

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514649
(P2025-514649A)

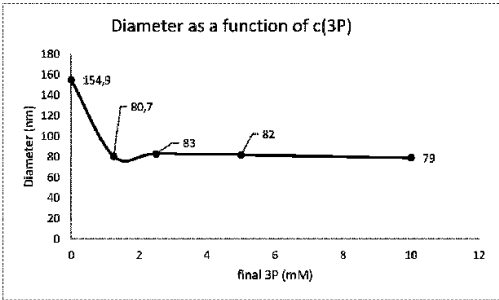
(43)公表日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		4 C 0 8 4
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51		4 C 0 8 5
A 6 1 K	9/127(2025.01)	A 6 1 K	9/127		4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全217頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-559221(P2024-559221)		(71)出願人	522021206	
(86)(22)出願日	令和5年4月5日(2023.4.5)			ビオンテック・ソシエタス・エウロパエ	
(85)翻訳文提出日	令和6年11月26日(2024.11.26)			ア	
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/059066			B i o N T e c h S E	
(87)国際公開番号	WO2023/194508			ドイツ 5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア	
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)			・ゴルトグルーベ 1 2	
(31)優先権主張番号	PCT/EP2022/059023		(74)代理人	100145403	
(32)優先日	令和4年4月5日(2022.4.5)			弁理士 山尾 憲人	
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		(74)代理人	100156144	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			弁理士 落合 康	
	最終頁に続く		(72)発明者	パンツナー, シュテッフェン	
				ドイツ 5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア	
				・ゴルトグルーベ 1 2、ビオンテック・	
				ソシエタス・エウロパ内	
			(72)発明者	ハムラズ, ゴラン-マルティン	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 無機ポリリン酸などの多価アニオンを含む核酸組成物ならびにその製造、保存および使用のための方法

(57)【要約】

本開示は、一般に、多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸)を含む核酸(例えば、DNAまたはRNA、特にmRNAまたは阻害性RNA、例えばsiRNA)組成物、そのような組成物を製造および保存するための方法、ならびに治療におけるそのような組成物の使用の分野に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 核酸；(ii) カチオンのイオン化可能な脂質；(iii) ステロイド；(iv) 中性脂質；および(v) 無機ポリリン酸を含む、組成物。

【請求項 2】

無機ポリリン酸が式 $[P_x O_{(3x+1)}]^{y-}$ [式中、 x は整数であり、少なくとも 3 であり；そして y はアニオン電荷である。] を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

無機ポリリン酸が、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、好ましくは、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、より好ましくは、無機ポリリン酸が三リン酸である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

無機ポリリン酸が、線形無機ポリリン酸、例えば線形無機三リン酸である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

(v) 無機ポリリン酸と(ii) カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比が、少なくとも約 1 : 2、好ましくは少なくとも約 2 : 3、例えば少なくとも約 4 : 3 である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

ポリエチレングリコール (PEG) を含む脂質を実質的に含まない、好ましくは PEG を含むあらゆる化合物を実質的に含まない、より好ましくは PEG を実質的に含まない、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 7】

組成物の pH が約 4.0 ～ 約 8.0、好ましくは約 4.5 ～ 約 8.0、例えば約 5.0 ～ 約 8.0、約 5.5 ～ 約 8.0、約 6.0 ～ 約 8.0、約 6.5 ～ 約 8.0、約 6.8 ～ 約 7.9、または約 7.0 ～ 約 7.8 である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

水が組成物中の主成分であるおよび／または組成物中に含まれる水以外の溶媒の総量が約 0.5 % (v / v) 未満である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 9】

組成物の浸透圧が、最大で約 $1000 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、好ましくは約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～ 約 $500 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、より好ましくは約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

組成物中の核酸の濃度が約 1 mg/l ～ 約 500 mg/l 、例えば約 1 mg/l ～ 約 100 mg/l 、約 5 mg/l ～ 約 100 mg/l 、または約 10 mg/l ～ 約 100 mg/l である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

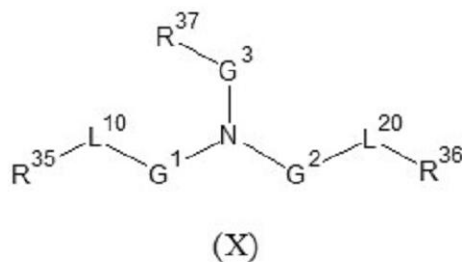
カチオンのイオン化可能な脂質が、少なくとも 1 つの第 3 級アミン部分を含む頭基を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 12】

カチオンのイオン化可能な脂質が、式 (X)

【化 1】



10

〔式中、

L^{10} および L^{20} の一方は、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ または $-NR^aC(=O)O-$ であり、そして L^{10} および L^{20} の他方は、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ または $-NR^aC(=O)O-$ または直接結合であり；

G^1 および G^2 は、各々独立して、非置換の C_1-C_{12} アルキレンまたは C_2-C_{12} アルケニレンであり；

20

G^3 は、 C_1-C_{24} アルキレン、 C_2-C_{24} アルケニレン、 C_3-8 シクロアルキレンまたは C_3-8 シクロアルケニレンであり；

R^a は、H または C_1-C_{12} アルキルであり；

R^{35} および R^{36} は、各々独立して、 C_6-C_{24} アルキルまたは C_6-C_{24} アルケニルであり；

R^{37} は、H、 OR^{50} 、 CN 、 $-C(=O)OR^{40}$ 、 $-OC(=O)R^{40}$ または $-NR^{50}C(=O)R^{40}$ であり；

R^{40} は C_1-C_{12} アルキルであり；

R^{50} は H または C_1-C_6 アルキルであり；そして

x は 0、1 または 2 である。〕

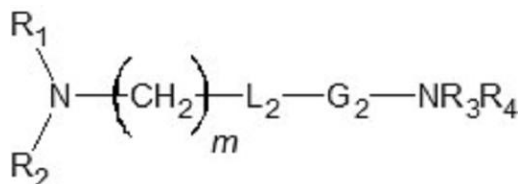
30

の構造を有するかまたはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体である、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質が、式 (XI)：

【化 2】



40

〔式中、

R_1 および R_2 の各々は、独立して R_5 または $-G_1-L_1-R_6$ であり、ここで、 R_1 および R_2 の少なくとも一方は $-G_1-L_1-R_6$ であり；

R_3 および R_4 の各々は、独立して C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、アリールおよび C_3-10 シクロアルキルからなる群から選択され；

R_5 および R_6 の各々は、独立して少なくとも 10 個の炭素原子を有する非環式ヒドロカルビル基であり；

G_1 および G_2 の各々は、独立して非置換の C_1-C_{12} アルキレンまたは C_2-C_{12} アルケニレンであり；

50

L_1 および L_2 の各々は、独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$ 、 $-C(=O)NRa-$ 、 $-NRaC(=O)NRa-$ 、 $-OC(=O)NRa-$ および $-NRaC(=O)O-$ からなる群から選択され；

Ra は、 H または C_{1-12} アルキルであり；

m は 0、1、2、3、または 4 であり；そして

x は 0、1 または 2 である。）

の構造を有する、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 20 mol%～約 75 mol%、例えば約 40 mol%～約 70 mol%、約 45 mol%～約 65 mol%、約 50 mol%～約 60 mol%、約 20 mol%～約 40 mol%、約 25 mol%～約 40 mol% または 約 25 mol%～約 35 mol% を構成する、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 15】

ステロイドが、コレステロールなどのステロールを含む、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 60 mol%、例えば約 15 mol%～約 40 mol%、約 20 mol%～約 35 mol%、約 20 mol%～約 30 mol%、約 35 mol%～約 60 mol%、約 40 mol%～約 60 mol% または 約 45 mol%～約 60 mol% を構成する、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 17】

中性脂質が、リン脂質であり、好ましく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、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン および スフィンゴミエリン からなる群から選択され、より好ましくは、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE) および ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(DPPE) からなる群から選択される、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 18】

中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 5 mol%～約 25 mol%、例えば約 10 mol%～約 25 mol%、約 15 mol%～約 25 mol%、約 17 mol%～約 21 mol%、約 5 mol%～約 15 mol% または 約 7 mol%～約 14 mol% を構成する、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 20 mol%～約 70 mol% を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 60 mol% を構成し；そして中性脂質(例えばリン脂質)が、組成物中に存在する総脂質の約 5 mol%～約 25 mol% を構成する、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 20】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 40 mol%～約 70 mol%、例えば約 45 mol%～約 65 mol% または 約 50 mol%～約 60 mol% を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 40 mol%、例えば約 20 mol%～約 35 mol%、または 約 20 mol%～約 30 mol% を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 25 mol%、例えば約 17 mol%～約 21 mol% を構成する、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

中性脂質に対するステロイドのモル比が最大 2.5 であり、好ましくは前記比が 1～2.5 である、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 22】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 20 mol%～約 40 mol%、例えば約 25 mol%～約 40 mol%または約 25 mol%～約 35 mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 35 mol%～約 60 mol%、例えば約 40 mol%～約 60 mol%または約 45 mol%～約 60 mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 5 mol%～約 15 mol%、例えば約 7 mol%～約 14 mol%を構成する、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも 3.0 であり、好ましくは前記比が 3.0～10.0、例えば 5.0～7.0 である、請求項 1～19 および 22 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 24】

組成物が水相に分散した粒子を含み、ここで、粒子が核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、ステロイドの少なくとも一部、および中性脂質の少なくとも一部を含み；そして無機ポリリン酸の少なくとも一部が粒子と結合している、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

粒子が、脂質ナノ粒子(LNP)、リボソーム、リボプレックス(LPX)、およびそれらの混合物から選択される、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

粒子が、組成物中に存在する核酸の少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 85%を含む、請求項 24 または 25 に記載の組成物。

20

【請求項 27】

組成物中に存在するポリリン酸の少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 20%、そしてより好ましくは少なくとも 50%が粒子と結合している、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 28】

粒子が約 30 nm～約 500 nm、例えば約 50 nm～約 150 nm のサイズを有する、請求項 24～27 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 29】

核酸が RNA、好ましくは mRNA である、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 30】

RNA が、(1)ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み、ここで、修飾ヌクレオシドは、好ましくはシュドウリジン(ψ)、N1-メチルシュドウリジン(m1ψ)および 5-メチルウリジン(m5U)から選択され；(2)コドン最適化されているコード配列を有し；そして／または(3)野生型コード配列と比較して G/C 含量が増加しているコード配列を有する、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

RNA が、5' キャップ；5' UTR；3' UTR；およびポリ A 配列の少なくとも 1 つ、好ましくは全てを含む、請求項 29 または 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

ポリ A 配列が少なくとも 100 個の A ヌクレオチドを含み、ここで、ポリ A 配列が好ましくは A ヌクレオチドの中断配列である、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

5' キャップが、キャップ 1 構造またはキャップ 2 構造である、請求項 31 または 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

RNA が 1 つ以上のポリペプチドをコードし、ここで、好ましくは、1 つ以上のポリペプチドが、対象における抗原に対する免疫応答を誘導するための薬学的活性ポリペプチド

50

であるおよび／またはエピトープを含む、請求項 29～33 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 35】

薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、病原体のタンパク質、タンパク質の免疫原性バリエーションまたはタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、SARS-CoV-2 スパイク(S)タンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、請求項 34 または 35 に記載の組成物。

10

【請求項 37】

組成物が液体形態であり、好ましくは約 2℃～約 10℃の温度である、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 38】

好ましくは約 2℃～約 8℃の温度で、少なくとも 1 週間保存後の組成物の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも 90%である、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

組成物の保存後の核酸粒子のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI)が、保存前の核酸粒子のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／またはPDIと本質的に等しい、請求項 24～38 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 40】

組成物が凍結形態である、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 41】

凍結組成物解凍後の核酸完全性が、組成物凍結前の核酸完全性と比較して、少なくとも 90%または実質的に 100%である、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

凍結組成物解凍後の核酸粒子のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI)が、組成物凍結前の核酸粒子のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／またはPDIと本質的に等しい、請求項 40 または 41 に記載の組成物。

30

【請求項 43】

最終水相に分散した粒子を含む組成物を製造する方法であって、

ここで、組成物が(i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)無機ポリリン酸を含み；粒子が核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、およびステロイドの少なくとも一部を含み；無機ポリリン酸の少なくとも一部が粒子と結合しており；そして、最終水相が最終緩衝系を含み；

40

ここで、該方法が、

(I)最終水相に分散した粒子を含む製剤であって、ここで、粒子が核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、ステロイドの少なくとも一部、および中性脂質の少なくとも一部を含み、無機ポリリン酸の少なくとも一部が粒子と結合している製剤を製造し；そして

(II)任意選択的に、製剤を約 -10℃以下に凍結させ、それにより、組成物を得ることを含む方法であって、

ここで、工程(I)が、

(a)水および第一緩衝系を含む核酸溶液を準備し；

(b)カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を含む有機溶液を準

50

備し；

(c)(a)の下に準備した核酸溶液と(b)の下に準備した有機溶液を混合し、それにより第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤を製造し；

(d)(c)の下に製造した第一中間製剤と無機ポリリン酸またはその塩を混合し、それにより第二緩衝系を含む第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、無機ポリリン酸の少なくとも一部が粒子と結合しており；そして

(e)最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて、(d)の下に製造した第二中間製剤を濾過および／または希釈し、

それにより、最終水相に分散した粒子を含む製剤を製造することを含む、方法。

【請求項 4 4】

10

工程(I)が、希釈および濾過から選択される1つ以上の工程をさらに含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

工程(I)が、

(a')水性核酸溶液を準備し；

(b')第一緩衝系を含む第一水性緩衝液を準備し；

(c')(a')の下に準備した水性核酸溶液と(b')の下に準備した第一水性緩衝液を混合し、それにより水および第一緩衝系を含む核酸溶液を製造し；

(d')カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を含む有機溶液を準備し(例えば、製造し)；

20

(e')(c')の下に製造した核酸溶液と(d')の下に準備した(例えば、製造した)有機溶液を混合し、それにより第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤を製造し；

(f')任意選択的に、水またはさらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を用いて、(e')の下に製造した第一中間製剤を希釈し、それにより第一緩衝系またはさらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここで、さらなる水性緩衝液は第一水性緩衝液と同一でも異なってもよく；

(g')工程(f')が存在しないならば工程(e')で得た第一中間製剤、または工程(f')が存在するならば工程(f')で得たさらなる中間製剤と無機ポリリン酸またはその塩を混合し、それにより第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、無機ポリリン酸の少なくとも一部が粒子と結合しており；

30

(h')任意選択的に、さらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を用いて、(g')の下に製造した第二の第一中間製剤を濾過し、それにより、さらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここで、さらなる水性緩衝液は、第一および／または第二水性緩衝液と同一でも異なってもよく；

(i')任意選択的に、工程(h')を1回、2回またはそれ以上繰り返し、ここで、1サイクルの工程(h')の後に得たさらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を次のサイクルの第二中間製剤として使用し、ここで、各サイクルにおいて、さらなる水性緩衝液は第一および／または第二水性緩衝液と同一でも異なってもよく；

(j')工程(h')が存在しないならば工程(g')で得た第二中間製剤、または工程(h')が存在して工程(i')が存在しないならば工程(h')で得たさらなる中間製剤、または工程(h')および(i')が存在するならば工程(i')の後に得たさらなる中間製剤を、最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて濾過し；そして

(k')任意選択的に、工程(j')で得た製剤を希釈溶液で希釈し；

それにより、最終水相に分散した粒子を含む製剤を製造することを含む、請求項 4 3 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

濾過が透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーションであり、好ましくは透析またはタンジェンシャルフロー濾過である、請求項 4 3 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 47】

無機ポリリン酸またはその塩が、式 $P_xO_{(3x+1)}M_y$ 、〔式中、 x は整数であり、少なくとも 3 であり；各 M は独立して、 H^+ またはカチオンであり；そして y は、電荷平衡化に必要なカチオンの数である〕を含むかまたはそれを有する、請求項 43～46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

各 M が、 H^+ 、アルカリカチオン、アンモニウム、および単価の有機カチオンからなる群から独立して選択され、好ましくは、各 M が、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、および NH_4^+ からなる群から独立して選択される、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

無機ポリリン酸またはその塩が、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択され、好ましくは、三リン酸、四リン酸、五リン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択され、より好ましくは、無機ポリリン酸またはその塩が、三リン酸またはその塩である、請求項 43～48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

無機ポリリン酸またはその塩が、線形無機ポリリン酸またはその塩、例えば線形三リン酸またはその塩である、請求項 43～49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

(v) 無機ポリリン酸と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比が、少なくとも約 1 : 2、好ましくは少なくとも約 2 : 3、例えば少なくとも約 4 : 3 である、請求項 43～50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

組成物が、PEG を含む脂質を実質的に含まない、好ましくは PEG を含むあらゆる化合物を実質的に含まない、より好ましくは PEG を実質的に含まない、請求項 43～51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

(1) 工程(a)で得た核酸溶液が 6.0 未満、好ましくは最大約 5.0、より好ましくは最大約 4.5 の pH を有するか；または(2)第一水性緩衝液が 6.0 未満、好ましくは最大約 5.0、より好ましくは最大約 4.5 の pH を有する、請求項 43～52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

組成物の pH が、約 4.0～約 8.0、好ましくは約 4.5～約 8.0、例えば約 5.0～約 8.0、約 5.5～約 8.0、約 6.0～約 8.0、約 6.5～約 8.0、約 6.8～約 7.9 または約 7.0～約 7.8 である、請求項 43～53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

水が製剤および／または組成物の主成分であるおよび／または組成物に含まれる水以外の溶媒の総量が約 0.5 % (v/v) 未満である、請求項 43～54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

組成物の浸透圧が、最大で約 $1000 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、好ましくは約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $500 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、より好ましくは約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である、請求項 43～55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

組成物中の核酸の濃度が、約 1 mg/l ～約 500 mg/l 、例えば約 1 mg/l ～約 100 mg/l 、約 5 mg/l ～約 100 mg/l 、または約 10 mg/l ～約 100 mg/l である、請求項 43～56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

カチオンのイオン化可能な脂質が、少なくとも 1 つの第 3 級アミン部分を含む頭基を含む、請求項 43～57 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 59】

カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質が、約 20 mol%～約 70 mol%のカチオンのイオン化可能な脂質；約 15 mol%～約 60 mol%のステロイド；および約 5 mol%～約 25 mol%の中性脂質（例えばリン脂質）のモル比で有機溶液中に存在する、請求項 43～58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質が、約 40 mol%～約 70 mol%、例えば約 45 mol%～約 65 mol%または約 50 mol%～約 60 mol%のカチオンのイオン化可能な脂質；約 15 mol%～約 40 mol%、例えば約 20 mol%～約 35 mol%または約 20 mol%～約 30 mol%のステロイド；および約 15 mol%～約 25 mol%、例えば約 17 mol%～約 21 mol%の中性脂質のモル比で有機溶液中に存在する、請求項 43～59 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 61】

有機溶液中の中性脂質に対するステロイドのモル比が最大 2.5 であり、好ましくは前記比率が 1～2.5 である、請求項 43～60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質が、約 20 mol%～約 40 mol%、例えば約 25 mol%～約 40 mol%または約 25 mol%～約 35 mol%のカチオンのイオン化可能な脂質；約 35 mol%～約 60 mol%、例えば約 40 mol%～約 60 mol%または約 45 mol%～約 60 mol%のステロイド；および約 5 mol%～約 15 mol%、例えば約 7 mol%～約 14 mol%の中性脂質のモル比で有機溶液中に存在する、請求項 43～59 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 63】

中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも 3.0 であり、好ましくは前記比率が 3.0～10.0、例えば 5.0～7.0 である、請求項 43～59 および 62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

粒子が、約 30 nm～約 500 nm、例えば約 50 nm～約 150 nm のサイズを有する、請求項 43～63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

粒子が、脂質ナノ粒子(LNP)、リポソーム、リポプレックス(LPX)、およびそれらの 2 つ以上の混合物からなる群から選択される、請求項 43～64 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 66】

核酸が、RNA、好ましくは mRNA である、請求項 43～65 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 67】

RNA が (i) ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み、ここで、修飾ヌクレオシドは好ましくはシュドウリジン(ψ)、N1-メチルシュドウリジン(m1 ψ)および 5-メチルウリジン(m5U)から選択され；(ii) コドン最適化されているコード配列を有し；そして／または(iii) 野生型コード配列と比較して G/C 含量が増加しているコード配列を有する、請求項 66 に記載の方法。

40

【請求項 68】

RNA が、5' キャップ；5' UTR；3' UTR；およびポリ A 配列の少なくとも 1 つ、好ましくは全てを含む、請求項 66 または 67 に記載の方法。

【請求項 69】

ポリ A 配列が、少なくとも 100 個の A ヌクレオチドを含み、ここで、ポリ A 配列が好ましくは A ヌクレオチドの中断配列である、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

5' キャップがキャップ 1 構造またはキャップ 2 構造である、請求項 68 または 69 に

50

記載の方法。

【請求項 7 1】

R N A が 1 つ以上のポリペプチドをコードし、ここで、好ましくは、1 つ以上のポリペプチドが、薬学的活性ポリペプチドであるおよび／または対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含む、請求項 6 6 ～ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、病原体のタンパク質、タンパク質の免疫原性バリエーションまたはタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、請求項 7 1 に記載の方法。

10

【請求項 7 3】

薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、S A R S - C o V - 2 スパイク(S)タンパク質、その免疫原性バリエーションまたはS A R S - C o V - 2 S タンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、請求項 7 1 または 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

(II) 製剤を約 - 1 0 °C 以下に凍結することを含む、請求項 4 3 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

工程(II)を含まない、請求項 4 3 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7 6】

請求項 4 3 ～ 7 4 のいずれか一項に記載の方法に従い組成物を製造し、該組成物を約 - 9 0 °C ～ 約 - 1 0 °C、例えば約 - 9 0 °C ～ 約 - 4 0 °C または約 - 2 5 °C ～ 約 - 1 0 °C の範囲の温度で保存することを含む、組成物を保存する方法。

【請求項 7 7】

組成物を、少なくとも 1 ヶ月間、例えば少なくとも 2 ヶ月間、少なくとも 3 ヶ月間、少なくとも 6 ヶ月間、少なくとも 1 2 ヶ月間、少なくとも 2 4 ヶ月間または少なくとも 3 6 ヶ月間保存する、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

請求項 4 3 ～ 7 5 のいずれか一項に記載の方法に従い組成物を製造し、該組成物を約 0 °C ～ 約 2 0 °C、例えば約 1 °C ～ 約 1 5 °C、約 2 °C ～ 約 1 0 °C または約 2 °C ～ 約 8 °C の範囲の温度で、または約 5 °C の温度で保存することを含む、組成物を保存する方法。

30

【請求項 7 9】

組成物を、少なくとも 1 週間、例えば少なくとも 2 週間、少なくとも 3 週間、少なくとも 4 週間、少なくとも 1 ヶ月、少なくとも 2 ヶ月、少なくとも 3 ヶ月、少なくとも 6 ヶ月、少なくとも 1 2 ヶ月または少なくとも 2 4 ヶ月保存する、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

請求項 4 3 ～ 7 9 のいずれか一項に記載の方法によって製造可能な組成物。

【請求項 8 1】

凍結形態である、請求項 8 0 に記載の組成物。

40

【請求項 8 2】

凍結組成物解凍後の核酸完全性が、組成物凍結前の核酸完全性と比較して少なくとも 9 0 % または実質的に 1 0 0 % である、請求項 8 1 に記載の組成物。

【請求項 8 3】

凍結組成物の解凍後の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(P D I)が、組成物凍結前の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／または P D I と本質的に等しい、請求項 8 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 4】

液体形態である、請求項 8 0 に記載の組成物。

50

【請求項 85】

好ましくは約 2℃～約 8℃の温度で、組成物を少なくとも 1 週間保存後の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも 90%である、請求項 84 に記載の組成物。

【請求項 86】

組成物を少なくとも 1 週間保存後の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI)が、保存前の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／または PDI と本質的に等しい、請求項 84 または 85 に記載の組成物。

【請求項 87】

請求項 43～74、76 および 77 のいずれか一項に記載の方法によって製造した凍結組成物を準備し、そして該凍結組成物を解凍し、それにより使用準備済医薬組成物を得る工程を含む、使用準備済医薬組成物を製造するための方法。

10

【請求項 88】

請求項 43～73 および 75～77 のいずれか一項に記載の方法によって製造した液体組成物を準備し、それにより使用準備済医薬組成物を得る工程を含む、使用準備済医薬組成物を製造するための方法。

【請求項 89】

請求項 87 または 88 に記載の方法により製造可能な、使用準備済医薬組成物。

【請求項 90】

治療に使用するための、請求項 1～42、80～86 および 89 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 91】

対象における免疫応答の誘導に使用するための、請求項 1～42、80～86 および 89 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 92】

請求項 1～42、80～86 および 89 のいずれか一項に記載の組成物を細胞に添加し；そして組成物と細胞との混合物を十分な時間インキュベートすることを含む、細胞をトランスフェクトする方法。

【請求項 93】

組成物と細胞との混合物を血清の存在下でインキュベートする、請求項 92 に記載の方法。

30

【請求項 94】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 40 mol%～約 70 mol%、例えば約 45 mol%～約 65 mol%または約 50 mol%～約 60 mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 40 mol%、例えば約 20 mol%～約 35 mol%または約 20 mol%～約 30 mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 25 mol%、例えば約 17 mol%～約 21 mol%を構成する、請求項 92 または 93 に記載の方法。

【請求項 95】

中性脂質に対するステロイドのモル比が最大 2.5 であり、好ましくは前記比が 1～2.5 である、請求項 92～94 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 96】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 20 mol%～約 40 mol%、例えば約 25 mol%～約 40 mol%または約 25 mol%～約 35 mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 35 mol%～約 60 mol%、例えば約 40 mol%～約 60 mol%または約 45 mol%～約 60 mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 5 mol%～約 15 mol%、例えば約 7 mol%～約 14 mol%を構成する、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 97】

中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも 3.0 であり、好ましくは前記比率

50

が 3.0～10.0、例えば 5.0～7.0 である、請求項 92 または 96 に記載の方法。

【請求項 98】

細胞をトランスフェクトするための、請求項 1～42、80～86 および 89 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 99】

細胞のトランスフェクションが血清存在下で実施される、請求項 98 に記載の使用。

【請求項 100】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 40 mol%～約 70 mol%、例えば約 45 mol%～約 65 mol% または約 50 mol%～約 60 mol% を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 40 mol%、例えば約 20 mol%～約 35 mol% または約 20 mol%～約 30 mol% を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 15 mol%～約 25 mol%、例えば約 17 mol%～約 21 mol% を構成する、請求項 98 または 99 に記載の使用。

10

【請求項 101】

中性脂質に対するステロイドのモル比が最大 2.5 であり、好ましくは前記比率が 1～2.5 である、請求項 98～100 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 102】

カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 20 mol%～約 40 mol%、例えば約 25 mol%～約 40 mol% または約 25 mol%～約 35 mol% を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約 35 mol%～約 60 mol%、例えば約 40 mol%～約 60 mol% または約 45 mol%～約 60 mol% を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約 5 mol%～約 15 mol%、例えば約 7 mol%～約 14 mol% を構成する、請求項 98 に記載の使用。

20

【請求項 103】

中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも 3.0 であり、好ましくは前記比率が 3.0～10.0、例えば 5.0～7.0 である、請求項 98 または 102 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

30

本開示は、一般に、多価アニオン(無機ポリリン酸など)を含む核酸(DNA または RNA など、特に mRNA または阻害性 RNA、例えば siRNA)組成物、そのような組成物の製造および保存のための方法ならびに治療におけるそのような組成物の使用の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

外来遺伝情報を標的細胞に送達するための組換え核酸(DNA または RNA など)の使用は周知である。組換え核酸はそれを必要とする対象に裸の形態で投与され得るが、通常組換え核酸は組成物を用いて投与される。例えば、RNA などの核酸は、核酸とともにナノ粒子を形成するカチオン性ポリマーまたは脂質に大部分基づく、種々の送達媒体を用いて対象に送達され得る。ナノ粒子は、RNA などの核酸を分解から保護し、RNA などの核酸の標的部位への送達を可能とし、標的細胞による細胞の取り込みおよびプロセッシングを促進することを意図される。核酸送達の効率は、部分的にはナノ粒子の分子組成に依存し、粒子サイズ、製剤、および電荷またはポリエチレングリコール(PEG)もしくは他のリガンドなどの分子部分とのグラフティングを含む、多数のパラメータにより影響を受け得る。このようなナノ粒子製剤の運命は、多様な鍵となる因子(ナノ粒子のサイズおよびサイズ分布など)によって制御される。これらの因子は、例えば、2018 年から、FDA の“Liposome Drug Products Guidance”において、分析および特定されるべき特異的属性として言及されている。RNA を用いる利点は、一過性発現および非形質転換特徴

40

50

を含む。さらに、RNAは発現されるために核に入る必要がなく、加えて宿主ゲノムに統合することができないため、発がんなどの多様なリスクを排除する。

【0003】

PEGとのグラフティングは、血清相互作用を減らし、血清安定性を高め、循環時間を長くすると考えられており、これは特定の標的化アプローチに有用であり得る。標的部位の受容体に結合するリガンドは、標的化効果を向上させるのに役立ち得る。さらに、PEG化は粒子工学に利用され得る。例えば、RNAなどの核酸の水相と脂質の有機相を混合して脂質ナノ粒子(LNP)を製造するとき、脂質混合物中のPEGコンジュゲート脂質の特定の割合が必要であり、そうでなければ、混合工程中または混合工程後に粒子が凝集する。種々のモル質量のPEGを含むPEG脂質のモル分率を変化させることによって、粒子のサイズを調整できることが示されている。同様に、粒子サイズは、PEG化された脂質のPEG部分のモル質量を変化させることによって調整され得る。利用可能な典型的なサイズは、30~200nmの範囲である(Belliveau et al., 2012, Molecular Therapy-Nucleic Acids 1, e37)。そうして形成された粒子は、さらに、PEGフラクションのために血清成分との相互作用が少なく、長い循環半減期を有するという利点を有し、これは多くの薬物送達アプローチにおいて望ましい。PEG脂質がないと、不連続な大きさの粒子を形成することができず；粒子は大きな凝集体を形成して沈殿する。したがって、PEG脂質の主な役割の1つは、RNAなどの核酸を結合する脂質を含むエタノール溶液中で核酸を急速に混合するときに形成される発生期の粒子の表面に立体バリアを提供することによって、粒子の自己集合を促進することである。PEGの立体障害は粒子間の融合を防ぎ、直径<100nmが達成可能なLNPの均質な集団の形成を促進する。

10

20

【0004】

PEGは、薬物送達において最も広く使用されている、ゴールドスタンダードの「ステルス」ポリマーである。PEG脂質は、その親水性立体障害特性(PEGシェルが凝集につながる静電引力またはファンデルワールス引力を防ぐこと)により、均一でコロイド的に安定なナノ粒子集団を調製するために、一般的に系に組み込まれる。PEG化によって、ポリマーの周囲に水のシェルを引きつけることができ、粒子が血清タンパク質とのオプソニン化から保護されるため、血清中半減期が長くなり、その結果、薬物動態が改善される。脂質のアシル鎖の長さ(C₁₈、C₁₆またはC₁₄)を変化させると、粒子へのPEG脂質の組み込みの安定性が変化し、薬物動態の調節につながる。LNPからインビボで半減期<30分で解離する短い(C₁₄)アシル鎖を含むPEG脂質の使用は、最適な肝細胞遺伝子サイレンシング効力をもたらす(Chen et al., 2014, J. Control Release 196:106-12; Ambegia et al., 2005, Biochimica et Biophysica Acta 1669:155-163)。さらに、PEG脂質パラメータを変化させることで、粒子径を厳密に制御できる；PEGの分子量が高いほど、あるいは粒子中のPEG脂質のモル分率が高いほど、粒子は小さくなる。

30

【0005】

このような利点があるにもかかわらず、ナノ粒子のPEG化は、薬物送達のために意図された使用にとって有害なくつかの効果をもたらす可能性もある。リポソームおよびLNPのPEG化は、細胞への取り込みおよびエンドソーム脱出(endosomal escape)を減少させ、最終的に全トランスフェクション効率を低下させることが知られている。実際、PEGシェルは粒子が細胞に効率的に結合するための立体障壁をもたらす、またリポソームとエンドソーム膜の膜融合を妨げることによってエンドソーム放出を妨げる。このため、PEG脂質の種類およびPEG脂質の使用量は、常に慎重に調整しなければならない。一方ではインビボおよび安定化の面で十分なステルス効果を発揮し、他方ではトランスフェクションを妨げないものでなければならない。この現象は「PEGジレンマ」として知られている。

40

【0006】

PEG化は、トランスフェクション効率を低下させるだけでなく、抗PEG抗体および／または補体活性化によって誘導される血液クリアランス促進(ABC)現象、ならびに蓄

50

積症(storage diseases)とも関連している(Bendele A et al., 1998, Toxicological Sciences 42, 152-157; Young MA et al., 2007, Translational Research 149(6), 333-342; S.M. Moghimi, J. Szebeni, 2003, Progress in Lipid Research 42:463-478)。Ishidaら、およびLavermanらは、PEG-グラフトリポソームのラットへの静脈内注射は、この2回目の投与が数日の間隔をおいて投与されたとき、2回目の投与の薬物動態学的挙動を有意に変化させ得ることを報告している(Laverman P et al., 2001, J. Pharmacol. Exp. Ther. 298(2), 607-12; Ishida et al., 2006, J. Control Release 115(3), 251-8)。「血液クリアランスの促進」(ABC)現象は、リポソームのPEG含量に関係しているようである。血漿中に抗PEG抗体が存在すると、単核食細胞系(MPS)による粒子のクリアランスが高くなり、最終的に薬効が低下する。

10

【0007】

また、PEGは補体活性化を誘導すると考えられており、補体活性化関連仮性アレルギー(CARPA)としても知られる過敏症反応を引き起こす可能性がある。補体の活性化がナノ粒子全般によるものなのか、あるいは特にPEGの存在によるものなのかは、文献からはまだ明らかではない。

【0008】

他の脂質粒子にPEGが含まれているときも、特異的な免疫反応を引き起こし得る。Sempleら(2005, J. Pharmacol. Exp. Ther. 312(3), 1020-6)は、PEG脂質誘導体および封入されたアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドまたはプラスミドDNAを含むリポソームが、強力な免疫反応を引き起こし、その結果、マウスに投与した後、速やかに血中クリアランスに至ることを報告した。この反応の大きさは、顕著な罹患率、場合によっては死亡率を引き起こすのに十分であった。非PEG化リポソームまたは急速に交換可能なPEG脂質を含むリポソームの使用は反応を消失させたため、リポソームで封入されたオリゴデオキシヌクレオチドの血液中からの迅速な除去は、膜中のPEG脂質の存在に依存していた。抗PEG抗体の生成および推定される補体活性化が、小胞が血液から速やかに排除されたことの説明となった。

20

【0009】

PEGは免疫反応を引き起こし得るため、複数回の注射が必要な用途では避ける必要がある。例として、例えばタンパク質補充療法のための核酸(RNAなど、特にmRNA)を用いた治療法が挙げられ。ここで、核酸(特にRNA)の内在性免疫原性の可能性により、リスクは特に高くなる可能性がある。他の例としては、阻害性RNA(siRNAなど)、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはDNAに基づく療法を用いたタンパク質ノックダウン療法が挙げられる。

30

【0010】

したがって、当技術分野では、PEGの使用に伴う欠点を回避した、RNAなどの核酸を細胞に導入するための効率的な組成物および方法に対する必要性が残っている。理想的には、これらの組成物および方法は、(i)組成物が安定であり、製薬実務における通常の技術に準拠した温度範囲、特に約-20℃の温度で、あるいは+2~+20℃の温度で液体形態でも保存でき；(ii)組成物が繰り返し凍結および解凍でき；(iii)組成物がすぐに使用でき；(iv)PEGを含まない組成物は高い生物学的効力を維持し；および／または(v)組成物中に含まれる核酸は安定な形態であり、保存時に著しく分解されないようなものであるべきである。本開示は、これらのニーズおよびその他のニーズに対処する。

40

【0011】

本発明者らは、驚くべきことに、本明細書に記載の組成物および方法が上記の要件を満たすことを見出した。特に、無機ポリリン酸、無機リン酸またはクエン酸のような多価アニオンを使用することにより、(特に前記組成物に含まれる粒子のコロイドサイズに関して)安定であり、液体形態で保存でき、凍結および解凍を繰り返すことができ、安定な形態の核酸を含み、そして組成物／粒子がPEG脂質または任意の他のステルス脂質を含む／含まないときでも、高い生物学的効力を維持できる組成物を製造することが可能である

50

ことが実証されている。

【発明の概要】

【0012】

概要

第一の態様において、本開示は、(i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)無機ポリリン酸などの多価アニオンを含む組成物を提供する。

【0013】

本出願で示されるとおり、組成物(特に水性組成物)中に含まれ、核酸(特にmRNAなどのRNA)から形成される粒子(脂質ナノ粒子(LNP)、リボソーム、リボプレックス(LPX)、またはそれらの混合物など)、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質の凝集は、組成物／粒子がPEG脂質または任意の他のステルス脂質を含む／含まないときでも、無機ポリリン酸などの多価アニオンを組成物に添加することによって防止できる。さらに、本出願は、驚くべきことに、無機ポリリン酸などの多価陰イオンの存在下で、脂質の量を互いに調整することにより、種々の生物学的性能を示す核酸(RNAなど)組成物を得ることが可能であることを実証している：細胞のトランスフェクションに使用するとき、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない核酸組成物は、血清の存在下でトランスフェクションを行ったとき、血清の非存在下でトランスフェクションを行ったときに得られる発現と比較して、トランスフェクションされた細胞における核酸の高い発現をもたらす(この効果は、本明細書では「血清刺激」と呼ばれ、PEG脂質を含む標準的な核酸組成物の生物学的性能に類似している)。対照的に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多く、細胞のトランスフェクションに使用される核酸組成物は、血清の存在下でトランスフェクションを行ったとき、トランスフェクトされた細胞における核酸の発現が同等または減少する(すなわち、これらの組成物は、血清阻害をいくらか示すかまたは全く示さないが、血清刺激を示さない)。したがって、請求する組成物は、安定であり、製薬実務における通常の技術に準拠した温度範囲で保存でき、使用準備済(ready-to-use)組成物を提供し、そして組成物／粒子がPEG脂質または任意の他のステルス脂質を含む／含まないときでも、高い生物学的効力を維持する。さらに、脂質相互の相対量に応じて、請求する組成物は、種々の生物学的性能、すなわち、血清によって刺激性であり得るかを示す可能性がある。

【0014】

本明細書で使用される「多価アニオン」という用語は、複数の(すなわち1つ以上の)負電荷を有するイオンを指すと理解され得る。例えば、多価アニオンはジアニオン、すなわち2-の電荷を有するアニオン、または2個の負電荷を有するアニオンであり得る。別の例では、多価アニオンはトリアニオン、すなわち3-の電荷を有するアニオン、または3個の負電荷を有するアニオンであり得る。さらに別の例では、多価アニオンはテトラアニオン、すなわち4-の電荷を有するアニオン、または4個の負電荷を有するアニオンであり得る。さらなる例では、多価アニオンは複数の負電荷を有し得る。典型的には、多価アニオンはDNAまたはRNAなどの核酸ではないか、あるいはDNAまたはRNAなどの核酸を含まない。ある実施態様において、多価アニオンは、20個の負電荷(すなわち、20-の電荷)以下、好ましくは10個の負電荷(すなわち、10-の電荷)以下、または最も好ましくは5個の負電荷(すなわち、5-の電荷)以下の負電荷を有する。多価アニオンは、2~20、2~15、2~10、2~8、2~5、3~20、3~15、3~10、3~8、または3~5の負電荷、任意で2~10の負電荷、好ましくは2~5の負電荷を有し得る。

【0015】

多価アニオンは、無機ポリリン酸(本明細書でさらに定義される)、無機リン酸(例えば、 PO_4^{3-})、硫酸、亜硫酸、ピロ硫酸、ジチオン酸、亜ジチオン酸、メタ重亜硫酸、チオ硫酸、トリチオン酸またはテトラチオン酸、ジカルボン酸(例えば、シュウ酸、マロ

10

20

30

40

50

ン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、セバシン酸、フタル酸、イソフタル酸、またはテレフタル酸)、置換ジカルボン酸(例えば、タルトロン酸、メソシュウ酸、リンゴ酸、酒石酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒドロキシグルタル酸、またはサッカリン酸)、トリカルボン酸(例えば、クエン酸、イソクエン酸、プロパン-1, 2, 3-トリカルボン酸、またはトリメシン酸)、またはそれらの混合物からなる群から選択され得る。典型的に、水中の多価アニオンは溶質として分子的に溶解し、ミセルなどの超分子集合体を形成しない。構造的には、多価アニオンは、親水性部分と親油性部分とを有する負に帯電した両親媒性ではないか、あるいは、親水性部分と親油性部分とを有する負に帯電した両親媒性を含まない(例えば、多価アニオンは負に帯電した脂質ではない)。

【0016】

10

ある実施態様では、多価アニオンは無機ポリリン酸である。無機ポリリン酸は、あらゆる線形、環状、または分岐の無機ポリリン酸であり得る。第一の態様のある実施態様では、無機ポリリン酸は線形無機ポリリン酸(線形無機三リン酸など)である。

【0017】

第一の態様のある実施態様において、無機ポリリン酸は、式 $[P_x O_{(3x+1)}]^{y-}$ を含み、式中、 x は整数であり、少なくとも2であり、好ましくは少なくとも3であり；そして y はアニオン電荷である。例えば、 x が3のとき、無機ポリリン酸は、式 $[P_3 O_{10}]^{5-}$ を含む線形無機三リン酸である。同様に、 x が4であるとき、無機ポリリン酸は、式 $[P_4 O_{13}]^{6-}$ を含む線形または分岐の無機四リン酸である。

【0018】

20

第一の態様のある実施態様において、無機ポリリン酸は、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。第一の態様のいくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。第一の態様のいくつかの好ましい実施態様では、無機ポリリン酸は三リン酸である。

【0019】

ある実施態様において、多価アニオンは、無機リン酸(例えば、 PO_4^{3-})、硫酸、亜硫酸、ピロ硫酸、ジチオン酸、亜ジチオン酸、メタ重亜硫酸、チオ硫酸、トリチオン酸またはテトラチオン酸である。ある実施態様において、多価アニオンは、無機リン酸(例えば、 PO_4^{3-})である。

30

【0020】

ある実施態様において、多価アニオンは、ジカルボン酸(例えば、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、セバシン酸、フタル酸、イソフタル酸またはテレフタル酸)、または置換ジカルボン酸(例えば、タルトロン酸、メソシュウ酸、リンゴ酸、酒石酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒドロキシグルタル酸またはサッカリン酸)である。

【0021】

ある実施態様において、多価アニオンはトリカルボン酸(例えば、クエン酸、イソクエン酸、プロパン-1, 2, 3-トリカルボン酸またはトリメシン酸)である。

40

【0022】

いくつかの好ましい実施態様において、多価アニオンは、無機ポリリン酸(本明細書において定義される)、無機リン酸(例えば、 PO_4^{3-})、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物からなる群から選択される。ある実施態様において、多価アニオンは、無機ポリリン酸(本明細書において定義される)、無機リン酸またはクエン酸である。いくつかの最も好ましい実施態様において、多価アニオンは、無機ポリリン酸(本明細書において定義される)である。

【0023】

第一の態様のある実施態様において、(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1:2である。例えば、(v)

50

多価アニオン(無機ポリリン酸など)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約0.55、少なくとも約0.60、少なくとも約0.65、少なくとも約2:3、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.80、少なくとも約0.85、少なくとも約0.90、少なくとも約0.95、少なくとも約1.00、少なくとも約1.10、少なくとも約1.20、少なくとも約1.30、少なくとも約4:3、少なくとも約1.40、少なくとも約1.50、少なくとも約1.60、少なくとも約1.70、少なくとも約1.80、少なくとも約1.90、または少なくとも約2.0である。第一の態様のいくつかの好ましい実施態様において、(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約2:3である。第一の態様のいくつかの好ましい実施態様では、(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約4:3である。

10

【0024】

第一の態様のある実施態様において、組成物は、ポリエチレングリコール(PEG)を含む脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、組成物はPEGを含む化合物を実質的に含まない。ある実施態様において、組成物はPEGを実質的に含まない。したがって、第一の態様のある実施態様において、組成物は、(i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)多価アニオンを含み、ここで、組成物は、PEGを含む脂質を実質的に含まないか、PEGを含むあらゆる化合物を実質的に含まないか、またはPEGを実質的に含まない。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかでは、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸およびクエン酸からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかでは、多価アニオンは無機ポリリン酸である。

20

【0025】

第一の態様のある実施態様において、組成物はまた、別のポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、別のポリマーコンジュゲート脂質はポリサルコシンコンジュゲート脂質である。ある実施態様において、組成物は、あらゆるポリマーコンジュゲート脂質(PEG脂質およびポリサルコシンコンジュゲート脂質を含む)を実質的に含まない。したがって、第一の態様のある実施態様において、組成物は、(i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)多価アニオンを含み、ここで、組成物は、あらゆるポリマーコンジュゲート脂質(PEG脂質およびポリサルコシンコンジュゲート脂質を含む)を実質的に含まない。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸(例えば、 PO_4^{3-})、硫酸、亜硫酸、ピロ硫酸、ジチオン酸、亜ジチオン酸、メタ重亜硫酸、チオ硫酸、トリチオン酸またはテトラチオン酸、ジカルボン酸(例えば、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、セバシン酸、フタル酸、イソフタル酸またはテレフタル酸)、置換ジカルボン酸(例えば、タルトロン酸、メソシュウ酸、リンゴ酸、酒石酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒドロキシグルタル酸またはサッカリン酸)、またはトリカルボン酸(例えば、クエン酸、イソクエン酸、プロパン-1,2,3-トリカルボン酸またはトリメシン酸)からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは無機ポリリン酸である。

30

40

【0026】

第一の態様のある実施態様において、組成物のpHは約4.0~約8.0である。第一の態様のある実施態様において、組成物のpHは、約4.5~約8.0、例えば約5.0~約8.0、約5.5~約8.0、約6.0~約8.0、約6.5~約8.0、約6.8~約7.9、ま

50

たは約 7.0 ～ 約 7.8 である。

【0027】

第一の態様のある実施態様において、水は組成物の主成分であるおよび／または組成物中に含まれる水以外の溶媒の総量は約 1.0 (v/v) 未満、例えば約 0.5 % (v/v) 未満である。例えば、組成物に含まれる水の量は、少なくとも 50 % (w/w)、例えば少なくとも 55 % (w/w)、少なくとも 60 % (w/w)、少なくとも 65 % (w/w)、少なくとも 70 % (w/w)、少なくとも 75 % (w/w)、少なくとも 80 % (w/w)、少なくとも 85 % (w/w)、少なくとも 90 % (w/w)、または少なくとも 95 % (w/w) であり得る。特に、組成物が抗凍結剤を含むならば、組成物に含まれる水の量は、少なくとも 50 % (w/w)、例えば少なくとも 55 % (w/w)、少なくとも 60 % (w/w)、少なくとも 65 % (w/w)、少なくとも 70 % (w/w)、少なくとも 75 % (w/w)、少なくとも 80 % (w/w)、少なくとも 85 % (w/w)、または少なくとも 90 % (w/w) であり得る。組成物が抗凍結剤を実質的に含まないならば、組成物に含まれる水の量は少なくとも 95 % (w/w) であり得る。これに加えてまたはこれとは別に、組成物に含まれる水以外の溶媒の総量は、約 0.5 % (v/v) 未満、例えば約 0.4 % (v/v) 未満、約 0.3 % (v/v) 未満、約 0.2 % (v/v) 未満、約 0.1 % (v/v) 未満、約 0.05 % (v/v) 未満、約 0.01 % (v/v) 未満、または約 0.005 % (v/v) 未満であり得る。これに関して、標準条件下で液体である抗凍結剤は、水以外の溶媒ではなく、抗凍結剤とみなすべきである。換言すると、組成物に含まれる水以外の溶媒の総量が約 0.5 % (v/v) 未満、例えば約 0.4 % (v/v) 未満であり得るという上記最適限界は、標準条件下で液体である抗凍結剤には適用されない。

10

20

【0028】

第一の態様のある実施態様において、組成物の浸透圧は最大約 $1000 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である。第一の態様のある実施態様において、組成物の浸透圧は、最大約 $1000 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である。ある実施態様において、組成物の浸透圧は、最大約 $500 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、例えば、最大約 $490 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $480 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $470 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $460 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $450 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $440 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $430 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $420 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $410 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $400 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $390 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $380 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $370 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $360 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $350 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $340 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $330 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $320 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $310 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、または最大約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である。第一の態様のある実施態様において、組成物の浸透圧は、約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～ 約 $500 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、例えば約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である。組成物が抗凍結剤を含まないならば、組成物の浸透圧は $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 未満、例えば最大約 $250 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $200 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $150 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $50 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $40 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、または最大約 $30 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ であり得る。組成物が抗凍結剤を含むならば、組成物の浸透圧の大部分は抗凍結剤によりもたらされるのが好ましい。例えば、抗凍結剤は、組成物の浸透圧の少なくとも 50 %、例えば少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、または少なくとも 90 % をもたらし得る。

30

40

【0029】

第一の態様のある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約 1 mg/l ～ 約 500 mg/l である。ある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約 1 mg/l ～ 約 100 mg/l である。ある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は、約 5 mg/l ～ 約 500 mg/l 、例えば約 10 mg/l ～ 約 400 mg/l 、約

50

10 mg/l～約300 mg/l、約10 mg/l～約200 mg/l、約10 mg/l～約150 mg/l、または約10 mg/l～約100 mg/l、好ましくは約10 mg/l～約140 mg/l、より好ましくは約20 mg/l～約130 mg/l、さらにより好ましくは約30 mg/l～約120 mg/lである。ある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は、約5 mg/l～約150 mg/l、例えば約10 mg/l～約140 mg/l、約20 mg/l～約130 mg/l、約25 mg/l～約125 mg/l、約30 mg/l～約120 mg/l、約35 mg/l～約115 mg/l、約40 mg/l～約110 mg/l、約45 mg/l～約105 mg/l、または約50 mg/l～約100 mg/lである。ある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は、1 mg/l～約50 mg/l、または約10 mg/l～約100 mg/lである。第一の態様のある実施態様(特に、組成物が凍結形態である実施態様)において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約1 mg/l～約50 mg/lである。第一の態様のある実施態様(特に、組成物が液体形態である実施態様)において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約10 mg/l～約100 mg/lである。

10

【0030】

第一の態様のある実施態様において、組成物は抗凍結剤を含む。第一の態様のある実施態様において、組成物は抗凍結剤を実質的に含まない。

【0031】

第一の態様のある実施態様において、多価アニオンとカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1:2(好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約1.00または少なくとも約4:3)であり、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約1 mg/l～約100 mg/l(例えば、1 mg/l～約50 mg/lまたは約10 mg/l～約100 mg/l)である。第一の態様のある実施態様(特に、組成物が冷凍の形態である実施態様)において、多価アニオンとカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1:2(好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約1.00または少なくとも約4:3)であり、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約1 mg/l～約50 mg/lである。第一の態様のある実施態様(特に、組成物が液体形態である実施態様)において、多価アニオンとカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1:2(好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約1.00または少なくとも約4:3)であり、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約10 mg/l～約100 mg/lである。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸およびクエン酸からなる群から選択される。

20

30

【0032】

第一の態様のある実施態様において、多価アニオンは、線形無機ポリリン酸、特に三リン酸である無機ポリリン酸であり、無機ポリリン酸とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1:2、好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約1.00または少なくとも約4:3である。第一の態様のいくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸は線形無機ポリリン酸(特に三リン酸)であり、無機ポリリン酸とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約1:2(好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約1.00または少なくとも約4:3)であり、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約1 mg/l～約100 mg/l(例えば、1 mg/l～約50 mg/lまたは約10 mg/l～約100 mg/lである)。第一の態様のある実施態様(特に、組成物が凍結形態である実施態様)において、無機ポリリン酸は線形無機ポリリン酸(特に三リン酸)であり、無機ポリリン酸とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約1:2(好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約1.00または少なくとも約4:3)であり、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約1 mg/l～約50 mg/lである。第一の態様のある実施態様(特に、組成物が液体形態である実施態様)において、無機ポリリン酸は線形無機ポリリン酸であり(特に三リン酸)、無機ポリリン酸とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約1:2(好ましくは少なくとも約2:3

40

50

、例えば少なくとも約 1.00 または少なくとも約 4 : 3) であり、組成物中の核酸 (特に RNA) の濃度は約 10 mg/l ~ 約 100 mg/l である。

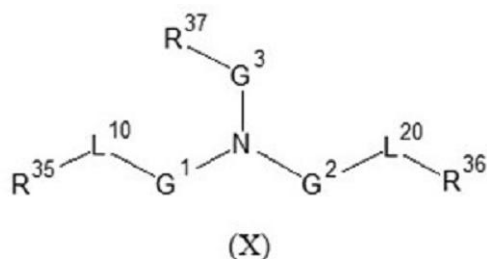
【0033】

第一の態様のある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、少なくとも 1 つの第 3 級アミン部分を含む頭基を含む。

【0034】

第一の態様のある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、式 (X)

【化 1】



10

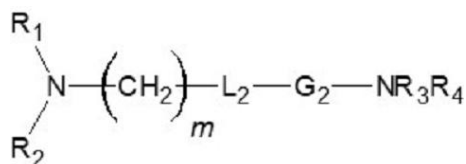
の構造を有するかまたはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、ここで、 L^{10} 、 L^{20} 、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 R^{35} 、 R^{36} および R^{37} は、本明細書において定義されるとおりである。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 X-1 ~ X-36 (本明細書に示す) ; 構造 A ~ G (本明細書に示す) ; または N, N-ジメチル-2, 3-ジオレイルオキシプロピルアミン (DODMA)、1, 2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン (DODAP)、ヘプタトリアコンター-6, 9, 28.31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (DLin-MC3-DMA) および 4-((ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)アミノ)オキシ)-N, N-ジメチル-4-オキソブタン-1-アミン (DPL-14) から選択される。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 X-3 を有する脂質である。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は DPL-14 (すなわち、構造 G を有する脂質) である。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 D を有する脂質である。

20

【0035】

第一の態様のある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、式 (XI) :

【化 2】



30

の構造を有し、ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 L_2 、 G_2 および m は、本明細書において定義されるとおりである。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 (XIV-1)、(XIV-2)、および (XIV-3) (本明細書に示す) から選択される。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 XIV-1 を有する脂質である。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 XIV-2 を有する脂質である。ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 XIV-3 を有する脂質である。

40

【0036】

第一の態様のある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、カチオン性脂質で完全にまたは部分的に置換されている。ある実施態様において、カチオン性脂質は、構造 XV-1 ~ XV-6 (本明細書に示す) から選択される。カチオンのにイオン化可能な脂質がカチオン性脂質で完全に置換されているこれらの実施態様において、多価アニオン (無機ポリリン酸など) とカチオンのにイオン化可能な脂質とのモル比は、多価アニオン (

50

無機ポリリン酸など)とカチオン性脂質とのモル比に置き換えられる。ある実施態様において、多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオン性脂質とのモル比は、少なくとも約 1 : 2 (例えば、少なくとも約 0.55、少なくとも約 0.60、少なくとも約 0.65、少なくとも約 2 : 3、少なくとも約 0.7、少なくとも約 0.75、少なくとも約 0.80、少なくとも約 0.85、少なくとも約 0.90、少なくとも約 0.95、少なくとも約 1.00、少なくとも約 1.10、少なくとも約 1.20、少なくとも約 1.30、少なくとも約 4 : 3、少なくとも約 1.40、少なくとも約 1.50、少なくとも約 1.60、少なくとも約 1.70、少なくとも約 1.80、少なくとも約 1.90、または少なくとも約 2.0、好ましくは多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオン性脂質のモル比は少なくとも約 2 : 3、例えば少なくとも約 4 : 3 である)である。カチオンのイオン化可能な脂質がカチオン性脂質で部分的に置換されているこれらの実施態様において、多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、多価アニオン(無機ポリリン酸など)と、カチオン性脂質とカチオンのイオン化可能な脂質の合計とのモル比に置き換えられる。したがって、ある実施態様において、多価アニオン(無機ポリリン酸など)と、カチオン性脂質とカチオンのイオン化可能な脂質の合計とのモル比は、少なくとも約 1 : 2 (例えば、少なくとも約 0.55、少なくとも約 0.60、少なくとも約 0.65、少なくとも約 2 : 3、少なくとも約 0.7、少なくとも約 0.75、少なくとも約 0.80、少なくとも約 0.85、少なくとも約 0.90、少なくとも約 0.95、少なくとも約 1.00、少なくとも約 1.10、少なくとも約 1.20、少なくとも約 1.30、少なくとも約 4 : 3、少なくとも約 1.40、少なくとも約 1.50、少なくとも約 1.60、少なくとも約 1.70、少なくとも約 1.80、少なくとも約 1.90、または少なくとも約 2.0、好ましくは多価アニオン(無機ポリリン酸など)と、カチオン性脂質とカチオンのイオン化可能な脂質の合計とのモル比は少なくとも約 2 : 3、例えば少なくとも約 4 : 3 である)である。

10

20

30

40

50

【0037】

第一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約 20 mol%~約 75 mol%、例えば約 40 mol%~約 70 mol%、約 45 mol%~約 65 mol%、または約 50 mol%~約 60 mol%を構成するか；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約 20 mol%~約 40 mol%、約 25 mol%~約 40 mol%、または約 25 mol%~約 35 mol%を構成する。カチオンのイオン化可能な脂質の一部または全部がカチオン性脂質で置換されているこれらの実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質とカチオン性脂質の合計に対して、カチオンのイオン化可能な脂質について上記で特定されたのと同じ範囲(例えば、約 20 mol%~約 75 mol%など)が適用されることが好ましい。

【0038】

第一の態様のある実施態様において、ステロイドはステロールを含む。第一の態様のいくつかの好ましい実施態様において、ステロイドはコレステロールを含むかまたはコレステロールである。

【0039】

第一の態様のある実施態様において、ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約 15 mol%~約 60 mol%、例えば、約 15 mol%~約 40 mol%、約 20 mol%~約 35 mol%、または約 20 mol%~約 30 mol%を構成するか；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約 35 mol%~約 60 mol%、約 40 mol%~約 60 mol%、または約 45 mol%~約 60 mol%を構成する。

【0040】

第一の態様のある実施態様において、中性脂質はリン脂質である。ある実施態様におい

て、リン脂質は、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、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびスフィンゴミエリンからなる群から選択される。ある実施態様において、リン脂質は、30℃より高いT_g値を有するリン脂質からなる群から選択される。ある実施態様において、リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、およびジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)からなる群から選択される。ある実施態様において、中性脂質はDSPCである。

【0041】

第一の態様のある実施態様において、中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約5mol%~約25mol%、例えば約15mol%~約25mol%または約17mol%~約21mol%を構成するか；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約5mol%~約15mol%または約7mol%~約14mol%を構成する。

10

【0042】

第一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20mol%~約70mol%を構成し；ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約15mol%~約60mol%を構成し；そして中性脂質(例えば、リン脂質)は、組成物中に存在する総脂質の約5mol%~約25mol%を構成する。

20

【0043】

第一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約40mol%~約70mol%、例えば約45mol%~約65mol%または約50mol%~約60mol%を構成する；ステロイド(好ましくはコレステロールである)は、組成物中に存在する総脂質の約15mol%~約40mol%、例えば約20mol%~約35mol%、または約20mol%~約30mol%を構成し；そして中性脂質(好ましくはリン脂質である)は、組成物中に存在する総脂質の約15mol%~約25mol%、例えば約17mol%~約21mol%を構成する。第一の態様の組成物のこれらの実施態様、すなわち、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない組成物は、血清の存在下で細胞をトランスフェクトするのに特に適している。これらの実施態様のいくつかでは、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

30

【0044】

イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない第一の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は最大2.5であり、好ましくは、前記比率は1~2.5である。したがって、第一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約40mol%~約70mol%(例えば、約45mol%~約65mol%、または約50mol%~約60mol%)を構成し；ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約15mol%~約40mol%(例えば、約20mol%~約35mol%、または約20mol%~約30mol%である)を構成し；中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約15mol%~約25mol%(例えば、約17mol%~約21mol%である)を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比は、最大2.5であり、好ましくは、前記比率は1~2.5である。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

40

【0045】

第一の態様のいくつかの別の実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20mol%~約40mol%、例えば約25mol%~約40mol%または約25mol%~約35mol%を構成する；ステロイド(好ましくはコレステロールである)は、組成物中に存在する総脂質の約35mol%~約60mol%、例えば約

50

40 mol%～約60 mol%または約45 mol%～約60 mol%を構成し；そして中性脂質（好ましくはリン脂質である）は、組成物中に存在する総脂質の約5 mol%～約15 mol%、例えば約7 mol%～約14 mol%を構成する。第一の態様の組成物のこれらの別の実施態様、すなわち、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い組成物は、血清の非存在下で細胞をトランスフェクトするのに特に適している。これらの実施態様のいくつかでは、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

【0046】

イオン化可能脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い第一の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは、前記比率は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。したがって、第一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20 mol%～約40 mol%（例えば、約25 mol%～約40 mol%、または約25 mol%～約35 mol%）を構成し；ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約35 mol%～約60 mol%（例えば、約40 mol%～約60 mol%、または約45 mol%～約60 mol%）を構成し；中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約5 mol%～約15 mol%（例えば、約7 mol%～約14 mol%）を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比は、少なくとも3.0であり、好ましくは、前記比は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

【0047】

第一の態様のある実施態様において、組成物はさらに、1つ以上のさらなる脂質を含む。例えば、1つ以上のさらなる脂質は、カチオン性脂質を含み得る。これらの実施態様において、カチオン性脂質が存在するとき、(1)カチオンのイオン化可能な脂質の量と(2)カチオン性脂質の量の合計が計算に使用される。例えば、組成物中のカチオンのイオン化可能な脂質の量が約20 mol%～約70 mol%であり、組成物がカチオン性脂質も含むならば、(1)カチオンのイオン化可能な脂質の量と(2)カチオン性脂質の量の合計は約20 mol%～約70 mol%となる。

【0048】

第一の態様のある実施態様において、組成物に含まれる脂質は、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質のみであり、特にカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよびリン脂質のみである。

【0049】

第一の態様のある実施態様において、組成物は、水相に分散した粒子を含み、ここで、粒子は、核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、ステロイドの少なくとも一部、および中性脂質の少なくとも一部を含み；そしてここで、多価アニオン（無機ポリリン酸など）の少なくとも一部が粒子と結合している。ある実施態様において、粒子は、脂質ナノ粒子(LNP)、リポソーム、リポプレックス(LPX)、およびそれらの混合物を含むかまたはそれらから選択される。ある実施態様において、粒子はLNPを含むかまたはLNPである。ある実施態様において、粒子はリポソームを含むかまたはリポソームである。ある実施態様において、粒子はLPXを含むか、LPXである。ある実施態様において、粒子はLNPとリポソームの混合物を含むかまたは該混合物である。ある実施態様において、粒子はLNPとLPXの混合物を含むかまたは該混合物である。ある実施態様において、粒子はLNPとリポソームとLPXの混合物を含むかまたは該混合物である。

【0050】

組成物が水相に分散した粒子を含む第一の態様のある実施態様において、粒子は、組成物中に存在する脂質、（特に、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質の全て）の本質的に全てを含む。

【0051】

組成物が水相に分散した粒子を含む第一の態様のある実施態様において、水相は、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を実質的に含まない(例えば、脂質を実質的に含まない)。

【0052】

組成物が水相に分散した粒子を含む第一の態様のある実施態様において、粒子は、組成物中に存在する核酸(特にRNA)の少なくとも50%(例えば、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%)を含む。ある実施態様において、粒子は組成物中に存在する核酸(特にRNA)の少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%を含む。

10

【0053】

組成物が水相に分散した粒子を含む第一の態様のある実施態様において、水相は、核酸を実質的に含まない。

【0054】

組成物が水相に分散した粒子を含む第一の態様のある実施態様において、核酸(RNAなど)は粒子内に封入されるか、または粒子と結合する。

【0055】

組成物が水相に分散した粒子を含む第一の態様のある実施態様において、組成物中に存在する多価アニオン(ポリリン酸など)の少なくとも10%(例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%)が粒子と結合する。ある実施態様において、組成物中に存在する多価アニオン(ポリリン酸など)の少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%が粒子と結合している。

20

【0056】

組成物が水相に分散した粒子を含む第一の態様のある実施態様において、粒子は約30nm~約500nmのサイズを有する。ある実施態様において、粒子は約50nm~約150nmのサイズを有する。

30

【0057】

第一の態様のある実施態様において、核酸はDNAである。

【0058】

第一の態様のある実施態様において、核酸はRNA、好ましくはmRNAまたは阻害性RNA、(例えばsiRNA)である。

【0059】

第一の態様のある実施態様において、核酸はRNA(mRNAなど)であり、(i)ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み；(ii)コドン最適化されているコード配列を有し；および／または(iii)野生型コード配列と比較してG/C含量が増加しているコード配列を有する。ある実施態様において、修飾ヌクレオシドは、シュードウリジン(ψ)、N1-メチルシュードウリジン(m1 ψ)、および5-メチルウリジン(m5U)から選択される。

40

【0060】

第一の態様のある実施態様において、核酸はRNA(mRNAなど)であり、次の少なくとも1つ以上を含む：5'キャップ；5'UTR；3'UTR；およびポリA配列。ある実施態様において、RNA(mRNAなど)は、次の全てを含む：5'キャップ；5'UTR；3'UTR；およびポリA配列。ある実施態様において、ポリA配列は少なくとも100個のAヌクレオチドを含み、ここで、ポリA配列は好ましくはAヌクレオチドの中断配列である。ある実施態様において、5'キャップはキャップ1またはキャップ2構造である。

50

【0061】

第一の態様のある実施態様において、核酸はRNA(mRNAなど)であり、1つ以上のポリペプチドをコードする。ある実施態様において、1つ以上のポリペプチドは、対象における抗原に対する免疫応答を誘導するための薬学的活性ポリペプチドであるおよび／またはエピトープを含む。

【0062】

第一の態様のある実施態様において、薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープは、病原体のタンパク質、タンパク質の免疫原性バリエーションまたはタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである。ある実施態様において、病原体は感染性疾患を引き起こす病原体である。

10

【0063】

第一の態様のある実施態様において、薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープは、SARS-CoV-2スパイク(S)タンパク質、その免疫原性バリエーション、またはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである。ある実施態様において、RNA(mRNAなど)は、SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーション、またはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。

【0064】

第一の態様のある実施態様において、核酸は阻害性RNA(siRNAなど)であり、標的mRNAに選択的にハイブリダイズするおよび／または特異的である。ある実施態様において、標的mRNAは、発現(特に、例えば、健常対象における発現と比較して増加した発現)が疾患と関連する薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。ある実施態様において、標的mRNAは、発現(特に、例えば、健常対象における発現と比較して増加した発現)ががんに関連する薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。

20

【0065】

第一の態様のある実施態様において、組成物は、好ましくは約2℃～約10℃の温度で、液体形態である。

【0066】

第一の態様のある実施態様において、好ましくは0℃以上、例えば約2℃～約8℃の温度で、少なくとも1週間保存後の組成物の核酸完全性(RNA完全性など)とは例えば免疫応答を誘導するための所望の効果が達成され得るようなものである。ある実施態様において、好ましくは0℃以上、例えば約2℃～約8℃の温度で、少なくとも1週間(例えば、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、または少なくとも6ヶ月)保存後の組成物の核酸完全性(RNA完全性など)は、保存前の核酸完全性と比較して、少なくとも90%である。ある実施態様において、好ましくは0℃以上、例えば約2℃～約8℃の温度で、少なくとも4週間保存後の組成物の核酸完全性(RNA完全性など)は、保存前の核酸完全性と比較して、少なくとも90%である。ある実施態様において、好ましくは0℃以上、例えば約2℃～約8℃の温度で、少なくとも3ヶ月保存後の組成物の核酸完全性(RNA完全性など)は、保存前の核酸完全性と比較して、少なくとも90%である。

30

40

【0067】

第一の態様のある実施態様において、組成物の最初の核酸完全性(最初のRNA完全性など)(すなわち、製造後であるが、保存前)は、少なくとも50%であり、好ましくは0℃以上、例えば約2℃～約8℃の温度で、少なくとも1週間(例えば、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、または少なくとも3ヶ月)保存後の組成物の核酸完全性(RNA完全性など)は、最初のRNA完全性の少なくとも90%である。

【0068】

50

これに加えてまたはこれとは別に、第一の態様のある実施態様において、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度での(例えば、少なくとも 1 週間)保存後の液体組成物の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI))は、例えば、免疫応答を誘導するための所望の効果が達成され得るようなものである。ある実施態様において、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度で、(例えば、少なくとも 1 週間)保存後の液体組成物の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI))は、最初の組成物、すなわち保存前の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／または PDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度で、少なくとも 1 週間(例えば、少なくとも 4 週間、または少なくとも 3 ヶ月)保存後の核酸粒子(RNA 粒子などの)のサイズ(Z 平均)は、約 50 nm～約 500 nm、好ましくは約 40 nm～約 200 nm、より好ましくは約 40 nm～約 120 nm である。ある実施態様において、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度で、少なくとも 1 週間(例えば、少なくとも 4 週間、または少なくとも 3 ヶ月)保存後の核酸粒子(RNA 粒子など)の PDI は、0.3 未満、好ましくは 0.2 未満、より好ましくは 0.1 未満である。ある実施態様において、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度で、少なくとも 1 週間(例えば、少なくとも 4 週間、または少なくとも 3 ヶ月)保存後の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)は、約 50 nm～約 500 nm、好ましくは約 40 nm～約 200 nm、より好ましくは約 40 nm～約 120 nm であり、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度で、少なくとも 1 週間(例えば、少なくとも 4 週間、または少なくとも 3 ヶ月)の液体組成物の保存後の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／または PDI)は、保存前の核酸粒子(RNA 粒子などの)のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／または PDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度で、少なくとも 1 週間(例えば、少なくとも 4 週間、または少なくとも 3 ヶ月)の液体組成物の保存後の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)は、約 50 nm～約 500 nm、好ましくは約 40 nm～約 200 nm、より好ましくは約 40 nm～約 120 nm であり、好ましくは 0℃以上、例えば約 2℃～約 8℃の温度で、例えば 0℃以上で、少なくとも 1 週間(例えば、少なくとも 4 週間、または少なくとも 3 ヶ月)の液体組成物の保存後の核酸粒子(RNA 粒子など)の PDI は、0.3 未満(好ましくは 0.2 未満、より好ましくは 0.1 未満)である。

【0069】

第一の態様のある実施態様において、組成物は(例えば、-20℃での)凍結形態である。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸完全性(RNA 完全性など)は、組成物凍結前の核酸完全性(RNA 完全性など)と比較して、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または実質的に 100%である。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA 粒子など)、特に LNP のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI)は、組成物凍結前の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／または PDI と本質的に等しい。

【0070】

第一の態様のある実施態様において、組成物の最初の核酸完全性(最初の RNA 完全性など)(すなわち、製造後であるが、凍結前)は少なくとも 50%であり、凍結組成物解凍後の組成物の核酸完全性(RNA 完全性など)は、最初の核酸完全性(最初の RNA 完全性など)の少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 95%、より好ましくは少なくとも 97%、さらにより好ましくは少なくとも 98%、さらにより好ましくは実質的に 100%である。

【0071】

これに加えてまたはこれとは別に、第一の態様のある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA 粒子など)のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／

または多分散性指数(PDI)は、組成物凍結前の核酸粒子(RNA粒子など)のサイズ(Z平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA粒子など)のサイズ(Z平均)は、約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmである。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA粒子など)のPDIは0.3未満、好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満である。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA粒子など)のサイズ(Z平均)は、約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmであり、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA粒子のような)のサイズ(Z平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)は、凍結前の核酸粒子(RNA粒子など)のサイズ(Z平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA粒子など)のサイズ(Z平均)は、約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmであり、凍結組成物解凍後の核酸粒子(RNA粒子など)のPDIは0.3未満である(好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満)である。

10

20

30

40

50

【0072】

第一の態様のある実施態様において、1回の凍結／解凍サイクル後、好ましくは2回の凍結／解凍サイクル後、より好ましくは3回の凍結／解凍サイクル後、さらにより好ましくは4回の凍結／解凍サイクル後、さらにより好ましくは5回以上の凍結／解凍サイクル後の組成物の核酸粒子のサイズ(RNA粒子など)および核酸完全性(RNA完全性など)は、最初の組成物の核酸粒子のサイズ(RNA粒子など)および核酸完全性(RNA完全性など)(すなわち、組成物が最初に凍結される前)と本質的に等しい。

【0073】

第二の態様において、本開示は、最終水相に分散した粒子を含む組成物を製造する方法を提供し、ここで、組成物は、(i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)を含み；粒子が、核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、およびステロイドの少なくとも一部を含み；多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも一部が粒子と結合し；そして、最終水相が最終緩衝系を含み；ここで、該方法は、

(I)最終水相に分散した粒子を含む製剤であって、ここで、粒子が核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、ステロイドの少なくとも一部、および中性脂質の少なくとも一部を含み、多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも一部が粒子と結合している製剤を製造し；そして

(II)任意選択的に、製剤を約-10℃以下に凍結させ、

これにより組成物を得ることを含む方法であって、

ここで、工程(I)は、

(a)水および第一緩衝系を含む核酸溶液を準備し(例えば、製造し)；

(b)カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を含む有機溶液を準備し(例えば、製造し)；

(c)(a)の下に準備した核酸溶液と(b)の下に準備した有機溶液を混合し、それにより第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤を製造し；

(d)(c)の下に製造した第一中間製剤と多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩を混合し、それにより第二緩衝系を含む第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも一部が粒子と結合しており；そして

(e)最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて、(d)の下に製造した第二中間製剤を濾過(例えば、透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーション)および／または希釈し、

それにより、最終水相に分散した粒子を含む製剤を製造することを含む。

【0074】

本出願において示されるとおり、本出願の方法を用いることにより、最終水相に分散した粒子を含む組成物を製造でき、ここで、組成物は、(i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)を含み；そして、粒子が、核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、およびステロイドの少なくとも一部を含み、ここで、組成物／粒子がPEG脂質または任意の他のステルス脂質(ポリマーコンジュゲート脂質)を含む／含まないときであっても、多価アニオン(無機ポリリン酸など)の存在により、粒子の凝集が防止され得る。さらに、本出願は、驚くべきことに、本出願の方法を用いることにより、特に脂質の量を互いに調整することにより、種々の生物学的性能を示す核酸(RNAなど)組成物を得ることが可能であることを実証している：細胞のトランスフェクションに使用する

10

とき、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない核酸組成物は、血清の存在下でトランスフェクションを行ったとき、血清の非存在下でトランスフェクションを行ったときに得られる発現と比較して、トランスフェクションされた細胞における核酸の高い発現をもたらす(これらの組成物は、PEG脂質を含む標準的な核酸組成物に類似している)。対照的に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多く、細胞のトランスフェクションに使用される核酸組成物は、血清の存在下でトランスフェクションを行ったとき、トランスフェクトされた細胞における核酸の発現が同等または減少する(すなわち、これらの組成物は、血清阻害をいくらか示すかまたは全く示さないが、血清刺激を示さない)。

【0075】

20

第二の態様の方法による工程(c)～(e)の例示的なフローチャートを図1Aに示す。まず、水性核酸溶液(第一緩衝系、例えば、約6.0未満のpH、例えば約3.5～約5.9のpHを有する緩衝系を含む)を、有機(例えば、エタノール)脂質溶液(図1Aにおける「有機溶液中の脂質」)と混合し、それにより、第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤が形成される。その後、第一中間製剤を多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩と混合し、それにより、第二緩衝系を含む第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも一部が粒子と結合する。次いで、第二中間製剤を濾過し(例えば、タンジェンシャルフロー濾過および／またはダイアフィルトレーションを使用する)、および／または最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて希釈し、それにより、最終水相に分散した粒子を含む製剤を製造する。例えば、第二中間製剤から望まない化合物(例えば、有機溶媒(エタノールなど)、および／または1つ以上の一塩基性有機酸、二塩基性有機酸および／または多塩基性有機酸、および任意選択的に、pHを6.0未満に維持するために使用されるそれぞれの対カチオン)を除去するため、および／または核酸(RNAなど)濃度を増加させるため、および／またはpHを変えるため、および／または緩衝系を最終緩衝系に変えるために、第二中間製剤を濾過する。

30

【0076】

第二の態様のある実施態様において、工程(d)は、工程(c)の最大約20分後に実施される。ある実施態様において、工程(d)は、工程(c)の最大約19分後(例えば、最大約18分後、最大約17分後、最大約16分後、最大約15分後、最大約14分後、最大約13分後、最大約12分後、最大約11分後、最大約10分後、最大約9分後、最大約8分後、最大約7分後、最大約6分後、または最大約5分後)に実施される。

40

【0077】

第二の態様のある実施態様において、工程(I)は、工程(c)および／または工程(d)および／または工程(e)の後(好ましくは、工程(d)および／または工程(e)の後のみ)に、希釈および濾過、例えば透析、タンジェンシャルフロー濾過およびダイアフィルトレーションから選択される1つ以上の任意のプロセッシング工程をさらに含む。例えば、希釈工程は、中間製剤に希釈溶液(例えば、水)を添加することを含む。このような希釈溶液は、1つ以上の付加的化合物(例えば、抗凍結剤)および任意選択的に緩衝系(例えば、最終緩衝系)を含み得る。希釈工程は、中間製剤中の望まない化合物(例えば、有機溶媒(エタノー

50

ルなど)および／または1つ以上の二塩基性有機酸および／または多塩基性有機酸)を希釈するため、および／またはpHを変えるため、および／または緩衝系を変えるため、および／または1つ以上の付加的化合物(例えば、抗凍結剤)を添加するために実施され得る。1つ以上の濾過工程(本明細書で特定される工程(e)、(h')、(i')および(j'))を含む)は、中間製剤から望まない化合物(例えば、有機溶媒(エタノールなど)および／または1つ以上の二塩基性有機酸および／または多塩基性有機酸)を除去するため、および／または中間製剤の核酸(RNAなど)濃度を増加させるため、および／またはpHを変えるため、および／または中間製剤の緩衝系を変えるために使用され得る。この目的のために、望まない化合物を含まない(望まない化合物が中間製剤から水性緩衝液に濾過または洗い流されるようにする)および／または水性緩衝液と比較して高張である(水が中間製剤から水性緩衝液に流れるようにする)および／または中間製剤のpHおよび／または緩衝系と異なるpHおよび／または緩衝系を有する水性緩衝液を使用できる。

10

【0078】

第二の態様のある実施態様において、工程(a)は、(a')水性核酸溶液を準備すること；(b')第一緩衝系を含む第一水性緩衝液を準備すること；および(c')(a')の下に準備した水性核酸溶液と(b')の下に準備した第一水性緩衝液を混合し、それにより水および第一緩衝系を含む核酸溶液を準備する(例えば、製造する)ことを含む。

【0079】

第二の態様のある実施態様において、有機溶媒は、低級アルコール、例えば最大6個の炭素原子を有するアルコール(特に脂肪族アルコール)、およびこれらのアルコールの2つ以上の混合物から選択される有機溶媒を含む。好ましい実施態様において、有機溶媒は水と完全に混和する。ある実施態様において、有機溶媒は、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、1,2-プロパンジオール、およびこれらのアルコールの2つ以上の混合物からなる群から選択される。

20

【0080】

第二の態様のある実施態様において、工程(I)は、
 (a')水性核酸溶液を準備し；
 (b')第一緩衝系を含む第一水性緩衝液を準備し；
 (c')(a')の下に準備した水性核酸溶液と(b')の下に準備した第一水性緩衝液を混合し、それにより水および第一緩衝系を含む核酸溶液を製造し；
 (d')カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を含む有機溶液を準備し(例えば、製造し)；
 (e')(c')の下に製造した核酸溶液と(d')の下に準備した(例えば、製造した)有機溶液を混合し、それにより第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤を製造し；
 (f')任意選択的に、水またはさらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を用いて、(e')の下に製造した第一中間製剤を希釈し、それにより第一緩衝系またはさらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここで、さらなる水性緩衝液は第一水性緩衝液と同一でも異なってもよく；
 (g')工程(f')が存在しないならば工程(e')で得た第一中間製剤、または工程(f')が存在するならば工程(f')で得たさらなる中間製剤と多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩(本明細書において特定される)を混合し、それにより第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも一部が粒子と結合しており；
 (h')任意選択的に、さらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を用いて、(g')の下に製造した第二の第一中間製剤を濾過し、それにより、さらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここで、さらなる水性緩衝液は、第一および／または第二水性緩衝液と同一でも異なってもよく；
 (i')任意選択的に、工程(h')を1回、2回またはそれ以上繰り返し、ここで、1サイクルの工程(h')の後に得たさらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさら

30

50

なる中間製剤を次のサイクルの第二中間製剤として使用し、ここで、各サイクルにおいて、さらなる水性緩衝液は第一および／または第二水性緩衝液と同一でも異なってもよく；
(j')工程(h')が存在しないならば工程(g')で得た第二中間製剤、または工程(h')が存在して工程(i')が存在しないならば工程(h')で得たさらなる中間製剤、または工程(h')および(i')が存在するならば工程(i')の後に得たさらなる中間製剤を、最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて濾過し；そして

(k')任意選択的に、工程(j')で得た製剤を希釈溶液で希釈し；
それにより最終水相に分散した粒子を含む製剤を製造することを含む。

【0081】

第二の態様のこれらの実施態様による工程(e')、(g')、および(j')の例示的なフロー10
チャートを図1Bに示す(また任意のプロセッシング工程(f')、(h')、(i')、および(k')
も示す)。まず、工程(e')において、水性核酸溶液(第一緩衝系、例えば、約6.0未満の
pH、例えば約3.5～約5.9のpHを有する緩衝系を含む)と有機脂質溶液を混合し、
それにより、第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤を形成する。
その後、任意選択的に、第一中間製剤を(f')水またはさらなる緩衝系を含むさらなる水
性緩衝液を用いて希釈し、それにより、第一またはさらなる緩衝系を含むさらなる水相に
分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここで、さらなる水性緩衝液は、第一水
性緩衝液と同一でも異なってもよい。任意の工程(f')は、第一中間製剤中の望まない化
合物(例えば、有機溶媒(エタノールなど)および／または1つ以上の二塩基性有機酸およ
び／または多塩基性有機酸)を希釈するため、および／またはpHを変えるため、および 20
／または緩衝系を変えるために実施でされ得る。具体的な実施態様において、工程(f')
は、第一中間製剤のpHを7～9、好ましくは7.5～8.5、さらに好ましくは7.5～
8.0のpHに変えるために使用される。次いで、工程(g')において、(工程(f')が存在
しないならば)第一中間製剤または(工程(f')が存在するならば)それぞれのさらなる中間
製剤と多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩を混合し、それにより、第二緩衝
系を含む第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、多価アニオン(
無機ポリリン酸など)の少なくとも一部が粒子と結合している。次いで、任意選択的に、
第二中間製剤を(h')さらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を用いて濾過(例えば、透
析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーション)し、それにより、さ
らなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここ 30
で、さらなる水性緩衝液は、第一および／または第二水性緩衝液と同一でも異なってもよ
く；そして任意選択的に、(i')の下に、工程(h')を1回、2回またはそれ以上繰り返す
。任意の工程(h')および(i')は、第二中間製剤から望まない化合物(例えば、有機溶媒(
エタノールなど)および／または1つ以上の一塩基性、二塩基性、および／または多塩基
性有機酸、ならびに任意選択的にそれぞれの対カチオン)を除去するため、および／また
は核酸(RNAなど)濃度を増加させるため、および／またはpHを変えるため、および／
または緩衝系を変えるために実施できる。次いで、工程(j')において、(工程(h')が存
在するならば)第二中間製剤または(工程(h')があるか、または工程(h')および(i')の両
方が存在するならば)それぞれのさらなる中間製剤を、最終緩衝系を含む最終水性緩衝液
を用いて濾過(例えば、透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルタレーシ 40
ョン)する。工程(j')は、中間製剤から望まない化合物(例えば、有機溶媒(エタノールな
ど)、および／または1つ以上の一塩基性、二塩基性、および／または多塩基性有機酸、
および任意選択的にそれらのそれぞれの対カチオン)を除去するため、および／または核
酸(RNAなど)濃度を増加させるため、および／またはpHを変えるため、および／また
は緩衝系を最終緩衝系に変えるために実施される。任意選択的に、工程(k')において、(
例えば、抗凍結剤を添加するために)工程(j')で得られた製剤を希釈液で希釈する。

【0082】

第二の態様のある実施態様において、工程(f')は、第一中間製剤のpHを7～9、好
ましくは7.5～8.5、さらに好ましくは7.5～8.0のpHに変えるために使用され、
工程(e')の後遅くとも12時間以内、好ましくは4時間以内、より好ましくは30分以 50

内に実施される。第二の態様の具体的な実施態様において、工程(f')は第一中間製剤のpHをpH 7~9に変えるために使用され、次いで工程(g')で多価アニオンを添加し、工程(f')と(g')を合わせた持続時間は、工程(e')の後12時間以下、好ましくは4時間以下、より好ましくは30分以下である。

【0083】

第二の態様のある実施態様において、工程(g')は、工程(e')の最大約20分後に実施される。ある実施態様において、工程(g')は、工程(e')の最大約19分後(例えば、最大約18分後、最大約17分後、最大約16分後、最大約15分後、最大約14分後、最大約13分後、最大約12分後、最大約11分後、最大約10分後、最大約9分後、最大約8分後、最大約7分後、最大約6分後、または最大約5分後)に実施される。

10

【0084】

第二の態様のある実施態様において、工程(f')は存在せず、工程(g')は工程(e')の最大約20分後に実施される。ある実施態様において、工程(g')は、工程(e')の最大約19分後(例えば、最大約18分後、最大約17分後、最大約16分後、最大約15分後、最大約14分後、最大約13分後、最大約12分後、最大約11分後、最大約10分後、最大約9分後、最大約8分後、最大約7分後、最大約6分後、または最大約5分後)に実施される。

【0085】

第二の態様のある実施態様において、工程(f')は存在しない。第二の態様のこれらの実施態様による(すなわち、工程(f')が存在しない)工程(e')、(g')、および(j')の例示的なフローチャートを図1Cに示す(任意のプロセッシング工程(h')、(i')および(k')も示す)。これらの実施態様は、工程(g')が工程(e')の最大約20分後に実施されるときに特に好ましい。

20

【0086】

第二の態様のある実施態様において、工程(f')が存在する。

【0087】

第二の態様のある実施態様において、工程(e')で準備した有機溶液は、低級アルコール、例えば、最大6個の炭素原子を有するアルコール(特に脂肪族アルコール)およびそれらの混合物(例えば、これらのアルコールの2つ以上の混合物)から選択される有機溶媒を含む。好ましい実施態様において、有機溶媒は水と完全に混和する。ある実施態様において、有機溶媒は、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、1,2-プロパンジオール、およびこれらのアルコールの2つ以上の混合物からなる群から選択される。

30

【0088】

第二の態様のある実施態様において、多価アニオンまたはその塩は、無機リン酸、硫酸、亜硫酸、ピロ硫酸、ジチオン酸、亜ジチオン酸、メタ重亜硫酸、チオ硫酸、トリチオン酸、テトラチオン酸、またはその塩である。ある実施態様において、多価アニオンは、無機リン酸(例えば、 PO_4^{3-})である。

【0089】

第二の態様のある実施態様において、多価アニオンまたはその塩は、ジカルボン酸(例えば、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、セバシン酸、フタル酸、イソフタル酸またはテレフタル酸)、置換ジカルボン酸(例えば、タルトロン酸、メソシュウ酸、リンゴ酸、酒石酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒドロキシグルタル酸またはサッカリン酸)、またはその塩である。

40

【0090】

ある実施態様において、多価アニオンまたはその塩は、トリカルボン酸(例えば、クエン酸、イソクエン酸、プロパン-1,2,3-トリカルボン酸またはトリメシン酸)、またはその塩である。

【0091】

第二の態様のいくつかの好ましい実施態様において、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸(例えば、 PO_4^{3-})、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸

50

、リンゴ酸、クエン酸、それらの塩、またはそれらの混合物からなる群から選択される。ある実施態様において、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、クエン酸、またはその塩である。

【0092】

第二の態様の最も好ましい実施態様において、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸またはその塩である。

【0093】

多価アニオンまたはその塩が無機ポリリン酸またはその塩である第二の態様のある実施態様において、無機ポリリン酸またはその塩は、任意の線形、環状、または分岐の無機ポリリン酸またはその塩であり得る。第二の態様のある実施態様において、無機ポリリン酸またはその塩は、線形無機ポリリン酸(線形無機三リン酸など)またはその塩である。

10

【0094】

多価アニオンまたはその塩が無機ポリリン酸またはその塩である第二の態様のある実施態様において、無機ポリリン酸またはその塩は、式 $[P_x O_{(3x+1)}] M_y$ (式中、 x は整数であり、少なくとも2であり、好ましくは少なくとも3であり；各Mは独立して、 H^+ またはカチオンであり；そして y は、電荷平衡化に必要なカチオンの数である。) を含むかまたはそれを有する。Mは1種類のみ(例えば、 Na^+ のみ)であってよく、または2種類以上(例えば、 Na^+ と K^+ の混合物、または Na^+ と H^+ の混合物、または Na^+ 、 K^+ および H^+ の混合物)であってよい。ある実施態様において、各Mは、 H^+ 、アルカリカチオン(例えば、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+)、アンモニウム(すなわち、 NH_4^+)、および単価の有機カチオン(例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミンなどの単価の有機アミン)からなる群から独立して選択される。ある実施態様において、各Mは、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、および NH_4^+ からなる群から独立して選択される。例えば x が3であるならば、無機ポリリン酸またはその塩は線形無機三リン酸または式 $[P_3 O_{10}] M_y$ (例えば $[P_3 O_{10}] Na_5$ を含むかもしくは有する塩である。同様に、 x が4であるならば、無機ポリリン酸またはその塩は、線形もしくは分岐の無機四リン酸または式 $[P_4 O_{13}] M_y$ (例えば $[P_4 O_{13}] Na_6$ または $[P_4 O_{13}] Na_4 K_2$) を含むかもしくは有するその塩である。

20

【0095】

多価アニオンまたはその塩が無機ポリリン酸またはその塩である第二の態様のある実施態様において、無機ポリリン酸またはその塩は、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択され、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。第二の態様のいくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸またはその塩は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択される。第二の態様のいくつかの好ましい実施態様では、無機ポリリン酸またはその塩は、三リン酸またはその塩である。

30

【0096】

第二の態様のある実施態様において、(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1:2である。例えば、(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約0.55、少なくとも約0.60、少なくとも約0.65、少なくとも約2:3、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.80、少なくとも約0.85、少なくとも約0.90、少なくとも約0.95、少なくとも約1.00、少なくとも約1.10、少なくとも約1.20、少なくとも約1.30、少なくとも約4:3、少なくとも約1.40、少なくとも約1.50、少なくとも約1.60、少なくとも約1.70、少なくとも約1.80、少なくとも約1.90、または少なくとも約2.0であり得る。第二の態様のいくつかの好ましい実施態様において、(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質のモル比は、少なくとも約2:3である。第二の態様のいくつかの好ましい実施態様では、(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)と

40

50

(ii) カチオンのイオン化可能な脂質のモル比は、少なくとも約 4 : 3 である。

【0097】

第二の態様のある実施態様において、特に凍結形態の組成物を製造することが所望されるならば、第二の態様の方法は(II)製剤を約 -10°C 以下に凍結することを含む。したがって、これらの実施態様において、第二の態様の方法を実施すると、凍結形態の組成物が得られる。

【0098】

いくつかの別の実施態様において、特に液体形態の組成物を製造することが所望されるならば、第二の態様の方法は工程(II)を含まない。したがって、これらの実施態様において、第二の態様の方法を実施すると、液体形態の組成物が得られる。

10

【0099】

第二の態様のある実施態様において、それぞれ(b)または(d')の下に準備した(例えば、製造した)有機溶液は、さらに酸を含む。ある実施態様において、酸は、無機酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、または硝酸などの一塩基無機酸)または有機酸(例えば、一塩基性有機酸、二塩基性有機酸、または多塩基性有機酸、例えば、モノカルボン酸(酢酸、プロピオン酸、または乳酸など)、ジカルボン酸(シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、またはリンゴ酸など)、またはポリカルボン酸(クエン酸、イソクエン酸、トリメシン酸など))である。いくつかの好ましい実施態様において、酸は一塩基酸、例えば一塩基無機酸(塩酸など)または一塩基性有機酸(酢酸など)である。

20

【0100】

第二の態様のある実施態様において、組成物は、ポリエチレングリコール(PEG)を含む脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、組成物はPEGを含む化合物を実質的に含まない。ある実施態様において、組成物は実質的にPEGを含まない。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、クエン酸、およびそれらの塩からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかでは、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸またはその塩である。

30

【0101】

第二の態様のある実施態様において、組成物はまた、別のポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、別のポリマーコンジュゲート脂質はポリサルコシンコンジュゲート脂質である。したがって、ある実施態様において、組成物はPEG脂質を実質的に含まず、ポリサルコシンコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、組成物は実質的にあらゆるポリマーコンジュゲート脂質を含まない。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、クエン酸、およびそれらの塩からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかでは、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸またはその塩である。

40

【0102】

第二の態様のある実施態様において、最終的な緩衝系のpH(および組成物のpH)は、約4.0~約8.0である。例えば、最終的な緩衝系のpH(および組成物のpH)は、約4.5~約8.0、例えば約5.0~約8.0、約5.5~約8.0、約6.0~約8.0、約6.5~約8.0、約6.8~約7.9、約7.0~約7.8または約7.5であり得る。

【0103】

第二の態様のある実施態様において、第一緩衝系(および工程(a)または(c')で準備した/得た核酸(RNAなど)溶液のpH)は、6.0未満のpHを有し、好ましくは最大約5

50

.5、例えば最大約5.0、最大約4.9、最大約4.8、最大約4.7、最大約4.6、または最大約4.5のpHを有する。例えば、第一緩衝系のpH(および工程(a)または(c'))で準備した／得た核酸(RNAなど)溶液のpHは、約3.5～約5.9、例えば約4.0～約5.5、または約4.5～約5.0であり得る。この目的のために、工程(a)または(c')で準備した／得た核酸(RNAなど)溶液は、(例えば、無機酸(塩酸、臭化水素酸、または硝酸など)および有機酸(例えば、一塩基性有機酸、二塩基性有機酸または多塩基性有機酸、例えば、モノカルボン酸(酢酸、プロピオン酸または乳酸など)、ジカルボン酸(シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、またはリンゴ酸など)またはポリカルボン酸(クエン酸、イソクエン酸またはトリメシクエン酸など))から選択される)1つ以上の酸を含む。いくつかの好ましい実施態様において、酸は一塩基酸、例えば一塩基無機酸(塩酸など)または一塩基性有機酸(酢酸など)である。ある実施態様において、工程(e)は、1つ以上の望まない物質(例えば、有機溶媒(エタノールなど)および／または1つ以上の酸)を除去する条件下で実施されることが好ましく、その結果、最終水相に分散した粒子を含む製剤が得られ、最終水相はそのような1つ以上の望まない物質を実質的に含まない。例えば、このような条件は、工程(d)で得た中間水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を、最終緩衝系(すなわち、最終緩衝物質)を含む最終緩衝液を使用する少なくとも1つの工程の濾過、例えば透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーションに付すことを含み得て、ここで、最終緩衝液は1つ以上の望まない物質を含まない。あるいは、このような条件は、(1)工程(d)で得た第二中間水相に分散した粒子を含む中間製剤(すなわち、第二中間製剤)を、水またはさらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を使用する、少なくとも1つの工程の希釈に付し、それにより第一緩衝系もしくはさらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し(ここで、さらなる水性緩衝液のさらなる緩衝系は工程(a)で使用した緩衝系と同一でも異なってもよい)；そして(2)工程(1)で得たさらなる中間製剤を、最終水性緩衝液を使用する少なくとも1つの工程の濾過、例えば透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーションに付すこと(ここで、少なくとも最終水性緩衝液(好ましくは、中間水性緩衝液と最終水性緩衝液)は、1つ以上の望まない物質を含まない)を含み得る。

10

20

【0104】

同様に、第二の態様のある実施態様において、工程(I)が工程(a')～(e')、(g')および(j')(ならびに任意選択的に工程(f')、(h')、(i')、および(k')の1つ以上)を含むとき、第一水性緩衝液(および工程(c')の下に得た核酸(RNAなど)溶液のpH)は、6.0未満、好ましくは最大約5.5、例えば最大約5.0、最大約4.9、最大約4.8、最大約4.7、最大約4.6、または最大約4.5のpHを有する。例えば、第一水性緩衝液のpH(および工程(c')の下に得た核酸(RNAなど)溶液のpH)は、約3.5～約5.9、例えば約4.0と～約5.5、または約4.5～約5.0であり得る。この目的のために、(b')の下に準備した第一水性緩衝液(および第一水相)が、1つ以上の酸(例えば、1つ以上の一塩基酸、二塩基酸または多塩基酸)をさらに含み得る。これらの実施態様において、工程(f')～(j')の少なくとも1つを、1つ以上の望まない物質(例えば、有機溶媒(エタノールなど)および／または1つ以上の一塩基酸、二塩基酸または多塩基酸)を第一中間製剤および／または第二中間製剤および／またはさらなる中間製剤から除去する条件下に実施し、さらなる水相または最終水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤をもたらすのが好ましく、さらなる水相および／または最終水相は、1つ以上の望まない物質を実質的に含まない。例えば、このような条件は、さらなる水性緩衝液および／または最終緩衝液を使用することを含み得て、ここで、さらなる水性緩衝液および最終緩衝液の少なくとも1つ(好ましくはさらなる水性緩衝液および最終緩衝液の全て)は、1つ以上の望まない物質を含まない。ある実施態様において、濾過工程は、透析、タンジェンシャルフロー濾過およびダイアフィルトレーションから独立して選択され得て、好ましくは透析およびタンジェンシャルフロー濾過から選択され得る。

40

【0105】

50

第二の態様のある実施態様において、工程(a)で使用する第一緩衝系は工程(e)で使用する最終緩衝物質を含み、好ましくは工程(a)で使用する第一緩衝系の緩衝系およびpHは工程(e)で使用する最終水性緩衝液の緩衝系およびpHと同一である。例えば、第二の態様のこの実施態様において、1つのみの水性緩衝液を使用する。このような場合、第二中間製剤のpHは、多価アニオン(無機ポリリン酸など)をそれぞれの対カチオンと組み合わせて添加することで調整され得る。例えば、第二中間製剤のpHは、三リン酸五ナトリウム、二リン酸四ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムまたはクエン酸三ナトリウムの溶液を添加することによって到達され得る。

【0106】

同様に、第二の態様のある実施態様において、工程(I)が工程(a')~(e')、(g')および(j') (および任意選択的に工程(f')、(h')、(i')および(k')の1つ以上)を含むとき、第一緩衝系および工程(b')、(f')、(h')および(i')で使用する全てのさらなる緩衝系の各々は工程(j')で使用する最終緩衝物質を含み、好ましくは、第一水性緩衝液および工程(b')、(f')、(h')および(i')で使用する全てのさらなる水性緩衝液の各々の緩衝系およびpHは、最終水性緩衝液の緩衝系およびpHと同一である。ある実施態様において、例えば、均一な緩衝系(すなわち、方法において使用する第一緩衝系およびさらなる緩衝系の各々)は酢酸およびトリスーヒドロキシメチルアミノメタンを含み得て、ここで、酢酸は工程(a')~(d')において好ましく、トリスーヒドロキシメチルアミノメタンは工程(f')における多価アニオンの添加の前に、pH 7~9、好ましくはpH 7.5~8.5に到達する量で、(e')において添加される。別の例では、クエン酸とトリスーヒドロキシメチルアミノメタンからなる緩衝液の場合のように、多価アニオンが緩衝系の構成成分であり得て、ここで、クエン酸を0.1~2、好ましくは0.2~1当量のトリスーヒドロキシメチルアミノメタンと組み合わせて工程(a')~(d')で添加し、トリスーヒドロキシメチルアミノメタンを(e')でpH 7~9、好ましくは7.5~8.5に到達する量で添加し、工程(f')は水を添加するために使用されるかまたは存在しない。この例では、工程(e')および(f')で使用する材料を逆にして、工程(f')でトリスーヒドロキシメチルアミノメタン溶液を用いてpHを調整する前に、第一中間製剤を水で希釈してよい。第二の態様のある実施態様において、工程(I)で得た製剤および/または組成物は、抗凍結剤を含む。第二の態様のある実施態様において、工程(I)で得た製剤および/または組成物は、抗凍結剤を実質的に含まない。

【0107】

第二の態様のある実施態様において、製剤および/または組成物は主成分として水を含むおよび/または組成物に含まれる水以外の溶媒の総量は約1.0%(v/v)未満、例えば約0.5%(v/v)未満である。例えば、製剤および/または組成物に含まれる水の量は少なくとも50%(w/w)、例えば少なくとも55%(w/w)、少なくとも60%(w/w)、少なくとも65%(w/w)、少なくとも70%(w/w)、少なくとも75%(w/w)、少なくとも80%(w/w)、少なくとも85%(w/w)、少なくとも90%(w/w)、または少なくとも95%(w/w)であり得る。製剤および/または組成物が抗凍結剤を含むとき、製剤および/または組成物に含まれる水の量は少なくとも50%(w/w)、例えば少なくとも55%(w/w)、少なくとも60%(w/w)、少なくとも65%(w/w)、少なくとも70%(w/w)、少なくとも75%(w/w)、少なくとも80%(w/w)、少なくとも85%(w/w)、または少なくとも90%(w/w)であり得る。製剤および/または組成物は抗凍結剤を実質的に含まないとき、製剤および/または組成物中に含まれる水の量は少なくとも95%(w/w)であり得る。これに加えてまたはこれとは別に、組成物に含まれる水以外の溶媒の総量は約1.0%(v/v)未満、例えば約0.9%(v/v)未満、約0.8%(v/v)未満、約0.7%(v/v)未満、約0.6%(v/v)未満、約0.5%(v/v)未満、約0.4%(v/v)未満、約0.3%(v/v)未満、約0.2%(v/v)未満、約0.1%(v/v)未満、約0.05%(v/v)未満、約0.01%(v/v)未満または約0.005%(v/v)未満であり得る。これに関して、標準条件下で液体である抗凍結剤は、水以外の溶媒ではなく、抗凍結剤とみなすべきである。換言すると、組成

物に含まれる水以外の溶媒の総量は約1.0%(v/v)未満、例えば約0.5%(v/v)未満であり得る上記最適限界は標準条件下で液体である抗凍結剤には適用されない。

【0108】

第二の態様のある実施態様において、組成物の浸透圧は最大約 $1000 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である。ある実施態様において、組成物の浸透圧は最大約 $500 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、例えば最大約 $490 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $480 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $470 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $460 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $450 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $440 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $430 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $420 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $410 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $400 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $390 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $380 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $370 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $360 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $350 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $340 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $330 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $320 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $310 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ または最大約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である。組成物が抗凍結剤を含まないならば、組成物の浸透圧は $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 未満、例えば最大約 $250 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $200 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $150 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $50 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、最大約 $40 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ または最大約 $30 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ であり得る。組成物が抗凍結剤を含むならば、組成物の浸透圧の大部分は抗凍結剤によりもたらされるのが好ましい。例えば、抗凍結剤は組成物の浸透圧の少なくとも50%、例えば少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%をもたらし得る。

【0109】

第二の態様のある実施態様において、組成物中の核酸(RNAなど)の濃度は約 1 mg/l ～約 500 mg/l 、例えば約 1 mg/l ～約 100 mg/l である。ある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約 5 mg/l ～約 500 mg/l 、例えば約 10 mg/l ～約 400 mg/l 、約 10 mg/l ～約 300 mg/l 、約 10 mg/l ～約 200 mg/l 、約 10 mg/l ～約 150 mg/l または約 10 mg/l ～約 100 mg/l 、好ましくは約 10 mg/l ～約 140 mg/l 、より好ましくは約 20 mg/l ～約 130 mg/l 、より好ましくは約 30 mg/l ～約 120 mg/l である。ある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約 5 mg/l ～約 150 mg/l 、例えば約 10 mg/l ～約 140 mg/l 、約 20 mg/l ～約 130 mg/l 、約 25 mg/l ～約 125 mg/l 、約 30 mg/l ～約 120 mg/l 、約 35 mg/l ～約 115 mg/l 、約 40 mg/l ～約 110 mg/l 、約 45 mg/l ～約 105 mg/l 、または約 50 mg/l ～約 100 mg/l である。ある実施態様において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は、 1 mg/l ～約 50 mg/l 、または約 10 mg/l ～約 100 mg/l である。

【0110】

第二の態様のある実施態様(特に该方法が(II)製剤を約 -10°C 以下に凍結することを含み、したがって该方法により製造した組成物が凍結形態である実施態様)において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約 1 mg/l ～約 50 mg/l である。

【0111】

第二の態様のある実施態様(特に该方法が工程(II)を含まず、したがって该方法により製造した組成物が液体形態である実施態様)において、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約 10 mg/l ～約 100 mg/l である。

【0112】

第二の態様のある実施態様において、多価アニオンまたはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約1:2(好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約1.00または少なくとも約4:3)であり、組成物中の核酸(特にRNA)の濃度は約 1 mg/l ～約 100 mg/l (例えば 1 mg/l ～約 50 mg/l または約 10 mg/l

～約 100 mg/l)である。第二の態様のある実施態様(特に該方法が(II)製剤を約 -10℃以下に凍結することを含み、したがって該方法により製造した組成物が凍結形態である実施態様)において、多価アニオンまたはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約 1:2 (好ましくは少なくとも約 2:3、例えば少なくとも約 1.00 または少なくとも約 4:3 である)であり、組成物中の核酸(特に RNA)の濃度は約 1 mg/l～約 50 mg/l である。第二の態様のある実施態様(特に、該方法が工程(II)を含まず、したがって該方法により製造した組成物が液体形態である実施態様)において、多価アニオンまたはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約 1:2 (好ましくは少なくとも約 2:3、例えば少なくとも約 1.00 または少なくとも約 4:3 である)であり、組成物中の核酸(特に RNA)の濃度は約 10 mg/l～約 100 mg/l である。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、クエン酸、およびそれらの塩からなる群から選択される。

10

【0113】

第二の態様のある実施態様において、多価アニオンは無機ポリリン酸またはその塩である。ある実施態様において、無機ポリリン酸またはその塩は、本明細書で定義される線形無機ポリリン酸またはその塩(例えば線形三リン酸またはその塩)であり、無機ポリリン酸またはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約 1:2、好ましくは少なくとも約 2:3、例えば少なくとも約 1.00 または少なくとも約 4:3 である。第二の態様のいくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸またはその塩は線形無機ポリリン酸(特に三リン酸)またはその塩であり、無機ポリリン酸またはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約 1:2 (好ましくは少なくとも約 2:3、例えば少なくとも約 1.00 または少なくとも約 4:3)であり、組成物中の核酸(特に RNA)の濃度は約 1 mg/l～約 100 mg/l (例えば 1 mg/l～約 50 mg/l または約 10 mg/l～約 100 mg/l)である。第二の態様のある実施態様(特に該方法が(II)製剤を約 -10℃以下に凍結することを含み、したがって該方法により製造した組成物が凍結形態である実施態様)において、無機ポリリン酸は線形無機ポリリン酸(特に三リン酸)またはその塩であり、無機ポリリン酸またはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約 1:2 (好ましくは少なくとも約 2:3、例えば少なくとも約 1.00 または少なくとも約 4:3)であり、組成物中の核酸(特に RNA)の濃度は約 1 mg/l～約 50 mg/l である。第二の態様のある実施態様(特に該方法が工程(II)を含まず、したがって該方法により製造した組成物が液体形態である実施態様)において、無機ポリリン酸またはその塩は線形無機ポリリン酸(特に三リン酸)またはその塩であり、無機ポリリン酸またはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は少なくとも約 1:2 (好ましくは少なくとも約 2:3、例えば少なくとも約 1.00 または少なくとも約 4:3)であり、組成物中の核酸(特に RNA)の濃度は約 10 mg/l～約 100 mg/l である。

20

30

【0114】

第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、少なくとも 1 つの第 3 級アミン部分を含む頭基を含む。

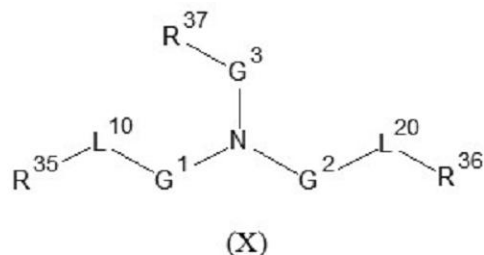
40

【0115】

第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、式(X)：

50

【化 3】

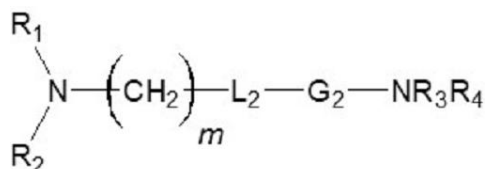


の構造を有するかまたはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体であり、ここで、 L^{10} 、 L^{20} 、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 R^{35} 、 R^{36} および R^{37} は、本明細書において定義されるとおりである。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は次のものから選択される：構造X-1～X-36(本明細書に示す)；および／または構造A～G(本明細書に示す)；および／またはN，N-ジメチル-2，3-ジオレイルオキシプロピルアミン(DODMA)、1，2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、ヘプタトリアコンタ-6，9，28.31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(DLin-MC3-DM A)、および4-((ジ((9Z，12Z)-オクタデカ-9，12-ジエン-1-イル)アミノ)オキシ)-N，N-ジメチル-4-オキソブタン-1-アミン(DPL-14)。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、構造X-3を有する脂質である。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、DPL-14(すなわち、構造Gを有する脂質)である。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、構造Dを有する脂質である。

【0116】

第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は式(XI)：

【化 4】



の構造を有し、ここで、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 L_2 、 G_2 および m は、本明細書において定義されるとおりである。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、構造(XIV-1)、(XIV-2)、および(XIV-3)(本明細書に示す)から選択される。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、構造XIV-1を有する脂質である。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、構造XIV-2を有する脂質である。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、構造XIV-3を有する脂質である。

【0117】

第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、カチオン性脂質で完全にまたは部分的に置換されている。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、構造XV-1～XV-6(本明細書に示す)から選択される。カチオンのイオン化可能な脂質がカチオン性脂質で完全に置換されているこれらの実施態様において、多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩とカチオン性脂質とのモル比に置き換えられる。ある実施態様において、多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩とカチオン性脂質とのモル比は、少なくとも約1：2(例えば少なくとも約0.55、少なくとも約0.60、少なくとも約0.65、少なくとも約2：3、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.80、少なくとも約0.85、少なくとも約

0.90、少なくとも約0.95、少なくとも約1.00、少なくとも約1.10、少なくとも約1.20、少なくとも約1.30、少なくとも約4:3、少なくとも約1.40、少なくとも約1.50、少なくとも約1.60、少なくとも約1.70、少なくとも約1.80、少なくとも約1.90、または少なくとも約2.0、好ましくは多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩とカチオン性脂質とのモル比は少なくとも約2:3、例えば少なくとも約4:3)である。カチオンのイオン化可能な脂質がカチオン性脂質で部分的に置換されているこれらの実施態様において、多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比は、多価アニオン(無機ポリリン酸など)と、カチオン性脂質とカチオンのイオン化可能な脂質の合計とのモル比に置き換えられる。ある実施態様において、多価アニオン(無機ポリリン酸など)と、カチオン性脂質とカチオンのイオン化可能な脂質の合計とのモル比は、少なくとも約1:2(例えば少なくとも約0.55、少なくとも約0.60、少なくとも約0.65、少なくとも約2:3、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.80、少なくとも約0.85、少なくとも約0.90、少なくとも約0.95、少なくとも約1.00、少なくとも約1.10、少なくとも約1.20、少なくとも約1.30、少なくとも約4:3、少なくとも約1.40、少なくとも約1.50、少なくとも約1.60、少なくとも約1.70、少なくとも約1.80、少なくとも約1.90、または少なくとも約2.0、好ましくは多価アニオン(無機ポリリン酸など)と、カチオン性脂質とカチオンのイオン化可能な脂質の合計とのモル比は少なくとも約2:3、例えば少なくとも約4:3)である。

10

20

30

40

50

【0118】

第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、有機溶液中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約20mol%~約75mol%、例えば約40mol%~約70mol%、約45mol%~約65mol%、または約50mol%~約60mol%；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約20mol%~約40mol%、約25mol%~約40mol%、または約25mol%~約35mol%を構成する。第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約20mol%~約75mol%、例えば約40mol%~約70mol%、約45mol%~約65mol%、または約50mol%~約60mol%；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約20mol%~約40mol%、約25mol%~約40mol%、または約25mol%~約35mol%を構成する。カチオンのイオン化可能な脂質がカチオン性脂質で完全にまたは部分的に置換されているこれらの実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質およびカチオン性脂質の合計に対して、カチオンのイオン化可能な脂質について上記で規定したのと同じ範囲(例えば約20mol%~約75mol%など)が適用されることが好ましい。

【0119】

第二の態様のある実施態様において、ステロイドはステロールを含む。第二の態様のいくつかの好ましい実施態様において、ステロイドはコレステロールを含むかまたはコレステロールである。

【0120】

第二の態様のある実施態様において、ステロイドは、有機溶液中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約15mol%~約60mol%、例えば約15mol%~約40mol%、約20mol%~約35mol%、または約20mol%~約30mol%；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約35mol%~約60mol%、約40mol%~約60mol%、または約45mol%~約60mol%を構成する。第二の態様のある実施態様において、ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイド

の相対量が少ない実施態様では)約15 mol%～約60 mol%、例えば約15 mol%～約40 mol%、約20 mol%～約35 mol%、または約20 mol%～約30 mol%；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約35 mol%～約60 mol%、約40 mol%～約60 mol%、または約45 mol%～約60 mol%を構成する。

【0121】

第二の態様のある実施態様において、中性脂質はリン脂質である。ある実施態様において、リン脂質は、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、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびスフィンゴミエリンからなる群から選択される。ある実施態様において、リン脂質は、30℃より高いT_g値を有するリン脂質からなる群から選択される。ある実施態様において、リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、およびジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)からなる群から選択される。ある実施態様において、中性脂質はDSPCである。

【0122】

第二の態様のある実施態様において、中性脂質は、有機溶液中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約5 mol%～約25 mol%、例えば約15 mol%～約25 mol%または約17 mol%～約21 mol%；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約5 mol%～約15 mol%または約7 mol%～約14 mol%を構成する。第二の態様のある実施態様において、中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約5 mol%～約25 mol%、例えば約15 mol%～約25 mol%または約17 mol%～約21 mol%；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約5 mol%～約15 mol%または約7 mol%～約14 mol%を構成する。

【0123】

第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、有機溶液中に存在する総脂質の約20 mol%～約70 mol%を構成し；ステロイドは、有機溶液中に存在する総脂質の約15 mol%～約60 mol%を構成し；そして中性脂質(例えばリン脂質)は、有機溶液中に存在する総脂質の約5 mol%～約25 mol%を構成する。

【0124】

第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、有機溶液中に存在する総脂質の約40 mol%～約70 mol%、例えば約45 mol%～約65 mol%または約50 mol%～約60 mol%を構成し；(好ましくはコレステロールである)ステロイドは、有機溶液中に存在する総脂質の約15 mol%～約40 mol%、例えば約20 mol%～約35 mol%、または約20 mol%～約30 mol%を構成し；そして(好ましくはリン脂質である)中性脂質は、有機溶液中に存在する総脂質の約15 mol%～約25 mol%、例えば約17 mol%～約21 mol%を構成する。第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約40 mol%～約70 mol%、例えば約45 mol%～約65 mol%、または約50 mol%～約60 mol%を構成し；(好ましくはコレステロールである)ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約15 mol%～約40 mol%、例えば約20 mol%～約35 mol%、または約20 mol%～約30 mol%を構成し；そして中性脂質(好ましくはリン脂質である)は、組成物中に存在する総脂質の約15 mol%～約25 mol%、例えば約17 mol%～約21 mol%を構成する。第二の態様のこれらの実施態様、すなわち、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が高く、ステロイドの相対量が高い核酸組成物を製造するための実施態様は、血清の存在下で細胞をトランスフェクションするのに特に適している。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

【0125】

イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量がより多く、ステロイドの相対量がより少ない第二の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は最大2.5であり、好ましくは前記比率は1~2.5である。したがって、第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、有機溶液中(または組成物中)に存在する総脂質の約40mol%~約70mol%(例えば約45mol%~約65mol%または約50mol%~約60mol%)を構成し；ステロイドは、有機溶液中(または組成物中)に存在する総脂質の約15mol%~約40mol%(例えば約20mol%~約35mol%または約20mol%~約30mol%)を構成し；中性脂質は、有機溶液中(または組成物中)に存在する総脂質の約15mol%~約25mol%(例えば約17mol%~約21mol%)を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比は、最大2.5、好ましくは前記比率は1~2.5である。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

10

【0126】

第二の態様のいくつかの別の実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、有機溶液中に存在する総脂質の約20mol%~約40mol%、例えば約25mol%~約40mol%または約25mol%~約35mol%を構成し；(好ましくはコレステロールである)ステロイドは、有機溶液中に存在する総脂質の約35mol%~約60mol%、例えば約40mol%~約60mol%または約45mol%~約60mol%を構成し；そして(好ましくはリン脂質である)中性脂質は、有機溶液中に存在する総脂質の約5mol%~約15mol%、例えば約7mol%~約14mol%を構成する。第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20mol%~約40mol%、例えば約25mol%~約40mol%または約25mol%~約35mol%を構成し；(好ましくはコレステロールである)ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約35mol%~約60mol%、例えば約40mol%~約60mol%または約45mol%~約60mol%を構成し；そして(好ましくはリン脂質である)中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約5mol%~約15mol%、例えば約7mol%~約14mol%を構成する。これらの第二の態様の実施態様、すなわちイオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い核酸組成物を製造するための実施態様は、血清の非存在下で細胞をトランスフェクションするのに特に適している。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

20

30

【0127】

イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い第二の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比率は3.0~10.0、例えば5.0~7.0である。したがって、第二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、有機溶液中(または組成物中)に存在する総脂質の約20mol%~約40mol%(例えば約25mol%~約40mol%または約25mol%~約35mol%)を構成し；ステロイドは、有機溶液中(または組成物中)に存在する総脂質の約35mol%~約60mol%(例えば約40mol%~約60mol%または約45mol%~約60mol%)を構成し；中性脂質は、有機溶液中(または組成物中)に存在する総脂質の約5mol%~約15mol%(例えば約7mol%~約14mol%)を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比は、少なくとも3.0であり、好ましくは前記比は3.0~10.0、例えば5.0~7.0である。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

40

【0128】

第二の態様のある実施態様において、有機溶液／組成物は、1つ以上の付加的脂質をさらに含む。カチオン性脂質が存在するこれらの実施態様において、(1)カチオンのイオン化可能な脂質の量と(2)カチオン性脂質の量の合計が計算に使用される。例えば、有機溶液／組成物中のカチオンのイオン化可能な脂質の量が約20mol%~約70mol%で

50

あり、有機溶液／組成物がカチオン性脂質も含むならば、(1)カチオンのイオン化可能な脂質の量と(2)カチオン性脂質の量の合計は約20mol%～約70mol%となるべきである。

【0129】

第二の態様のある実施態様において、有機溶液、組成物またはその両方は、ポリエチレングリコール(PEG)を含む脂質を実質的に含まない。第二の態様のある実施態様において、有機溶液、組成物またはその両方は、PEGを含む化合物を実質的に含まない。第二の態様のある実施態様において、有機溶液、組成物またはその両方は、実質的にPEGを含まない。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、クエン酸、およびそれらの塩からなる群から選択される。これらの実施態様のある実施態様において、多価アニオンは無機ポリリン酸またはその塩である。

10

【0130】

第二の態様のある実施態様において、有機溶液はまた、別のポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、別のポリマーコンジュゲート脂質はポリサルコシンコンジュゲート脂質である。したがって、ある実施態様において、有機溶液はPEG脂質を実質的に含まず、ポリサルコシンコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、有機溶液は(PEG脂質およびポリサルコシンコンジュゲート脂質を含む)ポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、クエン酸、およびそれらの塩からなる群から選択される。これらの実施態様のある実施態様において、多価アニオンは無機ポリリン酸またはその塩である。

20

【0131】

第二の態様のある実施態様において、有機溶液に含まれる脂質はカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質のみであり、特にカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよびリン脂質である。第二の態様のある実施態様において、組成物はあらゆるポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない。第二の態様のある実施態様において、組成物に含まれる脂質はカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質のみであり、特にカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよびリン脂質である。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンまたはその塩は、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、クエン酸、およびそれらの塩からなる群から選択される。これらの実施態様のある実施態様において、多価アニオンは無機ポリリン酸またはその塩である。

30

【0132】

第二の態様のある実施態様において、粒子は脂質ナノ粒子(LNP)、リポソーム、リポプレックス(LPX)、およびそれらの混合物を含むかまたはそれらから選択される。ある実施態様において、粒子はLNPを含むかまたはLNPである。ある実施態様において、粒子はリポソームを含むかまたはリポソームである。ある実施態様において、粒子はLPXを含むかまたはLPXである。ある実施態様において、粒子はLNPとリポソームの混合物を含むかまたは該混合物である。ある実施態様において、粒子はLNPとLPXの混合物を含むかまたは該混合物である。ある実施態様において、粒子はLNPとリポソームとLPXの混合物を含むかまたは該混合物である。

40

【0133】

50

第二の態様のある実施態様において、粒子は、組成物中に存在する脂質(特に、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質の全て)の本質的に全てを含む。

【0134】

第二の態様のある実施態様において、水相は、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を実質的に含まない(例えば、脂質を実質的に含まない)。

【0135】

第二の態様のある実施態様において、粒子は組成物中に存在する核酸(特にRNA)の少なくとも50%(例えば少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%)を含む。ある実施態様において、粒子は組成物中に存在する核酸(特にRNA)の少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%を含む。

10

【0136】

第二の態様のある実施態様において、水相は核酸を実質的に含まない。

【0137】

第二の態様のある実施態様において、核酸(RNAなど)は粒子内に封入されるかまたは粒子に結合する。

【0138】

第二の態様のある実施態様において、組成物中に存在する多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも10%(例えば少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%)が粒子と結合する。ある実施態様において、組成物中に存在する多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%が粒子と結合している。

20

【0139】

第二の態様のある実施態様において、粒子は約30nm~約500nmのサイズを有する。ある実施態様において、粒子は約50nm~約150nmのサイズを有する。

【0140】

第二の態様のある実施態様において、核酸はDNAである。

【0141】

第二の態様のある実施態様において、核酸はRNA(例えばmRNAまたは阻害性RNA、例えばsiRNA)である。

【0142】

第二の態様のある実施態様において、RNA(mRNAなど)は、(i)ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み；(ii)コドン最適化されているコード配列を有し；および／または(iii)野生型コード配列と比較してG/C含量が増加しているコード配列を有する。ある実施態様において、修飾ヌクレオシドはシュドウリジン(ψ)、N1-メチルシュドウリジン(m1 ψ)および5-メチルウリジン(m5U)から選択される。

30

40

【0143】

第二の態様のある実施態様において、RNA(mRNAなど)は、次の(a)キャップ1またはキャップ2構造などの5'キャップ；(b)5' UTR；(c)3' UTR；および(d)ポリA配列の1つ以上を含む。ある実施態様において、RNA(mRNAなど)は、次の全てを含む：5'キャップ；5' UTR；3' UTR；およびポリA配列。ある実施態様において、ポリA配列は少なくとも100個のAヌクレオチドを含み、ここで、ポリA配列は好ましくはAヌクレオチドの中断配列である。

【0144】

第二の態様のある実施態様において、RNA(mRNAなど)は1つ以上のポリペプチドをコードする。ある実施態様において、1つ以上のポリペプチドは、対象における抗原に

50

対する免疫応答を誘導するための薬学的活性ポリペプチドであるおよび／またはエピトープを含む。

【0145】

第二の態様のある実施態様において、薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープは病原体のタンパク質、タンパク質の免疫原性バリエーションまたはタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである。ある実施態様において、病原体は感染性疾患を引き起こす病原体である。

【0146】

第二の態様のある実施態様において、薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープはSARS-CoV-2スパイク(S)タンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである。ある実施態様において、RNA(mRNAなど)は、SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。

【0147】

第二の態様のある実施態様において、核酸は阻害性RNA(siRNAなど)であり、標的mRNAに選択的にハイブリダイズするおよび／または標的mRNAに対して特異的である。ある実施態様において、標的mRNAは薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含み、特にその発現(特に、例えば健常対象における発現と比較して増加した発現)が疾患と関連する薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。ある実施態様において、標的mRNAはその発現(特に、例えば健常対象における発現と比較して増加した発現)ががんに関連している薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。

【0148】

第一の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第二の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0149】

第三の態様において、本開示は、第二の態様の方法に従い組成物を製造し、組成物を約-90℃～約-10℃、例えば約-90℃～約-40℃、約-40℃～約-25℃、約-25℃～約-10℃の範囲の温度または約-20℃の温度で保存することを含む、組成物を保存する方法を提供する。第三の態様のある実施態様において、凍結組成物の保存は少なくとも1週間、例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月、少なくとも24ヶ月、または少なくとも36ヶ月、好ましくは少なくとも4週間である。第三の態様のある実施態様において、凍結組成物の保存は、-20℃で少なくとも4週間、好ましくは少なくとも1カ月、より好ましくは少なくとも2カ月、より好ましくは少なくとも3カ月、より好ましくは少なくとも6カ月である。第三の態様のある実施態様において、組成物は-70℃で保存できる。

【0150】

第三の態様のある実施態様において、組成物は抗凍結剤を含む。第三の態様のある実施態様において、組成物は抗凍結剤を実質的に含まない。

【0151】

第三の態様のある実施態様において、組成物を保存する方法は、工程(II)(すなわち、製剤を約-10℃以下に凍結すること)を含む第二の態様の方法に従い組成物を製造し；凍結組成物を約-90℃～約-10℃の範囲の温度で一定期間(例えば、少なくとも1週間)保存し；そして凍結組成物を約0℃～約20℃の範囲の温度で一定期間(例えば、少なくとも4週間)保存することを含む。

【0152】

第一または第二の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第三の態

様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0153】

第四の態様において、本開示は、第二の態様の方法に従い液体組成物を製造し、液体組成物を約0℃～約20℃、例えば約1℃～約15℃、約2℃～約10℃または約2℃～約8℃の範囲の温度または約5℃の温度で保存することを含む、組成物を保存する方法を提供する。第四の態様のある実施態様において、液体組成物の保存は、少なくとも1週間、例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月、または少なくとも24ヶ月、好ましくは少なくとも4週間である。第四の態様のある実施態様において、液体組成物の保存は、5℃で少なくとも4週間、好ましくは少なくとも1ヶ月、より好ましくは少なくとも2ヶ月、より好ましくは少なくとも3ヶ月、より好ましくは少なくとも6ヶ月である。

10

【0154】

第四の態様のある実施態様において、組成物は抗凍結剤を含む。第四の態様のいくつかの好ましい実施態様において、組成物は抗凍結剤を実質的に含まない。

【0155】

第一または第二の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第四の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0156】

第五の態様において、本開示は、第二、第三、または第四の態様の方法によって製造可能な組成物を提供する。第五の態様のある実施態様において、組成物は凍結形態であってよく、これは、好ましくは、約-90℃以上、例えば約-90℃～約-10℃の温度で保存され得る。例えば、第五の態様の凍結組成物は、約-90℃から約-40℃、または約-40℃～約-25℃または約-25℃～約-10℃の範囲の温度または約-20℃の温度で保存され得る。第五の態様のある実施態様において、組成物は、少なくとも1週間、例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月、少なくとも24ヶ月または少なくとも36ヶ月、好ましくは少なくとも4週間保存され得る。例えば、凍結組成物は、-20℃で少なくとも4週間、好ましくは少なくとも1ヵ月、より好ましくは少なくとも2ヵ月、より好ましくは少なくとも3ヵ月、より好ましくは少なくとも6ヵ月保存され得る。

20

30

【0157】

第五の態様のある実施態様において、組成物は抗凍結剤を含む。第五の態様のある実施態様において、組成物は抗凍結剤を実質的に含まない。

【0158】

組成物が凍結形態である第五の態様のある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸完全性(特にRNA完全性)は、組成物が凍結される前の組成物の核酸完全性(特にRNA完全性)と比較して、例えば-20℃で保存された凍結組成物の解凍後、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または実質的に100%である。

40

【0159】

ある実施態様において、組成物の最初の核酸完全性(特に最初のRNA完全性)(すなわち、製造後であるが、凍結前)は少なくとも50%であり、凍結組成物解凍後の組成物の核酸完全性(特にRNA完全性において)は、最初の核酸完全性(特に最初のRNA完全性)の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは実質的に100%である。

【0160】

これに加えてまたはこれとは別に、第五の態様のある実施態様において、組成物が凍結形態であるとき、凍結組成物解凍後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI))は、組成物凍結前の核酸(RNA

50

など)粒子のサイズ(Z 平均)(および/またはサイズ分布および/またはPDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)は約50nm~約500nm、好ましくは約40nm~約200nm、より好ましくは約40nm~約120nmである。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸(RNAなど)粒子のPDIは0.3未満、好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満である。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)は約50nm~約500nm、好ましくは約40nm~約200nm、より好ましくは約40nm~約120nmであり、凍結組成物解凍後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)(および/またはサイズ分布および/またはPDI)は凍結前の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)(および/またはサイズ分布および/またはPDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、凍結組成物解凍後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)は約50nm~約500nm、好ましくは約40nm~約200nm、より好ましくは約40nm~約120nmであり、凍結組成物解凍後の核酸(RNAなど)粒子のPDIは0.3未満(好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満)である。

10

20

30

40

50

【0161】

ある実施態様において、1回の凍結/解凍サイクル後、好ましくは2回の凍結/解凍サイクル後、より好ましくは3回の凍結/解凍サイクル後、より好ましくは4回の凍結/解凍サイクル後、より好ましくは5回以上の凍結/解凍サイクル後の組成物の核酸(RNAなど)粒子のサイズおよび核酸完全性(特にRNA完全性)は、最初の組成物の核酸(RNAなど)粒子のサイズおよび核酸完全性(特にRNA完全性)(すなわち、組成物が最初に凍結される前)と本質的に等しい。

【0162】

第五の態様の別の実施態様において、組成物は液体形態である。

【0163】

組成物が液体形態である第五の態様のある実施態様において、例えば0℃以上で少なくとも1週間保存したとき、液体組成物の核酸完全性(特にRNA完全性)は、所望の効果、例えば免疫応答を誘導する効果を達成できるようなものである。例えば、0℃以上で少なくとも1週間(例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月または少なくとも6ヶ月)保存したとき、液体組成物の核酸完全性(特にRNA完全性)は、保存前の核酸完全性(特にRNA完全性)と比較して、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも98%であり得る。ある実施態様において、好ましくは0℃以上、例えば約2℃~約8℃の温度で、少なくとも4週間保存後の組成物の核酸完全性(特にRNA完全性)は、保存前の核酸完全性(特にRNA完全性において)と比較して、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも98%である。

【0164】

ある実施態様において、液体組成物の最初の核酸完全性(特に最初のRNA完全性)(すなわち、製造後であるが、保存前)は少なくとも50%であり、好ましくは0℃以上、例えば約2℃~約8℃の温度で少なくとも1週間(例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月または少なくとも3ヶ月)保存後の液体組成物の核酸完全性(特にRNA完全性)は、最初の核酸完全性(特に最初のRNA完全性)の少なくとも90%である。

【0165】

これに加えてまたはこれとは別に、組成物が液体形態である第五の態様のある実施態様において、例えば0℃またはそれ以上の温度で少なくとも1週間保存したとき、液体組成物の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)(および/またはサイズ分布および/または多分散性指数(PDI))は、所望の効果、例えば免疫応答を誘導する効果を達成できるようなものである。例えば、例えば0℃以上の温度で少なくとも1週間保存したとき、液体組成物の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)(および/またはサイズ分布および/または多分散性指数(PDI))は、最初の組成物、すなわち保存前の核酸(RNAなど)粒子

のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、液体組成物を例えば0℃以上で少なくとも1週間保存した後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)は、約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmである。ある実施態様において、液体組成物を例えば0℃以上で少なくとも1週間保存した後の核酸(RNAなど)粒子のPDIは、0.3未満、好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満である。ある実施態様において、液体組成物を例えば0℃以上で少なくとも1週間保存した後の核酸液体組成物の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)は約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmであり、液体組成物を例えば0℃以上で少なくとも1週間保存した後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)は、保存前の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、液体組成物を例えば0℃以上で少なくとも1週間保存した後の核酸(RNAなど)粒子のサイズ(Z 平均)は、約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmであり、液体組成物を例えば0℃以上で少なくとも1週間保存した後の核酸(RNAなど)粒子のPDIは、0.3未満(好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満)である。

10

【0166】

第一、第二、第三、または第四の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第五の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

20

【0167】

第六の態様において、本開示は、第二、第三または第四の態様の方法により製造した凍結組成物を準備し、凍結組成物を解凍して、それにより使用準備済医薬組成物を得る工程を含む、使用準備済医薬組成物を製造する方法を提供する。

【0168】

第一、第二、第三、第四または第五の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第六の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0169】

第七の態様において、本開示は、第二、第三または第四の態様の方法により製造した液体組成物を準備し、それにより使用準備済医薬組成物を得る工程を含む、使用準備済医薬組成物を製造する方法を提供する。

30

【0170】

第一、第二、第三、第四、第五または第六の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第七の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0171】

第八の態様において、本開示は、第六または第七の態様の方法によって製造可能な、使用準備済医薬組成物を提供する。

【0172】

第一、第二、第三、第四、第五、第六または第七の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第八の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

40

【0173】

第九の態様において、本開示は、治療における使用のための第一、第五および第八の態様のいずれか1つの組成物を提供する。

【0174】

第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七または第八の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第九の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0175】

第十の態様において、本開示は、免疫応答の誘導に使用するための第一、第五、第八、

50

および第九の態様のいずれか1つの組成物を提供する。

【0176】

第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八または第九の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第十の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0177】

第十一の態様において、本開示は、第一、第五または第八の態様のいずれか1つの組成物を細胞に添加し；そして組成物と細胞との混合物を十分な時間インキュベートすることを含む、細胞をトランスフェクトする方法を提供する。ある実施態様、特に、核酸がDNAまたはRNA(mRNAなど)であり、薬学的活性タンパク質をコードする実施態様において、組成物と細胞の混合物を、薬学的活性タンパク質の発現を可能にするのに十分な時間インキュベートする。ある実施態様、特に核酸が標的mRNAに対する阻害性RNA(sRNAなど)である実施態様において、組成物と細胞の混合物を、標的mRNAの転写および／または翻訳の阻害を可能にするのに十分な時間インキュベートする。ある実施態様において、十分な時間の量は、少なくとも1時間(少なくとも約2時間、少なくとも約3時間、少なくとも約4時間、少なくとも約5時間、少なくとも約6時間、少なくとも約9時間、少なくとも約12時間)および／または最大約48時間(例えば最大約36時間または最大約24時間)である。第十一の態様のある実施態様において、組成物と細胞との混合物のインキュベートを血清(ヒト血清など)の存在下で実施する。

【0178】

第十一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約40mol%～約70mol%、例えば約45mol%～約65mol%または約50mol%～約60mol%を構成し；(好ましくはコレステロールである)ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約40mol%、例えば約20mol%～約35mol%または約20mol%～約30mol%を構成し；そして(好ましくはリン脂質である)中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約25mol%、例えば約17mol%～約21mol%を構成する。これらの実施態様(すなわち、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない組成物)では、組成物と細胞の混合物のインキュベーションを血清(ヒト血清など)の存在下で実施することが好ましい。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

【0179】

イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない組成物に関する第十一の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は最大2.5であり、好ましくは前記比率は1～2.5である。したがって、第十一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約40mol%～約70mol%(例えば約45mol%～約65mol%または約50mol%～約60mol%)を構成し；ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約40mol%(例えば約20mol%～約35mol%または約20mol%～約30mol%)を構成し；中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約25mol%(例えば約17mol%～約21mol%)を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比は、最大2.5であり、好ましくは前記比率は1～2.5である。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

【0180】

第十一の態様のいくつかの別の実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約40mol%、例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%を構成し；(好ましくはコレステロールである)ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約35mol%～約60mol%、例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%を構成し；そして(好ましくはリン脂質である)中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約15mol

%、例えば約7 mol%～約14 mol%を構成する。これらの実施態様(すなわち、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い組成物)では、組成物と細胞の混合物のインキュベーションを血清の存在下または非存在下、例えば血清の非存在下で実施し得る。

【0181】

イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い組成物に関する第十一の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比率は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。したがって、第十一の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20 mol%～約40 mol%(例えば約25 mol%～約40 mol%または約25 mol%～約35 mol%)を構成し；ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約35 mol%～約60 mol%(例えば約40 mol%～約60 mol%または約45 mol%～約60 mol%)を構成し；中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約5 mol%～約15 mol%(例えば約7 mol%から約14 mol%)を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比率は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

10

【0182】

第十一の態様のある実施態様において、本方法をインビボ(すなわち、細胞は対象の臓器、組織および／または生体の一部を形成する)で実施する。第十一の態様のある実施態様において、本方法をインビトロ(すなわち、細胞は対象の臓器、組織および／または生体の一部を形成しない、例えば、細胞はエクスピボ細胞培養である)で実施する。

20

【0183】

第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、または第十の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第十一の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0184】

第十二の態様において、本開示は、細胞をトランスフェクトするための、第一、第五または第八の態様のいずれか1つの組成物の使用を提供する。第十二の態様のある実施態様において、細胞のトランスフェクションを血清(ヒト血清など)の存在下で実施する。

30

【0185】

第十二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約40 mol%～約70 mol%、例えば約45 mol%～約65 mol%または約50 mol%～約60 mol%を構成し；ステロイド(好ましくはコレステロールである)は、組成物中に存在する総脂質の約20 mol%～約40 mol%を構成し；そして中性脂質(好ましくはリン脂質である)は、組成物中に存在する総脂質の約15 mol%～約25 mol%を構成する。これらの実施態様(すなわち、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない組成物)では、組成物と細胞の混合物のインキュベーションを血清(ヒト血清など)の存在下で実施することが好ましい。これらの実施態様のいくつかでは、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

40

【0186】

イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない組成物に関する第十二の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は、最大2.5であり、好ましくは前記比率は1～2.5である。したがって、第十二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約40 mol%～約70 mol%(例えば約45 mol%～約65 mol%または約50 mol%～約60 mol%)を構成し；ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約15 mol%～約40 mol%(例えば約20 mol%～約35 mol%または約20 mol%～約30 mol%)を構成し；中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約15 mol%～約25 mol%(例えば約17 mol%～約21 mol%)を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比

50

は最大2.5であり、好ましくは前記比は1～2.5である。これらの実施態様のいくつかでは、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

【0187】

第十二の態様のいくつかの別の実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約40mol%、例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%を構成し；(好ましくはコレステロールである)ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約35mol%～約60mol%、例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%を構成し；そして(好ましくはリン脂質である)中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約15mol%、例えば約7mol%～約14mol%を構成する。これらの実施態様(すなわち、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い組成物)では、組成物と細胞の混合物のインキュベーションを血清の存在下または非存在下、例えば血清の非存在下で実施し得る。

10

【0188】

イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い組成物に関する第十二の態様のある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比率は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。したがって、第十二の態様のある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約40mol%(例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%)を構成し；ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の約35mol%～約60mol%(例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%)を構成し；中性脂質は、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約15mol%(例えば約7mol%～約14mol%)を構成し；そして中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。これらの実施態様のいくつかにおいて、ステロイドはコレステロールであり、中性脂質はリン脂質である。

20

【0189】

第十二の態様のある実施態様において、使用はインビボ使用(すなわち、細胞は対象の臓器、組織および／または生物の一部を形成する)である。第十二の態様のある実施態様において、使用はインビトロ使用(すなわち、細胞は対象の器官、組織および／または生体の一部を形成しない、例えば、細胞はエクスピボ細胞培養である)である。

30

【0190】

第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、または第十一の態様の状況において本明細書に記載のいずれの実施態様も、第十二の態様のあらゆる実施態様に適用され得ることは理解される。

【0191】

さらなる態様において、本開示は、第一、第五、第八、第九または第十の態様のいずれか1つの組成物または本明細書に記載の医薬組成物を含む、キットを提供する。ある実施態様において、キットは免疫応答を誘導するためなどの治療に使用するためのものである。ある実施態様において、キットは、感染症の処置または予防などの、病原体に対する免疫応答の誘導に使用するためのものである。

40

【0192】

さらなる項目別実施態様は次のとおりである：

1. (i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)多価アニオンを含む、組成物。

【0193】

2. 多価アニオンが、2～10個の負電荷、任意選択的に2～5個の負電荷を含む、項1に記載の組成物。

【0194】

3. 多価アニオンが、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒

50

石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物からなる群から選択される、項 1 または項 2 に記載の組成物。

【0195】

4. 多価アニオンが無機ポリリン酸である、項 1～3 のいずれか一項に記載の組成物。

【0196】

4 a. 無機ポリリン酸が式 $[P_x O_{(3x+1)}]^{y-}$ 〔式中、 x は整数であり、少なくとも 3 であり；そして y はアニオン電荷である。〕を含む、項 4 に記載の組成物。

【0197】

4 b. 無機ポリリン酸が、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、好ましくは、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、より好ましくは、無機ポリリン酸が三リン酸である、項 4 または項 4 a に記載の組成物。

10

【0198】

4 c. 無機ポリリン酸が、線形無機ポリリン酸、例えば線形無機三リン酸である、項 4～4 b のいずれか一項に記載の組成物。

【0199】

5. (v)多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比が、少なくとも約 1:2、好ましくは少なくとも約 2:3、例えば少なくとも約 4:3 である、項 1～4 c のいずれか一項に記載の組成物。

【0200】

6. ポリエチレングリコール(P E G)を含む脂質を実質的に含まない、好ましくは P E G を含むあらゆる化合物を実質的に含まない、より好ましくは P E G を実質的に含まない、項 1～5 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【0201】

6 a. ポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない、項 1～6 のいずれか一項に記載の組成物。

【0202】

7. 組成物の pH が約 4.0～約 8.0、好ましくは約 4.5～約 8.0、例えば約 5.0～約 8.0、約 5.5～約 8.0、約 6.0～約 8.0、約 6.5～約 8.0、約 6.8～約 7.9、または約 7.0～約 7.8 である、項 1～6 a のいずれか一項に記載の組成物。

30

【0203】

8. 水が組成物中の主成分であるおよび／または組成物中に含まれる水以外の溶媒の総量が約 0.5 % (v/v) 未満である、項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物。

【0204】

9. 組成物の浸透圧が、最大で約 $1000 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、好ましくは約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $500 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、より好ましくは約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ である、項 1～8 のいずれか一項に記載の組成物。

【0205】

10. 組成物中の核酸の濃度が、約 1 mg/l ～約 500 mg/l 、例えば約 1 mg/l ～約 100 mg/l 、約 5 mg/l ～約 100 mg/l 、または約 10 mg/l ～約 100 mg/l である、項 1～9 のいずれか一項に記載の組成物。

40

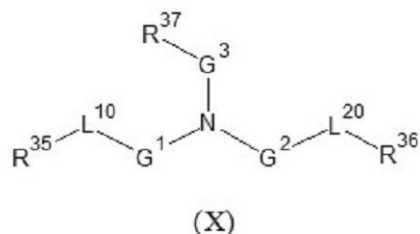
【0206】

11. カチオンのイオン化可能な脂質が、少なくとも 1 つの第 3 級アミン部分を含む頭基を含む、項 1～10 のいずれか一項に記載の組成物。

【0207】

12. カチオンのイオン化可能な脂質が、式 (X)

【化 5】



〔式中、

10

L^{10} および L^{20} の一方は、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ または $-NR^aC(=O)O-$ であり、そして L^{10} および L^{20} の他方は、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ または $-NR^aC(=O)O-$ または直接結合であり；

G^1 および G^2 は、各々独立して、非置換の C_1-C_{12} アルキレンまたは C_2-C_{12} アルケニレンであり；

G^3 は、 C_1-C_{24} アルキレン、 C_2-C_{24} アルケニレン、 C_3-8 シクロアルキレンまたは C_3-8 シクロアルケニレンであり；

20

R^a は、H または C_1-C_{12} アルキルであり；

R^{35} および R^{36} は、各々独立して、 C_6-C_{24} アルキルまたは C_6-C_{24} アルケニルであり；

R^{37} は、H、 OR^{50} 、 CN 、 $-C(=O)OR^{40}$ 、 $-OC(=O)R^{40}$ または $-NR^{50}C(=O)R^{40}$ であり；

R^{40} は C_1-C_{12} アルキルであり；

R^{50} は H または C_1-C_6 アルキルであり；そして

x は 0、1 または 2 である。〕

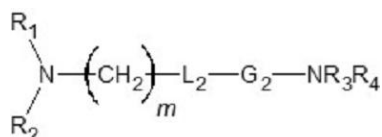
の構造を有するかまたはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体である、項 1～11 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【0208】

13. カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質が、式(XI)：

【化 6】



〔式中、

40

R_1 および R_2 の各々は、独立して R_5 または $-G_1-L_1-R_6$ であり、ここで、 R_1 および R_2 の少なくとも一方は $-G_1-L_1-R_6$ であり；

R_3 および R_4 の各々は、独立して C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、アリールおよび C_3-10 シクロアルキルからなる群から選択され；

R_5 および R_6 の各々は、独立して少なくとも 10 個の炭素原子を有する非環式ヒドロカルビル基であり；

G_1 および G_2 の各々は、独立して非置換の C_1-C_{12} アルキレンまたは C_2-C_{12} アルケニレンであり；

L_1 および L_2 の各々は、独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$

50

—、—C(=O)NRa—、—NRaC(=O)NRa—、—OC(=O)NRa—および—NRaC(=O)O—からなる群から選択され；

Raは、HまたはC₁–₁₂アルキルであり；

mは0、1、2、3、または4であり；そして

xは0、1または2である。]

の構造を有する、項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【0209】

14. カチオンのにイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約75mol%、例えば約40mol%～約70mol%、約45mol%～約65mol%、約50mol%～約60mol%、約20mol%～約40mol%、約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%を構成する、項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

10

【0210】

15. ステロイドが、コレステロールなどのステロールを含む、項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

【0211】

16. ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約60mol%、例えば約15mol%～約40mol%、約20mol%～約35mol%、約20mol%～約30mol%、約35mol%～約60mol%、約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%を構成する、項1～15のいずれか一項に記載の組成物。

20

【0212】

17. 中性脂質が、リン脂質であり、好ましく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、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびスフィンゴミエリンからなる群から選択され、より好ましくは、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイル–ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)およびジパルミトイル–ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)からなる群から選択される、項1～16のいずれか一項に記載の組成物。

【0213】

18. 中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約25mol%、例えば約10mol%～約25mol%、約15mol%～約25mol%、約17mol%～約21mol%、約5mol%～約15mol%または約7mol%～約14mol%を構成する、項1～17のいずれか一項に記載の組成物。

30

【0214】

19. カチオンのにイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約70mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約60mol%を構成し；そして中性脂質(例えばリン脂質)が、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約25mol%を構成する、項1～18のいずれか一項に記載の組成物。

【0215】

20. カチオンのにイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約40mol%～約70mol%、例えば約45mol%～約65mol%または約50mol%～約60mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約40mol%、例えば約20mol%～約35mol%、または約20mol%～約30mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約25mol%、例えば約17mol%～約21mol%を構成する、項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

40

【0216】

20a. ステロイドがコレステロールであり、中性脂質がリン脂質である、項1～20のいずれか一項に記載の組成物。

【0217】

21. 中性脂質に対するステロイドのモル比が最大2.5であり、好ましくは前記比が1

50

～2.5である、項1～20aのいずれか一項に記載の組成物。

【0218】

22. カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約40mol%、例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約35mol%～約60mol%、例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約15mol%、例えば約7mol%～約14mol%を構成する、項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【0219】

22a. ステロイドがコレステロールであり、中性脂質がリン脂質である、項22に記載の組成物。

10

【0220】

23. 中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも3.0であり、好ましくは前記比が3.0～10.0、例えば5.0～7.0である、項1～19、22および22aのいずれか一項に記載の組成物。

【0221】

24. 組成物が水相に分散した粒子を含み、粒子が核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、ステロイドの少なくとも一部、および中性脂質の少なくとも一部を含み；そして多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸)の少なくとも一部が粒子と結合している、項1～23のいずれか一項に記載の組成物。

20

【0222】

25. 粒子が、脂質ナノ粒子(LNP)、リポソーム、リポプレックス(LPX)、およびそれらの混合物から選択される、項24に記載の組成物。

【0223】

25a. 粒子が、組成物中に存在するカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質の本質的に全てを含む、項24または項25に記載の組成物。

【0224】

25b. 水相が、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を実質的に含まない、項24～25aのいずれか一項に記載の組成物。

【0225】

26. 粒子が、組成物中に存在する核酸の少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%を含む、項24から25bのいずれか一項に記載の組成物。

30

【0226】

26a. 水相が、核酸を実質的に含まない、項24～26のいずれか一項に記載の組成物。

【0227】

27. 組成物中に存在する多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)の少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、そしてより好ましくは少なくとも50%が粒子と結合している、項24～26aのいずれか一項に記載の組成物。

40

【0228】

28. 粒子が約30nm～約500nm、例えば約50nm～約150nmのサイズを有する、項24～27のいずれか一項に記載の組成物。

【0229】

29. 核酸がRNA、好ましくはmRNAである、項1～28のいずれか一項に記載の組成物。

【0230】

29a. 核酸がDNAである、項1～28のいずれか一項に記載の組成物。

【0231】

29b. 核酸が、siRNAなどの阻害性RNAである、項1～28のいずれか一項に

50

記載の組成物。

【0232】

30. RNAが、(1)ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み、ここで、修飾ヌクレオシドは、好ましくはシュードウリジン(ψ)、N1-メチル-シュードウリジン(m1 ψ)および5-メチル-ウリジン(m5U)から選択され；(2)コドン最適化されているコード配列を有し；そして／または(3)野生型コード配列と比較してG/C含量が増加しているコード配列を有する、項29に記載の組成物。

【0233】

31. RNAが、組成物：5'キャップ；5' UTR；3' UTR；およびポリA配列の少なくとも1つ、好ましくは全てを含む、項29または30に記載の組成物。

10

【0234】

32. ポリA配列が少なくとも100個のAヌクレオチドを含み、ここで、ポリA配列が好ましくはAヌクレオチドの中断配列である、項31に記載の組成物。

【0235】

33. 5'キャップがキャップ1構造またはキャップ2構造である、項31または項32に記載の組成物。

【0236】

34. RNAが1つ以上のポリペプチドをコードし、ここで、好ましくは1つ以上のポリペプチドが対象における抗原に対する免疫応答を誘導するための薬学的活性ポリペプチドであるおよび／またはエピトープを含む、項29および項30～33のいずれか一項に記載の組成物。

20

【0237】

35. 薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、病原体のタンパク質、タンパク質の免疫原性バリエーションまたはタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、項34に記載の組成物。

【0238】

36. 薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、SARS-CoV-2スパイク(S)タンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、項34または項35に記載の組成物。

30

【0239】

37. 組成物が液体形態であり、好ましくは約2℃～約10℃の温度である、項1～36のいずれか一項に記載の組成物。

【0240】

37a. 組成物中の核酸の濃度が、約10mg/l～約100mg/lである、項37に記載の組成物。

【0241】

38. 好ましくは約2℃～約8℃の温度で、少なくとも1週間保存後の組成物の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも90%である、項1～37aのいずれか一項に記載の組成物。

40

【0242】

38a. 好ましくは約2℃～約8℃の温度で、少なくとも4週間保存後の組成物の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも90%である、項1～38のいずれか一項に記載の組成物。

【0243】

38b. 好ましくは約2℃～約8℃の温度で、少なくとも3ヶ月間保存後の組成物の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも90%である、項1～38aのいずれか一項に記載の組成物。

【0244】

39. 組成物の保存後の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／ま

50

たは多分散性指数(PDI)が、保存前の核酸粒子のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／またはPDIと本質的に等しい、項24～38bのいずれか一項に記載の組成物。

【0245】

40. 組成物が凍結形態である、項1～36のいずれか一項に記載の組成物。

【0246】

40a. 組成物中の核酸の濃度が、約1mg/l～約50mg/lである、項40に記載の組成物。

【0247】

40b. 凍結組成物解凍後の核酸完全性が、組成物凍結前の核酸完全性と比較して少なくとも50%である、項40または項40aに記載の組成物。

10

【0248】

41. 凍結組成物解凍後の核酸完全性が、組成物凍結前の核酸完全性と比較して、少なくとも90%または実質的に100%である、項40、40aまたは40bに記載の組成物。

【0249】

42. 凍結組成物解凍後の核酸粒子のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI)が、組成物凍結前の核酸粒子のサイズ(Z 平均)および／またはサイズ分布および／またはPDIと本質的に等しい、項40～41のいずれか一項に記載の組成物。

20

【0250】

42a. 1回の凍結／解凍サイクル後、好ましくは2回の凍結／解凍サイクル後の組成物の粒子のサイズおよび核酸完全性が、組成物が最初に凍結される前の粒子のサイズおよび核酸完全性と本質的に等しい、項40～42のいずれか一項に記載の組成物。

【0251】

43. 最終水相に分散した粒子を含む組成物を製造する方法であって、ここで、組成物が(i)核酸；(ii)カチオンのイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質；および(v)多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)を含み；粒子が核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、およびステロイドの少なくとも一部を含み；多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)の少なくとも一部が粒子と結合しており；そして、最終水相が最終緩衝系を含み；ここで、該方法が、

30

(I)最終水相に分散した粒子を含む製剤であって、ここで、粒子が核酸の少なくとも一部、カチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部、ステロイドの少なくとも一部、および中性脂質の少なくとも一部を含み、多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)の少なくとも一部が粒子と結合している製剤を製造し；そして

(II)任意選択的に、製剤を約-10℃以下に凍結させ、

これにより組成物を得ることを含む方法であって、

ここで、工程(I)は、

(a)水および第一緩衝系を含む核酸溶液を準備し；

(b)カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を含む有機溶液を準備し；

40

(c)(a)の下に準備した核酸溶液と(b)の下に準備した有機溶液を混合し、それにより第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤を製造し；

(d)(c)の下に製造した第一中間製剤と多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)またはその塩を混合し、それにより第二緩衝系を含む第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)の少なくとも一部が粒子と結合しており；そして

(e)最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて、(d)の下に製造した第二中間製剤を濾過および／または希釈し、

それにより、最終水相に分散した粒子を含む製剤を製造することを含む、方法。

50

【0252】

43 a. 工程(a)が、(a')水性核酸溶液を準備し；(b')第一緩衝系を含む第一水性緩衝液を準備し；そして(c')(a')の下に準備した水性核酸溶液と(b')の下に準備した第一水性緩衝液を混合し、それにより、水および第一緩衝系を含む核酸溶液を準備することを含み、項43に記載の方法。

【0253】

43 b. 有機溶液が、最大6個の炭素原子を有するアルコールおよびこれらのアルコールの2つ以上の混合物からなる群から選択される有機溶媒、好ましくは、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、1, 2-プロパンジオールおよびこれらのアルコールの2つ以上の混合物からなる群から選択される有機溶媒を含む、項43または項43 aに記載の方法。 10

【0254】

44. 工程(I)が、希釈および濾過から選択される1つ以上の工程をさらに含む、項43～43 bのいずれか一項に記載の方法。

【0255】

45. 工程(I)が、
 (a')水性核酸溶液を準備し；
 (b')第一緩衝系を含む第一水性緩衝液を準備し；
 (c')(a')の下に準備した水性核酸溶液と(b')の下に準備した第一水性緩衝液を混合し、それにより水および第一緩衝系を含む核酸溶液を製造し；
 (d')カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を含む有機溶液を準備し(例えば、製造し)；
 (e')(c')の下に製造した核酸溶液と(d')の下に準備した(例えば、製造した)有機溶液を混合し、それにより第一緩衝系を含む第一水相に分散した粒子を含む第一中間製剤を製造し；
 (f')任意選択的に、水またはさらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を用いて、(e')の下に製造した第一中間製剤を希釈し、それにより第一緩衝系またはさらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここで、さらなる水性緩衝液は第一水性緩衝液と同一でも異なってもよく；
 (g')工程(f')が存在しないならば工程(e')で得た第一中間製剤、または工程(f')が存在するならば工程(f')で得たさらなる中間製剤と多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)またはその塩を混合し、それにより第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)の少なくとも一部が粒子と結合しており；
 (h')任意選択的に、さらなる緩衝系を含むさらなる水性緩衝液を用いて、(g')の下に製造した第二の第一中間製剤を濾過し、それにより、さらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を製造し、ここで、さらなる水性緩衝液は、第一および／または第二水性緩衝液と同一でも異なってもよく；
 (i')任意選択的に、工程(h')を1回、2回またはそれ以上繰り返し、ここで、1サイクルの工程(h')の後に得たさらなる緩衝系を含むさらなる水相に分散した粒子を含むさらなる中間製剤を次のサイクルの第二中間製剤として使用し、ここで、各サイクルにおいて、さらなる水性緩衝液は第一および／または第二水性緩衝液と同一でも異なってもよく；
 (j')工程(h')が存在しないならば工程(g')で得た第二中間製剤、または工程(h')が存在して工程(i')が存在しないならば工程(h')で得たさらなる中間製剤、または工程(h')および(i')が存在するならば工程(i')の後に得たさらなる中間製剤を、最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて濾過し；そして
 (k')任意選択的に、工程(j')で得た製剤を希釈溶液で希釈し；
 それにより最終水相に分散した粒子を含む製剤を製造することを含み、項43～44のいずれか一項に記載の方法。

【0256】

4 5 a. 有機溶液が、最大 6 個の炭素原子を有するアルコールおよびこれらのアルコールの 2 つ以上の混合物からなる群から選択される有機溶媒、好ましくは、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、1, 2-プロパンジオールおよびこれらのアルコールの 2 つ以上の混合物からなる群から選択される有機溶媒を含む、項 4 5 に記載の方法。

【0 2 5 7】

4 5 b. 工程(f')が存在しない、項 4 5 または項 4 5 a に記載の方法。

【0 2 5 8】

4 5 c. 工程(f')が存在する、項 4 5 または項 4 5 a に記載の方法。

【0 2 5 9】

4 5 d. 工程(g')が、工程(e')の最大約 2 0 分後に実施される、項 4 5 ~ 4 5 c のいずれか一項に記載の方法。

【0 2 6 0】

4 5 e. (b)または(d')の下にそれぞれ準備した有機溶液が、さらに酸を含む、項 4 3 ~ 4 5 d のいずれか一項に記載の方法。

【0 2 6 1】

4 5 f. 工程(f')が、第一中間製剤の pH を pH 約 7.0 ~ 約 9.0、任意選択的に pH 約 7.5 ~ 約 8.5、好ましくは pH 約 7.5 ~ 約 8.0 に変えることを含む、項 4 3 ~ 4 5 e のいずれか一項に記載の方法。

【0 2 6 2】

4 5 g. 工程(f')が、工程(e')の後 1 2 時間以内、好ましくは 4 時間以内、より好ましくは 3 0 分後以内に実施される、項 4 5 f に記載の方法。

【0 2 6 3】

4 5 h. 工程(f')が第一中間製剤の pH を pH 7 ~ 9 に変えるために使用され、次いで工程(g')で多価アニオンを添加し、工程(f')と工程(g')を合わせた持続時間が、工程(e')の後 1 2 時間以下、好ましくは 4 時間以下、より好ましくは 3 0 分以下である、項 4 5 f または項 4 5 g に記載の方法。

【0 2 6 4】

4 6. 濾過が透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーションであり、好ましくは透析またはタンジェンシャルフロー濾過である、項 4 3 ~ 4 5 h のいずれか一項に記載の方法。

30

【0 2 6 5】

4 7. 多価アニオンが、2 ~ 1 0 個の負電荷、任意選択的に 2 ~ 5 個の負電荷を含む、項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【0 2 6 6】

4 7 a. 多価アニオンが、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物からなる群から選択される、項 4 3 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【0 2 6 7】

4 7 b. 多価アニオンが無機ポリリン酸またはその塩である、項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【0 2 6 8】

4 7 c. 無機ポリリン酸またはその塩が、式 $P_x O_{(3x+1)} M_y$ 、〔式中、x は整数であり、少なくとも 3 であり；各 M は独立して、 H^+ またはカチオンであり；そして y' は、電荷平衡化に必要なカチオンの数である〕を含むかまたはそれを有する、項 4 7 b に記載の方法。

【0 2 6 9】

4 8. 各 M が、 H^+ 、アルカリカチオン、アンモニウム、および単価の有機カチオンからなる群から独立して選択され、好ましくは、各 M が、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、および NH_4^+ からなる群から独立して選択される、項 4 7 c に記載の方法。

【0 2 7 0】

50

49. 無機ポリリン酸またはその塩が、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択され、好ましくは、三リン酸、四リン酸、五リン酸、それらの塩および混合物からなる群から選択され、より好ましくは、無機ポリリン酸またはその塩が、三リン酸またはその塩である、項47b～48のいずれか一項に記載の方法。

【0271】

50. 無機ポリリン酸またはその塩が、線形無機ポリリン酸またはその塩、例えば線形三リン酸またはその塩である、項47b～49のいずれか一項に記載の方法。

【0272】

51. (v)多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)と(ii)カチオンのイオン化可能な脂質とのモル比が、少なくとも約1:2、好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約4:3である、項43～50のいずれか一項に記載の方法。

10

【0273】

52. 組成物が、PEGを含む脂質を実質的に含まない、好ましくはPEGを含むあらゆる化合物を実質的に含まない、より好ましくはPEGを実質的に含まない、項43～51のいずれか一項に記載の方法。

【0274】

52a. 組成物が、あらゆるポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない、項43～52のいずれか一項に記載の方法。

【0275】

53. (1)工程(a)で得た核酸溶液が6.0未満、好ましくは最大約5.0、より好ましくは最大約4.5のpHを有する；または(2)第一水性緩衝液が6.0未満、好ましくは最大約5.0、より好ましくは最大約4.5のpHを有する、項43～52aのいずれか一項に記載の方法。

20

【0276】

54. 組成物のpHが、約4.0～約8.0、好ましくは約4.5～約8.0、例えば約5.0～約8.0、約5.5～約8.0、約6.0～約8.0、約6.5～約8.0、約6.8～約7.9または約7.0～約7.8である、項43～53のいずれか一項に記載の方法。

【0277】

55. 水が製剤および／または組成物の主成分であるおよび／または組成物に含まれる水以外の溶媒の総量が約0.5%(v/v)未満である、項43～54のいずれか一項に記載の方法。

30

【0278】

56. 組成物の浸透圧が、最大約 1000×10^{-3} osmol/kg、好ましくは約 100×10^{-3} osmol/kg～約 500×10^{-3} osmol/kg、より好ましくは約 300×10^{-3} osmol/kgである、項43～55のいずれか一項に記載の方法。

【0279】

57. 組成物中の核酸の濃度が、約1mg/l～約500mg/l、例えば約1mg/l～約100mg/l、約5mg/l～約100mg/l、または約10mg/l～約100mg/lである、項43～56のいずれか一項に記載の方法。

40

【0280】

58. カチオンのイオン化可能な脂質が、少なくとも1つの第3級アミン部分を含む頭基を含む、項43～57のいずれか一項に記載の方法。

【0281】

59. カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質が、有機溶液中に約20mol%～約70mol%のカチオンのイオン化可能な脂質；約15mol%～約60mol%のステロイド；および約5mol%～約25mol%の中性脂質(例えばリン脂質)のモル比で存在する、項43～58のいずれか一項に記載の方法。

【0282】

60. カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質が、有機溶液中に

50

約 40 mol%～約 70 mol%、例えば約 45 mol%～約 65 mol%または約 50 mol%～約 60 mol%のカチオンのイオン化可能な脂質；約 15 mol%～約 40 mol%、例えば約 20 mol%～約 35 mol%または約 20 mol%～約 30 mol%のステロイド；および約 15 mol%～約 25 mol%、例えば約 17 mol%～約 21 mol%の中性脂質のモル比で存在する、項 43～59 のいずれか一項に記載の方法。

【0283】

60 a. ステロイドがコレステロールであり、中性脂質がリン脂質である、項 43～60 のいずれか一項に記載の方法。

【0284】

61. 有機溶液中の中性脂質に対するステロイドのモル比が最大 2.5 であり、好ましくは前記比率が 1～2.5 である、項 43～60 a のいずれか一項に記載の方法。

10

【0285】

62. カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質が、有機溶液中に、約 20 mol%～約 40 mol%、例えば約 25 mol%～約 40 mol%または約 25 mol%～約 35 mol%のカチオンのイオン化可能な脂質；約 35 mol%～約 60 mol%、例えば約 40 mol%～約 60 mol%または約 45 mol%～約 60 mol%のステロイド；および約 5 mol%～約 15 mol%、例えば約 7 mol%～約 14 mol%の中性脂質のモル比で存在する、項 43～59 のいずれか一項に記載の方法。

【0286】

62 a. ステロイドがコレステロールであり、中性脂質がリン脂質である、項 62 に記載の方法。

20

【0287】

63. 中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも 3.0 であり、好ましくは前記比率が 3.0～10.0、例えば 5.0～7.0 である、項 43～59、62 および 62 a のいずれか一項に記載の方法。

【0288】

64. 粒子が、約 30 nm～約 500 nm、例えば約 50 nm～約 150 nm のサイズを有する、項 43～63 のいずれか一項に記載の方法。

【0289】

65. 粒子が、脂質ナノ粒子(LNP)、リポソーム、リポプレックス(LPX)、およびそれらの 2 つ以上の混合物からなる群から選択される、項 43～64 のいずれか一項に記載の方法。

30

【0290】

65 a. 粒子が、組成物中に存在するカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質の本質的に全てを含む、項 43～65 のいずれか一項に記載の方法。

【0291】

65 b. 最終水相が、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質を実質的に含まない、項 43～65 a のいずれか一項に記載の方法。

【0292】

65 c. 粒子が、組成物中に存在する核酸の少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 85%を含む、項 43～65 b のいずれか一項に記載の方法。

40

【0293】

65 d. 最終水相が核酸を実質的に含まない、項 43～65 c のいずれか一項に記載の方法。

【0294】

65 e. 組成物中に存在する多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)の少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 20%、およびより好ましくは少なくとも 50%が粒子と結合している、項 43～65 d のいずれか一項に記載の方法。

【0295】

50

66. 核酸がRNA、好ましくはmRNAである、項43～65eのいずれか一項に記載の方法。

【0296】

66a. 核酸がDNAである、項43～65eのいずれか一項に記載の方法。

【0297】

66b. 核酸がsiRNAなどの阻害性RNAである、項43～65eのいずれか一項に記載の方法。

【0298】

67. RNAが(i)ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み、修飾ヌクレオシドは好ましくはシュードウリジン(ψ)、N1-メチル-シュードウリジン(m1 ψ)および5-メチル-ウリジン(m5U)から選択され；(ii)コドン最適化されているコード配列を有し；そして／または(iii)野生型コード配列と比較してG/C含量が増加しているコード配列を有する、項66に記載の方法。

【0299】

68. RNAが、5'キャップ；5' UTR；3' UTR；およびポリA配列の少なくとも1つ、好ましくは全てを含む、項66または項67に記載の方法。

【0300】

69. ポリA配列が、少なくとも100個のAヌクレオチドを含み、ここで、ポリA配列が好ましくはAヌクレオチドの中断配列である、項68に記載の方法。

【0301】

70. 5'キャップがキャップ1構造またはキャップ2構造である、項68または項69に記載の方法。

【0302】

71. RNAが1つ以上のポリペプチドをコードし、ここで、好ましくは1つ以上のポリペプチドが薬学的活性ポリペプチドであるおよび／または対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含む、項66および項67～70のいずれか一項に記載の方法。

【0303】

72. 薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、病原体のタンパク質、タンパク質の免疫原性バリエーションまたはタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、項71に記載の方法。

【0304】

73. 薬学的活性ポリペプチドおよび／または抗原またはエピトープが、SARS-CoV-2スパイク(S)タンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来するかまたはそれである、項71または項72に記載の方法。

【0305】

74. (II)製剤を約-10℃以下に凍結する工程を含む、項43～73のいずれか一項に記載の方法。

【0306】

74a. 組成物中の核酸の濃度が、約1mg/l～約50mg/lである、項74に記載の方法。

【0307】

74b. 最終水性緩衝液が、多価アニオン(例えば無機ポリリン酸)またはその塩を含む、項74または項74aに記載の方法。

【0308】

75. 工程(II)を含まない、項43～73のいずれか一項に記載の方法。

【0309】

75a. 組成物中の核酸の濃度が、約10mg/l～約100mg/lである、項75に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0310】

76. 項43～74bのいずれか一項に記載の方法に従い組成物を製造し、組成物を約－90℃～約－10℃、例えば約－90℃～約－40℃または約－25℃～約－10℃の範囲の温度で保存することを含む、組成物を保存する方法。

【0311】

77. 組成物を、少なくとも1ヶ月間、例えば少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも12ヶ月間、少なくとも24ヶ月間または少なくとも36ヶ月間保存する、項76に記載の方法。

【0312】

78. 項43～75aのいずれか一項に記載の方法に従い組成物を製造し、該組成物を約0℃～約20℃、例えば約1℃～約15℃、約2℃～約10℃または約2℃～約8℃の範囲の温度で、または約5℃の温度で保存することを含む、組成物を保存する方法。

10

【0313】

79. 組成物を、少なくとも1週間、例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月または少なくとも24ヶ月保存する、項78に記載の方法。

【0314】

80. 項43～79のいずれか一項に記載の方法によって製造可能な組成物。

【0315】

81. 凍結形態である、項80に記載の組成物。

20

【0316】

81a. 組成物中の核酸の濃度が、約1mg/l～約50mg/lである、項81に記載の組成物。

【0317】

81b. 凍結組成物解凍後の核酸完全性が、組成物凍結前の組成物の核酸完全性と比較して少なくとも50%である、項81または項81aに記載の組成物。

【0318】

81c. 凍結組成物解凍後の核酸完全性が、組成物凍結前の核酸完全性と比較して少なくとも50%である、項81、項81aおよび項81bのいずれか一項に記載の組成物。

【0319】

82. 凍結組成物解凍後の核酸完全性が、組成物凍結前の核酸完全性と比較して少なくとも90%または実質的に100%である、項81、項81a、項81bおよび項81cに記載の組成物。

30

【0320】

83. 凍結組成物の解凍後の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI)が、組成物凍結前の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／またはPDIと本質的に等しい、項81～82のいずれか一項に記載の組成物。

【0321】

83a. 1回の凍結／解凍サイクル後、好ましくは2回の凍結／解凍サイクル後の組成物の粒子のサイズおよび核酸完全性が、組成物が最初に凍結される前の粒子のサイズおよび核酸完全性と本質的に等しい、項81～83のいずれか一項に記載の組成物。

40

【0322】

84. 液体形態である、項80に記載の組成物。

【0323】

84a. 組成物中の核酸の濃度が、約10mg/l～約100mg/lである、項84に記載の組成物。

【0324】

85. 好ましくは約2℃～約8℃の温度で、組成物を少なくとも1週間保存後の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも90%である、項84または項84a

50

に記載の組成物。

【0325】

85a. 好ましくは約2℃～約8℃の温度で、組成物を少なくとも4週間保存後の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも90%である、項84、項84aおよび項85のいずれか一項に記載の組成物。

【0326】

85b. 好ましくは約2℃～約8℃の温度で、組成物を少なくとも3ヶ月間保存後の核酸完全性が、保存前の核酸完全性と比較して少なくとも90%である、項84、項84a、項85および項85aのいずれか一項に記載の組成物。

【0327】

86. 組成物を少なくとも1週間保存後の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI)が、保存前の核酸粒子のサイズ($Z_{平均}$)および／またはサイズ分布および／またはPDIと本質的に等しい、項84、項84a、項85、項85aおよび項85bのいずれか一項に記載の組成物。

【0328】

87. 項43～74b、項76および項77のいずれか一項に記載の方法によって製造した凍結組成物を準備し、そして該凍結組成物を解凍し、それにより使用準備済医薬組成物を得る工程を含む、使用準備済医薬組成物を製造するための方法。

【0329】

88. 項43～73および75～77のいずれか一項に記載の方法によって製造した液体組成物を準備し、それにより使用準備済医薬組成物を得る工程を含む、使用準備済医薬組成物を製造するための方法。

【0330】

89. 項87または項88に記載の方法によって製造可能な、使用準備済医薬組成物。

【0331】

90. 治療に使用するための、項1～42a、項80～86および項89のいずれか一項に記載の組成物。

【0332】

91. 対象における免疫応答の誘導に使用するための、項1～42a、項80～86および項89のいずれか一項に記載の組成物。

【0333】

92. 項1～42a、項80～86および項89のいずれか一項に記載の組成物を細胞に添加し；そして該組成物と細胞との混合物を十分な時間インキュベートすることを含む、細胞をトランスフェクトする方法。

【0334】

93. 組成物と細胞との混合物を血清の存在下でインキュベートする、項92に記載の方法。

【0335】

93a 血清がヒト血清である、項93に記載の方法。

【0336】

94. カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約40mol%～約70mol%、例えば約45mol%～約65mol%または約50mol%～約60mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約40mol%、例えば約20mol%～約35mol%または約20mol%～約30mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約25mol%、例えば約17mol%～約21mol%を構成する、項92、項93または項93aに記載の方法。

【0337】

94a. ステロイドがコレステロールであり、中性脂質がリン脂質である、項92～94のいずれか一項に記載の方法。

【0338】

10

20

30

40

50

95. 中性脂質に対するステロイドのモル比が最大2.5であり、好ましくは前記比が1～2.5である、項92～94aのいずれか一項に記載の方法。

【0339】

96. カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約40mol%、例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約35mol%～約60mol%、例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約15mol%、例えば約7mol%～約14mol%を構成する、項92に記載の方法。

【0340】

96a. ステロイドがコレステロールであり、中性脂質がリン脂質である、項96に記載の方法。

【0341】

97. 中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも3.0であり、好ましくは前記比率が3.0～10.0、例えば5.0～7.0である、項92、項96および項96aのいずれか一項に記載の方法。

【0342】

98. 細胞をトランスフェクトするための、項1～42a、項80～86および項89のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【0343】

99. 細胞のトランスフェクションが血清存在下で実施される、項98に記載の使用。

【0344】

99a. 血清がヒト血清である、項99に記載の使用。

【0345】

100. カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約40mol%～約70mol%、例えば約45mol%～約65mol%または約50mol%～約60mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約40mol%、例えば約20mol%～約35mol%または約20mol%～約30mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約15mol%～約25mol%、例えば約17mol%～約21mol%を構成する、項98、項99または項99aに記載の使用。

【0346】

100a. ステロイドがコレステロールであり、中性脂質がリン脂質である、項98～100のいずれか一項に記載の使用。

【0347】

101. 中性脂質に対するステロイドのモル比が最大2.5であり、好ましくは前記比率が1～2.5である、項98～100aのいずれか一項に記載の使用。

【0348】

102. カチオンのイオン化可能な脂質が、組成物中に存在する総脂質の約20mol%～約40mol%、例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%を構成し；ステロイドが、組成物中に存在する総脂質の約35mol%～約60mol%、例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%を構成し；そして中性脂質が、組成物中に存在する総脂質の約5mol%～約15mol%、例えば約7mol%～約14mol%を構成する、項98に記載の使用。

【0349】

102a. ステロイドがコレステロールであり、そして中性脂質がリン脂質である、項102に記載の使用。

【0350】

103. 中性脂質に対するステロイドのモル比が少なくとも3.0であり、好ましくは前記比率が3.0～10.0、例えば5.0～7.0である、項98、項102および項102aのいずれか一項に記載の使用。

10

20

30

40

50

【0351】

本開示のさらなる態様が、本明細書に開示されている。

【図面の簡単な説明】

【0352】

【図1】第二の態様の方法に従う特定の工程を示す例示的なフローチャートである。

【0353】

【図2】非PEG脂質粒子組成物対安定ポリリン酸脂質粒子組成物の凝集。A：カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質を含むが、PEGおよび無機ポリリン酸を含まない脂質粒子組成物を製造し、そのサイズ(直径($Z_{平均}$))(nm)を経時的に(最大30分)測定した。B：種々の濃度(0~10mM)のカチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、中性脂質および無機ポリリン酸(三リン酸(3P))を含み、PEGを含まない脂質粒子組成物を製造し、そのサイズ(直径($Z_{平均}$))(nm)製造から16時間後に測定した。

10

【0354】

【図3】ポリリン酸脂質粒子組成物は様々な条件下で安定である。RNA(2つの異なる濃度：10または70mg/l)、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、中性脂質、無機ポリリン酸(三リン酸(3P)、粒子形成後に2.5mMの濃度で添加、任意選択的に最終濾過(透析)段階にも存在する)とPEG脂質を含む(+PEG)またはPEG脂質なし(-PEG)の、脂質粒子組成物を製造した。様々な条件下(5℃、-20℃または-70℃)で保存した後、粒子組成物のコロイドパラメータ(直径(nm)および多分散性指数(PDI))を測定した。

20

【0355】

【図4】血清の非存在下または存在下での、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質のモル比の違いによる発現レベルへの影響。RNA(ルシフェラーゼをコードする)、カチオンのイオン化可能な脂質(A：脂質XIV-3、B：脂質XIV-1、C：脂質XIV-2、D：脂質G(DPL-14))、ステロイド(コレステロール)、中性脂質(DSPC)および無機ポリリン酸(三リン酸(3P))を図に示されているDSPCのモルパーセンテージを有する組成物を用いて製造し、脂質組成物の残りは図に示されているモルパーセンテージのイオン化可能脂質(ION)およびコレステロール(CHOL)であった。細胞を、血清存在下(+血清(+S))または血清非存在下(-血清(-S))で、いずれかの組成物でトランスフェクトした。ルシフェラーゼ発現量を測定し、血清非存在下(-S)のルシフェラーゼ発現量に対する血清存在下(+S)のルシフェラーゼ発現量の比(比+S/-S)に基づいて血清刺激を算出した。図4は、ルシフェラーゼ発現、血清刺激($\log_{10}$ (比+S/-S)値で表示されている)の結果を示す。

30

【0356】

【図5】多価アニオンを用いた脂質粒子組成物の安定化。イオン化可能な脂質成分として(A)DODAP、(B)脂質Dまたは(C)脂質XIV-2を用いて、ステルス脂質を含まないアルカリ性生コロイド(raw colloid)を製造した。その物質を緩衝液A(HEPES pH7.4)、緩衝液B(緩衝液A+5mM 三リン酸ナトリウム)、緩衝液C(緩衝液A+5mM ニリン酸ナトリウム)、緩衝液D(緩衝液A+5mM リン酸ナトリウム)または緩衝液E(緩衝液A+5mM クエン酸ナトリウム)に対して透析し、成熟コロイドを得た。PEG脂質を含むコントロール材料を同様に処理した。成熟コロイドの粒子径および多分散性を48時間にわたってモニターした。

40

【0357】

【図6】多価アニオンを用いた脂質粒子組成物の活性。図5で記載されているとおり成熟したコロイドを、HEK細胞にmRNAをトランスフェクトする能力について試験した。イオン化可能な脂質は、(A)DODAP、(B)脂質Dまたは(C)脂質XIV-2であった。

【発明を実施するための形態】

【0358】

配列の説明

50

以下の表は、本明細書で言及される特定の配列の一覧である。

【表 1】

表 1：配列の説明

配列番号	説明	配列
5' -UTR (hA g-コザック)		
1	5' -UTR	AACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAAACCCGCCACC
3' -UTR (F I エlement)		
2	3' -UTR	CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGU CUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCACCUCACCCACUCACCACC UCUGCUAGUCCAGACACCUCCAAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCC UAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUU AACUAAGCUAUACUAAACCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACC
A 3 0 L 7 0		
3	A 3 0 L 7 0	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
S e c / M I T D		
4	S e c	MRVMAPRTLILLSGALALTETWAGS
5	M I T D	IVGIVAGLAVLAVVVI GAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGS D V S L T A
P 2 P 1 6		
6	P 2 P 1 6	KKQYIKANSKFIGITELKKLGGGKRGGGKMTNSVDDALINSTKIYSYFSPVISKVN QGAQGKKL
G S リンカー		
7	G S リンカー 1	GGSGGGGSGGG
8	G S リンカー 2	GSSGGGGSPGGSS
ヘルパーエピトープ		
9	P 2	QYIKANSKFIGITEL
10	P 1 6	MTNSVDDALINSTKIYSYFSPVISKVNQGAQG

10

20

30

40

50

【0359】

発明の詳細な説明

本開示を下にさらに詳細に記載するが、本開示は方法、プロトコルおよび試薬は変わり得るために、本明細書に記載の特定のものに限定されないことは理解される。また本明細書で使用する用語は、特定の実施態様の記載のみを目的とし、添付する特許請求の範囲によってのみ限定される本開示の範囲を限定する意図はないことも理解される。他に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術的および科学的用語は、当業者に共通して理解されるのと同じ意味を有する。

【0360】

以下では、本開示の要素をより詳細に説明する。これらの要素は具体的実施態様と共に挙げられているが、しかしながら、それらは任意の方法かつ任意の数で組み合わせ、さらなる実施態様を作ることとはできることは理解されるべきである。多種多様に記載される例および好ましい実施態様は、明示的に記載された実施態様にのみ本開示を限定すると解釈されてはならない。この記載は、明示的に記載された実施態様と任意の数の開示されたおよび／または好ましい要素を組み合わせる、実施態様を支持しかつ包含すると理解されるべきである。さらに、本明細書における全ての記載された要素のあらゆる置換および組

み合わせは、状況から反することは示されない限り、本出願の記載により開示されるとみなされるべきである。

【0361】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Koelbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995)に記載のとおり定義する。

【0362】

本開示の実施は、特に断らない限り、該分野の文献に説明されている慣用の化学、生物学、細胞生物学、免疫学および組換えDNA技術を用いる(例えば、Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1990; Streitwieser/Heathcock, “Organische Chemie”, VCH, 1990; Beyer/Walter, “Lehrbuch der Organischen Chemie”, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1988; Carey/Sundberg, “Organische Chemie”, VCH, 1995; March, “Advanced Organic Chemistry”, John Wiley & Sons, 1985; Roempp Chemie Lexikon, Falbe/Regitz (Hrsg.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989参照)。

10

【0363】

本明細書および以下の特許請求の範囲をとおして、状況から反する解釈が必要ではない限り、用語「含む」および「含み」および「含んで」などのその変形は、記載するメンバー、整数または工程またはメンバー、整数または工程の群の包含を含意するが、あらゆる他のメンバー、整数または工程またはメンバー、整数または工程の群の除外は含意しないと理解されるべきである。用語「から本質的になる」は、何らかの本質的な意義の他のメンバー、整数または工程の除外を意味する。用語「含む」は用語「から本質的になる」を含み、これは、次に用語「からなる」を含む。故に、本明細書における各場合、用語「含む」は、用語「から本質的になる」または「からなる」に置き換えられ得る。同様に、本明細書における各場合、用語「から本質的になる」は用語「からなる」に置き換えられ得る。

20

【0364】

本開示を説明する状況(特に特許請求の範囲における状況)で使用される単数表現および類似表現は、本明細書で特に断らない限りまたは状況に明らかに反しない限り、単数および複数両方を包含すると解釈すべきである。

30

【0365】

本明細書に記載の全ての方法は、本明細書で特に断らない限りまたは状況に明らかに反しない限り、任意の適当な順番で実施できる。

【0366】

本明細書に提供する任意かつ全ての例または例示的用語(例えば、「など」)の使用は、単に本開示を説明する意図であり、その他請求される本開示の範囲に限定を課さない。本明細書において、本開示の実施に必須の何らかの請求されていない要素を示すと解釈すべき用語はない。

40

【0367】

本明細書で使用する時、「および／または」は、他方を伴うまたは伴わない2個の特定した特性または成分の各々の具体的開示として解釈される。例えば、「Xおよび／またはY」は、各々は個々に本明細書で示されるかのように、(i) X、(ii) Y、および(iii) XおよびYの各々の具体的開示として解釈される。

【0368】

本開示の状況において、用語「約」は、当業者は問題の特性の技術的效果をなお確信すると理解される、精度の間隔を意味する。本用語は、典型的に示す数値からの±10%、例えば±5%、±4%、±3%、±2%、±1%、±0.9%、±0.8%、±0.7%、

50

±0.6%、±0.5%、±0.4%、±0.3%、±0.2%、±0.1%、±0.05%、例えば±0.01%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±10%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は、示す数値からの±5%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±4%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は、示す数値からの±3%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±2%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は、示す数値からの±1%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は、示す数値からの±0.9%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.8%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.7%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.6%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.5%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.4%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.3%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.2%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.1%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.05%の逸脱を示す。ある実施態様において、「約」は示す数値からの±0.01%の逸脱を示す。当業者には認識されたとおり、ある技術的効果についての数値からの具体的なこのような逸脱は、技術的効果の性質による。例えば、天然または生物学的技術的効果は、一般に人為的または工学的技術的効果よりこのような逸脱は大きい。

10

【0369】

20

本明細書での値の範囲の参照は、単に範囲内に入る各別個の数値を個々に参照する省略的方法として提供することが意図される。本明細書で特に断らない限り、各個々の値を、個々に本明細書に言及されているかのように本明細書に包含させる。

【0370】

本明細書をとおしていくつかの文献は引用されている。本明細書で引用する文献の各々(全特許、特許出願、科学的刊行物、製造業者の明細、指示などを含む)は、上記であろうが、下記であろうが、全体として引用により本明細書に包含させる。本明細書での全ては、先行発明によって本開示はかかる開示に先行する権利はないことを認めるものとして解釈されるものではない。

【0371】

30

定義

下に、本開示の全態様に適用される定義を提供する。次の用語は、特に断らない限り、次の意味を有する。あらゆる定義されていない用語は、当分野で認識されている意味を有する。

【0372】

本明細書で使用する「減少」または「阻害」などの用語は、例えば、レベルの約5%以上、約10%以上、約15%以上、約20%以上、約25%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上または約75%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。用語「阻害」または類似の用語は、完全なまたは本質的に完全な阻害、すなわち0または本質的に0への減少を含む。

40

【0373】

本明細書使用する「増強」および「増加」などの用語は、例えば、レベルの少なくとも約5%以上、約10%以上、約15%以上、約20%以上、約25%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約75%以上または約100%以上の全体的な増加または増強を引き起こす能力を意味する。ある実施態様において、これらの用語は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約80%または少なくとも約100%の増加または増強に関連する。

【0374】

本明細書で使用する「生理学的pH」は、約7.5または約7.4のpHを指す。ある

50

実施態様において、生理的学的 pH は 7.3 ~ 7.5 である。ある実施態様において、生理的学的 pH は 7.35 ~ 7.45 である。ある実施態様において、生理的学的 pH は 7.3、7.35、7.4、7.45 または 7.5 である。

【0375】

本明細書で使用する「生理学的条件」は、生存対象、特にヒトにおける条件(特に pH と温度)を指す。好ましくは、生理学的条件は、生理的学的 pH および／または約 37℃ の温度を意味する。

【0376】

本開示で使用する「%(w/v)」(または「%w/v」)は、ミリリットル(ml)での溶液総体積のパーセントとして表す、グラム(g)で溶質の量を測定する濃度の単位である重量／体積パーセントを指す。

10

【0377】

本開示で使用する「体積%」または「%(v/v)」(または「%v/v」)は、ミリリットル(ml)での溶液総体積のパーセントとして表す、ミリリットル(ml)で液体物質の量を測定する濃度の単位である体積パーセントを指す。

【0378】

本開示で使用する「重量%」または「%(w/w)」(または「%w/w」)は、グラム(g)での総組成物の総重量のパーセントとして表す、グラム(g)で物質の量を測定する濃度の単位である、重量パーセントを指す。

【0379】

本開示で使用する「mol%」は、全成分のモル数の合計に対するある成分のモル数の比に 100 を乗じたものとして定義される。

20

【0380】

本開示で使用する「総脂質中の mol%」は、総脂質のモル数の合計に対するある脂質成分のモル数の比に 100 を乗じたものとして定義される。この状況で、ある実施態様において、用語「総脂質」は脂質および脂質様物質を含む。

【0381】

本明細書で使用する用語「相対量」は、全成分(例えば、総脂質成分)のモル数の合計に対する、ある成分(例えば、脂質成分)のモル数を意味する。例えば、組成物が 3 つの脂質成分(脂質 1、脂質 2 および脂質 3)をそれぞれ 45 mol、45 mol および 10 mol の量で含むならば、相対量は 45 mol%(脂質 1)、45 mol%(脂質 2) および 10 mol%(脂質 3)となる。ある成分の相対量を増やすには、(脂質の絶対量は実質的に一定に保たれるように)他の成分の少なくとも 1 つの相対量を減らす必要があり、その逆も同様である。例えば、脂質 1 および脂質 3 の相対量を(例えば、58 mol%(脂質 1) および 20 mol%(脂質 3)に)増やすには、脂質 2 の相対量を(より低い相対量、例えば 22 mol%に)減らす必要がある。さらに、脂質 1 および脂質 3 の相対量を(例えば、39 mol%(脂質 1) および 5 mol%(脂質 3)に)減らすには、脂質 2 の相対量を(より高い相対量、例えば 56 mol%に)増やす必要がある。

30

【0382】

用語「イオン強度」は、特定の溶液中の種々のイオン種の数とその各電荷の数学的関係を指す。故に、イオン強度 I は数学的に、式：

40

【数 1】

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum_i z_i^2 \cdot c_i$$

〔式中、 c は特定のイオン種のモル濃度であり、 z はその電荷の絶対値である。〕により表される。総和 Σ は、溶液中の全種類のイオン(i)に及ぶ。

【0383】

本開示によると、ある実施態様において、用語「イオン強度」は単価イオンの存在に関

50

する。

【0384】

二価無機イオン、特に二価無機カチオンの存在に関して、キレート剤の存在によるその濃度または有効濃度(遊離イオンの存在)は、ある実施態様において、RNAの分解を防止するために十分に低い。ある実施態様において、二価無機イオンの濃度または有効濃度は、RNAヌクレオチド間のホスホジエステル結合の加水分解の触媒レベル以下である。ある実施態様において、遊離二価無機イオンの濃度は20 μM以下である。ある実施態様において、遊離二価無機イオンは存在しないかまたは本質的に存在しない。

【0385】

本明細書で使用する「モル比」は、任意の2つの物質のモル量の比を指す。例えば、第一の物質が組成物中に1ミリモル(mmol)の量で存在し、第二の物質が組成物中に2ミリモル(mmol)の量で存在するならば、第一の物質と第二の物質のモル比は1:2または0.5である。

【0386】

「浸透圧」とは、溶媒のキログラムあたりの溶質のモル数として表される、特定の溶質の濃度を指す。

【0387】

用語「凍結乾燥する」または「凍結乾燥」は、物質を、凍結し、次いで周りの圧を低下させ(例えば、15 Pa未満、例えば10 Pa未満、5 Pa未満または1 Pa未満またはそれ以下)、物質中の凍結媒体を直接固体相からガス相に昇華させることによる、物質のフリーズドライを指す。故に、用語「凍結乾燥」および「フリーズドライ」は本明細書では相互交換可能に使用する。

【0388】

用語「噴霧乾燥」は、容器(噴霧乾燥器)内で(加熱)ガスと霧状(噴霧)である流体の混合により物質を噴霧乾燥させ、該容器で、形成された液滴からの溶媒は蒸発し、乾燥粉末となることを指す。

【0389】

用語「再構成」は、水などの溶媒を乾燥生成物に添加し、元の液体状態などの液体状態に戻すことを指す。

【0390】

用語「凍結」は、通常、熱の除去による、液体の固化に関する。ある実施態様において、凍結は解凍とは逆の作用である。

【0391】

用語「解凍」は、通常、熱の付加による、固体の液化に関する。ある実施態様において、解凍は凍結とは逆の作用である。

【0392】

粒子、特にLNP、リボソームおよび／またはリボプレックスを含む組成物／製剤に関連して本明細書で使用する用語「水相」は、移動相または液体相、すなわち、(形式上)粒子以外の溶解された全成分を含む、連続的水相を意味する。故に、LNPなどの粒子は水相に分散し、水相が化合物Xを実質的に含まないとき、水相は、実質的におよび現実的に実行可能であるような方法でXを含まず、例えば、水性組成物中の化合物Xの濃度は1重量%未満である。しかしながら、同時に、水相に分散する粒子は化合物Xを、1重量%を超える量で含み得ることも可能である。

【0393】

本開示の状況における用語「組換え」は、「遺伝子操作を介して製造すること」を意味する。ある実施態様において、本開示の状況における「組換え物体」は、天然には存在しない。

【0394】

本明細書で使用する用語「天然に存在する」は、物体が自然に見られ得るとの事実を指す。例えば、生物(ウイルスを含む)に存在し、天然源から単離でき、実験室で人により意

10

20

30

40

50

図的に修飾されていないペプチドまたは核酸は、天然に存在する。用語「天然に見られる」は「天然に存在する」ことを意味し、既知物体ならびにまだ天然から発見されていないおよび／または単離されていないが、将来的に天然源から発見されるおよび／または単離される可能性のある物体を含む。

【0395】

本明細書で使用する用語「室温」および「環境温度」は、本明細書では相互交換可能に使用され、少なくとも約15℃、好ましくは約15℃～約35℃、約15℃～約30℃、約15℃～約25℃または約17℃～約22℃の温度を指す。このような温度は、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃および22℃を含む。

【0396】

用語「アルキル」は、飽和直鎖または分岐鎖炭化水素のモノラジカルを指す。好ましくは、アルキル基は、1～12個(1～10個など)の炭素原子、すなわち、C₁₋₁₂アルキルと略す1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個の炭素原子(例えば、C₁₋₁₀アルキルと略す1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の炭素原子)、より好ましくは1～8個の炭素原子、例えば1～6個または1～4個の炭素原子を含む。アルキル基の例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル(別名2-プロピルまたは1-メチルエチル)、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペンチル、1,2-ジメチル-プロピル、イソアミル、n-ヘキシル、イソヘキシル、sec-ヘキシル、n-ヘプチル、イソヘプチル、n-オクチル、2-エチル-ヘキシル、n-ノニル、n-デシル、n-ウンデシル、n-ドデシルなどを含む。「置換アルキル」は、アルキレン基の水素原子の1以上(例えば、1からアルキル基に結合した水素原子の最大数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または最大10、例えば1～5、1～4または1～3または1または2)が、水素以外の置換基に置き換えられていることを意味する(1を超える水素原子が置き換えられるとき、置換基は同一でも異なってもよい)。好ましくは、水素以外の置換基は、本明細書に特定する第一レベル置換基である。置換アルキルの例は、クロロメチル、ジクロロメチル、フルオロメチルおよびジフルオロメチルを含む。

【0397】

用語「アルキレン」は、飽和直鎖または分岐鎖炭化水素のジラジカルを指す。好ましくは、アルキレンは、1～12個(1～10個など)の炭素原子、すなわち、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個の炭素原子(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の炭素原子)、より好ましくは1～8個の炭素原子、例えば1～6個または1～4個の炭素原子を含む。アルキレン基の例は、メチレン、エチレン(すなわち、1,1-エチレン、1,2-エチレン)、プロピレン(すなわち、1,1-プロピレン、1,2-プロピレン(-CH(CH₃)CH₂-)、2,2-プロピレン(-C(CH₃)₂-)および1,3-プロピレン)、ブチレン異性体(例えば、1,1-ブチレン、1,2-ブチレン、2,2-ブチレン、1,3-ブチレン、2,3-ブチレン(cisもしくはtransまたはそれらの混合物)、1,4-ブチレン、1,1-イソブチレン、1,2-イソブチレンおよび1,3-イソブチレン)、ペンチレン異性体(例えば、1,1-ペンチレン、1,2-ペンチレン、1,3-ペンチレン、1,4-ペンチレン、1,5-ペンチレン、1,1-イソペンチレン、1,1-sec-ペンチル、1,1-ネオペンチル)、ヘキシレン異性体(例えば、1,1-ヘキシレン、1,2-ヘキシレン、1,3-ヘキシレン、1,4-ヘキシレン、1,5-ヘキシレン、1,6-ヘキシレンおよび1,1-イソヘキシレン)、ヘプチレン異性体(例えば、1,1-ヘプチレン、1,2-ヘプチレン、1,3-ヘプチレン、1,4-ヘプチレン、1,5-ヘプチレン、1,6-ヘプチレン、1,7-ヘプチレンおよび1,1-イソヘプチレン)、オクチレン異性体(例えば、1,1-オクチレン、1,2-オクチレン、1,3-オクチレン、1,4-オクチレン、1,5-オクチレン、1,6-オクチレン、1,7-オクチレン、1,8-オクチレンおよび1,1-イソオクチレン)な

10

20

30

40

50

どを含む。少なくとも3個の炭素原子および各末端に自由原子価を有する直鎖アルキレン部分はまた複数のメチレンとしても称され得る(例えば、1, 4-ブチレンはテトラメチレンとも称され得る)。一般に、アルキレン部分について上記のように末尾「イレン」を使用する代わりに、末尾「ジイル」も使用してよい(例えば、1, 2-ブチレンはブタン-1, 2-ジイルとも称され得る)。「置換アルキレン」は、アルキレン基の水素原子の1以上(例えば、1からアルキレン基に結合した水素原子の最大数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または最大10、例えば1~5、1~4または1~3または1または2)が、水素以外の置換基に置き換えられていることを意味する(1を超える水素原子が置き換えられるとき、置換基は同一でも異なってもよい)。好ましくは、水素以外の置換基は、本明細書に特定する第一レベル置換基である。

10

【0398】

用語「アルケニル」は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する不飽和直鎖または分岐炭化水素のモノラジカルを指す。一般に、アルケニル基における炭素-炭素二重結合の最大数は、アルケニル基における炭素原子数を2で割り、アルケニル基の炭素原子数が奇数であるならば、分数の結果を次の整数に切り捨てることによって算出される整数に等しくできる。例えば、9個の炭素原子を有するアルケニル基について、炭素-炭素二重結合の最大数は4である。好ましくは、アルケニル基は1~6個(1~4個など)、すなわち、1個、2個、3個、4個、5個、または6個の炭素-炭素二重結合を有する。好ましくは、アルケニル基は、2~12個(2~10個など)の炭素原子、すなわち、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個の炭素原子(2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の炭素原子など)、より好ましくは2~8個の炭素原子、例えば2~6個の炭素原子または2~4個の炭素原子を含む。故に、好ましい実施態様において、アルケニル基は、 C_{2-12} アルケニルと略す2~12個(例えば、2~10個)の炭素原子および1個、2個、3個、4個、5個または6個(例えば、1個、2個、3個、4個または5個)の炭素-炭素二重結合を含み、より好ましくは、2~8個の炭素原子および1個、2個、3個または4個の炭素-炭素二重結合、例えば2~6個の炭素原子および1個、2個または3個の炭素-炭素二重結合または2~4個の炭素原子および1個または2個の炭素-炭素二重結合を含む。炭素-炭素二重結合は、*cis*(Z)配置または*trans*(E)配置であり得る。アルケニル基の例は、ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル(すなわち、アリル)、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、1-ヘプテニル、2-ヘプテニル、3-ヘプテニル、4-ヘプテニル、5-ヘプテニル、6-ヘプテニル、1-オクテニル、2-オクテニル、3-オクテニル、4-オクテニル、5-オクテニル、6-オクテニル、7-オクテニル、1-ノネニル、2-ノネニル、3-ノネニル、4-ノネニル、5-ノネニル、6-ノネニル、7-ノネニル、8-ノネニル、1-デセニル、2-デセニル、3-デセニル、4-デセニル、5-デセニル、6-デセニル、7-デセニル、8-デセニル、9-デセニル、1-ウンデセニル、2-ウンデセニル、3-ウンデセニル、4-ウンデセニル、5-ウンデセニル、6-ウンデセニル、7-ウンデセニル、8-ウンデセニル、9-ウンデセニル、10-ウンデセニル、1-ドデセニル、2-ドデセニル、3-ドデセニル、4-ドデセニル、5-ドデセニル、6-ドデセニル、7-ドデセニル、8-ドデセニル、9-ドデセニル、10-ドデセニル、11-ドデセニルなどを含む。アルケニル基が窒素原子に結合しているならば、二重結合は窒素原子に対してアルファではあり得ない。「置換アルケニル」は、アルケニル基の水素原子の1以上(例えば1からアルケニル基に結合する水素原子の最大数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または最大10、例えば1~5、1~4または1~3または1または2)が、水素以外の置換基に置き換えられていることを意味する(1を超える水素原子が置き換えられるとき、置換基は同一でも異なってもよい)。好ましくは、水素以外の置換基は本明細書に特定する第一レベル置換基である。

20

30

40

【0399】

50

用語「アルキニル」は、炭素原子の総数が6～30個、典型的に6～20個、しばしば6～18個であり得る、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有する線形または分岐単価炭化水素部分を指す。アルキニル基は、任意選択的に1つ以上の炭素炭素二重結合を有し得る。一般に、アルキニル基における炭素-炭素三重結合の最大数は、アルキニル基における炭素原子数を2で割り、アルキニル基における炭素原子数が奇数であるならば、分数の結果を次の整数に切り捨てることによって算出される整数に等しくできる。例えば、9個の炭素原子を有するアルキニル基について、炭素-炭素三重結合の最大数は4である。好ましくは、アルキニル基は1～6個(1～4個など)、すなわち1個、2個、3個、4個、5個または6個、より好ましくは1または2個の炭素-炭素三重結合を有する。

【0400】

用語「アルケニレン」は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する、不飽和直鎖または分岐炭化水素のジラジカルを指す。一般に、アルケニレン基における炭素-炭素二重結合の最大数は、アルケニレン基における炭素原子の数を2で割り、アルケニレン基における炭素原子数が奇数であるならば、分数の結果を次の整数に切り捨てることによって算出される整数に等しくできる。例えば、9個の炭素原子を有するアルケニレン基について、炭素-炭素二重結合の最大数は4である。好ましくは、アルケニレン基は、1～6個(1～4個など)、すなわち、1個、2個、3個、4個、5個または6個の炭素-炭素二重結合を有する。好ましくは、アルケニレン基は、2～12個(2～10個など)の炭素原子、すなわち、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個または12個の炭素原子(例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の炭素原子)、より好ましくは2～8個の炭素原子、例えば2～6個の炭素原子または2～4個の炭素原子を含む。故に、好ましい実施態様において、アルケニレン基は、2～12個(2～10個の炭素など)の原子および1個、2個、3個、4個、5個または6個(1個、2個、3個、4個または5個など)の炭素-炭素二重結合を含み、より好ましくは、2～8個の炭素原子および1個、2個、3個または4個の炭素-炭素二重結合、例えば、2～6個の炭素原子および1個、2個または3個の炭素-炭素二重結合または2～4個の炭素原子および1個または2個の炭素-炭素二重結合を含む。炭素-炭素二重結合は、*cis*(Z)配置または*trans*(E)配置であり得る。アルケニレン基の例は、エテン-1, 2-ジイル、ビニリデン(別名エテニリデン)、1-プロペン-1, 2-ジイル、1-プロペン-1, 3-ジイル、1-プロペン-2, 3-ジイル、アリリデン、1-ブテン-1, 2-ジイル、1-ブテン-1, 3-ジイル、1-ブテン-1, 4-ジイル、1-ブテン-2, 3-ジイル、1-ブテン-2, 4-ジイル、1-ブテン-3, 4-ジイル、2-ブテン-1, 2-ジイル、2-ブテン-1, 3-ジイル、2-ブテン-1, 4-ジイル、2-ブテン-2, 3-ジイル、2-ブテン-2, 4-ジイル、2-ブテン-3, 4-ジイルなどを含む。アルケニレン基が窒素原子に結合しているならば、二重結合は窒素原子に対してアルファではあり得ない。「置換アルケニレン」は、アルケニレン基の水素原子の1以上(例えば1からアルケニレン基に結合した水素原子の最大数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または最大10、例えば1～5、1～4または1～3または1または2)が、水素以外の置換基に置き換えられていることを意味する(1を超える水素原子が置き換えられるとき、置換基は同一でも異なってもよい)。好ましくは、水素以外の置換基は本明細書に特定する第一レベル置換基である。

【0401】

用語「シクロアルキル」は、好ましくは3～14個の炭素原子、例えば3～12個または3～10個の炭素原子、すなわち3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個または14個の炭素原子(例えば3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の炭素原子)、より好ましくは3～7個の炭素原子を有する、「アルキル」および「アルケニル」の環状非芳香族バージョンを表す。シクロアルキル基の例は、シクロプロピル、シクロプロペニル、シクロブチル、シクロブテニル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、シクロヘプテニル、シクロオクチル、シクロオクテニル、シクロノニル、シクロノネニル、

シクロデシル、シクロデセニルおよびアダマンチルを含む。シクロアルキル基は、1つの環(単環式)、2つの環(二環式)、または2つを超える環(多環式)から構成される。

【0402】

用語「シクロアルキレン」は、「アルキレン」の環状非芳香族バージョンを表し、ジェミナル、ビシナルまたは孤立ジラジカルである。ある実施態様において、シクロアルキレンは(i)単環式または多環式(例えば二または三環式)および/または(ii)3～14員(すなわち、3員、4員、5員、6員、7員、8員、9員、10員、11員、12員、13員または14員、例えば3～12員または3～10員)である。ある実施態様において、シクロアルキレンは単環、二環または三環式3～14員(すなわち、3員、4員、5員、6員、7員、8員、9員、10員、11員、12員、13員または14員、例えば3～12員または3～10員)シクロアルキレンである。一般に、シクロアルキレン部分について、上記のように末尾「イレン」を使用する代わりに、末尾「ジイル」も使用してよい(例えば、1,2-シクロプロピレンはシクロプロパン-1,2-ジイルとも称し得る)。シクロアルキレン基の例は、シクロヘキシレン、シクロヘプチレン、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロオクチレン、ビシクロ[3.2.1]オクチレン、ビシクロ[3.2.2]ノニレンおよびアダマンタニレン(例えば、トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-2,2-ジイル)を含む。「置換シクロアルキレン」は、アルキレン基の水素原子の1以上(例えば、1からシクロアルキレン基に結合した水素原子の最大数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または最大10、例えば1～5、1～4または1～3または1または2)が、水素以外の置換基に置き換えられていることを意味する(1を超える水素原子が置き換えられるとき、置換基は同一でも異なってもよい)。好ましくは、水素以外の置換基は本明細書に特定する第一レベル置換基である。

10

20

【0403】

用語「シクロアルケニレン」は、「アルケニレン」の環状非芳香族バージョンを表し、ジェミナル、ビシナルまたは孤立ジラジカルである。一般に、シクロアルケニレン基における炭素-炭素二重結合の最大数は、シクロアルケニレン基における炭素原子数が奇数であるならば、分数の結果を、次の整数に切り捨てることによって算出される整数に等しくできる。例えば、9個の炭素原子を有するシクロアルケニレン基について、炭素-炭素二重結合の最大数は4である。好ましくは、シクロアルケニレン基は、1～6個(1～4個など)、すなわち、1個、2個、3個、4個、5個または6個の炭素-炭素二重結合を有する。ある実施態様において、シクロアルケニレンは(i)単環式または多環式(例えば二または三環式)および/または(ii)3～14員(すなわち、3員、4員、5員、6員、7員、8員、9員、10員、11員、12員、13員または14員、例えば3～12員または3～10員)である。ある実施態様において、シクロアルケニレンは単環、二環または三環式3～14員(すなわち、3員、4員、5員、6員、7員、8員、9員、10員、11員、12員、13員または14員、例えば3～12員または3～10員)シクロアルケニレンである。シクロアルケニレン基の例は、シクロヘキセニレン、シクロヘプテニレン、シクロプロペニレン、シクロブテニレン、シクロペンテニレンおよびシクロオクテニレンを含む。「置換シクロアルケニレン」は、シクロアルケニレン基の水素原子の1以上(例えば1からシクロアルケニレン基に結合した水素原子の最大数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または最大10、例えば1～5、1～4または1～3または1または2)が、水素以外の置換基に置き換えられていることを意味する(1を超える水素原子が置き換えられるとき、置換基は同一でも異なってもよい)。好ましくは、水素以外の置換基は本明細書に特定する第一レベル置換基である。

30

40

【0404】

用語「アリール」は、芳香族環状炭化水素のモノラジカルを指す。好ましくは、アリール基は、1つの環(例えば、フェニル)または2つ以上の縮合環(例えば、ナフチル)で配置され得る3～14個(例えば、5個、6個、7個、8個、9個または10個など)の炭素原子を含む。アリール基の例は、シクロプロペニル、シクロペンタジエニル、フェニル、インデニル、ナフチル、アズレニル、フルオレニル、アントリルおよびフェナントリルを含

50

む。好ましくは、「アリール」は、6個の炭素原子を含む単環式環、または10個の炭素原子を含む芳香族二環式環系を指す。好ましい例はフェニルおよびナフチルである。アリールはフラーレンを含まない。

【0405】

炭化水素に関連してする用語「芳香族」は、分子全体が芳香族でなければならないことを意味する。例えば、単環式アリールが水素化されているならば(部分的にまたは完全に)、得られた水素化環状構造は、本開示の目的で、シクロアルキルとして分類される。同様に、二環式または多環式アリール(例えばナフチル)が水素化されているならば、得られた水素化二環式または多環式構造(例えば1,2-ジヒドロナフチル)は、本開示の目的でシクロアルキルとして分類される(1,2-ジヒドロナフチルにおけるように、一環はなお芳香族であっても)。

10

【0406】

本明細書で使用する用語「ヒドロカルビル」は、炭化水素分子からH原子を1つ取り除くことによって得られる単価の有機基に関する。ある実施態様において、ヒドロカルビル基は非環式、例えば、線形(直鎖)または分岐である。ヒドロカルビル基の代表例は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、およびそれらの組合せ(例えば、アリールアルキル(アラルキル)など)を含む。ヒドロカルビル基の特定の例は、 C_{1-6} アルキル、アリールおよびアリール(C_{1-6} アルキル)である。ある実施態様において、ヒドロカルビル基は、炭化水素の全体的な極性が比較的無極性のままであることを条件として、(例えば、本明細書に定義する1つ以上の第一レベル置換基で)任意選択的に置換される。

20

【0407】

典型的な第一レベル置換基は、好ましくは C_{1-3} アルキル、フェニル、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-SCH_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-z(CH_3)_z$ 、 $-C(=O)OH$ および $-C(=O)OCH_3$ からなる群から選択され、ここで、 z は0、1または2であり、 C_{1-3} アルキルはメチル、エチル、プロピルまたはイソプロピルである。特に好ましい第一レベル置換基は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、例えばハロゲン(例えば、F、ClまたはBr)および $-CF_3$ からなる群から選択される。

【0408】

本明細書で使用する用語「第三級アミン部分」は、3つの有機置換基(ここで、置換基は互いに同一でも異なってもよい)で置換された窒素原子を含む部分に関する。ある実施態様において、有機置換基は、(例えば、本明細書に定義する1つ以上の第一レベル置換基で)任意選択的に置換されたヒドロカルビル基(例えばアルキル基、特に C_{1-6} アルキル基)から選択される。

30

【0409】

本明細書で使用する用語「濾過」は、組成物に含まれる成分の分子サイズに基づいて、液体組成物の少なくとも1つの成分(例えば、塩などの透過性分子、低分子タンパク質、溶媒など)の除去または分離を伴うあらゆるプロセスに関する。この分離は、微小分子透過性フィルター(例えば、ダイアフィルトレーション用またはタンジェンシャルフロー濾過用)または半透膜(例えば、透析用)を使用できる。したがって、濾過の例は、透析、タンジェンシャルフロー濾過およびダイアフィルトレーションを含む。

40

【0410】

凍結組成物に関連して本明細書で使用する用語「凍結組成物解凍後」は、凍結組成物が、特徴(例えば組成物に含まれる粒子(例えばLNP)の核酸完全性(RNA完全性など)および/またはサイズ(Z 平均)および/またはサイズ分布および/またはPDI)が測定され得る前に解凍されなければならないことを意味する。

【0411】

「単価」化合物は、目的の官能基1個のみを有する化合物に関する。例えば、単価の酸は、1個の酸基(例えば、1個のカルボキシル($-COOH$)基)のみを有する化合物に関する。単価のカチオンは、例えば、アルカリカチオン(例えば、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+)、ア

50

ンモニウムカチオン(NH_4^+)、または1個の第1級、第2級または第3級アミン基を有する有機化合物(トリエチルアミン、トリメチルアミンなどのプロトン化体など)、1個の第4級アミン基を有する有機化合物など、カチオン性基を1個だけ有する化合物に関する。

【0412】

「二価」または「二塩基性」化合物は、2個の目的の官能基を有する化合物に関する。例えば、二塩基性有機酸は、2個のカルボキシル基を有する。

【0413】

「多価」または「多塩基性」化合物は、2個以上の目的の官能基、好ましくは3個以上の目的の官能基を有する化合物に関する。例えば、多塩基性有機酸は、2個以上、好ましくは3個以上の酸カルボキシル基を有する。

10

【0414】

「ポリリン酸」は、2個以上の連続するリン酸基、好ましくは3個以上の連続するリン酸基を含む化合物に関する。ポリリン酸の例は、無機ポリリン酸、および少なくとも3個の連続するリン酸基を有するヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドなどのポリリン酸(三リン酸など)と1個以上の有機アルコールとのエステルを含む。

【0415】

本明細書で使用する表現「無機ポリリン酸」は、2個以上の連続するリン酸基、好ましくは3個以上の連続するリン酸基を含み、それに共有結合するあらゆる有機部分を含まない化合物(例えば、無機ポリリン酸は、ポリリン酸のアニオン部分に含まれるあらゆる酸素またはリン原子と炭素原子との間の共有結合を欠く)を意味する。したがって、表現「無機ポリリン酸」は、ポリリン酸と1つ以上の有機アルコールとのエステルは含まない。その結果、表現「無機ポリリン酸」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを、それらが少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個の連続するリン酸基を含んでいても、包含しない。無機ポリリン酸は、線形(すなわち、ポリリン酸の全てのリン酸部分が鎖状に並んでいる)、分岐または環状であり得る。ある実施態様において、ポリリン酸は、式 $[\text{P}_x\text{O}_{(3x+1)}]^-y$ (式中、 x は整数であり、少なくとも2、好ましくは少なくとも3であり；そして y はアニオン電荷である) を含む。ポリリン酸の例は、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、より高次の同族体、およびそれらの混合物(特に、これらのポリリン酸の線形形態)、特に、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、より高次の同族体、およびそれらの混合物(特に、これらのポリリン酸の線形形態)を含む。好ましいポリリン酸は、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物(特に、これらのポリリン酸の線形形態)、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物(特に、これらのポリリン酸の線形形態)、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物(特に、これらのポリリン酸の線形形態)を含む。特に好ましいポリリン酸は、三リン酸である。

20

30

【0416】

同様に、本明細書で使用する表現「無機リン酸」は、1個のリン酸基のみを含み、それに共有結合する有機部分を含まない化合物(例えば、無機リン酸は、リン酸のアニオン部分に含まれるあらゆる酸素またはリン原子と炭素原子との間の共有結合を欠く)を意味する。故に、表現「無機リン酸」は、リン酸と1つ以上の有機アルコールとのエステルは含まれない。したがって、表現「無機リン酸」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを、それらが1個のリン酸基を含んでいても、包含しない。無機リン酸は、線形または環状であり得る。ある実施態様において、無機リン酸は、式 $[\text{PO}_4]^{3-}$ を含む。

40

【0417】

本明細書で使用する表現「Xを実質的に含まない」は、混合物(例えば、本明細書に記載の組成物または製剤の水相)が、実際的かつ現実的に実施可能な方法でXを含まないことを意味する。例えば、混合物がXを実質的に含まないならば、混合物中のXの量は、混

50

合物の総重量に基づき、1重量%未満(例えば、0.5重量%未満、0.4重量%未満、0.3重量%未満、0.2重量%未満、0.1重量%未満、0.09重量%未満、0.08重量%未満、0.07重量%未満、0.06重量%未満、0.05重量%未満、0.04重量%未満、0.03重量%未満、0.02重量%未満、0.01重量%未満、0.005重量%未満、0.001重量%未満)であり得る。

【0418】

例えば、本明細書で使用する「ポリエチレングリコール(P E G)を含む脂質を実質的に含まない」は、混合物(例えば、本明細書に記載の組成物または製剤の水相)が、実際的かつ現実的に実施可能な方法でP E Gを含む脂質を含まないことを意味する。例えば、混合物がP E Gを含む脂質を実質的に含まないならば、混合物中のP E Gを含む脂質の量は、混合物の総重量に基づき、1重量%未満(例えば、0.5重量%未満、0.4重量%未満、0.3重量%未満、0.2重量%未満、0.1重量%未満、0.09重量%未満、0.08重量%未満、0.07重量%未満、0.06重量%未満、0.05重量%未満、0.04重量%未満、0.03重量%未満、0.02重量%未満、0.01重量%未満、0.005重量%未満、0.001重量%未満)であり得る。同様のことが、「P E Gを含む化合物を実質的に含まない」、「P E Gを実質的に含まない」および「カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質を実質的に含まない」という表現に当てはまる。

【0419】

用語「核酸完全性」は、サンプルに含まれる核酸の総量(すなわち、非フラグメント化+フラグメント化核酸)に対する完全長(すなわち、非フラグメント化)核酸のパーセンテージを意味する。核酸完全性は、核酸をクロマトグラフィーにより分離し(例えば、キャピラリー電気泳動を使用し)、主核酸ピークのピーク面積(すなわち、完全長(すなわち、非フラグメント化)核酸のピーク面積)を決定し、総核酸のピーク面積を決定し、そして主核酸ピークのピーク面積を総核酸のピーク面積で除することにより決定され得る。同様に、表現「RNA完全性」は、サンプルに含まれるRNAの総量(すなわち、非フラグメント化+フラグメント化RNA)に対する完全長(すなわち、非フラグメント化)RNAのパーセンテージを意味する。RNA完全性は、RNAをクロマトグラフィーで分離し(例えば、キャピラリー電気泳動を使用し)、主RNAピークのピーク面積(すなわち、完全長(すなわち、非フラグメント化)RNAのピーク面積)を決定し、総RNAのピーク面積を決定し、そして主RNAピークのピーク面積を総RNAのピーク面積で除することにより決定され得る。

【0420】

用語「抗凍結剤」は、凍結段階中の調製物の活性成分を保護するために、調製物(例えば、製剤または組成物)に添加する物質に関する。

【0421】

用語「凍結乾燥保護剤」は、乾燥段階中の活性成分を保護するために、製剤に添加する物質に関する。

【0422】

物質の「ガラス転移温度」(略称： T_g)という表現は、このガラス転移が起こる温度範囲を意味する。「ガラス転移」という表現は、非晶質物質(または半結晶物質内の非晶質領域)において、温度が上昇するにつれて、硬い(例えば、比較的もろい「ガラス質」)非晶質状態から粘性のある(例えば、ゴム)溶融状態へと徐々にかつ可逆的に転移することを意味する。ガラス転移温度を測定する方法は、当業者に公知であり、熱膨張測定法、誘電法、動的粘弾性測定法(D T M A)、示差走査熱量測定法(D S C)、屈折率測定法またはN M R分光法を含む。適切な標準化された方法には、D I N 53765：1994-03およびI S O 11357-2：1999-03が含まれる。

【0423】

本開示によると、用語「ペプチド」はオリゴおよびポリペプチドを含み、互いにペプチド結合により連結した約2個以上、約3個以上、約4個以上、約6個以上、約8個以上、約10個以上、約13個以上、約16個以上、約20個以上および最大約50個、約10

0 個または約 150 個の連続アミノ酸を含む物質を指す。用語「ポリペプチド」は、大型ペプチド、特に少なくとも約 151 個のアミノ酸を有するペプチドを指す。「ペプチド」および「ポリペプチド」はいずれもタンパク質分子であるが、用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は本明細書では通常同義語として使用する。

【0424】

「治療用タンパク質」は、治療有効量で対象に提供したとき、対象の状態または疾患状態に良いまたは有利な効果をもたらす。ある実施態様において、治療用タンパク質は、治療的または緩和的性質を有し、疾患または障害の 1 つ以上の症状の改善、緩和、軽減、逆転、発症遅延または重症度低減のために投与され得る。治療用タンパク質は予防的性質を有し得て、疾患発症遅延またはそのような疾患または病態の重症度低減のために使用され得る。用語「治療用タンパク質」はタンパク質またはペプチド全体を含み、その治療活性フラグメントを指し得る。それは、タンパク質の治療活性バリエーションも含み得る。治療活性タンパク質の例は、ワクチン接種用抗原およびサイトカインなどの免疫刺激剤を含むが、これらに限定されない。用語「治療用タンパク質」および「薬学的に活性なペプチドまたはタンパク質」は、本明細書では相互交換可能に用いられる。

10

【0425】

本開示の種々の実施態様によると、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする RNA (例えば、mRNA) などの核酸は細胞に取り込まれまたは導入され、すなわちトランスフェクトまたは形質導入され、その細胞はインビトロまたは対象中に存在し得て、該ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の発現をもたらす。細胞は、コード化ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を細胞内に (例えば細胞質および／または核に) 発現でき、コード化ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を分泌できおよび／または表面に発現できる。

20

【0426】

本開示によると、「発現する核酸」および「コードする核酸」などの用語または類似の用語は本明細書では相互交換可能に使用され、特定のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に関して、核酸は、好ましくは細胞内の、適切な環境に存在するならば、該ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を産生するよう発現され得ることを意味する。

【0427】

用語「部分」はフラグメントを指す。アミノ酸配列またはタンパク質などの特定の構造に関して、その「部分」なる用語は、該構造の連続的または不連続的フラグメントをいい得る。

30

【0428】

用語「一部」および「フラグメント」は、本明細書では相互交換可能に使用され、連続的要素を指す。例えば、アミノ酸配列またはタンパク質などの構造の一部は、該構造の連続的要素を指す。組成物の状況で使用する時、用語「一部」は、組成物の部分を意味する。例えば、組成物の一部は、該組成物の 0.1%~99.9% (例えば、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、50%、90% または 99%) のあらゆる部分であり得る。

【0429】

アミノ酸配列 (ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質) に関する「フラグメント」は、アミノ酸配列の一部、すなわち N 末端および／または C 末端で短縮されたアミノ酸配列を表す配列に関する。C 末端で短縮されたフラグメント (N 末端フラグメント) は、例えば、オープンリーディングフレームの 3' 末端を欠く切断されたオープンリーディングフレームの翻訳によって得ることができる。N 末端で短縮されたフラグメント (C 末端フラグメント) は、例えば、切断されたオープンリーディングフレームが翻訳開始を司る開始コドンを含む限り、オープンリーディングフレームの 5' 末端を欠く切断されたオープンリーディングフレームの翻訳によって得ることができる。アミノ酸配列のフラグメントは、例えば、アミノ酸配列からのアミノ酸残基の少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% のアミノ酸残基を含む。アミノ酸配列のフラグメントは、好ましくはアミノ酸配列から少なくとも 6 個、特に少なくとも 8 個

40

50

、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも50個または少なくとも100個の連続アミノ酸を含む。アミノ酸配列のフラグメントは、例えば、アミノ酸配列の最大8個、特に最大10個、最大12個、最大15個、最大20個、最大30個または最大55個の連続アミノ酸の配列を含む。

【0430】

本開示によると、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の一部またはフラグメントは、好ましくはそれが由来するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の少なくとも1個の機能的性質を有する。このような機能的性質は、薬理的活性、他のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質との相互作用、酵素活性、抗体との相互作用および核酸の選択的結合を含む。例えば、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の薬理的活性フラグメントは、フラグメントは由来するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の薬理的活性の少なくとも1個を有する。ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の一部またはフラグメントは、好ましくは、ペプチドまたはタンパク質の少なくとも6個、特に少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個または少なくとも50個の連続アミノ酸の配列を含む。ペプチドまたはタンパク質の一部またはフラグメントは、好ましくは、ペプチドまたはタンパク質の最大8個、特に最大10個、最大12個、最大15個、最大20個、最大30個または最大55個の連続アミノ酸の配列を含む。

【0431】

本明細書で使用し、アミノ酸配列(ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質)に関する「バリエーション」は、少なくとも1個のアミノ酸により親アミノ酸配列と異なる(例えば、異なるアミノ酸または同じアミノ酸の修飾)アミノ酸配列を意味する。親アミノ酸配列は天然に存在するかまたは野生型(WT)アミノ酸配列であってよく、または野生型アミノ酸配列の修飾バージョンであってよい。ある実施態様において、バリエーションアミノ酸配列は、親アミノ酸配列と比較して少なくとも1個のアミノ酸差異、例えば、1〜約20個のアミノ酸差異および好ましくは親と比較して1〜約10または1〜約5個のアミノ酸差異を有する。

【0432】

アミノ酸配列に関する「野生型」または「WT」または「天然」は、アレル変異を含む、天然に見られるアミノ酸配列を意味する。野生型アミノ酸配列、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、意図的に修飾されていないアミノ酸配列を有する。同様に、核酸配列に関する「野生型」または「WT」または「天然」は、アレル変異を含む、天然に見られる核酸配列を意味する。例えば、野生型コード配列は、天然に見られ、意図的に修飾されていないコード配列を意味する。

【0433】

本明細書で使用する「コード配列」は、タンパク質をコードする核酸(例えば、遺伝子のDNAまたはRNA)の部分を意味する。

【0434】

「グアノシン/シトシン(G/C)含量」または「G/C含量」という表現は、グアニン(G)またはシトシン(C)のいずれかであるDNAまたはRNA分子中の塩基のパーセンテージを意味する。G/C含量は、DNAまたはRNAの特定の部分について、あるいはゲノム全体に対して示され得る。G/C含量が一部を指すとき、それは、個々の遺伝子または遺伝子(ドメイン)の一部、遺伝子群または遺伝子クラスター、非コード領域、コード配列、またはプライマーなどの合成オリゴヌクレオチドのG/C含量を示し得る。

【0435】

本開示の目的で、アミノ酸配列(ペプチド、タンパク質またはポリペプチド)の「バリエーション」は、アミノ酸挿入バリエーション、アミノ酸付加バリエーション、アミノ酸欠失バリエーションおよび/またはアミノ酸置換バリエーションを含む。用語「バリエーション」は、全変異体、スプライス変異体、翻訳後修飾変異体、立体構造、アイソフォーム、アレル変異体、種変異体および種ホモログ、特に天然に存在するものを含む。用語「バリエーション」は、特に、アミ

ノ酸配列のフラグメントを含む。

【0436】

アミノ酸挿入バリエーションは、特定のアミノ酸配列への1または2個以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列バリエーションの場合、1個以上のアミノ酸残基はアミノ酸配列における特定の部位に挿入されるが、ランダム挿入と得られた生成物の適切なスクリーニングも可能である。アミノ酸付加バリエーションは、1個以上のアミノ酸、例えば1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個以上のアミノ酸のアミノおよび／またはカルボキシ末端融合を含む。アミノ酸欠失バリエーションは、1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個以上アミノ酸の除去などの、配列からの1個以上のアミノ酸の除去により特徴づけられる。欠失は、タンパク質のどの位置でもよい。タンパク質のN末端および／またはC末端に欠失を含むアミノ酸欠失バリエーションは、N末端および／またはC末端短縮化バリエーションとも称される。アミノ酸置換バリエーションは、配列における少なくとも1個の残基は除去され、その場所に他の残基は挿入されることにより特徴づけられる。相同タンパク質またはペプチドで保存されていないアミノ酸配列の位置の修飾および／またはアミノ酸の類似の性質を有する他の者への置換が好ましい。ある実施態様において、ペプチドおよびタンパク質バリエーションにおけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に荷電または非荷電のアミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化は、側鎖は関連するアミノ酸のファミリーの1つの置換である。天然に存在するアミノ酸は、一般に4つのファミリーに分けられる：酸性(アスパラギン酸、グルタミン酸)、塩基性(リシン、アルギニン、ヒスチジン)、非極性(アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)および非荷電極性(グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン)アミノ酸。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、まとめて芳香族アミノ酸に分類されることもある。ある実施態様において、保存的アミノ酸置換は、次の群内の置換を含む：

- － グリシン、アラニン；
- － バリン、イソロイシン、ロイシン；
- － アスパラギン酸、グルタミン酸；
- － アスパラギン、グルタミン；
- － セリン、スレオニン；
- － リシン、アルギニン；および
- － フェニルアラニン、チロシン。

【0437】

ある実施態様において、あるアミノ酸配列と該あるアミノ酸配列のバリエーションであるアミノ酸配列の間の類似性、好ましくは同一性の程度は、少なくとも約60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%である。類似性または同一性の程度は、好ましくは、参照アミノ酸配列の全長の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%であるアミノ酸領域に対して示される。例えば、参照アミノ酸配列が200個のアミノ酸からなるならば、類似性または同一性の程度は、好ましくは、少なくとも約20個、少なくとも約40個、少なくとも約60個、少なくとも約80個、少なくとも約100個、少なくとも約120個、少なくとも約140個、少なくとも約160個、少なくとも約180個または約200個のアミノ酸、ある実施態様においては連続アミノ酸に対して示される。ある実施態様において、類似性または同一性の程度は、参照アミノ酸配列の全長に対して示される。配列類似性、好ましくは配列同一性を決定するためのアラインメントは、当分野で知られるツールを使用し、好ましくは最良配列アラインメントを使用し、例えば、Alignを使用し、標準設定、好ましくはEMBOS S : : n e e d l e , M a t r i x : B l o s u m 6 2 , G a p O p e n 1 0 . 0

10

20

30

40

50

、 Gap Extend 0.5 を使用して実施できる。

【0438】

「配列類似性」は、同一または保存的アミノ酸置換を表すアミノ酸のパーセンテージを示す。2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。2つの核酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるヌクレオチドのパーセンテージを示す。

【0439】

用語「%同一」および「%同一性」または類似の用語は、特に、比較する配列間で最適アラインメントで同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸のパーセンテージを指す。該パーセンテージは純粋に統計であり、2つの配列間の差異は、必ずしもではないが、比較する配列の全長にわたり無作為に分布してよい。2つの配列の比較は、通常対応する配列の局所領域を同定するために、最適アラインメント後、セグメントまたは「比較の窓」に関して配列を比較することにより、実施される。比較のための最適アラインメントは手動でまたはSmith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482による局所相同性アルゴリズムの助けを借りて、Neddleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443による局所相同性アルゴリズムの助けを借りて、Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444による類似性検索アルゴリズムの助けをかりてまたは該アルゴリズムを使用するコンピュータプログラム(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.のGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST NおよびTFASTA)の助けを借りて、実施し得る。ある実施態様において、2つの配列のパーセント同一性は、United States National Center for Biotechnology Information (NCBI)ウェブサイト(例えば、blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)で利用可能なBLASTNまたはBLASTPアルゴリズムを使用して決定される。ある実施態様において、NCBIウェブサイトのBLASTNアルゴリズムで使用するアルゴリズムパラメータは、(i)期待閾値設定10；(ii)文字サイズ設定28；(iii)クエリー範囲の最大マッチ設定0；(iv)マッチ／ミスマッチスコア設定1、-2；(v)ギャップコスト設定直線；および(vi)低複雑度領域のフィルター使用を含む。ある実施態様において、NCBIウェブサイトでBLASTPアルゴリズムで使用するアルゴリズムパラメータは、(i)期待閾値設定10；(ii)文字サイズ設定3；(iii)クエリー範囲の最大マッチ設定0；(iv)マトリックス設定BLOSUM62；(v)ギャップコスト設定存在：11 拡張：1；および(vi)条件の組成スコアマトリクス調整を含む。

【0440】

パーセンテージ同一性は、比較配列が対応する同一位置の数を決定し、該数値を比較する位置の数(例えば、参照配列における位置の数)で除し、この結果を100倍することにより得る。

【0441】

ある実施態様において、類似性または同一性の程度は、参照配列の全長の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%である領域に対して示す。例えば、参照核酸配列が200ヌクレオチドからなるとき、同一性の程度は、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約140ヌクレオチド、少なくとも約160ヌクレオチド、少なくとも約180ヌクレオチドまたは約200ヌクレオチド、ある実施態様においては連続ヌクレオチドに対して示される。ある実施態様において、類似性または同一性の程度は、参照配列の全長に対して示される。

【0442】

相同アミノ酸配列は、本開示によると、アミノ酸残基の少なくとも40%、特に少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%および好ましくは少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一

10

20

30

40

50

性を示す。

【0443】

アミノ酸配列バリエントは、当業者により、例えば、組換えDNA操作により容易に製造され得る。置換、付加、挿入または欠失を有するペプチドまたはタンパク質を製造するためのDNA配列の操作は、例えば、Sambrook et al.(1989)に詳述される。さらに、本明細書に記載のペプチドおよびアミノ酸バリエントは、例えば、固相合成および類似の方法によるなどの、既知ペプチド合成技術の助けを借りて、容易に製造できる。

【0444】

ある実施態様において、アミノ酸配列(ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質)のフラグメントまたはバリエントは、好ましくは「機能的フラグメント」または「機能的バリエント」である。アミノ酸配列の「機能的フラグメント」または「機能的バリエント」なる用語は、由来するアミノ酸配列と同一または類似の1つ以上の機能的性質を示すあらゆるフラグメントまたはバリエントを指し、すなわち、機能的に等価である。抗原または抗原性配列について、ある特定の機能は、フラグメントまたはバリエントは由来するアミノ酸配列により示される1つ以上の免疫原性活性である。本明細書で使用する用語「機能的フラグメント」または「機能的バリエント」は、特に親分子または配列のアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸が改変されたアミノ酸配列を含みかつ親分子または配列の機能の1つ以上、例えば、免疫応答の誘導を依然として果たすことができる(免疫学的フラグメント)、バリエント分子または配列を指す。ある実施態様において、親分子または配列のアミノ酸配列における修飾は、分子または配列の特徴に顕著に影響しないまたは改変しない。異なる実施態様において、機能的フラグメントまたは機能的バリエントの機能は減少されていてよいが、なお顕著に存在し、例えば、機能的バリエントの免疫原性は、親分子または配列の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%であり得る。しかしながら、他の実施態様において、機能的フラグメントまたは機能的バリエントの免疫原性は、親分子または配列と比較して増強され得る。

【0445】

指定アミノ酸配列(ペプチド、タンパク質またはポリペプチド)に「由来する」アミノ酸配列(ペプチド、タンパク質またはポリペプチド)は、第一アミノ酸配列の起源を指す。ある実施態様において、特定のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列は、特定の配列またはそのフラグメントと同一、本質的に同一または相同であるアミノ酸配列を有する。特定のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列は、その特定の配列またはそのフラグメントのバリエントであり得る。例えば、本明細書での使用に適する抗原は、由来する天然に存在するまたは天然配列から配列は異なるように改変されていてよいが、なお天然配列の望ましい活性を保持することは当業者には理解される。

【0446】

ある実施態様において、「単離」は、天然状態または製造工程からの組成物などの人工組成物から改変または除去(例えば、精製)されていることを意味する。例えば、生存動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離」されていないが、その天然状態の共存物質から部分的にまたは完全に分離されている同じ核酸またはペプチドは「単離」されている。単離核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在できまたは例えば、宿主細胞など非天然環境で存在できる。ある実施態様において、本開示で使用するRNA(例えばmRNA)は実質的に精製された形態である。ある実施態様において、実質的に精製された形態のRNA(例えばmRNA)の溶液(好ましくは水溶液)は第一緩衝系を含む。

【0447】

用語「遺伝子修飾」または単に「修飾」は、核酸での細胞のトランスフェクションを含む。用語「トランスフェクション」は、細胞への核酸、特にRNAの導入に関する。本開示の目的で、用語「トランスフェクション」はまた細胞への核酸の導入またはそのような細胞による核酸の取り込みも含み、ここで、細胞は対象、例えば、患者内に存在し得る。故に、本開示によると、本明細書に記載の核酸のトランスフェクションのための細胞はイ

ンビトロ(例えば、細胞培養における)またはインビボ(例えば、細胞は患者の臓器、組織および／または生物の一部を形成し得る)で存在し得る。本開示によると、トランスフェクションは一過性または安定であり得る。トランスフェクションのある適用について、トランスフェクトされた遺伝物質が一過性にのみ発現されるならば、十分である。RNAはそのコード化タンパク質を一過性に発現するために、細胞にトランスフェクトされ得る。トランスフェクション過程で導入された核酸は通常核ゲノムに統合されないため、外来核酸は有糸分裂を通して希釈されるかまたは分解する。核酸のエピソーム増幅は可能な細胞の希釈率は大きく減少する。トランスフェクトされた核酸は実際に細胞およびその娘細胞のゲノムに残ることが望まれるならば、安定なトランスフェクションは起こらなければならない。このような安定なトランスフェクションは、トランスフェクションのためのウイルスベクターの系またはトランスポゾンベクターの系の使用により達成できる。一般に、抗原をコードする核酸は、細胞に一過性にトランスフェクトされる。RNAを、そのコード化タンパク質を一過性に発現するために細胞にトランスフェクトし得る。

10

【0448】

本開示は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のアナログを含む。本開示によると、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のアナログは、それが由来している該ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の修飾形態であり、該ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の機能的性質の少なくとも1個を有する。例えば、薬理学的活性ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のアナログは、アナログは由来しているペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の薬理学的活性の少なくとも1個を有する。このような修飾はあらゆる化学修飾を含み、炭水化物、脂質および／またはタンパク質またはペプチドなどのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドと関連するあらゆる分子の単一または複数置換、欠失および／または付加を含む。ある実施態様において、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの「アナログ」は、グルコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、パルミトイル化、ミリストイル化、イソプレニル化、脂質化、アルキル化、誘導体化、保護／遮断基の導入、タンパク質分解的切断または抗体もしくは他の細胞リガンドへの結合に起因する修飾形態を含む。用語「アナログ」はまた該タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドの全機能的化学等価物まで拡大される。

20

【0449】

本明細書で使用する「活性化」または「刺激」は、検出可能な細胞増殖の誘導のために十分に刺激されている、細胞(例えば、T細胞などの免疫エフェクター細胞)の状態を指す。活性化はまたシグナル伝達経路開始、サイトカイン産生誘導および検出可能なエフェクター機能とも関連し得る。用語「活性化免疫エフェクター細胞」は、とりわけ、細胞分裂を受けている免疫エフェクター細胞を指す。

30

【0450】

用語「プライミング」は、T細胞などの免疫エフェクター細胞がその特異的抗原と初めて接触し、エフェクターT細胞などのエフェクター細胞への分化を引き起こす過程を指す。

【0451】

用語「クローン拡大」または「拡大」は、特異的エンティティが増加する過程を指す。ある実施態様において、本用語は、好ましくは免疫エフェクター細胞が抗原により刺激され、増殖し、該抗原を認識する特異的免疫エフェクター細胞が増幅する免疫学的応答の状況において使用される。ある実施態様において、拡大は免疫エフェクター細胞の分化に至る。

40

【0452】

本開示による「抗原」は、免疫応答を誘導するあらゆる物質および／または細胞応答などの免疫応答または免疫機構が標的とするあらゆる物質を包含する。これはまた、抗原が抗原ペプチドにプロセッシングされ、免疫応答または免疫機構が、特にMHC分子により提示されているならば、1つ以上の抗原ペプチドを標的とする状況も含む。特に、「抗原」は抗体またはTリンパ球(T細胞)と特異的に反応するあらゆる物質、好ましくはペプチド

50

またはタンパク質に関する。本開示によると、用語「抗原」は、T細胞エピトープなどの少なくとも1個のエピトープを含むあらゆる分子を含む。好ましくは、本開示の状況における抗原は、任意選択的にプロセッシング後、好ましくは抗原(抗原を発現する細胞を含む)特異的である、免疫応答を誘導する分子である。ある実施態様において、抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原または細菌抗原などの疾患関連抗原またはそのような抗原由来のエピトープである。

【0453】

本開示によると、免疫応答のための候補であるあらゆる適当な抗原が使用され得て、ここで、免疫応答は液性または細胞免疫応答または両方であり得る。本開示のある実施態様の状況において、抗原は、MHC分子の状況で細胞、好ましくは抗原提示細胞により提示され、これは抗原に対する免疫応答をもたらす。抗原は、天然に存在する抗原に対応するまたはそれ由来の生成物であり得る。このような天然に存在する抗原は、アレルゲン、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫および他の感染因子および病原体を含み得るかまたはそれに由来し得るかまたは抗原はまた腫瘍抗原であり得る。本開示によると、抗原は、天然に存在する生成物、例えば、ウイルスタンパク質またはその一部に対応し得る。

【0454】

用語「疾患関連抗原」は、その最も広い意味で使用し、疾患と関連するあらゆる抗原を指す。疾患関連抗原は、宿主の免疫系を刺激して、該疾患に対する細胞抗原特異的免疫応答および／または液性抗体応答を行うエピトープを含む分子である。疾患関連抗原は病原体関連抗原、すなわち、微生物による感染に関連する抗原、典型的に微生物抗原(例えば細菌またはウイルス抗原)または腫瘍抗原などのがん、典型的に腫瘍に関連する抗原を含む。

【0455】

ある実施態様において、抗原は腫瘍抗原、すなわち、腫瘍細胞の一部、特に主に細胞内にまたは腫瘍細胞の表面抗原として生ずるものである。他の実施態様において、抗原は病原体関連抗原、すなわち、病原体、例えば、ウイルス、細菌、単細胞生物または寄生虫由来の抗原、例えばウイルスリボ核タンパク質またはコートタンパク質などのウイルス抗原である。特に、抗原はMHC分子により提示されるべきであり、これは、特に、T細胞受容体の活性の調節を介して、免疫系の細胞、好ましくはCD4+およびCD8+リンパ球の調節、特に活性化をもたらす。

【0456】

用語「腫瘍抗原」または「腫瘍関連抗原」は、細胞質、細胞表面または細胞核に由来し得るがん細胞の構成要素を指す。特に、細胞内でまたは腫瘍細胞の表面抗原として産生される抗原を指す。例えば、腫瘍抗原は、がん胎児性抗原、 $\alpha 1$ -フェトプロテイン、イソフェリチンおよび胎児スルホ糖タンパク質、 $\alpha 2$ -H-鉄蛋白および γ -フェトプロテインならびに種々のウイルス腫瘍抗原を含む。本開示のある実施態様によると、腫瘍抗原はタイプおよび／または発現レベルに関して腫瘍またはがんならびに腫瘍細胞またはがん細胞に特徴的であるあらゆる抗原を含む。

【0457】

用語「ウイルス抗原」は、抗原性性質を有する、すなわち、個体において免疫応答を誘発できるあらゆるウイルス成分を指す。ウイルス抗原はウイルスリボ核タンパク質またはエンベロープタンパク質であり得る。

【0458】

用語「細菌抗原」は、抗原性性質を有する、すなわち、個体において免疫応答を誘発できるあらゆる細菌成分を指す。細菌抗原は細菌の細胞壁または細胞質膜に由来し得る。

【0459】

用語「エピトープ」は、抗原などの分子の抗原性決定基、すなわち、特に、MHC分子により提示されたとき、免疫系により認識される、例えば、抗体T細胞またはB細胞により認識される分子の一部またはフラグメントを指す。タンパク質のエピトープは、該タンパク質の連続的または不連続的部分を含み得て、例えば、約5〜約100、約5〜約50

、約 8 ～ 約 10、約 10 ～ 約 25 アミノ酸長であってよく、例えば、エピトープは好ましくは 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 または 25 アミノ酸長であり得る。ある実施態様において、本開示の状況におけるエピトープは T 細胞エピトープである。

【0460】

「エピトープ」、「抗原のフラグメント」、「免疫原性ペプチド」および「抗原ペプチド」などの用語は、本明細書では相互交換可能に使用され、例えば、抗原または抗原を発現するかまたは含みかつ提示する細胞に対する、例えば、免疫応答を誘発できる、抗原の不完全な表現に関連し得る。ある実施態様において、本用語は、抗原の免疫原性部分に関する。好ましくは、特に MHC 分子により提示されるとき、T 細胞受容体により認識(すなわち、特異的に結合)される抗原の部分である。ある好ましい免疫原性部分は MHC クラス I またはクラス II 分子に結合する。用語「エピトープ」は、免疫系により認識される、抗原などの分子の一部またはフラグメントを指す。例えば、エピトープは T 細胞、B 細胞または抗体により認識され得る。抗原のエピトープは抗原の連続的または不連続的部分を含み得て、約 5 ～ 約 100、例えば約 5 ～ 約 50、より好ましくは約 8 ～ 約 30、最も好ましくは約 8 ～ 約 25 アミノ酸長であってよく、例えば、エピトープは好ましくは 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 または 25 アミノ酸長であってよい。ある実施態様において、エピトープは約 10 ～ 約 25 アミノ酸長である。用語「エピトープ」は T 細胞エピトープを含む。

【0461】

用語「T 細胞エピトープ」は、MHC 分子により提示されたとき、T 細胞により認識されるタンパク質の一部またはフラグメントを指す。用語「主要組織適合性複合体」および略称「MHC」は MHC クラス I および MHC クラス II 分子を含み、全脊椎動物に存在する遺伝子の複合体に関する。MHC タンパク質または分子は、免疫反応におけるリンパ球と抗原提示細胞または罹患細胞の間のシグナル伝達に重要であり、ここで、MHC タンパク質または分子はペプチドエピトープと結合し、T 細胞上の T 細胞受容体による認識のためにそれを提示する。MHC によりコードされるタンパク質は細胞表面に発現され、自己抗原(細胞自体からのペプチドフラグメント)および非自己抗原(例えば、侵襲微生物のフラグメント)の両方を T 細胞に示す。クラス I MHC / ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは典型的に約 8 ～ 約 10 アミノ酸長であるが、より長いまたは短いペプチドは有効であり得る。クラス II MHC / ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは典型的に約 10 ～ 約 25 アミノ酸長、特に約 13 ～ 約 18 アミノ酸長であり、一方より長いおよび短いペプチドは有効であり得る。

【0462】

ペプチドおよびタンパク質抗原は、例えば、5 アミノ酸長、10 アミノ酸長、15 アミノ酸長、20 アミノ酸長、25 アミノ酸長、30 アミノ酸長、35 アミノ酸長、40 アミノ酸長、45 アミノ酸長または 50 アミノ酸長を含み、2 ～ 100 アミノ酸長であり得る。ある実施態様において、ペプチドは 50 アミノ酸より大きくてよい。ある実施態様において、ペプチドは 100 アミノ酸より大きくてよい。

【0463】

ペプチドまたはタンパク質抗原は、免疫系が該ペプチドまたはタンパク質に対する抗体および T 細胞応答を進展する能力を誘導または増加できる、あらゆるペプチドまたはタンパク質であり得る。

【0464】

ある実施態様において、ワクチン抗原、すなわち、対象への接種は免疫応答を誘導する抗原は、免疫エフェクター細胞により認識される。ある実施態様において、ワクチン抗原は、免疫エフェクター細胞により認識されるならば、ワクチン抗原を認識する抗原受容体を担持する免疫エフェクター細胞の適切な共刺激シグナル、刺激、プライミングおよび／または拡大存在下に誘導することができる。本開示の実施態様の状況において、ワクチン抗原は好ましくは細胞、好ましくは抗原提示細胞表面に提示されるかまたは存在する。あ

る実施態様において、抗原は罹患細胞(例えば腫瘍細胞または感染細胞)により提示される。ある実施態様において、抗原受容体は、MHCにより提示される抗原のエピトープに結合するTCRである。ある実施態様において、TCRの結合は、抗原提示細胞などの細胞により提示される抗原に対してT細胞により発現されおおよび／またはT細胞に存在するとき、該T細胞の刺激、プライミングおおよび／または拡大をもたらす。ある実施態様において、TCRの結合は、罹患細胞に提示される抗原に対してT細胞により発現されおおよび／またはT細胞に存在するとき、罹患細胞の細胞溶解おおよび／またはアポトーシスをもたらす、ここで、該T細胞は、好ましくは細胞毒性因子、例えば、パーフォリンおおよびグランザイムを遊離する。

【0465】

ある実施態様において、抗原受容体は、抗原のエピトープに結合する抗体またはB細胞受容体である。ある実施態様において、抗体またはB細胞受容体は、抗原の天然エピトープに結合する。

【0466】

用語「細胞表面に発現」または「細胞表面と結合」は、抗原などの分子は細胞の原形質膜と結合し、そこに位置することを意味し、ここで、分子の少なくとも一部は、該細胞の細胞外空間に面し、例えば、細胞の外に位置する抗体により、該細胞の外側からアクセス可能である。この状況で、一部は、例えば、少なくとも4個、少なくとも8個、少なくとも12個または少なくとも20個のアミノ酸であり得る。結合は直接でも間接でもよい。例えば、結合は1つ以上の膜貫通ドメイン、1つ以上の脂質アンカーによるものであるかまたは任意の他のタンパク質、脂質、糖または細胞の原形質膜の外葉に見られ得る他の構造との相互作用によるものであり得る。例えば、細胞の表面と結合する分子は、細胞外部分を有する膜貫通タンパク質であってよくまたは膜貫通タンパク質である他のタンパク質との相互作用により細胞の表面と結合するタンパク質であってよい。

【0467】

「細胞表面」または「細胞の表面」は、当分野におけるその通常の意味に従い使用し、故に、タンパク質おおよび他の分子による結合に対してアクセス可能である細胞の外側を含む。抗原は、該細胞の表面に位置するならば、細胞の表面に発現され、例えば、細胞に添加された抗原特異的抗体による結合に対してアクセス可能である。ある実施態様において、細胞の表面に発現される抗原は、CARにより認識され得る細胞外部分を有する膜内在性タンパク質である。

【0468】

本開示の状況における用語「細胞外部分」または「エキソドメイン」は、細胞の細胞外空間に面し、好ましくは、例えば、細胞の外側に位置する抗体などの分子の結合により、該細胞の外側からアクセス可能であるタンパク質などの分子の一部を指す。ある実施態様において、本用語は、1つ以上の細胞外ループまたはドメインまたはそのフラグメントを指す。

【0469】

用語「T細胞」おおよび「Tリンパ球」は、本明細書では相互交換可能に使用され、Tヘルパー細胞(CD4+ T細胞)おおよび細胞溶解T細胞を含む細胞毒性T細胞(CTL、CD8+ T細胞)を含む。用語「抗原特異的T細胞」または類似の用語は、特に、MHC分子により、抗原提示細胞またはがん細胞などの罹患細胞の表面に提示されたとき、T細胞が標的とし、好ましくはT細胞のエフェクター機能を発揮する、抗原を認識するT細胞に関する。T細胞は、該細胞が抗原を発現する標的細胞を殺すならば、抗原に特異的と考えられる。T細胞特異性は、多様な標準技術のいずれか、例えば、クロム放出アッセイまたは増殖アッセイを使用して評価され得る。あるいは、リンホカイン(例えばインターフェロン- γ)の合成を測定できる。本開示のある実施態様において、RNA(特にmRNA)は少なくとも1個のエピトープをコードする。

【0470】

用語「標的」は、細胞免疫応答などの免疫応答の標的である、細胞または組織などの因

10

20

30

40

50

子を意味する。標的は、抗原または抗原エピトープ、すなわち、抗原に由来するペプチドフラグメントを提示する細胞を含む。ある実施態様において、標的細胞は、抗原を発現し、好ましくは該抗原をクラスⅠ MHCにより提示する細胞である。

【0471】

「抗原プロセッシング」は、抗原を、該抗原のフラグメントであるプロセッシング生成物に分解し(例えば、タンパク質をペプチドに分解し)、これらフラグメントの1つ以上とMHC分子を関連させて(例えば、結合による)、特異的T細胞に対して細胞、好ましくは抗原提示細胞により提示することを指す。抗原提示細胞は、プロフェッショナル抗原提示細胞と非プロフェッショナル抗原提示細胞に区別できる。

【0472】

「抗原応答性CTL」は、抗原提示細胞の表面にクラスⅠ MHCにより提示される抗原または該抗原に由来するペプチドに応答性であるCD8⁺ T細胞を意味する。

【0473】

本開示によると、CTL応答性は、持続的カルシウム流動、細胞分裂、IFN- γ およびTNF- α などのサイトカインの産生、CD44およびCD69などの活性化マーカーの上方制御ならびに腫瘍抗原発現標的細胞の特異的細胞溶解による死滅を含み得る。CTL応答性はまたCTL応答性を正確に示す人工レポーターを用いて決定され得る。

【0474】

用語「免疫応答」および「免疫反応」は、その慣用の意味で本明細書では相互交換可能に使用し、抗原に対する統合された身体応答を指し、細胞免疫応答、液性免疫応答または両方を指し得る。本開示によると、抗原、細胞または組織などの因子に関する「への免疫応答」または「に対する免疫応答」という用語は、該因子に向かう細胞応答などの免疫応答に関する。免疫応答は、1つ以上の抗原に対する抗体の進展およびCD4⁺およびCD8⁺ Tリンパ球、例えば、CD8⁺ Tリンパ球などの抗原特異的Tリンパ球の拡大からなる群から選択される1つ以上の反応を含み得て、インビトロで種々の増殖またはサイトカイン産生試験で検出され得る。

【0475】

本開示の状況における用語「免疫応答の誘導」および「免疫応答の誘発」および類似の用語は、細胞免疫応答、液性免疫応答または両方の誘導などの免疫応答の誘導を指す。免疫応答は保護／予防／防止的および／または治療的であり得る。免疫応答はあらゆる免疫原または抗原または抗原ペプチド、好ましくは腫瘍関連抗原または病原体関連抗原(例えば、ウイルス(例えばインフルエンザウイルス(A、BまたはC)、CMVまたはRSV)の抗原)に対するものであり得る。この状況で「誘導」は、誘導前特定の抗原または病原体に対する免疫応答がなかったことを意味し得るだけでなく、誘導前に特定の抗原または病原体に対する一定レベルの免疫応答があり、誘導後に該免疫応答が増強されることも意味し得る。故に、この状況で「免疫応答の誘導」は「免疫応答の増強」も含む。ある実施態様において、個体における免疫応答の誘導後、該個体は感染性疾患またはがん性疾患などの疾患の発症から保護されるかまたは疾患状態は免疫応答の誘導により軽減される。

【0476】

用語「細胞免疫応答」、「細胞応答」、「細胞介在免疫」または類似の用語は、クラスⅠまたはクラスⅡ MHCとの抗原発現および／または抗原により特徴づけられる細胞に対する細胞応答を含むことを意味する。細胞応答は、「ヘルパー」または「キラー」として働き得るT細胞またはTリンパ球と称される細胞に関する。ヘルパーT細胞(CD4⁺ T細胞とも称される)は、免疫応答の制御により中心的役割を有し、キラー細胞(細胞毒性T細胞、細胞溶解T細胞、CD8⁺ T細胞またはCTLとも称される)は、罹患細胞などの細胞を殺す。

【0477】

用語「液性免疫応答」は、生存生物における、抗体が因子および生物に応答して産生され、最終的に中和および／または排除される過程を指す。抗体応答の特異性は、単一特異性の抗原に結合する膜関連受容体を介してTおよび／またはB細胞により介在される。適

10

20

30

40

50

切な抗原の結合および種々の他の活性化シグナルの受信後、Bリンパ球が分裂し、記憶B細胞ならびに各々抗原受容体により認識されたとおり同一抗原性エピトープを認識する抗体を産生する抗体分泌形質細胞クローンを産生する。記憶Bリンパ球は、特異的抗原によりその後活性化されるまで休止状態のままである。これらのリンパ球は、記憶の細胞基盤および特異的抗原に再暴露されたとき抗体応答の結果的な漸増を提供する。

【0478】

本明細書で使用する「抗体」という用語は、抗原のエピトープに特異的に結合できる免疫グロブリン分子を指す。特に、用語「抗体」は、ジスルフィド結合により相互結合された少なくとも2個の重(H)鎖および2個の軽(L)鎖を含む糖タンパク質を指す。用語「抗体」は、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体および前記のいずれかの組合せを含む。各重鎖は重鎖可変領域(VH)および重鎖定常領域(CH)からなる。各軽鎖は軽鎖可変領域(VL)および軽鎖定常領域(CL)からなる。可変領域および定常領域は本明細書ではそれぞれ可変ドメインおよび定常ドメインとも称する。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存された領域が散在する、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域にさらに細分化され得る。各VHおよびVLは3個のCDRおよび4個のFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端方向で次の順番で配置される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。VHのCDRはHCDR1、HCDR2およびHCDR3と称され、VLのCDRはLCDR1、LCDR2およびLCDR3と称される。重鎖および軽鎖可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は重鎖定常領域(CH)および軽鎖定常領域(CL)を含み、ここで、CHは定常ドメインCH1、ヒンジ領域および定常ドメインCH2およびCH3にさらに細分化され得る(アミノ末端からカルボキシ末端方向で次の順番で配置される：CH1、CH2、CH3)。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと、種々の免疫系の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む宿主組織または因子の結合を介在し得る。抗体は、天然源または組換え源由来のインタクト免疫グロブリンであってよく、インタクト免疫グロブリンの免疫活性部分であってよい。抗体は、典型的に免疫グロブリン分子の四量体である。抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)₂ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を含む、多様な形態で存在し得る。

【0479】

用語「免疫グロブリン」は、抗体またはB細胞受容体(BCR)などの抗原受容体などの、免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質に関する。免疫グロブリンは、特徴的免疫グロブリン(Ig)折り畳みを有する構造ドメイン、すなわち、免疫グロブリンドメインにより特徴づけられる。本用語は、膜結合免疫グロブリンならびに可溶性免疫グロブリンを含む。膜結合免疫グロブリンは表面免疫グロブリンまたは膜免疫グロブリンとも称され、一般にBCRの一部である。可溶性免疫グロブリンは、一般に抗体と称される。免疫グロブリンは、一般に数鎖、典型的にジスルフィド結合により連結された2個の同一重鎖および2個の同一軽鎖を含む。これらの鎖は、主にVL(可変軽鎖)ドメイン、CL(定常軽鎖)ドメイン、VH(可変重鎖)ドメインおよびCH(定常重鎖)ドメインCH1、CH2、CH3、およびCH4などの免疫グロブリンドメインからなる。5つのタイプの哺乳動物免疫グロブリン重鎖、すなわち、α、δ、ε、γおよびμがあり、抗体の異なるクラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMを担う。可溶性免疫グロブリンの重鎖とは逆に、膜または表面免疫グロブリンの重鎖は、カルボキシ末端に膜貫通ドメインおよび短細胞質ドメインを含む。哺乳動物において、2つのタイプの軽鎖、すなわち、ラムダおよびカッパがある。免疫グロブリン鎖は可変領域および定常領域を含む。定常領域は本質的に免疫グロブリンの種々のアイソタイプ内で保存されており、ここで、可変部分は高度に多様性であり、抗原認識を担う。

【0480】

用語「ワクチン接種」および「免疫化」は、治療または予防理由のために個体を処置する過程を指し、本明細書に記載するとおり、1つ以上の免疫原または抗原またはその誘導

10

20

30

40

50

体を、特にそれをコードするRNA(特にmRNA)の形態で個体に投与し、該1つ以上の免疫原または抗原または該1つ以上の免疫原または抗原の提示により特徴づけられる細胞に対する免疫応答を刺激することに関する。

【0481】

「抗原の提示により特徴づけられる細胞」または「抗原を提示する細胞」または「抗原提示細胞表面上に抗原を提示するMHC分子」または類似の表現は、罹患細胞、特に腫瘍細胞または感染細胞または抗原提示細胞などの細胞は、抗原または抗原ペプチドを、直接またはプロセッシング後、MHC分子、好ましくはMHCクラスIおよび／またはMHCクラスII分子、最も好ましくはMHCクラスI分子により提示することを意味する。

【0482】

本開示の状況において、用語「転写」は、DNA配列の遺伝子コードがRNA(特にmRNA)に転写される過程に関する。その後、RNA(特にmRNA)はペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳され得る。

【0483】

RNAに関して、用語「発現」または「翻訳」は、mRNAの鎖はアミノ酸の配列の集合を指示し、ペプチドまたはタンパク質を製造する、細胞のリボソームにおける過程に関する。

【0484】

本明細書で使用する用語「血清」は、特に血清の存在下での細胞のインキュベーションに関し、ヒトまたはマウスから得た全血などの全血からの細胞または凝固因子の除去によりもたらされる液体を意味する。ある実施態様において、血清はヒト血清またはマウス血清である。

【0485】

本明細書に記載の医薬製剤、特にキットは、指示材または指示を含み得る。本明細書で使用する「指示材」または「指示」は、本開示の組成物および方法の有用性の伝達に使用できる、刊行物、レコーディング、図表または表現のための何らかの他の媒体を含む。本開示のキットの指示材は、例えば、本開示の組成物を含むコンテナに添付されまたは組成物を含むコンテナと共に輸送されることができる。あるいは、指示材は、指示材および組成物はレシピエントにより協調的に使用されることを意図して、コンテナと別に輸送され得る。

【0486】

本明細書で使用する用語「任意」または「任意選択的に」は、その後に記載されている事象、状況または状態が起きても起きなくてもよいことを意味し、この記載は、該事象、状況または状態が起こる場合および起こらない場合を含む。

【0487】

本明細書に記載の特定の化合物のプロドラッグは、個体への投与により、生理学的条件下化学変換を受けて、特定の化合物をもたらす化合物である。さらに、プロドラッグは、エキスピボ環境で化学的または生化学的方法で特定の化合物に変換され得る。例えば、プロドラッグは、例えば、適当な酵素または化学試薬と共に経皮パッチリザーバーに入れたとき、特定の化合物にゆっくり変換され得る。プロドラッグの例は、インビボで加水分解可能なエステル(特定の化合物に含まれるアルコールまたはカルボキシ基使用)またはアミド(特定の化合物に含まれるアミノまたはカルボキシ基使用)である。具体的に、特定の化合物に含まれ、少なくとも1個の水素原子を有するあらゆるアミノ基は、プロドラッグ形態に変換され得る。典型的N-プロドラッグ形態は、カルバメート、マンニッヒ塩基、エナミンおよびエナミノンを含む。

【0488】

本明細書において、化合物の構造式は、該化合物のある異性体を表し得る。しかしながら、本開示は、構造的に生ずる幾何異性体、不斉炭素光に基づく学異性体、立体異性体、互変異性体などの全異性体および異性体混合物を含み、式の記載に限定されないことは理解される。さらに、本明細書において、化合物の構造式は、該化合物の特定の塩および／

10

20

30

40

50

または溶媒和物を示し得る。しかしながら、本開示は全ての塩(例えば、薬学的に許容される塩)および溶媒和物(例えば、水和物)を含み、特定の塩および／または溶媒和物の記載に限定されないことは理解される。

【0489】

「異性体」は、同じ分子式を有するが、構造(「構造異性体」)または官能基および／または原子の幾何(空間)位置(「立体異性体」)は異なる化合物である。「エナンチオマー」は、互いに重なり合わない鏡像である立体異性体の対である。「ラセミ混合物」または「ラセミ体」は、等量でエナンチオマーの対を含み、接頭辞(±)により示される。「ジアステレオマー」は、重なり合わず、互いに鏡像ではない立体異性体である。「互変異性体」は、自発的にかつ、純粋であっても、個々の原子または原子の基の移動により互いに可逆性に相互変換される、同じ化学物質の構造異性である；すなわち、互変異性体は、互いに動的化学平衡にある。互変異性体の例は、ケト-エノール-互変異性の異性体である。「立体構造異性体」は、形式上単結合に対する単なる回転により相互変換され得る立体異性体であり、特に、シクロヘキサンのいす形、半いす形、舟形およびねじれ舟形などの異なる3次元形態の(ヘテロ)環状環に至るものを含む

10

【0490】

本明細書で使用する用語「溶媒和物」は、溶媒(例えば有機溶媒(例えば、脂肪族アルコール(例えばメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール)、アセトン、アセトニトリル、エーテルなど)、水またはこれら液体の2以上の混合物)における溶解物質の付加複合体を指し、ここで、付加複合体は結晶または混合結晶の形態で存在する。付加複合体に含まれる溶媒の量は、化学量論的または非化学量論的であり得る。「水和物」は、溶媒は水である溶媒和物である。

20

【0491】

同位体標識された化合物において、1つ以上の原子は同じプロトン数を有するが、中性子数は異なる対応する原子に置き換えられる。例えば、水素原子は、重水素またはトリチウム原子に置き換えられ得る。本開示で使用する同位体の例は、重水素、トリチウム、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{32}S 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl および ^{125}I を含む。

【0492】

用語「平均直径」は、動的光散乱法(DLS)により測定した粒子の平均流体力学直径を指し、いわゆるキュムラントアルゴリズムを使用してデータ解析し、結果として、いわゆるZ平均と長さの寸法および大きさのない多分散性指数(PDI)を提供する(Koppel, D., J. Chem. Phys. 57, 1972, pp 4814-4820, ISO 13321)。ここで、粒子の「平均直径」、「直径」または「サイズ」は、このZ平均値と同義的に使用される。

30

【0493】

ある実施態様において、「多分散性指数」は、「平均直径」の定義に記載したとおり、いわゆるキュムラント解析による動的光散乱法測定値に基づき、計算される。ある必要条件下、ナノ粒子のアンサンブルのサイズ分布の測定値として解釈され得る。

【0494】

回転軸に対する粒子の「回転半径」(本明細書では R_g と略す)は、粒子の全質量は濃縮されていると仮定したとき、所定の軸に対するその慣性モーメントがその実際の質量分布と同じである、回転軸からの点の半径方向距離である。数学上、 R_g は重心または所定の軸からの粒子の成分の二乗平均平方根距離である。例えば、重心から固定距離 s_i に位置する、質量 m_i ($i = 1, 2, 3, \dots, n$)の n 質量要素からなる巨大分子について、 R_g は、全質量要素にわたる s_i^2 の質量平均の平方根であり、次のとおり、計算できる。

40

【数2】

$$R_g = \left(\sum_{i=1}^n m_i \cdot s_i^2 / \sum_{i=1}^n m_i \right)^{1/2}$$

【 0 4 9 5 】

回転半径は、例えば、光散乱法を用いて実験的に決定または計算できる。特に、小散乱ベクトル

【数 3】

$$\vec{q}$$

10

について、構造関数 S は次のとおり定義される：

【数 4】

$$S(\vec{q}) \approx N \cdot \left(1 - \frac{q^2 \cdot R_g^2}{3} \right)$$

〔式中、 N は成分数である (ギニエ則)。〕。

【 0 4 9 6 】

20

特に粒子の定量的サイズ分布に関連して、「D 1 0 値」は、粒子の 1 0 % がこの値未満の直径を有する、直径である。D 1 0 値は、粒子集団内 (例えばフィールド・フロー・フラクシヨネーションにより得た粒子ピーク内) の最小粒子径の割合をいう手段である。

【 0 4 9 7 】

特に粒子の定量的サイズ分布に関連して、「D 5 0 値」は、粒子の 5 0 % がこの値未満の直径を有する、直径である。D 5 0 値は、粒子集団内 (例えばフィールド・フロー・フラクシヨネーションにより得た粒子ピーク内) の平均粒子径の集団をいう手段である。

【 0 4 9 8 】

特に粒子の定量的サイズ分布に関連して、「D 9 0 値」は、粒子の 9 0 % がこの値未満の直径を有する、直径である。「D 9 5」、「D 9 9」および「D 1 0 0」値は対応する意味を有する。D 9 0、D 9 5、D 9 9 および D 1 0 0 値は、粒子集団内 (例えばフィールド・フロー・フラクシヨネーションにより得た粒子ピーク内) の大型粒子の割合をいう手段である。

30

【 0 4 9 9 】

粒子の「流体力学半径」(「ストークス半径」または「ストークス・アインシュタイン半径」と称することもある) は、該粒子と同じ速度で拡散する仮定上の剛球の半径である。流体力学半径は、サイズだけでなく、溶媒効果も考慮に入れた、粒子の移動性に関する。例えば、水和は強い小さな荷電粒子は、水和は弱い大型荷電粒子より大きな流体力学半径を有し得る。これは、小さな粒子は溶液を移動する際引きずる水分子の数は多いためである。溶媒中の粒子の実際の寸法は直接測定不可能であるため、流体力学半径は、ストークス・アインシュタイン式により定義され得る：

40

【数 5】

$$R_h = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

〔式中、 k_B はボルツマン定数であり； T は温度であり； η は溶媒の粘性であり；そして D は拡散係数である。〕。拡散係数は、例えば、動的光散乱法 (DLS) の使用により実験的に決定され得る。故に、粒子または粒子の集団 (例えば本明細書に開示する製剤または組成物に含まれる LNP などの粒子の流体力学半径またはそのような製剤または組成物を

50

フィールド・フロー・フラクシオネーションに付して得られる粒子ピークの流体力学半径)の流体力学半径を決定する1つの方法は、該粒子または粒子の集団のDLSシグナル(例えば本明細書に開示する製剤または組成物に含まれるLNPなどの粒子のDLSシグナルまたはそのような製剤または組成物をフィールド・フロー・フラクシオネーションに付して得られる粒子ピークのDLSシグナル)を測定することである。

【0500】

本明細書で使用する用語「凝集体」は粒子の集団に関し、ここで、粒子は同一であるかまたは極めて類似し、互いに非共有結合(例えば、イオン相互作用、H架橋相互作用、双極子相互作用および／またはファンデルワールス相互作用)で接着する。

【0501】

本明細書で使用する表現「光散乱法」は、光が通過する媒体における局在化非均一性のために、光を1つ以上の通路で直線軌道から逸脱させる物理的過程を指す。

【0502】

用語「UV」は紫外線を意味し、10nm～400nmの波長、すなわち、可視光の波長よりは短い、X線の波長よりは長い波長を有する電磁スペクトルのバンドを指す。

【0503】

本明細書で使用する表現「多角度光散乱法」または「MALS」は、サンプルにより複数の角度に散乱された光の測定の技術に関する。「多角度」は、これに関して、散乱光は、例えば、選択した特定の角度を含む範囲にわたり移動する1個の検出器または特定の角度位置に固定された一連の検出器により、測定される異なる別々の角度で検出され得ることを意味する。ある好ましい実施態様において、MALSで使用する光源はレーザー源である(MALLS: 多角度レーザー光散乱法)。粒子を含む組成物のMALSシグナルに基づき、適切な定式化(例えば、Zimmプロット、BerryプロットまたはDebyeプロット)の使用により、該粒子の回転半径(R_g)、故に、該粒子のサイズを決定することが可能である。好ましくは、Zimmプロットは、次の式を使用する図示である：

【数6】

$$\frac{R_\theta}{K^*c} = M_w P(\theta) - 2A_2 c M_w^2 P^2(\theta)$$

〔式中、 c は溶媒中の粒子の質量濃度(g/mL)であり； A_2 は第二ビリアル係数($mol \cdot mL/g^2$)であり； $P(\theta)$ は散乱光強度の角度への依存に関連する形状因子であり； R_θ は過剰レイリー比(cm^{-1})であり；そして K^* は、 $4\pi^2 \eta_0 (dn/dc)^2 \lambda_0^{-4} N_A^{-1}$ に等しい光学定数であり、ここで、 η_0 は入射放射(真空)波長での溶媒の屈折率であり、 λ_0 は入射放射(真空)波長(nm)であり、 N_A はアボガドロ数(mol^{-1})であり、そして dn/dc は示差的屈折率増分(mL/g)である。〕(例えば、Buchholz et al. (Electrophoresis 22 (2001), 4118-4128); B.H. Zimm (J. Chem. Phys. 13 (1945), 141; P. Debye (J. Appl. Phys. 15 (1944): 338;およびW. Burchard (Anal. Chem. 75 (2003), 4279-4291参照)。好ましくは、Berryプロットは次の項またはその逆数で計算される：

【数7】

$$\sqrt{\frac{R_\theta}{K^*c}}$$

〔式中、 c 、 R_θ および K^* は上に定義したとおりである。〕。好ましくは、Debyeプロットは次の項またはその逆数で計算される：

【数8】

$$\frac{K^*c}{R_\theta}$$

〔式中、 c 、 R_θ および K^* は上に定義したとおりである。〕。

【0504】

本明細書で使用する表現「動的光散乱法」または「DLS」は、特に粒子の流体力学半径に関連して、粒子のサイズおよびサイズ分布プロファイルを決定するための技術を指す。単色光源、通常レーザーを、偏光子をとおり、サンプルに照射する。その後、散乱光は第二偏光子をとおり、そこで、検出され、得られた像はスクリーンに投影される。溶液中の粒子は光で照射され、全方向に光を回折させる。粒子から回折された光は、建設的に(明領域)または破壊的に(暗領域)干渉し得る。この過程を短時間間隔で繰り返し、得られた斑点パターンのセットを、経時的に各スポットの光強度を比較するオートコリレータにより分析する。

【0505】

本明細書で使用する表現「静的光散乱法」または「SLS」は、特に、粒子の回転半径および／または粒子のモル質量に関して、粒子のサイズおよびサイズ分布プロファイルを決定する技術を指す。高強度単色光、通常レーザーを、粒子を含む溶液に発射する。1個または多数の検出器を使用して、1個または多数の角度での散乱強度を測定する。その角度依存性は、全巨大分子のモル質量および半径のサイズの両方の正確な測定値を得るために必要である。故に、多角度光散乱法(MALS)または多角度レーザー光散乱法(MALLS)として知られる、入射光の方向に対する複数の角度での同時測定は、一般に静的光散乱法の標準的な実施としてみなされる。

【0506】

核酸

用語「核酸」は、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、それらの組み合わせおよびそれらの修飾形態を含む。本用語は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換えにより産生したおよび化学合成した分子を含む。核酸は、一本鎖または二本鎖および線形または共有結合で閉環した分子として存在し得る。核酸は単離され得る。用語「単離核酸」は、本開示によると、核酸が(i)例えばDNAについてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)でインビトロで増幅されたかまたはRNAについてインビトロ転写されたか(例えば、RNAポリメラーゼを使用)、(ii)クローニングにより組換え産生されたか、(iii)例えば、ゲル電気泳動による切断および分離により精製されたか、または(iv)例えば、化学合成により合成されたことを意味する。

【0507】

用語「ヌクレオシド」(本明細書では「N」と略す)は、リン酸基を伴わないヌクレオチドと考えられ得る化合物に関する。ヌクレオシドは糖(例えば、リボースまたはデオキシリボース)に連結した核酸塩基であるが、ヌクレオチドはヌクレオシドおよび1つ以上のリン酸基からなる。ヌクレオシドの例は、シチジン、ウリジン、シュードウリジン、アデノシンおよびグアノシンを含む。

【0508】

通常天然に存在する核酸を構成する5種の標準ヌクレオシドは、ウリジン、アデノシン、チミジン、シチジンおよびグアノシンである。5種のヌクレオシドは、通常それぞれ1文字コードU、A、T、CおよびGと略される。しかしながら、チミジンは、ウリジンに見られるリボフラノース環ではなく、2'-デオキシリボフラノース部分を含むため、より一般的に「dT」(「d」は「デオキシ」を表す)と表記される。これは、チミジンがデオキシリボ核酸(DNA)に見られ、リボ核酸(RNA)に見られないためである。逆に、ウリジンはRNAに見られ、DNAに見られない。残りの3種のヌクレオシドはRNAおよびDNAの両方に見られ得る。RNAにおいて、それらはA、CおよびGと表され、一方DNAにおいては、dA、dCおよびdGと表される。

【0509】

修飾プリン(AまたはG)またはピリミジン(C、TまたはU)塩基部分は、好ましくは1つ以上のアルキル基、より好ましくは1つ以上のC₁₋₄アルキル基、さらにより好ましくは1つ以上のメチル基により修飾される。修飾プリンまたはピリミジン塩基部分の具体例はN⁷-アルキル-グアニン、N⁶-アルキル-アデニン、5-アルキル-シトシン、5-アルキル-ウラシルおよびN(1)-アルキル-ウラシル、例えばN⁷-C₁₋₄アルキル-グアニン、N⁶-C₁₋₄アルキル-アデニン、5-C₁₋₄アルキル-シトシン、5-C₁₋₄アルキル-ウラシルおよびN(1)-C₁₋₄アルキル-ウラシル、好ましくはN⁷-メチル-グアニン、N⁶-メチル-アデニン、5-メチル-シトシン、5-メチル-ウラシルおよびN(1)-メチル-ウラシルを含む。

10

【0510】

本開示の全態様のある実施態様において、核酸はDNAである。

【0511】

本明細書において、用語「DNA」は、デオキシリボヌクレオチド残基を含む核酸分子に関する。好ましい実施態様において、DNAは全てまたは大多数のデオキシリボヌクレオチド残基を含む。本明細書で使用する「デオキシリボヌクレオチド」は、β-D-リボフラノシル基の2'位にヒドロキシル基を欠くヌクレオチドを指す。DNAは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、単離DNA例えば、部分的に精製されたDNA、本質的に純粋なDNA、合成DNA、組換えにより産生したDNAならびに天然に存在するDNAと1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または改変により異なる修飾DNAを含むが、これらに限定されない。このような改変は、内部DNAヌクレオチドまたはDNAの末端への非ヌクレオチド物質の付加を指し得る。DNAにおけるヌクレオチドは、化学合成したヌクレオチドまたはリボヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドであり得ることも本明細書で意図される。本開示に関して、これらの改変DNAは、天然に存在するDNAのアナログと考えられる。分子は、分子におけるデオキシリボヌクレオチド残基の含量が、分子における総ヌクレオチド残基数に基づき50%を超える(例えば少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%)ならば、「大多数のデオキシリボヌクレオチド残基」を含む。分子におけるヌクレオチド残基の総数は、全ヌクレオチド残基の総和である(ヌクレオチド残基は標準(すなわち、天然に存在する)ヌクレオチド残基であるかまたはそのアナログであるかは無関係)。

20

30

【0512】

DNAは組換えDNAであってよく、核酸、特にcDNAのクローニングにより得ることができる。cDNAは、RNAの逆転写により得ることができる。

【0513】

RNA

本開示の全態様のある実施態様において、核酸はRNAである。

【0514】

本開示によると、用語「RNA」は、リボヌクレオチド残基を含む核酸分子を意味する。好ましい実施態様において、RNAは全てまたは大多数のリボヌクレオチド残基を含む。本明細書で使用する「リボヌクレオチド」は、β-D-リボフラノシル基の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを指す。RNAは、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離RNA例えば、部分的に精製されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換えにより産生したRNAならびに天然に存在するRNAと1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または改変により異なる修飾RNAを含むが、これらに限定されない。このような改変は、内部RNAヌクレオチドまたはRNAの末端への非ヌクレオチド物質の付加を指し得る。RNAにおけるヌクレオチドは、化学合成したヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドであり得ることも本明細書で意図される。本開示に関して、これらの改変／修飾ヌクレオチド(または修飾ヌクレオシド)は天然

40

50

に存在するヌクレオチド(ヌクレオシド)のアナログと称することができ、このような改変／修飾ヌクレオチドまたはヌクレオシドを含む対応するRNA(すなわち、改変／修飾RNA)は天然に存在するRNAのアナログと称することができる。分子は、分子におけるリボヌクレオチド残基の含量が、分子における総ヌクレオチド残基数に基づき、50%を超える(例えば少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%)ならば、「大多数のリボヌクレオチド残基」を含む。分子におけるヌクレオチド残基の総数は、全ヌクレオチド残基の総和である(ヌクレオチド残基は標準(すなわち、天然に存在する)ヌクレオチド残基であるかまたはそのアナログあるかは無関係)。

10

【0515】

「RNA」は、mRNA、tRNA、リボソームRNA(rRNA)、小核RNA(snRNA)、自己増幅RNA(sarRNA)、一本鎖RNA(ssRNA)、dsRNA、阻害性RNA(例えばアンチセンスssRNA、小干渉RNA(siRNA)またはマイクロRNA(miRNA))、活性化RNA(例えば小活性化RNA)および免疫刺激性RNA(isRNA)を含む。ある実施態様において、「RNA」はmRNAを指す。

【0516】

好ましい実施態様において、RNAは、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。

【0517】

本明細書で使用する用語「インビトロ転写」または「IVT」は、転写(すなわち、RNAの産生)が無細胞様式で実施されることを意味する。すなわち、IVTは生存／培養細胞ではなく、細胞から抽出した転写機構(例えば、RNAポリメラーゼ(好ましくはT7、T3またはSP6ポリメラーゼ)を含む細胞ライセートまたはその単離成分)を使用する。

20

【0518】

mRNA

本開示の全態様のある実施態様において、核酸はmRNAである。

【0519】

本開示によると、用語「mRNA」は「メッセンジャーRNA」を意味し、DNA鋳型を使用して産生され得る「複写物」を含む。一般に、mRNAは、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする。典型的に、mRNAは、5'-UTR、ペプチド／タンパク質コード領域および3'-UTRを含む。本開示の状況において、mRNAは、好ましくはDNA鋳型からのインビトロ転写(IVT)により産生される。上記のとおり、インビトロ転写方法は当業者に知られ、多様なインビトロ転写キットが市販されている。

30

【0520】

mRNAは一本鎖であるが、自己相補的配列を含み得て、mRNAの一部が折り畳まれ、それ自体と対合して、二重螺旋を形成することができる。

【0521】

本開示によると、「dsRNA」は二本鎖RNAを意味し、2個の部分的にまたは完全に相補的な鎖を有するRNAである。

40

【0522】

本開示の好ましい実施態様において、mRNAは、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードするRNA複写物に関する。

【0523】

ある実施態様において、好ましくはペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードするRNAは、少なくとも45ヌクレオチド(例えば少なくとも60、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、少なくとも1,000、少なくとも1,500、少なくとも2,000、少なくとも2,5

50

00、少なくとも3,000、少なくとも3,500、少なくとも4,000、少なくとも4,500、少なくとも5,000、少なくとも6,000、少なくとも7,000、少なくとも8,000、少なくとも9,000ヌクレオチド)、好ましくは最大15,000、例えば最大14,000、最大13,000、最大12,000ヌクレオチド、最大11,000ヌクレオチドまたは最大10,000ヌクレオチドの長さを有する。

【0524】

当分野で確立されているとおり、RNA(例えばmRNA)は、一般に5'非翻訳領域(5'-UTR)、ペプチド/ポリペプチド/タンパク質コード領域および3'非翻訳領域(3'-UTR)を含む。ある実施態様において、RNA(例えばmRNA)はインビトロ転写または化学合成により産生される。ある実施態様において、RNA(例えばmRNA)は、DNA鋳型を使用するインビトロ転写により産生される。インビトロ転写方法は当業者に知られる;例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989参照。さらに、多様なインビトロ転写キットが、例えばThermo Fisher Scientificから市販されている(例えばTranscriptAid™ T7キット、MEGAscript(登録商標)T7キット、MAXIscrip(登録商標)、New England BioLabs Inc. (例えばHiScribe™ T7キット、HiScribe™ T7 ARCA mRNAキット)、Promega(例えばRiboMAX™、HeLaScribe(登録商標)、Riboprobe(登録商標)系)、Jena Bioscience(例えばSP6またはT7転写キット)およびEpicentre(例えばAmpliScribe™)。修飾RNA(例えばmRNA)を提供するために、修飾されている天然に存在するヌクレオチド、天然に存在しないヌクレオチドおよび/または修飾されている天然に存在しないヌクレオチドなどの、対応して修飾されているヌクレオチドを合成(好ましくはインビトロ転写)中に組み込むことができるかまたは修飾を転写後mRNAに実施および/または付加することができる。

【0525】

ある実施態様において、RNA(例えばmRNA)はインビトロ転写RNA(IVT-RNA)であり、適切なDNA鋳型のインビトロ転写により得ることができる。転写制御のためのプロモーターは、任意のRNAポリメラーゼのための任意のプロモーターであり得る。RNAポリメラーゼの具体例は、T7、T3およびSP6 RNAポリメラーゼである。好ましくは、インビトロ転写はT7またはSP6プロモーターにより制御される。インビトロ転写のためのDNA鋳型は、核酸、特にcDNAをクローニングし、それをインビトロ転写のための適切なベクターに導入することにより、得ることができる。cDNAは、RNAの逆転写により得ることができる。

【0526】

本開示のある実施態様において、RNA(例えばmRNA)は、「レプリコンRNA」(例えば「レプリコンmRNA」)または単に「レプリコン」、特に「自己複製RNA」(例えば「自己複製mRNA」)または「自己増幅RNA」(または「自己増幅mRNA」)である。ある特に好ましい実施態様において、レプリコンまたは自己複製RNA(例えば自己複製mRNA)は、ssRNAウイルス、特にプラス鎖ssRNAウイルス、例えばアルファウイルスに由来するかまたはそれに由来する要素を含む。アルファウイルスは、プラス鎖RNAウイルスの典型的代表例である。アルファウイルスは、感染細胞の細胞質で複製する(アルファウイルス生活環のレビューは、Jose et al., Future Microbiol., 2009, vol. 4, pp. 837-856参照)。多くのアルファウイルスの総ゲノム長は、典型的に11,000~12,000ヌクレオチドの範囲であり、ゲノムRNAは典型的に5'キャップおよび3'ポリ(A)テールを有する。アルファウイルスのゲノムは、非構造タンパク質(ウイルスRNAの転写、修飾および複製ならびにタンパク質修飾に関与)および構造タンパク質(ウイルス粒子を形成)をコードする。ゲノムには典型的に2個のオープンリーディングフレーム(ORF)がある。4個の非構造タンパク質(nsP1-nsP4)は、典型的にゲノムの5'末端近辺から開始される第一ORFにより一緒にコードされ、一方アルファウイルス構造タンパク質は、第一ORFの下流に見られ、ゲノムの3'末端近辺ま

で伸びる第二ORFにより一緒にコードされる。典型的に、第一ORFは第二ORFより大きく、およそ2:1の比である。アルファウイルスにより感染された細胞において、非構造タンパク質をコードする核酸配列のみがゲノムRNAから翻訳され、一方構造タンパク質をコードする遺伝情報は、真核生物メッセンジャーRNAを模倣するRNA分子であるサブゲノム複製物から翻訳可能である(mRNA; Gould et al., 2010, Antiviral Res., vol. 87 pp. 111-124)。感染後、すなわちウイルス生活環の早期段階で、(+)
鎖ゲノムRNAは、非構造ポリタンパク質(nsP1234)をコードするオープンリーディングフレームの翻訳のためのメッセンジャーRNAのように直接作用する。アルファウイルス由来ベクターは、標的細胞または標的生物への外来遺伝情報の送達のために提案されている。単純なアプローチにおいて、アルファウイルス構造タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを、目的のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームに置き換える。アルファウイルスベースのトランス複製系は、一方の核酸分子はウイルスレプリカーゼをコードし、他方の核酸分子は該レプリカーゼによりトランスで複製され得る2個の別の核酸分子におけるアルファウイルスヌクレオチド配列要素に依存する(故に命名トランス複製系)。トランス複製は、所定の宿主細胞におけるこれら核酸分子両方の存在を必要とする。レプリカーゼによりトランスで複製され得る核酸分子は、アルファウイルスレプリカーゼによる認識およびRNA合成を可能にするために、特定のアルファウイルス配列要素を含まなければならない。

10

【0527】

本開示のある実施態様において、本明細書に記載する(例えば、本開示の組成物に含まれるおよび／または本開示の方法で使用される)RNA(例えばmRNA)は、例えば、安定性増加および／または翻訳効率増加および／または免疫原性減少および／または細胞毒性減少のために、1つ以上の修飾を含む。例えば、RNA(例えばmRNA)の発現を増加させるために、コード領域、すなわち、発現ペプチドまたはタンパク質をコードする配列内を、好ましくは発現ペプチドまたはタンパク質の配列を変えることなく、修飾し得る。このような修飾は、例えば、WO2007/036366およびPCT/EP2019/056502に記載され、次のものを含む: 5'キャップ構造; 天然に存在するポリ(A)テールの伸長または短縮化; 5'-および／または3'非翻訳領域(UTR)の改変、例えば該RNAのコード領域と無関係のUTRの導入; 1つ以上の天然に存在するヌクレオチドの合成ヌクレオチドでの置き換え; およびコドン最適化(例えば、RNAのG/C含量を変える、好ましくは増加するため)。本開示の修飾mRNAの状況における用語「修飾」は、好ましくは該RNA(例えばmRNA)に天然に存在しない、mRNAのあらゆる修飾に関する。

20

30

【0528】

ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(例えばmRNA)は5'キャップ構造を含む。ある実施態様において、mRNAは、キャップのない5'-三リン酸を有さない。ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(例えばmRNA)は、慣用の5'キャップおよび／または5'キャップアナログを含み得る。用語「慣用の5'キャップ」は、mRNA分子の5'末端に見られるキャップ構造を指し、一般に三リン酸部分を介してmRNAの隣接ヌクレオチドの5'末端に結合するグアノシン5'-三リン酸(Gppp)からなる(すなわち、グアノシンは、mRNAの残りに5'→5'三リン酸結合を介して結合する)。グアノシンは、位置N⁷でメチル化されていてよい(キャップ構造m⁷Gpppとなる)。用語「5'キャップアナログ」は、慣用の5'キャップに基づくが、逆配向での5'キャップアナログの組み込みを回避するために、m⁷グアノシン構造の2'位または3'位で修飾されている、5'キャップを指す(このような5'キャップアナログはアンチリバースキャップアナログ(ARCA)とも称される)。特に好ましい5'キャップアナログは、WO2019/175356(PCT/EP2019/056502)に記載のβ-リン酸におけるホスホロチオエート修飾5'キャップアナログ(例えばm₂^{7,2'}G(5')ppSp(5')G(ベーターS-ARCAまたはβ-S-ARCAと称される))などの、リン酸架橋における架橋および非架橋酸素に1つ以上の置換を有するものである。本明細書に記載のとお

40

50

りRNA(例えばmRNA)に5'キャップ構造を施すことは、5'キャップ構造が産生されたRNA(例えばmRNA)鎖に共転写的に組み込まれる対応する5'キャップ化合物の存在下のDNA鋳型のインビトロ転写により達成され得るか、またはRNA(例えばmRNA)を、例えばインビトロ転写により産生し得て、5'キャップ構造を、キャッピング酵素、例えばワクシニアウイルスのキャッピング酵素を使用して転写後mRNAに負荷し得ることで達成され得る。

【0529】

ある実施態様において、RNA(例えばmRNA)は、 $m_2^{7,2'}G(5')ppSp(5')G$ (特にそのD1ジアステレオマー)、 $m_2^{7,3'}G(5')ppp(5')G$ および $m^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ からなる群から選択される5'キャップ構造を含む。ある実施態様において、抗原またはエпитープを含むペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードするRNAは、5'キャップ構造として $m_2^{7,2'}G(5')ppSp(5')G$ (特にそのD1ジアステレオマー)を含む。

10

【0530】

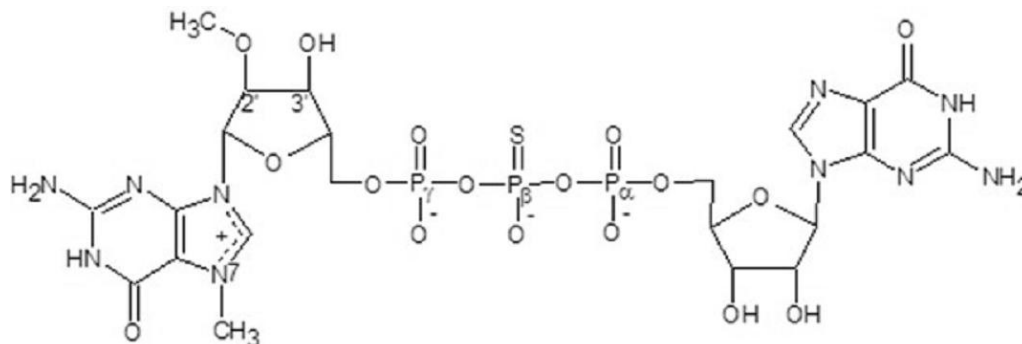
ある実施態様において、RNA(例えばmRNA)は、キャップ0、キャップ1またはキャップ2、好ましくはキャップ1またはキャップ2を含む。本開示によると、用語「キャップ0」は構造「 m^7GpppN 」を意味し、ここで、Nは2'位にOH部分を担持するあらゆるヌクレオシドである。本開示によると、用語「キャップ1」は構造「 $m^7GpppNm$ 」を意味し、ここで、Nmは2'位に OC_2H_5 部分を担持するあらゆるヌクレオシドである。本開示によると、用語「キャップ2」は構造「 $m^7GpppNmNm$ 」を意味し、ここで、各Nmは独立して2'位に OC_2H_5 部分を担持するあらゆるヌクレオシドである。

20

【0531】

5'-キャップアナログの $\beta-S-ARCA(\beta-S-ARCA)$ は次の構造を有する：

【化7】



30

【0532】

「ベータ-S-ARCAのD1ジアステレオマー」または「ベータ-S-ARCA(D1)」は、HPLCカラムでベータ-S-ARCAのD2ジアステレオマー(ベータ-S-ARCA(D2))と比較して最初に溶出し、故に短い保持時間を示す、ベータ-S-ARCAのジアステレオマーである。HPLCは好ましくは分析的HPLCである。ある実施態様において、好ましくは $5\mu m$ 、 $4.6 \times 250mm$ 形式の、Supelcosil LC-18-T RPカラムは分離に使用され、それによって流速 $1.3ml/分$ は適用され得る。ある実施態様において、酢酸アンモニウム中メタノールの勾配、例えば、15分以内の $0.05M$ 酢酸アンモニウム、 $pH=5.9$ 中メタノールの $0 \sim 25\%$ 線形勾配が使用される。UV検出(VWD)を $260nm$ で実施でき、蛍光検出(FLD)を $280nm$ での励起および $337nm$ での検出で実施できる。

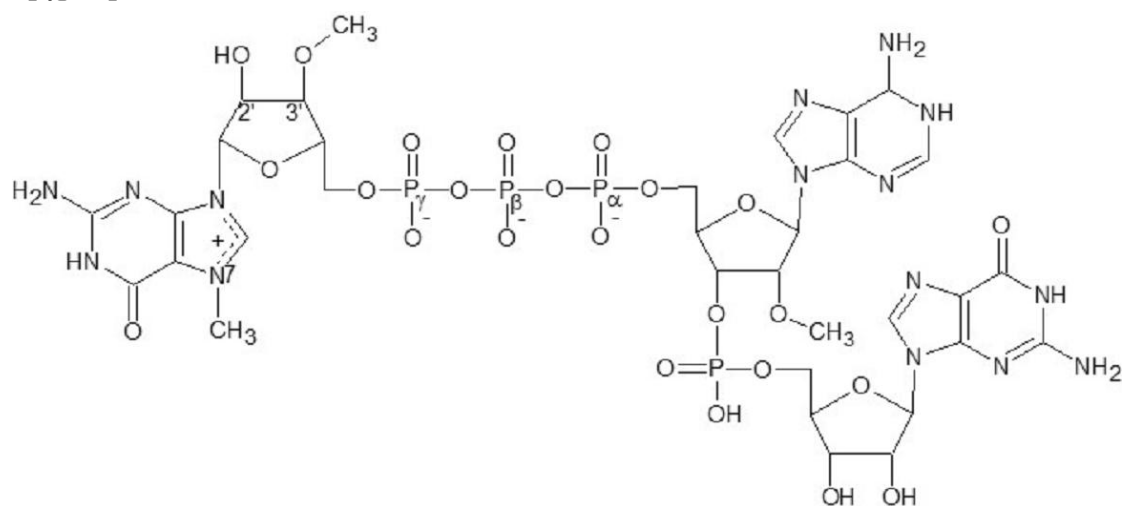
40

【0533】

キャップ1の構成要素である5'キャップアナログ $m_2^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ (別名 $m_2^{7,3'}G(5')ppp(5')m^{7,3'}-9ApG$)は次の構造を有する：

50

【化 8】

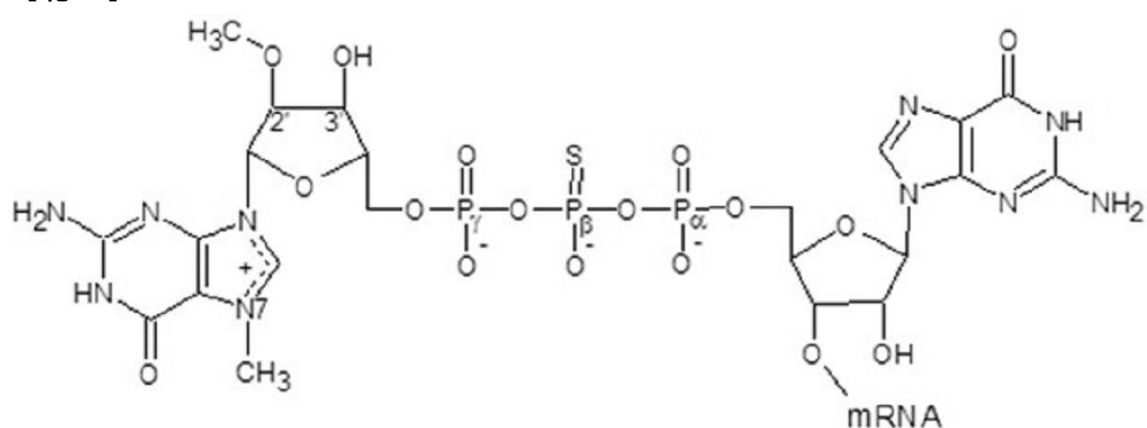


10

【0534】

β -S-ARCAおよびmRNAを含むキャップ0 mRNAの例は、次の構造を有する：

【化 9】



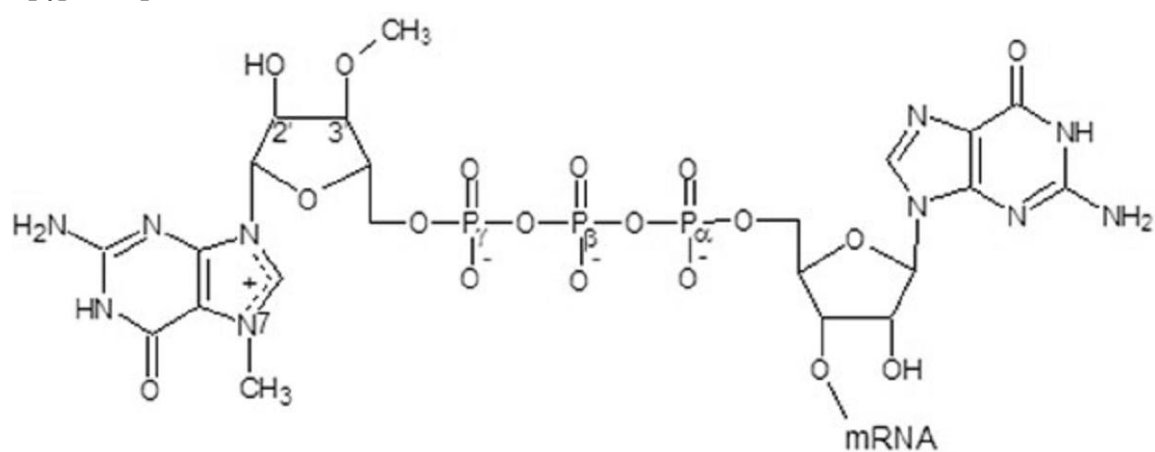
20

30

【0535】

$m_2^{7,3'}G(5')ppp(5')G$ およびmRNAを含むキャップ0 mRNAの例は次の構造を有する：

【化 10】



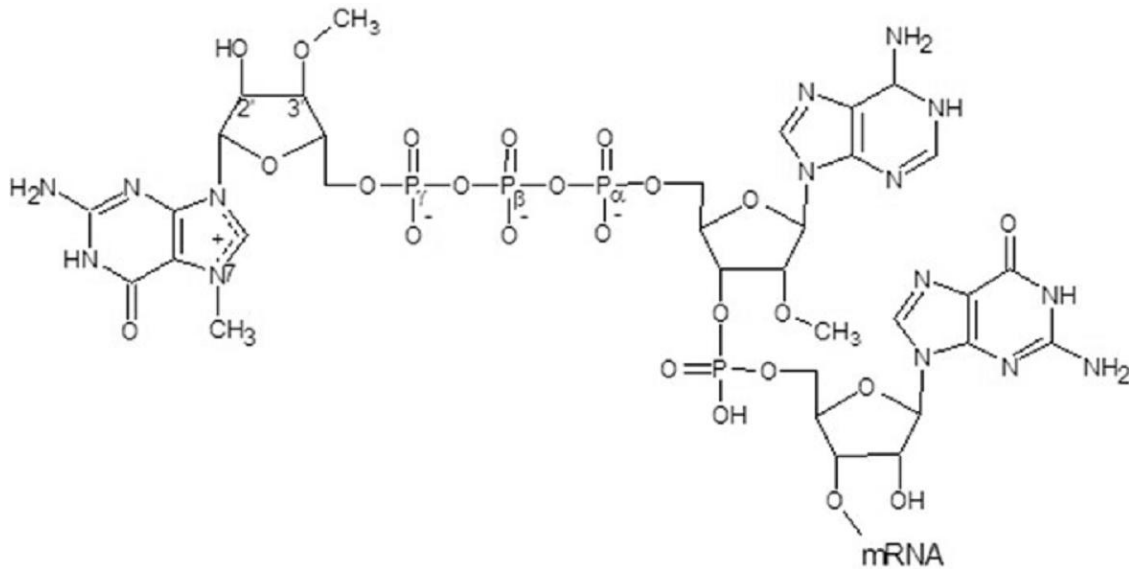
40

【0536】

50

$m_2^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-GApG$ および mRNA を含むキャップ 1 mRNA
A の例は、次の構造を有する：

【化 1 1】



10

【0537】

20

本明細書で使用する用語「ポリ A テール」または「ポリ A 配列」は、典型的に RNA (例えば mRNA) 分子の 3' 末端に位置するアデニル酸残基の中断されていないまたは中断配列を指す。ポリ A テールまたはポリ A 配列は当業者に知られ、本明細書に記載の RNA (例えば mRNA) における 3' - UTR に続き得る。中断されていないポリ A テールは、連続アデニル酸残基により特徴づけられる。本来、中断されていないポリ A テールは典型的である。本明細書に開示する RNA (例えば mRNA) は、転写後に鋳型非依存的 RNA ポリメラーゼにより RNA の遊離 3' 末端に結合されたポリ A テール、または DNA によりコードされ鋳型依存性 RNA ポリメラーゼにより転写されたポリ A テールを有し得る。

【0538】

約 120 個の A ヌクレオチドのポリ A テールが、トランスフェクト真核生物細胞における mRNA レベルおよびポリ A テールの上流 (5') に存在するタンパク質レベルに有益な影響を有することが示されている (Holtkamp et al., 2006, Blood, vol. 108, pp. 4009-4017)。

30

【0539】

ポリ A テールはどの長さでもよい。ある実施態様において、ポリ A テールは、少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 80 個または少なくとも 100 個および最大 500 個、最大 400 個、最大 300 個、最大 200 個または最大 150 個の A ヌクレオチド、特に、約 120 個の A ヌクレオチドを含むか、本質的にそれらからなるかまたはそれらからなる。この状況で、「本質的に～からなる」は、ポリ A テールにおけるヌクレオチドの大部分、典型的にポリ A テールにおけるヌクレオチド数で少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% が A ヌクレオチドであるが、残りのヌクレオチドは A ヌクレオチド以外のヌクレオチド、例えば U ヌクレオチド (ウリジル酸)、G ヌクレオチド (グアニル酸) または C ヌクレオチド (シチジル酸) であってよいことを意味する。この状況で、「～からなる」は、ポリ A テールにおける全ヌクレオチド、すなわち、ポリ A テールにおけるヌクレオチド数で 100% が A ヌクレオチドであることを意味する。用語「A ヌクレオチド」または「A」はアデニル酸を指す。

40

【0540】

ある実施態様において、ポリ A テールは RNA 転写中、例えば、インビトロ転写 RNA

50

の製造中、コード鎖に相補的な鎖に反復 d T ヌクレオチド(デオキシチミジル酸)を含む DNA 鋳型に基づき、付加される。ポリ A テールをコードする DNA 配列(コード鎖)はポリ(A)カセットと称される。

【0541】

ある実施態様において、DNA のコード鎖に存在するポリ(A)カセットは、本質的に d A ヌクレオチドからなるが、4 ヌクレオチド(d A、d C、d G および d T)のランダム配列により中断されている。このようなランダム配列は 5 ~ 50、10 ~ 30 または 10 ~ 20 ヌクレオチド長であり得る。このようなカセットは、参照により本明細書に組み込まれる WO 2016 / 005324 A 1 に開示される。WO 2016 / 005324 A 1 に開示されるあらゆるポリ(A)カセットは本開示で使用され得る。本質的に d A ヌクレオチドからなるが、4 ヌクレオチド(d A、d C、d G、d T)は均等に分布したランダム配列により中断され、例えば、5 ~ 50 ヌクレオチド長を有し、DNA レベルで、大腸菌におけるプラスミド DNA の一定増殖を示し、RNA レベルで、なお RNA 安定性および翻訳効率の支持に関する有益な性質と関連するポリ(A)カセットが包含される。結果として、ある実施態様において、本明細書に記載の RNA (特に、mRNA)分子に含まれるポリ A テールは、本質的に A ヌクレオチドからなるが、4 ヌクレオチド(A、C、G、U)のランダム配列により中断される。このようなランダム配列は 5 ~ 50、10 ~ 30 または 10 ~ 20 ヌクレオチド長であり得る。

10

【0542】

ある実施態様において、A ヌクレオチド以外のヌクレオチドはその 3' 末端でポリ A テールに隣接しておらず、すなわち、ポリ A テールはマスクされていないかまたはその 3' 末端で A 以外のヌクレオチドは続いている。

20

【0543】

ある実施態様において、ポリ A テールは少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 80 個または少なくとも 100 個および最大 500 個、最大 400 個、最大 300 個、最大 200 個または最大 150 個のヌクレオチドを含み得る。ある実施態様において、ポリ A テールは本質的に少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 80 個または少なくとも 100 個および最大 500 個、最大 400 個、最大 300 個、最大 200 個または最大 150 個のヌクレオチドからなり得る。ある実施態様において、ポリ A テールは少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 80 個または少なくとも 100 個および最大 500 個、最大 400 個、最大 300 個、最大 200 個または最大 150 個のヌクレオチドからなり得る。ある実施態様において、ポリ A テールは約 150 個のヌクレオチドを含む。ある実施態様において、ポリ A テールは約 120 個のヌクレオチドを含む。ある実施態様において、ポリ A テールは配列番号 3 のヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。ある実施態様において、ポリ A 配列は、配列番号 3 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% または 80% の同一性を有するヌクレオチド配列を有する。

30

【0544】

ある実施態様において、本開示で使用する RNA (例えば mRNA)は 5' - UTR および / または 3' - UTR を含む。用語「非翻訳領域」または「UTR」は、転写されるが、アミノ酸配列に翻訳されない DNA 分子における領域または mRNA 分子などの RNA 分子における対応する領域に関する。非翻訳領域(UTR)は、オープンリーディングフレームの 5' (上流)(5' - UTR)および / またはオープンリーディングフレームの 3' (下流)(3' - UTR)に存在し得る。5' - UTR は、存在するならば、5' 末端、タンパク質コード化領域の開始コドンの上流に位置する。5' - UTR は、5' キャップ(存在するならば)の下流である、例えば、5' キャップに直接隣接する。3' - UTR は、存在するならば、3' 末端、タンパク質コード化領域の停止コドンの下流に位置するが、用語「3' - UTR」は好ましくはポリ A 配列を含まない。故に、3' - UTR は、ポリ A 配列(存在する

40

50

ならば)の上流、例えば、ポリ A 配列に直接隣接する。RNA (好ましくは mRNA) 分子の 3' 非翻訳領域への 3' - UTR の組み込みは、翻訳効率の増強をもたらし得る。2 以上のこのような 3' - UTR の組み込みにより、相乗的効果は達成され得る (好ましくは頭から尾の向きで配置される; 例えば、Holtkamp et al., Blood 108, 4009-4017 (2006) 参照)。3' - UTR は、導入される RNA (好ましくは mRNA) に対して自己でも異種でもよい。ある特定の実施態様において、3' - UTR はグロビン遺伝子または mRNA、例えばアルファ 2-グロビン、アルファ 1-グロビンまたはベータ-グロビン、好ましくはベータ-グロビン、より好ましくはヒトベータ-グロビンの遺伝子または mRNA に由来する。例えば、RNA (好ましくは mRNA) は、既存の 3' - UTR を、アルファ 2-グロビン、アルファ 1-グロビン、ベータ-グロビン、好ましくはベータ-グロビン、より好ましくはヒトベータ-グロビンなどのグロビン遺伝子由来の 3' - UTR の 1 つ以上、好ましくは 2 つのコピーで置き換えるかまたはそれを挿入することにより修飾され得る。

10

【0545】

ある実施態様において、本開示で使用する RNA (例えば mRNA) は、配列番号 1 のヌクレオチド配列または配列番号 1 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% または 80% 同一性を有するヌクレオチド配列を含む 5' - UTR を含む。

【0546】

ある実施態様において、本開示で使用する RNA (例えば mRNA) は、配列番号 2 のヌクレオチド配列または配列番号 2 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% または 80% 同一性を有するヌクレオチド配列を含む 3' - UTR を含む。

20

【0547】

本明細書に記載の RNA (例えば mRNA) は、安定性増加および／または免疫原性減少および／または細胞毒性減少のために、修飾リボヌクレオチドを有し得る。例えば、ある実施態様において、本明細書に記載の RNA (例えば mRNA) におけるウリジンは、修飾ヌクレオチドにより (部分的にまたは完全に、好ましくは完全に) 置き換えられているある実施態様において、修飾ヌクレオチドは修飾ウリジンである。

【0548】

ある実施態様において、ウリジンを置き換える修飾ウリジンは、シュードウリジン (ψ)、N1-メチルシュードウリジン (m1 ψ)、5-メチルウリジン (m5U) およびそれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0549】

ある実施態様において、RNA (mRNA など) におけるウリジンを (部分的にまたは完全に、好ましくは完全に) 置き換える修飾ヌクレオチドは、3-メチルウリジン (m3U)、5-メトキシウリジン (m5U)、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 (h5U)、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、5-ブロモウリジン)、ウリジン 5-オキシ酢酸 (cm5U)、ウリジン 5-オキシ酢酸メチルエステル (mcm5U)、5-カルボキシメチルウリジン (cm5U)、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 (chm5U)、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 (mchm5U)、5-メトキシカルボニルメチルウリジン (mcm5U)、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン (mcm5s2U)、5-アミノメチル-2-チオウリジン (nm5s2U)、5-メチルアミノメチルウリジン (nm5U)、1-エチルシュードウリジン、5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン (nm5s2U)、5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン (nm5se2U)、5-カルバモイルメチルウリジン (ncm5U)、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン (

40

50

c m n m 5 U)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオーウリジン(c m n m 5 s 2 U)、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(τ m 5 U)、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-チオーウリジン(τ m 5 s 2 U)、1-タウリノメチル-4-チオーシュードウリジン)、5-メチル-2-チオーウリジン(m 5 s 2 U)、1-メチル-4-チオーシュードウリジン(m 1 s 4 ψ)、4-チオー1-メチル-シュードウリジン、3-メチル-シュードウリジン(m 3 ψ)、2-チオー1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザーシュードウリジン、2-チオー1-メチル-1-デアザーシュードウリジン、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(m 5 D)、2-チオージヒドロウリジン、2-チオー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-チオーウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオーシュードウリジン、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 p 3 U)、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 p 3 ψ)、5-(イソペンテニルアミノメチル)ウリジン(i n m 5 U)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオーウリジン(i n m 5 s 2 U)、 α -チオーウリジン、2'-O-メチル-ウリジン(U m)、5,2'-O-ジメチル-ウリジン(m 5 U m)、2'-O-メチル-シュードウリジン(ψ m)、2-チオー2'-O-メチル-ウリジン(s 2 U m)、5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチル-ウリジン(m c m 5 U m)、5-カルバモイルメチル-2'-O-メチル-ウリジン(n c m 5 U m)、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 m 5 U m)、3,2'-O-ジメチル-ウリジン(m 3 U m)、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 m 5 U m)、1-チオーウリジン、デオキシチミジン、2'-F-a r a-ウリジン、2'-F-ウリジン、2'-O H-a r a-ウリジン、5-(2-カルボメトキシビニル)ウリジン、5-[3-(1-E-プロペニルアミノ)ウリジンまたは当分野で知られる任意の他の修飾ウリジンのいずれか1つ以上であり得る。

【0550】

(ウリジンを部分的にまたは完全に、好ましくは完全に置き換える)シュードウリジンにより修飾されているRNA(好ましくはmRNA)は本明細書では「 Ψ 修飾」と称し、一方用語「m1 Ψ 修飾」は、RNA(好ましくはmRNA)はN(1)-メチルシュードウリジン(ウリジンを部分的にまたは完全に、好ましくは完全に置き換える)を含むことを意味する。さらに、用語「m5U修飾」は、RNA(好ましくはmRNA)が(ウリジンを部分的にまたは完全に、好ましくは完全に置き換える)5-メチルウリジンを含むことを意味する。このような Ψ またはm1 Ψ またはm5U修飾RNAは、通常非修飾形態と比較して免疫原性の減少を示し、故に、免疫応答の誘導は回避または最小化されるべき適用において好ましい。ある実施態様において、RNA(好ましくはmRNA)は、ウリジンを完全に置き換えるN(1)-メチルシュードウリジンを含む。

【0551】

本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)のコドンは、例えば、RNAのG/C含量を増加するためおよび/または目的のペプチドまたはタンパク質を発現する細胞(または対象)において希なコドンを、該細胞(または対象)において同義高頻度コドンであるコドンに置き換えるためにさらに最適化され得る。ある実施態様において、本明細書に記載のRNAによりコードされるアミノ酸配列は、コドン最適化されたおよび/または野生型コード配列と比較してG/C含量が増加したコード配列によりコードされる。これはまた、コード配列の1つ以上の配列領域がコドン最適化および/または野生型コード配列の対応する配列領域と比較してG/C含量が増加した実施態様も含む。ある実施態様において、コドン最適化および/またはG/C含量増加は、好ましくはコードするアミノ酸配列の配列を変化させない。

【0552】

用語「コドン最適化」は、核酸分子のコード領域におけるコドンを、好ましくは核酸分

子によりコードされるアミノ酸配列を改変することなく、宿主生物の典型的なコドンの利用を反映するよう改変することを指す。本開示の状況内において、コード領域は、好ましくは本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)を使用して処置する対象における最適発現のためにコドン最適化される。コドン最適化は、細胞におけるtRNAの出現における異なる頻度によっても翻訳効率が決定されるとの知見に基づく。故に、RNA(好ましくはmRNA)の配列は、高頻度に出現するtRNAが利用可能なコドンが、「稀なコドン」の代わりに挿入されるように修飾され得る。

【0553】

ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)のコード領域のグアノシン/シトシン(G/C)含量は、野生型RNAの対応するコード配列のG/C含量と比較して増加し、ここで、RNA(好ましくはmRNA)によりコードされるアミノ酸配列は、好ましくは野生型RNAによりコードされるアミノ酸配列と比較して修飾されていない。このRNA配列の修飾は、翻訳されるあらゆるRNA領域の配列がそのRNA(好ましくはmRNA)の効率的翻訳に重要であるとの事実に基づく。G(グアノシン)/C(シトシン)含量が増加した配列は、A(アデノシン)/U(ウラシル)含量が増加した配列より安定である。数個のコドンは全く同一のアミノ酸をコードする(いわゆる遺伝子コードの縮重)事実に関し、安定性のための最も好ましいコドンが決定され得る(いわゆる代替コドン利用)。RNA(好ましくはmRNA)によりコードされるアミノ酸により、野生型配列と比較して、RNA配列の修飾には種々の可能性がある。特に、Aおよび/またはUヌクレオチドを含むコドンは、これらのコドンを、同じアミノ酸をコードするがAおよび/またはUを含まないかまたはAおよび/またはUヌクレオチド含量が低い他のコドンに置換することにより、修飾され得る。

【0554】

種々の実施態様において、本明細書に記載のRNA(特に、mRNA)のコード領域のG/C含量は、野生型RNAのコード領域のG/C含量と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも55%またはそれ以上増加される。

【0555】

上記修飾の組合せ、すなわち、5'キャップ構造の組み込み、ポリA配列の組み込み、ポリA配列のアンマスキング、5'ーおよび/または3'ーUTRの改変(例えば1つ以上の3'ーUTRの組み込み)、1つ以上の天然に存在するヌクレオチドの合成ヌクレオチドでの置き換え(例えば、シチジンについて5-メチルシチジンおよび/またはウリジンについてシュードウリジン(Ψ)またはN(1)-メチルシュードウリジン(m1Ψ)または5-メチルウリジン(m5U))およびコドン最適化は、RNA(好ましくはmRNA)の安定性に相乗効果を有し、翻訳効率を増加する。故に、ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)、特に本明細書に開示する免疫応答の誘導のための抗原またはエピトープをコードするRNA(好ましくはmRNA)は、上記修飾、すなわち、(i) 5'キャップ構造の組み込み；(ii) ポリA配列の組み込み、ポリA配列のアンマスキング；(iii) 5'ーおよび/または3'ーUTRの改変(例えば1つ以上の3'ーUTRの組み込み)；(iv) 1個以上の天然に存在するヌクレオチドの合成ヌクレオチドでの置き換え(例えば、シチジンについて5-メチルシチジンおよび/またはウリジンについてシュードウリジン(Ψ)またはN(1)-メチルシュードウリジン(m1Ψ)または5-メチルウリジン(m5U))；および(v) コドン最適化の少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個または全5個の組合せを含む。ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)はキャップ1またはキャップ2、好ましくはキャップ1構造を含む。ある実施態様において、ポリA配列は、少なくとも100ヌクレオチドを含む。ある実施態様において、ポリA配列は配列番号3のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる。ある実施態様において、5'ーUTRは配列番号1のヌクレオチド配列または配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。ある実施態様において、3'

ー U T R は配列番号 2 のヌクレオチド配列または配列番号 2 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、90 %、85 % または 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0556】

本開示のいくつかの態様は、本明細書に開示する RNA (好ましくは mRNA) のある細胞または組織への標的化送達に関する。ある実施態様において、本開示は、リンパ系、特に二次性リンパ系臓器、より具体的に脾臓のターゲティングに関する。リンパ系、特に二次性リンパ系臓器、より具体的に脾臓のターゲティングは、投与される RNA (好ましくは mRNA) が免疫応答の誘導のための抗原またはエピトープをコードする RNA (好ましくは mRNA) であるならば、特に好ましい。ある実施態様において、標的細胞は脾臓細胞である。ある実施態様において、標的細胞は脾臓におけるプロフェッショナル抗原提示細胞などの抗原提示細胞である。ある実施態様において、標的細胞は脾臓における樹状細胞である。「リンパ系」は、リンパ液を運ぶリンパ管のネットワークを含む、循環系の一部であり、免疫系の重要な一部である。リンパ系はリンパ性臓器、リンパ管の伝導ネットワークおよび循環リンパ液からなる。一次または中枢リンパ系臓器は、未成熟前駆細胞からリンパ球を産生する。胸腺および骨髄は一次リンパ系臓器を構成する。リンパ節および脾臓を含む二次性または末梢リンパ系臓器は、成熟ナイーブリンパ球を維持し、適応免疫応答を開始する。ある実施態様において、標的細胞は T 細胞である。

【0557】

脂質ベースの RNA (例えば mRNA) 送達系は、肝臓に生来の優先性を有する。肝臓蓄積は、肝臓脈管構造の不連続性または脂質代謝 (リポソームと脂質またはコレステロールコンジュゲート) により引き起こされる。ある実施態様において、標的臓器は肝臓であり、標的組織は肝臓組織である。このような標的組織への送達は、特に、この臓器または組織へのコード化ペプチドまたはタンパク質の存在が望ましいならばおよび／または大量のコード化ペプチドまたはタンパク質の発現が望まれるならばおよび／または特に相当量のコード化ペプチドまたはタンパク質が全身に存在することが望まれるかまたは必要であるならば、好ましい。

【0558】

ある実施態様において、本明細書に記載の RNA (特に、mRNA) 組成物の投与後、RNA の少なくとも一部は標的細胞または標的臓器に送達される。ある実施態様において、RNA の少なくとも一部は標的細胞のサイトゾルに送達される。ある実施態様において、RNA は、ペプチドまたはタンパク質をコードする RNA (好ましくは mRNA) であり、RNA は標的細胞により翻訳されて、該ペプチドまたはタンパク質を産生する。ある実施態様において、標的細胞は肝臓における細胞である。ある実施態様において、標的細胞は筋肉細胞である。ある実施態様において、標的細胞は内皮細胞である。ある実施態様において、標的細胞は腫瘍細胞または腫瘍微小環境の細胞である。ある実施態様において、標的細胞は血液細胞である。ある実施態様において、標的細胞はリンパ節の細胞である。ある実施態様において、標的細胞は肺の細胞である。ある実施態様において、標的細胞は皮膚の細胞である。ある実施態様において、標的細胞は脾臓細胞である。ある実施態様において、標的細胞は脾臓におけるプロフェッショナル抗原提示細胞などの抗原提示細胞である。ある実施態様において、標的細胞は脾臓における樹状細胞である。ある実施態様において、標的細胞は T 細胞である。ある実施態様において、標的細胞は B 細胞である。ある実施態様において、標的細胞は NK 細胞である。ある実施態様において、標的細胞は単球である。故に、本明細書に記載の核酸 (例えば RNA) 粒子 (例えば RNA LNP) 組成物を、このような標的細胞に核酸 (例えば RNA、好ましくは mRNA) を送達するために使用し得る。したがって、本開示はまた本明細書に記載の核酸 (例えば RNA、好ましくは mRNA) 組成物を対象に投与することを含む、対象における標的細胞に核酸 (例えば RNA、好ましくは mRNA) を送達する方法に関する。ある実施態様において、RNA は標的細胞のサイトゾルに送達される。ある実施態様において、RNA はペプチドまたはタンパク質をコードする RNA (好ましくは mRNA) であり、RNA は標的細胞により翻訳さ

れて、該ペプチドまたはタンパク質を産生する。

【0559】

阻害性RNA

本開示の全態様のある実施態様において、核酸は阻害性RNAである。

【0560】

本明細書で使用する用語「阻害性RNA」は、標的mRNAに選択的にハイブリダイズするおよび／または特異的であり、それによりその転写および／または翻訳を阻害(例えば、減少)する、RNAを意味する。阻害性RNAは、標的mRNAに対してアンチセンス配向で配列を有するRNA分子を含む。適当な阻害性オリゴヌクレオチドは、典型的に5～数百ヌクレオチド、より典型的に約20～70ヌクレオチド長またはそれより短い、さらにより典型的に約10～30ヌクレオチド長まで種々の長さである。阻害性RNAの例は、アンチセンスRNA、リボザイム、iRNA、siRNAおよびmiRNAを含む。本開示の全態様のある実施態様において、阻害性RNAはsiRNAである。

10

【0561】

本明細書で使用する用語「アンチセンスRNA」は、生理学的条件下、特定の遺伝子を含むDNAまたは該遺伝子のmRNAとハイブリダイズし、それにより、該遺伝子の転写および／または該mRNAの翻訳を阻害するRNAを指す。核酸のアンチセンス転写物またはその一部は、天然に存在するmRNAと二重鎖を形成し得て、故にmRNAの蓄積または翻訳を阻止し得る。他の可能性は、核酸不活性化のためのリボザイムの使用である。アンチセンスRNAは、N末端または5'上流部位、例えば翻訳開始部位、転写開始部位またはプロモーター部位とハイブリダイズし得る。ある実施態様において、アンチセンスRNAは、3'非翻訳領域またはmRNAスプライシング部位とハイブリダイズし得る。

20

【0562】

アンチセンスRNAのサイズは、15ヌクレオチド～15,000、好ましくは20～12,000、特に100～10,000、150～8,000、200～7,000、250～6,000、300～5,000ヌクレオチド、例えば15～2,000、20～1,000、25～800、30～600、35～500、40～400、45～300、50～250、55～200、60～150または65～100ヌクレオチドまで変わり得る。ある実施態様において、アンチセンスRNAは、少なくとも2,700ヌクレオチド(例えば少なくとも2,800、少なくとも2,900、少なくとも3,000、少なくとも3,100、少なくとも3,200、少なくとも3,300、少なくとも3,400、少なくとも3,500、少なくとも3,600、少なくとも3,700、少なくとも3,800、少なくとも3,900、少なくとも4,000、少なくとも4,100、少なくとも4,200、少なくとも4,300、少なくとも4,400、少なくとも4,500、少なくとも4,600、少なくとも4,700、少なくとも4,800、少なくとも4,900、少なくとも5,000ヌクレオチド)の長さを有する。

30

【0563】

アンチセンスRNAの安定性は必要に応じて修飾され得る。例えば、アンチセンスRNAは、安定化効果を有する1つ以上の修飾により安定化され得る。このような修飾は、修飾ホスホジエステル結合(例えば天然に存在するホスホジエステル結合の代わりにメチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートまたはホスホロアミデート結合)および2'-置換(例えば、2'-フルオロ、2'-O-アルキル(例えば2'-O-メチル、2'-O-プロピルまたは2'-O-ペンチル)および2'-O-アリル)を含む。例えば、アンチセンスRNAのある実施態様において、ホスホロチオエート結合は部分的にホスホジエステル結合に置換されている。あるいはまたはさらに、アンチセンスRNAのある実施態様において、リボース部分は部分的に2'位をO-アルキル(例えば2'-O-メチル)で置換されている。

40

【0564】

アンチセンスRNAは、標的mRNA配列(「標的配列」)のいずれかにおける約19～25連続ヌクレオチドのあらゆるストレッチに対して標的化され得る。一般に、標的mRNA

50

NAの標的配列は、開始コドンから好ましくは50～100nt下流(すなわち、3'方向)から開始する、標的mRNAに対応する所定のcDNA配列から選択され得る。しかしながら、標的配列は、5'もしくは3'非翻訳領域または開始コドンに近接する領域に位置し得る。

【0565】

アンチセンスRNAは、当分野で知られるいくつかの技術を使用して、得ることができる。例えば、アンチセンスRNAは、当分野で知られる方法を使用して、化学合成されるかまたは組換えにより産生され得る。好ましくは、アンチセンスRNAは、任意の適当なプロモーターを使用して、組換え環状または線形DNAプラスミドから転写される。

【0566】

アンチセンスRNAの発現に適するプラスミドの選択、アンチセンスRNAを発現するための核酸配列をプラスミドに挿入する方法および該アンチセンスRNAのインビトロ転写のためのIVT方法は当分野における技術の範囲内である。

【0567】

本明細書で使用する「小干渉RNA」または「siRNA」は、標的mRNAの一部に特異的に結合できる、好ましくは10を超えるヌクレオチド長、より好ましくは15を超えるヌクレオチド長、最も好ましくは18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド長の、RNA分子を意味する。この結合は、標的mRNAの該部分が切断または分解され、それにより該標的mRNAの遺伝子発現が阻害されるプロセスを誘導する。19～25ヌクレオチドの範囲は、siRNAの最も好ましいサイズである。原則として、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖は、2つの相補的な一本鎖RNA分子を含み得るが、本開示によるsiRNAは、2つの相補的部分が塩基対合し、一本鎖「ヘアピン」領域により共有結合で結合している単一分子を含む。すなわち、センス領域およびアンチセンス領域は、リンカー分子を介して共有結合で結合され得る。リンカー分子はポリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリンカーであり得るが、好ましくはポリヌクレオチドリンカーである。何らかの理論に拘束されることを願わないが、siRNA分子のヘアピン領域は細胞内で「ダイサー」タンパク質(またはその等価物)により開裂され、2個の個々の塩基対合したRNA分子のsiRNAを形成すると考えられる。

【0568】

siRNAはまた3'オーバーハングを含んでよい。本明細書で使用する「3'オーバーハング」は、RNA鎖の3'末端から伸びる少なくとも1個の不對ヌクレオチドを指す。故に、ある実施態様において、siRNAは、1～約6ヌクレオチド(リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを含む)長、好ましくは1～約5ヌクレオチド長、より好ましくは1～約4ヌクレオチド長および特に好ましくは約2～約4ヌクレオチド長の少なくとも1個の3'オーバーハングを含む。siRNA分子の両鎖(すなわち、siRNA分子が細胞内で「ダイサー」タンパク質により開裂された後)が3'オーバーハングを含む実施態様において、オーバーハングの長さは各鎖で同一でも異なってもよい。いくつかの好ましい実施態様において、3'オーバーハングはsiRNAの両鎖に存在し、2ヌクレオチド長である。例えば、siRNAの各鎖はジデオキシチミジル酸(「TT」)またはジウリジル酸(「uu」)の3'オーバーハングを含み得る。

【0569】

siRNAの安定性を増強するために、3'オーバーハングを分解に対して安定化させることもできる。ある実施態様において、オーバーハングは、アデノシンまたはグアノシンヌクレオチドなどのプリンヌクレオチドを含むことにより安定化される。あるいは、ピリミジンヌクレオチドの修飾アナログによる置換、例えば、3'オーバーハングのウリジンヌクレオチドの2'-デオキシチミジンでの置換は許容され、RNAi分解効率に影響しない。特に、2'-デオキシチミジンに2'-ヒドロキシルが存在しないことは、組織培養培地における3'オーバーハングのヌクレアーゼ抵抗性を顕著に増強する。

【0570】

本明細書で使用する「標的mRNA」は、下方制御の標的であるRNA分子を指す。ある実施態様において、標的mRNAは、本明細書に特定する薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。ある実施態様において、薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドは、その発現(特に、例えば、健常対象における発現と比較して増加した発現)が疾患と関連するものである。ある実施態様において、標的mRNAは、その発現(特に、例えば、健常対象における発現と比較して増加した発現)ががんに関連する薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。

【0571】

本開示によると、siRNAは、標的mRNA配列(「標的配列」)のいずれかにおける約19~25連続ヌクレオチドのあらゆるストレッチに対して標的化され得る。siRNAの標的配列を選択する技術は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる2002年10月11日改定のTuschl T. et al., "The siRNA User Guide"に示される。「The siRNA User Guide」は、Dr. Thomas Tuschl, Laboratory of RNA Molecular Biology, Rockefeller University, New York, USAにより維持されるウェブサイトでインターネット上で利用可能であり、Rockefeller Universityのウェブサイトにアクセスし、キーワード「siRNA」で検索することにより見ることができる。標的配列の選択および／またはsiRNAの設計に関するさらなるガイダンスは、キーワード「siRNA」を使用して、Protocol Online(www.protocol-online.com)のウェブページに見ることができる。故に、ある実施態様において、本開示で使用するsiRNAのセンス鎖は、標的mRNAにおける約19~約25ヌクレオチドの任意の連続ストレッチと実質的に同一のヌクレオチド配列を含む。

【0572】

一般に、標的mRNAの標的配列は、好ましくは、開始コドンから50~100 nt下流(すなわち、3'方向)から開始する、標的mRNAに対応する所定のcDNA配列から選択され得る。しかしながら、標的配列は5'または3'非翻訳領域または開始コドンに近接する領域に位置し得る。

【0573】

siRNAは、当分野で知られるいくつかの技術を使用して、得ることができる。例えば、siRNAは、開示全体を参照により本明細書に組み込まれるTuschl et al.の米国出願2002/0086356に記載のショウジョウバエインビトロ系などの、当分野で知られる方法を使用して、化学合成または組換えにより産生し得る。siRNAは、pol IIIプロモーターからのRNA発現が最初に転写されたヌクレオチドはプリンであるときのみ効率的であると考えられるため、標的部位を変化させることなくpol III発現ベクターから発現できる。

【0574】

好ましくは、siRNAは、任意の適当なプロモーターを使用して、組換え環状または線形DNAプラスミドから転写される。プラスミドから本開示で使用するsiRNAを転写するための適当なプロモーターは、例えば、U6またはH1 RNA pol IIIプロモーター配列およびサイトメガロウイルスプロモーターを含む。他の適当なプロモーターの選択は当分野の技術の範囲内である。

【0575】

siRNAを転写するための適当なプラスミドの選択、siRNAを発現するための核酸配列をプラスミドに挿入する方法および該siRNAのインビトロ転写のIVT方法は当分野の技術の範囲内である。

【0576】

本明細書で使用する用語「miRNA」(マイクロRNA)は、21~25(例えば21~23、好ましくは22)ヌクレオチドの長さを有し、標的mRNAの分解および／または翻訳阻止を誘導する、非コードRNAに関する。miRNAは、典型的に植物、動物および一部ウイルスで見られ、それぞれ植物および動物では真核生物核DNAおよびウイルスDNA(ゲノムがDNAに基づくウイルスにおいて)によりコードされる。miRNAは

、標的メッセンジャーRNA複写物(mRNA)の相補的配列に結合し、通常翻訳抑制または標的分解および遺伝子サイレンシングをもたらす転写後制御因子である。

【0577】

miRNAは、当分野で知られるいくつかの技術を使用して、得ることができる。例えば、miRNAは、当分野で知られる方法を使用して、化学合成または(例えば、Applied Biological Materials Inc.販売のmiRNA cDNA合成キットなどの市販キットの使用により)組換えにより産生し得る。好ましくは、miRNAは、任意の適当なプロモーターを使用して、組換え環状または線形DNAプラスミドから転写される。

【0578】

薬学的活性ペプチドまたはポリペプチド

「コード」は、遺伝子、cDNAまたはRNA(好ましくはmRNA)などのポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの特異的配列の、生物学的過程においてヌクレオチドの規定配列(すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA)またはアミノ酸の規定配列を有する他のポリマーおよび巨大分子の合成の鑄型として機能するための固有の性質、およびそれに起因する生物学的性質を指す。故に、遺伝子は、その遺伝子に対応するRNA(好ましくはmRNA)の転写および翻訳が細胞または他の生物学的系においてタンパク質を産生するならば、タンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がRNA配列と同一であり、通常配列表に提供されるコード鎖および遺伝子またはcDNAの転写の鑄型として使用される非コード鎖の両方が、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると称され得る。

【0579】

ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)は、1つ以上のポリペプチド、例えば、ペプチドまたはタンパク質、好ましくは薬学的活性ペプチドまたはタンパク質をコードする核酸配列(例えば、ORF)を含む。

【0580】

ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)は、ペプチドまたはタンパク質、好ましくは薬学的活性ペプチドまたはタンパク質をコードする核酸配列(例えば、ORF)を含み、特に細胞または対象に導入されたならば、該ペプチドまたはタンパク質を発現することができる。故に、ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)は、ペプチドまたはタンパク質をコードする、好ましくは薬学的活性ペプチドまたはタンパク質をコードするコード領域(ORF)を含む。これに関して、「オープンリーディングフレーム」または「ORF」は、開始コドンから始まり、停止コドンで終わるコドンの連続的ストレッチである。このような薬学的活性ペプチドまたはタンパク質をコードするRNA(好ましくはmRNA)は、本明細書では「薬学的活性RNA」(または「薬学的活性mRNA」)とも称する。ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)は、1を超えるペプチドまたはポリペプチド、例えば、2個、3個、4個またはそれ以上のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列を含む。

【0581】

本開示によると、用語「薬学的活性ペプチドまたはタンパク質」は、ペプチドまたはタンパク質の発現が、例えば、疾患または障害の症状の軽減に利益がある、個体の処置に使用できるペプチドまたはタンパク質を意味する。好ましくは、薬学的活性ペプチドまたはタンパク質は、治癒的または緩和的性質を有し、疾患または障害の1つ以上の症状の改善、緩和、軽減、逆転、発症遅延または重症度低減のために投与され得る。ある実施態様において、薬学的活性ペプチドまたはタンパク質は、治療有効量で個体に投与したとき、個体の状態または疾患状態に良いまたは有利な効果を有する。薬学的活性ペプチドまたはタンパク質は予防的性質を有し得て、疾患または障害の発症遅延またはそのような疾患または障害の重症度低減に使用し得る。用語「薬学的活性ペプチドまたはタンパク質」はタンパク質またはポリペプチド全体を含み、その薬学的活性フラグメントも指し得る。またペプチドまたはタンパク質の薬学的活性アナログも含み得る。用語「薬学的活性ペプチドま

10

20

30

40

50

たはタンパク質」および「治療用タンパク質」は、本明細書で相互交換可能に用いられる。

【0582】

薬学的活性ペプチドおよびタンパク質の具体例は、免疫刺激剤、例えば、サイトカイン、ホルモン、接着分子、免疫グロブリン、免疫学活性化合物、増殖因子、プロテアーゼ阻害剤、酵素、受容体、アポトーシス制御因子、転写因子、腫瘍抑制タンパク質、構造タンパク質、再プログラム化因子、ゲノム工学タンパク質および血液タンパク質を含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、薬学的活性ペプチドおよびポリペプチドは代替タンパク質を含む。

【0583】

「免疫刺激剤」は、免疫系の成分のいずれか、特に免疫エフェクター細胞の活性化誘導または活性増加により、免疫系を刺激する、あらゆる物質である。免疫刺激剤は、炎症促進性(例えば、感染またはがんを処置するとき)または抗炎症性(例えば、自己免疫性疾患を処置するとき)であり得る。

【0584】

ある実施態様において、免疫刺激剤はサイトカインまたはそのバリエーションである。サイトカインの例は、インターフェロン、例えばインターフェロン-アルファ(IFN- α)またはインターフェロン-ガンマ(IFN- γ)、インターロイキン、例えばIL2、IL7、IL12、IL15およびIL23、コロニー刺激因子、例えばM-CSFおよびGM-CSF、および腫瘍壊死因子を含む。他の態様によると、免疫刺激剤は、APC T cell様受容体アゴニストまたは共刺激/細胞接着膜タンパク質などのアジュバント型免疫刺激剤を含む。T cell様受容体アゴニストの例は、CD80、CD86およびICAM-1などの共刺激/接着タンパク質を含む。

【0585】

用語「サイトカイン」は、約5~60 kDa(例えば約5~20 kDa)の分子量を有し、細胞シグナル伝達(例えば、傍分泌、内分泌および/または自己分泌シグナル伝達)に関与するタンパク質に関する。特に、放出されたとき、サイトカインは、放出部位周囲の細胞の行動に効果を発揮する。サイトカインの例は、リンホカイン、インターロイキン、ケモカイン、インターフェロンおよび腫瘍壊死因子(TNF)を含む。本開示によると、サイトカインはホルモンまたは増殖因子を含まない。サイトカインは、ホルモンと、(i)通常ホルモンよりはるかに可変性の濃度で作用し、(ii)一般に広範囲の細胞により産生される(ほぼ全ての有核細胞はサイトカインを産生できる)点で異なる。インターフェロンは、通常抗ウイルス、抗増殖性および免疫調節活性により特徴づけられる。インターフェロンは、制御細胞表面のインターフェロン受容体への結合により、細胞内の遺伝子の転写を改変および制御し、それにより細胞内のウイルス複製を阻止するタンパク質である。インターフェロンは2タイプに分類され得る。IFN-ガンマは唯一II型インターフェロンである；残りのその他はI型インターフェロンである。サイトカインの具体例はエリスロポエチン(EPO)、コロニー刺激因子(CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)、骨形成タンパク質(BMP)、インターフェロンアルファ(IFN α)、インターフェロンベータ(IFN β)、インターフェロンガンマ(INF γ)、インターロイキン2(IL-2)、インターロイキン4(IL-4)、インターロイキン10(IL-10)、インターロイキン11(IL-11)、インターロイキン12(IL-12)およびインターロイキン21(IL-21)を含む。

【0586】

本開示によると、サイトカインは天然に存在するサイトカインまたはその機能的フラグメントもしくはバリエーションであり得る。サイトカインはヒトサイトカインであってよく、あらゆる脊椎動物、特にあらゆる哺乳動物に由来し得る。ある特に好ましいサイトカインはインターフェロン- α である。

【0587】

免疫刺激剤は、肝臓または肝臓組織へのRNAの優先的送達のための製剤で免疫刺激剤をコードするRNAを対象に投与することにより、対象に提供され得る。そのような標的臓器または組織へのRNAの送達は、特に、大量の免疫刺激剤の発現が望ましいならばおよび／または特に相当量での免疫刺激剤が全身に存在することが望ましいかまたは必要であるならば、好ましい。RNA送達系は、肝臓に生来の優先性を有する。これは脂質ベースの粒子、カチオン性および中性ナノ粒子、特に脂質ナノ粒子に関する。

【0588】

肝臓をターゲティングするための適当な免疫刺激剤の例は、T細胞増殖および／または維持に参与するサイトカインである。適当なサイトカインの例は、IL2またはIL7、そのフラグメントおよびバリエーションおよびこれらサイトカイン、フラグメントおよびバリエーションの融合タンパク質、例えば拡張PKサイトカインを含む。

10

【0589】

他の実施態様において、免疫刺激剤をコードするRNAは、リンパ系、特に二次性リンパ系臓器、より具体的に脾臓へのRNAの優先的送達のための製剤で投与され得る。そのような標的組織への免疫刺激剤の送達は、特に、この臓器または組織における免疫刺激剤の存在が望ましいならば、好ましく(例えば、免疫応答の誘導のために、特にサイトカインなどの免疫刺激剤がT細胞プライミング中または常在免疫細胞の活性化に必要であるとき)、一方、免疫刺激剤が、特に相当量で、全身に存在することは望まれない(例えば、免疫刺激剤は全身毒性を有するため)。

【0590】

20

適当な免疫刺激剤の例は、T細胞プライミングに参与するサイトカインである。適当なサイトカインの例は、IL12、IL15、IFN- α またはIFN- β 、そのフラグメントおよびバリエーションおよびこれらサイトカイン、フラグメントおよびバリエーションの融合タンパク質、例えば拡張PKサイトカインを含む。

【0591】

インターフェロン(IFN)は、ウイルス、細菌、寄生虫などのいくつかの病原体およびまた腫瘍細胞の存在に応答して、宿主細胞により産生および放出される一群のシグナル伝達タンパク質である。典型的シナリオにおいて、ウイルス感染細胞は、近隣細胞の抗ウイルス防御増大を引き起こすインターフェロンを放出する。

【0592】

30

シグナル伝達する受容体のタイプに基づき、インターフェロンは典型的にI型インターフェロン、II型インターフェロンおよびIII型インターフェロンの3群に分けられる。

【0593】

全てのI型インターフェロンは、IFNAR1鎖およびIFNAR2鎖からなるIFN- α ／ β 受容体(IFNAR)として知られる特異的細胞表面受容体複合体に結合する。

【0594】

ヒトに存在するI型インターフェロンは、IFN α 、IFN β 、IFN ϵ 、IFN κ およびIFN ω である。一般に、I型インターフェロンは、体が侵入してきたウイルスを認識したとき産生される。それらは線維芽細胞および単球により産生される。放出されたら、I型インターフェロンは標的細胞上の特異的受容体に結合し、ウイルスがRNAおよびDNAを産生して複製することを阻止するタンパク質の発現を引き起こす。

40

【0595】

IFN α タンパク質は、主に形質細胞様樹状細胞(pDC)により産生される。主に、ウイルス感染に対する自然免疫に参与する。その合成を担う遺伝子は、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17、IFNA21と称される13のサブタイプがある。これらの遺伝子は、9番染色体に一体となってクラスターで見られる。

【0596】

IFN β タンパク質は、線維芽細胞により大量に産生される。主に自然免疫応答に参与

50

する抗ウイルス活性を有する。IFN β 1およびIFN β 3の2タイプのIFN β が記載されている。IFN β 1の天然および組換え形態は、抗ウイルス、抗細菌および抗がん性質を有する。

【0597】

II型インターフェロン(ヒトにおけるIFN γ)は免疫インターフェロンとしても知られ、IL12により活性化される。さらに、II型インターフェロンは細胞毒性T細胞およびTヘルパー細胞により放出される。

【0598】

III型インターフェロンは、IL10R2(別名CRF2-4)およびIFNLR1(別名CRF2-12)からなる受容体複合体を介してシグナル伝達する。I型およびII型IFNよりも最近発見されたが、最近の情報では、いくつかのタイプのウイルスまたは真菌感染におけるIII型IFNの重要性が示されている。

【0599】

一般に、I型およびII型インターフェロンは免疫応答の制御および活性化を担う。

【0600】

本開示によると、I型インターフェロンは好ましくはIFN α またはIFN β 、より好ましくはIFN α である。

【0601】

本開示によると、インターフェロンは天然に存在するインターフェロンまたはその機能的フラグメントもしくはバリエーションであり得る。インターフェロンはヒトインターフェロンであってよく、あらゆる脊椎動物、特にあらゆる哺乳動物に由来し得る。

【0602】

インターロイキン(IL)は、特徴的構造特性に基づき4つの主要な群に分割され得る一群のサイトカイン(分泌型タンパク質およびシグナル分子)である。しかしながら、これらのアミノ酸配列類似性はむしろ弱い(典型的に15~25%の同一性)。ヒトゲノムは、50を超えるインターロイキンおよび関連タンパク質をコードする。

【0603】

本開示によると、インターロイキンは天然に存在するインターロイキンまたはその機能的フラグメントもしくはバリエーションであり得る。インターロイキンはヒトインターロイキンであってよく、あらゆる脊椎動物、特にあらゆる哺乳動物に由来し得る。

【0604】

本明細書に記載の免疫刺激剤ポリペプチドは、免疫刺激剤部分および異種ポリペプチド(すなわち、免疫刺激剤ではないポリペプチド)を含む融合またはキメラポリペプチドとして製造できる。免疫刺激剤は、拡張PK基に融合し得て、それは循環半減期を延長する。拡張PK基の非限定的例は下に記載されている。サイトカインなどの免疫刺激剤またはそのバリエーションの循環半減期を延長する他のPK基も本開示において適用可能であることは理解されるべきである。ある実施態様において、拡張PK基は血清アルブミンドメイン(例えば、マウス血清アルブミン、ヒト血清アルブミン)である。

【0605】

本明細書で使用する用語「PK」は「薬物動態(pharmacokinetic)」の頭字語であり、例として、対象による吸収、分布、代謝および排除を含む、化合物の性質を包含する。本明細書で使用する「拡張PK基」は、生物学的活性分子に融合したときまたは一緒に投与されたとき、生物学的活性分子の循環半減期を延長するタンパク質、ペプチドまたは部分を指す。拡張PK基の例は、血清アルブミン(例えば、HSA)、免疫グロブリンFcまたはそのFcフラグメントおよびバリエーション、トランスフェリンおよびそのバリエーションおよびヒト血清アルブミン(HSA)結合剤(米国公開2005/0287153および2007/0003549に開示)を含む。拡張PK基の他の例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるKontermann, Expert Opin Biol Ther, 2016 Jul;16(7):903-15に開示される。本明細書で使用する「拡張PK」免疫刺激剤は、拡張PK基と組み合わせた免疫刺激剤部分を指す。ある実施態様において、拡張PK免疫刺激剤は、免疫

10

20

30

40

50

刺激剤部分が拡張 P K 基に結合または融合している融合タンパク質である。

【0606】

ある実施態様において、拡張 P K 免疫刺激剤の血清半減期は、免疫刺激剤単独(すなわち、拡張 P K 基に融合していない免疫刺激剤)と比較して延長する。ある実施態様において、拡張 P K 免疫刺激剤の血清半減期は、免疫刺激剤単独の血清半減期に対して少なくとも 20 %、少なくとも 40 %、少なくとも 60 %、少なくとも 80 %、少なくとも 100 %、少なくとも 120 %、少なくとも 150 %、少なくとも 180 %、少なくとも 200 %、少なくとも 400 %、少なくとも 600 %、少なくとも 800 % または少なくとも 1000 % 長い。ある実施態様において、拡張 P K 免疫刺激剤の血清半減期は、免疫刺激剤単独の血清半減期より少なくとも 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 10 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、10 倍、12 倍、13 倍、15 倍、17 倍、20 倍、22 倍、25 倍、27 倍、30 倍、35 倍、40 倍または 50 倍長い。ある実施態様において、拡張 P K 免疫刺激剤の血清半減期は少なくとも 10 時間、15 時間、20 時間、25 時間、30 時間、35 時間、40 時間、50 時間、60 時間、70 時間、80 時間、90 時間、100 時間、110 時間、120 時間、130 時間、135 時間、140 時間、150 時間、160 時間または 200 時間である。

【0607】

本明細書で使用する「半減期」は、ペプチドまたはポリペプチドなどの化合物の血清または血漿濃度が、例えば、天然機構による分解および／またはクリアランスまたは隔離により、インビボで 50 % 減少するのにかかる時間である。本明細書で使用するのに適する 20 拡張 P K 免疫刺激剤は、例えば、分解および／またはクリアランスまたは隔離に耐える血清アルブミン(例えば、HSA または MSA)への融合により、インビボで安定化され、半減期は延長する。半減期は、薬物動態分析などのそれ自体既知の任意の方法で決定され得る。適当な技術は当業者には明らかであり、例えば一般に適当な用量のアミノ酸配列または化合物を対象に適切に投与し；一定間隔で該対象から血液サンプルまたは他のサンプルを採取し；該血液サンプル中のアミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度を決定し；そして、そうして得たデータ(のプロット)から、アミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度が投与時の初期レベルと比較して 50 % 減少するまでの時間を計算する工程を含み得る。さらなる詳細は、例えば、Kenneth, A. et al., Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (1996)などの標準ハンドブックに提供される。Gibaldi, M. et al., Pharmacokinetics, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982)もまた参照のこと。 30

【0608】

ある実施態様において、拡張 P K 基は、血清アルブミンまたはそのフラグメントまたは血清アルブミンもしくはそのフラグメントのバリエーションを含む(本開示の目的のためにその全てが用語「アルブミン」に含まれる)。本明細書に記載のポリペプチドをアルブミン(またはそのフラグメントもしくはバリエーション)に融合して、アルブミン融合タンパク質を形成し得る。そのようなアルブミン融合タンパク質は米国公開 20070048282 に記載されている。 40

【0609】

本明細書で使用する「アルブミン融合タンパク質」は、少なくとも 1 分子のアルブミン(またはそのフラグメントもしくはバリエーション)と少なくとも 1 分子の治療用タンパク質、特に免疫刺激剤などのタンパク質の融合により形成されたタンパク質を指す。アルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質をコードするポリヌクレオチドがインフレイムでアルブミンをコードするポリヌクレオチドと結合する核酸の翻訳により産生され得る。治療用タンパク質およびアルブミンは、アルブミン融合タンパク質の一部となったら、各々アルブミン融合タンパク質の「部」、「領域」または「部分」(例えば、「治療用タンパク質部分」または「アルブミンタンパク質部分」と称され得る。高度に好ましい実施態様において、アルブミン融合タンパク質は、少なくとも 1 分子の治療用タンパク質(治療用 50

タンパク質の成熟形態を含むが、これに限定されない)および少なくとも1分子のアルブミン(アルブミンの成熟形態を含むが、これに限定されない)を含む。ある実施態様において、アルブミン融合タンパク質は、投与RNAの標的臓器の細胞、例えば肝臓細胞などの宿主細胞によりプロセシングされ、循環に分泌される。RNA発現に使用する宿主細胞の分泌経路で起こる発生期アルブミン融合タンパク質のプロセシングは、シグナルペプチド切断；ジスルフィド結合形成；適切な折り畳み；炭水化物付加およびプロセシング(例えば、N-およびO結合グルコシル化など)；特異的タンパク分解的切断；および／または多量体タンパク質への集合を含み得るが、これらに限定されない。アルブミン融合タンパク質は、好ましくは特にN末端にシグナルペプチドを有するプロセシングされていない形態のRNAによりコードされ、細胞による分泌後、好ましくは特にシグナルペプチドが開裂されたプロセシングされた形態で存在する。最も好ましい実施態様において、「プロセシングされた形態のアルブミン融合タンパク質」は、N末端シグナルペプチド切断を受けているアルブミン融合タンパク質生成物を指し、本明細書では「成熟アルブミン融合タンパク質」とも称する。

10

【0610】

好ましい実施態様において、治療用タンパク質を含むアルブミン融合タンパク質は、アルブミンに融合していないときの同じ治療用タンパク質の血漿安定性と比較して、血漿安定性が高い。血漿安定性は、典型的に治療用タンパク質がインビボで投与され、血流に運搬されるときと、治療用タンパク質が分解され、血流から最終的に治療用タンパク質を体から除去する腎臓または肝臓などの臓器に入るときの間時間を指す。血漿安定性は、血流中の治療用タンパク質の半減期の点で計算される。血流中の治療用タンパク質の半減期は、当分野で知られる一般的アッセイにより容易に決定され得る。

20

【0611】

本明細書において「アルブミン」は、まとめて、アルブミンの1つ以上の機能的活性(例えば、生物学的活性)を有するアルブミンタンパク質またはアミノ酸配列またはアルブミンフラグメントまたはバリエーションを指す。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミンまたはそのフラグメントもしくはバリエーション、特にヒトアルブミンまたは他の脊椎動物からのアルブミンの成熟形態またはそのフラグメントまたはこれらの分子のバリエーションを指す。アルブミンは、あらゆる脊椎動物、特にあらゆる哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ヒツジまたはブタに由来し得る。非哺乳動物アルブミンは、雌鶏およびサケを含むが、これらに限定されない。アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、治療用タンパク質部分とは異なる動物由来であってよい。

30

【0612】

特定の実施態様において、アルブミンはヒト血清アルブミン(HSA)またはそのフラグメントもしくはバリエーションであり、例えばUS5,876,969、WO2011/124718、WO2013/075066およびWO2011/0514789に開示のものである。用語ヒト血清アルブミン(HSA)およびヒトアルブミン(HA)は本明細書では相互交換可能に使用される。用語「アルブミン」および「血清アルブミン」はより広義であり、ヒト血清アルブミン(およびそのフラグメントおよびバリエーション)ならびに他の種由来のアルブミン(およびそのフラグメントおよびバリエーション)を包含する。

40

【0613】

本明細書において、使用する治療用タンパク質の治療活性または血漿安定性の延長に十分なアルブミンのフラグメントは、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分の血漿安定性が非融合状態の血漿安定性と比較して延長または拡大するように、タンパク質の治療活性または血漿安定性を安定化または延長するのに十分な長さまたは構造のアルブミンのフラグメントを指す。

【0614】

アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は完全長のアルブミン配列を含んでよいまたは治療活性または血漿安定性を安定化または延長できる1つ以上のそのフラグメントを含んでよい。このようなフラグメントは10以上のアミノ酸長であってよいまたはア

50

ルブミン配列からの約15、20、25、30、50またはそれ以上の連続アミノ酸を含んでよい。またはアルブミンの特異的ドメインの一部または全てを含んでよい。例えば、最初の2個の免疫グロブリン様ドメインにわたるHSAの1つ以上のフラグメントを使用し得る。好ましい実施態様において、HSAフラグメントはHSAの成熟形態である。

【0615】

一般的に言って、アルブミンフラグメントまたはバリエーションは少なくとも100アミノ酸長、好ましくは少なくとも150アミノ酸長である。

【0616】

本開示によると、アルブミンは天然に存在するアルブミンまたはそのフラグメントもしくはバリエーションであってよい。アルブミンはヒトアルブミンであってよく、あらゆる脊椎動物、特にあらゆる哺乳動物に由来してよい。

【0617】

ある実施態様において、アルブミン融合タンパク質はN末端部分としてアルブミンおよびC末端部分として治療用タンパク質を含む。あるいは、C末端部分としてアルブミンおよびN末端部分として治療用タンパク質を含むアルブミン融合タンパク質も使用され得る。他の実施態様において、アルブミン融合タンパク質は、アルブミンのN末端およびC末端両方に融合した治療用タンパク質を有する。好ましい実施態様において、N末端およびC末端に融合した治療用タンパク質は同じ治療用タンパク質である。他の好ましい実施態様において、N末端およびC末端に融合した治療用タンパク質は異なる治療用タンパク質である。ある実施態様において、異なる治療用タンパク質は両方サイトカインである。

【0618】

ある実施態様において、治療用タンパク質は、ペプチドリッカーを介してアルブミンに結合する。融合部分間のペプチドリッカーは部分間の物理的分離を大きくし、故に、例えば、その同族受容体への結合のために、治療用タンパク質部分の接近可能性を最大化し得る。ペプチドリッカーは、柔軟またはより剛性であるようにアミノ酸からなる。リンカー配列はプロテアーゼによりまたは化学的に開裂し得る。

【0619】

本明細書で使用する用語「Fc領域」は、天然免疫グロブリンの、その2個の重鎖の各Fcドメイン(またはFc部分)から形成される部分を指す。本明細書で使用する用語「Fcドメイン」は、単一免疫グロブリン(Ig)重鎖の部分またはフラグメントであり、ここで、FcドメインはFvドメインを含まない。特定の実施態様において、Fcドメインはパイン切断部位の直ぐ上流のヒンジ領域から始まり、抗体のC末端で終わる。したがって、完全なFcドメインは、少なくともヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。特定の実施態様において、Fcドメインは、ヒンジ(例えば、上部、中央および/または下部ヒンジ領域)ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメインまたはそのバリエーション、部分もしくはフラグメントの少なくとも1個を含む。特定の実施態様において、Fcドメインは、完全なFcドメイン(すなわち、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメイン)を含む。特定の実施態様において、Fcドメインは、CH3ドメイン(またはその一部)に融合したヒンジドメイン(またはその一部)を含む。特定の実施態様において、Fcドメインは、CH3ドメイン(またはその一部)に融合したCH2ドメイン(またはその一部)を含む。特定の実施態様において、Fcドメインは、CH3ドメインまたはその一部からなる。特定の実施態様において、Fcドメインは、ヒンジドメイン(またはその一部)およびCH3ドメイン(またはその一部)からなる。特定の実施態様において、Fcドメインは、CH2ドメイン(またはその一部)およびCH3ドメインからなる。特定の実施態様において、Fcドメインは、ヒンジドメイン(またはその一部)およびCH2ドメイン(またはその一部)からなる。特定の実施態様において、Fcドメインは、少なくともCH2ドメインの一部(例えば、CH2ドメインの全てまたは一部)を欠く。ここでのFcドメインは、一般に免疫グロブリン重鎖のFcドメインの全てまたは一部を含むポリペプチドを指す。これは、CH1、ヒンジ、CH2および/またはCH3ドメイン全体を含むポリペプチドならびに、例えば、ヒンジ、CH2およびCH

10

20

30

40

50

3ドメインのみを含むそのようなペプチドのフラグメントを含むが、これらに限定されない。Fcドメインは、どんな種の免疫グロブリンおよび／または、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgEまたはIgM抗体を含むが、これらに限定されないどんなサブタイプに由来してもよい。Fcドメインは天然FcおよびFcバリエーション分子を含む。本明細書に示すとおり、あらゆるFcドメインを、天然に存在する免疫グロブリン分子の天然Fcドメインとアミノ酸配列が変わるように修飾し得ることは当業者により認識される。特定の実施態様において、Fcドメインのエフェクター機能(例えば、FcγR結合)は低減している。

【0620】

本明細書に記載のポリペプチドのFcドメインは、異なる免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、ポリペプチドのFcドメインは、IgG1分子由来のCH2および／またはCH3ドメインおよびIgG3分子由来のヒンジ領域を含み得る。他の例で、Fcドメインは、一部IgG1分子および一部IgG3分子由来のキメラヒンジ領域を含み得る。他の例で、Fcドメインは一部IgG1分子および一部IgG4分子由来のキメラヒンジ領域を含み得る。

【0621】

特定の実施態様において、拡張PK基は、FcドメインまたはそのフラグメントまたはFcドメインもしくはそのフラグメントのバリエーション(その全て、本開示の目的で用語「Fcドメイン」に含まれる)を含む。Fcドメインは抗原に結合する可変領域を含まない。本開示での使用に適するFcドメインは、いくつかの異なる源から得ることができる。特定の実施態様において、Fcドメインはヒト免疫グロブリン由来である。特定の実施態様において、FcドメインはヒトIgG1定常領域由来である。しかしながら、Fcドメインは、例えば、齧歯類(例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット)または非ヒト霊長類(例えばチンパンジー、マカク)種を含む他の哺乳動物種の免疫グロブリンに由来し得ることは理解される。

【0622】

さらに、Fcドメイン(またはそのフラグメントもしくはバリエーション)は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含むあらゆる免疫グロブリンクラスならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含むあらゆる免疫グロブリンアイソタイプに由来し得る。

【0623】

多様なFcドメイン遺伝子配列(例えば、マウスおよびヒト定常領域遺伝子配列)は、公的にアクセス可能なデポジットの形で利用可能である。特定のエフェクター機能を欠くおよび／または免疫原性を低減するために特定の修飾をされた、Fcドメイン配列を含む定常領域ドメインを選択できる。抗体および抗体コード化遺伝子の多くの配列は公開されており、適当なFcドメイン配列(例えばヒンジ、CH2および／またはCH3配列またはそのフラグメントもしくはバリエーション)を、当分野で認識される技術を使用して、これら配列から導き得る。

【0624】

特定の実施態様において、拡張PK基は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるUS2005/0287153、US2007/0003549、US2007/0178082、US2007/0269422、US2010/0113339、WO2009/083804およびWO2009/133208に記載されるものなどの、血清アルブミン結合タンパク質である。ある実施態様において、拡張PK基は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるUS7,176,278およびUS8,158,579に開示のトランスフェリンである。特定の実施態様において、拡張PK基は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるUS2007/0178082、US2014/0220017およびUS2017/0145062のものなどの、血清免疫グロブリン結合タンパク質である。特定の実施態様において、拡張PK基は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるUS2012/0094909に開示のものなどの、血清アルブミンに結合

10

20

30

40

50

するフィブロネクチン(Fn)ベースの足場ドメインタンパク質である。フィブロネクチンベースの足場ドメインタンパク質を製造する方法も、US 2012/0094909に開示される。Fn3ベースの拡張PK基の非限定的例はFn3(HSA)、すなわち、ヒト血清アルブミンに結合するFn3タンパク質である。

【0625】

特定の実施態様において、本開示での使用に適する拡張PK免疫刺激剤は、1つ以上のペプチドリンカーを用い得る。本明細書で使用する用語「ペプチドリンカー」は、ポリペプチド鎖の線形アミノ酸配列において2つ以上のドメイン(例えば、拡張PK部分および免疫刺激剤部分)を結合するペプチドまたはポリペプチド配列を指す。例えば、ペプチドリンカーを使用して、免疫刺激剤部分をHSAドメインに結合し得る。

10

【0626】

拡張PK基を、例えば、免疫刺激剤に融合するのに適するリンカーは当分野で周知である。リンカーの例は、グリシン-セリン-ポリペプチドリンカー、グリシン-プロリン-ポリペプチドリンカーおよびプロリン-アラニン-ポリペプチドリンカーを含む。特定の実施態様において、リンカーはグリシン-セリン-ポリペプチドリンカー、すなわち、グリシンおよびセリン残基からなるペプチドである。

【0627】

ある実施態様において、薬学的活性ペプチドまたはタンパク質は代替タンパク質を含む。これらの実施態様において、本開示は、対象に代替タンパク質をコードする本明細書に記載のRNAを投与することを含む、タンパク質補充を必要とする障害(例えば、タンパク質欠損障害)を有する対象を処置する方法を提供する。用語「タンパク質補充」は、タンパク質(その機能的バリエーションを含む)の、そのようなタンパク質が欠損している対象への導入を指す。本用語はまた他の点でタンパク質の提供が必要なまたは利益がある、例えば、タンパク質不足を患う対象へのタンパク質の導入を指す。用語「タンパク質欠乏により特徴づけられる障害」は、タンパク質がないかまたはタンパク質の量が不十分であることにより引き起こされる病理を呈する、あらゆる障害を指す。この用語は、生物学的に不活性なタンパク質生成物をもたらすタンパク質折り畳み障害、すなわち、立体配座障害を含む。タンパク質不足は感染症、免疫抑制、臓器不全、腺問題、放射線障害、栄養欠乏、中毒または他の環境的または外的損傷に関与し得る。

20

【0628】

用語「ホルモン」は、腺により産生されるシグナル伝達分子のクラスに関し、ここで、シグナル伝達は、通常次の工程を含む：(i)特定の組織におけるホルモンの合成；(ii)保存および分泌；(iii)標的へのホルモンの輸送；(iv)受容体によるホルモンの結合；(v)シグナルの中継および増幅；および(vi)ホルモンの分解。ホルモンは、サイトカインと、(1)ホルモンは通常活性濃度の変動が少ない、および(2)一般に特定の種の細胞により産生される点で異なる。ある実施態様において、「ホルモン」は、インスリン、バソプレッシン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、甲状腺ホルモン、成長ホルモン(例えばヒト成長ホルモンまたはウシソマトトロピン)、オキシトシン、心房ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、グルカゴン、ソマトスタチン、コレシストキニン、ガストリンおよびレプチンなどのペプチドまたはタンパク質ホルモンである。

30

40

【0629】

用語「接着分子」は、細胞の表面に位置し、該細胞と他の細胞または細胞外マトリクス(ECM)の結合に関与するタンパク質に関する。接着分子は典型的に膜貫通受容体であり、カルシウム非依存性(例えば、インテグリン、免疫グロブリンスーパーファミリー、リンパ球ホーミング受容体)およびカルシウム依存性(カドヘリンおよびセ렉チン)に分類できる。接着分子の具体例は、インテグリン、リンパ球ホーミング受容体、セ렉チン(例えば、P-セ렉チン)およびアドレシンである。

【0630】

インテグリンはまたシグナル伝達に関与する。特に、リガンド結合により、インテグリンは細胞シグナル伝達経路、例えば、受容体チロシンキナーゼ(RTK)などの膜貫通タン

50

パク質キナーゼの経路を調節する。このような制御は細胞増殖、分裂、生存もしくは分化またはアポトーシスに至る。インテグリンの具体例は、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_V\beta_1$ 、 $\alpha_V\beta_3$ 、 $\alpha_V\beta_5$ 、 $\alpha_V\beta_6$ 、 $\alpha_V\beta_8$ および $\alpha_6\beta_4$ を含む。

【0631】

用語「免疫グロブリン」または「免疫グロブリンスーパーファミリー」は、細胞の認識、結合および／または接着過程に関与する分子を指す。このスーパーファミリーに属する分子は、免疫グロブリンドメインまたはフォールドとして知られる領域を含むという特性を共有する。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、抗体(例えば、IgG)、T細胞受容体(TCR)、主要組織適合性複合体(MHC)分子、共受容体(例えば、CD4、CD8、CD19)、抗原受容体アクセサリー分子(例えば、CD-3 γ 、CD3- δ 、CD-3 ϵ 、CD79a、CD79b)、共刺激または阻害性分子(例えば、CD28、CD80、CD86)およびその他を含む。

【0632】

用語「免疫学活性化合物」は、好ましくは免疫細胞の成熟誘導および／または抑制、サイトカイン生合成誘導および／または抑制により免疫応答を変える、ならびに／またはB細胞による抗体産生刺激により液性免疫を改変する、あらゆる化合物に関する。免疫学活性化合物は、抗ウイルスおよび抗腫瘍活性を含むが、これらに限定されない強力な免疫刺激活性を有し、また免疫応答の他の態様を下方制御でき、例えば免疫応答をTH2免疫応答からシフトさせることができ、広範なTH2介在疾患の処置に有用である。免疫学活性化合物はワクチンアジュバントとして有用であり得る。免疫学活性化合物の具体例は、インターロイキン、コロニー刺激因子(CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロポエチン、腫瘍壊死因子(TNF)、インターフェロン、インテグリン、アドレシン、セレクトリン、ホーミング受容体および抗原、特に腫瘍関連抗原、病原体関連抗原(例えば細菌、寄生虫またはウイルス抗原)、アレルゲンおよび自己抗原を含む。好ましい免疫学活性化合物はワクチン抗原、すなわち、対象への接種が免疫応答を誘導する抗原である。

【0633】

ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(特に、mRNA)は、対象における抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列を含む。「対象における抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド」はまた、本明細書では「ワクチン抗原」、「ペプチドおよびタンパク質抗原」または単に「抗原」とも称される。

【0634】

ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNA(特に、mRNA)は、RNAを投与された対象の細胞、例えば、抗原提示細胞(APC)への侵入により、各タンパク質に翻訳される一本鎖、5'キャップ化mRNAである。好ましくは、RNAは、(i)安定性および翻訳効率に関してRNAの最大有効性のために最適化された構造要素を含む(5'キャップ、5' UTR、3' UTR、ポリ(A)配列)；(ii)RNAの有効性の最適化のために修飾されている(例えば、翻訳有効性増加、免疫原性減少および／または細胞毒性減少)(例えば、天然に存在するヌクレオシド(特にシチジン)を、合成ヌクレオシド(例えば、シュードウリジン(ψ)、N1-メチル-シュードウリジン(m1 ψ)および5-メチル-ウリジンからなる群から選択される修飾ヌクレオシド)で(部分的にまたは完全に、好ましくは完全に)置き換えることにより；および／またはコドンの最適化により)または(iii)(i)および(ii)の両方である。

【0635】

ある実施態様において、ベーターS-ARCA(D1)は、RNAの5'末端の特異的キャッピング構造として利用される。ある実施態様において、5'-UTRは配列番号1のヌクレオチド配列または配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%の同一性を有するヌクレオチ

ド配列を含む。ある実施態様において、3'-UTRは、配列番号2のヌクレオチド配列、または配列番号2のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。ある実施態様において、ポリ(A)配列は110ヌクレオチド長であり、30アデノシン残基のストレッチ、続いて10ヌクレオチドリンカー配列および他の70アデノシン残基からなる。このポリ(A)配列は、樹状細胞におけるRNA安定性および翻訳効率の増強のために設計された。ある実施態様において、ポリ(A)配列は、配列番号3のヌクレオチド配列、または配列番号3のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。ある実施態様において、RNAは、ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。ある実施態様において、ウリジンを(部分的にまたは完全に、好ましくは完全に)置き換える修飾ヌクレオシドは、シュードウリジン(ψ)、N1-メチルシュードウリジン(m1 ψ)および5-メチルウリジンからなる群から選択される。ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAは、(a)コドン最適化されている、(b)野生型コード配列と比較してG/C含量が増加しているまたは(c)(a)および(b)の両方である、コード配列を有する。

10

【0636】

ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAは、ワクチン抗原を提供するために対象の細胞で発現される。ある実施態様において、ワクチン抗原の発現は細胞表面である。ある実施態様において、ワクチン抗原は、MHCにより提示される。ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAは、対象の細胞で一過性に発現される。ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAは全身投与される。ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAの全身投与後、脾臓でワクチン抗原をコードするRNAが発現される。ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAの全身投与後、抗原提示細胞、好ましくはプロフェッショナル抗原提示細胞でワクチン抗原をコードするRNAが発現される。ある実施態様において、抗原提示細胞は、樹状細胞、マクロファージおよびB細胞からなる群から選択される。ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAの全身投与後、肺および/または肝臓でワクチン抗原をコードするRNAの発現はされないかまたは本質的にされない。ある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAの全身投与後、脾臓におけるワクチン抗原をコードするRNAの発現は、肺における発現量の少なくとも5倍である。

20

30

【0637】

ワクチン抗原は、対象における抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含む。したがって、ワクチン抗原は、対象における抗原に対する免疫応答を誘導するための抗原性配列を含む。このような抗原性配列は、標的抗原または疾患関連抗原、例えば、感染因子のタンパク質(例えば、ウイルスまたは細菌抗原)または腫瘍抗原に対応し得るかまたはその免疫原性バリエーションまたは標的抗原または疾患関連抗原またはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに対応し得る。故に、抗原性配列は、標的抗原または疾患関連抗原またはその免疫原性バリエーションの少なくとも1エピトープを含み得る。

【0638】

本開示での使用に適する抗原性配列、例えば、エピトープは、典型的に標的抗原、すなわち免疫応答の誘発対象となる抗原に由来し得る。例えば、ワクチン抗原内に含まれる抗原性配列は、標的抗原または標的抗原のフラグメントもしくはバリエーションであり得る。

40

【0639】

抗原性配列またはその処理産物、例えば、そのフラグメントは、免疫エフェクター細胞により担持されるTCRまたはCARなどの抗原受容体に結合し得る。ある実施態様において、抗原性配列は、免疫エフェクター細胞が向かう標的細胞により発現される抗原またはそのフラグメントまたは抗原性配列もしくはフラグメントのバリエーションからなる群から選択される。

【0640】

50

ワクチン抗原をコードするRNAの投与により、本開示により対象に提供され得るワクチン抗原は、ワクチン抗原は提供される対象において、好ましくは免疫応答の誘導、例えば、免疫エフェクター細胞の刺激、プライミングおよび／または拡大をもたらす。該免疫応答、例えば、刺激された、プライミングされたおよび／または拡大された免疫エフェクター細胞は、好ましくは標的抗原、特に罹患細胞、組織および／または臓器により発現される標的抗原、すなわち、疾患関連抗原に向かう。故に、ワクチン抗原は、疾患関連抗原またはそのフラグメントもしくはバリエーションを含み得る。ある実施態様において、そのようなフラグメントまたはバリエーションは、疾患関連抗原と免疫学的に等価である。

【0641】

本開示の状況において、用語「抗原のフラグメント」または「抗原のバリエーション」は、免疫応答の誘導、例えば、免疫エフェクター細胞の刺激、プライミングおよび／または拡大をもたらす、その免疫応答、例えば、刺激された、プライミングされたおよび／または拡大された免疫エフェクター細胞は、特に、罹患細胞、組織および／または臓器により提示されたとき、抗原、すなわち疾患関連抗原を標的とする、薬剤を意味する。故に、ワクチン抗原は疾患関連抗原に対応し得るまたは含み得るか、疾患関連抗原のフラグメントに対応し得るまたは含み得るか、または疾患関連抗原またはそのフラグメントと相同である抗原に対応し得るまたは含み得る。ワクチン抗原が疾患関連抗原のフラグメントと相同である疾患関連抗原のフラグメントまたはアミノ酸配列を含むならば、該フラグメントまたはアミノ酸配列は、免疫エフェクター細胞の抗原受容体が標的とする疾患関連抗原のエピトープまたは疾患関連抗原のエピトープと相同である配列を含み得る。故に、本開示によると、ワクチン抗原は、疾患関連抗原の免疫原性フラグメントまたは疾患関連抗原の免疫原性フラグメントと相同であるアミノ酸配列を含み得る。「免疫原性抗原のフラグメント」は、本開示によると、好ましくは、抗原または抗原を発現する細胞に対する免疫応答の誘導、例えば、それに結合する抗原受容体を担持する免疫エフェクター細胞の、刺激、プライミングおよび／または拡大ができる抗原のフラグメントに関する。ワクチン抗原(疾患関連抗原に類似)は、免疫エフェクター細胞に提示される抗原受容体により結合される関連するエピトープを提供するのが好ましい。ある実施態様において、ワクチン抗原またはそのフラグメント(疾患関連抗原に類似)は、免疫エフェクター細胞が結合するために関連エピトープを提供するために、抗原提示細胞などの細胞の表面に発現される(任意選択的にMHCにより)。ワクチン抗原は組換え抗原であり得る。

【0642】

本発明の全態様のある実施態様において、ワクチン抗原をコードするRNAは対象の細胞で発現され、免疫エフェクター細胞により発現される抗原受容体が結合するための抗原またはその処理産物を提供し、該結合は免疫エフェクター細胞の刺激、プライミングおよび／または拡大をもたらす。本開示による「抗原」は、免疫応答を誘導するあらゆる物質および／または細胞応答および／または液性応答などの免疫応答または免疫機構は向かうあらゆる物質を含む。これはまた、抗原が抗原ペプチドにプロセッシングされ、特にMHC分子により提示されるならば、免疫応答または免疫機構が1つ以上の抗原ペプチドに向かう状況も含む。特に、「抗原」は、抗体またはTリンパ球(T細胞)と特異的に反応するペプチドまたはポリペプチドなどのあらゆる物質に関する。用語「抗原」は、T細胞エピトープなどの少なくとも1個のエピトープを含む分子を含み得る。ある実施態様において、抗原は、任意選択的にプロセッシング後、抗原(抗原を発現する細胞を含む)に対して特異的であり得る免疫反応を誘導する分子である。ある実施態様において、抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原または細菌抗原などの疾患関連抗原、またはそのような抗原由来のエピトープである。

【0643】

ある実施態様において、抗原は、樹状細胞またはマクロファージなどの抗原提示細胞などの免疫系の細胞の表面に提示されるかまたは存在する。抗原またはT細胞エピトープなどのその処理産物は、ある実施態様において、抗原受容体により結合される。したがって、抗原またはその処理産物は、Tリンパ球(T細胞)などの免疫エフェクター細胞と特異的

に反応し得る。

【0644】

用語「オート抗原」または「自己抗原」は、対象体内に端を発し(すなわち、自己抗原は「自己由来抗原」とも称され得る)、この正常な体の一部に対し異常に活発な免疫応答を生ずる抗原を指す。自己抗原に対するこのような活発な免疫反応は「自己免疫性疾患」の原因であり得る。

【0645】

ある実施態様において、抗原は罹患細胞(例えば腫瘍細胞または感染細胞)表面に発現される。ある実施態様において、抗原受容体は、抗原の細胞外ドメインまたは細胞外ドメインのエピトープに結合するCARである。ある実施態様において、CARは、生存細胞表面に提示される抗原の天然エピトープに結合する。ある実施態様において、抗原提示細胞などの細胞に存在する抗原に対してT細胞により発現されたときおよび／またはT細胞に存在するとき、CARの結合は、該T細胞の刺激、プライミングおよび／または拡大をもたらす。ある実施態様において、罹患細胞に存在する抗原に対してT細胞により発現されたときおよび／またはT細胞に存在するとき、CARの結合は、罹患細胞の細胞溶解および／またはアポトーシスをもたらす、ここで、該T細胞は、好ましくは細胞毒性因子、例えば、パーフォリンおよびグランザイムを放出する。

【0646】

ある実施態様によると、抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、抗原性ペプチドまたはポリペプチド(抗原性配列)に直接またはリンカーを介して融合される。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載のRNAは、抗原性ペプチドまたはポリペプチドおよび抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列をコードする少なくとも1個のコード領域を含む。

【0647】

ある実施態様において、抗原をそれをコードするRNAの形態で投与し得るワクチン接種のための抗原は、天然に存在する抗原またはそのエピトープなどのフラグメントを含む。

【0648】

そのような抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、好ましくは抗原性ペプチドまたはポリペプチドのC末端(および所望により免疫寛容を解除するアミノ酸配列のC末端)に位置するが、これに限定されない。本明細書に定義する抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、好ましくは抗原プロセッシングおよび／または提示を改善する。ある実施態様において、本明細書に定義する抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、ヒトMHCクラスI複合体(HLA-B*51、ハプロタイプA2、B*27/B*51、Cw2/Cw3)由来の配列、特に配列番号5のアミノ酸配列を含む配列またはその機能的バリエーションを含むが、これらに限定されない。

【0649】

ある実施態様において、分泌配列、例えば、配列番号4のアミノ酸配列を含む配列は、抗原性ペプチドまたはポリペプチドのN末端に融合し得る。

【0650】

ある実施態様において、抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、配列番号5のアミノ酸配列、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一性を有するアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列もしくは配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一性を有するアミノ酸配列の機能的フラグメントを含む。ある実施態様において、抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【0651】

したがって、ある実施態様において、本明細書に記載のRNAは抗原性ペプチドまたはポリペプチドおよび抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列をコー

10

20

30

40

50

ドする少なくとも1個のコード領域を含み、本明細書に記載するとおり該抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、好ましくは抗原性ペプチドまたはポリペプチドに、より好ましくは抗原性ペプチドまたはポリペプチドのC末端に融合されている。

【0652】

さらに、分泌配列、例えば、配列番号4のアミノ酸配列を含む配列は、抗原性ペプチドまたはポリペプチドのN末端に融合し得る。

【0653】

クロストリジウム・テタニの破傷風トキソイド由来のアミノ酸配列を、プライミング中、T細胞の助けにより、自己抗原に対する免疫応答を効率的に搭載するために、自己寛容機構に打ち勝つために用い得る。

【0654】

破傷風トキソイド重鎖は、破傷風ワクチン接種個体ほぼ全てで乱雑にMHCクラスIIアレルに結合し、CD4⁺記憶T細胞を誘導できるエピトープを含むことが知られている。さらに、破傷風トキソイド(TT)ヘルパーエピトープと腫瘍関連抗原の組み合わせは、プライミング中のCD4⁺介在T細胞の助けにより、腫瘍関連抗原単独の適用と比較して免疫刺激を改善することが知られている。意図する腫瘍抗原特異的T細胞応答を打ち負かし得る破傷風配列でのCD8⁺T細胞刺激のリスクを低減するために、CD8⁺T細胞エピトープを含むことが知られている破傷風トキソイドのフラグメントC全体を使用しない。あるいはできるだけ多くのMHCクラスIIアレルとの結合を確実にするために、乱雑に結合するヘルパーエピトープを含む2個のペプチド配列を選択する。エクスピボ試験のデータに基づき、周知エピトープp2(QYIKANSKFIGITEL; TT₈₃₀₋₈₄₄; 配列番号9)およびp16(MTNSVDDALINSTKIYSYFSPVISKVNQGAQG; TT₅₇₈₋₆₀₉; 配列番号10)を選択した。p2エピトープは、抗黒色腫活性をブーストするために臨床治験におけるペプチドワクチン接種で既に使用された。

【0655】

非臨床データは、腫瘍抗原+乱雑に結合破傷風トキソイド配列の両方をコードするRNAワクチンが、腫瘍抗原に対するCD8⁺T細胞応答の増強および寛容の解除の改善をもたらすことを示した。腫瘍抗原特異的配列と共にインフレイムで融合したこれら配列を含むワクチンをワクチン接種した患者からの免疫モニタリングデータは、選択した破傷風配列はほぼ全患者で破傷風特異的T細胞応答を誘導できることを確認した。

【0656】

ある実施態様によると、免疫寛容を解除するアミノ酸配列は、抗原性ペプチドまたはポリペプチドに、直接またはリンカー、例えば、配列番号7のアミノ酸配列を有するリンカーを介して融合する。

【0657】

このような免疫寛容を解除するアミノ酸配列は、好ましくは抗原性ペプチドまたはポリペプチドのC末端(および所望により抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列のN末端、ここで、免疫寛容を解除するアミノ酸配列および抗原プロセッシングおよび／または提示を増強するアミノ酸配列は、直接またはリンカー、例えば、配列番号8のアミノ酸配列を有するリンカーを介して結合し得る)に位置するが、これに限定されない。本明細書で定義する免疫寛容を解除するアミノ酸配列は、好ましくはT細胞応答を改善する。ある実施態様において、本明細書で定義する免疫寛容を解除するアミノ酸配列は、破傷風トキソイド由来ヘルパー配列p2およびp16(P2P16)由来配列、特に配列番号6のアミノ酸配列を含む配列またはその機能的バリエーションを含むが、これらに限定されない。

【0658】

ある実施態様において、免疫寛容を解除するアミノ酸配列は、配列番号6のアミノ酸配列、配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一性を有するアミノ酸配列または配列番号6のアミノ酸配

列または配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一性を有するアミノ酸配列の機能的フラグメントを含む。ある実施態様において、免疫寛容を解除するアミノ酸配列は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。

【0659】

次に、ワクチンRNAの実施態様を記載し、ここで、その要素を記載するときに使用する特定の用語は、次の意味を有する：

キャップ： $m^{7,2'}$ G(5') p p S p(5') G (特にその D1 ジアステレオマー)、 $m^{7,3'}$ G(5') p p p(5') G および $m^{7,3'}$ - G p p p ($m^{1,2'}$ - 9 A p G からなる群から選択される 5' キャップ構造。

10

【0660】

h A g - コザック：翻訳効率を上げるための最適化「コザック配列」を伴うヒトアルファヘンウイルス mRNA の 5' - UTR 配列。

【0661】

s e c / M I T D：抗原プロセッシングおよび提示を改善することが示されている、ヒト MHC クラス I 複合体 (H L A - B 5 1、ハプロタイプ A 2、B 2 7 / B 5 1、C w 2 / C w 3) をコードする配列由来の融合タンパク質タグ。S e c は、発生期ポリペプチド鎖の小胞体への移行をガイドする、分泌シグナルペプチドをコードする 78 bp フラグメントに対応する。M I T D は MHC クラス I 分子の膜貫通および細胞質ドメインに対応し、MHC クラス I 輸送ドメインとも称される。

20

【0662】

抗原：各ワクチン抗原／エピトープをコードする配列。

【0663】

グリシン-セリンリンカー (G S)：融合タンパク質で一般に使用されている、主にアミノ酸グリシン (G) およびセリン (S) からなる短ペプチドリンカーをコードする配列。

【0664】

P 2 P 1 6：免疫寛容を解除するための破傷風トキソイド由来ヘルパーエピトープをコードする配列。

【0665】

F I 要素：3' - UTR は、「スプリットのアミノ末端エンハンサー」(A E S) mRNA (F と称される) およびミトコンドリアにコードされた 12 S リボソーム RNA (I と称される) 由来の 2 個の配列要素の組み合わせである。これらは、RNA 安定性に寄与し、総タンパク質発現を増強する配列のエクスピボ選択過程により同定された。

30

【0666】

A 3 0 L 7 0：樹状細胞における RNA 安定性および翻訳効率の増強のために設計された、30 アデノシン残基、続いて 10 ヌクレオチドリンカー配列および他の 70 アデノシン残基のストレッチからなる 110 ヌクレオチド長のポリ (A) テール。

【0667】

ある実施態様において、本明細書に記載のワクチン RNA は、次の構造の 1 つを有する：

40

キャップ - h A g - コザック - s e c - G S (1) - 抗原 - G S (2) - P 2 P 1 6 - G S (3) - M I T D - F I - A 3 0 L 7 0

ベータ - S - A R C A (D 1) - h A g - コザック - s e c - G S (1) - 抗原 - G S (2) - P 2 P 1 6 - G S (3) - M I T D - F I - A 3 0 L 7 0。

【0668】

ある実施態様において、ワクチン抗原は、構造：

s e c - G S (1) - 抗原 - G S (2) - P 2 P 1 6 - G S (3) - M I T D

を有する。

【0669】

ある実施態様において、h A g - コザックは、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む。

50

ある実施態様において、secは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、P2P16は、配列番号6のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、MITDは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、GS(1)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、GS(2)は、配列番号8のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、GS(3)は、配列番号8のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、FIは、配列番号2のヌクレオチド配列を含む。ある実施態様において、A30L70は、配列番号3のヌクレオチド配列を含む。

【0670】

ある実施態様において、ワクチン抗原／エピトープをコードする配列はウリジンを(部分的にまたは完全に、好ましくは完全に)置き換える修飾ヌクレオシドを含み、ここで、修飾ヌクレオシドはシュードウリジン(ψ)、N1-メチル-シュードウリジン(m1 ψ)および5-メチル-ウリジンからなる群から選択される。

10

【0671】

ある実施態様において、ワクチン抗原／エピトープをコードする配列はコドン最適化されている。

【0672】

ある実施態様において、ワクチン抗原／エピトープをコードする配列のG／C含量は、野生型コード配列と比較して増加している。

【0673】

用語「プロフェッショナル抗原提示細胞」は、ナイーブT細胞との相互作用に必要な主要組織適合性複合体クラスII(MHCクラスII)分子を構成的に発現する抗原提示細胞に関する。T細胞が抗原提示細胞の膜上のMHCクラスII分子複合体と相互作用するならば、抗原提示細胞は、T細胞の活性化を誘導する共刺激分子を産生する。プロフェッショナル抗原提示細胞は樹状細胞およびマクロファージを含む。

20

【0674】

用語「非プロフェッショナル抗原提示細胞」は、MHCクラスII分子を構成的にはないが、インターフェロナーガンマなどの特定のサイトカインによる刺激により発現する、抗原提示細胞に関する。例として、非プロフェッショナル抗原提示細胞は、線維芽細胞、胸腺上皮性細胞、甲状腺上皮性細胞、グリア細胞、脾臓ベータ細胞または血管内皮細胞を含む。

30

【0675】

用語「樹状細胞」(DC)は、抗原提示細胞のクラスに属する食細胞のサブタイプを指す。ある実施態様において、樹状細胞は造血骨髓前駆細胞由来である。これらの前駆細胞は、最初に未成熟樹状細胞に形質転換する。これらの未成熟細胞は、高食作用活性および低T細胞活性化能により特徴づけられる。未成熟樹状細胞は、常にウイルスおよび細菌などの病原体について周辺環境をサンプリングする。提示可能抗原と接触したら、成熟樹状細胞へと活性化され、脾臓またはリンパ節に遊走する。未成熟樹状細胞は、病原体を貪食し、タンパク質を小片に分解し、成熟によりMHC分子を使用してこれらフラグメントを細胞表面に提示する。同時に、T細胞を活性化する能力を大きく増強するCD80、CD86およびCD40などのT細胞活性化における共受容体として作用する細胞表面受容体を上方制御する。また、樹状細胞の血流を通して脾臓までまたはリンパ系を通してリンパ節までの移動を誘導する走化性受容体であるCCR7も上方制御する。ここで、それらは抗原提示細胞として働き、非抗原特異的共刺激シグナルと並行して、抗原を提示することにより、ヘルパーT細胞およびキラーT細胞ならびにB細胞を活性化する。故に、樹状細胞はT細胞またはB細胞関連免疫応答を能動的に誘導できる。ある実施態様において、樹状細胞は脾臓樹状細胞である。

40

【0676】

用語「マクロファージ」は、単球の分化により産生される食細胞のサブグループを指す。炎症、免疫サイトカインまたは微生物生成物により活性化されるマクロファージは、病原体の分解をもたらす加水分解的および酸化的攻撃によりマクロファージ内の外来病原体

50

を非特異的に貪食し、殺す。分解タンパク質からのペプチドはマクロファージ細胞表面に提示され、そこで、T細胞により認識され得て、B細胞表面の抗体と直接相互作用でき、TおよびB細胞活性化および免疫応答のさらなる刺激をもたらす。マクロファージは、抗原提示細胞のクラスに属する。ある実施態様において、マクロファージは脾臓マクロファージである。

【0677】

用語「アレルゲン」は、対象の体外に端を発し(すなわち、アレルゲンは「異種抗原」とも称することはできる)、対象の免疫系は、そうしなければ対象に有害である認知された脅威と戦う異常に活発な免疫応答を生ずる一種の抗原を指す。「アレルギー」は、アレルゲンに対するそのような活発な免疫反応により引き起こされる疾患である。アレルゲンは、通常免疫グロブリンE(IgE)応答を介してアトピー個体のI型過敏症反応を刺激することはできる抗原である。アレルゲンの具体例は、ピーナツタンパク質(例えば、Ara h 2.02)、オブアルブミン、牧草花粉タンパク質(例えば、Phl p 5)およびイエダニタンパク質(例えば、Der p 2)由来のアレルゲンを含む。

【0678】

用語「増殖因子」は、細胞増殖、増殖、治癒および／または細胞分化を刺激できる分子を指す。典型的に、増殖因子は、細胞間のシグナル伝達分子として作用する。用語「増殖因子」は、標的細胞の表面の特異的受容体に結合する特定のサイトカインおよびホルモンを含む。増殖因子の例は、骨形成タンパク質(BMP)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、例えばVEGFA、上皮細胞増殖因子(EGF)、インシュリン様増殖因子、エフリン、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ニューレグリン、神経栄養因子(例えば、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経増殖因子(NGF))、胎盤増殖因子(PGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、レナラーゼ(RNLS)(抗アポトーシス生存因子)、T細胞増殖因子(TCGF)、トロンボポエチン(TPO)、トランスフォーミング増殖因子(トランスフォーミング増殖因子アルファ(TGF- α))、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- β))および腫瘍壊死因子-アルファ(TNF- α)を含む。ある実施態様において、「増殖因子」はペプチドまたはタンパク質増殖因子である。

【0679】

用語「プロテアーゼ阻害剤」は、プロテアーゼの機能を阻害する分子、特にペプチドまたはタンパク質を指す。プロテアーゼ阻害剤は、それが阻害するプロテアーゼにより(例えば、アスパラギンプロテアーゼ阻害剤)または作用機序により(例えば、セルピンなどの自殺阻害剤)分類され得る。プロテアーゼ阻害剤の具体例はセルピン、例えばアルファ1-アンチトリプシン、アプロチニンおよびベスタチンを含む。

【0680】

用語「酵素」は、化学反応を加速する巨大分子生物学的触媒を指す。あらゆる触媒と同様、酵素は、触媒する反応により消費されず、該反応の平衡を変えない。多くの他の触媒とは異なり、酵素ははるかに特異的である。ある実施態様において、酵素は、対象の恒常性に必須であり、例えば、酵素の何らかの機能不全(特に、変異、欠失または産生減少のいずれかにより引き起こされ得る活性減少)は、疾患をもたらす。酵素の例は、単純ヘルペスウイルスタイプ1チミジンキナーゼ(HSV1-TK)、ヘキソサミニダーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、シュードコリンエステラーゼおよびラクターゼを含む。

【0681】

用語「受容体」は、細胞の外からシグナル(特にリガンドと称される化学シグナル)を受信するタンパク質分子を指す。シグナル(例えば、リガンド)の受容体への結合は、細胞にある種の応答、例えば、キナーゼの細胞内活性化を引き起こす。受容体は、膜貫通受容体(例えばイオンチャネル結合(イオンチャネル型)受容体、Gタンパク質結合(代謝型)受容体および酵素結合受容体)および細胞内受容体(例えば細胞質受容体および核受容体)を含む。受容体の具体例はステロイドホルモン受容体、増殖因子受容体およびペプチド受容体(すなわち、リガンドはペプチドである受容体)、例えばP-セレクチン糖タンパク質リガ

10

20

30

40

50

ンドー 1 (P S G L - 1) を含む。用語「増殖因子受容体」は、増殖因子に結合する受容体を指す。

【 0 6 8 2 】

用語「アポトーシス制御因子」は、アポトーシスを調節する、すなわち、アポトーシスを活性化または阻害する分子、特にペプチドまたはタンパク質を指す。アポトーシス制御因子は、ミトコンドリア機能を制御するものとカスパーゼを制御するものという 2 つの広いクラスに分類され得る。第一クラスは、ミトコンドリア膜電位の喪失および／またはサイトゾルへのシトクロム C などのアポトーシス促進性タンパク質の放出の防止により、ミトコンドリア完全性を保持するよう作用するタンパク質(例えば、B C L - 2、B C L - x L)を含む。またこの第一クラスに属するのは、シトクロム C の放出を促進するアポト

10

【 0 6 8 3 】

用語「転写因子」は、特に、特定の D N A 配列への結合により、D N A からメッセンジャー R N A への遺伝情報の転写速度を制御するタンパク質に関する。転写因子は、一生を通じて細胞分裂、細胞増殖および細胞死；胚発生中の細胞遊走および組織化；および／またはホルモンなどの細胞外からのシグナルに対する応答を制御し得る。転写因子は、通常、該転写因子により制御される遺伝子に隣接して、特定の D N A 配列に結合する少なくとも 1 個の D N A 結合ドメインを含む。転写因子の具体例は M E C P 2、F O X P 2、F O X P 3、S T A T タンパク質ファミリーおよび H O X タンパク質ファミリーを含む。

20

【 0 6 8 4 】

用語「腫瘍サプレッサータンパク質」は、細胞をがん化する過程から保護する分子、特にペプチドまたはタンパク質に関する。腫瘍サプレッサータンパク質(通常対応する腫瘍サプレッサー遺伝子によりコードされる)は、細胞周期の制御に弱化または抑制効果を発揮するおよび／またはアポトーシスを促進する。それらの機能は、次の 1 つ以上であり得る：細胞周期の継続に必須の遺伝子の抑制；細胞周期と D N A 損傷のカップリング(細胞に損傷 D N A は存在する限り、細胞分裂は起こらないはずである)；損傷 D N A が修復され得ないならばアポトーシス開始；転移抑制(例えば、腫瘍細胞の分散阻止、接触阻害の喪失遮断および転移阻害)；および D N A 修復。腫瘍サプレッサータンパク質の具体例は p 5 3、ホスファターゼおよびテンシンホモログ(P T E N)、S W I / S N F (S W i t c h / スクロース非発酵性)、フォンヒッペルリンドウ腫瘍サプレッサー(p V H L)、大腸腺腫症(A P C)、C D 9 5、腫瘍形成能の抑制 5 (S T 5)、腫瘍形成能の抑制 5 (S T 5)、腫瘍形成能の抑制 1 4 (S T 1 4) および Y i p p e e 様 3 (Y P E L 3) を含む。

30

【 0 6 8 5 】

用語「構造タンパク質」は、そうでなければ流体である生物学的成分に堅さおよび硬性を与えるタンパク質を指す。構造タンパク質は、大部分線維性(例えばコラーゲンおよびエラスチン)であるが、球状(例えばアクチンおよびチューブリン)でもあり得る。通常、球状タンパク質は、モノマーとして可溶性であるが、重合して、長い繊維を形成し、例えば、細胞骨格を形成し得る。他の構造タンパク質は、機械力を産生できるモータータンパク質(例えばミオシン、キネシンおよびダイニン)およびサーファクタントプロテインである。構造タンパク質の具体例はコラーゲン、サーファクタントプロテイン A、サーファクタントプロテイン B、サーファクタントプロテイン C、サーファクタントプロテイン D、エラスチン、チューブリン、アクチンおよびミオシンを含む。

40

【 0 6 8 6 】

用語「再プログラム化因子」または「再プログラム化転写因子」は、体細胞に、所望により再プログラム化因子などのさらなる因子と共に発現されたとき、該体細胞の幹細胞特徴、特に多能性を有する細胞への再プログラム化または脱分化に至る分子、特にペプチドまたはタンパク質に関する。再プログラム化因子の具体例は O C T 4、S O X 2、c - M Y C、K L F 4、L I N 2 8 および N A N O G を含む。

50

【0687】

用語「ゲノム工学タンパク質」は、対象のゲノムにおけるDNAの挿入、欠失または置換が可能なタンパク質に関する。ゲノム工学タンパク質の具体例はメガヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)および規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列-CRISPR関連タンパク質9(CRISPR-Cas9)を含む。

【0688】

用語「血液タンパク質」は、対象の血漿、特に健常対象の血漿に存在するペプチドまたはタンパク質に関する。血液タンパク質は、輸送(例えば、アルブミン、トランスフェリン)、酵素活性(例えば、トロンビンまたはセルプラスミン)、凝血(例えば、フィブリノゲン)、病原体に対する防御(例えば、補体成分および免疫グロブリン)、プロテアーゼ阻害剤(例えば、アルファ1-アンチトリプシン)などの多様な機能を有する。血液タンパク質の具体例はトロンビン、血清アルブミン、第VII因子、第VIII因子、インスリン、第IX因子、第X因子、組織プラスミノゲン活性化因子、タンパク質C、フォン・ヴィレブランド因子、アンチトロンビンIII、グルコセレブロシダーゼ、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、修飾第VIII因子および抗凝血因子を含む。

【0689】

したがって、ある実施態様において、薬学的活性ペプチドまたはタンパク質は、(i)好ましくはエリスロポエチン(EPO)、インターロイキン4(IL-2)およびインターロイキン10(IL-11)からなる群から選択される、より好ましくはEPOであるサイトカイン；(ii)接着分子、特にインテグリン；(iii)免疫グロブリン、特に抗体；(iv)免疫学活性化合物、特に抗原、例えばウイルスまたは細菌抗原、例えば、SARS-CoV-2の抗原；(v)ホルモン、特にバソプレッシン、インスリンまたは成長ホルモン；(vi)増殖因子、特にVEGFA；(vii)プロテアーゼ阻害剤、特にアルファ1-アンチトリプシン；(viii)好ましくは単純ヘルペスウイルスタイプ1チミジンキナーゼ(HSV1-TK)、ヘキサミニダーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、シュードコリンエステラーゼ、膵臓酵素およびラクターゼからなる群から選択される酵素；(ix)受容体、特に増殖因子受容体；(x)アポトーシス制御因子、特にBAX；(xi)転写因子、特にFOX P3；(xii)腫瘍サプレッサータンパク質、特にp53；(xiii)構造タンパク質、特にサーファクタントプロテインB；(xiv)例えば、OCT4、SOX2、c-MYC、KLF4、LIN28およびNANOGからなる群から選択される再プログラム化因子；(xv)ゲノム工学タンパク質、特に規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列-CRISPR関連タンパク質9(CRISPR-Cas9)；および(xvi)血液タンパク質、特にフィブリノゲンである。

【0690】

ある実施態様において、薬学的活性ペプチドまたはタンパク質は1つ以上の抗原または1つ以上のエピトープを含み、すなわち、対象へのペプチドまたはタンパク質の投与は、対象における1つ以上の抗原または1つ以上のエピトープに対する免疫応答を誘導し、治療的または部分的もしくは完全に保護的であり得る。

【0691】

特定の実施態様において、RNA(好ましくはmRNA)は、少なくとも1個のエピトープ、例えば、少なくとも2個のエピトープ、少なくとも3個のエピトープ、少なくとも4個のエピトープ、少なくとも5個のエピトープ、少なくとも6個のエピトープ、少なくとも7個のエピトープ、少なくとも8個のエピトープ、少なくとも9個のエピトープまたは少なくとも10個のエピトープをコードする。

【0692】

特定の実施態様では、標的抗原は腫瘍抗原であり、抗原性配列(例えば、エピトープ)は腫瘍抗原由来である。腫瘍抗原は、種々のがんが発現されることが一般に知られる「標準」抗原である。腫瘍抗原はまた、個体の腫瘍に特異的であり、以前は免疫系により認識されていなかった「ネオ抗原」でもよい。ネオ抗原またはネオエピトープは、アミノ酸変化

10

20

30

40

50

をもたらすがん細胞のゲノムの1つ以上のがん特異的変異に起因し得る。腫瘍抗原がネオ抗原であるならば、ワクチン抗原は、好ましくは1つ以上のアミノ酸変化を含む該ネオ抗原のエピトープまたはフラグメントを含む。

【0693】

腫瘍抗原の例は、p53、ART-4、BAGE、ベターカテニン/m、Bcr-abl、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CDC27/m、CDK4/m、CEA、クローディンファミリーの細胞表面タンパク質、例えばクローディン-6、クローディン-18.2およびクローディン-12、c-MYC、CT、Cyp-B、DAM、ELF2M、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gap100、HAGE、HER-2/neu、HPV-E7、HPV-E6、HAST-2、hTERT(またはhTRT)、LAGE、LDLR/FUT、MAGE-A、好ましくはMAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11またはMAGE-A12、MAGE-B、MAGE-C、MART-1/Melan-A、MC1R、ミオシン/m、MUC1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NF1、NY-ESO-1、NY-BR-1、p190マイナーBCR-abl、Pml/RARa、PRAME、プロテイナーゼ3、PSA、PSM、RAGE、RU1またはRU2、SAGE、SART-1またはSART-3、SCGB3A2、SCP1、SCP2、SCP3、SSX、サバイビン、TEL/AML1、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TPTE、WTおよびWT-1を含むが、これらに限定されない。

【0694】

がん変異は各個体で異なる。故に、新規エピトープ(ネオエピトープ)をコードするがん変異は、ワクチン組成物および免疫療法の開発における魅力的標的を代表する。腫瘍免疫療法の有効性は、宿主内で強力な免疫応答を誘導できる、がん特異的抗原およびエピトープの選択に依存する。RNAを、患者への患者特異的腫瘍エピトープの送達に使用できる。脾臓に常在する樹状細胞(DC)は、腫瘍エピトープなどの免疫原性エピトープまたは抗原のRNA発現のために特に興味深い抗原提示細胞を代表する。複数エピトープの使用は、腫瘍ワクチン組成物の治療有効性を促進することが示されている。腫瘍ミュータノームの迅速なシーケンシングは、例えば、エピトープは任意選択的にリンカーにより離されている、単一ポリペプチドとして、本明細書に記載のRNA(特にmRNA)によりコードされ得る個別化ワクチンのための複数エピトープを提供し得る。本開示の特定の実施態様において、RNA(特にmRNA)は、少なくとも1個のエピトープ、少なくとも2個のエピトープ、少なくとも3個のエピトープ、少なくとも4個のエピトープ、少なくとも5個のエピトープ、少なくとも6個のエピトープ、少なくとも7個のエピトープ、少なくとも8個のエピトープ、少なくとも9個のエピトープまたは少なくとも10個のエピトープをコードする。例示的实施態様は、少なくとも5個のエピトープ(「ペントープ」と称する)をコードするRNA(特に、mRNA)および少なくとも10個のエピトープ(「デカトープ」と称する)をコードするRNA(特に、mRNA)を含む。

【0695】

特定の実施態様において、エピトープは病原体関連抗原に由来する。ある実施態様において、薬学的活性ポリペプチドおよび/または抗原またはエピトープは病原体のタンパク質、タンパク質の免疫原性バリエーションまたはタンパク質の免疫原性フラグメントもしくはその免疫原性バリエーションに由来するかまたはそれである。

【0696】

ある実施態様において、病原体はウイルス、細菌、真菌、寄生虫および他の微生物から選択される。

【0697】

ウイルスの例は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)、例えばSARS-CoV2、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、エプスタイン・バールウイルス(E

BV)、サイトメガロウイルス(CMV)(例えば、CMV5)、ヒトヘルペスウイルス(HHV)(例えば、HHV6、7または8)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、ウシヘルペスウイルス(BHV)(例えば、BHV4)、ウマヘルペスウイルス(EHV)(例えば、EHV2)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)5、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、麻疹ウイルス、パポウイルス(JCおよびBK)、肝炎ウイルス(例えば、HBVまたはHCV)、粘液腫ウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、エンテロウイルス、パルボウイルス、ポリオマウイルス、インフルエンザウイルス、パピローマウイルス(例えばヒトパピローマウイルス(HPV))、ポックスウイルス、例えばワクシニアウイルスおよび伝染性軟属腫ウイルス(MCV)、リッサウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、風疹ウイルスおよびムンプスウイルスを含むが、これらに限定されない。ウイルス感染が原因の疾患の例は、SARS、後天性免疫不全症候群(AIDS)、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス感染、性器ヘルペス、肝炎(例えばB型またはC型肝炎)、インフルエンザ(インフル、例えばヒトインフルエンザ、ブタインフルエンザ、イヌインフルエンザ、ウマインフルエンザおよびトリインフルエンザ)、HPV感染、帯状疱疹、狂犬病、一般的な風邪、胃腸炎、風疹およびムンプスを含むが、これらに限定されない。

10

【0698】

細菌の例は、カンピロバクター(例えばカンピロバクター・ジェジュニ)、エンテロバクター種、エンテロコッカス・フェシウム、エンテロコッカス・ファエカリス、大腸菌(例えば、E. coli O157:H7)、A群レンサ球菌、ヘモフィルス・インフルエンザエ、ヘリコバクター・ピロリ、リステリア、マイコバクテリウム・ツベルクロシス、シュドモナス・エルギノーザ、肺炎球菌、サルモネラ、シゲラ、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミデス、ボレリアおよびリケッチア、クラミジア科、Nマイセリア・ゴノレー、ボルデテラ・パータシス、クロストリジウム・テタニ、ナイセリア・メニンギティディス、ストレプトコッカス(例えばストレプトコッカス・ニューモニエまたはストレプトコッカス・ピオゲネス)および梅毒トレポネーマを含むが、これらに限定されない。細菌感染が原因の疾患の例は、炭疽、コレラ、ジフテリア、食中毒、ハンセン病、髄膜炎、消化性潰瘍疾患、肺炎、敗血症、敗血症性ショック、破傷風、結核、腸チフス、尿路感染、ライム病、ロッキーマウンテン熱、クラミジア、淋菌、百日咳、破傷風、髄膜炎、猩紅熱および梅毒を含むが、これらに限定されない。

20

【0699】

寄生虫の例は、プラスモジウム、トリパノソーマ、リーシュマニア、トリコモナス、ディエンタメーバ、ジアルジア、赤痢アメーバ、ネグレリア、イソスポラ、トキソプラズマ、サルコシスティス、リノスポリジウム・セーベリおよびバランチジウムを含むが、これらに限定されない。寄生虫感染が原因の疾患の例は、マラリア、トリパノソーマ症、シャーガス病、リーシュマニア症、トリコモナス症、二核アメーバ症、ジアルジア症、アメーバ赤痢、コクシジウム症、トキソプラズマ症、肉胞子虫症、リノスポリジウム症およびバランチジウム症を含むが、これらに限定されない。

30

【0700】

ある実施態様において、病原体は、感染性病原体、特にウイルス疾患、細菌疾患または寄生虫疾患などの感染性疾患を引き起こす病原体である。ある実施態様において、病原体は、ウイルス、細菌または寄生虫である。したがって、これらの実施態様において、本明細書に記載のRNA(特にmRNA)および／または組成物を該病原体により引き起こされる感染性疾患の予防および／または処置に使用できる。

40

【0701】

特定の実施態様では、エピトープはウイルス抗原に由来する。

【0702】

ある実施態様において、抗原またはエピトープは、コロナウイルスタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはコロナウイルスタンパク質またはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来する。したがって、ある実施態様において、本開示で使用するmRNAは、コロナウイルスタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはコロナウイルスタ

50

ンパク質またはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列をコードする。

【0703】

ある実施態様において、抗原またはエピトープは、コロナウイルスSタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはコロナウイルスSタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来する。したがって、ある実施態様において、本開示に記載するRNA(特に、mRNA)は、コロナウイルスSタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはコロナウイルスSタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列をコードする。ある実施態様において、コロナウイルスはMERS-CoVである。ある実施態様において、コロナウイルスはSARS-CoVである。ある実施態様において、コロナウイルスはSARS-CoV-2である。

10

【0704】

コロナウイルスは、エンベロープのある、陽方向鎖、一本鎖RNA((+)ssRNA)ウイルスである。既知RNAウイルスの中で最大のゲノム(26~32kb)を有し、系統的に4属(α、β、γおよびδ)に分けられ、ベータコロナウイルスはさらに4分化系列(A、B、CおよびD)に細分される。コロナウイルスは、広範なトリおよびヒトを含む哺乳動物種に感染する。一部ヒトコロナウイルスは、一般に軽度呼吸器疾患を引き起こすが、幼児、高齢者および免疫不全者では重症度は大きくなり得る。それぞれベータコロナウイルス分化系列CおよびBに属する中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)および重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)は高度に病原性である。両ウイルスとも、最近15年以内に動物リザーバーからヒト集団に発生し、大流行を引き起こし、高致死率であった。非定型肺炎(コロナウイルス感染症2019; COVID-19)を引き起こす重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2(SARS-CoV-2)の大流行は、2019年12月半ばから中国で猛威を振るい、国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態にまで進展している。SARS-CoV-2(MN908947.3)は、ベータコロナウイルス系統Bに属する。それはSARS-CoVと少なくとも70%の配列類似性を有する。

20

【0705】

一般に、コロナウイルスは4個の構造タンパク質、すなわち、エンベロープ(E)、膜(M)、ヌクレオカプシド(N)およびスパイク(S)を有する。EおよびMタンパク質はウイルス集合に重要な機能を有し、Nタンパク質はウイルスRNA合成に必要である。重大な糖タンパク質はウイルス結合および標的細胞への侵入を担う。Sタンパク質は、一本鎖不活性前駆体として合成され、産生細胞でフーリン様宿主プロテアーゼにより2個の非共有結合で結合したサブユニット、S1およびS2に開裂される。S1サブユニットは、宿主細胞受容体を認識する受容体結合ドメイン(RBD)を含む。S2サブユニットは、融合ペプチド、2個の7反復および膜貫通ドメインを含み、その全てが、大立体配座再配列に付されることによるウイルスと宿主細胞膜の融合の介在に必要である。S1およびS2サブユニットは三量体形成して、大きな融合前スパイクを形成する。

30

【0706】

SARS-CoV-2のS前駆体タンパク質はタンパク質分解によりS1(685aa)およびS2(588aa)サブユニットに開裂される。S1サブユニットは、ウイルスの宿主アンジオテンシン-変換酵素2(ACE2)受容体を介する感受性細胞の侵入を介する受容体結合ドメイン(RBD)を含む。

40

【0707】

ある実施態様において、抗原またはエピトープは、SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントに由来する。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載のRNA(好ましくはmRNA)は、SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列をコードする。したがっ

50

て、ある実施態様において、コード化アミノ酸配列は、対象におけるコロナウイルス S タンパク質、特に S A R S - C o V - 2 S タンパク質に対する免疫応答の誘導のための S A R S - C o V - 2 S タンパク質またはその免疫原性バリエーションのエピトープを含む。

【0708】

ある実施態様において、RNA (特に、mRNA) を投与して、(適切な標的細胞による発現後) 標的抗原 (コロナウイルス S タンパク質、特に S A R S - C o V - 2 S タンパク質) またはその処理産物に向けた、免疫応答、例えば、抗体および／または免疫エフェクター細胞の誘導のための抗原を提供する。ある実施態様において、本開示により誘導される免疫応答は B 細胞介在免疫応答、すなわち、抗体介在免疫応答である。これに加えてまたはこれとは別に、ある実施態様において、本開示により誘導される免疫応答は T 細胞介在免疫応答である。ある実施態様において、免疫応答は抗コロナウイルス、特に抗 S A R S - C o V - 2 免疫応答である。

10

【0709】

ある実施態様において、S A R S - C o V - 2 S タンパク質の免疫原性フラグメントは、S A R S - C o V - 2 S タンパク質の S 1 サブユニットまたは S A R S - C o V - 2 S タンパク質の S 1 サブユニットの受容体結合ドメイン (RBD) を含む。ある実施態様において、本明細書に記載の RNA (例えば、mRNA) は、RNA はポリペプチドの細胞内発現に適する S A R S - C o V - 2 S タンパク質の受容体結合部分を含む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を含む。ある実施態様において、このようなコード化ポリペプチドは完全な S タンパク質を含まない。ある実施態様において、コード化ポリペプチドは、受容体結合ドメイン (RBD) を含む。

20

【0710】

当業者は、種々のスパイクバリエーションおよび／またはそれを記載するリソースを知っている。

【0711】

ある実施態様において、本明細書に記載の (例えば、本開示の組成物に含まれるおよび／または本開示の方法で使用される) RNA (特に、mRNA) は、S A R S - C o V - 2 のスパイク (S) タンパク質、そのバリエーションまたはそのフラグメントを含む、本質的にそれからなるまたはそれからなるアミノ酸配列をコードする。

【0712】

ある実施態様において、S A R S - C o V - 2 S タンパク質、その免疫原性バリエーションまたは S A R S - C o V - 2 S タンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列は、多量体複合体、特に三量体複合体を形成できる。この目的で、S A R S - C o V - 2 S タンパク質、その免疫原性バリエーションまたは S A R S - C o V - 2 S タンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列は、S A R S - C o V - 2 S タンパク質、その免疫原性バリエーションまたは S A R S - C o V - 2 S タンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列の多量体複合体、特に三量体複合体形成を可能とするドメインを含み得る。ある実施態様において、多量体複合体の形成を可能とするドメインは、三量体化ドメイン、例えば、本明細書に記載の三量体化ドメインを含む。

30

40

【0713】

ある実施態様において、三量体化ドメインは、S A R S - C o V - 2 S タンパク質、そのバリエーションまたはそのフラグメント、すなわち、抗原性ペプチドまたはタンパク質に、直接またはリンカー、例えば、グリシン／セリンリンカーを介して融合する。したがって、ある実施態様において、三量体化ドメインは、上記コード化アミノ酸配列 (これは所望により上記シグナルペプチドに融合してよい) に含まれる S A R S - C o V - 2 S タンパク質または免疫原性そのフラグメント (抗原性ペプチドまたはタンパク質) 由来の上記アミノ酸配列に融合する。

【0714】

このような三量体化ドメインは好ましくは抗原性ペプチドまたはタンパク質の C 末端に

50

位置するが、これに限定されない。本明細書に定義する三量体化ドメインは、好ましくはRNAによりコードされる抗原性ペプチドまたはタンパク質の三量体化を可能とする。本明細書に定義する三量体化ドメインの例は、T4フィブリチンの天然三量体化ドメインであるフォルドンを含むが、これに限定されない。T4フィブリチン(フォルドン)のC末端ドメインはフィブリチン三量体構造の形成に必須であり、人工三量体化ドメインとして使用できる。

【0715】

ある実施態様において、SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメント(例えば、本明細書に記載されるとおり)をコードするRNAにより発現されるRBD抗原は、例えば、免疫原性を増加するために、T4-フィブリチン由来「フォルドン」三量体化ドメインの付加により修飾され得る。

10

【0716】

ある実施態様において、SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントを含むアミノ酸配列は、コドン最適化されたおよび／または野生型コード配列と比較してG/C含量が増加したコード配列によりコードされ、ここで、コドン最適化および／またはG/C含量増加は、好ましくはコードするアミノ酸配列の配列を変化させない。

【0717】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該RNAは、上記RNA修飾の1つ以上、すなわち、5'キャップ構造の組み込み、ポリA配列の組み込み、ポリA配列のアンマスキング、5'-および／または3'-UTRの改変(例えば1つ以上の3'-UTRの組み込み)、1つ以上の天然に存在するヌクレオチドの合成ヌクレオチドでの置き換え(例えば、シチジンについて5-メチルシチジンおよび／またはウリジンについてシュードウリジン(Ψ)またはN(1)-メチルシュードウリジン(m1Ψ)または5-メチルウリジン(m5U))およびコドン最適化を含む。ある実施態様において、該RNAは、上記修飾の組み合わせ、好ましくは上記修飾の少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個のまたは全5個の組み合わせ、すなわち、(i)5'キャップ構造の組み込み、(ii)ポリA配列の組み込み、ポリA配列のアンマスキング；(iii)5'-および／または3'-UTRの改変(例えば1つ以上の3'-UTRの組み込み)；(iv)1つ以上の天然に存在するヌクレオチドの合成ヌクレオチドでの置き換え(例えば、シチジンについて5-メチルシチジンおよび／またはウリジンについてシュードウリジン(Ψ)またはN(1)-メチルシュードウリジン(m1Ψ)または5-メチルウリジン(m5U))および(v)コドン最適化を含む。

20

30

【0718】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該RNAは、修飾RNA、特に安定化mRNAである。ある実施態様において、該RNAは、少なくとも1個のウリジンの代わりに修飾ヌクレオチドを含む。ある実施態様において、該RNAは、各ウリジンの代わりになど少なくとも1個のウリジンの代わりに修飾ヌクレオチドを含む。ある実施態様において、修飾ヌクレオチドは独立してシュードウリジン(Ψ)、N1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)および5-メチルウリジン(m5U)から選択される。ある実施態様において、該RNAは、5'キャップ、好ましくはキャップ1またはキャップ2構造、より好ましくはキャップ1構造を含む。ある実施態様において、該RNAは、配列番号1のヌクレオチド配列または配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一性を有するヌクレオチド配列を含む5'-UTRを含む。ある実施態様において、該RNAは、配列番号2のヌクレオチド配列または

40

50

配列番号2のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一性を有するヌクレオチド配列を含む3'-UTRを含む。ある実施態様において、該RNAはポリA配列を含む。ある実施態様において、ポリA配列は、少なくとも100ヌクレオチドを含む。ある実施態様において、ポリA配列は配列番号3のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる。

【0719】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該バリエーションは、RBDに変異を含むおよび／またはスパイクタンパク質に変異を含む。当業者は、種々のスパイクバリエーションおよび／またはそれを記載するリソースを知っており(例えば、COVID-19 Viral Genome Analysis Pipelineにより維持され、https://cov.lanl.gov/components/sequence/COV/int_sites_tbls.comp(最終アクセス2020年8月24日)に見られるスパイク変異部位の表)、本明細書を読むことにより、本明細書に記載のRNA組成物および／または方法が、このようなバリエーションのいずれかまたは全ておよび／またはそれらの組み合わせに対して中和活性を示す、ワクチン接種対象に血清を誘導する能力により特徴づけられることを知る。

【0720】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該バリエーションは、「懸念される変異株202012/01」(VOC-202012/01; 系統B.1.1.7としても知られる)を含む。バリエーションは、以前は英国公衆衛生庁により2020年12月に調査中の第一変異株(VUI-202012/01)と名付けられたが、懸念される変異株(VOC-202012/01)に再分類された。VOC-202012/01は、英国でCOVID-19パンデミック中の2020年10月に、前の月に採取したサンプルから初めて検出され、12月半ばまでに急速に拡散し始めたSARS-CoV-2のバリエーションである。英国でのCOVID-19感染率の顕著な増加と相関する; この増加は、少なくとも一部、ヒト細胞におけるACE2への結合に必要なスパイク糖タンパク質受容体結合ドメイン内の変化N501Yによる。VOC-202012/01バリエーションは13非同義変異、4欠失および6同義変異(すなわち、タンパク質を変換させる17変異および変化させない6変異)の23変異により定義される。VOC-202012/01におけるスパイクタンパク質変化は、欠失69~70、欠失144、N501Y、A570D、D614G、P681H、T716I、S982AおよびD1118Hを含む。VOC-202012/01における最も重要な変化の一つは、N501Y、アミノ酸501位のアスパラギン(N)からチロシン(Y)への変化と考えられる。この変異は単独でまたはN末端ドメイン(NTD)の69/70位の欠失と組み合わせて、ウイルスの伝達性を増強させ得る。

【0721】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該バリエーションは、バリエーション「501.V2」を含む。このバリエーションは、2020年10月のサンプルで最初に観察され、それ以来、南アフリカで全ゲノムシーケンシング(WGS)により501.V2バリエーションの300を超える症例が確認されており、2020年12月には、その地域ではウイルスの優勢形態となった。予備的結果は、このバリエーションの伝達性は増加している可能性が示されている。501.V2バリエーションは、D80A、D215G、E484K、N501YおよびA701Vを含む複数スパイクタンパク質変化により定義されており、さらに最近集められたウイルスは、さらなる変化: L18F、R246I、K417Nおよび欠失242~244を有する。

【0722】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該バリエーションは、デンマーク国立血清研究所(SSI)によりΔFVIESパイックとも称されるバリエーション「クラスター5」を含む。デンマークの北ユラン地域で発見され、ミンク農家を介してミンクからヒトに広がっていると考えられる。クラスター5において、ウイルスのスパイクタンパク質における数個の異なる変異は確認されている。特異的変異は、69～70デルタHV(タンパク質の69位および70位のヒスチジンおよびバリン残基の欠失)、Y453F(453位のチロシンからフェニルアラニンへの変化)、I692V(692位のイソロイシンからバリン)、M1229I(1229位のメチオニンからイソロイシン)および任意選択的にS1147L(1147位のセリンからロイシン)を含む。

10

【0723】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該バリエーションは、ブラジル変異株として知られるバリエーション系統B.1.1.248を含む。SARS-CoV-2のこのバリエーションは、P.1系統と名付けられ、17の特有のアミノ酸変化を有し、その10個は、N501YおよびE484Kを含むスパイクタンパク質である。B.1.1.248はB.1.1.28に始まる。E484KはB.1.1.28およびB.1.1.248の両方に存在する。B.1.1.248は、いくつかのSタンパク質多形性[L18F、T20N、P26S、D138Y、R190S、K417T、E484K、N501Y、H655Y、T1027I、V1176F]を有し、南アフリカからの記載したバリエーションと特定の重要なRBD位置(K417、E484、N501)が類似する。

20

【0724】

SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードするRNAのある実施態様において、該バリエーションは、オミクロン変異株として知られるバリエーション系統B.1.1.529を含む。このバリエーションは、A67V、Δ69～70、T95I、G142D、Δ143～145、Δ211、L212I、ins214EPE(アミノ酸214後のEPEの挿入)、G339D、S371L、S373P、S375F、K417N、N440K、G446S、S477N、T478K、E484A、Q493R、G496S、Q498R、N501Y、Y505H、T547K、D614G、H655Y、N679K、P681H、N764K、D796Y、N856K、Q954H、N969KおよびL981Fを含む多数の変異を含む。

30

【0725】

本開示のある実施態様において、抗原(例えば腫瘍抗原またはワクチン抗原)は、好ましくは、RNAを投与された対象の細胞に入ると各タンパク質に翻訳される、一本鎖、5'キャップ化RNA(好ましくはmRNA)として投与される。好ましくは、RNAは、安定性および翻訳効率に関してRNAの最大有効性のために最適化された構造要素(5'キャップ、5'UTR、3'UTR、ポリ(A)配列)を含む。

40

【0726】

ある実施態様において、ベーターS-ARCA(D1)は、RNAの5'末端の特異的キャッピング構造として利用される。ある実施態様において、 $m_2^{7,3'}-^{\text{OG}}ppp(m_1^{2'}-^{\text{9A}}pG$ は、RNAの5'末端の特異的キャッピング構造として利用される。ある実施態様において、5'-UTR配列はヒトアルファグロビンmRNA由来であり、任意選択的に翻訳効率を増加するための最適化「コザック配列」を有する。ある実施態様において、「スプリットのアミノ末端エンハンサー」(AES)mRNA(Fと称される)およびミトコンドリアにコードされた12SリボソームRNA(Iと称される)由来の2個の配列要素の組合せがコード配列とポリ(A)配列の間に配置され、高い最高タンパク質レベルおよびmRNA持続の延長を確実にする。ある実施態様において、ヒトベーターグロビンmR

50

NA由来の2個の反復3'-UTRがコード配列とポリ(A)配列の間に配置され、高い最高タンパク質レベルおよびmRNA持続の延長を確実にする。ある実施態様において、30アデノシン残基、続いて10ヌクレオチドリンカー配列および他の70アデノシン残基のストレッチからなる110ヌクレオチド長であるポリ(A)配列が使用される。このポリ(A)配列は、RNA安定性および翻訳効率の増強のために設計された。

【0727】

一般に、本明細書に記載のワクチンRNAは、5'→3'で、次の構造の1つを含み得る：

キャップ-5'-UTR-ワクチン抗原コード化配列-3'-UTR-ポリ(A)

または

ベータ-S-ARCA(D1)-hAg-コザック-ワクチン抗原コード化配列-FI-A30L70。

【0728】

上記RNAまたは上記ワクチン抗原をコードするRNAは、非修飾ウリジン含有mRNA(uRNA)、ヌクレオシド修飾mRNA(modRNA)または自己増幅RNA(saRNA)であり得る。ある実施態様において、上記RNAまたは上記ワクチン抗原をコードするRNAはヌクレオシド修飾mRNA(modRNA)である。

【0729】

非修飾ウリジンメッセンジャーRNA(uRNA)

非修飾メッセンジャーRNA(uRNA)の活性本体は、細胞に入ると翻訳される一本鎖mRNAである。ワクチン抗原をコードする配列に加えて、各uRNAは、好ましくは安定性および翻訳効率に関して最適化された共通構造要素(5'キャップ、5'-UTR、3'-UTR、ポリ(A)テール)を含む。好ましい5'キャップ構造はベータ-S-ARCA(D1)(m₂^{7,2}-GpppG)である。好ましい5'-UTRおよび3'-UTRは、それぞれ配列番号1のヌクレオチド配列および配列番号2のヌクレオチド配列を含む。好ましいポリ(A)テールは配列番号3の配列を含む。

【0730】

これに関して、「hAg-コザック」は、翻訳効率を上げるための最適化「コザック配列」を伴うヒトアルファグロビンmRNAの5'-UTR配列を意味する；「FI要素」は、3'-UTRは「スプリットのアミノ末端エンハンサー」(AES)mRNA(Fと称される)およびミトコンドリアにコードされた12SリボソームRNA(Iと称される)由来の2個の配列要素の組み合わせであることを意味する。これらは、RNA安定性に寄与し、総タンパク質発現を増強する配列のエクスピボ選択過程により同定された；「A30L70」は、樹状細胞におけるRNA安定性および翻訳効率を増強するため設計された、30アデノシン残基、続いて10ヌクレオチドリンカー配列および他の70アデノシン残基のストレッチからなる、110ヌクレオチド長あるポリ(A)テールを意味する；「GS」は、グリシン-セリンリンカー、すなわち、融合タンパク質で一般に使用されている、主にアミノ酸グリシン(G)およびセリン(S)からなる短リンカーペプチドをコードする配列を意味する。

【0731】

ヌクレオシド修飾メッセンジャーRNA(modRNA)

ヌクレオシド修飾メッセンジャーRNA(modRNA)薬物物質の活性本体は、同様に細胞に入ると翻訳される一本鎖mRNAである。ワクチン抗原をコードする配列(すなわち、オープンリーディングフレーム)に加えて、各modRNAは、uRNAと同様RNAの最大有効性について最適化された共通構造要素(5'キャップ、5'-UTR、3'-UTR、ポリ(A)テール)を含む。uRNAと比較して、modRNAは、ウリジンの代わりに1-メチル-シュードウリジンを含む。好ましい5'キャップ構造はm₂^{7,3}-Gppp(m₁²-GApG)である。好ましい5'-UTRおよび3'-UTRは、それぞれ配列番号1のヌクレオチド配列および配列番号2のヌクレオチド配列を含む。好ましいポリ(A)テールは配列番号3の配列を含む。さらなる精製工程は、インビトロ転写反応中に

10

20

30

40

50

産生される dsRNA 汚染物を減らすために、modRNA に適用される。

【0732】

自己増幅 RNA (saRNA)

自己増幅 mRNA (saRNA) 薬物物質の活性本体は、細胞に入ると自己増幅し、その後ワクチン抗原が翻訳される、一本鎖 RNA である。好ましくは単一タンパク質をコードする uRNA および modRNA とは対照的に、saRNA のコード領域は 2 個のオープンリーディングフレーム (ORF) を含む。5' - ORF は、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (レプリカーゼ) などの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコードする。レプリカーゼ ORF の後ろに、3' にサブゲノムプロモーターおよび抗原をコードする第二 ORF は続く。さらに、saRNA UTR は、自己増幅に必要な 5' および 3' 保存配列要素 (CSE) を含む。saRNA は、uRNA と同様 RNA の最大有効性について最適化された共通構造要素 (5' キャップ、5' - UTR、3' - UTR、ポリ (A) テール) を含む。saRNA は、好ましくはウリジンを含む。好ましい 5' キャップ構造はベーター S - ARCA (D1) ($m_2^{7,2}$ - GpppSpG) である。

10

【0733】

saRNA の細胞質送達は、アルファウイルス様生活環を開始させる。しかしながら、saRNA はゲノムパッケージングまたは細胞侵入に必要なアルファウイルス構造タンパク質をコードせず、それ故複製コンピテントウイルス粒子の産生は極めて可能性が低い乃至は不可能である。複製は、DNA を産生する中間工程を何ら含まない。よって、saRNA の使用／取り込みは、標的細胞内のゲノム組込みまたは他の永久遺伝子修飾のリスクがない。さらに、saRNA 自体、dsRNA 中間体の認識を介して自然免疫応答を効率的に活性化することにより、永続性複製を防止する。

20

【0734】

さらに、分泌シグナルペプチド (sec) は、好ましくは sec が N 末端タグとして翻訳されるような方法で、抗原コード化領域に融合し得る。ある実施態様において、sec は、S タンパク質の分泌シグナルペプチドに対応する。融合タンパク質で一般的に使用される主にアミノ酸グリシン (G) およびセリン (S) からなる短リンカーペプチドをコードする配列を GS / リンカーとして使用し得る。

【0735】

ある実施態様において、抗原 (例えば腫瘍抗原またはワクチン抗原) をコードする RNA (好ましくは mRNA) は、抗原を提供するよう処置された対象の細胞で発現される。ある実施態様において、RNA は、対象の細胞で一過性に発現される。ある実施態様において、RNA は、インビトロで転写される。ある実施態様において、抗原の発現は細胞表面である。ある実施態様において、抗原は発現され、MHC により提示される。ある実施態様において、抗原の発現は細胞外空間である、すなわち、抗原は分泌される。

30

【0736】

抗原分子またはその処理産物、例えば、そのフラグメントは、免疫エフェクター細胞により担持される BCR または TCR などの抗原受容体または抗体に結合し得る。

【0737】

ペプチドおよびタンパク質抗原をコードする RNA (例えば mRNA) の投与により本開示に従い対象に提供されるペプチドおよびタンパク質抗原 (ここで、抗原はワクチン抗原である) は、好ましくはペプチドまたはタンパク質抗原を提供した対象で免疫応答、例えば、液性および／または細胞免疫応答の誘導をもたらす。該免疫応答は、好ましくは標的抗原に対する。故に、ワクチン抗原は、標的抗原、そのバリエーションまたはそのフラグメントを含み得る。ある実施態様において、このようなフラグメントまたはバリエーションは、標的抗原と免疫学的に等価である。本開示の状況において、用語「抗原のフラグメント」または「抗原のバリエーション」は、免疫応答の誘導をもたらす薬剤を意味し、その免疫応答は抗原、すなわち標的抗原を標的とする。故に、ワクチン抗原は標的抗原に対応し得るかまたは含み得る、標的抗原のフラグメントに対応し得るかまたは含み得る、または標的抗原またはそのフラグメントと相同である抗原に対応し得るかまたは含み得る。故に、本開示

40

50

によると、ワクチン抗原は、標的抗原の免疫原性フラグメントまたは標的抗原の免疫原性フラグメントと相同であるアミノ酸配列を含み得る。本開示による「免疫原性抗原のフラグメント」は、好ましくは標的抗原に対する免疫応答の誘導はできる抗原のフラグメントに関する。ワクチン抗原は組換え抗原であり得る。

【0738】

用語「免疫学的に等価」は、免疫学的に等価なアミノ酸配列などの免疫学的に等価な分子が、同じまたは本質的に同じ免疫学的性質を有するおよび／または、例えば免疫学的効果のタイプに関して、同じまたは本質的に同じ免疫学的効果を発揮することを意味する。本開示の状況において、用語「免疫学的に等価」は、好ましくは、免疫化に使用する抗原または抗原バリエーションの免疫学的効果または性質に関して使用する。例えば、アミノ酸配列は、該アミノ酸配列を、対象の免疫系に暴露したとき、参照アミノ酸配列と反応する特異性を有する免疫反応を誘導するならば、参照アミノ酸配列と免疫学的に等価である。故に、ある実施態様において、抗原と免疫学的に等価である分子は、同じまたは本質的に同じ性質を示すおよび／またはT細胞は標的とする抗原に関してT細胞の刺激、プライミングおよび／または拡大に関して同じまたは本質的に同じ効果を示す。

10

【0739】

ある実施態様において、本開示で使用するRNA(好ましくはmRNA)は非免疫原性である。免疫刺激剤をコードするRNAを、本開示に従い投与して、アジュバント効果を提供し得る。免疫刺激剤をコードするRNAは標準RNAまたは非免疫原性RNAであり得る。

20

【0740】

本明細書で使用する用語「非免疫原性RNA」(例えば「非免疫原性mRNA」)は、例えば哺乳動物に、投与時に免疫系による応答を誘導しないか、または非免疫原性RNAを非免疫原性にする修飾および処理に付されていない点でのみ異なる同じRNAにより誘導される応答、すなわち標準RNA(s t d RNA)により誘導される応答よりも弱い応答を誘導するRNAを指す。特定の実施態様において、本明細書では修飾RNA(mod RNA)とも称される非免疫原性RNAは、自然免疫受容体のRNA介在活性化を抑制する修飾ヌクレオシドのRNAへの組み込みおよび／または例えばインビトロ転写中の、例えば、二本鎖RNA(ds RNA)の形成の制限および／もしくは例えばインビトロ転写後の二本鎖RNA(ds RNA)の除去による二本鎖RNA(ds RNA)の量の制限により、非免疫原性とされる。特定の実施態様において、非免疫原性RNAは、自然免疫受容体のRNA介在活性化を抑制する修飾ヌクレオシドのRNAへの組み込みおよび／または例えばインビトロ転写後の二本鎖RNA(ds RNA)の除去により、非免疫原性とされる。

30

【0741】

非免疫原性RNA(特にmRNA)を、修飾ヌクレオシドの組み込みにより非免疫原性とするために、RNAの免疫原性を低減または抑制する限り、あらゆる修飾ヌクレオシドが使用され得る。特に好ましいのは、自然免疫受容体のRNA介在活性化を抑制する修飾ヌクレオシドである。ある実施態様において、修飾ヌクレオシドは、1つ以上のウリジンの修飾核酸塩基を含むヌクレオシドでの置換を含む。ある実施態様において、修飾核酸塩基は修飾ウラシルである。ある実施態様において、修飾核酸塩基を含むヌクレオシドは3-メチル-ウリジン(m^3U)、5-メトキシ-ウリジン(m^5U)、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(s^2U)、4-チオ-ウリジン(s^4U)、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^5U)、5-アミノアリル-ウリジン、5-ハロー-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)、ウリジン5-オキシ酢酸(cm^5U)、ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル(mcm^5U)、5-カルボキシメチル-ウリジン(cm^5U)、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(chm^5U)、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($mchm^5U$)、5-メトキシカルボニルメチル-ウリジン(mcm^5U)、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオ-ウリジン(mcm^5s^2U)、5-

40

50

アミノメチル-2-チオ-ウリジン($\text{nm}^5 \text{s}^2 \text{U}$)、5-メチルアミノメチル-ウリジン($\text{mnm}^5 \text{U}$)、1-エチル-シュードウリジン、5-メチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン($\text{mnm}^5 \text{s}^2 \text{U}$)、5-メチルアミノメチル-2-セレノ-ウリジン($\text{mnm}^5 \text{se}^2 \text{U}$)、5-カルバモイルメチル-ウリジン($\text{ncm}^5 \text{U}$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウリジン($\text{cmnm}^5 \text{U}$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン($\text{cmnm}^5 \text{s}^2 \text{U}$)、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($\tau \text{m}^5 \text{U}$)、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($\tau \text{m}^5 \text{s}^2 \text{U}$)、1-タウリノメチル-4-チオ-シュードウリジン、5-メチル-2-チオ-ウリジン($\text{m}^5 \text{s}^2 \text{U}$)、1-メチル-4-チオ-シュードウリジン($\text{m}^1 \text{s}^4 \psi$)、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($\text{m}^3 \psi$)、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($\text{m}^5 \text{D}$)、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($\text{acp}^3 \text{U}$)、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($\text{acp}^3 \psi$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)ウリジン($\text{inm}^5 \text{U}$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオ-ウリジン($\text{inm}^5 \text{s}^2 \text{U}$)、 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(^5mUm)、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($\text{s}^2 \text{Um}$)、5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチル-ウリジン($\text{mcn}^5 \text{Um}$)、5-カルバモイルメチル-2'-O-メチル-ウリジン($\text{ncn}^5 \text{Um}$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチル-ウリジン($\text{cmn}^5 \text{Um}$)、3,2'-O-ジメチル-ウリジン($\text{m}^3 \text{Um}$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-O-メチル-ウリジン($\text{inm}^5 \text{Um}$)、1-チオ-ウリジン、デオキシチミジン、2'-F-a r a-ウリジン、2'-F-ウリジン、2'-OH-a r a-ウリジン、5-(2-カルボメトキシビニル)ウリジンおよび5-[3-(1-E-プロベニルアミノ)ウリジン]からなる群から選択される。ある特に好ましい実施態様において、修飾核酸塩基を含むヌクレオシドはシュードウリジン(ψ)、N1-メチル-シュードウリジン($\text{m}^1 \psi$)または5-メチル-ウリジン($\text{m}^5 \text{U}$)、特にN1-メチル-シュードウリジンである。

10

20

30

40

50

【0742】

ある実施態様において、修飾核酸塩基を含むヌクレオシドでの1つ以上のウリジンの置換は、ウリジンの少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の置換を含む。

【0743】

T7 RNAポリメラーゼを使用するインビトロ転写(IVT)によるRNA(好ましくはmRNA)の合成中、酵素の非定型的活性により、二本鎖RNA(dsRNA)を含む相当量の異常生成物が産生される。dsRNAは炎症性サイトカインを誘導し、エフェクター酵素を活性化し、タンパク質合成阻害に至る。dsRNAの形成は、例えば、合成中のウリジン三リン酸(UTP)の量を制限することにより、インビトロ転写(IVT)によるmRNAの合成中、制限され得る。任意選択的に、mRNAの合成中、UTPを1回または数回添加し得る。また、dsRNAは、例えば、非多孔性または多孔性C-18ポリスチレン-ジビニルベンゼン(PS-DVB)マトリクスを使用するイオン対逆相HPLCにより、IVT RNAなどのRNAから除去され得る。あるいは、dsRNAを特異的に加水分解するがssRNAは加水分解しない大腸菌RNase IIIを使用し、それによりIVT RNA調製物からdsRNA汚染物を除去する酵素ベースの方法を使用できる。さ

らに、dsRNAは、セルロース物質を使用してssRNAから分離できる。ある実施態様において、dsRNAがセルロース物質と結合しssRNAがセルロース物質に結合しない条件下で、RNA調製物をセルロース物質と接触させ、ssRNAをセルロース物質から分離する。ssRNAを提供するための適当な方法は、例えば、WO2017/182524に開示される。

【0744】

本明細書で使用する用語「除去する」または「除去」は、非免疫原性RNAなどの第一物質の集団がdsRNAなどの第二物質の集団の近位から分離されているという特徴を指し、ここで、第一物質の集団は必ずしも第二物質を含まないものではなく、第二物質の集団は必ずしも第一物質を含まないものではない。しかしながら、第二物質の集団の除去により特徴づけられる第一物質の集団は、第一および第二物質の分離されていない混合物と比較して、第二物質の含量が測定可能に低い。

【0745】

ある実施態様において、非免疫原性RNAからのdsRNA(特にds mRNA)の除去は、非免疫原性RNA組成物の10%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満、0.5%未満、0.3%未満または0.1%未満のRNAがdsRNAであるようなdsRNAの除去を含む。ある実施態様において、非免疫原性RNA(特にmRNA)はdsRNAを含まないかまたは本質的に含まない。ある実施態様において、非免疫原性RNA(特にmRNA)組成物は、一本鎖ヌクレオシド修飾RNAの精製調製物を含む。例えば、ある実施態様において、一本鎖ヌクレオシド修飾RNA(特にmRNA)の精製調製物は二本鎖RNA(dsRNA)を実質的に含まない。ある実施態様において、精製調製物は、全ての他の核酸分子(DNA、dsRNAなど)に対して、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%または少なくとも99.9%一本鎖ヌクレオシド修飾RNAである。

【0746】

種々の方法を使用して、dsRNAの量を決定できる。例えば、サンプルをdsRNA特異的抗体と接触させてよく、RNAに結合した抗体の量を、サンプル中のdsRNAの量の指標としてとり得る。既知量のdsRNAを含むサンプルを参照として使用し得る。

【0747】

例えば、RNAを膜、例えば、ナイロンブロッキング膜にスポットし得る。膜を、例えば、5%(w/v)脱脂粉乳含有TBS-T緩衝液(20mMトリスpH7.4、137mM NaCl、0.1%(v/v)TWEEN-20)でブロックし得る。dsRNA検出のために、膜を、sRNA特異的抗体、例えば、dsRNA特異的マウスmAb(English & Scientific Consulting, Szirak, Hungary)とインキュベートし得る。例えば、TBS-Tでの洗浄後、膜を二次抗体、例えば、HRP-コンジュゲートロバ抗マウスIgG(Jackson ImmunoResearch, Cat #715-035-150)とインキュベートしてよく、二次抗体により産生されるシグナルを検出し得る。

【0748】

ある実施態様において、非免疫原性RNA(特にmRNA)は、同じ配列の標準RNAより効率的に細胞で翻訳される。ある実施態様において、翻訳は、その非修飾カウンターパートと比較して、2倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、3倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、4倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、5倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、6倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、7倍増強される。ある実施態様において、翻訳は8倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、9倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、10倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、15倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、20倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、50倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、100倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、200倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、500倍増強される。ある実施態様において、翻訳

は、1000倍増強される。ある実施態様において、翻訳は、2000倍増強される。ある実施態様において、倍数は10～1000倍である。ある実施態様において、倍数は10～100倍である。ある実施態様において、倍数は10～200倍である。ある実施態様において、倍数は10～300倍である。ある実施態様において、倍数は10～500倍である。ある実施態様において、倍数は20～1000倍である。ある実施態様において、倍数は30～1000倍である。ある実施態様において、倍数は50～1000倍である。ある実施態様において、倍数は100～1000倍である。ある実施態様において、倍数は200～1000倍である。ある実施態様において、翻訳は、任意の他の相当量または量の範囲によって増強される。

【0749】

ある実施態様において、非免疫原性RNA(特にmRNA)は、同じ配列の標準RNAより顕著に低い自然免疫原性を示す。ある実施態様において、非免疫原性RNA(特にmRNA)は、その非修飾カウターパートより2倍低い自然免疫応答を示す。ある実施態様において、自然免疫原性は3倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は4倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は5倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は6倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は7倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は8倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は9倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は10倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は15倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は20倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は50倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は100倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は200倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は500倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は1000倍減少される。ある実施態様において、自然免疫原性は2000倍減少される。

【0750】

用語「顕著に低い自然免疫原性を示す」は、自然免疫原性の検出可能な減少を指す。ある実施態様において、本用語は、検出可能な自然免疫応答を引き起こすことなく、有効量の非免疫原性RNA(特にmRNA)を投与できるような減少を指す。ある実施態様において、本用語は、非免疫原性RNA(特にmRNA)が、非免疫原性RNAによりコードされたタンパク質の産生の検出可能な減少に十分な自然免疫応答を誘発することなく、繰り返し投与され得るような減少を指す。ある実施態様において、減少は、非免疫原性RNA(特にmRNA)が、非免疫原性RNAによりコードされたタンパク質の検出可能な産生の排除に十分な自然免疫応答を誘発することなく、繰り返し投与され得るようなものである。

【0751】

「免疫原性」は、ヒトまたは他の動物の体で免疫応答を誘発する、RNAなどの外来物質の能力である。自然免疫系は、比較的非特異的および即時である、免疫系の構成要素である。適応免疫系と共に、脊椎動物免疫系の2つの主要な構成要素の一つである。

【0752】

本明細書で使用する「内因性」は、生物、細胞、組織または系の内部由来のまたはその内部で産生されたあらゆる物質を指す。

【0753】

本明細書で使用する用語「外因性」は、生物、細胞、組織または系の外部由来のまたはその外部で産生されたあらゆる物質を指す。

【0754】

本明細書で使用する用語「発現」は、特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳として定義される。

【0755】

本明細書で使用する用語「結合」、「融合」または「融合体」は、相互交換可能に使用される。これらの用語は、2つ以上の要素または成分またはドメインを一体につなぎ合わ

10

20

30

40

50

せることを指す。

【0756】

粒子

本明細書に記載のRNA、特にmRNAなどの核酸は、(i)核酸、(ii)少なくとも1種のカチオン性またはカチオンのイオン化可能な化合物、および(v)無機ポリリン酸などの多価アニオンを含む粒子中に存在し得る。ある実施態様において、粒子は、(i)核酸(例えばRNA、特にmRNAである)；(ii)本明細書に開示される少なくとも1つのカチオン性またはカチオンのイオン化可能な化合物；(iii)本明細書に開示されるステロイド；(iv)本明細書に開示される中性脂質；および(v)本明細書に開示される多価アニオン(無機ポリリン酸など)を含む。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸およびそれらの混合物からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかにおいて、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸およびクエン酸からなる群から選択される。これらの実施態様のいくつかでは、多価アニオンは無機ポリリン酸である。

10

【0757】

種々のタイプのRNA含有粒子が、粒子形態のRNAの送達に適するとして以前に記載されている(例えば、Kaczmarek, J. C. et al., 2017, Genome Medicine 9, 60参照)。非ウイルスRNA送達媒体に関して、RNAのナノ粒子封入は、RNAを物理的に分解から保護し、特定の化学に依存して、細胞取り込みおよびエンドソーム脱出を助けることができる。

20

【0758】

ポリマーおよび脂質などの正荷電分子と負荷電核酸の間の静電的相互作用は、粒子形成に関与する。これにより、複合体化および核酸粒子の自発的形成がもたらされる。

【0759】

製造工程中、例えばpH5の、核酸(RNAなど)の水溶液を、カチオンのイオン化可能な脂質を含む脂質混合物を含む有機(例えばエタノール)溶液への導入により、負に帯電した核酸(薬物)と正に帯電したカチオンのイオン化可能な脂質との間に静電的相互作用がもたらされる。この静電相互作用により、核酸(薬物)の効率的な封入と同時に粒子形成がもたらされる。核酸封入後、得られた核酸粒子(RNA-LNPなど)を取り囲む媒体を例えばpH8に調整するか、または多価アニオン(無機ポリリン酸など)を添加すると、粒子の表面電荷の中和がもたらされ、あるいは一多価アニオン(無機ポリリン酸など)を添加する場合には一安定なアニオン性粒子の形成さえももたらされる。全ての他の変数を一定に維持したとき、電荷一中性粒子は、荷電粒子と比較して長いインビボ循環寿命および良好な肝細胞への送達を示し、細網内皮系により迅速に浄化される。エンドソーム取り込みにより、エンドソームの低pHは粒子(LNPなど)を融合性とし、標的細胞のサイトゾルへのRNAの放出を可能とする。

30

【0760】

本開示の状況において、用語「粒子」は、分子または分子複合体、特に粒子形成化合物により形成される、構造体に関する。ある実施態様において、粒子は、1タイプ以上の両親媒性物質(例えば、両親媒性脂質、両親媒性ポリマーおよび／または両親媒性タンパク質／ポリペプチド)から製造されるエンベロープ(例えば、1つ以上の層または薄膜)を含む。この状況で、表現「両親媒性物質」は、親水性および親油性の両方の性質を有する物質を意味する。エンベロープは、両親媒性である必要はない付加的物質(例えば、付加的脂質および／または付加的ポリマー)を含み得る。故に、粒子は、単層膜または多重膜構造であってよく、ここで、1つ以上の層または薄膜を構成する物質は、任意選択的に両親媒性である必要はない付加的物質(例えば、付加的脂質および／または付加的ポリマー)と組み合わせた1タイプ以上の両親媒性物質(特に両親媒性脂質、両親媒性ポリマーおよび／または両親媒性タンパク質／ポリペプチドからなる群から選択される)を含む。ある実施態様において、用語「粒子」は、マイクロまたはナノサイズ小型構造など、マイクロまたはナノサイズ構造に関する。これに関して、用語「マイクロサイズ」は、粒子の全3つ

40

50

の外部寸法はマイクロスケール、すなわち、 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ であることを意味する。本開示によると、用語「粒子」は、リポプレックス粒子(LPX)、脂質ナノ粒子(LNP)、ポリプレックス粒子、リボポリプレックス粒子、ウイルス様粒子(VLP)およびそれらの混合物(例えば、LPXとVLPの混合物またはLNPとVLPの混合物などの2タイプ以上の粒子の混合物)を含む。

【0761】

「核酸粒子」を使用して、核酸(例えばRNA、特にmRNA)を目的の標的部位(例えば、細胞、組織、臓器など)に送達できる。核酸粒子は、少なくとも1つのカチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質または脂質様物質、プロタミンなどの少なくとも1つのカチオン性ポリマーまたはそれらの混合物および核酸から形成され得る。核酸粒子は、脂質ナノ粒子(LNP)ベース、リポプレックス(LPX)ベースおよび／またはリボソームベースの製剤を含む。

【0762】

いかなる理論にも拘束されるつもりはないが、カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質または脂質様物質および／またはカチオン性ポリマーが核酸と一体に結合して凝集体を形成し、この凝集によってコロイド状に安定な粒子をもたらすと考えられる。ある実施態様において、粒子は、本明細書に記載の両親媒性脂質、特にカチオン性またはカチオン性イオン化可能両親媒性脂質、および核酸(RNA、特にmRNAなど)を含む。ある実施態様において、粒子は、カチオン性／カチオンのにイオン化可能な脂質(特に、本明細書中に開示される式(X)のカチオンのにイオン化可能な脂質；本明細書中に開示される構造A～Gのうちの1つを有するカチオンのにイオン化可能な脂質；または本明細書中に開示される式(XI)のカチオンのにイオン化可能な脂質)；中性脂質(リン脂質など)などのヘルパー脂質、およびステロイド(コレステロールなど)、およびそれらの組合せ；ならびに多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸、例えば三リン酸などの線形無機ポリリン酸である)。

【0763】

ある実施態様において、本明細書に開示される核酸(RNAなど)粒子は、(i)本明細書に記載の核酸(RNA、特にmRNAなど)；(ii)両親媒性脂質、特にカチオン性またはカチオンのにイオン化可能な両親媒性脂質(例えば、本明細書に開示される式(X)のカチオンのにイオン化可能な脂質；本明細書中に開示される構造A～Gの1つを有するカチオンのにイオン化可能な脂質；本明細書中に開示される式(XI)のカチオンのにイオン化可能な脂質；または本明細書中に開示されるカチオン性脂質)；(iii)ステロイド(コレステロールなど)、中性脂質(リン脂質など)；および(v)多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸、例えば、三リン酸などの線形無機ポリリン酸)を含む。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；そして中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択される。ある実施態様において、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。ある実施態様において、多価アニオンは、無機ポリリン酸、無機リン酸およびクエン酸からなる群から選択される。ある実施態様において、多価アニオンは無機ポリリン酸、特に線形無機ポリリン酸(線形無機三リン酸など)である。ある実施態様において、無機ポリリン酸は、式 $[P_x O_{(3x+1)}]^{y-}$ (式中、 x は整数であり、少なくとも3であり；そして y はアニオン電荷である。)を含む。ある実施態様において、無機ポリリン酸は、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。好ましくは、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸は三リン酸である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPE、およびDPPEからなる群から選択され；そして無機ポリリン酸は、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸お

よびそれらの混合物からなる群から選択され、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸およびそれらの混合物からなる群から選択され、好ましくは、無機ポリリン酸は三リン酸である。

【0764】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸粒子(RNA粒子など)中で、核酸(例えばRNA、特にmRNA)は、LNPの場合はLNPの中心コアを占める、カチオンのイオン化可能な脂質(特に、本明細書に開示される式(X)のカチオンのイオン化可能な脂質；本明細書に開示される構造A～Gの1つを有するカチオンのイオン化可能な脂質；または本明細書に開示される式(XI)のカチオンのイオン化可能な脂質)によって結合される。ある実施態様において、多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸、例えば、三リン酸などの線形無機ポリリン酸)は、リン脂質とともに粒子(LNPなど)の表面を形成する。ある実施態様において、粒子はPEG脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、粒子はPEG脂質を実質的に含まず、ポリサルコシンコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、粒子はポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、表面は二重層を含む。ある実施態様において、荷電形態および非荷電形態のコレステロールおよびカチオンのイオン化可能な脂質(特に、本明細書に開示される式(X)のカチオンのイオン化可能な脂質；本明細書に開示される構造A～Gのいずれかを有するカチオンのイオン化可能な脂質；または本明細書に開示される式(XI)のカチオンのイオン化可能な脂質)を、LNPなどの粒子全体に分布させることができる。

【0765】

一般に、リブレックス(LPX)は、2つの水相、すなわち核酸(特にRNA)を含む相と脂質の分散系を含む相を混合により得られる。ある実施態様において、脂質相はリポソームを含む。

【0766】

ある実施態様において、リポソームは、薄膜が脂質二重層を含み、封入された内腔は水相を含む、自己封鎖単層膜または多重膜小胞粒子である。ナノ粒子形成のためにリポソームを使用する必須要件は、必要である混合物中の脂質が適用された水性環境で薄膜(二層)相を形成できることである。

【0767】

ある実施態様において、リポソームは、水性コアを封入する単層膜または多重膜リン脂質二重層(本明細書では水性内腔とも称する)を含む。それらは、極性頭(親水性)基および非極性テール(疎水性)基を有する物質から製造され得る。ある実施態様において、核酸の送達のために設計されるリポソームの製剤に用いられるカチオン性脂質は、本来両親媒性であり、グリセロールを介して炭化水素鎖またはコレステロール誘導体に結合した正荷電(カチオン性)アミン頭基からなる。

【0768】

ある実施態様において、リブレックスは、カチオン性リポソームとRNAの静電的相互作用により形成される多重膜リポソームベースの製剤である。ある実施態様において、形成されたリブレックスは、リポソーム構造の小型RNA-リブレックスへの変換に起因する分子と異なる内部配置を有する。ある実施態様において、これらの製剤は、RNAの封入の悪さおよびRNAの不完全な捕捉により特徴づけられる。

【0769】

ある実施態様において、LPX粒子は、本明細書に記載の両親媒性脂質、特にカチオン性またはカチオンのイオン化可能な両親媒性脂質および核酸(RNA、特にmRNAなど)を含む。ある実施態様において、正荷電リポソーム(1つ以上の両親媒性脂質、特にカチオン性またはカチオンのイオン化可能な両親媒性脂質から製造される)と負荷電核酸(RNA、特にmRNAなど)との間の静電的相互作用は、複合体化およびRNAリブレックス粒子の自発的形成をもたらす。正荷電リポソームは、一般に、カチオン性またはカチオンのイオン化可能な両親媒性脂質、例えば式(I)のカチオンのイオン化可能な脂質

、DOTMAおよび／またはDODMA、ならびにDSPCなどの付加的脂質を用いて合成され得る。ある実施態様において、核酸(RNA、特にmRNAなど)リポプレックス粒子はナノ粒子である。

【0770】

一般に、脂質ナノ粒子(LNP)は、水相中の核酸(RNAなど)と、エタノールなどの有機溶媒を含む相中の脂質との直接混合により得られる。この場合、脂質または脂質混合物は、水で薄膜(二層)相を形成しない、粒子形成のために使用され得る。ある実施態様において、脂質は、カチオンのにイオン化可能な脂質(特に、本明細書に開示される式(X)のカチオンのにイオン化可能な脂質；本明細書に開示される構造A～Gの1つを有するカチオンのにイオン化可能な脂質；または本明細書に開示される式(XI)のカチオンのにイオン化可能な脂質)、本明細書に開示されるステロイド(コレステロールなど)、および本明細書に開示される中性脂質(リン脂質など)を含む。粒子の形成後、本明細書に開示される多価アニオン(無機ポリリン酸など)(例えば、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、およびそれらの混合物、特に線形無機ポリリン酸、例えば、三リン酸)が粒子に添加され、その結果、粒子の正に帯電した表面とアニオン性多価アニオン(アニオン性無機ポリリン酸など)との間の静電引力により、多価アニオン(無機ポリリン酸など)が粒子の表面に結合する。この結合(または装飾)は、粒子の表面電荷の中和、あるいは安定したアニオン性粒子の形成をもたらす。

10

【0771】

ある実施態様において、本明細書に記載の粒子は、本明細書に開示されるカチオンのにイオン化可能な脂質(特に、本明細書に開示される式(X)のカチオンのにイオン化可能な脂質；本明細書に開示される構造A～Gの1つを有するカチオンのにイオン化可能な脂質；または本明細書中に開示される式(XI)のカチオンのにイオン化可能な脂質)、本明細書中に開示されるステロイド(コレステロールなど)、本明細書中に開示される中性脂質(リン脂質など)および本明細書中に開示される多価アニオン(無機ポリリン酸など)(例えば、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸およびそれらの混合物、特に線形無機ポリリン酸、例えば、三リン酸)を含む。

20

【0772】

ある実施態様において、核酸粒子(特にRNA LNP(例えば、mRNA LNPなどのmRNA粒子)などのRNA粒子)は1を超えるタイプの核酸分子を含み、ここで、モル質量または基本的構造要素、例えば、分子構造、キャッピング、コード領域または他の特性に関するなど、核酸分子の分子パラメータは、互いに類似しても異なってもよい。

30

【0773】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(例えば、mRNAなどのRNA)は、本明細書に記載の粒子と非共有結合で結合し得る。ある実施態様において、核酸(RNA、特にmRNAなど)は、粒子の外表面に付着され得る(表面核酸(例えば表面RNA、特に表面mRNA))、および／または粒子に含まれ得る(封入核酸(封入RNA、特に封入mRNAなど))。

【0774】

本開示で使用する「ナノ粒子」は、本明細書に記載の核酸(特にmRNAなどのRNA)および少なくとも1個のカチオン性脂質を含む粒子を指し、ここで、粒子の全3つの外部寸法はナノスケールである、すなわち、少なくとも約1nmかつ約1000nm未満(好ましくは、10～990nm、例えば15～900nm、20～800nm、30～700nm、40～600nmまたは50～500nm)である。好ましくは、最長および最短軸の差は有意ではない。好ましくは、粒子のサイズはその直径である。

40

【0775】

本明細書に記載の核酸粒子(特にmRNA粒子などのRNA粒子)は、約0.5未満、約0.4未満、約0.3未満、約0.2未満、約0.1未満または約0.05未満の多分散性指数(PDI)を示し得る。例として、核酸粒子は、約0.01～約0.4または約0.1～約0.3の範囲の多分散性指数を示し得る。

50

【0776】

本開示の状況において、用語「リポプレックス粒子」は、両親媒性脂質、特にカチオン性両親媒性脂質および本明細書に記載の核酸(特にmRNAなどのRNA)を含む粒子に関する。正荷電リポソーム(1つ以上の両親媒性脂質、特にカチオン性両親媒性脂質から製造)と負荷電核酸(特にmRNAなどのRNA)の間の静電的相互作用は、複合体化および核酸リポプレックス粒子の自発的形成をもたらす。正荷電リポソームは、一般にDOTMAなどのカチオン性両親媒性脂質およびDSPCなどの付加的脂質を使用して合成され得る。ある実施態様において、核酸(特にmRNAなどのRNA)リポプレックス粒子はナノ粒子である。

【0777】

用語「脂質ナノ粒子」は、ナノサイズ脂質含有粒子に関する。

【0778】

本開示の状況において、用語「ポリプレックス粒子」は、両親媒性ポリマー、特にカチオン性両親媒性ポリマーおよび本明細書に記載の核酸(特にmRNAなどのRNA)を含む粒子に関する。正荷電カチオン性両親媒性ポリマーと負荷電核酸(特にmRNAなどのRNA)の間の静電的相互作用は、複合体化および核酸ポリプレックス粒子の自発的形成をもたらす。ポリプレックス粒子の製造に適する正荷電両親媒性ポリマーは、プロタミン、ポリエチレンジアミン、ポリレーリシン、ポリレーアルギニンおよびヒストンを含む。ある実施態様において、核酸(特にmRNAなどのRNA)ポリプレックス粒子はナノ粒子である。

【0779】

用語「リボポリプレックス粒子」は、本明細書に記載の両親媒性脂質(特にカチオン性両親媒性脂質)、本明細書に記載の両親媒性ポリマー(特にカチオン性両親媒性ポリマー)および本明細書に記載の核酸(特にmRNAなどのRNA)を含む粒子に関する。ある実施態様において、核酸(特にmRNAなどのRNA)リボポリプレックス粒子はナノ粒子である。

【0780】

用語「ウイルス様粒子」(本明細書ではVLPと略す)は、ウイルスを緊密に模倣するが、該ウイルスの遺伝物質を何ら含まず、故に、非感染性である分子を指す。好ましくは、VLPは本明細書に記載の核酸(好ましくはRNA)を含み、該核酸(好ましくはRNA)は、VLPは由来するウイルスと異種である。VLPは、ウイルス構造タンパク質の個々の発現により合成でき、その後、それらはウイルス様構造に自己集合し得る。ある実施態様において、異なるウイルスからの構造カプシドタンパク質の組み合わせを使用して、組換えVLPを作り得る。VLPは、B型肝炎ウイルス(HBV)(小HBV由来表面抗原(HbsAg))、パルボウイルス科(例えば、アデノ随伴ウイルス)、パピローマウイルス科(例えば、HPV)、レトロウイルス科(例えば、HIV)、フラビウイルス科(例えば、C型肝炎ウイルス)およびバクテリオファージ(例えばQ β 、AP205)を含む広範な科のウイルスの成分から産生され得る。

【0781】

用語「核酸含有粒子」は、核酸(特にmRNAなどのRNA)は結合している本明細書に記載の粒子に関する。これに関して、核酸(特にmRNAなどのRNA)を粒子の外表面に付着させてよい(表面核酸(特に表面mRNAなどの表面RNA))および／または粒子に封入してよい(封入核酸(特に封入mRNAなどの封入RNA))。

【0782】

ある実施態様において、本開示の方法および使用で利用する粒子は、約10～約2000nm、例えば少なくとも約15nm(好ましくは少なくとも約20nm、少なくとも約25nm、少なくとも約30nm、少なくとも約35nm、少なくとも約40nm、少なくとも約45nm、少なくとも約50nm、少なくとも約55nm、少なくとも約60nm、少なくとも約65nm、少なくとも約70nm、少なくとも約75nm、少なくとも約80nm、少なくとも約85nm、少なくとも約90nm、少なくとも約95nmまたは少なくとも

10

20

30

40

50

も約100nm)および／または最大1900nm(好ましくは最大約1900nm、最大約1800nm、最大約1700nm、最大約1600nm、最大約1500nm、最大約1400nm、最大約1300nm、最大約1200nm、最大約1100nm、最大約1000nm、最大約950nm、最大約900nm、最大約850nm、最大約800nm、最大約750nm、最大約700nm、最大約650nm、最大約600nm、最大約550nmまたは最大約500nm)の範囲、好ましくは約20～約1500nm、例えば約30～約1200nm、約40～約1100nm、約50～約1000nm、約60～約900nm、約70～800nm、約80～700nm、約90～600nmまたは約50～500nmまたは約100～500nmの範囲、例えば10～1000nm、15～500nm、20～450nm、25～400nm、30～350nm、40～300nm、50～250nm、60～200nmまたは70～150nmの範囲のサイズ(好ましくは直径、すなわち、回転半径(R_g)値の2倍または流体力学半径の2倍などの半径の2倍)を有する。

10

【0783】

ある実施態様において、本明細書に記載の粒子(例えば、LNPおよびLPX)は、ある実施態様において、約50nm～約1000nm、約50nm～約800nm、約50nm～約700nm、約50nm～約600nm、約50nm～約500nm、約50nm～約450nm、約50nm～約400nm、約50nm～約350nm、約50nm～約300nm、約50nm～約250nm、約50nm～約200nm、約100nm～約1000nm、約100nm～約800nm、約100nm～約700nm、約100nm～約600nm、約100nm～約500nm、約100nm～約450nm、約100nm～約400nm、約100nm～約350nm、約100nm～約300nm、約100nm～約250nm、約100nm～約200nm、約150nm～約1000nm、約150nm～約800nm、約150nm～約700nm、約150nm～約600nm、約150nm～約500nm、約150nm～約450nm、約150nm～約400nm、約150nm～約350nm、約150nm～約300nm、約150nm～約250nm、約150nm～約200nm、約200nm～約1000nm、約200nm～約800nm、約200nm～約700nm、約200nm～約600nm、約200nm～約500nm、約200nm～約450nm、約200nm～約400nm、約200nm～約350nm、約200nm～約300nmまたは約200nm～約250nmの範囲である、平均直径を有する。

20

【0784】

核酸粒子(例えばRNA脂質粒子、特にmRNA LNPなどのRNA LNP)に関して、N/P比またはN/P値は、脂質中の窒素基(特に正荷電性のポリマーアミン(N=窒素)基)と核酸中の負荷電リン酸(P)基の数の比を示す。窒素原子は(pHに依存)通常正荷電であり、リン酸基は負荷電であるため、電荷比と相関する。電荷平衡が存在するとき、N/P比はpHに依存する。正荷電ナノ粒子はトランスフェクションに好都合であると考えられるため、脂質製剤は、しばしば4より大きく12までのN/P比で形成される。この場合、RNAは、ナノ粒子に完全に結合されていると考えられる。

30

【0785】

本明細書に記載の核酸粒子(特にmRNA粒子などのRNA粒子)は、少なくとも1個のカチオン性またはカチオンのイオン化可能な脂質および／または少なくとも1個のカチオン性ポリマーからのコロイドを得て、コロイドと核酸を混合して核酸粒子を得ることを含み得る、広範な方法を使用して製造できる。

40

【0786】

本明細書で使用する用語「コロイド」は、分散粒子が沈降しない均質混合物のタイプに関する。混合物中の不溶性粒子は顕微鏡的であり、粒子径1～1000ナノメートルである。混合物はコロイドまたはコロイド状懸濁液と称され得る。用語「コロイド」は、懸濁液全体ではなく、混合物の粒子のみを指すことがある。

【0787】

少なくとも1個のカチオン性またはカチオンのイオン化可能な脂質および／または少なくとも1個のカチオン性ポリマーを含むコロイドの製造について、リポソーム小胞の製

50

造に慣用的に使用される方法は本明細書で適用可能であり、適切に適合される。リポソーム小胞の製造で最も一般に使用される方法は、次の基本的段階が共通する：(i)有機溶媒への脂質溶解、(ii)得られた溶液の乾燥および(iii)乾燥脂質の水和(種々の水性媒体を使用)。

【0788】

フィルム水和方法において、脂質をまず適当な有機溶媒に溶解し、フラスコの底に薄フィルムを生ずるよう乾燥させる。得られた脂質フィルムを適切な水性媒体を使用して水和して、リポソーム分散系を得る。さらに、付加的な小型化工程が含まれ得る。

【0789】

水相と脂質を含む有機相の間の油中水型エマルジョン形成を含む逆相蒸発は、リポソーム小胞の製造のためのフィルム水和に代わる方法である。この混合物の短い音波処理は、系均質化のために必要である。有機相の減圧下の除去により乳状ゲルを得て、これはその後リポソーム懸濁液に変わる。

【0790】

用語「エタノール注入技術」は、脂質を含むエタノール溶液を、針を通して水溶液に急速に注入する過程を指す。この行為により溶液全体に脂質が分散し、脂質構造形成、例えばリポソーム形成などの脂質小胞形成が促進される。一般に、本明細書に記載の核酸(特にmRNAなどのRNA)リポプレックス粒子は、核酸(特にmRNAなどのRNA)をコロイド状リポソーム分散系に添加することにより得られる。エタノール注入技術を使用して、このようなコロイド状リポソーム分散系は、ある実施態様において、次のとおり形成される：カチオンのイオン化可能な脂質(例えば本明細書に開示する式(X)のカチオンのイオン化可能な脂質；本明細書に開示する構造A～Gの1個を有するカチオンのイオン化可能な脂質；本明細書に開示する式(XI)のカチオンのイオン化可能な脂質；DOTMAおよび／またはDODMA)および付加的脂質(例えばポリマーコンジュゲート脂質(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)脂質；またはポリサルコシン脂質コンジュゲートまたはポリサルコシンと脂質様物質のコンジュゲート)；中性脂質(例えばリン脂質)；ステロイド(例えばコレステロール)；および組み合わせ)などの脂質を含むエタノール溶液を、攪拌下に水溶液に注入する。ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(特にmRNAなどのRNA)リポプレックス粒子を、押し出しの工程を用いることなく得ることができる。

【0791】

用語「押し出す」または「押し出し」は、固定、断面プロファイルを有する粒子を作ることを指す。特に、粒子を規定細孔のフィルターを篩過させる粒子の小型化を指す。

【0792】

無有機溶媒特徴を有する他の方法も、コロイドの製造のために本開示により使用され得る。

【0793】

LNPは典型的に、カチオンのイオン化可能な脂質またはカチオン性脂質；リン脂質などの中性脂質；コレステロールなどのステロイド；およびPEG脂質またはポリサルコシンコンジュゲート脂質などのポリマーコンジュゲート脂質(「ステルス脂質」または「立体安定化脂質」と称されることもある)の4つの成分を含む。各成分はペイロード保護を担い、効果的な細胞内送達を可能にする。しかしながら、PEG脂質(これは最も一般的なポリマーコンジュゲート脂質である)の欠点のために、本開示のLNPは、わずかに異なる組成：カチオンのイオン化可能な脂質またはカチオン性脂質；リン脂質などの中性脂質；コレステロールなどのステロイド；および多価アニオン(無機ポリリン酸など)を有する。ある実施態様において、本開示のLNPは、PEG脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、本開示のLNPは、ポリサルコシンコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、本開示のLNPは、PEG脂質を実質的に含まず、ポリサルコシンコンジュゲート脂質を実質的に含まない。ある実施態様において、本開示のLNPは、ポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない。本開示のLNPがPEGを

含む脂質を実質的に含まない(例えば、PEGを含む化合物を実質的に含まない、またはPEGを実質的に含まない)ある実施態様において、LNPは、次の組成を有し得る：カチオンのイオン化可能な脂質またはカチオン性脂質；リン脂質などの中性脂質；コレステロールなどのステロイド；および多価アニオン(例えば、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物)。

【0794】

LNPは、まず有機(例えばエタノール)溶液に溶解した脂質を水性緩衝液中で核酸と急速に混合し、そして得られた製剤を多価アニオン(無機ポリリン酸など)と混合することによって製造され得る。例えば、第二の態様の方法は、LNPを製造するために用いることができる(詳細については、図1A～Cも参照のこと)。

【0795】

種々のタイプの核酸含有粒子が、粒子形態の核酸の送達に適するとして以前に記載されている(例えば、Kaczmarek, J. C. et al., 2017, Genome Medicine 9, 60参照)。非ウイルス核酸送達媒体について、核酸のナノ粒子封入は、核酸を物理的に分解から保護し、特異的化学に依存して、細胞取り込みおよびエンドソーム脱出を助け得る。

【0796】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)および少なくとも1つのカチオンのイオン化可能な脂質を含むLNPは、(a)水および第一緩衝系を含む核酸溶液を準備し(例えば、製造し)；(b)カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質、ならびに任意選択的に1つ以上の付加的脂質を含む有機(例えば、エタノール)溶液を準備し(例えば、製造し)；(c)(a)の下に準備した(例えば、製造した)核酸溶液を、(b)の下に準備した(例えば、製造した)有機(例えば、エタノール)溶液と混合し、それにより、第一緩衝系を含む第一水相に分散したLNPを含む第一中間製剤を製造し；そして(d)(c)の下に製造した第一中間製剤を、本明細書に開示の多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩と混合し、それにより、第二緩衝系を含む第二水相に分散した粒子を含む第二中間製剤を製造し、ここで、多価アニオン(無機ポリリン酸など)の少なくとも一部が粒子と結合しており；そして(e)最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて、(d)の下に製造した第二中間製剤を濾過(例えば、透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーション)および／または希釈し、それにより、最終緩衝系を含む最終水相に分散したLNPを含む製剤を製造することにより、製造される。工程(e)の後、透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーションなどの希釈および濾過から選択される1つ以上の工程が続き得る。ある実施態様において、第一緩衝系は最終緩衝系とは異なる。別の実施態様において、第一緩衝系と最終緩衝系は同じである。ある実施態様、特に、第二水相が最終水相に非常に類似しているかまたは実質的に対応している実施態様、または第二水相を適切な希釈溶液(例えば、最終的な水性緩衝液)で希釈するだけで第二水相を最終水相に変換できる実施態様において、最終緩衝系を含む最終水性緩衝液を用いて(d)の下に製造した第二中間製剤を濾過することは、希釈溶液(例えば、最終緩衝系を含む最終水性緩衝液)を用いて(d)の下に製造した第二中間製剤を希釈することによって置き換えることができる。

【0797】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)および少なくとも1つのカチオンのイオン化可能な脂質を含むLNPは、(a')水相に、リポソームまたはカチオンのイオン化可能脂質と、存在するならば1つ以上の付加的脂質とのコロイド製剤を準備し(例えば、製造し)；(b')水および緩衝系を含む核酸(RNAなど)溶液を準備し(例えば、製造し)；(c')(a')の下に準備した(例えば、製造した)リポソームまたはコロイド製剤と、(b')の下に準備した(例えば、製造した)核酸(RNAなど)溶液を混合し；そして(d')(c')の下に製造した製剤と、多価アニオン(無機ポリリン酸など)またはその塩と混合することにより製造される。工程(d')の後、透析、タンジェンシャルフロー濾過またはダイアフィルトレーションなどの希釈および濾過から選択される1つ以上の工程が続き得る。LNPが多価アニオン(無機ポリリン酸など)の代わりに多価アニオン(例えば、無

10

20

30

40

50

機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物)を含む場合、工程(d')は、(c')の下に製造した製剤と、多価アニオン(例えば、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物)またはその塩を混合することである。

【0798】

本開示は、核酸(RNA、特にmRNAなど)と、核酸(RNAなど)と結合して核酸粒子を形成する少なくとも1つのカチオンのイオン化可能な脂質とを含む組成物を記載する。核酸粒子は、粒子と非共有結合的相互作用により種々の形態で複合体化する核酸(RNAなど)を含み得る。本明細書に記載の粒子は、ウイルス粒子、特に感染性ウイルス粒子ではなく、すなわち、細胞にウイルス性に感染できない。

10

【0799】

適当なカチオンのイオン化可能な脂質は、核酸粒子を含むものであり、用語「粒子形成成分」または「粒子形成剤」に含まれる。用語「粒子形成成分」または「粒子形成剤」は、核酸粒子を形成するよう核酸と結合するあらゆる成分に関する。このような成分は、核酸粒子の一部であり得るあらゆる成分を含む。

【0800】

ある実施態様において、核酸(RNAなど)粒子(特にmRNA粒子)は1を超えるタイプの核酸(RNAなど)分子を含み、ここで、モル質量または基本的構造要素、例えば、分子構造、キャッピング、コード領域または他の特性に関してなど、核酸分子の分子パラメータは、互いに類似しても異なってもよい。

20

【0801】

粒子製剤において、各核酸(RNAなど)種を個別粒子製剤として別々に製剤化することが可能である。この場合、各個々の粒子製剤は1個の核酸(RNAなど)種を含む。個々の粒子製剤は、例えば別々のコンテナに、別々の物として存在し得る。このような製剤は、各核酸(RNAなど)種を別々に粒子形成剤と共に準備し(典型的に各々核酸含有溶液の形態)、それにより粒子を形成させることにより得ることができる。各粒子は、排他的に粒子形成時に提供された特異的核酸(RNAなど)種(個々の粒子製剤)を含む。ある実施態様において、医薬組成物などの組成物は、1を超える個々の粒子製剤を含む。各医薬組成物は、混合粒子製剤と称される。本開示による混合粒子製剤は、個々の粒子製剤を、別々に形成し、続いて個々の粒子製剤を混合する工程により得られる。混合する工程により、核酸含有粒子の混合集団を含む製剤が得られる。個々の粒子集団は、一緒に、個々の粒子製剤の混合集団を含む1コンテナにあり得る。あるいは、医薬組成物の全核酸(RNAなど)種を、一緒に、組合せ粒子製剤として製剤することが可能である。このような製剤は、全核酸(RNAなど)種の組合せ製剤(典型的に組み合わせ溶液)を粒子形成剤と共に準備し、それにより粒子を形成させることにより得ることができる。混合粒子製剤とは逆に、組合せ粒子製剤は、典型的に1を超える核酸(RNAなど)種を含む粒子を含む。組み合わせ粒子組成物において、種々の核酸(RNAなど)種は典型的に単一粒子と一緒に存在する。

30

【0802】

脂質

用語「脂質」および「脂質様物質」は、1つ以上の疎水性部分または基を含み、任意選択的にまた1つ以上の親水性部分または基を含む分子として広く定義される。疎水性部分および親水性部分を含む分子は、しばしば両親媒性物質とも称される。脂質は、通常水に不溶性であるかまたはほとんど溶けないが、多くの有機溶媒に可溶性である。水性環境では、両親媒性性質により、分子は組織的構造および種々の相に自己集合できる。これらの相の一つは、水性環境における小胞、多重膜／単層膜リポソームまたは膜に存在するため、脂質二重層からなる。疎水性は、長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基であるが、これに限定されない非極性基の包含により付与でき、このような基は、1つ以上の芳香族、シクロ脂肪族またはヘテロ環式基で置換され得る。親水性基は極性および／または荷電基を含み得て、炭水化物、リン酸、カルボン酸、硫酸、アミノ(例えば、第3級アミノ)、スルフヒドリル、ニトロ、ヒドロキシルおよびその他の基を含む。

40

50

【0803】

本明細書で使用する用語「疎水性」は、水溶液に実質的に混和しないかまたは不溶性であるあらゆる分子、部分または基を指す。疎水性基という用語は、少なくとも6個の炭素原子を有する炭化水素を含む。炭化水素の単価ラジカルは、本明細書ではヒドロカルビルと称する。疎水性基は、基が水溶液に実質的に混和しないかまたは不溶性である条件を満たす限り、官能基(例えば、エーテル、エステル、ハロゲン化物など)ならびに炭素および水素以外の原子を有し得る。

【0804】

用語「炭化水素」は、本明細書で定義するアルキル、アルケニルまたはアルキニルなどの、非環状、例えば、線形(直鎖)または分岐、ヒドロカルビル基を含む。アルキル、アルケニルまたはアルキニルの水素原子の1個以上は、他の原子、例えば、ハロゲン、酸素または硫黄で置換され得ることが認識される。他に断らない限り、炭化水素基はまた、炭化水素の全体的極性が比較的非極性である限り、環状(アルキル、アルケニルまたはアルキニル)基またはアリール基を含み得る。

【0805】

本明細書で使用する用語「両親媒性」は、極性部分および非極性部分両方を有する分子を指す。しばしば、両親媒性化合物は、長疎水性テールに結合した極性頭を有する。ある実施態様において、極性部分は水に可溶性であり、一方非極性部分は水に不溶性である。さらに、極性部分は形式正電荷または形式負電荷を有し得る。あるいは、極性部分は形式正および負電荷の両方であり、双性イオンまたは分子内塩であり得る。本開示の目的で、両親媒性化合物は、天然または非天然脂質および脂質様化合物の1つ以上であり得るが、これらに限定されない。

【0806】

用語「脂質様物質」、「脂質様化合物」または「脂質様分子」は、脂質と構造的および／または機能的に関連するが、厳密な意味では脂質とみなされ得ない物質に関する。例えば、本用語は、水性環境で小胞、多重膜／単層膜リポソームまたは膜で存在するため両親媒性層を形成できる化合物を含み、親水性および疎水性両方の部分を有する界面活性剤または合成化合物を含む。一般的に言って、本用語は、脂質と類似していても類似していなくてもよい、異なる構造組織化を有する親水性および疎水性部分を含む分子を指す。細胞膜に自発的に組み込まれ得る脂質様化合物の例は、合成機能－スパーサー脂質構築物(FSL)、合成機能－スパーサーステロール構築物(FSS)ならびに人工両親媒性分子などの機能的脂質構築物を含む。2個の長アルキル鎖および極性頭基を含む脂質は、一般に円柱状である。2個のアルキル鎖により占拠される領域は、極性頭基により占拠される領域と類似する。このような脂質は、モノマーとして低溶解度であり、水不溶性である平面的二層に凝集する傾向にある。1個の線形アルキル鎖および親水性頭基のみを含む古典的界面活性剤モノマーは、一般に円錐形である。親水性頭基は線形アルキル鎖より多くの分子空間を占拠する傾向にある。ある実施態様において、界面活性剤は、水可溶性である球形または楕円形ミセルに凝集する傾向がある。脂質はまた、界面活性剤と同じ一般的構造－極性親水性頭基および非極性疎水性テール－を有するが、脂質は、モノマーの形、溶液中形成された凝集体のタイプおよび凝集に必要な濃度範囲が界面活性剤と異なる。本明細書で使用する用語「脂質」は、本明細書で特に断らない限りまたは文脈から明らかに反しない限り、脂質および脂質様物質の両方を含むと解釈される。

【0807】

両親媒性層に含まれ得る両親媒性化合物の具体例は、リン脂質、アミノ脂質およびスフィンゴ脂質を含むが、これらに限定されない。

【0808】

特定の実施態様において、両親媒性化合物は脂質である。用語「脂質」は、水に不溶性であるが、多くの有機溶媒に可溶性であることにより特徴づけられる、有機化合物の一群である。一般に、脂質は、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、ポリケチド(ケトアシルサブユニットの縮合由来)、ステロール脂質およびプレノ

10

20

30

40

50

ール脂質(イソブレンサブユニットの縮合由来)の8つのカテゴリーに分けられ得る。用語「脂質」は脂肪と同義語として使用されることはあるが、脂肪はトリグリセライドと称される脂質のサブグループである。脂質はまた、脂肪酸およびそれらの誘導体(トリ、ジ、モノグリセライドおよびリン脂質を含む)ならびにステロイド、すなわち、コレステロールまたはその誘導体などのステロール含有代謝物などの分子を含む。コレステロール誘導体の例は、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル-2'-ヒドロキシエチルエーテル、コレステリル-4'-ヒドロキシブチルエーテル、トコフェロールおよびその誘導体およびそれらの混合物を含むが、これらに限定されない。

【0809】

脂肪酸または脂肪酸残基は、カルボン酸基を末端とする炭化水素鎖から製造される多様な分子の群である；この配置により、分子は極性、親水性末端および水に不溶性である非極性、疎水性末端を有する。典型的に4〜24個の炭素長の炭素鎖は、飽和でも不飽和でもよく、酸素、ハロゲン、窒素および硫黄を含む官能基に結合してよい。脂肪酸が二重結合を含むならば、分子の配置に顕著に影響する、*c i s*または*t r a n s*幾何異性の可能性がある。*C i s*-二重結合により、脂肪酸鎖は脂肪酸鎖の屈曲を引き起こすが、鎖内の二重結合が多いほどその効果は増す。脂肪酸カテゴリーにおける他の主要脂質クラスは、脂肪エステルおよび脂肪アミドである。

【0810】

グリセロ脂質は、モノ、ジおよびトリ置換グリセロールからなり、トリグリセライドと称されるグリセロールの脂肪酸トリエステルが最も知られている。用語「トリアシルグリセロール」は、「トリグリセライド」と同義的に使用されることがある。これらの化合物において、グリセロールの3個のヒドロキシル基は各々、典型的に異なる脂肪酸により、エステル化されている。グリセロ脂質の付加的サブクラスは、グリコシド結合によりグリセロールに結合した1個以上の糖残基の存在により特徴づけられる、グリコシルグリセロールにより代表される。

【0811】

グリセロリン脂質は、エステル結合により2個の脂肪酸由来「テール」におよびリン酸エステル結合により1個の「頭」基に結合しているグリセロールコアを含む両親媒性分子(疎水性および親水性の両方の領域を含む)である。通常リン脂質(スフィンゴミエリンもリン脂質と分類されるが)と称される、グリセロリン脂質の例は、ホスファチジルコリン(別名PC、GPCホまたはレシチン)、ホスファチジエタノールアミン(PEまたはGPEn)およびホスファチジルセリン(PSまたはGPSer)を含む。

【0812】

スフィンゴ脂質は、共通構造特性、スフィンゴイド塩基主鎖を共有する化合物の複雑なファミリーである。哺乳動物における主要スフィンゴイド塩基は、一般にスフィンゴシンと称される。セラミド(N-アシルスフィンゴイド塩基)は、アミド結合脂肪酸を有するスフィンゴイド塩基誘導体の主要サブクラスである。脂肪酸は、典型的に16〜26個の炭素原子鎖長の飽和または一不飽和である。哺乳動物の主要ホスホスフィンゴ脂質はスフィンゴミエリン(セラミドホスホコリン)であるが、一方昆虫は主にセラミドホスホエタノールアミンを含み、真菌はフィトセラミドホスホイノシトールおよびマンノース含有頭基を有する。スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴイド塩基へのグリコシド結合を介して結合した1個以上の糖残基からなる多様な分子のファミリーである。これらの例は、セレブロシドおよびガングリオシドなどの単純および複雑スフィンゴ糖脂質である。

【0813】

コレステロールおよびその誘導体またはトコフェロールおよびその誘導体などのステロール脂質は、グリセロリン脂質およびスフィンゴミエリンと共に、膜脂質の重要な成分である。

【0814】

糖脂質は、脂肪酸は糖主鎖に直接結合し、膜二層と互換性の構造を形成する化合物を指

10

20

30

40

50

す。糖脂質において、単糖は、グリセロ脂質およびグリセロリン脂質に存在するグリセロール主鎖を置換する。最もなじみ深い糖脂質は、グラム陰性細菌のリポ多糖のリピド A 成分のアシル化グルコサミン前駆体である。典型的脂質 A 分子は、7 個もの脂肪-アシル鎖で誘導体化されたグルコサミンの二糖である。大腸菌増殖に必要な最小リポ多糖は、2 個の 3-デオキシ-D-マンノ-オクトン酸 (Kdo) 残基でグリコシル化されているグルコサミンのヘキサ-アシル化二糖である Kdo2-リピド A である。

【0815】

ポリケチドは、古典的酵素ならびに脂肪酸シンターゼと機構的特性を共有する反復的およびマルチモジュール酵素によるアセチルおよびプロピオニルサブユニットの重合により合成される。動物、植物、細菌、真菌および海生源からの多数の二次性代謝物および天然生成物を含み、構造多様性は大きい。多くのポリケチドは、主鎖はしばしばグルコシル化、メチル化、ヒドロキシル化、酸化または他の過程によりさらに修飾されている環状分子である。

【0816】

カチオンのにイオン化可能な脂質

本明細書に記載の核酸 (RNA など) 組成物および本明細書に記載の核酸粒子 (特に RNA-LNP) は、粒子形成剤として少なくとも 1 個のカチオンのにイオン化可能な脂質を含む。本明細書での使用が意図されるカチオンのにイオン化可能な脂質は、核酸と静電的に結合できるあらゆるカチオンのにイオン化可能な脂質または脂質様物質を含む。ある実施態様において、本明細書での使用が意図されるカチオンのにイオン化可能な脂質は、例えば核酸と複合体を形成することによりまたは核酸が封入または被覆されている小胞を形成することにより、核酸と結合できる。

【0817】

本明細書で使用する「カチオン性脂質」または「カチオン性脂質様物質」は、正味の正荷電を有する脂質または脂質様物質を指す。カチオン性脂質または脂質様物質は、負電核酸と静電的相互作用により結合する。一般に、カチオン性脂質は、ステロール、アシル鎖、ジアシルまたはそれ以上のアシル鎖などの親油性部分を含み、脂質の頭基は典型的に正荷電を有する。

【0818】

特定の実施態様において、カチオン性脂質または脂質様物質は、特定の pH、特に酸性 pH のみ正味の正荷電を有するが、異なる、好ましくは生理学的 pH などの高い pH で好ましくは正味の正荷電を有さず、好ましくは電荷を有しない、すなわち、中性である。このイオン化可能行動は、生理学的 pH でカチオン性のままである粒子と比較して、エンドソーム脱出を助け、毒性を低減することにより有効性を増強すると考えられる。

【0819】

本明細書で使用する「カチオンのにイオン化可能な脂質」は、正味の正荷電を有するかまたは中性である脂質または脂質様物質、すなわち、永久にカチオン性ではない脂質を指す。故に、カチオンのにイオン化可能な脂質が溶解した組成物の pH に応じて、カチオンのにイオン化可能な脂質は正荷電であるかまたは中性である。本開示の目的で、このような「カチオンのにイオン化可能な」脂質は、状況に反しない限り、用語「カチオン性脂質」に含まれる。

【0820】

ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、好ましくは生理学的条件下、正荷電であるかまたはプロトン化され得る少なくとも 1 個の窒素原子 (N) を含む頭基を含む。

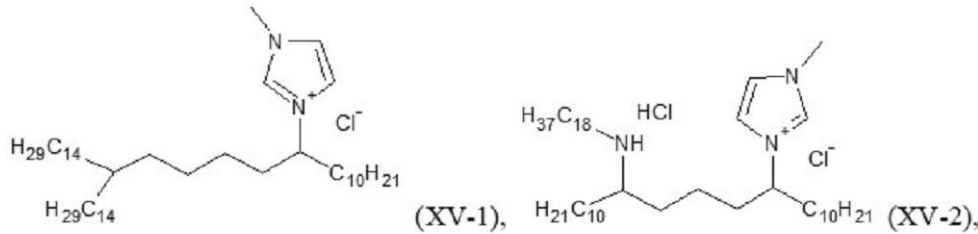
【0821】

カチオン性脂質の例は、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン (DODMA)、1,2-ジオ-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DOTMA)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル) コレステロール (DC-Chol)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDAB)；1,2-ジオレ

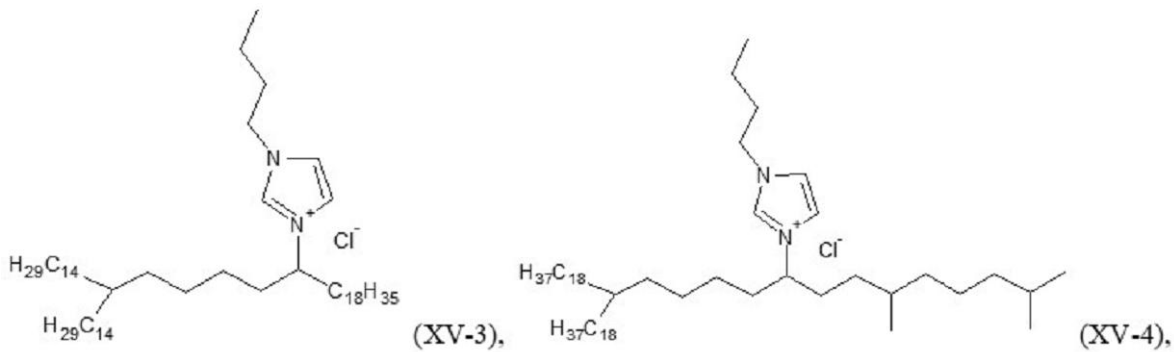
オイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP); 1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP); 1,2-ジアシルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン; 1,2-ジアルキルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン; ジオクタデシルジメチル塩化アンモニウム(DODAC)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)、2,3-ジ(テトラデオキシ)プロピル-(2-ヒドロキシエチル)-ジメチルアザニウム(DMRIE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DMEPC)、1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、1,2-ジオレイルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムプロマイド(DORIE)および2,3-ジオレオイルオキシ-N-[2(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパナミウムトリフルオロ酢酸(DOSPA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DL末端MA)、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン(イヌ)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CLinDMA)、2-[5'-(コレスト-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',12'-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン(DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DOcarbDAP)、2,3-ジリノレオイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン(DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DLincarbDAP)、1,2-ジリノレオイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinCDAP)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-XTC2-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタノアート(DLin-MC3-DMA)、N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムプロマイド(DMRIE)、(±)-N-(3-アミノプロピル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(cis-9-テトラデセニルオキシ)-1-プロパンアミニウムプロマイド(GAP-DMORIE)、(±)-N-(3-アミノプロピル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(ドデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムプロマイド(GAP-DLRIE)、(±)-N-(3-アミノプロピル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムプロマイド(GAP-DMRIE)、N-(2-アミノエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムプロマイド(βAE-DMRIE)、N-(4-カルボキシベンジル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(オレオイルオキシ)プロパン-1-アミニウム(DOBAQ)、2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ]オクチル}オキシ)-N,N-ジメチル-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]プロパン-1-アミン(オクチル-CLinDMA)、1,2-ジミリストイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DMDAP)、1,2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DPDAP)、N1-[2-((1S)-1-[(3-アミノプロピル)アミノ]-4-[ジ(3-アミノ-プロピル)アミノ]ブチルカルボキサミド)エチル]-3,4-ジ[オレイルオキシ]-ベンズアミド(MVL5)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEPC)、2,3-ビス(ドデシルオキシ)-N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミニウムプロマイド(DLRIE)、N-(2-アミノエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)プロパン-1-アミニウムプロマイド(DMORIE)、ジ((Z)-ノン-2-エン-1-イル)8,8'-((((2(ジメチルアミノ)エチル)チオ)カルボニル)アザンジイル)-ジオクタノエート(ATX)、N,N-ジメチル-2,3-ビス(ドデシルオキシ)プロパン

ー１－アミン(DLDMA)、N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)プロパン-1-アミン(DMDMA)、ジ((Z)-ノン-2-エン-1-イル)-9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)-オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)、N-ドデシル-3-((2-ドデシルカルバモイル-エチル)-{2-[(2-ドデシルカルバモイル-エチル)-2-{(2-ドデシルカルバモイル-エチル)-[2-(2-ドデシルカルバモイル-エチルアミノ)-エチル]-アミノ}-エチル-アミノ}プロピオンアミド(リポイド98N₁₂-5)、1-[2-[ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ]エチル-2-[4-[2-[ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ]エチル]ピペラジン-1-イル]エチル]アミノ]ドデカン-2-オール(リポイドC12-200)、および次の構造式(XV-1)~(XV-6) :
【化12】

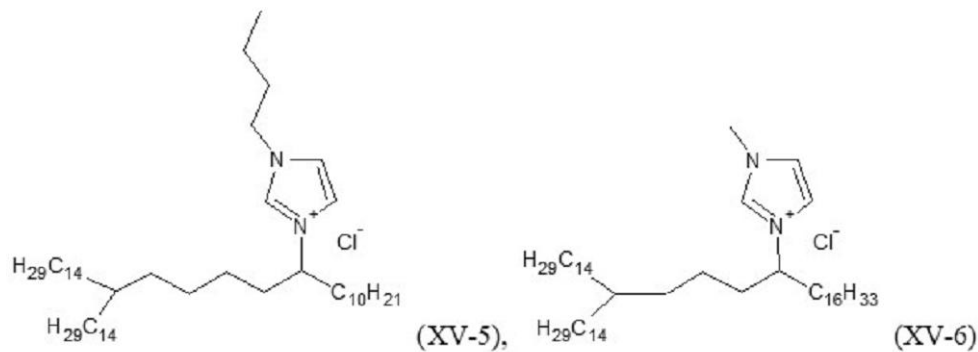
10



20



30



を含むが、これらに限定されない。

【0822】

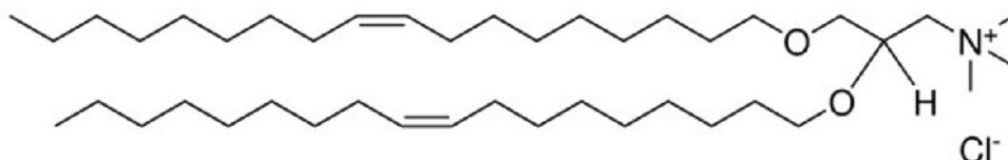
好ましいのは、DODMA、DOTMA、DOTAP、DODACおよびDOSPAである。具体的実施態様において、カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質はDODMAである。

40

【0823】

DOTMAは、4級アミン頭基を有するカチオン性脂質である。DOTMAの構造は、次のとおり表され得る：

【化13】

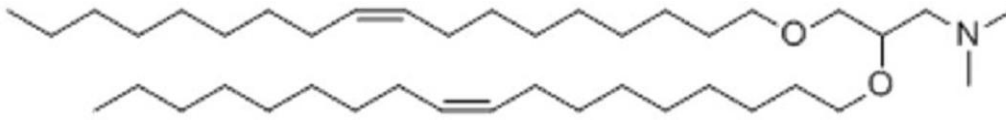


50

【0824】

DODMAは、3級アミン頭基を有するイオン化可能カチオン性脂質である。DODMAの構造は、次のとおり表され得る：

【化14】



【0825】

特定の実施態様において、組成物は、カチオンのイオン化可能な脂質を含む。

10

【0826】

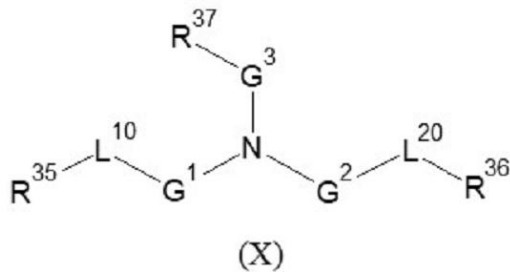
ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、好ましくは生理学的条件下で、正荷電であるかまたはプロトン化され得る少なくとも1つの窒素原子(N)を含む頭基を含む。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、少なくとも1つの第3級アミン部分を含む頭基を含む。

【0827】

カチオンのイオン化可能な脂質の例は、例えば、WO2016/176330およびWO2018/078053に開示される。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は式(X)：

【化15】

20



〔式中：

30

L^{10} および L^{20} の一方は $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ または $-NR^aC(=O)O-$ であり、 L^{10} および L^{20} の他方は $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ または $-NR^aC(=O)O-$ または直接結合であり；

G^1 および G^2 は各々独立して非置換 C_{1-12} アルキレンまたは C_{2-12} アルケニレンであり；

G^3 は C_{1-24} アルキレン、 C_{2-24} アルケニレン、 C_{3-8} シクロアルキレンまたは C_{3-8} シクロアルケニレンであり；

40

R^a は H または C_{1-12} アルキルであり；

R^{35} および R^{36} は各々独立して C_{6-24} アルキルまたは C_{6-24} アルケニルであり；

R^{37} は H、 OR^{50} 、 CN 、 $-C(=O)OR^{40}$ 、 $-OC(=O)R^{40}$ または $-NR^{50}C(=O)R^{40}$ であり；

R^{40} は C_{1-12} アルキルであり；

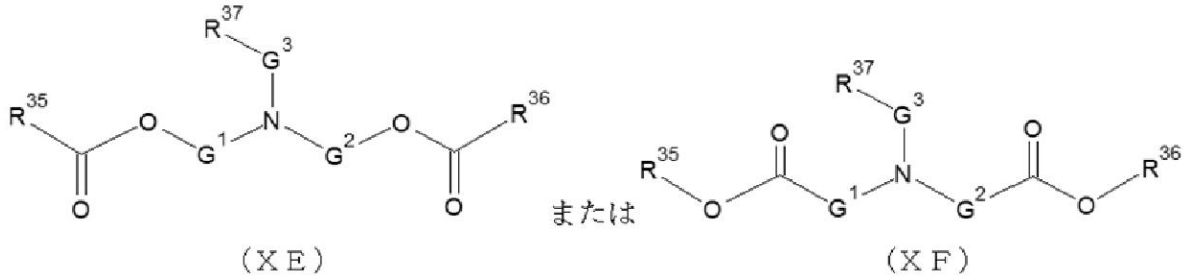
R^{50} は H または C_{1-6} アルキルであり；そして

x は 0、1 または 2 である。〕

の構造を有するかまたはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは

50

【化 1 8】



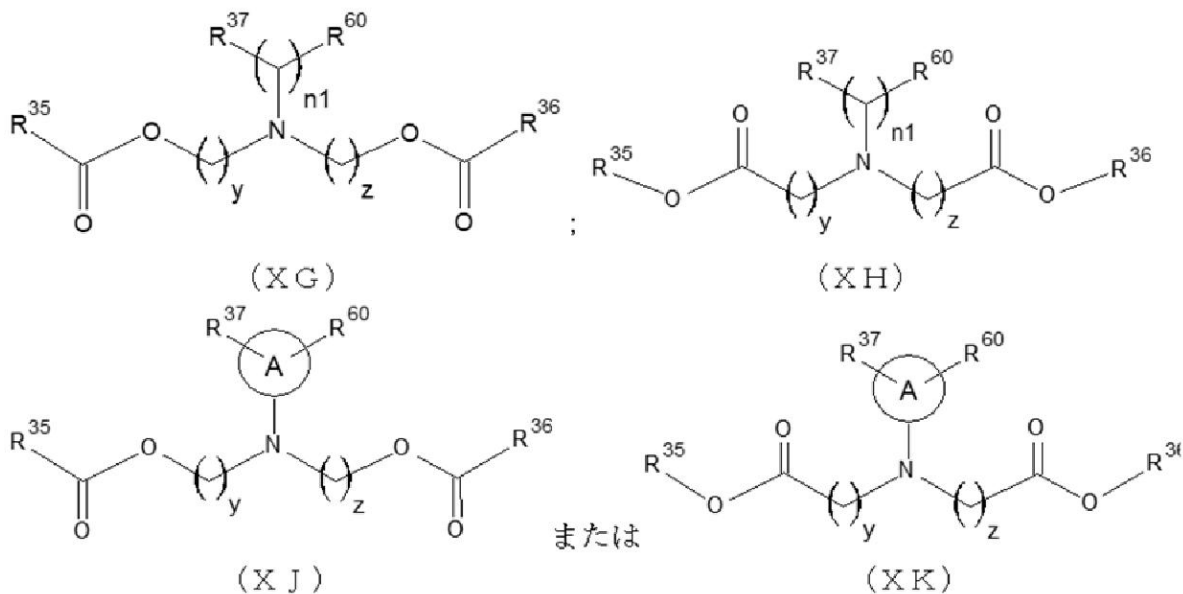
10

の 1 つを有する。

【 0 8 3 3】

式 (X) の前記実施態様のいくつかにおいて、脂質は、次の構造 (X G)、(X H)、(X J) または (X K) :

【化 1 9】



20

の 1 つを有する。

【 0 8 3 4】

式 (X) の前記実施態様のいくつかにおいて、n 1 は 2 ~ 1 2、例えば 2 ~ 8 または 2 ~ 4 の範囲の整数である。例えば、ある実施態様において、n 1 は 3、4、5 または 6 である。ある実施態様において、n 1 は 3 である。ある実施態様において、n 1 は 4 である。ある実施態様において、n 1 は 5 である。ある実施態様において、n 1 は 6 である。

【 0 8 3 5】

式 (X) の前記実施態様の他のいくつかにおいて、y および z は各々独立して 2 ~ 1 0 の範囲の整数である。例えば、ある実施態様において、y および z は各々独立して 4 ~ 9 または 4 ~ 6 の範囲の整数である。

40

【 0 8 3 6】

式 (X) の前記実施態様のいくつかにおいて、R⁶⁰ は H である。前記の他の実施態様において、R⁶⁰ は C₁ - C₂₄ アルキルである。他の実施態様において、R⁶⁰ は OH である。

【 0 8 3 7】

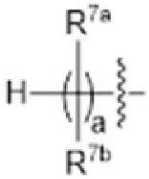
式 (X) のある実施態様において、G³ は非置換である。他の実施態様において、G³ は置換されている。種々の異なる実施態様において、G³ は線形 C₁ - C₂₄ アルキレンまたは線形 C₂ - C₂₄ アルケニレンである。

50

【0838】

式(X)の前記実施態様の他のいくつかにおいて、 R^{35} または R^{36} 、またはそれらの両方が C_6-C_{24} アルケニルである。例えば、ある実施態様において、 R^{35} および R^{36} は、各々独立して、次の構造：

【化20】



10

〔式中：

R^{7a} および R^{7b} は、各場合、独立してHまたは C_1-C_{12} アルキルであり；そしてaは2～12の整数であり、

ここで、 R^{7a} 、 R^{7b} およびaは、 R^{35} および R^{36} が各々独立して6～20個の炭素原子を含むよう選択される。〕

を有する。例えば、ある実施態様において、aは5～9または8～12の範囲の整数である。

【0839】

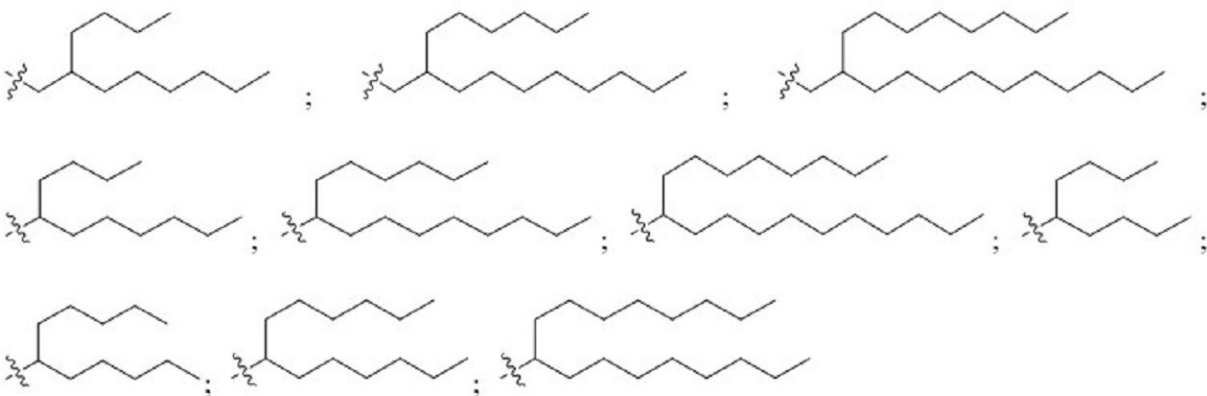
式(X)の前記実施態様のいくつかにおいて、 R^{7a} の少なくとも1個はHである。例えば、ある実施態様において、 R^{7a} は各場合でHである。前記の他の異なる実施態様において、 R^{7b} の少なくとも1個は C_1-C_8 アルキルである。例えば、ある実施態様において、 C_1-C_8 アルキルはメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ヘキシルまたはn-オクチルである。

20

【0840】

式(X)の異なる実施態様において、 R^{35} または R^{36} 、またはそれらの両方は次の構造：

【化21】



30

40

の1つを有する。

【0841】

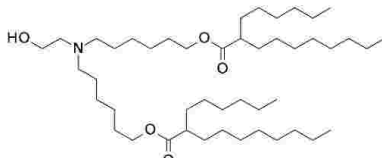
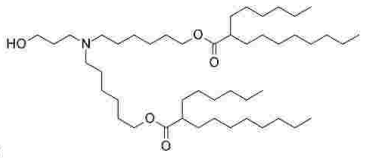
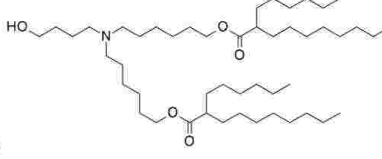
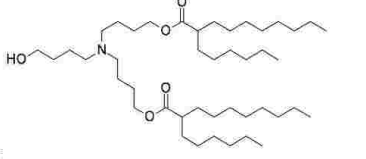
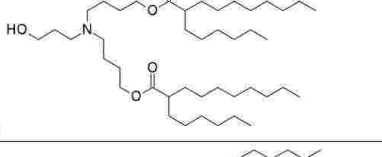
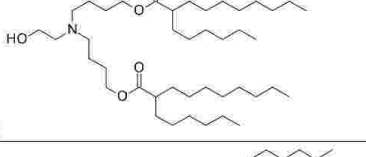
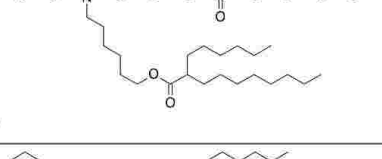
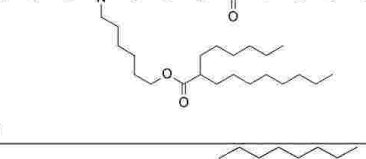
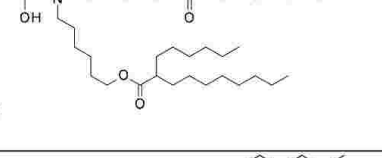
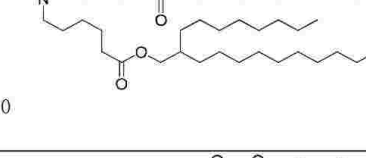
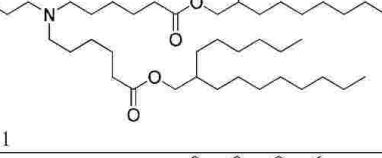
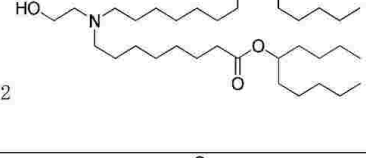
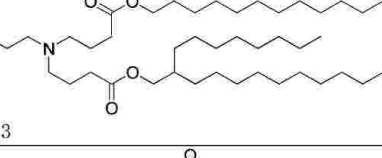
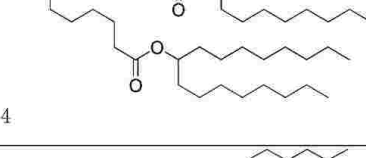
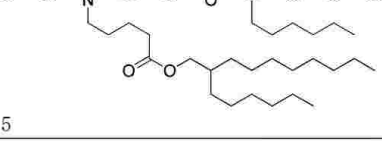
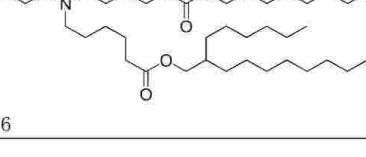
式(X)の前記実施態様のいくつかにおいて、 R^{37} はOH、CN、 $-C(=O)OR^{40}$ 、 $-OC(=O)R^{40}$ または $-NHC(=O)R^{40}$ である。ある実施態様において、 R^{40} はメチルまたはエチルである。

【0842】

種々の異なる実施態様において、式(X)のカチオン性脂質は次に示す構造の1つを有する。

50

【表 2】

式 (X) の代表的化合物	
 X-1	 X-2
 X-3	 X-4
 X-5	 X-6
 X-7	 X-8
 X-9	 X-10
 X-11	 X-12
 X-13	 X-14
 X-15	 X-16

10

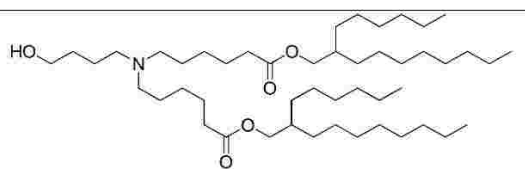
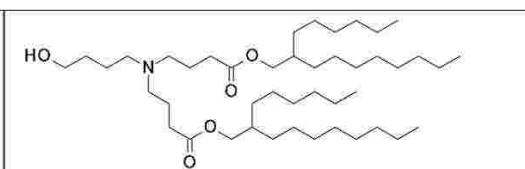
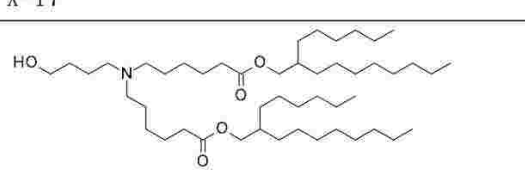
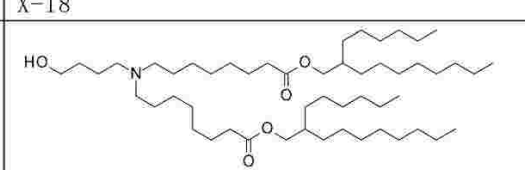
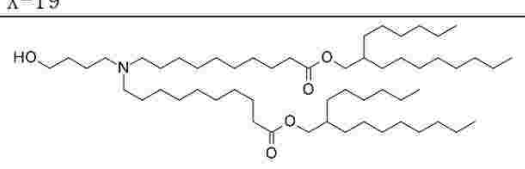
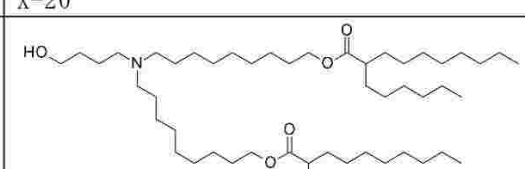
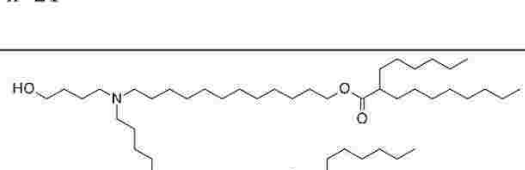
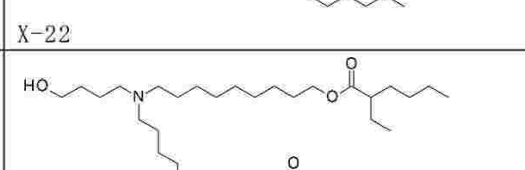
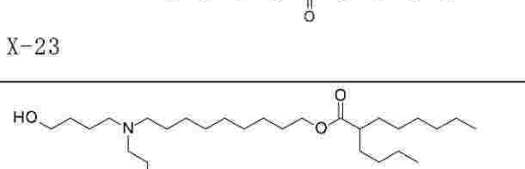
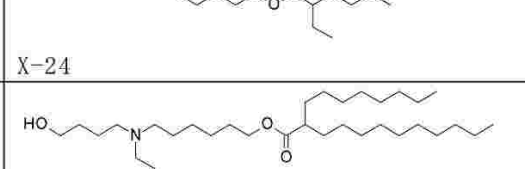
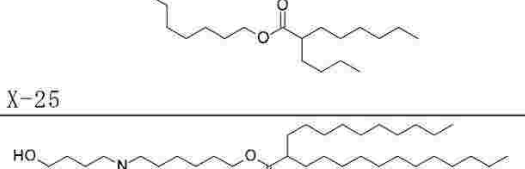
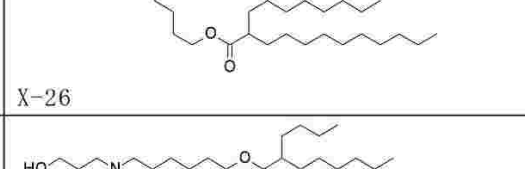
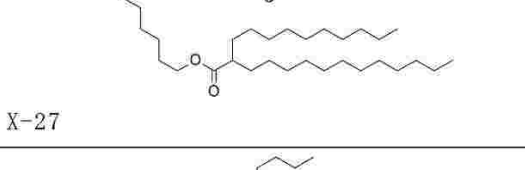
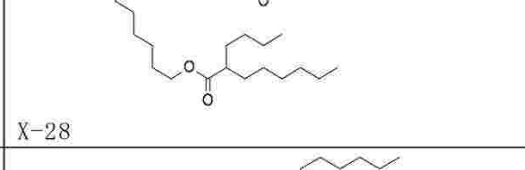
20

30

40

50

【表 3】

 X-17	 X-18
 X-19	 X-20
 X-21	 X-22
 X-23	 X-24
 X-25	 X-26
 X-27	 X-28
 X-29	 X-30

10

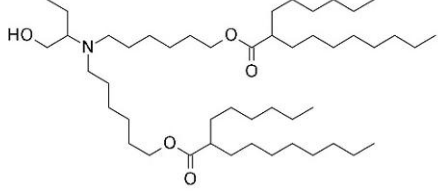
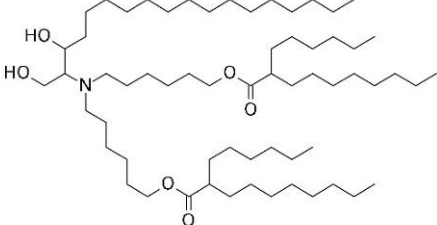
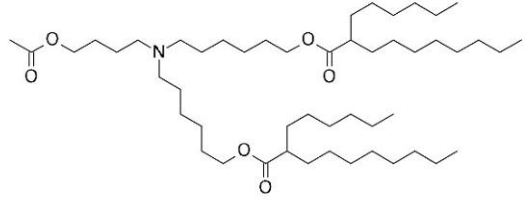
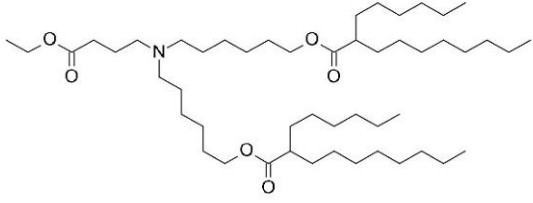
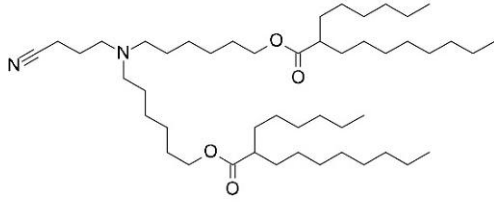
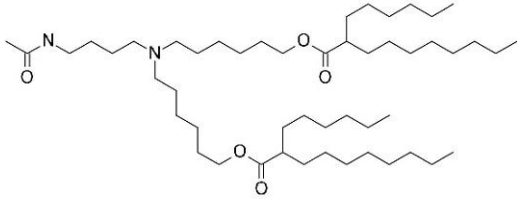
20

30

40

50

【表 4】

 X-31	 X-32
 X-33	 X-34
 X-35	 X-36

10

20

【 0 8 4 3 】

種々の異なる実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、下表に示す構造の 1 つを有する。

30

40

50

【表 5】

番号	構造
A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	

10

20

30

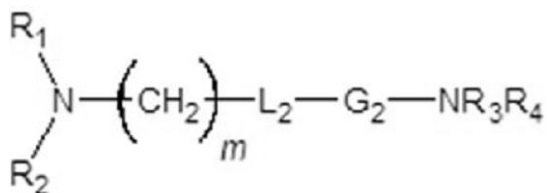
【0844】

ある実施態様において、カチオンの的にイオン化可能な脂質は構造 D を有する。

【0845】

ある実施態様において、実施態様において、カチオンの的にイオン化可能な脂質は式 (XI) :

【化 2 2】



40

【式中：

R^1 および R^2 の各々は独立して R_5 または $-G_1-L_1-R_6$ であり、ここで、 R_1 および R_2 の少なくとも 1 個は $-G_1-L_1-R_6$ であり；

R_3 および R_4 の各々は独立して C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、アリールおよび C_{3-10} シクロアルキルからなる群から選択され；

R_5 および R_6 の各々は独立して少なくとも 10 個の炭素原子を有する非環状ヒドロカルビル基であり；

G_1 および G_2 の各々は独立して非置換 C_{1-12} アルキレンまたは C_{2-12} アルケニレ

50

ンであり；

L_1 および L_2 の各々は独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$ 、 $-C(=O)NRa-$ 、 $-NRaC(=O)NRa-$ 、 $-OC(=O)NRa-$ および $-NRaC(=O)O-$ からなる群から選択され；

Ra は H または C_{1-12} アルキルであり；

m は 0、1、2、3 または 4 であり；そして

x は 0、1 または 2 である。]

の構造を有する。

【0846】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、 G_1 は独立して非置換 C_{1-12} アルキレンまたは非置換 C_{2-12} アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 C_{1-12} アルキレンまたは非置換、直鎖 C_{2-12} アルケニレンである。ある実施態様において、各 G_1 は独立して非置換 C_{6-12} アルキレンまたは非置換 C_{6-12} アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 C_{6-12} アルキレンまたは非置換、直鎖 C_{6-12} アルケニレンである。ある実施態様において、各 G_1 は独立して非置換 C_{8-12} アルキレンまたは非置換 C_{8-12} アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 C_{8-12} アルキレンまたは非置換、直鎖 C_{8-12} アルケニレンである。ある実施態様において、各 G_1 は独立して非置換 C_{6-10} アルキレンまたは非置換 C_{6-10} アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 C_{6-10} アルキレンまたは非置換、直鎖 C_{6-10} アルケニレンである。ある実施態様において、各 G_1 は独立して 8 個、9 個または 10 個の炭素原子を有する非置換アルキレン、例えば、8 個、9 個または 10 個の炭素原子を有する非置換、直鎖アルキレンである。ある実施態様において、 R_1 および R_2 は両方独立して $-G_1-L_1-R_6$ であるとき、 R_1 の G_1 は R_2 の G_1 と異なってよい。これらの実施態様のいずれかにおいて、例えば、 R_1 の G_1 は非置換、直鎖 C_{1-12} アルキレンであり、 R_2 の G_1 は非置換、直鎖 C_{2-12} アルケニレンである；または R_1 の G_1 は非置換、直鎖 C_{1-12} アルキレン基であり、 R_2 の G_1 は異なる非置換、直鎖 C_{1-12} アルキレン基である。ある実施態様において、 R_1 および R_2 は両方独立して $-G_1-L_1-R_6$ であるとき、 R_1 の G_1 は R_2 の G_1 と同一であってよい。これらの実施態様のいずれかにおいて、例えば、各 G_1 は同じ非置換、直鎖 C_{8-12} アルキレン、例えば非置換、直鎖 C_{8-10} アルキレンであるかまたは各 G_1 は同じ非置換、直鎖 C_{6-12} アルケニレンである。

【0847】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、各 L_1 は独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$ および $-C(=O)NRa-$ からなる群から選択される。ある実施態様において、 L_1 の Ra は H または C_{1-12} アルキルである。ある実施態様において、 L_1 の Ra は H または C_{1-6} アルキル、例えば、 H または C_{1-3} アルキルである。ある実施態様において、 L_1 の Ra は H 、メチルまたはエチルである。ある実施態様において、各 L_1 は独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$ および $-SC(=O)-$ からなる群から選択される。ある実施態様において、各 L_1 は独立して $-O(C=O)-$ または $-(C=O)O-$ である。ある実施態様において、 R_1 および R_2 は両方独立して $-G_1-L_1-R_6$ であるとき、 R_1 の L_1 は R_2 の L_1 と異なってよい。これらの実施態様のいずれかにおいて、例えば、 R_1 の L_1 は $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$ および $-C(=O)NRa-$ からなる群から選択されるある部分であり(例えば、 R_1 の L_1 は $-O(C=O)-$ である)、 R_2 の L_1 は $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$ および $-C(=O)NRa-$ から選択される異なる部分である(例えば、 R_2 の L_1 は $-(C=O)O-$ である)。ある実施態様において、 R_1 および R_2 は両方独立して $-G_1-L_1-R_6$ であるとき、 R_1 の L_1 は R_2 の L_1 と同一であってよい。これらの実施態様のいずれかにおいて、例えば、各 L_1 は $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$

10

20

30

40

50

—および—C(=O)NR_a—からなる群から選択される同じ部分である、例えば、各L₁は—O(C=O)—であるかまたは各L₁は—(C=O)O—である。

【0848】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、各R₆は独立して少なくとも10個の炭素原子を有する非環状ヒドロカルビル基、例えば、少なくとも10個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基である。ある実施態様において、各R₆は、独立して最大30個の炭素原子、例えば最大28個、最大26個、最大24個、最大22個または最大20個の炭素原子を有する。ある実施態様において、各R₆は独立して10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状ヒドロカルビル基、例えば、10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基である。ある実施態様において、各R₆はR₆の内部炭素原子を介してL₁に結合する。ある実施態様において、各R₆は独立して最大30個の炭素原子(例えば最大28個、最大26個、最大24個、最大22個または最大20個の炭素原子)を有し、各R₆はR₆の内部炭素原子を介してL₁に結合する。ある実施態様において、各R₆は独立して少なくとも10個の炭素原子を有する非環状ヒドロカルビル基であり、例えば、少なくとも10個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基であり、各R₆はR₆の内部炭素原子を介してL₁に結合する。ある実施態様において、各R₆は独立して10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状ヒドロカルビル基、例えば、10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基であり、各R₆はR₆の内部炭素原子を介してL₁に結合する。ある実施態様において、R₆のヒドロカルビル基はアルキルまたはアルケニル基、例えば、C₁₀₋₃₀アルキルまたはアルケニル基である。故に、ある実施態様において、各R₆は独立して少なくとも10個の炭素原子を有する非環状アルキル基または少なくとも10個の炭素原子を有する非環状アルケニル基、例えば、少なくとも10個の炭素原子を有する直鎖アルキル基または少なくとも10個の炭素原子を有する直鎖アルケニル基である。ある実施態様において、各R₆は独立して10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状アルキル基)または10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状アルケニル基、例えば、10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖アルキル基または10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖アルケニル基である。ある実施態様において、各R₆は独立して11～19個の炭素原子(例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する非環状アルキル基、例えば、11～19個の炭素原子(例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する直鎖アルキル基である。ある実施態様において、各R₆は独立して10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状アルキル基)または10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状アルケニル基、例えば、10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖アルキル基または10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖アルケニル基であり、各R₆はR₆の内部炭素原子を介してL₁に結合する。ある実施態様において、各R₆は独立して11～19個の炭素原子(例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する非環状アルキル基、例えば、11～19個の炭素原子(例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する

10

20

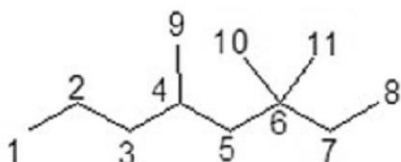
30

40

50

る直鎖アルキル基であり、各 R_6 は R_6 の内部炭素原子を介して L_1 に結合する。表現「内部炭素原子」は、 R_6 が L_1 に結合している R_6 の炭素原子が、 R_6 の少なくとも 2 個の他の炭素原子に直接結合することを意味する。例えば、次の C_{11} アルキル基について、2 位、3 位、4 位、5 位および 7 位のいずれかの各炭素原子は本開示により「内部炭素原子」としてみなされる一方 1 位、6 位、8 位、9 位、10 位および 11 位の炭素原子はみなされない。

【化 2 3】

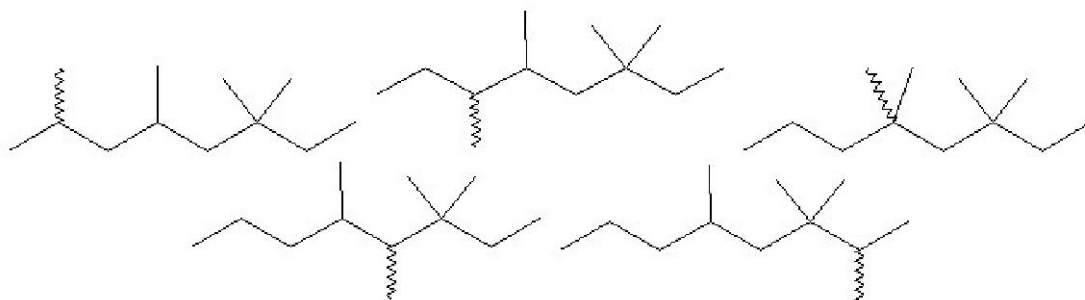


10

【0 8 4 9】

結果として、 R_6 の内部炭素を介して L_1 に結合する C_{11} アルキル基である R_6 は、次の基：

【化 2 4】



20

を含み、ここで、

【化 2 5】

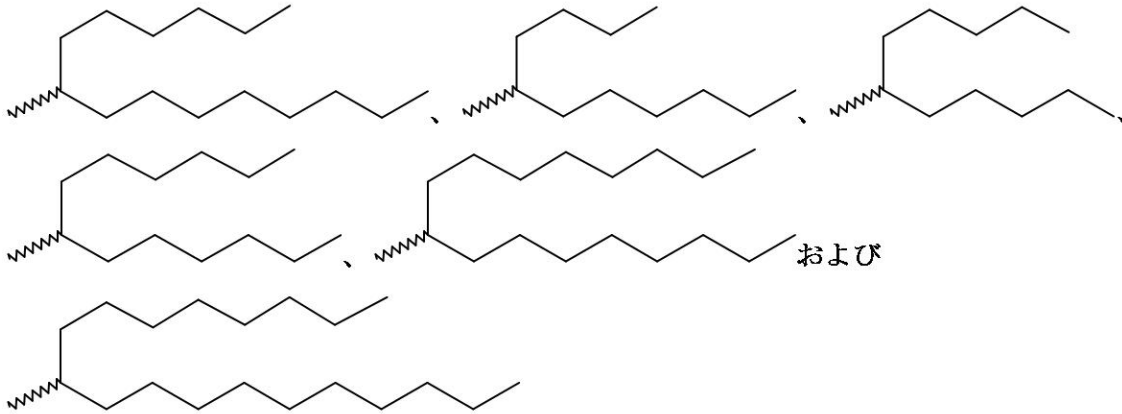
~~~~~

30

は  $R_6$  は  $L_1$  に結合する結合を表す。さらに、直鎖アルキル基、例えば、直鎖  $C_{11}$  アルキル基について、直鎖アルキル基の最初と最後の炭素原子以外(すなわち、直鎖  $C_{11}$  アルキル基の 1 位および 11 位の炭素原子以外)の各炭素原子は「内部炭素原子」としてみなさる。故に、ある実施態様において、 $p$  炭素原子を有する直鎖アルキル基であり、 $R_6$  の内部炭素原子を介して  $L_1$  に結合する  $R_6$  は、 $R_6$  は 2 位  $\sim$  ( $p - 1$ ) 位(それにより 1 位および  $p$  位の末端炭素原子は除外される)のいずれかの  $R_6$  の炭素原子を介して  $L_1$  に結合することを意味する。ある実施態様において、 $R_6$  は  $p'$  炭素原子(ここで、 $p'$  は偶数である)を有する直鎖アルキル基であり、 $R_6$  の内部炭素原子を介して  $L_1$  に結合するとき、 $R_6$  は、 $R_6$  の位置  $(p' / 2 - 1)$ 、 $(p' / 2)$  および  $(p' / 2 + 1)$  のいずれかの炭素を 40 介して  $L_1$  に結合する(例えば、 $p'$  が 10 であるならば、 $R_6$  は  $R_6$  の 4 位、5 位および 6 位のいずれかの炭素原子を介して  $L_1$  に結合する)。ある実施態様において、 $R_6$  は  $p''$  炭素原子(ここで、 $p''$  は奇数である)を有する直鎖アルキル基であり、 $R_6$  の内部炭素原子を介して  $L_1$  に結合するとき、 $R_6$  は、 $R_6$  の位置  $(p'' - 1) / 2$  および  $(p'' + 1) / 2$  のいずれかの炭素を介して  $L_1$  に結合する(例えば、 $p''$  が 11 であるとき、 $R_6$  は  $R_6$  の 5 位および 6 位のいずれかの炭素原子を介して  $L_1$  に結合する)。一般に、 $R_1$  および  $R_2$  両方は  $-G_1-L_1-R_6$  であり、各  $R_6$  は  $R_6$  の内部炭素原子を介して  $L_1$  に結合するとき、 $R_1$  の  $R_6$  は  $R_1$  の  $R_6$  の内部炭素原子を介して  $R_1$  の  $L_1$  に結合し(そして  $R_2$  の  $L_1$  には結合しない)、 $R_2$  の  $R_6$  は  $R_2$  の  $R_6$  の内部炭素原子を介して  $R_2$  の  $L_1$  に結合する(そして  $R_1$  の  $L_1$  には結合しない)。ある実施態様において、各  $R_6$  は独立して

50

## 【化 2 6】



10

からなる群から選択され、ここで、

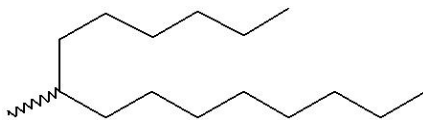
## 【化 2 7】



は、 $R_6$  は  $L_1$  に結合する結合を表す。ある実施態様において、 $R_1$  および  $R_2$  は両方独立して  $-G_1-L_1-R_6$  であるとき、 $R_1$  の  $R_6$  は  $R_2$  の  $R_6$  と異なる。これらの実施態様のいずれかにおいて、例えば、 $R_1$  の  $R_6$  は少なくとも 10 個の炭素原子を有する非環状、好ましくは直鎖、ヒドロカルビル基であってよく (例えば、 $R_1$  の  $R_6$  は

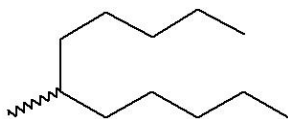
20

## 【化 2 8】



である)、そして  $R_2$  の  $R_6$  は異なる少なくとも 10 個の炭素原子を有する非環状、好ましくは直鎖、ヒドロカルビル基であってよい (例えば、 $R_2$  の  $R_6$  は

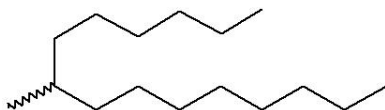
## 【化 2 9】



30

である)。ある実施態様において、 $R_1$  および  $R_2$  は両方独立して  $-G_1-L_1-R_6$  であるとき、 $R_1$  の  $R_6$  は  $R_2$  の  $R_6$  と同一である。これらの実施態様のいずれかにおいて、例えば、各  $R_6$  は同じ少なくとも 10 個の炭素原子を有する非環状、好ましくは直鎖、ヒドロカルビル基である (例えば、各  $R_6$  は

## 【化 3 0】



40

である)。

## 【0 8 5 0】

式 (XI) の前記実施態様のいくつかにおいて、 $R_5$  は少なくとも 10 個の炭素原子を有する非環状ヒドロカルビル基、例えば、少なくとも 10 個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基である。ある実施態様において、 $R_5$  は少なくとも 12 個の炭素原子を有する非環状ヒドロカルビル基、例えば少なくとも 14 個、少なくとも 16 個または少なくとも 18 個の炭素原子、例えば、少なくとも 12 個、少なくとも 14 個、少なくとも 16 個または少なくとも 18 個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基である。ある実施態様に

50

において、 $R_5$ は最大30個の炭素原子、例えば最大28個、最大26個、最大24個、最大22個または最大20個の炭素原子を有する。ある実施態様において、 $R_5$ は非環状ヒドロカルビル基、例えば、直鎖ヒドロカルビル基であり、ここで、各ヒドロカルビル基は10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個、10～20個の炭素原子または12～30個、12～28個、12～26個、12～24個、12～22個、12～20個の炭素原子または14～30個、14～28個、14～26個、14～24個、14～22個、14～20個の炭素原子または16～30個、16～28個、16～26個、16～24個、16～22個、16～20個の炭素原子または18～30個、18～28個、18～26個、18～24個、18～22個または18～20個の炭素原子)を有する。ある実施態様において、 $R_5$ のヒドロカルビル基はアルキルまたはアルケニル基、例えば、 $C_{10-30}$ アルキルまたはアルケニル基である。故に、ある実施態様において、 $R_5$ は少なくとも10個の炭素原子(例えば少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個または少なくとも18個の炭素原子)を有する非環状アルキル基)または少なくとも10個の炭素原子(例えば少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個または少なくとも18個の炭素原子)を有する非環状アルケニル基、例えば、少なくとも10個の炭素原子(例えば少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個または少なくとも18個の炭素原子)を有する直鎖アルキル基または少なくとも10個の炭素原子(例えば少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個または少なくとも18個の炭素原子)を有する直鎖アルケニル基である。ある実施態様において、 $R_5$ は非環状アルキル基または非環状アルケニル基、例えば、直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個、10～20個の炭素原子または12～30個、12～28個、12～26個、12～24個、12～22個、12～20個の炭素原子または14～30個、14～28個、14～26個、14～24個、14～22個、14～20個の炭素原子または16～30個、16～28個、16～26個、16～24個、16～22個、16～20個の炭素原子または18～30個、18～28個、18～26個、18～24個、18～22個または18～20個の炭素原子)を有する。ある実施態様において、アルケニル基は少なくとも2個の炭素-炭素二重結合、例えば、2個または3個の炭素-炭素二重結合、例えば2個の炭素-炭素二重結合を有する。ある実施態様において、アルケニル基は少なくとも1個の*cis*配置の炭素-炭素二重結合、例えば、1個、2個または3個、例えば2個の、*cis*配置の炭素-炭素二重結合を有する。故に、ある実施態様において、 $R_5$ は非環状アルキル基または非環状アルケニル基、例えば、直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個、10～20個の炭素原子または12～30個、12～28個、12～26個、12～24個、12～22個、12～20個の炭素原子または14～30個、14～28個、14～26個、14～24個、14～22個、14～20個の炭素原子または16～30個、16～28個、16～26個、16～24個、16～22個、16～20個の炭素原子または18～30個、18～28個、18～26個、18～24個、18～22個または18～20個の炭素原子)を有し、アルケニル基は少なくとも2個の炭素-炭素二重結合、例えば、2個または3個の炭素-炭素二重結合を有する。ある実施態様において、 $R_5$ は非環状アルキル基または非環状アルケニル基、例えば、直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個、10～20個の炭素原子または12～30個、12～28個、12～26個、12～24個、12～22個、12～20個の炭素原子または14～30個、14～28個、14～26個、14～24個、14～22個、14～20個の炭素原子または16～30個、16～28個、16～26個、16～24個、16～22個、16～20個の炭素原子または18～30個、18～28個、18～26個、18～24個、18～22個または18～20個の炭素

10

20

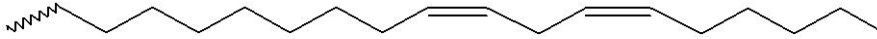
30

40

50

原子)を有し、アルケニル基は少なくとも1個の炭素-炭素二重結合、例えば1個、2個または3個の *c i s* 配置の炭素-炭素二重結合を有する。ある実施態様において、 $R_5$  は次の構造：

【化31】



を有し、ここで、

【化32】



10

は、 $R_5$  が化合物の残りに結合する結合を表す。

【0851】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、 $L_2$  は  $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$ 、 $-C(=O)NRa-$ 、 $-NRaC(=O)NRa-$ 、 $-OC(=O)NRa-$  および  $-NRaC(=O)O-$  からなる群から選択される。ある実施態様において、 $L_2$  は  $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-NRaC(=O)-$  および  $-C(=O)NRa-$  からなる群から選択される。ある実施態様において、 $L_2$  の  $Ra$  は  $H$  または  $C_{1-12}$  アルキルである。ある実施態様において、 $L_2$  の  $Ra$  は  $H$  または  $C_{1-6}$  アルキル、例えば、 $H$  または  $C_{1-3}$  アルキルである。ある実施態様において、 $L_2$  の  $Ra$  は  $H$ 、メチルまたはエチルである。ある実施態様において、 $L_2$  は  $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$  および  $-SC(=O)-$  からなる群から選択される。ある実施態様において、 $L_2$  は  $-O(C=O)-$  または  $-(C=O)O-$  である。

20

【0852】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、 $G_2$  は非置換  $C_{1-12}$  アルキレンまたは非置換  $C_{2-12}$  アルケニレン、例えば、非置換、直鎖  $C_{1-12}$  アルキレンまたは非置換、直鎖  $C_{2-12}$  アルケニレンである。ある実施態様において、 $G_2$  は非置換  $C_{2-10}$  アルキレンまたは非置換  $C_{2-10}$  アルケニレン、例えば、非置換、直鎖  $C_{2-10}$  アルキレンまたは非置換、直鎖  $C_{2-10}$  アルケニレンである。ある実施態様において、 $G_2$  は非置換  $C_{2-6}$  アルキレンまたは非置換  $C_{2-6}$  アルケニレン、例えば、非置換、直鎖  $C_{2-6}$  アルキレンまたは非置換、直鎖  $C_{2-6}$  アルケニレンである。ある実施態様において、 $G_2$  は非置換  $C_{2-4}$  アルキレンまたは非置換  $C_{2-4}$  アルケニレン、例えば、非置換、直鎖  $C_{2-4}$  アルキレンまたは非置換、直鎖  $C_{2-4}$  アルケニレンである。ある実施態様において、 $G_2$  はエチレンまたはトリメチレンである。

30

【0853】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、 $R_3$  および  $R_4$  の各々は独立して  $C_{1-6}$  アルキルまたは  $C_{2-6}$  アルケニルである。ある実施態様において、 $R_3$  および  $R_4$  の各々は独立して  $C_{1-4}$  アルキルまたは  $C_{2-4}$  アルケニルである。ある実施態様において、 $R_3$  および  $R_4$  の各々は独立して  $C_{1-3}$  アルキルである。ある実施態様において、 $R_3$  および  $R_4$  の各々は独立してメチルまたはエチルである。ある実施態様において、 $R_3$  および  $R_4$  の各々はメチルである。

40

【0854】

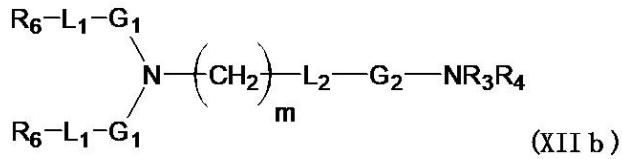
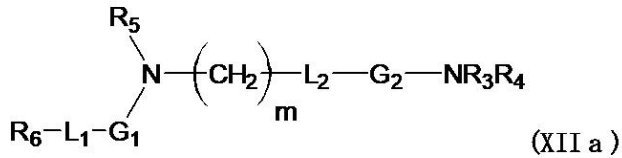
式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、 $m$  は 0、1、2 または 3 である。ある実施態様において、 $m$  は 0 または 2 である。ある実施態様において、 $m$  は 0 である。ある実施態様において、 $m$  は 2 である。

【0855】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、カチオンのイオン化可能な脂質は式(XIa)または(XIb)：

50

## 【化 3 3】



10

〔式中、

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> の各々は独立して C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルまたは C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルケニルであり；  
R<sub>5</sub> は少なくとも 14 個の炭素原子(例えば少なくとも 16 個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基であり、ここで、ヒドロカルビル基は好ましくは少なくとも 2 個の炭素-炭素二重結合を有し；

各 R<sub>6</sub> は独立して少なくとも 10 個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であるおよび／または各 R<sub>6</sub> は R<sub>6</sub> の内部炭素原子を介して L<sub>1</sub> に結合し、好ましくは各 R<sub>6</sub> は独立して少なくとも 10 個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、各 R<sub>6</sub> は R<sub>6</sub> の内部炭素原子を介して L<sub>1</sub> に結合し；

20

各 G<sub>1</sub> は独立して非置換、直鎖 C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub> アルキレンまたは C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub> アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 C<sub>6</sub> - C<sub>12</sub> アルキレンまたは C<sub>6</sub> - C<sub>12</sub> アルケニレン、例えば非置換、直鎖 C<sub>8</sub> - C<sub>12</sub> アルキレンまたは非置換、直鎖 C<sub>8</sub> - C<sub>12</sub> アルケニレンであり；

G<sub>2</sub> は非置換 C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルキレンまたは C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルケニレン、好ましくは非置換 C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキレンまたは C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルケニレンであり；

L<sub>1</sub> および L<sub>2</sub> の各々は独立して -O(C=O)- または -(C=O)O- であり；そして m は 0、1、2 または 3、好ましくは 0 または 2 である。〕

の構造を有する。

30

## 【0856】

式(XII a)の前記実施態様のいくつかにおいて、R<sub>5</sub> は最大 30 個の炭素原子、例えば最大 28 個、最大 26 個、最大 24 個、最大 22 個または最大 20 個の炭素原子を有する。式(XII a)のある実施態様において、R<sub>5</sub> は 14 ~ 30 個の炭素原子(例えば 14 ~ 28 個、14 ~ 26 個、14 ~ 24 個、14 ~ 22 個、14 ~ 20 個の炭素原子または 16 ~ 30 個、16 ~ 28 個、16 ~ 26 個、16 ~ 24 個、16 ~ 22 個、16 ~ 20 個の炭素原子または 18 ~ 30 個、18 ~ 28 個、18 ~ 26 個、18 ~ 24 個、18 ~ 22 個または 18 ~ 20 個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基である。式(XII a)のある実施態様において、R<sub>5</sub> は 14 ~ 30 個の炭素原子(例えば 14 ~ 28 個、14 ~ 26 個、14 ~ 24 個、14 ~ 22 個、14 ~ 20 個の炭素原子または 16 ~ 30 個、16 ~ 28 個、16 ~ 26 個、16 ~ 24 個、16 ~ 22 個、16 ~ 20 個の炭素原子または 18 ~ 30 個、18 ~ 28 個、18 ~ 26 個、18 ~ 24 個、18 ~ 22 個または 18 ~ 20 個の炭素原子)を有する直鎖アルキルまたはアルケニル基である。式(XII a)のある実施態様において、アルケニル基は少なくとも 2 個の炭素-炭素二重結合、例えば、2 個または 3 個の炭素-炭素二重結合、例えば 2 個の炭素-炭素二重結合を有する。ある実施態様において、アルケニル基は少なくとも 1 個の c i s 配置の炭素-炭素二重結合、例えば、1 個、2 個または 3 個、例えば 2 個の、c i s 配置の炭素-炭素二重結合を有する。故に、式(XII a)のある実施態様において、R<sub>5</sub> は直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して 14 ~ 30 個の炭素原子(例えば 14 ~ 28 個、14 ~ 26 個、14 ~ 24 個、14 ~ 22 個、14 ~ 20 個の炭

40

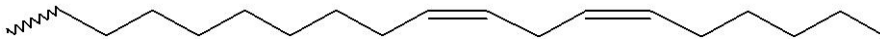
50

素原子または16～30個、16～28個、16～26個、16～24個、16～22個、16～20個の炭素原子または18～30個、18～28個、18～26個、18～24個、18～22個または18～20個の炭素原子)を有し、アルケニル基は少なくとも2個の炭素-炭素二重結合、例えば、2個または3個の炭素-炭素二重結合を有する。式(XIIa)のある実施態様において、R<sub>5</sub>は直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して14～30個の炭素原子(例えば14～28個、14～26個、14～24個、14～22個、14～20個の炭素原子または16～30個、16～28個、16～26個、16～24個、16～22個、16～20個の炭素原子または18～30個、18～28個、18～26個、18～24個、18～22個または18～20個の炭素原子)を有し、アルケニル基は少なくとも1個の炭素-炭素二重結合、例えば1個、2個または3個のcis配置の炭素-炭素二重結合を有する。式(XIIa)のある実施態様において、R<sub>5</sub>は直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して14～30個の炭素原子(例えば14～28個、14～26個、14～24個、14～22個、14～20個の炭素原子または16～30個、16～28個、16～26個、16～24個、16～22個、16～20個の炭素原子または18～30個、18～28個、18～26個、18～24個、18～22個または18～20個の炭素原子)を有し、アルケニル基は2個または3個の炭素-炭素二重結合を有し、ここで、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合、例えば1個、2個または3個の炭素-炭素二重結合はcis配置である。式(XIIa)のある実施態様において、R<sup>5</sup>は次の構造

10

20

【化34】



を有し、ここで、

【化35】



は、R<sub>5</sub>は化合物の残りに結合する結合を表す。式(XIIa)のある実施態様において、R<sub>6</sub>は最大30個の炭素原子、例えば最大28個、最大26個、最大24個、最大22個または最大20個の炭素原子を有する。式(XIIa)のある実施態様において、R<sub>6</sub>は10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状ヒドロカルビル基(例えば、非環状アルキル基)、例えば、10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)である。式(XIIa)のある実施態様において、R<sub>6</sub>は少なくとも10個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、R<sub>6</sub>はR<sub>6</sub>の内部炭素原子を介してL<sub>1</sub>に結合する。式(XIIa)のある実施態様において、R<sub>6</sub>は10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する非環状ヒドロカルビル基(例えば、非環状アルキル基)、例えば、10～30個の炭素原子(例えば10～28個、10～26個、10～24個、10～22個または10～20個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、R<sub>6</sub>はR<sub>6</sub>の内部炭素原子を介してL<sub>1</sub>に結合する。式(XIIa)のある実施態様において、G<sub>1</sub>は独立して非置換、直鎖C<sub>4-12</sub>アルキレンまたはC<sub>4-12</sub>アルケニレン、例えば、非置換、直鎖C<sub>6-12</sub>アルキレンまたはC<sub>6-12</sub>アルケニレンである。式(XIIa)のある実施態様において、R<sub>5</sub>は少なくとも14個の炭素原子(例えば14～30個の炭素原子)および2個または3個の炭素-炭素二重結合を有する直鎖ヒドロカルビル基、例えば、直鎖アルケニル基であり；R<sub>6</sub>は少なくとも10個の炭素原子(例えば、10～30個の炭素原子を有する)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、R<sub>6</sub>はR<sub>6</sub>の内部炭素原子を介してL<sub>1</sub>に結合し；そしてG<sub>1</sub>は独立して非置換、直鎖C<sub>4-12</sub>アルキレンまたはC<sub>4-12</sub>アルケニレン、例

30

40

50

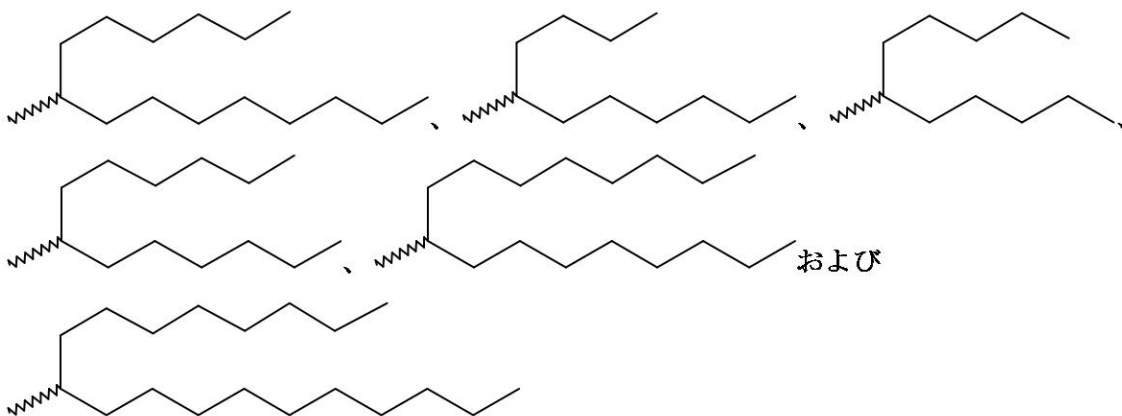
えば、非置換、直鎖  $C_{6-12}$  アルキレンまたは  $C_{6-12}$  アルケニレンである。

【0857】

式(XIIb)の前記実施態様のいくつかにおいて、各  $R_6$  は、独立して最大30個の炭素原子、例えば最大28個、最大26個、最大24個、最大22個または最大20個の炭素原子を有する。式(XIIb)のある実施態様において、各  $R_6$  は独立して10~30個の炭素原子(例えば10~28個、10~26個、10~24個、10~22個または10~20個の炭素原子または11~19個の炭素原子、例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)である。式(XIIb)のある実施態様において、各  $R_6$  は独立して10~30個の炭素原子(例えば10~28個、10~26個、10~24個、10~22個または10~20個の炭素原子または11~19個の炭素原子、例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、各  $R_6$  は  $R_6$  の内部炭素原子を介して  $L_1$  に結合する。式(XIIb)のある実施態様において、各  $R_6$  は独立して

10

【化36】



20

からなる群から選択され、ここで、

【化37】



30

は、 $R_6$  が  $L_1$  に結合する結合を表す。式(XIIb)のある実施態様において、各  $G_1$  は独立して非置換、直鎖  $C_{6-12}$  アルキレンまたは  $C_{6-12}$  アルケニレンである。式(XIIb)のある実施態様において、各  $G_1$  は独立して非置換、直鎖  $C_{8-12}$  アルキレンまたは  $C_{8-12}$  アルケニレンである。式(XIIb)のある実施態様において、各  $R_6$  は独立して少なくとも10個の炭素原子(例えば10~28個、10~26個、10~24個、10~22個または10~20個の炭素原子または11~19個の炭素原子、例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、 $R_6$  の内部炭素原子を介して  $L_1$  に結合し；そして各  $G_1$  は独立して非置換、直鎖  $C_{8-12}$  アルキレンまたは  $C_{8-12}$  アルケニレンである。

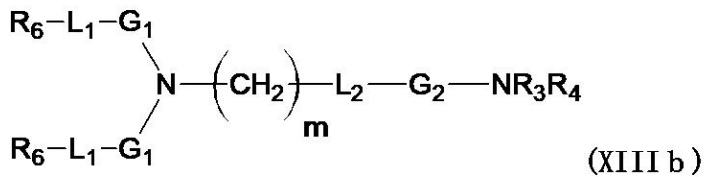
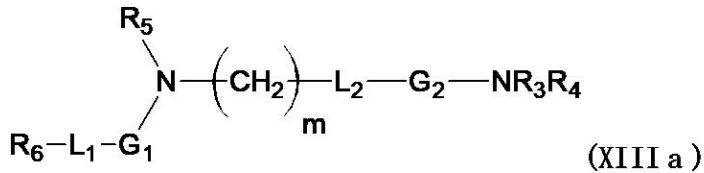
40

【0858】

式(XI)の前記実施態様のいくつかにおいて、カチオンのイオン化可能な脂質は式(XIIa)または(XIIb)：

50

【化 3 8】



〔式中、

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> の各々は独立して C<sub>1</sub> - 4 アルキルまたは C<sub>2</sub> - 4 アルケニル、より好ましくは C<sub>1</sub> - 3 アルキル、例えばメチルまたはエチルであり；

R<sub>5</sub> は少なくとも 16 個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル基であり、ここで、アルケニル基は好ましくは少なくとも 2 個の炭素 - 炭素二重結合を有し；

各 R<sub>6</sub> は独立して少なくとも 10 個の炭素原子を有する直鎖ヒドロカルビル基であり、ここで、R<sub>6</sub> は R<sub>6</sub> の内部炭素原子を介して L<sub>1</sub> に結合しており；

各 G<sub>1</sub> は独立して非置換、直鎖 C<sub>6</sub> - 12 アルキレンまたは非置換、直鎖 C<sub>6</sub> - 12 アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 C<sub>8</sub> - 12 アルキレンまたは非置換、直鎖 C<sub>8</sub> - 12 アルケニレン、例えば非置換、直鎖 C<sub>8</sub> - 10 アルキレンまたは非置換、直鎖 C<sub>8</sub> - 10 アルケニレン、例えば非置換、直鎖 C<sub>8</sub> アルキレンであり；

G<sub>2</sub> は非置換 C<sub>2</sub> - 6 アルキレンまたは C<sub>2</sub> - 6 アルケニレン、好ましくは非置換 C<sub>2</sub> - 4 アルキレンまたは C<sub>2</sub> - 4 アルケニレン、例えばエチレンまたはトリメチレンであり；

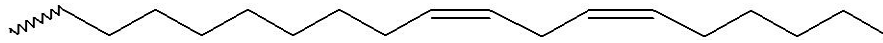
L<sub>1</sub> および L<sub>2</sub> の各々は独立して -O(C=O)- または -(C=O)O- であり；そして m は 0、1、2 または 3、好ましくは 0 または 2 である。〕

の構造を有する。

【0859】

式(XIII a)の前記実施態様のいくつかにおいて、R<sub>5</sub> は最大 30 個の炭素原子、例えば最大 28 個、最大 26 個、最大 24 個、最大 22 個または最大 20 個の炭素原子を有する。式(XIII a)のある実施態様において、R<sub>5</sub> は 16 ~ 30 個の炭素原子(例えば 16 ~ 28 個、16 ~ 26 個、16 ~ 24 個、16 ~ 22 個、16 ~ 20 個の炭素原子または 18 ~ 30 個、18 ~ 28 個、18 ~ 26 個、18 ~ 24 個、18 ~ 22 個または 18 ~ 20 個の炭素原子)を有する直鎖アルキルまたはアルケニル基である。式(XIII a)のある実施態様において、アルケニル基は少なくとも 2 個の炭素 - 炭素二重結合、例えば、2 個または 3 個の炭素 - 炭素二重結合、例えば 2 個の炭素 - 炭素二重結合を有する。ある実施態様において、アルケニル基は少なくとも 1 個の *c i s* 配置の炭素 - 炭素二重結合、例えば、1 個、2 個または 3 個、例えば 2 個の、*c i s* 配置の炭素 - 炭素二重結合を有する。故に、式(XIII a)のある実施態様において、R<sub>5</sub> は直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して 16 ~ 30 個の炭素原子(例えば 16 ~ 28 個、16 ~ 26 個、16 ~ 24 個、16 ~ 22 個、16 ~ 20 個の炭素原子または 18 ~ 30 個、18 ~ 28 個、18 ~ 26 個、18 ~ 24 個、18 ~ 22 個または 18 ~ 20 個の炭素原子)を有し、アルケニル基は少なくとも 2 個の炭素 - 炭素二重結合、例えば、2 個または 3 個の炭素 - 炭素二重結合を有する。式(XIII a)のある実施態様において、R<sub>5</sub> は直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して 16 ~ 30 個の炭素原子(例えば 16 ~ 28 個、16 ~ 26 個、16 ~ 24 個、16 ~ 22 個、16 ~ 20 個の炭素原子または 18 ~ 30 個、18 ~ 28 個、18 ~ 26 個、18 ~ 24 個、18 ~ 22 個または 18 ~ 20 個の炭素

原子)を有し、アルケニル基は少なくとも1個の炭素-炭素二重結合、例えば1個、2個または3個の *c i s* 配置の炭素-炭素二重結合を有する。式(XIII a)のある実施態様において、 $R_5$ は直鎖アルキル基または直鎖アルケニル基であり、ここで、アルキルおよびアルケニル基の各々は独立して16~30個の炭素原子(例えば16~28個、16~26個、16~24個、16~22個、16~20個の炭素原子または18~30個、18~28個、18~26個、18~24個、18~22個または18~20個の炭素原子)を有し、アルケニル基は2個または3個の炭素-炭素二重結合を有し、ここで、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合、例えば1個、2個または3個の炭素-炭素二重結合は *c i s* 配置である。式(XIII a)のある実施態様において、 $R_5$ は次の構造【化39】



を有し、ここで、【化40】



は、 $R_5$ は化合物の残りに結合する結合を表す。式(XIII a)のある実施態様において、 $R_6$ は最大30個の炭素原子、例えば最大28個、最大26個、最大24個、最大22個または最大20個の炭素原子を有する。式(XIII a)のある実施態様において、 $R_6$ は10~30個の炭素原子(例えば10~28個、10~26個、10~24個、10~22個または10~20個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、 $R_6$ は $R_6$ の内部炭素原子を介して $L_1$ に結合する。式(XIII a)のある実施態様において、 $R_6$ は10~30個の炭素原子(例えば10~28個、10~26個、10~24個、10~22個または10~20個の炭素原子)を有する直鎖アルキル基であり、 $R_6$ は $R_6$ の内部炭素原子を介して $L_1$ に結合する。式(XIII a)のある実施態様において、 $G_1$ は独立して非置換、直鎖 $C_{4-12}$ アルキレンまたは $C_{4-12}$ アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 $C_{6-12}$ アルキレンまたは $C_{6-12}$ アルケニレンである。式(XIII a)のある実施態様において、 $R_5$ は少なくとも16個の炭素原子(例えば16~30個の炭素原子)および2個または3個の炭素-炭素二重結合を有する直鎖ヒドロカルビル基、例えば、直鎖アルケニル基であり； $R_6$ は少なくとも10個の炭素原子(例えば、10~30個の炭素原子を有する)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、 $R_6$ は $R_6$ の内部炭素原子を介して $L_1$ に結合し；そして $G_1$ は独立して非置換、直鎖 $C_{4-12}$ アルキレンまたは $C_{4-12}$ アルケニレン、例えば、非置換、直鎖 $C_{6-12}$ アルキレンまたは $C_{6-12}$ アルケニレンである。

【0860】

式(XIII b)の前記実施態様のいくつかにおいて、各 $R_6$ は、独立して最大30個の炭素原子、例えば最大28個、最大26個、最大24個、最大22個または最大20個の炭素原子を有する。式(XIII b)のある実施態様において、各 $R_6$ は独立して10~30個の炭素原子(例えば10~28個、10~26個、10~24個、10~22個または10~20個の炭素原子または11~19個の炭素原子、例えば11個、13個、15個、17個または17個の炭素原子)を有する直鎖ヒドロカルビル基(例えば、直鎖アルキル基)であり、各 $R_6$ は $R_6$ の内部炭素原子を介して $L_1$ に結合する。式(XIII b)のある実施態様において、各 $R_6$ は $R_6$ の内部炭素原子を介して $L_1$ に結合しており、

10

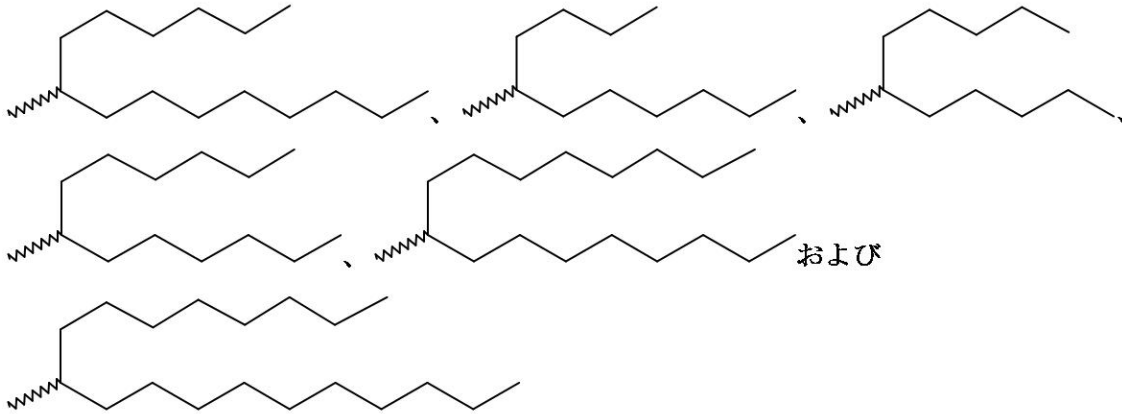
20

30

40

50

## 【化 4 1】



10

からなる群から独立して選択され、ここで、

## 【化 4 2】



は、 $R_6$  は  $L_1$  に結合する結合を表す。式 (XIII b) のある実施態様において、各  $G_1$  は独立して非置換、直鎖  $C_{8-12}$  アルキレンまたは  $C_{8-12}$  アルケニレン、例えば、非置換、直鎖  $C_{8-10}$  アルキレンまたは  $C_{8-10}$  アルケニレンである。式 (XIII b) のある実施態様において、各  $R_6$  は独立して少なくとも 10 個の炭素原子 (例えば 10 ~ 28 個、10 ~ 26 個、10 ~ 24 個、10 ~ 22 個または 10 ~ 20 個の炭素原子または 11 ~ 19 個の炭素原子、例えば 11 個、13 個、15 個、17 個または 17 個の炭素原子) を有する直鎖ヒドロカルビル基 (例えば、直鎖アルキル基) であり、 $R_6$  の内部炭素原子を介して  $L_1$  に結合し；そして各  $G_1$  は独立して非置換、直鎖  $C_{8-12}$  アルキレンまたは  $C_{8-12}$  アルケニレン、例えば、非置換、直鎖  $C_{8-10}$  アルキレンまたは  $C_{8-10}$  アルケニレンである。

20

## 【0861】

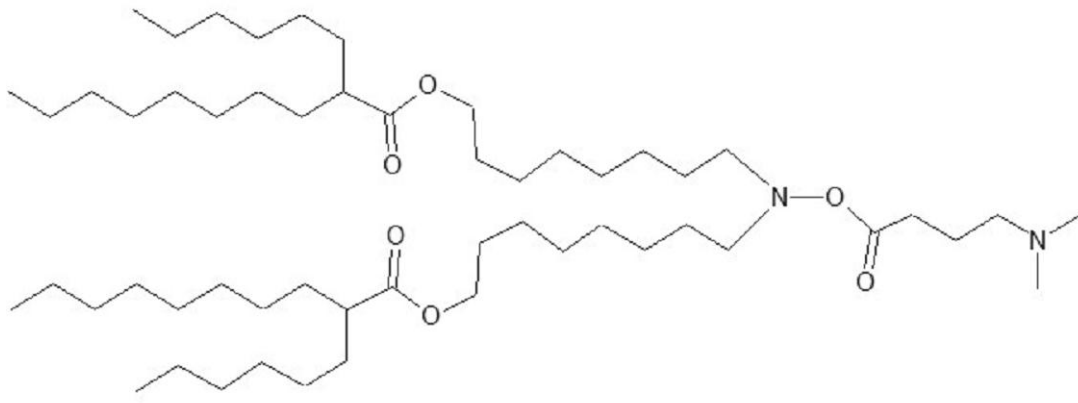
式 (XI) の前記実施態様のいくつかにおいて、カチオンのにイオン化可能な脂質は次の式 (XIV-1)、(XIV-2) および (XIV-3) :

30

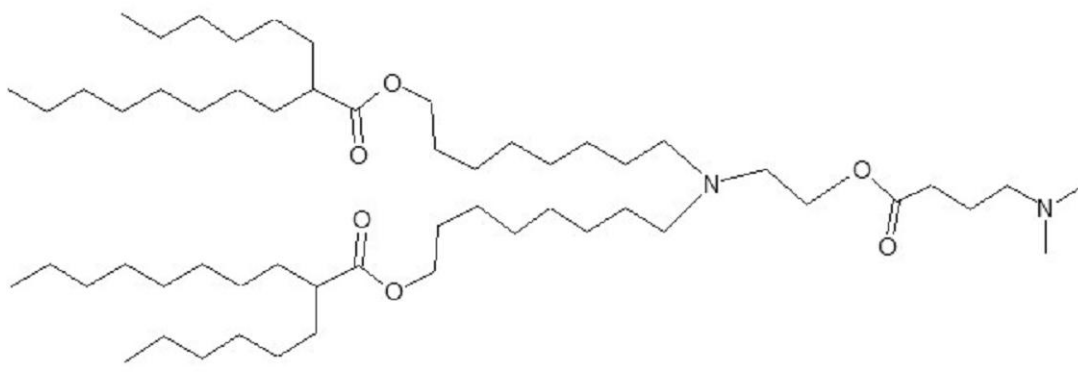
40

50

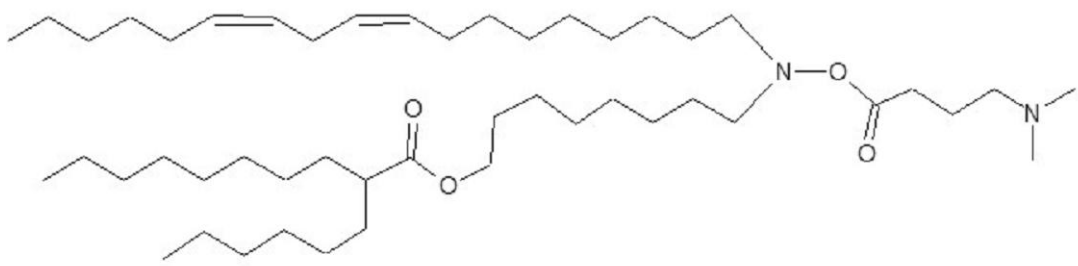
## 【化 4 3】



10



20



30

の 1 つを有する。

## 【0862】

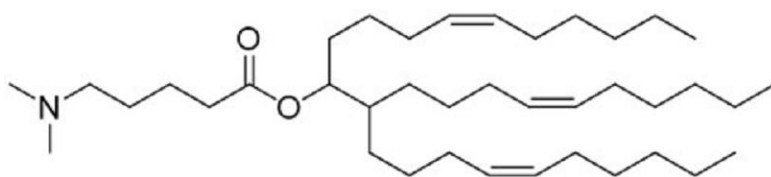
したがって、特定の実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は、構造 XIV-2 または XIV-3 を有する。

## 【0863】

ある実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は (6Z, 16Z)-12-((Z)-デクー 4-エン-1-イル)ドコサ-6, 16-ジエン-11-イル 5-(ジメチルアミノ)ペンタノエート (3D-P-DMA) である。3D-P-DMA の構造は、次のとおり表され得る。

40

## 【化 4 4】



## 【0864】

種々の異なる実施態様において、カチオンのにイオン化可能な脂質は N,N-ジメチル

50

ー2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン(DODMA)、1,2-ジオレオイルー3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、ヘプタトリアコンター6,9,28,31-テトラエンー19-イルー4-(ジメチルアミノ)ブタノアート(DLin-MC3-DMA)および4-((ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエンー1-イル)アミノ)オキシ)-N,N-ジメチル-4-オキソブタンー1-アミン(DPL-14)からなる群から選択される。

#### 【0865】

カチオンのイオン化可能な脂質のさらなる例は、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール(DC-Chol)、1,2-ジオレオイルー3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP); 1,2-ジアシルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン; 1,2-ジアルキルオキシ-3-ジメチルアンモニウムプロパン、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DL末端MA)、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン(イヌ)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-3-ベーターオキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CLindMA)、2-[5'-(コレスト-5-エン-3-ベーターオキシ)-3'-オキサペントキシ]-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',12'-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン(DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DOcarbDAP)、2,3-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルプロピルアミン(DLinDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DLincarbDAP)、1,2-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinCDAP)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-XTC2-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ヘプタトリアコンター6,9,28,31-テトラエンー19-イルー4-(ジメチルアミノ)ブタノアート(DLin-MC3-DMA)、2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ]オクチル}オキシ)-N,N-ジメチル-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエンー1-イルオキシ]プロパンー1-アミン(オクチル-CLindMA)、1,2-ジミリストイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DMDAP)、1,2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DPDAP)、N1-[2-((1S)-1-[(3-アミノプロピル)アミノ]-4-[ジ(3-アミノ-プロピル)アミノ]ブチルカルボキサミド)エチル]-3,4-ジ[オレイルオキシ]-ベンズアミド(MVL5)、ジ((Z)-ノン-2-エン-1-イル)8,8'-((((2(ジメチルアミノ)エチル)チオ)カルボニル)アザンジイル)ジオクタノエート(ATX)、N,N-ジメチル-2,3-ビス(ドデシルオキシ)プロパンー1-アミン(DLDMA)、N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)プロパンー1-アミン(DMDMA)、ジ((Z)-ノン-2-エン-1-イル)-9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)、N-ドデシル-3-((2-ドデシルカルバモイル-エチル)-{2-[(2-ドデシルカルバモイル-エチル)-2-{(2-ドデシルカルバモイル-エチル)-[2-(2-ドデシルカルバモイル-エチルアミノ)-エチル]-アミノ}-エチルアミノ)プロピオンアミド(リピドイド98N12-5)、1-[2-[ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ]エチル]-[2-[4-[2-[ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ]エチル]ピペラジン-1-イル]エチル]アミノ]ドデカン-2-オール(リピドイドC12-200)を含むが、これらに限定されない。

#### 【0866】

特定の実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は構造X-3を有する。

#### 【0867】

10

20

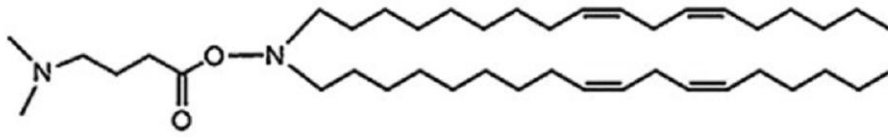
30

40

50

ある実施態様において、本明細書で使用するためのカチオン性脂質は、D P L - 1 4 であるか、または D P L - 1 4 を含む。本明細書で使用する「D P L - 1 4」は、次の一般式を含む脂質である。

【化 4 5】



【0 8 6 8】

本明細書に開示するカチオンのイオン化可能な脂質についての記載はまた、その塩(特に薬学的に許容される塩)、互変異性体、立体異性体、溶媒和物(例えば、水和物)および同位体標識された形態も含むことが理解される。

【0 8 6 9】

ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物／粒子に存在する総脂質の約 1 0 mol%～約 1 0 0 mol%、約 2 0 mol%～約 1 0 0 mol%、約 3 0 mol%～約 1 0 0 mol%、約 4 0 mol%～約 1 0 0 mol% または約 5 0 mol%～約 1 0 0 mol% を構成し得る。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物／粒子中に存在する総脂質の約 4 0 mol%～約 7 5 mol%、好ましくは約 4 0 mol%～約 7 0 mol%、より好ましくは約 4 5 mol%～約 6 5 mol% を構成する。

【0 8 7 0】

本明細書に記載の核酸組成物／粒子(特に R N A 組成物／粒子)がカチオンのイオン化可能な脂質および 1 つ以上の付加的脂質を含むある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物／粒子に存在する総脂質の約 1 0 mol%～約 8 0 mol%、約 2 0 mol%～約 7 5 mol%、約 2 0 mol%～約 7 0 mol%、約 2 0 mol%～約 6 0 mol%、約 2 5 mol%～約 5 5 mol%、約 3 0 mol%～約 5 0 mol%、約 3 5 mol%～約 4 5 mol% または約 4 0 mol% を構成する。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物／粒子中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約 4 0 mol%～約 7 0 mol%、例えば約 4 5 mol%～約 6 5 mol%、または約 5 0 mol%～約 6 0 mol% を構成する。いくつかの別の実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物／粒子中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約 2 0 mol%～約 4 0 mol%、例えば約 2 5 mol%～約 4 0 mol% または約 2 5 mol%～約 3 5 mol% を構成する。

【0 8 7 1】

ある実施態様において、本明細書に記載の粒子(特に R N A L N P)は、(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約 4 0 mol%～約 7 0 mol%、例えば約 4 5 mol%～約 6 5 mol% または約 5 0 mol%～約 6 0 mol% のカチオンのイオン化可能な脂質を含む。いくつかの別の実施態様において、本明細書に記載の粒子(特に R N A L N P)は、(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約 2 0 mol%～約 4 0 mol%、例えば約 2 5 mol%～約 4 0 mol% または約 2 5 mol%～約 3 5 mol% のカチオンのイオン化可能な脂質を含む。

【0 8 7 2】

本明細書に記載のカチオンのイオン化可能な脂質の少なくとも一部が核酸(R N A など)の少なくとも一部と結合して粒子(例えば、L N P)を形成するある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質は、組成物または粒子に存在する総脂質の(特に、イオン化可能脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約 4 0 mol%～約 7 0 mol%、例えば約 4 5 mol%～約 6 5 mol% または約 5 0 mol%～約 6 0 mol% を構成し得る。いくつかの別の実施態様において、カチオンのイオン

10

20

30

40

50

化可能な脂質は、組成物または粒子に存在する総脂質の(特に、イオン化可能脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約20mol%～約40mol%、例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%を構成する。

#### 【0873】

ある実施態様において、N/P値は少なくとも約4である。ある実施態様において、N/P値は4～20、4～12、4～10、4～8または5～7の範囲である。ある実施態様において、N/P値は約6である。

#### 【0874】

#### 付加的脂質

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物はカチオンのイオン化可能な脂質以外の脂質または脂質様物質、すなわち、非カチオン性脂質または脂質様物質(非カチオンのイオン化可能な脂質または脂質様物質を含む)も含み得る。まとめて、アニオン性および中性脂質または脂質様物質は、本明細書では非カチオン性脂質または脂質様物質と称する。ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質に加えて、コレステロールおよび脂質などの他の疎水性部分の付加による核酸粒子の製剤の最適化は、組成物および/または粒子安定性および核酸(例えばRNA)送達の有効性を増大し得る。

#### 【0875】

核酸粒子の全体的電荷に影響してもしなくてもよい1つ以上の付加的脂質を取り込み得る。ある実施態様において、1つ以上の付加的脂質は非カチオン性脂質または脂質様物質である。非カチオン性脂質は、例えば、1つ以上のアニオン性脂質および/または中性脂質を含み得る。本明細書で使用する「アニオン性脂質」は、選択したpHで負荷電であるあらゆる脂質を指す。本明細書で使用する「中性脂質」は、選択したpHで非荷電または中性双性イオン形態で存在する、あらゆるいくつかの脂質種のいずれかを指す。

#### 【0876】

特定の実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、カチオンのイオン化可能な脂質および1つ以上の付加的脂質を含む。

#### 【0877】

理論に拘束されることを願わないが、1つ以上の付加的脂質の量と比較したカチオンのイオン化可能な脂質の量は、核酸の電荷、粒子径、安定性、組織選択性および生理活性などの重要な核酸粒子特徴に影響し得る。したがって、ある実施態様において、カチオンのイオン化可能な脂質と1つ以上の付加的脂質とのモル比は、(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約0.25:1～約2.5:1、例えば約0.6:1～約2.4:1、約0.8:1～約1.9:1または約1.1～約1.5:1;あるいは(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約0.25:1～約0.7:1、約0.3:1～約0.7:1または約0.3:1～約0.54:1である。

#### 【0878】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)に含まれる1つ以上の付加的脂質は、中性脂質、ステロイドおよびそれらの組合せの1つ以上を含む。

#### 【0879】

#### 中性脂質

ある実施態様において、1つ以上の付加的脂質は、好ましくはリン脂質である中性脂質を含む。ある実施態様において、リン脂質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、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびスフィンゴミエリンからなる群から選択される。使用できる具体的リン脂質は、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、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンまたはスフィンゴミエリンを含むが、これらに

10

20

30

40

50

限定されない。このようなリン脂質は、特にジアシルホスファチジルコリン、例えばジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジミリスティルホスファチジルコリン(DMPC)、ジペンタデカノイルホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジアラキドイルホスファチジルコリン(DAPC)、ジベヘノイルホスファチジルコリン(DBPC)、ジトリコサノイルホスファチジルコリン(DTPC)、ジリグノセロイルフタチジルコリン(DLPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルコリン(POPC)、1,2-ジオ-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(18:0 Diether 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 LysopC)およびホスファチジリエタノールアミン、特にジアシルホスファチジリエタノールアミン、例えばジオレオイルホスファチジリエタノールアミン(DOPE)、ジステアロイル-ホスファチジリエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイル-ホスファチジリエタノールアミン(DPPE)、ジミリスティル-ホスファチジリエタノールアミン(DMPE)、ジラウロイル-ホスファチジリエタノールアミン(DLPE)、ジフィタノイル-ホスファチジリエタノールアミン(DPyPE)、1,2-ジオ-(9Z-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPG)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)(DPPG)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(POPE)、N-パルミトイル-D-エリトロースフィンゴシルホスホリルコリン(SM)および種々の疎水性鎖を有するさらなるホスファチジリエタノールアミン脂質を含む。ある実施態様において、中性脂質はDSPC、DOPC、DMPC、DPPC、POPC、DOPE、DOPG、DPPG、POPE、DPPE、DMPE、DSPEおよびSMからなる群から選択される。ある実施態様において、中性脂質はDSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPEおよびSMからなる群から選択される。ある実施態様において、中性脂質はDSPCである。

10

20

30

40

50

#### 【0880】

ある実施態様において、リン脂質は、30℃より高い $T_g$ 値を有するリン脂質からなる群から選択される。したがって、ある実施態様において、リン脂質は、DSPC、DPPC、DSPE、およびDPPEからなる群から選択される。ある実施態様において、中性脂質はDSPCである。

#### 【0881】

したがって、ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、カチオンのイオン化可能な脂質と、30℃より高い $T_g$ 値を有するリン脂質とを含む。ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、カチオンのイオン化可能な脂質と、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択されるリン脂質とを含む。ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、カチオンのイオン化可能な脂質およびDSPCを含む。

#### 【0882】

ある実施態様において、中性脂質は、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)中に5~25molパーセントの範囲の濃度で存在する。ある実施態様において、中性脂質は、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約15mol%~約25mol%、例えば約17mol%~約21mol%の濃度で存在する。ある実施態様において、中性脂質は、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様には)約5mol%~約15mol%、例えば約7mol%~約14mol%の濃度で存在する。

#### 【0883】

## ステロイド

ある実施態様において、ステロイドはコレステロールである。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、カチオンのイオン化可能な脂質およびコレステロールを含む。

### 【0884】

ある実施態様において、ステロイドは、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)中に15~60molパーセントの範囲の濃度で存在する。ある実施態様において、ステロイドは、本明細書に記載の組成物(特にmRNA組成物)中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約15mol%~約40mol%、例えば約20mol%~約35mol%または約20mol%~約30mol%の濃度で存在する。ある実施態様において、ステロイドは、組成物中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約35mol%~約60mol%、例えば約40mol%~約60mol%または約45mol%~約60mol%の範囲の濃度で、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)中に存在する。

### 【0885】

特定の好ましい実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、30℃より高い $T_g$ 値を有するリン脂質およびコレステロールを、好ましくは上記の濃度で含む。ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択されるリン脂質、ならびにコレステロールを、好ましくは上記の濃度で含む。ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、DSPCおよびコレステロールを、好ましくは上記の濃度で含む。

### 【0886】

ある実施態様において、中性脂質(特に、1つ以上のリン脂質)およびステロイド(特にコレステロール)の組合せ濃度は、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)中に存在する総脂質の、(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約0mol%~約80mol%、例えば約30mol%~約65mol%、約30mol%~約60mol%、約32mol%~約60mol%、約35mol%~約60mol%、約37mol%~約55mol%または約37mol%~約51mol%を含み得て；または(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約40mol%~約75mol%、約42mol%~約74mol%、約45mol%~約74mol%、約47mol%~約70mol%、約50mol%~約67mol%、または約52mol%~約65mol%を含み得る。

### 【0887】

(i)核酸(RNAなど)、(ii)カチオンのイオン化可能な脂質、および(iii)1つ以上の付加的脂質(例えば、1つ以上のリン脂質および/またはステロイド)の少なくとも一部が粒子(例えば、LNP)を形成する本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)のある実施態様において、多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸またはクエン酸または無機リン酸)の少なくとも一部は粒子と結合しており、付加的脂質(例えば、1つ以上のリン脂質および/またはステロイド)は、粒子中に存在する総脂質の約0mol%~約60mol%、約2mol%~約55mol%、約5mol%~約50mol%、約5mol%~約45mol%、約10mol%~約45mol%、約15mol%~約40mol%、または約20mol%~約40mol%を構成し得る。

### 【0888】

ある実施態様において、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量がより少ない実施態様では)約5mol%~約25mol%、例えば約15mol%~約25mol%または約17mol%~約21mol%を構成し得る。別のある実施態様において、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対

量が多い実施態様では)約5 mol%～約15 mol%、例えば約7 mol%～約14 mol%を構成する。

【0889】

ある実施態様において、ステロイド(特にコレステロール)は、粒子中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様では)約15 mol%～約40 mol%、例えば約20 mol%～約35 mol%、または約20 mol%～約30 mol%を構成する。ある実施態様において、ステロイド(特にコレステロール)は、粒子中に存在する総脂質の(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様では)約35 mol%～約60 mol%、例えば約40 mol%～約60 mol%または約45 mol%～約60 mol%を構成する。

10

【0890】

#### ポリマーコンジュゲート脂質

ポリマーコンジュゲート脂質は典型的に脂質部分およびそれにコンジュゲートしたポリマー部分を含む分子である。

【0891】

ポリマーコンジュゲート脂質の例は、PEGコンジュゲート脂質であり、本明細書ではPEG化脂質またはPEG脂質とも称される。用語「PEG化脂質」は、脂質部分およびポリエチレングリコール部分両方を含む分子を指す。PEG化脂質は当分野で知られる。

【0892】

ポリマーコンジュゲート脂質のもう一つの例は、ポリサルコシンコンジュゲート脂質であり、本明細書ではサルコシン化脂質またはpS ar脂質とも称される。用語「サルコシン化脂質」は、脂質部分とポリサルコシン(ポリ(N-メチルグリシン)部分)の両方を含む分子を指す。

20

【0893】

本明細書で使用する「ポリマー」は、その通常の意味であり、すなわち、共有結合により結合した1つ以上の反復単位(モノマー)を含む分子構造を指す。反復単位は全て同一でよくまたはある場合、ポリマー内に1を超えるタイプの反復単位が存在し得る。ある場合、ポリマーは生物学的に由来し、すなわち、タンパク質などのバイオポリマーである。ある場合、付加的部分、例えばターゲティング部分もポリマーに存在し得る。1を超えるタイプの反復単位がポリマー内に存在するならば、ポリマーは「コポリマー」と称される。コポリマーを形成する反復単位は、どのような形式で配置されていてもよい。例えば、反復単位は無作為の順番、交互の順番または「ブロック」コポリマー、すなわち、各々第一反復単位(例えば、第一ブロック)を含む1つ以上の領域および各々第二反復単位(例えば、第二ブロック)を含む1つ以上の領域を含むポリマーとしてなどのように配置され得る。ブロックコポリマーは、2個(ジブロックコポリマー)、3個(トリブロックコポリマー)またはそれ以上の数の異なるブロックを有し得る。

30

【0894】

ある実施態様において、ポリマーコンジュゲート脂質は、疎水性脂質層を遮蔽する保護的親水性層の形成により、脂質粒子を立体的に安定化するように設計される。ある実施態様において、ポリマーコンジュゲート脂質は、そのような脂質粒子がインビボに投与されたとき血清タンパク質との結合および／または結果的な細網内皮系による取り込みを減少できる。

40

【0895】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、サルコシン化脂質を実質的に含まない。

【0896】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、PEG化脂質を実質的に含まない。

【0897】

50

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、PEG化脂質を実質的に含まず、サルコシン化脂質を実質的に含まない(またはPEG化脂質またはサルコシン化脂質を含まない)。

【0898】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、あらゆるポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない(またはあらゆるポリマーコンジュゲート脂質を含まない)。

【0899】

#### 核酸(RNAなど)組成物の実施態様

ある実施態様において、1つ以上の付加的脂質は、(1)中性脂質；(2)ステロイド；または(3)中性脂質とステロイドの混合物；の成分の1つを、好ましくはそれぞれ上記の濃度で、含む。ある実施態様において、1つ以上の付加的脂質は、(3)中性脂質とステロイドの混合物を含む(そして好ましくはPEG脂質を含まず、より好ましくはあらゆるポリマーコンジュゲート脂質を含まない)。ある実施態様において、1つ以上の付加的脂質は、(1)リン脂質；(2)コレステロール；(3)リン脂質とコレステロールの混合物；の成分の1つを、好ましくはそれぞれ上記の濃度で、含む。ある実施態様において、1つ以上の付加的脂質は、(3)リン脂質とコレステロールの混合物を含む(そして、好ましくはPEG脂質を含まず、より好ましくはあらゆるポリマーコンジュゲート脂質を含まない)。

【0900】

したがって、好ましい実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、(ii)カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質(特にリン脂質)；および(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)を、好ましくはそれぞれ上記の濃度で、含む。特定の実施態様(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様)において、カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質は、約40mol%～約70mol%(例えば約45mol%～約65mol%または約50mol%～約60mol%)の濃度で存在し；ステロイドは、約15～約40molパーセント(例えば、約20mol%～約35mol%または約20mol%～約30mol%)の濃度で存在し；中性脂質(特にリン脂質)は、約15～約25molパーセント(例えば、約17mol%～約21mol%)の濃度で存在し；そして多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1：2、好ましくは少なくとも約2：3、例えば少なくとも約4：3である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；そして中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択される。ある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は最大2.5であり、好ましくは前記比は1～2.5である。ある実施態様において、無機ポリリン酸は線形無機ポリリン酸(線形無機三リン酸など)である。ある実施態様において、無機ポリリン酸は、式 $[P_xO_{(3x+1)}]^y$ を含み、式中、xは整数であり、少なくとも2、好ましくは少なくとも3であり；そしてyはアニオン電荷である。ある実施態様において、無機ポリリン酸は、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。好ましくは、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸は三リン酸である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択され；そして無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、好ましくは無機ポリリン酸は三リン酸である。ある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は最大2.5であり、好ましくは前記比は1～2.5である。

【0901】

いくつかの他の具体的な実施態様(特に、イオン化可能脂質と中性脂質の相対量が少な

く、ステロイドの相対量が多い実施態様)において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(特にmRNA組成物)は、(ii)カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質；(iii)ステロイド；(iv)中性脂質(特にリン脂質)；および(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)を含み、ここで、カチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質は、約20mol%～約40mol%(例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%)の濃度で存在し；ステロイドは、約35mol%～約60mol%(例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%)の濃度で存在し；中性脂質(特にリン脂質)は、約5mol%～約15mol%(例えば約7mol%～約14mol%)の濃度で存在し；そして多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオン性またはカチオンのにイオン化可能な脂質とのモル比は、少なくとも約1：2、好ましくは少なくとも約2：3、例えば少なくとも約4：3である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；そして中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPPEからなる群から選択される。ある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。ある実施態様において、無機ポリリン酸は線形無機ポリリン酸(線形無機三リン酸など)である。ある実施態様において、無機ポリリン酸は、式 $[P_xO_{(3x+1)}]^-y$ を含み、式中、xは整数であり、少なくとも2、好ましくは少なくとも3であり；そしてyはアニオン電荷である。ある実施態様において、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、例えば、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。好ましくは、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸は三リン酸である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPPEからなる群から選択され；そして無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、好ましくは無機ポリリン酸は三リン酸である。ある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。

10

20

#### 【0902】

核酸(RNAなど)組成物の上記の実施態様(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様、またはイオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少ない、ステロイドの相対量が多い実施態様)のいくつかにおいて、これらの核酸組成物は、PEGを含む脂質を実質的に含まない(例えば、PEGを含む化合物を実質的に含まない、PEGを実質的に含まない、またはポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない)。これらの実施態様において、多価アニオンは、本明細書で定義されるとおりであり得る(例えば、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される)。

30

#### 【0903】

N/P値は好ましくは少なくとも約4である。ある実施態様において、N/P値は4～20、4～12、4～10、4～8または5～7の範囲である。ある実施態様において、N/P値は約6である。

40

#### 【0904】

ある実施態様において、核酸(RNAなど)は、約1mg/l～約500mg/l、例えば約1mg/l～約100mg/l、約5mg/l～約100mg/l、または約10mg/l～約100mg/lの濃度で、本明細書に記載の核酸組成物(RNA組成物など)中に存在する。ある実施態様、特に核酸組成物が凍結形態である実施態様において、組成物中の核酸濃度は約1mg/l～約50mg/lである。ある実施態様、特に核酸組成物が液体形態である実施態様において、組成物中の核酸濃度は約10mg/l～約100mg/lである。

#### 【0905】

50

核酸(RNA、好ましくはmRNAなど)粒子を含む組成物

本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、核酸粒子(例えば、RNA LNPなどのRNA粒子)、好ましくは複数の核酸粒子(複数のRNA粒子など)を含み得る。用語「複数の核酸粒子」または「複数の核酸-脂質粒子」は、特定の数の粒子の集団を指す。特定の実施態様において、この用語は、 $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、 $10^{21}$ 、 $10^{22}$ または $10^{23}$ またはそれを超える集団を指す。

## 【0906】

本明細書に記載の核酸粒子(例えば、RNA粒子、RNAを含むLNP(または「RNA LNP」)など)は、ある実施態様において、約30nm～約1000nm、約30nm～約800nm、約30nm～約700nm、約30nm～約600nm、約30nm～約500nm、約30nm～約450nm、約30nm～約400nm、約30nm～約350nm、約30nm～約300nm、約30nm～約250nm、約30nm～約200nm、約30nm～約190nm、約30nm～約180nm、約30nm～約170nm、約30nm～約160nm、約30nm～約150nm、約50nm～約500nm、約50nm～約450nm、約50nm～約400nm、約50nm～約350nm、約50nm～約300nm、約50nm～約250nm、約50nm～約200nm、約50nm～約190nm、約50nm～約180nm、約50nm～約170nm、約50nm～約160nmまたは約50nm～約150nmの範囲の平均直径を有する。

## 【0907】

特定の実施態様において、本明細書に記載の核酸粒子(例えば、RNA LNPなどのRNA粒子)は、約40nm～約800nm、約50nm～約700nm、約60nm～約600nm、約70nm～約500nm、約80nm～約400nm、約150nm～約800nm、約150nm～約700nm、約150nm～約600nm、約200nm～約600nm、約200nm～約500nmまたは約200nm～約400nmの範囲の平均直径を有する。

## 【0908】

特定の実施態様において、本明細書に記載の核酸粒子(例えばRNA LNPなどのRNA粒子)は、ある実施態様において、約30nm～約500nm、例えば約30nm～約200nm、または約50nm～約150nmの範囲の平均直径を有し得る。

## 【0909】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、4000/ml未満、好ましくは最大3500/ml、例えば最大3400/ml、最大3300/ml、最大3200/ml、最大3100/mlまたは最大3000/mlの量で、少なくとも10 $\mu$ mのサイズを有する粒子を含む。

## 【0910】

複数の粒子が、前記範囲の任意のフラクションまたはその中の任意の範囲で含まれ得ることは、当業者には明らかである。

## 【0911】

本明細書に記載の核酸粒子(例えばRNA LNPなどのRNA粒子)は、例えば本明細書に記載の方法によって製造され、約0.5未満、約0.4未満、約0.3未満、約0.2未満、約0.1未満、または約0.05またはそれより小さい多分散性指数を示す。例として、核酸粒子(RNA LNPなど)は、約0.05～約0.2、例えば約0.05～約0.1の範囲の多分散性指数を示すことができる。

## 【0912】

一般に、本明細書に記載の核酸粒子(例えばRNA LNPなどのRNA粒子)は、核酸を目的の標的部位(例えば、細胞、組織、臓器など)に送達するために使用できる「核酸-脂質粒子」(例えば「RNA-脂質粒子」)である。核酸-脂質粒子は、典型的には、カチオン性またはカチオンのイオン化可能な脂質(例えば、本明細書に開示されるカチオン

10

20

30

40

50

性またはカチオンの的にイオン化可能な脂質)、1つ以上の付加的脂質(例えば、本明細書に開示されるリン脂質(例えばDSPC)およびステロイド(例えばコレステロールまたはその類似体))、および本明細書に開示される多価アニオン(無機ポリリン酸など)(例えば、多価アニオンは、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物などの無機ポリリン酸、好ましくは三リン酸であってよく、あるいは多価アニオンは、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物であってよい)から形成される。

#### 【0913】

いかなる理論に拘束されることを願わないが、カチオン性またはカチオンの的にイオン化可能な脂質および1つ以上の付加的脂質は、核酸(RNAなど)と一緒に粒子を形成し、この粒子は、多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物)の添加により(多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物)が粒子の表面に結合することにより、粒子の表面電荷を中和するか、あるいはアニオン性粒子を形成することにより)コロイド的に安定になり、ここで核酸は脂質マトリックスに結合している、と考えられる。

10

#### 【0914】

ある実施態様において、核酸-脂質粒子(RNA-脂質粒子など)は、1つを超えるタイプの核酸分子(1つを超えるタイプのRNA分子など)を含み、ここで、核酸分子の分子パラメータは、モル質量または分子構造、キャッピング、コード領域もしくは他の特徴などの基本構造要素に関して等、互いに類似してよく異なってよい。

20

#### 【0915】

ある実施態様(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様)において、核酸-脂質粒子(例えば、RNA-LNPなどのRNA-脂質粒子)は、(i)核酸に加えて、(ii)粒子中に存在する総脂質の約40mol%~約70mol%(例えば約25mol%~約40mol%または約25mol%~約35mol%)を構成し得るカチオン性またはカチオンの的にイオン化可能な脂質；(iii)粒子中に存在する総脂質の約15mol%~約40mol%(例えば約20mol%~約35mol%または約20mol%~約30mol%)を構成し得るステロイド；(iv)粒子中に存在する総脂質の約15mol%~約25mol%(例えば約7mol%~約14mol%)を構成し得る中性脂質；および(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)を含み、ここで多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオン性またはカチオンの的にイオン化可能な脂質とのモル比が、少なくとも約1:2、好ましくは少なくとも約2:3、例えば少なくとも約4:3である。ある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は最大2.5であり、好ましくは前記比は1~2.5である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；そして中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択される。上記の実施態様のいずれかにおいて、多価アニオンは、本明細書に開示されているとおりであり得て、例えば、無機ポリリン酸または無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物であり得る。例えば、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され得る。好ましくは、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸は三リン酸である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択され；そして無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、好ましくは無機ポリリン酸は三リン酸である。

30

40

#### 【0916】

いくつかの他の実施態様において、核酸-脂質粒子(例えばRNA-脂質粒子、RNA-LNPなど、例えばmRNA-脂質LNP)は、(i)核酸に加えて、(ii)粒子中に存在す

50

る総脂質の約20mol%～約40mol%(例えば約25mol%～約40mol%または約25mol%～約35mol%)を構成し得るカチオン性またはカチオンのイオン化可能な脂質；(iii)粒子中に存在する総脂質の約35mol%～約60mol%(例えば約40mol%～約60mol%または約45mol%～約60mol%)を構成し得るステロイド；(iv)粒子中に存在する総脂質の約5mol%～約15mol%(例えば約7mol%～約14mol%)を構成し得る中性脂質；および(v)多価アニオン(無機ポリリン酸など)を含み、ここで、多価アニオン(無機ポリリン酸など)とカチオン性またはカチオンのイオン化可能な脂質とのモル比が、少なくとも約1：2、好ましくは少なくとも約2：3、例えば少なくとも約4：3である。ある実施態様において、中性脂質に対するステロイドのモル比は少なくとも3.0であり、好ましくは前記比は3.0～10.0、例えば5.0～7.0である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；そして中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択される。上記の実施態様のいずれかにおいて、多価アニオンは、本明細書に開示されているとおりであり得て、例えば、無機ポリリン酸または無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物であり得る。例えば、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され得る。好ましくは、無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施態様において、無機ポリリン酸は三リン酸である。ある実施態様において、ステロイドはコレステロールであり；中性脂質は、DSPC、DPPC、DSPEおよびDPPEからなる群から選択され；そして無機ポリリン酸は、三リン酸、四リン酸、五リン酸、六リン酸、七リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、好ましくは無機ポリリン酸は三リン酸である。

10

20

#### 【0917】

核酸-脂質粒子(例えばRNA-脂質粒子、RNA LNPなど、例えばmRNA-脂質LNP)の上記の実施態様(特に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない実施態様、またはイオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多い実施態様)のいくつかにおいて、核酸-脂質粒子は、PEG(例えば、PEGを含む化合物を実質的に含まない、PEGを実質的に含まない、またはポリマーコンジュゲート脂質を実質的に含まない)を含む脂質を実質的に含まない。これらの実施態様において、多価アニオンは、本明細書で定義されたとおりであり得て、例えば、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され得る。

30

#### 【0918】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物は液体または固体であり、固体は凍結形態を指す。

#### 【0919】

本発明者らは、核酸と脂質から形成されるが、ステルス脂質(PEG脂質など)を含まない粒子を含む核酸組成物は、粒子が数分または数時間で凝集するため安定ではないことを見出した。驚くべきことに、本発明者らは、本明細書に開示されているとおりの多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸、または無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物)、またはそれらの塩をそのような核酸粒子に添加することにより、安定な組成物が得られることを見出した。実施例6および図5も参照のこと。

40

#### 【0920】

さらに、本出願は、驚くべきことに、多価アニオンを含むことにより、液体または凍結形態でコロイド安定性を有する核酸組成物を得ることが可能であることを示している。したがって、特許請求されている方法によって製造される組成物は、十分な安定性を提供し、製薬実務における通常の技術に準拠した温度範囲で保存でき、すぐに使用できる製造物を提供する。

#### 【0921】

50

さらに、本発明者らは、驚くべきことに、核酸粒子の形成に使用される脂質の量を調節することにより(特に、特定の脂質(すなわち、カチオン性またはカチオンのイオン化可能な脂質および中性脂質)の量を増加させ、他の脂質(すなわち、コレステロール)の量を減少させることにより)、生物学的性能を変化させることができることを見出した：細胞をトランスフェクションするために使用されるとき、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が多く、ステロイドの相対量が少ない核酸組成物は、血清の非存在下でトランスフェクションを実施するときに得られる発現と比較して、血清の存在下でトランスフェクションを実施するときにトランスフェクトされた細胞における核酸の高い発現をもたらす。対照的に、イオン化可能な脂質および中性脂質の相対量が少なく、ステロイドの相対量が多く、細胞をトランスフェクションするために使用される核酸組成物は、トランスフェクションを血清の存在下で実施するときにトランスフェクトされた細胞における核酸の同等または低い発現をもたらす(すなわち、これらの組成物は、血清阻害をいくらか示すかまたは全く示さないが、血清刺激を示さない)。

10

#### 【0922】

粒子(LNPなど)のサイズ( $Z$ 平均)に関して本明細書で使用する表現「本質的に等しい」は、プロセッシング工程後(例えば凍結／融解サイクル後)の組成物中に含まれる粒子のサイズ( $Z$ 平均)値が、プロセッシング工程前(例えば凍結／解凍サイクル前)の粒子のサイズ( $Z$ 平均)値 $\pm 30\%$ (好ましくは $\pm 25\%$ 、より好ましくは $\pm 24\%$ 、例えば $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 1\%$ )に対応することを意味する。例えば、凍結／解凍サイクルにまだ付されていない組成物に含まれる粒子(LNPなど)のサイズ( $Z$ 平均)値が90nmであり、凍結／解凍サイクルに付された組成物に含まれる粒子(LNPなど)のサイズ( $Z$ 平均)の値が115nmであるならば、凍結／解凍サイクル後、すなわち、凍結組成物解凍後の粒子のサイズ( $Z$ 平均)は、凍結／解凍サイクル前、すなわち組成物の凍結前の粒子のサイズ( $Z$ 平均)に本質的に等しいと考えられる。粒子(LNPなど)のサイズ分布またはPDIに関して本明細書で使用する表現「本質的に等しい」は、それに応じて解釈される。例えば、凍結／解凍サイクルにまだ付されていない組成物に含まれる粒子(LNPなど)のPDI値が0.30であり、凍結／解凍サイクルに付された組成物に含まれる粒子(LNPなど)のPDI値が0.38であるならば、凍結／解凍サイクル後、すなわち凍結組成物解凍後の粒子のPDIは、凍結／解凍サイクル前、すなわち組成物の凍結前の粒子のPDIに本質的に等しいと考えられる。

20

30

#### 【0923】

本明細書に記載の組成物はまた、生成物品質の実質的な低下、および、特に保存および／または凍結中の核酸(RNAなど)活性の実質的な低下を回避するため、例えば凝集、粒子崩壊、核酸(RNAなど)分解および／または他のタイプの損傷を減少または阻止するために、安定化剤として抗凍結剤および／または界面活性剤を含み得る。

#### 【0924】

ある実施態様において、抗凍結剤は炭水化物である。本明細書で使用する用語「炭水化物」は、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖および多糖を指し、これらを包含する。

#### 【0925】

ある実施態様において、抗凍結剤は単糖である。本明細書で使用する用語「単糖」は、より単純な炭水化物単位に加水分解され得ない、単一炭水化物単位(例えば、単糖)を指す。単糖抗凍結剤の例は、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、リボースなどを含む。

40

#### 【0926】

ある実施態様において、抗凍結剤は二糖である。本明細書で使用する用語「二糖」は、グリコシド結合で、例えば1-4結合または1-6結合で結合される2個の単糖単位により形成された化合物または化学部分を指す。二糖は、2個の単糖に加水分解され得る。二糖抗凍結剤の例は、スクロース、トレハロース、ラクトース、マルトースなどを含む。

#### 【0927】

用語「三糖」は、一体となって結合されて1分子を形成する3個の糖を意味する。三糖

50

の例は、ラフィノースおよびメレジトースを含む。

【0928】

ある実施態様において、抗凍結剤はオリゴ糖である。本明細書で使用する用語「オリゴ糖」は、線形、分岐または環状構造を形成するよう、グリコシド結合で、例えば1-4結合または1-6結合で、結合された3〜約15、好ましくは3〜約10単糖単位により形成される化合物または化学部分を指す。オリゴ糖抗凍結剤の例は、シクロデキストリン、ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース、スタキオース、アカルボースなどを含む。オリゴ糖は酸化または還元され得る。

【0929】

ある実施態様において、抗凍結剤は環状オリゴ糖である。本明細書で使用する用語「環状オリゴ糖」は、環状構造を形成するようグリコシド結合で、例えば1-4結合または1-6結合で結合された3〜約15、好ましくは6、7、8、9または10単糖単位により形成される化合物または化学部分を指す。環状オリゴ糖抗凍結剤の例は、 $\alpha$ シクロデキストリン、 $\beta$ シクロデキストリンまたは $\gamma$ シクロデキストリンなどの個別の化合物である環状オリゴ糖を含む。

【0930】

環状オリゴ糖抗凍結剤の他の例は、環状オリゴ糖部分を含むポリマーなどの大型分子構造にシクロデキストリン部分を含む化合物を含む。環状オリゴ糖は酸化または還元され得る、例えば、ジカルボニル形態に酸化される。本明細書で使用する用語「シクロデキストリン部分」は、ポリマーなどの大型分子構造に組み込まれたまたはその一部であるシクロデキストリン(例えば、 $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ シクロデキストリン)ラジカルを指す。シクロデキストリン部分は、直接または任意的リンカーを介して1つ以上の他の部分に結合され得る。シクロデキストリン部分は酸化または還元され得る、例えば、ジカルボニル形態に酸化され得る。

【0931】

炭水化物抗凍結剤、例えば、環状オリゴ糖抗凍結剤は誘導体化炭水化物であり得る。例えば、ある実施態様において、抗凍結剤は、誘導体化環状オリゴ糖、例えば、誘導体化シクロデキストリン、例えば、2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン、例えば、部分的にエーテル化されたシクロデキストリン(例えば、部分的にエーテル化された $\beta$ シクロデキストリン)である。

【0932】

抗凍結剤の例は、多糖である。本明細書で使用する用語「多糖」は、線形、分岐または環状構造を形成するようグリコシド結合で、例えば1-4結合または1-6結合で結合された少なくとも16単糖単位により形成される化合物または化学部分を指し、主鎖構造の一部として多糖を含むポリマーを含む。主鎖において、多糖は線形でも環状でもよい。多糖抗凍結剤の例は、グリコーゲン、アミラーゼ、セルロース、デキストラン、マルトデキストリンなどを含む。

【0933】

ある実施態様において、抗凍結剤は糖アルコールである。本明細書で使用する用語「糖アルコール」は、少なくとも2個の炭素原子および各炭素原子に結合した1個のヒドロキシル基を含む有機化合物を指す。典型的に、糖アルコールは、糖由来であり(例えば、糖の水素化)、水可溶性固体である。本明細書で使用する用語「糖」は、甘味のある、可溶性炭水化物を指す。糖アルコールの例は、エチレングリコール、グリセロール、エリトリトール、トレイトール、アラビトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、ソルビトール、ガラクトール、フシトール、イジトール、イノシトール、ボレミトール、イソマルト、マルチトール、ラクチトール、マルトトリイトール、マルトテトライトールおよびポリグリシトールを含む。ある実施態様において、糖アルコールは式 $\text{HOCCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ (ここで、 $n$ は0〜22(例えば、0、1、2、3または4)を有する)を有するかまたは環状そのバリエーション(形式上環状エーテルをもたらす糖アルコールの脱水に由来する;例えばイソソルビドは、ソルビトールの環状脱水バリエーションである)であ

る。

【0934】

ある実施態様において、抗凍結剤はグリセロールおよび／またはソルビトールである。

【0935】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)は、抗凍結剤としてスクロースを含み得る。理論に拘束されることを願わないが、スクロースは、組成物の凍結保護の促進に機能し、それにより核酸(特にRNA)粒子の凝集を阻止し、組成物の化学および物理的安定性を維持する。ある実施態様は、本開示におけるスクロースの代替抗凍結剤を意図する。代替安定化剤は、グルコース、グリセロールおよびソルビトールを含むが、これらに限定されない。

10

【0936】

好ましい抗凍結剤は、スクロース、グルコース、グリセロール、ソルビトール、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。好ましい実施態様において、抗凍結剤はスクロースおよび／またはグリセロールを含む。より好ましい実施態様において、抗凍結剤はスクロースである。

【0937】

好ましくは、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)は、抗凍結剤を、組成物の総重量に基づき、約 $50 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $1 \text{ osmol/kg}$ (例えば約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $900 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $120 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $800 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $140 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $700 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $160 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $600 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $180 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $500 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ または約 $200 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $400 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ )、例えば、約 $50 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $400 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ (例えば約 $50 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $390 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $60 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $380 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $70 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $370 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $80 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $360 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $90 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $350 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $100 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $340 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $120 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $330 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $140 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $320 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $160 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $310 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ 、約 $180 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ または約 $200 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ ～約 $300 \times 10^{-3} \text{ osmol/kg}$ )の範囲の組成物の浸透圧をもたらす濃度で含む。

20

30

【0938】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)は、好ましくは本明細書に規定される量／濃度で、抗凍結剤としてのスクロースおよび多価アニオン(例えば、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物)を含む。例えば、ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)は、抗凍結剤としてのスクロースおよび多価アニオンとしての線形無機ポリリン酸(好ましくは、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択され、より好ましくは、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される)を、好ましくは本明細書に特定される量／濃度で含む。ある実施態様において、無機ポリリン酸は三リン酸である。

40

【0939】

いくつかの別の実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)は、抗凍結剤を実質的に含まず、例えば、あらゆる抗凍結剤を含まず、多価アニオンとして、無機ポリリン酸、無機リン酸、硫酸、コハク酸、グルタル酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、またはそれらの混合物を含み得る。例えば、いくつかの代わりの実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成

50

物など)は、抗凍結剤を実質的に含まず、例えば、あらゆる抗凍結剤を含まず、線形無機ポリリン酸(好ましくは、三リン酸、四リン酸、五リン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される)を、好ましくは本明細書に特定される量／濃度で含む。ある実施態様において、無機ポリリン酸は三リン酸である。

#### 【0940】

本開示の特定の実施態様は、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)におけるキレート剤の使用を意図する。キレート剤は、金属イオンと少なくとも2個の配位共有結合を形成でき、それにより安定な、水可溶性複合体を形成する化学化合物を指す。理論に拘束されることを願わないが、キレート剤は、遊離二価イオン濃度を低下させ、遊離二価イオンは、そうしなければ、本開示のRNA分解を加速し得る。適当なキレート剤の例は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、EDTAの塩、デフェロキサミンB、デフェロキサミン、ジチオカルブナトリウム、ペニシラミン、ペンテト酸カルシウム、ペンテト酸ナトリウム塩、サクシマー、トリエンチン、ニトリロ三酢酸、trans-ジアミノシクロヘキサン四酢酸(DCTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)およびビス(アミノエチル)グリコールエーテル-N,N',N'-四酢酸を含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、キレート剤はEDTAまたはEDTAの塩である。例示的实施態様において、キレート剤はEDTA二ナトリウム二水和物である。ある実施態様において、EDTAは、濃度約0.05 mM～約5 mM、約0.1 mM～約2.5 mMまたは約0.25 mM～約1 mMである。

10

#### 【0941】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)の水相は、キレート剤を含まない。例えば、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(RNA LNP組成物など)がキレート剤を含むならば、前記キレート剤は、存在するならば、粒子中にのみ存在することが好ましい。

20

#### 【0942】

#### 医薬組成物

本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、治療または予防処置のための医薬組成物または医薬としてまたはその製造のために有用である。

#### 【0943】

本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、任意の適当な医薬組成物の形態で投与され得る。

30

#### 【0944】

用語「医薬組成物」は、好ましくは、薬学的に許容される担体、希釈剤および／または添加物と共に治療的有効剤を含む、組成物を指す。該医薬組成物は、対象への該医薬組成物の投与により、疾患または障害の処置、予防または重症度低減に有用である。本開示の状況において、医薬組成物は、本明細書に記載のRNAを含む。

#### 【0945】

本開示の医薬組成物は1つ以上のアジュバントを含んでよくまたは1つ以上のアジュバントと共に投与してよい。用語「アジュバント」は、免疫応答を延長、増強または加速する化合物に関する。アジュバントは、油エマルジョン(例えば、フロイントアジュバント)、無機化合物(例えばミョウバン)、細菌生成物(例えばボルデテラ・パータシス毒素)または免疫刺激複合体など、雑多な化合物群に関する。アジュバントの例は、LPS、GP96、CpGオリゴデオキシヌクレオチド、増殖因子およびサイトカイン、例えばモノカイン、リンホカイン、インターロイキン、ケモカインを含むが、これらに限定されない。ケモカインはIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、INF $\alpha$ 、INF $\gamma$ 、GM-CSF、LT $\alpha$ であり得る。さらに知られるアジュバントは、水酸化アルミニウム、フロイントアジュバントまたは油、例えばMontanide(登録商標)ISA51であり得る。本開示で使用する他の適当なアジュバントは、リポペプチド、例えばPam3Cysならびに親油性成分、例えばサポニン、トレハロース-6,6-ジベヘナート(TDB)、モノホスホリル

40

50

脂質-A (MPL)、モノミコイルグリセロール (MMG) またはグルコピラノシル脂質アジュバント (GLA) を含む。

【0946】

本開示の医薬組成物は凍結形態または「使用準備済形態」(すなわち、例えば、解凍、再構成または希釈などの処理を何ら行わず、対象にすぐに投与できる形態、特に液体形態)であり得る。故に、保存可能形態の医薬組成物の投与前、この保存可能形態は、使用準備済または投与可能形態へ処理または移行しなければならない。例えば、凍結医薬組成物は解凍しなければならない。使用準備済注射剤は、バイアル、アンプルまたはシリンジなどのコンテナで提供でき、ここで、コンテナは1つ以上の用量を含み得る。

【0947】

ある実施態様において、医薬組成物は凍結形態であり、約 $-90^{\circ}\text{C}$ 以上、例えば約 $-90^{\circ}\text{C}$ ~約 $-10^{\circ}\text{C}$ で保存できる。例えば、本明細書に記載の凍結医薬組成物(例えば、第二、第三もしくは第六の態様の方法によって製造した凍結組成物、または第一、第五、第八、第九もしくは第十の態様の凍結組成物)は、約 $-90^{\circ}\text{C}$ ~約 $-10^{\circ}\text{C}$ の範囲の温度で、例えば約 $-90.5^{\circ}\text{C}$ ~約 $-40^{\circ}\text{C}$ または約 $-40^{\circ}\text{C}$ ~約 $-25^{\circ}\text{C}$ または約 $-25^{\circ}\text{C}$ ~約 $-10^{\circ}\text{C}$ の範囲の温度で、または約 $-20^{\circ}\text{C}$ の温度で保存できる。

【0948】

凍結形態の医薬組成物のある実施態様において、医薬組成物は、少なくとも1週間、例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1カ月、少なくとも2カ月、少なくとも3カ月、少なくとも6カ月、少なくとも12カ月、少なくとも24カ月、または少なくとも36カ月、好ましくは少なくとも4週間保存され得る。例えば、凍結医薬組成物は、 $-20^{\circ}\text{C}$ で少なくとも4週間、好ましくは少なくとも1カ月、より好ましくは少なくとも2カ月、より好ましくは少なくとも3カ月、より好ましくは少なくとも6カ月保存され得る。

【0949】

凍結形態の医薬組成物のある実施態様において、凍結医薬組成物解凍後の核酸(RNAなど)完全性は、例えば、凍結組成物解凍後、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または実質的に100%であり、それは、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存されている(少なくとも1週間、例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月、少なくとも24ヶ月、または少なくとも36ヶ月、好ましくは少なくとも4週間)。

【0950】

ある実施態様において、医薬組成物の最初の核酸完全性(最初のRNA完全性など)(すなわち、準備の後、冷凍する前である)は少なくとも50%であり、凍結組成物解凍後の組成物の核酸(RNAなど)完全性は、最初の核酸完全性(最初のRNA完全性など)の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、さらに好ましくは少なくとも98%、より好ましくは実質的に100%である。

【0951】

凍結形態の医薬組成物のある実施態様において、凍結医薬組成物解凍後の粒子のサイズ( $Z$ 平均)および/またはサイズ分布および/またはPDIは、凍結前の粒子のサイズ( $Z$ 平均)および/またはサイズ分布および/またはPDIと本質的に等しい。例えば、使用準備済医薬組成物が本明細書に記載する凍結医薬組成物から製造されるとき、使用準備済医薬組成物に含まれる粒子のサイズ( $Z$ 平均)および/またはサイズ分布および/またはPDIは、凍結前の凍結医薬組成物に含まれる(例えば第二態様の方法の工程(I)で製造される製剤に含まれる)粒子のサイズ( $Z$ 平均)および/またはサイズ分布および/またはPDIと本質的に等しいのが好ましい。

【0952】

ある実施態様において、1回の凍結/解凍サイクル後、好ましくは2回の凍結/解凍サイクル後、より好ましくは3回の凍結/解凍サイクル後、より好ましくは4回の凍結/解

10

20

30

40

50

凍サイクル後、さらに好ましくは5回以上の凍結／解凍サイクル後の医薬組成物の核酸(RNAなど)粒子サイズおよび核酸(RNAなど)完全性は、最初の医薬組成物(すなわち、医薬組成物が最初に凍結される前)の核酸(RNAなど)粒子サイズおよび核酸(RNAなど)完全性と本質的に等しい。

【0953】

ある実施態様において、医薬組成物は液体形態であり、約0℃～約20℃の温度範囲で保存できる。例えば、本明細書に記載の液体医薬組成物(例えば第二、第四もしくは第七の態様の方法によって製造した液体組成物、または第一、第五、第八、第九もしくは第十の態様の液体組成物)は、約1℃～約15℃、例えば約2℃～約10℃または約2℃～約8℃または約5℃の範囲の温度で保存できる。

10

【0954】

液体形態の医薬組成物のある実施態様において、医薬組成物は、少なくとも1週間、例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1カ月、少なくとも2カ月、少なくとも3カ月、少なくとも6カ月、少なくとも12カ月または少なくとも24カ月、好ましくは少なくとも4週間保存できる。例えば、液体医薬組成物は、5℃で少なくとも4週間、好ましくは少なくとも1カ月、より好ましくは少なくとも2カ月、より好ましくは少なくとも3カ月、より好ましくは少なくとも6カ月保存できる。

【0955】

液体形態の医薬組成物のある実施態様において、液体組成物の核酸(RNAなど)の完全性は、例えば0℃以上で少なくとも1週間保存したとき、所望の効果をもたらす、例えば免疫応答を誘導することが達成され得るようなものである。例えば、液体組成物の核酸(RNAなど)完全性は、例えば0℃以上で少なくとも1週間(例えば、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、または少なくとも6ヶ月)保存したとき、最初の組成物の核酸(RNAなど)完全性、すなわち組成物が保存される前の核酸(RNAなど)完全性と比較して、少なくとも90%である。ある実施態様において、少なくとも4週間(例えば、少なくとも3ヶ月間)、好ましくは約2℃～約8℃のような0℃以上の温度で保存した後の組成物の核酸(RNAなど)の完全性は、保存前の核酸(RNAなど)の完全性と比較して、少なくとも90%である。

20

【0956】

ある実施態様において、医薬組成物の最初の核酸完全性(最初のRNA完全性など)(すなわち、製造後であるが、保管前)は少なくとも50%であり、好ましくは0℃以上、例えば約2℃～約8℃の温度で少なくとも1週間(例えば少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月または少なくとも3ヶ月)保存後の医薬組成物の核酸(RNAなど)完全性(最初のRNA完全性など)は、最初の核酸完全性(最初のRNA完全性など)の少なくとも90%である。

30

【0957】

液体形態の医薬組成物のある実施態様において、医薬組成物の粒子のサイズ(Z平均)(および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI))は、例えば、0℃以上で少なくとも1週間保存したとき、所望の効果をもたらす、例えば、免疫応答を誘導することが達成され得るようなものである。例えば、医薬組成物の粒子のサイズ(Z平均)(および／またはサイズ分布および／または多分散性指数(PDI))は、例えば、0℃以上で少なくとも1週間保存したとき、最初の医薬組成物の粒子のサイズ(Z平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)、すなわち保存前のサイズ(Z平均)(および／またはサイズ分布および／またはPDI)に本質的に等しい。ある実施態様において、医薬組成物の保存後、例えば0℃以上で少なくとも1週間保存後の粒子のサイズ(Z平均)は、約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmである。ある実施態様において、医薬組成物の保存後、例えば0℃以上で少なくとも1週間保存後の粒子のPDIは、0.3未満、好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満である。ある実施態様において、医薬組成物の保存後、例えば0℃以上

40

50

で少なくとも1週間保存後の粒子のサイズ( $Z$ 平均)は、約50nm～約500nm、好ましくは約40nm～約200nm、より好ましくは約40nm～約120nmであり、医薬組成物の保存後、例えば0℃以上で少なくとも1週間保存後の粒子のサイズ( $Z$ 平均)(および/またはサイズ分布および/またはPDI)は、保存前の粒子のサイズ( $Z$ 平均)(および/またはサイズ分布および/またはPDI)と本質的に等しい。ある実施態様において、医薬組成物の保存後、例えば0℃以上の温度で少なくとも1週間保存後の粒子のサイズ( $Z$ 平均)は、約50nm～約500nmであり、好ましくは約40nm～約200nmであり、より好ましくは約40nm～約120nmであり、医薬組成物の保存、例えば0℃以上の温度で少なくとも1週間保存後の粒子のPDIは、0.3未満(好ましくは0.2未満、より好ましくは0.1未満)である。

10

#### 【0958】

本開示による医薬組成物は、一般に「薬学的に有効な量」でおよび「薬学的に許容される製剤」で適用される。

#### 【0959】

用語「薬学的に許容される」は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない物質の非毒性を指す。

#### 【0960】

用語「薬学的に有効量」は、単独でまたはさらなる用量で所望の反応または所望の効果を達成する量を指す。特定の疾患の処置の場合、所望の反応は、好ましくは疾患の経過の阻止を指す。これは、疾患進行の減速および、特に、疾患進行の中断または逆転を含む。疾患の処置における所望の反応は、該疾患もしくは該状態の発症の遅延または発症の予防でもあり得る。本明細書に記載する粒子または医薬組成物の有効量は、処置する状態、疾患重症度、年齢、生理学的状態、体格および体重を含む患者の個々のパラメータ、付随する治療(存在するならば)のタイプ、具体的投与経路および類似の因子に依存する。したがって、本明細書に記載する粒子または医薬組成物を投与する用量は、種々のこのようなパラメータに依存し得る。患者における反応が、最初の用量で不十分であるならば、高用量(または異なる、より局在的な投与経路により達成される効率的に高用量)が使用され得る。

20

#### 【0961】

具体的実施態様において、本開示の医薬組成物(例えば、免疫原性組成物、すなわち、免疫応答の誘導に使用できる医薬組成物)は、コンテナ、例えば、バイアルに1回用量として製剤化できる。ある実施態様において、免疫原性組成物は、バイアルに多回用量製剤として製剤化できる。ある実施態様において、多回用量製剤は、バイアルあたり少なくとも2回用量含む。ある実施態様において、多回用量製剤は、バイアルあたり計2～20回用量、例えば、バイアルあたり2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回または12回用量含む。ある実施態様において、バイアルにおける各用量は体積が等しい。ある実施態様において、第一用量は、その後の用量と異なる体積である。

30

#### 【0962】

「安定な」多回用量製剤は、好ましくは許容されないレベルの微生物増殖を示さず、活性生物学的分子成分の破壊または分解が実質的にないまたはない。本明細書で使用する「安定な」免疫原性組成物は、対象に投与したとき所望の免疫学的応答を誘導できるままである製剤を含む。

40

#### 【0963】

本開示の医薬組成物は、緩衝液(特に、医薬組成物製造に用いた核酸(RNAなど)組成物由来)、防腐剤および所望により他の治療剤を含む。ある実施態様において、本開示の医薬組成物、特に使用準備済医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤および/または添加物を含む。

#### 【0964】

本開示の医薬組成物における使用に適当な防腐剤は、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンおよびチメロサルを含むが、これらに限定されない。

50

## 【0965】

本明細書で使用する用語「添加物」は、本開示の医薬組成物に存在し得るが、活性成分ではない物質を指す。添加物の例は、担体、結合剤、希釈剤、滑沢剤、増粘剤、表面活性剤、防腐剤、安定化剤、乳化剤、緩衝液、風味剤または着色剤を含むが、これらに限定されない。

## 【0966】

「薬学的に許容される塩」は、例えば、塩酸、酢酸、乳酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸(HEPES)または安息香酸などの薬学的に許容される酸を使用して形成され得る、例えば、酸付加塩を含む。さらに、適当な薬学的に許容される塩は、アルカリ金属塩(例えば、ナトリウムまたはカリウム塩)；アルカリ土類金属塩(例えば、カルシウムまたはマグネシウム塩)；アンモニウム( $\text{NH}_4^+$ )；および適当な有機リガンド(例えば、4級アンモニウムおよびアミンカチオン)と形成される塩を含み得る。薬学的に許容される塩の説明的例は、先行文献に見ることができる；例えば、S. M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66, pp. 1-19 (1977)参照。薬学的に許容されない塩を、薬学的に許容される塩の製造に使用する可能性があり、本開示に含まれる。

10

## 【0967】

用語「希釈剤」は、希釈および／または薄化剤に関する。さらに、用語「希釈剤」は、任意の1つ以上の流体、液体または固体懸濁液および／または混合媒体を含む。適当な希釈剤の例は、エタノールおよび水を含む。

20

## 【0968】

用語「担体」は、活性成分が医薬組成物の投与を容易にする、増強するまたは可能にするために組み合わせされている、天然、合成、有機、無機であり得る成分を指す。本明細書で使用する担体は、対象への投与に適する、1つ以上の適合性固体または液体充填剤、希釈剤または封入物質であり得る。適当な担体は、無菌水、リンゲル、乳酸リンゲル、無菌塩化ナトリウム溶液、等張食塩水、ポリアルキレングリコール、水素化ナフタレンおよび、特に、生体適合性ラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドコポリマーまたはポリオキシエチレン／ポリオキシプロピレンコポリマーを含むが、これらに限定されない。

## 【0969】

治療用途のための薬学的に許容される担体、添加物または希釈剤は医薬分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載される。

30

## 【0970】

医薬担体、添加物または希釈剤は、意図する投与経路および標準薬務に関連して選択され得る。

## 【0971】

医薬組成物の投与経路

ある実施態様において、本明細書に記載する医薬組成物または使用準備済医薬組成物などの明細書に記載の組成物は、静脈内、動脈内、皮下、皮内、経皮、リンパ節内、筋肉内または腫瘍内投与され得る。特定の実施態様において、(医薬)組成物は、局所投与または全身投与のために製剤化される。全身投与は、消化管を介する吸収を含む経腸投与または非経腸投与を含み得る。本明細書で使用する「非経腸投与」は、静脈内注射によってなど、消化管を介する以外の何らかの方法での投与を指す。好ましい実施態様において、(医薬)組成物、特に使用準備済医薬組成物は、全身投与のために製剤化される。他の好ましい実施態様において、全身投与は静脈内投与による。他の好ましい実施態様において、(医薬)組成物、特に使用準備済医薬組成物は、筋肉内投与用に製剤化される。

40

## 【0972】

医薬組成物の使用

本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、種々の疾患、特に対象へのペプチドまた

50

はタンパク質の提供が治療または予防効果をもたらす疾患の治療または予防処置に使用され得る。例えば、ウイルス由来の抗原またはエピトープの提供は、該ウイルスにより引き起こされるウイルス疾患の処置または予防に有用であり得る。腫瘍抗原またはエピトープの提供は、がん細胞が該腫瘍抗原を発現するがん疾患の処置に有用であり得る。機能的タンパク質または酵素の提供は、例えば、リソソーム蓄積症(例えばムコ多糖症)または因子欠乏症における、タンパク質機能不全により特徴づけられる遺伝子障害の処置に有用であり得る。サイトカインまたはサイトカイン-融合体の提供は、腫瘍微小環境の調節に有用であり得る。

#### 【0973】

用語「疾患」(本明細書では「障害」とも称する)は、個体の体に影響する異常状態を指す。疾患は、しばしば特異的症状および徴候を伴う医学的状态として解釈される。疾患は、感染性疾患などの外的源に端を発する因子により引き起こされ得るかまたは自己免疫性疾患など内部機能不全により引き起こされ得る。ヒトにおいて、「疾患」は、しばしばより広義に使用され、罹患個体の疼痛、機能不全、窮迫、社会問題または死亡を引き起こすまたは該個体と接触した者に類似の問題を引き起こすあらゆる状態を指す。広い意味で、傷害、能力障害、障害、症候群、感染、単離症状、逸脱行動および構造および機能の非定型バリエーションを含むことがあり、一方他の文脈および他の目的で、区別可能なカテゴリーと考えられ得る。疾患は、通常、多くの疾患への罹患およびそれを抱えて生きることは、人生観および人格を変え得るため、身体的だけでなく、感情的にも個体に影響する。

#### 【0974】

用語「感染性疾患」は、個体から個体または生物から生物に伝播され得て、微生物因子により引き起こされるあらゆる疾患を指す。感染症は当分野で知られ、例えば、それぞれウイルス、細菌および寄生虫により引き起こされる疾患であるウイルス疾患、細菌疾患または寄生虫疾患を含む。これに関して、感染性疾患は、例えば、性感染疾患(例えば、クラミジア、淋菌または梅毒)、SARS、後天性免疫不全症候群(AIDS)、麻疹、水痘、サイトメガロウイルス感染、性器ヘルペス、肝炎(例えばB型肝炎またはC型肝炎)、インフルエンザ(ヒトインフルエンザ、ブタインフルエンザ、イヌインフルエンザ、ウマインフルエンザおよびトリインフルエンザなどのインフルエンザ)、HPV感染、带状疱疹、狂犬病、一般的な風邪、胃腸炎、風疹、ムンプス、炭疽、コレラ、ジフテリア、食中毒、ハンセン病、髄膜炎、消化性潰瘍疾患、肺炎、敗血症、敗血症性ショック、破傷風、結核、腸チフス、尿路感染、ライム病、ロッキーマウンテン紅斑熱、クラミジア、百日咳、破傷風、髄膜炎、猩紅熱、マラリア、トリパノソーマ症、シャーガス病、リーシュマニア症、トリコモナス症、二核アメーバ症、ジアルジア症、アメーバ赤痢、コクシジウム症、トキソプラズマ症、肉孢子虫症、リノスポリジウム症およびバランチジウム症を含む。

#### 【0975】

ある実施態様において、本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物は、感染性疾患の治療または予防処置に使用され得る。

#### 【0976】

本文脈において、用語「処置」、「処置する」または「治療介入」は、疾患または障害などの状態と闘う目的での、対象の管理および介護に関する。本用語は、対象が罹患しているある状態の処置、例えば、症状または合併症軽減のための治療的有效化合物の投与、疾患、障害または状態の進行遅延、症状および合併症の軽減または緩和および／または疾患、障害または状態の治療または排除ならびに状態の予防までの処置の全範囲を含み、ここで、予防は、疾患、状態または障害と戦う目的での個体の管理および介護であり、症状または合併症の発症を予防するための活性化合物の投与を含むと理解される。

#### 【0977】

用語「治療処置」は、個体の健康状態を改善するおよび／または余命を延長(増加)するあらゆる処置に関する。該処置は、個体における疾患の排除、個体における疾患進展の停止または減速、個体における疾患進展の阻止または減速、個体における症状の頻度または重症度の低減および／または現在または過去に疾患を有した個体における再発減少であり

10

20

30

40

50

得る。

【0978】

用語「予防処置」または「予防的処置」は、個体で疾患が発症するのを予防することを意図したあらゆる処置に関する。用語「予防処置」または「予防的処置」は本明細書では相互交換可能に使用する。

【0979】

用語「個体」および「対象」は本明細書では相互交換可能に使用する。ヒトまたは他の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマまたは霊長類)または鳥類(ニワトリ)、魚または疾患または障害(例えば、がん、感染症)に罹患し得るまたは疑われるが、疾患または障害を有するか有しない可能性があるかまたはワクチン接種などの予防介入の必要があり得るかまたはタンパク質補充によるなどの介入が必要であり得るあらゆる他の動物種を含む、あらゆる他の非哺乳動物を指す。多くの実施態様において、個体はヒトである。特に断らない限り、用語「個体」および「対象」は特定の年齢を意味せず、故に成人、高齢者、小児および新生児を含む。本開示の実施態様において、「個体」または「対象」は「患者」である。

【0980】

用語「患者」は、処置のための個体または対象、特に罹患個体または対象を意味する。

【0981】

本開示のある実施態様において、目的は、ワクチン接種により感染性疾患に対する保護を提供することである。

【0982】

本開示のある実施態様において、目的は、対象、特にそれを必要とする対象に分泌型治療用タンパク質、例えば抗体、二特異的抗体、サイトカイン、サイトカイン融合タンパク質、酵素を提供することである。

【0983】

本開示のある実施態様において、目的は、対象、特にそれを必要とする対象へのタンパク質補充治療、例えば、エリスロポエチン、第VII因子、フォン・ヴィレブランド因子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルファ-N-アセチルグルコサミニダーゼの産生を提供することである。

【0984】

本開示のある実施態様において、目的は血液における免疫細胞を調節／再プログラムすることである。

【0985】

本開示(特に阻害性RNAに関するもの)のある実施態様において、目的はペプチドまたはポリペプチドの発現(例えば標的mRNAの転写および／または翻訳)を減少または阻害することである。ある実施態様において、標的mRNAは、発現(特に、例えば、健常対象における発現と比較して増加した発現)は疾患と関連する薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。ある実施態様において、標的mRNAは、発現(特に、例えば、健常対象における発現と比較して増加した発現)はがんと関連する薬学的活性ペプチドまたはポリペプチドをコードするORFを含む。

【0986】

ある実施態様において、SARS-CoV-2 Sタンパク質、その免疫原性バリエーションまたはSARS-CoV-2 Sタンパク質もしくはその免疫原性バリエーションの免疫原性フラグメントをコードする核酸(RNAなど)を含む本明細書に記載の核酸(RNAなど)組成物(以下、単に「SARS-CoV-2 S核酸組成物」とし、SARS-CoV-2 S RNA組成物を明示的に含む)は、対象への投与後、SARS-CoV-2 Sタンパク質バリエーション、特に天然に存在するSタンパク質バリエーションなどの種々のSタンパク質バリエーションの一群を標的とする抗体応答、特に中和抗体応答を対象で誘導する。ある実施態様において、種々のSタンパク質バリエーションの一群は、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個またはそれ以上のSタンパク質バリエーションを含む。ある実

10

20

30

40

50

施態様において、このようなSタンパク質バリエーションは、RBDドメイン内にアミノ酸修飾を有するバリエーションおよび／またはRBDドメイン外にアミノ酸修飾を有するバリエーションを含む。ある実施態様において、本明細書に記載のSARS-CoV-2 S核酸組成物は、対象への投与後、VOC-202012/01を標的とする対象における免疫応答(細胞応答および／または抗体応答、特に中和抗体応答)を誘導する。

【0987】

ある実施態様において、本明細書に記載のSARS-CoV-2 S核酸組成物は、対象への投与後、501.V2を標的とする対象における免疫応答(細胞応答および／または抗体応答、特に中和抗体応答)を誘導する。

【0988】

ある実施態様において、本明細書に記載のSARS-CoV-2 S核酸組成物は、対象への投与後、「クラスター5」を標的とする対象における免疫応答(細胞応答および／または抗体応答、特に中和抗体応答)を誘導する。

【0989】

ある実施態様において、本明細書に記載のSARS-CoV-2 S核酸組成物は、対象への投与後、「B.1.1.28」を標的とする対象における免疫応答(細胞応答および／または抗体応答、特に中和抗体応答)を誘導する。

【0990】

ある実施態様において、本明細書に記載のSARS-CoV-2 S核酸組成物は、対象への投与後、「B.1.1.248」を標的とする対象における免疫応答(細胞応答および／または抗体応答、特に中和抗体応答)を誘導する。

【0991】

ある実施態様において、本明細書に記載のSARS-CoV-2 S核酸組成物は、対象への投与後、Omicron(B.1.1.529)変異体を標的とする対象における免疫応答(細胞応答および／または抗体応答、特に中和抗体応答)を誘導する。

【0992】

免疫療法およびワクチン接種の原理の1つは、疾患に対する免疫保護的反応が、処置する疾患と免疫学的に関連する抗原またはエピトープで免疫化した対象により産生されとの事実に基づくことを当業者は知っている。したがって、本明細書に記載する医薬組成物は、免疫応答の誘導または増強に適用可能である。故に、本明細書に記載する医薬組成物は、抗原またはエピトープが関与する疾患の予防および／または治療処置に有用である。

【0993】

用語「免疫化」または「ワクチン接種」は、例えば、治療または予防上の理由のため、免疫応答の誘導の目的で個体に抗原を投与する過程を指す。

【0994】

本明細書での文献および研究論文の引用は、これらの何れかが適切な先行文献であることを認めることを意図しない。これらの文献の内容についての記載は、出願人が入手可能な情報に基づき、これらの文献の内容の正確性について何ら承認するものではない。

【0995】

記載(次の実施例を含む)は、当業者が種々の実施態様を製造および使用することを可能とするものである。具体的デバイス、技術および適用の記載は、単なる例として提供する。本明細書に記載する実施例への種々の修飾が当業者には容易に明らかであり、本明細書に定義する一般的原理を、種々の実施態様の精神および範囲から逸脱することなく他の例および適用に適用し得る。故に、種々の実施態様は、本明細書に記載し、示す例に限定する意図はなく、特許請求の範囲に一致すべきである。

【実施例】

【0996】

材料

以下の材料は実験に使用され、下表に示す各サプライヤーから入手したものである。

10

20

30

40

50

【表 6】

| 溶剤／化学物質／溶液         | サプライヤー                          |
|--------------------|---------------------------------|
| 無水エタノール            | Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ         |
| 塩酸、37%             | Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ         |
| 酢酸 100%            | Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ         |
| 三リン酸五ナトリウム         | Sigma-Aldrich、ミズーリ、米国           |
| スクロース              | Sigma-Aldrich、ミズーリ、米国           |
| 水酸化ナトリウム水溶液 2 M    | Sigma-Aldrich、ミズーリ、米国           |
| dH2O               | Arrium(登録商標)mini Ultrapureにより生成 |
| トリス                | Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ         |
| ヒト男性AB血清           | Sigma-Aldrich、ミズーリ、米国           |
| Beetle Lysis Juice | PJK GmbH、ドイツ                    |

10

【表 7】

| キット             | サプライヤー             |
|-----------------|--------------------|
| ルシフェラーゼアッセイシステム | Promega、フィッチバーグ、米国 |

20

30

40

50

【表 8】

| 品目                                   | サプライヤー                               |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 2ml — 2R注射バイアル                       | APG Europe、ウイトーン、ドイツ                 |
| Slide-A-Lyzer™透析カセット、10K MWCO、3ml    | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国 |
| 1.0および2.0ml DeepWell™ プレート           | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国 |
| Nunc 96ウェルフラットボトム、透明                 | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国 |
| Nunc 96ウェルフラットボトム、白色                 | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国 |
| マイクロプレート、96ウェル、PS、Fボトム(HT-DLS用透明ボトム) | Greiner bio-one、フリッケンハウゼン、ドイツ        |
| 滅菌PESシリンジフィルター(0.2 μm)               | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国 |
| 細胞培養フラスコ                             | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国 |
| ピペッティングチップ                           | BRAND GMBH + CO KG、ヴェルトハイム、ドイツ       |
| シリンジ                                 | BD、ハイデルベルク、ドイツ                       |
| 15mlおよび50mlコニカル滅菌ポリプロピレン遠心チューブ       | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国 |
| 滅菌マイクロ遠心チューブ1.5 ml                   | Eppendorf、ハンブルグ、ドイツ                  |
| GREEN CHOICE 96 300 μlチップ            | INTEGRA Biosciences、Zizers、スイス       |

10

20

【表 9】

| 品目                  | サプライヤー                                       |
|---------------------|----------------------------------------------|
| DMEM/F12 + GlutaMAX | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国         |
| RPMI 1640           | Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ                      |
| Pen Strep           | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国         |
| トリプシン-EDTA          | Capricorn Scientific GmbH、Ebsdorfergrund、ドイツ |
| FBS Superior        | Sigma-Aldrich、ミズーリ、米国                        |
| DPBS                | Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国         |

30

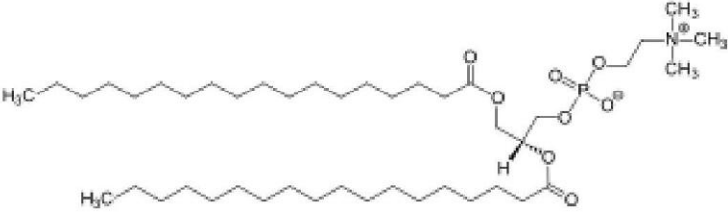
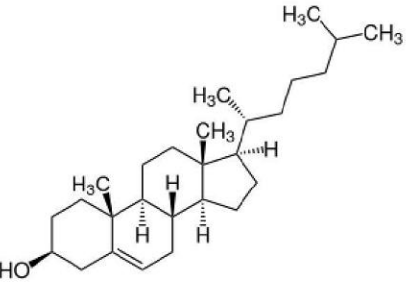
40

50

【表 1 0】

| 接着細胞用培地     |      |         |
|-------------|------|---------|
| 成分          | % 体積 | 体積 ml   |
| DMEM + F12  |      | 500 ml  |
| FBS         | 10%  | 55 ml   |
| Pen-Strep   | 1%   | 5, 5 ml |
|             |      |         |
| 浮遊細胞用培地     |      |         |
| 成分          | % 体積 | 体積 ml   |
| RPMI 1640   |      | 500 ml  |
| FBS         | 10%  | 55 ml   |
| Pen-Strep   | 1%   | 5, 5 ml |
|             |      |         |
| MOLT-4細胞用培地 |      |         |
| 成分          | % 体積 | 体積 ml   |
| RPMI 1640   |      | 500 ml  |
| FBS         | 20%  | 110 ml  |
| Pen-Strep   | 1%   | 6, 1 ml |

【表 1 1】

| 名称   | 化学構造                                                                                 | サプライヤー         |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| DSPC |  | Avanti、アラバマ、米国 |
| CHOL |   | Avanti、アラバマ、米国 |

10

20

30

40

50

【表 12】

| 装置                       | サプライヤー                           |
|--------------------------|----------------------------------|
| CERTUS FLEX              | Fritz Gyger AG、Gwatt、スイス         |
| DynaPro Plate Reader III | Wyatt、サンタバーバラ、米国                 |
| ViaFlo96                 | INTEGRA Biosciences、Zizers、スイス   |
| Spark Plate Reader       | Tecan Group Ltd.、Mannedorf、スイス   |
| Zetasizer Ultra          | Malvern Instruments、Malvern、イギリス |

10

【0997】

ルシフェラーゼ mRNA は BioNTech SE (マインツ、ドイツ) から提供された。

【0998】

次の細胞株は ATCC (バージニア、米国) により提供された: HEK293、HepG2、THP1、J774、Jurkat、MOLT-4、K-562、HL-60、C2C12。

20

【0999】

#### 方法

#### ジェットミックスによる配合

#### PEG を含む LNP

表 2 の脂質を含み、さらに 1.5 当量の酢酸 (カチオンイオン化可能な脂質に対して) を含む有機相を、溶媒としてエタノールを使用して提供し、脂質濃度は 47 mM である。RNA 相を、水 (2 mg/mL の RNA を 10 H pH 7.1 で希釈したもの) 中 0.4 mg/mL の RNA で提供する。混合物の希釈には水を使用した。RNA 相、有機相、および水を 3 : 1 : 1.5 (v/v) の割合で 225 mL/分の流速で連続的に混合する。混合は、Nemesys Flow System (CETONI、ドイツ) を使用し、口径 0.5 mm のミキシング T で達せられる。製剤体積は 15 ~ 50 mL の範囲であった。各製剤の最初の 7 mL は、LNP を回収する前に廃棄した。

30

【表 13】

表 2: LNP の百分率で示される脂質組成

| 脂質              |      | パーセント (%) |
|-----------------|------|-----------|
| カチオンのにイオン化可能な脂質 | カチオン | 47, 5     |
| DSPC            | 中性   | 10        |
| Chol            | Chol | 40, 7     |
| PEG 脂質          | PEG  | 1, 8      |

40

【1000】

#### 三リン酸 (3P) を含む、PEG を含まない LNP

3P LNP を、有機相から PEG 脂質を除き、上記のとおり配合した。混合物をビーカー中で攪拌しながら 250 mM の三リン酸溶液でクエンチし、最終濃度 2.5、5、7、5、10 mM の三リン酸を得た。

【1001】

#### 透析

50

サンプルを、10 kDa MWCOダイアライザーを備えたSlide A Lyzer透析カセット(Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ、米国)を用いて、最終緩衝液(35 mM Tris pH 7.4)に対して2×12時間透析した。

【1002】

ディスペンサーによるスポットミックス製剤および3 PクエンチPEGを含むLNP

スクリーニングのために、CERTUS FLEX(Fritz Gyger AG、Gwatt、スイス)ディスペンサーを使用し、96ウェルプレートでLNPを製剤化した。有機相、RNA相および水を、上記と同じ濃度および同じ比率で、総量200 µlになるように順次分注した。

10

【1003】

3 Pを含む、PEGを含まないLNP

3 P LNPの場合、有機相からPEGを除き、製剤化を上記のように行った。LNPを16 µlの250 mM三リン酸溶液でクエンチし、最終濃度を20 mM三リン酸にした。

【1004】

透析の代わりに緩衝液希釈

20 µlの製剤を、ViaFlo96(INTEGRA Biosciences、Zizers、スイス)を用いて新しい96ウェルプレートに移した。CERTUS FLEXディスペンサーを用いて、間に60秒の休止を挟み、pHを7.4にシフトさせながら、20 µlを10工程添加した。

20

【1005】

調合：

安定性試験のために、3 P LNPサンプルに1.2 Mのトレハロースを抗凍結剤として添加し、最終濃度を300 mMにした。試験には、4℃での保存、-20℃と-70℃での1回の凍結融解サイクル(1 f t)が含まれ、サンプルの最終mRNA濃度は10 µg/mlと70 µg/mlであった。希釈を、目的緩衝液で、常に指示された量の三リン酸の存在下で行った。

【1006】

動的光散乱(DLS)による粒子サイズと多分散性指数(PDI)の測定

サンプル中のLNPの平均粒子サイズとサイズ分布を、動的光散乱(DLS)によって評価した。この方法では、173°の後方散乱を利用して粒子サイズを測定するZetasizer Ultra(Malvern Instruments、マルバーン、イギリス)を使用する。結果は粒子のZ平均サイズと多分散性指数として報告される。多分散性値を、測定されたZ平均サイズの周りにフィットさせた対数正規分布の幅を表すために使用し、粒子サイズ測定ソフトウェア内の独自の数学的計算を使用して算出した。サイズおよび多分散性の結果は、それぞれnmおよび多分散性指数値として報告される。

30

【1007】

血清インキュベーション

LNPの一部をヒト血清と1:1(v/v)の割合で、室温で30分間インキュベートした。LNPの他の部分は未処理のままだった。

40

【1008】

トランスフェクションおよびルシフェラーゼリードアウト

LNPのトランスフェクションを、ViaFlo96を用いた96ウェル形式で実施し、10 µlのサンプルを10 ng/µlの濃度で用いた結果、1ウェルあたり100 ng mRNAとなった。必要であれば、サンプルを目的緩衝液(35 mM Tris pH 7.4)で希釈した。ヒト血清でインキュベートしたLNPのトランスフェクションには20 µlを用い、1ウェルあたり100 ngのRNAを供給した。

【1009】

50

生物発光レポーターとしてのホタルルシフェラーゼ活性の定量化は、LNPのトランスフェクションを定量化するための方法である。高いルシフェラーゼmRNA発現は、LNPの高いトランスフェクション性能の結果である。発現したルシフェラーゼは、ATP依存的にルシフェリンをオキシルシフェリンに酸化するのを触媒し、560nmに極大を持つ発光をもたらす。培養液を捨ててから24時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で1回洗浄し、100 $\mu$ lの1× Beetle Lysis Juice(PJK GmbH、ドイツ)を用いて溶解した。発光は10分後に測定した。

【1010】

#### 実施例 1

非PEG脂質粒子組成物とポリリン酸脂質粒子組成物の凝集挙動を比較した。

10

【1011】

この目的のために、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、および中性脂質を含むがPEGと無機ポリリン酸を含まない脂質粒子組成物を製造し、そのサイズ(nm単位の直径(Z平均))を経時的に(最大30分間)測定した。さらに、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、中性脂質および無機ポリリン酸(3リン酸(3P))を種々の濃度(0~10mM)で含むがPEGを含まない脂質粒子組成物を製造し、そのサイズ(直径(Z平均)(nm))を製造から16時間後に測定した。

【1012】

図2Aに見られるとおり、PEGおよび無機ポリリン酸を含まない脂質粒子組成物は、約20分以内に凝集した。対照的に、図2Bは、無機ポリリン酸を含むがPEGを含まない脂質粒子組成物は、少なくとも16時間コロイド的に安定であったことを示している。

20

【1013】

したがって、この実施例は、無機ポリリン酸を使用することにより、あらゆるステルス脂質(PEG脂質など)が存在しなくてもコロイド的に安定である核酸粒子組成物を製造できることを示している。

【1014】

#### 実施例 2

次に、様々な条件下での脂質粒子組成物の安定性を分析した。

【1015】

この目的のために、RNA(2つの異なる濃度: 10mg/lまたは70mg/l)、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイド、中性脂質、無機ポリリン酸(三リン酸(3P)、粒子形成後に2.5mMの濃度で添加され、任意選択的に最終濾過(透析)段階にも存在する)を、PEG脂質あり(+PEG)またはPEG脂質なし(-PEG)で含む脂質粒子組成物を製造した。様々な条件下(5℃、-20℃もしくは-70℃)で保存後、粒子組成物のコロイドパラメータ(nm単位の直径と多分散性指数(PDI))を測定した。

30

【1016】

一定のサイズ(図3A参照)および低いPDI(図3B参照)によって示されるとおり、得られた粒子組成物は、透析緩衝液中の無機ポリリン酸の存在下または非存在下で、液体形態で1日間安定であった。したがって、この実施例は、最終濾過(透析)段階での無機ポリリン酸の存在が必要でないことを示している。

40

【1017】

さらに、図3AおよびBから理解できるとおり、粒子組成物を、コロイド特性を維持したまま凍結できる; 粒子組成物の安定性を向上させるためには、無機ポリリン酸を水相中に存在させおよび/またはRNA濃度を約70mg/l未満にすべきである。

【1018】

要約すると、この実施例は、本開示の組成物が安定であり、製薬実務における通常の技術に準拠した温度範囲で保存できることを示している。

【1019】

#### 実施例 3

この例では、カチオンのイオン化可能な脂質、ステロイドおよび中性脂質のモル比の

50

違いによる、血清の非存在下または存在下での発現レベルへの影響を分析した。

#### 【1020】

RNA (ルシフェラーゼをコードする)、カチオンのイオン化可能な脂質(図4A：脂質XIV-3；図4B：脂質XIV-1；図4C：脂質XIV-2；図4D：脂質G(DPL-14))、ステロイド(コレステロール)、中性脂質(DSPC)、および無機ポリリン酸(三リン酸(3P))を含む脂質粒子組成物を、図に示したDSPCのモル比率を有する組成物を用いて製造し、脂質組成物の残りは、図に示したモル比率のイオン化可能な脂質およびコレステロールであった。

#### 【1021】

細胞を、血清存在下(+血清(+S))または血清非存在下(-血清(-S))で、いずれかの組成物でトランスフェクトした。ルシフェラーゼ発現量を測定し、血清存在下(+S)のルシフェラーゼ発現量と血清非存在下(-S)のルシフェラーゼ発現量との比(比+S/-S)に基づいて血清刺激を算出した。

#### 【1022】

図4は、ルシフェラーゼ発現、血清刺激( $\log_{10}$ (比+S/-S)値で表示される)の結果を示している。図4から理解できるとおり、RNA粒子組成物の脂質比率を変えると、トランスフェクション反応の血清刺激または血清阻害が生じた。比+S/-Sは、表3に示したコレステロールとDSPCのモル比に対応する。

#### 【表14】

表3：脂質組成におけるコレステロールとDSPCの比率

| DSPC [mol%] |     |     |     |
|-------------|-----|-----|-----|
| 10          | 14  | 17  | 21  |
| 6.0         | 4.0 | 3.0 | 2.4 |
| 5.6         | 3.7 | 2.8 | 2.2 |
| 5.1         | 3.4 | 2.6 | 2.1 |
| 4.7         | 3.1 | 2.4 | 1.9 |
| 4.3         | 2.9 | 2.1 | 1.7 |
| 3.9         | 2.6 | 1.9 | 1.5 |
| 3.4         | 2.3 | 1.7 | 1.4 |
| 3.0         | 2.0 | 1.5 | 1.2 |
| 2.6         | 1.7 | 1.3 | 1.0 |

#### 【1023】

コレステロール：DSPCの比が最大2.5である脂質組成物は、血清とのインキュベーションによる活性の向上を示し、 $\log(+S/-S)$ の係数は0より大きくなる。コレステロール：DSPC比が少なくとも3の脂質組成物は、血清とのインキュベーションによる活性の低下を示し、 $\log(+S/-S)$ の係数は0未満である。

#### 【1024】

この効果は、複数の異なるカチオンのイオン化可能な脂質で達成されることから、使用されるカチオンのイオン化可能な脂質タイプに依存せず、イオン化可能なカチオン性脂質、ステロイド(コレステロールなど)および中性脂質(DSPCなど)を含む脂質ナノ粒子の一般的な特徴であると考えられる。

#### 【1025】

#### 実施例4

この実施例では、2つのLNP製造工程がLNPの属性に与える影響を分析した。

#### 【1026】

#### 酸性生コロイドへの3P添加を用いる3P LNPの製造

LNPは、3：1：2(酸性化mRNA：有機相：クエンチ緩衝液)の容量部比で、水-

エタノール混合プロトコルを用いて製造した。そのために、濃度  $0.4 \text{ mg/mL}$  の mRNA を  $50 \text{ mM}$  酢酸ナトリウム  $\text{pH } 5.5$  に供した。  $47.4 \text{ mM}$  の総脂質 ( $49.1 \text{ mol\%}$  の脂質 XIV-3、  $17.4 \text{ mol\%}$  の DSPC、および  $33.5 \text{ mol\%}$  のコレステロール) を含む有機相をエタノールに供した。クエンチ緩衝液は、  $34.97 \text{ mM}$  の酢酸で  $\text{pH } 5.1$  に酸性化した  $15 \text{ mM}$  の 3P (三リン酸ナトリウム) であった。生コロイドは、酸性化した mRNA を有機相と連続的に混合し、その後クエンチ緩衝液をインライン添加することにより製造された。

#### 【1027】

酸性コロイドを  $50 \text{ mM}$  HEPES  $5 \text{ mM}$  三リン酸ナトリウム  $\text{pH } 7.7$  (NaOH) で透析した後、クロスフローメンブレン (MikroKros  $20 \text{ cm}^2$   $100 \text{ K}$  MPES  $0.5 \text{ mm}$  (C02-E100-05)) を用いて濃縮した。

#### 【1028】

最終的に、HEPES 3P 緩衝液とスクロースを加え、  $0.1 \text{ mg/mL}$  の RNA、  $50 \text{ mM}$  の HEPES、  $5 \text{ mM}$  の 3P、  $300 \text{ mM}$  のスクロース、  $\text{pH } 7.4$  を有する最終製造物に達した。

#### 【表15】

表4: 得られた 3P LNP (XIV-3 #1d001) の品質属性および  $4^\circ\text{C}$  で 21 日間の安定性データ

| 粒子属性          | t0 (RT) | 2日間   | 5日間   | 14日間  | 21日間  |
|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| サイズ [nm]      | 64      | 81    | 81    | 82    | 81    |
| PDI           | 0.020   | 0.029 | 0.016 | 0.011 | 0.025 |
| RNA完全性 [%]    | 86      | 82    | 87    | 81    | 79    |
| RNA含量 [mg/mL] | 0.081   | n. a. | n. a. | n. a. | n. a. |
| 封入の有効性 [%]    | 97      | 97    | 96    | 96    | 96    |

#### 【1029】

生コロイドを中和するために 3P を添加した 3P LNP の製造

LNP を、  $3:1:2$  (酸性化 mRNA : 有機相 : クエンチ緩衝液) の容量部比で、水-エタノール混合プロトコルを用いて製造した。そのために、  $0.4 \text{ mg/mL}$  の mRNA を  $50 \text{ mM}$  酢酸ナトリウム  $\text{pH } 5.5$  に供した。  $47.4 \text{ mM}$  の総脂質 ( $29.2 \text{ mol\%}$  の脂質 XIV-3、  $20.8 \text{ mol\%}$  の DSPC およびコレステロールの  $50.0 \text{ mol\%}$ ) を含む有機相をエタノールに供した。クエンチ緩衝液は水であった。生コロイドは、酸性化した mRNA を有機相と連続的に混合し、すぐにクエンチすることで生成された。生コロイドを回収し、  $250 \text{ mM}$  の 3P (三リン酸ナトリウム) 溶液を加えて濃度  $5 \text{ mM}$  の 3P に達した。

#### 【1030】

得られたコロイドを  $50 \text{ mM}$  HEPES、  $5 \text{ mM}$  三リン酸ナトリウム  $\text{pH } 7.4$  (NaOH) で透析した後、クロスフローメンブレン (MikroKros  $20 \text{ cm}^2$   $100 \text{ K}$  MPES  $0.5 \text{ mm}$  (C02-E100-05)) を用いて濃縮した。

#### 【1031】

最終的に、HEPES 3P 緩衝液およびスクロースを加え、  $0.1 \text{ mg/mL}$  の RNA、  $50 \text{ mM}$  HEPES、  $5 \text{ mM}$  3P、  $300 \text{ mM}$  スクロース、  $\text{pH } 7.4$  を有する最終製造物に達した。

#### 【1032】

10

20

30

40

50

## 【表 16】

表5：得られた3P-LNP (XIV-3 # 3 d 0 0 3) の品質属性および4℃で21日間の安定性データ

| 粒子属性          | t 0 (RT) | 2日間   | 5日間   | 14日間  | 21日間  |
|---------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| サイズ [nm]      | 62       | 72    | 75    | 77    | 79    |
| PDI           | 0.064    | 0.049 | 0.035 | 0.057 | 0.062 |
| RNA完全性 [%]    | 87       | 85    | 87    | 76    | 73    |
| RNA含量 [mg/mL] | 0.091    | n. a. | n. a. | n. a. | n. a. |
| 封入の有効性 [%]    | 99       | 98    | 98    | 98    | 98    |

10

## 【1033】

要約すると、3Pアニオンを酸性pHに調整し、25%エタノール存在下で酸性の第一コロイドと結合させる第一製造工程が用いられた。透析によりpHをほぼ中性状態に調整したが、それは時間がかかる工程である。

## 【1034】

25%エタノールを含む第一のコロイドを水で希釈し、3Pアニオンをアルカリ性状態で添加する第二の製造工程を用いた結果、pHが直ちにほぼ中性状態に調整された。その後、透析によってさらなる緩衝液交換および溶媒の除去が達せられた。

20

## 【1035】

どちらの方法でも、高度に均質なコロイドが形成され、mRNAが封入され、RNA完全性が維持された。素材は長期にわたって安定していた。

## 【1036】

## 実施例5

この実施例では、3P-LNP製剤の機能的特性を筋肉内(i.m.)注射後に分析した。

## 【1037】

試験品は、実施例4に記載のとおり製造した。8週齢のBalb/cマウス(雌、n=3)に、ルシフェラーゼをコードするmRNAを担持した3P-LNPを両側の腓腹筋に筋肉内注射した。1回の注射量は20μlで、マウス1匹あたり合計2μgのmRNAを投与した(c=0.05mg/mL)。注射後6時間後、24時間後、48時間後、96時間後および7日後に、全群のインビボイメージングを行った。マウスは背面から撮影した。試験終了時(7日後)、動物を失血とそれに続く頸椎脱臼により殺した。

30

## 【1038】

新規物質によって惹起される抗LUC免疫反応を特徴づけるために、ELISpot分析を行った。脾臓由来リンパ球が単離された。IFN-γを分泌するT細胞の同定には、Mabtech社のMouse IFN-γ ELISpotキットを製造業者の説明書に従って使用した。種々の動物から分離した細胞を、1ウェルあたり $1 \times 10^5$ 細胞と $2 \times 10^5$ 細胞の濃度でELISpotプレートに播種した。各濃度をデュプリケートで分析した。細胞の活性化のために、Luc特異的ペプチドプールを各ウェルに加えて、最終濃度2μg/mLを得た。ネガティブコントロール(Luc-ペプチド刺激なし)は、1ウェルあたり $2 \times 10^5$ 細胞の濃度で播種した。

40

## 【1039】

本明細書で試験した物質は、ルシフェラーゼタンパク質の強力な発現を媒介し、かつ、この外来タンパク質に特異的な免疫反応を搭載する。結果を表6および表7に示す。

50

【表 17】

表6：PEGを含まない3P-LNP製剤の時間分解LUC発現。

| 平均カウント／s<br>／cm <sup>2</sup> | 6時間    | 24時間  | 48時間  | 96時間 | 7日間 |
|------------------------------|--------|-------|-------|------|-----|
| XIV-3d001(#6)                | 9.052  | 5.540 | 2.936 | 443  | 60  |
| XIV-3d003(#7)                | 10.635 | 6.888 | 3.270 | 414  | 61  |

10

【表 18】

表7：マウスでのルシフェラーゼ発現によるELISpot分析

| 群          | 群平均カウント(±SD) |
|------------|--------------|
| 3P-LNP(#6) | 704 (±338)   |
| 3P-LNP(#7) | 369 (±217)   |

## 【1040】

3P-LNPは筋肉内でルシフェラーゼの発現を示し、その大部分は注射部位で発現することが判明した。実際の注射部位以外ではシグナルは検出されない。

20

## 【1041】

3P-LNPは、1回の投与の後、ルシフェラーゼに対する免疫反応を媒介できると結論づけられた。

## 【1042】

## 実施例6

この実施例では、種々の多価アニオンを用いてLNP製剤の安定化を分析した。

## 【1043】

水-エタノール混合プロトコルを用いて、3：1：2(酸性化mRNA：有機相：クエンチ溶媒)の容量部比で材料を製造した。そのために、0.4mg/mLのmRNAを50mM酢酸ナトリウムpH5.5に供した。非PEG化変異体では、総脂質47.4mM(48.4mol%のイオン化可能脂質、10mol%のDSPCおよび41.6mol%のコレステロール)を含む有機相をエタノールに供し、dH<sub>2</sub>Oでクエンチした。酸性化したmRNAと有機相を連続的に混合し、その後クエンチ溶媒としてdH<sub>2</sub>Oをインライン添加することにより、第一の混合物を生成し、前記混合物は「生コロイド」である。試験したイオン化可能な脂質は、DODAP、脂質Dまたは脂質XIV-2であった。

30

## 【1044】

コントロール試験では、PEG脂質を添加し、同じ水-エタノール混合プロトコルを47.4mMの総脂質(48.4mol%のイオン化可能脂質、10mol%のDSPC、39.8mol%のコレステロールおよび1.8mol%のDMG-PEG 2000)を含む有機相に適用した。

40

## 【1045】

最初の混合およびクエンチの後、生コロイド9部に対してHEPES 500mM pH 8.5を1容量部加えることにより、生コロイドのpHは急速に約pH8.5にシフトし、「アルカリ性生コロイド」が得られた。ほぼ中性pHの「成熟コロイド」を得るために、アルカリ性の生コロイドを次の緩衝液に対して透析した：

緩衝液A：50mM HEPES、pH 7.4 (NaOH)

緩衝液B：50mM HEPES、5mM トリリン酸ナトリウム、pH 7.4 (NaOH)

緩衝液C：50mM HEPES、5mM 第二リン酸ナトリウム、pH 7.4 (NaOH)

50

緩衝液 D : 50 mM HEPES、5 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4 (NaOH)

緩衝液 E : 50 mM HEPES、5 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.4 (NaOH)

【1046】

透析後、約 0.15 mg/mL の mRNA 濃度が得られた。成熟コロイドのコロイド安定性を 48 時間にわたって追跡し、結果を図 5A ~ C に示す。mRNA の機能的発現を HEK293 細胞で試験し、図 6A ~ C に示す。

【1047】

結果を次のとおり要約できる：

— ステルス脂質を含まない LNP 製剤は、様々な構造的に異なるイオン化可能な脂質から得ることができる。

— ステルス脂質を含まない LNP 製剤は、無機ポリリン酸アニオン、無機リン酸アニオンまたはクエン酸アニオンなどの多価アニオンを用いて安定化できるが、双性イオン種は用いない。

— ステルス脂質を含まず、多価アニオンを用いて安定化された LNP 製剤は、PEG 化担体コントロールと同等の有効性を有する活性担体である。

【図面】

【図 1A】

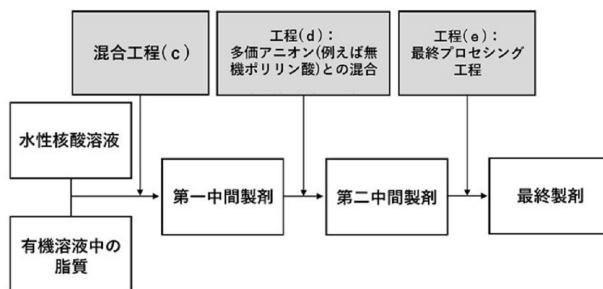


Fig. 1A

【図 1B】

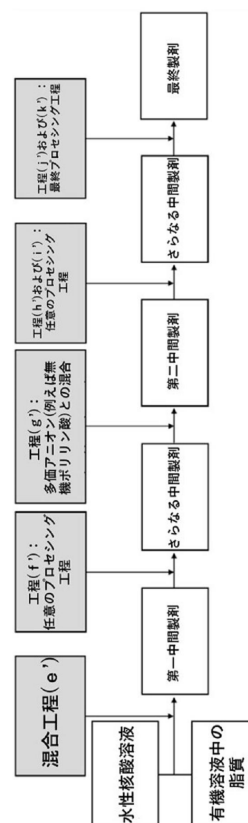


Fig. 1B

10

20

30

40

50

【図 1 C】

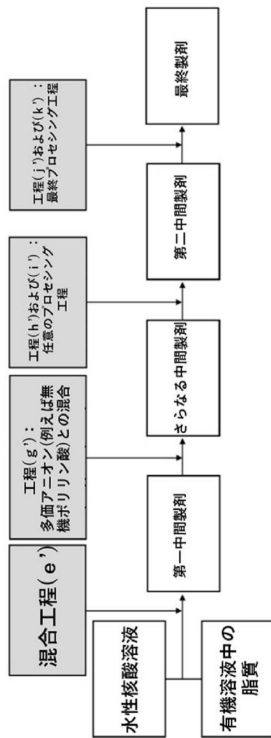


Fig. 1C

【図 2 A】

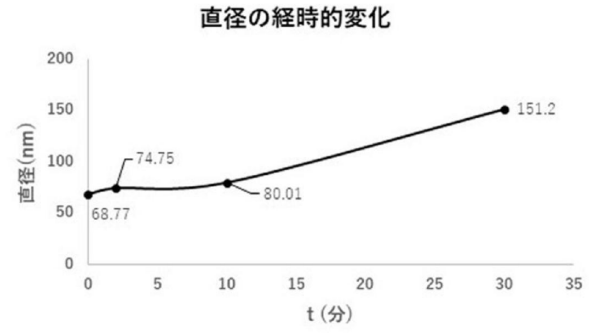


Fig. 2A

【図 2 B】

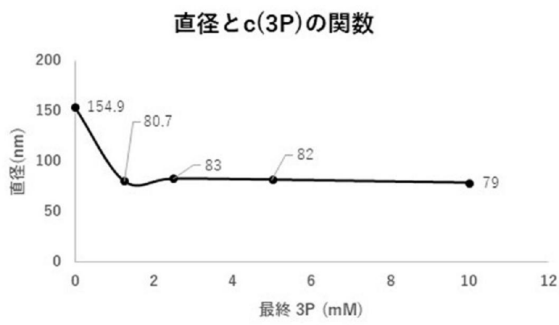


Fig. 2B

【図 3 A】

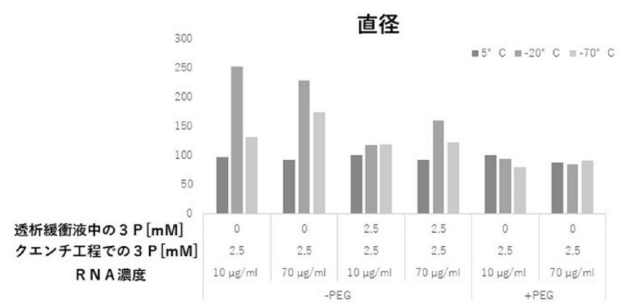


Fig. 3A

10

20

30

40

50

【図 3 B】

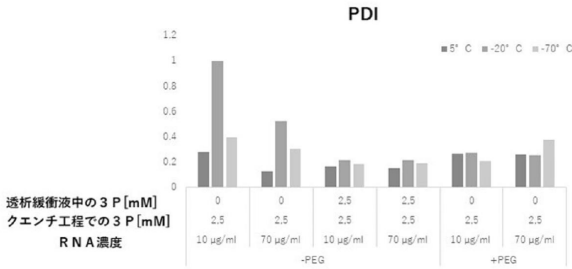


Fig. 3B

【図 4 A】

| NCl/ONCl | DSC [%] |       |       |       | log10 (s/s) |       |       |       |
|----------|---------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|
|          | DSC [%] |       |       |       | log10 (s/s) |       |       |       |
|          | 10      | 14    | 17    | 21    | 10          | 14    | 17    | 21    |
| 1.71     | 8E+05   | 1E+06 | 4E+06 | 6E+06 | 2E+05       | 6E+05 | 1E+07 | 2E+07 |
| 1.42     | 1E+06   | 3E+06 | 2E+06 | 4E+06 | 5E+05       | 4E+06 | 1E+07 | 1E+07 |
| 1.18     | 2E+06   | 2E+06 | 2E+06 | 4E+06 | 2E+06       | 1E+07 | 1E+07 | 2E+07 |
| 0.99     | 3E+06   | 1E+06 | 2E+06 | 4E+06 | 6E+06       | 1E+07 | 1E+07 | 1E+07 |
| 0.82     | 2E+06   | 1E+06 | 2E+06 | 2E+06 | 1E+07       | 8E+06 | 1E+07 | 1E+07 |
| 0.88     | 6E+05   | 9E+06 | 1E+06 | 2E+06 | 8E+06       | 1E+07 | 1E+07 | 1E+07 |
| 0.46     | 2E+06   | 4E+06 | 6E+05 | 1E+06 | 1E+07       | 1E+07 | 1E+07 | 1E+07 |
| 0.37     | 2E+05   | 7E+06 | 3E+05 | 1E+06 | 1E+07       | 1E+07 | 1E+07 | 1E+07 |
| 0.37     | 2E+05   | 2E+06 | 5E+05 | 9E+05 | 1E+07       | 1E+07 | 9E+06 | 7E+06 |

Fig. 4A

【図 4 B】

| NOL/1CHD | DSC [%] |       |       |       |         |       |       |       | DSC [%] |       |       |       |         |       |       |       |
|----------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
|          | DSC [%] |       |       |       | DSC [%] |       |       |       | DSC [%] |       |       |       | DSC [%] |       |       |       |
|          | DSC [%] |       |       |       | DSC [%] |       |       |       | DSC [%] |       |       |       | DSC [%] |       |       |       |
|          | 10      | 14    | 17    | 21    | 10      | 14    | 17    | 21    | 10      | 14    | 17    | 21    | 10      | 14    | 17    | 21    |
| 1.71     | 1E+05   | 5E+05 | 4E+05 | 4E+05 | 1E+04   | 4E+04 | 9E+04 | 1E+05 | 1E+04   | 4E+04 | 9E+04 | 1E+05 | -1.01   | -1.07 | -0.68 | -0.53 |
| 1.42     | 2E+05   | 2E+06 | 1E+06 | 6E+05 | 1E+04   | 3E+05 | 6E+05 | 7E+05 | 1E+04   | 3E+05 | 6E+05 | 7E+05 | -1.22   | -0.86 | -0.23 | -0.11 |
| 1.18     | 3E+05   | 4E+06 | 6E+05 | 1E+06 | 2E+04   | 3E+05 | 7E+05 | 2E+06 | 2E+04   | 3E+05 | 7E+05 | 2E+06 | -1.19   | -0.13 | 0.02  | 0.26  |
| 0.99     | 2E+06   | 2E+06 | 1E+06 | 8E+05 | 9E+04   | 8E+05 | 2E+06 | 1E+06 | 9E+04   | 8E+05 | 2E+06 | 1E+06 | -1.33   | -0.52 | 0.17  | 0.20  |
| 0.82     | 2E+06   | 4E+06 | 7E+05 | 4E+05 | 3E+05   | 7E+06 | 2E+06 | 1E+06 | 3E+05   | 7E+06 | 2E+06 | 1E+06 | -0.95   | -0.16 | 0.01  | 0.02  |
| 0.68     | 3E+06   | 4E+06 | 1E+06 | 1E+06 | 5E+05   | 5E+06 | 8E+06 | 9E+06 | 5E+05   | 5E+06 | 8E+06 | 9E+06 | -0.76   | 0.18  | 0.81  | 0.82  |
| 0.36     | 3E+07   | 4E+06 | 6E+05 | 6E+05 | 3E+06   | 9E+06 | 3E+06 | 4E+06 | 3E+06   | 9E+06 | 3E+06 | 4E+06 | -0.53   | 0.15  | 0.65  | 1.16  |
| 0.46     | 3E+06   | 4E+06 | 6E+05 | 5E+05 | 2E+06   | 9E+06 | 6E+06 | 2E+06 | 2E+06   | 9E+06 | 6E+06 | 2E+06 | -0.32   | 0.32  | 0.97  | 0.68  |
| 0.37     | 6E+06   | 2E+06 | 7E+05 | 3E+05 | 5E+06   | 4E+06 | 4E+06 | 5E+06 | 5E+06   | 4E+06 | 4E+06 | 5E+06 | -0.10   | 0.25  | 0.82  | 1.19  |

Fig. 4B

【図 4 C】

| NCH/10CHO | log10 (s/s) |       |       |       |         |       |       |       |      |      |      |      |
|-----------|-------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
|           | DSC [%]     |       |       |       | DSC [%] |       |       |       |      |      |      |      |
|           | (α-晶型)      |       |       |       | (β-晶型)  |       |       |       |      |      |      |      |
|           | 10          | 14    | 17    | 21    | 10      | 14    | 17    | 21    |      |      |      |      |
| XIV-2     | 1.71        | 1E+07 | 8E+06 | 6E+06 | 1E+07   | 2E+07 | 1E+07 | 1E+07 | 0.05 | 0.13 | 0.24 | 0.33 |
|           | 1.42        | 1E+07 | 8E+06 | 6E+06 | 9E+06   | 1E+07 | 2E+07 | 1E+07 | 0.03 | 0.37 | 0.38 | 0.15 |
|           | 1.18        | 1E+07 | 1E+07 | 1E+07 | 3E+06   | 2E+07 | 2E+07 | 4E+06 | 0.11 | 0.24 | 0.19 | 0.18 |
|           | 0.99        | 1E+07 | 2E+07 | 1E+07 | 3E+06   | 2E+07 | 2E+07 | 2E+07 | 0.11 | 0.13 | 0.11 | 0.17 |
|           | 0.82        | 1E+07 | 2E+07 | 1E+07 | 3E+06   | 2E+07 | 2E+07 | 2E+07 | 0.05 | 0.24 | 0.21 | 0.27 |
|           | 0.68        | 1E+07 | 1E+07 | 8E+06 | 5E+06   | 2E+07 | 2E+07 | 2E+07 | 0.10 | 0.26 | 0.42 | 0.47 |
|           | 0.36        | 1E+07 | 1E+07 | 3E+06 | 2E+07   | 2E+07 | 1E+07 | 2E+07 | 0.18 | 0.35 | 0.09 | 0.76 |
|           | 0.46        | 8E+06 | 6E+06 | 8E+06 | 8E+06   | 1E+07 | 2E+07 | 2E+07 | 0.19 | 0.39 | 0.23 | 0.57 |
|           | 0.37        | 5E+06 | 3E+06 | 3E+06 | 1E+06   | 1E+07 | 1E+07 | 1E+07 | 0.38 | 0.64 | 0.66 | 0.80 |
|           | 0.37        | 5E+06 | 3E+06 | 3E+06 | 1E+06   | 1E+07 | 1E+07 | 1E+07 | 0.38 | 0.64 | 0.66 | 0.80 |

Fig. 4C

10

20

30

40

50

【図 4 D】

| G | (-) 値    |       |       |       | (-) 値    |       |       |       | log10 (L/g) 5 |       |      |      |
|---|----------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|---------------|-------|------|------|
|   | DPEC (%) |       |       |       | DPEC (%) |       |       |       | DPEC (%)      |       |      |      |
|   | 10       | 14    | 17    | 21    | 10       | 14    | 17    | 21    | 10            | 14    | 17   | 21   |
|   | 1.71     | 34.06 | 76.06 | 16.07 | 16.07    | 35.05 | 71.06 | 36.07 | -0.68         | -0.01 | 0.41 | 0.30 |
|   | 1.42     | 34.06 | 34.06 | 34.06 | 16.07    | 95.05 | 85.06 | 26.07 | -0.56         | 0.39  | 0.21 | 0.29 |
|   | 1.18     | 34.06 | 34.06 | 64.06 | 96.06    | 26.06 | 15.07 | 36.07 | -0.20         | 0.46  | 0.23 | 0.56 |
|   | 0.99     | 76.06 | 24.06 | 84.06 | 76.06    | 76.06 | 15.07 | 36.07 | 0.05          | 0.65  | 0.55 | 0.55 |
|   | 0.82     | 34.06 | 84.06 | 54.06 | 66.06    | 15.07 | 35.07 | 36.07 | 0.43          | 0.55  | 0.80 | 0.89 |
|   | 0.68     | 44.06 | 64.06 | 34.06 | 26.06    | 26.07 | 46.07 | 26.07 | 0.72          | 0.77  | 1.01 | 0.97 |
|   | 0.56     | 74.06 | 74.06 | 24.06 | 16.06    | 46.07 | 55.07 | 26.07 | 0.72          | 0.81  | 1.15 | 1.00 |
|   | 0.46     | 34.06 | 64.06 | 64.06 | 16.06    | 36.07 | 86.06 | 16.07 | 0.76          | 1.10  | 1.16 | 0.91 |
|   | 0.37     | 34.06 | 76.06 | 54.06 | 96.06    | 16.07 | 86.06 | 16.07 | 0.80          | 1.11  | 1.17 | 1.04 |

Fig. 4D

【図 5 B】

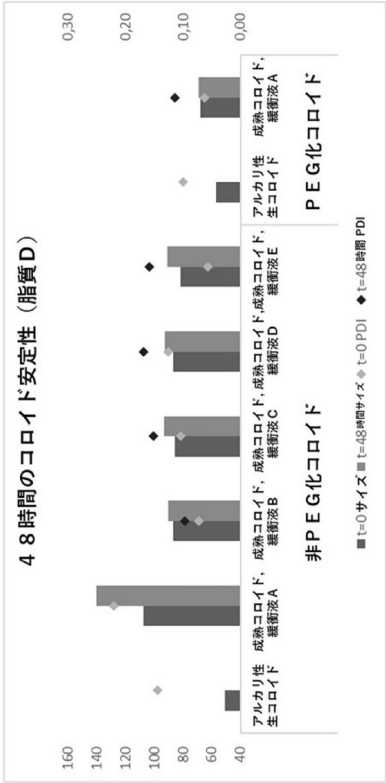


Fig. 5B

【図 5 A】

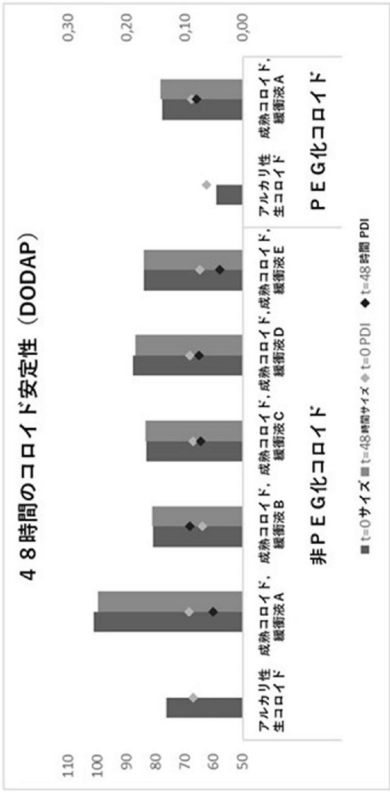


Fig. 5A

【図 5 C】

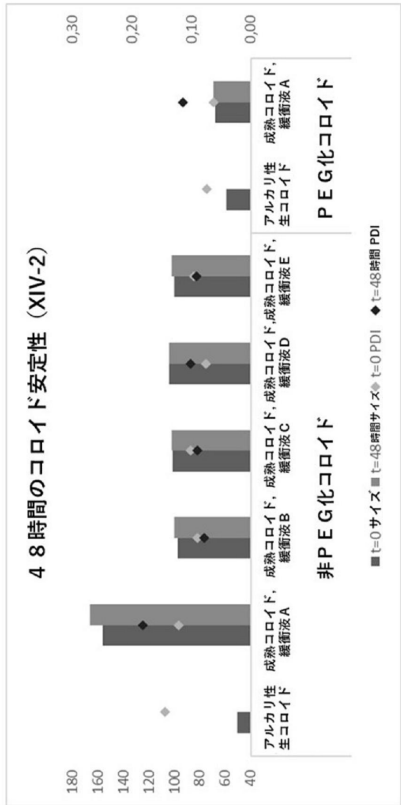


Fig. 5C

10

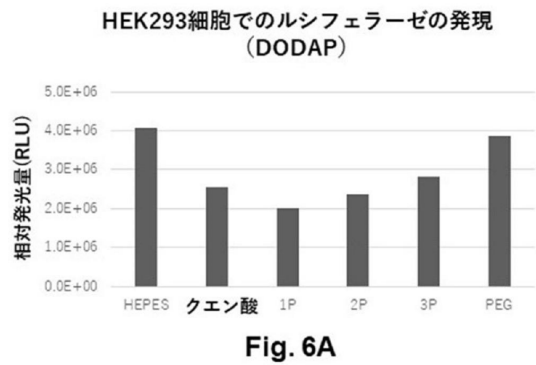
20

30

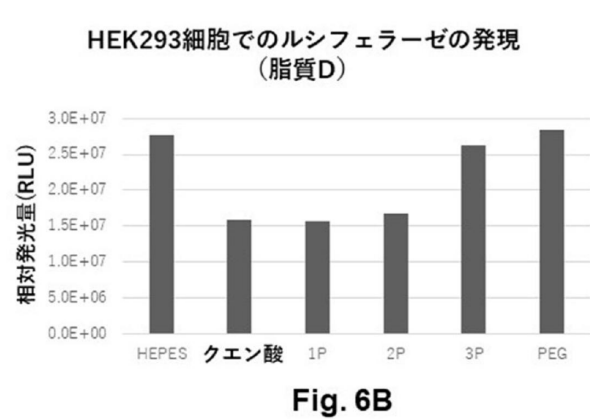
40

50

【 図 6 A 】

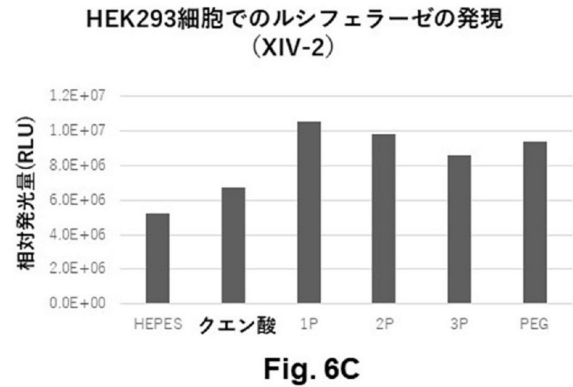


【 図 6 B 】



10

【 図 6 C 】



20

【 配 列 表 】

30

2025514649000001.xml

40

50

## 【国際調査報告】

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">International application No.<br/><br/>PCT/EP2023/059066</div> |
| <b>Box No. I    Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                    |
| <div>1.    With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</div> <div style="margin-left: 20px;"><div>a.    <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.</div><div style="margin-left: 20px;">b.    <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).<div style="margin-left: 40px;"><input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.</div></div><div>2.    <input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.</div><div>3.    Additional comments:</div></div> |                                                                                                                    |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2023/059066

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/51 A61K31/7105 A61P37/02 C12N15/88  
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 A61P C12N

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, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 2020/070040 A1 (UNIV MAINZ JOHANNES GUTENBERG [DE] ET AL.)<br>9 April 2020 (2020-04-09)<br>abstract; claims 1-39; figures 1-17;<br>examples 1-7<br>page 2, last paragraph - page 4, paragraph first<br>----- | 1-103                 |
| A         | WO 2021/191265 A1 (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH [DE])<br>30 September 2021 (2021-09-30)<br>claims 1-87; examples 1-9.4<br>page 3, line 17 - page 4, line 9<br>-----                                        | 1-103                 |
| A         | WO 2017/075531 A1 (ACUITAS THERAPEUTICS INC [CA]) 4 May 2017 (2017-05-04)<br>claims 1-40; examples 1-3<br>-----<br>-/--                                                                                         | 1-103                 |

☒ 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

14 June 2023

Date of mailing of the international search report

21/06/2023

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

Madalinska, K

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2023/059066

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                           |                       |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                        | Relevant to claim No. |
| A                                                    | WO 2016/115198 A1 (ENCAPSYS LLC [US]; BIAO DUAN [US]) 21 July 2016 (2016-07-21) abstract; claims 1-19; example 1<br>----- | 1-103                 |
| A                                                    | WO 2017/212494 A1 (OPKO BIOLOGICS LTD [IL]) 14 December 2017 (2017-12-14) paragraph [0268]<br>-----                       | 1-103                 |

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/059066

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2020070040 A1                          | 09-04-2020          | AU 2019353930 A1           | 06-05-2021          |
|                                           |                     | BR 112021006167 A2         | 29-06-2021          |
|                                           |                     | CA 3113151 A1              | 09-04-2020          |
|                                           |                     | CN 112867509 A             | 28-05-2021          |
|                                           |                     | EP 3860656 A1              | 11-08-2021          |
|                                           |                     | IL 281930 A                | 31-05-2021          |
|                                           |                     | JP 2022504141 A            | 13-01-2022          |
|                                           |                     | KR 20210092717 A           | 26-07-2021          |
|                                           |                     | SG 11202101732W A          | 30-03-2021          |
|                                           |                     | US 2022001025 A1           | 06-01-2022          |
|                                           |                     | WO 2020070040 A1           | 09-04-2020          |
|                                           |                     | ZA 202101368 B             | 26-10-2022          |
| WO 2021191265 A1                          | 30-09-2021          | AU 2021243599 A1           | 29-09-2022          |
|                                           |                     | CA 3172600 A1              | 30-09-2021          |
|                                           |                     | CN 115335084 A             | 11-11-2022          |
|                                           |                     | EP 4126069 A1              | 08-02-2023          |
|                                           |                     | JP 2023519245 A            | 10-05-2023          |
|                                           |                     | WO 2021191265 A1           | 30-09-2021          |
| WO 2017075531 A1                          | 04-05-2017          | AU 2016343803 A1           | 26-04-2018          |
|                                           |                     | AU 2021206881 A1           | 19-08-2021          |
|                                           |                     | CA 3003055 A1              | 04-05-2017          |
|                                           |                     | CN 108368028 A             | 03-08-2018          |
|                                           |                     | CN 113636947 A             | 12-11-2021          |
|                                           |                     | DK 3368507 T3              | 27-02-2023          |
|                                           |                     | EP 3368507 A1              | 05-09-2018          |
|                                           |                     | ES 2938557 T3              | 12-04-2023          |
|                                           |                     | FI 3368507 T3              | 21-03-2023          |
|                                           |                     | HR P20230209 T1            | 14-04-2023          |
|                                           |                     | IL 258501 A                | 31-05-2018          |
|                                           |                     | IL 286515 A                | 31-10-2021          |
|                                           |                     | JP 7030690 B2              | 07-03-2022          |
|                                           |                     | JP 2018533573 A            | 15-11-2018          |
|                                           |                     | JP 2022081512 A            | 31-05-2022          |
|                                           |                     | LT 3368507 T               | 10-03-2023          |
|                                           |                     | PL 3368507 T3              | 27-03-2023          |
|                                           |                     | PT 3368507 T               | 07-02-2023          |
|                                           |                     | RS 63986 B1                | 31-03-2023          |
|                                           |                     | SI 3368507 T1              | 28-04-2023          |
|                                           |                     | US 2017119904 A1           | 04-05-2017          |
|                                           |                     | US 2019314524 A1           | 17-10-2019          |
|                                           |                     | US 2020121809 A1           | 23-04-2020          |
|                                           |                     | US 2022072155 A1           | 10-03-2022          |
|                                           |                     | WO 2017075531 A1           | 04-05-2017          |
| WO 2016115198 A1                          | 21-07-2016          | CA 2970726 A1              | 21-07-2016          |
|                                           |                     | US 2016207020 A1           | 21-07-2016          |
|                                           |                     | US 2017189881 A1           | 06-07-2017          |
|                                           |                     | WO 2016115198 A1           | 21-07-2016          |
| WO 2017212494 A1                          | 14-12-2017          | EP 3468610 A1              | 17-04-2019          |
|                                           |                     | IL 263369 A                | 31-12-2018          |
|                                           |                     | TW 201808346 A             | 16-03-2018          |
|                                           |                     | US 2019160152 A1           | 30-05-2019          |
|                                           |                     | WO 2017212494 A1           | 14-12-2017          |

## 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)

|                |               |                  |                |               |          |
|----------------|---------------|------------------|----------------|---------------|----------|
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/28</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>47/28</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/24</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>47/24</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/04</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>47/04</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>48/00</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>48/00</b>  |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>39/00</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>39/00</b>  | <b>E</b> |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>39/215</b> | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>39/00</b>  | <b>G</b> |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>9/19</b>   | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>39/215</b> |          |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>9/10</b>   | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>9/19</b>   |          |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>37/04</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>9/10</b>   |          |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>31/00</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 P</b> | <b>37/04</b>  |          |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>31/14</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 P</b> | <b>31/00</b>  |          |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>15/87</b>  | <b>(2006.01)</b> | <b>A 6 1 P</b> | <b>31/14</b>  |          |
|                |               |                  | <b>C 1 2 N</b> | <b>15/87</b>  | <b>Z</b> |

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,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,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. T W E E N

ドイツ 5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ 1 2、ビオンテック・ソシエタス・エウロペア内

|                   |              |                                                          |
|-------------------|--------------|----------------------------------------------------------|
| <b>F ターム (参考)</b> | <b>4C076</b> | <b>CC06 CC07 CC31 CC35 DD26 DD37 DD49 DD63 DD70 FF36</b> |
|                   |              | <b>FF63 GG06 GG47</b>                                    |
|                   | <b>4C084</b> | <b>AA13 MA05 MA16 MA24 MA44 NA03 NA04 NA13 ZB09 ZB31</b> |
|                   |              | <b>ZB33</b>                                              |
|                   | <b>4C085</b> | <b>AA03 BA71 CC07 CC08 DD62 EE01</b>                     |
|                   | <b>4C086</b> | <b>AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA16 MA24 MA44 NA03 NA04</b> |
|                   |              | <b>NA06 NA13 ZB09 ZB31 ZB33</b>                          |