

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年12月3日(03.12.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/241679 A1

- (51) 国際特許分類:
B82Y 5/00 (2011.01) *C12N 15/88* (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01) *C12N 11/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/020895
- (22) 国際出願日: 2020年5月27日(27.05.2020)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2019-101203 2019年5月30日(30.05.2019) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 悠介(SATO Yusuke); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 原島 秀吉(HARASHIMA Hideyoshi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 渡慶次 学(TOKESHI Manabu); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学
- 法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 真栄城 正寿(MAEKI Masatoshi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 西澤 和純, 外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: LIPID NANOPARTICLE

(54) 発明の名称: 脂質ナノ粒子

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a lipid nanoparticle in which a nucleic acid, etc. required in genome editing is encapsulated and which can be produced by an alcohol dilution method using flow channels and contributes to high genome editing efficiency. The present invention pertains to a lipid nanoparticle which comprises a lipid component, a DNA nuclease, a guide RNA and a single-stranded oligonucleotide, wherein: the lipid component comprises a pH-sensitive cationic lipid, a neutral phospholipid and a polyalkylene glycol-modified lipid; the ratio of the pH-sensitive cationic lipid relative to the total lipids constituting the lipid nanoparticle is 30-50 mol%; the ratio of the neutral phospholipid relative to the total lipids constituting the lipid nanoparticle is 20-50 mol%; and the ratio of the polyalkylene glycol-modified lipid relative to the total lipids constituting the lipid nanoparticle is 1-4 mol%.

(57) 要約: 本発明は、ゲノム編集に必要な核酸等を内包しており、流路を用いたアルコール希釈法により製造することが可能であり、かつゲノム編集効率に優れた脂質ナノ粒子を提供することを課題とする。本発明は、脂質成分とDNAヌクレアーゼとガイドRNAと一本鎖オリゴヌクレオチドと、を含有し、前記脂質成分がpH感受性カチオン性脂質と中性リン脂質とポリアルキレングリコール修飾脂質とを含有し、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記pH感受性カチオン性脂質の割合が30~50モル%であり、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記中性リン脂質の割合が20~50モル%であり、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合が1~4モル%である、脂質ナノ粒子である。

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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：脂質ナノ粒子

技術分野

[0001] 本発明は、CRISPRシステムによるゲノム編集に用いられるRNA-タンパク質複合体 (ribonucleoprotein; RNP) のキャリアとして有用な脂質ナノ粒子に関する。

本願は、2019年5月30日に、日本に出願された特願2019-101203号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] ゲノム編集技術は、目的とする任意のゲノムDNA領域に選択的に、変異の導入又は遺伝子を含む任意のDNA配列を挿入することが可能なバイオテクノロジーである。遺伝性疾患や感染症などの様々な難治性疾患に対する根本的な治療の実現につながることから、ゲノム編集技術は、医薬への応用が切望されている。中でも第3世代ゲノム編集技術であるCRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / Cas9 (CRISPR-associated proteins 9) システムは、優れた遺伝子ノックアウト効率や設計の簡便さから、現在最も着目を浴びている技術である。本システムは、DNA二本鎖切断 (double-strand break; DSB) 活性を有するCas9タンパク質と、細菌由来のcrRNA (CRISPR RNA) 及びtracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) からなるキメラRNAであるgRNA (guide RNA) とのRNPとして機能する。したがって、標的細胞内でRNPを発現させる、又はRNPそのものを標的細胞内に送達することによって、目的とする遺伝子ノックアウトを誘導することが可能である。さらに、ドナーDNAを同時に送達することにより、遺伝子ノックインを誘導することも可能となる。

[0003] ゲノム編集技術における標的細胞内への送達手段としては、DNA又はRNAを導入することにより細胞内でRNPを発現させる手法や、RNPその

ものを細胞に直接導入する手法がある。前者の場合、ウイルスベクターや非ウイルスベクターなどの送達技術がある程度確立されているため、比較的容易に行えるが、Cas9タンパク質の発現が比較的長時間に亘るため、意図しないDNA領域における変異の導入（オフターゲット作用）が生じやすい。一方で、後者の場合、RNPは標的DNA領域における変異導入後、速やかに分解・消失するため、オフターゲット作用が最小限に抑えられる。特にDSBを伴うゲノム編集では、編集された細胞が生存する限り永続的に影響が続く為、オフターゲット作用の抑制は極めて重要である。

[0004] RNPそのものを送達可能な技術の開発は、複数報告されている。例えば、DNA Nanoclewsを用いる方法（非特許文献1）、生体内還元性脂質ナノ粒子を用いる方法（非特許文献2）、金ナノ粒子とのコンジュゲートを用いる方法（非特許文献3）、lipidoidを用いる方法（非特許文献4）、lecithin nano-liposomal particleを用いる方法（非特許文献5）がある。また、遺伝子ノックインを誘導した例としてはCRISPR-Gold（非特許文献6）が報告されている。ただし、いずれも培養細胞における遺伝子ノックダウンの誘導に、高濃度のCas9を要しているなど、ゲノム編集効率に課題が残されている。

[0005] 一方で、核酸等を内包する脂質ナノ粒子の製造方法としては、流路を用いたアルコール希釈法を原理とするものがある。例えば、2液の瞬間混合を達成可能な三次元マイクロミキサー内蔵マイクロ流路を用いることで直径30nm程度の脂質ナノ粒子を再現良く製造可能であることが報告されている（非特許文献7）。また、原料溶液を流すマイクロサイズの流路に、流路幅に対して一定幅のバッフル（邪魔板）を両側面より互い違いに配置した単純な二次元的構造の流路構造体を用いることにより、従来の三次元ミキサーを用いる流路構造体よりも、粒径制御性が高いナノサイズの脂質粒子形成システムを形成できることも報告されている（特許文献1）。これらのナノ粒子製剤の製造方法は、近年では主に、脂溶性薬物や、siRNA（short interfering RNA）又はmRNA等の核酸を搭載した脂質ナノ粒子（LNP）の製造に採用されている。例えば、siRNAなどの核酸を効率的に標的細胞内へ

送達するためのキャリアとなる脂質ナノ粒子として、pH感受性カチオン性脂質を構成脂質として含む脂質ナノ粒子が報告されている（特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2018/190423号

特許文献2：国際公開第2018/230710号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Sun et al., *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, vol.54, p.12029-12033.

非特許文献2：Wang et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, vol.113, p.2868-2873.

非特許文献3：Mout et al., *American Chemical Society Nano*, 2017, vol.11, p.2452-2458.

非特許文献4：Li et al., *Biomaterials*, 2018, vol.178, p.652-662.

非特許文献5：Cho et al., *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, vol.17, p.19.

非特許文献6：Lee et al., *Nature Biomedical Engineering*, 2017, vol.1, p.889-901.

非特許文献7：Leung et al., *Journal of Physical Chemistry C Nanomaterial Interfaces*, 2012, vol.116(34), p.18440-18450.

非特許文献8：Stroock et al., *Science*, 2002, vol.295, p.647-651

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] RNP等のタンパク質はこれまで用いられてきた低分子薬物や核酸と比較してアルコールなどの有機溶媒、緩衝液のpH、塩濃度、温度などの粒子製造時の様々な物理的パラメータにより不可逆的な不活性化を受けやすい。このため、現在までにアルコール希釈法を原理とするRNP搭載脂質ナノ粒子

製剤の製造に関する報告はない。

[0009] 本発明は、ゲノム編集に必要な核酸等を内包しており、流路を用いたアルコール希釈法により製造することが可能であり、かつゲノム編集効率に優れた脂質ナノ粒子を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

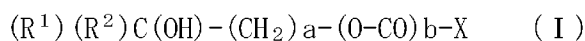
[0010] 本発明者らは、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集において、crRNAとtracrRNAとCas9タンパク質との複合体であるRNPを、さらにcrRNAと相補な塩基配列領域を含む一本鎖オリゴヌクレオチド(ssON)と複合体化して負に帯電させることにより、pH感受性カチオン性脂質を含む特定の組成の脂質膜構造からなる脂質ナノ粒子に効率的に搭載できることを見出し、本発明を完成させた。

[0011] すなわち、本発明は、以下の脂質ナノ粒子を提供するものである。

[1] 脂質成分と、DNAヌクレアーゼと、ガイドRNAと、一本鎖オリゴヌクレオチドと、を含有し、

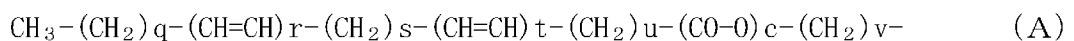
前記脂質成分が、下記一般式(1)

[0012] [化1]



[0013] [式(1)中、aは3～5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立に下記一般式(A)：

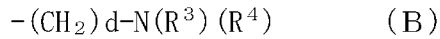
[0014] [化2]



[0015] (式(A)中、qは1～9の整数を示し；rは0又は1を示し；sは1～3の整数を示し；tは0又は1を示し；uは1～8の整数を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示し；q+2r+s+2t+u+c+vが19以上の整数であるが、bとcが同時に0となる場合には、qが3～5の整数であり、r及びtが1であり、sが1であり、かつu+vが6～10の整数である場合を除く)

で表される基を示し；Xは、下記一般式（B）：

[0016] [化3]



[0017] （式（B）中、dは0～3の整数を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基（該C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい）を示すが、R³及びR⁴は互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環（該環の1個又は2個の水素原子が、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい）を形成してもよい）

で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基（ただし、該基は炭素原子により(0-C0)b-に結合し、該環の1個又は2個の水素原子が、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい）を示す]

で表されるpH感受性カチオン性脂質と、中性リン脂質と、ポリアルキレングリコール修飾脂質と、を含有し、

脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記pH感受性カチオン性脂質の割合が30～50モル%であり、

脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記中性リン脂質の割合が20～50モル%であり、

脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合が1～4モル%である、脂質ナノ粒子。

[2] 前記中性リン脂質が、炭素数12～24の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を有する中性グリセロリン脂質である、前記[1]の脂質ナノ粒子。

[3] 前記中性リン脂質が、炭素数12～24の不飽和の脂肪酸残基を有するホスファチジルエタノールアミンである、前記[1]の脂質ナノ粒子。

[4] 前記pH感受性カチオン性脂質が、ポリエチレングリコール修飾脂質である、前記[1]～[3]のいずれかの脂質ナノ粒子。

[5] 前記DNAヌクレアーゼが、Cas9タンパク質であり、

前記ガイドRNAが、crRNAとtracrRNAとからなる、前記[

1] ~ [4] のいずれかの脂質ナノ粒子。

[6] 前記 Cas9 タンパク質が、RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性のいずれか一方のみを有するタンパク質である、前記 [5] の脂質ナノ粒子。

[7] 前記 DNAヌクレアーゼが、Cpf1 タンパク質である、前記 [1] ~ [4] のいずれかの脂質ナノ粒子。

[8] 前記 [1] ~ [7] のいずれかの脂質ナノ粒子を細胞内へ導入する、ゲノム編集方法。

[9] 前記 [1] ~ [7] のいずれかの脂質ナノ粒子を、流路構造体を用いて製造する方法であって、

前記流路構造体が、互いに独立した、第1の流動体を導入する第1導入路と、第2の流動体を導入する第2導入路とが、それぞれ一定長を有して合流して1つの希釈流路を形成しており、

前記希釈流路は、少なくともその一部において二次元的に屈曲した流路部位を有し、

当該屈曲した流路部位は、これより上流の希釈流路の軸線方向ないしその延長方向をX方向と、このX方向と垂直に交差する希釈流路の幅方向をY方向とし、これより上流の希釈流路の流路幅を y_0 とした場合に、Y方向において対向する希釈流路の両側壁面より交互に、流路中心側に向かって、略Y方向（略+Y方向、略-Y方向）に、 $1/2 y_0$ 以上 $1 y_0$ 未満の一定高さ h_1 、 $h_2 \dots$ を有し、かつX方向に一定幅 x_1 、 $x_2 \dots$ を有して突出し、希釈流路の流路幅を規制する構造子が、一定間隔 d_1 、 $d_2 \dots$ をもって少なくとも2つ以上設けられていることで形成されており、

前記第1導入路より前記脂質成分をエタノールに溶解させた脂質溶液を、前記第2導入路より前記DNAヌクレアーゼと前記ガイドRNAと前記一本鎖オリゴヌクレオチドとを含有するpHが5.0以上の水溶液を、総流量が $1 \mu\text{L}/\text{分} \sim 100 \text{mL}/\text{分}$ であり、かつ前記脂質溶液の流速に対する前記水溶液の流速の比が7以上である、脂質ナノ粒子の製造方法。

[10] 前記流路構造体が、さらに、第3の流動体を導入する第3導入路を有しており、

前記第1導入路から導入された第1の流動体が、前記第2導入路から導入された第2の流動体と合流する前に、前記第3導入路から導入された第3の流動体と接触するように、前記第1導入路と前記第2導入路と前記第3導入路とが、それぞれ一定長を有して合流して1つの希釈流路を形成している、前記[9]の脂質ナノ粒子の製造方法。

発明の効果

[0018] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、RNPがpH感受性カチオン性脂質を含む特定の組成の脂質膜構造からなる脂質ナノ粒子に搭載されているため、標的細胞のゲノム編集を効率よく行うことができる。また、本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質膜構造に搭載されるRNPがssONを含んでおり、負に帯電していることから、アルコール希釈法によって製造することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1A]本発明に係る脂質ナノ粒子の製造に用いられる流路構造体の一実施形態における構造を模式的に示す図面である。

[図1B]本発明に係る脂質ナノ粒子の製造に用いられる流路構造体の一実施形態における構造を模式的に示す図面である。

[図2]参考例1及び実施例1において使用された流路構造体の構造の模式図である。

[図3]参考例2において使用された流路構造体の構造の模式図である。

[図4]実施例1において、各RNP搭載脂質ナノ粒子のHeLa-GFP細胞に対するGFPノックアウト効率(%)の測定結果を示した図である。

[図5]実施例1において、各RNP搭載脂質ナノ粒子のHeLa-GFP細胞に対する、ノックアウト効率(%)に対するノックイン効率(%)の比([KI(%)]/[KO(%)])の測定結果を示した図である。

[図6]実施例2において、一次スクリーニングにおける各RNP搭載脂質ナノ粒子のHeLa-GFP細胞に対するGFPノックアウト効率(%)の測定

結果を示した図である。

[図7]実施例2において、一次スクリーニングにおける個数平均粒子径に有意に影響を与える因子を変化させた際の個数平均粒子径の予測プロファイルを示した図である。

[図8]実施例2において、一次スクリーニングにおける封入率に有意に影響を与える因子を変化させた際の封入率の予測プロファイルを示した図である。

[図9]実施例2において、一次スクリーニングにおける遺伝子ノックアウト活性に有意に影響を与える因子を変化させた際の遺伝子ノックアウト活性の予測プロファイルを示した図である。

[図10]実施例2において、二次スクリーニングにおける個数平均粒子径に有意に影響を与える因子を変化させた際の個数平均粒子径の予測プロファイルを示した図である。

[図11]実施例2において、二次スクリーニングにおける封入率に有意に影響を与える因子を変化させた際の封入率の予測プロファイルを示した図である。

[図12]実施例2において、二次スクリーニングにおける遺伝子ノックアウト活性に有意に影響を与える因子を変化させた際の遺伝子ノックアウト活性の予測プロファイルを示した図である。

[図13]実施例3において、RNP搭載脂質ナノ粒子B-4又はB-9を添加した細胞の細胞生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図14]実施例3において、RNP搭載脂質ナノ粒子B-9を添加した細胞を4℃で保存し、ゼータ電位とPdIを経時的に測定した結果を示した図である。

[図15]実施例3において、4℃の保存前後のRNP搭載脂質ナノ粒子B-9のHeLa-GFP細胞に対するGFPノックアウト効率(%)の測定結果を示した図である。

[図16A]実施例4において、RNP搭載脂質ナノ粒子B-4又はB-9を、培地にCas9タンパク質濃度が0.1nMとなるように添加して培養したH

e L a - G F P細胞におけるG F Pノックアウト効率（％）の測定結果を示した図である。

[図16B]実施例4において、R N P搭載脂質ナノ粒子B - 4又はB - 9を、培地にC a s 9タンパク質濃度が0. 3 n Mとなるように添加して培養したH e L a - G F P細胞におけるG F Pノックアウト効率（％）の測定結果を示した図である。

[図17]実施例5において、R N P搭載脂質ナノ粒子を、培地にC p f 1タンパク質濃度が0. 5、1、又は2 n Mとなるように添加して培養したH e L a - G F P細胞におけるG F Pノックアウト効率（％）の測定結果を示した図である。

[図18]実施例6において、C a s 9 nタンパク質を含むR N P搭載脂質ナノ粒子又はC a s 9タンパク質を含むR N P搭載脂質ナノ粒子を培地にC a s 9 nタンパク質等の濃度が0. 1、0. 3、1、又は2 n Mとなるように添加して培養したH e L a - G F P細胞におけるG F Pノックアウト効率（％）の測定結果を示した図である。

[図19A]実施例7において、R N P搭載脂質ナノ粒子B - 4又はB - 9を、培地にC a s 9タンパク質濃度が0. 5、1、3、又は5 n Mとなるように添加して培養したH E K - G F P細胞におけるG F Pノックアウト効率（％）の測定結果を示した図である。

[図19B]実施例7において、R N P搭載脂質ナノ粒子B - 4又はB - 9を、培地にC a s 9タンパク質濃度が0. 5、1、3、又は5 n Mとなるように添加して培養したH E K - G F P細胞におけるB F P陽性細胞割合（％）の測定結果を示した図である。

[図20]実施例7において、R N P搭載脂質ナノ粒子B - 4又はB - 9を添加した細胞の細胞生存率（％）を測定した結果を示した図である。

[図21]実施例8において、R N P搭載脂質ナノ粒子を導入する前のG F P恒常発現B M D Mのフローサイトメトリーの結果（A）と、R N P搭載脂質ナノ粒子を導入した後のG F P恒常発現B M D Mのフローサイトメトリーの結

果（B）を示した図である。

[図22]実施例9において、各RNP搭載脂質ナノ粒子B-9を、培地にCas9タンパク質濃度が0.1、0.3、又は1nMとなるように添加して培養したHeLa-GFP細胞におけるGFPノックアウト効率（%）の測定結果を示した図である。

[図23A]実施例10において、Cas9タンパク質を含有するRNP搭載脂質ナノ粒子を添加して培養したHeLa-GFP細胞におけるGFPノックアウト効率（%）の測定結果を示した図である。

[図23B]実施例10において、Cpf1タンパク質を含有するRNP搭載脂質ナノ粒子を添加して培養したHeLa-GFP細胞におけるGFPノックアウト効率（%）の測定結果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、CRISPRシステムにおいて、標的細胞にRNPを導入するキャリアとして使用されるものであり、ゲノム編集に用いられるDNAヌクレアーゼとガイドRNA（gRNA）とssONとの複合体であるRNPが、pH感受性カチオン性脂質を含む特定の組成の脂質膜構造に搭載されている脂質ナノ粒子である。当該脂質ナノ粒子に搭載されるRNPとしては、Cas9タンパク質とcrRNAとtracrRNAとssONとの複合体が挙げられる。RNP自体を直接脂質ナノ粒子に搭載して標的細胞に導入するため、Cas9タンパク質等のDNAヌクレアーゼをコードする遺伝子を標的細胞内に導入して発現させる方法よりも、オフターゲット作用が小さい。

[0021] [DNAヌクレアーゼ]

本発明及び本願明細書において、脂質ナノ粒子に搭載されるDNAヌクレアーゼは、gRNA依存的にDNAに結合し、gRNAの一部と対合して形成された二本鎖DNAを認識して切断する酵素である。当該DNAヌクレアーゼとしては、Cas9、Cpf1等が挙げられる。

[0022] <Cas9タンパク質>

本発明及び本願明細書において、Cas9タンパク質は、gRNA依存的にDNAに結合し、RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性の少なくとも一方を有するタンパク質である。RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性の両方を備えるCas9タンパク質は、ゲノムDNAの二本鎖を切断する。RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性のいずれか一方のみを備えるCas9タンパク質は、ゲノムDNAの二本鎖のうちのいずれか一方の鎖のみを切断する。

[0023] 本発明において用いられるCas9タンパク質は、CRISPR系を有する細菌に由来する野生型のCas9タンパク質であってもよく、野生型タンパク質を改変した変異型タンパク質であってもよい。CRISPR系を有する細菌としては、例えば、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス (*Geobacillus stearothermophilus*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、トレポネマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) 等が挙げられる。また、野生型のCas9タンパク質を改変した変異型タンパク質としては、RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性のいずれかを失活させるような変異が導入された変異体が挙げられる。当該変異体としては、例えば、野生型Cas9タンパク質の10番目のアスパラギン酸がアラニンに置換された変異体 (Cas9 (D10A)) が挙げられる。Cas9 (D10A) は、DNAニッカーゼとして機能するため、Cas9ニッカーゼ (Cas9n) とも呼ばれる。その他、野生型のCas9タンパク質のヌクレアーゼ活性に影響を与えない変異が導入された変異型タンパク質であってもよい。

[0024] 本発明において用いられるCas9タンパク質は、野生型のCas9タンパク質又はその変異型タンパク質に、各種ペプチドを付加したものであってもよく、他のタンパク質と融合させたキメラタンパク質であってもよい。当該ペプチドとしては、例えば、Hisタグ、Mycタグ、Flagタグ等の

タグペプチド、核移行シグナルペプチド等のシグナルペプチド等が挙げられる。野生型又は変異型のCas9タンパク質と融合させる他のタンパク質としては、例えば、GST、蛍光タンパク質等が挙げられる。

[0025] <Cpf1タンパク質>

本発明及び本願明細書において、Cpf1タンパク質は、gRNA依存的にDNAに結合し、RuvCヌクレアーゼ活性のみを有するタンパク質である。RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性の両方を備えるCas9タンパク質が、ゲノムDNAの二本鎖を切断して平滑末端を形成するのに対して、Cpf1タンパク質は、5'突出末端を形成する。

[0026] 本発明において用いられるCpf1タンパク質は、CRISPR/Cpf1システムを有する細菌に由来する野生型のCpf1タンパク質であってもよく、野生型タンパク質を改変した変異型タンパク質であってもよい。CRISPR/Cpf1システムを有する細菌としては、例えば、アシダミノコッカス属菌 (*Acidaminococcus* sp.)、ラクノスピラ・バクテリウム (*Lachnospiraceae* bacterium) 等が挙げられる。また、野生型のCpf1タンパク質を改変した変異型タンパク質としては、ヌクレアーゼ活性を増大させるような変異が導入された変異体や、ヌクレアーゼ活性に影響を与えない変異が導入された変異型タンパク質が挙げられる。

[0027] 本発明において用いられるCpf1タンパク質は、野生型のCpf1タンパク質又はその変異型タンパク質に、各種ペプチドを付加したものであってもよく、他のタンパク質と融合させたキメラタンパク質であってもよい。当該ペプチドや他のタンパク質としては、Cas9タンパク質で挙げられたものと同様のものを用いることができる。

[0028] [gRNA]

本発明及び本願明細書において、gRNAは、DNAヌクレアーゼによって切断させるゲノムDNA上の標的配列（ゲノム編集する対象の塩基配列）に対合可能な塩基配列を有するRNAである。「標的配列に対合可能な塩基配列」とは、標的配列以外の領域の認識を抑制するため、通常は、標的配列と

相同的（同一）又は相補的な塩基配列である。gRNAは、1本のRNAからなるものであってもよく、2本以上のRNAが複合体を形成しているものであってもよい。

[0029] <crRNA及びtracrRNA>

脂質ナノ粒子に搭載されるDNAヌクレアーゼがCas9タンパク質の場合、gRNAとしては、crRNA及びtracrRNAを用いることができる。crRNAは、CRISPR系を有する細菌に由来し、tracrRNAの一部と相補的な塩基配列からなる領域（tracrRNAとの結合領域）と、ゲノムDNA上の標的配列と相同的又は相補的な塩基配列からなる領域（ゲノムDNA結合領域）とを含む1本鎖RNAである。tracrRNAは、同じくCRISPR系を有する細菌に由来し、crRNAの一部と相補的な塩基配列からなる領域（crRNAとの結合領域）を有しており、当該領域においてcrRNAとハイブリダイズしてヘアピン構造を形成する1本鎖RNAである。当該ヘアピン構造をCas9タンパク質が認識し、RNPが形成される。crRNAとtracrRNAは、それぞれ独立した1本鎖RNAであってもよく、両者が適当なRNAリンカーを介して連結された1本鎖RNAであってもよい。なお、CRISPR系を有する細菌としては、前記の通りのものが挙げられる。Cas9タンパク質、crRNA及びtracrRNAは、いずれも同種の細菌由来であってもよく、互いに異種の細菌由来であってもよい。また、crRNA及びtracrRNAは、CRISPR/Cas9システムの機能を損なわない限り、天然のRNAのみからなるものであってもよく、その一部又は全部に修飾RNAや人工核酸が含まれていてもよい。

[0030] <Cpf1タンパク質と用いられるgRNA>

脂質ナノ粒子に搭載されるDNAヌクレアーゼがCpf1タンパク質の場合、gRNAとしては、crRNAと同様に標的配列を含むRNAであればよく、tracrRNAは不要である。このため、gRNAを、Cas9タンパク質を用いる場合よりもより短いものとすることができる。また、gR

NAは、CRISPR/Cpf1システムの機能を損なわない限り、天然のRNAのみからなるものであってもよく、その一部又は全部に修飾RNAや人工核酸が含まれていてもよい。

[0031] <標的配列>

標的配列は、通常、PAM配列がその直後にくる領域の塩基配列を選択する。PAM配列は、Cas9タンパク質等のDNAヌクレアーゼに認識される配列であり、用いられるCas9タンパク質等のDNAヌクレアーゼに依存して決定される。例えば、Cas9タンパク質が認識するPAM配列としては、5'-NGG (N:A、G、C、T) が挙げられ、Cpf1タンパク質が認識するPAM配列としては、5'-TTTV (V:A、G、C)、5'-TTTN (N:A、G、C、T) が挙げられる。crRNA等のgRNA中の標的配列の塩基長は、特に限定されるものではなく、例えば、15~30塩基長程度にすることができ、18~22塩基長が好ましい。

[0032] [ssON]

本発明において用いられるssONは、gRNAの一部と対合可能な領域を含む。これにより、脂質ナノ粒子に搭載されるDNAヌクレアーゼと複合体を形成している状態のgRNAと対合可能な領域を含む。これにより、DNAヌクレアーゼとgRNAとssONの複合体であるRNPが形成される。ssONは、DNAのみからなるオリゴヌクレオチドであってもよく、RNAのみからなるオリゴヌクレオチドであってもよく、DNAとRNAの両方を含むキメラオリゴヌクレオチドであってもよい。また、ssONは、使用されるCRISPRシステムの機能を損なわない限り、天然のRNAやDNAのみからなるものであってもよく、その一部又は全部に修飾核酸や人工核酸が含まれていてもよい。

[0033] 脂質ナノ粒子に搭載されるDNAヌクレアーゼがCas9タンパク質の場合、crRNAのうち、tracrRNAとの結合領域以外の部分領域と、相補的な塩基配列からなる領域を含む。このcrRNAと相補的な領域 (crRNAとの結合領域) を介して、ssONとcrRNAはハイブリダイズ

する。つまり、本発明に係る脂質ナノ粒子に搭載されるRNPは、*crRNA*と*tracrRNA*、*crRNA*と*ssON*が互いにハイブリダイズし、形成された3者複合体とCas9タンパク質が複合体化したものである。*crRNA*中の*ssON*とハイブリダイズする領域（*ssON*との結合領域）は、*crRNA*が、*tracrRNA*と*ssON*と同時にハイブリダイズして3者複合体を形成でき、かつこの3者複合体がCas9タンパク質が認識するヘアピン構造を形成できるのであれば、特に限定されるものではない。例えば、*crRNA*中の*ssON*との結合領域は、ゲノムDNA結合領域の一部又は全部を含んでいてもよく、ゲノムDNA結合領域と同一であってもよい。また、RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性の一方を不活化したCas9ニッカーゼ（Cas9n）を使用するダブルニッキング法の場合、ガイドRNAは2種類用いられる。そこで、脂質ナノ粒子に搭載されるDNAヌクレアーゼがCas9nであり、ダブルニッキング法のためのRNPを搭載した脂質ナノ粒子の場合、*ssON*は、それぞれのガイドRNAにハイブリダイズする2種類を使用する。

[0034] CRISPRシステムにより、切断されたゲノムDNAに目的の遺伝子断片をノックインする場合、*ssON*は、このノックインされるドナーDNAとして利用することもできる。例えば、*crRNA*等の*gRNA*との結合領域以外に、ノックインされる遺伝子断片の両末端に相同組換えのための40～60bpの相同配列領域（homology arms）が付加された領域を備えた*ssON*は、ドナーDNAとして機能する。

[0035] Cas9タンパク質やCpf1タンパク質は、核酸とは異なり正電荷を帯びているため、脂質膜を構成する脂質成分にpH感受性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子への搭載効率が低い。これに対して、本発明に係る脂質ナノ粒子では、Cas9タンパク質等のDNAヌクレアーゼと複合体化する核酸が、*crRNA*と*tracrRNA*等の*gRNA*だけではなく、*ssON*も含まれる。このように、RNPに含まれている核酸量が多いため、RNPの正電荷が抑えられて負電荷が強くなり、pH感受性カチオン性脂質を含む脂

質ナノ粒子へ効率よく搭載することができる。本発明において用いられる *ssON* の塩基長は、*RNP* を負に帯電させるために十分な長さであればよく、*gRNA*、例えば *crRNA* と *tracrRNA* の塩基長や、*Cas9* タンパク質等の種類等を考慮して適宜決定することができる。*ssON* の長さは、例えば、50～500塩基長程度とすることができる。

[0036] ゲノムDNA上の標的配列の決定、*crRNA* 及び *tracrRNA* 等の *gRNA* の塩基配列の設計、*ssON* の塩基配列の設計等は、ゲノムDNAの塩基配列情報に基づき、一般的に使用される分子生物学的ツールを利用して常法により行うことができる。例えば、*gRNA* の設計は、CRISPR Design Tool (Horizon Discovery)、TrueDesign Genome Editor (Invitrogen) 等の設計ツールを用いて行うことができる。

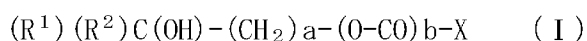
[0037] [脂質成分]

本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質膜構造体に *RNP* が搭載された脂質ナノ粒子である。脂質膜構造体を構成する脂質成分には、少なくとも、*pH* 感受性カチオン性脂質と、中性リン脂質と、ポリアルキレングリコール修飾脂質と、が含有されている。

[0038] <*pH* 感受性カチオン性脂質>

本発明に係る脂質ナノ粒子に含有されている *pH* 感受性カチオン性脂質は、下記一般式 (1) で表されるカチオン性脂質 (以下、「本発明の *pH* 感受性カチオン性脂質」ということがある。) である。

[0039] [化4]



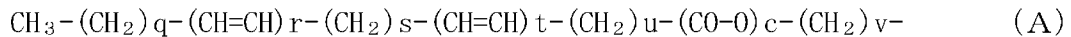
[0040] 一般式 (1) において、*a* は 3～5 の整数を示すが、好ましくは 4 である。

b は 0 又は 1 を示す。*b* が 0 の場合には -O-CO-基が存在せず、単結合であることを意味する。

[0041] 一般式 (1) において、*R*¹ 及び *R*² はそれぞれ独立に下記一般式 (A) で表される基を示す。一般式 (A) において、*q* は 1～9 の整数を示し；*r* は

0又は1を示し；sは1～3の整数を示し；tは0又は1を示し；uは1～8の整数を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示す。ただし、bとcが同時に0となる場合には、qが3～5の整数であり、r及びtが1であり、sが1であり、かつu+vが6～10の整数である場合を除く。

[0042] [化5]



[0043] 本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、本発明に係る脂質ナノ粒子の安定性の点から、R¹及びR²の炭化水素鎖が比較的長鎖であることが好ましい。具体的には、本発明のpH感受性カチオン性脂質では、R¹及びR²は、炭素数20以上の基であること、すなわち、一般式(A)において、q+2r+s+2t+u+c+vは19以上の整数であることが好ましい。なかでも、本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、q+2r+s+2t+u+c+vが19～33の整数であることが好ましく、19～31の整数であることがより好ましく、21～31の整数であることがさらに好ましく、21～27の整数であることがよりさらに好ましい。

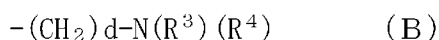
[0044] 本発明のpH感受性カチオン性脂質のR¹及びR²としては、一般式(A)において、rが1であり、tが0であり、qが5～11の整数、好ましくは6～10の整数であり、s+uが5～11の整数、好ましくは6～10の整数であり、cが1であり、vが4～12の整数であり、q+s+u+vが16以上の整数である基；rが0であり、tが1であり、q+sが5～11の整数、好ましくは6～10の整数であり、uが5～8の整数であり、cが1であり、vが4～12の整数であり、q+s+u+vが16以上の整数である基；r及びtが0であり、q+s+uが13～23の整数、好ましくは15～21であり、cが1であり、vが4～12の整数であり、q+s+u+vが18以上の整数である基；r及びtが0であり、q+s+uが13～23の整数、好ましくは15～21であり、cが1であり、vが6～10の整数であり、q+s+u+vが18以上の整数である基；が好ましい。

[0045] 本発明のpH感受性カチオン性脂質では、R¹及びR²は、一般式(A)で

表される基であればよく、互いに異なる基であってもよいが、同じ基であるほうが好ましい。

[0046] 一般式 (1) において、Xは、下記一般式 (B) で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基を示す。Xが示す5～7員非芳香族ヘテロ環基は、炭素原子により(O-CO)b-に結合する。

[0047] [化6]



[0048] 一般式 (B) 中、dは0～3の整数を示す。dが0の場合には-(CH₂)-基が存在せず、単結合であることを意味する。

[0049] 一般式 (B) 中、R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基（炭素数1～4のアルキル基）又はC₂₋₄アルケニル基（炭素数1～4のアルケニル基）を示す。R³及びR⁴が示すC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基で置換されていてもよい。

[0050] C₁₋₄アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基が挙げられる。C₂₋₄アルケニル基としては、ビニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-メチルビニル基、2-メチル-1-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基が挙げられる。

[0051] 一般式 (B) 中、R³及びR⁴は、互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環を形成していてもよい。R³及びR⁴が互いに結合して形成される5～7員非芳香族ヘテロ環としては、例えば、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、及び1-ピペラジニル基が挙げられる。R³及びR⁴が互いに結合して形成される5～7員非芳香族ヘテロ環は、環中の1個又は2個の水素原子がC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい。該環中の2個の水素原子がC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されている場合、互いに同じ基により置換されていてもよく、互いに異なる基により置換されていてもよい。

[0052] 一般式 (1) において、Xが5～7員非芳香族ヘテロ環基である場合、該

ヘテロ環基に含まれるヘテロ原子としては、窒素原子、酸素原子、又は硫黄原子などを挙げることができる。該ヘテロ環基中のヘテロ環を構成するヘテロ原子は、1個でもよく、同一又は異なるヘテロ原子が2個以上でもよい。該ヘテロ環基中のヘテロ環は、飽和のヘテロ環であってもよく、1個又は2個以上の二重結合が含まれていてもよいが、ヘテロ環が芳香環となることはない。

[0053] 本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、一般式(1)において、aが3~5の整数であり、bが1であり、Xが5~7員非芳香族ヘテロ環基(ただし、ヘテロ環基中の炭素原子により(0-CO)b-に結合する。)、好ましくは1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基(環中の炭素原子により(0-CO)b-に結合しており、1個の水素原子がC₁₋₄アルキル基若しくはC₂₋₄アルケニル基で置換されていてもよい。)であり、R¹及びR²がそれぞれ独立に、一般式(A)のうち、rが1であり、tが0であり、qが5~11の整数、好ましくは6~10の整数であり、s+uが5~11の整数、好ましくは6~10の整数であり、cが1であり、vが4~12の整数であり、q+s+u+vが16以上の整数である基、である脂質；一般式(1)において、aが3~5の整数であり、bが1であり、Xが5~7員非芳香族ヘテロ環基(ただし、ヘテロ環基中の炭素原子により(0-CO)b-に結合する。)、好ましくは1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基(環中の炭素原子により(0-CO)b-に結合しており、1個の水素原子がC₁₋₄アルキル基若しくはC₂₋₄アルケニル基で置換されていてもよい。)であり、R¹及びR²がそれぞれ独立に、一般式(A)のうち、rが0であり、tが1であり、q+sが5~11の整数、好ましくは6~10の整数であり、uが5~8の整数であり、cが1であり、vが4~12の整数であり、q+s+u+vが16以上の整数である基、である脂質；一般式(1)において、aが3~5の整数であり、bが0であり、Xが一般式(B)において、dが0であり、R³及びR⁴がそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基(R³及び

R^4 が示す C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基で置換されていてもよい)であり、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立に、一般式(A)のうち、 r が1であり、 t が0であり、 q が5~11の整数、好ましくは6~10の整数であり、 $s+u$ が5~11の整数、好ましくは6~10の整数であり、 c が1であり、 v が4~12の整数であり、 $q+s+u+v$ が16以上の整数である基、である脂質；一般式(1)において、 a が3~5の整数であり、 b が0であり、 X が一般式(B)において、 d が0であり、 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基(R^3 及び R^4 が示す C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基で置換されていてもよい)であり、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立に、一般式(A)のうち、 r が0であり、 t が1であり、 $q+s$ が5~11の整数、好ましくは6~10の整数であり、 u が5~8の整数であり、 c が1であり、 v が4~12の整数であり、 $q+s+u+v$ が16以上の整数である基、である脂質；が好ましい。これらの脂質のうち、 R^1 及び R^2 が同一の基である脂質が、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質としてより好ましく、 R^1 及び R^2 が同一の基であり、かつ a が4である脂質が特に好ましい。

[0054] 一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質の pK_a は特に限定されないが、例えば4.0~9.0程度、好ましくは4.5~8.5程度、より好ましくは6~8程度で選択することができ、この範囲の pK_a を与えるように各置換基の種類を選択することが好ましい。

[0055] 一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質は、例えば、本明細書の実施例に具体的に示した方法により容易に製造することができる。この製造方法を参照し、原料化合物、試薬、及び反応条件などを適宜選択することにより、当業者は一般式(1)の範囲に包含される任意の脂質を容易に製造することができる。

[0056] <中性リン脂質>

本発明に係る脂質ナノ粒子の脂質成分に含まれる中性リン脂質(以下、「

本発明の中性リン脂質」ということがある。)は、基全体として電荷が中性であり、リン酸基と正に帯電している基とが適当な連結基で連結された脂質である。正に帯電している基としては、例えば、アンモニウム基や4級アンモニウム基等が挙げられる。

[0057] 本発明の中性リン脂質としては、グリセロリン脂質又はスフィンゴリン脂質が好ましい。中性のグリセロリン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、カルジオリピン、プラスマロゲン等が挙げられる。中性のスフィンゴリン脂質としては、スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルエタノールアミン等が挙げられる。これらの中性グリセロリン脂質又は中性スフィンゴリン脂質における脂肪酸残基は特に限定されないが、例えば、炭素数12~24の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、炭素数14~20の飽和又は不飽和の脂肪酸残基が好ましい。具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸などの脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。これらのグリセロ脂質又はスフィンゴ脂質が2以上の脂肪酸残基を有する場合、全ての脂肪酸残基が同一の基であってもよく、互いに異なる基であってもよい。

[0058] 本発明の中性リン脂質としては、ゲノム編集効率をより向上させられる点から、炭素数12~24の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を有する中性グリセロリン脂質が好ましく、炭素数12~24の不飽和の脂肪酸残基を有する中性グリセロリン脂質又は中性スフィンゴリン脂質がより好ましく、炭素数12~24の不飽和の脂肪酸残基を有する中性グリセロリン脂質がさらに好ましい。中でも、炭素数12~24の不飽和の脂肪酸残基を有する炭素数12~24の不飽和の脂肪酸残基を有するホスファチジルエタノールアミンが好ましく、炭素数14~20の脂肪酸残基を有するホスファチジルエタノールアミンがより好ましく、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が特に好ましい。

[0059] <ポリアルキレングリコール修飾脂質>

本発明に係る脂質ナノ粒子の脂質成分に含まれるポリアルキレングリコール修飾脂質（以下、「本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質」ということがある。）は、ポリアルキレングリコールで修飾された脂質であれば特に限定されるものではないが、pH感受性カチオン性脂質及び中性リン脂質は除かれる。ポリアルキレングリコールは親水性ポリマーであり、ポリアルキレングリコール修飾脂質を脂質膜構成脂質として用いて脂質ナノ粒子を構築することにより、脂質ナノ粒子の表面をポリアルキレングリコールで修飾することができる。ポリアルキレングリコールで表面修飾することにより、脂質ナノ粒子の血中滞留性などの安定性を高めることができる場合がある。

[0060] ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコール、ポリヘキサメチレングリコールなどを用いることができる。ポリアルキレングリコールの重量平均分子量は、例えば300～10,000程度、好ましくは500～10,000程度、さらに好ましくは1,000～5,000程度である。

[0061] 例えば、脂質のポリエチレングリコールによる修飾には、ステアリル化ポリエチレングリコール（例えばステアリン酸PEG45(STR-PEG45)など）を用いることができる。その他、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000]-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、n-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000]-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-750]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミンなどのポリエチレングリコール誘導体などを用いることもできるが、ポリアルキレングリコール化脂質はこれらに限定されることはない。

[0062] <その他の脂質>

本発明に係る脂質ナノ粒子の構成脂質のうち、本発明のpH感受性カチオン性脂質と本発明の中性リン脂質と本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質以外の脂質としては、一般的にリポソームを形成する際に使用される脂質を用いることができる。このような脂質としては、例えば、正又は負に帯電したリン脂質、ステロール、又は飽和若しくは不飽和の脂肪酸等が挙げられる。これらは1種又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0063] 正又は負に帯電したリン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、セラミドホスホリルグリセロールホスファート、ホスファチジン酸などを挙げることができる。ステロールとしては、例えば、コレステロール、コレステロールコハク酸、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロール等の動物由来のステロール；スチグマステロール、シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロール等の植物由来のステロール（フィトステロール）；チモステロール、エルゴステロール等の微生物由来のステロールなどが挙げられる。

[0064] <脂質組成>

本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のpH感受性カチオン性脂質、中性脂質及び本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質は、それぞれ、1種類のみであってもよく、2種類以上であってもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のpH感受性カチオン性脂質が2種類以上である場合、本発明のpH感受性カチオン性脂質の量は、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子のうち、本発明のpH感受性カチオン性脂質に相当する脂質分子の合計量を意味する。同様に、本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明の中性脂質が2種類以上である場合、本発明の中性脂質の量は、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子のうち、本発明の中性脂質に相当する脂質分子の合計量を意味する。本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質が2種類以上である場合、本発明のポリアルキレング

リコール修飾脂質の量は、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子のうち、本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質に相当する脂質分子の合計量を意味する。

[0065] 脂質ナノ粒子を構成する脂質分子（脂質成分）の全量に占める本発明のpH感受性カチオン性脂質の割合が多いほど、脂質ナノ粒子の粒子径が小さく、RNPの封入効率が高くなる傾向がある。また、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子の全量に占める本発明の中性リン脂質の割合が多いほど、RNPの封入効率が高くなる傾向がある。また、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子に本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質が少量含まれていることにより、脂質ナノ粒子の粒子径を十分に小さく、RNPの封入効率を十分に高く、ゲノム編集効率を十分に高くなる傾向にある。より高いゲノム編集効率を達成するために、本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のpH感受性カチオン性脂質の割合（ $\left[\text{本発明のpH感受性カチオン性脂質量 (mol)} \right] / \left[\text{脂質ナノ粒子を構成する全脂質量 (mol)} \right] \times 100\%$ ）が30～50モル%であり、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明の中性リン脂質の割合（ $\left[\text{本発明の中性リン脂質量 (mol)} \right] / \left[\text{脂質ナノ粒子を構成する全脂質量 (mol)} \right] \times 100\%$ ）が20～50モル%であり、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質の割合（ $\left[\text{本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質量 (mol)} \right] / \left[\text{脂質ナノ粒子を構成する全脂質量 (mol)} \right] \times 100\%$ ）が1.0～4.0モル%であることが好ましく、本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のpH感受性カチオン性脂質の割合が40～50モル%であり、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明の中性リン脂質の割合が20～50モル%であり、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のポリアルキレングリコール修飾脂質の割合が1.5～2.0であることがより好ましい。

[0066] <表面修飾>

本発明に係る脂質ナノ粒子には、必要に応じて適宜の表面修飾などを行う

ことができる。

本発明に係る脂質ナノ粒子は、表面を親水性ポリマー等で修飾することにより、血中滞留性を高めることができる。これらの修飾基で修飾された脂質を脂質ナノ粒子の構成脂質として使用することにより、表面修飾を行なうことができる場合もある。

[0067] 本発明に係る脂質ナノ粒子の製造にあたり、血中滞留性を高めるための脂質誘導体として、例えば、グリコフォリン、ガングリオシドGM1、ホスファチジルイノシトール、ガングリオシドGM3、グルクロン酸誘導体、グルタミン酸誘導体、ポリグリセリンリン脂質誘導体などを利用することもできる。また、血中滞留性を高めるための親水性ポリマーとして、ポリアルキレングリコールのほかにデキストラン、プルラン、フィコール、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸交互共重合体、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどを表面修飾に用いることもできる。

[0068] また、本発明に係る脂質ナノ粒子の核内移行を促進するために、例えば、脂質ナノ粒子を3糖以上のオリゴ糖化合物で表面修飾することもできる。3糖以上のオリゴ糖化合物の種類は特に限定されないが、例えば、3~10個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができ、好ましくは3~6個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができる。中でも、好ましくはグルコースの3量体ないし6量体であるオリゴ糖化合物を用いることができ、さらに好ましくはグルコースの3量体又は4量体であるオリゴ糖化合物を用いることができる。より具体的には、イソマルトトリオース、イソパノース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースなどを好適に用いることができ、これらのうち、グルコースが α 1-4結合したマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースがさらに好ましい。特に好ましいのはマルトトリオース又はマルトテトラオースであり、最も好

ましいのはマルトトリオースである。オリゴ糖化合物による脂質ナノ粒子の表面修飾量は特に限定されないが、例えば、総脂質量に対して1～30モル%程度、好ましくは2～20モル%程度、より好ましくは5～10モル%程度である。

[0069] オリゴ糖化合物で脂質ナノ粒子を表面修飾する方法は特に限定されないが、例えば、脂質ナノ粒子をガラクトースやマンノースなどの単糖で表面を修飾したリポソーム（国際公開第2007/102481号）が知られているので、この刊行物に記載された表面修飾方法を採用することができる。上記刊行物の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。

[0070] また、本発明に係る脂質ナノ粒子には、例えば、温度変化感受性機能、膜透過機能、遺伝子発現機能、及びpH感受性機能などのいずれか1つ又は2つ以上の機能を付与することができる。これらの機能を適宜付加することにより、脂質ナノ粒子の血液中での滞留性を向上させ、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織による捕捉率を低下させるとともに、標的細胞におけるエンドサイトーシスの後にエンドソームから効率的に脂質ナノ粒子を脱出させて核内に移行させることができ、核内において高いゲノム編集活性を達成することが可能になる。

[0071] また、本発明に係る脂質ナノ粒子は、細胞表面の受容体や抗原に対して特異的に結合可能な抗体などの物質で修飾を施すこともでき、細胞の核内への物質送達効率を改善することができる。例えば標的組織又は臓器に特異的に発現する生体成分に対するモノクローナル抗体を脂質ナノ粒子の表面に配置することが好ましい。この手法は、例えば、STEALTH LIPOSOME（第233-244頁、CRC Press, Inc.発行、Danilo Lasic及びFrank Martin編）などに記載されている。脂質ナノ粒子の構成成分として、モノクローナル抗体やそのフラグメント（例えば、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、又はFab'フラグメントなど）中のメルカプト基と反応し得る脂質誘導体、例えばポリ（エチレングリコール）- α -ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン- ω -マレインイミド、 α -[N-(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォリル

-エチル) カルバミル)- ω -[3-[2-(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル) エタンカルボキサミド] プロピル} -ポリ (オキシ-1,2-エタンジール) などのマレインイミド構造を有する脂質誘導体を含有させることにより、モノクローナル抗体を脂質ナノ粒子の膜の表面に結合させることができる。

[0072] 本発明に係る脂質ナノ粒子の表面を、連続した複数個のアルギニン残基を含むポリペプチド (以下、「ポリアルギニン」と呼ぶ。) で修飾してもよい。ポリアルギニンとしては、好ましくは4~20個の連続したアルギニン残基を含むポリペプチド、さらに好ましくは4~20個の連続したアルギニン残基のみからなるポリペプチド、特に好ましくはオクタアルギニンなどを用いることができる。リポソームなどの脂質ナノ粒子の表面をオクタアルギニンなどのポリアルギニンで修飾することにより、リポソームに封入されたRNPの細胞内送達効率を向上させることができる (Journal of Controlled Release, 98, pp.317-323, 2004; 国際公開第2005/32593号)。ポリアルギニンによる脂質ナノ粒子表面の修飾は、上記の刊行物に記載された方法に従って、例えば脂質修飾ポリアルギニン、例えばステアリル化オクタアルギニンなどを脂質ナノ粒子の構成脂質として使用することにより容易に行うことができる。上記刊行物の開示及びこの刊行物において引用された全ての文献の開示を参照により本明細書の開示として含める。

[0073] [その他の成分]

本発明に係る脂質ナノ粒子は、トコフェロール、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビル、又はブチル化ヒドロキシルエンなどの抗酸化剤、荷電物質、及び膜ポリペプチドなどからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質をさらに含んでもよい。正荷電を付与する荷電物質としては、例えば、ステアリルアミン、オレイルアミンなどの飽和若しくは不飽和脂肪族アミン; ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパンなどの飽和若しくは不飽和カチオン性合成脂質; 又は、カチオン性ポリマーなどを挙げることができ、負電荷を付与する荷電物質としては、例えば、ジセチルホスフェー

ト、コレステリルヘミスクシネート、ホスファチジルセリン、ホスファチジリノシトール、ホスファチジン酸などを挙げることができる。膜ポリペプチドとしては、例えば、膜表在性ポリペプチド、又は膜内在性ポリペプチドなどが挙げられる。これらの物質の配合量は特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができる。

[0074] [脂質ナノ粒子]

本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質成分から構成される脂質膜構造体であって、RNPを搭載している。RNPの脂質ナノ粒子への封入率がより高められることから、本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する、当該脂質ナノ粒子に搭載されているRNPの割合（ $\left[\text{RNPの量 (mol)} \right] / \left(\left[\text{脂質ナノ粒子を構成する全脂質の量 (mol)} \right] \right) \times 100\%$ ）は、 $1.8 \sim 3.6 \times 10^{-2}$ モル%であることが好ましい。

[0075] 本発明に係る脂質ナノ粒子の大きさは、標的細胞が生体内の比較的深奥部に存在する場合でも高い送達効率が得られやすいことから、平均粒子径が80nm以下であることが好ましく、平均粒子径が50nm以下であることがより好ましく、40nm以下であることがさらに好ましく、30nm以下であることがよりさらに好ましく、10~30nmであることが特に好ましい。なお、脂質ナノ粒子の平均粒子径とは、動的光散乱法（Dynamic light scattering：DLS）により測定された個数平均粒子径を意味する。動的光散乱法による測定は、市販のDLS装置等を用いて常法により行うことができる。

[0076] 本発明に係る脂質ナノ粒子の多分散度指数（PDI）は0.05~0.1程度、好ましくは0.06~0.08程度、さらに好ましくは約0.07程度である。ゼータ電位は5.5mV~6.0mVの範囲、好ましくは5.8mV程度とすることができる。

[0077] 本発明に係る脂質ナノ粒子の形態は特に限定されないが、例えば、水系溶媒に分散した形態として一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、球状ミセル、又は不定型の層状構造物などを挙げることができる。本発明に係る脂質ナ

ノ粒子としては、一枚膜リポソーム、多重層リポソームであることが好ましい。

[0078] [製造方法]

本発明に係る脂質ナノ粒子の製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な任意の方法を採用することができる。一例を挙げれば、全ての脂質成分をクロロホルムなどの有機溶媒に溶解し、エバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行うことによって脂質膜を形成した後、RNP等を含む水系溶媒を乾燥した上記の混合物に添加し、さらにホモジナイザーなどの乳化機、超音波乳化機、又は高圧噴射乳化機などにより乳化することで製造することができる。また、リポソームを製造する方法としてよく知られている方法、例えば逆相蒸発法などによっても製造することができる。脂質ナノ粒子の大きさを制御したい場合には、孔径のそろったメンブランフィルターなどを用いて、高圧下でイクストルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。

[0079] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により製造することができる。製造に使用する流路としては、2液の瞬間混合を達成可能な三次元マイクロミキサー内蔵マイクロ流路であってもよいが、粒径制御性が高いナノサイズの脂質粒子形成システムを形成できることから、特許文献1に記載されているような、原料溶液を流すマイクロサイズの流路に、流路幅に対して一定幅のバッフル（邪魔板）を両側面より互い違いに配置した単純な二次元的構造の流路構造体を用いることが好ましい。

[0080] 具体的には、図1Aに示すような流路構造体（以下、「本発明の流路構造体」ということがある。）を使用することが好ましい。その上流側（図面左側）において、互いに独立した、第1の流動体を導入する第1導入路10と、第2の流動体を導入する第2導入路20とが、それぞれ一定長を有して合流し、その下流側に向かって1つの希釈流路30を形成している。前記希釈流路30は、少なくともその一部において二次元的に屈曲した流路部位50を有し、当該屈曲した流路部位50は、これより上流の希釈流路の軸線方向な

いしその延長方向をX方向と、このX方向と垂直に交差する希釈流路の幅方向をY方向とし、これより上流の希釈流路の流路幅を y_0 とした場合に、Y方向において対向する希釈流路の両側壁面より交互に、流路中心側に向かって、略Y方向（略+Y方向、略-Y方向）に、 $1/2 y_0$ 以上 $1 y_0$ 未満の一定高さ h_1 、 $h_2 \dots$ を有し、かつX方向に一定幅 x_1 、 $x_2 \dots$ を有して突出し、希釈流路の流路幅を規制する構造子40が、一定間隔 d_1 、 $d_2 \dots$ をもって少なくとも2つ以上設けられていることで形成されているものである。すなわち、前記構造子40が存在する部位においては、X方向において一定長さ x_1 、 $x_2 \dots$ の間、希釈流路の流路幅 y_1 、 $y_2 \dots$ が $1/2 y_0$ 以下、特に $1/2 y_0$ 以下 $1/40 y_0$ 以上に規制されることとなる。

[0081] なお、本発明の流路構造体は、概念的には、図1Aに例示し上記に説明したように、マイクロサイズの流路に略矩形形のバッフルを両側面より互い違いに配置したような形状であるが、実際上では、このように流路上に別体的なバッフルを配置することによって構成されるものに限られるものではない。すなわち、このようなバッフルを配置することで形成される流路に相応するように同様な形状の流路が形成される限り、構造子40の構成としては特に限定されるものではなく、前記したような構造子40を構成するように、流路構造体の壁面を（ほぼ一定肉厚を保ちながら）所定形状に屈曲させつつ、一体的に形成して、前記に規定したような屈折し縮たする二次元構造の流路形状を構成するものであってもよく、本発明の流路構造体には、当然にこのような態様が含まれるものである。このような二次元構造の流路は、例えば、熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂、紫外線硬化性樹脂、金属ないしガラス質材料等を用いた射出成型、注型成形、三次元プリンターを用いた成型等によって比較的容易に形成し得るものである。

[0082] 第1導入路10と第2導入路20が合流した後の希釈流路30の流路幅 y_0 は、形成しようとするナノサイズの脂質粒子の粒径の大きさによっても、ある程度左右されるが、代表的には $20 \sim 1000 \mu\text{m}$ 程度、より好ましくは $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 程度とされることが好ましい。所望するナノサイズ、具

体的には例えば約10～100nmの粒径範囲内のサイズの粒径の脂質粒子を得る上では、上記したような範囲内の流路幅 y_0 で脂質溶液を希釈媒体で希釈することがある程度必要な条件である。

[0083] また、各構造子40の高さ h_1 、 $h_2\dots$ （Y方向長さ）としては、それより上流側における希釈流路30の流路幅 y_0 に対して $1/2y_0$ 以上 $1y_0$ 未満、好ましくは $1/2y_0$ 以上 $39/40y_0$ 以下、さらに好ましくは $1/2y_0$ 以上 $3/4y_0$ 以下のものとされ、当該各構造子40が存在することにより、それより上流側における希釈流路30の流路幅 y_0 から、流路幅 y_1 、 $y_2\dots$ を $1/2y_0$ 未満で0よりも大きい幅に縮小させるものとされる。なお、屈曲した流路部位50において複数設けられる当該構造子40のそれぞれの高さ h_1 、 $h_2\dots$ は、必ずしも同一なものである必要はなく、上記した所定の条件を満たす限り、それぞれ異なるものであってもよい。これによって形成される流路幅 y_1 、 $y_2\dots$ もそれぞれ異なるものであってもよい。例えば、下流方向に行くに従って、各構造子40のそれぞれの幅 h_1 、 $h_2\dots$ が漸次長くなり、流路幅 y_1 、 $y_2\dots$ が狭められるような態様であってもよい。各構造子40の高さ h_1 、 $h_2\dots$ （Y方向長さ）が所定のものであって、これらの存在する部位の流路幅 y_1 、 $y_2\dots$ が $1/2y_0$ 未満の幅に絞られることで、分子拡散の効率が向上する。

[0084] 得ようとする脂質粒子の大きさや、構造子40の数、各ミキサー構造子40の幅（X方向長さ） x_1 、 $x_2\dots$ 、隣接する各構造子40間の間隔 d_1 、 $d_2\dots$ 等のその他の条件によっても左右され、特に限定されるものでもないが、具体的には例えば、上流の希釈流路の流路幅 y_0 が200 μm であった場合に、当該構造子40のそれぞれの高さ h_1 、 $h_2\dots$ は100 μm ～200 μm 未満とされることが望ましい。従って、各構造子40が存在する位置での流路幅 y_1 、 $y_2\dots$ は、 $1/2y_0$ 未満で0よりも大きい幅である、100 μm 未満程度とされる。

[0085] また、各構造子40の幅（X方向長さ） x_1 、 $x_2\dots$ 、としては、得ようとする脂質粒子の大きさや、構造子40の数、各構造子40の高さ h_1 、 $h_2\dots$

(Y方向長さ)、隣接する各構造子40間の間隔 d_1 、 $d_2\dots$ 等のその他の条件によっても左右されるが、上流の希釈流路の流路幅 y_0 に対し、 $1/10y_0$ 以上 $5y_0$ 以下程度の長さとなることが好ましい。具体的には例えば、上流の希釈流路の流路幅 y_0 が、 $20\sim 1000\mu\text{m}$ 、代表的には $200\mu\text{m}$ であった場合に、当該構造子40のそれぞれの幅 x_1 、 $x_2\dots$ は $20\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 程度となることが望ましい。各構造子40のそれぞれの幅 x_1 、 $x_2\dots$ は、必ずしも同一なものである必要はなく、上記した所定の条件を満たす限り、それぞれ異なるものであってもよい。例えば、下流方向に行くに従って漸次幅 x_1 、 $x_2\dots$ が長くなるような態様であってもよい。

[0086] また、隣接する各構造子40間の間隔 d_1 、 $d_2\dots$ としては、得ようとする脂質粒子の大きさや、構造子40の数、各構造子40の高さ h_1 、 $h_2\dots$ (Y方向長さ)、各構造子40の幅 (X方向長さ) x_1 、 $x_2\dots$ 、等のその他の条件によっても左右されるが、上流の希釈流路の流路幅 y_0 に対し、 $1/10y_0$ 以上 $5y_0$ 以下程度の長さとなることが好ましい。具体的には例えば、上流の希釈流路の流路幅 y_0 が、 $20\sim 1000\mu\text{m}$ 、代表的には $200\mu\text{m}$ であった場合に、隣接する各構造子40間の間隔 d_1 、 $d_2\dots$ は $20\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 程度となることが望ましい。隣接する各構造子40間の間隔 d_1 、 $d_2\dots$ は、必ずしも同一なものである必要はなく、上記した所定の条件を満たす限り、それぞれ異なるものであってもよい。例えば、下流方向に行くに従って漸次間隔 d_1 、 $d_2\dots$ が狭くなるような態様であってもよい。

[0087] なお、本発明の流路構造体において、上流の希釈流路の軸線方向ないしその延長方向をX方向と、このX方向と垂直に交差する希釈流路の幅方向をY方向とした場合、前記したように各構造子40は、両側壁面より交互に、流路中心側に向かって略Y方向 (略+Y方向、略-Y方向) に延長されており、流路方向 (X方向) に略直角に抗する壁面を有するものであるが、この角度としては必ずしも厳密に 90° である必要はなく、ある程度傾斜したものであっても有効な構成となり得るものであり、特に限定されるものではないが、具体的には例えば、 $30\sim 150^\circ$ 程度、より望ましくは $40\sim 140$

°、特に望ましくは80~100°の範囲であれば許容されるものである。さらに、各構造子40の流路中心側の角部の形状としてもある程度の丸みは許容されるものであり、特に限定されるものではないが、例えばR50μm以下、より望ましくはR20μm以下であれば許容される場合もあり得る。しかしながら、より制御性高く均一なナノサイズの脂質粒子を得る上では、これらの許容差はできるだけ少ない方が望ましい。また、図1Aに示す実施形態においては、流路構造体における上流の希釈流路の軸線方向ないしその延長方向であるX方向は便宜上で直線状に表わされているが、このX方向はあくまで希釈流路の軸線方向を示すものであって、実際上では、このような直線状なものに限られるものではなく、例えばある曲率をもって湾曲したものであってもよい。なお、このような場合には、このX方向と垂直に交差する希釈流路の幅方向であるY方向は、その単位長さの部位でのX方向と垂直な方向を指すこととなる。

[0088] また、本発明の流路構造体は、上記したように二次元的構造の流路構造体であるから、その流路の深さ方向（図1Aにおける紙厚方向）のサイズとしては、特に限定されるものではないが、例えば10~1000μm程度、より好ましくは50~200μm程度とすることが好ましい。

[0089] 本発明に係る脂質ナノ粒子をアルコール希釈法により製造する際に用いられる流路としては、図1Aに示す流路構造体中の希釈流路30が、三次元的な流れを生ずることができる流路であれば、特に限定されるものではない。例えば、本発明の流路構造体は、希釈流路30の少なくともその一部において、二次元的に屈曲した流路部位50に代えて、流路壁面に形成された溝又は微小突起によってカオティックな流れが生じるカオティックマイクロミキサー（スタッガードヘリンボーンミキサー）（非特許文献8）であってもよい。

[0090] 本発明の流路構造体が、図1Aに示すように、第1の流動体を導入する第1導入路10と、第2の流動体を導入する第2導入路20とが、それぞれ一定長を有して合流して1つの希釈流路を形成している場合には、第1導入路

より脂質成分をエタノールに溶解させた脂質溶液を、第2導入路よりCas9タンパク質とcrRNAとtracrRNAとssONとを含有する水溶液（RNP含有水溶液）を、それぞれ導入する。希釈流路において、脂質溶液はRNP含有水溶液により希釈され、この過程でRNPを搭載した脂質ナノ粒子が製造される。

[0091] 本発明の流路構造体は、互いに独立した複数の導入路を有しており、それらの導入路が、それぞれ一定長を有して合流して1つの希釈流路を形成していればよく、3つの導入路を有していてもよい。本発明の流路構造体が3つの導入路を有する場合、第1導入路から導入された第1の流動体が、第2導入路から導入された第2の流動体と合流する前に、第3導入路から導入された第3の流動体と接触するように、第1導入路と第2導入路と第3導入路とが、それぞれ一定長を有して合流して1つの希釈流路を形成することができる。

[0092] 例えば、図1Bに示すように、希釈流路30への合流地点が互いに最も離れている導入路を第1導入路10及び第2導入路20とし、残る導入路を第3導入路60とした場合には、第1導入路10より脂質成分をエタノールに溶解させた脂質溶液を、第2導入路20よりRNP含有水溶液を、第3導入路60よりRNP含有水溶液の調製に用いた水系溶媒を、それぞれ導入する。第1導入路10から導入された脂質溶液は、まず、第3導入路60から導入された水系溶媒と合流し、その後第2導入路20から導入されたRNP含有水溶液と合流する。RNP含有水溶液が、高濃度のエタノール溶液である脂質溶液と直接接触することが避けられるため、RNP含有水溶液中のタンパク質が希釈流路30、特にその入り口付近で高濃度エタノールによって凝集することを抑制できる。

[0093] 本発明の流路構造体における希釈は、分子拡散に依存するものとなる。原料となる脂質溶液の希釈速度が速いほど、生成する脂質粒子のサイズが小さいものとなる。従って、構造子（バッフル）の幅や長さ、配置を調整することによって、原料溶液の希釈速度を制御することができ、従来よりも粒径制

御性が高い脂質ナノ粒子を形成することが可能である。

[0094] RNP含有水溶液は、Cas9タンパク質とcrRNAとtracrRNAとssONとを、水系溶媒に溶解させることにより調製できる。当該水系溶媒は、ゲノム編集活性を保持した状態でRNPを脂質溶液に混合可能な水系溶媒であり、かつ製造された脂質ナノ粒子が安定して分散可能であれば特に限定されるものではない。当該水系溶媒としては、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地などを挙げることができる。これら水系溶媒（分散媒）は、さらに、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類；乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類；ラフィノース、メレジノースなどの三糖類；シクロデキストリンなどの多糖類；エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコール；グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール；などを加えてもよい。

[0095] RNP含有水溶液のpHが低いと、製造されたRNPを搭載した脂質ナノ粒子のゲノム編集活性が低下する場合がある。このため、RNP含有水溶液のpHは5.0以上が好ましく、5.0～8.5の範囲内であることがより好ましく、5.0～8.0の範囲内であることがさらに好ましく、5.0～7.5の範囲内であることがよりさらに好ましい。また、RNP含有水溶液のpHは、6以上も好ましく、6～8.5の範囲内であることがより好ましく、6～8の範囲内であることがさらに好ましく、6～7.5の範囲内であることがよりさらに好ましい。

[0096] 脂質溶液とRNP含有水溶液の流速比は、脂質溶液の希釈速度に影響し、ひいては生成する脂質粒子のサイズに影響する。本発明に係る脂質ナノ粒子

の製造においては、平均粒子径が十分に小さく、標的細胞への取り込み効率の高い脂質ナノ粒子を製造する点から、脂質溶液の流速に対するRNP含有水溶液の流速の比は、7以上が好ましく、7~10がより好ましく、7~9がさらに好ましい。

[0097] 脂質溶液とRNP含有水溶液の総流量は、特に限定されるものではなく、 $1\mu\text{L}/\text{分}\sim 100\text{mL}/\text{分}$ の範囲内で適宜調整することができる。本発明に係る脂質ナノ粒子の製造においては、脂質溶液とRNP含有水溶液の総流量は、 $50\mu\text{L}/\text{分}\sim 1\text{mL}/\text{分}$ の範囲内が好ましく、 $50\sim 800\mu\text{L}/\text{分}$ の範囲内がより好ましく、 $50\sim 600\mu\text{L}/\text{分}$ の範囲内がさらに好ましく、 $50\sim 500\mu\text{L}/\text{分}$ の範囲内がよりさらに好ましい。

[0098] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、標的細胞へゲノム編集を行うためのRNPを送達するキャリアである。本発明に係る脂質ナノ粒子を標的の細胞内へ導入することにより、ゲノム編集を行うことができる。標的細胞が培養細胞の場合、本発明に係る脂質ナノ粒子を、培養培地に添加する。標的細胞が動物の体内の細胞の場合、本発明に係る脂質ナノ粒子を、動物に投与する。投与経路は、特に限定されるものではないが、経静脈投与、経腸投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、経鼻投与、経肺投与等の非経口投与であることが好ましい。

[0099] 本発明に係る脂質ナノ粒子が投与される動物は、特に限定されるものではなく、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物であってもよい。非ヒト動物としては、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の哺乳動物や、ニワトリ、ウズラ、カモ等の鳥類等が挙げられる。

実施例

[0100] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0101] [参考例1]

図1Aに示すような流路構造体を含む製造装置を用いて、RNPを搭載し

た脂質ナノ粒子を調製するための条件を検討した。具体的にはRNPを溶解する緩衝液のpH、エタノールに対するRNP溶液の流速比（flow rate ratio；FRR）、及びエタノールとRNP溶液の総流速（total flow rate；TFR）を検討した。

[0102] 図2に、実際に使用した製造装置の構造を模式的に示す。図2（A）は全体の構造の模式図であり、図2（B）はミキサー内蔵マイクロ流路（流路構造体）の斜視図であり、図2（C）は希釈流路104cの一部の拡大図である。図2（A）に示すように、脂質溶液を搭載したシリンジ101と、RNP溶液を搭載したシリンジ102を、それぞれ流量制御装置103に設置し、これをミキサー内蔵マイクロ流路104の第1導入路の注入口104aと第2導入路の注入口104bにチューブ105で連結し、希釈流路104cの注出口104dを製造された脂質ナノ粒子を回収する回収容器106にチューブ105で連結した。

[0103] この条件検討においては、脂質による影響を除外するため、脂質溶液に代えて、エタノールを用いた。また、RNP溶液として、化膿レンサ球菌由来Cas9タンパク質（160kDa）（製品名：「Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3」、Integrated DNA technologies社製）と、GFP（green fluorescent protein）遺伝子中の標的配列（配列番号1、20塩基長）と相補的な塩基配列を含むcrRNA（配列番号2、36塩基長、1～20番目の領域が標的配列と相補的な塩基配列である。）と、tracrRNA（配列番号3、67塩基長）とを、モル比1：1：1となるように緩衝液に溶解させた溶液（RNP溶液）を用いた。crRNAとtracrRNAは、GFP安定発現HeLa（HeLa-GFP）細胞のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより増幅して得た。pH6の緩衝液はMES緩衝液（20mM MES、50mM NaCl、pH6.0）を用い、pH4.0、5.0、又は5.5の緩衝液はクエン酸緩衝液（20mM クエン酸、50mM NaCl、pH4.0、5.0、又は5.5）を用いた。

[0104] RNP溶液とエタノールをそれぞれ図2に記載の製造装置のマイクロ流路

内に送液後、希釈流路より排出された溶液を回収し、透析膜（MWC O : 12, 000-14, 000）に入れ、PBS（-）中で4℃、2時間以上透析を行うことでバッファー交換とアルコールの除去を行った。フルオレスカミンにより、透析後のRNP溶液のCas9タンパク質濃度を定量した後、当該RNP溶液を、標的配列を含む二本鎖DNA（dsDNA）（配列番号4, 0.25 pmol）に、Cas9タンパク質量換算で2又は5当量（モル比）となるように混合し、37℃で1時間反応させた。反応後の反応溶液をアガロース電気泳動し、DNA切断効率を評価した。RNPを混合していないdsDNAをネガティブコントロールとし、マイクロ流路内に通していないRNPをdsDNAに加えたサンプルをポジティブコントロールとした。各サンプルについて、ポジティブコントロールの内、標的dsDNAに対して5当量のRNPを加えたサンプルにおける切断活性を1とした時の相対的な切断活性を算出した。定量的な解析には画像解析ソフトImage Jを用いた。

[0105] RNP溶液をpH6.0の緩衝液で調製し、FRRは9.0とし、TFRを50~500 μ L/分の範囲として実験を行い、TFRの影響を調べた。結果を表1に示す。表中、「N.C.」はネガティブコントロールの結果を、「P.C.」はポジティブコントロールの結果を、それぞれ示す。表1に示すように、いずれの総流速においてもポジティブコントロールと同程度の切断活性を有しており、総流速によるDNA切断活性への影響は認められなかったため、以降の実験では、より混合速度の大きい500 μ L/分を採用した。

[0106] [表1]

TFR[μ L/min]	N.C.	P.C.		50		100		250		500	
RNP/dsDNA [mol]	-	2	5	2	5	2	5	2	5	2	5
相対切断活性	0.00	0.39	1.00	0.41	1.17	0.35	1.28	0.37	1.03	0.40	0.95

[0107] RNP溶液をpH6.0の緩衝液で調製し、TFRは500 μ L/分とし、FRRを3.0~9.0の範囲として実験を行い、FRRの影響を調べた。結果を表2に示す。表2に示すように、FRRが5.0以下の範囲におい

て、FRRの低下に伴ってDNA切断活性の低下が認められた。一方、FRRが7.0以上の範囲では、ポジティブコントロールと同程度の活性を示し、マイクロ流路への送液の影響は認められなかった。この結果から、以降の実験では、FRRは9.0を採用した。

[0108] [表2]

FRR	N.C.	P.C.		3		5		7		9	
RNP/dsDNA [mol]	-	2	5	2	5	2	5	2	5	2	5
相対切断活性	0.00	0.62	1.00	0.05	0.17	0.32	0.68	0.55	1.08	0.56	0.75

[0109] TFRは500 μ L/分とし、FRRを9.0とし、RNP溶液を調製する緩衝液のpHを4.0~6.0の範囲として実験を行い、RNP溶液のpHの影響を調べた。結果を表3に示す。表3に示すように、pH6.0ではポジティブコントロールと同程度のDNA切断活性を維持した一方で、pH5.5以下の範囲でpHの低下に伴ってDNA切断活性の著しい低下が認められた。この結果から、以降の実験では、RNP溶液の調製には、pH6.0の緩衝液を採用した。

[0110] [表3]

pH	N.C.	P.C.		6.0		5.5		5.0		4.0
RNP/dsDNA [mol]	-	2	5	2	5	2	5	2	5	5
相対切断活性	0.00	0.35	1.00	0.47	1.14	0.18	0.45	0.13	0.38	0.11

[0111] [参考例2]

本発明に係る脂質ナノ粒子を、カオティックミキサーを搭載した製造装置を使用して製造可能かどうかを調べた。具体的には、RNPを溶解する緩衝液のpH、エタノールに対するRNP溶液の流速比(FRR)、及びエタノールとRNP溶液の総流速(TFR)を検討した。脂質ナノ粒子の製造は、参考例1で使用した製造装置のうち、ミキサー内蔵マイクロ流路104が図3に記載のカオティックミキサー内蔵マイクロ流路107である製造装置を用いて行った。図3(A)はカオティックミキサー内蔵マイクロ流路(流路構造体)の斜視図であり、図3(B)は希釈流路107cの一部の拡大図である。

[0112] この条件検討においては、参考例1と同様に、脂質による影響を除外するため、脂質溶液に代えて、エタノールを用い、RNP溶液として、化膿レンサ球菌由来Cas9タンパク質(160kDa)と、GFP遺伝子中の標的配列(配列番号1、20塩基長)と相補的な塩基配列を含むcrRNA(配列番号2、36塩基長)と、tracrRNA(配列番号3、67塩基長)とを、モル比1:1:1となるように緩衝液に溶解させた溶液(RNP溶液)を用いた。pH6~6.6の緩衝液はMES緩衝液(20mM MES、50mM NaCl、pH6.0)を用い、pH5.5の緩衝液はクエン酸緩衝液(20mM クエン酸、50mM NaCl、pH5.5)を用いた。

[0113] RNP溶液とエタノールを図3に記載の製造装置のマイクロ流路内に、TFRが500 μ L/分、FRRが9の条件で送液し、希釈流路より排出されたRNP溶液を回収し、参考例1と同様にして透析した。透析後のRNP溶液を、参考例1と同様にして、dsDNAにCas9タンパク質量換算で5当量(モル比)となるように混合し、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、DNA切断効率を評価した。各サンプルについて、標的dsDNAに対して5当量のRNPを加えたポジティブコントロールの切断活性を1とした時の相対的な切断活性を算出した。結果を表4に示す。参考例1と同様に、pH6.0ではポジティブコントロールと同程度のDNA切断活性を維持した一方で、pH5.5ではDNA切断活性の著しい低下が認められた。

[0114] [表4]

pH	5.5	6.0	6.2	6.4	6.6
相対切断活性	0.46	1.01	0.93	0.95	0.88

[0115] RNP溶液をpH6.0の緩衝液で調製し、TFRは500 μ L/分とし、FRRを5.0、7.0、又は9.0として同様の実験を行い、FRRの影響を調べた。結果を表5に示す。FRRが5.0ではDNA切断活性はやや低かったのに対して、FRRが7.0以上の範囲では、ポジティブコントロールと同程度の活性を示し、マイクロ流路への送液の影響は認められな

った。

[0116] [表5]

FRR	5	7	9
相対切断活性	0.83	0.94	1.00

[0117] これらの結果から、本発明に係る脂質ナノ粒子は、図3に記載の製造装置を用いた場合でも、図2に記載の製造装置を用いた場合と同様の条件で、脂質ナノ粒子を製造できることが明らかとなった。すなわち、本発明に係る脂質ナノ粒子の製造において、ミキサーの構造選択性は低いことが示唆された。

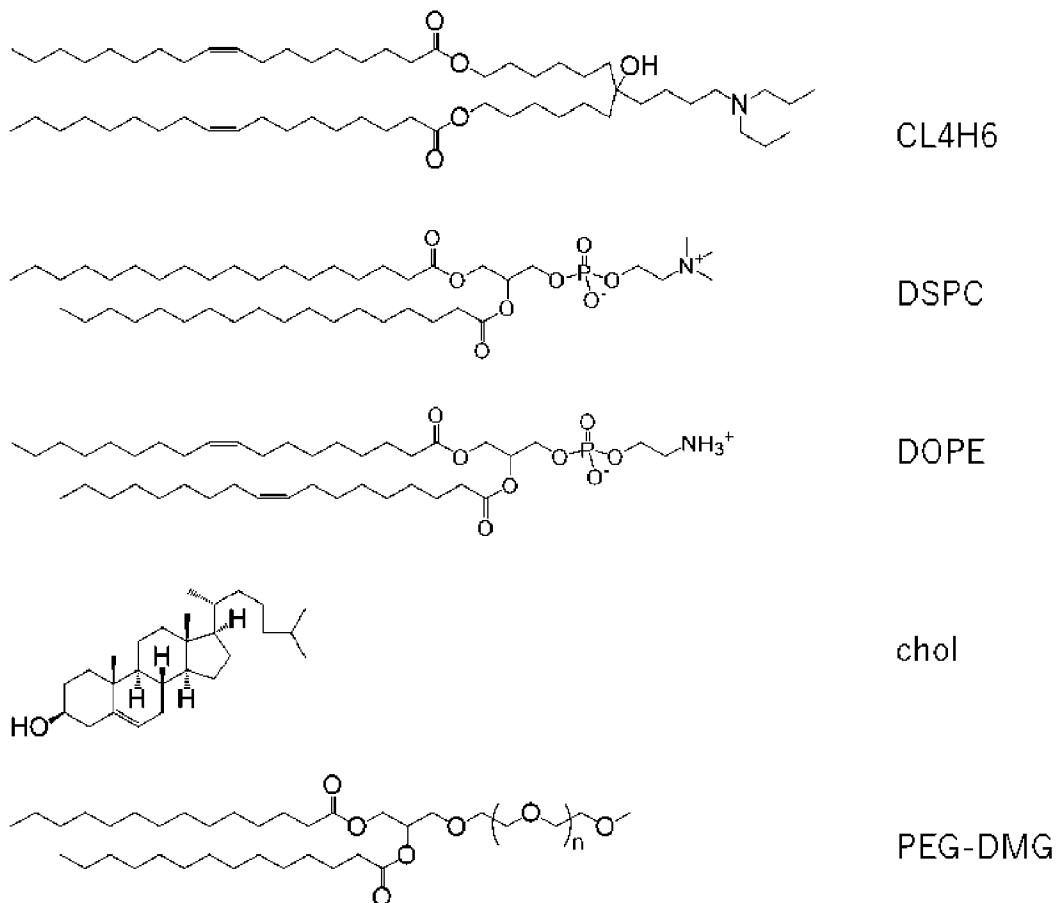
[0118] [実施例1]

GFP遺伝子のノックアウトを行うためのRNPを搭載した、脂質組成の異なる脂質ナノ粒子を製造し、HeLa-GFP細胞に対するGFPノックアウト活性を調べた。また、GFP遺伝子をBFP (blue fluorescent protein) 遺伝子へ改変するノックインを行うためのRNPを搭載した、脂質組成の異なる脂質ナノ粒子を製造し、HeLa-GFP細胞に対するGFPノックイン活性を調べた。脂質ナノ粒子の製造は、参考例1で使用した製造装置を用いて行った。

[0119] 脂質ナノ粒子の構成脂質として、pH感受性カチオン性脂質としてCL4H6 (pKa ~6.25、特許文献2) を、中性リン脂質として1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン (DSPC) 又は1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジリエタノールアミン (DOPE) を、その他の脂質としてコレステロール (chol) 及び1,2-ジミリスティル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG-DMG) を用いた。

[0120]

[化7]



[0121] 脂質ナノ粒子の製造には、表6に記載の5種類の脂質組成の脂質成分を使用した。

[0122] [表6]

	脂質組成 [mol%]
10% (DSPC)	CL4H6 / chol / DSPC / PEG-DMG = 50 / 40 / 10 / 2.5
20% (DSPC)	CL4H6 / chol / DSPC / PEG-DMG = 50 / 30 / 20 / 2.5
10% (DOPE)	CL4H6 / chol / DOPE / PEG-DMG = 50 / 40 / 10 / 2.5
20% (DOPE)	CL4H6 / chol / DOPE / PEG-DMG = 50 / 30 / 20 / 2.5
0%	CL4H6 / chol / DSPC / PEG-DMG = 50 / 50 / 0 / 2.5

[0123] Cas9タンパク質、crRNA、及びtracrRNAは参考例1で使用したものと同一のものを用いた。

GFPのノックアウトを行うためのRNPを製造する際には、GFPノックアウト用のssONとして、標的配列（配列番号1）を含むゲノムDNAの部分領域と同一の塩基配列からなる132塩基長のDNA（配列番号5、

68～87番目の領域が標的配列と同一の塩基配列である。)を用いた。

GFPからBFPへ改変するノックインを行うためのRNPを製造する際には、BFPノックイン用のssONとして、ノックアウト用に用いたssONの3塩基(65、67、及び72番目の塩基)に変異を導入したDNA(配列番号6)を用いた。変異配列の導入により、ホモロジー依存的修復(homology-dependent repair; HDR)経路が機能すると、GFPの蛍光団を構成するアミノ酸(スレオニン-チロシン-グリシン)がBFPの蛍光団を構成するアミノ酸(セリン-ヒスチジン-グリシン)に置換される。

[0124] <GFPノックアウト活性の測定>

160nMのCas9タンパク質、160nMのcrRNA、160nMのtracrRNA、及び160nMのssONを、参考例1で使用したpH6.0の緩衝液に溶解させてRNP溶液を調製し、第2導入路の注入口104bに連結したシリンジ102に充填した。また、脂質のエタノール溶液(総脂質:8.20mM)を第1導入路の注入口104aに連結したシリンジ101に充填した。FRRが9.0、TFRが500 μ L/分の送液条件でマイクロ流路内に送液し、RNP搭載脂質ナノ粒子を製造した。製造されたRNP搭載脂質ナノ粒子を、参考例1と同様にして透析した後、粒子計測機「zetasiser nano ZS ZEN3600」(Marvern製)を用いて、動的光散乱法により、個数平均粒子径(nm)、多分散度指数(polydispersity index; PDI)及び ζ 電位(mV)を測定した(n=3、Mean \pm SD)。また、gRNA及びssONの脂質ナノ粒子への封入率(%)及び脂質ナノ粒子溶液中濃度を、Ribogreen assay(Thermo Fisher Scientific社製)により測定した(n=3、Mean \pm SD)。gRNA及びssONの脂質ナノ粒子溶液中濃度の測定値から、RNP搭載脂質ナノ粒子の製造に使用したgRNA及びssONの総量に対する、図3に記載の装置による希釈及び透析による精製後に回収された核酸総量の割合(回収率:%)を算出した。

[0125]

[表7]

	個数平均粒子径 [nm]	ゼータ電位 [mV]	PdI	回収率 [%]	封入率 [%]
10% (DSPC)	109.5±41.1	-10.9±18.7	0.34±0.31	91.4±6.4	60.5±33.2
20% (DSPC)	122.9±17.8	-3.0±5.1	0.16±0.02	88.3±7.5	66.7±7.7
10% (DOPE)	109.5±25.8	-11.1±11.5	0.22±0.03	80.2±7.8	64.3±9.4
20% (DOPE)	78.4±3.8	-4.5±5.6	0.25±0.00	87.4±13.1	86.9±2.0
0%	95.7±21.8	-8.2±11.5	0.21±0.01	86.0±5.0	72.9±9.7

[0126] 測定結果を表7に示す。DOPE含有量が20%の組成の脂質ナノ粒子において、粒子径が小さく、封入率が高い傾向が認められた。

[0127] 各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHeLa-GFP細胞の培地に、Cas9タンパク質濃度が0.3、1、又は5nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から2日後に培地交換した後、さらに1日後に細胞を回収して、フローサイトメトリーによりGFPノックアウト効率(%) (細胞全体に占める、GFP蛍光を発していない細胞の割合(%))を測定した。比較対象として、RNPの導入に使用実績のある市販のトランスフェクション試薬「Lipofectamine RNAiMAX」(Thermo Fisher Scientific社製)を用いた。

[0128] 各RNP搭載脂質ナノ粒子のGFPノックアウト効率(%)の測定結果(n=3、Mean±SD)を図4に示す。中性リン脂質含有量が多いほど、より高いノックアウト活性を示した。また、中性リン脂質としてDOPEを含むRNP搭載脂質ナノ粒子のほうが、DSPCを含むRNP搭載脂質ナノ粒子よりも、より高いノックアウト活性を示した。また、中性リン脂質含有量が多い又は中性リン脂質としてDOPEを含むRNP搭載脂質ナノ粒子は、「Lipofectamine RNAiMAX」よりも高いノックアウト活性を示した。

[0129] <GFPノックイン活性の測定>

GFPノックアウト用のssONに代えて、ノックイン用ssONを用い、さらに脂質組成をDSPC含有量が20%(表6中、「20%(DSPC)」)又はDOPE含有量が20%(表6中、「20%(DOPE)」)とした以外は同様にして、RNP搭載脂質ナノ粒子を製造した。各RNP搭載脂質ナノ粒子を、

前日に播種したH e L a - G F P細胞の培地に、C a s 9タンパク質濃度が0.3、1、又は5 nMとなるように添加し、培養を行った。R N P搭載脂質ナノ粒子添加から2日後に培地交換した後、さらに1日後に細胞を回収して、フローサイトメトリーによりノックイン効率(%) (細胞全体に占める、B F P蛍光を発している細胞の割合(%))を測定した。B F PはG F Pよりも蛍光波長が短波長側であるため、ノックインによりG F P遺伝子がB F P遺伝子に改変された細胞は、フローサイトメトリーにより定量的に識別可能である。各R N P搭載脂質ナノ粒子について、ノックアウト効率(%)に対するノックイン効率(%)の比([K I (%)] / [K O (%)])を求めた結果を図5に示す。この結果、変異を導入したs s O Nを用いた場合、いずれのR N P搭載脂質ナノ粒子でも4~5%の遺伝子ノックイン効率を示した。

[0130] [実施例2]

脂質ナノ粒子の製剤処方が遺伝子ノックアウト活性に及ぼす影響を調べた。

[0131] <一次スクリーニング>

検討項目として、pH感受性カチオン性脂質(C L)含有量(30、40、50 mol%)、中性リン脂質(P L)含有量(20、35、50 mol%)、PEG-DMG含有量(1、2.5、4 mol%)、pH感受性カチオン性脂質の種類(C L 4 H 6又はC L 1 5 H 6 (pKa ~7.25、特許文献2))、中性リン脂質の種類(D S P C又はD O P E)、並びにR N P / l i p i d比(1.8、2.7、3.6 × 10⁻⁴ mol)の6因子とした。

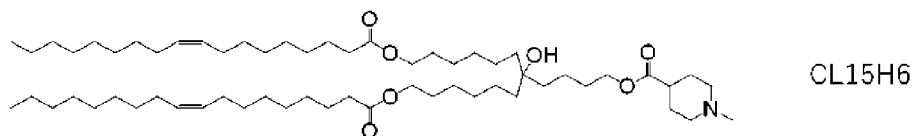
[0132] 連続変数については3水準、カテゴリカル因子については2水準を選出し、全組み合わせ324通りの内、実験計画法(Design of Experiment ; D o E)の一つである決定的スクリーニング計画により、表8に記載の14通りの処方を選抜した。脂質組成は、pH感受性カチオン性脂質(C L) : 中性リン脂質(P L) : コレステロール : PEG-DMG = X : Y : (100 - X - Y) : Z (mol%) (X : 表8中の「C L [%]」欄の数値、Y : 表

8中の「PL [%]」欄の数値)とした。

[0133] [表8]

Entry (No.)	因子					
	CL [%]	PL [%]	PEG-DMG [%]	CL	PL	RNP/lipid [mol, $\times 10^{-4}$]
A-1	50	20	2.5	15H6	DOPE	1.8
A-2	30	35	4	4H6	DOPE	1.8
A-3	30	50	1	15H6	DSPC	1.8
A-4	50	50	4	15H6	DSPC	1.8
A-5	40	20	1	4H6	DSPC	1.8
A-6	40	35	2.5	15H6	DOPE	2.7
A-7	50	50	1	4H6	DOPE	2.7
A-8	30	20	4	15H6	DSPC	2.7
A-9	40	35	2.5	4H6	DSPC	2.7
A-10	40	50	4	15H6	DOPE	3.6
A-11	30	20	1	4H6	DOPE	3.6
A-12	50	20	4	4H6	DOPE	3.6
A-13	50	35	1	15H6	DSPC	3.6
A-14	30	50	2.5	4H6	DSPC	3.6

[0134] [化8]



[0135] 脂質成分と脂質とRNPの比率を表8の処方とした以外は、実施例1におけるGFPロックアウト用RNP搭載脂質ナノ粒子と同様にして、GFPロックアウト用のRNP搭載脂質ナノ粒子を製造した。得られたRNP搭載脂質ナノ粒子の個数平均粒子径 (nm)、Pdl、gRNA及びssONの脂質ナノ粒子への封入率 (%) を、実施例1と同様にして測定した。

[0136] また、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHeLa-GFP細胞の培地に、Cas9タンパク質濃度が0.1、0.5、又は2nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から2日後に培地交換した後、さらに3日後に細胞を回収して、実施例1と同様にしてフローサイトメトリーによりGFPロックアウト効率 (%) を測定した。結果を表9に示す。また、図6に、GFPロックアウト効率 (%) の測定結果を示す。

[0137]

[表9]

Entry (No.)	応答			
	個数平均粒子径 [nm]	PdI	封入率 [%]	KO 活性 [%]
A-1	95.08	0.164	94.3	17.04
A-2	246.4	0.124	76.1	40.57
A-3	693.8	0.35	67.3	1.91
A-4	112	0.212	92.3	15.79
A-5	348.9	0.074	50.1	32.11
A-6	136.1	0.234	98.7	29.23
A-7	244.9	0.128	100.8	81.92
A-8	282.4	0.17	72.9	19.61
A-9	205.7	0.089	65.5	20.62
A-10	106.5	0.199	94.6	23.89
A-11	251.5	0.082	87.5	85.26
A-12	75.98	0.226	87.5	44.25
A-13	601.4	0.098	75.7	2.606
A-14	276.2	0.018	59.0	9.27

[0138] 個数平均粒子径に関して統計解析を行った。個数平均粒子径に有意に影響を与える主効果及び2因子間交互作用の結果を表10に、個数平均粒子径に有意に影響を与える因子を変化させた際の個数平均粒子径の予測プロフィールを図7に、それぞれ示す。pH感受性カチオン性脂質含有量、PEG-DMG含有量、pH感受性カチオン性脂質の種類、及び中性リン脂質が、粒子径に有意に影響を与える因子として検出された。より詳細には、pH感受性カチオン性脂質含有量を増加させたり、PEG-DMG含有量を2.5mol%近傍としたり、pH感受性カチオン性脂質としてCL4H6を使用したり、中性リン脂質としてDOPEを使用したりすることで、粒子径を小さく制御できることが明らかとなった。特にPEG脂質量及び中性リン脂質の種類の影響が大きい因子であることが明らかとなった。

[0139]

[表10]

	効果の検定					
	要因	パラメータ数	自由度	平方和	F 値	p 値 (Prob>F)
主効果	CL [%] (30, 50)	1	1	31276.76	40.1352	0.0007
	PEG-DMG [%] (1, 4)	1	1	151341.29	194.2054	<0.0001
	CL	1	1	24720.48	31.7220	0.0013
	Phospholipid	1	1	52557.16	67.4428	0.0002
2 因子間交互作用	CL [%]*PEG-DMG [%]	1	1	7309.61	9.3799	0.0221
	PEG-DMG [%]*CL	1	1	77784.48	99.8152	<0.0001
	PEG-DMG [%]*PEG-DMG [%]	1	1	52309.15	67.1246	0.0002

[0140] 封入率について同様に統計解析を行った。封入率に有意に影響を与える主効果及び2因子間交互作用の結果を表11に、封入率に有意に影響を与える因子を変化させた際の封入率の予測プロファイルを図8に、それぞれ示す。この結果、全ての因子が封入率に有意に影響を与えることが明らかとなった。より詳細には、pH感受性カチオン性脂質含有量を増加させる、中性リン脂質含有量を増加させる、PEG-DMG含有量を減少させる、pH感受性カチオン性脂質としてCL15H6を用いる、中性リン脂質としてDOPEを用いる、さらに、RNP/lipid比を下げることによって、封入率が向上することが明らかとなった。中性リン脂質の種類が、最も大きな影響を与える因子であった。

[0141] [表11]

	効果の検定					
	要因	パラメータ数	自由度	平方和	F 値	p 値 (Prob>F)
主効果	CL [%] (30, 50)	1	1	273.0400	470.7347	<0.0001
	Phospholipid [%] (20, 50)	1	1	107.4924	185.3222	0.0002
	PEG-DMG [%] (1, 4)	1	1	6.8200	11.7580	0.0266
	CL			348.6864	601.1528	<0.0001
	Phospholipid			1563.4561	2695.477	<0.0001
	RNP/lipid[mol] (1.8, 3.6 x10 ⁻⁴)	1	1	14.1151	24.3352	0.0079
2 因子間交互作用	Phospholipid [%]*RNP/lipid [mol]	1	1	77.9284	134.3525	0.0003
	PEG-DMG [%]*Phospholipid	1	1	296.1108	510.5100	<0.0001
	CL*RNP/lipid [mol]	1	1	6.0364	10.4071	0.0321

[0142] 遺伝子ノックアウト活性 (%) について同様に統計解析を行った。遺伝子ノックアウト活性 (%) に有意に影響を与える主効果及び2因子間交互作用の結果を表12に、遺伝子ノックアウト活性 (%) に有意に影響を与える因子を変化させた際の遺伝子ノックアウト活性 (%) の予測プロファイルを図9に、それぞれ示す。PEG-DMG含有量、pH感受性カチオン性脂質の種類、及び中性リン脂質の種類が、ノックアウト活性に有意な影響を及ぼす因子として同定された。より詳細には、PEG-DMG含有量を1mol%程度にする、pH感受性カチオン性脂質をCL4H6にする、中性リン脂質をDOPEとすることによって、遺伝子ノックアウト活性が向上することが明らかとなった。特にカチオン性脂質の種類及び中性リン脂質の種類が、影響の大きい因子であった。

[0143] [表12]

	効果の検定					
	要因	パラメータ数	自由度	平方和	F値	p値 (Prob>F)
主効果	PEG-DMG[%] (1,4)	1	1	417.5155	17.2980	0.0032
	CL			1730.8645	71.7111	<0.0001
	Phospholipid	1	1	2984.3383	123.6435	<0.0001
2因子間交互作用	PEG-DMG[%]*CL	1	1	1679.3493	69.5768	<0.0001
	CL* Phospholipid	1	1	1180.6233	48.9142	0.0001

[0144] 実際に、遺伝子ノックアウト活性を向上させる条件を満たした処方であるA-7及びA-11の処方では、他の脂質ナノ粒子と比較して高いノックアウト活性を示し(図6)、RNPのIC₅₀(50%抑制濃度)は0.1nM以下(Cas9タンパク質濃度換算)であった。また、最大ノックアウト効率は95%以上に達した(図6)。

[0145] <二次スクリーニング>

一次スクリーニングの結果を受けて、二次スクリーニングを行った。実験系は、一次スクリーニングと同様の実験系で評価した。

検討項目として、pH感受性カチオン性脂質(CL)含有量(30、40、50mol%)、中性リン脂質(PL)含有量(20、35、50mol%)

%)、及びPEG-DMG含有量(1.0、2.0、3.0mol%)の3因子3水準とし、全組み合わせ27通りの内、決定的スクリーニング計画により、表13に記載の9通りの処方を選抜した。脂質組成は、pH感受性カチオン性脂質(CL)：中性リン脂質(PL)：コレステロール：PEG-DMG=X：Y：(100-X-Y)：Z(mol%) (X：表13中の「CL [%]」欄の数値、Y：表13中の「PL [%]」欄の数値)とした。pH感受性カチオン性脂質はCL4H6を、中性リン脂質はDOPEを、それぞれ用いた。

[0146] [表13]

Entry (No.)	因子			応答		
	CL [%]	PL [%]	PEG-DMG [%]	個数平均粒子径 [nm]	封入率 [%]	KO 活性 [%]
B-1	30	20	1	379.6	83.6	77.6
B-2	30	35	2	137.2	85.1	65.7
B-3	30	50	3	93.3	83.2	42.5
B-4	40	20	2	134.4	84.4	70.6
B-5	40	35	3	41.4	88.6	52.0
B-6	40	50	1	253.6	96.6	87.8
B-7	50	20	3	75.6	84.5	49.5
B-8	50	35	1	243.4	97.4	84.6
B-9	50	50	2	100.7	94.1	73.2

[0147] 脂質成分と脂質とRNPの比率を表13の処方とした以外は、一次スクリーニングと同様にして、GFPノックアウト用のRNP搭載脂質ナノ粒子を製造し、得られたRNP搭載脂質ナノ粒子の個数平均粒子径(nm)、PdI、gRNA及びssONの脂質ナノ粒子への封入率(%)を測定した。さらに、一次スクリーニングと同様にして、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、HeLa-GFP細胞に添加し、GFPノックアウト効率(%)を測定した。結果を表13に示す。

[0148] 個数平均粒子径に関して統計解析を行った。個数平均粒子径に有意に影響を与える主効果の結果を表14に、個数平均粒子径に有意に影響を与える因子を変化させた際の個数平均粒子径の予測プロファイルを図10に、それぞれ示す。PEG脂質量を増加させることによって、粒子径を小さく制御できることが明らかとなった。

[0149] [表14]

	効果の検定					
	要因	パラメータ数	自由度	平方和	F値	p値(Prob>F)
主効果	PEG-DMG[%](1,2,3)	2	2	80497.321	17.6005	0.0031

[0150] 封入率について同様に統計解析を行った。封入率に有意に影響を与える主効果の結果を表15に、封入率に有意に影響を与える因子を変化させた際の封入率の予測プロファイルを図11に、それぞれ示す。この結果、pH感受性カチオン性脂質含有量を増加させる、中性リン脂質含有量を増加させる、又はPEG-DMG含有量を減少させることによって、封入率が向上することが明らかとなった。

[0151] [表15]

	効果の検定					
	要因	パラメータ数	自由度	平方和	F値	p値(Prob>F)
主効果	CL[%](30,40,50)	2	2	0.00866781	189.1389	0.0053
	PL[%](20,35,50)	2	2	0.00624187	136.2028	0.0073
	PEG-DMG[%](1,2,3)	2	2	0.00665894	145.3037	0.0068

[0152] 遺伝子ロックアウト活性(%)について同様に統計解析を行った。遺伝子ロックアウト活性(%)に有意に影響を与える主効果の結果を表16に、遺伝子ロックアウト活性(%)に有意に影響を与える因子を変化させた際の遺伝子ロックアウト活性(%)の予測プロファイルを図12に、それぞれ示す。PEG-DMG含有量を減少させる、又はpH感受性カチオン性脂質含有量を40mol%以上に増加させることによって、遺伝子ロックアウト活性が向上することが明らかとなった。

[0153] [表16]

	効果の検定					
	要因	パラメータ数	自由度	平方和	F値	p値(Prob>F)
主効果	CL[%](30,40,50)	2	2	119.4482	19.6730	0.0085
	PEG-DMG[%](1,2,3)	2	2	1908.5049	314.3286	<0.0001

[0154] これらの結果から、pH感受性カチオン性脂質としてCL4H6を用い、かつその含有量を40~50mol%とし、中性リン脂質としてDOPEを

用い、かつその含有量を20~50mol%とし、PEG脂質量を1.5~2.0mol%とし、RNP/lipid比を 3.6×10^{-4} mol以上とすることによって、個数平均粒子径が小さく、RNPの封入効率が高く、遺伝子ノックアウト活性(%)も高い良好なRNP搭載脂質ナノ粒子が得られることがわかった。

[0155] [実施例3]

実施例2で製造したRNP搭載脂質ナノ粒子B-4及びB-9について、細胞毒性や保存安定性を調べた。

[0156] <細胞毒性の評価>

各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHeLa-GFP細胞の培地に、Cas9タンパク質濃度が0.3、0.5、又は1nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から1日後に、WST-8アッセイを行った。WST-8アッセイは、細胞数測定用キット(製品名:「Cell Counting Kit-8」、同仁化学社製)を用いて行った。RNP搭載脂質ナノ粒子に代えてPBS(-)をHeLa-GFP細胞の培地に添加した細胞をコントロールとして、同様にWST-8アッセイを行った。

[0157] 各RNP搭載脂質ナノ粒子を添加した細胞の細胞生存率([RNP搭載脂質ナノ粒子を添加した細胞のWST-8アッセイの測定値] / [コントロール細胞のWST-8アッセイの測定値] × 100:%)を算出した。結果を図13に示す。RNP搭載脂質ナノ粒子の量にかかわらず、RNP搭載脂質ナノ粒子B-4及びB-9を導入させた細胞の細胞生存率はほぼ100%であった。すなわち、これらのRNP搭載脂質ナノ粒子は、HeLa細胞においては、顕著な細胞毒性を示さなかった。

[0158] <保存安定性の評価>

実施例2と同様にして製造したRNP搭載脂質ナノ粒子B-9を、4℃で保存し、保存後の物性とノックアウト活性を調べた。具体的には、経時的にゼータ電位とPDIを測定した。また、4℃保存前と4℃で2週間保存した後のRNP搭載脂質ナノ粒子B-9を、Cas9タンパク質濃度が0.3n

Mとなるように培地に添加することによってHeLa-GFP細胞に導入し、GFPノックアウト活性を調べた。ゼータ電位、Pdl、及びGFPノックアウト活性は、実施例1と同様にして測定した。

[0159] ゼータ電位とPdlの測定結果を図14に、GFPノックアウト活性の測定結果を図15に、それぞれ示す。この結果、RNP搭載脂質ナノ粒子B-9は、4℃で保存することにより、製造後少なくとも2週間は物性とノックアウト活性の両方が、保存前と同程度の状態が維持されていた。これらの結果から、本発明に係るRNP搭載脂質ナノ粒子が実用上十分な保存安定性を有していることが確認された。

[0160] [実施例4]

RNP搭載脂質ナノ粒子に搭載するssONの塩基長が、ノックアウト活性に与える影響を調べた。

[0161] GFPノックアウト用のssONとして、実施例2でも用いた132塩基長のDNA（配列番号5）、20塩基長のDNA（配列番号5の68～87番目の領域と同一の塩基配列）、60塩基長のDNA（配列番号5の48～107番目の領域と同一の塩基配列）、又は60塩基長のDNAをRNAとしたもの（配列番号7）を用いた。

[0162] まず、ssONとして、132塩基長のDNA、20塩基長のDNA、60塩基長のDNA、又は60塩基長のRNAを用いた以外は実施例2と同様にしてRNP搭載脂質ナノ粒子B-9及びB-4を製造した。次いで、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHeLa-GFP細胞の培地に、Cas9タンパク質濃度が0.1nM又は0.3nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から2日後に培地交換した後、さらに3日間培養した後に細胞を回収して、フローサイトメトリーによりGFPノックアウト効率（%）（細胞全体に占める、GFP蛍光を発していない細胞の割合（%））を測定した。Cas9タンパク質濃度が0.1nMとなるようにRNP搭載脂質ナノ粒子を導入した細胞の結果を図16Aに、Cas9タンパク質濃度が0.3nMとなるようにRNP搭載脂質ナノ粒子を

導入した細胞の結果を図16Bに、それぞれ示す。

[0163] この結果、RNP搭載脂質ナノ粒子B-4及びB-9のいずれにおいても、ssONの塩基長が長くなるほど、遺伝子ノックアウト活性が増大する傾向が観察された。また、同じ塩基長の場合、ssONがDNAの場合よりもRNAのほうが、ノックアウト活性が高い傾向も観察された。

[0164] [実施例5]

Cas9に代えて、RNA依存性DNAヌクレアーゼCpf1を搭載した脂質ナノ粒子を製造し、その遺伝子ノックアウト活性を調べた。

[0165] まず、Cas9タンパク質に代えて、Cpf1タンパク質（製品名：「Alt-R A.s. Cas12a (Cpf1) Ultra」、Integrated DNA technologies社製）を用い、gRNAとして、参考例1で用いたcrRNAとtracrRNAに代えて、41塩基長のRNA（配列番号8）又は100塩基長のRNA（配列番号9）を用い、ssONとして、120塩基長のRNA（配列番号10）又は60塩基長のRNA（配列番号10の27～86番目の領域と同一の塩基配列。配列番号11）を用いた以外は、実施例2と同様にして、RNP搭載脂質ナノ粒子B-9を製造した。次いで、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHeLa-GFP細胞の培地に、Cpf1タンパク質濃度が0.5、1、又は2nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から2日後に培地交換した後、さらに3日間培養した後に細胞を回収して、フローサイトメトリーによりGFPノックアウト効率（%）（細胞全体に占める、GFP蛍光を発していない細胞の割合（%））を測定した。

[0166] GFPノックアウト効率の測定結果を図17に示す。図中、「NT」はRNP搭載脂質ナノ粒子を添加しない培地で培養した細胞の結果を示す。「gGFP」は、41塩基長のRNA（配列番号8）を用いたRNP搭載脂質ナノ粒子を添加しない培地で培養した細胞の結果、「gGFP+59」は、100塩基長のRNA（配列番号9）を用いたRNP搭載脂質ナノ粒子を添加しない培地で培養した細胞の結果を、それぞれ示す。「ssON」欄中、「

ー」は、ssONを含まないRNP搭載脂質ナノ粒子を添加しない培地で培養した細胞の結果を示す。また、0.5 nM、1 nM、2 nMの各カラムは、それぞれ、RNP搭載脂質ナノ粒子をCpf1タンパク質濃度が0.5、1、又は2 nMとなるように培地に添加した細胞の結果を示す。

[0167] 図17に示すように、Cas9タンパク質を用いた場合と同様に、RNPにssONを加えることにより、GFPノックアウト活性が改善された。また、添加するssONの塩基長が長いほど、ノックアウト活性が増大する傾向が観察された。これらの結果から、本発明に係る脂質ナノ粒子は、CRISPER/Cas9システムのみならずCRISPER/Cpf1システムにおけるRNPを導入するキャリアとして有用であることが明らかである。

[0168] [実施例6]

Cas9によるオフターゲット効果（標的としないgRNA領域への変異導入）を減少させる手法として、RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性の一方を不活化したCas9ニッカーゼ（Cas9n）を2対組み合わせて使用するダブルニッキング法が知られている。このダブルニッキング法に使用するRNPを搭載した脂質ナノ粒子を製造し、その遺伝子ノックアウト活性を調べた。

[0169] まず、Cas9タンパク質に代えて、Cas9nタンパク質（製品名：「Alt-R S.p. Cas9 D10A Nickase V3」、Integrated DNA technologies社製）を用い、gRNAとして、参考例1で使用したtracrRNAと、GFP遺伝子中の第1の標的配列と相補的な塩基配列を含むcrRNA（配列番号12、36塩基長）と第2の標的配列と相補的な塩基配列を含むcrRNA（配列番号13、36塩基長）を用い、ssONを使用しなかったこと以外は、実施例2と同様にして、RNP搭載脂質ナノ粒子B-9を製造した。比較対象として、実施例2と同様にして、Cas9タンパク質を含むRNPを搭載したRNP搭載脂質ナノ粒子B-9を製造した。

[0170] 次いで、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHeLa-GFP細胞の培地に、Cas9nタンパク質又はCas9タンパク質の濃度が0.

1、0.3、1、又は2 nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から2日後に培地交換した後、さらに3日間培養した後に細胞を回収して、フローサイトメトリーによりGFPノックアウト効率（%）（細胞全体に占める、GFP蛍光を発していない細胞の割合（%））を測定した。

[0171] 測定結果を、図18に示す。Cas9タンパク質を搭載したRNP搭載脂質ナノ粒子も、Cas9タンパク質を搭載したRNP搭載脂質ナノ粒子と同様に高いGFPノックアウト活性があった。特に、Cas9タンパク質濃度が2 nMとなるように添加した細胞では、GFPノックアウト効率は98%であった。この結果から、本発明に係る特定の脂質組成の脂質ナノ粒子は、Cas9タンパク質を用いたダブルニッキング法におけるRNPを導入するキャリアとして有用であることが明らかであり、このダブルニッキング法におけるRNPに、さらに、それぞれのgRNAとハイブリダイズするssONを含有させたRNPも、ダブルニッキング法におけるRNPを導入するキャリアとしても有用であることが示唆された。

[0172] [実施例7]

実施例2で製造したRNP搭載脂質ナノ粒子B-4及びB-9について、GFP安定発現HEK（HEK-GFP）細胞に導入して、ノックアウト活性、ノックイン活性、及び細胞毒性を調べた。

[0173] <GFPノックアウト活性の測定>

まず、実施例2と同様にして、GFPノックアウト用のssONを含むRNP搭載脂質ナノ粒子B-9及びB-4を製造した。次いで、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHEK-GFP細胞の培地に、Cas9タンパク質濃度が0.5、1、3、又は5 nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から3日後に培地交換した後、さらに3日後に細胞を回収して、フローサイトメトリーにより、ノックアウト効率（%）（細胞全体に占める、GFP蛍光を発していない細胞の割合（%））を測定した。測定結果を図19Aに示す。RNP搭載脂質ナノ粒子B-9及び

B-4のどちらを導入した細胞でも、最大で約97%のノックアウト効率であった。

[0174] <GFPノックイン活性の測定>

まず、GFPノックアウト用のssONに代えて、実施例1で使用したGFPノックイン用のssONを用いた以外は実施例2と同様にして、RNP搭載脂質ナノ粒子B-9及びB-4を製造した。次いで、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前記のGFPノックアウト活性の測定と同様にHEK-GFP細胞に導入して培養した後、回収してフローサイトメトリーを行い、ノックイン効率(%) (細胞全体に占める、BFP蛍光を発している細胞の割合(%))を測定した。測定結果を図19Bに示す。RNP搭載脂質ナノ粒子B-9及びB-4のどちらを導入した細胞でも、最大で約23%のノックイン効率であった。

[0175] <細胞毒性>

各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHEK-GFP細胞の培地に、Cas9タンパク質濃度が0.5、1、2、3、4、又は5nMとなるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から1日後に、実施例3と同様にしてWST-8アッセイを行い、細胞生存率(%)を測定した。結果を図20に示す。RNP搭載脂質ナノ粒子の量にかかわらず、RNP搭載脂質ナノ粒子B-4及びB-9を導入させた細胞の細胞生存率はほぼ100%であった。すなわち、これらのRNP搭載脂質ナノ粒子は、HEK細胞においてもHeLa細胞と同様に、顕著な細胞毒性を示さなかった。

[0176] [実施例8]

実施例2で製造したRNP搭載脂質ナノ粒子B-9について、GFPを恒常発現している骨髄由来マクロファージ(BMDM)に導入して、GFPノックアウト活性を調べた。

[0177] <GFP恒常発現BMDM>

GFPを恒常発現しているBMDMは、GFP恒常発現マウス(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウス) (雌、6週齢)から回収したものをを用いた。具体的には

、GFP恒常発現マウスの大腿骨及び脛骨から骨髓細胞を採取し、 $40\ \mu\text{m}$ セルストレーナーを通した後、可溶化バッファー（製品名：「ACK lysing buffer」、Gibco社製）を用いて赤血球を除去した。次いで、当該骨髓細胞を、recombinant mouse M-CSF（終濃度： $50\ \text{ng}/\text{mL}$ 、BioLegend社製）及び非働化FBS（終濃度：10%）を含む培地で7日間培養することによって、BMDMを得た。

[0178] <GFPノックアウト活性の測定>

まず、実施例2と同様にして、GFPノックアウト用のssONを含むRNP搭載脂質ナノ粒子B-9を製造した。次いで、RNP搭載脂質ナノ粒子を、BMDMを培養している培地に、Cas9タンパク質濃度が $8\ \text{nM}$ となるように添加し、培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から1日後に培地交換した後、さらに2日後に細胞を回収して、フローサイトメトリーを行った。

[0179] RNP搭載脂質ナノ粒子を導入する前のBMDMのフローサイトメトリーの結果を図21(A)に、RNP搭載脂質ナノ粒子を導入した後のBMDMのフローサイトメトリーの結果を図21(B)に、それぞれ示す。RNP搭載脂質ナノ粒子導入前のBMDMは、ほぼ全ての細胞がGFPの蛍光を発していたが、RNP搭載脂質ナノ粒子導入後のBMDMでは、GFP蛍光を発さない細胞の割合が増大していた。これらの結果から、本発明に係る脂質ナノ粒子は、生体から採取された細胞に対しても、ゲノム編集等に用いられるRNPを導入するキャリアとして有用であることが明らかである。

[0180] [実施例9]

参考例1等で使用された図2に記載されている製造装置のミキサー内蔵マイクロ流路104が、図1Bに示すような三つの導入路を有する流路107に置換された装置を用いて、RNP搭載脂質ナノ粒子を製造し、物性とGFPノックアウト活性を調べた。

[0181] <RNP搭載脂質ナノ粒子B-9の製造>

図1Bと同様に、第1の導入路（図中、上方の導入路）から脂質のエタノ

ール溶液を、第2の導入路（図中、下方の導入路）からRNP溶液を、第3の導入路（図中、中央の導入路）からPBS（-）を、それぞれのFRR（流速比：[脂質のエタノール溶液の流速（x）] / [PBS（-）の流速（y）] / [RNP溶液の流速（z）]）が表17に記載の通りとなるように導入した以外は、実施例2と同様にして、RNP搭載脂質ナノ粒子B-9を製造した。なお、表16中、FRRが $x/y/z=9/0/1$ の場合には、参考例1で用いた2つの導入路の製造装置を用いて製造した。

[0182] 得られたRNP搭載脂質ナノ粒子の個数平均粒子径（nm）、PdI、gRNA及びssONの脂質ナノ粒子への封入率（%）を、実施例1と同様にして測定した。測定結果を表17に示す。この結果、3つの導入路を有する製造装置を用いた場合でも、2つの導入路を有する製造装置を用いた実施例2で得られたRNP搭載脂質ナノ粒子と同等以上の物性のRNP搭載脂質ナノ粒子を製造することができた。

[0183] [表17]

FRR (x/y/z)	個数平均粒子径 [nm]	PdI	封入率 [%]
9/0/1	147.4	0.213	95.0
8/1/1	130.5	0.121	94.8
7/2/1	115.8	0.134	95.2
6/3/1	115.2	0.128	93.6
5/4/1	131.1	0.117	94.6

[0184] 製造後の製造装置を確認したところ、参考例1で用いた2つの導入路の製造装置を使用した場合には、希釈流路の入り口付近において、脂質のエタノール溶液とRNP溶液との界面上に凝集物が形成されていた。これに対して、3つの導入路を有する製造装置を用いて、中央の導入路からPBSを導入して製造した場合には、希釈流路に凝集物は確認されなかった。

[0185] 得られたRNP搭載脂質ナノ粒子を、実施例4と同様にして、培地にCas9タンパク質濃度が0.1、0.3、又は1nMとなるように添加してHeLa-GFP細胞に導入して、GFPノックアウト活性を調べた。結果を図22に示す。いずれのRNP搭載脂質ナノ粒子も、実施例2で得られたRNP搭載脂質ナノ粒子と同等以上のGFPノックアウト活性を有していた。

[0186] これらの結果から、図1Bに示すような3つの導入路を有するミキサー内蔵マイクロ流路を用いることにより、十分な物性と遺伝子ノックアウト活性を示すRNP搭載脂質ナノ粒子を、ミキサー内蔵マイクロ流路内での凝集物の生成を回避して、安定的に製造できることが確認された。

[0187] [実施例10]

RNP搭載脂質ナノ粒子の製造時のRNP溶液のpHが、製造されたRNP搭載脂質ナノ粒子のノックアウト活性に与える影響を調べた。

[0188] RNP溶液を調製する際の緩衝液として、pH6.0又は6.3の緩衝液はMES緩衝液(20mM MES、50mM NaCl、pH6.0又は6.3)を用い、pH4.0、5.0、又は5.5の緩衝液はクエン酸緩衝液(20mM クエン酸、50mM NaCl、pH4.0、5.0、又は5.5)を用いた以外は、実施例2で製造したRNP搭載脂質ナノ粒子B-9と同様にして、Cas9タンパク質を含有するRNP搭載脂質ナノ粒子を調製した。また、Cas9タンパク質に代えて、実施例5で使用したCpf1タンパク質を用いた以外は同様にして、Cpf1タンパク質を含有するRNP搭載脂質ナノ粒子を調製した。

[0189] 次に、各RNP搭載脂質ナノ粒子を、前日に播種したHeLa-GFP細胞の培地に、Cas9タンパク質濃度が0.1nM又は0.3nMとなるように、又はCpf1タンパク質濃度が0.5nM、1.0nM、又は2.0nMとなるように、添加して培養を行った。RNP搭載脂質ナノ粒子添加から2日後に培地交換した後、さらに3日間培養した後に細胞を回収して、フローサイトメトリーによりGFPノックアウト効率(%) (細胞全体に占める、GFP蛍光を発していない細胞の割合(%))を測定した。Cas9タンパク質を含有するRNP搭載脂質ナノ粒子を導入した細胞の結果を図23Aに、Cpf1タンパク質を含有するRNP搭載脂質ナノ粒子を導入した細胞の結果を図23Bに、それぞれ示す。

[0190] この結果、Cas9タンパク質とCpf1タンパク質のいずれを含有するRNP搭載脂質ナノ粒子でも、調製時のpHが5.0以上の場合に、遺伝子

ノックアウト活性が保持されていた。

符号の説明

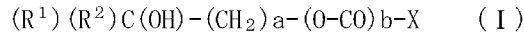
[0191] 10…第1導入路、20…第2導入路、30 希釈流路、31…合流点、40…構造子、50…屈曲した流路部位、60…第3導入路、101、102…シリンジ、103…流量制御装置、104…ミキサー内蔵マイクロ流路、104a…第1導入路の注入口、104b…第2導入路の注入口、104c…希釈流路、104d…希釈流路の注出口、105…チューブ、106…回収容器、107…カオティックミキサー内蔵マイクロ流路、107a…第1導入路の注入口、107b…第2導入路の注入口、107c…希釈流路、107d…希釈流路の注出口。

請求の範囲

[請求項1] 脂質成分と、DNAヌクレアーゼと、ガイドRNAと、一本鎖オリゴヌクレオチドと、を含有し、

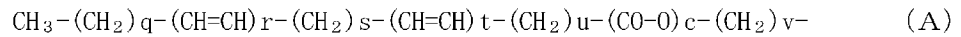
前記脂質成分が、下記一般式(1)

[化1]



[式(1)中、aは3～5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立に下記一般式(A)：

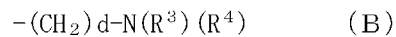
[化2]



(式(A)中、qは1～9の整数を示し；rは0又は1を示し；sは1～3の整数を示し；tは0又は1を示し；uは1～8の整数を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示し；q+2r+s+2t+u+c+vが19以上の整数であるが、bとcが同時に0となる場合には、qが3～5の整数であり、r及びtが1であり、sが1であり、かつu+vが6～10の整数である場合を除く)

で表される基を示し；Xは、下記一般式(B)：

[化3]



(式(B)中、dは0～3の整数を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基(該C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい)を示すが、R³及びR⁴は互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環(該環の1個又は2個の水素原子が、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい)を形成してもよい)

で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基(ただし、該基は炭素

原子により(0-C0)b-に結合し、該環の1個又は2個の水素原子が、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい)を示す]

で表されるpH感受性カチオン性脂質と、中性リン脂質と、ポリアルキレングリコール修飾脂質と、を含有し、

脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記pH感受性カチオン性脂質の割合が30～50モル%であり、

脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記中性リン脂質の割合が20～50モル%であり、

脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合が1～4モル%である、脂質ナノ粒子。

[請求項2] 前記中性リン脂質が、炭素数12～24の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を有する中性グリセロリン脂質である、請求項1に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項3] 前記中性リン脂質が、炭素数12～24の不飽和の脂肪酸残基を有するホスファチジルエタノールアミンである、請求項1に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項4] 前記pH感受性カチオン性脂質が、ポリエチレングリコール修飾脂質である、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項5] 前記DNAヌクレアーゼが、Cas9タンパク質であり、
前記ガイドRNAが、crRNAとtracrRNAとからなる、
請求項1～4のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項6] 前記Cas9タンパク質が、RuvCヌクレアーゼ活性とHNHヌクレアーゼ活性のいずれか一方のみを有するタンパク質である、請求項5に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項7] 前記DNAヌクレアーゼが、Cpf1タンパク質である、請求項1～4のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項8] 請求項1～7のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子を細胞内へ導入

する、ゲノム編集方法。

[請求項9]

請求項1～7のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子を、流路構造体を用いて製造する方法であって、

前記流路構造体が、互いに独立した、第1の流動体を導入する第1導入路と、第2の流動体を導入する第2導入路とが、それぞれ一定長を有して合流して1つの希釈流路を形成しており、

前記希釈流路は、少なくともその一部において二次元的に屈曲した流路部位を有し、

当該屈曲した流路部位は、これより上流の希釈流路の軸線方向ないしその延長方向をX方向と、このX方向と垂直に交差する希釈流路の幅方向をY方向とし、これより上流の希釈流路の流路幅を y_0 とした場合に、Y方向において対向する希釈流路の両側壁面より交互に、流路中心側に向かって、略Y方向（略+Y方向、略-Y方向）に、 $1/2 y_0$ 以上 $1 y_0$ 未満の一定高さ h_1 、 $h_2 \dots$ を有し、かつX方向に一定幅 x_1 、 $x_2 \dots$ を有して突出し、希釈流路の流路幅を規制する構造子が、一定間隔 d_1 、 $d_2 \dots$ をもって少なくとも2つ以上設けられていることで形成されており、

前記第1導入路より前記脂質成分をエタノールに溶解させた脂質溶液を、前記第2導入路より前記DNAヌクレアーゼと前記ガイドRNAと前記一本鎖オリゴヌクレオチドとを含有するpHが5.0以上の水溶液を、総流量が $1 \mu\text{L}/\text{分} \sim 100 \text{mL}/\text{分}$ であり、かつ前記脂質溶液の流速に対する前記水溶液の流速の比が7以上である、脂質ナノ粒子の製造方法。

[請求項10]

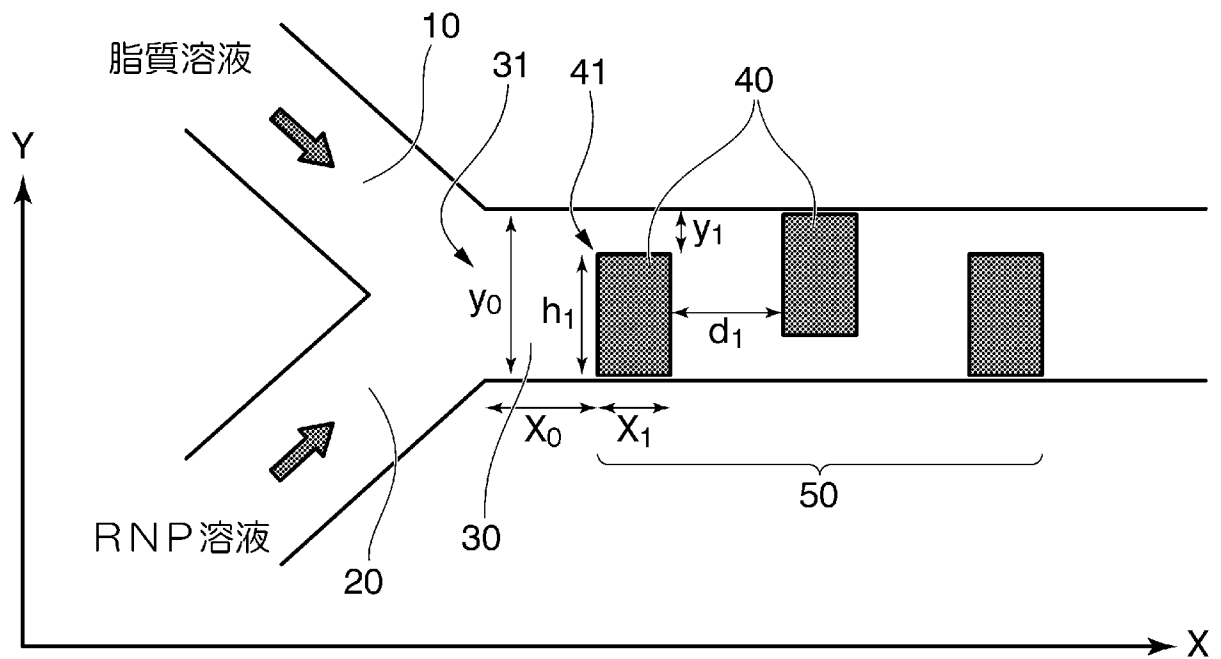
前記流路構造体が、さらに、第3の流動体を導入する第3導入路を有しており、

前記第1導入路から導入された第1の流動体が、前記第2導入路から導入された第2の流動体と合流する前に、前記第3導入路から導入された第3の流動体と接触するように、前記第1導入路と前記第2導

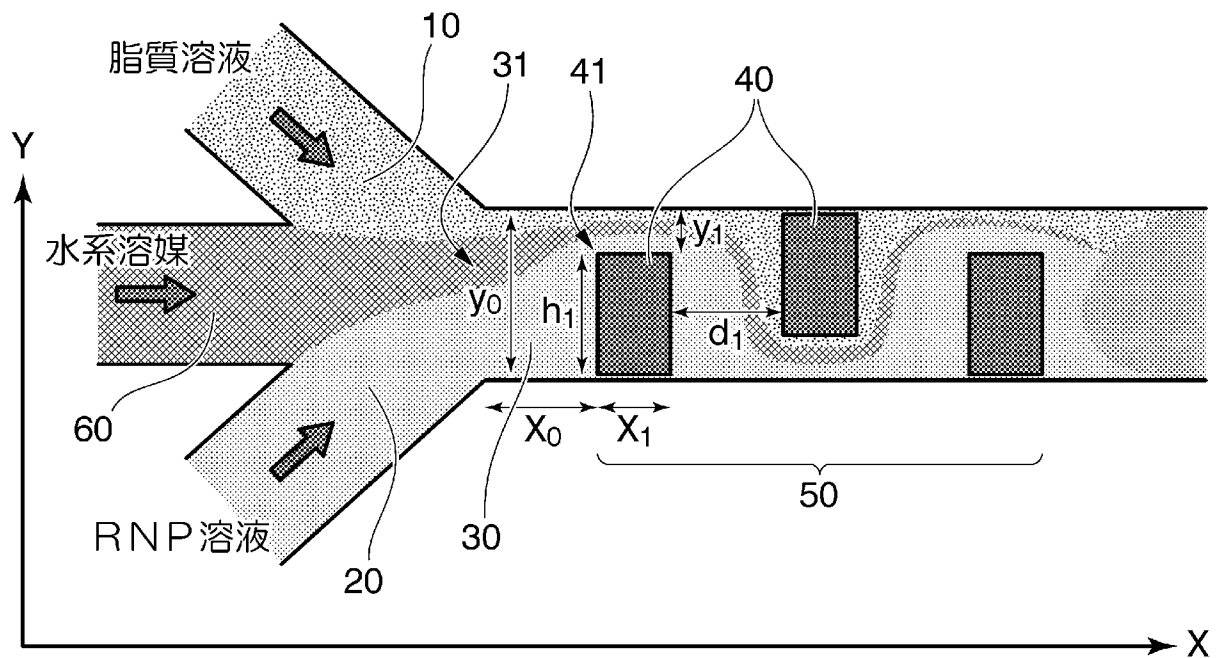
入路と前記第3導入路とが、それぞれ一定長を有して合流して1つの希釈流路を形成している、請求項9に記載の脂質ナノ粒子の製造方法

。

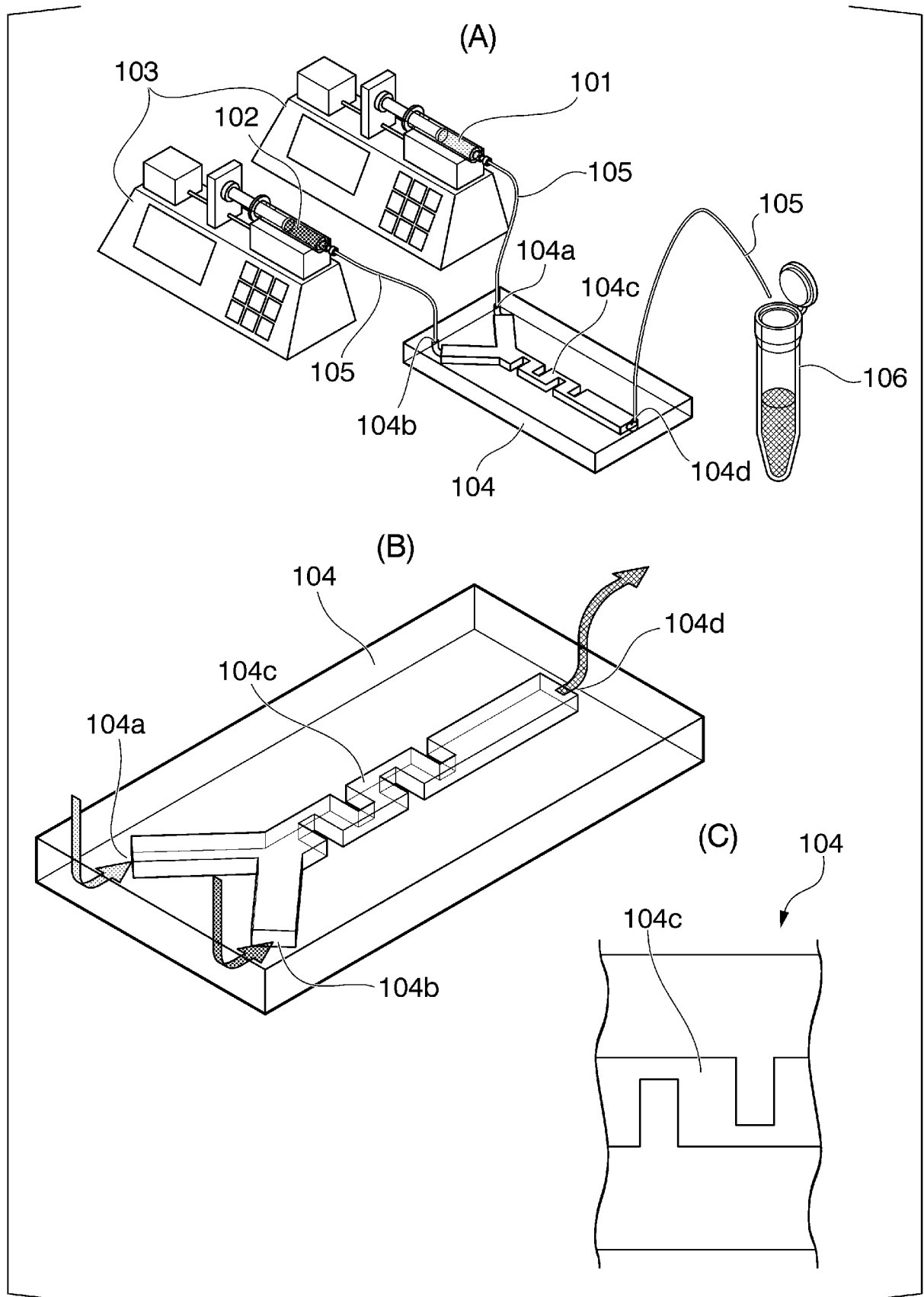
[図1A]



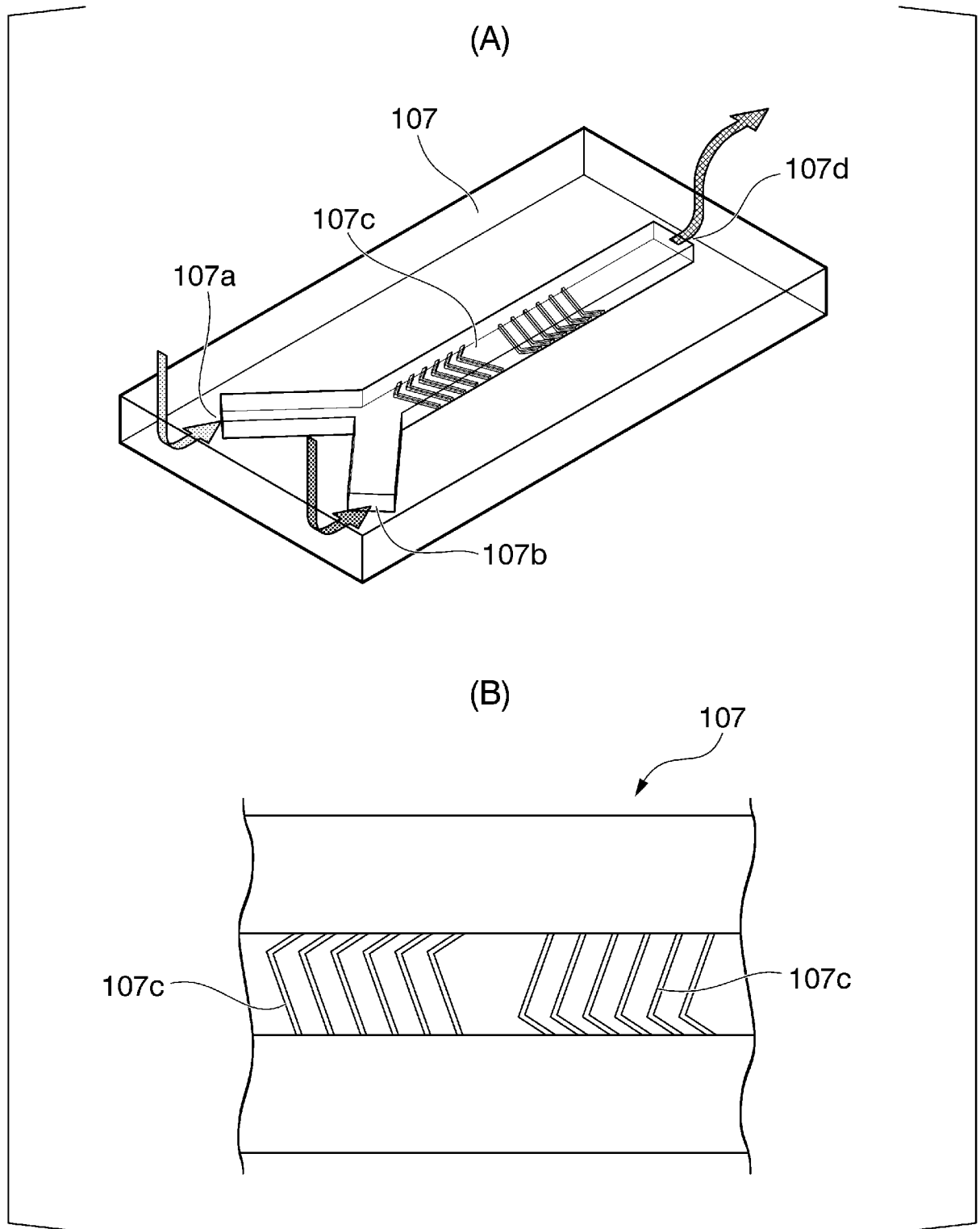
[図1B]



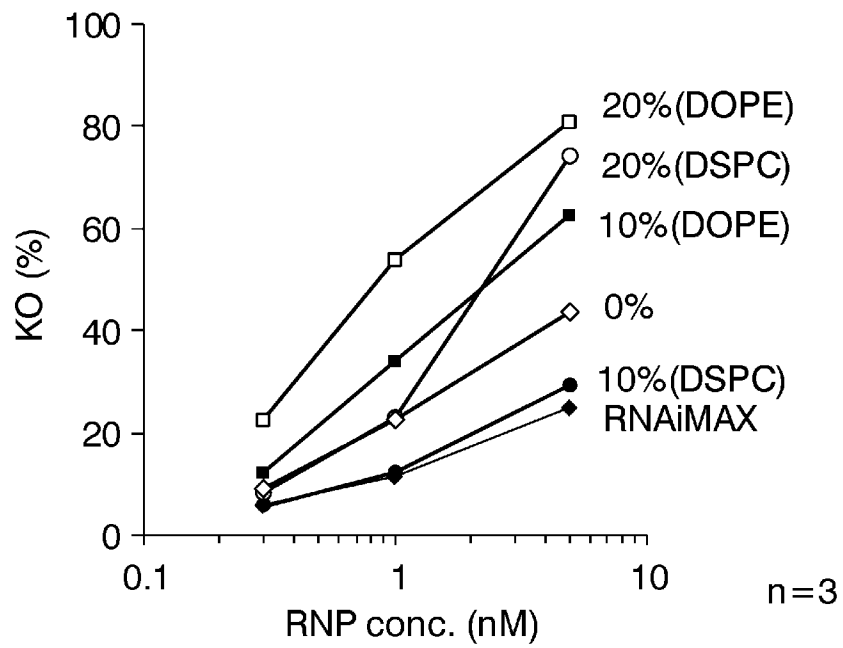
[図2]



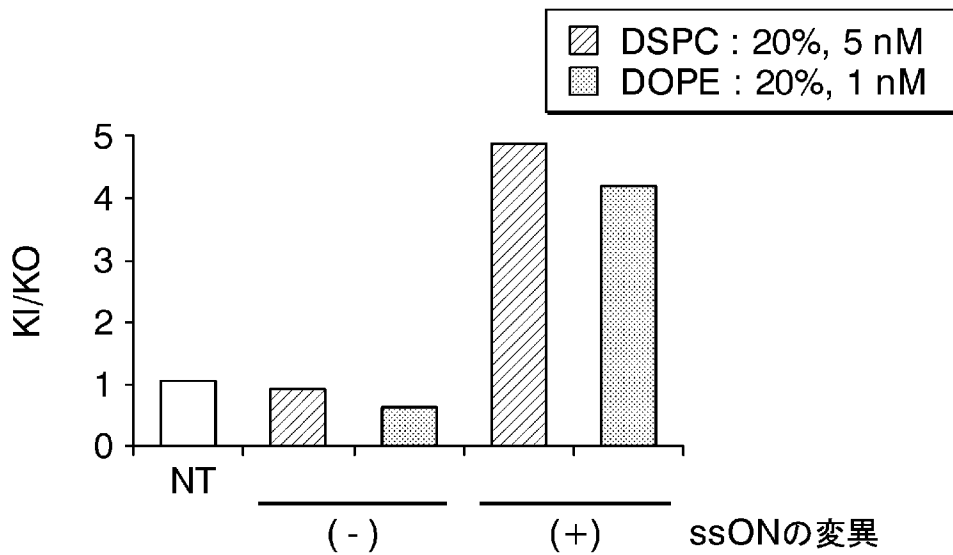
[図3]



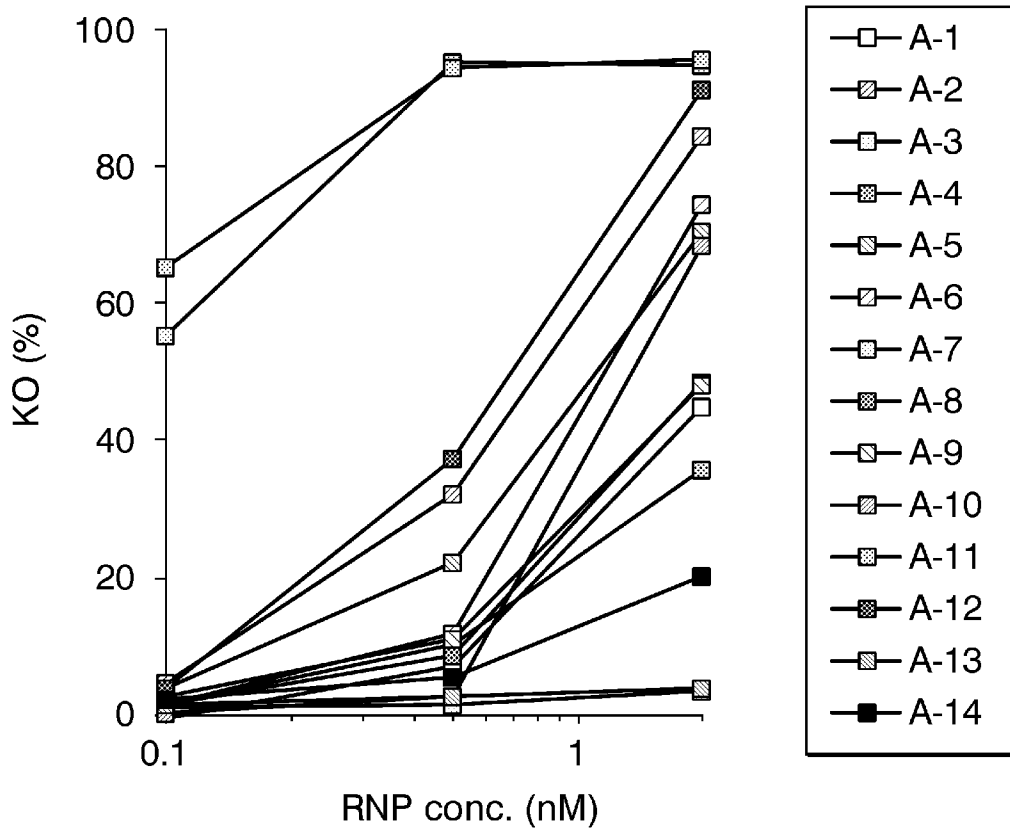
[図4]



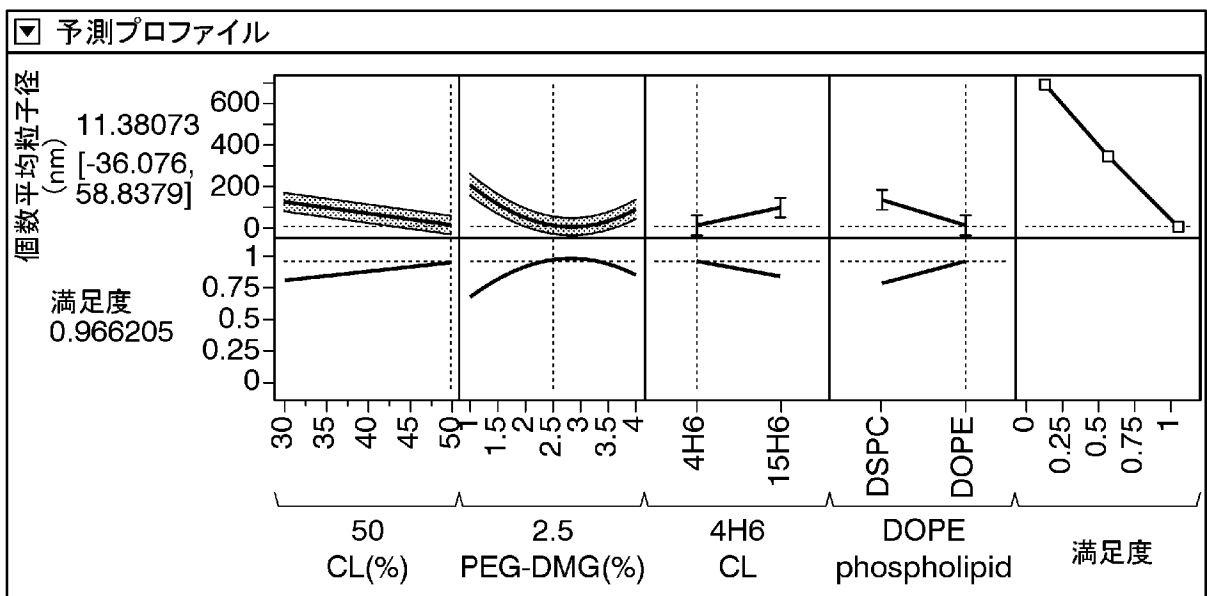
[図5]



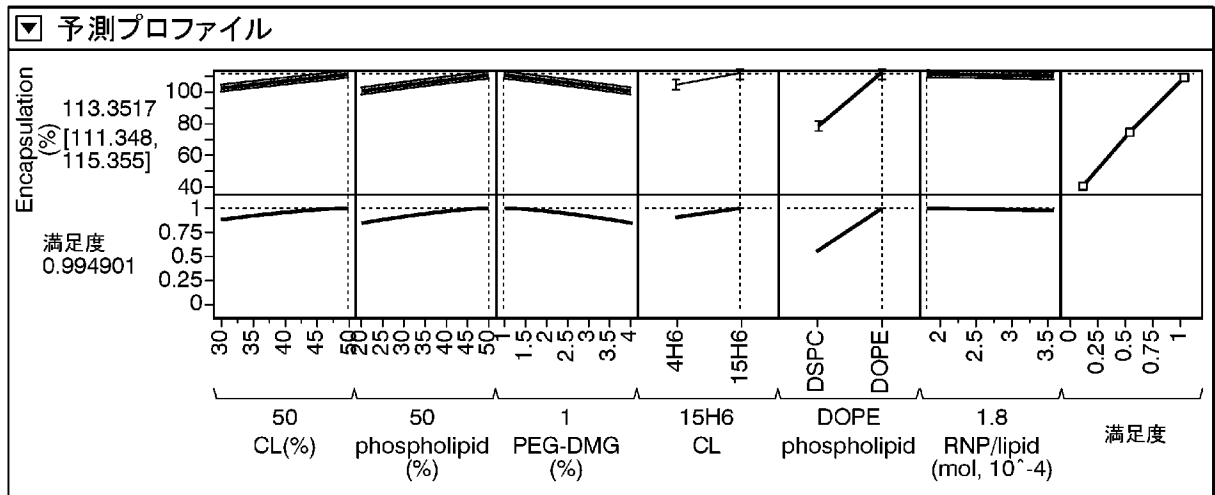
[図6]



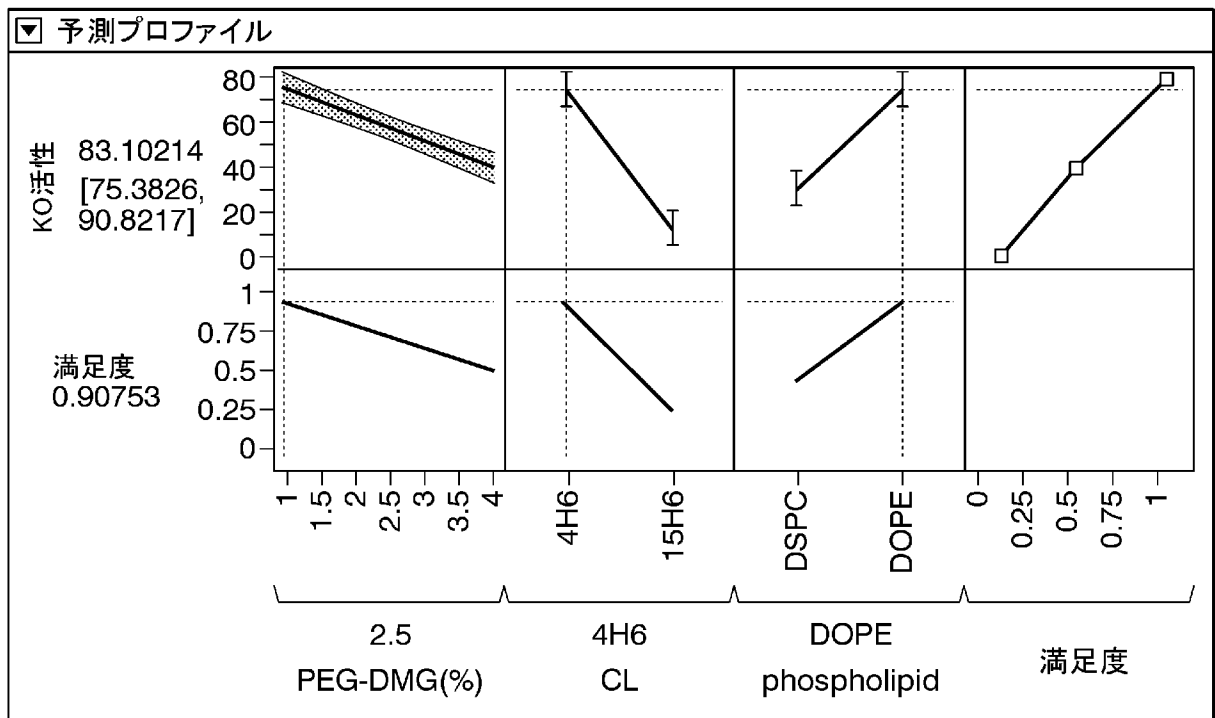
[図7]



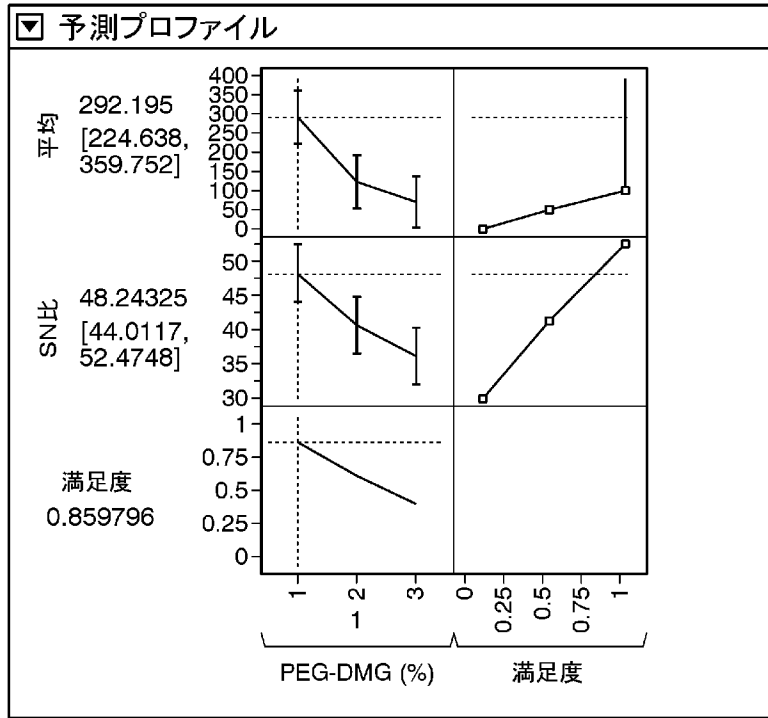
[図8]



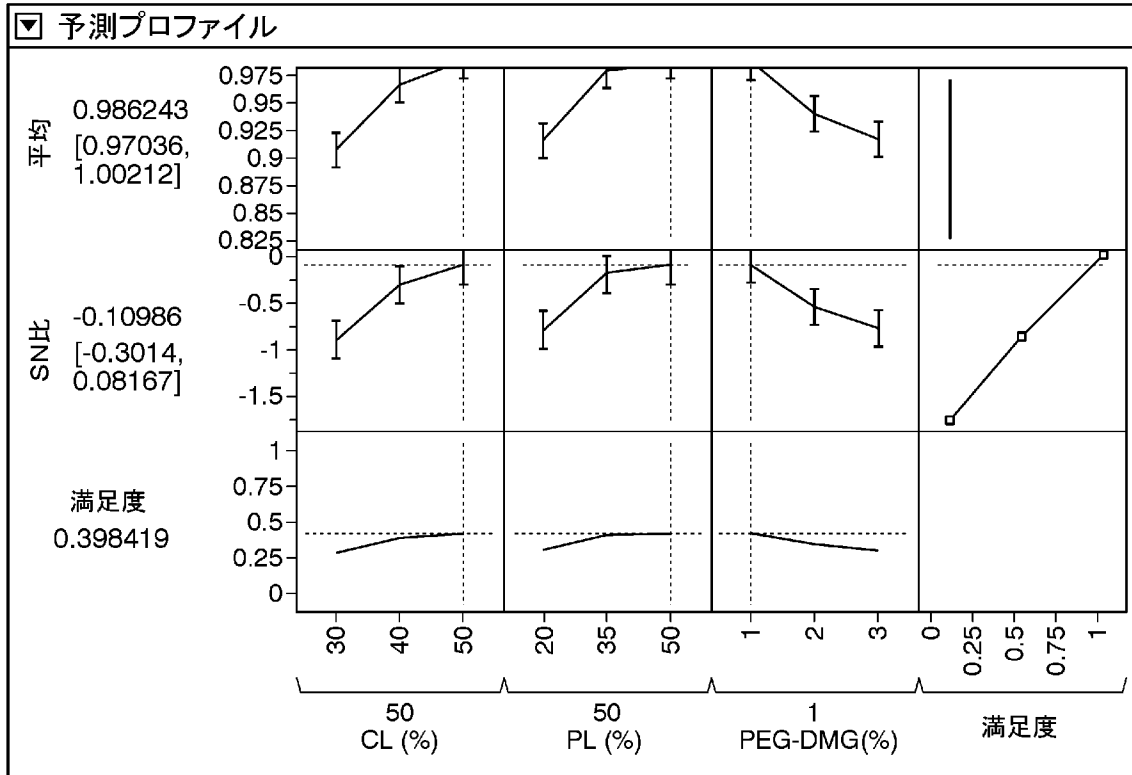
[図9]



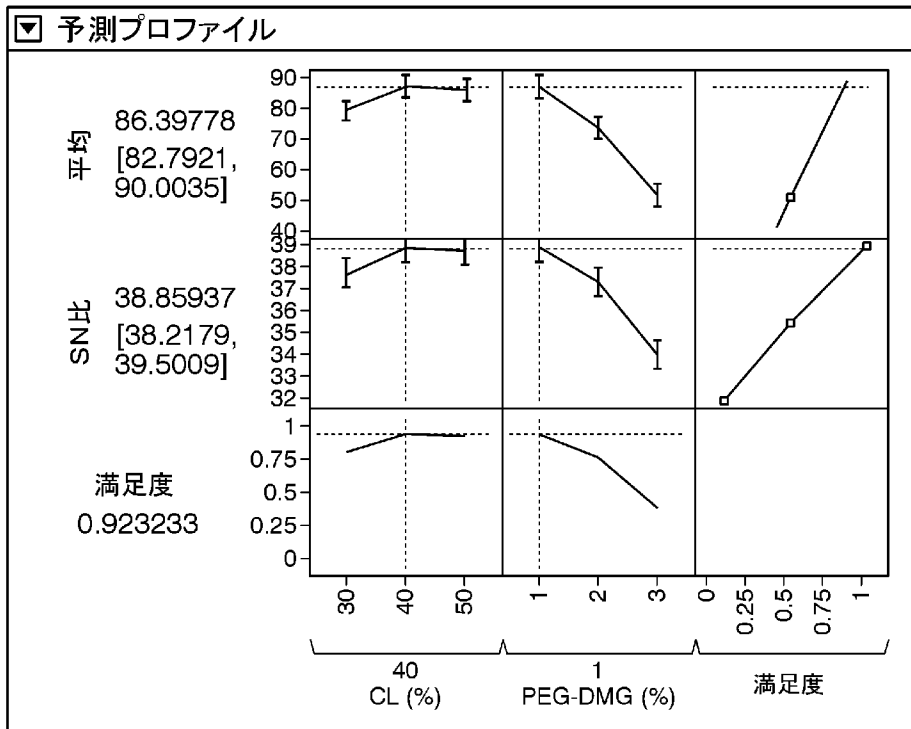
[図10]



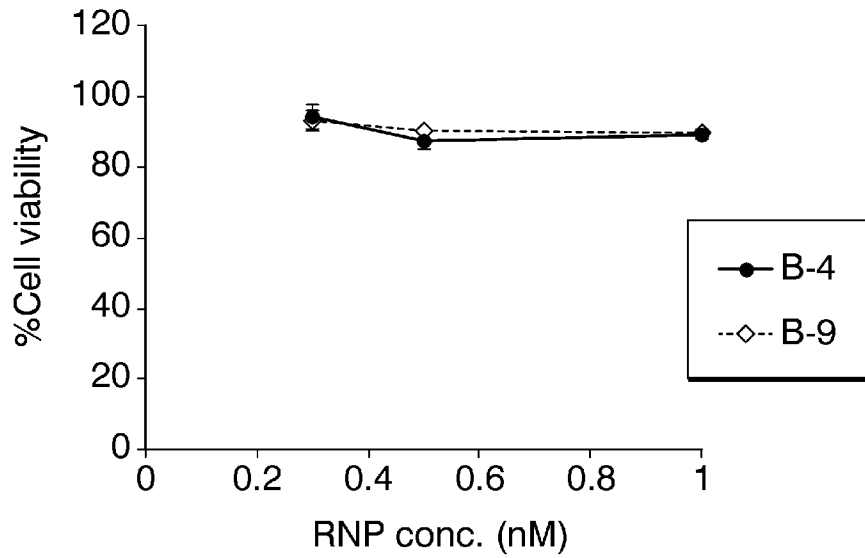
[図11]



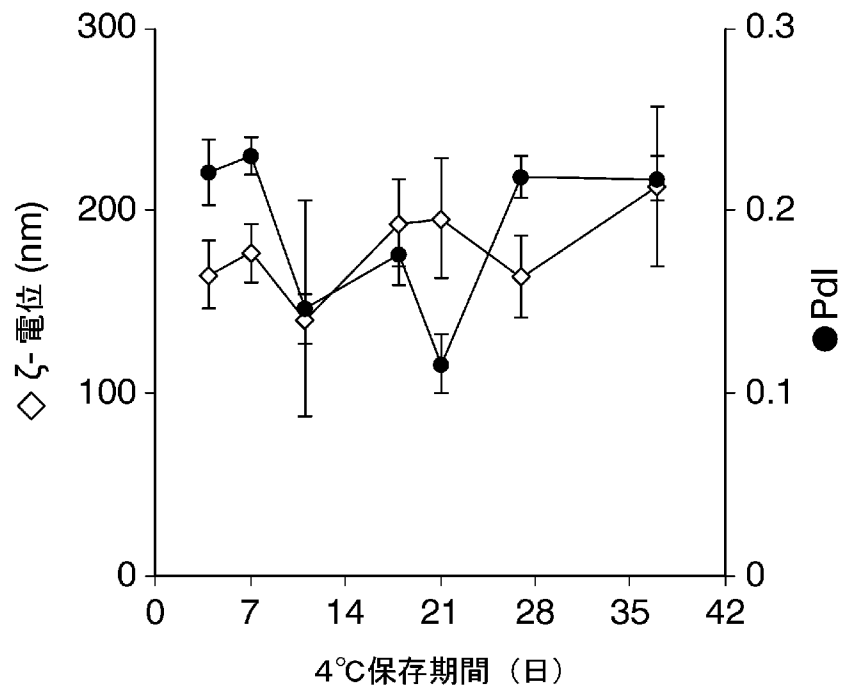
[図12]



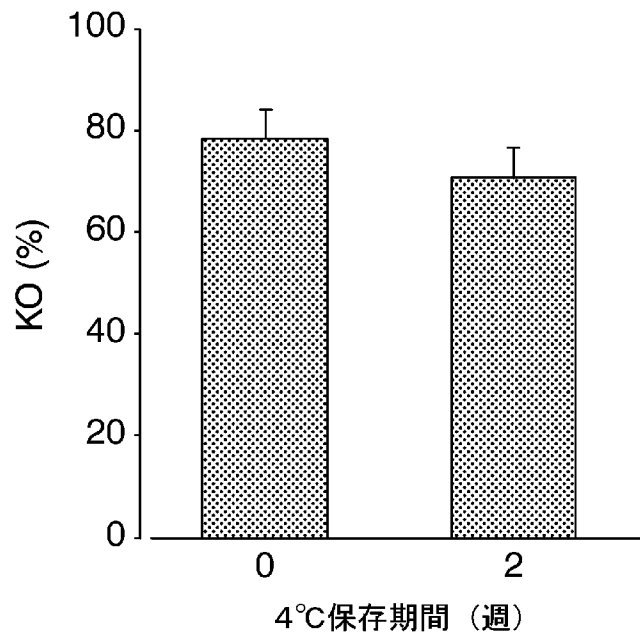
[図13]



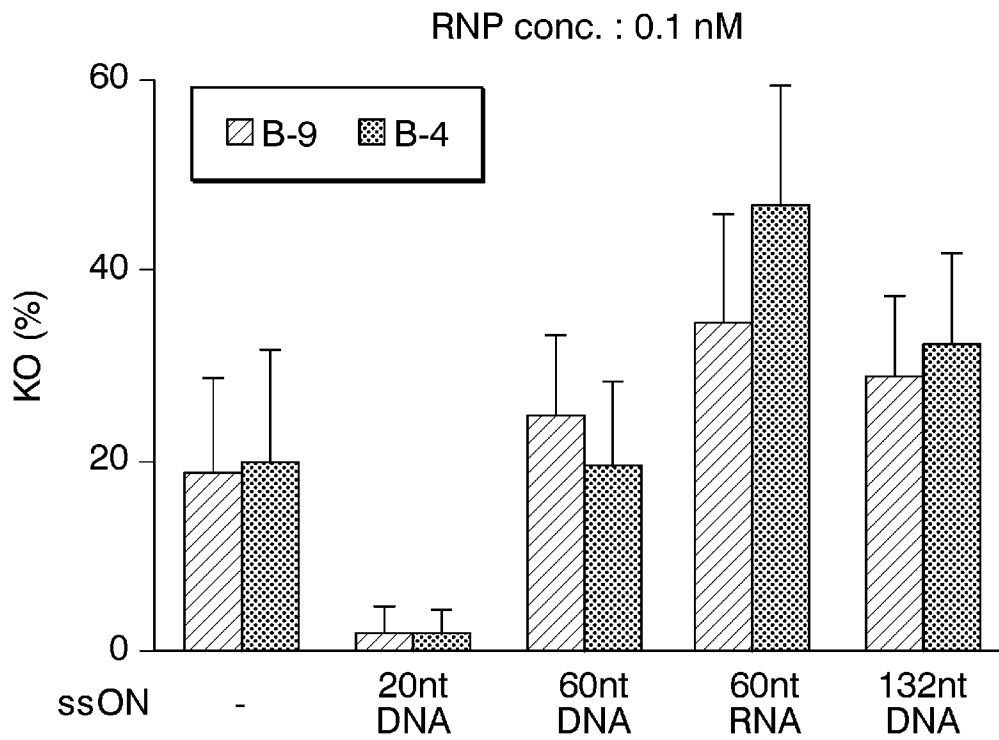
[図14]



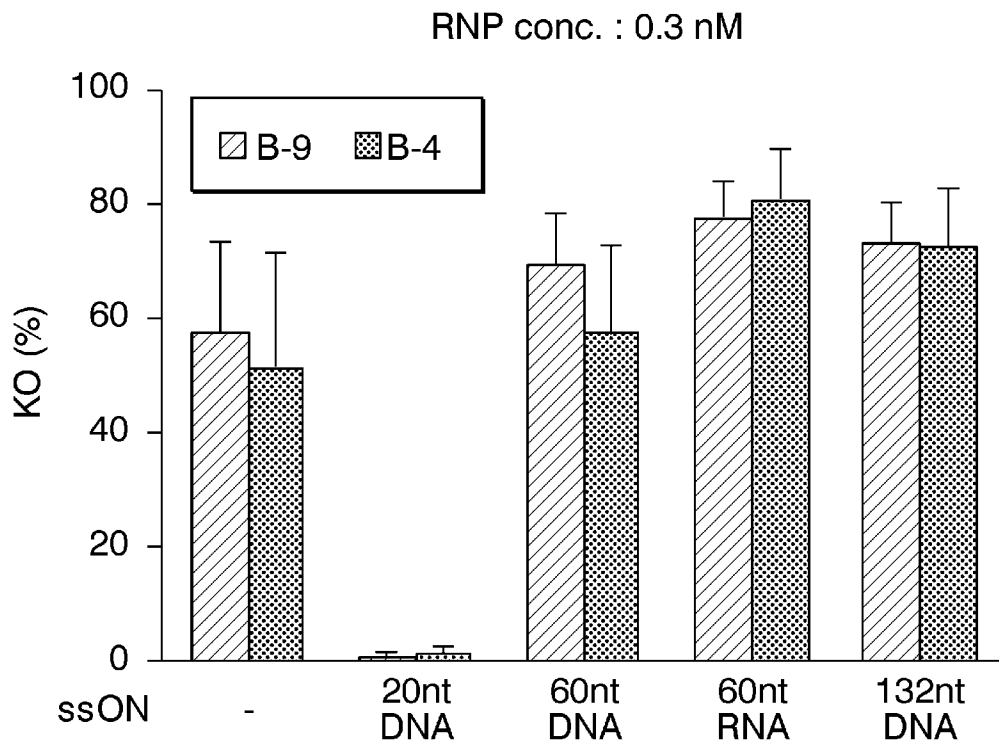
[図15]



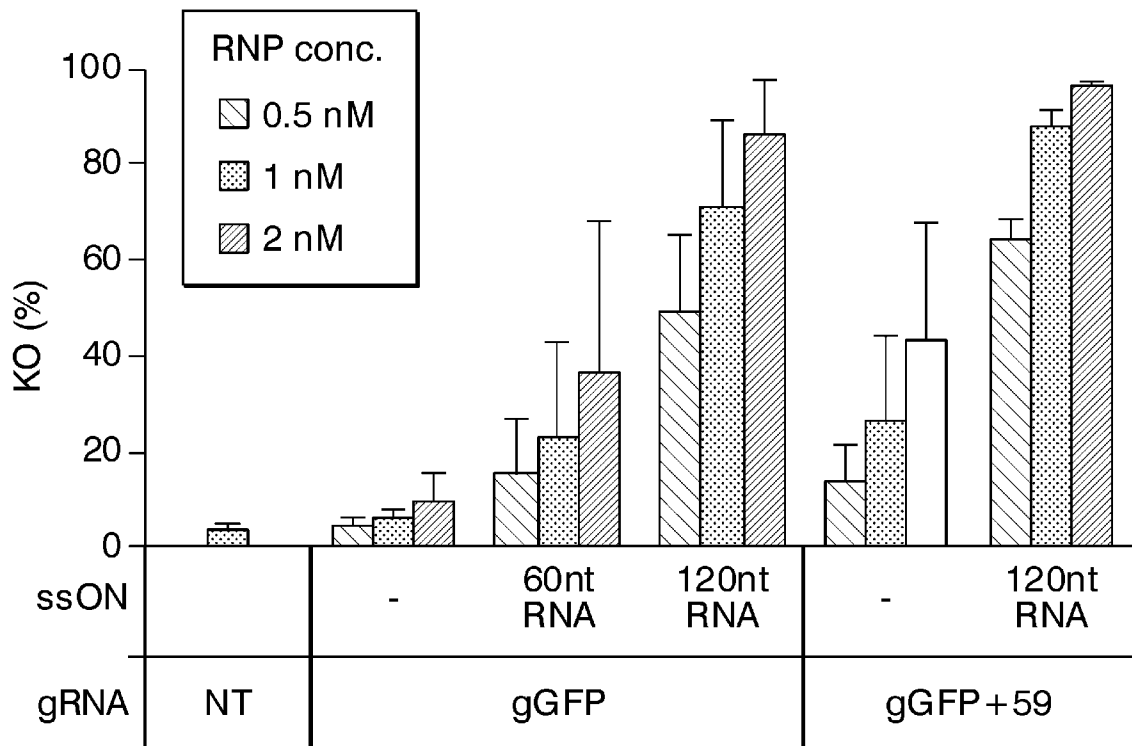
[図16A]



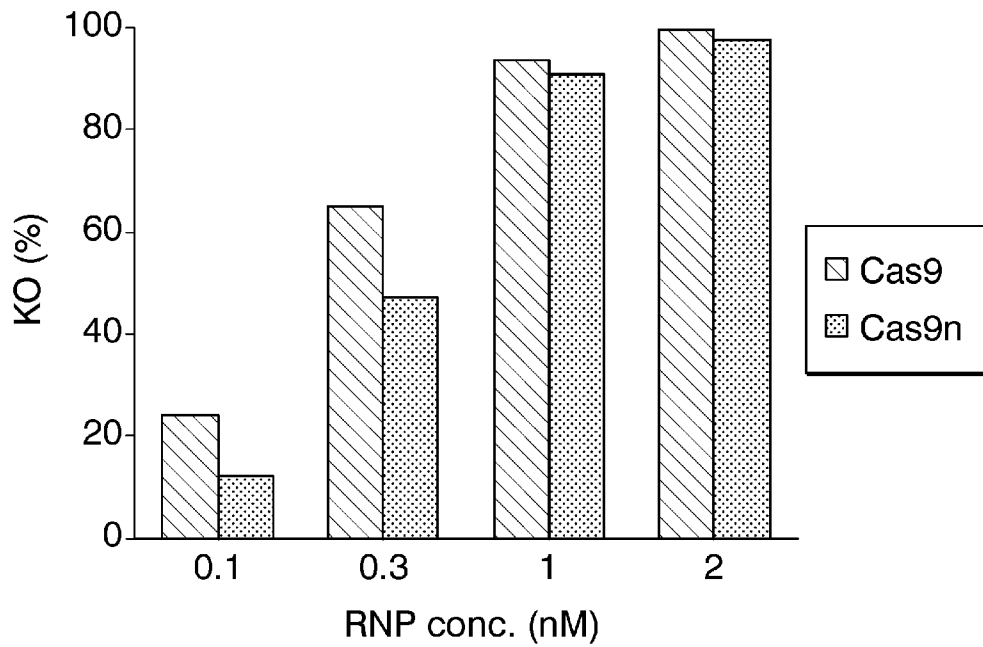
[図16B]



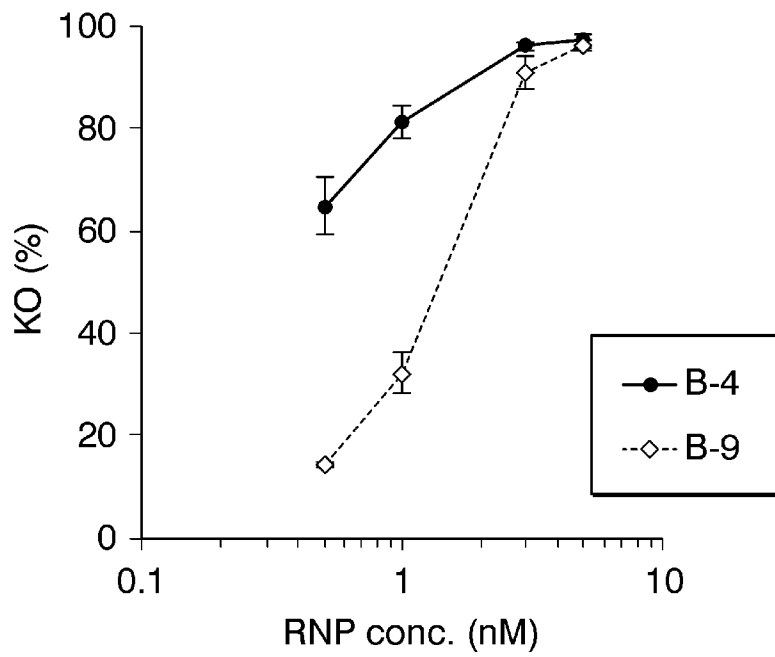
[圖17]



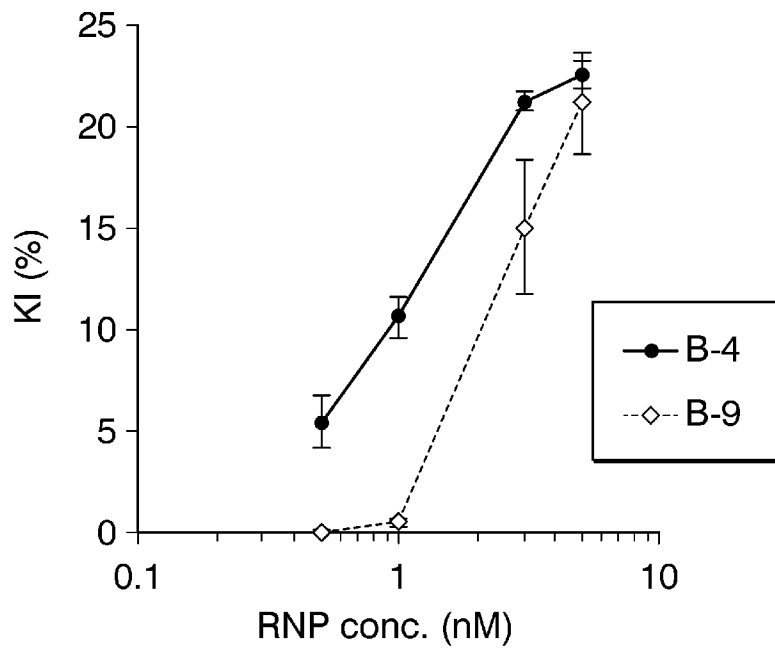
[圖18]



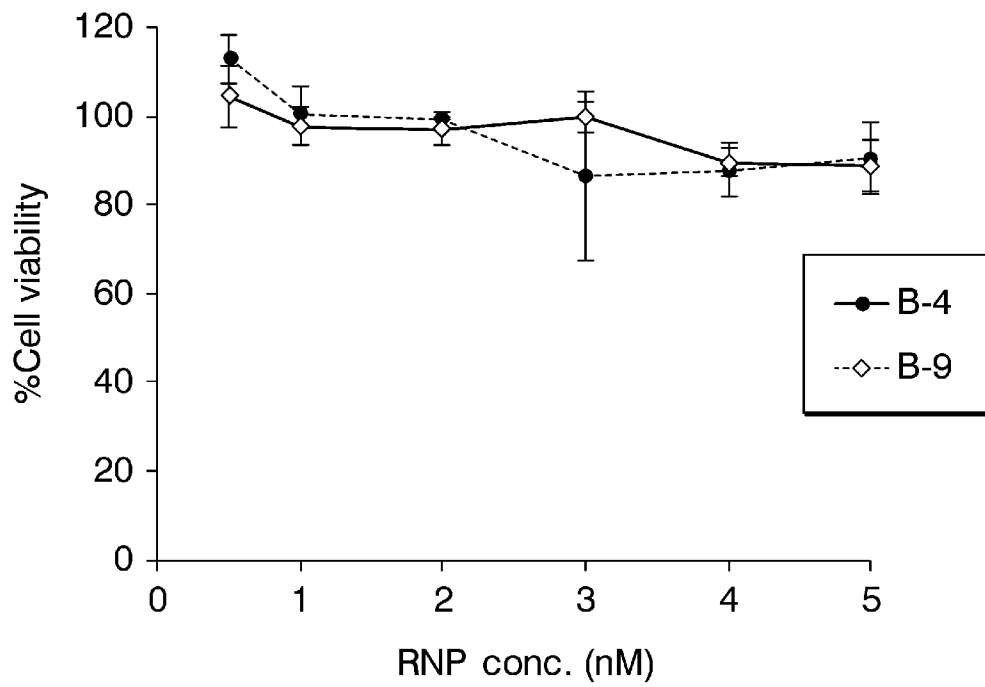
[図19A]



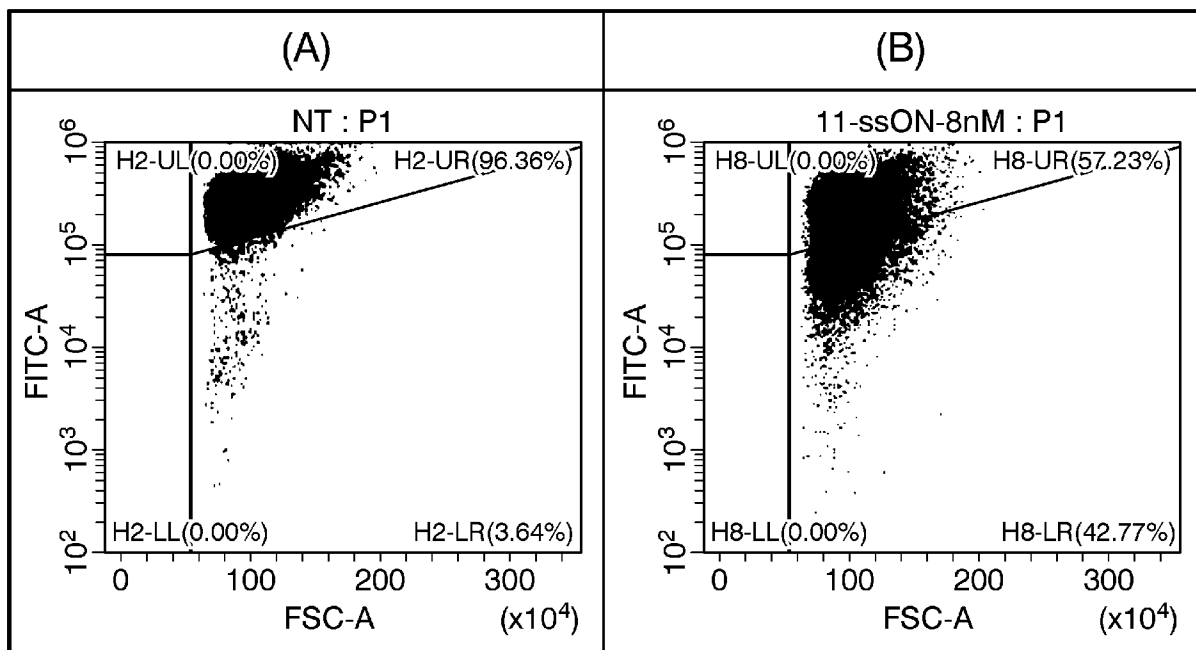
[図19B]



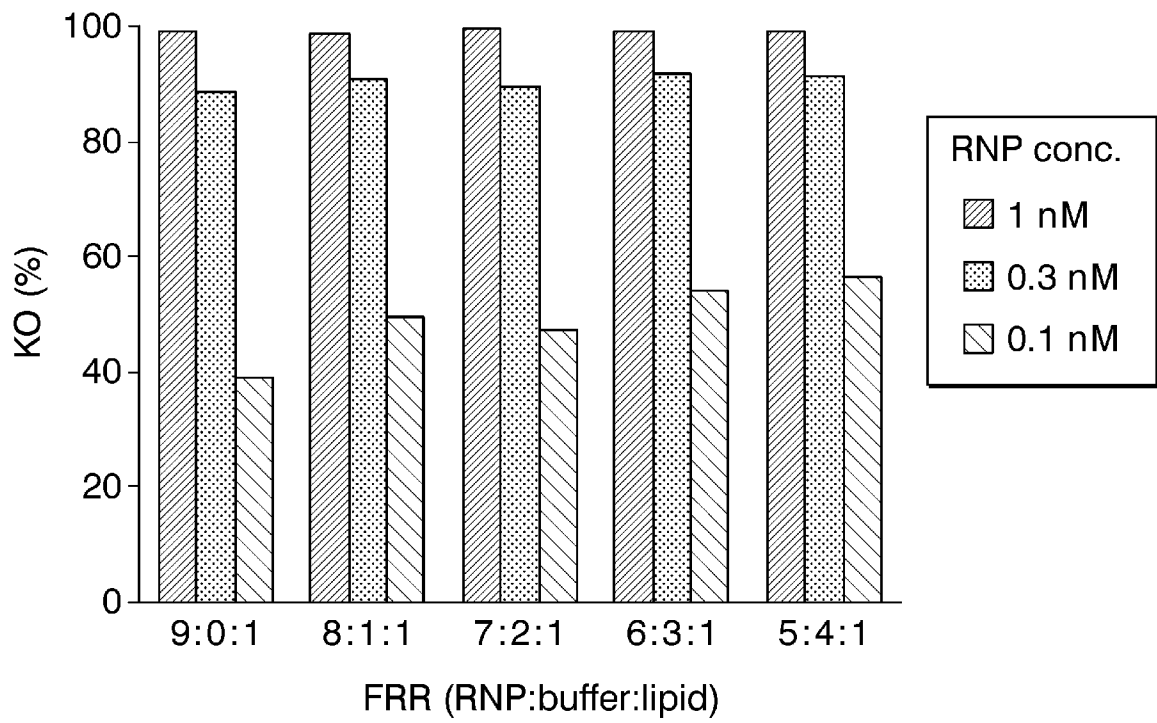
[図20]



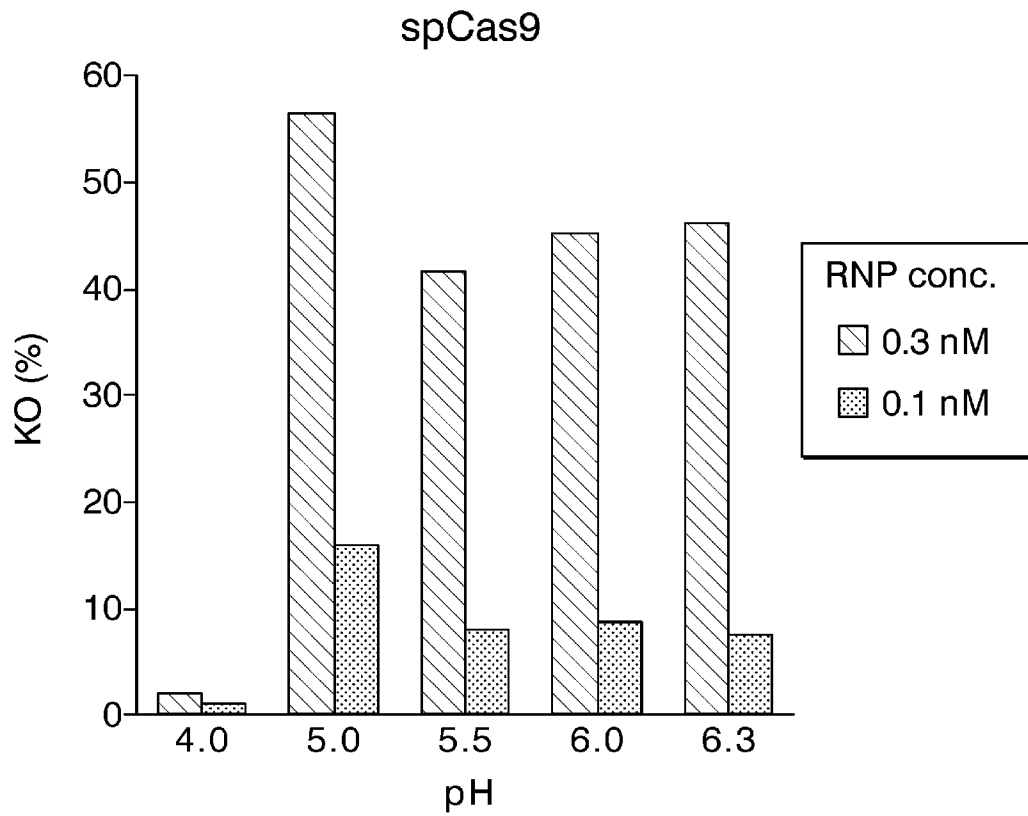
[図21]



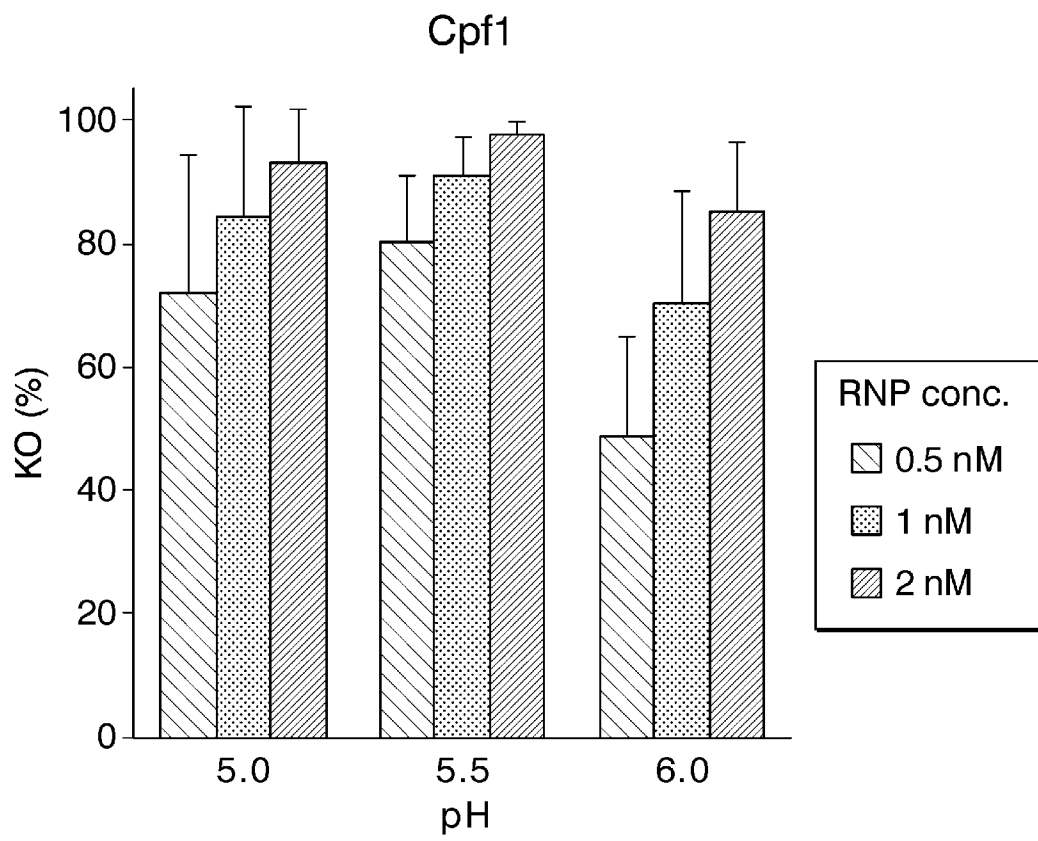
[圖22]



[圖23A]



[図23B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/020895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B82Y 5/00(2011.01)i; B82Y 40/00(2011.01)i; C12N 15/88(2006.01)i; C12N 11/04(2006.01)i
 FI: C12N15/88 Z; C12N11/04; B82Y5/00; B82Y40/00

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)
 B82Y5/00; B82Y40/00; C12N15/88; C12N11/04

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI, Yamin et al., "Intracellular delivery and biodistribution study of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein loaded bio-reducible lipidoid nanoparticles", Biomaterials Science, 01 February 2019, vol. 7, pp. 596-606, experimental, fig. 1	1-10
Y	WO 2018/230710 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 20.12.2018 (2018-12-20) claims, examples	1-10
Y	RICHARDSON, C. D. et al., "Non-homologous DNA increases gene disruption efficiency by altering DNA repair outcomes", Nature Communications, 2016, vol. 7:12463, pp. 1-7, fig. 1	1-10

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

"I" 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
 05 August 2020 (05.08.2020)

Date of mailing of the international search report
 18 August 2020 (18.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/
 Japan Patent Office
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

 Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/020895

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/107028 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS, INC.) 14.06.2018 (2018-06-14) paragraphs [0234]-[0240]	6, 8-10
Y	WO 2018/213708 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC.) 22.11.2018 (2018-11-22) claims	7-10
Y	WO 2018/190423 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 18.10.2018 (2018-10-18) claims, fig. 2, 18	9, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/020895

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2018/230710 A1	20 Dec. 2018	CA 3067192 A	
WO 2018/107028 A1	14 Jun. 2018	JP 2019-536464 A	
		US 2019/0316121 A1	
		EP 3551757 A1	
WO 2018/213708 A1	22 Nov. 2018	CA 3063739 A	
WO 2018/190423 A1	18 Oct. 2018	EP 3610943 A1	
		claims, fig. 2, 18	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） B82Y 5/00(2011.01)i; B82Y 40/00(2011.01)i; C12N 15/88(2006.01)i; C12N 11/04(2006.01)i FI: C12N15/88 Z; C12N11/04; B82Y5/00; B82Y40/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） B82Y5/00; B82Y40/00; C12N15/88; C12N11/04 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); WPIDS/WPIX (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LI, Yamin et al., Intracellular delivery and biodistribution study of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein loaded bioreducible lipidoid nanoparticles, Biomaterials Science, 2019.02.01, Vol. 7, p. 596-606 Experimental, Fig. 1	1-10
Y	WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018-12-20) 請求の範囲、実施例	1-10
Y	RICHARDSON, C. D. et al., Non-homologous DNA increases gene disruption efficiency by altering DNA repair outcomes, Nature Communications, 2016, Vol. 7:12463, p. 1-7 Figure 1	1-10
Y	WO 2018/107028 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS, INC.) 14.06.2018 (2018-06-14) [00234]-[00240]	6, 8-10
Y	WO 2018/213708 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC.) 22.11.2018 (2018-11-22) Claims	7-10
Y	WO 2018/190423 A1 (国立大学法人北海道大学) 18.10.2018 (2018-10-18) 請求の範囲、図2、18	9, 10
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
05.08.2020	18.08.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 小倉 梢 4B 4504 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/020895

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2018/230710	A1	20.12.2018	CA	3067192	A	

WO	2018/107028	A1	14.06.2018	JP	2019-536464	A	
				US	2019/0316121	A1	
				EP	3551757	A1	

WO	2018/213708	A1	22.11.2018	CA	3063739	A	

WO	2018/190423	A1	18.10.2018	EP	3610943	A1	
				Claims, Figure 2, 18			
