(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-500539
(P2020-500539A)
(43)公表日　令和2年1月16日(2020.1.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/88	(2006.01)	C12N	15/88	ZNAZ	4B065
C12N 15/11	(2006.01)	C12N	15/11	Z	4C076
C12N 15/55	(2006.01)	C12N	15/55		4C084
C12N 15/12	(2006.01)	C12N	15/12		4C086
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	100	4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 159 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-530472 (P2019-530472)
(86)(22)出願日　平成29年12月8日 (2017.12.8)
(85)翻訳文提出日　令和1年7月26日 (2019.7.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/065303
(87)国際公開番号　WO2018/107026
(87)国際公開日　平成30年6月14日 (2018.6.14)
(31)優先権主張番号　62/432,042
(32)優先日　平成28年12月9日 (2016.12.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/458,373
(32)優先日　平成29年2月13日 (2017.2.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　508241200
サンガモ　セラピューティクス，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　リッチモンド　カナル　ブールバード　５０１　ポイント　リッチモンド　テク　センター　スート　エー１００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】標的特異的ヌクレアーゼの送達

(57)【要約】
カチオン性脂質および他の脂質を含み、核酸の細胞への移入を促進する工学技術で作製されたヌクレアーゼも含む脂質ナノ粒子が本明細書に記載される。本開示は、遺伝子治療試薬を含むＬＮＰ試薬を使用することによって遺伝子治療の効率を増大させるための方法および組成物を提供する。したがって、本明細書で、遺伝子治療に使用するための、工学技術で作製された転写因子もしくは工学技術で作製されたヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、ならびに／または、工学技術で作製された転写因子、工学技術で作製されたヌクレアーゼおよび／もしくはドナー（導入遺伝子）をコードするＤＮＡを送達することが可能なＬＮＰを含む組成物が記載される。

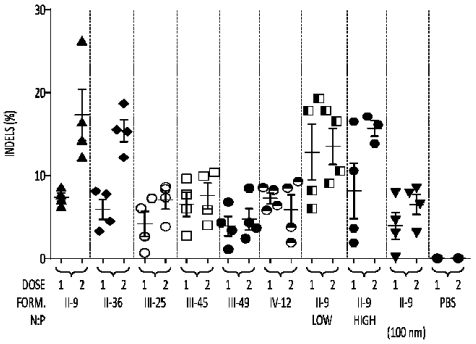
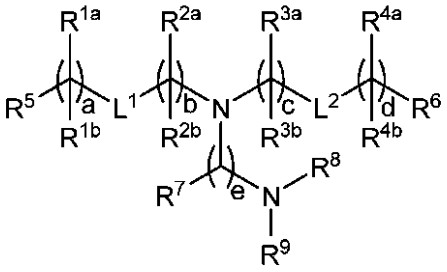


FIGURE 23

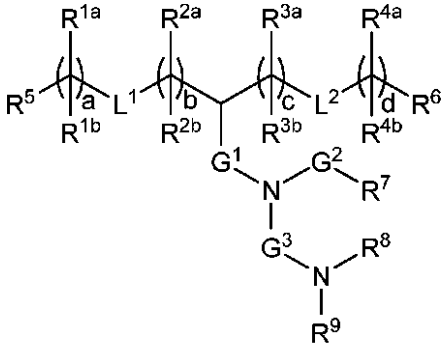
【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つまたは複数の導入遺伝子をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）。
【請求項２】
前記１つまたは複数の導入遺伝子が、１つもしくは複数の工学技術で作製されたヌクレアーゼ、１つもしくは複数の工学技術で作製された転写因子、治療用タンパク質をコードする１つもしくは複数の導入遺伝子、またはこれらの組合せをコードする、請求項１に記載のＬＮＰ。
【請求項３】
前記ポリヌクレオチドが、ゲノム内にランダムに組み込まれれているか、ゲノム内に標的化様式で組み込まれれているか、または細胞内でエピソームとして発現される、請求項１または請求項２に記載のＬＮＰ。
【請求項４】
前記ヌクレアーゼおよび前記転写因子が、ジンクフィンガータンパク質を含むＤＮＡ結合ドメイン、ＴＡＬ－エフェクタードメインまたは単一ガイドＲＮＡを含み、該ヌクレアーゼが、切断ドメインをさらに含み、該転写因子が、転写制御ドメインをさらに含む、請求項２または請求項３に記載のＬＮＰ。
【請求項５】
前記ポリヌクレオチドが、ＤＮＡ、ＲＮＡまたはその両方を含む、請求項１から４のいずれかに記載のＬＮＰ。
【請求項６】
前記ＲＮＡがｍＲＮＡであり、前記ＤＮＡがプラスミド、ミニ遺伝子、または直鎖状ＤＮＡである、請求項５に記載のＬＮＰ。
【請求項７】
ヌクレアーゼをコードする第１のポリヌクレオチドおよび導入遺伝子を含む第２のポリヌクレオチドを含む、請求項１から６のいずれかに記載のＬＮＰ。
【請求項８】
前記ＬＮＰを細胞に投与し、そこで前記ヌクレアーゼを発現させることにより、細胞のゲノムへの前記導入遺伝子の標的化組込みがもたらされる、請求項７に記載のＬＮＰ。
【請求項９】
カチオン性脂質分子および必要に応じて中性脂質、荷電脂質、ステロイド、ステロイド類似体、ポリマーとコンジュゲートした脂質、またはこれらの組合せを含む、請求項１から８のいずれかに記載のＬＮＰ。
【請求項１０】
前記カチオン性脂質が、以下の式（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶ）：

【化５７】



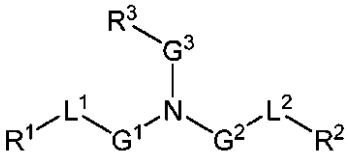
;

(I)

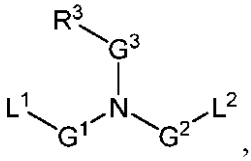


;

(II)



(III); および



,

(IV)

（式中、式（Ｉ）に関して、

Ｌ^{1}およびＬ^{2}は、それぞれ独立に、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－または炭素－炭素二重結合であり；

Ｒ^{1a}およびＲ^{1b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{12}$アルキルであるか、または（ｂ）Ｒ^{1a}がＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{12}$アルキルであり、Ｒ^{1b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するＲ^{1b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

Ｒ^{2a}およびＲ^{2b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{12}$アルキルであるか、または（ｂ）Ｒ^{2a}がＨもしくはＣ$_{1}$～Ｃ$_{12}$アルキルであり、Ｒ^{2b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するＲ^{2b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{3a}およびR^{3b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{3a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{3b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{3b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{4a}およびR^{4b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{4a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{4b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{4b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^5およびR^6は、それぞれ独立に、メチルまたはシクロアルキルであり；

R^7は、各出現につき、独立に、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり；

R^8およびR^9は、それぞれ独立に、非置換C_1～C_{12}アルキルである；またはR^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に、窒素原子を１つ含む５員、６員または７員複素環式環を形成しており；

ａおよびｄは、それぞれ独立に、０から２４までの整数であり；

ｂおよびｃは、それぞれ独立に、１から２４までの整数であり；

ｅは、１または２であり、

式（ＩＩ）に関して、

L^1およびL^2は、それぞれ独立に、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－NR^aＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）NR^a－、－NR^aＣ（＝Ｏ）NR^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）NR^a－、－NR^aＣ（＝Ｏ）Ｏ－または直接結合であり；

G^1は、C_1～C_2アルキレン、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－NR^aＣ（＝Ｏ）－または直接結合であり；

G^2は、－Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）NR^a－または直接結合であり；

G^3は、C_1～C_6アルキレンであり；

R^aは、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり；

R^{1a}およびR^{1b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{1a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{1b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{1b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{2a}およびR^{2b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{2a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{2b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{2b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{3a}およびR^{3b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{3a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{3b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{3b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{4a}およびR^{4b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{4a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{4b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{4b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^5およびR^6は、それぞれ独立に、Ｈまたはメチルであり；

R^7は、C_4～C_{20}アルキルであり；

R^8およびR^9は、それぞれ独立に、C_1～C_{12}アルキルである、またはR^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に５員、６員または７員複素環式環を形成しており；

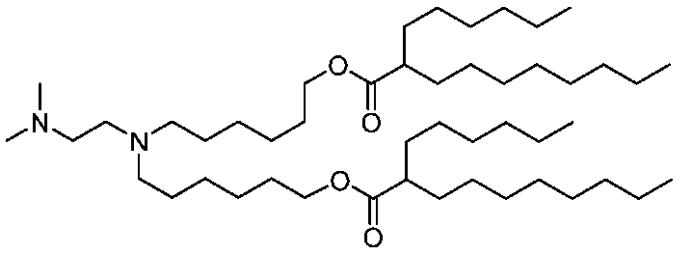
ａ、ｂ、ｃおよびｄは、それぞれ独立に、１から２４までの整数であり；

ｘは、０、１または２であり、

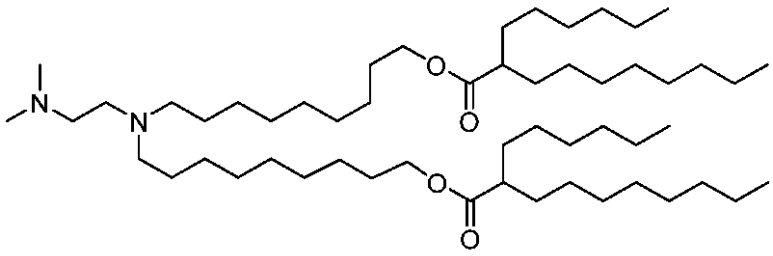
式（ＩＩＩ）に関して、
L^1またはL^2の一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－または－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、であり、L^1またはL^2の他方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－もしくは－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－または直接結合であり；
G^1およびG^2は、それぞれ独立に、非置換Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_1$～Ｃ$_{12}$アルケニレンであり；
G^3は、Ｃ$_1$～Ｃ$_{24}$アルキレン、Ｃ$_1$～Ｃ$_{24}$アルケニレン、Ｃ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルキレン、Ｃ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルケニレンであり；
Ｒ^{a}は、ＨまたはＣ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルであり；
R^1およびR^2は、それぞれ独立に、Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$アルキルまたはＣ$_6$～Ｃ$_{24}$アルケニルであり；
R^3は、Ｈ、ＯＲ^5、ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^4、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{4}または－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{4}であり；
Ｒ^{4}は、Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルであり；
Ｒ^{5}は、ＨまたはＣ$_1$～Ｃ$_6$アルキルであり；
ｘは、０、１または２であり、
式（ＩＶ）に関して、
L^1またはL^2の一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－または－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、L^1またはL^2の他方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－もしくは－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－または直接結合であり；
G^1およびG^2は、それぞれ独立に、非置換Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_1$～Ｃ$_{12}$アルケニレンであり；
G^3は、Ｃ$_1$～Ｃ$_{24}$アルキレン、Ｃ$_1$～Ｃ$_{24}$アルケニレン、Ｃ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルキレン、Ｃ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルケニレンであり；
Ｒ^{a}は、ＨまたはＣ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルであり；
R^1およびR^2は、それぞれ独立に、Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$アルキルまたはＣ$_6$～Ｃ$_{24}$アルケニルであり；
R^3は、Ｈ、ＯＲ^5、ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^4、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{4}または－ＮＲ^{5}Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{4}であり；
Ｒ^{4}は、Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルであり；
Ｒ^{5}は、ＨまたはＣ$_1$～Ｃ$_6$アルキルであり；
ｘは、０、１または２である）
を有する化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体から選択される、請求項９に記載のＬＮＰ。

【請求項１１】
以下の化合物Ｉ－５、Ｉ－６、ＩＩ－９、ＩＩ－１１、ＩＩ－３６、ＩＩＩ－２５、ＩＩ－４５、ＩＩＩ－４９またはＩＶ－１２：

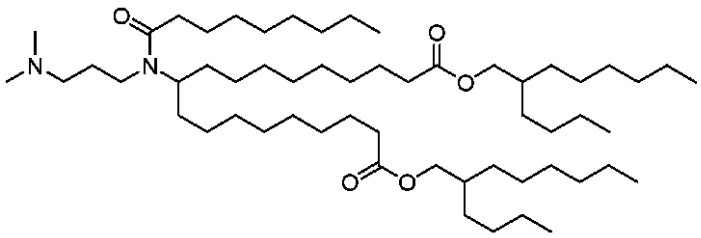
【化５８】



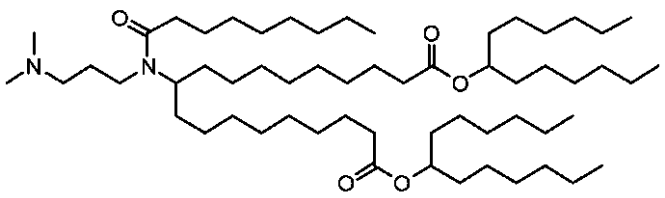
I-5 ;



I-6 ;

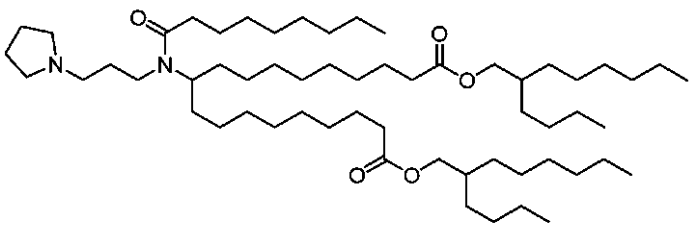


II-9 ;

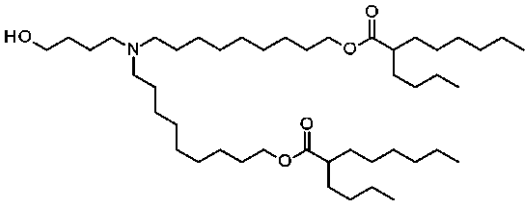


II-11 ;

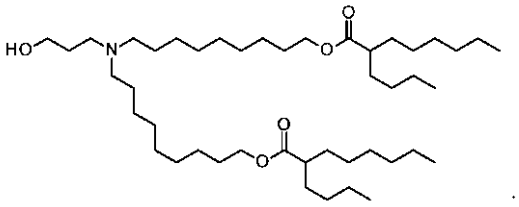
【化５９】



(II-36)

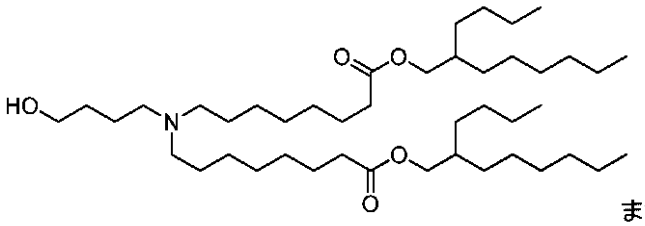


(III-25)



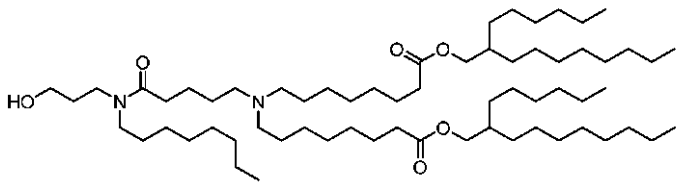
;

III-45



または

(III-49)



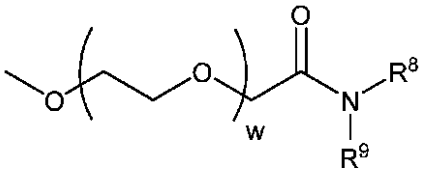
(IV-12)

のうちの１つを含む、請求項１０に記載のＬＮＰ。

【請求項１２】

式（Ｖ）

【化６０】



(V)

（式中、Ｒ^{8}およびＲ^{9}は、それぞれ独立に、炭素原子を１２個から１６個まで含む直鎖状の飽和アルキル鎖であり、ｗは、４２～５５である）
の構造を有するペグ化脂質を含む、請求項１から１１のいずれかに記載のＬＮＰ。

【請求項１３】
請求項１から１２のいずれかに記載の１つまたは複数のＬＮＰを含む医薬組成物。

【請求項１４】
ウイルスベクターをさらに含む、請求項１３に記載の医薬組成物。

【請求項１５】
前記ウイルスベクターが、導入遺伝子ドナーを含む、請求項１４に記載の医薬組成物。

【請求項１６】
請求項１に記載の１つまたは複数のＬＮＰを含む細胞。

【請求項１７】
請求項１６に記載の細胞に由来する細胞。

【請求項１８】
前記細胞が遺伝子改変されており、該遺伝子改変が、挿入、欠失またはその両方を含む、請求項１６または請求項１７に記載の細胞。

【請求項１９】
１つまたは複数のポリヌクレオチドを細胞または被験体に送達する方法であって、請求項１から１２のいずれかに記載の１つまたは複数のＬＮＰを該細胞または該被験体に投与するステップを含む方法。

【請求項２０】
細胞のゲノム内の目的領域を切断する方法であって、請求項１から１２のいずれかに記載の１つまたは複数のＬＮＰを該細胞に送達するステップを含み、少なくとも１つのＬＮＰが、該ゲノムを切断するヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、方法。

【請求項２１】
前記目的領域が、セーフハーバー遺伝子内にある、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】
前記セーフハーバー遺伝子が、ＡＡＶＳ１遺伝子、アルブミン遺伝子、Ｒｏｓａ遺伝子、ＣＣＲ５遺伝子、ＣＸＣＲ遺伝子またはＨＰＲＴ遺伝子である、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】
前記１つまたは複数のＬＮＰが、導入遺伝子を含むドナーを含み、該導入遺伝子が、前記ヌクレアーゼによる切断後に前記細胞のゲノム内に組み込まれることが可能である、請求項２０または２１に記載の方法。

【請求項２４】
前記１つまたは複数のＬＮＰがヌクレアーゼを含み、導入遺伝子を含むウイルスベクターを投与することをさらに含み、該導入遺伝子が、該ヌクレアーゼによる切断後に前記細胞のゲノム内に挿入されることが可能である、請求項２０に記載の方法。

【請求項２５】
疾患を処置する方法における使用のための、請求項１から１２のいずれかに記載の１つもしくは複数のＬＮＰまたは請求項１３から１５のいずれかに記載の医薬組成物であって、該方法は、該１つもしくは複数のＬＮＰまたは医薬組成物を、それを必要とする被験体

に投与して、それを必要とする被験体における該疾患を処置する改変細胞を生成するステップを含む、ＬＮＰまたは医薬組成物。
【請求項２６】
少なくとも１つのＬＮＰが、セーフハーバー遺伝子内のゲノムを切断するポリヌクレオチドを含み、前記ＬＮＰの少なくとも１つが、該セーフハーバー遺伝子に組み込まれ、前記被験体において前記改変細胞によって発現されるドナー導入遺伝子を含む、請求項２５に記載の使用のためのＬＮＰまたは医薬組成物。
【請求項２７】
少なくとも１つのＬＮＰが、前記被験体における細胞のゲノムを切断するポリヌクレオチドを含み、前記方法が、ドナー導入遺伝子を含むウイルスベクターを該被験体に投与するステップをさらに含み、該ドナー導入遺伝子が該ゲノムの切断後に該被験体の該細胞内に組み込まれ、必要に応じて、該ＬＮＰおよびウイルスベクターが逐次的におよび／または反復して投与される、請求項２５に記載の使用のための医薬組成物のＬＮＰ。
【請求項２８】
ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｅｘ ｖｉｖｏ、またはｉｎ ｖｉｖｏで実施される、請求項１９から２４のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記ＬＮＰが、２回またはそれよりも多く投与される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記ＬＮＰが、患者に投与され、最初の投与の７日後、１４日後、２１日後、２８日後、３０日後、４０日後、５０日後、７５日後、１００日後、２００日後もしくはその後に、またはこれらの組合せで再投与される、請求項２３または２４に記載の方法。
【請求項３１】
請求項１から１２のいずれかに記載の１つまたは複数のＬＮＰまたは請求項１３から１５までのいずれかに記載の医薬組成物を含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、２０１６年１２月９日に出願された米国仮出願第６２／４３２，０４２号、２０１７年２月１３日に出願された米国仮出願第６２／４５８，３７３号、２０１７年５月９日に出願された米国仮出願第６２／５０３，４７０号および２０１７年９月１５日に出願された米国仮出願第６２／５５９，１８６号の利益を主張し、これらの開示は、その全体が本明細書において参考として援用される。
【０００２】
技術分野
本開示は、ポリペプチドおよびゲノム工学技術、ならびに、細胞への核酸の移入を促進するための、カチオン性脂質および他の脂質構成成分の使用の分野にある。
【背景技術】
【０００３】
背景
遺伝子治療は、ヒト治療学の新しい時代の莫大な潜在性を秘める。これらの方法論は、以前は標準医療行為によって対処可能ではなかった状態のための処置を可能にする。特に有望な領域の１つは、導入遺伝子を細胞に付加して、その細胞に以前にはその細胞において生成されていなかった生成物を発現させることができることである。この技術の使用の例には、治療用タンパク質をコードする遺伝子の挿入、細胞または個体において何らかの理由で欠如しているタンパク質をコードするコード配列の挿入およびマイクロＲＮＡなどの構造的核酸をコードする配列の挿入が含まれる。
【０００４】
工学技術で作製された（engineered）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写

活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、ＲＮＡガイドヌクレアーゼとも呼ばれる、工学技術で作製されたｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒ　ＲＮＡ（「単一ガイドＲＮＡ」）を用いるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、および／またはアルゴノート系に基づくヌクレアーゼ、例えば、「ＴｔＡｇｏ」として公知である、Ｔ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓに由来するもの（Swartsら（２０１４年）Nature　５０７巻（７４９１号）；２５８～２６１頁）などの人工ヌクレアーゼは、切断ドメインと会合または作動可能に連結したＤＮＡ結合ドメイン（ヌクレオチドまたはポリペプチド）を含み、ゲノム配列の標的化変更のために使用されている。例えば、ヌクレアーゼは、外因性配列を挿入するため、１つまたは複数の内因性遺伝子を不活性化するため、遺伝子発現パターンが変更された生物体（例えば、作物）および細胞株を作製するためなどに使用されている。例えば、米国特許第９，３９４，５４５号；同第９，１５０，８４７号；同第９，０４５，７６３号；同第９，００５，９７３号；同第８，９５６，８２８号；同第８，９４５，８６８号；同第８，７０３，４８９号；同第８，５８６，５２６号；同第６，５３４，２６１号；同第６，５９９，６９２号；同第６，５０３，７１７号；同第６，６８９，５５８号；同第７，０６７，３１７号；同第７，２６２，０５４号；同第７，８８８，１２１号；同第７，９７２，８５４号；同第７，９１４，７９６号；同第７，９５１，９２５号；同第８，１１０，３７９号；同第８，４０９，８６１号；米国特許出願公開第２００３０２３２４１０号；同第２００５０２０８４８９号；同第２００５００２６１５７号；同第２００５００６４４７４号；同第２００６００６３２３１号；同第２００８０１５９９９６号；同第２０１０００２１８２６４号；同第２０１２００１７２９０号；同第２０１１０２６５１９８号；同第２０１３０１３７１０４号；同第２０１３０１２２５９１号；および同第２０１５００５６７０５号を参照のこと。例えば、ヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ、ｄＣａｓ－Ｆｏｋ融合物）の対を使用して、ゲノム配列を切断することができる。対の各メンバーは、一般に、ヌクレアーゼの１つまたは複数の切断ドメイン（または半ドメイン）と連結した、工学技術で作製された（天然に存在しない）ＤＮＡ結合タンパク質を含む。ＤＮＡ結合タンパク質がそれらの標的部位に結合すると、これらのＤＮＡ結合タンパク質と連結している切断ドメインが、二量体化およびその後のゲノムの切断が起こるように位置づけられる。

【０００５】

導入遺伝子が細胞自体のゲノムに組み込まれ、そこで維持されるように、導入遺伝子を種々のやり方によって細胞に送達することができる。近年、選択されたゲノム遺伝子座への標的化挿入のための、部位特異的ヌクレアーゼを用いた切断を使用する、導入遺伝子を組み込むための戦略が開発されている（例えば、共同保有の米国特許第７，８８８，１２１号を参照のこと）。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系（工学技術で作製されたガイドＲＮＡを利用する）などのヌクレアーゼ系などのヌクレアーゼは、標的化された遺伝子に対して特異的であり、相同組換え修復（ＨＤＲ）によって、または非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって駆動されるプロセス中の末端捕捉によってのいずれかで導入遺伝子構築物が挿入されるように利用することができる。例えば、参照によりそれらの全体の開示が本明細書に組み込まれている、米国特許第９，３９４，５４５号；同第９，２５５，２５０号；同第９，２００，２６６号；同第９，０４５，７６３号；同第９，００５，９７３号；同第９，１５０，８４７号；同第８，９５６，８２８号；同第８，９４５，８６８号；同第８，７０３，４８９号；同第８，５８６，５２６号；同第６，５３４，２６１号；同第６，５９９，６９２号；同第６，５０３，７１７号；同第６，６８９，５５８号；同第７，０６７，３１７号；同第７，２６２，０５４号；同第７，８８８，１２１号；同第７，９７２，８５４号；同第７，９１４，７９６号；同第７，９５１，９２５号；同第８，１１０，３７９号；同第８，４０９，８６１号；米国特許出願公開２００３０２３２４１０号；同第２００５０２０８４８９号；同第２００５００２６１５７号；同第２００５００６４４７４号；同第２００６００６３２３１号；同第２００８０１５９９９６号；同第２０１０００２１８２６４号；同第２０１２００１７２９０号；同第２０１

１０２６５１９８号；同第２０１３０１３７１０４号；同第２０１３０１２２５９１号；同第２０１３０１７７９８３号；同第２０１３０１９６３７３号；同第２０１４０１２０６２２号；同第２０１５００５６７０５号；同第２０１５０３３５７０８号；同第２０１６００３０４７７号および同第２０１６００２４４７４号を参照のこと。

【０００６】

導入遺伝子を様々なやり方で細胞内に導入し、そこで維持することができる。「ｃＤＮＡ」アプローチの後、導入遺伝子を細胞に、導入遺伝子が、細胞のクロマチンへの組込みによるのではなく、染色体外に維持されるように導入する。導入遺伝子は、環状ベクター（例えば、プラスミド、またはＡＡＶもしくはレンチウイルスなどの非組込み型ウイルスベクター）上に維持することができ、ここで、ベクターは、プロモーター、エンハンサー、ポリＡシグナル配列、イントロン、およびスプライシングシグナルなどの転写性制御配列を含むことができる（ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／４２０９９）。代替アプローチは、アルブミン遺伝子などの高度に発現するセーフハーバーの位置への導入遺伝子の挿入を伴う（米国特許第９，３９４，５４５号および同第９，１５０，８４７号を参照のこと）。このアプローチは、Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ Ｐｌａｔｆｏｒｍ（商標）またはＩＶＰＲＰと称されている。このアプローチの後、導入遺伝子をセーフハーバー（例えば、アルブミン）遺伝子にヌクレアーゼ媒介標的化挿入によって挿入し、そこで導入遺伝子の発現がアルブミンプロモーターによって駆動される。導入遺伝子は、導入遺伝子によってコードされるタンパク質の分泌／排出を補助するためのシグナル配列を含むように工学技術で作製する。

【０００７】

「セーフハーバー」遺伝子座は、ヒト細胞におけるＡＡＶＳ１遺伝子、ＨＰＲＴ遺伝子、アルブミン遺伝子およびＣＣＲ５遺伝子などの遺伝子座、およびマウス細胞におけるＲｏｓａ２６を含む。例えば、米国特許第９，３９４，５４５号；同第９１５０，８４７；７，８８８，１２１号；同第７，９７２，８５４号；同第７，９１４，７９６号；同第７，９５１，９２５号；同第８，１１０，３７９号；同第８，４０９，８６１号；同第８，５８６，５２６号；米国特許公開２００３０２３２４１０号；同第２００５０２０８４８９号；同第２００５００２６１５７号；同第２００６００６３２３１号；同第２００８０１５９９９６号；同第２０１０００２１８２６４号；同第２０１２００１７２９０号；同第２０１１０２６５１９８号；同第２０１３０１３７１０４号；同第２０１３０１２２５９１号；および同第２０１４００１７２１２号を参照のこと。ヌクレアーゼ媒介組込みにより、遺伝子サイレンシングまたは近くのオンコジーンの活性化のリスクを最小限にするための正確な導入遺伝子の配置が可能になるので、導入遺伝子のランダムな組込みに依拠する古典的な組込みアプローチと比較して、導入遺伝子発現の改善、安全性および発現耐久性増大の見込みがもたらされる。

【０００８】

遺伝子治療の臨床への変換は、ｉｎ ｖｉｖｏおよびｉｎ ｖｉｔｒｏ／ｅｘ ｖｉｖｏの両方における核酸の送達を取り巻く問題によって妨害されている。ウイルスによるアプローチは、大きな見込みをもたらすものであるが、制限が多すぎる。例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などのベクターは、一般に安全であると考えられるが、それらのペイロードは限定され（＜４．８ｋｂ）、ある特定の血清型の効率は、そうでなければ潜在的である患者において先天的な抗体が存在することによって低減する。さらに、多数回の投薬は同様に最初の投薬後の免疫応答の発生の影響を受ける可能性がある。さらに、そのようなウイルスベクターの製造は、特に、これらの送達ベクターを診療所において使用するために必要になる最終的なウイルス収率を考慮すると、簡単ではない可能性がある（Nayerossadatら（２０１２年）Adv Biomed Res １巻：２７頁）。ウイルスによるまたはウイルスによらない理想的な送達ビヒクルは、低い抗原性潜在性、遺伝子材料を受け入れるための大きな容量、高い形質導入効率、調節および標的化された導入遺伝子発現ならびに容易な製造プロセスを有するべきであり、同時に、これらは全て、患者および環境の両方に対して妥当な費用および安全性を有するべきである（Wangら（２０１５年）J. Func

t Biomat ６巻：３７９～３９４頁）。

ウイルスによらないアプローチの１つは、核酸を含むナノ粒子の、それらのペイロードを標的細胞に送達するための使用に関する。ナノ粒子は、特性上固体であってよく、多糖、脂質、タンパク質、生分解性ポリマー、および金属酸化物を含めた材料を含む。他のナノ粒子は液体の形態であり、主に、両親媒性分子またはポリマーで構成されるリポソーム、ミセルまたはエマルション系である。脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、核酸の包被効率が高く、生物学的環境との安定性および適合性が高いので、ナノ粒子の最も有望な型の１つである（Leeら（２０１６年）Am Ｊ Cancer Res ６巻（５号）：１１１８～１１３４頁）。

しかし、ＬＮＰによる送達は、現在のところ、一般に利用可能な脂質構成成分の特徴が最適以下であることに主に起因して、非効率的である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】米国特許第９，３９４，５４５号明細書

【特許文献２】米国特許第９，１５０，８４７号明細書

【特許文献３】米国特許第９，０４５，７６３号明細書

【特許文献４】米国特許第９，００５，９７３号明細書

【特許文献５】米国特許第８，９５６，８２８号明細書

【特許文献６】米国特許第８，９４５，８６８号明細書

【特許文献７】米国特許第８，７０３，４８９号明細書

【特許文献８】米国特許第８，５８６，５２６号明細書

【特許文献９】米国特許第６，５３４，２６１号明細書

【特許文献１０】米国特許第６，５９９，６９２号明細書

【特許文献１１】米国特許第６，５０３，７１７号明細書

【特許文献１２】米国特許第６，６８９，５５８号明細書

【特許文献１３】米国特許第７，０６７，３１７号明細書

【特許文献１４】米国特許第７，２６２，０５４号明細書

【特許文献１５】米国特許第７，８８８，１２１号明細書

【特許文献１６】米国特許第７，９７２，８５４号明細書

【特許文献１７】米国特許第７，９１４，７９６号明細書

【特許文献１８】米国特許第７，９５１，９２５号明細書

【特許文献１９】米国特許第８，１１０，３７９号明細書

【特許文献２０】米国特許第８，４０９，８６１号明細書

【特許文献２１】米国特許公開第２００３／０２３２４１０号明細書

【特許文献２２】米国特許出願公開第２００５／０２０８４８９号明細書

【特許文献２３】米国特許出願公開第２００５／００２６１５７号明細書

【特許文献２４】米国特許出願公開第２００５／００６４４７４号明細書

【特許文献２５】米国特許出願公開第２００６／００６３２３１号明細書

【特許文献２６】米国特許出願公開第２００８／０１５９９９６号明細書

【特許文献２７】米国特許出願公開第２０１０／００２１８２６４号明細書

【特許文献２８】米国特許出願公開第２０１２／００１７２９０号明細書

【特許文献２９】米国特許出願公開第２０１１／０２６５１９８号明細書

【特許文献３０】米国特許出願公開第２０１３／０１３７１０４号明細書

【特許文献３１】米国特許出願公開第２０１３／０１２２５９１号明細書

【特許文献３２】米国特許出願公開第２０１５／００５６７０５号明細書

【特許文献３３】米国特許第７，８８８，１２１号明細書

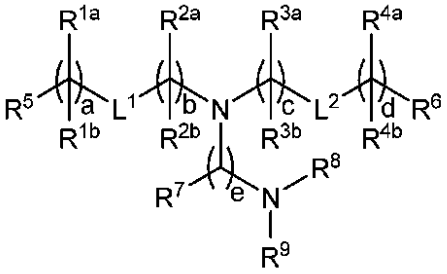
【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Swartsら（２０１４年）Nature ５０７巻（７４９１号）；２５８～２

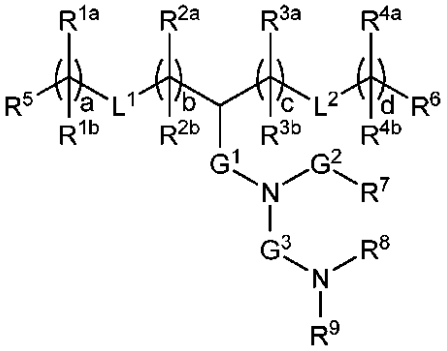
６１頁
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１１】
したがって、遺伝子治療試薬を生物系に送達するためのさらなる方法および組成物が依然として必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
本開示は、遺伝子治療試薬を含むＬＮＰ試薬を使用することによって遺伝子治療の効率を増大させるための方法および組成物を提供する。したがって、本明細書で、遺伝子治療に使用するための、工学技術で作製された転写因子もしくは工学技術で作製されたヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、ならびに／または、工学技術で作製された転写因子、工学技術で作製されたヌクレアーゼおよび／もしくはドナー（導入遺伝子）をコードするＤＮＡを送達することが可能なＬＮＰを含む組成物が記載される。本開示は、これらの組成物を、目的の遺伝子の制御、１つもしくは複数の遺伝子をノックアウトするための目的領域内の細胞クロマチンの標的化切断、および／または細胞内の所定の目的領域での標的化組込みによる導入遺伝子の組込みのために使用する方法も提供する。
【００１３】
したがって、一態様では、本明細書で、１つまたは複数のカチオン性脂質を含み、かつ、１つまたは複数の核酸（例えば、１つまたは複数の工学技術で作製された転写因子（例えば、活性化因子または抑制因子）、１つまたは複数の工学技術で作製されたヌクレアーゼなどの１つまたは複数のタンパク質、１つまたは複数のドナー（導入遺伝子）、１つまたは複数のｓｈＲＮＡなどをコードする核酸（ＤＮＡおよび／またはｍＲＮＡ））を含む、新規のＬＮＰが記載される。細胞に（ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで）送達されると、核酸によってコードされるタンパク質は、核酸（複数可）を他の（ウイルスによらないまたはウイルスによる）送達機構によって送達した場合と比較して、細胞における活性の増大を示し、かつ／または、細胞における送達プロセスに対する忍容性の改善をもたらす。一部の実施形態では、ＬＮＰの核酸は、１つまたは複数のヌクレアーゼまたは転写因子をコードする１つまたは複数のｍＲＮＡを含む。一部の態様では、工学技術で作製された転写因子は、１つまたは複数のジンクフィンガータンパク質（ＺＦ－ＴＦ）、１つまたは複数のＴＡＬ－エフェクタードメインタンパク質（ＴＡＬＥ）、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ転写因子（ＣＲＩＳＰＲ－ＴＦ）を含む。一部の態様では、ヌクレアーゼ（複数可）は、１つまたは複数のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を含む。さらなる態様では、ヌクレアーゼ（複数可）は、Ｔａｌｅエフェクター様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、１つもしくは複数のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ、１つもしくは複数のＭｅｇａＴＡＬおよび／または１つもしくは複数のメガヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、ＬＮＰの核酸は、ドナーＤＮＡを含む。一部の態様では、ドナーＤＮＡは、プラスミド、ミニ遺伝子、または直鎖状ＤＮＡである。さらなる態様では、細胞に送達するための導入遺伝子を含むＤＮＡを含む核酸は、標的化組込みの鋳型として機能させることもでき、または染色体外に維持することもできる。
【００１４】
一部の実施形態では、ＬＮＰは、カチオン性脂質分子を含む。一部の態様では、ＬＮＰは、中性脂質、荷電脂質、コレステロールおよび／もしくはそれらの類似体を含めたステロイド、ならびに／またはポリマーとコンジュゲートした脂質も含む。
【００１５】
一部の実施形態では、カチオン性脂質は、以下の式（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶ）：

【化１】

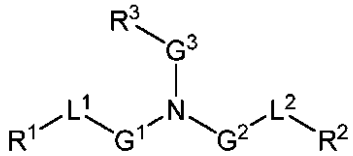


(I);

【化２】

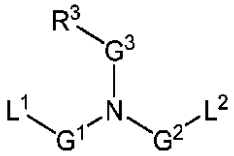


(II);



(III);

および

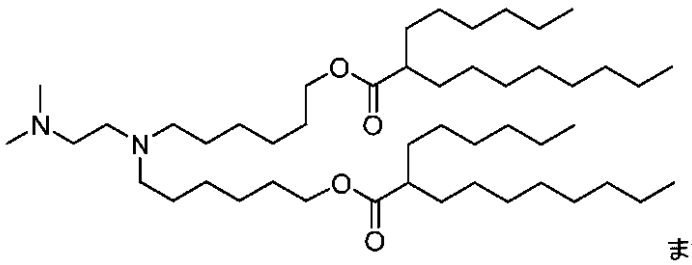


(IV)

（式中、R^1、R^2、R^3、R^{1a}、R^{1b}、R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、L^1、L^2、G^1、G^2、G^3、a、b、c、dおよびeは、式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および（ＩＶ）のそれぞれについて本明細書で定義されている通りである）

またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を有する分子から選択される。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、以下に示すＩ－５またはＩ－６である：

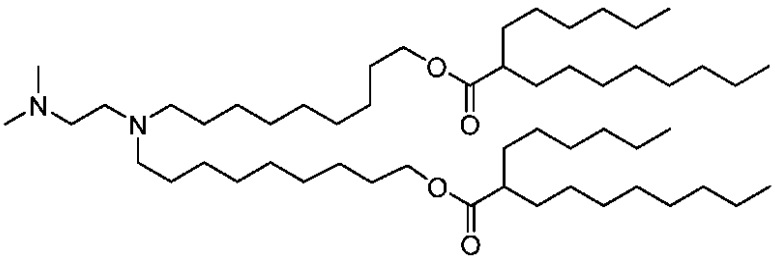
【化３】



または

I-5

【化４】

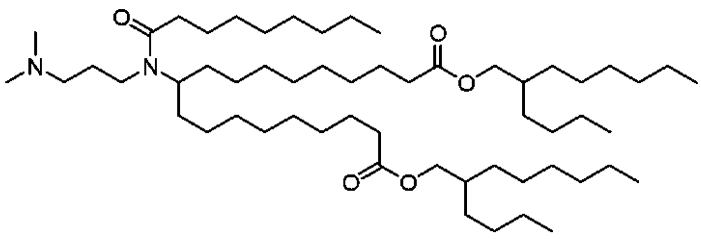


I-6

【００１６】

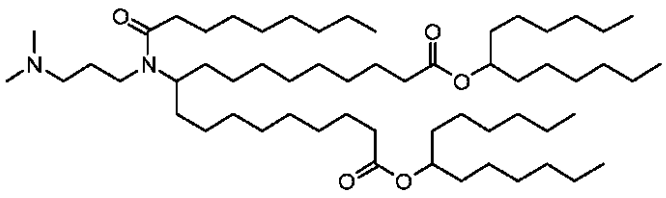
他の実施形態では、カチオン性脂質は、以下に示すＩＩ－９、ＩＩ－１１またはＩＩ－３６である：

【化５】



;

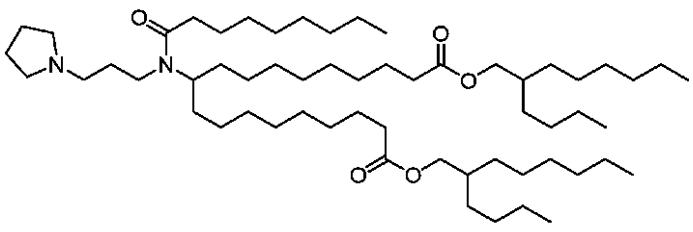
II-9



;

II-11

または

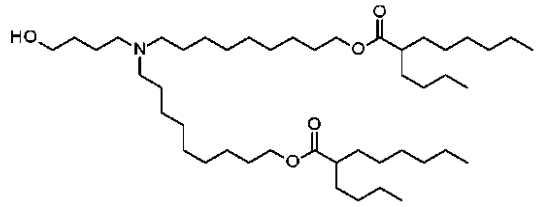


II-36

【００１７】

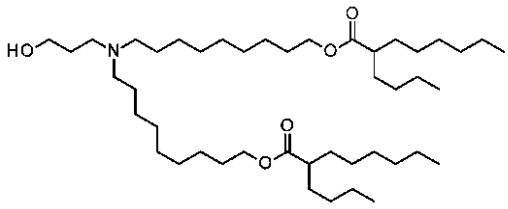
他の実施形態では、カチオン性脂質は、以下に示すＩＩＩ－２５、ＩＩＩ－４５またはＩＩＩ－４９である：

【化６】



;

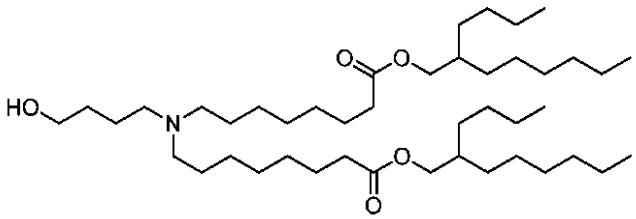
(III-25)



;

III-45

または

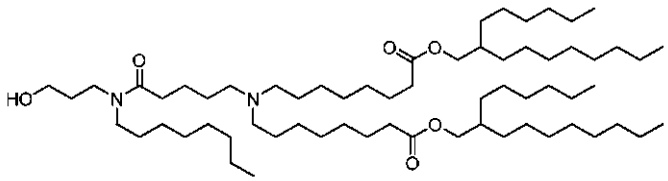


III-49

【００１８】

他の異なる実施形態では、カチオン性脂質は、以下に示すＩＶ－１２である：

【化７】



(IV-12)

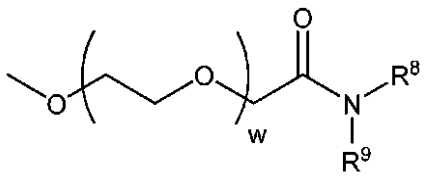
【００１９】

本明細書に記載の１つまたは複数のＬＮＰを含む医薬組成物も提供される。一部の実施形態では、治療剤はＲＮＡまたはＤＮＡを含み、一部の態様では、ＲＮＡはｍＲＮＡである。さらなる態様では、ｍＲＮＡは、ヌクレアーゼまたは転写因子をコードする。一部の実施形態では、医薬組成物は、中性脂質、荷電脂質、ステロイドおよびポリマーとコンジュゲートした脂質から選択される１つまたは複数の構成成分をさらに含む。そのような組成物は、治療剤を送達するための脂質ナノ粒子の形成に有用である。

【００２０】

なおさらなる実施形態では、ＬＮＰは、以下の構造（Ｖ）：

【化８】



(V)

（式中、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}およびｗは、式（Ｖ）に関して本明細書で定義されている通りである）を有するペグ化脂質またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を含む。

【００２１】

したがって、一実施形態では、カチオン性脂質を含むＬＮＰが本明細書に記載され、ここで、カチオン性脂質は、式Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶの脂質、ならびに必要に応じて式Ｖのペグ化脂質から選択され、ここで、ＬＮＰはまた、１つまたは複数の核酸（例えば、１つもしくは複数の工学技術で作製されたヌクレアーゼおよび／またはドナー（導入遺伝子）分子をコードする核酸）も含む。

【００２２】

一部の実施形態では、核酸は、工学技術で作製されたヌクレアーゼをコードし、ここで、ヌクレアーゼは、ＤＮＡ結合ドメインおよび切断ドメインを含む。他の実施形態では、ＬＮＰの核酸は、ＤＮＡ結合ドメインおよび転写ドメイン（例えば、活性化または抑制ドメイン）を含む、工学技術で作製された転写因子をコードする。一部の態様では、ＤＮＡ結合ドメインは、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン、ＲＮＡ分子（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼの単一ガイド（ｓｇ）ＲＮＡ）、またはメガヌクレアーゼＤＮＡ結合ドメインである。さらなる態様では、ヌクレアーゼの切断ドメインは、エンドヌクレアーゼに由来する野生型切断ドメインもしくは工学技術で作製された（変異した）切断ドメイン、メガヌクレアーゼＤＮＡ切断ドメイン、またはＣａｓ　ＤＮＡ切断ドメインを含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ切断ドメインは、ＦｏｋＩである。さらなる実施形態では、ＦｏｋＩドメインは、二量体化ドメインに変異を含む（例えば、米国特許第８，６２３，６１８号を参照のこと）またはＤＮＡ分子のリン酸骨格と非特異的に相互作用するＦｏｋＩドメインの領域に変異を含む（例えば、米国特許出願第１５／６８５，５８０号を参照のこと）。

【００２３】

別の態様では、ＤＮＡ結合ドメインおよび本明細書に記載の工学技術で作製された切断半ドメインを含む融合ポリペプチドが提供される。ある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ジンクフィンガー結合ドメイン（例えば、工学技術で作製されたジンクフィンガー結合ドメイン）である。他の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインである。なおさらなる実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、触媒として不活性なＣａｓ９またはＣｆｐ１タンパク質（ｄＣａｓ９またはｄＣｆｐ１）である。一部の実施形態では、工学技術で作製された切断半ドメインは、触媒として不活性な工学技術で作製された切断半ドメインとヌクレアーゼ複合体を形成して、ニッカーゼを形成する（米国特許第９，２００，２６６号を参照のこと）。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガードメインは、赤血球（ＲＢＣ）におけるアルブミン遺伝子またはグロビン遺伝子内の標的部位を認識する。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１４００１７２１号を参照のこと。他の実施形態では、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、および／またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、セーフハーバー遺伝子、例えば、ＣＣＲ５遺伝子、ＰＰＰ１Ｒ１２Ｃ（ＡＡＶＳ１としても公知）遺伝子、アルブミン、ＨＰＲＴまたはＲｏｓａ遺伝子に結合し、かつ／またはそれを切断する。例えば、米国特許第７，８８８，１２１号；同第７，９７２，８５４号；同第７，９１４，７９６号；同第７，９５１，９２５号；同第８，１１０，３７９号；同第８，４０９，８６１号；同第８，５８

６，５２６号；米国特許出願公開第２００３０２３２４１０号；同第２００５０２０８４８９号；同第２００５００２６１５７号；同第２００６００６３２３１号；同第２００８０１５９９９６号；同第２０１０００２１８２６４号；同第２０１２００１７２９０号；同第２０１１０２６５１９８号；同第２０１３０１３７１０４号；同第２０１３０１２２５９１号；同第２０１３０１７７９８３号；同第２０１３０１７７９６０および同第２０１４００１７２１２号を参照のこと。ヌクレアーゼ（またはその構成成分）は、本明細書に記載の１つまたは複数のＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、および／またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系をコードするポリヌクレオチドとして提供することができる。ポリヌクレオチドは、例えば、ｍＲＮＡであってよい。一部の態様では、ｍＲＮＡは化学改変されてもよい（例えば、Kormannら、（２０１１年）Nature Biotechnology ２９巻（２号）：１５４～１５７頁を参照のこと）。他の態様では、ｍＲＮＡは、合成中に導入されたＡＲＣＡキャップを含むことができる（米国特許第７，０７４，５９６号および同第８，１５３，７７３号を参照のこと）。一部の態様では、ｍＲＮＡは、酵素的修飾によって導入されたｃａｐを含むことができる。酵素によって導入されたｃａｐは、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１またはＣａｐ２を含む場合がある（例えば、Smietanskiら、（２０１４年）Nature Communications ５巻：３００４頁を参照のこと）。さらなる態様では、ｍＲＮＡは、化学修飾によってキャッピングすることができる。さらなる実施形態では、ｍＲＮＡは、修飾されていないヌクレオチドと修飾されたヌクレオチドの混合物を含むことができる（米国特許公開第２０１２０１９５９３６号を参照のこと）。なおさらなる実施形態では、ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥエレメントを含むことができ（米国特許出願第１５／１４１，３３３号を参照のこと）、さらなる実施形態では、ＷＰＲＥエレメントは、変異ＷＰＲＥエレメントであってよい（例えば、Zanta-Boussifら（２００９年）Gene Ther １６巻（５号）：６０５～１９頁を参照のこと）。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、二本鎖である（例えば、Karikoら（２０１１年）Nucl Acid Res ３９巻：ｅ１４２頁を参照のこと）。他の実施形態では、ｍＲＮＡは、一本鎖である。一部の実施形態では、メッセージの最後にポリＡトラックが伸長している。好ましい実施形態では、ポリＡトラックは、例えば、５０個、５１個または６４個のポリＡを含め、５０個よりも多くのポリＡを含む。より好ましい実施形態では、ポリＡトラックは、１２８個のポリＡを含む、または１９３個またはそれよりも多くのポリＡを含む。好ましい実施形態では、ポリＡトラックは、５０個、５１個、６４個、７０個、８０個、９０個、１００個、１１０個、１２０個、１２８個、１３０個、１４０個、１５０個、１６０個、１７０個、１８０個、１９０個、１９３個、２００個またはそれよりも多くのポリＡを含む。他の実施形態では、ｍＲＮＡのコドンのゆらぎ位置にあるウリジンの一部、大部分または全てを別のヌクレオチドに変更する。一部の実施形態では、ゆらぎ位置にあるヌクレオチドの５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％またはそれよりも多くを変更する。

【００２４】

本発明の方法および組成物はまた、ＤＮＡ骨格のリン酸と非特異的に相互作用し得るＺＦＰ ＤＮＡ結合ドメイン（「ＺＦＰ骨格」）内のアミノ酸に対する変異を有するが、ＤＮＡ認識へリックスの変化は含まないＺＦＮを含むＬＮＰも含む。したがって、本発明は、ヌクレオチド標的特異性のために必要なものではないＺＦＰ骨格内のカチオン性アミノ酸残基の変異を含む。例えば、米国特許出願第１５／６８５，５８０号を参照のこと。

【００２５】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、ドナー分子（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む。一部の態様では、ドナーは、プラスミド、ミニサークルまたは直鎖状ＤＮＡである。さらなる実施形態では、ＬＮＰは、ＲＮＡおよびＤＮＡの両方を含む。一部の態様では、ＲＮＡおよび／またはＤＮＡは、融合タンパク質をコードし、一部の例では、融合タンパク質は、工学技術で作製されたヌクレアーゼまたは工学技術で作製された転写因子である。ＲＮＡおよびＤＮＡは、ＲＮＡヌクレアーゼ（複数可）とＤＮＡドナー、ＲＮＡヌクレアーゼとＲＮＡドナー、ＲＮＡドナーとＤＮＡヌクレアーゼ、およびＤＮＡヌクレアーゼとＤＮＡドナーを限定されずに含む、任意の組合せで提供することができる。一部の実施形態

では、提供されるＲＮＡは、内因性遺伝子の切断に特異的なヌクレアーゼをコードし、提供されるＤＮＡは、切断された遺伝子に挿入するための導入遺伝子カセットを含む。ＤＮＡまたはＲＮＡ導入遺伝子は、治療用タンパク質をコードするオープンリーディングフレームまたは目的のｍＲＮＡを含むことができ、プロモーター配列などの制御配列をさらに含むことができ、イントロンおよびエンハンサー配列を含めた、導入遺伝子の発現の増大に関連する配列をなおさらに含むことができる。さらなる実施形態では、プロモーター配列は、組織特異的発現パターンを有する。一部の実施形態では、ＤＮＡ導入遺伝子は、ヌクレアーゼによって駆動される標的化組込みを増強するための相同アームを含む。他の実施形態では、ＤＮＡまたはＲＮＡ導入遺伝子は、治療用タンパク質をコードするｃＤＮＡを含む、または、例えばｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ＲＮＡｉなどの目的のＲＮＡ分子をコードすることができる。さらなる実施形態では、ドナーは、全長の導入遺伝子を含んでもよく、または導入遺伝子の短縮型または断片を含んでもよいｃＤＮＡであってよい。一部の実施形態では、挿入のための導入遺伝子は、遺伝子の野生型バージョンを発現しない細胞に挿入するための野生型遺伝子である。他の実施形態では、挿入のための導入遺伝子は、抗体または野生型バージョンと比較して品質が改善された治療用タンパク質の改変バージョンなどの、工学技術で作製された治療用タンパク質をコードする。

【００２６】

ドナー配列の長さは、５０ヌクレオチドから５，０００ヌクレオチドの範囲（またはその間の任意の整数値のヌクレオチド）であってもよいし、またはそれよりも長くてよい。一部の実施形態では、ドナーは、標的化切断部位と相同の領域が隣接する全長の遺伝子を含む。一部の実施形態では、ドナーは、相同領域を欠き、相同性に依存しない機構（すなわち、ＮＨＥＪ）を通じて標的遺伝子座に組み込まれる。他の実施形態では、ドナーは、細胞において使用するため（すなわち、標的化組込みによる遺伝子補正のため）の、相同領域が隣接する核酸のより小さな一部を含む。一部の実施形態では、ドナーは、例えばｓｈＲＮＡ、ＲＮＡｉ、ｍｉＲＮＡなどの、機能的または構造的な構成成分をコードする遺伝子を含む。他の実施形態では、ドナーは、目的の遺伝子に結合し、かつ／またはその発現をモジュレートする１つまたは複数の制御エレメントをコードする配列を含む。他の実施形態では、ドナーは、目的の遺伝子に結合し、かつ／またはその発現をモジュレートする、目的の制御タンパク質（例えば、ＺＦＰ　ＴＦ、ＴＡＬＥ　ＴＦおよび／またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＴＦ）である。

【００２７】

一部の実施形態では、導入遺伝子は、それを必要とする患者を処置するためのタンパク質をコードし、本発明の方法および組成物を使用してセーフハーバー遺伝子座に組み込まれる。一部の態様では、セーフハーバーは、ＡＡＶＳ１、アルブミン、ＨＰＲＴまたはＲｏｓａから選択される。導入遺伝子は、欠損しているまたは欠けているタンパク質を産生させるために（例えば、「タンパク質置き換え」）本発明の方法を使用することができるようにタンパク質をコードすることができる。一部の例では、タンパク質は、リソソーム蓄積症の処置に関与し得る。表皮水疱症またはＡＡＴ欠損肺気腫のような多様な状態に対するタンパク質治療薬を含めた他の治療用タンパク質を発現させることができる。他の態様では、導入遺伝子は、発現するタンパク質が、新規かつ望ましい特徴（半減期の増大、血漿クリアランス特徴の変化など）をもたらす特徴を有するように、配列（例えば、工学技術で作製された配列）を含むことができる。工学技術で作製された配列は、アルブミン配列に由来するアミノ酸も含むことができる。一部の態様では、導入遺伝子は、治療用タンパク質、治療用ホルモン、血漿タンパク質、抗体などをコードする。一部の態様では、導入遺伝子は、凝固障害などの血液障害に関与するタンパク質をコードすることができる。一部の実施形態では、タンパク質は、神経性障害を処置するための工学技術で作製された転写因子、例えば、抑制因子である（例えば、ハンチントン病を処置するためのＨｔｔ抑制因子）。例えば、米国特許第９，２３４，０１６号および米国特許公開第２０１５０３３５７０８号を参照のこと。

【００２８】

本明細書で、本発明のＬＮＰ、ウイルス、ポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドによって改変された細胞も提供される。一部の実施形態では、細胞は、導入遺伝子のヌクレアーゼ媒介挿入、または遺伝子のヌクレアーゼ媒介ノックアウトを含む。改変細胞、および改変細胞に由来する任意の細胞は、必ずしも本発明のヌクレアーゼを一過性よりも長く含まないが、そのようなヌクレアーゼによって媒介される改変は残る。本発明の細胞は、真核細胞であっても原核細胞であってもよい。一部の実施形態では、真核細胞には、哺乳動物細胞、植物細胞、幹細胞、胚性幹細胞、造血幹細胞、肝細胞、肺の細胞、筋肉細胞、心臓細胞、神経細胞、皮膚細胞、骨細胞、胃腸細胞、腎臓細胞および腫瘍細胞を限定されずに含めることができる。細胞は、真菌細胞、霊長類細胞、マウス細胞およびヒト細胞であってもよい。

【００２９】

さらに別の態様では、目的領域内の細胞クロマチンを標的化切断するための方法；細胞において標的化変更（例えば、挿入および／または欠失）を生じさせる方法；感染を処置する方法；および／または疾患を処置する方法が提供される。これらの方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。本方法は、本明細書に記載の融合ポリペプチドの対（すなわち、一方の融合ポリペプチドが本明細書に記載の工学技術で作製された切断半ドメインを含む、融合ポリペプチドの対）を発現させることにより、細胞内の所定の目的領域において細胞クロマチンを切断することを伴う。ある特定の実施形態では、オンターゲット部位の標的化切断が、本明細書に記載の変異を有さない切断ドメインと比較して、５０％～６０％（またはその間の任意の値）、６０％～７０％（またはその間の任意の値）、７０％～８０％（またはその間の任意の値）、８０％～９０％（またはその間の任意の値）、９０％～２００％（またはその間の任意の値）を含め、少なくとも５０～２００％（またはその間の任意の値）またはそれよりも大きく増大する。同様に、本明細書に記載の方法および組成物を使用すると、オフターゲット部位切断が、１～５０分の１（またはその間の任意の値）を限定されずに含む、１～１００分の１に、またはそれよりも大きく低減する。

【００３０】

標的化変更には、点変異（すなわち、一塩基対の異なる塩基対への変換）、置換（すなわち、複数の塩基対の同一の長さの異なる配列への変換）、１つまたは複数の塩基対の挿入、１つまたは複数の塩基対の欠失および上述の配列変更の任意の組合せが限定されずに含まれる。変更は、コードされるアミノ酸が変更されるような、コード配列の一部である塩基対の変換も含んでよい。変更は、相同組換え修復機構または非相同組換え修復機構によって促進することができる。

【００３１】

本明細書に記載のＬＮＰのいずれかを含む組成物も提供される。一部の実施形態では、組成物は、１つまたは複数の種類のＬＮＰを含み、ＬＮＰの各種類が、代替核酸および／または代替カチオン性脂質を含む。一部の例では、カチオン性脂質は、式Ｉ～ＩＶのいずれか１つで記載される。さらなる実施形態では、ＬＮＰは、式Ｖに記載されているペグ化脂質を含むことができる。一部の例では、組成物は、ウイルス粒子をさらに含む。一部の態様では、ウイルス粒子は、ＡＡＶ、アデノウイルス、レンチウイルスなどである。一部の実施形態では、ウイルスはＤＮＡを含み、さらなる実施形態では、ＬＮＰはｍＲＮＡを含み、ウイルスは本明細書に記載のＤＮＡドナーを含む。ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰ、およびＤＮＡドナーを含むＡＡＶを含む組成物が特に好ましい。一部の態様では、ヌクレアーゼは、工学技術で作製されたヌクレアーゼ（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ＭｅｇａＴＡＬ、メガヌクレアーゼ、またはＴｔＡｇｏまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）である。

【００３２】

一部の実施形態では、本発明の組成物は、緩衝剤、安定剤などなどのさらなる組成物を含む。

【００３３】

一部の実施形態では、融合タンパク質をコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰを含む組成物を、それを必要とする患者に単回用量として投与する。他の実施形態では、組成物を患者に１回、２回、３回またはそれよりも多く投与する。一部の実施形態では、組成物を患者に投与し、次いで、最初の投与の７日後、１４日後、２１日後、２８日後、３０日後、４０日後、５０日後、７５日後、１００日後、２００日後またはそれよりも後に再投与する。さらなる実施形態では、さらなる投与を、最初の投与の１年後、２年後、５年後、もしくは１０年後に、または最初の年に１回または複数回の投与を行った後に実施する。

【００３４】

本発明のＬＮＰを、それを必要とする患者を処置するために使用することができる。したがって、本発明は、それを必要とする患者を処置するための方法を含み、当該方法は、本発明のＬＮＰを含む組成物を製剤化し、組成物を患者に投与し、その結果、疾患を予防または処置するステップを含む。他の実施形態では、本発明のＬＮＰを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける細胞への形質導入のために使用することができる。したがって、本発明は、必要に応じて組成物として製剤化されたＬＮＰを用いて細胞に形質導入して、本発明の遺伝子治療試薬を細胞に導入する方法を含む。本明細書に記載のＬＮＰは、ＬＮＰドナーの投与前および／または後にＬＮＰヌクレアーゼを投与することを限定されずに含め、逐次的におよび／または反復して投与することができる。

【００３５】

別の態様では、本明細書に記載の核酸を含むＬＮＰ（例えば、本明細書に記載の融合タンパク質または１つもしくは複数のジンクフィンガータンパク質、切断ドメイン、転写活性化もしくは抑制ドメインおよび／もしくは本明細書に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド）；本明細書に記載の目的のドナーを含むウイルス、補助試薬；ならびに必要に応じて指示および適する容器を含むキットが本明細書に記載される。キットは、１つまたは複数のヌクレアーゼまたはそのようなヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドも含むことができる。

【００３６】

したがって、本発明の方法および組成物は、少なくとも以下の実施形態を含む：

【００３７】

１．遺伝子治療試薬としての活性を有する１つまたは複数のポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）。

【００３８】

２．ａ）ポリヌクレオチドの１つもしくは複数が、１つもしくは複数の工学技術で作製されたヌクレアーゼ、１つもしくは複数の工学技術で作製された転写因子および／もしくは治療用タンパク質、例えば、リソソーム蓄積症もしくは凝固障害などの障害を有する被験体において欠損しているもしくは欠けているタンパク質をコードする１つもしくは複数の導入遺伝子をコードする、またはｂ）ポリヌクレオチドが、アンチセンスＲＮＡをコードする、１に記載のＬＮＰ。

【００３９】

３．ポリヌクレオチドが、ゲノム内にランダムに組み込まれれているか、ゲノム内に標的化様式で組み込まれれているか、または細胞内でエピソームとして発現される、１または２に記載のＬＮＰ。

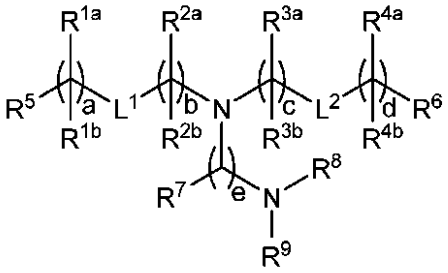
【００４０】

４．ヌクレアーゼまたは転写因子が、ジンクフィンガータンパク質、ＴＡＬ－エフェクタードメインまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の単一ガイドＲＮＡを含み、ヌクレアーゼが、ＦｏｋＩまたはＣａｓエンドヌクレアーゼドメインなどの野生型または工学技術で作製された（変異体）切断ドメインをさらに含み、転写因子が、活性化ドメインまたは抑制ドメインなどの転写制御ドメインをさらに含む、２または３に記載のＬＮＰ。

【００４１】

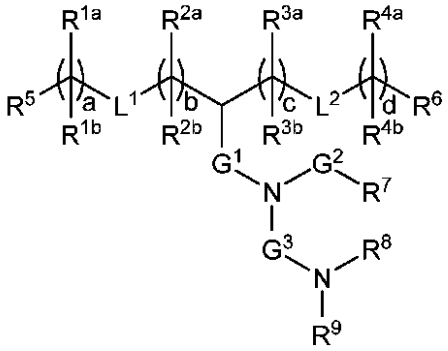
５．ポリヌクレオチドが、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡを含む、１から４のいずれかに記載のＬＮＰ。

【００４２】
６．ＲＮＡがｍＲＮＡであり、ＤＮＡがプラスミド、ミニ遺伝子、または直鎖状ＤＮＡである、４に記載のＬＮＰ。
【００４３】
７．ヌクレアーゼをコードする第１のポリヌクレオチドおよび導入遺伝子を含む第２のポリヌクレオチドを含む、１から６のいずれかに記載のＬＮＰ。
【００４４】
８．細胞でヌクレアーゼを発現させることにより、細胞のゲノムへの導入遺伝子の標的化組込みがもたらされる、７に記載のＬＮＰ。
【００４５】
９．カチオン性脂質分子、ならびに必要に応じて中性脂質、荷電脂質、コレステロールおよび／もしくはそれらの類似体を含めたステロイド、ならびに／またはポリマーとコンジュゲートした脂質を含む、１から８のいずれかに記載のＬＮＰ。
【００４６】
１０．カチオン性脂質が、以下の式（Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶ）：
【化９】



;

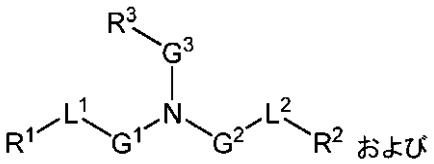
(I)



;

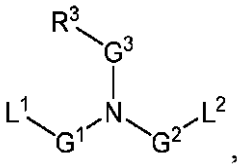
(II)

【化１０】



および

(III)

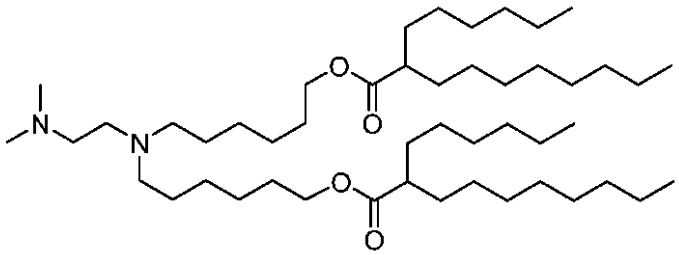


,

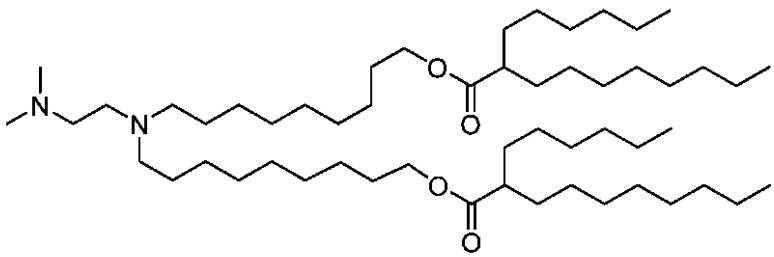
(IV)

（式中、R^1、R^2、R^3、R^{1a}、R^{1b}、R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、L^1、L^2、G^1、G^2、G^3、a、b、c、dおよびeは、以下に示す化合物Ｉ－５、Ｉ－６、ＩＩ－９、ＩＩ－１１、ＩＩ－３６、ＩＩＩ－２５、ＩＩＩ－４５、ＩＩＩ－４９およびＩＶ－１２を含め、式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および（ＩＶ）のそれぞれについて本明細書で定義されている通りである）：

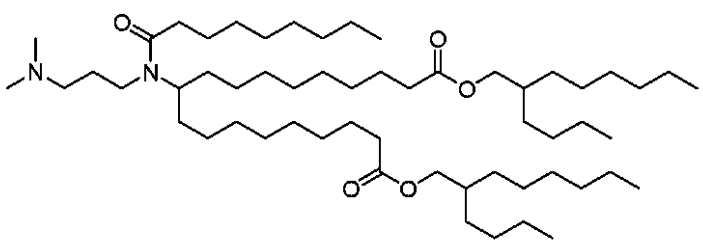
【化１１】



I-5 ;

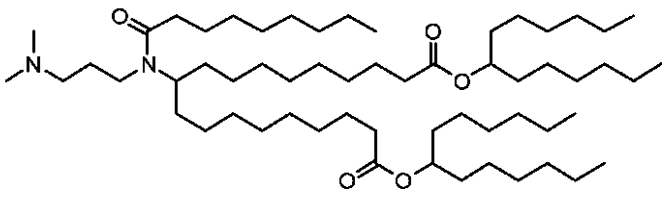


I-6 ;

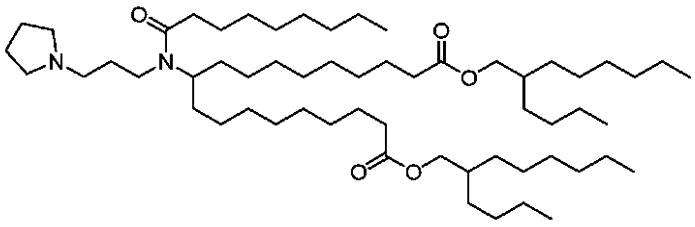


【化１２】

II-9 ;

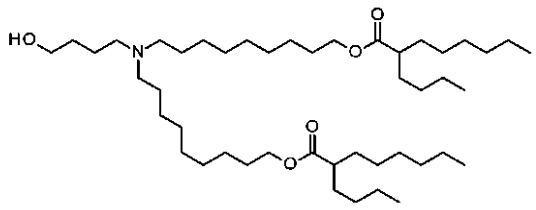


II-11 ;



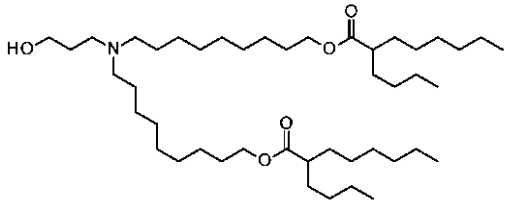
;

II-36



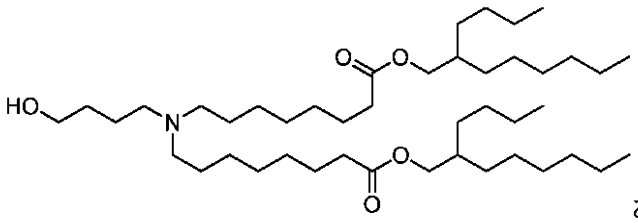
;

III-25



;

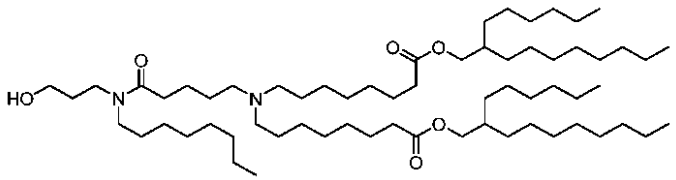
III-45



および

III-49

【化１３】



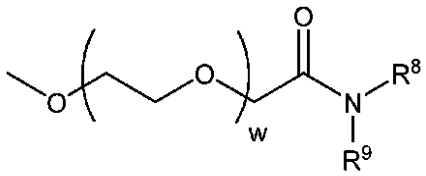
IV-12

を有する化合物、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体から選択される、９に記載のＬＮＰ。

【００４７】

１１．以下の構造（Ｖ）：

【化１４】



(V)

（式中、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}およびｗは、式（Ｖ）に関して本明細書で定義されている通りである）

を有するペグ化脂質、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を含む、１から１０のいずれかに記載のＬＮＰ。

【００４８】

１２．１から１１のいずれかに記載の１つまたは複数のＬＮＰを含む医薬組成物であって、必要に応じて、異なるＬＮＰを含む、医薬組成物。

【００４９】

１３．１から１１のいずれかに記載の１つもしくは複数のＬＮＰを含むまたは１２に記載の医薬組成物を含む細胞またはその細胞に由来する細胞。

【００５０】

１４．１から１１のいずれかに記載のＬＮＰによって改変された遺伝子改変細胞またはその遺伝子改変細胞に由来する細胞であって、遺伝子改変が、点変異（すなわち、一塩基対の異なる塩基対への変換）、置換（すなわち、複数の塩基対の同一の長さの異なる配列への変換）、１つもしくは複数の塩基対の挿入、および／または１つもしくは複数の塩基対の欠失を含む、細胞。

【００５１】

１５．１つまたは複数のポリヌクレオチドを細胞または被験体に送達する方法であって、１から１１のいずれかに記載の１つもしくは複数のＬＮＰまたは１２に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法。

【００５２】

１６．細胞における目的領域を切断する方法であって、１から１１のいずれかに記載の１つもしくは複数のＬＮＰまたは１２に記載の医薬組成物を送達するステップを含み、少なくとも１つのＬＮＰが、目的領域を切断するヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む方法。

【００５３】

１７．目的領域が、セーフハーバー遺伝子、必要に応じてＡＡＶＳ１遺伝子、アルブミン遺伝子、Ｒｏｓａ遺伝子、ＣＣＲ５遺伝子、ＣＸＣＲ遺伝子またはＨＰＲＴ遺伝子内にある、１６に記載の方法。

【００５４】

１８．１つまたは複数のＬＮＰが、導入遺伝子を含むドナーを含み、導入遺伝子が、ヌクレアーゼによる切断後に細胞のゲノムに組み込まれる、１５から１７のいずれかに記載の方法。

【００５５】

１９．それを必要とする患者を処置する方法であって、１つまたは複数のＬＮＰを１５から１８のいずれかに記載の方法に従って投与するステップを含む方法。

【００５６】

２０．ｉｎ ｖｉｔｒｏ、ｅｘ ｖｉｖｏ、またはｉｎ ｖｉｖｏで実施される、１５から１９のいずれかに記載の方法。

【００５７】

２１．ＬＮＰおよび／または医薬組成物が、１回または複数回、必要に応じて、１回、２回、３回またはそれよりも多く投与される、１５から２０のいずれかに記載の方法。

【００５８】

２２．ＬＮＰおよび／または医薬組成物を患者に投与し、初回投与の７日後、１４日後、２１日後、２８日後、３０日後、４０日後、５０日後、７５日後、１００日後、および／または２００日後またはそれよりも後に再投与する、２１に記載の方法。

【００５９】

２３．被験体における障害を処置するための、１から１１のいずれかに記載の１つもしくは複数のＬＮＰまたは１２に記載の医薬組成物の使用。

【００６０】

２４．ＬＮＰのポリヌクレオチドが、被験体における標的遺伝子の発現をモジュレートする転写制御因子をコードする、２３に記載の使用。

【００６１】

２５．ＬＮＰのポリヌクレオチドの少なくとも１つが、被験体において欠損しているまたは欠けている治療用タンパク質をコードし、必要に応じて、ＬＮＰのポリヌクレオチドが、ヌクレアーゼをコードする、２３に記載の使用。

【００６２】

２６．治療用タンパク質が、ヌクレアーゼ媒介標的化組込みによってゲノムに、必要に応じてＡＡＶＳ１遺伝子、アルブミン遺伝子、Ｒｏｓａ遺伝子、ＣＣＲ５遺伝子、ＣＸＣＲ遺伝子またはＨＰＲＴ遺伝子に組み込まれる、２５に記載の使用。

【００６３】

２７．ＬＮＰおよび／または医薬組成物が、１回または複数回、必要に応じて、１回、２回、３回またはそれよりも多く投与される、２３から２６のいずれかに記載の使用。

【００６４】

２８．ＬＮＰおよび／または医薬組成物を患者に投与し、初回投与の７日後、１４日後、２１日後、２８日後、３０日後、４０日後、５０日後、７５日後、１００日後、および／または２００日後またはそれよりも後に再投与する、２１に記載の方法。

【００６５】

２９．１から１１に記載の１つもしくは複数のＬＮＰまたは１２に記載の医薬組成物を含むキット。

【００６６】

これらおよび他の態様は全体として開示に照らせば当業者には明らかになろう。

【図面の簡単な説明】

【００６７】

【図１Ａ－１Ｆ】図１Ａから１Ｆは、例示的なＺＦＮをコードする核酸を含むＬＮＰのｉｎ ｖｉｖｏ投与の結果を示すグラフである。図１Ａは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－６を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに様々な用量で注射し、肝臓を採取した、別々の（個々の）３０７２４ ＺＦＮ ｍＲＮＡおよび３０７２５ ＺＦＮ ｍＲＮＡ（二重ＨＢＢ ３’ＵＴＲ；２５％ ２チオウリジン（２ｔＵ）および２５％ ５メチルシトシン（５ｍＣ）ヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの

）の単回投薬を示す。この試験のための動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図１Ｂは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－６を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに３ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、別々の３０７２４　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３０７２５　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（二重ＨＢＢ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の投薬の結果を示す。この試験のための動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図１Ｃは、混合し、ＬＮＰ製剤Ｉ－６に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、３０７２４および３０７２５（別々のｍＲＮＡ）または４８６４１および３１５２３（別々のｍＲＮＡ）ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（二重ＨＢＢ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）のいずれかの単回投薬の結果を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図１Ｄは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－６を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、二重ＨＢＢまたはＷＰＲＥ　３’ＵＴＲのいずれかを有する１つの２Ａ連結４８６４１および３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬の結果を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図１Ｅは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－６またはＩ－５を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、別々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬の結果を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図１Ｆは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－５を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに様々な用量で注射し、肝臓を採取した、別々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬の結果を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。示されている全てのデータについて、「二重ＨＢＢ　３’ＵＴＲ」は、２コピーのヒトベータグロビン遺伝子の３’非翻訳領域（ＵＴＲ）を指す（詳細については実施例Ｘを参照のこと）；「２５％　２ｔＵ」は、２５％のプソイドウリジンを含むｍＲＮＡを指す；「２５％　５ｍＭ　Ｃ」は、２５％のメチルシチジンを含むｍＲＮＡを指す；「ＡＲＣＡでキャッピングされた」は、ＡＲＣＡ（抗リバースキャップ類似物）キャップを含むｍＲＮＡを指す；「シリカ精製された」は、ｍＲＮＡを精製するために使用された方法を指す（実施例２を参照のこと）；「ＷＰＲＥ」は、ｍＲＮＡが追加の安定性のためにＷＰＲＥステムループ構造を含む、ウッドチャック転写後制御エレメントとして公知のＲＮＡ構造を意味する。全てのグラフにおいて、個々のデータ点は個々のマウスを表す。データから、Ｉ－６またはＩ－５カチオン性脂質を用いて製剤化した場合、ＺＦＮ対３０７２４／３０７２５および４８６４１／３１５２３を含むＬＮＰにより、マウス肝臓における切断を誘導することができることが実証される。

【００６８】

【図２Ａ－２Ｄ】図２Ａから２Ｄは、ＬＮＰを含むＩ－５およびＩＩ－９カチオン性脂質およびヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのさらなる最適化試験についての結果を比較したグラフである。図２Ａは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－５またはＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに１ｍｇ／ｋｇまたは３ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３をコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰ（ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換を含み；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたものであった）を用いた処置についてのヌクレアーゼ活性を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図２Ｂは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、別々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の反復投薬（２８

日間隔）についての結果を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図２Ｃは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、別々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣまたは２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬の結果を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。図２Ｄは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、別々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の反復投薬（１４日間隔）についての結果を示す。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。

【００６９】

【図３Ａ－３Ｃ】図３Ａから３Ｃは、精製スキームおよび異なるｍＲＮＡ組成およびキャップを最適化するための実験からの結果を示すグラフである。図３Ａは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに３．５ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換）の反復投薬（１４日間隔）を示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。図３Ｂは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１）の反復投薬（１４日間隔）についての結果を示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。図３Ｃは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換（白抜きの丸）またはｐＵ置換なし（黒塗りの丸）；示されている異なるキャップを含む、シリカ精製されたもの）の反復投薬（１４日間隔）からの結果を示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。

【００７０】

【図４Ａ－４Ｂ】図４Ａおよび４Ｂは、ＬＮＰを介して送達されたヌクレアーゼの活性に対する免疫抑制の影響を試験する実験からの結果を示すグラフである。図４Ａは、混合し、カチオン性ペプチドＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の反復投薬（１４日間隔）からの結果を示す。図４Ｂは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、個々の（別々の）４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の単回投薬の結果を示す。動物を、デキサメタゾンを用いて前処置したか、またはＳｏｌｕ－ｍｅｄｒｏｌ（登録商標）（コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム）を用いてＬＮＰ投薬の１日前に処置し、次いで、さらに３日間、毎日処置した。

【００７１】

【図５Ａ－５Ｂ】図５Ａおよび５Ｂは、ＬＮＰを介して送達されたヌクレアーゼのｉｎｖｉｔｒｏ活性を示すグラフである。図５Ａは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、Ｈｅｐａ１－６細胞培養物に様々な用量で添加した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；野生型残基または２５％　ｐＵヌクレオシド置換；示されている通りＡＲＣＡまたはＣａｐ１でキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬によるヌクレアーゼ活性を示す。図５Ｂは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、Ｈｅｐａ１－６肝細胞培養物に様々な用量で添加した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（マウスアルブミン）、５９７７１　ＺＦＮ

ｍＲＮＡおよび５９７９０　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（マウスＴＴＲ）、または５８７８０　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび６１７４８　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（マウスＰＣＳＫ９）（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の単回投薬によるヌクレアーゼ活性を示す。

【００７２】

【図６Ａ－６Ｄ】図６Ａから６Ｄは、ＬＮＰを介して送達された、マウスアルブミンまたはＴＴＲを標的とするヌクレアーゼのｉｎ　ｖｉｖｏ投薬からの結果を示す。図６Ａは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに０．８ｍｇ／ｋｇで注射し、２回投薬後または４回投薬後に肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（マウスアルブミン）または５９７７１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび５９７９０　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（マウスＴＴＲ）（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の反復投薬（１４日間隔で合計４回の投薬）の結果を示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。図６Ｂは、処置後の血漿中のＴＴＲを決定するためのＥＬＩＳＡの結果を示す。図６Ａに示されているマウスから血漿を収集した。図６Ｃは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに０．８ｍｇ／ｋｇで注射し、２回投薬後または４回投薬後に肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（マウスアルブミン）または５８７８０　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび６１７４８　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（マウスＰＣＳＫ９）（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の反復投薬（１４日間隔で合計４回の投薬）からの結果を示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。図６Ｄは、処置後の血漿中のＰＣＳＫ９を決定するためのＥＬＩＳＡの結果を示す。図６Ｃに示されているマウスから血漿を収集した。

【００７３】

【図７Ａ－７Ｂ】図７Ａおよび７Ｂは、ＩＤＳ遺伝子のアルブミン遺伝子座への標的化組込みの結果を示すグラフである。図７Ａは、ヌクレアーゼの活性を示す。混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに様々な用量で、ヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、1.5×10^{12}と一緒に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の単回投薬。ＩＤＳ導入遺伝子は、マウスアルブミン遺伝子内のＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを含んだ。動物をデキサメタゾンで前処置した。ヌクレアーゼ活性を決定するためのインデル分析のために肝臓を採取した。図７Ｂは、図７Ａに示されているマウスにおけるＩＤＳ活性を示すグラフである。どちらのグラフにおいても、いずれのデータ点も個々のマウスを表す。

【００７４】

【図８Ａ－８Ｆ】図８Ａから８Ｆは、導入遺伝子組込みのためにＩＶＰＲＰアプローチを使用したヌクレアーゼ活性についての、ＬＮＰを使用したさらなる試験からのグラフである。図８Ａは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－５を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ６またはＡＡＶ８、1.5×10^{12}の１日後（前送達）またはそれと同時に（同時送達）のいずれかで注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵ＆２５％　５ｍＣヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬の結果を示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。図８Ｂは、図８Ａに記載されているマウスから収集された血漿におけるＩＤＳ活性を示すグラフである。図８Ｃは、混合し、カチオン性脂質Ｉ－５またはＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに、２ｍｇ／ｋｇで、ヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナ

ーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}と同時に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣまたは２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬の結果を示す。ドナーは、アルブミン遺伝子内のＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを含んだ。動物をデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。図８Ｄは、図８Ｃに記載されているマウスの血漿において見出されたＩＤＳ活性のグラフである。図８Ｅは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに、２ｍｇ／ｋｇで、ヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}と同時に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡまたは４８６５２　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２７　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ３’ＵＴＲ；改変されていない残基または２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡまたはＣａｐ１でキャッピングされたもの；シリカまたはＨＰＬＣで精製されたもの）の単回投薬によるヌクレアーゼ活性結果を示すグラフである。ドナーは、アルブミン遺伝子内のＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有した。動物をデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。図８Ｆは、図８Ｅに記載されているマウスから収集された血漿におけるＩＤＳ活性を示すグラフである。

【００７５】

【図９Ａ－９Ｂ】図９Ａおよび９Ｂは、ＬＮＰヌクレアーゼ送達を用いたＩＶＰＲＰアプローチの結果を示すグラフである。図９Ａは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに、２ｍｇ／ｋｇで、ヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}と同時に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基または２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の単回投薬を使用したヌクレアーゼ活性の結果を示す。ドナーは、アルブミン遺伝子内のＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを含んだ。動物を、デキサメタゾンを用いてＬＮＰ投薬の直前に前処置したか、または、投薬の直前および投薬後さらに３日間にわたって処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。図９Ｂは、図９Ａに示されているマウスから収集された血漿におけるＩＤＳ活性を示す。

【００７６】

【図１０Ａ－１０Ｂ】図１０Ａおよび１０Ｂは、ＬＮＰ製剤中のカチオン性脂質を変動させ、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）ドナーを使用したＩＶＰＲＰアプローチを使用した結果を示すグラフである。図１０Ａは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９またはＩ－５を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇまたは３．５ｍｇ／ｋｇで、ヒトＦＩＸ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}と同時に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の単回投薬についてのヌクレアーゼ活性の結果を示す。ＦＩＸドナーは、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを含んだ。動物をＬＮＰ投薬の直前にデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。図１０Ｂは、図１０Ａに記載されているマウスから収集された血漿におけるＦＩＸ活性の結果を示す。

【００７７】

【図１１Ａ－１１Ｄ】図１１Ａから１１Ｄは、ＩＶＰＲＰアプローチにおいて反復投薬を使用した結果を示すグラフである。図１１Ａは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌ

クレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の反復投薬（１４日間隔）後のヌクレアーゼ活性を示すグラフである。第１の投薬には、アルブミン遺伝子内のＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}の同時送達も含めた。動物を各ＬＮＰ投薬の前にデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。図１１Ｂは、図１１Ａに示されているマウスから収集された血漿において検出されたＩＤＳ活性を示すグラフである。図１１Ｃは、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）の反復投薬（７日間隔）のヌクレアーゼ活性の結果を示すグラフである。第１の投薬には、アルブミン遺伝子内のＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}の同時送達も含めた。動物を各ＬＮＰ投薬の前にデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。図１１Ｄは、図１１Ｃに記載されているマウスから収集された血漿におけるＩＤＳ活性を示す。

【００７８】

【図１２】図１２は、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９またはＩ－５を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに様々な用量で注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基；Ｃａｐ１；ＨＰＬＣで精製されたもの）の単回投薬後のｉｎ　ｖｉｖｏにおけるヌクレアーゼ活性を示すグラフである。動物はデキサメタゾンで前処置しなかった。インデル分析のために注射部位周囲の皮膚を採取した。

【００７９】

【図１３】図１３は、混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９、ＩＩ－１１、またはＩＩＩ－４５に製剤化し、マウスに１ｍｇ／ｋｇで注射し、７日後に肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の反復投薬の結果を示すグラフである。動物（全て雌、絶食させていない）をデキサメタゾンで前処置した（５ｍｇ／ｋｇ、ＬＮＰ投薬の３０分前に）。

【００８０】

【図１４Ａ－１４Ｃ】図１４Ａ～１４Ｃは、ＺＦＮを含むＬＮＰの単回投薬後の、切断活性および導入遺伝子発現ならびに肝機能をアッセイしたデータを示すグラフである。図１４Ａは、混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに様々な用量で、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}と一緒に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の単回投薬についてのデータを示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。投薬の２８日後にインデル分析のために肝臓を採取した。図１４Ｂは、図１４Ａに記載されているマウスから収集された血漿におけるＩＤＳ活性アッセイを示す。図１４Ｃは、投薬の１日後に図１４Ａに記載されているマウスから収集された血清における肝機能検査（ＬＦＴ）の結果を示す。「ＬＦＴ」は、肝機能検査を指す；「ＡＬＴ」は、アラニントランスアミナーゼを指す；「ＡＳＴ」は、アスパラギン酸トランスアミナーゼを指す。結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける用量依存的な切断ならびに用量依存的なＩＤＳ導入遺伝子の発現が実証された。さらに、ＬＮＰで動物を処置することにより、肝機能にはいかなる注目すべき変化も引き起こされなかった。

【００８１】

【図１５】図１５は、ＩＤＳ導入遺伝子の用量依存的な活性を示すグラフである。混合し

、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに、０．５ｍｇ／ｋｇで、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするＡＡＶ８と一緒に、様々なベクターゲノム（ｖｇ）用量で注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の単回投薬。動物をデキサメタゾンで前処置した。血漿を投薬の２８日後に収集し、ＩＤＳ活性アッセイについて分析した。データから、血漿中で測定されたＩＤＳ活性の量はＡＡＶ　ＩＤＳ導入遺伝子ドナー用量依存的応答を示すことが実証された。

【００８２】

【図１６】図１６は、混合し、ＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに０．５ｍｇ／ｋｇ（シリカ精製されたｍＲＮＡを使用、黒塗りの四角で示されている）または２ｍｇ／ｋｇ（ＨＰＬＣで精製されたｍＲＮＡを使用、白抜きの丸で示されている）で注射し、肝臓を採取した、ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３をコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰ（ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１を含んだ）を含有するＩＩ－９カチオン性脂質の６回の反復投与後の結果を示すグラフである。動物をデキサメタゾンで前処置した（５ｍｇ／ｋｇ、ＬＮＰ投薬の３０分前に）。対照動物が「ＰＢＳ」として示されている（黒塗りの丸）。

【００８３】

【図１７Ａ－１７Ｂ】図１７Ａおよび１７Ｂは、混合し、ＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２．０ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓、骨髄、および脾臓を採取した、ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３をコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰ（ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１を含んだ、シリカ精製されたもの）を含有するＩＩ－９カチオン性脂質の単回投与後のゲノム改変の生体内分布を示すグラフである。動物をデキサメタゾンで前処置した（５ｍｇ／ｋｇ、ＬＮＰ投薬の３０分前に）。図１７Ａは、示されている器官（肝臓、脾臓、骨髄）におけるゲノム改変（インデル）を示す。図１７Ｂは、屠殺し、肝臓を採取する前に処理しなかったか（無灌流）または肝臓を採取する前に緩衝生理食塩水を経心的に灌流させて肝臓内の血液細胞を除去した（無選別）マウスのゲノム改変を示す。灌流を行った肝臓の画分をコラゲナーゼで消化して単一細胞懸濁液を作製し、次いで、クッパー細胞特異的マーカーおよび内皮細胞特異的マーカーを用いて蛍光免疫染色した。次いで、染色された細胞を内皮細胞マーカー陽性、クッパー細胞マーカー陽性、またはマーカー陰性（肝細胞）細胞集団にＦＡＣＳで選別した。次いで、これらの選別された細胞からゲノムＤＮＡを採取し、ゲノム改変（インデル）について分析した。

【００８４】

【図１８】図１８は、混合し、ＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに０．５ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３をコードする２５％　ｐＵ置換されたまたは改変されていないｍＲＮＡ（ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；Ｃａｐ１を含み、シリカ精製されたものであった）を含むＬＮＰを含有するＩＩ－９カチオン性脂質の単回投与後のゲノム改変（％インデル）を示すグラフである。動物をデキサメタゾンで前処置した（５ｍｇ／ｋｇ、ＬＮＰ投薬の３０分前に）。次いで、ゲノムＤＮＡを採取し、実施例２に記載の通りゲノム改変（インデル）について分析した。

【００８５】

【図１９】図１９は、混合し、ＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに０．５ｍｇ／ｋｇで注射し、肝臓を採取した、ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３をコードする２５％　ｐＵ置換されたまたは改変されていないｍＲＮＡ（ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；Ｃａｐ１を含み、シリカ精製されたものであった）を含むＬＮＰを含有するＩＩ－９カチオン性脂質の単回投与後のゲノム改変を示すグラフである。動物をデキサメタゾンで前処置した（５ｍｇ／ｋｇ、ＬＮＰ投薬の３０分前に）。次いで、ゲノムＤＮＡを採取し、実施例２に記載の通りゲノム改変（インデル）について分析した。

【００８６】
【図２０Ａ－２０Ｂ】図２０Ａから２０Ｃは、ＺＦＮを含むＬＮＰの単回用量または複数回用量およびヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーを含むＡＡＶの単回投薬後の切断活性および導入遺伝子発現データを示すグラフである。図２０Ａは、混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに、０．５ｍｇ／ｋｇで、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８またはＡＡＶ６　１．５×１０^{12}と一緒に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基；Ｃａｐ１；ＨＰＬＣで精製されたもの）の単回投薬および複数回投薬についてのデータを示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。ＬＮＰを反復投薬した群には７日間隔で投薬した。最初の投薬の３５日後にインデル分析のために肝臓を採取した。図２０Ｂは、示されている条件下で処置した被験体の血漿におけるＩＤＳ活性アッセイを示す。図２０Ｃは、図２０Ａに記載されているマウスから収集された、示されている組織（肝臓、脾臓、腎臓、骨髄および脳）における示されている条件下でのＩＤＳ活性アッセイを示す。結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける用量依存的な切断ならびに用量依存的なＩＤＳ導入遺伝子の発現が実証された。
【図２０Ｃ】図２０Ａから２０Ｃは、ＺＦＮを含むＬＮＰの単回用量または複数回用量およびヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーを含むＡＡＶの単回投薬後の切断活性および導入遺伝子発現データを示すグラフである。図２０Ａは、混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに、０．５ｍｇ／ｋｇで、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８またはＡＡＶ６　１．５×１０^{12}と一緒に注射した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基；Ｃａｐ１；ＨＰＬＣで精製されたもの）の単回投薬および複数回投薬についてのデータを示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。ＬＮＰを反復投薬した群には７日間隔で投薬した。最初の投薬の３５日後にインデル分析のために肝臓を採取した。図２０Ｂは、示されている条件下で処置した被験体の血漿におけるＩＤＳ活性アッセイを示す。図２０Ｃは、図２０Ａに記載されているマウスから収集された、示されている組織（肝臓、脾臓、腎臓、骨髄および脳）における示されている条件下でのＩＤＳ活性アッセイを示す。結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける用量依存的な切断ならびに用量依存的なＩＤＳ導入遺伝子の発現が実証された。
【００８７】
【図２１】図２１は、異なるｍＲＮＡ組成およびポリＡ長を使用した最適化試験からの結果を示すグラフである。図２１は、混合し、カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに０．５ｍｇ／ｋｇで注射し、投薬の７日後に肝臓を採取した、示されている通りタンパク質コード配列におけるポリＡ長およびウリジンの組成が異なる個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の反復投薬（１４日間隔）を示す。「６４ｐｏｌｙＡ」、「１２８ｐｏｌｙＡ」、および「１９３ｐｏｌｙＡ」は、それぞれ、６４、１２８または１９３の長さのポリＡ領域を指し、「ウリジン枯渇」は、コドンのゆらぎ位置からウリジンが欠失したパーセンテージのポリヌクレオチドを指す（実施例を参照のこと）。グラフ内の幾何的形状は、個々の対象を示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。結果から、より長いポリＡ尾部、および、得られる翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を同じに保持しながらできるだけ多くのウリジンの構築物を枯渇させることにより、最高レベルの遺伝子改変がもたらされることが実証される。
【００８８】
【図２２Ａ－２２Ｂ】図２２Ａから２２Ｆは、マウスＴＴＲ遺伝子のエクソン２を標的とする種々のＺＦＮを含むＬＮＰの単回用量または複数回用量後の切断活性、タンパク質ノックダウン、肝機能および炎症性サイトカイン分泌を示すグラフである。図２２Ａは、混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに様々な用量で注射した、個々の６９１２

１／６９１２８　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび６９０５２／６９１０２　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの；１９３　ポリＡ尾部；ウリジン枯渇）の単回投薬についてのオンターゲットの切断データを示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。最初の投薬の３５日後に、インデルのために肝臓を採取し、タンパク質ノックダウン分析のためにヘパリン添加血漿を採取した。図２２Ｂは、図２２Ａに記載されているマウスから収集された血漿におけるマウスＴＴＲ　ＥＬＩＳＡアッセイを示す。図２２Ｃおよび２２Ｄは、投薬の１日後に図２２Ａに記載されているマウスから収集された血清における肝機能検査（ＬＦＴ）の結果を示す。「ＬＦＴ」は、肝機能検査を指す；「ＡＬＴ」は、アラニントランスアミナーゼを指す；「ＡＳＴ」は、アスパラギン酸トランスアミナーゼを指す。図２２Ｅおよび２２Ｆは、それぞれ２２Ａの肝臓と同時に収集したオフターゲットの器官である脾臓および腎臓におけるゲノム編集を示すグラフである。結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける用量依存的なオンターゲットの切断と最小のオフターゲットの切断、ならびに用量依存的なｍＴＴＲタンパク質発現のノックダウンが実証された。さらに、ＬＮＰで動物を処置することにより、肝機能にはいかなる注目すべき変化も引き起こされなかった。

【図２２Ｃ－２２Ｄ】図２２Ａから２２Ｆは、マウスＴＴＲ遺伝子のエクソン２を標的とする種々のＺＦＮを含むＬＮＰの単回用量または複数回用量後の切断活性、タンパク質ノックダウン、肝機能および炎症性サイトカイン分泌を示すグラフである。図２２Ａは、混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに様々な用量で注射した、個々の６９１２１／６９１２８　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび６９０５２／６９１０２　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの；１９３　ポリＡ尾部；ウリジン枯渇）の単回投薬についてのオンターゲットの切断データを示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。最初の投薬の３５日後に、インデルのために肝臓を採取し、タンパク質ノックダウン分析のためにヘパリン添加血漿を採取した。図２２Ｂは、図２２Ａに記載されているマウスから収集された血漿におけるマウスＴＴＲ　ＥＬＩＳＡアッセイを示す。図２２Ｃおよび２２Ｄは、投薬の１日後に図２２Ａに記載されているマウスから収集された血清における肝機能検査（ＬＦＴ）の結果を示す。「ＬＦＴ」は、肝機能検査を指す；「ＡＬＴ」は、アラニントランスアミナーゼを指す；「ＡＳＴ」は、アスパラギン酸トランスアミナーゼを指す。図２２Ｅおよび２２Ｆは、それぞれ２２Ａの肝臓と同時に収集したオフターゲットの器官である脾臓および腎臓におけるゲノム編集を示すグラフである。結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける用量依存的なオンターゲットの切断と最小のオフターゲットの切断、ならびに用量依存的なｍＴＴＲタンパク質発現のノックダウンが実証された。さらに、ＬＮＰで動物を処置することにより、肝機能にはいかなる注目すべき変化も引き起こされなかった。

【図２２Ｅ－２２Ｆ】図２２Ａから２２Ｆは、マウスＴＴＲ遺伝子のエクソン２を標的とする種々のＺＦＮを含むＬＮＰの単回用量または複数回用量後の切断活性、タンパク質ノックダウン、肝機能および炎症性サイトカイン分泌を示すグラフである。図２２Ａは、混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに様々な用量で注射した、個々の６９１２１／６９１２８　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび６９０５２／６９１０２　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの；１９３　ポリＡ尾部；ウリジン枯渇）の単回投薬についてのオンターゲットの切断データを示す。動物をデキサメタゾンで前処置した。最初の投薬の３５日後に、インデルのために肝臓を採取し、タンパク質ノックダウン分析のためにヘパリン添加血漿を採取した。図２２Ｂは、図２２Ａに記載されているマウスから収集された血漿におけるマウスＴＴＲ　ＥＬＩＳＡアッセイを示す。図２２Ｃおよび２２Ｄは、投薬の１日後に図２２Ａに記載されているマウスから収集された血清における肝機能検査（ＬＦＴ）の結果を示す。「ＬＦＴ」は、肝機能検査を指す；「ＡＬＴ」は、アラニントランスアミナーゼを指す；「ＡＳＴ」は、アスパラギン酸トランスアミナーゼを指す。図２２Ｅおよび２２Ｆは、それぞれ２２Ａの肝臓と同時に収集したオフターゲットの器官である脾臓および腎臓におけるゲノム編集を示すグラフである。結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける用量依存的なオンターゲット

の切断と最小のオフターゲットの切断、ならびに用量依存的なｍＴＴＲタンパク質発現のノックダウンが実証された。さらに、ＬＮＰで動物を処置することにより、肝機能にはいかなる注目すべき変化も引き起こされなかった。

【００８９】

【図２３】図２３は、混合し、中間のアミノ脂質（Ｎ）：ｍＲＮＡ（Ｐ）比でＬＮＰ製剤ＩＩ－９、ＩＩ－３６、ＩＩＩ－２５、ＩＩＩ－４５、ＩＩＩ－４９、またはＩＶ－１２に製剤化し、マウスに０．５ｍｇ／ｋｇで注射し、７日後に肝臓を採取した、個々の４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）の反復投薬の結果を示すグラフを示す。製剤ＩＩ－９を、低Ｎ：Ｐ比および高Ｎ：Ｐ比、ならびに中間のＮ：Ｐ比であるが約１００ｎｍのより大きなＬＮＰでも製剤化した。「Ｎ：Ｐ比」は、組成物中の窒素（Ｎ）のリン酸（Ｐ）に対する比である。Ｎは、荷電脂質内の窒素を表し、Ｐは、核酸骨格上のリン酸を表す。したがって、「高Ｎ：Ｐ」製剤は、低Ｎ：Ｐ製剤よりも、核酸に対して脂質をより多く有する。動物（全て雄、注射前に終夜絶食させた）をデキサメタゾンで前処置した（５ｍｇ／ｋｇ、ＬＮＰ投薬の３０分前に）。

【発明を実施するための形態】

【００９０】

詳細な説明

本明細書で、ヌクレアーゼを細胞に送達するための方法および組成物が開示される。これらの方法は、カチオン性脂質および必要に応じてペグ化脂質を含む新規の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の使用を含む。ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを送達するためにＬＮＰの実施形態が使用され、ここで、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ配列内に種々のｃａｐ（ＡＲＣＡ、Ｃａｐ１、Ｃａｐ２またはＣａｐ０）および／または種々のヌクレオシド組成を含むことができる。ＺＦＮをコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰを使用して、細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏで処置することができる。動物では、ＬＮＰをドナーと同時投薬し、したがって、ＬＮＰによって送達されるヌクレアーゼをドナーの標的化組込みに向けることができる。

【００９１】

一般

本明細書に開示される方法の実施、ならびに組成物の調製および使用は、別途指示がない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算化学、細胞培養、組換えＤＮＡおよび当技術分野の範囲内である関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献において詳細に説明される。例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第２版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、１９８９年および第３版、２００１年；Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、１９８７年および定期の最新版；シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY、Academic Press、San Diego；Wolffe、CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION、第３版、Academic Press、San Diego、１９９８年；METHODS IN ENZYMOLOGY、第３０４巻、「Chromatin」（P.M. WassarmanおよびA. P. Wolffe編）、Academic Press、San Diego、１９９９年；およびMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、第１１９巻、「Chromatin Protocols」（P.B. Becker編）、Humana Press、Totowa、１９９９年を参照のこと。

【００９２】

定義

「遺伝子治療試薬」または「遺伝子治療ポリヌクレオチド」は、細胞における遺伝子発現をモジュレートするために使用される試薬である。遺伝子治療試薬は、ヌクレアーゼおよび転写因子を含むことができ、試薬は、遺伝子と相互作用してその発現をモジュレートする。一部の実施形態では、ヌクレアーゼを、遺伝子内の特異的な配列を切断するように工学技術で作製し、他の実施形態では、工学技術で作製された転写因子を使用して所望の遺伝子を活性化または抑制する。一部の実施形態では、遺伝子治療試薬は、特異的なドナ

ー分子、例えば、治療用タンパク質をコードする導入遺伝子、導入遺伝子の断片、ヌクレアーゼまたは転写因子も含むことができる。

【００９３】

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は互換的に使用され、直鎖状または環状の立体配座の、および一本鎖または二本鎖の形のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示のために、これらの用語は、ポリマーの長さに関して制限するものと解釈されるべきでない。これらの用語は、天然のヌクレオチドならびに塩基、糖および／またはリン酸部分（例えば、ホスホロチオエート骨格）が修飾されるヌクレオチドの公知の類似体を包含することができる。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対合特異性を有する；すなわち、Ａの類似体はＴと塩基対合する。

【００９４】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は互換的に用いられて、アミノ酸残基のポリマーを指す。本用語は、１つまたは複数のアミノ酸が対応する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体または改変誘導体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【００９５】

「結合」は、巨大分子の間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的、非共有結合的相互作用を指す。結合相互作用が全体として配列特異的である限り、該結合相互作用の全ての構成成分が配列特異的である（例えば、ＤＮＡ骨格中のリン酸残基と接触する）必要があるわけではない。そのような相互作用は、$10^{-6}M^{-1}$またはそれより低い解離定数（K_d）によって一般的に特徴付けられる。「親和性」は、結合の強さを指す。結合親和性の増加はより低いK_dと相関する。「非特異的結合」は、目的の任意の分子（例えば工学技術で作製されたヌクレアーゼ）と巨大分子（例えばＤＮＡ）との間に生じる標的配列に依存しない非共有結合的相互作用を指す。

【００９６】

「結合性タンパク質」は、別の分子に非共有結合で結合することができるタンパク質である。結合性タンパク質は、例えば、ＤＮＡ分子（ＤＮＡ結合性タンパク質）、ＲＮＡ分子（ＲＮＡ結合性タンパク質）および／またはタンパク質分子（タンパク質結合性タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合性タンパク質の場合、それはそれ自体に結合することができ（ホモダイマー、ホモトリマーなどを形成する）、および／またはそれは1つまたは複数の異なるタンパク質の１つまたは複数の分子に結合することができる。結合性タンパク質は、１つより多いタイプの結合活性を有することができる。例えば、ジンクフィンガータンパク質はＤＮＡ結合活性、ＲＮＡ結合活性およびタンパク質結合活性を有する。ＲＮＡガイドヌクレアーゼ系の場合では、ＲＮＡガイドは、ヌクレアーゼ構成成分（Ｃａｓ９またはＣｆｐ１）に対して異種性であり、どちらも工学技術で作製されたものであってよい。

【００９７】

「ＤＮＡ結合分子」は、ＤＮＡに結合することができる分子である。そのようなＤＮＡ結合分子は、ポリペプチド、タンパク質のドメイン、より大きなタンパク質内のドメインまたはポリヌクレオチドであってよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはＤＮＡであり、一方他の実施形態では、ポリヌクレオチドはＲＮＡである。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合分子はヌクレアーゼのタンパク質ドメイン（例えばＦｏｋＩドメイン）であり、一方他の実施形態では、ＤＮＡ結合分子はＲＮＡガイドヌクレアーゼのガイドＲＮＡ構成成分（例えばＣａｓ９またはＣｆｐ１）である。

【００９８】

「ＤＮＡ結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、ＤＮＡに、例えば、１つもしくは複数のジンクフィンガーを通じてまたはそれぞれジンクフィンガータンパク質もしくはＴＡＬＥ内の１つもしくは複数のＲＶＤ相互作用を通じて配列特異的に結合するタンパク質またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーＤＮＡ結合タンパ

ク質という用語は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはＺＦＰと省略される。

【００９９】

「ジンクフィンガーＤＮＡ結合性タンパク質」（または、結合ドメイン）は、その構造が亜鉛イオンの配位を通して安定する結合ドメインの中のアミノ酸配列の領域である、１つまたは複数のジンクフィンガーを通して配列特異的な様式でＤＮＡに結合するタンパク質、またはより大きなタンパク質の中のドメインである。用語ジンクフィンガーＤＮＡ結合性タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質またはＺＦＰとしてしばしば略される。

【００１００】

「ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン」または「ＴＡＬＥ」は、１つまたは複数のＴＡＬＥ反復ドメイン／単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、それぞれ反復可変性二残基（ｒｅｐｅａｔ　ｖａｒｉａｂｌｅ　ｄｉｒｅｓｉｄｕｅ）（ＲＶＤ）を含み、そのコグネイト標的ＤＮＡ配列へのＴＡＬＥの結合に関与する。単一の「反復単位」（「反復」とも呼ばれる）は、長さが一般的に３３～３５アミノ酸であり、天然に存在するＴＡＬＥタンパク質の中の他のＴＡＬＥ反復配列と少なくとも一部の配列相同性を示す。ＴＡＬＥタンパク質は、反復単位内のカノニカルなまたは非カノニカルなＲＶＤを使用して標的部位に結合するように設計することができる。例えば、その全体が本明細書に参考としてそれぞれ援用される、米国特許第８，５８６，５２６号および第９，４５８，２０５号を参照。

【００１０１】

ジンクフィンガーおよびＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、天然に存在するジンクフィンガータンパク質の認識ヘリックス領域の工学技術（１つまたは複数のアミノ酸を変更）を介して、またはＤＮＡ結合（「反復可変性二残基」またはＲＶＤ領域）に関与するアミノ酸の工学技術によって、所定のヌクレオチド配列に結合するように「工学技術で作製する」ことができる。したがって、工学技術で作製されたジンクフィンガータンパク質またはＴＡＬＥタンパク質は、天然に存在しないタンパク質である。ジンクフィンガータンパク質およびＴＡＬＥを工学技術で作製するための方法の非限定的例は、設計および選択である。設計されたタンパク質は、その設計／組成が合理的基準から主に生じる、天然に存在しないタンパク質である。設計のための合理的基準には、既存のＺＦＰまたはＴＡＬＥ設計および結合データの情報を保存するデータベース中の情報を処理するための、置換規則およびコンピュータ化アルゴリズムの適用が含まれる。例えば、米国特許第９，４５８，２０５号、第８，５８６，５２６号、第６，１４０，０８１号、第６，４５３，２４２号および第６，５３４，２６１号を参照、ＷＯ９８／５３０５８、ＷＯ９８／５３０５９、ＷＯ９８／５３０６０、ＷＯ０２／０１６５３６およびＷＯ０３／０１６４９６も参照。

【００１０２】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質、ＴＡＬＥタンパク質またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然には見出されず、その産生がファージディスプレイ、相互作用トラップまたはハイブリッド選択などの実験プロセスから主に生じる。例えば、Ｕ．Ｓ．５，７８９，５３８；Ｕ．Ｓ．５，９２５，５２３；Ｕ．Ｓ．６，００７，９８８；Ｕ．Ｓ．６，０１３，４５３；Ｕ．Ｓ．６，２００，７５９；ＷＯ９５／１９４３１；ＷＯ９６／０６１６６；ＷＯ９８／５３０５７；ＷＯ９８／５４３１１；ＷＯ００／２７８７８；ＷＯ０１／６０９７０；ＷＯ０１／８８１９７およびＷＯ０２／０９９０８４を参照のこと。

【００１０３】

「ＴｔＡｇｏ」は、遺伝子サイレンシングに関与すると考えられている原核生物のアルゴノートタンパク質である。ＴｔＡｇｏは、細菌Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来である。例えばSwartsら、同書；G. Shengら、（２０１３年）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. １１１巻、６５２頁）を参照。「ＴｔＡｇｏ系」は、例えばＴｔＡｇｏ酵素による切断のためのガイドＤＮＡを含む要求される構成成分の全てである。

【００１０４】

「組換え」は、２つのポリヌクレオチドの間での遺伝情報の交換のプロセスを指す。この開示のために、「相同組換え（ＨＲ）」は、例えば、相同組換え修復機構による細胞中の二本鎖切断の修復の間に起こるそのような交換の特殊化した形態を指す。このプロセスはヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経たもの）の鋳型修復に「ドナー」分子を使用し、「非交叉遺伝子変換」または「ショートトラクト遺伝子変換」として様々に公知であるが、その理由は、それがドナーから標的への遺伝情報の伝達をもたらすからである。いかなる特定の理論にも束縛されることを望むことなく、そのような伝達は、切断された標的とドナーとの間で形成されるヘテロ二本鎖ＤＮＡのミスマッチ補正、および／または、ドナーが標的の一部になる遺伝情報を再合成するために使用される「合成依存性鎖アニーリング」、および／または関連したプロセスに関与することができる。そのような特殊化したＨＲは標的分子の配列の変更をしばしばもたらし、そのため、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全体が標的ポリヌクレオチドに組み入れられる。

【０１０５】

本開示のある特定の方法では、本明細書に記載される１つまたは複数の標的化ヌクレアーゼは、所定部位（例えば、目的の遺伝子または遺伝子座）の標的配列（例えば、細胞クロマチン）において二本鎖切断（ＤＳＢ）を生じさせる。ＤＳＢは、本明細書に記載されるとおりの構築物（例えば、ドナー）の組み込みを媒介し、切断領域のヌクレオチド配列と相同性を有する「ドナー」ポリヌクレオチドを、細胞に導入することができる。ＤＳＢの存在により、ドナー配列の組込みを促進することが示された。任意選択で構築物は、切断の領域におけるヌクレオチド配列に相同性を有する。ドナー配列は物理的に組み込まれてもよいし、または代わりに、ドナーポリヌクレオチドを、相同組換えによる切断の修復のための鋳型として使用し、細胞クロマチンへのドナーの場合のようにヌクレオチド配列の全部または一部の導入をもたらす。したがって、細胞クロマチン中の第１の配列を改変することができ、ある特定の実施形態では、ドナーポリヌクレオチドに存在する配列へと変換することができる。したがって、用語「置き換える」または「置き換え」の使用は、１つのヌクレオチド配列の、別のものによる置き換え（すなわち、情報の意味での配列の置き換え）を表し、１つのポリヌクレオチドの、別のものによる物理的または化学的置き換えを必ずしも必要とするものではないことを理解することができる。

【０１０６】

本明細書に記載される方法のいずれでも、細胞の中のさらなる標的部位のさらなる二本鎖切断のために、工学技術で作製されたさらなるヌクレアーゼを使用することができる。

【０１０７】

細胞クロマチン中の目的領域における配列の標的化組換えおよび／または置き換えおよび／または変更のための方法のある特定の実施形態では、染色体配列は、外因性「ドナー」ヌクレオチド配列による相同組換えによって変更される。切断の領域に相同性の配列が存在するならば、そのような相同組換えは細胞クロマチン中の二本鎖切断の存在によって刺激される。

【０１０８】

本明細書に記載される方法のいずれでも、第１のヌクレオチド配列（「ドナー配列」）は、目的領域のゲノム配列に相同的であるが同一でない配列を含有することができ、それによって相同組換えを刺激して、目的領域の中に同一でない配列を挿入することができる。したがって、ある特定の実施形態では、目的領域の配列に相同性であるドナー配列の部分は、置き換えられたゲノム配列と約８０から９９％（または、その間の任意の整数）の間の配列同一性を呈示する。他の実施形態では、例えば、１００個の連続した塩基対にわたってドナー配列とゲノム配列との間で１ヌクレオチドだけが異なる場合は、ドナー配列とゲノム配列との間の相同性は９９％より高い。ある特定の場合には、新しい配列が目的領域に導入されるように、ドナー配列の非相同部分は、目的領域に存在しない配列を含有することができる。これらの場合には、非相同配列は、目的領域の配列に相同性または同一である、５０～１，０００塩基対（または、その間の任意の整数値）または１，０００

を超える任意数の塩基対の配列に一般的に隣接する。他の実施形態では、ドナー配列は第１の配列に非相同性であり、非相同組換え機構によってゲノムに挿入されている。

【０１０９】

本明細書に記載される方法のいずれも、目的の遺伝子（複数可）の発現を破壊するドナー配列の標的化組込みによる、細胞における１つまたは複数の標的配列の部分的または完全な不活性化のために使用することができる。部分的または完全に不活性化された遺伝子を有する細胞株も、提供される。

【０１１０】

さらに、本明細書に記載される標的化組込みの方法は、１つまたは複数の外因性配列を組み込むために使用することもできる。外因性核酸配列は、例えば、１つまたは複数の遺伝子もしくはｃＤＮＡ分子、または任意のタイプのコード配列もしくは非コード配列、ならびに１つまたは複数の調節エレメント（例えば、プロモーター）を含むことができる。さらに、外因性核酸配列は、１つまたは複数のＲＮＡ分子（例えば、小ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）など）を産生することができる。

【０１１１】

「切断」は、ＤＮＡ分子の共有結合骨格の切断を指す。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を限定されずに含む、様々な方法によって開始することができる。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能であり、二本鎖切断は２つの異なる一本鎖切断事象の結果として起こり得る。ＤＮＡ切断は、平滑末端または付着末端のいずれかの産生をもたらし得る。ある特定の実施形態では、標的化二本鎖ＤＮＡ切断のために融合ポリペプチドが使用される。

【０１１２】

「切断半ドメイン」は、第２のポリペプチド（同一のまたは異なる）と共に、切断活性（好ましくは二本鎖切断活性）を有する複合体を形成するポリペプチド配列である。用語「第１および第２の切断半ドメイン」、「＋および－切断半ドメイン」ならびに「右および左切断半ドメイン」は互換的に使用されて、二量体化する切断半ドメインの対を指す。

【０１１３】

「工学技術で作製された切断半ドメイン」は、別の切断半ドメイン（例えば、別の工学技術で作製された切断半ドメイン）と絶対ヘテロダイマー（obligate heterodimer）を形成するように改変された切断半ドメインである。参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第７，８８８，１２１号；第７，９１４，７９６号；第８，０３４，５９８号；第８，６２３，６１８号および米国特許出願公開第２０１１／０２０１０５５号も参照されたい。

【０１１４】

用語「配列」は、任意の長さのヌクレオチド配列を指し、それはＤＮＡまたはＲＮＡであってもよく；直鎖状、環状または分枝状であってもよく、一本鎖または二本鎖のいずれかであってもよい。用語「ドナー配列」は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さ、例えば２から１００，０００，０００ヌクレオチド（または、その間の任意の整数値）の間の長さ、好ましくは約１００から１００，０００ヌクレオチド（または、その間の任意の整数）の間の長さ、より好ましくは約２０００から２０，０００ヌクレオチド（または、その間の任意の値）の間の長さ、さらにより好ましくは、約５から約１５ｋｂ（または、その間の任意の値）の間の長さであってよい。

【０１１５】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造物である。細胞クロマチンは、核酸、主にＤＮＡ、ならびにヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。大多数の真核生物の細胞クロマチンはヌクレオソームの形で存在し、ここで、ヌクレオソームコアはヒストンＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３およびＨ４の各々２つを含む八量体に会合した概ね１５０塩基対のＤＮＡを含み；リンカーＤＮＡ（生物体によって様々な長さの）がヌクレオソームコアの間に延びる。ヒストンＨ１の分子は、リンカーＤＮＡに一

般的に会合している。本開示のために、用語「クロマチン」は、原核生物および真核生物の両方の、全てのタイプの細胞核タンパク質の包含を意味するものである。細胞クロマチンには、染色体およびエピソームの両方のクロマチンが含まれる。

【０１１６】

「染色体」は、細胞のゲノムの全体または一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、細胞のゲノムを含む全ての染色体の集合である、その核型によってしばしば特徴付けられる。細胞のゲノムは、１つまたは複数の染色体を含むことができる。

【０１１７】

「エピソーム」は、複製する核酸、核タンパク質複合体、または細胞の染色体核型の一部でない核酸を含む他の構造物である。エピソームの例には、プラスミド、ミニサークル（minicircle）およびある特定のウイルスゲノムが含まれる。本明細書に記載の肝臓特異的構築物は、エピソームとして維持することもでき、あるいは、細胞に安定に組み込むこともできる。

【０１１８】

「外因性」分子は、細胞に通常は存在しないが、１つまたは複数の遺伝的方法、生化学的方法または他の方法によって細胞に導入することができる分子である。「細胞における正常な存在」は、細胞の特定の発達段階および環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発達の間だけに存在する分子は、成体の筋細胞に関しては外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、非熱ショック細胞に関しては外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全の内因性分子の機能バージョンまたは正常機能内因性分子の機能不全バージョンを含むことができる。

【０１１９】

外因性分子は、とりわけ、小分子、例えばコンビナトリアル化学プロセスによって生成されるもの、または巨大分子、例えばタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記の分子の任意の改変誘導体、または上記の分子の１つまたは複数を含む任意の複合体であってよい。核酸にはＤＮＡおよびＲＮＡが含まれ、一本鎖または二本鎖であってよく、直鎖状、分枝状または環状であってよく、任意の長さであってよい。核酸には、二重鎖を形成することが可能な核酸ならびに三重鎖形成核酸が含まれる。例えば、米国特許第５，１７６，９９６号および第５，４２２，２５１号を参照されたい。タンパク質には、ＤＮＡ結合性タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化ＤＮＡ結合性タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、脱アセチル化酵素、キナーゼ、ホスファターゼ、リガーゼ、脱ユビキチン化酵素、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ギラーゼおよびヘリカーゼが限定されずに含まれる。

【０１２０】

外因性分子は、内因性分子と同じ種類の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であってよい。例えば、外因性核酸は、細胞に導入される感染性のウイルスゲノム、プラスミドもしくはエピソーム、または細胞に通常は存在しない染色体を含むことができる。細胞への外因性分子の導入のための方法は当業者に公知であり、脂質媒介伝達（すなわち、中性およびカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介伝達およびウイルスベクター媒介伝達が限定されずに含まれる。外因性分子は内因性分子と同じ種類の分子であってもよいが、細胞が由来する種と異なる種に由来してもよい。例えば、マウスまたはハムスターに本来由来する細胞株に、ヒト核酸配列を導入することができる。

【０１２１】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下で特定の発達段階の特定の細胞に通常存在するものである。例えば、内因性の核酸は、染色体、ミトコンドリアのゲノム、クロロプラストもしくは他のオルガネラ、または天然に存在するエピソーム核酸を含むことができる。さらなる内因性分子には、タンパク質、例えば、転写因子および酵素を含めることができる。

【０１２２】
本明細書で使用される場合、用語「外因性核酸の生成物」は、ポリヌクレオチド生成物およびポリペプチド生成物の両方、例えば、転写産物（ＲＮＡなどのポリヌクレオチド）および翻訳産物（ポリペプチド）を包含する。
【０１２３】
「融合」分子は、２つまたはそれより多いサブユニット分子が、好ましくは共有結合で連結される分子である。サブユニット分子は、同じ化学的タイプの分子であってよいか、または異なる化学的タイプの分子であってよい。融合分子の例には、融合タンパク質（例えば、ＺＦＰまたはＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインと１つまたは複数の活性化ドメインとの間の融合物）および融合核酸（例えば、上に記載の融合タンパク質をコードする核酸）が限定されずに含まれる。第２のタイプの融合分子の例には、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝バインダーと核酸との間の融合物が限定されずに含まれる。用語には、ポリヌクレオチド構成成分が機能的分子を形成するようにポリペプチド構成成分と会合する系（例えば、単一ガイドＲＮＡが遺伝子発現をモジュレートするために機能的ドメインと会合するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）も含まれる。
【０１２４】
細胞における融合タンパク質の発現は、細胞への融合タンパク質の送達から、または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの細胞への送達によって生じることができ、ここで、ポリヌクレオチドは転写され、転写物は翻訳されて融合タンパク質を生成する。細胞におけるタンパク質の発現において、トランススプライシング、ポリペプチド切断およびポリペプチドライゲーションが関与することもできる。細胞へのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの送達の方法は、本開示の他の場所で提示される。
【０１２５】
本開示のために、「遺伝子」は、遺伝子生成物（下を参照のこと）をコードするＤＮＡ領域、ならびに、そのような調節配列がコード配列および／または転写配列に隣接しているか否かを問わず、遺伝子生成物の産生を調節する全てのＤＮＡ領域を含む。したがって、遺伝子は、必ずしも限定されずに、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、例えばリボソーム結合部位および内部リボソーム侵入部位、エンハンサー、サイレンサー、インシュレータ、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位および遺伝子座調節領域を含む。
【０１２６】
「遺伝子発現」は、遺伝子に含まれる情報の遺伝子生成物への変換を指す。遺伝子生成物は、遺伝子の直接転写生成物（例えば、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、リボザイム、構造的ＲＮＡまたは任意の他のタイプのＲＮＡ）、またはｍＲＮＡの翻訳によって生成されるタンパク質であってよい。遺伝子生成物には、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化および編集などのプロセスによって改変されるＲＮＡ、ならびに、例えばメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ＡＤＰリボシル化、ミリストイル化およびグリコシル化によって改変されるタンパク質も含まれる。
【０１２７】
遺伝子発現の「モジュレーション」または「改変」は、遺伝子の活性の変化を指す。発現のモジュレーションには、外因性分子（例えば、工学技術で作製された転写因子）の結合を介した遺伝子の改変によるものを含む遺伝子活性化および遺伝子抑制を限定されずに含めることができる。モジュレーションは、ゲノム編集（例えば、切断、変更、不活性化、ランダム変異）を介した遺伝子配列の改変によっても達成することができる。遺伝子不活性化は、本明細書に記載される改変されていない細胞と比較したときの、遺伝子発現のいかなる低減も指す。したがって、遺伝子不活性化は部分的であるか、または完全であってもよい。
【０１２８】
「目的領域」は、外因性分子を結合させることが望ましい、例えば、遺伝子または遺伝子の中のもしくはそれに隣接した非コード配列などの細胞クロマチンの任意の領域である

。結合は、標的化ＤＮＡ切断および／または標的化組換えのためであってもよい。目的領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞小器官ゲノム（例えば、ミトコンドリア、クロロプラスト）、または、例えば感染性ウイルスゲノムに存在することができる。目的領域は、遺伝子のコード領域の中、例えばリーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロンなどの転写された非コード領域の中、または、コード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域の中にあってもよい。目的領域は、単一のヌクレオチド対と同じくらい小さくてもよく、または最高２，０００ヌクレオチド対の長さ、または任意の整数値のヌクレオチド対であってもよい。

【０１２９】

「セーフハーバー」遺伝子座は、遺伝子を宿主細胞へのいかなる有害作用もなしに挿入することができるゲノム内の遺伝子座である。最も有益なのは、挿入された遺伝子配列の発現が付近の遺伝子からのいかなるリードスルー発現によっても攪乱されないセーフハーバー遺伝子座である。ヌクレアーゼ（複数可）によって標的化されるセーフハーバー遺伝子座の非限定的例には、ＣＣＲ５、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、ＡＡＶＳ１、Ｒｏｓａおよびアルブミンが含まれる。例えば、米国特許第７，９５１，９２５号；同第８，７７１，９８５号；同第８，１１０，３７９号；同第７，９５１，９２５；米国特許出願公開第２０１００２１８２６４号；同第２０１１０２６５１９８号；同第２０１３０１３７１０４号；同第２０１３０１２２５９１号；同第２０１３０１７７９８３号；同第２０１３０１７７９６０号；同第２０１５００５６７０５号および同第20150159172を参照されたい。

【０１３０】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」は、好ましくはルーチンのアッセイにおいてとは限らないが、容易に測定されるタンパク質生成物を産生する任意の配列を指す。適するレポーター遺伝子には、抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、Ｇ４１８耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、着色または蛍光性または発光性のタンパク質（例えば、緑色蛍光性タンパク質、強化された緑色蛍光性タンパク質、赤色蛍光性タンパク質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、ならびに強化された細胞増殖および／または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）が限定されずに含まれる。エピトープタグには、例えば、ＦＬＡＧ、Ｈｉｓ、ｍｙｃ、Ｔａｐ、ＨＡまたは任意の検出可能なアミノ酸配列の１つまたは複数のコピーが含まれる。「発現タグ」には、目的の遺伝子の発現をモニタリングするために所望の遺伝子配列に作動可能に連結することができるレポーターをコードする配列が含まれる。

【０１３１】

「真核」細胞には、幹細胞（多能性および多分化能）を含めた真菌細胞（例えば酵母など）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞およびヒト細胞（例えば、Ｔ細胞）が限定されずに含まれる。

【０１３２】

用語「作用的連結」および「作用的に（ｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ）連結する」（または、「作動可能に（ｏｐｅｒａｂｌｙ）連結する」）は、２つまたはそれより多い構成成分（配列エレメントなど）の並置に関して互換的に使用され、ここで、構成成分は、両構成成分が正常に機能して、構成成分の少なくとも１つが他の構成成分の少なくとも１つにおいて発現する機能を媒介することができるということを可能にするように配置される。例証として、プロモーターなどの転写調節配列は、その転写調節配列が１つまたは複数の転写調節因子の存在または不在に応答してコード配列の転写のレベルを調節するならば、コード配列に作用的に連結されている。転写調節配列はコード配列と一般的にｃｉｓで作用的に連結するが、それと直接的に隣接する必要がない。例えば、たとえそれらが近接していなくても、エンハンサーはコード配列に作用的に連結している転写調節配列である。

【０１３３】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能的断片」は、その配列が完全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一でないが、完全長タンパク質、ポリペプチドまたは核

酸と同じ機能を保持する、タンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能的断片は対応する天然分子より多くの、より少ないまたは同じ数の残基を保有することができ、および／または１つまたは複数のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含有することができる。核酸またはタンパク質の機能を決定するための方法（例えば、コード機能、別の核酸とハイブリダイズする能力、酵素活性アッセイ）は、当技術分野で周知である。

【０１３４】

ポリヌクレオチド「ベクター」または「構築物」は、遺伝子配列を標的細胞に移すことが可能である。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、「発現構築物」、「発現カセット」および「遺伝子導入ベクター」は、目的の遺伝子の発現に誘導することが可能であり、遺伝子配列を標的細胞に移すことができる任意の核酸構築物を意味する。したがって、本用語は、クローニングおよび発現ビヒクルならびに組込みベクターを含む。

【０１３５】

用語「被験体」および「患者」は、互換的に用いられ、ヒト患者および非ヒト霊長類、ならびにウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウスなどの実験動物、ならびに他の動物などの哺乳動物を指す。したがって本明細書において使用される用語「被験体」または「患者」は、本発明の発現カセットを投与することができる任意の哺乳動物患者または被験体を意味する。本発明の被験体は、障害を有する被験体または障害を発症するリスクがある被験体を含む。

【０１３６】

「到達可能な領域」は、核酸内に存在する標的部位に標的部位を認識する外因性分子が結合することができる、細胞クロマチン内の部位である。いかなる特定の理論にも制約されることなく、到達可能な領域は、ヌクレオソーム構造にパッケージされない領域であると考えられる。到達可能な領域の別個の構造は、多くの場合、化学的プローブおよび酵素的プローブ、例えばヌクレアーゼに対するその感受性によって検出することができる。

【０１３７】

「標的部位」または「標的配列」は、結合のための十分な条件が存在することを条件に、結合性分子が結合する核酸の一部を規定する核酸配列である。例えば、配列５’－ＧＡＴＴＣ－３’は、ＥｃｏＲＩ制限エンドヌクレアーゼのための標的部位である。「意図された」または「オンターゲットの」配列とは、結合分子が結合することが意図された配列であり、「意図されたものではない」または「オフターゲットの」配列は、意図された標的ではない結合分子が結合するあらゆる配列を含む。

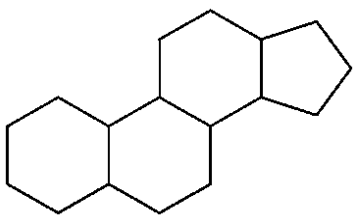
【０１３８】

用語「脂質」は、これだけに限定されないが、脂肪酸のエステルを含めた有機化合物の群を指し、一般に、難水溶性であるが多くの有機溶媒には可溶性であることを特徴とする。脂質は、通常、少なくとも３つのクラスに分類される：（１）脂肪および油ならびにワックスを含む「単純脂質」；（２）リン脂質および糖脂質を含む「複合脂質」；および（３）ステロイドなどの「誘導脂質」。

【０１３９】

「ステロイド」は、以下の炭素骨格：

【化１５】



を含む化合物である。

【０１４０】

ステロイドの非限定的な例としては、コレステロールなどが挙げられる。

【０１４１】
「カチオン性脂質」は、正に荷電することが可能な脂質を指す。例示的なカチオン性脂質としては、正電荷を持つ１つまたは複数のアミン基が挙げられる。好ましいカチオン性脂質はイオン化することができ、したがって、ｐＨに応じて正に荷電した形態または中性の形態で存在することができる。カチオン性脂質のイオン化は、異なるｐＨ条件下での脂質ナノ粒子の表面電荷に影響を及ぼす。この電荷の状態は、血漿タンパク質吸収、血液クリアランスおよび組織分布（Semple, S.C.ら、（１９９８年）Adv. Drug Deliv Rev ３２巻：３～１７頁）ならびに核酸の細胞内送達のために極めて重要なエンドソーム溶解性非二重層構造を形成する能力（Hafez, I.M.ら、（２００１年）Gene Ther ８巻：１１８８～１１９６頁）に影響を及ぼす可能性がある。

【０１４２】
用語「脂質ナノ粒子」は、式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）もしくは（ＩＶ）の化合物または他の指定のカチオン性脂質の１つまたは複数を含む、ナノメートルほど（例えば、１～１，０００ｎｍ）の少なくとも１つの寸法を有する粒子を指す。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子を、核酸（例えば、ｍＲＮＡ）などの活性薬剤または治療剤を目的の標的部位（例えば、細胞、組織、器官、腫瘍など）に送達するために使用することができる製剤中に含める。一部の実施形態では、本発明の脂質ナノ粒子は核酸を含む。そのような脂質ナノ粒子は、典型的には、式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）または（ＩＶ）の化合物および中性脂質、荷電脂質、ステロイドおよびポリマーとコンジュゲートした脂質から選択される１つまたは複数の賦形剤を含む。一部の実施形態では、核酸などの活性薬剤または治療剤を脂質ナノ粒子の脂質部分または脂質ナノ粒子の脂質部分の一部もしくは全部によって覆われた水性空間に包被し、それにより、酵素による分解または宿主生物体もしくは細胞の機構によって誘導される他の望ましくない影響、例えば有害な免疫応答から保護することができる。

【０１４３】
種々の実施形態では、脂質ナノ粒子は、平均直径が約３０ｎｍから約１５０ｎｍまで、約４０ｎｍから約１５０ｎｍまで、約５０ｎｍから約１５０ｎｍまで、約６０ｎｍから約１３０ｎｍまで、約７０ｎｍから約１１０ｎｍまで、約７０ｎｍから約１００ｎｍまで、約８０ｎｍから約１００ｎｍまで、約９０ｎｍから約１００ｎｍまで、約７０から約９０ｎｍまで、約８０ｎｍから約９０ｎｍまで、約７０ｎｍから約８０ｎｍまで、または約３０ｎｍ、３５ｎｍ、４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ、または１５０ｎｍであり、実質的に無毒性である。ある特定の実施形態では、核酸は、脂質ナノ粒子中に存在する場合、水溶液中でのヌクレアーゼによる分解に対して抵抗性である。核酸、カチオン性脂質、ペグ化脂質を含む脂質ナノ粒子およびそれらの調製方法は、例えば、その全ての開示は全ての目的のためによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第２００４／０１４２０２５号、同第２００７／００４２０３１号およびＰＣＴ公開ＷＯ２０１３／０１６０５８、同ＷＯ２０１３／０８６３７３、同ＷＯ２０１５／１９９９５２、同ＷＯ２０１７／００４１４３および同ＷＯ２０１７／０７５５３１号に開示されている。

【０１４４】
用語「ポリマーとコンジュゲートした脂質」は、脂質部分およびポリマー部分の両方を含む分子を指す。ポリマーとコンジュゲートした脂質の例は、ペグ化脂質である。用語「ペグ化脂質」は、脂質部分およびポリエチレングリコール部分の両方を含む分子を指す。ペグ化脂質は、当技術分野で公知であり、式（ＩＶ）の化合物、１－（モノメトキシポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ ＤＭＧ）などが挙げられる。

【０１４５】
用語「中性脂質」は、選択されたｐＨにおいて非荷電または中性双性イオン性形態で存

在するいくつもの脂質種のうちのいずれかを指す。生理的ｐＨでは、そのような脂質には、ホスファチジルコリン（phosphotidylcholines）、例えば、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン、例えば、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、セラミドなど、ステロイド、例えば、ステロールおよびそれらの誘導体などが限定されずに含まれる。中性脂質は、合成であっても天然由来であってもよい。

【０１４６】

用語「荷電脂質」は、有用な生理的範囲内、例えば、ｐＨ約３～ｐＨ約９で、ｐＨに関係なく正に荷電した形態または負に荷電した形態のいずれかで存在するいくつもの脂質種のうちのいずれかを指す。荷電脂質は、合成であっても天然由来であってもよい。荷電脂質の例としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ステロールヘミスクシネート、ジアルキルトリメチルアンモニウム－プロパン（例えば、ＤＯＴＡＰ、ＤＯＴＭＡ）、ジアルキルジメチルアミノプロパン、エチルホスホコリン、ジメチルアミノエタンカルバモイルステロール（例えば、ＤＣ－Ｃｈｏｌ）が挙げられる。

【０１４７】

「アルキル」とは、炭素原子および水素原子のみからなる直鎖または分枝状炭化水素鎖基を指し、飽和または不飽和（すなわち、１つまたは複数の二重結合および／または三重結合を含有する）であり、炭素原子を１～２４個有するか（Ｃ１～Ｃ２４アルキル）、炭素原子を１～１２有するか（Ｃ１～Ｃ１２アルキル）、炭素原子を１～８個有するか（Ｃ１～Ｃ８アルキル）または炭素原子を１～６個有し（Ｃ１～Ｃ６アルキル）、分子の残りに単結合によって結合しており、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、１－メチルエチル（イソプロピル）、ｎ－ブチル、ｎ－ペンチル、１，１－ジメチルエチル（ｔ－ブチル）、３－メチルヘキシル、２－メチルヘキシル、エテニル、プロパ－１－エニル、ブタ－１－エニル、ペンタ－１－エニル、ペンタ－１，４－ジエニル、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニルなどである。本明細書において具体的に別段の指定のない限り、アルキル基は、必要に応じて置換されている。

【０１４８】

「シクロアルキル」または「炭素環」とは、炭素原子および水素原子のみからなる安定な非芳香族単環式または多環式炭化水素基を指し、融合または架橋した環系を含むことができ、炭素原子を３～１５個有し、好ましくは炭素原子を３～１０個有し、飽和または不飽和であり、分子の残りに単結合によって結合している。単環基としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。多環基としては、例えば、アダマンチル、ノルボルニル、デカリニル、７，７－ジメチルビシクロ［２．２．１］ヘプタニルなどが挙げられる。本明細書において具体的に別段の指定のない限り、シクロアルキル基は、必要に応じて置換されている。

【０１４９】

「ヘテロシクリル」または「複素環式環」とは、安定な３～１８員の非芳香族環基を指し、炭素原子２～１２個、ならびに窒素、酸素および硫黄からなる群から選択されるヘテロ原子１～６個からなる。本明細書において具体的に別段の指定のない限り、ヘテロシクリル基は、単環系、二環系、三環系または四環系であってよく、融合または架橋した環系を含むことができ、また、ヘテロシクリル基中の窒素原子、炭素原子または硫黄原子は、必要に応じて酸化されていてもよく、窒素原子は、必要に応じて四級化されていてもよく、ヘテロシクリル基は、部分的にまたは完全に飽和していてもよい。そのようなヘテロシクリル基の例には、ジオキソラニル、チエニル［１，３］ジチアニル、デカヒドロイソキ

ノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、２－オキソピペラジニル、２－オキソピペリジニル、２－オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、４－ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリチアニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、１－オキソチオモルホリニル、および１，１－ジオキソチオモルホリニルが限定されずに含まれる。本明細書において具体的に別段の指定のない限り、ヘテロシクリル基は、必要に応じて置換されていてもよい。

【０１５０】

本明細書で使用される用語「置換」は、上記の基のいずれか（例えば、アルキル、シクロアルキルまたはヘテロシクリル）の少なくとも１つの水素原子が、例えば、これだけに限定されないが、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、およびＩなどのハロゲン原子；オキソ基（＝Ｏ）；ヒドロキシル基（－ＯＨ）；アルコキシ基（ＯＲａ、Ｒａは、Ｃ１～Ｃ１２アルキルまたはシクロアルキルである）；カルボキシル基（ＯＣ（＝Ｏ）Ｒａまたは－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲａ、Ｒａは、Ｈ、Ｃ１～Ｃ１２アルキルまたはシクロアルキルである）；アミン基（ＮＲａＲｂ、ＲａおよびＲｂは、それぞれ独立に、Ｈ、Ｃ１～Ｃ１２アルキルまたはシクロアルキルである）；Ｃ１～Ｃ１２アルキル基；およびシクロアルキル基などの非水素原子との結合によって置き換えられていることを意味する。一部の実施形態では、置換基は、Ｃ１～Ｃ１２アルキル基である。他の実施形態では、置換基は、シクロアルキル基である。他の実施形態では、置換基は、フルオロなどのハロ基である。他の実施形態では、置換基は、オキソ基である。他の実施形態では、置換基は、ヒドロキシル基である。他の実施形態では、置換基は、アルコキシ基である。他の実施形態では、置換基は、カルボキシル基である。他の実施形態では、置換基は、アミン基である。

【０１５１】

「必要に応じた」または「必要に応じて」（例えば、必要に応じて置換されている）とは、その後に記載される事象または状況が生じる場合もあれば、生じない場合もあることを意味し、このような記載は、前記事象または状況が生じる例および前記事象または状況が生じない例を含む。例えば、「必要に応じて置換されているアルキル」とは、アルキル基が置換されていてもよいし、置換されていなくてもよいことを意味し、このような記載は、置換アルキル基と置換を有さないアルキル基のどちらも含む。

【０１５２】

本明細書において開示される本発明の実施形態は、式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および（ＩＶ）の化合物の１つまたは複数の原子を原子質量または質量数が異なる原子で置き換えることによって同位体標識された全ての薬学的に許容される化合物を含むＬＮＰも包含することを意味する。開示されている化合物に組み入れることができる同位元素の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、亜リン酸、フッ素、塩素、およびヨウ素の同位元素、例えば、それぞれ^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{13}Ｃ、^{14}Ｃ、^{13}Ｎ、^{15}Ｎ、^{15}Ｏ、^{17}Ｏ、^{18}Ｏ、^{31}Ｐ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{18}Ｆ、^{36}Ｃｌ、^{123}Ｉ、および^{125}Ｉなどが挙げられる。これらの放射標識された化合物は、例えば作用部位もしくは様式または薬理学的に重要な作用部位に対する結合親和性を特徴付けることによって化合物の効果を決定または測定することを補助するために有用であり得る。ある特定の同位体標識された構造（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および（ＩＶ）の化合物、例えば、放射性同位元素が組み入れられた化合物は、薬物および／または基質の組織分布試験において有用である。放射性同位元素トリチウム、すなわち^{3}Ｈ、および炭素－１４、すなわち^{14}Ｃは、それらの組み入れやすさおよび検出手段の得やすさを考慮すると、この目的のために特に有用である。

【０１５３】

重水素、すなわち^{2}Ｈなどのより重い同位元素を用いた置換により、より大きな代謝安定性、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏ半減期の増大または投与量要件の低減に起因するある特定の治療上の利点をもたらすことができ、したがって、一部の場合では好ましい可能性があ

る。
【０１５４】
基質受容体占有率を調査する陽電子放射断層撮影（ＰＥＴ）試験においては^{11}Ｃ、^{18}Ｆ、^{15}Ｏおよび^{13}Ｎなどの陽電子放射同位元素を用いた置換が有用であり得る。同位体で標識された構造（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）、（ＩＶ）および（Ｖ）の化合物は、一般に、当業者に公知の従来の技法によってまたは下に詳述されている調製および実施例に記載されているものに類似したプロセスによって、以前使用されていた標識されていない試薬の代わりに適切な同位体で標識された試薬を使用して、調製することができる。
【０１５５】
「薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤」としては、これだけに限定することなく、米国食品医薬品局により、ヒトまたは家畜動物における使用に許容されるものとして認可されている任意のアジュバント、担体、賦形剤、滑剤、甘味剤、希釈剤、防腐剤、色素／着色剤、調味料、界面活性物質、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張化剤、溶媒、または乳化剤が挙げられる。
【０１５６】
「薬学的に許容される塩」は、酸付加塩および塩基付加塩のどちらも含む。
【０１５７】
「薬学的に許容される酸付加塩」とは、生物学的にまたは他の点で望ましくないものではない遊離塩基の生物学的効果および特性を保持し、例えば、これだけに限定されないが、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸、および、例えば、これだけに限定されないが、酢酸、２，２－ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、４－アセトアミド安息香酸、カンファー酸、カンファー－１０－スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、炭酸、ケイ皮酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン－１，２－ジスルホン酸、エタンスルホン酸、２－ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクタル酸、ゲンチジン酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルクロン酸、グルタミン酸、グルタル酸、２－オキソ－グルタル酸、グリセロリン酸、グリコール酸、馬尿酸、イソ酪酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムチン酸、ナフタレン－１，５－ジスルホン酸、ナフタレン－２－スルホン酸、１－ヒドロキシ－２－ナフトエ酸、ニコチン酸、オレイン酸、オロト酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモン酸、プロピオン酸、ピログルタミン酸、ピルビン酸、サリチル酸、４－アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、チオシアン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、ウンデシレン酸などの有機酸と形成される塩を指す。
【０１５８】
「薬学的に許容される塩基付加塩」とは、生物学的にまたは他の点で望ましくないものではない遊離酸の生物学的効果および特性を保持する塩を指す。これらの塩は、無機塩基または有機塩基を遊離酸に付加することによって調製される。無機塩基に由来する塩には、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、マンガン塩、アルミニウム塩などが限定されずに含まれる。好ましい無機塩は、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、およびマグネシウム塩である。有機塩基に由来する塩には、第一級アミン、第二級アミンおよび第三級アミン、天然に存在する置換アミンを含めた置換アミン、環状アミン、ならびに、アンモニア、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジエタノールアミン、エタノールアミン、デアノール、２－ジメチルアミノエタノール、２－ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、ベネタミン、ベンザチン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオブロミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、Ｎ－エチルピペリジン、ポリアミン樹脂などの塩基性イオン交換樹脂の塩が限定されず

に含まれる。特に好ましい有機塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリンおよびカフェインである。

【０１５９】

「医薬組成物」は、哺乳動物、例えばヒトへの生物学的に活性な化合物の送達のために当技術分野において一般に許容される本発明の化合物および媒体の製剤を指す。そのためのそのような媒体には、全ての薬学的に許容されるキャリア、希釈剤または賦形剤が含まれる。

【０１６０】

「有効量」または「治療有効量」は、哺乳動物、好ましくはヒトに投与された場合に、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて処置をもたらすために十分である本発明の化合物の量を指す。「治療有効量」を構成する本発明の脂質ナノ粒子の量は、化合物、状態およびその重症度、投与の様式ならびに処置される哺乳動物の年齢に応じて変化するが、当業者自身の知識および本開示を考慮して当業者によって日常的に決定することができる。

【０１６１】

本明細書において使用される「処置する」または「処置」は、目的の疾患または状態を有する哺乳動物、好ましくはヒトにおける目的の疾患または状態の処置を包含し、

（ｉ）哺乳動物において、具体的にはそのような哺乳動物が状態になりやすい素因を有するが、それを有するとしてまだ診断されていない場合に、疾患または状態の出現を予防すること；

（ｉｉ）疾患もしくは状態を抑制すること、すなわちその発症を抑止すること；

（ｉｉｉ）疾患もしくは状態を緩和すること、すなわち疾患もしくは状態の退縮をもたらすこと；または

（ｉｖ）疾患もしくは状態から生じる症状を緩和すること、すなわち根底にある疾患もしくは状態に対処することなく疼痛を緩和すること

を含む。本明細書において使用される、用語「疾患」および「状態」は、互換的に使用することができる、または特定の疾病もしくは状態が公知の原因因子（そのため病因がまだ解明されていない）、したがってそれはまだ疾患としてではなく、望ましくない状態もしくは症候群としてのみ認識されていて、ある程度の具体的な症状のセットが臨床医によって同定されているという点では、異なっていてよい。がん、単一遺伝子疾患および移植片対宿主病は本明細書に記載の組成物および方法を使用して処置することができる状態の非限定的な例である。

【０１６２】

カチオン性脂質（例えば、式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）または（ＩＶ）の化合物）、またはそれらの薬学的に許容される塩は、１つまたは複数の非対称の中心を含有することができ、したがって、アミノ酸に関して絶対的な立体化学の観点で（Ｒ）もしくは（Ｓ）としてまたは（Ｄ）もしくは（Ｌ）として定義することができる鏡像異性体、ジアステレオマー、および他の立体異性体が生じ得る。本発明は、そのような可能性のある全ての異性体、ならびにそれらのラセミ形態および光学的に純粋な形態を含むことを意味する。光学的に活性な（＋）および（－）、（Ｒ）および（Ｓ）または（Ｄ）および（Ｌ）異性体は、キラルシントンもしくはキラル試薬を使用して調製することができる、または従来の技法、例えば、クロマトグラフィーおよび分別結晶を使用して分割することができる。個々の鏡像異性体を調製／単離するための従来の技法としては、適する光学的に純粋な前駆体からのキラル合成、または、例えばキラル高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を使用したラセミ化合物（または塩もしくは誘導体のラセミ化合物）の分割が挙げられる。本明細書に記載の化合物がオレフィン系二重結合または他の幾何的非対称の中心を含有する場合、および特に指定のない場合、化合物は、Ｅ幾何異性体およびＺ幾何異性体の両方を含むものとする。同様に、全ての互変異性形態も含まれるものとする。

【０１６３】

「立体異性体」は、同じ結合によって結合した同じ原子で構成されるが、交換すること

ができない異なる三次元構造を有する化合物を指す。本発明は、種々の立体異性体およびそれらの混合物を企図しており、その分子が、互いに重ねることができない鏡像である２つの立体異性体を指す「鏡像異性体」を包含する。

【０１６４】

「互変異性体」は、分子の１つの原子から同じ分子の別の原子へのプロトンシフトを指す。本発明は、任意の前記化合物の互変異性体を含む。

【０１６５】

「ゆらぎ位置」は、翻訳された際に得られるアミノ酸の同一性を変化させることなく代替ヌクレオチドで変化させる（置換する）ことができる、コドンをコードするｍＲＮＡ内の第３のヌクレオチドと定義される。

【０１６６】

ＤＮＡ結合分子およびドメイン

本明細書で、任意の遺伝子または目的の遺伝子座中の標的部位に特異的に結合するＤＮＡ結合ドメインを含む組成物が記載される。任意のＤＮＡ結合ドメインは、本明細書で開示される組成物および方法において使用することができ、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼの ＤＮＡ結合部分（ｓｇＲＮＡ）またはメガヌクレアーゼ由来ＤＮＡ結合ドメインが含まれるがこれらに限定されない。

【０１６７】

ある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択された標的部位に結合するように工学技術で作製されている点で、天然に存在しない。例えば、Beerliら（２００２年）Nature Biotechnol.２０巻：１３５～１４１頁；Paboら（２００１年）Ann. Rev. Biochem.７０巻：３１３～３４０頁；Isalanら（２００１年）Nature Biotechnol.１９巻：６５６～６６０頁；Segalら（２００１年）Curr. Opin. Biotechnol.１２巻：６３２～６３７頁；Chooら（２０００年）Curr. Opin. Struct. Biol.１０巻：４１１～４１６頁；米国特許第６，４５３，２４２号；同第６，５３４，２６１号；同第６，５９９，６９２号；同第６，５０３，７１７号；同第６，６８９，５５８号；同第７，０３０，２１５号；同第６，７９４，１３６号；同第７，０６７，３１７号；同第７，２６２，０５４号；同第７，０７０，９３４号；同第７，３６１，６３５号；同第７，２５３，２７３号；および米国特許出願公開第２００５／００６４４７４号；同第２００７／０２１８５２８号；同第２００５／０２６７０６１号（すべて本明細書にその全体が参考として援用される）を参照のこと。ある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１２／００６０２３０号に開示されているジンクフィンガータンパク質を含む（例えば、表１）。

【０１６８】

工学技術で作製されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質と比較して、新規の結合特異性を有することができる。工学技術で作製する方法には、合理的なデザインおよび種々のタイプの選択が限定されずに含まれる。合理的なデザインには、例えば、三つ組（または、四つ組）ヌクレオチド配列および個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することが含まれ、ここで、各三つ組または四つ組ヌクレオチド配列は、特定の三つ組または四つ組配列に結合するジンクフィンガーの１つまたは複数のアミノ酸配列と会合している。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第６，４５３，２４２号および第６，５３４，２６１号を参照のこと。

【０１６９】

ファージディスプレイおよび２ハイブリッド系を含む例示的な選択方法は、米国特許第５，７８９，５３８号；５，９２５，５２３号；６，００７，９８８号；６，０１３，４５３号；６，４１０，２４８号；６，１４０，４６６号；６，２００，７５９号；および６，２４２，５６８号；ならびにＷＯ９８／３７１８６；ＷＯ９８／５３０５７；ＷＯ０

０／２７８７８；ＷＯ０１／８８１９７およびＧＢ２，３３８，２３７に開示されている。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインの結合特異性の増強が、例えば、米国特許第６，７９４，１３６号に記載されている。

【０１７０】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび／またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば長さが５またはそれより多くのアミノ酸のリンカーを含む、任意の適するリンカー配列を使用して一緒に連結することができる。長さが６またはそれより多くのアミノ酸の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号；６，９０３，１８５号；および７，１５３，９４９号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質には、タンパク質の個々のジンクフィンガーの間の適するリンカーの任意の組合せを含めることができる。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば米国特許第６，７９４，１３６号に記載されている。

【０１７１】

標的部位；ＺＦＰの選択および融合タンパク質（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法は、当業者に公知であり、米国特許第６，１４０，０８１号、第５，７８９，５３８号、第６，４５３，２４２号、第６，５３４，２６１号、第５，９２５，５２３号、第６，００７，９８８号、第６，０１３，４５３号、第６，２００，７５９号、ＷＯ９５／１９４３１、ＷＯ９６／０６１６６、ＷＯ９８／５３０５７、ＷＯ９８／５４３１１、ＷＯ００／２７８７８、ＷＯ０１／６０９７０、ＷＯ０１／８８１９７、ＷＯ０２／０９９０８４、ＷＯ９８／５３０５８、ＷＯ９８／５３０５９、ＷＯ９８／５３０６０、ＷＯ０２／０１６５３６およびＷＯ０３／０１６４９６に詳細に記載されている。

【０１７２】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび／またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば５またはそれより多いアミノ酸長のリンカーを含む、任意の適するリンカー配列を使用して一緒に連結することができる。６またはそれより多いアミノ酸長の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号、第６，９０３，１８５号および第７，１５３，９４９号も参照。本明細書に記載されるタンパク質には、そのタンパク質の個々のジンクフィンガーの間の適するリンカーの任意の組合せを含めることができる。

【０１７３】

通常、本明細書に記載のＬＮＰのＺＦＰは、少なくとも３つのフィンガーを含む。ある特定のＺＦＰは、４つ、５つまたは６つのフィンガーを含む。３つのフィンガーを含むＺＦＰは、９または１０ヌクレオチドを含む標的部位を典型的には認識し；４つのフィンガーを含むＺＦＰは、１２から１４ヌクレオチドを含む標的部位を典型的には認識し；一方６つのフィンガーを有するＺＦＰは、１８から２１ヌクレオチドを含む標的部位を認識することができる。ＺＦＰは、転写活性化または抑制ドメインであってよい１つまたは複数の制御ドメインを含む融合タンパク質であってもよい。

【０１７４】

本明細書に記載のＺＦＮ－ＬＮＰは、ＺＦＰが、その意図された標的に対する特異性が、例えば、米国特許出願第１５／６８５，５８０号に記載されている通りＺＦＰ骨格に変異を導入することにより、オフターゲット部位として公知の意図されたものではない他の切断部位と比べて増大するようにさらに変更されているＺＦＮを含むことができる。したがって、本明細書に記載の工学技術で作製された抑制因子および／または工学技術で作製されたヌクレアーゼは、それらのＤＮＡ結合ドメイン骨格領域の１つもしくは複数に変異を含むことができ、かつ／またはそれらの転写制御ドメインに１つもしくは複数の変異を含むことができる。これらのＺＦＰは、ＤＮＡ骨格上のリン酸と非特異的に相互作用し得るアミノ酸残基を除去するためにＺＦＰ　ＤＮＡ結合ドメイン（「ＺＦＰ骨格」）内のアミノ酸に対する変異を含むことができるが、ＤＮＡ認識ヘリックスには変化を含まない。

したがって、本発明は、ヌクレオチド標的特異性のために必要なものではないＺＦＰ骨格内のカチオン性アミノ酸残基の変異を含む。一部の実施形態では、これらのＺＦＰ骨格内の変異は、カチオン性アミノ酸残基の中性またはアニオン性アミノ酸残基への変異を含む。一部の実施形態では、これらのＺＦＰ骨格内の変異は、極性アミノ酸残基の中性または非極性アミノ酸残基への変異を含む。好ましい実施形態では、変異は、ＤＮＡ結合ヘリックスの（－５）、（－９）位および／または（－１４）位においてなされる。一部の実施形態では、ジンクフィンガーは、（－５）、（－９）および／または（－１４）に１つまたは複数の変異を含むことができる。さらなる実施形態では、マルチフィンガージンクフィンガータンパク質内の１つまたは複数のジンクフィンガーは、（－５）、（－９）および／または（－１４）に変異を含むことができる。一部の実施形態では、（－５）、（－９）および／または（－１４）のアミノ酸（例えば、アルギニン（Ｒ）またはリシン（Ｋ））をアラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ａｓｐ（Ｎ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｔｙｒ（Ｙ）および／またはグルタミン（Ｑ）に変異させる。他の実施形態では、融合ポリペプチドは、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインに変異を含むことができ、ここで、（－５）、（－９）および／または（－１４）位のアミノ酸が上で列挙されているアミノ酸のいずれかに任意の組合せで変化している（例えば、米国特許出願第１５／６８５，５８０号を参照のこと）。

【０１７５】

一部の実施形態ではＤＮＡ結合ドメインは、ヌクレアーゼ由来であってよい。例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼ（例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、ＰＩ－Ｓｃｅ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩおよびＩ－ＴｅｖＩＩＩ）の認識配列が公知である。米国特許第５，４２０，０３２号；米国特許第６，８３３，２５２号；Belfortら（１９９７年）Nucleic Acids Res.２５巻：３３７９～３３８８頁；Dujonら（１９８９年）Gene ８２巻：１１５～１１８頁；Perlerら（１９９４年）Nucleic Acids Res.２２巻、１１２５～１１２７頁；Jasin（１９９６年）Trends Genet.１２巻：２２４～２２８頁；Gimbleら（１９９６年）J. Mol. Biol.２６３巻：１６３～１８０頁；Argastら（１９９８年）J. Mol. Biol.２８０巻：３４５～３５３頁およびNew England Biolabsカタログも参照。さらに、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのＤＮＡ結合特異性は、非天然の標的部位に結合するように工学技術で作製することができる。例えば、Chevalierら（２００２年）Molec. Cell １０巻：８９５～９０５頁；Epinatら（２００３年）Nucleic Acids Res.３１巻：２９５２～２９６２頁；Ashworthら（２００６年）Nature ４４１巻：６５６～６５９頁；Paquesら（２００７年）Current Gene Therapy ７巻：４９～６６頁；米国特許出願公開第２００７０１１７１２８号を参照のこと。

【０１７６】

他の実施形態ではＤＮＡ結合ドメインは、植物病原体Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ（Bochら、（２００９年）Science ３２６巻：１５０９～１５１２頁ならびにMoscouおよびBogdanove、（２００９年）Science ３２６巻：１５０１頁を参照）ならびにＲａｌｓｔｏｎｉａ（Heuerら（２００７年）Applied and Environmental Microbiology ７３巻（１３号）：４３７９～４３８４頁を参照）；米国特許出願第２０１１０３０１０７３号および第２０１１０１４５９４０号由来のものに類似する転写活性化因子様（ＴＡＬ）エフェクター（ＴＡＬＥ）由来の工学技術で作製されたドメインを含む。Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属の植物病原細菌は、重要な作物植物における多くの疾患を引き起こすことが公知である。Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓの病原性は、植物細胞に２５を超える異なるエフェクタータンパク質を注入する、保存されたＩＩＩ型分泌（Ｔ３Ｓ）系に依存する。植物転写活性化因子を模倣して植物トランスクリプトームを操作する、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）は、これらの注入されるタンパク質の１つである（Kayら（２００７年）Science ３１８巻：６４８～６５１頁を参照のこと）。これらのタンパク質は、ＤＮＡ結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含有する。最も良く特徴付けられたＴＡＬＥの１つは

、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ ｃａｍｐｅｓｔｇｒｉｓ ｐｖ．ＶｅｓｉｃａｔｏｒｉａからのＡｖｒＢｓ３である（Bonasら（１９８９年）Mol Gen Genet ２１８巻：１２７～１３６頁およびＷＯ２０１００７９４３０を参照のこと）。ＴＡＬＥはタンデムリピートの集中型ドメイン（centralized domain）を含有し、各リピートは概ね３４アミノ酸を含有し、それらはこれらのタンパク質のＤＮＡ結合特異性にとって重要である。さらに、それらは核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含有する（レビューについては、Schornack Sら（２００６年）J Plant Physiol １６３巻（３号）：２５６～２７２頁を参照のこと）。さらに、植物病原細菌Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎａｃｅａｒｕｍでは、Ｒ．ｓｏｌａｎａｃｅａｒｕｍ生物型（biovar）１菌株ＧＭＩ１０００および生物型４菌株ＲＳ１０００において、ＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓのＡｖｒＢｓ３ファミリーに相同性である、ｂｒｇ１１およびｈｐｘ１７と呼ばれる２つの遺伝子が見出された（Heuerら（２００７年）Appl and Envir Micro ７３巻（１３号）：４３７９～４３８４頁を参照のこと）。これらの遺伝子はヌクレオチド配列がお互いと９８．９％同一であるが、ｈｐｘ１７の反復配列ドメインにおける１，５７５ｂｐが欠失している点で異なる。しかし、両遺伝子生成物は、ＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓのＡｖｒＢｓ３ファミリータンパク質と４０％未満の配列同一性を有する。

【０１７７】

これらのＴＡＬエフェクターの特異性は、タンデムリピートに見出される配列に依存する。反復配列は概ね１０２塩基対を含み、そのリピートはお互いと典型的にはに９１～１００％相同である（Bonasら、同上）。そのリピートの多型は通常１２位および１３位に位置し、１２位および１３位の超可変二残基（hypervariable diresidues）（リピート可変二残基またはＲＶＤ領域）の同一性とＴＡＬエフェクターの標的配列の中の近接したヌクレオチドの同一性の間に１対１の対応があるようである（MoscouおよびBogdanove、（２００９年）Science ３２６巻：１５０１頁およびBochら（２００９年）Science ３２６巻：１５０９～１５１２頁を参照のこと）。実験的に、１２位および１３位のＨＤ配列（リピート可変二残基またはＲＶＤ領域）がシトシン（Ｃ）への結合をもたらし、ＮＧがＴに結合し、ＮＩがＡ、Ｃ、ＧまたはＴに、ＮＮがＡまたはＧに結合し、ＩＮＧがＴに結合するように、これらのＴＡＬエフェクターのＤＮＡ認識のための天然のコードを決定した。これらのＤＮＡ結合リピートは、新しい配列と相互作用して、植物細胞中の非内因性レポーター遺伝子の発現を活性化することができる人工転写因子を作製するために、新しい組合せおよび多数のリピートを有するタンパク質に組み立てられた（Bochら、同上）。非定型ＲＶＤを伴うＴＡＬＥＮを包含する、ＴＡＬエフェクタードメインヌクレアーゼ融合物（ＴＡＬＥＮ）を得るために、工学技術で作製されたＴＡＬタンパク質をＦｏｋＩ切断半ドメインに連結した。例えば、米国特許第８，５８６，５２６号を参照のこと。

【０１７８】

一部の実施形態ではＴＡＬＥＮは、エンドヌクレアーゼ（例えば、ＦｏｋＩ）切断ドメインまたは切断半ドメインを含む。他の実施形態ではＴＡＬＥヌクレアーゼは、メガＴＡＬである。これらのメガＴＡＬヌクレアーゼは、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインおよびメガヌクレアーゼ切断ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは、単量体として活性であり、活性のために二量体化を必要としない（Boisselら、（２０１３年）Nucl Acid Res：１～１３頁、doi: 10.1093/nar/gkt1224を参照）。

【０１７９】

なおさらなる実施形態では、ヌクレアーゼは、コンパクトなＴＡＬＥＮを含む。これらは、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインをＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに連結する単鎖融合タンパク質である。ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインがＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに関してどこに配置されるかに応じて、融合タンパク質は、ＴＡＬＥ領域によって局在化されたニッカーゼとして作用することができるか、または二本鎖切断を引き起こすことができる（Beurdeleyら（２０１３年）Nat Comm：１～８頁、DOI: 10.1038/ncomms2782を参照）。さらに、ヌクレアーゼドメインは、ＤＮＡ結合機能性も示すことができる。任意のＴＡＬＥＮを、１つまたは複数のメガＴＡＬＥを含むさらなるＴＡＬＥＮ（例えば、１つま

たは複数のＴＡＬＥＮ（ｃＴＡＬＥＮまたはＦｏｋＩ－ＴＡＬＥＮ）と組み合わせて使用することができる。

【０１８０】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび／またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質またはＴＡＬＥは、例えば５またはそれより多くのアミノ酸長のリンカーを含む、任意の適するリンカー配列を使用して一緒に連結することができる。６またはそれより多くのアミノ酸長の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号、第６，９０３，１８５号；および第７，１５３，９４９号も参照。本明細書に記載されるタンパク質には、そのタンパク質の個々のジンクフィンガーの間の適するリンカーの任意の組合せを含めることができる。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば米国特許第６，７９４，１３６号に記載されている。ある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＤＮＡに結合するシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）ＤＮＡ結合分子を包含する、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系の一部である。例えば、米国特許第８，６９７，３５９号ならびに米国特許出願公開第２０１５００５６７０５号および２０１５０１５９１７２号を参照のこと。その系のＲＮＡ構成成分をコードするＣＲＩＳＰＲ（クラスター化規則的散在性ショートパリンドロームリピート）遺伝子座、およびタンパク質をコードするｃａｓ（ＣＲＩＳＰＲ関連）遺伝子座（Jansenら、２００２年、Mol. Microbiol.４３巻：１５６５～１５７５頁；Makarovaら、２００２年、Nucleic Acids Res.３０巻：４８２～４９６頁；Makarovaら、２００６年、Biol. Direct １巻：７頁；Haftら、２００５年、PLoS Comput. Biol.１巻：ｅ６０頁）が、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子の組合せ、ならびにＣＲＩＳＰＲ媒介核酸切断の特異性をプログラムすることが可能な非コードＲＮＡエレメントを含有する。

【０１８１】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＴｔＡｇｏ系の一部である（Swartsら、同上；Shengら、同上を参照のこと）。真核生物では、遺伝子サイレンシングはアルゴノート（Ａｇｏ）ファミリーのタンパク質によって媒介される。このパラダイムでは、Ａｇｏは小さい（１９～３１ｎｔ）ＲＮＡに結合する。このタンパク質－ＲＮＡサイレンシング複合体は、小ＲＮＡと標的の間のワトソン－クリック型塩基対を通して標的ＲＮＡを認識し、標的ＲＮＡをエンドヌクレアーゼ的分解で（endonucleolytically）切断する（Vogel（２０１４年）Science ３４４巻：９７２～９７３頁）。対照的に、原核生物のＡｇｏタンパク質は小さい一本鎖ＤＮＡ断片に結合し、外来の（しばしばウイルスの）ＤＮＡを検出し、除去する機能をおそらく果たす（Yuanら、（２００５年）Mol. Cell １９巻、４０５頁；Olovnikovら、（２０１３年）Mol. Cell ５１巻、５９４頁；Swartsら、同上）。例示的な原核生物Ａｇｏタンパク質には、Ａｑｕｉｆｅｘ ａｅｏｌｉｃｕｓ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｈａｅｒｏｉｄｅｓおよびＴｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓからのものが含まれる。

【０１８２】

最も良く特徴付けられた原核生物Ａｇｏタンパク質の１つは、Ｔ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓからのものである（ＴｔＡｇｏ；Swartsら、同上）。ＴｔＡｇｏは、５’リン酸基で１５ｎｔまたは１３～２５ｎｔの一本鎖ＤＮＡ断片と会合する。ＴｔＡｇｏに結合するこの「ガイドＤＮＡ」は、タンパク質－ＤＮＡ複合体がＤＮＡの第三者分子中のワトソン－クリック相補的ＤＮＡ配列に結合するように誘導する役目をする。これらのガイドＤＮＡ中の配列情報が標的ＤＮＡの同定を可能にしたら、ＴｔＡｇｏ－ガイドＤＮＡ複合体は標的ＤＮＡを切断する。そのような機構は、その標的ＤＮＡに結合する間、ＴｔＡｇｏ－ガイドＤＮＡ複合体の構造によっても支持される（G. Shengら、同上）。Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｈａｅｒｏｉｄｅｓからのＡｇｏ（ＲｓＡｇｏ）は、類似の特性を有する（Olivnikovら、同上）。

【０１８３】

任意のＤＮＡ配列の外因性ガイドＤＮＡを、ＴｔＡｇｏタンパク質にロードすることができる（Swartsら、同上）。ＴｔＡｇｏ切断の特異性はガイドＤＮＡによって方向づけられるので、外因性の、調査者によって指定されたガイドＤＮＡで形成されるＴｔＡｇｏ－ＤＮＡ複合体は、したがって、ＴｔＡｇｏ標的ＤＮＡ切断を相補的な調査者によって指定された標的ＤＮＡに導く。この様に、ＤＮＡにおいて標的化二本鎖切断を生じさせることができる。ＴｔＡｇｏ－ガイドＤＮＡ系（または、他の生物体からのオルソログのＡｇｏ－ガイドＤＮＡ系）の使用は、細胞の中でゲノムＤＮＡの標的化切断を可能にする。そのような切断は、一本鎖または二本鎖であってよい。哺乳動物のゲノムＤＮＡの切断のために、哺乳動物細胞での発現のために最適化されるバージョンのＴｔＡｇｏコドンを使用するのが好ましいであろう。さらに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成されるＴｔＡｇｏ－ＤＮＡ複合体で細胞を処理することが好ましい場合があり、ここで、ＴｔＡｇｏタンパク質は細胞貫通性ペプチドに融合される。さらに、３７℃で改善された活性を有するように変異誘発を通して変更された、ＴｔＡｇｏタンパク質のバージョンを使用することが好ましい場合がある。Ａｇｏ－ＲＮＡ媒介ＤＮＡ切断は、遺伝子ノックアウト、標的化遺伝子付加、遺伝子補正、ＤＮＡ切断の活用のための当技術分野で標準の技術を使用した標的化遺伝子欠失を含む転帰の一式（a　panopoly　of　outcomes）に影響をもたらすために使用できた。

【０１８４】

したがって任意のＤＮＡ結合ドメインを使用することができる。

【０１８５】

融合分子

本明細書に記載のＬＮＰは、ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、ＺＦＰまたはＴＡＬＥ、単一ガイドＲＮＡなどのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ構成成分）を含む融合分子を包含し得、異種制御（機能的）ドメイン（またはその機能性断片）もまた提供される。共通ドメインには、例えば、転写因子ドメイン（活性化因子、抑制因子、共活性化因子、共抑制因子）、サイレンサー、オンコジーン（例えば、ｍｙｃ、ｊｕｎ、ｆｏｓ、ｍｙｂ、ｍａｘ、ｍａｄ、ｒｅｌ、ｅｔｓ、ｂｃｌ、ｍｙｂ、ｍｏｓファミリーメンバーなど）；ＤＮＡ修復酵素およびそれらの関連因子およびモディファイヤー；ＤＮＡ再編成酵素およびそれらの関連因子およびモディファイヤー；クロマチン関連タンパク質およびそれらのモディファイヤー（例えばキナーゼ、アセチラーゼおよび脱アセチル化酵素）；ならびにＤＮＡ改変酵素（例えば、メチル基転移酵素、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ）およびそれらの関連因子およびモディファイヤーが含まれる。ＤＮＡ結合ドメインおよびヌクレアーゼ切断ドメインの融合に関する詳細についての米国特許出願公開第２００５００６４４７４号；同第２００６０１８８９８７号および同第２００７０２１８５２８号、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１８６】

活性化を達成するために適するドメインには、ＨＳＶ　ＶＰ１６活性化ドメイン（例えばHagmannら、Ｊ．Virol．　７１巻、５９５２～５９６２頁（１９９７年）を参照）核内ホルモン受容体（例えばTorchiaら、Curr．Opin．Cell．Biol．　１０巻：３７３～３８３頁（１９９８年）を参照）；核内因子カッパＢのｐ６５サブユニット（Bitko　&　Barik、Ｊ．Virol．　７２巻：５６１０～５６１８頁（１９９８年）およびDoyle　&　Hunt、Neuroreport　８巻：２９３７～２９４２頁（１９９７年））、Liuら、Cancer　Gene　Ther．　５巻：３～２８頁（１９９８年））、またはＶＰ６４などの人工キメラ機能的ドメイン（Beerliら、（１９９８年）Proc．Natl．Acad．Sci．USA　９５巻：１４６２３～３３頁）、およびデグロン（Molinariら、（１９９９年）EMBO　Ｊ．　１８巻、６４３９～６４４７頁）が含まれる。さらなる例示的活性化ドメインには、Ｏｃｔ　１、Ｏｃｔ－２Ａ、Ｓｐ１、ＡＰ－２およびＣＴＦ１（Seipelら、EMBO　Ｊ．　１１巻、４９６１～４９６８頁（１９９２年）ならびにｐ３００、ＣＢＰ、ＰＣＡＦ、ＳＲＣ１　ＰｖＡＬＦ、ＡｔＨＤ２ＡおよびＥＲＦ－２が含まれる。例えばRobyrら（２０００年）Mol．Endocri

nol. １４巻：３２９～３４７頁、Collingwoodら（１９９９年）J. Mol. Endocrinol. ２３巻：２５５～２７５頁、Leoら（２０００年）Gene ２４５巻：１～１１頁、Manteuffel-Cymborowska （１９９９年）Acta Biochim. Pol. ４６巻：７７～８９頁、McKennaら（１９９９年）J. Steroid Biochem. Mol. Biol. ６９巻：３～１２頁、Malikら（２０００年）Trends Biochem. Sci. ２５巻：２７７～２８３頁およびLemonら（１９９９年）Curr. Opin. Genet. Dev. ９巻：４９９～５０４頁を参照。さらなる例示的活性化ドメインには、ＯｓＧＡＩ、ＨＡＬＦ－１、Ｃ１、ＡＰ１、ＡＲＦ－５、－６、－７および－８、ＣＰＲＦ１、ＣＰＲＦ４、ＭＹＣ－ＲＰ／ＧＰならびにＴＲＡＢ１が限定されずに含まれる。例えばOgawaら（２０００年）Gene ２４５巻：２１～２９頁、Okanamiら（１９９６年）Genes Cells １巻：８７～９９頁、Goffら（１９９１年）Genes Dev. ５巻：２９８～３０９頁、Choら（１９９９年）Plant Mol. Biol. ４０巻：４１９～４２９頁、Ulmasonら（１９９９年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９６巻：５８４４～５８４９頁、Sprenger-Hausselsら（２０００年）Plant J. ２２巻：１～８頁、Gongら（１９９９年）Plant Mol. Biol. ４１巻：３３～４４頁およびHoboら（１９９９年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９６巻：１５，３４８～１５，３５３頁を参照。

【０１８７】

ＤＮＡ結合ドメインと機能的ドメインとの間の融合タンパク質（またはそれをコードする核酸）形成において、活性化ドメインまたは活性化ドメインと相互作用する分子のいずれかが機能的ドメインとして好適であることは、当業者に明らかである。本質的に、活性化複合体および／または活性化活性（例えば、ヒストンアセチル化など）を標的遺伝子にリクルートすることが可能な任意の分子は、融合タンパク質の活性化ドメインとして有用である。融合分子での機能的ドメインとしての使用のために適する、インシュレータードメイン、局在性ドメインならびに、ＩＳＷＩ含有ドメインなどのクロマチンリモデリングタンパク質および／またはメチル結合ドメインタンパク質は、例えば米国特許出願２００２／０１１５２１５および同２００３／００８２５５２ならびにＷＯ ０２／４４３７６において記載されている。

【０１８８】

例示的抑制ドメインには、ＫＲＡＢ Ａ／Ｂ、ＫＯＸ、ＴＧＦベータ誘導性初期遺伝子（ＴＩＥＧ）、ｖ－ｅｒｂＡ、ＳＩＤ、ＭＢＤ２、ＭＢＤ３、ＤＮＭＴファミリーのメンバー（例えばＤＮＭＴ１、ＤＮＭＴ３Ａ、ＤＮＭＴ３Ｂ）、ＲｂおよびＭｅＣＰ２が限定されずに含まれる。例えばBirdら（１９９９年）Cell ９９巻：４５１～４５４頁、Tylerら（１９９９年）Cell ９９巻：４４３～４４６頁、Knoepflerら（１９９９年）Cell ９９巻：４４７～４５０頁およびRobertsonら（２０００年）Nature Genet. ２５巻：３３８～３４２頁を参照。さらなる例示的抑制ドメインには、ＲＯＭ２およびＡｔＨＤ２Ａが限定されずに含まれる。例えばChemら（１９９６年）Plant Cell ８巻：３０５～３２１頁およびWuら（２０００年）Plant J. ２２巻：１９～２７頁を参照。

【０１８９】

融合分子は、当業者に周知であるクローニングおよび生化学的コンジュゲーションの方法によって構築される。融合分子は、ＤＮＡ結合ドメインおよび機能的ドメイン（例えば、転写活性化または抑制ドメイン）を含む。融合分子は、核局在化シグナル（例えばＳＶ４０中型Ｔ抗原（SV40 medium T-antigen）由来のものなど）およびエピトープタグ（例えばＦＬＡＧおよびヘマグルチニンなど）も任意選択で含む。融合タンパク質（およびそれらをコードする核酸）は、翻訳リーディングフレームが融合物の構成成分内で保存されるように設計される。

【０１９０】

一方が機能的ドメイン（またはその機能性断片）と、他方が非タンパク質ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、抗生物質、干渉物質、副溝バインダー、核酸）のポリペプチド構成成分の間の融合は、当業者に公知の生化学コンジュゲーションの方法によって構築される。例えばthe Pierce Chemical Company (Rockford、IL) Catalogueを参照。副溝バイン

ダーとポリペプチドとの間の融合を作製するための方法および組成物が、記載されている。Mappら（２０００年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９７巻：３９３０～３９３５頁。さらにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の単一ガイドＲＮＡは、活性転写制御因子およびヌクレアーゼを形成するように機能的ドメインと会合する。

【０１９１】

ある特定の実施形態では標的部位は、細胞性クロマチンの到達可能な領域中に存在する。到達可能領域は、例えば米国特許第７，２１７，５０９号および第７，９２３，５４２号に記載の通り決定することができる。標的部位が細胞性クロマチンの到達可能領域に存在しない場合、１つまたは複数の到達可能領域を、米国特許第７，７８５，７９２号および第８，０７１，３７０号に記載の通り生成することができる。さらなる実施形態では融合分子のＤＮＡ結合ドメインは、その標的部位が到達可能領域中にあるかどうかに関わらず、細胞性クロマチンに結合することができる。例えばそのようなＤＮＡ結合ドメインは、リンカーＤＮＡおよび／またはヌクレオソームＤＮＡに結合可能である。この種類の「先駆」ＤＮＡ結合ドメインの例は、ある特定のステロイド受容体において、および肝細胞核因子３（ＨＮＦ３）において見出される（Cordingleyら（１９８７年）Cell ４８巻：２６１～２７０頁、Pinaら（１９９０年）Cell ６０巻：７１９～７３１頁およびCirilloら（１９９８年）EMBO J. １７巻：２４４～２５４頁）。

【０１９２】

融合分子は、当業者に公知である通り薬学的に許容されるキャリアを用いて製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第１７版、１９８５年ならびに米国特許第６，４５３，２４２号および第６，５３４，２６１号を参照。

【０１９３】

融合分子の機能的構成成分／ドメインは、融合分子がそのＤＮＡ結合ドメインを介して標的配列に結合すると、遺伝子の転写に影響を与えることが可能である種々の異なる構成成分のいずれかから選択することができる。それにより機能的構成成分には、活性化因子、抑制因子、共活性化因子、共抑制因子およびサイレンサーなどの種々の転写因子ドメインが限定されずに含まれる。

【０１９４】

さらなる例示的機能的ドメインは、例えば米国特許第６，５３４，２６１号および第６，９３３，１１３号に開示されている。

【０１９５】

外因性小分子またはリガンドによって制御される機能的ドメインはまた、本明細書に記載のＬＮＰにおいて使用するために選択することができる。例えばＲｈｅｏＳｗｉｔｃｈ（登録商標）技術を用いることができ、ここで機能的ドメインは、外部ＲｈｅｏＣｈｅｍ（商標）リガンド（例えばＵＳ２００９０１３６４６５を参照）の存在下でその活性なコンフォーメーションだけを想定する。したがってＺＦＰは、調節可能な機能的ドメインに作動可能に連結でき、生じたＺＦＰ－ＴＦの活性は、外部リガンドによって調節される。

【０１９６】

ヌクレアーゼ

ある特定の実施形態では融合タンパク質は、ＤＮＡ結合結合ドメイン（DNA-binding binding domain）および切断（ヌクレアーゼ）ドメインを含む。そのように遺伝子改変は、ヌクレアーゼ、例えば工学技術で作製されたヌクレアーゼを使用して達成することができる。工学技術で作製されるヌクレアーゼ技術は、天然に存在するＤＮＡ結合タンパク質の工学技術に基づいている。例えば、目的に合わせたＤＮＡ結合特異性を有するホーミングエンドヌクレアーゼの工学技術は記載されている。Chamesら（２００５年）Nucleic Acids Res ３３巻（２０号）：ｅ１７８頁、Arnouldら（２００６年）J. Mol. Biol. ３５５巻：４４３～４５８頁。さらに、ＺＦＰの工学技術も記載されている。例えば米国特許第６，５３４，２６１号、第６，６０７，８８２号、第６，８２４，９７８号、第６，９７９，５３９号、第６，９３３，１１３号、第７，１６３，８２４号および第７，０１３，２１９号を参照。

【０１９７】
さらにＺＦＰおよび／またはＴＡＬＥは、ＺＦＮおよびＴＡＬＥＮ－その工学技術で作製された（ＺＦＰまたはＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメインを通じてその所期の核酸標的を認識することができ、ヌクレアーゼ活性を介してＤＮＡ結合部位近くでＤＮＡが切断されるようにする機能的実体、を作り出すようにヌクレアーゼドメインに融合されている。例えば、Kimら（１９９６年）Proc Nat'l Acad Sci USA ９３巻（３号）：１１５６～１１６０頁を参照のこと。つい最近、そのようなヌクレアーゼは、種々の生物体においてゲノム改変のために使用されている。例えば、米国特許公開第２００３０２３２４１０号；同第２００５０２０８４８９号；同第２００５００２６１５７号；同第２００５００６４４７４号；同第２００６０１８８９８７号；同第２００６００６３２３１号；および国際公開ＷＯ０７／０１４２７５を参照のこと。

【０１９８】
したがって本明細書に記載される方法および組成物は、広範に適用可能であり、目的の任意のヌクレアーゼを含むことができる。ヌクレアーゼの非限定的例には、メガヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮおよびジンクフィンガーヌクレアーゼが含まれる。ヌクレアーゼは、異種ＤＮＡ結合および切断ドメイン（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、異種切断ドメインを含むメガヌクレアーゼＤＮＡ結合ドメイン）を含むことができる、または代替的に、天然に存在するヌクレアーゼのＤＮＡ結合ドメインは、選択された標的部位に結合するように変更することができる（例えば、コグネイト結合部位とは異なる部位に結合するように工学技術で作製されたメガヌクレアーゼ）。

【０１９９】
本明細書に記載されるいずれのヌクレアーゼでも、ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮとも呼ばれる、工学技術で作製されたＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインおよびヌクレアーゼドメイン（例えば、エンドヌクレアーゼおよび／またはメガヌクレアーゼドメイン）を含むことができる。使用者が選択した標的配列との堅牢な、部位特異的相互作用のためにこれらのＴＡＬＥＮタンパク質を工学技術で作製するための方法および組成物は公開されている（米国特許第８，５８６，５２６号を参照）。一部の実施形態ではＴＡＬＥＮは、エンドヌクレアーゼ（例えば、ＦｏｋＩ）切断ドメインまたは切断半ドメインを含む。他の実施形態ではＴＡＬＥヌクレアーゼは、メガＴＡＬである。これらのメガＴＡＬヌクレアーゼは、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインおよびメガヌクレアーゼ切断ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは、単量体として活性であり、活性のために二量体化を必要としない（Boisselら、（２０１３年）Nucl Acid Res：１～１３頁、doi: 10.1093/nar/gkt1224を参照）。さらにヌクレアーゼドメインは、ＤＮＡ結合機能性を示すこともできる。

【０２００】
なおさらなる実施形態では、ヌクレアーゼは、コンパクトなＴＡＬＥＮ（ｃＴＡＬＥＮ）を含む。これらは、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインをＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに連結する単鎖融合タンパク質である。融合タンパク質は、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインがＴｅｖＩヌクレアーゼドメインに関してどこに配置されるかに応じて、ＴＡＬＥ領域によって局在化されたニッカーゼとして作用することができるか、または二本鎖切断を引き起こすことができる（Beurdeleyら（２０１３年）Nat Comm：１～８頁、DOI: 10.1038/ncomms2782を参照）。任意のＴＡＬＥＮを、さらなるＴＡＬＥＮ（例えば、１つもしくは複数のメガＴＡＬによる１つもしくは複数のＴＡＬＥＮ（ｃＴＡＬＥＮまたはＦｏｋＩ－ＴＡＬＥＮ））または他のＤＮＡ切断酵素と組み合わせて使用することができる。

【０２０１】
ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）または切断活性を示すその一部を含む。天然に存在するメガヌクレアーゼは１５～４０塩基対の切断部位を認識し、４つのファミリー：ＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリー、ＧＩＹ－ＹＩＧファミリー、Ｈｉｓ－ＣｙｓｔボックスファミリーおよびＨＮＨファミリーに一般的に分類される。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼには、Ｉ－ＳｃｅＩ

、Ｉ－ＣｅｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、ＰＩ－Ｓｃｅ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩおよびＩ－ＴｅｖＩＩＩが含まれる。それらの認識配列は公知である。米国特許第５，４２０，０３２号；米国特許第６，８３３，２５２号；Belfortら（１９９７年）Nucleic Acids Res.２５巻：３３７９～３３８８頁；Dujonら（１９８９年）Gene ８２巻：１１５～１１８頁；Perlerら（１９９４年）Nucleic Acids Res.２２巻、１１２５～１１２７頁；Jasin（１９９６年）Trends Genet.１２巻：２２４～２２８頁；Gimbleら（１９９６年）J. Mol. Biol.２６３巻：１６３～１８０頁；Argastら（１９９８年）J. Mol. Biol.２８０巻：３４５～３５３頁およびNew England Biolabsカタログも参照。

【０２０２】

天然に存在するメガヌクレアーゼ由来、主にＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリー由来のＤＮＡ結合ドメインは、植物、酵母、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ、哺乳動物細胞およびマウスにおける部位特異的ゲノム改変を促進するために使用されているが、このアプローチは、メガヌクレアーゼ認識配列を保存するいずれかの相同性遺伝子の改変（Monetら（１９９９年）、Biochem. Biophysics. Res. Common. ２５５巻：８８～９３頁）または認識配列が導入される工学技術で作製される前のゲノムへの改変（Routeら（１９９４年）、Mol. Cell. Biol. １４巻：８０９６～１０６頁、Chiltonら（２００３年）、Plant Physiology. １３３巻：９５６～６５頁、Puchtaら（１９９６年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９３巻：５０５５～６０頁、Rongら（２００２年）、Genes Dev. １６巻：１５６８～８１頁、Goubleら（２００６年）、J. Gene Med. ８巻（５号）：６１６～６２２頁）に限定されている。したがって、医学的にまたは生物工学的に関連する部位で新規結合特異性を示すメガヌクレアーゼを工学技術で作製する試みがなされている（Porteusら（２００５年）、Nat. Biotechnol. ２３巻：９６７～７３頁、Sussmanら（２００４年）、J. Mol. Biol. ３４２巻：３１～４１頁、Epinatら（２００３年）、Nucleic Acids Res. ３１巻：２９５２～６２頁、Chevalierら（２００２年）Molec. Cell １０巻：８９５～９０５頁、Epinatら（２００３年）Nucleic Acids Res. ３１巻：２９５２～２９６２頁、Ashworthら（２００６年）Nature ４４１巻：６５６～６５９頁、Paquesら（２００７年）Current Gene Therapy ７巻：４９～６６頁、米国特許出願公開第２００７０１１７１２８号、第２００６０２０６９４９号、第２００６０１５３８２６号、第２００６００７８５５２号および第２００４０００２０９２）。さらに、メガヌクレアーゼ由来の天然に存在するまたは工学技術で作製されたＤＮＡ結合ドメインは、異種ヌクレアーゼ由来の切断ドメイン（例えば、ＦｏｋＩ）と作動可能に連結することができる、および／またはメガヌクレアーゼ由来の切断ドメインは異種ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、ＺＦＰまたはＴＡＬＥ）と作動可能に連結することができる。

【０２０３】

他の実施形態では、ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）またはＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインヌクレアーゼ融合物（ＴＡＬＥＮ）である。ＺＦＮおよびＴＡＬＥＮは、選り抜きの遺伝子中の標的部位に結合するように工学技術で作製されたＤＮＡ結合ドメイン（ジンクフィンガータンパク質またはＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメイン）および切断ドメインまたは切断半ドメイン（例えば、本明細書に記載される制限および／またはメガヌクレアーゼ由来）を含む。

【０２０４】

上で詳述されているように、ジンクフィンガー結合ドメインおよびＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインは、選り抜きの配列に結合するように工学技術で作製することができる。例えばBeerliら（２００２年）Nature Biotechnol. ２０巻：１３５～１４１頁、Paboら（２００１年）Ann. Rev. Biochem. ７０巻：３１３～３４０頁、Isalanら（２００１年）Nature Biotechnol. １９巻：６５６～６６０頁、Segalら（２００１年）Curr. Opin. Biotechnol. １２巻：６３２～６３７頁、Chooら（２０００年）Curr. Opin. Struct. Biol. １０巻：４１１～４１６頁を参照。工学技術で作製されたジンクフィンガ

ー結合ドメインまたはＴＡＬＥタンパク質は、天然に存在するタンパク質と比較して、新規の結合特異性を有することができる。工学技術方法には、合理的な設計および様々な種類の選択が限定されずに含まれる。合理的な設計には、例えば、トリプレット（または、クアドルプレット）ヌクレオチド配列および個々の、ジンクフィンガーまたはＴＡＬＥアミノ酸配列を含むデータベースを使用することが含まれ、ここで、各トリプレットまたはクアドルプレットヌクレオチド配列は、特定のトリプレットまたはクアドルプレット配列に結合するジンクフィンガーまたはＴＡＬＥ反復単位の１つまたは複数のアミノ酸配列と会合している。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第６，４５３，２４２号および第６，５３４，２６１号を参照。

【０２０５】

標的部位の選択；および融合タンパク質（および、それをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法は当業者に公知であり、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれている、米国特許第７，８８８，１２１号および第８，４０９，８６１号に詳細に記載されている。

【０２０６】

さらに、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメイン、ＴＡＬＥおよび／またはマルチフィンガーのジンクフィンガータンパク質は、例えば５またはそれより多くのアミノ酸長のリンカー（例えば、ＴＧＥＫＰ（配列番号４１）、ＴＧＧＱＲＰ（配列番号４２）、ＴＧＱＫＰ（配列番号４３）、および／またはＴＧＳＱＫＰ（配列番号４４）を含む、任意の適するリンカー配列を使用して一緒に連結することができる。長さが６またはそれより多くのアミノ酸の例示的なリンカー配列については、例えば、米国特許第６，４７９，６２６号；同第６，９０３，１８５号；および同第７，１５３，９４９号を参照のこと。本明細書に記載されるタンパク質には、タンパク質の個々のジンクフィンガーの間の適するリンカーの任意の組合せを含めることができる。米国特許第８，７７２，４５３号も参照されたい。

【０２０７】

それによりＺＦＮ、ＴＡＬＥＮおよび／またはメガヌクレアーゼなどのヌクレアーゼは、任意のＤＮＡ結合ドメインおよび任意のヌクレアーゼ（切断）ドメイン（切断ドメイン、切断半ドメイン）を含むことができる。上記したように、切断ドメインは、ＤＮＡ結合ドメインに対して異種であってもよく、例として、ジンクフィンガーもしくはＴＡＬエフェクターＤＮＡ結合ドメインとヌクレアーゼ由来切断ドメイン、またはメガヌクレアーゼＤＮＡ結合ドメインと異なるヌクレアーゼ由来の切断ドメインである。異種切断ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインを誘導することができる例示的なエンドヌクレアーゼとしては、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、２００２～２００３年のカタログ、New England Biolabs、Beverly、MA；およびBelfortら（１９９７年）Nucleic Acids Res.２５巻：３３７９～３３８８頁を参照のこと。ＤＮＡを切断するさらなる酵素は公知である（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ；リョクトウヌクレアーゼ；膵臓のＤＮアーゼＩ；ミクロコッカルヌクレアーゼ；酵母ＨＯエンドヌクレアーゼ；Linnら（編）Nucleases、Cold Spring Harbor Laboratory Press、１９９３年も参照）。これらの酵素の１つまたは複数（または、それらの機能的断片）は、切断ドメインおよび切断半ドメインの供給源として使用することができる。

【０２０８】

同様に、上記のように、切断活性のために二量体化を必要とする切断半ドメインは、任意のヌクレアーゼまたはその部分に由来することができる。一般に、２つの融合タンパク質が切断半ドメインを含む場合は、該２つの融合タンパク質が切断のために必要とされる。あるいは、２つの切断半ドメインを含む単一のタンパク質を使用することができる。２つの切断半ドメインは同じエンドヌクレアーゼ（または、その機能的断片）に由来することができ、または、各切断半ドメインは異なるエンドヌクレアーゼ（または、その機能的断片）に由来することができる。さらに、２つの融合タンパク質のそれらのそれぞれの標

的部位への結合が、切断半ドメインを、お互いとの空間配向に置き、切断半ドメインが、例えば二量体化によって機能的切断ドメインを形成することを可能にするように、２つの融合タンパク質のための標的部位が、好ましくはお互いに関して配置される。したがって、ある特定の実施形態では、標的部位の近端は、５～８ヌクレオチドまたは１５～１８ヌクレオチド分離している。しかし、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、２つの標的部位の間に介入することができる（例えば、２から５０ヌクレオチド対、またはそれより多い）。一般に、切断部位は標的部位の間にあるが、切断部位から１～５０塩基対の間（または、その間の任意の値）、１～１００塩基対の間（または、その間の任意の値）、１００～５００塩基対の間（または、その間の任意の値）、５００～１０００塩基対の間（または、その間の任意の値）またはさらには１ｋｂ超を含む、切断部位から１またはそれより大きいキロベース離れて存在することができる。

【０２０９】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は多くの種に存在し、ＤＮＡ（認識部位で）に配列特異的に結合すること、および結合部位またはその近くでＤＮＡを切断することが可能である。ある特定の制限酵素（例えば、ＩＩＳ型）は、認識部位から離れた部位でＤＮＡを切断し、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを有する。例えば、ＩＩＳ型酵素Ｆｏｋ　Ｉは、１本の鎖の上のその認識部位から９ヌクレオチドの位置、および他の鎖の上のその認識部位から１３ヌクレオチドの位置で、ＤＮＡの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第５，３５６，８０２号；第５，４３６，１５０号および第５，４８７，９９４号；ならびにLiら（１９９２年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ８９巻：４２７５～４２７９頁；Liら（１９９３年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９０巻：２７６４～２７６８頁；Kimら（１９９４ａ）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９１巻：８８３～８８７頁；Kimら（１９９４ｂ）J. Biol. Chem.２６９巻：３１，９７８～３１，９８２頁を参照のこと。したがって、一実施形態では、融合タンパク質は、工学技術で作製されてもされなくてもよい、少なくとも１つのＩＩＳ型制限酵素からの切断ドメイン（または、切断半ドメイン）、および１つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメインを含む。

【０２１０】

その切断ドメインは結合ドメインと分離できる例示的なＩＩＳ型制限酵素は、ＦｏｋＩである。この特定の酵素は、ダイマーとして活性である。Bitinaiteら（１９９８年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９５巻：１０，５７０～１０，５７５頁。したがって、本開示のために、開示される融合タンパク質で使用されるＦｏｋ　Ｉ酵素の部分は、切断半ドメインと考えられる。したがって、ジンクフィンガー－Ｆｏｋ　Ｉ融合物を使用した標的化二本鎖切断および／または細胞配列の標的化置き換えのために、各々Ｆｏｋ　Ｉ切断半ドメインを含む２つの融合タンパク質を、触媒活性切断ドメインを再構成するために使用することができる。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメインおよび２つのＦｏｋ　Ｉ切断半ドメインを含有する単一のポリペプチド分子を使用することもできる。ジンクフィンガー－Ｆｏｋ　Ｉ融合物を使用した標的化切断および標的化配列変更のパラメータは、この開示の他の場所で提供される。

【０２１１】

切断ドメインまたは切断半ドメインは、切断活性を保持する、または多量体化（例えば、二量体化）して機能的切断ドメインを形成する能力を保持するタンパク質の任意の部分であってよい。

【０２１２】

例示的なＩＩＳ型制限酵素は、その全体が本明細書に組み入れられる、国際公開ＷＯ０７／０１４２７５に記載される。さらなる制限酵素も分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを含有し、これらは本開示によって企図される。例えば、Robertsら（２００３年）Nucleic Acids Res.３１巻：４１８～４２０頁を参照のこと。

【０２１３】

ある特定の実施形態では、切断ドメインは、以下に示す配列を有する結晶構造１ＦＯＫ

．ｐｄｂおよび２ＦＯＫ．ｐｄｂを生成するために使用されるＦｏｋＩ切断ドメインを含む（Wahら（１９９７年）Nature　３８８巻：９７～１００頁を参照のこと）：

【化１６】

野生型 *Fok*I 切断半ドメイン（配列番号 40）

QLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRG
KHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNK
HINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIG
GEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF

【０２１４】

ＦｏｋＩに由来する切断半ドメインは、配列番号４０に示されているアミノ酸残基の１つまたは複数に変異を含むことができる。変異は、置換（野生型アミノ酸残基の異なる残基での置換）、挿入（１つまたは複数のアミノ酸残基の挿入）および／または欠失（１つまたは複数のアミノ酸残基の欠失）を含む。ある特定の実施形態では、残基４１４～４２６、４４３～４５０、４６７～４８８、５０１～５０２、および／または５２１～５３１（配列番号４０に対して番号付けされる）の１つまたは複数を変異させ、これは、これらの残基が、Millerら（（２００７年）Nat　Biotechnol　２５巻：７７８～７８４頁）に記載されているその標的部位に結合したＺＦＮの分子モデルのＤＮＡ骨格の近くに位置するからである。ある特定の実施形態では、４１６位、４２２位、４４７位、４４８位、および／または５２５位の１つまたは複数の残基を変異させる。ある特定の実施形態では、変異は、野生型残基の異なる残基、例えば、セリン（Ｓ）残基での置換を含む。例えば、米国特許出願第１５／６８５，５８０号を参照のこと。

【０２１５】

ある特定の実施形態では、切断ドメインは、例えば、その全ての開示は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第７，９１４，７９６号；同第８，０３４，５９８号および同第８，６２３，６１８号ならびに米国特許出願公開第２０１１０２０１０５５号に記載される通り、ホモ二量体化を最小にするかまたは防止する１つまたは複数の工学技術で作製された切断半ドメイン（二量体化ドメイン変異体とも呼ばれる）を含む。ＦｏｋＩの４４６位、４４７位、４７９位、４８３位、４８４位、４８６位、４８７位、４９０位、４９１位、４９６位、４９８位、４９９位、５００位、５３１位、５３４位、５３７位、および５３８位（配列番号４０に対して番号付けされる）のアミノ酸残基は、全て、ＦｏｋＩ切断半ドメインの二量体化に影響を及ぼすための標的である。変異は、ＦｏｋＩと相同な天然の制限酵素において見出される残基に対する変異を含むことができる。好ましい実施形態では、４１６位、４２２位、４４７位、４４８位および／または５２５位（配列番号４０に対して番号付けされる）における変異は、正に荷電したアミノ酸の非荷電または負に荷電したアミノ酸での置き換えを含む。別の実施形態では、工学技術で作製された切断半ドメインは、全て配列番号４０に対して番号付けされる、１つまたは複数のアミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５の変異に加えて、アミノ酸残基４９９、４９６および４８６に変異を含む。

【０２１６】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、例えば、米国特許第７，９１４，７９６号；同第８，０３４，５９８号；同第８，９６１，２８１号および同第８，６２３，６１８号；米国特許公開第２００８０１３１９６２号および同第２０１２００４０３９８号に記載されている絶対ヘテロダイマー（ｏｂｌｉｇａｔｅ　ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒ）を形成する、ＦｏｋＩの工学技術で作製された切断半ドメインを含む。したがって、好ましい一実施形態では、本発明は、工学技術で作製された切断半ドメインが、４１６位、４２２位、４４７位、４４８位、または５２５位（配列番号１に対して番号付けされる）における１つまたは複数の変異に加えて、４８６位の野生型Ｇｌｎ（Ｑ）残基がＧｌｕ（Ｅ）残基で置き換えられており、４９９位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｅｕ（Ｌ）残基で置き換えられており、４９６位の野生型Ａｓｎ（Ｎ）残基がＡｓｐ（Ｄ）またはＧｌ

ｕ（Ｅ）残基で置き換えられている（「ＥＬＤ」または「ＥＬＥ」）ポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。別の実施形態では、工学技術で作製された切断半ドメインは、野生型ＦｏｋＩ切断半ドメインに由来し、アミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５における１つまたは複数の変異に加えて、野生型ＦｏｋＩ（配列番号１）に対して番号付けされるアミノ酸残基４９０、５３８および５３７に変異を含む。好ましい実施形態では、本発明は、工学技術で作製された切断半ドメインが、４１６位、４２２位、４４７位、４４８位、または５２５位における１つまたは複数の変異に加えて、４９０位の野生型Ｇｌｕ（Ｅ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基で置き換えられており、５３８位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基で置き換えられており、５３７位の野生型Ｈｉｓ（Ｈ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基またはＡｒｇ（Ｒ）残基で置き換えられている（「ＫＫ」または「ＫＫＲ」）（参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，９６２，２８１号を参照のこと）ポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。例えば、その開示は全ての目的のために参照によりその全体が組み込まれる、米国特許第７，９１４，７９６号；同第８，０３４，５９８号および同第８，６２３，６１８号を参照のこと。他の実施形態では、工学技術で作製された切断半ドメインは、「Ｓｈａｒｋｅｙ」変異および／または「Ｓｈａｒｋｅｙ」の一部の変異を含む（Guoら、（２０１０年）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４００巻（１号）：９６～１０７頁を参照のこと）。

【０２１７】

別の実施形態では、工学技術で作製された切断半ドメインは、野生型ＦｏｋＩ切断半ドメインに由来し、アミノ酸残基４１６、４２２、４４７、４４８、または５２５における１つまたは複数の変異に加えて、野生型ＦｏｋＩに対して番号付けされるアミノ酸残基４９０、および５３８における変異を含む。好ましい実施形態では、本発明は、工学技術で作製された切断半ドメインが、４１６位、４２２位、４４７位、４４８位、または５２５位における１つまたは複数の変異に加えて、４９０位の野生型Ｇｌｕ（Ｅ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基で置き換えられており、５３８位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｙｓ（Ｋ）残基で置き換えられている（「ＫＫ」）ポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、工学技術で作製された切断半ドメインが、４１６位、４２２位、４４７位、４４８位、または５２５位における１つまたは複数の変異に加えて、４８６位の野生型Ｇｌｎ（Ｑ）残基がＧｌｕ（Ｅ）残基で置き換えられており、４９９位の野生型Ｉｌｅ（Ｉ）残基がＬｅｕ（Ｌ）残基で置き換えられている（「ＥＬ」）（参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，０３４，５９８号を参照のこと）ポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。

【０２１８】

一態様では、本発明は、工学技術で作製された切断半ドメインが、ＦｏｋＩ触媒ドメインの３８７位、３９３位、３９４位、３９８位、４００位、４０２位、４１６位、４２２位、４２７位、４３４位、４３９位、４４１位、４４７位、４４８位、４６９位、４８７位、４９５位、４９７位、５０６位、５１６位、５２５位、５２９位、５３４位、５５９位、５６９位、５７０位、５７１位の１つまたは複数における野生型アミノ酸残基が変異したポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、ＦｏｋＩドメインにおけるこれらの変異により、ＦｏｋＩドメインとＤＮＡ骨格に含有されるリン酸との間の非特異的相互作用が防止されるまたは減少する。一部の実施形態では、１つまたは複数の変異により、野生型アミノ酸が正に荷電した残基から中性残基または負に荷電した残基に変更される。これらの実施形態のいずれにおいても、記載されている変異体は、１つまたは複数のさらなる変異を含むＦｏｋＩドメインでも作製される。好ましい実施形態では、これらのさらなる変異は、二量体化ドメイン、例えば、４９９位、４９６位、４８６位、４９０位、５３８位および５３７位におけるものである。

【０２１９】

あるいは、ヌクレアーゼを、いわゆる「スプリット酵素」技術を使用して核酸標的部位にｉｎ　ｖｉｖｏで組み立てることができる（例えば、米国特許出願公開第２００９００６８１６４号を参照のこと）。そのようなスプリット酵素の構成成分は、別個の発現構築

物の上で発現させることができるか、または１つのオープンリーディングフレームの中に連結させることもでき、ここで、個々の構成成分は、例えば、自己切断２ＡペプチドまたはＩＲＥＳ配列によって分離される。構成成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメインまたはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであってよい。

【０２２０】

ヌクレアーゼ（例えば、ＺＦＮおよび／またはＴＡＬＥＮ）は、使用前に、例えば米国特許第８，５６３，３１４号に記載されるとおりに、酵母をベースとした染色体系において、活性についてスクリーニングすることができる。

【０２２１】

ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を含む。系のＲＮＡ構成成分をコードするＣＲＩＳＰＲ（規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列）遺伝子座、およびタンパク質をコードするＣａｓ（ＣＲＩＳＰＲ関連）遺伝子座（Jansenら、２００２年、Mol. Microbiol.４３巻：１５６５～１５７５頁；Makarovaら、２００２年、Nucleic Acids Res.３０巻：４８２～４９６頁；Makarovaら、２００６年、Biol. Direct １巻：７頁；Haftら、２００５年、PLoS Comput. Biol.１巻：ｅ６０頁）が、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子の組合せ、ならびにＣＲＩＳＰＲ媒介核酸切断の特異性をプログラムすることが可能な非コードＲＮＡエレメントを含有する。

【０２２２】

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲは最も良く特徴付けられた系の１つであり、４つの逐次的ステップで標的化ＤＮＡ二本鎖切断を実行する。先ず、２つの非コードＲＮＡ、プレｃｒＲＮＡアレイおよびｔｒａｃｒＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座から転写される。第２に、ｔｒａｃｒＲＮＡはプレｃｒＲＮＡのリピート領域にハイブリダイズし、個々のスペーサー配列を含有する成熟ｃｒＲＮＡへのプレｃｒＲＮＡのプロセシングを媒介する。第３に、成熟ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体は、ｃｒＲＮＡ上のスペーサーとプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の隣の標的ＤＮＡ上のプロトスペーサーとの間のワトソン－クリック塩基対合を通して、Ｃａｓ９を標的ＤＮＡに向けるが、これは、標的認識のためのさらなる要件である。最後に、Ｃａｓ９は標的ＤＮＡの切断を媒介して、プロトスペーサー内に二本鎖切断を生じさせる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の活性は、３つのステップで構成される：（ｉ）「適応」と呼ばれるプロセスにおける、将来の攻撃を防止するためのＣＲＩＳＰＲアレイへのエイリアンＤＮＡ配列の挿入、（ｉｉ）関連するタンパク質の発現、ならびにアレイの発現およびプロセシング、続いて（ｉｉｉ）エイリアン核酸に対するＲＮＡ媒介干渉。したがって、細菌細胞では、いわゆる「Ｃａｓ」タンパク質のいくつかはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の天然の機能に関与し、エイリアンＤＮＡの挿入などの機能における役割を果たすなどである。

【０２２３】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１系が使用される。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｓｐｐにおいて同定されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１系は、ヒト細胞において堅牢なＤＮＡ干渉を媒介するクラス２ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系である。機能は保存されているが、Ｃｐｆ１とＣａｓ９とは、それらのガイドＲＮＡおよび基質特異性を含む多くの態様において異なっている（Fagerlundら、（２０１５年）Genom Bio １６巻：２５１頁を参照）。Ｃａｓ９とＣｐｆ１タンパク質との間の主な差異は、Ｃｐｆ１がｔｒａｃｒＲＮＡを利用せず、そのためｃｒＲＮＡのみを必要とすることである。ＦｎＣｐｆ１ ｃｒＲＮＡは、４２～４４ヌクレオチド長（１９ヌクレオチド反復および２３～２５ヌクレオチドスペーサー）であり、二次構造を保持する配列変化を許容する単一のステムループを含有する。さらにＣｐｆ１ ｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９によって必要とされる工学技術で作製されたｓｇＲＮＡより約１００ヌクレオチド超有意に短く、ＦｎＣｐｆｌについてのＰＡＭ要件は置換鎖（displaced strand）上の５’－ＴＴＮ－３’および５’－ＣＴＡ－３’である。Ｃａｓ９およびＣｐｆ１の両方は、標的ＤＮＡ中に二重鎖切断を作製するが、Ｃａ

ｓ９はガイドＲＮＡのシード配列内に平滑末端切断を作製するためにそのＲｕｖＣ様ドメインおよびＨＮＨ様ドメインを使用する一方で、Ｃｐｆ１はシードの外側に互い違いの切断を産生するためにＲｕｖＣ様ドメインを使用する。Ｃｐｆ１が重要なシード領域から離れて、互い違いの切断を作製することから、ＮＨＥＪは標的部位を破壊せず、したがってＣｐｆ１が、所望のＨＤＲ組換え事象が生じるまで同じ部位を切断し続けることができることを確実にする。それにより、本明細書に記載される方法および組成物において、用語「Ｃａｓ」がＣａｓ９およびＣｆｐ１タンパク質の両方を含むことが理解される。それにより、本明細書において使用される「ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム」は、ヌクレアーゼおよび／または転写因子システムの両方を含む、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓおよび／またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｆｐ１システムの両方を指す。

【０２２４】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、天然に存在するＣａｓタンパク質の「機能的誘導体」であってよい。天然配列ポリペプチドの「機能的誘導体」は、天然配列のポリペプチドと共通した定性的生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」には、天然配列の断片、ならびに天然配列ポリペプチドの誘導体およびその断片が限定されずに含まれるが、ただし、それらは対応する天然配列ポリペプチドと共通する生物学的活性を有する。本明細書で企図される生物学的活性は、ＤＮＡ基質を断片に加水分解する機能的誘導体の能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリアント、共有結合性改変および誘導体Ｃａｓタンパク質などのその融合物を包含する。Ｃａｓポリペプチドの適する誘導体またはその断片には、Ｃａｓタンパク質の変異体、融合物、共有結合性改変またはそれらの断片が限定されずに含まれる。Ｃａｓタンパク質またはその断片、ならびにＣａｓタンパク質の誘導体またはその断片を含むＣａｓタンパク質は、細胞から得ることができるか、または化学的に合成するか、もしくはこれらの２つの手順の組合せによって得ることができる。細胞は、Ｃａｓタンパク質を天然に産生する細胞、または、Ｃａｓタンパク質を天然に産生し、内因性Ｃａｓタンパク質をより高い発現レベルで産生するように遺伝子操作されているか、または、内因性Ｃａｓと同じであるか異なるＣａｓをコードする、外因的に導入される核酸からＣａｓタンパク質を産生するように遺伝子操作されている細胞であってよい。一部の場合には、細胞はＣａｓタンパク質を天然に産生せず、Ｃａｓタンパク質を産生するように遺伝子操作される。一部の実施形態ではＣａｓタンパク質は、ＡＡＶベクターを介した送達のための小さなＣａｓ９オルソログである（Ranら（２０１５年）Nature　５１０巻、１８６頁）。

【０２２５】

ヌクレアーゼ（複数可）は、標的部位で１つまたは複数の２本鎖および／または１本鎖切断を作製することができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼは、触媒として不活性な切断ドメインを含む（例えば、ＦｏｋＩおよび／またはＣａｓタンパク質）。例えば、米国特許第９，２００，２６６号、第８，７０３，４８９号およびGuillingerら（２０１４年）Nature Biotech. ３２巻（６号）：５７７～５８２頁を参照。触媒として不活性な切断ドメインは、触媒として活性なドメインと組み合わせて１本鎖切断を作製するためのニッカーゼとして作用することができる。したがって、２つのニッカーゼは特異的領域において２本鎖切断を作製するために組み合わせて使用することができる。さらなるニッカーゼも、当技術分野において公知であり、例えばMcCafferyら（２０１６年）Nucleic Acids Res. ４４巻（２号）:ｅ１１頁. doi: 10.1093/nar/gkv878. Epub 2015 Oct 19において公知である。

【０２２６】

化合物

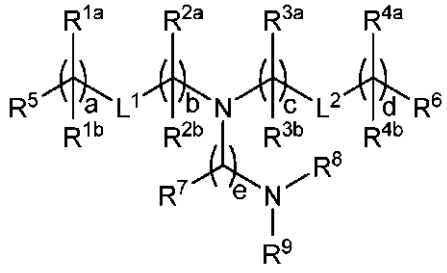
ある態様では、本発明は、中性脂質、荷電脂質、ステロイドおよび／またはポリマーとコンジュゲートした脂質などの他の脂質構成成分と組み合わせて、オリゴヌクレオチドを有する脂質ナノ粒子を形成することが可能なカチオン性脂質化合物を含むＬＮＰを含む。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの脂質ナノ粒子によりオリゴヌクレオチドが血清中での分解から遮蔽され、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおける

オリゴヌクレオチドの細胞への有効な送達がもたらされると考えられる。

【０２２７】

一実施形態では、ＬＮＰは、遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドおよび式（Ｉ）

【化１７】



(I)

（式中、

L^1およびL^2は、それぞれ独立に、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－または炭素－炭素二重結合であり；

R^{1a}およびR^{1b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{1a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{1b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{1b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{2a}およびR^{2b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{2a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{2b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{2b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{3a}およびR^{3b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{3a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{3b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{3b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{4a}およびR^{4b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{4a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{4b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{4b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^5およびR^6は、それぞれ独立に、メチルまたはシクロアルキルであり；

R^7は、各出現につき、独立に、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり；

R^8およびR^9は、それぞれ独立に、非置換C_1～C_{12}アルキルである；またはR^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に、窒素原子を１つ含む５員、６員または７員複素環式環を形成しており；

ａおよびｄは、それぞれ独立に、０から２４までの整数であり；

ｂおよびｃは、それぞれ独立に、１から２４までの整数であり；

ｅは、１または２である）

の構造を有する脂質化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体を含む。

【０２２８】

式（Ｉ）化合物のある特定の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}またはR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_{12}アルキルである、またはL^1もしくはL^2の少なくとも１つは、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－もしくは－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。他の実施形態では、R^{1a}およびR^{1b}は、ａが６である場合イソプロピルではない、またはａが８である場合ｎ－ブチルではない。

【０２２９】

なおさらなる実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}またはR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_{12}アルキルである、またはL^1もしくはL^2の少なくとも１つは、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－もしくは－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－であり、R^{1a}およびR^{1b}は、ａが６である場合イソプロピルではない、またはａが８である場合ｎ－ブチルではない。

【０２３０】

式Ｉの化合物では、L^1またはL^2のいずれか一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－または炭素－炭素二重結合であってよい。L^1およびL^2は、それぞれ－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であってよい、またはそれぞれ炭素－炭素二重結合であってよい。

【０２３１】

式Ｉの一部の実施形態では、L^1またはL^2の一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。式Ｉの他の実施形態では、L^1およびL^2はどちらも－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。

【０２３２】

式Ｉの一部の実施形態では、L^1またはL^2の一方は－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。式Ｉの他の実施形態では、L^1およびL_2はどちらも－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０２３３】

式Ｉの一部の実施形態では、L^1またはL^2の一方は炭素－炭素二重結合である。式Ｉの他の実施形態では、L^1およびL^2はどちらも炭素－炭素二重結合である。

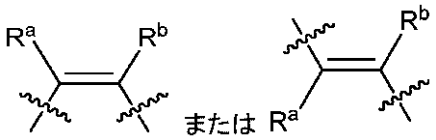
【０２３４】

式Ｉのさらに他の実施形態では、L^1またはL^2の一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であり、L^1またはL^2の他方は－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。式Ｉのその他の実施形態では、L^1またはL^2の一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－であり、L^1またはL^2の他方は炭素－炭素二重結合である。式Ｉのさらにその他の実施形態では、L^1またはL^2の一方は－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－であり、L^1またはL^2の他方は炭素－炭素二重結合である。

【０２３５】

本開示全体を通して使用される「炭素－炭素」二重結合は、以下の構造：

【化１８】



（式中、R^aおよびR^bは、各出現につき、独立に、Ｈまたは置換基である）

のうちの１つを指すことが理解される。

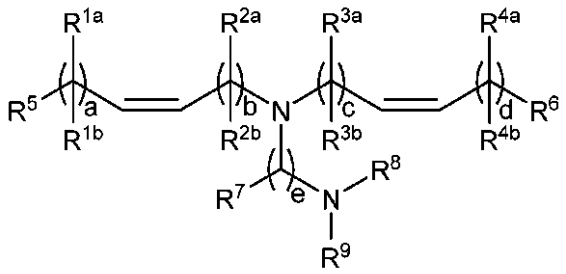
【０２３６】

例えば、一部の実施形態では、R^aおよびR^bは、各出現につき、独立に、Ｈ、C_1～C_{12}アルキルまたはシクロアルキル、例えば、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルである。

【０２３７】

式Ｉの他の実施形態では、脂質化合物は、以下の構造（Ｉａ）：

【化１９】



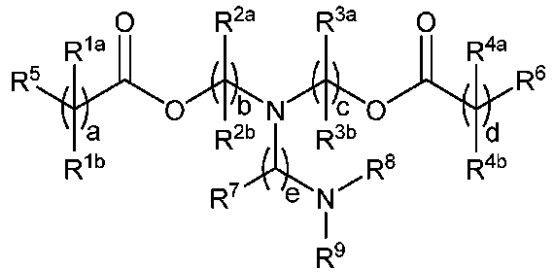
(Ia)

を有する。

【０２３８】

式Ｉの他の実施形態では、脂質化合物は、以下の構造（Ｉｂ）：

【化２０】



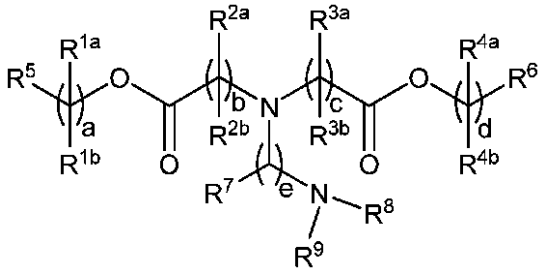
(Ib)

を有する。

【０２３９】

式Ｉのさらに他の実施形態では、脂質化合物は、以下の構造（Ｉｃ）：

【化２１】



(Ic)

を有する。

【０２４０】

式Ｉのある特定の実施形態では、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、それぞれ独立に、２から１２までの整数または４から１２までの整数である。式Ｉの他の実施形態では、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、それぞれ独立に、８から１２までまたは５から９までの整数である。式Ｉの一部のある特定の実施形態では、ａは０である。式Ｉの一部の実施形態では、ａは１である。式Ｉの他の実施形態では、ａは２である。式Ｉのその他の実施形態では、ａは３である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ａは４である。式Ｉの一部の実施形態では、ａは５である。式Ｉの他の実施形態では、ａは６である。式Ｉのその他の実施形態では、ａは７である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ａは８である。式Ｉの一部の実施形態では、ａは９である。式Ｉの他の実施形態では、ａは１０である。式Ｉのその他の実施形態では、ａは１１である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ａは１２である。式Ｉの一部の実施形態では、ａは１３である。式Ｉの他の実施形態では、ａは１４である。式Ｉのその他の実施形態では、ａは１５である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ａは１６である。

【０２４１】

式Ｉの一部の実施形態では、ｂは１である。式Ｉの他の実施形態では、ｂは２である。式Ｉのその他の実施形態では、ｂは３である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｂは４である。式Ｉの一部の実施形態では、ｂは５である。式Ｉの他の実施形態では、ｂは６である。式Ｉのその他の実施形態では、ｂは７である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｂは８である。式Ｉの一部の実施形態では、ｂは９である。式Ｉの他の実施形態では、ｂは１０である。式Ｉのその他の実施形態では、ｂは１１である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｂは１２である。式Ｉの一部の実施形態では、ｂは１３である。式Ｉの他の実施形態では、ｂは１４である。式Ｉのその他の実施形態では、ｂは１５である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｂは１６である。

【０２４２】

式Ｉの一部の実施形態では、ｃは１である。式Ｉの他の実施形態では、ｃは２である。式Ｉのその他の実施形態では、ｃは３である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｃは４で

ある。式Ｉの一部の実施形態では、ｃは５である。式Ｉの他の実施形態では、ｃは６である。式Ｉのその他の実施形態では、ｃは７である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｃは８である。式Ｉの一部の実施形態では、ｃは９である。式Ｉの他の実施形態では、ｃは１０である。式Ｉのその他の実施形態では、ｃは１１である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｃは１２である。式Ｉの一部の実施形態では、ｃは１３である。式Ｉの他の実施形態では、ｃは１４である。式Ｉのその他の実施形態では、ｃは１５である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｃは１６である。

【０２４３】

式Ｉの一部のある特定の実施形態では、ｄは０である。式Ｉの一部の実施形態では、ｄは１である。式Ｉの他の実施形態では、ｄは２である。式Ｉのその他の実施形態では、ｄは３である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｄは４である。式Ｉの一部の実施形態では、ｄは５である。式Ｉの他の実施形態では、ｄは６である。式Ｉのその他の実施形態では、ｄは７である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｄは８である。式Ｉの一部の実施形態では、ｄは９である。式Ｉの他の実施形態では、ｄは１０である。式Ｉのその他の実施形態では、ｄは１１である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｄは１２である。式Ｉの一部の実施形態では、ｄは１３である。式Ｉの他の実施形態では、ｄは１４である。式Ｉのその他の実施形態では、ｄは１５である。式Ｉのさらに他の実施形態では、ｄは１６である。

【０２４４】

式Ｉの一部の他の種々の実施形態では、ａとｄは同じである。式Ｉの一部の他の実施形態では、ｂとｃは同じである。式Ｉの一部の他の特定の実施形態では、ａとｄは同じであり、ｂとｃは同じである。

【０２４５】

ａとｂの合計およびｃとｄの合計は、所望の特性を有する脂質を得るために変動させることができる因子である。式Ｉの一実施形態では、ａおよびｂは、それらの合計が１４から２４の範囲の整数になるように選択される。式Ｉの他の実施形態では、ｃおよびｄは、それらの合計が１４から２４の範囲の整数になるように選択される。式Ｉのさらなる実施形態では、ａとｂの合計およびｃとｄの合計は同じである。例えば、式Ｉの一部の実施形態では、ａとｂの合計およびｃとｄの合計は、どちらも１４から２４の範囲であり得る同じ整数である。式Ｉのなおその他の実施形態では、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、ａとｂの合計およびｃとｄの合計が１２またはそれよりも大きくなるように選択される。

【０２４６】

式Ｉの一部の実施形態では、ｅは１である。式Ｉの他の実施形態では、ｅは２である。

【０２４７】

R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}における置換基は、特に限定されない。式Ｉのある特定の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}は、各出現につき、Ｈである。式Ｉのある特定の他の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_{12}アルキルである。式Ｉのある特定の他の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_8アルキルである。式Ｉのある特定の他の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_6アルキルである。式Ｉの前述の実施形態の一部では、C_1～C_8アルキルは、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０２４８】

式Ｉのある特定の実施形態では、R^{1a}、R^{1b}、R^{4a}およびR^{4b}は、各出現につき、C_1～C_{12}アルキルである。

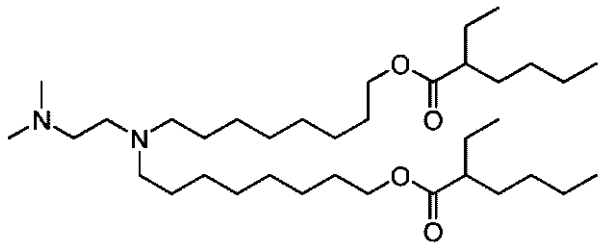
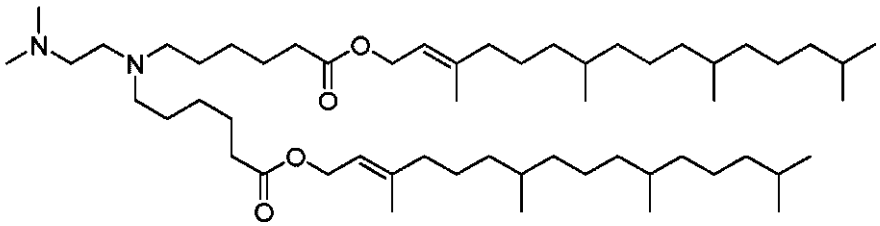
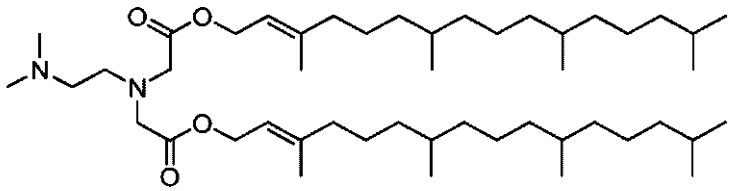
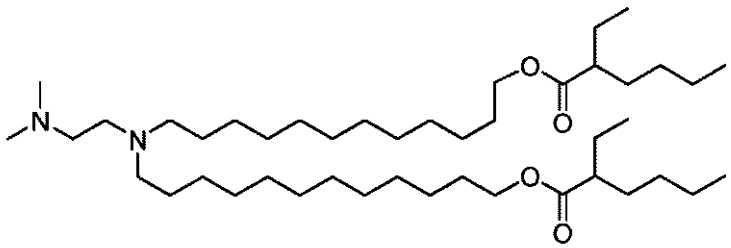
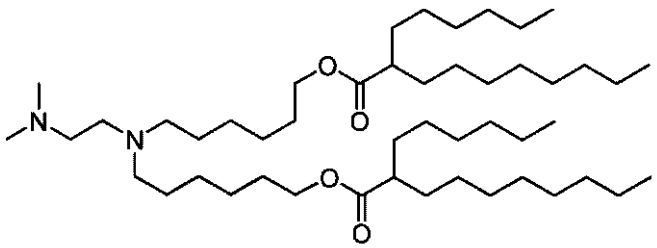
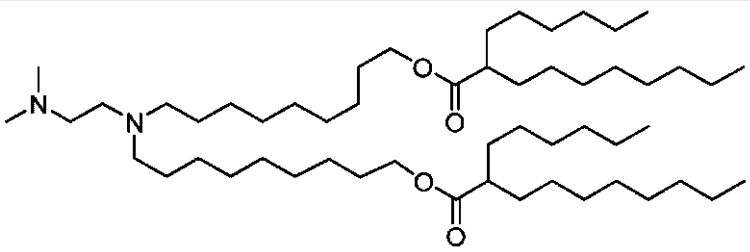
【０２４９】

式Ｉのさらなる実施形態では、R^{1b}、R^{2b}、R^{3b}およびR^{4b}の少なくとも１つは、Ｈである、またはR^{1b}、R^{2b}、R^{3b}およびR^{4b}は、各出現につき、Ｈである。

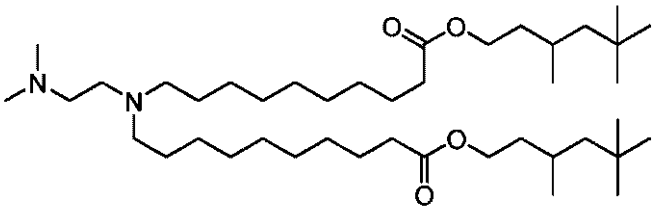
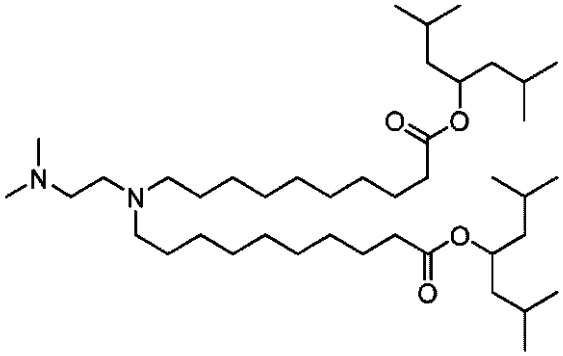
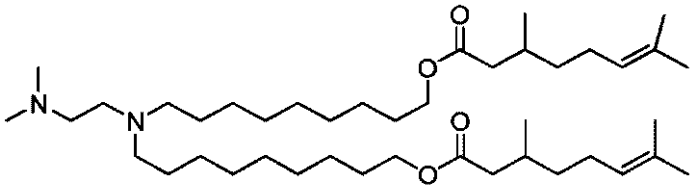
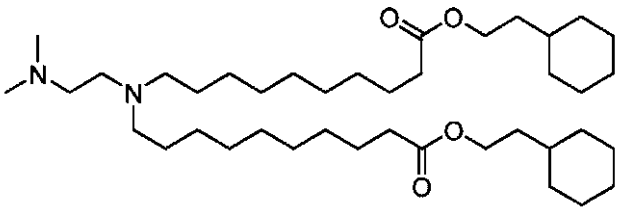
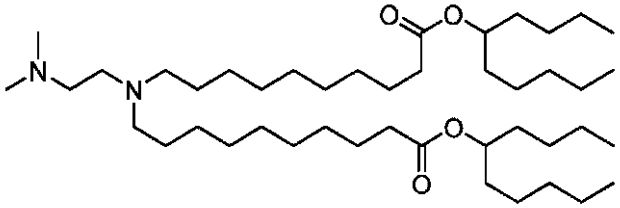
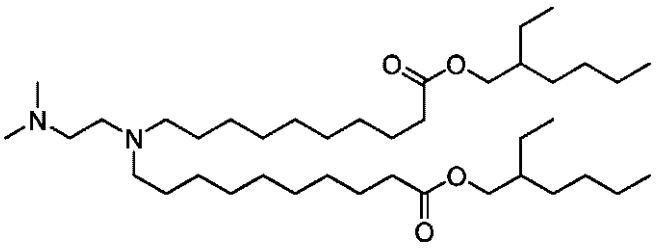
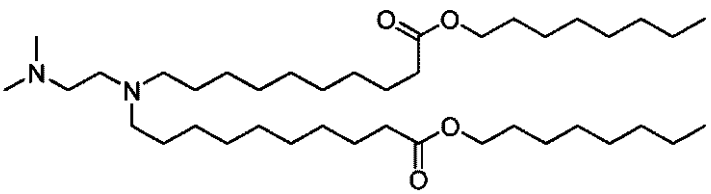
【０２５０】
式Ｉのある特定の実施形態では、R^{1b}は、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{1b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成している。式Ｉの他の実施形態では、R^{4b}は、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{4b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成している。
【０２５１】
R^5およびR^6における置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。式Ｉのある特定の実施形態では、R^5またはR^6の一方または両方が、メチルである。式Ｉのある特定の他の実施形態では、R^5またはR^6の一方または両方が、シクロアルキル、例えば、シクロヘキシルである。これらの実施形態では、シクロアルキルは置換されていても置換されていなくてもよい。ある特定の他の実施形態では、シクロアルキルはC_1～C_{12}アルキル、例えば、ｔｅｒｔ－ブチルで置換されている。
【０２５２】
R^7における置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。式Ｉのある特定の実施形態では、少なくとも１つのR^7は、Ｈである。一部の他の実施形態では、R^7は、各出現につき、Ｈである。式Ｉのある特定の他の実施形態では、R^7は、C_1～C_{12}アルキルである。
【０２５３】
式Ｉのある特定の他の実施形態では、R^8またはR^9の一方は、メチルである。他の実施形態では、R^8およびR^9の両方がメチルである。
【０２５４】
式Ｉの一部の異なる実施形態では、R^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に５員、６員または７員複素環式環を形成している。前述の一部の実施形態では、R^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に５員複素環式環、例えば、ピロリジニル環を形成している。
【０２５５】
種々の異なる実施形態では、ＬＮＰは、以下の表Ｉに記載の構造の１つを有する化合物を含む。

【表１－１】

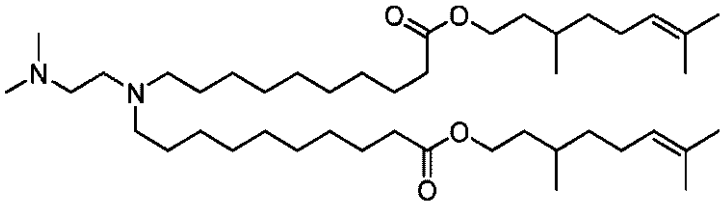
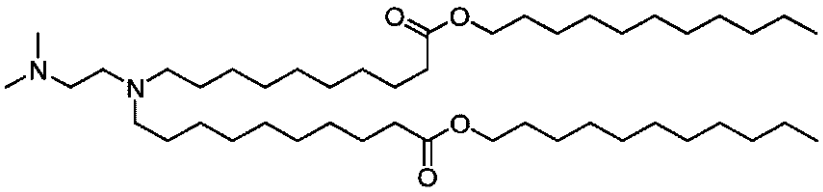
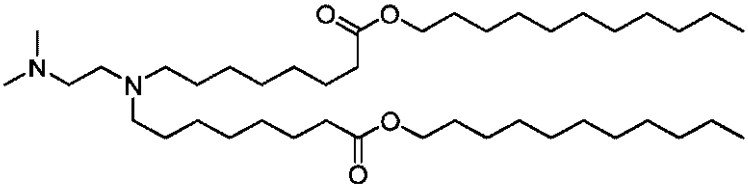
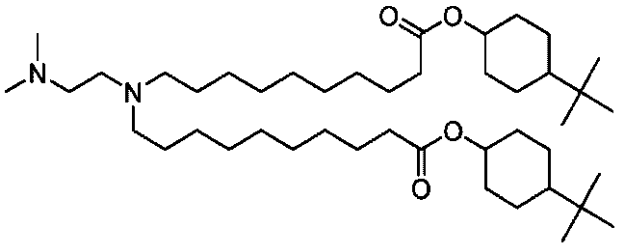
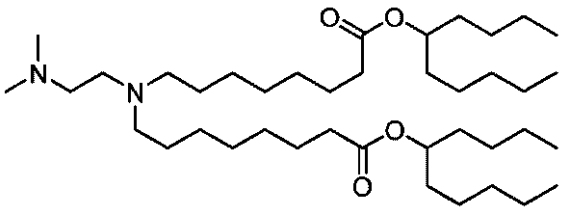
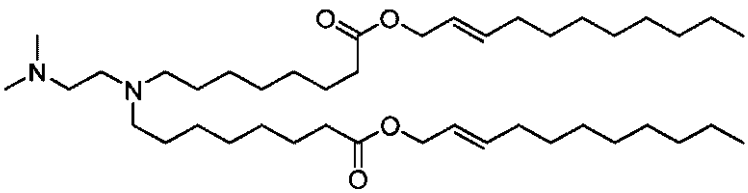
表I:式(I)の代表的な脂質化合物

番号	構造	調製方法*
I-1		B
I-2		A
I-3		A
I-4		B
I-5		B
I-6		B

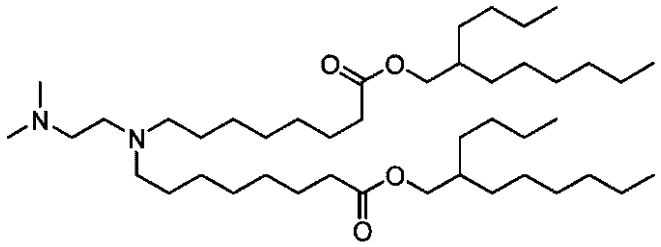
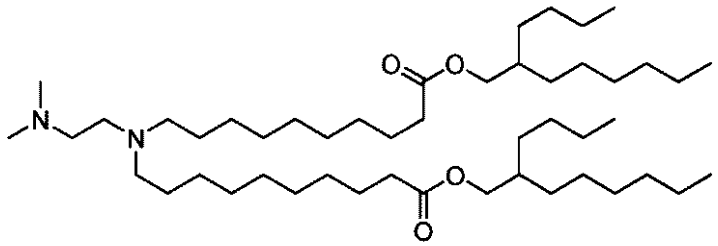
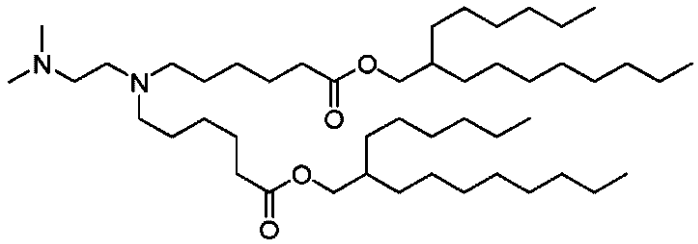
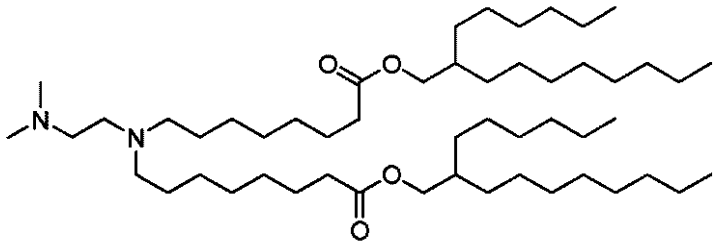
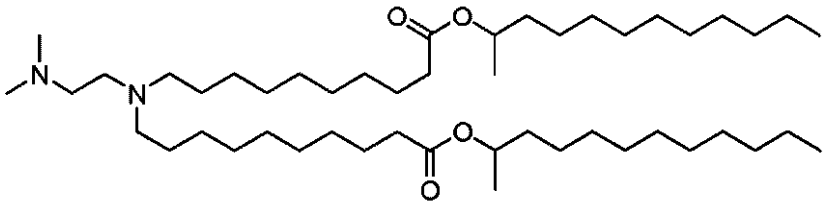
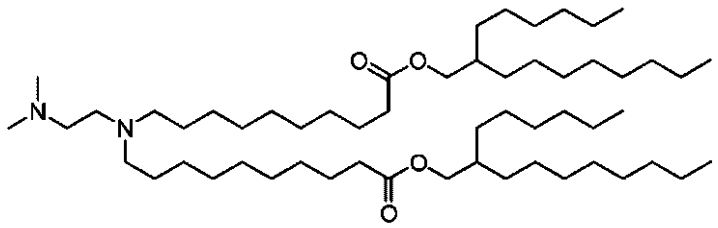
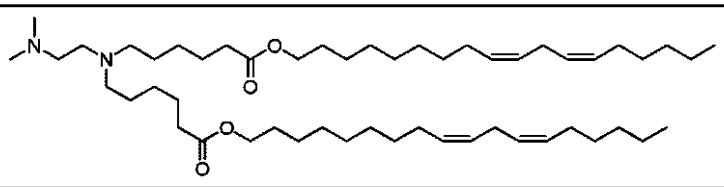
【表１－２】

番号	構造	調製方法*
I-7		A
I-8		A
I-9		B
I-10		A
I-11		A
I-12		A
I-13		A

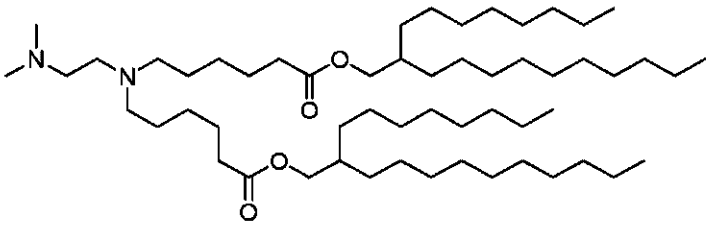
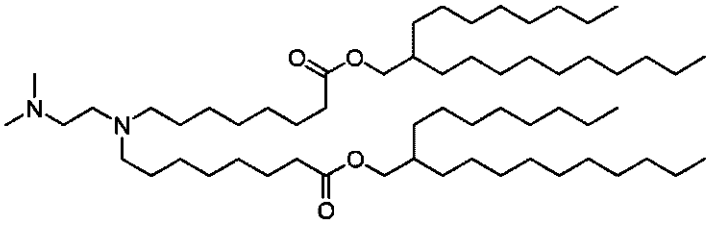
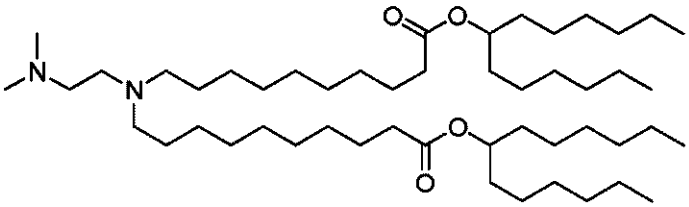
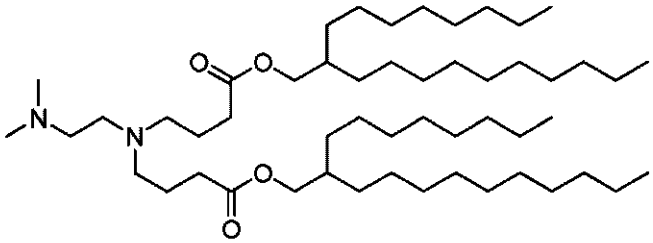
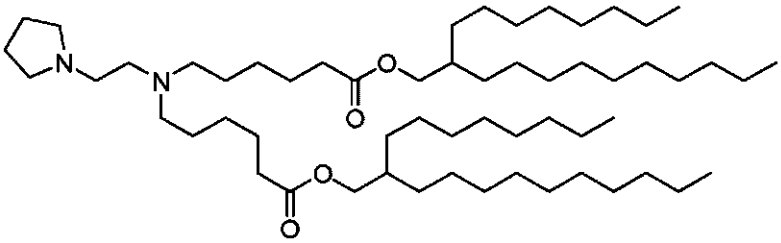
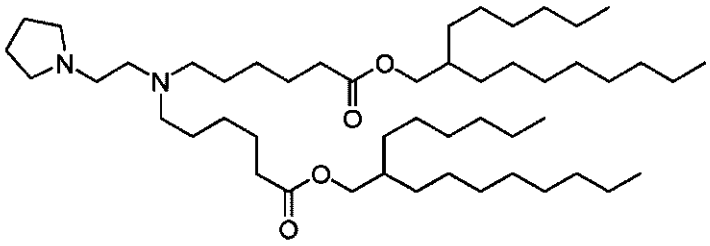
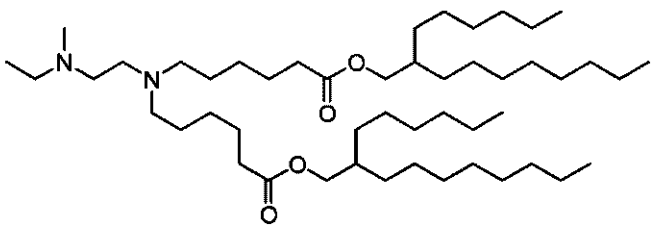
【表１－３】

番号	構造	調製方法*
I-14		A
I-15		A
I-16		A
I-17		A
I-18		A
I-19		A

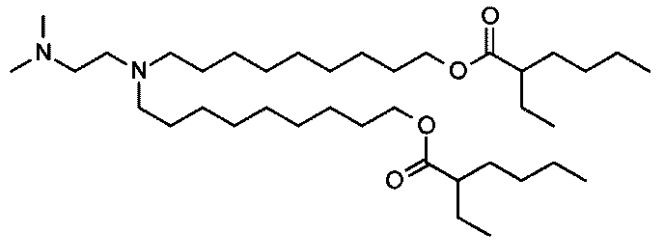
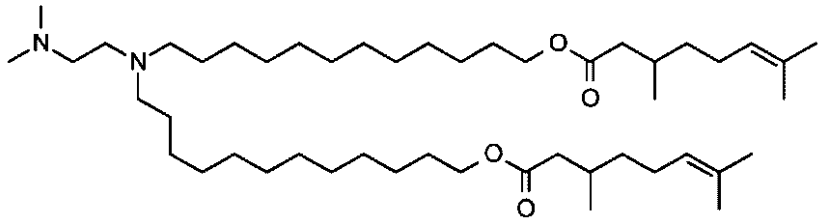
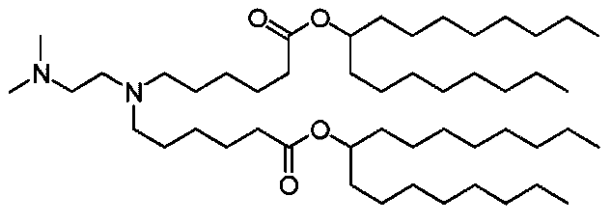
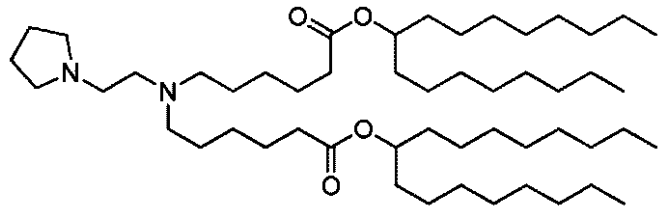
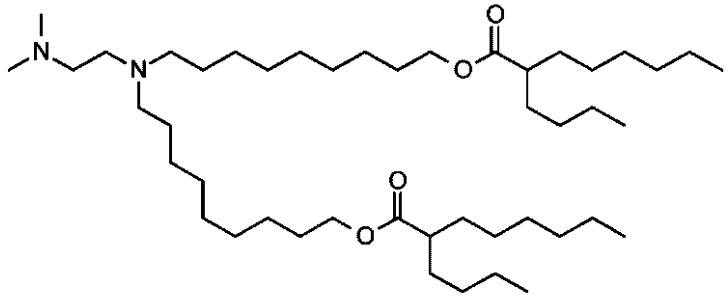
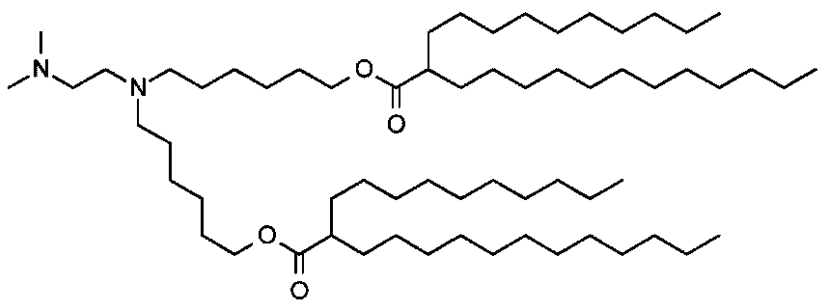
【表１－４】

番号	構造	調製方法*
I-20		A
I-21		A
I-22		A
I-23		A
I-24		A
I-25		A
I-26		A

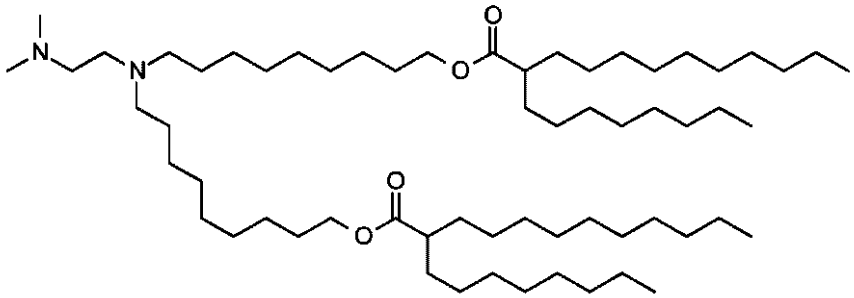
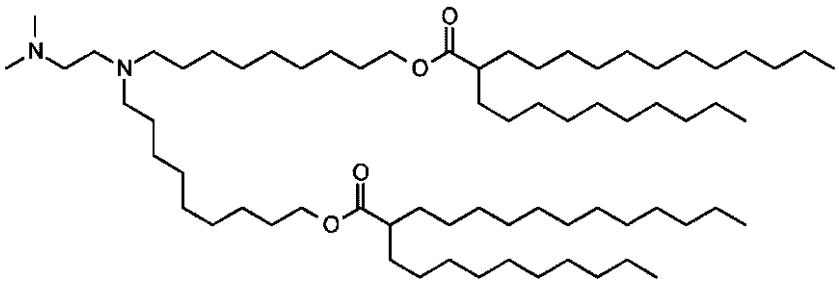
【表１－５】

番号	構造	調製方法*
I-27		A
I-28		A
I-29		A
I-30		A
I-31		C
I-32		C
I-33		C

【表１－６】

番号	構造	調製方法*
I-34		B
I-35		B
I-36		C
I-37		C
I-38		B
I-39		B

【表１－７】

番号	構造	調製方法*
I-40		B
I-41		B

*は、脂質を調製するための一般的な合成方法を指す

【０２５６】

上記の式（Ｉ）の化合物の任意の実施形態、ならびに上記の化合物式（Ｉ）の任意の特定の置換基および／または変数は、独立に、式（Ｉ）の化合物の他の実施形態ならびに／または置換基および／もしくは変数と組み合わせて、上で具体的に記載されていない本発明の実施形態を形成することができることが理解される。さらに、特定の実施形態および／または請求項において任意の特定のＲ基、Ｌ基または変数ａ～ｅに関して置換基および／または変数の一覧が列挙されている場合には、個々の置換基および／または変数それぞれを特定の実施形態および／または請求項から削除することができること、ならびに残りの置換基および／または変数の一覧は本発明の範囲内に入るとみなされることが理解される。

【０２５７】

本説明において、示されている式の置換基および／または変数の組合せは、そのような寄与により安定な化合物がもたらされる場合にのみ許容されることが理解される。

【０２５８】

一部の実施形態では、式（ＩＩ）の化合物の任意の１つまたは複数および遺伝子編集／遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドを含む組成物が提供される。例えば、一部の実施形態では、組成物は、式（ＩＩ）の化合物のいずれか、ならびに遺伝子編集／遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチド、ならびに中性脂質、ステロイドおよびポリマーとコンジュゲートした脂質から選択される１つまたは複数の賦形剤を含む。他の薬学的に許容される賦形剤および／または担体も組成物の種々の実施形態に含めることができる。

【０２５９】

一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥおよびＳＭから選択される。一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣである。種々の実施形態では、化合物と中性脂質とのモル比は、約２：１から約８：１の範囲である。

【０２６０】

種々の実施形態では、組成物は、ステロイドまたはステロイド類似体をさらに含む。あ

る特定の実施形態では、ステロイドまたはステロイド類似体は、コレステロールである。これらの実施形態の一部では、化合物とコレステロールとのモル比は、約２：１から１：１の範囲である。

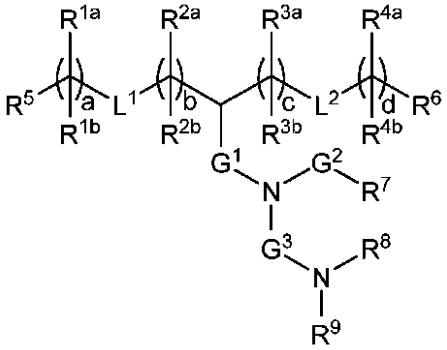
【０２６１】

種々の実施形態では、ポリマーとコンジュゲートした脂質は、ペグ化脂質である。例えば、一部の実施形態は、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）などのペグ化ジアシルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、４－Ｏ－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－Ｏ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタン二酸（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）などのＰＥＧスクシネートジアシルグリセロール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ）、ペグ化セラミド（ＰＥＧ－ｃｅｒ）、またはω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル－Ｎ－（２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル）カルバメートもしくは２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル－Ｎ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）カルバメートなどのＰＥＧジアルコキシプロピルカルバメートを含む。種々の実施形態では、化合物とペグ化脂質とのモル比は、約１００：１から約２５：１の範囲である。

【０２６２】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドおよび次式（ＩＩ）：

【化２２】



(II)

（式中、

L^1およびL^2は、それぞれ独立に、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－または直接結合であり；

G^1は、C_1～C_2アルキレン、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－または直接結合であり；

G^2は、－Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－または直接結合であり；

G^3は、C_1～C_6アルキレンであり；

R^aは、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり；

R^{1a}およびR^{1b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{1a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{1b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{1b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{2a}およびR^{2b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{2a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{2b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{2b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{3a}およびR^{3b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{3a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{3b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{3b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^{4a}およびR^{4b}は、各出現につき、独立に、（ａ）ＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであるか、または（ｂ）R^{4a}がＨもしくはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{4b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{4b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成しているかのいずれかであり；

R^5およびR^6は、それぞれ独立に、Ｈまたはメチルであり；

R^7は、C_4～C_{20}アルキルであり；

R^8およびR^9は、それぞれ独立に、C_1～C_{12}アルキルである、またはR^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に５員、６員または７員複素環式環を形成しており；

ａ、ｂ、ｃおよびｄは、それぞれ独立に、１から２４までの整数であり；

ｘは、０、１または２である）

を有する脂質化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体を含む。

【０２６３】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、L^1およびL^2は、それぞれ独立に、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－または直接結合である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、G^1およびG^2は、それぞれ独立に、－（Ｃ＝Ｏ）－または直接結合である。式（ＩＩ）の一部の異なる実施形態では、L^1およびL^2は、それぞれ独立に、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－または直接結合であり；G^1およびG^2は、それぞれ独立に、－（Ｃ＝Ｏ）－または直接結合である。

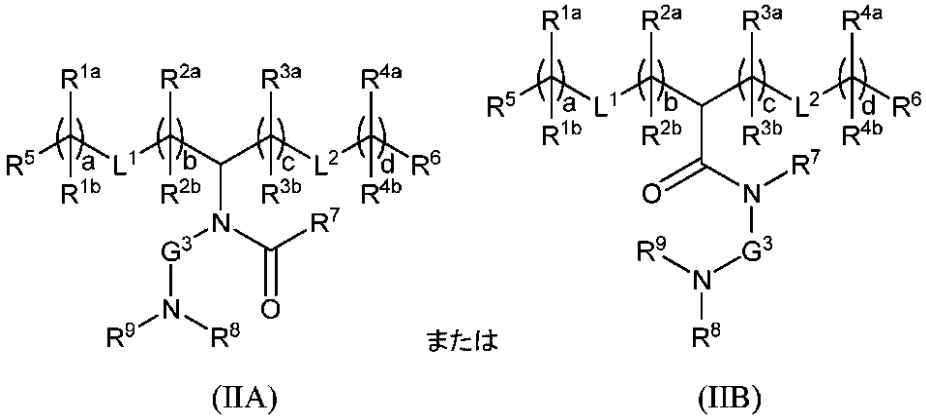
【０２６４】

式（ＩＩ）の一部の異なる実施形態では、L^1およびL^2は、それぞれ独立に、－Ｃ（＝Ｏ）－，－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^a－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＮＲ^{a}Ｓ（Ｏ）$_x$ＮＲ^a－、－ＮＲ^{a}Ｓ（Ｏ）$_x$－または－Ｓ（Ｏ）$_x$ＮＲ^a－である。

【０２６５】

式（ＩＩ）の前述の実施形態の他のものでは、化合物は、以下の構造（ＩＩＡ）または（ＩＩＢ）のうちの一方を有する：

【化２３】



(IIA) (IIB)

【０２６６】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、化合物は、構造（ＩＩＡ）を有する。式（ＩＩ）の他の実施形態では、化合物は、構造（ＩＩＢ）を有する。

【０２６７】

式（ＩＩ）の前述の実施形態のいずれかでは、L^1またはL^2の一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、式（ＩＩ）の一部の実施形態では、L^1およびL^2のそれぞれが－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。

【０２６８】

式（ＩＩ）の一部の異なる実施形態では、L^1またはL^2の一方は－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。例えば、式（ＩＩ）の一部の実施形態では、L^1およびL^2のそれぞれが、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０２６９】

式（ＩＩ）の異なる実施形態では、L^1またはL^2の一方は直接結合である。本明細書において使用される「直接結合」とは、基（例えば、L^1またはL^2）が存在しないことを意味する。例えば、式（ＩＩ）の一部の実施形態では、L^1およびL^2のそれぞれが直接結合である。

【０２７０】

式（ＩＩ）の他の異なる実施形態では、R^{1a}およびR^{1b}の少なくとも１つの出現に関して、R^{1a}は、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{1b}は、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{1b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成している。

【０２７１】

式（ＩＩ）のさらに他の異なる実施形態では、R^{4a}およびR^{4b}の少なくとも１つの出現に関して、R^{4a}は、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{4b}は、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{4b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成している。

【０２７２】

式（ＩＩ）のその他の実施形態では、R^{2a}およびR^{2b}の少なくとも１つの出現に関して、R^{2a}は、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{2b}は、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{2b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成している。

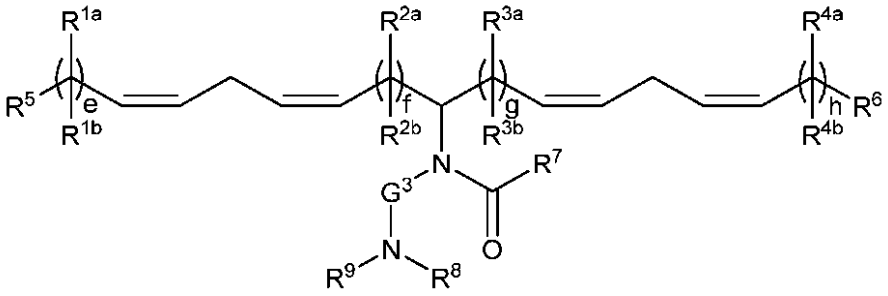
【０２７３】

式（ＩＩ）の他の異なる実施形態では、R^{3a}およびR^{3b}の少なくとも１つの出現に関して、R^{3a}は、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり、R^{3b}は、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{3b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成している。

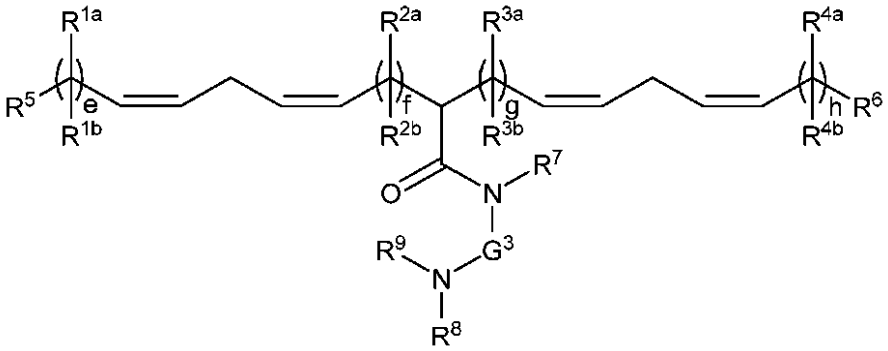
【０２７４】

式（ＩＩ）の種々の他の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＩＣ）または（ＩＩＤ）：

【化２４】



(IIC)



(IID)

（式中、ｅ、ｆ、ｇおよびｈは、それぞれ独立に、１から１２までの整数である）のうちの一方を有する。

【０２７５】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、化合物は、構造（ＩＩＣ）を有する。式（ＩＩ）の他の実施形態では、化合物は、構造（ＩＩＤ）を有する。

【０２７６】

構造（ＩＩＣ）または（ＩＩＤ）の化合物の種々の実施形態では、ｅ、ｆ、ｇおよびｈは、それぞれ独立に、４から１０までの整数である。

【０２７７】

式（ＩＩ）のある特定の実施形態では、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、それぞれ独立に、２から１２までの整数または４から１２までの整数である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、それぞれ独立に、８から１２までまたは５から９までの整数である。一部のある特定の実施形態では、ａは０である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ａは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ａは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ａは３である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ａは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ａは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ａは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ａは７である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ａは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ａは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ａは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ａは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ａは１２である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ａは１３である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ａは１４である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ａは１５である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ａは１６である。

【０２７８】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｂは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｂは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｂは３である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｂは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｂは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｂは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｂは７

である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｂは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｂは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｂは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｂは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｂは１２である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｂは１３である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｂは１４である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｂは１５である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｂは１６である。

【０２７９】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｃは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｃは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｃは３である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｃは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｃは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｃは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｃは７である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｃは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｃは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｃは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｃは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｃは１２である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｃは１３である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｃは１４である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｃは１５である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｃは１６である。

【０２８０】

式（ＩＩ）の一部のある特定の実施形態では、ｄは０である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｄは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｄは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｄは３である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｄは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｄは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｄは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｄは７である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｄは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｄは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｄは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｄは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｄは１２である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｄは１３である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｄは１４である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｄは１５である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｄは１６である。

【０２８１】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｅは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｅは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｅは３である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｅは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｅは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｅは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｅは７である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｅは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｅは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｅは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｅは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｅは１２である。

【０２８２】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｆは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｆは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｆは３である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｆは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｆは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｆは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｆは７である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｆは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｆは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｆは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｆは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｆは１２である。

【０２８３】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｇは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｇは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｇは３である。式（ＩＩ）のさらに他

の実施形態では、ｇは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｇは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｇは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｇは７である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｇは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｇは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｇは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｇは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｇは１２である。

【０２８４】

式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｈは１である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｅは２である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｈは３である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｈは４である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｅは５である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｈは６である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｈは７である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｈは８である。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ｈは９である。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｈは１０である。式（ＩＩ）のその他の実施形態では、ｈは１１である。式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、ｈは１２である。

【０２８５】

式（ＩＩ）の一部の他の種々の実施形態では、ａとｄは同じである。一部の他の実施形態では、ｂとｃは同じである。式（ＩＩ）の一部の他の特定の実施形態ではａとｄは同じであり、ｂとｃは同じである。

【０２８６】

ａとｂの合計およびｃとｄの合計は、所望の特性を有する脂質を得るために変動させることができる因子である。式（ＩＩ）の一実施形態では、ａおよびｂは、それらの合計が１４から２４の範囲の整数になるように選択される。式（ＩＩ）の他の実施形態では、ｃおよびｄは、それらの合計が１４から２４の範囲の整数になるように選択される。式（ＩＩ）のさらなる実施形態では、ａとｂの合計およびｃとｄの合計は同じである。例えば、式（ＩＩ）の一部の実施形態では、ａとｂの合計およびｃとｄの合計は、どちらも１４から２４の範囲であり得る同じ整数である。式（ＩＩ）のなおその他の実施形態では、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、ａとｂの合計およびｃとｄの合計が１２またはそれよりも大きくなるように選択される。

【０２８７】

R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}における置換基は、特に限定されない。一部の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}の少なくとも１つは、Ｈである。式（ＩＩ）のある特定の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}は、各出現につき、Ｈである。式（ＩＩ）のある特定の他の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_{12}アルキルである。ある特定の他の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_8アルキルである。式（ＩＩ）のある特定の他の実施形態では、R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}およびR^{4a}の少なくとも１つは、C_1～C_6アルキルである。式（ＩＩ）の前述の実施形態の一部では、C_1～C_8アルキルは、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０２８８】

式（ＩＩ）の前述のある特定の実施形態では、R^{1a}、R^{1b}、R^{4a}およびR^{4b}は、各出現につき、C_1～C_{12}アルキルである。

【０２８９】

式（ＩＩ）のさらなる実施形態では、R^{1b}、R^{2b}、R^{3b}およびR^{4b}の少なくとも１つは、Ｈである、またはR^{1b}、R^{2b}、R^{3b}およびR^{4b}は、各出現につき、Ｈである。

【０２９０】

式（ＩＩ）のある特定の実施形態では、R^{1b}は、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{1b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結

合を形成している。式（ＩＩ）の他の実施形態では、R^{4b}が、それが結合している炭素原子と一緒に、隣接するR^{4b}およびそれが結合している炭素原子と一緒になって炭素－炭素二重結合を形成している。

【０２９１】

R^5およびR^6における置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。式（ＩＩ）のある特定の実施形態では、R^5またはR^6の一方は、メチルである。他の実施形態では、R^5またはR^6のそれぞれがメチルである。

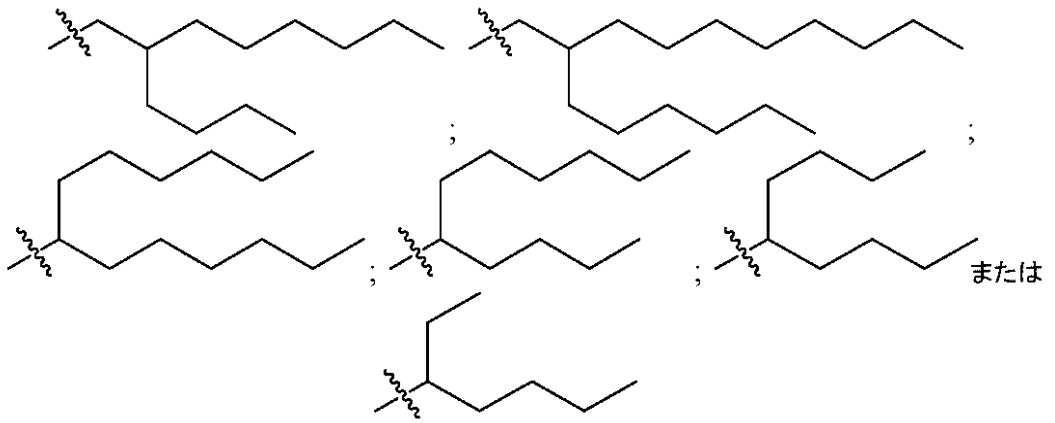
【０２９２】

R^7における置換基は、前述の実施形態では特に限定されない。式（ＩＩ）のある特定の実施形態では、R^7は、C_6～C_{16}アルキルである。一部の他の実施形態では、R^7は、C_6～C_9アルキルである。式（ＩＩ）のこれらの実施形態の一部では、R^7は、－（Ｃ＝Ｏ）OR^b、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）R^b、－Ｃ（＝Ｏ）R^b、－OR^b、－Ｓ（Ｏ）$_xR^b$、－Ｓ－SR^b、－Ｃ（＝Ｏ）SR^b、－ＳＣ（＝Ｏ）R^b、－NR^aR^b、－NR^aC（＝Ｏ）R^b、－Ｃ（＝Ｏ）NR^aR^b、－NR^aC（＝Ｏ）NR^aR^b、－ＯＣ（＝Ｏ）NR^aR^b、－NR^aC（＝Ｏ）OR^b、－NR^aS（Ｏ）$_xNR^aR^b$、－NR^aS（Ｏ）$_xR^b$または－Ｓ（Ｏ）$_xNR^aR^b$で置換されており、ここで、R^aは、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり；R^bは、C_1～C_{15}アルキルであり、ｘは、０、１または２である。例えば、一部の実施形態では、R^7は、－（Ｃ＝Ｏ）OR^bまたは－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）R^bで置換されている。

【０２９３】

式（ＩＩ）の種々の前述の実施形態では、R^bは、分枝状C_1～C_{15}アルキルである。例えば、式（ＩＩ）の一部の実施形態では、R^bは、以下の構造：

【化２５】



のうちの１つを有する。

【０２９４】

前述の式（ＩＩ）他のある特定の実施形態では、R^8またはR^9の一方は、メチルである。他の実施形態では、R^8およびR^9の両方がメチルである。

【０２９５】

式（ＩＩ）の一部の異なる実施形態では、R^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に５員、６員または７員複素環式環を形成している。式（ＩＩ）の一部の実施形態では、R^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に５員複素環式環、例えば、ピロリジニル環を形成している。式（ＩＩ）の一部の異なる実施形態では、R^8およびR^9は、それらが結合している窒素原子と一緒に６員複素環式環、例えば、ピペラジニル環を形成している。

【０２９６】

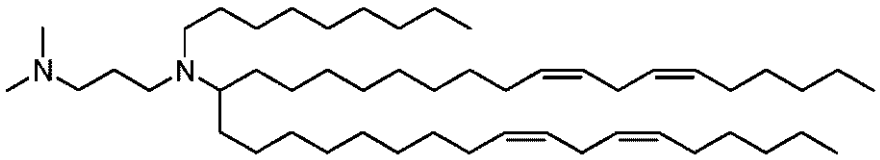
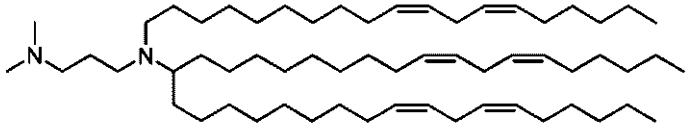
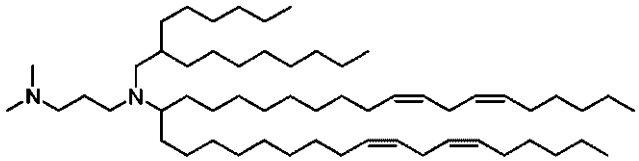
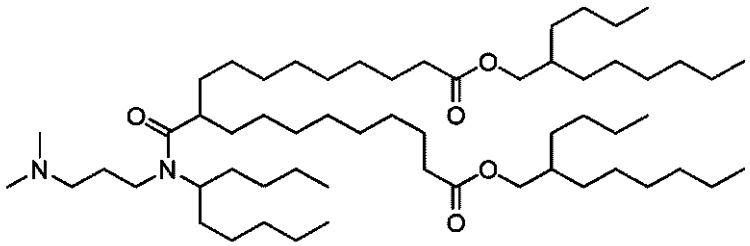
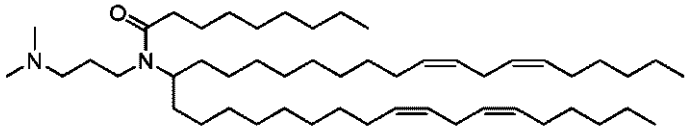
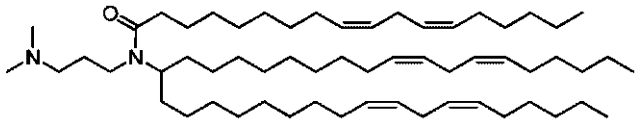
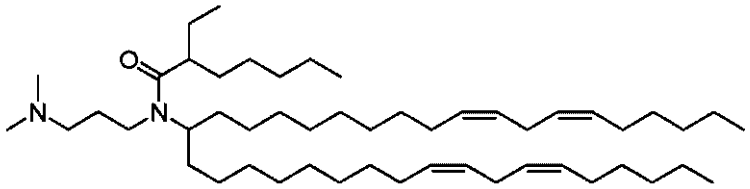
式（ＩＩ）のさらに他の実施形態では、G^3は、C_2～C_4アルキレン、例えば、C_3アルキレンである。

【０２９７】

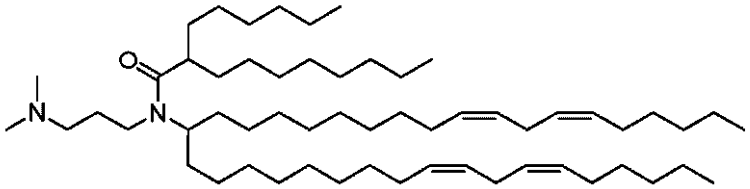
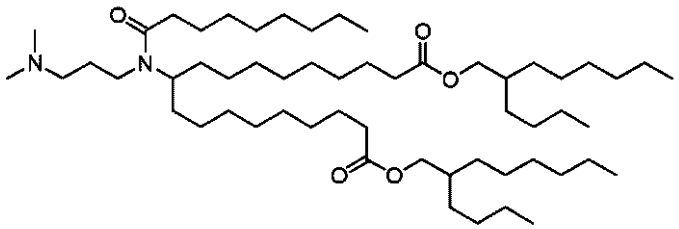
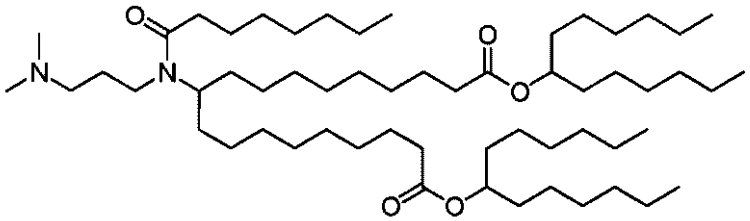
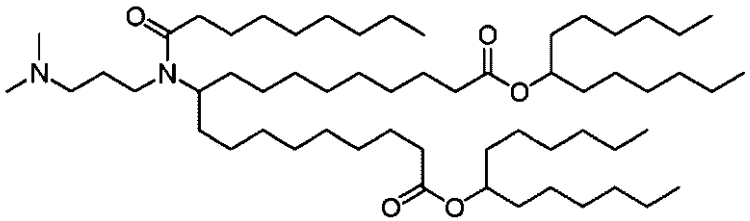
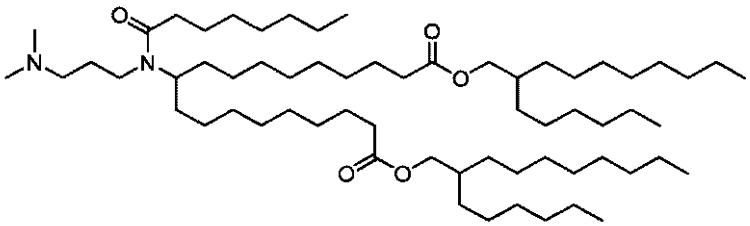
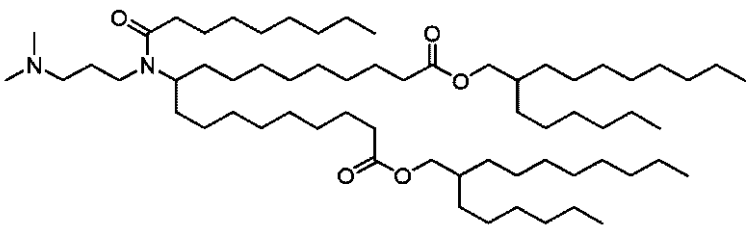
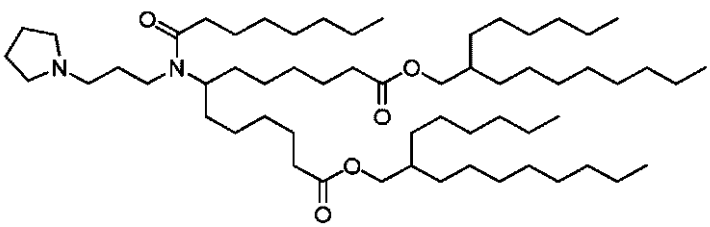
種々の異なる実施形態では、ＬＮＰは、以下の表ＩＩに記載されている構造の１つを有する化合物を含む。

【表２－１】

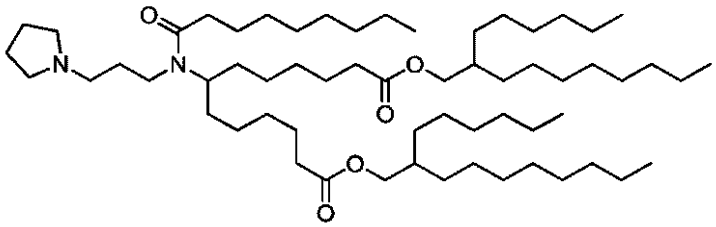
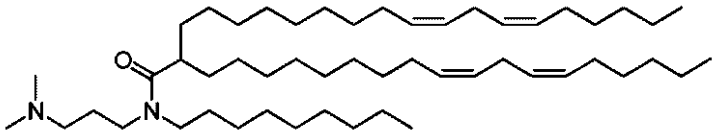
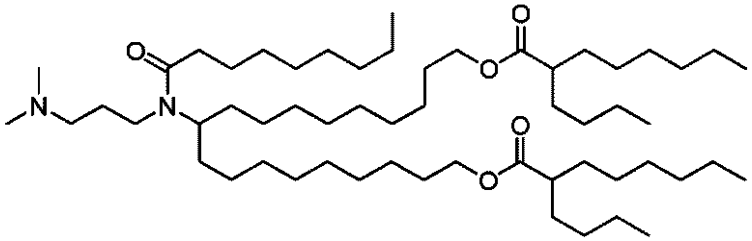
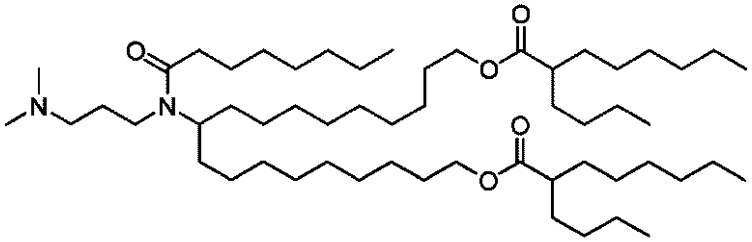
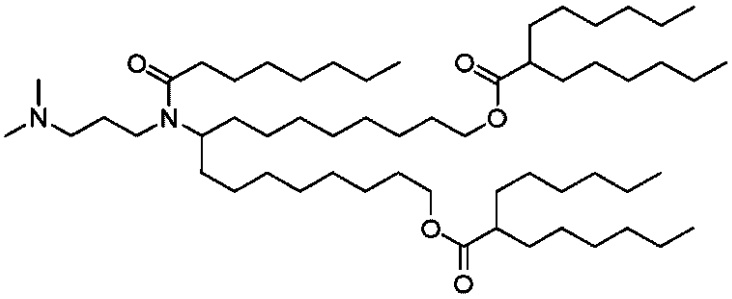
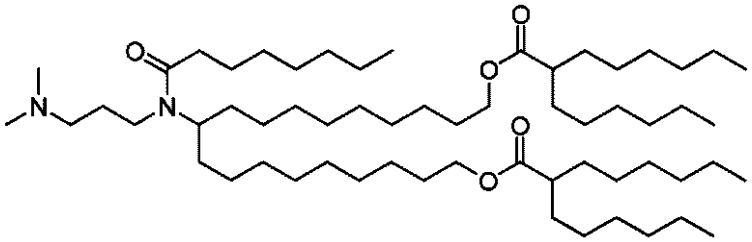
表II:式IIの代表的な脂質化合物

番号	構造	調製方法*
II-1		D
II-2		D
II-3		D
II-4		E
II-5		D
II-6		D
II-7		D

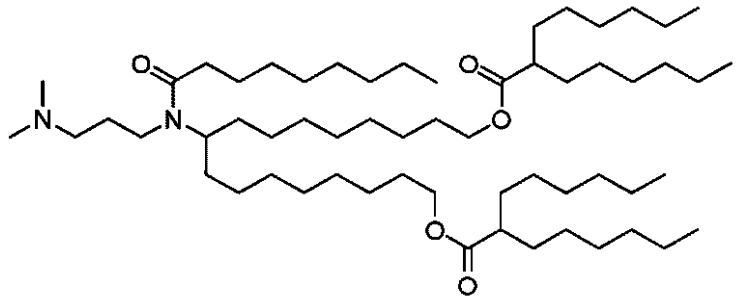
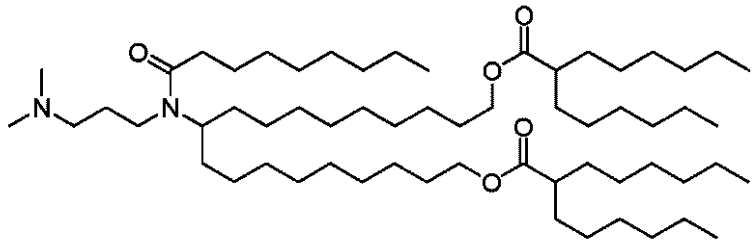
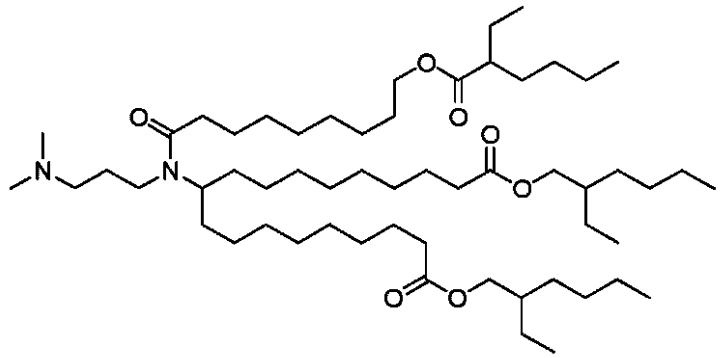
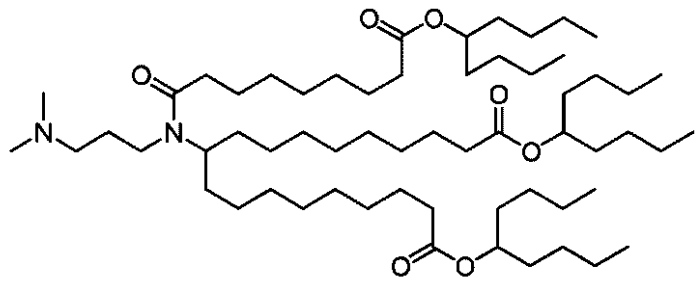
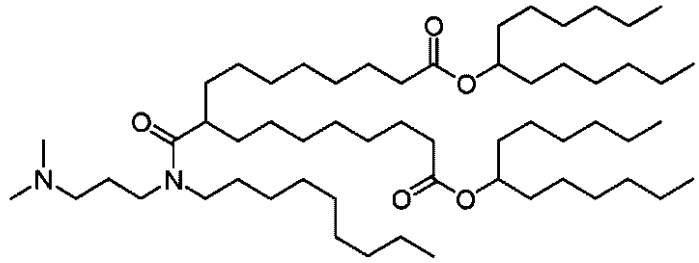
【表２－２】

番号	構造	調製方法*
II-8		D
II-9		D
II-10		D
II-11		D
II-12		D
II-13		D
II-14		D

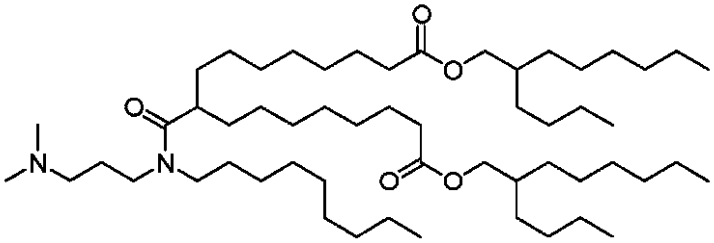
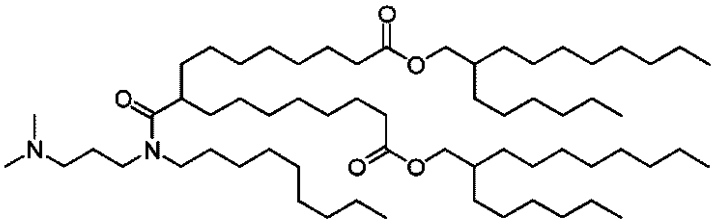
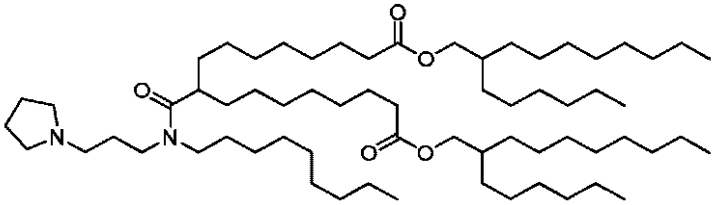
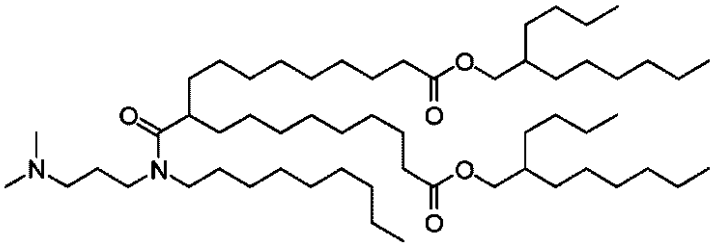
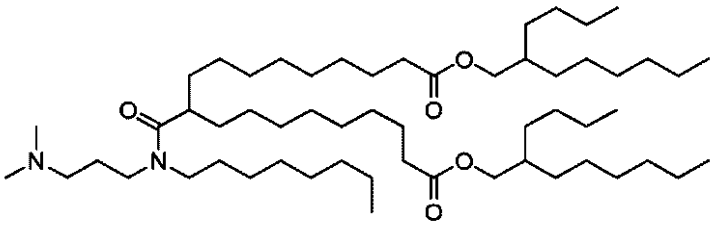
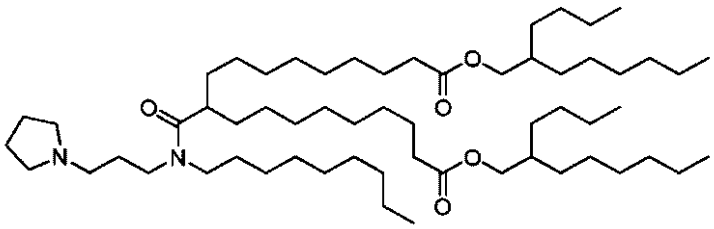
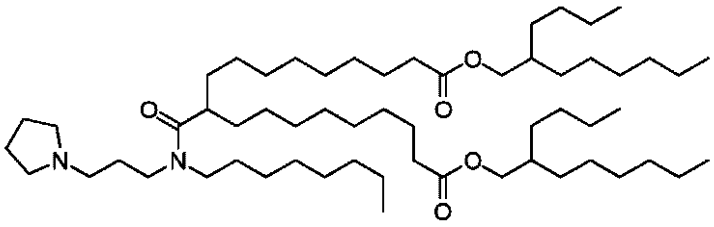
【表２－３】

番号	構造	調製方法*
II-15		D
II-16		E
II-17		D
II-18		D
II-19		D
II-20		D

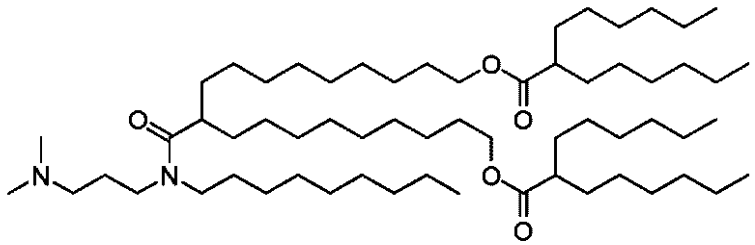
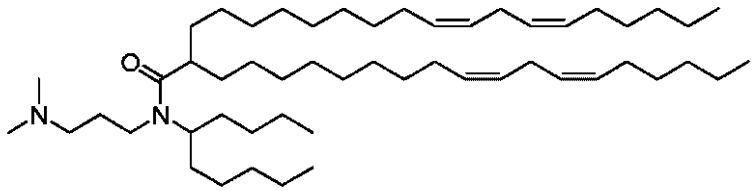
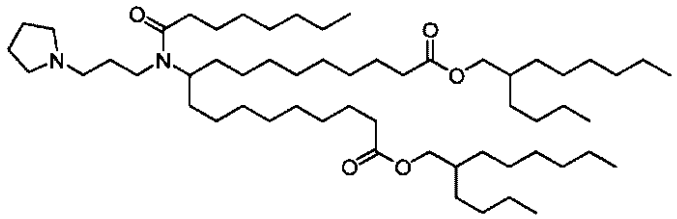
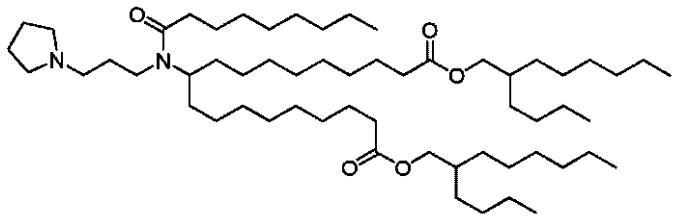
【表２－４】

番号	構造	調製方法*
II-21		D
II-22		D
II-23		D
II-24		D
II-25		E

【表２－５】

番号	構造	調製方法*
II-26		E
II-27		E
II-28		E
II-29		E
II-30		E
II-31		E
II-32		E

【表２－６】

番号	構造	調製方法*
II-33		E
II-34		E
II-35		D
II-36		D

* は、脂質を調製するための一般的な合成方法を指す

【０２９８】

上記の式（ＩＩ）の化合物の任意の実施形態、ならびに上記の式（ＩＩ）の化合物の任意の特定の置換基および／または変数は、独立に、式（ＩＩ）の化合物の他の実施形態ならびに／または置換基および／もしくは変数と組み合わせて、上で具体的に記載されていない本発明の実施形態を形成することができることが理解される。さらに、特定の実施形態および／または請求項において任意の特定のＲ基、Ｌ基、Ｇ基、または変数ａ～ｈ、またはｘに関して置換基および／または変数の一覧が列挙されている場合には、個々の置換基および／または変数それぞれを特定の実施形態および／または請求項から削除することができること、ならびに残りの置換基および／または変数の一覧は本発明の範囲内に入るとみなされることが理解される。

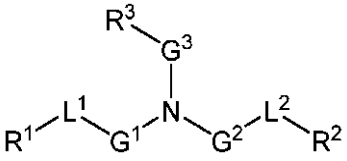
【０２９９】

本説明において、示されている式の置換基および／または変数の組合せは、そのような寄与により安定な化合物がもたらされる場合にのみ許容されることが理解される。

【０３００】

一部の実施形態では、式（ＩＩ）の化合物の任意の１つまたは複数および遺伝子編集／遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドを含む組成物が提供される。例えば、一部の実施形態では、組成物は、式（ＩＩ）の化合物のいずれか、ならびに遺伝子編集／遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチド、ならびに中性脂質、ステロイドおよびポリマーとコンジュゲートした脂質から選択される１つまたは複数の賦形剤を含む。他の薬学的に許容される賦形剤および／または担体も組成物の種々の実施形態に含めることができる。

【０３０１】
一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥおよびＳＭから選択される。一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣである。種々の実施形態では、化合物と中性脂質とのモル比は、約２：１から約８：１の範囲である。
【０３０２】
種々の実施形態では、組成物は、ステロイドまたはステロイド類似体をさらに含む。ある特定の実施形態では、ステロイドまたはステロイド類似体は、コレステロールである。これらの実施形態の一部では、化合物とコレステロールとのモル比は、約２：１から１：１の範囲である。
【０３０３】
種々の実施形態では、ポリマーとコンジュゲートした脂質は、ペグ化脂質である。例えば、一部の実施形態は、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）などのペグ化ジアシルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、４－Ｏ－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－Ｏ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタン二酸（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）などのＰＥＧスクシネートジアシルグリセロール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ）、ペグ化セラミド（ＰＥＧ－ｃｅｒ）、またはω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル－Ｎ－（２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル）カルバメートもしくは２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル－Ｎ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）カルバメートなどのＰＥＧジアルコキシプロピルカルバメートを含む。種々の実施形態では、化合物とペグ化脂質とのモル比は、約１００：１から約２５：１の範囲である。
【０３０４】
一部の実施形態では、ＬＮＰは、遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドおよび次式（ＩＩＩ）：
【化２６】



(III)

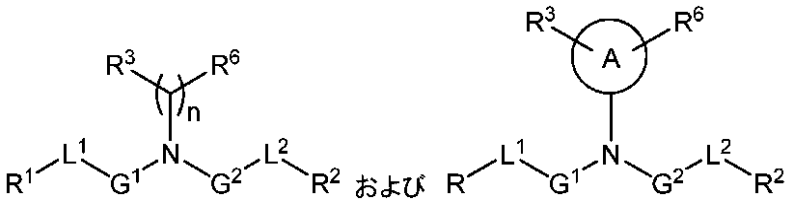
（式中、
L^1またはL^2の一方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－または－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、L^1またはL^2の他方は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）$_x$－、－Ｓ－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ－、ＳＣ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^a－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^a－もしくは－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－または直接結合であり；
G^1およびG^2は、それぞれ独立に、非置換Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_1$～Ｃ$_{12}$アルケニレンであり；
G^3は、Ｃ$_1$～Ｃ$_{24}$アルキレン、Ｃ$_1$～Ｃ$_{24}$アルケニレン、Ｃ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルキレン、Ｃ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルケニレンであり；
Ｒ^{a}は、ＨまたはＣ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルであり；
R^1およびR^2は、それぞれ独立に、Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$アルキルまたはＣ$_6$～Ｃ$_{24}$アルケニルであり；
R^3は、Ｈ、ＯＲ^5、ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^4、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{4}または－ＮＲ^5

Ｃ（＝Ｏ）Ｒ^{4}であり；
Ｅ　Ｒ^{4}は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{12}$アルキルであり；
Ｒ^{5}は、ＨまたはＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり；
ｘは、０、１または２である）
を有する脂質化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体を含む。

【０３０５】

式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の一部では、化合物は、以下の構造（ＩＩＩＡ）または（ＩＩＩＢ）：

【化２７】



(IIIA)　　(IIIB)

（式中、
Ａは、３～８員シクロアルキルまたはシクロアルキレン環であり；
Ｒ^{6}は、各出現につき、独立に、Ｈ、ＯＨまたはＣ$_{1}$～Ｃ$_{24}$アルキルであり；
ｎは、１から１５の範囲の整数である）のうちの一方を有する。

【０３０６】

式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の一部では、化合物は、構造（ＩＩＩＡ）を有し、式（ＩＩＩ）の他の実施形態では、化合物は、構造（ＩＩＩＢ）を有する。

【０３０７】

式（ＩＩＩ）の他の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＩＩＣ）または（ＩＩＩＤ）：

【化２８】



(IIIC)　　(IIID)

（式中、ｙおよびｚは、それぞれ独立に、１から１２の範囲の整数である）のうちの一方を有する。

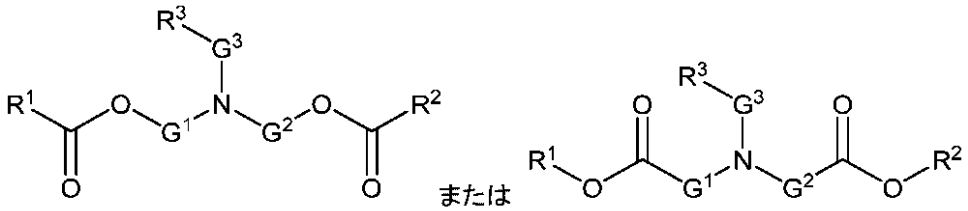
【０３０８】

式（ＩＩＩ）の前述の実施形態のいずれかでは、Ｌ^{1}またはＬ^{2}の一方は－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、Ｌ^{1}およびＬ^{2}のそれぞれが－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。式（ＩＩＩ）の一部の異なる実施形態では、Ｌ^{1}およびＬ^{2}は、それぞれ独立に、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－または－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）－である。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、Ｌ^{1}およびＬ^{2}のそれぞれが－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。

【０３０９】

式（ＩＩＩ）の一部の異なる実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＩＩＥ）または（ＩＩＩＦ）のうちの一方を有する：

【化２９】

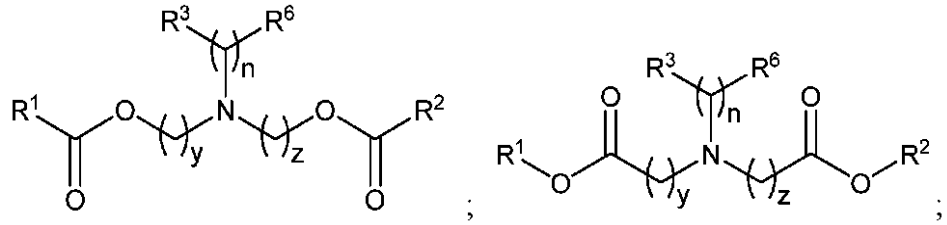


(IIIE) または (IIIF)

【０３１０】

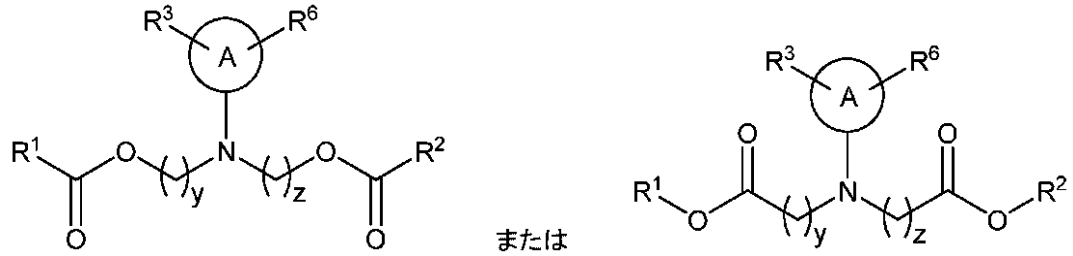
式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の一部では、化合物は、以下の構造（ＩＩＩＧ）、（ＩＩＩＨ）、（ＩＩＩ　Ｉ）または（ＩＩＩＪ）のうちの１つを有する：

【化３０】



(IIIG) ; (IIIH) ;

【化３１】



(IIII) または (IIIJ)

【０３１１】

式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の一部では、ｎは、２から１２まで、例えば、２から８までまたは２から４の範囲の整数である。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、ｎは、３、４、５または６である。式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、ｎは３である。式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、ｎは４である。式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、ｎは５である。式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、ｎは６である。

【０３１２】

式（ＩＩＩ）の一部の他の前述の実施形態では、ｙおよびｚは、それぞれ独立に、２から１０の範囲の整数である。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、ｙおよびｚは、それぞれ独立に、４から９までまたは４から６の範囲の整数である。

【０３１３】

式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の一部では、R^6は、Ｈである。式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の他のものでは、R^6は、C_1～C_{24}アルキルである。式（ＩＩＩ）の他の実施形態では、R^6は、ＯＨである。

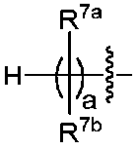
【０３１４】

式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、G^3は、置換されていない。式（ＩＩＩ）の他の実施形態では、Ｇ３は、置換されている。式（ＩＩＩ）の種々の異なる実施形態では、G^3は、直鎖状C_1～C_{24}アルキレンまたは直鎖状C_1～C_{24}アルケニレンである。

【０３１５】

式（ＩＩＩ）の一部の他の前述の実施形態では、Ｒ^{1}もしくはＲ^{2}、または両方がＣ$_{6}$～Ｃ$_{24}$アルケニルである。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、それぞれ独立に、以下の構造：

【化３２】



（式中、Ｒ^{7a}およびＲ^{7b}は、各出現につき、独立に、ＨまたはＣ$_{1}$～Ｃ$_{12}$アルキルであり、ａは、２から１２までの整数であり、Ｒ^{7a}、Ｒ^{7b}およびａは、それぞれ、Ｒ^{1}およびＲ^{2}がそれぞれ独立に炭素原子を６個から２０個まで含むように選択される）を有する。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、ａは、５から９までまたは８から１２の範囲の整数である。

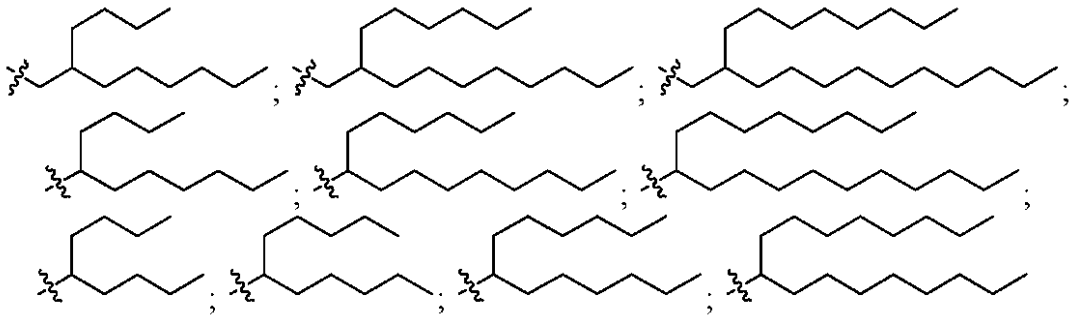
【０３１６】

式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の一部では、Ｒ^{7a}の少なくとも１つの出現は、Ｈである。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、Ｒ^{7a}は、各出現につき、Ｈである。式（ＩＩＩ）の他の異なる実施形態では、Ｒ^{7b}の少なくとも１つの出現は、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキルである。例えば、式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{8}$アルキルは、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０３１７】

式（ＩＩＩ）の異なる実施形態では、Ｒ^{1}もしくはＲ^{2}、または両方は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化３３】



【０３１８】

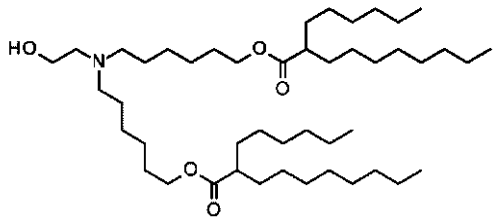
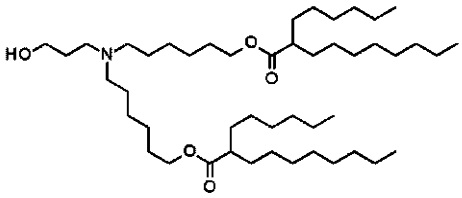
式（ＩＩＩ）の前述の実施形態の一部では、Ｒ^{3}は、ＯＨ、ＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ^{4}、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ^{4}または－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｒ^{4}である。式（ＩＩＩ）の一部の実施形態では、Ｒ^{4}は、メチルまたはエチルである。

【０３１９】

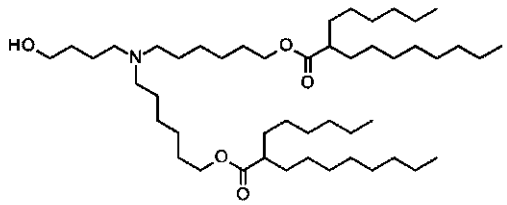
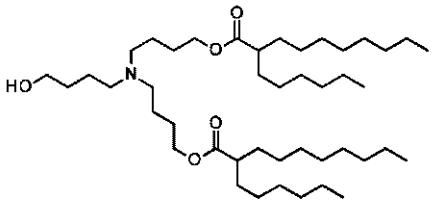
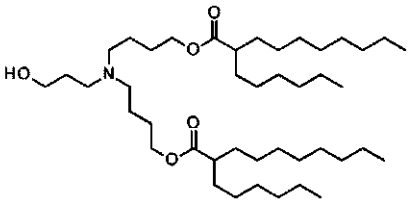
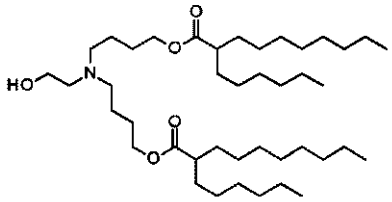
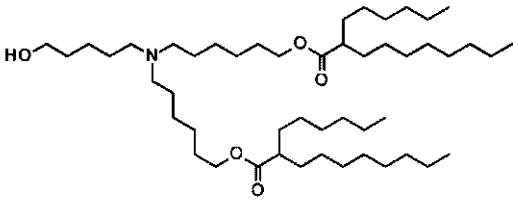
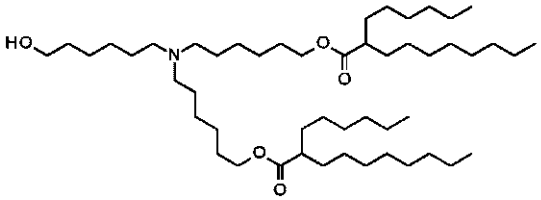
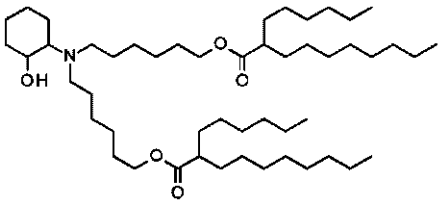
式（ＩＩＩ）の種々の異なる実施形態では、ＬＮＰは、以下の表ＩＩＩに記載されている構造のうちの１つを有する化合物を含む。

【表３－１】

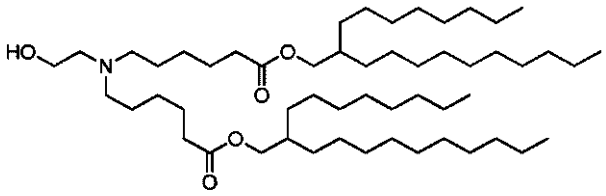
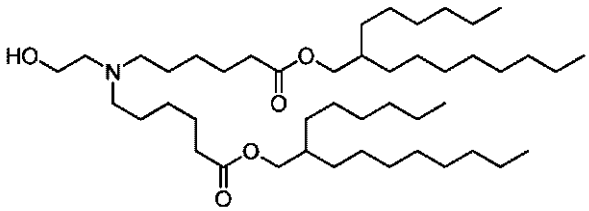
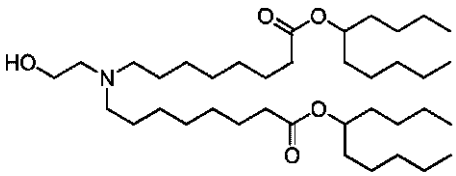
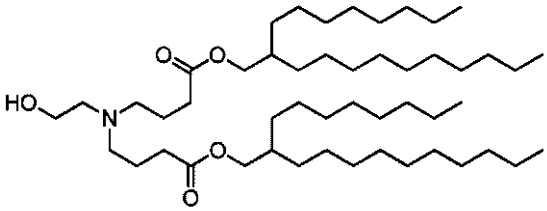
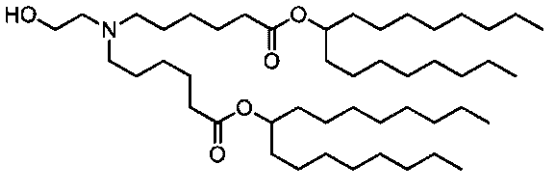
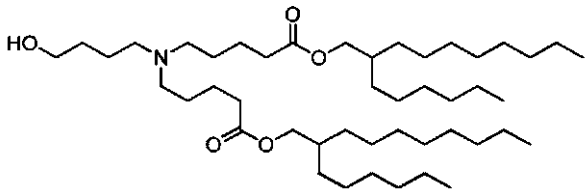
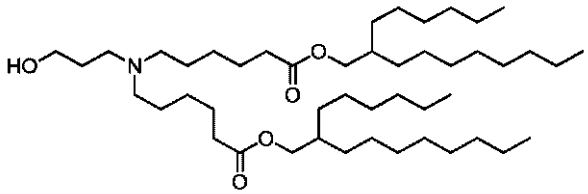
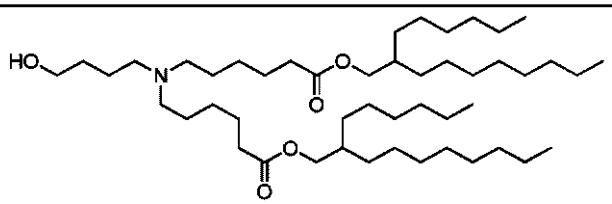
表III:式(III)の代表的な脂質化合物

番号	構造	調製方法*
III-1		F
III-2		F

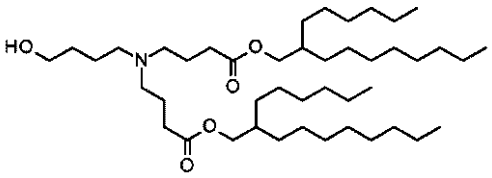
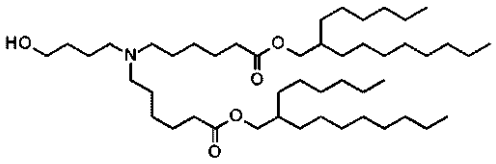
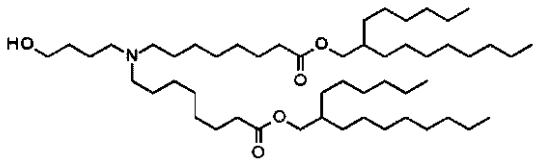
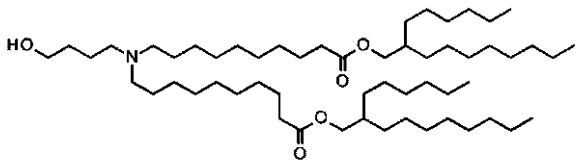
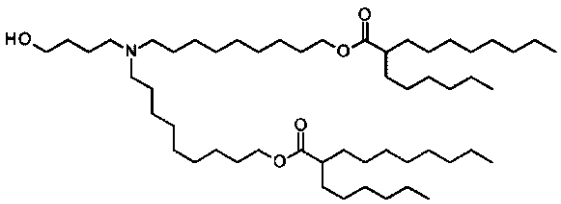
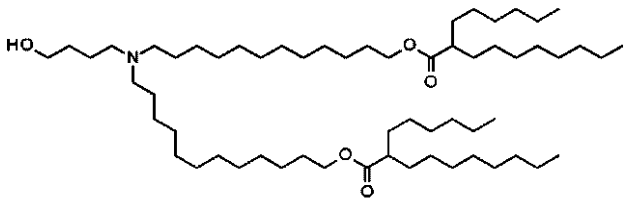
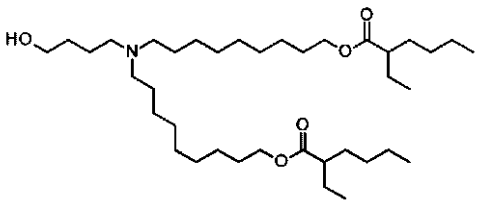
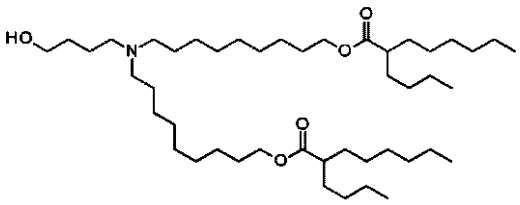
【表３－２】

番号	構造	調製方法*
III-3		F
III-4		F
III-5		F
III-6		F
III-7		F
III-8		F
III-9		F

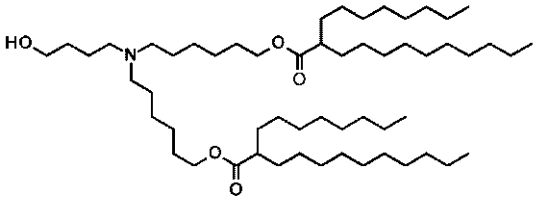
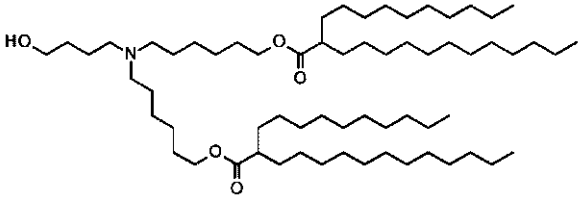
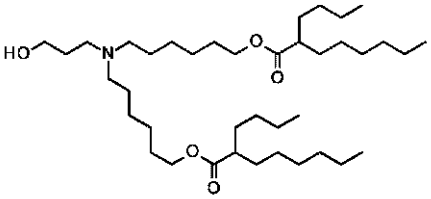
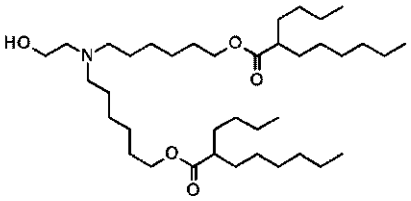
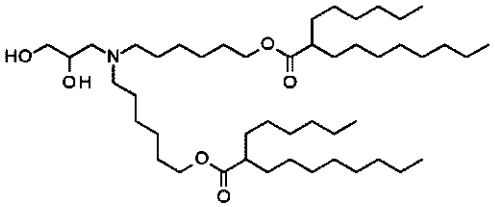
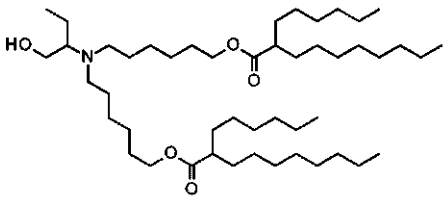
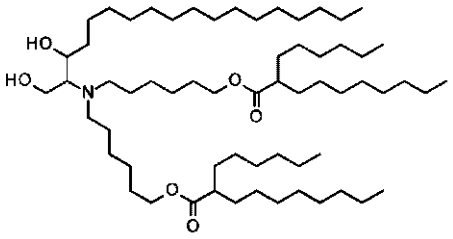
【表３－３】

番号	構造	調製方法*
III-10		F
III-11		F
III-12		F
III-13		F
III-14		F
III-15		F
III-16		F
III-17		F

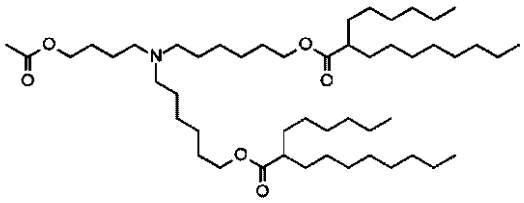
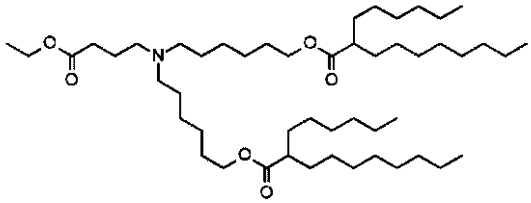
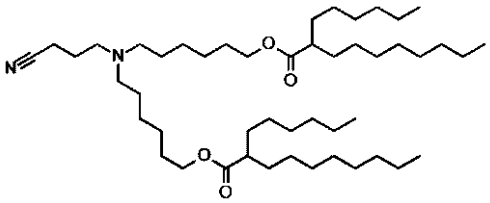
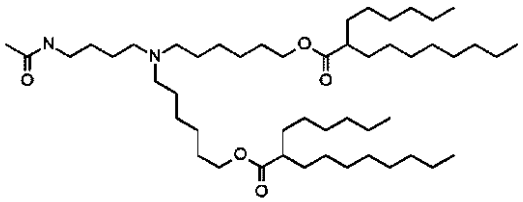
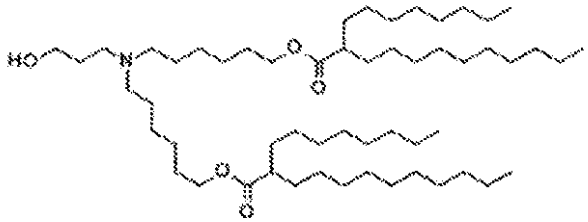
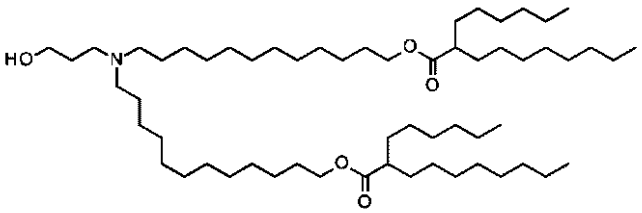
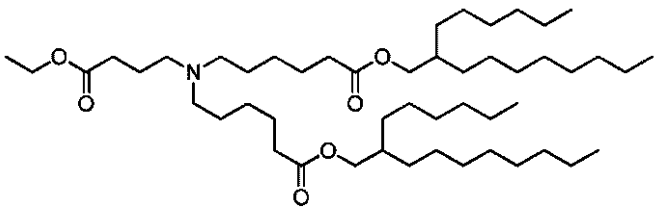
【表３－４】

番号	構造	調製方法*
III-18		F
III-19		F
III-20		F
III-21		F
III-22		F
III-23		F
III-24		F
III-25		F

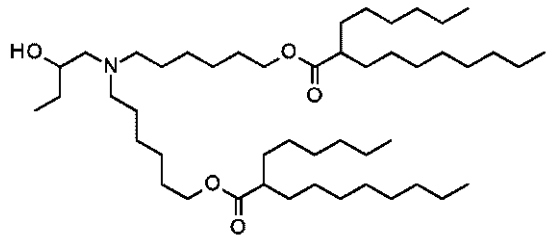
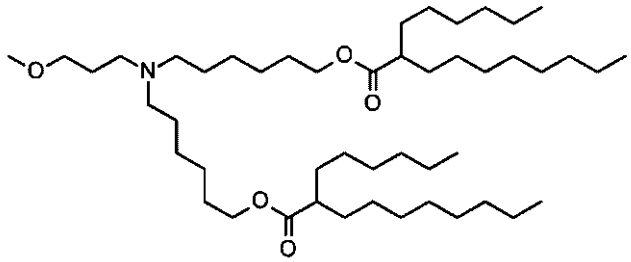
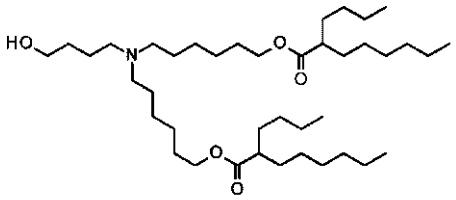
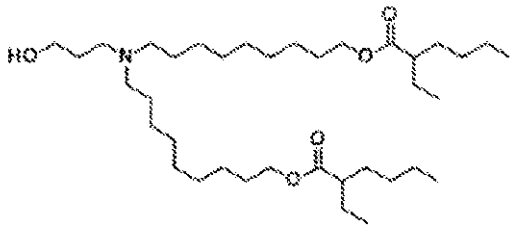
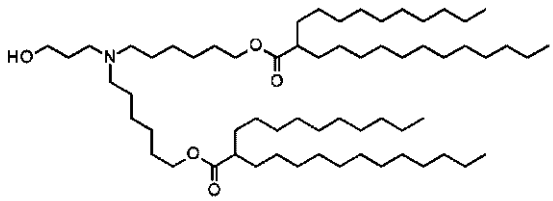
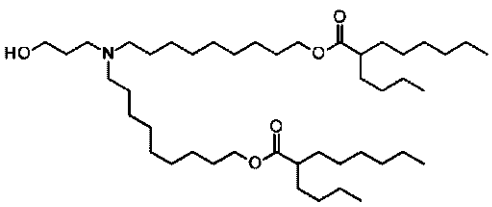
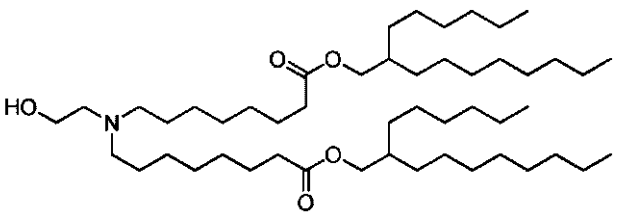
【表３－５】

番号	構造	調製方法*
III-26		F
III-27		F
III-28		F
III-29		F
III-30		F
III-31		F
III-32		F

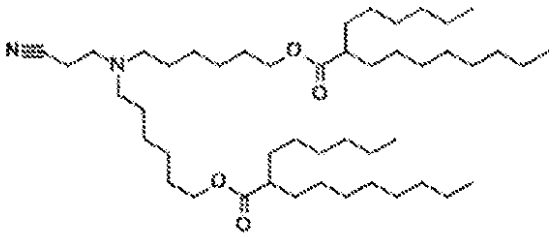
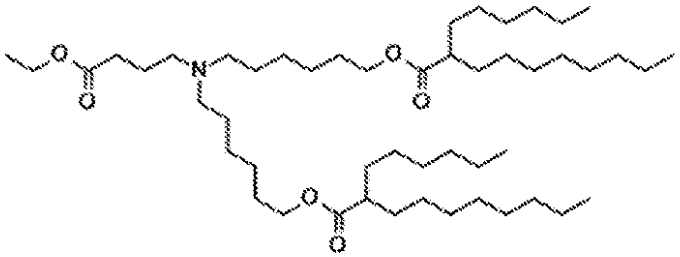
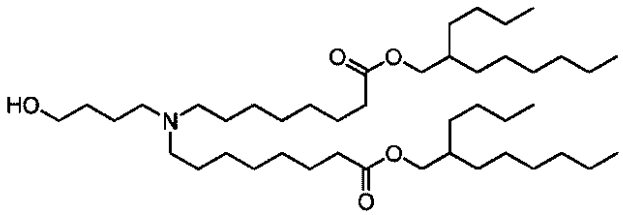
【表３－６】

番号	構造	調製方法*
III-33		F
III-34		F
III-35		F
III-36		F
III-37		F
III-38		F
III-39		F

【表３－７】

番号	構造	調製方法*
III-40		F
III-41		F
III-42		F
III-43		F
III-44		F
III-45		F
III-46		F

【表３－８】

番号	構造	調製方法*
III-47		F
III-48		F
III-49		F

*は、脂質を調製するための一般的な合成方法を指す

【０３２０】

上記の構造（ＩＩＩ）の化合物の任意の実施形態、ならびに上記の化合物の構造（ＩＩＩ）の任意の特定の置換基および／または変数は、独立に、構造（ＩＩＩ）の化合物の他の実施形態ならびに／または置換基および／もしくは変数と組み合わせて、上で具体的に記載されていない本発明の実施形態を形成することができることが理解される。さらに、特定の実施形態および／または請求項において任意の特定のＲ基、Ｌ基、Ｇ基、Ａ基、または変数ａ、ｎ、ｘ、ｙ、もしくはｚに関して置換基および／または変数の一覧が列挙されている場合には、個々の置換基および／または変数それぞれを特定の実施形態および／または請求項から削除することができること、ならびに残りの置換基および／または変数の一覧は本発明の範囲内に入るとみなされることが理解される。

【０３２１】

本説明において、示されている式の置換基および／または変数の組合せは、そのような寄与により安定な化合物がもたらされる場合にのみ許容されることが理解される。

【０３２２】

一部の実施形態では、構造（ＩＩＩ）の化合物の任意の１つまたは複数および遺伝子編集／遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドを含む組成物が提供される。例えば、一部の実施形態では、ＬＮＰは、構造（ＩＩＩ）の化合物のいずれか、ならびに遺伝子編集／遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチド、ならびに中性脂質、ステロイドおよびポリマーとコンジュゲートした脂質から選択される１つまたは複数の賦形剤を含む。他の薬学的に許容される賦形剤および／または担体も組成物の種々の実施形態に含めることができる。

【０３２３】

一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥおよびＳＭから選択される。一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣである。種々の実施形態では、化合物と中性脂質とのモル比は、約２：１から約８：１の範

囲である。

【０３２４】

種々の実施形態では、組成物は、ステロイドまたはステロイド類似体をさらに含む。ある特定の実施形態では、ステロイドまたはステロイド類似体は、コレステロールである。これらの実施形態の一部では、化合物とコレステロールとのモル比は、約５：１から１：１の範囲である。

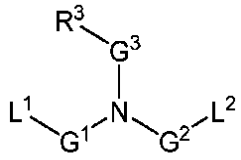
【０３２５】

本明細書に開示されるＬＮＰの種々の実施形態では、ポリマーとコンジュゲートした脂質は、ペグ化脂質である。例えば、一部の実施形態は、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）などのペグ化ジアシルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、４－Ｏ－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－Ｏ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタン二酸（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）などのＰＥＧスクシネートジアシルグリセロール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ）、ペグ化セラミド（ＰＥＧ－ｃｅｒ）、またはω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル－Ｎ－（２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル）カルバメートもしくは２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル－Ｎ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）カルバメートなどのＰＥＧジアルコキシプロピルカルバメートを含む。種々の実施形態では、化合物とペグ化脂質とのモル比は、約１００：１から約２０：１の範囲である。

【０３２６】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドおよび次式（ＩＶ）：

【化３４】



IV

（式中、

L^1は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）R^1、－（Ｃ＝Ｏ）ＯR^1、－Ｃ（＝Ｏ）R^1、－ＯR^1、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^1$、－Ｓ－Ｓ$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^1$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）$R^1$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$または－Ｎ$R^a$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^1$であり；

L^2は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）R^2、－（Ｃ＝Ｏ）ＯR^2、－Ｃ（＝Ｏ）R^2、－ＯR^2、－Ｓ（Ｏ）$_x$$R^2$、－Ｓ－Ｓ$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｓ$R^2$、－ＳＣ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）$R^2$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－Ｎ$R^c$Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$；－Ｎ$R^d$Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^2$または直接結合であり；

G^1およびG^2は、それぞれ独立に、Ｃ$_2$～Ｃ$_{12}$アルキレンまたはＣ$_2$～Ｃ$_{12}$アルケニレンであり；

G^3は、Ｃ$_1$～Ｃ$_{24}$アルキレン、Ｃ$_2$～Ｃ$_{24}$アルケニレン、Ｃ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルキレンまたはＣ$_3$～Ｃ$_8$シクロアルケニレンであり；

R^a、R^b、R^dおよびR^eは、それぞれ独立に、ＨまたはＣ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_2$～Ｃ$_{12}$アルケニルであり；

R^cおよびR^fは、それぞれ独立に、Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_2$～Ｃ$_{12}$アルケニルであり；

R^1およびR^2は、それぞれ独立に、分枝状Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$アルキルまたは分枝Ｃ$_6$～Ｃ$_{24}$アルケニルであり；

R^3は、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（R^4）R^5または－Ｃ（＝Ｏ）ＯR^6であり；

R^4は、Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルであり；

R^5は、HまたはC$_1$～C$_8$アルキルまたはC$_2$～C$_8$アルケニルであり；
R^6は、H、アリールまたはアラルキルであり；
xは、０、１または２である）
を有する脂質化合物またはその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体を含む。

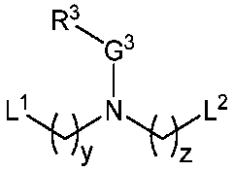
【０３２７】

式（ＩＶ）のある特定の実施形態では、G^3は、置換されていない。その他の特定の実施形態では、G^3は、C$_2$～C$_{12}$アルキレンであり、例えば、一部の実施形態では、G^3は、C$_3$～C$_7$アルキレンである、または他の実施形態では、G^3は、C$_3$～C$_{12}$アルキレンである。

【０３２８】

式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、化合物は、以下の構造（ＩＶＡ）：

【化３５】



(IVA)

（式中、ｙおよびｚは、それぞれ独立に、２から１２の範囲の整数である）を有する。

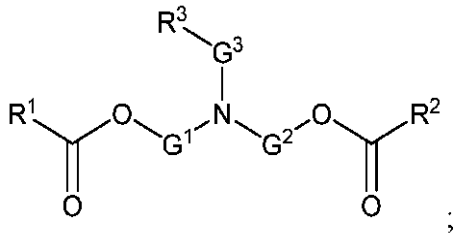
【０３２９】

式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、L^1は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）R^1、－（Ｃ＝Ｏ）ＯR^1または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^b$$R^c$であり、$L^2$は、－Ｏ（Ｃ＝Ｏ）$R^2$、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ$R^2$または－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。例えば、一部の実施形態では、$L^1$および$L^2$のそれぞれが、－（Ｃ＝Ｏ）Ｏ－である。他の実施形態では、L^1は－（Ｃ＝Ｏ）ＯR^1であり、L^2は－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^e$$R^f$である。

【０３３０】

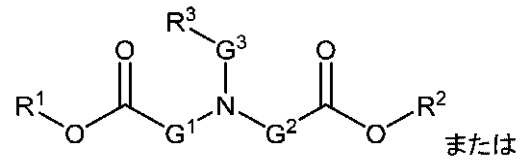
前述の式（ＩＶ）の化合物の他の実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＶＢ）、（ＩＶＣ）または（ＩＶＤ）のうちの１つを有する：

【化３６】



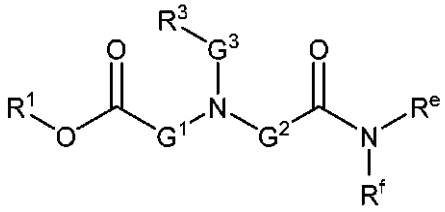
(IVB)

；



または

(IVC)

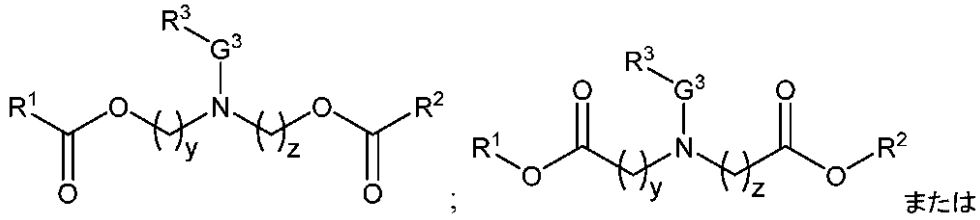


(IVD)

【０３３１】

前述の実施形態の一部では、化合物は、構造（ＩＶＢ）を有し、他の実施形態では、化合物は、構造（ＩＶＣ）を有し、さらに他の実施形態では、化合物は、構造（ＶＩＤ）を有する。

【０３３２】
前述の一部の異なる実施形態では、化合物は、以下の構造（ＩＶＥ）、（ＶＩＦ）または（ＩＶＧ）：
【化３７】

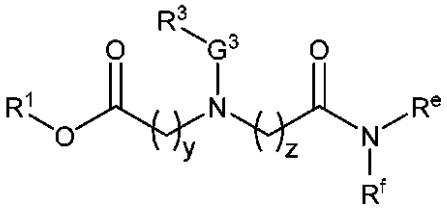


(IVE)

;

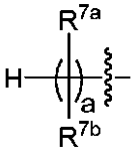
または

(IVF)



(IVG)

（式中、ｙおよびｚは、それぞれ独立に、２から１２の範囲の整数である）のうちの１つを有する。
【０３３３】
式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、ｙおよびｚは、それぞれ独立に、２から１０まで、２から８まで、４から１０までまたは４から７の範囲の整数である。例えば、式（ＩＶ）の一部の実施形態では、ｙは、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２である。式（ＩＶ）の一部の実施形態では、ｚは、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２である。式（ＩＶ）の一部の実施形態では、ｙとｚは同じであり、他の実施形態では、ｙおよびｚは異なる。
【０３３４】
式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、R^1もしくはR^2、または両方が分枝状C_6～C_{24}アルキルである。例えば、式（ＩＶ）の一部の実施形態では、R^1およびR^2は、それぞれ独立に、以下の構造：
【化３８】



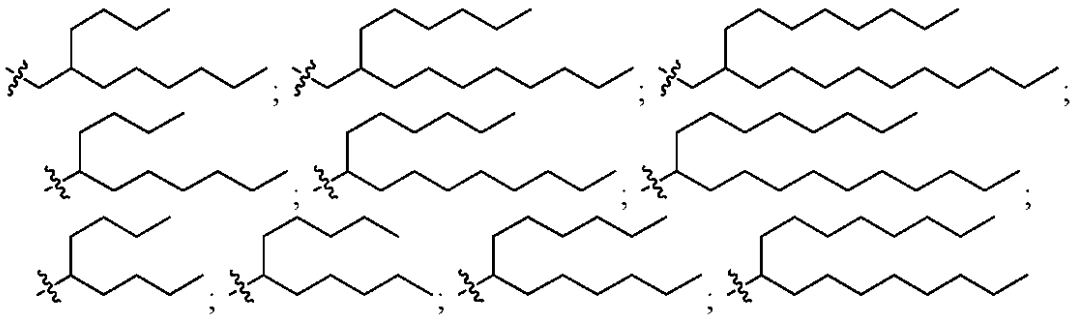
（式中、
R^{7a}およびR^{7b}は、各出現につき、独立に、ＨまたはC_1～C_{12}アルキルであり；
ａは、２から１２までの整数であり、
R^{7a}、R^{7b}およびａは、それぞれ、R^1およびR^2がそれぞれ独立に炭素原子を６個から２０個までを含むように選択される）を有する。例えば、一部の実施形態では、ａは、５から９までまたは８から１２の範囲の整数である。
【０３３５】
式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、R^{7a}の少なくとも１つの出現は、Ｈである。例えば、式（ＩＶ）の一部の実施形態では、R^{7a}は、各出現につき、Ｈである。前述の式（ＩＶ）の化合物の他の異なる実施形態では、R^{7b}の少なくとも１つの出現は、C_1～C_8アルキルである。例えば、一部の実施形態では、C_1～C_8アルキルは、メチル

、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０３３６】

式（ＩＶ）の異なる実施形態では、R^1もしくはR^2、または両方は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化３９】



【０３３７】

式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、R^b、R^c、R^eおよびR^fは、それぞれ独立に、C_3～C_{12}アルキルである。例えば、式（ＩＶ）の一部の実施形態では、R^b、R^c、R^eおよびR^fは、ｎ－ヘキシルであり、他の実施形態では、R^b、R^c、R^eおよびR^fは、ｎ－オクチルである。

【０３３８】

式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、R^3は、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（R^4）R^5である。式（ＩＶ）のその他の特定の実施形態では、R^4は、エチル、プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－オクチルまたはｎ－ノニルである。式（ＩＶ）のある特定の実施形態では、R^5は、Ｈ、メチル、エチル、プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ヘキシルまたはｎ－オクチルである。

【０３３９】

式（ＩＶ）の一部の実施形態では、R^3は、－Ｃ（＝Ｏ）ＯR^6である。式（ＩＶ）のある特定の実施形態では、R^6は、ベンジルであり、他の実施形態では、R^6は、Ｈである。

【０３４０】

式（ＩＶ）の前述の実施形態の一部では、R^4、R^5およびR^6は、独立に、－ＯR^g、－ＮR^gＣ（＝Ｏ）R^h、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ$R^g$$R^h$、－Ｃ（＝Ｏ）$R^h$、－ＯＣ（＝Ｏ）$R^h$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ$R^h$および－Ｏ$R^h$ＯＨからなる群から選択される１つまたは複数の置換基で、必要に応じて置換されており、ここで、

R^gは、各出現につき、独立に、ＨまたはC_1～C_6アルキルであり；

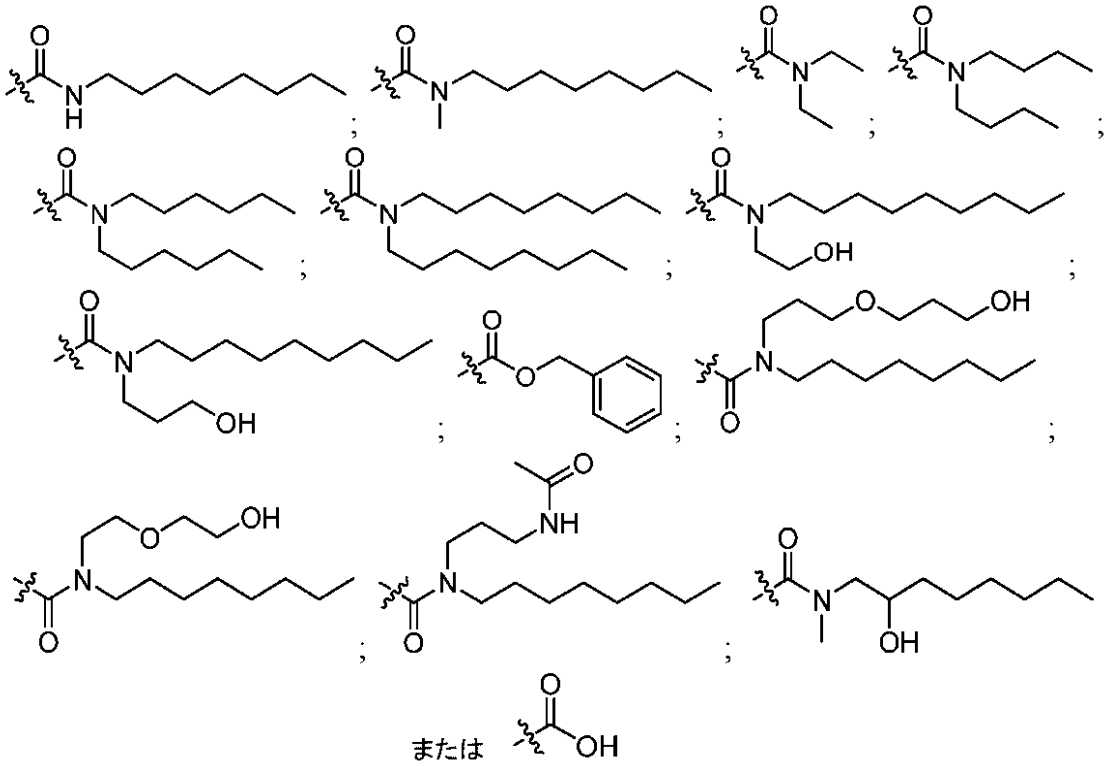
R^hは、各出現につき、独立に、C_1～C_6アルキルであり；

R^iは、各出現につき、独立に、C_1～C_6アルキレンである。

【０３４１】

式（ＩＶ）のある特定の個別の実施形態では、R^3は、以下の構造のうちの１つを有する：

【化４０】

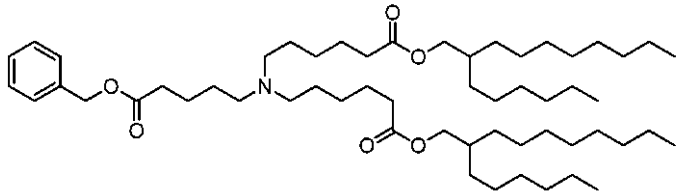
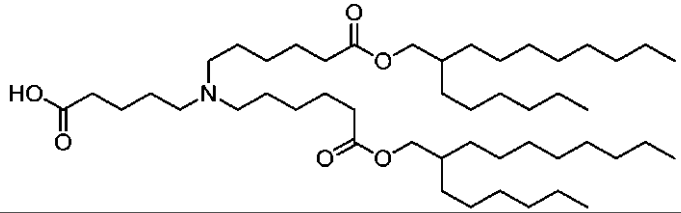
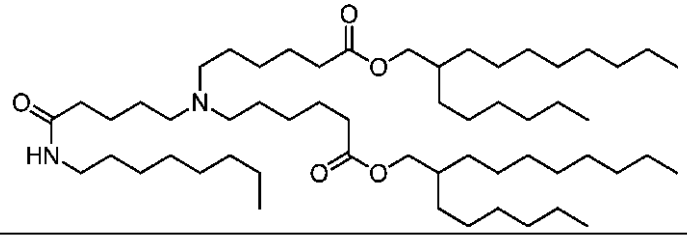


【０３４２】

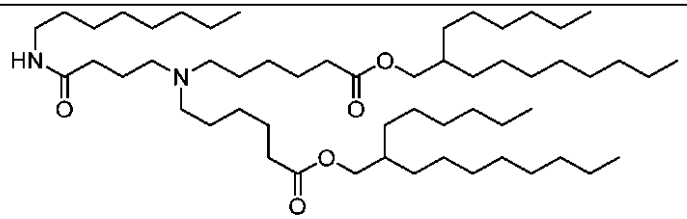
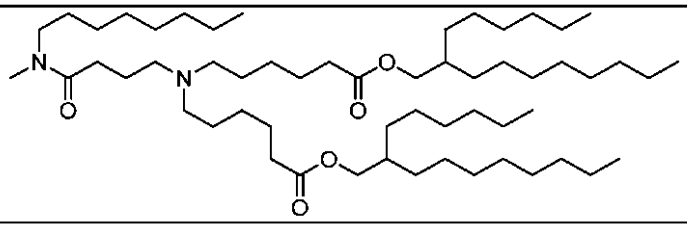
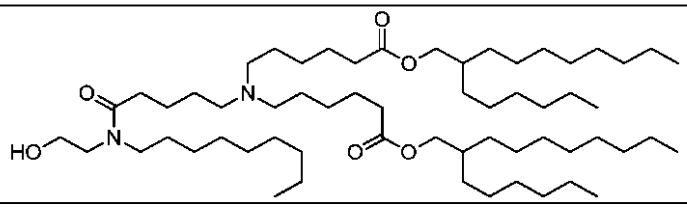
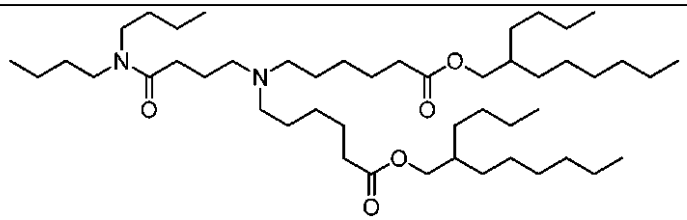
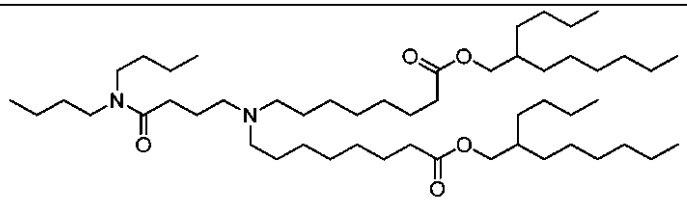
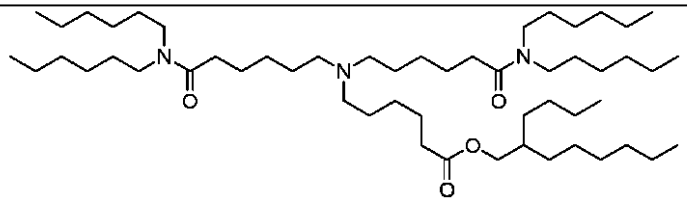
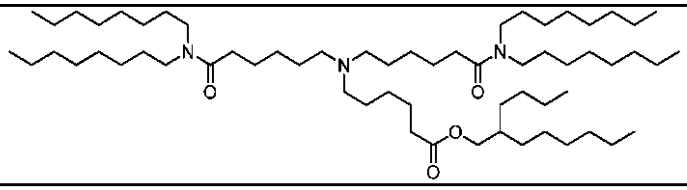
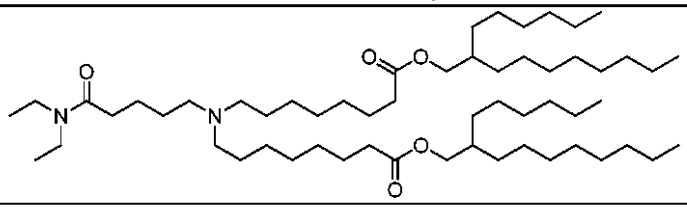
式（ＩＶ）の種々の異なる実施形態では、化合物は、以下の表ＩＶに記載されている構造のうちの１つを有する。

【表４－１】

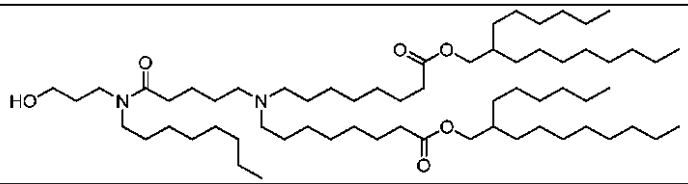
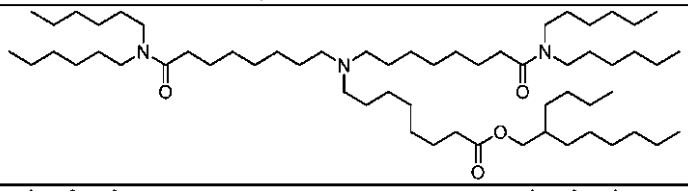
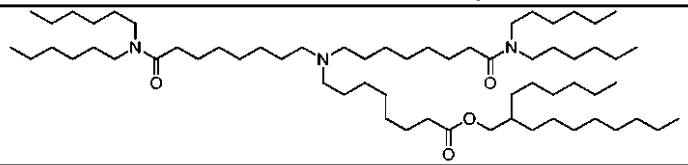
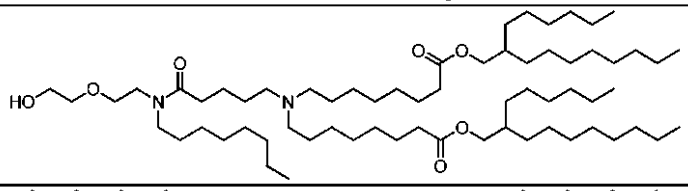
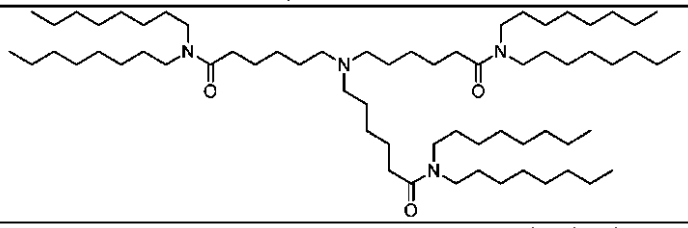
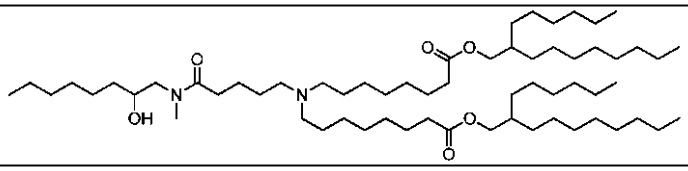
表IV:式(IV)の代表的な脂質化合物

番号	構造	調製方法
1		G
2		G
3		G

【表４－２】

番号	構造	調製方法
4		G
5		G
6		G
7		H
8		H
9		I
10		I
11		G

【表４－３】

番号	構造	調製方法
12		G
13		I
14		I
15		G
16		I
17		G

【０３４３】

上記の式（ＩＶ）の化合物の任意の実施形態、ならびに上記の式（ＩＶ）の化合物の任意の特定の置換基および／または変数は、独立に、式（ＩＶ）の化合物の他の実施形態ならびに／または置換基および／もしくは変数と組み合わせて、上で具体的に記載されていない本発明の実施形態を形成することができることが理解される。さらに、特定の実施形態および／または請求項において任意の特定のＲ基、Ｌ基、Ｇ基、または変数ａ、ｘ、ｙ、もしくはｚに関して置換基および／または変数の一覧が列挙されている場合には、個々の置換基および／または変数それぞれを特定の実施形態および／または請求項から削除することができること、ならびに残りの置換基および／または変数の一覧は本発明の範囲内に入るとみなされることが理解される。

【０３４４】

本説明において、示されている式の置換基および／または変数の組合せは、そのような寄与により安定な化合物がもたらされる場合にのみ許容されることが理解される。

【０３４５】

一部の実施形態では、式（ＩＶ）の化合物の任意の１つまたは複数および遺伝子編集／遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドを含む組成物が提供される。例えば、一部の実施形態では、組成物は、式（ＩＶ）の化合物のいずれか、ならびに遺伝子治

療試薬としての活性を有するポリヌクレオチド、ならびに中性脂質、ステロイドおよびポリマーとコンジュゲートした脂質から選択される１つまたは複数の賦形剤を含む。他の薬学的に許容される賦形剤および／または担体も組成物の種々の実施形態に含めることができる。

【０３４６】

一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥおよびＳＭから選択される。一部の実施形態では、中性脂質は、ＤＳＰＣである。種々の実施形態では、化合物と中性脂質とのモル比は、約２：１から約８：１の範囲である。

【０３４７】

種々の実施形態では、組成物は、ステロイドまたはステロイド類似体をさらに含む。ある特定の実施形態では、ステロイドまたはステロイド類似体は、コレステロールである。これらの実施形態の一部では、化合物とコレステロールとのモル比は、約５：１から１：１の範囲である。

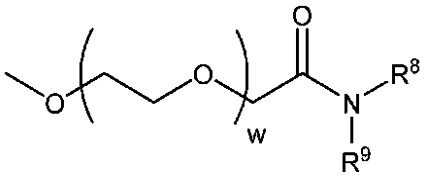
【０３４８】

種々の実施形態では、ポリマーとコンジュゲートした脂質は、ペグ化脂質である。例えば、一部の実施形態は、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）などのペグ化ジアシルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、４－Ｏ－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－Ｏ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタン二酸（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）などのＰＥＧスクシネートジアシルグリセロール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ）、ペグ化セラミド（ＰＥＧ－ｃｅｒ）、またはω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル－Ｎ－（２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル）カルバメートもしくは２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル－Ｎ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）カルバメートなどのＰＥＧジアルコキシプロピルカルバメートを含む。種々の実施形態では、化合物とペグ化脂質とのモル比は、約１００：１から約２０：１の範囲である。

【０３４９】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、次式（Ｖ）：

【化４１】



(V)

（式中、

R^8およびR^9は、それぞれ独立に、炭素原子を１０個から３０まで含有する、直鎖状または分枝状、飽和または不飽和アルキル鎖であり、ここで、アルキル鎖は、必要に応じて１つまたは複数のエステル結合によって遮られている；ｗは、３０から６０の範囲の平均値を有する）

を有するペグ化脂質またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体を含む。

【０３５０】

式（Ｖ）の一部の実施形態では、R^8およびR^9は、それぞれ独立に、炭素原子を１２個から１６個まで含む直鎖状の飽和アルキル鎖である。他の実施形態では、平均ｗは、約４５である。

【０３５１】

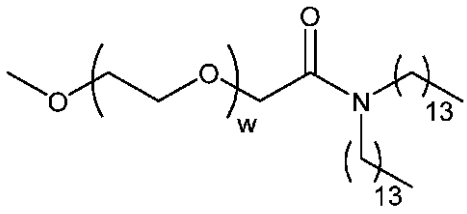
式（Ｖ）の他の実施形態では、平均ｗは、４２から５５の範囲である。例えば、４２、

４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４または５５。一部の特定の実施形態では、ｗは、約４９である。

【０３５２】

一部の実施形態では、ペグ化脂質は、以下の構造（Ｖａ）：

【化４２】



(Va)

（式中、平均ｗは、約４９である）を有する。

【０３５３】

送達

投与目的に関して、本発明のＬＮＰは、未加工の化学物質として投与することもでき、または医薬組成物として製剤化することもできる。本発明の医薬組成物は、遺伝子治療試薬としての活性を有するポリヌクレオチドなどの治療剤を含むＬＮＰ、構造（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および／または（ＩＶ）の化合物、ならびに１つまたは複数の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む。構造（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および／または（ＩＶ）の化合物は、組成物中に、脂質ナノ粒子を形成し、例えば、特定の目的の疾患または状態を処置するために治療剤を送達するために有効な量で存在する。適切な濃度および投与量は、当業者が容易に決定することができる。

【０３５４】

タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）、ポリヌクレオチドならびに／または本明細書に記載されるタンパク質および／もしくポリヌクレオチドを含む組成物は、例えばタンパク質および／またはｍＲＮＡ構成成分を含むＬＮＰの注射によってを含む任意の適する手段によって標的細胞に送達することができる。

【０３５５】

適する細胞としては、真核および原核細胞ならびに／または細胞株が挙げられるがこれらに限定されない。そのような細胞またはそのような細胞から生成された細胞株の非限定的例は、Ｔ細胞、ＣＯＳ、ＣＨＯ（例えば、ＣＨＯ－Ｓ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－ＤＧ４４、ＣＨＯ－ＤＵＸＢ１１、ＣＨＯ－ＤＵＫＸ、ＣＨＯＫ１ＳＶ）、ＶＥＲＯ、ＭＤＣＫ、ＷＩ３８、Ｖ７９、Ｂ１４ＡＦ２８－Ｇ３、ＢＨＫ、ＨａＫ、ＮＳ０、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、ＨｅＬａ、ＨＥＫ２９３（例えば、ＨＥＫ２９３－Ｆ、ＨＥＫ２９３－Ｈ、ＨＥＫ２９３－Ｔ）およびｐｅｒＣ６細胞、ならびにＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｕｇｉｐｅｒｄａ（Ｓｆ）などの昆虫細胞、またはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａおよび Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓなどの真菌細胞を含む。ある特定の実施形態では細胞株は、ＣＨＯ－Ｋ１、ＭＤＣＫまたはＨＥＫ２９３細胞株である。適する細胞は、例として、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）、造血幹細胞、ニューロン幹細胞および間葉系幹細胞などの幹細胞も含む。

【０３５６】

ＤＮＡ結合ドメインを含むタンパク質を送達する方法はまた、例えば、その全ての開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第６，４５３，２４２号；同第６，５０３，７１７号；同第６，５３４，２６１号；同第６，５９９，６９２号；同第６，６０７，８８２号；同第６，６８９，５５８号；同第６，８２４，９７８号；同第６，９３３，１１３号；同第６，９７９，５３９号；同第７，０１３，２１９号；および同第７，１６３，８２４号に記載されるものを包含する。

【０３５７】

ＤＮＡ結合ドメインおよび本明細書に記載されるこれらのＤＮＡ結合ドメインを含む融合タンパク質も、１つまたは複数のＤＮＡ結合タンパク質をコードする配列を含有するベクターを使用して送達することができる。さらに、さらなる核酸（例えば、ドナー）もこれらのベクターを介して送達することができる。プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター；ヘルペスウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターなどを限定されずに含む、任意のベクター系を使用することができる。参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第６，５３４，２６１号；同第６，６０７，８８２号；同第６，８２４，９７８号；同第６，９３３，１１３号；同第６，９７９，５３９号；同第７，０１３，２１９号；および同第７，１６３，８２４号も参照。さらに、これらのベクターのいずれもが１つもしくは複数のＤＮＡ結合タンパク質コード配列および／またはさらなる核酸を必要に応じて含むことができることは明らかである。それにより、本明細書に記載される１つまたは複数のＤＮＡ結合タンパク質、および必要に応じてさらなるＤＮＡが細胞に導入される場合、それらは同じベクター上でまたは異なるベクター上で運ばれ得る。複数のベクターが使用される場合、各ベクターは１つまたは複数のＤＮＡ結合タンパク質をコードする配列および所望のさらなる核酸を含むことができる。

【０３５８】

従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子移行法は、工学技術で作製されたＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸を細胞（例えば、哺乳動物細胞）および標的組織に導入するために、ならびに所望のさらなるヌクレオチド配列を共導入するために使用することができる。そのような方法は、核酸（例えば、ＤＮＡ結合タンパク質および／またはドナーをコードする）を細胞にｉｎ　ｖｉｔｒｏ投与するために使用できる。ある特定の実施形態では、核酸は、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ遺伝子治療用途のために投与される。非ウイルス性のベクター送達系には、ＤＮＡプラスミド、裸の核酸、およびリポソームまたはポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合体を形成した核酸が含まれる。ウイルスベクター送達系にはＤＮＡウイルスおよびＲＮＡウイルスが含まれ、それらは、細胞への送達後にエピソームゲノムまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有する。遺伝子治療手順のレビューについては、Anderson、Science　２５６巻：８０８～８１３頁（１９９２年）；NabelおよびFelgner、TIBTECH　１１巻：２１１～２１７頁（１９９３年）；MitaniおよびCaskey、TIBTECH　１１巻：１６２～１６６頁（１９９３年）；Dillon、TIBTECH　１１巻：１６７～１７５頁（１９９３年）；Miller、Nature　３５７巻：４５５～４６０頁（１９９２年）；Van　Brunt、Biotechnology　６巻（１０号）：１１４９～１１５４頁（１９８８年）；Vigne、Restorative　Neurology　and　Neuroscience　８巻：３５～３６頁（１９９５年）；KremerおよびPerricaudet、British　Medical　Bulletin　５１巻（１号）：３１～４４頁（１９９５年）；Haddadaら、Current　Topics　in　Microbiology　and　Immunology　Doerfler　and　Boehm（編）（１９９５年）；およびYuら、Gene　Therapy　１巻：１３～２６頁（１９９４年）を参照のこと。

【０３５９】

核酸の非ウイルス性の送達方法には、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、脂質ナノ粒子、免疫リポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸のＤＮＡ、ｍＲＮＡ、人工ビリオンおよび作用物質によって強化されたＤＮＡの取込みが含まれる。例えばＳｏｎｉｔｒｏｎ　２０００システム（Ｒｉｃｈ－Ｍａｒ）を使用するソノポレーションを、核酸の送達のために使用することもできる。好ましい実施形態では、１つまたは複数の核酸は、ｍＲＮＡとして送達される。同様に好ましいのは、翻訳効率の増加のためおよび／またはｍＲＮＡ安定性のためのキャッピングされたｍＲＮＡの使用である。特に好ましいのは、ＡＲＣＡ（抗リバースキャップ類似物）キャップまたはそのバリアントである。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，０７４，５９６号および第８，１５３，７７３号を参照。

【０３６０】

さらなる例示的な核酸送達系には、Ａｍａｘａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｃｏｌｏｇｎｅ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｍａｘｃｙｔｅ，Ｉｎｃ．（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、Ｍａｒｙｌａｎｄ）、ＢＴＸ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ、ＭＡ）およびＣｏｐｅｒｎｉｃｕｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　Ｉｎｃ．によって提供されるものが含まれる、（例えば、ＵＳ６００８３３６を参照のこと）。リポフェクションは、例えば、ＵＳ５，０４９，３８６；ＵＳ４，９４６，７８７；およびＵＳ４，８９７，３５５に記載され、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標）およびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＲＮＡｉＭＡＸ））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションのために適するカチオン性および中性脂質には、Ｆｅｌｇｎｅｒ、ＷＯ９１／１７４２４、ＷＯ９１／１６０２４のものが含まれる。送達は、細胞に対して（ｅｘ　ｖｉｖｏ投与）、または標的組織に対して（ｉｎ　ｖｉｖｏ投与）であり得る。

【０３６１】

免疫脂質複合体などの標的化リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal、Science　２７０巻：４０４～４１０頁（１９９５年）；Blaeseら、Cancer　Gene　Ther.２巻：２９１～２９７頁（１９９５年）；Behrら、Bioconjugate　Chem.５巻：３８２～３８９頁（１９９４年）；Remyら、Bioconjugate　Chem.５巻：６４７～６５４頁（１９９４年）；Gaoら、Gene　Therapy　２巻：７１０～７２２頁（１９９５年）；Ahmadら、Cancer　Res.５２巻：４８１７～４８２０頁（１９９２年）；米国特許第４，１８６，１８３号、４，２１７，３４４号、４，２３５，８７１号、４，２６１，９７５号、４，４８５，０５４号、４，５０１，７２８号、４，７７４，０８５号、４，８３７，０２８号および４，９４６，７８７号を参照のこと）。

【０３６２】

送達のさらなる方法には、送達する核酸をＥｎＧｅｎｅＩＣ送達ビヒクル（ＥＤＶ）にパッケージすることの使用が含まれる。これらのＥＤＶは、二重特異的抗体の１つのアームが標的組織への特異性を有し、他方がＥＤＶへの特異性を有する二重特異的抗体を使用して、標的組織に特異的に送達される。抗体はＥＤＶを標的細胞表面に運び、次に、ＥＤＶはエンドサイトーシスによって細胞に運ばれる。細胞に入ると、内容物は放出される（MacDiarmidら（２００９年）Nature　Biotechnology　２７巻（７号）：６４３頁を参照されたい）。

【０３６３】

所望により、工学技術で作製されたＤＮＡ結合タンパク質、および／またはドナーをコードする核酸の送達のための、ＲＮＡウイルスベースのまたはＤＮＡウイルスベースの系の使用は、体内の特異的細胞にウイルスを向かわせて、核にウイルスのペイロードを輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者に直接的に（ｉｎ　ｖｉｖｏで）投与することができるか、または、それらは細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで処置するために使用することができ、改変された細胞は患者に（ｅｘ　ｖｉｖｏで）投与される。核酸の送達のための従来のウイルスベースの系には、遺伝子導入のためのレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、ワクシニアベクターおよび単純ヘルペスウイルスベクターが限定されずに含まれる。宿主ゲノムへの組込みは、レトロウイルス、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルス遺伝子導入方法で可能であり、挿入される導入遺伝子の長期発現をしばしばもたらす。さらに、多くの異なる細胞型および標的組織において、高い形質導入効率が観察された。

【０３６４】

外来のエンベロープタンパク質を組み込み、標的細胞の潜在的標的集団を拡張することによって、レトロウイルスの向性を変更することができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入または感染させ、高いウイルス力価を一般的にもたらすことができるレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最高６～１０ｋｂの外来配列のためのパッケージング能力を有するシス作用性ロングターミナルリピートで構成される。ベクターの複製およ

びパッケージングのために最小限のシス作用性ＬＴＲが十分であり、それらは次に、恒久的導入遺伝子発現を提供するために標的細胞の中に治療的遺伝子を組み込むために使用される。広く使用されているレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）に基づくものおよびそれらの組合せが含まれる（例えば、Buchscherら、Ｊ．Virol.６６巻：２７３１～２７３９頁（１９９２年）；Johannら、Ｊ．Virol.６６巻：１６３５～１６４０頁（１９９２年）；Sommerfeltら、Virol.１７６巻：５８～５９頁（１９９０年）；Wilsonら、Ｊ．Virol.６３巻：２３７４～２３７８頁（１９８９年）；Millerら、Ｊ．Virol.６５巻：２２２０～２２２４頁（１９９１年）；ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００を参照のこと）。

【０３６５】

一過性の発現が好まれる適用では、アデノウイルスをベースにした系を使用することができる。アデノウイルスをベースにしたベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターで、高い力価および高レベルの発現が得られた。このベクターは、比較的単純な系において大量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス（「ＡＡＶ」）ベクターは、例えば、核酸およびペプチドのｉｎ　ｖｉｔｒｏ産生において、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏおよびｅｘ　ｖｉｖｏの遺伝子治療手順のために、標的核酸で細胞を形質導入するためにも使用される（例えば、Westら、Virology　１６０巻：３８～４７頁（１９８７年）；米国特許第４，７９７，３６８号；ＷＯ９３／２４６４１；Kotin、Human　Gene　Therapy　５巻：７９３～８０１頁（１９９４年）；Muzyczka、Ｊ．Clin.　Invest.９４巻：１３５１頁（１９９４年）を参照のこと。組換えＡＡＶベクターの構築は、米国特許第５，１７３，４１４号；Tratschinら、Mol.　Cell.　Biol.５巻：３２５１～３２６０頁（１９８５年）；Tratschinら、Mol.　Cell.　Biol.４巻：２０７２～２０８１頁（１９８４年）；HermonatおよびMuzyczka、PNAS　USA　８１巻：６４６６～６４７０頁（１９８４年）；およびSamulskiら、Ｊ．Virol.６３巻：０３８２２～３８２８頁（１９８９年）を含む、いくつかの刊行物に記載されている。

【０３６６】

臨床試験での遺伝子導入のために少なくとも６つのウイルスベクターアプローチが今日利用でき、それらは、形質導入剤を生成するためにヘルパー細胞株に挿入された遺伝子による欠損ベクターの補完を含むアプローチを利用する。

【０３６７】

ｐＬＡＳＮおよびＭＦＧ－Ｓは、臨床試験で使用されたレトロウイルスベクターの例である（Dunbarら、Blood　８５巻：３０４８～３０５頁（１９９５年）；Kohnら、Nat.　Med.１巻：１０１７～１０２頁（１９９５年）；Malechら、PNAS　USA　９４巻：２２　１２１３３～１２１３８頁（１９９７年））。ＰＡ３１７／ｐＬＡＳＮは、遺伝子治療治験で使用された最初の治療的ベクターであった。（Blaeseら、Science　２７０巻：４７５～４８０頁（１９９５年））。ＭＦＧ－Ｓパッケージベクターで、５０％またはそれより高い形質導入効率が観察された。（Ellemら、Immunol　Immunother.４４巻（１号）：１０～２０頁（１９９７年）；Dranoffら、Hum.　Gene　Ther.１巻：１１１～２頁（１９９７年）。

【０３６８】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター（ｒＡＡＶ）は、欠損非病原性パルボウイルスアデノ随伴２型ウイルスに基づく有望な代替遺伝子送達系である。全てのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するＡＡＶ　１４５ｂｐ逆方向末端反復だけを保持するプラスミドに由来する。形質導入細胞のゲノムへの組込みに起因する効率的な遺伝子導入および安定した導入遺伝子送達は、このベクター系の鍵となる特徴である。（Wagnerら、Lancet３５１巻：９１１７　１７０２～３頁（１９９８年）、Kearnsら、Gene　Ther.９巻：７４８～５５頁（１９９６年））。ＡＡＶ１、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８、ＡＡＶ８．２、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０ならびにＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／

５およびＡＡＶ２／６などの偽型化ＡＡＶを含む他のＡＡＶ血清型を、本発明に従って使用することもできる。

【０３６９】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター（Ａｄ）は、高い力価で産生することができ、いくつかの異なる細胞型を容易に感染させることができる。ほとんどのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子がＡｄ　Ｅ１ａ、Ｅ１ｂおよび／またはＥ３遺伝子を置き換えるように工学技術で作製され、その後、複製欠損ベクターは欠失した遺伝子機能をトランスで供給するヒト２９３細胞において増殖する。Ａｄベクターは、肝臓、腎臓および筋肉において見出されるものなどの非分裂、分化細胞を含む、複数の種類の組織をｉｎ　ｖｉｖｏで形質導入させることができる。従来のＡｄベクターは、大きな運搬能力を有する。臨床試験におけるＡｄベクターの使用例は、筋肉内注射による抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド治療を含んだ（Sterman ら、Hum. Gene Ther. 7巻：１０８３～９頁（１９９８年））。臨床試験における遺伝子導入のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例には、Rosenecker ら、Infection ２４巻：１　５～１０頁（１９９６年）；Sterman ら、Hum. Gene Ther. 9巻：７号、１０８３～１０８９頁（１９９８年）；Welsh ら、Hum. Gene Ther. 2巻：２０５～１８頁（１９９５年）；Alvarez ら、Hum. Gene Ther. 5巻：５９７～６１３頁（１９９７年）；Topf ら、Gene Ther. 5巻：５０７～５１３頁（１９９８年）；Sterman ら、Hum. Gene Ther. 7巻：１０８３～１０８９頁（１９９８年）が含まれる。

【０３７０】

パッケージング細胞は、宿主細胞を感染させることが可能であるウイルス粒子を形成するために使用される。そのような細胞には、アデノウイルスをパッケージする２９３細胞、およびレトロウイルスをパッケージするψ２細胞またはＰＡ３１７細胞が含まれる。遺伝子治療で使用されるウイルスベクターは、ウイルス粒子に核酸ベクターをパッケージするプロデューサー細胞株によって通常生成される。ベクターは、パッケージングおよび以降の宿主への組込み（適用可能な場合）のために必要とされる最小限のウイルス配列を一般的に含有し、他のウイルス配列は発現させるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられる。欠落しているウイルスの機能は、パッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療で使用されるＡＡＶベクターは、宿主ゲノムへのパッケージングおよび組込みのために必要であるＡＡＶゲノムからの逆方向末端反復（ＩＴＲ）配列を一般的に所有するだけである。ウイルスＤＮＡは、他のＡＡＶ遺伝子、すなわちｒｅｐおよびｃａｐをコードするが、ＩＴＲ配列を欠いているヘルパープラスミドを含有する細胞株にパッケージされる。細胞株は、ヘルパーとしてアデノウイルスにも感染する。ヘルパーウイルスは、ＡＡＶベクターの複製およびヘルパープラスミドからのＡＡＶ遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ＩＴＲ配列の欠如に起因して、有意な量でパッケージされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがＡＡＶより感受性である熱処理によって低減することができる。さらに、ＡＡＶは、バキュロウイルス系を使用して製造することができる（例えば米国特許第６，７２３，５５１号および第７，２７１，００２号を参照）。

【０３７１】

２９３またはバキュロウイルス系からのＡＡＶ粒子の精製は、典型的にはウイルスを産生する細胞の成長、続く細胞上清からのウイルス粒子の回収または、細胞を溶解することおよび粗溶解物からウイルスを回収することを含む。次にＡＡＶは、イオン交換クロマトグラフィー（例えば米国特許第７，４１９，８１７号および第６，９８９，２６４号を参照）、イオン交換クロマトグラフィーならびにＣｓＣｌ密度遠心分離（例えばＰＣＴ公開ＷＯ２０１１０９４１９８Ａ１０）、免疫親和性クロマトグラフィー（例えばＷＯ２０１６１２８４０８）またはＡＶＢセファロース（例えばＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用する精製を含む、当技術分野において公知の方法によって精製される。

【０３７２】

多くの遺伝子治療適用では、遺伝子治療ベクターが特定の組織型に高度の特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外部表面のウイルスコートタンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現することによって所与の細胞型に対して特異性を有するように改変することができる。リガンドは、目的の細胞型に存在することが公知である受容体に親和性を有するように選択される。例えば、Hanら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９２巻：９７４７～９７５１頁（１９９５年））は、モロニーマウス白血病ウイルスは、ｇｐ７０に融合したヒトヘレグリンを発現するように改変することができること、および組換えウイルスは、ヒト上皮増殖因子受容体を発現するある特定のヒト乳がん細胞を感染させることを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス－標的細胞対に拡張することができる。例えば、繊維状ファージは、選択される事実上いかなる細胞受容体に特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、ＦＡＢまたはＦｖ）を提示するように、工学技術で作製することができる。上の記載はウイルスベクターに主に適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。そのようなベクターは、特異的標的細胞による取込みを有利にする、特異的取込み配列を含有するように工学技術で作製することができる。

【０３７３】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の送達方法は、上記のこれらの方法を含むことができる。例えば、動物モデルにおいて、ｉｎ ｖｉｔｒｏで転写されたＣａｓをコードするｍＲＮＡまたは組換えＣａｓタンパク質を１細胞期胚にガラス針を使用して直接注射して、動物をゲノム編集することができる。ＣａｓおよびガイドＲＮＡをｉｎ ｖｉｔｒｏで細胞において発現させるために、典型的には、それらをコードするプラスミドを、リポフェクションまたはエレクトロポレーションによって細胞にトランスフェクトする。また、組換えＣａｓタンパク質とｉｎ ｖｉｔｒｏで転写されたガイドＲＮＡの複合体を形成することができ、そこで、Ｃａｓ－ガイドＲＮＡリボ核タンパク質が目的の細胞に取り込まれる（Kimら（２０１４年）Genome Res ２４巻（６号）：１０１２頁）。治療目的では、ＣａｓおよびガイドＲＮＡをウイルスによる技法とウイルスによらない技法の組合せによって送達することができる。例えば、ＣａｓをコードするｍＲＮＡをナノ粒子送達によって送達することができ、一方で、ガイドＲＮＡおよび任意の所望の導入遺伝子または修復鋳型をＡＡＶによって送達する（Yinら（２０１６年）Nat Biotechnol ３４巻（３号）、３２８頁）。

【０３７４】

遺伝子治療ベクターは、下記のように、一般的に全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下または頭蓋内注入）または局所適用による、個々の患者への投与によってｉｎ ｖｉｖｏで送達することができる。あるいは、ベクターは、細胞に、例えば個々の患者から外植される細胞（例えば、リンパ球、骨髄吸引物、組織生検）、または汎用性ドナー造血幹細胞にｅｘ ｖｉｖｏで送達することができ、続いて、通常ベクターを取り込んだ細胞の選択の後に、細胞を患者に再移植することができる。

【０３７５】

診断、研究、移植のための、または遺伝子治療のためのｅｘ ｖｉｖｏ細胞トランスフェクション（例えば、宿主生物へのトランスフェクトした細胞の再注入を介して）は、当業者に周知である。好ましい実施形態では、細胞は、被験体生物から単離され、ＤＮＡ結合タンパク質核酸（DNA-binding proteins nucleic acid）（遺伝子またはｃＤＮＡ）を用いてトランスフェクトされ、被験体生物（例えば、患者）に再注入されて戻される。ｅｘ ｖｉｖｏトランスフェクションに適する種々の細胞型は、当業者に周知である（例えば、Freshneyら、Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique（第３版、１９９４年））および患者から細胞をどのように単離および培養するかについての考察について、それに引用される参考文献を参照）。

【０３７６】

一実施形態では、幹細胞は、細胞トランスフェクションおよび遺伝子治療のためにｅｘ

ｖｉｖｏ手順で使用される。幹細胞を使用する有利な点は、ｉｎ ｖｉｔｒｏで幹細胞は他の細胞型に分化できること、または哺乳動物（細胞のドナーなど）に導入することができ、そこで幹細胞が骨髄中で生着することである。ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γおよびＴＮＦ－αなどのサイトカインを使用して臨床に重要な免疫細胞型にＣＤ３４＋細胞をｉｎ ｖｉｔｒｏで分化させるための方法は公知である（Inabaら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６巻：１６９３～１７０２頁（１９９２年）を参照）。

【０３７７】

幹細胞は、形質導入および分化のために公知の方法を使用して単離される。例えば、幹細胞は、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋（Ｔ細胞）、ＣＤ４５＋（ｐａｎＢ細胞）、ＧＲ－１（顆粒球）ならびにＩａｄ（分化した抗原提示細胞）などの不必要な細胞に結合する抗体を用いて骨髄細胞をパニングすることによって骨髄細胞から単離される（Inabaら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６巻：１６９３～１７０２頁（１９９２年）を参照）。

【０３７８】

改変された幹細胞はまた、一部の実施形態において使用することができる。例えば、アポトーシスに対して抵抗性にされたニューロン幹細胞は、幹細胞が本発明のＺＦＰ ＴＦも含有する場合、治療用組成物として使用することができる。アポトーシスへの抵抗性は、幹細胞において、例えば、ＢＡＸ－特異的ＺＦＮまたはＢＡＫ－特異的ＺＦＮを使用して（米国特許出願第１２／４５６，０４３号を参照）、または、カスパーゼ中で破壊されているもの、例えば再度カスパーゼ６特異的ＺＦＮを使用して、ＢＡＸおよび／またはＢＡＫをノックアウトすることによって生じさせることができる。

【０３７９】

治療用ＤＮＡ結合タンパク質（またはこれらのタンパク質をコードする核酸）を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソームなど）は、ｉｎ ｖｉｖｏでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することもできる。代替的に、裸のＤＮＡを投与することができる。投与は、分子を導入して血液または組織細胞と最終的に接触させるために通常使用される、注射、注入、局所適用およびエレクトロポレーションを限定されずに含む経路のいずれかによる。そのような核酸を投与する好適な方法は、当業者に利用可能であり、周知であり、特定の組成物を投与するために２つ以上の経路を使用することができるが、特定の経路が別の経路より速く（immediate）、より有効な反応をしばしば提供することができる。

【０３８０】

ＤＮＡの造血幹細胞への導入のための方法は、例えば米国特許第５，９２８，６３８号に開示されている。造血幹細胞、例えばＣＤ３４＋細胞への導入遺伝子の導入のために有用なベクターには、３５型アデノウイルスが含まれる。

【０３８１】

免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）への導入遺伝子の導入のために適切なベクターには、非組込み型のレンチウイルスベクターが含まれる。例えば、Oryら（１９９６年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９３巻：１１３８２～１１３８８頁；Dullら（１９９８年）Ｊ. Virol.７２巻：８４６３～８４７１頁；Zufferyら（１９９８年）Ｊ. Virol.７２巻：９８７３～９８８０頁；Follenziら（２０００年）Nature Genetics ２５巻：２１７～２２２頁を参照のこと。

【０３８２】

上記したように、開示された方法および組成物は、限定されずに、原核細胞、真菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞ならびに、Ｔ細胞および任意の種類の幹細胞を含むヒト細胞を含む、任意の種類の細胞において使用することができる。タンパク質発現のために適する細胞株は当業者に公知であり、限定されずにＣＯＳ、ＣＨＯ（例えば、ＣＨＯ－Ｓ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－ＤＧ４４、ＣＨＯ－ＤＵＸＢ１１）、ＶＥＲＯ、ＭＤＣＫ、ＷＩ３８、Ｖ７９、Ｂ１４ＡＦ２８－Ｇ３、ＢＨＫ、ＨａＫ、ＮＳ０、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、ＨｅＬａ、ＨＥＫ２９３（例えば、ＨＥＫ２９３－Ｆ、ＨＥＫ２９３－Ｈ、ＨＥＫ２９３－Ｔ）、ｐｅｒＣ６、Ｓｐｏｄｏｐｔｅ

ｒａ　ｆｕｇｉｐｅｒｄａ（Ｓｆ）などの昆虫細胞、ならびにＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、ＰｉｃｈｉａおよびＳｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓなどの真菌細胞を含む。これらの細胞株の後代、バリアントおよび派生物も使用することができる。

【０３８３】

組成物

薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって一部決定される。

【０３８４】

本発明の組成物の投与は、同様の有用性をもたらすために許容される作用物質の投与形式のいずれかによって実施することができる。本発明の医薬組成物は、固体、半固体の形態、液体の形態または気体の形態の調製物、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、液剤、懸濁剤、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル剤、マイクロスフェア剤、およびエアロゾル剤などに製剤化することができる。そのような医薬組成物の投与の典型的な経路としては、限定することなく、経口、局所、経皮、吸入、非経口、舌下、頬側、直腸、膣内、および鼻腔内が挙げられる。本明細書において使用される非経口という用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、皮内、胸骨内注射または注入技法を含む。本発明の医薬組成物は、組成物が患者に投与されると、その中に含有される活性成分が生物により利用可能になるように製剤化される。被験体または患者に投与される組成物は、１回または複数回の投与量単位を取り、例えば、錠剤は単一の投与量単位であってよく、本発明の化合物のエアロゾル形態の容器に複数の投与量単位を保持することができる。そのような剤形の実際の調製方法は、公知である、または当業者には明らかになろう；例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第２０版（Philadelphia College of Pharmacy and Science、２０００年）を参照のこと。投与される組成物は、いずれにしても、本発明の教示と一致して、目的の疾患または状態を処置するための治療有効量の本発明の化合物または薬学的に許容されるその塩を含有する。

【０３８５】

本発明の医薬組成物は、固体または液体の形態であってよい。一態様では、担体（複数可）は粒子であり、したがって、組成物は、例えば錠剤または散剤の形態である。担体（複数可）は、液体であってよく、組成物は、例えば、経口シロップ剤、注射用液剤またはエアロゾル剤であり、これは、例えば、吸入による投与に有用である。

【０３８６】

経口投与が意図されている場合、医薬組成物は固体または液体の形態であることが好ましく、ここで、本明細書で固体または液体のいずれかとみなされる形態には、半固体、半流動体、懸濁液およびゲルの形態が含まれる。

【０３８７】

経口投与用の固体組成物としては、医薬組成物を、散剤、顆粒剤、圧縮錠、丸剤、カプセル剤、チューインガム、ウェーハなどの形態に製剤化することができる。そのような固体組成物は、典型的には、１つまたは複数の不活性な希釈剤または食用担体を含有する。さらに、以下の１つまたは複数が存在してよい：結合物質、例えば、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなど；賦形剤、例えば、デンプン、ラクトースまたはデキストリンなど、崩壊剤、例えば、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、Ｐｒｉｍｏｇｅｌ、トウモロコシデンプンなど；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはＳｔｅｒｏｔｅｘなど；滑剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素など；甘味剤、例えば、スクロースまたはサッカリンなど；香味剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ香味物質など；および着色剤。

【０３８８】

医薬組成物がカプセル剤、例えば、ゼラチンカプセル剤の形態である場合、医薬組成物は、上記の種類の材料に加えて、ポリエチレングリコールまたは油などの液体担体を含有することができる。

【０３８９】
医薬組成物は、液剤、例えば、エリキシル剤、シロップ剤、溶剤、エマルション剤または懸濁剤の形態であってよい。液体は、２つの例として、経口投与用または注射による送達用の場合がある。経口投与が意図されている場合、好ましい組成物は、本化合物に加えて、甘味剤、防腐剤、色素／着色料および調味料の１つまたは複数を含有する。注射によって投与されることが意図された組成物では、界面活性物質、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定剤および等張化剤の１つまたは複数を含めることができる。
【０３９０】
本発明の液体の医薬組成物は、それが溶液であるか懸濁液であるかまたは他の同様の形態であるかにかかわらず、以下のアジュバントの１つまたは複数を含むことができる：滅菌希釈剤、例えば、注射用水、食塩溶液、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒としての機能を果たし得る合成モノグリセリドまたはジグリセリドなどの不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒など；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなど；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸など；緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩、および、張度を調整するための作用物質、例えば、塩化ナトリウムまたはブドウ糖など；凍結保護物質としての機能を果たす作用物質、例えば、スクロースまたはトレハロースなど。非経口用調製物は、アンプル、使い捨てシリンジまたはガラスまたはプラスチック製の複数回用量バイアルに封入することができる。生理食塩水が好ましいアジュバントである。注射用医薬組成物は、滅菌されていることが好ましい。
【０３９１】
非経口投与または経口投与のいずれかが意図された本発明の液体の医薬組成物は、本発明の化合物を、適する投与量が得られる量で含有すべきである。
【０３９２】
本発明の医薬組成物は、局所的投与が意図されたものであってよく、その場合、担体は、液剤、エマルション剤、軟膏剤またはゲル基剤を適切に含むことができる。基剤は、例えば、以下：ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、ミツロウ、鉱油、水およびアルコールなどの希釈剤、ならびに乳化剤および安定剤の１つまたは複数を含むことができる。局所的投与用の医薬組成物中には増粘剤が存在してよい。経皮投与が意図されている場合、組成物は、経皮吸収パッチまたはイオン導入デバイスを含むことができる。
【０３９３】
本発明の医薬組成物は、直腸内投与が意図された、例えば、直腸内で溶けて薬物を放出する坐薬の形態であってよい。直腸内投与用の組成物は、適する非刺激性賦形剤として油性基材を含有することができる。そのような塩基としては、限定することなく、ラノリン、カカオバターおよびポリエチレングリコールが挙げられる。
【０３９４】
本発明の医薬組成物は、固体または液体の投与量単位の物理的形態を改変する種々の材料を含むことができる。例えば、組成物は、活性成分の周囲にコーティング殻を形成する材料を含むことができる。コーティング殻を形成する材料は、典型的には不活性であり、例えば、糖、シェラック、および他の腸溶コーティング剤から選択することができる。あるいは、活性成分をゼラチンカプセルで包むことができる。
【０３９５】
固体または液体の形態の本発明の医薬組成物は、本発明の化合物に結合し、それにより、化合物の送達を補助する作用物質を含むことができる。この能力で作用することができる、適する作用物質には、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはタンパク質が含まれる。
【０３９６】
本発明の医薬組成物は、エアロゾル剤として投与することができる投与量単位からなってよい。エアロゾル剤という用語は、コロイド性の系から加圧パッケージからなる系にわ

たる種々の系を示すために使用される。送達は、活性成分を分配する、液化ガスもしくは圧縮ガスによるものまたは適するポンプ系によるものであってよい。本発明の化合物のエアロゾル剤は、活性成分（複数可）を送達するために、一相系、二相系、または三相系で送達することができる。エアロゾル剤の送達は、必要な容器、活性化因子、弁、副次容器などを含み、これらを一緒にしてキットを形成することができる。当業者は、過度な実験を伴わずに好ましいエアロゾル剤を決定することができる。

【０３９７】

本発明の医薬組成物は、製薬技術分野において周知の方法体系によって調製することができる。例えば、注射によって投与されることが意図された医薬組成物は、本発明の脂質ナノ粒子を滅菌された蒸留水または他の担体と組み合わせて、溶液を形成することによって調製することができる。均一な溶液または懸濁液の形成を促進するために界面活性物質を添加することができる。界面活性物質は、本発明の化合物と非共有結合により相互作用して、水性送達系中への化合物の溶解または均一な懸濁を促進する化合物である。

【０３９８】

本発明の組成物またはそれらの薬学的に許容される塩は、治療有効量で投与され、治療有効量は、使用される特定の治療剤の活性；治療剤の代謝安定性および作用の長さ；患者の年齢、体重、全体的な健康、性別、および食事；投与の方式および時間；排出速度；薬物の組合せ；特定の障害または状態の重症度；および治療を受ける被験体を含めた種々の因子に応じて変動する。

【０３９９】

本発明の組成物は、１つまたは複数の他の治療剤の投与と同時に、その前に、またはその後に投与することもできる。そのような併用治療は、本発明の組成物の単一の医薬投薬形態（ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　ｄｏｓａｇｅ　ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ）および１つまたは複数のさらなる活性薬剤の投与、ならびに本発明の組成物および各活性薬剤のそれ自体の別々の医薬投薬形態での投与を含む。例えば、本発明の組成物および他の活性薬剤を、患者に、錠剤もしくはカプセル剤などの単一の経口投薬組成物として一緒に投与することもでき、または各作用物質を、別々の経口投薬形態で投与することもできる。別々の投薬形態を使用する場合、本発明の化合物および１つまたは複数のさらなる活性薬剤は、基本的に同じ時間に、すなわち、同時に投与することもでき、または別々に時間をずらして、すなわち、逐次的に投与することもできる；併用治療は、これらのレジメン全てを含むものと理解される。

【０４００】

上記の化合物および組成物の調製方法は本明細書において下に記載されており、かつ／または当技術分野で公知である。

【０４０１】

本明細書に記載のプロセスにおいて、中間化合物の官能基を適する保護基によって保護する必要があり得ることが当業者には理解されよう。そのような官能基には、ヒドロキシ、アミノ、メルカプトおよびカルボン酸が含まれる。ヒドロキシに適する保護基には、トリアルキルシリルまたはジアリールアルキルシリル（例えば、ｔ－ブチルジメチルシリル、ｔ－ブチルジフェニルシリルまたはトリメチルシリル）、テトラヒドロピラニル、ベンジルなどが含まれる。アミノ、アミジノおよびグアニジノに適する保護基には、ｔ－ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニルなどが含まれる。メルカプトに適する保護基には、Ｃ（Ｏ）Ｒ”（ここで、Ｒ”はアルキル、アリールまたはアリールアルキルである）、ｐ－メトキシベンジル、トリチルなどが含まれる。カルボン酸に適する保護基には、アルキル、アリールまたはアリールアルキルエステルが含まれる。保護基は、当業者には公知であり、本明細書に記載されている標準の技法に従って付加することまたは除去することができる。保護基の使用は、Green, T.W.およびP.G.M. Wutz、（１９９９年）、Protective Groups in Organic Synthesis、第３版、Wileyに詳細に記載されている。当業者には理解される通り、保護基は、Ｗａｎｇ樹脂、Ｒｉｎｋ樹脂または２－クロロトリチル－塩化物樹脂などのポリマー樹脂であってもよい。

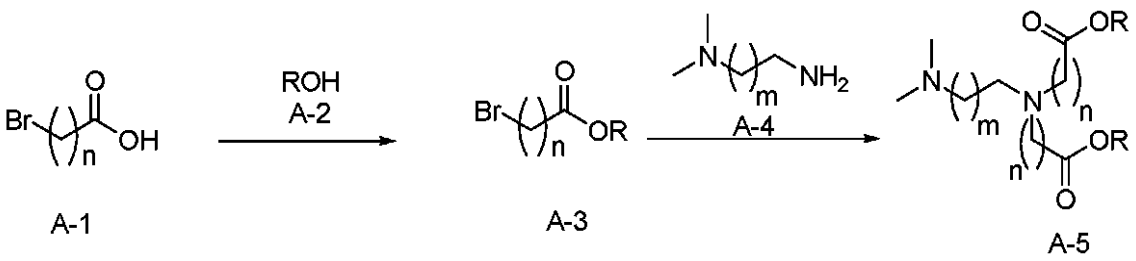
【０４０２】

さらに、遊離塩基または遊離酸の形態で存在する脂質は全て、適切な無機もしくは有機塩基または酸を用いて当業者に公知の方法によって処理することにより、それらの薬学的に許容される塩に変換することができる。脂質の塩は、標準の技法によってそれらの遊離塩基または遊離酸の形態に変換することができる。以下の反応スキームは、式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）または（ＩＶ）の脂質を作製する方法を例示するものである。

【０４０３】

一般的な反応スキーム１

【化４３】

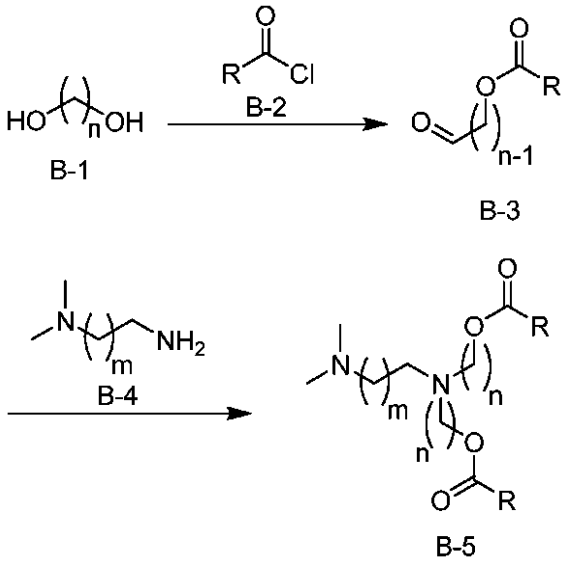


式（Ｉ）の脂質の実施形態（例えば、化合物Ａ－５）は、一般的な反応スキーム１（「方法Ａ」）に従って調製することができ、ここで、Ｒは、飽和もしくは不飽和Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{24}$アルキルまたは飽和もしくは不飽和シクロアルキルであり、ｍは、０または１であり、ｎは、１から２４までの整数である。一般的な反応スキーム１を参照して、構造Ａ－１の化合物は、商業的な供給源から購入してもよいし、または当業者によく知られている方法に従って調製してもよい。Ａ－１、Ａ－２およびＤＭＡＰの混合物をＤＣＣで処理して、臭化物Ａ－３を得る。臭化物Ａ－３、塩基（例えば、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン）およびＮ，Ｎ－ジメチルジアミンＡ－４の混合物を、あらゆる必然的なワークアップおよび／または精製ステップ後にＡ－５が生成するのに十分な温度で、そのために十分な時間にわたって加熱する。

【０４０４】

一般的な反応スキーム２

【化４４】



式（Ｉ）の化合物の他の実施形態（例えば、化合物Ｂ－５）は、一般的な反応スキーム２（「方法Ｂ」）に従って調製することができ、ここで、Ｒは、飽和もしくは不飽和Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{24}$アルキルまたは飽和もしくは不飽和シクロアルキルであり、ｍは、０または１であり、ｎは、１から２４までの整数である。一般的な反応スキーム２に示されている通り、構造Ｂ－１の化合物は、商業的な供給源から購入してもよいし、または当業者によく知られている方法に従って調製してもよい。Ｂ－１の溶液（１当量）を酸塩化物Ｂ－２（１

当量）および塩基（例えば、トリエチルアミン）で処理する。粗生成物を酸化剤（例えば、クロロクロム酸ピリジニウム）で処理し、中間生成物Ｂ－３を回収する。次いで、粗製物Ｂ－３、酸（例えば、酢酸）、およびＮ，Ｎ－ジメチルアミノアミンＢ－４の溶液を還元剤（例えば、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム）で処理して、任意の必要なワークアップおよび／または精製後にＢ－５を得る。

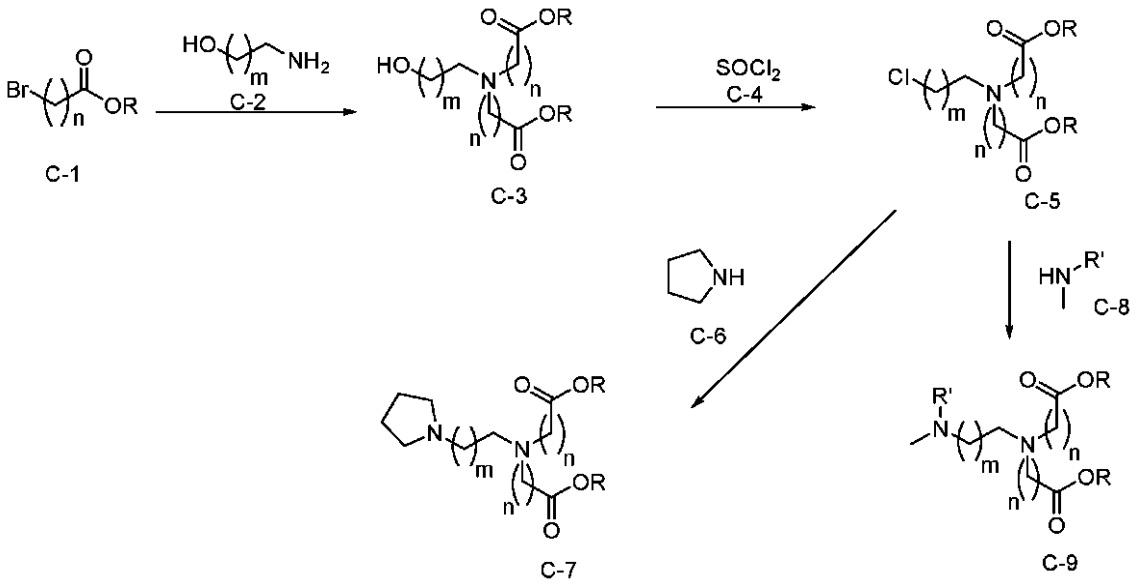
【０４０５】

出発材料Ａ－１およびＢ－１は飽和メチレン炭素のみを含むものとして上に示されているが、炭素－炭素二重結合を含む化合物を調製するために炭素－炭素二重結合を含む出発材料を使用することもできることに留意するべきである。

【０４０６】

一般的な反応スキーム３

【化４５】

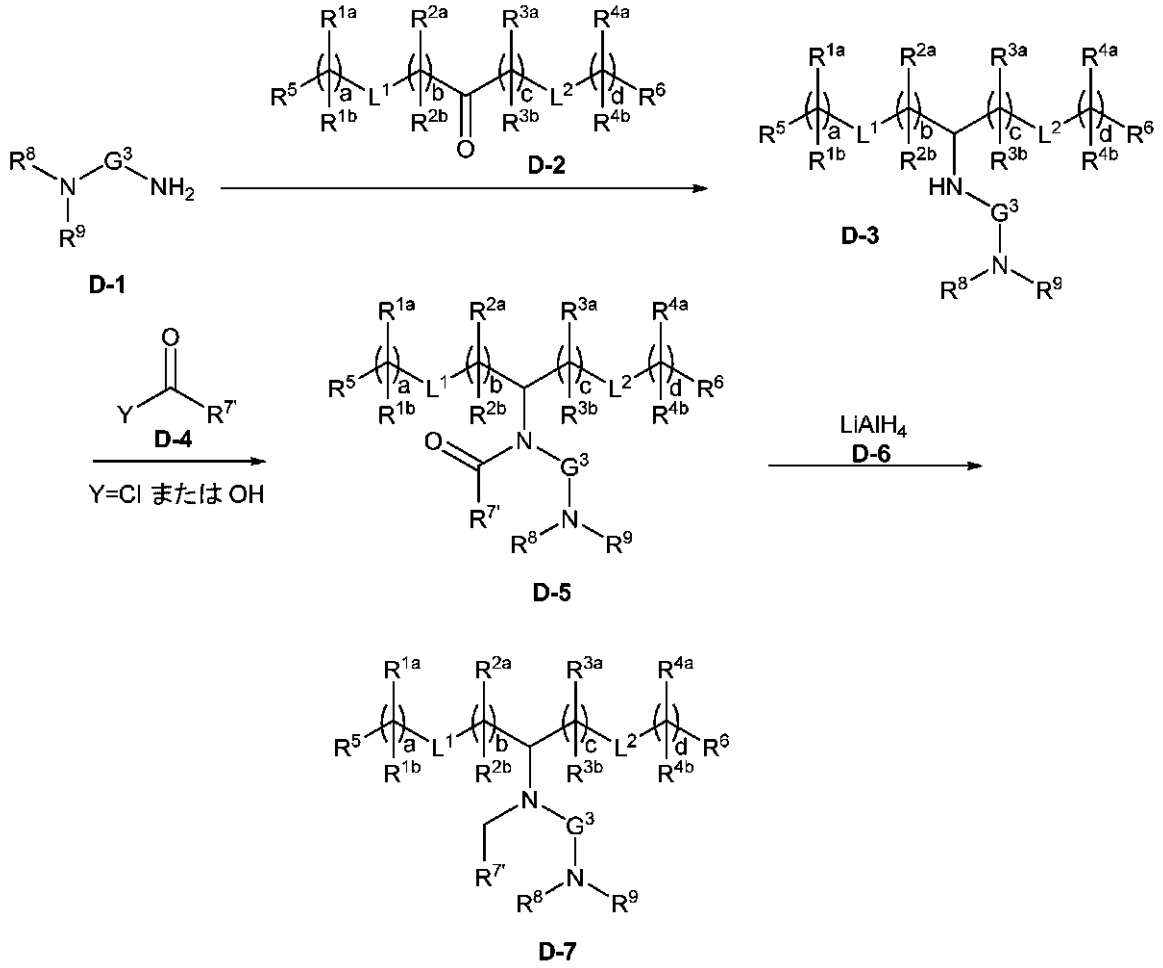


異なる式（Ｉ）の脂質の実施形態（例えば、化合物Ｃ－７またはＣ９）は、一般的な反応スキーム３（「方法Ｃ」）に従って調製することができ、ここで、Ｒは、飽和もしくは不飽和Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{24}$アルキルまたは飽和もしくは不飽和シクロアルキルであり、ｍは、０または１であり、ｎは、１から２４までの整数である。一般的な反応スキーム３を参照して、構造Ｃ－１の化合物は、商業的な供給源から購入してもよいし、または当業者によく知られている方法に従って調製してもよい。

【０４０７】

一般的な反応スキーム４

【化４６】

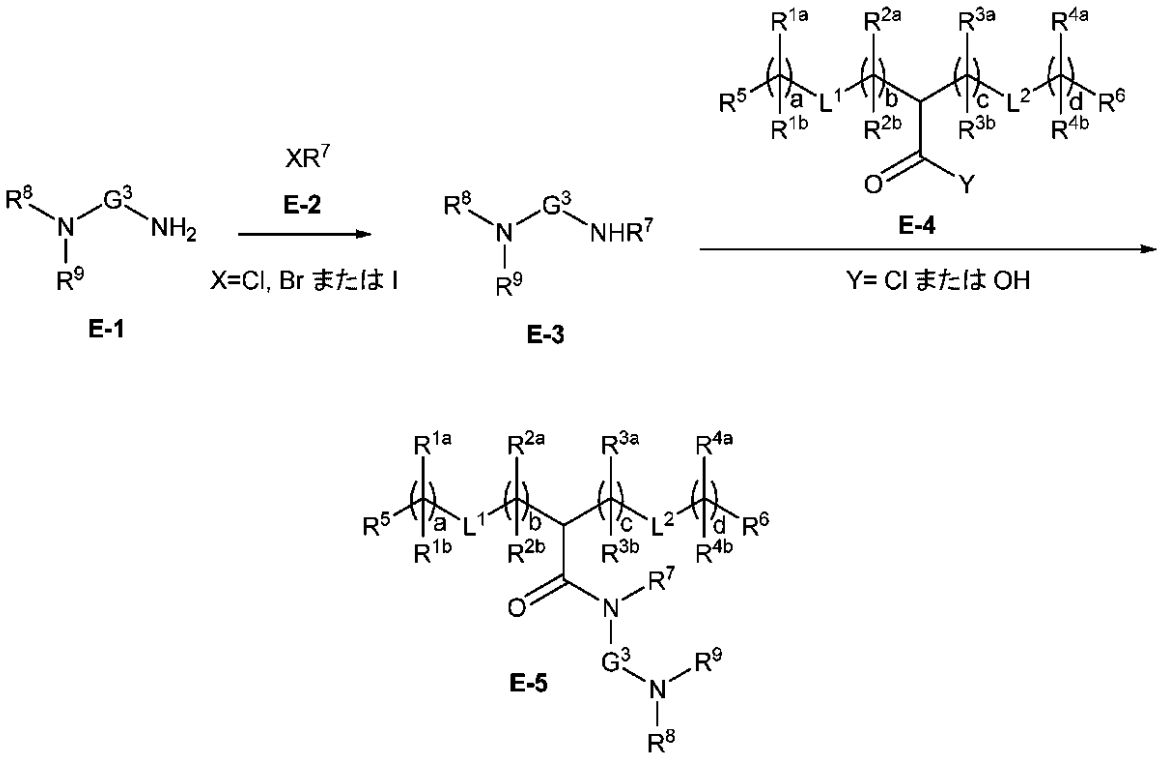


式（ＩＩ）の化合物の実施形態（例えば、化合物Ｄ－５およびＤ－７）は、一般的な反応スキーム４（「方法Ｄ」）に従って調製することができ、ここで、R^{1a}、R^{1b}、R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}、R^{5}、R^{6}、R^{8}、R^{9}、L^{1}、L^{2}、G^{1}、G^{2}、G^{3}、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、本明細書で定義されている通りであり、$R^{7'}$は、R^{7}またはC_{3}～C_{19}アルキルを表す。一般的な反応スキーム１を参照して、構造Ｄ－１およびＤ－２の化合物は、商業的な供給源から購入してもよいし、または当業者によく知られている方法に従って調製してもよい。Ｄ－１およびＤ－２の溶液を、還元剤（例えば、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム）で処理して、任意の必要なワークアップ後にＤ－３を得る。Ｄ－３および塩基（例えば、トリメチルアミン、ＤＭＡＰ）の溶液を塩化アシルＤ－４（またはカルボン酸およびＤＣＣ）で処理して、任意の必要なワークアップおよび／または精製後にＤ－５を得る。Ｄ－５をＬｉＡｌＨ４　Ｄ－６で還元して、任意の必要なワークアップおよび／または精製後にＤ－７を得ることができる。

【０４０８】

一般的な反応スキーム５

【化４７】

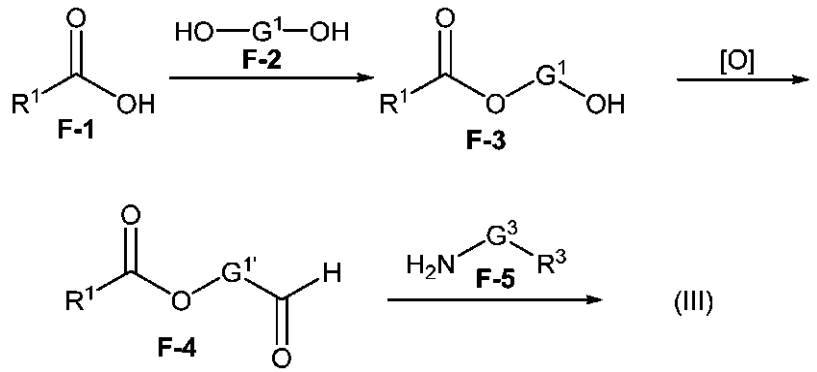


式（ＩＩ）の脂質の実施形態（例えば、化合物Ｅ－５）は、一般的な反応スキーム５（「方法Ｅ」）に従って調製することができ、ここで、R^{1a}、R^{1b}、R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}、R^{3b}、R^{4a}、R^{4b}、R^{5}、R^{6}、R^{7}、R^{8}、R^{9}、L^{1}、L^{2}、G^{3}、ａ、ｂ、ｃおよびｄは、本明細書で定義されている通りである。一般的な反応スキーム２を参照して、構造Ｅ－１およびＥ－２の化合物は、商業的な供給源から購入するしてもよいし、または当業者によく知られている方法に従って調製してもよい。Ｅ－１（過剰量）、Ｅ－２および塩基（例えば、炭酸カリウム）の混合物を加熱して、任意の必要なワークアップ後にＥ－３を得る。Ｅ－３および塩基（例えば、トリメチルアミン、ＤＭＡＰ）の溶液を塩化アシルＥ－４（またはカルボン酸およびＤＣＣ）で処理して、任意の必要なワークアップおよび／または精製後にＥ－５を得る。

【０４０９】

一般的な反応スキーム６

【化４８】



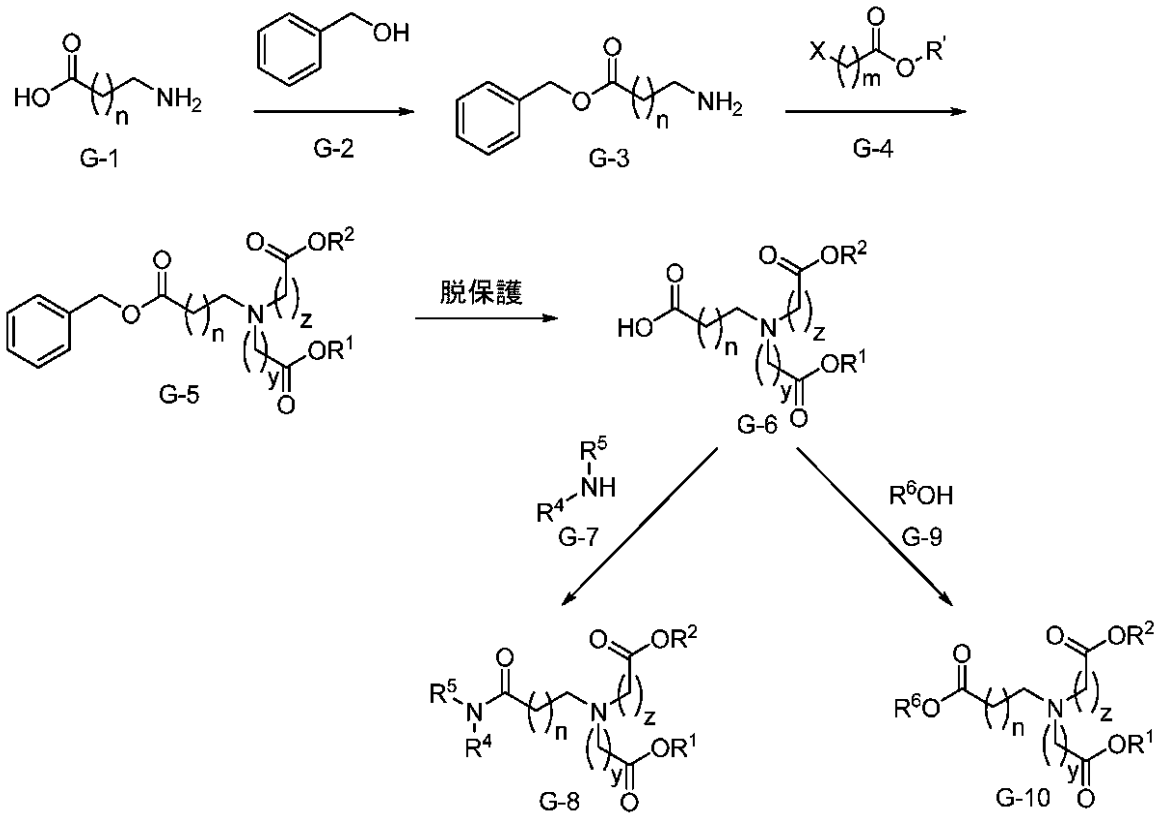
一般的な反応スキーム６は、式（ＩＩＩ）の脂質を調製するための例示的な方法（方法Ｆ）を提供する。一般的な反応スキーム６におけるG^{1}、G^{3}、R^{1}およびR^{3}は、式（ＩＩＩ）に関して本明細書で定義されている通りであり、Ｇ１’は、Ｇ１の炭素１つ分短いホモログを指す。構造Ｆ－１の化合物は、購入するか、または当技術分野で公知の方法に従って調製する。Ｆ－１とジオールＦ－２を適切な縮合条件下（例えば、ＤＣＣ）で反応させることによってエステル／アルコールＦ－３を得、次いでそれを酸化して（例えば

、ＰＣＣ）アルデヒドＦ－４にすることができる。Ｆ－４とアミン Ｆ－５の還元的アミノ化条件下での反応によって式（ＩＩＩ）の脂質を得る。

【０４１０】

一般的な反応スキーム７

【化４９】

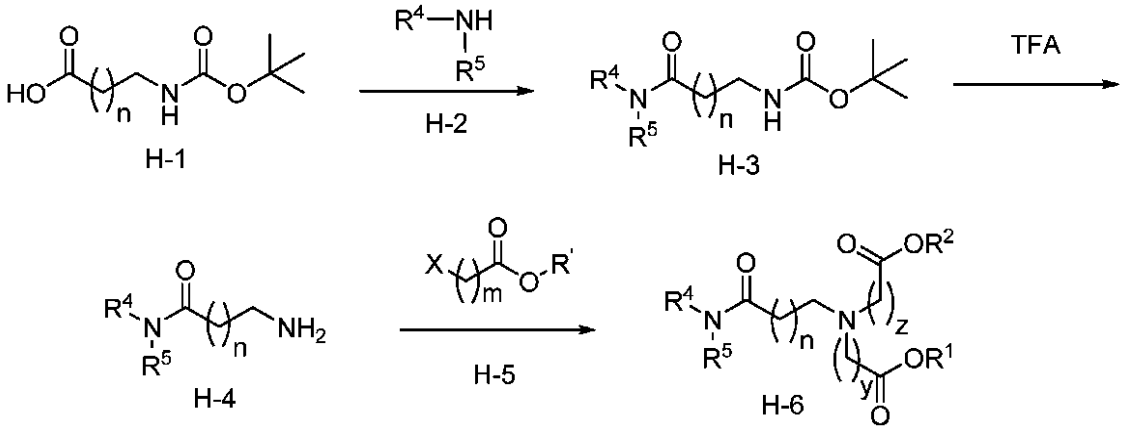


一般的な反応スキーム７（「方法Ｇ」）は、構造（ＩＶ）の化合物を調製するための例示的な方法を提供する。一般的な反応スキーム７におけるR^1、R^2、R^4、R^5、R^6、ｙおよびｚは、本明細書で定義されている通りである。Ｒ’、Ｘ、ｍおよびｎは、Ｇ－５、Ｇ－６、Ｇ－８、およびＧ－１０が構造（ＩＶ）を有する化合物になるように選択される変数を指す。例えば、Ｒ’はR^1またはR^2であり、ＸはＢｒであり、ｍは、ｙまたはｚであり、ｎは、０から２３の範囲の整数である。構造Ｇ－１の化合物は、購入するか、または当技術分野で公知の方法に従って調製する。アミン／酸Ｇ－１をアルコールＧ－２（例えば、ベンジルアルコール）を用い、適する条件および試薬（例えば、ｐ－ＴＳＡ）を使用して保護して、エステル／アミンＧ－３を得る。エステル／アミンＧ－３をエステルＧ－４とカップリングして（例えば、ＤＩＰＥＡを使用して）、ベンジルエステルＧ－５を得る。化合物Ｇ－５を、必要に応じて、適切な条件（例えば、Ｐｄ／Ｃ、H_2）を使用して脱保護して酸Ｇ－６を得る。酸Ｇ－６をアミンＧ－７と反応させて（例えば、塩化オキサリル／ＤＭＦを使用して）、アミドＧ－８を得ることもでき、あるいは、アルコールＧ－９と反応させて（例えば、ＤＣＣ／ＤＭＡＰを使用して）、エステルＧ－１０を得ることもできる。Ｇ－５、Ｇ－６、Ｇ－８、およびＧ－１０はそれぞれ構造（ＩＶ）の化合物である。

【０４１１】

一般的な反応スキーム８

【化５０】

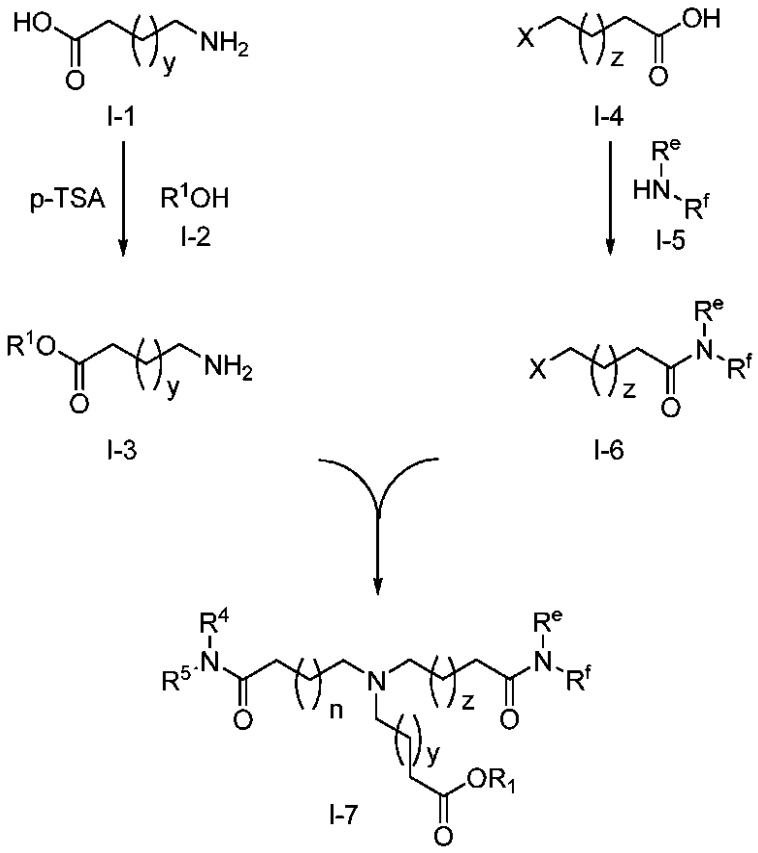


一般的な反応スキーム８（「方法Ｈ」）は、構造（ＩＶ）の化合物を調製するための例示的な方法を提供する。一般的な反応スキーム８におけるR^1、R^2、R^4、R^5、ｙおよびｚは、本明細書で定義されている通りである。Ｒ’、Ｘ、ｍおよびｎは、Ｈ－６が構造（ＩＶ）を有する化合物になるように選択される変数を指す。例えば、Ｒ’はR^1またはR^2であり、ＸはＢｒであり、ｍはｙまたはｚであり、ｎは、０から２３の範囲の整数である。構造Ｈ－１の化合物は、購入するか、または当技術分野で公知の方法に従って調製する。保護されたアミン／酸Ｈ－１とアミンＨ－２の反応を適切なカップリング条件下（例えば、ＮＨＳ、ＤＣＣ）で行って、アミドＨ－３を得る。酸性条件（例えば、ＴＦＡ）を使用した脱保護ステップの後、アミンＨ－４をエステルＨ－５と適する条件下（例えば、ＤＩＰＥＡ）でカップリングして、Ｈ－６、構造（ＩＶ）の化合物を得る。

【０４１２】

一般的な反応スキーム９

【化５１】



一般的な反応スキーム９（「方法Ｉ」）は、構造（ＩＶ）の化合物を調製するための例

示的な方法を提供する。一般的な反応スキーム９におけるＲ[1]、Ｒ[4]、Ｒ[5]、Ｒ[e]、Ｒ[f]、ｙおよびｚは、本明細書で定義されている通りである。Ｒ’、Ｘ、ｍおよびｎは、Ｉ－７が構造（ＩＶ）を有する化合物になるように選択される変数を指す。例えば、Ｒ’はＲ[1]またはＲ[2]であり、ＸはＢｒであり、ｍはｙまたはｚであり、ｎは、０から２３の範囲の整数である。構造Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－４およびＩ－５の化合物は、購入するか、または当技術分野で公知の方法に従って調製する。アミン／酸Ｉ－１とアルコールＩ－２の反応を適切なカップリング条件下（例えば、ｐ－ＴＳＡ）で行ってアミン／エステルＩ－３を得る。並行して、酸Ｉ－４とアミンＩ－５を適する条件下（例えば、塩化オキサリル／ＤＭＦ）でカップリングすることによってアミドＩ－６を調製する。Ｉ－３およびＩ－６を塩基性条件下で（例えば、ＤＩＰＥＡ）組み合わせて、Ｉ－７、構造（ＩＶ）の化合物を得る。

【０４１３】

当業者は、これらの化合物を同様の方法によってまたは当業者に公知の他の方法を組み合わせることによって作製することが可能であり得ることが理解される。当業者は、下記と同様に、構造（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および（ＩＶ）の他の化合物を、適切な出発構成成分を使用し、必要に応じて合成パラメータを改変することによって作製することが可能であり得ることも理解される（さらに、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるＰＣＴ特許公開番号ＷＯ２０１５／１９９９５２、ＷＯ２０１７／００４１４３およびＷＯ２０１７／０７５５３１を参照のこと）。

【０４１４】

適用

疾患の処置および予防における、工学技術で作製された遺伝子治療の使用は、今後何年間も薬の最も意味のある開発の１つになることが予想される。本明細書に記載の方法および組成物は、所望の標的部位が切断の主要部位になることを確実にするために、これらの新規のツールの特異性を増大させるのに役立つ。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｅｘ　ｖｉｖｏにおける適用全てに関してこの技術の完全な潜在性を現実化するためにはオフターゲットの切断を最小化または排除することが求められる。

【０４１５】

例示的な遺伝子疾患には、軟骨無形成症、色覚異常、酸性マルターゼ欠損症、アデノシンデアミナーゼ欠損症（ＯＭＩＭ番号１０２７００）、副腎白質ジストロフィー、アイカルディ症候群、アルファ１アンチトリプシン欠損症、アルファ－サラセミア、アンドロゲン不応症、アペール症候群、不整脈原性右室心筋症、異形成、毛細血管拡張性運動失調症（ataxia telangictasia）、バース症候群、ベーターサラセミア、青色ゴム乳首様母斑症候群、カナバン病、慢性肉芽腫性疾患（ＣＧＤ）、ネコ鳴き症候群、嚢胞性線維症、ダーカム病、外胚葉異形成症、ファンコニー貧血、進行性骨化性線維異形成症（fibrodysplasia ossificans progressive）、脆弱Ｘ症候群、ガラクトース血症（galactosemis）、ゴーシェ病、全身性ガングリオシドーシス（例えば、ＧＭ１）、ヘモクロマトーシス、ベーターグロビンの第６コドンにおけるヘモグロビンＣ変異（ＨｂＣ）、血友病、ハンチントン病、ハーラー症候群、低ホスファターゼ血症、クラインフェルター症候群（Klinefleter syndrome）、クラッペ病、ランガー・ギデオン症候群、白血球接着不全症（ＬＡＤ、ＯＭＩＭ番号１１６９２０）、白質ジストロフィー、ＱＴ延長症候群、マルファン症候群、メビウス症候群、ムコ多糖症（ＭＰＳ）、爪膝蓋骨症候群、腎性尿崩症（nephrogenic diabetes insipdius）、神経線維腫症、ニーマン・ピック病（Neimann-Pick disease）、骨形成不全症、ポルフィリン症、プラダー・ウィリー症候群、早老症、プロテウス症候群、網膜芽細胞腫、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、サンフィリポ症候群、重症複合免疫不全症（ＳＣＩＤ）、シュワックマン・ダイアモンド症候群、鎌状赤血球症（鎌状赤血球貧血）、スミス・マゲニス症候群、スティックラー症候群、テイ・サックス病、血小板減少橈骨欠損症（ＴＡＲ）症候群、トリーチャー・コリンズ症候群、トリソミー、結節性硬化症、ターナー症候群、尿素サイクル異常症、フォンヒッペル・リンダウ病（von Hippel-Landau disease）、ワールデンブルグ症候群、ウィリアムズ

症候群、ウィルソン病、ウィスコット・アルドリッチ症候群、Ｘ連鎖リンパ増殖性症候群（ＸＬＰ、ＯＭＩＭ番号３０８２４０）が限定されずに含まれる。

【０４１６】

標的化ＤＮＡ切断および／または相同組換えによって処置することができるさらなる例示的な疾患には、後天性免疫不全症、リソソーム蓄積症（例えば、ゴーシェ病、ＧＭ１、ファブリー病およびテイ・サックス病）、ムコ多糖症（例えば、ハンター病、ハーラー病）、異常ヘモグロビン症（例えば、鎌状赤血球症、ＨｂＣ、α－サラセミア、β－サラセミア）および血友病が含まれる。

【０４１７】

そのような方法により、遺伝子疾患を処置するために、宿主における感染（ウイルスまたは細菌）を処置することも可能になる（例えば、ウイルスまたは細菌受容体の発現を遮断し、それにより、宿主生物体における感染および／または拡散を予防することによって）。

【０４１８】

感染したまたは組み込まれたウイルスゲノムの標的化切断を使用して、宿主におけるウイルス感染を処置することができる。さらに、ウイルスに対する受容体をコードする遺伝子の標的化切断を使用して、そのような受容体の発現を遮断し、それにより、宿主生物体におけるウイルス感染および／またはウイルス拡散を予防することができる。ウイルス受容体（例えば、ＨＩＶに対するＣＣＲ５受容体およびＣＸＣＲ４受容体）をコードする遺伝子の標的化変異誘発を使用して、受容体をウイルスに結合できなくし、それにより、新しい感染を予防し、既存の感染症の拡散を遮断することができる。米国特許出願第２００８／０１５９９６号を参照のこと。標的化することができるウイルスまたはウイルス受容体の非限定的な例には、ＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２などの単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）およびサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ＨＨＶ６およびＨＨＶ７が含まれる。ウイルスの肝炎ファミリーには、Ａ型肝炎ウイルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、デルタ型肝炎ウイルス（ＨＤＶ）、Ｅ型肝炎ウイルス（ＨＥＶ）およびＧ型肝炎ウイルス（ＨＧＶ）が含まれる。Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ（例えば、ポリオウイルスなど）；Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ；Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ（例えば、風疹ウイルス、デングウイルスなど）；Ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ；Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ；Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ；Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ；Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅ（例えば、狂犬病ウイルスなど）；Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ；Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ（例えば、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルスなど）；Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ（例えば、Ａ型インフルエンザウイルス、Ｂ型インフルエンザウイルスおよびＣ型インフルエンザウイルスなど）；Ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ；Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ；Ｒｅｔｒｏｖｉｒａｄａｅ；レンチウイルス（例えば、ＨＴＬＶ－Ｉ；ＨＴＬＶ－ＩＩ；ＨＩＶ－１（ＨＴＬＶ－ＩＩＩ、ＬＡＶ、ＡＲＶ、ｈＴＬＲなどとしても公知）ＨＩＶ－ＩＩ）；サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、インフルエンザウイルスおよびダニ媒介脳炎ウイルスを限定されずに含む、他のウイルスまたはそれらの受容体を標的化することができる。これらの説明および他のウイルスについては例えば、Virology、第３版（W. K. Joklik編、１９８８年）；Fundamental Virology、第２版（B. N. FieldsおよびD. M. Knipe編、１９９１年）を参照のこと。ＨＩＶに対する受容体としては、例えば、ＣＣＲ－５およびＣＸＣＲ－４が挙げられる。

【０４１９】

上記の通り、本明細書に記載の組成物および方法は、遺伝子改変、遺伝子補正、および遺伝子破壊のために使用することができる。遺伝子改変の非限定的な例には、相同組換え修復（ＨＤＲ）に基づく標的化組込み；ＨＤＲに基づく遺伝子補正；ＨＤＲに基づく遺伝子改変；ＨＤＲに基づく遺伝子破壊；ＮＨＥＪに基づく遺伝子破壊および／またはＨＤＲ、ＮＨＥＪ、および／または一本鎖アニーリング（ＳＳＡ）の組合せが含まれる。一本鎖

アニーリング（ＳＳＡ）は、５’－３’エキソヌクレアーゼによりＤＳＢが切除されて２つの相補的な領域が曝露することによって同じ配向で生じる２つの反復配列間の二本鎖切断の修復を指す。次いで、２つのダイレクトリピートをコードする一本鎖が互いとアニーリングし、アニーリングした中間体が、一本鎖尾部（いかなる配列ともアニーリングしていない一本鎖ＤＮＡの部分）が消化され、ギャップがＤＮＡポリメラーゼによって埋められ、ＤＮＡ末端が再結合するように処理され得る。この結果、ダイレクトリピート間に位置する配列の欠失が生じる。

【０４２０】

切断ドメイン（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）を含む組成物および本明細書に記載の方法は、種々の遺伝子疾患および／または感染症の処置においても使用することができる。

【０４２１】

組成物および方法は、一遺伝子遺伝子治療のための短いパッチ遺伝子変換または標的化組込みによる体細胞変異の補正；ドミナントネガティブ対立遺伝子の破壊；病原体が細胞に侵入または増殖性感染するために必要な遺伝子の破壊；例えば遺伝子活性を改変して機能的組織の分化もしくは形成を促進することおよび／または遺伝子活性を破壊して機能的組織の分化もしくは形成を促進することによる先進組織工学；例えば、分化を遮断する遺伝子を破壊して幹細胞の特定の系列経路への分化を促進すること、幹細胞分化を刺激することができる遺伝子もしくはｓｉＲＮＡ発現カセットの標的化挿入、幹細胞分化を遮断することができ、より良好な拡張および多能性の維持を可能にする遺伝子もしくはｓｉＲＮＡ発現カセットの標的化挿入、ならびに／またはレポーター遺伝子を容易なマーカーにより幹細胞の分化状態および培地中でどのように変化するか、サイトカイン、成長条件、遺伝子の発現、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡもしくはｍｉＲＮＡ分子の発現、細胞表面マーカーに対する抗体への曝露、もしくはこの状態を変更する薬物をスコア化することを可能にする多能性もしくは分化状態のマーカーである内因性遺伝子とインフレームで標的化挿入することによって分化を遮断または誘導すること；体細胞核移植、例えば、患者の独自の体細胞を単離し、意図された標的遺伝子を適切な様式で改変し、細胞クローンを生成し（および品質管理してゲノム安全性を確実にする）、これらの細胞から核を単離し、未授精卵に移して、直接注射することもできるか、または患者に生着させる前に分化させることができ、それにより、組織拒絶反応を低減または排除する、患者に特異的なｈＥＳ細胞を生成することができる；ＭＨＣ受容体をノックアウトすることによる普遍的幹細胞（例えば、免疫学的同一性が低減したまたは総じて消失した細胞を生成する）を限定されずに含む、幹細胞に基づく治療に適用することもできる。この手順のための細胞型には、Ｔ細胞、Ｂ細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が限定されずに含まれる。さらに、患者独自の体細胞から生成される人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）も使用することができる。したがって、これらの幹細胞またはそれらの誘導体（分化細胞型または組織）は、潜在的に、それらの起源または組織適合性にかかわらずあらゆる人に生着させることができる。

【０４２２】

組成物および方法はまた、体細胞治療に使用することもでき、それにより、生物学的特性が増強するように改変された細胞のストックの産生が可能になる。そのような細胞は、細胞のドナー供給源およびレシピエントに対するそれらの組織適合性に関係なく、種々の患者に注入することができる。

【０４２３】

治療への適用に加えて、工学技術で作製されたヌクレアーゼに使用した場合に本明細書に記載のバリアントによってもたらされる特異性の増大は、作物工学、細胞株工学および疾患モデルの構築に使用することができる。絶対ヘテロダイマー切断半ドメインにより、ヌクレアーゼ特性を改善するための容易な手段がもたらされる。

【０４２４】

記載されている工学技術で作製された切断半ドメインはまた、介在領域を欠失させるかまたは２つの特異的な遺伝子座を一度に変更するかのいずれかで、多数の標的での同時切

断を必要とする遺伝子改変プロトコールにおいても使用することができる。２つの標的での切断には、４つのＺＦＮまたはＴＡＬＥＮの細胞発現が必要であり、これにより、潜在的に１０種の異なる活性なＺＦＮまたはＴＡＬＥＮの組合せが生じる。そのような適用のために、これらの新規のバリアントで野生型ヌクレアーゼドメインを置換することにより、望ましくない組合せの活性が排除され、オフターゲット切断の機会が低減する。ある特定の所望のＤＮＡ標的での切断には、ヌクレアーゼ対Ａ＋Ｂの活性が必要であり、第２の所望のＤＮＡ標的での同時切断には、ヌクレアーゼ対Ｘ＋Ｙの活性が必要であり、次いで、本明細書に記載の変異の使用により、ＡとＡ、ＡとＸ、ＡとＹなどの対形成を防ぐことができる。したがって、これらのＦｏｋＩ変異により、「変則的な」対形成結果としての非特異的切断活性が低減し、より効率的なヌクレアーゼの直交性変異体対の生成が可能になる（米国特許公開第２００８０１３１９６２号および同第２００９０３０５３４６号を参照のこと）。

【０４２５】

本明細書で指摘される全ての特許、特許出願および公開は、参照によりそれらの全体が本明細書によって組み込まれる。

【０４２６】

理解の明快性のために開示は例証および例として多少詳細に提供されたが、本開示の精神または範囲から逸脱せずに様々な変更および改変を実施することができることは当業者に明らかである。したがって、前述の開示および以下の実施例は限定するものと解釈されるべきでない。

【実施例】

【０４２７】

（実施例１）

ＺＦＮの調製

基本的にUrnovら（２００５年）Nature　４３５巻（７０４２号）：６４６～６５１頁、Perezら（２００８年）Nature　Biotechnology　２６巻（７号）；８０８～８１６頁、および米国特許第９，３９４，５４５号および同第９，１５０，８４７号；ＰＣＴ特許出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０３２０４９号および米国特許公開第２０１７０２１１０７５号および同第２０１７０１７３０８０号に記載されている通り、マウスアルブミン、ＴＴＲおよびＰＣＳＫ９遺伝子内の部位を標的とするＺＦＮを設計し、プラスミドベクターに組み入れた。ＺＦＮを試験し、全て活性であることが見出された。使用したＺＦＮを以下の表４に示し、標的とした配列を表５に示す：

【表４－４】

表4:ZFN設計

SBS #	設計						
(遺伝子)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	ドメインリンカー

【表４－５】

30724 (m*ALB*)	TSGSLTR (配列番号 1)	RSDALST (配列番号 2)	QSATRTK (配列番号 3)	TSGHLSR (配列番号 4)	QSGNLAR (配列番号 5)	N/A	5,6
30725 (mALB)	RSDHLSA (配列番号 6)	TKSNRTK (配列番号 7)	DRSNLSR (配列番号 8)	WRSSLRA (配列番号 9)	DSSDRKK (配列番号 10)	N/A	5,6
48641 (mALB)	TSGSLTR (配列番号 1)	RSDALST (配列番号 2)	QSATRTK (配列番号 3)	LRHHLTR (配列番号 11)	QAGQRRV (配列番号 12)	N/A	5,6
31523 (m*ALB*)	RSDNLSE (配列番号 13)	QSGNLAR (配列番号 5)	DRSNLSR (配列番号 8)	WRSSLRA (配列番号 9)	DSSDRKK (配列番号 10)	N/A	5,6
59771 (m*TTR*)	QSSNLAR (配列番号 14)	QSGHLSR (配列番号 15)	QSSDLSR (配列番号 16)	TSGHLSR (配列番号 4)	RSDNLSE (配列番号 13)	ASKTRKN (配列番号 17)	N7a
59790 (m*TTR*)	QSGHLAR (配列番号 18)	QLTHLNS (配列番号 19)	SKLYLNN (配列番号 20)	DRSNLTR (配列番号 21)	YRWLRNS (配列番号 22)	DRSNLTR (配列番号 21)	N7a
58780 (m*PCSK9*)	HGQTLNE (配列番号 23)	QSGNLAR (配列番号 5)	RSDNLSE (配列番号 13)	SKQYLIK (配列番号 24)	DRSHLTR (配列番号 25)	QSGHLSR (配列番号 15)	N7a
61748 (m*PCSK9*)	DRSNLSR (配列番号 8)	QSGHLSR (配列番号 15)	DRSHLSR (配列番号 26)	TSGNLTR (配列番号 27)	QSSDLSR (配列番号 16)	TSGHLSR (配列番号 4)	L0
48652 (m*ALB*)	LRHHLTR (配列番号 11)	LRHNLRA (配列番号 28)	DRSHLAR (配列番号 29)	TSGHLSR (配列番号 4)	QSGNLAR (配列番号 5)	N/A	5,6
31527 (m*ALB*)	RSDHLSE (配列番号 30)	QSGNLAR (配列番号 5)	DRSNLSR (配列番号 8)	WRSSLRA (配列番号 9)	DSSDRKK (配列番号 10)	N/A	5,6

【表５】

表5:標的配列

SBS 番号	標的配列 (5' -> 3')
30724	ctGAAGGTgGCAATGGTTcctctctgct (配列番号 31)
30725	ttTCCTGTAACGATCGGgaactggcatc (配列番号 32)
48641	ctGAAGGTgGCAATGGTTcctctctgct (配列番号 31)
31523	ttTCCTGTAACGATCGGgaactggcatc (配列番号 32)
59771/69121/69052	gtGCCCAGGGTGCTGGAGAAtccaaatg (配列番号 33)
59790/69128/69102	agGACTTTGACCATcAGAGGAcatttgg (配列番号 34)
58780	ctGGAGGCTGCCAGGAACCTacattgtg (配列番号 35)
61748	gtGGTGCTGATGGAGGAGACccagaggc (配列番号 36)
48652	ctGAAGGTGGCAATGGTtcctctctgct (配列番号 31)
31527	ttTCCTGTAACGATCGGgaactggcatc (配列番号 32)

【０４２８】

一部のＺＦＮをさらに改変してＺＦＰ骨格またはＦｏｋＩドメイン内のアミノ酸と接触する潜在的なリン酸を取り除いた。これらの残基は、ＤＮＡ骨格上のリン酸と相互作用し、それにより非特異的切断を導く潜在性を有する（米国特許出願第１５／６９７，９１７号に記載されている）。表６は、ＺＦＰ骨格を、示されている位置で潜在的な非特異的リン酸接触が取り除かれるように変異させた親および誘導体ＺＦＮを示す。

【表６】

表6:最適化されたZFN設計

SBS番号	設計							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	リンカー	FokI 変異体
SBS番号 59771 [親]	QSSNLAR (配列番号 NO:14)	QSGHLSR (配列番号 15)	QSSDLSR (配列番号 16)	TSGHLSR (配列番号 4)	RSDNLSE (配列番号 13)	ASKTRKN (配列番号 17)	N7a	ELD
SBS番号 69121	QSSNLAR (配列番号 NO:14)	QSGHLSR (配列番号 15)	QSSDLSR (配列番号 16)	TSGHLSR (配列番号 4)	RSDNLSE (配列番号 13)	ASKTRKN (配列番号 17)	N7a	ELD
69121 変異体	なし	なし	なし	なし	なし	なし		D421S, Q531R
SBS番号 69052	QSSNLAR (配列番号 NO:14)	QSGHLSR (配列番号 15)	QSSDLSR (配列番号 16)	TSGHLSR (配列番号 4)	RSDNLSE (配列番号 13)	ASKTRKN (配列番号 17)	N7a	ELD
69052 変異体	なし	Qm5	なし	Qm5	なし	Qm5		S418P
SBS番号 59790 [親]	QSGHLAR (配列番号 18)	QLTHLNS (配列番号 19)	SKLYLNN (配列番号 20)	DRSNLTR (配列番号 21)	YRWLRNS (配列番号 22)	DRSNLTR (配列番号 21)	N7a	KKR
SBS番号 69128	QSGHLAR (配列番号 18)	QLTHLNS (配列番号 19)	SKLYLNN (配列番号 20)	DRSNLTR (配列番号 21)	YRWLRNS (配列番号 22)	DRSNLTR (配列番号 21)	N7a	KKR
69128 変異体	なし	なし	なし	なし	なし	なし		D421S, Q481H
SBS番号 69102	QSGHLAR (配列番号 18)	QLTHLNS (配列番号 19)	SKLYLNN (配列番号 20)	DRSNLTR (配列番号 21)	YRWLRNS (配列番号 22)	DRSNLTR (配列番号 21)	N7a	
69102 変異体	なし	Qm5	なし	Qm5	なし	Qm5		S418P

【０４２９】

マウスＡＬＢ遺伝子のイントロン１、マウスＰＣＳＫ９遺伝子のエクソン２、およびマウスＴＴＲ遺伝子のエクソン２を標的とするＺＦＮ（全て上の表４および５に示されている）を、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、Ｘｅｎｏｐｕｓベーターグロビン遺伝子に由来する配列を含有する５’ＵＴＲ、ＨＢＢ遺伝子に由来する配列の二重カセットを含有する３’ＵＴＲ、および６４塩基対のポリＡトラクトを含有する個々のベクター（ｐＶＡＶ－ＧＥＭ）にサブクローニングした。Ｘｅｎｏｐｕｓ　５’ＵＴＲ、ＨＢＢ　３’ＵＴＲ、およびＷＰＲＥ　３’ＵＴＲの配列は以下の通りであった：

Ｘｅｎｏｐｕｓベーターグロビン５’ＵＴＲ［Falconeら（１９９１年）Molecular and Cellular Biology　１１巻（５号）：２６５６～２６６４頁］：

【化５２】

5’

TGCTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATC

(配列番号　37)

二重ＨＢＢ　３’ＵＴＲ［Russellら（１９９６年）Blood　８７巻：５３１４～５３２３頁］：

【化５３】

5’CTAGAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTTC
CCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATC
TGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCTGCGCTAGAAGCTC
GCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAA
CTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCT
AATAAAAAACATTTATTTTCATTGCTGCG (配列番号 38)

ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ（米国特許出願第１５／１４１，３３３号を参照のこと）：

【化５４】

5’AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA
ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTA
TCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCC
TGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGC
GTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCC
ACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCA
CGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGG
CTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTT
CCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTC
TGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTG
CTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGT
CGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG (配列番号 39)

【０４３０】

（実施例２）

方法

ｍＲＮＡ合成：メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を、Ｔｒｉｌｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓにおいて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（ＩＶＴ）を使用し、改変されていない残基または改変されたヌクレオシド（２チオウリジン（「２ｔＵ」）、および５メチルシトシン（「５ｍＣ」））の画分のいずれかを用い、ＳｐｅＩ直線化ＺＦＮ構築物で生成した。ｍＲＮＡを、抗リバースキャップ類似物（ＡＲＣＡ）キャップとの同時転写で、「Ｃａｐ１」ｍＲＮＡを生成するためにＩＶＴ後にワクシニアウイルスキャッピング酵素をｍＲＮＡ　Ｃａｐ　２’－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ酵素と一緒に使用して酵素的に、または「Ｃａｐ１」（ＣｌｅａｎＣａｐ）を生成するために化学的に、のいずれかでキャッピングした。ｍＲＮＡを、シリカビーズカラムを通して精製し（例えば、Bowmanら（２０１２年）Methods　９４１巻　Conn　G.L.（編）、New　York、N.Y.　Humana　Pressを参照のこと）、次いで、パッケージした（シリカ精製されたもの）、または、その後、ＨＰＬＣカラムに流し、分画して、二本鎖ＲＮＡ種を除去し、次いで、パッケージした（ＨＰＬＣ精製されたもの、例えば、Karikoら（２０１１年）Nucl　Acid　Res　３９巻：ｅ１４２頁；Weissmanら（２０１３年）Synthetic　Messenger　RNA　and　and　Cell　Metabolism　Modulation　in　Methods　in　Molecular　Biology　９６９巻、Rabinovich,　P.H.編を参照のこと）。

【０４３１】
ＬＮＰ：ＬＮＰを、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ２０１５／１９９９５２、ＷＯ２０１７／００４１４３およびＷＯ２０１７／０７５５３１に記載されている一般的な手順に従って調製した。簡単に述べると、カチオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロールおよび式（ＩＶａ）のＰＥＧ－脂質をエタノール中におよそ５０：１０：３８．５：１．５または４７．５：１０：４０．８：１．７のモル比で可溶化した。脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を、ｍＲＮＡの総脂質に対する比０．０３～０．０４ｗ／ｗで調製した。ＺＦＮ　ｍＲＮＡを１０～５０ｍＭのクエン酸緩衝剤、ｐＨ４中０．０５～０．２ｍｇ／ｍＬまで希釈した。シリンジポンプを使用して、毎分１５ｍｌを上回る総流速でエタノール性脂質溶液とｍＲＮＡ水溶液を約１：５～１：３（ｖｏｌ／ｖｏｌ）の比で混合した。次いで、エタノールを除去し、外部の緩衝剤を透析によってＰＢＳで置き換えた。最後に、脂質ナノ粒子を、０．２μｍ孔の滅菌フィルターを通して濾過した。脂質ナノ粒子の粒径サイズは、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ（Ｍａｌｖｅｒｎ、ＵＫ）を使用して準弾性光散乱によって決定して６０～９０ｎｍであった。製剤を、約２４時間以内に上で調製したまま使用する、または、必要に応じて、より長期間の保管安定性のために凍結保護物質としてスクロースを最終濃度３００ｍＭで添加する。

【０４３２】
固有の製剤番号（例えば、Ｉ－６、Ｉ－５、およびＩＩ－９）は独特のカチオン性脂質を指し、他の３つの脂質構成成分は一定のままである。代表的な脂質の合成は本明細書において下に、および、それぞれが参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１５／１９９９５２、ＷＯ２０１７／００４１４３およびＷＯ２０１７／０７５５３１において記載されている。

【０４３３】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏ形質導入：ＺＦＮ　ｍＲＮＡを含有するＬＮＰの活性を評価するために、懸濁液中にＨｅｐａ１－６細胞を含有する培地にＬＮＰを導入し、細胞を接着させ、ＬＮＰを取り込ませ、３日間成長させた。次いで、形質導入された細胞をゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のためにＱｉａｇｅｎスピンカラムを使用して採取した。

【０４３４】
ｉｎ　ｖｉｖｏ形質導入：Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒから購入した８～１０週齢のＣ５７ＢＬ６に、希釈したＬＮＰまたは希釈したＬＮＰとＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームを含有するヒトＩＤＳもしくはヒトＦＩＸ導入遺伝子および導入遺伝子のコード配列のすぐ上流のスプライスアクセプターをコードするＡＡＶドナーの混合物を含有する水溶液２００μＬを尾静脈に静脈内注射した。一部の動物には、ＬＮＰ投薬の３０分前に５ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンを腹腔内注射した。次いで、動物をＬＮＰ投薬の７日後に屠殺した、または７日もしくは１４日の間隔でＬＮＰを再投薬した後に屠殺し、肝組織を採取した。肝臓をスナップ凍結し、左葉および右葉の両方のごく一部を切開し、ｇＤＮＡのためにＦａｓｔＰｒｅｐ－２４　Ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）、Ｌｙｓｉｓ　Ｍａｔｒｉｘ　Ｄ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）、およびＭａｓｔｅｒＰｕｒｅ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を使用して採取した。

【０４３５】
インデル分析（ヌクレアーゼ活性）：およそ２００ｂｐの、ＺＦＮ切断部位を含有する総ゲノムＤＮＡ配列を増幅するためにプライマーを設計した。次いで、アンプリコンにＭｉｓｅｑまたはＮｅｘｔｓｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）のいずれかを実行し、野生型ゲノム配列からの挿入および欠失（インデル）を定量化した。

【０４３６】
ＩＤＳ酵素活性アッセイ：動物屠殺時に、マウス血液を、クエン酸ナトリウムを含有するチューブ中に収集し、細胞画分を除去してマウス血漿を得た。次いで、血漿を水中１：１００に希釈し、イズロネート－２－スルファターゼ（ＩＤＳ）基質（４－メチルウンベリフェリル－α－イズロネート２－スルフェート）と一緒に３７℃で４時間インキュベー

トした。次いで、０．４Ｍのリン酸ナトリウム溶液を添加して反応を停止させた。次いで、組換えヒトイズロニダーゼ（ＩＤＵＡ）を添加し、次いで、溶液を３７℃で２４時間インキュベートした。首尾よく切断されたＩＤＳ基質から蛍光生成物が生じ、次いでそれを蛍光プレートリーダーにおいて３６５ｎｍ励起／４５０ｎｍ放出で測定する。

【０４３７】

ｈＦＩＸ　ＥＬＩＳＡ：マウス血漿をＰＢＳ中１：１００に希釈し、ｈＦＩＸタンパク質レベルに関してサンドイッチＥＬＩＳＡキット（Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）を実行した。マイクロプレートリーダーを使用して４５０ｎｍにおける吸光度を読み取った。

【０４３８】

ｍＰＣＳＫ９　ＥＬＩＳＡ：マウス血漿をＰＢＳ中１：１００に希釈し、ｍＰＣＳＫ９タンパク質レベルに関してサンドイッチＥＬＩＳＡキット（Ｂｏｓｔｅｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を実行した。マイクロプレートリーダーを使用して４５０ｎｍにおける吸光度を読み取った。

【０４３９】

ｍＴＴＲ　ＥＬＩＳＡ：マウス血漿を、０．５％ＢＳＡを伴うＰＢＳ中１：１０，０００に希釈し、ｍＴＴＲタンパク質レベルに関してサンドイッチＥＬＩＳＡキット（Ｃｕｓａｂｉｏ）を実行した。マイクロプレートリーダーを使用して４５０ｎｍにおける吸光度を読み取った。

【０４４０】

Ｉ－５の調製：化合物Ｉ－５を以下の方法Ｂに従って調製した：

塩化メチレン（４０ｍＬ）およびテトラヒドロフラン（２０ｍＬ）中ヘキサン－１，６－ジオール（１０ｇ）の溶液を２－ヘキシルデカノイルクロリド（１０ｇ）およびトリエチルアミン（１０ｍＬ）で処理した。溶液を１時間撹拌し、溶媒を除去した。反応混合物をヘキサンに懸濁させ、濾過し、濾液を水で洗浄した。溶媒を除去し、残留物を、ヘキサン、その後、溶離液として塩化メチレンを使用してシリカゲル（５０ｇ）カラムを通過させ、６－（２’－ヘキシルデカノイルオキシ）ヘキサン－１－オールを油として得た（７．４ｇ）。

【０４４１】

精製した生成物（７．４ｇ）を塩化メチレン（５０ｍＬ）中に溶解させ、クロロクロム酸ピリジニウム（５．２ｇ）で２時間処理した。ジエチルエーテル（２００ｍＬ）を添加し、上清を、シリカゲルベッドを通して濾過した。濾液から溶媒を除去し、得られた油状物を、酢酸エチル／ヘキサン（０～５％）勾配を使用してシリカゲル（５０ｇ）カラムを通過させた。６－（２’－ヘキシルデカノイルオキシ）ドデカナールを油状物として回収した（５．４ｇ）。

【０４４２】

塩化メチレン（２０ｍＬ）中、生成物（４．９ｇ）、酢酸（０．３３ｇ）および２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチルアミン（０．４０ｇ）の溶液をトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（２．１ｇ）で２時間処理した。溶液を水性水酸化ナトリウムで洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで脱水し、濾過し、溶媒を除去した。残留物を、メタノール／塩化メチレン（０～８％）勾配を使用してシリカゲル（５０ｇ）カラムを通過させて、所望の生成物を無色の油状物として得た（１．４ｇ）。

【０４４３】

Ｉ－６の調製：化合物Ｉ－６を以下の方法Ｂに従って調製した：

塩化メチレン（８０ｍＬ）中ノナン－１，９－ジオール（１２．６ｇ）の溶液を２－ヘキシルデカン酸（１０．０ｇ）、ＤＣＣ（８．７ｇ）およびＤＭＡＰ（５．７ｇ）で処理した。溶液を２時間撹拌した。反応混合物を濾過し、溶媒を除去した。残留物を温めたヘキサン（２５０ｍＬ）中に溶解させ、結晶化させた。溶液を濾過し、溶媒を除去した。残留物を塩化メチレン中に溶解させ、希塩酸で洗浄した。有機画分を無水硫酸マグネシウムで脱水し、濾過し、溶媒を除去した。残留物を、０～１２％酢酸エチル／ヘキサンを溶離

液として使用してシリカゲルカラム（７５ｇ）を通過させ、９－（２’－ヘキシルデカノイルオキシ）ノナン－１－オールを油状物として得た（９．５ｇ）。

【０４４４】

生成物を塩化メチレン（６０ｍＬ）中に溶解させ、クロロクロム酸ピリジニウム（６．４ｇ）で２時間処理した。ジエチルエーテル（２００ｍＬ）を添加し、上清を、シリカゲルベッドを通して濾過した。濾液から溶媒を除去し、得られた油状物を、酢酸エチル／ヘキサン（０～１２％）勾配を使用してシリカゲル（７５ｇ）カラムを通過させ、９－（２’－エチルヘキサノイルオキシ）ノナナールを油状物として得た（６．１ｇ）。

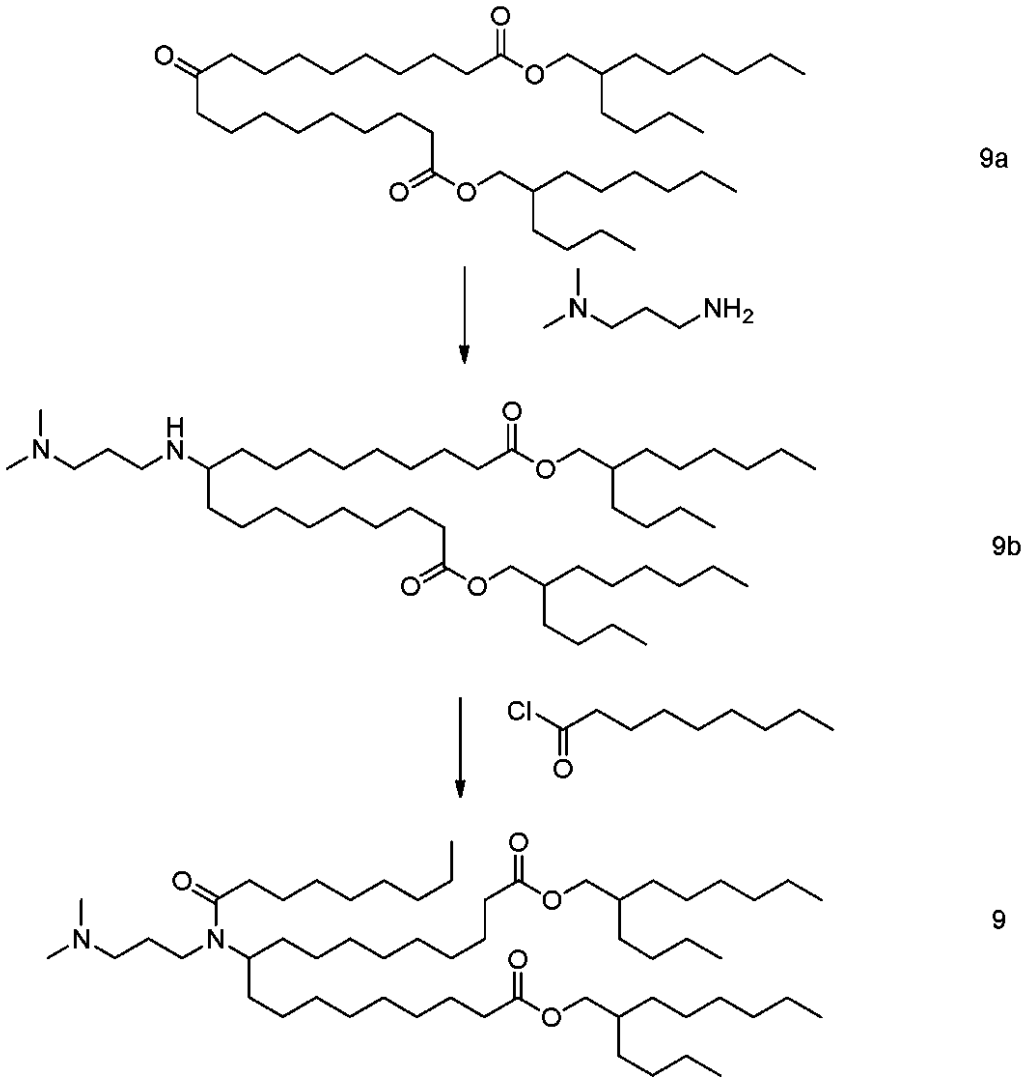
【０４４５】

塩化メチレン（２０ｍＬ）中、粗生成物（６．１ｇ）、酢酸（０．３４ｇ）および２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチルアミン（０．４６ｇ）の溶液をトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（２．９ｇ）で２時間処理した。溶液を、水性水酸化ナトリウム、その後、水で洗浄した塩化メチレンで希釈した。有機相を無水硫酸マグネシウムで脱水し、濾過し、溶媒を除去した。残留物を、メタノール／塩化メチレン（０～８％）勾配を使用してシリカゲル（７５ｇ）カラムを通過させ、その後、塩化メチレン／酢酸／メタノール勾配を使用して第２のカラム（２０ｇ）を通過させた。精製した画分を塩化メチレン中に溶解させ、希薄な水性水酸化ナトリウム溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水、濾過し、溶媒を除去して、所望の生成物を無色の油状物として得た（１．６ｇ）。

【０４４６】

ＩＩ－９の調製：化合物ＩＩ－９を以下の方法Ｄに従って調製した：

【化５５】



ステップ１：
３－ジメチルアミン－１－プロピルアミン（１当量、１．３ｍｍｏｌ、１３３ｍｇ、１６３μＬ；ＭＷ１０２．１８、ｄ０．８１２）およびケトン９ａ（１当量、０．８８５ｇ、１．３ｍｍｏｌ）をＤＣＥ（８ｍＬ）中で混合し、次いで、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（１．４当量、１．８２ｍｍｏｌ、３８６ｍｇ；ＭＷ２１１．９４）およびＡｃＯＨ（１当量、１．３ｍｍｏｌ、７８ｍｇ、７４μＬ、ＭＷ６０．０５、ｄ１．０６）で処理した。混合物を室温、Ａｒ雰囲気下で２日間撹拌した。反応混合物をヘキサン－ＥｔＯＡｃ（９：１）で希釈し、０．１ＮのＮａＯＨ（２０ｍＬ）を添加することによってクエンチした。有機相を分離し、ｓａｔ　ＮａＨＣＯ３、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水し、デカンテーションし、濃縮させて、所望の生成物９ｂをわずかに黄色く濁った油状物として得た（１．０７ｇ、１．３９８ｍｍｏｌ）。

【０４４７】
ステップ２：
ベンゼン（１０ｍＬ）中ノナノイルクロリド（１．３当量、１．２７ｍｍｏｌ、２２５ｍｇ）の溶液を、ベンゼン（１０ｍＬ）中、ステップ１からの化合物９ｂ（０．７５ｇ、０．９８ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（５当量、４．９０ｍｍｏｌ、０．６８ｍＬ）およびＤＭＡＰ（２０ｍｇ）の溶液に室温、１０分でシリンジによって添加した。添加後、混合物を室温で終夜撹拌した。メタノール（５．５ｍＬ）を添加して過剰な塩化アシルを除去した。３時間後に、混合物を、シリカゲルのパッド（１．２ｃｍ）を通して濾過した。濃縮により無色の油状物（０．７０ｇ）を得た。

【０４４８】
粗生成物（０．７０ｇ）を、シリカゲル（クロロホルム中０～４％ＭｅＯＨ）でフラッシュ乾燥カラムクロマトグラフィーによって精製した。これにより無色の油状物４５７ｍｇ、０．５０ｍｍｏｌ、５１％が得られた。1HNMR (400 MHz, CDCl3) δ: 4.54-4.36 (非常に広幅, 見積値0.3H, アミド結合の回りの異性化が遅いため), 3.977, 3.973 (2組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.14-3.09 (m, 2H), 2.33-2.25 (m, 8H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 1.76-1.56 (m, 10H), 1.49-1.39 (m, 4H), 1.37-1.11 (62H), 0.92-0.86 (m, 15H)。

【０４４９】
ＩＩ－１１の調製：
化合物ＩＩ－１１を一般的な手順Ｄに従って調製して、無色の油状物２３９ｍｇ、０．２６ｍｍｏｌを得、２ステップの総収率は５２％であった。[1]HNMR (400 MHz, CDCl3) δ: 4.87 (五重線類似, 6.3 Hz, 2H), 4.54-4.36 (非常に広幅, 見積値0.3H, アミド結合の回りの異性化が遅いため), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.14-3.09 (m, 2H), 2.33-2.25 (m, 8H), 2.23, 2.22 (2組の一重線, 6H), 1.76-1.56 (m, 8H), 1.55-1.39 (m, 12H), 1.37-1.11 (62H), 0.92-0.86 (m, 15H)。

【０４５０】
ＩＩ－３６の調製
化合物ＩＩ－３６を一般的な手順Ｄに従って調製して、無色の油状物２３４ｍｇ、０．２５ｍｍｏｌを得、総収率は２ステップで３４％であった。[1]HNMR (400 MHz, CDCl3) δ: 4.54-4.36 (広幅, 見積値0.3H, アミド結合の回りの異性化が遅いため), 3.977, 3.973 (2組の二重線, 5.8 Hz, 4H), 3.63 (五重線類似, 6.8 Hz, 0.7H), 3.17-3.10 (m, 2H), 2.53-2.43 (m, 6H), 2.34-2.26 (m, 6H), 1.83-1.71 (m, 6H), 1.70-1.57 (m, 8H), 1.49-1.38 (m, 4H), 1.37-1.11 (62H), 0.92-0.86 (m, 15H)。

【０４５１】
ＩＩＩ－２５の調製
塩化メチレン（１５０ｍＬ）中ノナン－１，９－ジオール（１２．０ｇ）の溶液を２－ブチルオクタン酸（５．０ｇ）、ＤＣＣ（７．７ｇ）およびＤＭＡＰ（４．５ｇ）で処理

した。溶液を終夜撹拌した。反応混合物を濾過し、溶媒を除去した。残留物をヘキサンに懸濁させ、濾過した。濾液を希塩酸で洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで脱水し、シリカゲルベッドを通して濾過し、溶媒を除去した。粗生成物を、メタノール／塩化メチレン（０～４％）勾配を使用してシリカゲルカラムを通過させて、９－（２’－ブチルオクタノイルオキシ）ノナン－１－オールを油状物として生成させた（６ｇ）。

【０４５２】

９－（２’－ブチルオクタノイルオキシ）ノナン－１－オールを塩化メチレン（１００ｍＬ）中に溶解させ、クロロクロム酸ピリジニウム（３．８ｇ）で終夜処理した。ヘキサン（３００ｍＬ）を添加し、上清を、シリカゲルベッドを通して濾過した。濾液から溶媒を除去し、得られた油状物をヘキサン中に溶解させた。懸濁液を、シリカゲルベッドを通して濾過し、溶媒を除去し、それにより、９－（２’－ブチルオクタノイルオキシ）ノナン－１－アールを無色の油状物として得た（３．１ｇ）。

【０４５３】

塩化メチレン（５０ｍＬ）中、９－（２’－ブチルオクタノイルオキシ）ノナン－１－アール（２．６ｇ）、酢酸（０．２０ｇ）および４－アミノブタン－１－オール（０．２６ｇ）の溶液をトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（１．４２ｇ）で終夜処理した。溶液を炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで脱水し、濾過し、溶媒を除去した。残留物を、酢酸／メタノール／塩化メチレン（２～０／０～１２／９８～８８％）勾配を使用してシリカゲルカラムを通過させた。純粋な画分を重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄し、化合物ＩＩＩ－２５を無色の油状物として得た（０．８２ｇ）。

【０４５４】

ＩＩＩ－４５の調製：

ＩＩＩ－４５を以下の通り調製した。塩化メチレン（５０ｍＬ）中、９－（２’－ブチルオクタノイルオキシ）ノナン－１－アール（２．６ｇ）、酢酸（０．１７ｇ）および３－アミノプロパン－１－オール（０．２１ｇ）の溶液をトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（１．３４ｇ）で終夜処理した。溶液を炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで脱水し、濾過し、溶媒を除去した。残留物を、酢酸／メタノール／塩化メチレン（２～０／０～８／９８～９６％）勾配を使用してシリカゲルカラムを通過させた。純粋な画分を重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄し、化合物４５を無色の油状物として得た（１．１ｇ）。

【０４５５】

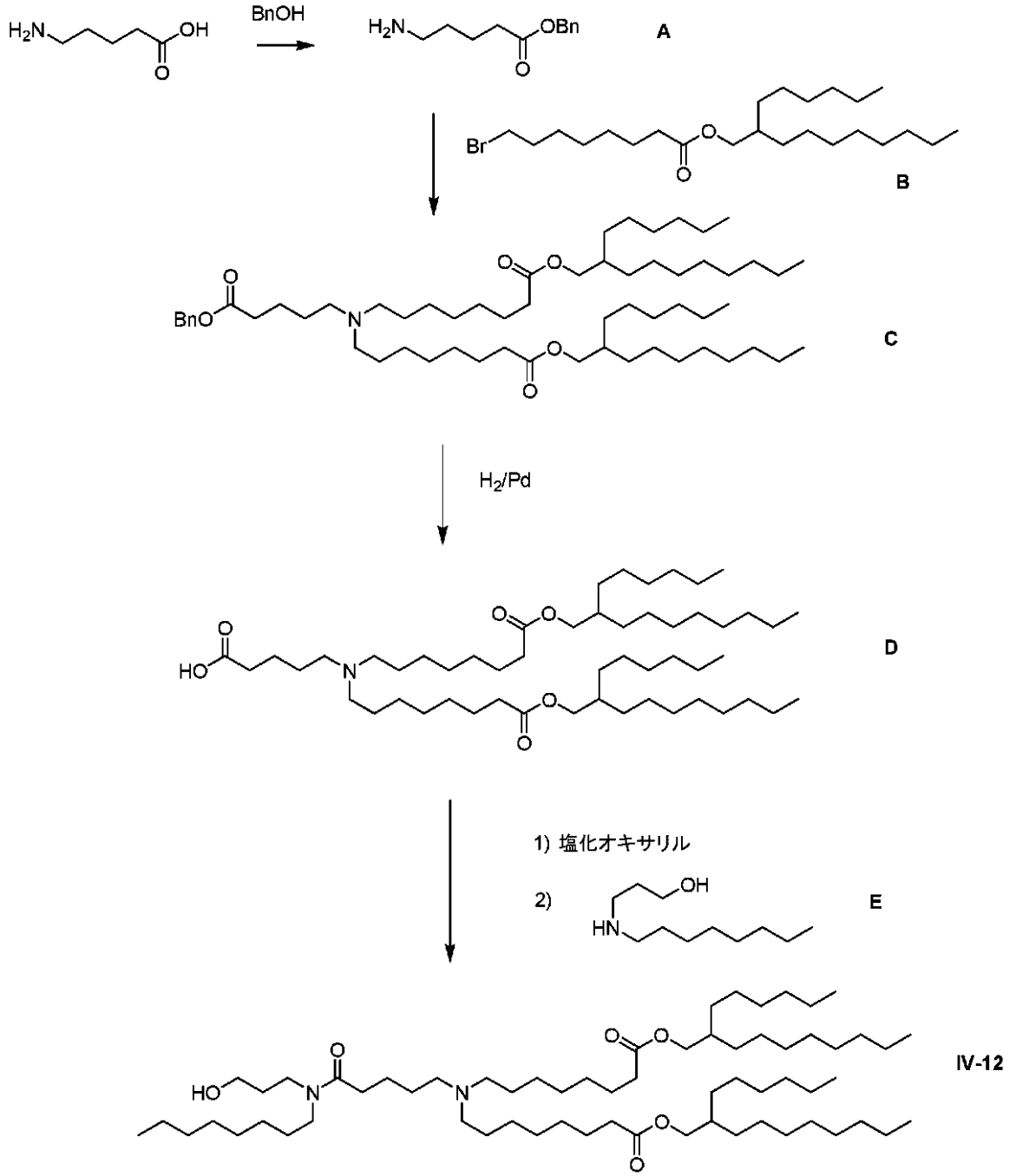
ＩＩＩ－４９の調製：

無水ＴＨＦ２０ｍｌ中２－ブチルオクチル８－ブロモオクタノエート（２当量、１．８７７ｇ、４．８ｍｍｏｌ）の溶液に、４－アミノ－１－ブタノール（１当量、２．４ｍｍｏｌ、２１４ｍｇ、２２１ｕｌ）、炭酸カリウム（２当量、４．８ｍｍｏｌ、６６４ｍｇ）、炭酸セシウム（０．３当量、０．７２ｍｍｏｌ、２３４ｍｇ）およびヨウ化ナトリウム（ｃａ　５ｍｇ）を添加した。圧力丸底フラスコ中の混合物を６日間加熱した（油浴、８０℃）。反応混合物を冷却し、濃縮した。残留物をヘキサンと酢酸エチルの混合物（ｃａ　５：１）中に溶解させ、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水し、濾過し、濃縮した。残留物をシリカゲル上、フラッシュカラムクロマトグラフィーで精製した（クロロホルム中メタノール、１～４％）。これにより、化合物４９を無色の油状物として得た（８５７ｍｇ、１．２１ｍｍｏｌ、５０％）。^{1}HNMR (400 MHz, CDCl3) δ: 6.55 (br. s, 1H), 3.97 (d, 5.8 Hz, 4H), 3.55 (十分に分解していない三重線, 2H), 2.45-2.40 (m. 6H), 2.30 (t, 7.5 Hz, 4H), 1.71-1.58 (m, 10 H), 1.51-1.42 (m, 4H), 1.39-1.19 (m, 44H), 0.93-0.87 (m, 12H)。

【０４５６】

ＩＶ－１２の調製：化合物　ＩＶ－１２を以下の反応スキームに従って調製した：

【化５６】



Ａの合成：

５－アミノバレリン酸（１当量、２．９ｇ、２４．８ｍｍｏｌ）、ベンジルアルコール（２．３当量、５８ｍｍｏｌ、６．２６ｇ、６ｍＬ）、トルエン（７０ｍＬ）およびｐ－トルエンスルホン酸一水和物（１．１当量、２３．４ｍｍｏｌ、４．４５ｇ）の混合物をＤｅａｎ－Ｓｔａｒｋ条件下で２０時間加熱して還流させた。混合物を室温まで冷却した。固体を濾過によって収集し、トルエン（２０ｍＬ×２）およびジエチルエーテル（２０ｍＬ）で洗浄した。所望の生成物（ｔ－ＴｓＯＨ塩として）を白色固体として得た（７．５０３ｇ、１９．８ｍｍｏｌ、８０％）。

【０４５７】

Ｃの合成：

Ａ（１当量、５．５９ｍｍｏｌ、２．５ｇ）、Ｂ（塩の形態、１．４当量、３ｇ、７．９ｍｍｏｌ、ＭＷ３７９．４７）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（３．５当量、２７．６７ｍｍｏｌ、３．５８ｇ、４．８２ｍＬ）および無水アセトニトリル（２０ｍＬ

）の混合物を密閉した圧力フラスコ中に入れて１６時間加熱した（油浴、８３Ｃ）。粗生成物を、シリカゲル上、カラムクロマトグラフィーによって精製した（ヘキサン－ＥｔＯＡｃ－Ｅｔ３Ｎ、９５：５：０から７５：２５：１まで）。これにより、所望の生成物Ｃを黄色の油状物として得た（９１２ｍｇ、０．９７ｍｍｏｌ、３５％）。

【０４５８】

Ｄの合成：

ＥｔＯＨ－ＥｔＯＡｃ（１：１０ｍＬ）中Ｃ（９１２ｍｇ、０．９７ｍｍｏｌ）の溶液に、１０％Ｐｄ／Ｃ（２５ｍｇ）を添加し、混合物を水素下で１６時間撹拌した。反応混合物を、Ｃｅｌｉｔｅ（著作権）のパッドを通して濾過し、酢酸エチル（１００ｍＬ）で洗浄した。濾液を濃縮して、粗生成物をわずかに黄色の油状物として得た（９０２ｍｇ）。粗生成物を、シリカゲル上、カラムクロマトグラフィーによって精製した（クロロホルム中０～１０％メタノール）。これにより、所望の生成物Ｄを青白いロウとして得た（４９２ｍｇ、０．５８ｍｍｏｌ、６０％）。

【０４５９】

ＩＶ－１２の合成：

ＤＣＭ（５ｍＬ）およびＤＭＦ（８ｍｇ）中Ｄ（４９２ｍｇ、０．５８ｍｍｏｌ）の溶液に塩化オキサリル（３．２ｍｍｏｌ、４０６ｍｇ）を室温、Ａｒ下で添加した。この混合物を室温で終夜撹拌し、濃縮した。残留物をＤＣＭ（５ｍＬ）中に溶解させ、再度濃縮して、あらゆる塩化オキサリルを除去した。ＤＣＭ　１０ｍＬ中に溶解させた残油状物（粘性の黄色の油状物）を、ＤＣＭ（１０ｍＬ）中、Ｅ（１．９ｍｍｏｌ、３５６ｍｇ）およびトリエチルアミン（７５０μＬ）およびＤＭＡＰ（５ｍｇ）の溶液に－１５Ｃで５分のうちにシリンジによって添加した。添加後、混合物をゆっくりと室温まで上昇させ、終夜撹拌した。カラムクロマトグラフィー（クロロホルム中０～５％メタノール）によって精製した後、所望の化合物ＩＶ－１２を無色の油状物として得た（１００ｍｇ）。

^{1}HNMR (400 MHz, CDCl3) δ: 4.08 (t-like, 7.1 Hz, 1H), 3.97 (d, 5.8 Hz, 4H), 3.54-3.44 (m, 4H), 3.23-3.17 (m, 2H), 2.44-2.33 (m, 8H), 2.30 (t, 7.5 Hz, 4H), 1.71-1.55 (m, 12H), 1.52-1.36 (m, 6H), 1.36-1.08 (70H), 0.92-0.86 (m, 15H)。

【０４６０】

（実施例３）

ＬＮＰを介したヌクレアーゼの送達によるマウスアルブミンの切断

標的化ジンクフィンガーヌクレアーゼのｉｎ　ｖｉｖｏにおいてマウスゲノム部位を切断する能力を試験するために、アルブミン特異的ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを上記の通りＬＮＰにカチオン性脂質Ｉ－６を使用して組み入れた。次いで、これらを上記の通りＣ５７ＢＬ６マウスに１ｍｇ／ｋｇから３０ｍｇ／ｋｇの用量の範囲で尾静脈を通じて静脈内注射した。

【０４６１】

データから、高量のＺＦＮを使用することにより投薬の７日後に肝臓におけるヌクレアーゼ活性の増大がもたらされる、用量応答が示された（図１Ａ、３０７２４　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３０７２５　ＺＦＮ　ｍＲＮＡを使用、ｍＲＮＡは二重ＨＢＢ　３’ＵＴＲ、ＡＲＣＡキャップを含み、２５％　ｔＵおよび２５％　ｍＣヌクレオシド置換も含んだ）。３ｍｇ／ｋｇの一定用量を使用し、単回投薬または最初の投薬、続いて４日後、７日後、１４日後、もしくは２１日後の第２の投薬のいずれかを比較する実験も行った（図１Ｂを参照のこと）。これらの最初の実験では、第２の投薬に起因するヌクレアーゼ活性のいかなる増大も検出されなかった。３０７２４／３０７２５　ＺＦＮ対を含むＬＮＰを、２ｍｇ／ｋｇで投薬したＩ－６カチオン性脂質を含む同じＬＮＰ製剤中の第２のアルブミン特異的対４８６４１／３１５２３とも比較し、結果から、どちらの種類のＬＮＰも肝臓におけるヌクレアーゼ活性のレベルが同等であることが示された（図１Ｃ）。

【０４６２】

個々のＺＦＮ　ｍＲＮＡをそれらの間に２Ａ－自己切断性ペプチドを含む単一のｍＲＮ

Ａとして一緒に供給した場合に生じるヌクレアーゼ活性を観察するための実験も実施した（図１Ｄ）。ｍＲＮＡ構築物は、二重ＨＢＢ　３’ＵＴＲまたはＷＰＲＥ　３’ＵＴＲのいずれかを有した。動物に２ｍｇ／ｋｇで投薬し、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲを含むｍＲＮＡを含むＬＮＰを投薬した動物では、肝臓における観察可能なヌクレアーゼ活性がより高かった。さらに、４８６４１／３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡを含むＬＮＰであって、Ｉ－５またはＩ－６カチオン性脂質のいずれかを含むＬＮＰもｉｎ　ｖｉｖｏヌクレアーゼ活性について比較した。これらの実験では、動物に２ｍｇ／ｋｇのＬＮＰを投薬し、採取された肝臓において非常に類似した量のヌクレアーゼ活性が示された（図１Ｅ）。最後に、４８６４１／３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡをＩ－５　ＬＮＰに組み入れ、１．８ｍｇ／ｋｇから５．４ｍｇ／ｋｇまでの漸増用量のＬＮＰを使用して活性について試験し（図１Ｆ）、ＬＮＰ用量が増大するにしたがってヌクレアーゼ活性が増大することが見出された。

【０４６３】

４８６４１／３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ対を使用してＩ－５　ＬＮＰ製剤とＩＩ－９　ＬＮＰ製剤を２つの異なる用量（１ｍｇ／ｋｇまたは３ｍｇ／ｋｇ）で比較するための実験を行い、ここで、ｍＲＮＡはＷＰＲＥ　３’ＵＴＲを含み、ＡＲＣＡキャッピングされており、また、２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換も含んだ。これらの実験では（図２Ａ）、どちらの製剤についても、漸増量のＬＮＰを投薬することにより、ヌクレアーゼ活性の増大がもたらされた。多数回投薬の活性をさらに調査するために、Ｉ－５製剤またはＩＩ－９製剤のいずれかを含むＬＮＰおよび４８６４１／３１５２３　ＺＦＮ対をコードするｍＲＮＡを２ｍｇ／ｋｇ、２８日間隔で注射した（図２Ｂ）。

【０４６４】

データから、用量が増大するにしたがってヌクレアーゼ活性が増大することが示された。ＬＮＰに組み込むＺＦＮをコードするｍＲＮＡへの他のヌクレオシド組成の使用を調査するための実験も実施した。図２Ｃは、ＩＩ－９カチオン性脂質ＬＮＰを使用し、２ｍｇ／ｋｇで投薬した、２５％　２ｔＵ／２５％　５ｍＣを含むｍＲＮＡで構成される対と２５％のプソイドウリジン（ｐＵ）を含むｍＲＮＡで構成される対を比較した結果を示す。さらに、上記の２５％のプソイドウリジンを含むｍＲＮＡを、同じくＩＩ－９　ＬＮＰ製剤で、反復投薬を１４日間隔で最大で合計３回の投薬、各投薬を２ｍｇ／ｋｇで行い、反復投薬について試験した。データから、反復投薬時に切断の証拠の増大が検出可能であり、第３の投薬後に標的アルブミン遺伝子に見出されるインデルがおよそ２５％に達したことが実証された。

【０４６５】

（実施例４）

ＬＮＰ性能における精製およびキャップ構造の役割

次に、本発明者らは、ｍＲＮＡの精製のために使用される方法がＬＮＰの性能において果たす役割ならびにいずれのキャップをｍＲＮＡに組み入れるかの改変を調査した。ＩＩ－９カチオン性脂質製剤に製剤化された、ＺＦＮ　４８６４１／３１５２３（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、２５％　ｐＵ）をコードするｍＲＮＡを含むＬＮＰの反復投薬を行い、ここで、各用量は３．５ｍｇ／ｋｇであり、投薬は１４日間隔で行った。これらの実験では、動物をＬＮＰ投薬の３０分前に５ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンで前処置した。さらに、本発明者らは、キャップ構造をＡＲＣＡキャップ、Ｃａｐ１またはＣｌｅａｎｃａｐの間で変動させた。データ（図３）から、ＨＰＬＣによって精製され、Ｃａｐ１キャップを含むｍＲＮＡを合計３回投薬した動物は、ＡＲＣＡキャップを含む、シリカクロマトグラフィーによって精製されたｍＲＮＡよりも良好に機能することが示された（図３Ａ）。４８６４１／３１５２３（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、２５％　ｐＵ、Ｃａｐ１）を使用した、２ｍｇ／ｋｇで投薬する１４日間隔での反復投薬も実施し、ここでも同様に動物をデキサメタゾンで前処置し、ｍＲＮＡをＨＰＬＣまたはシリカクロマトグラフィーのいずれかによって精製した。

【０４６６】

結果（図３Ｂ）から、この実験ではシリカ精製レジメンにより、最も良好なヌクレアーゼ活性がもたらされることが示された。最後に、野生型ｍＲＮＡ塩基組成（「ＷＴ」）または２５％　ｐＵのいずれかを含む、シリカにより精製したｍＲＮＡを用いた実験を行った。これらの実験はまた、３つの異なる種類のキャップ－ＡＲＣＡ、Ｃａｐ１またはＣｌｅａｎＣａｐを用いて行い、２ｍｇ／ｋｇのＩＩ－９　ＬＮＰ製剤を１４日間隔で投薬した。これらの試験では（図３Ｃ）、Ｃａｐ１　ｍＲＮＡを用いて送達されたヌクレアーゼが最も高い活性を示した。

【０４６７】

（実施例５）

免疫抑制の使用

研究を継続し、ステロイド処置の使用を探究した。動物を、４８６４１／３１５２３ｍＲＮＡ対（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、２５％　ｐＵ、ＡＲＣＡキャッピングおよびシリカ精製されたもの）、２ｍｇ／ｋｇの１４日間隔での反復投薬に供した。動物をデキサメタゾンで前処置したか、または前処置しなかった。結果（図４Ａ）から、デキサメタゾンを用いた前処置により、検出可能なヌクレアーゼ活性をより大きくすることが可能であることが実証される。デキサメタゾンを用いた前処置の結果と、Ｓｏｌｕｍｅｄｒｏｌ（登録商標）を用いた前処置および感染後３日間の処置を比較することによってステロイド処置をさらに試験した。どちらの処置も有効であり、Ｓｏｌｕｍｅｄｒｏｌ（登録商標）がわずかにより効果的であることが見出された（図４Ｂ）。

【０４６８】

（実施例６）

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ形質導入

我々のＬＮＰ製剤をｉｎ　ｖｉｔｒｏでも試験して、この状況でヌクレアーゼ活性を検出することができるかを確かめた。カチオン性脂質ＩＩ－９を含むＬＮＰ製剤中の様々なＬＮＰ濃度をＨｅｐａ１－６細胞において試験した。図５Ａは、ｍＲＮＡが、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、および野生型ＲＮＡ残基または２５％　ｐＵヌクレオシド置換のいずれかを含み、ＡＲＣＡまたはＣａｐ１のいずれかでキャッピングされた、アルブミン特異的４８６４１／３１５２３対を使用した実験を示す。データから、全ての製剤が、ヌクレアーゼを細胞に導入することが可能であり、優れた活性を実現したことが実証される。さらに、マウスアルブミン（４８６４１／３１５２３）、ＰＣＳＫ９（５８７８０／６１７４８）またはＴＴＲ（５９７７１／５９７９０）に特異的なＺＦＮ対を試験するＩＩ－９製剤におけるｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験も行った。

【０４６９】

結果（図５Ｂ）から、全てのＬＮＰ製剤が、ＺＦＮをコードするｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける細胞への形質導入に有効であったことが実証される。

【０４７０】

（実施例７）

マウスＴＴＲおよびＰＣＳＫ９のｉｎ　ｖｉｖｏ標的化

次に、本発明者らは、実施例６に記載のＺＦＮ対を、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、ＩＩ－９カチオン性脂質を含むＬＮＰに製剤化された、ＺＦＮをコードするｍＲＮＡの０．８ｍｇ／ｋｇでの反復投薬を使用して試験し、ここで、動物はデキサメタゾンで前処置した。ｍＲＮＡがＷＰＲＥ　３’ＵＴＲおよびＡＲＣＡ－キャップを含む場合、およびｍＲＮＡが２５％　ｐＵヌクレオシド置換を含む場合の、５９７７１／５９７９０　ＴＴＲおよび４８６４１／３１５２３アルブミン試薬を試験した、ＴＴＲ特異的ＬＮＰとアルブミン特異的ＬＮＰの比較を行った。図６Ａに結果が示されており、ｍＴＴＲ特異的ＬＮＰおよびｍＡＬＢ特異的ＬＮＰがどちらもｉｎ　ｖｉｖｏにおいて活性であることが実証された。ＴＴＲ試薬を用いて処置されたマウス（ノックアウトマウス）から血漿を収集し、実施例２において考察されている通り、ＴＴＲ発現についてＥＬＩＳＡによって分析した。結果（図６Ｂ）から、ＥＬＩＳＡによって検出されるＴＴＲタンパク質が緩衝剤またはアルブミンを標的とするＺＦＮを含むＬＮＰを用いて処置されたマウスと比較して減少したこと

が実証される。

【０４７１】

マウスＰＣＳＫ９特異的ＺＦＮをコードするｍＲＮＡ（５８７８０／６１７４８）を用いてＩＩ－９カチオン性脂質製剤に製剤化されたＬＮＰを使用した実験も行った。上記の通り、ｍＲＮＡはＷＰＲＥ　３’ＵＴＲおよびＡＲＣＡ－キャップを含み、ｍＲＮＡ配列は２５％　ｐＵヌクレオシド置換を含んだ。動物をデキサメタゾンで前処置し、次いで、ＬＮＰを用いた反復投薬に供し、結果（図６Ｃ）から、ｍＡＬＢ特異的ＬＮＰおよびｍＰＣＳＫ９特異的ＬＮＰがｉｎ　ｖｉｖｏにおいて活性であることが実証された。ＴＴＲ特異的ＺＦＮを用いた実験と同様に、ＰＣＳＫ９を標的とするＬＮＰを受けたマウスから血漿を収集し、ＥＬＩＳＡを実施して、処置後の血漿中のＰＣＳＫ９の濃度を評価した。結果（図６Ｄ）から、血漿中のＰＣＳＫ９の量がアルブミン特異的ＬＮＰを用いて処置されたマウスと比較して低減したことが示され、これにより、ヌクレアーゼがｉｎ　ｖｉｖｏにおいてそれらの標的の切断に有効であったことが示される。

【０４７２】

（実施例８）

導入遺伝子組込みのためのｉｎ　ｖｉｖｏにおける標的化ヌクレアーゼのＬＮＰ送達の使用

ｉｎ　ｖｉｖｏにおいてＬＮＰを介して導入遺伝子と組み合わせて送達されるＺＦＮの使用も探究した。マウスアルブミン特異的ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（４８６４１／３１５２３）を、ＩＩ－９カチオン性脂質製剤を含むＬＮＰを介して送達し、ここで、ｍＲＮＡはＷＰＲＥ　３’ＵＴＲおよびＣａｐ１を含み、ＲＮＡ配列の組成は２５％　ｐＵを含んだ。マウスを、様々な用量（１～４ｍｇ／ｋｇ）のＬＮＰを、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーを含むＡＡＶ２／８組成物ベクターゲノム１．５×１０^{12}と一緒に用いて静脈内処置した。動物をデキサメタゾンで前処置した。結果（図７Ａ）から、アルブミン遺伝子座における最大５０％のヌクレアーゼ活性、および実施例２に記載のアッセイを使用して血漿におけるＩＤＳ活性（図７Ｂ）が実証された。

【０４７３】

ｍＲＮＡが、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲおよびＣａｐ１を含み、シリカ精製され、ＲＮＡ配列の組成が２５％　ｐＵを含む、ＩＩ－９カチオン性脂質製剤を含めて製剤化した４８６４１／３１５２３　ＬＮＰをより低い用量（最大０．５ｍｇ／ｋｇ）で使用した試験も行った。図１４に示されている通り、これらのより低い用量では、０．５ｍｇ／ｋｇ用量でおよそ１５％の肝臓インデルが観察され、およそ８００ｎｍｏｌ／時間／ｍＬのＩＤＳ活性が検出された。さらに、肝酵素の分析（図１４Ｃ）から、これらの用量は、被験体における忍容性が良好であることが示された。

【０４７４】

ｍＲＮＡ組成に関してさらに特徴付けるための別の試験を、アルブミン特異的ＺＦＮをコードするｍＲＮＡを使用して行った。４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣヌクレオシド置換ならびにＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）を、カチオン性脂質Ｉ－５を含むＬＮＰ製剤に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇで、上記のヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ２／６またはＡＡＶ２／８、１．５×１０^{12}の１日後（前送達）またはそれと同時に（同時送達）注射した。動物をデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取し、結果（図８Ａ）から、処置したマウスにおけるヌクレアーゼ（インデル）活性が示された。次いで、これらのマウスを血漿ＩＤＳ活性について分析した（図８Ｂ）。最後に、様々なドナーＡＡＶ投与量を試験した。これらの実験では、４８６４１／３１５２３　ＬＮＰ（ｍＲＮＡが、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲおよびＣａｐ１を含み、シリカ精製され、ＲＮＡ配列の組成が２５％　ｐＵを含む、ＩＩ－９カチオン性脂質製剤を含めて製剤化した）を単一の０．５ｍｇ／ｋｇ用量で与え、ドナーＡＡＶ２／８を２×１０^{12}ｖｇ／ｋｇ～６×１０^{13}

ｖｇ／ｋｇの範囲で与えた。次いで、血漿中のＩＤＳ導入遺伝子活性を記載されている通り検出した。結果（図１５）から、血漿中で測定されたＩＤＳ活性の量は用量依存的応答を示すことが実証された。

【０４７５】

データから、ＩＤＳ活性は、導入遺伝子をＡＡＶ２／６によって送達した試料においてより高かったことが示される。

【０４７６】

４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　２ｔＵおよび２５％　５ｍＣまたは２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）を使用したアルブミン特異的ＺＦＮをコードするｍＲＮＡを使用して試験を行った。ｍＲＮＡを混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－５またはＩＩ－９に製剤化し、マウスに、２ｍｇ／ｋｇで、上記のヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ２／８、１．５×１０^{12}と同時に注射した。動物をデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。

【０４７７】

結果（図８Ｃ）から、全ての製剤が活性であること、および２５％　ｐＵヌクレオシド組成を有するｍＲＮＡを含むＩＩ－９　ＬＮＰ製剤が最も活性であることが実証された。これらのマウスから血漿も収集し、ＩＤＳ活性について分析した（図８Ｄ）。結果から、ＬＮＰおよびＡＡＶドナーを含む全ての試料が活性であることが実証された。

【０４７８】

最後に、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化された、ｍＲＮＡ対（ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲを含む；改変されていない残基または２５％　ｐＵヌクレオシド置換を含む；ＡＲＣＡまたはＣａｐ１でキャッピングされたもの；シリカまたはＨＰＬＣで精製されたもの）をコードする４８６４１／３１５２３　ＺＦＮまたは４８６５２／３１５２７　ＺＦＮのいずれかを含むＬＮＰを使用し、マウスに、２ｍｇ／ｋｇで、ヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ２／８、１．５×１０^{12}と同時に注射した試験を行った。動物をデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。

【０４７９】

ヌクレアーゼ活性の結果が図８Ｅに示されており、ＬＮＰおよびドナーＡＡＶを含む組成物の全てが活性であったことが示される。この実験では、「２５％　ｐＵ、ＡＲＣＡ、シリカ」および「ＷＴ、Ｃａｐ１、ＨＰＬＣ」と標識されたデータセットは、ＬＮＰを含むアルブミン特異的４８６４１／３１５２３を用いて行った実験の結果である。処置したマウスから血漿を収集し、ＩＤＳ活性について分析した（図８Ｆ）。結果から、ＨＰＬＣによって精製された野生型ヌクレオシドおよびＣａｐ１型のキャップを含む製剤により最も高い活性がもたらされることが実証された。

【０４８０】

導入遺伝子組込みに対する免疫抑制の影響をさらに特徴付けるために、４８６４１／３１５２３対を使用してさらなる実験を行った。これらの実験では、４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；改変されていない残基または２５％　ｐＵヌクレオシド置換；Ｃａｐ１；シリカ精製されたもの）を混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９に製剤化し、マウスに、２ｍｇ／ｋｇで、ヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}と同時に注射した。動物を、ＬＮＰ投薬の直前に５ｍｇ／ｋｇのデキサメタゾンで前処置したか、またはＬＮＰ投薬の直前およびＬＮＰ投薬後さらに３日間、毎回５ｍｇ／ｋｇで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取した。結果（図９Ａ）から、ＬＮＰおよびＡＡＶドナーを含む試料の全てにおけるヌクレアーゼ活性が実証された。これらのマウスから血漿を採取し、ＩＤＳ活性について分析した（図９Ｂ）。処置したマウスの全てが血漿におけるＩＤＳ活性を有した。

【０４８１】

ドナーをコードするヒト第ＩＸ因子（ｈＦＩＸ）をアルブミン特異的ＺＦＮと組み合わせて使用する実験も実施した。これらの実験では、４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ（ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）を混合し、ＬＮＰ製剤ＩＩ－９またはＩ－５に製剤化し、マウスに２ｍｇ／ｋｇまたは３．５ｍｇ／ｋｇで注射した。同時に、ＺＦＮ切断部位に隣接する相同アームおよび導入遺伝子コード領域のすぐ上流のスプライスアクセプターを有するヒトＦＩＸ導入遺伝子ドナーを含むベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}を注射した。動物をＬＮＰ投薬の直前にデキサメタゾンで前処置した。インデル分析のために肝臓を採取し、図１０Ａに結果が示されている。試験から、ＬＮＰおよびＡＡＶドナーを受けたマウスの全てがヌクレアーゼ活性を有することが示された。処置したマウス由来の血漿をｈＦＩＸの存在について実施例２に記載の通り分析し、図１０Ｂに結果が示されている。ＬＮＰおよびＡＡＶドナーで処置したマウスの全てが、治療レベルのｈＦＩＸを含め、血漿中に検出可能なレベルのｈＦＩＸを有した。

【０４８２】

マウスに、４８６４１／３１５２３　ＺＦＮ対を、ＩＩ－９カチオン性脂質を使用して製剤化されたＺＦＮをコードするｍＲＮＡのＬＮＰ送達によって受けさせる反復投薬も実施した。ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲおよびＡＲＣＡキャップを含み、２５％　ｐＵヌクレオシド組成を有した。ＬＮＰを２ｍｇ／ｋｇで注射した。第１の投薬は、上記のヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}との同時送達も含み、動物を各ＬＮＰ投薬の前にデキサメタゾンで前処置した。したがって、初回用量は、ＺＦＮ対を含むＬＮＰ、およびＡＡＶドナーを含んだ。その後の投薬は、１４日間隔で合計３回の投薬で行った。インデル分析のために肝臓を採取し、図１１Ａに結果が示されている。データから、ＬＮＰおよびＡＡＶドナーを受けたマウスの全てが活性であること、およびその後の投薬でヌクレアーゼ活性が増大したことが実証された。血漿を収集し、ＩＤＳ活性についてアッセイし（図１１Ｂ）、結果から、ドナーおよびＬＮＰを受けた動物の全てにおいてＩＤＳ活性が存在したこと、および活性がその後の投薬それぞれで増大したことが実証された。別の試験のセットを、投薬スケジュールを７日毎に短縮して行った。これらの実験では、ＩＩ－９カチオン性脂質を含めて製剤化した同じＬＮＰを使用し（４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡ、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ；２５％　ｐＵヌクレオシド置換；ＡＲＣＡでキャッピングされたもの；シリカ精製されたもの）、マウスを、第１の投薬時に２ｍｇ／ｋｇの用量のＬＮＰ、およびＩＤＳドナーを含むベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８、１．５×１０^{12}で処置した。図１１Ｃに結果が示されており、ＬＮＰおよびＡＡＶドナーを受けたマウスの全てが肝臓におけるヌクレアーゼ活性を示すことが実証された。血漿も採取し、ＩＤＳ活性を前と同様にアッセイした（図１１Ｄ）。結果から、ＬＮＰ／ＡＡＶ－ドナーによる処置を受けた試料の全てにおいてＩＤＳ活性が存在したこと、および活性が投薬期間にわたって増大したことが実証された。

【０４８３】

マウスに、４８６４１／３１５２３　ＺＦＮ対を、ＩＩ－９カチオン性脂質を使用して製剤化されたＺＦＮをコードするｍＲＮＡのＬＮＰ送達によって受けさせる反復投薬も実施した。ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、Ｃａｐ１を含み、ＨＰＬＣで精製されており、改変されていない残基を有した。ＬＮＰを０．５ｍｇ／ｋｇで注射した。第１の投薬には、上記のヒトＩＤＳ導入遺伝子ドナーをコードするベクターゲノム（ｖｇ）ＡＡＶ８またはＡＡＶ６、１．５×１０^{12}の同時送達も含め、また、動物を各ＬＮＰ投薬の前にデキサメタゾンで前処置した。したがって、初回用量は、ＺＦＮ対を含むＬＮＰ、およびＡＡＶドナーを含んだ。その後の投薬は、７日間隔で合計３回の投薬で行った。

【０４８４】

インデル分析のために肝臓を採取し、図２０Ａに結果が示されている。データから、ＬＮＰおよびＡＡＶドナーを受けたマウスの全てが活性であること、およびその後の投薬で

ヌクレアーゼ活性が増大したことが実証された。

【０４８５】

血漿および組織を収集し、ＩＤＳ活性についてアッセイし（それぞれ図２０Ｂおよび２０Ｃ）、結果から、ドナーおよびＬＮＰを受けた動物の全てにおいてＩＤＳ活性が存在したこと、およびその後の投薬のそれぞれで活性が増大したことが実証された。

【０４８６】

（実施例９）

ヌクレアーゼの皮内送達

ヌクレアーゼを含むＬＮＰをマウスの皮内に送達する試験を実施した。簡単に述べると、４８６４１　ＺＦＮ　ｍＲＮＡおよび３１５２３　ＺＦＮ　ｍＲＮＡを含むＬＮＰを、Ｉ－５カチオン性脂質またはＩＩ－９カチオン性脂質のいずれかを使用して製剤化した。次いで、マウスの背側の領域を剃毛し、次いで、ＰＢＳ中に様々な用量で希釈した製剤化ｍＲＮＡ　ＬＮＰ　５０μＬを皮内注射した。マウスを屠殺し、注射部位のすぐ周囲の皮膚を採取し、ヌクレアーゼ活性を上記の通り分析した。

【０４８７】

結果（図１２）から、ＬＮＰを受けたマウスが注射部位の周囲の皮膚において検出可能なヌクレアーゼ活性を有したことが実証される。

【０４８８】

（実施例１０）

ｉｎ　ｖｉｖｏ標的化マウスアルブミン

種々の異なる製剤、ＩＩ－９、ＩＩ－１１またはＩＩＩ－４５カチオン性脂質（図１３）およびＩＩ－９、ＩＩ－３６、ＩＩＩ－２５、ＩＩＩ－４５、ＩＩＩ－４９、またはＩＶ－１２（図２３）を使用してマウスアルブミンを標的化した。全て中間のアミノ脂質（Ｎ）：ｍＲＮＡ（Ｐ）比で製剤化した。図２３では、製剤ＩＩ－９を、低Ｎ：Ｐ比および高Ｎ：Ｐ比、ならびに中間のＮ：Ｐ比であるがＬＮＰをより大きな約１００ｎｍとしても製剤化した。ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３を上記の通り使用し、ＺＦＮ対をコードするｍＲＮＡは２５％　ｐＵ置換、ＷＰＲＥおよびＣａｐ１を含み、シリカによって精製されたものであった。マウスを投薬の３０分前にデキサメタゾン（５ｍｇ／ｋｇ）で前処置した。投薬の反復を１４日間空けて行い、マウスを第２の投薬の７日後に屠殺した。データ（図１３および２３）から、全てのＬＮＰ製剤が活性であったことが示された。

【０４８９】

ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３を含有するＬＮＰ　ＩＩ－９製剤を使用した実験も実施し、ここで、ＺＦＮ対をコードするｍＲＮＡが、２５％　ｐＵ置換、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、Ｃａｐ１を含み、シリカ膜によって精製されたものか（０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量）またはＨＰＬＣで精製されたもの（２．０ｍｇ／ｋｇ用量）であった。マウスを各ＬＮＰ投薬の３０分前にデキサメタゾン（５ｍｇ／ｋｇ）で前処置した。投薬の反復を１４日間空けて行い、各投薬の７日後にマウスのコホートを屠殺した。

【０４９０】

図１６に示されている通り、その後のＬＮＰ投薬それぞれの後にゲノム改変（インデル）の蓄積が観察された。

【０４９１】

ＬＮＰ　ＩＩ－９製剤を使用し、ＺＦＮ　４８６４１および３１５２をコードする２５％　ｐＵ置換されたｍＲＮＡ、または改変されていないｍＲＮＡを比較する実験も実施し、ここで、ｍＲＮＡは、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、Ｃａｐ１を含み、シリカ精製されたものであった。マウスを投薬の３０分前にデキサメタゾン（５ｍｇ／ｋｇ）で前処置した。マウスに０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰを投薬し、７日後に肝臓をゲノム改変分析のために採取した。

【０４９２】

図１８に示されている通り、改変されていないＺＦＮ　ｍＲＮＡでは２５％　ｐＵ置換された試料よりも高いゲノム改変レベルがもたらされた。

【０４９３】
（実施例１１）
ゲノム改変の生体内分布
ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３を含有するＬＮＰ　ＩＩ－９製剤を使用してマウスアルブミンを標的化し、ここで、ＺＦＮ対をコードするｍＲＮＡは２５％　ｐＵ置換、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、Ｃａｐ１を含み、シリカ膜精製されたものであった。マウスをＬＮＰ投薬の３０分前にデキサメタゾン（５ｍｇ／ｋｇ）前処置した。マウスに２．０ｍｇ／ｋｇのＬＮＰを投薬し、７日後にマウスを屠殺し、肝臓、骨髄、および脾臓をゲノム改変分析のために採取した。
【０４９４】
さらに、マウスのコホートを屠殺し、肝臓を採取する前に処置しなかったか（「無灌流」）または肝臓を採取する前に緩衝生理食塩水を経心的に灌流させて肝臓内の血液細胞を除去した（「無選別」）。灌流を行った肝臓の画分をコラゲナーゼで消化して単一細胞懸濁液を作製し、次いで、クッパー細胞特異的マーカーおよび内皮細胞特異的マーカーを用いて蛍光免疫染色した。次いで、染色された細胞を内皮細胞マーカー陽性、クッパー細胞マーカー陽性、またはマーカー陰性（肝細胞）細胞集団にＦＡＣＳで選別した。次いで、これらの選別された細胞からゲノムＤＮＡを採取し、ゲノム改変（インデル）について分析した。
【０４９５】
図１７Ａは、種々の器官（肝臓、脾臓および骨髄）におけるゲノム改変（インデル）を示す。図１７Ｂは、マウスバルク肝組織におけるゲノム改変が灌流を行ったマウスにおいて実質的により低く、これは血液中に標的化されなかった有核細胞が存在することに起因する可能性があることを示す。さらに、肝細胞は、肝臓内で最も高度に標的化された細胞集団である。
【０４９６】
（実施例１２）
ＬＮＰ投薬前の動物の絶食
ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３を含有する製剤ＩＩ－９カチオン性脂質（ＬＮＰ　ＩＩ－９製剤）を使用してマウスアルブミンを標的化し、ここで、ＺＦＮ対をコードするｍＲＮＡは２５％　ｐＵ置換、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、Ｃａｐ１を含み、シリカ膜精製されたものであった。動物のコホートを、免疫抑制およびＬＮＰ投薬を開始する前、終夜、およそ１６時間にわたって食物を得られないようにした。全てのマウスをＬＮＰ投薬の３０分前にデキサメタゾン（５ｍｇ／ｋｇ）前処置した。マウスに０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰを投薬し、７日後にマウスを屠殺し、肝臓をゲノム改変分析のために採取した。
【０４９７】
図１９に示されている通り、終夜絶食させた動物におけるゲノム改変（インデル）は、ＬＮＰ投薬前、終夜、食物を自由に得られた動物よりも高かった。
【０４９８】
（実施例１３）
ポリＡ尾部の伸長およびｍＲＮＡ転写物のコード領域からのウリジンの除去
ＺＦＮ　４８６４１および３１５２３を含有する製剤ＩＩ－９カチオン性脂質を使用してマウスアルブミンを標的化し、ここで、ＺＦＮ対をコードするｍＲＮＡは、改変されていない残基、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、Ｃａｐ１を含み、シリカ膜精製されたものであった。全てのマウスをＬＮＰ投薬の３０分前にデキサメタゾン（５ｍｇ／ｋｇ）前処置した。マウスに０．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰを投薬し、７日後にマウスを屠殺し、肝臓をゲノム改変分析のために採取した。反復投薬したマウスには、１４日間隔で投薬した。
【０４９９】
図２１に示されている通り、動物におけるゲノム改変（インデル）の最高レベルは、ｍＲＮＡ上により長いポリＡ尾部が存在する場合、および得られるアミノ酸配列は同じに保持しながらｍＲＮＡ転写物のコード領域内のゆらぎ位置のウリジンをできるだけ多く除去

した（置き換えた）場合（約１２５０ｂｐのコード領域から約５０～６０個のウリジンを除去した）に得られた。

【０５００】

（実施例１４）

最適化されたＺＦＮ構築物

ＺＦＮ　６９１２１／６９１２８および６９０５２／６９１０２を含有する製剤ＩＩ－９カチオン性脂質を使用してマウスＴＴＲを標的化し、ここで、ＺＦＮ対をコードするｍＲＮＡは、改変されていない残基、ＷＰＲＥ　３’ＵＴＲ、Ｃａｐ１、１９３個のｐｏｌｙＡ尾部、ウリジン枯渇コードドメインを含み、シリカ膜精製されたものであった。全てのマウスをＬＮＰ投薬の３０分前にデキサメタゾン（５ｍｇ／ｋｇ）前処置した。マウスに様々なＬＮＰ用量を投薬し、最初のＬＮＰ投薬の３５日後にマウスを屠殺し、肝臓をゲノム改変分析のために採取した。

【０５０１】

図２２Ａに示されている通り、動物の意図されたマウスＴＴＲ遺伝子座においてオンターゲットのゲノム改変（インデル）が観察された。図２２Ｂは、図２２Ａに記載されているマウスから収集された血漿におけるマウスＴＴＲ　ＥＬＩＳＡアッセイを示す。図２２Ｃおよび２２Ｄは、投薬の１日後に図２２Ａに記載されているマウスから収集された血清における肝機能検査（ＬＦＴ）の結果を示す。「ＬＦＴ」は、肝機能検査を指す；「ＡＬＴ」は、アラニントランスアミナーゼを指す；「ＡＳＴ」は、アスパラギン酸トランスアミナーゼを指す。図２２Ｅおよび２２Ｆは、それぞれ、オフターゲットの器官である脾臓および腎臓における最小のゲノム編集を示す。

【０５０２】

結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける用量依存的なオンターゲットの切断、ならびに用量依存的なｍＴＴＲタンパク質発現のノックダウンが実証された。さらに、ＬＮＰで動物を処置することにより、肝機能にはいかなる注目すべき変化も引き起こされなかった。

【０５０３】

これらの実験により、特異的ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのＬＮＰを介した送達により、処置された動物の肝臓および皮膚における標的化切断をもたらすことができること、ならびに、ドナー導入遺伝子を含めることにより、標的化組込み、および肝臓からを含む処置された動物におけるｉｎ　ｖｉｖｏでの導入遺伝子の発現をもたらすことができることが実証された。具体的には、ｍＲＮＡ－ＬＮＰとプロモーターレスヒトＩＤＳまたはＦＩＸ導入遺伝子ドナーのいずれかを含むＡＡＶを同時送達することにより、治療的に関連するレベルの酵素活性（１９５０ｎｍｏｌ／時間／ｍＬ）およびタンパク質発現（１０１５ｎｇ／ｍＬ）が、それぞれ、血漿内でもたらされた（野生型レベルの７７００倍に至るまで、およびヒトＩＤＳに関する以前のマウス試験の８倍）。さらに、単回ＡＡＶドナー投薬後にｍＲＮＡ－ＬＮＰを反復投与することにより、ゲノム編集および導入遺伝子発現のレベルが有意に増大した（２～３回の投薬後におよそ２倍）。遺伝子ノックアウト適用に関しては、エレクトロポレーションによってｍＲＮＡとして送達されたＴＴＲ遺伝子（トランスサイレチン関連アミロイドーシスの処置に関して臨床的に検証された遺伝子ノックアウト／ノックダウン標的）を標的とするＺＦＮにより、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてマウス肝細胞株内で＞９９％のインデルをもたらすことが可能であった。次いで、これらのＺＦＮをｍＲＮＡとして生成し、ＬＮＰ中にパッケージし、野生型マウスに静脈内注射した。単回投薬（０．２ｍｇ／ｋｇ）後、肝組織における６６％のインデルおよび血漿における８１％のタンパク質ノックダウンが観察され、血清中で肝臓に関連するトランスアミナーゼの有意な増大は伴わなかった。

【０５０４】

要約すると、ＬＮＰ媒介ＺＦＮ　ｍＲＮＡ送達により、遺伝子疾患を有する被験体の処置および／または予防のための治療用導入遺伝子をもたらすゲノム編集を含む、高度に効率的なレベルのｉｎ　ｖｉｖｏゲノム編集が駆動される。

【図１Ａ－１Ｆ】

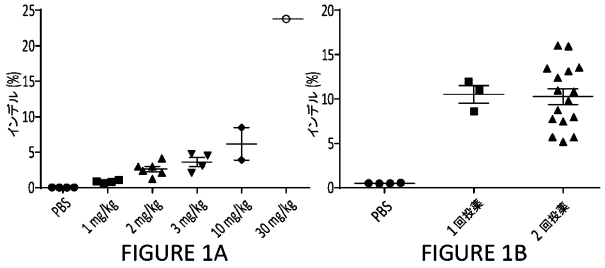


FIGURE 1A

FIGURE 1B

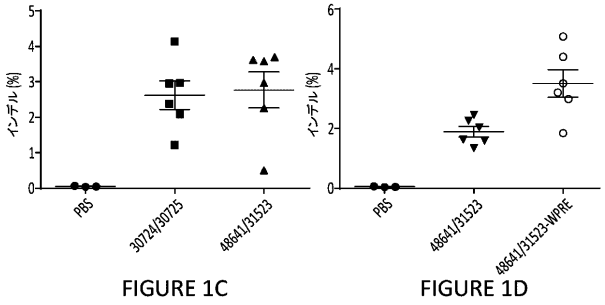


FIGURE 1C

FIGURE 1D

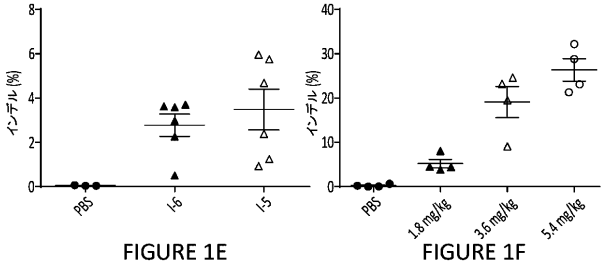


FIGURE 1E

FIGURE 1F

【図２Ａ－２Ｄ】

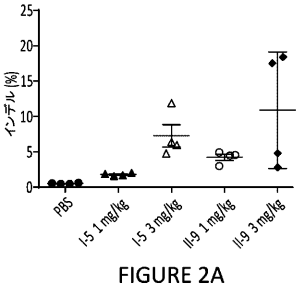


FIGURE 2A

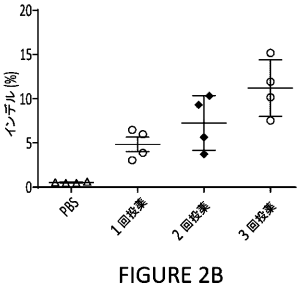


FIGURE 2B

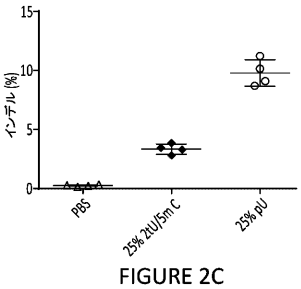


FIGURE 2C

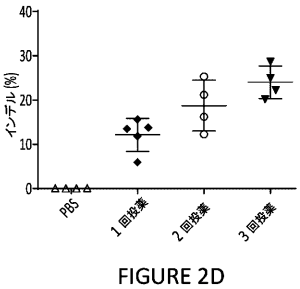


FIGURE 2D

【図３Ａ－３Ｃ】

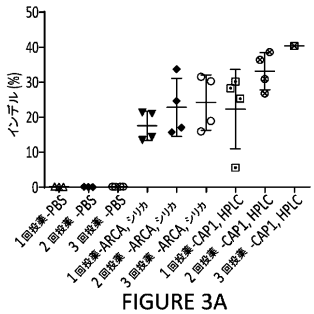


FIGURE 3A

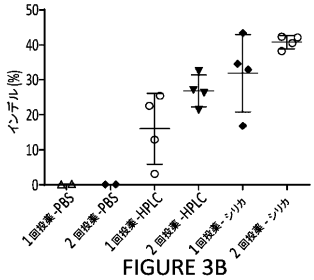


FIGURE 3B

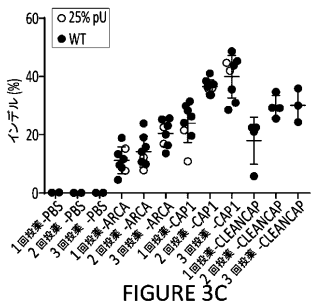


FIGURE 3C

【図４Ａ－４Ｂ】

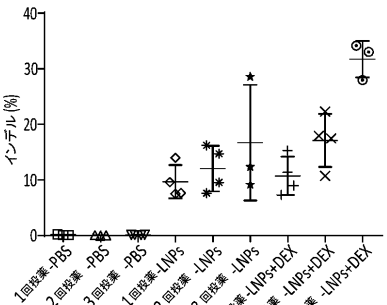


FIGURE 4A

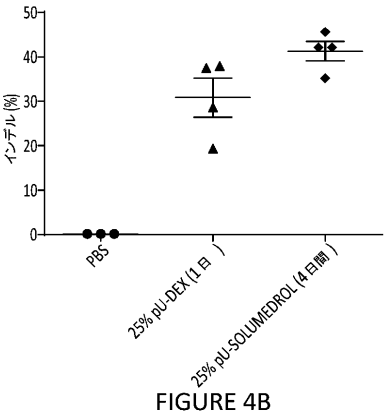


FIGURE 4B

【図５Ａ－５Ｂ】

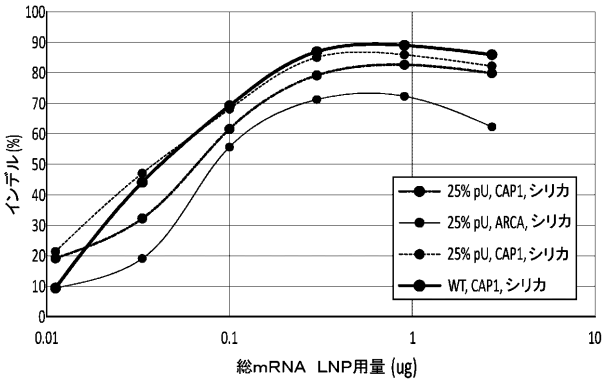


FIGURE 5A

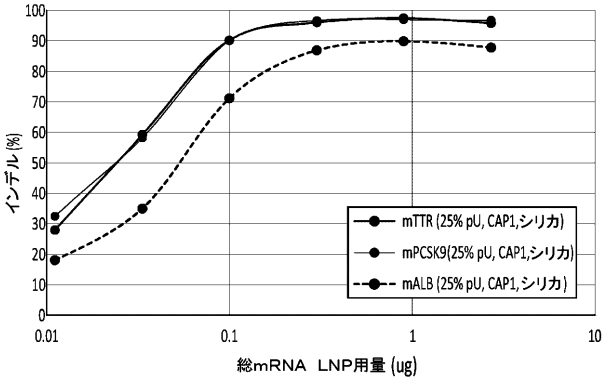


FIGURE 5B

【図６Ａ－６Ｄ】

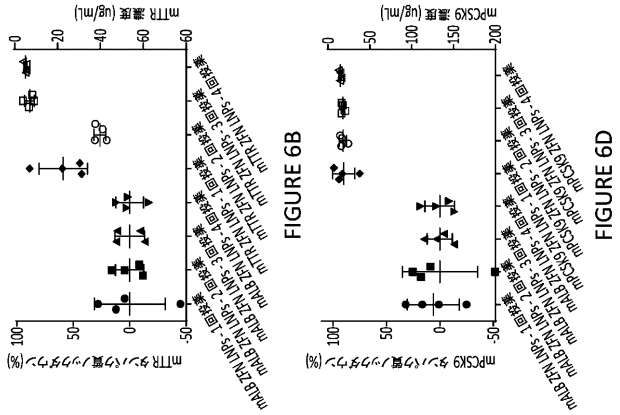


FIGURE 6B　FIGURE 6D

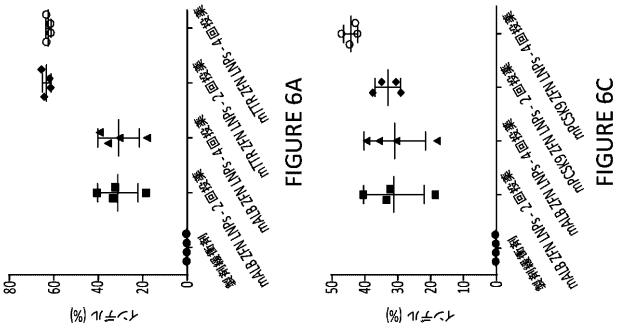


FIGURE 6A　FIGURE 6C

【図７Ａ－７Ｂ】

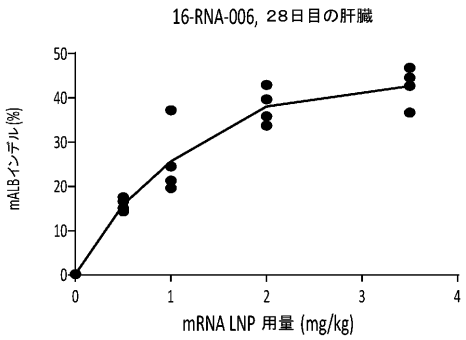


FIGURE 7A

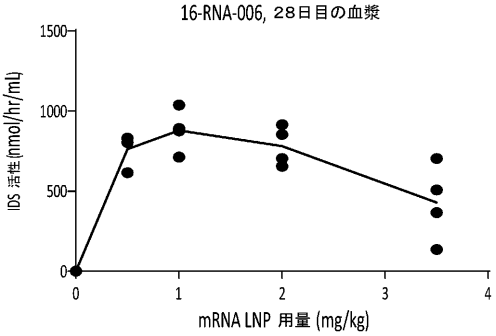


FIGURE 7B

【図８Ａ－８Ｆ】

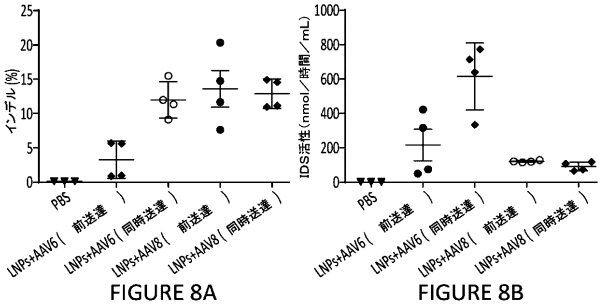


FIGURE 8A　FIGURE 8B

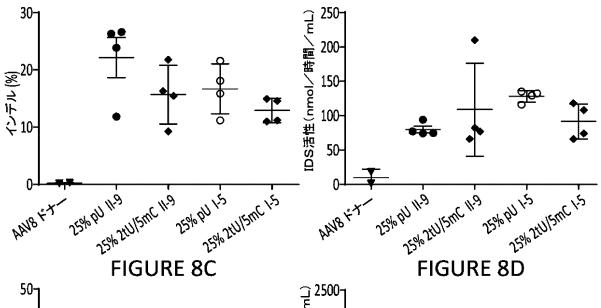


FIGURE 8C　FIGURE 8D

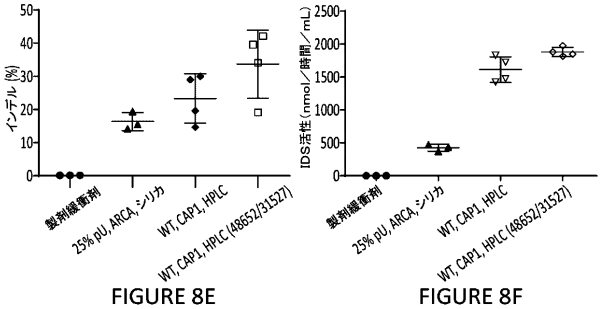


FIGURE 8E　FIGURE 8F

【図９Ａ－９Ｂ】

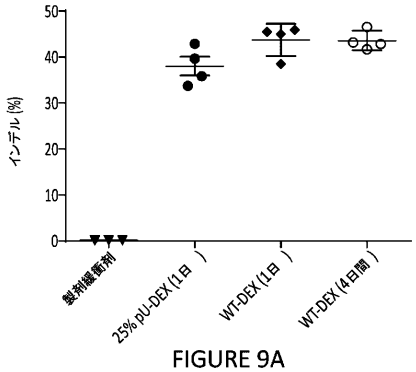


FIGURE 9A

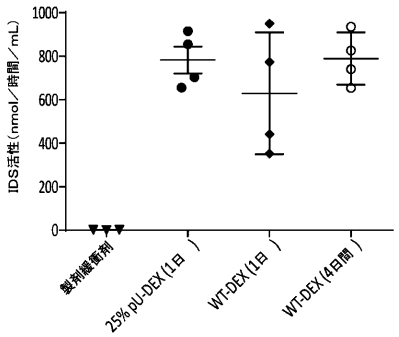


FIGURE 9B

【図１０Ａ－１０Ｂ】

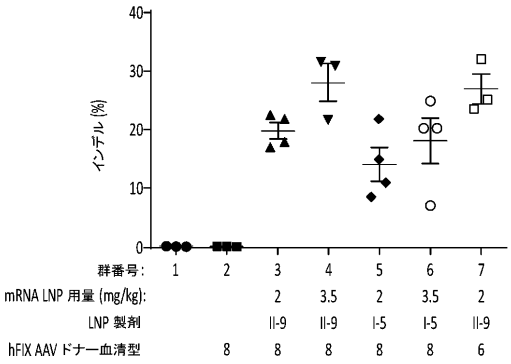


FIGURE 10A

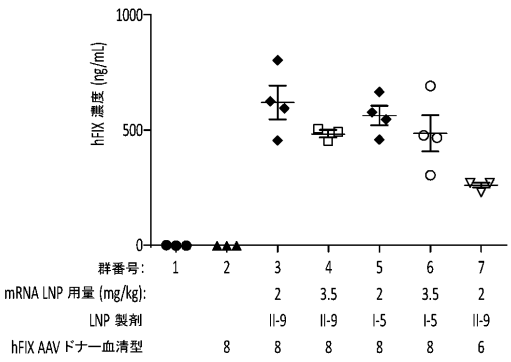


FIGURE 10B

【図１１Ａ－１１Ｄ】

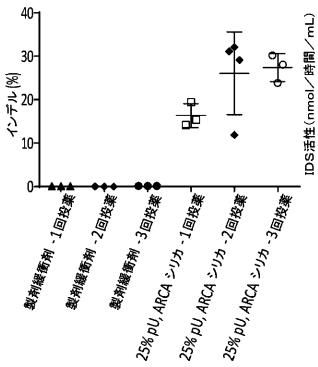


FIGURE 11A

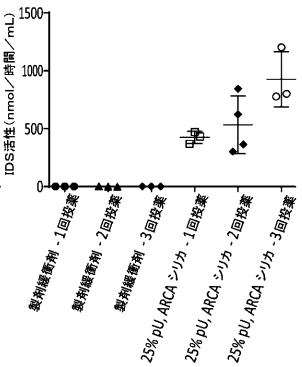


FIGURE 11B

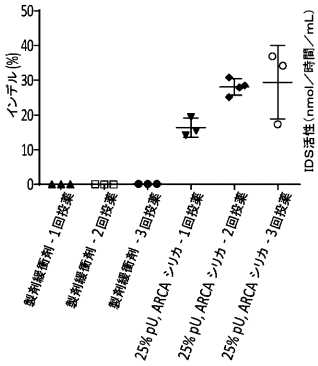


FIGURE 11C

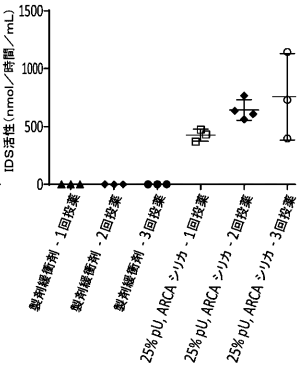


FIGURE 11D

【図１２】

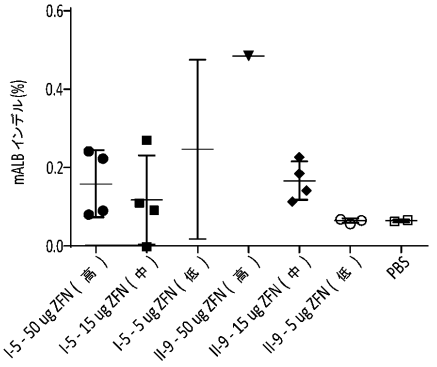


FIGURE 12

【図１３】

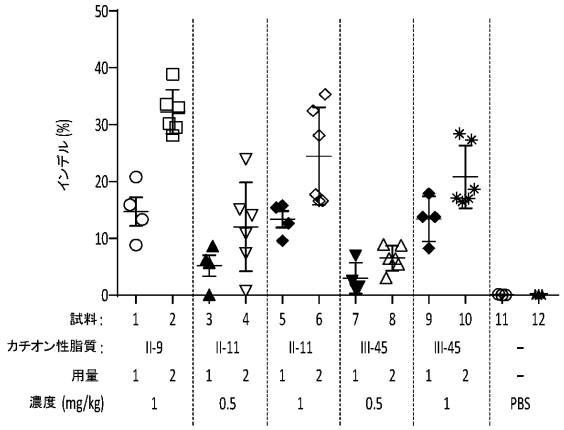


FIGURE 13

【図１４Ａ－１４Ｃ】

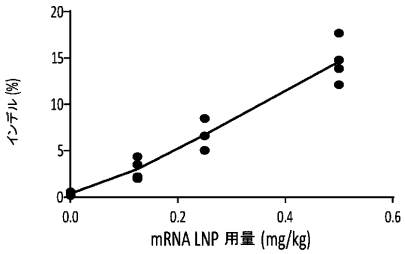


FIGURE 14A

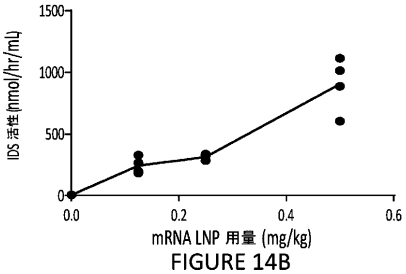


FIGURE 14B

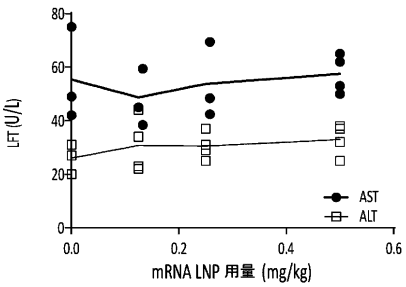


FIGURE 14C

【図１５】

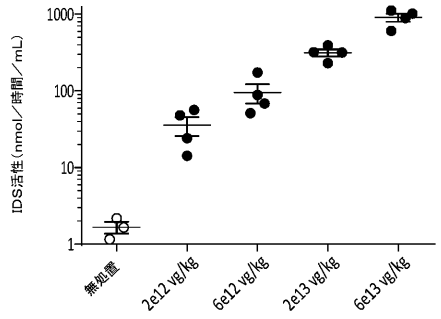


FIGURE 15

【図１７Ａ－１７Ｂ】

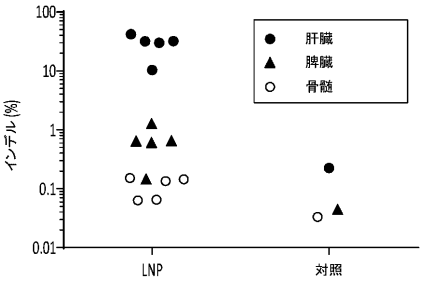


FIGURE 17A

【図１６】

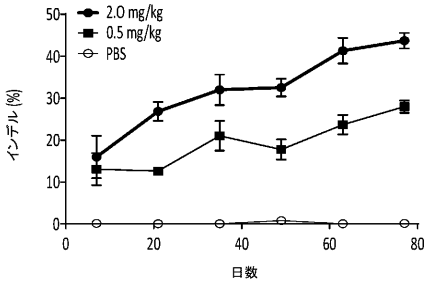


FIGURE 16

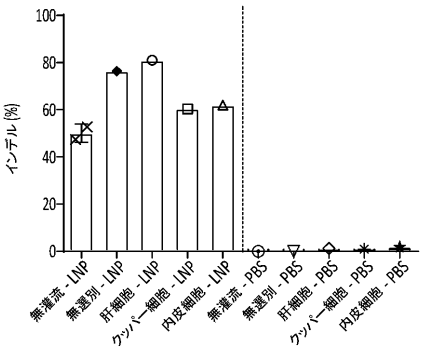


FIGURE 17B

【図１８】

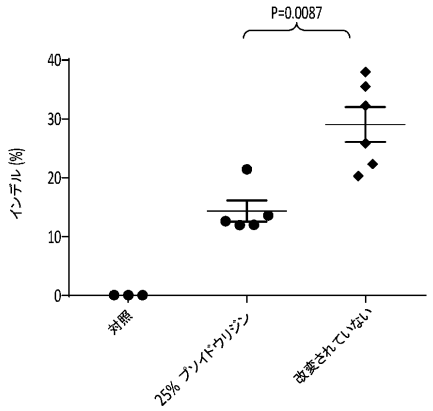


FIGURE 18

【図１９】

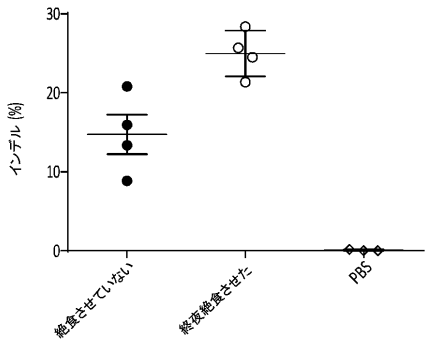


FIGURE 19

【図２０Ａ－２０Ｂ】

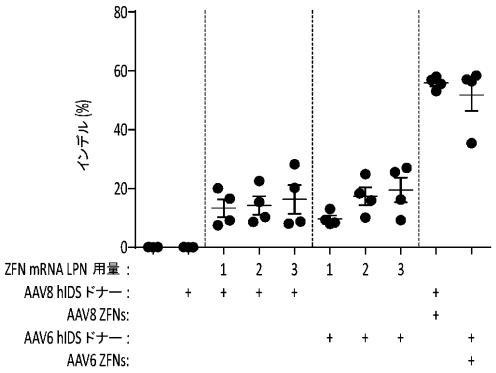


FIGURE 20A

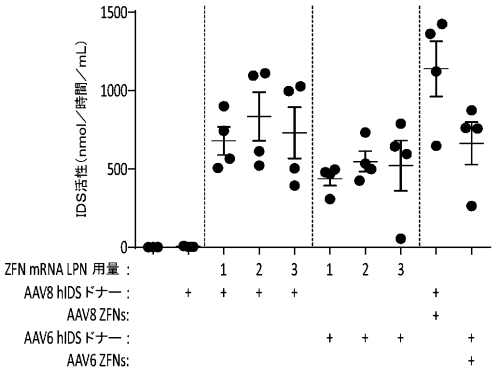


FIGURE 20B

【図２０Ｃ】

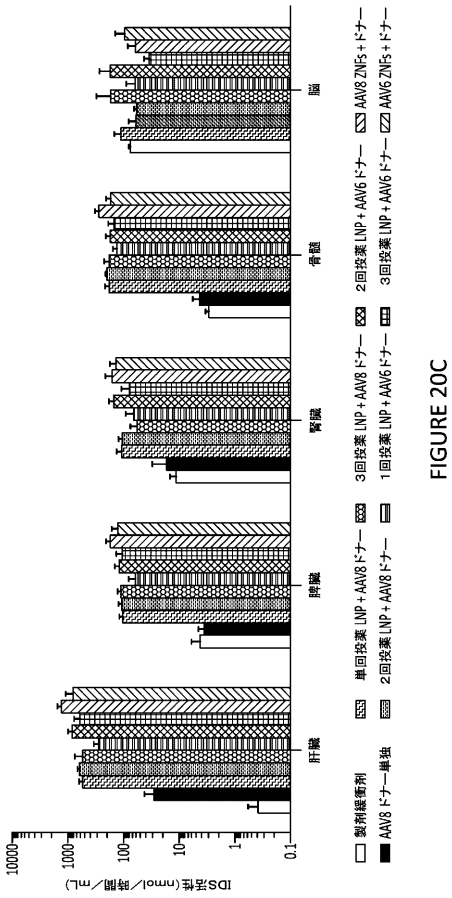


FIGURE 20C

【図２１】

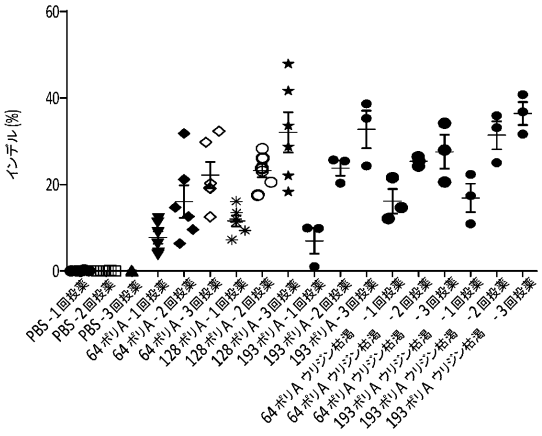


FIGURE 21

【図２２Ａ－２２Ｂ】

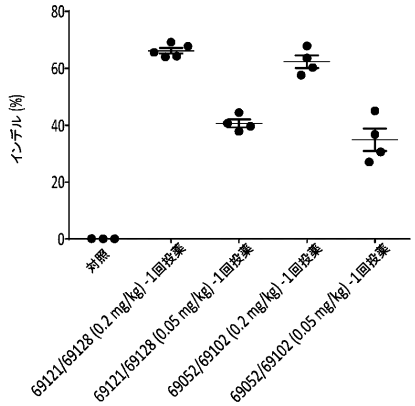


FIGURE 22A

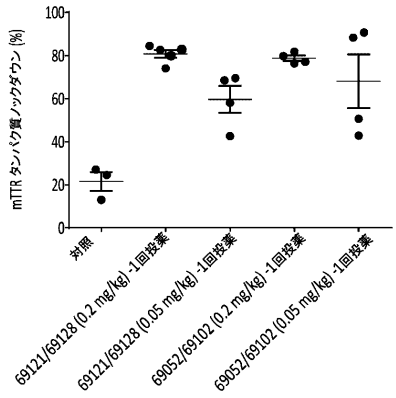


FIGURE 22B

【図２２Ｃ－２２Ｄ】

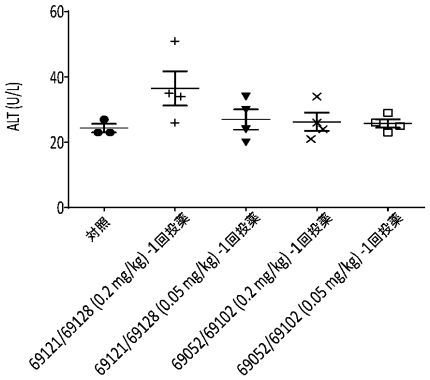


FIGURE 22C

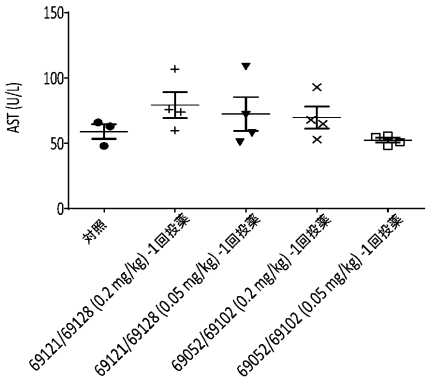


FIGURE 22D

【図２２Ｅ－２２Ｆ】

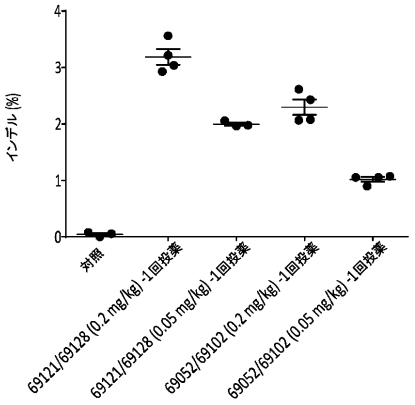


FIGURE 22E

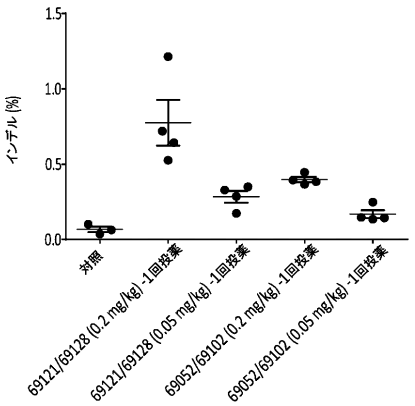


FIGURE 22F

【図２３】

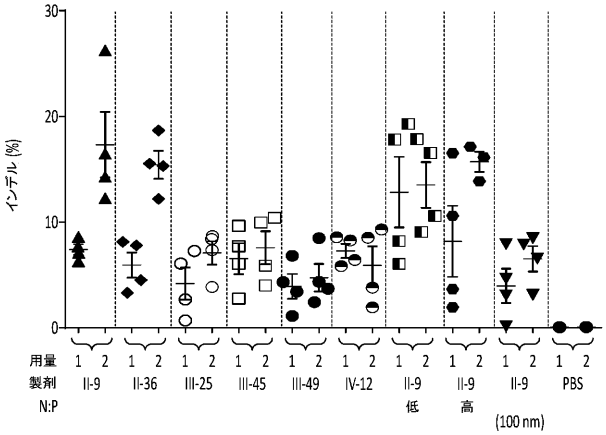


FIGURE 23

【配列表】
2020500539000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/065303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 9/127; A61K 9/51; A61K 31/7088; A61K 31/7105; A61K 35/28; A61K 38/48 (2018.01)
CPC - C07C 219/06; C07C 219/08; C07C 219/10; C07C 227/16; C07D 295/13 (2018.02)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/93.21; 435/320.1; 514/785 (keyword delimited)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/014794 A1 (SANGAMO BIOSCIENCES, INC.) 28 January 2016 (28.01.2016) entire document	1-3, 16-18
P, X	US 9,604,908 B2 (STANTON et al) 28 March 2017 (28.03.2017) entire document	1-3, 16-18
A	US 2015/0376115 A1 (ACUITAS THERAPEUTICS, INC) 31 December 2015 (31.12.2015) entire document	1-3, 16-18
A	US 8,754,062 B2 (DE FOUGEROLLES et al) 17 June 2014 (17.06.2014) entire document	1-3, 16-18
A	WILSON et al. "The Combination of Stabilized Plasmid Lipid Particles and Lipid Nanoparticle Encapsulated CpG Containing Oligodeoxynucleotides as a Systemic Genetic Vaccine," The Journal of Gene Medicine, 01 January 2009 (01.01.2009), Vol. 11, Iss. 1, Pgs. 14-25. entire document	1-3, 16-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 February 2018	12 MAR 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/065303

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/065303

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-15, 19-31
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/86	*(2006.01)*	C12N	15/86	Z
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10	
C12N 15/14	*(2006.01)*	C12N	15/14	
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61K	31/7088	
A61K 31/7105	*(2006.01)*	A61K	31/7105	
A61K 31/711	*(2006.01)*	A61K	31/711	
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00	
A61K 38/46	*(2006.01)*	A61K	38/46	
A61K 38/17	*(2006.01)*	A61K	38/17	
A61K 35/76	*(2015.01)*	A61K	35/76	
A61K 47/69	*(2017.01)*	A61K	47/69	
A61K 9/14	*(2006.01)*	A61K	9/14	
A61K 9/51	*(2006.01)*	A61K	9/51	
A61K 9/127	*(2006.01)*	A61K	9/127	

(31)優先権主張番号 62/503,470
(32)優先日 平成29年5月9日(2017.5.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/559,186
(32)優先日 平成29年9月15日(2017.9.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(71)出願人 516386834
アクイタス セラピューティクス インコーポレイテッド
カナダ国 ブイ６ティー １ダブリュー５ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, アグロノミー ロード ６１９０, スイート ４０２, ユニバーシティ オブ ブリティッシュ コロンビアーケーイーティーアール
(74)代理人 100078282
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
弁護士 山本 健策

(72)発明者 アンセル, スティーブン エム.
カナダ国 ブイ６エル ２エー１ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト３１エスティー アベニュー ２７１４, アクイタス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 バルボーサ, クリストファー
カナダ国 ブイ６エル ２エー１ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト３１エスティー アベニュー ２７１４, アクイタス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 コンウェイ, アンソニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４８０４, リッチモンド, カナル ブールバード ５０１, スイート エー１００, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ドゥ, シンヤオ
カナダ国 ブイ６エル ２エー１ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト３１エスティー アベニュー ２７１４, アクイタス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ホープ, マイケル ジェイ.
カナダ国 ブイ６エル ２エー１ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト３１エスティー アベニュー ２７１４, アクイタス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ホームズ, マイケル シー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４８０４, リッチモンド, カナル ブールバード ５０１, スイート エー１００, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 リー, ゲイリー ケー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４８０４, リッチモンド, カナル ブールバード ５０１, スイート エー１００, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 リン, パウロ ジア チン
カナダ国 ブイ６エル ２エー１ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト３１エスティー アベニュー ２７１４, アクイタス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 マッデン, トーマス
カナダ国 ブイ６エル ２エー１ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト３１エスティー アベニュー ２７１４, アクイタス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ムイ, バーバラ
カナダ国 ブイ６エル ２エー１ ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウエスト３１エスティー アベニュー ２７１４, アクイタス セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

Ｆターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02 BA05 CA44
4C076 AA95 DD49 DD60 EE23 EE24 EE59 FF68
4C084 AA01 AA02 AA13 BA03 BA44 DC22 MA05 NA05 NA13
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA05 NA05 NA13
4C087 AA01 AA02 BC83 NA05 NA13