

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7245651号

(P7245651)

(45)発行日 令和5年3月24日(2023.3.24)

(24)登録日 令和5年3月15日(2023.3.15)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 Z N A

A 6 1 K 38/46 (2006.01)

A 6 1 K 38/46

A 6 1 K 9/14 (2006.01)

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 47/28 (2006.01)

A 6 1 K 47/28

請求項の数 44 (全109頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-551306(P2018-551306)

(86)(22)出願日 平成29年3月30日(2017.3.30)

(65)公表番号 特表2019-516351(P2019-516351  
A)

(43)公表日 令和1年6月20日(2019.6.20)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/024973

(87)国際公開番号 WO2017/173054

(87)国際公開日 平成29年10月5日(2017.10.5)

審査請求日 令和2年3月27日(2020.3.27)

(31)優先権主張番号 62/315,602

(32)優先日 平成28年3月30日(2016.3.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/433,228

(32)優先日 平成28年12月12日(2016.12.12)

最終頁に続く

(73)特許権者 518196169

インテリア セラピューティクス, イン  
コーポレイテッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0

2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト

リート 4 0, スイート 1 3 0

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100186897

弁理士 平川 さやか

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 モリッシー, デビッド ヴィ.

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C R I S P R / C A S 構成成分のための脂質ナノ粒子製剤

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C a s スクレアーゼをコードする m R N A ;

ガイド R N A 核酸 ;

以下を含む複数の成分脂質 :

イオン化可能な脂質 ;

ステロイド、ステロールおよびアルキルレゾルシノールから選択されるヘルパー脂質 ;

ヘプタデシルベンゼン - 1 , 3 - ジオール ( レゾルシノール )、ジパルミトイルホス  
 ファチジルコリン ( D P P C )、ジステアロイルホスファチジルコリン ( D S P C )、ホ  
 スホコリン ( D O P C )、ジミリストイルホスファチジルコリン ( D M P C )、ホスファ  
 チジルコリン ( P L P C )、1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリ  
 ン ( D A P C )、ホスファチジルエタノールアミン ( P E )、卵ホスファチジルコリン (   
 E P C )、ジラウリロイルホスファチジルコリン ( D L P C )、ジミリストイルホスファ  
 チジルコリン ( D M P C )、1 - ミリストイル - 2 - パルミトイルホスファチジルコリン  
 ( M P P C )、1 - パルミトイル - 2 - ミリストイルホスファチジルコリン ( P M P C )  
 、1 - パルミトイル - 2 - ステアロイルホスファチジルコリン ( P S P C )、1 , 2 - ジ  
 アラキドイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D B P C )、1 - ステアロイル - 2  
 - パルミトイルホスファチジルコリン ( S P P C )、1 , 2 - ジエイコセノイル - s n -  
 グリセロ - 3 - ホスホコリン ( D E P C )、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリ  
 ン ( P O P C )、リゾホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールア

10

20

ミン（D O P E）、ジリノレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（D S P E）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（D M P E）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（D P P E）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（P O P E）、およびリゾホスファチジルエタノールアミンから選択される中性脂質、  
 ; および

脂質部分に連結した親水性の頭基を有する、ステルス脂質を含む脂質ナノ粒子（L N P）組成物であって、イオン化可能な脂質が、

リピドA〔（9 Z，1 2 Z）- 3 - （（4，4 - ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）- 2 - （（（（3 - （ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ - 9，1 2 - ジエノエート〕、

10

リピドB〔（5 - （（ジメチルアミノ）メチル）- 1，3 - フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン - 8，1 - ジイル）ビス（デカノエート）〕、

リピドC〔2 - （（4 - （（（3 - （ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）ヘキサデカノイル）オキシ）プロパン - 1，3 - ジイル（9 Z，9 ' Z，1 2 Z，1 2 ' Z）- ビス（オクタデカ - 9，1 2 - ジエノエート）〕および

リピドD〔3 - （（（3 - （ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）- 1 3 - （オクタノイルオキシ）トリデシル 3 - オクチルウンデカノエート〕から選択される、L N P 組成物。

【請求項 2】

20

前記C a sヌクレアーゼをコードするmRNAが、クラス2 C a sヌクレアーゼmRNAであり、前記ガイドRNA核酸が、単一のガイドRNA（s gRNA）であるかまたはそれをコードする、請求項 1 に記載のL N P 組成物。

【請求項 3】

前記ガイドRNAが、s gRNAである、請求項 1 または 2 に記載のL N P 組成物。

【請求項 4】

前記ガイドRNA核酸が、ガイドRNAをコードする発現カセットである、請求項 1 または 2 に記載のL N P 組成物。

【請求項 5】

肝臓における遺伝子編集において用いるための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のL N P 組成物。

30

【請求項 6】

第 1 のL N Pおよび第 2 のL N Pを含み、前記mRNAが第 1 のL N Pに封入されており、前記ガイドRNA核酸が第 2 のL N Pに封入されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のL N P 組成物。

【請求項 7】

前記mRNAおよび前記ガイドRNA核酸が前記L N P 組成物と一緒に封入されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの鋳型核酸をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のL N P 組成物。

40

【請求項 9】

前記mRNAがC a s 9ヌクレアーゼmRNAである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のL N P 組成物。

【請求項 10】

前記C a s 9ヌクレアーゼmRNAがヒトコドン最適化C a s 9ヌクレアーゼである、請求項 9 に記載のL N P 組成物。

【請求項 11】

前記イオン化可能な脂質がリピドAである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のL N P 組成物。

50

## 【請求項 12】

前記ヘルパー脂質が、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノールおよびコレステロールヘミスクシネートから選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 13】

前記中性脂質がDSPCおよびDMPEから選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 14】

前記ステルス脂質がPEG2k-DMGおよびPEG2k-C11から選択される、請求項1～13のいずれか一項に記載のLNP組成物。

10

## 【請求項 15】

少なくとも1つのLNPがリピドA、コレステロール、DSPCおよびPEG2k-DMGを含む、請求項1～14のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 16】

少なくとも1つのLNPがリピドB、コレステロール、DSPCおよびPEG2k-DMGを含む、請求項1～10および12～15のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 17】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を約30モル%から約60モル%の量で含む、請求項1～16のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 18】

前記成分脂質が、ヘルパー脂質を約30モル%から約60モル%の量で含む、請求項1～17のいずれか一項に記載のLNP組成物。

20

## 【請求項 19】

前記成分脂質が、中性脂質を約1モル%から約20モル%の量で含む、請求項1～18のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 20】

前記成分脂質が、ステルス脂質を約1モル%から約10モル%の量で含む、請求項1～19のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 21】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を約45モル%の量で含む、請求項1～20のいずれか一項に記載のLNP組成物。

30

## 【請求項 22】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を約30モル%から約60モル%の量で含み、ヘルパー脂質を約30モル%から約60モル%の量で含み、中性脂質を約1モル%から約20モル%の量で含み、ステルス脂質を約1モル%から約10モル%の量で含む、請求項1～16のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 23】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を42モル%から47モル%の量で含み、ヘルパー脂質を41モル%から46モル%の量で含み、中性脂質を5モル%から15モル%の量で含み、ステルス脂質を1モル%から5モル%の量で含む、請求項1～16のいずれか一項に記載のLNP組成物。

40

## 【請求項 24】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を42モル%から47モル%の量で含み、ヘルパー脂質を41モル%から46モル%の量で含み、中性脂質を7モル%から12モル%の量で含み、ステルス脂質を1モル%から3モル%の量で含む、請求項1～16のいずれか一項に記載のLNP組成物。

## 【請求項 25】

前記イオン化可能な脂質がリピドAおよびリピドBから選択され、ヘルパー脂質が、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノールおよびコレステロールヘミスクシネートから選択され、中性脂質がジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)およびジミ

50

リストイルホスファチジルエタノールアミン ( D M P E ) から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の L N P 組成物。

【請求項 26】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を 42 モル% から 47 モル% の量で含み、ヘルパー脂質を 41 モル% から 46 モル% の量で含み、中性脂質を 5 モル% から 15 モル% の量で含み、ステルス脂質を 1 モル% から 5 モル% の量で含む、請求項 25 に記載の L N P 組成物。

【請求項 27】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を 42 モル% から 47 モル% の量で含み、ヘルパー脂質を 41 モル% から 46 モル% の量で含み、中性脂質を 7 モル% から 12 モル% の量で含み、ステルス脂質を 1 モル% から 3 モル% の量で含む、請求項 25 に記載の L N P 組成物。

10

【請求項 28】

前記イオン化可能な脂質がリピド A およびリピド B から選択され、ヘルパー脂質が、コレステロールであり、中性脂質が D S P C であり、ステルス脂質の親水性の頭基が P E G - 2000 ポリエチレングリコールを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の L N P 組成物。

【請求項 29】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を 42 モル% から 47 モル% の量で含み、ヘルパー脂質を 41 モル% から 46 モル% の量で含み、中性脂質を 5 モル% から 15 モル% の量で含み、ステルス脂質を 1 モル% から 5 モル% の量で含む、請求項 28 に記載の L N P 組成物。

20

【請求項 30】

前記成分脂質が、イオン化可能な脂質を 42 モル% から 47 モル% の量で含み、ヘルパー脂質を 41 モル% から 46 モル% の量で含み、中性脂質を 7 モル% から 12 モル% の量で含み、ステルス脂質を 1 モル% から 3 モル% の量で含む、請求項 28 に記載の L N P 組成物。

【請求項 31】

前記イオン化可能な脂質がアミンを含み、イオン化可能な脂質アミン対前記 R N A リン酸のモル比が約 3 ~ 約 5 である、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の L N P 組成物。

30

【請求項 32】

前記 L N P が、約 75 nm から約 150 nm の粒径を有する、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の L N P 組成物。

【請求項 33】

前記 m R N A および前記ガイド R N A 核酸が、約 70 % から約 100 % の封入効率で前記 L N P 組成物に封入されている、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の L N P 組成物。

【請求項 34】

対象中の A p o E 結合性細胞における遺伝子編集において用いるための、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記遺伝子編集が、前記対象に治療有効量の前記 L N P 組成物を投与することを含む、L N P 組成物。

40

【請求項 35】

対象中の肝臓細胞における遺伝子の発現を変更する方法において用いるための、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記方法が、前記対象に治療有効量の前記 L N P 組成物を投与することを含む、L N P 組成物。

【請求項 36】

対象中の A p o E 結合性細胞を遺伝子編集するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の L N P 組成物の使用。

【請求項 37】

対象中の肝臓細胞における遺伝子の発現を変更するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の L N P 組成物の使用。

50



## 【請求項 38】

請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の L N P 組成物の、肝臓細胞を遺伝子編集するための使用であって、肝臓細胞を前記 L N P 組成物と in vitro で接触させることを含む、使用。

## 【請求項 39】

肝臓細胞または A p o E 結合性細胞を遺伝子編集する in vitro の方法であって、肝臓細胞または A p o E 結合性細胞を、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の L N P 組成物と接触させることを含む、方法。

## 【請求項 40】

肝臓細胞において遺伝子編集する方法である請求項 39 に記載の方法であって、肝臓細胞を前記 L N P 組成物と接触させることが、前記 L N P 組成物を前記肝臓細胞に送達することを含む、方法。

10

## 【請求項 41】

A p o E 結合性細胞において遺伝子編集する方法である請求項 39 に記載の方法であって、A p o E 結合性細胞を前記 L N P 組成物と接触させることが、前記 L N P 組成物を前記 A p o E 結合性細胞に送達することを含む、方法。

## 【請求項 42】

前記肝臓細胞が肝細胞である、請求項 39 または 40 に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記肝臓細胞が幹細胞である、請求項 39、40 および 42 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 44】

前記方法が、少なくとも 80 % の編集効率をもたらす、請求項 39 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2016年3月30日に出願の米国特許仮出願第62/315,602号明細書、2016年8月16日に出願の米国特許仮出願第62/375,776号明細書、2016年12月12日に出願の米国特許仮出願第62/433,228号明細書および2017年3月7日に出願の米国特許仮出願第62/468,300号明細書への優先権益を主張する；各々の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

対象への生物学的活性薬剤（治療関連化合物を含む）の送達は、薬剤が標的の細胞または組織に到達するのが困難であることによってしばしば妨げられる。特に、生細胞への多くの生物学的活性薬剤の輸送は、細胞の膜系によって制限される可能性がある。

## 【0003】

細胞に送達するのが特に困難である生物学的活性薬剤の1つのクラスは、タンパク質、核酸ベースの薬物およびその誘導体を含む生物製剤である。ある特定の核酸およびタンパク質は、細胞または血漿中で限られた期間だけ安定で、時には高度に荷電しており、これにより、細胞膜を越える送達が複雑になる可能性がある。したがって、そのような薬剤を安定にし、細胞に送達することができる組成物は、特に興味がある。細胞へのこれらの生物学的活性薬剤の送達を向上させるために、脂質担体、生分解性ポリマーおよび様々なコンジュゲート系を使用することができる。

40

## 【0004】

i n v i v o の細胞において遺伝子を編集するためのいくつかの構成成分および組成物が今や存在し、遺伝性、ウイルス性、細菌性、自己免疫性、がん、加齢関連および炎症性の疾患を処置するためのおびただしい可能性を提供する。これらの編集テクノロジーのいくつかは、酵素、例えばメガヌクレアーゼ、クラスター化規則的散在性の短いパリンド

50

ローム反復配列 (CRISPR) 関連 (「Cas」) のヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (「ZFN」) および転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (「TALEN」) によって形成された二本鎖切断 (「DSB」) を修復するための細胞機構を利用する。DSBが細胞で起こるとき、細胞はいくつかの方法の1つによって切断を修復することができる。そのような方法の1つは、DNAの切断された末端の非相同的末端連結 (「NHEJ」) を含む。NHEJの間、細胞はヌクレオチドを加えるかまたは除去することができ、切断された配列から変更された配列をもたらす。他の状況では、細胞は、相同性誘導修復 (「HDR」) または相同組換え (「HR」) 機構によってDSBを修復し、ここで、例えばDSBの各末端に相同性を有する内因性または外因性の鋳型が、切断の修復を誘導するために使用される。これらの編集テクノロジーのいくつかは、一本鎖切断または二本鎖切断 (「DSB」) を修復するための細胞機構を利用する。

10

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

CRISPR/Cas 遺伝子編集系は、細胞中のリボ核タンパク質複合体として活性である。患者の細胞などの細胞への、CRISPR/Casのタンパク質および核酸構成成分の送達ための組成物が必要である。

##### 【0006】

本発明者らは、CRISPR/Cas 遺伝子編集構成成分の送達のために有益である脂質ナノ粒子をベースとした組成物を本明細書で提供する。

##### 【0007】

一部の実施形態では、本発明者らは、遺伝子操作された肝臓細胞を生成する方法であって、以下を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と細胞を接触させることを含む方法を本明細書で提供する：クラス2 CasヌクレアーゼmRNA；ガイドRNA核酸；CCD脂質；ヘルパー脂質；中性脂質；およびステルス脂質。クラス2 CasヌクレアーゼmRNA、ガイドRNA核酸、CCD脂質、ヘルパー脂質、中性脂質およびステルス脂質を含む脂質ナノ粒子 (LNP) も提供される。

20

##### 【0008】

さらなる実施形態は、遺伝子編集の方法であって、クラス2 CasヌクレアーゼmRNAおよびガイドRNA核酸を肝臓細胞に送達することを含み、クラス2 Cas mRNAおよびガイドRNA核酸は：CCD脂質；ヘルパー脂質；中性脂質；およびステルス脂質を含む少なくとも1つのLNP組成物として製剤化されている、方法を提供する。さらなる実施形態は、CRISPR-Cas複合体を肝臓細胞に投与する方法であって、細胞を：クラス2 CasヌクレアーゼmRNA；ガイドRNA核酸；CCD脂質；ヘルパー脂質；中性脂質；およびステルス脂質を含むLNPと接触させること、を含む方法を提供する。

30

##### 【0009】

ある特定の実施形態では、肝臓細胞における遺伝子の発現を変更する方法であって、1つまたは複数のLNP製剤としてクラス2 CasヌクレアーゼmRNAおよびガイドRNA核酸の治療的有効量を対象に投与することを含み、少なくとも1つのLNP製剤は：ガイドRNA核酸またはクラス2 CasヌクレアーゼmRNA；CCD脂質；ヘルパー脂質；中性脂質；およびステルス脂質を含む、方法が提供される。

40

##### 【0010】

一部の実施形態では、遺伝子操作された肝臓細胞を生成する方法は、細胞を：クラス2 CasヌクレアーゼmRNA；単一のガイドRNA (sgRNA) であるかまたはそれをコードするガイドRNA核酸；CCD脂質；ヘルパー脂質；中性脂質；およびステルス脂質を含む脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む。

##### 【0011】

ある特定の態様では、クラス2 CasヌクレアーゼmRNAは第1のLNP組成物に製剤化され、ガイドRNA核酸は第2のLNP組成物に製剤化されている。他の態様では、クラス2 CasヌクレアーゼmRNAおよびガイドRNA核酸は、LNP組成物に一

50

緒に製剤化されている。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】マウス肝細胞 (H e p a 1 . 6) への 1 ウェルにつき 1 0 0 n g および 5 0 0 n g の e G F P m R N A の量で送達された様々な L N P 製剤の送達後の G F P の発現を示す図である。

【図 2】用量依存的応答をもたらした、様々な用量の様々な L N P 製剤の投与の後のマウスにおける g L U C 発現を示す図である。

【図 3】図 3 A は、様々な L N P 製剤の投与の後のマウスにおける第 V I I 因子標的化の編集効率を示す図である。図 3 B は、様々な L N P 製剤の投与の後のマウスにおける T T R 標的化の編集効率を示す図である。

10

【図 4】図 4 A は、g R N A および C a s 9 m R N A が別々に製剤化されている、様々な投与レジメンによる様々な L N P 製剤の送達後のマウスにおける T T R 標的化の編集効率を示す図である。図 4 B は、g R N A および C a s 9 m R N A が別々に製剤化された L N P 製剤の送達後の、マウスにおける T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 5】g R N A および C a s 9 m R N A が別々に製剤化された様々な L N P 製剤の投与の後の、細胞における第 V I I 因子または T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 6】g R N A および C a s 9 m R N A が別々に製剤化された様々な L N P 製剤の投与の後の、マウスにおける第 V I I 因子または T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 7】g R N A および C a s 9 m R N A が一緒に製剤化され、様々な濃度で送達される、様々な L N P 製剤の投与の後の、細胞における編集効率を示す図である。

20

【図 8 - 1】図 8 A は、様々な L N P 製剤の投与の後のマウスにおける T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 8 - 2】図 8 B は、様々な L N P 製剤の投与の後のマウスにおける第 V I I 因子標的化の編集効率を示す図である。

【図 9】様々な L N P 製剤を投与した動物から収集された切除部位 D N A の P C R 増幅を示す図である。

【図 1 0】g R N A および C a s 9 m R N A が一緒に製剤化された様々な L N P 製剤を投与したマウスの、血清中 T T R レベルを示す図である。

【図 1 1】g R N A および C a s 9 m R N A が一緒に製剤化された様々な L N P 製剤を動物に投与した後のマウスにおける、相対的な第 V I I 因子活性を示す図である。

30

【図 1 2 - 1】図 1 2 A は、用量依存的応答をもたらした L N P - 1 6 9 を様々な用量で投与した後のマウスにおける T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 1 2 - 2】図 1 2 B は、用量依存的応答をもたらした L N P - 1 6 9 を様々な用量で投与した後の様々な日のマウスにおける血清中 T T R レベルを示す図である。

【図 1 3 - 1】図 1 3 A は、C a s 9 m R N A 対 s g R N A の比が異なった様々な L N P 製剤の投与の後のマウスにおける、T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 1 3 - 2】図 1 3 B は、C a s 9 m R N A 対 s g R N A の比が異なった様々な L N P 製剤の投与の後の、別個の 2 日におけるマウスでの血清中 T T R レベルを示す図である。

【図 1 4 - 1】図 1 4 A は、L N P - 1 6 9 の 1 つまたは 2 つの用量での投与の後のマウスにおける T T R 標的化の編集効率を示す図である。

40

【図 1 4 - 2】図 1 4 B は、L N P - 1 6 9 の 1 つまたは 2 つの用量での投与の 9 日後のマウスにおける血清中 T T R レベルを示す図である。

【図 1 5】様々な L N P 製剤の投与の後のマウスの脾臓における T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 1 6】様々な L N P 製剤の投与の後のマウスにおける T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 1 7】マウス血清の存在下での様々な濃度の L N P - 1 6 9 の細胞への送達後の、一次マウス肝細胞における T T R 標的化の編集効率を示す図である。

【図 1 8】A p o E の存在量の増加に伴う A p o E による L N P 結合の増加を示す図であ

50

る。

【図 19】ガイド RNA が DNA 発現カセットとして送達された、様々な LNP 製剤の編集効率を示す図である。

【図 20】一次肝細胞培養と *in vivo* のマウス肝臓細胞の間で編集効率が相関することを示す図である。

【図 21】Neuro 2A の *in vitro* 細胞株対一次マウス肝細胞における編集の特有の修復スペクトルを示す図である。

【図 22】一次マウス肝細胞対 *in vivo* のマウス肝臓細胞における編集の類似の修復スペクトルを示す図である。

【図 23】時間の関数としての、Cas9 mRNA およびガイド RNA の血漿中濃度を示す図である。

10

【図 24】肝臓組織における、時間の関数としての Cas9 mRNA およびガイド RNA の濃度を示す図である。

【図 25】脾臓組織における、時間の関数としての Cas9 mRNA およびガイド RNA の濃度を示す図である。

【図 26 - 1】図 26 A は、血漿および組織における、時間の関数としての Cas9 mRNA およびガイド RNA の相対濃度を示す図である。

【図 26 - 2】図 26 B は、血漿および組織における、時間の関数としてのリポド A の濃度を示す図である。

【図 27】LNP の投与後の時間の関数としての、血漿中サイトカインレベルの変化を示す図である。

20

【図 28】LNP の投与後の経時的なマウス血清中 TTR レベルを示す図である。

【図 29 - 1】図 29 A は、LNP の投与後のマウスにおける経時的な TTR 編集を示す図である。

【図 29 - 2】図 29 B は、LNP の投与後のマウスにおける経時的な TTR 編集および血清中 TTR レベルを示す図である。

【図 30】異なる mRNA 調製物を含有する LNP の投与後の、マウス血清中サイトカインレベルを示す図である。

【図 31】異なる mRNA 調製物を含有する LNP の投与後の、マウス血清中 TTR 濃度レベルを示す図である。

30

【図 32】異なる mRNA 調製物を含有する LNP の投与後のマウスにおける経時的な TTR 編集レベルを示す図である。

【図 33】- 80 または 4 で保存した LNP の投与後の、マウス血清中 TTR 濃度レベルを示す図である。

【図 34】- 80 または 4 で保存した LNP の投与後の、マウス TTR 編集レベルを示す図である。

【図 35】様々な製剤の投与後の、マウス血清中濃度レベルを示す図である。

【図 36】様々な製剤の投与後の、マウス肝臓 TTR 編集レベルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

40

本開示は、細胞への送達およびそれらの使用のための方法のための、CRISPR/Cas 構成成分（「カーゴ」）の脂質ナノ粒子（LNP）組成物の実施形態を提供する。LNP は、(i) CCD 脂質、(ii) 中性脂質、(iii) ヘルパー脂質および(iv) ステルス脂質を含有することができる。ある特定の実施形態では、カーゴは、Cas9 などの Cas ヌクレアーゼをコードする mRNA、およびガイド RNA またはガイド RNA をコードする核酸を含む。

【0014】

CRISPR/Cas カーゴ

LNP 製剤を通して送達される CRISPR/Cas カーゴは、Cas ヌクレアーゼをコードする mRNA 分子を含み、細胞での Cas ヌクレアーゼの発現を可能にする。カー

50

ゴは、1つまたは複数のガイドRNAまたはガイドRNAをコードする核酸をさらに含有する。カーゴは、修復または組換えのための鋳型核酸をさらに含むことができる。

#### 【0015】

##### Casヌクレアーゼ

開示される製剤の1つの構成成分は、CasヌクレアーゼmRNAとも呼ばれる、CasヌクレアーゼをコードするmRNAである。向上した安定性および/または免疫原性のために、mRNAを改変することができる。改変は、mRNAの中の1つまたは複数のヌクレオシドに加えることができる。mRNA核酸塩基への化学的改変の例には、プソイドウリジン、1-メチル-プソイドウリジンおよび5-メチルシチジンが含まれる。安定性、発現および免疫原性を向上させるさらなる公知の改変が企図される。CasヌクレアーゼをコードするmRNAは、特定の細胞型、例えば、真核細胞、哺乳動物細胞または、より具体的にはヒト細胞での発現のためにコドン最適化することができる。一部の実施形態では、mRNAは、Casヌクレアーゼとして、ヒトコドン最適化Cas9ヌクレアーゼまたはヒトコドン最適化Cpfヌクレアーゼをコードする。一部の実施形態では、mRNAは精製される。一部の実施形態では、mRNAは沈殿法（例えば、LiCl沈殿、アルコール沈殿、または、例えば本明細書に記載される同等の方法）を使用して精製される。一部の実施形態では、mRNAは、クロマトグラフィーをベースとした方法、例えばHPLCをベースとした方法または同等の方法（例えば、本明細書に記載されるもの）を使用して精製される。一部の実施形態では、mRNAは、沈殿法（例えば、LiCl沈殿）およびHPLCをベースとした方法の両方を使用して精製される。

#### 【0016】

Casヌクレアーゼのコード配列に加えて、mRNAは、3'または5'非翻訳領域(UTR)を含むことができる。一部の実施形態では、3'または5'UTRは、ヒト遺伝子配列に由来することができる。例示的な3'および5'UTRには、<sup>1</sup>-および<sup>2</sup>-グロピン、アルブミン、HSD17B4および真核生物の伸長因子1が含まれる。さらに、ウイルス由来の5'および3'UTRを使用することもでき、例には、オルソポックスウイルスおよびサイトメガロウイルスのUTR配列を含めることができる。ある特定の実施形態では、mRNAは、m7G(5')ppp(5')Nなどの5'キャップを含む。さらに、このキャップは、ヌクレオチドNが2'OMeを含有しないキャップ-0、またはヌクレオチドNが2'OMeを含有するキャップ-1、またはヌクレオチドNおよびN+1が2'OMeを含有するキャップ-2であってもよい。このキャップは、抗リバースキャップ類似体(ARCA)によって組み込まれる、m2',3'-Qg(5')Nの構造であってもよく、また、類似のキャップ-0、キャップ-1およびキャップ-2等の構造を含むこともできる。一部の実施形態では、5'キャップは、核外移行を調節すること；エキソヌクレアーゼによる分解を阻止すること；翻訳を促進すること；および5'近位イントロン切除を促進することができる。キャップのための安定化要素には、ホスホロチオエート連結、ボラノホスフェート改変およびメチレン架橋が含まれる。さらに、キャップは、真核生物の翻訳開始因子4E、eIF4Eのための結合要素として作用する、非核酸実体を含有することもできる。ある特定の実施形態では、mRNAは、ポリ(A)テールを含む。このテールは、長さが約40~約300ヌクレオチドであってよい。一部の実施形態では、テールは、長さが約40~約100ヌクレオチドであってよい。一部の実施形態では、テールは、長さが約100~約300ヌクレオチドであってよい。一部の実施形態では、テールは、長さが約100~約300ヌクレオチドであってよい。一部の実施形態では、テールは、長さが約50~約200ヌクレオチドであってよい。一部の実施形態では、テールは、長さが約50~約250ヌクレオチドであってよい。ある特定の実施形態では、テールは、長さが約100、150または200ヌクレオチドであってよい。ポリ(A)テールは、ホスホロチオエート連結および核酸塩基改変を含む、エキソヌクレアーゼ分解を阻止するための改変を含有することができる。さらに、ポリ(A)テールは、改変されたまたは非天然の核酸塩基または他の合成部分を含むことができる3'「キャップ」を含有することができる。

。

10

20

30

40

50

## 【0017】

本明細書に記載されるmRNAは、RNAの細胞内半減期を変更することが可能である少なくとも1つの要素を含むことができる。一部の実施形態では、RNAの半減期を増加することができる。一部の実施形態では、RNAの半減期を減少させることができる。一部の実施形態では、要素は、RNAの安定性を増加することが可能であってよい。一部の実施形態では、要素は、RNAの安定性を減少させることが可能であってよい。一部の実施形態では、要素は、RNA減衰を促進することができる。一部の実施形態では、要素は、翻訳を活性化することができる。一部の実施形態では、要素は、RNAの3'UTRの中にあってもよい。例えば、要素は、mRNA減衰シグナルであってよい。一部の実施形態では、要素は、ポリアデニル化シグナル(PA)を含むことができる。一部の実施形態では、PAは、RNAの3'UTRの中にあってもよい。一部の実施形態では、RNAは、それが転写の後に細胞中でより速い分解を受けるように、PAを含まなくてもよい。一部の実施形態では、要素は、少なくとも1つのAUに富む要素(ARE)を含むことができる。一部の実施形態では、要素は、AREを含まない。AREには、組織型、細胞型、タイミング、細胞局在化および環境に依存する様式で、ARE結合性タンパク質(ARE-BP)が結合することができる。一部の実施形態では、AREは、50~150ヌクレオチドの長さを含むことができる。一部の実施形態では、AREは、配列AUUUAの少なくとも1コピーを含むことができる。一部の実施形態では、RNAの3'UTRに少なくとも1つのAREを加えることができる。一部の実施形態では、要素は、転写物からの発現を増強するために三次構造を形成する、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHV)転写後調節要素(WPRE)であってよい。一部の実施形態では、RNAの3'UTRにWPREを加えることができる。一部の実施形態では、要素は、減衰の速いかまたは遅い転写物に存在する他のRNA配列モチーフから選択することができる。一部の実施形態では、各要素は、単独で使用することができる。一部の実施形態では、要素は、1つまたは複数の要素と組み合わせて使用することができる。

## 【0018】

一部の実施形態では、送達されるmRNAによってコードされるヌクレアーゼは、CRISPR/Cas系からのCasタンパク質を含むことができる。Casタンパク質は、ガイドRNA(「gRNA」)と相互作用する少なくとも1つのドメインを含むことができる。さらに、Casタンパク質は、ガイドRNAによって標的配列に誘導することができる。ガイドRNAはCasタンパク質ならびに標的配列と相互作用し、そのため、それは標的配列への結合を誘導する。一部の実施形態では、ガイドRNAは標的化切断のための特異性を提供し、Casタンパク質は汎用性であり、異なるガイドRNAと対になって異なる標的配列を切断することができる。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、一本鎖または二本鎖のDNAを切断することができる。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、RNAを切断することができる。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、RNAにニックを入れることができる。一部の実施形態では、Casタンパク質は、少なくとも1つのDNA結合性ドメインおよび少なくとも1つのヌクレアーゼドメインを含む。一部の実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、DNA結合性ドメインに異種であってよい。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、ヌクレアーゼ活性を低減または排除するように改変することができる。Casタンパク質は、DNA配列に結合してその発現または活性をモジュレートするために使用することができる。

## 【0019】

一部の実施形態では、CRISPR/Cas系は、リボ核酸タンパク質複合体を含む、クラス1またはクラス2の系構成成分を含むことができる。例えば、Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60: 385-397 (2015)を参照。クラス2 CRISPR/Cas系は、単一タンパク質エフェクターを有する。タイプII、VおよびVIのCasタンパク質は、「クラス2 Casヌクレアーゼ」と本明細書で呼ばれる、単一タンパク質のRNAによって誘導されるエンドヌクレアーゼであってよい。クラス2 Casヌクレアーゼには、例えば、Cas9、

C p f 1、C 2 c 1、C 2 c 2 および C 2 c 3 タンパク質が含まれる。C p f 1 タンパク質、Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015)、は C a s 9 に相同的であり、R u v C 様ヌクレアーゼドメインを含有する。Z e t s c h e の C p f 1 配列は、参照により完全に組み込まれる。例えば、Z e t s c h e の表 S 1 および S 3 を参照する。

#### 【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、C a s タンパク質は、タイプ I I の C R I S P R / C a s 系からのもの、すなわち、C R I S P R / C a s 9 系からの C a s 9 タンパク質、またはタイプ V の C R I S P R / C a s 系からのもの、例えば C p f 1 タンパク質であってもよい。一部の実施形態では、C a s タンパク質は、クラス 2 の C R I S P R / C a s 系からのもの、すなわち、C a s 9 タンパク質または C p f 1 タンパク質などの単一タンパク質 C a s ヌクレアーゼであってもよい。クラス 2 C a s ヌクレアーゼファミリーのタンパク質は、D N A エンドヌクレアーゼ活性を有する酵素であり、それらは、本明細書でさらに記載される適当なガイド R N A を設計することによって所望の核酸標的を切断するように誘導することができる。

10

#### 【 0 0 2 1 】

クラス 2 の C R I S P R / C a s 系構成成分は、タイプ I I A、タイプ I I B、タイプ I I C、タイプ V またはタイプ V I の系からのものであってよい。C a s 9 およびそのオルソログが包含される。C a s 9 タンパク質または他の構成成分が由来することができる非限定的な例示的な種には、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカス属の種 (*Streptococcus* sp.)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、リステリア・イノキュア (*Listeria innocua*)、ラクトバシラス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*)、フランキセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*)、ウォリネラ・スクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*)、ステレラ・ワズウォルテンシス (*Sutterella wadsworthensis*)、ガンマ・プロテオバクテリア (*Gamma proteobacterium*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、パスツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、フィプロバクター・スクシノゲン (*Fibrobacter succinogenes*)、ロドスピリillum・ルブラム (*Rhodospirillum rubrum*)、ノカルディオプシス・ダソンビレイ (*Nocardiopsis dassonvillei*)、ストレプトマイセス・プリステネスピラリス (*Streptomyces pristinaespiralis*)、ストレプトマイセス・ピリドクロモゲネス (*Streptomyces viridochromogenes*)、ストレプトマイセス・ピリドクロモゲネス (*Streptomyces viridochromogenes*)、ストレプトスポランギウム・ロゼウム (*Streptosporangium roseum*)、アリシクロバシラス・アシドカルダリウス (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、バシラス・シュードミコイデス (*Bacillus pseudomycoides*)、バシラス・セレニチレデュセン (*Bacillus selenitireducens*)、エキシグオバクテリウム・シビリカム (*Exiguobacterium sibiricum*)、デルブリュック乳酸杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバシラス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ブーフナー乳酸杆菌 (*Lactobacillus buchneri*)、トレポネーマ・デンチコーラ (*Treponema denticola*)、ミクロシラ・マリーナ (*Microscilla marina*)、ブルクホルデリアレス (*Burkholderiales*) 細菌、ポラロモナス・ナフタレニボランス (*Polaromonas naphthalenivorans*)、ポラロモナス属の種 (*Polaromonas* sp.)、クロコスフェラ・ワツウオニ (*Crocospaera watsonii*)、シアノテセ属の種 (*Cyanothece* sp.)、アオコ (*Microcystis aeruginosa*)、シネココッカス属の種 (*Synechococcus* sp.)、アセトハロビウム・アラバチウム (*Acetohalobium arabaticum*)、アンモニフェックス・デゲンシ (*Ammonifex degensii*)、カルディセルロシルプトー・ベクシ (*Caldicelulosiruptor beccsii*)、カンディダツス・デスルホルディス (*Candidatus Desulforudis*)、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*)、フィネゴールド・マグナ (*Finegoldia magna*)、ナトラネロビウス・サーモフィルス (*Natranaerobius thermophilus*)、ペロトマクラム・サーモプロピオニウム (*Pelotomaculum thermop*

20

30

40

50

ropionium)、アシディチオバシラス・カルダス (*Acidithiobacillus caldus*)、アシディチオバシラス・フェロオキシダンス (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、アロクロマチウム・ビノサム (*Allochromatium vinosum*)、マリノバクター属の種 (*Marinobacter* sp.)、ニトロソコッカス・ハロフィルス (*Nitrosococcus halophilus*)、ニトロソコッカス・ワツウオニ (*Nitrosococcus watsoni*)、シュードアルテロモナス・ハロプランクチス (*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、テドノバクター・ラセミフェル (*Ktedonobacter racemifer*)、メタノハロピウム・エベスチガタム (*Methanohalobium evestigatum*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、ノデュラリア・スプミゲナ (*Nodularia spumigena*)、ネンジュモ属の種 (*Nostoc* sp.)、アースロスピラ・マキシマ (*Arthrospira maxima*)、アースロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*)、アースロスピラ属の種 (*Arthrospira* sp.)、リングビア属の種 (*Lyngbya* sp.)、ミクロコレウス・クトノプラステス (*Microcoleus chthonoplastes*)、ユレモ属の種 (*Oscillatoria* sp.)、ペトロトガ・モビリス (*Petrotoga mobilis*)、サーモシフォ・アフリカヌス (*Thermosiphon africanus*)、ストレプトコッカス・パストリアヌス (*Streptococcus pasteurianus*)、ナイセリア・シネレア (*Neisseria cinerea*)、カンピロバクター・ラリ (*Campylobacter lari*)、パルビバキュラム・ラバメンチボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheria*) またはアカリオクロリス・マリーナ (*Acaryochloris marina*) が含まれる。一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来であってよい。一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 由来であってよい。一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来であってよい。さらなる実施形態では、C p f 1 タンパク質は、野兔病菌 (*Francisella tularensis*)、ラクノスピラセエ科 (*Lachnospiraceae*) 細菌、ブチリビブリオ・プロテオクラステイクス (*Butyrivibrio proteoclasticus*)、ペレグリニバクテリア (*Peregrinibacteria*) 細菌、パルクバクテリア (*Parcubacteria*) 細菌、スミテラ (*Smithella*)、アシドアミノコッカス属 (*Acidaminococcus*)、カンディダツス・メタノプラズマ・テルミタム (*Candidatus Methanoplasma termitum*)、ユーバクテリウム・エリゲンス (*Eubacterium eligens*)、モラクセラ・ボボクリ (*Moraxella bovoculi*)、レプトスピラ・イナダイ (*Leptospira inadai*)、ポルフィロモナス・クレビオリカニス (*Porphyromonas crevioricanis*)、プレボテラ・ディジエンス (*Prevotella disiens*) またはポルフィロモナス・マカケ (*Porphyromonas macacae*) 由来であってよい。ある特定の実施形態では、C p f 1 タンパク質は、アシドアミノコッカス属 (*Acidaminococcus*) またはラクノスピラセエ科 (*Lachnospiraceae*) 由来であってよい。

#### 【0022】

一部の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、C a s 9 または C p f 1 タンパク質などの少なくとも1つのR u v C 様ヌクレアーゼドメインを含むことができる。一部の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、1つより多いヌクレアーゼドメインを含むことができる。例えば、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、少なくとも1つのR u v C 様ヌクレアーゼドメインおよび少なくとも1つのH N H 様ヌクレアーゼドメインを含むことができる。一部の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、標的配列にD S Bを導入することが可能であってよい。一部の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、ただ1つの機能的ヌクレアーゼドメインを含有するように改変することができる。例えば、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、その核酸切断活性を低減するために、ヌクレアーゼドメインの1つが突然変異しているかまたは完全もしくは部分的に欠失しているように改変することができる。一部の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、機能的R u v C 様ヌクレアーゼドメインを含有しないように改変することができる。他の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアーゼ、例えばC a s 9 タンパク質は、機能的H N H 様ヌクレアーゼドメインを含有しないように改変することができる。ただ1つのヌクレアーゼドメインが機能的である一部の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアー

10

20

30

40

50



ゼは、一本鎖切断（「ニック」）を標的配列に導入することが可能であるニッカーゼであってよい。一部の実施形態では、クラス2 Casヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインの中の保存されたアミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減または変更するために置換される。一部の実施形態では、ヌクレアーゼドメインの突然変異は、DNA切断活性を不活性化することができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼドメインの突然変異は、クラス2 Casヌクレアーゼの1つのヌクレアーゼドメインを不活性化することができ、ニッカーゼをもたらす。一部の実施形態では、ニッカーゼは、RuvC様ヌクレアーゼドメインにアミノ酸置換を含むことができる。RuvC様ヌクレアーゼドメイン中の例示的なアミノ酸置換は、D10A（化膿連鎖球菌（*S. pyogenes*）Cas9タンパク質に基づく、例えば、UniProtKB - Q99ZW2（CAS9\_\_STRP1）を参照）を含む。さらなる例示的なアミノ酸置換には、D917A、E1006AおよびD1255A（フランキセラ・ノビシダ（*Francisella novicida*）U112Cpf1（FnCpf1）配列（UniProtKB - A0Q7Q2（CPF1\_\_FRATN）に基づく）が含まれる。一部の実施形態では、ニッカーゼは、HNH様ヌクレアーゼドメインにアミノ酸置換を含むことができる。HNH様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換には、E762A、H840A、N863A、H983AおよびD986A（化膿連鎖球菌（*S. pyogenes*）Cas9タンパク質に基づく）が含まれる。例示的な突然変異はヌクレアーゼドメイン中の保存された触媒性残基を変更し、そのドメインの核溶解活性を変更する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるヌクレアーゼ系は、ニッカーゼ、ならびに標的配列のセンスおよびアンチセンス鎖にそれぞれ相補的である一対のガイドRNAを含むことができる。ガイドRNAは、標的配列の対向する鎖にニックを生成すること（すなわち、二重ニックング）によってDSBを標的にして、それを導入するようにニッカーゼを誘導することができる。タンパク質の1つのドメインまたは領域が異なるタンパク質の一部と置き換えられる、キメラのクラス2 Casヌクレアーゼを使用することもできる。例えば、ヌクレアーゼドメインは、FokIなどの異なるヌクレアーゼからのドメインで置き換えることができる。ある特定の実施形態では、クラス2 Casヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を低減または排除するように改変することができる。それは、DNA配列に結合してその発現または活性をモジュレートするために使用することができる。

#### 【0023】

代替の実施形態では、Casタンパク質は、タイプIのCRISPR/Cas系のカスケード複合体の構成成分であってよい。例えば、Casタンパク質は、Cas3タンパク質であってよい。一部の実施形態では、Casタンパク質は、タイプIIのCRISPR/Cas系からのものであってよい。一部の実施形態では、Casタンパク質は、タイプIIIのCRISPR/Cas系からのものであってよい。一部の実施形態では、Casタンパク質は、タイプIVのCRISPR/Cas系からのものであってよい。一部の実施形態では、Casタンパク質は、タイプVのCRISPR/Cas系からのものであってよい。一部の実施形態では、Casタンパク質は、タイプVIのCRISPR/Cas系からのものであってよい。一部の実施形態では、Casタンパク質は、RNA切断活性を有することができる。

#### 【0024】

一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、少なくとも1つの異種タンパク質ドメインと融合することができる。少なくとも1つのタンパク質ドメインは、ヌクレアーゼのN末端、C末端、または内部の位置に位置することができる。一部の実施形態では、2つ以上の異種タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼの1つまたは複数の位置にある。

#### 【0025】

一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、細胞の核へのヌクレアーゼの輸送を促進することができる。例えば、タンパク質ドメインは、核局在化シグナル（NLS）であってよい。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、1～10個のNLS（複数可）と融合することができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、1～5個のNLS（複数可）と融合することができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、1つのNLSと融合する

10

20

30

40

50

ことができる。1つのNLSが使用される場合、NLSは、ヌクレアーゼのN末端またはC末端にあってよい。他の実施形態では、ヌクレアーゼは、1つより多いNLSと融合することができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、2、3、4または5個のNLSと融合することができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、2つのNLSと融合することができる。ある特定の状況では、2つのNLSは同じであってもよく（例えば、2つのSV40 NLS）、または異なってもよい。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、カルボキシ末端で2つのSV40 NLS配列と融合する。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは2つのNLSと融合することができ、1つはN末端に、1つはC末端にある。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、3つのNLSと融合することができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、NLSと融合しなくてもよい。一部の実施形態では、NLSは一連配列、例えばSV40 NLS、PKKKRKVまたはPKKKRRVであってよい。一部の実施形態では、NLSは二連配列、例えばヌクレオプラスミンのNLS、KRPAATKKAGQAKKKKであってよい。具体的な実施形態では、単一のPKKKRKVのNLSは、ヌクレアーゼのC末端にあってよい。

#### 【0026】

一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼの細胞内半減期を改変することが可能であってよい。一部の実施形態では、ヌクレアーゼの半減期を増加することができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼの半減期を低減することができる。一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼの安定性を増加することが可能であってよい。一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼの安定性を低減することが可能であってよい。一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、タンパク質分解のためのシグナルペプチドとして作用することができる。一部の実施形態では、タンパク質分解は、タンパク質分解酵素、例えばプロテアソーム、リソソームプロテアーゼまたはカルパインプロテアーゼが媒介することができる。一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、PEST配列を含むことができる。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、ユビキチンまたはポリユビキチン鎖の追加によって改変することができる。一部の実施形態では、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質（UBL）であってよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例には、小さいユビキチン様モディファイヤー（SUMO）、ユビキチン交差反応タンパク質（UCRP、インターフェロン刺激遺伝子15（ISG15）としても知られる）、ユビキチン関連モディファイヤー1（URM1）、神経細胞前駆体細胞によって発現される発達下方制御タンパク質8（NEDD8、出芽酵母（*S. cerevisiae*）のRub1とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原F関連（FAT10）、自己貪食-8（ATG8）および-12（ATG12）、Fauユビキチン様タンパク質（FUB1）、膜固定UBL（MUB）、ユビキチン折畳みモディファイヤー1（UFM1）、ならびにユビキチン様タンパク質5（UBL5）が含まれる。

#### 【0027】

一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、マーカードメインであってよい。マーカードメインの非限定的な例には、蛍光性タンパク質、精製タグ、エピトープタグおよびリポーター遺伝子配列が含まれる。一部の実施形態では、マーカードメインは、蛍光性タンパク質であってよい。適する蛍光性タンパク質の非限定的な例には、緑色蛍光性タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、モノマーAzami Green、CopeGFP、AceGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光性タンパク質（例えば、YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）、青色蛍光性タンパク質（例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）、シアン蛍光性タンパク質（例えば、ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan）、赤色蛍光性タンパク質（例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRedモノマー、HcRed-Tandem、HcRe

10

20

30

40

50

d 1、A s R e d 2、e q F P 6 1 1、m R a s b e r r y、m S t r a w b e r r y、J r e d)、およびオレンジ色蛍光性タンパク質(m O r a n g e、m K O、K u s a b i r a - O r a n g e、モノマーK u s a b i r a - O r a n g e、m T a n g e r i n e、t d T o m a t o)、または任意の他の適する蛍光性タンパク質が含まれる。他の実施形態では、マーカードメインは、精製タグおよび/またはエピトープタグであってよい。非限定的な例示的なタグには、グルタチオン-S-転移酵素(G S T)、キチン結合性タンパク質(C B P)、マルトース結合性タンパク質(M B P)、チオレドキシン(T R X)、ポリ(N A N P)、タンデム親和性精製(T A P)タグ、m y c、A c V 5、A U 1、A U 5、E、E C S、E 2、F L A G、H A、n u s、S o f t a g 1、S o f t a g 3、S t r e p、S B P、G l u - G l u、H S V、K T 3、S、S 1、T 7、V 5、V S V - G、6 x H i s、8 x H i s、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質(B C C P)、ポリH i sおよびカルモジュリンが含まれる。非限定的な例示的なリポーター遺伝子には、グルタチオン-S-転移酵素(G S T)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(H R P)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(C A T)、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼまたは蛍光性タンパク質が含まれる。

10

#### 【0028】

さらなる実施形態では、タンパク質ドメインは、特異的オルガネラ、細胞型、組織または器官をヌクレアーゼの標的にすることができる。一部の実施形態では、タンパク質ドメインは、ミトコンドリアをヌクレアーゼの標的にすることができる。

20

#### 【0029】

さらなる実施形態では、タンパク質ドメインは、エフェクタードメインであってよい。ヌクレアーゼがその標的配列に誘導されるとき、例えばC a s 9タンパク質がガイドRNAによって標的配列に誘導されるとき、エフェクタードメインは標的配列を改変するかまたは影響することができる。一部の実施形態では、エフェクタードメインは、核酸結合性ドメイン、ヌクレアーゼドメイン、後成的改変ドメイン、転写活性化ドメイン、メチル化ドメインまたは転写リプレッサードメインから選択することができる。ある特定の実施形態では、DNA改変ドメインは、メチル化ドメイン、例えば脱メチル化またはメチルトランスフェラーゼドメインである。ある特定の実施形態では、エフェクタードメインは、塩基編集ドメインなどのDNA改変ドメインである。特定の実施形態では、DNA改変ドメインは、デアミナーゼドメインなどの、特異的改変をDNAに導入する核酸編集ドメインである。国際出願番号国際公開第2015/089406号パンフレット；米国特許出願公開第2016/0304846号明細書を参照。国際出願番号国際公開第2015/089406号パンフレットおよび米国特許出願公開第2016/0304846号明細書に記載される核酸編集ドメイン、デアミナーゼドメイン、およびC a s 9変異体は、ここに参照により組み込まれる。

30

#### 【0030】

##### ガイドRNA

本開示の一部の実施形態では、L N P製剤のためのカーゴは、少なくとも1つのガイドRNAを含む。ガイドRNAは標的核酸分子の上の標的配列にクラス2 C a sヌクレアーゼを誘導することができ、ここで、ガイドRNAは標的配列とハイブリダイズし、C a sヌクレアーゼはそれを切断またはモジュレートする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、クラス2ヌクレアーゼに結合し、それによる切断の特異性を提供する。一部の実施形態では、ガイドRNAおよびC a sタンパク質は、リボ核タンパク質(R N P)、例えば、C R I S P R / C a s複合体を形成することができる。一部の実施形態では、C R I S P R複合体は、タイプI IのC R I S P R / C a s 9複合体であってよい。一部の実施形態では、C R I S P R / C a s複合体は、C p f 1 / ガイドRNA複合体などの、タイプVのC R I S P R / C a s複合体であってよい。一部の実施形態では、C a sヌクレアーゼは、単一タンパク質C a sヌクレアーゼ、例えばC a s 9タンパク質またはC p f 1タンパク質であってよい。一部の実施形態では、ガイドRNAは、C a s 9タンパク質に

40

50

よる切断を標的化する。

【0031】

C R I S P R / C a s 9ヌクレアーゼ系のためのガイドRNAは、C R I S P R R N A ( c r R N A ) および t r a c r R N A ( t r a c r ) を含む。一部の実施形態では、c r R N A は、標的核酸分子の上の標的配列に相補性であり、それとハイブリダイズする標的化配列を含むことができる。c r R N A は、t r a c r R N A の一部に相補性であり、それとハイブリダイズするフラッグポールを含むこともできる。一部の実施形態では、c r R N A は、細菌のC R I S P R 遺伝子座から転写される天然に存在するc r R N A の構造に対応することができ、ここで、標的化配列はC R I S P R / C a s 9系のスペーサーとして作用し、フラッグポールは、C R I S P R 遺伝子座の上のスペーサーに隣接する反復配列の一部に対応する。

10

【0032】

ガイドRNAは、c r R N A の標的化配列を通して、目的の任意の配列を標的にすることができる。一部の実施形態では、ガイドRNAの標的化配列と標的核酸分子の上の標的配列の間の相補性の程度は、約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%であってよい。一部の実施形態では、ガイドRNAの標的化配列および標的核酸分子の上の標的配列は、100%補足性であってよい。他の実施形態では、ガイドRNAの標的化配列および標的核酸分子の上の標的配列は、少なくとも1つのミスマッチを含むことができる。例えば、ガイドRNAの標的化配列および標的核酸分子の上の標的配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のミスマッチを含むことができる。一部の実施形態では、ガイドRNAの標的化配列および標的核酸分子の上の標的配列は、1～6個のミスマッチを含むことができる。一部の実施形態では、ガイドRNAの標的化配列および標的核酸分子の上の標的配列は、5個または6個のミスマッチを含むことができる。

20

【0033】

標的化配列の長さは、使用するC R I S P R / C a s 系および構成成分に依存してもよい。例えば、異なる細菌種からの異なるC a s タンパク質は、様々な最適な標的化配列長を有する。したがって、標的化配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50個、または50個より多いヌクレオチドの長さを含むことができる。一部の実施形態では、標的化配列は、18～24ヌクレオチドの長さを含むことができる。一部の実施形態では、標的化配列は、19～21ヌクレオチドの長さを含むことができる。一部の実施形態では、標的化配列は、20ヌクレオチドの長さを含むことができる。

30

【0034】

フラッグポールは、機能的C R I S P R / C a s 複合体の形成を促進するのに十分な相補性をt r a c r R N A と有する、任意の配列を含むことができる。一部の実施形態では、フラッグポールは、同じC R I S P R / C a s 系のt r a c r R N A に相補性である天然に存在するc r R N A の配列(「タグ」または「ハンドル」とも呼ばれる)の全体または一部を含むことができる。一部の実施形態では、フラッグポールは、天然に存在するC R I S P R / C a s 系からの反復配列の全体または一部を含むことができる。一部の実施形態では、フラッグポールは、ランケーションまたは改変されたタグまたはハンドル配列を含むことができる。一部の実施形態では、t r a c r R N A と2つの配列のうちの短い方の長さに沿ってt r a c r R N A とハイブリダイズするフラッグポールの部分の間の相補性の程度は、約40%、50%、60%、70%、80%以上であってよいが、100%より低い。一部の実施形態では、t r a c r R N A およびt r a c r R N A とハイブリダイズするフラッグポールの部分は、2つの配列のうちの短い方の長さに沿って100%相補性でなく、その理由は、t r a c r の上の1つまたは複数の隆起構造の存在および/またはt r a c r とフラッグポールとの間の揺らぎ塩基対形成のためである。フラッグポールの長さは、使用するC R I S P R / C a s 系またはt r a c r R N A に

40

50

依存してもよい。例えば、フラッグポールは10～50ヌクレオチド、または50を超えるヌクレオチドの長さを含むことができる。一部の実施形態では、フラッグポールは、15～40ヌクレオチドの長さを含むことができる。他の実施形態では、フラッグポールは、20～30ヌクレオチドの長さを含むことができる。さらに他の実施形態では、フラッグポールは、22ヌクレオチドの長さを含むことができる。例えば二重のガイドRNAが使用される場合、フラッグポールの長さは上限を有さなくてもよい。

#### 【0035】

一部の実施形態では、tracrRNAは、天然に存在するCRISPR/Cas系からの野生型tracrRNA配列の全体または一部を含むことができる。一部の実施形態では、tracrRNAは、野生型tracrRNAのトランシェーションまたは改変された変異体を含むことができる。tracrRNAの長さは、使用するCRISPR/Cas系に依存してもよい。一部の実施形態では、tracrRNAは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100より多いヌクレオチドの長さを含むことができる。ある特定の実施形態では、tracrRNAは少なくとも26ヌクレオチドの長さである。さらなる実施形態では、tracrRNAは少なくとも40ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、tracrRNAはある特定の二次構造、例えば、1つまたは複数のヘアピンもしくはステム-ループ構造、または1つまたは複数の隆起構造を含むことができる。

#### 【0036】

一部の実施形態では、ガイドRNAは2つのRNA分子を含むことができ、「二重ガイドRNA」または「dgRNA」と本明細書で呼ばれる。一部の実施形態では、dgRNAは、crRNAを含む第1のRNA分子、およびtracrRNAを含む第2のRNA分子を含むことができる。第1および第2のRNA分子は、crRNAの上のフラッグポールとtracrRNAの間の塩基対形成を通してRNA二重鎖を形成することができる。

#### 【0037】

さらなる実施形態では、ガイドRNAは単一のRNA分子を含むことができ、「単一ガイドRNA」または「sgRNA」と本明細書で呼ばれる。一部の実施形態では、sgRNAは、tracrRNAに共有結合しているcrRNAを含むことができる。一部の実施形態では、crRNAおよびtracrRNAは、リンカーを通して共有結合することができる。一部の実施形態では、単一分子ガイドRNAは、crRNAの上のフラッグポールとtracrRNAの間の塩基対形成を通してステム-ループ構造を含むことができる。一部の実施形態では、sgRNAは、Cas9タンパク質によるRNA誘導DNA切断を媒介することが可能な「Cas9 sgRNA」である。一部の実施形態では、sgRNAは、Cpf1タンパク質によるRNA誘導DNA切断を媒介することが可能な「Cpf1 sgRNA」である。ある特定の実施形態では、ガイドRNAは、Cas9タンパク質と活性複合体を形成して、RNA誘導DNA切断を媒介するのに十分なcrRNAおよびtracrRNAを含む。ある特定の実施形態では、ガイドRNAは、Cpf1タンパク質と活性複合体を形成して、RNA誘導DNA切断を媒介するのに十分なcrRNAを含む。Zetsche 2015を参照する。

#### 【0038】

本発明のある特定の実施形態は、本明細書に記載されるガイドRNAをコードする核酸、例えば、発現カセットも提供する。「ガイドRNA核酸」は、本明細書において、ガイドRNA（例えば、sgRNAまたはdgRNA）、および1つまたは複数のガイドRNAをコードする核酸であるガイドRNA発現カセットを指すために使用される。

#### 【0039】

一部の実施形態では、核酸は、DNA分子であってよい。一部の実施形態では、核酸は、crRNAをコードするヌクレオチド配列を含むことができる。一部の実施形態では、crRNAをコードするヌクレオチド配列は、天然に存在するCRISPR/Cas系が

10

20

30

40

50

らの反復配列の全体または一部が隣接した標的化配列を含む。一部の実施形態では、核酸は、*tracrRNA*をコードするヌクレオチド配列を含むことができる。一部の実施形態では、*crRNA*および*tracrRNA*は、2つの別個の核酸によってコードされてもよい。他の実施形態では、*crRNA*および*tracrRNA*は、単一の核酸によってコードされてもよい。一部の実施形態では、*crRNA*および*tracrRNA*は、単一の核酸の対向する鎖によってコードされてもよい。他の実施形態では、*crRNA*および*tracrRNA*は、単一の核酸の同じ鎖によってコードされてもよい。一部の実施形態では、発現カセットは、*sgRNA*をコードする。一部の実施形態では、発現カセットは、*Cas9*ヌクレアーゼ*sgRNA*をコードする。一部の実施形態では、発現カセットは、*Cpf1*ヌクレアーゼ*sgRNA*をコードする。

10

#### 【0040】

ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つの転写または調節制御配列、例えばプロモーター、3' UTRまたは5' UTRに作動可能に連結することができる。一例では、プロモーターは、*tRNA*プロモーター、例えば、*tRNA<sup>Lys</sup>*または*tRNA*キメラであってよい。Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9; Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35: 2620-2628を参照。ある特定の実施形態では、プロモーターは、RNAポリメラーゼIII (*Pol III*) が認識することができる。*Pol III* プロモーターの非限定的な例には、U6およびH1プロモーターも含まれる。一部の実施形態では、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのU6プロモーターに作動可能に連結することができる。一部の実施形態では、発現カセットは、改変された核酸である。ある特定の実施形態では、発現カセットは、改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、発現カセットの組み込みを安定化および阻止するために、発現カセットは、5' 末端の改変、例えば改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、発現カセットは、各鎖の上に5' 末端改変を有する二本鎖DNAを含む。ある特定の実施形態では、発現カセットは、5' 末端改変として反転したジデオキシ-Tまたは反転した無塩基のヌクレオシドもしくはヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、発現カセットは、ビオチン、デスチオビオテン-TEG、ジゴキシゲニン、ならびに、例えばFAM、ROX、TAMRAおよびAlexaFluorを含む蛍光性マーカーなどの標識を含む。

20

#### 【0041】

ある特定の実施形態では、1つより多いガイドRNAをCRISPR/Casヌクレアーゼ系で 사용할 ことができる。CRISPR/Cas系が1つより多い標的配列を切断するように、各ガイドRNAは異なる標的化配列を含有することができる。一部の実施形態では、1つまたは複数のガイドRNAは、CRISPR/Cas複合体の中に、活性または安定性などの同じまたは異なる特性を有することができる。1つより多いガイドRNAを使用する場合、各ガイドRNAは同じまたは異なる発現カセットにコードされてもよい。1つより多いガイドRNAの発現を促進するために使用されるプロモーターは、同じであっても異なってもよい。

30

#### 【0042】

##### 化学改変されたRNA

40

ガイドRNAまたはmRNAに、改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチドが存在してもよい。1つまたは複数の改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むmRNAをコードするガイドRNAまたはCasヌクレアーゼは、正規のA、G、CおよびU残基の代わりまたはそれに加えて使用される、1つまたは複数の天然に存在しないおよび/または天然に存在する構成成分または構成の存在を記載するために、「改変された」RNAと呼ばれる。一部の実施形態では、改変されたRNAは、「改変された」とここで呼ばれる、非正規のヌクレオシドまたはヌクレオチドで合成される。改変されたヌクレオシドおよびヌクレオチドは、以下の1つまたは複数を含むことができる：(i) 非連結リン酸酸素の1つまたは両方および/またはホスホジエステル骨格連結中の連結リン酸酸素の1つまたは複数の変更、例えば交換(例示的な骨格改変)；(ii) リボース糖の構成成分、

50

例えば、リボース糖の上の 2' ヒドロキシルの変更、例えば交換（例示的な糖改変）；（i i i）「デホスホ」リンカーによるリン酸部分の大幅な交換（例示的な骨格改変）；（i v）非正規核酸塩基によるものを含む、天然に存在する核酸塩基の改変または交換（例示的な塩基改変）；（v）リボース-リン酸骨格の交換または改変（例示的な骨格改変）；（v i）オリゴヌクレオチドの 3' 末端または 5' 末端の改変、例えば、末端リン酸基の除去、改変もしくは交換、または部分、キャップもしくはリンカーのコンジュゲーション（そのような 3' または 5' キャップ改変は、糖および/または骨格の改変を含むことができる）；ならびに（v i i）糖の改変または交換（例示的な糖改変）。

#### 【0043】

2、3、4 またはそれより多くの改変を有することができるヌクレオシドおよびヌクレオチド（一括して「残基」）を含む改変された RNA を提供するために、上記の改変を組み合わせることができる。例えば、改変された残基は、改変された糖および改変された核酸塩基を有することができる。一部の実施形態では、g RNA のあらゆる塩基が改変される、例えば、全ての塩基はホスホロチオエート基などの改変されたリン酸基を有する。ある特定の実施形態では、s g RNA 分子のリン酸基の全てまたは実質的に全ては、ホスホロチオエート基で置き換えられる。一部の実施形態では、改変された RNA は、RNA の 5' 末端にまたはその近くに少なくとも 1 つの改変された残基を含む。一部の実施形態では、改変された RNA は、RNA の 3' 末端にまたはその近くに少なくとも 1 つの改変された残基を含む。

#### 【0044】

ある特定の実施形態では、改変された残基をガイド RNA に組み込むことができる。ある特定の実施形態では、改変された残基を mRNA に組み込むことができる。一部の実施形態では、ガイド RNA は、1、2、3 またはそれより多くの改変された残基を含む。一部の実施形態では、ガイド RNA は、ガイド RNA の 5' および 3' 末端の各々に、1、2、3 またはそれより多くの改変された残基を含む。一部の実施形態では、mRNA は、5、10、15、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 またはそれより多い改変された残基を含む。一部の実施形態では、改変されたガイド RNA または mRNA の位置のうちの少なくとも 5%（例えば、少なくとも約 5%、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95% または約 100%）は、改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

#### 【0045】

未改変の核酸は、例えば細胞性ヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。例えば、ヌクレアーゼは、核酸ホスホジエステル結合を加水分解することができる。したがって、一態様では、本明細書に記載されるガイド RNA は、例えばヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1 つまたは複数の改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含有することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される mRNA は、例えばヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1 つまたは複数の改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含有することができる。一部の実施形態では、i n v i v o および e x v i v o の両方で、本明細書に記載される改変された RNA 分子は細胞の集団に導入されるとき自然免疫応答の低減を示すことができる。用語「自然免疫応答」は、一本鎖核酸を含む外因性核酸への細胞性応答を含み、それは、サイトカイン、特にインターフェロンの発現および放出、ならびに細胞死の誘導を含む。

#### 【0046】

骨格改変の一部の実施形態では、改変された残基のリン酸基は、酸素の 1 つまたは複数異なる置換基で置き換えることによって改変することができる。さらに、改変された残基、例えば改変された核酸に存在する改変された残基は、本明細書に記載される改変され

たリン酸基による未改変のリン酸部分の大幅な交換を含むことができる。一部の実施形態では、リン酸骨格の骨格改変は、非荷電リンカーまたは非対称電荷分布の荷電リンカーをもたらす変更を含むことができる。

#### 【0047】

改変されたリン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネートおよびホストリエステルが含まれる。未改変のリン酸基中のリン原子は、アキラル性である。しかし、上記の原子または原子群の1つによる非架橋酸素の1つの交換は、リン原子をキラルにすることができる。立体原性リン原子は、「R」配置（本明細書ではRp）または「S」配置（本明細書ではSp）を有することができる。骨格は、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）および炭素（架橋メチレンホスホネート）による架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の交換によって改変することもできる。交換は、連結酸素のいずれかで、または連結酸素の両方で起こることができる。

#### 【0048】

リン酸基は、ある特定の骨格改変における非リン含有コネクタによって置き換えることができる。一部の実施形態では、荷電リン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることができる部分の例には、限定されずに、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリナー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾおよびメチレンオキシメチルイミノを含めることができる。

#### 【0049】

リン酸リンカーおよびリボース糖がヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチド代用物によって置き換えられている、核酸を模倣することができる足場を構築することもできる。そのような改変は、骨格および糖改変を含むことができる。一部の実施形態では、核酸塩基は代用骨格によって連結することができる。例には、限定されずに、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジンおよびペプチド核酸（PNA）ヌクレオシド代用物を含めることができる。

#### 【0050】

改変されたヌクレオシドおよび改変されたヌクレオチドは、糖基への1つまたは複数の改変、すなわち糖改変を含むことができる。例えば、2'ヒドロキシル基（OH）は、いくつかの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で改変すること、例えば、置き換えることができる。一部の実施形態では、ヒドロキシルを脱プロトン化して2'-アルコキシドイオンを形成することがもはやできないので、2'ヒドロキシル基への改変は、核酸の安定性を強化することができる。

#### 【0051】

2'ヒドロキシル基改変の例には、アルコキシまたはアリールオキシ（OR、「R」は、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラキル、ヘテロアリールまたは糖であってよい）；ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ を含めることができ、ここで、Rは、例えばH、または任意選択で置換されたアルキルであってよく、nは、0から20までの整数（例えば、0から4、0から8、0から10、0から16、1から4、1から8、1から10、1から16、1から20、2から4、2から8、2から10、2から16、2から20、4から8、4から10、4から16および4から20）であってよい。一部の実施形態では、2'ヒドロキシル基改変は、2'-O-Meであってよい。一部の実施形態では、2'ヒドロキシル基改変は、2'-フルオロ改変であってよく、それは2'ヒドロキシル基をフッ化物で置き換える。一部の実施形態では、2'ヒドロキシル基改変は、「ロック」核酸（LNA）を含むことができ、ここで、2'ヒドロキシルは、例えばC<sub>1-6</sub>アルキレンまたはC<sub>1-6</sub>ヘテロアルキレン架橋によつ

10

20

30

40

50



て、同じリボース糖の 4' 炭素に接続することができ、例示的な架橋には、メチレン、プロピレン、エーテルまたはアミノ架橋；O-アミノ（アミノは、例えば、 $\text{NH}_2$ ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであってよい）、およびアミノアルコキシ、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n$ -アミノ（アミノは、例えば、 $\text{NH}_2$ ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノまたはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミンまたはポリアミノであってよい）を含めることができる。一部の実施形態では、2' ヒドロキシル基改変は、リボース環が C 2' - C 3' 結合を欠いている「未ロック」核酸（UNA）を含むことができる。一部の実施形態では、2' ヒドロキシル基改変は、メトキシエチル基（MOE）、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)$ 、例えば、PEG 誘導体）を含むことができる。

10

#### 【0052】

「デオキシ」2' 改変は、水素（すなわち、例えば部分的 dsRNA のオーバーハング部分にあるデオキシリボース糖）；ハロ（例えば、ブromo、クロロ、フルオロまたはヨード）；アミノ（アミノは、例えば、 $-\text{NH}_2$ 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノまたはアミノ酸であってよい）； $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -アミノ（アミノは、例えば、本明細書に記載されるものであってよい）、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ （R は、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラキル、ヘテロアリールまたは糖であってよい）、シアノ；メルカプト；アルキル-チオ-アルキル；チオアルコキシ；ならびに、例えば本明細書に記載されるアミノにより任意選択で置換されてもよい、アルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルを含むことができる。

20

#### 【0053】

糖改変は、糖基を含むことができ、それは、リボースの対応する炭素のそれと反対の立体化学的配置を有する 1 つまたは複数の炭素を含有することもできる。したがって、改変された核酸は、糖として例えばアラビノースを含有するヌクレオチドを含むことができる。改変された核酸は、無塩基糖を含むこともできる。これらの無塩基糖は、構成成分糖原子の 1 つまたは複数においてさらに改変されてもよい。改変された核酸は、L 形の 1 つまたは複数の糖、例えば L-ヌクレオチドを含むこともできる。

30

#### 【0054】

改変された核酸に組み込むことができる、本明細書に記載される改変されたヌクレオチドおよび改変されたヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる改変された塩基を含むことができる。核酸塩基の例には、限定されずに、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）およびウラシル（U）が含まれる。これらの核酸塩基は改変するかまたは全面的に置き換えて、改変された核酸に組み込むことができる改変された残基を提供することができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、プリン、ピリミジン、プリン類似体またはピリミジン類似体から独立して選択することができる。一部の実施形態では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然に存在するおよび合成の誘導体を含むことができる。

#### 【0055】

二重ガイド RNA を用いる実施形態では、crRNA および tracrRNA の各々は、改変を含むことができる。そのような改変は、crRNA および / または tracrRNA の一方または両方の末端にあってもよい。sgRNA を含む実施形態では、sgRNA の一方または両方の末端の 1 つまたは複数の残基が化学改変されてもよい、または、全体の sgRNA が化学改変されてもよい。ある特定の実施形態は、5' 末端の改変を含む。ある特定の実施形態は、3' 末端の改変を含む。ある特定の実施形態では、ガイド RNA 分子の一本鎖オーバーハング中のヌクレオチドの 1 つまたは複数、または全ては、デオキシヌクレオチドである。改変された mRNA は、5' 末端および / または 3' 末端の改変を含むことができる。

40

#### 【0056】

50

### 鋳型核酸

本明細書に開示される製剤は、鋳型核酸を含むことができる。C a sヌクレアーゼのための標的部位において、またはその近くで核酸配列を変更または挿入するために、鋳型を使用することができる。

#### 【0057】

一部の実施形態では、鋳型は相同組換えにおいて使用することができる。一部の実施形態では、相同組換えは、標的核酸分子への鋳型配列または鋳型配列の一部の組み込みをもたらすことができる。一部の実施形態では、単一の鋳型を提供することができる。他の実施形態では、相同組換えが2つ以上の標的部位で起こるように、2つ以上の鋳型を提供することができる。例えば、細胞中の単一の遺伝子または細胞中の2つの異なる遺伝子を修復するために、異なる鋳型を提供することができる。一部の実施形態では、少なくとも1つの鋳型の複数のコピーが細胞に提供される。一部の実施形態では、独立したコピー数または独立した量で異なる鋳型を提供することができる。

10

#### 【0058】

他の実施形態では、鋳型は、核酸の切断部位におけるDNA鎖侵入を含む、相同性誘導修復において使用することができる。一部の実施形態では、相同性誘導修復は、編集された標的核酸分子への鋳型配列の組入れをもたらすことができる。一部の実施形態では、単一の鋳型を提供することができる。他の実施形態では、相同性誘導修復によって、異なる配列を有する2つ以上の鋳型を2つ以上の部位において使用することができる。例えば、細胞中の単一の遺伝子または細胞中の2つの異なる遺伝子を修復するために、異なる鋳型を提供することができる。一部の実施形態では、少なくとも1つの鋳型の複数のコピーが細胞に提供される。一部の実施形態では、独立したコピー数または独立した量で異なる鋳型を提供することができる。

20

#### 【0059】

さらに他の実施形態では、非相同的末端連結によって媒介される遺伝子編集において鋳型を使用することができる。一部の実施形態では、鋳型配列は、切断部位の近くの核酸配列と類似性を有しない。一部の実施形態では、鋳型または鋳型配列の一部が組み込まれる。一部の実施形態では、単一の鋳型を提供することができる。他の実施形態では、非相同的末端連結によって、異なる配列を有する2つ以上の鋳型を2つ以上の部位に挿入することができる。例えば、細胞に単一の鋳型を、または細胞に2つの異なる鋳型を挿入するために、異なる鋳型を提供することができる。一部の実施形態では、独立したコピー数で異なる鋳型を提供することができる。一部の実施形態では、鋳型は、隣接した逆方向末端反復(I T R)配列を含む。

30

#### 【0060】

一部の実施形態では、鋳型配列は、標的細胞の内因性配列に対応することができる。本明細書で用いるように、用語「内因性配列」は、細胞に固有の配列を指す。用語「外因性配列」は、細胞に固有でない配列、または細胞のゲノム中のその固有の位置が異なる位置にある配列を指す。一部の実施形態では、内因性配列は、細胞のゲノム配列であってよい。一部の実施形態では、内因性配列は、染色体のまたは染色体外の配列であってよい。一部の実施形態では、内因性配列は、細胞のプラスミド配列であってよい。一部の実施形態では、鋳型配列は、切断部位のまたはその近くの細胞中の内因性配列の一部と実質的に同一であってよいが、少なくとも1つのヌクレオチド変化を含むことができる。一部の実施形態では、切断された標的核酸分子の鋳型による修復は、標的核酸分子の1つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失または置換を含む突然変異をもたらすことができる。一部の実施形態では、突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の、1つまたは複数のアミノ酸変化をもたらすことができる。一部の実施形態では、突然変異は、標的遺伝子から発現されるRNA中の、1つまたは複数のヌクレオチド変化をもたらすことができる。一部の実施形態では、突然変異は、標的遺伝子の発現レベルを変更することができる。一部の実施形態では、突然変異は、標的遺伝子の発現の増加または減少をもたらすことができる。一部の実施形態では、突然変異は、遺伝子ノックダウンをもたらすこ

40

50

とができる。一部の実施形態では、突然変異は、遺伝子ノックアウトをもたらすことができる。一部の実施形態では、突然変異は、遺伝子機能の回復をもたらすことができる。一部の実施形態では、切断された標的核酸分子の鋳型による修復は、標的遺伝子のエクソン配列、イントロン配列、調節配列、転写制御配列、翻訳制御配列、スプライシング部位または非コード配列に変化をもたらすことができる。

#### 【0061】

他の実施形態では、鋳型配列は、外因性配列を含むことができる。一部の実施形態では、外因性配列は、外因性プロモーター配列に作動可能に連結されるタンパク質またはRNAコード配列を含むことができ、そのため、標的核酸分子への外因性配列の組み込みにより、組み込まれた配列によってコードされるタンパク質またはRNAを細胞が発現することが可能である。他の実施形態では、標的核酸分子への外因性配列の組み込みにより、組み込まれた配列の発現は、内因性のプロモーター配列によって調節することができる。一部の実施形態では、外因性配列は、染色体のまたは染色体外の配列であってよい。一部の実施形態では、外因性配列は、タンパク質またはタンパク質の一部をコードするcDNA配列を提供することができる。さらに他の実施形態では、外因性配列は、エクソン配列、イントロン配列、調節配列、転写制御配列、翻訳制御配列、スプライシング部位または非コード配列を含むことができる。一部の実施形態では、外因性配列の組み込みは、遺伝子機能の回復をもたらすことができる。一部の実施形態では、外因性配列の組み込みは、遺伝子ノックインをもたらすことができる。一部の実施形態では、外因性配列の組み込みは、遺伝子ノックアウトをもたらすことができる。

#### 【0062】

鋳型は、任意の適する長さであってよい。一部の実施形態では、鋳型は、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000またはそれより多くのヌクレオチドの長さを含むことができる。鋳型は、一本鎖核酸であってよい。鋳型は、二本鎖または部分的に二本鎖の核酸であってよい。ある特定の実施形態では、一本鎖の鋳型は、長さが20、30、40、50、75、100、125、150、175または200ヌクレオチドである。一部の実施形態では、鋳型は、標的配列を含む標的核酸分子の一部に相補性であるヌクレオチド配列（すなわち、「相同性の腕」）を含むことができる。一部の実施形態では、鋳型は、標的核酸分子の上の切断部位の上流または下流に位置する配列に相補性である、相同性の腕を含むことができる。一部の実施形態では、鋳型は、切断部位の上流および下流に位置する配列にそれぞれ相補性である、第1の相同性の腕および第2の相同性の腕（第1および第2のヌクレオチド配列とも呼ばれる）を含むことができる。鋳型が2つの相同性の腕を含む場合、各腕は同じ長さまたは異なる長さであってもよく、相同性の腕の間の配列は、相同性の腕の間の標的配列に実質的に類似するかもしくは同一であってよく、または、それは完全に無関係であってもよい。一部の実施形態では、鋳型の上の第1のヌクレオチド配列と切断部位の上流の配列の間、および鋳型の上の第2のヌクレオチド配列と切断部位の下流の配列の間の相補性の程度は、鋳型と標的核酸分子の間で相同組換え、例えば高忠実度相同組換えを許すことができる。一部の実施形態では、相補性の程度は、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%であってよい。一部の実施形態では、相補性の程度は、約95%、97%、98%、99%または100%であってよい。一部の実施形態では、相補性の程度は、少なくとも98%、99%または100%であってよい。一部の実施形態では、相補性の程度は、100%であってよい。

#### 【0063】

一部の実施形態では、鋳型は、隣接した逆方向末端反復（ITR）配列を含む、ssDNAまたはdsDNAを含む。一部の実施形態では、鋳型は、プラスミド、ミニサークル、ナノサークルまたはPCR生成物として供給される。

#### 【0064】

10

20

30

40

50

## 核酸の精製

一部の実施形態では、核酸は精製される。一部の実施形態では、核酸は、沈殿法（例えば、L i C l 沈殿、アルコール沈殿、または、例えば本明細書に記載される同等の方法）を使用して精製される。一部の実施形態では、核酸は、クロマトグラフィーをベースとした方法、例えばH P L Cをベースとした方法または同等の方法（例えば、本明細書に記載されるもの）を使用して精製される。一部の実施形態では、核酸は、沈殿法（例えば、L i C l 沈殿）およびH P L Cをベースとした方法の両方を使用して精製される。

### 【0065】

#### 標的配列

一部の実施形態では、本開示のC R I S P R / C a s 系は、標的核酸分子の上の標的配列に誘導し、それを切断することができる。例えば、標的配列は、C a s ヌクレアーゼが認識して、切断することができる。一部の実施形態では、クラス2 C a s ヌクレアーゼは、標的核酸分子の標的配列にガイドR N A が誘導することができ、ここで、ガイドR N A は標的配列とハイブリダイズし、C a s タンパク質がそれを切断する。一部の実施形態では、ガイドR N A はそのコグネイトP A M を含む標的配列とハイブリダイズし、C a s タンパク質がそれを切断する。一部の実施形態では、標的配列は、ガイドR N A の標的化配列に相補性であってよい。一部の実施形態では、ガイドR N A の標的化配列とガイドR N A にハイブリダイズする対応標的配列の一部の間の相補性の程度は、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%であってよい。一部の実施形態では、標的の相同性領域は、コグネイトP A M 配列に隣接している。一部の実施形態では、標的配列は、ガイドR N A の標的化配列に100%相補性である配列を含むことができる。他の実施形態では、標的配列は、ガイドR N A の標的化配列と比較して、少なくとも1つのミスマッチ、欠失または挿入を含むことができる。例えば、標的配列およびガイドR N A の標的化配列は、任意選択でP A M に隣接した標的配列の一部において、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のミスマッチを含有することができる。一部の実施形態では、標的配列およびガイドR N A の標的化配列は、1～9個のミスマッチを含有することができる。一部の実施形態では、標的配列およびガイドR N A の標的化配列は、3～6個のミスマッチを含有することができる。一部の実施形態では、標的配列およびガイドR N A の標的化配列は、5または6個のミスマッチを含有することができる。

### 【0066】

標的配列の長さは、使用するヌクレアーゼ系に依存してもよい。例えば、C R I S P R / C a s 系のためのガイドR N A の標的化配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50個、または50個より多いヌクレオチドの長さを含むことができ、標的配列は対応する長さであり、任意選択でP A M 配列に隣接している。一部の実施形態では、標的配列は、15～24ヌクレオチドの長さを含むことができる。一部の実施形態では、標的配列は、17～21ヌクレオチドの長さを含むことができる。一部の実施形態では、標的配列は、20ヌクレオチドの長さを含むことができる。ニッカーゼが使用される場合は、標的配列は、D N A 分子の対向する鎖を切断する一対のニッカーゼによって認識される一対の標的配列を含むことができる。一部の実施形態では、標的配列は、D N A 分子の同じ鎖を切断する一対のニッカーゼによって認識される一対の標的配列を含むことができる。一部の実施形態では、標的配列は、1つまたは複数のC a s ヌクレアーゼによって認識される標的配列の部分を含むことができる。

### 【0067】

標的核酸分子は、細胞にとって内因性または外因性である任意のD N A またはR N A 分子であってよい。一部の実施形態では、標的核酸分子は、細胞からのまたは細胞中の、エピソームD N A、プラスミド、ゲノムD N A、ウイルスゲノム、ミトコンドリアD N A または染色体であってよい。一部の実施形態では、標的核酸分子の標的配列は、細胞からのまたは細胞中のゲノム配列であってよい。他の実施形態では、細胞は、哺乳動物の細胞で

あってよい。一部の実施形態では、細胞は、齧歯動物の細胞であってよい。一部の実施形態では、細胞は、ヒトの細胞であってよい。一部の実施形態では、細胞は、肝臓細胞であってよい。ある特定の実施形態では、細胞は、ヒトの肝臓細胞であってよい。一部の実施形態では、肝臓細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、肝細胞はヒト肝細胞である。一部の実施形態では、肝臓細胞は、幹細胞である。一部の実施形態では、ヒト肝細胞は、肝臓の洞様内皮細胞 (LSEC) であってよい。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、クッパー細胞であってよい。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、肝臓の星状細胞であってよい。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、腫瘍細胞であってよい。さらなる実施形態では、細胞は、ApoE 結合性受容体を含む。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、肝臓の幹細胞であってよい。例えば、Wang, et al. Nature, 2015 ; Font-Burgada, et al. Cell, 2015, 162:766-799を参照する。

10

#### 【0068】

さらなる実施形態では、標的配列は、ウイルスの配列であってよい。さらなる実施形態では、標的配列は、病原体の配列であってよい。さらに他の実施形態では、標的配列は、合成された配列であってよい。さらなる実施形態では、標的配列は、染色体の配列であってよい。ある特定の実施形態では、標的配列は、転座接合部、例えば、がんに関連した転座を含み得る。一部の実施形態では、標的配列は、ヒト染色体などの真核生物の染色体の上にあり得る。ある特定の実施形態では、標的配列は、肝臓細胞で発現されるという点で、肝臓特異的配列である。

#### 【0069】

20

一部の実施形態では、標的配列は、遺伝子のコード配列、遺伝子のイントロン配列、調節配列、遺伝子の転写制御配列、遺伝子の翻訳制御配列、スプライシング部位または遺伝子の間の非コード配列に位置することができる。一部の実施形態では、遺伝子は、タンパク質コード遺伝子であってよい。他の実施形態では、遺伝子は、非コードRNA遺伝子であってよい。一部の実施形態では、標的配列は、疾患関連遺伝子の全体または一部を含むことができる。ある特定の場場合には、遺伝子は肝臓で発現される。

#### 【0070】

一部の実施形態では、標的配列は、足場部位または遺伝子座制御領域などの、クロマチン組織の態様を制御するゲノム中の非遺伝子機能部位に位置することができる。

#### 【0071】

30

クラス2 CasヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼを含む実施形態では、標的配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ (「PAM」) に隣接することができる。一部の実施形態では、PAMは、標的配列の3'末端に隣接するか、またはそれから1、2、3または4ヌクレオチド以内であってよい。PAMの長さおよび配列は、使用されるCasタンパク質に依存することができる。例えば、PAMは、その各々の関連する開示は参照により本明細書に組み込まれる、Ran et al., Nature, 520: 186-191 (2015)の図1およびZetsche 2015の図S5に開示されるものを含む、特異的Cas9タンパク質またはCas9オルソログのためのコンセンサスまたは特定のPAM配列から選択することができる。一部の実施形態では、PAMは、長さが2、3、4、5、6、7、8、9または10ヌクレオチドであってよい。非限定的な例示的なPAM配列には、NGG、NGGNG、NG、NAAAAAN、NNAAAAW、NNNNACA、GNNNCNNA、TTNおよびNNNNGATT (ここで、Nは任意のヌクレオチドと規定され、WはAまたはTと規定される) が含まれる。一部の実施形態では、PAM配列は、NGGであってよい。一部の実施形態では、PAM配列は、NGGNGであってよい。一部の実施形態では、PAM配列は、TTNであってよい。一部の実施形態では、PAM配列は、NNAAAAWであってよい。

40

#### 【0072】

##### 脂質製剤

CRISPR/CasカーゴのためのLNP製剤の様々な実施形態が、本明細書に開示される。そのようなLNP製剤は、ヘルパー脂質、中性脂質およびステルス脂質に加えて

50

、ＣＣＤ脂質を含むことができる。「脂質ナノ粒子」は、分子間力によって物理的に互いに関係する複数の（すなわち、１つより多い）脂質分子を含む粒子を意味する。ＬＮＰは、例えば、マイクロスフェア（一部の実施形態では実質的に球状であり、より特定の実施形態では、水性のコアを含むことができる、例えばＲＮＡ分子の相当部分を含む、単層および多層の小胞、例えば、「リボソーム」-ラメラ相脂質二重層を含む）、乳剤中の分散相、ミセルまたは懸濁液中の内相であってよい。乳剤、ミセルおよび懸濁液は、ローカルなおよび／または局所の送達のために適する組成物であってよい。

#### 【００７３】

本明細書で提供されるＬＮＰ組成物は、肝臓細胞（例えば、肝細胞）によって優先的に取り込まれる。さらに、ＬＮＰ組成物は、それらが治療の有効用量で*in vivo*において細胞傷害性レベルまで蓄積しないという点で、生分解性である。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、治療的用量レベルにおいて、相当な有害効果につながる自然免疫応答を引き起こさない。一部の実施形態では、本明細書で提供されるＬＮＰ組成物は、治療的用量レベルで毒性を引き起こさない。ＬＮＰ組成物は、血液中のアポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）などのアポリポタンパク質に特異的に結合する。アポリポタンパク質は、脂質輸送の調節における鍵である、血漿中を循環するタンパク質である。ＡｐｏＥは、リポタンパク質の取り込みの間に肝臓で細胞表面硫酸ヘパリンプロテオグリカンと相互作用する、アポリポタンパク質の１つのクラスを表す。（例えば、Scherphof and Kamps, The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. Prog Lipid Res. 2001 May;40(3):149-66を参照）。

#### 【００７４】

##### ＣＣＤ脂質

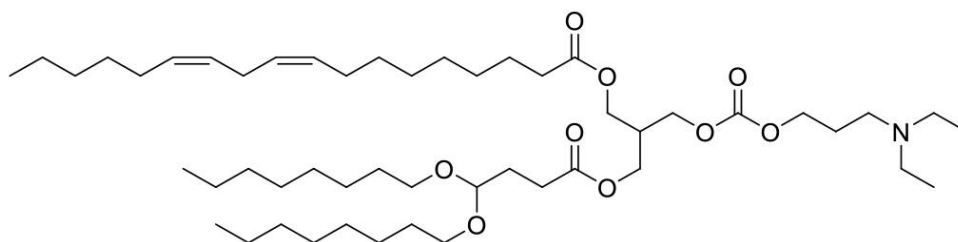
生物学的活性薬剤の送達のための脂質組成物は、肝臓細胞または器官を優先的に標的にするように調整することができる。ある特定の実施形態では、脂質組成物は、アポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）結合性細胞、例えばＡｐｏＥ受容体を発現する細胞を優先的に標的にする。肝臓細胞へのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡ構成成分の送達のための脂質組成物は、ＣＣＤ脂質を含む。

#### 【００７５】

一部の実施形態では、ＣＣＤ脂質はリピドＡであり、それは（９Ｚ，１２Ｚ）-３-（（４，４-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-２-（（（（３-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-９，１２-ジエノエートであり、別名、３-（（４，４-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-２-（（（（３-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）-オクタデカ-９，１２-ジエノエートとも呼ばれる。リピドＡは、以下のように表すことができる：

#### 【００７６】

##### 【化１】



#### 【００７７】

リピドＡは、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット（例えば、８４～８６頁）により合成することができる。

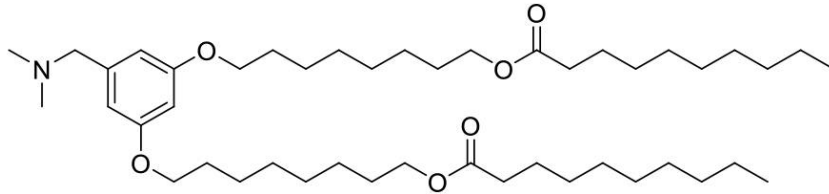
#### 【００７８】

一部の実施形態では、ＣＣＤ脂質はリピドＢであり、それは（（５-（（ジメチルアミ

ノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(デカノエート)であり、別名、((5-((ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(デカノエート)とも呼ばれる。リピドBは、以下のように表すことができる：

【0079】

【化2】



10

【0080】

リピドBは、国際公開第2014/136086号パンフレット(例えば、107~09頁)により合成することができる。

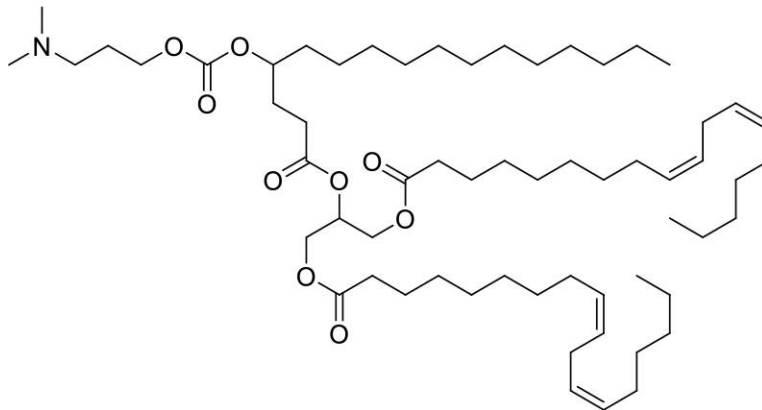
【0081】

一部の実施形態では、CCD脂質はリピドCであり、それは2-((4-((3-((ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)ヘキサデカノイル)オキシ)プロパン-1,3-ジイル(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-ビス(オクタデカ-9,12-ジエノエート)である。リピドCは、以下のように表すことができる：

20

【0082】

【化3】



30

【0083】

一部の実施形態では、CCD脂質はリピドDであり、それは、3-((3-((ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)-1,3-((オクタノイルオキシ)トリデシル3-オクチルウンデカノエート)である。

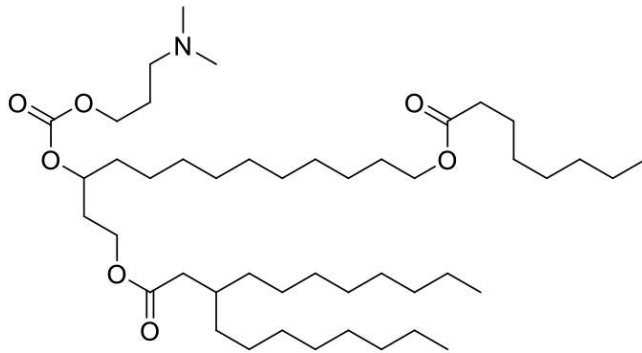
40

【0084】

リピドDは、以下のように表すことができる：

【0085】

## 【化 4】



10

## 【 0 0 8 6 】

リピドCおよびリピドDは、国際公開第2015/095340号パンフレットにより合成することができる。

## 【 0 0 8 7 】

CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDの同等物であってもよい。ある特定の実施形態では、CCD脂質は、リピドAの同等物またはリピドBの同等物である。

## 【 0 0 8 8 】

本明細書に記載されるLNPで使用するのに適するCCD脂質は、*in vivo*で生分解性である。CCD脂質は、低毒性である（例えば、10mg/kg以上の量において動物モデルで耐容性を示し、有害作用もない）。ある特定の実施形態では、CCD脂質を含むLNPには、CCD脂質の少なくとも75%が8、10、12、24もしくは48時間以内に、または3、4、5、6、7もしくは10日以内に血漿から消去されるものが含まれる。ある特定の実施形態では、CCD脂質を含むLNPには、mRNAまたはガイドRNAの少なくとも50%が8、10、12、24もしくは48時間以内に、または3、4、5、6、7もしくは10日以内に血漿から消去されるものが含まれる。ある特定の実施形態では、CCD脂質を含むLNPには、例えば、脂質（例えばCCD脂質）、RNA（例えばmRNA）またはタンパク質成分を測定することによって、LNPの少なくとも50%が8、10、12、24もしくは48時間以内に、または3、4、5、6、7もしくは10日以内に血漿から消去されるものが含まれる。ある特定の実施形態では、脂質封入対LNPの遊離脂質、RNAまたはタンパク質成分が測定される。

20

30

## 【 0 0 8 9 】

脂質クリアランスは、文献に記載されている通りに測定することができる。Maier, M.A., et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. Mol. Ther. 2013, 21(8), 1570-78 ("Maier")を参照。例えば、Maierでは、ルシフェラーゼ標的化siRNAを含有するLNP-siRNA系を、側方の尾静脈を通した静脈内ボラス注射によって0.3mg/kgで6～8週齢の雄C57BL/6マウスに投与した。投与の0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、96および168時間後に、血液、肝臓および脾臓試料を収集した。血漿を得るために組織収集および血液試料を処理する前に、マウスを食塩水で灌流した。全ての試料は、LC-MSによって処理し、分析した。さらに、LNP-siRNA製剤の投与の後に毒性を評価するための手順を、Maierは記載する。例えば、ルシフェラーゼ標的化siRNAを、5mL/kgの投与量で単一の静脈内ボラス注射によって、0、1、3、5および10mg/kgで雄SDラット（5動物/群）に投与した。24時間後に、意識のある動物の頸静脈から約1mLの血液を得、血清を単離した。投与の72時間後に、全ての動物を検死のために安楽死させた。臨床徴候、体重、血清化学、器官重量および組織病理学の評価を実行した。MaierはsiRNA-LNP製剤の評価方法を記載するが、これらの方法は、本開示の製剤の投与のクリアラ

40

50



ンス、薬物動態および毒性を評価するために適用することができる。

#### 【 0 0 9 0 】

ＣＣＤ脂質は、クリアランス速度の上昇につながる。一部の実施形態では、クリアランス速度は、脂質クリアランス速度、例えばＣＣＤ脂質が血液、血清または血漿から消去される速度である。一部の実施形態では、クリアランス速度は、ＲＮＡクリアランス速度、例えばｍＲＮＡまたはガイドＲＮＡが血液、血清または血漿から消去される速度である。一部の実施形態では、クリアランス速度は、ＬＮＰが血液、血清または血漿から消去される速度である。一部の実施形態では、クリアランス速度は、ＬＮＰが肝臓組織または脾臓組織などの組織から消去される速度である。ある特定の実施形態では、クリアランス速度の高い速度は、相当な有害作用のない安全性プロファイルにつながる。ＣＣＤ脂質は、循環および組織中のＬＮＰ蓄積を低減する。一部の実施形態では、循環および組織中のＬＮＰ蓄積の低減は、相当な有害作用のない安全性プロファイルにつながる。

10

#### 【 0 0 9 1 】

本開示のＣＣＤ脂質は、それらがその中にある媒体のｐＨによってイオン化可能である。例えば、わずかに酸性の媒体中では、ＣＣＤ脂質はプロトン化が可能であり、したがって、陽電荷を有する。反対に、わずかに塩基性の媒体中では、例えばｐＨが概ね７．３５である血液の中では、ＣＣＤ脂質はプロトン化することができず、したがって、無電荷である。一部の実施形態では、本開示のＣＣＤ脂質は、少なくとも約９のｐＨでプロトン化することができる。一部の実施形態では、本開示のＣＣＤ脂質は、少なくとも約９のｐＨでプロトン化することができる。一部の実施形態では、本開示のＣＣＤ脂質は、少なくとも約１０のｐＨでプロトン化することができる。

20

#### 【 0 0 9 2 】

電荷を持つためのＣＣＤ脂質の能力は、その固有のｐＫ<sub>a</sub>に関係している。例えば、本開示のＣＣＤ脂質の各々は、約５．８から約６．２の範囲内のｐＫ<sub>a</sub>を独立して有することができる。約５．１から約７．４の範囲内のｐＫ<sub>a</sub>を有するカチオン性脂質が肝臓へのカーゴの送達のために有効であることが見出されたので、これは有利である可能性がある。さらに、約５．３から約６．４の範囲内のｐＫ<sub>a</sub>を有するカチオン性脂質は、腫瘍への送達のために有効であることが見出された。例えば、国際公開第２０１４／１３６０８６号パンフレットを参照。

#### 【 0 0 9 3 】

##### さらなる脂質

本開示の脂質組成物での使用に適する「中性脂質」には、例えば、様々な中性、非荷電または双性イオン性の脂質が含まれる。本開示で使用するのに適する中性リン脂質の例には、限定されずに、５－ヘプタデシルベンゼン－１，３－ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ホスファチジルコリン（ＰＬＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＡＰＣ）、ホスファチジリエタノールアミン（ＰＥ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－ミリストイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＭＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイルホスファチジルコリン（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイルホスファチジルコリン（ＰＳＰＣ）、１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＢＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＳＰＰＣ）、１，２－ジェイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、リゾホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジリエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジリエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ジミリストイルホスファチジリエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジリエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジリエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、リゾホスフ

30

40

50

ァチジルエタノールアミンおよびその組合せが含まれる。一実施形態では、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) およびジミリス Toil ホスファチジルエタノールアミン (DMPE) からなる群から選択することができる。別の実施形態では、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) であってよい。中性脂質は、LNP の処理を安定化し、向上させる働きをする。

【0094】

「ヘルパー脂質」は、トランスフェクション (例えば、生物学的活性薬剤を含むナノ粒子のトランスフェクション) を増強する脂質である。ヘルパー脂質がトランスフェクションを増強する機構は、粒子安定性を増強することを含む。ある特定の実施形態では、ヘルパー脂質は、膜融合誘導を強化する。ヘルパー脂質は、ステロイド、ステロールおよびアルキルレゾルシノールを含む。本開示で使用するのに適するヘルパー脂質には、限定されずに、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノールおよびコレステロールヘミスクシネートが含まれる。一実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールであってよい。一実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールヘミスクシネートであってよい。

【0095】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子が *in vivo* に (例えば、血液中に) 存在することができる時間の長さを変更する脂質である。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減し、粒径を制御することによって、製剤工程で支援することができる。本明細書で用いられるステルス脂質は、LNP の薬物動態学的特性をモジュレートすることができる。本開示の脂質組成物での使用に適するステルス脂質には、限定されずに、脂質部分に連結した親水性の頭基を有するステルス脂質が含まれる。本開示の脂質組成物での使用に適するステルス脂質、およびそのような脂質の生化学に関する情報は、Romberg et al., *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 1, 2008, pg. 55-71 および Hoekstra et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52 に見出すことができる。さらなる適する PEG 脂質は、例えば、国際公開第 2006/007712 号パンフレットに開示される。

【0096】

一実施形態では、ステルス脂質の親水性頭基は、PEG (時にはポリ (エチレンオキシド) と呼ばれる)、ポリ (オキサゾリン)、ポリ (ビニルアルコール)、ポリ (グリセロール)、ポリ (N-ビニルピロリドン)、ポリアミノ酸およびポリ [N- (2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド] に基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含む。

【0097】

ステルス脂質は、脂質部分を含むことができる。一部の実施形態では、ステルス脂質の脂質部分は、約 C 4 から約 C 40 の飽和または不飽和炭素原子を独立して含むアルキル鎖長を有する、ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基を含むものを含む、ジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドに由来することができ、ここで、鎖は 1 つまたは複数の官能基、例えばアミドまたはエステルを含むことができる。ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基は、1 つまたは複数の置換されたアルキル基をさらに含むことができる。

【0098】

別途指示がない限り、本明細書で用いる用語「PEG」は、任意のポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。一実施形態では、PEG は、エチレングリコールまたはエチレンオキシドの任意選択で置換された線状または分枝状のポリマーである。一実施形態では、PEG は未置換である。一実施形態では、PEG は、例えば、1 つまたは複数のアルキル、アルコキシ、アシル、ヒドロキシまたはアリアル基によって置換される。一実施形態では、この用語は、PEG-ポリウレタンまたは PEG-ポリプロピレンなどの PEG コポリマーを含む (例えば、J. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992) を参照) ; 別の実施形態では、この用語は PEG コポリマーを含まない。一実施形態では、PEG は、約 130 から約 50,000、下位実施形態では約 150 から約 30,000、下位実施形態では約 150 から約 20,000、下位実施形態では約 150 から約 15

10

20

30

40

50

、000、下位実施形態では約150から約10,000、下位実施形態では約150から約6,000、下位実施形態では約150から約5,000、下位実施形態では約150から約4,000、下位実施形態では約150から約3,000、下位実施形態では約300から約3,000、下位実施形態では約1,000から約3,000、下位実施形態では約1,500から約2,500の分子量を有する。

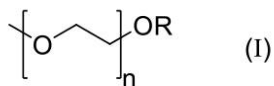
【0099】

ある特定の実施形態では、PEG（例えば、ステルス脂質などの、脂質にコンジュゲートした）は、約2,000ダルトンの平均分子量を有する、「PEG2000」とも呼ばれる「PEG-2K」である。PEG-2Kは、本明細書で以下の式（I）によって表され、式中、nは45であり、数平均重合度が約45サブユニットを含むことを意味する

10

【0100】

【化5】



。しかし、例えば、数平均重合度が約23サブユニット（ $n = 23$ ）および/または68サブユニット（ $n = 68$ ）を含む、当技術分野で公知である他のPEG実施形態を使用することができる。一部の実施形態では、nは約30から約60の範囲内であってよい。一部の実施形態では、nは約35から約55の範囲内であってよい。一部の実施形態では、nは約40から約50の範囲内であってよい。一部の実施形態では、nは約42から約48の範囲内であってよい。一部の実施形態では、nは45であってよい。一部の実施形態では、Rは、H、置換されたアルキルおよび未置換のアルキルから選択することができる。一部の実施形態では、Rは、未置換のアルキルであってよい。一部の実施形態では、Rは、メチルであってよい。

20

【0101】

本明細書に記載される実施形態のいずれでも、ステルス脂質は、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリストイルグリセロール（PEG-DMG）（NOF、Tokyo、Japanからのカタログ#GM-020）、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール（PEG-DSPE）（NOF、Tokyo、Japanからのカタログ#DSPE-020CN）、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、およびPEG-ジステアロイルグリカミド、PEG-コレステロール（1-[8'-(コレスタ-5-エン-3[ベータ]-オキシ)カルボキシアミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)、PEG-DMB（3,4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)エーテル）、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]（PEG2k-DMG）（Avanti Polar Lipids、Alabaster、Alabama、USAからのカタログ#880150P）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]（PEG2k-DSPE）（Avanti Polar Lipids、Alabaster、Alabama、USAからのカタログ#880120C）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（PEG2k-DSG; GS-020、NOF Tokyo、Japan）、ポリ(エチレングリコール)-2000-ジメタクリレート（PEG2k-DMA）および1,2-ジステアリルオキシプロピル-3-アミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000]（PEG2k-DSA）から選択することができる。一実施形態では、ステルス脂質は、PEG2k-DMGであってよい。一部の実施形態では、ステルス脂質は、PEG2k-DSGであってよい。一実施形態では、ステルス脂質は、PEG2k-DSPEであってよい。一実施形態では、ステルス脂

30

40

50

質は、PEG 2 k - DMAであってよい。一実施形態では、ステルス脂質は、PEG 2 k - DSAであってよい。一実施形態では、ステルス脂質は、PEG 2 k - C 1 1であってよい。一部の実施形態では、ステルス脂質は、PEG 2 k - C 1 4であってよい。一部の実施形態では、ステルス脂質は、PEG 2 k - C 1 6であってよい。一部の実施形態では、ステルス脂質は、PEG 2 k - C 1 8であってよい。

#### 【0102】

##### LNP製剤

LNPは、(i)封入のためおよびエンドソーム逃避のためにCCD脂質を、(ii)安定化のために中性脂質を、(iii)同じく安定化のためにヘルパー脂質を、ならびに(iv)ステルス脂質を含有することができる。

10

#### 【0103】

ある特定の実施形態では、カーゴは、Cas 9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNA、およびガイドRNAまたはガイドRNAをコードする核酸を含む。一実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、例えばリピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDを含むことができる。一部の態様では、CCD脂質は、リピドAである。一部の態様では、CCD脂質は、リピドBである。様々な実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、中性脂質、ヘルパー脂質およびステルス脂質を含む。ある特定の実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態では、中性脂質は、DSPCである。具体的な実施形態では、ステルス脂質は、PEG 2 k - DMGである。一部の実施形態では、LNP組成物は、リピドA、ヘルパー脂質、中性脂質およびステルス脂質を含むことができる。一部の実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、DSPC、コレステロールおよびステルス脂質を含む。一部の実施形態では、LNP組成物は、PEGを含むステルス脂質を含む。ある特定の実施形態では、CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDから選択される。さらなる実施形態では、LNP組成物は、リピドAまたはリピドB、コレステロール、DSPCおよびPEG 2 k - DMGから選択されるCCD脂質を含む。

20

#### 【0104】

一実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質およびCasヌクレアーゼをコードするmRNAを含むことができる。一実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよび少なくとも1つの他の脂質成分を含むことができる。CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む一部の組成物では、LNPは、ヘルパー脂質、中性脂質またはステルス脂質から選択される少なくとも1つの他の脂質成分を含む。CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含むある特定の組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む他の組成物では、中性脂質は、DSPCである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含むさらなる実施形態では、ステルス脂質は、PEG 2 k - DMGである。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質およびCasヌクレアーゼをコードするmRNAを含むことができる。CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む具体的な組成物では、CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDから選択される。CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含むさらなる組成物では、CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDから選択され、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はDSPCであり、ステルス脂質はPEG 2 k - DMGである。一部の実施形態では、CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む組成物中のCCD脂質は、リピドAである。一部の実施形態では、CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む組成物中のCCD脂質は、リピドBである。一部の実施形態では、CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む組成物中のCCD脂質は、リピドCである。一部の実施形態では、CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含む組成物中のCCD脂質は、リピドDである。

30

40

#### 【0105】

一実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質およびクラス2 Casヌクレアーゼm

50

R N Aを含むことができる。一実施形態では、L N P組成物は、C C D脂質、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aおよび少なくとも1つの他の脂質成分を含むことができる。クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含む一部の組成物では、L N Pは、ヘルパー脂質、中性脂質またはステルス脂質から選択される少なくとも1つの他の脂質成分を含む。クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含むある特定の組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含む他の組成物では、中性脂質は、D S P Cである。クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含むさらなる実施形態では、ステルス脂質は、P E G 2 k - D M Gである。ある特定の実施形態では、L N P組成物は、C C D脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質およびクラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含むことができる。クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含む具体的な組成物では、C C D脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDから選択される。クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含むさらなる組成物では、C C D脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDから選択され、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はD S P Cであり、ステルス脂質はP E G 2 k - D M Gである。一部の実施形態では、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含む組成物中のC C D脂質は、リピドAである。一部の実施形態では、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含む組成物中のC C D脂質は、リピドBである。一部の実施形態では、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含む組成物中のC C D脂質は、リピドCである。一部の実施形態では、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N Aを含む組成物中のC C D脂質は、リピドDである。

#### 【0106】

一部の実施形態では、L N P組成物は、ガイドR N Aを含むことができる。ある特定の実施形態では、L N P組成物は、C C D脂質、ガイドR N A、ヘルパー脂質、中性脂質およびステルス脂質を含むことができる。ガイドR N Aを含むある特定のL N P組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。ガイドR N Aを含む他の組成物では、中性脂質は、D S P Cである。ガイドR N Aを含むさらなる実施形態では、ステルス脂質は、P E G 2 k - D M GまたはP E G 2 k - C 1 1である。ある特定の実施形態では、L N P組成物は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドD；ヘルパー脂質；中性脂質；ステルス脂質；およびガイドR N Aを含む。ガイドR N Aを含むある特定の組成物では、C C D脂質は、リピドAである。ガイドR N Aを含むある特定の組成物では、C C D脂質は、リピドBである。ガイドR N Aを含むある特定の組成物では、C C D脂質は、リピドCである。ガイドR N Aを含むある特定の組成物では、C C D脂質は、リピドDである。ガイドR N Aを含むさらなる組成物では、C C D脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はD S P Cであり、ステルス脂質はP E G 2 k - D M Gである。

#### 【0107】

ある特定の実施形態では、L N P製剤は、約25：1から約1：25の範囲内の、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N A対g R N A核酸の比を含む。ある特定の実施形態では、L N P製剤は、約10：1から約1：10の範囲内の、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N A対g R N A核酸の比を含む。本明細書で測定されるように、比は重量による。一部の実施形態では、L N P製剤は、約5：1から約1：5の範囲内の、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N A対g R N A核酸の比を含む。一部の実施形態では、L N P製剤は、約1：1のクラス2 C a sヌクレアーゼm R N A対g R N A核酸の比を含む。一部の実施形態では、L N P製剤は、約1：1から約1：5の、クラス2 C a sヌクレアーゼm R N A対g R N A核酸の比を含む。一部の実施形態では、L N P製剤は、約10：1のクラス2 C a sヌクレアーゼm R N A対g R N A核酸の比を含む。比は、約25：1、10：1、5：1、3：1、1：1、1：3、1：5、1：10または1：25であってよい。

#### 【0108】

一実施形態では、LNP組成物は、sgRNAを含むことができる。一実施形態では、LNP組成物は、Cas9 sgRNAを含むことができる。一実施形態では、LNP組成物は、Cpf1 sgRNAを含むことができる。sgRNAを含む一部の組成物では、LNPは、CCD脂質、ヘルパー脂質、中性脂質およびステルス脂質を含む。sgRNAを含むある特定の組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。sgRNAを含む他の組成物では、中性脂質は、DSPCである。sgRNAを含むさらなる実施形態では、ステルス脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質およびsgRNAを含むことができる。sgRNAを含む具体的な組成物では、CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDである。sgRNAを含むさらなる組成物では、CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はDSPCであり、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。

10

#### 【0109】

ある特定の実施形態では、LNP組成物は、CasヌクレアーゼをコードするmRNA、およびsgRNAであってよいガイドRNAを含む。一実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、CasヌクレアーゼをコードするmRNA、ガイドRNA、ヘルパー脂質、中性脂質およびステルス脂質を含むことができる。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびガイドRNAを含むある特定の組成物では、ヘルパー脂質はコレステロールである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびガイドRNAを含む一部の組成物では、中性脂質はDSPCである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびガイドRNAを含むさらなる実施形態では、ステルス脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、CCD脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質、CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびガイドRNAを含むことができる。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびガイドRNAを含む具体的な組成物では、CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびガイドRNAを含むさらなる組成物では、CCD脂質は、リピドA、リピドB、リピドCまたはリピドDであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はDSPCであり、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。

20

30

#### 【0110】

本明細書に開示されるLNP組成物は、鋳型核酸を含むことができる。鋳型核酸は、クラス2 CasヌクレアーゼmRNAなどのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと一緒に共製剤化することができる。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ガイドRNAと一緒に共製剤化することができる。一部の実施形態では、鋳型核酸は、CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびガイドRNAの両方と一緒に共製剤化することができる。一部の実施形態では、鋳型核酸は、CasヌクレアーゼをコードするmRNAまたはガイドRNAと別々に製剤化することができる。そのような製剤では、所望の修復機構によって、鋳型核酸は一本鎖であっても、二本鎖であってもよい。鋳型は、標的DNAに、または標的DNAに隣接した配列に相同性である領域を有することができる。

40

#### 【0111】

本開示の実施形態は、製剤中の構成成分脂質のそれぞれのモル比により記載される脂質組成物も提供する。一実施形態では、CCD脂質のモル%は、約30モル%から約60モル%であってよい。一実施形態では、CCD脂質のモル%は、約35モル%から約55モル%であってよい。一実施形態では、CCD脂質のモル%は、約40モル%から約50モル%であってよい。一実施形態では、CCD脂質のモル%は、約42モル%から約47モル%であってよい。一実施形態では、CCD脂質のモル%は、約45%であってよい。一部の実施形態では、LNPパッチのCCD脂質モル%は、標的モル%の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ または $\pm 2.5\%$ になる。ある特定の実施形態では、LNPロット間変動は、15%未満、10%未満または5%未満になる。

50

## 【0112】

一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約30モル%から約60モル%であってよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約35モル%から約55モル%であってよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約40モル%から約50モル%であってよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約41モル%から約46モル%であってよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約44モル%であってよい。一部の実施形態では、LNPバッチのヘルパーモル%は、標的モル%の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ または $\pm 2.5\%$ になる。ある特定の実施形態では、LNPロット間変動は、15%未満、10%未満または5%未満になる。

## 【0113】

一実施形態では、中性脂質のモル%は、約1モル%から約20モル%であってよい。一実施形態では、中性脂質のモル%は、約5モル%から約15モル%であってよい。一実施形態では、中性脂質のモル%は、約7モル%から約12モル%であってよい。一実施形態では、中性脂質のモル%は、約9モル%であってよい。一部の実施形態では、LNPバッチの中性脂質モル%は、標的モル%の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ または $\pm 2.5\%$ になる。ある特定の実施形態では、LNPロット間変動は、15%未満、10%未満または5%未満になる。

## 【0114】

一実施形態では、ステルス脂質のモル%は、約1モル%から約10モル%であってよい。一実施形態では、ステルス脂質のモル%は、約1モル%から約5モル%であってよい。一実施形態では、ステルス脂質のモル%は、約1モル%から約3モル%であってよい。一実施形態では、ステルス脂質のモル%は、約2モル%であってよい。一実施形態では、ステルス脂質のモル%は、約1モル%であってよい。一部の実施形態では、LNPバッチのステルス脂質モル%は、標的モル%の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ または $\pm 2.5\%$ になる。ある特定の実施形態では、LNPロット間変動は、15%未満、10%未満または5%未満になる。

## 【0115】

本開示の実施形態は、CCD脂質の正電荷のアミン基(N)と封入される核酸の負電荷のリン酸基(P)の間の比によって記載される脂質組成物も提供する。これは、式N/Pによって数学的に表すことができる。一実施形態では、N/P比は、約0.5から約100であってよい。一実施形態では、N/P比は、約1から約50であってよい。一実施形態では、N/P比は、約1から約25であってよい。一実施形態では、N/P比は、約1から約10であってよい。一実施形態では、N/P比は、約1から約7であってよい。一実施形態では、N/P比は、約3から約5であってよい。一実施形態では、N/P比は、約4から約5であってよい。一実施形態では、N/P比は、約4であってよい。一実施形態では、N/P比は、約4.5であってよい。一実施形態では、N/P比は、約5であってよい。

## 【0116】

一部の実施形態では、LNPは、水性RNA溶液を有機溶媒ベースの脂質溶液、例えば100%エタノールと混合することによって形成される。適する溶液または溶媒には、水、PBS、トリス緩衝液、NaCl、クエン酸緩衝液、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールが含まれる、または含有されていてもよい。例えばLNPの*in vivo*投与のための、薬学的に許容される緩衝液を使用することができる。ある特定の実施形態では、緩衝液は、LNPを含む組成物のpHをpH7.0以上に維持するために使用される。さらなる実施形態では、組成物は、約7.3から約7.7の範囲内、または約7.4から約7.6の範囲内のpHを有する。さらなる実施形態では、組成物は、約7.3、7.4、7.5、7.6または7.7のpHを有する。組成物のpHは、マイクロpHプローブで測定することができる。ある特定の実施形態では、凍結保護物質が組成物に含まれる。凍結保護物質の非限定的な例には、スクロース、トレハロース、グリセロール、DMSOおよびエチ

10

20

30

40

50

レングリコールが含まれる。例示的な組成物は、最高 10 % の凍結保護物質、例えばスクロースを含むことができる。ある特定の実施形態では、LNP 組成物は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 % の凍結保護物質を含むことができる。ある特定の実施形態では、LNP 組成物は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 % のスクロースを含むことができる。一部の実施形態では、LNP 組成物は、緩衝液を含むことができる。一部の実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝液 (PBS)、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液およびそれらの混合物を含むことができる。ある特定の例示的な実施形態では、緩衝液は NaCl を含む。NaCl の例示的な量は、約 40 mM から約 50 mM の範囲内であってよい。一部の実施形態では、NaCl の量は、約 45 mM である。一部の実施形態では、緩衝液は、トリス緩衝液である。トリスの例示的な量は、約 40 mM から約 60 mM の範囲内であってよい。一部の実施形態では、トリスの量は、約 50 mM である。一部の実施形態では、緩衝液は、NaCl およびトリスを含む。LNP 組成物のある特定の例示的な実施形態は、トリス緩衝液中に 5 % のスクロースおよび 45 mM の NaCl を含有する。他の例示的な実施形態では、組成物は、約 5 w/v % の量のスクロース、約 45 mM の NaCl および約 50 mM のトリスを含有する。全体の製剤のオスモル濃度が維持されるように、塩、緩衝液および凍結保護物質の量を変更することができる。例えば、最終オスモル濃度は、450 mOsm/L 未満に維持することができる。さらなる実施形態では、オスモル濃度は、350 から 250 mOsm/L の間である。ある特定の実施形態は、 $300 \pm 20$  mOsm/L の最終オスモル濃度を有する。

#### 【0117】

一部の実施形態では、微流動混合、T 混合または交差混合が使用される。ある特定の態様では、流速、接合部サイズ、接合部幾何構造、接合部形状、チューブ直径、溶液および/または RNA および脂質濃度を変更することができる。LNP または LNP 組成物は、例えば透析またはクロマトグラフィーを通して、濃縮することまたは精製することができる。LNP は、例えば、懸濁液、乳剤または凍結乾燥粉末として保存することができる。一部の実施形態では、LNP 組成物は 2 ~ 8 で保存され、ある特定の態様では、LNP 組成物は室温で保存される。さらなる実施形態では、LNP 組成物は、例えば -20 または -80 で冷凍保存される。他の実施形態では、LNP 組成物は、約 0 から約 -80 の範囲内の温度で保存される。冷凍 LNP 組成物は、使用時に例えば氷上で、室温で、または 25 で解凍することができる。

#### 【0118】

本開示の LNP の多分散指数 (「*pdi*」) およびサイズを特徴付けるために、動的光散乱 (「*DLS*」) を使用することができる。DLS は、試料を光源にさらすことから生じる、光の散乱を測定する。DLS 測定から判定される PDI は、集団における粒径 (平均粒径あたり) の分布を表し、完全に均一な集団はゼロの PDI を有する。一部の実施形態では、*pdi* は、約 0.005 から約 0.75 の範囲内であってよい。一部の実施形態では、*pdi* は、約 0.01 から約 0.5 の範囲内であってよい。一部の実施形態では、*pdi* は、約 0.02 から約 0.4 の範囲内であってよい。一部の実施形態では、*pdi* は、約 0.03 から約 0.35 の範囲内であってよい。一部の実施形態では、*pdi* は、約 0.1 から約 0.35 の範囲内であってよい。

#### 【0119】

本明細書に開示される LNP は、約 1 から約 250 nm のサイズを有する。一部の実施形態では、LNP は、約 10 から約 200 nm のサイズを有する。さらなる実施形態では、LNP は、約 20 から約 150 nm のサイズを有する。一部の実施形態では、LNP は、約 50 から約 150 nm のサイズを有する。一部の実施形態では、LNP は、約 50 から約 100 nm のサイズを有する。一部の実施形態では、LNP は、約 50 から約 120 nm のサイズを有する。一部の実施形態では、LNP は、約 75 から約 150 nm のサイズを有する。一部の実施形態では、LNP は、約 30 から約 200 nm のサイズを有する。特記しない限り、本明細書で言及される全てのサイズは、*Malvern Zetasizer* で動的光散乱によって測定した、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ (直径



）である。計数率が概ね 200 ~ 400 k c t であるように、ナノ粒子試料をリン酸緩衝食塩水（PBS）に希釈する。データは、強度測定の加重平均として提示される。一部の実施形態では、LNP は、約 50 % から約 100 % の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、LNP は、約 50 % から約 70 % の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、LNP は、約 70 % から約 90 % の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、LNP は、約 90 % から約 100 % の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、LNP は、約 75 % から約 95 % の範囲内の平均封入効率で形成される。

#### 【0120】

細胞を工学操作する方法；工学操作された細胞

10

本明細書に開示される LNP 組成物は、in vivo および in vitro の両方で遺伝子編集を通して細胞を工学操作する方法において使用することができる。一部の実施形態では、本方法は、細胞を本明細書に記載される LNP 組成物と接触させることを含む。一部の実施形態では、細胞は、哺乳動物の細胞であってよい。一部の実施形態では、細胞は、齧歯動物の細胞であってよい。一部の実施形態では、細胞は、ヒトの細胞であってよい。一部の実施形態では、細胞は、肝臓細胞であってよい。ある特定の実施形態では、細胞は、ヒトの肝臓細胞であってよい。一部の実施形態では、肝臓細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、肝細胞は、ヒトの肝細胞である。一部の実施形態では、肝臓細胞は、幹細胞である。一部の実施形態では、ヒト肝臓細胞は、肝臓の洞様内皮細胞（LSEC）であってよい。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、クッパー細胞であってよい。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、肝臓の星状細胞であってよい。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、腫瘍細胞であってよい。一部の実施形態では、ヒトの肝臓細胞は、肝臓の幹細胞であってよい。さらなる実施形態では、細胞は、Apoe 結合性受容体を含む。

20

#### 【0121】

一部の実施形態では、工学操作された細胞、例えば、前段落の細胞型のいずれか 1 つに由来する工学操作された細胞が提供される。そのような工学操作された細胞は、本明細書に記載される方法によって生成される。一部の実施形態では、工学操作された細胞は、対象の中の組織または器官、例えば肝臓の中に存在する。

#### 【0122】

30

本明細書に記載される方法および細胞の一部では、細胞は、標的配列中の改変、例えばヌクレオチドの挿入または欠失（「インデル」）または置換を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1、2、3、4 または 5 個またはそれより多くのヌクレオチドの挿入を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1 または 2 個のヌクレオチドの挿入を含む。他の実施形態では、改変は、標的配列中の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 または 25 個またはそれより多くのヌクレオチドの欠失を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1 または 2 個のヌクレオチドの欠失を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列においてフレームシフト突然変異をもたらすインデルを含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 または 25 個またはそれより多くのヌクレオチドの置換を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1 または 2 個のヌクレオチドの置換を含む。一部の実施形態では、改変は、鋳型核酸、例えば本明細書に記載される鋳型核酸のいずれかの組込みからもたらされる、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換の 1 つまたは複数を含む。

40

#### 【0123】

一部の実施形態では、工学操作された細胞を含む細胞の集団、例えば、本明細書に記載される方法によって工学操作された細胞を含む細胞の集団が提供される。一部の実施形態では、集団は、in vitro で培養された工学操作された細胞を含む。一部の実施形態では、集団は、対象の中の組織または器官、例えば肝臓の中に存在する。一部の実施形態では、集団の中の細胞の、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少

50

なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 %、またはそれより多くが工学操作される。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される方法は、インデルの検出によって規定される、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % の編集効率（または「パーセント編集」）をもたらす。他の実施形態では、本明細書に開示される方法は、挿入、欠失、置換または他によるかを問わず、配列中の変化の検出によって規定される、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % の DNA 改変効率をもたらす。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される方法は、約 5 % から約 100 %、約 10 % から約 50 %、約 20 から約 100 %、約 20 から約 80 %、約 40 から約 100 % または約 40 から約 80 % の間の、編集効率レベルまたは DNA 改変効率レベルをもたらす。

10

20

#### 【0124】

本明細書に記載される方法および細胞の一部では、集団の中の細胞は、改変、例えば標的配列におけるインデルまたは置換を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1、2、3、4 または 5 個またはそれより多くのヌクレオチドの挿入を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1 または 2 個のヌクレオチドの挿入を含む。他の実施形態では、改変は、標的配列中の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 または 25 個またはそれより多くのヌクレオチドの欠失を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1 または 2 個のヌクレオチドの欠失を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列においてフレームシフト突然変異をもたらすインデルを含む。一部の実施形態では、集団中の工学操作された細胞の少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % またはそれより多くは、フレームシフト突然変異を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 または 25 個またはそれより多くのヌクレオチドの置換を含む。一部の実施形態では、改変は、標的配列中の 1 または 2 個のヌクレオチドの置換を含む。一部の実施形態では、改変は、鋳型核酸、例えば本明細書に記載される鋳型核酸のいずれかの組込みからもたらされる、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換の 1 つまたは複数を含む。

30

#### 【0125】

##### 処置の方法

本明細書に開示される LNP 組成物は、*in vivo* および *in vitro* での遺伝子編集のために使用することができる。一実施形態では、それを必要とする対象に、本明細書に記載される 1 つまたは複数の LNP 組成物を投与することができる。一実施形態では、本明細書に記載される組成物の治療的有効量は、それを必要とする対象の細胞と接触させることができる。一実施形態では、本明細書に記載される LNP 組成物と細胞を接触させることによって、遺伝子操作された細胞を生成することができる。

40

#### 【0126】

一部の実施形態では、本方法は、肝臓障害に関連した細胞に LNP 組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、本方法は、肝臓障害を処置することを含む。ある特定の実施形態では、本方法は、肝臓細胞を LNP 組成物と接触させることを含む。ある特定の

50

実施形態では、本方法は、肝細胞を L N P 組成物と接触させることを含む。一部の実施形態では、本方法は、A p o E 結合性細胞を L N P 組成物と接触させることを含む。

【 0 1 2 7 】

一実施形態では、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、g R N A および鋳型を含む L N P 組成物を、A p o E 結合性細胞などの細胞に投与することができる。ある特定の場合には、C a s ヌクレアーゼおよび s g R N A を含む L N P 組成物を、A p o E 結合性細胞などの細胞に投与することができる。一実施形態では、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、g R N A および鋳型を含む L N P 組成物を、肝臓細胞に投与することができる。ある特定の場合には、C a s ヌクレアーゼおよび s g R N A を含む L N P 組成物を、肝臓細胞に投与することができる。一部の場合には、肝臓細胞は対象にある。ある特定の実施形態では、対象は、L N P 組成物の単回投与を受けることができる。他の例では、対象は、L N P 組成物の複数回投与を受けることができる。1 用量より多く投与される場合、用量は、約 1、2、3、4、5、6、7、1 4、2 1 もしくは 2 8 日離れて；約 2、3、4、5 もしくは 6 カ月離れて；または約 1、2、3、4 もしくは 5 年離れて投与することができる。

10

【 0 1 2 8 】

一実施形態では、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A を含む L N P 組成物は、肝臓細胞（肝細胞とも呼ばれる）に投与し、続いて g R N A および任意選択で鋳型を含む組成物を投与することができる。一実施形態では、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A および g R N A を含む L N P 組成物は、肝臓細胞に投与し、続いて鋳型を含む組成物をその細胞に投与することができる。一実施形態では、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A を含む L N P 組成物は、肝臓細胞に投与し、続いて g R N A を含む L N P 組成物、次に鋳型を含む L N P 組成物をその細胞に順次投与することができる。C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A を含む L N P 組成物が、g R N A を含む L N P 組成物の前に投与される実施形態では、投与は、約 4、6、8、1 2 もしくは 2 4 時間；または 2、3、4、5、6 もしくは 7 日離すことができる。

20

【 0 1 2 9 】

一実施形態では、L N P 組成物は、遺伝子ノックアウトをもたらす遺伝子を編集するために使用することができる。一実施形態では、L N P 組成物は、遺伝子補正をもたらす遺伝子を編集するために使用することができる。一実施形態では、L N P 組成物は、遺伝子挿入をもたらす細胞を編集するために使用することができる。

30

【 0 1 3 0 】

一実施形態では、L N P 組成物の投与は、持続的な応答をもたらす遺伝子編集をもたらすことができる。例えば、投与は、1 日、1 カ月、1 年またはそれより長い応答期間をもたらすことができる。本明細書で用いるように、「応答期間」は、本明細書に開示される L N P 組成物を使用して細胞を編集した後、結果として生じる改変が L N P 組成物の投与から一定期間なお存在することを意味する。改変は、標的タンパク質のレベルを測定することによって検出することができる。改変は、標的 D N A を検出することによって検出することができる。一部の実施形態では、応答期間は、少なくとも 1 週間であってよい。他の実施形態では、応答期間は、少なくとも 2 週間であってよい。一実施形態では、応答期間は、少なくとも 1 カ月であってよい。一部の実施形態では、応答期間は、少なくとも 2 カ月であってよい。一実施形態では、応答期間は、少なくとも 4 カ月であってよい。一実施形態では、応答期間は、少なくとも 6 カ月であってよい。ある特定の実施形態では、応答期間は、約 2 6 週間であってよい。一部の実施形態では、応答期間は、少なくとも 1 年であってよい。一部の実施形態では、応答期間は、少なくとも 5 年であってよい。一部の実施形態では、応答期間は、少なくとも 1 0 年であってよい。標的タンパク質のレベルを測定することによって、または標的 D N A の検出によって、持続的応答は少なくとも 6 カ月後にも検出可能である。

40

【 0 1 3 1 】

L N P 組成物は、非経口的に投与することができる。L N P 組成物は、血流、組織、筋

50

肉または内部器官に直接的に投与することができる。投与は、例えば、注射または注入に全身性であってよい。投与は、局所であってよい。投与のために適する手段には、静脈内、動脈内、クモ膜下、心室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、網膜下、硝子体内、前房内、筋肉内、関節滑液嚢内および皮下が含まれる。投与に適するデバイスには、針（顕微針を含む）注射器、無針注射器および注入技術が含まれる。

#### 【0132】

LNP組成物は、必然的ではないが一般的に、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤と合わせた製剤として投与される。用語「賦形剤」には、本開示の化合物（複数可）以外の任意の成分、他の脂質成分（複数可）および生物学的活性薬剤が含まれる。賦形剤は、製剤に対して機能的（例えば、薬物放出速度の制御）および/または非機能的（例えば、プロセス助剤または希釈剤）特性を付与することができる。賦形剤の選択は、特定の投与様式、溶解性および安定性に及ぼす賦形剤の影響、ならびに剤形の性質などの因子に大きく依存する。

10

#### 【0133】

非経口製剤は、一般的に水性または油性の溶液または懸濁液である。製剤が水性である場合、糖（限定されずに、グルコース、マンニトール、ソルビトール等を含む）、塩、炭水化物および緩衝剤（好ましくは3から9のpH）などの賦形剤であるが、一部の適用のために、それらはより好適には無菌の非水性溶液と一緒に、または無菌の無発熱物質の水（WFI）などの適するビヒクルと共に使用される乾燥形として製剤化することができる。

#### 【0134】

20

一部の実施形態では、遺伝子編集の方法は、第VII因子標的遺伝子を改変する。ある特定の実施形態では、第VII因子遺伝子を改変するために、LNP組成物は肝臓細胞に投与される。第VII因子欠乏などの肝臓障害を処置するために、LNP組成物を使用することができる。本方法は、異常な第VII因子活性をモジュレートすることができる。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、血友病または制御不能な血液凝固を処置または予防するために投与することができる。例えば、Lapecorella, M. and Mariani, G. Factor VII deficiency: defining the clinical picture and optimizing therapeutic options. *Haemophilia* (2008), 14, 1170-1175を参照する。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、血液が凝塊を形成する傾向の増大を有する状態である血栓形成傾向を処置または予防するために投与することができる。

30

#### 【0135】

組織への損傷が起こるとき、第VII因子酵素前駆体と組織因子の間で等モル複合体が形成され、第VII因子配列の152位で切断が生じ、活性化第VII因子または第VIIa因子の形成につながる。第VIIa因子/組織因子複合体は、凝固につながる。第VII因子関連の障害の処置方法には、第VIIa因子凝固を増加させる方法、血液凝固を向上させる方法または血液凝固プロファイルを向上させる方法が含まれる。ある特定の実施形態では、これらの方法では、第VII因子欠乏の対象にLNP組成物を投与する。一部の実施形態では、これらの方法では、第VII因子欠乏のために、例えば組換え第VIIa因子で以前に処置された対象にLNP組成物を投与する。

#### 【0136】

40

一部の実施形態では、遺伝子編集の方法は、TTR標的遺伝子を改変する。ある特定の実施形態では、アミロイド症などの肝臓におけるTTR発現に関連した障害を処置するために、LNP組成物を使用することができる。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、トランスチレチン型のアミロイド症を含むアミロイド症を処置または予防するために投与することができる。例えば、Patel, K. and Hawkins, P. Cardiac amyloidosis: where are we today? *J. Intern. Med.* (2008), 278, 126-144を参照する。

#### 【0137】

TTR関連の障害は、アミロイド沈着物の蓄積につながる可能性がある。したがって、TTR関連の障害を処置または予防する方法には、TTRレベルを低減する方法、TTR生成を低減する方法、アミロイド沈着物を低減する方法、遺伝性トランスチレチン型アミロ

50

イド症を処置する方法、非遺伝性トランスチレチン型アミロイド症を処置する方法、または心臓ならびに自律神経および末梢神経におけるアミロイド沈着物に影響を与える方法が含まれる。一部の実施形態では、TTR関連の障害を処置または予防する方法は、アミロイド沈着を診断された対象にLNP組成物を投与することを含む。ある特定の実施形態では、これらの方法では、TTR生成の低減を必要とする対象にLNP組成物を投与する。

#### 【0138】

一部の実施形態では、遺伝子編集の方法は、SERPINA1、FVIIII、FIX、SERPING1、KLKB1、KNG1、FXII、ASS1、ASL、BCKDHA、BCKDHB、G6PC、GO/HAO1、AGXT、PCCA、PCCB、OTC、LIPA、ABCB11、GALT、ATP7BおよびPAHから選択される遺伝子を標的にする。一部の実施形態では、遺伝子編集の方法は、アルファ1抗トリプシン欠乏、血友病A、血友病B、HAE、1型シトルリン血、アルギノコハク酸性尿、メーブルシロップ尿症、糖原病、原発性過シュウ酸尿症1型、プロピオン酸アカデミア、オルニチントランスカルバミラーゼ欠乏、コレステリルエステル保存病、進行性の家族性肝内性胆汁うっ滞、ガラクトース血、ウイルソン病およびフェニルケトン尿症から選択される疾患に侵されている対象を処置するために使用することができる。

#### 【0139】

請求項および/または明細書で用語「含む」と一緒に使用されるとき、単語「a」、「an」または「the」は、「1つ」を意味することがあるが、各々は、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つまたは1つより多い」の意味にも一致する。「または」の使用は、特に明記しない限り「および/または」を意味する。用語「含んでいる(including)」、「含有している(containing)」、「ならびに他の形、例えば、「含む(includes)」、「含んでいた(included)」、「含有する(contains)」および「含有した(contained)」の使用は、非限定的である。本出願で与えられる全ての範囲は、特に明記しない限り端点を包含する。

本発明の様々な実施形態を以下に示す。

1. 遺伝子操作された肝臓細胞を生成する方法であって、細胞を、

クラス2 CasヌクレアーゼmRNA；

ガイドRNA核酸；

CCD脂質；

ヘルパー脂質；

中性脂質；および

ステルス脂質を含む脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む方法。

2. クラス2 CasヌクレアーゼmRNAおよびガイドRNA核酸を肝臓細胞に送達することを含む遺伝子編集の方法であって、前記クラス2 Cas mRNAおよび前記ガイドRNA核酸は、

CCD脂質；

ヘルパー脂質；

中性脂質；および

ステルス脂質を含む少なくとも1つのLNP組成物として製剤化されている、方法。

3. クラス2 CasヌクレアーゼmRNAおよびガイドRNA核酸を対象のApoE結合性細胞に投与することを含む遺伝子編集の方法であって、前記クラス2 Cas mRNAおよび前記ガイドRNA核酸は、

CCD脂質；

ヘルパー脂質；

中性脂質；および

ステルス脂質を含む少なくとも1つのLNP組成物として製剤化されている、方法。

4. 肝臓細胞を、

CasヌクレアーゼをコードするmRNA；

ガイドRNA核酸；

10

20

30

40

50

- ＣＣＤ脂質；  
ヘルパー脂質；  
中性脂質；および  
ステルス脂質を含むＬＮＰと接触させることを含む遺伝子編集の方法。
5. 肝臓細胞における遺伝子の発現を変更する方法であって、１つまたは複数のＬＮＰ製剤としてクラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡ核酸の治療的有効量を対象に投与することを含み、少なくとも１つのＬＮＰ製剤が、  
ガイドＲＮＡ核酸またはクラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ；  
ＣＣＤ脂質；  
ヘルパー脂質；  
中性脂質；および  
ステルス脂質を含む、方法。
6. 遺伝子操作された肝臓細胞を生成する方法であって、細胞を、  
クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ；  
単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）であるかまたはそれをコードするガイドＲＮＡ核酸；  
ＣＣＤ脂質；  
ヘルパー脂質；  
中性脂質；および  
ステルス脂質を含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させることを含む方法。
7. 遺伝子操作された肝臓細胞を生成する方法であって、細胞を、  
クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ；  
ｓｇＲＮＡであるかまたはそれをコードするガイドＲＮＡ核酸；  
ＣＣＤ脂質；  
ヘルパー脂質；  
中性脂質；および  
ステルス脂質を含むＬＮＰと接触させることを含む方法。
8. 遺伝子操作された肝臓細胞を生成する方法であって、細胞を、  
クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ；  
ガイドＲＮＡ核酸；  
肝臓特異的方法で前記ＲＮＡを送達するための手段を含む脂質ナノ粒子組成物と接触させることを含む方法。
9. 遺伝子操作された肝臓細胞を生成する方法であって、細胞を、  
クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ；  
ｓｇＲＮＡであるかまたはそれをコードするガイドＲＮＡ核酸；  
肝臓細胞に前記ＲＮＡを送達するための手段を含む脂質ナノ粒子と接触させることを含む方法。
10. ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を肝臓細胞に投与する方法であって、肝臓細胞における遺伝子編集のための、  
Ｃａｓ９ヌクレアーゼｍＲＮＡ；  
ｓｇＲＮＡであるかまたはそれをコードするガイドＲＮＡ；  
肝臓細胞に前記ＲＮＡを送達するための生分解性手段を含むＬＮＰ組成物を対象に投与することを含む方法。
11. 前記肝臓細胞が肝細胞である、上記１～１０のいずれかに記載の方法。  
12. 前記肝細胞が一次肝細胞である、上記１１に記載の方法。  
13. 前記肝臓細胞が幹細胞である、上記１１に記載の方法。  
14. 前記細胞が対象の中にある、上記１～１３のいずれかに記載の方法。  
15. 前記対象がヒトである、上記１４に記載の方法。  
16. 前記ｍＲＮＡが第１のＬＮＰ組成物に製剤化され、前記ガイドＲＮＡ核酸が第２のＬＮＰ組成物に製剤化されている、上記１～１５のいずれかに記載の方法。  
17. 前記第１および第２のＬＮＰ組成物が同時に投与される、上記１６に記載の方法。

10

20

30

40

50

18. 前記第1および第2のLNP組成物が逐次的に投与される、上記16に記載の方法。
19. 前記mRNAおよび前記ガイドRNA核酸が単一のLNP組成物に製剤化されている、上記1～15のいずれかに記載の方法。
20. 少なくとも1つの鑄型をさらに含む、上記1～19のいずれかに記載の方法。
21. 前記mRNAがCas9ヌクレアーゼmRNAである、上記1～20のいずれかに記載の方法。
22. 前記Cas9 mRNAがヒトコドン最適化Cas9ヌクレアーゼである、上記16に記載の方法。
23. 前記ガイドRNA核酸がガイドRNAをコードする発現カセットである、上記1～22のいずれかに記載の方法。
24. 前記発現カセットが調節エレメントをさらに含む、上記23に記載の方法。
25. 前記ガイドRNA核酸がガイドRNAである、上記1～22のいずれかに記載の方法。
26. 前記ガイドRNAがsgRNAである、上記23～25のいずれかに記載の方法。
27. 前記ガイドRNAが二重ガイドRNA(dgRNA)である、上記23～25のいずれかに記載の方法。
28. 前記ガイドRNA核酸が改変された残基を含む、上記1～27のいずれかに記載の方法。
29. 前記改変された残基が、骨格改変、糖改変および塩基改変から選択される改変を含む、上記28に記載の方法。
30. 前記CCD脂質がリピドAである、上記1～29のいずれかに記載の方法。
31. 前記CCD脂質が、リピドA、リピドB、リピドCおよびリピドDから選択される、上記1～29のいずれかに記載の方法。
32. 前記ヘルパー脂質が、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノールおよびコレステロールヘミスクシネートから選択される、上記1～31のいずれかに記載の方法。
33. 前記ヘルパー脂質がコレステロールである、上記32に記載の方法。
34. 前記中性脂質がDSPCおよびDMPEから選択される、上記1～33のいずれかに記載の方法。
35. 前記中性脂質がDSPCである、上記34に記載の方法。
36. 前記ステルス脂質がPEG2k-DMGおよびPEG2k-C11から選択される、上記1～35のいずれかに記載の方法。
37. 前記ステルス脂質がPEG2k-DMGである、上記36に記載の方法。
38. 少なくとも1つのLNPがリピドA、コレステロール、DSPCおよびPEG2k-DMGを含む、上記1～37のいずれかに記載の方法。
39. 少なくとも1つのLNPがリピドB、コレステロール、DSPCおよびPEG2k-DMGを含む、上記1～37のいずれかに記載の方法。
40. 前記組成物が前記CCD脂質を約30モル%から約60モル%の範囲内の量で含む、上記1～39のいずれかに記載の方法。
41. 前記組成物が前記ヘルパー脂質を約30モル%から約60モル%の範囲内の量で含む、上記1～40のいずれかに記載の方法。
42. 前記組成物が前記中性脂質を約1モル%から約20モル%の範囲内の量で含む、上記1～41のいずれかに記載の方法。
43. 前記組成物が前記ステルス脂質を約1モル%から約10モル%の範囲内の量で含む、上記1～42のいずれかに記載の方法。
44. 前記組成物が前記CCD脂質を約45モル%の量で含む、上記1～43のいずれかに記載の方法。
45. 前記組成物が前記ヘルパー脂質を約44モル%の量で含む、上記1～44のいずれかに記載の方法。
46. 前記組成物が前記中性脂質を約9モル%の量で含む、上記1～45のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

47. 前記組成物が前記ステルス脂質を約2モル%の量で含む、上記1～46のいずれかに記載の方法。

48. 前記クラス2 CasヌクレアーゼmRNAおよび前記ガイドRNA核酸が重量で約10:1から約1:10の範囲内の比で存在する、上記1～47のいずれかに記載の方法。

49. 前記クラス2 CasヌクレアーゼmRNAおよび前記ガイドRNAが重量で約1:1の比で存在する、上記1～48のいずれかに記載の方法。

50. 前記CCD脂質アミン対前記RNAリン酸の比が約3から約5の範囲内である、上記1～49のいずれかに記載の方法。

51. 前記CCD脂質アミン対前記RNAリン酸の比が約4.5である、上記1～50のいずれかに記載の方法。

10

52. 前記組成物の粒径が約50nmから約120nmの範囲内である、上記1～51のいずれかに記載の方法。

53. 前記組成物の粒径が約75nmから約150nmの範囲内である、上記1～52のいずれかに記載の方法。

54. 前記組成物の封入効率が約70%から約100%の範囲内である、上記1～53のいずれかに記載の方法。

55. 前記組成物の多分散指数が約0.005から約0.5の範囲内である、上記1～54のいずれかに記載の方法。

56. 前記組成物の多分散指数が約0.02から約0.35の範囲内である、上記1～55のいずれかに記載の方法。

20

57. 前記組成物の投与が遺伝子編集をもたらす、上記1～56のいずれかに記載の方法。

58. 前記遺伝子編集が遺伝子ノックアウトをもたらす、上記57に記載の方法。

59. 前記遺伝子編集が遺伝子補正をもたらす、上記58に記載の方法。

60. 前記遺伝子編集が持続的応答をもたらす、上記57～59のいずれかに記載の方法。

61. 前記遺伝子編集が約1日から約1年の応答期間をもたらす、上記57～59のいずれかに記載の方法。

62. 前記遺伝子編集が少なくとも1週間の応答期間をもたらす、上記57～59のいずれかに記載の方法。

63. 前記遺伝子編集が少なくとも2週間の応答期間をもたらす、上記57～59のいずれかに記載の方法。

30

64. 前記遺伝子編集が少なくとも1カ月の応答期間をもたらす、上記57～59のいずれかに記載の方法。

65. 前記遺伝子編集が少なくとも4カ月の応答期間をもたらす、上記57～59のいずれかに記載の方法。

66. 前記遺伝子編集が少なくとも1年の応答期間をもたらす、上記57～59のいずれかに記載の方法。

67. CasヌクレアーゼをコードするmRNA;

ガイドRNA核酸;

CCD脂質;

ヘルパー脂質;

中性脂質;および

ステルス脂質を含むLNP組成物。

68. クラス2 CasヌクレアーゼmRNA;

sgRNAであるかまたはそれをコードするガイドRNA核酸;

CCD脂質;

ヘルパー脂質;

中性脂質;および

ステルス脂質を含むLNP組成物。

69. 肝臓細胞における遺伝子編集のためのLNP組成物であって、

40

50



- クラス 2 C a s ヌクレアーゼ m R N A ;  
s g R N A であるかまたはそれをコードするガイド R N A 核酸 ;  
C C D 脂質 ;  
ヘルパー脂質 ;  
中性脂質 ; および  
ステルス脂質を含む L N P 組成物。
- 7 0 . クラス 2 C a s ヌクレアーゼ m R N A ;  
ガイド R N A 核酸 ;  
肝臓特異的方法で前記 R N A を送達するための手段を含む L N P 組成物。
- 7 1 . クラス 2 C a s ヌクレアーゼ m R N A ; 10  
s g R N A であるかまたはそれをコードするガイド R N A 核酸 ;  
肝臓細胞に前記 R N A を送達するための手段を含む L N P 組成物。
- 7 2 . 肝臓細胞における遺伝子編集のための L N P 組成物であって、  
C a s 9 ヌクレアーゼ m R N A  
s g R N A であるかまたはそれをコードするガイド R N A ;  
肝臓細胞に前記 R N A を送達するための生分解性手段を含む L N P 組成物。
- 7 3 . 前記 m R N A および前記ガイド R N A 核酸が L N P に別々に封入されており、これら  
の L N P が合わされて前記 L N P 組成物を形成する、上記 6 7 ~ 7 2 のいずれかに記載の  
組成物。
- 7 4 . 前記 m R N A および前記ガイド R N A 核酸が前記 L N P 組成物と一緒に封入されて 20  
いる、上記 6 7 ~ 7 2 のいずれかに記載の組成物。
- 7 5 . 少なくとも 1 つの鋳型をさらに含む、上記 6 7 ~ 7 4 のいずれかに記載の組成物。  
7 6 . 前記 m R N A が C a s 9 ヌクレアーゼ m R N A である、上記 6 7 ~ 7 5 のいずれか  
に記載の組成物。
- 7 7 . 前記 C a s 9 ヌクレアーゼ m R N A がヒトコドン最適化 C a s 9 ヌクレアーゼであ  
る、上記 7 6 に記載の組成物。
- 7 8 . 前記ガイド R N A 核酸がガイド R N A をコードする発現カセットである、上記 6 7  
~ 7 7 のいずれかに記載の組成物。
- 7 9 . 前記発現カセットが調節エレメントをさらに含む、上記 7 8 に記載の組成物。
- 8 0 . 前記ガイド R N A 核酸がガイド R N A である、上記 6 7 ~ 7 7 のいずれかに記載の 30  
組成物。
- 8 1 . 前記ガイド R N A が s g R N A である、上記 7 8 ~ 8 0 のいずれかに記載の組成物。  
8 2 . 前記ガイド R N A が二重ガイド R N A ( d g R N A ) である、上記 7 3 ~ 8 0 のい  
ずれかに記載の組成物。
- 8 3 . 前記ガイド R N A 核酸が改変された残基を含む、上記 6 7 ~ 8 2 のいずれかに記載  
の組成物。
- 8 4 . 前記改変された残基が、骨格改変、糖改変および塩基改変から選択される改変を含  
む、上記 8 3 に記載の組成物。
- 8 5 . 前記 C C D 脂質がリピド A である、上記 6 7 ~ 7 4 のいずれかに記載の組成物。
- 8 6 . 前記 C C D 脂質が、リピド A、リピド B、リピド C およびリピド D から選択される 40  
、上記 6 7 ~ 8 5 のいずれかに記載の組成物。
- 8 7 . 前記ヘルパー脂質が、コレステロール、5 - ヘプタデシルレゾルシノールおよびコ  
レステロールヘミスクシネートから選択される、上記 6 7 ~ 8 6 のいずれかに記載の組成  
物。
- 8 8 . 前記ヘルパー脂質がコレステロールである、上記 8 7 に記載の組成物。
- 8 9 . 前記中性脂質が D S P C および D M P E から選択される、上記 6 7 ~ 8 8 のいずれ  
かに記載の組成物。
- 9 0 . 前記中性脂質が D S P C である、上記 8 9 に記載の組成物。
- 9 1 . 前記ステルス脂質が P E G 2 k - D M G および P E G 2 k - C 1 1 から選択される  
、上記 6 7 ~ 9 0 のいずれかに記載の組成物。 50

9 2 . 前記ステルス脂質が P E G 2 k - D M G である、上記 9 1 に記載の組成物。

9 3 . 少なくとも 1 つの L N P がリピド A、コレステロール、D S P C および P E G 2 k - D M G を含む、上記 6 7 ~ 9 2 のいずれかに記載の組成物。

9 4 . 少なくとも 1 つの L N P がリピド B、コレステロール、D S P C および P E G 2 k - D M G を含む、上記 6 7 ~ 9 3 のいずれかに記載の組成物。

9 5 . 前記 C C D 脂質を約 3 0 モル % から約 6 0 モル % の範囲内の量で含む、上記 6 7 ~ 9 4 のいずれかに記載の組成物。

9 6 . 前記ヘルパー脂質を約 3 0 モル % から約 6 0 モル % の範囲内の量で含む、上記 6 7 ~ 9 5 のいずれかに記載の組成物。

9 7 . 前記中性脂質を約 1 モル % から約 2 0 モル % の範囲内の量で含む、上記 6 7 ~ 9 6 のいずれかに記載の組成物。

10

9 8 . 前記ステルス脂質を約 1 モル % から約 1 0 モル % の範囲内の量で含む、上記 6 7 ~ 9 7 のいずれかに記載の組成物。

9 9 . 前記 C C D 脂質を約 4 5 モル % の量で含む、上記 6 7 ~ 9 8 のいずれかに記載の組成物。

1 0 0 . 前記ヘルパー脂質を約 4 4 モル % の量で含む、上記 6 7 ~ 9 9 のいずれかに記載の組成物。

1 0 1 . 前記中性脂質を約 9 モル % の量で含む、上記 6 7 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の組成物。

1 0 2 . 前記ステルス脂質を約 2 モル % の量で含む、上記 6 7 ~ 1 0 1 のいずれかに記載の組成物。

20

1 0 3 . 前記クラス 2 C a s ヌクレアーゼ m R N A および前記ガイド R N A 核酸が重量で約 1 0 : 1 から約 1 : 1 0 の範囲内の比で存在する、上記 6 7 ~ 1 0 2 のいずれかに記載の組成物。

1 0 4 . 前記クラス 2 C a s ヌクレアーゼ m R N A および前記ガイド R N A 核酸が重量で約 1 : 1 のモル比で存在する、上記 6 7 ~ 1 0 3 のいずれかに記載の組成物。

1 0 5 . 前記 C C D 脂質アミン対前記 R N A リン酸の比が約 3 から約 5 の範囲内である、上記 6 7 ~ 1 0 4 のいずれかに記載の組成物。

1 0 6 . 前記 C C D 脂質アミン対前記 R N A リン酸の比が約 4 . 5 である、上記 6 7 ~ 1 0 5 のいずれかに記載の組成物。

30

1 0 7 . 前記組成物の粒径が約 5 0 n m から約 1 2 0 n m の範囲内である、上記 6 7 ~ 1 0 6 のいずれかに記載の組成物。

1 0 8 . 前記組成物の粒径が約 7 5 n m から約 1 5 0 n m の範囲内である、上記 6 7 ~ 1 0 7 のいずれかに記載の組成物。

1 0 9 . 前記組成物の封入効率が約 7 0 % から約 1 0 0 % の範囲内である、上記 6 7 ~ 1 0 8 のいずれかに記載の組成物。

1 1 0 . 前記組成物の多分散指数が約 . 0 0 5 から約 0 . 5 の範囲内である、上記 6 7 ~ 1 0 9 のいずれかに記載の組成物。

1 1 1 . 前記組成物の多分散指数が約 . 0 2 から約 0 . 3 5 の範囲内である、上記 6 7 ~ 1 1 0 のいずれかに記載の組成物。

40

1 1 2 . 肝臓選択的である、上記 6 7 ~ 1 1 1 のいずれかに記載の組成物。

1 1 3 . 肝細胞選択的である、上記 1 1 2 に記載の組成物。

1 1 4 . A p o E 受容体選択的である、上記 1 1 2 に記載の組成物。

1 1 5 . 上記 1 ~ 5 9 のいずれかの方法によって作製される、遺伝子操作された肝臓細胞。

1 1 6 . 上記 6 7 ~ 1 1 4 のいずれかの組成物で作製される、遺伝子操作された肝臓細胞。

1 1 7 . 前記肝臓細胞が一次肝細胞である、上記 1 1 5 または 1 1 6 に記載の遺伝子操作された肝臓細胞。

1 1 8 . 凍結保護物質をさらに含む、上記 6 7 ~ 1 1 4 のいずれかに記載の組成物。

1 1 9 . 前記凍結保護物質が約 1 % から約 1 0 w / v % の範囲内の量で存在する、上記 1 1 8 に記載の組成物。

50

120. 前記凍結保護物質が、スクロース、トレハロース、グリセロール、DMSOおよびエチレングリコールから選択される、上記118または119に記載の組成物。

121. 前記凍結保護物質がスクロースである、上記118～120のいずれかに記載の組成物。

122. 緩衝液をさらに含む、上記67～114または118～121のいずれかに記載の組成物。

123. 前記緩衝液が、リン酸緩衝液(PBS)、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液およびそれらの混合物から選択される、上記122に記載の組成物。

124. NaClをさらに含む、上記122または123に記載の組成物。

125. 前記凍結保護物質がスクロースであり；

前記スクロースが約1%から約10w/v%の範囲内の量で存在し；

前記緩衝液が前記トリス緩衝液およびNaCl緩衝液の混合物であり；

前記NaCl緩衝液が約40mMから約50mMの範囲内の量で存在し；

前記トリス緩衝液が約40mMから約60mMの範囲内の量で存在する、上記124に記載の組成物。

126. 前記スクロースが約5w/v%の量で存在し；

前記NaCl緩衝液が約45mMの量で存在し；

前記トリス緩衝液が約50mMの量で存在する、上記125に記載の組成物。

127. 約7.3から約7.7の範囲内のpHを有する、上記125または126に記載の組成物。

128. 約7.3、約7.4、約7.5または約7.6のpHを有する、上記127に記載の組成物。

129. 約7.4から約7.6の範囲内のpHを有する、上記127または128に記載の組成物。

130. 約7.5のpHを有する、上記129に記載の組成物。

131. 少なくとも20%の編集効率を達成することをさらに含む、上記1～66のいずれかに記載の方法。

132. 少なくとも50%の編集効率を達成することをさらに含む、上記1～66のいずれかに記載の方法。

133. 少なくとも80%の編集効率を達成することをさらに含む、上記1～66のいずれかに記載の方法。

134. 少なくとも20%のDNA改変効率を達成することをさらに含む、上記1～66のいずれかに記載の方法。

135. 少なくとも50%のDNA改変効率を達成することをさらに含む、上記1～66のいずれかに記載の方法。

136. 少なくとも80%のDNA改変効率を達成することをさらに含む、上記1～66のいずれかに記載の方法。

#### 【実施例】

##### 【0140】

#### [実施例1]

材料および方法。

脂質ナノ粒子(「LNP」)製剤

約4.5のCCD脂質アミン対RNAリン酸(N:P)のモル比で、LNPを製剤化した。脂質ナノ粒子構成成分を100%エタノールに以下のモル比で溶解した：45モル%(12.7mM)のCCD脂質(例えば、リピドAまたはリピドB)；44モル%(12.4mM)のヘルパー脂質(例えば、コレステロール)；9モル%(2.53mM)の中性脂質(例えば、DSPC)；および2モル%(.563mM)のPEG(例えば、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11)。RNAカーゴは50mM酢酸緩衝液pH4.5に溶解し、概ね0.45mg/mLのRNAカーゴの濃度をもたらした。

##### 【0141】

10

20

30

40

50

Precision Nanosystems NanoAssembler (商標) ベンチトップ機器を製造業者のプロトコルに従って使用して、脂質およびRNA溶液を微流動混合することによってLNPを形成した。差別的流速を使用した混合の間、水性対有機溶媒の2:1の比を維持した。混合の後、LNPを収集し、リン酸緩衝食塩水(PBS、概ね1:1)に希釈し、次に、10 kDaのSlide-a-Lyzer (商標) G2透析カセット(ThermoFisher Scientific)を使用して、軽く攪拌しながら4 で一晩、残りの緩衝液をPBS(試料量の100倍過剰)に交換した。結果として生じた混合物を、次に0.2 μm滅菌フィルターを使用して濾過した。結果として生じた濾液は、2~8 で保存した。封入効率、多分散指数および平均粒径を判定するために、単離したLNPを下記のように特徴付けた。

10

#### 【0142】

ヌクレアーゼmRNAおよび単一のガイドRNA(sgRNA)のin vitro転写(「IVT」)

線状化プラスミドDNA鋳型およびT7 RNAポリメラーゼを使用したin vitro転写によって、N1-メチル偽性Uを含有するキャップされたおよびポリアデニル化されたCas9 mRNAを生成した。以下の条件でXbaIと37 で2時間インキュベートすることによって、T7プロモーターおよび100 ntポリ(A/T)領域を含有するプラスミドDNAを線状化した: 200 ng/μLのプラスミド、2 U/μLのXbaI(NEB)および1×反応緩衝液。反応を65 で20分間加熱することによって、XbaIを不活性化した。線状化プラスミドはシリカマキシスピンカラム(Epoch Life Sciences)を使用して酵素および緩衝塩から精製し、線形化を確認するためにアガロースゲルによって分析した。Cas9の改変mRNAを生成するIVT反応を、以下の条件において37 で4時間インキュベートした: 50 ng/μLの線状化プラスミド; GTP、ATP、CTPおよびN1-メチル偽性UTP(Trilink)の各々の2 mM; 10 mMのARCA(Trilink); 5 U/μLのT7 RNAポリメラーゼ(NEB); 1 U/μLのマウスRNAアーゼ阻害剤(NEB); 0.004 U/μLの無機の大腸菌(E. coli)ピロホスファターゼ(NEB); ならびに1×反応緩衝液。4時間のインキュベーションの後、TURBO DNアーゼ(ThermoFisher)を0.01 U/μLの最終濃度まで加え、反応をさらなる30分間インキュベートしてDNA鋳型を除去した。製造業者のプロトコル(ThermoFisher)に従って MegaClear転写クリーンアップキットを使用して、酵素およびヌクレオチドからCas9 mRNAを精製した。代わりに、例えば実施例15に示すように、沈殿プロトコルを通してmRNAを精製し、その後、一部の場合にはHPLCに基づく精製が続いた。簡潔には、DNアーゼ消化の後、7.5 MのLiCl溶液の0.21倍の量を加えて混合することによってmRNAを沈殿させ、沈殿したmRNAは遠心分離によってペレットにした。上清を除去したならば、mRNAを水で復元した。酢酸アンモニウムおよびエタノールを使用して、mRNAを再び沈殿させた。2倍量の100% EtOHと一緒に、5 Mの酢酸アンモニウムを2 Mの最終濃度のためにmRNA溶液に加えた。溶液を混合し、-20 で15分間インキュベートした。沈殿したmRNAを遠心分離によって再びペレットにし、上清を除去し、mRNAを水で復元した。最終段階として、酢酸ナトリウムおよびエタノールを使用して、mRNAを沈殿させた。1/10量の3 Mの酢酸ナトリウム(pH 5.5)を、2倍量の100% EtOHと一緒に溶液に加えた。溶液を混合し、-20 で15分間インキュベートした。沈殿したmRNAを遠心分離によって再びペレットにし、上清を除去し、ペレットを70%の冷エタノールで洗浄し、空気乾燥させた。mRNAを、水で復元した。HPLC精製mRNAのために、LiCl沈殿および復元の後、mRNAをRP-IP HPLCによって精製した(例えば、Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142を参照)。プールするために選択された分画を合わせ、上記の酢酸ナトリウム/エタノール沈殿によって脱塩した(desalted)。

20

30

40

#### 【0143】

50

全ての方法のために、260 nmで吸光度を測定することによって転写物濃度を判定し (Nanodrop)、転写物はBioanalyzer (Agilent) による毛细管電気泳動によって分析した。

#### 【0144】

類似の方法でsgRNAを生成するためにも、IVTを使用した。T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列だけで構成された最上部オリゴならびにsgRNA鋳型および相補性配列を含有する最下部の鎖をプロモーター部位にアニーリングすることによって、sgRNAのためのDNA鋳型を生成した。アニールされた鋳型は、以下の条件においてIVT反応で直接的に使用した：125 nMの鋳型；GTP、ATP、CTPおよびUTPの各々の7.5 mM；5 U/μLのT7 RNAポリメラーゼ (NEB)；1 U/μLのマウスRNAアーゼ阻害剤 (NEB)；0.004 U/μLの無機の大腸菌 (E. coli) ピロホスファターゼ (NEB)；ならびに1×反応緩衝液。反応を37℃で8時間インキュベートし、その後、TURBO DNアーゼ (ThermoFisher) を0.01 U/μLの最終濃度まで加え、反応をさらなる30分間インキュベートしてDNA鋳型を除去した。製造業者のプロトコル (ThermoFisher) によるMegaclear転写クリーンアップキットによって、sgRNA転写物を精製した。260 nmでの吸光度によって転写物濃度を判定し (Nanodrop)、転写物はPAGEによって分析した。

#### 【0145】

##### 製剤分析

LNP製剤を、平均粒径、多分散 (pdi)、全RNA含有量およびRNAの封入効率のために分析した。平均粒径および多分散は、Malvern Zetasizer DLS機器を使用して動的光散乱 (DLS) によって測定した。DLSによる測定の前に、LNP試料をPBSで30倍に希釈した。平均粒径の強度に基づく測定であるZ平均直径を、pdiと一緒に報告した。

#### 【0146】

全RNA濃度および封入効率を判定するために、蛍光に基づくアッセイを使用した。RiboGreen (登録商標) 色素 (ThermoFisher Scientific、カタログ番号R11491) の線形範囲の中に入るように、LNPを1×TE緩衝液で75倍に希釈した。希釈したLNPの50 μlを、50 μlの1×TE緩衝液または0.2% Triton X-100を含む1×TE緩衝液と2反復でさらに混合した。TritonがLNPを完全に破壊し、全RNAを曝露させてRiboGreen (登録商標) 色素と相互作用させることを可能にするために、試料を37℃で10分の間インキュベートした。LNPを作製するために使用された出発RNA溶液を利用し、上記と同じステップに従うことによって、標準曲線のための試料を調製した。希釈したRiboGreen (登録商標) 色素 (100 μL、1×TE緩衝液に100倍、製造業者の説明書による) を試料の各々に次に加え、光の非存在下において室温で10分の間インキュベートした。試料を読み取るためにSpectraMax M5マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を使用し、励起、オートカットオフおよび放射波長はそれぞれ488 nm、515 nmおよび525 nmに設定した。封入効率 (%EE) は、以下の式を使用して計算した：

#### 【0147】

##### 【数1】

$$\%EE = \left(1 - \frac{\text{蛍光 @525nm} - \text{トリトン}}{\text{蛍光 @525} + \text{トリトン}}\right) * 100$$

ここで、蛍光@525 nm - トリトンはトリトンなしの試料のための平均蛍光読取りであり、蛍光@525 nm + トリトンはトリトンのある試料のための平均蛍光読取りである。全RNA濃度は、トリトン値のある試料のための線形標準曲線および平均蛍光読取りを使

用して判定した。

【 0 1 4 8 】

DNAをベースとしたカーゴ構成成分の封入効率を判定するために、同じ手順を使用することができる。一本鎖DNAのためにOligreen色素を使用することができ、二本鎖DNAのためにPicogreen色素を使用することができる。

【 0 1 4 9 】

様々なLNP組成物のための、平均粒径、多分散および%EEの値は、下の表1で報告される。

【 0 1 5 0 】

【表1 - 1】

表 1. LNP 製剤データの要約

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステル ス脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP002	N/A	eGFP mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	71.8	0.073	80%
LNP006	N/A	eGFP mRNA	リピド A	PEG2k- C11	83.2	0.130	92%
LNP007	N/A	eGFP mRNA	リピド A	PEG2k- C11	94.5	0.122	90%
LNP010	N/A	eGFP mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	71.0	0.135	96%
LNP011	N/A	eGFP mRNA	リピド A	PEG2k- C11	78.9	0.138	96%
LNP012	N/A	eGFP mRNA	リピド B	PEG2k- DMG	88.8	0.029	94%
LNP013	N/A	eGFP mRNA	リピド B	PEG2k- C11	88.1	0.056	95%
LNP014	N/A	gLUC mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	66.6	0.129	92%
LNP015	N/A	gLUC mRNA	リピド B	PEG2k- DMG	110.4	0.191	90%
LNP093	FVII	cr004* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	97.67	0.173	79%
LNP094	FVII	cr004* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	83.09	0.159	92%
LNP095	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	131	0.219	86%
LNP096	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	77.66	0.138	96%
LNP097	N/A	Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	90.02	0.118	88%
LNP116	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	136.3	0.202	56%

10

20

30

40

50

【 0 1 5 1 】

【 表 1 - 2 】

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステル ス脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP120	N/A	Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	85.8	0.123	94%
LNP121	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	77.8	0.150	94%
LNP123	TTR	sg003	リピド A	PEG2k- DMG	93.4	0.215	86%
LNP136	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	72.2	0.043	96%
LNP137	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	76.1	0.090	96%
LNP138	FVII	sg008**	リピド A	PEG2k- DMG	86.9	0.305	96%
LNP139	TTR	sg003	リピド A	PEG2k- DMG	84.5	0.324	97%
LNP140	N/A	Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	71.95	0.183	95%
LNP152	FVII	sg013** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	97.5	0.092	95%
LNP153	FVII	sg014** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	96.5	0.057	97%
LNP154	TTR	sg015** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	96.4	0.060	97%
LNP155	TTR	sg016** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	92.9	0.060	97%
LNP169	TTR	sg017** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	81.8	0.098	98%

【 0 1 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステル ス脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP170	TTR	sg017** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	75.3	0.088	99%
LNP171	TTR	sg017** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	100.7	0.062	97%
LNP172	N/A	Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	111.4	0.028	98%
LNP173	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	58.3	0.087	98%
LNP174	TTR	cr005* + tr002* + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	85.5	0.079	98%
LNP175	TTR	cr005* + tr002*	リピド A	PEG2k- DMG	82.6	0.065	98%
LNP176	TTR	sg004 (DNA)	リピド A	PEG2k- DMG	65.82	0.064	100%
LNP178	N/A	Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	115.8	0.072	97%
LNP294	TTR	sg009* + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	83.6	0.115	92%
* = 5'および3'末端の3つの末端ヌクレオチドの間のホスホロチオエート連結 ** = 5'および3'末端の3つの末端ヌクレオチドでの、およびそれの間の2'-O-メチル改変 およびホスホロチオエート連結							

## 【0153】

## T7E1アッセイ

Cas9によるDNA切断の後の非相同的末端連結（NHEJ）を通して生成された挿入、欠失および置換などのゲノムDNAにおける突然変異事象を検出するために、T7E1アッセイを一部の実施例において使用した（例えば、Cho et al., Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nature Biotechnology. 2013; 31, 230-232を参照）。

## 【0154】

CRISPR/Cas9の標的であるゲノムDNA領域をPCRによって増幅し、95



で10分間変性させ、その後、0.5 /秒の速度で温度を95 から25 に降下させることによって再アニールした。ヘテロ二本鎖を形成するDNAの組合せは、増幅された領域における突然変異の存在を示した。再アニールされたヘテロ二本鎖は、次に37で25分またはそれより長くバクテリオファージレゾルバーゼT7E1 (New England Biolabs) で消化して二本鎖切断を生成し、ここで、T7E1ヌクレアーゼはミスマッチを認識した。結果として生じたDNA断片は、断片アナライザーを使用して分析し、編集効率の近似値を判定するために数量化した。編集効率の定量的分析のために、本明細書に記載される通りに次世代配列決定を使用した。

#### 【0155】

的確な切断効率のための次世代配列決定 (「NGS」) および分析

10

ゲノム中の標的位置で編集効率を定量的に判定するために、深部配列決定を利用して遺伝子編集によって導入された挿入および欠失の存在を確認した。

#### 【0156】

標的部位 (例えば、TTR、FVII) の周囲でPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅した。プライマー配列は、下に提供する。配列決定のために必要な化学を加えるために、製造業者のプロトコル (Illumina) に従ってさらなるPCRを実行した。Illumina MiSeq機器でアンプリコンを配列決定した。低品質のスコアを有するものを排除した後に、読み取りデータをヒト参照ゲノム (例えば、hg38) と整列させた。読み取りデータを含む生じたファイルを参照ゲノム (BAMファイル) にマッピングし、ここで、標的の目的領域に重なった読み取りデータを選択して、野生型読み取りデータの数に対する挿入、置換または欠失を含む読み取りデータの数を計算した。

20

#### 【0157】

編集百分率 (例えば、「編集効率」または「パーセント編集」) は、挿入または欠失を有する配列読み取りデータの総数割る野生型を含む配列読み取りデータの総数と規定される。

#### 【0158】

*in vitro* LNP送達

マウス細胞株 (Neuro2AおよびHepa1.6) を10%ウシ胎児血清を加えたDMEM培地で培養し、本明細書に記載される溶解および分析 (例えば、リポーター発現、T7E1アッセイ、NGS) の18~24時間前のLNPによるトランスフェクションの24時間前に、15,000細胞/ウェルの密度で平板培養した。コラーゲンコート96ウェルプレートを使用して、肝細胞平板培養培地 (Invitrogen) にマウス一次肝細胞 (Invitrogen) を1ウェルにつき細胞数15,000で培養した。5時間後に、平板培養培地を除去し、LNPおよび3%マウス血清を含有する肝細胞維持培地 (37で5分間プレインキュベートした) と交換した。本明細書に記載される溶解および分析 (例えば、T7E1アッセイ、NGS) の前に、細胞に42~48時間トランスフェクトした。細胞株および一次肝細胞両方のために、LNPを希釈し、1ウェルにつき100ngのCas9 mRNAおよび概ね30nMのガイドRNAから出発して細胞に加え、1ウェルにつき0.1ngのCas9 mRNAおよび0.03nMのガイドRNAまでの段階希釈を片対数により実行した。

30

40

#### 【0159】

*in vivo* LNP送達

6~10週齢のCD-1雌マウスを、各研究で使用した。群平均体重に基づいて投与溶液を調製するために、動物を計量し、体重によってグループ分けした。1動物につき0.2mLの量 (体重1キログラムにつき概ね10mL) で、LNPを側方の尾静脈を通して投与した。有害作用について投与の概ね6時間後に動物を観察した。投与の24時間後に体重を測定し、イソフルラン麻酔下で心臓の穿刺を通した放血によって動物を様々な時点で安楽死させた。血清分離管または本明細書に記載される血漿のための緩衝クエン酸ナトリウムを含有する管に、血液を収集した。*in vivo* 編集を含む研究のために、DNA抽出および分析のために、肝臓組織を各動物からの中央の小葉から、または3つの独立

50

した小葉（例えば、右中央、左中央および左側葉）から収集した。一部の研究のために、脾臓組織も収集した。

#### 【0160】

##### ゲノムDNA単離

溶解緩衝液（組織10mgにつき概ね200μL）で組織をホモジナイズし、DNAを沈殿させることを含む製造業者のプロトコルに従って、Invitrogen Pure LinkゲノムDNAキット（カタログK1820-02）を使用して、10mgの組織からゲノムDNAを抽出した。本明細書に記載される通り、PCRおよび以降のNGS分析のために、全てのDNA試料を100ng/μL濃度に正規化した。

#### 【0161】

##### トランスチレチン（TTR）ELISA分析

血液を収集し、血清を示すように単離した。全TTR血清レベルは、マウスプレアルブミン（トランスチレチン）ELISAキット（Aviva Systems Biology、カタログOKIA00111）を使用して判定した。キット試薬および標準は、製造業者のプロトコルに従って調製した。マウス血清を、1×アッセイ希釈剤で10,000倍の最終希釈まで希釈した。2回の逐次的な50倍希釈を実行して2,500倍希釈をもたらすことによって、これは実行された。10,000倍の全体の試料希釈のために、最終の4倍希釈ステップを実行した。捕捉抗体をプレコーティングしたELISAプレートの各ウェルに、標準曲線希釈溶液（各々100μL）および希釈血清試料の両方を加えた。洗浄の前に、プレートを室温で30分の間インキュベートした。酵素抗体コンジュゲート（1ウェルにつき100μL）を、20分のインキュベーションのために加えた。未結合の抗体コンジュゲートを除去し、プレートを再び洗浄してから発色性基質溶液を加えた。プレートを10分の間インキュベートしてから、100μLの停止溶液、例えば硫酸（概ね0.3M）を加えた。450nmの吸光度で、プレートをSpectraMax M5プレートリーダーで読み取った。標準曲線から4つのパラメータロジスティック曲線あてはめを使用して、SoftMax Proソフトウェアバージョン6.4.2によって血清TTRレベルを計算した。最終血清値を、アッセイ希釈のために調整した。

#### 【0162】

##### 第VII因子（FVII）活性アッセイ

示した通りに、血液を血漿のために収集した。BIOPHEN FVIIアッセイキット（Anaria Diagnostics、カタログA221304）を使用して、血漿中の第VII因子活性レベルを測定した。キット試薬は、製造業者のプロトコルに従って調製した。2回の逐次的な50倍希釈を実行して2,500倍希釈をもたらすことによって、キットの試料希釈緩衝液で血漿を10,000倍に希釈した。10,000倍の全体の試料希釈のために、最終の4倍希釈ステップを実行した。希釈した試料（30μL）を、キット試薬1（30μL）に加えた。次に、キット試薬2（60μL）をプレートに加え、その後それを37℃で7分の間インキュベートした。キット試薬3（60μL）を次にプレートに加え、プレートを37℃でさらなる5分の間インキュベートした後、酢酸（20v/v%水溶液、60μL）を加えて酵素反応を停止した。405nmで、プレートをSoftMax M5プレートリーダーで読み取った。対照動物の血漿から作成した校正曲線に基づいてFVII活性の相対値を計算し、ピヒクル対照のパーセントとして報告した。

#### 【0163】

##### [実施例2]

eGFP mRNA封入LNPのin vitro送達。

eGFP（TriLink、カタログL-6101）をコードするmRNAを含むLNPを、実施例1に記載されている通りに調製した。各LNP調製物の構成成分には、CCD脂質（45モル%）、コレステロール（44モル%）、DSPC（9モル%）およびPEG2k-DMGまたはPEG2k-C11（2モル%）が含まれる。LNP-002、-006、-007、-010および-011は、リピドAをCCD脂質として含み、L

10

20

30

40

50

N P - 0 1 2 および - 0 1 3 は、リピド B を C C D 脂質として含む。L N P - 0 0 2、 - 0 1 0 および - 0 1 2 は P E G 2 k - D M G を含む、L N P - 0 0 6、 - 0 0 7、 - 0 1 1 および - 0 1 3 は P E G 2 k - C 1 1 を含む。平均粒径、多分散および封入効率を含む L N P の詳細は、表 1 に提供される。実施例 1 に記載のように L N P はマウス肝細胞株 ( H e p a 1 . 6 ) に送達され、送達された e G F P m R N A の総量は、各 L N P について 1 ウェルにつき 1 0 0 n g または 5 0 0 n g であった。細胞を L N P と一緒に概ね 1 8 時間インキュベートし、e G F P 発現は C y t o F L E X 細胞アナライザー ( B e c h m a n C o u l t e r ) を使用して測定した。

#### 【 0 1 6 4 】

図 1 に示すように、e G F P 発現は、各製剤で観察された。リピド A を含む L N P 製剤 ( L N P - 0 0 2、 - 0 0 6、 - 0 0 7、 - 0 1 0 および - 0 1 1 ) は、e G F P m R N A を首尾よく送達した。リピド B を含む L N P 製剤 ( L N P - 0 1 2 および - 0 1 3 ) も、e G F P m R N A を送達した。P E G 2 k - C 1 1 および P E G 2 k - D M G ステルス脂質を含む L N P は、これらの実験で両方とも m R N A を効果的に送達し、i n v i t r o で L N P を使用することによるマウス肝細胞株への m R N A の送達を実証している。

#### 【 0 1 6 5 】

##### [実施例 3]

g L U C m R N A 封入 L N P の i n v i v o 送達。

G a u s s i a l シフェラーゼ ( g L U C ) ( T r i L i n k、カタログ L - 6 1 2 3 ) をコードする m R N A を含む L N P を実施例 1 に記載されている通りに調製し、i n v i v o で動物への m R N A の送達について試験した。各 L N P 調製物の構成成分には、C C D 脂質 ( 4 5 モル% )、コレステロール ( 4 4 モル% )、D S P C ( 9 モル% ) および P E G 2 k - D M G ( 2 モル% ) が含まれる。L N P - 0 1 4 はリピド A を含む、L N P - 0 1 5 はリピド B を含んでいた。平均粒径、多分散および封入効率などのこれらの製剤の詳細は、表 1 に提供される。0 . 1 m g / k g および 0 . 3 m g / k g の g L U C m R N A 用量が、各 L N P 製剤と送達された。動物を 2 4 時間後に安楽死させ、実施例 1 に記載されている通りに血液採取および血清の単離を実行した。P i e r c e ( 商標 ) G a u s s i a l シフェラーゼフラッシュアッセイキット ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c、カタログ番号 1 6 1 5 8 ) を製造業者のプロトコルに従って使用して、血清ルシフェラーゼ発現を測定した。

#### 【 0 1 6 6 】

図 2 に示すように、P B S 対照と比較して g L U C 発現の用量依存性の増加が各動物 ( 各群につき n = 5 ) で観察された。ルシフェラーゼ活性によって測定したとき、リピド A またはリピド B を含む L N P は、m R N A の有効な i n v i v o 送達および発現を示した。

#### 【 0 1 6 7 】

##### [実施例 4]

C a s 9 m R N A 封入 L N P ( m R N A - L N P ) と二重ガイド RNA 封入 L N P ( d g R N A - L N P ) を使用した i n v i v o 送達および編集。

肝臓での i n v i v o 編集のために C R I S P R / C a s RNA 構成成分 ( 例えば、g R N A および C a s 9 をコードする m R N A ) を送達するための L N P を、C D - 1 マウスで試験した。これらの実験において、d g R N A および m R N A は別々に製剤化した。

#### 【 0 1 6 8 】

実施例 1 に記載されるように、i n v i t r o 転写 C a s 9 m R N A および化学改変 d g R N A ( T T R または F V I I を標的にする) で L N P を別々に製剤化した。この実施例で使用された d g R N A は化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、二重ガイドを構成する c r R N A および t r R N A の 5 ' および 3 ' 末端の両方における 3 つの末端ヌクレオチドの間にホスホロチオエート連結を有する。各 L N P 調製物 ( L N P - 0 9 3、 - 0 9 4、 - 0 9 5、 - 0 9 6 および - 0 9 7 ) の構成成分には、C C D 脂質 (リ

10

20

30

40

50

ピドA) (45モル%)、コレステロール(44モル%)、DSPC(9モル%)およびPEG2k-DMG(2モル%)が含まれる。平均粒径、多分散および封入効率を含むこれらの製剤の詳細は、表1に提供される。2つの異なる投与レジメンが用いられた:(1)mRNA-LNP製剤(LNP-097)およびdgRNA-LNP製剤(LNP-093、-094、-095または-096)を等しい部(RNAの重量による)で一緒に合わせ、合わせた製剤を2日連続投与する(各日に、各RNA構成成分製剤の1mg/kgで投与する、合計2mg/kg);または、(2)dgRNA-LNP(LNP-093、-094、-095および-096)を投与する4時間前にmRNA-LNP(LNP-097)を2日連続で投与する(各製剤は、1mg/kgで投与した)。動物は、各群の最初の投与の5日後に安楽死させた。対照群との比較(PBSを受けた動物)に加えて、各実験群は内部配列決定対照を有し、実施例1に記載の通り、NGS分析のためのPCR反応を各動物(各群でn=3)の両方の標的のために実行した。肝臓からのゲノムDNAを単離し、実施例1に記載の通りにNGSにより分析した。

#### 【0169】

図3Aおよび3Bに示すように、共投与(A1(LNP-093/-097)またはA2(LNP-094/-097))または前投与(A3(LNP-093/-097))投与レジメンを使用して、FVIIを標的にしたLNPを受けた動物の肝臓において、in vivo編集(概ね1.8%編集~2.8%編集)が観察された。TTRを標的にしたLNPを受けた動物は、Cas9 mRNAと共投与された(B1(LNP-095/LNP-097)またはB2(LNP-096/-097))dgRNAを受けた、または前投与された(B3(LNP-095/-097)またはB4(LNP-096/-097))ときの動物の肝臓において、概ね2%~4.5%の編集を示した。実施例1に記載の通り、血清および血漿分析を全ての動物について実行したが、いずれの動物も、TTRの全体の血清レベルまたは血漿中のFVII活性のいずれにおいても統計的有意差(PBSを投与した動物と比較して)を示さなかった(示さず)。

#### 【0170】

##### [実施例5]

dgRNA-LNPおよびIVT sgRNA-LNPを使用したin vitroおよびin vivo送達および編集。

化学改変dgRNAを含むLNPおよびin vitro転写(IVT)sgRNAを含むLNPの効力を、Cas9 mRNA-LNPによる共投与との関連で試験した。

#### 【0171】

LNP-115、-116、-117、-120、-121および-123を実施例1に従って製剤化した。具体的な製剤についての詳細は表1に提供される。実施例1に記載の手順を用いて、この実施例の製剤をNeuro2A細胞への送達について試験した。

#### 【0172】

LNP-121(gRNA)およびLNP-120(Cas9 mRNA)を互いに混合し、それぞれ1ウェルにつき152nM、76nMおよび38nMのgRNA濃度に加えて570ng、285ngおよび142ngのmRNAを投与した; LNP-123(gRNA)およびLNP-120を互いに混合し、それぞれ1ウェルにつき156nM、78nMおよび39nMのgRNA濃度に加えて528ng、264ngおよび132ngのmRNAを投与した; ならびに、LNP-116(gRNA)をLNP-120(Cas9 mRNA)と混合し、それぞれ1ウェルにつき124nM、62nMおよび31nMのgRNA濃度に加えて460ng、229ngおよび114ngのmRNAを投与した。LNP-121は、198nM、99nMおよび49.5nMのgRNA濃度で投与し; LNP-123は、189nM、94.5nMおよび47nMのgRNA濃度で投与し; LNP-116は、124nM、62nMおよび31nMのgRNA濃度で投与し、Cas9 mRNA(1ウェルにつき100ng)は、製造業者の説明書に従ってLF2Kによって実験に加えた。IVT sgRNA-LNP(LNP-123)をLNP(LNP-120)またはLF2Kを使用してCas9 mRNAと、ならびに化学改変d

gRNAとgRNA(LNP-121)の試験濃度で共投与することを含む試料で、編集が観察された。

【0173】

この実施例の製剤を、次に*in vivo*で試験した。実施例1に記載されているように、Cas9 mRNA-LNPとgRNA-LNPのうちの1つとの混合物を2日連続で動物に投与し(動物は、各製剤の1mg/kgを各日に投与された)、1つの製剤は1日だけ投与された(各群でn=5)。最初の投与から6日後(または、単回の投与だけを受けた群では7日後)に動物を安楽死させ、肝臓組織を採取して実施例1に記載の通りNGSによって分析した。

【0174】

図4Aに示すように、単回および2回の投与は、送達のために有効だった。単一の日に1回の投与を受けた群(LNP-121およびLNP-120;図4AのC)と、Cas9 mRNA-LNPを化学改変dgRNA-LNPと共投与したときに連続した日に2回の投与を受けた群(LNP-116およびLNP-120、図4AのA;LNP-121およびLNP-120、図4BのB)との間に統計的差はない。未改変のIVT sgRNA-LNPと共投与されたCas9 mRNA-LNP(LNP-123およびLNP-120、図4BのD)を受けた動物は、この実施例で使用されたdgRNA-LNPと比較して相対的に低いレベルの編集を呈した(図4B)。これらの実験は、Cas9 mRNA-LNPと共投与されるとき、改変dgRNAまたはIVT sgRNAを含むLNPは、*in vitro*および*in vivo*編集を可能にすることを立証する。この実験でIVT sgRNAを含むLNPを使用したときに観察された*in vivo*編集のレベルは、単離されたIVT sgRNA中の不純物によって影響を受ける可能性がある。

【0175】

[実施例6]

改変dgRNA-LNPまたは改変sgRNA-LNPを使用した*in vitro*および*in vivo*送達および編集。

化学改変されたdgRNAを含むLNPおよび化学改変されたsgRNAを含むLNPは、Cas9 mRNA-LNPとの共投与によっても試験した。

【0176】

実施例1に記載の通り、LNPは、化学改変されたdgRNA(TTRまたはFVIIを標的化)、化学改変されたsgRNA(TTRまたはFVIIを標的化)およびIVT Cas9 mRNAで製剤化した。この実施例のdgRNAは化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、二重ガイドを構成するcrRNAおよびtrRNAの5'および3'末端の両方における3つの末端ヌクレオチドの間にホスホロチオエート連結を有する。この実施例のsgRNAも化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、sgRNAの5'および3'末端の両方における3つの末端ヌクレオチドで、およびその間に2'-O-メチル改変およびホスホロチオエート連結を有する。各LNP調製物の構成成分には、CCD脂質(リピドA、45モル%)、コレステロール(44モル%)、DSPC(9モル%)およびPEG2k-DMG(2モル%)が含まれる。LNP-136、-137、-138、-139および-140が、これらの実験で使用された。平均粒径、多分散および封入効率を含む詳細は、表1に提供される。

【0177】

実施例1に記載の通り、この実施例の製剤をNeuro2A細胞への送達について試験した。各製剤を細胞培地に直接的に加えることによって、細胞にガイドLNPおよびCas9 mRNA-LNPをコトランスフェクトして、表2に掲載の濃度をもたらし、実施例1に記載のT7E1アッセイを使用して、パーセント編集を判定した。図5で、ラベルは表2に記載の製剤を表す。

【0178】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 実施例 6 で用いた製剤

図ラベル	ガイド LNP	ガイド濃度 (nM)	Cas9 mRNA (ng) LNP 140
A1	LNP-136	66	245
A2		33	122.5
A3		16.5	61
B1	LNP-139	54	175
B2		27	87.5
B3		13.5	43
C1	LNP-137	49	343
C2		24.5	171.5
C3		12	85
D1	LNP-138	74	239
D2		37	119.5
D3		18.5	60

10

20

## 【0179】

試験した dgRNA - LNP 製剤と比較したときの、Cas9 mRNA - LNP とコトランスフェクトした化学改変された sgRNA - LNP を使用したときの、編集の大きな増加を両標的について測定した（図 5）。FVII および TTR を標的にしたとき、Cas9 mRNA - LNP とコトランスフェクトした化学改変された sgRNA - LNP（LNP - 138 および - 139、図 5）は、細胞でそれぞれ概ね 35 ~ 50 % および 65 ~ 70 % の編集をもたらした。

30

## 【0180】

この実施例の製剤を、次に *in vivo* で試験した。実施例 1 に記載されているように、Cas9 mRNA - LNP（LNP - 140）と試験した gRNA - LNP（LNP - 136、- 137、- 138 および - 139）の 1 つとの混合物を動物に投与し、各構成成分製剤は 2 日連続で 1 mg / kg / 日で投与した（合計 2 mg / kg / 日）（各群で n = 5）。最初の投与から 6 日後に動物を安楽死させ、肝臓組織を採取して実施例 1 に記載の通り NGS によって分析した。

## 【0181】

40

図 6 で、A1 および A2 は、製剤 LNP - 136 および LNP - 140 の混合物の投与を表し；B1 および B2 は、製剤 LNP - 139 および LNP - 140 の混合物の投与を表し；C1 および C2 は、製剤 LNP - 137 および LNP - 140 の混合物の投与を表し；D1 および D2 は、製剤 LNP - 138 および LNP - 140 の混合物の投与を表す。図 6 に示すように、Cas9 mRNA - LNP と共投与した化学改変された sgRNA - LNP を使用したときの、dgRNA - LNP 製剤の使用がもたらした編集の量（概ね 2 % 編集 ~ 5 % 編集）と比較したときの編集の増加（概ね 10 % 編集 ~ 32 % 編集）を両標的について測定した。TTR を標的にする dgRNA - LNP 製剤を受けた動物は、2 つの肝生検にわたって 5 % 未満の編集をもたらしたが、sgRNA - LNP 製剤は 20 % 以上の平均パーセント編集をもたらした（1 動物で 30 % 以上のピーク）。同様に、F

50

V I Iを標的にするd g R N A - L N P製剤を受けた動物は、2つの肝生検にわたって3%未満の編集を示したが、s g R N A - L N P製剤は概ね10%の平均パーセント編集をもたらした(1動物で12%以上のピーク)。

【0182】

これらの結果は、C a s 9 mRNAおよびg R N A (d g R N Aおよびs g R N Aの両方)で別々に製剤化されたL N Pは、一緒に共投与されるときにi n v i v o編集を達成し、C a s 9 mRNA - L N Pがg R N A - L N Pの前に投与されるときにL N Pはi n v i v o編集を達成することを立証した。

【0183】

[実施例7]

C a s 9 mRNAと共製剤化したs g R N Aを含むL N Pを使用したi n v i t r oおよびi n v i v o送達および編集。

L N P組成物と一緒に封入したC a s 9 mRNAおよびs g R N Aの送達のために製剤化したL N Pも、C R I S P R / C a s構成成分を効果的に送達する。

【0184】

実施例1に記載されるように、I V T C a s 9 mRNAと共に化学改変s g R N A (T T RまたはF V I Iを標的にする)でL N Pを製剤化した。RNA構成成分の重量によるm R N A : s g R N Aの比は、概ね1 : 1であった。この実施例のs g R N Aは化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、s g R N Aの5'および3'末端の両方における3つの末端ヌクレオチドで、およびその間に2'-O-メチル改変およびホスホロチオエート連結を有する。各L N P調製物の構成成分には、C C D脂質(リピドA、45モル%)、コレステロール(44モル%)、D S P C (9モル%)およびP E G 2 k - D M G (2モル%)が含まれる。L N P - 152、- 153、- 154および- 155をこれらの実験で使用し、平均粒径、多分散および封入効率を含むこれらの製剤の詳細は、表1に提供される。

【0185】

実施例1に記載の通りに、この実施例の製剤をN e u r o 2 A細胞への送達について試験した。細胞に製剤をトランスフェクトし、パーセント編集は実施例1に記載の通りにN G Sを使用して判定した。

【0186】

図7で、AはL N P - 152の投与を表し；Bは、L N P - 153の投与を表し；Cは、L N P - 154の投与を表し；Dは、L N P - 155の投与を表し；Eは、L N P - 152およびL N P - 153の組合せの投与を表す。各製剤は、300 ngのC a s 9 mRNAおよび93 nMのg R N A ; 100 ngのC a s 9 mRNAおよび31 nMのg R N A ; 30 ngのC a s 9 mRNAおよび10 nMのg R N A ; ならびに10 ngのC a s 9 mRNAおよび3 nMのg R N Aで投与された。図7に示すように、各L N P製剤の投与は強健な編集効率をもたらし、一部の製剤は80%を超える細胞の編集をもたらした(L N P - 153および- 155)。F V I Iを標的にするL N P製剤のうちの2つ(L N P - 152およびL N P - 153)の組合せで細胞を処理し、それも効率的な編集(概ね70~90%編集)、ならびに送達した2つのs g R N Aの間に存在するF V I I遺伝子の一部の切除をもたらした(図7、データ示さず)。

【0187】

この実施例の製剤を、i n v i v oでも試験した。実施例1に記載されているように、動物に投与した(各群でn = 4)。F V I Iを標的にするL N Pを受けた処置群は単回投与(2 mg / kg)を受け、処置群の1つは2 mg / kg(例えば、L N P - 152およびL N P - 153の各々の1 mg / kg)の単回の組合せ投与(L N P - 152およびL N P - 153)を受けた。T T Rを標的にするL N Pを受けた処置群は2回の投与(各々2 mg / kg)を受け、2回目の投与は初回の投与の4日後に送達された(すなわち、1日目に投与1、5日目に投与2)。最初の投与から8日後に全ての群の動物を安楽死させ、血液および肝臓組織を採取して実施例1に記載の通りに分析した。各製剤を、4動物

10

20

30

40

50

に投与した。

【0188】

図8A、8Bおよび9で、AはLNP-152の投与を表し；Bは、LNP-153の投与を表し；Cは、LNP-152およびLNP-153の組合せの投与を表す。各製剤を、4動物で試験した。図8Aおよび8Bに示すように、試験した各LNP製剤は、強健な*in vivo*編集効率をもたらした。TTR配列を標的にするLNP製剤で処置した動物については、一部の動物の各生検からの肝臓細胞の50%より多くは標的部位でインデルを示し、各処置群の全平均（全動物の全ての生検にわたる）は $45.2 \pm 6.4\%$ （LNP-154）および $51.1 \pm 3.7\%$ （LNP-155）であった（図8A）。

【0189】

FVII配列を標的にするLNPで処置した動物は、百分率編集の範囲を肝生検で示し、最大の観察された編集では、FVII配列を標的にする両方のLNP製剤を受けた1動物で、肝臓細胞の70%より多くが生検試料から編集された（例えば、標的部位（複数可）で、またはそれらの間で、インデルまたは切除事象を有する）。各処置群（LNP-152、LNP-153およびLNP-152とLNP-153）の全体の平均（全動物の全ての生検にわたる）は、それぞれ、 $16.9 \pm 6.5\%$ 、 $38.6 \pm 13.2\%$ および $50.7 \pm 15.0\%$ であった（図8B）。両方のFVII標的化LNPを受けた動物については、各sgRNAの標的部位の間の介在ゲノムDNAの切除は、標的部位の一方または両方でのインデルがそうであるように、PCRによって検出された（図9）。

【0190】

図10および11で、Aは、LNP-152の投与を表し；Bは、LNP-153の投与を表し；Cは、LNP-154の投与を表し；Dは、LNP-155の投与を表し；Eは、LNP-152およびLNP-153の組合せの投与を表す。LNP製剤をこの実施例で投与したときに観察された強健な*in vivo*編集は、表現型変化をももたらした。図10に示すように、TTR配列を標的にしたLNPで処置した動物において血清中TTRレベルの大きな低下（最高概ね75%）が観察された（しかし、対照またはFVIIを標的にしたLNPで処置した動物では観察されなかった）。同様に、FVIIを標的にしたLNPで処置した動物において血漿中FVII活性の低減したレベルが観察された（しかし、対照またはTTRを標的にしたLNPで処置した動物では観察されなかった）（図11）。

【0191】

[実施例8]

製剤パラメータの変異。

1つの製剤としてCas9 mRNAおよびgRNAと一緒に送達するために製剤化されたLNPを、（1）ある範囲の用量にわたって；（2）変化させたmRNA：gRNAの比で；（3）1回投与対2回投与による効力について；および（4）LNPが脾臓によって取り込まれるかまたは脾臓における編集をもたらすかどうかについて試験した。

【0192】

実施例1に記載されるように、IVT Cas9 mRNAと共に化学改変sgRNA（TTRを標的にする）でLNPを製剤化した。mRNA：sgRNAの試験した比（RNA構成成分の重量による）は、概ね1：1（LNP-169）、概ね10：1（LNP-170）または概ね1：10（LNP-171）であった。この実施例で使用したsgRNAは、sgRNAの5'および3'末端の両方における3つの末端ヌクレオチドで、およびその間に2'-O-メチル改変およびホスホロチオエート連結をそれぞれ含む。各LNP調製物の構成成分には、リポドA（45モル%）、コレステロール（44モル%）、DSPC（9モル%）およびPEG2k-DMG（2モル%）が含まれた。LNP-169、-170およびLNP-171が、これらの実験で使用された。平均粒径、多分散および封入効率を含む詳細は、表1に提供される。

【0193】

用量応答研究

10

20

30

40

50



この研究で、実施例 1 に記載の通り 1 日目に L N P - 1 6 9 を 0 . 1 m g / k g 、 0 . 5 m g / k g または 2 m g / k g の用量で動物に投与した（各群で  $n = 5$  ）。5 日目および 9 日目に、T T R の血清レベル分析のために血液を採取した。実施例 1 に記載の通り、N G S 分析のために 9 日目に検死で肝臓および脾臓を採取した。

#### 【 0 1 9 4 】

図 1 2 A に示すように、3 用量全ての投与は肝臓においてかなりの編集効率をもたらし、観察された線形用量応答は 0 . 9 4 4 1 の  $r^2$  値を有していた。最高用量群（2 m g / k g ）では、1 動物の肝臓細胞のほぼ 6 0 % が T T R 標的部位で編集され、この群は肝臓細胞の平均約 5 0 % が編集されていた。投与の 5 日後および 9 日後に測定したとき、最高用量を投与された各動物は血清中 T T R レベルの統計的に有意な低減も示し、血清中 T T R レベルの平均低減は 7 5 % であった（P B S を投与した動物と比較して；図 1 2 B ）。

10

#### 【 0 1 9 5 】

m R N A : g R N A の比を変更する

1 日目に、実施例 1 に記載されているように、1 : 1 の m R N A : g R N A 比の L N P - 1 6 9 （すなわち、1 m g / k g の m R N A 、1 m g / k g の g R N A 、合計 2 m g / k g の R N A 用量）、1 0 : 1 の比の L N P - 1 7 0 （すなわち、1 . 8 m g / k g の m R N A 、0 . 1 8 m g / k g の g R N A 、合計 1 . 9 8 m g / k g の R N A 用量）、または、1 : 1 0 の比の L N P - 1 7 1 （すなわち、0 . 1 8 m g / k g の m R N A 、1 . 8 m g / k g の g R N A 、合計 1 . 9 8 m g / k g の R N A 用量）、を動物に投与した（各群につき  $n = 5$  ）。（注：1 : 1 の m R N A : g R N A 比の用量を受けた群およびデータは、上のこの実施例の用量応答研究に記載されるのと同じ群およびデータである。）5 日目および 9 日目に血液を採取し、血清中 T T R レベルを測定した。実施例 1 に記載の通り、N G S 分析のために 9 日目に検死で肝臓および脾臓を採取した。

20

#### 【 0 1 9 6 】

図 1 3 A に示すように、L N P - 1 6 9 （1 : 1 の m R N A : g R N A 比）の投与は、1 動物で T T R 標的部位におけるほぼ 6 0 % の編集をもたらし、この群は平均約 5 0 % の編集を有していた。1 : 1 0 および 1 0 : 1 の L N P 製剤を受けた動物も編集を実証し、この実験において、L N P - 1 7 1 を受けた群の平均パーセント編集は概ね 3 2 % の編集を示し、L N P - 1 7 0 を受けた群は概ね 1 7 % の編集を示した。さらに、図 1 3 B に示すように、5 日目に、血清中 T T R レベルの統計的に有意な低減が各処置群で検出された（P B S 対照と比較して）。9 日目まで、1 : 1 の m R N A : s g R N A および 1 : 1 0 の m R N A : s g R N A を受けた群は、血清中 T T R レベルの統計的に有意な低減を保持した。

30

#### 【 0 1 9 7 】

1 回投与対 2 回投与

この研究では、1 群の動物は、1 日目に L N P - 1 6 9 の単回投与（2 m g / k g ）を受けたが、別の群は実施例 1 に記載されているように L N P - 1 6 9 の 2 回の投与（各々 2 m g / k g ）を受け、最初の投与は 1 日目におよび 2 回目の投与は 5 日目に投与された（両群で  $n = 5$  ）。（注：L N P - 1 6 9 の単回投与を受けた群およびデータは、上のこの実施例の用量応答および m R N A : g R N A 比研究に記載されるのと同じ群およびデータである。）5 日目に（2 回目の投与を受けた群のためには 2 回目の用量の投与の前に）および実施例 1 に記載の通りに再び 9 日目の検死で、血液を T T R 血清中レベルのために両群から採取した。

40

#### 【 0 1 9 8 】

図 1 4 A に示すように、L N P - 1 6 9 の単回投与を受けた群で、T T R 標的部位のほぼ 6 0 % の編集が 1 動物で観察され、この群は平均約 5 0 % の編集を有していた。L N P - 1 6 9 の 2 回の投与を受けた動物で類似の平均数がより低い標準偏差で達成され、この群は T T R 標的部位の編集が平均で概ね 5 5 % であった。図 1 4 B に示すように、両群は血清中 T T R レベルの有意な低減を示した。

#### 【 0 1 9 9 】

50

### 脾臓による取り込みおよびそこにおける編集の評価

LNPが脾臓に誘導されてそれによって取り込まれ、それによって遺伝子編集をもたらすかどうか判定するために、上記の研究（この実施例の中の）の各動物から脾臓を検死で採取した。ゲノムDNAを脾臓組織から抽出し、実施例1に記載の通りにNGS分析に付した。

#### 【0200】

図15で、Aは、2回の投与のために2mg/kgで投与されたLNP-169を表し；Bは、単回投与としての0.1mg/kgの1:1のmRNA:gRNAの比を有するLNP-169を表し；Cは、単回投与としての0.5mg/kgの1:1のmRNA:gRNAの比を有するLNP-169を表し；Dは、単回投与としての2mg/kgの1:1のmRNA:gRNAの比を有するLNP-169を表し；Eは、単回投与としての2mg/kgの10:1のmRNA:gRNAの比を有するLNP-170を表し；Fは、単回投与としての2mg/kgの1:10のmRNA:gRNAの比を有するLNP-171を表す。図15に示すように、それらの肝臓と比較してこれらの動物の脾臓において、有意により少ない編集（細胞の概ね2%未満）が観察された。これらの研究において、肝臓において概ね50%の編集が観察された（例えば、LNP-169を受けた群において）。これらの結果は、本明細書で提供されるLNPが、脾臓と対照的にほとんど肝臓を標的にすることを示す。

#### 【0201】

##### [実施例9]

(1) Cas9 mRNA-LNPと共投与される改変されたdgRNA-LNPと、(2) Cas9 mRNAおよび改変されたdgRNAを1つの製剤と一緒に含むLNPの間のin vivo比較研究。

別々のLNPとしての、または1つの製剤中に一緒に、Cas9 mRNAおよび改変されたdgRNAの送達のために製剤化されたLNPは、CRISPR/Cas構成成分を効果的に送達する。

#### 【0202】

実施例1に記載の通りに、化学改変されたdgRNA(TTRを標的化)と一緒に(LNP-174、-175)、または別々に(LNP-172、-173)IVT Cas9 mRNAでLNPを製剤化した。この実施例でdgRNAを構成するcrRNAおよびtrRNAの両方は、各RNAの5'および3'末端の両方における3つの末端ヌクレオチドの間にホスホロチオエート連結を含んでいた。各LNP調製物の構成成分には、CCD脂質(リピドA、45モル%)、コレステロール(44モル%)、DSPC(9モル%)およびPEG2k-DMG(2モル%)が含まれる。LNP-172、-173、-174および-175が、これらの実験で使用された。LNP-175でdgRNAを構成するcrRNAおよびtrRNAがLNPで製剤化される前にお互いに先ずプレアニールされたことを除いて、LNP-174およびLNP-175の組成物は同一であった。これは、前述のように、先ずcrRNAおよびtrRNAを95℃で10分の間一緒にインキュベートし、その後、室温に冷却して製剤化に進行することによって達成された。平均粒径、多分散および封入効率を含むLNPに関する他の詳細は、表1に提供される。

#### 【0203】

実施例1に記載の通りに、各LNPを2mg/kgで動物に投与した(各群でn=5)。投与の8日後の検死で肝臓を採取し、実施例1に記載の通りに、ゲノムDNAを単離してNGS分析に付した。

#### 【0204】

図16で、Aは、dgRNAスプリット製剤(LNP-172およびLNP-173)の投与を表し；Bは、dgRNA共製剤(LNP-174)の投与を表し；Cは、dgRNAがプレアニールされた製剤(LNP-175)の投与を表す。図16に示すように、各群からの肝臓で編集が検出された(概ね4~6%の編集)。Cas9 mRNAおよびdgRNAと一緒に共製剤化されたLNPを受けた動物、ならびに別々に製剤化されたL

N P から m R N A および d g R N A を受けた動物は、編集を示した。d g R N A で製剤化された ( C a s 9 m R N A と一緒にまたは別々に ) L N P を使用して測定した編集効率は、s g R N A で製剤化された L N P を使用して検出したものより実質的に低い ( 例えば、実施例 6 ~ 8 を参照 ) 。

【 0 2 0 5 】

[ 実施例 1 0 ]

L N P の A p o E 結合および一次肝細胞のトランスフェクション。

実施例 8 で実証されるように、本明細書で提供される L N P は、肝臓によって効果的に取り込まれるが、脾臓によってわずかに取り込まれるだけである。この実施例は、一次肝細胞における A p o E 媒介取り込みに関するデータを提供し、L N P が A p o E に結合することを実証した L N P - A p o E 結合を試験するためのアッセイを提供する。

10

【 0 2 0 6 】

一次肝細胞への L N P の送達

他のタンパク質に加えて、血清は培地に A p o E の供与源を提供し、したがって、L N P が一次肝細胞への取り込みのために血清 ( 例えば、A p o E の供与源として ) を必要とするかどうかについて試験した。これは、血清の存在の有無で、L N P を一次肝細胞に i n v i t r o で加えることによって達成された。

【 0 2 0 7 】

実施例 1 に記載の通りに、L N P をマウス一次肝細胞に送達した。血清の非存在下では、試験したいかなる L N P についても、T 7 E 1 アッセイによって編集は検出されなかった ( データ示さず ) 。しかし、トランスフェクションの前に L N P を 3 % のマウス血清とインキュベートしたとき、L N P は肝細胞によって取り込まれて編集をもたらした。代表的データセットを、図 1 7 に示す。この実験では、L N P - 1 6 9 ( T T R を標的化 ) を 3 % のマウス血清にプレインキュベートし、次に様々な濃度でマウス一次肝細胞に加えた。図 1 7 のラベルは表 3 に規定され、投与された L N P - 1 6 9 の濃度を記載する。図 1 7 に示すように、N G S によって測定したとき、血清の追加は、T T R 標的部位で編集の用量依存的増加をもたらした。これらの結果は、血清中に存在する A p o E が肝細胞における L N P 取り込みを媒介することを示唆する。

20

【 0 2 0 8 】

【 表 3 】

30

表 3. 投与した LNP-169 の濃度

ラベル	nM gRNA	ng Cas9 mRNA
A	30.8	99.9
B	10.3	33.3
C	3.4	11.1
D	1.1	3.7
E	0.4	1.2
F	0.1	0.4
G	0.0	0.1

40

【 0 2 0 9 】

A p o E 結合アッセイ

L N P を A p o E で最も一般的な形態である組換え A p o E 3 とインキュベートし、次に、H P L C の上の塩勾配を使用してヘパリン親和性カラムで分離した。H P L C ランにおいて、A p o E 3 に結合した L N P および未結合の L N P に対応した 2 つのピーク群が

50

あった。A p o E 3 に結合せず、ヘパリンカラム中を自由に流れた遊離の L N P は未結合である。結合していたのは、ヘパリンカラムに結合し塩勾配において溶出した L N P / A p o E 3 複合体に相当する、より長い滞留時間を有するピークであった。結合を計算するために、A p o E 3 に結合した L N P に対応するピーク面積を、両方のピークの面積の合計によって割り算することによって結合ピーク面積の百分率を計算した。

#### 【 0 2 1 0 】

実施例 1 に記載されるように、C a s 9 mRNA および化学改変 s g R N A で L N P を製剤化した。この実施例で使用した s g R N A は化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、それぞれ s g R N A の 5' および 3' 末端の両方における 3 つの末端ヌクレオチドで、およびその間に 2' - O - メチル改変およびホスホロチオエート連結を有していた。各 L N P 調製物 ( L N P - 1 6 9 および L N P - 1 7 1 ) の構成成分には、リピド A ( 4 5 モル % )、コレステロール ( 4 4 モル % )、D S P C ( 9 モル % ) および P E G 2 k - D M G ( 2 モル % ) が含まれる。平均粒径、多分散および封入効率を含むこれらの製剤の詳細は、表 1 に提供される。保存用 A p o E 3 ( 組換えヒトアポリポタンパク質 E 3、R & D S y s t e m s、カタログ番号 4 1 4 4 - A E - 5 0 0 ) 溶液を 0.5 m g / m L で用いて、A p o E 3 を 2 5 μ g / m L、5 0 μ g / m L、1 0 0 μ g / m L、2 0 0 μ g / m L および 3 0 0 μ g / m L で L N P 試料に加えた。試料は、室温で一晩インキュベートした。

#### 【 0 2 1 1 】

2 つの緩衝液を調製した ( 各々 5 0 0 m L ) ; 緩衝液 A は、p H 8.0 に調整した 2 0 m M のトリス緩衝液であり、緩衝液 B は、1 M の N a C l を有する p H 8.0 に調整した 2 0 m M のトリス緩衝液である。H P L C 分析のための勾配および流量は、下記のようなものである。

#### 【 0 2 1 2 】

#### 【表 4】

番号	時間	流量 (ml/分)	%B	曲線
1	0.000	ラン		
2	0.000	0.200	0.0	5
3	8.000	0.200	0.0	5
4	10.000	0.200	80.0	5
5	13.000	0.200	80.0	5
6	15.000	0.200	100.0	5
7	18.000	0.200	100.0	5
8	19.000	0.200	0.0	5
9	25.000	0.200	0.0	5
10	New Row			
11	25.000	ランを終了		

#### 【 0 2 1 3 】

試料を一晩インキュベートした後に、各試料を H P L C によって分析し、結合したピークのパーセント面積を前述の通りに計算した。

#### 【 0 2 1 4 】

図 1 8 に示すように、A p o E 3 の量の増加に伴って、例えば A p o E 3 に結合した結果として、より多くの L N P ( 両 L N P - 1 6 9 ( 破線によって表される ) および - 1 7 1 ( 実線によって表される ) ) がヘパリンカラムに結合した。これらの結果は、L N P が A p o E 3 に結合することを示す。

#### 【 0 2 1 5 】

## [実施例 1 1]

DNA 発現カセットから発現された sgRNA と LNP を使用した *in vitro* および *in vivo* 送達および編集。

この実施例は、Cas9 mRNA および sgRNA をコードする発現カセットを担持させた LNP を使用した遺伝子編集を実証する。

## 【0216】

*in vitro* LNP 送達

マウス TTR を標的にする sgRNA として連結した U6 プロモーターを含有する DNA 配列の PCR 増幅によって、sgRNA をコードするアンプリコンを調製した。ゲノム DNA への DNA アンプリコンの組込みを阻止するために、各プライマーは、5' 末端に反転したジデオキシヌクレオチドを含有した。フェノール/クロロホルム抽出と続くエタノール沈殿によって、PCR 生成物を精製した。DNA ペレットを乾燥させて、TE 緩衝液に再懸濁させた。

## 【0217】

実施例 1 に記載の通りに、LNP を IVT Cas9 mRNA (「mRNA - LNP」または LNP - 178) または sgRNA 発現カセット (「DNA - LNP」または LNP - 176) で製剤化した。IVT Cas9 mRNA および sgRNA 発現カセットは、製造業者の説明書に従って Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) で別々に製剤化した (それぞれ、「mRNA LF2K」または「DNA LF2K」)。以下のレジメンによって各ウェルの中の細胞培地に直接的に加えて希釈することによって、製剤をマウス Neuro2A 細胞に適用した (100 ng の Cas9 mRNA および 100 ng の sgRNA 発現カセット) :

- ・ Cas9 mRNA および sgRNA 発現カセットの共送達 ;
- ・ Cas9 mRNA の 2 時間前に投与した sgRNA 発現カセット ; および
- ・ sgRNA 発現カセットの 2 時間前に投与した Cas9 mRNA 。

## 【0218】

トランスフェクションの後の 48 時間細胞をインキュベートし、細胞溶解物は実施例 1 に記載の通りに T7E1 分析によって分析した。図 19 に示すように、mRNA および DNA 構成成分の両方を LNP に製剤化したとき、1 つの構成成分または他を Lipofectamine 2000 で製剤化したときと比較して、より高い百分率の TTR 編集が観察された。

## 【0219】

## [実施例 1 2]

*in vitro* 対 *in vivo* 編集。

実施例 1 に記載の通りに、Cas9 mRNA および異なるマウス TTR 配列を標的にする化学改変 sgRNA を製剤化して、マウスに投与した (2 mg / kg)。マウス一次肝細胞に *in vitro* でトランスフェクトするために、同じ LNP 調製物を使用した。この実施例の sgRNA は化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、それぞれ sgRNA の 5' および 3' 末端の両方における 3 つの末端ヌクレオチドで、およびその間に 2' - O - メチル改変およびホスホロチオエート連結を有する。

## 【0220】

10

20

30

40

## 【表 5 - 1】

表 4. 実施例 12 で用いられた製剤

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステルス 脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP257 (TTR686)	TTR	sg009 + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	77.86	0.015	99%
LNP258 (TTR705)	TTR	sg016 + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	88.24	0.033	99%
LNP259 (TTR268)	TTR	cr013*** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	81.74	0.070	99%
LNP260 (TTR269)	TTR	cr018*** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	86.94	0.049	99%
LNP262 (TTR271)	TTR	cr021*** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	86.48	0.078	98%
LNP263 (TTR272)	TTR	cr009*** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	86.81	0.047	98%
LNP264 (TTR273)	TTR	cr010*** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	86.86	0.032	98%
LNP265 (TTR274)	TTR	cr007*** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	86.85	0.049	97%
LNP266 (TTR275)	TTR	cr019*** + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	87.77	0.050	97%

## 【 0 2 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

LNP267 (TTR276)	TTR	cr008*** + Cas9 mRNA	リポド A	PEG2k- DMG	81.29	0.081	98%
LNP268 (TTR277)	TTR	cr011*** + Cas9 mRNA	リポド A	PEG2k- DMG	83.80	0.053	97%

\*\*\* = 5'および3'末端の3つの末端ヌクレオチドでの、およびそれの間の2'-O-メチル改変およびホスホロチオエート連結による単一ガイドフォーマット

## 【0222】

*in vitro* 研究のために、7ポイント対数用量応答を実行した(100 ng / ウェルから開始)。トランスフェクションの48時間後に、ゲノムDNAを収集し、編集パーセントをNGSによって測定した。図20はこれらの*in vitro*および*in vivo*実験の編集百分率を示し、編集効率が培養および*in vivo*における一次肝細胞の間で相関することを実証している。

## 【0223】

NGSは全体の編集効率に加えて特異的配列決定結果を提供するので、配列特異的編集パターンをNeuro2A細胞と比較した。図21は、マウスNeuro2A細胞(Cas9 mRNAおよびgRNAをトランスフェクトされた)とマウス一次肝細胞(Cas9 mRNAおよびgRNAを含有するLNPをトランスフェクトされた)の間で、挿入および欠失パターンが有意に異なることを実証する代表的データを示す。マウス一次肝細胞は、*in vivo*で観察されたもの(Cas9 mRNAおよびgRNAを含有するLNPをトランスフェクトされた)と非常に類似の編集パターンを与えた(図22)。図22に示すように、マウス一次肝細胞で測定された編集の53.2%は欠失(主に1bpの欠失)であり、16.8%は挿入(主に1bpの挿入)であって、合計で70%の編集であった。合計70%の編集のうち、編集の64.5%はフレームシフト突然変異をもたらし、それは測定された全編集の約92%を占める(示さず)。同様に、*in vivo*でのマウス肝臓細胞へのCas9 mRNAおよびgRNAのLNPに基づく送達から観察された編集百分率および編集タイプのための、代表的データを示す：マウス肝臓細胞で*in vivo*で測定された編集の46.6%は欠失(再び、主に1bpの欠失)であり、12.9%は挿入(再び、主に1bpの挿入)であって、合計で59.5%の編集であった。合計59.5%の編集のうち、編集の57.4%はフレームシフト突然変異をもたらし、*in vivo*で測定された編集の約96%を占める(示さず)。

## 【0224】

## [実施例13]

LNPによって送達されたCRISPR/Cas9構成成分の薬物動態。

Cas9 mRNAおよびマウスTTRを標的にするsgRNAを含有するLNP-294を、実施例1に記載の通りに製剤化した。mRNA対ガイドRNAの比は、HPLCによって確認した。実施例1に記載の通りに各LNPを2 mg / kgで動物に投与し(各群でn = 3)、以下の時点で解体した：5分、15分、30分、60分、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、72時間および7日。検死時に、Cas9 mRNAおよびガイドRNAのレベルのqPCR分析のために、血漿、肝臓および脾臓を採取した。図23はこれらの構成成分の血漿中濃度を示し、図24は肝臓中の濃度を示し、図25は脾臓中の濃度を示す。血漿中濃度のために、以下の薬物動態学的パラメータを計算した：

## 【0225】

## 【表 6】

表 5. 薬物動態学的パラメータ

パラメータ	sg009 (sgRNA)	Cas9 (mRNA)
Dose (mg/kg)	1 (25mcg/ms)	1 (25mcg/ms)
C <sub>max</sub> (mcg/mL)	39.049	18.15
T <sub>max</sub> (hr)	0.083	0.5
T <sub>1/2</sub> (hr)	2.32	2.54
Vd (mL/kg)	195.6	208.4
Cl (mL/hr*kg)	58.4	56.7
AUC <sub>last</sub> (mcg*hr/mL)	21.99	18.39

10

## 【0226】

図26Aは、血漿および組織におけるsgRNA対Cas9 mRNAの相対比を示す。

## 【0227】

20

処置マウスにおけるサイトカイン誘導も、測定した。この分析のために、血清サイトカイン測定のために尾静脈ニックによって概ね50～100μLの血液を採取した。室温で概ね2時間血液を凝固させ、1000×gで10分間遠心分離してから血清を採取した。採取試料でのサイトカイン分析のために、IL-6、TNF-アルファ、IFN-アルファおよびMCP-1を測定するLuminexベースの磁気ビーズ多重アッセイ(Affymetrix ProcartaPlus、カタログ番号Exp040-00000-801)を使用した。キット試薬および標準は、製造業者のプロトコルの指示通りに調製した。提供された試料希釈剤を用いてマウス血清を4倍に希釈し、50μLを、希釈された抗体コート磁気ビーズの50μLを含有するウェルに加えた。プレート室温で2時間インキュベートし、その後洗浄した。希釈したビオチン抗体(50μL)をビーズに加え、室温で1時間インキュベートした。ビーズを再び洗浄した後、希釈したストレプトアビジン-PEの50μLを各ウェルに加え、続いて30分間インキュベートした。ビーズを再び洗浄し、次に100μLの洗浄緩衝液に懸濁し、Bio-Plex 200機器(Bio-Rad)で読み取った。BioPlex Managerバージョン6.1分析パッケージを使用してデータを分析し、5パラメータロジスティック曲線あてはめを使用して標準曲線からサイトカイン濃度を計算した。図27は、処置マウスの経時的血漿中サイトカインレベルを示す。図27に示すように、サイトカインの各々は、処置の2～4時間後に測定可能な増加を有し、12～24時間までに各々ベースラインに戻った。

30

## 【0228】

3つの異なるガイド配列を実施例1に従って別々に製剤化し、リピドAの薬物動態学的プロファイルを判定するためにマウス(n=3)に注射した。マウスの肝臓および血漿におけるリピドAのレベルは、LC/MSによって測定した。図26Bは、リピドAの血漿および肝臓濃度を経時的に示す。肝臓におけるT<sub>max</sub>は投与から30分以内に達成されたが、血漿および肝臓におけるT<sub>1/2</sub>はLNP投与から概ね5～6時間以内に達成された。

40

## 【0229】

## [実施例14]

in vivo編集の応答の期間

Cas9 mRNAおよびマウスTTR配列を標的にする化学改変sgRNAを、実施例1に記載の通りに製剤化した。

## 【0230】

50



## 【表 7】

表 6. LNP402 の製剤情報。

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステルス 脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP402	TTR	sg282 + Cas9 mRNA	リポド A	PEG2k- DMG	82.3	0.171	97.43

10

## 【0231】

LNP を、実施例 1 に記載の通りにマウス (3 mg / kg、1 mg / kg または 0.3 mg / kg の単回投与) に投与した。マウスのコホートを投与の 1、2、4、9、13 および 16 週後に血清中 TTR レベルについて、ならびに投与の 1、2、9 および 16 週後に肝臓 TTR 編集について測定した。肝臓 TTR 編集を測定するために、DNA 抽出および分析のための特定のコホートの各動物からの中葉から肝臓組織試料を採取した。ビーズをベースとした抽出キット、MagMAX-96 DNA 多試料キット (ThermoFisher、カタログ番号 4413020) を製造業者のプロトコルに従って使用して、10 mg の組織からゲノム DNA を抽出し、それは、溶解緩衝液 (組織 10 mg につき概ね 400 μL) で組織をホモジナイズし、DNA を沈殿させることを含む。PCR および以降の NGS 分析のために、全ての DNA 試料を 100 ng / μL 濃度に正規化した。

20

## 【0232】

この実施例の sgRNA は化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、下に表すように 2' - O - メチル改変およびホスホロチオエート連結を有する (m = 2' - OMe ; \* = ホスホロチオエート) :

## 【0233】

sg282 :

## 【0234】

## 【化 6】

mU\*mU\*mA\*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm  
AmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm  
AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*  
mU\*mU\*mU.

40

## 【0235】

図 28 はマウス血清中 TTR レベルを経時的に示し、図 29A は NGS によって測定したときの対応する編集百分率を示す。図 29B は、投与から 16 週後までの経時的マウス血清中 TTR レベルおよび NGS によって測定したときの対応する編集百分率を示す。

## 【0236】

## [実施例 15]

mRNA 調製物を使用した製剤

実施例 1 に記載の通りに、Cas9 mRNA は、沈殿だけおよび HPLC 精製プロト

50

コルの両方を使用して調製した。HPLC精製mRNAを使用してLNPを製剤化し(LNP492)、沈殿だけで処理したmRNAを使用して製剤化したLNP(LNP490、LNP494)と比較した。LNP494のCas9 mRNAカーゴは、沈殿だけのmRNAの異なる合成ロットを使用して調製した。

【0237】

【表8】

表7. 実施例15で用いた製剤。

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステルス 脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP490	TTR	sg282 + Cas9 mRNA	リポド A	PEG2k- DMG	81.9	0.194	98.24
LNP492	TTR	sg282 + Cas9 mRNA	リポド A	PEG2k- DMG	85.9	0.207	96.33
LNP494	TTR	sg282 + Cas9 mRNA	リポド A	PEG2k- DMG	70.2	0.153	96.48

【0238】

実施例1の*in vivo* LNP送達に記載の通りに、マウスに各製剤の0.5または1 mg/kgを投与した。この実施例で使用したsgRNAは、実施例14に記載のようにsg282であった。

【0239】

図30は、投与から4時間後のマウス血清中のサイトカイン活性を示す。図31はマウス血清中TTR濃度レベルを示し、図32はマウス肝臓のTTR編集レベルを示す。

【0240】

10

20

30

40

50

## 【表 9】

表 8. 図 30、31 および 32 の図ラベル。

図ラベル	LNP	用量(mg/kg)
対照	N/A (PBS)	N/A
A1	LNP490	1
A2		0.5
B1	LNP492	1
B2		0.5
C1	LNP494	1
C2		0.5

## 【0241】

## [実施例 16]

## 凍結製剤

約 4.5 のリピド A 対 RNA リン酸 (N:P) のモル比で、LNP を製剤化した。脂質 ナノ粒子構成成分を 100% エタノールに以下のモル比で溶解した：45 モル% (12.7 mM) のリピド A；44 モル% (12.4 mM) のコレステロール；9 モル% (2.53 mM) の DSPC；および 2 モル% (0.563 mM) の PEG2k-DMG。RNA カーゴは 50 mM 酢酸緩衝液 pH 4.5 に溶解し、概ね 0.45 mg/mL の RNA カーゴの濃度をもたらした。この研究のために、実施例 14 に記載される sg282 を使用した。

## 【0242】

## 【表 10】

表 9. 実施例 16 で用いた LNP 製剤。

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステルス 脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP493	TTR	sg282 + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	69.1	0.013	97.93
LNP496	PCSK9	sg396 + Cas9 mRNA	リピド A	PEG2k- DMG	78.6	0.150	94.45

## 【0243】

Precision Nanosystems NanoAssembler (商標) ベンチトップ機器を製造業者のプロトコルに従って使用して、脂質およびRNA溶液を微流動混合することによってLNP (LNP493、LNP496) を形成した。差別的流速を使用した混合の間、水性対有機溶媒の2:1の比を維持した。混合の後、LNPを採取し、50 mMのトリス緩衝液pH 7.5に希釈した。製剤化したLNPを、0.2 μm滅菌フィルターを使用して濾過した。結果として生じた濾液を、pH 7.5の50 mMトリス緩衝液で調製した10 w/v %スクロース90 mM NaClと1:1で混合した。5 w/v %スクロース、45 mM NaCl、50 mMトリス緩衝液の最終LNP製剤は、投与の日まで1.5日の間4 °Cおよび-80 °Cで保存した。

【0244】

0.5および1 mg/kg (投与の1時間前に凍結製剤を25 °Cで解凍した) で、LNPをマウスに投与した。図33はマウス血清中TTR濃度レベルを示し、図34は投与後のマウス肝臓のTTR編集レベルを示す。

【0245】

【表11】

表10. 図33および34の図ラベル。

図ラベル	LNP	用量(mg/kg)
対照	N/A (PBS)	N/A
A1	LNP493 (4°Cで保存)	1
A2		0.5
B1	LNP493 (-80°Cで保存)	1
B2		0.5
C1	LNP494 (4°Cで保存)	1
C2		0.5
D	LNP496 (非 TTR 標的化対照、マウス PCSK9 を標的にする)	2

【0246】

この実施例のsgRNAは化学的に合成されて、民間の供給業者から供給され、下に表すように2'-O-メチル改変およびホスホロチオエート連結を有する (m = 2'-OMe; \* = ホスホロチオエート) :

sg396:

【0247】

10

20

30

40

50

## 【化 7】

mG\*mC\*mU\*GCCAGGAACCUACAUUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm  
AmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm  
AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*  
mU\*mU\*mU.

10

## 【0248】

## [実施例 17]

## 代わりの LNP 製剤化プロセス

約 4.5 のリピド A 対 RNA リン酸 (N:P) のモル比で、LNP を製剤化した。脂質 ナノ粒子構成成分を 100% エタノールに以下のモル比で溶解した：45 モル% (12.7 mM) のリピド A；44 モル% (12.4 mM) のコレステロール；9 モル% (2.53 mM) の DSPC；および 2 モル% (0.563 mM) の PEG2k-DMG。酢酸緩衝液 (最終濃度 25 mM の酢酸ナトリウム、pH 4.5) またはクエン酸緩衝液 (最終濃度 25 mM のクエン酸ナトリウム、100 mM の NaCl、pH 5) に RNA カーゴを溶解し、概ね 0.45 mg/mL の RNA カーゴの濃度をもたらした。この研究のために、実施例 14 に記載される sg282 を使用した。

20

## 【0249】

Precision Nanosystems NanoAssembler (商標) ベンチトップ機器を製造業者のプロトコルに従って使用して、またはクロスフロー混合を使用して、脂質および RNA 溶液を微流動混合することによって LNP を形成した。LNP 563 および LNP 564 は、NanoAssembler 調製物を使用して調製し、ここでは、水相で 8 mL/分および有機相で 4 mL/分である差別的流速を使用した混合の間、水性対有機溶媒の 2:1 の比を維持した。混合の後、LNP を採取し、50 mM のトリス緩衝液 pH 7.5 に 1:1 で希釈した。LNP を 50 mM トリス pH 7.5 で一晚透析し、その翌日、0.2 μm 滅菌フィルターを使用して濾過した。結果として生じた濾液を濃縮し、pH 7.5 の 50 mM トリス緩衝液で調製した 10 w/v% スクロース 90 mM の NaCl と 1:1 で混合した。5 w/v% スクロース、45 mM NaCl、50 mM トリス緩衝液の最終 LNP 製剤は、投与の日まで 1.5 日の間 4 および -80 で保存した。

30

## 【0250】

40

50

## 【表 1 2】

表 11. 実施例 17 で使用した LNP の製剤情報。

LNP #	標的	RNA カーゴ	CCD 脂質	ステルス 脂質	平均 粒径 (nm)	pdi	EE (%)
LNP561	TTR	sg282 + Cas9 mRNA*	リピド A	PEG2k- DMG	111.0	0.058	94.73
LNP562	TTR	sg282 + Cas9 mRNA*	リピド A	PEG2k- DMG	106.2	0.047	93.68
LNP563	TTR	sg282 + Cas9 mRNA*	リピド A	PEG2k- DMG	72.8	0.065	94.68
LNP564	TTR	sg282 + Cas9 mRNA*	リピド A	PEG2k- DMG	123.0	0.105	88.03

\*Cas9 1×NLS、HA タグなし。

## 【 0 2 5 1】

LNP561 および LNP562 は、クロスフロー技術を使用して調製し、シリンジポンプを 2 シリンジの RNA と 0.45 mg/mL で使用し、1 シリンジは脂質含有有機相であり、1 シリンジは水であった。これらを可変管長により 40 mL/分 で混合し、水相および有機相を 0.5 mm ピーククロスを通して押し出し、このアウトプットは水の管に接続された 1 mm ティーに導入した。LNP は室温で 1 時間インキュベートし、次に水で 1:1 に希釈した。簡潔には、シリンジポンプによって LNP および水を 1 mm ティーに 25 mL/分 で導入した。

## 【 0 2 5 2】

精製および濃縮のために、接線流濾過を使用した。この手順のためには、通常、Sartorius からの Vivaflow 50 カートリッジを 500 mL の水でプライミングし、次に、Pall Minimate システムを 60 mL/分の供給速度で使用して LNP を導入する。およそ 1.7 mL/分の一定流速を維持するように、濾過液のラインを締める。LNP が濃縮されると、15 倍の量の PBS または 5% スクロース、45 mM NaCl、pH 7.5 の 50 mM トリスを 80 mL/分の供給速度で真空下において導入する。1.9 mL/分の流速を維持するように、濾過液のラインを締める。限外濾過が完了すると、LNP を濃縮し、無菌の無 DNアーゼ RNアーゼ収集管に採取し、投与の日まで、PBS 製剤のために 4℃ で、または TSS (すなわち、トリス、スクロースおよび塩) 製剤のために 4℃ もしくは -80℃ で保存する。

## 【 0 2 5 3】

1.0 および 2 mg/kg (投与の 1 時間前に凍結製剤を 25℃ で解凍した) で、LNP をマウスに投与した。図 35 はマウス血清中 TTR 濃度レベルを示し、図 36 は異なる

製剤を投与した後のマウス肝臓の T T R 編集レベルを示す。

【 0 2 5 4 】

【表 1 3 】

表 12. 図 35 および 36 の図ラベル。

図ラベル	LNP	用量(mg/kg)
対照	N/A (TSS 緩衝液)	N/A
A1	LNP561	2
A2		1
B1	LNP 562 (2〜8℃で保存した LNP)	2
B2		1
C1	LNP562 (-80℃で保存した LNP)	2
C2		1
D1	LNP563	2
D2		1
E1	LNP564	2
E2		1

【 0 2 5 5 】

[実施例 1 8]

より高等な種への L N P の送達。

実施例 1 4 に記載されるものと同様に製剤を調製した。ある特定の試験では、s g 2 8 2 におけるのと同じ化学的改変で s g R N A を改変したが、ラット T T R 配列に特異的な標的化配列であった。ラット肝臓において効率的な編集が、観察された。2 m g / k g (全カーゴ) 投与および 5 m g / k g (全カーゴ) 投与は、試験で良好な耐容性を示した。G F P をコードする m R N A を含有する類似の製剤も、1 m g / k g および 3 m g / k g の用量で非ヒト霊長類に良好な耐容性を示した。

【 0 2 5 6 】

配列

上の実施例に記載される配列を以下のように掲載する ( 5 ' から 3 ' までのポリヌクレオチド配列 ) :

【 0 2 5 7 】

C a s 9 m R N A ( 太字の C a s 9 コード配列 ; 下線付き太字の H A タグ ; 下線付きの 2 × N L S ) :

【 0 2 5 8 】

10

20

30

40

50

【化 8 - 1】

GGGUCCCCGAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGUCGU  
UGCAGGCCUUAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUACUCAAUCGGGCUGG  
AUAUCGGAACUAAUCCGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACA  
AAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAACACCGAUAGACACA  
GCAUCAAGAAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAA

【 0 2 5 9 】

10

20

30

40

50



【化 8 - 2】

CCGCAGAAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACACCC  
GGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUUCGAACGAAA  
UGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCC  
UGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAAC  
AUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAU  
CUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAAGGCCGACCUCAGAUUG  
AUCUACUUGGCCCUCGCCCAUAUGAUCAAAUUCGCGGACACUCCUG  
AUCGAAGGCGAUCUGAACCUCGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUC  
AUUCAACUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUC  
AAUGCUAGCGGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUC  
GAAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGA  
AAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGAUCGCUCUCUCACUGGGACUCA  
CUCCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGC  
AACUCUCAAAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUUGCUGGCAC  
AAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUCCUUGCCGCUAAGAACCUUU  
CGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGAAAUA  
CCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUC  
ACCAGGAUCUCACGCUGCUCAAAAGCGCUCGUGAGACAGCAACUGCCUG  
AAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAG  
GGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCA  
AGCCAAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGC  
UGAACAGGGAGGAUCUGCUCCGGAAACAGAGAACCUUUGACAACGGAU  
CCAUUCGCCACCAUAUCCUGGGUGAGCUGCACGCCAUUCUUGCGGC  
GCCAGGAGGACUUUUACCCAUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAUCG  
AGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCCACUGGCGC  
GCGGCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGAAACCA  
UCACUCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCA  
CAAAGCUUCAUCGAACGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUCUCCAAAC  
GAGAAGGUGCUUCCUAAGCACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUC  
UACAACGAACUGACUAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAG  
CCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUG  
UUCAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUAAAAGAGGACUAC  
UUCAAGAAGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGA

10

20

30

40

【 0 2 6 0】

50

【化 8 - 3】

GGACAGAUUCAACGCUUCGCUGGGAACCUAUCAUGAUCUCCUGAAGAU  
CAUCAAGGACAAGGACUCCUUGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCU  
GGAAGAUAUUGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUCGCGAGAUGAU  
CGAGGAGAGGCUTAAAGACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAU  
GAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUACACUGGUUGGGGCCGCCUCUCCCG  
CAAGCUGAUCAACGGUAUUCGCGAUAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCU  
GGAUUUCCUCAAAUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUU  
GAUCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCAAAAAGCACA  
AGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGC  
CGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGG  
UCGACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUC  
GUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAAACCAGACUACCCAGAAGGGGCCAGAAA  
AACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAGCU  
GGGCAGCCAGAUCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAGCUGC  
AGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGACAUGU  
ACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAAUCGGUUGUCUGAUUACGACGUG  
GACCACAUCGUUCCACAGUCCUUCUGAAGGAUGACUCGAUCGAUAAC  
AAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGU  
GCCAUCCGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUACUGGCGGCAGC  
UCCUGAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUA  
AAGCCGAGCGCGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUAUC  
AAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCA  
GAUCUUGGACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCU  
CAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGA  
CUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUA  
CCAUCACGCGCAUGACGCAUACCUC AACGCUGUGGUCGGUACCGCCCU  
GAUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUA  
CAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAU  
CGGGAAAGCAACUGCGAAAUACUUCUUUACUCAAAACAUCAUGAACUU  
UUUCAAGACUGAAAUACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGGCC  
ACUGAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGG  
GCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCA  
AUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUCAAAGGAAU

10

20

30

40

【 0 2 6 1】

50

【化 8 - 4】

CGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGCGACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAG  
 ACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCA  
 UACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAA  
 GCUCAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACGAUC  
 CUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCCUCGAGGCGAAGGGUUACAA  
 GGAGGUGAAGAAGGAUCUGAUCAUCAAAACUCCCCAAGUACUCACUGUU  
 CGAACUGGAAAAUGGUCGGAAGCGCAUGCUGGCCUUCGGCCGGAGAAC  
 UCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAACUCC  
 UCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAGGGGUCACCGGAAGAU  
 ACGAACAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUGGAUG  
 AAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCG  
 ACGCCAACCUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAU  
 AGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUAUCCACUUGUUCACCCUGA  
 CUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUAAGUACUUCGAUACUACUAUCG  
 AUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGACGCGACCCUGA  
 UCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGC  
 AGCUGGGUGGCGAUGGCUCGGCUUACCCAUACGACGUGCCUGACUAC  
GCCUCGCUCGGAUCGGGCUCCCCCAAAAAGAAACGGAAGGUGGACGGA  
UCCCCGAAAAAGAAGAGAAAGGUGGACUCCGGAUGAGAAUUAUGCAGUC  
 UAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAA  
 GAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCAUUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUG  
 UAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUCUUUAAUCAUUUUGCC  
 UCUUUUCUCUGUCUCAAUUAUAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAA  
 AA  
 AAAU  
 CUAG

10

20

30

【 0 2 6 2】

表 1 1 で参照され、実施例 1 7 で使用される「C a s 9 1 × N L S、H A タグなし」:

【 0 2 6 3】

【化 9 - 1】

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGU  
 UGCAGGCCUUAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUACUCAAUCCGGGCUGGA  
 UAUCGGAACUAAUCCGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAA  
 GUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAU  
 CAAGAAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAG

40

50

【 0 2 6 4 】

【 化 9 - 2 】

AAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACACCCGGCGGAAG  
AAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUUCGAACGAAAUGGCAAAGG  
UCGACGACAGCUUCUUCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAG  
GACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACGAAG  
UGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUG  
GUUGACUCAACUGACAAGGCCGACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCUCGC  
CCAUAUGAUCAAAUCCGCGGACACUCCUGAUCGAAGGCGAUCUGAACC  
CUGAUAAUCUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUAACUGGUGCAGACCUAC  
AACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUAGCUAGCGGCGUCGAUGCCAA  
GGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCGAAGUCGCGGCCUCGAAAACCUGA  
UCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGAUC  
GCUCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGC  
CGAGGACGCGAAGCUGCAACUCUCAAGGACACCUACGACGACGACUUGG  
ACAAUUUGCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUCCUUGCC  
GCUAAGAACCUUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAA  
CACCGAAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCGGUACG  
ACGAGCAUCACCAGGAUCUCACGCUGCUCAAAGCGCUCGUGAGACAGCAA  
CUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGU  
ACGCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUU  
CAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCA  
AGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCGGAACAGAGAACCUUUGACAACGG  
AUCCAUCCCCACCAGAUAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUUCUUGCGGC  
GCCAGGAGGACUUUUACCCAUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAUCGAG  
AAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCACUGGCGCGCGG  
CAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGAAACCAUCACUC  
CUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUU  
CAUCGAACGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGC  
UUCCUAAGCACAGCCUCCUUUACGAUACUUCACUGUCUACAACGAACUG  
ACUAAAGUGAAAUAACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGU  
CCGGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUAAGACCAACCGC  
AAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUAAGAAGAUCGAGU  
GUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUC  
GCUGGGAACCUAUCAUGAUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUC

10

20

30

40

【 0 2 6 5 】

50

## 【化 9 - 3】

UUGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAAGAU AUCGUCCUGACCUU  
GACCCUUUUCGAGGAUCGCGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUAC  
GCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUA  
CACUGGUUGGGGCCGCCUCUCCCCGAAGCUGAUC AACGGUAUUCGCGAUA  
AACAGAGCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAA AUCGGAUGGCUUCGCU  
AAUCGUAACUUCAUGCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGA  
GGACAUCCAAAAAGCACAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAAC  
ACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAA  
ACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAAC  
CGGAGAAUAUCGUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAAACCAGACUACCCAGAA  
GGGCCAGAAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAUUC  
AAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCA  
GCUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGAC  
AUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUAUCGGUUGUCUGAUUACGACG  
UGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGAUGACUCGAUCGAU AAC  
AAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGUGC  
CAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUACUGGCGGCAGCUCCU  
GAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCC  
GAGCGCGGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUAUCAAAACGGCA  
GCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUUUUGGACU  
CCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAAGUG  
AAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACU  
UUCAGUUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCAUGAC  
GCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCUAA  
ACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGG  
AAGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAU  
ACUUCUUUUACUCAAAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUUACGCU  
GGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGAA  
ACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCA  
AAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCA  
AACCGGCGGAUUUUCAAAGGAUUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGCGACA  
AGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUU  
CGAUUCGCCGACUGUCGAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGA

10

20

30

40

## 【 0 2 6 6】

## 【化 9 - 4】

AGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUAC  
 CAUCAUGGAACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCUCGAGG  
 CGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUCUGAUCAUCAAACUCCCCAA  
 GUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAUGGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCG  
 GCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGU  
 CAACUUCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAGGGGUCACCGG  
 AAGAUAAACGAACAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCU  
 GGAUGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCG  
 CCGACGCCAACCUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAU  
 AAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUAUCCACUUGUUCACCCUGAC  
 UAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAAGUACUUCGAUACUACUAUCGAUC  
 GCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCAC  
 CAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGCAGCUGGG  
 UGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAAAGAAGAGAAAGGUGUAAUGAGCU  
 AGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAG  
 AAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCGUGGUGU  
 AAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUCUUAUAUCAUUUUGCCU  
 CUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAA  
 AA  
 AAUC  
 UAG

10

20

30

## 【0267】

t r 0 0 1 ( t r R N A ) :

## 【0268】

## 【化10】

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA  
 GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU

40

## 【0269】

c r 0 0 2 ( F V I I を 標 的 に す る c r R N A ; 下 線 付 き の 標 的 化 配 列 ) :

## 【0270】

## 【化11】

AGGGCUCUUGAAGAUCUCCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG

## 【0271】

s g 0 0 1 ( F V I I を 標 的 に す る s g R N A ; 下 線 付 き の 標 的 化 配 列 ) :

## 【0272】

50

【化 1 2】

AGGGCUCUUGAAGAUCUCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA  
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU  
UUUUU

【0 2 7 3】

c r 0 0 3 ( T T R を標的にする c r R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【0 2 7 4】

【化 1 3】

CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG

【0 2 7 5】

s g 0 0 6 ( I V T によって作製された T T R を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【0 2 7 6】

【化 1 4】

GGCCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA  
AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC  
UUUUUUU

【0 2 7 7】

s g 0 0 3 ( T T R を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【0 2 7 8】

【化 1 5】

CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA  
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU  
UU

【0 2 7 9】

s g 0 0 7 ( F V I I を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【0 2 8 0】

【化 1 6】

CUCAGUUUUCAUAACCCAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA  
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU  
UU

【0 2 8 1】

s g 0 0 2 ( F V I I を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【0 2 8 2】

10

20

30

40

50

【化 1 7】

CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA  
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU  
 UU

【 0 2 8 3】

s g 0 0 4 ( T T R を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 2 8 4】

10

【化 1 8】

CUUUCUACAAGCUUACCCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA  
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU  
 UU

【 0 2 8 5】

s g 0 0 5 ( T T R を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 2 8 6】

20

【化 1 9】

UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA  
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU  
 UU

\* = ホスホロチオエート連結

m = 2 ' O M e

【 0 2 8 7】

30

t r 0 0 2 ( t r R N A ) :

【 0 2 8 8】

【化 2 0】

A\*A\*C\*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA  
 AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU\*U\*U

【 0 2 8 9】

c r 0 0 4 ( F V I I を標的にする c r R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 2 9 0】

40

【化 2 1】

A\*G\*G\*GCUCUUGAAGAUCUCCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUU\*U\*U\*G

【 0 2 9 1】

c r 0 0 5 ( T T R を標的にする c r R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 2 9 2】

【化 2 2】

C\*C\*A\*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUU\*U\*U\*G

50



【 0 2 9 3 】

s g 0 0 8 ( F V I I を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 2 9 4 】

【 化 2 3 】

mA\*mG\*mG\*GCUCUUGAAGAUCUCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU  
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG  
UGCmU\*mU\*mU\*U

10

【 0 2 9 5 】

s g 0 0 9 ( T T R を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 2 9 6 】

【 化 2 4 】

mC\*mC\*mA\*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU  
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG  
UGCmU\*mU\*mU\*U

20

【 0 2 9 7 】

s g 0 1 0 ( F V I I を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 2 9 8 】

【 化 2 5 】

mC\*mU\*mC\*AGUUUUCAUAACCCAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU  
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG  
UGCmU\*mU\*mU\*U

30

【 0 2 9 9 】

s g 0 0 2 ( F V I I を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 3 0 0 】

【 化 2 6 】

mC\*mA\*mG\*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU  
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG  
UGCmU\*mU\*mU\*U

40

【 0 3 0 1 】

s g 0 1 1 ( T T R を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

【 0 3 0 2 】

【 化 2 7 】

mC\*mU\*mU\*UCUACAAGCUUACCCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU  
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG  
UGCmU\*mU\*mU\*U

50

## 【 0 3 0 3 】

s g 0 1 2 ( T T R を標的にする s g R N A ; 下線付きの標的化配列 ) :

## 【 0 3 0 4 】

## 【 化 2 8 】

mU\*mU\*mA\*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU  
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG  
UGCmU\*mU\*mU\*U

10

## 【 0 3 0 5 】

e c 0 0 1 ( 発現カセット - T T R を標的にする s g R N A を発現するためのアンプリ  
コン ; 太字の U 6 プロモーター、下線付きの標的化配列 ; 構築物は、各 5 ' 末端に反転した  
ジデオキシ T を含有する ) :

## 【 0 3 0 6 】

## 【 化 2 9 】

GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT  
GTAAACGACGGCCAGTGAATTC**GAGGGCCTATTTTCCCATGATTCCTTC**  
**ATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAAT**  
**TTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGT**  
**AATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAAAATGGAC**  
**TATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATA**  
**TATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGCTTTCTACAAGCTTACCCAGGTTTT**  
AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA  
AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCG  
ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT  
GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA  
AGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA

20

30

## 【 0 3 0 7 】

c r 0 0 1 の標的である F V I I 標的部位の N G S 分析のためのプライマー対 :

フォワード :

## 【 0 3 0 8 】

## 【 化 3 0 】

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGATCCAGTGTGGCTGTTTCCA  
TTC

40

リバーズ :

## 【 0 3 0 9 】

50

## 【化 3 1】

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTACACAAGAGCAGGCACGAGAT  
G

## 【0 3 1 0】

c r 0 0 2 および s g 0 0 1 の標的である F V I I 標的部位の N G S 分析のためのプライマー対：

フォワード：

## 【0 3 1 1】

10

## 【化 3 2】

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGCACATGAGACCTTCTGTTT  
CTC

リバーズ：

## 【0 3 1 2】

## 【化 3 3】

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACATAGGTGTGACCCTCACAATC

20

## 【0 3 1 3】

s g 0 0 2 の標的である F V I I 標的部位の N G S 分析のためのプライマー対：

## 【0 3 1 4】

## 【化 3 4】

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGCACATGAGACCTTCTGTTT  
CTC

リバーズ：

## 【0 3 1 5】

## 【化 3 5】

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACATAGGTGTGACCCTCACAATC

30

## 【0 3 1 6】

c r 0 0 3 および s g 0 0 3 の標的である T T R 標的部位の N G S 分析のためのプライマー対：

フォワード：

## 【0 3 1 7】

40

## 【化 3 6】

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGTCAATAATCAGAATCAGC  
AGGT

リバーズ：

## 【0 3 1 8】

50

【化 3 7】

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAAGGCACTTCTTCTTTATCTAA  
GGT

【0 3 1 9】

s g 0 0 4 の標的である T T R 標的部位の N G S 分析のためのプライマー対：  
フォワード：

【0 3 2 0】

【化 3 8】

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCTGGAGAATCCAAATGTC  
CTC

リバーズ：

【0 3 2 1】

【化 3 9】

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTAGGAATTAAACCTGTGTCTCT  
TAC

【0 3 2 2】

s g 0 0 5 の標的である T T R 標的部位の N G S 分析のためのプライマー対：  
フォワード：

【0 3 2 3】

【化 4 0】

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTTTGTTCCAGAGTCTATCA  
CCG

リバーズ：

【0 3 2 4】

【化 4 1】

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACACGAATAAGAGCAAATGGGAA  
C

【0 3 2 5】

s g 0 0 4 発現カセットの P C R 増幅のためのプライマー対：  
/ 5 I n v d d T / = 反転したジデオキシ T

フォワード：

/ 5 I n v d d T / G C T G C A A G G C G A T T A A G T T G

リバーズ：

/ 5 I n v d d T / T A G C T C A C T C A T T A G G C A C C

【0 3 2 6】

10

20

30

40

50

## 【表 1 4 - 1】

表 13. マウス TTR ガイド配列。

ガイド名称	位置	ガイド
cr006	Chr18:20666429- 20666451	UCUUGUCUCCUCUGUGCCCA
cr007	Chr18:20666435- 20666457	CUCCUCUGUGCCCAGGGUGC
cr008	Chr18:20666458- 20666480	AGAAUCCAAAUGUCCUCUGA
cr009	Chr18:20666533- 20666555	AGUGUUCAAAAAGACCUCUG
cr010	Chr18:20666541- 20666563	AAAAGACCUCUGAGGGAUCC
cr011	Chr18:20666558- 20666580	UCCUGGGAGCCCUUUGCCUC
cr012	Chr18:20666500- 20666522	CGUCUACAGCAGGGCUGCCU
cr013	Chr18:20666559- 20666581	CCCAGAGGCAAAGGGCUCCC
cr014	Chr18:20670008- 20670030	UUCUACAAACUUCUCAUCUG
cr015	Chr18:20670086- 20670108	AUCCGCGAAUUCAUGGAACG
cr016	Chr18:20673606- 20673628	UGUCUCUCCUCUCUCCUAGG
cr017	Chr18:20673628- 20673650	GUUUUCACAGCCAACGACUC
cr018	Chr18:20673684- 20673706	CCCAUACUCCUACAGCACCA
cr019	Chr18:20673657- 20673679	GCAGGGCUGCGAUGGUGUAG

## 【 0 3 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

<u>ガイド名称</u>	<u>位置</u>	<u>ガイド</u>
cr020	Chr18:20673675- 20673697	UGUAGGAGUAUGGGCUGAGC
cr021	Chr18:20673685- 20673707	GCCGUGGUGCUGUAGGAGUA
cr022	Chr18:20673723- 20673745	UGGGCUGAGUCUCUCAAUUC
cr023	Chr18:20665448- 20665470	CUCUCCUCCUUUGCCUCGC
cr024	Chr18:20665472- 20665494	CUGGUAUUUGUGUCUGAAGC
cr025	Chr18:20665453- 20665475	CCUCCUUUGCCUCGCUGGAC
cr026	Chr18:20665496- 20665518	CUCACAGGAUCACUCACCGC
cr027	Chr18:20665414- 20665436	UCCACAAGCUCCUGACAGGA
cr028	Chr18:20665441- 20665463	GGCAAAGGAGGAAGAGUCGA
cr003	Chr18:20665453- 20665475	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGG
cr029	Chr18:20665456- 20665478	AUACCAGUCCAGCGAGGCAA
cr030	Chr18:20665497- 20665519	GCUCACAGGAUCACUCACCG
cr031	Chr18:20665462- 20665484	ACACAAAUACCAGUCCAGCG
cr032	Chr18:20665495- 20665517	UCACAGGAUCACUCACCGCG
cr033	Chr18:20665440- 20665462	GCAAAGGAGGAAGAGUCGAA

10

20

30

40

【 0 3 2 8 】

50

【表 1 4 - 3】

<u>ガイド名称</u>	<u>位置</u>	<u>ガイド</u>
cr034	Chr18:20666463- 20666485	UUUGACCAUCAGAGGACAUU
cr035	Chr18:20666488- 20666510	GGCUGCCUCGGACAGCAUCC
cr036	Chr18:20666470- 20666492	UCCUCUGAUGGUCAAAGUCC
cr037	Chr18:20666542- 20666564	AAAGACCUCUGAGGGAUCCU
cr038	Chr18:20666510- 20666532	UUUACAGCCACGUCUACAGC
cr039	Chr18:20666534- 20666556	GUGUUCAAAAAGACCUCUGA
cr040	Chr18:20666567- 20666589	CAAGCUUACCCAGAGGCAAA
cr041	Chr18:20666503- 20666525	AGGCAGCCCUGCUGUAGACG
cr042	Chr18:20666471- 20666493	UCCAGGACUUUGACCAUCAG
cr043	Chr18:20666547- 20666569	GGGCUCCCAGGAUCCCUCAG
cr044	Chr18:20666483- 20666505	AAAGUCCUGGAUGCUGUCCG
cr045	Chr18:20666568- 20666590	ACAAGCUUACCCAGAGGCAA
cr046	Chr18:20666574- 20666596	CUUUCUACAAGCUUACCCAG
cr047	Chr18:20666509- 20666531	UUACAGCCACGUCUACAGCA
cr048	Chr18:20669968- 20669990	UCCAGGAAGACCGCGGAGUC

10

20

30

40

【 0 3 2 9 】

50

【表 1 4 - 4】

<u>ガイド名称</u>	<u>位置</u>	<u>ガイド</u>
cr049	Chr18:20670093- 20670115	CACUUACAUCCGCGAAUUCA
cr050	Chr18:20670056- 20670078	AAGUGUCUUCCAGUACGAUU
cr051	Chr18:20670087- 20670109	CAUCCGCGAAUUCAUGGAAC
cr052	Chr18:20670058- 20670080	AAAUCGUACUGGAAGACACU
cr053	Chr18:20669981- 20670003	CGGAGUCUGGAGAGCUGCAC
cr054	Chr18:20670030- 20670052	AGGAGUGUACAGAGUAGAAC
cr055	Chr18:20670084- 20670106	UUCCCCGUUCCAUGAAUUCG
cr056	Chr18:20670010- 20670032	ACAGAUGAGAAGUUUGUAGA
cr057	Chr18:20670047- 20670069	AACUGGACACCAAAUCGUAC
cr058	Chr18:20670088- 20670110	ACAUCCGCGAAUUCAUGGAA
cr059	Chr18:20669980- 20670002	GCGGAGUCUGGAGAGCUGCA
cr060	Chr18:20669978- 20670000	GUGCAGCUCUCCAGACUCCG
cr061	Chr18:20669961- 20669983	UGUGCCCUCCAGGAAGACCG
cr062	Chr18:20673723- 20673745	UGGGCUGAGUCUCUCAAUUC
cr063	Chr18:20673675- 20673697	UGUAGGAGUAUGGGCUGAGC

【 0 3 3 0 】

10

20

30

40

50



【表 1 4 - 5】

<u>ガイド名称</u>	<u>位置</u>	<u>ガイド</u>
cr064	Chr18:20673665- 20673687	UGGGCUGAGCAGGGCUGCGA
cr065	Chr18:20673638- 20673660	GUGGCGAUGGCCAGAGUCGU
cr066	Chr18:20673651- 20673673	CUGCGAUGGUGUAGUGGCGA
cr067	Chr18:20673685- 20673707	GCCGUGGUGCUGUAGGAGUA

10

【 0 3 3 1 】

20

30

40

50

## 【表 15 - 1】

表 14. ヒト TTR ガイド配列。

ガイド 名称	ガイド	位置	エクソン	鎖
cr700	CUGCUCCUCCUCUGCCUUGC	Chr18:31591918- 31591940	1	+
cr701	CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC	Chr18:31591923- 31591945	1	+
cr702	CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG	Chr18:31591923- 31591945	1	-
cr703	AUACCAGUCCAGCAAGGCAG	Chr18:31591926- 31591948	1	-
cr704	ACACAAAUACCAGUCCAGCA	Chr18:31591932- 31591954	1	-
cr705	UGGACUGGUAAUUUGUGUCUG	Chr18:31591938- 31591960	1	+
cr706	CUGGUAAUUUGUGUCUGAGGC	Chr18:31591942- 31591964	1	+
cr707	CUUCUCUACACCCAGGGCAC	Chr18:31592881- 31592903	2	+
cr708	CAGAGGACACUUGGAUUCAC	Chr18:31592900- 31592922	2	-
cr709	UUUGACCAUCAGAGGACACU	Chr18:31592909- 31592931	2	-
cr710	UCUAGAACUUUGACCAUCAG	Chr18:31592917- 31592939	2	-
cr711	AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG	Chr18:31592929- 31592951	2	+
cr712	CAUUGAUGGCAGGACUGCCU	Chr18:31592946- 31592968	2	-
cr713	AGGCAGUCCUGCCAUCA AUG	Chr18:31592949- 31592971	2	+

## 【 0 3 3 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 2】

ガイド 名称	ガイド	位置	エクソン	鎖
cr714	UGCACGGCCACAUGAUGGC	Chr18:31592956- 31592978	2	-
cr715	CACAUGCACGGCCACAUGA	Chr18:31592960- 31592982	2	-
cr716	AGCCUUUCUGAACACAUGCA	Chr18:31592972- 31592994	2	-
cr717	GAAAGGCUGCUGAUGACACC	Chr18:31592987- 31593009	2	+
cr718	AAAGGCUGCUGAUGACACCU	Chr18:31592988- 31593010	2	+
cr719	ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC	Chr18:31593004- 31593026	2	+
cr720	CCCAGAGGCAAAUGGCUCCC	Chr18:31593005- 31593027	2	-
cr721	GCAACUUACCCAGAGGCAAA	Chr18:31593013- 31593035	2	-
cr722	UUCUUUGGCAACUUACCCAG	Chr18:31593020- 31593042	2	-
cr723	AUGCAGCUCUCCAGACUCAC	Chr18:31595125- 31595147	3	-
cr724	AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA	Chr18:31595127- 31595149	3	+
cr725	GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU	Chr18:31595128- 31595150	3	+
cr726	GCUGCAUGGGCUCACAACUG	Chr18:31595141- 31595163	3	+
cr727	GCAUGGGCUCACAACUGAGG	Chr18:31595144- 31595166	3	+
cr728	ACUGAGGAGGAAUUGUAGA	Chr18:31595157- 31595179	3	+

【 0 3 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 3】

ガイド 名称	ガイド	位置	エクソン	鎖
cr729	CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA	Chr18:31595158- 31595180	3	+
cr730	UGUAGAAGGGAUUAUACAAAG	Chr18:31595171- 31595193	3	+
cr731	AAAUAGACACCAAUUCUUAC	Chr18:31595194- 31595216	3	+
cr732	AGACACCAAUUCUUACUGGA	Chr18:31595198- 31595220	3	+
cr733	AAGUGCCUCCAGUAAGAUAU	Chr18:31595203- 31595225	3	-
cr734	CUCUGCAUGCUCUAGGAAUG	Chr18:31595233- 31595255	3	-
cr735	CCUCUGCAUGCUCUAGGAAU	Chr18:31595234- 31595256	3	-
cr736	ACCUCUGCAUGCUCUAGGAA	Chr18:31595235- 31595257	3	-
cr737	UACUCACCUCUGCAUGCUCU	Chr18:31595240- 31595262	3	-
cr738	GUAUUCACAGCCAACGACUC	Chr18:31598571- 31598593	4	+
cr739	GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU	Chr18:31598581- 31598603	4	-
cr740	AAUGGUGUAGCGGCGGGGCG	Chr18:31598590- 31598612	4	-
cr741	CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG	Chr18:31598594- 31598616	4	-
cr742	GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG	Chr18:31598595- 31598617	4	-
cr743	GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC	Chr18:31598596- 31598618	4	-

【 0 3 3 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 4】

ガイド 名称	ガイド	位置	エクソン	鎖
cr744	GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG	Chr18:31598597- 31598619	4	-
cr745	GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG	Chr18:31598600- 31598622	4	-
cr746	GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA	Chr18:31598608- 31598630	4	-
cr747	GGAGUAGGGGCUCAGCAGGG	Chr18:31598614- 31598636	4	-
cr748	AUAGGAGUAGGGGCUCAGCA	Chr18:31598617- 31598639	4	-
cr749	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGC	Chr18:31598618- 31598640	4	-
cr750	CCCCUACUCCUAUUCCACCA	Chr18:31598627- 31598649	4	+
cr751	CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG	Chr18:31598627- 31598649	4	-
cr752	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA	Chr18:31598628- 31598650	4	-
cr753	GACGACAGCCGUGGUGGAAU	Chr18:31598635- 31598657	4	-
cr754	AUUGGUGACGACAGCCGUGG	Chr18:31598641- 31598663	4	-
cr755	GGGAUUGGUGACGACAGCCG	Chr18:31598644- 31598666	4	-
cr756	GGCUGUCGUCACCAAUCCCA	Chr18:31598648- 31598670	4	+
cr757	AGUCCCUCAUUCCUUGGGAU	Chr18:31598659- 31598681	4	-

10

20

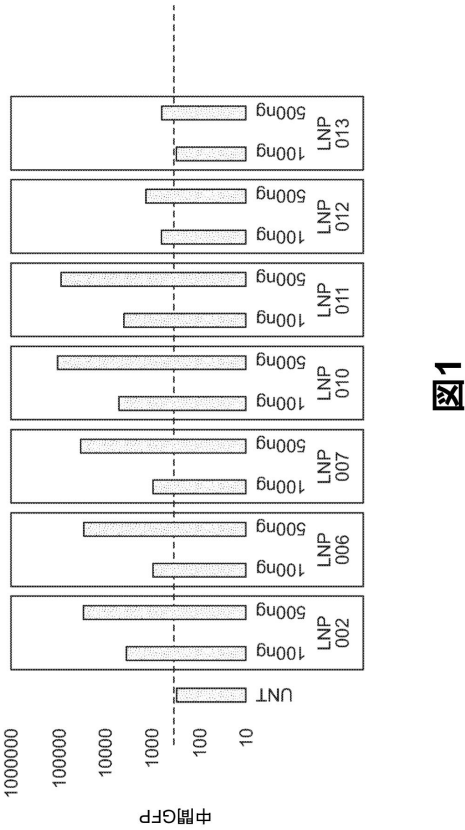
30

40

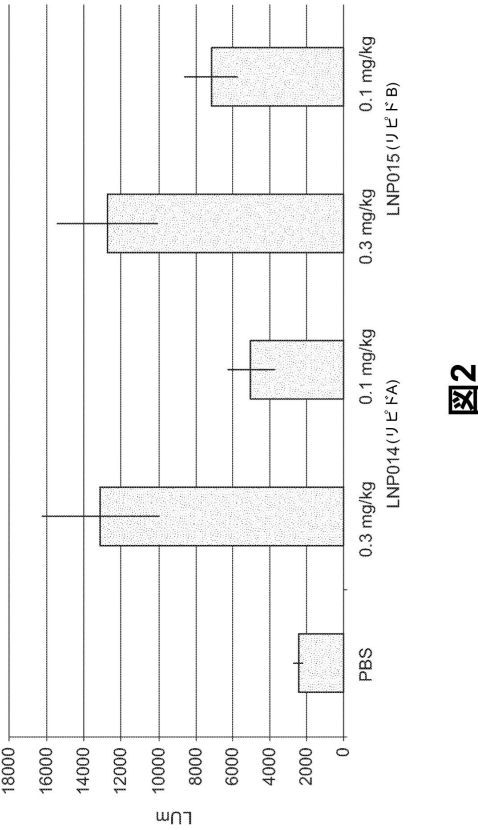
50

【図面】

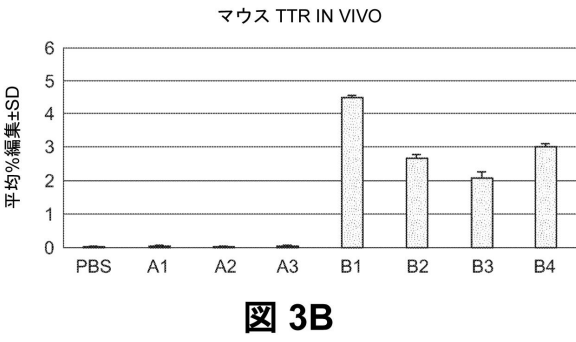
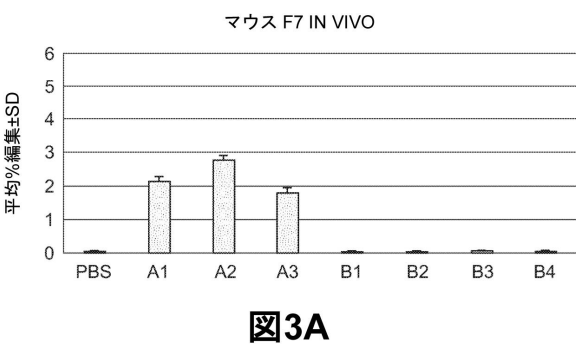
【図 1】



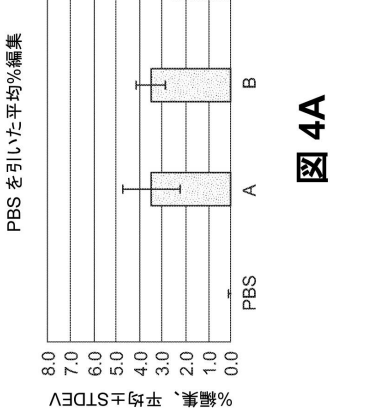
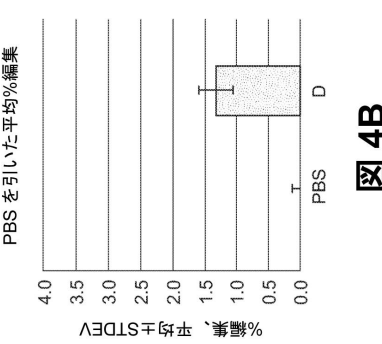
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【図 5】

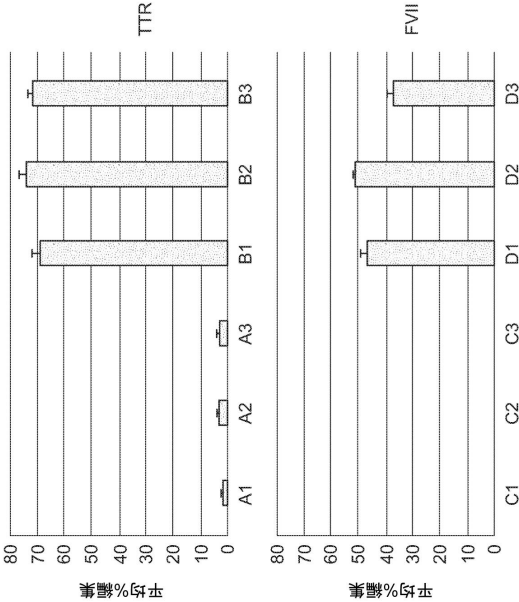


図 5

【図 6】

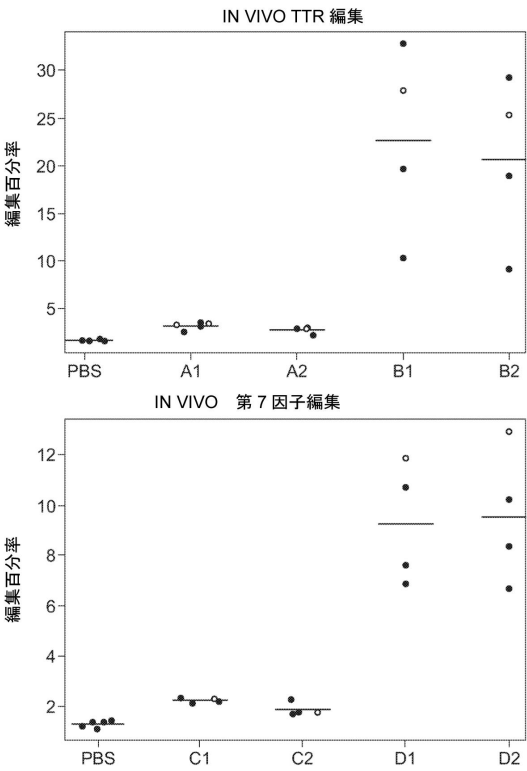


図 6

【図 7】

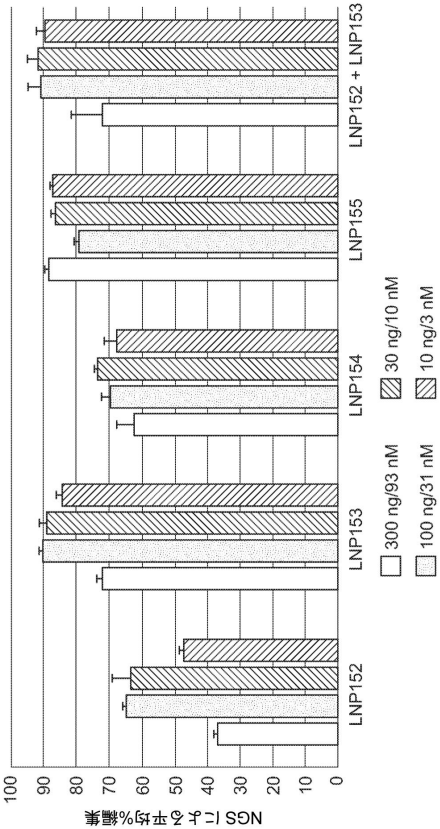


図 7

【図 8 - 1】

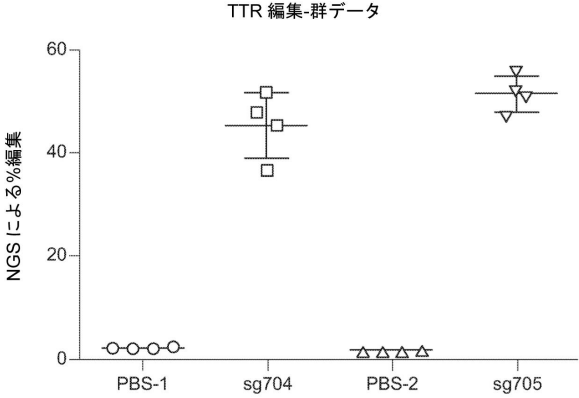


図 8A

10

20

30

40

50

【図 8 - 2】

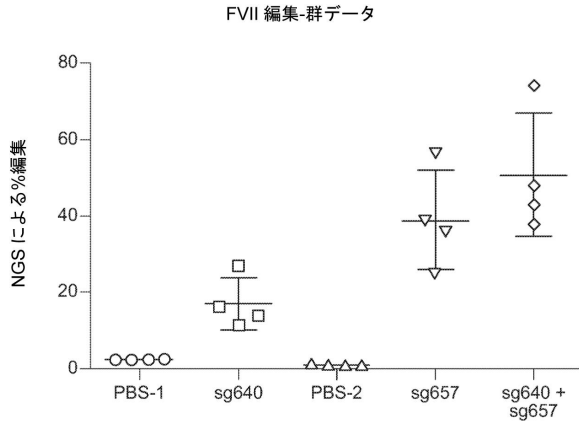


図 8B

【図 9】

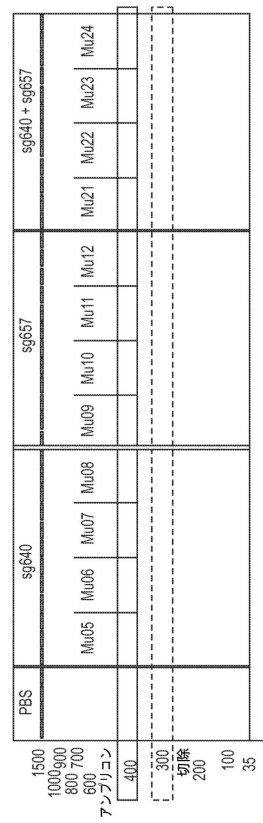


図 9

【図 1 0】

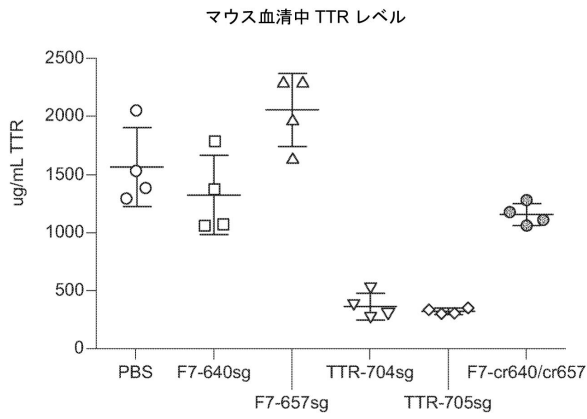


図 10

【図 1 1】

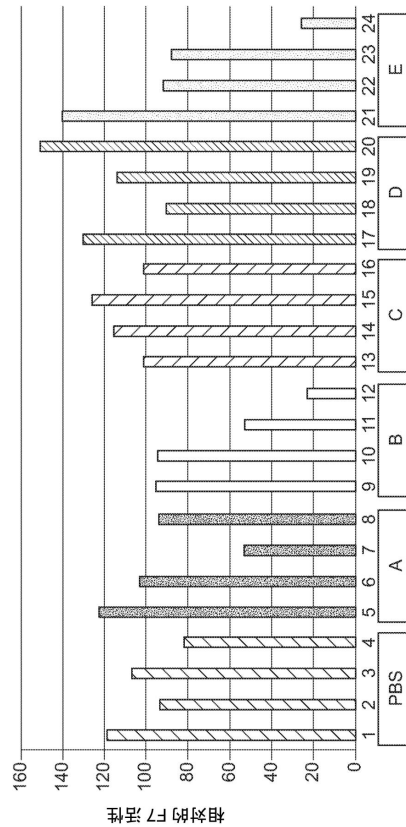


図 11

10

20

30

40

50



【図 1 2 - 1】

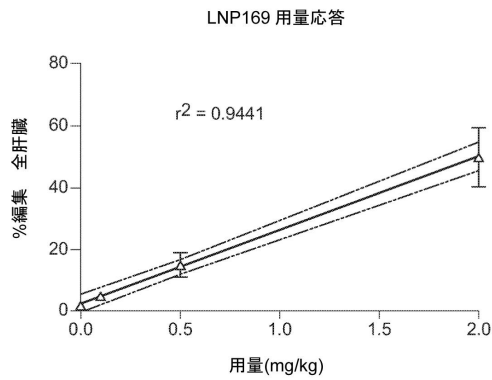
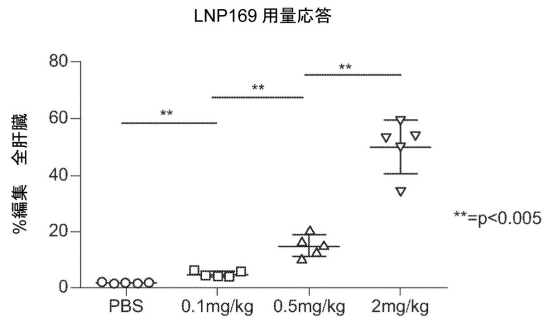


図 12A

【図 1 2 - 2】

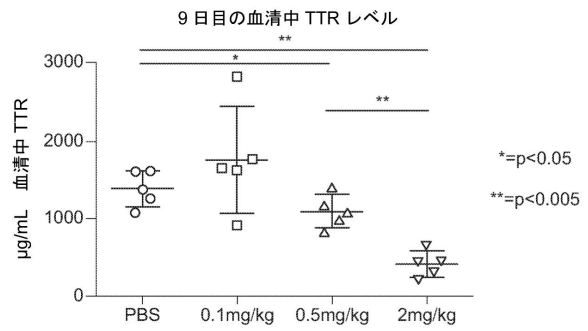
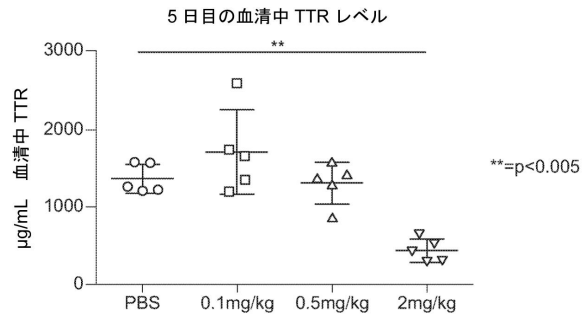


図 12B

【図 1 3 - 1】

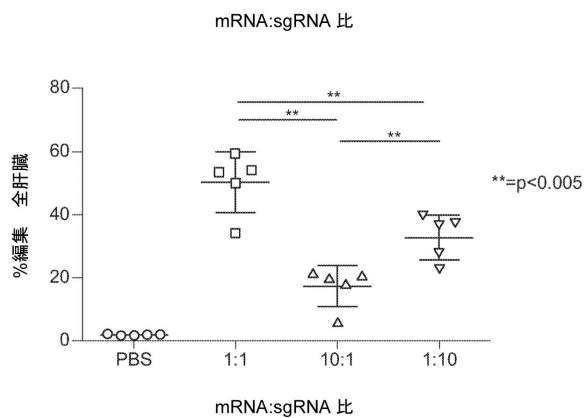


図 13A

【図 1 3 - 2】

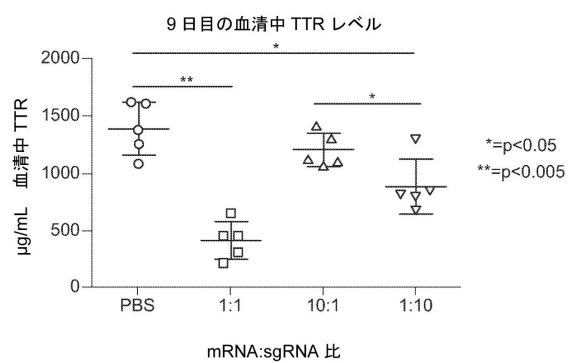
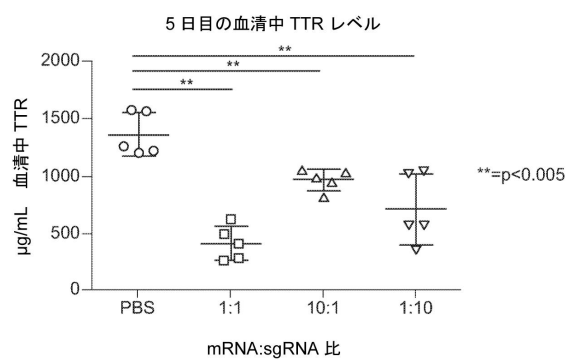


図 13B

10

20

30

40

50

【図 14 - 1】

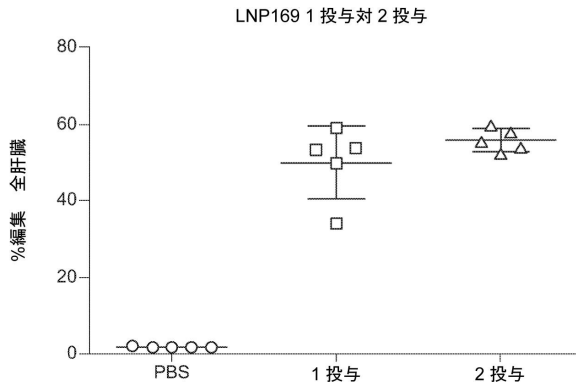


図 14A

【図 14 - 2】

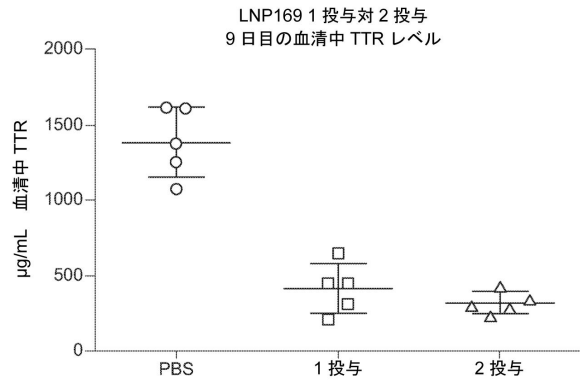


図 14B

【図 15】

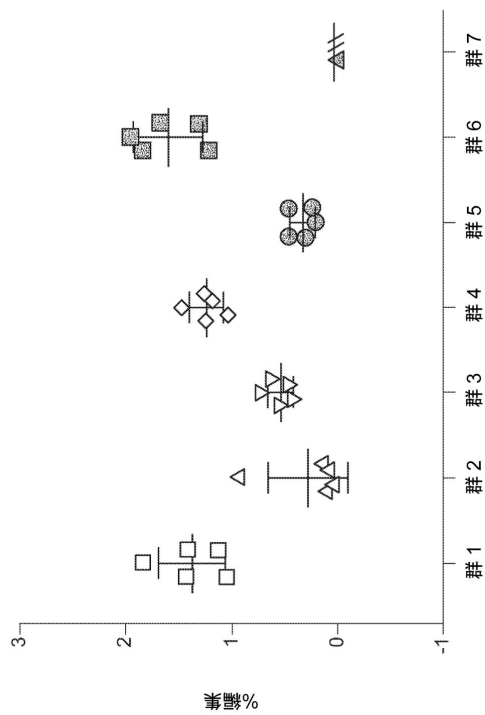


図 15

【図 16】

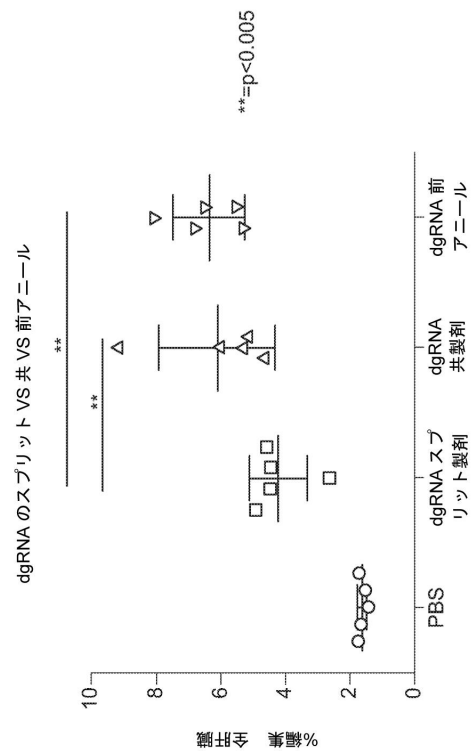


図 16

10

20

30

40

50

【図 17】

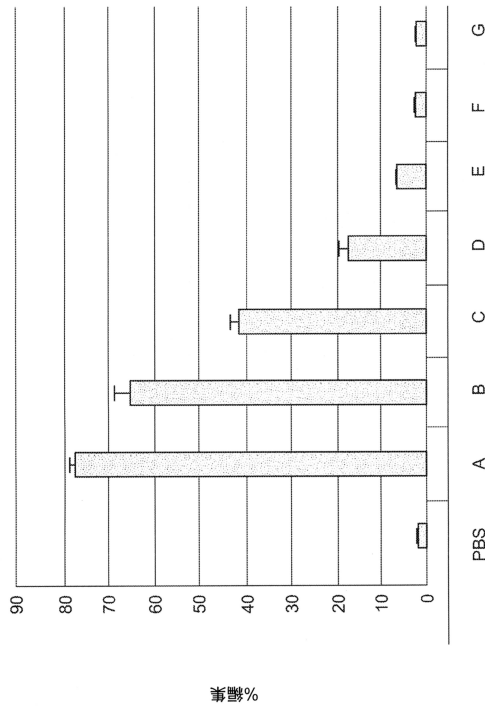


図 17

【図 18】

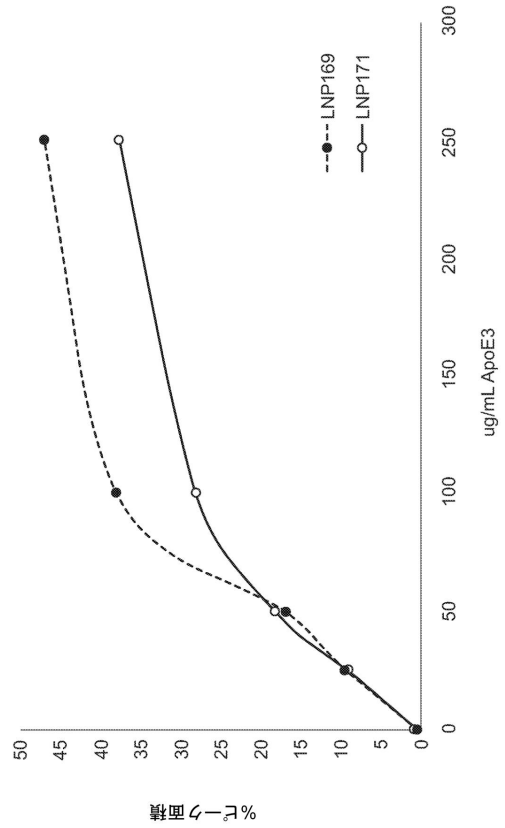


図 18

【図 19】

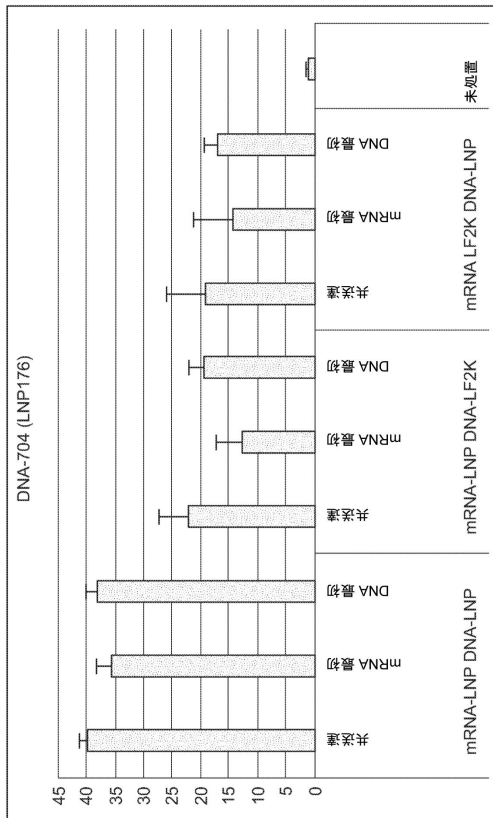


図 19

【図 20】

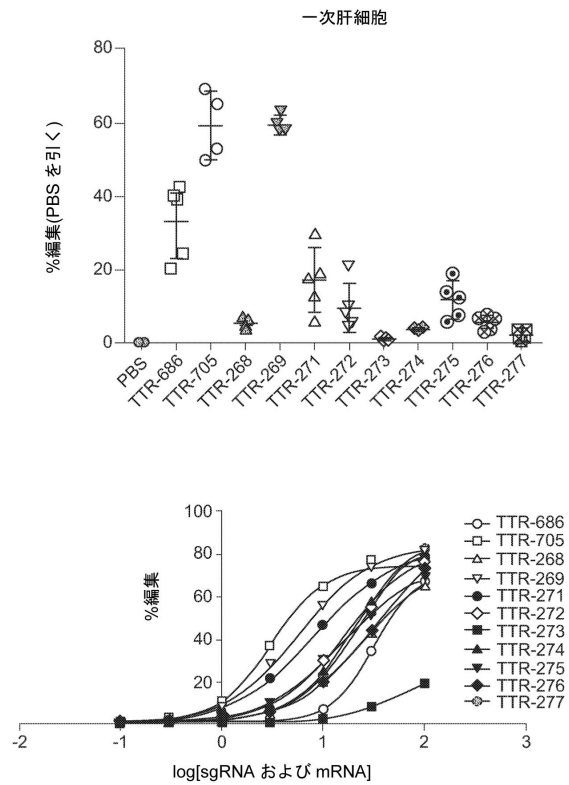
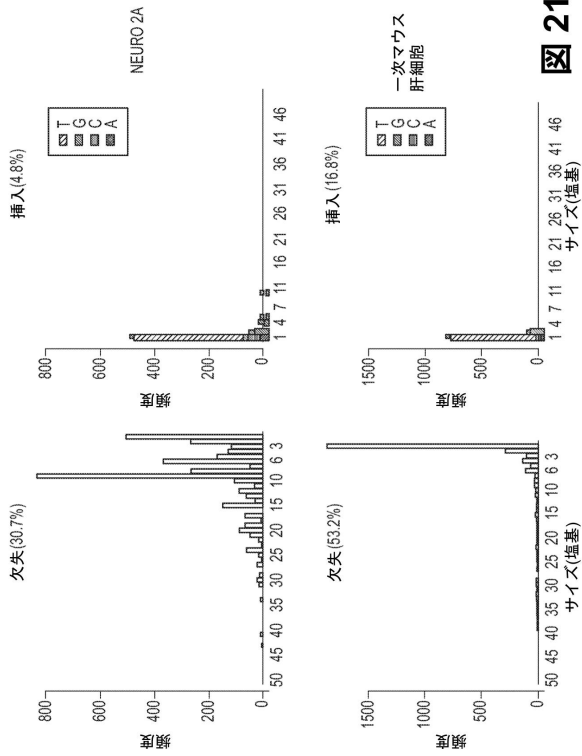
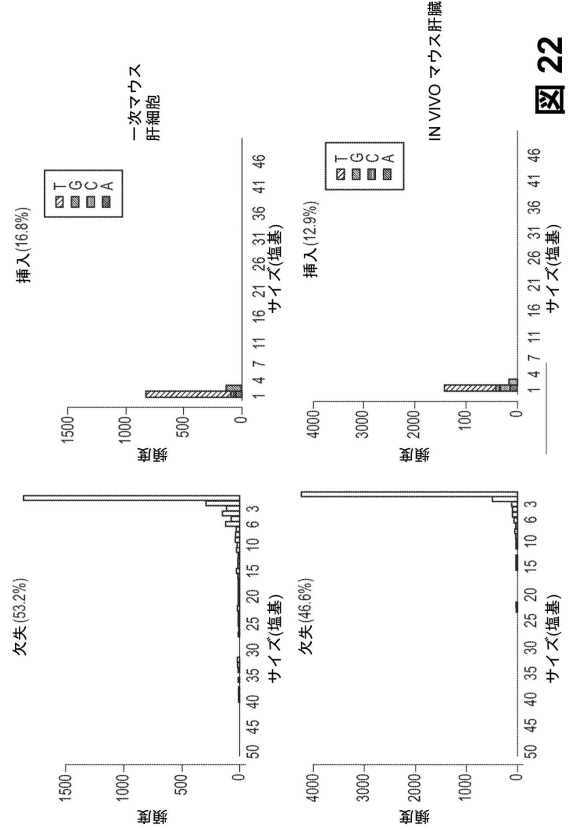


図 20

【図 2 1】



【図 2 2】



【図 2 3】

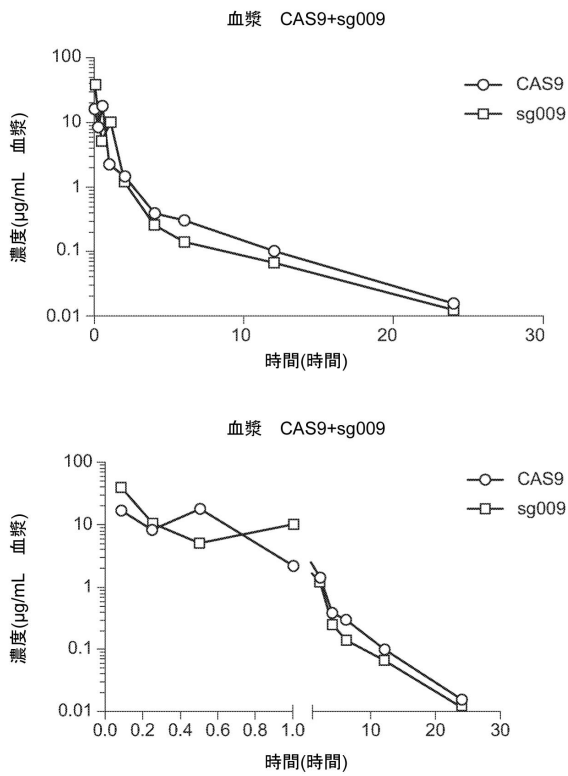


図 23

【図 2 4】

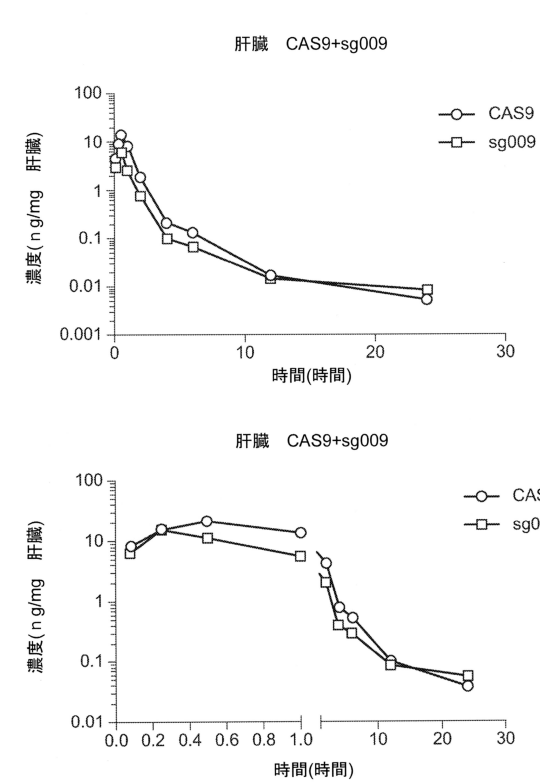


図 24

10

20

30

40

50

【図 25】

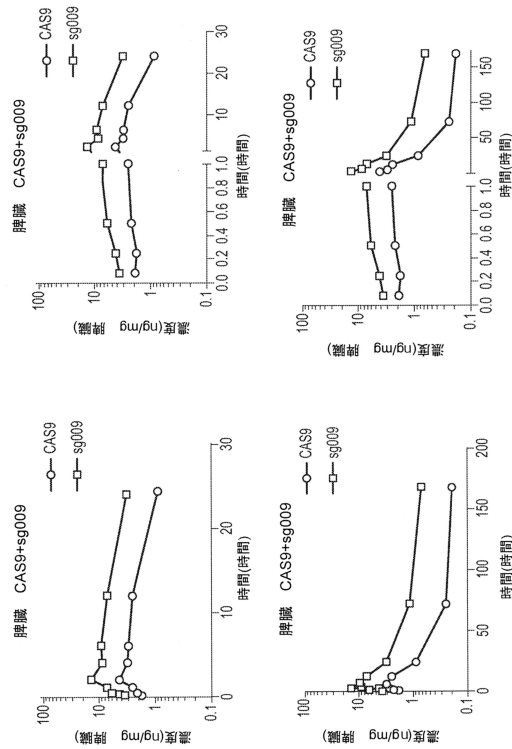


図 25

【図 26 - 1】

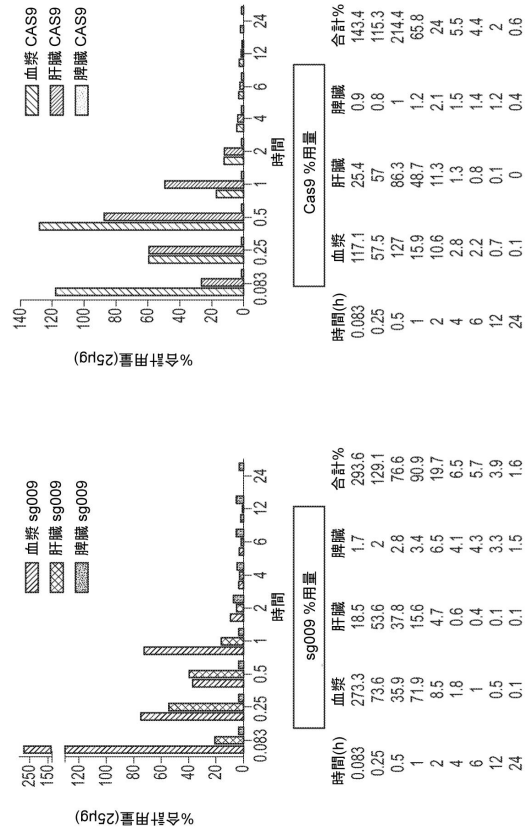


図 26A

【図 26 - 2】

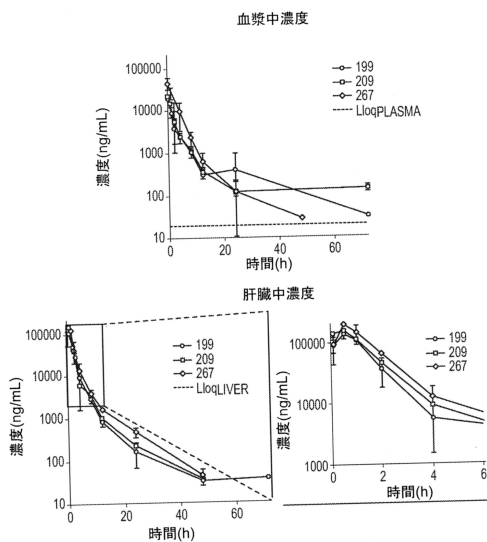


図 26B

【図 27】

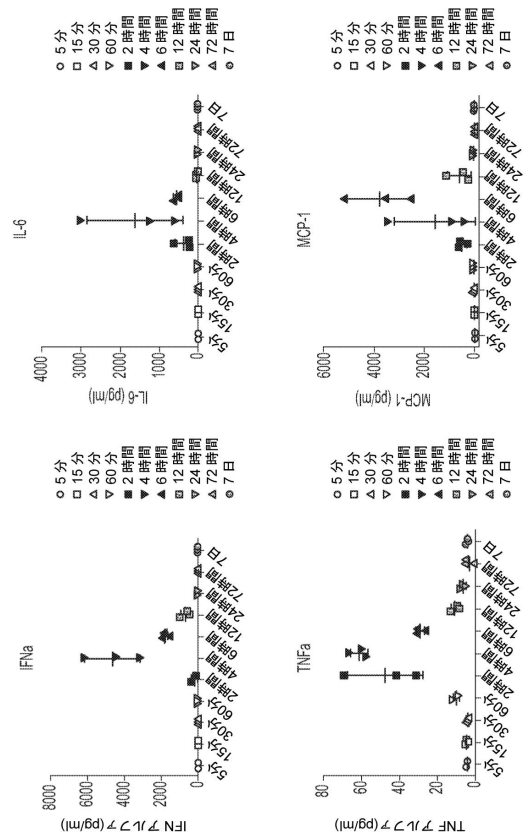


図 27

10

20

30

40

50

【図 28】

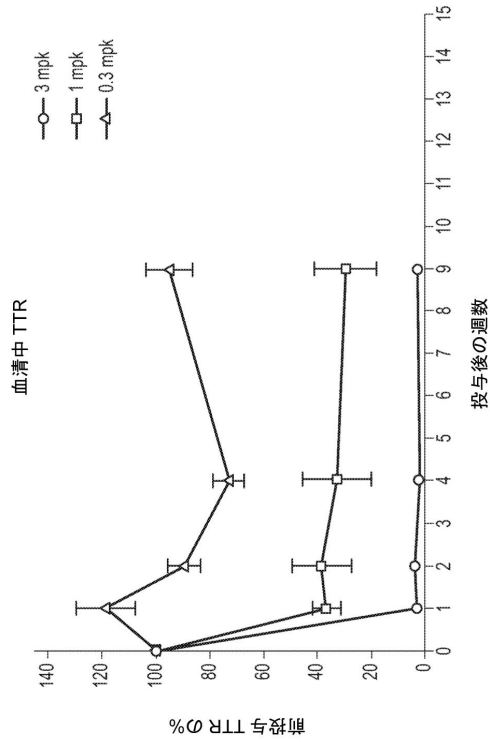


図 28

【図 29 - 1】

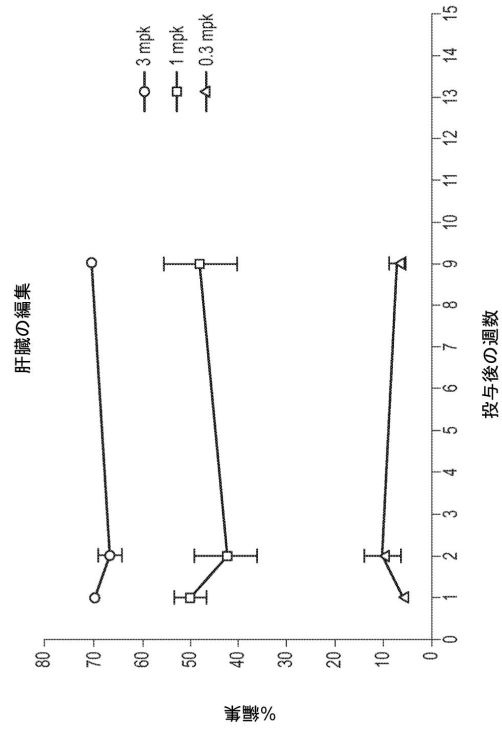


図 29A

【図 29 - 2】

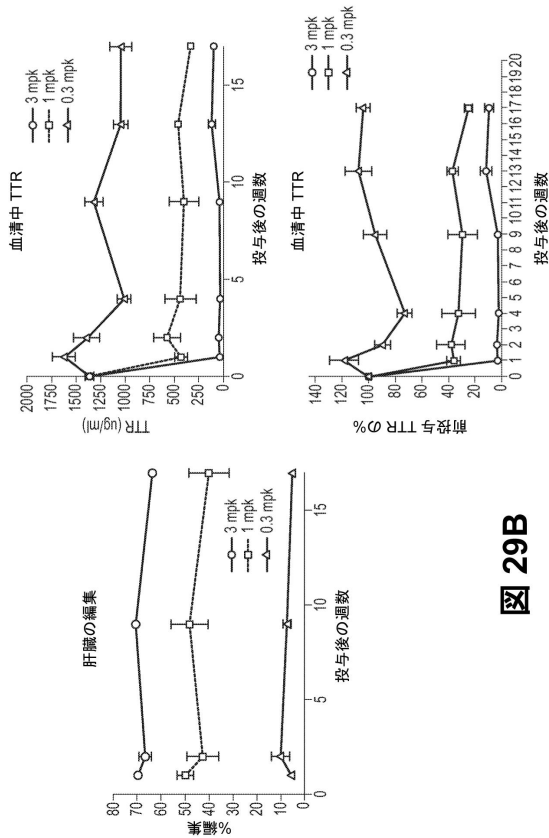


図 29B

【図 30】

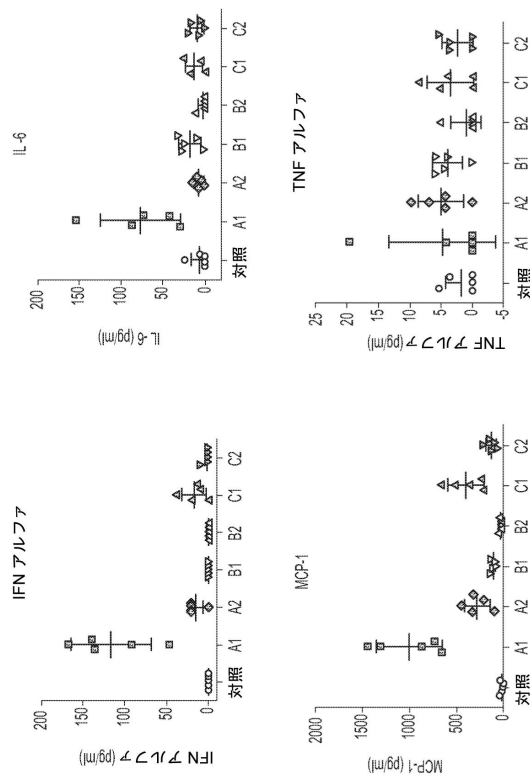
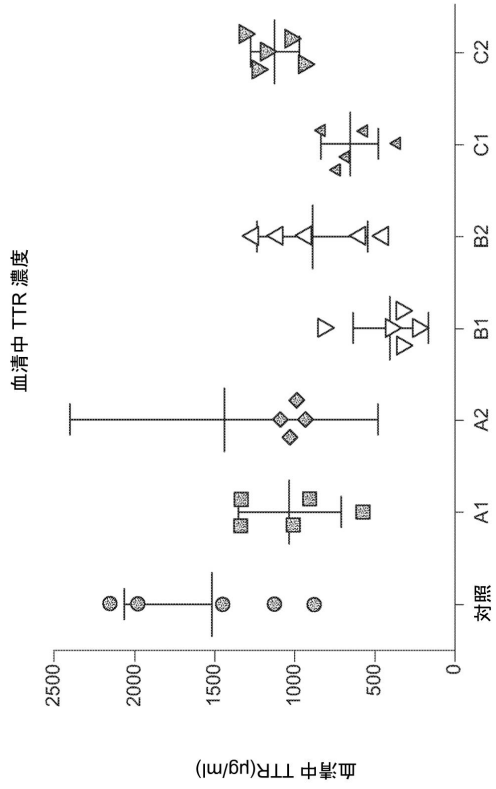


図 30

【図 3 1】



【図 3 2】

図 31

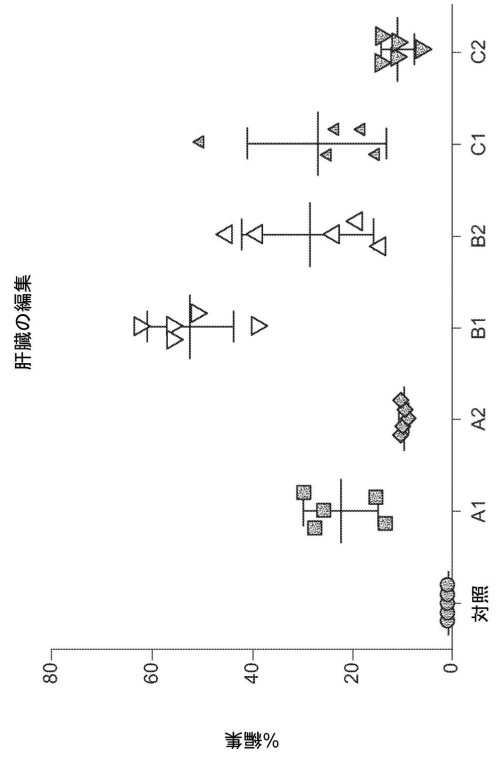


図 32

【図 3 3】

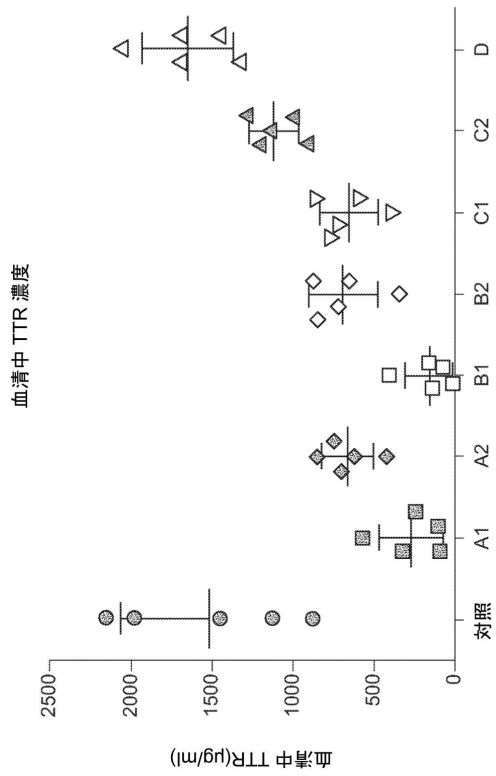


図 33

【図 3 4】

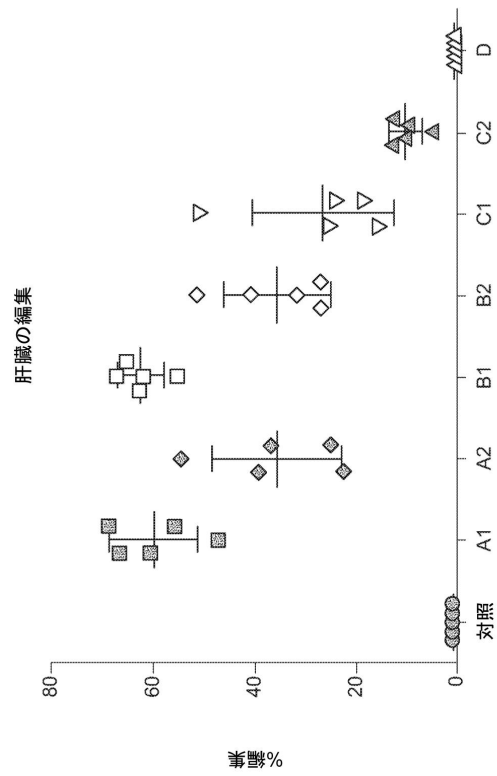


図 34

10

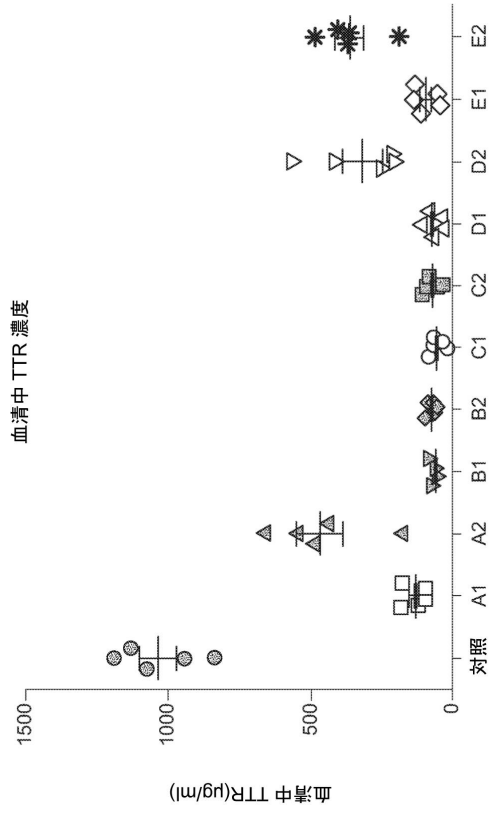
20

30

40

50

【図 35】



【図 36】

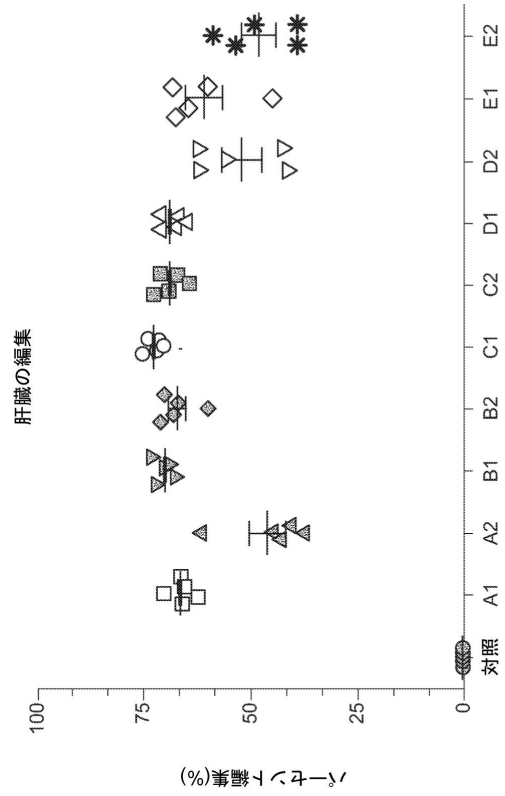


図 36

10

20

30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N	15/55	(2006.01)	C 1 2 N	15/55	
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/468,300

## (32)優先日 平成29年3月7日(2017.3.7)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/375,776

## (32)優先日 平成28年8月16日(2016.8.16)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 8 9 0 , ウィンチェスター , ルロイド ストリート 6 0

## (72)発明者 バテル , ミハイル , チャンドラカント

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 8 9 4 4 , パーカシー , ブルーミング グレン ロード 9 3 7

## (72)発明者 フィン , ジョナサン ディ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 7 6 , メルローズ , フランクリン ストリート 1 0 5 9

## (72)発明者 スミス , エイミー マディソン ローデン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2 , ウォータータウン , ユニット 2 , キムボール  
ロード 3 1

## (72)発明者 ショー , ルシンダ ジェイ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 1 , レキシントン , チェダー ストリート 4 4

## (72)発明者 ドンブロフスキー , クリスチャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 0 , ボストン , ステッドマン ストリート 2 8

## (72)発明者 シャー , ラッチー ラドラプラサッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 4 5 , ブルックリン , アpartment 1 0 , ビルデ  
イング 3 , ビーカン ストリート 1 8 6 2

審査官 中野 あい

## (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 6 ( WO , A 1 )

国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 5 3 5 1 ( WO , A 1 )

特表 2 0 1 2 - 5 2 6 1 3 4 ( JP , A )

国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 5 3 4 6 ( WO , A 1 )

Mol Pharm, 2014 Mar 3, vol. 11, no. 5, pp. 1424-1434

Human Gene Therapy, 2016 Nov, vol. 27, no. 11, pp. A131 (P280)

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )