

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-101756
(P2023-101756A)

(43)公開日 令和5年7月21日(2023.7.21)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 9/127(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 38/43
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全61頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2023-90876(P2023-90876)	(71)出願人	517316797
(22)出願日	令和5年6月1日(2023.6.1)		トランスレイト バイオ, インコーポレ
(62)分割の表示	特願2021-212128(P2021-212128)		イテッド
)の分割		アメリカ合衆国マサチューセッツ州02
原出願日	平成26年10月22日(2014.10.22)		451・ウォルサム・ウェスト・ストリ
(31)優先権主張番号	61/894,294		ート200
(32)優先日	平成25年10月22日(2013.10.22)	(74)代理人	100078282
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山本 秀策
		(74)代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルギニノコハク酸合成酵素欠損症のmRNA治療

(57)【要約】

【課題】アルギニノコハク酸合成酵素欠損症(ASD)の治療をmRNA治療に基づいて行う改善された方法及び組成物を提供する。

【解決手段】本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素欠損症(ASD)を治療するための、mRNA治療に基づく方法及び組成物を提供する。詳しくは、本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素(ASS)をコードするmRNAを含む組成物を、ASDの症状または特徴の少なくとも1つを、強度、重症度、若しくは頻度の点で低減させる、または発症を遅延させるような有効用量及び投与間隔で、治療を必要としている被検体に投与することによりASDを治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、mRNAを、1個以上のリポソーム内に封入する。いくつかの実施形態では、本発明に好適なりポソームは、カチオン性脂質または非カチオン性脂質(複数可)、コレステロール系脂質(複数可)及びPEG修飾脂質(複数可)を含有する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願図面の一部に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2013年10月22日に出願された、米国仮特許出願第61/894,294号に対する優先権を主張するものであり、その開示は参照により本願に組み入れられたものとする。

10

【背景技術】

【0002】

アルギニノコハク酸合成酵素欠損症(ASD)は、酵素アルギニノコハク酸合成酵素(ASS1)の遺伝子変異を特徴とする、常染色体劣性遺伝による遺伝性代謝疾患であり、シトルリン、アスパラギン酸塩及び他の分子に対するこの酵素の結合能力に影響を及ぼす。ASSタンパク質の欠陥により尿素サイクルが攪乱され、過剰な窒素が肝臓で適切に尿素にプロセッシングされなくなる。アンモニア及び尿素サイクルの他の副生成物(シトルリンなど)の蓄積は有毒であり、この蓄積が生後数日で出現すると、脱力(嗜眠)、哺乳不良、嘔吐、痙攣及び意識消失などの症状を引き起こす。現在、この疾患の治療法はなく、食事管理、タンパク質含有量の多い食事の最小限化、並びにアルギニン及びフェニル酢酸の栄養補助食品による治療が標準である。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本発明は、特に、アルギニノコハク酸合成酵素欠損症(ASD)の治療をmRNA治療に基づいて行う改善された方法及び組成物を提供する。本発明には、リポソーム内に封入した、ヒトASS1タンパク質をコードするmRNAを投与することにより、*in vivo*でタンパク質が高効率かつ持続的に産生され、臨床的に意義のある疾患マーカーであるアンモニア血漿濃度を低下させることに成功したという知見が包含される。

【0004】

一態様では、本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素(ASS1)をコードするmRNAを含む組成物を、ASDの症状または特徴の少なくとも1つを、強度、重症度、若しくは頻度の点で低減させる、または発症を遅延させるような有効用量及び投与間隔で、治療を必要としている被検体に投与することを含む、ASD治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、mRNAをリポソーム内に封入する。

30

【0005】

別の態様では、本発明は、ASS1をコードするmRNAをリポソーム内に有効用量封入して含む、ASDを治療するための組成物を提供する。

【0006】

いくつかの実施形態では、好適なリポソームには、1種以上のカチオン性脂質、1種以上の非カチオン性脂質、1種以上のコレステロール系脂質及び1種以上のPEG修飾脂質が含まれる。

40

【0007】

いくつかの実施形態では、かかる1種以上のカチオン性脂質は、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinKC2DMA、cKK-E12、ICE(イミダゾール系)、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA及びDMDMA、DODAC、DLinDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003、並びにその組み合わせ、からなる群から

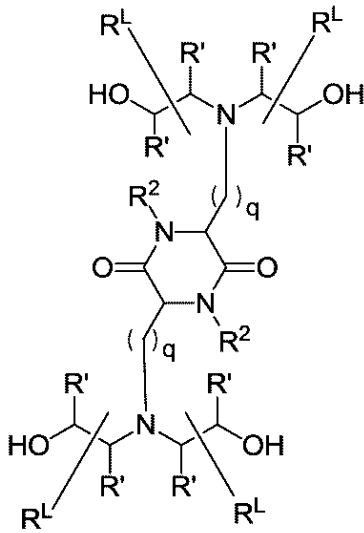
50

選択される。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、かかる 1 種以上のカチオン性脂質は、式 I - c 1 - a の化合物

【 化 1 】



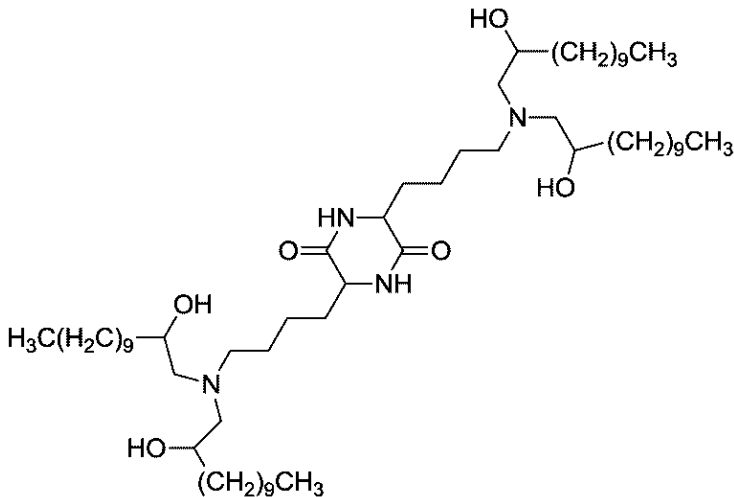
I - c 1 - a

、またはその薬理的に許容される塩を含み、式中、
各 R^2 は互いに独立して水素または C_{1-3} アルキル基であり、
各 q は互いに独立して 2 ~ 6 であり、
各 R' は互いに独立して水素または C_{1-3} アルキル基であり、
各 R^L は互いに独立して C_{8-12} アルキル基である。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、かかる 1 種以上のカチオン性脂質は、c K K - E 1 2

【 化 2 】



を含む。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、本発明に好適な前述の 1 種以上の非カチオン性脂質は、D S P C (1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、D P P C (1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、D O P E (1 , 2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、D O P C (1 , 2 - ジオレイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホチジルコリン (p h o s p h o t i d y l c h o l i n e)) D P P E (1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン

10

20

30

40

50

)、DMPE(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPG(、2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール)、及びその組み合わせから選択される。

【0011】

いくつかの実施形態では、前述の1種以上のコレステロール系脂質は、コレステロール、PEG化コレステロール及びDC-Chol(N,N-ジメチル-N-エチルカルボキシアミドコレステロール(ethylcarboxamidocholesterol))、1,4-ビス(3-N-オレイルアミノ-プロピル)ピペラジンから選択される。

【0012】

いくつかの実施形態では、リポソームは、1種以上のPEG修飾脂質をさらに含む。いくつかの実施形態では、かかる1種以上のPEG修飾脂質は、鎖長C₆-C₂₀のアルキル鎖(複数可)を有する脂質に共有結合している鎖長が最高5kDaのポリ(エチレン)グリコール鎖を含む。いくつかの実施形態では、PEG修飾脂質は、N-オクタノイルスフィンゴシン-1-[スクシニル(メトキシポリエチレングリコール)-2000]のような誘導体化したセラミドである。いくつかの実施形態では、PEG修飾した、すなわちPEG化した脂質はPEG化コレステロールまたはジミリストイルグリセロール(DMG)-PEG-2Kである。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、cKK-E12と、DOPEと、コレステロールとDMG-PEG2K;C12-200と、DOPEと、コレステロールとDMG-PEG2K;HGT4003と、DOPEと、コレステロールとDMG-PEG2K;またはICEと、DOPEと、コレステロールとDMG-PEG2K、から選択される組み合わせを含む。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び/またはHGT4003)は、モル比で、リポソームの約30~60%(例えば、約30~55%、約30~50%、約30~45%、約30~40%、約35~50%、約35~45%、または約35~40%)を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び/またはHGT4003)は、モル比で、リポソームの約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、または約60%を構成する。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(複数可)(例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び/またはHGT4003)と、非カチオン性脂質(複数可)(例えば、DOPE)と、コレステロール系脂質(複数可)(例えば、コレステロール)と、PEG化脂質(複数可)(例えば、DMG-PEG2K)との比は、それぞれ、約30~60:25~35:20~30:1~15であってよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(複数可)(例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び/またはHGT4003)と、非カチオン性脂質(複数可)(例えば、DOPE)と、コレステロール系脂質(複数可)(例えば、コレステロール)と、PEG化脂質(複数可)(例えば、DMG-PEG2K)との比は、それぞれ、約40:30:20:10である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(複数可)(例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び/またはHGT4003)と、非カチオン性脂質(複数可)(例えば、DOPE)と、コレステロール系脂質(複数可)(例えば、コレステロール)と、PEG化脂質(複数可)(例えば、DMG-PEG2K)との比は、それぞれ、約40:30:25:5である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質(複数可)(例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び/またはHGT4003)と、非カチオン性脂質(複数可)(例えば、DOPE)と、コレステロール系脂質(複数可)(例えば、コレステロール)と、PEG化脂質(複数可)(例えば、DMG-PEG2K)との比は、それぞれ、約40:32:25:3である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質

40

50

(複数可)(例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E、及び/またはH G T 4 0 0 3)と、非カチオン性脂質(複数可)(例えば、D O P E)と、コレステロール系脂質(複数可)(例えば、コレステロール)と、P E G化脂質(複数可)(例えば、D M G - P E G 2 K)との比は、約5 0 : 2 5 : 2 0 : 5である。

【0 0 1 6】

いくつかの実施形態では、リポソームのサイズはリポソーム粒子の最長直径で決定する。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、サイズが約5 0 0 n M、4 0 0 n M、3 0 0 n M、2 5 0 n M、2 0 0 n M、1 5 0 n M、1 0 0 n M、7 5 n M、または5 0 n M未満である。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、サイズが約1 0 0 n M、9 0 n M、8 0 n M、7 0 n M、または6 0 n M未満である。

10

【0 0 1 7】

いくつかの実施形態では、m R N Aを、範囲が約0 . 1 ~ 5 . 0 m g / k g体重の用量、例えば、約0 . 1 ~ 4 . 5、0 . 1 ~ 4 . 0、0 . 1 ~ 3 . 5、0 . 1 ~ 3 . 0、0 . 1 ~ 2 . 5、0 . 1 ~ 2 . 0、0 . 1 ~ 1 . 5、0 . 1 ~ 1 . 0、0 . 1 ~ 0 . 5、0 . 1 ~ 0 . 3、0 . 3 ~ 5 . 0、0 . 3 ~ 4 . 5、0 . 3 ~ 4 . 0、0 . 3 ~ 3 . 5、0 . 3 ~ 3 . 0、0 . 3 ~ 2 . 5、0 . 3 ~ 2 . 0、0 . 3 ~ 1 . 5、0 . 3 ~ 1 . 0、0 . 3 ~ 0 . 5、0 . 5 ~ 5 . 0、0 . 5 ~ 4 . 5、0 . 5 ~ 4 . 0、0 . 5 ~ 3 . 5、0 . 5 ~ 3 . 0、0 . 5 ~ 2 . 5、0 . 5 ~ 2 . 0、0 . 5 ~ 1 . 5、または0 . 5 ~ 1 . 0 m g / k g体重で投与する。いくつかの実施形態では、m R N Aを、約5 . 0、4 . 5、4 . 0、3 . 5、3 . 0、2 . 5、2 . 0、1 . 5、1 . 0、0 . 8、0 . 6、0 . 5、0 . 4、0 . 3、0 . 2、または0 . 1 m g / k g体重以下の用量で投与する。

20

【0 0 1 8】

いくつかの実施形態では、提供組成物を静脈内に投与する。いくつかの実施形態では、提供組成物を経肺送達により投与する。ある実施形態では、経肺送達は、エアゾール化、吸入、噴霧化または点眼法により実施される。いくつかの実施形態では、提供組成物を、吸入可能な粒子、噴霧化可能な脂質、または吸入可能な乾燥粉末として製剤化する。

【0 0 1 9】

いくつかの実施形態では、提供組成物を1日1回、週1回、月2回、月1回投与する。いくつかの実施形態では、提供組成物を、7日に1回、10日に1回、14日に1回、28日に1回または30日に1回投与する。

30

【0 0 2 0】

いくつかの実施形態では、A S S 1タンパク質を肝臓に発現させる。いくつかの実施形態では、提供組成物を投与することにより、肝臓総タンパク質中のA S S 1タンパク質が約1 0 0 n g / m g以上の量(例えば、約2 0 0 n g / m g、4 0 0 n g / m g、5 0 0 n g / m g、1 0 0 0 n g / m g、2 0 0 0 n g / m gまたは3 0 0 0 n g / m g以上)の量で発現する。

【0 0 2 1】

いくつかの実施形態では、組成物を投与することにより、A S S 1タンパク質血清濃度が上昇する。いくつかの実施形態では、組成物を投与することにより、A S S 1タンパク質血清濃度が治療前のベースラインのA S S 1タンパク質血清濃度と比較して、少なくとも約1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1倍、2倍、3倍、4倍または5倍上昇する。

40

【0 0 2 2】

いくつかの実施形態では、組成物を投与することにより、被検体のシトルリン量が治療前ベースラインのシトルリン量より低下する。いくつかの実施形態では、組成物を投与することにより、血漿中シトルリン量が治療前ベースラインの血漿中シトルリン量と比較して、少なくとも約1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または9 5 %低下する。いくつかの実施形態では、組成物を投与することにより、血漿中シトルリン量を約2 0 0 0 μ M、1 5 0 0 μ M、1 0 0 0 μ M、7 5 0 μ M、5 0 0 μ M、2 5 0 μ M、1 0 0 μ M、9 0 μ M、8 0 μ M、7 0 μ M、6 0 μ M、5 0 μ

50

M、40 μM、または30 μMより少ない値まで低下させる。

【0023】

いくつかの実施形態では、組成物を投与することにより、被検体のアンモニア濃度が治療前のベースラインのアンモニア濃度より低下する。いくつかの実施形態では、提供組成物を投与することにより、血漿中または血清中のアンモニア濃度を約3000 μmol/L以下、約2750 μmol/L以下、約2500 μmol/L以下、約2250 μmol/L以下、約2000 μmol/L以下、約1750 μmol/L以下、約1500 μmol/L以下、約1250 μmol/L以下、約1000 μmol/L以下、約750 μmol/L以下、約500 μmol/L以下、約250 μmol/L以下、約100 μmol/L以下、または約50 μmol/L以下まで低下させる。特定の実施形態では、

10

【0024】

いくつかの実施形態では、提供組成物を投与することにより、生体試料中のアンモニア濃度を、治療前のベースラインのアンモニア濃度に比較して少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%低下させる。好適な生体試料は、全血、血清、血漿、または尿であって

20

【0025】

いくつかの実施形態では、mRNAはコドンが最適化されている。いくつかの実施形態では、コドンが最適化されたmRNAは、配列番号3、配列番号13、配列番号14または配列番号15（コドンが最適化された、ヒトASS1 mRNA配列に相当する）を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号4の5' UTR配列（5' UTR配列Xに相当する）を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号5の3' UTR配列（3' UTR配列Yに相当する）を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、配列番号6の3' UTR配列（3' UTR配列Yに相当する）を含む。いくつかの実施形態では、コドンが最適化されたmRNAは、配列番号7または配列番号8（コドンが最適化された、5' UTR及び3' UTR配列を有するヒトASS1 mRNA配列に相当する）を含む。

30

【0026】

いくつかの実施形態では、mRNAは、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、かかる1つ以上の修飾ヌクレオチドは、プソイドウリジン、N-1-メチル-プソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニルシチジン、C-5プロピニルウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニルウリジン、C5-プロピニルシチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、及び/または2-チオシチジンを含む。いくつかの実施形態では、mRNAは修飾されていない。

40

【0027】

特定の実施形態では、本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）をコードするmRNAを有効用量リボソーム内に封入して含む、ASDを治療するための組成物を提供し、これにおいて、かかるmRNAは、配列番号3、配列番号13、配列番号14または配列番号15を含み、さらに、かかるリボソームは、カチオン性脂質または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG修飾脂質を含む。

【0028】

50

特定の実施形態では、本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）をコードする mRNA を有効用量リポソーム内に封入して含む、ASD を治療するための組成物を提供し、これにおいて、かかる mRNA は、配列番号 7 または配列番号 8 を含み、さらに、かかるリポソームは、カチオン性脂質または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及び PEG 修飾脂質を含む。

【0029】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以降に記載の発明を実施するための形態、図面及び請求項において明らかである。しかしながら、発明を実施するための形態、図面、及び請求項は、本発明の実施形態を指してはいるが、あくまで例示的なものに過ぎず、それに限定されないことを理解されるべきである。本発明の範囲内でのさまざまな変更及び修正は当業者には明らかとなるであろう。

10

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目 1）

アルギニノコハク酸合成酵素欠損症（ASD）を治療する方法であって、アルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）をコードする mRNA を含む組成物を、ASD の症状または特徴の少なくとも 1 つを、強度、重症度、若しくは頻度の点で低減させる、または発症を遅延させるような有効用量及び投与間隔で、治療を必要としている被検体に投与することを含む、前記治療方法。

（項目 2）

mRNA をリポソーム内に封入する、項目 1 に記載の方法。

20

（項目 3）

リポソームが、1 種以上のカチオン性脂質、1 種以上の非カチオン性脂質、1 種以上のコレステロール系脂質及び 1 種以上の PEG 修飾脂質を含む、項目 2 に記載の方法。

（項目 4）

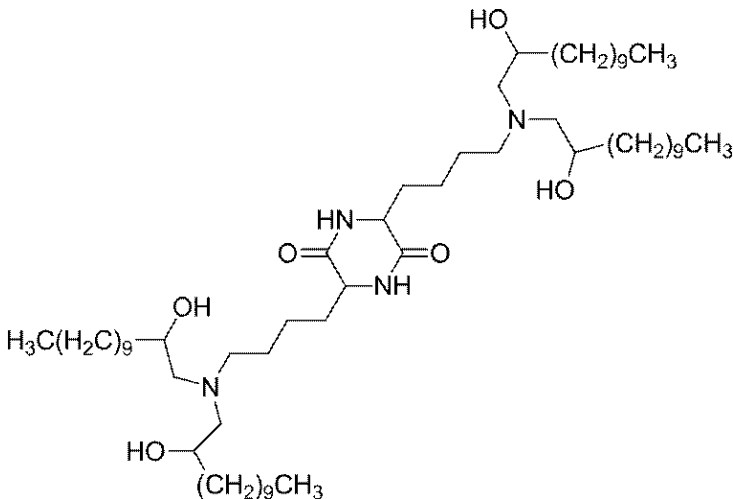
1 種以上のカチオン性脂質が、C12-200、MC3、DLiNDMA、DLiNC2DMA、cKK-E12、ICE（イミダゾール系）、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA 及び DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLiNDMA、CpLiNDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLiNDAP、DLincarbDAP、DLiNC DAP、KLin-K-DMA、DLiN-K-XTC2-DMA、HGT4003、並びにその組み合わせからなる群から選択されるカチオン性脂質を含む、項目 3 に記載の方法。

30

（項目 5）

1 種以上のカチオン性脂質が、cKK-E12

【化 6】



40

を含む、項目 4 に記載の方法。

50

(項目6)

1種以上の非カチオン性脂質が、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DPPC(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPC(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホチジルコリン(phosphotidylcholine))、DPPE(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DMPE(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPG(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール))から選択される、項目3~5のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目7)

1種以上のコレステロール系脂質が、コレステロール及び/またはPEG化コレステロールである、項目3~6に記載の方法。

(項目8)

1種以上のPEG修飾脂質が、鎖長C₆-C₂₀のアルキル鎖(複数可)を有する脂質に共有結合している鎖長が最高5kDaのポリ(エチレン)グリコール鎖を含む、項目3~7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

カチオン性脂質が、重量で、リポソームの約30~50%を構成する、項目1~8のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目10)

カチオン性脂質が、重量で、リポソームの約40%を構成する、項目9に記載の方法。

(項目11)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：PEG化脂質の比が、モル比で約40：30：20：10である、項目3~10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：PEG化脂質の比が、重量で約40：30：25：5である、項目3~10のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロール：PEG化脂質の比が、重量で約40：32：25：3である、項目3~10のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目14)

リポソームが、
cKK-E12、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；
C12-200、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；
HGT4003、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K；または
ICE、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2K
から選択される組み合わせを含む、項目2~13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

リポソームのサイズが約100nm未満である、項目2~14のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目16)

mRNAを、範囲が約0.1~5.0mg/kg体重の有効用量で投与する、項目1~15のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

mRNAを、範囲が約0.1~3.0mg/kg体重の有効用量で投与する、項目1~16のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

mRNAを、範囲が約0.1~1.0mg/kg体重の有効用量で投与する、項目1~17のいずれか一項に記載の方法。

50

- (項目 19)
組成物を静脈内に投与する、項目 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 20)
組成物を週 1 回投与する、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 21)
組成物を週 2 回投与する、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 22)
組成物を月 2 回投与する、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 23)
組成物を月 1 回投与する、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。 10
- (項目 24)
組成物を 14 日に 1 回投与する、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 25)
A S S 1 タンパク質が、肝臓に発現する、項目 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 26)
組成物の投与により、肝臓の総タンパク質量中 A S S 1 タンパク質量の発現量が約 100 ng / mg 以上になる、項目 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 27)
組成物の投与により、A S S 1 タンパク質血清濃度が上昇する、項目 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。 20
- (項目 28)
組成物の投与により、被検体のシトルリン量が治療前ベースラインのシトルリン量と比較して低下する、項目 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 29)
組成物の投与により、被検体のアンモニア濃度が治療前ベースラインのアンモニア濃度と比較して低下する、項目 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 30)
組成物の投与により、アンモニア血漿濃度が約 50 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 以下まで低下する、項目 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 31)
組成物の投与により、アンモニア血漿濃度が約 300 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 以下まで低下する、項目 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。 30
- (項目 32)
組成物の投与により、アンモニア血漿濃度が約 1500 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 以下まで低下する、項目 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 33)
mRNA がコドンが最適化されている mRNA である、項目 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 34)
コドンが最適化された mRNA が、配列番号 3、配列番号 13、配列番号 14 または配列番号 15 を含む、項目 33 に記載の方法。 40
- (項目 35)
mRNA が、配列番号 4 の 5' UTR 配列をさらに含む、項目 34 に記載の方法。
- (項目 36)
mRNA が、配列番号 5 または配列番号 6 の 3' UTR 配列をさらに含む、項目 34 に記載の方法。
- (項目 37)
mRNA は、配列番号 7 または配列番号 8 を含む、項目 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 38) 50

mRNAは、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、項目1～37のいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

1つ以上の修飾ヌクレオチドが、プソイドウリジン、N-1-メチル-プソイドウリジン、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニルシチジン、C-5プロピニルウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニルウリジン、C5-プロピニルシチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、及び/または2-チオシチジンを含む、項目38に記載の方法。

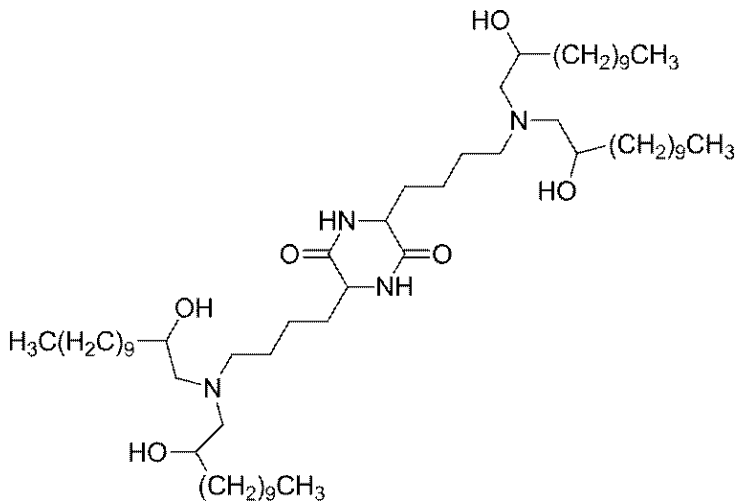
(項目40)

mRNAが修飾されていない、項目1～32のいずれか一項に記載の方法。

(項目41)

カチオン性脂質 c K K - E 1 2

【化7】



を含むリボソーム内にアルギニノコハク酸合成酵素(ASS1)をコードするmRNAを有効用量封入した、アルギニノコハク酸合成酵素欠損症(ASD)を治療するための組成物。

(項目42)

リボソームが1種以上の非カチオン性脂質、1種以上のコレステロール系脂質、及び1種以上のPEG修飾脂質をさらに含む、項目41に記載の組成物。

(項目43)

1種以上の非カチオン性脂質が、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DPPC(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPC(1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホチジルコリン(phosphatidylcholine))DPPE(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DMPE(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DOPG(、2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-(1'-rac-グリセロール))から選択される、項目42に記載の組成物。

(項目44)

1種以上のコレステロール系脂質が、コレステロール及び/またはPEG化コレステロールから選択される、項目42または43に記載の組成物。

(項目45)

10

20

30

40

50

1種以上のPEG修飾脂質が、鎖長C₆-C₂₀のアルキル鎖(複数可)を有する脂質に共有結合している鎖長が最高5kDaのポリ(エチレン)グリコール鎖を含む、項目42~44のいずれか一項に記載の組成物。

(項目46)

リポソームが、cKK-E12、DOPE、コレステロール及びDMG-PEG2Kを含む、項目41~45のいずれか一項に記載の組成物。

(項目47)

カチオン性脂質が、モル比で、リポソームの約30~50%を構成する、項目41~46のいずれか一項に記載の組成物。

(項目48)

カチオン性脂質が、モル比で、リポソームの約40%を構成する、項目47に記載の組成物。

(項目49)

cKK-E12:DOPE:コレステロール:DMG-PEG2Kの比が、モル比で約40:30:20:10である、項目46~48のいずれか一項に記載の組成物。

(項目50)

cKK-E12:DOPE:コレステロール:DMG-PEG2Kの比が、モル比で約40:30:25:5である、項目42~48のいずれか一項に記載の組成物。

(項目51)

cKK-E12:DOPE:コレステロール:DMG-PEG2Kの比が、モル比で約40:32:25:3である、項目42~48のいずれか一項に記載の組成物。

(項目52)

リポソームのサイズが約100nm未満である、項目41~51のいずれか一項に記載の組成物。

(項目53)

組成物を、静脈内投与用に製剤化する、項目41~52のいずれか一項に記載の組成物。

(項目54)

mRNAが、配列番号3配列番号13、配列番号14または配列番号15を含む、項目41~53のいずれか一項に記載の組成物。

(項目55)

mRNAが、配列番号4の5'UTR配列をさらに含む、項目54に記載の組成物。

(項目56)

mRNAが、配列番号5または配列番号6の3'UTR配列をさらに含む、項目54に記載の組成物。

(項目57)

mRNAが、配列番号7または配列番号8を含む、項目41~56のいずれか一項に記載の組成物。

(項目58)

アルギニノコハク酸合成酵素欠損症(ASD)を治療するための組成物であって、アルギニノコハク酸合成酵素(ASS1)をコードするmRNAを有効用量リポソーム内に封入して含み、ここで、前記mRNAは、配列番号3、配列番号13、配列番号14または配列番号15を含み、さらに、前記リポソームは、カチオン性脂質または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG修飾脂質を含む、前記組成物。

(項目59)

アルギニノコハク酸合成酵素欠損症(ASD)を治療するための組成物であって、アルギニノコハク酸合成酵素(ASS1)をコードするmRNAを有効用量リポソーム内に封入して含み、ここで、前記mRNAは、配列番号7または配列番号8を含み、さらに、前記リポソームは、カチオン性脂質または非カチオン性脂質、コレステロール系脂質及びPEG修飾脂質を含む、前記組成物。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0030】

図面はあくまでも例示に過ぎず、それに限定されるものではない。

【図1】図1は、さまざまな用量でのヒトASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子による治療後にELISAにより検出された例示的ASS1タンパク質量を示す。

【図2A】図2A～2Dは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子を静脈内に単回投与した後の肝臓中ヒトASS1タンパク質量を、用量と相関する要素として比較した例示的ウエスタンプロットを示す。複数のCD1マウスを投与から24時間後に殺し、各肝臓を回収して上記のように解析した。ヒトASS1タンパク質を2H8マウスのモノクローナル抗体を使用して検出した。肝臓総タンパク質50マイクログラムを各ウェルに入れた。組換えヒトASS1タンパク質を陽性対照として各ゲルに担持させた（R5対照）。

【図2B】図2A～2Dは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子を静脈内に単回投与した後の肝臓中ヒトASS1タンパク質量を、用量と相関する要素として比較した例示的ウエスタンプロットを示す。複数のCD1マウスを投与から24時間後に殺し、各肝臓を回収して上記のように解析した。ヒトASS1タンパク質を2H8マウスのモノクローナル抗体を使用して検出した。肝臓総タンパク質50マイクログラムを各ウェルに入れた。組換えヒトASS1タンパク質を陽性対照として各ゲルに担持させた（R5対照）。

【図2C】図2A～2Dは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子を静脈内に単回投与した後の肝臓中ヒトASS1タンパク質量を、用量と相関する要素として比較した例示的ウエスタンプロットを示す。複数のCD1マウスを投与から24時間後に殺し、各肝臓を回収して上記のように解析した。ヒトASS1タンパク質を2H8マウスのモノクローナル抗体を使用して検出した。肝臓総タンパク質50マイクログラムを各ウェルに入れた。組換えヒトASS1タンパク質を陽性対照として各ゲルに担持させた（R5対照）。

【図2D】図2A～2Dは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子を静脈内に単回投与した後の肝臓中ヒトASS1タンパク質量を、用量と相関する要素として比較した例示的ウエスタンプロットを示す。複数のCD1マウスを投与から24時間後に殺し、各肝臓を回収して上記のように解析した。ヒトASS1タンパク質を2H8マウスのモノクローナル抗体を使用して検出した。肝臓総タンパク質50マイクログラムを各ウェルに入れた。組換えヒトASS1タンパク質を陽性対照として各ゲルに担持させた（R5対照）。

【図3】図3は、ELISAで測定したヒトのアルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）タンパク質の蓄積量を例示的グラフで示したものである。検出されたタンパク質は、脂質ナノ粒子（ASS1 mRNAを1.0mg/kg封入）の静脈内単回投与によりASS1 mRNAが送達された結果、経時的に産生されたものである。

【図4A】図4A～4Eは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子（用量1.0mg/kg）を静脈内に単回投与した後の、経時的な肝臓中ヒトASS1タンパク質量を例示的ウエスタンプロットで示している。

【図4B】図4A～4Eは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子（用量1.0mg/kg）を静脈内に単回投与した後の、経時的な肝臓中ヒトASS1タンパク質量を例示的ウエスタンプロットで示している。

【図4C】図4A～4Eは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子（用量1.0mg/kg）を静脈内に単回投与した後の、経時的な肝臓中ヒトASS1タンパク質量を例示的ウエスタンプロットで示している。

【図4D】図4A～4Eは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子（用量1.0mg/kg）を静脈内に単回投与した後の、経時的な肝臓中ヒトASS1タンパク質量を例示的ウエスタンプロットで示している。

【図4E】図4A～4Eは、ヒトASS1 mRNAを封入した脂質ナノ粒子（用量1.0 mg/kg）を静脈内に単回投与した後の、経時的な肝臓中ヒトASS1タンパク質量を例示的ウエスタンブロットで示している。

【図5A】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5B】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5C】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5D】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5E】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5F】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5G】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5H】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図5I】図5A～5Iは、各処置マウスの肝臓における*in situ*ハイブリダイゼーションによるヒトASS1メッセンジャーRNAの検出を示す。外因性mRNAは、ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子の単回投与（1.0 mg/kg）を行った後少なくとも7日間は観察可能である。ヒトASS1 mRNAは類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。

【図6A】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1 mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク

10

20

30

40

50

質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6B】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6C】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6D】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6E】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6F】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6G】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6H】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図6I】図6A～6Iは、cKK-E12脂質ナノ粒子を含有するASS1 mRNA 1mg/kgの投与後の、さまざまな測定時点におけるマウス肝臓中のASS1タンパク質量を例示的に免疫組織化学染色で示している。ヒトASS1タンパク質は、類洞壁細胞並びに肝細胞で検出可能である。ヒトASS1タンパク質は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子の単回投与後少なくとも1週間は検出可能である。

【図7A】図7A～7Bは、ASS1 mRNA含有cKK-E12リポソーム1mg/kg投与後24時間のマウス肝臓中のASS1タンパク質量を、低倍率(4x)免疫組織化学染色で示している。未処置マウスの肝臓(左)と比較すると、肝臓全体にわたりヒトASS1タンパク質の広範な分布が示されている。

【図7B】図7A～7Bは、ASS1 mRNA含有cKK-E12リポソーム1mg/kg投与後24時間のマウス肝臓中のASS1タンパク質量を、低倍率(4x)免疫組織化学染色で示している。未処置マウスの肝臓(左)と比較すると、肝臓全体にわたりヒトA

10

20

30

40

50

SS1タンパク質の広範な分布が示されている。

【図8】図8は、ELISAで測定したヒトのアルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）タンパク質量を例示的にグラフで示す。検出されたタンパク質は、各種の脂質ナノ粒子の静脈内単回投与によりASS1 mRNAが送達された結果産生されたものである。

【図9】図9は、ASS1 mRNAをASS1 KO細胞株（SK（-））にトランスフェクションした後の、タンパク質への¹⁴Cアルギニンの取り込みを、安定発現陽性ASS1細胞株（SK（+）、クローン#5）と比較したものを示す。対照は、Lipofectamineのみで処置したSK（-）細胞である。

【図10】図10は、ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子投与後24時間のラット肝臓中のヒトASS1タンパク質量を示す。

【図11】図11は、1.0 mg/kgのASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子を14日に1回、30日間投与したASS1ノックアウトマウスのアンモニア血漿濃度を示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

定義

本発明がより容易に理解されるよう、特定の用語を最初に下記に定義する。以下の用語及び他の用語のさらなる定義は、本明細書を通して記載される。発明の背景を説明し、その実施に関するさらなる詳細を提供するために本明細書で参照される刊行物及び他の参照資料は、参照により本明細書に取り込まれる。

【0032】

アルキル：本明細書で使用する場合、「アルキル」とは、炭素原子1～15個を有する直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素基のラジカル（「C₁₋₁₅アルキル」）をいう。いくつかの実施形態では、アルキル基は、炭素原子を1～3個有する（「C₁₋₃アルキル」）。C₁₋₃アルキル基の例としては、メチル基（C₁）、エチル基（C₂）、N-プロピル基（C₃）、及びイソプロピル基（C₃）が挙げられる。いくつかの実施形態では、アルキル基は、炭素原子を8～12個有する（「C₈₋₁₂アルキル」）。C₈₋₁₂アルキル基の例としては、nオクチル基（C₈）、N-ノニル基（C₉）、N-デシル基（C₁₀）、N-ウンデシル基（C₁₁）、N-ドデシル基（C₁₂）等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。接頭辞「N-」（normal）とは、分岐していないアルキル基をいう。例えば、N-C₈アルキル基は-(CH₂)₇CH₃などを指し、N-C₁₀アルキル基は-(CH₂)₉CH₃などを指す。

【0033】

アミノ酸：本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」は、その最も広い意味において、ポリペプチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物及び/または物質をいう。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造H₂N-C(H)(R)-COOHを有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は天然に生じるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は合成アミノ酸であり、実施形態によっては、アミノ酸はd-アミノ酸であり、実施形態によっては、アミノ酸はL-アミノ酸である。「標準アミノ酸」とは、天然に生じるペプチドに一般に見られる20の標準L-アミノ酸の任意のものをいう。「非標準アミノ酸」とは、合成して調製したのか、または天然資源から得たのかにかかわらず、上記の標準アミノ酸以外のあらゆるアミノ酸をいう。本明細書で使用する場合、「合成アミノ酸」は化学的に修飾したアミノ酸を包含し、これには、塩類、アミノ酸誘導体（アミド類など）、及び/または置換が含まれるが、これらに限定されるものではない。アミノ酸は、ペプチドのカルボキシ末端及び/またはアミノ末端にあるアミノ酸を含めて、ペプチドの循環血中半減期をその活性に悪影響を及ぼすことなく変化させ得るメチル化、アミド化、アセチル化、保護基、及び/または、他の化学基との置換により修飾可能である。アミノ酸はジスルフィド結合に関与してよい。アミノ酸は、1種以上の化学的実体（chemical entities）（例えば、メチル基、アセテート基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ビオチン部分等）との会合のような1つまたは翻訳後修飾を含んで

10

20

30

40

50

よい。用語「アミノ酸」は、「アミノ酸残基」と同じ意味で使用され、遊離のアミノ酸及び/またはペプチドのアミノ酸残基を指すことがある。用語が遊離のアミノ酸を指すのか、またはペプチドの残基を指すのかは、その用語が使用されている文脈から明らかとなるであろう。

【0034】

動物：本明細書で使用する場合、用語「動物」とは、動物界の任意のメンバーをいう。いくつかの実施形態では、「動物」とは、任意の発達段階にあるヒトをいう。いくつかの実施形態では、「動物」とは、任意の発達段階にある非ヒト動物をいう。ある実施形態では、かかる非ヒト動物は哺乳類（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び/またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物には、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類、及び/または虫類が含まれるが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、動物はトランスジェニック動物、遺伝子工学処理動物、及び/またはクローンであってよい。

10

【0035】

約 (Approximately) または約 (about)：本明細書で使用する場合、用語「約 (approximately)」または「約 (about)」は、1つ以上の対象となる値に付される場合、記載されている基準値と同様の値をいう。ある実施形態では、用語「約 (approximately)」または「約 (about)」とは、記載されている基準値からいずれの方向（より大またはより小）においても25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満の値以内に入る数値範囲をいうが、他に断りがあるかまたは文脈から他の意味が明らかな場合はその限りではない（ただし、このような数値が可能値の100%を超える場合を除く）。

20

【0036】

生物学的に活性である：本明細書で使用する場合、語句「生物学的に活性である」とは、生物系、特に生物において活性がある任意の薬剤の特性をいう。例えば、生物に投与した場合にその生物に対して生物学的作用がある薬剤は、生物学的に活性であると見なされる。

【0037】

送達：本明細書で使用する場合、用語「送達」は、局所送達及び全身送達の両方を包含する。例えば、mRNAの送達というときは、mRNAが標的組織に送達され、そのコードしたタンパク質が発現して標的組織内に保持される状況（「局所分布」または「局所送達」とも呼ばれる）、及び、mRNAが標的組織に送達され、そのコードしたタンパク質が発現して患者の循環血液系内（例えば、血清）に分泌され、全身に分布し他組織に取り込まれる状況（「全身分布」または「全身送達」とも呼ばれる）を包含する。

30

【0038】

発現：本明細書で使用する場合、核酸配列の「発現」とは、mRNAからポリペプチドへの翻訳、多数のポリペプチドから一つの完全タンパク質（例えば、酵素）の構築、及び/または一つのポリペプチドまたは完全に構築されたタンパク質（例えば、酵素）の翻訳後修飾をいう。本願では、用語「発現」及び「産生」、及び文法上の同等表現は、同じ意味で使用される。

40

【0039】

機能的：本明細書で使用する場合、「機能的」生物学的分子は、その特徴とされる特性及び/または活性を示す形態にある、生物学的分子である。

【0040】

半減期：本明細書で使用する場合、用語「半減期」は、核酸若しくはタンパク質の濃度または活性のようなある量が、ある期間開始時の測定値の半分まで減少するのに要する時間である。

【0041】

改善する (Improve)、上昇する (increase)、または低下させる (r

50

reduce) : 本明細書で使用する場合、用語「改善する (improve)」、「上昇する (increase)」、「低下させる (reduce)」)、または文法上の同等表現は、本明細書に記載の治療開始前の同一個人における測定値、または本明細書に記載の治療を行わない一個の対照被検体 (または複数の対照被検体) における測定値、といったベースライン測定値と比較した値を指す。「対照被検体」とは、治療される被検体と同一の疾患型に罹患しており、治療される被検体とほぼ同じ年齢の被検体である。

【0042】

In vitro : 本明細書で使用する場合、用語「in vitro」とは、多細胞生物内ではなく人工的環境、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養中などにおいて発現する事象をいう。

【0043】

In vivo : 本明細書で使用する場合、用語「in vivo」とは、ヒト及び非ヒト動物のような多細胞生物体内で発現する事象をいう。細胞由来系の文脈では、かかる用語を使用して生きた細胞内に発現する事象をいう場合がある (これは、例えば、in vitro系とは対照的である)。

【0044】

単離された : 本明細書で使用する場合、用語「単離された」とは、物質及び/または実体で、(1) 初めに産生されたときに (自然界及び/または実験的設定において)、それが会合していた成分の少なくとも一部から分離されているもの、並びに/または (2) 人の手により作製、調製、及び/または製造が行われたものをいう。単離された物質及び/または実体は、それらが初めに会合していた他の成分の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%以上から分離されてよい。いくつかの実施形態では、単離された物質は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%以上の純度である。本明細書で使用する場合、他の成分が実質的に含まれていない場合、物質は「純粋」である。本明細書で使用する場合、単離された、物質及び/または実体の純度計算には、添加剤 (例えば、緩衝液、溶媒、水など) を含めないものとする。

【0045】

局所的な分布または送達 : 本明細書で使用する場合、用語「局所分布」、「局所送達」、または文法上の同等表現は、組織特異的な送達または分布をいう。典型的に、局所的な分布または送達では、mRNAでコードされるタンパク質 (例えば、酵素) が翻訳され、細胞内で発現するかまたは限定的に分泌されて、患者の循環血液系に入らないようにさせる必要がある。

【0046】

メッセンジャーRNA (mRNA) : 本明細書で使用する場合、用語「メッセンジャーRNA (mRNA)」とは、少なくとも1つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをいう。mRNAは、本明細書で使用する場合、修飾RNA及び非修飾RNAの両方を包含する。mRNAは、1つ以上のコード領域及び非コード領域を含有してよい。mRNAは、天然資源から精製し、組換え発現系を用いて作製することができ、任意選択で精製、化学的合成などが可能である。適切な場合、例えば、化学合成した分子の場合、mRNAは、化学修飾された塩基若しくは糖類、骨格修飾などを有する類似体のようなヌクレオチド類似体を含み得る。mRNA配列は、特に明記しない限り5'から3'の方向で提示される。いくつかの実施形態では、mRNAは、天然ヌクレオチド (例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン) ; ヌクレオチド類似体 (例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニルシチジン、C-5プロピニルウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニルウリジン、C5-プロピニルシチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノア

10

20

30

40

50

デノシン、7 - デアザアデノシン、7 - デアザグアノシン、8 - オキソアデノシン、8 - オキソグアノシン、O (6) - メチルグアニン、及び2 - チオシチジン) ; 化学的修飾塩基 ; 生物学的修飾塩基 (例えば、メチル化塩基) ; インターカレートした塩基 ; 修飾糖類 (例えば、2' - フルオロリボース、リボース、2' - デオキシリボース、アラビノース、及び六炭糖) ; 及び / または修飾リン酸基 (例えば、チオリン酸エステル結合及び5' - N - アミド垂リン酸エステル結合) である、またはこれらを含んでいる。

【 0 0 4 7 】

核酸 : 本明細書で使用する場合、用語「核酸」は、その最も広い意味において、ポリヌクレオチド鎖に組み込まれる、または組み込まれ得る、任意の化合物及び / または物質をいう。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を介してポリヌクレオチド鎖に組み込まれる、または組み込まれ得る、化合物及び / または物質である。いくつかの実施形態では、「核酸」とは、個々の核酸残基 (例えば、ヌクレオチド及び / またはヌクレオシド) をいう。いくつかの実施形態では、「核酸」とは、個々の核酸残基を含むポリヌクレオチド鎖をいう。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNA 並びに、一本鎖及び / 若しくは二本鎖の DNA 及び / 若しくは cDNA を包含する。

10

【 0 0 4 8 】

患者 : 本明細書で使用する場合、用語「患者」または「被検体」とは、例えば、試験、診断、予防、美容、及び / または治療を目的として提供組成物が投与され得る任意の生物をいう。典型的な患者には、動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及び / またはヒトなどの哺乳類) が含まれる。いくつかの実施形態では、患者はヒトである。ヒトには、出生前及び出生後の両形態が含まれる。

20

【 0 0 4 9 】

薬理的に許容される : 用語「薬理的に許容される」は、本明細書で使用する場合、正しい医学的判断の範囲内で、ヒト及び動物の組織と接触して使用するのに好適であり、過渡の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題または合併症がなく、妥当な利益 / リスクの度合いに見合った物質をいう。

【 0 0 5 0 】

薬理的に許容される塩 : 薬理的に許容される塩は、当技術分野において周知である。例えば、S . M . B e r g e r は、薬理的に許容される塩について J . P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s (1 9 7 7) 6 6 : 1 - 1 9 で詳細に記載している。本発明の化合物の薬理的に許容される塩には、好適な無機及び有機の酸及び塩基に由来する塩が挙げられる。薬理的に許容される、非毒性酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸及び過塩素酸のような無機酸で形成されるアミノ基、または、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸若しくはマロン酸のような有機酸で形成されるアミノ基、または、イオン交換法のような当該技術分野で使用される他の方法を使用して形成されるアミノ基、の塩である。他の薬理的に許容される塩としては、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ニグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩等が挙げられる。適切な塩基由来の塩としては、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム及び $N^+ (C_{1-4} \text{アルキル})_4$ の塩が挙げられる。代表的アルカリまたはアルカリ土類の金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等が挙げられる。さらなる薬

30

40

50

理学的に許容される塩としては、適切な場合には、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、スルホン酸塩及びアリアルスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成される、非毒性のアンモニウム、四級アンモニウム、及びアミンカチオンが挙げられる。さらなる薬理的に許容される塩としては、四級化アルキルアミノ塩を形成するための適切な求電子剤、例えば、ハロゲン化アルキルを使用してアミンの四級化により形成される塩が挙げられる。

【0051】

全身的な分布または送達：本明細書で使用する場合、用語「全身分布」、「全身送達」、または文法上の同等表現は、身体全体または生物体全体に影響が及ぶ送達または分布の、機構または方法をいう。典型的には、全身分布または全身送達は、体の循環系、例えば、血流を介して達成される。「局所的な分布または送達」の定義と対比される。

10

【0052】

被検体：本明細書で使用する場合、用語「被検体」とは、ヒトまたは任意の非ヒト動物（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）をいう。ヒトには、出生前及び出生後の形態が含まれる。多くの実施形態では、被検体はヒトである。被検体は患者であり得、疾患の診断または治療のために医療提供者を訪れるヒトを指す。用語「被検体」は、本明細書では「個人」または「患者」と同じ意味で使用される。被検体は、疾患または障害に罹患している、または罹患しやすい被検体であり得るが、その疾患または障害の症状を呈していてもいなくてもよい。

【0053】

実質的に：本明細書で使用する場合、用語「実質的に」とは、対象とする特徴または特性の範囲または程度が完全またはほぼ完全に示されている定性的条件をいう。生物学分野の当業者は、生物学的及び化学的現象が、完全に終了する、及び/または、完了まで進行する、または、絶対的な結果を達成若しくは回避することは、生じたとしてもまれであることを理解できよう。したがって、用語「実質的に」は、本明細書では、多くの生物学的及び化学的現象に固有の、完全性に欠ける可能性を捕捉するために使用する。

20

【0054】

標的組織：本明細書で使用する場合、用語「標的組織」とは、治療すべき疾患に罹患している任意の組織をいう。いくつかの実施形態では、標的組織には、疾患に関連する病理、症状、または特徴を示す組織が含まれる。

30

【0055】

治療的有効量：本明細書で使用する場合、治療剤の「治療的有効量」とは、疾患、障害、及び/または病態に罹患しているまたは罹患しやすい被検体に投与した場合に、疾患、障害、及び/または病態の症状（複数可）を治療する、診断する、予防する、及び/またはその発症を遅延させるのに十分である量を意味する。治療的有効量は、典型的には、少なくとも1つの単位用量を含む投与レジメンで投与されることは当業者には理解されるであろう。

【0056】

治療：本明細書で使用する場合、用語「治療する (treat)」、「治療 (treatment)」、または「治療すること (treating)」とは、特定の疾患、障害、及び/または病態の症状若しくは特徴の1つ以上について、部分的または完全に、回復させる、改善する、軽減させる、抑制する、予防する、発症を遅延させる、重症度を低減させる、及び/または発生率を低下させるために使用される任意の方法をいう。治療は、疾患の徴候を示していない、及び/または疾患の初期徴候しか示していない被検体に、疾患に関連した病理の発症リスクを低下させることを目的として施行してよい。

40

【0057】

(詳細な説明)

本発明は、特に、アルギニノコハク酸合成酵素欠損症 (ASD) を治療するための、mRNA治療に基づく方法及び組成物を提供する。詳しくは、本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素 (ASS) をコードするmRNAを含む組成物を、ASDの症状または特徴の

50

少なくとも1つを、強度、重症度、若しくは頻度の点で低減させる、または発症を遅延させるような有効用量及び投与間隔で、治療を必要としている被検体に投与することによりASDを治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、mRNAを、1個以上のリポソーム内に封入する。本明細書で使用する場合、用語「リポソーム」とは、任意の層状、多重層状、または固体のナノ粒子の小胞をいう。典型的に、リポソームは、本明細書で使用する場合、1種以上の脂質の混合または1種以上の脂質とポリマー（複数可）との混合により形成することができる。したがって、用語「リポソーム」は、本明細書で使用する場合、脂質系ナノ粒子及びポリマー系ナノ粒子の両方を包含する。いくつかの実施形態では、本発明に好適なリポソームは、カチオン性脂質または非カチオン性脂質（複数可）、コレステロール系脂質（複数可）及びPEG修飾脂質（複数可）を含有する。

10

【0058】

アルギニノコハク酸合成酵素欠損症（ASD）

本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素欠損症（ASD）に罹患しているかまたは罹患しやすい被検体を治療するために使用してよい。ASDは、酵素アルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）の遺伝子変異を特徴とする、常染色体劣性遺伝による遺伝性代謝疾患である。I型ASDを引き起こす少なくとも50の変異がASS1遺伝子で同定されている。これらの変異の大部分で、単一アミノ酸の置換が関与している。ASS1遺伝子内の変異の多くは、その結果として作られるタンパク質の構造及びそのタンパク質のシトルリン、アスパラギン酸塩及び他の分子に対する結合能力に影響を与える可能性が高い。ASS1遺伝子内変異のうちの少数は、通常より異常に短い酵素を産生させ、その酵素は尿素サイクルでの役割を有効に果たすことができない。

20

【0059】

ASS1タンパク質の欠陥により尿素サイクルが攪乱され、肝臓が、タンパク質がエネルギーに利用される際に生成される過剰な窒素を適切に尿素に処理するのを妨げる。アンモニア及び尿素サイクルの他の副生成物（シトルリンなど）の蓄積は有毒であり、この蓄積が生後数日で発症した場合、脱力（嗜眠）、哺乳不良、嘔吐、痙攣及び意識消失などの症状を引き起こす。これらの医学的問題は、多くの場合、生命を脅かす可能性がある。

【0060】

本明細書に記載する組成物及び方法は、ASDの症状または特徴の少なくとも1つを治療するために使用してよい。

30

【0061】

アルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）

いくつかの実施形態では、本発明は、アルギニノコハク酸合成酵素欠損症（ASD）を治療するために、ASS1をコードするmRNAを被検体に送達する方法及び組成物を提供する。好適なASS1mRNAは、天然に生じるASS1タンパク質活性の置き換え可能、かつ/またはASDに関連した1つ以上の症状の強度、重症度、及び/または頻度を低下させることができる、ASS1タンパク質の完全長、断片または部分の任意をコードする。

【0062】

いくつかの実施形態では、好適なmRNA配列はヒトASS1タンパク質をコードするmRNA配列である。天然に生じるヒトASS1 mRNA配列及び対応するアミノ酸配列を表1に示す。

40

【表 1 - 1】

表 1. ヒト ASS1

ヒト A	G C C G G C G C G C C C C U G G G A G G G U G A G C C G G C
S S 1	G C C G G G C C C A G G C C C G G A C C U G G U G G G A G G
(m R	C G G G G G G A G G U G G G G A C G A G G C C U G G G G A G
N A)	G C G G G C C C C G C C C A U C U G C A G G U G G C U G U G
	A A C G C U G A G C G G C U C C A G G C G G G G G C C G G G
	C C C G G G G G C G G G G U C U G U G G C G C G C G U C C C
	C G C C A C G U G U C C C C G G U C A C C G G C C C U G C C
	C C C G G G C C C U G U G C U U A U A A C C U G G G A U G G
	G C A C C C C U G C C A G U C C U G C U C U G C C G C C U G
	C C A C C G C U G C C C G A G C C C G A G U G G U U C A C U
	G C A C U G U G A A A A C A G A U U C C A G A C G C C G G G
	A A C U C A C G C C U C C A A U C C C A G A C G C U A U G U
	C C A G C A A A G G C U C C G U G G U U C U G G C C U A C A
	G U G G C G G C C U G G A C A C C U C G U G C A U C C U C G
	U G U G G C U G A A G G A A C A A G G C U A U G A C G U C A
	U U G C C U A U C U G G C C A A C A U U G G C C A G A A G G
	A A G A C U U C G A G G A A G C C A G G A A G A A G G C A C
	U G A A G C U U G G G G C C A A A A A G G U G U U C A U U G
	A G G A U G U C A G C A G G G A G U U U G U G G A G G A G U
	U C A U C U G G C C G G C C A U C C A G U C C A G C G C A C
	U G U A U G A G G A C C G C U A C C U C C U G G G C A C C U
	C U C U U G C C A G G C C C U G C A U C G C C C G C A A A C
	A A G U G G A A A U C G C C C A G C G G G A G G G G G C C A
	A G U A U G U G U C C C A C G G C G C C A C A G G A A A G G
	G G A A C G A U C A G G U C C G G U U U G A G C U C A G C U
	G C U A C U C A C U G G C C C C C C A G A U A A A G G U C A
	U U G C U C C C U G G A G G A U G C C U G A A U U C U A C A
	A C C G G U U C A A G G G C C G C A A U G A C C U G A U G G
	A G U A C G C A A A G C A A C A C G G G A U U C C C A U C C
	C G G U C A C U C C C A A G A A C C C G U G G A G C A U G G
	A U G A G A A C C U C A U G C A C A U C A G C U A C G A G G
	C U G G A A U C C U G G A G A A C C C C A A G A A C C A A G
	C G C C U C C A G G U C U C U A C A C G A A G A C C C A G G
	A C C C A G C C A A A G C C C C C A A C A C C C C U G A C A
	U U C U C G A G A U C G A G U U C A A A A A A G G G G U C C
	C U G U G A A G G U G A C C A A C G U C A A G G A U G G C A
	C C A C C C A C C A G A C C U C C U U G G A G C U C U U C A
	U G U A C C U G A A C G A A G U C G C G G G C A A G C A U G

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	<p>G C G U G G G C C G U A U U G A C A U C G U G G A G A A C C G C U U C A U U G G A A U G A A G U C C C G A G G U A U C U A C G A G A C C C C A G C A G G C A C C A U C C U U U A C C A U G C U C A U U U A G A C A U C G A G G C C U U C A C C A U G G A C C G G G A A G U G C G C A A A A U C A A A C A A G G C C U G G G C U U G A A A U U U G C U G A G C U G G U G U A U A C C G G U U U C U G G C A C A G C C C U G A G U G U G A A U U U G U C C G C C A C U G C A U C G C C A A G U C C C A G G A G C G A G U G G A A G G G A A A G U G C A G G U G U C C G U C C U C A A G G G C C A G G U G U A C A U C C U C G G C C G G G A G U C C C C A C U G U C U C U C U A C A A U G A G G A G C U G G U G A G C A U G A A C G U G C A G G G U G A U U A U G A G C C A A C U G A U G C C A C C G G G U U C A U C A A C A U C A A U U C C C U C A G G C U G A A G G A A U A U C A U C G U C U C C A G A G C A A G G U C A C U G C C A A A U A G A C C C G U G U A C A A U G A G G A G C U G G G G C C U C C U C A A U U U G C A G A U C C C C C A A G U A C A G G C G C U A A U U G U U G U G A U A A U U U G U A A U U G U G A C U U G U U C U C C C C G G C U G G C A G C G U A G U G G G G C U G C C A G G C C C C A G C U U U G U U C C C U G G U C C C C C U G A A G C C U G C A A A C G U U G U C A U C G A A G G G A A G G G U G G G G G G C A G C U G C G G U G G G G A G C U A U A A A A A U G A C A A U U A A A A G A G A C A C U A G U C U U U U A U U U C U A A A A A A A A A A A A A A A A (SEQ ID NO : 1)</p>	
ヒト A S S 1 (アミ ノ酸配 列)	<p>M S S K G S V V L A Y S G G L D T S C I L V W L K E Q G Y D V I A Y L A N I G Q K E D F E E A R K K A L K L G A K K V F I E D V S R E F V E E F I W P A I Q S S A L Y E D R Y L L G T S L A R P C I A R K Q V E I A Q R E G A K Y V S H G A T G K G N D Q V R F E L S C Y S L A P Q I K V I A P W R M P E F Y N R F K G R N D L M E Y A K Q H G I P I P V T P K N P W S M D E N L M H I S Y E A G I L E N P K N Q A P P G L Y T K T Q D P A K A P N T P D I L E I E F K K G V P V K V T N V K D G T T H Q T S L E L F M Y L N E V A G K H G V G R I D I V E N R F I G M K S R G I Y E T P A G T I L Y H A H L D I E A F T M D R E V R K I K Q G L G L K F A E L V Y T G F W H S P E C E F V R H C I A K S Q E R V E G K V Q V S V L K G Q V Y I L G R E S P L S L Y N E E L V S M N V Q G D Y E P T D A T G F I N I N S L R L K E Y H R L Q S K V T A K (SEQ ID NO : 2)</p>	

10

20

30

40

【0063】

いくつかの実施形態では、好適な mRNA は、配列（配列番号 1）の野生型 h A S S 1 mRNA である。いくつかの実施形態では、好適な mRNA は、下記に示す配列のような、コドン最適化した h A S S 1 配列であってよい

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

50

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

(配列番号3)。

【0064】

さらなる例示的な mRNA 配列は、下記実施例の項に記載されており、例えば、配列番号7及び配列番号8はいずれも、ASS1をコードするコドン最適化済み mRNA の枠付けをする5'及び3'の非翻訳領域を含んでいる。

【0065】

いくつかの実施形態では、好適な mRNA 配列は、ヒト ASS1 タンパク質の相同体または類似体 mRNA 配列であってよい。例えば、ヒト ASS1 タンパク質の相同体または類似体は、野生型または天然に生じるヒト ASS1 タンパク質と比べた場合、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を1つ以上含有し、実質的な ASS1 タンパク質活性は維持されている修飾ヒト ASS1 タンパク質であってよい。いくつかの実施形態では、本発明に好適な mRNA は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が配列番号2と相同であるアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に好適な mRNA は、ヒト ASS1 タンパク質と実質的に同一なタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に好適な mRNA は、少なくとも、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が、配列番号2と同一であるアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に好適な mRNA は、ヒト ASS1 タンパク質の断片または部分をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に好適な mRNA は、ヒト ASS1 タンパク質の断片または部分をコードし、これにおいて、かかるタンパク質の断片または部分は野生型タンパク質の ASS1 活性と同様の活性をそのまま維持している。いくつかの実施形態では、本発明に好適な mRNA は、少なくとも、50%、55%、60%、65%、70%、7

10

20

30

40

50

5%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号8、配列番号13、配列番号14または配列番号15と同一であるヌクレオチド配列を有する。

【0066】

いくつかの実施形態では、好適なmRNAは、別のタンパク質に融合させた（例えば、N末端またはC末端での融合）ASS1タンパク質の完全長、断片または部分を含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ASS1タンパク質の完全長、断片または部分をコードするmRNAに融合させたタンパク質は、シグナルまたは細胞標的配列をコードする。

【0067】

送達ビヒクル

本発明によれば、本明細書に記載する、ASS1タンパク質をコードするmRNA（例えば、ASS1タンパク質の完全長、断片または部分）は、裸のRNA（包み込まれていない）として、または送達ビヒクルを介して送達してよい。本明細書で使用する場合、用語「送達ビヒクル」、「運搬（transfer）ビヒクル」、「ナノ粒子」または文法上の同等表現は同じ意味で使用される。

【0068】

いくつかの実施形態では、ASS1タンパク質をコードするmRNAは、単一送達ビヒクルを介して送達してよい。いくつかの実施形態では、ASS1タンパク質をコードするmRNAは、それぞれの組成物が異なる1種以上の送達ビヒクルを介して送達してよい。さまざまな実施形態によれば、好適な送達ビヒクルとしては、ポリエチレンイミン（PEI）などのポリマー系担体、脂質ナノ粒子及び脂質リポソーム、ナノリポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、プロテオリポソーム、天然由来エキソソーム及び合成由来エキソソーム、天然、合成及び半合成の層状体、ナノ粒子状物質、リン酸カルシウムまたはケイ酸カルシウムのナノ粒子状物質、リン酸カルシウムナノ粒子状物質、二酸化ケイ素ナノ粒子状物質、ナノ結晶粒子、半導体ナノ粒子状物質、ポリ（D-アルギニン）、ゾルまたはゲル、ナノデンドリマー（nanodendrimer）、デンプン系送達システム、ミセル、エマルジョン、ニオソーム、マルチドメイン-ブロックポリマー（ビニルポリマー、ポリプロピルアクリル酸ポリマー、動的ポリ複合体）、乾燥散剤、プラスミド、ウイルス、リン酸カルシウムヌクレオチド、アプタマー、ペプチド並びに他のベクタータグが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0069】

リポソーム送達ビヒクル

いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルはリポソーム送達ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子である。本明細書で使用する場合、リポソーム送達ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子は、通常、1つ以上の二重層でなる膜により外側の媒体から隔離した水性画分を内部に有する顕微鏡的小胞として特徴付けられる。リポソームの二重膜は、典型的に、空間的に分離された親水性領域と疎水性領域を含む、合成または天然由来の脂質のような両親媒性分子で形成される（Lasica, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998）。リポソームの二重膜は、両染性（amphophilic）のポリマー及び界面活性剤（例えば、ポリメロソーム（polymerosome）、ニオソーム等）で形成することもできる。本発明の文脈において、リポソーム送達ビヒクルは、典型的に、標的とする細胞または組織に所望のmRNAを輸送するために機能する。

【0070】

カチオン性脂質

いくつかの実施形態では、リポソームは、1種以上のカチオン性脂質を含んでよい。本明細書で使用する場合、語句「カチオン性脂質」とは、生理的pHなどの選択pHで実効正電荷を有する多数の脂質種の任意のものをいう。幾つかのカチオン性脂質は文献に記載されており、その多くは市販されている。本発明の組成物及び方法での使用に特に好適な

10

20

30

40

50

カチオン性脂質は、国際特許公開WO2010/053572（及び、特に、段落[00225]に記載のCI2-200）及びWO2012/170930に記載のものであり、これらはともに参照により本明細書に組み込まれる。ある実施形態では、本発明の組成物及び方法は、例えば、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-15, 18-ジエン-1-アミン(HGT5000)、(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-4, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5001)、及び(15Z, 18Z)-N, N-ジメチル-6-(9Z, 12Z)オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)テトラコサ-5, 15, 18-トリエン-1-アミン(HGT5002)などの2012年3月29日出願U.S.特許仮出願第61/617, 468号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のイオン化可能なカチオン性脂質を含む、脂質ナノ粒子を使用する。

10

【0071】

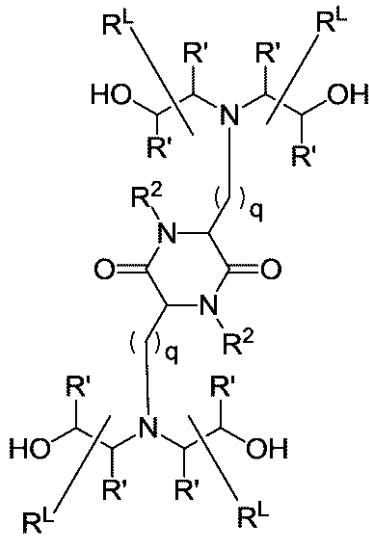
いくつかの実施形態では、提供リポソームは、WO2013063468、並びに、本出願と同日付で同時出願されたU.S.仮出願（名称「メッセンジャーRNAの送達のための脂質製剤(Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA)」）に記載のカチオン性脂質を含み、これらはいずれも参照により本明細書に取り込まれる。

【0072】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式I-c1-a

20

【化3】



I - c 1 - a

30

、の化合物またはその薬理的に許容される塩を含み、式中、各R²は互いに独立して水素またはC₁₋₃アルキル基であり、各qは互いに独立して2~6であり、各R'は互いに独立して水素またはC₁₋₃アルキル基であり、各R^Lは互いに独立してC₈₋₁₂アルキル基である。

40

【0073】

いくつかの実施形態では、各R²は互いに独立して水素、メチル基またはエチル基である。いくつかの実施形態では、各R²は互いに独立して水素またはメチル基である。いくつかの実施形態では、各R²は水素である。

【0074】

いくつかの実施形態では、各qは互いに独立して3~6である。いくつかの実施形態では、各qは互いに独立して3~5である。いくつかの実施形態では、各qは4である。

【0075】

いくつかの実施形態では、各R'は互いに独立して水素、メチル基またはエチル基であ

50

る。いくつかの実施形態では、各 R^1 は互いに独立して水素またはメチル基である。いくつかの実施形態では、各 R^1 は互いに独立して水素である。

【0076】

いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して C_{8-12} アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して $N-C_{8-12}$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して C_{9-11} アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して $N-C_{9-11}$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して C_{10} アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して $N-C_{10}$ アルキル基である。

【0077】

いくつかの実施形態では、各 R^2 は互いに独立して水素またはメチル基であり；各 q は互いに独立して 3 ~ 5 であり；各 R^1 は互いに独立して水素またはメチル基であり；かつ、各 R^L は互いに独立して C_{8-12} アルキル基である。

【0078】

いくつかの実施形態では、各 R^2 は水素であり；各 q は互いに独立して 3 ~ 5 であり；各 R^1 は水素であり；かつ、各 R^L は互いに独立して C_{8-12} アルキル基である。

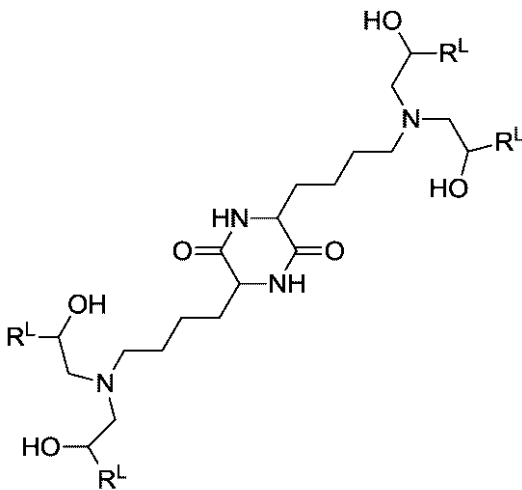
【0079】

いくつかの実施形態では、各 R^2 は水素であり；各 q は 4 であり；各 R^1 は水素であり；かつ、各 R^L は互いに独立して C_{8-12} アルキル基である。

【0080】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式 I - g

【化 4】



I - g

、の化合物またはその薬理的に許容される塩を含み、各 R^L は互いに独立して C_{8-12} アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して $N-C_{8-12}$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して C_{9-11} アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して $N-C_{9-11}$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は互いに独立して C_{10} アルキル基である。いくつかの実施形態では、各 R^L は $N-C_{10}$ アルキル基である。

【0081】

特定の実施形態では、提供リポソームには、カチオン性脂質 c K K - E 1 2、または (3, 6 - ビス (4 - (ビス (2 - ヒドロキシドデシル) アミノ) プチル) ピペラジン - 2, 5 - ジオン) が含まれる。c K K - E 1 2 の構造を下記に示す：

10

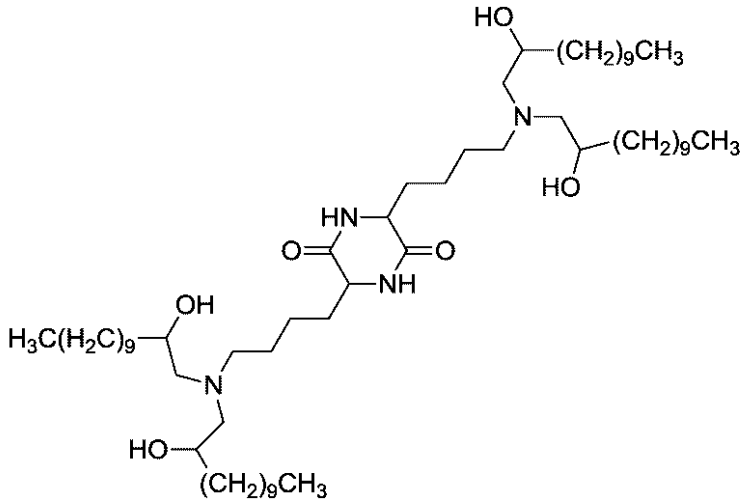
20

30

40

50

【化5】



10

【0082】

いくつかの実施形態では、かかる1種以上のカチオン性脂質は、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリドまたは「DOTMA」であってよい。(Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); U.S. Pat. No. 4,897,355)。DOTMAは、単独で製剤化可能であり、または、中性脂質、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(「DOPE」)または他のカチオン性脂質若しくは非カチオン性脂質と組み合わせて、リポソーム運搬(transfer)ビヒクルまたは脂質ナノ粒子内に入れることが可能であり、このようなリポソームを使用して標的細胞内への核酸送達を促進させることができる。他の好適なカチオン性脂質としては、例えば、5-カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミド(carboxyspermyl glycinedioctadecylamide)(「DOGS」)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウム(「DOSPA」)(Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); U.S. Pat. No. 5,171,678; U.S. Pat. No. 5,334,761)、1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(「DODAP」)、1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(「DOTAP」)が挙げられる。

20

30

【0083】

さらなる例示的なカチオン性脂質としては、1,2-ステアリルオキシ(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-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(「DODMA」)、1,2-ジリノレイルオキシ(dilinoleyl oxy)-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(「DLinDMA」)、1,2-ジリノレニルオキシ(dilinolenyl oxy)-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(「DLenDMA」)、N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAC」)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド(「DDAB」)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド(「DMRIE」)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-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(octadecadienoxy))プロパン(「CLinDMA」)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-ベータ-オキシ)-3'-オキサペントキシ(oxapentoxy))-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',1'-2'-オクタデカジエンオキシ(octadecadienoxy))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(dioleylexy

40

50

benzylamine) (「DMOBA」)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル(dioleyl carbamyl)-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(Dilinoleoyloxy)-, -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(Dilinoleyl carbamyl)-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(Dilinoleoyl carbamyl)-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-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」)、及び2-(2,2-ジ((9Z,12Z)オクタデカ-9,12-ジエン-1-イル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)-N,N-ジメチルエタンアミン(DLin-KC2-DMA))(WO2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28:172-176(2010)を参照のこと)、またはその混合物も挙げられる。(Heyes, J., et al., J Controlled Release 107:276-287(2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8):1003-1007(2005); PCT公開WO2005/121348A1)。いくつかの実施形態では、1種以上のカチオン性脂質は、イミダゾール、ジアルキルアミノ、またはグアニジニウム部分の少なくとも1つを含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、かかる1種以上のカチオン性脂質は、XTC(2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン)、MC3((6Z,9Z,28Z,31Z)-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)、ALNY-100((3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-ジ((9Z,12Z)オクタデカ-9,12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン)、NC98-5(4,7,13-トリス(3-オキソ-3-(ウンデシルアミノ)プロピル)-N1,N16-ジウンデシル-4,7,10,13-テトラアザヘキサデカン-1,16-ジアミド)、DODAP(1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン)、HGT4003(WO2012/170889:その教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、ICE(WO2011/068810:その教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、HGT5000(U.S.特許仮出願No.61/617,468:その教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)またはHGT5001(cisまたはtrans)(特許仮出願No.61/617,468)、WO2010/053572に開示のようなアミノアルコールリポイド(aminoalcohol lipidoid)、DOTAP(1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)、DOTMA(1,2-ジ-O-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)、DLinDMA(Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids", J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287)、DLin-KC2-DMA(Semple, S.C. et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery", Nature Biotech. 2010, 28, 172-176)、C12-200(Love, K.T. et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869)から選ばれてよい。

【0085】

いくつかの実施形態では、リポソーム内のカチオン性脂質の割合は、10%より大きい

、20%より大きい、30%より大きい、40%より大きい、50%より大きい、60%より大きい、または70%より大きくてよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（複数可）は、重量で、リポソームの約30~50%（例えば、約30~45%、約30~40%、約35~50%、約35~45%、または約35~40%）を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、cKK-E12）は、モル比で、リポソームの約30%、約35%、約40%、約45%、または約50%を構成する。

【0086】

非カチオン性ノヘルパー脂質

いくつかの実施形態では、提供リポソームは、1種以上の非カチオン性（「ヘルパー」）脂質を含有する。本明細書で使用する場合、語句「非カチオン性脂質」とは、中性、両性イオン型またはアニオン性の任意の脂質をいう。本明細書で使用する場合、語句「アニオン性脂質」とは、生理的pHなどの選択pHで実効負電荷を持つ多数の脂質種のうちの任意のものをいう。非カチオン性脂質には、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシラート（DOPE-mal）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPE）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（SPE）、またはその混合物が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0087】

いくつかの実施形態では、このような非カチオン性脂質を単独で使用してよいが、好ましくは他の添加剤、例えば、カチオン性脂質と組み合わせて使用する。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、モル比で、リポソームに存在する総脂質の約5%~約90%、または約10%~約70%を構成してよい。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、中性脂質、すなわち、組成物を製剤化及び/または投与する条件下で実効電荷を持たない脂質である。いくつかの実施形態では、リポソーム内の非カチオン性脂質の割合は、5%より大きい、10%より大きい、20%より大きい、30%より大きい、または40%より大きくてよい。

【0088】

コレステロール系脂質

いくつかの実施形態では、提供リポソームは、1種以上のコレステロール系脂質を含む。例えば、好適なコレステロール系カチオン性脂質として、例えば、DC-Chol（N,N-ジメチル-N-エチルカルボキシアミドコレステロール（ethylcarboxamidocholesterol））、1,4-ビス（3-N-オレイルアミノ・プロピル）ピペラジン（Gao, et al. BioChem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); U.S. Pat. No. 5,744,335）、またはICEが挙げられる。いくつかの実施形態では、コレステロール系脂質は、モル比で、リポソームに存在する総脂質の約2%~約30%、または約5%~約20%を構成してよい。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のコレステロール系脂質の割合は、5%より大きい、10%、20%より大きい、30%より大きい、または40%より大きくてよい。

【0089】

PEG化脂質

いくつかの実施形態では、提供リポソームは、1種以上のPEG化脂質を含む。例えば、N-オクタノイルスフィンゴシン-1-[スクシニル(メトキシポリエチレングリコール)-2000](C8PEG-2000セラミド)などの誘導体化セラミド(PEG-CER)のような、ポリエチレングリコール(PEG)修飾したリン脂質及び誘導体化された脂質を、1種以上のカチオン性脂質、実施形態によっては他の脂質と組み合わせるリポソーム構成に使用することもまた本発明で意図される。意図されるPEG修飾脂質には、鎖長C₆-C₂₀のアルキル鎖(複数可)を有する脂質に共有結合している鎖長が最高5kDaのポリエチレングリコール鎖が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、PEG修飾した、すなわちPEG化した脂質はPEG化コレステロールまたはPEG-2Kである。このような成分の付加により、複合体の凝集を予防することができ、また、循環血中寿命を延長させ、脂質と核酸を結合させた組成物の標的細胞への送達量を増加させる手段も提供され得るか(Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268(1): 235-237)、または、in vivoで製剤からの交換を急速に行わせるために付加成分を選択してよい(U.S. Pat. No. 5,885,613を参照のこと)。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、特に有用な交換可能な脂質は、短いアシル鎖(例えば、C₁₄またはC₁₈)を有するPEG-セラミドである。本発明のPEG修飾リン脂質及び誘導体化脂質は、モル比で、リポソーム中に存在する総脂質の約0%~約15%、約0.5%~約15%、約1%~約15%、約4%~約10%、または約2%を構成してよい。

20

【0091】

さまざまな実施形態によれば、脂質ナノ粒子を構成する、カチオン性脂質、非カチオン性脂質及び/またはPEG修飾脂質の選択は、かかる脂質同士の相対モル比と同様に、選択脂質(複数可)の特徴、意図される標的細胞の性質、送達されるべきmRNAの特徴に基づいて行う。考慮すべきさらなる項目としては、例えば、アルキル鎖の飽和度、並びに、選択脂質(複数可)のサイズ、電荷、pH、pKa、膜融合性(fusogenicity)及び毒性が挙げられる。したがって、これらに応じてモル比を調整してよい。

【0092】

ポリマー

いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、ポリマーを担体として、単独で使用して、または、本明細書に記載のさまざまな脂質など他の担体と組み合わせ使用し製剤化する。したがって、いくつかの実施形態では、リポソーム送達ビヒクルには、本明細書で使用する場合、ナノ粒子含有ポリマーも包含される。好適なポリマーには、例えば、ポリアクリレート、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリ乳酸、ポリ乳酸-ポリグリコール酸のコポリマー、ポリカプロラクトン、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルジネート、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン、プロタミン、PEG化プロタミン、PLL、PEG化PLL及びポリエチレンイミン(PEI)が含まれてよい。PEIが存在する場合、分子量が10~40kDaの範囲の分岐PEI、例えば、25kDaの分岐PEI(Sigma#408727)であってよい。

30

【0093】

本発明に好適なりポソームとして、本明細書に記載するカチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール脂質、PEG化脂質及び/またはポリマーの任意のものを1種以上、さまざまな比で含めてよい。非限定的な例として、好適なりポソーム製剤には、cKK-E12と、DOPEと、コレステロールと、DMG-PEG2K;C12-200と、DOPEと、コレステロールと、DMG-PEG2K;HGT4003と、DOPEと、コレステロールと、DMG-PEG2K;またはICEと、DOPEと、コレステロールと、DMG-PEG2K、から選択される組み合わせを含めてよい。

40

【0094】

さまざまな実施形態では、カチオン性脂質(例えば、cKK-E12、C12-200、ICE、及び/またはHGT4003)は、モル比で、リポソームの約30~60%(

50

例えば、約 30 ~ 55 %、約 30 ~ 50 %、約 30 ~ 45 %、約 30 ~ 40 %、約 35 ~ 50 %、約 35 ~ 45 %、または約 35 ~ 40 %) を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質 (例えば、c K K - E 1 2、C 1 2 - 2 0 0、I C E、及び / または H G T 4 0 0 3) の割合は、モル比で、リポソームの約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、または約 60 % 以上である。

【0095】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質 (複数可) と非カチオン性脂質 (複数可) とコレステロール系脂質 (複数可) と P E G 化脂質 (複数可) との比は、それぞれ、約 30 ~ 60 : 25 ~ 35 : 20 ~ 30 : 1 ~ 15 であってよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質 (複数可) と非カチオン性脂質 (複数可) とコレステロール系脂質 (複数可) と P E G 化脂質 (複数可) との比は、それぞれ、約 40 : 30 : 20 : 10 である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質 (複数可) と非カチオン性脂質 (複数可) とコレステロール系脂質 (複数可) と P E G 化脂質 (複数可) との比は、それぞれ、約 40 : 30 : 25 : 5 である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質 (複数可) と非カチオン性脂質 (複数可) とコレステロール系脂質 (複数可) と P E G 化脂質 (複数可) との比は、それぞれ、約 40 : 32 : 25 : 3 である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質 (複数可) と非カチオン性脂質 (複数可) とコレステロール系脂質 (複数可) と P E G 化脂質 (複数可) との比は、約 50 : 25 : 20 : 5 である。

10

【0096】

m R N A の合成

本発明による m R N A を、多種多様な任意の公知の方法にしたがって合成してよい。例えば、本発明による m R N A を、i n v i t r o 転写 (I V T) により合成してよい。簡単に言えば、I V T は、典型的に、プロモーターを含有する直鎖 D N A または環状 D N A の鋳型、リボヌクレオシド三リン酸のプール、D T T 及びマグネシウムイオンを含み得る緩衝液系、並びに、適切な、R N A ポリメラーゼ (例えば、R N A ポリメラーゼの T 3、T 7 または S P 6)、D N A s e I、ピロホスファターゼ、及び / または R N A s e 阻害剤を用いて実施する。その正確な条件は、具体的用途により異なってくる。

20

【0097】

いくつかの実施形態では、本発明による m R N A を調製するため、D N A の鋳型を i n v i t r o で転写させる。好適な D N A の鋳型は、典型的に、i n v i t r o 転写用にプロモーター、例えば、T 3、T 7 または S P 6 プロモーターを有し、それに続いて、所望の m R N A の所望のヌクレオチド配列及び終止シグナルを有する。

30

【0098】

本発明による所望の m R N A 配列 (複数可) は、標準的方法を使用して決定し、また、D N A の鋳型に組み込んでよい。例えば、所望のアミノ酸配列 (例えば、酵素配列) から開始し、縮重している遺伝暗号に基づき仮想逆翻訳 (v i r t u a l r e v e r s e t r a n s l a t i o n) を実施する。その後、最適化アルゴリズムを使用して好適なコドンを選択してよい。典型的には、一方で G / C 含量を最適化して可能な限りの最高 G / C 含量を達成し、もう一方で、使用コドンにしたがった t R N A の頻度を可能な限り考慮に入れる。最適化された R N A 配列を確立し、それを例えば、適切な表示装置を用いて表示させ、元の (野生型の) 配列と比較することができる。二次構造を解析して、R N A の領域について安定化及び不安定化の特性それぞれを算出することも可能である。

40

【0099】

修飾 m R N A

いくつかの実施形態では、本発明による m R N A を、非修飾または修飾 m R N A として合成してよい。典型的に、m R N A を修飾して安定性を高める。m R N A の修飾としては、例えば、R N A のヌクレオチドの修飾を挙げることができる。したがって、本発明による m R N A の修飾として、例えば、骨格修飾、糖修飾または塩基修飾が含まれる。いくつかの実施形態では、m R N A は、天然に生じるヌクレオチド及び / またはヌクレオチド類似体 (修飾ヌクレオチド) から合成され得、これらとしては、プリン (アデニン (A)、

50

グアニン (G)) またはピリミジン (チミン (T) 、 シトシン (C) 、 ウラシル (U)) 、 並びに、修飾ヌクレオチドとして、例えば、1 - メチルアデニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルチオ - N - 6 - イソペンテニルアデニン、N 6 - メチルアデニン、N 6 - イソペンテニルアデニン、2 - チオシトシン、3 - メチルシトシン、4 - アセチルシトシン、5 - メチルシトシン、2 , 6 - ジアミノプリン、1 - メチルグアニン、2 - メチルグアニン、2 , 2 - ジメチルグアニン、7 - メチルグアニン、イノシン、1 - メチルイノシン、プソイドウラシル (5 - ウラシル) 、ジヒドロウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - (カルボキシヒドロキシメチル) ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、5 - メチル - 2 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 ' - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v) 、 1 - メチル - プソイドウラシル、ケウオシン、 - D - マンノシルケウオシン、ワイプトキソシン、及びホスホルアミド酸のような、プリン及びピリミジンの類似体または誘導体、チオリン酸エステル、ペプチド・ヌクレオチド、メチルホスホン酸、7 - デアザグアノシン、5 - メチルシトシン並びにイノシンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。このような類似体の調製は、例えば、U . S . Pat . No . 4 , 3 7 3 , 0 7 1 、 U . S . Pat . No . 4 , 4 0 1 , 7 9 6 、 U . S . Pat . No . 4 , 4 1 5 , 7 3 2 、 U . S . Pat . No . 4 , 4 5 8 , 0 6 6 、 U . S . Pat . No . 4 , 5 0 0 , 7 0 7 、 U . S . Pat . No . 4 , 6 6 8 , 7 7 7 、 U . S . Pat . No . 4 , 9 7 3 , 6 7 9 、 U . S . Pat . No . 5 , 0 4 7 , 5 2 4 、 U . S . Pat . No . 5 , 1 3 2 , 4 1 8 、 U . S . Pat . No . 5 , 1 5 3 , 3 1 9 、 U . S . Pat . Nos . 5 , 2 6 2 , 5 3 0 及び 5 , 7 0 0 , 6 4 2 より当業者に公知であり、これらの開示内容は参照によりその全体が取り込まれる。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態では、mRNA (例えば、ASS1 をコードする mRNA) は、RNA 骨格修飾を含有してよい。典型的に、骨格修飾は、RNA に含有されているヌクレオチドの骨格のリン酸基が化学的に修飾されている修飾である。例示的な骨格修飾には、典型的に、メチルホスホン酸基、メチルホスホルアミド酸 (methylphosphoramidate) 基、ホスホルアミド酸基、チオリン酸基 (例えば、シチジン 5 ' - O - (1 - チオリン酸)) 、ボラノリン酸基、正電荷をもつグアニジニウム基等からなる群の基を、ホスホジエステル結合に代えて他のアニオン性基、カチオン性基または中性基で置換することによる修飾が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【 0 1 0 1 】

いくつかの実施形態では、mRNA (例えば、ASS1 をコードする mRNA) は糖修飾を含有してよい。典型的な糖修飾は、そのヌクレオチドに含有されている糖の化学的修飾であり、これらには、2 ' - デオキシ - 2 ' - フルオロ - オリゴリボヌクレオチド (2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシシチジン 5 ' - 三リン酸、2 ' - フルオロ - 2 ' - デオキシウリジン 5 ' - 三リン酸) 、2 ' - デオキシ - 2 ' - デアミン (deamine) - オリゴリボヌクレオチド (2 ' - アミノ - 2 ' - デオキシシチジン 5 ' - 三リン酸、2 ' - アミノ - 2 ' - デオキシウリジン 5 ' - 三リン酸) 、2 ' - O - アルキルオリゴリボヌクレオチド、2 ' - デオキシ - 2 ' - C - アルキルオリゴリボヌクレオチド (2 ' - O - メチルシチジン 5 ' - 三リン酸、2 ' - メチルウリジン 5 ' - 三リン酸) 、2 ' - C - アルキルオリゴリボヌクレオチド、及びそれらの異性体 (2 ' - アラシチジン 5 ' - 三リン酸、2 ' - アラウリジン 5 ' - 三リン酸) 、またはアジドトリホスファート (azidotriphosphate) (2 ' - アジド - 2 ' - デオキシシチジン 5 ' - 三リン酸、2 ' - アジド - 2 ' - デオキシウリジン 5 ' - 三リン酸) からなる群から選ばれる糖修飾が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【 0 1 0 2 】

50

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、ASS1をコードするmRNA）は、ヌクレオチドの塩基の修飾（塩基修飾）を含有してよい。塩基修飾を含有する修飾ヌクレオチドは、塩基修飾ヌクレオチドとも呼ばれる。このような塩基修飾ヌクレオチドの例としては、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、2-アミノアデノシン5'-三リン酸、2-チオシチジン5'-三リン酸、2-チオウリジン5'-三リン酸、4-チオウリジン5'-三リン酸、5-アミノアリルシチジン（aminoallylcytidine）5'-三リン酸、5-アミノアリルウリジン（aminoallyluridine）5'-三リン酸、5-プロモシチジン5'-三リン酸、5-プロモウリジン5'-三リン酸、5-ヨードシチジン5'-三リン酸、5-ヨードウリジン5'-三リン酸、5-メチルシチジン5'-三リン酸、5-メチルウリジン5'-三リン酸、6-アザシチジン5'-三リン酸、6-アザウリジン5'-三リン酸、6-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、7-デアザアデノシン5'-三リン酸、7-デアザグアノシン5'-三リン酸、8-アザアデノシン5'-三リン酸、8-アジドアデノシン5'-三リン酸、ベンゾイミダゾールリボシド5'-三リン酸、N1-メチルアデノシン5'-三リン酸、N1-メチルグアノシン5'-三リン酸、N6-メチルアデノシン5'-三リン酸、O6-メチルグアノシン5'-三リン酸、プソイドウリジン5'-三リン酸、ピューロマイシン5'-三リン酸またはキサントシン5'-三リン酸が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0103】

典型的に、mRNA合成には、N末端（5'）への「キャップ」付加、及びC末端（3'）への「テール」付加が挙げられる。キャップの存在は、大部分の真核細胞に見られるヌクレアーゼに抵抗性を与える上で重要である。「テール」の存在は、mRNAをエキソヌクレアーゼによる分解から保護するために機能する。

【0104】

したがって、いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、ASS1をコードするmRNA）は5'末端キャップ構造を含む。5'末端キャップは典型的に、以下のとおり付加される：まず、RNA末端のホスファターゼで末端リン酸基の1つを5'ヌクレオチドから除去し、末端リン酸基2つを残す；次いで、グアニリルトランスフェラーゼによりグアノシン三リン酸（GTP）を末端リン酸基に加え、5'5'5三リン酸エステル結合を作る；その後、グアニンの7位の窒素を、メチルトランスフェラーゼによりメチル化させる。キャップ構造の例としては、m7G(5')ppp(5'(A, G(5')ppp(5')A及びG(5')ppp(5')Gが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0105】

いくつかの実施形態では、mRNA（例えば、ASS1をコードするmRNA）は、3'ポリ(A)テール構造を含む。mRNAの3'末端にあるポリAテールとしては、典型的に、約10~300アデノシン型ヌクレオチド（配列番号9）（例えば、約10~200アデノシン型ヌクレオチド、約10~150アデノシン型ヌクレオチド、約10~100アデノシン型ヌクレオチド、約20~70アデノシン型ヌクレオチド、または約20~60アデノシン型ヌクレオチド）が挙げられる。いくつかの実施形態では、mRNAには、3'ポリ(C)テール構造が含まれる。好適なmRNAの3'末端にあるポリCテールには、典型的に、約10~200シトシン型ヌクレオチド（配列番号10）（例えば、約10~150シトシン型ヌクレオチド、約10~100シトシン型ヌクレオチド、約20~70シトシン型ヌクレオチド、約20~60シトシン型ヌクレオチド、または約10~40シトシン型ヌクレオチド）が挙げられる。ポリCテールを、ポリAテールに付加してよく、または、ポリAテールと置き換えてよい。

【0106】

いくつかの実施形態では、mRNAには、5'及び/または3'の非翻訳領域が含まれる。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域には、mRNAの安定性または翻訳に影響を与える1種以上の要素、例えば、鉄応答性エレメントが含まれる。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、約50~500ヌクレオチドの長さであってよい。

【0107】

いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域には、1つ以上のポリアデニル化シグナル、細胞内位置のmRNAの安定性に影響を与えるタンパク質が結合する部位、またはmiRNAが結合する1つ以上の部位が含まれる。いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、50~500ヌクレオチド以上の長さであってよい。

【0108】

キャップ構造

いくつかの実施形態では、mRNAは、5'末端キャップ構造を含む。5'末端キャップは典型的に、以下のとおり付加される：まず、RNA末端のホスファターゼで末端リン酸基の1つを5'ヌクレオチドから除去し、末端リン酸基2つを残す；次いで、グアニリルトランスフェラーゼによりグアノシン三リン酸(GTP)を末端リン酸基に加え、5'5' 10
5三リン酸エステル結合を作る；その後、グアニンの7位の窒素を、メチルトランスフェラーゼによりメチル化させる。キャップ構造の例としては、m⁷G(5')ppp(5' (A、G(5')ppp(5')A及びG(5')ppp(5')Gが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0109】

天然に生じるキャップ構造は、最初に転写されたヌクレオチドの5'末端に三リン酸架橋により結合している7-メチルグアノシンを含み、これが、m⁷G(5')ppp(5')N(Nは任意のヌクレオチド)のジヌクレオチドキャップとなる。In vivoでは、キャップは酵素により付加される。キャップは、細胞核内で付加され、酵素グアニリルトランスフェラーゼにより触媒される。RNAの5'末端へのキャップ付加は、転写開始直後に起こる。末端のヌクレオチドは典型的にグアノシンであり、他の全ヌクレオチドに対し逆方向、すなわち、G(5')ppp(5')GpNpNpとなっている。 20

【0110】

In vitro転写で作製される一般的なmRNAのキャップはm⁷G(5')ppp(5')Gであり、これは、in vitroでのT7またはSP6 RNAポリメラーゼによる転写において、5'末端にキャップ構造を有するRNAを得るためにジヌクレオチドキャップとして使用されてきた。キャップ付加されたmRNAをin vitroで合成する最も一般的な方法では、予め形成したm⁷G(5')ppp(5')G(「m⁷GpppG」)型のジヌクレオチドを転写開始因子として使用する。

【0111】

これまで、in vitro翻訳実験で使用する合成ジヌクレオチドキャップの通常型は、アンチリバーScyap類似体(「Anti-Reverse Cap Analog: ARCA」)または修飾ARCAであり、一般に、2'位または3'位のOH基が-OCH₃で置換されている修飾されたキャップ類似体である。 30

【0112】

さらなるキャップ類似体には、m⁷GpppG、m⁷GpppA、m⁷GpppCからなる群から選択される化学構造；非メチル化キャップ類似体(例えば、GpppG)；ジメチル化キャップ類似体(例えば、m^{2,7}GpppG)、トリメチル化キャップ類似体(例えば、m^{2,2,7}GpppG)、左右対称ジメチル化キャップ類似体(例えば、m⁷Gpppm⁷G)、またはアンチリバーScyap類似体(例えば、ARCA；m⁷、2'-Ome GpppG、m⁷2'-d GpppG、m⁷、3'-Ome GpppG、m⁷、3'-d GpppG及びそれらの四リン酸誘導体)(例えば、Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)を参照のこと)が挙げられるが、これに限定されるものではない。 40

【0113】

いくつかの実施形態では、好適なキャップは、最初に転写されたヌクレオチドの5'末端に三リン酸架橋により結合している7-メチルグアノシン(「m⁷G」)であり、これが、m⁷G(5')ppp(5')N(Nは任意のヌクレオチド)となる。本発明の実施形 50

態に使用される m^7G キャップの好ましい実施形態は $m^7G(5')ppp(5')G$ である。

【0114】

いくつかの実施形態では、キャップは $Cap0$ 構造である。 $Cap0$ 構造には、塩基 1 及び 2 に結合しているリボースの 2'-O-メチル残基がない。いくつかの実施形態では、キャップは $Cap1$ 構造である。 $Cap1$ 構造は、塩基 2 に 2'-O-メチル残基を有する。いくつかの実施形態では、キャップは $Cap2$ 構造である。 $Cap2$ 構造は、塩基 2 と 3 の両方に結合している 2'-O-メチル残基を有する。

【0115】

多種多様な m^7G キャップ類似体が当技術分野で公知であり、その多くが市販されている。これらには、上記の m^7GpppG 、並びに、 $ARCA3'-OCH_3$ 及び $2'-OCH_3$ キャップ類似体が含まれる (Jemielity, J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003))。本発明の実施形態に使用するさらなるキャップ類似体には、 N^7 -ベンジル化ジヌクレオシド四リン酸 (N^7 -benzylated dinucleoside tetraphosphate) 類似体 (Grudzien, E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004) に記載)、チオリン酸エステルキャップ類似体 (Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007) に記載)、並びに U.S. Patent Nos. 8,093,367 及び 8,304,529 に記載のキャップ類似体 (ピオチン化キャップ類似体を含む) が挙げられ、これらは参照により本明細書に取り込まれる。

【0116】

テール構造

典型的に、「テール」の存在は mRNA をエキソヌクラーゼによる分解から保護するために機能する。ポリ A テールは、天然のメッセンジャー及び合成のセンス RNA を安定化させると考えられている。したがって、ある実施形態では、長いポリ A テールを mRNA 分子に付加し、それにより RNA をより安定化させることが可能である。ポリ A テールは、当該技術分野で認められている多種多様な技術を使用して付加することができる。例えば、長いポリ A テールは、ポリ A ポリメラーゼを使用して合成 RNA または *in vitro* 転写した RNA に付加することができる (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256)。転写ベクターは、長いポリ A テールをコードすることもできる。さらに、ポリ A テールは、PCR 産物から直接転写することにより付加が可能である。ポリ A は、センス RNA の 3' 末端に RNA リガーゼで連結してもよい (例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1991 edition) を参照のこと)。

【0117】

いくつかの実施形態では、mRNA は、3' ポリ (A) テール構造を含む。典型的に、ポリ A テールの長さは、少なくとも約 10、50、100、200、300、400、少なくとも 500 ヌクレオチドであり得る (配列番号 11)。いくつかの実施形態では、mRNA の 3' 末端にあるポリ A テールには、典型的に、約 10 ~ 300 アデノシン型ヌクレオチド (配列番号 9) (例えば、約 10 ~ 200 アデノシン型ヌクレオチド、約 10 ~ 150 アデノシン型ヌクレオチド、約 10 ~ 100 アデノシン型ヌクレオチド、約 20 ~ 70 アデノシン型ヌクレオチド、または約 20 ~ 60 アデノシン型ヌクレオチド) が含まれる。いくつかの実施形態では、mRNA は、3' ポリ (C) テール構造を含む。mRNA の 3' 末端にある好適なポリ C テールには、典型的に、約 10 ~ 200 シトシン型ヌクレオチド (配列番号 10) (例えば、約 10 ~ 150 シトシン型ヌクレオチド、約 10 ~ 100 シトシン型ヌクレオチド、約 20 ~ 70 シトシン型ヌクレオチド、約 20 ~ 60 シトシン型ヌクレオチド、または約 10 ~ 40 シトシン型ヌクレオチド) が含まれる。ポリ C テールは、ポリ A テールに付加してよく、または、ポリ A テールと置き換えてよい。

【0118】

いくつかの実施形態では、ポリAテールまたはポリCテールの長さを調整して、本発明の修飾されたセンスmRNA分子の安定性を制御し、これにより、タンパク質の転写を制御する。例えば、ポリAテールの長さはセンスmRNA分子の半減期に影響するので、ポリAテールの長さを調整してmRNAのヌクレアーゼに対する抵抗度を修正し、これにより、標的細胞におけるポリヌクレオチド発現及び/またはポリペプチド産生の経時変化を制御できる。

【0119】

5'及び3'非翻訳領域

いくつかの実施形態では、mRNAには、5'及び/または3'の非翻訳領域が含まれる。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域には、mRNAの安定性または翻訳に影響を与える1種以上の要素、例えば、鉄応答性エレメントが含まれる。いくつかの実施形態では、5'非翻訳領域は、約50~500ヌクレオチドの長さであってよい。

【0120】

いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域には、1つ以上のポリアデニル化シグナル、細胞内位置のmRNAの安定性に影響を与えるタンパク質が結合する部位、またはmiRNAが結合する1つ以上の部位が含まれる。いくつかの実施形態では、3'非翻訳領域は、50~500ヌクレオチド以上の長さであってよい。例示的な3'及び/または5'UTR配列は、安定であるmRNA分子（例えば、グロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路の酵素）を由来として、センスmRNA分子の安定性を高めることができる。例えば、5'UTR配列には、ヌクレアーゼ抵抗性の改善及び/またはポリヌクレオチドの半減期の改善のためにCMV前初期1(IE1)遺伝子の部分配列、またはその断片が含まれてよい。さらに意図されるのは、ポリヌクレオチドをさらに安定化させるために、ヒト成長ホルモン(hGH)をコードする配列、またはその断片を、ポリヌクレオチド(例えば、mRNA)の3'末端または非翻訳領域に含めることである。一般に、これらの修飾により、非修飾ポリヌクレオチドに比べると、ポリヌクレオチドの安定性及び/または薬物動態特性(例えば、半減期)が改善され、これらには、例えば、このようなポリヌクレオチドのin vivoヌクレアーゼによる消化に対する抵抗性改善のためになされる修飾が含まれる。

【0121】

リポソームの形成

本発明の組成物に使用するためのリポソーム運搬(transfer)ビヒクルは、現在、当技術分野で公知のさまざまな技術により調製することができる。提供組成物に使用するためのリポソームは、現在、当技術分野で公知のさまざまな技術により調製することができる。例えば、適切な溶媒に選択脂質を溶解させてその脂質を好適な容器または器の内壁に付着させ、その後、溶媒を蒸発乾涸させて容器内側に薄膜を残すかまたは噴霧乾燥させるといった従来技術にしたがい多重膜ベシクル(multilamellar vesicle: MLV)を調製しうる。次いで、ボルテックスによる攪拌運動中の容器に水相を加えてよく、これでMLVが形成される。その後、多層膜ベシクルを均質化、超音波処理または押出することにより単層膜ベシクル(ULV)を形成することができる。さらに、界面活性剤除去法により単層膜ベシクルを形成することができる。

【0122】

ある実施形態では、提供組成物はリポソームを含み、ここで、mRNAはそのリポソームの両面で会合するとともに、その同一リポソーム内に封入されている。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性リポソームを静電相互作用によりmRNAと会合させてよい。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性リポソームを静電相互作用によりmRNAと会合させてよい。

【0123】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法は、リポソーム内に封入されたmRNAを含む。いくつかの実施形態では、かかる1種以上のmRNA種は同一のリポソーム

内に封入されてよい。いくつかの実施形態では、かかる1種以上のmRNA種は異なる複数のリポソーム内に封入されてよい。いくつかの実施形態では、mRNAは1個以上のリポソーム内に封入され、これらのリポソームは脂質組成、脂質成分のモル比、サイズ、電荷（ゼータ電位）、標的にするリガンド及び/またはこれらの組み合わせにおいて異なる。いくつかの実施形態では、かかる1個以上のリポソームは、カチオン性脂質、中性脂質、PEG修飾脂質及び/またはその組み合わせからなる組成が異なっていてよい。いくつかの実施形態では、かかる1種以上のリポソームは、そのリポソーム作製に使用するカチオン性脂質、中性脂質、コレステロール及びPEG修飾脂質のモル比が異なっていてよい。

【0124】

所望のmRNAをリポソームに組み込む方法はしばしば「搭載」と呼ばれる。例示的な方法は、Lasica, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。リポソームが組み込まれた核酸は、完全または部分的に、リポソームの内部空間に位置するか、リポソーム二重膜内に位置するか、またはリポソーム膜の外面と会合してよい。核酸をリポソーム内に組み込むことを本明細書では「封入」ともいい、その場合、核酸はその全体がリポソームの内部空間内に含有されている。リポソームのような運搬（transfer）ビヒクルにmRNAを組み込む目的は、核酸を分解する酵素若しくは化学薬品、及び/または核酸を短時間で排泄させる系若しくは受容体含有し得る環境から、核酸を保護するためであることが多い。したがって、いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、そこに含有されているmRNAの安定性を高めることができ、かつ/または標的細胞または組織へのmRNAの送達を促進する。

【0125】

リポソームのサイズ

本発明の好適なリポソームは、さまざまなサイズで作製してよい。いくつかの実施形態では、提供リポソームは、これまでに公知のmRNA封入リポソームより小さくてよい。いくつかの実施形態では、リポソームのサイズ縮小とmRNA送達の高効率とは関連している。リポソームの適切なサイズの選択には、標的とする細胞または組織の部位、及び、ある程度は、リポソーム作製の用途が考慮されうる。

【0126】

いくつかの実施形態では、mRNAによりコードされる抗体の全身分布を促進するために適切なサイズのリポソームを選択する。いくつかの実施形態では、特定の細胞または組織へのmRNAのトランスフェクションを制限することが望ましい場合がある。例えば、肝細胞を標的にするには、リポソームを、その大きさが肝臓の肝類洞内膜の内皮細胞層の小孔より小さくなるようなサイズにすることがあるが、そのような場合は、リポソームは、このような内皮細胞の小孔を容易に通り抜けて標的とする肝細胞に到達することができると思われる。

【0127】

別法または追加として、リポソームは、特定の細胞または組織への分布を制限するかまたは明らかに回避させるのに十分な直径をもつ大きさのリポソームとなるようサイズ調整してよい。例えば、リポソームの大きさを肝類洞内膜の内皮細胞層の小孔より大きくして、肝細胞へのリポソーム分布が制限されるようなサイズにしてよい。

【0128】

いくつかの実施形態では、リポソームのサイズはリポソーム粒子の最長直径で決定する。いくつかの実施形態では、好適なリポソームは、サイズが約250nm以下（例えば、約225nm、200nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、または50nm以下）である。いくつかの実施形態では、好適なリポソームのサイズは、約10~250nmの範囲（例えば、約10~225nm、10~200nm、10~175nm、10~150nm、10~125nm、10~100nm、10~75nm、または10~50nmの範囲）である。いくつかの実施形態では、好適なリポソーム

10

20

30

40

50

のサイズは、約100～250nmの範囲（例えば、約100～225nm、100～200nm、100～175nm、100～150nmの範囲）である。いくつかの実施形態では、好適なリポソームのサイズは、約10～100nmの範囲（例えば、約10～90nm、10～80nm、10～70nm、10～60nm、または10～50nmの範囲）である。

【0129】

リポソーム集団のサイズ制御には当技術分野で公知の多種多様な別法が利用可能である。サイズを制御するそのような方法は、U.S. Pat. No. 4,737,323に記載があり、参照により本明細書に組み込まれる。リポソーム懸濁液をバス型またはプローブ型超音波処理で超音波処理すると段階的にサイズが縮小され、直径約0.05ミクロン未満の小さなULVが作製される。均一化法は、せん断エネルギーを利用して大きなリポソームを小さくするもう一つの方法である。典型的な均一化の手順では、標準的なエマルジョン・ホモジナイザーに通し、選択したサイズ、典型的には、約0.1～0.5ミクロンのリポソームが得られるまでMLVを再循環させる。リポソームのサイズは、Bloombfield, Ann. Rev. Biophys. BioEng., 10:421-150(1981)に記載されるような準電気性光散乱法(quasi-electric light scattering: QELS)により測定してよく、参照により本明細書に組み込まれる。形成されたリポソームを超音波処理することにより平均リポソーム径は小さくなり得る。間欠的な超音波処理サイクルをQELS評価と交互に行い効率的にリポソームを合成してもよい。

10

20

【0130】

医薬組成物

In vivoでのmRNAの発現を促進するために、リポソームなどの送達ビヒクルを、追加の核酸、担体、標的リガンド若しくは定化剤1種以上と組み合わせ、または好適な添加剤とともに混合した薬理的組成物にして、製剤化することが可能である。薬物の製剤化及び投与方法についての手法は、"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest editionに記載されている。

【0131】

提供される、リポソームに封入または会合させたmRNA、及びそれを含有する組成物は、被検体の臨床状態、投与部位と投与方法、投与計画、被検体の年齢、性別、体重など当業臨床医に関連する因子を考慮に入れ、現在の医療にしたがい投与及び用量決定してよい。本明細書の目的のための「有効量」は、試験的臨床研究、薬理学、臨床及び医療分野の当業者に知られているような関連因子を考慮して決定してよい。いくつかの実施形態では、投与された量は、症状のほか、当業者が疾患の進行、退縮または改善の測定値として適当であるとして選択する他の指標について、少なくとも何らかの安定化、改善または消失が達成されるのに有効な量である。例えば、量及び投与の好適レジメンは、少なくとも一過性にタンパク質（例えば、酵素）を産生させるレジメンである。

30

【0132】

好適な投与経路には、例えば、経口、経腸、経膈、経粘膜、気管内若しくは吸入を含む経肺、または経腸による投与；皮内、経皮（局所）、筋肉内、皮下、髄内注射による非経口送達、並びに、くも膜下腔内、脳室内直接、静脈内、腹腔内、または経鼻の非経口送達挙げられる。

40

【0133】

別法または追加として、リポソームに封入したmRNA及び本発明の組成物を、全身ではなく局所的に、例えば、標的組織内へ医薬組成物を直接注射して、好ましくは、徐放性製剤にして投与してよい。局所送達はさまざまな方法で影響を受け、その標的とする組織により異なる。例えば、本発明の組成物を含有するエアロゾルは、吸入可能であり（経鼻、経気管、または気管支送達）；本発明の組成物は、例えば、損傷部位、疾患症状発現部位、または疼痛部位に注入可能であり；組成物は、経口、気管、または食道の適応には薬

50

用ドロップで提供可能であり；組成物は胃または腸への投与用に、液体、錠剤またはカプセルの形態で供給可能であり、直腸または膣の適応には坐剤形態で供給可能であり；または、組成物は、クリーム、点眼薬の使用、若しくは注射でも眼への送達さえ可能である。治療的分子またはリガンドと複合体化させた提供組成物含有製剤は、外科的処置で投与することも可能であり、例えば、組成物が移植部位から周辺細胞へ広がることができるようにするポリマーまたは他の構造体若しくは物質に会合させて投与可能である。別法として、それらは、ポリマーまたは支持体を使用せずに外科的処置で適応可能である。

【0134】

本発明の提供方法では、本明細書に記載する治療的有効量の治療剤（例えば、A S S 1 タンパク質をコードするmRNA）の単回並びに頻回投与が意図される。治療剤は、被検体の病態（例えば、A S D）の性質、重症度及び程度に応じ、一定の間隔で投与可能である。いくつかの実施形態では、治療的有効量の本発明治療剤（例えば、A S S 1 タンパク質をコードするmRNA）は、髄腔内に一定の間隔で定期的に投与してよい（例えば、年1回、6か月に1回、5か月に1回、3か月に1回、隔月（2か月に1回）、毎月（月1回）、隔週（2週間に1回）、30日に1回、28日に1回、14日に1回、10日に1回、7日に1回、毎週、連日または継続的）。

【0135】

いくつかの実施形態では、提供するリポソーム及び/または組成物は、そこに含有されるmRNAの徐放性に好適となるよう製剤化する。このような徐放性組成物は、投与間隔を長くして被検体に好都合に投与されうる。例えば、一実施形態では、本発明の組成物を1日2回、連日または隔日で被検体に投与する。好ましい実施形態では、本発明の組成物を、週2回、週1回、7日に1回、10日に1回、14日に1回、28日に1回、30日に1回、2週間に1回、3週間に1回、または、さらに好ましくは、4週間に1回、月1回、6週間に1回、8週間に1回、2か月に1回、3か月に1回、4か月に1回、6か月に1回、8か月に1回、9か月に1回、若しくは毎年、被検体に投与する。長期間にわたりmRNAを送達または放出させるためにデポー投与（例えば、筋肉内、皮下、硝子体内）用に製剤化された組成物及びリポソームも意図される。好ましくは、使用する徐放性手段を、安定性を高めるためにmRNAに行った修飾と組み合わせる。

【0136】

本明細書で使用する場合、用語「治療的有効量」は、主として、本発明の医薬組成物に含有される治療剤の総量に基づき決定される。一般に、治療的有効量は、被検体にとって意義のある利益（例えば、A S Dの治療、調節、治癒、予防及び/または改善）を達成するのに十分である。例えば、治療的有効量は、所望の治療的及び/または予防的効果を達成するのに十分な量であり得る。一般に、治療剤（例えば、A S S 1 タンパク質をコードするmRNA）を必要とする被検体に投与されるその治療剤の量は、その被検体の特徴により異なることになる。このような特徴には、その被検体の病態、疾患の重症度、全体的健康状態、年齢、性別及び体重が挙げられる。当業者は、これら及び他の関連因子に応じて適切な用量を容易に決定できるであろう。さらに、客観的評価法及び主観的評価法を任意選択で用いて至適用量範囲を確認してよい。

【0137】

治療的有効量は、複数の単位用量を含み得る投与レジメンにおいて一般的に投与される。任意の特定の治療タンパク質の場合、治療的有効量（及び/または効果的投与レジメンの範囲内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の医薬製剤との併用に応じて異なり得る。また、任意の特定の患者に対する具体的な治療的有効量（及び/または単位用量）は、治療される障害及びその障害の重症度；使用する特定の製剤の活性；使用する特定の組成物；患者の年齢、体重、全体的健康状態、性別及び食事；使用する特定のタンパク質の投与時間、投与経路、及び/または排泄速度若しくは代謝速度；治療期間；並びに、医療分野において周知の同様の因子を含む、多種多様な因子に依存し得る。

【0138】

いくつかの実施形態では、治療的有効量の範囲は、約0.005mg/kg体重～5

10

20

30

40

50

0.005 mg/kg 体重、例えば、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 400 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 300 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 200 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 100 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 90 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 80 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 70 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 60 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 50 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 40 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 30 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 25 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 20 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 15 mg/kg 体重、約 0.005 mg/kg 体重 ~ 10 mg/kg 体重である。

10

【0139】

いくつかの実施形態では、治療的有効用量は、約 0.1 mg/kg 体重より大きい、約 0.5 mg/kg 体重より大きい、約 1.0 mg/kg 体重より大きい、約 3 mg/kg 体重より大きい、約 5 mg/kg 体重より大きい、約 10 mg/kg 体重より大きい、約 15 mg/kg 体重より大きい、約 20 mg/kg 体重より大きい、約 30 mg/kg 体重より大きい、約 40 mg/kg 体重より大きい、約 50 mg/kg 体重より大きい、約 60 mg/kg 体重より大きい、約 70 mg/kg 体重より大きい、約 80 mg/kg 体重より大きい、約 90 mg/kg 体重より大きい、約 100 mg/kg 体重より大きい、約 150 mg/kg 体重より大きい、約 200 mg/kg 体重より大きい、約 250 mg/kg 体重より大きい、約 300 mg/kg 体重より大きい、約 350 mg/kg 体重より大きい、約 400 mg/kg 体重より大きい、約 450 mg/kg 体重より大きい、約 500 mg/kg 体重より大きい。

20

【0140】

本明細書では、本明細書に開示するリポソーム 1 種以上を含む凍結乾燥医薬組成物、及び、例えば、2011年6月8日出願の米国仮出願 No. 61/494,882 に開示されるような組成物の使用に関連する方法も意図され、その教示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、本発明の凍結乾燥医薬組成物は、投与前に調製してよく、または、*in vivo* で調製可能である。例えば、凍結乾燥医薬組成物は、適切な剤形に製剤化可能であり（例えば、ディスク、ロッドまたは膜のような皮内投与剤形）、その剤形が個人の体液により *in vivo* で経時的に再水和されるよう投与可能である。

30

【0141】

提供リポソーム及び組成物は、任意の所望の組織に投与してよい。いくつかの実施形態では、提供するリポソームまたは組成物で送達された mRNA は、そのリポソーム及び/または組成物を投与した組織に発現する。いくつかの実施形態では、送達される mRNA は、リポソーム及び/または組成物を投与した組織とは異なる組織に発現する。送達された mRNA が送達され得、かつ/または発現し得る例示的な組織には、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、血清、脳、骨格筋、リンパ節、皮膚、及び/または脳脊髄の流体が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0142】

本発明によれば、治療的有効用量は、一定の間隔で投与した場合、肝臓中 ASS1 量の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、治療的有効用量は、一定の間隔で投与した場合、治療前ベースラインの血清中シトルリン量に比べ血清中シトルリン量の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、治療的有効用量は、一定の間隔で投与した場合、治療前ベースラインの血清中アンモニア濃度と比べ血清中アンモニア濃度の低下をもたらす。

40

【0143】

いくつかの実施形態では、提供組成物を投与すると、肝臓の ASS1 タンパク質の発現量が治療前ベースライン時の量より増加する。いくつかの実施形態では、提供組成物を投与すると、肝臓総タンパク質量中の ASS1 タンパク質量は約 3000 ng/mg 以上、約 2000 ng/mg 以上、約 1000 ng/mg 以上、約 500 ng/mg 以上、約 400 ng/mg 以上、約 200 ng/mg 以上または約 100 ng/mg 以上になる。特

50

定の実施形態では、提供組成物を投与すると、肝臓総タンパク質量中のASS1タンパク質量は120ng/mg以上になる。

【0144】

いくつかの実施形態では、提供組成物を投与すると、血漿中または血清中のASS1タンパク質量が治療前ベースラインの量より増加する。いくつかの実施形態では、提供組成物を投与すると、血漿中または血清中のASS1タンパク質量が少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%、治療前ベースラインの量より増加する。

【0145】

いくつかの実施形態では、組成物を投与すると、被検体のシトルリン及び/またはアンモニアの濃度が治療前ベースラインの濃度より減少する。典型的に、ベースラインの量は、治療直前に測定する。典型的に、シトルリン及び/またはアンモニアの濃度は生体試料中で測定する。好適な生体試料には、例えば、全血、血漿、血清、尿または脳脊髄液が含まれる。

10

【0146】

いくつかの実施形態では、組成物を投与すると、生体試料（例えば、血清試料、血漿試料、または尿試料）中のシトルリン量が、治療直前のベースラインのシトルリン量より少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%減少する。いくつかの実施形態では、組成物を投与すると、血漿中シトルリン量が約2000µM、1500µM、1000µM、750µM、500µM、250µM、100µM、90µM、80µM、70µM、60µM、50µM、40µM、または30µMより少ない量まで減少する。

20

【0147】

いくつかの実施形態では、組成物を投与すると、生体試料（例えば、血清試料、血漿試料、または尿試料）中のアンモニア濃度が、治療直前のベースラインの濃度より少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%減少する。

30

【0148】

いくつかの実施形態では、提供組成物を投与すると、血漿中または血清中のアンモニア濃度が、治療直前のベースラインのアンモニア濃度より減少する。いくつかの実施形態では、提供組成物を投与すると、血漿中または血清中のアンモニア濃度が、未治療の被検体のアンモニア濃度に比して減少する。いくつかの実施形態では、組成物を投与すると、血漿中または血清中のアンモニア濃度が約3000µmol/L以下、約2750µmol/L以下、約2500µmol/L以下、約2250µmol/L以下、約2000µmol/L以下、約1750µmol/L以下、約1500µmol/L以下、約1250µmol/L以下、約1000µmol/L以下、約750µmol/L以下、約500µmol/L以下、約250µmol/L以下、約100µmol/L以下、または約50µmol/L以下まで減少する。特定の実施形態では、組成物を投与すると、血漿中または血清中のアンモニア濃度が約50µmol/L以下まで減少する。

40

【0149】

さまざまな実施形態によれば、送達されたmRNAの発現時期は、特定の医療のニーズに合うよう調整可能である。いくつかの実施形態では、送達されたmRNAによりコードされたタンパク質の発現は、提供するリボソーム及び/または組成物を投与してから1、2、3、6、12、24、48、72、及び/または96時間後に検出可能である。いくつかの実施形態では、送達されたmRNAによりコードされたタンパク質の発現は、投与してから1週間後、2週間後、及び/または1か月後に検出可能である。

【実施例】

50

【0150】

本発明の特定の化合物、組成物及び方法は、特定の実施形態にしたがい具体的に記載してきたが、以下の実施例はあくまでも本発明の化合物の例示のためであり、それらを限定することを意図するものではない。

【0151】

実施例1. ASS1 mRNAを送達及び発現させるための例示的リボソーム製剤

本実施例では、*in vivo*でASS1 mRNAを効果的に送達及び発現させるための例示的リボソーム製剤を提供する。

【0152】

脂質物質

本明細書に記載する製剤は、mRNA ASS1タンパク質をコードするmRNAを封入するよう設計された、1種以上のカチオン性脂質、ヘルパー脂質（例えば、非カチオン性脂質及び/またはコレステロール系脂質）及びPEG化脂質を異なる比で使用する、複数成分脂質混合物を含む。カチオン性脂質には、（非限定的に）DOTAP（1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン）、DODAP（1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン）、DOTMA（1,2-ジ-O-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン）、DLiDMA（Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. 「Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids」 *J. Contr. Rel.* 2005, 107, 276-287）、DLiN-KC2-DMA（Semple, S. C. et al. 「Rational Design of Cationic lipids for siRNA Delivery」 *Nature Biotech.* 2010, 28, 172-176）、C12-200（Love, K. T. et al. 「Lipid-like materials for low-dose *in vivo* gene silencing」 *PNAS* 2010, 107, 1864-1869）、cKK-E12（3,6-ビス（4-（ビス（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン-2,5-ジオン）、HGT5000、HGT5001、HGT4003、ICE、ジアルキルアミノ系、イミダゾール系、グアニジウム系などが挙げられる。ヘルパー脂質には、（非限定的に）DSPC（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DPPC（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DOPE（1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DOPC（1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホチジルコリン（phosphatidylcholine））、DPPE（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DMPE（1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DOPG（2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-（1'-rac-グリセロール））、コレステロールなどが挙げられる。PEG化脂質には、（非限定的に）鎖長C₆-C₂₀のアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有結合している鎖長が最高5 kDaのポリ（エチレン）グリコール鎖が挙げられる。

【0153】

コドンが最適化された、ヒトのアルギニノコハク酸合成酵素（ASS1）メッセンジャーRNAを、遺伝子をコードするプラスミドDNAの鋳型から*in vitro*転写して合成し、その後、それに5'末端キャップ構造（キャップ1）（Fechter, P.; Brownlee, G. G. 「Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins」 *J. Gen. Virology* 2005, 86, 1239-1249）、及び、ゲル電気泳動で測定した約250ヌクレオチドの長さの3'ポリ（A）テール（配列番号12）を付加した。各mRNA産物内にある5'及び3'の非翻訳領域を、それぞれ、X及びYとして表し、記載の通り定義した（下記参照）。

10

20

30

40

50

コドンが最適化された、ヒトのアルギニノコハク酸合成酵素 (A S S 1) m R N A の例構成体設計 :

X - 配列番号 3 - Y、
X - 配列番号 1 3 - Y、
X - 配列番号 1 4 - Y ; 及び
X - 配列番号 1 5 - Y。

5 ' 及び 3 ' U T R 配列

X (5 ' U T R 配列) =

G G A C A G A U C G C C U G G A G A C G C C A U C C A C G C U G U U U U G A C C
U C C A U A G A A G A C A C C G G G A C C G A U C C A G C C U C C G C G G C C G 10
G G A A C G G U G C A U U G G A A C G C G G A U U C C C C G U G C C A A G A G U
G A C U C A C C G U C C U U G A C A C G [配列番号 4]

Y (3 ' U T R 配列) =

C G G G U G G C A U C C C U G U G A C C C C U C C C C A G U G C C U C U C C U G
G C C C U G G A A G U U G C C A C U C C A G U G C C C A C C A G C C U U G U C C
U A A U A A A A U U A A G U U G C A U C A A G C U [配列番号 5]

または

G G G U G G C A U C C C U G U G A C C C C U C C C C A G U G C C U C U C C U G G
C C C U G G A A G U U G C C A C U C C A G U G C C C A C C A G C C U U G U C C U
A A U A A A A U U A A G U U G C A U C A A A G C U (配列番号 6) 20

【 0 1 5 4 】

コドンが最適化された、ヒト A S S 1 m R N A 配列の例には、発明を実施するための形態の項に記載の配列番号 3、及び下記配列番号 1 3、配列番号 1 4 及び配列番号 1 5 が挙げられる :

配列番号 1 3

A U G A G C U C A A A G G G A U C U G U G G U G C U G G C A U A C U C G G G G G
G A U U G G A C A C U U C A U G C A U A C U U G U C U G G U U G A A G G A A C A
G G G C U A C G A C G U G A U C G C C U A C C U G G C U A A C A U C G G U C A A
A A G G A G G A C U U C G A G G A G G C C C G G A A G A A G G C C C U G A A G C
U G G G C G C G A A G A A A G U G U U C A U C G A G G A C G U G U C C C G G G A 30
A U U U G U G G A A G A G U U C A U C U G G C C C G C C A U C C A A A G C A G C
G C A C U G U A C G A G G A U A G A U A C C U C C U C G G A A C A U C C C U U G
C C C G G C C A U G U A U U G C C A G G A A A C A G G U G G A A A U C G C C C A
G C G G G A A G G A G C C A A A U A C G U G U C C C A C G G G G C G A C C G G A
A A G G G G A A C G A C C A A G U G C G C U U C G A G C U G U C G U G C U A C U
C C C U G G C A C C G C A G A U U A A G G U C A U C G C G C C G U G G A G A A U
G C C U G A A U U C U A C A A C C G C U U C A A G G G C C G C A A C G A U C U G
A U G G A A U A C G C C A A G C A G C A C G G C A U C C C G A U C C C C G U G A
C C C C U A A G A A C C C U U G G U C A A U G G A C G A G A A U C U G A U G C A
C A U C A G C U A C G A A G C G G G C A U C C U G G A G A A C C C C A A G A A U 40
C A A G C U C C G C C C G G A C U G U A C A C U A A G A C U C A G G A U C C C G
C U A A G G C G C C C A A C A C U C C U G A U A U U U U G G A A A U C G A A U U
C A A G A A G G G U G U C C C A G U G A A G G U C A C C A A C G U G A A G G A C
G G C A C U A C C C A C C A G A C C U C G C U G G A A C U G U U U A U G U A U C
U G A A C G A G G U G G C C G G C A A A C A U G G A G U C G G C A G A A U C G A
U A U U G U G G A G A A C C G C U U U A U U G G C A U G A A G U C C A G G G G G
A U C U A U G A A A C C C C G G C C G G A A C C A U C C U C U A C C A C G C C C
A U C U C G A C A U U G A A G C G U U C A C C A U G G A C C G C G A G G U C C G
C A A G A U U A A G C A G G G C C U G G G A C U C A A G U U C G C C G A G C U C
G U G U A C A C C G G U U U C U G G C A U U C C C C G G A A U G C G A A U U C G 50

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

(配列番号 1 3)、

配列番号 1 4

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

(配列番号 1 4)、

配列番号 1 5

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

10

20

30

40

50

A A G G G A A A U G A C C A A G U C C G C U U C G A G C U G U C U U G C U A C U
 C A C U C G C U C C G C A A A U C A A G G U C A U C G C A C C G U G G A G G A U
 G C C C G A G U U C U A C A A C C G G U U C A A G G G G C G G A A C G A C C U G
 A U G G A G U A C G C G A A G C A G C A C G G U A U C C C G A U C C C U G U C A
 C C C C A A A G A A C C C C U G G A G C A U G G A C G A A A A U C U G A U G C A
 C A U C A G C U A C G A A G C A G G A A U C C U G G A G A A C C C G A A A A A U
 C A A G C A C C U C C U G G A C U G U A C A C U A A G A C C C A G G A C C C A G
 C C A A G G C C C C G A A U A C C C C G G A C A U C U U G G A A A U C G A G U U
 C A A G A A G G G G G U G C C A G U G A A G G U U A C C A A U G U C A A G G A U
 G G G A C C A C U C A C C A A A C U A G C C U G G A A C U G U U C A U G U A C C 10
 U G A A C G A A G U G G C U G G A A A A C A U G G C G U G G G A A G A A U C G A
 U A U C G U G G A G A A C C G C U U C A U C G G C A U G A A G U C A A G G G G A
 A U C U A C G A A A C U C C G G C C G G G A C G A U A C U G U A U C A U G C G C
 A U C U C G A C A U U G A A G C C U U U A C U A U G G A U C G G G A A G U C C G
 A A A G A U C A A A C A G G G C U U G G G C C U C A A G U U U G C C G A G C U G
 G U G U A C A C G G G A U U C U G G C A C U C G C C G G A A U G C G A A U U C G
 U G C G C C A C U G U A U U G C G A A G U C C C A G G A G C G C G U G G A A G G
 G A A G G U C C A A G U C U C C G U G C U C A A A G G A C A G G U C U A C A U C
 C U U G G A C G G G A G U C G C C C C U G U C G C U C U A C A A C G A A G A A C
 U G G U G U C G A U G A A C G U G C A G G G A G A C U A U G A A C C A A C G G A 20
 U G C U A C U G G U U U C A U C A A C A U C A A U U C G C U G C G G C U U A A G
 G A G U A C C A U C G G C U G C A G U C C A A G G U C A C C G C G A A G U A G

(配列番号15)。

【0155】

コドンが最適化された、ヒトのアルギニノコハク酸合成酵素 (ASS1) メッセンジャーRNA完全長配列の一例を下記に示す：

G G A C A G A U C G C C U G G A G A C G C C A U C C A C G C U G U U U U G A C C
 U C C A U A G A A G A C A C C G G G A C C G A U C C A G C C U C C G C G G C C G
 G G A A C G G U G C A U U G G A A C G C G G A U U C C C C G U G C C A A G A G U 30
 G A C U C A C C G U C C U U G A C A C G A U G A G C A G C A A G G G C A G C G U
 G G U G C U G G C C U A C A G C G G C G G C C U G G A C A C C A G C U G C A U C
 C U G G U G U G G C U G A A G G A G C A G G G C U A C G A C G U G A U C G C C U
 A C C U G G C C A A C A U C G G C C A G A A G G A G G A C U U C G A G G A G G C
 C C G C A A G A A G G C C C U G A A G C U G G G C G C C A A G A A G G U G U U C
 A U C G A G G A C G U G A G C C G C G A G U U C G U G G A G G A G U U C A U C U
 G G C C C G C C A U C C A G A G C A G C G C C C U G U A C G A G G A C C G C U A
 C C U G C U G G G C A C C A G C C U G G C C C G C C C C U G C A U C G C C C G C
 A A G C A G G U G G A G A U C G C C C A G C G C G A G G G C G C C A A G U A C G
 U G A G C C A C G G C G C C A C C G G C A A G G G C A A C G A C C A G G U G C G 40
 C U U C G A G C U G A G C U G C U A C A G C C U G G C C C C C C A G A U C A A G
 G U G A U C G C C C C U G G C G C A U G C C C G A G U U C U A C A A C C G C U
 U C A A G G G C C G C A A C G A C C U G A U G G A G U A C G C C A A G C A G C A
 C G G C A U C C C C A U C C C C G U G A C C C C C A A G A A C C C C U G G A G C
 A U G G A C G A G A A C C U G A U G C A C A U C A G C U A C G A G G C C G G C A
 U C C U G G A G A A C C C C A A G A A C C A G G C C C C C C C G G C C U G U A
 C A C C A A G A C C C A G G A C C C G C C A A G G C C C C C A A C A C C C C C
 G A C A U C C U G G A G A U C G A G U U C A A G A A G G G C G U G C C C G U G A
 A G G U G A C C A A C G U G A A G G A C G G C A C C A C C C A C C A G A C C A G
 C C U G G A G C U G U U C A U G U A C C U G A A C G A G G U G G C C G G C A A G
 C A C G G C G U G G G C C G C A U C G A C A U C G U G G A G A A C C G C U U C A 50

U C G G C A U G A A G A G C C G C G G C A U C U A C G A G A C C C C C G C C G G
 C A C C A U C C U G U A C C A C G C C C A C C U G G A C A U C G A G G C C U U C
 A C C A U G G A C C G C G A G G U G C G C A A G A U C A A G C A G G G C C U G G
 G C C U G A A G U U C G C C G A G C U G G U G U A C A C C G G C U U C U G G C A
 C A G C C C C G A G U G C G A G U U C G U G C G C C A C U G C A U C G C C A A G
 A G C C A G G A G C G C G U G G A G G G C A A G G U G C A G G U G A G C G U G C
 U G A A G G G C C A G G U G U A C A U C C U G G G C C G C G A G A G C C C C C U
 G A G C C U G U A C A A C G A G G A G C U G G U G A G C A U G A A C G U G C A G
 G G C G A C U A C G A G C C C A C C G A C G C C A C C G G C U U C A U C A A C A
 U C A A C A G C C U G C G C C U G A A G G A G U A C C A C C G C C U G C A G A G
 C A A G G U G A C C G C C A A G U G A C G G G U G G C A U C C C U G U G A C C C
 C U C C C C A G U G C C U C U C C U G G C C C U G G A A G U U G C C A C U C C A
 G U G C C C A C C A G C C U U G U C C U A A U A A A A U U A A G U U G C A U C A
 A G C U (配列番号 7) 。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 6 】

別の実施例では、コドンが最適化された、ヒトのアルギニノコハク酸合成酵素 (A S S 1) メッセンジャー R N A 完全長配列を下記に示す :

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

U C A A C A G C C U G C G C C U G A A G G A G U A C C A C C G C C U G C A G A G
 C A A G G U G A C C G C C A A G U G A G G G U G G C A U C C C U G U G A C C C C
 U C C C C A G U G C C U C U C C U G G C C C U G G A A G U U G C C A C U C C A G
 U G C C C A C C A G C C U U G U C C U A A U A A A A U U A A G U U G C A U C A A
 A G C U (配列番号 8) 。

【 0 1 5 7 】

例示的製剤プロトコル

A . c K K - E 1 2

c K K - E 1 2、D O P E、コレステロール及びD M G - P E G 2 Kの各エタノール溶液 5 0 m g / m Lの分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 m Lとした。別に 10
 、原液 1 m g / m LからA S S 1 m R N Aの水性緩衝液 (1 0 m Mクエン酸塩 / 1 5 0 m M N a C l、p H 4 . 5)を調製した。脂質溶液を水性m R N A溶液にすばやく注入し、攪拌して 2 0 %エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、
 1 × P B S (p H 7 . 4)でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0 . 6 4 m g / m L A S S 1 m R N A (封入)。Z_{ave} = 7 8 n M (D v (5 0)) = 4 6 n M ; D v (9 0) = 9 6 n M) 。

【 0 1 5 8 】

B . C 1 2 - 2 0 0

C 1 2 - 2 0 0、D O P E、コレステロール及びD M G - P E G 2 Kの各エタノール溶液 5 0 m g / m Lの分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 m Lとした。別に 20
 、原液 1 m g / m LからA S S 1 m R N Aの水性緩衝液 (1 0 m Mクエン酸塩 / 1 5 0 m M N a C l、p H 4 . 5)を調製した。脂質溶液を水性m R N A溶液にすばやく注入し、攪拌して 2 0 %エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、
 1 × P B S (p H 7 . 4)でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0 . 8 2 m g / m L A S S 1 m R N A (封入)。Z_{ave} = 8 6 n M (D v (5 0)) = 5 0 n M ; D v (9 0) = 1 0 1 n M) 。

【 0 1 5 9 】

C . H G T 4 0 0 3

H G T 4 0 0 3、D O P E、コレステロール及びD M G - P E G 2 Kの各エタノール溶液 5 0 m g / m Lの分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 m Lとした。別に 30
 、原液 1 m g / m LからA S S 1 m R N Aの水性緩衝液 (1 0 m Mクエン酸塩 / 1 5 0 m M N a C l、p H 4 . 5)を調製した。脂質溶液を水性m R N A溶液にすばやく注入し、攪拌して 2 0 %エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、
 1 × P B S (p H 7 . 4)でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0 . 8 2 m g / m L A S S 1 m R N A (封入)。Z_{ave} = 8 6 n M (D v (5 0)) = 5 0 n M ; D v (9 0) = 1 0 1 n M) 。

【 0 1 6 0 】

D . I C E

I C E、D O P E、コレステロール及びD M G - P E G 2 Kの各エタノール溶液 5 0 m g / m Lの分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 m Lとした。別に、原液 1 40
 m g / m LからA S S 1 m R N Aの水性緩衝液 (1 0 m Mクエン酸塩 / 1 5 0 m M N a C l、p H 4 . 5)を調製した。脂質溶液を水性m R N A溶液にすばやく注入し、攪拌して 2 0 %エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、1 × P B S (p H 7 . 4)でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0 . 9 1 m g / m L A S S 1 m R N A (封入)。Z_{ave} = 8 1 n M (D v (5 0)) = 4 8 n M ; D v (9 0) = 9 6 n M) 。

【 0 1 6 1 】

E . H G T 5 0 0 1

H G T 5 0 0 1、D O P E、コレステロール及びD M G - P E G 2 Kの各エタノール溶液 5 0 m g / m Lの分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 m Lとした。別に 50

、原液 1 mg / mL から ASS1 mRNA の水性緩衝液 (10 mM クエン酸塩 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を調製した。脂質溶液を水性 mRNA 溶液にすばやく注入し、攪拌して 20 % エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0.20 mg / mL ASS1 mRNA (封入)。Z_{ave} = 87.0 nM (D_{v(50)} = 75 nM ; D_{v(90)} = 103 nM)。

【 0162 】

F . HGT5000

HGT5000、DOPE、コレステロール及び DMG - PEG2K の各エタノール溶液 50 mg / mL の分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 mL とした。別に、原液 1 mg / mL から ASS1 mRNA の水性緩衝液 (10 mM クエン酸塩 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を調製した。脂質溶液を水性 mRNA 溶液にすばやく注入し、攪拌して 20 % エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0.20 mg / mL ASS1 mRNA (封入)。Z_{ave} = 81 nM (D_{v(50)} = 67 nM ; D_{v(90)} = 97 nM)。

10

【 0163 】

G . DLinKC2DMA

DLinKC2DMA、DOPE、コレステロール及び DMG - PEG2K の各エタノール溶液 50 mg / mL の分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 mL とした。別に、原液 1 mg / mL から ASS1 mRNA の水性緩衝液 (10 mM クエン酸塩 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を調製した。脂質溶液を水性 mRNA 溶液にすばやく注入し、攪拌して 20 % エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0.20 mg / mL ASS1 mRNA (封入)。Z_{ave} = 78 nM (D_{v(50)} = 60 nM ; D_{v(90)} = 92 nM)。

20

【 0164 】

H . DODAP

DODAP、DOPE、コレステロール及び DMG - PEG2K の各エタノール溶液 50 mg / mL の分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 mL とした。別に、原液 1 mg / mL から ASS1 mRNA の水性緩衝液 (10 mM クエン酸塩 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を調製した。脂質溶液を水性 mRNA 溶液にすばやく注入し、攪拌して 20 % エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0.20 mg / mL ASS1 mRNA (封入)。Z_{ave} = 84 nM (D_{v(50)} = 62 nM ; D_{v(90)} = 92 nM)。

30

【 0165 】

I . DODMA

DODMA、DOPE、コレステロール及び DMG - PEG2K の各エタノール溶液 50 mg / mL の分注を混合し、エタノールで希釈して最終容積を 3 mL とした。別に、原液 1 mg / mL から ASS1 mRNA の水性緩衝液 (10 mM クエン酸塩 / 150 mM NaCl、pH 4.5) を調製した。脂質溶液を水性 mRNA 溶液にすばやく注入し、攪拌して 20 % エタノールに最終懸濁液を得た。得られたナノ粒子懸濁液をろ過し、1 × PBS (pH 7.4) でダイアフィルトレーション後、濃縮し、2 ~ 8 で保存した。最終濃度 = 0.20 mg / mL ASS1 mRNA (封入)。Z_{ave} = 86 nM (D_{v(50)} = 69 nM ; D_{v(90)} = 98 nM)。

40

【 0166 】

実施例 2 . ASS1 mRNA 搭載リボソームナノ粒子の投与

本実施例では、ASS1 mRNA 搭載リボソームナノ粒子の投与方法及び *in vivo* のさまざまな標的組織で発現したタンパク質の解析方法を例示的に説明する。

50

【0167】

すべての試験は、各実験開始時の週齢が約6～8週齢の雄CD-1マウスを使用して実施した。試料は、封入ASS1 mRNA総投与量1.0 mg/kg（または他の指定量）に相当する量を尾静脈注射の単回ボラス投与により導入した。マウスを殺し、指定された時点で生理食塩水による灌流を行った。

【0168】

各マウスの肝臓、脾臓、腎臓及び心臓などの組織を回収し、個々の部分に分け、10%中性緩衝ホルマリンまたは瞬間凍結して保存し、分析用に-80℃で保存した。

【0169】

全動物は、用量投与後（±5%）の指定された時点でCO₂で窒息させて安楽死させ、開胸し、最終心血を採取した。安楽死させた動物に心臓穿刺をして全血（採取可能最大量）を血清分離管に採取し、室温で少なくとも30分間凝固させてから、22 ± 5、9300 gで10分間遠心分離にかけた後、血清を抽出した。中間血液採取は、顔面の静脈穿刺または尾部の切断により全血を約40～50 µL採取した。未処置動物から採取した試料は、試験動物と比較するためのASS1量ベースラインとして使用した。

10

【0170】

酵素結合免疫吸着法（ELISA）分析 - ヒトASS1 ELISA

捕捉抗体にマウス抗ASS1 2D1-2E12 IgGを、二次抗体（検出用）にウサギ抗ASS1 #3285 IgGを用いてELISAの標準の手順にしたがった（Shire Human Genetic Therapies）。ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）と複合体化させたヤギ抗ウサギIgGを使用して3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン（TMB）基質溶液を活性化させた。20分後、2N H₂SO₄を使用して反応を停止させた。モレキュラーデバイス製SpectraMax装置で吸光度（450 nm）検出値を監視した。未処置マウスの血清及び臓器並びにヒトASS1タンパク質を、それぞれ、陰性対照及び陽性対照として使用した。

20

【0171】

実施例3. ASS1タンパク質の効率的in vivo発現

本実施例では、ASS1 mRNAの投与により、タンパク質が良好に産生され、in vivoの臨床の有効性がもたらされることを示す。

【0172】

コドンが最適化されたhASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子によるヒトASS1タンパク質の産生を、単回ボラス静脈内注射した場合についてCD-1マウスで試験した。図1は、さまざまな用量のヒトASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子でマウスを処置した場合の、ELISAで検出されたヒトASS1タンパク質量を表す。注射してから24時間後にマウスを殺し臓器を回収した（上記のとおり）。

30

【0173】

図1に示すように、肝臓のヒトASS1タンパク質量を測定したところ、はっきりとした用量反応が得られた。用量範囲は、封入ヒトASS1 mRNA 0.10～2.0 mg/kgであった。これらのデータは、脂質ナノ粒子が肝臓中で蓄積し、搭載mRNAを放出し、肝臓が翻訳を介してこの外因性mRNAを処理しヒトASS1タンパク質を産生することができることを示している。ELISA解析で測定したヒトASS1タンパク質の生の数値（図1に図示）を下記表1に示す。

40

【表 1 - 3】

表 1

封入 A S S 1 m R N A 用量 (m g / k g)	ヒト A S S 1 タンパク質 (n g / 総タンパク質 1 m g)
0 . 1 0	B L D
0 . 3 0	B L D
0 . 6 0	5 4 6
1 . 0	1 3 8 8
2 . 0	3 3 7 1

10

コドンが最適化されたヒト A S S 1 m R N A を c K K - E 1 2 系脂質ナノ粒子を介して送達した。用量は、封入 A S S 1 m R N A に基づいている。数値は、肝臓中総タンパク質量 (ミリグラム) あたりのヒト A S S 1 タンパク質量をナノグラムで示している。B L D = E L I S A 検出下限。

【 0 1 7 4 】

E L I S A では低値での感度に限界があるが、ウェスタンブロット解析では、低用量でも (0 . 3 0 m g / k g) ヒト A S S 1 タンパク質が明瞭に表示できる (図 2 A ~ 2 D) 。

【 0 1 7 5 】

A S S 1 m R N A を封入した脂質ナノ粒子が、選択臓器 (肝臓) への m R N A 送達を促進する能力をさらに理解するために、我々は、1 週間の間の肝臓中のヒト A S S 1 タンパク質量を監視する薬物動態試験を行った。図 3 は、ヒト A S S 1 搭載脂質ナノ粒子 (c K K - E 1 2) 投与後のさまざまな測定時点で検出された肝臓中のヒト A S S 1 タンパク質量の量を示す。これは、静脈内に単回投与 (封入 m R N A 1 . 0 m g / k g) を行った場合に得られた結果である。

20

【 0 1 7 6 】

この例では、投与から約 2 4 ~ 4 8 時間後にヒト A S S 1 タンパク質の最大血清濃度が観察された。測定可能な量のタンパク質が投与から 1 週間後もなお、E L I S A 及びウェスタンブロットの双方で観察された (それぞれ、図 3 及び 4 A - 4 E) 。

30

【 0 1 7 7 】

I n s i t u ハイブリダイゼーション (I S H) に基づいた方法を使用して、処置マウスのそれぞれの肝臓中の医薬活性成分 (A S S 1 m R N A) を直接検出した。図 5 A ~ 5 I に示されるように、外因性ヒト A S S 1 メッセンジャー R N A は、試験の最初の測定時点 (3 0 分) で高濃度で検出可能であり、そのシグナルの強さは投与から 4 8 時間後まで変わらなかった。さらに、ヒト A S S 1 m R N A は投与 7 日後もなお検出可能であった。

【 0 1 7 8 】

I S H のほかに、免疫組織化学的 (I H C) 手段を用いて、先に得られたヒト A S S 1 タンパク質の検出を行った。特異的結合にマウスモノクローナル抗体 (0 2 D 2 - 2 E 1 2) を用いたところ、処置を受けた肝臓肝細胞の細胞質に標的ヒト A S S 1 タンパク質がすぐに観察された。シグナルは、最初、処置を受けた肝臓に投与後 3 0 分以内にかすかに認められたが、投与後 3 時間以内に明瞭に認められた。図 6 A ~ 6 I は、投与後の処置マウス肝臓中のヒト A S S 1 タンパク質染色を経時的に示している。

40

【 0 1 7 9 】

さらに、ヒト A S S 1 タンパク質が類洞壁細胞並びに標的肝細胞の両方で肝臓全体にわたり広範囲で分布している様子が強く検出されているのが認められる。図 7 A ~ 7 B は、投与後 2 4 時間のヒト A S S 1 タンパク質の陽性 I H C 染色の呈色を低倍率で表したものである。

【 0 1 8 0 】

50

ヒトASS1 mRNAの送達とそれに続くタンパク産生は単一の脂質ナノ粒子系に限定されるものではない。幾つかのカチオン性脂質系ナノ粒子系を、それらがmRNAを送達し所望のタンパク質を産生する能力について探索した。選択すべき分析対象物としてヒトASS1 mRNAを使用して異なる10種類のカチオン性脂質系のスクリーニング調査をした。各製剤用のカチオン性脂質成分は表2に一覧が示され、また、図8に示されている。単回静脈内注射で投与し、肝臓試料を投与から24時間後に採取した。

【0181】

製剤の用量はいずれも封入mRNAに基づき1.0mg/kgとした。数値は、投与後24時間の肝臓試料に基づいている。

【表2】

10

表2

カチオン性／イオン化可能な脂質成分	用量 (mg / kg)	ヒトASS1タンパク質 (ng / 総タンパク質1mg)
cKK-E12 (1)	1.0	2,028
cKK-E12 (2)	1.0	911
ICE	1.0	663
C12-200	1.0	385
HGT4003	1.0	100

20

ELISA解析で測定したさまざまなカチオン性脂質系ナノ粒子系のヒトASS1タンパク質の生の数値(図9に図示)。用量はいずれも1.0mg/kgで静脈内投与した。タンパク質の数値は、肝臓総タンパク質(ミリグラム)あたりのヒトASS1タンパク質量をナノグラムで示している。cKK-E12(1)は、PEG脂質の割合がcKK-E12(2)よりも低い(PEG脂質:3%対5%)。

【0182】

mRNA搭載脂質ナノ粒子によるタンパク質産生は検出可能ではあるが、我々は、得られたタンパク質が活性であるのか、また、それが適切に機能し得るのかどうかさらに検討した。そのために、¹⁴Cシトルリン添加により細胞タンパク質への¹⁴Cアルギニンの取り込みを測定する*in vitro*活性試験を行った。放射性シトルリンは、活性ASS1タンパク質の存在下、¹⁴C-アルギニノコハク酸に変換され、その後、¹⁴C-アルギニン変換された。ヒトASS1 mRNAをトランスフェクションした細胞と未処置細胞とを比較して、それぞれの外因性mRNA由来ASS1タンパク質の活性を測定することができた。図9は、細胞タンパク質への¹⁴Cアルギニンの取り込みを1分あたりの放射線量計測数で表している。ヒトASS1 mRNAをトランスフェクションしたSK(-)細胞(ASS1タンパク質ノックアウト細胞株)を枯渇培地(アルギニンまたはロイシン未含)に曝露させたところ、放射線観測値は未処置SK(-)細胞より高くなった。トランスフェクションを行ったこれらの細胞で測定された活性は、安定してトランスフェクションされた陽性ASS1細胞株(SK(+))の活性に匹敵するものであった。

30

40

【0183】

実施例4. ASS1 mRNA搭載脂質ナノ粒子による治療後のヒトASS1タンパク質量
本実施例では、ASS1 mRNAの投与により、ASS1タンパク質が肝臓中で良好に産生されることを示す。

【0184】

雄CD-1マウスは、脂質ナノ粒子(ASS1 mRNA搭載cKK-E12系脂質ナノ粒子)1.0mg/kgを静脈内に単回投与したマウス、または、上記実施例2のような未処置(すなわち、対照)マウスであった。マウスを殺し、その臓器を投与24時間

50

後に採取した。肝臓中のヒトのアルギニノコハク酸合成酵素 (A S S 1) タンパク質を E L I S A で測定した。これらのデータは、対照と比較して多量の A S S 1 タンパク質が検出されたこと、及び、その産生タンパク質は、 A S S 1 m R N A が経静脈送達によるものであることを示している (図 1 0) 。

【 0 1 8 5 】

実施例 5 : A S S 1 m R N A 搭載脂質ナノ粒子による治療後のアンモニア血漿濃度

本実施例では、 A S S 1 m R N A の投与により、アンモニア血漿濃度が良好に低下したことを示す。

【 0 1 8 6 】

A S S 1 ノックアウトマウスに、 A S S 1 m R N A 脂質ナノ粒子 (A S S 1 m R N A 搭載 c K K - E 1 2 系脂質ナノ粒子) または空の脂質ナノ粒子 1 . 0 m g / k g を 1 4 日に 1 回、 3 0 日間、上記実施例 2 のとおり投与した。空の脂質ナノ粒子を投与したマウスはビヒクル対照として使用した。さらなる対照群に、未処置野生型マウス及び未処置 A S S 1 ノックアウトマウスを含めた。第 1、 1 5 及び 2 9 日の各投与に先立ち、血漿試料を採取した (すなわち、投与前) 。血漿試料は、第 2、 1 6 及び 3 0 日の各投与後 2 4 時間以内にも採取した。さらなる血漿試料を第 8 日及び 2 2 日に採取した。全試料のアンモニア血漿濃度を定量したところ、処置後少なくとも 2 4 時間は、アンモニア血漿濃度が野生型マウスで観察された濃度に近い濃度まで低下し再現性があることが示された。

10

【 0 1 8 7 】

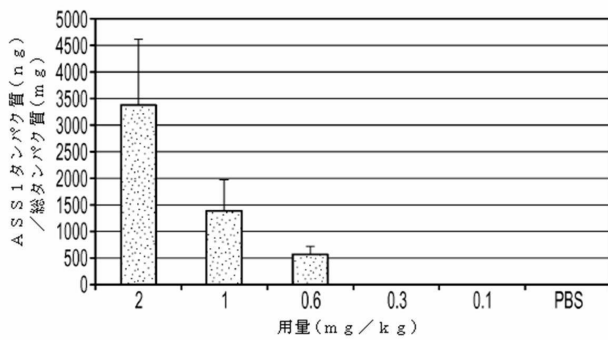
等価物

20

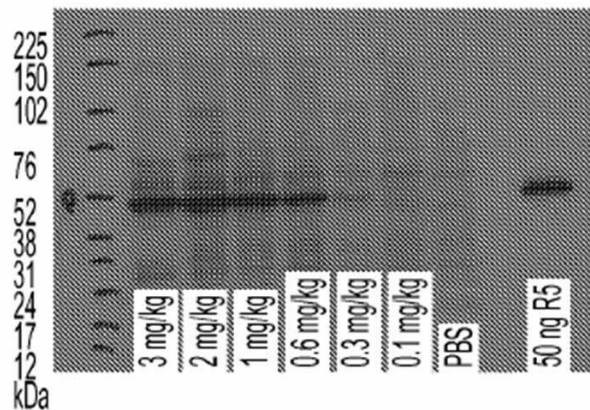
当業者は、慣用となっている実験を使用して、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物について認識または確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記の「発明を実施するための形態」に限定されるものではなく、むしろ、以下の請求項に記載されている。

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 A 】

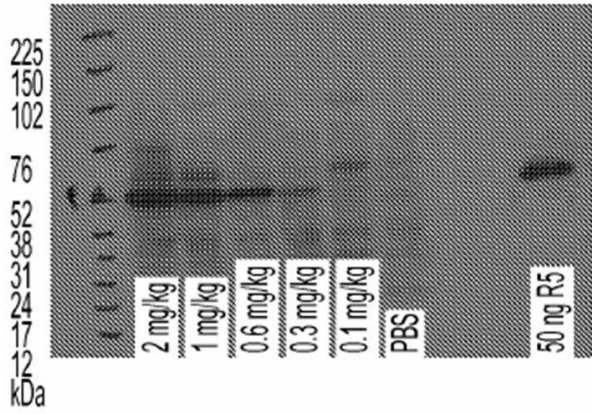


30

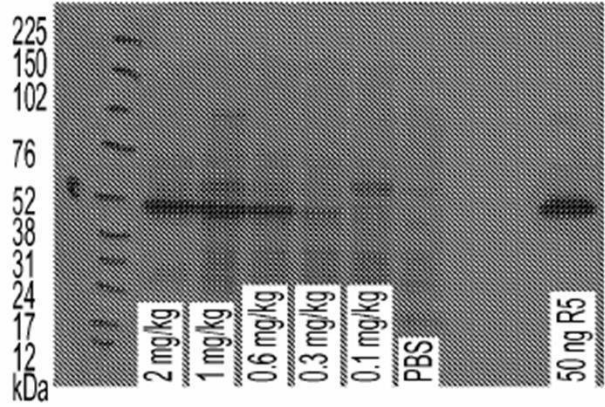
40

50

【 図 2 B 】

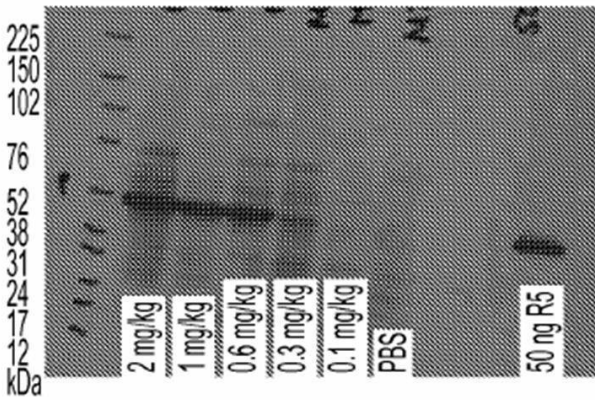


【 図 2 C 】

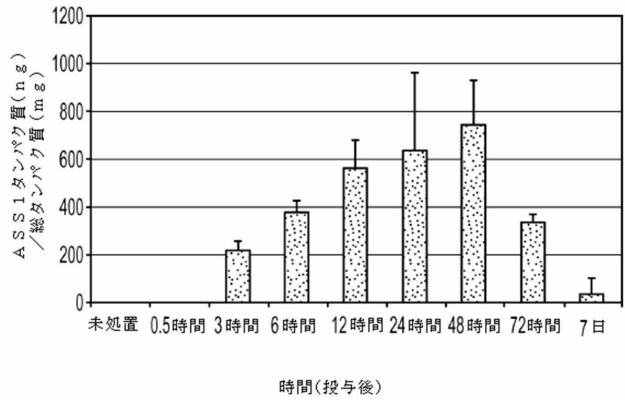


10

【 図 2 D 】



【 図 3 】



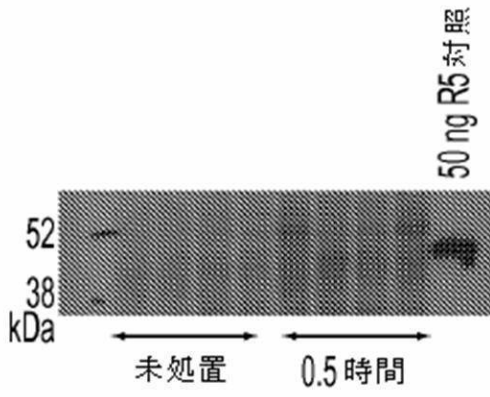
20

30

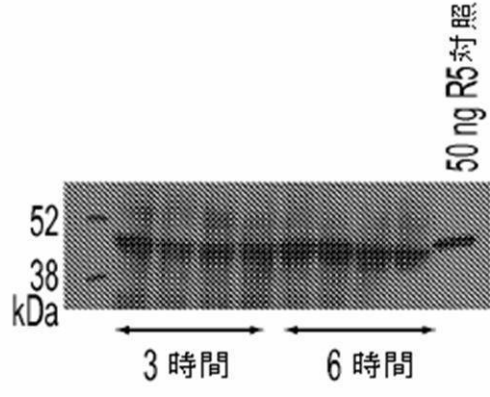
40

50

【 図 4 A 】

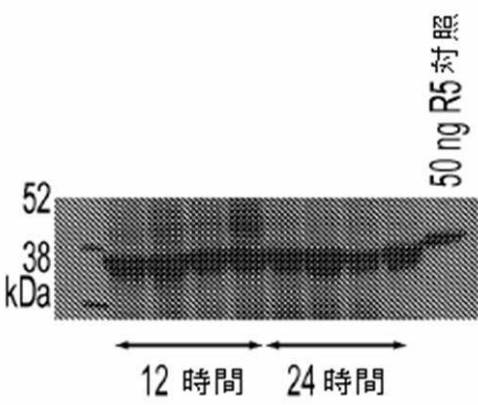


【 図 4 B 】

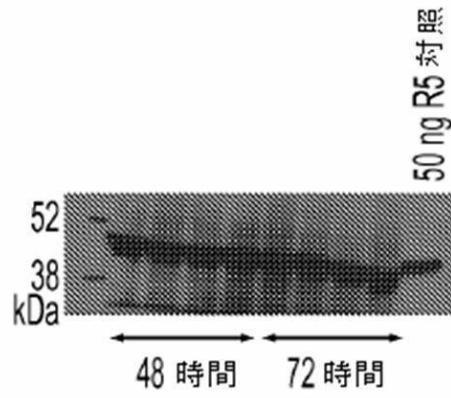


10

【 図 4 C 】



【 図 4 D 】



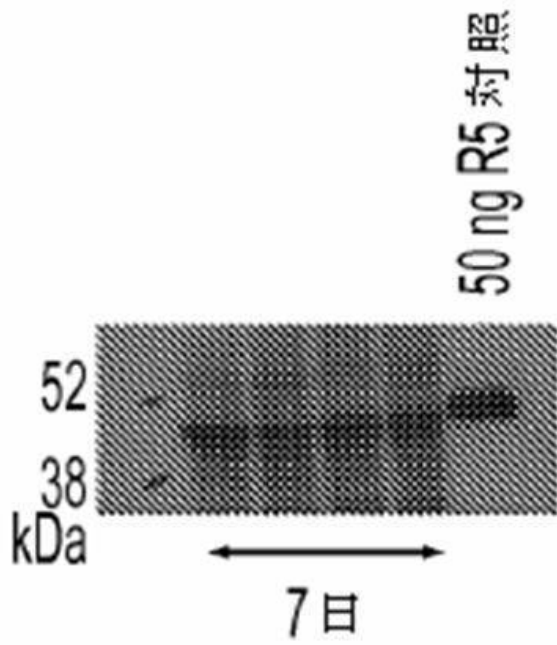
20

30

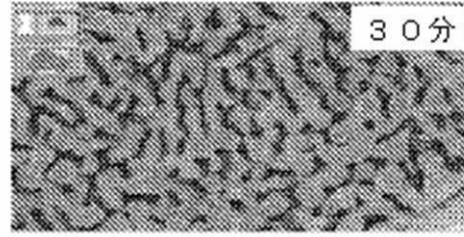
40

50

【 図 4 E 】



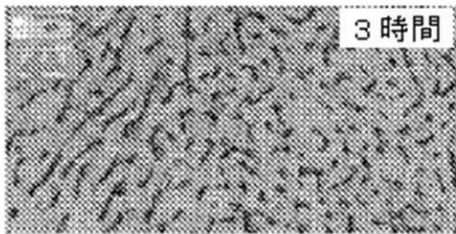
【 図 5 A 】



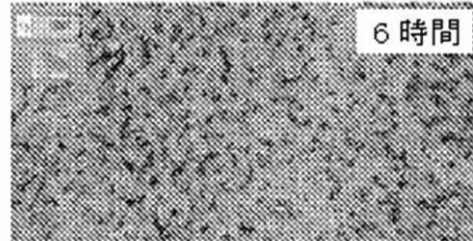
10

20

【 図 5 B 】



【 図 5 C 】

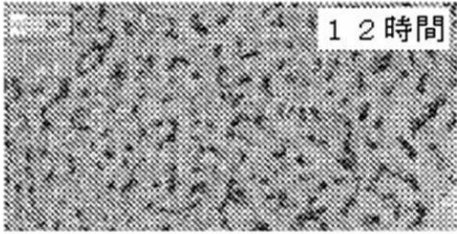


30

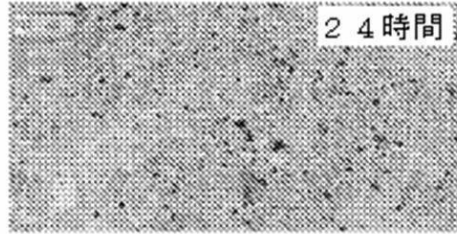
40

50

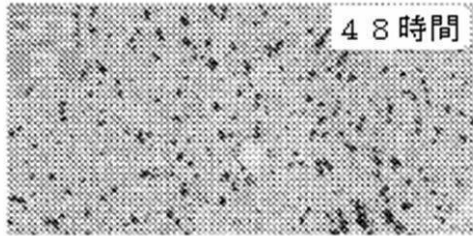
【図 5 D】



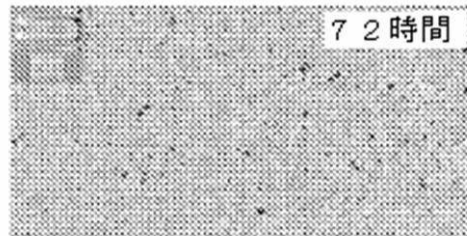
【図 5 E】



【図 5 F】



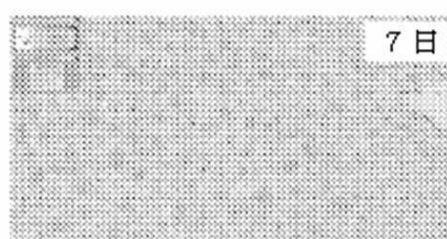
【図 5 G】



【図 5 H】



【図 5 I】



10

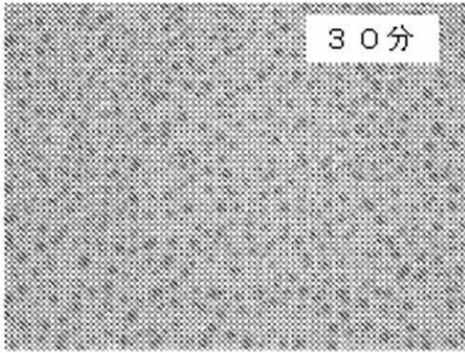
20

30

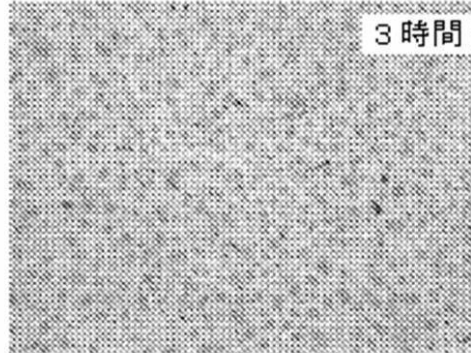
40

50

【図 6 A】

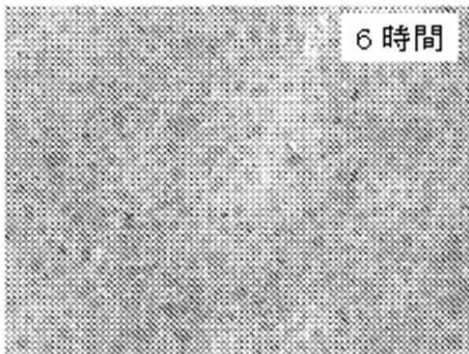


【図 6 B】

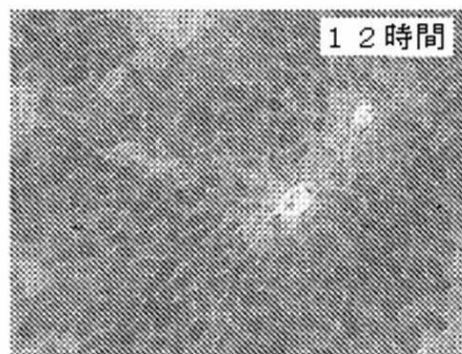


10

【図 6 C】

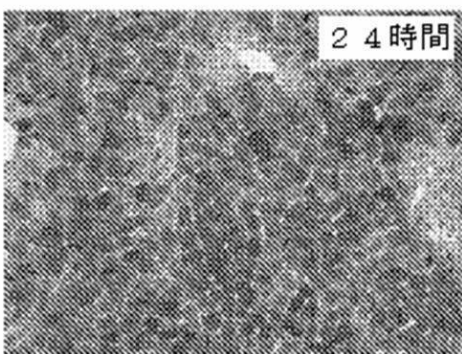


【図 6 D】

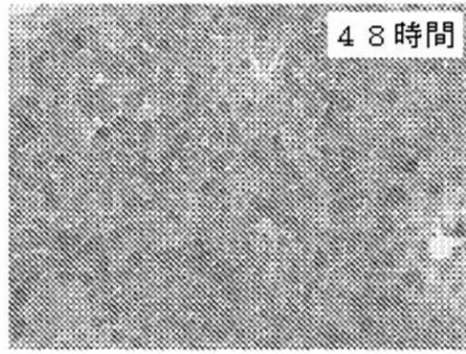


20

【図 6 E】



【図 6 F】

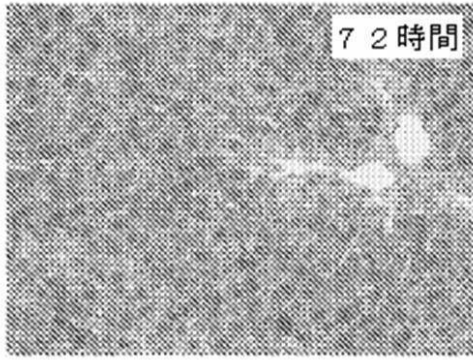


30

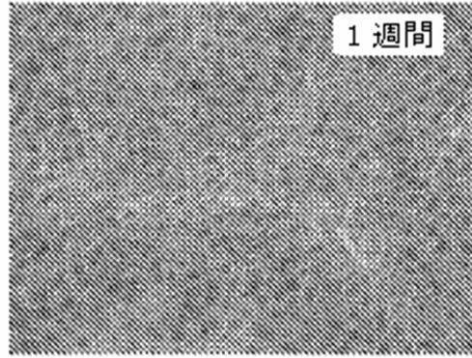
40

50

【 図 6 G 】

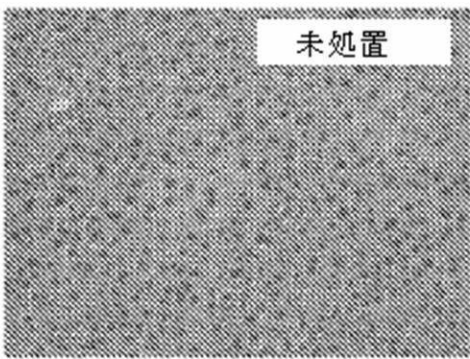


【 図 6 H 】

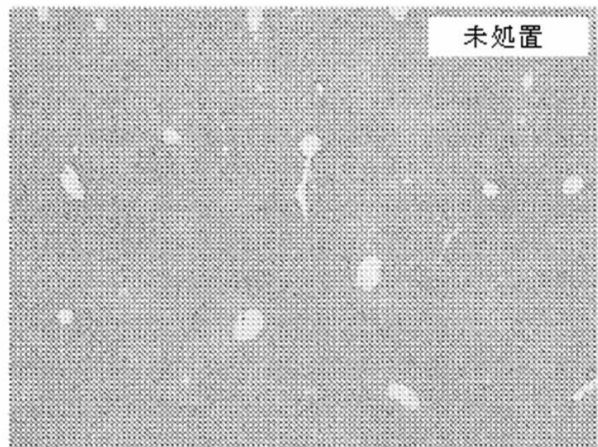


10

【 図 6 I 】



【 図 7 A 】



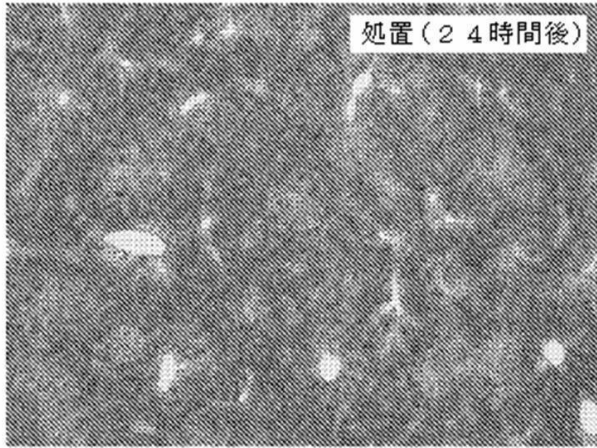
20

30

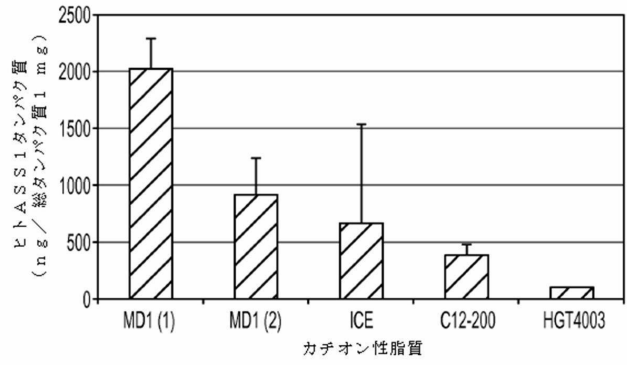
40

50

【 図 7 B 】

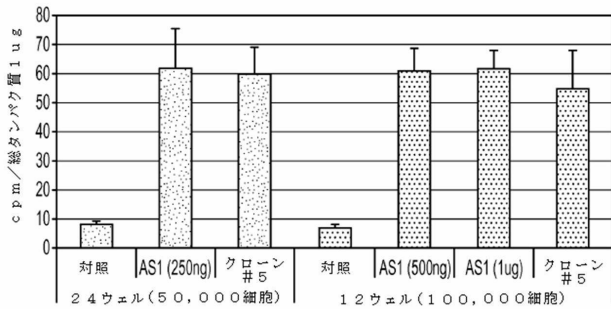


【 図 8 】

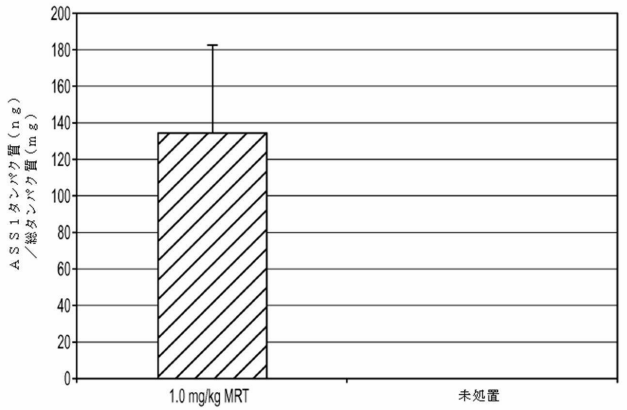


10

【 図 9 】



【 図 10 】



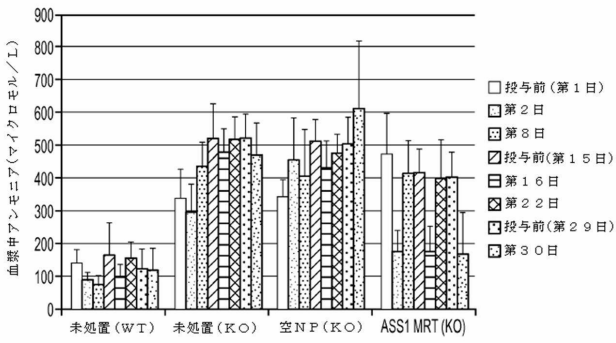
20

30

40

50

【 図 1 1 】



10

【 配列表 】

[202310175600001.app](#)

【 外国語明細書 】

[2023101756000047.pdf](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28		
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34		
C 1 2 N	15/52 (2006.01)	C 1 2 N	15/52		Z Z N A
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88		Z

弁護士 山本 健策

- (72)発明者 マイケル ハートレイン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1 , レキシントン , シャイアー ウェイ 3 0 0
- (72)発明者 フランク デローザ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1 , レキシントン , シャイアー ウェイ 3 0 0
- (72)発明者 リアンヌ スミス
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1 , レキシントン , シャイアー ウェイ 3 0 0