

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-515650
(P2024-515650A)

(43)公表日 令和6年4月10日(2024.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 C 0 7 6
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16		4 C 0 8 4
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18		4 C 0 8 7
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24		4 H 0 0 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全181頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-563210(P2023-563210)			(71)出願人	520107630
(86)(22)出願日	令和4年4月15日(2022.4.15)				インテリア セラピューティクス, イン
(85)翻訳文提出日	令和5年12月5日(2023.12.5)				コーポレーテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/025076				アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー
(87)国際公開番号	WO2022/221697				セッツ州, ケンブリッジ, エリー スト
(87)国際公開日	令和4年10月20日(2022.10.20)				リート 4 0
(31)優先権主張番号	63/316,568			(74)代理人	110002572
(32)優先日	令和4年3月4日(2022.3.4)				弁理士法人平木国際特許事務所
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(72)発明者	スワミ, アルチャナ
(31)優先権主張番号	63/176,227				アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー
(32)優先日	令和3年4月17日(2021.4.17)				セッツ州, ケンブリッジ, エリー スト
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				リート 4 0, インテリア セラピューテ
(31)優先権主張番号	63/274,153			(72)発明者	イクス, インコーポレーテッド
	最終頁に続く				ラクシェ, ヴィシャル
					アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂質ナノ粒子組成物

(57)【要約】

本開示は、イオン化可能な脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びPEG脂質の脂質ナノ粒子（LNP）組成物であって、生物学的に活性な薬剤の送達、例えば、操作細胞の調製のために生物学的に活性な薬剤を細胞に送達するのに有用である、LNP組成物を提供する。本明細書で開示するLNP組成物は、遺伝子編集の方法、生物学的に活性な薬剤を送達する方法、及びDNAを修飾または切断する方法に有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質組成物であって、

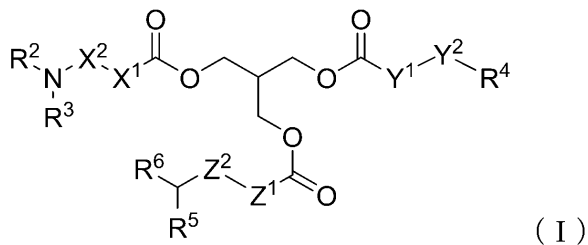
生物学的に活性な薬剤、及び

脂質構成要素を含み、前記脂質構成要素が、

- a) 前記脂質構成要素の約 25 ～ 45 mol % の量のイオン化可能な脂質、
 - b) 前記脂質構成要素の約 10 ～ 30 mol % の量の中性脂質、
 - c) 前記脂質構成要素の約 25 ～ 65 mol % の量のヘルパー脂質、及び
 - d) 前記脂質構成要素の約 1.5 ～ 3.5 mol % の量の PEG 脂質を含み、
- 前記イオン化可能な脂質が、式 (I) の化合物

10

【化 1】



20

(式中、

X¹ は O、NH、または直接結合であり、

X² は C₂ ～ 3 アルキレンであり、

R³ は C₁ ～ 3 アルキルであり、

R² は C₁ ～ 3 アルキルであり、または

R² は、それが結合する窒素原子及び X² の 2 ～ 3 個の炭素原子と一緒に becoming 5 員もしくは 6 員環を形成し、または

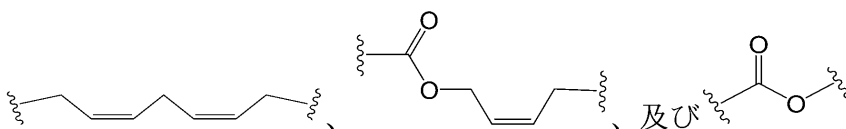
R² は、R³ 及びそれらが結合している窒素原子と一緒に becoming 5 員環を形成し、

Y¹ は C₆ ～ 10 アルキレンであり、

Y² は

30

【化 2】



から選択され、

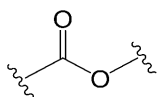
R⁴ は C₄ ～ 11 アルキルであり、

40

Z¹ は C₂ ～ 5 アルキレンであり、

Z² は

【化 3】



または不在であり、

R⁵ は、C₆ ～ 8 アルキル、C₅ ～ 10 アルコキシ（例えば、-OC₅ ～ 10 ハロアルキル

50

)、 $-O(C_2 \sim 3 \text{ アルキル})OC_6 \sim 10 \text{ アルキル}$ 、 $-OC_6 \sim 10 \text{ アルケニル}$ (例えば、 $-OC_6 \sim 10 \text{ 分枝状アルケニル}$)、もしくは $-OC_6 \sim 10 \text{ アルキニル}$ であり、 R^6 は、 $C_6 \sim 8 \text{ アルキル}$ 、 $C_5 \sim 10 \text{ アルコキシ}$ (例えば、 $-OC_5 \sim 10 \text{ ハロアルキル}$)、 $-O(C_2 \sim 3 \text{ アルキル})OC_6 \sim 10 \text{ アルキル}$ 、 $-OC_6 \sim 10 \text{ アルケニル}$ (例えば、 $-OC_6 \sim 10 \text{ 分枝状アルケニル}$)、もしくは $-OC_6 \sim 10 \text{ アルキニル}$ であり、または R^5 は R^6 と一緒に、ジェミナルな $C_6 \sim 8 \text{ アルキル}$ により置換された6員環のアセタールを形成する)

またはその塩である、前記脂質組成物。

【請求項2】

脂質組成物であって、

10

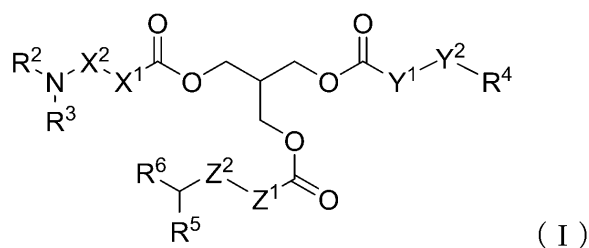
生物学的に活性な薬剤、及び

脂質構成要素を含み、前記脂質構成要素が、

- a) 前記脂質構成要素の約25～45mol%の量のイオン化可能な脂質、
 - b) 前記脂質構成要素の約10～30mol%の量の中性脂質、
 - c) 前記脂質構成要素の約25～65mol%の量のヘルパー脂質、及び
 - d) 前記脂質構成要素の約1.5～3.5mol%の量のPEG脂質を含み、
- 前記イオン化可能な脂質が、式(I)の化合物

【化4】

20



(式中、

X^1 はO、NH、または直接結合であり、

X^2 は $C_2 \sim 3 \text{ アルキレン}$ であり、

30

R^3 は $C_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ であり、

R^2 は $C_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ であり、または

R^2 は、それが結合する窒素原子及び X^2 の2～3個の炭素原子と一緒に、5員もしくは6員環を形成し、または

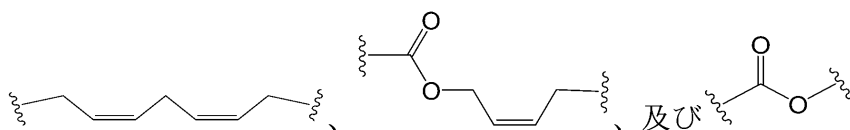
R^2 は、 R^3 及びそれらが結合している窒素原子と一緒に、5員環を形成し、

Y^1 は $C_6 \sim 10 \text{ アルキレン}$ であり、

Y^2 は

【化5】

40



から選択され、

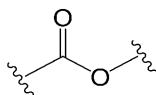
R^4 は $C_4 \sim 11 \text{ アルキル}$ であり、

Z^1 は $C_2 \sim 5 \text{ アルキレン}$ であり、

Z^2 は

50

【化 6】



または不在であり、

R^5 は $C_6 \sim 8$ アルキルまたは $C_6 \sim 8$ アルコキシであり、

R^6 は $C_6 \sim 8$ アルキルまたは $C_6 \sim 8$ アルコキシである)

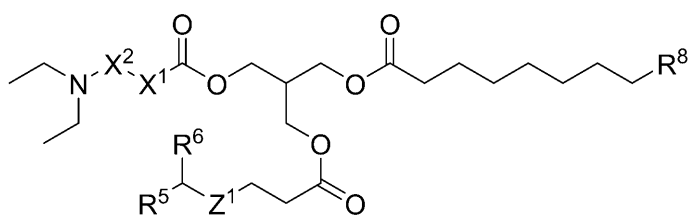
またはその塩である、前記脂質組成物。

10

【請求項 3】

前記イオン化可能な脂質が、式 (I I) の化合物

【化 7】



(I I)

20

(式中、

X^1 は O、NH、または直接結合であり、

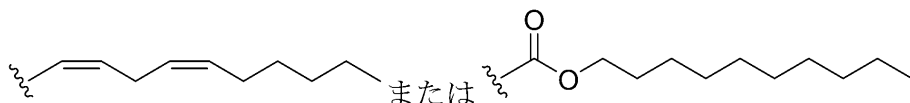
X^2 は $C_2 \sim 3$ アルキレンであり、

Z^1 は C_3 アルキレンであり、 R^5 及び R^6 は各々 C_6 アルキルであり、または Z^1 は直接結合であり、 R^5 及び R^6 は各々 C_8 アルコキシであり、

R^8 は

【化 8】

30



である)

またはその塩である、請求項 1 または 2 に記載の脂質組成物。

【請求項 4】

脂質組成物であって、

生物学的に活性な薬剤、及び

脂質構成要素を含み、前記脂質構成要素が、

40

a) 前記脂質構成要素の約 25 ~ 45 mol % の量のイオン化可能な脂質、

b) 前記脂質構成要素の約 10 ~ 30 mol % の量の中性脂質、

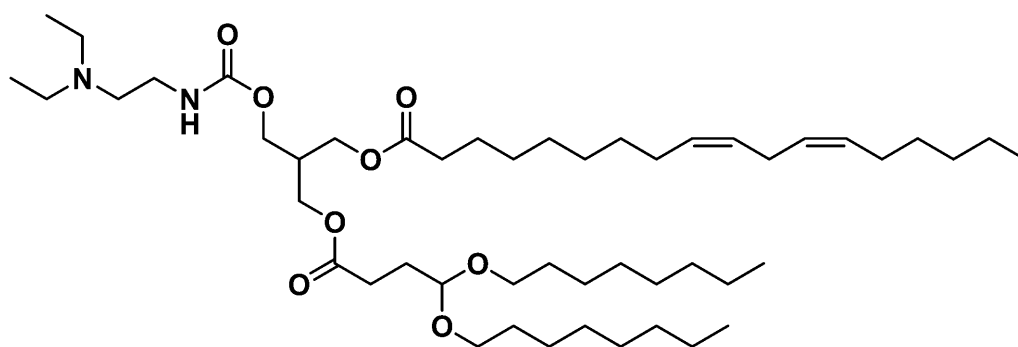
c) 前記脂質構成要素の約 25 ~ 65 mol % の量のヘルパー脂質、及び

d) 前記脂質構成要素の約 1.5 ~ 3.5 mol % の量の PEG 脂質を含み、

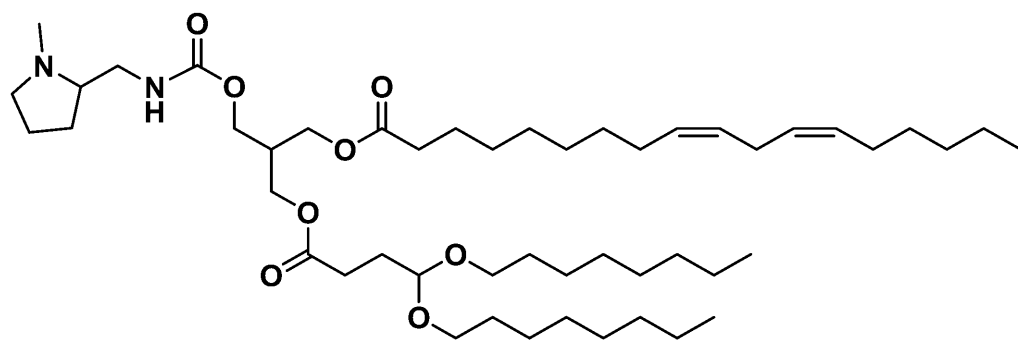
前記イオン化可能な脂質が、

50

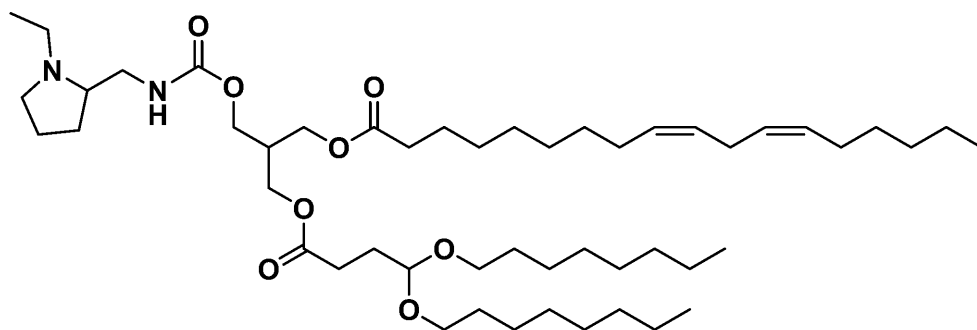
【化 9 - 1】



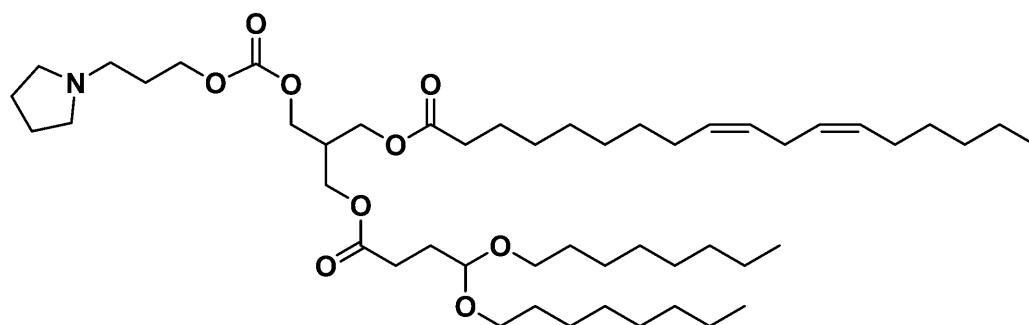
10



20



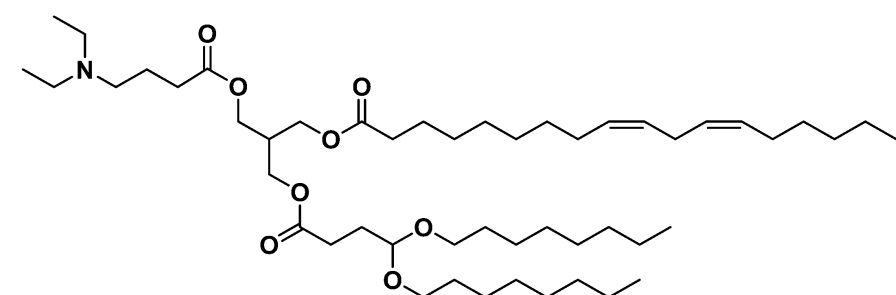
30



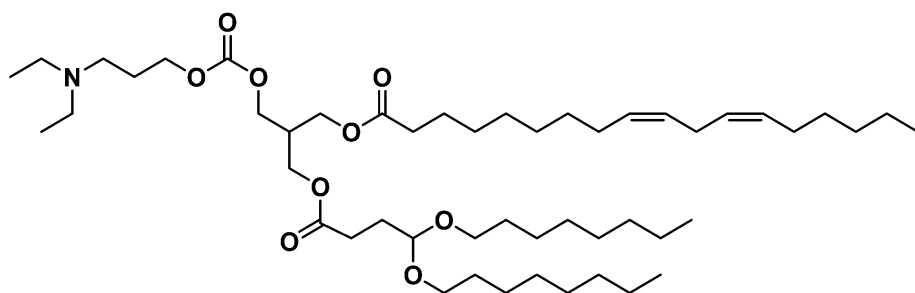
40

50

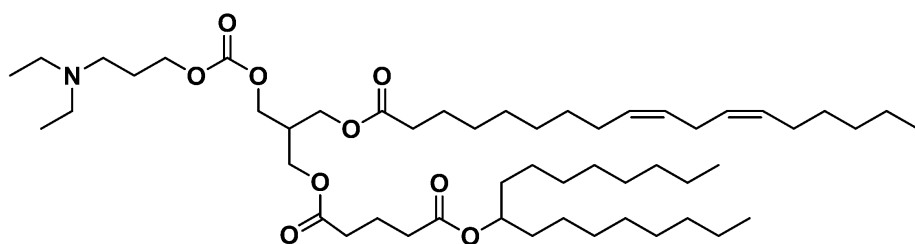
【化 9 - 2】



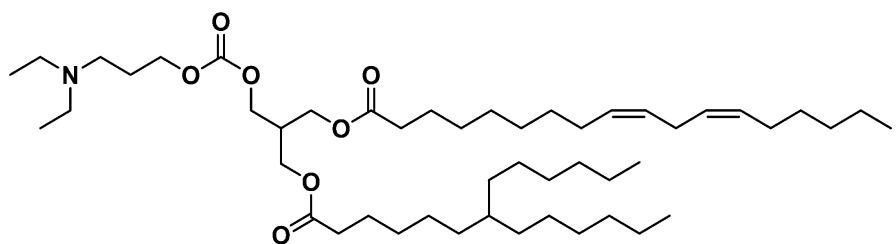
10



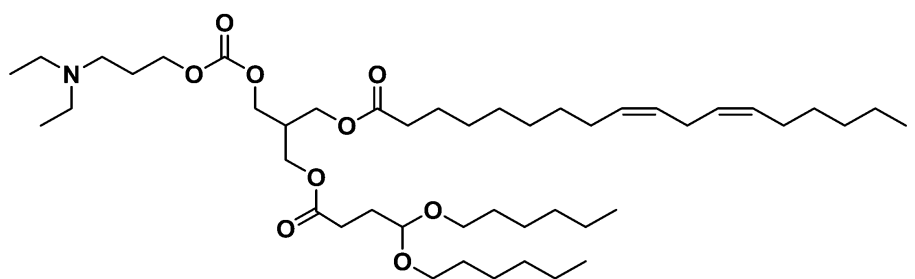
20



30

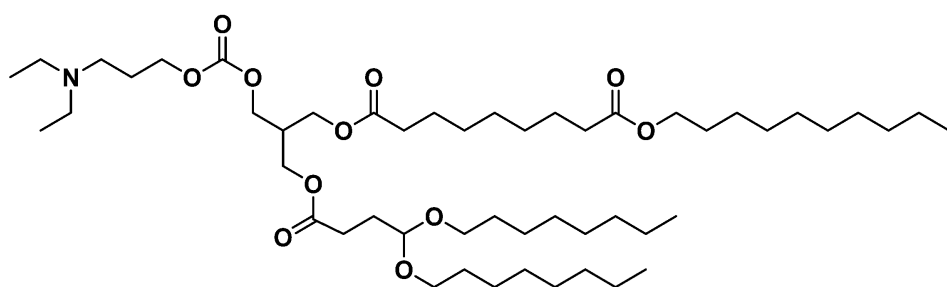


40

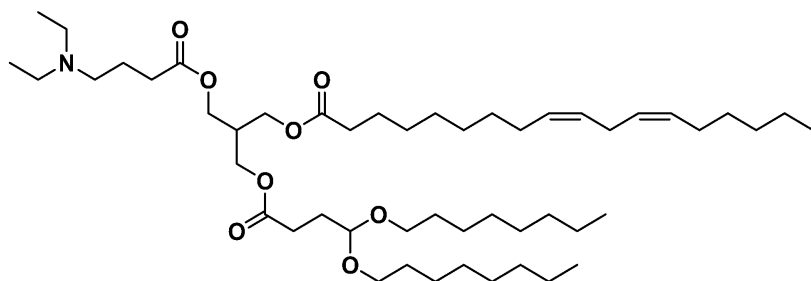


50

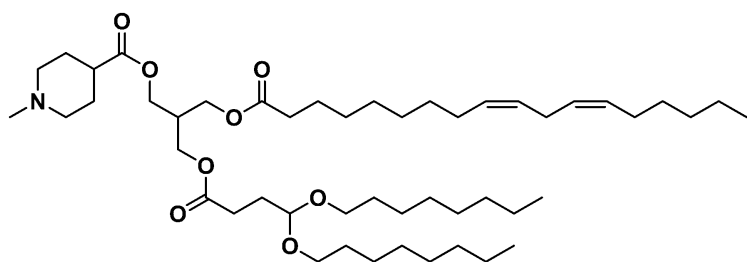
【化 9 - 3】



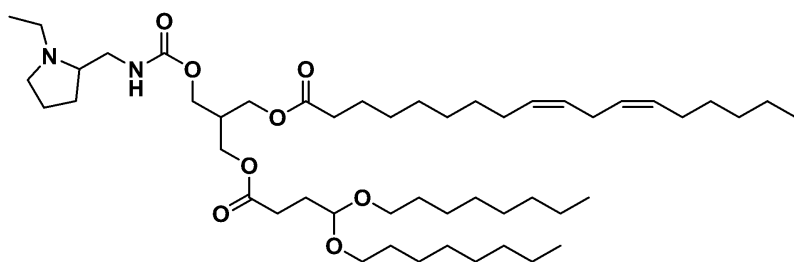
10



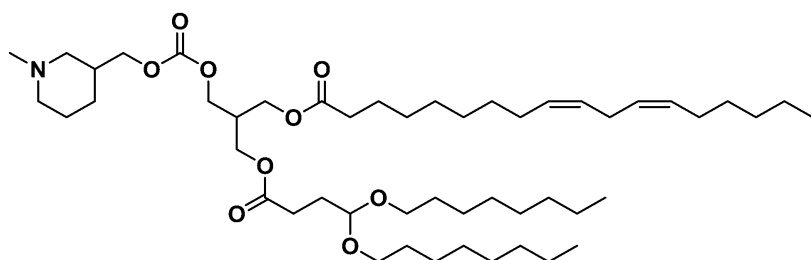
20



30

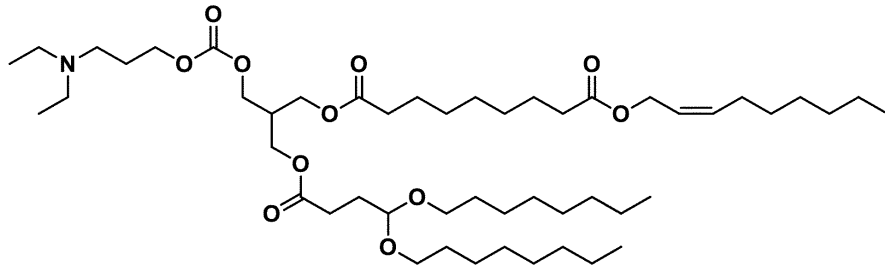


40

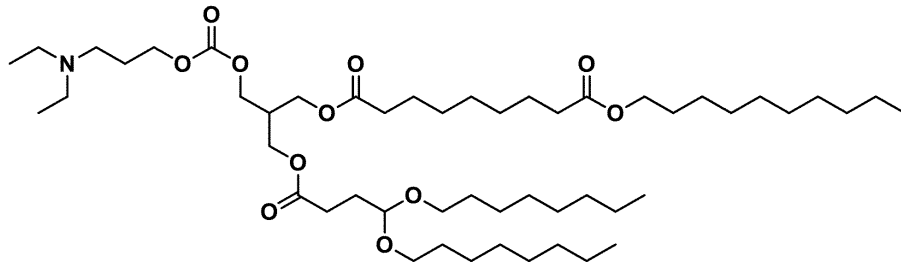


50

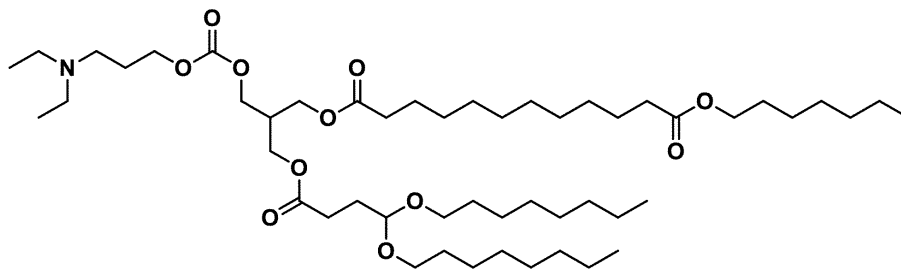
【化 9 - 4】



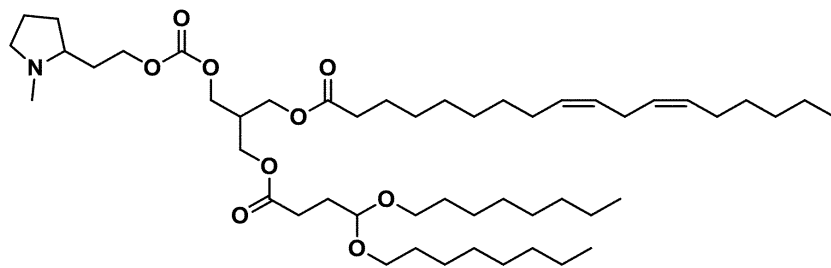
10



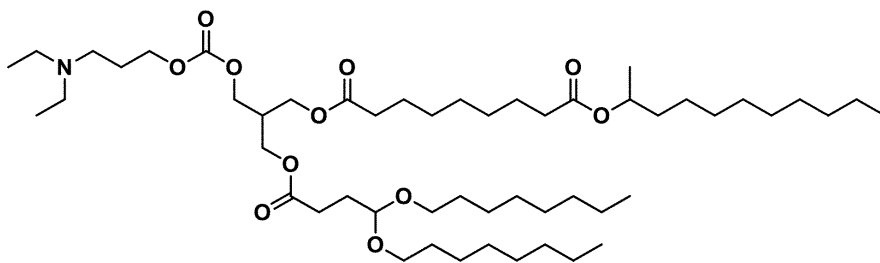
20



30



、または



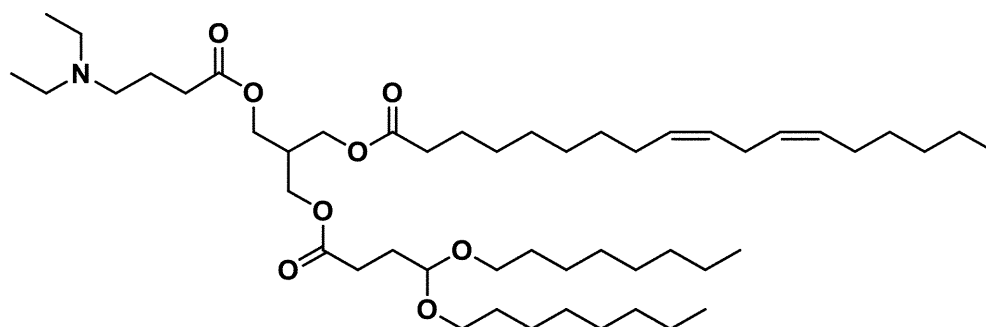
40

またはその塩である、前記脂質組成物。

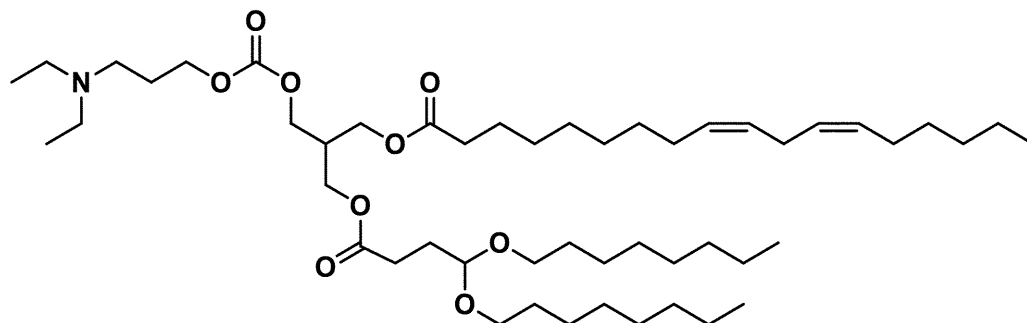
【請求項 5】

前記イオン化可能な脂質が、

【化 1 0】

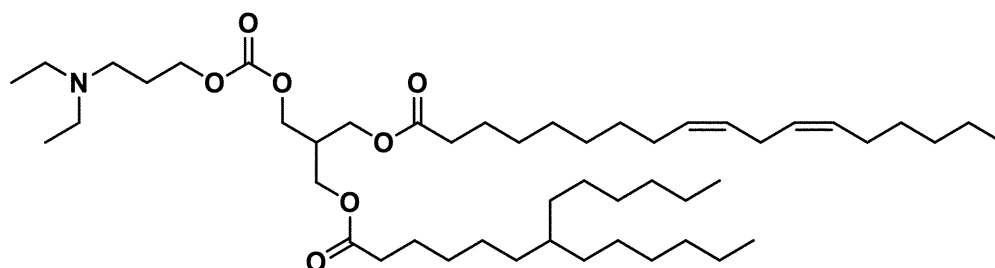


10



、または

20



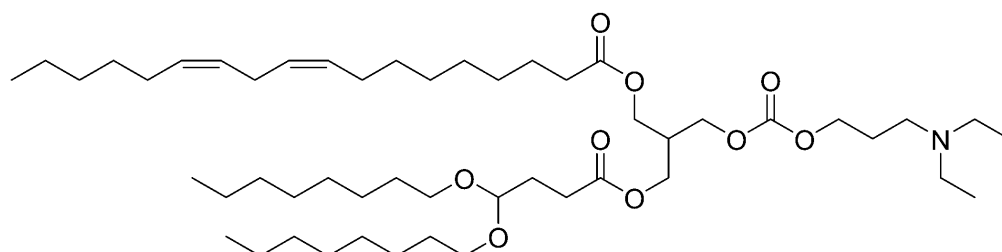
またはその塩である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

30

【請求項 6】

前記イオン化可能な脂質が、

【化 1 1】



40

またはその塩である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 7】

前記中性脂質が非荷電性脂質または双性イオン性脂質である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 8】

前記中性脂質が DSPC または DPME である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

50

【請求項 9】

前記中性脂質が DSPC である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 10】

前記ヘルパー脂質が、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、及びコレステロールヘミスクシネートから選択される、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 11】

前記ヘルパー脂質がコレステロールである、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 12】

前記 PEG 脂質がジミリストイルグリセロール (DMG) を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 13】

前記 PEG 脂質が PEG-2k を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 14】

前記 PEG 脂質が PEG-DMG である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 15】

前記 PEG 脂質が PEG-2k DMG である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

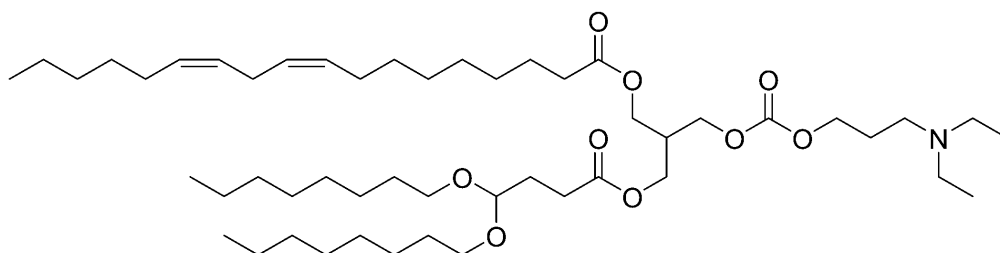
【請求項 16】

前記 PEG 脂質が 1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 17】

前記イオン化可能な脂質が、

【化 12】



であり、前記中性脂質が DSPC であり、前記ヘルパー脂質がコレステロールであり、前記 PEG 脂質が 1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 18】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約 29 ~ 38 mol % である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 19】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約 30 ~ 43 mol % である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 20】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約 25 ~ 34 mol % である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 21】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約 33 mol % である、請求項 1 ~

17のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項22】

前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約11～20mol%である、先行請求項のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項23】

前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約15mol%である、請求項1～21のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項24】

前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約43～65mol%である、先行請求項のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項25】

前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約43～55mol%である、請求項1～23のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項26】

前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約49mol%である、請求項1～23のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項27】

前記PEG脂質の量が前記脂質構成要素の約2.0～3.5mol%である、先行請求項のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項28】

前記PEG脂質の量が前記脂質構成要素の約2.3～3.5mol%である、請求項1～26のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項29】

前記PEG脂質の量が前記脂質構成要素の約2.3～2.7mol%である、請求項1～26のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項30】

前記PEG脂質の量が前記脂質構成要素の約2.7mol%である、請求項1～26のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項31】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約29～44mol%であり、前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約11～28mol%であり、前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約28～55mol%であり、前記PEG脂質の量が前記脂質構成要素の約2.3～3.5mol%である、請求項1～17のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項32】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約29～38mol%であり、前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約11～20mol%であり、前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約43～55mol%であり、前記PEG脂質の量が前記脂質構成要素の約2.3～2.7mol%である、請求項1～17のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項33】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約25～34mol%であり、前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約10～20mol%であり、前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約45～65mol%であり、前記PEG脂質の量が前記脂質構成要素の約2.5～3.5mol%である、請求項1～17のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項34】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約30～43mol%であり、前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約10～17mol%であり、前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約43.5～56mol%であり、前記PEG脂質の量が前記脂質

10

20

30

40

50

構成要素の約 1.5 ~ 3 mol % である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 35】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約 33 mol % であり、前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約 15 mol % であり、前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約 49 mol % であり、前記 PEG 脂質の量が前記脂質構成要素の約 3 mol % である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 36】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約 32.9 mol % であり、前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約 15.2 mol % であり、前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約 49.2 mol % であり、前記 PEG 脂質の量が前記脂質構成要素の約 2.7 mol % である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 37】

前記イオン化可能な脂質の量が前記脂質構成要素の約 35 mol % であり、前記中性脂質の量が前記脂質構成要素の約 15 mol % であり、前記ヘルパー脂質の量が前記脂質構成要素の約 47.5 mol % であり、前記 PEG 脂質の量が前記脂質構成要素の約 2.5 mol % である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 38】

各 mol % の変動が 5 % 未満である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 39】

各 mol % の変動が 1 % 未満である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 40】

各 mol % の変動が 0.5 % 未満である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 41】

各 mol % が、前記イオン化可能な脂質、前記中性脂質、前記ヘルパー脂質、及び前記 PEG 脂質の相対的な名目濃度に基づく、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 42】

各 mol % が、前記イオン化可能な脂質、前記中性脂質、前記ヘルパー脂質、前記、及び前記 PEG 脂質の相対的な実測濃度に基づく、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 43】

前記脂質組成物が LNP の形態をとり、前記 LNP が約 145 nm 未満の Z 平均直径を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 44】

前記脂質組成物が LNP の形態をとり、前記 LNP が約 120 nm 未満の Z 平均直径を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 45】

前記 LNP 組成物が LNP の形態をとり、前記 LNP が約 115 nm 未満の Z 平均直径を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 46】

脂質組成物が LNP の形態をとり、前記 LNP が約 100 nm 未満の Z 平均直径を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 47】

前記脂質組成物が LNP の形態をとり、前記 LNP が約 50 nm 超の数平均直径を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 48】

前記脂質組成物が LNP の形態をとり、前記 LNP が約 60 nm 超の数平均直径を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

前記脂質組成物が L N P の形態をとり、前記 L N P が約 0.005 ～ 約 0.75 の多分散性指数を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 50】

前記脂質組成物が L N P の形態をとり、前記 L N P が約 0.005 ～ 約 0.1 の多分散性指数を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 51】

前記脂質組成物の N / P 比が約 5 ～ 約 7 である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 52】

前記脂質組成物の N / P 比が約 6 である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

10

【請求項 53】

前記生物学的に活性な薬剤が非核酸構成要素を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 54】

前記生物学的に活性な薬剤が、治療的に活性なタンパク質を含むまたはコードする、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 55】

前記生物学的に活性な薬剤がゲノム編集ツールを含むまたはコードする、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

20

【請求項 56】

前記生物学的に活性な薬剤が、DNA または RNA の一本鎖または二本鎖切断を行うことが可能な 1 つ以上のヌクレアーゼを含むまたはコードする、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 57】

前記生物学的に活性な薬剤が核酸構成要素を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 58】

前記生物学的に活性な薬剤が RNA を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

30

【請求項 59】

前記 RNA が mRNA である、請求項 58 に記載の脂質組成物。

【請求項 60】

前記核酸構成要素が、RNA 先導 DNA 結合剤をコードする mRNA を含む、請求項 59 に記載の脂質組成物。

【請求項 61】

前記 mRNA が Cas ヌクレアーゼ mRNA を含む、請求項 60 に記載の脂質組成物。

【請求項 62】

前記 mRNA がクラス 2 Cas ヌクレアーゼ mRNA を含む、請求項 60 に記載の脂質組成物。

40

【請求項 63】

前記 mRNA が Cas 9 ヌクレアーゼ mRNA を含む、請求項 60 に記載の脂質組成物。

【請求項 64】

前記核酸構成要素が修飾 RNA を含む、請求項 57 ～ 63 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

【請求項 65】

前記核酸構成要素がガイド RNA 核酸を含む、請求項 57 ～ 64 のいずれか 1 項に記載の脂質組成物。

50

【請求項 66】

前記ガイドRNA核酸がgRNAである、請求項65に記載の脂質組成物。

【請求項 67】

前記ガイドRNA核酸がデュアルガイドRNA (dgRNA) である、またはそれをコードする、請求項65または66に記載の脂質組成物。

【請求項 68】

前記ガイドRNA核酸がシングルガイド (sgRNA) である、またはそれをコードする、請求項65または66に記載の脂質組成物。

【請求項 69】

前記gRNAが修飾gRNAである、請求項66～68のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項 70】

前記修飾gRNAが、5'末端の最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上に修飾を含む、請求項69に記載の脂質組成物。

【請求項 71】

前記修飾gRNAが、3'末端の最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上に修飾を含む、請求項69または70に記載の脂質組成物。

【請求項 72】

前記核酸構成要素がガイドRNA核酸を含み、前記mRNAがクラス2 CasヌクレアーゼmRNAを含み、前記mRNA：前記ガイドRNA核酸の重量比が約2：1～1：4である、請求項57～71のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項 73】

前記ガイドRNA核酸：前記クラス2 CasヌクレアーゼmRNAの重量比が約1：1である、請求項72に記載の脂質組成物。

【請求項 74】

前記脂質組成物がLNP組成物である、先行請求項のいずれか1項に記載の脂質組成物。

【請求項 75】

遺伝子編集の方法であって、細胞を、先行請求項のいずれか1項に記載の脂質組成物に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 76】

前記遺伝子編集が遺伝子ノックアウトをもたらす、請求項75に記載の方法。

【請求項 77】

前記遺伝子編集が遺伝子修正をもたらす、請求項75に記載の方法。

【請求項 78】

前記遺伝子編集が挿入をもたらす、請求項75に記載の方法。

【請求項 79】

DNAを切断する方法であって、細胞を、請求項1～74のいずれか1項に記載の脂質組成物に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 80】

生物学的に活性な薬剤を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項1～74のいずれか1項に記載の脂質組成物に接触させることを含む、前記方法。

【請求項 81】

前記接触ステップが一本鎖DNAニックをもたらす、請求項75～80のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 82】

前記接触ステップが二本鎖DNA切断をもたらす、請求項75～80のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 83】

少なくとも1つの鋳型核酸を前記細胞に導入することをさらに含む、請求項75～82

10

20

30

40

50

のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記脂質組成物を前記細胞に投与することを含む、請求項 7 5～8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記脂質組成物が第 1 の脂質組成物であり、前記方法が、前記細胞を、mRNA、gRNA、及び gRNA 核酸のうちの 1 つ以上を含む第 2 の脂質組成物に接触させることをさらに含む、請求項 7 5～8 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記第 2 の脂質組成物が、請求項 1～7 4 のいずれか 1 項に記載の第 2 の脂質組成物である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記第 1 の脂質組成物及び前記第 2 の脂質組成物が同時に投与される、請求項 8 5 または 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記第 1 の脂質組成物及び前記第 2 の脂質組成物が順次投与される、請求項 8 5 または 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記第 1 の脂質組成物が第 1 の gRNA を含み、前記第 2 の脂質組成物が第 2 の gRNA を含み、前記第 1 の gRNA 及び前記第 2 の gRNA が、異なる標的配列に相補的である異なるガイド配列を含む、請求項 8 5～8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記細胞が真核細胞である、請求項 7 5～8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記細胞が養子細胞療法（ACT）に有用である、請求項 7 5～9 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記細胞が自己由来細胞療法に有用である、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記細胞が幹細胞である、請求項 7 5～9 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記幹細胞が造血幹細胞（HSC）または誘導多能性幹細胞（iPSC）である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記細胞が免疫細胞である、請求項 7 5～9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記免疫細胞が白血球またはリンパ球である、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記免疫細胞がリンパ球である、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記リンパ球が T 細胞、B 細胞、または NK 細胞である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記リンパ球が T 細胞である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記リンパ球が活性化 T 細胞である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記リンパ球が非活性化 T 細胞である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

10

20

30

40

50

前記細胞が *in vitro* で前記脂質組成物と接触される、請求項 75～102 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 104】

前記細胞が *ex vivo* で前記脂質組成物と接触される、請求項 75～103 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 105】

前記方法が、動物の組織を前記脂質に接触させることを含む、請求項 75～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 106】

前記方法が、前記脂質組成物を動物に投与することを含む、請求項 75～105 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

前記動物がヒトである、請求項 104 または 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記脂質組成物が、T 細胞受容体、MHC クラス I、または MHC クラス II の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする gRNA を含む、請求項 75～107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

前記脂質組成物が、TRAC を標的とする gRNA を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記脂質組成物が、TRBC を標的とする gRNA を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 111】

前記脂質組成物が、CIITA を標的とする gRNA を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 112】

前記脂質組成物が、HLA-A を標的とする gRNA を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 113】

前記脂質組成物が、HLA-B を標的とする gRNA を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 114】

前記脂質組成物が、HLA-C を標的とする gRNA を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 115】

前記脂質組成物が、B2M を標的とする gRNA を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 116】

細胞内で複数のゲノム編集を生成する方法であって、
前記細胞を、少なくとも請求項 1～74 のいずれか 1 項に記載の第 1 の脂質組成物及び請求項 1～74 のいずれか 1 項に記載の第 2 の脂質組成物に接触させることを含み、
前記第 1 の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第 1 の標的配列に向けられた第 1 のガイド RNA (gRNA) と、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含み、
前記第 2 の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第 2 の標的配列に向けられた第 2 の gRNA と、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含み、
それにより、前記細胞内で複数のゲノム編集を生成する、前記方法。

【請求項 117】

前記細胞を、請求項 1～74 のいずれか 1 項に記載の第 3 の脂質組成物に接触させることをさらに含み、前記第 3 の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第 3 の標的配列に向けられた第 3 の gRNA と、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含む、請求項 11

10

20

30

40

50

6 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記細胞を、請求項 1 ～ 7 4 のいずれか 1 項に記載の第 4 の脂質組成物に接触させることをさらに含み、前記第 4 の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第 4 の標的配列に向けられた第 4 の gRNA と、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含む、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記細胞を、請求項 1 ～ 7 4 のいずれか 1 項に記載の第 5 の脂質組成物に接触させることをさらに含み、前記第 5 の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第 5 の標的配列に向けられた第 5 の gRNA と、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含む、請求項 1 1 8 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 0】

前記細胞を、請求項 1 ～ 7 4 のいずれか 1 項に記載の第 6 の脂質組成物に接触させることをさらに含み、前記第 6 の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第 6 の標的配列に向けられた第 6 の gRNA と、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含む、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記細胞が、ゲノム編集ツールを含む少なくとも 1 つの脂質組成物と接触される、請求項 1 1 6 ～ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記ゲノム編集ツールが、RNA 先導 DNA 結合剤をコードする核酸を含む、請求項 1 2 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 2 3】

前記細胞が、標的配列に挿入するためのドナー核酸にさらに接触され、任意選択で、前記ドナー核酸がベクターとして提供される、請求項 1 1 6 ～ 1 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記脂質組成物が順次投与される、請求項 1 1 6 ～ 1 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

少なくとも 2 つの脂質組成物が同時に投与される、請求項 1 1 6 ～ 1 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 2 6】

前記細胞が真核細胞である、請求項 1 1 6 ～ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記細胞が養子細胞療法 (ACT) に有用である、請求項 1 1 6 ～ 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記細胞が養子細胞療法に有用である、請求項 1 2 8 に記載の組成物。

40

【請求項 1 3 0】

前記細胞が幹細胞である、請求項 1 1 6 ～ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記幹細胞が造血幹細胞 (HSC) または誘導多能性幹細胞 (iPSC) である、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記細胞が免疫細胞である、請求項 1 1 6 ～ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記免疫細胞が白血球またはリンパ球である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

50

【請求項 1 3 4】

前記免疫細胞がリンパ球である、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記リンパ球が T 細胞、B 細胞、または NK 細胞である、請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記免疫細胞が、リンパ球、単球、マクロファージ、マスト細胞、樹状細胞、顆粒球、一次免疫細胞、CD 3 + 細胞、CD 4 + 細胞、CD 8 + T 細胞、調節性 T 細胞 (T r e g)、B 細胞、NK 細胞、及び樹状細胞 (D C)) から選択される、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記細胞が T 細胞である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記細胞が活性化 T 細胞である、請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記細胞が非活性化 T 細胞である、請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記細胞が T 細胞であり、前記ドナー核酸が、T 細胞受容体配列の対応する領域と相同性を有する領域を含む、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R A C を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R B C を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、M H C クラス I の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、M H C クラス I I の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R A C を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R B C を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R A C を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R B C を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、H L A - A を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、C I I T A を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R A C を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R B C を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、H L A - A を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、M H C クラス I I の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1 6 ~ 1 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R A C を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、T R B C を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、M H C クラス I の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする g R N A を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、C I I T A を標的とする g R N A を含む、請求項 1 1

10

20

30

40

50

6～145のいずれか1項に記載の方法。

【請求項149】

前記脂質組成物のうちの1つが、T細胞受容体の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、HLA-Aを標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、CIITAを標的とするgRNAを含む、請求項116～145のいずれか1項に記載の方法。

【請求項150】

前記脂質組成物のうちの1つが、TRACを標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、HLA-Aを標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、CIITAを標的とするgRNAを含む、請求項116～145のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項151】

前記脂質組成物のうちの1つが、T細胞受容体の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、MHCクラスIの表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、CIITAを標的とするgRNAを含む、請求項116～145のいずれか1項に記載の方法。

【請求項152】

前記細胞を*in vitro*で増殖させることをさらに含む、請求項116～151のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項153】

細胞の集団内で複数のゲノム編集を生成する方法であって、

a) 前記細胞の集団を、少なくとも請求項1～74のいずれか1項に記載の第1の脂質組成物及び請求項1～74のいずれか1項に記載の第2の脂質組成物に接触させるステップを含み、

前記第1の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第1の標的配列に向けられた第1のガイドRNA(gRNA)と、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含み、

前記第2の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第2の標的配列に向けられた第2のgRNAと、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含み、

それにより、前記細胞の集団内で複数のゲノム編集を生成する、前記方法。

30

【請求項154】

前記細胞の集団を、請求項1～74のいずれか1項に記載の第3の脂質組成物に接触させることをさらに含む、前記第3の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第3の標的配列に向けられた第3のgRNAと、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含む、請求項153に記載の方法。

【請求項155】

前記細胞の集団を、請求項1～74のいずれか1項に記載の第4の脂質組成物に接触させることをさらに含む、前記第4の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第4の標的配列に向けられた第4のgRNAと、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含む、請求項154に記載の方法。

40

【請求項156】

前記細胞の集団を、請求項1～74のいずれか1項に記載の第5の脂質組成物に接触させることをさらに含む、第5の脂質組成物の生物学的に活性な薬剤が、第5の標的配列に向けられた第5のgRNA、及び任意選択で核酸ゲノム編集ツールを含む、請求項155に記載の方法。

【請求項157】

前記細胞の集団を、請求項1～74のいずれか1項に記載の第6の脂質組成物に接触させることをさらに含む、前記第6の脂質組成物の前記生物学的に活性な薬剤が、第6の標的配列に向けられた第6のgRNAと、任意選択で核酸ゲノム編集ツールとを含む、請求項156に記載の方法。

50

【請求項 1 5 8】

前記細胞の集団が、ゲノム編集ツールを含む少なくとも 1 つの脂質組成物と接触される、請求項 1 5 3 ～ 1 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記ゲノム編集ツールが、RNA 先導 DNA 結合剤をコードする核酸を含む、請求項 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

前記細胞の集団が、標的配列に挿入するためのドナー核酸とさらに接触され、任意選択で、前記ドナー核酸がベクターとして提供する、請求項 1 5 3 ～ 1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記脂質組成物が順次投与される、請求項 1 5 3 ～ 1 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

少なくとも 2 つの脂質組成物が同時に投与される、請求項 1 5 3 ～ 1 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

前記細胞の集団が真核細胞の集団である、請求項 1 5 3 ～ 1 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記細胞の集団がヒト細胞の集団である、請求項 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

前記細胞の集団が養子細胞療法（ACT）に有用である、請求項 1 5 3 ～ 1 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

前記細胞の集団が自己由来細胞療法に有用である、請求項 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記細胞の集団が幹細胞の集団である、請求項 1 5 3 ～ 1 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記幹細胞の集団が造血幹細胞（HSC）の集団または誘導多能性幹細胞（iPSC）の集団である、請求項 1 6 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

前記細胞の集団が免疫細胞の集団である、請求項 1 5 3 ～ 1 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

前記免疫細胞の集団が白血球の集団またはリンパ球の集団である、請求項 1 6 9 に記載の方法。

【請求項 1 7 1】

前記免疫細胞の集団がリンパ球の集団である、請求項 1 7 0 に記載の方法。

【請求項 1 7 2】

前記リンパ球の集団が、T 細胞の集団、B 細胞の集団、または NK 細胞の集団である、請求項 1 7 1 に記載の方法。

【請求項 1 7 3】

前記免疫細胞が、リンパ球、単球、マクロファージ、マスト細胞、樹状細胞、顆粒球、一次免疫細胞、CD3+細胞、CD4+細胞、CD8+T細胞、調節性T細胞（Treg）、B細胞、NK細胞、及び樹状細胞（DC）から選択される、請求項 1 6 9 に記載の方法。

【請求項 1 7 4】

前記細胞の集団がT細胞の集団である、請求項 1 6 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 175】

前記細胞が活性化 T 細胞である、請求項 174 に記載の方法。

【請求項 176】

前記細胞が非活性化 T 細胞である、請求項 174 に記載の方法。

【請求項 177】

前記細胞の集団が T 細胞の集団であり、前記ドナー核酸が、T 細胞受容体配列の対応する領域と相同性を有する領域を含む、請求項 160 に記載の方法。

【請求項 178】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRAC を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 177 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 179】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRBC を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 178 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 180】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、MHC クラス I の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 179 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 181】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、MHC クラス II の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 180 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 182】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRAC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRBC を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 181 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 183】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRAC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRBC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、HLA-A を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、CIITA を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 182 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 184】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRAC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRBC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、HLA-A を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、MHC クラス II の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 182 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 185】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRAC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRBC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、MHC クラス I の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、CIITA を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 182 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 186】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、T 細胞受容体の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、HLA-A を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、CIITA を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 182 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 187】

前記脂質組成物のうちの 1 つが、TRAC を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、HLA-A を標的とする gRNA を含む、前記脂質組成物のうちの 1 つが、CIITA を標的とする gRNA を含む、請求項 153 ~ 182 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 188】

前記脂質組成物のうちの1つが、T細胞受容体の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、MHCクラスIの表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、前記脂質組成物のうちの1つが、CIITAを標的とするgRNAを含む、請求項153～182のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 189】

前記細胞の集団を*in vitro*で増殖させることをさらに含む、請求項153～188のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国仮特許出願第63／176227号（2021年4月17日出願）、米国仮特許出願第63／254948号（2021年10月12日出願）、米国仮特許出願第63／274153号（2021年11月1日出願）、及び米国仮特許出願第63／316568号（2022年3月4日出願）に対する優先権の利益を主張し、これらの各出願の全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

イオン化可能な脂質を用いて製剤化された脂質ナノ粒子は、生物学的に活性な薬剤、特にポリヌクレオチド、例えばRNA（mRNA及びガイドRNAを含む）を細胞内に送達するためのカーゴビヒクルとして機能することができる。イオン化可能な脂質を含むLNP組成物は、細胞膜を横断したオリゴヌクレオチド薬剤の送達を促進することができ、また、遺伝子編集用の構成要素及び組成物を生細胞に導入するために使用することができる。細胞への送達が特に困難な生物学的に活性な薬剤としては、タンパク質、核酸ベース薬剤、及びその誘導体、特にmRNAのような比較的大きなオリゴヌクレオチドを含む薬剤が挙げられる。細胞に有望な遺伝子編集技術を送達するための、例えば、CRISPR／Cas9システムの構成要素（例えば、ヌクレアーゼをコードするmRNA及び関連するガイドRNA（gRNA））を送達するための組成物が特に注目されている。

【0003】

*in vivo*及び*in vitro*で核酸（例えば、RNA）の送達を改善するための組成物に対するニーズが存在する。一例として、CRISPR／Casの構成要素を真核細胞（例えば、ヒト細胞）に送達するための組成物が必要とされている。詳細には、CRISPRタンパク質構成要素をコードするmRNAを送達するための組成物、及びCRISPR gRNAを送達するための組成物が特に関心対象となる。また、RNA構成要素を安定化させ送達することができる*in vitro*及び*in vivo*での送達に有用な特性を有する組成物も特に関心対象となる。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、脂質組成物（例えば、脂質ナノ粒子（LNP）組成物）を提供する。このような脂質組成物は、例えば、核酸カーゴ（例えば、CRISPR／Cas遺伝子編集構成要素）を含む生物学的薬剤を細胞に送達するのに有利な特性を有し得る。

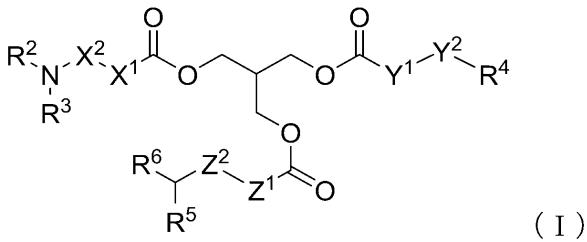
【0005】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、核酸構成要素、及び

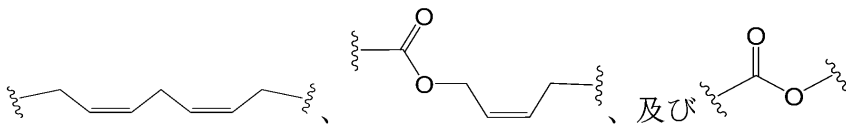
脂質構成要素を含み、当該脂質構成要素は、

- 脂質構成要素の約25～45mol%の量のイオン化可能な脂質、
- 脂質構成要素の約10～30mol%の量の中性脂質、
- 脂質構成要素の約25～65mol%の量のヘルパー脂質、及び

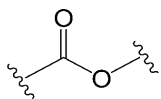
d) 脂質構成要素の約 1.5 ~ 3.5 mol % の量の PEG 脂質を含み、
イオン化可能な脂質は、式 (I) の化合物
【化 1】



(式中、
X¹ は O、NH、または直接結合であり、
X² は C₂ ~ 3 アルキレンであり、
R³ は C₁ ~ 3 アルキルであり、
R² は C₁ ~ 3 アルキルであり、または
R² は、それが結合する窒素原子及び X² の 2 ~ 3 個の炭素原子と一緒になって 5 員もしくは 6 員環を形成し、または
R² は、R³ 及びそれらが結合している窒素原子と一緒になって 5 員環を形成し、
Y¹ は C₆ ~ 10 アルキレンであり、
Y² は
【化 2】



から選択され、
R⁴ は C₄ ~ 11 アルキルであり、
Z¹ は C₂ ~ 5 アルキレンであり、
Z² は
【化 3】



または不在であり、
R⁵ は、C₆ ~ 8 アルキル、C₅ ~ 10 アルコキシ（例えば、-OC₅ ~ 10 ハロアルキル）、-O(C₂ ~ 3 アルキル)OC₆ ~ 10 アルキル、-OC₆ ~ 10 アルケニル（例えば、-OC₆ ~ 10 分枝状アルケニル）、もしくは -OC₆ ~ 10 アルキニルであり、
R⁶ は、C₆ ~ 8 アルキル、C₅ ~ 10 アルコキシ（例えば、-OC₅ ~ 10 ハロアルキル）、-O(C₂ ~ 3 アルキル)OC₆ ~ 10 アルキル、-OC₆ ~ 10 アルケニル（例えば、-OC₆ ~ 10 分枝アルケニル）、もしくは -OC₆ ~ 10 アルキニルであり、または
R⁵ は R⁶ と一緒に、ジェミナルな C₆ ~ 8 アルキルにより置換された 6 員環のアセタールを形成する）
またはその塩を含む。

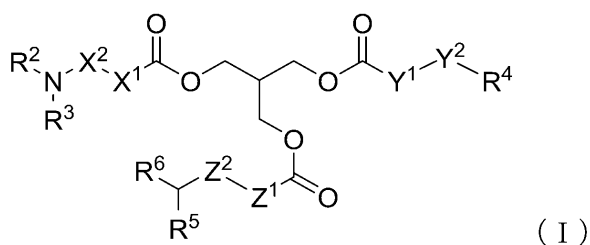
【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、
生物学的に活性な薬剤、及び
脂質構成要素を含み、当該脂質構成要素は、

- a) 脂質構成要素の約25～45mol%の量のイオン化可能な脂質、
- b) 脂質構成要素の約10～30mol%の量の中性脂質、
- c) 脂質構成要素の約25～65mol%の量のヘルパー脂質、及び
- d) 脂質構成要素の約1.5～3.5mol%の量のPEG脂質を含み、
イオン化可能な脂質は、式(I)の化合物

【化4】

10

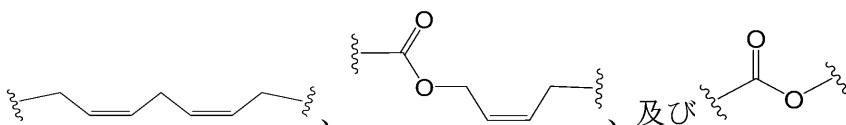


20

(式中、
X¹はO、NH、または直接結合であり、
X²はC₂～3アルキレンであり、
R³はC₁～3アルキルであり、
R²はC₁～3アルキルであり、または
R²は、それが結合する窒素原子及びX²の2～3個の炭素原子と一緒に becoming 5員もしくは6員環を形成し、または
R²は、R³及びそれらが結合している窒素原子と一緒に becoming 5員環を形成し、
Y¹はC₆～10アルキレンであり、
Y²は

30

【化5】

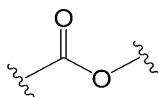


から選択され、

- R⁴はC₄～11アルキルであり、
- Z¹はC₂～5アルキレンであり、
- Z²は

40

【化6】



または不在であり、

- R⁵はC₆～8アルキルまたはC₆～8アルコキシであり、
- R⁶はC₆～8アルキルまたはC₆～8アルコキシである)

50

またはその塩を含む。

【0007】

ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は脂質構成要素の約29～44 mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約11～28 mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約28～55 mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約2.3～3.5 mol%である。

【0008】

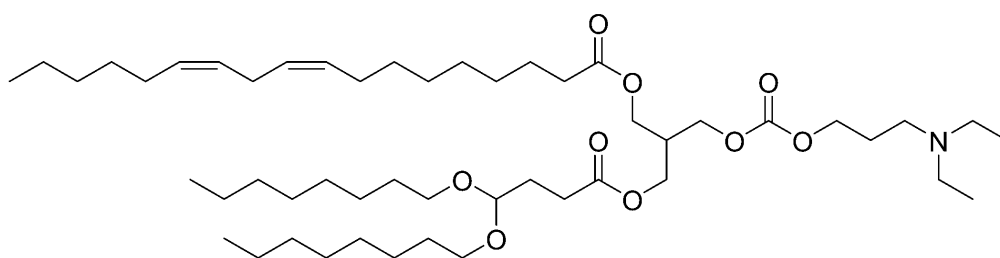
いくつかの実施形態において、イオン化可能な脂質の量は脂質構成要素の約33 mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約15 mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約49 mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約3 mol%である。

10

【0009】

ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質は

【化7】



20

またはその塩であり、中性脂質はDSPCであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、PEG脂質は1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000である。

【0010】

ある特定の実施形態において、LNPは約145 nm未満、例えば約120 nm未満、約115 nm未満、または約100 nm未満のZ平均直径を有する。ある特定の実施形態において、LNPは約50 nm超、例えば約60 nm超の数平均直径を有する。

30

【0011】

ある特定の実施形態において、LNPは約0.005～約0.75、例えば約0.005～約0.1の多分散指数を有する。

【0012】

いくつかの実施形態において、LNP組成物のN/P比は約5～約7、好ましくは約6である。

【0013】

ある特定の実施形態において、本開示は、核酸構成要素がRNA構成要素である、本明細書に記載の任意のLNP組成物に関する。いくつかの実施形態において、RNA構成要素はmRNAを含む。好ましい実施形態において、本開示は、RNA構成要素が、RNA先導DNA結合剤、例えば、CasヌクレアーゼmRNA、例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA、またはCas9ヌクレアーゼmRNAを含む、本明細書に記載の任意のLNP組成物に関する。

40

【0014】

ある特定の実施形態において、本開示は、mRNAが修飾mRNAである、本明細書に記載の任意のLNP組成物に関する。いくつかの実施形態において、本開示は、RNA構成要素がgRNA核酸を含む、本明細書に記載の任意のLNP組成物に関する。ある特定の実施形態において、本開示は、gRNA核酸がgRNAである、本明細書に記載の任意のLNP組成物に関する。

【0015】

50

ある特定の好ましい実施形態において、本開示は、RNA構成要素がクラス2 CasヌクレアーゼmRNA及びgRNAを含む、本明細書に記載のLNP組成物に関する。ある特定の実施形態において、本開示は、gRNA核酸がデュアルガイドRNA (dgRNA)である、またはそれをコードする、本明細書に記載のLNP組成物に関する。ある特定の実施形態において、本開示は、gRNA核酸がシングルガイドRNA (sgRNA)である、またはそれをコードする、本明細書に記載のLNP組成物に関する。

【0016】

ある特定の実施形態において、本開示は、ガイドRNA核酸及びクラス2 CasヌクレアーゼmRNAを含み、mRNA：ガイドRNA核酸の重量比が、約2：1～1：4、好ましくは約1：1である、本明細書に記載のLNP組成物に関する。

10

【0017】

ある特定の実施形態において、本開示は、gRNAが修飾gRNAであり、例えば、修飾gRNAが、5'末端の最初の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上に修飾を含む、または修飾gRNAが、3'末端の最後の5つのヌクレオチドのうちの1つ以上に修飾を含む、またはその両方である、本明細書に記載のLNP組成物に関する。

【0018】

ある特定の実施形態において、本開示は、生物学的に活性な薬剤を細胞に送達する方法であって、細胞を、本明細書に記載のLNP組成物に接触させることを含む、方法に関する。

【0019】

ある特定の実施形態において、本開示は、DNAを切断する方法であって、細胞を、本明細書に記載のLNP組成物に接触させることを含む、方法に関する。ある特定の実施形態において、切断ステップは一本鎖DNAニックを導入することを含む。他の実施形態において、切断ステップは二本鎖DNA切断を導入することを含む。ある特定の実施形態において、LNP組成物はクラス2 Cas mRNA及びgRNA核酸を含む。ある特定の実施形態において、この方法は、少なくとも1つの鑄型核酸を細胞に導入することをさらに含む。

20

【0020】

ある特定の実施形態において、本開示は、LNP組成物を動物（例えば、ヒト）に投与することを含む、本明細書に記載の任意の遺伝子編集の方法に関する。ある特定の実施形態において、この方法は、LNP組成物を、細胞（例えば、真核細胞、特にヒト細胞）に投与することを含む。いくつかの実施形態において、細胞は、療法（例えば、養子細胞療法 (ACT)）に有用なタイプである。ACTの例としては、自己由来細胞療法及び同種異系細胞療法が挙げられる。いくつかの実施形態において、細胞は幹細胞であり、例えば、造血幹細胞、誘導多能性幹細胞、または別の多分化能もしくは多能性細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は幹細胞であり、例えば、骨、軟骨、筋肉、または脂肪細胞に発達し得る間葉系幹細胞である。いくつかの実施形態において、幹細胞は眼球幹細胞を含む。ある特定の実施形態において、細胞は、間葉系幹細胞、造血幹細胞 (HSC)、単核細胞、内皮前駆細胞 (EPC)、神経幹細胞 (NSC)、辺縁幹細胞 (LSC)、組織特異的初代細胞またはそれに由来する細胞 (TSC)、誘導多能性幹細胞 (iPSC)、眼球幹細胞、多能性幹細胞 (PSC)、胚性幹細胞 (ESC)、及び臓器または組織移植用の細胞から選択される。

30

40

【0021】

ある特定の実施形態において、細胞は肝細胞である。他の実施形態において、細胞は免疫細胞であり、例えば、白血球またはリンパ球、好ましくはリンパ球、さらに好ましくはT細胞、B細胞、またはNK細胞、最も好ましくは活性化T細胞または非活性化T細胞である。

【0022】

ある特定の実施形態において、本開示は、mRNA、gRNA、及びgRNA核酸のうちの1つ以上を含む第1のLNP組成物及び第2のLNP組成物中で製剤化されたmRNA

50

Aを投与することを含む、本明細書に記載の任意の遺伝子編集の方法に関する。いくつかの実施形態において、第1及び第2のLNP組成物が同時に投与される。他の実施形態において、第1及び第2のLNP組成物が順次投与される。ある特定の実施形態において、mRNA及びgRNA核酸は、単一のLNP組成物中で製剤化される。いくつかの実施形態において、第1のLNP組成物は第1のgRNAを含み、第2のLNP組成物は第2のgRNAを含み、第1及び第2のgRNAは、異なる標的に相補的である異なるガイド配列を含む。

【0023】

ある特定の実施形態において、本開示は、細胞が*in vitro*でLNP組成物と接触される、本明細書に記載の遺伝子編集の任意の方法に関する。ある特定の実施形態において、本開示は、細胞が*ex vivo*でLNP組成物と接触される、本明細書に記載の遺伝子編集の任意の方法に関する。ある特定の実施形態において、本開示は、動物の組織をLNPに接触させることを含む、本明細書に記載の遺伝子編集の任意の方法に関する。

10

【0024】

ある特定の実施形態において、本開示は、遺伝子編集が遺伝子ノックアウトをもたらす、本明細書に記載の遺伝子編集の任意の方法に関する。

【0025】

いくつかの実施形態において、本開示は、遺伝子編集が遺伝子修正をもたらす、本明細書に記載の遺伝子編集の任意の方法に関する。

【0026】

ある特定の実施形態において、本開示は、遺伝子編集が挿入をもたらす、本明細書に記載の遺伝子編集の任意の方法に関する。いくつかの実施形態において、挿入は遺伝子挿入である。

20

【0027】

本明細書では、先行プロセスのハードルを克服する、T細胞を*in vitro*で遺伝子操作する方法が提供される。いくつかの実施形態において、ナイーブT細胞が*in vitro*で少なくとも1つの脂質組成物と接触され、遺伝子修飾される。いくつかの実施形態において、非活性化T細胞が*in vitro*で2つ以上の脂質組成物と接触され、遺伝子修飾される。いくつかの実施形態において、活性化T細胞が*in vitro*で2つ以上の脂質組成物と接触され、遺伝子修飾される。いくつかの実施形態において、T細胞は、（非活性化）T細胞を1つ以上の脂質組成物に接触させることを含む前活性化ステップで修飾され、次いでT細胞の活性化が行われ、次いで活性化されたT細胞を1つ以上の脂質組成物に接触させることを含む後活性化ステップでT細胞のさらなる修飾が行われる。いくつかの実施形態において、非活性化T細胞が1、2、または3つの脂質組成物と接触させられる。いくつかの実施形態において、活性化T細胞が1～12の脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、活性化T細胞が1～8つの脂質組成物、任意選択で1～4つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、活性化T細胞が1～6つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が2つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が3つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が4つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が5つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が6つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が7つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が8つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が9つの脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が10の脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が11の脂質組成物と接触される。いくつかの実施形態において、T細胞が12の脂質組成物と接触される。このような例示的な脂質組成物の順次投与（任意選択で、活性化前ステップ及び活性化後ステップでのさらなる順次投与または同時投与を伴うもの）は、T細胞の活性化状態を利用し、独自の利点及びより健康な細胞を編集後に提供する。いくつかの実施形態において、遺伝子操作T細胞は、各標的部位にお

30

40

50

る高い編集効率、編集後の生存率の増加、形質移入の多重度に反して低い毒性、低い転座（例えば、測定可能な標的間転座がない、測定可能な標的－標的間転座がない）、サイトカイン（例えば、 $IL-2$ 、 $IFN\gamma$ 、 $TNF\alpha$ ）の生成の増加、反復刺激による（例えば、反復抗原刺激による）増殖の継続、増殖の増加、及び／または記憶細胞（例えば、初期の幹細胞を含む）の表現型マーカーの発現を有する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1A】様々な比率の脂質構成要素を有する化合物6を含むLNP組成物を用いて、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを活性化CD3+T細胞に送達した後のCD3-細胞のパーセンテージを示すグラフである。

10

【図1B】様々な比率の脂質構成要素を有する化合物6を含むLNP組成物を用いて、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを非活性化CD3+T細胞に送達した後のCD3-細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図2A】様々な比率の脂質構成要素を有する化合物6を含むLNP組成物を用いて、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを活性化CD3+T細胞に送達した後のCD3-細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図2B】様々な比率の脂質構成要素を有する化合物6を含むLNP組成物を用いて、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを非活性化CD3+T細胞に送達した後のCD3-細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図3A】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する化合物6、化合物8、及び化合物11を含むLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する化合物6、化合物8、及び化合物11を含む比較LNP組成物を使用することにより、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを活性化CD3+T細胞に送達した後のCD3-細胞のパーセンテージを示すグラフである。

20

【図3B】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する化合物6、化合物8、及び化合物11を含むLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する化合物6、化合物8、及び化合物11を含む比較LNP組成物とを使用することにより、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを非活性化CD3+T細胞に送達した後のCD3-細胞のパーセンテージを示すグラフである。

30

【図4A】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する化合物6を含むLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMG脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを活性化CD3+T細胞に送達した後に、様々な比率のsgRNA： $Cas9$ mRNAがCD3-細胞のパーセンテージに及ぼす効果を示すグラフである。

40

【図4B】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する化合物6を含むLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、 $Cas9$ mRNA及びsgRNAを2例の異なるドナーからの非活性化CD3+T細胞に送達した後に、様々な比率のsgRNA： $Cas9$ mRNAがCD3-細胞のパーセンテージに及ぼす効果を示すグラフである。

50

【図 5】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する化合物6を含むLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びsgRNAを送達した後に、様々な血清培地条件が活性化CD3+T細胞におけるGFP挿入効率に及ぼす効果を示すグラフである。

【図 6 A】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びTRAC標的化sgRNAを活性化T細胞に送達した後に、様々なLNP組成物濃度がCD3+細胞のパーセンテージに及ぼす効果を示すグラフである。

【図 6 B】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMG脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びCIITA標的化sgRNAを活性化T細胞に送達した後に、様々な比率のLNP組成濃度がHLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ細胞のパーセンテージに及ぼす効果を示すグラフである。

【図 6 C】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMG脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びTRBC標的化sgRNAを活性化T細胞に送達した後に、様々なLNP組成濃度がCD3+細胞のパーセンテージに及ぼす効果を示すグラフである。

【図 6 D】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びHLA-A標的化sgRNAを活性化T細胞に送達した後に、様々なLNP組成物濃度がHLA-A細胞のパーセンテージに及ぼす効果を示すグラフである。

【図 7 A】0.65 µg/mLまたは2.5 µg/mLの濃度のLNP組成物を使用することにより、CIITA、HLA-A、TRAC、及びTRBC座位を標的とするCas9 mRNA及びsgRNAを送達した後のCD8+T細胞におけるHLA-A、CIITA、TCR及びWT1の各々の編集率を示すグラフであり、ここで、LNP組成物は、以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有し、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する比較LNP組成物及び陰性対照とともに用いた。

【図 7 B】0.65 µg/mLまたは2.5 µg/mLの濃度のLNP組成物を使用することにより、CIITA、HLA-A、TRAC、及びTRBC座位を標的とするCas9 mRNA及びsgRNAを送達した後のCD8+T細胞におけるHLA-A、CIITA、TCR及びWT1の各々の合わされた編集率を示すグラフであり、ここで、LNP組成物は、以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、4

10

20

30

40

50

7.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有し、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する比較LNP組成物及び陰性対照とともに用いた。

【図8】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMG脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びAAVS1標的化sgRNAをNK細胞に送達した後に、様々なLNP組成濃度が編集パーセントに及ぼす効果を示すグラフである。

10

【図9A】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMG脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びAAVS1標的化sgRNAを単球に送達した後に、様々なLNP組成濃度が編集パーセントに及ぼす効果を示すグラフである。

【図9B】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMG脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びAAVS1標的化sgRNAをマクロファージに送達した後に、様々なLNP組成濃度が編集パーセントに及ぼす効果を示すグラフである。

20

【図10】以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP組成物と、以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMG脂質構成要素を有する比較LNP組成物とを使用することにより、Cas9 mRNA及びAAVS1標的化sgRNAをB細胞に送達した後に、様々なLNP組成濃度が編集パーセントに及ぼす効果を示すグラフである。

30

【発明を実施するための形態】

【0029】

本開示は、生物学的に活性な薬剤（核酸（例えば、CRISPR/Cas構成要素RNA（mRNA及び／またはgRNA））（「カーゴ」）を含む）を細胞に送達するのに有用な脂質組成物、ならびにこのような組成物を調製及び使用する方法を提供する。このような脂質組成物は、イオン化可能な脂質、中性脂質、PEG脂質、及びヘルパー脂質を含む。いくつかの実施形態において、イオン化可能な脂質は、本明細書で定義される式（I）または（II）の化合物である。ある特定の実施形態において、脂質組成物は生物学的に活性な薬剤（例えば、RNA構成要素）を含むことができる。ある特定の実施形態において、RNA構成要素はmRNAを含む。いくつかの実施形態において、mRNAは、クラス2 CasヌクレアーゼをコードするmRNAである。ある特定の実施形態において、RNA構成要素は、gRNAと、任意選択でクラス2 CasヌクレアーゼをコードするmRNAとを含む。いくつかの実施形態において、脂質組成物は脂質ナノ粒子（LNP）組成物である。「脂質ナノ粒子」または「LNP」とは、意味を限定するものではないが、分子間力によって物理的に互いに結合した複数（すなわち、2つ以上）の脂質構成要素を含む粒子を指す。

40

【0030】

これらの脂質組成物を用いた遺伝子編集の方法及び操作細胞の作製方法も提供される。

50

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、生物学的に活性な薬剤を細胞、組織、または動物に送達するために使用することができる。いくつかの実施形態において、細胞は真核細胞、特にヒト細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は肝細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、療法、例えば、養子細胞療法（ACT）（例えば、自己由来及び同種異系細胞療法）に有用なタイプの細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は幹細胞であり、例えば、造血幹細胞、誘導多能性幹細胞、または別の多分化能もしくは多能性細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は幹細胞であり、例えば、骨、軟骨、筋肉、または脂肪細胞に発達し得る間葉系幹細胞である。いくつかの実施形態において、幹細胞は眼球幹細胞を含む。ある特定の実施形態において、細胞は、間葉系幹細胞、造血幹細胞（HSC）、単核細胞、内皮前駆細胞（EPC）、神経幹細胞（NSC）、10 辺縁幹細胞（LSC）、組織特異的初代細胞またはそれに由来する細胞（TSC）、誘導多能性幹細胞（iPSC）、眼球幹細胞、多能性幹細胞（PSC）、胚性幹細胞（ESC）、及び臓器または組織移植用の細胞から選択される。

【0031】

いくつかの実施形態において、細胞は免疫細胞（例えば、白血球またはリンパ球）である。好ましい実施形態において、免疫細胞はリンパ球である。ある特定の実施形態において、リンパ球はT細胞、B細胞、またはNK細胞である。好ましい実施形態において、リンパ球はT細胞である。ある特定の実施形態において、リンパ球は活性化T細胞である。ある特定の実施形態において、リンパ球は非活性化T細胞である。

【0032】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるLNP組成物及び方法は、約80%超、約90%超、または約95%超の編集効率をもたらす。いくつかの実施形態において、LNP組成物及び方法は、約80~95%、約90~95%、約80~99%、約90~99%、または約95~99%の編集効率をもたらす。

【0033】

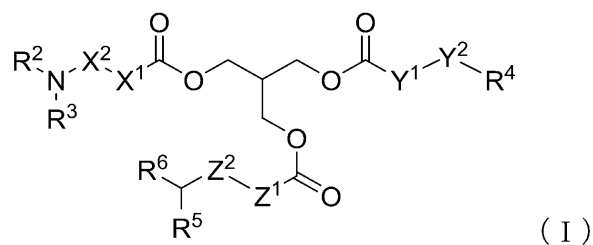
イオン化可能な脂質

本開示は、LNP組成物に使用できるイオン化可能な脂質を提供する。

【0034】

いくつかの実施形態において、イオン化可能な脂質は、式（I）の化合物

【化8】



（式中、

X¹はO、NH、または直接結合であり、

X²はC₂~3アルキレンであり、

R³はC₁~3アルキルであり、

R²はC₁~3アルキルであり、または

R²は、それが結合する窒素原子及びX²の2~3個の炭素原子と一緒になって5員もしくは6員環を形成し、または

R²は、R³及びそれらが結合している窒素原子と一緒になって5員環を形成し、

Y¹はC₆~10アルキレンであり、

Y²は

10

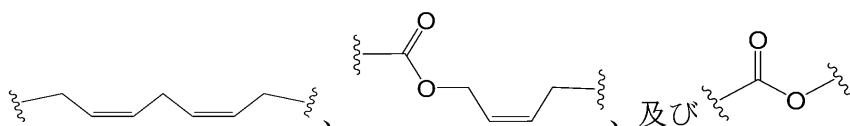
20

30

40

50

【化 9】



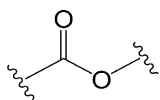
から選択され、

R^4 は $C_4 \sim 11$ アルキルであり、

Z^1 は $C_2 \sim 5$ アルキレンであり、

Z^2 は

【化 10】



または不在であり、

R^5 は、 $C_6 \sim 8$ アルキル、 $C_5 \sim 10$ アルコキシ（例えば、 $-OC_5 \sim 10$ ハロアルキル）、 $-O(C_2 \sim 3$ アルキル) $OC_6 \sim 10$ アルキル、 $-OC_6 \sim 10$ アルケニル（例えば、 $-OC_6 \sim 10$ 分枝状アルケニル）、もしくは $-OC_6 \sim 10$ アルキニルであり、

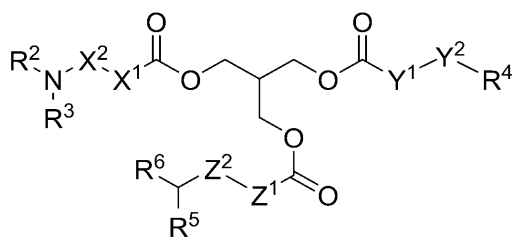
R^6 は、 $C_6 \sim 8$ アルキル、 $C_5 \sim 10$ アルコキシ（例えば、 $-OC_5 \sim 10$ ハロアルキル）、 $-O(C_2 \sim 3$ アルキル) $OC_6 \sim 10$ アルキル、 $-OC_6 \sim 10$ アルケニル（例えば、 $-OC_6 \sim 10$ 分枝アルケニル）、もしくは $-OC_6 \sim 10$ アルキニルであり、または R^5 は R^6 と一緒になって、ジェミナルな $C_6 \sim 8$ アルキルにより置換された 6 員環のアセタールを形成する）

またはその塩である。

【0035】

いくつかの実施形態において、イオン化可能な脂質は、式 I の構造を有する化合物

【化 11】



(I)

(式中、

X^1 は O、NH、または直接結合であり、

X^2 は $C_2 \sim 3$ アルキレンであり、

R^3 は $C_1 \sim 3$ アルキルであり、

R^2 は $C_1 \sim 3$ アルキルであり、または

R^2 は、それが結合する窒素原子及び X^2 の 2 ～ 3 個の炭素原子と一緒にになって 5 員もしくは 6 員環を形成し、または

R^2 は、 R^3 及びそれらが結合している窒素原子と一緒にになって 5 員環を形成し、

Y^1 は $C_6 \sim 10$ アルキレンであり、

Y^2 は

10

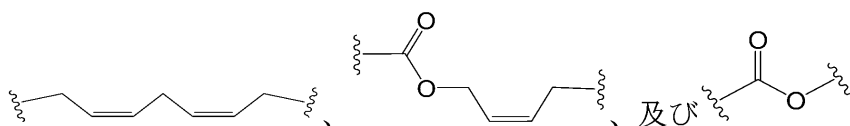
20

30

40

50

【化 1 2】



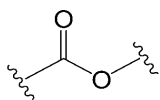
から選択され、

R^4 は $C_4 \sim 11$ アルキルであり、

Z^1 は $C_2 \sim 5$ アルキレンであり、

Z^2 は

【化 1 3】



または不在であり、

R^5 は $C_6 \sim 8$ アルキルまたは $C_6 \sim 8$ アルコキシであり、

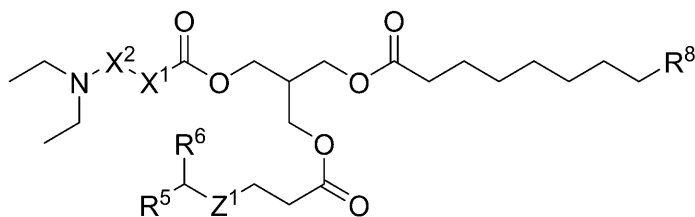
R^6 は $C_6 \sim 8$ アルキルまたは $C_6 \sim 8$ アルコキシである)

またはその塩である。

【0036】

いくつかの実施形態において、イオン化可能な脂質は、式 (I I) の化合物

【化 1 4】



(I I)

(式中、

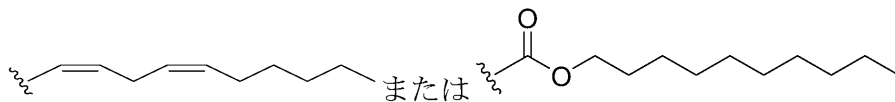
X^1 は O 、 NH 、または直接結合であり、

X^2 は $C_2 \sim 3$ アルキレンであり、

Z^1 は C_3 アルキレンであり、 R^5 及び R^6 は各々 C_6 アルキルであり、または Z^1 は直接結合であり、 R^5 及び R^6 は各々 C_8 アルコキシであり、

R^8 は

【化 1 5】



である)

またはその塩である。

【0037】

ある特定の実施形態において、 X^1 は O であり、他の実施形態において、 X^1 は NH で

ある。さらに他の実施形態において、 X^1 は直接結合である。

【0038】

ある特定の実施形態において、 X^2 は C_3 アルキレンである。特定の実施形態において、 X^2 は C_2 アルキレンである。

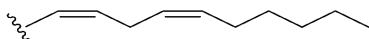
【0039】

ある特定の実施形態において、 Z^1 は直接結合であり、 R^5 及び R^6 は各々 C_8 アルコキシである。他の実施形態において、 Z^1 は C_3 アルキレンであり、 R^5 及び R^6 は各々 C_6 アルキルである。

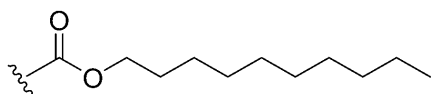
【0040】

ある特定の実施形態において、 R^8 は
【化16】

10



である。他の実施形態において、 R^8 は
【化17】



20

である。

【0041】

ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質は塩である。

【0042】

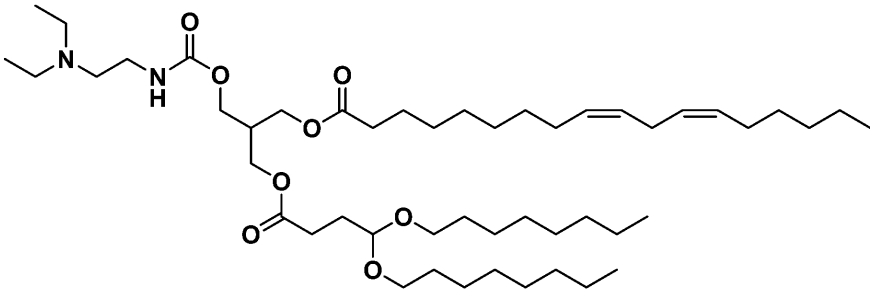
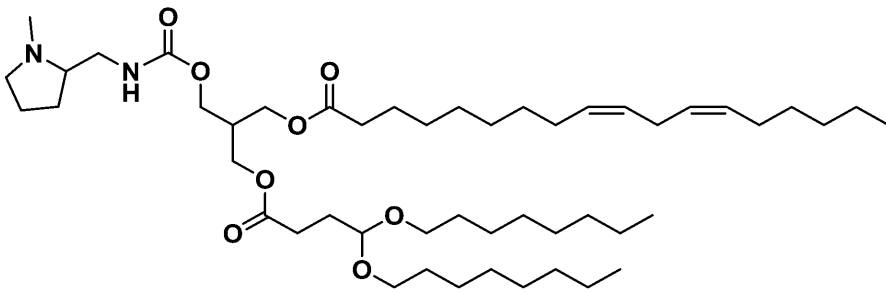
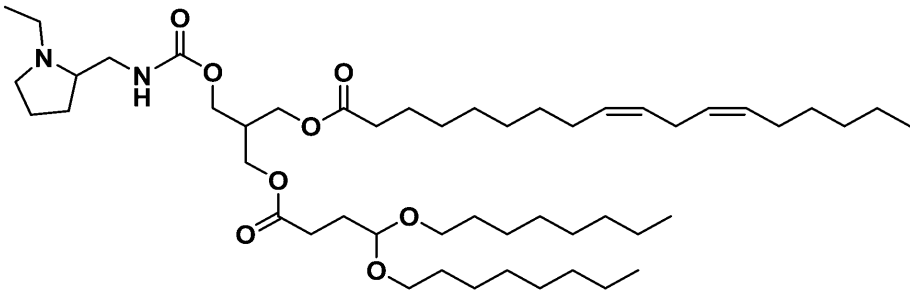
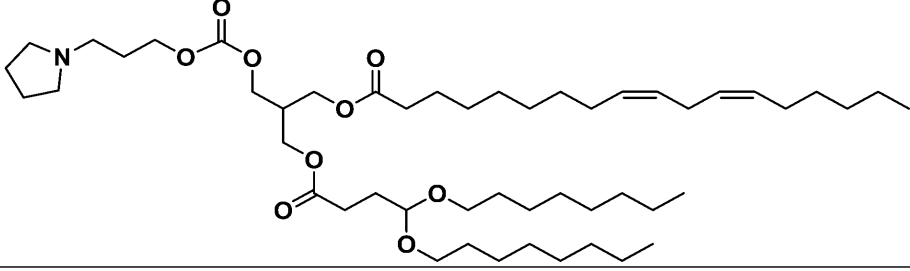
式 (I) の代表的な化合物としては、以下：

30

40

50

【表 1 - 1】

化合物番号	化合物
1	
2	
3	
4	

10

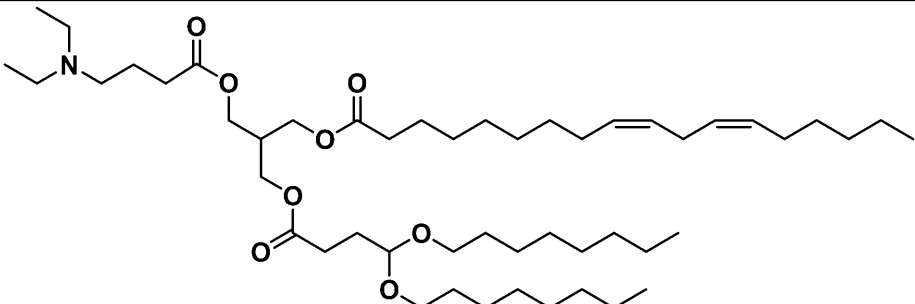
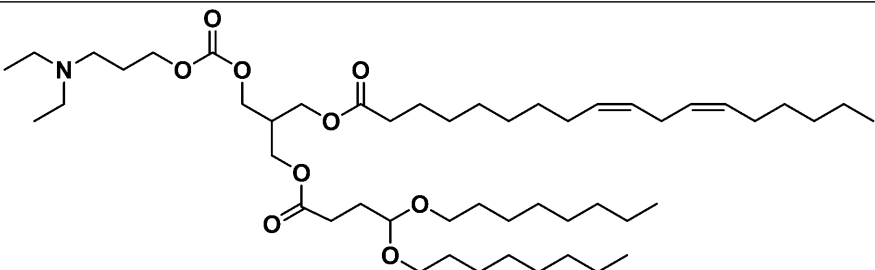
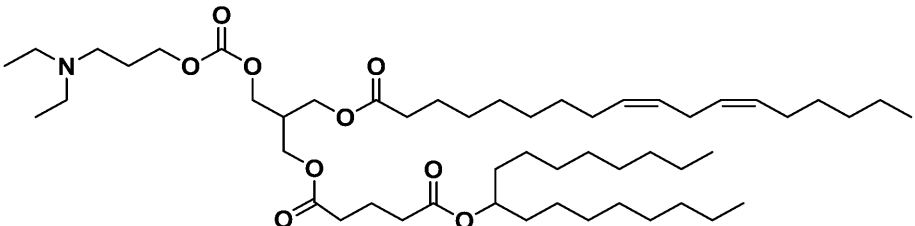
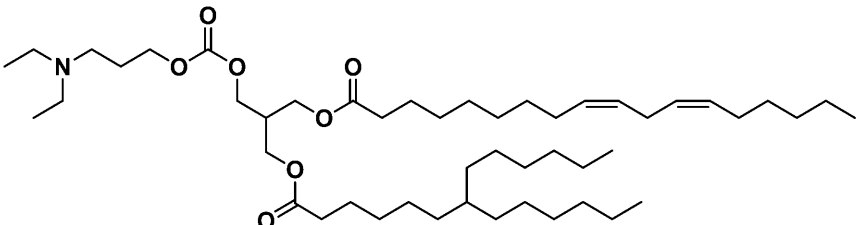
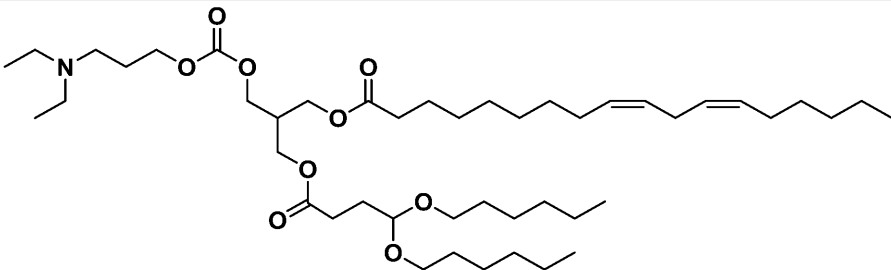
20

30

40

50

【表 1 - 2】

化合物番号	化合物
5	
6	
7	
8	
9	

10

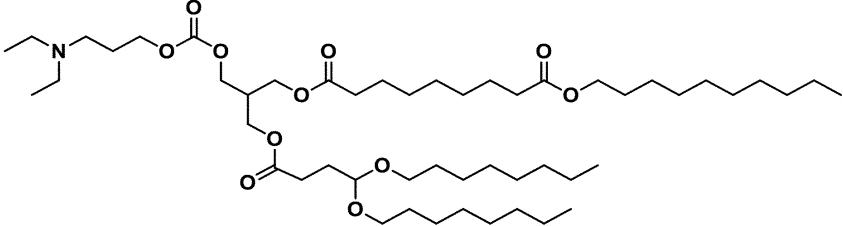
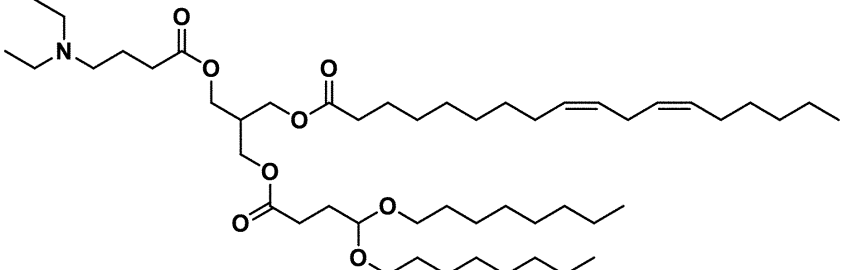
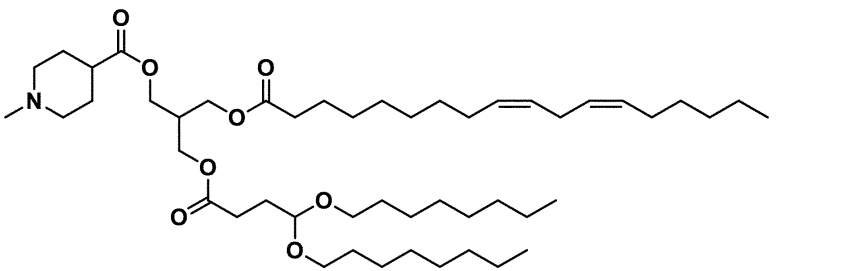
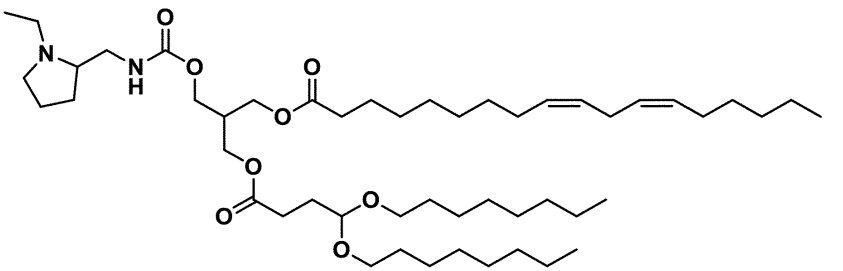
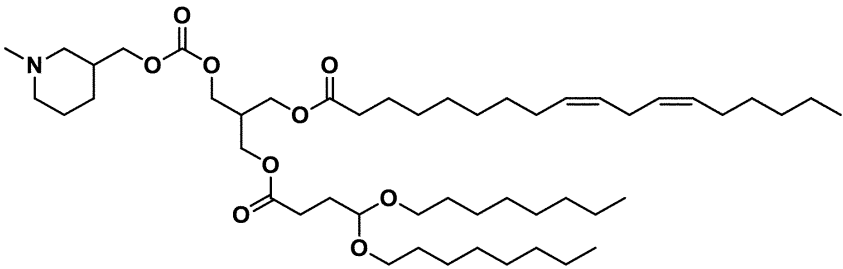
20

30

40

50

【表 1 - 3】

化合物番号	化合物
1 0	
1 1	
1 2	
1 3	
1 4	

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

化合物番号	化合物
1 5	
1 6	
1 7	
1 8	
1 9	

10

20

30

40

またはその塩、例えばその医薬的に許容される塩が挙げられる。化合物は、WO 2 0 1 5 / 0 9 5 3 4 0（例えば、8 4～8 6 ページ）及びWO 2 0 2 0 / 2 1 9 8 7 6（例えば、8 7～1 8 6 ページ）（これらの各々は、参照により全体として組み込まれる）に記載の方法に従って合成することができる。

【0 0 4 3】

本開示の式（I）または（II）の化合物は、それらが存在する媒体のpHに応じて塩を形成することができる。例えば、わずかに酸性の媒体中では、式（I）または（II）の化合物はプロトン化されて正電荷を有することがある。逆に、わずかに塩基性の媒体（例えば、pHがおよそ7.35の血液）中では、式（I）または（II）の化合物はプロ

50

トン化されず、電荷を有しないことがある。いくつかの実施形態において、本開示の式 (I) または (II) の化合物は、主に少なくとも約 9 の pH でプロトン化され得る。いくつかの実施形態において、本開示の式 (I) または (II) の化合物は、主に少なくとも約 10 の pH でプロトン化され得る。

【0044】

式 (I) または (II) の化合物が主にプロトン化される pH は、その固有の pKa に関連する。いくつかの実施形態において、本開示の式 (I) または (II) の化合物の塩は、約 5.1 ~ 約 8.0、さらに好ましくは約 5.5 ~ 約 7.6 の範囲の pKa を有する。いくつかの実施形態において、本開示の式 (I) または (II) の化合物の塩は、約 5.7 ~ 約 8.0、約 5.7 ~ 約 7.6、約 6 ~ 約 8.0、約 6 ~ 約 7.5、約 6 ~ 約 7.0、約 6 ~ 約 6.9、約 6 ~ 約 6.5、約 6.1 ~ 約 6.9、または約 6 ~ 約 6.85 の範囲の pKa を有する。いくつかの実施形態において、本開示の式 (I) または (II) の化合物の塩は、約 6.0、約 6.1、約 6.1、約 6.2、約 6.3、約 6.4、約 6.6、約 6.7、約 6.8、または約 6.9 の pKa を有する。代替的に、本開示の式 (I) または (II) の化合物の塩は、約 6 ~ 約 8 の範囲の pKa を有する。式 (I) または (II) の化合物の塩の pKa は、LNP を製剤化する際に重要な考慮事項となり得る。これは、約 5.5 ~ 約 7.0 の範囲の pKa を有するある特定の脂質を用いて製剤化された LNP が、例えば肝臓への、カーゴの *in vivo* 送達に有効であることが分かっているためである。さらに、約 5.3 ~ 約 6.4 の範囲の pKa を有するある特定の脂質で製剤化した LNP は、例えば腫瘍への *in vivo* 送達に有効であることが分かっている。例えば、WO2014/136086 を参照。いくつかの実施形態において、イオン化可能な脂質は、酸性 pH では正に帯電しているが、血液中では中性である。

10

20

【0045】

追加の脂質

本開示の脂質組成物に使用するのに適した「中性脂質」としては、例えば、様々な中性、非荷電、または双性イオン性脂質が挙げられる。本開示での使用に適した中性リン脂質の例としては、限定されるものではないが、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ホスホコリン (DOPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMP C)、ホスファチジルコリン (PLPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DAPC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジラウロイルホスファチジルコリン (DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMP C)、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン (MPPC)、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン (PMP C)、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン (PSPC)、1,2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DBPC)、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン (SPPC)、1,2-ジェイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DEPC)、パルミトイルオレイルホスファチジルコリン (POPC)、リゾホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジリノレイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、パルミトイルオレイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組合せが挙げられる。ある特定の実施形態において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) 及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPE) から選択することができ、好ましくはジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) であり得る。

30

40

【0046】

「ヘルパー脂質」としては、ステロイド、ステロール、及びアルキルレゾルシノールが挙げられる。本開示での使用に適したヘルパー脂質としては、限定されるものではないが

50

、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、及びコレステロールヘミスクシネートが挙げられる。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質はコレステロールまたはその誘導体、例えばコレステロールヘミスクシネートであり得る。

【0047】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、ポリマー脂質、例えば、ナノ粒子が *in vivo* または *ex vivo*（例えば、血液中または培地中）で存在できる時間の長さに影響を及ぼし得るPEG脂質を含む。PEG脂質は、例えば、粒子の凝集を低減し、粒子サイズを制御することにより、製剤化プロセスを支援することができる。本明細書で使用するPEG脂質は、LNPの薬物動態特性を調節することができる。典型的には、PEG脂質は、脂質部分と、PEG（ポリ（エチレンオキシド）と称されることもある）に基づくポリマー部分（PEG部分）とを含む。本開示の式（I）または（II）の化合物を有する脂質組成物に使用するのに適したPEG脂質、及びこのような脂質の生化学に関する情報は、Romberg et al., *Pharmaceutical Research* 25 (1), 2008, pp. 55-71 及び Hoekstra et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52に見出すことができる。追加の好適なPEG脂質は、例えば、WO 2015/095340（p. 31の第14行～p. 37の第6行）、WO 2006/007712、及びWO 2011/076807（「ステルス脂質」）に開示されており、これらの各々は参照により全体として組み込まれる。

10

【0048】

いくつかの実施形態において、脂質部分はジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドに由来してもよく、これには、約C4～約C40の飽和または不飽和炭素原子を独立して含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基を含むものが含まれ、ここで、鎖は1つ以上の官能基（例えば、アミドまたはエステル）を含むことができる。いくつかの実施形態において、アルキル鎖長は約C10～C20を含む。ジアルキルグリセロール基またはジアルキルグリカミド基は、1つ以上の置換アルキル基をさらに含むことができる。鎖長は対称であっても非対称であってもよい。

20

【0049】

別段の指示がない限り、本明細書で使用する場合、「PEG」という用語は、任意のポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマー、例えば、エチレングリコールまたはエチレンオキシドの任意選択で置換された直鎖状または分枝状ポリマーを意味する。ある特定の実施形態において、PEG部分は置換されていない。代替的に、PEG部分は、例えば、1つ以上のアルキル基、アルコキシ基、アシル基、ヒドロキシ基、またはアリアル基によって置換されてもよい。例えば、PEG部分はPEG-ポリウレタンまたはPEG-ポリプロピレンなどのPEGコポリマーを含んでもよく（例えば、J. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992)を参照）、代替的に、PEG部分はPEGホモポリマーであってもよい。ある特定の実施形態において、PEG部分は約130～約50,000、例えば、約150～約30,000、さらに約150～約20,000の分子量を有する。同様に、PEG部分は約150～約15,000、約150～約10,000、約150～約6,000、またはさらに約150～約5,000の分子量を有することができる。ある特定の好ましい実施形態において、PEG部分は約150～約4,000、約150～約3,000、約300～約3,000、約1,000～約3,000、または約1,500～約2,500の分子量を有する。

30

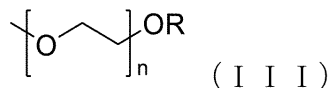
40

【0050】

ある特定の好ましい実施形態において、PEG部分は「PEG-2K」（「PEG-2000」とも称される）であり、これは約2,000ダルトンの平均分子量を有する。PEG-2Kは、本明細書では以下の式（III）、

50

【化 18】



によって表され、式中、 n は約45であり、これは数平均重合度が約45のサブユニットを含むことを意味する。ただし、当技術分野で知られている他のPEG実施形態（例えば、数平均重合度が約23サブユニット（ $n=23$ ）及び／または68サブユニット（ $n=68$ ）を含む実施形態を含む）を使用することができる。いくつかの実施形態において、 n は約30～約60の範囲とすることができる。いくつかの実施形態において、 n は約35～約55の範囲とすることができる。いくつかの実施形態において、 n は約40～約50の範囲とすることができる。いくつかの実施形態において、 n は約42～約48の範囲とすることができる。いくつかの実施形態において、 n は45とすることができる。いくつかの実施形態において、 R は、 H 、置換アルキル、及び非置換アルキルから選択することができる。いくつかの実施形態において、 R は、メチルなどの非置換アルキルであり得る。

【0051】

本明細書に記載の実施形態のいずれかにおいて、PEG脂質は、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）（カタログ番号GM-020（NOF, Tokyo, Japan））、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール（PEG-DSP）（カタログ番号DSP-020CN（NOF, Tokyo, Japan））、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、及びPEG-ジステアロイルグリカミド、PEG-コレステロール（1-[8'-（コレスト-5-エン-3[ベータ]-オキシ）カルボキサミド-3'-, 6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール））、PEG-DMB（3, 4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール）エーテル）、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DMPE）、1, 2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000（PEG2k-DMG）、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DSP）（カタログ番号880120C（Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA））、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（PEG2k-DSG; GS-020（NOF Tokyo, Japan））、ポリ（エチレングリコール）-2000-ジメタクリレート（PEG2k-DMA）、及び1, 2-ジステアリルオキシプロピル-3-アミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DSA）から選択することができる。ある特定のこのような実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DMGであってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DSGであってもよい。他の実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DSPであってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DMAであってもよい。また他の実施形態において、PEG脂質はPEG2k-C-DMAであってもよい。ある特定の実施形態において、PEG脂質はWO2016/010840（段落[00240]～[00244]）に開示されている化合物S027であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DSAであってもよい。他の実施形態において、PEG脂質はPEG2k-C11であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質はPEG2k-C14であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質はPEG2k-C16であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質はP

G 2 k - C 1 8であってもよい。

【 0 0 5 2 】

好ましい実施形態において、P E G 脂質はグリセロール基を含む。好ましい実施形態において、P E G 脂質はジミリストイルグリセロール（D M G）基を含む。好ましい実施形態において、P E G 脂質はP E G - 2 kを含む。好ましい実施形態において、P E G 脂質はP E G - D M Gである。好ましい実施形態において、P E G 脂質はP E G - 2 k - D M Gである。好ましい実施形態において、P E G 脂質は1，2 - ジミリストイル - r a c - グリセロ - 3 - メトキシポリエチレングリコール - 2 0 0 0である。好ましい実施形態において、P E G - 2 k - D M Gは1，2 - ジミリストイル - r a c - グリセロ - 3 - メトキシポリエチレングリコール - 2 0 0 0である。

10

【 0 0 5 3 】

脂質組成物

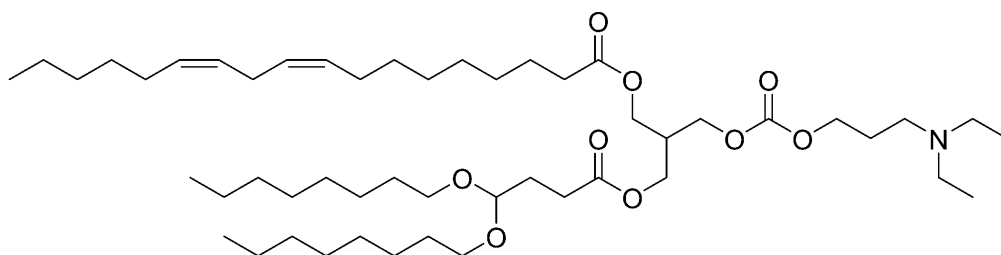
本明細書では、少なくとも1つの式（I）もしくは（II）の化合物、またはその塩（例えば、その医薬的に許容される塩）、少なくとも1つのヘルパー脂質、少なくとも1つの中性脂質、及び少なくとも1つのポリマー脂質を含む脂質組成物が記載されている。いくつかの実施形態において、脂質組成物は、少なくとも1つの式（I）もしくは（II）の化合物またはその塩、少なくとも1つの中性脂質、少なくとも1つのヘルパー脂質、及び少なくとも1つのP E G 脂質を含む。いくつかの実施形態において、中性脂質はD S P CまたはD P M Eである。いくつかの実施形態において、ヘルパー脂質はコレステロール、5 - ヘプタデシルレゾルシノール、またはコレステロールヘミスクシネートである。

20

【 0 0 5 4 】

好ましい実施形態において、イオン化可能な脂質は

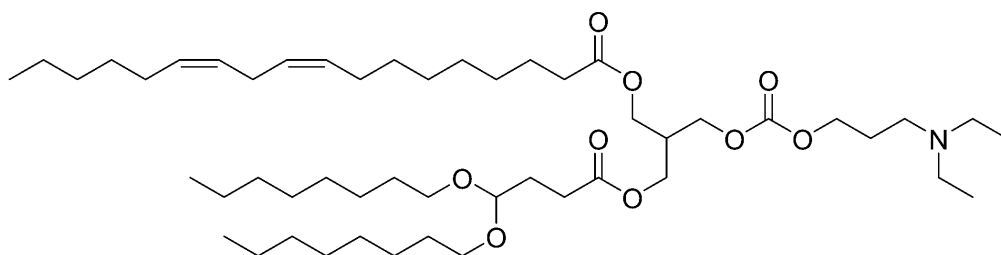
【 化 1 9 】



30

である。好ましい実施形態において、中性脂質はD S P Cである。好ましい実施形態において、ヘルパー脂質はコレステロールである。好ましい実施形態において、P E G 脂質は1，2 - ジミリストイル - r a c - グリセロ - 3 - メトキシポリエチレングリコール - 2 0 0 0である。特に好ましい実施形態において、イオン化可能な脂質は

【 化 2 0 】



40

であり、中性脂質はD S P Cであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、P E G 脂質は1，2 - ジミリストイル - r a c - グリセロ - 3 - メトキシポリエチレングリコール - 2 0 0 0である。

50

【0055】

いくつかの実施形態において、脂質組成物は、1つ以上の追加の脂質構成要素をさらに含む。

【0056】

いくつかの実施形態において、脂質組成物はリボソームの形態をとる。好ましい実施形態において、脂質組成物は脂質ナノ粒子（LNP）の形態をとる。ある特定の実施形態において、脂質組成物は *in vivo* 送達に適している。ある特定の実施形態において、脂質組成物は肝臓などの器官への送達に適している。ある特定の実施形態において、脂質組成物は組織への *ex vivo* 送達に適している。ある特定の実施形態において、脂質組成物は細胞への *in vitro* 送達に適している。

10

【0057】

式（I）もしくは（II）の脂質、またはその医薬的に許容される塩を含む脂質組成物は様々な形態をとることができ、これには、限定されるものではないが、様々な分子を細胞に送達するのに有用であるマイクロ粒子、ナノ粒子、及び形質移入剤を含む粒子形成送達剤が含まれる。特定の組成物は、生物学的に活性な薬剤の形質移入または送達に有効である。好ましい生物学的に活性な薬剤はRNAなどの核酸である。さらなる実施形態において、生物学的に活性な薬剤は、mRNA及びgRNAから選択される。gRNAは、dgRNAまたはsgRNAであり得る。ある特定の実施形態において、カーゴは、RNA先導DNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ、クラス2 Casヌクレアーゼ、もしくはCas9）をコードするmRNA、gRNAもしくはgRNAをコードする核酸、またはmRNA及びgRNAの組合せを含む。

20

【0058】

上記の脂質組成物に使用するための式（I）または（II）の例示的な化合物は、WO 2020/219876（参照により全体として組み込まれる）に示されている。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物1である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物2である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物3である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物4である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物5である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物6である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物7である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物8である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物9である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物10である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物11である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物12である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物13である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物14である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物15である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物16である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物17である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物18である。ある特定の実施形態において、式（I）の化合物は化合物19である。

30

【0059】

概して組成物は、必ずしもそうではないが、1つ以上の医薬的に許容される賦形剤を含む。「賦形剤」という用語は、本開示の化合物（複数可）、他の脂質構成要素（複数可）、及び生物学的に活性な薬剤以外の任意の構成要素を含む。賦形剤は、組成物に機能的特性（例えば、薬物放出速度の制御）及び／または非機能的特性（例えば、処理補助もしくは希釈）のいずれかを付与することができる。賦形剤の選択は、特定の投与様式、賦形剤が溶解性及び安定性に及ぼす影響、及び投与形態の性質などの要因にかなりの程度まで依存する。

40

【0060】

典型的には、非経口製剤は水性または油性の溶液または懸濁液である。製剤が水性である場合、糖（例えば、限定されるものではないが、グルコース、マンニトール、ソルビト

50

ールなどを含む)、塩、炭水化物、及びバッファー(好ましくは3から9までのpHにするもの)などの賦形剤となるが、いくつかの用途においては、無菌の非水溶液を用いて、または無菌のピロジェンフリー水(WFI)などの好適なビヒクルとともに使用するため乾燥形態として、より好適に製剤化することができる。

【0061】

LNP組成物

脂質組成物はLNP組成物として提供することができ、本明細書に記載のLNP組成物は脂質組成物として提供することができる。脂質ナノ粒子は、例えば、ミクロスフェア(単層及び多重層小胞、例えば、「リポソーム」：いくつかの実施形態において、実質的に球状であり、より特定の実施形態において、水性コアを含むことができる(例えば、RNA分子の実質的な部分を含む)層状相脂質二重層を含む)、エマルション中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相であり得る。

10

【0062】

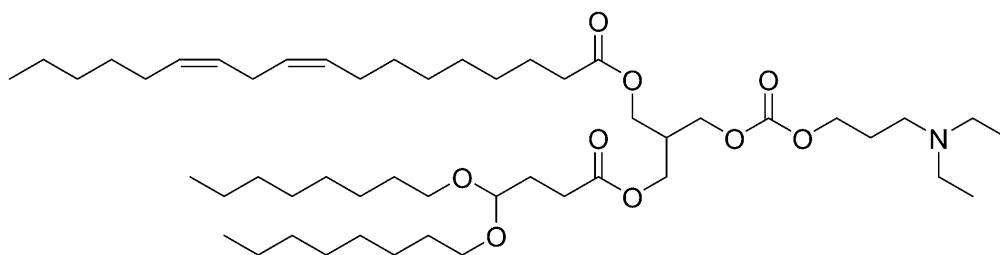
本明細書では、少なくとも1つの式(I)もしくは(II)の化合物、またはその塩(例えば、その医薬的に許容される塩)、少なくとも1つのヘルパー脂質、少なくとも1つの中性脂質、及び少なくとも1つのポリマー脂質を含むLNP組成物が記載されている。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、少なくとも1つの式(I)もしくは(II)の化合物またはその医薬的に許容される塩、少なくとも1つの中性脂質、少なくとも1つのヘルパー脂質、及び少なくとも1つのPEG脂質を含む。いくつかの実施形態において、中性脂質はDSPCまたはDPMEである。いくつかの実施形態において、ヘルパー脂質はコレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、またはコレステロールヘミスクシネートである。

20

【0063】

好ましい実施形態において、イオン化可能な脂質は

【化21】

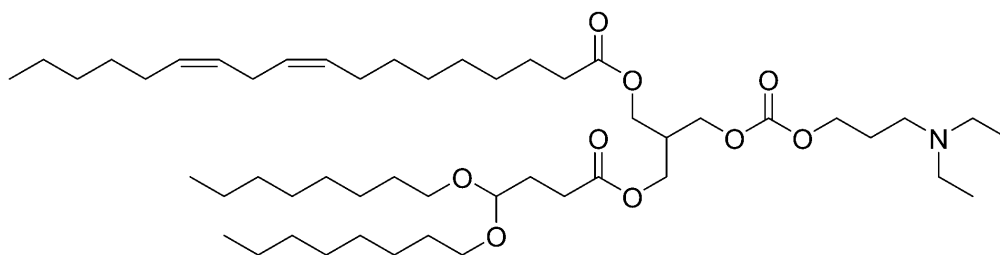


30

である。好ましい実施形態において、中性脂質はDSPCである。好ましい実施形態において、ヘルパー脂質はコレステロールである。好ましい実施形態において、PEG脂質は1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000である。特に好ましい実施形態において、イオン化可能な脂質は

【化22】

40



であり、中性脂質はDSPCであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、PEG脂質

50

は 1, 2-ジミリスチル-*rac*-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 である。

【0064】

本開示の実施形態は、組成物中の構成要素脂質のそれぞれのモル比に従って記載される脂質組成物を提供する。全てのmol%の数字は、脂質組成物、より具体的にはLNP組成物の脂質構成要素の割合として示されている。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対する脂質のmol%は、脂質の指定、名目、または実測mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対する脂質のmol%は、脂質構成要素の指定、名目、または実測mol%の±4mol%、±3mol%、±2mol%、±1.5mol%、±1mol%、±0.5mol%、±0.25mol%、または±0.05mol%となる。ある特定の実施形態において、脂質のmol%は、脂質の指定、名目、または実測mol%から15%未満、10%未満、5%未満、1%未満、または0.5%未満変動する。いくつかの実施形態において、mol%の数字は名目濃度に基づく。本明細書で使用する場合、「名目濃度」とは、得られる組成物を形成するために組み合わせられる物質の投入量に基づく濃度を指す。例えば、100mgの溶質を1Lの水に加える場合、名目濃度は100mg/Lである。いくつかの実施形態において、mol%の数字は実測濃度、例えば、解析方法によって定量された濃度に基づく。いくつかの実施形態において、脂質構成要素の脂質の実測濃度は、例えば、クロマトグラフィー（例えば、液体クロマトグラフィー）を行い、次に検出方法（例えば、荷電エアロゾル検出）を行うことにより定量することができる。いくつかの実施形態において、脂質構成要素の脂質の実測濃度は、脂質解析、AF4-MALS、NTA、及び／またはクライオEMによって特性評価することができる。全てのmol%の数字は、脂質構成要素の脂質のパーセンテージとして示されている。

10

20

【0065】

本開示の実施形態は、脂質構成要素の脂質のそれぞれのモル比に従って記載されるLNP組成物を提供する。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は約25mol%～約45mol%であり、中性脂質の量は約10mol%～約30mol%であり、ヘルパー脂質の量は約25mol%～約65mol%であり、PEG脂質の量は約1.5mol%～約3.5mol%である。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は脂質構成要素の約29～44mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約11～28mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約28～55mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約2.3～3.5mol%である。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は脂質構成要素の約29～38mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約11～20mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約43～55mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約2.3～2.7mol%である。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は脂質構成要素の約25～34mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約10～20mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約45～65mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約2.5～3.5mol%である。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質は脂質構成要素の約30～43mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約10～17mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約43.5～56mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約1.5～3mol%である。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質は脂質構成要素の約33mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約15mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約49mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約3mol%である。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は脂質構成要素の約32.9mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約15.2mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約49.2mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約2.7mol%である。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は脂質構成要素

30

40

50

の約35mol%であり、中性脂質の量は脂質構成要素の約15mol%であり、ヘルパー脂質の量は脂質構成要素の約47.5mol%であり、PEG脂質の量は脂質構成要素の約2.5mol%である。

【0066】

ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は、約20～50mol%、約25～34mol%、約25～38mol%、約25～45mol%、約29～38mol%、約29～43mol%、約29～34mol%、約30～34mol%、約30～38mol%、約30～43mol%、約30～43mol%、または約33mol%である。追加の実施形態において、イオン化可能な脂質の量は、25～45mol%、約25～43mol%、約25～40mol%、約25～38mol%、約25～35mol%、約25～33mol%、約25～30mol%、約25～28mol%、約28～45mol%、約28～43mol%、約28～40mol%、約28～38mol%、約28～35mol%、約28～33mol%、約28～30mol%、約30～45mol%、約30～43mol%、約30～40mol%、約30～38mol%、約30～35mol%、約30～33mol%、約32～45mol%、約32～43mol%、約32～40mol%、約32～38mol%、約32～35mol%、約35～45mol%、約35～43mol%、約35～40mol%、約35～38mol%、約37～45mol%、約37～43mol%、約37～40mol%、約40～45mol%、約40～43mol%、または約42～45mol%である。いくつかの実施形態において、イオン化可能な脂質のmol%は、約30mol%、約31mol%、約32mol%、約33mol%、約34mol%、約35mol%、約36mol%、約37mol%、約38mol%、約39mol%、約40mol%、約41mol%、約42mol%、約43mol%、約44mol%、または約45mol%であり得る。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対するイオン化可能な脂質のmol%は、指定、名目、または実測mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対するイオン化可能な脂質のmol%は、指定、名目、または実測mol%の±4mol%、±3mol%、±2mol%、±1.5mol%、±1mol%、±0.5mol%、または±0.25mol%となる。ある特定の実施形態において、イオン化可能な脂質のmol%のLNPロット間変動は、15%未満、10%未満、または5%未満となる。いくつかの実施形態において、mol%の数字は名目濃度に基づく。いくつかの実施形態において、mol%の数字は実測濃度に基づく。

【0067】

ある特定の実施形態において、中性脂質の量は、約10～30mol%、約11～30mol%、約11～20mol%、約13～17mol%、または約15mol%である。追加の実施形態において、中性脂質の量は、約5～30mol%、約5～28mol%、約5～25mol%、約5～23mol%、約5～20mol%、約5～18mol%、約5～23mol%、約5～20mol%、約5～18mol%、約5～15mol%、約5～13mol%、約5～10mol%、約10～30mol%、約10～28mol%、約10～25mol%、約10～23mol%、約10～20mol%、約10～18mol%、約10～23mol%、約10～20mol%、約10～18mol%、約10～15mol%、約10～13mol%、約12～30mol%、約12～28mol%、約12～25mol%、約12～23mol%、約12～20mol%、約12～18mol%、約12～23mol%、約12～20mol%、約12～18mol%、約12～15mol%、約15～30mol%、約15～28mol%、約15～25mol%、約15～23mol%、約15～20mol%、約15～18mol%、約17～30mol%、約17～28mol%、約17～25mol%、約17～23mol%、約17～20mol%、約17～18mol%、約17～23mol%、約17～20mol%、約20～30mol%、約20～28mol%、約20～25mol%、約20～23mol%

l%、約22~30mol%、約22~28mol%、約22~25mol%、約22~23mol%、約22~20mol%、または約22~18mol%であり得る。いくつかの実施形態において、中性脂質のmol%は、約10mol%、約11mol%、約12mol%、約13mol%、約14mol%、約15mol%、約16mol%、約17mol%、約18mol%、約19mol%、約20mol%、約21mol%、約22mol%、約23mol%、約24mol%、または約25mol%であり得る。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対する中性脂質のmol%は、指定、名目、または実測中性脂質mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対する中性脂質のmol%は、指定、名目、または実測mol%の±4mol%、±3mol%、±2mol%、±1.5mol%、±1mol%、±0.5mol%、または±0.25mol%となる。ある特定の実施形態において、LNPのロット間変動は15%未満、10%未満、または5%未満となる。いくつかの実施形態において、mol%の数字は名目濃度に基づく。いくつかの実施形態において、mol%の数字は実測濃度に基づく。

10

【0068】

ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質の量は、約35~50mol%、約35~65mol%、約35~55mol%、約38~50mol%、約38~55mol%、約38~65mol%、約40~50mol%、約40~65mol%、約43~65mol%、約43~55mol%、または約49mol%である。追加の実施形態において、ヘルパー脂質の量は、約25~65mol%、約28~65mol%、約30~65mol%、約32~65mol%、約35~65mol%、約38~65mol%、約40~65mol%、約42~65mol%、約45~65mol%、約48~65mol%、約50~65mol%、約52~65mol%、約55~65mol%、約58~65mol%、約60~65mol%、約25~62mol%、約28~62mol%、約30~62mol%、約32~62mol%、約35~62mol%、約38~62mol%、約40~62mol%、約42~62mol%、約45~62mol%、約48~62mol%、約50~62mol%、約52~62mol%、約55~62mol%、約58~62mol%、約60~62mol%、約25~60mol%、約28~60mol%、約30~60mol%、約32~60mol%、約35~60mol%、約38~60mol%、約40~60mol%、約42~60mol%、約45~60mol%、約48~60mol%、約50~60mol%、約52~60mol%、約55~60mol%、約58~60mol%、約25~58mol%、約28~58mol%、約30~58mol%、約32~58mol%、約35~58mol%、約38~58mol%、約40~58mol%、約42~58mol%、約45~58mol%、約48~58mol%、約50~58mol%、約52~58mol%、約55~58mol%、約25~55mol%、約28~55mol%、約30~55mol%、約32~55mol%、約35~55mol%、約38~55mol%、約40~55mol%、約42~55mol%、約45~55mol%、約48~55mol%、約50~55mol%、約52~55mol%、約25~53mol%、約28~53mol%、約30~53mol%、約32~53mol%、約35~53mol%、約38~53mol%、約40~53mol%、約42~53mol%、約45~53mol%、約48~53mol%、約50~53mol%、約25~50mol%、約28~50mol%、約30~50mol%、約32~50mol%、約35~50mol%、約38~50mol%、約40~50mol%、約42~50mol%、約45~50mol%、約48~50mol%、約25~48mol%、約28~48mol%、約30~48mol%、約32~48mol%、約35~48mol%、約38~48mol%、約40~48mol%、約42~48mol%、約45~48mol%、約25~45mol%、約28~45mol%、約30~45mol%、約32~45mol%、約35~45mol%、約38~45mol%、約40~45mol%、約42~45mol%、約25~43mol%、約28~43mol%、約30~43mol%、約32~43mol%、約35~43mol%

20

30

40

50

l %、約 38 ~ 43 mol %、約 40 ~ 43 mol %、約 25 ~ 40 mol %、約 28 ~ 40 mol %、約 30 ~ 40 mol %、約 32 ~ 40 mol %、約 35 ~ 40 mol %、約 38 ~ 40 mol %、約 25 ~ 38 mol %、約 28 ~ 38 mol %、約 30 ~ 38 mol %、約 32 ~ 38 mol %、約 35 ~ 38 mol %、約 25 ~ 35 mol %、約 28 ~ 35 mol %、約 30 ~ 35 mol %、約 32 ~ 35 mol %、約 25 ~ 33 mol %、約 28 ~ 33 mol %、約 30 ~ 33 mol %、約 25 ~ 30 mol %、約 28 ~ 30 mol %、または約 25 ~ 28 mol %であり得る。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質の量は、イオン化可能な脂質、中性脂質、及び／または PEG 脂質の量に基づき、脂質構成要素を約 100 mol %にするように調整される。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対するヘルパー脂質の mol %は、指定、名目、または実測ヘルパー脂質の mol %の ±30 %、±25 %、±20 %、±15 %、±10 %、±5 %、または ±2.5 %となる。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対するヘルパー脂質の mol %は、指定、名目、または実測 mol %の ±4 mol %、±3 mol %、±2 mol %、±1.5 mol %、±1 mol %、±0.5 mol %、または ±0.25 mol %となる。ある特定の実施形態において、LNP のロット間変動は 15 %未満、10 %未満、または 5 %未満となる。いくつかの実施形態において、mol %の数字は名目濃度に基づく。いくつかの実施形態において、mol %の数字は実測濃度に基づく。

10

【0069】

ある特定の実施形態において、PEG 脂質の量は、約 1.5 ~ 3.5 mol %、約 2.0 ~ 2.7 mol %、約 2.0 ~ 3.5 mol %、約 2.3 ~ 3.5 mol %、約 2.3 ~ 2.7 mol %、約 2.5 ~ 3.5 mol %、約 2.5 ~ 2.7 mol %、約 2.9 ~ 3.5 mol %、または約 2.7 mol %である。追加の実施形態において、PEG 脂質の量は、約 1.0 ~ 4.0 mol %、約 1.2 ~ 4.0 mol %、約 1.4 ~ 4.0 mol %、約 1.5 ~ 4.0 mol %、約 1.6 ~ 4.0 mol %、約 1.7 ~ 4.0 mol %、約 1.8 ~ 4.0 mol %、約 1.9 ~ 4.0 mol %、約 2.0 ~ 4.0 mol %、約 2.1 ~ 4.0 mol %、約 2.2 ~ 4.0 mol %、約 2.3 ~ 4.0 mol %、約 2.4 ~ 4.0 mol %、約 2.5 ~ 4.0 mol %、約 2.6 ~ 4.0 mol %、約 2.7 ~ 4.0 mol %、約 2.8 ~ 4.0 mol %、約 2.9 ~ 4.0 mol %、約 3.0 ~ 4.0 mol %、約 3.1 ~ 4.0 mol %、約 3.2 ~ 4.0 mol %、約 3.3 ~ 4.0 mol %、約 3.4 ~ 4.0 mol %、約 3.5 ~ 4.0 mol %、約 3.7 ~ 4.0 mol %、1.0 ~ 3.7 mol %、約 1.2 ~ 3.7 mol %、約 1.4 ~ 3.7 mol %、約 1.5 ~ 3.7 mol %、約 1.6 ~ 3.7 mol %、約 1.7 ~ 3.7 mol %、約 1.8 ~ 3.7 mol %、約 1.9 ~ 3.7 mol %、約 2.0 ~ 3.7 mol %、約 2.1 ~ 3.7 mol %、約 2.2 ~ 3.7 mol %、約 2.3 ~ 3.7 mol %、約 2.4 ~ 3.7 mol %、約 2.5 ~ 3.7 mol %、約 2.6 ~ 3.7 mol %、約 2.7 ~ 3.7 mol %、約 2.8 ~ 3.7 mol %、約 2.9 ~ 3.7 mol %、約 3.0 ~ 3.7 mol %、約 3.1 ~ 3.7 mol %、約 3.2 ~ 3.7 mol %、約 3.3 ~ 3.7 mol %、約 3.4 ~ 3.7 mol %、約 3.5 ~ 3.7 mol %、1.0 ~ 3.5 mol %、約 1.2 ~ 3.5 mol %、約 1.4 ~ 3.5 mol %、約 1.5 ~ 3.5 mol %、約 1.6 ~ 3.5 mol %、約 1.7 ~ 3.5 mol %、約 1.8 ~ 3.5 mol %、約 1.9 ~ 3.5 mol %、約 2.0 ~ 3.5 mol %、約 2.1 ~ 3.5 mol %、約 2.2 ~ 3.5 mol %、約 2.3 ~ 3.5 mol %、約 2.4 ~ 3.5 mol %、約 2.5 ~ 3.5 mol %、約 2.6 ~ 3.5 mol %、約 2.7 ~ 3.5 mol %、約 2.8 ~ 3.5 mol %、約 2.9 ~ 3.5 mol %、約 3.0 ~ 3.5 mol %、約 3.1 ~ 3.5 mol %、約 3.2 ~ 3.5 mol %、約 3.3 ~ 3.5 mol %、約 3.4 ~ 3.5 mol %、1.0 ~ 3.4 mol %、約 1.2 ~ 3.4 mol %、約 1.4 ~ 3.4 mol %、約 1.5 ~ 3.4 mol %、約 1.6 ~ 3.4 mol %、約 1.7 ~ 3.4 mol %、約 1.8 ~ 3.4 mol %、約 1.9 ~ 3.4 mol %、約 2.0 ~ 3.4 mol %、約 2.1 ~ 3.4 mol %、約 2.2 ~ 3.4 mol %、約 2.3 ~ 3.4 mol %、約 2.4 ~ 3.4 mol %、約 2.5 ~ 3.4 mol %、約

20

30

40

50

50

mol%、約1.9~2.5mol%、約2.0~2.5mol%、約2.1~2.5mol%、約2.2~2.5mol%、約2.3~2.5mol%、約2.4~2.5mol%、1.0~2.4mol%、約1.2~2.4mol%、約1.4~2.4mol%、約1.5~2.4mol%、約1.6~2.4mol%、約1.7~2.4mol%、約1.8~2.4mol%、約1.9~2.4mol%、約2.0~2.4mol%、約2.1~2.4mol%、約2.2~2.4mol%、約2.3~2.4mol%、1.0~2.3mol%、約1.2~2.3mol%、約1.4~2.3mol%、約1.5~2.3mol%、約1.6~2.3mol%、約1.7~2.3mol%、約1.8~2.3mol%、約1.9~2.3mol%、約2.0~2.3mol%、約2.1~2.3mol%、約2.2~2.3mol%、1.0~2.2mol%、約1.2~2.2mol%、約1.4~2.2mol%、約1.5~2.2mol%、約1.6~2.2mol%、約1.7~2.2mol%、約1.8~2.2mol%、約1.9~2.2mol%、約2.0~2.2mol%、約2.1~2.2mol%、約2.2~2.2mol%、約2.3~2.2mol%、約2.4~2.2mol%、1.0~2.1mol%、約1.2~2.1mol%、約1.4~2.1mol%、約1.5~2.1mol%、約1.6~2.1mol%、約1.7~2.1mol%、約1.8~2.1mol%、約1.9~2.1mol%、約2.0~2.1mol%、1.0~2.0mol%、約1.2~2.0mol%、約1.4~2.0mol%、約1.5~2.0mol%、約1.6~2.0mol%、約1.7~2.0mol%、約1.8~2.0mol%、約1.9~2.0mol%、1.0~1.9mol%、約1.2~1.9mol%、約1.4~1.9mol%、約1.5~1.9mol%、約1.6~1.9mol%、約1.7~1.9mol%、約1.8~1.9mol%、1.0~1.8mol%、約1.2~1.8mol%、約1.4~1.8mol%、約1.5~1.8mol%、約1.6~1.8mol%、約1.7~1.8mol%、1.0~1.7mol%、約1.2~1.7mol%、約1.4~1.7mol%、約1.5~1.7mol%、約1.6~1.7mol%、1.0~1.6mol%、約1.2~1.6mol%、約1.4~1.6mol%、約1.5~1.6mol%、約1.7~1.6mol%、約1.8~1.5mol%、約1.9~1.5mol%、1.0~1.4mol%、約1.2~1.4mol%、または1.0~1.2mol%であり得る。いくつかの実施形態において、PEG脂質のmol%は、約1.5mol%、約1.6mol%、約1.7mol%、約1.8mol%、約1.9mol%、約2.0mol%、約2.1mol%、約2.2mol%、約2.3mol%、約2.4mol%、約2.5mol%、約2.6mol%、約2.7mol%、約2.8mol%、約2.9mol%、約3.0mol%、約3.1mol%、約3.2mol%、約3.3mol%、約3.4mol%、または約3.5mol%であり得る。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対するPEG脂質mol%は、指定、名目、または実測PEG脂質mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。いくつかの実施形態において、脂質構成要素に対するPEG脂質のmol%は、指定、名目、または実測mol%の±4mol%、±3mol%、±2mol%、±1.5mol%、±1mol%、±0.5mol%、または±0.25mol%となる。ある特定の実施形態において、LNPのロット間変動は15%未満、10%未満、または5%未満となる。いくつかの実施形態において、mol%の数字は名目濃度に基づく。いくつかの実施形態において、mol%の数字は実測濃度に基づく。

【0070】

ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質の量は約30~40mol%、PEG脂質の量は約2.5~3.5mol%であるか、ヘルパー脂質の量は約33~37mol%、PEG脂質の量は約2.9~3.3mol%であるか、またはヘルパー脂質の量は約35mol%、PEG脂質の量は約3mol%である。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質の量は約37~47mol%、PEG脂質の量は約2.0~3.0mol%である

か、ヘルパー脂質の量は約40～45mol%、PEG脂質の量は約2.2～2.8mol%であるか、またはヘルパー脂質の量は約42mol%、PEG脂質の量は約2.2～2.8mol%である。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質の量は約47～57mol%、PEG脂質の量は約2.0～3.0mol%であるか、ヘルパー脂質の量は約50～55mol%、PEG脂質の量は約2.3～2.7mol%であるか、またはヘルパー脂質の量は約52mol%、PEG脂質の量は約2.3～2.7mol%である。

【0071】

ある特定の実施形態において、脂質組成物（例えば、LNP組成物）は、脂質構成要素及び核酸構成要素（水性構成要素とも称される）（例えば、RNA構成要素）を含み、式（I）または（II）の化合物：核酸のモル比を測定することができる。また、本開示の実施形態は、式（I）または（II）の化合物の医薬的に許容される塩の正に荷電したアミン基（N）と、カプセル化される核酸の負に荷電したリン酸基（P）との間で、規定されたモル比を有する脂質組成物も提供する。これは、式N/Pによって数学的に表すことができる。いくつかの実施形態において、脂質組成物（例えば、LNP組成物）は、N/P比が約3～10である、式（I）もしくは（II）の化合物またはその医薬的に許容される塩を含む脂質構成要素と、核酸構成要素とを含むことができる。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、N/P比が約3～10である、式（I）もしくは（II）の化合物またはその医薬的に許容される塩を含む脂質構成要素と、RNA構成要素とを含むことができる。例えば、N/P比は約4～7、約5～7、または約6～7であり得る。いくつかの実施形態において、N/P比は約6、例えば6±1、または6±0.5であり得る。いくつかの実施形態において、N/P比は約7、例えば7±1、または7±0.5であり得る。

【0072】

いくつかの実施形態において、水性構成要素は生物学的に活性な薬剤を含む。いくつかの実施形態において、水性構成要素はポリペプチドを、任意選択で核酸と組み合わせて含む。いくつかの実施形態において、水性構成要素は核酸（例えば、RNA）を含む。いくつかの実施形態において、水性構成要素は核酸構成要素である。いくつかの実施形態において、核酸構成要素はDNAを含み、これはDNA構成要素と呼ぶことができる。いくつかの実施形態において、核酸構成要素はRNAを含む。いくつかの実施形態において、水性構成要素（例えば、RNA構成要素）は、mRNA（例えば、RNA先導DNA結合剤をコードするmRNA）を含むことができる。いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤はCasヌクレアーゼである。ある特定の実施形態において、水性構成要素は、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするmRNAを含むことができる。ある特定の実施形態において、生物学的に活性な薬剤はCasヌクレアーゼmRNAである。ある特定の実施形態において、生物学的に活性な薬剤はクラス2 CasヌクレアーゼmRNAである。ある特定の実施形態において、生物学的に活性な薬剤はCas9ヌクレアーゼmRNAである。ある特定の実施形態において、水性構成要素は修飾RNAを含むことができる。いくつかの実施形態において、水性構成要素はガイドRNA核酸を含むことができる。ある特定の実施形態において、水性構成要素はgRNAを含むことができる。ある特定の実施形態において、水性構成要素はdgRNAを含むことができる。ある特定の実施形態において、水性構成要素は修飾gRNAを含むことができる。RNA先導DNA結合剤をコードするmRNAを含むいくつかの組成物においては、組成物はgRNA核酸（例えば、gRNA）をさらに含む。いくつかの実施形態において、水性構成要素はRNA先導DNA結合剤及びgRNAを含む。いくつかの実施形態において、水性構成要素はCasヌクレアーゼmRNA及びgRNAを含む。いくつかの実施形態において、水性構成要素はクラス2 CasヌクレアーゼmRNA及びgRNAを含む。

【0073】

ある特定の実施形態において、脂質組成物（例えば、LNP組成物）は、Casヌクレアーゼ（例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ）をコードするmRNAと、式（I）もしくは（II）の化合物またはその医薬的に許容される塩と、ヘルパー脂質と、任意選択

で中性脂質と、PEG脂質とを含むことができる。Casヌクレアーゼ（例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ）をコードするmRNAを含むある特定の組成物において、ヘルパー脂質はコレステロールである。Casヌクレアーゼ（例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ）をコードするmRNAを含む他の組成物において、中性脂質はDSPCである。Casヌクレアーゼ（例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9）をコードするmRNAを含む追加の実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DMGである。Casヌクレアーゼ（例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ）をコードするmRNAと、式(I)もしくは(II)の化合物またはその医薬的に許容される塩とを含む特定の組成物において、ある特定の組成物において、組成物はgRNA（例えば、dgRNAまたはsgRNA）をさらに含む。

10

【0074】

いくつかの実施形態において、脂質組成物（例えば、LNP組成物）はgRNAを含むことができる。ある特定の実施形態において、組成物は、式(I)もしくは(II)の化合物またはその医薬的に許容される塩と、gRNAと、ヘルパー脂質と、任意選択で中性脂質と、PEG脂質とを含むことができる。gRNAを含むある特定のLNP組成物において、ヘルパー脂質はコレステロールである。gRNAを含むいくつかの組成物において、中性脂質はDSPCである。gRNAを含む追加の実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DMGである。ある特定の組成物において、gRNAはdgRNA及びsgRNAから選択される。

20

【0075】

ある特定の実施形態において、脂質組成物（例えば、LNP組成物）は、水性構成要素中にRNA先導DNA結合剤とgRNA（sgRNAであり得る）をコードするmRNAとを含み、脂質構成要素中に式(I)または(II)の化合物を含む。例えば、LNP組成物は、式(I)もしくは(II)の化合物またはその医薬的に許容される塩と、CasヌクレアーゼをコードするmRNAと、gRNAと、ヘルパー脂質と、中性脂質と、PEG脂質とを含むことができる。CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びgRNAを含むある特定の組成物において、ヘルパー脂質はコレステロールである。CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びgRNAを含むいくつかの組成物において、中性脂質はDSPCである。CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びgRNAを含む追加の実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DMGである。

30

【0076】

ある特定の実施形態において、脂質組成物（例えば、LNP組成物）は、RNA先導DNA結合剤（例えば、クラス2 Cas mRNA及び少なくとも1つのgRNA）を含む。いくつかの実施形態において、gRNAはsgRNAである。いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤はCas9 mRNAである。ある特定の実施形態において、LNP組成物は、約1:1～約1:2のgRNA:RNA先導DNA結合剤mRNA（例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA）の比を含む。いくつかの実施形態において、重量比は、約25:1～約1:25、約10:1～約1:10、約8:1～約1:8、約4:1～約1:4、約2:1～約1:2、約2:1～約1:4、または約1:1～約1:2である。

40

【0077】

本明細書で開示する脂質組成物（例えば、LNP組成物）を本明細書で開示する方法で使用して、CRISPR/Cas9構成要素を送達し、鋳型核酸（例えば、DNA鋳型）を挿入することができる。鋳型核酸は、式(I)もしくは(II)の化合物またはその医薬的に許容される塩を含む脂質組成物とは別に送達することができる。いくつかの実施形態において、鋳型核酸は、所望の修復機構に応じて、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。鋳型は、例えば標的DNA配列内に、及び／または標的DNAに隣接する配列に、標的DNAと相溶性のある領域を有することができる。

【0078】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、RNA水溶液と有機溶媒ベースの脂質

50

溶液とを混合することにより形成される。好適な溶液または溶媒は、水、PBS、トリスバッファー、NaCl、クエン酸バッファー、酢酸バッファー、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールを含む、または含むことができる。例えば、有機溶媒は100%エタノールであってもよい。医薬的に許容されるバッファー、例えば、LNP組成物のin vivo投与のためのバッファーを使用することができる。ある特定の実施形態において、LNPを含む組成物のpHをpH6.5以上に維持するためにバッファーが使用される。ある特定の実施形態において、LNPを含む組成物のpHをpH7.0以上に維持するためにバッファーが使用される。ある特定の実施形態において、組成物は約7.2～約7.7の範囲のpHを有する。追加の実施形態において、組成物は約7.3～約7.7の範囲または約7.4～約7.6の範囲のpHを有する。さらなる実施形態において、組成物は約7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、または7.7のpHを有する。組成物のpHは、マイクロpHプローブを用いて測定することができる。ある特定の実施形態において、凍結保護剤が組成物中に含まれる。凍結保護剤の非限定的な例としてはスクロース、トレハロース、グリセロール、DMSO、及びエチレングリコールが挙げられる。例示的な組成物は凍結保護剤（例えば、スクロース）を最大10%含むことができる。ある特定の実施形態において、組成物はトリス食塩水スクロース（TSS）を含むことができる。ある特定の実施形態において、LNP組成物は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%の凍結保護剤を含むことができる。ある特定の実施形態において、LNP組成物は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%のスクロースを含むことができる。いくつかの実施形態において、LNP組成物はバッファーを含むことができる。いくつかの実施形態において、バッファーは、リン酸バッファー（PBS）、トリスバッファー、クエン酸バッファー、及びこれらの混合物を含むことができる。ある特定の例示的な実施形態において、バッファーはNaClを含む。ある特定の実施形態において、バッファーはNaClが欠如している。NaClの例示的な量は、約20mM～約45mMの範囲であり得る。NaClの例示的な量は、約40mM～約50mMの範囲であり得る。いくつかの実施形態において、NaClの量は約45mMである。いくつかの実施形態において、バッファーはトリスバッファーである。トリスの例示的な量は、約20mM～約60mMの範囲であり得る。トリスの例示的な量は、約40mM～約60mMの範囲であり得る。いくつかの実施形態において、トリスの量は約50mMである。いくつかの実施形態において、バッファーはNaCl及びトリスを含む。LNP組成物のある特定の例示的な実施形態は、トリスバッファー中に5%のスクロース及び45mMのNaClを含む。他の例示的な実施形態において、組成物は約5%w/vの量のスクロース、約45mMのNaCl、及びpH7.5の約50mMのトリスを含む。塩、バッファー、及び凍結保護剤の量は、組成物全体のオスモル濃度が維持されるように変化させることができる。例えば、最終オスモル濃度は450mOsm/L未満に維持することができる。さらなる実施形態において、オスモル濃度は350～250mOsm/Lである。ある特定の実施形態は300±20mOsm/Lまたは310±40mOsm/Lの最終オスモル濃度を有する。

10

20

30

40

50

【0079】

いくつかの実施形態において、有機溶媒中の水性RNA溶液及び脂質溶液のマイクロ流体混合、T混合、またはクロス混合が使用される。ある特定の態様において、流量、接合部サイズ、接合部幾何学的形態、接合部形状、チューブ直径、溶液、及び／またはRNA及び脂質の濃度を変化させることができる。LNPまたはLNP組成物は、例えば、透析、遠心フィルター、タンジェンシャルフロー濾過、またはクロマトグラフィーを介して、濃縮または精製することができる。LNP組成物は、例えば、懸濁液、乳濁液、または凍結乾燥粉末として保存することができる。いくつかの実施形態において、LNP組成物は2～8℃で保存され、ある態様では、LNP組成物は室温で保存される。追加の実施形態において、LNP組成物は、例えば、-20℃または-80℃で凍結保存される。他の実施形態において、LNP組成物は約0℃～約-80℃の範囲の温度で保存される。凍結されたLNP組成物は使用前に、例えば、氷上で、室温で、または25℃で解凍することが

できる。

【0080】

好ましい脂質組成物（例えば、LNP組成物）は、例えば、治療有効用量において *in vivo* で細胞毒性レベルまで蓄積しないという点において、生分解性である。いくつかの実施形態において、組成物は、治療用量レベルにおいて、実質的な有害作用につながる自然免疫応答を引き起こさない。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される組成物は、治療用量レベルにおいて毒性を引き起こさない。

【0081】

いくつかの実施形態において、LNP組成物中のLNPの濃度は、約1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2.5～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2.5～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

【0082】

いくつかの実施形態において、動的光散乱法（「DLS」）は、本開示のLNPの多分散指数（PDI）及びサイズを特性評価するために使用することができる。DLSは、試料を光源に供することから生じる光の散乱を測定する。DLS測定から求められるPDIは、集団における粒子サイズの分布（平均粒子サイズの周辺）に相当し、完全に均一な集団はゼロのPDIを有する。

【0083】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示するLNPは約0.005～約0.75のPDIを有する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示するLNPは約0.005～約0.1のPDIを有する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示するLNPは約0.005～約0.09、約0.005～約0.08、約0.005～約0.07、または約0.006～約0.05のPDIを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約0.01～約0.5のPDIを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約ゼロ～約0.4のPDIを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約ゼロ～約0.35のPDIを有する。いくつかの実施形態において、LNP PDIは約ゼロ～約0.3の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、LNPは、約ゼロ～約0.25の範囲であり得るPDIを有する。いくつかの実施形態において、LNP PDIは約ゼロ～約0.2の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、LNPは約ゼロ～約0.05のPDIを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約ゼロ～約0.01のPDIを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約0.01、約0.02、約0.05、約0.08、約0.1、約0.15、約0.2、または約0.4未満のPDIを有する。

【0084】

LNPサイズは、当技術分野で知られている様々な解析方法によって測定することができる。いくつかの実施形態において、LNPサイズは、非対称流動場分画法—マルチアングル光散乱（AF4-MALS）を使用して測定することができる。ある特定の実施形態において、LNPサイズは、流体力学的半径によって組成物中の粒子を分離し、次に分割された粒子の分子量、流体力学的半径、及び二乗平均平方根半径を測定することにより、測定することができる。いくつかの実施形態において、LNPサイズ及び粒子濃度は、ナノ粒子追跡解析（NTA、Malvern Nanosight）によって測定することができる。ある特定の実施形態において、LNP試料は適切に希釈され、顕微鏡スライド上に注入される。粒子が視野を通じてゆっくり注入されるに伴い、カメラが散乱光を記録する。動画が取り込まれた後、ナノ粒子追跡解析は、ピクセルを追跡し拡散係数を計算することにより動画を処理する。この拡散係数を粒子の流体力学的半径に変換することができる。このような方法は、個々の粒子の数を数えて粒子濃度を得ることもできる。いくつかの実施形態において、LNPのサイズ、形態、及び構造特性は、クライオ電子顕微鏡法（「クライオEM」）によって定量することができる。

【0085】

本明細書で開示するLNP組成物のLNPは、約1～約250nmのサイズ（例えば、Z平均直径または数平均直径）を有する。いくつかの実施形態において、LNPは約10～約200nmのサイズを有する。さらなる実施形態において、LNPは約20～約150nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約50～約150nmまたは約70～約130nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約50～約100nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約50～約120nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約60～約100nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約75～約150nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約75～約120nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約75～約100nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約50～約145nm、約50～約120nm、約50～約120nm、約50～約115nm、約50～約100nm、約60～約145nm、約60～約120nm、約60～約115nm、または約60～約100nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約145nm未満、約120nm未満、約115nm未満、約100nm未満、または約80nm未満のサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは約50nm超または約60nm超のサイズを有する。いくつかの実施形態において、粒子サイズはZ平均粒子サイズである。いくつかの実施形態において、粒子サイズは数平均粒子サイズである。いくつかの実施形態において、粒子サイズは個々のLNPのサイズである。別段の指示がない限り、本明細書で言及する全てのサイズは、Malvern ZetasizerまたはWyatt NanoStarにおいて動的光散乱法により測定した、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ（直径）である。ナノ粒子試料をリン酸緩衝食塩水（PBS）で希釈し、カウントレートがおよそ200～400kcpsになるようにする。

10

20

【0086】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は約50%～約100%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約50%～約95%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約70%～約90%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約90%～約100%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約75%～約95%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約90%～約100%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約95%～約100%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約98%～約100%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は約99%～約100%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。

30

【0087】

カーゴ

本明細書に記載のLNP組成物を介して送達されるカーゴは、生物学的に活性な薬剤を含む。生物学的に活性な薬剤は核酸（例えば、mRNAやgRNA）であり得る。ある特定の実施形態において、カーゴは、1つ以上の生物学的に活性な薬剤、例えば、mRNA、gRNA、発現ベクター、RNA先導DNA結合剤、抗体（例えば、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ナノボディ、及びこれらのフラグメントなど）、コレステロール、ホルモン、ペプチド、タンパク質、化学療法剤及び他のタイプの抗悪性腫瘍剤、低分子薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素核酸、アンチセンス核酸、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、アンチセンスDNAまたはRNA組成物、キメラDNA：RNA組成物、アロザイム、アプタマー、リボザイム、デコイ及びそのアナログ、プラスミド及び他のタイプのベクター、ならびに低分子核酸分子、RNAi剤、短鎖干渉核酸（siNA）、短鎖干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）

40

50

A)、マイクロRNA (miRNA)、ショートヘアピンRNA (shRNA) 及び「自己複製RNA」(レプリカーゼ酵素活性をコードし、in vivoで自身の複製または増幅を指示可能) 分子、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸リボヌクレオチド (LNA)、モルホリノヌクレオチド、スレオース核酸 (TNA)、グリコール核酸 (GNA)、sisRNA (低分子内部セグメント化干渉RNA)、及びiRNA (非対称干渉RNA) である、またはそれらを含む。上記の生物学的に活性な薬剤のリストは例示に過ぎず、限定であるようには意図されていない。このような化合物は精製しても部分的に精製してもよく、天然に存在しても合成であってもよく、化学的に修飾されてもよい。

【0088】

LNP組成物を介して送達されるカーゴはRNA (例えば、目的タンパク質をコードするmRNA分子) であり得る。例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、RNA先導DNA結合剤、またはCasヌクレアーゼなどのタンパク質を発現するためのmRNAが含まれる。CasヌクレアーゼmRNA、例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ (例えば、Cas9またはCpf1 (Cas12aとも呼ばれる) タンパク質) の細胞内での発現を可能にするクラス2 CasヌクレアーゼmRNAを含むLNP組成物が提供される。さらに、カーゴは、1つ以上のgRNAまたはgRNAをコードする核酸を含むことができる。鋳型核酸 (例えば、修復または組換えのためのもの) が組成物に含まれてもよく、または鋳型核酸を本明細書に記載の方法で使用するができる。下位実施形態において、カーゴは、Streptococcus pyogenes Cas9をコードするmRNAと、任意選択でS. pyogenes gRNAとを含む。さらなる下位実施形態において、カーゴは、Neisseria meningitidis Cas9をコードするmRNAと、任意選択でNme (Neisseria meningitidis) gRNAとを含む。

【0089】

「mRNA」はポリヌクレオチドを指し、ポリペプチドに翻訳することができる (すなわち、リボソーム及びアミノアシル化tRNAによる翻訳のための基質として機能することができる) オープンリーディングフレームを含む。mRNAは、リボース残基またはそのアナログ (例えば、2'-メトキシリボース残基) を含むリン酸-糖骨格を含むことができる。いくつかの実施形態において、mRNAリン酸-糖骨格の糖は、リボース残基、2'-メトキシリボース残基、またはこれらの組合せから本質的になる。概して、mRNAは、実質的な量のチミジン残基を含まない (例えば、0個の残基、または30、20、10、5、4、3、もしくは2個のチミジン残基、または10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、または0.1%未満のチミジン含量)。mRNAは、ウリジンの位置の一部または全てに修飾ウリジンを含むことができる。

【0090】

ゲノム編集ツール

いくつかの実施形態において、LNP組成物は脂質核酸集合体であり、脂質核酸組成物とも称される。いくつかの実施形態において、脂質核酸組成物またはLNP組成物は、ゲノム編集ツールまたはそれをコードする核酸を含む。本明細書で使用する場合、「ゲノム編集ツール」(または「遺伝子編集ツール」) という用語は、細胞のゲノムに編集を生成するために必要または有用な「ゲノム編集システム」(または「遺伝子編集システム」) の任意の構成要素である。いくつかの実施形態において、本開示は、ゲノム編集システム (例えば、ジungkフィンガーヌクレアーゼシステム、TALENシステム、メガヌクレアーゼシステム、またはCRISPR/Casシステム) のゲノム編集ツールを細胞 (または細胞の集団) に送達する方法を提供する。ゲノム編集ツールとしては、例えば、細胞のDNAまたはRNA、例えば細胞のゲノムに一本鎖または二本鎖の切断を起こすことが可能なヌクレアーゼが挙げられる。ゲノム編集ツール、例えば、ヌクレアーゼまたはニッカーゼは、任意選択で、核酸を切断することなく細胞のゲノムを修飾することができる。ゲノム編集ヌクレアーゼまたはニッカーゼはmRNAによってコードされ得る。このような

ヌクレアーゼとしては、例えば、RNA先導DNA結合剤及びCRISPR/Cas構成要素が挙げられる。ゲノム編集ツールには融合タンパク質（例えば、ニッカーゼをエフェクタードメイン（例えば、エディタードメイン）と融合させたものを含む）が含まれる。ゲノム編集ツールには、ゲノム編集の目標を達成するために必要または有用な任意のアイテム（例えば、ガイドRNA、sgRNA、dgRNA、ドナー核酸など）が含まれる。
【0091】

脂質核酸集合組成物とともに送達するためのゲノム編集ツールを含む様々な好適な遺伝子編集システムが本明細書に記載されており、これには、限定されるものではないが、CRISPR/Casシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）システム、及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）システムが含まれる。概して、遺伝子編集システムは、標的DNA配列内で二重鎖切断（DSB）またはニック（例えば、一本鎖切断、またはSSB）を誘導するために、操作された切断システムの使用を伴う。切断またはニックは、特異的ヌクレアーゼ（例えば、操作されたZFN、TALEN）の使用により、またはCRISPR/Casシステムを操作されたガイドRNAとともに使用して、標的DNA配列の特異的切断もしくはニックングを先導することにより、生じ得る。さらに、アルゴノートシステムに基づいた標的ヌクレアーゼが開発されており（例えば、「TtAgo」として知られている*T. thermophilus*由来のもの；Swarts et al (2014) *Nature* 507 (7491) : 258-261を参照）、これは、ゲノム編集及び遺伝子治療で使用される可能性も有し得る。
【0092】

ある特定の実施形態において、本開示の組成物は、1つ以上のDNA修飾剤（例えば、DNA切断剤）を含む。様々なDNA修飾剤が本明細書に記載のLNP組成物に含まれ得る。例えば、DNA修飾剤としては、ヌクレアーゼ（配列特異的及び非特異的の両方）、トポイソメラーゼ、メチラーゼ、アセチラーゼ、化学物質、医薬、及び他の薬剤が挙げられる。いくつかの実施形態において、所与のDNA配列または配列のセットに結合するタンパク質を用いて、鎖切断などのDNA修飾を誘導することができる。タンパク質は、例えば、放射性崩壊が鎖切断を引き起こす¹²⁵Iの組込み、またはUV光に曝露するとDNAとの架橋を形成する4-アジドフェナシルプロミドなどの架橋試薬の修飾などの多くの手段によって修飾することができる。このようなタンパク質-DNA架橋は、続いてペリジンで処置することにより二本鎖DNA切断に変換することができる。DNA修飾のまた別のアプローチは、転写因子または構築クロマチンタンパク質などの、1つ以上のDNA部位に結合している特異的タンパク質に対する抗体の産生を伴い、これを核タンパク質複合体からDNAを単離するために使用する。

【0093】

ある特定の実施形態において、本開示の組成物は、1つ以上のDNA切断剤を含む。DNA切断剤としては、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）、mito-TALEN、及びメガヌクレアーゼシステムなどの技術が挙げられる。TALENとZFNの技術は、特定のゲノム座位で標的DNAの二本鎖切断（DSB）を誘導するために、エンドヌクレアーゼの触媒ドメインをモジュラーDNA結合タンパク質に繋留するという戦略を使用する。さらなるDNA切断剤としては、低分子干渉RNA、マイクロRNA、抗マイクロRNA、アンタゴニスト、低分子ヘアピンRNA、及びアプタマー（RNA、DNA、またはペプチドベース（アプタマーを含む））が挙げられる。

【0094】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集システムはTALENシステムである。転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）は、DNAの特定の配列を切断するように操作することができる制限酵素である。これは、TALEエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメイン（DNA鎖を切断するヌクレアーゼ）に融合させることによって作製される。転写活性化因子様エフェクター（TALE）は、所望のDNA配列に結合し、特定の位置でDNA切断を促進するように操作することができる（例えば、Bo

ch, 2011, Nature Biotechを参照)。制限酵素は、遺伝子編集に使用するために、あるいは操作されたヌクレアーゼによるゲノム編集として知られる技法である *in situ*でのゲノム編集のために、細胞に導入することができる。このような方法及びそこで使用するための組成物は、当技術分野で知られている。例えば、WO2019147805、WO2014040370、WO2018073393を参照（これらの内容は、全体として本明細書に組み込まれる）。

【0095】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集システムはジンクフィンガーシステムである。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインと融合させることによって生成される人工制限酵素である。ジンクフィンガードメインは、特定の所望のDNA配列を標的化するように操作して、複雑なゲノム内のユニークな配列を標的化するジンクフィンガーヌクレアーゼを有効にすることができる。IIS型制限エンドヌクレアーゼFokIの非特異的切断ドメインは、典型的にはZFN内の切断ドメインとして使用される。切断は、内在性DNA修復装置によって修復され、これによりZFNは高等生物のゲノムを正確に改変することが可能になる。このような方法及びそこで使用するための組成物は、当技術分野で知られている。例えば、WO2011091324を参照（これらの内容は、全体として本明細書に組み込まれる）。

【0096】

好ましい実施形態において、本開示の組成物は、RNA先導DNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）をコードするmRNAを含む。特定の実施形態において、本開示の組成物は、S. pyogenes Cas9などのクラス2 CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む。

【0097】

本明細書で使用する場合、「RNA先導DNA結合剤」とは、RNA及びDNAの結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはこのような複合体のDNA結合サブユニットを意味し、このときDNA結合活性は配列特異的であり、RNAの配列に依存する。例示的なRNA先導DNA結合剤としては、Casクリーバーゼ／ニッカーゼ及びその不活性化形態（「dCas DNA結合剤」）が挙げられる。本明細書で使用する場合、「Casヌクレアーゼ」はCasクリーバーゼ、Casニッカーゼ、及びdCas DNA結合剤を包含する。Casクリーバーゼ／ニッカーゼ及びdCas DNA結合剤は、III型CRISPRシステムのCsmまたはCmr複合体、Cas10、そのCsm1またはCmr2サブユニット、I型CRISPRシステムのCascade複合体、そのCas3サブユニット、及びクラス2 Casヌクレアーゼを含む。本明細書で使用する場合、「クラス2 Casヌクレアーゼ」とは、RNA先導DNA結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス2 Casヌクレアーゼとしては、RNA先導DNAクリーバーゼまたはニッカーゼ活性をさらに有するクラス2 Casクリーバーゼ／ニッカーゼ（例えば、H840A、D10A、またはN863Aバリエーション）、及びクリーバーゼ／ニッカーゼ活性が不活性化されているクラス2 dCas DNA結合剤が挙げられる。本明細書に記載のLNP組成物とともに使用することができるクラス2 Casヌクレアーゼとしては、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9（例えば、N497A、R661A、Q695A、Q926Aバリエーション）、HypaCas9（例えば、N692A、M694A、Q695A、H698Aバリエーション）、eSPCas9（1.0）（例えば、K810A、K1003A、R1060Aバリエーション）、及びeSPCas9（1.1）（例えば、K848A、K1003A、R1060Aバリエーション）のタンパク質及びこれらの修飾物が挙げられる。Cpf1タンパク質（Zetsche et al., Cell, 163:1-13 (2015)）はCas9に相同的であり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含む。ZetscheのCpf1配列は、参照により全体として組み込まれる。例えば、Zetscheの表2及び4を参照。例えば、Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36 (2015); Shmakov et al.

10

20

30

40

50

, Molecular Cell, 60:385-397 (2015) を参照。

【0098】

Casヌクレアーゼが由来し得る種の非限定的な例示としては、Streptococcus pyogenes、Streptococcus thermophilus、Streptococcus sp.、Staphylococcus aureus、Listeria innocua、Lactobacillus gasserii、Francisella novicida、Wolinella succinogenes、Sutterella wadsworthensis、Gammaproteobacterium、Neisseria meningitidis、Campylobacter jejuni、Pasteurella multocida、Fibr 10
obacter succinogenes、Rhodospirillum rubrum、Nocardiosis dassonvillei、Streptomyces pristinaespiralis、Streptomyces viridochromogenes、Streptomyces viridochromogenes、Streptosporangium roseum、Streptosporangium roseum、Alicyclobacillus acidocaldarius、Bacillus pseudomycoides、Bacillus selen 20
itireducens、Exiguobacterium sibiricum、Lactobacillus delbrueckii、Lactobacillus salivarius、Lactobacillus buchneri、Treponema denticola、Microscilla marina、Burkholderiales bacterium、Polaromonas naphthalenivorans、Polaromonas sp.、Crocosphaera wats 30
onii、Cyanothecce sp.、Microcystis aeruginosa、Synechococcus sp.、Acetohalobium arabaticum、Ammonifex degensii、Caldicelulosiruptor becscii、Candidatus Desulforudis、Clostridium botulinum、Clostridium difficile、Finegoldia magna、Natranaerobius thermophilus、Pelotomaculum thermopropionicum、Ac 40
idithiobacillus caldus、Acidithiobacillus ferrooxidans、Allochromatium vinosum、Marinobacter sp.、Nitrosococcus halophilus、Nitrosococcus watsoni、Pseudoalteromonas haloplanktis、Ktedonobacter racemifer、Methanohalobium evestigatum、Anabaena variabilis、Nodularia spumigena、Nostoc sp.、Arthrospira maxima、Arthrospira platensis、Arthrospira sp.、Lyngbya sp.、Microcoleus chtho 50
noplastes、Oscillatoria sp.、Petrotoga mobilis、Thermosiphon africanus、Streptococcus pasteurianus、Neisseria cinerea、Campylobacter lari、Parvibaculum lavamentivorans、Corynebacterium diphtheria、Acidaminococcus sp.、Lachnospiraceae bacterium ND2006、及びAcaryochloris marinaが挙げられる。

【0099】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Streptococcus pyogenes由来のCas9ヌクレアーゼである。他の実施形態において、Casヌ 50
クレアーゼは、Streptococcus thermophilus由来のCas9

ヌクレアーゼである。なお他の実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Neisseria meningitidis*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Staphylococcus aureus*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Francisella novicida*由来のCpf1ヌクレアーゼである。他の実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus* sp. 由来のCpf1ヌクレアーゼである。なお他の実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Lachnospiraceae bacterium ND2006*由来のCpf1ヌクレアーゼである。さらなる実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Francisella tularensis*、*Lachnospiraceae bacterium*、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregrinibacteria bacterium*、*Parcubacteria bacterium*、*Smithella*、*Acidaminococcus*、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovoculi*、*Leptospira inadai*、*Porphyromonas crevioricanis*、*Prevotella disiens*、または*Porphyromonas macacae*由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus*または*Lachnospiraceae*由来のCpf1ヌクレアーゼである。

10

20

【0100】

野生型Cas9は、RuvC及びHNHという2つのヌクレアーゼドメインを有する。RuvCドメインは非標的DNA鎖を切断し、HNHドメインはDNAの標的鎖を切断する。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、2つ以上のRuvCドメイン及び／または2つ以上のHNHドメインを含む。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは野生型Cas9である。いくつかの実施形態において、Cas9は標的DNAの二本鎖切断を誘導可能である。他の実施形態において、CasヌクレアーゼはdsDNAを切断することもあれば、dsDNAの一本鎖を切断することもあれば、DNAクリパーゼまたはニッカーゼ活性を有しないこともある。

【0101】

いくつかの実施形態において、1つのドメインまたは領域が異なるタンパク質の一部で置き換えられているキメラCasヌクレアーゼが使用される。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼドメインは、FokIのような異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは修飾ヌクレアーゼであり得る。

30

【0102】

他の実施形態において、CasヌクレアーゼまたはCasニッカーゼは、I型CRISPR／Casシステム由来であってもよい。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR／Casシステムのカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼはCas3タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、Casタンパク質は、III型CRISPR／Casシステム由来であってもよい。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼはRNA切断活性を有し得る。

40

【0103】

いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤は一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、1本のDNA鎖を切断して、「ニック」としても知られる一本鎖切断をもたらすことができる。いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤はCasニッカーゼを含む。ニッカーゼとは、dsDNA内でニックを作成する酵素であり、すなわち、DNA二重らせんの一方の鎖を切断し、他方の鎖を切断しない。いくつかの実施形態において、Casニッカーゼは、エンドヌクレアーゼ活性部位が、例えば、触媒ドメインに

50

おける1つ以上の改変（例えば、点変異）によって不活性化されたCasヌクレアーゼ（例えば、上述のCasヌクレアーゼ）のバージョンである。例えば、Casニッカーゼ及び例示的な触媒ドメインの改変の議論については、米国特許第8,889,356号を参照。いくつかの実施形態において、Casニッカーゼ（例えば、Cas9ニッカーゼ）は、不活性化RuvCまたはHNHドメインを有する。いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤は、1つの機能的ヌクレアーゼドメインのみを含むように修飾されている。例えば、薬剤タンパク質は、ヌクレアーゼドメインのうちの1つが変異し、または完全もしくは部分的に欠失して、その核酸切断活性を低減するように修飾することができる。いくつかの実施形態において、活性が低減したRuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態において、不活性のRuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態において、活性が低減したHNHドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態において、不活性のHNHドメインを有するニッカーゼが使用される。

10

20

30

40

50

【0104】

いくつかの実施形態において、Casタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸が、ヌクレアーゼ活性を低減または改変するために置換される。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含むことができる。RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメイン内の例示的なアミノ酸置換としては、D10A（*S. pyogenes* Cas9タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3):759-771を参照。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含むことができる。HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメイン内の例示的なアミノ酸置換としては、E762A、H840A、N863A、H983A、及びD986A（*S. pyogenes* Cas9タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Zetsche et al. (2015)を参照。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、D917A、E1006A、及びD1255Aが挙げられる（*Francisella novicida* U112 Cpf1（FnCpf1）配列（UniProtKB:A0Q7Q2（CPF1_FRNATN））に基づく）。

【0105】

いくつかの実施形態において、ニッカーゼをコードするmRNAは、標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖にそれぞれ相補的な一対のガイドRNAと組み合わせて提供される。この実施形態において、ガイドRNAは、ニッカーゼを標的配列に誘導し、標的配列の対向鎖上にニックを生成すること（すなわち、二重ニックング）によってDSBを導入する。いくつかの実施形態において、ダブルニックングの使用は、特異性を改善し、オフターゲット効果を低減し得る。いくつかの実施形態において、ニッカーゼは、標的DNA内で二重ニックを生成するために、DNAの対向鎖を標的化する2つの別々のガイドRNAと一緒に使用される。いくつかの実施形態において、ニッカーゼは、標的DNA内でダブルニックを生成するために、極めて近接するように選択された2つの別々のガイドRNAと一緒に使用される。

【0106】

いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤はクリーパーゼ及びニッカーゼ活性が欠如している。いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤はdCasDNA結合ポリペプチドを含む。dCasポリペプチドはDNA結合活性を有する一方で、触媒活性（クリーパーゼ／ニッカーゼ活性）が本質的に欠如している。いくつかの実施形態において、dCasポリペプチドはdCas9ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、クリーパーゼ及びニッカーゼ活性が欠如しているRNA先導DNA結合剤、またはdCasDNA結合ポリペプチドは、そのエンドヌクレアーゼ活性部位が、例えば、その触媒ドメインにおける1つ以上の改変（例えば、点変異）によって不活性化されているCasヌクレアーゼのバージョン（例えば、上記で論じたCasヌクレアーゼ）

である。例えば、US 2014 / 0186958 A1 及び US 2015 / 0166980 A1 を参照。

【0107】

いくつかの実施形態において、RNA 先導 DNA 結合剤は APOBEC3 デアミナーゼを含む。いくつかの実施形態において、APOBEC3 デアミナーゼは APOBEC3A (A3A) である。いくつかの実施形態において、A3A はヒト A3A である。いくつかの実施形態において、A3A は野生型 A3A である。

【0108】

いくつかの実施形態において、RNA 先導 DNA 結合剤はエディターを含む。例示的なエディターとしては、XTEN リンカーによって *S. pyogenes*-D10ACas9 ニッカーゼと融合した *H. sapiens* APOBEC3A を含む BC22n がある。いくつかの実施形態において、エディターはウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (「UGI」) とともに提供される。いくつかの実施形態において、エディターは UGI と融合している。いくつかの実施形態において、エディターをコードする mRNA 及び UGI をコードする mRNA は、LNP 中で一緒に製剤化される。他の実施形態において、エディター及び UGI は別々の LNP 中で提供される。

【0109】

いくつかの実施形態において、RNA 先導 DNA 結合剤は、1 つ以上の異種の機能的ドメインを含む (例えば、融合ポリペプチドである、またはそれを含む)。

【0110】

いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインは、RNA 先導 DNA 結合剤の細胞核内への輸送を促進することができる。例えば、異種の機能的ドメインは核局在化シグナル (NLS) であってもよい。

【0111】

いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインは RNA 先導 DNA 結合剤の細胞内半減期を修飾可能であり得る。いくつかの実施形態において、RNA 先導 DNA 結合剤の半減期を増加させることができる。いくつかの実施形態において、RNA 先導 DNA 結合剤の半減期を低減することができる。いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインは RNA 先導 DNA 結合剤の安定性を増加可能であり得る。いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインは RNA 先導 DNA 結合剤の安定性を低減可能であり得る。いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインはタンパク質分解のためのシグナルペプチドとして作用することができる。いくつかの実施形態において、タンパク質分解はタンパク質分解酵素 (例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、またはカルパインプロテアーゼ) によって媒介することができる。いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインは PEST 配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、RNA 先導 DNA 結合剤はユビキチンまたはポリユビキチン鎖の付加により修飾することができる。いくつかの実施形態において、ユビキチンはユビキチン様タンパク質 (UBL) であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小ユビキチン様修飾因子 (SUMO)、ユビキチン交差反応性タンパク質 (UCRP、別名インターフェロン刺激遺伝子-15 (ISG15))、ユビキチン関連修飾因子-1 (URM1)、神経細胞前駆体細胞発現発達下方調節タンパク質-8 (NEDD8: neuronal precursor cell expressed developmentally down regulated protein-8; *S. cerevisiae* においては Rub1 と呼ばれる)、ヒト白血球抗原 F 関連 (FAT10)、オートファジー-8 (ATG8) 及び-12 (ATG12)、Fau ユビキチン様タンパク質 (FUB1)、膜アンカー UBL (MUB)、ユビキチンフォールド修飾因子-1 (UFM1)、及びユビキチン様タンパク質-5 (UBL5) が挙げられる。

【0112】

いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインはマーカードメインであってもよい。マーカードメインの非限定的な例としては、蛍光タンパク質、精製タグ、エピトープ

10

20

30

40

50

タグ、及びレポーター遺伝子配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、マーカードメインは蛍光タンパク質であってもよい。好適な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、単量体Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）、青色蛍光タンパク質（例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan）、赤色蛍光タンパク質（例えば、mKate 10
mKate2、mPlum、DsRed単量体、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed単量体、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred）、及び橙色蛍光タンパク質（mOrange、mKO、Kusabira-Orange、単量体Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato）、または他の任意の好適な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態において、マーカードメインは精製タグ及び／またはエピトープタグであってもよい。非限定的な例示的なタグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質（MBP）、チオレドキシ 20
ン（TRX）、ポリ（NANP）、タンデムアフィニティー精製（TAP）タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、8xHis、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（BCCP）、ポリ-His、及びカルモジュリンが挙げられる。非限定的な例示的なレポーター遺伝子としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ベクターガラクトシダーゼ、ベクターグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

【0113】

追加の実施形態において、異種の機能的ドメインは、RNA先導DNA結合剤を特定のオルガネラ、細胞タイプ、組織、または器官に標的化させることができる。いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインは、RNA先導DNA結合剤をミトコンドリアに標的化することができる。

【0114】

さらなる実施形態において、異種の機能的ドメインはエフェクタードメイン（例えば、エディタードメイン）であってもよい。RNA先導DNA結合剤が標的配列に誘導される場合、例えばCasヌクレアーゼがgRNAによって標的配列に誘導される場合、エフェクタードメイン（例えば、エディタードメイン）は標的配列を修飾したりそれに影響を及ぼしたりすることができる。いくつかの実施形態において、エフェクタードメイン（例えば、エディタードメイン）は核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えば、非Casヌクレアーゼドメイン）、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制ドメインから選択することができる。いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインはヌクレアーゼ（例えば、FokIヌクレアーゼ）である。例えば、米国特許第9,023,649号を参照。いくつかの実施形態において、異種の機能的ドメインは転写活性化因子または転写抑制因子である。例えば、Qi et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” Cell 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription fa 50

ctors,” Nat. Methods 10:973–6 (2013); Mali et al., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering,” Nat. Biotechnol. 31:833–8 (2013); Gilbert et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes,” Cell 154:442–51 (2013)を参照。そのため、RNA先導DNA結合剤は本質的に、ガイドRNAを用いて所望の標的配列に結合するように誘導することができる転写因子となる。いくつかの実施形態において、DNA修飾ドメインはメチル化ドメイン（例えば、脱メチル化またはメチルトランスフェラーゼドメイン）である。いくつかの実施形態において、エフェクタードメインはDNA修飾ドメイン（例えば、塩基編集ドメイン）である。特定の実施形態において、DNA修飾ドメインは、DNAに特定の修飾を導入する核酸編集ドメイン（例えば、デアミナーゼドメイン）である。例えば、WO2015/089406及びUS2016/0304846を参照。WO2015/089406及びU.S. 2016/0304846に記載されている核酸編集ドメイン、デアミナーゼドメイン、及びCas9バリエーションは、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる。

10

【0115】

ヌクレアーゼは、ガイドRNA（「gRNA」）と相互作用する少なくとも1つのドメインを含むことができる。さらに、ヌクレアーゼは、gRNAによって標的配列に誘導されてもよい。クラス2 Casヌクレアーゼシステムにおいて、gRNAはヌクレアーゼ及び標的配列と相互作用して、標的配列との結合を誘導する。いくつかの実施形態において、gRNAは標的切断の特異性を提供し、ヌクレアーゼは汎用性であり、異なるgRNAと対合して異なる標的配列を切断することができる。クラス2 Casヌクレアーゼは、上記に挙げたタイプ、オルソログ、及び例示的な種のgRNAスキュフォールド構造と対合することができる。

20

【0116】

本明細書で使用する場合、「リボ核タンパク質」（RNP）または「RNP複合体」とは、RNA先導DNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Casクリーパーゼ、Casニッカーゼ、またはdCas DNA結合剤（例えば、Cas9））と一緒にになったgRNAを指す。いくつかの実施形態において、gRNAは、RNA先導DNA結合剤（例えば、Cas9）を標的配列に先導し、gRNAは標的配列とハイブリダイズし、結合剤は標的配列に結合する。結合剤がクリーパーゼまたはニッカーゼである場合、結合は切断またはニッキングの後に行われ得る。

30

【0117】

本開示のいくつかの実施形態において、LNP組成物におけるカーゴは、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼ）であり得るRNA先導DNA結合剤を標的DNAに誘導するガイド配列を含む少なくとも1つのgRNAを含む。gRNAは、Casヌクレアーゼまたはクラス2 Casヌクレアーゼを標的核酸分子上の標的配列に先導することができる。いくつかの実施形態において、gRNAはクラス2 Casヌクレアーゼと結合し、また当該ヌクレアーゼによる切断の特異性を提供する。いくつかの実施形態において、gRNA及びCasヌクレアーゼは、リボ核タンパク質（RNP）、例えば、CRISPR/Cas複合体（例えば、CRISPR/Cas9複合体）を形成することができる。いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas複合体はII型CRISPR/Cas9複合体であり得る。いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas複合体はV型CRISPR/Cas複合体（例えば、Cpf1/gRNA複合体）であり得る。Casヌクレアーゼ及び同族gRNAは対合することができる。各クラス2 Casヌクレアーゼと対合するgRNAスキュフォールド構造は、特定のCRISPR/Casシステムによって異なる。

40

50

【0118】

「ガイドRNA」、「gRNA」、及び単に「ガイド」は、本明細書では互換的に使用され、RNA先導DNA結合剤の同族ガイド核酸を指す。ガイドRNAは、本明細書に記載のような修飾RNAを含むことができる。gRNAは、例えば、単一のガイドRNA、またはcrRNAとtrRNA（別名tracrRNA）との組合せのいずれかであり得る。crRNA及びtrRNAは、単一のRNA分子として（シングルガイドRNA、sgRNAとして）会合することも、例えば、2つの別々のRNA鎖（デュアルガイドRNA、dgRNA）において会合することもできる。いくつかのシステムでは、gRNAはcrRNA（別名CRISPR RNA）であり得る。「ガイドRNA」または「gRNA」は各々のタイプを指す。trRNAは、天然に存在する配列であっても、天然に存在する配列と比較して修飾またはバリエーションを有するtrRNA配列であってもよい。

10

【0119】

いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤をコードするmRNAが第1のLNP組成物中で製剤化され、gRNA核酸が第2のLNP組成物中で製剤化される。いくつかの実施形態において、第1及び第2のLNP組成物が同時に投与される。他の実施形態において、第1及び第2のLNP組成物が順次投与される。いくつかの実施形態において、第1及び第2のLNP組成物はプレインキュベートステップの前に組み合わせられる。他の実施形態において、第1及び第2のLNP組成物は別々にプレインキュベートされる。

【0120】

いくつかの実施形態において、カーゴはDNA分子を含むことができる。いくつかの実施形態において、核酸は、crRNAをコードするヌクレオチド配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、crRNAをコードするヌクレオチド配列は、天然に存在するCRISPR/Casシステムからの反復配列の全部または一部に隣接する標的化配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、tracrRNAをコードするヌクレオチド配列を含むことができる。ある特定の実施形態において、crRNA及びtracrRNAは2つの別々の核酸によってコードすることができる。他の実施形態において、crRNA及びtracrRNAは単一の核酸によってコードすることができる。いくつかの実施形態において、crRNA及びtracrRNAは単一の核酸の対向鎖によってコードすることができる。他の実施形態において、crRNA及びtracrRNAは単一の核酸の同じ鎖によってコードすることができる。いくつかの実施形態において、gRNA核酸はsgRNAをコードする。いくつかの実施形態において、gRNA核酸はCas9ヌクレアーゼsgRNAをコードする。いくつかの実施形態において、gRNA核酸はCpf1ヌクレアーゼsgRNAをコードする。

20

30

【0121】

ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つの転写制御配列または調節制御配列（例えば、プロモーター、3'UTR、または5'UTR）に作用可能に結合することができる。一例において、プロモーターはtRNAプロモーター（例えば、tRNA^{Lys}3またはtRNA^{Kimura}）であり得る。Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9; Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35:2620-2628を参照。いくつかの実施形態において、プロモーターはRNAポリメラーゼIII（Pol III）により認識することができる。Pol IIIプロモーターの非限定的な例としては、U6プロモーター及びH1プロモーターも挙げられる。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのU6プロモーターに対し作用可能に結合していてもよい。いくつかの実施形態において、gRNA核酸は修飾核酸である。いくつかの実施形態において、gRNA核酸は修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、gRNA核酸は、核酸の統合を安定化及び防止するために、5'末端修飾（例えば、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチド）を含む。他の実施形態において、gRNA核酸は、各鎖に5'末端修飾を有する二本鎖DNAを含む。いくつかの

40

50

実施形態において、gRNA核酸は、5'末端修飾として、逆ジデオキシ-Tまたは逆脱塩基ヌクレオシドもしくはヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、gRNA核酸は、ビオチン、デスチオビオチン-TEG、ジゴキシゲニン、及び蛍光マーカ（例えば、FAM、ROX、TAMRA、及びAlexaFluorを含む）などの標識を含む。

【0122】

本明細書で使用する場合、「ガイド配列」とは、標的配列に対し相補的であり、RNA先導DNA結合剤による結合及び／または修飾（例えば、切断）のためにgRNAを標的配列に誘導する、gRNA内の配列を指す。また「ガイド配列」は「標的化配列」または「スパーサー配列」と称されることもある。ガイド配列は、例えば、Streptococcus pyogenes（すなわち、SpyCas9）及び関連するCas9ホモログ／オーソログの場合、20塩基対の長さであり得る。これより短い配列または長い配列（例えば、長さ15、16、17、18、19、21、22、23、24、または25ヌクレオチド）も、ガイドとして使用することができる。いくつかの実施形態において、標的配列は、例えば、遺伝子内または染色体上にあり、ガイド配列に相補的である。いくつかの実施形態において、ガイド配列と対応する標的配列との間の相補性または同一性は、約または少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。いくつかの実施形態において、ガイド配列及び標的領域は、少なくとも15、16、17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドの領域にわたって100%相補的または同一であり得る。他の実施形態において、ガイド配列及び標的領域は少なくとも1つのミスマッチを含むことができる。例えば、ガイド配列及び標的配列は1つ、2つ、3つ、または4つのミスマッチを含むことができ、ここで標的配列の全長は、少なくとも17、18、19、20、またはそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態において、ガイド配列及び標的領域は1～4つのミスマッチを含むことができ、ここでガイド配列は、少なくとも17、18、19、20、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ガイド配列及び標的領域は1つ、2つ、3つ、または4つのミスマッチを含むことができ、ここでガイド配列は20ヌクレオチドを含む。

【0123】

ある特定の実施形態において、複数のLNP組成物を協同的に、及び／または別々の目的で 사용할 ことができる。いくつかの実施形態において、細胞を本明細書に記載の第1及び第2のLNP組成物に接触させることができる。いくつかの実施形態において、第1及び第2のLNP組成物は、それぞれ独立して、mRNA、gRNA、及びガイドRNA核酸のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、第1及び第2のLNP組成物が同時に投与される。いくつかの実施形態において、第1及び第2のLNP組成物が順次投与される。

【0124】

いくつかの実施形態において、細胞内で複数のゲノム編集を生成する方法（本明細書などで「多重化」または「多重遺伝子編集」または「多重ゲノム編集」と称されることもある）が提供される。単一の細胞に複数の属性を操作する能力は、生存能及び所望される細胞の表現型を保持しながら、複数の標的遺伝子の編集（ノックアウト及び座位挿入を含む）を効率的に実施する能力に依存する。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞をin vitroで培養することと、細胞を2つ以上の脂質核酸集合組成物に接触させることであって、各脂質核酸集合組成物が、標的部位を編集可能な核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させることと、細胞をin vitroで増殖させることとを含む。この方法により、複数かつ異なるゲノム編集を有する細胞が得られる。ある特定の実施形態において、第1のLNP組成物は第1のgRNAを含み、第2のLNP組成物は第2のgRNAを含み、第1及び第2のgRNAは、異なる標的に相補的である異なるガイド配列を含む。このような実施形態において、LNP組成物は多重遺伝子編集を可能にし得る。いくつかの実施形態において、細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または

11の脂質核酸集合組成物と接触される。いくつかの実施形態において、細胞は、少なくとも6つの脂質核酸集合組成物と接触される。

【0125】

Casタンパク質の核酸基質は二本鎖核酸であるため、RNA先導DNA結合タンパク質（例えば、Casタンパク質）の標的配列は、ゲノムDNAのプラス鎖及びマイナス鎖の両方（すなわち、所与の配列及びその配列の逆相補配列）を含む。したがって、ガイド配列が「標的配列に相補的」であると述べられている場合、ガイド配列はgRNAに標的配列の逆相補配列に結合するように誘導することができることを理解されたい。したがって、いくつかの実施形態において、ガイド配列が標的配列の逆相補配列に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列中でTがUに置換されていることを除いて、標的配列（例えば、PAMを含まない標的配列）におけるある特定のヌクレオチドと同一である。

10

【0126】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、T細胞受容体、MHCクラスI、またはMHCクラスIIの表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とする。ある特定の実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、TRACを標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、TRBCを標的とする。さらなる実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、CIITAを標的とする。他の実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、HLA-Aを標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、HLA-Bを標的とする。他の実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、HLA-Cを標的とする。さらなる実施形態において、本明細書に記載のgRNAは、B2Mを標的とする。いくつかの実施形態において、*in vitro*培養細胞における複数のゲノム編集を生成するための方法であって、a)細胞を*in vitro*で、第1の核酸を含む少なくとも第1の脂質組成物に接触させて、接触細胞を生成するステップと、b)細胞を*in vitro*で、第2の核酸を含む少なくとも第2の脂質組成物に接触させるステップであって、第2の核酸が第1の核酸とは異なるステップと、c)細胞を*in vitro*で増殖させるステップとを含む、方法が提供される。ある特定の実施形態において、*in vitro*培養細胞における複数のゲノム編集を生成するための方法であって、a)細胞を*in vitro*で、第1の核酸を含む少なくとも第1の脂質組成物に接触させて、接触細胞を生成するステップと、b)接触細胞を*in vitro*で培養して、培養接触細胞を精製するステップと、c)培養接触細胞を*in vitro*で、第2の核酸を含む少なくとも第2の脂質組成物に接触させるステップであって、第2の核酸が第1の核酸とは異なるステップと、d)細胞を*in vitro*で増殖させるステップとを含む、方法が提供される。さらなる実施形態において、この方法は、細胞を*in vitro*で、第3の核酸を含む少なくとも第3の脂質組成物に接触させることをさらに含み、ここで、第3の核酸は第1及び第2の核酸とは異なる。さらなる実施形態において、この方法は、細胞を*in vitro*で、第4の核酸を含む少なくとも第4の脂質組成物に接触させることをさらに含み、ここで、第4の核酸は第1、第2、及び第3の核酸とは異なる。なおまたさらなる実施形態において、この方法は、細胞を*in vitro*で、第5の核酸を含む少なくとも第5の脂質組成物に接触させることをさらに含み、ここで、第5の核酸は第1、第2、第3、及び第4の核酸とは異なる。追加の実施形態において、この方法は、細胞を*in vitro*で、第6の核酸を含む少なくとも第6の脂質組成物に接触させることをさらに含み、ここで、第6の核酸は第1、第2、第3、第4、及び第5の核酸とは異なる。ある特定の実施形態において、少なくとも2つの脂質組成物が順次投与される。いくつかの実施形態において、少なくとも2つの脂質組成物が同時に投与される。いくつかの実施形態において、細胞の増殖は生存率の増加を示す。

20

30

40

【0127】

いくつかの実施形態において、*in vitro*培養細胞において複数のゲノム編集を生成するための前述のいずれかの方法の核酸はRNA（例えば、gRNA）である。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRACを標的とする

50

gRNAを含む。いくつかの実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRBCを標的とするgRNAを含む。さらなる実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、MHCクラスIの表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含む。なおさらなる実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、MHCクラスIIの表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含む。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRACを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRBCを標的とするgRNAを含む。いくつかの実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、HLA-Aを標的とするgRNAを含み、任意選択で、細胞はHLA-Bにホモ接合性であり、HLA-Cにホモ接合性である。いくつかの実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、CIITAを標的とするgRNAを含む。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRACを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRBCを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、HLA-Aを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、CIITAを標的とするgRNAを含む。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRACを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRBCを標的とするgRNA、HLA-Aを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、MHCクラスIIの表面発現を低減または除去するgRNAを含む。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRACを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRBCを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、MHCクラスIの表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、CIITAを標的とするgRNAを含む。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、T細胞受容体の表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、HLA-Aを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、CIITAを標的とするgRNAを含む。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、TRACを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、HLA-Aを標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、CIITAを標的とするgRNAを含む。ある特定の実施形態において、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、MHCクラスIの表面発現を低減または除去する遺伝子を標的とするgRNAを含み、脂質組成物のうちの少なくとも1つは、CIITAを標的とするgRNAを含む。

10

20

30

40

50

【0128】

ある特定の実施形態において、前述の脂質組成物のうちの少なくとも1つは、本明細書に記載の核酸ゲノム編集ツールを含む。いくつかの実施形態において、さらなる脂質組成物はRNA先導DNA結合剤を含む。いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤はCas9である。

【0129】

いくつかの実施形態において、本開示の方法は、細胞をドナー核酸に接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態において、さらなる脂質組成物はドナー核酸を含む。ドナー核酸は標的配列に挿入することができる。いくつかの実施形態において、ドナー核酸配列がベクターとして提供される。いくつかの実施形態において、ドナー核酸は標的化受容体をコードする。ある特定の実施形態において、ドナー核酸は、T細胞受容体配列の対応する領域と相同性を有する領域を含む。「標的化受容体」とは、細胞（例えば、T細胞）の表面に存在して、細胞が標的部位（例えば、生物内の特定の細胞または組織）に結合するのを可能にするポリペプチドのことである。いくつかの実施形態において、標的化受容体はCARである。いくつかの実施形態において、標的化受容体はユニバーサルCAR（UniCAR）である。いくつかの実施形態において、標的化受容体はT細胞受容体融合コンストラクト（TRu

C)である。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、B細胞受容体(BCR)(例えば、B細胞上に発現するもの)である。いくつかの実施形態において、標的化受容体はケモカイン受容体である。いくつかの実施形態において、標的化受容体はサイトカイン受容体である。

【0130】

いくつかの実施形態において、*in vitro*ゲノム編集法は、T細胞の複数の標的部位で高い編集効率をもたらしている。いくつかの実施形態において、内在性TCRがノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、内在性TCRの発現がノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、2つの遺伝子の発現が減少し、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、3つの遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、4つの遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、5つの遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、6つの遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、7つの遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、8つの遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、9つの遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、10の遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、11の遺伝子がノックダウンされ、及び／またはノックアウトされている操作T細胞が生成される。

10

20

【0131】

いくつかの実施形態において、内在性TCRがノックアウトされ、トランスジェニックTCRが挿入及び発現される操作T細胞が生成される。いくつかの実施形態において、操作T細胞は初代ヒトT細胞である。いくつかの実施形態において、tgTCRはウィルムス腫瘍1(WT1)を標的とする。いくつかの実施形態において、WT1 tgTCRが、本開示の脂質組成物を用いて高い割合(例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%超)のT細胞に挿入される。

30

【0132】

β 2MまたはB2Mは、本明細書では互換的に、 β -2ミクログロブリンの核酸配列またはタンパク質配列に関連して使用される。ヒト遺伝子はアクセッション番号NC_000015(範囲44711492...44718877)、参照GRCh38.p13を有する。B2Mタンパク質は、有核細胞の表面でヘテロ二量体としてMHCクラスI分子と会合しており、MHCクラスIタンパク質の発現に必要である。

【0133】

CIITAまたはCIITAまたはC2TAは、本明細書では互換的に使用され、クラスII主要組織適合性複合体トランスアクチベーターの核酸配列またはタンパク質配列を指し、ヒト遺伝子のアクセッション番号はNC_000016.10(範囲10866208...10941562)、参照GRCh38.p13であり、参照により本明細書に組み込まれる。核内のCIITAタンパク質は、MHCクラスII遺伝子転写の正の調節因子として機能し、MHCクラスIIタンパク質の発現に必要である。

40

【0134】

MHCまたはMHC分子(複数可)またはMHCタンパク質またはMHC複合体(複数可)とは、主要組織適合性複合体分子(複数可)を指し、例えばMHCクラスI及びMHCクラスII分子を含む。ヒトの場合、MHC分子はヒト白血球抗原複合体またはHLA分子またはHLAタンパク質と称される。MHC及びHLAという用語の使用は限定的であるようには意図されておらず、本明細書で使用する場合、MHCという用語はヒトMH

50

C分子、すなわちHLA分子を指すために使用することができる。そのため、MHCとHLAという用語は本明細書では互換的に使用される。

【0135】

HLA-Aタンパク質の文脈で本明細書で使用する場合、HLA-Aとは、重鎖（HLA-A遺伝子によってコードされる）及び軽鎖（すなわち、ベータ2ミクログロブリン）を含むヘテロ二量体であるMHCクラスIタンパク質分子を指す。核酸の文脈で本明細書で使用する場合、HLA-AまたはHLA-A遺伝子という用語は、HLA-Aタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。HLA-A遺伝子はHLAクラスI組織適合性Aアルファ鎖とも称され、ヒト遺伝子のアクセッション番号はNC_000006.12（29942532..29945870）であり、参照により本明細書に組み込まれる。HLA-A遺伝子は、集団において数百の異なるバージョン（アレルとも称される）を有することが知られている（そして、一個体がHLA-A遺伝子の2つの異なるアレルを受けることがある）。HLA-Aの全てのアレルは、HLA-A及びHLA-A遺伝子という用語に包含される。

10

【0136】

核酸の文脈で本明細書で使用する場合、HLA-Bとは、HLA-Bタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。HLA-BはHLAクラスI組織適合性Bアルファ鎖とも称され、ヒト遺伝子のアクセッション番号はNC_000006.12（31353875..31357179）であり、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0137】

核酸の文脈で本明細書で使用する場合、HLA-Cとは、HLA-Cタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。HLA-CはHLAクラスI組織適合性Cアルファ鎖とも称され、ヒト遺伝子のアクセッション番号はNC_000006.12（31268749..31272092）であり、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0138】

標的化配列の長さは、使用するCRISPR/Casシステム及び構成要素に依存し得る。例えば、異なる細菌種由来の異なるクラス2 Casヌクレアーゼは、最適な標的配列の長さが異なる。したがって、標的化配列は5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、または50超のヌクレオチド長を含むことができる。いくつかの実施形態において、標的化配列の長さは、天然に存在するCRISPR/Casシステムのガイド配列よりも0、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長いまたは短い。ある特定の実施形態において、Casヌクレアーゼ及びgRNAスキャフォールドは、同じCRISPR/Casシステムに由来する。いくつかの実施形態において、標的化配列は18~24ヌクレオチドを含む、またはそれからなることができる。いくつかの実施形態において、標的化配列は19~21ヌクレオチドを含む、またはそれからなることができる。いくつかの実施形態において、標的化配列は20ヌクレオチドを含む、またはそれからなることができる。

40

【0139】

いくつかの実施形態において、sgRNAは、Cas9タンパク質によるRNA先導DNA切断を媒介可能な「Cas9 sgRNA」である。いくつかの実施形態において、sgRNAは、Cpf1タンパク質によるRNA先導DNA切断を媒介可能な「Cpf1 sgRNA」である。ある特定の実施形態において、gRNAは、Cas9タンパク質と活性複合体を形成し、RNA先導DNA切断を媒介するのに十分なcrRNA及びtracrRNAを含む。ある特定の実施形態において、gRNAは、Cpf1タンパク質と活性複合体を形成し、RNA先導DNA切断を媒介するのに十分なcrRNAを含む。Zetsche 2015を参照。

【0140】

ある特定の実施形態は、本明細書に記載のgRNAをコードする核酸（例えば、発現カセット）も提供する。「ガイドRNA核酸」は、本明細書ではgRNA（例えば、sgR

50

N A または d g R N A) 及び g R N A 発現カセット (1 つ以上の g R N A をコードする核酸) を指すために使用される。

【 0 1 4 1 】

修飾 R N A

ある特定の実施形態において、脂質組成物 (例えば、L N P 組成物) は修飾核酸 (修飾 R N A を含む) を含む。

【 0 1 4 2 】

修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは R N A (例えば、g R N A または m R N A) 内に存在し得る。1 つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む g R N A または m R N A は、カノニカルな A、G、C、及び U 残基の代わりに、またはそれに加えて使用される 1 つ以上の非天然及び / または天然に存在する構成要素または構成の存在を説明するために、例えば、「修飾」R N A と呼ばれる。いくつかの実施形態において、修飾 R N A はノンカノニカルなヌクレオシドまたはヌクレオチドで合成され、ここでは「修飾」と呼ばれる。

【 0 1 4 3 】

修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドは、(i) ホスホジエステル骨格結合における非結合リン酸酸素の一方もしくは両方、及び / または結合リン酸酸素の一方もしくは両方の改変 (例えば、置換) (例示的な骨格修飾)、(i i) 例えばリボース糖上の 2 ' ヒドロキシルの、リボース糖の構成要素の改変 (例えば、置換) (例示的な糖修飾)、(i i i) 「脱ホスホ」リンカーによるリン酸部分のホールセール置換 (例示的な骨格修飾)、(i v) 天然に存在する核酸塩基の修飾または置換 (ノンカノニカルな核酸塩基を含む) (例示的な塩基修飾)、(v) リボース-リン酸骨格の置換または修飾 (例示的な骨格修飾)、(v i) ポリヌクレオチドの 3 ' 末端または 5 ' 末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分、キャップ、もしくはリンカーの結合体化 (このような 3 ' または 5 ' キャップ修飾は、糖及び / または骨格修飾を含み得る)、ならびに (v i i) 糖の修飾または置換 (例示的な糖修飾)、のうちの 1 つ以上を含むことができる。ある特定の実施形態は m R N A、g R N A、または核酸に対する 5 ' 末端修飾を含む。ある特定の実施形態は m R N A、g R N A、または核酸に対する修飾を含む。ある特定の実施形態は m R N A、g R N A、または核酸に対する 3 ' 末端修飾を含む。修飾 R N A は 5 ' 末端及び 3 ' 末端の修飾を含むことができる。修飾 R N A は、非末端位置に 1 つ以上の修飾残基を含むことができる。ある特定の実施形態において、g R N A は少なくとも 1 つの修飾残基を含む。ある特定の実施形態において、m R N A は少なくとも 1 つの修飾残基を含む。ある特定の実施形態において、修飾 g R N A は、5 ' 末端の最初の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上に修飾を含む。ある特定の実施形態において、修飾 g R N A は、5 ' 末端の最初の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上に修飾を含む。修飾 g R N A が、3 ' 末端の最後の 5 つのヌクレオチドのうちの 1 つ以上に修飾を含む、請求項 5 2 または 5 3 に記載の L N P 組成物。

【 0 1 4 4 】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中に見出されるヌクレアーゼによって分解する傾向があり得る。例えば、ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、1 つの態様において、本明細書に記載の R N A (例えば、m R N A、g R N A) は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清ベースのヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1 つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の修飾 R N A 分子は、i n v i v o 及び e x v i v o の両方において、細胞集団に導入されたときに自然免疫応答の低減を示すことができる。「自然免疫応答」という用語は、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を含み、これはサイトカイン、特にインターフェロンの発現及び放出、ならびに細胞死の誘導を伴う。

【 0 1 4 5 】

したがって、いくつかの実施形態において、R N A または核酸は、核酸に安定性の増加

または増強を付与する少なくとも1つの修飾を含み、これには、例えば *in vivo* でのヌクレアーゼ消化に対する抵抗性の改善が含まれる。本明細書で使用する場合、「修飾」及び「修飾されている」という用語は、このような用語が本明細書で提供される核酸に関連する場合、好ましくは安定性を増強し、RNAまたは核酸をRNAまたは核酸の野生型または天然バージョンよりも安定に（例えば、ヌクレアーゼ消化に対し抵抗性に）する少なくとも1つの修飾を含む。本明細書で使用する場合、「安定」及び「安定性」などの用語は、このような用語が本明細書に記載の核酸に関する場合、特にRNAにおいて、通常このようなRNAを分解可能な、例えばヌクレアーゼ（すなわち、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ）による分解に対する抵抗性の増加または増強を指す。安定性の増加には、例えば、内在性酵素（例えば、エンドヌクレアーゼもしくはエキソヌクレアーゼ）または標的細胞もしくは組織内の条件による加水分解または他の破壊に対する感受性が低くなることにより、標的細胞、組織、対象、及び／または細胞質においてこのようなRNAまたは核酸の滞留が増加または増強することが含まれ得る。本明細書で提供される安定化されたRNAまたは核酸分子は、天然に存在する非修飾対応物（例えば、野生型バージョンの分子）よりも長い半減期を示す。また、本明細書で開示するLNP組成物のmRNAに関連する用語としての「修飾」及び「修飾されている」という用語は、mRNA核酸の翻訳を改善または増強する改変を企図しており、例えば、タンパク質翻訳の開始の際に機能する配列（例えば、Kozakコンセンサス配列）の包含が含まれる。（Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20) : 8125-48 (1987)）。

10

20

【0146】

いくつかの実施形態において、RNAまたは核酸は、より安定にするために化学的または生物学的修飾を経ている。RNAまたは核酸に対する例示的な修飾としては、塩基の枯渇（例えば、欠失によるもの、もしくはあるヌクレオチドの別のヌクレオチドに対する置換によるもの）または塩基の修飾（例えば、塩基の化学的修飾）が挙げられる。本明細書で使用する場合、「化学修飾」という表現は、天然に存在するRNAまたは核酸に見られる化学的性質とは異なるものを導入する修飾、例えば、共有結合修飾（例えば、修飾ヌクレオチド（例えば、ヌクレオチドアナログ、またはこのようなRNAに天然に見出されないペンダント基（例えば、デオキシヌクレオシド）の包含、または核酸分子）の導入）を含む。

30

【0147】

骨格修飾のいくつかの実施形態において、修飾残基のリン酸基は、酸素のうちの1つ以上を異なる置換基で置き換えることにより、修飾することができる。さらに、修飾残基、例えば、修飾核酸中に存在する修飾残基は、本明細書に記載のような修飾リン酸基による非修飾リン酸部分のホールセル置換を含むことができる。いくつかの実施形態において、リン酸骨格の骨格修飾は、非荷電リンカーまたは非対称電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかをもたらし改変を含むことができる。

【0148】

修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが挙げられる。非修飾リン酸基のリン原子はアキラルである。ただし、非架橋酸素のうちの1つを上記の原子または原子群の1つで置き換えると、リン原子をキラルにすることができる。立体化学的リン原子は「R」配置（本明細書ではRp）または「S」配置（本明細書ではSp）のいずれかを有し得る。また、骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに結合する酸素）を窒素（架橋ホスホロアミデート）、及び硫黄（架橋ホスホロチオエート）、炭素（架橋メチレンホスホネート）で置き換えることによって修飾することもできる。この置換は、一方の結合酸素で生じることとあれば、両方の結合酸素で生じることとある。リン酸基は、ある特定の骨格修飾において非リン含有コネクターによって置き換えることができる。いくつかの実施形態において、荷電リン酸基は中性部分によって置き換えることができる。

40

50

ホスフェート基を置き換えることができる部分の例としては、限定されるものではないが、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルマセタール、ホルマセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、及びメチレンオキシメチルイミノを挙げることができる。

【0149】

mRNA

いくつかの実施形態において、本明細書で開示する組成物または製剤は、RNA先導DNA結合剤（例えば、本明細書に記載のCasヌクレアーゼまたはクラス2 Casヌクレアーゼ）をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含むmRNAを含む。いくつかの実施形態において、RNA先導DNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼまたはクラス2 Casヌクレアーゼ）をコードするORFを含むmRNAが提供、使用、または投与される。mRNAは5'キャップ、5'非翻訳領域（UTR）、3'UTR、及びポリアデニンテールのうちの1つ以上を含むことができる。mRNAは、例えば、核局在化配列をコードするために、または代替コドンを使用してタンパク質をコードするために、修飾オープンリーディングフレームを含むことができる。

【0150】

本開示のLNP組成物中のmRNAは細胞表面または細胞内ポリペプチドをコードすることができる。本開示のLNP組成物中のmRNAは、例えば、分泌ホルモン、酵素、受容体、ポリペプチド、ペプチド、または通常分泌される他の目的タンパク質をコードすることができる。いくつかの実施形態において、mRNAは任意選択で、例えば、このようなmRNAの安定性及び／または半減期を改善する、あるいはタンパク質生成を改善または他の方法で促進する化学的または生物学的修飾を有することができる。

【0151】

さらに、好適な修飾としては、コドンが同じアミノ酸をコードし、ただし野生型バージョンのmRNAに見出されるコドンよりも安定するような、コドンの1つ以上のヌクレオチドの改変が挙げられる。例えば、RNAの安定性とシチジン（C）残基及び／またはウリジン（U）残基の数がより多いこととの間の逆比例関係が実証されており、C残基及びU残基がないRNAはほとんどのRNAアーゼに対して安定していることが分かっている（Heidenreich, et al. J Biol Chem 269, 2131-8 (1994)）。いくつかの実施形態において、mRNA配列中のC及び／またはU残基の数が低減される。別の実施形態において、C及び／またはU残基の数は、特定のアミノ酸をコードする1つのコドンを、同じまたは関連するアミノ酸をコードする別のコドンで置換することにより、低減される。mRNA核酸に対し企図される修飾には、プソイドウリジンの組み込みも含まれる。プソイドウリジンをmRNA核酸に組み込むことにより、安定性及び翻訳能力を増強し、さらにin vivoの免疫原性を減弱することができる。例えば、Kariko, K., et al., Molecular Therapy 16 (11): 1833-1840 (2008)を参照。mRNAの置換及び修飾は、当業者に容易に知られている方法により実施することができる。

【0152】

配列中のC残基及びU残基の数を低減することの制約は、mRNAのコード領域内では、非翻訳領域と比較して大きくなる可能性がある（すなわち、メッセージが所望のアミノ酸配列をコードする能力を保持したまま、メッセージ中に存在するC残基及びU残基を全て除去することはおそらく不可能である）。ただし、遺伝暗号の縮退は、同じコード能力を維持しながら、配列中に存在するC残基及び／またはU残基の数の低減を可能にする機会をもたらす（すなわち、どのアミノ酸がコドンによってコードされるかに応じて、RNA配列の修飾にはいくつかの異なる可能性が考えられ得る）。

【0153】

修飾という用語は、例えば、mRNA配列への非ヌクレオチド結合または修飾ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドの組み込み（例えば、機能的分泌タンパク質または酵素をコードするmRNA分子の3'末端及び5'末端の一方または両方に対する修飾）も含む。このような修飾としては、mRNA配列への塩基の付加（例えば、ポリAテールまたはより長いポリAテールの包含）、3'UTRまたは5'UTRの改変、mRNAと薬剤（例えば、タンパク質または相補的核酸分子）との複合体化、及びmRNA分子の構造を変化させる要素の包含（例えば、二次構造を形成するもの）が挙げられる。

【0154】

ポリAテールは天然のメッセンジャーを安定化させると考えられている。そのため、長いポリAテールをmRNA分子に付加してmRNAをより安定にすることができる。ポリAテールは、当技術分野で認められている様々な技法を用いて付加することができる。例えば、ポリAポリメラーゼを用いて、合成またはin vitro転写されたmRNAに長いポリAテールを付加することができる（Yokoe, et al. Nature Biotechnology, 1996; 14: 1252-1256）。転写ベクターは長いポリAテールもコードすることができる。さらに、PCR産物から直接転写することによりポリAテールを付加することもできる。いくつかの実施形態において、ポリAテールの長さは少なくとも約90、200、300、400、少なくとも500ヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、ポリAテールの長さが、修飾mRNA分子の安定性、ひいてはタンパク質の転写を制御するために調整される。例えば、ポリAテールの長さはmRNA分子の半減期に影響を及ぼし得るため、ポリAテールの長さを調節して、ヌクレアーゼに対するmRNAの抵抗性のレベルを修飾し、それにより細胞内でのタンパク質発現の時間経過を制御することができる。いくつかの実施形態において、安定化されたmRNA分子は、in vivo分解（例えば、ヌクレアーゼによるもの）に対する抵抗性が十分であるため、移動ビヒクルなしで標的細胞に送達することができる。

【0155】

ある特定の実施形態において、mRNAは、野生型mRNA中に天然には見出されない3'及び／または5'非翻訳（UTR）配列を組み込むことにより、修飾することができる。いくつかの実施形態において、mRNAに天然に隣接し、第2の無関係なタンパク質をコードする3'及び／または5'フランキング配列は、それを修飾するために治療的または機能的タンパク質をコードするmRNA分子のヌクレオチド配列に組み込むことができる。例えば、安定しているmRNA分子（例えば、グロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路酵素）からの3'または5'配列を、センスmRNA核酸分子の3'及び／または5'領域に組み込んでセンスmRNA分子の安定性を高めることができる。例えば、US2003/0083272を参照。

【0156】

mRNA修飾のより詳細な説明は、US2017/0210698A1の57～68ページに見出すことができ、その内容は本明細書に組み込まれる。

【0157】

鋳型核酸

本明細書で開示する方法は、鋳型核酸を使用することを含むことができる。鋳型は、RNAガイドDNA結合タンパク質（例えば、Casヌクレアーゼ、例えばクラス2 Casヌクレアーゼ）の標的部位におけるまたはその付近の核酸配列を改変または挿入するために使用することができる。いくつかの実施形態において、この方法は細胞に鋳型を導入することを含む。いくつかの実施形態において、単一の鋳型が提供され得る。他の実施形態において、2つ以上の標的部位で編集が生じることができるよう2つ以上の鋳型が提供され得る。例えば、細胞内の単一の遺伝子を編集するために、または細胞内の2つの異なる遺伝子を編集するために異なる鋳型が提供され得る。

【0158】

いくつかの実施形態において、鋳型は相同組換えで使用するすることができる。いくつかの実施形態において、相同組換えの結果、鋳型配列または鋳型配列の一部を標的核酸分子に組み込むことができる。他の実施形態において、鋳型は、核酸内の切断部位におけるDN

A鎖侵入を伴う相同組換え修復に使用することができる。いくつかの実施形態において、相同組換え修復の結果、編集した標的核酸分子内に鑄型配列を含めることができる。また他の実施形態において、鑄型は、非相同末端結合によって媒介される遺伝子編集に使用することができる。いくつかの実施形態において、鑄型配列は、切断部位付近の核酸配列と類似性を有しない。いくつかの実施形態において、鑄型または鑄型配列の一部が組み込まれる。いくつかの実施形態において、鑄型はフランキング逆方向末端反復（ITR）配列を含む。

【0159】

いくつかの実施形態において、鑄型配列は標的細胞の内在性配列に対応する、それを含む、またはそれからなることができる。また、標的細胞の外来性配列に対応する、それを含む、またはそれからなることもできる。本明細書で使用する場合、「内在性配列」という用語は、細胞にネイティブな配列を指す。「外来性配列」という用語は、細胞にネイティブでない配列、または細胞のゲノム内のネイティブな位置が異なる位置にある配列を指す。いくつかの実施形態において、内在性配列は細胞のゲノム配列であり得る。いくつかの実施形態において、内在性配列は染色体配列または染色体外配列であり得る。いくつかの実施形態において、内在性配列は細胞のプラスミド配列であり得る。

10

【0160】

いくつかの実施形態において、鑄型は、フランキング逆方向末端反復（ITR）配列を含むssDNAまたはdsDNAを含む。いくつかの実施形態において、鑄型はベクター、プラスミド、ミニサークル、ナノサークル、またはPCR産物として提供される。

20

【0161】

いくつかの実施形態において、核酸は精製される。いくつかの実施形態において、核酸は沈殿法（例えば、LiCl沈殿、アルコール沈殿、または同等の方法、例えば、本明細書に記載の方法）を用いて精製される。いくつかの実施形態において、核酸は、クロマトグラフィーベースの方法（例えば、HPLCベースの方法または同等の方法（例えば、本明細書に記載の方法））を用いて精製される。いくつかの実施形態において、核酸は、沈殿法（例えば、LiCl沈殿法）及びHPLCベースの方法の両方を用いて精製される。いくつかの実施形態において、核酸はタンジェンシャルフロー濾過（FFF）によって精製される。

【0162】

30

細胞タイプ

いくつかの実施形態において、細胞は免疫細胞である。本明細書で使用する場合、「免疫細胞」とは免疫システムの細胞を指し、これには例えば、リンパ球（例えば、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞（「NK細胞」、及びNKT細胞、もしくはiNKT細胞））、単球、マクロファージ、マスト細胞、樹状細胞、または顆粒球（例えば、好中球、好酸球、及び好塩基球）が含まれる。いくつかの実施形態において、細胞は初代免疫細胞である。いくつかの実施形態において、免疫システム細胞は、CD3+、CD4+、及びCD8+T細胞、調節性T細胞（Treg）、B細胞、NK細胞、ならびに樹状細胞（DC）から選択することができる。いくつかの実施形態において、免疫細胞は同種異系である。いくつかの実施形態において、細胞はリンパ球である。いくつかの実施形態において、細胞は適応免疫細胞である。いくつかの実施形態において、細胞はT細胞である。いくつかの実施形態において、細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、細胞はNK細胞である。

40

【0163】

本明細書で使用する場合、T細胞は、T細胞受容体（「TCR」または「 $\alpha\beta$ TCR」または「 $\gamma\delta$ TCR」）を発現する細胞として定義することができるが、いくつかの実施形態において、T細胞のTCRは、（例えば、TRACまたはTRBC遺伝子に対する遺伝子修飾により）その発現を低減するように遺伝子修飾することがあり、そのため、タンパク質CD3の発現は、標準的なフローサイトメトリー法によりT細胞を同定するためのマーカーとして使用することができる。CD3は、TCRと会合するマルチサブユニ

50

ットシグナル伝達複合体である。したがって、T細胞はCD3+と称されることがある。いくつかの実施形態において、T細胞は、CD3+マーカー及びCD4+マーカーまたはCD8+マーカーのいずれかを発現する細胞である。

【0164】

いくつかの実施形態において、T細胞は糖タンパク質CD8を発現し、そのため標準的なフローサイトメトリー法によればCD8+であり、「細胞傷害性」T細胞と称されることがある。いくつかの実施形態において、T細胞は糖タンパク質CD4を発現し、そのため標準的なフローサイトメトリー法によればCD4+であり、「ヘルパー」T細胞と称されることがある。CD4+T細胞はサブセットに分化することができ、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、Th22細胞、T調節性（「Treg」）細胞、またはT濾胞ヘルパー細胞（「Tfh」）と称され得る。各CD4+サブセットは、炎症または抗炎症機能、生存または保護機能のいずれかを有し得る特定のサイトカインを放出する。T細胞は、CD4+またはCD8+選択法により、対象から単離することができる。

10

【0165】

いくつかの実施形態において、T細胞はメモリーT細胞である。体内では、メモリーT細胞が抗原に遭遇している。メモリーT細胞は、二次リンパ器官に位置する（セントラルメモリーT細胞）こともあれば、最近感染した組織に位置する（エフェクターメモリーT細胞）こともある。メモリーT細胞はCD8+T細胞であり得る。メモリーT細胞はCD4+T細胞であり得る。本明細書で使用する場合、「セントラルメモリーT細胞」は抗原経験T細胞として定義することができ、例えば、CD62L及びCD45ROを発現することができる。セントラルメモリーT細胞はCD62L+及びCD45RO+として検出され得る。セントラルメモリーT細胞はCCR7も発現し、そのため標準的なフローサイトメトリー法によりCCR7+として検出され得る。

20

【0166】

本明細書で使用する場合、「初期幹細胞メモリーT細胞」（または「Tscm」）は、CD27及びCD45RAを発現し、そのため標準的なフローサイトメトリー法によりCD27+及びCD45RAであるT細胞として定義することができる。TscmはCD45アイソフォームCD45ROを発現せず、そのため、標準的なフローサイトメトリー法によりこのアイソフォームが染色されると、TscmはさらにCD45RO-となる。そのためCD45RO-CD27+細胞は、初期の幹細胞メモリーT細胞でもある。Tscm細胞はCD62L及びCCR7をさらに発現し、そのため標準的なフローサイトメトリー法によりCD62L+及びCCR7+として検出され得る。初期の幹細胞メモリーT細胞は、細胞療法製品の持続性及び治療有効性の増加と相関することが示されている。

30

【0167】

いくつかの実施形態において、細胞はB細胞である。本明細書で使用する場合、「B細胞」はCD19及び／またはCD20、及び／またはB細胞成熟抗原（「BCMA」）を発現する細胞として定義することができ、そのため、B細胞は標準的なフローサイトメトリー法によればCD19+、及び／またはCD20+、及び／またはBCMA+である。B細胞はさらに、標準的なフローサイトメトリー法によればCD3及びCD56が陰性である。B細胞は形質細胞であり得る。B細胞はメモリーB細胞であり得る。B細胞はナイーブB細胞であり得る。B細胞はIgM+であり得、またはクラススイッチB細胞受容体（例えば、IgG+、IgA+）を有する。

40

【0168】

ACT療法に使用される細胞が含まれ、例えば、間葉系幹細胞（例えば、骨髄（BM）、末梢血（PB）、胎盤、臍帯（UC）、もしくは脂肪から単離）、造血幹細胞（HSC；例えば、BMから単離）、単核細胞（例えば、BMもしくはPBから単離）、内皮前駆細胞（EPC；BM、PB、及びUCから単離）、神経幹細胞（NSC）、角膜縁幹細胞（LSC）、または組織特異的初代細胞もしくはそれに由来する細胞（TSC）が含まれる。ACT療法に使用される細胞としてはさらに、他の細胞タイプ（例えば、島細胞、神経細胞、及び血液細胞を含む）に分化するように誘導することができる誘導多能性幹細胞

50

(iPSC)、眼球幹細胞、多能性幹細胞(PSC)、胚性幹細胞(ESC)、臓器または組織移植用の細胞(例えば、島細胞、心筋細胞、甲状腺細胞、胸腺細胞、神経細胞、皮膚細胞、網膜細胞、軟骨細胞、筋細胞、及びケラチノサイト)が挙げられる。

【0169】

いくつかの実施形態において、細胞はヒト細胞(例えば、対象由来の細胞)である。いくつかの実施形態において、細胞はヒト対象(例えば、ヒトドナー)から単離される。いくつかの実施形態において、細胞はヒトドナーPBMCまたはロイコパックから単離される。いくつかの実施形態において、細胞は状態、障害、疾患を有する対象由来である。いくつかの実施形態において、細胞はエプスタインバーウイルス(「EBV」)を有するヒトドナー由来である。

10

【0170】

いくつかの実施形態において、細胞は単核細胞(例えば、骨髄または末梢血由来)である。いくつかの実施形態において、細胞は末梢血単核球(「PBMC」)である。いくつかの実施形態において、細胞はPBMC(例えば、リンパ球または単球)である。いくつかの実施形態において、細胞は末梢血リンパ球(「PBL」)である。

【0171】

いくつかの実施形態において、この方法はex vivoで行われる。本明細書で使用する場合、「ex vivo」とは、例えばACT療法として、細胞を対象に移行可能なin vitroの方法を指す。いくつかの実施形態において、ex vivoの方法は、ACT療法細胞または細胞集団を伴うin vitroの方法である。

20

【0172】

いくつかの実施形態において、細胞は培養下で維持される。いくつかの実施形態において、細胞は患者に移植される。いくつかの実施形態において、細胞が対象から取り出され、ex vivoで遺伝子修飾され、次いで同じ患者に再び投与される。いくつかの実施形態において、細胞が対象から取り出され、ex vivoで遺伝子修飾され、次いで取り出された対象以外の対象に投与される。

【0173】

いくつかの実施形態において、細胞は細胞株由来である。いくつかの実施形態において、細胞株はヒト対象に由来する。いくつかの実施形態において、細胞株はリンパ芽球様細胞株(「LCL」)である。細胞は凍結保存し解凍することができる。細胞は以前に凍結保存されていなくてもよい。

30

【0174】

いくつかの実施形態において、細胞は細胞バンク由来である。いくつかの実施形態において、細胞は遺伝子修飾され、次いで細胞バンクに移される。いくつかの実施形態において、細胞は対象から取り出され、ex vivoで遺伝子修飾され、細胞バンクに移される。いくつかの実施形態において、遺伝子修飾された細胞集団が細胞バンクに移される。いくつかの実施形態において、遺伝子修飾された免疫細胞集団が細胞バンクに移される。いくつかの実施形態において、第1及び第2の亜集団を含む遺伝子修飾された免疫細胞集団であって、第1及び第2の亜集団が少なくとも1つの共通の遺伝子修飾及び少なくとも1つの異なる遺伝子修飾を有する、遺伝子修飾された免疫細胞集団が、細胞バンクに移される。

40

【0175】

いくつかの実施形態において、T細胞は、ポリクローナル活性化(または「ポリクローナル刺激」)(抗原特異的刺激ではない)によって活性化される。いくつかの実施形態において、T細胞はCD3刺激(例えば、抗CD3抗体の提供)によって活性化される。いくつかの実施形態において、T細胞はCD3及びCD28刺激(例えば、抗CD3抗体及び抗CD28抗体の提供)によって活性化される。いくつかの実施形態において、T細胞は、T細胞を活性化するためのすぐに使用可能な試薬を用いて(例えば、CD3/CD28刺激を介して)活性化される。いくつかの実施形態において、T細胞はビーズにより提供されるCD3/CD28刺激によって活性化される。いくつかの実施形態において、T

50

細胞は、1つ以上の構成要素が可溶性であり、及び／または1つ以上の構成要素が固体表面（例えば、プレートまたはビーズ）に結合しているCD3／CD28刺激を介して活性化される。いくつかの実施形態において、T細胞は、抗原非依存性マイトジェン（例えば、レクチン（例えば、コンカナバリンA（「ConA」）またはPHAを含む））によって活性化される。

【0176】

いくつかの実施形態において、1つ以上のサイトカインがT細胞の活性化のために使用される。IL-2は、T細胞の活性化のため及び／またはT細胞の生存を促進するために提供される。いくつかの実施形態において、T細胞の活性化のためのサイトカイン（複数可）は、共通ガンマ鎖（ γc ）受容体に結合するサイトカインである。いくつかの実施形態において、IL-2がT細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、IL-7がT細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、IL-15がT細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、IL-21がT細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、サイトカインの組合せ（例えば、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21を含む）がT細胞活性化のために提供される。

【0177】

いくつかの実施形態において、T細胞は、細胞を抗原に曝露する（抗原刺激）ことにより活性化される。抗原が主要組織適合複合体（MHC）分子（ペプチド-MHC複合体）内でペプチドとして提示されると、T細胞は抗原により活性化される。T細胞を抗原提示細胞（フィーダー細胞）及び抗原と共培養することにより、同族抗原をT細胞に提示することができる。いくつかの実施形態において、T細胞は、抗原でパルスされた抗原提示細胞との共培養により活性化される。いくつかの実施形態において、抗原提示細胞は抗原のペプチドでパルスされている。

【0178】

いくつかの実施形態において、T細胞は12～72時間活性化させることができる。いくつかの実施形態において、T細胞は12～48時間活性化させることができる。いくつかの実施形態において、T細胞は12～24時間活性化させることができる。いくつかの実施形態において、T細胞は24～48時間活性化させることができる。いくつかの実施形態において、T細胞は24～72時間活性化させることができる。いくつかの実施形態において、T細胞は12時間活性化させることができる。いくつかの実施形態において、T細胞は48時間活性化させることができる。いくつかの実施形態において、T細胞は72時間活性化させることができる。

【0179】

本発明を示された実施形態と併せて説明するが、これらの実施形態は、本発明をこれらの実施形態に限定するように意図されていないことを理解されたい。そうではなく、本開示は、添付の特許請求の範囲によって定義されるような本発明内に含まれ得る全ての代替形態、変更形態、及び等価物（特定の特徴の等価物を含む）を網羅するように意図されている。

【0180】

前述の一般的な説明及び詳細な説明、ならびに以下の実施例は、いずれも例示及び説明にとどまるものであり、教示内容を制限するものではない。本明細書で使用される節の見出しは、編成上の目的にとどまるものであり、いかなる形でも主題を限定するものと解釈すべきではない。参照により組み込まれた文献が本明細書で定義された用語と矛盾する場合は、本明細書が優先される。本出願で示される全ての範囲は、別段の記載がない限り、両端値を包含する。

【0181】

定義

本出願で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈による明確な別段の定めがない限り、複数形への言及を含むことに留意されたい。したがって、

10

20

30

40

50

例えば、「(1つの)組成物」に言及された場合は複数の組成物を含み、「(1つの)細胞」に言及された場合は複数の細胞を含む、などとなる。「または」の使用は包括的であり、別段の記載がない限り「及び／または」を意味する。

【0182】

本明細書の上記で特に注記しない限り、本明細書内で、様々な構成要素を「含む」と記載している実施形態は、記載された構成要素から「なる」または「本質的になる」ことも企図されており、本明細書内で様々な構成要素から「なる」と記載されている実施形態は、記載された構成要素を「含む」またはそれから「本質的になる」ことも企図されており、本明細書内で様々な構成要素について「約」と記載している実施形態は、記載された構成要素「における」ことも企図されており、本明細書内で、様々な構成要素から「本質的になる」と記載している実施形態は、記載された構成要素から「なる」またはそれを「含む」ことも企図されている（この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない）。

10

【0183】

数値範囲は、その範囲を規定する数字を含む。測定値及び測定可能値は、有効数字及び測定に伴う誤差を考慮した概算値であると理解される。本出願で使用される「約」及び「およそ」という用語は、当技術分野で理解されている意味を有する。一方及び他方の使用は、必ずしも異なる範囲を意味するものではない。別段の指示がない限り、本出願で使用される数値は、「約」または「およそ」などの修飾語の有無にかかわらず、関連技術分野の当業者が理解すると考えられる通常の乖離及び／または変動を包含するものと理解されたい。ある特定の実施形態において、「およそ」または「約」という用語は、別段の明記がない限り、または文脈から別の内容が明らかでない限り（このような数字が可能な値の100%を超える場合を除いて）、記載された基準値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、またはそれ以下のいずれかの方向（より大きい、またはより小さい）に収まる値の範囲を指すことができる。

20

【0184】

本明細書で使用する場合、「接触」という用語は、2つ以上の実体間に物理的な接続を確立することを意味する。例えば、哺乳類細胞をナノ粒子組成物に接触させることは、哺乳類細胞及びナノ粒子に物理的な接続を共有させることを意味する。細胞を外部の実体に接触させる方法は、*in vivo* 及び *ex vivo* の両方において、生物学的技術分野で周知されている。例えば、哺乳類内で配置されたナノ粒子組成物と哺乳類細胞との接触は、様々な投与経路（例えば、静脈内、筋肉内、皮内、及び皮下）により実施することができ、様々な量のナノ粒子組成物を伴うことができる。さらに、複数の哺乳類細胞をナノ粒子組成物に接触させることができる。

30

【0185】

本明細書で使用する場合、「送達する」という用語は、実体を宛先に供給することを意味する。例えば、治療薬及び／または予防薬を対象に送達することは、治療薬及び／または予防薬を含むナノ粒子組成物を（例えば、静脈内、筋肉内、皮内、または皮下経路により）対象に投与することを伴い得る。哺乳類または哺乳類細胞へのナノ粒子組成物の投与は、1つ以上の細胞をナノ粒子組成物に接触させることを含み得る。

40

【0186】

本明細書で使用する場合、「カプセル化効率」とは、ナノ粒子組成物の調製に使用される治療薬及び／または予防薬の最初の総量に対する、ナノ粒子組成物の一部となる治療薬及び／または予防薬の量を指す。例えば、最初に組成物に供給された合計100mgの治療薬及び／または予防薬のうち、97mgの治療薬及び／または予防薬がナノ粒子組成物内にカプセル化された場合、カプセル化効率は97%として得ることができる。本明細書で使用する場合、「カプセル化」とは完全な、実質的な、または部分的な封入、拘束、取囲み、または内包を指すことができる。

【0187】

50

本明細書で使用する場合、「編集効率」、「編集パーセンテージ」、「インデル効率」、及び「パーセントインデル」という用語は、配列リードの総数に対する挿入または欠失を伴った配列リードの総数を指す。例えば、ゲノム内の標的位置における編集効率は、ゲノムDNAを単離及びシーケンシングして、遺伝子編集によって導入された挿入及び欠失の存在を特定することにより、測定することができる。いくつかの実施形態において、編集効率は、最初にその遺伝子を含んでいた細胞（例えば、CD3+細胞）の数に対する、処置後に遺伝子をもはや含まない細胞（例えば、CD3）のパーセンテージとして測定される。

【0188】

本明細書で使用する場合、「ノックダウン」とは、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、mRNA、またはこの両方）の発現の減少を指す。タンパク質のノックダウンは、目的の組織、液体、細胞集団などの試料から、そのタンパク質の細胞内総量を検出することにより、測定することができる。また、タンパク質のサロゲート、マーカー、または活性を測定することによっても測定することができる。mRNAのノックダウンを測定する方法は知られており、目的試料から単離したmRNAのシーケンシングを含む。いくつかの実施形態において、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物における発現の何らかの喪失、例えば、転写されるmRNAの量の減少、または細胞集団（組織中に見出されるような*in vivo*集団を含む）により発現するタンパク質の量の減少を指すことができる。

10

【0189】

本明細書で使用する場合、「ノックアウト」とは、細胞内で特定の遺伝子からのまたは特定のタンパク質の発現が喪失することを指す。ノックアウトは、例えば、細胞、組織、または細胞集団におけるタンパク質の総細胞量を検出することにより測定することができる。また、ノックアウトは、例えばゲノムやmRNAレベルで検出することもできる。

20

【0190】

本明細書で使用する場合、「生分解性」という用語は、細胞内に導入されたときに、細胞機構（例えば、酵素分解）または加水分解によって分解され、細胞に対する重大な毒性効果（複数可）なしで細胞が再利用または廃棄できる構成要素となる物質を指すために使用される。ある特定の実施形態において、生分解性材料の分解によって生成される構成要素は、*in vivo*で炎症及び／または他の有害作用を誘導しない。いくつかの実施形態において、生分解性材料は酵素的に分解される。代替的または追加的に、いくつかの実施形態において、生分解性材料は加水分解によって分解される。

30

【0191】

本明細書で使用する場合、「N/P比」とは、例えば、脂質構成要素及びRNAを含むナノ粒子組成物中の、イオン化可能な窒素原子含有脂質（例えば式Iの化合物）：RNA中のリン酸基のモル比のことである。

【0192】

また、組成物は1つ以上の化合物の塩も含むことができる。塩は医薬的に許容される塩であり得る。本明細書で使用する場合、「医薬的に許容される塩」とは、既存の酸または塩基部分をその塩の形態に変換することにより（例えば、遊離塩基を好適な有機酸と反応させることにより）親化合物が改変されている本開示の化合物の誘導体を指す。医薬的に許容される塩の例としては、限定されるものではないが、アミンなどの塩基性残基の鉱物または有機酸塩、カルボン酸などの酸性残基のアルカリまたは有機酸塩などが挙げられる。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、カンファー酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサ酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタ

40

50

ンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどに加えて無毒性アンモニウム、四級アンモニウム、及びアミンカチオンが挙げられ、これには、限定されるものではないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどが含まれる。本開示の医薬的に許容される塩としては、例えば無毒性の無機酸または有機酸から形成される、親化合物の従来の無毒性塩が挙げられる。本開示の医薬的に許容される塩は、従来の化学的方法により、塩基性または酸性部分を含む親化合物から合成することができる。概して、このような塩は、これらの化合物の遊離酸または塩基形態を、化学量論量の適切な塩基または酸と、水または有機溶媒中で、またはこの2つの混合物中で反応させることによって調製することができ、概して、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、またはアセトニトリルのような非水性媒体が好ましい。好適な塩のリストは、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008及びBerge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977)に記載されており、これらの各々は参照により全体として本明細書に組み込まれる。

10

20

【0193】

本明細書で使用する場合、「多分散指数」とは、システムの粒度分布の均一性を表す比率のことである。小さい値、例えば0.3未満は粒度分布が狭いことを示す。いくつかの実施形態において、多分散指数は0.1未満であり得る。

【0194】

本明細書で使用する場合、「形質移入」とは、ある種（例えば、RNA）を細胞に導入することを指す。形質移入は、例えば、in vitro、ex vivo、またはin vivoで行うことができる。

30

【0195】

本明細書で使用する場合、「アルキル」という用語は、1～24個の炭素原子を有する分枝状または非分枝状の飽和炭化水素基のことであり、例えば、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、s-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、s-ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、エイコシル、テトラコシルである。アルキル基は環状であっても非環状であってもよい。アルキル基は分枝状であっても非分枝状（すなわち、直鎖状）であってもよい。また、アルキル基は置換されていても置換されていなくてもよい。例えば、アルキル基は、本明細書に記載のように、1つ以上の基（限定されるものではないが、アルキル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、アルコキシ、アミノ、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ニトロ、シリル、スルホオキシ、スルホネート、カルボキシレート、またはチオールを含む）で置換されてもよい。「低級アルキル」基は、1～6個（例えば、1～4個）の炭素原子を含有するアルキル基である。

40

【0196】

本明細書で使用する場合、「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素間二重結合を含む脂肪族基を指し、「非置換アルケニル」及び「置換アルケニル」の両方を含むことが意図され、後者は、当該アルケニル基の1個以上の炭素上の水素を置き換える置換

50

基を有するアルケニル部分を指す。このような置換基は、1つ以上の二重結合に含まれるか、または含まれない1個以上の炭素上で存在し得る。さらに、このような置換基は、安定性が抑制される場合を除いて、以下のようにアルキル基に対して企図されるもの全てを含む。例えば、アルケニル基は、1つ以上のアルキル基、カルボシクリル基、アリール基、ヘテロシクリル基、またはヘテロアリール基で置換され得ることが企図される。例示的なアルケニル基としては、限定されるものではないが、ビニル ($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、アリル ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、シクロペンテニル ($-\text{C}_5\text{H}_7$)、及び5-ヘキセニル ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) が挙げられる。

【0197】

「アルキレン」基とは、分枝状であっても非分枝状（すなわち、直鎖状）であってもよい二価のアルキルラジカルを指す。上述した一価のアルキル基はいずれも、アルキルから第2の水素原子を除去することにより、アルキレンに変換することができる。代表的なアルキレンとしては、 $\text{C}_2\sim 4$ アルキレン及び $\text{C}_2\sim 3$ アルキレンが挙げられる。代表的なアルキレン基としては、限定されるものではないが、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ などが挙げられる。また、アルキレン基は置換されていても置換されていなくてもよい。例えば、アルキレン基は、本明細書に記載のように、1つ以上の基（限定されるものではないが、アルキル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、アルコキシ、アミノ、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ニトロ、シリル、スルホオキシ、スルホネート、カルボキシレート、またはチオールを含む）で置換されてもよい。

【0198】

「アルケニレン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有し、1つの実施形態では炭素間三重結合を有しない、二価の直鎖状または分枝状不飽和非環式ヒドロカルビル基を含む。上述した一価のアルケニル基はいずれも、アルケニルから第2の水素原子を除去することにより、アルケニレンに変換することができる。代表的なアルケニレンとしては $\text{C}_2\sim 6$ アルケニレンが挙げられる。

【0199】

「 $\text{C}_x\sim y$ 」という用語は、アルキルまたはアルキレンなどの化学部分とともに使用される場合、鎖内に $x\sim y$ 個の炭素を含む基を含むことを意味する。例えば、「 $\text{C}_x\sim y$ アルキル」という用語は、鎖内に $x\sim y$ 個の炭素を含む直鎖状及び分枝状のアルキル基及びアルキレン基を含む、置換または非置換の飽和炭化水素基を指す。

【0200】

「アルコキシ」という用語は、酸素が結合しているアルキル基、好ましくは低級アルキル基を指す。代表的なアルコキシ基としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、*tert*-ブトキシなどが挙げられる。

【0201】

参照による組込み

論文、特許、及び特許出願の内容、ならびに本明細書で言及または引用されている他の全ての文書及び電子的に入手可能な情報は、個々の刊行物が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されている場合と同じ程度に、参照により全体として本明細書に組み込まれる。出願人は、このような論文、特許、特許出願、または他の物理的及び電子的文書に含まれる全ての資料及び情報を本出願に物理的に組み込む権利を留保する。

【実施例】

【0202】

実施例1：材料及び方法

実施例1.1 脂質ナノ粒子（「LNP」）製剤

LNP構成要素を、様々なモル比で100%エタノールに溶解した。RNAカーゴ（例えば、Cas9 mRNA及びsgRNAの組合せ）を25mMのクエン酸、100mMのNaCl、pH5.0に溶解して、その結果RNAカーゴの濃度はおよそ0.45mg

／mLとなった。LNPは、別段の指定がない限り、脂質アミン：RNAリン酸（N：P）のモル比を約6で、sgRNA：Cas9 mRNAの重量比を1：2で製剤化した。

【0203】

4構成要素脂質システムにおいて様々なアミン脂質を用いてLNPを調製した。別段の指定がない限り、LNPには、イオン化可能な脂質、化合物6（（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノエート（別名3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12-ジエノエート））、DSPC、コレステロール、及びPEG2k-DMGが含まれた。

10

【0204】

LNPは、エタノール中の脂質と2体積のRNA溶液及び1体積の水との衝突ジェット混合を利用するクロスフロー技法を用いて調製した。エタノール中の脂質を、ミキシングクロスを通じて2体積のRNA溶液と混合した。第4の水流を、インラインティーを通じてクロスのアウトレット流と混合した（WO2016010840の図2を参照）。LNPを室温で1時間保持し、さらに水で希釈した（およそ1：1 v/v）。タンジェンシャルフロー濾過を、例えばフラットシートカートリッジ（Sartorius、100kD MWCO）上で用いてLNPを濃縮し、任意選択で、PD-10脱塩カラム（GE）を用いて50mMのトリス、45mMのNaCl、5%（w/v）のスクロース、pH7.5（TSS）にバッファー交換した。代替的に、100kDaのAmiconスピンフィルターを用いてLNPを任意選択で濃縮し、PD-10脱塩カラム（GE）を用いてTSSにバッファー交換した。次に、0.2μMの滅菌フィルターを用いて得られた混合物を濾過した。最終的なLNPを、さらに使用するまで4℃または-80℃で保存した。

20

【0205】

実施例1.2 ヌクレアーゼmRNAのin vitro転写（「IVT」）

N1-メチルシュードーUを含むキャッピング及びポリアデニル化されたmRNAを、線状化プラスミドDNA鋳型及びT7 RNAポリメラーゼを用いたin vitro転写により生成した。T7プロモーター、転写のための配列、及びポリアデニル化領域を含むプラスミドDNAを、以下の条件：200ng/μLのプラスミド、2U/μLのXbaI（NEB）、及び1×反応バッファーを用いて、XbaIとともに37℃にて2時間インキュベートすることにより線状化した。XbaIは、反応物を65℃で20分間加熱することにより不活性化した。線状化プラスミドを酵素及びバッファー塩から精製した。修飾mRNAを生成するためのIVT反応を、以下の条件：50ng/μLの線状化プラスミド；各2～5mMのGTP、ATP、CTP、及びN1-メチルシュードーUTP（Trilink）；10～25mMのARCA（Trilink）；5U/μLのT7 RNAポリメラーゼ（NEB）；1U/μLのマウスRNAアーゼ阻害剤（NEB）；0.004U/μLの無機E. coliピロホスファターゼ（NEB）；ならびに1×反応バッファーにおいて、37℃で1.5～4時間インキュベートすることにより実施した。TURBO DNアーゼ（ThermoFisher）を加えて最終濃度0.01U/μLとし、反応物をさらに30分間インキュベートしてDNA鋳型を取り出した。Megaclear Transcription Clean-up kit（ThermoFisher）またはRNeasy Maxi kit（Qiagen）を製造業者のプロトコルに従って用いて、mRNAを精製した。

30

40

【0206】

代替的に、mRNAを沈殿プロトコルにより精製し、場合によってはその後にHPLCベースの精製を行った。簡潔に説明すると、DNアーゼ消化後、LiCl沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、及び酢酸ナトリウム沈殿を用いてmRNAを精製する。HPLC精製mRNAについては、LiCl沈殿及び再構成の後、mRNAをRP-IP HPLCによって精製した（例えば、Kariko, et al. Nucleic Acids Res

50

earch, 2011, Vol. 39, No. 21 e142を参照)。プール用に選択した画分を合わせ、上記のように酢酸ナトリウム／エタノール沈殿により脱塩した。さらに代替的な方法では、mRNAをLiCl沈殿方法で精製し、続いてタンジェンシャルフロー濾過によりさらに精製した。RNA濃度を、260nmにおける光吸収を測定することにより定量し(Nanodrop)、転写物をBioanalyzer(Agilent)によるキャピラリー電気泳動により解析した。

【0207】

Streptococcus pyogenes(「Spy」)Cas9 mRNAを、配列番号1〜3に従うオープンリーディングフレームをコードするプラスミドDNAから生成した(表35の配列参照)。この段落で引用する配列が以下でRNAに関し言及される場合、TsをUs(上記のように修飾されたヌクレオシドであり得る)で置き換えるべきであることを理解されたい。実施例で使用したメッセンジャーRNAは5'キャップ及び3'ポリアデニル化配列(例えば、最大100nt)を含み、表35で明らかにしている。

10

【0208】

ガイドRNAは、当技術分野で知られている方法により化学合成される。

【0209】

実施例1.4 製剤解析

動的光散乱法(「DLS」)を使用して、本開示のLNPの多分散指数(「pdi」)及びサイズを特性評価した。DLSは、試料を光源に供することから生じる光の散乱を測定する。DLS測定から求められるPDIは、集団における粒子サイズの分布(平均粒子サイズの周辺)に相当し、完全に均一な集団はゼロのPDIを有する。

20

【0210】

非対称流動場分画-多角度光散乱(AF4-MALS)は、流体力学的半径によって組成物中の粒子を分離し、次いで分割された粒子の分子量、流体力学的半径、及び二乗平均平方根半径を測定するために使用される。これにより、分子量分布及び粒度分布を評価する能力に加えて、二次特性、例えば、Burcharde-Stockmeyerプロット(粒子の内部コア密度を示唆する二乗平均平方根(「rms」)半径:流体力学的半径の経時的な比)及びrms立体構造プロット(得られる線形フィットの傾きによって圧縮vs伸長の程度が得られるrms半径の対数vs分子量の対数)を評価することができる。

30

【0211】

クライオ電子顕微鏡(「クライオEM」)は、LNPの粒子サイズ、形態、及び構造特性を定量するために使用することができる。

【0212】

液体クロマトグラフィー及び荷電エアロゾル検出(LC-CAD)を用いてLNPの脂質組成物解析を決定した。この解析は、実測脂質含量及び名目脂質含量を比較するものである。

【0213】

LNP組成物の平均粒子サイズ、多分散指数(pdi)、総RNA含量、RNAのカプセル化効率、及びゼータ電位を解析した。LNP組成物は脂質解析、AF4-MALS、NTA、及び/またはクライオEMによってさらに特性評価することができる。Malvern Zetasizer DLS装置を用いた動的光散乱法(DLS)により、平均粒子サイズ及び多分散性を測定した。LNP試料をPBSバッファで希釈してからDLSにより測定した。Z平均直径を数平均直径及びpdiとともに報告した。Z平均とは、粒子の集合の強度加重平均流体力学的サイズのことであり、動的光散乱法によって測定した。数平均とは、動的光散乱法によって測定された粒子の集合の粒子数加重平均流体力学的サイズのことである。Malvern Zetasizer装置も使用してLNPのゼータ電位を測定した。測定前に試料を0.1×PBS、pH7.4で1:17(800µL中50µL)に希釈した。

40

【0214】

50

カプセル化効率を（総RNA－遊離RNA）／総RNAとして計算した。蛍光ベースアッセイ（Ribogreen（登録商標）；ThermoFisher Scientific）を使用して総RNA濃度及び遊離RNAを定量した。LNP試料を0.2%のTriton-X100を含む1×TEバッファーで適切に希釈して、総RNAまたは1×TEバッファーを定量して遊離RNAを定量した。標準曲線は、組成物の作製に使用し1×TEバッファー＋／－0.2%のTriton-X100で希釈した出発RNA溶液を利用することによって用意した。次いで、希釈したRibogreen（登録商標）色素（製造業者の指示に従う）を標準物質及び試料の各々に加え、光の不在下で、室温でおよそ10分間インキュベートした。SpectraMax M5マイクロプレートリーダー（Molecular Devices）を使用して、励起、オートカットオフ、及び発光の波長をそれぞれ488nm、515nm、及び525nmに設定して試料を読み取った。総RNA及び遊離RNAを適切な標準曲線から定量した。

10

【0215】

AF4-MALSは、分子量及び粒度分布、ならびにこれらの計算値からの二次統計量を調べるために使用される。LNPを適宜希釈し、HPLCオートサンプラーを用いてAF4分離チャンネルに注入し、集中させ、次いでチャンネルを横切るクロスフローの指数関数的勾配で溶出する。全ての流体はHPLCポンプ及びWyatt Eclipse装置によって駆動される。AF4チャンネルから溶出した粒子は、UV検出器、多角度光散乱検出器、準弾性光散乱検出器、及び示差屈折率検出器を流れる。生データを、Debyeモデルを使用することによって処理して、検出器シグナルから分子量及びrms半径を定量する。

20

【0216】

CADは、全ての不揮発性化合物を検出する破壊質量ベース検出器であり、シグナルはアナライト構造に関係なく一貫している。

【0217】

LNP中の脂質構成要素を、荷電エアロゾル検出器（CAD）と結合したHPLCにより定量的に解析した。4つの脂質構成要素のクロマトグラフィー分離は逆相HPLCにより達成される。HPLC脂質解析により、表1に示されているように、以下の実施例に記載したLNP組成物の各構成要素の実際のモル%（mol-%）脂質レベルが得られた。

30

40

50

【表 2－1】

表 1．L N P 組成物の脂質解析の結果

L N P I D	モル比（名目値）	実測または測定m o l %			
		化合物 6	D S P C	コレステ ロール	P E G
組成物 1	50/10/38.5/1.5	49.4%	11.5%	37.5%	1.7%
組成物 2	50/5/43.5/1.5	46.6%	4.8%	46.6%	1.9%
組成物 3	45/15/38.5/1.5	42.1%	16.3%	39.7%	1.8%
組成物 4	45/5/48.5/1.5	42.2%	5.8%	50.2%	1.8%
組成物 5	40/10/48.5/1.5	38.9%	11.0%	48.4%	1.7%
組成物 6	30/10/58.5/1.5	24.7%	9.8%	63.9%	1.6%
組成物 7	30/5/63.5/1.5	25.9%	5.5%	66.8%	1.8%
組成物 8	55/5/38.5/1.5	52.9%	6.1%	39.4%	1.5%
組成物 9	55/10/33.5/1.5	51.7%	11.5%	35.0%	1.8%
組成物 1 0	65/5/28.5/1.5	66.8%	5.9%	25.5%	1.7%
組成物 1 1	50/10/38.5/1.5	46.4%	11.0%	41.0%	1.6%
組成物 1 2	50/10/38.5/1.5	45.6%	11.8%	40.6%	2.0%
組成物 1	50/10/38.5/1.5	45.8%	12.2%	40.3%	1.6%
組成物 1 3	30/5/62.5/2.5	23.7%	5.5%	68.3%	2.6%
組成物 1 4	35/10/52.5/2.5	30.6%	10.4%	56.0%	3.0%
組成物 1 5	35/10/53.5/1.5	31.6%	11.4%	55.4%	1.6%
組成物 1 6	35/15/47.5/2.5	31.7%	16.1%	49.3%	3.0%
組成物 5	40/10/48.5/1.5	39.3%	10.5%	48.6%	1.6%
組成物 1 7	40/15/43.5/1.5	37.0%	16.4%	45.0%	1.7%
組成物 1 8	45/10/43.5/1.5	42.9%	11.6%	43.8%	1.6%
組成物 1 9	40/10/48.5/1.5	34.2%	10.2%	53.9%	1.7%
組成物 2 0	40/10/48.5/1.5	38.1%	12.3%	47.9%	1.7%
組成物 2 1	50/9/39.5/1.5	46.8%	10.1%	41.5%	1.5%
組成物 2 2	50/9/39.5/1.5	46.3%	11.1%	41.0%	1.5%
組成物 23	35/15/47.5/2.5	32.9%	15.2%	49.2%	2.7%
組成物 24	37.2/9.6/50.5/2.7	34.9%	9.8%	52.4%	2.9%
組成物 25	36.1/12.4/49/2.6	33.4%	12.1%	51.7%	2.8%
組成物 26	34/17.5/46.1/2.4	30.4%	18.2%	48.9%	2.5%
組成物 27	33/19.8/44.8/2.4	29.5%	19.9%	48.1%	2.5%
組成物 28	43.8/18.8/35.6/1.9	43.6%	19.4%	35.3%	1.7%
組成物 29	43.5/18.6/35.4//2.5	43.7%	18.8%	34.9%	2.6%
組成物 30	43.2/18.5/35.2/3.1	42.8%	17.9%	36.3%	3.0%
組成物 31	38.9/16.7/42.2/2.2	37.0%	16.4%	44.4%	2.3%
組成物 32	38.7/16.6/42/2.8	37.4%	16.6%	43.4%	2.6%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

L N P I D	モル比 (名目値)	実測または測定m o l %			
		化合物 6	D S P C	コレステ ロール	P E G
組成物 33	38.5/16.5/41.8/3.3	36.5%	16.0%	44.1%	3.5%
組成物 34	32/13.7/52.1/2.3	30.0%	13.6%	54.0%	2.3%
組成物 35	31.8/13.6/51.8/2.7	29.5%	13.6%	54.5%	2.4%
組成物 36	31.7/13.6/51.6/3.2	29.4%	13.2%	54.2%	3.3%
組成物 37	45.2/15.5/36.8/2.6	45.9%	15.5%	36.4%	2.2%
組成物 38	40.1/13.8/43.6/2.6	40.2%	14.7%	42.5%	2.6%
組成物 39	32.8/11.2/53.4/2.6	31.6%	11.4%	54.7%	2.3%
組成物 40	38.5/27.7/31.3/2.5	37.8%	27.8%	31.6%	2.8%
組成物 41	45/23.2/29.3/2.5	43.3%	24.3%	28.8%	3.6%
組成物 42	39.1/20.1/38.3/2.5	39.6%	20.5%	36.9%	2.9%
組成物 43	35/15/47.5/2.5	31.2%	15.5%	50.0%	3.4%
組成物 44	35/15/47.5/2.5	32.1%	15.0%	50.6%	2.3%

10

20

【0218】

実施例 1. 5 T細胞の調製

健康なヒトドナーの白血球アフェレーシスを市販で入手した (Hemacare)。Easy Sep ヒト T 細胞単離キット (Stem Cell Technology; カタログ番号 17951) を用いたネガティブセレクション、または Straight From (登録商標) Leukopak (登録商標) CD4/CD8 マイクロビーズ (Milteny; カタログ番号 130-122-352) を用いた CD4/CD8 ポジティブセレクションにより、T 細胞を、製造業者の指示に従って MultiMACSTM Cell 24 Separator Plus 装置上で単離した。T 細胞は、将来の使用のために Cryostor CS10 凍結培地 (カタログ番号 07930) 中で凍結保存した。

30

【0219】

解凍したら、CTS Optmizer 基本培地 (Gibco; A3705001) に $1 \times$ GlutaMAX、10mM の HEPES バッファー (10mM)、及び 1% pen-strep (Gibco; 15140-122) を補充し、さらに 200 IU/mL の IL2 (Pepro tech; 200-02)、5 ng/mL の IL7 (Pepro tech; 200-07)、5 ng/mL の IL15 (Pepro tech; 200-15)、及び 2.5% ヒト血清 (Gemini; 100-512) を補充したものから構成される完全 T 細胞増殖培地中で T 細胞を培養した。一晚静置した後、 10^6 細胞/mL の密度の T 細胞を T 細胞 TransAct 試薬 (1:100 希釈、Miltenyi) で活性化し、37°C で 24 または 48 時間インキュベートした。インキュベート後、 0.5×10^6 / mL の密度の細胞を編集用途に使用した。

40

【0220】

別段の指示がない限り、以下の例外を除いて非活性化 T 細胞にも同じプロセスを使用した。解凍したら、CTS Optmizer 基本培地 (Thermo fisher; A10485-01)、1% の pen-strep (Corning; 30-002-CI)、 $1 \times$ GlutaMAX (Thermo fisher; 35050061)、10mM の HEPES (Thermo fisher; 15630080) から構成され、さらに 200 IU/mL の IL2 (Pepro tech; 200-02)、5 ng/mL の IL7 (P

50

eprotech; 200-07)、5 ng/mLのIL15 (Peprotech; 200-15) 及び5%ヒトAB血清 (Gemini; 100-512) を補充したCTS完全増殖培地中で非活性化T細胞を培養し、活性化せずに24時間インキュベートした。2.5%ヒト血清及び編集用途用サイトカインを含む100 uLの上述したCTS OpTmizer基本培地に、T細胞を 10^6 /mLの細胞密度でプレーティングした。

【0221】

実施例1.6 T細胞のLNP形質移入

T細胞を、実施例1で先に記載のように調製したLNPにより形質移入した。LNP形質移入に用いた材料については実施例1に記載されている。LNP用量応答曲線 (DRC) 形質移入をHamilton MicroLab STARリキッドハンドリングシステムで実施した。リキッドハンドラーに以下のものを供給した: (a) 96ディープウェルプレートの最上列のディープウェルに入った所望される最高用量の4倍のLNP、(b) $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ で培地に希釈したApoE3、(c) 先に実施例1に記載したCTS OpTmizer基本培地で構成された完全T細胞増殖培地、及び(d) 96ウェル平底組織培養プレートに100 uL中 10^6 /mLの密度でプレーティングしたT細胞。まずリキッドハンドラーは、ディープウェルプレートに入ったLNPの4倍用量から、LNPの8ポイント2倍段階希釈を実施した。次いで、等体積のApoE3培地を各ウェルに加えた。続いて100 μL のLNP-ApoE混合物を各T細胞プレートに加えた。最高用量におけるLNPの最終濃度は $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。ApoE3の最終濃度は $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、T細胞は 0.5×10^6 細胞/mLの最終密度であった。プレートを37°C、5%のCO₂で、活性化T細胞及びオン活性化T細胞についてそれぞれ24時間または48時間インキュベートした。インキュベート後、LNPで処置したT細胞を採取し、オンターゲット編集またはCas9タンパク質発現検出を解析した。残りの細胞をLNP処置後7~10日間培養し、フローサイトメトリーによりタンパク質表面発現を評価した。

【0222】

実施例1.8 フローサイトメトリー解析

TRACによってコードされるT細胞受容体アルファ鎖は、T細胞受容体/CD3複合体のアセンブリー及び細胞表面への転座に必要である。編集は、編集後のCD3陰性細胞のパーセンテージの増加によってアッセイした。フローサイトメトリーにより細胞表面タンパク質をアッセイするため、T細胞を100 μL の抗体カクテル (1:100 PE-抗ヒトCD3 [Biolegend; カタログ番号300441]、1:200 FITC抗ヒトCD4 [Biolegend; カタログ番号300538]、1:200 APC抗ヒトCD8a [Biolegend; カタログ番号301049]、FACSバッファー [PBS+2%のFBS+2 mMのEDTA]) 中に浮遊させ、4°Cで30分間インキュベートした。T細胞を洗浄し、次いでFACSバッファー (PBS+2%のFBS+2 mMのEDTA) に再浮遊させた。続いてT細胞をCytotoflex装置 (Beckman Coulter) で処理した。FlowJoソフトウェアパッケージ (v. 10.6.1またはv. 10.7.1) を用いてデータ解析を実施した。簡潔に説明すると、T細胞をリンパ球でゲーティングし、続いて単一細胞でゲーティングした。これらの単一細胞をCD4+/CD8+状態でゲーティングし、そこからCD8+/CD3-細胞を選択した。CD8+/CD3-細胞のパーセントを定量化して、編集した標的座位がTCRノックアウトをもたらした細胞集団のパーセンテージを求めた。線形回帰モデルを使用して、TCR KOの用量応答曲線をPrism GraphPad (v. 9.0) を用いて作成した。曲線の半数効果濃度 (EC₅₀) 及びCD3-の最大パーセント値を各LNPごとに算出した。

【0223】

実施例1.9 次世代シーケンシング (NGS) 及び編集効率の解析

ゲノム内の標的位置における編集効率を定量的に決定するため、シーケンシングを利用して、遺伝子編集により導入された挿入及び欠失の存在を特定した。目的の遺伝子 (例えば、TRAC) 内の標的部位に基づいてPCRプライマーを設計し、目的のゲノム区域

を増幅した。プライマー配列設計は、この分野で標準的であるように行った。

【0224】

製造業者のプロトコル (Illumina) に従って追加のPCRを実施して、シーケンシングに化学作用を加えた。Illumina MiSeq装置上でアンプリコンをシーケンシングした。品質スコアが低いリードを除去した後、リードを参照ゲノム (例えば、hg38) に対しアラインメントした。リードを含む結果ファイルを参照ゲノムにマッピングし (BAMファイル)、目的の標的領域と重なるリードを選択し、野生型のリード数に対し挿入または欠失 (「インデル」) を含むリード数を計算した。

【0225】

実施例2：T細胞における化合物6組成物のスクリーニング

10

2.1 CD3陽性T細胞におけるLNPのイオン化可能な脂質の特性評価

編集の有効性を評価するため、Cas9 mRNA及びTRAC遺伝子を標的とするsgRNAをカプセル化する様々なモルパーセントの脂質構成要素を含むLNP組成物でT細胞を処置し、フローサイトメトリーにより、T細胞受容体表面タンパク質の喪失を評価した。

【0226】

概してLNPは、表1に示す脂質組成物 (それぞれ、イオン化可能な化合物6 / DSPC / コレステロール / PEGのモル比として表されている) を用いて、実施例1のように調製した。LNPは、Cas9 (配列番号4) をコードするmRNA及びヒトTRACを標的とするsgRNA (配列番号10) を送達した。sgRNA : Cas9 mRNAのカーゴ重量比は1 : 2であった。

20

【0227】

LNP組成物のZ平均粒子サイズ、数平均粒子サイズ、多分散性 (pdi)、総RNA含量、及びRNAのカプセル化効率を実施例1に記載のように解析した。結果を表2に示す。脂質解析は、表1に示されているように各構成要素の実測mol-%脂質レベルを示した。

30

40

50

【表 3】

表 2. LNP組成物の解析

LNP ID	名目モル比	カプセル化 (%)	Z 平均サイズ (nm)	PDI	数平均サイズ (nm)	N / P 比
組成物 1 (比較)	50/10/38.5/1.5	99%	118	0.05	96	6
組成物 2	50/5/43.5/1.5	99%	111	0.04	90	6
組成物 3	45/15/38.5/1.5	99%	120	0.02	101	6
組成物 4	45/5/48.5/1.5	99%	121	0.03	99	6
組成物 5	40/10/48.5/1.5	99%	143	0.04	122	6
組成物 6	30/10/58.5/1.5	96%	277	0.08	238	6
組成物 7	30/5/63.5/1.5	99%	173	0.05	150	6
組成物 8	55/5/38.5/1.5	98%	119	0.03	99	6
組成物 9	55/10/33.5/1.5	98%	111	0.03	91	6
組成物 10	65/5/28.5/1.5	95%	177	0.04	155	6
組成物 11 (比較)	50/10/38.5/1.5	98%	109	0.05	88	5
組成物 12 (比較)	50/10/38.5/1.5	99%	115	0.02	97	7

【0228】

LNP 組成比が CD3 陽性 (CD3+) T 細胞の編集効率に及ぼす効果を定量するために表 2 の LNP を評価した。2 例のドナーからの T 細胞 (ロット番号 W0106 及び W0186) を調製し、それぞれ活性化 T 細胞と非活性化 T 細胞について実施例 1 に記載のように形質移入した。形質移入から 7 日後、編集した T 細胞を採取し、実施例 1 に記載のようにフローサイトメトリーによりフェノタイピングした。

【0229】

0.04 µg/mL、0.08 µg/mL、0.16 µg/mL、0.25 µg/mL、0.63 µg/mL、1.25 µg/mL、2.5 µg/mL、及び 5 µg/mL の LNP 濃度で処置した後の CD3 陰性 (CD3-) T 細胞のパーセンテージを測定した。各 LNP 用量における CD3 陰性 T 細胞の平均パーセント、CD3 陰性最大パーセント、及び EC50 を、活性化 T 細胞については表 3 及び図 1A に、非活性化 T 細胞については表 4 及び図 1B に示す。近似値には「チルダ」を、解析ソフトにより定量できなかった値には「ND」を付している。

10

20

30

40

50

【表 4－1】

表 3．活性化 T 細胞を指示 L N P 組成で処置した後の C D 3 陰性細胞の平均パーセント。

LNP ID	LNP	LNP 用 量(μ g/mL)	平均 CD3- %	SD	N	最大 CD3- %	EC50
組成物 1 (比較)	50/10/38. 5/1.5	5	95.3	0.5	2	97.2	1.55
		2.5	81.7	0.8	2		
		1.25	31.8	3.1	2		
		0.63	5.8	0.6	2		
		0.31	1.4	0.0	2		
		0.16	0.6	0.0	2		
		0.08	0.4	0.0	2		
		0.04	0.3	0.1	2		
組成物 2	50/5/43.5/ 1.5	5	88.8	0.2	2	90.9	1.41
		2.5	77.8	0.7	2		
		1.25	37.4	1.6	2		
		0.63	8.2	0.8	2		
		0.31	2.9	0.7	2		
		0.16	0.6	0.0	2		
		0.08	0.3	0.0	2		
		0.04	0.3	0.0	2		
組成物 3	45/15/38. 5/1.5	5	97.1	0.2	2	98.4	1.41
		2.5	87.6	0.8	2		
		1.25	38.6	0.6	2		
		0.63	6.6	0.7	2		
		0.31	1.3	0.2	2		
		0.16	0.4	0.1	2		
		0.08	0.3	0.1	2		
		0.04	0.2	0.1	2		
組成物 4	45/5/48.5/ 1.5	5	90.2	1.1	2	92.7	1.42
		2.5	76.7	0.0	2		
		1.25	38.5	0.9	2		
		0.63	8.5	0.5	2		
		0.31	1.5	0.3	2		
		0.16	0.5	0.0	2		
		0.08	0.5	0.1	2		
		0.04	0.5	0.2	2		

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

LNP ID	LNP	LNP 用 量(μ g/mL)	平均 CD3- %	SD	N	最大 CD3- %	EC50
組成物 5	40/10/48. 5/1.5	5	94.0	1.7	2	95.2	0.93
		2.5	89.7	1.2	2		
		1.25	66.5	0.8	2		
		0.63	24.5	0.2	2		
		0.31	6.8	0.2	2		
		0.16	2.2	0.2	2		
		0.08	0.8	0.1	2		
		0.04	0.6	0.0	2		
組成物 6	30/10/58. 5/1.5	5	4.7	0.2	2	10.5	6.43
		2.5	3.1	0.8	2		
		1.25	1.6	0.3	2		
		0.63	1.1	0.0	2		
		0.31	0.7	0.1	2		
		0.16	0.6	0.0	2		
		0.08	0.3	0.0	2		
		0.04	0.3	0.0	2		
組成物 7	30/5/63.5/ 1.5	5	52.0	1.6	2	84.0	3.19
		2.5	34.3	2.7	2		
		1.25	26.0	0.4	2		
		0.63	15.6	0.2	2		
		0.31	7.3	0.4	2		
		0.16	2.9	0.2	2		
		0.08	1.3	0.1	2		
		0.04	0.4	0.1	2		
組成物 8	55/5/38.5/ 1.5	5	67.0	2.0	2	80.2	2.68
		2.5	36.7	0.5	2		
		1.25	9.8	1.1	2		
		0.63	2.6	0.1	2		
		0.31	0.6	0.2	2		
		0.16	0.4	0.1	2		
		0.08	0.1	0.1	2		
		0.04	0.3	0.1	2		

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

LNP ID	LNP	LNP 用 量(μ g/mL)	平均 CD3- %	SD	N	最大 CD3- %	EC50
組成物 9	55/10/33. 5/1.5	5	89.2	0.6	2	92.7	2.30
		2.5	54.6	1.1	2		
		1.25	7.3	0.2	2		
		0.63	1.4	0.1	2		
		0.31	0.5	0.2	2		
		0.16	0.3	0.1	2		
		0.08	0.2	0.1	2		
		0.04	0.2	0.1	2		
組成物 10	65/5/28.5/ 1.5	5	0.2	0.1	2	約0.26	-0.50
		2.5	0.2	0.0	2		
		1.25	0.3	0.0	2		
		0.63	0.4	0.1	2		
		0.31	0.2	0.0	2		
		0.16	0.1	0.1	2		
		0.08	0.3	0.0	2		
		0.04	0.3	0.1	2		
組成物 11 (比較)	50/10/38. 5/1.5(N/P :5.0)	5	95.6	0.1	2	98.4	1.17
		2.5	90.0	1.0	2		
		1.25	53.4	1.3	2		
		0.63	16.4	1.7	2		
		0.31	4.5	0.2	2		
		0.16	1.8	0.1	2		
		0.08	0.5	0.0	2		
		0.04	0.6	0.1	2		
組成物 12 (比較)	50/10/38. 5/1.5(N/P :7.0)	5	97.7	0.1	2	97.7	0.90
		2.5	93.5	0.2	2		
		1.25	73.0	0.9	2		
		0.63	24.0	0.2	2		
		0.31	5.5	0.1	2		
		0.16	1.5	0.5	2		
		0.08	0.9	0.3	2		
		0.04	0.6	0.1	2		

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 4．非活性化 T 細胞を指示 L N P 組成で処置した後の C D 3 陰性細胞の平均パーセント。

LNP ID	LNP	LNP 用 量(μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 1 (比較)	50/10/38.5/1.5	5	69.7	0.9	2	68.8	1.21
		2.5	65.1	1.3	2		
		1.25	41.3	8.9	2		
		0.63	11.1	4.0	2		
		0.31	10.2	0.5	2		
		0.16	8.1	1.5	2		
		0.08	9.9	2.0	2		
		0.04	7.2	2.5	2		
組成物 2	50/5/43.5/1.5	5	47.6	3.6	2	83.7	4.71
		2.5	30.0	5.0	2		
		1.25	20.1	2.9	2		
		0.63	11.4	2.3	2		
		0.31	9.8	1.3	2		
		0.16	9.1	0.0	2		
		0.08	9.3	0.8	2		
		0.04	7.9	3.6	2		
組成物 3	45/15/38.5/1.5	5	83.1	1.5	2	86.2	1.36
		2.5	73.0	3.1	2		
		1.25	43.4	6.8	2		
		0.63	19.4	3.4	2		
		0.31	11.7	2.4	2		
		0.16	8.9	1.3	2		
		0.08	9.0	1.6	2		
		0.04	9.5	2.9	2		
組成物 4	45/5/48.5/1.5	5	49.0	1.7	2	68.4	2.99
		2.5	33.7	6.3	2		
		1.25	25.8	2.3	2		
		0.63	14.7	1.0	2		
		0.31	9.8	0.7	2		
		0.16	11.2	3.9	2		
		0.08	10.2	1.9	2		
		0.04	9.5	2.5	2		

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

LNP ID	LNP	LNP 用量(μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 5	40/10/48.5/1.5	5	60.5	3.2	2	60.8	0.66
		2.5	61.6	4.4	2		
		1.25	57.9	6.7	2		
		0.63	34.0	7.9	2		
		0.31	12.1	0.8	2		
		0.16	10.4	1.2	2		
		0.08	13.7	0.4	2		
		0.04	10.4	4.7	2		
組成物 6	30/10/58.5/1.5	5	11.0	0.1	2	ND	ND
		2.5	11.3	2.9	2		
		1.25	8.0	0.5	2		
		0.63	11.3	0.5	2		
		0.31	10.3	0.7	2		
		0.16	9.3	1.3	2		
		0.08	10.8	0.8	2		
		0.04	10.7	5.1	2		
組成物 7	30/5/63.5/1.5	5	26.7	1.0	2	33.4	0.37
		2.5	18.9	0.1	2		
		1.25	19.6	1.5	2		
		0.63	23.0	1.2	2		
		0.31	15.4	0.5	2		
		0.16	11.8	3.5	2		
		0.08	12.5	0.3	2		
		0.04	9.9	3.4	2		
組成物 8	55/5/38.5/1.5	5	24.6	1.0	2	24.6	約 2.5
		2.5	18.0	2.4	2		
		1.25	10.1	2.2	2		
		0.63	12.4	3.2	2		
		0.31	9.5	3.2	2		
		0.16	10.4	1.3	2		
		0.08	11.4	1.5	2		
		0.04	12.4	2.7	2		

10

20

30

40

50

【表 5－3】

LNP ID	LNP	LNP用量(μg/mL)	平均CD3-%	SD	N	最大CD3-%	EC50
組成物 9	55/10/33.5/1.5	5	61.0	3.7	2	61.8	1.57
		2.5	53.6	6.5	2		
		1.25	26.5	7.3	2		
		0.63	12.4	2.4	2		
		0.31	13.1	5.7	2		
		0.16	9.9	2.9	2		
		0.08	10.4	1.5	2		
		0.04	10.1	3.0	2		
組成物 10	65/5/28.5/1.5	5	14.7	0.8	2	約 100	約 6.052
		2.5	8.6	1.6	2		
		1.25	10.9	2.9	2		
		0.63	10.7	1.1	2		
		0.31	12.0	3.8	2		
		0.16	10.4	4.8	2		
		0.08	10.6	0.6	2		
		0.04	8.9	2.2	2		
組成物 11 (比較)	50/10/38.5/1.5(N/P:5.0)	5	74.4	2.3	2	76.2	1.30
		2.5	69.6	7.9	2		
		1.25	40.5	7.2	2		
		0.63	19.5	0.3	2		
		0.31	8.9	3.2	2		
		0.16	9.3	1.1	2		
		0.08	9.9	0.2	2		
		0.04	14.3	14.3	2		
組成物 12 (比較)	50/10/38.5/1.5(N/P:7.0)	5	76.0	0.5	2	73.3	0.76
		2.5	68.4	2.1	2		
		1.25	65.4	3.8	2		
		0.63	27.9	4.9	2		
		0.31	12.1	1.9	2		
		0.16	9.3	0.5	2		
		0.08	10.5	2.2	2		
		0.04	0.0	0.0	2		

【0230】

実施例 3：T 細胞における選択化合物 6 LNP 組成物のスクリーニング

3. 1 編集した CD3＋ T 細胞における選択 LNP 組成物の評価

LNP 編集の有効性を評価するため、化合物 6 を含み、Cas9 mRNA 及び TRAC 遺伝子を標的とする sgRNA をカプセル化する様々なモルパーセントの脂質構成要素を含む LNP 組成物で T 細胞を処置し、フローサイトメトリーにより、T 細胞受容体表面タンパク質の喪失を評価した。

【0231】

概して LNP は、表 5 に示す脂質組成物（それぞれ、イオン化可能な化合物 6 / DSP

10

20

30

40

50

C／コレステロール／PEGのモル比として表されている）を用いて、実施例1に記載のように調製した。LNPは、Cas9 mRNA（配列番号4）をコードするmRNA及びヒトTRACを標的とするsgRNA（配列番号10）を送達した。sgRNA：Cas9 mRNAのカーゴ重量比は1：2であった。

【0232】

LNP組成物の平均粒子サイズ、多分散性（pdi）、総RNA含量、及びRNAのカプセル化効率を実施例1に記載のように解析した。結果を表5に示す。脂質解析は、表1に示されているように実測mole%脂質レベルを示した。

【表6】

表5．LNP組成物の解析

LNP ID	名目モル比	カプセル化 (%)	Z 平均 サイズ (nm)	PD I	数平均 サイズ (nm)	N/ P比
組成物1 (比較)	50/10/38.5/1.5	98%	113	0.03	102	6
組成物13	30/5/62.5/2.5	99%	108	0.08	92	6
組成物14	35/10/52.5/2.5	99%	84	0.06	67	6
組成物15	35/10/53.5/1.5	98%	218	0.05	206	6
組成物16	35/15/47.5/2.5	98%	78	0.03	72	6
組成物5	40/10/48.5/1.5	99%	162	0.09	142	6
組成物17	40/15/43.5/1.5	99%	124	0.02	113	6
組成物18	45/10/43.5/1.5	99%	121	0.06	107	6
組成物19	40/10/48.5/1.5	99%	156	0.06	147	7
組成物20	40/10/48.5/1.5	99%	146	0.08	126	9

【0233】

2例のドナーのT細胞（ロット番号W0106及びW790）を調製し、実施例1に記載のように形質移入した。形質移入から6日後、編集した活性化T細胞及び非活性化T細胞を採取し、実施例1に記載のようにフローサイトメトリーによりフェノタイピングした。0.04μg、0.08μg、0.16μg、0.31μg、0.63μg、1.25μg、2.5μg、及び5μgのLNP濃度で処置したT細胞について、CD3陰性T細胞のパーセンテージを測定した。各LNP用量におけるCD3陰性T細胞の平均パーセント、CD3最大パーセントの計算値、及びEC50を、活性化T細胞については表6及び図2Aに、非活性化T細胞については表7及び図2Bに示す。

【表 7 - 1】

表 6. 活性化 T 細胞を指示 L N P 組成の L N P で処置した後の C D 3 陰性細胞のパーセント

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 1 (比較)	50/10/38.5/1.5	5	96.2	0.3	2	98.3	0.91
		2.5	93.2	0.1	2		
		1.25	68.6	3.4	2		
		0.63	27.3	2.2	2		
		0.31	8.1	1.1	2		
		0.16	2.6	0.2	2		
		0.08	1.1	0.1	2		
		0.04	0.7	0.1	2		
組成物 13	30/5/62.5/2.5	5	77.7	0.2	2	81.3	0.48
		2.5	77.7	0.4	2		
		1.25	71.1	2.0	2		
		0.63	48.1	0.8	2		
		0.31	29.0	0.7	2		
		0.16	16.2	0.3	2		
		0.08	7.4	0.3	2		
		0.04	3.5	0.5	2		
組成物 14	35/10/52.5/2.5	5	95.3	0.2	2	96.6	0.26
		2.5	95.0	0.2	2		
		1.25	92.0	0.5	2		
		0.63	80.1	0.9	2		
		0.31	55.9	0.5	2		
		0.16	31.5	1.1	2		
		0.08	13.2	0.1	2		
		0.04	6.1	0.4	2		
組成物 15	35/10/53.5/1.5	5	68.3	0.2	2	71.6	1.14
		2.5	59.2	0.9	2		
		1.25	39.4	1.2	2		
		0.63	16.9	1.5	2		
		0.31	5.2	0.2	2		
		0.16	2.1	0.2	2		
		0.08	0.8	0.1	2		
		0.04	0.5	0.1	2		

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 16	35/15/47.5/2.5	5	97.9	0.4	2	98.6	0.20
		2.5	97.6	0.1	2		
		1.25	96.4	0.2	2		
		0.63	88.9	0.2	2		
		0.31	69.7	1.1	2		
		0.16	41.5	1.5	2		
		0.08	19.6	0.3	2		
		0.04	8.4	0.3	2		
組成物 5	40/10/48.5/1.5	5	91.2	0.1	2	93.1	0.85
		2.5	86.7	1.6	2		
		1.25	66.6	0.4	2		
		0.63	31.2	1.2	2		
		0.31	10.1	0.5	2		
		0.16	3.9	0.0	2		
		0.08	1.6	0.3	2		
		0.04	0.8	0.1	2		
組成物 17	40/15/43.5/1.5	5	93.7	0.6	2	95.0	0.88
		2.5	90.8	0.3	2		
		1.25	69.3	0.2	2		
		0.63	27.4	0.8	2		
		0.31	7.5	0.9	2		
		0.16	2.3	0.3	2		
		0.08	1.1	0.1	2		
		0.04	0.6	0.3	2		
組成物 18	45/10/43.5/1.5	5	96.5	0.2	2	97.5	0.56
		2.5	94.9	0.6	2		
		1.25	86.1	1.0	2		
		0.63	56.1	1.6	2		
		0.31	21.3	1.3	2		
		0.16	7.4	0.5	2		
		0.08	3.0	0.4	2		
		0.04	1.4	0.2	2		

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 19	40/10/48.5/1.5(N/P:7.0)	5	88.5	0.8	2	90.2	0.69
		2.5	85.0	1.2	2		
		1.25	70.8	1.6	2		
		0.63	40.9	0.5	2		
		0.31	15.4	0.5	2		
		0.16	5.4	0.3	2		
		0.08	2.1	0.1	2		
		0.04	0.8	0.1	2		
組成物 20	40/10/48.5/1.5(N/P:9.0)	5	90.2	1.2	2	90.3	0.63
		2.5	85.8	0.6	2		
		1.25	75.2	1.1	2		
		0.63	46.0	1.6	2		
		0.31	16.1	0.9	2		
		0.16	4.7	0.3	2		
		0.08	2.3	0.2	2		
		0.04	1.1	0.1	2		

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 7. 非活性化 T 細胞を指示 L N P 組成で処置した後の C D 3 陰性細胞のパーセント

L N P ID	LNP	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組 成 物 1 (比 較)	50/10/38.5/1.5	5	89.4	0.9	2	89	0.89
		2.5	86.1	2.0	2		
		1.25	70.7	2.5	2		
		0.63	27.5	2.9	2		
		0.31	12.8	1.4	2		
		0.16	7.9	1.1	2		
		0.08	10.1	0.5	2		
		0.04	9.7	2.4	2		
組 成 物 13	30/5/62.5/2.5	5	46.5	1.7	2	56	0.27
		2.5	58.6	1.1	2		
		1.25	59.6	3.8	2		
		0.63	58.8	3.9	2		
		0.31	40.8	3.2	2		
		0.16	17.5	0.3	2		
		0.08	14.8	2.1	2		
		0.04	10.2	0.9	2		
組 成 物 14	35/10/52.5/2.5	5	70.9	4.4	2	81	0.19
		2.5	80.7	0.6	2		
		1.25	88.1	1.5	2		
		0.63	82.8	1.6	2		
		0.31	67.6	4.1	2		
		0.16	37.3	0.5	2		
		0.08	23.3	0.0	2		
		0.04	12.5	0.4	2		
組 成 物 15	35/10/53.5/1.5	5	40.6	0.4	2	41.1	1.00
		2.5	40.3	1.4	2		
		1.25	31.1	1.5	2		
		0.63	15.5	1.8	2		
		0.31	11.0	0.1	2		
		0.16	9.2	0.4	2		
		0.08	10.4	0.6	2		
		0.04	11.1	2.8	2		

10

20

30

40

50

【表 8－2】

L N P ID	LNP	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組 成 物 16	35/15/47.5/2.5	5	87.4	3.6	2	92	0.23
		2.5	91.5	1.0	2		
		1.25	94.3	0.5	2		
		0.63	89.3	1.5	2		
		0.31	64.8	0.3	2		
		0.16	38.5	1.0	2		
		0.08	23.6	1.6	2		
		0.04	14.9	0.9	2		
組 成 物 5	40/10/48.5/1.5	5	66.8	0.2	2	70.2	1.04
		2.5	72.8	1.9	2		
		1.25	51.2	0.4	2		
		0.63	16.0	2.8	2		
		0.31	13.5	0.5	2		
		0.16	9.7	3.2	2		
		0.08	8.8	1.1	2		
		0.04	7.3	1.3	2		
組 成 物 17	40/15/43.5/1.5	5	73.5	0.6	2	77.4	1.09
		2.5	78.1	0.6	2		
		1.25	49.3	0.2	2		
		0.63	20.0	0.7	2		
		0.31	13.0	1.0	2		
		0.16	7.5	0.6	2		
		0.08	7.5	1.5	2		
		0.04	10.7	1.8	2		
組 成 物 18	45/10/43.5/1.5	5	82.4	2.2	2	84.8	0.74
		2.5	86.3	1.3	2		
		1.25	79.4	3.9	2		
		0.63	34.8	2.1	2		
		0.31	17.9	1.5	2		
		0.16	11.4	3.4	2		
		0.08	11.2	0.8	2		
		0.04	10.7	1.8	2		

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

LN P ID	LNP	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組 成 物 19	40/10/48.5/1.5 (N/P:7.0)	5	51.9	1.5	2	62.2	0.55
		2.5	68.9	0.6	2		
		1.25	65.4	2.6	2		
		0.63	44.0	5.1	2		
		0.31	14.9	0.6	2		
		0.16	11.5	1.1	2		
		0.08	11.1	0.6	2		
		0.04	7.4	1.4	2		
組 成 物 20	40/10/48.5/1.5 (N/P:9.0)	5	59.0	2.9	2	66.3	0.52
		2.5	71.1	1.3	2		
		1.25	67.7	0.7	2		
		0.63	46.9	1.5	2		
		0.31	16.1	1.0	2		
		0.16	9.7	0.2	2		
		0.08	7.6	1.7	2		
		0.04	8.7	1.7	2		

10

20

【0234】

実施例 4. T 細胞における化合物 6 組成物のスクリーニング

4. 1 CD3 陽性 T 細胞における LNP のイオン化可能な脂質の特性評価

30

LNP 編集の有効性を評価するため、Cas9 mRNA 及び TRAC 遺伝子を標的とする sgRNA をカプセル化する代替的モル比の脂質構成要素を含む LNP 組成物で T 細胞を処置し、フローサイトメトリーにより、T 細胞受容体表面タンパク質の喪失を評価した。

【0235】

概して LNP は、表 8 に示す脂質組成物（それぞれ、イオン化可能な化合物 6 / DSPC / コレステロール / PEG のモル比として表されている）を用いて、実施例 1 のように調製した。LNP は、Cas9（配列番号 4）をコードする mRNA 及びヒト TRAC を標的とする sgRNA（配列番号 10）を送達した。sgRNA : Cas9 mRNA のカーゴ重量比は 1 : 2 または 1 : 1 であった。比較組成物 21 のカーゴ比は 1 : 2、残りの LNP のカーゴ比は 1 : 1 であった。

40

【0236】

LNP 組成物の平均粒子サイズ、多分散性 (pdi)、総 RNA 含量、及び RNA のカプセル化効率を実施例 1 に記載のように解析した。結果を表 8 に示す。脂質解析は、表 1 に示されているように実測 mol-% 脂質レベルを示した。

【表 9】

表 8. LNP 組成物の解析

LNP ID	名目モル比	カプセル化 (%)	Z 平均 サイズ (nm)	PDI	数平 均サ イズ (nm)	N/P 比
組成物 21 (比較)	50/9/39.5/1.5	99%	124	0.03	113	6
組成物 22 (比較)	50/9/39.5/1.5	99%	114	0.01	108	6
組成物 23	35/15/47.5/2.5	99%	76	0	70	6
組成物 24	37.2/9.6/50.5/2.7	99%	69	0.03	61	6
組成物 25	36.1/12.4/49/2.6	99%	69	0.04	60	6
組成物 26	34/17.5/46.1/2.4	99%	70	0.02	62	6
組成物 27	33/19.8/44.8/2.4	99%	74	0.04	66	6
組成物 28	43.8/18.8/35.6/1.9	99%	86	0.01	80	6
組成物 29	43.5/18.6/35.4/2.5	98%	75	0.04	69	6
組成物 30	43.2/18.5/35.2/3.1	98%	70	0.01	66	6
組成物 31	38.9/16.7/42.2/2.2	98%	75	0.03	68	6
組成物 32	38.7/16.6/42/2.8	99%	71	0.04	62	6
組成物 33	38.5/16.5/41.8/3.3	99%	61	0.03	56	6
組成物 34	32/13.7/52.1/2.3	99%	83	0.05	73	6
組成物 35	31.8/13.6/51.8/2.7	99%	73	0.03	65	6
組成物 36	31.7/13.6/51.6/3.2	99%	63	0.04	54	6
組成物 37	45.2/15.5/36.8/2.6	99%	81	0.02	74	6
組成物 38	40.1/13.8/43.6/2.6	99%	71	0.05	62	6
組成物 39	32.8/11.2/53.4/2.6	99%	83	0.04	73	6
組成物 40	38.5/27.7/31.3/2.5	98%	68	0.02	60	6
組成物 41	45/23.2/29.3/2.5	96%	67	0.02	62	6
組成物 42	39.1/20.1/38.3/2.5	98%	66	0.01	61	6
組成物 43	35/15/47.5/2.5	98%	57	0.06	46	5
組成物 44	35/15/47.5/2.5	99%	78	0.01	71	7

【0237】

1 例のドナー (W0106) からの T 細胞を調製し、活性化し、実施例 1 に記載のように形質移入した。形質移入から 7 日後、編集した活性化 T 細胞及び非活性化 T 細胞を採取し、実施例 1 に記載のようにフローサイトメトリーによりフェノタイピングした。

【0238】

0.04 µg、0.08 µg、0.16 µg、0.25 µg、0.63 µg、1.25 µg、2.5 µg、及び 5 µg の LNP 濃度で処置した後の CD3 陰性 T 細胞のパーセンテージを測定した。各 LNP 用量における CD3 陰性 T 細胞の平均パーセント、CD3 の最大パーセント値、及び EC50 を表 9 及び 10 に示す。

【表 10 - 1】

表 9. 活性化 T 細胞を指示 L N P 組成で処置した後の C D 3 陰性細胞の平均パーセント

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 21 (比較)	50/9/39.5/1.5	5	97.3	0.0	2	98.2	0.86
		2.5	94.9	1.1	2		
		1.25	75.0	1.3	2		
		0.63	28.8	0.7	2		
		0.31	8.2	0.5	2		
		0.16	3.7	0.1	2		
		0.08	2.0	0.1	2		
		0.04	1.7	0.2	2		
組成物 22 (比較)	50/9/39.5/1.5	5	97.9	0.1	2	99.1	0.85
		2.5	96.4	0.3	2		
		1.25	77.2	0.1	2		
		0.63	29.1	0.5	2		
		0.31	10.3	0.5	2		
		0.16	4.6	0.5	2		
		0.08	2.5	0.2	2		
		0.04	1.2	0.2	2		
組成物 23	35/15/47.5/2.5	5	99.5	0.1	2	100	0.15
		2.5	99.1	0.2	2		
		1.25	99.1	0.0	2		
		0.63	96.7	0.4	2		
		0.31	83.9	0.4	2		
		0.16	55.1	0.4	2		
		0.08	28.7	0.6	2		
		0.04	11.7	0.4	2		
組成物 24	37.2/9.6/50.5/2.7	5	98.1	0.2	2	98.8	0.37
		2.5	97.6	0.1	2		
		1.25	94.7	0.1	2		
		0.63	78.6	0.6	2		
		0.31	40.5	0.6	2		
		0.16	16.0	1.0	2		
		0.08	5.9	0.5	2		
		0.04	3.0	0.7	2		

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 25	36.1/12.4/49/2.6	5	98.7	0.1	2	99.8	0.25
		2.5	98.8	0.3	2		
		1.25	97.5	0.2	2		
		0.63	88.7	0.1	2		
		0.31	62.4	1.4	2		
		0.16	32.3	0.6	2		
		0.08	14.4	1.1	2		
		0.04	6.3	1.2	2		
組成物 26	34/17.5/46.1/2.4	5	99.3	0.1	2	100	0.14
		2.5	99.2	0.1	2		
		1.25	99.1	0.1	2		
		0.63	96.3	0.0	2		
		0.31	82.6	0.1	2		
		0.16	57.2	0.6	2		
		0.08	30.6	0.3	2		
		0.04	13.0	1.0	2		
組成物 27	33/19.8/44.8/2.4	5	99.5	0.1	2	100	0.14
		2.5	99.5	0.1	2		
		1.25	99.2	0.2	2		
		0.63	96.4	0.4	2		
		0.31	83.3	0.6	2		
		0.16	58.2	0.1	2		
		0.08	29.9	1.2	2		
		0.04	13.0	0.7	2		
組成物 28	43.8/18.8/35.6/1.9	5	99.4	0.0	2	100	0.79
		2.5	98.3	0.0	2		
		1.25	82.0	0.1	2		
		0.63	33.5	0.1	2		
		0.31	6.8	0.4	2		
		0.16	2.5	0.8	2		
		0.08	1.6	0.5	2		
		0.04	1.9	0.9	2		

10

20

30

40

50

【表 10 - 3】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 29	43.5/18.6/35.4/2.5	5	99.6	0.0	2	100	0.39
		2.5	99.5	0.1	2		
		1.25	97.7	0.2	2		
		0.63	80.9	0.9	2		
		0.31	35.9	2.1	2		
		0.16	9.2	0.3	2		
		0.08	3.4	0.4	2		
		0.04	2.1	0.8	2		
組成物 30	43.2/18.5/35.2/3.1	5	99.5	0.1	2	100	0.31
		2.5	99.6	0.1	2		
		1.25	99.1	0.3	2		
		0.63	90.7	0.8	2		
		0.31	50.7	4.4	2		
		0.16	16.9	1.2	2		
		0.08	6.3	0.1	2		
		0.04	2.2	0.2	2		
組成物 31	38.9/16.7/42.2/2.2	5	99.5	0.1	2	100	0.18
		2.5	99.5	0.1	2		
		1.25	99.2	0.1	2		
		0.63	96.6	0.1	2		
		0.31	78.5	0.7	2		
		0.16	46.5	0.0	2		
		0.08	22.3	0.5	2		
		0.04	9.6	0.7	2		
組成物 32	38.7/16.6/42/2.8	5	99.5	0.1	2	100	0.17
		2.5	99.5	0.0	2		
		1.25	99.4	0.1	2		
		0.63	97.0	0.1	2		
		0.31	79.2	0.9	2		
		0.16	48.6	0.5	2		
		0.08	22.2	0.1	2		
		0.04	9.4	0.7	2		

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 4】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC5 0
組成物 33	38.5/16.5/41.8/3. 3	5	98.5	0.0	2	99.1	0.31
		2.5	98.6	0.1	2		
		1.25	97.4	0.3	2		
		0.63	89.5	0.4	2		
		0.31	50.7	0.7	2		
		0.16	17.1	0.2	2		
		0.08	5.6	0.3	2		
		0.04	2.6	0.2	2		
組成物 34	32/13.7/52.1/2.3	5	98.8	0.1	2	99.2	0.15
		2.5	98.2	0.1	2		
		1.25	98.3	0.2	2		
		0.63	96.1	0.2	2		
		0.31	82.6	0.6	2		
		0.16	55.8	1.3	2		
		0.08	28.7	0.9	2		
		0.04	13.6	0.6	2		
組成物 35	31.8/13.6/51.8/2. 7	5	98.2	0.3	2	98.6	0.14
		2.5	97.5	0.1	2		
		1.25	97.3	0.2	2		
		0.63	95.3	0.0	2		
		0.31	82.3	0.8	2		
		0.16	57.2	0.6	2		
		0.08	30.5	0.3	2		
		0.04	14.0	0.3	2		

10

20

30

40

50

【表 1 0 – 5】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC5 0
組成物 36	31.7/13.6/51.6/3. 2	5	93.8	0.0	2	93.4	0.20
		2.5	91.2	0.4	2		
		1.25	91.5	0.1	2		
		0.63	86.4	0.1	2		
		0.31	66.8	0.5	2		
		0.16	38.9	0.2	2		
		0.08	17.8	0.2	2		
		0.04	7.2	0.1	2		
組成物 37	45.2/15.5/36.8/2. 6	5	99.3	0.1	2	99.9	0.34
		2.5	99.2	0.2	2		
		1.25	98.3	0.1	2		
		0.63	83.9	0.4	2		
		0.31	44.5	2.3	2		
		0.16	13.0	1.1	2		
		0.08	3.9	0.1	2		
		0.04	1.9	0.1	2		
組成物 38	40.1/13.8/43.6/2. 6	5	99.1	0.0	2	99.8	0.20
		2.5	99.2	0.0	2		
		1.25	98.8	0.2	2		
		0.63	95.3	0.2	2		
		0.31	74.6	0.7	2		
		0.16	39.1	0.4	2		
		0.08	15.5	1.2	2		
		0.04	5.7	0.1	2		

10

20

30

40

50

【表 10 - 6】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 39	32.8/11.2/53.4/2.6	5	98.6	0.1	2	98.8	0.17
		2.5	97.7	0.4	2		
		1.25	97.3	0.2	2		
		0.63	94.3	0.0	2		
		0.31	76.9	0.6	2		
		0.16	48.8	0.5	2		
		0.08	22.1	0.1	2		
		0.04	10.1	0.2	2		
組成物 40	38.5/27.7/31.3/2.5	5	98.4	0.0	2	99.8	0.24
		2.5	98.4	0.2	2		
		1.25	96.1	0.4	2		
		0.63	84.5	1.4	2		
		0.31	61.2	2.7	2		
		0.16	32.9	2.7	2		
		0.08	14.5	0.9	2		
		0.04	5.0	0.6	2		
組成物 41	45/23.2/29.3/2.5	5	98.4	0.1	2	100	0.30
		2.5	98.3	0.0	2		
		1.25	96.7	0.2	2		
		0.63	82.4	1.0	2		
		0.31	52.8	2.3	2		
		0.16	25.8	1.6	2		
		0.08	9.4	0.3	2		
		0.04	3.5	0.5	2		
組成物 42	39.1/20.1/38.3/2.5	5	99.4	0.1	2	11.0	0.19
		2.5	99.1	0.1	2		
		1.25	99.0	0.1	2		
		0.63	95.3	0.3	2		
		0.31	74.9	1.0	2		
		0.16	41.2	1.6	2		
		0.08	13.6	2.2	2		
		0.04	4.3	0.4	2		

10

20

30

40

50

【表 1 0 – 7】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC5 0
組成物 43	35/15/47.5/2.5(N /P:5.0)	5	88.5	0.3	2	90.1	0.57
		2.5	88.4	0.5	2		
		1.25	80.4	1.0	2		
		0.63	50.6	0.5	2		
		0.31	19.0	1.2	2		
		0.16	5.5	0.5	2		
		0.08	2.5	0.1	2		
		0.04	1.3	0.2	2		
組成物 44	35/15/47.5/2.5(N /P:7.0)	5	98.7	0.0	2	99.5	0.15
		2.5	98.8	0.1	2		
		1.25	98.8	0.0	2		
		0.63	96.1	0.2	2		
		0.31	82.3	0.7	2		
		0.16	56.0	0.0	2		
		0.08	28.5	2.0	2		
		0.04	13.5	1.1	2		

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 1 0. 非活性化T細胞を指示L N P組成で処置した後のC D 3 陰性細胞の平均パーセント。

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 21 (比較)	50/9/39.5/1.5	5	78.9	3.2	2	76.0	0.68
		2.5	69.4	8.5	2		
		1.25	65.5	4.7	2		
		0.63	35.3	9.1	2		
		0.31	9.8	2.4	2		
		0.16	6.7	3.7	2		
		0.08	1.9	0.1	2		
		0.04	2.3	0.7	2		
組成物 22 (比較)	50/9/39.5/1.5	5	80.7	3.5	2	80.4	0.68
		2.5	76.2	3.6	2		
		1.25	69.5	2.6	2		
		0.63	36.5	13.9	2		
		0.31	13.9	1.2	2		
		0.16	3.6	0.9	2		
		0.08	4.6	1.2	2		
		0.04	2.7	0.4	2		
組成物 23	35/15/47.5/2.5	5	85.8	5.4	2	88.3	0.09
		2.5	88.2	0.1	2		
		1.25	86.5	0.5	2		
		0.63	91.4	0.1	2		
		0.31	88.6	4.2	2		
		0.16	78.3	5.4	2		
		0.08	47.3	13.0	2		
		0.04	24.4	2.8	2		
組成物 24	37.2/9.6/50.5/2.7	5	80.3	3.9	2	77.8	0.25
		2.5	79.9	1.2	2		
		1.25	61.4	21.5	2		
		0.63	78.8	4.0	2		
		0.31	41.6	1.0	2		
		0.16	30.6	7.3	2		
		0.08	8.0	2.7	2		
		0.04	6.3	4.6	2		

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 25	36.1/12.4/49/2.6	5	81.4	2.9	2	82.2	0.13
		2.5	76.2	8.9	2		
		1.25	81.8	5.5	2		
		0.63	87.9	1.5	2		
		0.31	79.1	0.5	2		
		0.16	56.2	12.4	2		
		0.08	25.3	10.4	2		
		0.04	10.2	2.7	2		
組成物 26	34/17.5/46.1/2.4	5	85.1	2.7	2	88.7	0.12
		2.5	90.1	1.4	2		
		1.25	85.1	3.4	2		
		0.63	92.0	1.8	2		
		0.31	89.8	2.2	2		
		0.16	71.2	3.4	2		
		0.08	44.9	3.0	2		
		0.04	33.1	4.9	2		
組成物 27	33/19.8/44.8/2.4	5	93.5	0.0	2	90.0	0.05
		2.5	91.1	0.7	2		
		1.25	90.7	3.8	2		
		0.63	87.3	3.3	2		
		0.31	83.5	5.6	2		
		0.16	87.0	3.0	2		
		0.08	65.6	4.9	2		
		0.04	29.9	8.9	2		
組成物 28	43.8/18.8/35.6/1.9	5	92.7	2.8	2	91.4	0.29
		2.5	89.4	2.0	2		
		1.25	91.1	0.4	2		
		0.63	69.4	4.4	2		
		0.31	55.2	0.7	2		
		0.16	12.9	0.6	2		
		0.08	5.6	0.4	2		
		0.04	2.3	0.1	2		

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 29	43.5/18.6/35.4/2.5	5	80.3	7.1	2	88.1	0.10
		2.5	89.8	1.8	2		
		1.25	88.3	1.8	2		
		0.63	91.5	1.8	2		
		0.31	61.0	23.2	2		
		0.16	62.8	11.2	2		
		0.08	37.7	1.4	2		
		0.04	20.2	11.3	2		
組成物 30	43.2/18.5/35.2/3.1	5	83.7	8.5	2	86.6	0.12
		2.5	82.7	8.9	2		
		1.25	93.2	2.0	2		
		0.63	87.3	6.5	2		
		0.31	79.3	2.3	2		
		0.16	68.8	1.8	2		
		0.08	44.8	1.0	2		
		0.04	34.1	1.7	2		
組成物 31	38.9/16.7/42.2/2.2	5	91.3	2.2	2	91.9	0.10
		2.5	91.0	3.1	2		
		1.25	94.0	0.7	2		
		0.63	89.1	1.2	2		
		0.31	91.0	1.1	2		
		0.16	74.8	4.2	2		
		0.08	47.3	2.8	2		
		0.04	28.0	5.6	2		
組成物 32	38.7/16.6/42/2.8	5	90.1	2.3	2	88.4	0.12
		2.5	92.2	1.8	2		
		1.25	87.9	5.9	2		
		0.63	82.7	7.6	2		
		0.31	89.0	1.4	2		
		0.16	80.2	2.8	2		
		0.08	47.8	8.7	2		
		0.04	44.6	1.9	2		

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 4】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 33	38.5/16.5/41.8/3.3	5	78.5	6.7	2	83.2	0.13
		2.5	84.9	2.0	2		
		1.25	79.7	7.9	2		
		0.63	78.0	9.2	2		
		0.31	57.6	0.1	2		
		0.16	46.4	3.0	2		
		0.08	37.1	3.3	2		
		0.04	8.1	0.2	2		
組成物 34	32/13.7/52.1/2.3	5	89.7	1.1	2	86.3	0.09
		2.5	83.6	6.9	2		
		1.25	78.5	1.3	2		
		0.63	90.3	1.6	2		
		0.31	89.5	0.2	2		
		0.16	79.6	0.9	2		
		0.08	52.0	12.0	2		
		0.04	31.6	2.6	2		
組成物 35	31.8/13.6/51.8/2.7	5	78.7	2.4	2	82.0	0.09
		2.5	81.3	4.4	2		
		1.25	76.0	9.9	2		
		0.63	88.2	0.7	2		
		0.31	86.1	3.4	2		
		0.16	76.2	2.0	2		
		0.08	53.0	6.2	2		
		0.04	37.6	4.1	2		
組成物 36	31.7/13.6/51.6/3.2	5	61.0	2.0	2	62.0	0.13
		2.5	53.4	8.8	2		
		1.25	61.3	7.8	2		
		0.63	64.8	9.6	2		
		0.31	69.6	2.1	2		
		0.16	52.1	3.9	2		
		0.08	27.1	9.8	2		
		0.04	23.3	3.0	2		

10

20

30

40

50

【表 1 1 – 5】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 37	45.2/15.5/36.8/2.6	5	95.6	1.5	2	92.3	0.12
		2.5	93.1	1.0	2		
		1.25	90.0	3.3	2		
		0.63	86.5	5.5	2		
		0.31	82.3	5.6	2		
		0.16	59.2	7.1	2		
		0.08	23.4	3.1	2		
		0.04	6.3	2.3	2		
組成物 38	40.1/13.8/43.6/2.6	5	92.7	1.0	2	92.1	0.14
		2.5	94.0	0.2	2		
		1.25	87.3	5.7	2		
		0.63	91.4	1.3	2		
		0.31	80.4	0.4	2		
		0.16	61.2	2.0	2		
		0.08	35.9	7.2	2		
		0.04	24.4	3.7	2		
組成物 39	32.8/11.2/53.4/2.6	5	86.3	1.4	2	84.4	0.10
		2.5	83.6	1.8	2		
		1.25	81.4	0.1	2		
		0.63	86.9	2.2	2		
		0.31	83.4	2.1	2		
		0.16	77.5	10.9	2		
		0.08	40.5	0.8	2		
		0.04	22.1	5.0	2		
組成物 40	38.5/27.7/31.3/2.5	5	76.5	6.0	2	81.0	0.19
		2.5	78.7	3.3	2		
		1.25	84.4	3.5	2		
		0.63	80.0	6.2	2		
		0.31	70.0	0.2	2		
		0.16	45.7	4.4	2		
		0.08	51.1	5.3	2		
		0.04	28.7	2.7	2		

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 6】

LNP ID	LNP	LNP 用量 (μ g/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
組成物 41	45/23.2/29.3/2.5	5	81.7	7.5	2	84.1	0.18
		2.5	84.3	5.6	2		
		1.25	83.1	3.2	2		
		0.63	84.2	2.0	2		
		0.31	70.4	4.5	2		
		0.16	52.6	0.1	2		
		0.08	41.4	11.7	2		
		0.04	31.5	2.9	2		
組成物 42	39.1/20.1/38.3/2.5	5	91.6	2.5	2	91.6	0.15
		2.5	91.1	1.1	2		
		1.25	91.0	0.3	2		
		0.63	90.3	2.8	2		
		0.31	86.1	2.1	2		
		0.16	63.5	3.5	2		
		0.08	42.3	6.1	2		
		0.04	31.9	4.8	2		
組成物 43	35/15/47.5/2.5(N/ P:5.0)	5	38.9	12.7	2	46.2	0.41
		2.5	43.3	5.0	2		
		1.25	58.1	3.5	2		
		0.63	34.0	2.5	2		
		0.31	20.7	7.4	2		
		0.16	11.5	4.5	2		
		0.08	12.4	4.0	2		
		0.04	3.6	1.1	2		
組成物 44	35/15/47.5/2.5(N/ P:7.0)	5	90.6	0.2	2	90.1	0.08
		2.5	91.2	0.2	2		
		1.25	89.9	1.6	2		
		0.63	91.7	1.2	2		
		0.31	85.7	6.8	2		
		0.16	87.2	1.7	2		
		0.08	66.2	2.5	2		
		0.04	45.4	9.6	2		

10

20

30

40

【0 2 3 9】

表 9 及び表 1 0に見られるように、イオン化可能な脂質の量が少なく、D S P C、コレステロール、及びP E G脂質の量が多いL N Pほど、比較組成物に比べて驚くほど好ましいE C 5 0値を有した。

【0 2 4 0】

実施例 5：T細胞におけるイオン化可能な脂質のスクリーニング

5. 1 様々なイオン化可能な脂質を含むL N P組成物の特性評価

L N P中の他のイオン化可能な脂質が編集に及ぼす影響を評価するため、3つのイオン化可能な脂質のうちの1つを2つの異なる構成要素比で製剤化したL N P組成物でT細胞

50

を処置した。概してLNPは、表11に示す脂質組成物（それぞれ、イオン化可能な脂質化合物／DSPC／コレステロール／PEGのモル比として表されている）を用いて、実施例1に記載のように調製した。化合物6、化合物8、及び化合物11の各々を、以下の名目mol%比：35%のイオン化可能な脂質、15%のDSPC、47.5%のコレステロール、及び2.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有するLNP中で、及び以下の名目mol%比：50%のイオン化可能な脂質、10%のDSPC、38.5%のコレステロール、及び1.5%のPEG-2k-DMGの脂質構成要素を有する比較LNP中で製剤化した。LNPはCas9 mRNA及びTRAC遺伝子を標的とするsgRNAをカプセル化した。フローサイトメトリーにより、T細胞受容体表面タンパク質の喪失について編集を評価した。

10

【0241】

LNPは、Cas9（配列番号5）をコードするmRNA及びヒトTRACを標的とするsgRNA（配列番号10）を送達した。試験したLNPにおけるsgRNA：Cas9 mRNAのカーゴ重量比は1：1であった。

【0242】

LNP組成物の平均粒子サイズ、多分散性（pdi）、総RNA含量、及びRNAのカプセル化効率を実施例1に記載のように解析した。結果を表11に示す。脂質解析は、表1に示されているように実測mol%脂質レベルを示した。

【表12】

20

表11. LNP組成物の解析

LNP ID	化合物	名目モル比	カプセル化 (%)	Z平均サイズ (nm)	PD I	数平均サイズ (nm)	N / P 比
組成物 45 (比較)	6	50/10/38.5/1.5	99%	111	0.06	99	6
組成物 46 (比較)	11	50/10/38.5/1.5	97%	110	0.02	99	6
組成物 47 (比較)	8	50/10/38.5/1.5	99%	94	0.02	86	6
組成物 23	6	35/15/47.5/2.5	99%	73	0.03	63	6
組成物 48	11	35/15/47.5/2.5	99%	71	0.03	64	6
組成物 49	8	35/15/47.5/2.5	99%	63	0.04	55	6

30

【0243】

単一ドナー（W0106）からのT細胞を、非活性化T細胞を形質移入の前に48時間静置した以外は、実施例1に記載のように一般的に調製し、活性化し、形質移入した。形質移入から7日後、編集した活性化T細胞を採取し、実施例1に記載のようにフローサイトメトリーによりフェノタイピングした。

【0244】

0.04 µg、0.08 µg、0.16 µg、0.25 µg、0.63 µg、1.25 µg、2.5 µg、及び5 µgのLNP濃度で処置した後のCD3陰性T細胞のパーセンテージを測定した。各LNP用量におけるCD3陰性T細胞の平均パーセント、CD3の最大パーセント値、及びEC50を、活性化T細胞については表12及び図3Aに、非活

40

50

性化 T 細胞については表 1 3 及び図 3 B に示す。

【表 1 3 - 1】

表 1 2. 活性化 T 細胞を異なるイオン化可能な脂質で製剤化した L N P で処置した後の C D 3 陰性細胞のパーセント

LNP	LNP ID	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
50/10/38/1.5 (比較)	組成物 45	5	96.8	0.2	2	98.3	0.56
		2.5	94.9	0.2	2		
		1.25	86.9	0.1	2		
		0.63	55.1	1.6	2		
		0.31	23.8	0.3	2		
		0.16	8.6	0.2	2		
		0.08	3.3	0.5	2		
		0.04	1.9	0.0	2		
	組成物 46	5	5	93.9	0.1	98.7	0.81
		2.5	2.5	89.5	0.2		
		1.25	1.25	68.8	2.2		
		0.63	0.63	38.7	0.6		
		0.31	0.31	18.4	0.5		
		0.16	0.16	9.2	0.5		
		0.08	0.08	3.9	0.1		
		0.04	0.04	2.2	0.2		
	組成物 47	5	97.9	0.0	2	100	0.42
		2.5	96.4	0.4	2		
		1.25	89.6	1.3	2		
		0.63	65.1	1.6	2		
		0.31	39.8	2.4	2		
		0.16	18.3	1.0	2		
		0.08	7.3	0.8	2		
		0.04	2.3	0.4	2		

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

LNP	LNP ID	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
35/15/47.5/2.5	組成物 23	5	99.1	0.1	2	99.4	0.13
		2.5	98.2	0.0	2		
		1.25	97.8	0.5	2		
		0.63	95.2	1.3	2		
		0.31	84.1	1.9	2		
		0.16	61.7	1.0	2		
		0.08	37.6	0.5	2		
		0.04	18.6	0.4	2		
	組成物 48	5	97.9	0.1	2	98.71	0.19
		2.5	98.0	0.2	2		
		1.25	97.9	0.1	2		
		0.63	94.0	0.8	2		
		0.31	75.5	2.0	2		
		0.16	44.8	1.0	2		
		0.08	20.5	1.4	2		
		0.04	10.1	0.7	2		
	組成物 49	5	98.1	0.0	2	98.6	0.16
		2.5	97.1	0.3	2		
		1.25	96.6	0.1	2		
		0.63	93.1	0.6	2		
		0.31	76.8	0.8	2		
		0.16	52.6	0.4	2		
		0.08	29.6	0.1	2		
		0.04	14.4	1.5	2		

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表 1 3. 非活性化T細胞を異なるイオン化可能な脂質で製剤化したLNPで処置した後のCD3陰性細胞のパーセント

LNP	LNP ID	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
50/10/ 38/1.5 (比較)	組成物 45	5	83.5	1.3	2	85	0.42
		2.5	86.7	0.4	2		
		1.25	83.5	1.9	2		
		0.63	72.0	3.3	2		
		0.31	22.3	6.5	2		
		0.16	6.7	0.3	2		
		0.08	2.9	0.2	2		
		0.04	1.7	0.1	2		
	組成物 46	5	68.5	0.1	2	71.9	0.83
		2.5	74.8	3.9	2		
		1.25	58.4	3.1	2		
		0.63	25.9	4.5	2		
		0.31	9.3	2.3	2		
		0.16	2.7	0.1	2		
		0.08	6.7	2.4	2		
		0.04	11.9	8.1	2		
	組成物 47	5	89.7	0.6	2	93.1	0.50
		2.5	83.2	4.6	2		
		1.25	75.0	0.7	2		
		0.63	55.1	0.9	2		
		0.31	35.5	11.5	2		
		0.16	17.8	7.5	2		
		0.08	16.8	1.8	2		
		0.04	4.7	0.3	2		

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

LNP	LNP ID	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
35/15/ 47.5/2. 5	組成物 23	5	95.5	0.4	2	92.9	0.05
		2.5	91.3	2.2	2		
		1.25	90.3	1.5	2		
		0.63	89.6	0.8	2		
		0.31	89.3	0.1	2		
		0.16	83.8	1.1	2		
		0.08	74.1	7.8	2		
		0.04	64.9	6.1	2		
	組成物 48	5	93.0	3.0	2	92.8	0.12
		2.5	93.3	0.7	2		
		1.25	91.7	1.0	2		
		0.63	90.6	1.5	2		
		0.31	82.7	1.3	2		
		0.16	66.4	0.8	2		
		0.08	36.7	9.1	2		
		0.04	19.9	4.8	2		
	組成物 49	5	90.6	0.3	2	85.9	0.05
		2.5	85.7	1.0	2		
		1.25	83.3	1.9	2		
		0.63	78.4	2.2	2		
		0.31	80.4	3.4	2		
		0.16	68.9	0.2	2		
		0.08	58.4	1.9	2		
		0.04	32.0	2.9	2		

10

20

30

【0 2 4 5】

実施例 6：選択した L N P 組成物のカーゴ比評価

カーゴ比が L N P 編集効果に及ぼす効果を評価するため、C D 3 陽性 T 細胞を、様々な比率の C a s 9 m R N A 及び T R A C 遺伝子を標的とする s g R N A を含む L N P 組成物で処置した。フローサイトメトリーにより、編集を T 細胞受容体表面タンパク質の喪失について評価した。

40

【0 2 4 6】

6. 1 活性化 T 細胞におけるカーゴ比評価

カーゴ比の変化が表 1 4 に記載の選択 L N P の編集効率に及ぼす効果を活性化 C D 3 陽性 T 細胞において試験した。概して L N P は、表 1 4 に示す脂質組成物（それぞれ、イオン化可能な化合物 6 / D S P C / コレステロール / P E G のモル比として表されている）を用いて、実施例 1 に記載のように調製した。L N P は、C a s 9 m R N A（配列番号 5）をコードする m R N A 及び T R A C を標的とする s g R N A（配列番号 1 0）を送達した。フローサイトメトリーにより、編集を T 細胞受容体表面タンパク質の喪失について評価した。s g R N A：C a s 9 m R N A のカーゴ重量比は、1：1、1：2、2：1

50

、または 4 : 1 であった。

【 0 2 4 7 】

L N P 組成物の平均粒子サイズ、多分散性 (p d i) 、総 R N A 含量、及び R N A のカプセル化効率を実施例 1 に記載のように解析した。結果を表 1 4 に示す。脂質解析は、表 1 に示されているように実測 m o l - % 脂質レベルを示した。

【表 1 5 】

表 1 4 . L N P 組成物の解析

L N P I D	名目モル比	カプセル化 (%)	Z 平均サ イズ (n m)	P D I	数平均 サイズ (n m)	R N A 濃度	N / P 比
組成物 5 0 (比較)	50/10/38.5/1.5	99%	113	0.02	95	0.07	6
組成物 5 1 (比較)	50/10/38.5/1.5	99%	112	0.03	92	0.07	6
組成物 5 2 (比較)	50/10/38.5/1.5	99%	110	0.06	86	0.07	6
組成物 5 3 (比較)	50/10/38.5/1.5	99%	110	0.01	91	0.07	6
組成物 5 4	35/15/47.5/2.5	99%	83	0.02	67	0.07	6
組成物 5 5	35/15/47.5/2.5	99%	80	0.03	65	0.07	6
組成物 5 6	35/15/47.5/2.5	98%	77	0.04	61	0.07	6
組成物 5 7	35/15/47.5/2.5	99%	75	0.03	60	0.07	6

10

20

30

【 0 2 4 8 】

T 細胞を単一のドナー (ロット番号 W 0 1 0 6) から収集し、調製し、実施例 1 に記載のように形質移入した。形質移入から 7 日後、実施例 1 に記載のように、フローサイトメトリー解析により T 細胞をフェノタイピングした。0 . 0 4 μ g 、 0 . 0 8 μ g 、 0 . 1 6 μ g 、 0 . 2 5 μ g 、 0 . 6 3 μ g 、 1 . 2 5 μ g 、 2 . 5 μ g 、及び 5 μ g の L N P 濃度で処置した後に C D 3 陰性 T 細胞のパーセンテージを測定した。各 L N P 用量における C D 3 陰性 T 細胞の平均パーセント、C D 3 の最大パーセント値、及び E C 5 0 を表 1 5 及び図 4 A に示す。

40

50

【表 1 6 - 1】

表 1 5. 活性化T細胞を様々なカーゴ比のLNPで処置した後のCD3陰性細胞のパーセント

LNP	LNP ID	カーゴ 比	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
50/1 0/38/ 1.5 (比 較)	組成物 50	1:2	5	95.4	0.6	2	95.9	0.98
			2.5	93.0	0.9	2		
			1.25	68.4	2.9	2		
			0.63	17.1	2.2	2		
			0.31	4.7	0.6	2		
			0.16	1.3	0.1	2		
			0.08	0.9	0.0	2		
			0.04	0.3	0.0	2		
	組成物 51	1:1	5	95.7	0.3	2	95.6	0.89
			2.5	92.8	1.0	2		
			1.25	74.4	1.0	2		
			0.63	22.1	2.6	2		
			0.31	5.4	0.3	2		
			0.16	1.8	0.4	2		
			0.08	0.8	0.1	2		
			0.04	0.4	0.1	2		
	組成物 52	2:1	5	95.4	0.6	2	95.1	0.89
			2.5	92.5	1.0	2		
			1.25	75.2	2.4	2		
			0.63	21.5	2.7	2		
			0.31	5.0	0.1	2		
			0.16	1.8	0.5	2		
			0.08	0.8	0.2	2		
			0.04	0.6	0.1	2		
	組成物 53	4:1	5	94.3	0.4	2	95.5	1.18
			2.5	89.2	0.2	2		
			1.25	52.4	0.2	2		
			0.63	11.3	1.2	2		
			0.31	2.4	0.2	2		
			0.16	0.7	0.1	2		
			0.08	0.7	0.2	2		
			0.04	0.4	0.1	2		

10

20

30

40

50

【表 16 - 2】

LNP	LNP ID	カーゴ 比	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
35/1 5/47. 5/2.5	組成物 54	1:2	5	97.3	0.5	2	97.3	0.29
			2.5	96.3	0.3	2		
			1.25	93.8	0.6	2		
			0.63	84.7	0.8	2		
			0.31	53.8	2.3	2		
			0.16	22.2	0.4	2		
			0.08	8.6	0.2	2		
			0.04	2.6	0.0	2		
	組成物 55	1:1	5	97.2	0.8	2	97.6	0.19
			2.5	97.1	1.0	2		
			1.25	96.9	0.2	2		
			0.63	93.7	0.4	2		
			0.31	76.8	2.9	2		
			0.16	42.1	0.7	2		
			0.08	15.9	0.7	2		
			0.04	5.8	0.1	2		
	組成物 56	2:1	5	97.2	0.7	2	97.2	0.24
			2.5	97.1	0.4	2		
			1.25	96.0	0.4	2		
			0.63	92.4	0.8	2		
			0.31	67.1	1.2	2		
			0.16	25.4	1.3	2		
			0.08	7.3	0.3	2		
			0.04	2.4	0.1	2		
	組成物 57	4:1	5	97.6	0.3	2	97.6	0.21
			2.5	97.3	0.5	2		
			1.25	96.2	0.6	2		
			0.63	94.9	0.3	2		
			0.31	73.8	1.6	2		
			0.16	33.1	0.9	2		
			0.08	9.5	0.1	2		
			0.04	3.3	0.5	2		

【0249】

6.2 非活性化T細胞における荷電比評価

カーゴ比の変化が実施例6.1に記載の選択LNPのLNP編集効率に及ぼす効果を非活性化CD3陽性T細胞において試験した。実施例6.1に記載の選択されたLNP組成物を本試験で使用した。

【0250】

2例のドナーのT細胞（ロット番号W106、W790）を調製し、実施例1に記載のように形質移入した。形質移入から7日後、編集した非活性化T細胞を、実施例1に記載のように、フローサイトメトリー解析によりフェノタイピングした。

【 0 2 5 1 】

C D 3 陰性 T 細胞のパーセンテージを 0 . 0 4 μ g 、 0 . 0 8 μ g 、 0 . 1 6 μ g 、 0 . 2 5 μ g 、 0 . 6 3 μ g 、 1 . 2 5 μ g 、 2 . 5 μ g 、 5 μ g の L N P 濃度で測定した。各 L N P 用量における C D 3 陰性 T 細胞の平均パーセント、C D 3 の最大パーセント値、及び E C 5 0 を表 1 6 及び 1 7 ならびに図 4 B に示す。

【表 1 7 - 1 】

表 1 6 . ドナー W 1 0 6 において非活性化 T 細胞を様々なカーゴ比の L N P で処置した後の C D 3 陰性細胞のパーセント

LNP	LNP ID	カーゴ 比	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
50/1 0/38 /1.5 (比較)	組成物 50	1:2	5	61.3	0.1	2	64.6	1.99
			2.5	44.1	0.1	2		
			1.25	13.3	0.0	2		
			0.63	4.9	0.0	2		
			0.31	2.1	0.0	2		
			0.16	1.5	0.0	2		
			0.08	1.5	0.0	2		
			0.04	1.6	0.0	2		
	組成物 51	1:1	5	65.5	0.0	2	67.5	1.86
			2.5	50.7	0.1	2		
			1.25	14.9	0.0	2		
			0.63	5.2	0.0	2		
			0.31	1.9	0.0	2		
			0.16	2.1	0.0	2		
			0.08	2.3	0.0	2		
			0.04	1.9	0.0	2		
	組成物 52	2:1	5	59.3	0.0	2	61.7	1.94
			2.5	43.5	0.1	2		
			1.25	13.9	0.0	2		
			0.63	2.4	0.0	2		
			0.31	2.4	0.0	2		
			0.16	2.5	0.0	2		
			0.08	2.1	0.0	2		
			0.04	3.1	0.0	2		
	組成物 53	4:1	5	42.6	0.0	2	48.2	2.96
			2.5	18.1	0.0	2		
			1.25	4.0	0.0	2		
			0.63	2.0	0.0	2		
			0.31	1.7	0.0	2		
			0.16	2.7	0.0	2		
			0.08	2.7	0.0	2		
			0.04	1.9	0.0	2		

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

LNP	LNP ID	カーゴ 比	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
35/15 /47.5/ 2.5	組成物 54	1:2	5	71.4	0.0	2	71.7	0.65
			2.5	69.6	0.0	2		
			1.25	61.8	0.0	2		
			0.63	34.7	0.0	2		
			0.31	10.8	0.0	2		
			0.16	3.5	0.0	2		
			0.08	2.0	0.0	2		
			0.04	2.3	0.0	2		
	組成物 55	1:1	5	76.5	0.1	2	78.9	0.57
			2.5	80.0	0.0	2		
			1.25	70.9	0.0	2		
			0.63	45.8	0.0	2		
			0.31	15.9	0.0	2		
			0.16	5.3	0.0	2		
			0.08	3.9	0.0	2		
			0.04	2.8	0.0	2		
	組成物 56	2:1	5	69.2	0.0	2	68.6	0.66
			2.5	66.5	0.0	2		
			1.25	53.8	0.1	2		
			0.63	36.5	0.1	2		
			0.31	7.2	0.0	2		
			0.16	3.0	0.0	2		
			0.08	2.5	0.0	2		
			0.04	1.9	0.0	2		
	組成物 57	4:1	5	66.1	0.0	2	64.2	0.53
			2.5	65.0	0.1	2		
			1.25	58.8	0.0	2		
			0.63	44.4	0.1	2		
			0.31	7.8	0.0	2		
			0.16	2.9	0.0	2		
			0.08	2.4	0.0	2		
			0.04	2.9	0.0	2		

10

20

30

40

50

【表 18-1】

表 17. ドナー W790 において非活性化 T 細胞を様々なカーゴ比の LNP で処置した後の CD3 陰性細胞のパーセント

LNP	LNP ID	カーゴ比	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
50/10 /38/1 .5 (比較)	組成物 50	1:2	5	86.6	0.0	2	88.9	1.63
			2.5	70.2	0.0	2		
			1.25	36.7	0.0	2		
			0.63	11.5	0.0	2		
			0.31	12.3	0.1	2		
			0.16	13.5	0.0	2		
			0.08	11.4	0.0	2		
			0.04	7.8	0.0	2		
	組成物 51	1:1	5	84.1	0.0	2	86.5	1.70
			2.5	70.6	0.0	2		
			1.25	29.2	0.0	2		
			0.63	14.9	0.1	2		
			0.31	12.5	0.0	2		
			0.16	8.4	0.0	2		
			0.08	8.2	0.0	2		
			0.04	8.2	0.0	2		
	組成物 52	2:1	5	79.8	0.0	2	82	1.82
			2.5	63.1	0.1	2		
			1.25	25.6	0.0	2		
			0.63	9.8	0.0	2		
			0.31	7.7	0.0	2		
			0.16	9.9	0.0	2		
			0.08	10.2	0.0	2		
			0.04	9.7	0.0	2		
	組成物 53	4:1	5	64.1	0.0	2	72	2.62
			2.5	38.6	0.0	2		
			1.25	16.0	0.1	2		
			0.63	9.6	0.0	2		
			0.31	9.1	0.0	2		
			0.16	7.9	0.0	2		
			0.08	10.6	0.0	2		
			0.04	11.0	0.0	2		

10

20

30

40

50

【表 18-2】

LNP	LNP ID	カーゴ比	LNP(μg)	平均 CD3-%	SD	N	最大 CD3-%	EC50
35/15 /47.5 /2.5	組成物 54	1:2	5	91.3	0.0	2	89.3	0.51
			2.5	86.4	0.0	2		
			1.25	80.5	0.0	2		
			0.63	60.6	0.0	2		
			0.31	25.5	0.0	2		
			0.16	11.6	0.0	2		
			0.08	12.6	0.0	2		
			0.04	7.4	0.0	2		
	組成物 55	1:1	5	94.1	0.0	2	94	0.39
			2.5	91.4	0.0	2		
			1.25	90.7	0.0	2		
			0.63	72.4	0.0	2		
			0.31	40.0	0.0	2		
			0.16	17.9	0.0	2		
			0.08	9.7	0.0	2		
			0.04	8.8	0.0	2		
	組成物 56	2:1	5	92.6	0.0	2	90.3	0.61
			2.5	84.3	0.0	2		
			1.25	82.2	0.0	2		
			0.63	51.7	0.0	2		
			0.31	22.3	0.1	2		
			0.16	17.7	0.1	2		
			0.08	9.8	0.0	2		
			0.04	11.5	0.0	2		
	組成物 57	4:1	5	89.4	0.0	2	86.9	0.50
			2.5	87.1	0.0	2		
			1.25	79.9	0.0	2		
			0.63	64.5	0.0	2		
			0.31	22.8	0.0	2		
			0.16	9.7	0.0	2		
			0.08	14.5	0.1	2		
			0.04	10.5	0.0	2		

【0252】

実施例 7：血清培地条件下で評価する LNP 組成物活性

LNP の編集効果を評価するため、LNP 組成物を *in vitro* で試験して、代替培地条件が CD3 陽性 T 細胞における挿入効率に及ぼす効果を評価した。Cas9 mRNA 及び TRAC 遺伝子を標的とする sgRNA をカプセル化する様々なモル比の脂質構成要素を含む LNP 組成物で T 細胞を処置した。AAV6 ウイルスコンストラクトは、TRAC 座位に部位特異的に組み込むための相溶性アームに隣接する GFP レポーターをコードする相同組換え修復鋳型 (HDR T) を送達した。フローサイトメトリーにより、TRAC 遺伝子破壊を T 細胞受容体表面タンパク質の喪失について評価した。挿入をフロー

サイトメトリーにより G F P 発光について評価した。

【 0 2 5 3 】

概して L N P は、表 1 8 に示す脂質組成物（それぞれ、イオン化可能な化合物 6 / D S P C / コレステロール / P E G のモル比として表されている）を用いて、実施例 1 のように調製した。L N P は、C a s 9（配列番号 4）をコードする m R N A 及びヒト T R A C を標的とする s g R N A（配列番号 1 0）を送達した。s g R N A : C a s 9 m R N A のカーゴ重量比は 1 : 2 であった。

【 0 2 5 4 】

L N P 組成物の平均粒子サイズ、多分散性（p d i）、総 R N A 含量、及び R N A のカプセル化効率を実施例 1 に記載のように解析した。結果を表 1 8 に示す。脂質解析は、表 1 に示されているように実測 m o l - % 脂質レベルを示した。

【表 1 9】

表 1 8. L N P 組成物の解析結果

L N P I D	組成モル比	カプセル化 (%)	Z 平均サ イズ (n m)	P D I	数平均サ イズ (n m)	N/ P 比
組成物 1 (比 較)	50/10/38.5/1.5	98%	113	0.03	102	6
組成物 1 6	35/15/47.5/2.5	98%	78	0.03	72	6

【 0 2 5 5 】

単一ドナー由来の T 細胞（ロット番号 W 0 1 0 6）を、以下の培地修飾を伴って実施例 1 に記載のように調製した。2. 5 % ヒト A B 血清（H A B S）、2. 5 % の C T S 免疫細胞 S R（G i b c o；カタログ番号 A 2 5 9 6 1 - 0 1）血清代替物（S R）、5 % 血清代替物（S R）、または 2. 5 % ヒト A B 血清と 2. 5 % 血清代替物との組合せのいずれかを補充した培地で T 細胞をプレーティングした。T 細胞を、実施例 1. 5 に記載のように解凍後 2 4 時間活性化した。活性化から 2 日後、実施例 1. 6 に記載のように T 細胞の L N P による形質移入を、0. 3 1 μ g / m l、0. 6 3 μ g / m l、1. 2 5 μ g / m l、及び 2. 5 μ g / m l の L N P 濃度で行った。T R A C 座位への部位特異的組込みのための相同性アームに隣接する G F P レポーター（V i g e n e；配列番号 7）をコードする相同組換え修復鋳型（H D R T）をコードする A A V 6 を、3 × 1 0⁵ ウイルス粒子 / 細胞の感染多重度（M O I）で各ウェルに加えた。D N A 依存性プロテインキナーゼの低分子阻害剤を 0. 2 5 u M で加えた。以下で「D N A P K I 化合物 4」と称する阻害剤は、9 -（4, 4 - ジフルオロシクロヘキシル）- 7 - メチル - 2 -（（7 - メチル - [1, 2, 4] トリアゾロ [1, 5 - a] ピリジン - 6 - イル）アミノ）- 7, 9 - ジヒドロ - 8 H - プリン - 8 - オンであり、また下記のように示される。

10

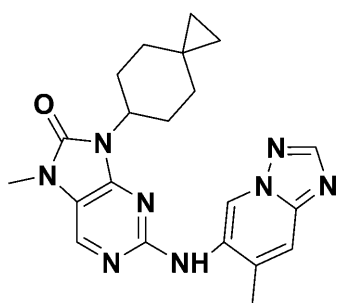
20

30

40

50

【化 2 3】



10

【0 2 5 6】

DNA PKI 化合物 4 を以下のように調製した。

【0 2 5 7】

一般的情報

全ての試薬及び溶媒は、商用ベンダーから購入しそのまま使用するか、または引用の手順に従って合成した。全ての中間体及び最終化合物は、シリカゲルによるフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。NMRスペクトルはBrukerまたはVarian 400 MHz 分光計で記録し、NMRデータはCDCl₃中周囲温度で収集した。化学シフトはCDCl₃ (7.26) に対しppm単位で報告する。¹H NMRのデータは以下のように報告する：化学シフト、多重度 (br = 幅広、s = 一重線、d = 二重線、t = 三重線、q = 四重線、dd = 二重線の二重線、dt = 三重線の二重線、m = 多重線)、結合定数、及び積分。MSデータは、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 源を備えたWaters SQD2 質量分析計で記録した。最終化合物の純度は、UPLC-MS-ELSにより、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器及び蒸発光散乱 (ELS) 検出器を備えたSQD2 質量分析計を装備したWaters Acquity H-Class 液体クロマトグラフィー装置を用いて定量した。

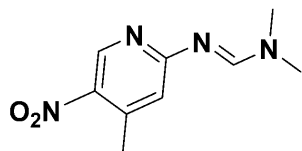
20

【0 2 5 8】

中間体 1 a : (E) - N , N - ジメチル - N ' - (4 - メチル - 5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ホルムイミダミド

30

【化 2 4】



4 - メチル - 5 - ニトロ - ピリジン - 2 - アミン (5 g 、 1 . 0 当量) のトルエン (0 . 3 M) 中溶液に、DMF - DMA (3 . 0 当量) を加えた。混合物を 110 °C で 2 時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して残渣を得、カラムクロマトグラフィーにより精製して生成物を黄色の固体として得た (59 %) 。¹H NMR (400 MHz , (CD₃)₂SO) δ 8 . 82 (s , 1 H) , 8 . 63 (s , 1 H) , 6 . 74 (s , 1 H) , 3 . 21 (m , 6 H) .

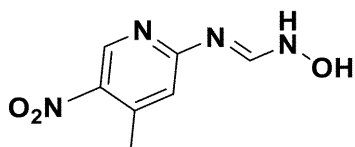
40

【0 2 5 9】

中間体 1 b : (E) - N - ヒドロキシ - N ' - (4 - メチル - 5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ホルムイミダミド

50

【化 2 5】



中間体 1 a (4 g、1.0 当量) の MeOH (0.2 M) 中溶液に、NH₂OH-HCl (2.0 当量) を加えた。反応混合物を 80℃ で 1 時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残渣を得た。残渣を H₂O 及び EtOAc に分割し、続いて EtOAc で 2 回抽出した。有機相を減圧下で濃縮して残渣を得、カラムクロマトグラフィーにより精製して生成物を白色の固体として得た (66%)。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 10.52 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 10.08 (dd, J = 9.9, 3.7 Hz, 1H), 8.84 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 9.7, 3.8 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H)。

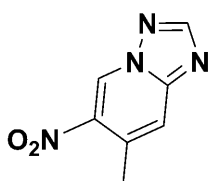
10

【0 2 6 0】

中間体 1 c : 7-メチル-6-ニトロ-[1, 2, 4] トリアゾロ [1, 5-a] ピリジン

【化 2 6】

20



中間体 1 b (2.5 g、1.0 当量) の THF (0.4 M) 中溶液に、トリフルオロ酢酸無水物 (1.0 当量) を 0℃ で加えた。混合物を 25℃ で 18 時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を白色の固体として得た (44%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.53 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 2.78 (d, J = 1.0 Hz, 3H)。

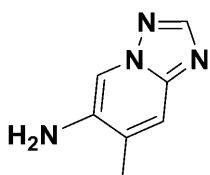
30

【0 2 6 1】

中間体 1 d : 7-メチル-[1, 2, 4] トリアゾロ [1, 5-a] ピリジン-6-アミン

【化 2 7】

40



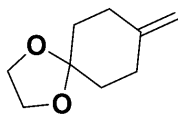
Pd/C (10% w/w、0.2 当量) の EtOH (0.1 M) 中混合物に、中間体 1 c (1.0 当量) 及びギ酸アンモニウム (5.0 当量) を加えた。混合物を 105℃ で 2 時間加熱した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を淡褐色の固体として得た。¹H NMR (

50

400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.41 (s, 2H), 8.07 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 2.22 (s, 3H).

【0262】

中間体 1 e : 8-メチレン-1,4-ジオキサスピロ[4.5]デカン
【化28】



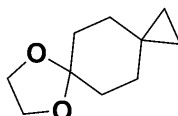
10

メチル(トリフェニル)ホスホニウムブロミド(1.15当量)のTHF(0.6M)中溶液に、n-BuLi(1.1当量)を-78℃で滴加し、混合物を0℃で1時間攪拌した。次いで1,4-ジオキサスピロ[4.5]デカン-8-オン(50g、1.0当量)を反応混合物に加えた。混合物を25℃で12時間攪拌した。反応混合物を水性NH₄Clに0℃で注ぎ、H₂Oで希釈し、EtOAcで3回抽出した。合わせた有機層を減圧下で濃縮して残渣を得、カラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を無色の油として得た(51%)。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 4.67 (s, 1H), 3.96 (s, 4H), 2.82 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 1.70 (t, J = 6.4 Hz, 4H).

【0263】

中間体 1 f : 7,10-ジオキサジスピロ[2.2.4⁶.2³]ドデカン
【化29】

20

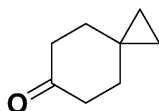


中間体 4 a (5g、1.0当量)のトルエン(3M)中溶液にZnEt₂(2.57当量)を-40℃で滴加し、混合物を-40℃で1時間攪拌した。次いでジヨードメタン(6.0当量)を混合物にN₂下で、-40℃で滴加した。次いで混合物をN₂雰囲気下で、20℃で17時間攪拌した。反応混合物を水性NH₄Clに0℃で注ぎ、EtOAcで2回抽出した。合わせた有機相をブライン(20mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を淡黄色の油として得た(73%)。

30

【0264】

中間体 1 g : スピロ[2.5]オクタン-6-オン
【化30】



40

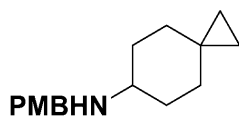
中間体 4 b (4g、1.0当量)の1:1 THF/H₂O(1.0M)中溶液に、TFA(3.0当量)を加えた。混合物をN₂雰囲気下で、20℃で2時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮してTHFを除去し、2MのNaOH(水性)で残渣のpHを7に調整した。混合物を水に注ぎ、EtOAcで3回抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を淡黄色の油として得た(68%)。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 2.35 (t, J = 6.6 Hz, 4H)

50

, 1.62 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 0.42 (s, 4H).

【0265】

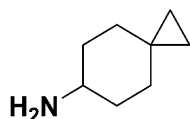
中間体 1h : N-(4-メトキシベンジル)スピロ[2.5]オクタン-6-アミン
【化31】



中間体 4c (2g、1.0当量) 及び (4-メトキシフェニル)メタンアミン (1.1当量) の DCM (0.3M) 中混合物に AcOH (1.3当量) を加えた。混合物を N₂ 雰囲気下で、20℃で1時間攪拌した。次いで NaBH(OAc)₃ (3.3当量) を混合物に0℃で加え、混合物を N₂ 雰囲気下で、20℃で17時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して DCM を除去し、得られた残渣を H₂O で希釈し、EtOAc で3回抽出した。合わせた有機層を食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を灰色の固体として得た (51%)。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 7.15 – 7.07 (m, 2H), 6.77 – 6.68 (m, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.54 (s, 2H), 2.30 (ddt, J = 10.1, 7.3, 3.7 Hz, 1H), 1.69 – 1.62 (m, 2H), 1.37 (td, J = 12.6, 3.5 Hz, 2H), 1.12 – 1.02 (m, 2H), 0.87 – 0.78 (m, 2H), 0.13 – 0.04 (m, 2H).

【0266】

中間体 1i : スピロ[2.5]オクタン-6-アミン
【化32】



Pd/C (10% w/w、1.0当量) の MeOH (0.25M) 中懸濁液に中間体 4d (2g、1.0当量) を加え、混合物を H₂ 雰囲気下で、80℃、50 Psi で24時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残渣を得、これをカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 2.61 (tt, J = 10.8, 3.9 Hz, 1H), 1.63 (ddd, J = 9.6, 5.1, 2.2 Hz, 2H), 1.47 (td, J = 12.8, 3.5 Hz, 2H), 1.21 – 1.06 (m, 2H), 0.82 – 0.72 (m, 2H), 0.14 – 0.05 (m, 2H).

【0267】

中間体 1j : エチル 2-クロロ-4-(スピロ[2.5]オクタン-6-イルアミノ)ピリミジン-5-カルボキシレート

10

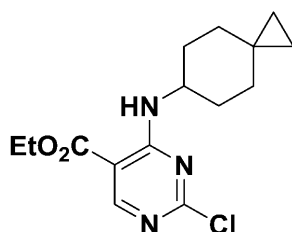
20

30

40

50

【化 3 3】



10

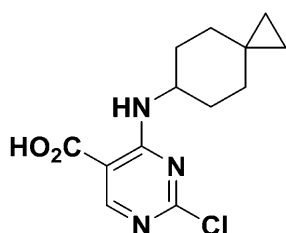
エチル 2, 4-ジクロロピリミジン-5-カルボキシレート (2.7 g、1.0 当量) 及び中間体 1 i (1.0 当量) の ACN (0.5~0.6 M) 中混合物に、 K_2CO_3 (2.5 当量) を N_2 下で一度に加えた。混合物を 20℃で 12 時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を白色の固体として得た (54%)。 ^1H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 8.64 (s, 1H), 8.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.33 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.08 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 1.90 (dd, $J = 12.7, 4.8$ Hz, 2H), 1.64 (t, $J = 12.3$ Hz, 2H), 1.52 (q, $J = 10.7, 9.1$ Hz, 2H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.12 (d, $J = 13.0$ Hz, 2H), 0.40 – 0.21 (m, 4H)。

20

【0268】

中間体 1 k : 2-クロロ-4-(スピロ[2.5]オクタン-6-イルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸

【化 3 4】



30

中間体 1 j (2 g、1.0 当量) の 1 : 1 THF / H_2O (0.3 M) 中溶液に LiOH (2.0 当量) を加えた。混合物を 20℃で 12 時間攪拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残渣を得た。残渣を 2 M 塩酸で pH 2 に調整し、沈殿物を濾過により収集し、水で洗浄し、真空下で試みた。生成物をさらに精製せずに次のステップに直接使用した (82%)。 ^1H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 13.54 (s, 1H), 8.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 3.82 (qt, $J = 8.2, 3.7$ Hz, 1H), 1.66 (dq, $J = 12.8, 4.1$ Hz, 2H), 1.47 – 1.34 (m, 2H), 1.33 – 1.20 (m, 2H), 0.86 (dt, $J = 13.6, 4.2$ Hz, 2H), 0.08 (dd, $J = 8.3, 4.8$ Hz, 4H)。

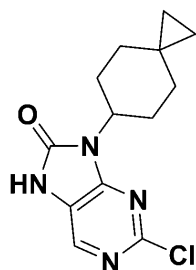
40

【0269】

中間体 1 l : 2-クロロ-9-(スピロ[2.5]オクタン-6-イル)-7, 9-ジヒドロ-8H-プリン-8-オン

50

【化 3 5】



10

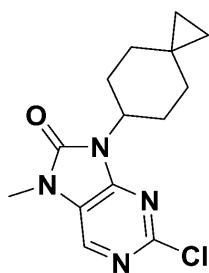
中間体 1 k (1.5 g、1.0 当量) 及び Et_3N (1.0 当量) の DMF (0.3 M) 中混合物に DPPA (1.0 当量) を加えた。混合物を N_2 雰囲気下で、 120°C で 8 時間攪拌した。反応混合物を水に注いだ。沈殿物を濾過により収集し、水で洗浄し、真空下で乾燥させて残渣を得、これをさらに精製せずに次のステップに直接使用した (67%)。 ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11.68 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 4.26 (ddt, $J = 12.3, 7.5, 3.7$ Hz, 1H), 2.42 (qd, $J = 12.6, 3.7$ Hz, 2H), 1.95 (td, $J = 13.3, 3.5$ Hz, 2H), 1.82 – 1.69 (m, 2H), 1.08 – 0.95 (m, 2H), 0.39 (tdq, $J = 11.6, 8.7, 4.2, 3.5$ Hz, 4H)。

20

【0270】

中間体 1 m: 2-クロロ-7-メチル-9-(スピロ[2.5]オクタン-6-イル)-7,9-ジヒドロ-8H-プリン-8-オン

【化 3 6】



30

中間体 1 l (1.0 g、1.0 当量) 及び NaOH (5.0 当量) の 1:1 THF/ H_2O (0.3 ~ 0.5 M) 中混合物に MeI (2.0 当量) を加えた。混合物を N_2 雰囲気下で、 20°C で 12 時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して残渣を得、これをカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物を淡黄色の固体として得た (67%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (s, 1H), 4.03 (tt, $J = 12.5, 3.9$ Hz, 1H), 3.03 (s, 3H), 2.17 (qd, $J = 12.6, 3.8$ Hz, 2H), 1.60 (td, $J = 13.4, 3.6$ Hz, 2H), 1.47 – 1.34 (m, 2H), 1.07 (s, 1H), 0.63 (dp, $J = 14.0, 2.5$ Hz, 2H), -0.05 (s, 4H)。

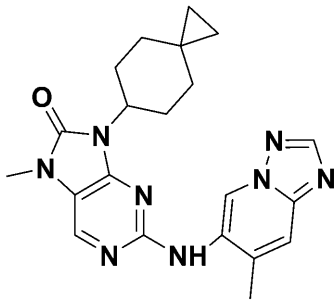
40

【0271】

DNA PKI 化合物 4: 7-メチル-2-((7-メチル-[1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリジン-6-イル)アミノ)-9-(スピロ[2.5]オクタン-6-イル)-7,9-ジヒドロ-8H-プリン-8-オン

50

【化 3 7】



10

中間体 1 m (1.0 当量) 及び中間体 1 d (1.0 当量) の混合物に、DMF (0.2 ~ 0.3 M) 中の Pd (dppf) Cl₂ (0.2 当量)、XantPhos (0.4 当量)、及び Cs₂CO₃ (2.0 当量) を脱気し、N₂ で 3 回パージし、混合物を N₂ 雰囲気下で、130℃で12時間攪拌した。次いで混合物を水に注ぎ、DCMで3回抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製して、生成物をオフホワイト色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 9.09 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 4.21 (t, J = 12.5 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.34 (dt, J = 13.0, 6.5 Hz, 2H), 1.93 – 1.77 (m, 2H), 1.77 – 1.62 (m, 2H), 0.91 (d, J = 13.2 Hz, 2H), 0.31 (t, J = 7.1 Hz, 2H). MS: 405.5 m/z [M+H].

20

【0272】

形質移入から5日後、LNP組成物の挿入効率を評価するため、実施例1に記載のようにフローサイトメトリー解析によりT細胞をフェノタイピングした。表19はCD3陰性細胞のパーセントを示している。TRACによりコードされるT細胞受容体アルファ鎖は、T細胞受容体/CD3複合体のアセンブリー及び細胞表面への転座に必要である。したがって、ゲノム編集によってTRAC遺伝子を破壊すると、T細胞の細胞表面上のCD3タンパク質の喪失につながる。各培地条件におけるGFP陽性T細胞の平均パーセンテージを表20及び図5に示す。GFPタンパク質を発現する細胞は、ゲノムへの挿入の成功を示している。

30

40

50

【表 2 0】

表 1 9 . 活性化 T 細胞を A A V 及び指示 L N P 組成物で処置した後の C D 3 陰性 T 細胞のパーセント。

LNP	用量(μ g/mL)	2.5% HABS		2.5% SR		5% SR		2.5% HABS 及び 2.5% SR	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
組成物 1 50/10/38.5/ 1.5	2.5	94.55	0.07	99.00	0.14	97.95	0.07	99.25	0.07
	1.25	92.25	0.35	96.05	1.20	92.10	2.55	95.95	0.21
	0.63	76.55	0.21	76.60	3.11	63.55	2.47	74.70	1.27
	0.31	48.35	1.34	25.95	1.20	16.55	2.47	41.55	1.20
組成物 16 35/15/47.5/ 2.5	2.5	99.40	0.00	98.80	0.42	98.65	0.07	98.70	0.14
	1.25	98.85	0.07	98.95	0.64	98.50	0.14	97.25	0.35
	0.63	94.10	0.28	96.80	0.42	95.25	0.35	84.60	1.41
	0.31	75.20	0.14	68.75	9.97	64.20	0.57	50.30	1.56

10

20

【表 2 1】

表 2 0 . 活性化 T 細胞を A A V 及び指示 L N P 組成物で処置した後の G F P + 細胞のパーセント。

LNP	用量 (μ g/mL)	2.5% HABS		2.5% SR		5% SR		2.5% HABS 及 び 2.5% SR	
		GFP%+(平 均)	SD	GFP%+(平 均)	SD	GFP%+(平 均)	SD	GFP%+(平 均)	SD
組成物 1 50/10/38.5/1.5	2.5	94.6	0.0	95.4	0.4	93.7	0.6	90.0	0.1
	1.25	92.3	0.3	92.3	0.5	87.7	1.8	75.1	1.1
	0.63	76.6	0.1	76.3	1.3	63.1	1.8	31.2	2.6
	0.31	48.4	0.9	30.5	1.0	19.5	2.5	5.0	0.7
組成物 16 35/15/47.5/2.5	2.5	95.6	0.0	96.3	0.5	95.6	0.1	94.7	0.4
	1.25	94.8	0.5	96.0	1.4	95.6	0.0	91.1	0.2
	0.63	89.6	0.6	93.3	0.5	91.1	0.2	78.8	1.0
	0.31	74.7	0.1	75.0	0.0	64.4	0.4	48.8	1.2

30

40

【 0 2 7 3 】

実施例 8 : 様々な s g R N A を有する L N P 組成物の評価

複数の標的における編集有効性を評価するため、C a s 9 m R N A 及び T R A C (配列番号 1 0)、T R B C (配列番号 1 1)、H L A - A (配列番号 1 3)、または C I I T A (配列番号 1 2) 遺伝子を標的とする s g R N A をカプセル化する様々なモル比の脂質構成要素を含む L N P 組成物で T 細胞を処置した。T R A C または T R B C の編集を、編集後の C D 3 陰性細胞のパーセンテージの増加によってアッセイした。それぞれ T R A C または T R B C によってコードされる T 細胞受容体アルファ鎖及び T 細胞受容体ベータ鎖は、T 細胞受容体 / C D 3 複合体の集合及び細胞表面への転座に必要である。したがっ

50

て、ゲノム編集によってTRACまたはTRBCいずれかの遺伝子を破壊すると、T細胞の細胞表面上のCD3タンパク質の喪失につながる。CIITAはHLAクラスII遺伝子の発現に直接関与する転写因子であるため、CIITAを破壊すると細胞表面のHLA-DR DP DQアレルの喪失につながる。

【0274】

3例のドナー（W0662、110046967、110044591）からの健康ヒトドナーの白血球を市販品で入手した（STEMCELL Technologies）。EasySepヒトT細胞単離キット（Stem Cell Technology；カタログ番号17951）を用いたネガティブセクション、またはStraight From（登録商標）Leukopak（登録商標）CD4／CD8マイクロビーズ（Milteny；カタログ番号130-122-352）を用いたCD4／CD8ポジティブセクションにより、T細胞を、製造業者の指示に従ってMultiMACSTM Cell 24 Separator Plus装置上で単離した。T細胞は、将来の使用のためにCryostor CS10凍結培地（カタログ番号07930）中で凍結保存した。

10

【0275】

解凍したら、CTS Optmizer基本培地（Gibco；A3705001）に1×GlutaMAX、10mMのHEPESバッファー（10mM）、及び1% pen-strep（Gibco；15140-122）を補充し、さらに200IU/mLのIL2（Peprotech；200-02）、5ng/mLのIL7（Peprotech；200-07）、5ng/mLのIL15（Peprotech；200-15）、及び2.5%ヒト血清（Gemini；100-512）を補充したものから構成される完全T細胞増殖培地中でT細胞を培養した。一晚静置した後、 10^6 /mLの密度のT細胞をT細胞TransAct試薬（1：100希釈、Miltenyi）で活性化し、以下の方法を用いてLNPで処置した。

20

【0276】

T細胞は、表21に示されている、イオン化可能な化合物6／DSPC／コレステロール／PEGのモル比として表される脂質組成物を用いて、実施例1に記載のように調製したLNPで形質移入した。LNPは、示される通りにCas9（配列番号4）をコードするmRNA及びsgRNAを送達した。sgRNA：Cas9 mRNAのカーゴ重量比は、50／10／35.5／1.5（化合物6／DSPC／コレステロール／PEG）LNP組成物においては1：2、35／15／47.5／2.5（化合物6／DSPC／コレステロール／PEG）組成物においては1：1であった。N：P比は、別の指示がない限り約6であった。

30

【0277】

活性化T細胞を、先に実施例1に記載のように製剤化したLNPで形質移入した。LNP形質移入は、表26の各組成物について記載されているように、活性化後の順序及びタイミングで行った。CIITAを標的とするsgRNA（配列番号12）を含むT細胞を活性化直後にLNPで処置し、HLA-Aを標的とするsgRNA（配列番号13）を含むT細胞を活性化から24時間後に処置し、TRACを標的とするsgRNA（配列番号10）を含むT細胞を活性化から48時間後に処置し、TRBCを標的とするsgRNA（配列番号11）を含むT細胞を活性化から72時間後に処置した。LNP処置した細胞を、使用するまで37℃、5%のCO₂でインキュベートした。

40

【0278】

各LNP処置について、T細胞を96ウェルプレートで100μLの体積でプレーティングした。表21に示されているLNPの8ポイント2倍段階希釈を、最高LNP最終用量としての5μg/mLから開始し、先に実施例1に記載のように、CTS Optmizer基本培地から構成されたApoE完全T細胞増殖培地を用いて実施した。続いて100μLのLNP-ApoE混合物を、ウェルにプレーティングした細胞に加え、その結果、200μLの最終体積において 0.5×10^6 /mLの最終密度、及び5μg/mLの最終ApoE濃度となった。細胞を37℃、5%のCO₂で24時間培養し、次いで

50

新鮮培地上で1：4に分割した。

【0279】

インキュベート後、LNPで処置したT細胞を採取し、オンターゲット編集を解析した。プレートを37℃、5%のCO₂で11日目までインキュベートし、次いでフローサイトメトリー解析のために採取した。

【0280】

フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリーにより細胞表面タンパク質をアッセイするため、CD4を標的とする抗体(Biolegend;カタログ番号300538)及びCD8aを標的とする抗体(Biolegend;カタログ番号301049)を、CD3を標的とする抗体(Biolegend;カタログ番号300441)またはHLA-DR、DP、DQを標的とする抗体(Biolegend;カタログ番号361712)またはHLA-A*02を標的とする抗体(Biolegend;カタログ番号343320)と混合したものと同時に、T細胞をインキュベートした。続いてT細胞をCytotflex装置(Beckman Coulter)で処理した。FlowJoソフトウェアパッケージ(v.10.6.1またはv.10.7.1)を用いてデータ解析を実施した。簡潔に説明すると、T細胞をリンパ球でゲーティングし、続いて単一細胞でゲーティングした。これらの単一細胞をCD4+/CD8+状態でゲーティングし、そこからCD8+/CD3-、CD8+/HLA-DR、DP、DQ-、またはCD8+/HLA-A*02-細胞を定量化した。

【0281】

CD8+/CD3-、CD8+/HLA-DR、DP、DQ-、CD8+/HLA-A*02-細胞のパーセントを定量化して、編集した標的座位がTCRノックアウトをもたらした細胞集団のパーセンテージを求めた。線形回帰モデルを使用して、TCR KOの用量応答曲線をPrism GraphPad(v.9.0)を用いて作成した。曲線の半数効果濃度(EC₅₀)及びCD3-の最大パーセント値を各LNPごとに算出した。

【0282】

LNP組成物のZ平均及び数平均粒子サイズ、多分散性(pdi)、総RNA含量、ならびにRNAのカプセル化効率を実施例1に記載のように解析した。結果を表21に示す。

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 1. L N P 組成物の解析

L N P I D	名目モル比	s g R N A	カプセル化 (%)	Z 平均サイズ (n m)	P D I	数平均サイズ (n m)	N / P 比
組成物 58	50/10/38.5/1.5	配列番号 12	99%	113	0.01	104	6
組成物 59	50/10/38.5/1.5	配列番号 13	99%	111	0.03	99	6
組成物 1	50/10/38.5/1.5	配列番号 10	98%	109	0.02	87	6
組成物 60	50/10/38.5/1.5	配列番号 11	98%	108	0.03	88	6
組成物 23	35/15/47.5/2.5	配列番号 10	99%	75	0.06	68	6
組成物 61	35/15/47.5/2.5	配列番号 11	99%	75	0.03	67	6
組成物 62	35/15/47.5/2.5	配列番号 12	99%	72	0.05	63	6
組成物 63	35/15/47.5/2.5	配列番号 13	99%	73	0.00	68	6

【0 2 8 3】

0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の L N P 濃度で処置した後の C D 3 陰性 T 細胞のパーセンテージを測定した。アッセイを三重反復で実施した。各 L N P 用量における C D 3 陰性 T 細胞の平均パーセント、C D 3 値の標準偏差、及び E C 5 0 を表 2 2 ~ 2 5 及び図 6 A ~ 6 D に示す。

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 2．活性化T細胞を、TRACを標的とする sgRNA（配列番号 1 0）を含むTRAC LNP組成物で処置した後のCD 3 陰性細胞の平均パーセント。

L N P 組成物	L N P （u g／m L）	平均	S D	E C 5 0
50/10/38.5/1.5(組成 物 1)	5	98.1	1.2	0.77
	2.5	96.1	3.5	
	1.25	92.5	5.6	
	0.63	76.1	5.7	
	0.31	52.6	4.5	
	0.16	30.5	2.3	
	0.08	16.6	1.9	
	0.04	8.0	0.4	
35/15/47.5/2.5(組成 物 23)	5	98.8	0.4	0.19
	2.5	98.7	0.2	
	1.25	97.9	0.7	
	0.63	92.3	2.0	
	0.31	72.7	3.3	
	0.16	46.3	3.7	
	0.08	25.2	3.5	
	0.04	12.9	2.4	

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 3．活性化T細胞を、TRBCを標的とする sgRNA（配列番号 1 1）を含むTRBC LNP組成物で処置した後のCD 3 陰性細胞の平均パーセント。

LNP組成物	LNP (ug / mL)	平均	SD	EC 50
50/10/38.5/1.5(組成物 60)	5	88.8	2.1	0.59
	2.5	87.7	0.9	
	1.25	78.1	2.3	
	0.63	47.4	4.6	
	0.31	24.6	4.9	
	0.16	11.9	2.9	
	0.08	5.0	1.0	
	0.04	2.2	0.4	
35/15/47.5/2.5(組成物 61)	5	89.6	0.5	0.09
	2.5	90.1	0.9	
	1.25	89.5	1.8	
	0.63	87.7	0.6	
	0.31	86.1	1.2	
	0.16	76.5	1.7	
	0.08	52.4	3.7	
	0.04	31.6	0.5	

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 2 4．活性化T細胞を、C I I T Aを標的とする s g R N A（配列番号 1 2）を含むC I I T A L N P組成物で処置した後のC D 3 陰性細胞の平均パーセント。

L N P組成物	L N P（u g／m L）	平均	S D	E C 5 0
50/10/38.5/1.5(組成物 58)	5	94.5	1.2	0.40
	2.5	92.7	1.2	
	1.25	92.6	1.3	
	0.63	79.5	1.2	
	0.31	49.8	5.8	
	0.16	33.9	9.6	
	0.08	30.2	8.5	
	0.04	26.3	10.7	
35/15/47.5/2.5(組成物 62)	5	96.4	0.3	0.12
	2.5	94.3	1.6	
	1.25	94.1	0.6	
	0.63	94.1	3.8	
	0.31	91.3	2.4	
	0.16	74.7	1.2	
	0.08	51.6	2.5	
	0.04	38.0	6.7	

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 2 5. 活性化 T 細胞を H L A - A を標的とする s g R N A (配列番号 1 3) を含む H L A - A L N P 組成物で処置した後の C D 3 陰性細胞の平均パーセント。

L N P 組成物	L N P (u g / m L)	平均	S D	E C 5 0
50/10/38.5/1.5(組 成物 59)	5	92.4	4.0	0.55
	2.5	92.2	4.3	
	1.25	82.0	9.7	
	0.63	52.3	18.0	
	0.31	25.1	15.0	
	0.16	9.5	5.3	
	0.08	3.9	2.7	
	0.04	1.5	1.3	
35/15/47.5/2.5(組 成物 63)	5	95.5	3.3	0.15
	2.5	95.0	3.1	
	1.25	93.7	4.6	
	0.63	92.7	6.5	
	0.31	81.5	10.4	
	0.16	54.8	13.8	
	0.08	26.9	13.3	
	0.04	12.9	7.6	

【0 2 8 4】

実施例 9：複数の遺伝子破壊及び挿入のための複数の L N P 組成物の順次送達

T 細胞を一連の遺伝子破壊及び挿入により操作した。健康ドナー細胞を 4 つの L N P 組成物で順次処置し、各 L N P 組成物を、C a s 9 (配列番号 4) をコードする m R N A、及び T R A C (配列番号 1 0)、T R B C (配列番号 1 1)、C I I T A (配列番号 1 2)、または H L A - A (配列番号 1 3) のいずれかを標的とする s g R N A とともに共製剤化した。L N P を、表 2 6 に示されている群に従って、化合物 6、D S P C、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を 3 5 : 1 5 : 4 7 . 5 : 2 . 5 のモル比で (第 1 群及び第 2 群)、または化合物 6、D S P C、コレステロール、及び P E G 2 k - D M G を 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 のモル比で (第 3 群)、それぞれ指示用量で製剤化した。

【0 2 8 5】

第 1 群及び第 2 群は L N P 濃度が異なる。脂質核酸集合体を、脂質アミン : R N A リン酸 (N : P) のモル比を約 6 で、g R N A : m R N A の重量比を 1 : 2 で製剤化した。A A V を用いて相同組換え修復鑄型を送達することにより、トランスジェニック W T 1 標的化 T C R (配列番号 1 4) を部位特異的に T R A C 切断部位に組み込んだ。L N P の群を毎日調製し、表 2 6 に記載のように T 細胞に順次送達した。

【0 2 8 6】

9. 1 T 細胞の調製

2 例の健康ドナーの白血球アフェレーシス製品 (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) から、3 つの H L A - A * 0 2 : 0 1 + 血清型からの T 細胞を単離した。E a

sySep ヒト T 細胞単離キット (STEMCELL Technologies; カタログ番号 17951) を製造業者のプロトコルに従って用いて T 細胞を単離し、Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies; カタログ番号 07930) を用いて凍結保存した。T 細胞編集を開始する前日に、細胞を解凍し、T 細胞活性化培地 (TCAM: CTS Optmizer [ThermoFisher; カタログ番号 A3705001] に 2.5% ヒト AB 血清 [Gemini; カタログ番号 100-512]、1X GlutaMAX [ThermoFisher; カタログ番号 35050061]、10mM の HEPES [ThermoFisher; カタログ番号 15630080]、200U/mL の IL-2 [PeproTech; カタログ番号 200-02]、5ng/mL の IL-7 [PeproTech; カタログ番号 200-07]、及び 5ng/mL の IL-15 [PeproTech; カタログ番号 200-15] を補充) 中で一晩静置した。

10

【0287】

9.2 LNP 処置及び T 細胞の増殖

以下のように、LNP を毎日解凍して ApoE 含有培地に希釈し、T 細胞に送達した。

【表 27】

表 26: T 細胞操作における編集の順序

群	1 日目の編集 (LNP 組成物及び最終濃度)	2 日目の編集 (LNP 組成物及び最終濃度)	3 日目の編集 (LNP 組成物及び最終濃度)	4 日目の編集 (LNP 組成物及び最終濃度)
第 1 群	組成物 62 (0.65 μ g/mL)	組成物 63 (0.65 μ g/mL)	組成物 23 (0.65 μ g/mL) + WT 1 (配列番号 14) AAV + DNA PKI 化合物 4	組成物 61 (0.65 μ g/mL)
第 2 群	組成物 62 (2.5 μ g/mL)	組成物 63 (2.5 μ g/mL)	組成物 23 (2.5 μ g/mL) + WT 1 (配列番号 14) AAV + DNA PKI 化合物 4	組成物 61 (2.5 μ g/mL)
第 3 群	組成物 58 (2.5 μ g/mL)	組成物 59 (2.5 μ g/mL)	組成物 1 (2.5 μ g/mL) + WT 1 (配列番号 14) AAV + DNA PKI 化合物 4	組成物 60 (2.5 μ g/mL)
未編集	なし	なし	なし	なし

20

30

40

50

【0288】

1日目に、表26に示されているLNPを、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のrhApoE3 (Peprrotech; 350-02)を含むTCAM中でインキュベートした。一方、T細胞を採取し、洗浄し、T細胞TransActヒト試薬 (Miltenyi; 130-111-160)を1:50で希釈したTCAMに、 2×10^6 細胞/mLの密度で再浮遊させた。T細胞及びLNP-ApoE培地を1:1比で混合し、T細胞を培養フラスコ内で一晚プレーティングした。

【0289】

2日目に、表26に示すLNPを、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ のrhApoE3 (Peprrotech; 350-02)を含むTCAM中で $25\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でインキュベートした。次いでLNP-ApoE溶液を適切な培養液に10:1比で加えた。

【0290】

3日目に、表26に示すTRAC-LNPを、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のrhApoE3 (Peprrotech; 350-02)を含むTCAM中でインキュベートした。一方、T細胞を採取し、洗浄し、TCAMに 1×10^6 細胞/mLの密度で再浮遊させた。T細胞及びLNP-ApoE培地を1:1比で混合し、T細胞を培養フラスコ内でプレーティングした。次いでWT1 (配列番号14)AAVを 3×10^5 GC/細胞のMOIで各群に加えた。DNAPKI化合物4を $0.25\mu\text{M}$ の濃度で各群に加えた。

【0291】

4日目に、表26に示すLNPを、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のrhApoE3 (Peprrotech; 350-02)を含むTCAM中でインキュベートした。一方、T細胞を採取し、洗浄し、TCAMに 1×10^6 細胞/mLの密度で再浮遊させた。T細胞及びLNP-ApoE培地を1:1比で混合し、T細胞を培養フラスコ内でプレーティングした。

【0292】

5~13日目に、T細胞をT細胞拡大培地 (TCM:CTS Optmizer [ThermoFisher; カタログ番号A3705001]に5%ヒトAB血清 [Gemini; カタログ番号100-512]、 $1 \times \text{GlutaMAX}$ [ThermoFisher; カタログ番号35050061]、 10mM のHEPES [ThermoFisher; カタログ番号15630080]、 $200\text{U}/\text{mL}$ のIL-2 [Peprrotech; カタログ番号200-02]、 $5\text{ng}/\text{mL}$ のIL-7 [Peprrotech; カタログ番号200-07]、 $5\text{ng}/\text{mL}$ のIL-15 [Peprrotech; カタログ番号200-15]を補充)が入った24ウェルGREXプレート (Wilson Wolf; 80192)に移し、製造業者のプロトコルに従って増殖させた。簡潔に説明すると、T細胞を2~3日ごとに培地交換しながら8日間増殖させた。

【0293】

9.3 フローサイトメトリー及びNGSによるT細胞編集の定量化

増殖後、編集したT細胞をフローサイトメトリーによりアッセイして、HLA-A*02:01ノックアウト、CIITAノックアウトによるHLA-DR-DP-DQノックダウン、WT1-TCR挿入 (CD3+Vb8+)、及び残存内在性 (CD3+Vb8-)を発現する細胞のパーセンテージを求めた。T細胞を、以下の分子を標的とする抗体カクテルとインキュベートした: Vb8 (Biolegend; カタログ番号348104)、HLA-A2 (Biolegend; カタログ番号343320)、HLA-DRDPDQ (Biolegend; カタログ番号361712)、CD4 (Biolegend; カタログ番号300538)、CD8 (Biolegend; カタログ番号301046)、CD3 (Biolegend; カタログ番号317336)、CCR7 (Biolegend; カタログ番号353214)、CD62L (Biolegend; カタログ番号304820)、CD45RA (Biolegend; カタログ番号304134)、CD45RO (Biolegend; カタログ番号304230)、CD56 (Biolegend; カタログ番号318328)、及びViakrome (Beckman Coulter; カタログ番号C36628)。続いて細胞を洗浄し、Cytotoflex

10

20

30

40

50

L X 装置 (Beckman Coulter) で処理し、FlowJo ソフトウェアパッケージを用いて解析した。T 細胞をサイズ及び CD 4 / CD 8 の状態でゲーティングしてから編集率及び挿入率を求めた。

【0294】

CIITA、HLA-A、TRAC、及び TRBC 座位を標的とする Cas9 mRNA 及び sgRNA の送達に使用する LNP 組成物を、実施例 1 及び 8 に記載のように解析した。

【0295】

順次 T 細胞操作の後に関連する細胞表面タンパク質を発現する細胞のパーセンテージを、CD 8 + T 細胞について表 27 及び図 7A に示す。全ての意図された編集を有する T 細胞のパーセンテージ (すなわち、WT1-TCR の挿入と HLA-A 及び CIITA のノックアウトとの組合せ、または CD 3 + Vb 8 + HLA-A-HLA-DRDPDQ-%) を、各群について図 7B に示す。全ての群からの編集した試料で高レベルの HLA-A 及び CIITA のノックアウトならびに WT1-TCR の挿入が観察され、75% 超の完全に編集した CD 8 + T 細胞が得られた。第 1 群に使用した低投与量 ($0.65 \mu\text{g}/\text{mL}$) は、より高い LNP 用量 ($2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) の第 2 群製剤及び第 3 群製剤と同様に、全ての標的にわたり T 細胞の編集に同様の効力を示した。

【表 28】

表 27 CD 8 + T 細胞における編集率

群	第 1 群			第 2 群			第 3 群			未編集		
編集	平均 (%)	SD	N	平均 (%)	SD	N	平均 (%)	SD	N	平均 (%)	SD	N
完全編集(Vb8+、CD3+、HLA-DRDPDQ-、HLA-A*02:01-)	79.6	4.7	3	80.5	4.2	3	76.8	1.9	3	0.2	0.2	3
HLA-A KO(HLA-A*02:01-)	97.1	3.6	3	96.4	4.7	3	96.4	4.4	3	3.6	3.8	3
CIITA KO(HLA-DRDPDQ-)	99.3	0.4	3	97.7	2.1	3	98.7	0.9	3	該当なし	該当なし	3
TCR KO(CD3-)	99.3	0.1	3	99.7	0.1	3	98.7	1.1	3	1.8	1.4	3
WT1 TCR 挿入(Vb8+)	82.6	2.0	3	85.6	0.8	3	81.1	2.1	3	0.2	0.2	3

【0296】

実施例 10. NK 細胞における編集

10.1. LNP 組成物

LNP を実施例 1 に記載のように製剤化した。約 6 の脂質アミン：RNA リン酸 (N：P) のモル比、組成物 64 については 1：2 の sgRNA：Cas9 mRNA 重量比 (カーゴ比)、または組成物 65 については 1：1 のカーゴ重量比、及び化合物 6 を用いて LNP を製剤化した。LNP は、Cas9 (配列番号 4) をコードする mRNA 及びヒト AAVS1 遺伝子を標的とする sgRNA (配列番号 15) を送達した。

【0297】

LNP中の脂質構成要素を、荷電エアロゾル検出器（CAD）と結合したHPLCにより定量的に解析した。逆相HPLCにより、4つの脂質構成要素のクロマトグラフィー分離を達成した。HPLC脂質解析により、表28に示されているように、以下の実施例に記載したLNP組成物の各構成要素の実際のモル%（mol-%）脂質レベルが得られた。

【表29】

表28. LNP組成物の脂質解析結果

LNP 組成物	モル比(名目値)	実測または測定 mol%			
		脂質	DSPC	コレステロール	PEG
組成物 64	50/10/38.5/1.5	47.2	10.2	41.1	1.6
組成物 65	35/15/47.5/2.5	35.0	14.4	48.2	2.4

10

【0298】

LNP組成物のZ平均及び数平均粒子サイズ、多分散性（PDI）、総RNA含量、ならびにRNAのカプセル化効率を実施例1に記載の方法に従って解析した。結果を表29に示す。

【表30】

20

表29. LNP組成物の解析

LNP 組成物	カプセル化 (%)	Z 平均 サイズ (nm)	PDI	数平均 サイズ (nm)	RNA 濃度 (mg/mL)	N/P 比
組成物 65	99%	70	0.04	61	0.07	6
組成物 64	99%	105	0.01	98	0.07	6

30

【0299】

市販で入手した健康ドナー由来のロイコパックから、EasySep Human NK Cell Isolation Kit（STEMCELL；カタログ番号17955）を製造業者のプロトコルに従って用いてNK細胞を単離した。分離後、NK細胞を必要となるまで凍結保存した。細胞解凍後、NK細胞をCTS（商標）Optmizer（商標）T細胞増殖培地（Gibco；カタログ番号A10221-01）（5%ヒトAB血清（GemCell；カタログ番号100-512）、500U/mLのIL-2（PeproTech；カタログ番号200-02）、5ng/mLのIL-15（PeproTech；カタログ番号200-15）、10mLのGlutamax（Gibco；カタログ番号35050-61）、10mLのHEPES（Gibco；カタログ番号15630-080）、及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン（ThermoFisher；カタログ番号15140-122）を含む）中で一晩静置した。次いで、静置したNK細胞を、41BBL（配列番号16）を発現する照射K562細胞と1：1の比で培養し、膜結合IL21（配列番号17）を、NK活性化のためのフィーダー細胞として上記のCTS（商標）Optmizer（商標）T細胞増殖培地中で3日間使用した。

40

【0300】

活性化から3日後、NK細胞を、AAVS1座位を標的とするCas9（配列番号4）及びsgRNA（配列番号15）をコードするmRNAを送達するLNPで処置した。2.5%ヒトAB血清及び0.25μMのDNAPKI化合物4を含む上記のCTS（商標）Optmizer（商標）T細胞増殖培地において、2.5μg/mLのApoE3（

50

Peprtech ; 350-02) と混合した $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の LNP から開始して 2 倍段階希釈系列を実施することにより、12 ポイントの用量応答曲線を作成した。表 30 に示すように、LNP 中の総 RNA カーゴの最終濃度は 10、5、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、及び $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ (無処置対照) となった。混合 LNP を 1×10^6 細胞/mL の NK 細胞に 1 : 1 比で三重反復で加えた。

【0301】

LNP 処置から 7 日後、ゲノム DNA を細胞から単離し、実施例 1 に記載のように NGS 解析を実施した。

【0302】

指示濃度における LNP 組成物の平均編集パーセント、標準偏差、及び EC50 を表 30 に示し、用量応答曲線を図 8 に示す。

【表 31】

表 30. NK 細胞の編集パーセント

LNP 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	組成物 64			組成物 65		
	平均	SD	EC50	平均	SD	EC50
10	98.4	0.3	1.1	97.1	0.3	0.1
5	98.1	0.2		97.6	0.7	
2.5	94.4	1.5		98.0	0.4	
1.25	58.4	8.6		97.4	0.8	
0.63	20.4	4.3		96.5	0.4	
0.31	5.5	1.2		87.2	1.2	
0.16	2.0	0.6		56.1	3.2	
0.08	0.6	0.1		34.1	1.2	
0.04	0.4	0.3		10.2	0.6	
0.02	0.2	0.1		1.9	0.5	
0.01	0.1	0.1		0.8	0.2	
0.005	0.1	0.0		0.3	0.1	
0	0.2	0.1		0.2	0.1	

【0303】

実施例 11. 単球及びマクロファージの編集

市販で入手したロイコパック (Hemacare) から、MultiMACS (商標) Cell24 Separator Plus 装置 (Miltenyi Biotec 社) 上で Straight From (登録商標) Leukopak (登録商標) CD14 ビーズキットヒト用 (Miltenyi Biotec ; カタログ 130-117-020) を製造業者のプロトコルに従って用いて CD14+ 細胞を単離した。CD14+ 細胞を解凍し、96 ウェル非組織培養プレート (Falcon ; 351172) 上で $10 \text{ ng}/\text{mL}$ の GM-CSF (Stemcell ; 78140.1) を $5 \times 10^5/\text{mL}$ の細胞密度で含む実施例 1 に記載の Optimizer 基本培地中で、50,000 細胞/ウェルで三重反復で培養した。2~3 日ごとに、ウェル当たり Optimizer 培地の 50% を $20 \text{ ng}/\text{mL}$ の新鮮なサイトカイン培地 (GM-CSF (Stemcell ; 78140.1)、2.5% ヒト血清 (HS) Optimizer (Gibco ; A3705001)) と交換した。

【0304】

細胞を、実施例10に記載のように調製したLNPで処置した。LNPを10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のApoE3 (Peprotech 350-02)と37℃で15分間ブレインキュベートした。ブレインキュベートしたLNPを1:1のv/v比で細胞に加え、0~1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終総RNAカーゴ量を得た。

【0305】

インキュベート後、50 μL のLNP濃度を、単球にはCD14+細胞を非組織培養プレート (Falcon; 351172) にプレーティングした同じ日に加え、マクロファージには非組織培養プレート (Falcon; 351172) で5日間インキュベートした後に加えた。単球及びマクロファージプレートを、使用するまで37℃でインキュベートした。

【0306】

LNP処置から6日後、実施例1に記載のようにゲノムDNAを単球から単離し、実施例1に記載のようにNGSを行うためにマクロファージ操作細胞を収集した。

【0307】

指示濃度における各LNP組成物の平均編集パーセント、標準偏差、及びEC50を、単球については表31に、マクロファージについては表32に示す。単球及びマクロファージにおける用量応答曲線をそれぞれ図9A及び9Bに示す。

【表32】

表31. 単球を様々なイオン化可能な脂質を含むLNPで処置してから6日後の平均編集パーセント

LNP 濃度 (ng/mL)	組成物 65			組成物 64		
	平均	SD	EC50	平均	SD	EC50
0	0.1	0	151	0.1	0	1080
4.88	0.2	0.2		0.6	0.4	
9.77	0.3	0.2		0.4	0.2	
19.53	0.7	0.2		0.4	0.1	
39.06	3.9	2.2		1.7	0.1	
78.13	17.3	2.6		5.8	1.7	
156.25	48	1.2		12.1	1.1	
312.5	85.2	1.1		26.6	2	
625	91.6	4.4		54.3	1.1	
1250	94.7	2.7		90.5	0.5	
2500	95.3	0.3		97.2	0.1	
5000	93.9	0.3		98.1	0.2	

10

20

30

40

50

【表 3 3】

表 3 2. マクロファージを様々なイオン化可能な脂質を含む LNP で処置してから 6 日後の平均編集パーセント

LNP 濃度 (ng/mL)	組成物 65			組成物 64		
	平均	SD	EC50	平均	SD	EC50
0	3.9	3.6	224.8	1.6	2.1	231.4
4.88	0.9	0.2		1.4	0.6	
9.77	1.3	0.1		2.3	0.3	
19.53	3.4	0.4		4.5	0.8	
39.06	8.8	0.2		13.4	1.4	
78.13	17.1	2.3		21.5	0.3	
156.25	33.9	1.6		42.5	2.6	
312.5	62.7	1.2		63.5	2.8	
625	87.5	1.8		84.9	1.4	
1250	91.5	1.7		96.1	0.3	
2500	85.8	2.2		98.0	1.0	
5000	78.3	2.5		97.8	1.0	

10

20

【0308】

実施例 12. B 細胞の編集

12. 1. B 細胞の分離及び培養ならびに培地調製

B 細胞 (Hemacare) を、Stemspan SFEM 培地 (StemCell Technologies; カタログ番号 09650) に 1% ペニシリン・ストレプトマイシン (ThermoFisher; カタログ番号 15140122)、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CpG ODN 2006 (Invivogen; カタログ番号 tlr1-2006-1)、 $50 \text{ ng}/\text{ml}$ の IL-2 (PeproTech; カタログ番号 200-02)、 $50 \text{ ng}/\text{ml}$ の IL-10 (PeproTech; カタログ番号 200-10)、及び $10 \text{ ng}/\text{ml}$ の IL-15 (PeproTech; カタログ番号 200-15) を補充したもので培養した。また、様々な濃度の 2 つの培地構成要素も培地の補充に使用した: 1. ヒト血清 AB (Gemini Bioproducts; カタログ番号 100-512、ロット番号 H94X00K、2.5% 及び 5%)、ならびに 2. MEGACD40L (Enzo Life Sciences; カタログ番号 ALX-522-110-0000、 $1 \text{ ng}/\text{ml}$ 及び $100 \text{ ng}/\text{ml}$)。B 細胞の調製に使用する B 細胞培養基組成物を表 3 3 に示す。

30

40

50

【表 3 4】

表 3 3. B細胞培地組成物

培地 番号	培地組成	
1	StemSpan SFEM培地+Pen /Strep、IL2、IL10、IL15、 CpG ODN、1ng/ml MEGAC D40L	5%ヒト血清AB含有
2	StemSpan SFEM培地+Pen /Strep、IL2、IL10、IL15、 CpG ODN、1ng/ml MEGAC D40L	2.5%ヒト血清AB含有
3	StemSpan SFEM培地+Pen /Strep、IL2、IL10、IL15、 CpG ODN、100ng/ml MEG ACD40L	5%ヒト血清AB含有

10

20

【0309】

健康ヒトドナー由来のロイコパック (Hemacare) から、MultiMACS Cell24 Separator Plus装置上でStraightFromロイコパックCD19マイクロビーズキット (Miltenyi、130-117-021) を製造者の指示に従って用いて、B細胞をCD19ポジティブセレクションにより単離した。単離したCD19+B細胞は、必要になるまで液体窒素で凍結保存した。

30

【0310】

使用の準備ができたなら、B細胞を解凍し、同じ日にB細胞培地1で活性化した。

【0311】

B細胞の解凍及び活性化から2日後、B細胞を培地2中で培養し、Cas9 mRNA (配列番号4) 及びAAVS1を標的とするgRNA (配列番号15) を送達するLNPで処置した。各LNPについていくつかの濃度を試験して、20μg/mlの総RNAカーゴ (最終用量の4倍) を開始点に1:2の段階希釈を設定することにより、8ポイントの用量応答曲線を作成した。続いてB細胞培地2中4μg/mlのAPOE3 (最終用量の4倍) を加えてから、B細胞を1:1比v/vでLNP-APOE3混合物に加え、その結果、表34に示すように、総RNAカーゴの最終用量は5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078μg/mlとなった。細胞を、実施例10に記載のように調製及び解析したLNPで処置するか、または対照としてLNPで処置しなかった。

40

【0312】

LNP処置から3日後、細胞を洗浄し、B細胞培地3に再浮遊させた。LNP処置から7日後、ゲノムDNAを細胞から単離し、実施例1に記載のようにNGS解析を実施した。

【0313】

指示濃度におけるLNP組成物の平均編集パーセント及び標準偏差を表34に示し、用量応答曲線を図10に示す。「無処置B細胞」はLNP組成物で処置しなかった。

50

【表 3 5】

表 3 4. B細胞の編集パーセント

脂質組成物	L N P 濃度 (n g / m L)	平均	S D
無処置 B 細胞	0	0.1	0
組成物 6 5	5	50.3	5.52
	2.5	53.75	1.34
	1.25	60.9	0.14
	0.625	61.2	0.14
	0.313	30.85	0.50
	0.156	11.05	1.06
	0.078	3.05	0.35
無処置 B 細胞	0	0.1	0
組成物 6 4	5	58.1	9.19
	2.5	40.75	3.32
	1.25	5.75	8.13
	0.625	0.5	0.71
	0.313	0.45	0.21
	0.156	0.2	0.14
	0.078	0.15	0.07

【0 3 1 4】

以下の表及び全体において、「m A」、「m C」、「m U」、または「m G」という用語は、2' - O - M e で修飾されたヌクレオチドを示すために使用される。

【0 3 1 5】

以下の表において、「*」は P S 修飾を示すために使用される。本出願において、A *、C *、U *、または G * という用語は、P S 結合で次の（例えば、3'）ヌクレオチドに結合しているヌクレオチドを示すために使用され得る。

【0 3 1 6】

（Tを含む）D N A 配列が R N A に関して言及される場合、T は U（文脈に応じて修飾されている場合も修飾されていない場合もある）に置き換えられるべきであり、逆もまた同様であることを理解されたい。

【0 3 1 7】

以下の表では、アミノ酸一文字コードを使用してペプチド配列を示す。

【表 3 6 - 1】

表 3 5 . 配列のリスト

説明	配列番号	配列
Sp.Cas9 をコー ドする ORF	配列番号 1	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA AACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACA GACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTT CGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAG AACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAG GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCT TCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTA CCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGG CACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGG AGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTC ATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAA ACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCT GAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCT GATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTT CGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAAC TTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCT GCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTG GCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACA TCCTGAGAGTCAACACAGAAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGA CCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCG GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACG GATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAG AATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGA CGGAACAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGA CCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATC CCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGA GAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAG

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 2】

説明	配列番号	配列
		AGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTAC TACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCAT GGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGA ACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGA GCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCC GAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAA TACTTCACAGTCTACAACGAAGTACAAAGGTCAAGTACG TCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAG AACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAA CAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTC AAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAG TCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGA CCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAC GAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACAC TGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT GAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAG CAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTG AGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGC GGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCG CAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGG ACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGC AGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGT

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 3】

説明	配列番号	配列
		CAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACAC AAGCCGGAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGA ATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGC CAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGC AGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAG AGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCC TGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAA GCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCG AAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGC TGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAA CCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGA CAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAG ACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGA ATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG ACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT CAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCA GTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGG AAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGT CAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAA GGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAC TTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCA GAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAG AAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAG

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 4】

説明	配列番号	配列
		AAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAG ACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATC CTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAG AAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGC CCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCTG AAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAA GAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGA AGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGC CTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCA AGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTG CCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGA AGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGA AATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATC CTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACA ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAA ACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACC GGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTG ATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCG ACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGTCTAG

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 5】

説明	配列番号	配列
Sp.Cas9 を コードす る ORF	配列番号 2	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCA ACTCCGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACAAGGT GCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG CACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCTGCTGTTCG ACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGAC CGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGC TACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGG ACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTG GAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGC AACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA CCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGA CAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAC ATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACC TGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCA GCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCC ATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCG CCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGC CCAGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAAC CTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTC CAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCC AAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCC AGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCCTGGCCGCCAA GAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGG GTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTCCA TGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCT GCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTAC

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 6】

説明	配列番号	配列
		AAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCG GCTACATCGACGGCGGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAA GTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAG GAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGA AGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCACCAGAT CCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAG GACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCG AGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCC CCTGGCCCGGGGCAACTCCCGGTTGCGCTGGATGACCCGG AAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGG TGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGAGCG GATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTG CTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTA CAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCAT GCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCC ATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCG TGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTG CTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTT AACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCA TCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGG ACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTGA GGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC CCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGA TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCT GGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTC ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG ACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATC AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAG CTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCAGAACATCG TGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGG GCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 7】

説明	配列番号	配列
		AGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCA CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGA CCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCG ACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCA AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC ACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGG GGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGC GGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGC CCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAG AACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGA AGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTT CTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCAC GACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCA AGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGA CTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCC GAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCT ACTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCT GGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACC AACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGG TGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTT CTCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAAGTCCGACAAG CTGATCGCCCCGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTAC GGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGT GGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAA GTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGG TCCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCA AGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC TGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAA GCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAAC GAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCT GGCCTCCCCTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGAC AACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACT

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 8】

説明	配列番号	配列
		ACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAA GCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTG TCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGC AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACACCTGACCAACCT GGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATC GACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACG CCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGAC CCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGC TCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
Hibit タグ 付き Cas9 用オープ ンリーデ ィングフ レーム	配列番号 3	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACC AACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAG GUGCCCUCCAAGAAGUUAAGGUGCUGGGCAACACCGAC CGGCACUCCAUAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCUUGCUG UUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAG CGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGG AUCUGCUACCUGCAGGAGAUUCUUCUCCAACGAGAUGGCC AAGGUGGACGACUCCUUCUUCACCGGCUGGAGGAGUCC UUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCC AUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAG AAGUACCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUG GACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUG GCCCUGGCCCACAUGAUAAGUUCGGGGCCACUUCUG AUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGAC AAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUG UUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCC AAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGG CUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAG AACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCUGGGC CUGACCCCCAACUUAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAG GACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGAC GACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUAC GCCGACCUGUUCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCC

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 9】

説明	配列番号	配列
		AUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUC ACCAAGGCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUAC GACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCUG GUGCGGCAGCAGCUGCCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUC UUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGAC GGCGGCGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUAAG CCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUG GUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGG ACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCACCAGAUCACCUG GGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCGGCAGGAGGACUUC UACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAG AUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUG GCCCCGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAG UCCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUG GUGGACAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAUCGAGCGG AUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUG CUGCCCAAGCACUCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUG UACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGC AUGCGGAAGCCCGCCUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAG GCCAUCGUGGACCUGCUGUUAAGACCAACCGGAAGGUG ACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUAAGAAGAUC GAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUUCUCCGGCGUGGAGGAC CGGUUCAACGCCUCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUG AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAG AACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC CUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAG ACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAG

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 0】

説明	配列番号	配列
		CUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCC CGGAAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGC AAGACCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCC AACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCUG ACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCCGGC CAGGGCGACUCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCC GGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUG AAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCA CAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAA CCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCG GAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUC CCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCU GCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGG CCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCG GCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUC CUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGAC CCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCC CUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGC GGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGU UCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCG AGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGG AGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCUGG ACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGC UGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGC UGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCAGUUCUACAAGG UGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCACGACGCCU ACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCUGAUAAGAAGU ACCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACA

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 1】

説明	配列番号	配列
		AGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGC AGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACU CCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACCGAGAUCACCCUGG CCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCA ACGGCGAGACCGGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGG ACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGG UGAACAUUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCU UCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACA AGCUGAUCGCCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGU ACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGC UGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAG CUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUG GAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUCCUG GAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUC AUCAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAAC GGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAG AAGGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAAC UUCUGUACCUGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGC UCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAG CAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUAUCGAGCAGAUC UCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAAC CUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGAC AAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUAUCCACCUG UUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUAAG UACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCC ACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCC AUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCAG CUGGGCGGCGACGGCGGCGGCUCCCCAAGAAGAAGCGG AAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGUCCGGC UGGCGGCUGUUAAGAAGAUCUCCUGA

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 2】

説明	配列番号	配列
Cas9 の配 列番号 1~3 によ りコード されるア ミノ酸配 列	配列番号 4	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLI EGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDDLNDLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR QQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS EETITPWNFEVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKH SLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLF KTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMA RENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLL NAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK HVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQ FYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGD YKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVK KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVVAKEKKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKH YLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ ITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKKRKV*

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 3】

説明	配列番号	配列
Sp Cas9-Hibit 融合体の アミノ酸 配列	配列番号 5	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFHRLVESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLI EGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKD TYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR QQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYFPFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS EETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHK SLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLF KTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL DFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMA RENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNPSEEVVKKMKNYWRQLL NAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK HVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQ FYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGD YKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVK KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSF EKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKH YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ ITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKVSE SATPESVSGWR LF KKIS

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 4】

説明	配列番号	配列
完全 HDRT 鑄 型:GFP T2A イン サート GFP:P008 94	配列番号 6	GAGGGCCGCGGCAGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGG AGAAAtCCCGGCCCCATGgtgAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACG TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGG CGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC ACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGA CCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGC CCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA GTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGAC AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCC ACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA AAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCCTGCTGGA GTTCTGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG CTGTACAAGTAAcctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT CTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA GGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAAT TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGct tctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggtatccccACTAGTCGTGTAC CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCC TATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAAGT AAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAG ACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC CTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTC AACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCC CAGgtaagggcagctttggtgccttcgcaggctgttccttgcttcaggaatggccaggttctgc ccagagctctgtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtggtctcggccttatccattgccacca aaacctcttttactaagaaacagtgagccttggttggcagtcagagaatgacacgggaaaaa agcagatgaagagaagggtggcaggagagggcacgtggcccgagcctcagtcctct

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 5】

説明	配列番号	配列
HDRT 用 GFP イン サート GFP:P008 94	配列番号 7	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGC CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA GTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC TGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTAC GGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGC AGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGG TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAAC AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG GCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACT ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
TCR α 鎖 pINT1066	配列番号 8	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVIN CSSSKALYSVHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHEKISAS FNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYFCGTAWINDYKLSFGAGTT VTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRI LLKLVAGFNLLMTLRLWSS*

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 6】

説明	配列番号	配列
eGFP ORF GFP:P008 94	配列番号 9	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTG CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA GTTTCAGCGTGTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC TGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTAC GGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGC AGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGT CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGG TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAAC AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG GCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA CGGCAGCGTGCACTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACT ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
TRAC を 標的とす る sgRNA	配列番号 10	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
TRBC を 標的とす る sgRNA	配列番号 11	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
CIITA を 標的とす る sgRNA	配列番号 12	mC*mC*mC*CCGGACGGUUCAAGCAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
HLA-A を 標的とす る sgRNA	配列番号 13	mA*mC*mA*GCGACGCCGCGAGCCAGGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 7】

説明	配列番号	配列
ITRを含む HD1 TCR 挿入	配列番号 14	ttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggctgcccagac gcccgggctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaa ctccatcactagggttctctagatcttccaacatacataaacctcccattctgctaattgccagc ctaagtggggagaccactccagattccaagatgtacagtttgcttgctggcctttttcccatgcc tgctttactctgccagagtattgtctggggtttgaagaagatcctattaaataaaagaataagca gtattattaagtagccctgcatttcagggttccttgagtgccaggccaggcctggcctgaacgttc actgaaatcatggcctcttgccaagattgtagcttgctgctgtccctgagtcaccagtcacacg aggagctgggttctaagatgctatttccgtataaagcatgagaccgtgacttgccagccccacag agccccgccctgtccatcactggcatctggactccagcctgggttgggcaagagggaatg agatcatgtcctaacctgatcctcttgcacacagatatccagaacctgacctgcggctccggt gcccgtcagtgaggcagagcgacatcggccacagtcggcagaagtggggggaggggctcg gcaattgaaccgggtgcctagagaagggtggcggggtaactgggaaagtgtctgtactg gtcccgctttttccgaggggtgggggagaacctatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttct tttgcgaacgggttgcggcagaacacaggttaagtccgtgtgtgttcccgcggcctggcc tctttacgggttatggccttgcgtgcctgaattactccacgcccctggctgcagtacgtgattctt gatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgttaaggagccccttc gcctcgtgttgagttgaggcctgcttggcgctggggccgccgctgcgaatctgtgtggcac cttcgcgcctgtctcgtcttgcataagtctctagccattaaaattttgatgacctgctgcgacg cttttttctgcaagatagctctgtaaatgcgggccaagatgtgcacactgggtatttcgggttttggg ggcgcgggcgcgacggggcccgtgcgtcccagcgacatgttcggcgagcgggggcctgc gagcgcgggccaccgagaatcgacgggggtagttcaagctggccggcctgctctggtgcctg gcctcgcggcgcggtatcgccccgcctggcgggcaaggctggcccggctggcaccagttg cgtgagcggaaaagatggcgcttcccggcctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcgg cgctcgggagagcggcggggtgagtcaccacacaaaaggaaaaggcctttccgtcctcagc cgtcgttcatgtgactccacggagtagccggcgccgtccaggcacctcgattagtctcagctt ttggagtacgtcgtctttaggttggggggagggggtttatgcgatggagtttcccacactgagtgg gtggagactgaagtaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaattgccctttttagttt ggatcttgggtcatttcaagcctcagacagtggttcaaaatttttttccatttcaggtgtcgtgatg cggccggccaccatgggatcttgacactgtgttgcgtgtccctgtgcatcctggtggccaagcac acagatgccggcggtgatcagctcctagacacgaagtaccgagatgggccaagaagtgacc ctgcgtgcaagcctatcagcgccacgattacgttctgtgtacagacagaccatgatgagagg cctggaactgctgatctacttcaacaacaacgtgccatcgacgacagcgcatgcccaggat agattcagcgccaagatgccaacgccagcttcagaccctgaagatccagcctagcgagccc agagatagcgccgtgtacttctgcgcagcagaaaagacaggcggtacagcaatcagccccag cactttggagatggcaccggctgagcatcctggaagatctgaagaacgtgttcccacctgaggt ggcctgttctgagccttctgaggccgagatcagccacacagaaaagccacactcgtgtgtctg gccaccggcttctatcccgatcacgtggaactgtcttgggtgggtcaacggcaagagggtgcaca

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 1 8】

説明	配列番号	配列
		gcggcgtcagcaccgatcctcagcctctgaaagagcagcccgtctgaacgacagcagatact gcctgagcagcagactgagagtgtccgccaccttctggcagaaccccagaaaccacttcagatg ccagggtgcagttctacggcctgagcgagaacgatgagtgaccaggatagagccaagcctgt gacacagatcgtgtctccgaagcctggggcagagccgattgtggctttaccagcgagagctac cagcagggcgctgctgtctgccacaatcctgtacgagatcctgctgggcaagccactctgtacgc cgtgctggtgtctgccctggtgtgatggccatggtcaagcggaaggatagcagggcggtcc ggtgccacaacttctccctgctcaagcagggcgagatgtggaagagaaccctggccctatgg aaaccctgctgaagggtgctgagcggcacactgctgtggcagctgacatgggtccgatctcagca gcctgtgcagtctcctcagggcgtgattctgagagaaggcgaggacgccgtgatcaactgcagc agcttaaggccctgtacagcgtgactggtacagacagaagcacggcgaggccccctgtgttc tgatgatcctgctgaaaggcgcgagcagaagggccacgagaagatcagcgccagcttcaac gagaagaagcagcagtcacgctgtacgtgacagccagccagctgagctacagcggcacctac tttggggcaccgctggatcaacgactacaagctgtctttcgagccggcaccacagtgcagct gcgggccaatattcagaaccccgatcctgccgtgtaccagctgagagacagcaagagcagcga caagagcgtgtgcctgttcaccgacttcgacagccagaccaacgtgtccagagcaaggacag cgacgtgtacatcaccgataagactgtgctggacatcgaggagcatggacttcaagagcaacagc gccgtggcctggtccaacaagagcgatttcgctgcgccaacgccttcaacaacagcattatccc cgagagacattcttccaagtctgagagcagctgcgacgtgaagctggtggaaaagagcttc gagacagacaccaacctgaacttcagaacctgagcgtgatcggttcagaatcctgctgtcaa ggtggccggcttcaacctgctgatgacctgagactgtgttcagctaacctCGACTGTG CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGT GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTCTT CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG GTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC AAGGGGGAGGATTGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG GATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgaggcggaagaaccagctggggtctag ggggtatccccactagtcgtgtaccagctgagagactctaatccagtgcagctgtctgcta ttcaccgattttgatttcaacaataatgtgtcacaagtaaggattctgatgttatatcacagacaaa actgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgtgtggcctggagcaacaatc tgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttctccccagccca ggtaagggcagcttgggtgccttcgaggtgtttccttgcctcaggaatggcaggttctgccc gagctctggtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtgtctcgcccttatccattgccacaaaa ccctcttttactaagaacagtgagccttgttctggcagtcagagaatgacacgggaaaaaagc agatgaagagaagggtggcaggagagggcacgtggccagcctcagctctagatctaggaacc cctagtgtgaggttggccactcctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaa agcccgggcgtcgggcgaccttgggtcgccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagaga gggagtggccaa

10

20

30

40

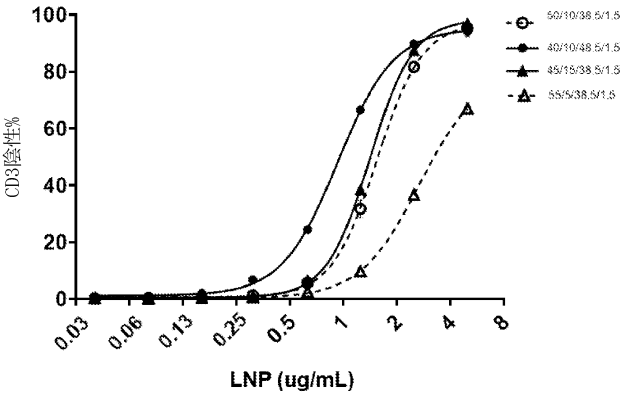
50

【表 3 6 - 1 9】

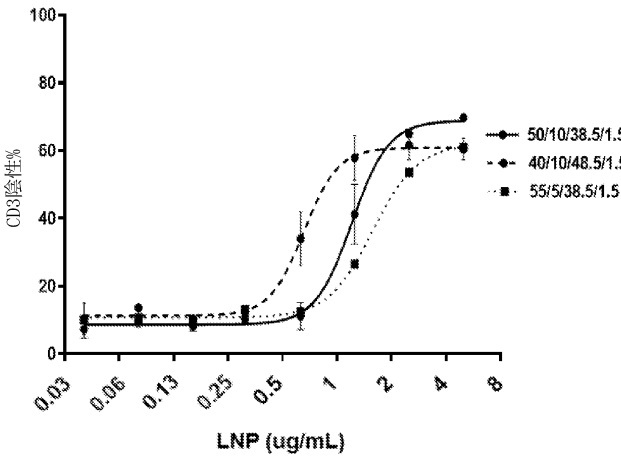
説明	配列番号	配列
AAVS1 を標的とする sgRNA	15	mC*mC*mA*AU AUCAGGAGACUAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
41BBL	16	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPR LREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
mIL21	17	MDWTWILFLVAAATRVHSHKSSSQGQDRHMIRM RQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS IKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSEQKLISEEDLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

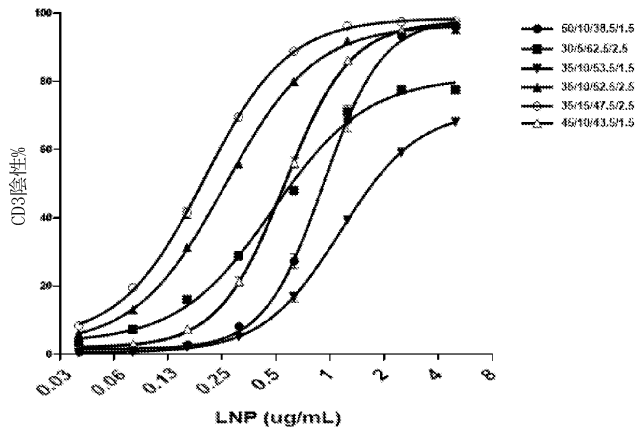
20

30

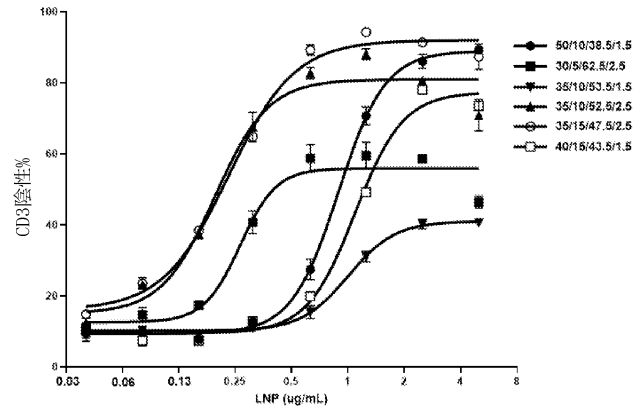
40

50

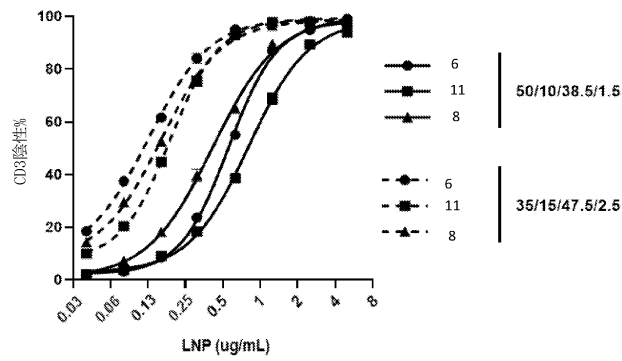
【図 2 A】



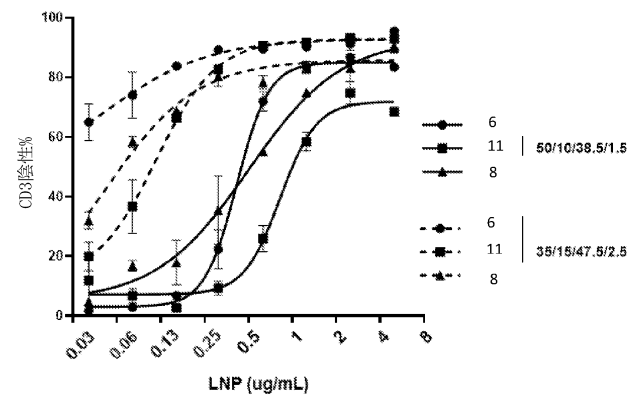
【図 2 B】



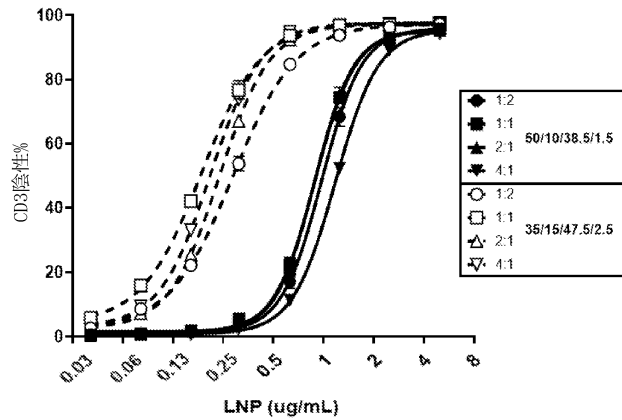
【図 3 A】



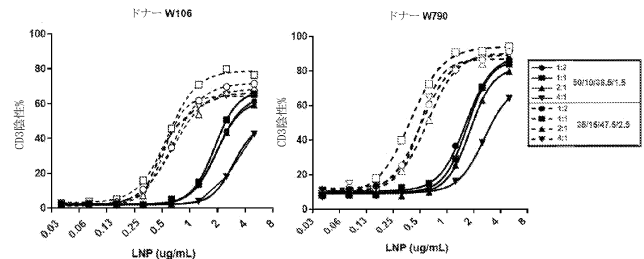
【図 3 B】



【図 4 A】



【図 4 B】



10

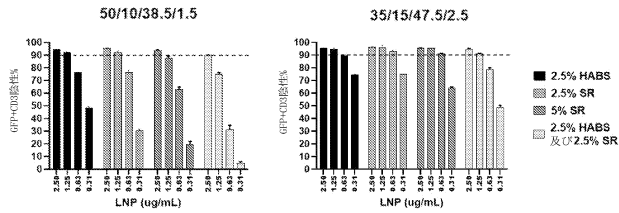
20

30

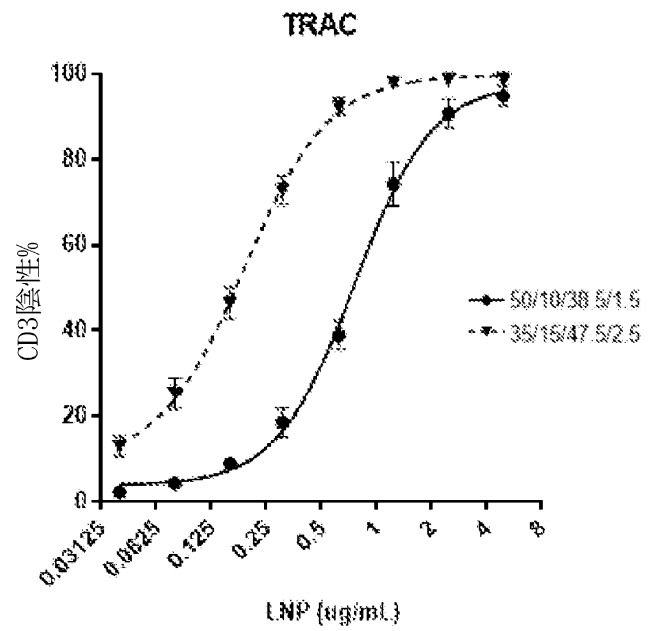
40

50

【図 5】



【図 6 A】



10

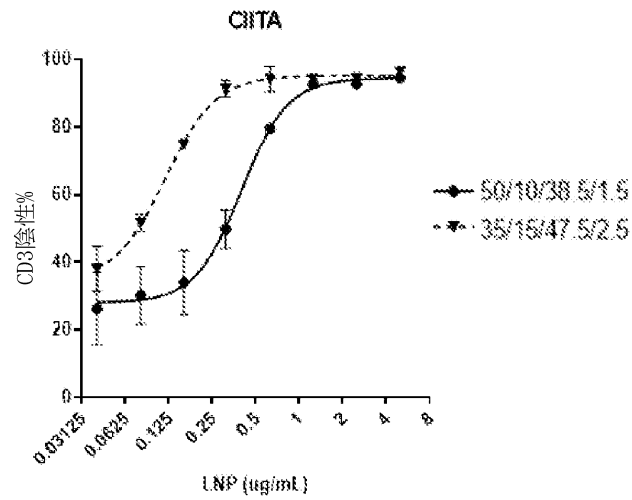
20

30

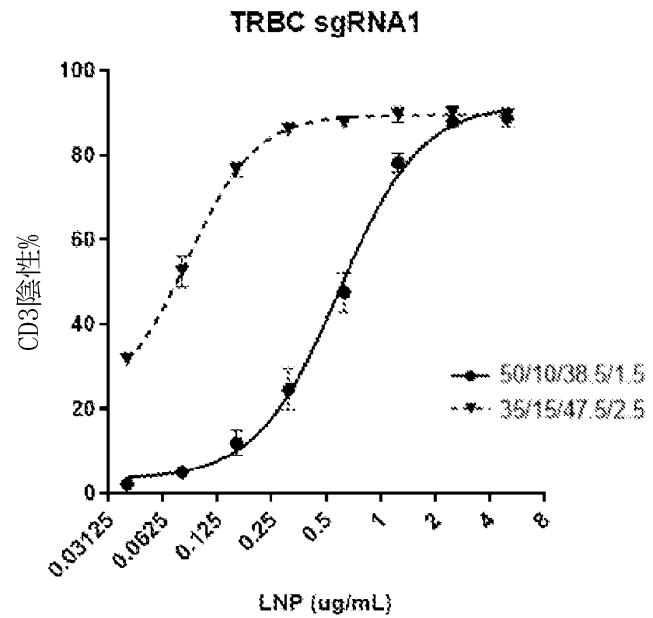
40

50

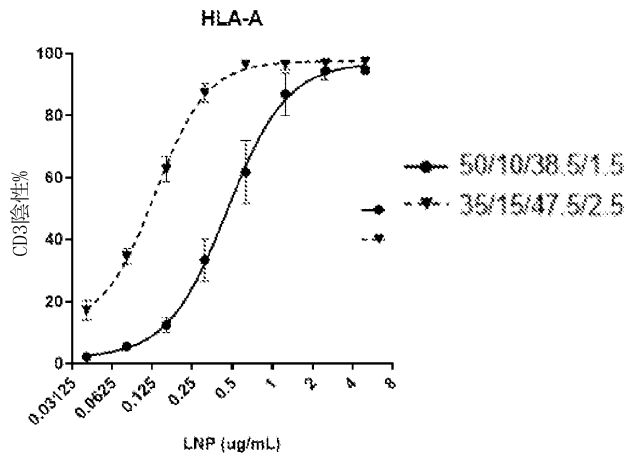
【図 6 B】



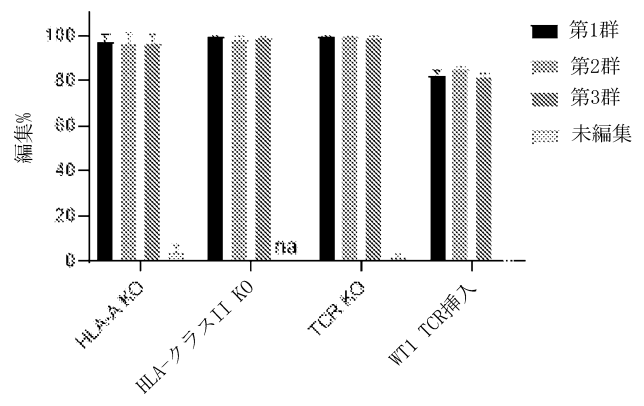
【図 6 C】



【図 6 D】

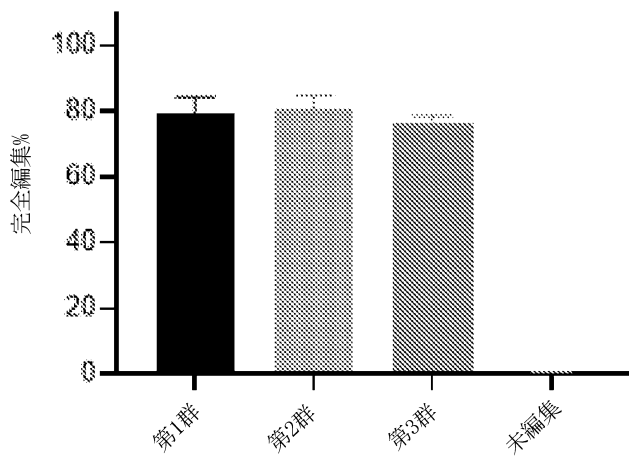


【図 7 A】

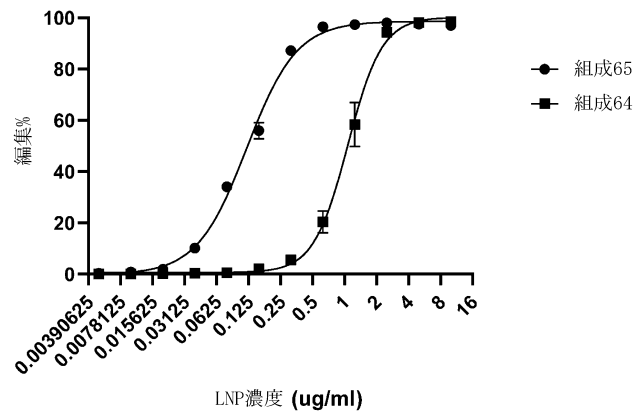


10

【図 7 B】



【図 8】



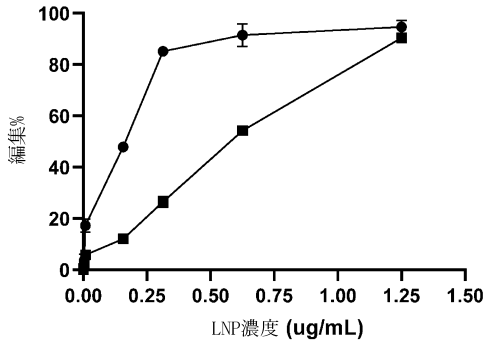
20

30

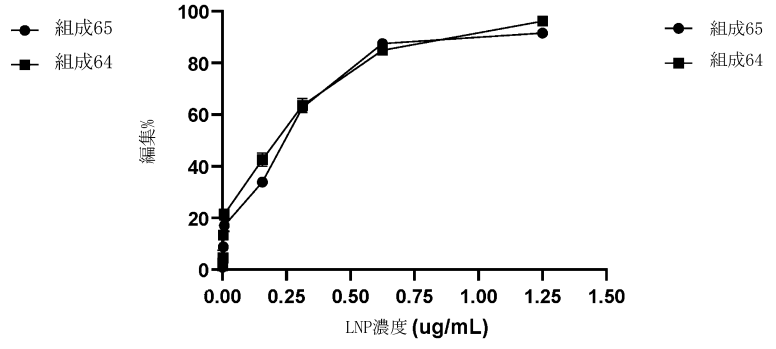
40

50

【図 9 A】

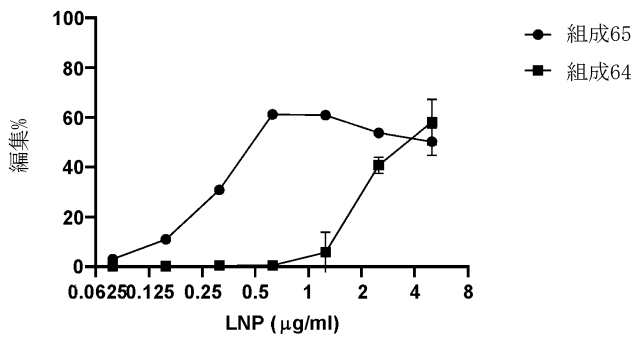


【図 9 B】



10

【図 10】



20

【配列表】

202451565000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/025076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/127 A61K47/28 C12N15/88 C12N15/90 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/198706 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 1 October 2020 (2020-10-01)	1-3, 6-39, 41-189
A	page 3, line 1 - page 29, line 2; claims 65-72; compound Lipid A paragraph [00586] -----	4, 5, 40
X	WO 2021/021634 A1 (GEORGIA TECH RES INST [US]) 4 February 2021 (2021-02-04)	1-3, 6-39, 41-189
A	paragraph [0012] - paragraph [0064] paragraph [0077] -----	4, 5, 40
☐ 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 9 August 2022		Date of mailing of the international search report 24/08/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stoyanov, Borislav

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/025076

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 13ter.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 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/025076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020198706 A1	01-10-2020	AU 2020248337 A1	04-11-2021
		CA 3134544 A1	01-10-2020
		CN 113874004 A	31-12-2021
		CO 2021014562 A2	19-11-2021
		EP 3946285 A1	09-02-2022
		JP 2022525429 A	13-05-2022
		KR 20220004984 A	12-01-2022
		WO 2020198706 A1	01-10-2020

WO 2021021634 A1	04-02-2021	AU 2020323897 A1	24-02-2022
		CA 3145913 A1	04-02-2021
		CN 114502542 A	13-05-2022
		EP 4003967 A1	01-06-2022
		KR 20220040484 A	30-03-2022
		WO 2021021634 A1	04-02-2021

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/10 (2017.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
C 0 7 C 211/03 (2006.01)	C 0 7 C 211/03	
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

(32)優先日 令和3年11月1日(2021.11.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/254,948

(32)優先日 令和3年10月12日(2021.10.12)

(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,IT,JM,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

セッツ州，ケンブリッジ，エリー ストリート 40，インテリア セラピューティクス，インコーポレーテッド

(72)発明者 プロデウス，アーロン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州，ケンブリッジ，エリー ストリート 40，インテリア セラピューティクス，インコーポレーテッド

(72)発明者 マエタニ，マイカ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州，ケンブリッジ，エリー ストリート 40，インテリア セラピューティクス，インコーポレーテッド

(72)発明者 パーマー，ルビナ，ギアレ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州，ケンブリッジ，エリー ストリート 40，インテリア セラピューティクス，インコーポレーテッド

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA44

4C076 AA31 CC26 DD49 DD60 DD63 DD70 EE23

4C084 AA13 MA41 NA10 NA14 ZB211

4C087 AA01 AA02 BB37 BB44 BB64

4H006 AA03 AB20