の使用を容易にして、疾患を治療または予防するために患者の細胞に送達するための治療的に有効な充填脂質ナノ粒子 (f L N P) 組成物にする。

【0027】

空の脂質ナノ粒子組成物を調製するためのプロセス

空の脂質ナノ粒子組成物を調製するためのプロセスは、低 p H、低イオン強度、高緩衝

10

20

30

40

50

強度、またはそれらの組み合わせにおける空の脂質ナノ粒子のナノ沈殿を含んでもよい。

【0028】

例えば、いくつかの実施形態は、空の脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスであって、

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質、及び
- (iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約4.5未満のpHを有する緩衝水溶液と混合することを含む、プロセスを含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約3.5から約4.5のpHを有する。別の実施形態では、緩衝水溶液は、約4のpHを有する。

【0030】

空の脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、比較的高い緩衝液濃度、例えば、脂質溶液中の脂質の緩衝効果を支配するのに十分な高い濃度でナノ粒子を沈殿させることを含んでもよい。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約30mMを超える緩衝液濃度を有する。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約40mMを超える緩衝液濃度を有する。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約30mMから約100mMの緩衝液濃度を有する。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約40mMから約75mMの緩衝液濃度を有する。別の実施形態では、緩衝水溶液は、約33mM、約37.5mM、または約45mMの緩衝液濃度を有する。

【0031】

いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約45mMの緩衝液濃度を有する。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約37.5mMの緩衝液濃度を有する。

【0032】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子を調製するプロセスに使用される水性緩衝液は、得られる空の脂質ナノ粒子のpKaよりも低いpHを有する。

【0033】

脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、比較的低いイオン強度でナノ粒子を沈殿させることをさらに含んでもよい。例えば、緩衝水溶液は、約15mM以下、約10mM以下、または約5mM以下のイオン強度を有してもよい。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、約0.1mMから約15mM、約0.1mMから約10mM、または約0.1mMから約5mMのイオン強度を有する。

【0034】

適した緩衝液としては、3から5のpHなどの酸性pHを維持するものが挙げられる。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含んでもよい。いくつかの実施形態では、緩衝水溶液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液を含む。別の実施形態では、緩衝水溶液は、酢酸ナトリウム緩衝液などの酢酸緩衝液である。

【0035】

空の脂質ナノ粒子を調製するプロセスは、比較的高いゼータ電位を特徴とする空の脂質ナノ粒子組成物をもたらす条件下でナノ粒子を沈殿させることを含んでもよい。いくつかの実施形態では、本プロセスは、約35mV以上、約50mV以上、または約100mV以上のゼータ電位を特徴とする空の脂質ナノ粒子組成物を生成する。いくつかの実施形態では、本プロセスは、約35mVから約140mV、約50mVから約120mV、または約60mVから約100mVのゼータ電位を特徴とする空の脂質ナノ粒子組成物を生成する。いくつかの実施形態では、本プロセスは、3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約25%、3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約33%、3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約50%、3から6のp

10

20

30

40

50

H 範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約 66 %、または 3 から 6 の pH 範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約 75 % である、ゼータ電位を特徴とする空の脂質ナノ粒子組成物を生成する。

【0036】

ゼータ電位は、コロイド分散液の界面動電位を測定する。ゼータ電位の大きさは、分散液中の同様に荷電した隣接粒子間の静電反発力の程度を示す。ゼータ電位は、Wyatt Technologies Mobius Zeta Potential 装置で測定することができる。この装置は、「超並列位相解析光散乱」または MP-PALS の原理によって移動度及びゼータ電位を特徴付ける。この測定は、1 つの検出角度のみを使用し、かつ操作により高い電圧を必要とする ISO 法 13099-1:2012 よりも感度が高く、誘導される応力が低い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の空の脂質ナノ粒子組成物の脂質のゼータ電位は、MP-PALS の原理を利用する装置を使用して測定される。

10

【0037】

本プロセスは、少なくとも以下の 4 つの脂質成分：イオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び PEG-脂質を含む組成物である脂質溶液をさらに使用してもよい。任意の適した濃度の脂質溶液を使用することができる。例えば、脂質溶液は、約 5 から約 100 mg/mL、約 15 から約 35 mg/mL、約 20 から約 30 mg/mL、または約 24 mg/mL の脂質濃度を有してもよい。

【0038】

20

脂質溶液は、アルコール、例えば、エタノールなどの有機溶媒をさらに含んでもよい。有機溶媒は、約 1 体積 % から約 50 体積 %、約 5 体積 % から約 40 体積 %、または約 10 体積 % から約 33 体積 % の量で存在することができる。いくつかの実施形態では、溶媒は、100 % エタノールまたは 95 体積 % 超のエタノールである。

【0039】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、総脂質に対して、約 30 mol % から約 60 mol %、約 35 mol % から約 55 mol %、または約 40 mol % から約 50 mol % のイオン化脂質を含む。

【0040】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、総脂質に対して、約 5 mol % から約 15 mol %、約 8 mol % から約 13 mol %、または約 10 % から約 12 mol % のリン脂質を含む。

30

【0041】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、総脂質に対して、約 30 mol % から約 50 mol %、約 35 mol % から約 45 mol %、または約 37 % から約 42 mol % の構造脂質を含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、総脂質に対して、約 0.1 mol % から約 2 mol %、約 0.1 mol % から約 1 mol %、または約 0.25 % から約 0.75 mol % の PEG-脂質を含む。

40

【0043】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、それぞれ総脂質に対して、約 40 mol % から約 50 mol % のイオン化脂質、約 10 mol % から約 12 mol % のリン脂質、約 37 mol % から約 42 mol % の構造脂質、及び約 0.25 mol % から約 0.75 mol % の PEG-脂質を含む。

【0044】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、それぞれ総脂質に対して、約 49 mol % のイオン化脂質、約 11 mol % から約 12 mol % のリン脂質、

50

約 39 mol % の構造脂質、及び
約 0.5 mol % の PEG-脂質を含む。

【0045】

脂質溶液及び緩衝溶液を混合することにより、脂質ナノ粒子が沈殿し、空の脂質ナノ粒子組成物が調製される。沈殿は、例えば、制御可能な形で脂質（エタノール中）を適切な貧溶媒（すなわち水）に導入して、液体過飽和及び脂質粒子への自然沈殿に至らせる高エネルギーミキサー（例えば、T字型接合、拘束衝突噴流、マイクロ流体ミキサー、ボルテックスミキサー）を使用して、エタノール沈殿によって行うことができる。いくつかの実施形態では、混合は、マルチインレットボルテックスミキサーを用いて行われる。いくつかの実施形態では、混合は、WO2014/172045に記載されているようなマイクロ流体ミキサーを用いて行われる。いくつかの実施形態では、混合するステップは、周囲温度、または例えば、約 30℃未満、約 28℃未満、約 26℃未満、約 25℃未満、約 24℃未満、約 22℃未満、または約 20℃未満の温度で行うことができる。

【0046】

沈殿した空の脂質ナノ粒子は、一般に、小さな平均粒径、例えば、約 60 nm 以下、約 50 nm 以下、約 45 nm 以下、約 30 nm 以下、約 25 nm 以下、または約 20 nm 以下の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子は、約 5 nm から約 30 nm または約 10 nm から約 20 nm の平均直径を有する場合がある。平均粒径は、例えば、動的光散乱（DLS）によって測定することができる。さらに、空の脂質ナノ粒子は、実質的に均一な形態を有する場合がある。例えば、空の脂質粒子は、約 1 以下、例えば、約 0.75 以下、0.5 以下、0.4 以下、0.3 以下、0.2 以下、0.1 以下、または 0.05 以下の多分散指数を有する場合がある。空の脂質ナノ粒子のクライオ EM 画像を比較した図 7 を参照のこと。粒子が pH 5 で調製された右側の画像とは対照的に、左側の画像は、本開示に従い pH 4 で調製された、均一な形態を有する粒子を示す。

【0047】

沈殿した空の脂質ナノ粒子は実質的にペイロードを含まず、ここで、ペイロードとは、細胞への送達を意図した、ポリペプチドまたは核酸などの任意の治療剤または予防剤を指す。

【0048】

いくつかの実施形態では、本プロセスは、安定な空の脂質ナノ粒子組成物をもたらす。「安定な」とは、空の脂質ナノ粒子が長期間そのサイズを実質的に維持することを意味する。例えば、空の脂質の平均直径は、25 時間にわたり約 150 % 未満増加するか、または 25 時間にわたり約 100 % 未満増加する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子の平均直径は、25 時間にわたり 50 nm 未満のままであるか、または 25 時間にわたり 40 nm 未満のままである。安定性は、アルコール（例えば、エタノール）などの有機溶媒を含む空の脂質ナノ粒子組成物で示される。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子は、約 1 体積 % から約 30 体積 %、約 10 体積 % から約 30 体積 %、約 20 体積 % から約 30 体積 %、または約 25 体積 % のエタノールの存在下で安定である。

【0049】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子の平均直径は、25℃で 25 時間にわたり 50 nm 以下のままであるか、または 25℃で 25 時間にわたり 40 nm 以下のままである。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子の平均直径は、25 体積 % のエタノールの存在下で少なくとも 24 時間にわたり 30 nm 以下のままである。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子の平均直径は、25℃で 25 体積 % のエタノールの存在下において少なくとも 24 時間にわたり 30 nm 以下のままである。

【0050】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、保存溶液中にある。いくつかの実施形態では、保存溶液は、緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 0.1 mM から約 100 mM、約 0.5 mM から約 90 mM、約 1.0 mM から約 80 mM、約 2 mM から約 70 mM、約 3 mM から約 60 mM、約 4 mM から約 50 mM、約 5

mMから約40mM、約6mMから約30mM、約7mMから約20mM、約8mMから約15mM、または約9mMから約12mMである。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約1から約20mM、約1から約10mM、または約5mMである。いくつかの実施形態では、保存溶液中の緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液のpHは、約3から約8、約4から約7、約4、約5、約6、約7、または約8である。

【0051】

いくつかの実施形態では、保存溶液は、凍結保護物質を含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、1つ以上の凍結保護剤、例えば、ポリオール（例えば、ジオールもしくはトリオール、例えば、プロピレングリコール（すなわち、1,2-プロパンジオール）、1,3-プロパンジオール、グリセロール、(+/-)-2-メチル-2,4-ペンタンジオール、1,6-ヘキサジオール、1,2-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、エチレングリコール、もしくはジエチレングリコール）、非界面活性型スルホベタイン（例えば、NDSB-201（3-（1-ピリジノ）-1-プロパンスルホネート））、オスモライト（例えば、L-プロリンもしくはトリメチルアミンN-オキシド二水和物）、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール200（PEG200）、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG3350、PEG4000、PEG8000、PEG10000、PEG20000、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル550（mPEG550）、mPEG600、mPEG2000、mPEG3350、mPEG4000、mPEG5000、ポリビニルピロリドン（例えば、ポリビニルピロリドンK15）、ペンタエリスリトールプロポキシレート、もしくはポリプロピレングリコールP400）、有機溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）もしくはエタノール）、糖（例えば、D-(+)-スクロース、D-ソルビトール、トレハロース、D-(+)-マルトース水和物、メソ-エリスリトール、キシリトール、ミオイノシトール、D-(+)-ラフィノース五水和物、D-(+)-トレハロース二水和物、もしくはD-(+)-グルコース水和物）、または塩（例えば、酢酸リチウム、塩化リチウム、ギ酸リチウム、硝酸リチウム、硫酸リチウム、酢酸マグネシウム、塩化ナトリウム、ギ酸ナトリウム、マロン酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、もしくはそれらの任意の水和物）、あるいはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースを含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースである。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、塩化ナトリウムである。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロース及び塩化ナトリウムである。

【0052】

いくつかの実施形態では、保存溶液中の空の脂質ナノ粒子濃度は、約5から約100mg/mL、約15から約75mg/mL、または約20から約60mg/mLである。

【0053】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子を含む保存溶液は、約15℃から約25℃、約15℃から約20℃、または約18℃から約20℃に維持される。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子を含む保存溶液は、約1℃から約10℃、約2℃から約9℃、または約3℃から約7℃に維持される。

【0054】

いくつかの実施形態では、保存溶液中の空の脂質ナノ粒子の平均直径は、5℃で少なくとも4か月にわたり30nm以下のままである。

【0055】

空の脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、以下から選択される1つ以上の追加のステップをさらに含んでもよい：

組成物を希釈緩衝液で希釈するステップ、

組成物のpHを約5から約6のpHに調節するステップ、

組成物をろ過するステップ、
組成物を濃縮するステップ、
組成物の緩衝液を交換するステップ、及び
凍結保護物質を組成物に添加するステップ。

【0056】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、上に挙げたステップの1、2、3、4、5つ、またはすべてをさらに含んでもよい。いくつかのステップが繰り返されてもよい。ステップは、列挙された順序で行われてもよいが、その必要はない。各ステップは、先に行ったステップから得られた組成物と関連する行為を指す。例えば、プロセスが組成物の緩衝液を交換するステップを含む場合、緩衝液交換は、上で挙げたステップのいずれかであり得る先行するステップから得られた組成物に対して行われる。

10

【0057】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物を希釈緩衝液で希釈するステップを含む。希釈ステップは、空の脂質ナノ粒子組成物中の有機溶媒の割合を低下させるのに有用であり得る。希釈緩衝液は、約0.1 mMから約100 mM、約0.5 mMから約90 mM、約1.0 mMから約80 mM、約2 mMから約70 mM、約3 mMから約60 mM、約4 mMから約50 mM、約5 mMから約40 mM、約6 mMから約30 mM、約7 mMから約20 mM、約8 mMから約15 mM、または約9 mMから約12 mMの緩衝液濃度を有する緩衝水溶液であってもよい。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約30 mMから約75 mM、約30 mMから約60 mM、または約30 mMから約50 mMである。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液を含む。別の実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液のpHは、約3から約7、約3から約6、約3から約5、約4、約5、約5.5、または約6である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、空の脂質ナノ粒子を沈殿させるために使用される緩衝水溶液中と同じ緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、空の脂質ナノ粒子を沈殿させるために使用される緩衝水溶液のpHと同じか、またはそれよりも高いpHを有する。

20

【0058】

例えば、組成物を希釈緩衝液で希釈することは、図11のILD緩衝液ステップに対応することがある。

30

【0059】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物のpHを約5から約6のpHに調節するステップを含む。例えば、空の脂質ナノ粒子組成物がpH4におけるナノ沈殿を経た場合、さらに高いpHの緩衝液を添加することによって組成物のpHを上げることができる。いくつかの実施形態では、pHは約pH5に調節される。

【0060】

例えば、組成物のpHを約5から約6のpHに調節することは、図1のILD緩衝液ステップに対応することがある。

40

【0061】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物のpHを調節するステップを含まない。例えば、空の脂質ナノ粒子組成物がpH4におけるナノ沈殿を経た場合、組成物のpHは、約4に維持される。

【0062】

いくつかの実施形態では、pH調節のための緩衝液は、約0.1 mMから約100 mM、約0.5 mMから約90 mM、約1.0 mMから約80 mM、約2 mMから約70 mM、約3 mMから約60 mM、約4 mMから約50 mM、約5 mMから約40 mM、約6 mMから約30 mM、約7 mMから約20 mM、約8 mMから約15 mM、または約9 mMから約12 mMの緩衝液濃度を有する緩衝水溶液であってもよい。いくつかの実施形態で

50

は、緩衝液濃度は、約 30 mM から約 75 mM、約 30 mM から約 60 mM、または約 30 mM から約 50 mM で安定している。いくつかの実施形態では、pH 調節のための緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、pH 調節のための緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液を含む。別の実施形態では、pH 調節のための緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、pH 調節のための緩衝液の pH は、約 3 から約 7、約 3 から約 6、約 3 から約 5、約 4、約 5、約 5.5、約 5.6、約 5.7、約 5.8、約 5.9、または約 6 である。いくつかの実施形態では、pH を調節するのに使用される緩衝液はまた、希釈緩衝液であってもよい。

【0063】

いくつかの実施形態では、プロセスは、凍結保護物質を組成物に添加するステップを含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、1 つ以上の凍結保護剤、例えば、ポリオール（例えば、ジオールもしくはトリオール、例えば、プロピレングリコール（すなわち、1,2-プロパンジオール）、1,3-プロパンジオール、グリセロール、（+/-）-2-メチル-2,4-ペンタンジオール、1,6-ヘキサジオール、1,2-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、エチレングリコール、もしくはジエチレングリコール）、非界面活性型スルホベタイン（例えば、NDSB-201（3-（1-ピリジノ）-1-プロパンスルホネート））、オスモライト（例えば、L-プロリンもしくはトリメチルアミン N-オキシド二水和物）、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール 200（PEG 200）、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 3350、PEG 4000、PEG 8000、PEG 10000、PEG 20000、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル 550（mPEG 550）、mPEG 600、mPEG 2000、mPEG 3350、mPEG 4000、mPEG 5000、ポリビニルピロリドン（例えば、ポリビニルピロリドン K15）、ペンタエリスリトールプロポキシレート、もしくはポリプロピレングリコール P400）、有機溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）もしくはエタノール）、糖（例えば、D-（+）-スクロース、D-ソルビトール、トレハロース、D-（+）-マルトース-水和物、メソ-エリスリトール、キシリトール、ミオイノシトール、D-（+）-ラフィノース五水和物、D-（+）-トレハロース二水和物、もしくは D-（+）-グルコース-水和物）、または塩（例えば、酢酸リチウム、塩化リチウム、ギ酸リチウム、硝酸リチウム、硫酸リチウム、酢酸マグネシウム、塩化ナトリウム、ギ酸ナトリウム、マロン酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、もしくはそれらの任意の水和物）、あるいはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースを含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースである。

【0064】

凍結保護物質は、約 0.1 mM から約 100 mM、約 0.5 mM から約 90 mM、約 1.0 mM から約 80 mM、約 2 mM から約 70 mM、約 3 mM から約 60 mM、約 4 mM から約 50 mM、約 5 mM から約 40 mM、約 6 mM から約 30 mM、約 7 mM から約 20 mM、約 8 mM から約 15 mM、または約 9 mM から約 12 mM の緩衝液濃度を有する水性緩衝液を含んでもよい凍結保護物質水溶液の添加によって空の脂質ナノ粒子組成物に添加されてもよい。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 1 から約 20 mM、約 1 から約 10 mM、または約 5 mM である。いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液中の緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液である。別の実施形態では、緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液の pH は、約 3 から約 6、約 4 から約 6、約 4、約 5、または約 6 である。

【0065】

いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 20 mM から約 60 mM、約 25 mM から約 55 mM、約 30 mM から約 50 mM、または約 30 mM から約 40 mM である。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 30 mM から約 38 mM、約 33 mM から約 38 mM、約 35 mM から約 38 mM、または約 37 mM から約 38 mM である。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 37 mM から約 44 mM、約 37 mM から約 42 mM、または約 37 mM から約 40 mM である。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 35 mM、約 36 mM、約 37 mM、約 38 mM、約 39 mM、または約 40 mM である。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 37.5 mM である。

【0066】

いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液は、約 40 % w / v から約 90 % w / v、約 50 % w / v から約 85 % w / v、約 60 % w / v から約 80 % w / v、または約 70 % w / v のスクロースを含む。

10

【0067】

例えば、凍結保護物質を組成物に添加することは、図 1 及び図 11 のスクロース添加ステップに対応することがある。

【0068】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物をろ過するステップ、組成物を濃縮するステップ、及び組成物の緩衝液を交換するステップの 1 つ以上のステップを含む。ろ過、濃縮、及び緩衝液交換ステップは、タンジェンシャルフローろ過 (TFF) を用いて行うことができる。

【0069】

例えば、組成物をろ過すること、組成物を濃縮すること、及び組成物の緩衝液を交換することは、図 1 及び図 11 の TFF ステップに対応することがある。

20

【0070】

いくつかの実施形態では、ろ過するステップは、脂質ナノ粒子組成物から有機溶媒（例えば、エタノールなどのアルコール）及びその他の望ましくない成分を除去することができる。

【0071】

いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、緩衝液濃度を上昇または低下させること、緩衝液組成物を変えること、有機溶媒を除去するか、もしくはその量を低減すること、または pH を変えることによって空の脂質ナノ粒子組成物の組成を変えることができる。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、緩衝液濃度を、例えば、約 1 mM から約 10 mM に、約 2 mM から約 8 mM に、約 4 mM から約 6 mM に、または約 5 mM に低下させることを含む。いくつかの実施形態では、緩衝液交換ステップは、有機溶媒を除去するか、またはその量を低減することを含む。

30

【0072】

いくつかの実施形態では、濃縮ステップは、組成物中の空の脂質ナノ粒子の濃度を増加させることができる。

【0073】

いくつかの実施形態では、プロセスは、少なくとも組成物の pH を約 5 から約 6 の pH に調節するステップを含む。

【0074】

いくつかの実施形態では、プロセスは、少なくとも組成物の pH を約 4.5 から約 6 の pH に調節するステップを含む。

40

【0075】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物の pH を約 5 から約 6 の pH に調節するステップ、及び凍結保護物質を組成物に添加するステップの少なくとも 2 つのステップを含む。

【0076】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物の pH を約 4.5 から約 6 の pH に調節するステップ、及び凍結保護物質を組成物に添加するステップの少なくとも 2 つのステップを含む。

50

【0077】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物がろ過、緩衝液交換、濃縮、またはそれらの組み合わせを受けるTFFを含む少なくとも1つのステップを含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物を希釈することを含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、組成物は、希釈緩衝液で希釈されてもよい。希釈緩衝液は、約0.1mMから約100mM、約0.5mMから約90mM、約1.0mMから約80mM、約2mMから約70mM、約3mMから約60mM、約4mMから約50mM、約5mMから約40mM、約6mMから約30mM、約7mMから約20mM、約8mMから約15mM、または約9mMから約12mMの緩衝液濃度を有する緩衝水溶液であってもよい。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約30mMから約75mM、約30mMから約60mM、または約30mMから約50mMである。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液を含む。別の実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液のpHは、約3から約7、約3から約6、約3から約5、約4、約5、約5.5、または約6である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、空の脂質ナノ粒子を沈殿させるために使用される緩衝水溶液中と同じ緩衝液を含む。

10

【0080】

いくつかの実施形態では、組成物は、酢酸溶液、酢酸ナトリウム溶液、クエン酸溶液、クエン酸ナトリウム溶液、リン酸溶液、またはリン酸ナトリウム溶液で希釈される。いくつかの実施形態では、組成物を希釈することは、組成物のpHを上昇させる。いくつかの実施形態では、組成物を希釈することは、組成物のpHを低下させる。いくつかの実施形態では、組成物が希釈された後の組成物のpHは、約4、約4.5、約5、約5.5、または約6である。

20

【0081】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約4のpHを有する緩衝水溶液と混合することと、

(b) 任意選択的に、約5から約6のpHを有するpH調節緩衝液の添加によって前のステップからの溶液のpHを調節することと、

(c) 任意選択的に、ろ過し、前のステップからの溶液の緩衝液濃度を低下させることと、

(d) 任意選択的に、前のステップからの溶液にスクロースを添加することと、

(e) 任意選択的に、前のステップからの溶液を希釈することと、を含むプロセスによって調製することができる。

30

40

【0082】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約4のpHを有する緩衝水溶液と混合することと、

(b) 約5から約6のpHを有するpH調節緩衝液の添加によって前のステップからの

50

溶液の pH を調節することと、

(c) 任意選択的に、ろ過し、前のステップからの溶液の緩衝液濃度を低下させることと、

(d) 前のステップからの溶液にスクロースを添加することと、

(e) 任意選択的に、前のステップからの溶液を希釈することと、を含むプロセスによって調製することができる。

【0083】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約 4 の pH を有する緩衝水溶液と混合することと、

(b) 任意選択的に、前のステップからの溶液にスクロースを添加することと、

(c) 任意選択的に、前のステップからの溶液を希釈することと、を含むプロセスによって調製することができる。

【0084】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約 4 の pH を有する緩衝水溶液と混合することと、

(b) 前のステップからの溶液にスクロースを添加することと、

(c) 任意選択的に、前のステップからの溶液を希釈することと、を含むプロセスによって調製することができる。

【0085】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約 4 の pH を有する緩衝水溶液と混合することと、

(b) 組成物の pH を約 5 から約 6 の pH に調節することと、

(c) 組成物をろ過することと、

(d) 組成物を濃縮することと、

(e) 組成物の緩衝液を交換することと、

(f) 凍結保護物質を組成物に添加することと、を含むプロセスによって調製することができる。

【0086】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約 4 の pH を有する緩衝水溶液と混合することと、

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、核酸溶液のpHは、約4、約4.5、約5、約5.5、または約6である。

【0095】

いくつかの実施形態では、核酸溶液の緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液である。別の実施形態では、緩衝液は、酢酸ナトリウム緩衝液などの酢酸緩衝液である。核酸溶液の緩衝液濃度は、約5mMから約140mMであってもよい。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約20mMから約100mM、約30mMから約70mM、または約40mMから約50mMである。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約42.5mMである。

10

【0096】

いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約20mMから約60mM、約25mMから約55mM、約30mMから約50mM、または約30mMから約40mMである。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約30mMから約38mM、約33mMから約38mM、約35mMから約38mM、または約37mMから約38mMである。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約37mMから約44mM、約37mMから約42mM、または約37mMから約40mMである。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約35mM、約36mM、約37mM、約38mM、約39mM、または約40mMである。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約37.5mMである。

【0097】

核酸溶液は、約0.05から約5.0mg/mL、0.05から約2.0mg/mL、約0.05から約1.0mg/mL、約0.1から約0.5mg/mL、または約0.2から約0.3mg/mLの濃度の核酸を含んでもよい。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.25mg/mLである。

20

【0098】

いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.2mg/mLから約2.0mg/mL、約0.4mg/mLから約1.8mg/mL、約0.6mg/mLから約1.4mg/mL、または約0.8mg/mLから約1.2mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.5mg/mL、約0.7mg/mL、約1.3mg/mL、または約1.5mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約1.0mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.8mg/mLから約2.6mg/mL、約1.0mg/mLから約2.4mg/mL、約1.2mg/mLから約2.0mg/mL、または約1.4mg/mLから約1.8mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約1.1mg/mL、約1.3mg/mL、約1.9mg/mL、または約2.1mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約1.6mg/mLである。

30

【0099】

いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.05mg/mLから約0.9mg/mL、約0.07mg/mLから約0.7mg/mL、約0.09mg/mLから約0.5mg/mL、または約0.2mg/mLから約0.3mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.15mg/mL、約0.25mg/mL、約0.35mg/mL、または約0.45mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.25mg/mLである。

40

【0100】

いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.08mg/mLから約1.3mg/mL、約0.1mg/mLから約1.1mg/mL、約0.3mg/mLから約0.9mg/mL、または約0.5mg/mLから約0.7mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.46mg/mL、約0.56mg/mL、約0.66mg/mL、または約0.76mg/mLである。いくつかの実施形態では、核酸濃度は、約0.56mg/mLである。

50

【0101】

空の脂質ナノ粒子組成物及び核酸溶液を混ぜ合わせるにより、空の脂質ナノ粒子に核酸が事後充填される。高エネルギーミキサー（例えば、T字型接合、拘束衝突噴流、マイクロ流体ミキサー、ボルテックスミキサー）が使用されてもよい。いくつかの実施形態では、混ぜ合わせることは、マルチインレットボルテックスミキサーを用いて行われる。いくつかの実施形態では、混ぜ合わせることは、WO 2014/172045に記載されているようなマイクロ流体ミキサーを用いて行われる。混ぜ合わせるステップは、周囲温度、または例えば、約30℃未満、約28℃未満、約26℃未満、約25℃未満、約24℃未満、約22℃未満、または約20℃未満の温度で行うことができる。

【0102】

本明細書で開示される空の脂質ナノ粒子組成物に関するカプセル化効率は、有利にも高い。カプセル化効率（EE）は、最初に準備された量に対する、調製後にカプセル化されたか、または別の方法で脂質ナノ粒子と会合した治療薬及び／または予防薬の量を示す。カプセル化効率は、例えば、1つ以上の有機溶媒または界面活性剤で脂質ナノ粒子を分解する前後の脂質ナノ粒子を含む溶液中の治療薬及び／または予防薬（例えば、ペイロード）の量を比較することによって測定してもよい。溶液中に遊離した治療薬及び／または予防薬（例えば、RNA）の量を測定するためにアニオン交換樹脂を使用してもよい。溶液中に遊離した治療薬及び／または予防薬（例えば、RNA）の量を測定するために蛍光を使用してもよい。本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物に関する、治療薬及び／または予防薬のカプセル化効率は、少なくとも約50%、例えば、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%である。いくつかの実施形態では、カプセル化効率は、約90%以上、約95%以上、約97%以上、約98%以上、または約99%以上であることがある。

【0103】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、以下から選択される1つ以上の追加のステップをさらに含む：

- 組成物を希釈緩衝液で希釈するステップ、
- 組成物のpHを約7から約8のpHに調節するステップ、
- 組成物をろ過するステップ、
- 組成物を濃縮するステップ、
- 組成物の緩衝液を交換するステップ、
- 1つ以上の界面活性剤を組成物に添加するステップ、
- 凍結保護物質を組成物に添加するステップ、及び
- 浸透圧調整剤を組成物に添加するステップ。

【0104】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、上に挙げたステップの1、2、3、4、5、6、7つ、またはすべてをさらに含んでもよい。いくつかのステップが繰り返されてもよい。ステップは、列挙された順序で行われてもよいが、その必要はない。各ステップは、先に行ったステップから得られた組成物と関連する行為を指す。例えば、プロセスが1つ以上の界面活性剤を組成物に添加するステップを含む場合、界面活性剤は、上で挙げたステップのいずれかであり得る先行するステップから得られた組成物に添加される。

【0105】

いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のステップは、組成物のpHを約7から約8のpHに調節することである。いくつかの実施形態では、pHは、約7.5のpHに調節される。

【0106】

いくつかの実施形態では、pHは、約7.2のpHに調節される。

【0107】

いくつかの実施形態では、pHは、中和緩衝液を添加することによって調節される。例えば、中和緩衝液を添加することは、図8または図12の中和緩衝液ステップに対応することがある。いくつかの実施形態では、中和緩衝液は、約1mMから約200mM、約10mMから約190mM、約20mMから約190mM、約30mMから約180mM、約40mMから約170mM、約50mMから約160mM、約60mMから約150mM、約70mMから約140mM、約80mMから約130mM、約90mMから約130mM、または約110mMから約125mMの緩衝液濃度を有する水性緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約110mM、約120mM、または約130mMである。いくつかの実施形態では、中和緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液は、トリス緩衝液である。いくつかの実施形態では、中和緩衝液のpHは、約7.0から約8.5、約7.4から約8.5、約7.6から約8.5、約7.8から約8.5、または約8.0から約8.4である。いくつかの実施形態では、中和緩衝液のpHは、約8.0から約8.15、約8.15から約8.25、または約8.25から約8.35である。いくつかの実施形態では、中和緩衝液のpHは、約8.12、約8.2、または約8.3である。いくつかの実施形態では、中和緩衝液は、スクロースを含む。いくつかの実施形態では、中和緩衝液は、約12%w/vから約22%w/v、約14%w/vから約20%w/v、約16%w/vから約18%w/v、または約17%w/vのスクロースを含む。

10

20

【0108】

いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のステップは、界面活性剤を組成物に添加することである。界面活性剤としては、PEG誘導体（例えば、PEG-DMG）、脂質アミン（例えば、ステロールアミン及び関連）、陰イオン性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、ジメチルジオクタデシル-臭化アンモニウムなどのカチオン性界面活性剤）、糖または糖誘導体（例えば、シクロデキストリン）、核酸、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレングリコール、及びポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、アセチルシステイン、マグワート、ブロメライン、パパイン、クレロデンドラム、ブロメキシム、カルボシステイン、エブラジノン、メスナ、アンブロキシソール、ソブレロール、ドミオドール、レトステイン、ステップロニン、チオプロニン、ゲルソリン、チモシン、β4、ドルナーゼアルファ、ネルテネキシム、及びエルドステイン）、ならびにDNアーゼ（例えば、rhDNアーゼ）を挙げることができるが、これらに限定されない。界面活性剤は、ナノ粒子内及び／またはその表面上に（例えば、コーティング、吸着、共有結合、または他のプロセスによって）配置されてもよい。

30

【0109】

例えば、さらなる界面活性剤を組成物に添加することは、図8のPI緩衝液ステップに対応することがある。

【0110】

いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のステップは、浸透圧調整剤を組成物に添加することである。浸透圧調整剤は、塩または糖であってもよい。いくつかの実施形態では、浸透圧調整剤は糖である。糖は、以下に限定されないが、グルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、ラクトース、マルトース、及びデキストロースから選択されてもよい。いくつかの実施形態では、浸透圧調整剤は塩である。塩は、無機塩、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、または塩化マグネシウムであってもよい。いくつかの実施形態では、無機塩は、塩化ナトリウムである。いくつかの実施形態では、塩は、4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-1-エタンスルホン酸ナトリウム塩である。塩は、約100から約500mM、約200から約400mM、約250から約350mM、または約300mMの塩濃度を有する塩溶液として準備されてもよい。塩溶液のpHは、約7から約8であってもよい。塩溶液は、例えば、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む緩衝液をさらに含んでもよい。緩衝液

40

50

濃度は、例えば、約 0.1 mM から約 100 mM、約 0.5 mM から約 90 mM、約 1.0 mM から約 80 mM、約 2 mM から約 70 mM、約 3 mM から約 60 mM、約 4 mM から約 50 mM、約 5 mM から約 40 mM、約 6 mM から約 30 mM、約 7 mM から約 20 mM、約 8 mM から約 15 mM、または約 9 mM から約 12 mM であってもよい。

【0111】

例えば、浸透圧調整剤を組成物に添加することは、図 8 の塩添加ステップに対応することがある。

【0112】

凍結保護物質は、約 0.1 mM から約 100 mM、約 0.5 mM から約 90 mM、約 1.0 mM から約 80 mM、約 2 mM から約 70 mM、約 3 mM から約 60 mM、約 4 mM から約 50 mM、約 5 mM から約 40 mM、約 6 mM から約 30 mM、約 7 mM から約 20 mM、約 8 mM から約 15 mM、または約 9 mM から約 12 mM の緩衝液濃度を有する水性緩衝液を含んでもよい凍結保護物質水溶液の添加によって充填粒子組成物に添加されてもよい。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 1 から約 20 mM、約 1 から約 10 mM、または約 5 mM である。いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液中の緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液である。別の実施形態では、緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液の pH は、約 7 から約 8、例えば、約 7.5 である。いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液は、約 40 重量% から約 90 重量%、約 50 重量% から約 85 重量%、約 60 重量% から約 80 重量%、または約 70 重量% のスクロースを含む。

【0113】

例えば、凍結保護物質を組成物に添加することは、図 8 の充填及び完了ステップに対応することがある。

【0114】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物を希釈緩衝液で希釈するステップを含む。希釈緩衝液は、約 0.1 mM から約 100 mM、約 0.5 mM から約 90 mM、約 1.0 mM から約 80 mM、約 2 mM から約 70 mM、約 3 mM から約 60 mM、約 4 mM から約 50 mM、約 5 mM から約 40 mM、約 6 mM から約 30 mM、約 7 mM から約 20 mM、約 8 mM から約 15 mM、または約 9 mM から約 12 mM の緩衝液濃度を有する緩衝水溶液であってもよい。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約 30 mM から約 75 mM、約 30 mM から約 60 mM、または約 30 mM から約 50 mM である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液を含む。別の実施形態では、希釈緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液の pH は、約 3 から約 7、約 3 から約 6、約 3 から約 5、約 4、約 5、約 5.5、または約 6 である。いくつかの実施形態では、希釈緩衝液は、空の脂質ナノ粒子組成物を核酸溶液と混ぜ合わせる間に使用される緩衝水溶液と同じ緩衝液を含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、プロセスは、組成物をろ過するステップ、組成物を濃縮するステップ、及び組成物の緩衝液を交換するステップの 1 つ以上のステップを含む。ろ過、濃縮、及び緩衝液交換ステップは、タンジェンシャルフローろ過 (TFF) を用いて行うことができる。残存有機溶媒は、ろ過ステップによって除去することができる。

【0116】

例えば、組成物をろ過すること、組成物を濃縮すること、組成物の緩衝液を交換することは、図 8 の TFF ろ過ステップに対応することがある。

【0117】

いくつかの実施形態では、緩衝液交換は、緩衝液濃度を上昇または低下させること、緩衝液組成物を変えること、または pH を変えることによって充填脂質ナノ粒子組成物の組

成を変えることができる。

【0118】

いくつかの実施形態では、濃縮ステップは、組成物中の充填脂質ナノ粒子の濃度を増加させることができる。

【0119】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、少なくとも組成物のpHを約7から約8のpH（例えば、約pH7.5）に調節するステップ、及び浸透圧調整剤（例えば、無機塩）を組成物に添加するステップをさらに含む。

【0120】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、少なくとも組成物のpHを約7から約8のpH（例えば、約pH7.5）に調節するステップ、界面活性剤を組成物に添加するステップ、及び浸透圧調整剤（例えば、無機塩）を組成物に添加するステップをさらに含む。

【0121】

空の脂質ナノ粒子組成物を核酸溶液と混ぜ合わせるにより、充填脂質ナノ粒子組成物が得られる。混ぜ合わせることは、高エネルギーミキサー（例えば、T字型接合、拘束衝突噴流、マイクロ流体ミキサー、ボルテックスミキサー）によって行われてもよい。いくつかの実施形態では、混合は、マルチインレットボルテックスミキサーを用いて行われる。いくつかの実施形態では、混合は、WO2014/172045に記載されているようなマイクロ流体ミキサーを用いて行われる。混ぜ合わせるステップは、周囲温度、または例えば、約30℃未満、約28℃未満、約26℃未満、約25℃未満、約24℃未満、約22℃未満、または約20℃未満の温度で行うことができる。

【0122】

一般的に言えば、充填脂質ナノ粒子組成物は、開始の空の粒子よりも大きな平均直径を有するナノ粒子を含む。例えば、充填粒子は、約160nm未満、約150nm未満、約140nm未満、約130nm未満、約120nm未満、約110nm未満、約100nm未満、約90nm未満、約80nm未満、または約70nm未満の平均直径を有する場合がある。いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、約50から約160nm、約50から約140nm、約50から約120nm、約50から約100nm、約60から約100nm、約70から約90nm、約75から約90、または75から約85nmの平均直径を有する粒子を含む。さらに、充填脂質ナノ粒子組成物は、多分散指数（PDI）により特徴づけられる。例えば、本明細書で開示される充填脂質ナノ粒子組成物に関する多分散指数（PDI）は、約0.12から約0.25であってもよい。

【0123】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、保存溶液中にある。いくつかの実施形態では、保存溶液は、緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約0.1mMから約100mM、約0.5mMから約90mM、約1.0mMから約80mM、約2mMから約70mM、約3mMから約60mM、約4mMから約50mM、約5mMから約40mM、約6mMから約30mM、約7mMから約20mM、約8mMから約15mM、または約9mMから約12mMである。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、約1から約20mM、約1から約10mM、または約5mMである。いくつかの実施形態では、保存溶液中の緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはトリス緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸ナトリウムなどの酢酸緩衝液である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液及びトリス緩衝液である。いくつかの実施形態では、凍結保護物質溶液のpHは、約3から約8、約4から約7、約4、約5、約6、約7、約7.5、または約8である。

【0124】

いくつかの実施形態では、保存溶液は、凍結保護物質を含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、1つ以上の凍結保護剤、例えば、ポリオール（例えば、ジオールもし

10

20

30

40

50

くはトリオール、例えば、プロピレングリコール（すなわち、1，2－プロパンジオール）、1，3－プロパンジオール、グリセロール、（＋／－）－2－メチル－2，4－ペンタンジオール、1，6－ヘキサジオール、1，2－ブタンジオール、2，3－ブタンジオール、エチレングリコール、もしくはジエチレングリコール）、非界面活性型スルホベタイン（例えば、NDSB－201（3－（1－ピリジノ）－1－プロパンスルホネート））、オスモライト（例えば、L－プロリンもしくはトリメチルアミンN－オキシドニ水和物）、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール200（PEG200）、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG3350、PEG4000、PEG8000、PEG10000、PEG20000、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル550（mPEG550）、mPEG600、mPEG2000、mPEG3350、mPEG4000、mPEG5000、ポリビニルピロリドン（例えば、ポリビニルピロリドンK15）、ペンタエリスリトールプロポキシレート、もしくはポリプロピレングリコールP400）、有機溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）もしくはエタノール）、糖（例えば、D－（＋）－スクロース、D－ソルビトール、トレハロース、D－（＋）－マルトース－水和物、メソ－エリスリトール、キシリトール、ミオイノシトール、D－（＋）－ラフィノース五水和物、D－（＋）－トレハロースニ水和物、もしくはD－（＋）－グルコース－水和物）、または塩（例えば、酢酸リチウム、塩化リチウム、ギ酸リチウム、硝酸リチウム、硫酸リチウム、酢酸マグネシウム、塩化ナトリウム、ギ酸ナトリウム、マロン酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、もしくはそれらの任意の水和物）、あるいはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースを含む。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースである。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、塩化ナトリウムである。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロース及び塩化ナトリウムである。

10

20

30

40

50

【0125】

いくつかの実施形態では、保存溶液中の充填脂質ナノ粒子濃度は、0.5から約10mg/mL、約1から約5mg/mL、または約1から約3mg/mLである。

【0126】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子を含む保存溶液は、約15℃から約25℃、約15℃から約20℃、または約18℃から約20℃に維持される。いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子を含む保存溶液は、約1℃から約10℃、約2℃から約9℃、または約3℃から約7℃に維持される。

【0127】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスは、

- (c) 組成物のpHを約7から約8のpHに調節することと、
- (d) 1つ以上の界面活性剤を組成物に添加することと、
- (e) 組成物を濃縮することと、
- (f) 無機塩を組成物に添加することと、
- (g) 組成物を希釈することと、をさらに含んでもよい。

【0128】

いくつかの実施形態は、

- (a)
 - (i) イオン化脂質、
 - (ii) リン脂質、
 - (iii) 構造脂質、及び
 - (iv) PEG－脂質を含む脂質溶液を

約4.5未満のpHを有する緩衝水溶液と混合して、空の脂質ナノ粒子組成物を得ることと、

(b) 空の脂質ナノ粒子組成物をパイロードと混ぜ合わせて、充填脂質ナノ粒子組成物を形成することと、

- (c) 組成物のpHを約7から約8のpHに調節することと、

(d) 1つ以上の界面活性剤を組成物に添加することと、
(e) 組成物をろ過することと、
(f) 組成物を濃縮することと、
(g) 組成物の緩衝液を交換することと、
(h) 浸透圧調整剤を組成物に添加することと、
(i) 凍結保護物質を組成物に添加することと、を含む充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスを含む。

【0129】

いくつかの実施形態は、

(a)

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む脂質溶液を

約4.5未満のpHを有する緩衝水溶液と混合して、空の脂質ナノ粒子組成物を得ることと、

(b) 空の脂質ナノ粒子組成物をペイロードと混ぜ合わせて、充填脂質ナノ粒子組成物を形成することと、

(c) 組成物のpHを約7から約8のpHに調節することと、

(d) 1つ以上の界面活性剤を組成物に添加することと、を含む充填脂質ナノ粒子組成物を調製するプロセスを含む。

【0130】

いくつかの実施形態は、充填脂質ナノ粒子組成物を調製するための本明細書に記載のいずれかのプロセスによって調製された充填脂質ナノ粒子組成物を含む。

【0131】

脂質ナノ粒子組成物

水、有機溶媒、緩衝液、凍結保護物質、医薬添加剤、またはそれらの組み合わせなどの任意の多くの他の成分を含む空の脂質ナノ粒子組成物も提供される。空の脂質ナノ粒子は、治療的または予防的使用のための搭載または充填脂質ナノ粒子組成物を調製するのに適している。空の脂質ナノ粒子組成物は、水及び／または有機溶媒が組成物中に存在し、粒子が液体媒体中に懸濁しているか、または別の方法で存在する液体形態で提供されてもよい。空の脂質ナノ粒子組成物はまた、凍結形態または凍結乾燥形態などの固体形態で提供されてもよい。

【0132】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む空の脂質ナノ粒子を含む空の脂質ナノ粒子組成物を含み、空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a) ペイロードを実質的に含まず、

(b) 約3から約5のpHを有し、

(c) 約35mV以上のゼータ電位を特徴とする。

【0133】

空の脂質ナノ粒子組成物は、ペイロードを実質的に含まず、例えば、いかなる治療用または予防用タンパク質または核酸も実質的に含まず、それにより組成物がペイロードを含む搭載または充填脂質ナノ粒子の調製に有用になる。

【0134】

空の脂質ナノ粒子組成物は、約35mV以上の比較的高いゼータ電位を有することの特徴とする場合がある。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、約50mV

10

20

30

40

50

以上、または約100mV以上のゼータ電位を特徴とする。別の実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、約35mVから約140mV、約50mVから約120mV、または約60mVから約100mVのゼータ電位を特徴とする。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約25%、3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約33%、3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約50%、3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約66%、または3から6のpH範囲において組成物に関して達成可能な最大のゼータ電位の少なくとも約75%である、ゼータ電位を特徴とする。

10

【0135】

空の脂質ナノ粒子組成物は、例えば、約3から約5の酸性pHを有することを特徴とする場合がある。いくつかの実施形態では、組成物は、約3.5から約4.5のpHを有する。別の実施形態では、組成物は、約4のpHを有する。別の実施形態では、組成物は、約5のpHを有する。

【0136】

空の脂質ナノ粒子組成物は、約30nm未満、約25nm未満、または約20nm未満の平均直径を有する空の脂質ナノ粒子を有することを特徴とする場合がある。いくつかの実施形態では、組成物の空の脂質ナノ粒子は、約5nmから約20nm、約8nmから約20nm、または約10nmから約20nmの平均直径を有する。

20

【0137】

空の脂質ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子組成物の均一性、例えば、粒度分布を示すために使用可能な多分散指数(PDI)によりさらに特徴づけられてもよい。小さい(例えば、0.3未満の)多分散指数は一般に、狭い粒度分布を示す。本明細書に記載される空の脂質ナノ粒子組成物は、約0から約0.25、約0.10から約0.25、約0.15から約0.25、または約0.2から約0.25の多分散指数を有する場合がある。

【0138】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、約1から約100mg/mL、約25から約75mg/mL、約40から約60mg/mL、または約50mg/mLの空の脂質ナノ粒子の濃度を有する。

30

【0139】

いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、緩衝液を含む。例えば、組成物は、約1から約100mMの緩衝液、約1から約10mMの緩衝液、または約5mMの緩衝液を含む場合がある。適した緩衝液は、比較的低いイオン強度で酸性pHを維持することができるいずれかのものである。例示的な緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、またはそれらの組み合わせを含む。

【0140】

空の脂質ナノ粒子組成物は、例えば、本明細書に記載のいずれかのものなどの凍結保護物質をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースである。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、約1から約50%w/v、約10から約30%w/v、または約20%w/vのスクロース(または他の凍結保護物質)を含んでもよい。別の実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、約1から約15%w/v、約5から約10%w/v、約7から約8%w/v、または約7.5%w/vのスクロース(または他の凍結保護物質)を含んでもよい。

40

【0141】

いくつかの実施形態では、本発明の空の脂質ナノ粒子組成物は、有機溶媒をさらに含んでもよい。有機溶媒は、一般に水と混和性である。例となる有機溶媒としては、エタノールなどのアルコールが挙げられる。いくつかの実施形態では、有機溶媒は、約25体積%以下の量で存在する。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、約25体積%のエタノールを含む。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、0から約

50

25%、約0から約10%、または0から約5%の有機溶媒を含む。いくつかの実施形態では、空の脂質ナノ粒子組成物は、有機溶媒を実質的に含まない。

【0142】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む約1から約100mg/mLの空の脂質ナノ粒子を含む空の脂質ナノ粒子組成物を含み、

空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a) ペイロードを実質的に含まず、

(b) 約4から約5のpHを有し、

(c) 約35mV以上のゼータ電位を特徴とし、

(d) 酢酸緩衝液またはクエン酸緩衝液から選択される約1mMから約100mMの緩衝液をさらに含み、

(e) 約1から約50%w/vの凍結保護物質をさらに含む。

10

【0143】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む約25から約75mg/mLの空の脂質ナノ粒子を含む空の脂質ナノ粒子組成物を含み、

空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a) ペイロードを実質的に含まず、

(b) 約5のpHを有し、

(c) 約35mV以上のゼータ電位を特徴とし、

(d) 約1mMから約10mMの酢酸緩衝液をさらに含み、

(e) 約10から約30%w/vのスクロースをさらに含む。

20

【0144】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

(i) イオン化脂質、

(ii) リン脂質、

(iii) 構造脂質、及び

(iv) PEG-脂質を含む約50mg/mLの空の脂質ナノ粒子を含む空の脂質ナノ粒子組成物を含み、

空の脂質ナノ粒子組成物は、

(a) ペイロードを実質的に含まず、

(b) 約5のpHを有し、

(c) 約35mV以上のゼータ電位を特徴とし、

(d) 約5mMの酢酸緩衝液をさらに含み、

(e) 約20%w/vのスクロースをさらに含む。

30

40

【0145】

いくつかの実施形態は、充填脂質ナノ粒子及び水、有機溶媒、緩衝液、凍結保護物質、またはそれらの組み合わせなどの任意の多くの他の成分を含む充填脂質ナノ粒子組成物を含む。充填脂質ナノ粒子は、一般に患者における治療的または予防的使用に適している。充填脂質ナノ粒子組成物は、水及び／または有機溶媒が組成物中に存在し、粒子が液体媒体中に懸濁しているか、または別の方法で存在する液体形態で提供されてもよい。充填脂質ナノ粒子組成物はまた、凍結形態または凍結乾燥形態などの固体形態で提供されてもよい。

50

【0146】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質、
- (iv) PEG-脂質、及び

(v) ペイロードを含む充填脂質ナノ粒子を含む充填脂質ナノ粒子組成物を含み、
充填脂質ナノ粒子組成物は、約4.5から約8のpHを有する。

【0147】

充填脂質ナノ粒子組成物は、本明細書に記載される空の脂質ナノ粒子組成物に充填することによって調製することができる。充填脂質ナノ粒子組成物は、約5から約8のpHを有してもよい。いくつかの実施形態では、例えば、充填から直接得られた充填脂質ナノ粒子組成物は、約5のpHを有する場合がある。いくつかの実施形態では、例えば、充填脂質ナノ粒子組成物が中和された場合、約7から約8、例えば、約7.5のpHを有する場合がある。

10

【0148】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、約0.1から約10mg/mL、約0.5から約5mg/mL、約1から約2mg/mL、約2mg/mL、または約1mg/mLのペイロード濃度を有する。

【0149】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、本明細書に記載の任意の凍結保護物質などの、凍結保護物質をさらに含む。充填脂質ナノ粒子組成物は、約0.1%w/vから約10%w/v、約1%w/vから約5%w/v、または約3%w/vから約4%w/vの量で凍結保護物質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、凍結保護物質は、スクロースである。

20

【0150】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、本明細書に記載の任意の無機塩などの、無機塩をさらに含む。いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、約5mMから約150mM、約10mMから約100mM、約50mMから約90mM、または約70mMを含む。いくつかの実施形態では、無機塩は、NaClである。

30

【0151】

いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、緩衝液をさらに含む。例示的な緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、約5mMから約100mMの緩衝液、約7.5mMから約75mMの緩衝液、約10mMから約50mMの緩衝液、または約30mMから約50mMの緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液もしくはTris緩衝液、またはそれらの組み合わせを含む。別の実施形態では、緩衝液は、酢酸緩衝液及びTris緩衝液を含む。

【0152】

充填脂質ナノ粒子組成物は、平均直径によりさらに特徴づけられてもよい。充填脂質ナノ粒子は、開始の空の粒子よりも大きな平均直径を有する場合がある。例えば、充填粒子は、約160nm未満、約150nm未満、約140nm未満、130nm未満、120nm未満、110nm未満、約100nm未満、約90nm未満、約80nm未満、または約70nm未満の平均直径を有する場合がある。いくつかの実施形態では、充填脂質ナノ粒子組成物は、約50から約160nm、約50から約140nm、約50から約120nm、約50から約100nm、約60から約100nm、約70から約90nm、約75から約90、または75から約85nmの平均直径を有する粒子を含む。

40

【0153】

充填脂質ナノ粒子組成物は、多分散指数(PDI)によりさらに特徴づけられてもよい。本明細書に記載される充填脂質ナノ粒子組成物は、約0から約0.25、約0.10か

50

ら約 0.25、約 0.15 から約 0.25、または約 0.2 から約 0.25 の多分散指数を有する場合がある。

【0154】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質、
- (iv) PEG-脂質、及び
- (v) ペイロードを含む充填脂質ナノ粒子組成物を含み、

充填脂質ナノ粒子組成物は、

- (a) 約 7 から約 8 の pH を有し、
- (d) 約 5 mM から約 100 mM の緩衝液をさらに含み、
- (c) 約 0.1 から約 10 % w/v の凍結保護物質をさらに含み、
- (d) 約 5 mM から約 150 mM の無機塩をさらに含み、
- (e) 約 0.1 mg/mL から約 10 mg/mL のペイロードを有する。

10

【0155】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質、
- (iv) PEG-脂質、及び
- (v) 核酸を含むペイロードを含む充填脂質ナノ粒子組成物を含み、

充填脂質ナノ粒子組成物は、

- (a) 約 7 から約 8 の pH を有し、
- (b) 酢酸緩衝液及び Tris 緩衝液を含む約 10 mM から約 50 mM の緩衝液をさらに含み、
- (c) 約 1 % w/v から約 5 % w/v のスクロースをさらに含み、
- (d) 約 50 mM から約 90 mM の NaCl をさらに含み、
- (e) 約 0.1 mg/mL から約 10 mg/mL のペイロードを有する。

20

【0156】

いくつかの実施形態は、以下の成分：

- (i) イオン化脂質、
- (ii) リン脂質、
- (iii) 構造脂質、
- (iv) PEG-脂質、及び
- (v) RNA を含むペイロードを含む充填脂質ナノ粒子組成物を含み、

充填脂質ナノ粒子組成物は、

- (a) 約 7 から約 8 の pH を有し、
- (b) 酢酸緩衝液及びトリス緩衝液を含む約 10 mM から約 50 mM の緩衝液をさらに含み、
- (c) 約 1 % から約 5 % のスクロースをさらに含み、
- (d) 約 70 mM の NaCl をさらに含み、
- (e) 約 1 mg/mL から約 2 mg/mL のペイロードを有する。

30

40

【0157】

いくつかの実施形態では、空のまたは充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して、約 30 mol % から約 60 mol %、約 35 mol % から約 55 mol %、または約 40 mol % から約 50 mol % のイオン化脂質を含む。

【0158】

いくつかの実施形態では、空のまたは充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して、約 5 mol % から約 15 mol %、約 8 mol % から約 13 mol %、または約 10 mol %

50

%から約12mol%のリン脂質を含む。

【0159】

いくつかの実施形態では、空のまたは充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して、約30mol%から約50mol%、約35mol%から約45mol%、または約37mol%から約42mol%の構造脂質を含む。

【0160】

いくつかの実施形態では、空のまたは充填脂質ナノ粒子組成物は、総脂質に対して、約0.1mol%から約2mol%、約0.1mol%から約1mol%、または約0.25mol%から約0.75mol%のPEG-脂質を含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、空のまたは充填脂質ナノ粒子組成物は、それぞれ総脂質に対して、

約40mol%から約50mol%のイオン化脂質、

約10mol%から約12mol%のリン脂質、

約37mol%から約42mol%の構造脂質、及び

約0.25mol%から約0.75mol%のPEG-脂質を含む。

【0162】

いくつかの実施形態では、脂質溶液は、それぞれ総脂質に対して、

約49mol%のイオン化脂質、

約11mol%から約12mol%のリン脂質、

約39mol%の構造脂質、及び

約0.5mol%のPEG-脂質を含む。

【0163】

本明細書で提供される任意の空のまたは充填脂質ナノ粒子組成物は、保存または輸送のために調製することができる。例えば、空のまたは充填脂質ナノ粒子組成物は、冷蔵、凍結、または凍結乾燥されてもよい。いくつかの実施形態では、本開示の脂質ナノ粒子及び／または医薬組成物は、保存及び／または輸送のために、例えば、約-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、または-80℃で冷蔵または冷凍される。

【0164】

イオン化脂質

本明細書で使用される場合、「イオン化脂質」という用語は、当該技術分野におけるその通常の意味を有し、1つ以上の荷電部分を含む脂質を指し得る。いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、正に荷電していても、または負に荷電していてもよい。例えば、イオン化脂質は、低いpHで正に荷電している場合があり、その場合、それは「カチオン性脂質」と称され得る。ある特定の実施形態では、イオン化脂質分子は、アミン基を含んでよく、イオン化アミノ脂質と称され得る。本明細書で使用される場合、「荷電部分」は、形式的な電子電荷、例えば、一価(+1、または-1)、二価(+2、または-2)、三価(+3、または-3)などを持つ化学部分である。荷電部分は、アニオン性(すなわち、負に荷電している)またはカチオン性(すなわち、正に荷電している)であってもよい。正に荷電した部分の例としては、アミン基(例えば、第一級、第二級、及び／または第三級アミン)、アンモニウム基、ピリジニウム基、グアニジン基、ならびにイミジゾリウム(imidizolium)基が挙げられる。特定の実施形態では、荷電部分はアミン基を含む。負に荷電した基またはその前駆体の例としては、カルボキシレート基、スルホネート基、サルフェート基、ホスホネート基、ホスフェート基、ヒドロキシル基などが挙げられる。荷電部分の電荷は、いくつかの場合では、環境条件によって変動する場合があり、例えば、pHの変化によって、部分の電荷が変化する場合がある、及び／または部分が荷電するようになるか、もしくは非荷電になる場合がある。一般に、分子の電荷密度は、所望に応じて選択されてもよい。

【0165】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、約30mol%から約60m

10

20

30

40

50

0.1%のイオン化脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、約35mol%から約55mol%のイオン化脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、約40mol%から約50mol%のイオン化脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、約45mol%から約50mol%のイオン化脂質を含む。

【0166】

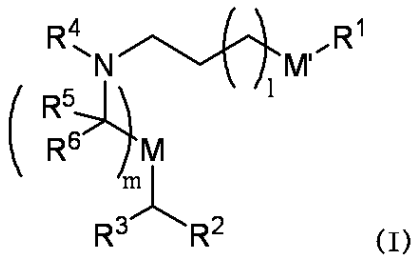
いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、イオン化アミノ脂質である。一実施形態では、イオン化アミノ脂質は、リンカー構造を介して接続された、正に荷電した親水性頭部及び疎水性尾部を有し得る。

【0167】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式(I)：

10

【化1】

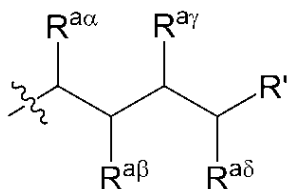


の化合物またはそのN-オキシドもしくは塩であり、式中、

20

R¹は、

【化2】



であり、

【化3】



30

は、結合点を示し、

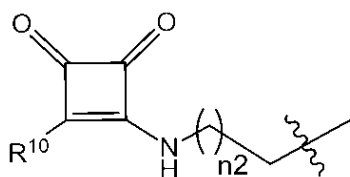
R^{aα}、R^{aβ}、R^{aγ}、及びR^{aδ}は、それぞれ独立して、H、C₂~12アルキル、及びC₂~12アルケニルから選択され、

R²及びR³は、それぞれ独立して、C₁~14アルキル及びC₂~14アルケニルから選択され、

R⁴は、-(CH₂)_nOH及び

【化4】

40



から選択され、

nは、1、2、3、4、及び5から選択され、

50

【化 5】



は、結合点を示し、

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり、

各 R は、独立して、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

各 R^5 は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

各 R^6 は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

M 及び M' は、それぞれ独立して、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ から選択され、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

l は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

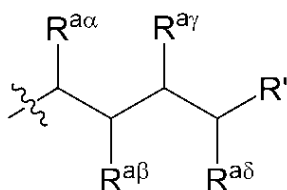
m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 から選択される。

【0168】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (I) の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

【化 6】



であり、

【化 7】



は、結合点を示し、

R^{α} 、 R^{β} 、 R^{γ} 、及び R^{δ} は、それぞれ H であり、

R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_1 \sim 14$ アルキルであり、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、

n は、2 であり、

各 R^5 は、 H であり、

各 R^6 は、 H であり、

M 及び M' は、それぞれ $-C(O)O-$ であり、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、

l は、5 であり、

m は、7 である。

【0169】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (I) の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

10

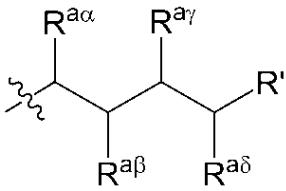
20

30

40

50

【化 8】



であり、

【化 9】



10

は、結合点を示し、

 $R^{\alpha\alpha}$ 、 $R^{\alpha\beta}$ 、 $R^{\alpha\gamma}$ 、及び $R^{\alpha\delta}$ は、それぞれ H であり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_1 \sim C_{14}$ アルキルであり、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2 であり、各 R^5 は、H であり、各 R^6 は、H であり、 M 及び M' は、それぞれ $-C(O)O-$ であり、

20

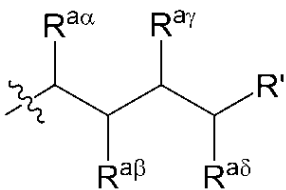
 R' は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 l は、3 であり、 m は、7 である。

【0170】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (I) の化合物またはその N-オキシド
もしくは塩であり、式中、

 R^1 は、

【化 10】



30

であり、

【化 11】

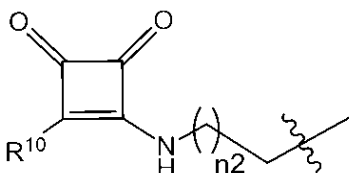


は、結合点を示し、

40

 $R^{\alpha\alpha}$ は、 $C_2 \sim C_{12}$ アルキルであり、 $R^{\alpha\beta}$ 、 $R^{\alpha\gamma}$ 、及び $R^{\alpha\delta}$ は、それぞれ H であり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_1 \sim C_{14}$ アルキルであり、 R^4 は、

【化 12】



50

であり、

R^{10} は、 $-NH(C_{1\sim6}\text{アルキル})$ であり、

n_2 は、2 であり、

各 R^5 は、H であり、

各 R^6 は、H であり、

M 及び M' は、それぞれ $-C(O)O-$ であり、

R' は、 $C_{1\sim12}$ アルキルであり、

l は、5 であり、

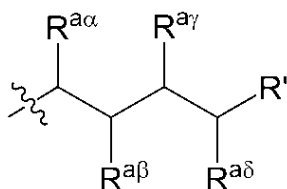
m は、7 である。

【0171】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (I) の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

【化13】



10

20

であり、

【化14】



は、結合点を示し、

$R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ H であり、

$R^{a\gamma}$ は、 $C_{2\sim12}$ アルキルであり、

R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_{1\sim14}$ アルキルであり、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、

n は、2 であり、

各 R^5 は、H であり、

各 R^6 は、H であり、

M 及び M' は、それぞれ $-C(O)O-$ であり、

R' は、 $C_{1\sim12}$ アルキルであり、

l は、5 であり、

m は、7 である。

【0172】

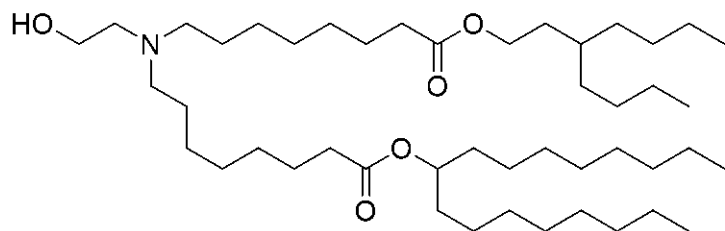
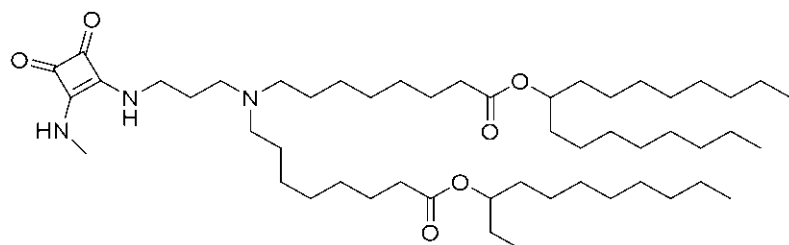
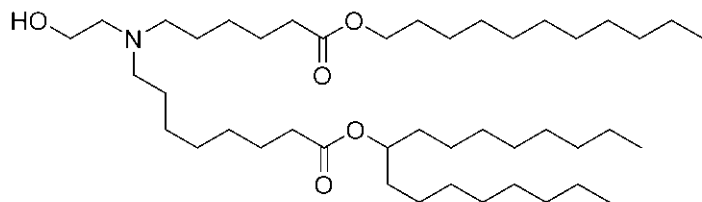
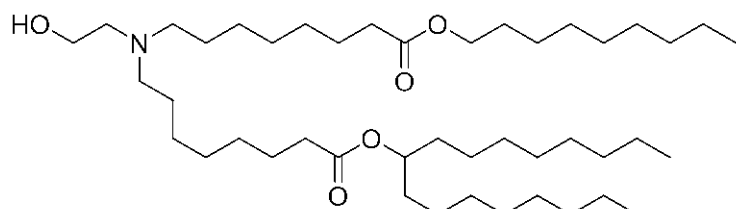
いくつかの実施形態では、イオン化可脂質は、

30

40

50

【化 1 5】



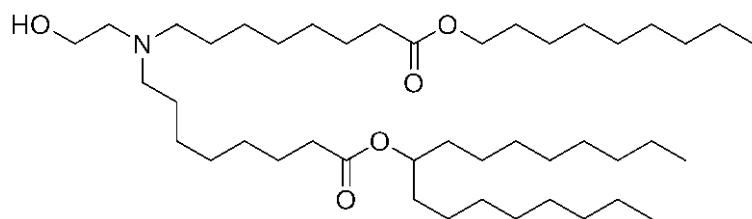
、及び

またはその N-オキシドもしくは塩から選択される。

【0173】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、化合物：

【化 1 6】

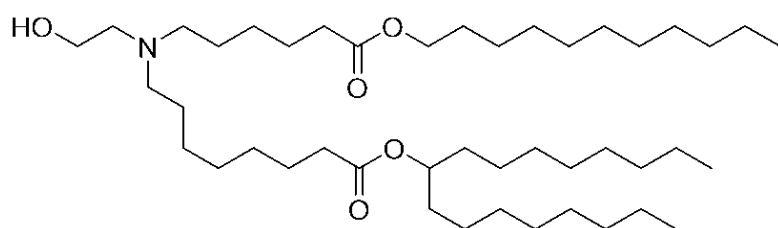


またはその N-オキシドもしくは塩である。

【0174】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、化合物：

【化 1 7】

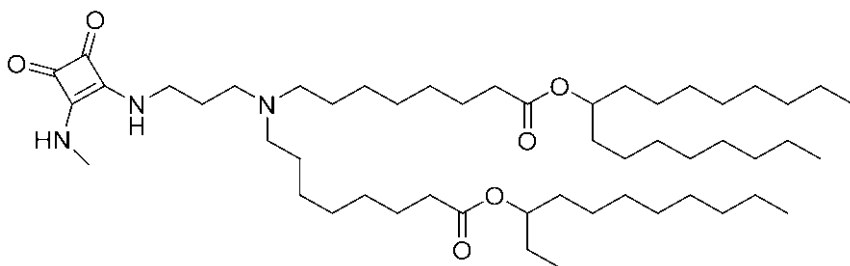


またはその N-オキシドもしくは塩である。

【0175】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、化合物：

【化 1 8】



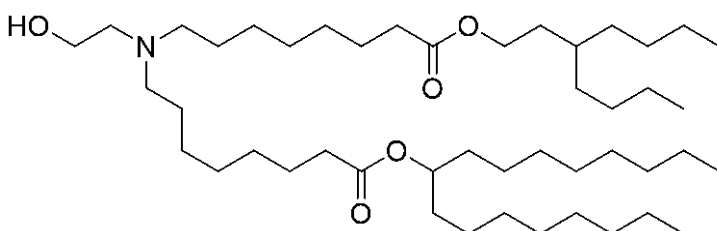
10

またはその N-オキシドもしくは塩である。

【0 1 7 6】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、化合物：

【化 1 9】



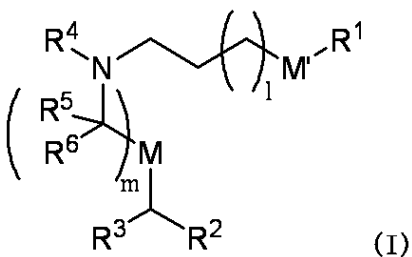
20

またはその N-オキシドもしくは塩である。

【0 1 7 7】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (I)：

【化 2 0】

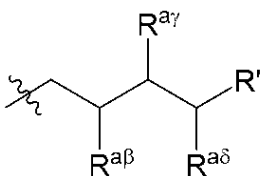


30

の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

【化 2 1】



40

であり、

【化 2 2】



は、結合点を示し、

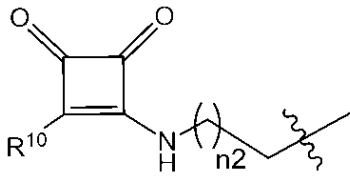
$R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ独立して、H、 $C_2 \sim 12$ アルキル、及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

50

R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキル及び $C_2 \sim 14$ アルケニルから選択され、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ 及び

【化 2 3】



10

から選択され、

【化 2 4】



は、結合点を示し、

n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり、

各 R は、独立して、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

20

各 R^5 は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

各 R^6 は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

M 及び M' は、それぞれ独立して、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ から選択され、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

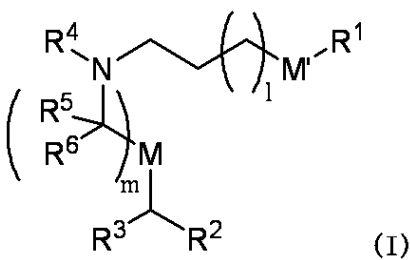
l は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 から選択される。

【0 1 7 8】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (I) :

【化 2 5】

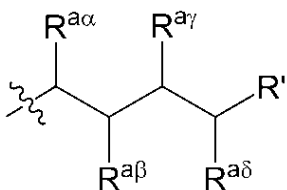


30

の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

【化 2 6】



40

であり、

【化 2 7】



50

は、結合点を示し、

$R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ独立して、 H 、 $C_2 \sim 12$ アルキル、及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキル及び $C_2 \sim 14$ アルケニルから選択され、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

各 R^5 は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

各 R^6 は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

M 及び M' は、それぞれ独立して、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ から選択され、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

l は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 から選択される。

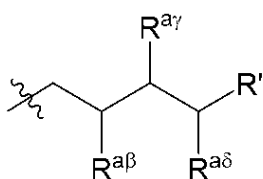
10

【0179】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (I) の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

【化28】



20

であり、

【化29】



は、結合点を示し、

$R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ H であり、

30

R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_1 \sim 14$ アルキルであり、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、

n は、2 であり、

各 R^5 は、 H であり、

各 R^6 は、 H であり、

M 及び M' は、それぞれ $-C(O)O-$ であり、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、

l は、5 であり、

m は、7 である。

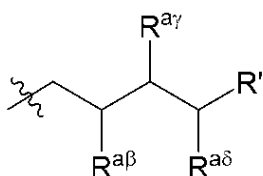
40

【0180】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (I) の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

【化30】



50

であり、

【化 3 1】



は、結合点を示し、

$R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ H であり、

R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_1 \sim C_{14}$ アルキルであり、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、

n は、2 であり、

各 R^5 は、H であり、

各 R^6 は、H であり、

M 及び M' は、それぞれ $-C(O)O-$ であり、

R' は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、

l は、3 であり、

m は、7 である。

10

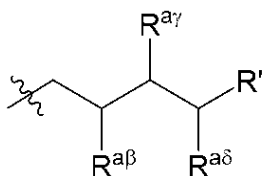
【0181】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (I) の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、

R^1 は、

20

【化 3 2】



であり、

【化 3 3】



30

は、結合点を示し、

$R^{a\beta}$ 及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ H であり、

$R^{a\gamma}$ は、 $C_2 \sim C_{12}$ アルキルであり、

R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_1 \sim C_{14}$ アルキルであり、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、

n は、2 であり、

各 R^5 は、H であり、

各 R^6 は、H であり、

M 及び M' は、それぞれ $-C(O)O-$ であり、

R' は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、

l は、5 であり、

m は、7 である。

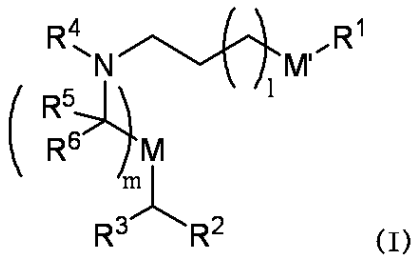
40

【0182】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (I) :

50

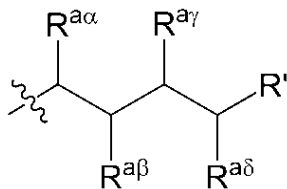
【化 3 4】



の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、

R¹ は、

【化 3 5】



であり、

【化 3 6】



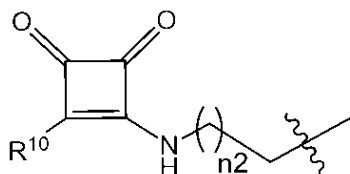
は、結合点を示し、

R^{aα}、R^{aβ}、R^{aγ}、及び R^{aδ} は、それぞれ独立して、H、C₂~₁₂アルキル、及び C₂~₁₂アルケニルから選択され、

R² 及び R³ は、それぞれ独立して、C₁~₁₄アルキル及び C₂~₁₄アルケニルから選択され、

R⁴ は、

【化 3 7】



であり、

【化 3 8】



は、結合点を示し、

R¹⁰ は、N(R)₂であり、

各 R は、独立して、C₁~₆アルキル、C₂~₃アルケニル、及び H から選択され、

n₂ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

各 R⁵ は、独立して、C₁~₃アルキル、C₂~₃アルケニル、及び H から選択され、

各 R⁶ は、独立して、C₁~₃アルキル、C₂~₃アルケニル、及び H から選択され、

M 及び M' は、それぞれ独立して、-C(O)O- 及び -OC(O)- から選択され、

R' は、C₁~₁₂アルキルまたは C₂~₁₂アルケニルであり、

l は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

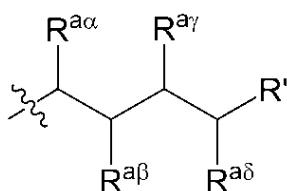
mは、5、6、7、8、9、10、11、12、及び13から選択される。

【0183】

いくつかの実施形態では、

R¹は、

【化39】



10

であり、

【化40】



は、結合点を示し、

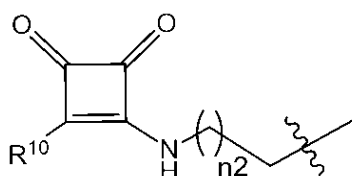
R^{\alpha\beta}、R^{\alpha\gamma}、及びR^{\alpha\delta}は、それぞれHであり、

R^{\alpha\alpha}は、C₂~12アルキルであり、

R²及びR³は、それぞれC₁~14アルキルであり、

R⁴は、

【化41】



20

であり、

【化42】



30

は、結合点を示し、

R¹⁰は、NH (C₁~6アルキル) であり、

n₂は、2であり、

各R⁵は、Hであり、

各R⁶は、Hであり、

M及びM'は、それぞれ-C(O)O-であり、

R'は、C₁~12アルキルであり、

lは、5であり、

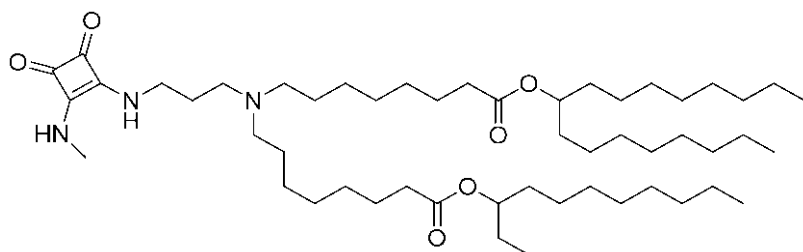
mは、7である。

【0184】

いくつかの実施形態では、式(I)のイオン化脂質は、

40

【化 4 3】



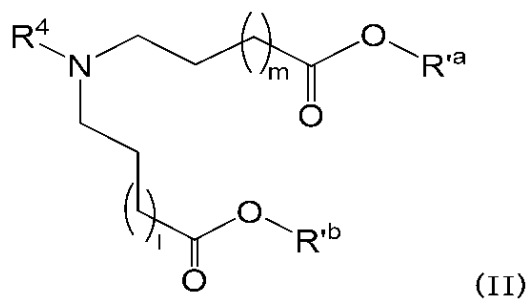
またはその N-オキシドもしくは塩である。

10

【0185】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (II) :

【化 4 4】



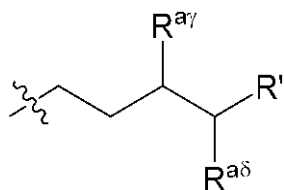
20

の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、

R^a は、R 分岐鎖または R 環状であり、

R 分岐鎖は

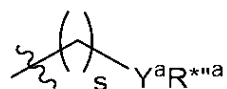
【化 4 5】



30

であり、R 環状は

【化 4 6】

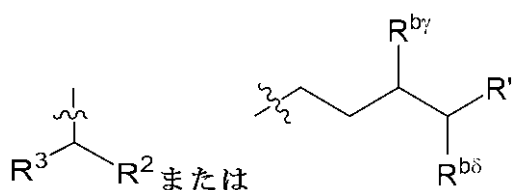


であり、

R^b は、

40

【化 4 7】



であり、

50

【化 4 8】



は、結合点を示し、

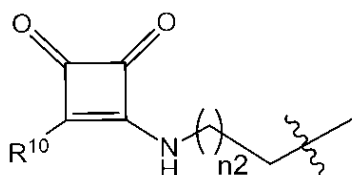
$R^{a\gamma}$ 及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ独立して、 H 、 $C_1 \sim 12$ アルキル、及び $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、 $R^{a\gamma}$ 及び $R^{a\delta}$ のうちの少なくとも 1 つは、 $C_1 \sim 12$ アルキル及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

$R^{b\gamma}$ 及び $R^{b\delta}$ は、それぞれ独立して、 H 、 $C_1 \sim 12$ アルキル、及び $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、 $R^{b\gamma}$ 及び $R^{b\delta}$ のうちの少なくとも 1 つは、 $C_1 \sim 12$ アルキル及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキル及び $C_2 \sim 14$ アルケニルから選択され、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ 及び

【化 4 9】



から選択され、

【化 5 0】



は、結合点を示し、

n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり、

各 R は、独立して、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

各 R' は、独立して、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

Y^a は、 $C_3 \sim 6$ 炭素環であり、

R^{*a} は、 $C_1 \sim 15$ アルキル及び $C_2 \sim 15$ アルケニルから選択され、

s は、2 または 3 であり、

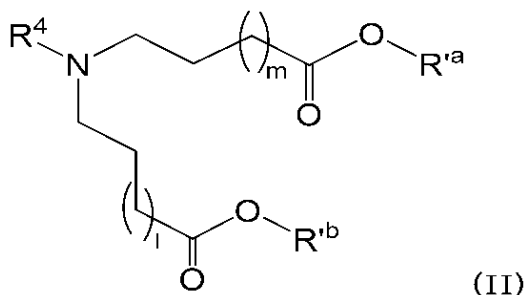
m は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択され、

l は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択される。

【0186】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (II) :

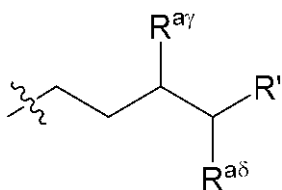
【化 5 1】



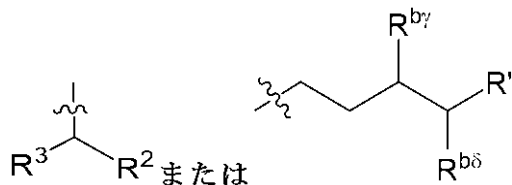
の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

$R^{a\gamma}$ は、 R 分岐鎖または R 環状であり、
 R 分岐鎖は

【化 5 2】



であり、 $R^{b\gamma}$ は、
 【化 5 3】



であり、
 【化 5 4】



は、結合点を示し、

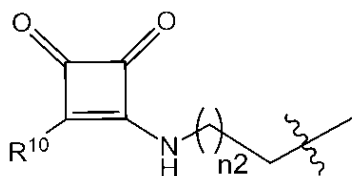
$R^{a\gamma}$ 及び $R^{a\delta}$ は、それぞれ独立して、 H 、 $C_1 \sim 12$ アルキル、及び $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、 $R^{a\gamma}$ 及び $R^{a\delta}$ のうちの少なくとも 1 つは、 $C_1 \sim 12$ アルキル及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

$R^{b\gamma}$ 及び $R^{b\delta}$ は、それぞれ独立して、 H 、 $C_1 \sim 12$ アルキル、及び $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、 $R^{b\gamma}$ 及び $R^{b\delta}$ のうちの少なくとも 1 つは、 $C_1 \sim 12$ アルキル及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキル及び $C_2 \sim 14$ アルケニルから選択され、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ 及び

【化 5 5】



から選択され、

【化 5 6】



は、結合点を示し、

n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり、

各 R は、独立して、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

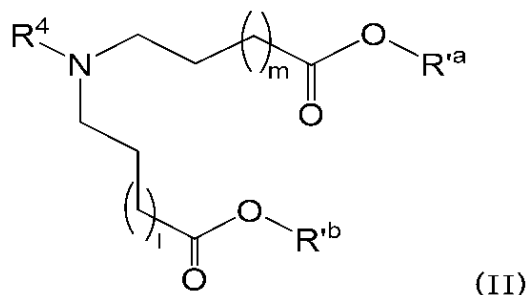
各 R' は、独立して、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

mは、1、2、3、4、5、6、7、8及び9から選択され、
 lは、1、2、3、4、5、6、7、8及び9から選択される。

【0187】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式（II）：

【化57】



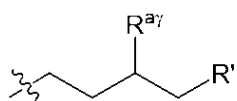
10

の化合物またはそのN-オキシドもしくは塩であり、式中、

R^aは、R分岐鎖またはR環状であり、

R分岐鎖は

【化58】



20

であり、R^bは、

【化59】



であり、

【化60】



30

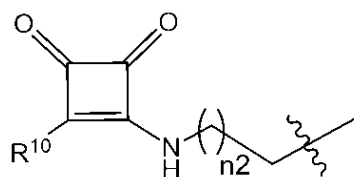
は、結合点を示し、

R^{ay}及びR^{by}は、それぞれ独立して、C₁～C₁₂アルキル及びC₂～C₁₂アルケニルから選択され、

R²及びR³は、それぞれ独立して、C₁～C₁₄アルキル及びC₂～C₁₄アルケニルから選択され、

R⁴は、-(CH₂)_nOH及び

【化61】



40

から選択され、

【化62】



50

は、結合点を示し、

n は、1、2、3、4、及び5から選択され、

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり、

各 R は、独立して、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10から選択され、

各 R' は、独立して、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

m は、1、2、3、4、5、6、7、8及び9から選択され、

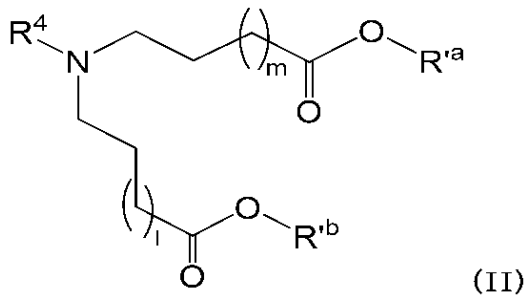
l は、1、2、3、4、5、6、7、8及び9から選択される。

【0188】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (II) :

10

【化63】



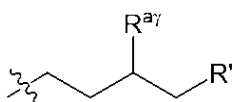
20

の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

$R^{a'}$ は、 R 分岐鎖または R 環状であり、

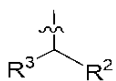
R 分岐鎖は

【化64】



であり、 $R^{b'}$ は、

【化65】



30

であり、

【化66】



は、結合点を示し、

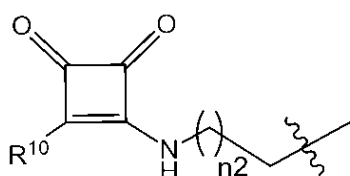
$R^{a'}$ は、 $C_1 \sim 12$ アルキル及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

40

R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキル及び $C_2 \sim 14$ アルケニルから選択され、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ 及び

【化67】



50

から選択され、

【化 6 8】



は、結合点を示し、

n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり、

各 R は、独立して、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_2 \sim 3$ アルケニル、及び H から選択され、

n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

m は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択され、

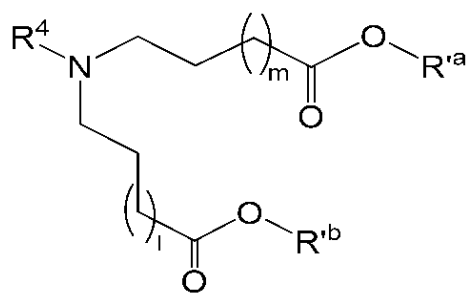
l は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択される。

10

【0189】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (II) :

【化 6 9】



20

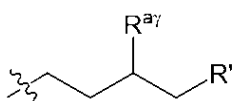
(II)

の化合物またはその N -オキシドもしくは塩であり、式中、

R^{1a} は、 R 分岐鎖または R 環状であり、

R 分岐鎖は

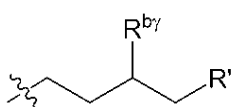
【化 7 0】



30

であり、 R^{1b} は、

【化 7 1】



であり、

【化 7 2】



40

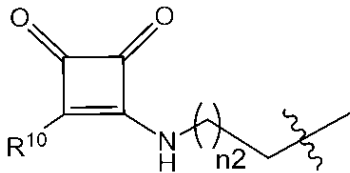
は、結合点を示し、

$R^{a'}$ 及び $R^{b'}$ は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 12$ アルキル及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ 及び

50

【化 7 3】



から選択され、

【化 7 4】



10

は、結合点を示し、

n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

R¹⁰ は、N(R)₂ であり、各 R は、独立して、C₁~6 アルキル、C₂~3 アルケニル、及び H から選択され、n₂ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、各 R' は、独立して、C₁~12 アルキルまたは C₂~12 アルケニルであり、

m は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択され、

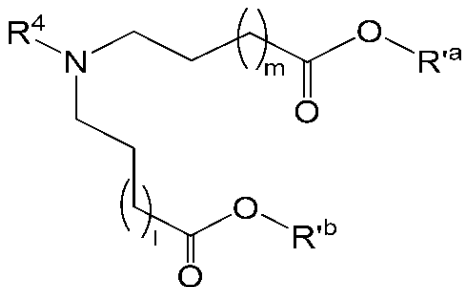
l は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択される。

20

【0190】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (II) :

【化 7 5】



(II)

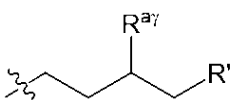
30

の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、

R^a は、R 分岐鎖または R 環状であり、

R 分岐鎖は

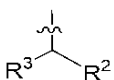
【化 7 6】



40

であり、R^b は、

【化 7 7】



であり、

【化 7 8】



50

は、結合点を示し、

R^{ay} は、 $C_1 \sim 12$ アルキル及び $C_2 \sim 12$ アルケニルから選択され、

R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキル及び $C_2 \sim 14$ アルケニルから選択され、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルまたは $C_2 \sim 12$ アルケニルであり、

m は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択され、

l は、1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 から選択される。

【0191】

いくつかの実施形態では、 m 及び l は、それぞれ独立して、4、5、及び 6 から選択される。いくつかの実施形態では、 m 及び l は、それぞれ 5 である。

10

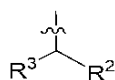
【0192】

いくつかの実施形態では、各 R' は、独立して、 $C_1 \sim 12$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R' は、独立して、 $C_2 \sim 5$ アルキルである。

【0193】

いくつかの実施形態では、 R^{yb} は、

【化79】



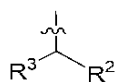
20

であり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキルである。

【0194】

いくつかの実施形態では、 R^{yb} は、

【化80】



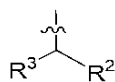
であり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_6 \sim 10$ アルキルである。

【0195】

いくつかの実施形態では、 R^{yb} は、

30

【化81】

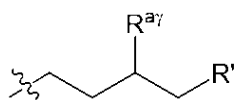


であり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ C_8 アルキルである。

【0196】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

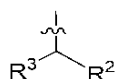
【化82】



40

であり、 R^{yb} は、

【化83】

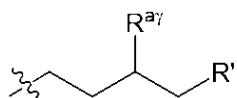


であり、 R^{ay} は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_6 \sim 10$ アルキルである。

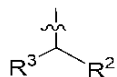
【0197】

50

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、
【化 8 4】

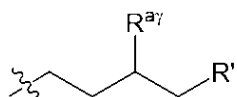


であり、 R^{yb} は、
【化 8 5】

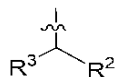


10

であり、 R^{ay} は、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_6 \sim 10$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、
【化 8 6】



であり、 R^{yb} は、
【化 8 7】

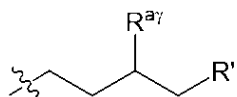


20

であり、 R^{ay} は、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ C_8 アルキルである。

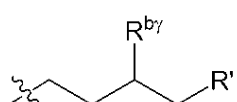
【0198】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、
【化 8 8】



30

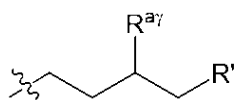
であり、 R^{yb} は、
【化 8 9】



であり、 R^{ay} 及び R^{by} は、 $C_1 \sim 12$ アルキルである。

【0199】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、
【化 9 0】

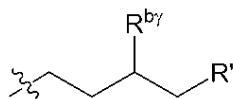


40

であり、 R^{yb} は、

50

【化 9 1】



であり、 R^{aY} 及び R^{bY} は、 $C_2 \sim 6$ アルキルである。

【0200】

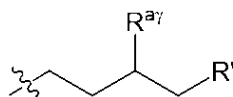
いくつかの実施形態では、 m 及び l は、それぞれ独立して、4、5、及び 6 から選択され、各 R' は、独立して $C_1 \sim 12$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 m 及び l は、それぞれ 5 であり、各 R' は、独立して、 $C_2 \sim 5$ アルキルである。

10

【0201】

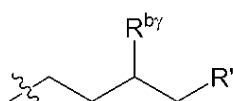
いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

【化 9 2】



であり、 R^{bY} は、

【化 9 3】



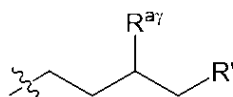
20

であり、 m 及び l は、それぞれ独立して 4、5 及び 6 から選択され、各 R' は、独立して $C_1 \sim 12$ アルキルであり、 R^{aY} 及び R^{bY} は、それぞれ $C_1 \sim 12$ アルキルである。

【0202】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

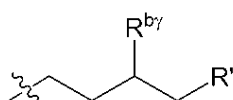
【化 9 4】



30

であり、 R^{bY} は、

【化 9 5】



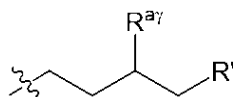
であり、 m 及び l は、それぞれ 5 であり、各 R' は、独立して $C_2 \sim 5$ アルキルであり、 R^{aY} 及び R^{bY} は、それぞれ $C_2 \sim 6$ アルキルである。

40

【0203】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

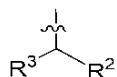
【化 9 6】



であり、 R^{bY} は、

50

【化 9 7】

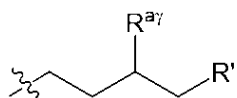


であり、 m 及び l は、それぞれ独立して、4、5及び6から選択され、 R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、 R^{ay} は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_6 \sim 10$ アルキルである。

【0204】

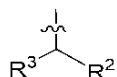
いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

【化 9 8】



であり、 R^{yb} は、

【化 9 9】

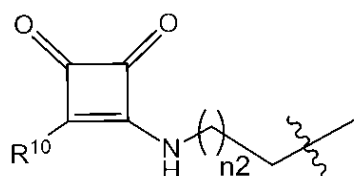


であり、 m 及び l は、それぞれ5であり、 R' は、 $C_2 \sim 5$ アルキルであり、 R^{ay} は、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ C_8 アルキルである。

【0205】

いくつかの実施形態では、 R^4 は、

【化 1 0 0】

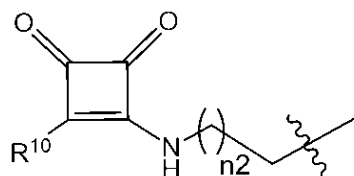


であり、 R^{10} は、 NH ($C_1 \sim 6$ アルキル) であり、 n_2 は、2である。

【0206】

いくつかの実施形態では、 R^4 は、

【化 1 0 1】

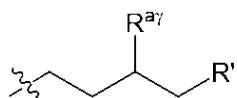


であり、 R^{10} は、 NH (CH_3) であり、 n_2 は、2である。

【0207】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

【化 1 0 2】



であり、 R^{yb} は、

10

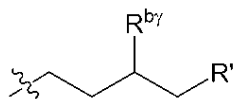
20

30

40

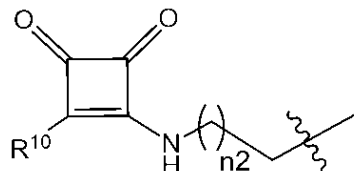
50

【化 1 0 3】



であり、 m 及び l は、それぞれ独立して、4、5及び6から選択され、各 R' は、独立して、 $C_{1\sim 12}$ アルキルであり、 $R^{a\gamma}$ 及び $R^{b\gamma}$ は、それぞれ $C_{1\sim 12}$ アルキルであり、 R^4 は、

【化 1 0 4】



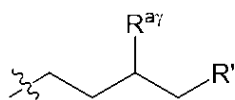
10

であり、 R^{10} は、 NH ($C_{1\sim 6}$ アルキル) であり、 n_2 は、2である。

【0 2 0 8】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

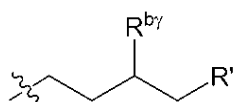
【化 1 0 5】



20

であり、 R^{1b} は、

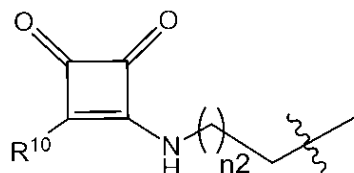
【化 1 0 6】



であり、 m 及び l は、それぞれ、5であり、各 R' は、独立して、 $C_{2\sim 5}$ アルキルであり、 $R^{a\gamma}$ 及び $R^{b\gamma}$ は、それぞれ $C_{2\sim 6}$ アルキルであり、 R^4 は、

30

【化 1 0 7】

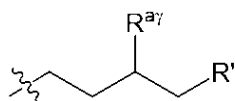


であり、 R^{10} は、 NH (CH_3) であり、 n_2 は、2である。

【0 2 0 9】

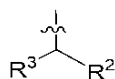
いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

【化 1 0 8】



であり、 R^{1b} は、

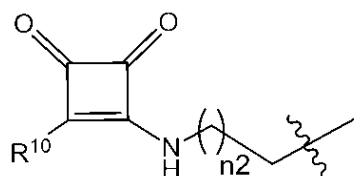
【化 1 0 9】



50

であり、 m 及び l は、それぞれ独立して、4、5及び6から選択され、 R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_6 \sim 10$ アルキルであり、 $R^{a\gamma}$ は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、 R^4 は、

【化110】



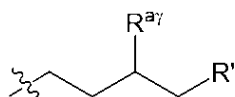
10

であり、 R^{10} は、 $NH(C_1 \sim 6 \text{ アルキル})$ であり、 n_2 は、2である。

【0210】

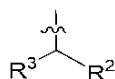
いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

【化111】



であり、 R^{1b} は、

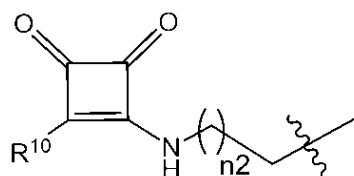
【化112】



20

であり、 m 及び l は、それぞれ5であり、 R' は、 $C_2 \sim 5$ アルキルであり、 $R^{a\gamma}$ は、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ C_8 アルキルであり、 R^4 は、

【化113】



30

であり、 R^{10} は、 $NH(CH_3)$ であり、 n_2 は、2である。

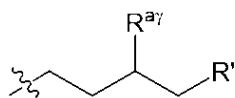
【0211】

いくつかの実施形態において、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2、3、または4である。いくつかの実施形態において、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2である。

【0212】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

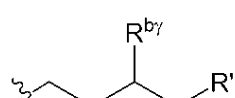
【化114】



40

であり、 R^{1b} は、

【化115】



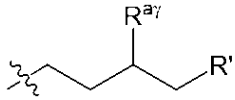
50

であり、 m 及び l は、それぞれ独立して、4、5及び6から選択され、各 R' は独立して、 $C_{1\sim 12}$ アルキルであり、 R^{ay} 及び R^{by} は、それぞれ $C_{1\sim 12}$ アルキルであり、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2、3または4である。

【0213】

いくつかの実施形態では、 R 分岐鎖は、

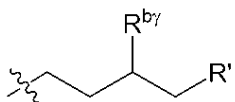
【化116】



10

であり、 R^{yb} は、

【化117】

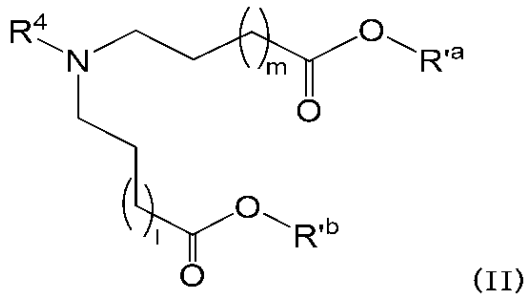


であり、 m 及び l は、それぞれ、5であり、各 R' は、独立して、 $C_{2\sim 5}$ アルキルであり、 R^{ay} 及び R^{by} は、それぞれ $C_{2\sim 6}$ アルキルであり、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2である。

【0214】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式(II)：

【化118】



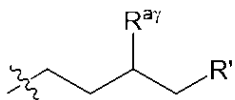
30

の化合物またはそのN-オキシドもしくは塩であり、式中、

R^{ya} は、 R 分岐鎖または R 環状であり、

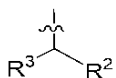
R 分岐鎖は

【化119】



であり、 R^{yb} は、

【化120】



40

であり、

【化121】



は、結合点を示し、

50

$R^{a\vee}$ は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、

R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、 $C_1 \sim 14$ アルキルであり、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、1、2、3、4、及び 5 から選択され、

R' は、 $C_1 \sim 12$ アルキルであり、

m は、4、5、及び 6 から選択され、

l は、4、5、及び 6 から選択される。

【0215】

いくつかの実施形態では、 m 及び l は、それぞれ 5 であり、 n は、2、3、または 4 である。

【0216】

いくつかの実施形態では、 R' は、 $C_2 \sim 5$ アルキルであり、 $R^{a\vee}$ は、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_6 \sim 10$ アルキルである。

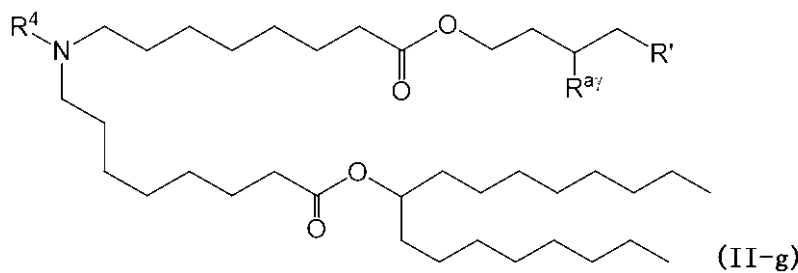
【0217】

いくつかの実施形態では、 m 及び l は、それぞれ 5 であり、 n は、2、3、または 4 であり、 R' は、 $C_2 \sim 5$ アルキルであり、 $R^{a\vee}$ は、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ $C_6 \sim 10$ アルキルである。

【0218】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (II-g) :

【化122】



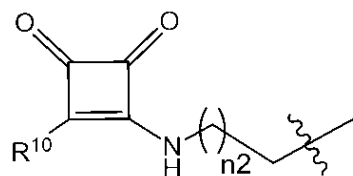
の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、

$R^{a\vee}$ は、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、

R' は、 $C_2 \sim 5$ アルキルであり、

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ 及び

【化123】



から選択され、

【化124】



は、結合点を示し、

n は、3、4、及び 5 から選択され、

R^{10} は、 $NH(C_1 \sim 6 \text{ アルキル})$ であり、

n_2 は、1、2、及び 3 から選択される。

【0219】

いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、式 (II-h) :

10

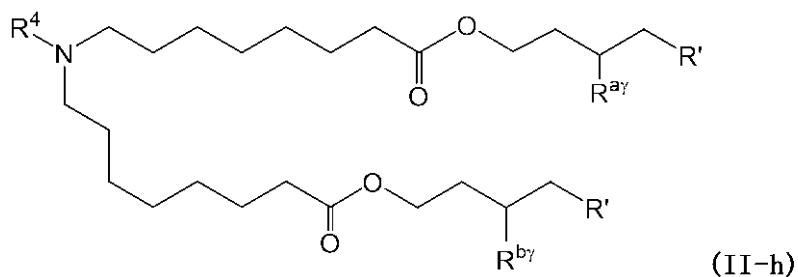
20

30

40

50

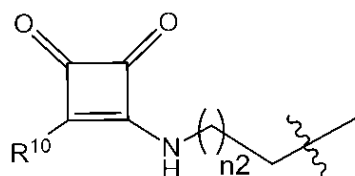
【化 1 2 5】



の化合物またはその N-オキシドもしくは塩であり、式中、
 $R^{a\gamma}$ 及び $R^{b\gamma}$ は、それぞれ独立して、 $C_2 \sim 6$ アルキルであり、
 各 R' は、独立して $C_2 \sim 5$ アルキルであり、
 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ 及び

10

【化 1 2 6】



20

から選択され、

【化 1 2 7】



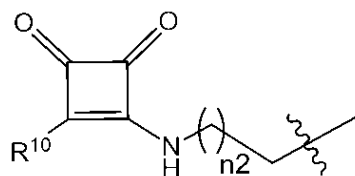
は、結合点を示し、
 n は、3、4、及び 5 から選択され、
 R^{10} は、 $NH(C_1 \sim 6 \text{ アルキル})$ であり、
 n_2 は、1、2、及び 3 から選択される。

30

【0 2 2 0】

いくつかの実施形態では、 R^4 は、

【化 1 2 8】



であり、

R^{10} は、 $NH(CH_3)$ であり、 n_2 は、2 である。

40

【0 2 2 1】

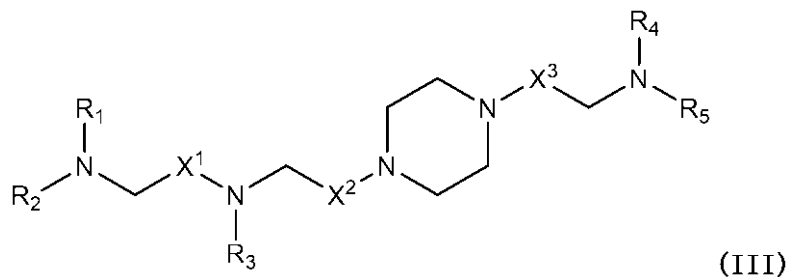
いくつかの実施形態では、 R^4 は、 $-(CH_2)_2OH$ である。

【0 2 2 2】

いくつかの態様では、イオン化脂質は、式 (III) :

50

【化 1 2 9】



の化合物またはそのN-オキシドもしくは塩であり、式中、

R₁、R₂、R₃、R₄、及びR₅は、独立して、C₅～20アルキル、C₅～20アルケニル、 $-R''MR'$ 、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、及び $-R^*OR''$ から選択され、

各Mは、独立して、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、アリール基、及びヘテロアリール基から選択され、

X¹、X²及びX³は、それぞれ独立して、結合、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 、 $-CH_2-OC(O)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 及び $-CH(SH)-$ から選択され、

各Yは、独立して、C₃～6炭素環であり、

各R^{*}は、独立して、C₁～12アルキル及びC₂～12アルケニルから選択され、

各Rは、独立して、C₁～3アルキル及びC₃～6炭素環から選択され、

各R'は、独立して、C₁～12アルキル、C₂～12アルケニル、及びHから選択され、

各R''は、独立して、C₃～12アルキル及びC₃～12アルケニルから選択され、

i) X¹、X²、及びX³のうちの少なくとも1つは、 $-CH_2-$ ではなく、及び／または

ii) R₁、R₂、R₃、R₄、及びR₅のうち少なくとも1つが、 $-R''MR'$ である。

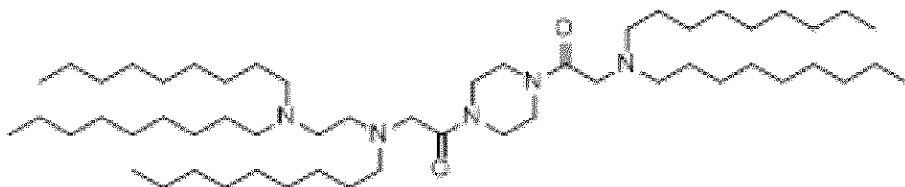
【0 2 2 3】

いくつかの実施形態では、R₁、R₂、R₃、R₄、及びR₅は、各々C₅～20アルキルであり、X¹は $-CH_2-$ であり、X²及びX³は、各々 $-C(O)-$ である。

【0 2 2 4】

いくつかの実施形態では、式(III)の化合物は、以下のものである。

【化 1 3 0】



【0 2 2 5】

いくつかの実施形態では、式(I)の化合物は、

10

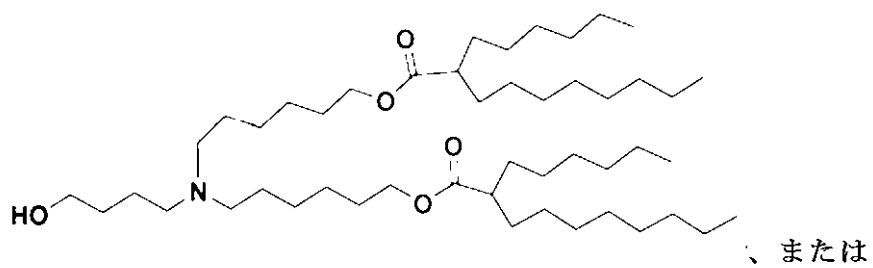
20

30

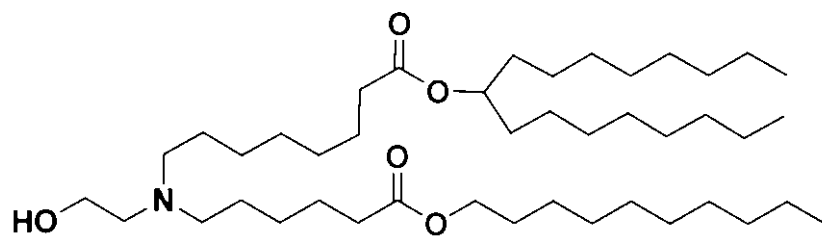
40

50

【化 1 3 1】



10



である。

【 0 2 2 6】

いくつかの実施形態では、イオン性脂質は、

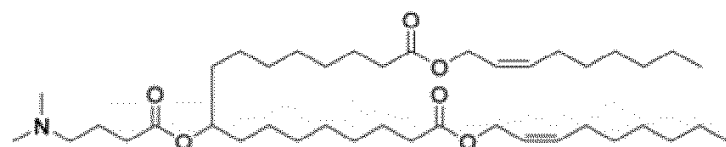
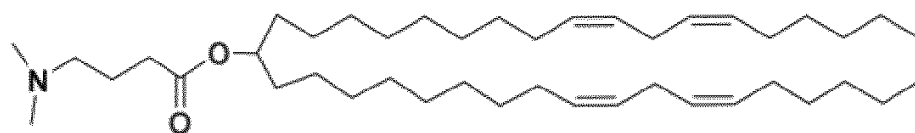
20

30

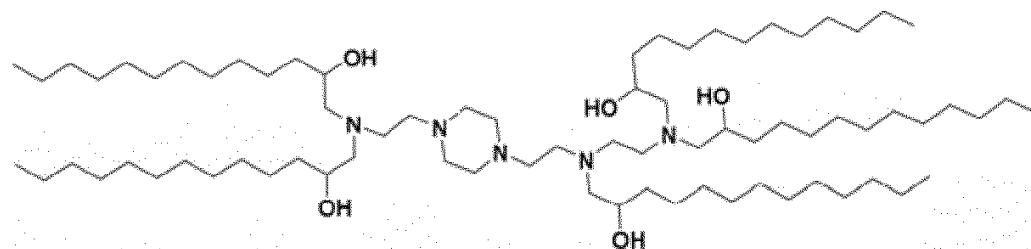
40

50

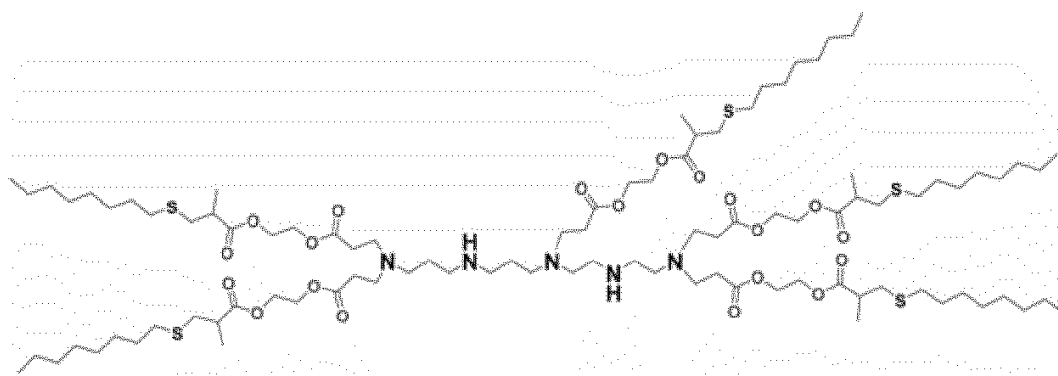
【化 1 3 2 - 1】



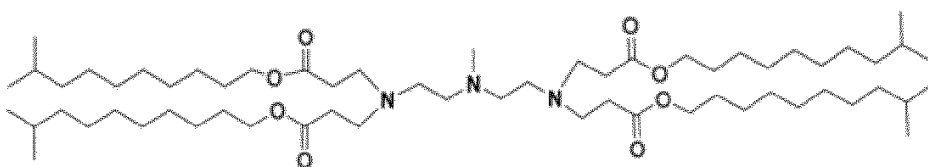
10



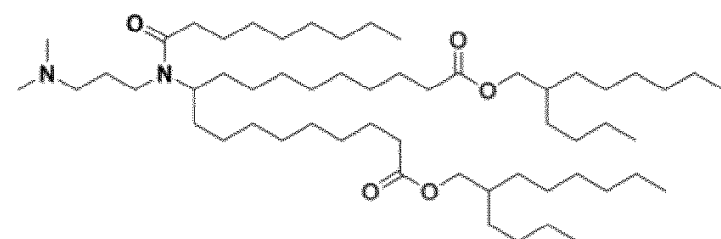
20



30

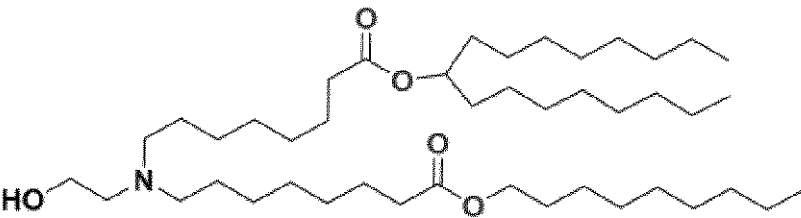
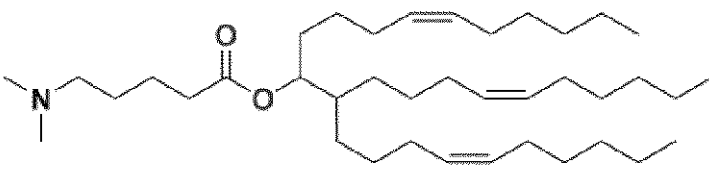
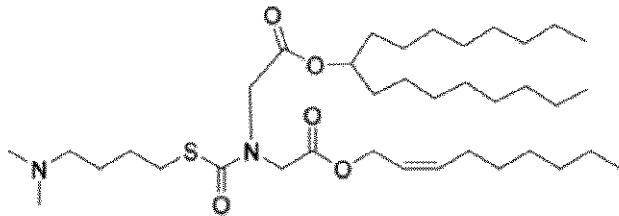
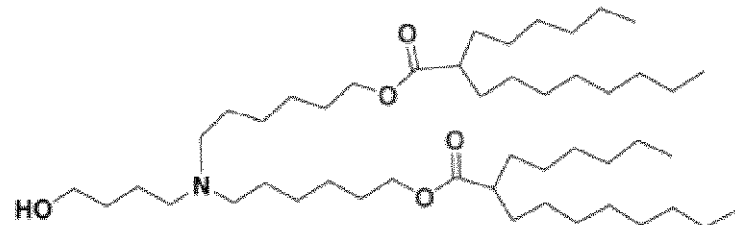


40

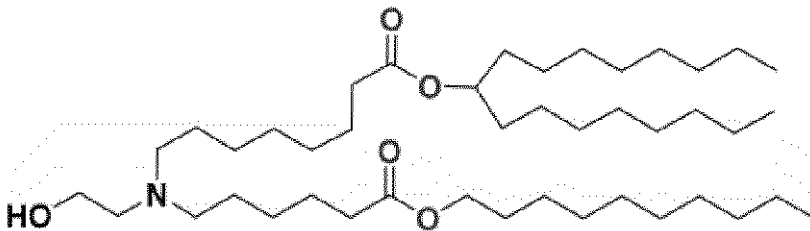


50

【化 1 3 2 - 2】



、または



である。

【0227】

mRNA-脂質付加体

特定のイオン化脂質は、脂質-ポリヌクレオチド付加体を形成しやすいことが判明した。特に、第三級アミン基を含むイオン化脂質は、ポリヌクレオチド（mRNAなど）と相互作用することができる第二級アミン及び反応性アルデヒド種的一方または両方に分解して、逆相イオンペアクロマトグラフィー（RP-IP HPLC）によって検出され得るイオン化脂質-ポリヌクレオチド付加体不純物を形成することがある。例えば、第三級アミンの酸化によりN-オキシドが形成される場合があり、これが、そのアミンで酸/塩基触媒加水分解を受け、mRNAと付加対を形成することもあるアルデヒド及び第二級アミンを生成する可能性がある。したがって、いくつかの態様では、イオン化脂質-ポリヌクレオチド付加体不純物は、アルデヒド-mRNA付加体不純物である。

【0228】

そのような付加体は、mRNA翻訳を妨害し、脂質ナノ粒子（LNP）製剤化mRNA製品の活性に影響を与える場合があることも判明した。したがって、RP-IP HPLCによって測定され得る場合に、mRNAの約20%未満、約10%未満、約5%未満、または約1%未満が、イオン化脂質-ポリヌクレオチド付加体不純物の形態であるなどの

10

20

30

40

50

、イオン化脂質－ポリヌクレオチド付加体不純物の含有量が低減された L N P 組成物を調製し、使用することが有利である。したがって、いくつかの態様によると、R P－I P H P L C によって測定され得る場合に、10 %未満、5 %未満、または1 %未満を含む、m R N A の約10 %未満、約5 %未満、または約1 %未満がイオン化脂質－ポリヌクレオチド付加体不純物の形態である、L N P 組成物が提供される。

【0229】

いくつかの態様では、組成物中の脂質アルデヒドの量は、50 ppm未満を含む、約50 ppm未満である。さらにまたは代わりに、いくつかの態様では、組成物中のN－オキシド化合物の量は、50 ppm未満を含む、約50 ppm未満である。さらにまたは代わりに、いくつかの態様では、組成物中のF eなどの遷移金属の量は、50 ppm未満を含む、約50 ppm未満である。さらにまたは代わりに、いくつかの態様では、組成物中のハロゲン化アルキル化合物の量は、50 ppm未満を含む、約50 ppm未満である。さらにまたは代わりに、いくつかの態様では、組成物中の無水化合物の量は、50 ppm未満を含む、約50 ppm未満である。さらにまたは代わりに、いくつかの態様では、組成物中のケトン化合物の量は、50 ppm未満を含む、約50 ppm未満である。さらにまたは代わりに、いくつかの態様では、組成物中の共役ジエン化合物の量は、50 ppm未満を含む、約50 ppm未満である。

【0230】

いくつかの態様では、組成物は、イオン化脂質－ポリヌクレオチド付加体不純物の形成に対して安定である。いくつかの態様では、組成物中のイオン化脂質－ポリヌクレオチド付加体不純物の量は、約25℃以下の温度で保存された場合、1日当たり2 %未満の平均速度を含む、1日当たり約2 %未満の平均速度で増加する。いくつかの態様では、組成物中のイオン化脂質－ポリヌクレオチド付加体不純物の量は、約5℃以下の温度で保存された場合、1日当たり0.5 %未満の平均速度を含む、1日当たり約0.5 %未満の平均速度で増加する。いくつかの態様では、組成物中のイオン化脂質－ポリヌクレオチド付加体不純物の量は、任意選択的に約5℃である、冷蔵温度で保存された場合、1日当たり約0.5 %未満の平均速度で増加する。

【0231】

イオン化脂質－ポリヌクレオチド付加体不純物の含有量が低減された脂質ビヒクル（例えば、L N P）組成物は、N－オキシド及びアルデヒドの一方または両方の形成を阻害する方法によって調製することができる。そのような方法は、組成物を還元剤で処理すること、組成物をキレート剤で処理すること、組成物のp Hを調節すること、組成物の温度を調節すること、及び組成物中の緩衝液を調節することなどによって、第三級アミン基を含むイオン化脂質を含む組成物を処理して、N－オキシド及びアルデヒドの一方または両方の形成を阻害することを含んでもよい。そのような方法は、イオン化脂質をポリヌクレオチドと混ぜ合わせる前に、イオン化脂質を捕捉剤で処理すること、イオン化脂質を還元処理剤で処理すること、イオン化脂質を還元剤で処理すること、イオン化脂質をキレート剤で処理すること、ポリヌクレオチドを還元剤で処理すること、及びポリヌクレオチドをキレート剤で処理することのうちの1つ以上を含んでもよい。

【0232】

上記のいずれかによると、捕捉剤、還元処理剤及び／または還元剤は、アルデヒド、ケトン、無水物及び／またはジエン化合物と反応する薬剤であってもよい。捕捉剤は、（O－（2，3，4，5，6－ペンタフルオロベンジル）ヒドロキシルアミン塩酸塩）（P F B H A）、メトキシアミン（例えば、メトキシアミン塩酸塩）、ベンジルオキシアミン（例えば、ベンジルオキシアミン塩酸塩）、エトキシアミン（例えば、エトキシアミン塩酸塩）、4－[2－（アミノオキシ）エチル]モルホリン二塩酸塩、ブトキシアミン（例えば、tert－ブトキシアミン塩酸塩）、4－ジメチルアミノピリジン（D M A P）、1，4－ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン（D A B C O）、トリエチルアミン（T E A）、ペリジン4－カルボキシレート（B P P C）及びこれらの組み合わせから選択される1つ以上を含んでもよい。還元処理剤は、ホウ素化合物（例えば、水素化ホウ素ナトリ

ウム及び／またはビス（ピナコラト）ジボロン）を含んでもよい。還元処理剤は、水素化ホウ素ナトリウム及びビス（ピナコラト）ジボロンの一方または両方などのホウ素化合物を含んでもよい。キレート剤は、固定化イミノ二酢酸を含んでもよい。還元剤は、シリカ上に固定化したジフェニルホスフィン（S i - D P P）、アガロース上に固定化したチオール（A g - チオール）、シリカ上に固定化したシステイン（S i - システイン）、シリカ上に固定化したチオール（S i - チオール）またはこれらの組み合わせなどの固定化還元剤を含んでもよい。還元剤は、メタ重亜硫酸カリウム、チオグリコール酸ナトリウム、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（T C E P）、チオ硫酸ナトリウム、N－アセチルシステイン、グルタチオン、ジチオスレイトール（D T T）、シスタミン、ジチオエリトリトール（D T E）、ジクロロジフェニルトリクロロエタン（D D T）、ホモシステイン、リポ酸またはこれらの組み合わせなどの遊離還元剤を含んでもよい。

10

【0233】

上記のいずれかによると、pHは、pH約7から約9のpHであってもよく、または約7から約9のpHに調節されてもよい。

【0234】

上記のいずれかによると、緩衝液は、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、ヒスチジン、ヒスチジン－H C l、リンゴ酸ナトリウム、炭酸ナトリウム及びT R I S（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）から選択されてもよい。上記のいずれかによると、緩衝液は、T R I Sであってもよく、約20mMから約150mMのT R I Sであってもよく、または約20mMから約150mMのT R I Sに調節されてもよい。

20

【0235】

上記いずれかによると、組成物の温度は、25℃以下であってもよく、または25℃以下に調節されてもよい。

【0236】

組成物はまた、遊離還元剤または抗酸化剤を含んでもよい。

【0237】

P E G 脂質

脂質ナノ粒子組成物のP E G脂質成分は、ポリエチレングリコール、例えば、P E GまたはP E G修飾脂質を含む1つ以上の分子を含んでもよい。そのような種は、代替的にP E G化脂質と呼ばれることもある。P E G脂質は、ポリエチレングリコールで修飾された脂質である。

30

【0238】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約0.1mol%から約10mol%のP E G－脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約0.1mol%から約5mol%のP E G－脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約0.1mol%から約3mol%のP E G－脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約0.1mol%から約2mol%のP E G－脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約0.1mol%から約1mol%のP E G－脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約0.25mol%から約0.75mol%のP E G－脂質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約0.5mol%のP E G－脂質を含む。

40

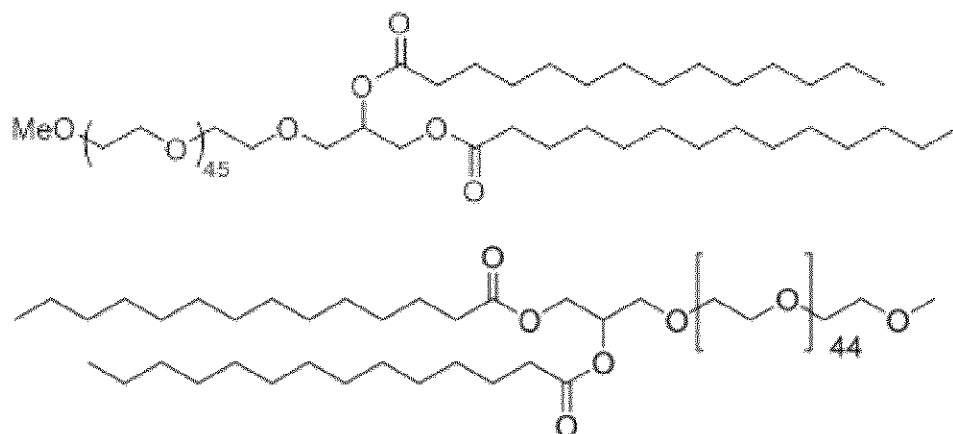
【0239】

P E G脂質は、P E G修飾ホスファチジルエタノールアミン、P E G修飾ホスファチジン酸、P E G修飾セラミド、P E G修飾ジアルキルアミン、P E G修飾ジアシルグリセロール、P E G修飾ジアルキルグリセロール及びこれらの混合物を含む非限定的な群から選択されてもよい。例えば、P E G脂質は、P E G－c－D O M G、P E G－D M G（例えば、P E G－D M G 2000もしくはD M G－P E G 2000）、P E G－D L P E、P

50

【 0 2 4 0 】

【化 1 3 3】



20

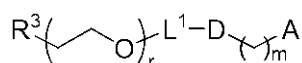
【 0 2 4 1 】

30

【 0 2 4 2 】

ある特定の実施形態では、PEG脂質は、式(VII)の化合物である。式(VII)

【化 1 3 4】



(VII)

40

r は、 $1 \sim 100$ （両端を含む）の整数であり、

50

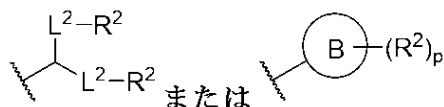
換えられており、

Dは、クリックケミストリーによって得られる部分、または生理学的条件下で切断可能な部分であり、

mは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、

Aは、式：

【化135】



10

のものであり、

L²の各事例は、独立して、結合または任意選択的に置換されているC₁~6アルキレンであり、ここで、この任意選択的に置換されているC₁~6アルキレンの1つのメチレン単位は、任意選択で、-O-、-N(R^N)-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、または-NR^NC(O)N(R^N)-で置き換えられており、

R²の各事例は、独立して、任意選択的に置換されているC₁~30アルキル、任意選択的に置換されているC₁~30アルケニル、または任意選択的に置換されているC₁~30アルキニルであり、任意選択で、ここで、R²の1つ以上のメチレン単位は、独立して、任意選択的に置換されているカルボシクリレン、任意選択的に置換されているヘトロシクリレン、任意選択的に置換されているアリーレン、任意選択的に置換されているヘテロアリーレン、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-NR^NC(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)₂-、-N(R^N)S(O)₂-、-S(O)₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)₂N(R^N)-、-OS(O)₂N(R^N)-、または-N(R^N)S(O)₂O-で置き換えられており、

20

30

各R^Nは、独立して、水素、任意選択的に置換されるアルキル、または窒素保護基であり、

環Bは、任意選択的に置換されているカルボシクリル、任意選択的に置換されているヘトロシクリル、任意選択的に置換されているアリール、または任意選択的に置換されているヘテロアリールであり、

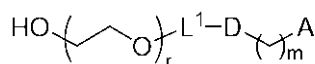
pは、1または2である。

40

【0243】

ある特定の実施形態では、式(VII)の化合物は、PEG-OH脂質である（すなわち、R³は-OR^Oであり、R^Oは水素である）。ある特定の実施形態では、式(VII)の化合物は、式(VII-OH)：

【化136】



(VII-OH)

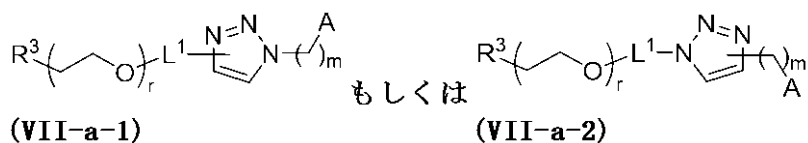
のもの、またはその塩である。

50

【0244】

ある特定の実施形態では、Dは、クリックケミストリーによって得られる部分（例えば、トリアゾール）である。ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、式（VII-a-1）もしくは（VII-a-2）：

【化137】



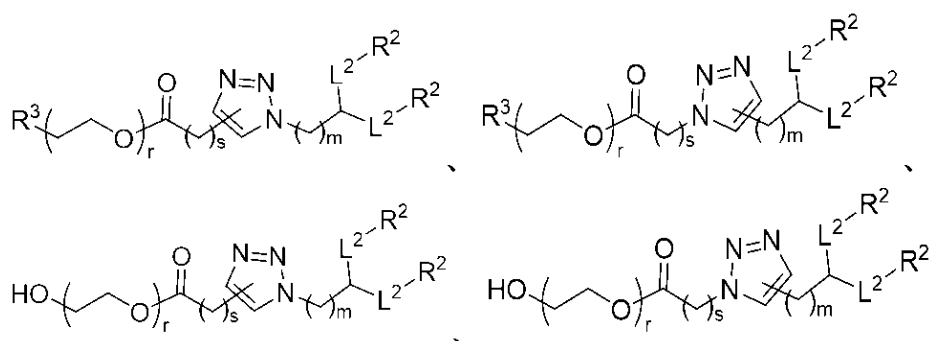
10

のもの、またはその塩である。

【0245】

ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、以下の式：

【化138】



20

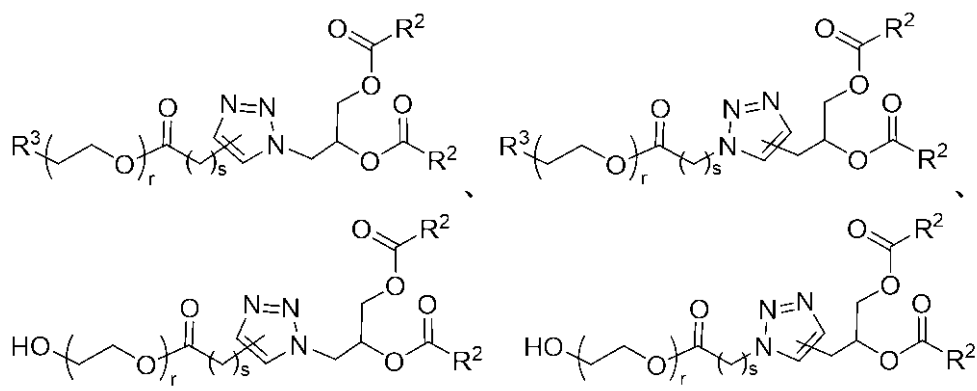
のうちの1つのもの、またはその塩であり、式中、

sは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。

【0246】

ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、以下の式：

【化139】



30

のうちの1つ、またはその塩である。

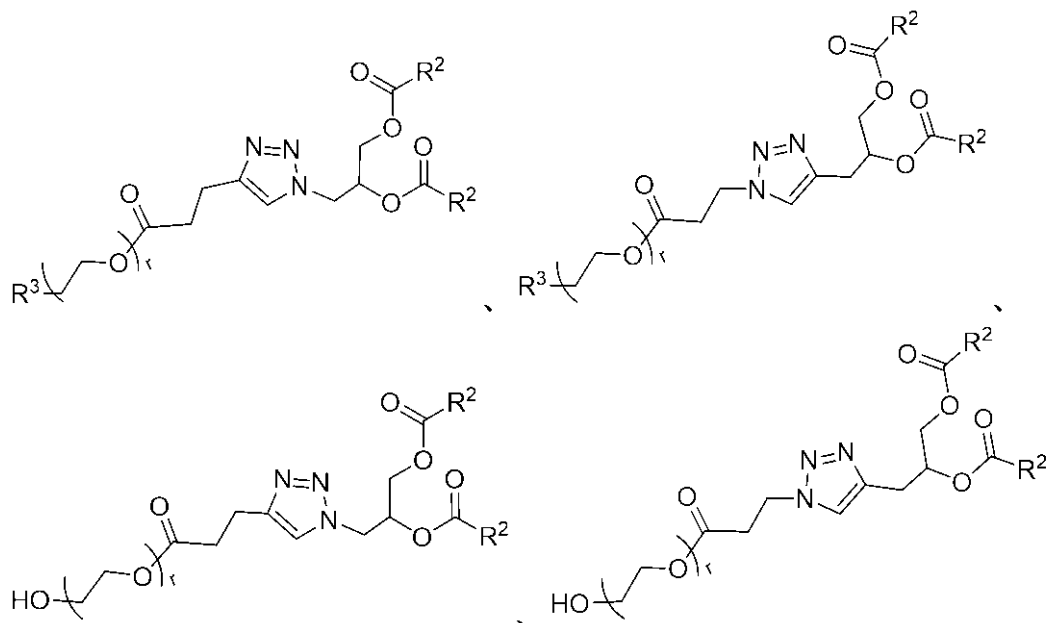
【0247】

ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、以下の式：

40

50

【化 1 4 0】



10

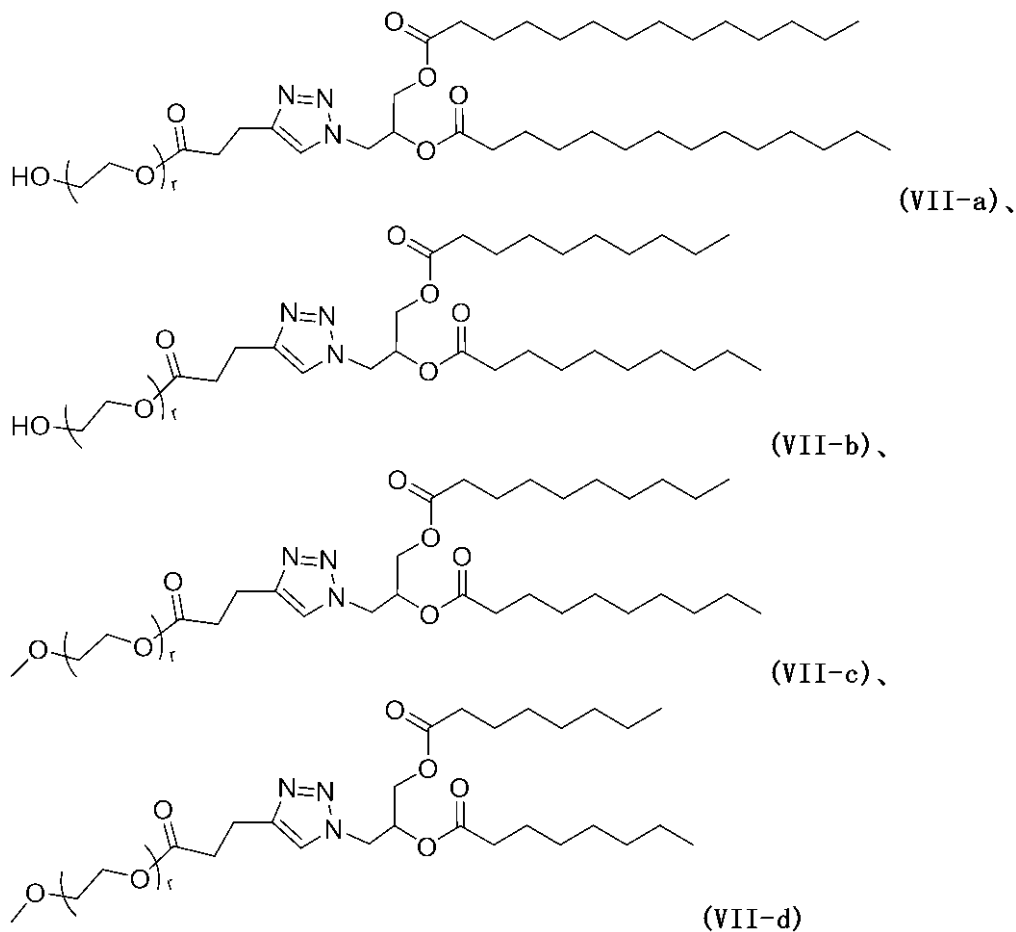
のうちの1つ、またはその塩である。

【0 2 4 8】

20

ある特定の実施形態では、式 (VII) の化合物は、 r が 1 ~ 100 である、以下の式：

【化 1 4 1】



30

40

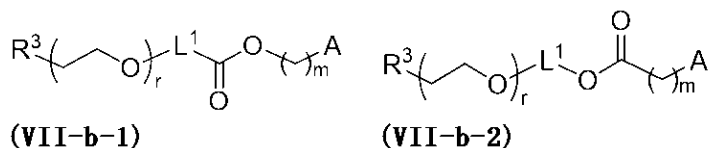
のうちの1つ、またはその塩である。

【0 2 4 9】

50

ある特定の実施形態では、Dは、生理学的条件下で切断可能な部分（例えば、エステル、アミド、カーボネート、カルバメート、尿素）である。ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、式（VII-b-1）または（VII-b-2）：

【化142】



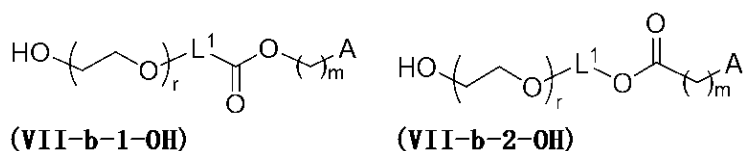
のもの、またはその塩である。

10

【0250】

ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、式（VII-b-1-OH）または（VII-b-2-OH）：

【化143】



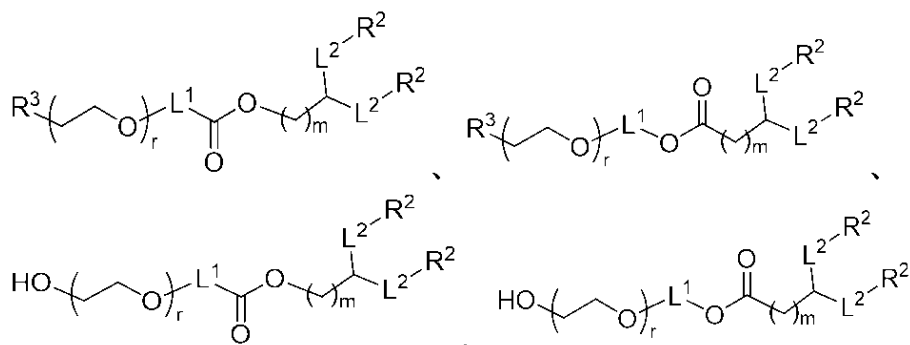
のもの、またはその塩である。

20

【0251】

ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、以下の式：

【化144】



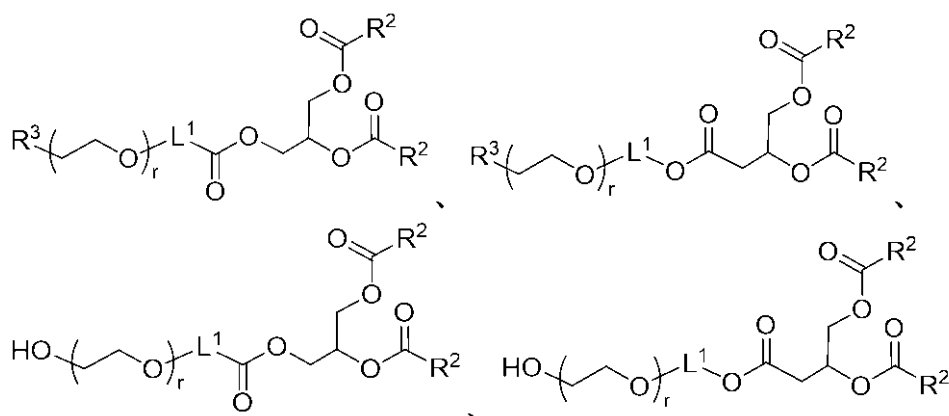
30

のうちの1つ、またはその塩である。

【0252】

ある特定の実施形態では、式（VII）の化合物は、以下の式：

【化145】

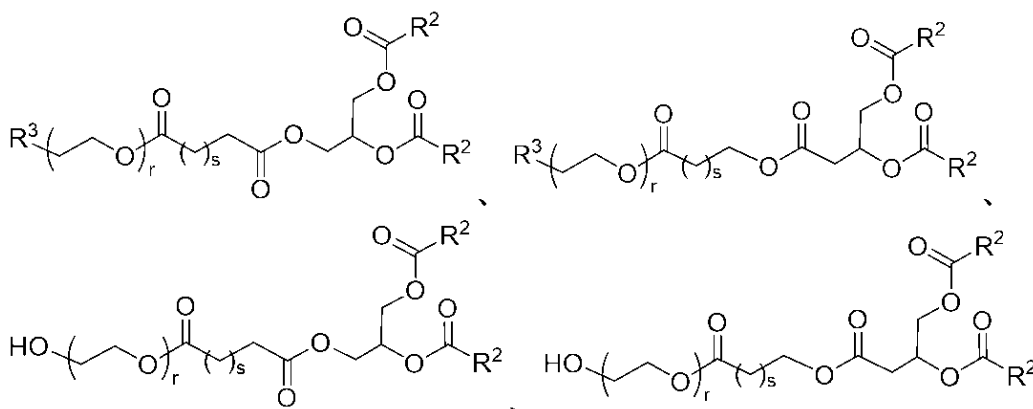


40

のうちの1つ、またはその塩である。

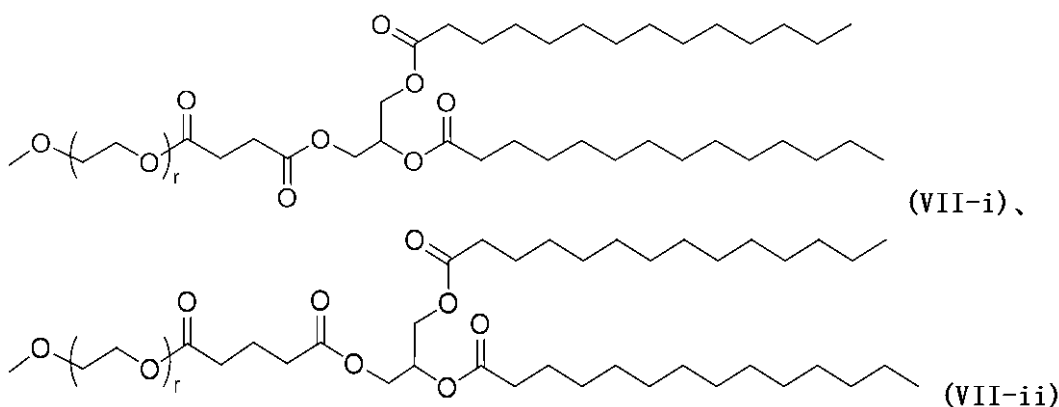
50

【化 1 4 6】



10

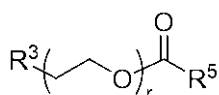
【化 1 4 7】



20

30

【化 1 4 8】



(VIII)

40

R⁵は、任意選択的に置換されているC₁₀~40アルキル、任意選択的に置換されているC₁₀~40アルケニル、または任意選択的に置換されているC₁₀~40アルキニルであり、任意選択で、R⁵の1つ以上のメチレン基は、任意選択的に置換されているカルボシクリレン、任意選択的に置換されているヘテロシクリレン、任意選択的に置換されているアリーレン、任意選択的に置換されているヘテロアリーレン、-N(R^N)-、-O-

50

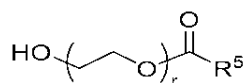
$-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 、または $-N(R^N)S(O)_2O-$ で置き換えられており、

R^N の各事例は、独立して、水素、任意選択的に置換されているアルキル、または窒素保護基である。

【0256】

ある特定の実施形態では、式(VIII)の化合物は、式(VIII-OH)：

【化149】



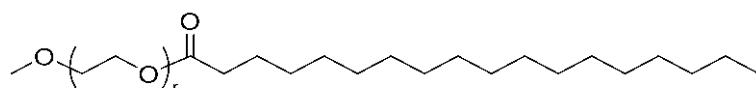
(VIII-OH)

のもの、またはその塩である。

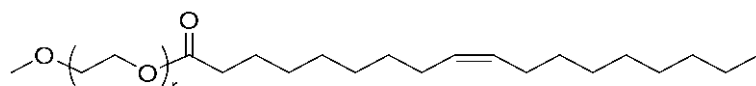
【0257】

ある特定の実施形態では、式(VIII)の化合物は、以下の式：

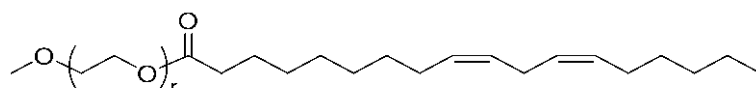
【化150】



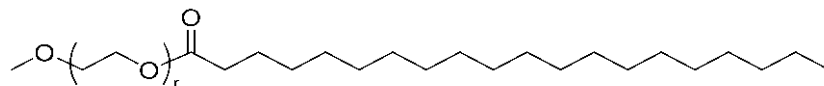
(VIII-i)、



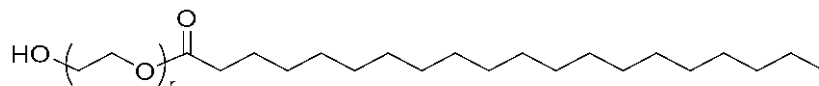
(VIII-ii)、



(VIII-iii)、



(VIII-iv)、



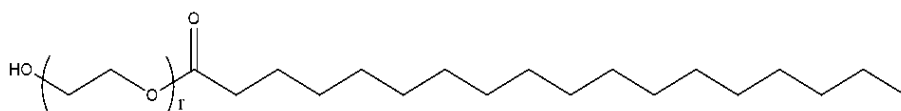
(VIII-v)

のうちの1つ、またはその塩である。いくつかの実施形態では、 r は、43、44、45、または46である。いくつかの実施形態では、 r は、45である。

【0258】

さらに別の実施形態では、式(VIII)の化合物は、

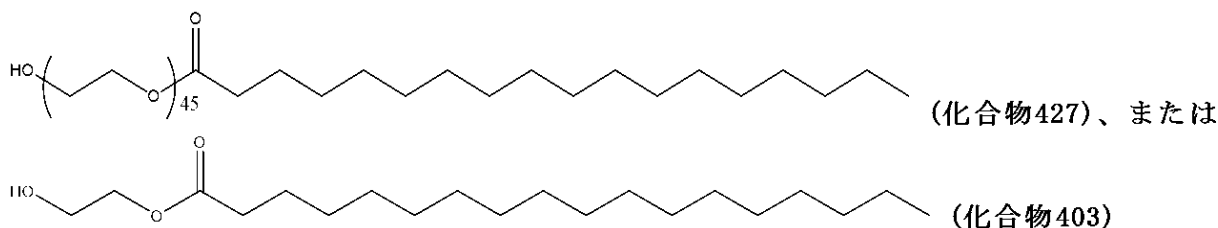
【化151】



またはその塩を有する。

【0259】

いくつかの実施形態では、式 (V I I I) の化合物は、
【化 1 5 2】



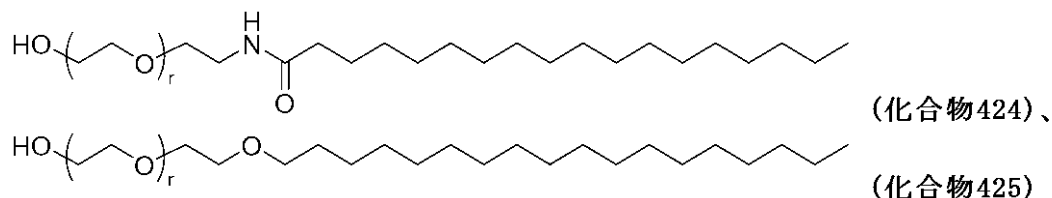
である。

10

【0 2 6 0】

ある特定の実施形態では、ある特定の実施形態、P E G 脂質は、以下の式：

【化 1 5 3】



のうちの1つ、またはその塩である。いくつかの実施形態では、r は、4 5 である。

20

【0 2 6 1】

適した追加のP E G 脂質は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるW O 2 0 1 7 / 0 9 9 8 2 3 に記載されている。

【0 2 6 2】

リン脂質

本明細書で定義されるリン脂質は、リン酸基を含む脂質である。脂質ナノ粒子組成物の脂質成分は、1つ以上のリン脂質、例えば、1つ以上の（ポリ）不飽和脂質を含んでもよい。リン脂質は、1層以上の脂質二重層にアセンブリされ得る。一般に、リン脂質は、リン脂質部分及び1つ以上の脂肪酸部分を含み得る。リン脂質部分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。脂肪酸部分は、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。分枝、酸化、環化、及びアルキンを含む修飾及び置換を有する天然種を含めた非天然種もまた企図される。例えば、リン脂質は、1つ以上のアルキン（例えば、1つ以上の二重結合が三重結合で置き換えられているアルケニル基）で官能化または架橋され得る。適切な反応条件下で、アルキン基は、アジドへの曝露時に銅触媒による付加環化を受ける可能性がある。そのような反応は、ナノ粒子組成物の脂質二重層を機能化して膜透過もしくは細胞認識を促進するのに、またはナノ粒子組成物を標的化部分もしくはイメージング部分（例えば、色素）などの有用な成分にコンジュゲートさせるのに、有用であり得る。

30

40

【0 2 6 3】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約1 m o l % から約20 m o l % のリン脂質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約5 m o l % から約15 m o l % のリン脂質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、約8 m o l % から約13 m o l % のリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、約10 m o l % から約12 m o l % のリン脂質を含む。

50

【0264】

適したリン脂質としては、以下のものが挙げられる：

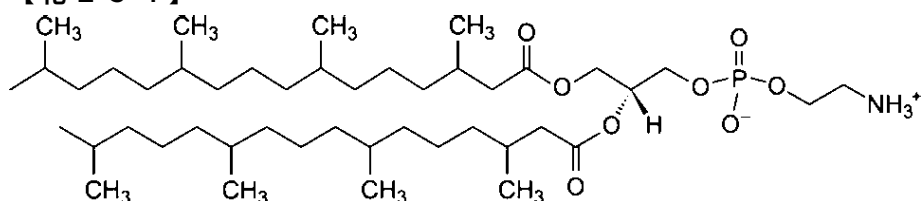
- 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、
 - 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、
 - 1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLPC)、
 - 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DMPC)、
 - 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、
 - 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、
 - 1, 2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DUPC)、
 - 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、
 - 1, 2-ジ-*O*-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (18:0 ジエーテルPC)、
 - 1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (OChemSPC)、
 - 1-ヘキサデシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (C16 Lyso PC)、
 - 1, 2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、
 - 1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、
 - 1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、
 - 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (ME 16:0 PE)、
 - 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (4ME 16:0 PC)、
 - 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホ- (1'-rac-グリセロール) (ナトリウム塩) (4ME 16:0 PG)、
 - 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (ナトリウム塩) (4ME 16:0 PS)、
 - 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 - 1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 - 1, 2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 - 1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 - 1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 - 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac- (1-グリセロール) ナトリウム塩 (DOPG)、
- 及びスフィンゴミエリン。それぞれの可能性は、別個の実施形態を表している。

【0265】

いくつかの実施形態では、リン脂質は、DSPCである。ある特定の実施形態では、リン脂質は、DOPEである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、DSPC及びDOPEの両方を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、

- 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (4ME 16:0 PE)

【化154】



- 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (4ME 16:0 PC)

10

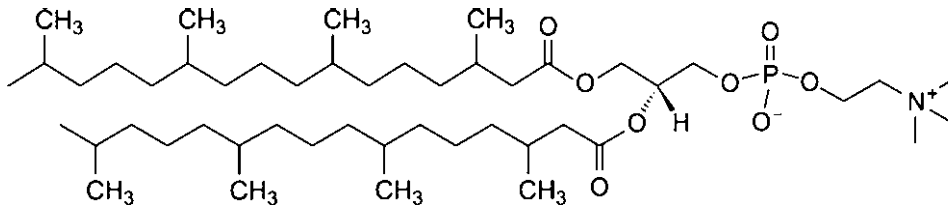
20

30

40

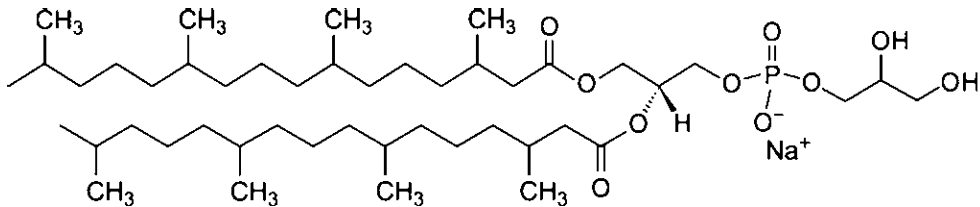
50

【化 1 5 5】



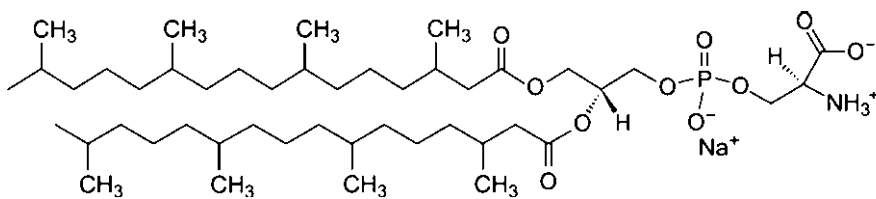
1, 2-ジフィタノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-(1'-*rac*-グリセロール)
(ナトリウム塩) (4ME 16:0 PG)、もしくは

【化 1 5 6】



1, 2-ジフィタノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (ナトリウム塩) (4ME 16:0 PS)

【化 1 5 7】



またはそれらの混合物である。

【0 2 6 6】

適したリン脂質のさらなる例としては、限定されるものではないが、以下のものが挙げられる：

10

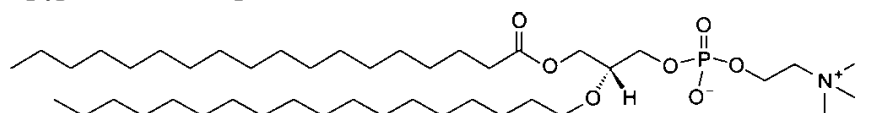
20

30

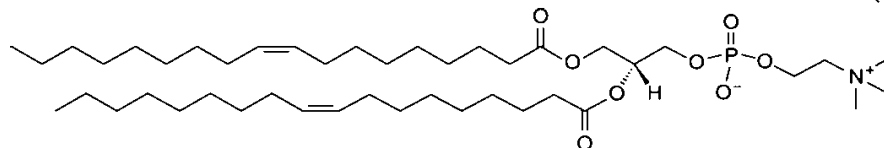
40

50

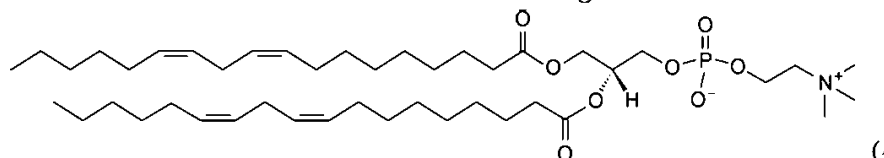
【化 1 5 8 - 1】



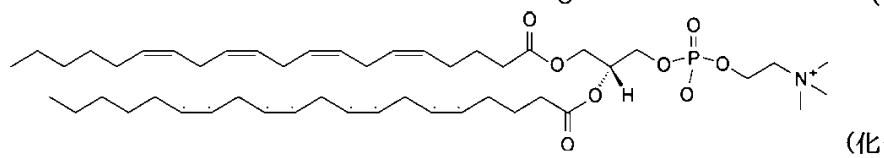
(化合物432)、



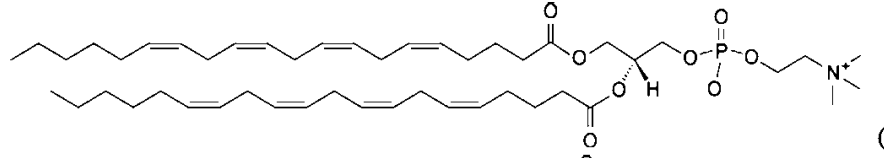
(化合物433)、



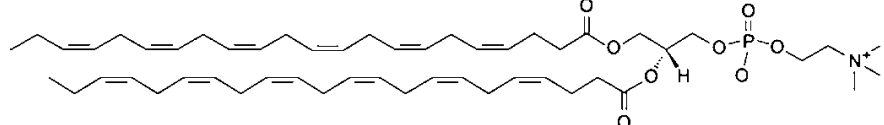
(化合物434)、



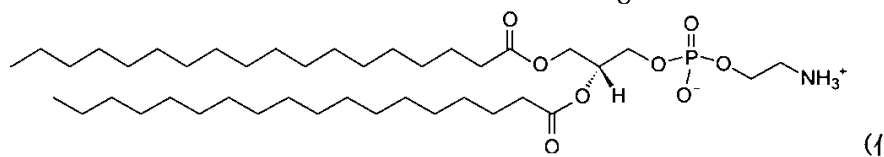
(化合物435)、



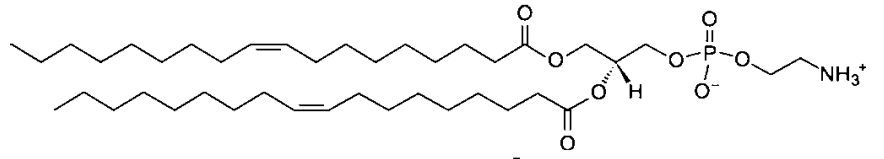
(化合物436)、



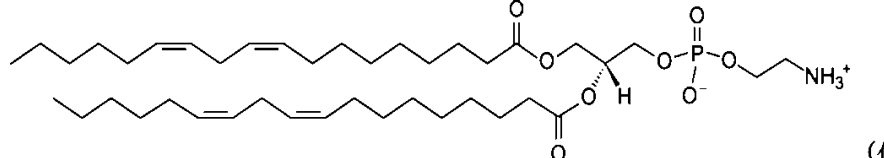
(化合物437)、



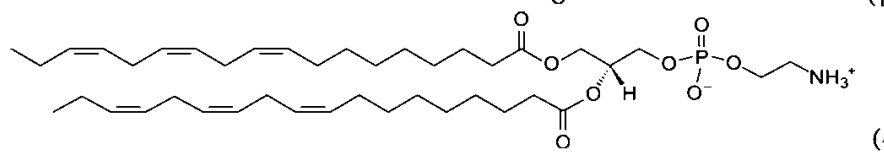
(化合物438)、



(化合物439)、



(化合物440)、



(化合物441)、

10

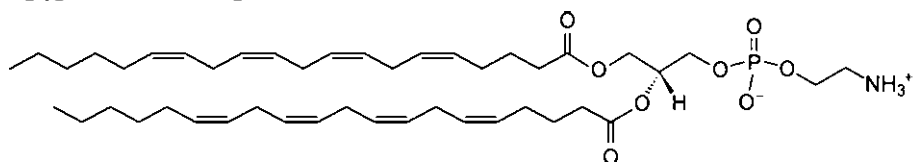
20

30

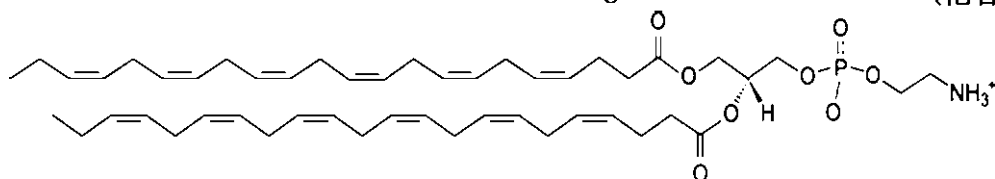
40

50

【化 1 5 8 - 2】

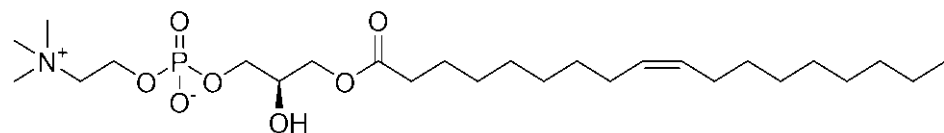


(化合物442)、

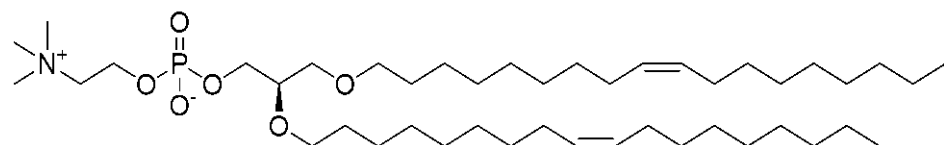


(化合物443)

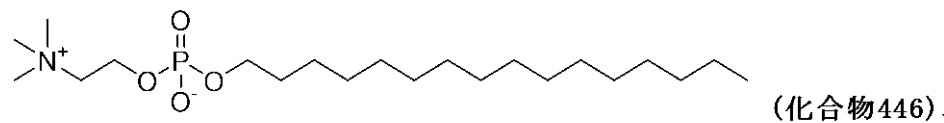
10



(化合物444)、

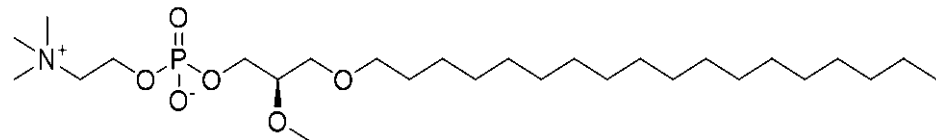


(化合物445)、

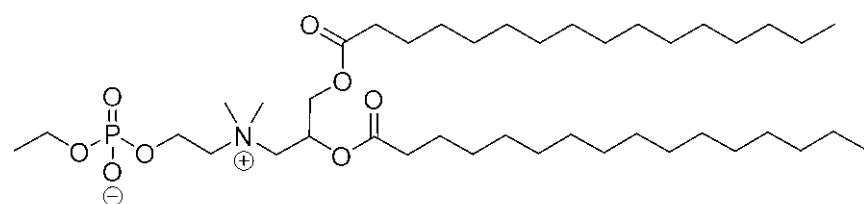


(化合物446)、

20



(化合物447)、及び



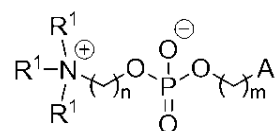
(化合物448)

30

【 0 2 6 7】

ある特定の実施形態では、リン脂質は、式 (IX) :

【化 1 5 9】



(IX)

40

の化合物またはその塩であり、式中：

各 R^1 は、独立して、Hもしくは任意選択的に置換されているアルキルであるか、または任意選択で、2つの R^1 が、介在原子と一緒に接続されて、任意選択的に置換されている単環式カルボシクリルもしくは任意選択的に置換されている単環式ヘテロシクリルを形成するか、または任意選択で、3つの R^1 が、介在原子と一緒に接続されて、任意選択的に置換されている二環式カルボシクリルもしくは任意選択的に置換されている二環式ヘテロシクリルを形成し、

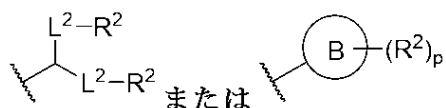
n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、

m は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、

A は、式：

50

【化 1 6 0】



のものであり、

L^2 の各事例は、独立して、結合または任意選択的に置換されている $C_1 \sim 6$ アルキレンであり、ここで、この任意選択的に置換されている $C_1 \sim 6$ アルキレンの 1 つのメチレン単位は、任意選択で、 $-O-$ 、 $-N(R^N)-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、または $-NR^NC(O)N(R^N)-$ で置き換えられており、

10

R^2 の各事例は、独立して、任意選択的に置換されている $C_1 \sim 30$ アルキル、任意選択的に置換されている $C_1 \sim 30$ アルケニル、または任意選択的に置換されている $C_1 \sim 30$ アルキニルであり、任意選択で、ここで、 R^2 の 1 つ以上のメチレン単位は、独立して、任意選択的に置換されているカルボシクリレン、任意選択的に置換されているヘテロシクリレン、任意選択的に置換されているアリーレン、任意選択的に置換されているヘテロアリーレン、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 、または $-N(R^N)S(O)_2O-$ で置き換えられており、

20

R^N の各事例は、独立して、水素、任意選択的に置換されているアルキル、または窒素保護基であり、

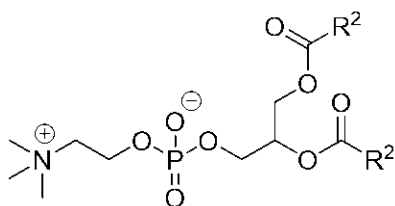
30

環 B は、任意選択的に置換されているカルボシクリル、任意選択的に置換されているヘテロシクリル、任意選択的に置換されているアリール、または任意選択的に置換されているヘテロアリールであり、

p は、1 または 2 である

(但し、この化合物は、式：

【化 1 6 1】



40

のものではなく、

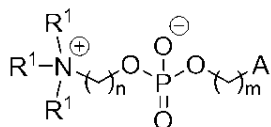
式中、各 R^2 は、独立して非置換アルキル、非置換アルケニル、または非置換アルキニルである)。

【0 2 6 8】

ある特定の実施形態では、リン脂質は、DSPC の類似体または変形、例えば、式 (IX)：

50

【化 1 6 2】



(IX)

の化合物またはその塩であり、式中：

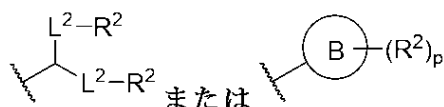
各 R^1 は、独立して、任意選択的に置換されているアルキルであるか、または任意選択で、2つの R^1 が、介在原子と一緒に接続されて、任意選択的に置換されている単環式カルボシクリルもしくは任意選択的に置換されている単環式ヘテロシクリルを形成するか、または任意選択で、3つの R^1 が、介在原子と一緒に接続されて、任意選択的に置換されている二環式カルボシクリルもしくは任意選択的に置換されている二環式ヘテロシクリルを形成し、

n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、

m は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、

A は、式：

【化 1 6 3】



のものであり、

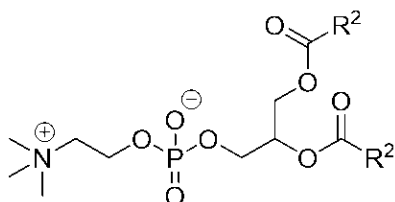
L^2 の各事例は、独立して、結合または任意選択的に置換されている $C_1 \sim 6$ アルキレンであり、ここで、この任意選択的に置換されている $C_1 \sim 6$ アルキレンの1つのメチレン単位は、任意選択で、 $-O-$ 、 $-N(R^N)-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^N C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^N C(O)O-$ 、または $-NR^N C(O)N(R^N)-$ で置き換えられており、

R^2 の各事例は、独立して、任意選択的に置換されている $C_1 \sim 30$ アルキル、任意選択的に置換されている $C_1 \sim 30$ アルケニル、または任意選択的に置換されている $C_1 \sim 30$ アルキニルであり、任意選択で、ここで、 R^2 の1つ以上のメチレン単位は、独立して、任意選択的に置換されているカルボシクリレン、任意選択的に置換されているヘテロシクリレン、任意選択的に置換されているアリーレン、任意選択的に置換されているヘテロアリーレン、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^N C(O)-$ 、 $-NR^N C(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^N C(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^N C(=NR^N)-$ 、 $-NR^N C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^N C(S)-$ 、 $-NR^N C(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 、または $-N(R^N)S(O)_2O-$ で置き換えられており、

R^N の各事例は、独立して、水素、任意選択的に置換されているアルキル、または窒素保護基であり、

環 B は、任意選択的に置換されているカルボシクリル、任意選択的に置換されているヘテロシクリル、任意選択的に置換されているアリール、または任意選択的に置換されてい

るヘテロアリアルであり、
 p は、1 または 2 である。
 但し、化合物は、式：
 【化 1 6 4】



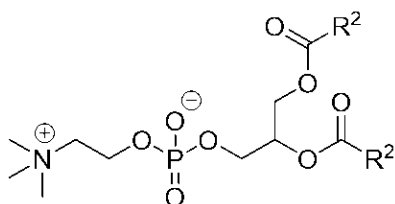
10

のものではなく、
 式中、各 R^2 は、独立して非置換アルキル、非置換アルケニル、または非置換アルキニルである。

【0 2 6 9】

いくつかの実施形態では、化合物は、式：

【化 1 6 5】



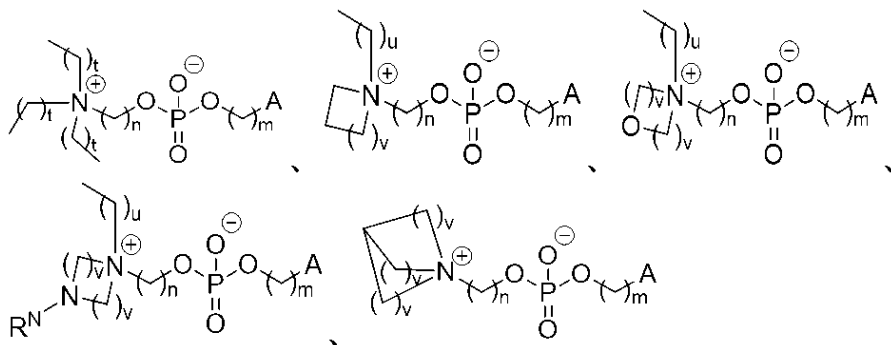
20

のものではなく、
 式中、各 R^2 は、独立して非置換アルキル、非置換アルケニル、または非置換アルキニルである。

【0 2 7 0】

ある特定の実施形態では、適したリン脂質は、修飾リン脂質頭部（例えば、修飾コリン基）を含む。ある特定の実施形態では、修飾頭部を有するリン脂質は、修飾四級アミンを有する DSPC、またはその類似体である。例えば、式（IX）の実施形態では、 R^1 のうちの少なくとも 1 つは、メチルではない。ある特定の実施形態では、 R^1 のうちの少なくとも 1 つは、水素またはメチルではない。ある特定の実施形態では、式（IX）の化合物は、以下の式：

【化 1 6 6】



40

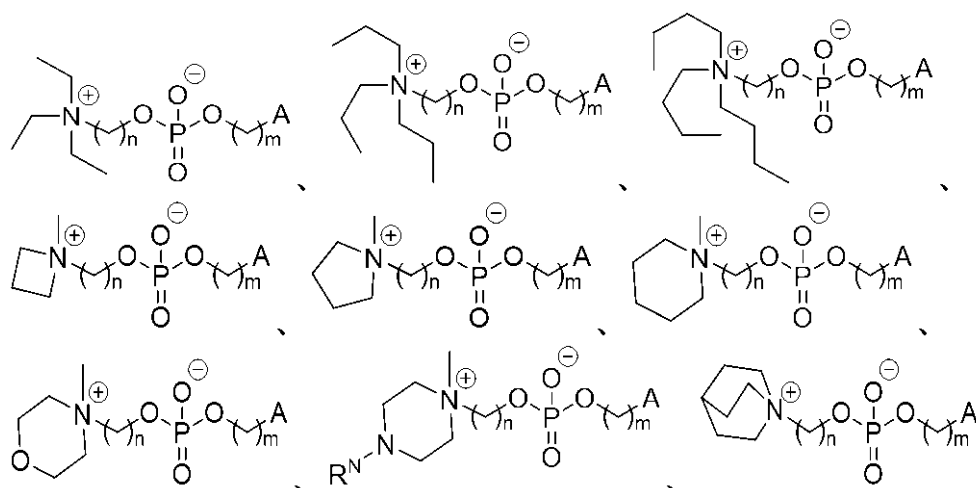
のうちの一つ、またはその塩であり、式中、

各 t は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 であり、
 各 u は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 であり、
 各 v は、独立して、1、2、または 3 である。

ある特定の実施形態では、式（IX）の化合物は、以下の式：

50

【化 1 6 7】



10

のうちの1つ、またはその塩である。

【0 2 7 1】

ある特定の実施形態では、式 (I X) の化合物は、以下の式：

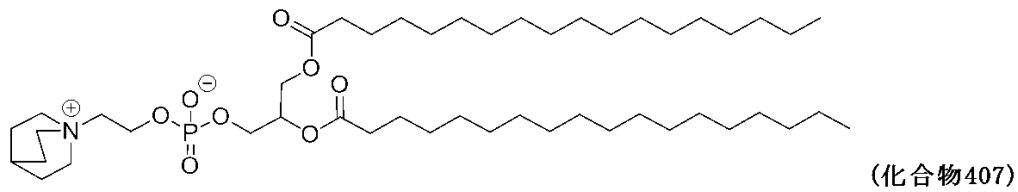
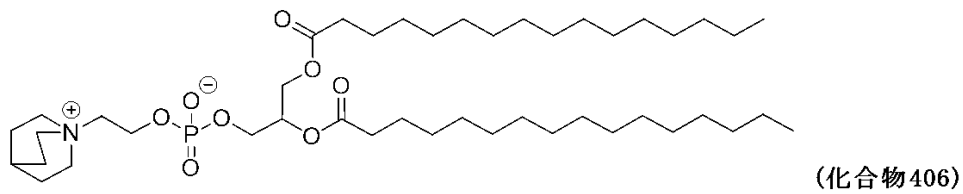
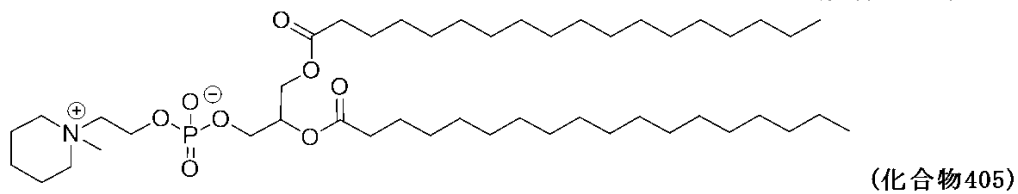
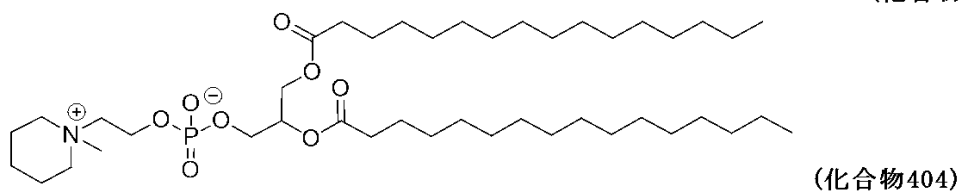
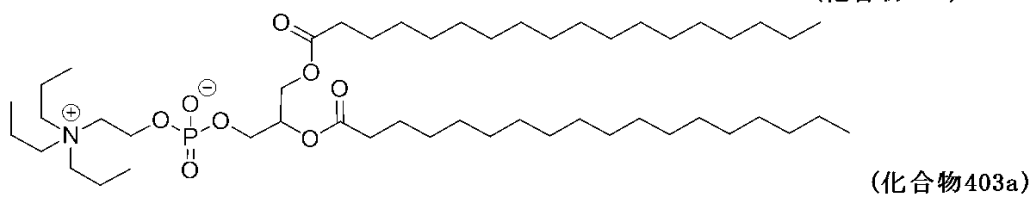
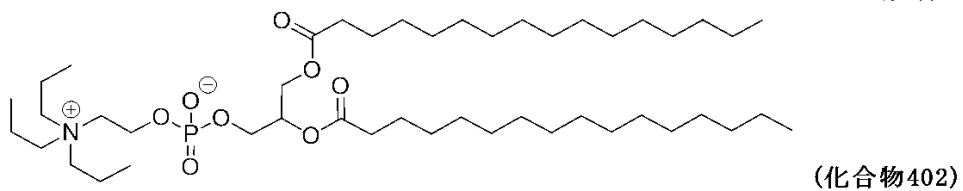
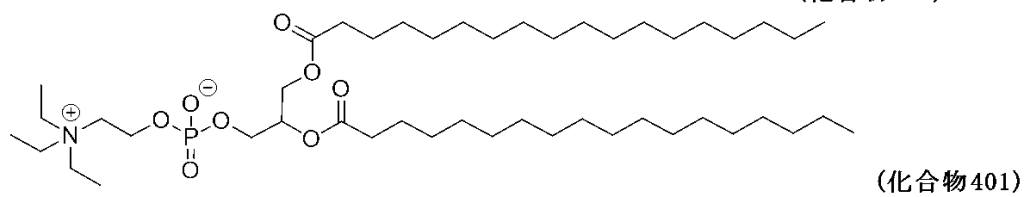
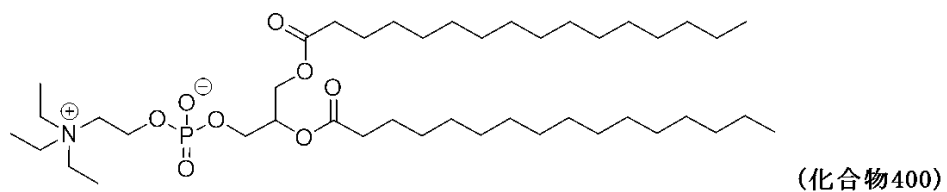
20

30

40

50

【化 1 6 8 - 1】



10

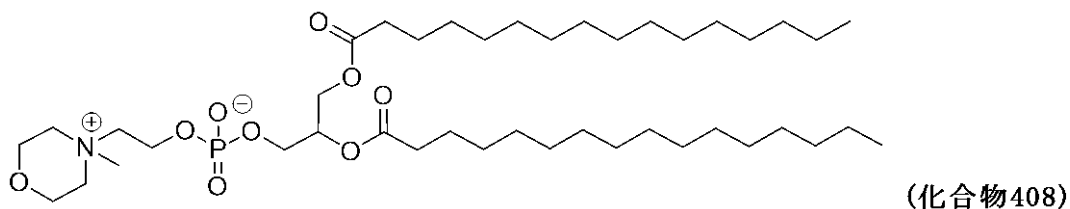
20

30

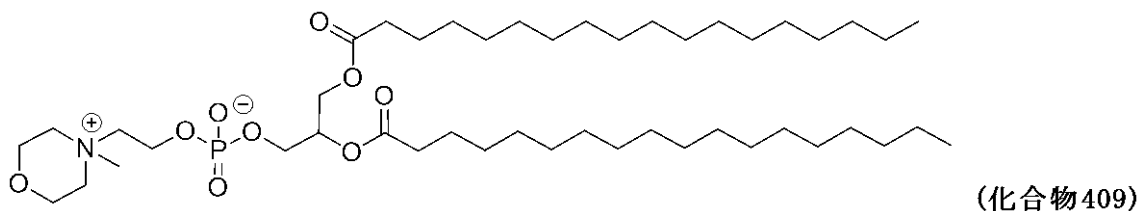
40

50

【化 1 6 8 - 2】



10

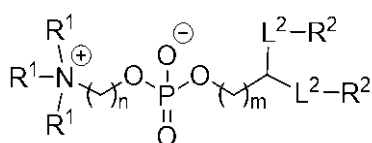


のうちの1つ、またはその塩である。

【0 2 7 2】

ある特定の実施形態では、式 (IX) の化合物は、式 (IX-a) :

【化 1 6 9】



20

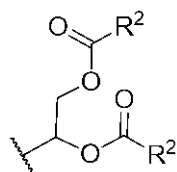
(IX-a)

またはその塩である。

【0 2 7 3】

ある特定の実施形態では、適したリン脂質は、修飾コアを含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の修飾コアを有するリン脂質は、修飾コア構造を有する DSPC またはその類似体である。例えば、式 (IX-a) のある特定の実施形態では、基 A は、以下の式 :

【化 1 7 0】



30

のものではない。

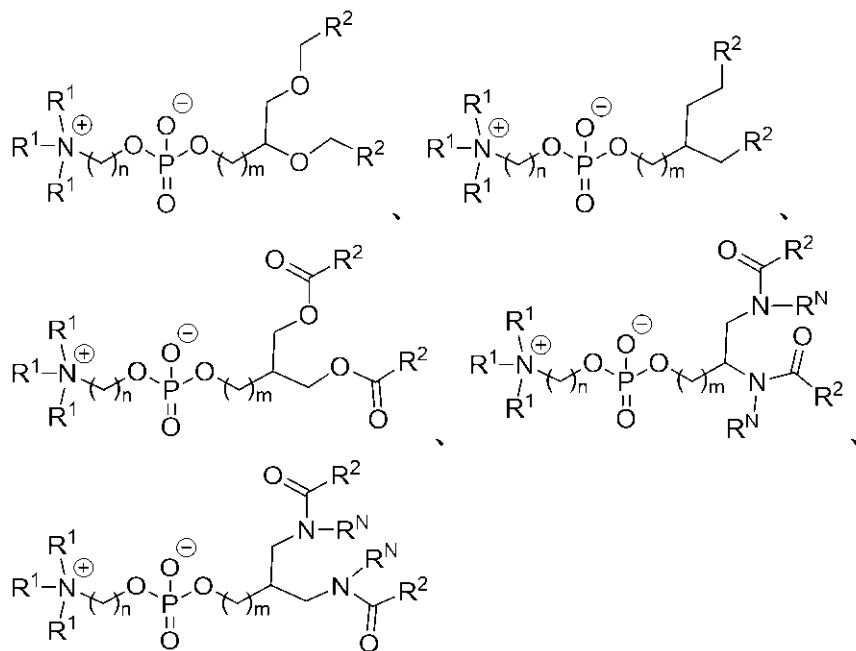
【0 2 7 4】

ある特定の実施形態では、式 (IX-b-4) の化合物は、以下の式 :

40

50

【化 1 7 1】



10

のうちの 1 つ、またはその塩である。

20

【 0 2 7 5】

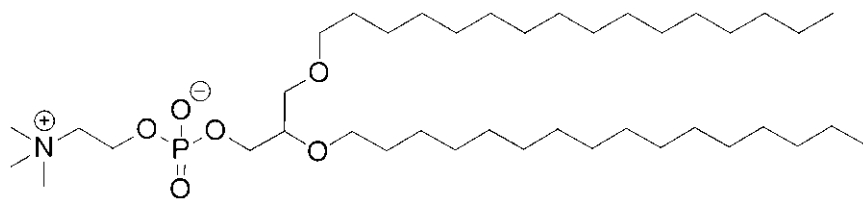
ある特定の実施形態では、式 (I X) の化合物は、以下の式：

30

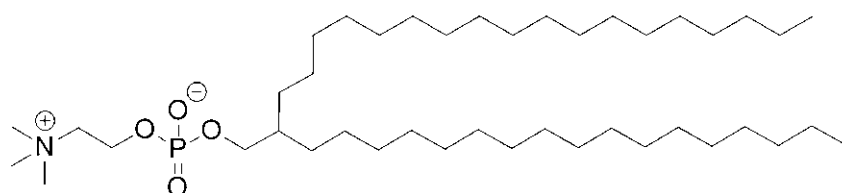
40

50

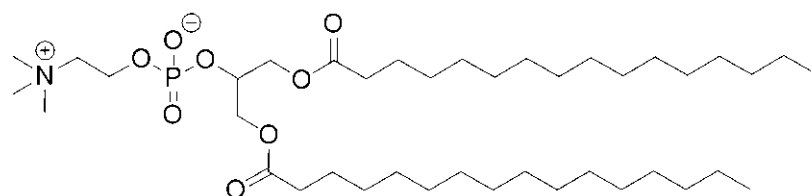
【化 1 7 2】



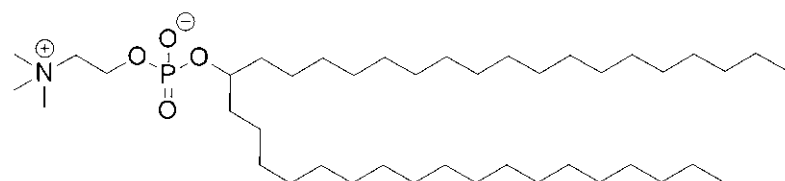
(化合物449)、



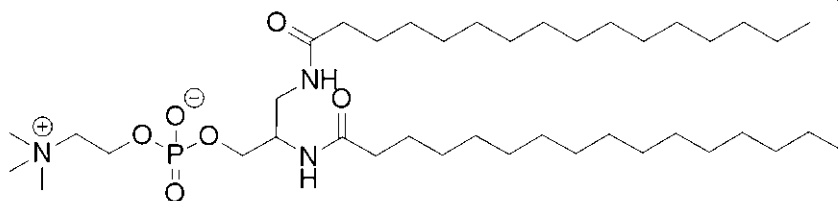
(化合物450)、



(化合物451)、



(化合物452)、



(化合物453)

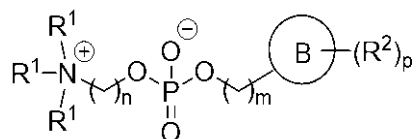
のうちの1つ、またはその塩である。

30

【0 2 7 6】

ある特定の実施形態では、リン脂質は、グリセリド部分の代わりに環状部分を含む。ある特定の実施形態では、リン脂質は、グリセリド部分の代わりに環状部分を有するDSPC、またはその類似体である。ある特定の実施形態では、式(IX)の化合物は、式(IX-b)：

【化 1 7 3】



(IX-b)

40

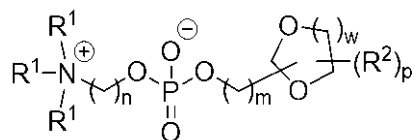
のもの、またはその塩である。

【0 2 7 7】

ある特定の実施形態では、式(IX-b)の化合物は、式(IX-b-1)：

50

【化 1 7 4】



(IX-b-1)

のもの、またはその塩であり、式中：

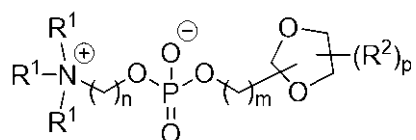
w は、0、1、2、または3である。

【0 2 7 8】

10

ある特定の実施形態では、式 (IX-b) の化合物は、式 (IX-b-2)：

【化 1 7 5】



(IX-b-2)

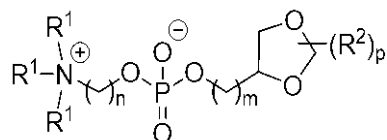
のもの、またはその塩である。

【0 2 7 9】

20

ある特定の実施形態では、式 (IX-b) の化合物は、式 (IX-b-3)：

【化 1 7 6】



(IX-b-3)

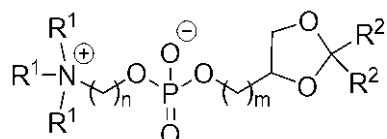
のもの、またはその塩である。

【0 2 8 0】

30

ある特定の実施形態では、式 (IX-b) の化合物は、式 (IX-b-4)：

【化 1 7 7】



(IX-b-4)

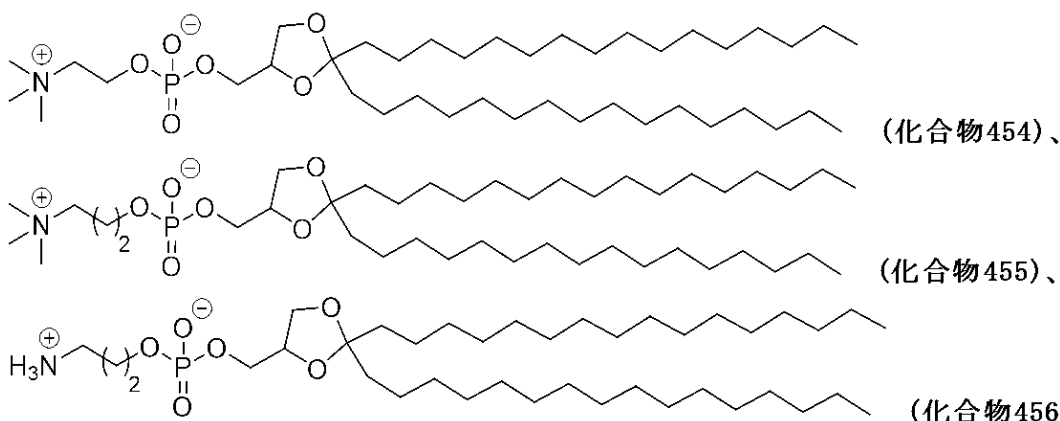
のもの、またはその塩である。

【0 2 8 1】

40

ある特定の実施形態では、式 (IX-b) の化合物は、以下の式：

【化 1 7 8】



10

のうちの1つ、またはその塩である。

【0 2 8 2】

ある特定の実施形態では、適したリン脂質は、修飾尾部を含む。ある特定の実施形態では、リン脂質は、修飾尾部を有するDSPCまたはその類似体である。本明細書に記載される場合、「修飾尾部」は、より短い、もしくはより長い脂肪族鎖、分岐が導入された脂肪族鎖、置換基が導入された脂肪族鎖、1つ以上のメチレンが環式基もしくはヘテロ原子基で置換された脂肪族鎖、またはそれらの任意の組み合わせを有する尾部であってもよい。例えば、ある特定の実施形態では、(IX)の化合物は、式(IX-a)のもの、またはその塩であり、式中、 R^2 の少なくとも1つの事例では、 R^2 の各事例は、任意選択的に置換されている $C_{1\sim 30}$ アルキルであり、ここで、 R^2 の1つ以上のメチレン単位は、独立して、任意選択的に置換されているカルボシクリレン、任意選択的に置換されているヘテロシクリレン、任意選択的に置換されているアリーレン、任意選択的に置換されているヘテロアリーレン、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 、または $-N(R^N)S(O)_2O-$ で置き換えられている。

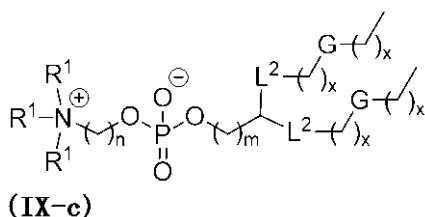
20

30

【0 2 8 3】

ある特定の実施形態では、式(IX)の化合物は、式(IX-c)：

【化 1 7 9】



40

のもの、またはその塩であり、式中：

各 x は、独立して、0～30の間(両端を含む)の整数であり、

各事例では、 G は、任意選択的に置換されているカルボシクリレン、任意選択的に置換

50

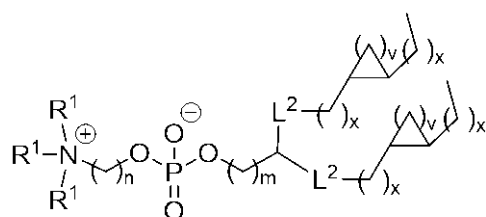
されているヘテロシクリレン、任意選択的に置換されているアリーレン、任意選択的に置換されているヘテロアリーレン、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 、または $-N(R^N)S(O)_2O-$ から独立して選択される。それぞれの可能性は、別個の実施形態を表している。

10

【0284】

ある特定の実施形態では、式(IX-c)の化合物は、式(IX-c-1)：

【化180】



20

(IX-c-1)

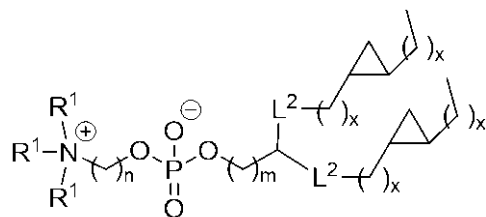
のもの、またはその塩であり、式中、

vの各事例は、独立して、1、2、または3である。

【0285】

ある特定の実施形態では、式(IX-c)の化合物は、式(IX-c-2)：

【化181】



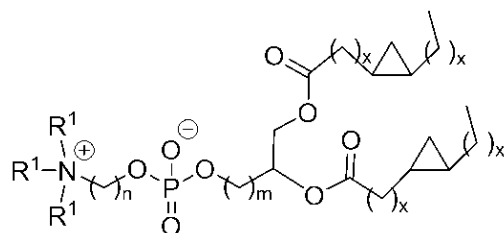
(IX-c-2)

のもの、またはその塩である。

【0286】

ある特定の実施形態では、式(IX-c)の化合物は、以下の式：

【化182】



のもの、またはその塩である。

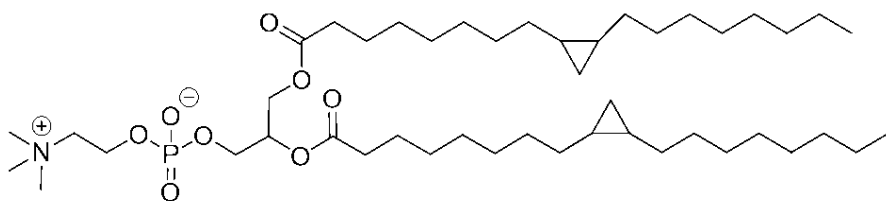
40

50

【0287】

ある特定の実施形態では、式 (IX-c) の化合物は、以下：

【化183】



(化合物457)

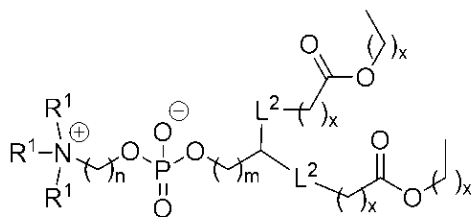
10

またはその塩である。

【0288】

ある特定の実施形態では、式 (IX-c) の化合物は、式 (IX-c-3)：

【化184】



(IX-c-3)

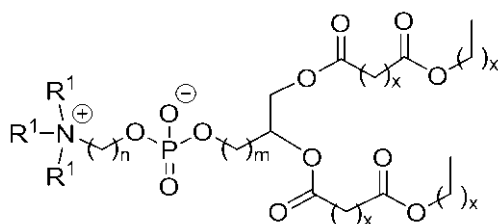
20

のもの、またはその塩である。

【0289】

ある特定の実施形態では、式 (IX-c) の化合物は、以下の式：

【化185】



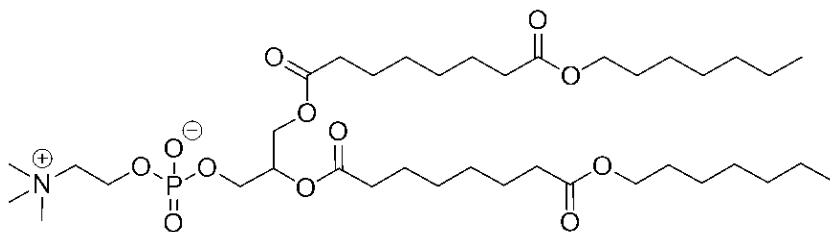
30

のもの、またはその塩である。

【0290】

ある特定の実施形態では、式 (IX-c) の化合物は、以下：

【化186】



(化合物458)

40

またはその塩である。

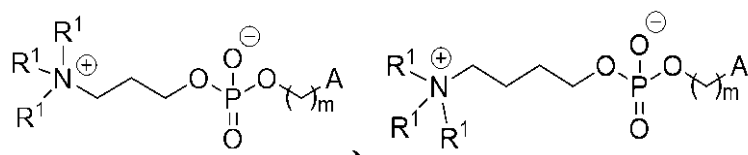
【0291】

ある特定の実施形態では、適したリン脂質は、修飾ホスホコリン部分を含み、四級アミンをホスホリル基に連結するアルキル鎖は、エチレンではない（例えば、nは2ではない）。したがって、ある特定の実施形態において、リン脂質は、式 (IX) の化合物であり、式中、nは、1、3、4、5、6、7、8、9、または10である。例えば、ある特定

50

の実施形態では、式（Ⅰ X）の化合物は、以下の式：

【化 1 8 7】



のうちの 1 つ、またはその塩である。

【0 2 9 2】

ある特定の実施形態では、式（Ⅰ X）の化合物は、以下の式：

10

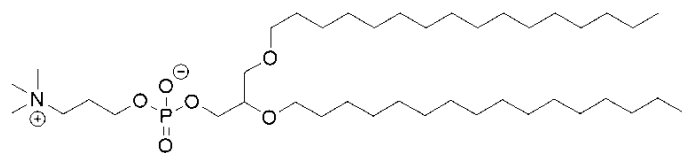
20

30

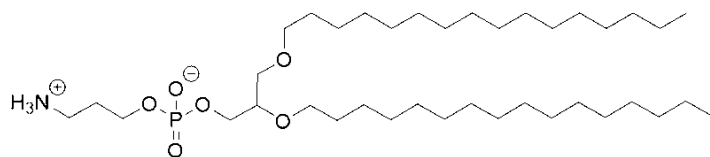
40

50

【化 1 8 8 - 1】

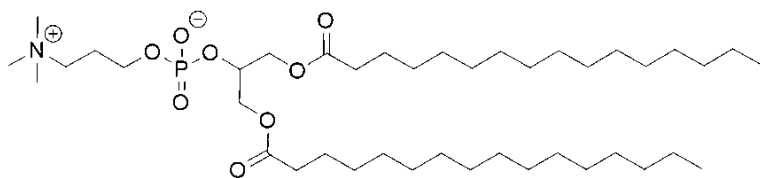


(化合物459)、

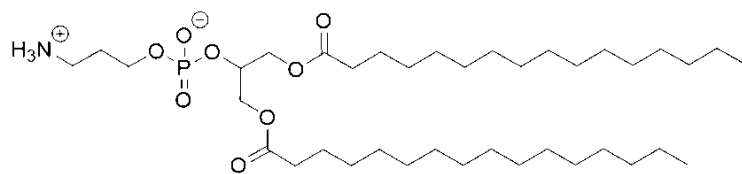


(化合物460)、

10

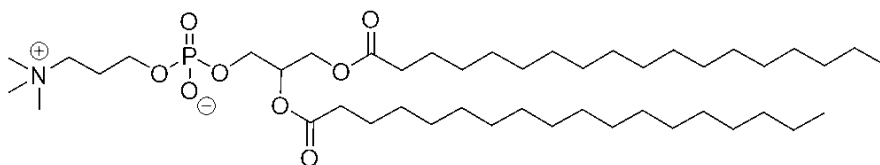


(化合物461)、

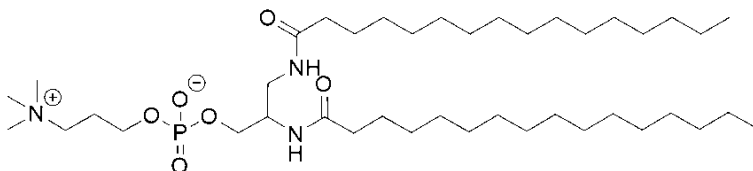


(化合物462)、

20

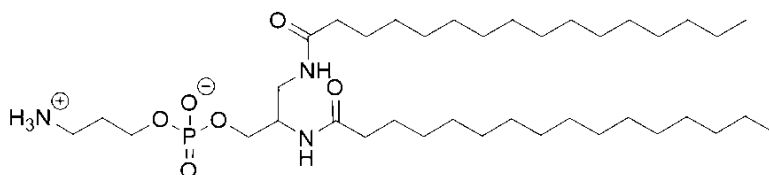


(化合物463a)、

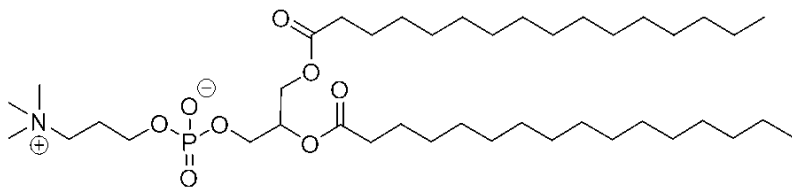


(化合物464)、

30



(化合物463)、

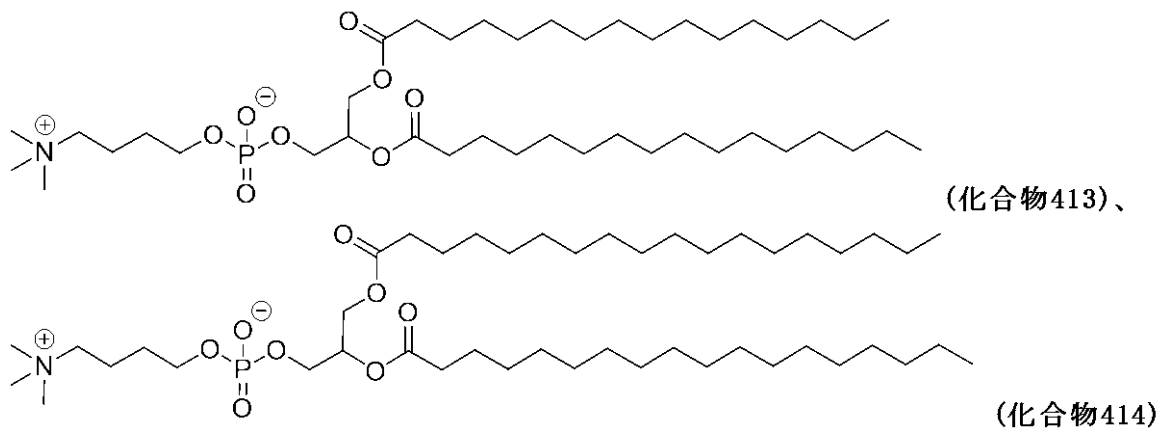


(化合物412)、

40

50

【化 1 8 8 - 2】



10

のうちの1つ、またはその塩である。

【0 2 9 3】

ある特定の実施形態では、リン脂質の代わりに、代替脂質が用いられる。そのような代替脂質の非限定的な例としては、以下：

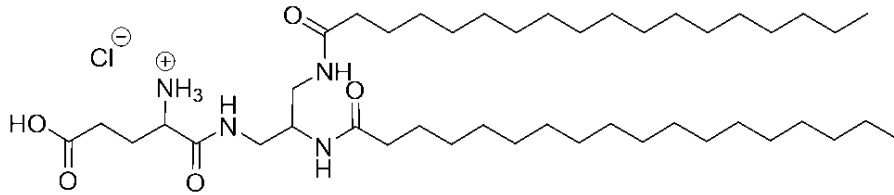
20

30

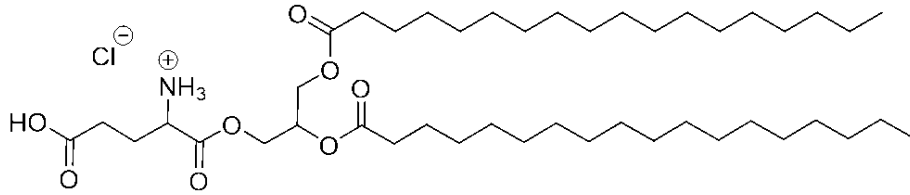
40

50

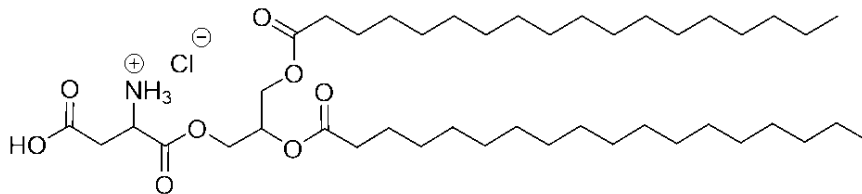
【化 1 8 9】



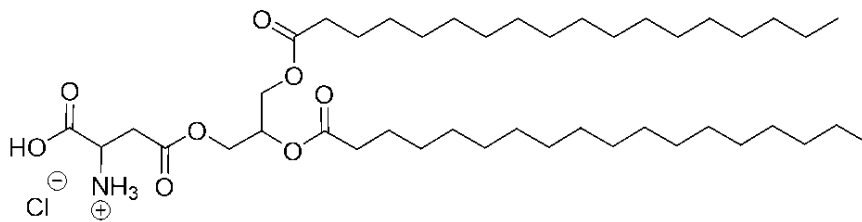
化合物457a、



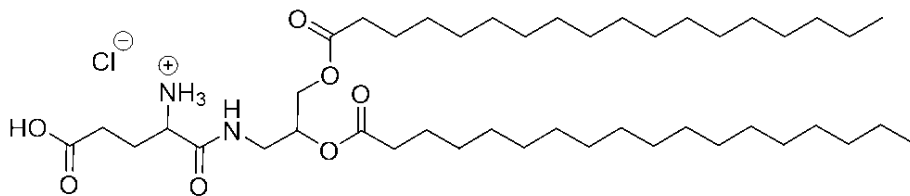
化合物458a、



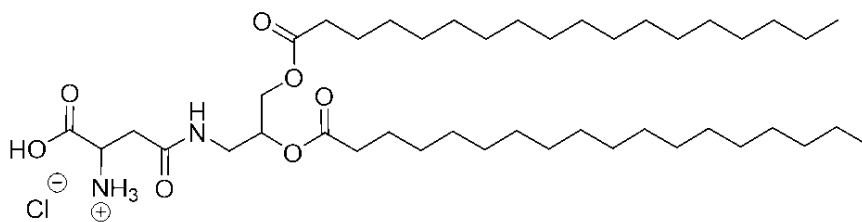
化合物459a、



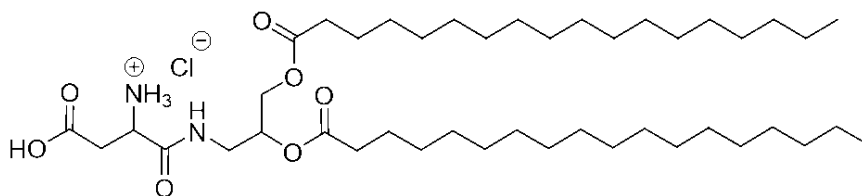
化合物460a、



化合物461a、



化合物461b、及び



化合物463b

が挙げられる。

【0 2 9 4】

構造脂質

脂質ナノ粒子組成物は、1つ以上の構造脂質を含んでもよい。脂質ナノ粒子内に構造脂質を組み込むことは、粒子内における他の脂質の凝集を軽減するのに役立つ場合がある。構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、アルファートコフェロール、ホパノイド、フィトステロール、ステロイド、及びそれらの混合物を含む群から選択することができるが、これらに限定されない。いく

10

20

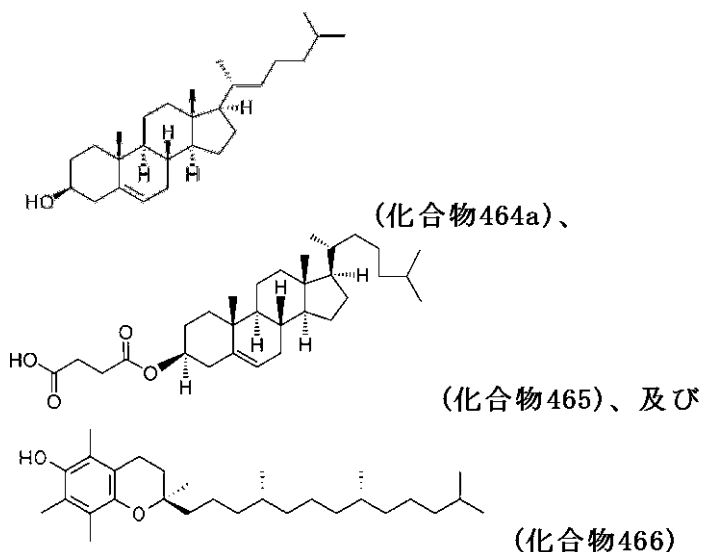
30

40

50

つかの実施形態では、該構造脂質は、ステロールである。本明細書で定義される、「ステロール」は、ステロイドアルコールからなるステロイドの亜群である。ある特定の実施形態では、該構造脂質は、ステロイドである。ある特定の実施形態では、該構造脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態では、該構造脂質は、コレステロールのアナログである。ある特定の実施形態では、構造脂質は、アルファートコフェロールである。構造脂質の例としては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：

【化190】



10

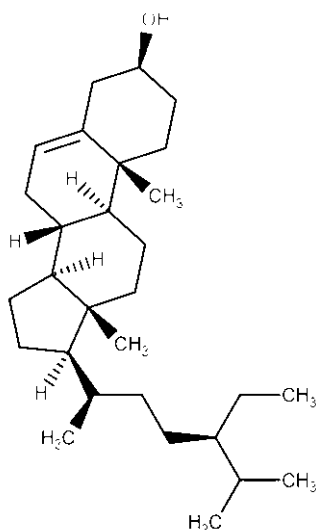
20

【0295】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子組成物は、約20mol%から約60mol%の構造脂質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、約30mol%から約50mol%の構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、約35mol%から約45mol%の構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、約37mol%から約42mol%の構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、約35、約36、約37、約38、約39、または約40mol%の構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、約39から約40mol%の構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、構造脂質は、コレステロールまたは以下の構造：

30

【化191】



40

を有する化合物である。

50

【0296】

ペイロードとしての治療剤及び予防剤

本開示の脂質ナノ粒子組成物は、多種多様な異なる治療剤または予防剤を患者に送達するために使用することができる。組成物によって送達される治療剤は核酸であるが、小分子、化学療法薬、ペプチド、ポリペプチド、及び他の生体分子などの非核酸剤も本開示によって包含されるペイロードである。送達することができる核酸には、DNAベースの分子（すなわち、デオキシリボヌクレオチドを含む）及びRNAベースの分子（すなわち、リボヌクレオチドを含む）が含まれる。さらに、核酸は、分子の天然に存在する形態、または（例えば、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む）分子の化学修飾された形態であり得る。

10

【0297】

一実施形態では、治療剤は、タンパク質発現を増強させる（すなわち、増加させる、刺激する、アップレギュレートさせる）薬剤である。タンパク質発現の増強に使用することができる治療剤のタイプの非限定的な例としては、RNA、mRNA、dsRNA、CRISPR/Cas9技術、ssDNA、及びDNA（例えば、発現ベクター）が挙げられる。

【0298】

一実施形態では、治療剤は、DNA治療剤である。DNA分子は、二本鎖DNA、一本鎖DNA（ssDNA）、または部分的に二本鎖DNAである分子、すなわち二本鎖である部分と一本鎖である部分とを有する分子であり得る。場合によっては、DNA分子は、三本鎖であるか、または部分的に三本鎖であり、すなわち、三本鎖の部分と二本鎖の部分とを有する。DNA分子は、環状DNA分子または線状DNA分子であり得る。

20

【0299】

DNA治療剤は、遺伝子を細胞に導入することができるDNA分子、例えば、転写物をコードしてそれを発現させることができるDNA分子であり得る。いくつかの実施形態では、DNA分子は、天然由来、例えば、天然源から単離されたものであり得る。他の実施形態では、DNA分子は、合成分子、例えばin vitroで生成された合成DNA分子である。いくつかの実施形態では、DNA分子は、組換え分子である。非限定的な例示的DNA治療剤としては、プラスミド発現ベクター及びウイルス発現ベクターが挙げられる。

30

【0300】

本明細書に記載のDNA治療剤、例えば、DNAベクターは、様々な異なる特徴を含んでもよい。本明細書に記載のDNA治療剤、例えば、DNAベクターは、非コードDNA配列を含んでもよい。例えば、DNA配列は、遺伝子の少なくとも1つの調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、終結エレメント、ポリアデニル化シグナルエレメント、スプライシングシグナルエレメントなどを含んでもよい。いくつかの実施形態では、非コードDNA配列は、イントロンである。いくつかの実施形態では、非コードDNA配列は、トランスポゾンである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のDNA配列は、転写活性のある遺伝子に作動可能に連結された非コードDNA配列を有してもよい。他の実施形態では、本明細書に記載のDNA配列は、遺伝子に連結されていない非コードDNA配列を有し得る。すなわち、非コードDNAは、DNA配列上の遺伝子を制御しない。

40

【0301】

一実施形態では、治療剤は、RNA治療剤である。RNA分子は、一本鎖RNA、二本鎖RNA（dsRNA）、または部分的に二本鎖RNAである分子、すなわち二本鎖である部分と一本鎖である部分とを有する分子であり得る。RNA分子は、環状RNA分子または線状RNA分子であり得る。

【0302】

RNA治療剤は、遺伝子を細胞に導入することができる、例えば、目的のタンパク質をコードすることにより気道細胞における目的のタンパク質の発現を増加させる、RNA治

50

療剤であり得る。いくつかの実施形態では、RNA分子は、天然由来、例えば、天然源から単離されたものであり得る。他の実施形態では、RNA分子は、合成分子、例えば *in vitro* で生成された合成RNA分子である。

【0303】

RNA治療剤の非限定的な例としては、メッセンジャーRNA (mRNA) (例えば、目的のタンパク質をコードするもの)、修飾mRNA (mmRNA)、マイクロRNA結合部位 (複数可) (miR結合部位 (複数可)) を導入したmRNA、機能性RNAエレメントを含む修飾RNA、マイクロRNA (miRNA)、アンタゴミル、低分子 (短鎖) 干渉RNA (siRNA) (ショートマー及びダイサー基質RNAを含む)、RNA干渉 (RNAi) 分子、アンチセンスRNA、リボザイム、小ヘアピンRNA (shRNA)、ロックド核酸 (LNA)、ならびにCRISPR/Cas9技術が挙げられ、これらのそれぞれは、以下のサブセクションでさらに説明される。

【0304】

mRNAは、天然に存在するmRNAであっても、または天然に存在しないmRNAであってもよい。mRNAは、以下に示される、1つ以上の修飾された核酸塩基、ヌクレオシド、またはヌクレオチドを含んでもよく、この場合、それは、「修飾mRNA」または「mmRNA」と呼ばれる場合もある。本明細書に記載される場合、「ヌクレオシド」は、有機塩基 (例えば、プリンもしくはピリミジン) またはその誘導体 (本明細書では「核酸塩基」とも呼ばれる) と組み合わせて糖分子 (例えば、ペントースもしくはリボース) またはその誘導体を含む化合物と定義される。本明細書に記載される場合、「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオシドと定義される。

【0305】

mRNAは、5'非翻訳領域 (5'-UTR)、3'非翻訳領域 (3'-UTR)、及び／またはコード領域 (例えば、オープンリーディングフレーム) を含んでもよい。mRNAは、数十 (例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100)、数百 (例えば、200、300、400、500、600、700、800、もしくは900) または数千 (例えば、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000) の塩基対を含む、任意の適した数の塩基対を含んでもよい。任意の数 (例えば、全部、一部、または0) の核酸塩基、ヌクレオシド、またはヌクレオチドが、標準種の類似体であっても、置換されていても、修飾されていても、または別の点で天然に存在していなくてもよい。ある特定の実施形態では、特定の核酸塩基タイプの全てが修飾され得る。

【0306】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のmRNAは、5'キャップ構造、鎖終結ヌクレオチド、任意選択で、コザック配列 (コザックコンセンサス配列としても知られる)、ステムループ、ポリA配列、及び／またはポリアデニル化シグナルを含み得る。

【0307】

5'キャップ構造またはキャップ種は、リンカーによって連結された2つのヌクレオシド部分を含む化合物であり、天然に存在するキャップ、天然に存在しないキャップもしくはキャップ類似体、またはアンチリバースキャップ類似体 (ARCA) から選択されてもよい。キャップ種は、1つ以上の修飾ヌクレオシド及び／またはリンカー部分を含んでもよい。例えば、天然のmRNAキャップは、グアニンヌクレオチド及び5'位置で三リン酸結合により連結され7位がメチル化されたグアニン (G) ヌクレオチド、例えば、一般的にm7GpppGと書かれるm7G (5')ppp (5')Gを含んでもよい。キャップ種はまた、アンチリバースキャップ類似体であってもよい。可能なキャップ種の非限定的なリストには、m7GpppG、m7Gpppm7G、m73'dGpppG、m27, O3'GpppG、m27, O3'GppppG、m27, O2'GpppppG、m7Gpppm7G、m73'dGpppG、m27, O3'GpppG、m27, O3'GppppG、及びm27, O2'GpppppGが含まれる。

【0308】

10

20

30

40

50

mRNAは、代わりに、または追加として、鎖終結ヌクレオシドを含んでもよい。例えば、鎖終結ヌクレオシドとしては、糖基の2'位及び／または3'位で脱酸素化されたヌクレオシドを挙げることができる。そのような種には、3'デオキシアデノシン（コルジセピン）、3'デオキシウリジン、3'デオキシシトシン、3'デオキシグアノシン、3'デオキシチミン、ならびに2'，3'ジデオキシヌクレオシド、例えば、2'，3'ジデオキシアデノシン、2'，3'ジデオキシウリジン、2'，3'ジデオキシシトシン、2'，3'ジデオキシグアノシン、及び2'，3'ジデオキシチミンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、鎖終結ヌクレオチドのmRNAへの、例えば3'末端での導入は、例えば、国際特許公開第WO2013／103659号に記載されているように、mRNAの安定化をもたらすし得る。

10

【0309】

mRNAは、ヒストンステムループなどのステムループを代わりにまたは追加で含む得る。ステムループは、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上のヌクレオチド塩基対を含んでもよい。例えば、ステムループは、4、5、6、7、または8つのヌクレオチド塩基対を含んでもよい。ステムループは、mRNAの任意の領域に位置していてもよい。例えば、ステムループは、非翻訳領域（5'非翻訳領域もしくは3'非翻訳領域）、コード領域、またはポリA配列もしくは尾部の中、前、または後に位置してもよい。いくつかの実施形態では、ステムループは、翻訳の開始、翻訳効率、及び／または転写終結などのmRNAの1つ以上の機能（複数可）に影響を及ぼす場合もある。

20

【0310】

mRNAは、ポリA配列及び／またはポリアデニル化シグナルを代わりにまたは追加で含む得る。ポリA配列は、アデニンヌクレオチドまたはそのアナログもしくは誘導体から完全にまたは主に構成され得る。ポリA配列は、mRNAの3'非翻訳領域に隣接して位置する尾部であり得る。いくつかの実施形態では、ポリA配列は、mRNAの核輸送、翻訳、及び／または安定性に影響を及ぼす場合がある。

【0311】

mRNAは、マイクロRNA結合部位を代わりにまたは追加で含む得る。

【0312】

いくつかの実施形態では、mRNAは、第1のコード領域及び第2のコード領域（第1及び第2のコード領域間の内部翻訳開始を可能にする内部リボソーム侵入部位（IRES）配列を含む介在配列、または2Aペプチドなどの自己切断ペプチドをコードする介在配列を有する）を含むバイシストロン性mRNAである。IRES配列及び2Aペプチドは、一般に、同じベクターからの複数のタンパク質の発現を増大させるために使用される。例えば、脳心筋炎ウイルスIRESを含む、様々なIRES配列が当該技術分野で知られており、利用可能であり、使用することができる。

30

【0313】

いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、1つ以上の修飾された核酸塩基、ヌクレオシド、またはヌクレオチド（「修飾mRNA」または「mmRNA」と呼ばれる）を含む。いくつかの実施形態では、修飾mRNAは、参照非修飾mRNAと比較して、安定性の向上、細胞内保持、翻訳の増強、及び／またはmRNAが導入された細胞の自然免疫応答を実質的に誘導しないことを含む、有用な特性を有してもよい。したがって、修飾mRNAの使用は、免疫原性の低下のみならず、タンパク質産生の効率、核酸の細胞内保持を向上させる場合もある。

40

【0314】

いくつかの実施形態では、mRNAは、1つ以上（例えば、1、2、3、または4つ）の異なる修飾核酸塩基、ヌクレオシド、またはヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上）の異なる修飾核酸塩基、ヌクレオシド、またはヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、修飾mRNAは、対応する非修飾mRNAと比較して、mRNAが導入される細胞の分解が低

50

減されている可能性がある。

【0315】

いくつかの実施形態では、該修飾核酸塩基は、修飾ウラシルである。修飾ウラシルを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドとしては、シュードウリジン (ψ)、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、6-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ウリジン ($s2U$)、4-チオ-ウリジン ($s4U$)、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシ-ウリジン ($h o5U$)、5-アミノアシル-ウリジン、5-ハロ-ウリジン (例えば、5-ヨード-ウリジンまたは5-ブロモ-ウリジン)、3-メチル-ウリジン ($m3U$)、5-メトキシ-ウリジン ($m o5U$)、ウリジン5-オキシ酢酸 ($c m o5U$)、ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル ($m c m o5U$)、5-カルボキシメチル-ウリジン ($c m5U$)、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-カルボキシヒドロキシメチル-ウリジン ($c h m5U$)、5-カルボキシヒドロキシメチル-ウリジンメチルエステル ($m c h m5U$)、5-メトキシカルボニルメチル-ウリジン ($m c m5U$)、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオ-ウリジン ($m c m5s2U$)、5-アミノメチル-2-チオ-ウリジン ($n m5s2U$)、5-メチルアミノメチル-ウリジン ($m n m5U$)、5-メチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン ($m n m5s2U$)、5-メチルアミノメチル-2-セレノ-ウリジン ($m n m5s e2U$)、5-カルバモイルメチル-ウリジン ($n c m5U$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウリジン ($c m n m5U$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン ($c m n m5s2U$)、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-ウリジン ($\tau m5U$)、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン ($\tau m5s2U$)、1-タウリノメチル-4-チオ-シュードウリジン、5-メチル-ウリジン ($m5U$ 、すなわち、核酸塩基デオキシチミンを有する)、1-メチル-シュードウリジン ($m1\psi$)、5-メチル-2-チオ-ウリジン ($m5s2U$)、1-メチル-4-チオ-シュードウリジン ($m1s4\psi$)、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、3-メチル-シュードウリジン ($m3\psi$)、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン (D)、ジヒドロシュードウリジン、5, 6-ジヒドロウリジン、5-メチル-ジヒドロウリジン ($m5D$)、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシ-ウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、N1-メチル-シュードウリジン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン ($a c p3U$)、1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)シュードウリジン ($a c p3\psi$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)ウリジン ($i n m5U$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオ-ウリジン ($i n m5s2U$)、 α -チオ-ウリジン、2'-O-メチル-ウリジン (Um)、5, 2'-O-ジメチル-ウリジン ($m5Um$)、2'-O-メチル-シュードウリジン (ψm)、2-チオ-2'-O-メチル-ウリジン ($s2Um$)、5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチル-ウリジン ($m c m5Um$)、5-カルバモイルメチル-2'-O-メチル-ウリジン ($n c m5Um$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチル-ウリジン ($c m n m5Um$)、3, 2'-O-ジメチル-ウリジン ($m3Um$)、及び5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-O-メチル-ウリジン ($i n m5Um$)、1-チオ-ウリジン、デオキシチミジン、2'-F-アラ-ウリジン、2'-F-ウリジン、2'-OH-アラ-ウリジン、5-(2-カルボメトキシビニル)ウリジン、及び5-[3-(1-E-プロペニルアミノ)]ウリジンが挙げられる。

【0316】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾シトシンである。修飾シトシンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドとしては、5-アザ-シチジン、6-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン ($m3C$)、N4-アセチル-シチジ

10

20

30

40

50

ン (a c 4 C)、5-ホルミル-シチジン (f 5 C)、N 4-メチル-シチジン (m 4 C)、5-メチル-シチジン (m 5 C)、5-ハロ-シチジン (例えば、5-ヨード-シチジン)、5-ヒドロキシメチル-シチジン (h m 5 C)、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン (s 2 C)、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、リシジン (k 2 C)、 α -チオ-シチジン、2'-O-メチル-シチジン (C m)、5, 2'-O-ジメチル-シチジン (m 5 C m)、N 4-アセチル-2'-O-メチル-シチジン (a c 4 C m)、N 4, 2'-O-ジメチル-シチジン (m 4 C m)、5-ホルミル-2'-O-メチル-シチジン (f 5 C m)、N 4, N 4, 2'-O-トリメチル-シチジン (m 4 2 C m)、1-チオ-シチジン、2'-F-アラ-シチジン、2'-F-シチジン、及び2'-OH-アラ-シチジンが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0317】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾アデニンである。修飾アデニンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドとしては、 α -チオ-アデノシン、2-アミノ-プリン、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-ハロ-プリン (例えば、2-アミノ-6-クロロ-プリン)、6-ハロ-プリン (例えば、6-クロロ-プリン)、2-アミノ-6-メチル-プリン、8-アジド-アデノシン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノ-プリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノ-プリン、7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチル-アデノシン (m 1 A)、2-メチル-アデニン (m 2 A)、N 6-メチル-アデノシン (m 6 A)、2-メチルチオ-N 6-メチル-アデノシン (m s 2 m 6 A)、N 6-イソペンテニル-アデノシン (i 6 A)、2-メチルチオ-N 6-イソペンテニル-アデノシン (m s 2 i 6 A)、N 6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン (i o 6 A)、2-メチルチオ-N 6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン (m s 2 i o 6 A)、N 6-グリシニルカルバモイル-アデノシン (g 6 A)、N 6-スレオニルカルバモイル-アデノシン (t 6 A)、N 6-メチル-N 6-スレオニルカルバモイル-アデノシン (m 6 t 6 A)、2-メチルチオ-N 6-スレオニルカルバモイル-アデノシン (m s 2 g 6 A)、N 6, N 6-ジメチル-アデノシン (m 6 2 A)、N 6-ヒドロキシノルバリルカルバモイル-アデノシン (h n 6 A)、2-メチルチオ-N 6-ヒドロキシノルバリルカルバモイル-アデノシン (m s 2 h n 6 A)、N 6-アセチル-アデノシン (a c 6 A)、7-メチル-アデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-アデニン、 α -チオ-アデノシン、2'-O-メチル-アデノシン (A m)、N 6, 2'-O-ジメチル-アデノシン (m 6 A m)、N 6, N 6, 2'-O-トリメチル-アデノシン (m 6 2 A m)、1, 2'-O-ジメチル-アデノシン (m 1 A m)、2'-O-リボシルアデノシン (リン酸) (A r (p))、2-アミノ-N 6-メチル-プリン、1-チオ-アデノシン、8-アジド-アデノシン、2'-F-アラ-アデノシン、2'-F-アデノシン、2'-OH-アラ-アデノシン、及びN 6-(19-アミノ-ペンタオキサノナデシル)-アデノシンが挙げられる。

【0318】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾グアニンである。修飾グアニンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドとしては、 α -チオ-グアノシン、イノシン (I)、1-メチル-イノシン (m 1 I)、ワイオシン (i m G)、メチルワイオシン (m i m G)、4-デメチル-ワイオシン (i m G-14)、イソワイオシン (i m G 2)、ウィブトシン (y W)、ペルオキシウィブトシン (o 2 y W)、ヒドロキシウィブトシン (O h y W)、低修飾 (under modified) ヒドロキシウィブトシン (O h y W*

)、7-デアザ-グアノシン、キューオシン(Q)、エポキシキューオシン(oQ)、ガラクトシル-キューオシン(galQ)、マンノシル-キューオシン(manQ)、7-シアノー-7-デアザ-グアノシン(preQ0)、7-アミノメチル-7-デアザ-グアノシン(preQ1)、アルカエオシン(G+)、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン(m7G)、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチル-イノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチル-グアノシン(m1G)、N2-メチル-グアノシン(m2G)、N2, N2-ジメチル-グアノシン(m22G)、N2, 7-ジメチル-グアノシン(m2, 7G)、N2, N2, 7-ジメチル-グアノシン(m2, 2, 7G)、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシン、N2, N2-ジメチル-6-チオ-グアノシン、 α -チオ-グアノシン、2'-O-メチル-グアノシン(Gm)、N2-メチル-2'-O-メチル-グアノシン(m2Gm)、N2, N2-ジメチル-2'-O-メチル-グアノシン(m22Gm)、1-メチル-2'-O-メチル-グアノシン(m1Gm)、N2, 7-ジメチル-2'-O-メチル-グアノシン(m2, 7Gm)、2'-O-メチル-イノシン(Im)、1, 2'-O-ジメチル-イノシン(m1Im)、2'-O-リボシルグアノシン(リン酸)(Gr(p))、1-チオ-グアノシン、O6-メチル-グアノシン、2'-F-アラ-グアノシン、及び2'-F-グアノシンが挙げられる。

10

20

【0319】

いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、前述の修飾核酸塩基のうちの1つ以上の組み合わせ(例えば、前述の修飾核酸塩基のうちの2、3、または4つの組み合わせ)を含む。

【0320】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、シュードウリジン(ψ)、N1-メチルシュードウリジン(m1 ψ)、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、5-メチルシトシン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-シュードウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5-メトキシウリジン、または2'-O-メチルウリジンである。いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、前述の修飾核酸塩基のうちの1つ以上の組み合わせ(例えば、前述の修飾核酸塩基のうちの2つ、3つ、または4つの組み合わせ)を含む。一実施形態では、修飾核酸塩基は、N1-メチルシュードウリジン(m1 ψ)であり、本開示のmRNAは、N1-メチルシュードウリジン(m1 ψ)で完全に修飾されている。いくつかの実施形態では、N1-メチルシュードウリジン(m1 ψ)は、mRNA中のウラシルの75~100%に相当する。いくつかの実施形態では、N1-メチルシュードウリジン(m1 ψ)は、mRNA中のウラシルの100%に相当する。

30

40

【0321】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾シトシンである。修飾シトシンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドとしては、N4-アセチル-シチジン(ac4C)、5-メチル-シチジン(m5C)、5-ハロ-シチジン(例えば、5-ヨード-シチジン)、5-ヒドロキシメチル-シチジン(hm5C)、1-メチル-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン(s2C)、2-チオ-5-メチル-シチジンが含まれる。いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、前述の修飾核酸塩基のうちの1つ以上の組み合わせ(例えば、前述の修飾核酸塩基のうちの2、3、または4つの組み合わせ)を含む。

【0322】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾アデニンである。修飾アデニンを有す

50

る例示的な核酸塩基及びヌクレオシドとしては、7-デアザ-アデニン、1-メチル-アデノシン (m1A)、2-メチル-アデニン (m2A)、N6-メチル-アデノシン (m6A) が含まれる。いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、前述の修飾核酸塩基のうちの1つ以上の組み合わせ（例えば、前述の修飾核酸塩基のうちの2、3、または4つの組み合わせ）を含む。

【0323】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾グアニンである。修飾グアニンを有する例示的な核酸塩基及びヌクレオシドとしては、イノシン (I)、1-メチル-イノシン (m1I)、ワイオシン (imG)、メチルワイオシン (mimG)、7-デアザ-グアノシン、7-シアノ-7-デアザ-グアノシン (preQ0)、7-アミノメチル-7-デアザ-グアノシン (preQ1)、7-メチル-グアノシン (m7G)、1-メチル-グアノシン (m1G)、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシンが挙げられる。いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、前述の修飾核酸塩基のうちの1つ以上の組み合わせ（例えば、前述の修飾核酸塩基のうちの2、3、または4つの組み合わせ）を含む。

【0324】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、1-メチル-シュードウリジン (m1ψ)、5-メトキシ-ウリジン (mo5U)、5-メチル-シチジン (m5C)、シュードウリジン (ψ)、α-チオ-グアノシン、またはα-チオ-アデノシンである。いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、前述の修飾核酸塩基のうちの1つ以上の組み合わせ（例えば、前述の修飾核酸塩基のうちの2、3、または4つの組み合わせ）を含む。

【0325】

いくつかの実施形態では、mRNAは、シュードウリジン (ψ) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、シュードウリジン (ψ) 及び5-メチル-シチジン (m5C) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、1-メチル-シュードウリジン (m1ψ) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、1-メチル-シュードウリジン (m1ψ) 及び5-メチル-シチジン (m5C) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2-チオウリジン (s2U) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2-チオウリジン及び5-メチル-シチジン (m5C) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、5-メトキシ-ウリジン (mo5U) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、5-メトキシ-ウリジン (mo5U) 及び5-メチル-シチジン (m5C) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-O-メチルウリジンを含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-O-メチルウリジン及び5-メチル-シチジン (m5C) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、N6-メチル-アデノシン (m6A) を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、N6-メチル-アデノシン (m6A) 及び5-メチル-シチジン (m5C) を含む。

【0326】

ある特定の実施形態では、本開示のmRNAは、特定の修飾のために均一に修飾される（すなわち、完全に修飾される、配列全体を通して修飾される）。例えば、mRNAは、N1-メチルシュードウリジン (m1ψ) または5-メチル-シチジン (m5C) で均一に修飾され得、このことは、mRNA配列中のすべてのウリジンまたはすべてのシトシンヌクレオシドが、N1-メチルシュードウリジン (m1ψ) または5-メチル-シチジン (m5C) で置き換えられることを意味する。同様に、本開示のmRNAは、上記のものなどの修飾残基での置換によって、配列に存在する任意の種類のヌクレオシド残基について均一に修飾され得る。

【0327】

いくつかの実施形態では、本開示のmRNAは、コード領域（例えば、ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム）で修飾されてもよい。他の実施形態では、mRNAは、コード領域以外の領域で修飾されてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、一方または両方が独立して1つ以上の異なるヌクレオシド修飾を含んでもよい5'-U

TR及び／または3'-UTRが提供される。そのような実施形態では、ヌクレオシド修飾はまた、コード領域内にも存在し得る。

【0328】

本開示のmRNAに存在し得るヌクレオシド修飾及びそれらの組み合わせの例としては、PCT特許出願公開WO2012045075、WO2014081507、WO2014093924、WO2014164253、及びWO2014159813に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0329】

本開示のmRNAは、糖、核酸塩基、及び／またはヌクレオシド間結合に対する修飾の組み合わせを含んでもよい。これらの組み合わせは、本明細書に記載の任意の1つ以上の修飾を含んでもよい。

【0330】

単一の修飾が挙げられている場合、挙げられたヌクレオシドまたはヌクレオチドが、修飾されたそのA、U、G、またはCヌクレオチドまたはヌクレオシドの100パーセントに相当する。パーセンテージが挙げられている場合、これらは、存在するA、U、G、またはC三リン酸の総量に対する、その特定のA、U、GまたはC核酸塩基三リン酸のパーセンテージを表す。例えば、組み合わせ：25% 5-アミノアリル-CTP + 75% CTP / 25% 5-メトキシ-UTP + 75% UTPとは、シトシン三リン酸のうちの25%が5-アミノアリル-CTPであると同時にシトシンのうちの75%がCTPであり、ウラシルのうちの25%が5-メトキシUTPであると同時にウラシルのうちの75%がUTPであるポリヌクレオチドを指す。修飾UTPが挙げられていない場合、天然に存在するATP、UTP、GTP及び／またはCTPが、ポリヌクレオチドに見られるそうしたヌクレオチドの部位の100%で使用される。この例では、全てのGTP及びATPヌクレオチドは未修飾のままである。

【0331】

本開示のmRNAまたはその領域は、コドン最適化されていてもよい。コドン最適化の方法は、当該技術分野において知られており、様々な目的：標的及び宿主生物におけるコドン頻度を一致させ、適切なフォールディングを確保するため、GC含量にバイアスをかけてmRNAの安定性を高め、もしくは二次構造を低減するため、遺伝子構成もしくは発現を損ない得るタンデムリピートコドンもしくは塩基の連続を最小にするため、転写及び翻訳調節領域をカスタマイズするため、タンパク質輸送配列を挿入もしくは除去するため、コードされるタンパク質の翻訳後修飾部位（例えば、グリコシル化部位）を除去／付加するため、タンパク質ドメインを付加、除去、もしくは入れ替えるため、制限酵素認識部位を挿入もしくは削除するため、リボソーム結合部位及びmRNA分解部位を修飾するため、翻訳速度を調節し、タンパク質の様々なドメインを正確にフォールドするため、または、該ポリヌクレオチド内の問題のある二次構造を低減もしくは取り除くために有用であり得る。コドン最適化ツール、アルゴリズム及びサービスは、当該技術分野で知られており、非限定的な例としては、GeneArt (Life Technologies)、DNA2.0 (Menlo Park, CA) からのサービス、及び／または独自方法が挙げられる。一実施形態では、mRNA配列は、例えば、哺乳動物細胞における発現を最適化するため、またはmRNAの安定性を向上させるために、最適化アルゴリズムを使用して最適化される。

【0332】

特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の任意のポリヌクレオチド配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む。

【0333】

本開示のmRNAは、in vitro転写 (IVT) 及び合成法を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で利用可能な手段によって生成され得る。酵素 (IVT)、固相、液相、複合合成法、小領域合成、及びライゲーション法を利用することができる。一

実施形態では、mRNAは、IVT酵素合成法を使用して作製される。IVTによるポリヌクレオチドの作製方法は当該技術分野で公知であり、国際出願PCT/US2013/30062に記載されており、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。したがって、本開示はまた、本明細書に記載のmRNAを*in vitro*で転写するために使用され得るポリヌクレオチド、例えば、DNA、コンストラクト、及びベクターを含む。

【0334】

非天然の修飾核酸塩基は、合成中または合成後にポリヌクレオチド、例えば、mRNAに導入されてもよい。特定の実施形態では、修飾は、ヌクレオシド間結合、プリンもしくはピリミジン塩基、または糖であってもよい。特定の実施形態では、修飾は、化学合成によって、またはポリメラーゼ酵素によって、ポリヌクレオチド鎖の末端またはポリヌクレオチド鎖の他のどこかに導入され得る。修飾核酸及びそれらの合成の例は、PCT出願第PCT/US2012/058519号に開示されている。修飾ポリヌクレオチドの合成は、Verma and Eckstein, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, 99-134 (1998)にも記載されている。

【0335】

酵素的または化学的ライゲーション法のいずれかを使用して、ポリヌクレオチドまたはその領域を、様々な機能的部分、例えば、標的化剤または送達剤、蛍光標識、液体、ナノ粒子などとコンジュゲートさせることができる。ポリヌクレオチドのコンジュゲート及び修飾ポリヌクレオチドは、Goodchild, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 1 (3), 165-187 (1990)に概説されている。

【0336】

いくつかの実施形態では、ペイロード治療剤は、タンパク質発現を低減させる（すなわち、減少させる、阻害する、ダウンレギュレートさせる）治療剤である。タンパク質発現を低減させるために使用することができる治療剤のタイプの非限定的な例としては、マイクロRNA結合部位（複数可）（miRNA結合部位）を導入したmRNA、マイクロRNA（miRNA）、アンタゴミル、低分子（短鎖）干渉RNA（siRNA）（ショートマー及びダイサー基質RNAを含む）、RNA干渉（RNAi）分子、アンチセンスRNA、リボザイム、小ヘアピンRNA（shRNA）、ロックド核酸（LNA）、ならびにCRISPR/Cas9技術が挙げられる。

【0337】

いくつかの実施形態では、治療剤は、ペプチド治療剤である。一実施形態では、治療剤は、ポリペプチド治療剤である。

【0338】

いくつかの実施形態では、ペプチドまたはポリペプチドは、天然由来、例えば、天然源から単離されたものである。他の実施形態では、ペプチドまたはポリペプチドは、合成分子、例えば、*in vitro*で生成された合成ペプチドまたはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ペプチドまたはポリペプチドは、組換え分子である。いくつかの実施形態では、ペプチドまたはポリペプチドは、キメラ分子である。いくつかの実施形態では、ペプチドまたはポリペプチドは、融合分子である。一実施形態では、本組成物のペプチドまたはポリペプチド治療剤は、天然に存在するペプチドまたはポリペプチドである。一実施形態では、本組成物のペプチドまたはポリペプチド治療剤は、天然に存在するペプチドまたはポリペプチドの修飾バージョンである（例えば、その野生型である、天然に存在するペプチドまたはポリペプチド対応物と比較して、3つ未満、5つ未満、10個未満、15個未満、20個未満、または25個未満のアミノ置換、欠失、または付加を含む）。

【0339】

医薬組成物

本開示は、1つ以上の医薬的に許容される添加剤とともに本明細書に記載の任意の脂質ナノ粒子組成物を含む医薬組成物を提供する。

【0340】

医薬組成物は、任意選択的に、1つ以上の追加の活性物質、例えば、治療上及び／または予防上活性な物質を含んでもよい。本開示の医薬組成物は、無菌及び／またはパイロジェンフリーであり得る。医薬薬剤の製剤化及び／または製造における全般的考慮事項は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、ヒト、ヒト患者、またはヒト対象に投与される。本開示の目的のために、「活性成分」という語句は、一般に、本明細書に記載の通りに送達されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドペイロードを含むナノ粒子を指す。

10

【0341】

本明細書に記載の医薬組成物は、薬理学の技術分野において既知または今後開発される任意の方法によって調製され得る。一般に、そのような調製方法は、ナノ粒子を、添加剤及び／または1つ以上の他の補助成分と会合させるステップと、次いで必要に応じて及び／または所望により、生成物を所望の単回または複数回用量単位に分割、成形、及び／または包装するステップとを含む。

【0342】

本開示による医薬組成物は、バルクで、1回単位用量として、及び／または複数の1回単位用量として、調製、包装及び／または販売できる。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の個別の量を指す。活性成分の量は一般に、対象に投与されることになる活性成分の投与量及び／またはそのような投与量の適切な分数、例えば、そのような投与量の2分の1もしくは3分の1などに等しい。

20

【0343】

本開示による医薬組成物中の活性成分、医薬的に許容される添加剤及び／または任意の追加の成分の相対量は、治療を受ける対象の個性、大きさ及び／または状態に応じて、さらには、組成物が投与される経路に応じて変動し得る。

【0344】

本明細書で提供される医薬組成物の説明は、主にヒトへの投与に適した医薬組成物を対象としているが、そのような組成物は一般に、任意の他の動物、例えば、非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物への投与に適していることを当業者は理解するであろう。

30

【0345】

本明細書で使用される場合、医薬的に許容される添加剤には、限定されないが、所望の特定の剤形に適した、あらゆる全ての溶媒、分散媒、または他の液体ビヒクル、分散助剤または懸濁助剤、希釈剤、造粒剤及び／または分散剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、防腐剤、結合剤、滑沢剤または油、着色剤、甘味剤または香味剤、安定剤、抗酸化剤、抗菌剤または抗真菌剤、浸透圧調整剤、pH調整剤、緩衝液、キレート剤、凍結保護物質、及び／または増量剤が含まれる。医薬組成物を調合するための様々な添加剤、及びその組成物を調製する技法は、当該技術分野で知られている（Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006（参照により、その全体が本明細書に援用される）を参照されたい）。

40

【0346】

酸化は、mRNA、特に液体mRNA製剤の潜在的な分解経路である。酸化を防止するために、抗酸化剤を製剤に添加することができる。例示的な抗酸化剤としては、アルファトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アコシル、ベンジルアルコール、ブチル化ヒドロキシアニソール、m-クレゾール、メチオニン、ブチル化ヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、メタ重亜硫酸ナトリウムまたはメタ重亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウムなど、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0347】

医薬組成物は、所望の生物学的効果、例えば、治療的効果または予防的効果（例えば、いくつかの実施形態では1つ以上の症状の軽減によって測定される、欠損タンパク質を補充するかもしれない置き換えるための、または望ましくないタンパク質発現を低減させるための、正常な遺伝子産物の発現によるもの）を生じさせるための有効量で投与することができる。製剤は、LNPを送達するための有効量で投与されてもよい。

【0348】

医薬組成物は、様々な投与の経路及び方法に適した様々な形態で調製され得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、液体剤形（例えば、エマルション、マイクロエマルション、ナノエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、及びエリキシル）、注射剤形、固体剤形（例えば、カプセル、錠剤、丸剤、粉末、及び顆粒）、局所及び／または経皮投与用の剤形（例えば、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー、吸入剤、及びパッチ）、懸濁液、粉末、及び他の形態で調製され得る。

【0349】

経口及び非経口投与のための液体剤形には、限定されないが、医薬的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、ナノエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、及び／またはエリキシル剤が含まれる。活性成分に加えて、液体剤形は、当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実、落花生、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ヒマシ、及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物を含む。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、追加の治療薬及び／または予防薬、追加の薬剤、例えば、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味剤、香味剤、及び／または芳香剤を含んでもよい。非経口投与のための特定の実施形態では、組成物は、可溶化剤、例えば、Cremophor（登録商標）、アルコール、油、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、及び／またはそれらの組み合わせと混合される。

【0350】

注射用調製物、例えば、滅菌の注射用水性または油性懸濁液は、好適な分散剤、湿潤剤、及び／または懸濁化剤を使用して、既知の技術に従って製剤化することができる。滅菌の注射用調製物は、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液として、非毒性の非経口的に許容される希釈剤及び／または溶媒中の滅菌注射用溶液、懸濁液、及び／またはエマルションであり得る。使用され得る許容されるビヒクル及び溶媒には、水、リンガー溶液、U.S.P.、及び等張塩化ナトリウム溶液がある。滅菌固定油は、従来、溶媒または懸濁媒として使用される。この目的においては、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含むいずれかの刺激の少ない固定油を使用できる。オレイン酸などの脂肪酸は、注射剤の調製に使用することができる。

【0351】

注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通して濾過することによって、及び／または使用前に滅菌水もしくは他の滅菌注射用媒体に溶解もしくは分散させることができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって滅菌され得る。

【0352】

医薬組成物は、肺投与に好適な製剤として調製、包装、及び／または販売され得る。かかる製剤は、活性成分を含む乾燥粒子を含んでもよい。そのような組成物は、推進剤の流れが粉末を分散させるように向けられ得る乾燥粉末貯蔵器を含むデバイスを使用して、及び／または密封された容器内の低沸騰推進剤に溶解及び／または懸濁させられた活性成分を含むデバイスなどの自己推進溶媒／粉末分注容器を使用して、投与するための乾燥粉末の形態であり得る。乾燥粉末組成物は、糖などの固体微細粉末希釈剤を含んでもよく、単位用量形態で提供され得る。

【0353】

低沸騰推進剤は、一般に、大気圧で約65°F以下の沸点を有する液体推進剤を含む。推進剤は組成物の50%から99.9%（重量／重量）を構成してもよく、活性成分は組成物の0.1%から20%（重量／重量）を構成してもよい。推進剤は、液体非イオン性及び／または固体アニオン性界面活性剤及び／または固体希釈剤（活性成分を含む粒子と同じ程度の粒径を有し得る）などの追加の成分をさらに含み得る。

【0354】

肺送達のために製剤化された医薬組成物は、溶液及び／または懸濁液の液滴の形態の活性成分を提供し得る。そのような製剤は、活性成分を含む、任意に滅菌した、水性及び／または希釈アルコール溶液及び／または懸濁液として、調製、包装、及び／または販売されてもよく、任意の噴霧化及び／または霧化装置を使用して都合よく投与されてもよい。かかる製剤は、限定されないが、サッカリンナトリウムなどの香味剤、揮発性油、緩衝剤、界面活性剤、及び／またはヒドロキシ安息香酸メチルなどの防腐剤を含む1つ以上の追加の成分をさらに含んでもよい。この投与経路によって提供される液滴は、約1nmから約200nmの範囲の平均直径を有し得る。

【0355】

肺送達に有用であると本明細書に記載される製剤は、医薬組成物の鼻腔内送達に有用である。鼻腔内投与に好適な別の製剤は、活性成分を含み、約0.2µmから500µmの平均粒子を有する粗製粉末である。そのような製剤は、鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻腔を介して急速に吸入することによる方法で投与される。経鼻投与に好適な製剤は、例えば、できるだけ少ない約0.1%（重量／重量）からできるだけ多い100%（重量／重量）の活性成分を含んでよく、本明細書に記載される1つ以上の追加の成分を含んでもよい。

【0356】

疾患を治療または予防する方法

本明細書に記載の充填脂質ナノ粒子は、疾患の治療または予防に有用であり得る。特に、そのような組成物は、タンパク質またはポリペプチド活性の欠損または異常を特徴とする疾患を治療する際に有用であり得る。いくつかの実施形態では、欠損した、または異常なポリペプチドをコードするmRNAが充填された本明細書に記載の充填脂質ナノ粒子組成物を細胞に投与または送達することができる。続くmRNAの翻訳により、ポリペプチドが生成され、それによりポリペプチドによって引き起こされる活性の欠如または異常な活性が原因となる問題を低減または解消することができる。翻訳は急速に生じ得るため、方法及び組成物は、敗血症、卒中、及び心筋梗塞などの急性疾患、障害、または状態の治療に有用な場合もある。LNPに含まれる治療薬及び／または予防薬は、所与の種の転写速度を変えることができる場合もあり、それにより遺伝子発現に影響を及ぼす。

【0357】

組成物が投与され得る機能不全または異常なタンパク質またはポリペプチド活性を特徴とする疾患としては、希少疾患、感染症（ワクチン及び治療薬の両方として）、がん及び増殖性疾患、遺伝子疾患、自己免疫疾患、糖尿病、神経変性疾患、心及び腎血管性疾患、ならびに代謝疾患が挙げられるが、これらに限定されない。複数の疾患、障害、及び／または状態は、タンパク質活性の欠損（または適切なタンパク質機能が生じない程実質的に減少した）を特徴とする場合もある。そのようなタンパク質は、存在していない場合もあり、または本質的に機能しない場合もある。本開示は、RNAならびに式（I）による脂質、リン脂質（任意選択的に不飽和）、PEG脂質、及び構造脂質を含む脂質成分を含むLNPを投与することによって、対象のそのような疾患、障害、及び／または状態を治療するための方法を提供し、この場合、RNAは、対象の細胞に存在する異常なタンパク質活性を拮抗するか、または別の方法で克服するポリペプチドをコードするmRNAであってもよい。

【0358】

本開示は、核酸、及びそれを含む医薬組成物などの、1つ以上の治療剤及び／または予

防剤が充填された脂質ナノ粒子組成物を投与することを含む方法を提供する。治療薬及び予防薬という用語は、本開示の特徴及び実施形態に対して本明細書では同義に使用することができる。治療用組成物、またはその画像化、診断用、もしくは予防用組成物は、疾患、障害、及び／または状態を予防、治療、診断または画像化するため、及び／または任意の他の目的のために効果的な任意の適度な量及び任意の投与経路を使用して対象に投与されてもよい。所与の対象に投与される具体的な量は、対象の種、年齢、及び全身状態；投与の目的；特定の組成物；投与様式などにより変動することがある。本開示による組成物は、投与の容易さ及び投与量の均一性のために単位剤形に製剤化されてもよい。しかし、当然のことながら、本開示の組成物の1日当たりの総使用量は適切な医学的判断の範囲内で主治医により決定される。任意の特定の患者に対する特定の治療有効、予防有効、またはその他（例えば、画像化のため）の適切な用量レベルは、治療されている障害の重症度及び識別（もしあれば）；使用される1つ以上の治療薬及び／または予防薬；使用される特定の組成物；患者の年齢、体重、全般的な健康、性別、及び食事；使用される特定の医薬組成物の投与時間、投与経路、及び排出速度；治療期間；使用される特定の医薬組成物と組み合わせるまたは同時に使用される薬物；ならびに医学分野で周知の同様の要因を含む様々な要因に左右される。

10

【0359】

併用療法

核酸などの1つ以上のペイロード治療薬及び／または予防薬が充填された脂質ナノ粒子組成物は、1つ以上の他の治療剤、予防剤、診断用薬剤、または造影剤と組み合わせて使用することができる。「と組み合わせる」とは、これらの送達方法は本開示の範囲内であるが、薬剤が同時に投与されなければならないこと、及び／または送達のために一緒に製剤化されなければならないことを暗示することは意図されない。脂質ナノ粒子組成物は、1つ以上の他の所望の治療薬または医療処置と同時に、その前に、またはその後に投与されてもよい。概して、各薬剤は、その薬剤について決定された用量及び／または時間スケジュールで投与される。いくつかの実施形態では、本開示は、バイオアベイラビリティを改善し、代謝を低減及び／または調整し、排出を阻害し、及び／または体内での分布を調整する薬剤と組み合わせて、組成物、またはその画像化、診断、もしくは予防用組成物の送達を包含する。

20

【0360】

組み合わせて利用される治療、予防、診断、または画像化に有効な薬剤が単一の組成物として一緒に投与されても、または異なる組成物として別々に投与されてもよいことがさらに理解されるであろう。一般に、組み合わせて利用される薬剤は、それらが個々に利用されるレベルを超えないレベルで利用されることが予期される。いくつかの実施形態では、組み合わせて利用されるレベルは、個別に利用されるレベルよりも低い場合もある。併用レジメンで使用する療法（治療薬または手技）の特定の組み合わせは、所望の治療薬及び／または手技と、達成される所望の治療効果との適合性を考慮に入れる。また、使用される療法は、同じ障害に対して所望の効果を達成することができるか（例えば、がんを治療するのに有用な組成物は、化学療法剤と同時に投与され得る）、または異なる効果（例えば、輸注反応などの任意の有害な作用の制御）を達成することも理解されるであろう。

30

40

【0361】

充填脂質ナノ粒子組成物は、組成物の有効性及び／または治療域を増加させる薬剤と組み合わせて使用されてもよい。そのような薬剤は、例えば、抗炎症化合物、ステロイド（例えば、コルチコステロイド）、スタチン、エストラジオール、BTK阻害剤、S1P1アゴニスト、グルココルチコイド受容体修飾薬（GRM）、または抗ヒスタミン薬であってもよい。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、デキサメタゾン、メトトレキセート、アセトアミノフェン、H1受容体遮断薬、またはH2受容体遮断薬と組み合わせて使用されてもよい。いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象を治療する方法あるいは治療薬及び／または予防薬を対象（例えば、哺乳動物）に送達する方法は、脂質

50

ナノ粒子組成物を投与する前に1つ以上の薬剤で対象を前処置することを含んでもよい。

【0362】

キット及びデバイス

本開示は、本開示の脂質ナノ粒子組成物を便利に及び／または効果的に使用するためのキットを提供する。通常、キットには、ユーザーが対象（複数可）の複数回の処置を実施することができるように、及び／または複数回の実験を実施することができるように、十分な量及び／または数の構成要素が含まれる。

【0363】

一態様では、本開示は、本開示のナノ粒子を含むキットを提供する。

【0364】

キットは、包装及び説明書及び／または製剤組成物を形成するための送達剤をさらにも含む。送達剤は、生理食塩水、緩衝溶液、またはリポイドを含んでもよい。

【0365】

いくつかの態様では、キットは、空の脂質ナノ粒子組成物及び核酸溶液を含んでもよい。いくつかの態様では、キットは、空の脂質ナノ粒子組成物を含む第1の容器と、治療剤または予防剤を含む溶液を含む第2の容器とを含む。いくつかの態様では、キットは、第1の容器及び第2の容器の内容物を混ぜ合わせる（例えば、混合すること）に関する説明書をさらにも含む。いくつかの実施形態では、容器は、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）バッグを含んでもよい。

【0366】

定義

本開示がより容易に理解され得るように、ある特定の用語が最初に定義される。本出願で使用される場合、本明細書に別途明示的に提供されない限り、以下の用語の各々は、以下に記載される意味を有するものとする。更なる定義は、本出願全体を通して記載されている。

【0367】

本開示は、群の正確に1つの要素が、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、または他の方法でそれと関連する実施形態を含む。本開示は、複数の、または全ての群要素が、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、または他の方法でそれと関連する実施形態を含む。

【0368】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈により別途明確に示されない限り、複数の指示対象を含む。「a」（または「an」）という用語に加えて「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」という用語は、本明細書では交換可能に使用され得る。ある特定の態様では、「a」または「an」という用語は、「単一」を意味する。他の態様では、「a」または「an」という用語は、「2つ以上」または「複数」を含む。

【0369】

さらに、「及び／または」は、本明細書で使用される場合、2つの指定された特徴または構成要素の各々の、他方を伴うか、または伴わない特定の開示とみなされるべきである。したがって、「及び／または」という用語は、本明細書で「A及び／またはB」などの語句で使用される場合、「A及びB」、「AまたはB」、「A」（単独）、ならびに「B」（単独）を含むことを意図する。同様に、「及び／または」という用語は、「A、B、及び／またはC」などの語句で使用される場合、以下の態様の各々を包含することを意図する：A、B、及びC、A、B、またはC、AまたはC、AまたはB、BまたはC、A及びC、A及びB、B及びC、A（単独）、B（単独）、ならびにC（単独）。

【0370】

別段の規定がない限り、本明細書で使用される全ての専門用語及び科学用語は、本開示が関連する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Mol

10

20

30

40

50

ecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press, The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press 及び Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press によって、当業者は、本開示で用いられている多くの用語の一般的な用語説明を得られる。

【0371】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの国際単位系（SI）で認められている形式で表記される。数値範囲は、その範囲を定義する数を含む。値の範囲が列挙されている場合、その範囲の列挙された上限値と下限値の間に介在する各整数値、及びその各分数も、そのような値の間の各部分範囲とともに具体的に開示されていることを理解されたい。任意の範囲の上限値及び下限値は、独立してその範囲に含まれてもよく、またはその範囲から除外されてもよく、限界値のいずれかが含まれる、どちらも含まれない、または両方とも含まれる範囲の各々も、本開示内に包含される。値が明示的に列挙されている場合、列挙された値とほぼ同じ数量または量である値も本開示の範囲内にあることを理解されたい。組み合わせが開示される場合、その組み合わせの要素の部分組み合わせの各々も具体的に開示され、本開示の範囲内にある。逆に、異なる要素または要素群が個別に開示されている場合、それらの組み合わせも開示されている。本開示の任意の要素が複数の代替物を有するものとして開示される場合、各代替物が単独で、または他の代替物との任意の組み合わせで除外される本開示の例も本明細書に開示される。本開示の複数の要素がそのような除外を有することができ、そのような除外を有する要素の全ての組み合わせが本明細書に開示される。

【0372】

「約」という用語は、本明細書及び特許請求の範囲全体を通して数値に関連して使用される場合、他に指定がない限り、例えば、±10%の精度の区間などの、当業者に周知かつ許容される精度の区間を指す。

【0373】

範囲が与えられている場合、端点が含まれる。更に、別途示されない限り、または文脈及び当業者の理解から別途明らかでない限り、範囲として表現される値は、文脈上別途明確に示されない限り、本開示の異なる実施形態における記載された範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、その範囲の下限値の単位の10分の1までと見なすことができる。

【0374】

本明細書で使用される場合、「組み合わせて投与される」または「併用投与」または「併用療法」という用語は、2つ以上の薬剤が、患者に対する各薬剤の効果が重複され得るように、同時にまたはある間隔内で対象に投与されることを意味する。いくつかの実施形態では、それらは互いに約60分、30分、15分、10分、5分、または1分以内に投与される。いくつかの実施形態では、薬剤の投与は、組み合わせ（例えば、相乗）効果が得られるように、互いに十分に近接した間隔で行われる。

【0375】

本明細書で使用される場合、「化合物」という用語は、示されている構造の立体異性体及び同位体のすべてを含むことが意図される。本明細書で使用される場合、「立体異性体」という用語は、化合物の任意の幾何異性体（例えば、シス及びトランス異性体）、エナンチオマー、またはジアステレオマーを意味する。本開示は、立体異性的に純粋な形態（例えば、幾何学的に純粋、エナンチオマー的に純粋、またはジアステレオマー的に純粋な）ならびにエナンチオマー及び立体異性体混合物、例えば、ラセミ体を含む、本明細書に記載される化合物のあらゆる全ての立体異性体を包含する。化合物のエナンチオマー及び立体異性体混合物ならびにそれらを、それらの構成要素であるエナンチオマーまたは立体異性体に分解する手段が周知である。「同位体」とは、同じ原子番号を有するが、核中の中性子の数が異なるため、異なる質量数を有する原子を指す。例えば、水素の同位体は、

トリチウム及び重水素を含む。さらに、本開示の化合物、塩、または複合体は、通常の方法によって、溶媒または水分子と組み合わせて調製して、溶媒和物及び水和物を生成することができる。

【0376】

本明細書で使用される場合、「送達すること」という用語は、実体を目的地に提供することを意味する。例えば、対象へのポリヌクレオチドの送達は、そのポリヌクレオチドを含むナノ粒子組成物を対象に、（例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路または皮下経路によって）投与することを含んでもよい。哺乳動物または哺乳動物細胞へのナノ粒子組成物の投与は、1つ以上の細胞を脂質ナノ粒子組成物と接触させることを含んでもよい。

10

【0377】

本明細書で使用される場合、「送達剤」とは、標的細胞へのポリヌクレオチドの *in vivo* 送達、*in vitro* 送達または *ex vivo* 送達を少なくとも部分的に促進するいずれかの物質を指す。

【0378】

本明細書で使用される場合、薬剤の「有効量」という用語は、有益または所望の結果、例えば、臨床結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、それが適用される状況に依存する。例えば、タンパク質欠損を処置する薬剤を投与する状況において、薬剤の有効量は、例えば、薬剤を投与しない場合に認められる症状の重症度と比較して、タンパク質欠損に関連する徴候及び症状を緩和、低減、除去、または予防するのに十分な前記タンパク質を発現する mRNA の量である。「有効量」という用語は、「有効用量」、「治療有効量」、または「治療有効用量」と交換可能に使用され得る。

20

【0379】

本明細書で使用される場合、「カプセル化効率」とは、ナノ粒子組成物の合成に使用されるポリヌクレオチドの初期総量と比較した、ナノ粒子組成物の一部となるポリヌクレオチドの量を指す。例えば、組成物に最初に提供されるポリヌクレオチドの総量 100 mg のうち、97 mg のポリヌクレオチドがナノ粒子組成物中にカプセル化される場合、カプセル化効率は 97 % とされ得る。本明細書で使用される場合、「カプセル化」は、完全な、実質的な、または部分的な封入、閉込め、包囲、または内包を指し得る。

【0380】

本明細書で使用される場合、核酸配列の「発現」は、以下の事象のうち1つ以上を指す：（1）DNA 配列からの mRNA 鋳型の生成（例えば、転写によって）、（2）mRNA 転写物のプロセッシング（例えば、スプライシング、編集、5' キャップ形成、及び／または 3' 末端プロセッシングによって）、（3）ポリペプチドまたはタンパク質への mRNA の翻訳、ならびに（4）ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾。

30

【0381】

本明細書で使用される場合、「リンカー」は、原子、例えば、10～1,000個の原子の群を指し、原子または基、例えば、限定されないが、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニル、及びイミンなどで構成され得る。リンカーは、第1の末端の核酸塩基部分または糖部分上の修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドと、第2の末端のペイロード、例えば、検出可能な物質または治療剤に結合できる。リンカーは、核酸配列への導入の妨げとならないような十分な長さであることができる。リンカーは、（例えば、2つ以上のキメラポリヌクレオチド分子もしくは I V T ポリヌクレオチドの結合を通じて）ポリヌクレオチド多量体、またはポリヌクレオチドコンジュゲートを形成するため、及び本明細書に記載されているようなペイロードを投与するためなど、いずれかの有用な目的で使用できる。リンカーに組み込むことができる化学基の例としては、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリールまたはヘテロシクリル（それぞれ、本明細書に記載されているように、任意に置換されていることができる）が挙げられるが、これらに限らない。リンカーの例としては、不飽和アルカン、ポリエチレン

40

50

グリコール（例えば、エチレンまたはプロピレングリコールモノマー単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコールもしくはテトラエチレングリコール）及びデキストランポリマー、ならびにこれらの誘導体が挙げられるが、これらに限らない。その他の例としては、例えば、還元剤または光分解を用いて切断できる、リンカー内の切断可能な部分（ジスルフィド結合（ $-S-S-$ ）またはアゾ結合（ $-N=N-$ ）など）が挙げられるが、これらに限らない。選択的に切断可能な結合の非限定的な例としては、例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）、あるいはその他の還元剤及び／または光分解を用いることによって切断できるアミド結合、ならびに、例えば酸性または塩基性の加水分解によって切断できるエステル結合が挙げられる。

10

【0382】

本明細書で使用される場合、「脂質アミン」という用語は、結合した1つ以上のアミン官能基を有する脂質分子を指す。アミン官能基としては、1つ以上の第一級（ NH_2 ）、第二級（ NHR ）、または第三級アミン基（ NR_2 ）を挙げることができ、ここで、Rは、アルキル基、炭素環基、複素環基、またはその置換誘導体などの非水素基を示す。脂質アミンとしては、分子の脂質部分がコレステロールまたは関連部分などのステロイドであるステロールアミンが挙げられる。

【0383】

本明細書で使用される場合、「生理的条件下で切断可能な部分」という語句は、例えば、エステル、アミド、カーボネート、カルバメート、または尿素部分を指す。

20

【0384】

本明細書で使用される場合、「患者」は、治療を望むか、もしくは必要とする、治療を必要としている、治療を受けている、治療を受ける予定の対象（例えばヒト対象）、または特定の疾患もしくは状態について熟練の専門家によるケアを受けている対象を指す。

【0385】

「医薬的に許容される」という語句は、本明細書において、妥当な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わずに、合理的な利益／リスク比に見合ったヒト及び動物の組織との接触に使用するのに好適な化合物、材料、組成物、及び／または剤形を指すために使用される。

【0386】

「医薬的に許容される添加剤」という語句は、本明細書で使用される場合、本明細書に記載される化合物以外の任意の成分（例えば、活性化合物を懸濁または溶解させることができるビヒクル）を指し、患者において実質的に無毒であり、非炎症性である特性を有する。添加剤としては例えば、抗接着剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮補助剤、崩壊剤、色素（着色剤）、軟化剤、乳化剤、賦形剤（希釈剤）、フィルム形成剤またはコーティング剤、香味剤、香料、流動化剤（流動促進剤）、滑沢剤、保存剤、印刷インク、吸収剤、懸濁化剤、分散剤、甘味剤及び水和水を挙げることができる。

30

【0387】

本開示はまた、本明細書に記載の化合物の塩も含む。本明細書で使用される場合、「塩」は、開示される化合物の誘導体を指し、既存の酸または塩基部分をその塩形態に変換することによって（例えば、遊離塩基を好適な有機酸と反応させることによって）親化合物が修飾される。塩の例としては、アミンなどの塩基性残基の鉱酸塩または有機酸塩、カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、塩は、医薬的に許容される塩である。医薬的に許容される塩の一覧は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008、及び Berge et al., Journal of Pharmaceutical Sc

40

50

ience, 66, 1-19 (1977)に見出され、その各々の全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0388】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用される場合、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、その類似体、またはそれらの混合物を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指す。この用語は、一次構造の分子を指す。したがって、本用語は、三本鎖、二本鎖及び一本鎖デオキシリボ核酸（「DNA」）に加えて、三本鎖、二本鎖及び一本鎖リボ核酸（「RNA」）を含む。本用語はまた、ポリヌクレオチドの、例えば、アルキル化による、及び／またはキャッピングによる修飾型、ならびに非修飾型も含む。より具体的には「ポリヌクレオチド」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含有する）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有する）、例えば、スプライシングされているか、またはスプライシングされていないかにかかわらず、tRNA、rRNA、hRNA、siRNA及びmRNAを含むもの、プリン塩基またはピリミジン塩基のN-またはC-グリコシドである任意の他の種類のポリヌクレオチド、ならびに非ヌクレオチド（normucleotidic）骨格を含有する他のポリマー、例えば、ポリアミド（例えば、ペプチド核酸「PNA」）及びポリモルホリノポリマー、ならびにポリマーが、DNA及びRNAに見られるものなどの、塩基対合及び塩基スタッキングを可能にする配置で核酸塩基を含有することを条件とする、他の合成配列特異的核酸ポリマーを含む。特定の態様では、ポリヌクレオチドはmRNAを含む。別の態様では、そのmRNAは、合成mRNAである。いくつかの態様では、その合成mRNAは、非天然の核酸塩基を少なくとも1つ含む。いくつかの態様では、特定の種類の核酸塩基はすべて、非天然の核酸塩基に置き換えられている（例えば、本明細書に開示されているポリヌクレオチドにおけるすべてのウリジンは、非天然の核酸塩基、例えば5-メトキシウリジンに置き換えられていることができる）。いくつかの態様では、ポリヌクレオチド（例えば、合成RNAまたは合成DNA）は、天然核酸塩基、すなわち、合成DNAの場合にはA（アデノシン）、G（グアノシン）、C（シチジン）、及びT（チミジン）のみ、または合成RNAの場合にはA、C、G、及びU（ウリジン）のみを含む。

10

20

【0389】

当業者は、本明細書に開示されるコドンマップ中のT塩基が、DNA中に存在するのに対して、対応するRNA中ではT塩基はU塩基で置き換えられると理解することになる。例えば、ベクターまたはin-vitro翻訳（IVT）鑄型などのDNA形態で本明細書に開示されるコドン-ヌクレオチド配列は、その対応する転写mRNAに基づいてUとして転写されるT塩基を有する。この点に関して、コドン最適化DNA配列（Tを含む）及びそれらの対応するmRNA配列（Uを含む）の両方が、本開示のコドン最適化ヌクレオチド配列と見なされる。当業者はまた、1つ以上の塩基を非天然塩基で置き換えることによって同等のコドンマップを作成することができることを理解するであろう。したがって、例えば、TTCコドン（DNAマップ）はUUCコドン（RNAマップ）に対応し、それによりΨΨCコドン（Uがシュードウリジンで置き換えられているRNAマップ）に対応することになる。

30

40

【0390】

標準的なA-T及びG-C塩基対は、チミジンのN3-H及びC4-オキシとアデノシンのそれぞれN1及びC6-NH2との間、及びシチジンのC2-オキシ、N3及びC4-NH2とグアノシンのそれぞれC2-NH2、N'-H及びC6-オキシとの間で水素結合の形成を可能にする条件下で形成される。したがって、例えば、グアノシン（2-アミノ-6-オキシ-9-β-D-リボフラノシル-プリン）は、イソグアノシン（2-オキシ-6-アミノ-9-β-D-リボフラノシル-プリン）を形成するように修飾され得る。そのような修飾によって、ヌクレオシド塩基はシトシンと標準的な塩基対を効果的に形成しないことになる。しかしながら、シトシン（1-β-D-リボフラノシル-2-オキシ-4-アミノ-ピリミジン）の修飾によるイソシトシン（1-β-D-リボフラノシ

50

ル-2-アミノ-4-オキシーピリミジン)の形成は、グアノシンとは効果的に塩基対合しないが、イソグアノシンとは塩基対を形成することになる修飾ヌクレオチドをもたらす(Collins et al. の米国特許第5,681,702号)。イソシトシンは、Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) から入手可能であり、イソシチジンは、Switzer et al. (1993) Biochemistry 32:10489-10496 及び当該文献で引用された参考文献によって記載される方法によって調製され得、2'-デオキシ-5-メチル-イソシチジンは、Tor et al., 1993, J. Am. Chem. Soc. 115:4461-4467 及び当該文献で引用された参考文献の方法によって調製され得、イソグアニンヌクレオチドは、Switzer et al., 1993 (上記) 及び Mantsch et al., 1993, Biochem. 14:5593-5601 によって記載される方法を使用して、または Collins et al. の米国特許第5,780,610号に記載される方法によって調製され得る。他の非天然塩基対は、2,6-ジアミノピリミジン及びその相補体(1-メチルピラゾロ-[4,3]ピリミジン-5,7-(4H,6H)-ジオン)の合成について、Piccirilli et al., 1990, Nature 343:33-37に記載される方法によって合成され得る。特有の塩基対を形成する他のそのような修飾ヌクレオチド単位が既知であり、例えば、Leach et al. (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:3675-3683 及び Switzer et al. (上記)に記載されるものなどである。

10

20

30

40

50

【0391】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書では、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために互換的に使用される。ポリマーは、修飾アミノ酸を含んでもよい。この用語には、天然において、または介入によって、例えば、ジスルフィド結合の形成、糖鎖付加、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションのようないずれかの他の操作もしくは修飾によって修飾されたアミノ酸ポリマーも含まれる。この定義内には、例えば、アミノ酸の類似体(例えば、ホモシステイン、オルニチン、p-アセチルフェニルアラニン、D-アミノ酸及びクレアチンなどの非天然のアミノ酸を含む)、ならびに当該技術分野で既知の他の修飾を1つ以上含むポリペプチドも含まれる。

【0392】

本用語は、本明細書で使用される場合、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを指す。ポリペプチドとしては、コードされたポリヌクレオチド産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片及び他の等価物、バリエーション、ならびに前述の類似体が挙げられる。ポリペプチドは、単量体であってもよく、または二量体、三量体もしくは四量体などの多分子の複合体であってもよい。ポリペプチドはまた、1本鎖または多鎖のポリペプチドを含む場合もある。ジスルフィド結合が、最も一般的に多鎖ポリペプチドに見られる。ポリペプチドという用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用できる。いくつかの実施形態では、「ペプチド」は、50アミノ酸長以下、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸長であり得る。

【0393】

本明細書で使用される場合、「予防する」という用語は、感染症、疾患、障害、及び/または状態の発症を部分的にまたは完全に遅延させること；特定の感染症、疾患、障害、及び/または状態の1つ以上の徴候及び症状、特質、または臨床症候の発症を部分的にまたは完全に遅延させること；特定の感染症、疾患、障害、及び/または状態の1つ以上の徴候及び症状、特質、または症候の発症を部分的にまたは完全に遅延させること；感染症、特定の疾患、障害、及び/または状態からの進行を部分的にまたは完全に遅延させること；及び/または感染症、疾患、障害、及び/または状態に関連する病態が発生するリスクを低減することを指す。

【0394】

本明細書で使用される場合、「予防的」は、疾患の発症、進行、または広がりを予防するために使用される治療薬または一連の行為を指す。

【0395】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」とは、診断、予後、または治療が望まれる任意の対象、特に哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象としては、ヒト、飼育動物、家畜、動物園の動物、スポーツ用の動物、ペットの動物（イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ（cattle）、ウシ（cow）など）、霊長類動物（猿人、サル、オランウータン及びチンパンジーなど）、イヌ科動物（イヌ及びオオカミなど）、ネコ科動物（ネコ、ライオン及びトラなど）、ウマ科動物（ウマ、ロバ及びシマウマなど）、クマ、食用動物（ウシ、ブタ及びヒツジなど）、有蹄類動物（シカ及びキリンなど）、齧歯類動物（マウス、ラット、ハムスター及びモルモットなど）などが挙げられるが、これらに限らない。ある特定の実施形態では、哺乳動物は、ヒト対象である。別の実施形態では、対象は、ヒト患者である。特定の実施形態では、対象は、治療を必要とするヒト患者である。

10

【0396】

本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、対象となる特徴または特性の全てのまたはほぼ全ての範囲または程度を示す定性的状態を指す。生物学的及び化学的な特徴は、完全な状態になったり、及び／または進行して完全な状態になったり、あるいは絶対的な結果を達成したりまたは回避したりすることは、あったとしても稀であることを、生物学分野の当業者は理解するであろう。したがって、「実質的に」という用語は、多くの生物学的及び化学的特徴に内在する潜在的な完全性の欠如を取り込むために本明細書で使用される。

20

【0397】

「治療剤」という用語は、対象に投与されるとき、治療、診断、及び／または予防効果を有し、及び／または所望の生物学的及び／または薬理学的効果を誘発する薬剤を指す。例えば、いくつかの実施形態では、ポリペプチドをコードするmRNAは、治療剤であり得る。

【0398】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、感染症、疾患、障害、及び／または状態に罹患しているか、または罹患しやすい対象に投与されたときに、その感染症、疾患、障害、及び／または状態の徴候及び症状を処置する、改善する、それらの発症を診断する、予防する、及び／または遅延させるのに十分である、送達される薬剤（例えば、核酸、薬物、治療剤、診断用薬剤、予防剤など）の量を意味する。

30

【0399】

本明細書で使用される場合、「治療すること」または「治療」または「療法」という用語は、疾患、例えば、嚢胞性線維症の1つ以上の徴候及び症状または特徴の部分的または完全な軽減、回復、改善、緩和、その発症の遅延、その進行の阻害、その重症度の低下、及び／または発症率の低下を指す。例えば、嚢胞性線維症を「治療する」とは、疾患に関連する徴候及び症状を減らすこと、患者の寿命を延長させる（生存率を増加させる）こと、疾患の重症度を低下させること、疾患の発症を予防するまたは遅延させることなどを指すことがある。治療は、疾患、障害、及び／または状態に関連する病態を発症するリスクを低減する目的で、疾患、障害、及び／または状態の徴候を呈さない対象に、及び／または疾患、障害、及び／または状態の初期徴候のみを呈する対象に施すことができる。

40

【0400】

本明細書で使用される場合、「アルキル」または「アルキル基」という用語は、1つ以上の炭素原子（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の炭素原子）を含む直鎖状または分枝状の飽和炭化水素を意味する。

【0401】

50

本明細書で使用される場合、「アルキレン」という用語は、連結アルキル基を指す。

【0402】

本明細書で使用される場合、「アルケニル」または「アルケニル基」という用語は、2つ以上の炭素原子（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の炭素原子）と少なくとも1つの二重結合とを含む直鎖状または分枝状の炭化水素を意味する。

【0403】

本明細書で使用される場合、「アルキニル」または「アルキニル基」という用語は、2つ以上の炭素原子（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の炭素原子）と少なくとも1つの三重結合とを含む直鎖状または分枝状の炭化水素を意味する。

10

【0404】

本明細書で使用される場合、「炭素環」、「カルボシクリル」及び「炭素環基」という用語は置き換え可能であり、炭素原子の環を1つ以上含む単環系または多環系を指す。環は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15員環であり得る。炭素環は芳香族または非芳香族であってもよく、あるいは炭素環は芳香族環及び非芳香族環の両方を含んでもよく、この場合、環は多環式である。

【0405】

本明細書で使用される場合、「シクロアルキル」という用語は、非芳香族炭素環を指し、炭素環のサブセットを表す。例となるシクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、及びシクロヘプチルが挙げられる。

20

【0406】

本明細書で使用される場合、「カルボシクリレン」という用語は、連結カルボシクリル基を指す。

【0407】

「C₃~6炭素環」という表記は、3~6つの炭素原子を有する単環を含む炭素環を意味する。炭素環は、1つ以上の二重結合を含むことができ、芳香族（例えば、アリール基）であり得る。炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、フェニル、ナフチル、及び1,2-ジヒドロナフチル基が挙げられる。炭素環は、任意選択的に置換されていてもよい。

30

【0408】

本明細書中で使用される場合、「カルボシクリルアルキル」という用語は、カルボシクリル基により置換されたアルキル基を指す。例となるカルボシクリルアルキル基は、ベンジルである。

【0409】

本明細書で使用される場合、「複素環」、「ヘテロシクリル」または「複素環基」という用語は、1つ以上の環を含み、少なくとも1つの環が少なくとも1つのヘテロ原子を含む、単環系または多環系を意味する。ヘテロ原子は、例えば、窒素、酸素、または硫黄原子であり得る。環は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12員環であり得る。複素環は、1つ以上の二重結合を含むことができ、芳香族（例えば、ヘテロアリール基）であり得る。複素環の例としては、イミダゾリル、イミダゾリジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、チアゾリル、チアゾリジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリル、イソオキサゾリジニル、イソオキサゾリル、イソチアゾリジニル、イソチアゾリル、モルホリニル、ピロリル、ピロリジニル、フリル、テトラヒドロフリル、チオフェニル、ピリジニル、ピペリジニル、キノリル、及びイソキノリル基が挙げられる。複素環は、任意選択的に置換されていてもよい。

40

【0410】

本明細書で使用される場合、「ヘテロシクロアルキル」という用語は、非芳香族複素環を指し、複素環のサブセットを表す。例となるヘテロシクロアルキル基としては、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニルなどが挙げられる。

50

【0411】

本明細書で使用される場合、「ヘテロシクリレン」という用語は、連結ヘテロシクリル基を指す。

【0412】

本明細書で使用される場合、「アリール基」は、1つ以上の炭素環式芳香族環を含む炭素環基である。アリール基の例としては、フェニル基及びナフチル基が挙げられる。

【0413】

本明細書で使用される場合、「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、ヘテロシクリル基により置換されたアルキル基を指す。

【0414】

本明細書で使用される場合、「アリーレン」という用語は、連結アリール基を指す。

【0415】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール基」は、1つ以上の複素環式芳香族環を含む複素環基である。ヘテロアリール基の例としては、ピロリル、フリル、チオフェニル、イミダゾリル、オキサゾリル及びチアゾリルが挙げられる。アリール基とヘテロアリール基の両方が任意選択的に置換されていてもよい。

【0416】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリーレン」という用語は、連結ヘテロアリール基を指す。

【0417】

本明細書で使用される場合、「酸素保護基」という用語は、特定の条件（例えば、酸性または塩基性条件）下で選択的に除去され得るオキソ置換基を指す。例となる酸素保護基としては、任意選択的に置換されるアルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、カルボシクリルアルキル、及びヘテロシクリルアルキル基を挙げることができる。

【0418】

本明細書で使用される場合、「窒素保護基」という用語は、特定の条件（例えば、酸性または塩基性条件）下で選択的に除去され得る窒素置換基（例えば、アミノ置換基）を指す。いくつかの実施形態では、窒素保護基は、9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）またはtert-ブチルオキシカルボニル（Boc）である。

【0419】

アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクリル（例えば、カルボシクリル及びヘテロシクリル）基は、別途明記されない限り、任意選択的に置換されていてもよい。任意選択的な置換基は、ハロゲン原子（例えば、塩化物、臭化物、フッ化物、またはヨウ化物基）、カルボン酸（例えば、 $C(O)OH$ ）、アルコール（例えば、ヒドロキシル、 OH ）、エステル（例えば、 $C(O)OR$ または $OC(O)R$ ）、アルデヒド（例えば、 $C(O)H$ ）、カルボニル（例えば、 $C(O)R$ 、あるいは $C=O$ によって表される）、ハロゲン化アシル（例えば、 $C(O)X$ （ X は、臭化物、フッ化物、塩化物、及びヨウ化物から選択されるハロゲン化物である））、カーボネート（例えば、 $OC(O)OR$ ）、アルコキシ（例えば、 OR ）、アセタール（例えば、 $C(OR)_2R$ ）（各 OR は、同じであってもまたは異なってもよいアルコキシ基であり、 R は、アルキルまたはアルケニル基である）、ホスフェート（例えば、 $P(O)_4^3$ ）、チオール（例えば、 SH ）、スルホキシド（例えば、 $S(O)R$ ）、スルフィン酸（例えば、 $S(O)OH$ ）、スルホン酸（例えば、 $S(O)_2OH$ ）、チアール（例えば、 $C(S)H$ ）、サルフェート（例えば、 $S(O)_4^2$ ）、スルホニル（例えば、 $S(O)_2$ ）、アミド（例えば、 $C(O)NR_2$ 、または $N(R)C(O)R$ ）、アジド（例えば、 N_3 ）、ニトロ（例えば、 NO_2 ）、シアノ（例えば、 CN ）、イソシアノ（例えば、 NC ）、アシルオキシ（例えば、 $OC(O)R$ ）、アミノ（例えば、 NR_2 、 NRH 、または NH_2 ）、カルバモイル（例えば、 $OC(O)NR_2$ 、 $OC(O)NRH$ 、または $OC(O)NH_2$ ）、スルホンアミド（例えば、 $S(O)_2NR_2$ 、 $S(O)_2NRH$ 、 $S(O)_2NH_2$ 、 $N(R)S(O)_2R$ 、 $N(H)S(O)_2R$ 、 $N(R)S(O)_2H$ 、または $N(H)S(O)_2H$ ）、

10

20

30

40

50

アルキル基、アルケニル基、ならびにシクリル（例えば、カルボシクリルまたはヘテロシクリル）基からなる群から選択され得るが、これらに限定されない。本明細書で定義される場合、Rは、アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基である。

【0420】

当業者であれば、通例の実験を使用するだけで、本明細書に記載される本開示による具体的な実施形態に対する多くの等価物を認識するか、またはそれを確認することができるであろう。本開示の範囲は、前述の説明に限定されることを意図するものではなく、添付の特許請求の範囲に記載されるものである。

【0421】

範囲が与えられている場合、端点が含まれる。更に、別途示されない限り、または文脈及び当業者の理解から別途明らかでない限り、範囲として表現される値は、文脈上別途明確に示されない限り、本開示の異なる実施形態における記載された範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、その範囲の下限値の単位の10分の1までと見なすことができることを理解されたい。

【0422】

加えて、先行技術内の本開示の任意の特定の実施形態が、請求項のうちのいずれか1つ以上から明示的に除外され得ることを理解されたい。そのような実施形態は、当業者に公知であると思なされるので、本明細書にその除外が明示的に記載されていない場合であっても除外され得る。本開示の組成物のいずれかの特定の実施形態（例えば、任意の核酸またはそれによりコードされるタンパク質、任意の生成方法、任意の使用方法など）は、先行技術の存在に関連するか否かにかかわらず、あらゆる理由により、任意の1つ以上の請求項から除外され得る。

【0423】

明確にするために別個の実施形態の文脈において説明されるある特徴を、単一の実施形態において組み合わせで提供することもできることがさらに理解される。逆に、簡潔にするために、単一の実施形態の文脈において説明される様々な特徴を、別々に、または任意の好適な部分組み合わせで提供することもできる。

【0424】

全ての引用した出典、例えば、参考文献、刊行物、データベース、データベースエントリー、及び本明細書で引用される技術は、引用において明示的に記載されていなくとも、参照によって本出願に組み込まれる。引用した出典と本出願との記載が矛盾する場合は、本出願の記載が優先することとする。

【0425】

セクション及び表の見出しは、限定するようには意図されていない。

【実施例】

【0426】

実施例 1

空の脂質ナノ粒子の生成

空の脂質ナノ粒子を図1で概説されるプロセスに従って調製した。脂質（イオン化脂質：DSPC：コレステロール：DMG-PEG2000脂質）をエタノールに24mg/mLの総濃度で溶解させ、酸性化緩衝液（pH4の45mM酢酸緩衝液）と混合した。脂質溶液及び酸性化緩衝液をマルチインレットボルトエクスキサーを使用してミキサー1及びミキサー2に関しては3：7の脂質：緩衝液の体積比で、ミキサー3に関しては1：3の脂質：緩衝液（25%エタノール）の体積比で混合した。5秒の滞留時間後に、得られたeLNPsを、pH5.6の55mM酢酸ナトリウムと5：7のeLNPs：緩衝液の体積比で混合した。次いで、得られた希釈eLNPsの緩衝液を交換し、タンジェンシャルフローろ過（TFF）を使用してpH5.0の5mM酢酸ナトリウムを含む最終緩衝液に濃縮した。次いで、pH5の5mM酢酸緩衝液中の70%スクロース溶液を続いて添加した。

【0427】

実施例 2

粒度の比較

脂質（イオン化脂質：DSPC：コレステロール：DMG-PEG2000脂質）をエタノールに24mg/mL（合計で40mM）の濃度で溶解させ、酸性化緩衝液（サンプル番号1に関してはpH4の37.5mM酢酸緩衝液、及びサンプル番号2に関してはpH5の37.5mM酢酸緩衝液）と混合した。

【0428】

脂質溶液を2.5mL/分で供給し、酸性化水性緩衝液流を7.5mL/分で供給した。これらの2つの流れは、内径0.5mmの混合T字管を使用して混合した。ナノ沈殿後の脂質濃度は、6mg/mLであった。各サンプルに対して600mLのLNP溶液を生成した。

10

【0429】

サンプル番号1に関しては30kDa mPESフィルターを使用し、サンプル番号2に関しては100kDa mPESフィルターを使用した。5倍体積の限外ろ過（UF1）を最初に行い、続いて30kDaフィルターに対して5倍体積のダイアフィルトレーション（DF）または100kDaフィルターに対して8倍体積のダイアフィルトレーション（DF）を行った。最後のステップは、さらに8倍の限外ろ過（UF2）である。

【0430】

各サンプルに関する最終脂質濃度及び算出収率については、表2-Aを参照のこと。

【0431】

TFFの後、（サンプル1に関しては）pH4または（サンプル2に関しては）pH5の37.5mM酢酸緩衝液中の70%スクロース溶液を添加して、74.5mg/mLのLNP及び200mg/mLのスクロースの最終生成物を生成した。

20

【表1】

表2-A

名称	回収量(g)	脂質量(mg/mL)	収率
30kDa pH4	10.66	142.87	42.3%
100kDa pH5	15.4	160.81	68.8%

30

【0432】

上記のとおりpH4及びpH5で調製した空の脂質ナノ粒子の平均直径を動的光散乱（DLS）により測定した。直径をナノメートル（nm）単位で示し、表2-Bに示す。データからわかるとおり、pH4でのナノ沈殿は、pH5と比較して小さなサイズの粒子をもたらす。

40

50

【表 2】

表 2－B

		TFF					
処理	TFF 前	UF1	DF	UF2	一晚	スクロース 添加後	清澄化後
ナノ沈殿、 pH 4	13.2	13.0	21.2	19.3	21.7	21.6	20.0
ナノ沈殿、 pH 5 (比較)	88.8	108.7	98.1	96.5	95.9	101.3	101.5

10

【0433】

実施例 3

20

空の脂質ナノ粒子の特徴づけ

実施例 2 のプロセスに従うが、以下に示した変更を行って調製した空の脂質ナノ粒子の平均サイズを測定した。

【0434】

空の脂質ナノ粒子の平均サイズをさまざまな pH 値及びさまざまな緩衝液濃度で比較した。平均粒径を動的光散乱 (DLS) により測定した。結果を図 2 に示し、これは、低 pH 及び高緩衝液濃度が小さなサイズの粒子の形成に有利であることを示している。

【0435】

空の脂質ナノ粒子の平均サイズをさまざまな緩衝強度及びさまざまな脂質溶液濃度で比較した。平均粒径を DLS により測定した。結果を図 3 に示し、これは、高緩衝液濃度が小さなサイズの粒子の形成に有利であることを示している。

30

【0436】

空の脂質ナノ粒子の平均サイズを、さまざまな緩衝強度 (20 mM、37.5 mM、75 mM、及び 120 mM) で 25 時間にわたり比較した。平均粒径を DLS により測定した。結果を図 4 に示し、これは、25 時間にわたり小さなままである小さなサイズの粒子の形成に高緩衝液濃度が有利であることを示している。

【0437】

空の脂質ナノ粒子の平均サイズを、さまざまな pH で 25 時間にわたり比較した。平均粒径を DLS により測定した。結果を図 5 に示し、これは、25 時間にわたり小さなままである小さなサイズの粒子の形成に低 pH が有利であることを示している。

40

【0438】

実施例 2 のプロセスに従って調製した空の脂質ナノ粒子のゼータ電位を、Wyatt Technologies Mobius Zeta Potential 装置で測定した。この装置は、「超並列位相解析光散乱」または MP-PALS の原理によって移動度及びゼータ電位を特徴付ける。この測定は、1 つの検出角度のみを使用し、かつ操作により高い電圧を必要とする ISO 法 13099-1:2012 よりも感度が高く、誘導される応力が低い。結果を図 6 に示し、これは、低 pH で高いゼータ電位を示し、これは緩衝液濃度及び脂質溶液濃度とはほとんど無関係である。

【0439】

空の脂質ナノ粒子の組成物をクライオ EM によって評価し、結果を図 7 に示す。pH 4

50

で沈殿した LNP は、pH 5 で調製したものと比較して、小さなサイズで均一の組成物を示している。

【0440】

実施例 4

充填脂質ナノ粒子の調製

実施例 1、図 1 に従って調製した空の脂質ナノ粒子に、図 8 に示したプロセスに従って核酸 (mRNA) を充填した。mRNA の充填は、事後充填 (PHL) プロセスを使用して行った。5 mM 酢酸塩 (pH 5) 及び 75 g/L のスクロース中の 11.72 mg/mL の脂質濃度の eLNP を pH 5.0 の 42.5 mM 酢酸ナトリウム中の 1.0 mg/mL の濃度の mRNA と混合した。eLNP 溶液及び mRNA を、マルチインレットボルテックスミキサーミキサーを使用して、eLNP : mRNA 体積比 3 : 2 で混合した。eLNP に mRNA を充填したら、60 秒の滞留時間の経過後、これらを 120 mM TRIS (pH 8.12) を含有する中和緩衝液と、ナノ粒子 : 緩衝液体積比 5 : 1 でインライン混合した。この添加ステップの後、ナノ粒子製剤を、20 mM TRIS (pH 7.5)、1.42 mg/mL DMG-PEG 2000、及び 2.5 mg/mL GL-67 (ステロールアミン) を含有する緩衝液と、ナノ粒子 : 緩衝液体積比 6 : 1 でインライン混合した。得られたナノ粒子懸濁液を、タンジェンシャルフローろ過 (TFF) を使用して濃縮し、300 nM NaCl 溶液を含む泳動緩衝液 (20 mM TRIS、14.3 mM 酢酸ナトリウム、及び 32 g/L スクロース、pH 7.5) において希釈して 70 mM NaCl を含有する最終緩衝液マトリックスにした。得られたナノ粒子懸濁液を、0.8 / 0.2 µm カプセルフィルタに通してろ過し、約 1 mg/mL (例えば、0.5 ~ 2 mg/mL) の mRNA 濃度でガラスバイアルに充填した。

10

20

【0441】

実施例 5

充填脂質ナノ粒子の特徴づけ

充填脂質ナノ粒子組成物を実施例 4 に記載のプロセスに従ってさまざまな mRNA ストック濃度で調製した。プロセスの詳細については、下記表 5-A を参照のこと。

【表 3】

表 5-A

30

ロット	1	2	3
eLNP ストック濃度	2.9mg/ml	7.3mg/ml	11.7mg/ml
mRNA ストック濃度	0.25mg/ml	0.62mg/ml	1.0mg/ml
PI 緩衝液－ PEG-DMG 濃度	0.363mg/ml	0.91mg/ml	1.4mg/ml
PI 緩衝液－ GL-67 濃度	0.625mg/ml	1.6mg/ml	2.5mg/ml
スループット	1×	2.5×	4×

40

【0442】

得られた平均粒径 (DLS により測定) 及び多分散性 (PDI) 値を図 9 で比較する。

50

値は、キュムラント解析を使用して算出した。MPカラムの直径は、PI緩衝液ステップ後に測定した。平均粒径は、全体をとおして一貫して75から85 nmの間であった。カプセル化効率は、>98%であった。充填するmRNA濃度は、粒度にほとんど影響がなかった。

【0443】

実施例6

空の脂質ナノ粒子の代替的な生成

空の脂質ナノ粒子を図11で概説されるプロセスに従って調製した。脂質（イオン化脂質：DSPC：コレステロール：DMG-PEG2000脂質）をエタノールに24 mg/mLの濃度で溶解させ、酸性化緩衝液（pH4の37.5 mM酢酸緩衝液）と混合した。5秒間の滞留時間後、得られたeLNPを、pH4の37.5 mM酢酸ナトリウムと、eLNP：緩衝液体積比5：7で混合した。次いで、得られた希釈eLNPの緩衝液を交換し、タンジェンシャルフロー過（TFF）を使用してpH4の37.5 mM酢酸ナトリウムを含む最終緩衝液に濃縮した。次いで、pH4の37.5 mM酢酸緩衝液中の70%スクロース溶液を続いて添加した。

【0444】

実施例7

充填脂質ナノ粒子の代替的な調製

実施例6、図11に従って調製した空の脂質ナノ粒子に、図12に示したプロセスに従って核酸（mRNA）を充填した。mRNAの充填は、事後充填（PHL）プロセスを使用して行った。pH5の32.5 mM酢酸塩中のmRNAを透析を使用して水に添加した。濃度は、NaOH消化を使用して測定した。緩衝液を使用して、pH4、4.5、5、5.5または6の37.5 mM酢酸緩衝液に関する酢酸及び酢酸ナトリウムの濃度を調べた。この追加で濃縮した緩衝液を使用して、水（追加の水を含む）でmRNAを希釈して、それぞれのpHの37.5 mM緩衝液中の1.6 mg/mLのmRNAにした。pH4、4.5、5、5.5、または6の37.5 mM酢酸塩及び20%スクロース中の37.25 mg/mLの脂質濃度のeLNP溶液を、eLNP溶液と同じpHの37.5 mM酢酸ナトリウム中の1.6 mg/mLの濃度のmRNAと混合した。eLNP溶液及びmRNAを、マルチインレットボルテックスミキサーを使用して、eLNP：mRNA体積比1：2.5で混合した。eLNPにmRNAを充填したら、60秒の滞留時間の経過後、これらをTRIS緩衝液及び32.3%スクロースを含有する中和緩衝液とインライン混合した。この添加ステップの後、ナノ粒子製剤を、20 mM TRIS（pH7.5）、4.5 mg/mL DMG-PEG2000を含有する緩衝液とインライン混合した。

【0445】

実施例8

充填脂質ナノ粒子の特徴づけ—粒度

表8-Aは、実施例7、図12に従って調製した充填脂質ナノ粒子のカプセル化効率を示す。図13は、混合前に測定した空の脂質ナノ粒子及びmRNA溶液の異なる充填pHでの充填脂質ナノ粒子のnm単位の平均直径を示す。Pre-neutraまたはPre-neuナノ粒子は、中和緩衝液に供されていないナノ粒子である。Post-neutraまたはPost-neuナノ粒子は、中和緩衝液に供されたナノ粒子である。

【表4】

表8-A

	pH4、 N/P2.6	pH4.5、 N/P2.6	pH5、 N/P2.6	pH5、 N/P5.2	pH5.5、 N/P2.6	pH6、 N/P2.6
カプセル化効率	65%	92%	88%	94%	84%	84%

10

20

30

40

50

【 0 4 4 6 】

表 8－B は、実施例 6 及び 7 に概説した手順に類似しているが、酸性化緩衝液の pH が 5 である手順を使用して調製した充填脂質ナノ粒子のカプセル化効率の比較を示す。図 1 4 は、混合前に測定した空の脂質ナノ粒子及び m R N A 溶液の異なる充填 pH での充填脂質ナノ粒子の nm 単位の平均直径を示す。

【表 5】

表 8－B

	pH4、 N/P2.6	pH4.5、 N/P2.6	pH5、 N/P2.6	pH5、 N/P5.2	pH5.5、 N/P2.6	pH6、 N/P2.6
カプセル化効率	39.5%	73.5%	37.8%	79.7%	16.9%	15.6%

【 0 4 4 7 】

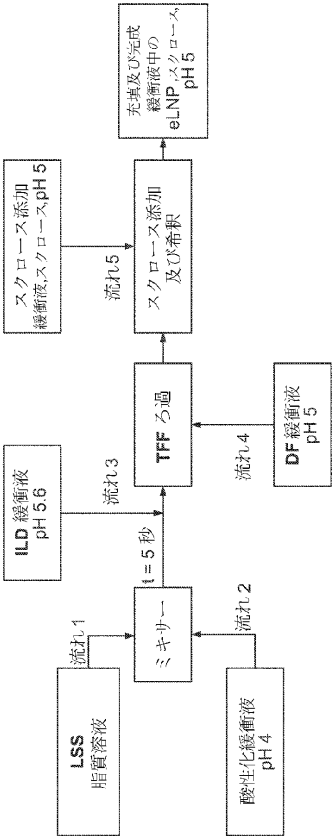
N 対 P は、ナノ粒子中の窒素対リンの比率である。

【 0 4 4 8 】

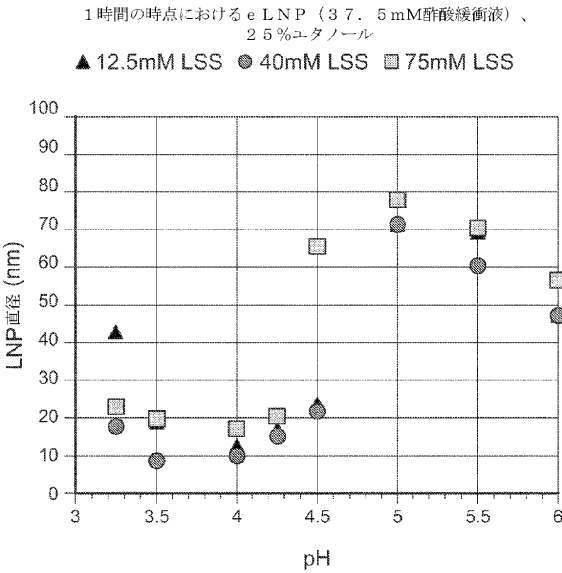
本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、それら全体が参照によって組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

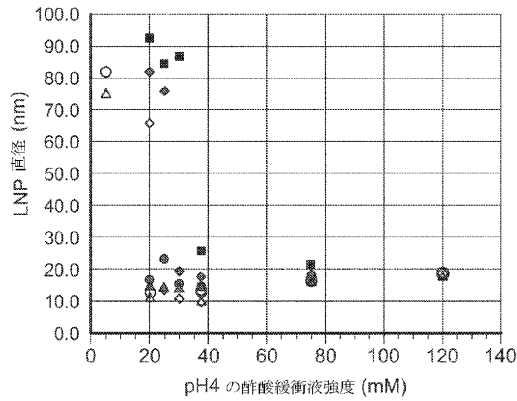
40

50

【図 3】

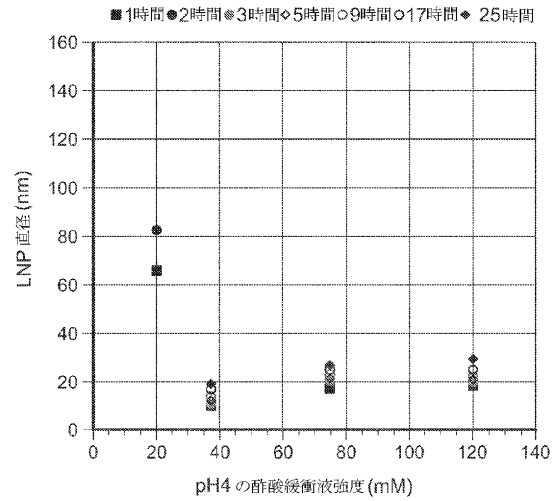
1時間の時点における pH 4 の酢酸緩衝液、e LNP、2.5% エタノールを伴う

● 2.5mM LSS ▲ 5mM LSS ○ 12.5mM LSS △ 25mM LSS
◇ 40mM LSS ◆ 75mM LSS ■ 100 mM LSS



【図 4】

pH 4 緩衝液, 40mM LSS

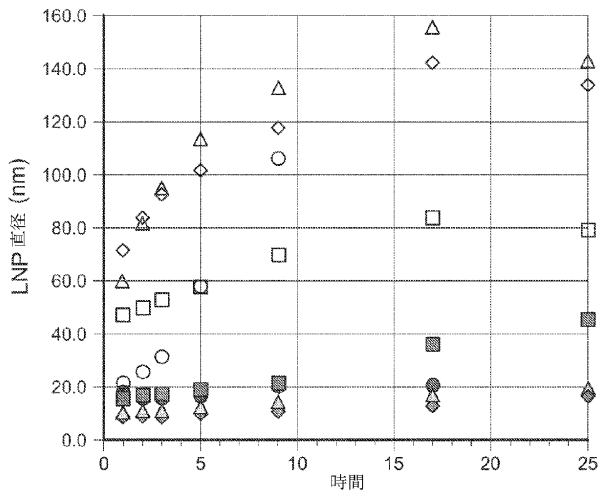


10

【図 5】

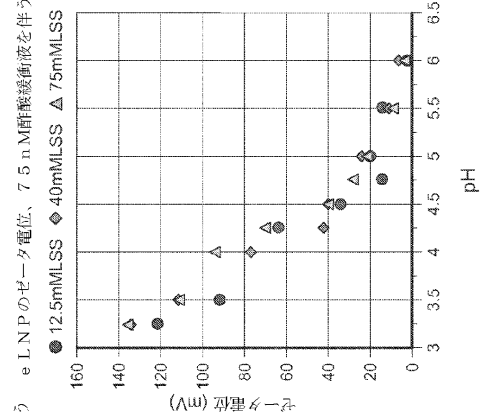
4.0 mM LSS、3.7. 5 nM 酢酸塩 e LNP、2.5% エタノールを伴う成熟

● pH3.25 ◆ pH3.5 ▲ pH4 ■ pH4.25 ○ pH4.5 ◇ pH5 △ pH5.5 □ pH6

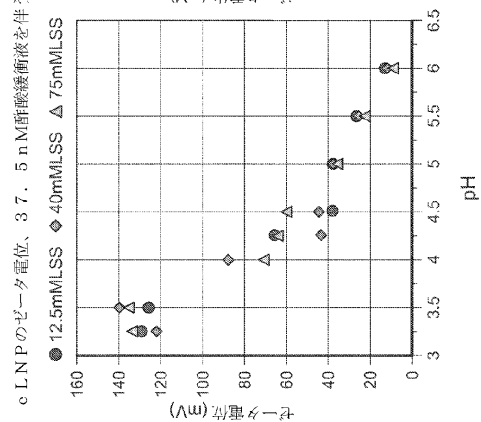


【図 6】

e LNP のゼータ電位、7.5 nM 酢酸緩衝液を伴う



e LNP のゼータ電位、3.7. 5 nM 酢酸緩衝液を伴う



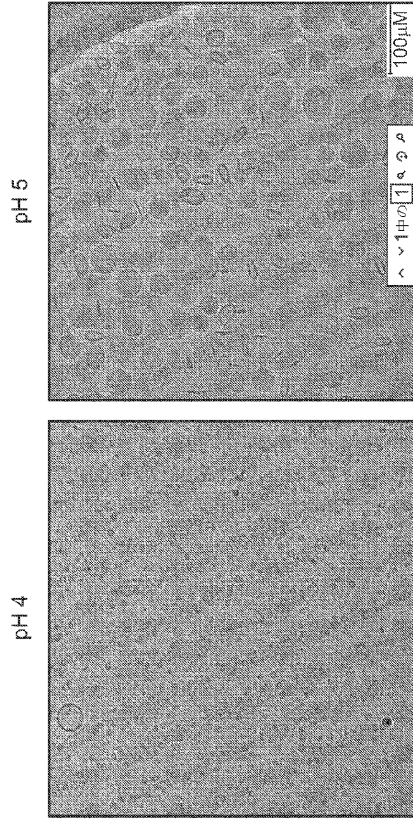
20

30

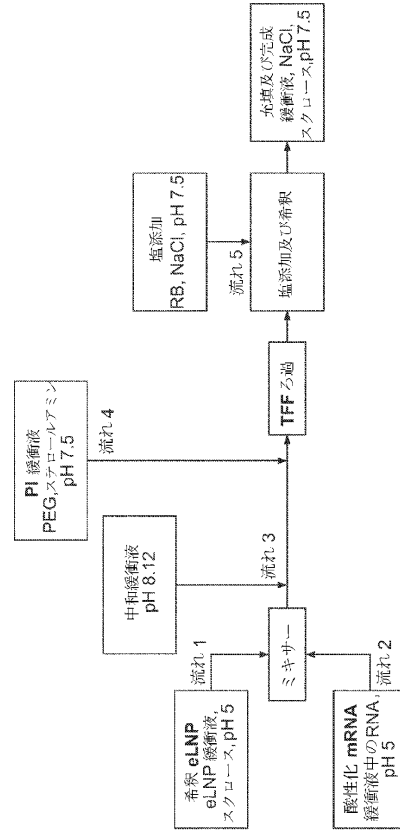
40

50

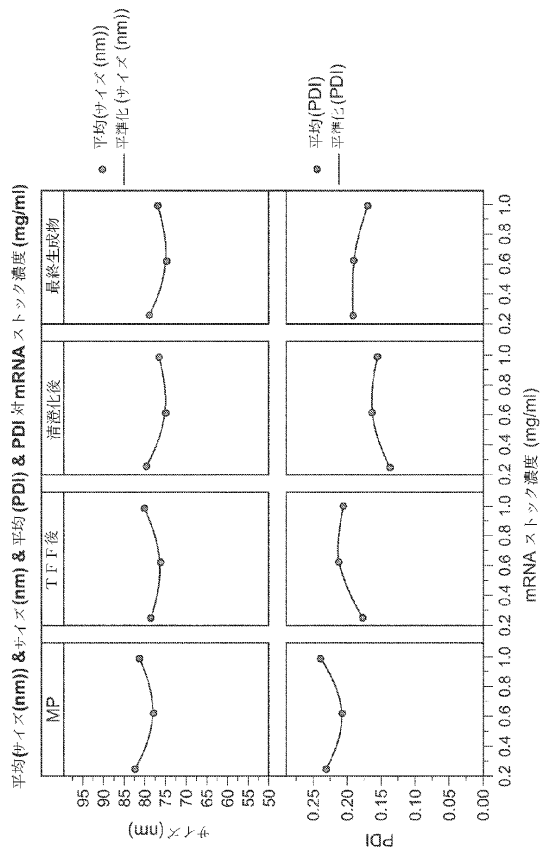
【図 7】



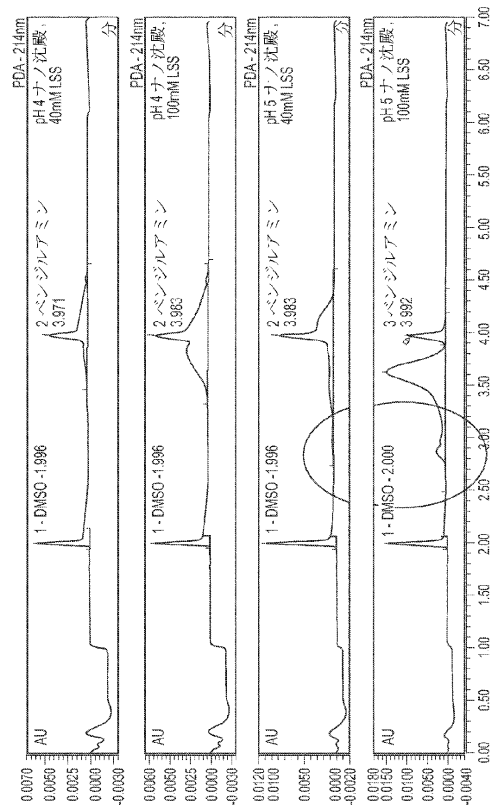
【図 8】



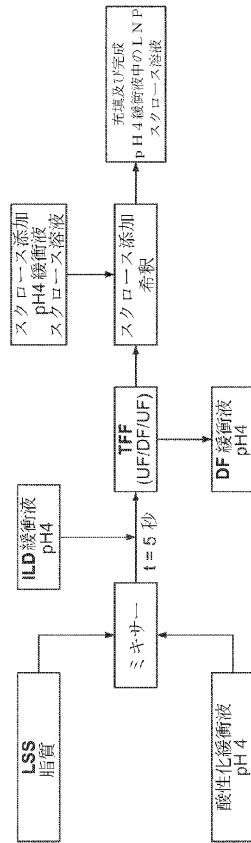
【図 9】



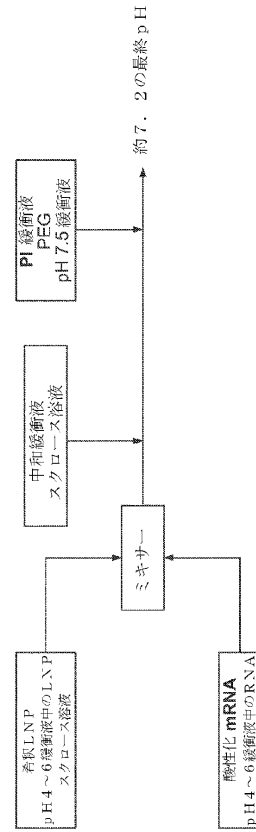
【図 10】



【図 1 1】



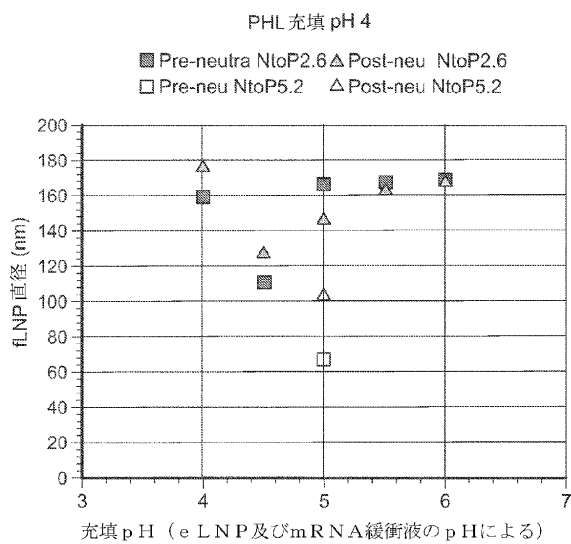
【図 1 2】



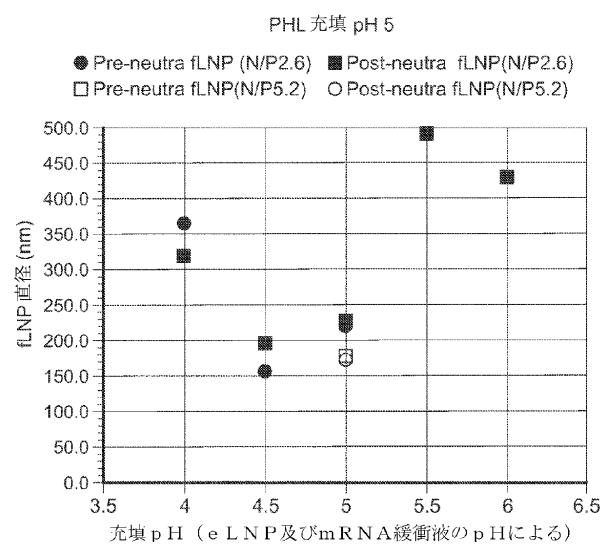
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】



30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/038151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. **A61K9/51 A61K9/00 C12N15/00**
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/031232 A1 (MODERNATX INC [US]) 23 February 2017 (2017-02-23)	1, 2, 5, 11, 12, 20, 55, 57, 60, 63-69
Y	page 2, lines 12-31 page 4, lines 25-31 page 5, lines 11-26 page 10, lines 14-25 page 20, line 6 - page 22, line 23 page 26, line 17 - page 29, line 5 page 30, lines 22-27 page 34, line 18 - page 35, line 3 page 40, lines 10-17 page 41 - page 44; examples 1-3 ----- --/--	3, 4, 6-10, 13-19, 23-25, 27, 28, 30-40, 42-54, 56, 58, 59, 61, 62, 70-72, 74

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 2022

Date of mailing of the international search report

14/11/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Raposo, Antonio

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/038151

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/226925 A1 (TRANSLATE BIO INC [US]) 28 November 2019 (2019-11-28)	1, 2, 11, 12, 20-22, 26, 29, 41, 63-65, 73
Y	page 1, paragraph 3 page 24 - page 65 page 76 - page 110 page 120, paragraph 378 pages 191-192; example 3	3, 4, 6-10, 13-19, 23-25, 27, 28, 30-40, 42-54, 56, 58, 59, 61, 62, 70-72, 74
Y	----- US 2021/087135 A1 (BENENATO KERRY E [US] ET AL) 25 March 2021 (2021-03-25) the whole document -----	3, 4, 6-10, 13-19, 23-25, 27, 28, 30-40, 42-54, 56, 58, 59, 61, 62, 70-72, 74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/038151

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017031232 A1	23-02-2017	US 2018243230 A1 WO 2017031232 A1	30-08-2018 23-02-2017
WO 2019226925 A1	28-11-2019	AU 2019275068 A1 CA 3100254 A1 CN 112437767 A EP 3802487 A1 JP 2021525240 A US 2022008338 A1 WO 2019226925 A1	03-12-2020 28-11-2019 02-03-2021 14-04-2021 24-09-2021 13-01-2022 28-11-2019
US 2021087135 A1	25-03-2021	AR 120080 A1 AU 2020350759 A1 BR 112022004759 A2 CA 3154618 A1 CN 114728887 A EP 4031524 A1 IL 291219 A KR 20220101077 A TW 202124360 A US 2021087135 A1 US 2022106259 A1 WO 2021055833 A1	02-02-2022 31-03-2022 21-06-2022 25-03-2021 08-07-2022 27-07-2022 01-05-2022 19-07-2022 01-07-2021 25-03-2021 07-04-2022 25-03-2021

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/14	(2017.01)	A 6 1 K	47/14	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
			A 6 1 P	3/00	

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

ッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア 2 0 0

(72)発明者 スード, ニミル
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア 2 0 0
(72)発明者 ティアン, チャン
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア 2 0 0
(72)発明者 ドハーティ, ダニエル ダブリュー
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア 2 0 0

F ターム (参考) 4C076 AA65 AA95 CC01 CC03 CC11 CC17 CC21 CC26 CC27 CC29
CC31 DD23D DD26Z DD41Z DD43Z DD50 DD50Z DD51 DD60 DD63 DD67Q
DD70 EE23 FF14 FF36 FF61 GG30
4C084 AA13 MA05 MA38 NA03 NA13 ZA011 ZA151 ZA361 ZA811 ZB081
ZB211 ZB261 ZB311 ZC211 ZC351 ZC411