

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-535226

(P2021-535226A)

(43) 公表日 令和3年12月16日 (2021. 12. 16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/69 (2017. 01)	A 6 1 K 47/69 Z N A	4 C O 7 6
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/18 (2006. 01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/24 (2006. 01)	A 6 1 K 47/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 124 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-536679 (P2021-536679)	(71) 出願人	508152917
(86) (22) 出願日	令和1年9月4日 (2019. 9. 4)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ
(85) 翻訳文提出日	令和3年4月30日 (2021. 4. 30)		ザ ユニバーシティー オブ テキサス
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/049552		システム
(87) 国際公開番号	W02020/051220		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス,
(87) 国際公開日	令和2年3月12日 (2020. 3. 12)		オースティン, ウェスト 7 番 スト
(31) 優先権主張番号	62/726, 770		リート 2 1 0
(32) 優先日	平成30年9月4日 (2018. 9. 4)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 核酸を臓器特異的送達するための組成物および方法

(57) 【要約】

本開示は、特定の臓器への核酸組成物の優先的な標的化または送達を示した組成物を提供する。いくつかの態様において、前記組成物は、核酸を送達するのに使用され得る、ステロイドまたはステロール、カチオン性イオン化可能脂質、リン脂質、PEG脂質、および永久カチオン性脂質を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(A) 治療剤と、

(B)

(1) 選択的臓器標的化化合物；

(2) カチオン性イオン化可能脂質；および

(3) リン脂質

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む、組成物であって、核酸を、肺、心臓、脳、脾臓、リンパ節、骨髄、骨、骨格筋、胃、小腸、大腸、腎臓、膀胱、乳房、肝臓、精巣、卵巣、子宮、脾臓、胸腺、脳幹、小脳、脊髄、眼、耳、舌、または皮膚より選択される標的臓器に優先的に送達する、前記組成物。

10

【請求項 2】

標的臓器が、肺、リンパ節、または脾臓である、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

選択的臓器標的化化合物が永久カチオン性脂質である、請求項1または2記載の組成物。

【請求項 4】

永久カチオン性脂質が、約5%～約20%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項3記載の組成物。

【請求項 5】

永久カチオン性脂質が、約20%～約65%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項1～4のいずれか一項記載の組成物。

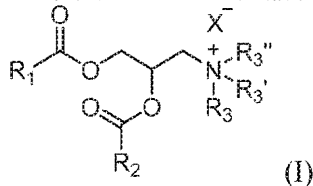
20

【請求項 6】

永久カチオン性脂質が四級アンモニウムイオンを含む、請求項1～5のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 7】

永久カチオン性脂質が、



30

としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 が各々独立して、アルキル ($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 、 R_3' 、および R_3'' が各々独立して、アルキル ($C \leq 6$) または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；

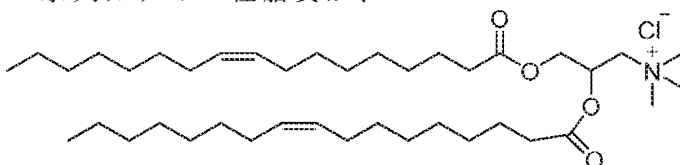
 X^- が一価アニオンである、

請求項4～6のいずれか一項記載の組成物。

40

【請求項 8】

永久カチオン性脂質が、

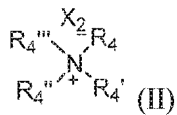


としてさらに定義される、請求項7記載の組成物。

【請求項 9】

永久カチオン性脂質が、

50



としてさらに定義され、

式中、

R_4 および R_4' が各々独立して、アルキル ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{24}$)、アルケニル ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_4'' が、アルキル ($\text{C} \leq 24$)、アルケニル ($\text{C} \leq 24$)、またはいずれかの基の置換型であり；

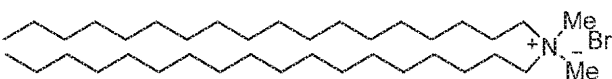
R_4''' が、アルキル ($\text{C}_1 \sim \text{C}_8$)、アルケニル ($\text{C}_2 \sim \text{C}_8$)、またはいずれかの基の置換型であり；かつ

X_2 が一価アニオンである、

請求項4～6のいずれか一項記載の組成物。

【請求項10】

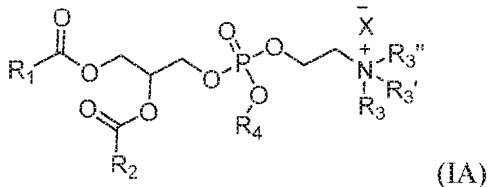
永久カチオン性脂質が、



としてさらに定義される、請求項9記載の組成物。

【請求項11】

永久カチオン性脂質が、



(IA)

としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 が各々独立して、アルキル ($\text{C}_8 \sim \text{C}_{24}$)、アルケニル ($\text{C}_8 \sim \text{C}_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 、 R_3' 、および R_3'' が各々独立して、アルキル ($\text{C} \leq 6$) または置換アルキル ($\text{C} \leq 6$) であり；

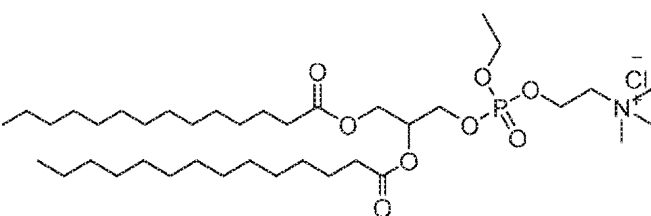
R_4 が、アルキル ($\text{C} \leq 6$) または置換アルキル ($\text{C} \leq 6$) であり；かつ

X^- が一価アニオンである、

請求項4～6のいずれか一項記載の組成物。

【請求項12】

永久カチオン性脂質が、



としてさらに定義される、請求項11記載の組成物。

【請求項13】

選択的臓器標的化合物が永久アニオン性脂質である、請求項1または2記載の組成物。

【請求項14】

永久アニオン性脂質が、約5%～約50%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項13記載の組成物。

【請求項15】

永久アニオン性脂質がリン酸基を含む、請求項13または14記載の組成物。

20

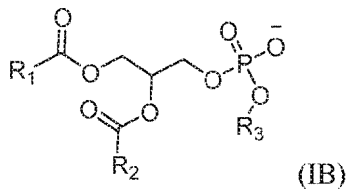
30

40

50

【請求項 16】

永久アニオン性脂質が、



としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 が各々独立して、アルキル ($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

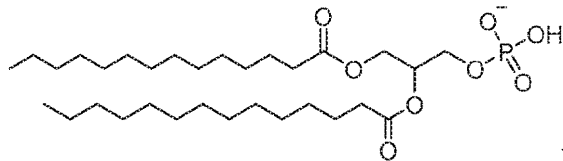
R_3 が、水素、アルキル ($C \leq 6$)、または置換アルキル ($C \leq 6$)、または $-Y_1-R_4$ であり、式中、

Y_1 が、アルカンジイル ($C \leq 6$) または置換アルカンジイル ($C \leq 6$) であり；かつ

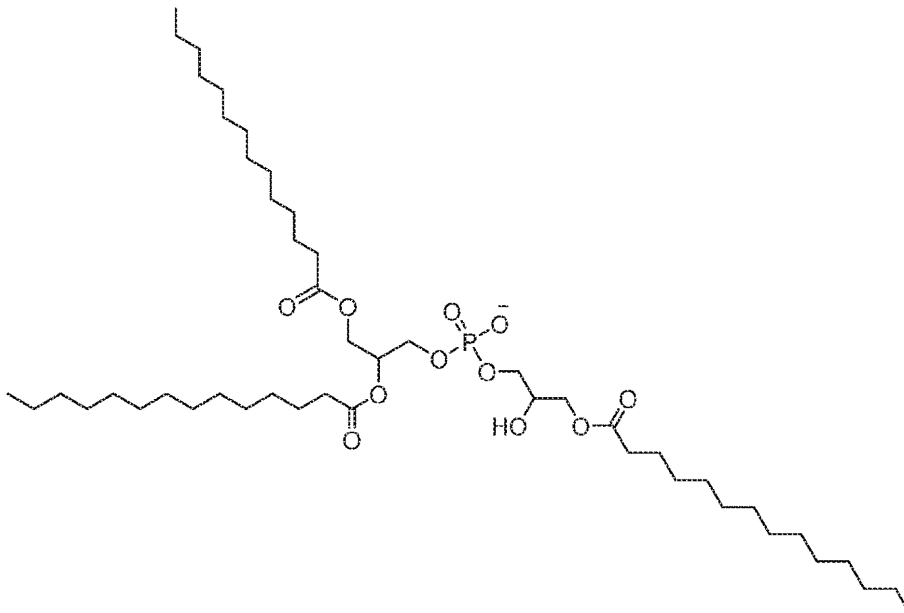
R_4 が、アシルオキシ ($C \leq 8 \sim 24$) または置換アシルオキシ ($C \leq 8 \sim 24$) である、請求項13～15のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 17】

永久アニオン性脂質が、



または



としてさらに定義される、請求項16記載の組成物。

【請求項 18】

選択的臓器標的化合物が、 $C_6 \sim C_{24}$ ジアシルホスホチジルコリン (diacyl phosphatidylcholine) である、請求項1または2記載の組成物。

【請求項 19】

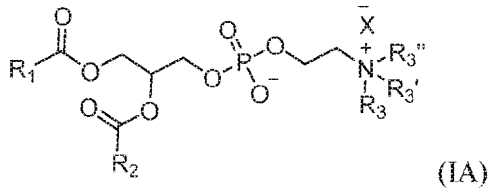
ジアシルホスホチジルコリンが、約5%～約50%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項18記載の組成物。

【請求項 20】

選択的臓器標的化合物が、少なくとも2つの脂肪酸鎖、四級アミン、およびアニオン性リン酸基を含む、請求項18または19記載の組成物。

【請求項 21】

ジアシルホスホチジルコリンが、



としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 が各々独立して、アルキル ($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

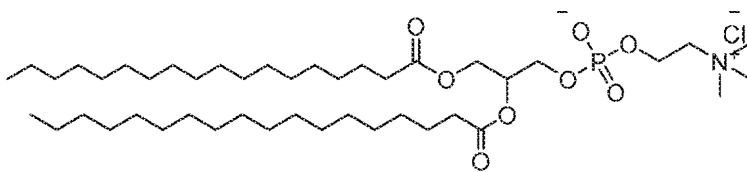
R_3 、 R_3' 、および R_3'' が各々独立して、アルキル ($C \leq 6$) または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；かつ

X^- が一価アニオンである、

請求項18～20のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 2 2】

ジアシルホスホチジルコリンが、



としてさらに定義される、請求項22記載の組成物。

【請求項 2 3】

カチオン性イオン化可能脂質が、約5%～約30%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項1～22のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 2 4】

カチオン性イオン化可能脂質が、約15%～約30%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項1～22のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 2 5】

カチオン性イオン化可能脂質が、生理学的pHで正に荷電するアンモニウム基を含み、かつ少なくとも2つの疎水基を含有する、請求項1～24のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 2 6】

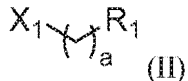
カチオン性イオン化可能脂質が、下記式：

コア-繰り返し単位-末端基(I)

によってさらに定義される dendrimer、またはその薬学的に許容される塩であって、

1つもしくは複数の水素原子をコアから除去して該原子を繰り返し単位で置換することによって、コアが繰り返し単位に連結され、かつ

コアが、下記式：



を有し、

式中、

X_1 が、アミノもしくはアルキルアミノ ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、ヘテロシクロアルキル ($C \leq 12$)、ヘテロアリール ($C \leq 12$)、またはその置換型であり；

R_1 が、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；かつ

a が1、2、3、4、5、または6であるか；

あるいは

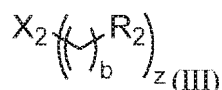
コアが、下記式：

10

20

30

40



を有し、
式中、

X_2 が $N(R_5)_v$ であり;

R₅が、水素、アルキル(C₁~18)、または置換アルキル(C₁~18)であり;

yおよびzの和が3であるという条件で、yが、0、1、または2であり;

R₂が、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ (C ≤ 12)

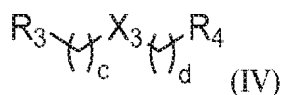
、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり;

b が、1、2、3、4、5、または6であり；かつ

zおよびvの和が3であるという条件で、zが、1、2、3であるか：

あるいは

コアが、下記式:



を有し、
式中、

X_3 が $-NR_6-$ であり、

式中、

R₆が、水素、アルキル(C₁ ≤ 8)、もしくは置換アルキル(C₁ ≤ 8)、-O-、もしくはアルキルアミノジイル(C₁ ≤ 8)、アルコキシジイル(C₁ ≤ 8)、アレーンジイル(C₁ ≤ 8)、ヘテロアレーンジイル(C₁ ≤ 8)、ヘテロシクロアルカンジイル(C₁ ≤ 8)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

R₃およびR₄が各々独立して、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ (C ≤ 12)、ジアルキルアミノ (C ≤ 12)、もしくはこれらの基のいずれかの置換型; または式: -N(R_f)_f(CH₂CH₂N)_e(R_c)R_dの基であり;

式中、

eおよびfの和が3であるという条件で、eおよびfが各々独立して、1、2、または3で
あり；

R_c 、 R_d 、および R_f が各々独立して、水素、アルキル($C \leq 6$)、または置換アルキル($C \leq 6$)であり；

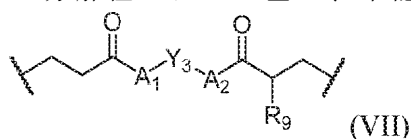
cおよびdが各々独立して、1、2、3、4、5、または6であるか；

あるいは

コアが、アルキルアミン ($C \leq 18$)、ジアルキルアミン ($C \leq 36$)、ヘテロシクロアルカン ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

繰り返し単位が、分解性ジアシルおよびリンカーを含み;

分解性ジアシル基が、下記式：



を有し

式中、

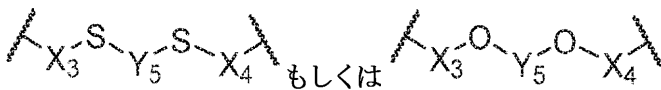
A₁ および A₂ が各々独立して、-O- または -NR_a- であり、

式中、

R_aが、水素、アルキル(C₁~6)、または置換アルキル(C₁~6)であり；

Y₃が、アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)

、もしくはこれらの基のいずれかの置換型;または式:



の基であり；

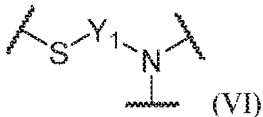
式中、

X_3 および X_4 が、アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

Y_5 が、共有結合、アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；かつ

R_9 が、アルキル ($C \leq 8$) または置換アルキル ($C \leq 8$) であり；

リンカー基が、下記式：



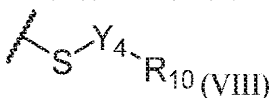
を有し、

式中、

Y_1 が、アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；かつ

繰り返し単位が、リンカー基を含む場合、 n が 1 より大きいなら、リンカー基が、リンカー基の窒素原子および硫黄原子の両方に結合した独立した分解性ジアシル基を含み、繰り返し単位中の最初の基が、分解性ジアシル基であり、各リンカー基について、隣の繰り返し単位が、リンカー基の窒素原子に結合した 2 つの分解性ジアシル基を含み； n が、繰り返し単位中に存在するリンカー基の数であり；かつ

末端基が、下記式：



を有し、

式中、

Y_4 が、アルカンジイル ($C \leq 18$)、またはアルカンジイル ($C \leq 18$) 上の水素原子の 1 つもしくは複数が -OH、-F、-Cl、-Br、-I、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-SCH₃、もしくは -OC(O)CH₃ で置換されているアルカンジイル ($C \leq 18$) であり；

R_{10} が、水素、カルボキシ、ヒドロキシ、またはアリール ($C \leq 12$)、アルキルアミノ ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、N-ヘテロシクロアルキル ($C \leq 12$)、-C(O)N(R₁₁)-アルカンジイル ($C \leq 6$)-ヘテロシクロアルキル ($C \leq 12$)、-C(O)-アルキルアミノ ($C \leq 12$)、-C(O)-ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、-C(O)-N-ヘテロシクロアルキル ($C \leq 12$) であり、

式中、

R_{11} が、水素、アルキル ($C \leq 6$)、または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；

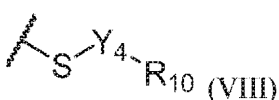
鎖中の最後の分解性ジアシルが、末端基に結合されており；

n が、0、1、2、3、4、5、または 6 である、

請求項 1～25 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 27】

末端基が、下記式：



によってさらに定義され、

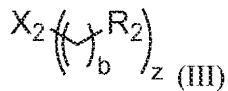
Y_4 がアルカンジイル ($C \leq 18$) であり；かつ

R_{10} が水素である、

請求項 26 記載の組成物。

【請求項 28】

コアが、下記式：



によってさらに定義され、

式中、

X_2 が $N(R_5)_y$ であり；

R_5 が、水素、またはアルキル $(C \leq 8)$ 、または置換アルキル $(C \leq 18)$ であり；かつ

y および z の和が3であるという条件で、 y が、0、1、または2であり；

10

R_2 が、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ $(C \leq 12)$

、ジアルキルアミノ $(C \leq 12)$ 、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

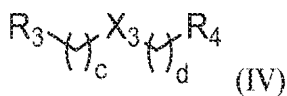
b が、1、2、3、4、5、または6であり；かつ

z および y の和が3であるという条件で、 z が、1、2、3である、

請求項26または27記載の組成物。

【請求項 29】

コアが、下記式：



20

によってさらに定義され、

式中、

X_3 が $-NR_6-$ であり、

式中、

R_6 が、水素、アルキル $(C \leq 8)$ 、もしくは置換アルキル $(C \leq 8)$ 、 $-O-$ 、もしくはアルキルアミノジイル $(C \leq 8)$ 、アルコキシジイル $(C \leq 8)$ 、アレーンジイル $(C \leq 8)$ 、ヘテロアレーンジイル $(C \leq 8)$ 、ヘテロシクロアルカンジイル $(C \leq 8)$ 、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

R_3 および R_4 が各々独立して、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ $(C \leq 12)$ 、ジアルキルアミノ $(C \leq 12)$ 、またはこれらの基のいずれかの置換型；または式： $-N(R_f)_f(CH_2CH_2N)_e(R_c)R_d$ の基であり；

30

式中、

e および f の和が3であるという条件で、 e および f が各々独立して、1、2、または3であり；または

R_c 、 R_d 、および R_f が各々独立して、水素、アルキル $(C \leq 6)$ 、または置換アルキル $(C \leq 6)$ であり；

c および d が各々独立して、1、2、3、4、5、または6である、

請求項26または27記載の組成物。

【請求項 30】

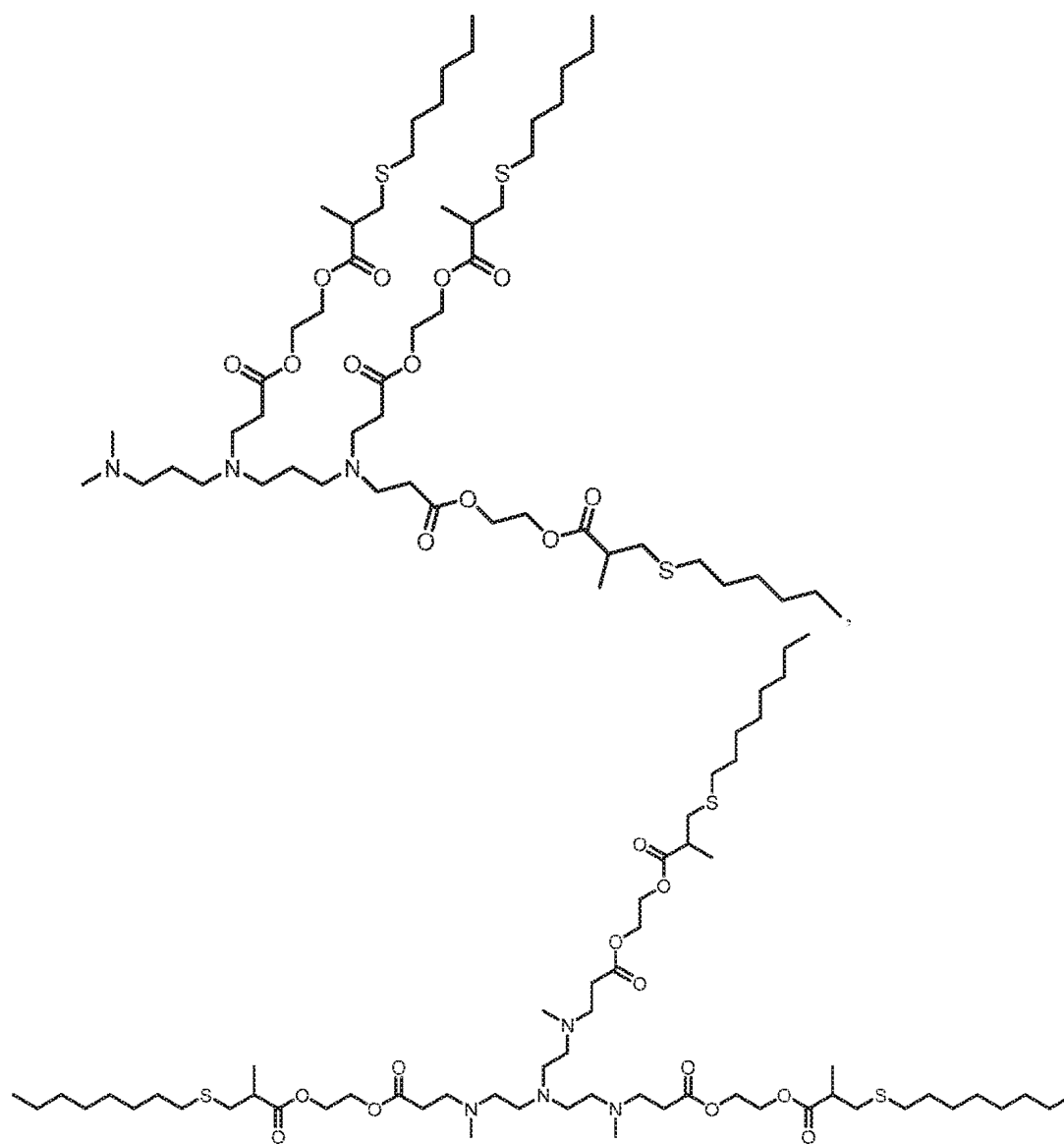
コアが、

40



【請求項 3 1】

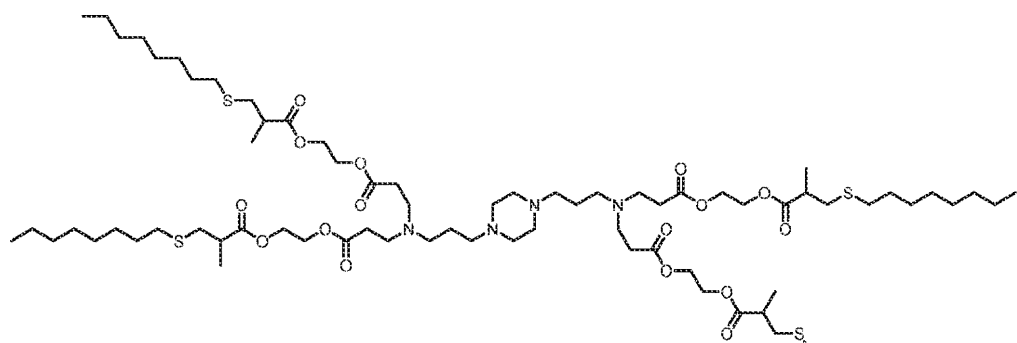
デンドリマーが、



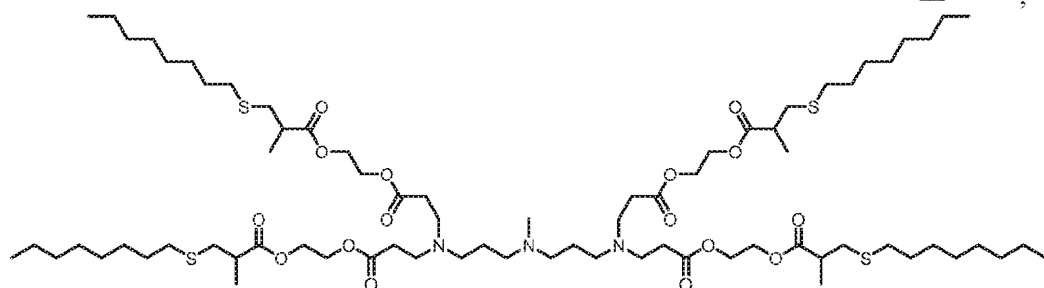
10

20

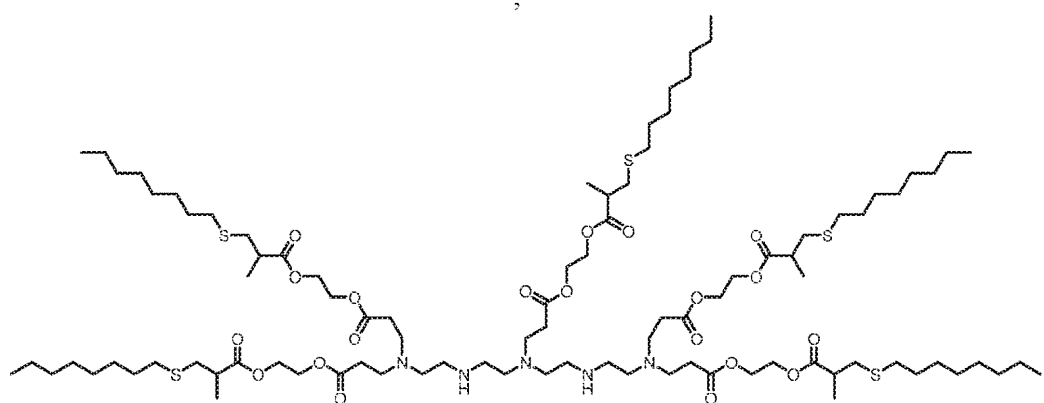
30



10

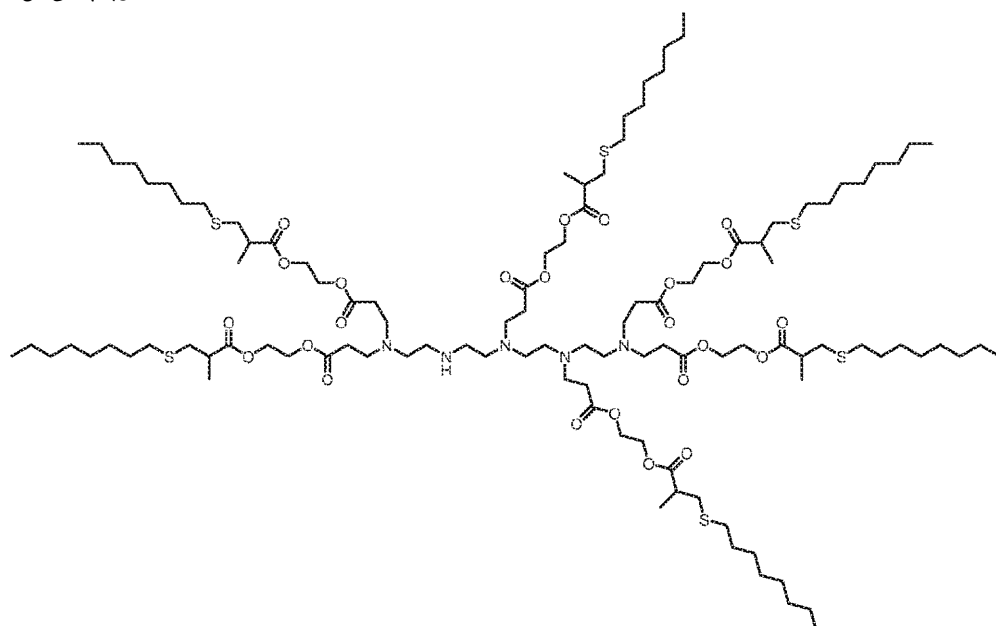


20



30

もしくは



40

、またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される、請求項26～30のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 3 2】

リン脂質が、約8%～約20%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、

50

請求項1～31のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 3 3】

リン脂質が、約20%～約23%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項1～31のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 3 4】

ステロイドをさらに含む、請求項1～33のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 3 5】

ステロイドが、約39%～約46%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項34記載の組成物。

【請求項 3 6】

ステロイドが、約15%～約39%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項35記載の組成物。

【請求項 3 7】

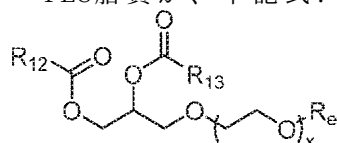
PEG化脂質をさらに含む、請求項1～36のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 3 8】

PEG化脂質が、約0.5%～約10.0%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する、請求項37記載の組成物。

【請求項 3 9】

PEG脂質が、下記式：



によってさらに定義され、

式中、

R_{12} および R_{13} が各々独立して、アルキル($C \leq 24$)、アルケニル($C \leq 24$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

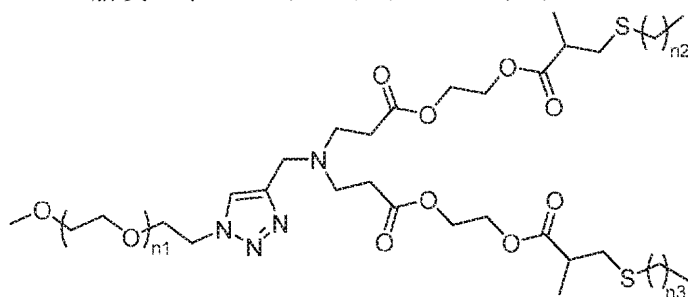
R_6 が、水素、アルキル($C \leq 8$)、または置換アルキル($C \leq 8$)であり；かつ

x が1～250である、

請求項37または38記載の組成物。

【請求項 4 0】

PEG脂質が、ジミリスチル-sn-グリセロールまたは下記式：



の化合物であり、

式中、

n_1 が5～250であり；かつ

n_2 および n_3 が各々独立して、2～25である、

請求項37または38記載の組成物。

【請求項 4 1】

治療剤が核酸である、請求項1～40のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 4 2】

核酸が治療用核酸である、請求項41記載の組成物。

【請求項 4 3】

10

20

30

40

50

核酸が、siRNA、miRNA、pri-miRNA、メッセンジャーRNA(mRNA)、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)関連核酸、シングルガイドRNA(sgRNA)、CRISPR RNA(crRNA)、トランス活性化crRNA(tracrRNA)、プラスミドDNA(pDNA)、トランスファーRNA(tRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、ガイドRNA、二本鎖DNA(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、一本鎖RNA(ssRNA)、および二本鎖RNA(dsRNA)である、請求項41記載の組成物。

【請求項44】

核酸が、約1:1～約1:100の脂質ナノ粒子組成物と核酸の比で存在する、請求項41～43のいずれか一項記載の組成物。

【請求項45】

タンパク質をさらに含む、請求項1～44のいずれか一項記載の組成物。

【請求項46】

タンパク質および核酸が、約1:1～約1:20のモル比で存在する、請求項1～45のいずれか一項記載の組成物。

【請求項47】

タンパク質と核酸の両方を含む、請求項1～46のいずれか一項記載の組成物。

【請求項48】

(A) 請求項1～47のいずれか一項記載の組成物と、

(B) 賦形剤と

を含む、薬学的組成物。

【請求項49】

核酸を細胞に送達する工程を含む、遺伝子の発現を調節する方法であって、

細胞への核酸の取り込みを引き起こすのに十分な条件下で、細胞を請求項1～48のいずれか一項記載の組成物または薬学的組成物と接触させる工程を含む、前記方法。

【請求項50】

疾患または障害の処置の必要がある患者に、薬学的に有効な量の請求項1～48のいずれか一項記載の組成物または薬学的組成物を投与する工程を含む、患者において疾患または障害を処置する方法であって、

組成物または薬学的組成物が疾患または障害に対する治療用核酸を含む、前記方法。

【請求項51】

疾患または障害が癌である、請求項50記載の方法。

【請求項52】

脂質ナノ粒子を調製する方法であって、以下の工程を含む方法：

(A) 永久カチオン性脂質、カチオン性イオン化可能脂質、およびリン脂質を第1の溶液中で溶解して脂質溶液を形成する工程であって、脂質溶液が有機溶媒中に形成される、工程；

(B) 治療剤を緩衝液中で溶解して、緩衝化された治療剤溶液を形成する工程であって、緩衝液がpH約6.8～約7.6の緩衝液である、工程；ならびに

(C) 脂質溶液を、緩衝化された治療剤溶液と混合して脂質ナノ粒子を形成する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018年9月4日付で出願された米国仮出願第62/726,770号の優先権の恩典を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

1. 分野

本開示は、概して、分子生物学の分野に関する。より具体的には、本開示は、脂質ナノ粒子の中にある治療剤、例えば、核酸、タンパク質、または低分子治療剤の組織特異的送達に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

CRISPR/Cas(クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/CRISPR関連タンパク質(Cas))技術を用いると、ゲノムを正確に配列依存的に編集し、永久に変えることができる。CRISPR/Cas技術は疾患の原因となる変異を標的化することができるので、一回だけの遺伝病治療や、多様な分野における他の多くの用途にとって大いに有望である。現在まで、うまくいった編集は主にウイルスベクターによって媒介されている。これには標的ごとに手間のかかるカスタマイゼーションが必要であり、免疫原性、反復投与を防ぐ抗体の作製、めったにないが危険な組込み事象についての懸念に起因するクリニカルトランスレーション(clinical translation)に対する課題が提示される。遺伝子編集の安全かつ効果的な用途を広げるために、合成ナノ粒子(NP)を介してCRISPR/Cas編集を成し遂げることが明らかに必要とされている。

10

【0004】

CRISPR/Casを用いると、RNAガイドCRISPR関連タンパク質9(Cas9)ヌクレアーゼまたはそのホモログと、関係のあるCRISPR関連(CAS)タンパク質による配列特異的なDNA編集が可能になり、ゲノムDNAに二本鎖切断(DSB)が形成する。Cas9は、シングルガイドRNA(sgRNA)と呼ばれるプログラム可能なRNAによってガイドされる。Cas9/sgRNA複合体は、3'プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を有する相補的なゲノム配列を認識する。DNA切断後にDSB修復経路によって、定方向突然変異誘発、すなわち、標的遺伝子を欠失させる挿入/欠失(インデル)が生じる。ドナーDNAが送達されると、細胞は相同組換え修復(HDR)を利用して遺伝子変異を訂正することができる。治療実用性のために、オフターゲットゲノム変化を制限する一過的なCas9発現が好ましい。Cas9タンパク質とsgRNAは両方とも同じ細胞に存在しなければならないので、1つのNPにCas9 mRNAと配列標的化sgRNAを同時送達することは、特に、組織浸透と細胞取り込みがより困難なインビボ用途には魅力的な方法である。同様に、sgRNA Cas9タンパク質リボ核タンパク質(RNP)を直接送達することも遺伝子編集にとって魅力的である。ウイルス、膜変形、およびハイドロダイナミックインジェクション(hydrodynamic injection)を用いたCRISPR/Cas編集が機能するが、持続的なCas9発現およびオフターゲット編集を含む、診療所におけるインビボ治療使用を妨げる可能性がある制約がある。さらに、これらの送達系は、一般的に、編集が必要とされる特定の臓器に対する選択性がない。例えば、ほとんどの脂質ナノ粒子は生物プロセスを介して肝臓に蓄積し、従って、標的臓器に送達された時に組成物の効力は低下する。

20

30

【0005】

同様に、臓器特異的送達から、タンパク質および低分子治療剤などの他の治療剤は利益を得ることができるかもしれない。化学療法剤などの多くの異なるタイプの化合物がかなりの細胞傷害性を示す。これらの化合物を、望ましい臓器への送達により良く仕向けることができればオフターゲット作用が小さくなる。

【0006】

従って、特定の臓器への優先的な送達を示す新たな脂質ナノ粒子を開発することが依然として必要とされている。

40

【発明の概要】

【0007】

概要

いくつかの局面において、本開示は、脂質組成物の臓器特異的送達を示す脂質組成物を提供する。これらの組成物は、特定の臓器に核酸成分を送達するのに使用され得る。

【0008】

いくつかの局面において、本開示は、

(A) 治療剤と、

(B)

(1) 永久カチオン性脂質;

50

(2) カチオン性イオン化可能脂質; および

(3) リン脂質

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む、組成物であって、核酸を、肺、心臓、脳、脾臓、リンパ節、骨、骨髄、骨格筋、胃、小腸、大腸、腎臓、膀胱、乳房、肝臓、精巣、卵巣、子宮、脾臓、胸腺、脳幹、小脳、脊髄、眼、耳、舌、または皮膚より選択される標的臓器に優先的に送達する、組成物を提供する。いくつかの態様において、標的臓器は、肺、心臓、脳、脾臓、リンパ節、骨、骨髄、骨格筋、胃、小腸、大腸、腎臓、膀胱、乳房、精巣、卵巣、子宮、脾臓、胸腺、脳幹、小脳、脊髄、眼、耳、舌、または皮膚より選択される。

【0009】

10

いくつかの態様において、標的臓器は肺、リンパ節、または脾臓である。いくつかの態様において、標的臓器は肺である。他の態様において、標的臓器は脾臓である。他の態様において、標的臓器は肝臓である。他の態様において、標的臓器はリンパ節である。

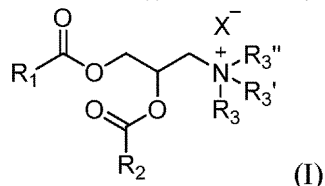
【0010】

いくつかの態様において、選択的臓器標的化合物は永久カチオン性脂質である。いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は、約5%～約20%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約12%～約18%の永久カチオン性脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、永久カチオン性脂質のモル百分率は約15%である。いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は、約20%～約65%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約40%～約61%の永久カチオン性脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、永久カチオン性脂質のモル百分率は約50%である。

20

【0011】

いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は四級アンモニウムイオンを含む。いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は、



30

としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 は各々独立して、アルキル ($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり;

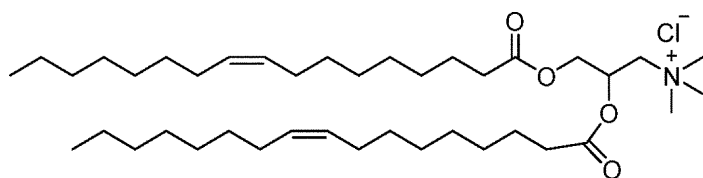
R_3 、 R_3' 、および R_3'' は各々独立して、アルキル ($C \leq 6$) または置換アルキル ($C \leq 6$) であり;

X^- は一価アニオンである。

【0012】

いくつかの態様において、 R_1 はアルケニル ($C_8 \sim C_{24}$) または置換アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$) である。いくつかの態様において、 R_2 はアルケニル ($C_8 \sim C_{24}$) または置換アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$) である。他の態様において、 R_1 はアルキル ($C_8 \sim C_{24}$) または置換アルキル ($C_8 \sim C_{24}$) である。他の態様において、 R_2 はアルキル ($C_8 \sim C_{24}$) または置換アルキル ($C_8 \sim C_{24}$) である。いくつかの態様において、 R_1 および R_2 は両方とも同じである。いくつかの態様において、 R_3 、 R_3' 、および R_3'' はそれぞれ同一である。いくつかの態様において、 R_3 、 R_3' 、および R_3'' はそれぞれメチルである。いくつかの態様において、 X^- は、ハロゲン化物アニオン、例えば、臭化物または塩化物である。いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は、

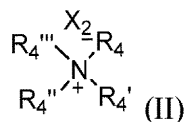
40



としてさらに定義される。

【0013】

他の態様において、永久カチオン性脂質は、



10

としてさらに定義され、

式中、

R_4 および R_4' は各々独立して、アルキル ($C_6 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_6 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_4'' は、アルキル ($C \leq 24$)、アルケニル ($C \leq 24$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_4''' は、アルキル ($C_1 \sim C_8$)、アルケニル ($C_2 \sim C_8$)、またはいずれかの基の置換型であり；かつ

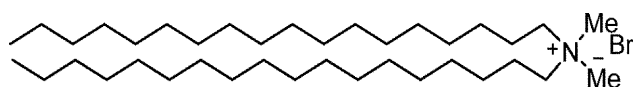
X_2 は一価アニオンである。

20

【0014】

いくつかの態様において、 R_4 はアルキル ($C_6 \sim C_{24}$) または置換アルキル ($C_6 \sim C_{24}$)、例えば、オクタデシルである。いくつかの態様において、 R_4' はアルキル ($C_6 \sim C_{24}$) または置換アルキル ($C_6 \sim C_{24}$)、例えば、オクタデシルである。いくつかの態様において、 R_4'' はアルキル ($C \leq 24$) または置換アルキル ($C \leq 24$) である。いくつかの態様において、 R_4''' はアルキル ($C \leq 8$) または置換アルキル ($C \leq 8$)、例えば、メチルである。いくつかの態様において、 R_4'''' はアルキル ($C_1 \sim C_8$) または置換アルキル ($C_1 \sim C_8$)、例えば、メチルである。いくつかの態様において、 X_2 はハロゲン化物、例えば、塩化物または臭化物である。いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は、

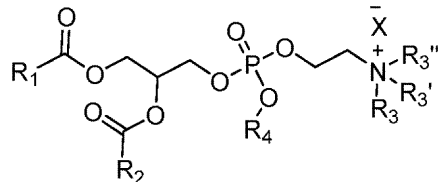
30



としてさらに定義される。

【0015】

いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は、



(IA)

としてさらに定義され、

40

式中、

R_1 および R_2 は各々独立して、アルキル ($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 、 R_3' 、および R_3'' は各々独立して、アルキル ($C \leq 6$) または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；

R_4 は、アルキル ($C \leq 6$) または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；かつ

X^- は一価アニオンである。

【0016】

いくつかの態様において、 R_1 はアルケニル ($C_8 \sim C_{24}$) または置換アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$) である。いくつかの態様において、 R_2 はアルケニル ($C_8 \sim C_{24}$) または置換アルケニル ($C_8 \sim C_2$)

50

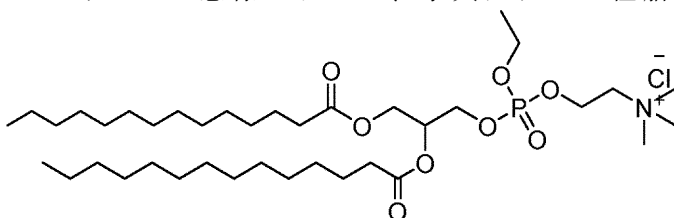
4)である。他の態様において、 R_1 はアルキル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルキル($C_8 \sim C_{24}$)である。他の態様において、 R_2 はアルキル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルキル($C_8 \sim C_{24}$)である。いくつかの態様において、 R_1 および R_2 は両方とも同じである。

【0017】

いくつかの態様において、 R_3 、 R_3' 、および R_3'' はそれぞれ同一であり、例えば、 R_3 、 R_3' 、および R_3'' はそれぞれメチルである。いくつかの態様において、 R_4 はアルキル($C \leq 6$)、例えば、エチルである。いくつかの態様において、 X^- はハロゲン化物アニオン、例えば、臭化物または塩化物である。

【0018】

いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は、



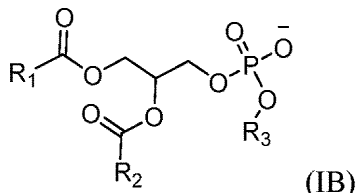
としてさらに定義される。

【0019】

他の態様において、選択的臓器標的化合物は永久アニオン性脂質である。いくつかの態様において、永久アニオン性脂質は約5%～約50%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約10%～約45%の永久アニオン性脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、永久アニオン性脂質のモル百分率は約30%である。いくつかの態様において、永久アニオン性脂質はリン酸基を含む。

【0020】

いくつかの態様において、永久アニオン性脂質は、



としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 は各々独立して、アルキル($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 は、水素、アルキル($C \leq 6$)、または置換アルキル($C \leq 6$)、または $-Y_1-R_4$ であり、式中、

Y_1 は、アルカンジイル($C \leq 6$)または置換アルカンジイル($C \leq 6$)であり；かつ

R_4 は、アシルオキシ($C \leq 8 \sim 24$)または置換アシルオキシ($C \leq 8 \sim 24$)である。

【0021】

いくつかの態様において、 R_1 はアルケニル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルケニル($C_8 \sim C_{24}$)である。他の態様において、 R_2 はアルケニル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルケニル($C_8 \sim C_{24}$)である。他の態様において、 R_1 はアルキル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルキル($C_8 \sim C_{24}$)である。他の態様において、 R_2 はアルキル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルキル($C_8 \sim C_{24}$)である。いくつかの態様において、 R_1 および R_2 は両方とも同じである。

【0022】

いくつかの態様において、 R_3 は水素である。他の態様において、 R_3 は $-Y_1-R_4$ であり、式中、

Y_1 はアルカンジイル($C \leq 6$)または置換アルカンジイル($C \leq 6$)であり；かつ

R_4 はアシルオキシ($C \leq 8 \sim 24$)または置換アシルオキシ($C \leq 8 \sim 24$)である。

【0023】

10

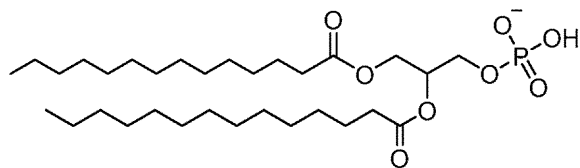
20

30

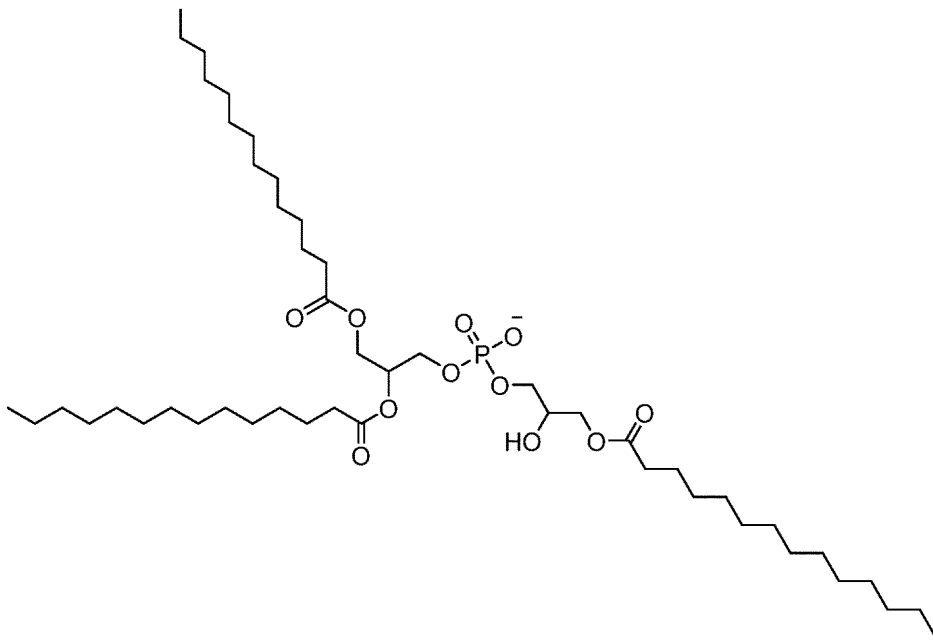
40

50

いくつかの態様において、 Y_1 は置換アルカンジイル($C \leq 6$)、例えば、2-ヒドロキシプロパンジイル(hydroxypropanediyl)である。いくつかの態様において、 R_4 はアシルオキシ($C \leq 8 \sim 24$)、例えば、オクタデセノエートである。いくつかの態様において、永久アニオン性脂質は、



または



10

20

としてさらに定義される。

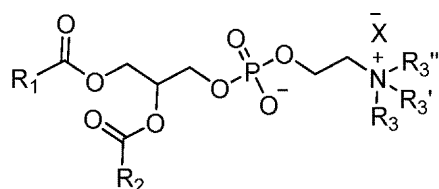
【0024】

他の態様において、選択的臓器標的化合物は、 $C_6 \sim C_{24}$ ジアシルホスホチジルコリン(diacyl phosphatidylcholine)である。いくつかの態様において、ジアシルホスホチジルコリンは約5%～約50%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約10%～約45%、例えば、約30%のジアシルホスホチジルコリンのモル百分率が存在する。

30

【0025】

いくつかの態様において、選択的臓器標的化合物は少なくとも2つの脂肪酸鎖、四級アミン、およびアニオン性リン酸基を含む。いくつかの態様において、ジアシルホスホチジルコリンは、



(IA)

40

としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 は各々独立して、アルキル($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 、 R_3' 、および R_3'' は各々独立して、アルキル($C \leq 6$)または置換アルキル($C \leq 6$)であり；かつ

X^- は一価アニオンである。

【0026】

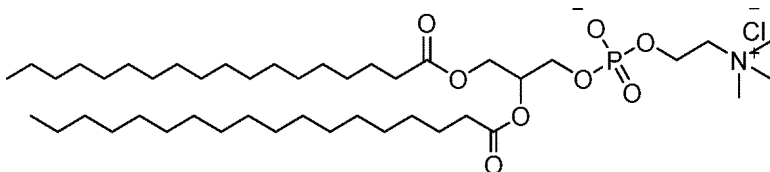
いくつかの態様において、 R_1 はアルケニル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルケニル($C_8 \sim C_{24}$)で

50

ある。いくつかの態様において、 R_2 はアルケニル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルケニル($C_8 \sim C_{24}$)である。他の態様において、 R_1 はアルキル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルキル($C_8 \sim C_{24}$)である。他の態様において、 R_2 はアルキル($C_8 \sim C_{24}$)または置換アルキル($C_8 \sim C_{24}$)である。いくつかの態様において、 R_1 および R_2 は両方とも同じである。

【0027】

いくつかの態様において、 R_3 、 R_3' 、および R_3'' はそれぞれ同一である。いくつかの態様において、 R_3 、 R_3' 、および R_3'' はそれぞれメチルである。いくつかの態様において、 X^- は臭化物または塩化物などのハライドアニオン(halide anion)である。いくつかの態様において、ジアシルホスホチジルコリンは、



としてさらに定義される。

【0028】

いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、約5%～約30%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約7.5%～約20%のカチオン性イオン化可能脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質のモル百分率は約11.9%である。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、約15%～約30%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約15%～約25%のカチオン性イオン化可能脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質のモル百分率は約20.3%である。

【0029】

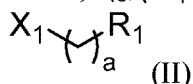
いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、生理学的pHで正に荷電するアンモニウム基を含み、かつ少なくとも2つの疎水基を含有する。いくつかの態様において、アンモニウム基は、約6～約8のpHで正に荷電している。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、デンドリマーまたはデンドロンである。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、少なくとも2つの $C_6 \sim C_{24}$ アルキル基またはアルケニル基を含む。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、少なくとも2つの $C_8 \sim C_{24}$ アルキル基を含む。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、下記式：

コア-繰り返し単位-末端基(I)

によってさらに定義されるデンドリマー、またはその薬学的に許容される塩であり、

1つもしくは複数の水素原子をコアから除去して前記原子を繰り返し単位で置換することによって、コアは繰り返し単位に連結され、かつ

コアは、下記式：



を有し、

式中、

X_1 は、アミノもしくはアルキルアミノ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ($C \leq 12$)、ヘテロシクロアルキル($C \leq 12$)、ヘテロアリール($C \leq 12$)、またはその置換型であり；

R_1 は、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；かつ

a は、1、2、3、4、5、または6であるか；

あるいは

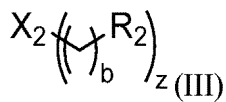
コアは、下記式：

10

20

30

40



を有し、
式中、

X_2 は $N(R_5)_y$ であり；

R_5 は、水素、アルキル ($C \leq 18$)、または置換アルキル ($C \leq 18$) であり；

y および z の和が3であるという条件で、 y は、0、1、または2であり；

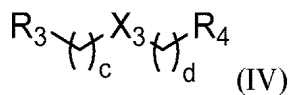
R_2 は、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

b は、1、2、3、4、5、または6であり；かつ

z および y の和が3であるという条件で、 z は、1、2、3であるか；

あるいは

コアは、下記式：



を有し、
式中、

X_3 は $-NR_6-$ であり、

式中、

R_6 は、水素、アルキル ($C \leq 8$)、もしくは置換アルキル ($C \leq 8$)、 $-O-$ 、もしくはアルキルアミノジイル ($C \leq 8$)、アルコキシジイル ($C \leq 8$)、アレーンジイル ($C \leq 8$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 8$)、ヘテロシクロアルカンジイル ($C \leq 8$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

R_3 および R_4 は各々独立して、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、もしくはこれらの基のいずれかの置換型；または式： $-N(R_f)_f(CH_2CH_2N)_e(R_c)R_d$ の基であり；

式中、

e および f の和が3であるという条件で、 e および f は各々独立して、1、2、または3であり；

R_c 、 R_d 、および R_f は各々独立して、水素、アルキル ($C \leq 6$)、または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；

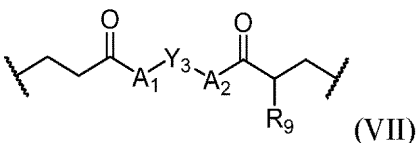
c および d は各々独立して、1、2、3、4、5、または6であるか；

あるいは

コアは、アルキルアミン ($C \leq 18$)、ジアルキルアミン ($C \leq 36$)、ヘテロシクロアルカン ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

繰り返し単位は、分解性ジアシルおよびリンカーを含み；

分解性ジアシル基は、下記式：



を有し、
式中、

A_1 および A_2 は各々独立して、 $-O-$ または $-NR_a-$ であり、

式中、

R_a は、水素、アルキル ($C \leq 6$)、または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；

Y_3 は、アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)

、もしくはこれらの基のいずれかの置換型；または式：

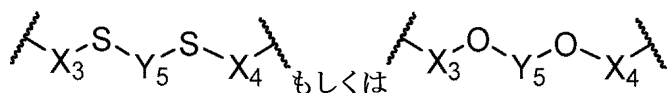
10

20

30

40

50



の基であり；

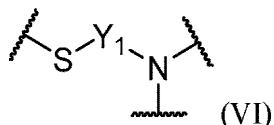
式中、

X_3 および X_4 は、アルカンジイル($\text{C} \leq 12$)、アルケンジイル($\text{C} \leq 12$)、アレーンジイル($\text{C} \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

Y_5 は、共有結合、アルカンジイル($\text{C} \leq 12$)、アルケンジイル($\text{C} \leq 12$)、アレーンジイル($\text{C} \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；かつ

R_9 は、アルキル($\text{C} \leq 8$)または置換アルキル($\text{C} \leq 8$)であり；

リンカー基は、下記式：



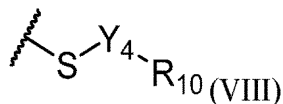
を有し、

式中、

Y_1 は、アルカンジイル($\text{C} \leq 12$)、アルケンジイル($\text{C} \leq 12$)、アレーンジイル($\text{C} \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；かつ

繰り返し単位がリンカー基を含む場合、 n が1より大きいなら、リンカー基は、リンカー基の窒素原子および硫黄原子の両方に結合した独立した分解性ジアシル基を含み、繰り返し単位中の最初の基は、分解性ジアシル基であり、各リンカー基について、隣の繰り返し単位は、リンカー基の窒素原子に結合した2つの分解性ジアシル基を含み； n は、繰り返し単位中に存在するリンカー基の数であり；かつ

末端基は、下記式：



を有し、

Y_4 は、アルカンジイル($\text{C} \leq 18$)、またはアルカンジイル($\text{C} \leq 18$)上の水素原子の1つもしくは複数が $-\text{OH}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{SCH}_3$ 、もしくは $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ で置換されているアルカンジイル($\text{C} \leq 18$)であり；

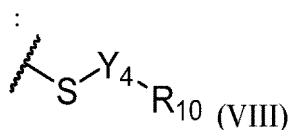
R_{10} は、水素、カルボキシ、ヒドロキシ、またはアリール($\text{C} \leq 12$)、アルキルアミノ($\text{C} \leq 12$)、ジアルキルアミノ($\text{C} \leq 12$)、 N -ヘテロシクロアルキル($\text{C} \leq 12$)、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}_{11})$ -アルカンジイル($\text{C} \leq 6$)-ヘテロシクロアルキル($\text{C} \leq 12$)、 $-\text{C}(\text{O})$ -アルキル-アミノ($\text{C} \leq 12$)、 $-\text{C}(\text{O})$ -ジアルキルアミノ($\text{C} \leq 12$)、 $-\text{C}(\text{O})$ - N -ヘテロシクロ-アルキル($\text{C} \leq 12$)であり、

式中、

R_{11} は、水素、アルキル($\text{C} \leq 6$)、または置換アルキル($\text{C} \leq 6$)であり；

鎖中の最後の分解性ジアシルは、末端基に結合されており；

n は、0、1、2、3、4、5、または6である。いくつかの態様において、末端基は、下記式



によってさらに定義され、

式中

Y_4 はアルカンジイル($\text{C} \leq 18$)であり；かつ

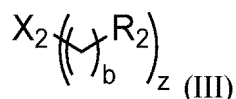
R_{10} は水素である。いくつかの態様において、コアは、下記式：

10

20

30

40



によってさらに定義され、

式中、

X_2 は $N(R_5)_y$ であり；

R_5 は、水素、またはアルキル ($C \leq 8$)、または置換アルキル ($C \leq 18$) であり；かつ

y および z の和が3であるという条件で、 y は、0、1、または2であり；

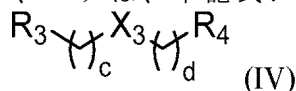
R_2 は、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

10

b は、1、2、3、4、5、または6であり；かつ

z および y の和が3であるという条件で、 z は、1、2、3である。いくつかの態様において

、コアは、下記式：



によってさらに定義され、

式中、

X_3 は $-NR_6-$ であり、

式中、

20

R_6 は、水素、アルキル ($C \leq 8$)、もしくは置換アルキル ($C \leq 8$)、 $-O-$ 、もしくはアルキルアミノジイル ($C \leq 8$)、アルコキシジイル ($C \leq 8$)、アレーンジイル ($C \leq 8$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 8$)、ヘテロシクロアルカンジイル ($C \leq 8$)、またはこれらの基のいずれかの置換型であり；

R_3 および R_4 は各々独立して、アミノ、ヒドロキシ、もしくはメルカプト、もしくはアルキルアミノ ($C \leq 12$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換型；または式： $-N(R_f)_f(CH_2CH_2N)_e(R_c)R_d$ の基であり；

式中、

e および f の和が3であるという条件で、 e および f は各々独立して、1、2、または3であり；

30

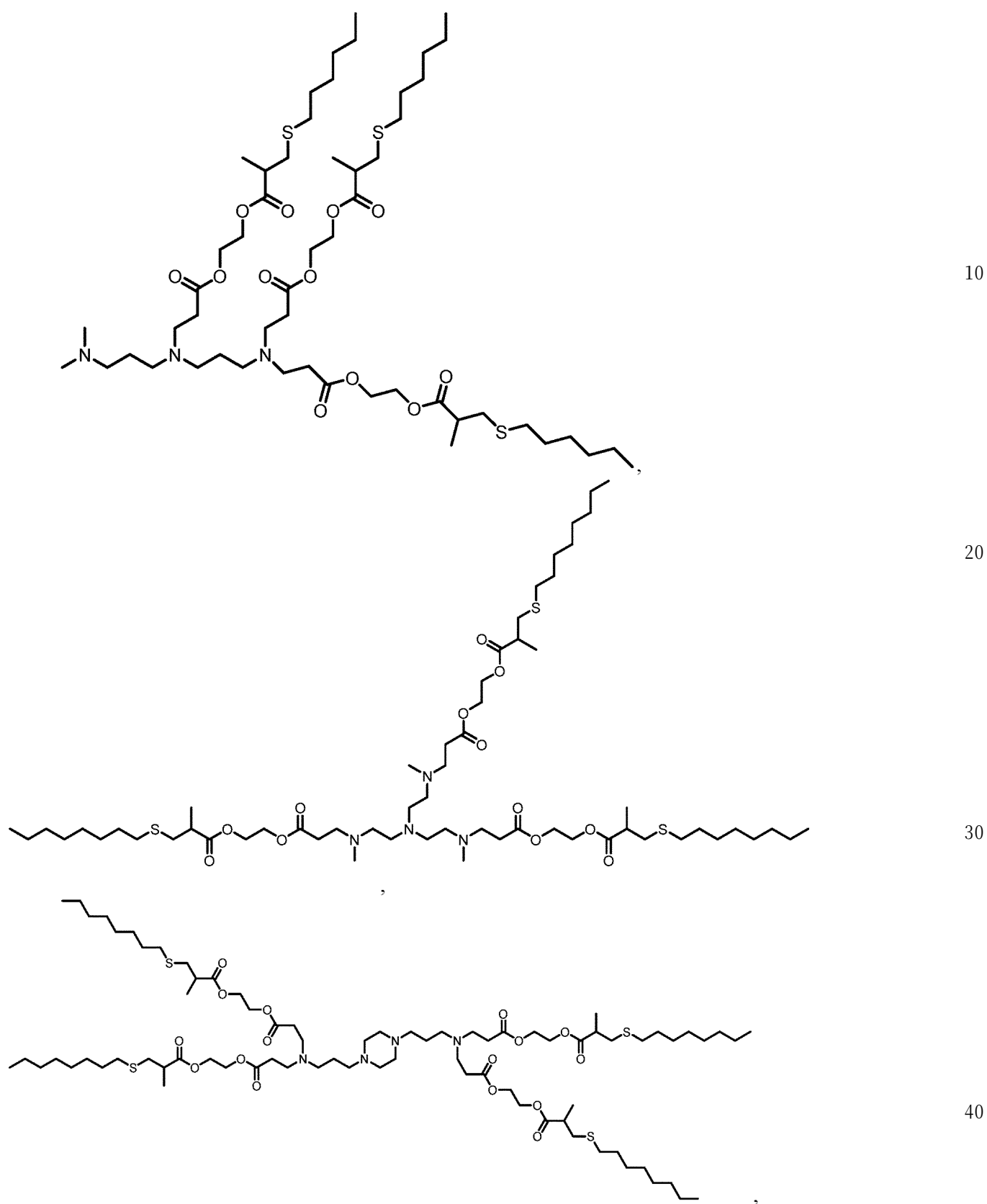
R_c 、 R_d 、および R_f は各々独立して、水素、アルキル ($C \leq 6$)、または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；

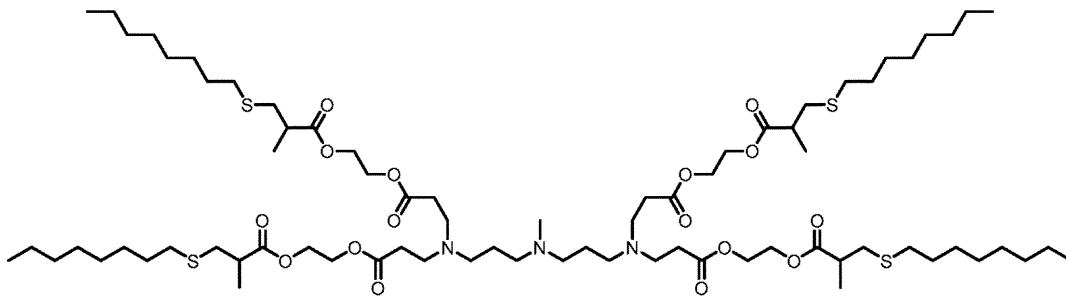
c および d は各々独立して、1、2、3、4、5、または6である。いくつかの態様において、コアは、

*CC(=O)OCCOC(=O)C(C)CC*
$$\begin{array}{c} \diagup \text{---} \text{S} \text{---} \text{Y}_1 \text{---} \text{N} \text{---} \diagup \\ | \\ \text{---} \end{array} \quad \text{(VI)}$$

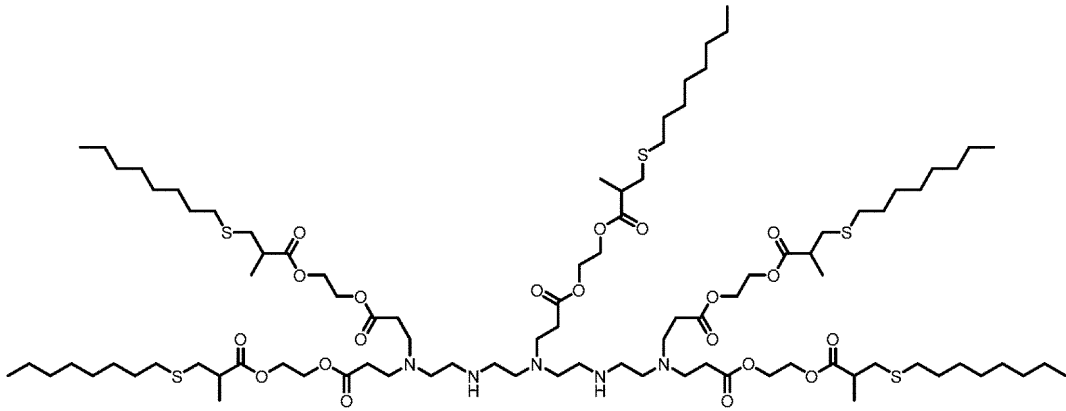
式中、

Y_1 は、アルカンジイル ($C \leq 8$) または置換アルカンジイル ($C \leq 8$) である。いくつかの態様において、デンドリマーは、



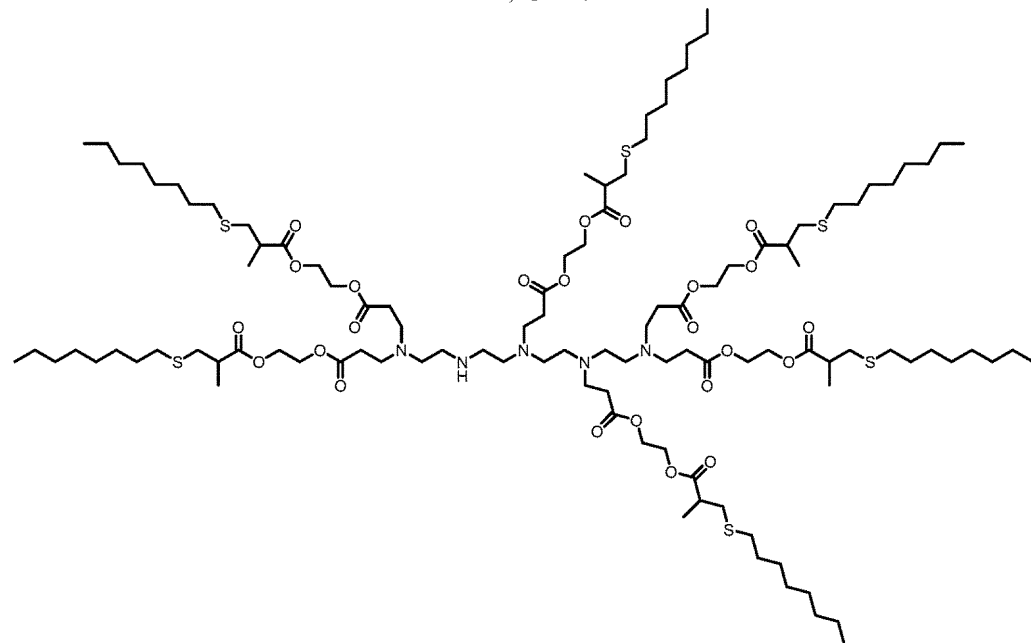


10



20

,もしくは



30

またはその薬学的に許容される塩としてさらに定義される。

【0030】

いくつかの態様において、リン脂質は、約8%～約20%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、リン脂質のモル百分率は、約10%～約14%である。いくつかの態様において、リン脂質のモル百分率は、約11.9%である。他の態様において、リン脂質は、約20%～約23%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約20%～約21%のリン脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、リン脂質のモル百分率は約20.3%である。いくつかの態様において、リン脂質は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンまたは1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンとしてさらに定義される。いくつかの態様において、リン脂質は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンである。

40

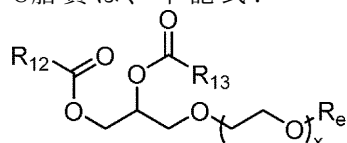
【0031】

50

いくつかの態様において、前記組成物はステロイドをさらに含む。いくつかの態様において、ステロイドは、約39%～約46%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、ステロイドのモル百分率は、約40%～約43%である。いくつかの態様において、ステロイドのモル百分率は約40.5%である。他の態様において、ステロイドは、約15%～約39%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約20%～約27.5%のステロイドのモル百分率が存在する。いくつかの態様において、ステロイドのモル百分率は約23.8%である。いくつかの態様において、ステロイドはコレステロールである。

【0032】

いくつかの態様において、前記組成物はPEG化脂質をさらに含む。いくつかの態様において、PEG化脂質は、約0.5%～約10.0%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約2.0%～約2.8%の、PEG化脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、PEG化脂質のモル百分率は約2.4%である。他の態様において、PEG化脂質は、約3.9%～約4.6%の、脂質ナノ粒子組成物に対するモル百分率で存在する。いくつかの態様において、約4.0%～約4.3%の、PEG化脂質のモル百分率が存在する。いくつかの態様において、PEG化脂質のモル百分率は、約4.1%である。いくつかの態様において、PEG化脂質は、約1000～約10,000ダルトンのPEG成分を含む。いくつかの態様において、PEG脂質はPEG化ジアシルグリセロールである。いくつかの態様において、PEG脂質は、下記式：



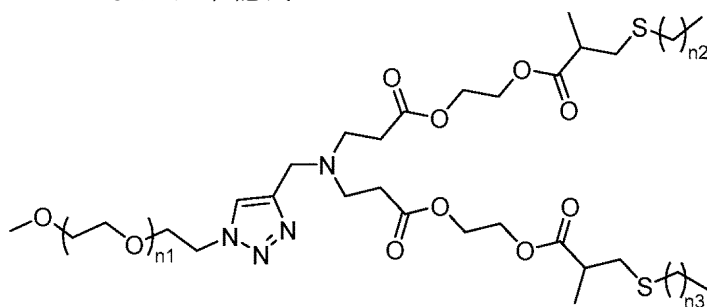
によってさらに定義され、

式中、

R_{12} および R_{13} は各々独立して、アルキル($C \leq 24$)、アルケニル($C \leq 24$)、またはこれらの基のいずれかの置換型あり；

R_e は、水素、アルキル($C \leq 8$)、または置換アルキル($C \leq 8$)であり；かつ

x は1～250である。いくつかの態様において、PEG脂質は、ジミリス Toil-*sn*-グリセロールまたは下記式：



の化合物であり、

式中、

n_1 は5～250であり；かつ

n_2 および n_3 は各々独立して、2～25である。

【0033】

いくつかの態様において、前記組成物はコレステロールおよびDMG-PEGを含む。いくつかの態様において、前記組成物はDOPEを含む。他の態様において、前記組成物はDSPCを含む。いくつかの態様において、前記組成物はDLin-MC3-DMAをさらに含む。他の態様において、前記組成物はC12-200をさらに含む。いくつかの態様において、前記組成物は、5つのテールがある3A5-SC8、3A3-SC8、4A1-SC8、4A3-SC8、5A2-SC8、または6つのテールがある5A2-SC8をさらに含む。いくつかの態様において、前記組成物は5A2-SC8をさらに含む。いくつかの態様において、前記組成物はDOTAPをさらに含む。いくつかの態様において、前

記組成物はコレステロール、DMG-PEG、DSPC、DLin-MC3-DMA、およびDOTAPを含む。

【0034】

いくつかの態様において、治療剤は、低分子、例えば、抗癌剤、抗真菌剤、精神医学剤、例えば、鎮痛薬、意識水準を変える薬剤、例えば、麻酔剤または睡眠剤、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)、駆虫剤、抗挫瘡剤、抗狭心症剤、抗不整脈剤、抗喘息剤、抗菌剤、抗良性前立腺肥大剤、抗凝固剤、抗うつ剤、抗糖尿病剤、制吐剤、抗てんかん剤、抗痛風剤、降圧剤、抗炎症剤、抗マラリア剤、抗片頭痛剤、抗ムスカリン剤、抗悪性腫瘍剤、抗肥満剤、抗骨粗鬆症剤、抗パーキンソン病剤、抗増殖剤、抗原虫剤、抗甲状腺剤、鎮咳剤、抗尿失禁剤、抗ウイルス剤、抗不安剤、食欲抑制剤、 β 遮断薬、心臓変力剤(cardiac inotropic agent)、化学療法剤、認知増強剤(cognition enhancer)、避妊薬、コルチコステロイド、Cox-2阻害剤、利尿薬、勃起不全改善剤、去痰剤、胃腸剤、ヒスタミン受容体アンタゴニスト、免疫抑制剤、角質溶解薬、脂質調節剤、ロイコトリエン阻害剤、マクロライド系薬、筋弛緩剤、神経遮断剤、栄養剤、オピオイド鎮痛薬、プロテアーゼ阻害剤、または鎮静剤より選択される低分子である。他の態様において、治療剤はタンパク質である。他の態様において、治療剤は核酸、例えば、治療用核酸である。いくつかの態様において、前記核酸は、siRNA、miRNA、pri-miRNA、メッセンジャーRNA(mRNA)、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピーター(CRISPR)関連核酸、シングルガイドRNA(sgRNA)、CRISPRRNA(crRNA)、トランス活性化crRNA(tracrRNA)、プラスミドDNA(pDNA)、トランスファーRNA(tRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、ガイドRNA、二本鎖DNA(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、一本鎖RNA(ssRNA)、および二本鎖RNA(dsRNA)である。いくつかの態様において、前記組成物は第1の核酸および第2の核酸を含む。いくつかの態様において、第1の核酸はメッセンジャーRNAである。いくつかの態様において、第2の核酸はシングルガイドRNAである。いくつかの態様において、第1の核酸はメッセンジャーRNA(mRNA)およびシングルガイドRNA(sgRNA)である。いくつかの態様において、核酸は約1:1~約1:100の、脂質ナノ粒子組成物と核酸の比で存在する。いくつかの態様において、比は約1:10~約1:60である。いくつかの態様において、比は約1:40である。

【0035】

いくつかの態様において、前記組成物はタンパク質をさらに含む。いくつかの態様において、前記タンパク質は、翻訳または転写に関連するタンパク質である。いくつかの態様において、前記タンパク質はCRISPRプロセスに関連する。いくつかの態様において、前記タンパク質はCRISPR関連タンパク質である。いくつかの態様において、前記タンパク質は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、そのホモログ、またはその改変されたバージョンである。いくつかの態様において、前記タンパク質はCas9である。いくつかの態様において、前記タンパク質および核酸は、約1:1~約1:20のモル比で存在する。いくつかの態様において、モル比は、約1:1~約1:10である。いくつかの態様において、モル比は、約1:3~約1:8である。

【0036】

いくつかの態様において、前記組成物はマイナスのゼータ電位を有する。いくつかの態様において、ゼータ電位は-0.25mV~約-10mVである。いくつかの態様において、ゼータ電位は約-0.5mV~約-2mVである。いくつかの態様において、前記組成物は、タンパク質と核酸の両方を含む。いくつかの態様において、前記組成物は、Cas9タンパク質およびシングルガイド核酸を含む。いくつかの態様において、前記組成物は、Cas9タンパク質、シングルガイド核酸、およびドナーDNAを含む。

【0037】

別の局面において、本開示は、

(A) 本明細書において記述される組成物と、

(B) 賦形剤と

を含む、薬学的組成物を提供する。

【0038】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、経口的に、脂肪内に(intraadiposally)、動脈内に、関節内に、頭蓋内に、皮内に、病巣内に、筋肉内に、鼻腔内に、眼内に、心膜内に、腹腔内に、胸膜内に、前立腺内に、直腸内に、くも膜下腔内に、気管内に、腫瘍内に、臍帯内に、腔内に、静脈内に、小胞内に、硝子体内に、リボソームに(liposomally)、局所に、粘膜に、非経口的に、直腸に、結膜下に、皮下に、舌下に、局部に、経頬的に(transbuccally)、経皮的に、腔に、クリームに入れて、脂質組成物に入れて、カテーテルを介して、洗浄を介して、連続注入を介して、注入を介して、吸入を介して、注射を介して、局所送達を介して、または局所灌流を介して投与するために処方される。いくつかの態様において、薬学的組成物は静脈内注射または動脈内注射するために処方される。いくつかの態様において、賦形剤は、薬学的に許容される担体である。いくつかの態様において、薬学的に許容される担体は溶媒または溶液である。いくつかの態様において、薬学的組成物はユニットドーズとして処方される。

10

【0039】

さらに別の局面において、本開示は、核酸を細胞に送達する工程を含む、遺伝子の発現を調節する方法であって、細胞への核酸の取り込みを引き起こすのに十分な条件下で、細胞を、本明細書において記述される組成物または薬学的組成物と接触させる工程を含む、前記方法を提供する。

【0040】

いくつかの態様において、前記細胞はインビトロまたはエクスピボで接触される。いくつかの態様において、前記細胞はインビボで接触される。いくつかの態様において、遺伝子発現の調節は疾患または障害、例えば、癌を処置するのに十分である。

20

【0041】

さらにもっと別の局面において、本開示は、疾患または障害の処置の必要がある患者に、薬学的に有効な量の本明細書において記述される組成物または薬学的組成物を投与する工程を含む、患者において疾患または障害を処置する方法であって、前記組成物または薬学的組成物が疾患または障害に対する治療用核酸またはタンパク質を含む、前記方法を提供する。

【0042】

いくつかの態様において、前記疾患または障害は癌である。いくつかの態様において、前記方法は、1つまたは複数のさらなる癌療法を患者に投与する工程をさらに含む。いくつかの態様において、癌療法は、化学療法化合物、外科手術、放射線療法、または免疫療法である。いくつかの態様において、前記組成物または薬学的組成物は患者に1回投与される。他の態様において、前記組成物または薬学的組成物は患者に2回以上投与される。いくつかの態様において、患者はヒトなどの哺乳動物である。

30

【0043】

さらに他の局面において、本開示は、脂質ナノ粒子を調製する方法であって、

(A) 永久カチオン性脂質、カチオン性イオン化可能脂質、およびリン脂質を第1の溶液中で溶解して脂質溶液を形成する工程であって、脂質溶液が有機溶媒中に形成される、工程

40

；
(B) 治療剤を緩衝液中で溶解して、緩衝化された治療剤溶液を形成する工程であって、緩衝液がpH約6.8～約7.6の緩衝液である、工程；ならびに

(C) 脂質溶液を、緩衝化された治療剤溶液と混合して脂質ナノ粒子を形成する工程を含む、方法を提供する。

【0044】

いくつかの態様において、有機溶媒はエタノールなどのC1～C4アルコール溶媒である。いくつかの態様において、緩衝液は水性PBS緩衝液である。いくつかの態様において、前記方法のカプセル化効率は80%を超える。

【0045】

50

さらに別の局面において、本開示は、

(A)治療剤と、

(B)

(1) カチオン性イオン化可能脂質；

(2) リン脂質；および

(3) 選択的臓器標的化化合物

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む組成物であって、臓器標的化リガンドが肝臓以外の臓器への組成物の優先的な送達を引き起こす、組成物を提供する。

【0046】

10

さらにもっと別の局面において、本開示は、

(A)治療剤と、

(B)

(1) カチオン性イオン化可能脂質；

(2) リン脂質；

(3) 選択的臓器標的化化合物；

(4) ステロイド；および

(5) PEG脂質

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む、組成物であって、臓器標的化リガンドが肝臓以外の臓器への組成物の優先的な送達を引き起こす、組成物を提供する。

20

【0047】

さらに別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) カチオン性イオン化可能脂質；

(B) リン脂質；および

(C) 選択的臓器標的化化合物

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む、組成物であって、約8～約13の見かけの pK_a を有し、主として核酸を肺に送達する、組成物を提供する。

【0048】

30

別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) カチオン性イオン化可能脂質；

(B) リン脂質；

(C) 選択的臓器標的化化合物；

(D) ステロイド；および

(E) PEG脂質；

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む、組成物であって、約8～約13の見かけの pK_a を有し、主として核酸を肺に送達する、組成物を提供する。

【0049】

40

さらに別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) カチオン性イオン化可能脂質；

(B) リン脂質；および

(C) 選択的臓器標的化化合物

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む組成物であって、約3～約6の見かけの pK_a を有し、主として核酸を脾臓に送達する、組成物を提供する。

【0050】

さらにもっと別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) ステロイド；

50

(B) カチオン性イオン化可能脂質;
(C) リン脂質;
(D) PEG脂質;および
(E) 選択的臓器標的化合物
を含む脂質ナノ粒子組成物と
を含む、組成物であって、約3～約6の見かけの pK_a を有し、主として核酸を脾臓に送達する、組成物を提供する。

【0051】

別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) カチオン性イオン化可能脂質;
(B) リン脂質;および
(C) $C_6 \sim C_{24}$ ジアシルホスホチジルコリン
を含む脂質ナノ粒子組成物と
を含む、組成物であって、主として核酸をリンパ節に送達する、組成物を提供する。

10

【0052】

さらに別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) ステロイド;
(B) カチオン性イオン化可能脂質;
(C) リン脂質;
(D) PEG脂質;および
(E) $C_6 \sim C_{24}$ ジアシルホスホチジルコリン
を含む脂質ナノ粒子組成物と
を含む、組成物であって、主として核酸をリンパ節に送達する、組成物を提供する。

20

【0053】

さらにもっと別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) カチオン性イオン化可能脂質;
(B) リン脂質;および
(C) 選択的臓器標的化合物
を含む脂質ナノ粒子組成物と
を含む、組成物であって、組成物の表面がビトロネクチンと相互作用し、組成物が主として核酸を肺に送達する、組成物を提供する。

30

【0054】

さらに別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) カチオン性イオン化可能脂質;
(B) リン脂質;
(C) 選択的臓器標的化合物;
(D) ステロイド;および
(E) PEG脂質
を含む脂質ナノ粒子組成物と
を含む、組成物であって、組成物の表面がビトロネクチンと相互作用し、組成物が主として核酸を肺に送達する、組成物を提供する。

40

【0055】

さらにもっと別の局面において、本開示は、治療剤と、

(A) カチオン性イオン化可能脂質;
(B) リン脂質;および
(C) 選択的臓器標的化合物
を含む脂質ナノ粒子組成物と
を含む、組成物であって、組成物の表面がApo Hと相互作用し、組成物が主として核酸を脾臓に送達する、組成物を提供する。

【0056】

50

別の局面において、本開示は、治療剤と、

- (A)ステロイド；
- (B)カチオン性イオン化可能脂質；
- (C)リン脂質；
- (D)PEG脂質；および

(E)選択的臓器標的化合物

を含む脂質ナノ粒子組成物と

を含む、組成物であって、組成物の表面がApo Hと相互作用し、組成物が主として核酸を脾臓に送達する、組成物を提供する。

【0057】

10

さらにもっと別の局面において、本開示は、治療剤と脂質ナノ粒子組成物とを含む組成物であって、前記組成物の表面でタンパク質コロナに存在する標的化タンパク質が、標的臓器に実質的に存在する標的タンパク質に結合し、かつ標的臓器が肝臓でない、組成物を提供する。

【0058】

いくつかの態様において、標的化タンパク質はビトロネクチンまたは β 2-糖タンパク質I(ApoH)より選択される。いくつかの態様において、標的化タンパク質はビトロネクチンであり、かつ標的臓器は肺である。他の態様において、標的化タンパク質はApoHであり、かつ標的臓器は脾臓である。

【0059】

20

いくつかの態様において、脂質ナノ粒子組成物は、タンパク質コロナ上のタンパク質の結合を改変する選択的臓器標的化合物をさらに含む。いくつかの態様において、さらに、選択的臓器標的化合物は、糖、脂質、低分子治療剤、ビタミン、またはタンパク質より選択される。いくつかの態様において、選択的臓器標的化合物は、脂質、例えば、永久カチオン性脂質、永久アニオン性脂質、またはホスホチジルコリンである。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子組成物は、カチオン性イオン化可能脂質をさらに含む。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子組成物は、リン脂質をさらに含む。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子組成物は、ステロイドをさらに含む。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子組成物は、PEG脂質をさらに含む。

【0060】

30

別の局面において、本開示は、治療剤と脂質ナノ粒子組成物とを含む組成物であって、脂質ナノ粒子組成物が、選択的臓器標的化合物を含み、かつ選択的臓器標的化合物が、約3～約6の見かけの pK_a を有する脂質ナノ粒子組成物をもたらす、組成物を提供する。

【0061】

さらに別の局面において、本開示は、治療剤と脂質ナノ粒子組成物とを含む組成物であって、脂質ナノ粒子組成物が、選択的臓器標的化合物を含み、かつ選択的臓器標的化合物が、約8～約13の見かけの pK_a を有する脂質ナノ粒子組成物をもたらす、組成物を提供する。

【0062】

40

本明細書で使用する、指定された成分に関して「本質的に含まない」とは、指定された成分がどれも、意図的に、組成物の中に処方されていない、および/または汚染物質としてしか、もしくは微量にしか存在しないことを意味するのに本明細書において用いられる。組成物の意図せぬ汚染に起因する指定された成分の全量は好ましくは0.01%未満である。標準的な分析方法を用いて、指定された成分の量を検出できない組成物が最も好ましい。

【0063】

本明細書および特許請求の範囲において本明細書中で用いられる場合、「1つの(a)」もしくは「1つの(an)」は1つまたは複数を意味する場合がある。本明細書および特許請求の範囲において本明細書中で用いられる場合、「含む(comprising)」という単語と一緒に用いられた時、「1つの(a)」もしくは「1つの(an)」という単語は1つまたは複数を意味する

50

場合がある。本明細書および特許請求の範囲において本明細書中で用いられる場合、「別の」または「さらなる」は少なくとも2番目以上を意味する場合がある。

【0064】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる場合、「約」という用語は、値が、その値を求めるために用いている装置、方法の誤差の固有の変動、または試験対象の間に存在する変動を含むことを示すために用いられる。

【0065】

本開示の他の目的、特徴、および利点は以下の詳細な説明から明らかになる。しかしながら、本開示の特定の態様が示されているものの、この詳細な説明から当業者には本開示の趣旨および範囲内のさまざまな変更および修正が明らかになるものと思われるので、詳細な説明および具体的な実施例は実例としてのみ与えられたものであると理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0066】

図面は本明細書の一部を形成し、本開示の特定の局面をさらに実証するために含まれる。本開示は、本明細書において提示される特定の態様の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つまたは複数を参照することによってさらによく理解され得る。

【図1】図1A~C: DOTAP mDLNP製剤はIV注射後に低用量で優れたmRNA送達効力を媒介し、所定のパーセントのDOTAPで組織特異的送達特徴を示した。(図1A)DOTAP mDLNP形成とDOTAP構造の模式図。5A2-SC8/DOPE/Chol/DMG-PEGのモル比を15/15/30/3に固定した(mDLNPと名付けた)。次いで、一連のDOTAP mDLNP製剤を生成するために、DOTAP比だけを0~1200に調整し、DOTAPYと名付けた。Yは全脂質中にあるDOTAPのパーセントを示した。(図1B)0.1mg/kgの用量のLuc mRNAをIV注射して6時間後の主要臓器におけるルシフェラーゼのエキスビポ画像(n=2)。DOTAPのモル百分率が増加するにつれて、ルシフェラーゼタンパク質発現は肝臓から脾臓、次いで、肺に移動した。(図1C)定量データから、DOTAPパーセントが組織特異的送達に最も重要な要因であることが証明された。mDLNP(0%)が肝臓に最適であり、DOTAP10-15(これらの間では類似する)が脾臓に最適であり、DOTAP50が肺に最適であった。IV注射後にルシフェラーゼ発現が肝臓、脾臓、および肺にしか検出されなかったので、各臓器における相対的発現を計算した。明らかに、製剤中にあるDOTAP(永久カチオン性脂質)パーセントが多いほど、肝臓におけるルミネセンスが少なくなり、>70%の時には0に近くなった。しかしながら、DOTAPパーセントが多いほど、肺におけるルミネセンスが多くなり、>70%の時には100%に近くなった。DOTAP5-20は脾臓において高いパーセントを示し、DOTAP10が最も高いように見えた。

【図2】図2A1~F2: 脂質の構造がIV注射後のmRNA発現プロファイルを決定的に決定する。一般的に、四級脂質(quaternary lipid)はパーセントが増加するにつれてmRNA送達を肝臓から脾臓、次いで、肺に変え、双性イオン性脂質は高いパーセントではmRNAを脾臓に送達するのに役立った。だが、三級アミン脂質はmRNA発現臓器を変えることができず、その代わりに肝臓における送達効力を改善した。四級脂質mDLNPの送達傾向をさらに確認するために、もう2つの四級脂質、DDABおよびEPCを選択して、DOTAPと同様に同じ改良された戦略を用いてインビポでmRNA送達を行った。(図2A1、図2B1)DDABおよびEPCは、これらの間で、およびDOTAPと、3つの比較段階:疎水性テールの長さ、飽和結合および不飽和結合、ならびに頭部の化学構造を含めて大きな構造差を示す。サイズ分布およびインビポ評価を検出するために、5%、15%、40%、および50%の四級脂質がある製剤を形成した(0.1mg/kg、6h、n=2)。(図2A2、図2B2)DOTAP mDLNPと同様に、DDABおよびEPCも、類似するmRNA送達プロファイルを示した。低いカチオンパーセント(5%)はmRNAを肝臓および脾臓に送達し、次いで、15%に増加した時には脾臓に多く送達した。40%まで増加するとmRNA発現は肝臓および脾臓ではほとんど観察されなかったが、肺は高いルシフェラーゼシグナルを示し、次いで、50%で減少した。これらの結果はDOTAP mDLNPと非常に似ている。このことから、四級脂質による官能基をもつ(functionalized)mDLNPは組織標的化mRNA送達にとって普遍的かつ一般化可能な戦略であることが示唆された。次いで、DOTAP戦略と同様に、代表的

な双性イオン性脂質、DSPCおよびDOCPeを用いてインビボでmRNA送達を評価した(図2C1、図2D1)。DSPCおよびDOCPe脂質の構造は双性イオン性脂質の一般的なクラスにある。IV注射前に、DSPCおよびDOCPe mDLNP製剤のサイズ分布をDLSによって試験した。本明細書において、DSPCおよびDOCPeは、構造:飽和对不飽和疎水性テールと、頭部における電荷位置(charge position versus in head groups)の点で二段階比較を示した(図2C2、図2D2)。興味深いことに、四級脂質製剤のような類似するmRNA発現プロファイルは観察されなかった。その代わりに、DSPCとDOCPeは両方とも所定の範囲内で(DSPCでは80%未満、DOCPeでは50%未満)脾臓へのmRNA送達を改善し、どんなパーセントでも肺においてシグナルは認められなかった(0.1mg/kg、6h、n=2)。これらの結果に触発されて、同じ戦略を用いて、イオン化可能な三級アミン脂質、DODAPおよびC12-200をさらに試験した。DODAPは頭部以外はDOTAPと同じ構造を有し(四級アミン対三級アミン)、C12-200は、siRNAまたはmRNA送達に用いられる効果的なリピドイド(lipidoid)であり、DODAPと全く異なる構造を有する。(図2E1、図2F1)同様に、両方の修飾mDLNPのサイズ分布は、ある特定のパーセント(80%未満)では依然として良好であった。(図2E2、図2F2)驚いたことに、DODAPおよびC12-200はmRNA発現プロファイルを変えることができなかった(四級脂質または双性イオン性脂質と比較して異なる効果)。その代わりに、DODAPおよびC12-200は肝臓へのmRNA送達を増加させた。これを支持するように、DODAP20およびC12-200はオリジナルmDLNP製剤よりもかなり良好な送達効力を示した(0.1mg/kg、6h、n=2)。DODAPまたはC12-200のパーセントが増加するにつれて(50%または80%)、ルシフェラーゼシグナルは大幅に減少したが、脾臓または肺ではなく、肝臓が依然として主要臓器であった。

10

20

【図3】図3A~C:次いで、様々な脂質が臓器においてmRNA発現の大きな差を誘導し得る理由を確かめるために、分布アッセイとpKa検出を行った。生体内分布とpKaは両方とも臓器でのmRNA発現プロファイルにとって重要な役割を果たした。(図3A)3種類の改変mDLNPであるDOTAP(四級脂質)、DSPC(双性イオン性脂質)、およびDODAP(三級アミン脂質)によって送達されたCy5.5-Luc mRNA製剤の臓器分布。C57BL/6マウスを0.5mg/kgの用量でIV注射し、注射して6時間後に画像化した(n=2)。DOTAPはオリジナルのmDLNP製剤(DOTAPなし)と比較してmRNAの臓器分布を変え、DOTAP10とDOTAP50は両方ともmRNAを肺に送達することができ、DOTAP50の方が多く増加させた。このことは、DOTAP製剤が高いパーセントで肺におけるmRNA発現を媒介した理由を部分的に説明するのかもしれない。しかしながら、DSPCとDODAPは両方とも80%(DSPC)でも50%(DODAP)パーセントでもmRNA分布をあまり変えることができなかった。図1および図2に示したように、DOTAP50およびDSPC80については、mRNAは肝臓に保持されることも認められた。前者は肺標的化NPであり、後者は脾臓標的化NPであった。従って、分布は、この機構を説明する唯一の要因ではなかった。(図3B)次いで、オリジナルのmDLNP、DOTAP、DDAB、EPC、DSCP、DOCPe、DODAP、およびC12-200によって改変された製剤を含む、全ての試験した、かつ有効な製剤のpKaを測定した。(図3C)最後に、定義された規則に基づいて、pKaと組織特異的mRNA送達との関係をプロットした。ここでは、表に示したように、スコア付けするために8つの規則を設計した。明らかに、全ての肝臓標的化製剤のpKaは狭く(約6~7)、脾臓標的化製剤には有意な範囲がなかったが、肺標的化送達は高いpKa(>9.25)を必要とした。

30

【図4】図4A~C:Td-TomatoとC57BL/6マウスの両方で肝臓遺伝子編集および肺遺伝子編集が成し遂げられた。(図4A)模式図は、Td-TomatoマウスにCas9 mRNAおよびsgTom1が同時送達されると、td-tomato発現が活性化されることを示す。(図4B)mDLNPおよびDOTAP50製剤で処置した時に、それぞれ、肝臓および肺においてTd-Tomato発現が誘導された。IVT Cas9 mRNAと修飾sgTom1(4/1、wt/wt)を2.5mg/kgの全用量(各50 µg)で同時送達するために、マウスにmDLNPおよびDOTAP50製剤をIV注射した。次いで、処置の10日目に主要臓器の蛍光が検出された。(図4C)T7E1アッセイから、インビボPTEN編集を用いて組織特異的特徴がさらに確認されたことが分かった。組織特異的遺伝子編集に到達するために、C57 BL6マウスにmDLNP、DODAP20、またはDOTAP50をIV注射した。全用量は2.5mg/kg(各50 µg)であった。IVT Cas9 mRNAと修飾sgPTENの重量比は4/1であり、検出時間は処置後10日目であった。

40

50

【図 5】図5A～C：DOTAP mDLNP製剤の特徴付け(n=3)。サイズ、PDI(図5A)、およびゼータ電位(図5B)を動的光散乱(DLS)によって検出した。(図5C)カプセル化効率(EE%)はRibogreen RNAアッセイによって試験した。

【図 6】図6A～C：DOTAP製剤は優れたmRNA送達効率を示し、エタノールまたは酸性緩衝液では良好な忍容性を示さなかった、これらのカーゴ、例えば、タンパク質に対して送達能力を示した。(図6A)DOTAP mDLNPはHuh-7細胞およびA549細胞において高いLuc mRNA発現を媒介し、mRNA送達には5%～50%のDOTAPパーセントがより良く、10%が最良であることが明らかになった。50ng/ウェルの用量のmRNAを用いたトランスフェクションの24時間後にLuc mRNA発現と細胞生存率を試験した(n=4)。ここでは、クエン酸緩衝液(10mM, pH4.0)ではなくPBS中でDOTAP mDLNPを形成した。(図6Bおよび6C)減少した体積百分率のエタノールは特徴付けとmRNA送達効能に影響を及ぼさなかった。mRNA送達に対するエタノールの影響を試験するために、モデルとしてDOTAP25を選択し、様々な体積比のエタノール:PBS(1:3、1:5、1:7.5、および1:10)を用いて4つの製剤を形成した。4つ全ての製剤が同様のEE、サイズ、およびPDIを示し(図6B)、FaDu細胞(50ng/ウェルmRNA、24h、n=4)において等しいmRNA送達効能を示した(図6C)。従って、この製剤を、酸性緩衝液(10mM pH4.0)ではなく1X PBS(pH7.4)を用いて最適化し、エタノールパーセントを激減させた。これから、高いエタノール濃度中でも酸性緩衝液中でも良好な忍容性を示さないカーゴ、例えば、タンパク質をDOTAP製剤は送達する可能性が示された。

【図 7】主要臓器における生体内分布の定量データ。C57 BL6マウスに、様々なCy5.5-Luc mRNA製剤を0.5mg/kgの用量でIV注射した(n=2)。6時間後に心臓、肺、肝臓、脾臓、および腎臓を単離、画像化、および定量した。

【図 8】図8A～C：PBSまたはクエン酸緩衝液によって形成されたDOTAP10製剤についてサイズ分布とLuc mRNA送達効力に大きな違いはなかったが、これはDSPC50およびDODAP50には適用されなかった。インビボでのmRNA送達効力に対する緩衝液の影響を試験するために、DOTAP10(四級脂質)、DSPC50(双性イオン性脂質)、およびDODAP50(三級アミン脂質)を選択した。C57 BL6マウスに各Luc mRNA製剤を0.1mg/kgの用量でIV注射し、6時間後に主要臓器を単離および画像化した(n=2)。(図8A)PBSによって形成したDOTAP10とクエン酸緩衝液(10mM、pH4.0)によって形成したDOTAP10との間でサイズと送達効力は両方ともあまり変化しなかった。(図8Bおよび8C)だが、クエン酸緩衝液によって形成したDSPC50およびDODAP50はmRNA送達効果を劇的に改善したが、サイズ分布に大きな差はなかった。DOTAP(または別の永久カチオン性脂質)は、中性pH(例えば、7.4 PBS緩衝液)におけるLNP形成に必須の要件である。

【図 9】mDLNPによって送達されたIVT Cas9 mRNA品質試験のウエスタンブロット結果。組織特異的遺伝子編集を成し遂げるために、Cas9mRNAおよびsgRNAを同時送達するように設計した。最初に、Cas9 mRNAをIVTによって作製し、品質試験のためにウエスタンブロットによって分析した。このアッセイでは、Cas9 pDNAはリポフェクタミン2000と市販のCas9 mRNA(TriLink)によって送達された。mDLNPは正の対照であり、mCherry mDLNPは負の対照であった。トランスフェクションの前日に293T細胞を12ウェルプレートに播種し、細胞を各条件で24時間処理した後にウエスタンブロットを行った。IVT Cas9 mRNAは市販のmRNAよりもかなり良好に働いた。従って、IVT Cas9 mRNAを用いてインビボで遺伝子編集を行った。

【図 10】図10AおよびB：Td-TomatoマウスにおけるsgRNAスクリーニングおよび重量比(Cas9 mRNA/sgRNA)の最適化。Td-Tomatoマウスにおいて最大遺伝子編集に到達するために、sgRNA配列をスクリーニングし、Cas9mRNAとsgRNAとの重量比を最適化した。(図10A)Cas9/sgTom1、Cas9/sgTom2、およびCas9/sgLoxP mDLNP製剤のサイズ分布、ならびに肝臓におけるtd-tomato発現。マウスに3種類のmDLNPを3mg/kgの全用量(Cas9/sgRNA、4/1、wt/wt)でIV注射し、7日目に臓器を画像化した。3種類の候補の中でsgTom1は首位であるように見えた。(図10B)SgTom1を選択し、肝臓遺伝子編集があるかどうか2/1、4/1、および6/1の異なる重量比(Cas9/sgRNA)によってさらに試験した。IV注射のためにmDLNPを3mg/kgの用量で使用した。td-tomato発現が7日目に検出された。この実施例では4/1は2/1および6/1より

も良好に働いた。

【図 1 1】図11A～G：Cas9/sgRNA複合体と、Cas9/sgRNA複合体をカプセル化した後のDOTN P脂質ナノ粒子の特徴付け。PBS(pH7.4)およびクエン酸緩衝液(pH4.2)中のCas9/sgLUC複合体(mol/mol=1/1)のサイズ(図11A)とゼータ電位(図11B)。クエン酸緩衝液中で調製したCas9/sgLUC複合体のサイズは非常に大きく(100nmより大きい)、ゼータ電位は正に荷電しており、そのため、脂質ナノ粒子によってカプセル化することは不可能である。しかしながら、PBS中で調製したCas9/sgLUC複合体のサイズは小さく(20nm未満)、負電荷を有し、そのため、脂質ナノ粒子によってカプセル化することができる。異なるCas9/sgRNAモル比(1/1、1/3、および1/5)で調製したCas9/sgLUC複合体のサイズ(図11C)とゼータ電位(図11D)。Cas9/sgLUC複合体(1/1、mol/mol)と比較して、モル比が大きいほど(1/3および1/5、mol/mol)、サイズが小さくなり、負電荷が大きくなった。これは脂質ナノ粒子カプセル化に有益である。異なるモル比(1/1、1/3、1/5)で調製した時の、DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgLUC複合体(DOTNP10-Lと名付けた)のサイズ(図11E)とゼータ電位(図11F)。(図11G)DOTNP10-L(1/3、mol/mol)のTEM画像。DOTAP脂質ナノ粒子は、5A2-SC8、コレステロール、DOPE、DMG-PEG、およびDOTAPを含む5つの成分からなる。5A2-SC8、コレステロール、DOPE、およびDMG-PEGのモル比を固定した(15:15:30:5、mol/mol)。DOTNPXとは、異なるモル百分率のDOTAPがあるDOTNPを意味する。ここでは、sgLUC、sgGFP、sgTOM、sgPTENなどを含む異なるsgRNAを使用した。これらを区別するために、DOTNPの終わりに各遺伝子の最初の文字を加えた。例えば、DOTNP10-Lとは、DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgLUC複合体を意味し、DOTNP10-Gとは、DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgGFP複合体を意味する。

【図 1 2】図12A～F：DOTNP脂質ナノ粒子はCas9/sgRNA複合体を核に送達することができ、インビトロで効率的な遺伝子編集を示した。(図12A)DOTNP10カプセル化Cas9-EGFP/sgLUC複合体(1/3、mol/mol)と1時間、3時間、6時間、および24時間インキュベートした後のHela-Luc細胞の共焦点画像(9nMのsgRNAを使用した)。緑色:EGFP融合Cas9タンパク質;青色:Hoechst 33342で染色した核。赤色の矢印は、DOTNP10が核に入るプロセスを示した。(図12B)異なるモル比のDOTNP10-Lと3日間インキュベートした後のLUC遺伝子座におけるインデルパーセントをTIDE配列決定によって分析した(24nMのsgRNAを使用した)。DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgGFP(DOTNP10-G)を負の対照として使用した。ここでは、2種類の市販のCas9タンパク質(GeneArt Cas9およびTruecut Cas9)を使用した。(図12C)異なる製剤とインキュベートしたHela-Luc細胞のT7EI切断アッセイ(24nMのsgRNAを使用した)。1.100bp DNAラダー;2.PBS;3.DOTNP10-G(1/3);4.DOTNP10-L(1/1);5.DOTNP10-L(1/3);6.DOTNP10-L(1/5);7.DOTNP10-L(1/3)をクエン酸緩衝液中で調製した。2種類の市販のCas9タンパク質(GeneArt Cas9およびTruecut Cas9)を使用した。これらのうち、Truecut Cas9タンパク質を使用した時に1/3のモル比が最良の遺伝子編集を示した。(図12D)DOTNP10-LおよびDOTNP10-GとインキュベートしたSKOV3-GFP細胞の蛍光顕微鏡画像(24nMのsgRNAを使用した)。ここでは、DOTNP10-Lを負の対照として使用した。(図12E)DOTNP10-LおよびDOTNP10-GとインキュベートしたSKOV3-GFP細胞のフローサイトメトリー分析。(図12F)フローサイトメトリーによる、DOTNP10-LおよびDOTNP10-GとインキュベートしたSKOV3-GFP細胞の平均蛍光強度。

【図 1 3】図13AおよびB：DOTNPはインビボで組織特異的遺伝子編集を示した。(図13A)異なる製剤(1.5mg/kgのsgRNA/マウス)をIV注射して7日後の主要臓器におけるtdTomato蛍光のエキスピボ画像。DOTNP5-Tは、DOTNP5脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgTom複合体を意味する。DOTNP10-Tは、DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgTom複合体を意味する。DOTNP50-Tは、DOTNP50脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgTom複合体を意味する。DOTNP5-T処置群ではtdTomato蛍光は肝臓でしか観察されなかった。DOTNP10-T群では、わずかな蛍光が肺に認められ、DOTAP用量が50%までさらに増加した場合(DOTNP50-T)、tdTomato蛍光のほとんどが肺で観察された。(図13B)DOTNP5-P(DOTNP5脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgPTEN複合体)、DOTNP10-P(DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgPTEN複合体)、およびDOTNP50-P(DOTNP50脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgPTEN複合体)(2mg/kgのsgRNA/マウス)とインキ

ュベートした後の肝臓および肺臓器のT7EI切断アッセイ。結果は、エキスピボ画像化によって得られたものと一致している。DOTNP5-Pで処置した後、遺伝子編集は肝臓でしか観察されなかった。DOTNP10-Pとインキュベートした時、遺伝子編集は肝臓と肺の両方で得られた。これに対して、DOTNP50-P処置群では、遺伝子編集のほとんどが肺で観察された。

【図14】図14AおよびB：(図14A)各成分の構造、(図14B)モル比、全脂質とmRNAの重量比、サイズ、およびPDIを含む、MC3 LNPおよびDOTAP改変MC3製剤の詳細を示す。

【図15】図15AおよびB：DLin-MC3-DMA(図15A)およびC12-200(図15B)を選択し、0.1mg/kgの用量でDOTAP戦略を用いて評価したことを示す(6h、n=2)。DOTAPパーセントが0~50%に増加するにつれて、MC3およびC12-200をベースとするLNPは、ルシフェラーゼシグナルが肝臓から脾臓に、最終的に肺に移動したmDLNPのように同一のmRNA発現プロファイルを示した。

10

【図16】図16AおよびB：(図16A)各成分の構造、(図16B)モル比、全脂質とmRNAの重量比、サイズ、およびPDIを含む、C12-200 LNPおよびDOTAP改変C12-200製剤の詳細を示す。

【図17】図17AおよびB：(図17A)さらなるmDLNP最適化を示す。mDLNPにおける重要な脂質として「5番目の」脂質である5A2-SC8を用いてmDLNPを改変して、10%~30%の余分なパーセントがある4つの製剤を形成した。(図17B)エキスピボルシフェラーゼ画像と定量データから、余分な15%~25%の5A2-SC8を用いてmRNA送達効率が劇的に改善し、20%のシグナルが最も高いことが分かった(0.05mg/kg、6h、n=2)。

【図18】5A2-SC8、DOPE、コレステロール、およびDMG-PEGの構造を示す。mDLNPは、15/15/30/3のモル比の5A2-SC8、DOPE、コレステロール、およびDME-PEGによって構成されている、以前の研究によって開発された肝臓標的化治療剤用の有効かつ安全なmRNA送達担体である。

20

【図19】図19A~G：選択的臓器標的化(selective ORgan Targeting)(SORT)を用いると、特定の臓器において正確に細胞を編集するように脂質ナノ粒子(LNP)を系統的かつ予測可能に操作できることを示す。(19A)従来のLNPへの補助成分(SORT脂質と呼ぶ)の添加はインスピボ送達プロファイルを系統的に変え、SORT脂質のパーセントおよび生物物理学的特性の関数として組織特異的送達を媒介する。この普遍的な方法論は複数のクラスのナノ粒子の方向を首尾良く変えた。ここでは、0.1mg/kgルシフェラーゼmRNAを肺特異的および脾臓特異的DLin-MC3-DMA LNP(Onpattro SNALP)および肝臓強化5A2-SC8分解性デンドリマーベースLNP(DLNP)の内部に入れて静脈内注射したマウスのバイオルミネセンス画像を示した。4成分5A2-SC8、DLin-MC3-DMA、およびC12-200 LNPにSORT脂質を含めることで5成分SORT LNPを作り出した。(19B)5A2-SC8 SORT LNPを5A2-SC8/DOPE/Chol/DMG-PEG/SORT脂質=15/15/30/3/X(mol/mol)のモル比で処方した。0%~100%のSORT脂質(全脂質に対する割合)を用いて一連のLNPを作製するように、Xを0~1200に調整した。ここでは、永久カチオン性脂質(DOTAP)を含めると、DOTAPパーセントの関数としてルシフェラーゼタンパク質発現が肝臓から脾臓から肺に系統的にシフトした(0.1mg/kg Luc mRNA、6h)。(19C)定量データから、SORT脂質パーセントは組織特異的送達に最も重要な要因であることが証明された。0%(mDLNP)は肝臓に最適であった。5~15%は脾臓に最適であった。50%は肺に最適であった。(19D)各臓器における相対ルシフェラーゼ発現から、分画(fractional)発現を予測可能に調整できたことが証明された。(19E)アニオン性SORT脂質を含めると脾臓への選択的mRNA送達が可能になった。18PA脂質をmDLNPに40%まで導入した時にはルシフェラーゼ発現は脾臓にしか観察されなかった(0.1mg/kg Luc mRNA、6h)。(19F)DLin-MC3-DMA SORT LNPと0.1mg/kgの用量のLuc mRNAをIV注射して6時間後の主要臓器におけるルミネセンスのエキスピボ画像。DOTAPのモル百分率が増加するにつれて、ルシフェラーゼ発現は肝臓から肺へ移動した。18PAは脾臓へのLuc mRNAの排他的送達を媒介した。改変されたC12-200 LNP(0.1mg/kg、6h)について同じ傾向が観察された。(19G)選択されたSORT脂質製剤の詳細。

30

40

【図20】図20A~C：(20A)モル比、モル百分率、全脂質とmRNAの重量比、サイズ、PDIおよびゼータ電位を含む、DOTAPおよび18PA SORT LNPの詳細を示す。(20B)改良されたエタノール希釈法を用いてLNPを処方した。SORT脂質をエタノール相に含め、LNP形成中にsgRNA/mRNAをカプセル化する。(20C)標準的なmDLNPおよびDOTAP/18PA SORT製剤に使用した脂

50

質の化学構造を示した。SORTを開発するために、5A2-SC8と名付けた分解性デンドリマーベースのカチオン性イオン化可能脂質が、MYCによって推進される(MYC-driven)肝臓癌(Zhou et al., 2016; Zhang et al., 2018a; Zhang et al., 2018b)および肝臓におけるトグル倍数性(toggle polyploidy)の遺伝子操作マウスモデルにおいて生存期間を延ばすためにsiRNA/miRNAを送達することができるLNPの焦点であった。mRNA送達に最適化されたLNPモル組成物は肝臓に集まり、mDLNPと名付けられた(Cheng et al., 2018)。5A2-SC8/DOPE/コレステロール/DMG-PEG2000=15/15/30/3(mol)の、この肝臓標的化基本mRNA製剤を調製し、SORT脂質を加えてSORT LNPを調製した(20Aに詳細)。さらに分かりやすくするために、従来の4成分LNPはカチオン性イオン化可能脂質(本明細書中では、 $pK_a < 8$ のアミノ基を含有すると定義された)、双性イオン性リン脂質(同数の正電荷と負電荷を有する脂質と定義された)、コレステロール、およびポリ(エチレングリコール)(PEG)脂質(最も一般的にはPEG 2000-DMG)で構成される。SORT LNPは5番目の脂質、例えば、永久カチオン性脂質(pK_a なしで、または $pK_a > 8$ で正に荷電していると定義された)または永久アニオン性脂質(負に荷電していると定義された)を含む。

【図 2 1】図21AおよびB：組み込まれたDOTAPパーセントの関数としての、(図21A)Huh-7肝臓細胞および(図21B)A549肺細胞におけるDOTAP改変SORT mDLNPのインビトロルシフェラーゼ(Luc)mRNA送達結果を示す。Luc mRNA送達結果から、Huh-7肝臓細胞とA549肺細胞の両方で、DOTAPパーセントが5%~50%のLNPが最も多くmRNAを送達することが分かった。10%DOTAPを含むSORT LNPは、インビトロで、以前に報告された基本mDLNPよりもかなり有効であった。どの製剤にも明らかな細胞傷害性は観察されず、全てが均一であり(低PDI)、直径は90nm~150nmであった(図20)。表面電荷の測定値から、DOTAPが60%未満の時にゼータ電位が0に近くなるので、DOTAPはmRNAと一緒に内部にカプセル化され、LNP表面には無いことが明らかになった。65%を超えるパーセントの時だけ表面電荷は正になった(図20)。このことは、クリニカルトランスレーションに重要な特質である中性に近い表面電荷を有し、選択的な組織向性があるPEG脂質コーティングSORT LNPが発見できたことを示している。トランスフェクションの前日に、細胞を96ウェルプレートに 1×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。50ng/ウェルの用量のLuc mRNAで処理して24時間後にLuc mRNA発現と細胞生存率を測定した($n=4$)。

【図 2 2】図22A~C：(22A)DLin-MC3-DMA SNALP(Jayaraman et al., 2012)および(22B)C12-200 LLNP(Love et al., 2010)において使用した脂質の化学構造を示した。DLin-MC3-DMA/DSPC/コレステロール/DMG-PEG2000=50/10/38.5/1.5(mol)およびC12-200/DOPE/コレステロール/DMG-PEG2000=35/16/46.5/2.5(mol)の肝臓標的化基本mRNA製剤を調製し、後でSORT脂質を加えてSORT LNPを調製した。(22C)DLin-MC3-DMAおよびC12-200を用いた、さらなるSORT製剤の表および結果。全てのDLin-MC3-DMAおよびC12-200LNPについて全脂質/mRNAの重量比は20/1(wt/wt)であった。

【図 2 3】図23A~C：SORTが一般的な生物物理学的特性に頼り、正確な化学構造に頼らないことを示す。(23A)SORT脂質は、定義された生物物理学的特性がある特定の群に分けることができる。永久カチオン性SORT脂質(DDAB、EPC、およびDOTAP)は全て、(SORT脂質パーセントに基づいて肝臓から脾臓から肺へ)同じmRNA送達プロファイルをもたらした(0.1mg/kg Luc mRNA、6h)。(23B)アニオン性SORT脂質(14PA、18BMP、18PA)は全て、同じmRNA送達プロファイルをもたらした(SORT脂質パーセントに基づいても脾臓)。(23C)三級アミノ基を有するカチオン性イオン化可能SORT脂質(DODAP、C12-200)は、肺でのルシフェラーゼ発現が全くなく肝臓送達を強化した(0.1mg/kg Luc mRNA、6h)。

【図 2 4】図24AおよびB：mDLNP肝臓送達をさらに強化するために、SORTをさらに適用して、カチオン性イオン化可能脂質をSORT脂質として利用したことを示す。(24A)SORTの模式図。(24B)5A2-SC8をSORT脂質として使用し、本質的に、SORT法を用いて、基本mRNA mDLNP製剤(5A2-SC8/DOPE/コレステロール/DMG-PEG2000=15/15/30/3(mol))に追加の5A2-SC8を加えた。エクスピボルシフェラーゼ画像と定量データから、余分な15%~25%SORT脂質を添加した時にmRNA送達効能は劇的に改善したことが分かった。20%を組み込んだ時に(0.05mg/kg、6h、 $n=2$)、最大発現が生じた。従って、SORTによって、効力が増した第2世代

のmDLNPが開発された。

【図 2 5】図25AおよびB：双性イオン性SORT脂質の効果が評価されたことを示す。双性イオン性SORT脂質を肝臓標的化mDLNPに含めると、SORT脂質の組み込みが増加するにつれて発現が肝臓から脾臓に変化した。IV注射後に、80%DSPCと50%DOCPe SORT LNPはmRNAをもっぱら脾臓に送達した。(25A)SORT方法の模式図。(25B)IV注射して6時間後の主要臓器におけるルミネセンスのエキスピボ画像。異なる構造の双性イオン性脂質であるDSPCおよびDOCPeは、パーセントが増加するにつれて脾臓へのLuc mRNA送達を改善した(0.1mg/kg、6h、n=2)。

【図 2 6】図26AおよびB：不活性LNP製剤を「活性化」するための潜在的な戦略としてSORTを評価した。(26A)SORTが活性を付与できるか試験するために、不活性C1製剤にSORT脂質を加えた模式図。(26B)脂質モル比、モル百分率、全脂質とmRNAの重量比、サイズ、およびPDIを含む、C1 LNP(不活性LNP)およびDOTAP(またはDODAP)C1 SORT LNPの詳細な情報。mRNAカプセル化と好ましい生物物理学的特性(均一<200nmサイズ)を可能にする手法でC1 LNPを調製した。しかしながら、C1 LNPのIV注射後にタンパク質は全く発現しなかった。従って、SORTが、死んだ(dead)LNPを「活性化」できるかどうか問い質した。DODAPおよびDOTAP SORT脂質を評価した。DODAP@C1 LNPはmRNAを脾臓および肝臓に送達し、DOTAP@C1 LNPはmRNAを肺および脾臓に送達した(0.1mg/kg、6h、n=2)。従って、SORTは死んだLNPを活性化し、組織選択性をもたらすことができる。

【図 2 7】図27AおよびB：SORTはLNP生体内分布を変え、相対的見かけのpKaと臓器特異性との相関関係を明らかにしたことを示す。(27A)蛍光Cy5標識mRNAを使用してSORT LNPの生体内分布を追跡した。SORT脂質としてDOTAPを含めると肺においてmRNA蓄積が増加した。このことは、RNAをマウス肺に送達する能力を部分的に説明している。18PAは脾臓への取り込みを増加させた。DODAPは肝臓蓄積をわずかに増加させ、脾臓蓄積を減少させた(0.5mg/kg、6h)。このデータはSORT LNPの場所について説明し、mRNAを細胞内に生産的に送達する能力について説明していないことに注意する。(27B)67全ての効果的なmRNA製剤の相対的見かけのpKaをTNSアッセイによって測定し、様々な臓器におけるインビボでの送達効力(タンパク質に翻訳されるmRNAによる機能的送達)に対してプロットした。予想通り、全ての肝臓標的化製剤のpKaは狭かった(6~7)。驚いたことに、肺標的送達には高いpKa(>9)が必要とされ、低いpKa(<6)は脾臓送達を助けた。全てのSORT LNPは、(集団で組織向性を媒介する)他の荷電した脂質と無荷電の脂質の混合物と共に、(エンドソーム回避のために)カチオン性イオン化可能脂質を含有することに注意する。

【図 2 8】図28AおよびB：Cy5標識mRNAを使用してSORT LNPの生体内分布を追跡したことを示す。IV注射後のDSPC mDLNPの臓器分布。(28A)SORTの模式図。(28B)DSPC mDLNPによって処置した主要臓器のCy5蛍光と定量データ(0.5mg/kg、6h、n=2)。

【図 2 9】改良されたTNSアッセイを用いてmRNA製剤の全体の/見かけのpKaを測定したことを示す。全部で67の成功したNP製剤(高いインビボ効力)を評価した。基準化されたシグナルの50%が発生した時の基本LNP製剤(SORT脂質を添加していない)と比較して相対pKaを推定した。TNSアッセイは、1種類のカチオン性イオン化可能脂質と中性(イオン化不可能な)ヘルパー脂質をもつLNPを測定して、自己集合したLNPの中にあるカチオン性脂質のイオン化挙動を捕らえた値を得るために歴史を通して用いられてきた。ここでは、改良された方法を使用した。なぜなら、高パーセント(>40%)の永久カチオン性脂質(例えば、DOTAP)を含むSORT LNPはカチオン性イオン化可能脂質を含有するが、電荷をあまり緩衝しないからである。(従来のLNPにあるように1種類のカチオン性イオン化可能脂質を含有せず)様々な荷電した脂質を含有するSORT LNPの複雑さのために、インビボ組織特異的活性と相関関係がある50%での相対シグナルに焦点を合わせた。

【図 3 0】図30AおよびB：効力を得るためにはイオン化可能脂質(例えば、5A2-SC8)の含有が必要であったことを示す。SORT脂質を含有するが、カチオン性イオン化可能脂質を含有しないLNPには活性がなかった。(30A)SORT C2 LNPの模式図。(30B)C2およびSORT脂質C2 LNPの詳細。エキスピボルシフエラーゼ画像から、DODAPとDOTAPは両方ともC2 LNPの有意なmRNA送達を可能にしなかったことが分かった。これらの結果から、mRNA送達の成功には

イオン化可能なアミノ脂質が必要なことが分かる(0.1mg/kg、6h、n=2)。

【図 3 1】図31A~E：SORT LNPを用いた時に、Td-TomatoマウスにおいてCre mRNA送達によって組織特異的遺伝子編集が可能になったことを示す。(31A)模式図は、Td-TomトランスジェニックマウスにCre mRNAが送達されることでTd-Tom発現が活性化されることを示す。(31B)mDLNPおよび20%DODAP LNPは肝臓において特異的にTd-Tom蛍光を誘導し、50%DOTAP LNPは肺を選択的に編集した。Cre mRNAを装填したLNP(0.3mg/kg)をIV注射して2日後に主要臓器のTd-Tom蛍光が検出された。(31C)30%18PA SORT LNPは脾臓において遺伝子編集を誘導した(PBS注射マウスでは肝臓バックグラウンド蛍光が強いことに注意する)。(31D)共焦点顕微鏡観察を用いて効果的な組織編集をさらに確認した。スケールバー=20 μ mおよび100 μ m。(31E)FACSを使用して、肝臓、肺、および脾臓の定義された細胞タイプ集団内にあるTdTom⁺細胞のパーセントを定量した(2日目、0.3mg/kg)。

10

【図 3 2】B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)}Hze/J(Ai9)マウスはTdTomの吸収領域において、いくらかの自己蛍光を示すことを示す。さらに、異なる臓器間でTdTom自己蛍光に大きな差がある(n=2)。肝臓と腎臓は最も高いシグナルを示し、脾臓は最も低いシグナルを示す。このことは、ほとんどの臓器において編集の検出を妨害しないが(バックグラウンドを無くすように励起設定を適切に調整した)、脾臓TdTom発現の検出を複雑にする。なぜなら、バックグラウンド脾臓が他の臓器よりもかなり低いからである。

【図 3 3】図33A~C：Cas9 mRNAとsgRNAを同時送達することによってTd-Tomトランスジェニックマウスと野生型C57/BL6マウスの両方において脾臓でのCRISPR/Cas遺伝子編集が成し遂げられたことを示す。(33A)模式図は、Td-TomマウスにCas9 mRNAとsgTom1を同時送達するとTd-Tom発現が活性化されることを示す。(33B)脾臓標的化製剤30%18PA SORT LNPによってTd-Tom発現が脾臓と肝臓において誘導された。定量データから、脾臓での編集が肝臓よりも多いことが分かった。4mg/kgの全用量でCas9 mRNAと修飾sgTom1(2/1、wt/wt)を同時送達したIV処置後2日目に主要臓器のTd-Tom蛍光が検出された。(33C)T7E1アッセイから、Cas9 mRNA(IVT)とsgPTENを同時送達することで脾臓の特異的PTEN編集が得られたことが分かった。C57/BL6マウスに30%18PA SORT LNPを4mg/kgの全用量でIV注射した(Cas9 mRNA/sgPTEN、2/1、wt/wt)。2日目にPTEN編集が検出された。この場合、肝臓編集は観察されなかった。このことから、脾臓を特異的に編集できることが示唆される。

20

【図 3 4】DODAP-20 SORT LNPを用いると、単回0.3mg/kg Cre mRNA用量を肝細胞に投与して、ほぼ100%のTdTom編集が成し遂げられたことを示す。フローサイトメトリーヒストグラムに示したように、TdTom-対照マウスとTdTom+20%DODAP処置マウスは完全に分離している。肝臓灌流後に、20%DODAP SORT LNPで処置したマウスの切除された肝臓は対照肝臓と比較して驚くほど明るい赤色であった。蛍光励起がなくても、TdTom発現が完全に活性化されたために肝臓は真っ赤になった。TdTomマウスに0.3mg/kg Cre mRNAを注射し、次いで、2日後に屠殺した(n=3)。肝細胞を二段階コラゲナーゼ灌流によって単離し、TdTom蛍光をフローサイトメトリーによって分析した。

30

【図 3 5】肺細胞におけるTdTom+発現を分析するためのFACSゲーティング戦略を説明する。Ghost Red780を用いて生細胞と死細胞を区別した。上皮細胞を規定するのにEpCam+を使用し、免疫細胞を規定するのにCD45+およびCD31-を使用し、内皮細胞を規定するのにCD45-およびCD31+を使用した。PBS注射対照マウスに基づいて細胞タイプにおけるTd-Tom+のゲートを描いた。Td-TomマウスにCre mRNA製剤を注射した。2日後にフローによって所定の細胞タイプにおいてTd-Tom+が検出された(n=3)。

40

【図 3 6】脾細胞におけるTdTom+発現を分析するためのFACSゲーティング戦略を説明する。Ghost Red 780を用いて生細胞と死細胞を区別した。免疫細胞を識別するのにCD44+を使用し、次いで、T細胞にはCD3+およびCD11b-を使用し、マクロファージ細胞にはCD3-およびCD11b+を使用し、B細胞にはCD19+およびCD11b-を使用した。PBS注射対照マウスに基づいて細胞タイプにおけるTd-Tom+のゲートを描いた。Td-TomマウスにCre mRNA製剤を注射した。2日後にフローによって所定の細胞タイプにおいてTd-Tomato+が検出された(n=3)。

【図 3 7】図37A~G：Cas9 mRNAとsgRNAの同時送達とCas9 RNPの送達による、SORT LNPによって媒介された、Td-TomトランスジェニックマウスおよびC57/BL6野生型マウスの組織

50

特異的CRISPR/Cas遺伝子編集を示す。(37A)模式図は、Td-TomトランスジェニックマウスにCas9 mRNA(またはCas9タンパク質)とsgTom1を同時送達するとTd-Tom発現が活性化されることを示す。(37B)mDLNPおよび20%DOTAP LNPは肝臓において特異的にTd-Tom蛍光を誘導し、50%DOTAP LNPは肺を選択的に編集した。Cas9 mRNAおよび修飾sgTom1(4/1、wt/wt)を2.5mg/kgの全用量でIV注射して10日後にTd-Tom蛍光が検出された。(37C)組織切片の共焦点画像化によってtdTom発現が確認された。スケールバー=20 μ mおよび100 μ m。(37D)C57/BL6マウスの肝臓、肺、および脾臓を選択的に編集するために、Cas9 mRNAおよびsgPTENをSORT LNPの中に入れて同時送達した(2.5mg/kgの全用量(Cas9 mRNA/sgPTEN、4/1、wt/wt; 1回注射して10日後に測定した)。T7E1アッセイから組織特異的PTEN編集が成し遂げられたことが分かった。(37E)H&E切片およびIHCによってPTEN編集が成功したことがさらに確認された。透明な細胞質はH&E切片では脂質蓄積を示し、IHC画像ではPTEN消失を示した。スケールバー=60 μ m。(37F)7%DOTAPまたは55% DOTAP SORT LNPの中に入れてCas9/sgTom1リボ核タンパク質(RNP)複合体を送達すると、それぞれ、肝臓および肺において特異的にTd-Tom蛍光が誘導された。Cas9/sgTom1 RNPを1.5mg/kg sgTom1の用量でIV注射して7日後にTd-Tom蛍光が検出された。組織切片の共焦点画像化によってtdTom発現が確認された。スケールバー=20 μ mおよび100 μ m。(37G)肝臓向性および肺向性のSORT LNPはまた、C57/BL6マウスの肝臓および肺を選択的に編集するようにCas9/sgPTEN RNPも送達した(1.5mg/kg sgPTEN;1回注射して7日後に測定した)。T7E1アッセイから組織特異的PTEN編集が成し遂げられたことが分かった。

10

【図38】IVT Cas9 mRNAがウエスタンブロットによって評価されたことを示す。トランスフェクションの前日に293T細胞を12ウェルプレートに播種し、細胞を各条件で24時間処理した後にウエスタンブロットを行った。Cas9 pDNAをリボフェクタミン2000によって送達し、mRNAをmDLNPによって送達した。

20

【図39】図39AおよびB: Cas9 mRNAとsgRNAの同時送達戦略を介してIVT Cas9 mRNAとsgTom1との重量比が最適化されたことを示す。(39A)模式図は、トランスジェニックマウスにCas9 mRNAとsgTom1を同時送達するとTd-Tom発現が活性化されることを示す。(39B)IV注射後7日目に主要臓器のTd-Tom蛍光を画像化した。これから、2/1のCas9/sgTom1(wt/wt)が最適なことが分かる。全RNA用量は1mg/kgであり、IVT Cas9 mRNAと修飾sgTom1をmDLNPによって同時カプセル化した。

【図40】図40A~I: 組織特異的ゲノム編集のためにCRISPR/Cas9リボ核タンパク質(RNP)を全身ナノ粒子送達するためのモジュール方式アプローチが開発されたことを示す。(40A)永久カチオン性補助成分(例えば、DOTAP)を従来のLNP製剤に加えると、ナノ粒子形成中に中性緩衝液を用いてCas9/sgRNA複合体をカプセル化し、保護することができた。DOTAPパーセントの正確な調整は組織特異的遺伝子編集を媒介した。(40B)PBS緩衝液(pH7.4)とクエン酸緩衝液(pH4.0)中で調製したCas9/sgLuc RNPのサイズ分布。サイズの増加は変性(denaturization)に起因する可能性が高い。(40C)PBSとクエン酸緩衝液中で調製した5A2-DOT-10カプセル化Cas9/sgLuc RNPのサイズ分布。RNPなしで調製した5A2-DOT-10を対照として使用した。(40D)1/1、1/3、および1/5のCas9/sgLucモル比を用いたCas9/sgRNA RNPのサイズ分布。(40E)1/1、1/3、および1/5のモル比を用いた5A2-DOT-10カプセル化Cas9/sgLucのサイズ分布。(40F)減少する電荷を示した、Cas9/sgRNA RNPのゼータ電位。(40G)モル比が異なる5A2-DOT-10カプセル化Cas9/sgLucについてゼータ電位の有意差は観察されなかった。(40H)細胞質放出と、核への段階的な侵入を示した、5A2-DOT-10 LNPカプセル化EGFP融合Cas9/sgRNAの時間依存的な細胞取り込み。(40I)5A2-DOT-10 LNP取り込みの阻害を特異的エンドサイトーシス阻害剤を用いて研究した。AMI:マクロピノサイトーシス阻害剤;CMZ:クラスリンを介したエンドサイトーシスの阻害剤;GEN:カベオラを介したエンドサイトーシスの阻害剤;M β CD:脂質ラフトを介したエンドサイトーシス;4 $^{\circ}$ C:エネルギーを介したエンドサイトーシス。

30

40

【図41】図41A~C: (41A)5A2-DOT-5(5モル%DOTAP)、5A2-DOT-10、5A2-DOT-20、5A2-DOT-30、5A2-DOT-40、5A2-DOT-50、および5A2-DOT-60(60モル%DOTAP)LNPを処方するのに使用したモル比とモル百分率を示した5A2-DOT-X LNPの表を示す。全てのLNPに40:1(wt.)の

50

全脂質/sgRNA比を使用した。(41B)異なる5A2-DOT-X Cas9/sgLuc RNP製剤で処理した後のHeLa-Luc細胞における遺伝子編集をT7EIアッセイを用いて検出した。(41C)遺伝子編集をサンガー配列決定とICE分析を用いて分析した。

【図42】1/3のモル比を用いた5A2-DOT-10カプセル化Cas9/sgLuc RNP複合体の代表的なTEM画像を示す。5A2-DOT-10 Cas9/sgLucを、PBS緩衝液中で2mg/mLの全脂質濃度で調製した。3μLのナノ粒子溶液をカーボンTEMグリッド上に滴下し、1分間沈着させた後に濾紙でブロッディングした。次いで、TEMグリッドを透過型電子顕微鏡(FEI Tecnai G2 Spirit Bio twin)を用いて画像化した。

【図43】処理して20時間後の、HeLa-Luc細胞におけるPBS(対照)、遊離Cas9/sgLuc複合体(対照)、および5A2-DOT-10 Cas9/sgLucの細胞取り込みを示した共焦点画像を示す。Cas9-EGFP融合タンパク質を使用してCas9/sgRNA複合体の細胞下分布を追跡した。Cas9/sgLuc複合体は細胞内にバックグラウンド(PBS)を超える検出可能な緑色蛍光を示さなかった。これに対して、5A2-DOT-10で処理した後に明るい緑色のシグナルが検出された。

【図44】図44A~H：遺伝子編集がインビトロで素早く、かつ効果的に起こることを示す。(44A)様々なナノ粒子および対照で処理したHeLa-Luc細胞から単離したDNAのT7EI切断アッセイ。Cas9/sgLucRNP(1/3および1/5)を送達する5A2-DOT-10によって極めて効果的な遺伝子編集が媒介された。Luc遺伝子座におけるインデル(%)をICE分析によって定量した。低pHクエン酸緩衝液(現在用いられている確立した方法)を用いて調製したLNPについては遺伝子編集が0%であったことに注意する。(44B)様々な製剤で処理した後のHeLa-GFP細胞の蛍光顕微鏡画像。スケールバー=100μm。5A2-DOT-10 Cas9/sgGFP処理によってGFP蛍光が有意に減少した。(44C)様々な製剤で処理した後のHeLa-GFP細胞のフローサイトメトリ分析。5A2-DOT-10 Cas9/sgGFP群だけ、GFP陽性細胞のピークは完全に左にシフトした。このことから、ほぼ全てのGFP陽性細胞が暗くなったことが分かる。(44D)様々な処理後のHeLa-GFP細胞の時間依存的なGFP蛍光強度。5A2-DOT-10Cas9/sgGFPで処理して2日目の後で恒久的なGFP蛍光消失が観察された。これに対して、サンガー配列決定データのICE分析から、2日目後にインデルは90%超で維持されたことが分かった。(44Eおよび44F)Cas9/sgGFPのみ、Cas9/sgGFPを装填した、10%補助DOTAPを含有する、5A2-SC8、C12-200、DLin-MC3-DMA LNP製剤、Cas9/sgGFPを装填した従来のC12-200およびDLin-MC3-DMA LNPナノ製剤(nanoformulation)、ならびにCas9/sgGFPを装填したRNAiMAXで処理した後のHeLa-GFP細胞の平均蛍光強度(%)。3つ全てのDOTAP改変製剤で処理した後にGFP蛍光は有意に減少した。サンガー配列決定データのICE分析から、最も高い遺伝子編集効率は5A2-DOT-10 LNPを用いた時であることがさらに確認された。平均±s.e.m.(n=3)。統計的有意性は両側ステューデントt検定を用いて求めた。†:t値=42.69、自由度(df)=4(P<0.0001);††:t値=16.75、自由度(df)=4(P<0.0001);†††:t値=37.53、自由度(df)=4(P<0.0001)。P値<0.05が統計的に有意だとみなされた。(44G)5A2-DOT-10 Cas9/sgGFP LNPを4℃で2ヶ月間保管した。ナノ粒子直径とPDIを経時的にモニタリングした。(44H)保管されたLNPを用いてHeLa-GFP細胞を定期的に処理しても活性は失われていないことが分かった。このとは長期のLNPおよびRNPの安定性と翻訳能力を示している。上記の実験における全細胞を24nM sgRNAで処理した。

【図45】図45AおよびB：HeLa-GFP細胞における異なるナノ製剤の遺伝子編集を示す。(45A)Cas9/sgGFPのみ、5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc、および5A2-DOT-10 Cas9/sgGFP(40:1の全脂質/sgGFP重量比)の処置後のHeLa-GFP細胞の平均蛍光強度(%)。(45B)10:1、20:1、30:1、および40:1の全脂質/sgGFP重量比で調製した5A2-DOT-10 Cas9/sgGFPの処理後のHeLa-GFP細胞の平均蛍光強度(%)。

【図46】図46A~K：一般化可能なRNP送達戦略(図40A)が、カチオン性イオン化可能脂質ナノ粒子(DLNP、LLNP、SNALP)、およびpH7.4で正に荷電している他のカチオン性脂質、および他の中性緩衝液にとって普遍的なことを示す。(46A)異なるイオン化可能脂質を含むLNP製剤のスキーム。(46B)最終的なモル比および各成分のパーセントならびに全脂質とsgRNAの重量比を含む、異なるイオン化可能脂質を含むLNP製剤の詳細。(46C)5A2-SC8、C12-200、およびDLin-MC3-DMAを含む、製剤に使用したカチオン性イオン化可能脂質の化学構造

。(46D)5A2-DOT-10、C12-200-DOT-10、およびMC3-DOT-10にカプセル化されたCas9/sgGFP RNPで処理した後のHeLa-GFP細胞の平均蛍光強度(%)。3つ全ての製剤で処理した後にGFP 10
蛍光は有意に減少した。(46E)異なる永久カチオン性脂質を含むLNP製剤の調製のスキーム。(46F)最終的なモル比および各成分のパーセントならびに全脂質とsgRNAの重量比を含む、異なる永久カチオン性脂質を含むLNP製剤の詳細。(46G)DOTAP、DDAB、およびEPCを含む、製剤に使用した永久カチオン性脂質の化学構造。(46H)5A2-DOT-10、5A2-DDAB-10、および5A2-EPC-10にカプセル化されたCas9/sgGFP RNPで処理した後のHeLa-GFP細胞の平均蛍光 20
強度(%)。DOTAPの代わりに他のカチオン性脂質(DDABおよびEPC)も効率的な遺伝子編集を成し遂げることができた。(46I)異なる緩衝液中のLNP製剤のスキーム。(46J)PBS、Opti-MEM、HEPES、およびクエン酸緩衝液を含む、異なる緩衝液を用いて処方した5A2-DOT-10で 30
処理した後のHeLa-GFP細胞の平均蛍光強度(%)。中性緩衝液はRNPカプセル化と送達に必要とされた。(46K)異なる緩衝液を用いて調製した5A2-DOT-10 Cas9/sgGFP LNPで処理した後の、HeLa-GFP細胞から単離したゲノムDNA中のGFP遺伝子座でのインデル(%)を、ICE分析を用いて測定した。全ての中性緩衝液が、細胞において多量の遺伝子編集を示した。このことから、ナノ粒子調製における中性緩衝液の重要性が証明された。理解しやすくするために、関連データを集めて一緒にするために、図44Eおよび44Fが上記の図45において再現されたことに留意してください。

【図47】図47A~J：高効率多重ゲノム編集がインビボで成し遂げられたことを示す。(47A)模式図は、Cas9/sgTOM RNPの送達によって、どのようにTd-Tomatoトランスジェニック 40
マウスにおいてTd-Tom発現が活性化されるかを示す。5A2-DOT-X LNPをTd-Tomマウスに(筋肉内または脳内注射を介して)局所注射および(尾静脈を通したi.v.注射によって)全身注射した。5A2-DOT-10 Cas9/sgTOMを筋肉内(1mg/kg sgTOM)(47B)または脳内(0.15mg/kg sgTOM)(47D)注射した後のTd-Tomマウスのインビボ画像化によって、(それぞれ)肢の筋肉または脳組織において明るい赤色の蛍光が示された。CRISPR/Cas遺伝子編集が成功したことが、(47C)筋肉および(47E)脳組織切片の共焦点画像化によってさらに確認された。5A2-DOT-10を用いると、局所RNP注射に以前に用いられたことがある正の対照RNAiMAXよりも高い遺伝子編集効率が可能になった。(47F)DOTAPのモル百分率が異なる5A2-DOT-X Cas9/sgTOM LNPを静脈内(IV)注射した後のTd-Tomマウスのインビボ画像化。DNA編集の下流読み取り(downstream readout)であるTd-Tom蛍光から、低DOTAPパーセントは肝臓編集を容易にするの 50
に対して、高DOTAPパーセントは肺編集を容易にすることが分かった(1.5mg/kg sgTOM、IV)。(47G)CRISPR/Cas遺伝子編集が成功したことが共焦点画像化によってさらに確認された。(47H)5A2-DOT-5、5A2-DOT-10、5A2-DOT-50、および5A2-DOT-60カプセル化Cas9/sgPTENを用いて全身IV処置した後に肝臓および肺組織から単離したDNAに対してT7EI切断アッセイを行った。インデル(%)を計算および報告した。(47I)6つの標的に対するsgRNA(sgTOM、sgP53、sgPTEN、sgEml4、sgALK、およびsgRB1)を含有する5A2-DOT-50 LNP(5A2-DOT-50-Pool)を2mg/kgの全RNA用量(0.33mg/kg各sgRNA)でtd-TomマウスにIV投与した。TOM遺伝子座における遺伝子編集がインビボ画像化によって確認された。(47J)肺組織に対するT7EI切断アッセイを用いて他の5つの遺伝子座の編集が確認された。

【図48】図48A~H：5A2-DOT-X LNPは複雑なマウスモデルの作製を単純化することを示す。(48A)インサイチュー肝臓特異的癌モデルを作り出すために、5A2-DOT-5 LNPカプセル 40
化Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNPを成獣C57BL/6マウスに毎週注射した(3回の注射、2.5mg/kg全sgRNA、IV、n=4)。12週間後、15週間後、および20週間後にマウスを屠殺し、肝臓を収集して腫瘍発生を分析した。(48B)肝臓から抽出したゲノムDNAからのT7EI切断結果から、遺伝子編集が3つ全ての遺伝子座において発生したことが確認された。(48C)注射して20週間後に切除した腫瘍を含有するマウス肝臓の代表的な写真。(48D)H&EおよびKi67染色によって進行性の腫瘍形成がさらに確認された。高い腫瘍増殖バイオマーカーKi67発現が腫瘍病変部において検出された。スケールバー=100 μm。(48E)インサイチュー肺特異的癌モデルを作り出すために、5A2-DOT-50 LNPカプセル化Cas9/sgEml4/sgAlk RNPを成獣C57BL/6マウスに1回(2mg/kg)または2回(2週間にわたって毎週1.5mg/kg)注射した(IV、n=5)。10週間後、16週間後、および24週間後にマウスを屠殺し、肺を収集して腫瘍発生を分析した。 50

(48F)肺から抽出したゲノムDNAからのT7EI切断結果から、遺伝子編集がEm14およびAlkの遺伝子座において発生したことが確認された。5A2-DOT-50 LNPで処置した全ての肺においてEm14-Alk再編成のPCRアンプリコンも検出された。(48G)Em14-Alk再編成がサブクロニングとDNA配列決定によってさらに確認された。(予測=SEQ ID NO:50;クローン1=SEQ ID NO:51;クローン2=SEQ ID NO:52;クローン3=SEQ ID NO:53;クローン4=SEQ ID NO:54;クローン5=SEQ ID NO:55;クローン6=SEQ ID NO:56;クローン7=SEQ ID NO:57;クローン8=SEQ ID NO:58)。(48H)H&EおよびKi67染色によって進行性の腫瘍形成がさらに確認された。高い腫瘍増殖バイオマーカーKi67発現が肺腫瘍病変部において検出された。スケールバー=100 μ m。

【図49】図49AおよびB：化学修飾され、かつ合成されたsgRNA(最初とおよび最後の3つのヌクレオチドにおける2'-メチル3'-ホスホロチオエート修飾)と比較した、インビトロ転写(IVT)によって合成された未修飾sgRNAの遺伝子編集効率を示す。(49A)ナノ粒子内にカプセル化された、IVT sgRNAおよび化学修飾されたsgRNAで処置した後のHela-Luc-Cas9細胞における相対ルシフェラーゼ活性。(49B)ナノ粒子内にカプセル化された、Cas9/IVT sgRNAおよびCas9/化学修飾sgRNAの遺伝子編集効率を検出したT7EIアッセイ。修飾sgRNA処置群において536bpおよび184bpの切断バンドがはっきりと観察された。

【図50】5A2-DOT-5 LNPカプセル化Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNPで処置した後のマウス肝臓におけるP53、PTEN、およびRB1遺伝子の遺伝子編集を示す。2週間にわたって毎週処置した後に、PTEN、P53、およびRB1ゲノム遺伝子座における肝臓ゲノムDNAの遺伝子編集を検出したT7EIアッセイ。PBS処置群を対照として使用した。261bpおよび215bpのP53標的PCRアンプリコンにおいて切断バンドが検出された。345bpおよび293bpのPTEN標的PCRアンプリコンにおいて切断バンドが検出された。395bpおよび207bpのRB1標的PCRアンプリコンにおいて切断バンドが検出された。

【図51】5A2-DOT-5 LNPカプセル化Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNPで処置した後のマウス肝臓におけるP53、PTEN、およびRB1遺伝子の遺伝子編集を検出したT7EIアッセイを示す。PBS処置および5A2-DOT-5のみ(Cas9/sgRNAなし)処置群を対照として使用した。5A2-DOT-5 LNPカプセル化Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNPで20週間処置した後のマウスの腫瘍から抽出したゲノムDNAのT7EI結果から、3つ全てのゲノム遺伝子座において切断バンドが検出されたので、これらの3つの遺伝子のノックアウトによって腫瘍発生が誘導されることが証明された。

【図52】マウス肝臓、および5A2-DOT-5 LNPカプセル化Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNPで15週間処置した群のマウスから切除した切除腫瘍の代表的な写真を示す。

【図53】図53A～C：5A2-DOT-5 LNPだけ(Cas9/sgRNAなし)(対照)で15週間および20週間処置した後のマウス肝臓(53A)、5A2-DOT-5 LNPカプセル化Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNPで20週間処置した群のマウスから切除した腫瘍(53B)のH&E染色画像およびKi67染色画像を示す。5A2-DOT-5 LNPのみの処置では形態学的変化は検出されなかった。このことから、ナノベクター(nanovector)だけでは腫瘍を引き起こさないことが示唆される。スケールバー:100 μ m。(53C)5A2-DOT-5 LNPカプセル化Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNPで20週間処置した後のマウス肝臓腫瘍発生の拡大画像。スケールバー:500 μ m。

【図54】図54A～D：5A2-DOT-50 LNPカプセル化Cas9/sgEm14/sgAlk RNPで7日間処置した後の(2mg/kgの全sgRNA)、マウス肺におけるEm14-Alk再編成の発生を示す。T7EIアッセイによって、マウス肺から抽出したゲノムDNAにおいてEm14編集(54A)およびAlk編集(54B)が検出された。(54C)Em14-Alk逆位(inversion)を確かめるために、マウス肺から抽出したゲノムDNAに対してPCR分析を行った。(54D)PCRアンプリコンをサブクロニングした。6つの独立したクローンの配列を列挙し、上パネルに代表的なクロマトグラムを示した。クロマトグラムはEm14-Alk再編成について予測されたものと全く同じであった(予測=SEQ ID NO:59;クローン1=SEQ ID NO:59;クローン2=SEQ ID NO:60;クローン4=SEQ ID NO:61;クローン5=SEQ ID NO:61;クローン6=SEQ ID NO:62)。

【図55】5A2-DOT-50 LNPだけ(Cas9/sgRNAなし)で10週間および16週間処置したマウス肝臓のH&E染色画像およびKi67染色画像を示す(LNP用量は1mg/kgの全sgRNAに等しい)。5A2-D

10

20

30

40

50

OT-50 LNPだけしか注射しなかった動物では形態学的変化は検出されなかった。スケールバー:100 μm 。

【図56】5A2-DOT-50 LNPカプセル化Cas9/sgEm14/sgAlk RNPで24週間処置した後のマウス肺腫瘍発生の拡大画像を示す。スケールバー:500 μm 。H&E染色画像およびKi67染色画像の両方から、いくつかの腫瘍病変部(強調済)が観察された。

【図57】5A2-DOT-10 LNPがオボアルブミン(OVA)タンパク質をHeLa-Luc細胞の細胞質に効率的に送達できることを示す。遊離ローダミン標識OVAタンパク質および5A2-DOT-10 LNPカプセル化ローダミン標識OVAで細胞を22時間処理した後に、共焦点顕微鏡観察で画像化した。

【発明を実施するための形態】

【0067】

例示的な態様の説明

1)永久カチオン性脂質、2)カチオン性イオン化可能脂質、および3)リン脂質で構成される脂質ナノ粒子(LNP)が本明細書において説明され、任意で、コレステロールと脂質PEGまたはその両方を含有してもよい。永久カチオン性脂質の含有は、LNPを肺、リンパ節、または脾臓などの特定の臓器に向けるのに役立つ。本明細書において示されたデータは、この効果が普遍的なものであり、成分がモジュラー化されていることを示しており、各カテゴリーは、5A2-SC8が任意のカチオン性イオン化可能脂質と交換することができ、DOTAPが任意のカチオン性脂質と交換することができ、DOPEが任意のリン脂質と交換することができることを示している。いくつかの態様において、コレステロールと脂質PEGも含まれるが、コレステロールも脂質PEGもない製剤が実現可能である。これらの担体は、インビボで特定の臓器にmRNA、sgRNA、およびタンパク質を送達することができ、従って、大きな課題が解決される。これらの担体はまたインビボで特定の臓器に、他の核酸(例えば、siRNA、miRNA、crRNA、trRNA、tRNAなど)および薬物(例えば、低分子)も送達できることが意図される。

【0068】

A. 化学的定義

化学基の文脈において用いられる場合:「水素」は-Hを意味し;「ヒドロキシ」は-OHを意味し;「オキソ」は=Oを意味し;「カルボニル」は-C(=O)-を意味し;「カルボキシ」は-C(=O)OH (-COOHもしくは-CO₂Hとも表記される)を意味し;「ハロ」は独立して-F、-Cl、-Brもしくは-Iを意味し;「アミノ」は-NH₂を意味し;「ヒドロキシアミノ」は-NHOHを意味し;「ニトロ」は-NO₂を意味し;イミノは-NHを意味し;「シアノ」は-CNを意味し;「イソシアネート」は-N=C=Oを意味し;「アジド」は-N₃を意味し;一価の文脈において「リン酸塩」は-OP(O)(OH)₂もしくはその脱プロトン化形態を意味し;二価の文脈において「リン酸塩」は-OP(O)(OH)O-もしくはその脱プロトン化形態を意味し;「メルカプト」は-SHを意味し;「チオ」は=Sを意味し;「スルホニル」は-S(O)₂-を意味し;「ヒドロキシルスルホニル」は-S(O)₂OHを意味し;「スルホンアミド」は-S(O)₂NH₂を意味し;および「スルフィニル」は-S(O)-を意味する。

【0069】

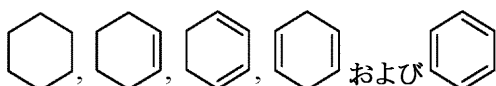
化学式の文脈において、記号「—」は単結合を意味し、「=」は二重結合を意味し、「≡」は三重結合を意味する。記号「----」は任意の結合を表し、これが存在する場合、単結合もしくは二重結合のいずれかである。記号:

「」

は単結合もしくは二重結合を示す。したがって、例えば、式:



は、



10

20

30

40

50

を含む。そのような環原子は2つ以上の二重結合の一部を形成しないことが理解される。さらに、共有結合記号「—」は、1個もしくは2個のステレオジェン原子を連結する場合、いかなる好ましい立体化学も示さないことに留意されたい。そうではなく、それは全ての立体異性体およびその混合物を網羅する。記号:

「」

は結合を横切って垂直に描かれた場合

(例えば、メチルの場合の—CH₃)、

基の結合点を示す。読者が結合点を明確に特定するのを補助するために、結合点は、典型的には、より大きな基についてこのようなやり方でのみ特定されることに留意されたい。

記号:

「」

は、くさびの太端に結合した基が「頁の外」にある単結合を意味する。記号:

「」

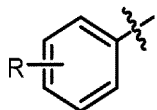
は、くさびの太端に結合した基が「頁の中」にある単結合を意味する。記号:

「」

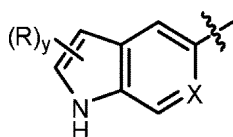
は、二重結合の周りの幾何(例えば、EもしくはZのどちらか)が定義されていない単結合を意味する。それゆえ、両方の選択枝、およびそれらの組み合わせが意図される。本出願において示される構造の原子上のいずれの未定義の原子価も、その原子に結合した水素原子を暗示する。炭素原子上の太点は、その炭素に結合している水素が紙面の外へ配向していることを示す。

【0070】

基「R」が、例えば、式:



において、環系上に「浮遊基」として描かれているなら、Rは、安定な構造が形成される限り、描写された、暗示された、または明確に定義された水素を含む、いずれかの環原子に結合した任意の水素原子に取って代わりうる。基「R」が、例えば式:



にあるように、縮合環系上に「浮遊基」として描かれているなら、Rは、特別の定めのない限り、縮合環のいずれかの環原子のいずれかに結合した任意の水素に取って代わりうる。置換可能な水素には、安定な構造が形成される限り、描かれた水素(例えば、上記の式中の窒素に結合した水素)、含意された水素(例えば、示されていないが、存在するものと理解される上記の式の水素)、明確に定義された水素、および存在が環原子の同一性に依る任意の水素(例えば、Xが—CH—に等しい場合、基Xに結合した水素)が含まれる。描かれた例において、Rは、縮合環系の5員環もしくは6員環のどちらかに存在しうる。上記の式において、括弧で囲まれた基「R」の直後の下付き文字「y」は数値変数を表す。特別の定めのない限り、この変数は、環もしくは環系の置換可能な水素原子の最大数によってのみ制限される、0、1、2、もしくは2より大きい任意の整数とすることができる。

【0071】

化学基および化合物クラスの場合、基もしくはクラスにおける炭素原子の数は以下のように示される: 「C_n」は基/クラスにおける炭素原子の正確な数(n)を定義する。「C_{≤n}」は、基/クラスに入ることができる炭素原子の最大数(n)を定義し、最小数は対象となっている基/クラスに対して可能な限り小さいものとなり、例えば、基「アルケニル_(C_{≤8})」もしくはクラス「アルケン_(C_{≤8})」における炭素原子の最小数は2であるものと理解される。1~10個の炭素原子を有するアルコキシ基を示す「アルコキシ_(C_{≤10})」と比較された

い。「Cn-n'」は、基中の炭素原子の最小数(n)と最大数(n')の両方を定義する。したがって、「アルキル_(C2~10)」は、2~10個の炭素原子を有するアルキル基を示す。これらの炭素数インジケータは、それが修飾する化学基もしくはクラスの前もしくは後にあってもよく、意味のいずれの変化も示すことなく、括弧で囲まれていてもいなくてもよい。したがって、「C5オレフィン」、「C5-オレフィン」、「オレフィン_(C5)」および「オレフィン_{C5}」という用語は、全て同意語である。

【0072】

「飽和した」という用語は、化合物もしくは化学基を修飾するために用いられる場合、化合物または化学基が、以下に記載の場合を除いて、炭素-炭素二重結合なしおよび炭素-炭素三重結合なしを意味する。この用語が原子を修飾するために用いられる場合、その原子が任意の二重結合もしくは三重結合の一部ではないことを意味する。飽和基の置換型の場合、1つもしくは複数の炭素酸素二重結合もしくは炭素窒素二重結合が存在しうる。そのような結合が存在するなら、ケト-エノール互変異性もしくはイミン/エナミン互変異性の一部として生じうる炭素-炭素二重結合は排除されない。「飽和した」という用語が物質の溶液を修飾するために用いられる場合、その物質がそれ以上その溶液に溶解しえないことを意味する。

【0073】

「脂肪族」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、そのように修飾された化合物もしくは化学基は、非環式もしくは環式であるが、非芳香族の炭化水素化合物もしくは基であることを示す。脂肪族化合物/基において、炭素原子は、直鎖、分枝鎖、もしくは非芳香族環(脂環式)において一緒に連結されることができる。脂肪族化合物/基は、一重炭素-炭素結合によって連結された飽和(アルカン/アルキル)、あるいは1つもしくは複数の炭素-炭素二重結合(アルケン/アルケニル)または1つもしくは複数の炭素-炭素三重結合(アルキン/アルキニル)による不飽和であることができる。

【0074】

「芳香族」という用語は、化合物もしくは化学基原子を修飾するために用いられる場合、環を形成する結合の相互作用によって安定化された原子の平面不飽和環を含む化合物もしくは化学基を意味する。

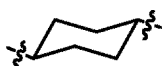
【0075】

「アルキル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての炭素原子、直鎖もしくは分枝鎖非環式構造を有し、炭素および水素以外の原子を有していない、一価の飽和脂肪族基をいう。基-CH₃ (Me)、-CH₂CH₃ (Et)、-CH₂CH₂CH₃ (n-Prもしくはプロピル)、-CH(CH₃)₂ (i-Pr、ⁱPrもしくはイソプロピル)、-CH₂CH₂CH₂CH₃ (n-Bu)、-CH(CH₃)CH₂CH₃ (sec-ブチル)、-CH₂CH(CH₃)₂ (イソブチル)、-C(CH₃)₃ (tert-ブチル、t-ブチル、t-Buもしくは^tBu)、および-CH₂C(CH₃)₃ (neo-ペンチル)は、アルキル基の非限定的な例である。「アルカンジイル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての1つもしくは2つの飽和炭素原子、直鎖もしくは分枝鎖非環式構造を有し、炭素-炭素二重もしくは三重結合を有しておらず、かつ炭素および水素以外の原子を有していない、二価の飽和脂肪族基をいう。基-CH₂- (メチレン)、-CH₂CH₂-, -CH₂C(CH₃)₂CH₂-, および-CH₂CH₂CH₂-はアルカンジイル基の非限定的な例である。「アルカン」は、Rが、この用語が上記で定義される通りのアルキルである、式H-Rを有する化合物のクラスをいう。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH、もしくは-S(O)₂NH₂により置き換えられている。以下の基は置換アルキル基の非限定的な例である: -CH₂OH、-CH₂Cl、-CF₃、-CH₂CN、-CH₂C(O)OH、-CH₂C(O)OCH₃、-CH₂C(O)NH₂、-CH₂C(O)CH₃、-CH₂OCH₃、-CH₂OC(O)CH₃、-CH₂NH₂、-CH₂N(CH₃)₂、および-CH₂CH₂Cl。「ハロアルキル」という用語は、置換アルキルの一部であり、炭素、水素およびハロゲン以外の他の原子が存在しないように、水素原子の置き換えがハロ(すなわち、-F、-Cl、-Br

、もしくは-I)に限定されている。基-CH₂Clは、ハロアルキルの非限定的な例である。「フルオロアルキル」という用語は、置換アルキルの一部であり、炭素、水素およびフッ素以外の他の原子が存在しないように、水素原子の置き換えがフルオロに限定されている。基-CH₂F、-CF₃、および-CH₂CF₃はフルオロアルキル基の非限定的な例である。

【0076】

「シクロアルキル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての炭素原子を有し、該炭素原子は1つもしくは複数の非芳香環構造の一部を形成し、炭素-炭素二重もしくは三重結合を有しておらず、かつ炭素および水素以外の原子を有していない、一価の飽和脂肪族基をいう。非限定的な例としては、-CH(CH₂)₂ (シクロプロピル)、シクロブチル、シクロペンチル、もしくはシクロヘキシル(Cy)が挙げられる。「シクロアルカンジイル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての2つの炭素原子を有し、炭素-炭素二重もしくは三重結合を有しておらず、かつ炭素および水素以外の原子を有していない、二価の飽和脂肪族基をいう。基:



は、シクロアルカンジイル基の非限定的な例である。「シクロアルカン」は、Rが、この用語が上記で定義される通りのシクロアルキルである、式H-Rを有する化合物のクラスをいう。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH、もしくは-S(O)₂NH₂により置き換えられている。

【0077】

「アルケニル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての炭素原子、直鎖もしくは分枝鎖非環式構造、少なくとも1つの非芳香族炭素-炭素二重結合を有し、炭素-炭素三重結合を有しておらず、かつ炭素および水素以外の原子を有していない、一価の不飽和脂肪族基をいう。非限定的な例としては、-CH=CH₂ (ビニル)、-CH=CHCH₃、-CH=CHCH₂CH₃、-CH₂CH=CH₂ (アリル)、-CH₂CH=CHCH₃、および-CH=CHCH=CH₂が挙げられる。「アルケンジイル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての2つの炭素原子、直鎖もしくは分枝鎖、直鎖もしくは分枝鎖非環式構造、少なくとも1つの非芳香族炭素-炭素二重結合を有し、炭素-炭素三重結合を有しておらず、かつ炭素および水素以外の原子を有していない、二価の不飽和脂肪族基をいう。基-CH=CH-、-CH=C(CH₃)CH₂-、-CH=CHCH₂-、および-CH₂CH=CHCH₂-はアルケンジイル基の非限定的な例である。アルケンジイル基は脂肪族であるが、両端で連結されると、この基は芳香族構造の一部を形成することから除外されないということが知られている。「アルケン」および「オレフィン」という用語は同意語であり、Rはこの用語が、上記で定義される通りのアルケニルである、式H-Rを有する化合物のクラスをいう。同様に、「末端アルケン」および「α-オレフィン」という用語は同意語であり、1つだけの炭素-炭素二重結合を有し、その結合は分子の末端のビニル基の一部であるアルケンをいう。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH、もしくは-S(O)₂NH₂により置き換えられている。基-CH=CHF、-CH=CHClおよび-CH=CHBrは置換アルケニル基の非限定的な例である。

【0078】

「アルキニル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての炭素原子、直鎖もしくは分枝鎖非環式構造、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を有し、かつ炭素および水素以外の原子を有していない、一価の不飽和脂肪族基をい

10

20

30

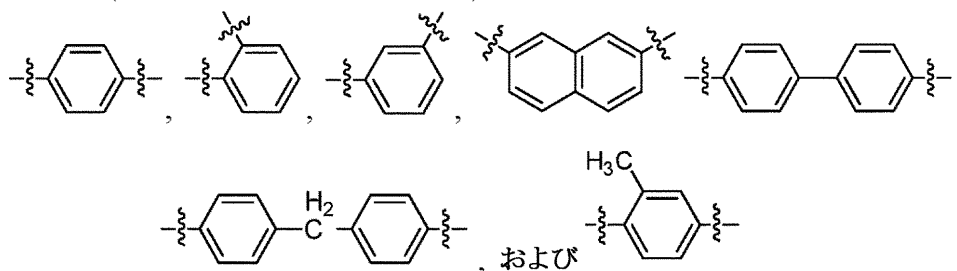
40

50

う。本明細書において用いられる場合、アルキニルという用語は、1つもしくは複数の非芳香族炭素-炭素二重結合の存在を除外しない。基 $-C\equiv CH$ 、 $-C\equiv CCH_3$ 、および $-CH_2C\equiv CCH_3$ はアルキニル基の非限定的な例である。「アルキン」は、Rがアルキニルである、式H-Rを有する化合物のクラスをいう。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して $-OH$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2CH_3$ 、 $-CN$ 、 $-SH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OCH_2CH_3$ 、 $-C(O)CH_3$ 、 $-NHCH_3$ 、 $-NHCH_2CH_3$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHCH_3$ 、 $-C(O)N(CH_3)_2$ 、 $-OC(O)CH_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$ 、 $-S(O)_2OH$ 、もしくは $-S(O)_2NH_2$ により置き換えられている。

【0079】

「アリール」いう用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての芳香族炭素原子を有し、該炭素原子は1つもしくは複数の6員芳香環構造の一部を形成し、環原子は全て炭素であり、かつ基は炭素および水素以外の原子からならない、一価の不飽和芳香族基をいう。2つ以上の環が存在する場合、環は縮合されても、縮合されなくてもよい。本明細書において用いられる場合、この用語は、第1の芳香環もしくは存在する任意のさらなる芳香環に結合された、1つもしくは複数のアルキルもしくはアラルキル基(炭素数の制限が許容する)の存在を除外しない。アリール基の非限定的な例としては、フェニル(Ph)、メチルフェニル、(ジメチル)フェニル、 $-C_6H_4CH_2CH_3$ (エチルフェニル)、ナフチル、およびビフェニルから誘導される一価の基が挙げられる。「アレージル」いう用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての2つの芳香族炭素原子を有し、該炭素原子は1つもしくは複数の6員芳香環構造の一部を形成し、環原子は全て炭素であり、かつ一価の基は炭素および水素以外の原子からならない、二価の芳香族基をいう。本明細書において用いられる場合、この用語は、第1の芳香環もしくは存在する任意のさらなる芳香環に結合された、1つもしくは複数のアルキル、アリールもしくはアラルキル基(炭素数の制限が許容する)の存在を除外しない。2つ以上の環が存在する場合、環は縮合されても、縮合されなくてもよい。非縮合環は下記の1つもしくは複数を通じて連結される：共有結合、アルカンジイル、もしくはアルケンジイル基(炭素数の制限が許容する)。アレージル基の非限定的な例としては、



が挙げられる。

【0080】

「アレーン」は、Rが、その用語が上記で定義される通りのアリールである、式H-Rを有する化合物のクラスをいう。ベンゼンおよびトルエンはアレーンの非限定的な例である。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して $-OH$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2CH_3$ 、 $-CN$ 、 $-SH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OCH_2CH_3$ 、 $-C(O)CH_3$ 、 $-NHCH_3$ 、 $-NHCH_2CH_3$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHCH_3$ 、 $-C(O)N(CH_3)_2$ 、 $-OC(O)CH_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$ 、 $-S(O)_2OH$ 、もしくは $-S(O)_2NH_2$ により置き換えられている。

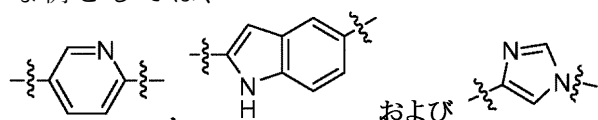
【0081】

「アラルキル」いう用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、アルカンジイルおよびアリールという用語がそれぞれ前述の定義に一致した様式で用いられる、一価の基-アルカンジイル-アリールをいう。非限定的な例は、フェニルメチル(ベンジル, Bn)および2-フェニル-エチルである。アラルキルという用語が「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、アルカンジイルおよび/もしくはアリール基からの1つ

もしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH、もしくは-S(O)₂NH₂により置き換えられている。置換アラルキルの非限定的な例は、(3-クロロフェニル)-メチル、および2-クロロ-2-フェニル-エタ-1-イルである。

【0082】

「ヘテロアリアル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての芳香族炭素原子もしくは窒素原子を有し、該炭素原子もしくは窒素原子は1つもしくは複数の芳香環構造の一部を形成し、環原子の少なくとも1つは窒素、酸素もしくは硫黄であり、かつヘテロアリアル基は炭素、水素、芳香族窒素、芳香族酸素および芳香族硫黄以外の原子からならない、一価の芳香族基をいう。ヘテロアリアル環は、窒素、酸素、および硫黄から選択される1つ、2つ、3つ、もしくは4つの環原子を含みうる。2つ以上の環が存在する場合、環は縮合されても、縮合されなくてもよい。本明細書において用いられる場合、この用語は、芳香環もしくは芳香環系に結合された1つもしくは複数のアルキル、アリアル、および/もしくはアラルキル基(炭素数の制限が許容する)の存在を除外しない。ヘテロアリアル基の非限定的な例としては、フラニル、イミダゾリル、インドリル、インダゾリル(Im)、イソキサゾリル、メチルピリジニル、オキサゾリル、フェニルピリジニル、ピリジニル(ピリジル)、ピロリル、ピリミジニル、ピラジニル、キノリル、キナゾリル、キノキサリニル、トリアジニル、テトラゾリル、チアゾリル、チエニル、およびトリアゾリルが挙げられる。「N-ヘテロアリアル」という用語は、結合点としての窒素原子を有するヘテロアリアル基をいう。「ヘテロアレレンジイル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、2つの結合点としての2つの芳香族炭素原子、2つの芳香族窒素原子、もしくは1つの芳香族炭素原子および1つの芳香族窒素原子を有し、該原子は1つもしくは複数の芳香環構造の一部を形成し、環原子の少なくとも1つは窒素、酸素もしくは硫黄であり、かつ二価基は炭素、水素、芳香族窒素、芳香族酸素および芳香族硫黄以外の原子からならない、二価の芳香族基をいう。2つ以上の環が存在する場合、環は縮合されても、縮合されなくてもよい。非縮合環は下記の1つもしくは複数の介して連結されうる：共有結合、アルカンジイル、もしくはアルケンジイル基(炭素数の制限が許容する)。本明細書において用いられる場合、この用語は、芳香環もしくは芳香環系に結合された1つもしくは複数のアルキル、アリアル、および/もしくはアラルキル基(炭素数の制限が許容する)の存在を除外しない。ヘテロアレレンジイル基の非限定的な例としては、



が挙げられる。「ヘテロアレーン」は、Rがヘテロアリアルである、式H-Rを有する化合物のクラスをいう。ピリジンおよびキノリンはヘテロアレーンの非限定的な例である。これらの用語が「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OC(H)₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH、もしくは-S(O)₂NH₂により置き換えられている。

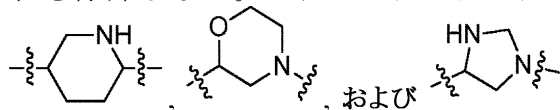
【0083】

「ヘテロシクロアルキル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、結合点としての炭素原子もしくは窒素原子を有し、該炭素原子もしくは窒素原子は1つもしくは複数の非芳香環構造の一部を形成し、環原子の少なくとも1つは窒素、酸素もしくは硫黄であり、かつヘテロシクロアルキル基は炭素、水素、窒素、酸素および硫黄以外の原子からならない、一価の非芳香族基をいう。ヘテロシクロアルキル環は、窒素、酸素、もしくは硫黄から選択される1つ、2つ、3つ、もしくは4つの環原子を含みうる。2つ以上の環が存在する場合、環は縮合されても、縮合されなくてもよい。本明細書において

て用いられる場合、この用語は、環もしくは環系に結合された1つもしくは複数のアルキル基(炭素数の制限が許容する)の存在を除外しない。同様に、この用語は、得られる基が非芳香族のままであることを条件として、環もしくは環系における1つもしくは複数の二重結合の存在を除外しない。ヘテロシクロアルキル基の非限定的な例としては、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ペペリジニル、ペペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、オキシラニル、およびオキセタニルが挙げられる。「N-ヘテロシクロアルキル」という用語は、結合点としての窒素原子を有するヘテロシクロアルキル基をいう。N-ピロリジニルはそのような基の一例である。「ヘテロシクロアルカンジイル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、2つの結合点としての2つの炭素原子、2つの窒素原子、もしくは1つの炭素原子および1つの窒素原子を有し、該原子は1つもしくは複数の環構造の一部を形成し、環原子の少なくとも1つは窒素、酸素もしくは硫黄であり、かつ二価基は炭素、水素、窒素、酸素および硫黄以外の原子からならない、二価の環基をいう。2つ以上の環が存在する場合、環は縮合されても、縮合されなくてもよい。非縮合環は下記の1つもしくは複数の介して連結されうる：共有結合、アルカンジイル、もしくはアルケンジイル基(炭素数の制限が許容する)。本明細書において用いられる場合、この用語は、環もしくは環系に結合された1つもしくは複数のアルキル基(炭素数の制限が許容する)の存在を除外しない。同様に、この用語は、得られる基が非芳香族のままであることを条件として、環もしくは環系における1つもしくは複数の二重結合の存在を除外しない。ヘテロシクロアルカンジイル基の非限定的な例としては、

10

20



が挙げられる。これらの用語が「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH、もしくは-S(O)₂NH₂により置き換えられている。

【0084】

「アシル」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rが、それらの用語が上記で定義される通りの、水素、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、アラルキルもしくはヘテロアリールである、基-C(O)Rをいう。基-CHO、-C(O)CH₃ (アセチル, Ac)、-C(O)CH₂CH₃、-C(O)CH₂CH₂CH₃、-C(O)CH(CH₃)₂、-C(O)CH(CH₂)₂、-C(O)C₆H₅、-C(O)C₆H₄CH₃、-C(O)CH₂C₆H₅、-C(O)(イミダゾリル)はアシル基の非限定的な例である。「チオアシル」は、基-C(O)Rの酸素原子が硫黄原子で置き換えられていること以外は、同様の様式で定義され、-C(S)Rである。「アルデヒド」という用語は、水素原子の少なくとも1つが-CHO基で置き換えられている、上記で定義の、アルカンに対応する。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子(もしあれば、カルボニルもしくはチオカルボニル基の炭素原子に直接結合された水素原子を含む)は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH、もしくは-S(O)₂NH₂により置き換えられている。基-C(O)CH₂CF₃、-CO₂H (カルボキシル)、-CO₂CH₃ (メチルカルボキシル)、-CO₂CH₂CH₃、-C(O)NH₂ (カルバモイル)、および-CON(CH₃)₂は置換アシル基の非限定的な例である。

30

40

【0085】

「アルコキシ」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rが、その用語が上記で定義される通りのアルキルである、基-ORをいう。非限定的な例としては、-OCH₃ (メトキシ)、-OCH₂CH₃ (エトキシ)、-OCH₂CH₂CH₃、-OCH(CH₃)₂ (イソプロポキシ)、-OC(CH₃)₃ (tert-ブトキシ)、-OCH(CH₂)₂、-O-シクロペンチル、および-O-シク

50

ロヘキシルが挙げられる。「シクロアルコキシ」、「アルケニルオキシ」、「アルキニルオキシ」、「アリールオキシ」、「アラルコキシ」、「ヘテロアリールオキシ」、「ヘテロシクロアルコキシ」、および「アシルオキシ」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rがそれぞれシクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、およびアシルである、-ORと定義される基をいう。「アルコキシジイル」という用語は、二価基-0-アルカンジイル-、-0-アルカンジイル-0-、もしくは-アルカンジイル-0-アルカンジイル-をいう。「アルキルチオ」および「アシルチオ」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rがそれぞれアルキルおよびアシルである、基-SRをいう。「アルコール」という用語は、水素原子の少なくとも1つがヒドロキシ基で置き換えられている、上記で定義の、アルカンに対応する。「エーテル」という用語は、水素原子の少なくとも1つがアルコキシ基で置き換えられている、上記で定義の、アルカンに対応する。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、1つもしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OC(=O)H₃、-OCH₂CH₃、-C(=O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(=O)NH₂、-C(=O)NHCH₃、-C(=O)N(CH₃)₂、-OC(=O)CH₃、-NHC(=O)CH₃、-S(=O)₂OH、もしくは-S(=O)₂NH₂により置き換えられている。

【0086】

「アルキルアミノ」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rが、その用語が上記で定義される通りのアルキルである、基-NHRをいう。非限定的な例としては、-NHCH₃および-NHCH₂CH₃が挙げられる。「ジアルキルアミノ」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、RおよびR'が同じもしくは異なるアルキル基でありうるか、またはRおよびR'が一緒になって、アルカンジイルを表しうる、基-NRR'をいう。ジアルキルアミノ基の非限定的な例としては、-N(CH₃)₂および-N(CH₃)(CH₂CH₃)が挙げられる。「シクロアルキルアミノ」、「アルケニルアミノ」、「アルキニルアミノ」、「アリールアミノ」、「アラルキルアミノ」、「ヘテロアリールアミノ」、「ヘテロシクロアルキルアミノ」、「アルコキシアミノ」、および「アルキルスルホニルアミノ」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rがそれぞれシクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、アルコキシ、およびアルキルスルホニルである、-NHRと定義される基をいう。アリールアミノ基の非限定的な例は-NHC₆H₅である。「アルキルアミノジイル」という用語は、二価基-NH-アルカンジイル-、-NH-アルカンジイル-NH-、もしくは-アルカンジイル-NH-アルカンジイル-をいう。「アミド」(アシルアミノ)という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rが、その用語が上記で定義される通りのアシルである、基-NHRをいう。アミド基の非限定的な例は-NHC(=O)CH₃である。「アルキルイミノ」という用語は、「置換された」という修飾語なしで用いられる場合、Rが、その用語が上記で定義される通りのアルキルである、二価基=NRをいう。これらの用語のいずれかが「置換された」という修飾語とともに用いられる場合、炭素原子に結合された1つもしくは複数の水素原子は独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(=O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(=O)NH₂、-C(=O)NHCH₃、-C(=O)N(CH₃)₂、-OC(=O)CH₃、-NHC(=O)CH₃、-S(=O)₂OH、もしくは-S(=O)₂NH₂により置き換えられている。基NHC(=O)OCH₃および-NHC(=O)NHCH₃は置換アミド基の非限定的な例である。

【0087】

「1つの(a)」もしくは「1つの(an)」という単語の使用は、特許請求の範囲および/もしくは本明細書において「含む(comprising)」という用語とともに用いられる場合、「1つ(one)」を意味しうるが、「1つもしくは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つもしくは2つ以上」の意味とも一致する。

【0088】

本出願の全体を通して、「約」という用語は、値がその値をもとめるために用いている

装置、方法の誤差の固有の変動、もしくは試験対象の間に存在する変動を含むことを示すために用いられる。

【0089】

本出願において用いられる場合、「平均分子量」という用語は、各ポリマー種のモル数とその種のモル質量との間の関係をいう。特に、各ポリマー分子は、異なるレベルの重合を有し、したがって、異なるモル質量を有しうる。平均分子量は、複数のポリマー分子の分子量を表すために用いることができる。平均分子量は、典型的には、平均モル質量と同義である。特に、3つの主要なタイプの平均分子量がある：数平均モル質量、重量(質量)平均モル質量、およびZ平均モル質量。本出願の文脈において、特別の定めのない限り、平均分子量は、式の数平均モル質量もしくは重量平均モル質量のどちらかを表す。いくつかの態様において、平均分子量は数平均モル質量である。いくつかの態様において、平均分子量は、脂質中に存在するPEG成分を記述するために使用されうる。

10

【0090】

「含む(comprise)」、「有する(have)」および「含む(include)」という用語は、制限のない連結動詞である。「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「有する(has)」、「有する(having)」、「含む(includes)」および「含む(including)」のような、これらの動詞の1つもしくは複数の任意の形式もしくは時制も制限がない。例えば、1つもしくは複数の段階を「含む(comprises)」、「有する(has)」もしくは「含む(includes)」任意の方法は、それらの1つもしくは複数の段階のみを有することに限定されることはなく、同様に他の列挙していない段階も網羅する。

20

【0091】

「有効」という用語は、その用語が本明細書および/もしくは特許請求の範囲において用いられる場合、所望の、予想の、もしくは所期の結果を達成するのに十分であることを意味する。「有効量」、「治療的有效量」もしくは「薬学的有効量」は、患者もしくは対象を化合物で処置するという文脈において用いられる場合、疾患を処置するために対象もしくは患者に投与されたときに、疾患に対するそのような処置を行うのに十分な化合物の量を意味する。

【0092】

本明細書において用いられる場合、「IC₅₀」という用語は、得られる最大の応答の50%である阻害用量をいう。この定量的尺度は、所与の生物学的、生化学的もしくは化学的プロセス(またはプロセスの成分、すなわち酵素、細胞、細胞受容体もしくは微生物)を半分だけ阻害するために、どれだけの特定の薬物もしくは他の物質(阻害剤)が必要とされるかを示す。

30

【0093】

第一の化合物の「異性体」は、各分子が第一の化合物と同じ構成原子を含むが、それらの原子の三次元の配置が異なる、別の化合物である。

【0094】

本明細書において用いられる場合、「患者」もしくは「対象」という用語は、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、もしくはそのトランスジェニック種などの、生きている哺乳類生物をいう。特定の態様において、患者もしくは対象は霊長類である。ヒト対象の非限定的な例は、成人、少年、乳児および胎児である。

40

【0095】

本明細書において一般に用いられる場合、「薬学的に許容される」とは、健全な医学的判断の範囲内で、妥当な損益比に相応の、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織、器官、および/または体液と接触して用いるのに適した、化合物、材料、組成物、および/または投与量形態をいう。

【0096】

「薬学的に許容される塩」は、上記で定義される通り、薬学的に許容され、かつ所望の薬理活性を保有する、本開示の化合物の塩を意味する。そのような塩には、塩酸、臭化水

50

素酸、硫酸、硝酸、リン酸などといった無機酸と；または1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、3-フェニルプロピオン酸、4,4'-メチレンビス(3-ヒドロキシ-2-エン-1-カルボン酸)、4-メチルビスクロ[2.2.2]オクタ-2-エン-1-カルボン酸、酢酸、脂肪族モノ-およびジカルボン酸、脂肪族硫酸、芳香族硫酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、炭酸、ケイ皮酸、クエン酸、シクロペンタンプロピオン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヘプタン酸、ヘキサン酸、ヒドロキシナフトエ酸、乳酸、ラウリル硫酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムコン酸、o-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、シュウ酸、p-クロロベンゼンスルホン酸、フェニル-置換アルカン酸、プロピオン酸、p-トルエンスルホン酸、ビルビン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、第三級ブチル酢酸、トリメチル酢酸などといった有機酸と形成される酸付加塩が含まれる。薬学的に許容される塩には、存在する酸性プロトンが無機または有機塩基と反応可能な場合に形成されうる、塩基付加塩も含まれる。許容される無機塩基には、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アルミニウムおよび水酸化カルシウムが含まれる。許容される有機塩基には、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N-メチルグルカミンなどが含まれる。本開示の任意の塩の一部を形成している特定のアニオンもしくはカチオンは、塩が全体として薬理的に許容される限り、重要ではないことが理解されるべきである。薬学的に許容される塩ならびにそれらの調製法および使用法のさらなる例は、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C. G. Wer

10

20

【0097】

本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」という用語は、化学物質を担持もしくは輸送することに関与する、液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒またはカプセル封入材料などの、薬学的に許容される材料、組成物もしくは媒体を意味する。

【0098】

「予防」または「予防すること」には、(1) 疾患のリスクが高い、および/もしくは素因を有しうるが、疾患の任意の、もしくは全ての病態もしくは総体症状をまだ経験もしくは提示していない、対象もしくは患者における疾患の発症を阻害すること、ならびに/または(2) 疾患のリスクが高い、および/もしくは素因を有しうるが、疾患の任意の、もしくは全ての病態もしくは総体症状をまだ経験もしくは提示していない、対象もしくは患者における疾患の病態もしくは総体症状の発症を遅延させることが含まれる。

30

【0099】

「繰り返し単位」は、特定の材料、例えば、有機材料、無機材料もしくは有機金属のいずれかの、骨格および/もしくはポリマーの最も単純な構造実体である。ポリマー鎖の場合、繰り返し単位は、ネックレスのビーズのように、鎖に沿って連続的に連結される。例えば、ポリエチレン- $[-CH_2CH_2-]_n$ -において、繰り返し単位は $-CH_2CH_2-$ である。下付き文字「n」は、重合度、すなわち、ともに連結した繰り返し単位の数を示す。「n」の値が未定義のままである場合、または「n」がない場合、それは単に材料のポリマー性のみでなく、括弧内の式の繰り返しを指定する。繰り返し単位概念は、金属有機骨格、変性ポリマー、熱硬化性ポリマーなどにおけるような、繰り返し単位間の連結が三次元的に伸びるところに等しく適用される。デンドリマーの文脈内で、繰り返し単位はまた、分枝単位、内部層、もしくは世代として記述されうる。同様に、末端基はまた、表面基として記述されうる。

40

【0100】

「立体異性体」もしくは「光学異性体」は、同じ原子が同じ他の原子に結合しているが、それらの原子の三次元の配置が異なる、所与の化合物の異性体である。「鏡像異性体」は、左右の手のような、互いに鏡像である、所与の化合物の立体異性体である。「ジアステレオマー」は、鏡像異性体ではない、所与の化合物の立体異性体である。キラル分子は

50

、立体中心もしくはステレオジェン中心ともいわれる、キラル中心を含み、これは任意の2つの基の交換が立体異性体につながるような基を担持する分子における任意の点であるが、必ずしも原子ではない。有機化合物において、キラル中心は典型的には炭素、リンもしくは硫黄原子であるが、有機および無機化合物において他の原子が立体中心であることも可能である。分子は複数の立体中心を有し、多くの立体異性体を生じることでもある。その立体異性が四面体ステレオジェン中心(例えば、四面体炭素)による化合物において、仮説上可能な立体異性体の総数は 2^n を越えず、 n は四面体立体中心の数である。対称性を有する分子は多くの場合、可能な最大数よりも少ない立体異性体を有する。鏡像異性体の50:50混合物はラセミ混合物といわれる。あるいは、鏡像異性体の混合物は、1つの鏡像異性体が50%よりも多い量で存在するように、鏡像異性的に濃縮されうる。典型的には、鏡像異性体および/もしくはジアステレオマーは、当技術分野において公知の技術を用いて分割もしくは分離することができる。立体化学が定義されていないキラリティーの任意の立体中心もしくは軸について、キラリティーのその立体中心もしくは軸はそのR型、S型、もしくはラセミおよび非ラセミ混合物を含む、RおよびS型の混合物として存在しうるものが企図される。本明細書において用いられる場合、「他の立体異性体を実質的に含まない」という語句は、組成物が $\leq 15\%$ 、より好ましくは $\leq 10\%$ 、さらにより好ましくは $\leq 5\%$ 、もしくは最も好ましくは $\leq 1\%$ の別の立体異性体を含むことを意味する。

10

【0101】

「処置」もしくは「処置すること」には、(1) 疾患の病態もしくは総体症状を経験もしくは提示している対象もしくは患者における疾患を阻害する(例えば、病態および/もしくは総体症状のさらなる発生を停止すること)、(2) 疾患の病態もしくは総体症状を経験もしくは提示している対象もしくは患者における疾患を改善する(例えば、病態および/もしくは総体症状を逆転すること)、および/または(3) 疾患の病態もしくは総体症状を経験もしくは提示している対象もしくは患者における疾患の任意の測定可能な低減を行うことが含まれる。

20

【0102】

前述の定義は、参照により本明細書に組み入れられる任意の参照文献における任意の相反する定義に取って代わる。しかし、特定の用語が定義されているという事実は、定義されていない任意の用語が明確ではないことを示すと考えられるべきではない。むしろ、用いられる全ての用語は、当業者であれば本開示の範囲を理解し、本開示を実践しうるような用語で本開示を記述すると考えられる。

30

【0103】

B. カチオン性イオン化可能脂質

本開示のいくつかの局面において、親油性成分およびカチオン性成分を含有する化合物を含有する組成物であって、カチオン性成分がイオン化可能である組成物が提供される。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、生理学的pHでプロトン化されるが、8、9、10、11、または12より大きなpHでは脱プロトンすることができ、かつ電荷がない、1つまたは複数の基を含有する。イオン化可能なカチオン基は、生理学的pHでカチオン基を形成することができる1つまたは複数のプロトン化可能なアミンを含有する場合がある。カチオン性イオン化可能脂質化合物はまた、1種類または複数種の脂質成分、例えば、 $C_6 \sim C_{24}$ アルキルまたはアルケニル炭素基がある2つ以上の脂肪酸もさらに含んでもよい。これらの脂質基はエステル結合を介して取り付けられてもよく、硫黄原子へのマイケル(Michael)付加によりさらに付加されてもよい。いくつかの態様において、これらの化合物はデンドリマー、デンドロン、ポリマー、またはその組み合わせでもよい。

40

【0104】

本開示のいくつかの局面において、親油性成分およびカチオン性成分を含有する化合物を含有する組成物であって、カチオン性成分がイオン化可能である組成物が提供される。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、電荷(pKa)を得ることができる窒素原子がある脂質および脂質様分子を指す。これらの脂質は文献中ではカチオン性脂質として知られる場合がある。アミノ基がある、これらの分子は、典型的には、2~6本の

50

疎水鎖、多くの場合、アルキルまたはアルケニル、例えば、C6～C24アルキル基またはアルケニル基を有するが、少なくとも、1つ、または6つより多いテールを有する場合がある。いくつかの態様において、これらのカチオン性イオン化可能脂質はデンドリマーであり、これは規則的な樹状分枝を示すポリマーであり、枝分かれした層を、コアにもしくはコアから、順次もしくは世代的に添加することにより形成され、コアと、少なくとも1つの内部分枝層と、表面分枝層とによって特徴付けられる。(Petar R. Dvornic and Donald A. Tomalia in Chem. in Britain, 641-645, August 1994を参照のこと)。他の態様において、本明細書において用いられる「デンドリマー」という用語は、限定するものではないが、内部コアを有する分子構造と、この内部コアに規則的に結合した繰り返し単位の内部層(もしくは「世代」)と、最外の世代に結合した末端基の外部表面とを含むことが意図される。「デンドロン」は、コアに直接もしくは連結部分を通じ連結されて、より大きなデンドリマーを形成するかもしれない形成しうる焦点から発する分枝を有するデンドリマーの種である。いくつかの態様において、デンドリマー構造は、各分枝について各繰り返し単位を兼ねる中心コアからの放射性的繰り返し基を有する。いくつかの態様において、本明細書において記述されるデンドリマーは、小分子、中型の分子、脂質、もしくは脂質様材料として記述されうる。これらの用語は、デンドロン様の外観(例えば、単一の焦点から放射する分子)を有する、本明細書において記述される化合物を記述するために使用されうる。

10

【0105】

デンドリマーはポリマーであるが、デンドリマーは、制御可能な構造、単一の分子量、多数の制御可能な表面官能基を有し、特定の世代に達した後に伝統的に球状構造をとるため、従来のポリマーより好ましい。デンドリマーは、単分散、樹状および/もしくは世代構造のポリマー構造を生成するために、各繰り返し単位の逐次反応によって調製することができる。個々のデンドリマーは、その中心コア上の1つもしくは複数の機能的部位に結合した樹状のくさびを有する、中心のコア分子からなる。デンドリマー表面層は、調製中に用いられるアセンブリ単量体によって、アニオン性、カチオン性、親水性もしくは親油性基を含む種々の官能基をその上に配置することができる。

20

【0106】

コア、繰り返し単位の官能基および/もしくは化学的性質、ならびに表面基もしくは末端基を修飾することにより、それらの物理的性質を調節することができる。変化させることができるいくつかの特性には、溶解性、毒性、免疫原性および生物学的付着能力が含まれるが、これらに限定されることはない。デンドリマーは、それらの世代もしくは枝中の繰り返し単位の数によって記述されることが多い。コア分子のみからなるデンドリマーは世代0といわれ、一方、全ての分枝に沿った各連続繰り返し単位は、末端基もしくは表面基まで、第1世代、第2世代などである。いくつかの態様において、チオールとの第2の縮合反応ではなく、アミンとの第1の縮合反応のみから生じる半世代が可能である。

30

【0107】

デンドリマーの調製は、各連続した基によりデンドリマーを構築することを含む一連の段階的反応によって達成される、あるレベルの合成制御を必要とする。デンドリマー合成は、収束型もしくは発散型のものであることができる。多様なデンドリマー合成の間、前世代に1つの世代を付着させ、続いて、反応の次の段階のために官能基を変化させる段階的プロセスにより、コアから周辺へと分子が組み立てられる。官能基の変換は、制御されない重合を防止するために必要である。そのような重合は、単分散ではなく、さもないと超分枝ポリマーとして知られている高度に分枝した分子をもたらす。デンドリマー繰り返し単位を反応させ続けると、立体効果により、立体的な過密状態が特定の世代で完全な反応を妨げ、分子の単分散性を破壊するまで、球状もしくは球形分子が生じる。したがって、いくつかの態様において、G1～G10世代のデンドリマーが特に企図される。いくつかの態様において、デンドリマーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個の繰り返し単位、またはその中で導き出せる任意の範囲を含む。いくつかの態様において、本明細書において用いられるデンドリマーは、G0、G1、G2もしくはG3である。しかし、分枝ポリマ

40

50

一中の間隔単位を低減させることによって、可能な世代数(11、12、13、14、15、20、もしくは25など)を増加させることができる。

【0108】

さらに、デンドリマーは、2つの主要な化学的環境：末端生成時に特定の表面基によって作出される環境と、高次構造によりバルク媒体および表面基から遮蔽されうる樹状構造の内部とを有する。これらの異なる化学的環境のために、デンドリマーは、治療用途を含む多数の異なる潜在的用途を見出した。

【0109】

いくつかの局面において、本発明の組成物において用いられうるデンドリマーは、アクリレートおよびメタクリレート基とアミンおよびチオールとの示差反応性を用いて組み立てられる。デンドリマーには、アクリレート基と第1級もしくは第2級アミンとのおよびメタクリレートとメルカプト基との反応によって形成される第2級もしくは第3級アミンおよびチオエーテルが含まれる。さらに、デンドリマーの繰り返し単位は、生理学的条件下で分解可能な基を含みうる。いくつかの態様において、これらの繰り返し単位は、1つもしくは複数の初期(germinal)ジエーテル、エステル、アミドもしくはジスルフィド基を含みうる。いくつかの態様において、コア分子は、一方向のみの樹状重合を可能にするモノアミンである。他の態様において、コア分子は、それぞれが1つもしくは複数の繰り返し単位を含みうる複数の異なる樹状分枝を有するポリアミンである。デンドリマーは、このコアから1つもしくは複数の水素原子を除去することによって形成されうる。いくつかの態様において、これらの水素原子は、窒素原子などのヘテロ原子上にある。いくつかの態様において、末端基は、長鎖アルキル基もしくはアルケニル基などの親油性基である。他の態様において、末端基は、長鎖ハロアルキル基もしくはハロアルケニル基である。他の態様において、末端基は、アミン(-NH₂)もしくはカルボン酸(-CO₂H)などのイオン化可能基を含む脂肪族基もしくは芳香族基である。さらに他の態様において、末端基は、水酸基、アミド基、もしくはエステルなどの1つもしくは複数の水素結合供与体を含む脂肪族基もしくは芳香族基である。

【0110】

本開示のカチオン性イオン化可能脂質は、1つもしくは複数の非対称に置換された炭素原子もしくは窒素原子を含み、光学的に活性な形態もしくはラセミ形態で単離されうる。したがって、特定の立体化学もしくは異性体形態が具体的に示されない限り、化学式の全てのキラル、ジアステレオマー、ラセミ形態、エピマー形態および全ての幾何異性形態が意図される。カチオン性イオン化可能脂質は、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一鏡像異性体、ジアステレオマー混合物ならびに個々のジアステレオマーとして生じうる。いくつかの態様において、単一のジアステレオマーが得られる。本開示のカチオン性イオン化可能脂質のキラル中心は、S配置またはR配置を有することができる。さらに、カチオン性イオン化可能脂質の1つもしくは複数の構造異性体として存在しうるということが企図される。いくつかの態様において、化合物は同じ式を有するが、コアの窒素原子との異なる結合性を有する。いかなる理論にも束縛されることを望まないが、出発単量体が最初に第1級アミンと反応し、次いで統計的に、存在するいずれかの第2級アミンと反応するので、そのようなカチオン性イオン化可能脂質が存在するものと考えられる。したがって、構造異性体は、完全に反応した第1級アミン、次いで、反応した第2級アミンの混合物を提示しうる。

【0111】

本開示のカチオン性イオン化可能脂質を表すために用いられる化学式は、典型的には、おそらくいくつかの異なる互変異性体のうちの1つのみを示すであろう。例えば、多くのタイプのケトン基が、対応するエノール基と平衡状態で存在することが知られている。同様に、多くのタイプのイミン基が、エナミン基と平衡して存在する。与えられた式についてどの互変異性体が描かれていても、どの1つが最も一般的であっても、所与の化学式の全ての互変異性体が意図される。

【0112】

本開示のカチオン性イオン化可能脂質はまた、本明細書において記載される適応症でもしくはそれ以外で用いるかどうかにかかわらず、それらが先行技術において公知の化合物よりも効果的であり、低い毒性であり、長く作用し、強力であり、少ない副作用をもたらし、容易に吸収され、および/もしくは良好な薬物動態プロファイル(例えば、高い経口バイオアベイラビリティおよび/もしくは低いクリアランス)を有し、ならびに/または先行技術において公知の化合物に比べて他の有用な薬理学的、物理的、もしくは化学的性質を有するという利点がありうる。

【0113】

さらに、本開示のカチオン性イオン化可能脂質を構成する原子は、そのような原子の全ての同位体形態を含むことが意図される。同位体は、本明細書において用いられる場合、同じ原子番号を有するが異なる質量数を有する原子を含む。一般的な例として、限定するものではないが、水素の同位体には三重水素および重水素が含まれ、炭素の同位体には ^{13}C および ^{14}C が含まれる。

【0114】

本明細書において提供されるカチオン性イオン化可能脂質の任意の塩形態の一部を形成している特定のアニオンもしくはカチオンは、塩が全体として薬理学的に許容される限り、重要ではないことが認識されるべきである。薬学的に許容される塩ならびにそれらの調製法および使用法のさらなる例は、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (2002)に提示されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。

【0115】

いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、約20～約23の量で存在する。いくつかの態様において、モル百分率は、約20、20.5、21、21.5、22、22.5～約23、またはその中で導き出せる任意の範囲である。他の態様において、モル百分率は、約7.5～約20である。いくつかの態様において、モル百分率は、約7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19～約20、またはその中で導き出せる任意の範囲である。

【0116】

C. 選択的臓器標的化(SORT)化合物

いくつかの局面において、本開示は、特定の臓器への前記組成物の選択的送達につながる1種類または複数種の選択的臓器標的化(SORT)化合物を含む。この化合物は、脂質、低分子治療剤、糖、ビタミン、ペプチド、またはタンパク質でもよい。

【0117】

いくつかの態様において、選択的臓器標的化(SORT)化合物は、前記組成物中に、約2%、4%、5%、10%、15%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、32%、34%、36%、38%、40%、45%、50%、55%、60%、65%～約70%、またはその中で導き出せる任意の範囲のモル比で存在する。いくつかの態様において、SORT化合物は、約5%～約40%、約10%～約40%、約20%～約35%、約25%～約35%、または約28%～約34%の量で存在してもよい。

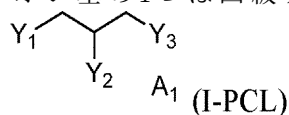
【0118】

いくつかの態様において、SORT化合物は脂質の場合がある。脂質とは、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{24}$ の2つ以上のアルキル鎖またはアルケニル鎖がある低分子である。低分子治療剤とは、100未満の非水素原子と2,000ダルトン未満の重量を含有する化合物である。糖とは、分子式 $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$ を含む分子またはその式の複数の分子の組み合わせであり、式中、 n は3～7である。タンパク質とは、少なくとも3つのアミノ酸残基を含むアミノ酸の配列である。正規の三次構造がないタンパク質はペプチドとも呼ばれることがある。タンパク質はまた、三次構造があるインタクトなタンパク質も含む場合がある。ビタミンは多量養素であり、ビタミンA、ビタミン B_1 、ビタミン B_2 、ビタミン B_3 、ビタミン B_5 、ビタミン B_6 、ビタミン B_7 、ビタミン B_9 、ビタミン B_{12} 、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、およびビタミンKより選択される1つまたは複数の化合物からなる。

【0119】

1. 永久カチオン性脂質

いくつかの局面において、本開示は、1つまたは複数の疎水性成分と永久カチオン基がある1種類または複数種の脂質を提供する。永久カチオン性脂質は、pHに関係なく正電荷を有する基を含有することができる。永久カチオン性脂質において使用され得る永久カチオン基の1つは四級アンモニウム基である。これらの永久カチオン性脂質は、下記の式：



に記載のような構造を含み、

式中、

Y_1 、 Y_2 、および Y_3 の少なくとも1つが $X_2N^+R_3R_4R_5$ という条件で、 Y_1 、 Y_2 、または Y_3 は各々独立して、 $X_1C(O)R_1$ または $X_2N^+R_3R_4R_5$ であり；

R_1 は、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{24}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{24}$ 置換アルケニルであり；

X_1 はOまたは NR_a であり、

式中、

R_a は水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、または $C_1 \sim C_4$ 置換アルキルであり；

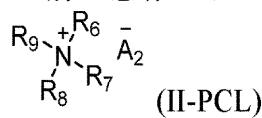
X_2 は $C_1 \sim C_6$ アルカンジイルまたは $C_1 \sim C_6$ 置換アルカンジイルであり；

R_3 、 R_4 、および R_5 は各々独立して、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{24}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{24}$ 置換アルケニルであり；

A_1 は、化合物中の $X_2N^+R_3R_4R_5$ 基の数に等しい電荷をもつアニオンである。

【0120】

別の態様において、永久カチオン性脂質は、下記式：



によってさらに定義され、

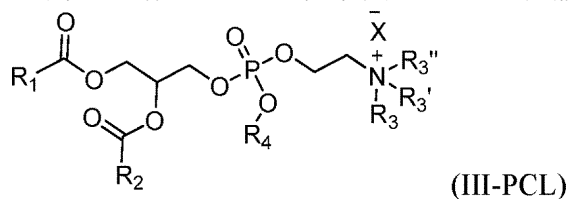
式中、

$R_6 \sim R_9$ の少なくとも1つが $C_8 \sim C_{24}$ の基という条件で、 $R_6 \sim R_9$ は各々独立して、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{24}$ 置換アルキル、 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、 $C_1 \sim C_{24}$ 置換アルケニルであり；

A_2 は一価アニオンである。

【0121】

別の態様において、永久カチオン性脂質は、下記式：



によってさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 は各々独立して、アルキル($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 、 R_3' 、および R_3'' は各々独立して、アルキル($C \leq 6$)または置換アルキル($C \leq 6$)であり；

R_4 は、アルキル($C \leq 6$)または置換アルキル($C \leq 6$)であり；かつ

X^- は一価アニオンである。

【0122】

いくつかの態様において、永久カチオン性脂質は全脂質組成物に対して約4～約16モル百分率の量で存在する。前記組成物は約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15モル百分率、またはその中で導き出せる任意の範囲を含有してもよい。他の態様におい

10

20

30

40

50

て、前記組成物は全脂質組成物に対して約18～約66モル百分率を含んでもよい。いくつかの態様において、前記組成物は約18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、もしくは66モル百分率、またはその中で導き出せる任意の範囲を含有してもよい。

【0123】

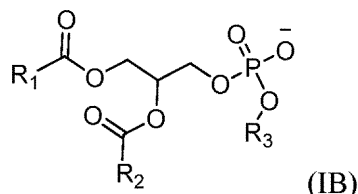
2. 永久アニオン性脂質

いくつかの局面において、本開示は、1つまたは複数の疎水性成分と永久アニオン基がある1種類または複数種の脂質を提供する。永久アニオン性脂質において使用され得るアニオン基の1つはリン酸基である。リン酸基は、8、9、10、11、12、13または14より小さなpHでは脱プロトンされ、負電荷を有する化合物でもよい。疎水性成分は1つまたは複数の $C_6 \sim C_{24}$ アルキル基またはアルケニル基でもよい。前記化合物は1つの疎水基、2つの疎水基、または3つの疎水基を有してもよい。

10

【0124】

いくつかの態様において、永久アニオン性脂質は、下記式：



の構造を有し、

20

式中、

R_1 および R_2 は各々独立して、アルキル ($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 は、水素、アルキル ($C \leq 6$)、または置換アルキル ($C \leq 6$)、または $-Y_1-R_4$ であり、式中、

Y_1 は、アルカンジイル ($C \leq 6$) または置換アルカンジイル ($C \leq 6$) であり；かつ

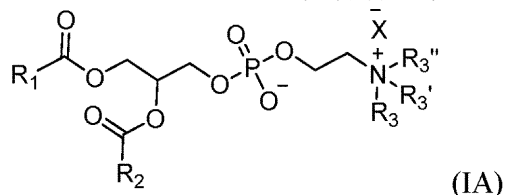
R_4 は、アシルオキシ ($C \leq 8 \sim 24$) または置換アシルオキシ ($C \leq 8 \sim 24$) である。

【0125】

3. ホスホチジルコリン (phosphatidylcholine)

いくつかの局面において、本開示は、1つまたは複数の疎水性成分、カチオン性アミン基、および負に荷電しているリン酸基がある1種類または複数種の脂質を提供する。カチオン性アミン基は、3つのメチル基が窒素原子に結合した四級アミンでもよい。疎水性成分は1つまたは複数の $C_6 \sim C_{24}$ アルキル基またはアルケニル基でもよい。前記化合物は1つの疎水基、2つの疎水基、または3つの疎水基を有してもよい。いくつかの態様において、ホスホチジルコリン化合物は、

30



40

としてさらに定義され、

式中、

R_1 および R_2 は各々独立して、アルキル ($C_8 \sim C_{24}$)、アルケニル ($C_8 \sim C_{24}$)、またはいずれかの基の置換型であり；

R_3 、 R_3' 、および R_3'' は各々独立して、アルキル ($C \leq 6$) または置換アルキル ($C \leq 6$) であり；かつ

X^- は一価アニオンである。

【0126】

D. 脂質ナノ粒子中のさらなる脂質

本開示のいくつかの局面において、組成物を作り出すために、1種類または複数種の脂

50

質を含有する組成物はカチオン性イオン化可能脂質と混合される。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質は、1、2、3、4、または5つの異なるタイプの脂質と混合される。カチオン性イオン化可能脂質は、1つのタイプの複数の異なる脂質と混合することができると意図される。いくつかの態様において、カチオン性イオン化可能脂質組成物は、少なくとも、ステロイドまたはステロイド誘導体、PEG脂質、およびリン脂質を含む。

【0127】

いくつかの態様において、脂質ナノ粒子は標的臓器に優先的に送達される。いくつかの態様において、標的臓器は、肺、心臓、脳、脾臓、骨髄、骨、骨格筋、胃、小腸、大腸、腎臓、リンパ節、膀胱、乳房、肝臓、精巣、卵巣、子宮、脾臓、胸腺、脳幹、小脳、脊髄、眼、耳、舌、または皮膚より選択される。または、前記組成物は、神経系、心臓血管系、もしくは呼吸器系などの標的臓器系、またはこれらの臓器系の1つの一部に優先的に送達され得る。本明細書で使用する「優先的に送達される」という用語は、投与された量の少なくとも25%が標的臓器または臓器系に送達される組成物を指すために用いられる。この用語は、投与された量の少なくとも25%、50%、または少なくとも75%が標的臓器または臓器系に送達される組成物を指すために用いられる。

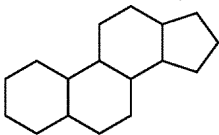
10

【0128】

1. ステロイドおよびステロイド誘導体

本開示のいくつかの局面において、カチオン性イオン化可能脂質を1つもしくは複数のステロイドもしくはステロイド誘導体と混合して組成物を作成する。いくつかの態様において、ステロイドもしくはステロイド誘導体は、任意のステロイドもしくはステロイド誘導体を含む。本明細書において用いられる場合、いくつかの態様において、「ステロイド」という用語は、アルキル基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、オキソ基、アシル基、または2つもしくはそれ以上の炭素原子間の二重結合を含む1つもしくは複数の置換をさらに含む四環17炭素環構造を有する化合物のクラスである。1つの局面において、ステロイドの環構造は、下記の式に示されるように、3つの縮合シクロヘキシル環および縮合シクロペンチル環を含む：

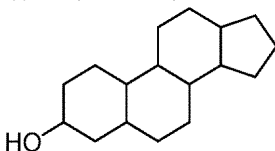
20



30

。

いくつかの態様において、ステロイド誘導体は、1つもしくは複数の非アルキル置換を有する上記の環構造を含む。いくつかの態様において、ステロイドもしくはステロイド誘導体は、式が、

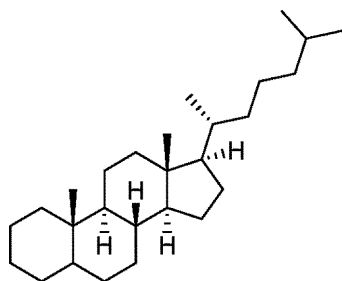


のようにさらに定義される、ステロールである。

40

【0129】

本開示のいくつかの態様において、ステロイドもしくはステロイド誘導体は、コレスタンもしくはコレスタン誘導体である。コレスタンにおいて、環構造は、式：



によってさらに定義される。上記のように、コレスタン誘導体は、上記環系の1つもしくは複数の非アルキル置換を含む。いくつかの態様において、コレスタンもしくはコレスタン誘導体は、コレステレンもしくはコレステレン誘導体またはステロールもしくはステロール誘導体である。他の態様において、コレスタンもしくはコレスタン誘導体は、コレステレンおよびステロールもしくはその誘導体の両方である。

10

【0130】

いくつかの態様において、組成物は、約40～約46の、全脂質組成物に対するステロイドのモル百分率をさらに含む。いくつかの態様において、モル百分率は、約40、41、42、43、44、45、～約46またはその中で導き出せる任意の範囲である。他の態様において、全脂質組成物に対するステロイドのモル百分率が、約15～約40である。いくつかの態様において、モル百分率は、15、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38もしくは40、またはその中で導き出せる任意の範囲である。

20

【0131】

2. PEGもしくはPEG化脂質

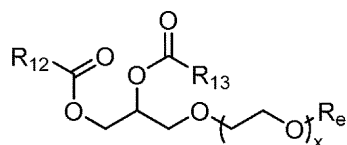
本開示のいくつかの局面において、ポリマーは、脂質組成物を作成するために1つもしくは複数のPEG化脂質(もしくはPEG脂質)と混合される。いくつかの態様において、本開示は、PEG基が結合した任意の脂質を用いることを含む。いくつかの態様において、PEG脂質は、グリセロール基に結合したPEG鎖をも含むジグリセリドである。他の態様において、PEG脂質は、PEG鎖でリンカー基に結合した1つもしくは複数のC6～C24長鎖アルキルもしくはアルケニル基またはC6～C24脂肪酸基を含む化合物である。PEG脂質のいくつかの非限定的な例としては、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEGセラミドコンジュゲート化PEG修飾ジアルキルアミンおよびPEG修飾1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミン、PEG修飾ジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロールが挙げられる。いくつかの態様においては、PEG修飾ジアステアロイルホスファチジルエタノールアミンもしくはPEG修飾ジミリストイル-sn-グリセロール。いくつかの態様において、PEG修飾は、脂質のPEG成分の分子量によって測定される。いくつかの態様において、PEG修飾は、約100～約15,000の分子量を有する。いくつかの態様において、分子量は、約200～約500、約400～約5,000、約500～約3,000、もしくは約1,200～約3,000である。PEG修飾の分子量は、約100、200、400、500、600、800、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,250、2,500、2,750、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、12,500～約15,000である。本開示において使用されうる脂質のいくつかの非限定的な例は、米国特許第5,820,873号、WO 2010/141069、もしくは米国特許第8,450,298号によって教示されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0132】

別の局面において、PEG脂質は下記式を有する：



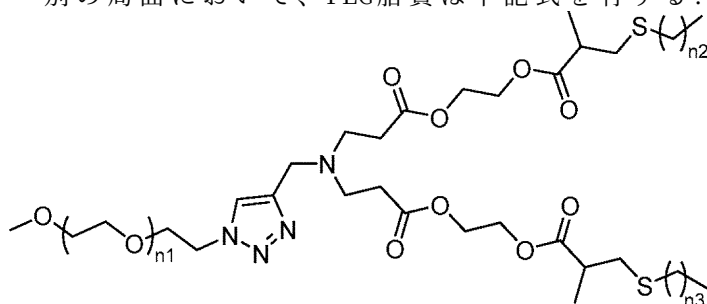
式中、 R_{12} および R_{13} は各々独立して、アルキル($C \leq 24$)、アルケニル($C \leq 24$)、もしくはこれらの基のいずれかの置換型であり； R_e は、水素、アルキル($C \leq 8$)もしくは置換アルキル($C \leq 8$)であり；および x は1～250である。いくつかの態様において、 R_e は、メチルなどの

50

アルキル ($C \leq 8$) である。R₁₂およびR₁₃は各々独立して、アルキル ($C \leq 4 \sim 20$) である。いくつかの態様において、xは5~250である。1つの態様において、xは5~125であり、またはxは100~250である。いくつかの態様において、PEG脂質は、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコールである。

【0133】

別の局面において、PEG脂質は下記式を有する：



式中、n₁は1~100の整数であり、n₂およびn₃は各々独立して1~29の整数から選択される。いくつかの態様において、n₁は5、10、15、20、25、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100、またはその中で導き出せる任意の範囲である。いくつかの態様において、n₁は約30~約50である。いくつかの態様において、n₂は5~23である。いくつかの態様において、n₂は11~約17である。いくつかの態様において、n₃は5~23である。いくつかの態様において、n₃は11~約17である。

【0134】

いくつかの態様において、前記組成物は、約4.0~約4.6の、全脂質組成物に対するPEG脂質のモル百分率をさらに含んでもよい。いくつかの態様において、モル百分率は約4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5~約4.6、またはその中で導き出せる任意の範囲である。他の態様において、モル百分率は約1.5~約4.0である。いくつかの態様において、モル百分率は約1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75~約4.0またはその中で導き出せる任意の範囲である。

【0135】

3. リン脂質

本開示のいくつかの局面において、組成物を作り出すために、前記ポリマーは1種類または複数種のリン脂質と混合される。いくつかの態様において、リン酸基も含む任意の脂質。いくつかの態様において、リン脂質は、1つまたは2つの長鎖C6~C24アルキル基またはアルケニル基、グリセロールまたはスフィンゴシン、1つまたは2つのリン酸基と任意で有機低分子を含有する構造である。いくつかの態様において、有機低分子は、アミノ酸、糖、またはアミノ置換されたアルコキシ基、例えば、コリンまたはエタノールアミンである。いくつかの態様において、リン脂質はホスファチジルコリンである。いくつかの態様において、リン脂質はジステアロイルホスファチジルコリンまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミンである。いくつかの態様において、他の双性イオン性脂質が用いられ、双性イオン性脂質は、正電荷と負電荷が両方ある脂質および脂質様分子を定義する。

【0136】

いくつかの態様において、前記組成物は、約20~約23の、全脂質組成物に対するリン脂質のモル百分率をさらに含んでもよい。いくつかの態様において、モル百分率は約20、20.5、21、21.5、22、22.5~約23、またはその中で導き出せる任意の範囲である。他の態様において、モル百分率は約7.5~約60である。いくつかの態様において、モル百分率は、約7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19~約20、またはその中で導き出せる任意の範囲である。

【0137】

E. 核酸、および核酸に基づく治療剤

1. 核酸

本開示のいくつかの局面において、脂質組成物は、1つもしくは複数の核酸を含む。いくつかの態様において、脂質組成物は、約5:1～約1:100の脂質組成物に対する重量比で存在する1つもしくは複数の核酸を含む。いくつかの態様において、核酸の脂質組成物に対する重量比は、約5:1、2.5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、もしくは1:100、またはその中で導き出せる任意の範囲である。いくつかの態様において、重量比は約1:40である。さらに、本開示は、本明細書において開示される特定の核酸に限定されないことが明らかなはずである。しかしながら、当業者は、ヒト以外の種(例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、テナガザル、チンパンジー、類人猿、ヒヒ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコおよび他の種)由来の核酸を含む核酸のさまざまな他の供給源における関連した同族体を容易に同定することができるので、本開示は、核酸の任意の特定の供給源、配列、もしくはタイプに範囲が限定されない。本開示において用いられる核酸は、天然に存在する配列に基づく配列を含みうることが企図される。遺伝コードの縮重を考慮すれば、天然配列のヌクレオチド配列と同一であるヌクレオチドの少なくとも約50%、一般的には少なくとも約60%、より一般的には約70%、最も一般的には約80%、好ましくは少なくとも約90%および最も好ましくは約95%を有する配列。別の態様において、核酸は、天然配列に対する相補配列であり、または75%、80%、85%、90%、95%および100%に相補的である。250、500、1000、1212、1500、2000、2500、3000もしくはそれ以上をコードする、より長いポリヌクレオチドが、本発明において企図される。

10

20

【0138】

本明細書において用いられる核酸は、ゲノムDNAに由来してもよく、すなわち、特定の生物のゲノムから直接クローン化されてもよい。しかし、好ましい態様において、核酸は相補的DNA (cDNA)を含むであろう。天然のイントロンもしくは別の遺伝子に由来するイントロンを加えたcDNAも企図される; そのように操作された分子は「ミニ遺伝子」といわれることもある。少なくとも、本開示のこれらのおよび他の核酸は、例えば、ゲル電気泳動における分子量標準として使用されうる。

【0139】

「cDNA」という用語は、メッセンジャーRNA (mRNA)を鋳型として用いて調製されたDNAをいうように意図される。ゲノムDNA、または、非プロセシングもしくは部分的にプロセシングされたRNA鋳型から重合されたDNAとは対照的に、cDNAを用いることの利点は、cDNAが主として、対応するタンパク質のコード配列を含むということである。最適な発現のために非コード領域が必要とされる場合、またはイントロンなどの非コード領域がアンチセンス戦略において標的とされる場合のような、完全もしくは部分ゲノム配列が好ましい場合がありうる。

30

【0140】

いくつかの態様において、核酸は、遺伝子もしくは遺伝子産物の発現を阻害する1つもしくは複数のアンチセンスセグメントを含む。アンチセンス方法論は、核酸が「相補的」配列と対になる傾向があるという事実を利用する。相補的とは、ポリヌクレオチドが、標準的なワトソン-クリック相補性規則にしたがって塩基対形成できるものであることを意味する。すなわち、より大きなプリンがより小さなピリミジンと塩基対を形成して、シトシンと対になったグアニン(G:C)、DNAの場合にはチミンと対になったアデニン(A:T)、もしくはRNAの場合にはウラシルと対になったアデニン(A:U)の組み合わせを形成するであろう。イノシン、5-メチルシトシン、6-メチルアデニン、ヒポキサンチンおよび他のものなどのあまり一般的でない塩基を、ハイブリダイズする配列に含めても、対形成は妨害されない。

40

【0141】

ポリヌクレオチドにより二本鎖(ds) DNAをターゲティングすると三重らせん形成が起こる; RNAをターゲティングすると二重らせん形成が起こるであろう。アンチセンスポリヌクレオチドは、標的細胞に導入されると、その標的ポリヌクレオチドに特異的に結合し、

50

転写、RNAプロセッシング、輸送、翻訳および/もしくは安定性を妨げる。アンチセンスRNA構築体、もしくはそのようなアンチセンスRNAをコードするDNAは、宿主細胞内で、インビトロもしくはインビボのどちらかで、例えばヒト対象を含む宿主動物内で、遺伝子転写もしくは翻訳またはその両方を阻害するために利用されうる。

【0142】

アンチセンス構築体は、プロモーターおよび他の制御領域、エクソン、イントロンもしくは遺伝子のエクソン-イントロン境界にさえも結合するようにデザインされうる。最も有効なアンチセンス構築体は、イントロン/エクソンスプライスジャンクションに相補的な領域を含むことが企図される。したがって、好ましい態様は、イントロン-エクソンスプライスジャンクションの50~200塩基内の領域に対して相補性を有するアンチセンス構築体を含むことが提案される。いくつかのエクソン配列を、その標的選択性に重大な影響を及ぼすことなく構築体に含めることができることが観察されている。含まれるエクソン材料の量は、用いられる特定のエクソンおよびイントロン配列に依って変化するであろう。単に、インビトロで構築体を試験して、正常細胞機能が影響を受けているかどうか、または相補配列を有する関連遺伝子の発現が影響を受けているかどうかを決定することによって、含まれているエクソンDNAが多すぎるかどうかを容易に試験することができる。

10

【0143】

上記のように、「相補的」もしくは「アンチセンス」は、それらの全長にわたって実質的に相補的であり、かつ塩基ミスマッチがほとんどないポリヌクレオチド配列を意味する。例えば、長さが15塩基の配列は、位置番号13もしくは14で相補的なヌクレオチドを有する場合、相補的と称されうる。当然のことながら、完全に相補的な配列は、その全長にわたって完全に相補的であり、かつ塩基のミスマッチを有しない配列であろう。相同性の程度がより低い他の配列も企図される。例えば、相同性の高い領域を限定的に有し、非同相領域も含む、アンチセンス構築体(例えば、リボザイム; 以下参照)をデザインすることができる。これらの分子は、50%未満の相同性を有するが、適切な条件下で標的配列に結合するであろう。

20

【0144】

2. 修飾された核酸塩基

いくつかの態様において、本開示の核酸は、修飾された糖部分を含む1つもしくは複数の修飾されたヌクレオシドを含む。1つもしくは複数の糖修飾されたヌクレオシドを含むそのような化合物は、天然の糖部分を含むヌクレオシドのみを含むオリゴヌクレオチドと比べて、標的核酸との増大したヌクレアーゼ安定性もしくは増加した結合親和性といった、望ましい特性を有しうる。いくつかの態様において、修飾された糖部分は、置換された糖部分である。いくつかの態様において、修飾された糖部分は糖代用物である。そのような糖代用物は、置換された糖部分の置換に対応する1つもしくは複数の置換を含みうる。

30

【0145】

いくつかの態様において、修飾された糖部分は、2'位および/もしくは5'位の置換基を含むがこれらに限定されない、1つもしくは複数の非架橋糖置換基を含む置換された糖部分である。2'位に適した糖置換基の例としては、2'-F、2'-OCH₃ (「OMe」もしくは「O-メチル」)、および2'-O(CH₂)₂OCH₃ (「MOE」)が挙げられるが、これらに限定されることはない。特定の態様において、2'位の糖置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O--C₁~C₁₀アルキル、O--C₁~C₁₀置換アルキル; OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂--O--N(Rm)(Rn)、およびO--CH₂--C(=O)--N(Rm)(Rn)から選択され、各RmおよびRnは、独立して、Hまたは置換もしくは非置換C₁~C₁₀アルキルである。5'位の糖置換基の例としては、5'-メチル(RもしくはS); 5'-ビニル、および5'-メトキシが挙げられるが、これらに限定されることはない。いくつかの態様において、置換された糖は、2つ以上の非架橋糖置換基、例えば、T-F-5'-メチル糖部分を含む(例えば、さらなる5',2'-ビス置換糖部分およびヌクレオシドの場合、PCT国際出願WO 2008/101157を参照のこと)。

40

【0146】

2'-置換糖部分を含むヌクレオシドは2'-置換ヌクレオシドといわれる。いくつかの態様

50

において、2'-置換ヌクレオシドは、ハロ、アリル、アミノ、アジド、SH、CN、OCN、CF₃、OCF₃、O、S、もしくはN(R_m)-アルキル；O、S、もしくはN(R_m)-アルケニル；O、SもしくはN(R_m)-アルキニル；O-アルキレニル-O-アルキル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、O-アルカリール、O-アラルキル、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂--O--N(R_m)(R_n)もしくはO-CH₂--C(=O)--N(R_m)(R_n)から選択される2'-置換基を含み、各R_mおよびR_nは、独立して、H、アミノ保護基または置換もしくは非置換C₁~C₁₀アルキルである。これらの2'-置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ(NO₂)、チオール、チオアルコキシ(S-アルキル)、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルから独立して選択される1つもしくは複数の置換基でさらに置換することができる。

10

【0147】

いくつかの態様において、2'-置換ヌクレオシドは、F、NH₂、N₃、OCF₃、O--CH₃、O(CH₂)₃NH₂、CH₂-CH=CH₂、O--CH₂-CH=CH₂、OCH₂CH₂OCH₃、O(CH₂)₂SCH₃、O--(CH₂)₂--O--N(R_m)(R_n)、O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂、およびN-置換アセトアミド(O--CH₂--C(=O)--N(R_m)(R_n))から選択される2'-置換基を含み、各R_mおよびR_nは、独立して、H、アミノ保護基または置換もしくは非置換C₁~C₁₀アルキルである。

【0148】

いくつかの態様において、2'-置換ヌクレオシドは、F、OCF₃、O--CH₃、OCH₂CH₂OCH₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂--O--N(CH₃)₂、--O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂、およびO--CH₂--C(=O)--N(H)CH₃から選択される2'-置換基を含む糖部分を含む。

20

【0149】

いくつかの態様において、2'-置換ヌクレオシドは、F、O--CH₃、およびOCH₂CH₂OCH₃から選択される2'-置換基を含む糖部分を含む。

【0150】

特定の修飾糖部分は、二環式糖部分を生じる第二の環を形成する架橋糖置換基を含む。いくつかのそのような態様において、二環式糖部分は、4'および2'フラノース環原子の間の架橋を含む。そのような4'-2'糖置換基の例としては、--[C(R_a)(R_b)]_n--、--[C(R_a)(R_b)]_n--O--、--C(R_aR_b)--N(R)--O--もしくは、--C(R_aR_b)--O--N(R)--；4'-CH₂-2'、4'-(CH₂)₂-2'、4'-(CH₂)--O-2' (LNA)；4'-(CH₂)--S-2'；4'-(CH₂)₂--O-2' (ENA)；4'-CH(CH₃)--O-2' (cEt)および4'-CH(CH₂OCH₃)--O-2'、ならびにそれらの類似体(例えば、米国特許第7,399,845号参照)；4'-C(CH₃)(CH₃)--O-2'およびその類似体(例えば、WO 2009/006478参照)；4'-CH₂--N(OCH₃)-2'およびその類似体(例えば、WO2008/150729参照)；4'-CH₂--O--N(CH₃)-2' (例えば、2004年9月2日付で公開されたUS2004/0171570を参照のこと)；4'-CH₂--O--N(R)-2'、および4'-CH₂--N(R)--O-2'-が挙げられるが、これらに限定されることはなく、式中、各Rは、独立して、H、保護基、もしくはC₁~C₁₂アルキル；4'-CH₂--N(R)--O-2'であり、式中、RはH、C₁~C₁₂アルキル、もしくは保護基(米国特許第7,427,672号参照)；4'-CH₂--C(H)(CH₃)-2' (例えば、Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照のこと)；ならびに4'-CH₂--C(=CH₂)-2'およびその類似体(PCT国際出願WO 2008/154401を参照のこと)である。

30

【0151】

いくつかの態様において、そのような4'-2'架橋は独立して、--[C(R_a)(R_b)]_n--、--C(R_a)=C(R_b)--、--C(R_a)=N--、--C(=NR_a)--、--C(=O)--、--C(=S)--、--O--、--Si(R_a)₂--、--S(=O)_x--、および--N(R_a)--から独立して選択される1~4個の連結基を含み；式中、

xは0、1、もしくは2であり；

nは1、2、3、もしくは4であり；

各R_aおよびR_bは、独立して、H、保護基、ヒドロキシル、C₁~C₁₂アルキル、置換されたC₁~C₁₂アルキル、C₂~C₁₂アルケニル、置換されたC₂~C₁₂アルケニル、C₂~C₁₂アルキニル、置換されたC₂~C₁₂アルキニル、C₅~C₂₀アリール、置換されたC₅~C₂₀アリール、複素環基、置換された複素環基、ヘテロアリール、置換されたヘテロアリール、C₅~C₇脂環式基、置換されたC₅~C₇脂環式基、ハロゲン、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、アシル(C(=

40

50

O)--H)、置換されたアシル、CN、スルホニル(S(=O)₂-J₁)、もしくはスルホキシル(S(=O)-J₁)であり; ならびに

各J₁およびJ₂は、独立して、H、C₁~C₁₂アルキル、置換されたC₁~C₁₂アルキル、C₂~C₁₂アルケニル、置換されたC₂~C₁₂アルケニル、C₂~C₁₂アルキニル、置換されたC₂~C₁₂アルキニル、C₅~C₂₀アリール、置換されたC₅~C₂₀アリール、アシル(C(=O)--H)、置換されたアシル、複素環基、置換された複素環基、C₁~C₁₂アミノアルキル、置換されたC₁~C₁₂アミノアルキル、または保護基である。

【0152】

二環式糖部分を含むヌクレオシドは、二環式ヌクレオシドもしくはBNAといわれる。二環式ヌクレオシドには、(A) α-L-メチレンオキシ(4'-CH₂--O-2') BNA、(B) β-D-メチレンオキシ(4'-CH₂--O-2') BNA (ロックド核酸もしくはLNAともいわれる)、(C) エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂--O-2') BNA、(D) アミノオキシ(4'-CH₂--O--N(R)-2') BNA、(E) オキシアミノ(4'-CH₂--N(R)--O-2') BNA、(F) メチル(メチレンオキシ)(4'-CH(CH₃)--O-2') BNA (拘束エチルもしくはcEtともいわれる)、(G) メチレン-チオ(4'-CH₂--S-2') BNA、(H) メチレン-アミノ(4'-CH₂-N(R)-2') BNA、(I) メチル炭素環式(4'-CH₂--CH(CH₃)-2') BNA、(J) プロピレン炭素環式(4'-(CH₂)₃-2') BNA、および(K) メトキシ(エチレンオキシ)(4'-CH(CH₂OMe)-O-2') BNA (拘束MOEもしくはcMOEともいわれる)が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0153】

さらなる二環式糖部分は、当技術分野において公知である、例えば: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 5561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; 米国特許第7,053,207号、同第6,268,490号、同第6,770,748号、同第6,794,499号、同第7,034,133号、同第6,525,191号、同第6,670,461号、および同第7,399,845号; WO 2004/106356、WO 1994/14226、WO 2005/021570、およびWO 2007/134181; 米国特許出願公開第2004/0171570号、同第2007/0287831号、および同第2008/0039618号; 米国特許出願第12/129,154号、同第60/989,574号、同第61/026,995号、同第61/026,998号、同第61/056,564号、同第61/086,231号、同第61/097,787号、および同第61/099,844号; ならびにPCT国際出願番号PCT/US2008/064591、PCT/US2008/066154、およびPCT/US2008/068922。

【0154】

いくつかの態様において、二環式糖部分、およびそのような二環式糖部分を組み入れたヌクレオシドは、異性立体配置によってさらに定義される。例えば、4'-2'メチレン-オキシ架橋を含むヌクレオシドは、α-L配置もしくはβ-D配置にありうる。これまでに、α-L-メチレンオキシ(4'-CH₂--O-2')二環式ヌクレオシドは、アンチセンス活性を示すアンチセンスオリゴヌクレオチドに組み入れられている(Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372)。

【0155】

いくつかの態様において、置換された糖部分は、1つもしくは複数の非架橋糖置換基および1つもしくは複数の架橋糖置換基(例えば、5'-置換および4'-2'架橋糖; PCT国際出願WO 2007/134181、ここではLNAが、例えば、5'-メチルもしくは5'-ビニル基で置換されている)を含む。

【0156】

いくつかの態様において、修飾された糖部分は糖代用物である。いくつかのそのような態様において、天然糖の酸素原子は、例えば、硫黄、炭素もしくは窒素原子で置換される。いくつかのそのような態様において、そのような修飾された糖部分はまた、上記のように架橋および/もしくは非架橋置換基を含む。例えば、特定の糖代用物は、4'-硫黄原子お

10

20

30

40

50

よび置換を2'-位(例えば、公開された米国特許出願第2005/0130923号を参照のこと)および/もしくは5'位に含む。さらなる例として、4'-2'架橋を有する炭素環式二環式ヌクレオシドが記述されている(例えば、Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443およびAlbaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740を参照のこと)。

【0157】

いくつかの態様において、糖代用物は、5-原子以外の環を含む。例えば、いくつかの態様において、糖代用物は、6員テトラヒドロピランを含む。そのようなテトラヒドロピランは、さらに修飾もしくは置換されうる。そのような修飾されたテトラヒドロピランを含むヌクレオシドには、ヘキシトール核酸(HNA)、アニトール核酸(ANA)、マンニトール(manitol)核酸(MNA) (Leumann, C J. Bioorg. & Med. Chem. (2002) 10:841-854を参照のこと)、およびフルオロHNA (F-HNA)が含まれるが、これらに限定されることはない。

10

【0158】

いくつかの態様において、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 および q_7 がそれぞれHである式VIIの修飾されたTHPヌクレオシドが提供される。特定の態様において、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 および q_7 の少なくとも1つはH以外である。いくつかの態様において、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 および q_7 の少なくとも1つはメチルである。いくつかの態様において、 R_1 および R_2 の1つがFである式VIIのTHPヌクレオシドが提供される。特定の態様において、 R_1 はフルオロであり、かつ R_2 はHであり、 R_1 はメトキシであり、かつ R_2 はHであり、および R_1 はメトキシエトキシであり、かつ R_2 はHである。

20

【0159】

アンチセンス化合物への組み入れのためのヌクレオシドを修飾するために用いることができる多くの他のビシクロおよびトリシクロ糖代用物環系も当技術分野において公知である(例えば、総説: Leumann, J. C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854を参照のこと)。

【0160】

非限定的に、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド(他の開示された5',2'-ビス置換ヌクレオシドの場合にはPCT国際出願WO 2008/101157を参照のこと)ならびにSでのリボシル環酸素原子の置換および2'位でのさらなる置換(米国特許出願第2005/0130923号参照)あるいは二環式核酸の5'置換(PCT国際出願WO 2007/134181を参照されたく、4'-CH₂--O-2'二環式ヌクレオシドは、5'の位置で5'-メチルもしくは5'-ビニル基によりさらに置換されている)などの、修飾の組み合わせも提供される。また、炭素環式二環式ヌクレオシドの合成および調製はそのオリゴマー化および生化学的研究とともに記述されている(例えば、Srivastava et al., 2007を参照のこと)。

30

【0161】

いくつかの態様において、本開示は、修飾されたヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドを提供する。それらの修飾されたヌクレオチドは、修飾された糖、修飾された核酸塩基、および/もしくは修飾された結合を含みうる。特定の修飾は、得られたオリゴヌクレオチドが所望の特徴を保有するように選択される。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1つもしくは複数のRNA様ヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1つもしくは複数のDNA様ヌクレオチドを含む。

40

【0162】

いくつかの態様において、本開示のヌクレオシドは、1つもしくは複数の未修飾核酸塩基を含む。特定の態様において、本開示のヌクレオシドは、1つもしくは複数の修飾核酸塩基を含む。

【0163】

いくつかの態様において、修飾された核酸塩基は、本明細書において定義されるユニバーサル塩基、疎水性塩基、無差別(promiscuous)塩基、サイズ拡張塩基、およびフッ素化塩基、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびにN-2、N-6およびO-6置換プリン; 5-プロピニルシトシン; 5-ヒド

50

ロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルCH₃)ウラシルおよびシトシンならびにピリミジン塩基の他のアルキル誘導体、6-アザ(azo)ウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルならびに他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-ブromo、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニン、本明細書において定義されるユニバーサル塩基、疎水性塩基、無差別塩基、サイズ拡張塩基、およびフッ素化塩基から選択される。さらに修飾された核酸塩基には、フェノキサジンシチジン([5,4-b][1,4]ベンゾオキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)などの三環式ピリミジン、置換フェノキサジンシチジン(例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-13][1,4]ベンゾオキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(²H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[2,3-d]ピリミジン-2-オン)などのG-クランプが含まれる。修飾された核酸塩基はまた、プリンもしくはピリミジン塩基が他の複素環で置換されたもの、例えば7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジンおよび2-ピリドンを含みうる。さらなる核酸塩基には、米国特許第3,687,808号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J. I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859に開示されているもの; Englisch et al., 1991により開示されているもの; およびSanghvi, Y. S., 1993により開示されているものが含まれる。

10

20

30

40

50

【0164】

上記の修飾された核酸塩基および他の修飾された核酸塩基のいくつかの調製を教示する代表的な米国特許には、非限定的に、米国特許第3,687,808号; 同第4,845,205号; 同第5,130,302号; 同第5,134,066号; 同第5,175,273号; 同第5,367,066号; 同第5,432,272号; 同第5,457,187号; 同第5,459,255号; 同第5,484,908号; 同第5,502,177号; 同第5,525,711号; 同第5,552,540号; 同第5,587,469号; 同第5,594,121号; 同第5,596,091号; 同第5,614,617号; 同第5,645,985号; 同第5,681,941号; 同第5,750,692号; 同第5,763,588号; 同第5,830,653号および同第6,005,096号が含まれ、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0165】

いくつかの態様において、本開示は、結合したヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドを提供する。そのような態様において、ヌクレオシド同士は、任意のヌクレオシド間結合を用いて連結されうる。ヌクレオシド間連結基の2つの主要なクラスは、リン原子の存在もしくは非存在によって定義される。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル(P=O)、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホラミデートおよびホスホロチオエート(P=S)が含まれるが、これらに限定されることはない。代表的な非リン含有ヌクレオシド間連結基には、メチレンメチルイミノ(--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--)、チオジエステル(--O--C(O)--S--)、チオカルバメート(--O--C(O)(NH)--S--); シロキサン(--O--Si(H)₂--O--); およびN,N'-ジメチルヒドラジン(--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--)が含まれるが、これらに限定されることはない。天然のホスホジエステル結合と比較して、修飾された結合は、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を変化させる、典型的には増加させるために用いることができる。いくつかの態様において、キラル原子を有するヌクレオシド間結合は、ラセミ混合物として、または別個の鏡像異性体として調製することができる。代表的なキラル結合には、アルキルホスホネートおよびホスホロチオエートが含まれるが、これらに限定されることはない。リン含有および非リン含有ヌクレオシド間結合の調製の方法は、当業者に周知である。

【0166】

本明細書において記述されるオリゴヌクレオチドは、1つもしくは複数の不斉中心を含み、したがって絶対立体化学に関して、(R)もしくは(S)、糖アノマーの場合などの α もしくは β 、またはアミノ酸などの場合などの(D)もしくは(L)として定義されうる鏡像異性体、ジアステレオマー、および他の立体異性体配置を生じる。本明細書において提供されるアンチセンス化合物に含まれるのは、全てのそのような可能な異性体、ならびにそれらのラセミ体および光学的に純粋な形態である。

【0167】

中性のヌクレオシド間結合には、非限定的に、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、MMI (3'-CH₂--N(CH₃)--O-5')、アミド-3 (3'-CH₂--C(=O)--N(H)-5')、アミド-4 (3'-CH₂--N(H)--C(=O)-5')、ホルムアセタール(3'-O--CH₂--O-5')、およびチオホルムアセタール(3'-S--CH₂--O-5')が含まれる。さらなる中性のヌクレオシド間結合には、シロキサン(ジアルキルシロキサン)、カルボキシレートエステル、カルボキサミド、スルフィド、スルホネートエステルおよびアミドを含む非イオン結合が含まれる(例えば: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y. S. Sanghvi and P. D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Chapters 3 and 4, 40-65を参照のこと)。さらなる中性のヌクレオシド間結合には、混合されたN、O、SおよびCH₂構成部分を含む非イオン結合が含まれる。

10

【0168】

オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位、および5'末端ヌクレオチドの5'位で、さらなる修飾を行うこともできる。例えば、本開示のリガンド結合オリゴヌクレオチドの1つのさらなる修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布もしくは細胞取り込みを増強する1つもしくは複数のさらなる非リガンド部分もしくはコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に連結することを伴う。そのような部分には、コレステロール部分(Letsinger et al., 1989)などの脂質部分、コール酸(Manoharan et al., 1994)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-5-トリチルチオール(Manoharan et al., 1992; Manoharan et al., 1993)、チオコレステロール(Oberhauser et al., 1992)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al., 1991; Kabanov et al., 1990; Svinarchuk et al., 1993)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharan et al., 1995; Shea et al., 1990)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., 1995)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., 1995)、バルミチル部分(Mishra et al., 1995)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Crooke et al., 1996)が含まれるが、これらに限定されることはない。

20

30

【0169】

そのようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第4,828,979号; 同第4,948,882号; 同第5,218,105号; 同第5,525,465号; 同第5,541,313号; 同第5,545,730号; 同第5,552,538号; 同第5,578,717号、同第5,580,731号; 同第5,580,731号; 同第5,591,584号; 同第5,109,124号; 同第5,118,802号; 同第5,138,045号; 同第5,414,077号; 同第5,486,603号; 同第5,512,439号; 同第5,578,718号; 同第5,608,046号; 同第4,587,044号; 同第4,605,735号; 同第4,667,025号; 同第4,762,779号; 同第4,789,737号; 同第4,824,941号; 同第4,835,263号; 同第4,876,335号; 同第4,904,582号; 同第4,958,013号; 同第5,082,830号; 同第5,112,963号; 同第5,214,136号; 同第5,082,830号; 同第5,112,963号; 同第5,214,136号; 同第5,245,022号; 同第5,254,469号; 同第5,258,506号; 同第5,262,536号; 同第5,272,250号; 同第5,292,873号; 同第5,317,098号; 同第5,371,241号、同第5,391,723号; 同第5,416,203号、同第5,451,463号; 同第5,510,475号; 同第5,512,667号; 同第5,514,785号; 同第5,565,552号; 同第5,567,810号; 同第5,574,142号; 同第5,585,481号; 同第5,587,371号; 同第5,595,726号; 同第5,597,696号; 同第5,599,923号; 同第5,599,928号および同第5,688,941号が含まれるが、これらに

40

50

限定されることはなく、これらの各々は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0170】

3. タンパク質

いくつかの態様において、前記組成物は1種類または複数種のタンパク質をさらに含んでもよい。いくつかのタンパク質にはヌクレアーゼ酵素などの酵素が含まれ得る。本明細書において記述される組成物は、Casタンパク質を含む1種類または複数種のCRISPR関連タンパク質(例えば、CRISPR酵素)を含んでもよい。Casタンパク質の非限定的な例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1およびCsx12とも知られる)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csfl、Csf2、Csf3、Csf4、そのホモログ、またはその改変されたバージョンが含まれる。これらの酵素は公知である。例えば、*S. pyogenes* Cas9タンパク質のアミノ酸配列をSwissProtデータベースにおいてアクセッション番号Q99ZW2で見つけることができる。

【0171】

本明細書において記述される組成物中のタンパク質はCas9(例えば、*S. pyogenes* または*S. pneumoniae*に由来する)でもよい。CRISPR酵素は、標的配列の場所で、例えば、標的配列内および/または標的配列の相補鎖内にある一方の鎖または両方の鎖の切断を誘導することができる。変異したCRISPR酵素から、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方の鎖または両方の鎖を切断する能力が無くなるように、CRISPR酵素は、対応する野生型酵素に対して変異させることができる。例えば、*S. pyogenes* に由来するCas9のRuvCI触媒ドメインにおいてアスパラギン酸からアラニンへの置換(D10A)があると、Cas9が両方の鎖を切断するヌクレアーゼからニッカーゼ(1本鎖を切断する)に変換される。いくつかの態様において、Cas9ニッカーゼが、ガイド配列、例えば、DNA標的のセンス鎖とアンチセンス鎖を標的とする2つのガイド配列と併用される場合がある。この組み合わせによって、両方の鎖に切れ目を入れ、NHEJまたはHDRを誘導するのに使用することが可能になる。

【0172】

いくつかの態様において、本開示は、1種類または複数種の治療用タンパク質を含有する化合物を提供する。前記組成物中に含まれ得る治療用タンパク質には、広範な分子、例えば、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、増殖因子、凝固因子、抗凝固剤、血液因子、骨形成タンパク質、免疫グロブリン、および酵素が含まれる。特定の治療用タンパク質のいくつかの非限定的な例には、エリスロポエチン(EPO)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、 α -ガラクトシダーゼA、 α -L-イズロニダーゼ、サイロトロピン α 、N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ(rhASB)、ドルナーゼアルファ、組織プラスミノゲンアクチベーター(TPA)、アクチバーゼ、グルコセレブロシダーゼ、インターフェロン(IF) β -1a、インターフェロン β -1b、インターフェロン γ 、インターフェロン α 、TNF- α 、IL-1~IL-36、ヒト成長ホルモン(rHGH)、ヒトインシュリン(BHI)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン α 、ダルベポエチン α 、卵胞刺激ホルモン(FSH)、および第VIII因子が含まれる。

【0173】

4. 低分子治療剤

いくつかの局面において、本開示は、治療剤を含む組成物を提供する。前記治療剤は、低分子、例えば、7-メトキシプテリジン、7-メチルプテリジン、アバカビル、アバファンギン、アバレリックス、アセブトロール、アセナフテン、アセトアミノフェン、アセトアニリド、アセタゾラミド、アセトヘキサミド、アシトレチン、アクリバスチン、アデニン、アデノシン、アラトロフロキサシン、アルベンダゾール、アルブテロール、アルクロフェナク、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アルフゾシン、アリトレチノイン、アロバルピタール、アロプリノール、オールトランスレチノイン酸(ATRA)、アロキシプリン、アルプラゾラム、アルプレノロール、アルトレタミン、アミホスチン、アミロライド、アミ

ノグルテチミド、アミノピリン、アミオダロンHCl、アミトリプチリン、アムロジピン、
 アモバルピタール、アモジアキン、アモキサピン、アンフェタミン、アンホテリシン、ア
 ンホテリシンB、アンピシリン、アンブレナビル、アムサクリン、硝酸アミル、アミロバ
 ルピトン、アナストロゾール、アンリノン(anrinone)、アントラセン、アントラサイクリ
 ン、アプロバルピタール、三酸化ヒ素、アスバラギナーゼ、アスピリン、アステミゾール
 、アテノロール、アトルバスタチン、アトバクオン、アトラジン、アトロピン、アトロピ
 ンアザチオプリン、オーラノフィン、アザシチジン、アザプロバゾン、アザチオプリン、
 アジンタミド(azintamide)、アジスロマイシン、アズトレオナム、バクロフェン、バルビ
 トン、BCG live、ベクラミド、ベクロメタゾン、ベンドロフルメチアジド、ベネゼプリル
 (benezepril)、ベニジピン、ベノリレート(benorylate)、ベンペリドール、ベンタゼパム
 、ベンズアミド、ベンズアントラセン、ベンザチンペニシリン、ベンズヘキサール(benz
 exol)HCl、ベンズニダゾール、ベンゾジアゼピン、安息香酸、ベフェニウムヒドロキシナ
 フトエート、ベタメタゾン、ベバシズマブ(アバスタチン)、ベキサロテン、ベザフィブラー
 ト、ピカルタミド、ビホナゾール、ビペリデン、ビスコジル、ビスアントレン、プレオマイ
 シン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、プリンゾラミド、プロマゼパム、メシル酸プロモ
 クリプチン、プロムペリドール、プロチゾラム、ブデソニド、ブメタニド、ブプロピオン
 、ブスルファン、ブタルピタール、ブタムベン、ブテナフィンHCl、ブトバルピトン、ブ
 トバルピトン(ブテタール)、ブトコナゾール、硝酸ブトコナゾール、ブチルパラベン、カ
 フェイン、カルシフェジオール、カルシプロトリエン(calciprotiene)、カルシトリオー
 ル、カルステロン、カンベンダゾール、ショウノウ、カンプトテシン、カンプトテシン類
 似体、カンデサルタン、カベシタビン、カブサイシン、カプトプリル、カルバマゼピン、
 カルビマゾール、カルボフラン、カルボプラチン、カルプロマール、カリマゾール(carim
 azole)、カルムスチン、セファマンドール、セファゾリン、セフィキシム、セフタジジム
 、セフロキシムアキセチル、セレコキシブ、セフラジン、セリバスタチン、セトリジン(c
 etrizine)、セツキシマブ、クロランブシル、クロラムフェニコール、クロルジアゼボキ
 シド、クロルメチアゾール、クロロキン、クロロチアジド、クロルフェニラミン、クロル
 プログアニルHCl、クロルプロマジン、クロルプロパミド、クロルプロチキセン、クロル
 ピリホス、クロルテトラサイクリン、クロルサリドン、クロルゾキサゾン、コレカルシフ
 ェロール、クリセン、シロスタゾール、シメチジン、シンナリジン、シノキサシン、シブ
 ロフィブラート、シブフロキサシンHCl、シサプリド、シスプラチン、シタロプラム、
 クラドリビン、クラリスロマイシン、フマル酸クレマスチン、クリオキノール、クロバザ
 ム、クロファラビン、クロファジミン、クロフィブレート、クエン酸クロミフェン、クロ
 ミプラミン、クロナゼパム、クロピドグレル、クロチアゼパム、クロトリマゾール、クロ
 トリマゾール、クロキサシリン、クロザピン、コカイン、コデイン、コルヒチン、コリス
 チン、結合型エストロゲン、コルチコステロン、コルチゾン、酢酸コルチゾン、シクリジ
 ン、シクロバルピタール、シクロベンザプリン、シクロブタン-スピロバルビツレート、
 シクロエタン-スピロバルビツレート、シクロヘプタン-スピロバルビツレート、シクロヘ
 キサン-スピロバルビツレート、シクロペンタン-スピロバルビツレート、シクロホスファ
 ミド、シクロプロパン-スピロバルビツレート、シクロセリン、シクロスポリン、シプロ
 ヘプタジン、シプロヘプタジンHCl、シタラビン、シトシン、ダカルバジン、ダクチノマ
 イシン、ダナゾール、ダンスロン、ダントロレンナトリウム、ダブソン、ダルベポエチン
 α、ダロジピン、ダウノルビシン、デコキネート、デヒドロエピアンドロステロン、デラ
 ビルジン、デメクロサイクリン、デニロイキン、デオキシコルチコステロン、デオキシメ
 タゾン、デキサメタゾン、デキサメフェタミン、デクスクロルフェニラミン、デクスフェ
 ンフルラミン、デクスラゾキササン、デクストロプロボキシフェン、ジアモルヒネ、ジアト
 リゾ酸、ジアゼパム、ジアゾキシド、ジクロロフェン、ジクロルプロップ、ジクロフェナク
 、ジクマロール、ジダノシン、ジフルニサル、ジギトキシン、ジゴキシン、ジヒドロコデ
 イン、ジヒドロエキリン、メシル酸ジヒドロエルゴタミン、ジョードヒドロキシキノリン
 、ジルチアゼムHCl、フロ酸ジロキサニド、ジメンヒドリナート、ジモルホラミン、ジニ
 トルミド、ジオスゲニン、ジフェノキシラートHCl、ジフェニル、ジピリダモール、ジリ

10

20

30

40

50

スロマイシン、ジソピラミド、ジスルフィラム、ジウロン、ドセタキセル、ドンペリドン、
 ドネベジル、ドキサゾシン、ドキサゾシンHCl、ドキシソルピシン(中性)、ドキシソルピシ
 ンHCl、ドキシサイクリン、プロピオン酸ドロモスタノロン、ドロペリドール、ジフィリ
 ン、エキノキャンディン、エコナゾール、硝酸エコナゾール、エファビレンツ、エリプチ
 シン、エナラプリル、エンリモマブ(enlimomab)、エノキシモン、エピネフリン、エピボ
 ドフィロトキシシン誘導体、エピルピシン、エポエチンアルファ、エポサルタン(eposartan)
)、エキレニン、エキリン、エルゴカルシフェロール、酒石酸エルゴタミン、エルロチニ
 ブ、エリスロマイシン、エストラジオール、エストラムスチン、エストリオール、エスト
 ロン、エタクリン酸、エタンブトール、エチナメート、エチオナミド、エトプロパジンHC
 l、エチル-4-アミノベンゾエート(ベンゾカイン)、エチルパラベン、エチニルエストラジ
 オール、エトドラク、エトミデート、エトポシド、エトレチナート、エキセメスタン、フ
 ェルバメート、フェロジピン、フェンベンダゾール、フェンブコナゾール(fenbuconazole)
)、フェンブフェン、フェンクロルホス、フェンクロフェナク、フェンフルラミン、フェ
 ノフィブラート、フェノルデパム(fenoldepam)、フェノプロフェンカルシウム、フェノキ
 シカルブ、フェンピクロニル、フェンタニル、フェンチコナゾール、フェキシフェナジン
 、フィルグラスチム、フィナステリド、酢酸フレカミド(flecamide)、フロクスウリジン
 、フルダラビン、フルコナゾール、フルコナゾール、フルシトシン、フルジオキシニル、
 フルドロコルチゾン、酢酸フルドロコルチゾン、フルフェナム酸、フルナニゾン、フルナ
 リジンHCl、フルニソリド、フルニトラゼパム、フルオコルトロン、フルオメツロン、フ
 ルオレン、フルオロウラシル、フルオキシセチンHCl、フルオキシメステロン、デカン酸フ
 ルベンチキソール、デカン酸フルベンチクソール、フルラゼパム、フルルビプロフェン、
 プロピオン酸フルチカゾン、フルバスタチン、葉酸、ホセノプリル、ホスフェニトインナ
 トリウム、フロバトリプタン、フロセミド、フルベストラント、フラゾリドン、ガバペン
 チン、G-BHC(リンデン)、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムフィブロジル、ゲムツズマ
 ブ、グラフェニン、グリベンクラミド、グリクラジド、グリメピリド、グリピジド、グル
 テチミド、グリブリド、三硝酸グリセリン(ニトログリセリン)、酢酸ゴセレリン、グレパ
 フロキサシン、グリセオフルビン、グアイフェネシン、酢酸グアナベンズ、グアニン、ハ
 ロファントリンHCl、ハロペリドール、ヒドロクロロチアジド、ヘプタバルビタール、ヘ
 ロイン、ヘスペレチン、ヘキサクロロベンゼン、ヘキセタール、酢酸ヒストレリン、ヒド
 ロコルチゾン、ヒドロフルメチアジド、ヒドロキシ尿素、ヒヨスチアミン、ヒポキサンチ
 ン、イブリツモマブ、イブプロフェン、イダルピシン、イドブタール、イホスファミド、
 イヒドロエキレニン(ihydroequilenin)、メシル酸イマチニブ、イミペネム、インダパミ
 ド、インジナビル、インドメタシン、インドプロフェン、インターフェロン α -2a、イン
 ターフェロン α -2b、ヨーダミド、イオパノ酸、イブロジオン、イルベサルタン、イリノ
 テカン、イサブコナゾール、イソカルボキサジド、イソコナゾール、イソグアニン、イソ
 ニアジド、イソプロピルバルビツレート、イソプロチュロン、二硝酸イソソルビド、一硝
 酸イソソルビド、イスラジピン、イトラコナゾール、イトラコナゾール、イトラコナゾー
 ル(Itra)、イベルメクチン、ケトコナゾール、ケトプロフェン、ケトロラック、ケリン、
 ラベタロール、ラミブジン、ラモトリギン、ラナトシドC、ランソプラゾール、L-ドーパ
 、レフルノミド、レナリドマイド、レトロゾール、ロイコボリン、酢酸リユープロリド、
 レバミゾール、レボフロキサシン、リドカイン、リニユロン、リシノプリル、ロメフロキ
 サシン、ロムスチン、ロペラミド、ロラタジン、ロラゼパム、ロメフロキサシン、ロルメ
 タゼパム、メシル酸ロサルタン、ロバスタチン、マレイン酸リスリド、マプロチリンHCl
 、マジンドール、メベンダゾール、メクリジンHCl、メクロフェナム酸、メダゼパム、メ
 ジゴキシシン、酢酸メドロキシプロゲステロン、メフェナム酸、メフロキンHCl、酢酸メゲ
 ストロール、メルファラン、臭化メペンゾラート、メプロバメート、メプタジノール、メ
 ルカプトプリン、メサラジン、メスナ、メソリダジン、メストラノール、メサドン、メタ
 カロン、メトカルバモール、メトイン、メトトレキセート、メトキサレン、メトスクシミ
 ド、メチクロチアジド、メチルフェニデート、メチルフェノバルビトン、メチル-p-ヒド
 ロキシベンゾエート、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、メチプリロン、マ

10

20

30

40

50

レイン酸メチセルジド、メトクロプラミド、メトラゾン、メトプロロール、メトロニダゾール、ミアンセリンHCl、ミコナゾール、ミダゾラム、ミフェプリストーン、ミグリトール、ミノサイクリン、ミノキシジル、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、モフェチルマイコフェノレート、モリンドン、モンテルカスト、モルヒネ、モキシフロキサシンHCl、ナブメトン、ナドロール、ナルブフィン、ナリジクス酸、ナンドロロン、ナフタセン、ナフタレン、ナプロキセン、ナラトリプタンHCl、ナタマイシン、ネララビン、ネルフィナビル、ネビラビン、ニカルジピンHCl、ニコチンアミド、ニコチン酸、ニクマロン、ニフェジピン、ニルタミド、ニモジピン、ニモラゾール、ニソルジピン、ニトラゼパム、ニトロフラントイン、ニトロフラゾン、ニザチジン、ノフェツモマブ、ノルエチステロン、ノルフロキサシン、ノルゲストレル、ノルトリプチリンHCl、ナイスタチン、エストラジオール、オフロキサシン、オランザピン、オメプラゾール、オモコナゾール、オンダンセトロンHCl、オプレルベキン、オルニダゾール、オキサリプラチン、オキサムニキン、オキサントレムボネート(oxantelmonate)、オキサプロジン、オキサトミド、オキサゼパム、オクスカルバゼピン、オクスフェンダゾール、オキシコナゾール、オクスプレノロール、オキシフェンブタゾン、オキシフェンサイクリミンHCl、パクリタキセル、パリフェルミン、パミドロネート、p-アミノサリチル酸、パントプラゾール、パラメタジオン、パロキセチンHCl、ペガデマールゼ、ペグアスバルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペメトレキセド二ナトリウム、ペニシラミン、三硝酸ペンタエリスリトール、ペンタゾシン、ペンタゾシン、ペントバルビタール、ペントバルビトン、ペントスタチン、ペントキシフィリン、ペルフェナジン、ペルフェナジンピモジド、ペリレン、フェナセミド、フェナセチン、フェナントレン、フェニンジオン、フェノバルビタール、フェノールバルビトン(phenolbarbitone)、フェノールフタレイン、フェノキシベンザミン、フェノキシベンザミンHCl、フェノキシメチルペニシリン、フェンサクシミド、フェニルブタゾン、フェニトイン、ピンドロール、ピオグリタゾン、ピボプロマン、ピロキシカム、マレイン酸ピゾチフェン、白金化合物、プリカマイシン、ポリエン、ポリミキシンB、ポリフィマーナトリウム、ポサコナゾール(Posa)、プラミベキソール、プラステロン、プラバスタチン、プラジカンテル、プラゾシン、プラゾシンHCl、プレドニゾロン、プレドニゾン、プリミドン、プロバルビタール、プロベネシド、プロブコール、プロカルバジン、プロクロルペラジン、プロゲステロン、プログアニルHCl、プロメタジン、プロボフォール、プロボクスル、プロプラノロール、プロピルパラベン、プロピルチオウラシル、プロスタグランジン、プソイドエフェドリン、プテリジン-2-メチル-チオール、プテリジン-2-チオール、プテリジン-4-メチル-チオール、プテリジン-4-チオール、プテリジン-7-メチル-チオール、プテリジン-7-チオール、ピランテレムボネート(pyrantelmonate)、ピラチナミド、ピレン、ピリドスチグミン、ピリメタミン、クエチアピン、キナクリン、キナプリル、キニジン、硫酸キニジン、キニーネ、硫酸キニーネ、ラベプラゾールナトリウム、ラニチジンHCl、ラスブリカーゼ、ラブコナゾール、レバグリニド、レボサル、レセルピン、レチノイド、リファブチン、リファンピシン、リファペンチン、リメキシロン、リスペリドン、リトナビル、リツキシマブ、安息香酸リザトリプタン、ロフェコキシブ、ロピニロールHCl、ロシグリタゾン、サッカリン、サルブタモール、サリチルアミド、サリチル酸、サキナビル、サルグラモスチム、セクブタバルビタール、セコバルビタール、セルタコナゾール、セルチンドール、セルトラリンHCl、シンバスタチン、シロリムス、ソラフェニブ、スパルフロキサシン、スピラマイシン、スピロノラクトン、スタノロン、スタノゾロール、スタブジン、スチルベストロール、ストレプトゾシン、ストリキニーネ、スルコナゾール、硝酸スルコナゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルファメラジン、スルファメタジン、スルファメトキサゾール、スルファニルアミド、スルファチアゾール、スリンダク、スルファベンズアミド、スルファセタミド、スルファジアジン、スルファドキシム、スルファフラゾール、スルファメラジン、スルファメトキサゾール、スルファピリジン、スルファサラジン、フルフィンピラゾン、スルピリド、スルチアム、コハク酸スマトリプタン、マレイン酸スニチニブ、タクリン、タクロリムス、タルブタール、クエン酸タモキシフェン、タムロシン(tamulosin)、タルグレチン、タキサン、タザロ

10

20

30

40

50

テン、テルミサルタン、テマゼパム、テモゾロミド、テニボシド、テノキシカム、テラゾシン、テラゾシンHCl、テルビナフィンHCl、硫酸テルブタリン、テルコナゾール、テルフェナジン、テストラクトン、テストステロン、テトラサイクリン、テトラヒドロカンナビノール、テトロキソプリム、サリドマイド、テバイン、テオブロミン、テオフィリン、チアベンダゾール、チアンフェニコール、チオグアニン、チオリダジン、チオテパ、トトイン(thotoin)、チミン、チアガビンHCl、チボロン、チクロピジン、チニダゾール、チオコナゾール、チロフィバン、チザニジンHCl、トラザミド、トルブタミド、トルカポン、トピラマート、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラマドール、トラスツズマブ、トラゾドンHCl、トレチノイン、トリアムシノロン、トリアムテレン、トリアゾラム、トリアゾール、トリフルプロマジン、トリメトプリム、マレイン酸トリミブラミン、トリフェニレン、トログリタゾン、トロメタミン、トロピカミド、トロバフロキサシン、チバメート、ユビデカレノン(コエンザイムQ10)、ウンデセン酸、ウラシル、ウラシルマスタード、尿酸、バルプロ酸、バルルビシン、バルサルタン、バンコマイシン、ベンラファキシシンHCl、ビガバトリン、ビンバルビタール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ポリコナゾール、キサンチン、ザフィルルカスト、ジドブジン、ジロートン、ゾレドロネート、ゾレドロン酸、ゾルミトリプタン、ゾルピデム、およびゾピクロンでもよい。

10

【0174】

F. キット

本開示はまた、キットを提供する。本明細書において開示される成分のいずれも、キットの形態で組み合わせることができる。いくつかの態様において、キットは、上記のもしくはは特許請求の範囲における組成物を含む。

20

【0175】

キットには一般に、成分が配置され、好ましくは適切に分注されうる、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジもしくは他の容器が含まれる。キット中に2つ以上の成分がある場合、キットにはまた一般に、さらなる成分が別個に配されうる、第2、第3もしくは他のさらなる容器が含まれる。しかしながら、成分のさまざまな組み合わせを容器に含めることができる。いくつかの態様において、脂質ナノ粒子成分の全てが単一の容器中で組み合わせられる。他の態様において、脂質ナノ粒子成分の一部もしくは全部が別個の容器中で提供される。

30

【0176】

本開示のキットはまた、典型的には、商業的販売のために密閉してさまざまな容器を含むための包装を含む。そのような包装は、所望の容器が保持される厚紙または射出成形もしくはブロー成形プラスチック包装を含みうる。キットはまた、キット成分を利用するための説明書を含みうる。説明書は、実行可能なバリエーションを含みうる。

【実施例】

【0177】

F. 実施例

以下の実施例は、本開示の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技法は、本開示の実践において良好に機能するように発明者によって発見された技法を表し、したがって、その実践のための好ましい様式を構成すると考えることができるが、当業者には理解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、開示された特定の態様において多くの変更をなすことができ、それでもなお、同様のもしくは類似の結果を得ることができることを認識すべきである。

40

【0178】

実施例1：DOTAPで改変された脂質ナノ粒子の調製

脂質ナノ粒子(LNP)は、インビボ核酸送達に最も効果がある担体クラスである。歴史的に、効果的なLNPは4つの成分：カチオン性イオン化可能脂質、双性イオン性リン脂質、コレステロール、および脂質ポリ(エチレングリコール)(PEG)で構成される。しかしながら

50

、これらのLNPは臓器標的化送達も組織標的化送達もせず核酸を全身にしか送達しない。LNPは典型的にはRNAを肝臓にしか送達しない。従って、標的核酸送達を提供する試みの中で新たなLNP製剤が探求されている。

【0179】

永久カチオン性脂質を添加して、または添加せずに4つの古典的なタイプの脂質を15:15:30:3モル比で混合した。簡単に述べると、5A2-SC8(カチオン性イオン化可能)、DOPE(双性イオン性)、コレステロール、DMG-PEG、およびDOTAP(永久カチオン性)を表1に示した比で混合することによってLNPを調製した。

【0180】

(表1) 改変されたLNPにおける脂質のモル比およびモル百分率

名称	モル比					モル百分率 (%)				脂質/ mRNA (wt/wt)
	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	
mDLNP	15	15	30	3	0	23.8	23.8	47.6	4.8	0.0
DOTAP5	15	15	30	3	3.3	22.6	22.6	45.2	4.5	5.0
DOTAP10	15	15	30	3	7	21.4	21.4	42.9	4.3	10.0
DOTAP15	15	15	30	3	11	20.3	20.3	40.5	4.1	14.9
DOTAP20	15	15	30	3	16	19.0	19.0	38.0	3.8	20.3
DOTAP25	15	15	30	3	21	17.9	17.9	35.7	3.6	25.0
DOTAP30	15	15	30	3	27	16.7	16.7	33.3	3.3	30.0
DOTAP35	15	15	30	3	34	15.5	15.5	30.9	3.1	35.1
DOTAP40	15	15	30	3	42	14.3	14.3	28.6	2.9	40.0
DOTAP45	15	15	30	3	52	13.0	13.0	26.1	2.6	45.2
DOTAP50	15	15	30	3	63	11.9	11.9	23.8	2.4	50.0
DOTAP55	15	15	30	3	77	10.7	10.7	21.4	2.1	55.0
DOTAP60	15	15	30	3	95	9.5	9.5	19.0	1.9	60.1
DOTAP65	15	15	30	3	117	8.3	8.3	16.7	1.7	65.0
DOTAP70	15	15	30	3	150	7.0	7.0	14.1	1.4	70.4
DOTAP75	15	15	30	3	190	5.9	5.9	11.9	1.2	75.1
DOTAP80	15	15	30	3	260	4.6	4.6	9.3	0.9	80.5
DOTAP85	15	15	30	3	357	3.6	3.6	7.1	0.7	85.0
DOTAP90	15	15	30	3	570	2.4	2.4	4.7	0.5	90.0
DOTAP95	15	15	30	3	1200	1.2	1.2	2.4	0.2	95.0
DOTAP100	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0

【0181】

mDLNP製剤を調製するためには、5A2-SC8、DOPE、コレステロール、およびDMG-PEGを所定のモル比(15:15:30:3)でエタノールに溶解した。mRNAをクエン酸緩衝液(10mM、pH4.0)に溶解した。次いで、40:1(全脂質:mRNA)の重量比になるようにmRNAを脂質溶液と3:1(mRNA:脂質、v/v)の体積比で混合することによってmRNAを脂質溶液で希釈した。次いで、この

10

20

30

40

50

溶液を室温で10分間インキュベートした。DOTAP改変mDLNP製剤を形成するためには、mRNAを1×PBSまたはクエン酸緩衝液(10mM、pH4.0)に溶解し、5A2-SC8、DOPE、コレステロール、DMG-PEG、およびDOTAPを含有するエタノールと素早く混合し、40:1(全脂質:mRNA)の重量比および3:1(mRNA:脂質)の体積比を固定した。表1に示したように、各製剤をDOTAPXと名付けた。式中、Xは全脂質中のDOTAPモル百分率を表す。

【0182】

実施例2：DOTAPで改変されたmDLNP製剤の特徴付け

様々なmDLNP製剤を特徴付けるために、サイズ、多分散指数(polydispersity index)、およびゼータ電位を動的光散乱によって各製剤について3回調べた。サイズおよび多分散指数を図5Aに示した。このことから、DOTAP濃度に関係なく、製剤は全て約90nm～約160nmのサイズ範囲内に収まるのに対して、サイズの相対的均一性を示す多分散指数は約0.1～約0.3で変化することが分かる。各製剤のゼータ電位を図5Bに示した。このことから、ゼータ電位は一般的にDOTAP濃度と共に増加することが分かる。

【0183】

次に、カプセル化効率をRibogreen RNAアッセイ(Zhao et al., 2016)を用いて試験した。簡単に述べると、mRNAを酸性緩衝液(10mMクエン酸塩、pH4)に溶解した時に、mRNAは、DOTAPを含まないmDLNPに約85%効率でカプセル化された(図5C)。カチオン性イオン化可能脂質(例えば、5A2-SC8、C12-200、DLin-MC3-DMA)の中にあるイオン化可能なアミンをプロトン化して、負に荷電しているmRNAとの静電的複合体形成を可能にするためには低いpHが必要である。この図表にある他の全ての製剤については、pH7.4でPBSに溶解したmRNAを用いて混合を行った。明らかに、低濃度のDOTAPを用いると、カプセル化効率が低かったが、DOTAPのモル百分率が25%を超えると>80%まで増加した(図5C)。カプセル化効率は、25%を超えるモル百分率のDOTAPを用いた全ての製剤について約80%～約95%であった。従って、中性pH PBS混合を使用する潜在能力は永久カチオン性脂質戦略の特色である。この戦略は組織特異的送達と多量のCas9タンパク質カプセル化を可能にする。永久カチオン性脂質を添加すると中性pHでのLNP形成が可能になる。これらのカプセル化結果は、緩衝液としてPBSを使用した時のものである。酸性緩衝液を使用した時(例えば、クエン酸緩衝液(10mM、pH4.0))、カプセル化効率は0～100%DOTAPの全ての製剤について高い(>90%)。

【0184】

最後に、2-(p-トリイジノ)-6-ナフタレンスルホン酸(TNS)アッセイを用いてpKaを求めた(図3B)(Zhao et al., 2016)。定義された規則に基づいて、pKaと組織特異的mRNA送達との関係をプロットした。ここでは、表に示したように、スコア付けするために8つの規則を設計した。明らかに、肝臓標的化製剤のpKaは狭く(約6～7)、脾臓標的化製剤には有意な範囲がなかったが、肺標的化送達は高いpKa(>9.25)を必要とした。分布とpKa検出を一緒に考慮すると、NPの内部電荷がmRNA分布に影響を及ぼす一要因であり、全体の/見かけのLNP pKaが、臓器におけるmRNAを介したタンパク質発現プロファイルを決定する別の要因であると結論を下した。

【0185】

実施例3：mRNA送達のための永久カチオン性脂質で改変されたmDLNPの効力

永久カチオン性脂質を含むLNPが活性カーゴをインビトロで送達することができる送達効力を調べるために、DOTAP改変mDLNPに、ルシフェラーゼをコードするmRNAを装填し、Huh-7肝臓細胞およびA549腺癌ヒト肺基底上皮細胞を50ng/ウェルのmRNAでトランスフェクトした。これらの細胞を24時間培養した後に、ルシフェラーゼ発現と細胞生存率を調べた。図6Aに示したように、インビトロでHuh-7肝臓細胞におけるmRNAの送達および発現には5%～50%のDOTAPパーセントがより良く、10%DOTAPが最大のルシフェラーゼ送達および発現を示すようにみえた(図6A)。インビボでの送達特徴は異なる可能性があることに留意する。一般的に、SORT LNPには、さらなるインビボ障壁、臓器分布、および細胞特異性(cellular specify)があるために、これらの研究はインビボ活性を予測するのにも組織向性を予測するのにも役に立たない場合がある。さらに、細胞生存率を調べ、ロバストなルシフェラーゼ発現を示したmDLNPの中で10%DOTAPが高い生存率をもたらすことが見出された(

図6A)。A549肺癌細胞株を用いて同じトランスフェクションを調べると同様の結果が示された。DOTAP10製剤を用いてトランスフェクトした細胞は他の製剤のほぼ二倍の蛍光を示し、高い細胞生存率を維持した(図6A)。DOTAP SORT LNPはクエン酸緩衝液(10mM、pH4.0)ではなくPBS(pH7.4)中で形成されたが、どちらの緩衝系中에서도形成され得る。これは、エタノール中에서도酸性緩衝液中でも安定でないカーゴ、例えば、タンパク質のカプセル化および送達を可能にするので特性である。

【0186】

製剤中にあるエタノール濃度の影響を確かめるために、DOTAP25を選択し、様々なエタノール:PBS比(1:3、1:5、1:7.5、および1:10)を用いて調製した(図6B)。4つ全ての製剤が同様のカプセル化効率、サイズ、およびPDIを示した(図2B)。mRNA送達効率もまた、FaDu下咽頭癌細胞を、各製剤中にある50ng/ウェルのmRNAでトランスフェクトすることによって測定した。各製剤の送達効率は似ており、細胞生存率にもほとんど影響を及ぼさなかった(図6C)。従って、これらの製剤は、肝臓、肺、および咽頭を含む多数の細胞タイプに適用可能なように思われる。さらに、この製剤もまた、酸性緩衝液(pH4.0)ではなく1×PBS(pH7.4)を使用するように首尾良く改変された。これらのデータから、エタノールのパーセントを激減できることが分かる。このことから、DOTAP製剤は、高いエタノール濃度と酸性緩衝液に対する感受性がかなり高いカーゴ、例えば、タンパク質を送達し得る可能性が得られた。

【0187】

次に、これらのmDLNPがインビボでmRNAを送達する能力を試験するために、マウスに、各製剤中にある0.1mg/kgの用量のLuc mRNAを注射した。図1Bは、各製剤をIV注射して6時間後の主要臓器におけるルシフェラーゼのエクスピボ画像を示す。興味深いことに、DOTAPのモル百分率が増加するにつれて、ルシフェラーゼ発現は肝臓から脾臓、次いで、肺に移動し、このことから臓器特異的送達が証明された。これらのデータを定量し、DOTAPパーセントは組織標的化送達の一要因であり、肝臓送達にはmDLNP(0%DOTAP)が最良であるのに対して、脾臓には5~15%DOTAPが最良であり、肺送達にはDOTAP50(50%)が最良であることが明らかになった(図1B)。ルシフェラーゼ発現がIV注射後に肝臓、脾臓、および肺にしか検出されなかったと仮定すると、各臓器において発現したルシフェラーゼのパーセントを計算することができる(図1C)。これらのデータから、製剤中にあるDOTAPモル百分率が増加するにつれて、肝臓への送達と肝臓における発現が減少し、DOTAPパーセントが70%を超えた時に肝臓においてゼロに近い発現が認められることがはっきりと分かる(図1B、1C)。しかしながら、DOTAPパーセントが大きいほど、肺組織において認められるルミネセンスが多くなり、DOTAPパーセントが80%を超えた時に肺において100%に近いルミネセンスが認められる(図1C)。DOTAP 5および30モル百分率の濃度は脾臓組織において高いパーセントのルミネセンスを示したのに対して、DOTAP10は他の組織と比較して脾臓において最高の相対ルミネセンスを示した(図1C)。これらの結果から、注射後の特定の組織送達に合わせて脂質濃度を調整できることが分かる。

【0188】

特定のDOTAP製剤の臓器生体内分布をさらに深く試験するために、PBS、または肝臓標的化NP(mDLNP)、脾臓標的化NP(DOTAP10)、および肺標的化NP(DOTAP50)を0.5mg/kg Cy5-Luc mRNA(RNA LNPを追跡する色素標識mRNA)の用量でC57BL/6マウス(n=2)に注射した。注射して6時間後に主要臓器を収集し、画像化した(図3A)。製剤の臓器分布はDOTAP量によって変化し、DOTAPパーセントが増加するにつれて肝臓での蓄積は徐々に肺に移動したが、DOTAPパーセントに関係なくNPは依然として肝臓に存在する(図7、図8)。このデータを図1のデータと一緒に考慮すると、臓器分布は組織標的送達効力(タンパク質へのmRNA翻訳)を分析するのに十分でないことが明らかである。さらに、これらの製剤間の類似するサイズ分布とEEを考慮すると、ゼータ電位とpKaが組織標的化mRNA発現において役割を果たしているのかもしれない。

【0189】

mDLNPへのDOTAPの添加の効果が限られているかどうか、または上記で示された分布が、

永久カチオン性脂質によって処方されたmDLNPにとって普遍的なものであるかどうか理解する試みの中で、別の人気があるカチオン性脂質、ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)を含めてmDLNPを作製した(図2A1)。DDABは、18個の炭素があり、不飽和結合が無い2つの疎水性テールを有し、DOTAPとは全く異なる頭部を有する(図1C)。DDAB5、DDAB15、DDAB40、およびDDAB50製剤をインビボ送達に選択した(0.1mg/kg、6h、n=2)。上記のDOTAP製剤と同様にサイズ分布の違いはほとんどなかったが(図2A1)、NP中でのDDABパーセントは10倍変化した(5%~50%)。インビボルシフェラーゼ発現から、DOTAP NPと同様にDDABパーセントが増加するにつれてルミネセンスが肝臓から脾臓に、次いで、肺に移動するという傾向が示された(図2A2)。

【0190】

10

DOTAPと同様の構造を有するが、もっと短い14個の炭素の疎水性テール((14:0)EPC)を有する頭部1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリンクロリドがある第3の永久カチオン性脂質を用いてmDLNPを形成した(図2B1)。DDAB戦略と同様に、(14:0)EPC5、(14:0)EPC15、(14:0)EPC40、および(14:0)EPC50製剤を調製し、サイズ分布(図2B1)とインビボLuc mRNA送達(0.1mg/kg、6h、n=2)を調べた(図2B2)。上記で分析したmDLNPと同様に粒径は概して均一であり(図2B1)、予想通り、(14:0)EPCモル百分率が増加するにつれてルミネセンスは肝臓から脾臓、次いで、肺に移動した(図2B2)。異なる疎水性テール、飽和結合および不飽和結合、ならびに異なる頭部を含む、これらのデータの全てをまとめると、組織標的化mRNA送達のための、カチオン性脂質によって処方されたmDLNPは普遍的なものだと思われる。

20

【0191】

LNPへのDOTAPの添加の効果が永久カチオン性脂質に特有のものかどうか理解する試みの中で、永久カチオン性脂質の代わりに双性イオン性脂質をmDLNP製剤に添加する効果を調べた。2種類の代表的な双性イオン性脂質である、異なる化学構造を有するホスホリピド(phospholipid):DSPCおよびDOCPeを試験した。さらに、これを、(永久カチオン性脂質の代わりに)双性イオン性脂質の添加が組織特異的送達効力に影響を及ぼすかどうか確かめるためにも試験した。図2C1および2D1は、DSPCおよびDOCPe脂質(双性イオン性脂質)の化学構造を示す。正に荷電している機能的頭部と負に荷電している機能的頭部の位置と疎水性ドメイン(飽和对不飽和)に違いがある。このことから、観察された効果は双性イオン性脂質に一般的/普遍的なものだと示唆される。DSPCまたはDOCPeを用いて処方されたmDLNPは似ていた(図2C1、2D1)。興味深いことに、5成分改良DLNPに双性イオン性脂質を含めてもDOTAPおよび他の永久カチオン性脂質の場合と同様に肝臓から肺へのタンパク質発現プロファイルは変化しなかった。その代わりに、DSPCとDOCPeは両方とも所定の範囲(DSPCでは80%未満、DOCPeでは50%未満)内で脾臓へのmRNA送達を改善した。どのパーセントでも肺においてタンパク質発現はなかった(0.1mg/kg、6h、n=2)(図2C2、2D2)。従って、さらなる双性イオン性脂質の含有は脾臓送達を助けることができるが、永久カチオン性脂質の含有のように肝臓から脾臓から肺への送達効力を調整することができない。

30

【0192】

LNPへのDOTAPの添加の効果が永久カチオン性脂質に特有のものかどうか理解する試みの中で、永久カチオン性脂質の代わりにカチオン性イオン化可能脂質をmDLNP製剤に添加する効果を調べた。異なる化学構造を有する2種類の代表的なカチオン性イオン化可能脂質:C12-200およびDODAPを試験した。DODAPは頭部以外はDOTAPと同じ構造を有し(四級アミン対三級アミン)する。C12-200は、イオン化可能な三級アミンを含有する(これも四級アミンではない)、siRNAまたはmRNA送達に用いられる効果的なリピドであり、DODAPと全く異なる構造を有する。(図2E1、2F1)同様に、両方の改良mDLNPのサイズ分布は、ある特定のパーセント(80%未満)では依然として均一であった。(図2E1、2F1)驚くべきことに、5成分改良DLNPにカチオン性イオン化可能脂質を含めても、DOTAPおよび他の永久カチオン性脂質の場合と同様に肝臓から脾臓から肺へのタンパク質発現プロファイルは変化しなかった。その代わりに、DLNPにカチオン性イオン化可能脂質を含めると肝臓へのmRNAのmRNA送達効力は増加した。これらは、さらなるカチオン性イオン化可能脂質を含まない(5A2-S

40

50

C8のみ)、オリジナルのmDLNP(0.1mg/kg、6h、n=2)よりもかなり良好な送達効力を示した。DODAPまたはC12-200のパーセントが増加するにつれて(50%または80%)、ルシフェラーゼシグナルは大幅に減少したが、脾臓または肺ではなく肝臓が依然として主要臓器であった。従って、臓器特異的効果は特定の比の永久カチオン性脂質を含めたことに起因し得ると結論を下した。さらに、このデータから、永久カチオン性脂質はカチオン性イオン化可能脂質とは異なる効果を生じることが分かる。さらに、これらのデータから、これらの傾向は脂質クラスに関して普遍的なものであることが分かる。

【0193】

実施例4：Cas9 mRNAとsgRNAを同時送達する改良mDLNPを用いたCRISPR/Cas9遺伝子編集

最初に、後の実験において、どのsgRNAが最も効果的かを確かめるために、Td-Tomatoマウスを標的化する3種類のsgRNAを比較した。これらのsgRNAはsgTom1、sgTom2、およびsgLoxPである。図10Aに示したようにsgTom1およびsgLoxPを送達および発現させ、同様の結果を得た。これらは、TdTomatoの誘導においてsgTom2よりもうまくいった(図10A)。sgLoxP(NAG)の弱いPAMを考慮すると、さらなる実験のために最終的にsgTom1を選択した。

【0194】

DOTAP NPを用いて組織特異的mRNA(luc mRNA)送達を示され、DDABおよびEPCによって改変されたNPが同様の送達傾向を示したことを考えると、次に、組織特異的遺伝子編集を実現することを目指して、Cas9mRNA/sgRNAを同時送達するためにDOTAP改変mDLNPを使用した。インビボでの同時送達を調べるために、全細胞に存在するホモ接合性Rosa26プロモーターLox-Stop-Lox tdTomato(tdTO)カセットを含有する遺伝子操作マウスを使用した(図4A)。Cas9-mRNAと、LoxPまたはTomに対するsgRNAを収容するDOTAP改変mDLNPを同時送達するとStopカセットが欠失され、tdTO発現が誘導された(図4B)。2.5mg/kg(各50ug)の全用量でIVT Cas9 mRNAと修飾sgTom1(4/1、wt/wt)を同時送達するために、マウスにmDLNPおよびDOTAP50製剤をIV注射した。次いで、主要臓器の蛍光が処置後10日目に検出された。(図4B)肝臓特異的および肺特異的なCRISPR/Cas9遺伝子編集が実現した。脾臓特異的編集も実現した。しかしながら、非常に強いバックグラウンド赤色自己蛍光のために、このTdTomatoレポーターマウスを用いて脾臓編集は定量できなかった。

【0195】

組織特異的編集をさらに調べるためにPTENを内因性標的として選択した。組織特異的遺伝子編集に到達するように、C57BL/6マウスにmDLNP、DODAP20、またはDOTAP50をIV注射した。全用量は2.5mg/kg(各50ug)であり、IVT Cas9 mRNAと修飾sgPTENの重量比は4/1であり、検出時間は処置後10日目であった。PTEN標的化sgRNAを使用した。T7E1アッセイから、インビボPTEN編集によって組織特異的特徴がさらに確かめられたことが分かった(図4C)。

【0196】

実施例5：Cas9タンパク質/sgRNAリボ核タンパク質(RNP)を送達する改変mDLNPを用いたCRISPR/Cas9遺伝子編集

カチオン性イオン化可能脂質、双性イオン性脂質、コレステロール、およびPEG化脂質を含有する従来のLNP製剤に永久カチオン性脂質(例えば、DOTAP)を含めたという発見に立脚して、この製剤方法論が、エタノールおよび/または低pH酸性緩衝水溶液に対して感受性がある他のカーゴも送達できるかどうか調べた。DOTAP戦略の重要な要素は、中性pHのPBSを用いて製剤を調製できることである。従って、この方法論も、遺伝子編集用途のためにCas9などの大きなタンパク質を封入および送達できるかどうか調べた。従って、DOTNP脂質ナノ粒子は5つの成分：カチオン性イオン化可能脂質(例えば、5A2-SC8)、双性イオン性脂質(例えば、DOPE)、コレステロール、DMG-PEG、および永久カチオン性脂質(例えば、DOTAP)のモジュール含有からなる。5A2-SC8、コレステロール、DOPE、およびDMG-PEGのモル比を固定した(15:15:30:5、mol/mol)。DOTNPXとは、異なるモル百分率のDOTAPがあるDOTNPを意味する。

【0197】

最初に特徴付けられたCas9/sgRNA複合体には酸性pHに対して感受性があるかどうか調べた。PBS(pH7.4)およびクエン酸緩衝液(pH4.2)中でCas9/sgLUC複合体(mol/mol=1/1)のサイ

ズ(直径)(図11A)およびゼータ電位(図11B)を測定した。クエン酸緩衝液中で調製したCas9/sgLUC複合体のサイズは大きく(100nmより大きい)、ゼータ電位は正に荷電している。これらの2つの特性(典型的な有効なLNPよりも大きなサイズ)と正電荷(正に荷電している脂質と複合体化するのに適合しない電荷)があるために、脂質ナノ粒子によって効果的にカプセル化することは不可能である。しかしながら、PBS中で調製したCas9/sgLUC複合体のサイズは小さく(20nm未満)、負電荷を有する。従って、中性pHで処方された時には脂質ナノ粒子によってカプセル化することができる。次に、異なるCas9タンパク質:sgRNAモル比のCas9/sgRNA複合体を調製し、特徴付けた。異なるCas9/sgRNAモル比(1/1、1/3、および1/5)で調製したCas9/sgLUC複合体のサイズ(図11C)およびゼータ電位(図11D)。Cas9/sgLUC複合体(1/1、mol/mol)と比較して、モル比が大きいほど(1/3および1/5、mol/mol)、サイズが小さくなり、負電荷が大きくなった。これは脂質ナノ粒子カプセル化に有益な場合がある。これらの組成物を調製し、Cas9/sgRNA複合体をカプセル化した後のDOTNP脂質ナノ粒子を特徴付けた。異なるモル比(1/1、1/3、1/5)で調製した時の、DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgLUC複合体(DOTNP10-Lと名付けた)のサイズ(図11E)およびゼータ電位(図11F)。このデータは、単分散LNPへのCas9/sgRNA RNPのカプセル化を示している。図11Gは、カプセル化されたRNPを含むDOTNP10-L(1/3、mol/mol)LNPのTEM画像を示す。この初回研究の後に、sgLUC、sgGFP、sgTOM、およびsgPTENを含む異なるsgRNAを使用した。これらを区別するために、DOTNPの終わりに各遺伝子の最初の文字を加えた。例えば、DOTNP10-Lとは、DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgLUC複合体を意味する。DOTNP10-Gとは、DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sGFP複合体を意味する。

【0198】

(表7)サイズ、PDI、およびカプセル化効力(encapsulation efficacy)を含む、PBSおよびクエン酸緩衝液によって形成されたDOTAP10、DSPC50、およびDODAP50製剤の特徴付け

	DOTAP10		DSPC50		DODAP50	
	PBS	クエン酸 緩衝液	PBS	クエン酸 緩衝液	PBS	クエン酸 緩衝液
サイズ(nm)	155.4	85.1	208.9	202.0	153.5	148.0
PDI	0.09	0.21	0.30	0.29	0.08	0.15
EE (%)	34.9	54.9	0	43.7	14.4	36.2

【0199】

(表8)PCR産物の長さとその目的を含めて、この研究において使用した全プライマーを列挙した(Cas9=SEQ ID NO:3~4; Ca9 Seq-1=SEQ ID NO:5; Ca9 Seq-2=SEQ ID NO:6; Ca9 Seq-3=SEQ ID NO:7; Ca9 Seq-4=SEQ ID NO:8; Ca9 Seq-5=SEQ ID NO:9; Ca9 Seq-6=SEQ ID NO:10; Ca9 Seq-7=SEQ ID NO:11; PTEN=SEQ ID NO:14~15; IVT sgTom1=SEQ ID NO:44~45; IVT sgTom2=SEQ ID NO:46~47; IVT sgLoxP=SEQ ID NO:48~49)

名称	フォワードプライマー (5' → 3')	リバースプライマー (5' → 3')	長さ	注
Cas9	ATATATGGATCCGCCACCATGGCCCCAA AGAAGAAGCGGAGGTC	ATATATGAATTCCTTACTTTTCTTTTT TGCCCTGGCCGCGCTTTTTCGTGGC CGCCGCGCTTTTGTGCGCTCCAG	423bp	IVTクローン用
Ca9 Seq-1	CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAAC			全Cas9配列を確認する ための配列決定用
Ca9 Seq-2		AGCAGGTCCTCTCTGTTCAG		
Ca9 Seq-3	GACGGCTTCGCCAACAGAAACTTC			
Ca9 Seq-4		TTTGATGCCCCCTCTTCGATCCG		
Ca9 Seq-5	GGGAGATCGTGTGGGATAAG			
Ca9 Seq-6		ACTTCTTAGGGTCCCAGTCC		
Ca9 Seq-7	AAGAGAGTGATCCTGGCCGAC			
PTEN	ATCCGTCCTTCTCCCCATTCCG	GACGAGCTCGCTAATCCAGTG	638bp	T7E1アッセイ用
IVT sgTom1	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTAAAC CTCTACAAATGGTTTAGAGCTAGAAATA GC	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	120bp	IVTテンプレート 調製用 赤色はsgRNA配列 を示す
IVT sgTom2	TAATACGACTCACTATAGGGAACCTCTA CAAAATCTGGTAGTTTAGAGCTAGAAATA GC	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	120bp	
IVT sgLoxP	TAATACGACTCACTATAGGCGGTATAGCA TACATTATACCGGTTTAGAGCTAGAAATA GC	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	120bp	

【0200】

DOTNP脂質ナノ粒子がインビトロでCas9/sgrNA RNP複合体を核に送達し、効率的な遺伝子編集を媒介できるかどうか調べるために、一連の実験を行った。最初に、緑色蛍光EGFPによってタグ化したCas9/sgrNA RNPを含有するDOTNPを共焦点顕微鏡観察によって追跡した(図12A)。DOTNP10カプセル化Cas9-EGFP/sgrLUC複合体(1/3、mol/mol)と1時間、3時間、6時間、および24時間インキュベートした後のHeLa-Luc細胞の画像(9nMのsgRNAを使用した)から、DOTNPは細胞に内部移行し、Cas9 RNPは核に輸送されたことが分かった。緑色:EGFP融合Cas9タンパク質; 青色:Hoechst33342で染色した核。赤色の矢印は、DOTNP10が核に入

10

20

30

40

50

るプロセスを示した。(図12B)

【0201】

次に、DOTNP脂質ナノ粒子がCas9/sgRNA RNP複合体を送達し、Cas9/sgRNA RNP複合体が標的ルシフェラーゼDNAを切断できるかどうか調べた。異なるモル比のDOTNP10-Lと3日間インキュベートした後のLUC遺伝子座におけるDNAインデル(挿入および欠失)のパーセントを、TIDEアッセイを用いて定量した(24nMのsgRNAを使用した)。DOTNP10脂質ナノ粒子カプセル化Cas9/sgGFP(DOTNP10-G)を負の対照として使用した。ここでは、2種類の市販のCas9タンパク質(GeneArt Cas9およびTruecut Cas9)を使用した。(図12B)次に、DNA編集を証明するために、異なる製剤とインキュベートしたHela-Luc細胞のT7EI切断アッセイ(24nMのsgRNA)を行った(図12C)。試験した条件のうち、Truecut Cas9タンパク質を使用した時に1/3のモル比が最良の遺伝子編集を示した。次に、蛍光顕微鏡を用いてGFP編集を試験した(図12D)。DOTNP10-L(対照。GFPを標的としない)およびDOTNP10-G(GFPを標的とする)とインキュベートしたSKOV3-GFP細胞の画像(24nMのsgRNA)。GFPタンパク質発現の消失によって標的上での編集が証明された。最後に、フローサイトメトリーを使用して、DOTNP10-LおよびDOTNP10-GとインキュベートしたSKOV3-GFP細胞を分析した(図12E)。(図12F)フローサイトメトリーによる、DOTNP10-LおよびDOTNP10-GとインキュベートしたSKOV3-GFP細胞の平均蛍光強度はCRISPR/CasによるGFP編集を示した。

【0202】

次に、DOTNP脂質ナノ粒子が、CRISPR/Casを介した遺伝子編集を成し遂げるためにインビボでCas9/sgRNA RNP複合体を送達できるかどうか調べた。前と同じように、遺伝子操作されたTdTomatoマウスモデルを使用した。以下の製剤を用いて1匹のマウスにつき1.5mg/kgのsgRNAが送達された。DOTNP5-Tは、DOTNP5 LNPカプセル化Cas9/sgTom複合体を意味する。DOTNP10-Tは、DOTNP10 LNPカプセル化Cas9/sgTom複合体を意味する。DOTNP50-Tは、DOTNP50 LNPカプセル化Cas9/sgTom複合体を意味する。これらの製剤をIV注射した後、注射して7日後に、tdTomato蛍光をエクスピボで主要臓器において定量した(図13A)。DOTNP5-T処置群ではtdTomato蛍光は肝臓にしか検出されなかった。DOTNP10-T群では、わずかな蛍光が肺に認められ、DOTAP用量が50%までさらに増加した場合(DOTNP50-T)、tdTomato蛍光のほとんどが肺で観察された。従って、上記でまとめたmRNA送達実験と同様に、DOTAP方法論もCas9/sgRNAリボ核タンパク質(RNP)複合体の組織特異的遺伝子編集を可能にする。送達をさらに調べるために、PTENに対するsgRNAを含有するLNPが送達された。肝臓および肺臓器のT7EI切断アッセイを用いて、DOTNP5-P(DOTNP5 LNPカプセル化Cas9/sgPTEN複合体)、DOTNP10-P(DOTNP10 LNPカプセル化Cas9/sgPTEN複合体)、およびDOTNP50-P(DOTNP50 LNPカプセル化Cas9/sgPTEN複合体)(2mg/kgのsgRNA/マウス)のIV注射は遺伝子編集を媒介することが確かめられた(図13B)。結果は、エクスピボ画像化によって得られたものと一致している。遺伝子編集は、DOTNP5-Pで処置した後、肝臓でしか観察されなかった。DOTNP10-Pとインキュベートした時、遺伝子編集は肝臓と肺の両方で得られた。これに対して、DOTNP50-P処置群では、遺伝子編集のほとんどが肺で観察された。

【0203】

本明細書において示されたデータから、ペイロードを特定の組織に特異的に標的化するために多種多様な組成物を用いて脂質ナノ粒子が調製され得ることが分かる。特に、低濃度の永久カチオン性脂質($\leq 10\%$)を含む脂質ナノ粒子は核酸を肝臓に送達するのに効果的であり、30%未満の永久カチオン性脂質を含むLNPは核酸を脾臓に送達するのに効果的であり、30%を超える永久カチオン性脂質を含むLNPは核酸を肺に効果的に送達する。これらの発見は普遍的なように思われ、頭部、飽和、およびテール長はほとんど影響を及ぼさない。

【0204】

実施例6：既知の4つの脂質組成物に別の脂質を添加すると送達標的が変化する

次いで、確立した4成分LNPに「5番目の」脂質を含めるアプローチ(方法論)の一般化可能性を探索した。

【0205】

10

20

30

40

50

永久カチオン性脂質(例えば、DOTAP)の含有が他のカチオン性イオン化可能脂質の組織特異性を変えることができるかどうか調べるために、2種類の周知の、かつ十分に確立したカチオン性イオン化可能脂質LNP系を選択した。DLin-MC3-DMAを選択し、DSPC、コレステロール、およびPEG-DMGを用いて処方した。Patisiran/Onpattro(Alnylam Pharmaceuticals)と同じモル組成物を生成し、15%または50%のDOTAP(Onpattro4脂質製剤に余分な5番目の脂質)を加えた(図14)。DLin-MC3-DMA LNPはsiRNAおよびmRNA送達のための「ゴールドスタンダード」とみなされている。現在まで、これらはIV投与後に肝臓に送達することしか示されていなかった。図15Aに示したように、DOTAPはDLin-MC3-DMAベースのLNPの臓器におけるmRNA発現プロファイルを変えた(0.1mg/kgルシフェラーゼmRNA、6時間)。DOTAPのパーセントが増加するにつれて、ルシフェラーゼシグナルは肝臓から脾臓に、最後に肺に移動した。これは5A2-SC8 mDLNPの現象と全く同じであった。このアプローチの普遍性をさらに研究するために、本発明者らはDOTAPをC12-200 LNPに含めた(図16)。DLin-MC3-DMAは、安定した核酸脂質ナノ粒子(SNALP)だとみなされている、1つのジメチルアミン頭部をもつ、2つのテールがある脂質であるのに対して、C12-200は、脂質様LNPに処方することができる代表的な「リピドイド」である。3つ全てがカチオン性イオン化可能脂質である。5A2-SC8およびDLin-MC3-DMAを用いた結果と同一であるが、15または50%DOTAPをC12-200 LNPに含めると、mRNA送達後のルシフェラーゼタンパク質発現が肝臓から脾臓から肺へと変化した(図15B)。従って、5番目の脂質方法論(例えば、永久カチオン性脂質を添加する)は他のカチオン性イオン化可能脂質LNPに一般化可能である。

10

20

【0206】

実施例7：既知の4つの脂質組成物に別の脂質を添加すると送達が改善する

さらに、追加のカチオン性イオン化可能脂質が肝臓送達を改善するかどうか問うことによってアプローチ(方法論)の一般化可能性を探索した。

【0207】

一般に、カチオン性イオン化可能脂質が肝臓送達を促進するかどうか調べるために、「5番目の」脂質として、追加の5A2-SC8カチオン性イオン化可能脂質を、適切な比の5A2-SC8、DOPE、コレステロール、およびPEG DMGを含有するLNPに含めた。余分な5A2-SC8を10~30のパーセントで含めた(図17Aおよび図18)。ルミネセンスの飽和を回避するために、低い0.05mg/kg用量のmRNA用量を試験した(IV、6時間)。図17Bに示したように、エキスビボ画像と定量データの両方から、増加した15%~25%の余分な5A2-SC8は肝臓でのmRNA送達効力の改善に役立つことが証明された。5A2-SC8²⁰(5A2-SC8 LNP+20%の余分な5A2-SC8)はルシフェラーゼをオリジナルのmDLNP製剤よりも2~3倍増加させた。

30

【0208】

実施例8：選択的臓器標的化組成物に関連する研究

本開示は、静脈内(IV)投与後に、mRNA、Cas9 mRNA/sgRNA、およびCas9リボ核タンパク質(RNP)複合体を含む多様なカーゴをマウスの肺、脾臓、および肝臓に正確に送達するようにナノ粒子が系統的に操作されるのを可能にする選択的臓器標的化(SORT)と呼ぶ戦略について説明する(図19A)。従来のLNPはカチオン性イオン化可能脂質、双性イオン性リン脂質、コレステロール、およびポリ(エチレングリコール)(PEG)脂質で構成される。本開示は、補助成分(SORT化合物または選択的臓器標的化化合物と呼ぶ)の添加がインビボRNA送達プロファイルを変え、添加されたSORT脂質のパーセントと生物物理学的特性の関数として組織特異的な遺伝子送達と編集を媒介することを示す。本開示は組織特異的送達のための理論の証拠を示し、この方法論が様々なナノ粒子システムに有用なことを確立し、治療上関連する細胞を編集するためのLNP設計方法を提供する。

40

【0209】

効果的な細胞内送達材料は、RNAに結合し、放出するためのイオン化可能なアミン(pKa6.0~6.5)と、疎水性を安定化するナノ粒子の最適なバランスに従来より頼ってきた(Kanasty et al., 2013; Jayaraman et al., 2012; Nelson et al., 2013; Hao et al., 2015)。いかなる理論に拘束されるものではないが、内部電荷および/または外部電荷が組織向性を調整する一要因であり得ると考えられている。開発されたSORT LNPを静脈内投与する

50

と高レベルの組織特異的遺伝子編集が可能になった。SORTは、mRNA、Cas9 mRNA/sgRNA、およびCas9 RNP(全身RNP送達)を含む遺伝子編集機構を配置する様々な方法と適合する。肺標的化SORT LNPは上皮細胞の40%と内皮細胞の65%を編集した。脾臓標的化SORT LNPはB細胞の13%とT細胞の10%を編集した。強化された肝臓標的化SORT LNPは単回低用量注射後に肝細胞の93%を編集した。

【0210】

A. SORTの発見と開発

内部電荷を調節することで組織特異的送達を媒介できるという仮説を調べるために、既に確立されているLNP組成物に5番目の脂質を添加する戦略が考案され、肝細胞での効力が検証された。この原理は、RNAカプセル化とエンドソーム回避を媒介するのに通常用いられるコア4成分比を破壊することなく有効なLNP製剤を調整することであった(Wittrup et al., 2015; Cheng et al., 2018)。

【0211】

永久カチオン性脂質(pKaなしで、またはpKa>8で正に荷電していると定義された)を、mDLNPに使用した5A2-SC8と名付けた分解性デンドリマーイオン化可能(pKa<8)カチオン性脂質に添加した効果(Zhou et al., 2016; Zhang et al., 2018a; Zhang et al., 2018b)が調べられた。これは、フマリルアセト酢酸加水分解酵素(FAH)mRNAを肝細胞に効果的に送達し、FAHノックアウトマウスにおける生存期間を延ばした(Cheng et al., 2018)。この最初の基本mDLNP製剤は、5A2-SC8、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、コレステロール、DMG-PEG(15/15/30/3、mol/mol)、およびmRNA(5A2-SC8/mRNA、20/1、wt/wt)からなった(図20)。次いで、追加の永久カチオン性脂質のパーセントを全脂質に対して5~100%まで系統的に増やすことによって一連のLNPを形成した(図19Bおよび20)。最初に、周知の四級アミノ脂質である1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)を、LNP製剤に添加するSORT脂質として選択した。従って、DOTAP改変SORT製剤は5つの脂質成分を含んだ。5A2-SC8/DOPE/Chol/DMG-PEGを15/15/30/3(mol/mol)に固定し、DOTAPを0~1200のモル比で添加して、滴定された一連の製剤を作製した(図20)。

【0212】

次いで、SORT改変の効果を、ルシフェラーゼ(Luc)mRNAを0.1mg/kgの用量で静脈内(IV)に送達することによって評価した。DOTAPのモル百分率が増加するにつれて、結果として生じたルシフェラーゼタンパク質発現は肝臓から脾臓、次いで、肺に連続的に移動した。このことから、排他的な肺送達を可能にする閾値を伴って明瞭かつ正確な臓器特異的送達傾向が証明された(図19B)。DOTAPパーセントは組織特異性を調節する重要な要因であった。基本LNP(0%DOTAP)は肝臓送達に最適であり、肝細胞送達に合わせて以前に最適化されていたので予期されていた(Cheng et al., 2018)。10~15% DOTAPを添加すると、結果として生じたSORT LNPは脾臓の中にある細胞にmRNAを送達することができた。永久カチオン性SORT脂質をさらに増やすと、50%DOTAPが肺送達に最適だと発見された(図19C)。50% DOTAP SORT LNPはインビボでmRNAを肺に送達するのに有効であるが、インビトロ送達ほど有効ではなかったことは注目に値する(図21)。さらに、50%DOTAP SORT LNPは中性のゼータ電位表面電荷(-0.52mV)を有する(図20)。このことから、組織向性は、正電荷に関連するMPS取り込みによるものでないことが分かる。各臓器での相対的発現を計算すると、SORT脂質としてDOTAPを使用すると、送達は肝臓から肺へと完全に变化した(図19D)。従って、>99%の最新のIVナノメディシン(nanomedicine)がMPSによって隔離されたと見積もられたことを考えると(Wilhelm et al., 2016; Gustafson et al., 2015)、これらの新たなSORTナノ粒子はナノメディシンにおける長年にわたる一課題を克服している。

【0213】

いかなる理論に拘束されるものではないが、永久カチオン性SORT脂質の機能的役割が解明されたので、他の脂質の含有も組織向性を変える可能性があると考えられる。この潜在能力を探索するために、負に荷電している1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(18PA)をSORT脂質として、DOTAPと同様に組み込んだ(図20)。10~40%の18PA取り込み

では、SORT LNPは、他の臓器でのルシフェラーゼ発現が全く無く、脾臓への完全に選択的な送達を媒介した(図19E)。従って、負に荷電しているSORT脂質は脾臓への明確な送達を可能にする。これらの結果から、IV注射を介した特定の組織mRNA送達に合わせてSORT脂質パーセントを調節できることが分かった。

【0214】

B.SORTは他のLNPタイプおよび脂質クラスに一般化可能である

次いで、SORTが普遍的であるかどうか試験するために、他のクラスの確立されている4成分LNPにSORT方法論が適用できるかどうか探索した。最初に、siRNAおよびmRNA送達のための「ゴールドスタンダード」とみなされているFDAにより認可されたOnpattro(Patisiran)(30)と同じモル組成物を用いて、DSPC、コレステロール、およびPEG-DMGを用いてDLin-MC3-DMAを処方した(図22)。現在まで、これらはIV投与後に肝臓に送達することしか示されておらず、ここでも確認された(図19F)。予想通り、DLin-MC3-DMA LNPにDOTAPを加えると、Onpattro製剤のタンパク質発現プロファイルは変化した。SORT脂質パーセントが増加するにつれて、ルシフェラーゼシグナルは肝臓から脾臓から肺に移動した。これは、最初に試験した5A2-SC8 DLNPと全く同じ現象であった。このアプローチの普遍性をさらに研究するために、DOTAPをC12-200 LNPに含めた(図19Gおよび22)。C12-200 LNPも肝臓へのRNA送達について十分に実証されている(Kove et al., 2010; Kauffman et al., 2015)。5A2-SC8およびDLin-MC3-DMA LNPを用いた結果と同一であるが、15%または50%のDOTAPをC12-200 LNPに含めると、mRNA送達後のルシフェラーゼタンパク質発現は肝臓から脾臓から肺へと変化した(図19Gおよび22)。さらに、SORT脂質としての18PAの含有は、5A2-SC8を用いた結果を再現し、DLin-MC3-DMA SNALPおよびC12-200 LLNPの両方について脾臓への排他的なLuc mRNA送達を媒介した(図19F~G)。DLin-MC3-DMAは、安定した核酸脂質ナノ粒子(SNALP)を形成する、1つのジメチルアミン頭部をもつ、2つのテールがある脂質であるのに対して、C12-200は、脂質様LNP(LLNP)を形成する代表的なリピドイドである。従って、SORT方法論は、他のクラスのカチオン性イオン化可能脂質LNPに一般化可能であることが示された。これにより、mRNAを脾臓または肺に送達するように既存の肝臓標的化LNPを容易に変えることができる。具体的には、SORT技術を用いると、FDAにより認可されたOnpattroを、肺および脾臓にある疾患を処置するように素早く再開発することが可能になるかもしれない。

【0215】

観察された組織向性プロファイルが正確な化学構造に特有なものかどうか、または定義された化学クラスに一般化可能かどうか理解するために、複数の永久カチオン性、アニオン性、双性イオン性、およびカチオン性イオン化可能SORT脂質を評価した(図23)。最初に、5A2-SC8 LNPを、2種類のさらなる永久カチオン性脂質:ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)と1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリンクロリド(EPC)と一緒に作製した。これらの脂質は全て四級アミノ基を含有するが、極性頭部、リンカー領域、および疎水性ドメインにおいて大きな化学的相違(例えば、飽和度)がある。5%、15%、40%、50%、および100%のDDABまたはEPCを含有するLNPを処方し、特徴付けた。インビボルシフェラーゼ発現プロファイルはDOTAP LNPのものと一致し、DDABまたはEPCパーセントが増加するにつれてルミネセンス活性は肝臓から脾臓、次いで、肺に系統的にシフトした(0.1mg/kg, 6h)。パーセントが40%まで増加したら、高いルシフェラーゼシグナルがもっぱら肺で観察された(図23A)。18PAと比較して異なる構造をもつ代表的なアニオン性脂質として、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(14PA)およびsn-(3'-オレオイル-2'-ヒドロキシ)-グリセロール-1-ホスホ-sn-3'-(1',2'-ジオレオイル)-グリセロール(18BMP)を作製した。全てのアニオン性SORT脂質は脾臓への排他的な送達を促進した(図23B)。この融通性は、SORT化合物を最適化することによって、効能、選択性、および忍容性を含む複数の要因のバランスを保つための道を開く。

【0216】

これらの発見により触発されて、確立されている製剤に他のカチオン性イオン化可能脂質を添加した。予想通り、DODAPまたはC12-200を5A2-SC8 LNPに添加しても組織向性は有

意に変化しなかったが、驚いたことに、20%取り込みで肝臓送達は>10倍になった(図23C)。既に確立されている5A2-SC8 LNPに、SORT脂質として追加の5A2-SC8を加えると肝臓mRNA送達は劇的に改善し、0.05mg/kgの極めて低い用量で 10^7 光子/sec/cm²が得られた。従って、SORTは肝臓標的化LNP系をさらに改善する新たな戦略を提供する(図24)。SORT脂質として双性イオン性脂質(DOCPeおよびDSPC)を使用した効果も評価した。組織向性は肝臓から脾臓に移動することが見出されたが、カチオン性SORT脂質またはアニオン性SORT脂質の使用と比較して選択的でなかった(図25)。

【0217】

SORT方法論の限界を試験するために、SORTが不活性製剤を「活性化」できるかどうか調べた。実際に、完全に不活性な製剤にDODAPまたはDOTAPを加えると脾臓および肺への組織特異的送達が起こった(図26)。これらの結果をまとめると、SORTは、組織標的送達を成し遂げるためのモジュール方式の、かつ普遍的な戦略である。

【0218】

C.SORTは、臓器特異的送達を媒介するようにタンパク質コロナ、LNP生体内分布、および見かけの pK_a を変える

定義されたカテゴリーにある余分な脂質を含めることで異なる臓器へのmRNA送達が制御される方法と理由を探索するために機構的実験を行った。肺内の細胞に送達するLNPは肺に生体分布(蓄積)しなければならないことは当然のことである。肺(DOTAP四級アミノ脂質)、脾臓(18PAアニオン性脂質およびDSPC双性イオン性脂質)、ならびに肝臓(DODAPイオン化可能な三級アミノ脂質)向性をもつSORT脂質を含有する5A2-SC8 LNPのインビボ分布を追跡するために、Cy5標識mRNAが送達された(図27Aおよび28)。全てのLNPを0.5mg/kg Cy5標識mRNAの用量でIV注射し、6時間後に画像化を行った。図27Aに示したように、DOTAPは生体内分布を変え、肺での蓄積がDOTAPパーセントの関数として進行的に増加した。18PAの取り込みによって脾臓への取り込みが増加した。DODAPは肝臓蓄積をわずかに増加させ、脾臓蓄積を減少させた。興味深いことに、肺特異的および脾臓特異的なSORT LNPについては肝臓におけるタンパク質発現は全く無かったが、これらのLNPは依然として肝臓に蓄積した。このことから、臓器生体内分布は臓器特異的効力に必要なが、組織標的送達の機構を説明する唯一の要因でないことが示唆される。

【0219】

いかなる理論に拘束されるものではないが、定義された細胞集団における生体内分布と活性の変化はタンパク質コロナの変化に起因する可能性があると考えられる。タンパク質コロナにおいて特異的タンパク質が結合すると、機能的に活性がある生物学的同一性(biological identity)が生じる。定量的質量分析を用いると、SORT分子の添加によって、最も密接に結合する特異的タンパク質と、全体のタンパク質コロナ組成の両方が激変することが見出された。いかなる理論に拘束されるものではないが、肺特異的SORT LNPは選択的におよび最も豊富にビトロネクチンに結合したと考えられる。ビトロネクチンは、正に荷電している脂質と相互作用することができ、肺の内皮細胞および上皮細胞の表面で高発現している $\alpha v \beta 3$ インテグリンに結合する。この内因性標的化機構は、気管支上皮を標的とするために $\alpha v \beta 5$ インテグリンを利用するアデノウイルスと直接比較する。脾臓特異的SORT LNPは、負に荷電している脂質と相互作用することが示されており、もしかすると、脾臓における免疫細胞集団との脾臓局在化において役割を果たしている $\beta 2$ -グリコプロテインIに最も密接に結合した。結合したタンパク質の複合混合物も役割を果たしている可能性があることは注目に値する。このアンサンブル(ensemble)効果はまた、複数の細胞タイプを標的化するための潜在的な機構であり、代替のSORT分子を用いて、ある臓器の中にある特定の細胞タイプへの特異性をさらに高める一つのやり方だとみなされた。アポリポタンパク質EはDLin-MC3-DMA Onpattro LNPに結合し、ApoEノックアウト動物では効力が失われることが以前に示されている。従って、肝細胞における、おそらく、LDL受容体による受容体を介した標的化および取り込みにはApoEが必要であり、説明されたタンパク質コロナ機構は細胞の特異性と効力を制御することができるという強力な証拠がある。従って、mDLNPがApoEにも強く結合することが分かることは励みになることであり、これにより、

これらの肝細胞効力のさらなる証拠が得られ、タンパク質コロナアッセイの妥当性が強化される。肝臓強化SORT LNPはApoE結合を保持しているが、アルブミンにも豊富にある。このことから、肝臓内で細胞タイプが増殖した可能性があることが示唆される。これらのデータは、SORT分子の化学構造が、臓器向性および細胞特異性を変える特定のタンパク質コロナを方向付けることができることを累積的に示す。いかなる理論に拘束されるものではないが、SORT分子の同一性がタンパク質コロナ同一性を制御できると考えられている。このことから、SORT分子は糖、脂質、低分子治療剤、ビタミン、低分子、親水性分子、疎水性分子、両親媒性分子、ペプチド、タンパク質などを含むことができると示唆される。

【0220】

LNPと機能的活性を相関付けるパラメータとして見かけの/全体の pK_a が立証されているので、見かけの/全体の pK_a を調べた。例えば、肝細胞への送達には約6.4の pK_a が最適なが示されている(Jayaraman et al., 2012)。TNSアッセイを用いて、全ての有効なインビボ製剤(67種類のLNP)に対して見かけの pK_a を分析した(図27Bおよび29、表1)。SORTは、さらなる荷電した脂質の含有を伴うので、結果として生じたTNS滴定曲線は、もっと複雑な混合種LNPのイオン化挙動を捕らえている。従って、その代わりに、基準化されたシグナルの50%が発生した時の相対 pK_a を推定した。組織向性に対して相対 pK_a をプロットした時に、SORT LNPは、定義された見かけの pK_a 範囲に分けられた(図27B)。予想通り、全ての有効な肝臓標的化製剤の pK_a は非常に狭く、十分に確立した6~7の範囲内にあった(Jayaraman et al., 2012)。全ての肺標的化製剤が高 pK_a 範囲(>9)に位置していた。その反対に、脾臓向性SORT LNPは低 pK_a 範囲(2~6)に分けられた。これらの結果は肝臓への送達には6~7が最適なことを裏付けているが、高 pK_a が肺送達を媒介し、低 pK_a が脾臓送達を媒介するという発見を明らかにしている。全てのSORT LNPがカチオン性イオン化可能脂質を依然として含有していることに注目しなければならない。カチオン性イオン化可能脂質は電荷を獲得する能力があるためにエンドソーム回避に有用だとみなされている(Wittrup et al., 2015)。対照実験を行った。効力を得るためにはカチオン性イオン化可能脂質の含有が必要なことが確認された(図30)。従って、SORTは、望ましいモル比率での効力に必要な特定の微細種(microspecies) pK_a をもつ分子の保持を可能にする一方で、SORT脂質を含めると見かけの pK_a が改変される。いかなる理論に拘束されるものではないが、2部からなる機構が役割を果たす可能性があると考えられる。SORT LNPは、肺または脾臓の中にある細胞における受容体を介した効力を可能にする、血清中にある特定のタンパク質に選択的に結合する。これは、リポタンパク質粒子(例えば、LDL)が天然でコレステロールを輸送する手法と非常に似ている。この制御された、かつ予測可能な内因性標的化機構を用いるとSORT LNPが非肝臓標的に到達することが可能になる。第2の部分は、SORT分子が肝臓効力を得るための生理化学的特性(例えば、全体の/見かけの pK_a 6.4)をもはや有さないように、非肝臓標的化SORT LNPの特性を変える手法が関与する。これにより精度が得られる。細胞特異的エンドサイトーシス輸送の違いなどの他のもっと複雑な要因も役割を果たしている可能性があることも注目する。結果を考慮すると、LNPナノ構造の内部電荷が生体内分布を媒介し、見かけの pK_a が特定の臓器におけるタンパク質発現プロファイルと相関関係があることが示唆される。この特別な価値が、他の臓器特異的ナノ粒子を開発し続けるために用いられ得る。

【0221】

(表1)各成分のモル比およびモル百分率、全脂質とmRNAの重量比、サイズ、およびPDIを含む、DDAB、EPC、14PA、18BMP、DODAP、C12-200、5A2-SC8、DSPC、およびDOCPeによって改変されたmDLNP製剤(SORT LNP)の詳細

名称	モル比					モル百分率 (%)					脂質/ mRNA (wt/wt)	サイズ (nm)	PDI
	5A2- SC8	DOPE	Chol	DMG- PEG	X ^a	5A2- SC8	DOPE	Chol	DMG- PEG	X ^a			
5% DDAB	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	193.5	0.14
15% DDAB	15	15	30	3	11.12	20.24	20.24	40.47	4.05	15.00	40	167.7	0.13
40% DDAB	15	15	30	3	42	14.29	14.29	28.57	2.86	40.00	40	143.8	0.13
50% DDAB	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	174.7	0.21
100% DDAB	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	3174.3	0.23
5% EPC	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	195.3	0.14
15% EPC	15	15	30	3	11.12	20.24	20.24	40.47	4.05	15.00	40	166.3	0.14
40% EPC	15	15	30	3	42	14.29	14.29	28.57	2.86	40.00	40	116.7	0.15
50% EPC	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	105.7	0.17
100% EPC	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	455.9	0.32
5% 14PA	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	92.8	0.18
10% 14PA	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	98.6	0.18
20% 14PA	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	105.7	0.17
30% 14PA	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30.00	40	107.3	0.19
100% 14PA	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	2607.3	0.28
5% 18BMP	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	112.0	0.13
10% 18BMP	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	131.4	0.10
20% 18BMP	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	172.9	0.12
30% 18BMP	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30.00	40	195.9	0.13
100% 18BMP	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	87.4	0.21
10% DODAP	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	138.5	0.11
20% DODAP	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	122.4	0.18
50% DODAP	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	148.0	0.15
80% DODAP	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	180.4	0.13
100% DODAP	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	932.8	0.74
10% C12-200	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	179.7	0.11
20% C12-200	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	141.3	0.19
50% C12-200	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	156.1	0.16
80% C12-200	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	273.2	0.21
100% C12-200	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	2505.3	1.00
10% 5A2-SC8	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	127.1	0.14
15% 5A2-SC8	15	15	30	3	11.12	20.24	20.24	40.47	4.05	15.00	40	130.9	0.13
20% 5A2-SC8	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	137.6	0.10
25% 5A2-SC8	15	15	30	3	21	17.86	17.86	35.71	3.57	25.00	40	126.0	0.12
30% 5A2-SC8	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30.00	40	134.7	0.10
20% DSPC	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	115.7	0.19
50% DSPC	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	202.0	0.29
80% DSPC	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	1024.7	0.67
100% DSPC	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	2134.8	0.99
20% DOPC	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	147.7	0.15
50% DOPC	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	173.6	0.20
80% DOPC	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	127.7	0.21
100% DOPC	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	93.7	0.36

^a Xは、DDAB、EPC、14PA、18BMP、DODAP、C12-200、5A2-SC8、DSPC、およびDOPCを表す。

【0222】

D.SORTはIV投与後に肺特異的、肝臓特異的、および脾臓特異的な遺伝子編集を可能にする

SORT LNPには特定の臓器を標的化すると仮定して、次いで、これらの発見を、IV注射を介して組織特異的遺伝子編集に適用した。CRISPR/Cas(クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート/CRISPR関連タンパク質(Cas))技術は正確に配列依存的にゲノムを編集することができ、疾患の原因となる変異の、可能性のある訂正を含めて多種多様な応用分野での用途のために急速に発展してきた(Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Hendel et al., 2015; Yin et al., 2016; Yin et al., 2017; Wang et al., 2018; Amoasii et al., 2018)。遺伝子編集は局所投与注射によって成し遂げることができる(Zuris et al., 2015; Sun et al., 2015; Chew et al., 2016; Staahl et al., 2017)。しかしながら、多くの重篤な遺伝障害は臓器の奥深くにある細胞の変異に起因し、疾患を治癒するには特定の細胞を訂正することが必要である。このような訂正は全身投与によって最も良く成し遂げられる可能性がある。最近、遺伝子を編集するにはCas9 mRNAとsgRNAのIV同時送達及安全かつ効果的な戦略だと報告された(Miller et al., 2017; Yin et al., 2017; Finn et al., 2018)。しかしながら、現在まで、肝臓以外の臓器にある細胞を編集するように合理的に操作されたLNPの報告はなかった。

【0223】

SORT LNPが臓器特異的遺伝子編集を媒介する能力を調べ、定量するために、tdTomタンパク質(Staahl et al., 2017)の発現を阻止するLoxP隣接stopカセット(Tabebordbar et al., 2016)を含有する、遺伝子操作されたtdTomato(tdTom)レポーターマウスを利用した。stopカセットが欠失されたら、tdTom蛍光がオンになり、遺伝子編集された細胞の検出が可能になる(図31A)。編集された細胞においてtdTomを活性化するために、最初にCreリコンビナーゼmRNA(Cre mRNA)を送達した。肝臓選択的SORT LNP、肺選択的SORT LNP、および脾臓選択的SORT LNPで処置した、選択された臓器では蛍光組織が容易に目で見えた(図31B)。実験ごとに別々の対照を使用しなければならなかったことに注目しなければならない。なぜなら、これらのマウスには、いくらかのバックグラウンド臓器蛍光があるからである。脾臓のバックグラウンド臓器蛍光は他の臓器と比較して最も弱い(図31Cおよび32)。これにより、tdTomマウスモデルにおいて脾臓特異性の検出は識別しにくい。その後で内因性PTENが編集された時に、T7E1アッセイによって、脾臓特異的SORT LNPは脾臓にだけ明瞭なDNA切断を示し(図33C)、肝臓でも肺でもDNA切断を示さなかった。それにもかかわらず、tdTom陽性細胞は組織切片の共焦点画像化によって容易に認められた(図31D)。

【0224】

E. SORTは特定の、かつ治療に関連する細胞集団において高レベルの編集を可能にする

編集された臓器から抽出したシングル細胞のフローサイトメトリーを用いた肝臓、肺、および脾臓の中にある特定の細胞タイプの遺伝子編集を定量した(図31E)。肝臓特異的SORT(20%DODAP)5A2-SC8 LNPは0.3mg/kg Cre mRNAの単回注射後に肝臓内にある全肝細胞の約93%を編集した(図31Eおよび34)。これは、現在まで報告された最も高いレベルの肝細胞遺伝子編集である。肺特異的SORT(50%DOTAP)5A2-SC8 LNPは肺において同じ用量で全上皮細胞の約40%、全内皮細胞の約65%、免疫細胞の約20%を編集した(図31Eおよび35)。上皮細胞が、嚢胞性線維症を引き起こすCFTR変異を訂正するための一次標的だということを考えると、この結果は、CFTR変異を訂正するためにすぐに適用される説得力のある送達系として肺特異的SORT LNPを成立させる。最後に、脾臓特異的SORT(30%18PA)5A2-SC8 LNPは全B細胞の約13%、全T細胞の約10%、全マクロファージの約20%を編集した(図31Eおよび36)。以前の研究よりも選択性が改善されたために、脾臓特異的SORT LNPは非ホジキンB細胞リンパ腫および他の免疫障害を処置するのに適用できるかもしれない。最初の焦点は単回低用量注射の定量にあったが、もっと高い用量または複数回の注射を投与することによって、もっと高レベルの編集が実現可能である。

【0225】

F. SORTは、Cas9 mRNA/sgRNAのIV同時送達とCas9 RNPの送達によって組織特異的遺伝子編集を可能にする

次に、Cas9 mRNAとsgRNAを1個のナノ粒子の中に入れてIV同時送達することによって(図37A、38、および39、表2)によって、SORT LNPが組織特異的CRISPR/Cas遺伝子編集を成し遂げる能力を調べた。肝臓標的化SORT LNPおよび肺標的化SORT LNPを2.5mg/kg全RNA(4:1 mRNA:sgRNA, wt:wt)の用量で注射し、単回IV注射して10日後に遺伝子編集を定量した。図37Bに示したように、基本LNP処置マウスと20%DODAP SORT LNP処置マウスの両方について肝臓に強力なtdTom蛍光が観察され、50%DOTAP SORT LNP処置マウスの肺に強力な蛍光が観察された。全ての結果がLuc mRNA送達結果と一致した。マウスでは脾臓免疫細胞が高速に入れ替わるために(Kamath et al., 2000)、Cas9/sgRNAの重量比が2/1になるように最適化し(図39)、注射して2日後に脾臓編集を試験した。バックグラウンド自己蛍光を考慮に入れて、30%18PA処置マウスの脾臓において明るいtdTom蛍光が観察された。もっぱら、脾臓から単離したDNAにおいて明瞭なT7E1切断バンドが検出された(肝臓編集も肺編集も無かった)(図33)。次いで、組織切片を共焦点顕微鏡観察で画像化することによって蛍光が確認された(図37C)。

【0226】

次に、合成担体にとって最も困難な戦略であるCas9 RNPの直接送達を探索した。永久カチオン性SORT脂質を使用すると、組織向性を制御して、Cas9タンパク質/sgtdTom複合体を

カプセル化することができた。7%DOTAP SORT LNPのIV注射によって肝臓が編集されたのに対して、55%DOTAP SORT LNPによって排他的に肺が編集された(図37F)。これらのデータから、説明された方法論によって、肝臓、肺、および脾臓に特異的なCRISPR/Cas遺伝子編集が可能になることが分かる。

【0227】

ゴービヨンド(go beyond)レポーターマウスに対して、組織特異的LNPが内因性標的を編集する能力を試験した。PTENが、ほとんどの細胞において発現する十分に確立した腫瘍抑制因子であるので選択した。野生型C57BL/6マウスに、Cas9 mRNAとsgPTENを同時装填したSORT LNP(2.5mg/kg全RNA)を注射した。単回IV注射して10日後に挿入と欠失(インデル)の発生を定量した。図37Dに示したように、T7E1アッセイによって、特定の組織において明瞭なDNA切断バンドが観察された。このことから、基本LNPと20%DODAP SORT LNPは両方とも肝臓において効果的なPTEN編集を媒介したが、肺でも脾臓でも全く媒介しなかったことが証明された。注目すべきことに、50%DOTAP SORT LNPは、もっぱら肺においてPTEN編集を示した。PTEN編集をさらに確認するために、組織切片のH&E染色と免疫組織化学(IHC)を行った。図37Eに示したように、組織切片中の細胞は、脂質蓄積に起因するPTEN消失の既知の表現型である透明な細胞質をはっきりと示した(Xue et al., 2014)。さらに、PTENの陰性染色は肝臓組織と肺組織のIHC切片の両方で観察された。このことから、PTEN編集の明らかな証拠が得られた。tdTomマウスモデルでは脾臓特異的18PA SORT LNP編集は識別しにくかったが、最適化された重量比のCas9/sgPTEN(2/1)と検出時間(2日)を用いた野生型マウスでは明らかな脾臓PTEN編集を観察することができた。18PA SORT LNP注射マウスに対して行ったT7E1アッセイによって、肝臓でも肺でもDNA編集は観察されなかった(図33)。最後に、SORTをCas9 RNPに適用し、PTENの内因性編集を調べた。前と同じように、Cas9タンパク質/sgPTENを含有する7%および55%DOTAP SORT LNPは、それぞれ、肝臓および肺に特異的な編集を可能にした(図37G)。内因性遺伝子を標的とした、これらの結果から、合理的にガイドされた組織選択的遺伝子編集が合成担体によって成し遂げられたことが証明された。

【0228】

G. 材料および方法

I. 材料

5A2-SC8(Zhou et al., 2016)、DLin-MC3-DMA(Jayaraman et al., 2012)、およびC12-200(Love et al., 2010)を以下の公表されたプロトコールによって合成および精製した。1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDAB)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EPC)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(ナトリウム塩)(18PA)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(ナトリウム塩)(14PA)、sn-(3-オレオイル-2-ヒドロキシ)-グリセロール-1-ホスホ-sn-3'-(1', 2'-ジオレオイル)-グリセロール(アンモニウム塩)(18:1 Hemi BMP, 18BMP)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、2-((2,3-bis(オレオイルオキシ)プロピル)ジメチルアンモニオ)エチルエチルホスフェート(DOCPE)、および1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)はAvanti Polar Lipidsから購入した。コレステロールはSigma-Aldrichから購入した。1,2-ジミリストイル-sn-グリセロール-メトキシ(ポリ((エチレングリコール)MW 2000)(DMG-PEG2000)はNOF America Corporationから購入した。Cas9タンパク質はThermo Fisherから購入した。ONE-Glo + Tox Luciferase ReporterアッセイキットはPromega Corporationから購入した。Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kits(WMCO、3.5kDa)はSigma-Aldrichから購入した。4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸(DAPI)はThermo Fisher Scientificから購入した。Cas9 mRNAはインビトロ翻訳(IVT)によって産生された。Cy5標識ホタルルシフェラーゼmRNA(Cy5-Luc mRNA)、非標識ホタルルシフェラーゼmRNA(Luc mRNA)、およびmCherry mRNAはTriLink BioTechnologiesから購入した。D-ルシフェリン(ナトリウム塩)はGold Biotechnologyから購入した。修飾されたsgTom1およびsgPTEN(表2)はSynthegoから購入した。

【0229】

(表2) TNSアッセイによって測定したSORT LNPの相対的見かけの pK_a 値

mDLNPベースのLNP						MC3およびC12-200ベースのLNP		C1ベースのLNP	
名称	pK_a	名称	pK_a	名称	pK_a	名称	pK_a	名称	pK_a
mDLNP	6.46	15% DDAB	7.21	10% 14PA	5.15	50% C12-200 LNP	6.98	20% DODAP C1	5.61
5% DOTAP	6.67	40% DDAB	>11.0	20% 14PA	4.78	15% DOT MC3	6.86	30% DODAP C1	5.53
10% DOTAP	6.92	50% DDAB	>11.0	30% 14PA	3.73	50% DOT MC3	>11	10% DOTAP C1	5.89
15% DOTAP	7.48	5% EPC	6.51	5% 18BMP	5.22	10% 18PA MC3	6.12	20% DOTAP C1	7.55
20% DOTAP	8.49	15% EPC	6.76	10% 18BMP	4.93	20% 18PA MC3	5.55	30% DOTAP C1	>11
30% DOTAP	10.8	40% EPC	8.45	20% 18BMP	4.63	30% 18PA MC3	5.21		
40% DOTAP	>11.0	50% EPC	>11.0	30% 18BMP	4.09	C12-200 LNP	6.64		
50% DOTAP	>11.0	5% 18PA	4.53	10% DODAP	6.32	15% DOT C12-200	6.77		
60% DOTAP	>11.0	10% 18PA	4.44	20% DODAP	6.46	50% DOT C12-200	>11		
70% DOTAP	>11.0	20% 18PA	4.43	50% DODAP	5.44	10% 18PA C12-200	5.95		
80% DOTAP	>11.0	30% 18PA	3.97	80% DODAP	6.09	20% 18PA C12-200	5.69		
90% DOTAP	>11.0	40% 18PA	3.52	20% C12-200	6.38	30% 18PA C12-200	5.55		
5% DDAB	6.55	5% 14PA	5.34	20% C12-200	6.46				

オリジナルLNP

カチオン性脂質 + LNP

アニオン性脂質 + LNP

イオン化可能脂質 + LNP

双性イオン性脂質 + LNP

10

20

30

40

50

【0230】

II. ナノ粒子形成

RNAを装填したLNP製剤を、エタノール希釈法(Zhou et al., 2016)を用いて形成した。肝臓標的化mRNA製剤(mDLNP)を開発し、以前の論文で報告した(Cheng et al., 2018)。以前に述べられたように(Jayaraman et al., 2012; Love et al., 2010、基本製剤を調製した。特に断りのない限り、指定されたモル比をもつ全脂質をエタノールに溶解し、RNAを10mMクエン酸緩衝液(pH4.0)に溶解した。2種類の溶液を、40:1の最終重量比(全脂質:mRNA)を満たすように体積で3:1の水溶液:エタノール比(3:1、水溶液:エタノール、vol:vol)で素早く混合し、次いで、室温で10分間インキュベートした。アニオン性SORT脂質(例えば、18PA、14PA、および18BMP)を含有するSORT LNP製剤を調製するために、アニオン性脂質を最初にテトラヒドロフラン(THF)に溶解し、次いで、エタノール中で他の脂質成分と混合し、最後に、上記で述べられたようにmRNA緩衝液(10mM、pH3.0)を用いて製剤を得た。全ての製剤を、追加の脂質に基づいて名付けた。DOTAP mDLNPを一例に挙げると、公表された論文で報告されたように、mDLNPの内部モル比を、15/15/30/3の5A2-SC8/DOPE/コレステロール/DMG-PEGで固定した(Cheng et al., 2018)。追加の脂質として、上記のエタノール脂質混合物には、5A2-SC8/DOPE/コレステロール/DMG-PEG/DOTAPのモル比が15/15/30/3/Xに等しくなるようにDOTAPを指定された量で溶解し、上記の標準的なプロトコールに従ってmRNA水溶液と素早く混合し、最終的にSORT LNPを得た。これをY%DOTAPと名付けた。Yは、全脂質中にあるDOTAPのモル百分率を意味する。同様に上記の方法を用いて、他の追加の脂質を含む製剤を形成した(図20および表3)。Cas9/sgRNAリボ核タンパク質(RNP)カプセル化のために、1×PBSを製剤に使用し、Cas9とsgRNAのモル比を1:3に固定した。SORT LNP形成後に、インビトロアッセイおよびサイズ検出の場合、新鮮なLNP製剤を1×PBSを用いて0.5ng/μL mRNA(最終エタノール濃度<5%)まで希釈した。インビボ実験の場合、製剤を、1×PBSに対して2時間透析し(Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kits, WMC0 3.5kDa, Sigma-Aldrich)、静脈内(IV)注射の場合はPBSで15 μL/gまで希釈した。

【0231】

(表3) sgRNA配列

名称	配列 (5'→3')	PAM (5'→3')	注
sgTom1	AAGTAAACCTCTACAAATG (SEQ ID NO: 1)	TGG	化学修飾されたsgTom1とsgPTENを選択した
sgPTEN	AGATCGTTAGCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 2)	AGG	

【0232】

III. mRNA製剤の特徴付け

サイズ分布と多分散指数(PDI)を、動的光散乱(DLS, Malvern MicroV モデル; He-Neレーザー、λ=632nm)を用いて測定し、ゼータ電位を、1×PBSで希釈した後に測定した。mRNA製剤の見かけのpK_aを測定するために、いくつかの変更を加えて、2-(p-トルイジノ)-6-ナフタレンスルホン酸(TNS)アッセイを使用した(Cheng et al., 2018; McLaughlin and Harary, 1976; Bailey and Cullis, 1994; Heyes et al., 2005)。mRNA製剤(60 μM全脂質)とTNSプローブ(2 μM)を、10mM HEPES、10mM MES(4-モルホリンエタンスルホン酸)、10mM酢酸アンモニウム、および130mM NaCl(2.5~11のpH範囲)を含有する一連の緩衝液と5分間インキュベートした。各ウェル(黒底(black bottom)96ウェルプレート)の平均蛍光強度を、Tecanプレートリーダーによってλ_{ex}=321nmおよびλ_{em}=445nmで測定し、データをpH2.5の値に対して基準化した。典型的に、見かけのpK_aは、蛍光最大値の半分になるpHと定義された。この方法は、ほとんどのLNPのLNP全体の/見かけのpK_aを推定するのに有用であったが、>40%永久カチオン性脂質を含有するSORT LNPには使用できなかった。なぜなら、これらのLNPは常に荷電しているからである。従って、その代わりに、基本LNP製剤(SORT脂質を添加していない)と比較して、基準化されたシグナルの50%が生じた時の相対pK_aを推定した。この代替計算値は、ほとんどのLNPについてpK_aを変えず、永久カチオン性SORT L

NPを推定することができ、組織選択的RNA送達の実験結果と一致した。従って、LNPが1種類のカチオン性イオン化可能脂質を含有する時には標準的なTNSアッセイが用いられ、様々な荷電状態をもつ複数種の脂質からなる複合混合物を含有するSORTなどの系には代替の50%基準化シグナル法が用いられることが示唆され得る。

【0233】

IV. インビトロシフェラーゼ発現および細胞生存率試験

Huh-7またはA549細胞をトランスフェクションの前日に白色96ウェルプレートに 1×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。培地を150 μ Lの新鮮なDMEM培地(5%FBS)と交換し、次いで、50 μ LのLuc mRNA製剤を添加し、1ウェルにつき25ng mRNAと固定した。さらに24時間インキュベートした後に、ONE-Glo+Toxキットを使用して、Promegaの標準的なプロトコールに従ってmRNA発現と細胞傷害性を検出した。

10

【0234】

V. 動物実験

全動物実験がテキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターの動物実験委員会(Institution Animal Care and Use Committees of The University of Texas Southwestern Medical Center)によって承認され、該当する場合には地方、州、および連邦政府の規制と一致している。C57BL/6マウスはUTSW Mouse Breeding Core Facilityから入手した。B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9}(CAG-tdTomato)^{Hze}/Jマウス(Ai9またはAi9(RCL-tdT)マウスとも知られる)はJackson Laboratory (007909)から入手し、CAGプロモーターによって駆動される赤色蛍光tdTomatoタンパク質の転写を阻止するloxP隣接STOPカセットを有するCreレポーター対立遺伝子のホモ接合性発現を維持するように交配した。Creを介した組換え後に、Ai9マウスはtdTomato蛍光を発現する。Ai9マウスはC57BL/6J遺伝的背景でコンジェニックである。

20

【0235】

VI. インビボLuc mRNA送達および生体内分布

体重が18~20gのC57BL/6マウスに、様々なLuc mRNA製剤を0.1 mg/kgまたは0.05mg/kgの用量でIV注射した。n=2~4匹/群。6時間後にマウスにD-ルシフェリン(150mg/kg)を腹腔内(IP)注射し、IVIS Lumina system(Perkin Elmer)によって画像化した。生体内分布のために、C57BL/6マウスにCy5-Luc mRNA製剤を0.5mg/kgの用量でIV注射した。注射して6時間後にエクスピボ画像化(Cy5チャンネル)を行った。

30

【0236】

VII. mRNA合成

最適化されたCreリコンビナーゼmRNAとCas9 mRNAをインビトロ転写(IVT)によって生成した。簡単に述べると、NLS-Cre断片とCas9断片を、それぞれ、PCRテンプレートとしてpCAG-CreERT2およびpSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458)を用いてPCRプログラムによって調製した。次いで、これらの断片を、最適化された5' (3')非翻訳領域(UTR)とポリA配列があるpCS2+MTベクターにクローニングした。標準的なプロトコールに従ってIVT反応を行ったが、典型的なUTPをN1-メチルプソイドウリジン-5'-三リン酸と取り替えた。最後に、mRNAをワクシニアキャッピング酵素と2'-O-メチルトランスフェラーゼ(NEB)によってキャッピング(Cap-1)した。表4は、本明細書において使用したプライマーを示す。

40

【0237】

(表4)PCR産物の長さとその目的を含むプライマー

名称	フォワードプライマー (5' → 3')	リバースプライマー (5' → 3')	長さ	注
Cas9	ATATATGGATCCGCCACCATGGCC CCAAAGAAGAAGCGGAAGGTC (SEQ ID NO: 3)	ATATATGAATTCTTACTTTTCTTT TTTGCCTGGCCGGCCTTTTCGTGGC CGCCGGCCTTTTGTGCGCTCCCAG (SEQ ID NO: 4)	4233bp	IVTクローン用
Ca9 Seq-1	CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAAC (SEQ ID NO: 5)			全Cas9配列を 確認するた めの配列決定用
Ca9 Seq-2		AGCAGGTCCTCTCTGTTTCAG (SEQ ID NO: 6)		
Ca9 Seq-3	GACGGCTTCGCCAACAGAACTTC (SEQ ID NO: 7)			
Ca9 Seq-4		TTTGATGCCCTCTTCGATCCG (SEQ ID NO: 8)		
Ca9 Seq-5	GGGAGATCGTGTGGGATAAG (SEQ ID NO: 9)			
Ca9 Seq-6		ACTTCTTAGGGTCCCAGTCC (SEQ ID NO: 10)		
Ca9 Seq-7	AAGAGAGTGATCCTGGCCGAC (SEQ ID NO: 11)			
NLS-Cre	ATATATGGATCCGCCACCATGCCC AAGAAGAAGAGGAAGGTGGCCAA TTACTGACCGTACACCAAAATTTG CCTG (SEQ ID NO: 12)	ATATATGAATTCTTAATCGCCATCT CCAGCAG (SEQ ID NO: 13)	1083bp	IVTクローン用
PTEN	ATCCGTCTTCTCCCCATTCCG (SEQ ID NO: 14)	GACGAGCTCGCTAATCCAGTG (SEQ ID NO: 15)	638bp	T7E1アッセイ用

【 0 2 3 8 】

NLS-CreとCas9のコード配列は以下の通りである。

10

20

NLS-Cre:

ATGCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGCCAATTTACTGACCGTACACCAAATTTG
CCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAGGTTTCGCAAGAACCTGATGGAC
ATGTTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACCTGGAAAATGCTTCTGTCCG
TTTGCCGGTTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGGTTTCCC
AGAACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCA
GTAAAAACTATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCGGTCCG
GGCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATGCGGCGTATCCG
AAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCAAAACAGGCTCTAGCGTTCGAACG
CACTGATTTTCGACCAGGTTTCGTTCACTCATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGAT
ATACGTAATCTGGCATTCTGTTGTTGCTTATAACACCTGTTACGTATAGCCG
AAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTGGGAGAATGT
TAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGG
CACTTAGCCTGGGGGTAACATAAAGTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGT
AGCTGATGATCCGAATAAAGTACCTGTTTTGCCGGGTCAGAAAAAATGGTGTGCG
GCGCCATCTGCCACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTGGAAGGGATTTTTGAAG
CAACTCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGC
CTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCTGGAGCCGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGG
AGTTTCAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATATTGTC
ATGAACTATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCCTGCTG
GAAGATGGCGATTAA (SEQ ID NO: 16)

10

20

SV40 NLS-Cas9-ヌクレオプラスミンNLS:

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGAC
AAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCGGTG
ATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACC
GACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGC
GAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAG
ACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAA
GGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAGAGGA
TAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA
CCACGAGAAGTACCCACCATCTACACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCAC
CGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTC

30

CGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGAC
AAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCC
ATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAG
AGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGC
CTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCA
ACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACG
ACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCT
GGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAA
CACCAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGA
GCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGA
GAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACAT
TGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGA
AAAGATGGACGGCACCGAGGAAGTCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGG
AGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCTGAAGGAC
AACC GGGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGC
CCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTTCGCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAA
ACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCAG
AGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTG
CTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
AAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGC
AGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGA
AGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAA
TCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATAACACGATCTGCT
GAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCT
GGAAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGA
ACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAA
GCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCAT
CCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTT
CGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGA
GGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACAT
TGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAA
GGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCGGCGACAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAAGAACAGCC
GCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATC
CTGAAAGAACACCCCGTGGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAAC
CGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACG
ACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGC
GACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAG
CTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCC
GAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTG
GTGGAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATG
AACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACC
CTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGC
GCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGG
GAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCG
ACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGAC
CGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAA

10

20

30

40

CGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCG
 GAAAGTGCTGAGCATGCCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGAC
 AGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGAT
 CGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCAC
 CGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAA
 ACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTT
 CGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAA
 GGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCCG
 AAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAAGTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTG
 CCCTCCAAATATGTGAACCTTCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGG
 GCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACT
 ACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGG
 CCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGGATAAGC
 CCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGG
 AGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACC
 AGCACCAAGAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTG
 TACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAAAAGGCCGGCGGCC
 ACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAGTAA (SEQ ID NO: 17)

【0239】

VIII. ウェスタンブロット

IVT Cas9 mRNAの品質をウェスタンブロットによって分析した。トランスフェクション
 の前日に、293T細胞を12ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。600 μ L
 の総体積で、細胞を、mCherry mDLNP(0.5 μ g mRNA/ウェル)、mCherry mDLNP(1.0 μ g mRNA
 /ウェル)、IVT Cas9 mDLNP(0.5 μ g mRNA/ウェル)、IVT Cas9 mDLNP(1.0 μ g mRNA/ウェル)
 、およびリポフェクタミン2000/Cas9 pDNA(0.5 μ g pDNA/ウェル)を含む様々な製剤でさら
 に24時間処理した。1 $\times$ PBSで3回洗浄した後、100 μ Lの溶解緩衝液(150mM NaCl、1mM EDTA
 、および1%TRITON X-100を含む50mM Tris HCl, pH7.4)と1 μ Lのプロテインインヒビター
 カクテル(100 $\times$, Thermo Fisher)を各ウェルに添加し、RTで20分間、揺らした。細胞溶解
 産物を収集して1.6mLチューブに入れ、4 $^{\circ}$ Cで10分間(13,000g)遠心分離した。上清を収集
 して新しいチューブに入れ、すぐに使用しなければ-80 $^{\circ}$ Cで保管した。ウェスタンブロッ
 トを行う前に、タンパク質濃度をBCAアッセイキット(ThermoFisher)を用いて測定した。1
 5マイクログラムの全タンパク質をロードし、4~20%ポリアクリルアミドゲル(ThermoFis
 her)で分離した。次いで、分離されたタンパク質をポリビニリデン膜(BioRad)に転写し、
 5%BSA(PBSTに溶解した)でRTで1時間ブロックした。一次抗体を4 $^{\circ}$ Cで一晩適用した。PBST
 を用いて4回洗浄した後、膜を二次抗体とRTで1時間インキュベートし、次いで、ECL基
 質を用いて画像化した後にPBST(ThermoFisher)で4回洗浄した。

【0240】

IX. Td-Tomatoマウスモデルにおける遺伝子編集(Cre mRNA)

上記で述べられたようにCre mRNA製剤を調製し、IV注射(0.3mg/kg Cre mRNA)を行った
 。2日後に、マウス(n=4匹/群)を屠殺し、主要臓器をIVIS Lumina system(Perkin Elmer)
 によって画像化した。

【0241】

X. フローサイトメトリー用の細胞単離および染色

各臓器の細胞タイプにあるTd-Tomato⁺細胞を試験するために、Cre mRNA製剤(0.3mg/kg)
 で処理して2日後に細胞の単離および染色を行い、次いで、フローサイトメトリーによっ
 て分析した。

【0242】

肝細胞単離のために、以前に述べられたように(Cheng et al., 2018)、二段階コラゲナ
 ーゼ灌流を実施した。簡単に述べると、マウスをイソフルオラン(isofluorane)で麻酔し
 、固定した。灌流を、7~10分間、肝臓灌流培地(liver perfusion medium)(Thermo Fische
 r Scientific, 17701038)を用いて開始し、次いで、さらに7~10分間、肝臓消化培地(liv
 er digestion medium)(Thermo Fisher Scientific, 17703034)に切り替えた。10mLの肝臓

10

20

30

40

50

消化培地を含有するプレートに肝臓を収集し、切断して肝細胞を解離した。次いで、解離した肝細胞を収集し、肝細胞洗浄培地(hepatocyte wash medium)(Thermo Fisher Scientific, 17704024)で2回、1×PBSで1回洗浄した。濾過および低速(50×g)遠心分離でさらに単離した後に、肝細胞をFACS Aria II SORP machine(BD Biosciences)で分析した。

【0243】

脾臓細胞タイプの単離および染色のために、取り出した脾臓を滅菌ブレードで細かく切り刻み、250 μLの1×消化培地(45ユニット/μLコラゲナーゼI、25ユニット/μL DNアーゼI、および30ユニット/μLヒアルロニダーゼ)に入れてホモジナイズした。5~10mLの1×消化培地が入っている15mLチューブに脾臓溶液を移した。次に、脾臓溶液を70 μmフィルターを用いて濾過し、1×PBSで1回洗浄した。300×gの速度で5分間遠心分離することによって細胞ペレットを得た。上清を除去し、細胞ペレットを2mLの1×RBC溶解緩衝液(lysis buffer)(BioLegend, 420301)に再懸濁し、氷上で5分間インキュベートした。インキュベーション後に、RBC溶解を止めるために4mLの細胞染色緩衝液(cell staining buffer)(BioLegend)を添加した。溶液を300×gで5分間遠心分離して細胞ペレットを得た。シングル細胞を細胞染色緩衝液に再懸濁し、抗体(100 μLの総体積)が入っているフローチューブ(flow tube)に添加した。細胞を抗体と4℃、暗所で20分間インキュベートした。染色された細胞を1mLの1×PBSで2回洗浄し、次いで、フローサイトメトリー分析のために500 μLの1×PBSに再懸濁した。使用した抗体は、Pacific Blue抗マウスCD45(BioLegend, 103126)、Alexa Fluor 488抗マウス/ヒトCD11b(BioLegend, 101217)、Alexa Fluor 647抗マウスCD19(BioLegend, 115522)、およびPerCP-Cyanine5.5抗マウスCD3e(145-2C11)(Tonbo Biosciences, 65-0031)であった。Ghost Dye Red 780(Tonbo Biosciences, 13-0865-T500)を用いて生細胞を識別した。

【0244】

肺細胞タイプの単離および染色のために、単離した肺を滅菌ブレードで細かく切り刻み、次いで、10mLの2×消化培地(90ユニット/μLコラゲナーゼI、50ユニット/μL DNアーゼI、および60ユニット/μLヒアルロニダーゼ)が入っている15mLチューブに移し、震盪しながら37℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後に、残っている肺組織をホモジナイズした。以下の工程は、上記の脾臓プロトコールと似ていた。ここで使用した抗体は、Pacific Blue抗マウスCD45(BioLegend, 103126)、Alexa Fluor 488抗マウスCD31(BioLegend, 102414)、およびAlexa Fluor 647抗マウスCD326(Ep-CAM)(BioLegend, 118212)であった。Ghost Dye Red 780 (Tonbo Biosciences, 13-0865-T500)を用いて生細胞を識別した。

【0245】

XI.Td-Tomatoマウスモデルにおける遺伝子編集(Cas9 mRNA/sgRNAおよびCas9/sgRNA RNP)

インビボ遺伝子編集を評価するために、同等の体重と同じ性別のTd-Tomマウスを選択した。Cas9 mRNAとsgRNAをtdTomato(td-Tom)マウスに同時送達した。Cas9 mRNA/sgTom1(4/1、wt/wt)を2.5mg/kgに等しい全RNA用量で様々な製剤によって同時送達した。IV注射して10日後に主要臓器を取り出し、IVIS Lumina systemによって画像化した。脾臓標的化製剤の場合、全RNA用量は4mg/kgであり、Cas9 mRNAとsgTom1の重量比は2/1であり、検出時間は2日であった。RNP送達のために、Cas9タンパク質とsgRNAのモル比は1:3に固定され、注射用量は1.5mg/kg RNAであり、検出時間は注射後7日目であった(n=2~4匹/群)。Td-Tom発現を確認するために、組織切片をさらに調製し、共焦点顕微鏡観察で画像化した。簡単に述べると、組織ブロックをoptimal cutting temperatureコンパウンド(OCT)(Sakura Finetek)に包埋し、クリオスタット機器(Leica Biosystems)で凍結切片を作製した(8 μm)。マウントした組織スライスを4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI, Vector Laboratories)で染色した後に、Zeiss LSM 700で共焦点顕微鏡によって画像化した。

【0246】

XII.C57BL/6マウスにおける遺伝子編集(Cas9 mRNA/sgPTENおよびCas9/sgRNA RNP)

インビボで内因性遺伝子編集を調べるためにPTENを選択した。野生型C57BL/6マウスにCas9 mRNAと修飾sgPTEN(4/1、mRNA/sgRNA、wt/wt)を2.5mg/kgの全用量で同時送達すること

によって様々な担体をIV注射した(n=2~4匹/群)。10日後に組織を収集し、ゲノムDNAを、PureLink Genomic DNA Mini Kit(ThermoFisher)を用いて抽出した。脾臓標的化製剤の場合、全RNA用量は4mg/kgであり、Cas9 mRNA/sgTom1は2/1(wt/wt)であり、検出時間は注射の2日後であった。RNP送達のために、Cas9タンパク質とsgRNAのモル比は1:3に固定され、注射用量は1.5mg/kg RNAであり、検出時間は注射後7日目であった(n=2~4匹/群)。PTEN PCR産物を入手した後、標準プロトコールによって遺伝子編集効力を確認するためにT7E1アッセイ(NEB)を行った。さらに、H&E染色と免疫組織化学(IHC)によって組織切片上でPTEN編集の評価を行った。簡単に述べると、UTSWにあるMolecular Pathology Coreがパラホルムアルデヒド(PFA)固定組織をパラフィンに包埋し、切片作製し、H&E染色した。4μm切片作製を標準的な方法で行い、IHCのためにElite ABC KitとDAB Substrate(Vector Laboratories)を用いて検出した。

10

【0247】

実施例9：中性緩衝液を用いた製剤

Cas9 RNPは酸性緩衝液中では変性し、それによって水力学的サイズが10nmから150nmに増加することが観察された(図40B)。このため、単分散ナノ粒子中へのRNPカプセル化は不可能ではないにしても困難である。これらの研究は脂質ナノ粒子(LNP)に焦点を合わせている。なぜなら、それらは前臨床モデルおよびヒト(Wood, 2018)において最も有効なクラス RNA送達担体だからである(Wang et al., 2017; Doudna & Charpentier, 2014; Hajj & Whitehead, 2017; Sander & Joung, 2014)。4つのLNP成分[カチオン性イオン化可能脂質、双性イオン性リン脂質、コレステロール、およびポリ(エチレングリコール)(PEG)脂質]のうち、pK_aが約6.4のカチオン性イオン化可能脂質は、混合のpH(例えば、pH4。この時、アミンはプロトン化している)では負に荷電したRNAに結合し、中性pHでは電荷を失って細胞に取り込まれ、次いで、エンドソーム膜と融合し、細胞質にカーゴを放出するためにエンドソーム内pHが低下した時に電荷を再び得るので活性に有用である。しかしながら、この特徴は中性pHでのカーゴの効果的なカプセル化を妨げる。なぜなら、カチオン性イオン化可能脂質は、中性pHでは無電荷だからである。この難題を克服するために、5番目の成分、具体的には、中性pHで正に荷電しているカチオン性脂質を加えると、(酸性緩衝液の代わりに)中性緩衝液を用いてRNAとタンパク質をカプセル化することが可能になり、従って、RNPの三次構造と安定性が保存される(図40A)。

20

【0248】

この戦略を評価するために、カチオン性イオン化可能脂質として5A2-SC8を選択した。なぜなら、5A2-SC8 LNPは、短いsiRNA/miRNAと長いmRNAを、MYCによって推進される肝臓癌(Zhou et al., 2016; Zhang et al., 2018a; Zhang et al., 2018b)またはフマリルアセト酢酸加水分解酵素(FAH)の遺伝子ノックアウト(Cheng et al., 2018)を含む肝機能が損なわれたマウスに安全に送達するからである。実際に、永久カチオン性脂質(例えば、DOTAP)を従来の4成分5A2-SC8 LNP製剤に導入すると、脂質のエタノール溶液をRNPのPBS溶液(1/3、v/v)と混合することによって、制御された自己集合が発生した。全脂質に対して5~60モル%のDOTAPの組み込みを評価した(図41)。これから、10~20%ではインビトロで高レベルの遺伝子編集と、サイズが<200nmの安定したRNP装填ナノ粒子の形成が明らかになった(図42)。最初に、レポーターシフエラーゼ標的化sgRNA (sgLuc)を用いて、PBS緩衝液を用いて調製した、10モル%のDOTAP取り込みがあるLNP(5A2-DOT-10:5A2-SC8/DOPE/cho1/DMG-PEG/DOTAP=15/15/30/3/7(mol/mol))のサイズを観察した。これは、RNP装填がないナノ粒子よりもわずかに大きかった。低PH緩衝液を用いて調製した同一のLNPはサイズを変えなかった。このことは、RNPはカプセル化されなかったことを意味している(図40C)。Cas9タンパク質とsgRNAの最適なモル比を求めるために、1/1、1/3、および1/5(mol/mol)のCas9/sgRNA複合体を調製した。これによりRNPのサイズは減少し(図40D)、負電荷が増加した(図40F)。このRNP比によって、カプセル化後の結果として生じたLNPのサイズもゼータ電位も変化しなかった(図1E、1G)。全LNPの表面電荷は中性であった。このことはカプセル化が成功しただけでなく、免疫単核食細胞系(MPS)系によるインビボ取り込みの最小化に有用でもあることを示している。5A2-DOT-10が核へのRNPの送達を首尾良く媒介で

30

40

50

きるかどうかさらに調べるために、カプセル化された蛍光EGFP融合Cas9タンパク質があるLNPを追跡した。遊離RNPだけがバックグラウンドを上回る緑色蛍光が検出できなかったで細胞に侵入することができなかった(図43)。5A2-DOT-10で3時間処理した後に、明るい緑色の蛍光が細胞の細胞質に観察された。次いで、Cas9には核局在化シグナルが存在するために、EGFP融合Cas9タンパク質は6時間以内に徐々に核に侵入することが観察された(図40H)。エンドサイトーシスはエネルギー依存的であり、脂質ラフトに基づくエンドサイトーシスの阻害剤であるM β CDで処理を行うとナノ粒子の細胞取り込みが有意に阻害されたので、主に脂質ラフトに依存する(図40I)。

【0249】

遺伝子編集効力を定量するために、HeLa-LucおよびHeLa-GFPレポーター細胞を使用した。様々なCas9/sgLuc比を調べた時に、1/3および1/5で遺伝子編集が高かった(図44A)。T7エンドヌクレアーゼI(T7EI)アッセイの結果から、ほとんどの標的DNAバンド(720bp)が2つの切断バンド(536bpおよび184bp)に切断されることが証明された。対照処理群では切断バンドは観察されなかった。Cas9を保護したままでRNPを封入するためには中性pH緩衝液が必要であるという仮説を試験するために、pH4クエン酸緩衝液を用いて調製した5A2-DOT-10の遺伝子編集効率も評価した。切断バンドは全く観察されなかった(図44A)。さらに、否定的な結果がサンガー配列決定によって確認された。このことから、従来の酸に基づく処方方法では有効なNPは生じないという追加の証拠が得られた。GFP発現細胞に切り替えた時に、5A2-DOT-10カプセル化 Cas9/sgGFPはGFP DNAに対してインデルを誘導し、ほぼ全てのGFP発現をロックアウトした。対照群はPBS処理細胞と同様の蛍光強度を示した(図44B)。これはフローサイトメトリーによって確認された(図44Cおよび45)。恒久的な遺伝子編集は、成長中の細胞における、はっきりしないGFP消失によって明らかであり、サンガー配列決定によって確認された。Inference of CRISPR Edits(ICE)分析から、インデルは95%に達したことが分かった(図44D)。クリニカルトランスレーションに目を向けて、RNPを装填した5A2-DOT-10の安定性を4°Cで2ヶ月間モニタリングした。LNPはサイズを変えず、均一なままであった(PDI<0.2)(図44G)。5A2-DOT-10ナノ粒子を継続的に試験すると、60日間保管した後でも遺伝子編集活性は一定であることが明らかになった(図44H)。

【0250】

RNPを効率的に送達するために、古典的な4成分LNPに永久カチオン性脂質を添加する戦略は、デンドリマーベースのイオン化可能脂質である5A2-SC8に限定されない。これを証明するために、他のクラスのイオン化可能な材料:FDAにより認可されたOnpattroに用いられている周知のDLin-MC3-DMA脂質(Wood, 2018)とC12-200リピドイドを用いて調製したナノ製剤に補助的なDOTAPを含めた(図46A~B)。これらは5A2-SC8と比較してかなり異なる化学構造をもつが(図46C)、全てのDOTAP修飾ナノ粒子が細胞を効率的に編集できたのに対して、DOTAPを含まない以前に確立されたC12-200またはMC3製剤は低い編集効率を示した(図44E)。5A2-DOT-10はまた正の対照RNAiMAXよりも高い編集効率を成し遂げた。5A2-DOT-10 LNPはMC3-DOT-10およびC12-200-DOT-10よりも有効であったので、後の全ての実験を5A2-SC8を用いて行った。DOTAPに加えて、DDABおよびEPCを含む他のカチオン性脂質もLNP製剤に導入した(図46E~G)。これらの結果は、異なる化学構造をもつ3つ全てのカチオン性脂質について似ている(図46H)。これらの結果から、この戦略は、カチオン性イオン化可能脂質ナノ粒子(DLNP、LLNP、SNALP)およびpH7.4で正に荷電している他のカチオン性脂質にとって普遍的なことが分かる。この方法論は、RNPを送達できるように、FDAにより認可されたOnpattro製剤を調製することを可能にするので、このアプローチは、クリニカルトランスレーションが可能なヒト疾患治療に様々な方向性を持たせる。

【0251】

RNP送達が成功する鍵は、タンパク質安定性を維持するために、標準的な酸性緩衝液をPBS緩衝液と交換することである。この方法論が他の中性緩衝液と適合するかどうか試験するために、PBS、Opti-MEM培地、およびHEPES中のLNPを処方した。クエン酸緩衝液(pH4)で調製した製剤を対照として使用した(図46I)。3つ全ての中性緩衝液条件で調製したLNPを用いて、有意かつ等価な遺伝子編集(>90%)が成し遂げられたが、酸性緩衝液では成し遂

げられなかった(図44F)。配列決定結果のICE分析は、フローサイトメトリーによって示されたものと一致した(図46K)。

【0252】

インビボ遺伝子編集を調べるために、5A2-DOT-10カプセル化Cas9/sgTOM複合体をTd-Tomatoマウスモデル(図47A)に送達した。これらのマウスの首尾良く編集された細胞では、CRISPRを介したLox-Stop-Loxカセット欠失が下流tdTom発現をオンにする。Cas9/sgTOM RNPを装填した5A2-DOT-10 LNPを1mg/kg sgTOMの用量でマウスの左肢に筋肉内注射によって注射した。直接注射遺伝子編集のために以前に用いられたという理由から(Zuris et al., 2015)、Cas9/sgTOM RNPと複合体を形成したRNAiMAXを比較に使用した。5A2-DOT-10で処置した筋肉では、RNAiMAXで処置したマウスよりも強いTd-Tom蛍光が観察された(図47B)。組織切片の画像化によって、5A2-DOT-10処置群では、明るい赤色の蛍光を生じた遺伝子編集がさらに確認された(図47C)。5A2-DOT-10をTd-Tomマウスの脳に注射した(0.15mg/kgのsgTOM)。これも、明るい赤色のシグナルが注射部位の近くに観察され、マウス脳の編集が確認された(図47D~E)。

【0253】

5A2-DOT-10の改善した安定性と効力は、評価した組織において、首尾良い系統的な遺伝子編集を媒介することができた。このRNP送達戦略を調べるために、様々なDOTAPモル百分率(5~60%)をもつLNPを調製し、RNPをTd-TomマウスIV(1.5mg/kgのsgTOM)に送達した。5A2-DOT-5を注射して7日後にTd-Tom蛍光がもっぱら肝臓で観察された。組み込まれたDOTAPパーセントが5から60%に増加すると、蛍光(CRISPRガイド遺伝子編集)は徐々に肝臓から肺に生じた。5A2-DOT-60は主に肺での編集を可能にした(図47F)。これらの結果から、内部脂質成分化学とモル比を調節することによって、深部組織を組織特異的に編集できることが分かる。組織特異的な編集は組織切片の共焦点画像化によってさらに確認された(図47G)。次いで、LNPカプセル化Cas9/sgPTEN RNPを野生型C57BL/6マウスに全身注射することによって、内因性標的であるPtenの編集を評価した。明瞭なT7EI切断バンドは5A2-DOT-5処置マウスの肝臓と5A2-DOT-50処置マウスおよび5A2-DOT-60処置マウスの肺でしか検出されなかった(図47H)。

【0254】

インビボで複数の遺伝子を同時に編集できるかどうか評価するために、Cas9タンパク質と6つの異なるsgRNAを5A2-DOT-50の中に入れた。sgTOM、sgP53、sgPTEN、sgEml4、sgALK、およびsgRB1をCas9タンパク質に装填し、カプセル化した。次いで、5A2-DOT-50(プール)を尾静脈注射(0.33mg/kgの各sgRNA)することによってTd-Tomマウスを処置した。1週間後に明るいTd-Tom蛍光が肺で検出された。このことから、TOMが遺伝子編集されたことが分かる(図47I)。明瞭なT7EI切断バンドが他の全ての5つのゲノム遺伝子座において観察された。このことから、5A2-DOT-50は低用量で複数の遺伝子を同時かつ効果的に編集できることが証明された(図47J)。定量分析から、標的の編集効率は肺において22%まであったことが明らかになった(図47および48)。sgRNA安定性と再現性を強化するために、最初と最後の3つのヌクレオチドの末端修飾があるsgRNAを本明細書において使用した(図49)(Finn et al., 2018; Hendel et al., 2015)。報告から、さらなるヌクレオチドに正確に修飾を加えると、末端修飾された(end-modified)sgRNAと比較してインビボ遺伝子編集を2~4倍増やすことができると示されている(Finn et al., 2018; Yin et al., 2017)。このことから、sgRNAをさらに最適化して、本明細書において報告された編集効率を高くできる可能性があることが示唆される。それにもかかわらず、5A2-DOT-50の高い効能と組織特異性によって、1回の注射で肺において6つの標的を同時編集することができた。

【0255】

動物モデルは従来では胚性幹細胞での遺伝子組換え(transgenesis)または遺伝子工学によって作製され、これには時間と費用がかかる。CRISPR/Casを用いた成獣マウスにおける腫瘍関連遺伝子と他の疾患関連遺伝子の直接変異は迅速なモデル作製のための実現可能なアプローチである。これは、標的ごとに、かつ肝臓へのハイドロダイナミックインジェクションによって操作しなければならない費用のかかるレンチウイルスを用いた時にだけ成

し遂げられる(Xue et al., 2014; Maddalo et al., 2014)。典型的には、機能的な癌モデルを作製するためには複数の遺伝子の変異が必要であるので、多重化(multiplexing)のための安価かつ効果的な非ウイルスのナノ粒子に基づくアプローチの開発が大いに望まれている。5A2-DOT-X LNPは強力であり、複数の標的を同時に編集することができ、繰り返し投与することができ、組織特異性を与えるので、多種多様な動物モデルを作製する道を開く。

【0256】

5A2-DOT-5を用いて、選択的に肝臓において3つの腫瘍抑制遺伝子(P53、PTEN、およびRB1)を同時にノックアウトした。これらの遺伝子は、肝臓を含む多くのヒト癌において特定されている。C57BL/6マウスを、2.5mg/kg全sgRNAの毎週IV注射によって3週間処置し、マウス肝臓における遺伝子編集効率を検出した(図48A)。2、12、15、および20週間処理した後に、3つ全ての遺伝子遺伝子座で明瞭な切断バンドがT7EIアッセイによって観察された(図48B、50、および51)。時間が進行するにつれて、これらの切断バンドはかなり明るくなった。このことは腫瘍が成長したことを示している。15週間および20週間でマウスを屠殺した時に、目に見える腫瘍が肝臓に見出され、それと一緒に、いくつかの転移性腫瘍が腹腔にあった(図48Cおよび52)。H&E染色と、腫瘍増殖バイオマーカーKi67を標的とするIHC染色による腫瘍発生(図48Dおよび53)も様々な時点で検出された。

【0257】

難しい肺癌マウスモデルを作製するために、多くの固体ヒト腫瘍、特に、非小細胞肺癌において発見される複合変異であるEml4-Alk染色体再編成に焦点を合わせた(Maddalo et al., 2014; Blasco et al., 2014)。Eml4とAlkとの間の再編成後に生じるEml4-Alk融合タンパク質は癌の発達を促進する。5A2-DOT-50の高い効能と肺標的化特異性を利用して、1回(2mg/kgの全sgRNAの用量)または2回(毎週、1.5mg/kgの全sgRNAの用量)のIV用量を注射し、腫瘍発生プロセスを評価した(図48E)。調べられた全ての時点で、両群のマウスから抽出された肺DNAからインデル発生が検出可能であった(図48Fおよび54)。5A2-DOT-50処置マウスの肺において明瞭な遺伝子再編成バンドが検出された。このことから、染色体再編成が首尾良く発生したことが確認された(図48Fおよび54)。時間が進行するにつれて、Eml4-Alk再編成バンドはかなり明るくなった。このことから、編集された細胞が増殖したことが示唆される。これらのPCRアンプリコンをサブクローニングした後の配列決定結果から、Eml4-Alk再編成がさらに確認された(図48Gおよび54)。16週間後および24週間後にH&E染色とKi67染色から肺において、いくつかの腫瘍病変部が観察された(図48H、55、および56)。これらの結果から、5A2-DOT-50 LNPを1回注射すると染色体再編成が首尾良く発生し、成獣マウスに肺腫瘍が発生する可能性があることが分かる。従って、これらのLNPは様々な疾患モデルのインサイチュー作製を加速する立場にある。

【0258】

B. 材料および方法

I. 材料

5A2-SC8(Zhou et al., 2016)、DLin-MC3-DMA(Jayaraman et al., 2012)、およびC12-200(Love et al., 2010)を以下の公表されたプロトコールによって合成および精製した。1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDAB)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EPC)、および1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)はAvanti Polar Lipidsから購入した。コレステロールはSigma-Aldrichから購入した。1,2-ジミリストイル-sn-グリセロール-メトキシ(ポリ((エチレングリコール)MW2000)(DMG-PEG2000)はNOF America Corporationから購入した。ONE-Glo + Tox Luciferase ReporterアッセイキットはPromega Corporationから購入した。Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kits(WMCO, 3.5kDa)はSigma-Aldrichから購入した。4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸(DAPI)、Hoechst 33342、DLS Ultramicroキュベット、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent、およびLab-Tek chambered cover glass unitsはThermo Fisher Scientificから購入した。Cas9タンパク質およびKi-67モ

ノクローナル抗体はThermofisherから購入した。GenCrispr NLS Cas9-EGFPヌクレアーゼはGenScriptから購入した。修飾されたsgRNAはSynthegoから購入した。

【0259】

II. Cas9/sgRNA複合体の調製

書き留められた緩衝液中のCas9タンパク質とsgRNAの別々の溶液を同じ体積と一緒に混合した。混合した後に、Cas9/sgRNA複合体が完全に自己集合するように室温で5分間インキュベートしてRNPを形成させた。使用したCas9タンパク質とsgRNAのモル比は1/1、1/3、および1/5であった。

【0260】

III. 最適化されたナノ粒子製剤および特徴付け

カチオン性イオン化可能脂質(5A2-SC8、C12-200、またはDLin-MC3-DMA)(Zhou et al., 2016; Jayaraman et al., 2012; Love et al., 2010)、双性イオン性脂質(DOPEまたはDSPC)、コレステロール、DMG-PEG、および永久カチオン性脂質(DOTAP、DDAB、またはEPC)を所定のモル比でエタノールに溶解した。Cas9/sgRNA複合体を1×PBS緩衝液に溶解した。PBS緩衝液中のCas9/sgRNA RNP複合体溶液を、エタノール中の脂質溶液と、全脂質とsgRNAの重量比が40:1(wt)になるように3:1の体積比(Cas9/sgRNA RNP:脂質、v/v)でピペットで素早く混合し、次いで、室温で15分間インキュベートした。その後で、新鮮な製剤を直接、特徴付け、インビトロアッセイに使用した。動物実験のために、局部注射(筋肉内注射もしくは脳内注射)または全身注射(静脈内注射)の前に、エタノールを除去するために製剤を1×PBSに対して1時間透析した(Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kits, WMC0 3.5kDa)。ナノ製剤のサイズ分布とゼータ電位を、動的光散乱(DLS, Malvern; He-Neレーザー、 $\lambda=632\text{nm}$; 検出角度=173°)を用いて測定した。

10

20

【0261】

IV. RNAiMAX製剤

RNAiMAXと複合体を形成したRNPを調製するために、Cas9/sgRNA複合体をOpti-MEMに溶解して調製し、Opti-MEMで希釈したリポフェクタミンRNAiMAXトランスフェクション試薬(1 μg のsgRNAにつき1 μL のRNAiMAXの用量)と穏やかに混合した。混合溶液を室温で30分間インキュベートして複合体形成を完了した。

【0262】

V. 標準的なLNP製剤

C12-200およびMC3 LNPカプセル化RNPを調製するために、クエン酸緩衝液(pH4.0)中のCas9/sgRNA RNP複合体溶液を、エタノール中の脂質溶液と、全脂質とsgRNAの重量比が40:1(wt/wt)になるように3:1の体積比(Cas9/sgRNA RNP:全脂質、v/v)でピペットで素早く混合し、次いで、室温で15分間インキュベートした。C12-200 LNPの場合、C12-200/DOPE/Chol/DMG-PEGのモル比は35/16/46.5/2.5であった。MC3 LNPの場合、DLin-MC3-DMA/DSPC/Chol/DMG-PEGのモル比は50/10/38.5/1.5であった。

30

【0263】

VI. 5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc処理の細胞取り込みと取り込み機構

細胞取り込みを調べるために、HeLa-Luc細胞をLab-Tek Chambered Coverglass(8ウェル)に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種し、37°Cで一晩インキュベートした。次いで、古い培地を、10%FBSを含有する新鮮なDMEM 150 μL と交換し、50 μL の5A2-DOT-10カプセル化Cas9-EGFP/sgLuc RNP(9nMのsgRNA/ウェル)で処理した。処理して1時間後、3時間後、6時間後、24時間後に細胞をPBSで3回洗浄し、Hoechst(0.1mg/mL)で37°Cで15分間染色し、次いで、共焦点顕微鏡観察で画像化した(Zeiss LSM 700)。

40

【0264】

取り込み機構を調べるために、HeLa-Luc細胞を用いて、エンドサイトーシス経路に対する特異的障害のアッセイを評価した。5A2-DOT10のみの処理を対照として使用した。HeLa-Luc細胞を12ウェルプレートに 5×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し、DMEM完全培地に入れて24時間インキュベートした。次いで、細胞をPBSで洗浄し、その後に、Opti-MEMに溶解した以下のエンドサイトーシス障害剤:20 μM クロロプロマジン(CMZ、クラスリンを介したエ

50

ンドサイトーシスの阻害剤)、2mMアミロライド(AMI、マクロピノサイトーシス阻害剤)、200 μ Mゲニステイン(GEN、カベオラを介したエンドサイトーシスの阻害剤)、5mM β -シクロデキストリン(M β CD、脂質ラフトを介したエンドサイトーシスの阻害剤)の1つと37°Cで1時間プレインキュベートした。次に、培地を除去し、5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc(24nM sgLuc)を含有する完全DMEM培地とさらに30分間交換した。その後、培地を除去し、細胞をPBSで3回洗浄した。次いで、細胞を収集し、フローサイトメトリーで分析した。全ての実験を3回繰り返して行った。ここでは、Cas9-EGFPタンパク質を用いてCas9/sgLuc複合体を処方した。これがエネルギー依存的エンドサイトーシスであるかどうか評価するために、細胞を4°Cで1時間でもプレインキュベートし、次いで、24nMの5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc(24nM sgLuc)を含有する完全DMEM培地でさらに30分間処理した後にフローサイトメトリーで分析した。

10

【0265】

VII. ゲノム編集を検出するためのT7EIアッセイ

インビトロゲノムDNA編集分析のために、HeLa-Luc細胞を12ウェルプレートに 1.5×10^5 細胞/ウェルの細胞密度で播種し、一晩インキュベートした。次いで、24nMのsgRNAを含有する異なるナノ製剤を細胞に添加した。3日後に、細胞を収集し、洗浄し、2 μ LのプロテイナーゼK(ThermoFisher)と一緒に50 μ Lの1 $\times$ passive lysis buffer(Promega)に再懸濁した。その後で、細胞溶解産物を得るために溶解PCRプログラム(65°C15分間、95°C10分間)を実行した。次いで、標的となったゲノム遺伝子座を、以下のPCR増幅プログラム(95°C5分間;(95°C30秒間;60~64°C30秒間;72°C1分間)の40サイクル;72°C7分間、次いで、4°Cに保つ)を用いて増幅した。細胞溶解産物をDNAテンプレートとして使用した。次いで、アンプリコンを、PCR purification kits(Qiagen)を用いて精製し、200ngの精製DNAを、19 μ Lの1 $\times$ NEBuffer2含有アニーリング反応物に添加した。次いで、PCR産物を、サーモサイクラー(thermocycler)に入れて、以下の条件(95°C5分間、次いで、混合物を-2°C/秒のランプレート(Ramp Rate)で95°C~85°Cまで、-0.1°C/秒のランプレートで85°C~25°Cまで冷却し、次いで、4°Cに保つ)を用いてアニールして、ヘテロ二本鎖(heteroduplex)DNAを形成した。その後で、1 μ LのT7EI(NEB)を添加し、37°Cで15分間インキュベートした。次いで、1.5uLの0.25M EDTAを添加することによって切断反応を止めた。次に、次に、消化されたDNAを、2.5%アガロースゲル電気泳動を用いて分析した。T7EIアッセイに使用した全てのプライマーを表5に列挙した。

20

【0266】

(表5) sgRNA配列

名称	標的配列 (5'→3')	PAM (5'→3')
sgLUC	CTTCGAAATGTCCGTTTCGGT (SEQ ID NO: 18)	TGG
sgGFP	GAAGTTCGAGGGCGACACCC (SEQ ID NO: 19)	TGG
sgTOM	AAGTAAAACCTCTACAAATG (SEQ ID NO: 20)	TGG
sgPTEN	AGATCGTTAGCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 21)	AGG
sgP53	GTGTAATAGCTCCTGCATGG (SEQ ID NO: 22)	GGG
sgRB1	TCTTACCAGGATTCCATCCA (SEQ ID NO: 23)	CGG
sgEml4	CCTGCCCTGAGTAAGCGACA (SEQ ID NO: 24)	CGG
sgAlk	TCCTGGCATGTCTATCTGTA (SEQ ID NO: 25)	AGG

30

40

【0267】

50

インビボゲノムDNA編集分析のために、ゲノムDNAを、PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)を用いて、製造業者の説明書に従って組織から抽出した。その後に、T7EI検出について上記で述べられたように上記の手順に従った。

【0268】

断片化したPCR産物を分析し、インデルパーセントを、以下の式：

$$\% \text{ 遺伝子修飾} = 100 \times (1 - (1 - \text{切断された割合 (fraction cleaved)})^{1/2})$$

に基づいて計算した。式中、切断された画分は、切断産物と親ピークの和で割った切断産物ピークの和である⁵。

【0269】

VIII. ゲノム編集を検出するためのサンガー配列決定

T7EIアッセイの精製PCRアンプリコンと、そのフォワードプライマーは、UTサウスウェスタンメディカルセンターにあるMcDermott Center Sequencingコアファシリティ (core facility) が配列決定した。最終的に、配列決定データは、Synthegoによって提供されるウェブツールであるオンライン解析ソフトウェアICE Analysisを用いて解析した。

【0270】

IX. HeLa-GFP細胞におけるインビトロ遺伝子編集

HeLa-GFPレポーター細胞を、10% FBSおよび1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するDMEM中で37°C/5% CO₂で培養した。実験のために、HeLa-GFP細胞を12ウェルプレートに1.5×10⁵細胞/ウェルの細胞密度で播種し、一晚インキュベートした。次いで、培地を0.5mLの新鮮な完全DMEMと交換し、100uLのナノ粒子分散液を添加した (sgRNAの最終濃度を24nMに固定した)。処理して3日後に細胞を蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて分析した。フローサイトメトリー分析のために、細胞を収集し、PBSで洗浄し、PBSに再懸濁し、BD Analyzers LSRFortessa SORP (BD Biosciences) を用いて分析した。

【0271】

X. 5A2-DOT-10 Cas9/sgGFPの安定性

安定性を測定するために、5A2-DOT-10 LNPカプセル化Cas9/sgGFP RNP複合体を調製し、4°Cで2ヶ月保管した。様々な期間にわたって保管した後に、これらのナノ粒子のサイズとPDIを試験し、ナノ粒子 (24nM sgRNA用量) を添加し、3日後に遺伝子編集を定量することによってHeLa-GFP細胞における遺伝子編集効率も評価した。各時点で、保管した5A2-DOT-10 LNPカプセル化Cas9/sgGFP RNPのアリコートを採取し、分析した (サイズ、PDI、効力)。

【0272】

XI. 動物実験

全動物実験がテキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターの動物実験委員会によって承認され、該当する場合には地方、州、および連邦政府の規制と一致している。C57BL/6マウスはUTSW Mouse Breeding Core Facilityから入手した。B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor^{tm9} (CAG-tdTomato) Hze/Jマウス (Ai9またはAi9 (RCL-tdT) マウスとも知られる) はJackson Laboratory (007909) から入手し、CAGプロモーターによって駆動される赤色蛍光tdTomatoタンパク質の転写を阻止するloxP隣接STOPカセットを有するCreレポーター対立遺伝子のホモ接合性発現を維持するように交配した。Cas9/sgRNA RNPを介した遺伝子編集後に、Ai9マウスはtdTomato蛍光を発現する。Ai9マウスはC57BL/6J遺伝的背景でコンジェニックである。

【0273】

XII. インビボ遺伝子編集

筋肉において遺伝子編集するために、Td-Tomatoマウスに5A2-DOT-10 LNPカプセル化Cas9/sgTOM RNP複合体を1mg/kg sgTOMの用量で筋肉内注射によって左肢に注射した。RNAiMAXカプセル化Cas9/sgTOM RNP複合体を正の対照として使用した。7日間処置した後に、全処置群の筋肉組織を収集し、IVIS Lumina system (Perkin Elmer) を用いて画像化した。その後で、筋肉組織をoptimal cutting temperature (OCT) コンパウンドに包埋し、10 μm切片に切断した。切片を4% パラホルムアルデヒド (Thermo Fisher Scientific) で20分間固定し、PBS緩衝液を用いて3回洗浄した。その後で、DAPI (Thermo Fisher Scientific) を含む

1滴のProLong Gold Mountantを各スライドに適用した。カバーガラスを置き、スライドを共焦点顕微鏡観察で画像化した(Zeiss LSM 700)。脳において遺伝子編集するために、Td-tomatoマウスに5A2-DOT-10 LNPカプセル化Cas9/sgTOM RNP複合体を0.15mg/kg sgTOMの用量で脳内注射によって注射した。6日間処置した後に、脳を切除し、IVIS Lumina systemを用いて画像化した。上述したプロトコールのように脳の凍結切片を調製し、共焦点顕微鏡観察で画像化した。

【0274】

i.v.注射によって遺伝子編集するために、尾静脈注射によって、1.5mg/kg sgTOMの用量で、異なるパーセントのDOTAPを含有する5A2-DOT-X LNPを用いてTd-Tomatoマウスを処置した。7日間処置した後に、全臓器を収集し、IVIS Lumina systemを用いて画像化した。上述したプロトコールのように、これらの組織の凍結切片を調製し、共焦点顕微鏡観察で画像化した。

【0275】

XIII.Em14-Alk再編成に対するPCR

インビボEm14-Alk再編成をネステッドPCR(Blasco et al., 2014)によって試験した。1回目PCRのために、テンプレートとして40ngのゲノムDNAと、95℃5分;(95℃30秒;64℃30秒;72℃30秒)の18サイクル;72℃7分のPCRプログラムを使用し、次いで、4℃に保った。2回目PCRのために、1μlの1回目PCR産物(100希釈)をPCR反応(95℃5分;(95℃30秒;68℃30秒;72℃30秒)の30サイクル;72℃7分)に使用し、次いで、4℃に保った。PCR反応に使用したプライマーを表6に列挙した。

【0276】

(表6)プライマーのリスト

名称	フォワードプライマー (5' → 3')	リバースプライマー (5' → 3')
LUC	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAA GAAAGGCCCGGCGCCATTC (SEQ ID NO: 26)	AACACTTAAAATCGCAGTATCCGGA ATG (SEQ ID NO: 27)
GFP	GTGGTGCCCATCTGGTCGAG (SEQ ID NO: 28)	CGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGC (SEQ ID NO: 29)
PTEN	ATCCGTCTTCTCCCCATTCGG (SEQ ID NO: 30)	GACGAGCTCGCTAATCCAGTG (SEQ ID NO: 31)
P53	ATAGAGACGCTGAGTCCGGTTC (SEQ ID NO: 32)	CCTAAGCCCAAGAGGAAACAGA (SEQ ID NO: 33)
RB1	CTGTGCTGGTGTGTGCAAACTATA (SEQ ID NO: 34)	CTGTCACAGTGAAACTCGTTACTTTG TATATC (SEQ ID NO: 35)
Em14	ACAAGGCTCTGGCTTCCATTG (SEQ ID NO: 36)	GATCAAAGCAAGGCCTTGTGCAT (SEQ ID NO: 37)
Alk	TCTGAGCCCCTTCCATCTGACC (SEQ ID NO: 38)	AGCTCAGCAGAAGCTCAGCAG (SEQ ID NO: 39)
Em14-Alk 逆位 (1回目)	CCCAGTCATCAGTTGCTATGCAAT T (SEQ ID NO: 40)	GGGTTTCCTTTGGTTCACAGATCCA (SEQ ID NO: 41)
Em14-Alk 逆位 (2回目)	CGTTTTTCCACAAGAGCTAAGGCT (SEQ ID NO: 42)	GTGGTTTGGTCACATCTCAGGTG (SEQ ID NO: 43)

【0277】

XIV.H&E染色および免疫組織化学(IHC)

簡単に述べると、UTSWにあるMolecular Pathology Coreが10%ホルマリン溶液固定組織をパラフィンに包埋し、切片作製し、H&E染色した。4μm切片作製を標準的な方法で行い、IHCのためにElite ABC KitおよびDAB Substrate(Vector Laboratories)を用いて検出した。

【0278】

XV. 統計解析

統計解析は、GraphPad Prismソフトウェア，バージョン7.04(GraphPad Software, USA)によって両側ステューデントt検定を用いて行った。どの統計検定でも補正を行わなかった。P値<0.05が統計的に有意だとみなされた。

【0279】

本明細書において開示および主張される方法の全てが、本開示を考慮すれば過度の実験なく作製および実行することができる。本開示の組成物および方法が好ましい態様に関して記述されたが、当業者には、本開示の概念、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書において記述される方法、ならびに方法の工程または工程の順序において変形が適用され得ることが明らかである。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連する特定の薬剤が、本明細書において記述される薬剤の代わりに代用されても、同じまたは同様の結果が達成されることは明らかである。当業者には明らかなそのような同様の代用および変更は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の趣旨、範囲、および概念の範囲内であるとみなされる。

【0280】

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書において記載されたものを補足する例示的な手順またはその他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

- Amoasii *et al.*, *Science*, 362:86-91, 2018.
- Bailey & Cullis, *Biochemistry*, 33:12573-12580, 1994.
- Blasco *et al.*, *Cell Rep.*, 9:1219-1227, 2014.
- Cheng *et al.*, *Adv. Mater.*, 30:e1805308, 2018.
- Chew *et al.*, *Nature methods*, 13:868, 2016.
- Cong *et al.*, *Science*, 339:819-823, 2013.
- Doudna & Charpentier, *Science*, 346:1258096, 2014.
- Finn *et al.*, *Cell Rep.*, 22:2227-2235, 2018.
- Gustafson *et al.*, *Nano Today*, 10:487-510, 2015.
- Hajj & Whitehead, *Nat. Rev. Mater.*, 2:17056, 2017.
- Hao *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 137:9206-9209, 2015.
- Hendel *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 33:985-989, 2015.
- Heyes *et al.*, *J. Controlled Release*, 107:276-287, 2005.
- Jayaraman *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51:8529-8533, 2012.
- Jinek *et al.*, *Science*, 337:816-821, 2012.
- Kamath *et al.*, *J Immunol*, 165:6762-6770, 2000.
- Kanasty *et al.*, *Nat. Mater.*, 12:967-977, 2013.
- Kauffman *et al.*, *Nano Lett.*, 15:7300-7306, 2015.
- Love *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107:1864-1869, 2010.
- Maddalo *et al.*, *Nature*, 516:423-427, 2014.
- Mali *et al.*, *Science*, 339:823-826, 2013.
- Miller *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56:1059-1063, 2017.
- McLaughlin & Harary, *Biochemistry*, 15:1941-1948, 1976.
- Nelson *et al.*, *ACS Nano*, 7:8870-8880, 2013.
- Sander & Joung, *Nat. Biotechnol.*, 32:347-355, 2014.
- Staahl *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 35:431-434, 2017.
- Sun *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54:12029-12033, 2015.
- Tabebordbar *et al.*, *Science*, 351:407-411, 2016.
- Wang *et al.*, *Chem. Rev.*, 117:9874-9906, 2017.

10

20

30

Wang *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2018.

Wilhelm *et al.*, *Nat. Rev. Mater.*, 1:16014, 2016.

Wittrup *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 33:870-976, 2015.

Wood, *Nat. Rev. Neurol.*, 14:570, 2018.

Xue *et al.*, *Nature*, 514:380-384, 2014.

Yin *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 34:328-333, 2016.

Yin *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 35:1179, 2017.

Zhang *et al.*, *Gastroenterology*, 154:1421-1434, 2018a.

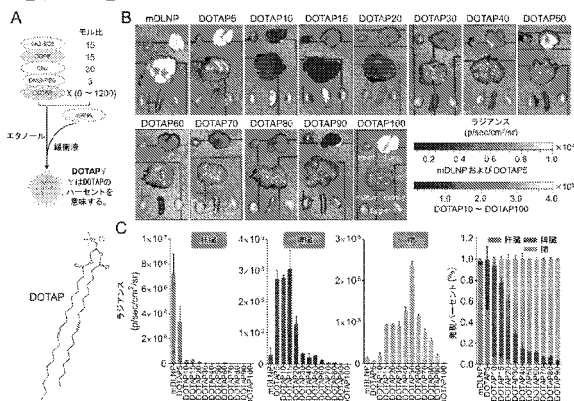
Zhang *et al.*, *Dev. Cell*, 44:447-459, 2018b.

Zhou, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 113(3):520-525, 2016.

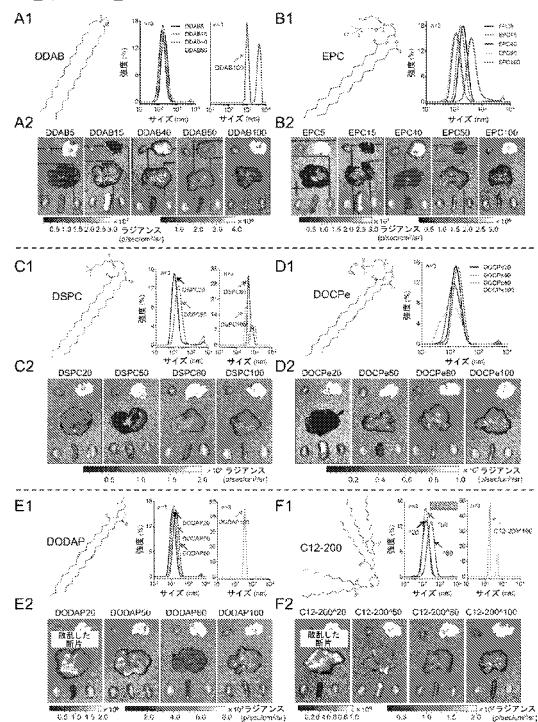
Zuris *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 33:73-80, 2015.

10

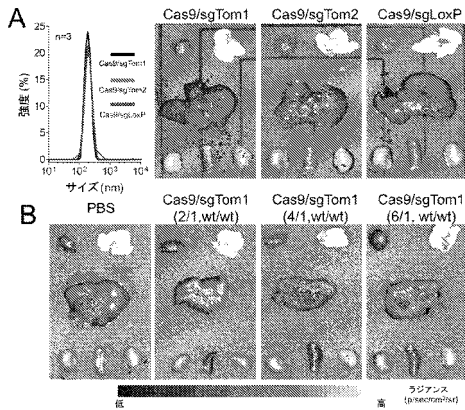
【図 1】



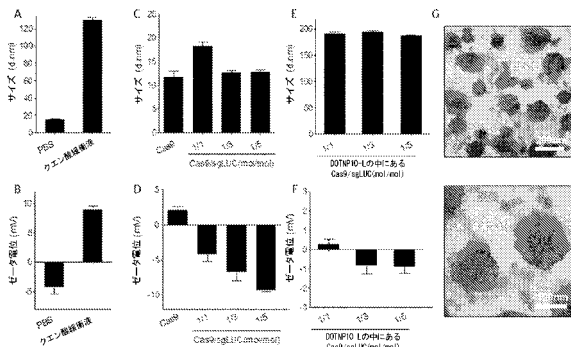
【図 2】



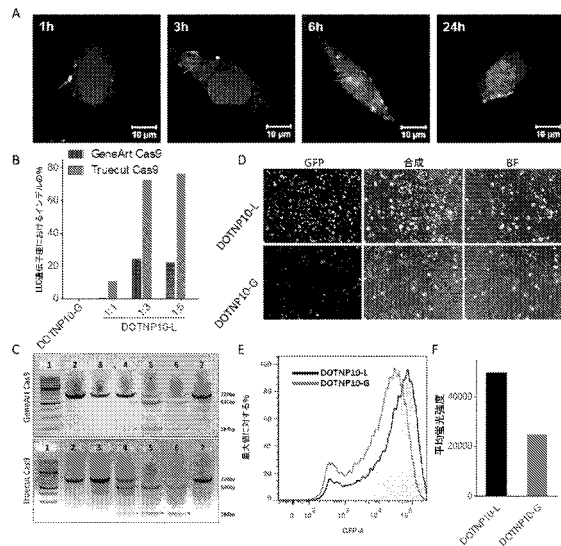
【図 10】



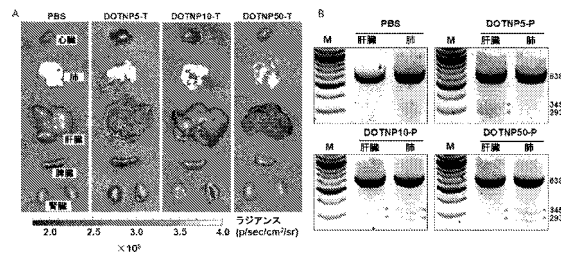
【図 11】



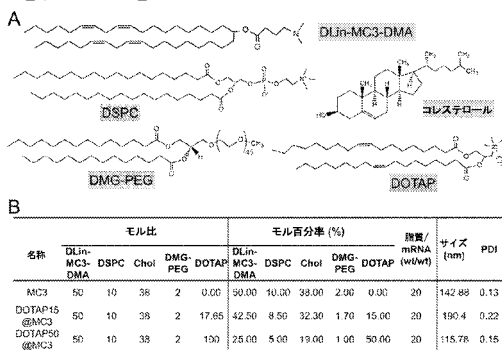
【図 12】



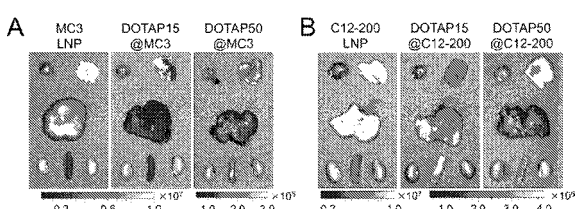
【図 13】



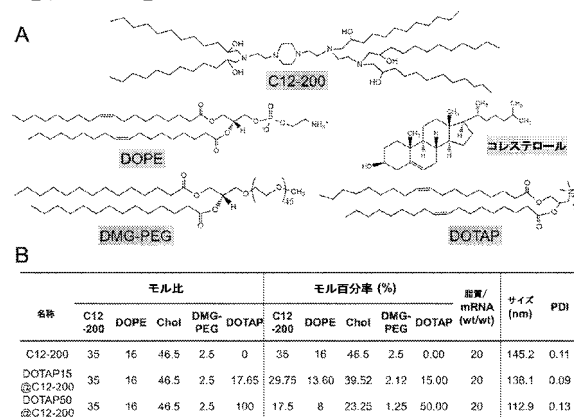
【図 14】



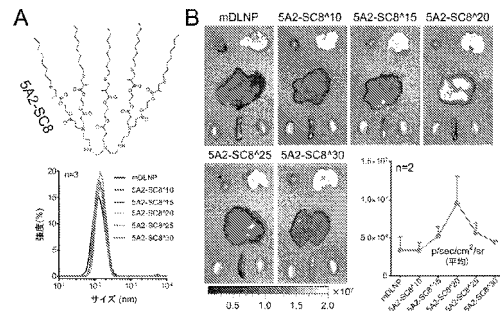
【図 15】



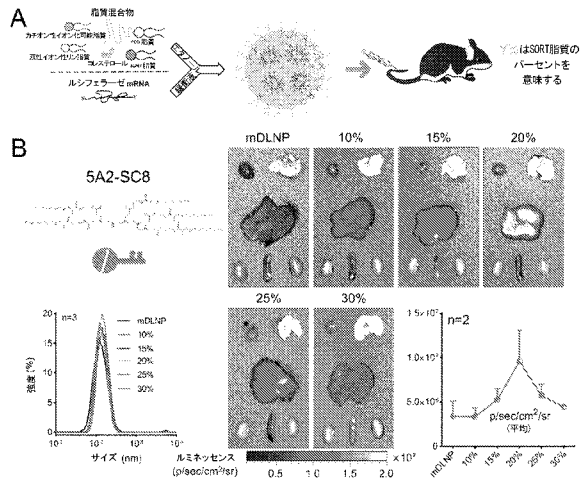
【図 16】



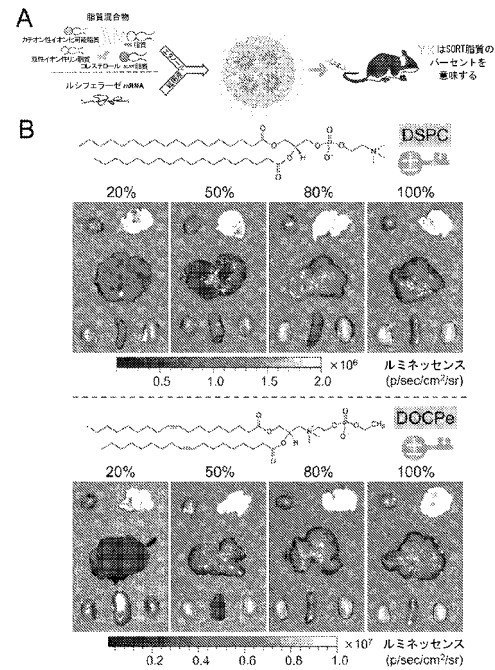
【図 17】



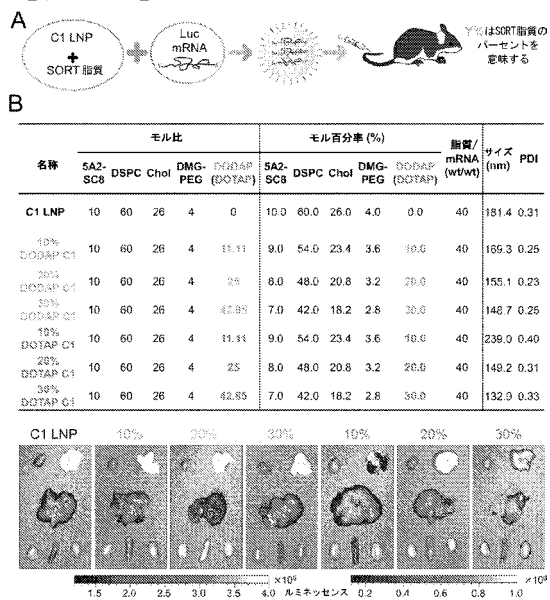
【図 24】



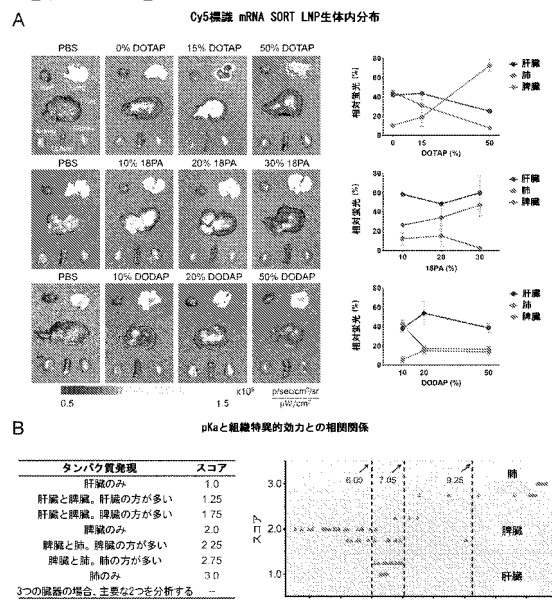
【図 25】



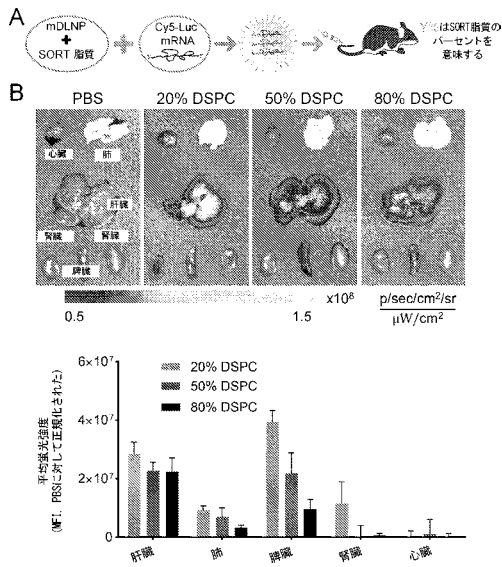
【図 26】



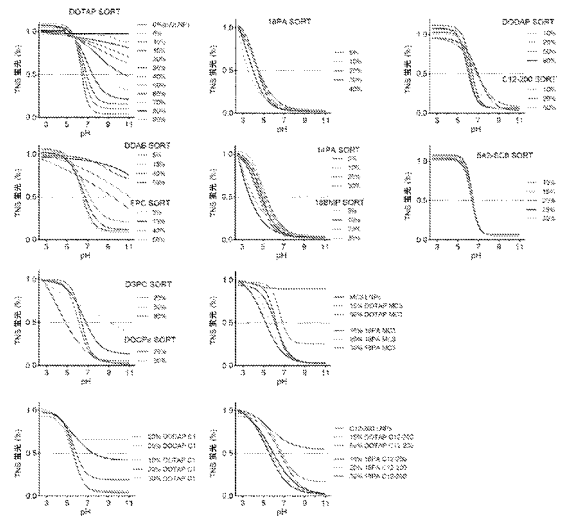
【図 27】



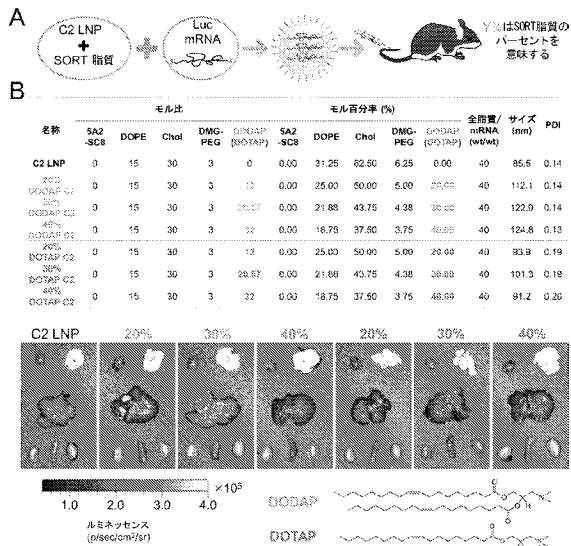
【図 28】



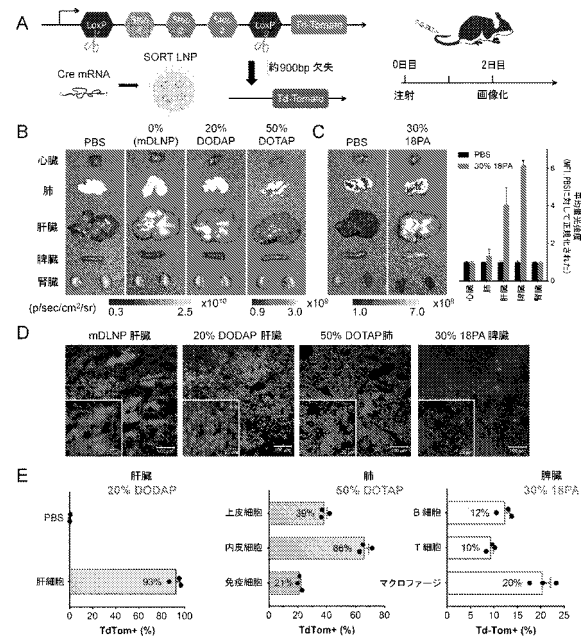
【図 29】



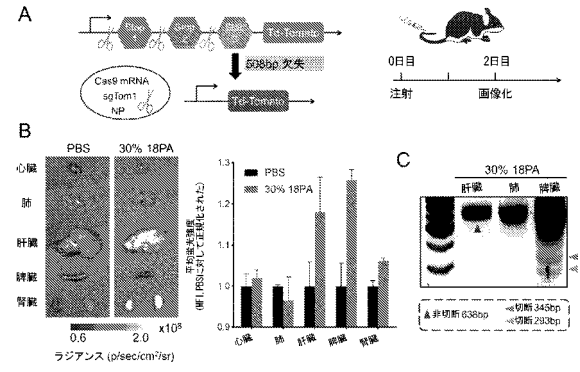
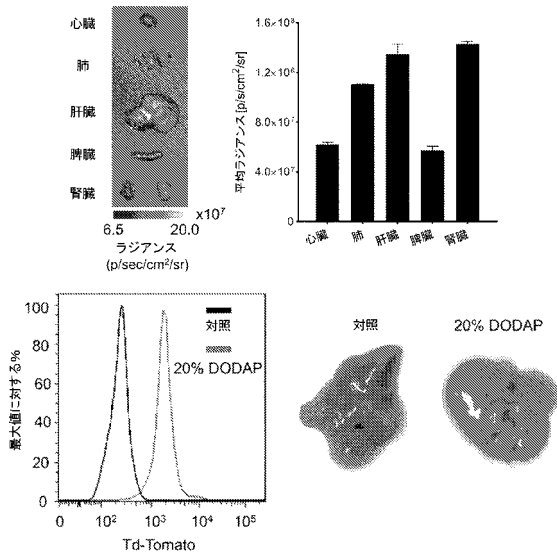
【図 30】



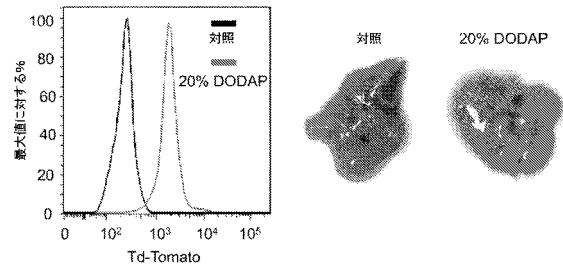
【図 31】



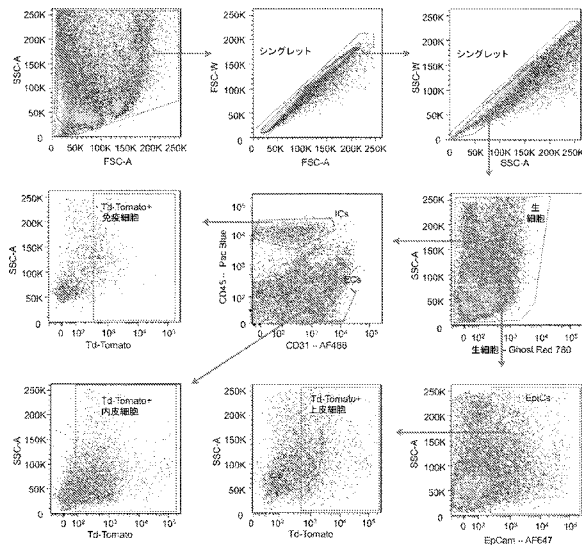
【图 3 3】



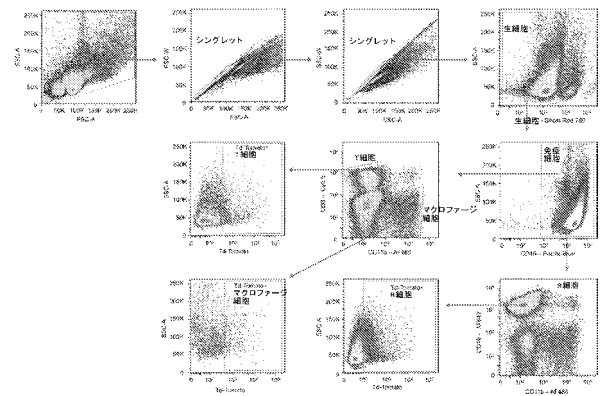
【図 3 4】



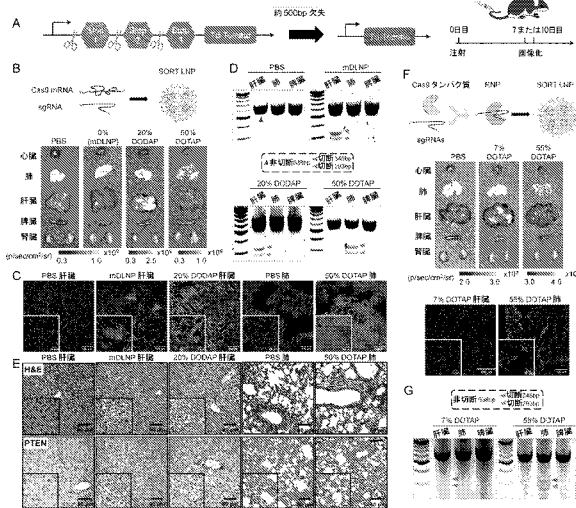
【图 3 5】



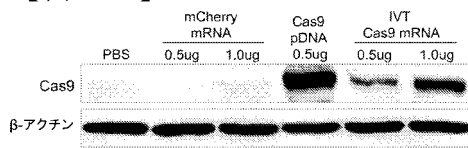
【図 3 6】



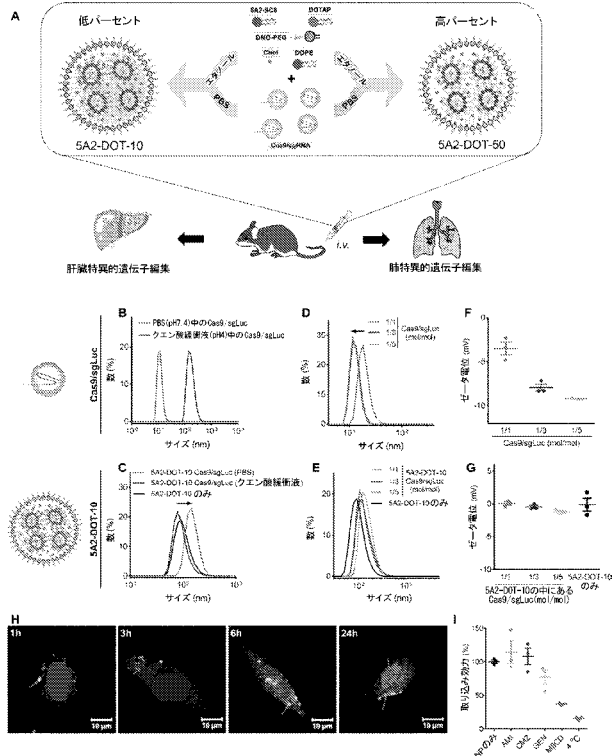
【図 37】



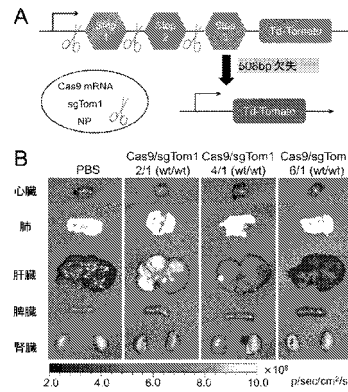
【図 38】



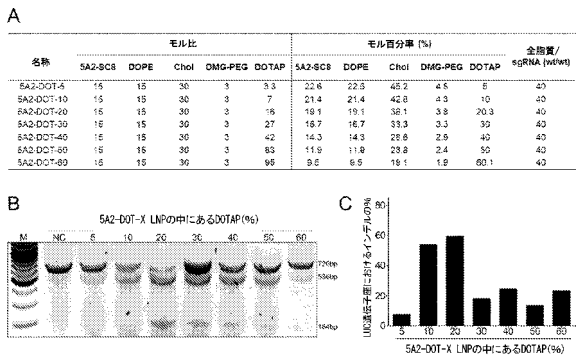
【図 40】



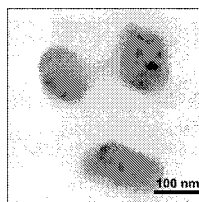
【図 39】



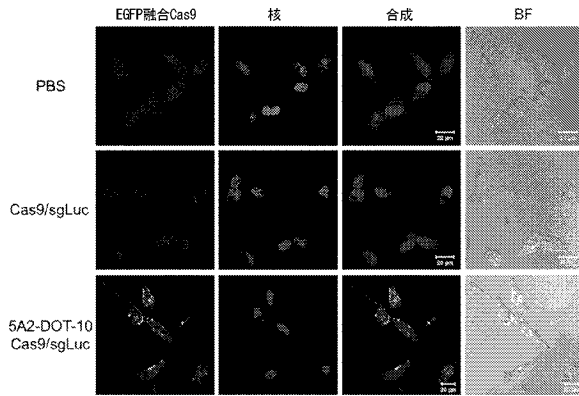
【図 41】



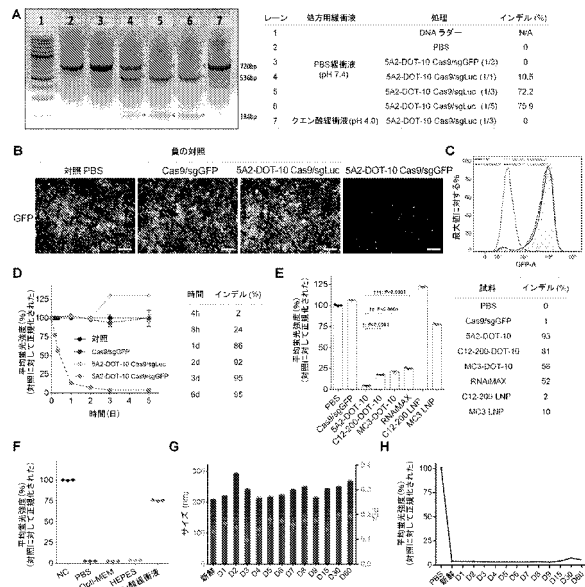
【図 42】



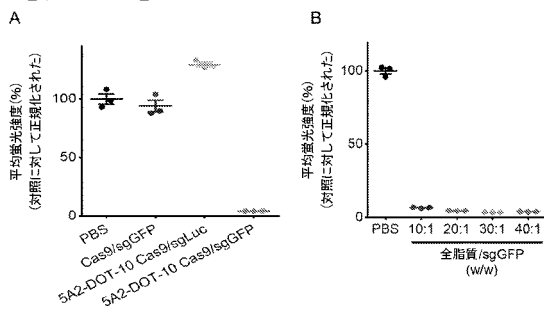
【図 4 3】



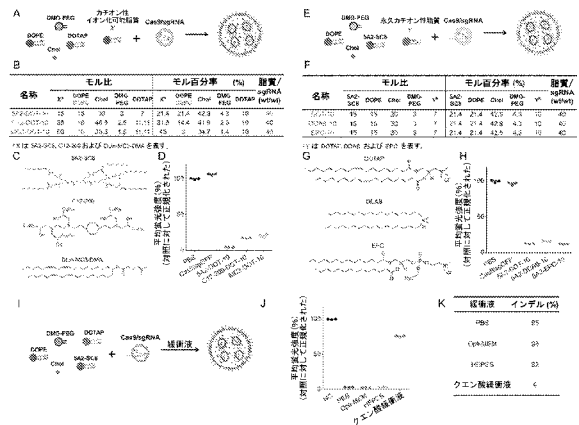
【図 4 4】



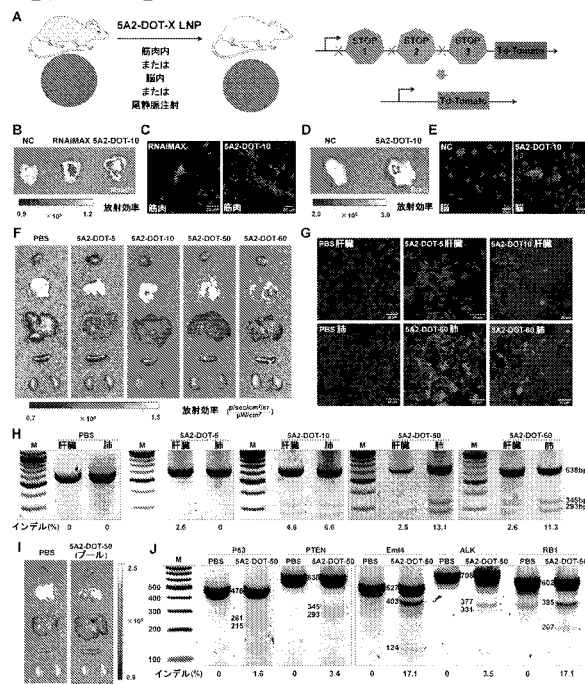
【図 4 5】



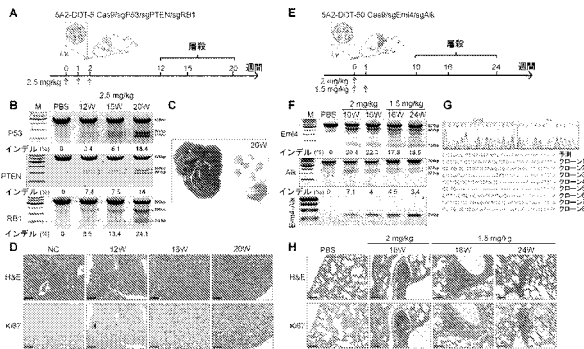
【図 4 6】



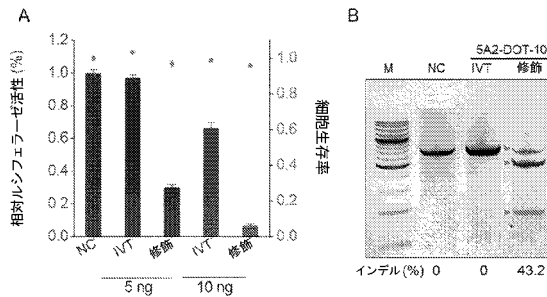
【図 4 7】



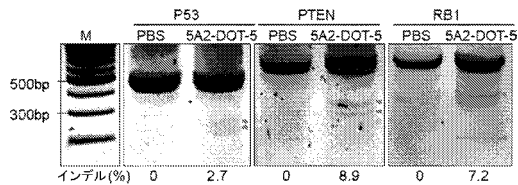
【図 48】



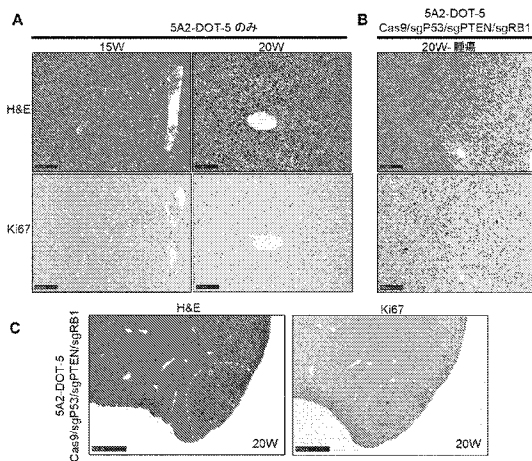
【図 49】



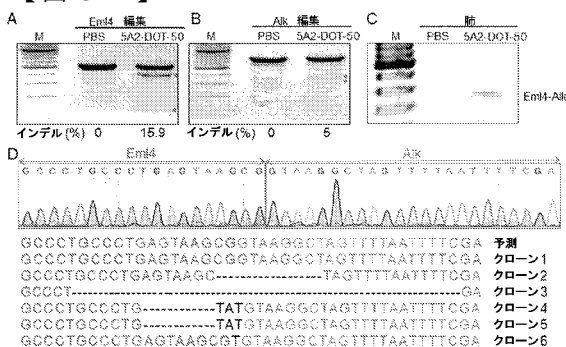
【図 50】



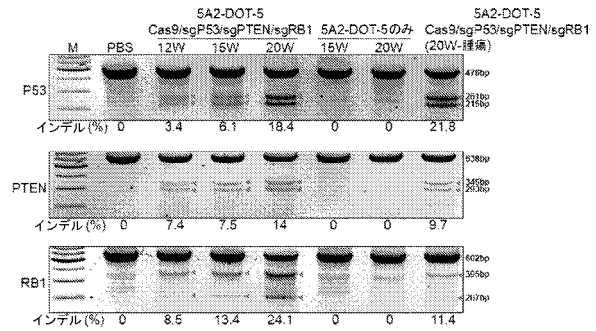
【図 53】



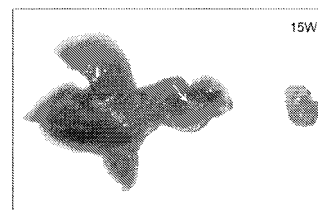
【図 54】



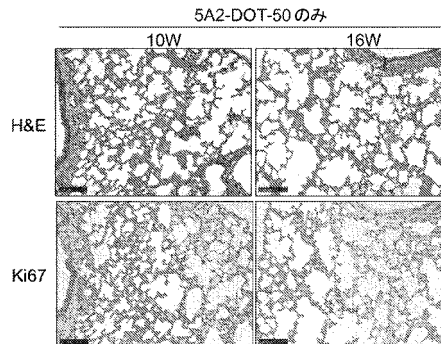
【図 51】



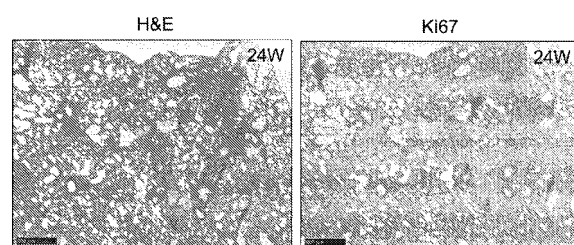
【図 52】



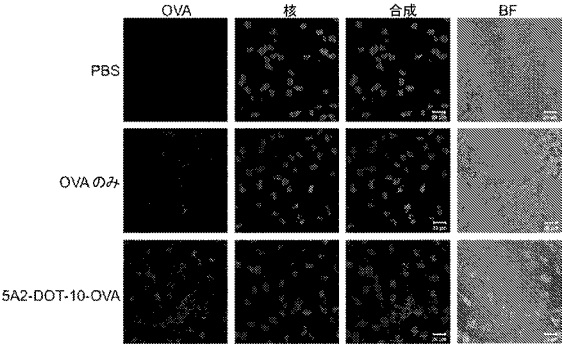
【図 55】



【図 56】



【図 5 7】



【配列表】

2021535226000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/49552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 47/69; A61K 48/00 (2019.01)

CPC - A01K 2217/052; A01K 2217/15; A01K 2217/203

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2012/170930 A9 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC), 13 December 2012 (13.12.2012), entire document esp pg 11 ln 20-30 pg 12 ln 5-10, pg 19 ln 8-15, pg 21 ln 1-5, pg 24 ln 24-30, pg 25 ln 31-32, pg 93 ln 5-10, pg 28 ln 24-30	1-4, 18, 19 ----- 13, 14
Y	WO 2013/177419 A2 (THE OHIO STATE UNIVERSITY) 28 November 2013 (28.11.2013), entire document esp para [0010], [0070], [0087], [0088]	13, 14
A	WO 2014/106208 A1 (Blend Therapeutics, Inc.) 3 July 2014 (03.07.2014), entire document esp pg 63 ln 20-25	18, 19
A	US 9,326,939 B2 (Paulson et al) 03 May 2016 (03.05.2016), entire document, esp col 10 ln 60 to col 11 ln 8 and col 9 ln 50-64	1-4, 18, 19

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

23 October 2019

Date of mailing of the international search report

30 DEC 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/49552

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 5-12, 15-17, 20-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

*****See Supplemental Box below*****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-4, 13, 14, 18, and 19
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 19/49552

Box III Lack of Unity

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-4, 13, 14, 18, and 19 drawn to a composition comprising: (A) a therapeutic agent; and (B) a lipid nanoparticle composition comprising: (1) a selective organ targeting compound; (2) an ionizable cationic lipid; and (3) a phospholipid; wherein the composition preferentially delivers the nucleic acid to a target organ.

Group II: Claim 52 drawn to a method of preparing a lipid nanoparticle comprising: (A) dissolving a permanently cationic lipid, an ionizable cationic lipid, and a phospholipid in a first solution to form a lipid solution wherein the lipid solution is formed in an organic solvent; (B) dissolving a therapeutic agent in a buffer, wherein the buffer is a buffer with a pH from about 6.8 to about 7.6 to form a buffered therapeutic agent solution; and (C) admixing the lipid solution to the buffered therapeutic agent solution to form a lipid nanoparticle.

The group of inventions listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I requires a composition comprising: (A) a therapeutic agent; and (B) a lipid nanoparticle composition comprising: (1) a selective organ targeting compound; (2) an ionizable cationic lipid; and (3) a phospholipid; wherein the composition preferentially delivers the nucleic acid to a target organ, not required by Group II.

Group II requires a method of preparing a lipid nanoparticle comprising: (A) dissolving a permanently cationic lipid, an ionizable cationic lipid, and a phospholipid in a first solution to form a lipid solution wherein the lipid solution is formed in an organic solvent; (B) dissolving a therapeutic agent in a buffer, wherein the buffer is a buffer with a pH from about 6.8 to about 7.6 to form a buffered therapeutic agent solution; and (C) admixing the lipid solution to the buffered therapeutic agent solution to form a lipid nanoparticle, not required by Group I.

Shared Technical Features:

Groups I and II share the technical feature of lipid nanoparticle. This shared technical feature, however, do not provide a contribution over the prior art, as being anticipated by WO 2012/170930 A1 to Shire Human Genetic Therapies, Inc (hereinafter 'Shire'). Shire discloses a composition comprising: (A) a therapeutic agent (pg 11 In 20-30 .. The invention provides compositions and methods for intracellular delivery of mRNA in a liposomal transfer vehicle to one or more target cells for production of therapeutic levels of secreted functional protein.); and (B) a lipid nanoparticle composition (pg 12 In 5-10 .. The compositions and in particular the transfer vehicles described herein are capable of delivering mRNA to the target cell. In embodiments, the transfer vehicle is a lipid nanoparticle.. pg 21 In 1-5 .. In a preferred embodiment of the present invention, the transfer vehicle is formulated as a lipid nanoparticle..)

Groups I and II do not share any technical features and therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note:

Claims 5-12, 15-17, 20-51 were found to be unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	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
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 チェン チャン
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3
ユーティアー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 ウェイ トゥオ
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3
ユーティアー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 シーグワート ダニエル ジェイ.
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3
ユーティアー サウスウェスタン メディカル センター内
- Fターム(参考) 4C076 AA95 CC27 DD49 DD63 FF01 GG01
4C086 AA01 AA02 EA16 ZB26