

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510739
(P2025-510739A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 7 6
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06		
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全63頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-556187(P2024-556187)		(71)出願人	518192998
(86)(22)出願日	令和5年3月20日(2023.3.20)			クリスパー・セラピューティクス・アク
(85)翻訳文提出日	令和6年11月14日(2024.11.14)			チェンゲゼルシャフト
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/052720			C R I S P R T h e r a p e u t i c s
(87)国際公開番号	WO2023/180904			A G
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)			スイス6300ツーク、バーラーシュト
(31)優先権主張番号	63/322,078			ラーセ14番
(32)優先日	令和4年3月21日(2022.3.21)		(74)代理人	100145403
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 山尾 憲人
(31)優先権主張番号	63/351,542		(74)代理人	100106518
(32)優先日	令和4年6月13日(2022.6.13)			弁理士 松谷 道子
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(74)代理人	100138911
				弁理士 櫻井 陽子
(31)優先権主張番号	63/385,093		(72)発明者	ドウソウザ, サンジャイ
				アメリカ合衆国02127マサチューセ
		最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リポタンパク質関連疾患を処置するための方法および組成物

(57)【要約】

本開示は、対象において、遺伝子編集によってL P A 遺伝子の発現を調節して、例えば心血管疾患などのリポタンパク質関連疾患を処置するための、方法、組成物、およびキットに関する。

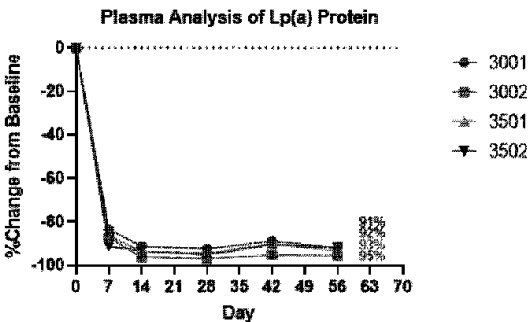


FIG. 16

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) L P A 遺伝子を標的とするガイド RNA (g R N A) (L P A g R N A) または L P A g R N A をコードする核酸 ; および

(b) RNA 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸

と複合体化した複数のナノ粒子を対象に投与し、それによって対象のリポタンパク質関連疾患を処置することを含む、リポタンパク質関連疾患の処置を必要とする対象においてリポタンパク質関連疾患を処置するための方法。

【請求項 2】

対象が複数のナノ粒子を 2 回以上投与される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

2 回以上の投与の各々が約 2 週間から約 4 週間離れている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

2 回以上の投与の各々が少なくとも 3 か月離れている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

対象の血漿における L P A 発現が、投与後少なくとも 20 %、少なくとも 40 %、少なくとも 70 %、または少なくとも 90 % 低下する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

対象の血漿における L P A タンパク質濃度が、投与後少なくとも 20 %、少なくとも 40 %、少なくとも 70 %、または少なくとも 90 % 低下する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

低下が、投与後 3 週間、4 週間、5 週間、2 か月、3 か月、またはそれ以上の長さである、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

低下が、投与後 1 か月で 65 % である、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

低下が、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿における L P A 発現または L P A タンパク質濃度 ; (b) 1 以上の未処置の対象における L P A 発現または L P A タンパク質濃度 ; および / または (c) 健康な対象の L P A 発現または L P A タンパク質濃度の参照レベルに対する低下である、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

処置を必要とする対象が 50 mg / d l より高い L p (a) レベルを有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

処置を必要とする対象が 100 mg / d L より高い L p (a) レベルを有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

処置を必要とする対象が、確立された心血管疾患 (C V D) リスク因子とは無関係に心筋梗塞 (M I) の増加したリスクを有するか、またはアテローム性動脈硬化性心血管疾患 (A S C V D) の増加した生涯リスクを有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

投与の前、投与中、および / または投与後に対象の L p (a) の血中または血清レベルを測定することを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 15】

処置を必要とする対象を特定することを含む、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

リボタンパク質関連疾患が、代謝疾患、心血管疾患、脂質代謝疾患、またはそれらの組み合わせである、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

リボタンパク質関連疾患が、石灰沈着性大動脈弁疾患、心筋梗塞、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化、血栓症、脳卒中、冠動脈疾患、家族性高脂血症、心筋梗塞、末梢動脈疾患、石灰沈着性大動脈弁狭窄症、またはそれらの組み合わせである、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 18】

対象におけるリボタンパク質関連疾患の 1 つ以上の症状が軽減または緩和される、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

複合体化した複数のナノ粒子を対象に投与することにより、心血管リスク、心血管イベントに関連する死亡確率、またはそれらの組み合わせが低下する、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

RNA 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸が RNA 誘導型エンドヌクレアーゼの mRNA である、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 21】

RNA 誘導型エンドヌクレアーゼが Cas9 エンドヌクレアーゼである、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

Cas9 エンドヌクレアーゼが S. ピオゲネス Cas9、S. アウレウス Cas9、N. メニンギティディス Cas9、S. サーモフィルス Cas9、S. サーモフィルス 3 Cas9、T. デンティコラ Cas9、またはそれらのバリエーションである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

gRNA がシングルガイド RNA (sgRNA) である、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 24】

gRNA が LPA 遺伝子のエクソン 3 を標的とする、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

gRNA が配列番号 18～25 のいずれか 1 つのスペーサー配列を含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

LPA gRNA が配列番号 18 のスペーサー配列を含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 27】

LPA gRNA が、配列番号 32 の配列を含むシングルガイド RNA (sgRNA) である、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

LPA gRNA が、配列番号 11 の配列を含むシングルガイド RNA (sgRNA) である、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

LPA gRNA または LPA gRNA をコードする核酸、および RNA 誘導型エンドヌクレアーゼが、複数のナノ粒子中にカプセル化されている、請求項 1～28 のいずれ

50

か一項に記載の方法。

【請求項 30】

ナノ粒子が脂質ナノ粒子である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

対象が霊長類の対象である、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

対象がヒトである、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 34】

複数のナノ粒子が、(a) および (b) の核酸全体として、 0.1 mg/kg 、 0.3 mg/kg 、 0.6 mg/kg 、もしくは 1 mg/kg の用量、または約 0.1 mg/kg 、約 0.3 mg/kg 、約 0.6 mg/kg 、もしくは約 1 mg/kg の用量による単回投与で対象に投与される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

複数のナノ粒子が脂質ナノ粒子である、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

脂質ナノ粒子が、1つ以上の中性脂質、荷電脂質、イオン化脂質、ステロイド、およびポリマーにコンジュゲートした脂質を含む、請求項 35 に記載の方法。

20

【請求項 37】

脂質ナノ粒子が、コレステロール、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質、または両方を含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

投与前、投与後、または両方において、対象の (i) アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、ビリルビン、アルカリホスファターゼ (Alk Phos)、およびアルブミンのうち1つ以上のレベル；(ii) プロトフロンビン時間 (PT)；および／または (iii) 部分トロンプラスチン時間 (PTT) を決定することをさらに含む、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 39】

対象に追加の処置が提供され、ここで追加の処置が、コルチコステロイド、抗H1抗ヒスタミン、抗H2抗ヒスタミン、またはそれらの任意の組み合わせの投与を含む、請求項 1～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

追加の処置が、対象への複数のナノ粒子の投与の1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、またはそれ以上前に対象に提供される、請求項 39 に記載の方法。

40

【請求項 41】

追加の処置の提供および複数のナノ粒子の投与が同時に行われる、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 42】

(a) LPA 遺伝子を標的とするガイドRNA (gRNA) (LPA gRNA)、および (b) Cas9 エンドヌクレアーゼをコードするmRNAと複合体化した複数のナノ粒子を含み、ここでgRNAが配列番号18～25のいずれか1つのスペーサー配列を含む、組成物。

【請求項 43】

(a) LPA 遺伝子を標的とするガイドRNA (gRNA) (LPA gRNA)、お

50

よび（b）Cas9エンドヌクレアーゼをコードするmRNAと複合体化した複数のナノ粒子を含み、ここでgRNAが配列番号18～25のいずれか1つのスペーサー配列を含む、リボタンパク質関連疾患の処置に使用するための組成物。

【請求項44】

リボタンパク質関連疾患が、代謝疾患、心血管疾患、脂質代謝疾患、またはそれらの組み合わせである、請求項43に記載の組成物。

【請求項45】

リボタンパク質関連疾患が、石灰沈着性大動脈弁疾患、心筋梗塞、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化、血栓症、脳卒中、冠動脈疾患、家族性高脂血症、心筋梗塞、末梢動脈疾患、石灰沈着性大動脈弁狭窄症、またはそれらの組み合わせである、請求項43に記載の組成物。

10

【請求項46】

gRNAが配列番号18のスペーサー配列を含む、請求項42～45のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項47】

gRNAが配列番号32の配列を含む、請求項42～45のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項48】

gRNAが配列番号11の配列を含む、請求項42～45のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項49】

Cas9エンドヌクレアーゼがS.ピオゲネスCas9エンドヌクレアーゼである、請求項42～48のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項50】

複数のナノ粒子が脂質ナノ粒子である、請求項42～49のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項51】

脂質ナノ粒子が、1つ以上の中性脂質、荷電脂質、イオン化脂質、ステロイド、およびポリマーにコンジュゲートした脂質を含む、請求項50に記載の組成物。

【請求項52】

脂質ナノ粒子が、コレステロール、ポリエチレングリコール（PEG）脂質、または両方を含む、請求項50に記載の組成物。

30

【請求項53】

1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である、請求項42～52のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本願は、2022年3月21日出願の米国仮出願第63／322,078号、2022年6月13日出願の米国仮出願第63／351,542号、および2022年11月28日出願の米国仮出願第63／385,093号に対する、合衆国法典第35巻119条（e）に基づく利益を請求する。これらの関連出願の内容は、全ての目的のために、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

配列表の参照

本願は、電子的形式の配列表と共に提出される。配列表は、80EM-341712-WO_SeqListと命名された、2023年3月15日作成の、サイズ35.9キロバイトのファイルとして提供される。電子的形式の配列表中の情報は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

50

【0003】

分野

本開示は、一般的には、遺伝子編集を含む分子生物学およびバイオテクノロジーの分野に関する。

【背景技術】

【0004】

関連技術の説明

リポタンパク質 (a) (Lp (a)) は、アポリポタンパク質 (a) [apo (a)] というタンパク質が低密度リポタンパク質 (LDL) 粒子のアポリポタンパク質 B-100 (apoB) 構成要素に共有結合したものである。Lp (a) の高いレベルは、例えば、石灰沈着性大動脈弁疾患 (Lp (a) の高いレベルはこの疾患の高い発生率および速い進行を引き起こす)、心筋梗塞 (MI)、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化、血栓症、および脳卒中を含む、心血管疾患のリスク増加と関連する。現在のところ、Lp (a) を直接標的とする認可された医薬は存在しない。

【0005】

CRISPR (クラスター化された規則的に間隔を空けた短鎖回文反復) - Cas (CRISPR 関連) システムの RNA 誘導型 DNA 標的化原理を使用した DNA の標的化が、広く使用されてきた。CRISPR-Cas システムは 2 つのクラスに分けることができ、クラス 1 システムは複数の Cas タンパク質 (I 型、III 型、および IV 型 CRISPR-Cas システムなど) の複合体を利用し、クラス 2 システムは単一の Cas タンパク質を利用する (II 型、V 型、および VI 型 CRISPR-Cas システムなど)。II 型 CRISPR-Cas ベースのシステムはゲノム編集のために使用されており、かつプログラム可能な DNA 標的化のためのカスタマイズ可能なガイド RNA (gRNA) によってガイドされる Cas ポリペプチドまたはそのバリエーションを必要とする。

【0006】

Lp (a) レベルを低下させることによる、心血管疾患および石灰沈着性大動脈弁疾患などのリポタンパク質関連疾患を処置するための安全かつ効果的な遺伝子編集戦略が求められている。

【発明の概要】

【0007】

本明細書で開示されるものは、リポタンパク質関連疾患を処置するための方法、組成物、およびキットを含む。いくつかの実施形態は、リポタンパク質関連疾患の処置を必要とする対象においてリポタンパク質関連疾患を処置するための方法を提供し、この方法は、(a) LPA 遺伝子を標的とするガイド RNA (gRNA) (LPA gRNA) または LPA gRNA をコードする核酸；および (b) RNA 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸と複合体化した複数のナノ粒子を対象に投与し、それによって対象のリポタンパク質関連疾患を処置することを含む。対象は、複数のナノ粒子を 2 回以上投与される。いくつかの実施形態において、2 回以上の投与の各々は、約 2 週間から約 4 週間離れている。いくつかの実施形態において、2 回以上の投与の各々は、少なくとも 3 か月離れている。いくつかの実施形態において、方法は、対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、対象の血漿における LPA 発現は、投与後に少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、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%、または少なくとも 90% 低下する。いくつかの実施形態において、対象の血漿における LPA タンパク質の濃度は、投与後に少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、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%、または少なくとも 9

10

20

30

40

50

0%低下する。いくつかの実施形態において、低下は、投与後3週間、4週間、5週間、2か月、3か月、6か月、1年、2年、3年、5年、10年、15年、またはそれ以上の長さである。いくつかの実施形態において、低下は投与後1か月で65%である。いくつかの実施形態において、低下は投与後3か月において75%である。いくつかの実施形態において、低下は、(a)複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿におけるLPA発現またはLPAタンパク質濃度；(b)1以上の未処置の対象におけるLPA発現またはLPAタンパク質濃度；および/または(c)健康な対象のLPA発現またはLPAタンパク質濃度の参照レベルに対する低下である。

【0009】

処置を必要とする対象は、50mg/dlより高い、例えば60mg/dl、70mg/dl、80mg/dl、90mg/dl、100mg/dl、110mg/dl、120mg/dl、130mg/dl、140mg/dl、150mg/dl、200mg/dl、250mg/dl、300mg/dl、またはそれ以上のLp(a)レベルを有し得る。いくつかの実施形態において、処置を必要とする対象は、100mg/dl超のLp(a)レベルを有する。いくつかの実施形態において、処置を必要とする対象は、確立された心血管疾患(CVD)リスク因子とは無関係に心筋梗塞(MI)の増加したリスクを有するか、またはアテローム性動脈硬化性心血管疾患(ASCVD)の増加した生涯リスクを有する。

【0010】

本明細書に記載される方法は、投与前、投与中、および/または投与後における対象のLp(a)の血中または血清レベルを測定することを含み得る。いくつかの実施形態において、方法は、処置を必要とする対象を特定することを含む。

【0011】

リポタンパク質関連疾患は、代謝疾患、心血管疾患、脂質代謝疾患、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、リポタンパク質関連疾患は、石灰沈着性大動脈弁疾患、心筋梗塞、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化、血栓症、脳卒中、冠動脈疾患、家族性高脂血症、心筋梗塞、末梢動脈疾患、石灰沈着性大動脈弁狭窄症、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、対象におけるリポタンパク質関連疾患の1つ以上の症状が、軽減または緩和される。いくつかの実施形態において、複合体化した複数のナノ粒子を対象に投与することにより、心血管リスク、心血管イベントに関連する死亡確率、またはそれらの組み合わせが低下する。

【0012】

いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼ、例えばCas9エンドヌクレアーゼのmRNAである。Cas9エンドヌクレアーゼの非限定的な例は、S.ピオゲネス(*S. pyogenes*) Cas9、S.アウレウス(*S. aureus*) Cas9、N.メニンギティディス(*N. meningitidis*) Cas9、S.サーモフィルス(*S. thermophilus*) Cas9、S.サーモフィルス3 Cas9、T.デンティコラ(*T. denticola*) Cas9、およびそれらのバリエーションを含む。gRNAは、シングルガイドRNA(sgRNA)であり得る。いくつかの実施形態において、gRNAはLPA遺伝子のエクソン3を標的とする。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは配列番号18~25のいずれか1つのスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは配列番号18のスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは配列番号32の配列を含むシングルガイドRNA(sgRNA)である。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは配列番号11の配列を含むシングルガイドRNA(sgRNA)である。

【0013】

LPA gRNAまたはLPA gRNAをコードする核酸、およびRNA誘導型ヌクレアーゼは、複数のナノ粒子中にカプセル化され得る。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は脂質ナノ粒子である。対象は、霊長類の対象、例えばヒトであり得る。

【0014】

いくつかの実施形態において、方法は、対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む。例えば、複数のナノ粒子は、(a) および (b) の核酸全体としてちょうど、または約、0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.6 mg/kg、もしくは 1 mg/kg の容量で、単回投与で対象に投与され得る。

【0015】

いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、1つ以上の中性脂質、荷電脂質、イオン化脂質、ステロイド、およびポリマーにコンジュゲートした脂質を含む。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、コレステロール、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質、または両方を含む。

10

【0016】

方法は、投与前、投与後、または両方における対象の (i) アラントランスアミナーゼ (ALT)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、ビリルビン、アルカリホスファターゼ (Alk Phos) およびアルブミンのうち1つ以上のレベル; (ii) プロトンピン時間 (PT); および/または (iii) 部分トロンボプラスチン時間 (PTT) を決定することをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、対象は追加の処置を提供され、ここで追加の処置は、コルチコステロイド、抗H1抗ヒスタミン、抗H2抗ヒスタミン、またはそれらの任意の組み合わせの投与を含む。追加の処置は、対象への複数のナノ粒子の投与の1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、またはそれ以上前に、対象に投与され得る。いくつかの実施形態において、追加の処置の提供および複数のナノ粒子の投与は、同時に行われる。

20

【0017】

本明細書で開示されるものは、(a) LPA 遺伝子を標的とするガイドRNA (gRNA) (LPA gRNA)、および (b) Cas9 エンドヌクレアーゼをコードする mRNA と複合体化したナノ粒子を含む組成物を含み、ここで gRNA は配列番号 18~25 のいずれか1つのスパーサー配列を含む。本明細書で開示されるものは、また、(a) LPA 遺伝子を標的とするガイドRNA (gRNA) (LPA gRNA)、および (b) Cas9 エンドヌクレアーゼをコードする mRNA と複合体化した複数のナノ粒子を含む、リポタンパク質関連疾患の処置に使用するための組成物を含み、ここで gRNA は配列番号 18~25 のいずれか1つのスパーサー配列を含む。リポタンパク質関連疾患は、代謝疾患、心血管疾患、脂質代謝疾患、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、リポタンパク質関連疾患は、石灰沈着性大動脈弁疾患、心筋梗塞、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化、血栓症、脳卒中、冠動脈疾患、家族性高脂血症、心筋梗塞、末梢動脈疾患、石灰沈着性大動脈弁狭窄症、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、gRNA は配列番号 18 のスパーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNA は配列番号 32 の配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNA は配列番号 11 の配列を含む。Cas9 エンドヌクレアーゼは S. ピオゲネス Cas9 エンドヌクレアーゼであり得る。いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、1つ以上の中性脂質、荷電脂質、イオン化脂質、ステロイド、およびポリマーにコンジュゲートした脂質を含む。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、コレステロール、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質、または両方を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、例示的なリポタンパク質 (a) (Lp(a)) 構造を描写する。

【0019】

50

【図 2】図 2 は、非限定的な非ヒト霊長類（NHP）試験デザインの例を描写する。

【0020】

【図 3-1】図 3 A-B は、群 4 の NHP（図 3 A）および群 5 の NHP（図 3 B）の血漿 Lp（a）レベルを示すプロットを描写する。

【図 3-2】同上。

【0021】

【図 4-1】図 4 A-B は、群 4 の NHP（図 4 A）および群 5 の NHP（図 4 B）の、血漿 Lp（a）レベルのベースラインからのパーセント変化を示すプロットを描写する。

【図 4-2】同上

【0022】

【図 5】図 5 は、非限定的な実験デザインの例を描写する。エンドポイントは以下を含むが、これらに限定されない：血液学：d-14（すなわち-14日目）、d-7（すなわち-7日目）、d7（すなわち7日目）、d15、d29、d43、d57、d71、および／またはd84；血清化学：d-14、d-7、d2、d4、d7、d10、d15、d29、d43、d57、d71、および／またはd84；凝固：d-14、d-7、d15、d29、d43、d57、d71、および／またはd84；ECG：d-12、d2、d22、および／またはd84；生体分析：d-7、d1、d2、d4、d8、d15、d29、d43、d57、d71、および／またはd84；バイオマーカー：d-14、d-7、d8、d15、d29、d43、d57、d71、および／またはd84；および組織における編集：組織リストは生殖組織を含む。

【0023】

【図 6】図 6 は、処置の14日前（-14日目）におけるNHP血漿中のベースラインLp（a）レベルを示すグラフである。

【0024】

【図 7】図 7 は、非限定的なNHP試験デザインの例を描写する。

【0025】

【図 8-1】図 8 A は、コントロール群と比較した、3つの異なる用量：0.5mg/kg、1.5mg/kg、および3mg/kgによるCTX320処置後の、NHPの血漿Lp（a）タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。図 8 B は、コントロール群と比較した、3つの異なる用量：0.5mg/kg、1.5mg/kg、および3mg/kgによるCTX320処置後の、NHPの血清Lp（a）タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。

【図 8-2】同上。

【0026】

【図 9-1】図 9 A-C は、CTX320の3つの異なる用量：0.5mg/kg（図 9 A）、1.5mg/kg（図 9 B）、および3.0mg/kg（図 9 C）による処置前後のNHPの血漿Lp（a）タンパク質レベルを示すグラフである。図 9 D は、CTX320処置後29日目におけるNHPの血漿Lp（a）レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。

【図 9-2】同上。

【0027】

【図 10】図 10 A は、コントロール群と比較した、3つの異なる用量：0.5mg/kg、1.5mg/kg、および3mg/kgによるCTX320処置後の、NHPの血清Lp（a）タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。図 10 B は、CTX320処置から約3か月後におけるNHPの血漿Lp（a）レベルのベースラインからのパーセント変化を示す。

【0028】

【図 11】図 11 は、肝臓、ならびに脾臓、副腎、脳、腎臓、肺、精巣上体、精巣、および卵巣を含む他の臓器組織におけるLPA遺伝子編集の割合を示すプロットである。

【0029】

10

20

30

40

50

【図12-1】図12A-12Cは、CTX320の投与後における生殖組織編集を示すプロットである。

【図12-2】同上。

【0030】

【図13】図13A-13Bは、処置後におけるLNP構成要素Aの血漿レベルを示すプロットである。

【0031】

【図14】図14A-14Bは、処置後におけるLNP構成要素Bの血漿レベルを示すプロットである。

【0032】

【図15】図15は、本明細書に記載されるLPA遺伝子編集ナノ粒子（例えばCTX320）のうち1つ以上のための、第1相安全性および忍容性臨床試験の非限定的な試験デザインの例を示す。

【0033】

【図16】図16は、CTX320処置後における患者の血清Lp(a)タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。患者はステロイドおよび抗ヒスタミン薬で前処置されている。

【0034】

【図17】図17は、CTX320投与（2.0mg/kg）の前にステロイドおよび抗ヒスタミン薬で前処置された患者、ならびに前処置を受けず1.5mg/kgのCTX320を投与された患者および3mg/kgのCTX320を投与された患者における、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラントランスアミナーゼ（ALT）、アルカリホスファターゼ（ALP）および総ビリルビンレベルを比較したプロットを提供する。

【発明を実施するための形態】

【0035】

詳細な説明

以下の詳細な説明においては付属の図面を参照し、これは本明細書の一部を形成する。図面において、文脈上そうでないことが示されない限り、類似の記号は典型的には類似の構成要素を指す。詳細な説明、図面、および特許請求の範囲に記載される例示的な実施形態は、限定的であるとは意図されない。本明細書に提示される対象の精神または範囲から離れることなく、他の実施形態が利用されてもよく、かつ他の変化がなされてもよい。本開示の態様は、本明細書において一般的に記載され図に例示されるように、多様な異なる構成で配置、置換、組み合わせ、分離、および設計され得、これらすべてが本明細書において明示的に企図され、かつ本明細書における開示の一部をなすことが容易に理解されるであろう。

【0036】

本明細書で参照する全ての特許、特許出願公開、その他の刊行物、ならびにGenBankおよび他のデータベースからの配列は、関連するテクノロジーについて、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0037】

Lp(a)の高いレベルは、心血管疾患のリスク増加に関連付けられてきた。50mg/dLより高いLp(a)レベル（例えば>125nmol/L）は、石灰沈着性大動脈弁疾患（CAVD）および心血管疾患（CVD）を引き起こし得る。低密度リポタンパク質とは異なり、Lp(a)レベルは環境、食事、運動、またはスタチンなどの既存の脂質低下薬によって調節できず、このことによりLp(a)レベルは遺伝的な疾患リスク因子とされている。現在のところ、Lp(a)を直接標的とする認可された医薬は存在しない。本開示は、Lp(a)レベルを調節（例えば低下）させて、心血管疾患のリスク低下および／または心血管疾患の処置を必要とする対象の心血管疾患のリスクを低下させ、かつ／または心血管疾患を処置するための、方法、組成物、システム、およびキットを提供す

10

20

30

40

50

る。

【0038】

本明細書で開示されるものは、対象、例えば霊長類の対象における心血管疾患または心血管障害を処置するための方法、組成物、およびキットを含む。いくつかの実施形態において、方法は、心血管疾患または心血管障害の処置を必要とする対象に、(a) LPA遺伝子を標的とするガイドRNA (gRNA) またはLPA遺伝子を標的とするgRNAをコードする核酸、および(b) RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸(例えばmRNA)と複合体化した複数のナノ粒子を投与し、それによって対象の心血管疾患または心血管障害を処置することを含む。

【0039】

定義

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、記載された値のプラスまたはマイナス5%を意味する。

【0040】

本明細書で使用される場合、「RNA誘導型エンドヌクレアーゼ」という用語は、RNA(例えばgRNA)と結合して(例えば標的DNA中の)特定のDNA配列に標的化された複合体を形成できる、ポリペプチドを指す。RNA誘導型エンドヌクレアーゼの非限定的な例は、Casポリペプチド(例えば、Cas9エンドヌクレアーゼなどのCasエンドヌクレアーゼ)である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるRNA誘導型エンドヌクレアーゼは、それと結合するRNA分子によって、標的DNA中の特定のDNA配列に標的化される。RNA分子は、標的DNA中の標的配列と相補的でありかつハイブリダイズできる配列を含み得、これによって結合したポリペプチドを標的DNA中の特定の位置に標的化させることが可能になる。

【0041】

本明細書において使用される場合、「ガイドRNA」または「gRNA」という用語は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼに結合して複合体を形成し、結合したRNA誘導型エンドヌクレアーゼ(Casエンドヌクレアーゼなど)の活性を標的核酸中の特定の標的配列に指向させ得る、部位特異的標的化RNAを指す。ガイドRNAは1つ以上のRNA分子を含み得る。

【0042】

本明細書において使用される場合、核酸分子(例えば、RNA断片、またはgRNA)の「二次構造」は、核酸分子内における塩基対合相互作用を指す。

【0043】

本明細書において使用される場合、「標的DNA」という用語は、「標的部位」または「標的配列」を含むDNAを指す。「標的配列」という用語は、ハイブリダイゼーションのために十分な条件が存在する場合、gRNAのDNAを標的とする配列またはセグメント(本明細書において「スパーサー」とも称する)がハイブリダイズできる、標的DNA中に存在する核酸配列を指すために、本明細書において使用される。例えば、標的DNA中の標的配列5'-GAGCATATC-3'は、RNA配列5'-GAUAUGCUC-3'によって標的とされる(または、この配列とハイブリダイズ可能、もしくは相補的である)。gRNAのDNAを標的とする配列またはセグメントと標的配列との間のハイブリダイゼーションは、例えばワトソン・クリック塩基対合法則に基づき得、これによりDNAを標的とする配列またはセグメントのプログラムが可能である。gRNAのDNAを標的とする配列またはセグメントは、例えば、任意の標的配列とハイブリダイズするように設計され得る。

【0044】

本明細書で使用される場合、「Casエンドヌクレアーゼ」または「Casヌクレアーゼ」という用語は、CRISPR獲得免疫系に関連するRNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼを指す。

【0045】

他に示唆されない限り、「ヌクレアーゼ」および「エンドヌクレアーゼ」は、ポリヌクレオチド切断のためのエンドヌクレアーゼ的切断 (endonucleolytic) 酵素活性を有する酵素を指すために本明細書で互換的に使用される。

【0046】

本明細書で使用される場合、gRNAの「不変領域」という用語は、gRNAの、RNA誘導型エンドヌクレアーゼと会合するヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態において、gRNAはcrRNAおよびトランス活性化crRNA (tracrRNA) を含み、ここでcrRNAおよびtracrRNAは互いにハイブリダイズして二重鎖を形成する。いくつかの実施形態において、crRNAは、5'から3'の順に以下を含む：スパーサー配列および最小CRISPR反復配列 (本明細書において「crRNA反復配列」とも称する) ; ならびに最小CRISPR反復配列に対して相補的である最小tracrRNA配列 (本明細書において「tracrRNAアンチ反復配列」とも称する) および3' tracrRNA配列を含むtracrRNA。いくつかの実施形態において、gRNAの不変領域は、crRNAの最小CRISPR反復配列部分およびtracrRNAを指す。

【0047】

本明細書において使用される場合、「ドナーテンプレート」という用語は、結果として外因性遺伝物質の標的化統合をもたらすために (例えば相同性指向性修復によって) ゲノムに導入され得る、外因性遺伝物質を含有する核酸鎖を指す。いくつかの実施形態において、ドナーテンプレートはDNAの標的部位に対して相同性の領域を有さなくてもよく、かつ標的部位の切断の後にNHEJ依存的な末端結合によって統合され得る。ドナーテンプレートは、DNAまたはRNA、一本鎖または二重鎖であり得、かつ直鎖状または環状の形態で細胞に導入され得る。

【0048】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書において互換的に使用され、任意の長さの、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、ヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、一本鎖、二重鎖、または多重鎖の、DNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド／三重らせん、あるいは、プリンおよびピリミジン塩基もしくはその他の天然のヌクレオチド塩基、化学的もしくは生化学的に改変されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーであり得る。

【0049】

本明細書において使用される場合、「結合」という用語は、高分子間 (例えばタンパク質と核酸との間) の非共有結合性相互作用を指す。非共有結合性相互作用の状態にある間、その高分子は「会合」または「相互作用」または「結合」していると表現される (例えば、分子Xが分子Yと相互作用していると表現される場合、これは分子Xが分子Yと非共有結合的に結合していることを意味する)。結合相互作用は、解離定数 (K_d)、例えば、 $10^{-6} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $10^{-15} M$ 、またはこれらの値のうち任意の2つ値の間の数値もしくは範囲の K_d またはそれ未満の K_d によって特徴付けることができる。 K_d は、例えば pH および温度などの環境条件に依存し得る。「親和性」は結合の強さを指し、かつ高い結合親和性は低い K_d と相関する。

【0050】

本明細書において使用される場合、「ハイブリダイズすること」または「ハイブリダイズする」という用語は、2つの異なる分子内の実質的に相補的または相補的な核酸配列の対合を指す。対合は、核酸配列が実質的に相補的または完全に相補的な配列に塩基対合を通して連結されハイブリダイゼーション複合体を形成する、任意のプロセスによって達成され得る。「ハイブリダイズすること」または「ハイブリダイズする」は、分子を変性させて分子の分子内構造 (例えば二次構造) を破壊することを含み得る。いくつかの実施形態において、分子を変性させることは、分子の分子内構造を破壊するために十分な温度ま

で、分子を含む溶液を熱することを含む。いくつかの場合において、分子を変性させることは、分子の分子内構造を破壊するために十分な pH まで、分子を含む溶液の pH を調節することを含む。ハイブリダイゼーションの文脈において、2つの核酸配列または配列のセグメントは、それらの個々の塩基の少なくとも80%がもう一方に対して相補的である場合、「実質的に相補的」である。いくつかの実施形態において、スプリントオリゴヌクレオチド (splint oligonucleotide) 配列は、相補的になるよう設計された2つのポリヌクレオチド (例えばRNA断片) の一方に対して同一性が約50%以下である。各配列の相補的部分は本明細書において「セグメント」と称され得、セグメントは80%以上の同一性を有する場合実質的に相補的である。

【0051】

「相補性」および「相補的」という用語は、アデノシン (A) がチミン (U) と対合しグアニン (G) がシトシン (C) と対合するという古典的なワトソン・クリック塩基対合法則に基づいて、ある核酸が別の核酸と水素結合を形成し得ることを意味する。相補性は、完璧 (例えば完全な相補性) または不完全 (例えば部分的な相補性) であり得る。完璧または完全な相補性は、一方の鎖のあらゆる核酸塩基が、ワトソン・クリックの古典的な塩基対合に従って、もう一方の逆平行の核酸配列の対応する塩基と水素結合を形成できることを指す。部分的な相補性は、核酸配列の近接している残基のうちある割合だけが、もう一方の逆平行の核酸配列のうち同じ数の近接している残基とワトソン・クリック塩基対を形成し得ることを指す。いくつかの実施形態において、相補性は、少なくとも70%、80%、90%、100%、またはこれらの値のうち任意の2つの間の数もしくは範囲であり得る。いくつかの実施形態において、相補性は完全、すなわち100%である。例えば、相補的候補配列セグメントは、候補配列セグメントに対して完全に相補的であり、その配列はワトソン・クリック塩基対合法則を使用して候補配列セグメントから演繹され得る。

【0052】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、宿主細胞に遺伝物質を伝達するために使用されるポリヌクレオチドコンストラクト、典型的にはプラスミドまたはウイルスを指す。ベクターは、例えば、ウイルス、プラスミド、コスミド、またはファージであり得る。本明細書で使用されるベクターは、DNAまたはRNAのいずれかから構成され得る。いくつかの実施形態において、ベクターはDNAから構成される。「発現ベクター」は、適切な環境に存在する場合、ベクターによって輸送される1つ以上の遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を誘導できるベクターである。ベクターは、好ましくは自己複製可能である。典型的には、発現ベクターは転写プロモーター、遺伝子、および転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は、通常はプロモーターの制御下で起こり、かつ遺伝子はプロモーターに「動作可能に連結」されていると表現される。

【0053】

本明細書で使用される場合、「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は互換的であり、かつ、ホスホジエステル結合から構成されるか、またはホスホトリエステル、ホスホロアミダート、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミダート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホロアミダート、架橋メチレンホスホン酸、架橋ホスホロアミダート、架橋ホスホロアミダート、架橋メチレンホスホン酸、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエート、もしくはスルトン結合などの改変された連結、およびこのような連結の組み合わせから構成されるかによらず、任意の核酸を指す。「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、生物学的に発生する5つの塩基 (アデニン、グアニン、チミン、シトシン、およびウラシル) 以外の塩基から構成される核酸も特に含む。

【0054】

本明細書において使用される場合、「トランスフェクション」または「感染」は、例えば本明細書に記載される組み換えMVAウイルスまたはガットレス (gutless) ピコルナウイルス粒子を細胞に接触させることなどによって、宿主細胞に核酸を導入することを指

10

20

30

40

50

す。

【0055】

本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」という用語は、ヒトの介入によって標的細胞の1つ以上の染色体に統合される、任意のヌクレオチドまたはDNA配列を指す。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、一般的には、転写調節配列などの目的のタンパク質の所望の発現を得るために有用な他の配列に、動作可能に連結される。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、導入遺伝子が統合された染色体を標識するために使用される核酸または他の分子を追加で含み得る。

【0056】

本明細書で使用される場合、「処置」は、患者が呈するかまたは患者が罹患する可能性のある疾患、障害、または生理的な状態に応じて行われる、臨床的な介入のことを指す。処置の目的は、症状を緩和または予防すること、あるいは、疾患、障害、もしくは状態の進行もしくは悪化、および／または疾患、障害、もしくは状態の再発を遅らせるかまたは止めることを含むが、これらに限定されない。「処置」は、治療的処置および予防的または防止的手段の、一方または両方を指す。処置を必要とする対象は、疾患もしくは障害または望ましくない生理学的状態を既に患っている対象、および疾患もしくは障害または望ましくない生理学的状態を予防すべき対象を含む。

【0057】

本明細書において使用される場合、「有効量」または「薬学的に有効な量」または「治療上有効な量」という用語は、有益なまたは所望の、生物学的小および／または臨床的結果をもたらすために十分な量を指す。

【0058】

本明細書において使用される「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、対象に目的の化合物を投与するための薬学的に許容される担体、添加剤、または希釈剤を提供する、任意の適切な物質を指す。薬学的に許容される賦形剤は、薬学的に許容される希釈剤、薬学的に許容される添加剤、および薬学的に許容される担体と称される物質を包含し得る。

【0059】

本明細書で使用される場合、「対象」は、その診断、処置、または治療が所望される動物を指す。いくつかの実施形態において、対象は哺乳動物である。本明細書において使用される「哺乳動物」は、哺乳類に属する個体を指し、かつ、ヒト、家畜、畜産動物、動物園動物 (zoo animal)、スポーツ動物 (sport animal)、およびペット動物を含むが、これらに限定されない。哺乳動物の非限定的な例は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ならびにサル、チンパンジーおよび類人猿などの霊長類を含み、特にヒトを含む。いくつかの実施形態において、哺乳動物は霊長類である。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトではない。いくつかの態様において、対象は、心血管疾患を有し得、または有していることが疑われ得、かつ／または心血管疾患の1つ以上の症状を有している。いくつかの態様において、対象は、診断の時点またはその後において心血管疾患のリスクを有すると診断されている、ヒトである。いくつかのケースにおいて、心血管疾患のリスクを有するという診断は、内因性アポリポタンパク質 (a) (LPA) 遺伝子、またはゲノムのLPA遺伝子の近くのapo (a) タンパク質の発現に影響する可能性のあるゲノム配列における1つ以上の変異の存在に基づいて決定され得る。

【0060】

本明細書において分子の文脈で使用される「血漿レベル」という用語は、その分子の濃度または量、例えば所定の量の血漿中に存在する分子のモル数もしくは重量を指す。

【0061】

Lp (a) の高いレベルは、心血管疾患のリスク増加に関連付けられてきた。50 mg / dL より高いLp (a) レベルは、石灰沈着性大動脈弁疾患 (CAVD) および心血管疾患 (CVD) を引き起こし得る。低密度リポタンパク質とは異なり、Lp (a) レベル

10

20

30

40

50

は環境、食事、運動、またはスタチンなどの既存の脂質低下薬によって調節できず、このことによりLp(a)レベルは遺伝的な疾患リスク因子とされている。長期間にわたって安定的にLp(a)レベルを低下させるかまたはLp(a)レベルを永続的に低下させ得る、新規の遺伝子治療が必要とされている。本開示は、LPA遺伝子またはそのバリエーションを直接標的としてゲノムからLPA遺伝子を永続的にノックアウトし、それによって対象の血中（例えば血漿）におけるLp(a)のレベルを永続的に低下させる、効率の高い遺伝子編集方法ならびに関連する組成物およびキットを提供する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法、組成物、およびキットは、血漿Lp(a)レベルを、少なくとも20%、少なくとも30%、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%、またはそれより大きく低下させ得る。いくつかの実施形態において、方法を実施した後の対象における血漿Lp(a)レベルは、ちょうど、または約、60mg/dL、55mg/dL、50mg/dL、45mg/dL、40mg/dL、35mg/dL、30mg/dL、もしくはそれ未満まで低下する。また、本明細書に記載されるgRNA配列は、オフターゲット効果の数および頻度を顕著に最小化し、それによって遺伝毒性のリスクを低下させ得る。本明細書に記載される方法、組成物、およびキットは、対象において心血管疾患を処置、かつ／または心血管疾患のリスクを低下させるために、使用され得る。

10

20

30

40

50

【0062】

リポタンパク質(a) (Lp(a))

本明細書で提供されるものは、細胞ゲノムにおいてリポタンパク質(a) (Lp(a))のアポリポタンパク質(a)タンパク質をコードするLPA遺伝子（例えば、心血管疾患リスクの増加および／またはLp(a)発現の増加に関連するLPA遺伝子バリエーションも含む）を編集して、細胞中のLp(a)の発現、機能、または活性を調節する（例えば低下させる）ための、ベクター、組成物、方法、システム、およびキットを含む。本明細書において使用される「LPA遺伝子」という用語は、LPA調節性プロモーターおよびエンハンサー配列ならびにLPAコード配列を包含する遺伝子領域を含む。

【0063】

Lp(a)は、低密度リポタンパク質(LDL)粒子のアポリポタンパク質B-100(apoB)構成要素に共有結合しているアポリポタンパク質(a) (apo(a))というタンパク質からなる、アテローム原性のリポタンパク質である（例えば、図1を参照）。apo(a)タンパク質はLPA遺伝子によってコードされ、肝細胞で作られ、かつ循環中に分泌される。しかしながら、apo(a)はLDLにドッキングしてapoBとジスルフィド共有結合を形成しLp(a)となることが知られている一方で、Lp(a)会合の正確な部位は知られていない。このapo(a)のapoBに対する結合は、apoBのLDL受容体結合部位をブロックし、それによってLDL受容体経路を通じたクリアランスを阻害する。apo(a)はプラスミノーゲン遺伝子から進化したものであり、かつ関連するタンパク質ドメインを含有する。apo(a)タンパク質は、1つのクリングルV(KV)ドメイン、クリングルIV(KIV)ドメインの複数のコピー、および不活性プロテアーゼ様ドメインから構成され、これらは全てプラスミノーゲンに由来する。KIVは、1コピー存在するKIV1およびKIV3-10、ならびに1から40コピー超存在するKIV2の、10個のサブタイプに分類される。apo(a)のサイズは個々のヒトの間で異なり、KIV2のコピー数に比例し、これは遺伝的に決定される。Lp(a)の血漿レベルはapo(a)タンパク質のサイズと負に相関し、これはより大きなアイソフォームの分泌が遅いことによるものと考えられる。Lp(a)の高い血漿レベルは、石灰沈着性大動脈弁疾患、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化、血栓症、および脳卒中を含む、多くの心血管疾患の独立リスク因子である(Kronenberg, F. (2016). Cardiovasc. Drugs Ther., 30(1):87-100においてレビューされている)。

【0064】

Lp(a)の病態形成メカニズムは、そのアテローム原性、炎症促進性および血栓形成

促進性を介する。Lp(a)のapo(a)およびLDL構成要素の組み合わせは、心血管系に対し複合的な効果をもたらす。LDLは、単独で、リン脂質が酸化された血管壁へのLDLの進入を通して、アテローム性動脈硬化の特徴である免疫応答および炎症応答を引き起こし得る。Lp(a)は血漿中で循環し、酸化されたリン脂質に結合して、炎症促進応答を引き起こす。apo(a)そのものは、損傷した血管壁の露出した表面に結合し得る部位を含有し、それにより、その位置におけるapo(a)の進入および蓄積が媒介される。apo(a)の小さいアイソフォームは、線維素溶解を抑制することにより血栓症を促進することが示されている。

【0065】

Lp(a)の血漿レベルは心血管疾患との関係で広く検討されており、複数の研究が、高いLp(a)レベルと心血管疾患の高いリスクとを正に関連付けてきた(Kronenberg, F. (2016). *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 30(1):87-100においてレビューされている)。ヒトにおける血漿Lp(a)レベルの範囲は個体間で1000倍異なり得る(例えば、0.1mg/dLから>300mg/dL、または<30nmol/Lから>400nmol/L)。可変である血清レベルは、遺伝的に、例えばapo(a)アレルサイズ(allele size)(KIV-2反復の数)、5'ペンタヌクレオチド反復多型、LPA遺伝子の5'およびその他の領域におけるSNPなどによって決定される。血清におけるLp(a)レベルは、ELISAアッセイまたは免疫比濁分析を使用して、当業者に理解されるように検出され得る。

【0066】

LPA遺伝子(LP、AK38、およびAPOAとしても知られる)は、6q25.3-q26の細胞遺伝学的位置を有し、かつゲノム座標は6番染色体、リバースストランド、ポジション160531482-160664275である。LPAのヌクレオチド配列は、NCBIウェブサイトにおいて、NCBIリファレンス配列:NC_000006.12で見ることができる。LPAのNCBI遺伝子IDは4018、Uniprot IDはP08519、Ensembl Gene IDはENSG00000198670である。

【0067】

遺伝子編集

本明細書で提供されるものは、LPA遺伝子またはそのバリエーションを編集し、それによって対象のLp(a)の発現レベル(例えばLp(a)の血漿濃度)を低下させるための、方法、組成物、およびキットを含む。遺伝子編集(ゲノム編集を含む)は標的細胞のゲノムなどのDNA配列中のヌクレオチド/核酸が、挿入、欠失、および/または置換される、遺伝子操作の一種である。標的化遺伝子編集は、標的細胞のゲノム中(例えば標的とする遺伝子中または標的とするDNA配列中)の予め選択した部位における挿入、欠失、および/または置換を可能にする。例えばヌクレオチド/核酸の欠失、挿入、または置換によって内因性遺伝子の配列が編集される場合、影響を受けた配列を含む内因性遺伝子は、配列の変化が原因でノックアウトまたはノックダウンされ得る。したがって、標的化編集は、内因性遺伝子発現を破壊するために使用され得る。「標的化統合」は、挿入部位の内因性配列の欠失を伴うかまたは伴わない、1つ以上の外因性配列の挿入を伴うプロセスを指す。外因性配列を含有するドナーテンプレートが存在する場合、標的化遺伝子編集の結果として標的化統合が起こり得る。

【0068】

標的化編集は、ヌクレアーゼ非依存的アプローチまたはヌクレアーゼ依存的アプローチのいずれかを介して達成され得る。ヌクレアーゼ非依存的標的化編集アプローチにおいては、宿主細胞の酵素機構を介して内因性配列に導入されるように、外因性ポリヌクレオチドを挟む相同な配列によって相同組み換えが誘導される。外因性ポリヌクレオチドは、内因性配列中にヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を導入し得る。

【0069】

あるいは、ヌクレアーゼ依存的アプローチは、特異的レアカッターヌクレアーゼ(rar

10

20

30

40

50

e-cutting nuclease) (例えばエンドヌクレアーゼ) による二重鎖切断 (DSB) の特異的導入を介して、高い頻度で標的化編集を達成し得る。このようなヌクレアーゼ依存の標的化編集は、DNA 修復メカニズム、例えば DSB に応じて起こる非相同末端結合 (NHEJ) も利用する。NHEJ による DNA 修復は、しばしば少数の内因性ヌクレオチドのランダムな挿入または欠失 (インデル) をもたらす。NHEJ を介した修復とは対照的に、修復は相同性指向性修復 (HDR) によっても起こり得る。ホモロジーアームのペアによって挟まれた外因性遺伝物質を含有するドナーテンプレートが存在する場合、その外因性遺伝物質は、HDR によってゲノムに導入され得、その結果として外因性遺伝物質の標的化統合が起こり得る。

【0070】

特異的かつ標的化された DSB を導入することができる利用可能なエンドヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、および RNA 誘導型 CRISPR-Cas9 ヌクレアーゼ (CRISPR/Cas9; クラスター化された規則的に間隔を空けた短鎖回文反復関連 9) を含むが、これらに限定されない。加えて、phiC31 および Bxb1 インテグラーゼを利用する DICE (デュアルインテグラーゼカセット交換) システムが標的化統合に使用されてもよい。

【0071】

ZFN は、ジンクフィンガー DNA 結合ドメイン (ZFB D) に融合したヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼであり、これは 1 つ以上のジンクフィンガーを介して配列特異的に DNA に結合するポリペプチドドメインである。ジンクフィンガーは、その構造が亜鉛イオンの配位によって安定化されている、ジンクフィンガー結合ドメイン内の約 30 アミノ酸のドメインである。ジンクフィンガーの例は、C2H2 ジンクフィンガー、C3H ジンクフィンガー、および C4 ジンクフィンガーを含むが、これらに限定されない。設計されたジンクフィンガードメインは非天然のドメインであり、その設計/組成は主に、例えば置換法則ならびに既存の ZFP 設計および結合データの情報を蓄積するデータベースの情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムの適用などの、合理的基準の結果である。例えば、米国特許第 6,140,081 号、6,453,242 号、および 6,534,261 号を参照。WO98/53058、WO98/53059、WO98/53060、WO02/016536、および WO03/016496 も参照。選択されるジンクフィンガードメインは、主にファージディスプレイ、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択などの経験的プロセスの結果として生産される、天然に存在しないドメインである。ZFN については、米国特許第 7,888,121 号および米国特許第 7,972,854 号でより詳細に記載されている。ZFN の最も認知されている例は、FokI ヌクレアーゼとジンクフィンガー DNA 結合ドメインとの融合体である。

【0072】

TALEN は、TALE エフェクター DNA 結合ドメインと融合したヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「転写活性化因子様エフェクター DNA 結合ドメイン」、「TALE エフェクター DNA 結合ドメイン」、または「TALE DNA 結合ドメイン」は、DNA に対する TALE エフェクタータンパク質の結合を担う、TALE エフェクタータンパク質のポリペプチドドメインである。TALE エフェクタータンパク質は、キサントモナス (Xanthomonas) 属の植物病原体によって、感染の過程で分泌される。これらのタンパク質は植物細胞の核に入り、DNA 結合ドメインを介してエフェクター特異的 DNA 配列に結合し、トランス活性化ドメインを介してその配列で遺伝子転写を活性化する。TALE エフェクター DNA 結合ドメインの特異性は、選択反復位置に反復可変二残基 (repeat variable diresidue: RVD) と呼ばれる多型を含む、不完全な 34 アミノ酸反復のエフェクター変数に依存する。TALEN については、米国特許出願第 2011/0145940 号でより詳細に記載されている。当技術分野で最も認知されている TALEN の例は、FokI ヌクレアーゼと TALE エフェクター DNA 結合ドメインとの融合ポリペプチドである。

10

20

30

40

50

【0073】

本明細書で提供される用途に適した標的化ヌクレアーゼのさらなる例は、Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1、およびWβ／SPBc／TP901-1を含むがこれらに限定されず、単独で、または組み合わせて使用される。

【0074】

標的化ヌクレアーゼの他の非限定的な例は、天然および組み換え型のヌクレアーゼ、例えばCRISPR／Cas9、制限エンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼなどを含む。

【0075】

CRISPR-Cas 遺伝子編集システムおよびRNA誘導型ヌクレアーゼ

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるベクター、組成物、方法、およびキットは、CRISPR-Cas 遺伝子編集システムなどの遺伝子編集システムにおいて、LPA 遺伝子を遺伝子編集するために使用され得る。例えば、CRISPR-Cas9 システムは、原核生物の天然の防御機構を、遺伝子編集のために使用されるRNA誘導型DNA標的化プラットフォームとして転用したものである。これは、DNAヌクレアーゼであるCas9、ならびにDNAの切断を標的化するための2つの非コードRNAであるcrisprRNA (crRNA) およびトランス活性化RNA (tracrRNA) に依存する。crRNAは、標的DNA中の典型的には20ヌクレオチド (nt) の配列とのワトソン・クリック塩基対合を介して、CRISPR-Cas9 複合体の配列認識および特異性を駆動する。CRISPR-Cas9 複合体は、標的配列の後にプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) と称される特定の短いDNAモチーフ (配列NGGを伴う) がある場合、crRNAの最初の20nt、すなわちシングルガイドRNA (sgRNA) と一致する配列を含有するDNA配列のみと結合する。tracrRNAは、crRNAの3'末端とハイブリダイズしてRNA二重鎖構造を形成し、これにCas9エンドヌクレアーゼが結合して触媒作用的に活性なCRISPR-Cas9 複合体を形成して、それによって標的DNAを切断し得る。CRISPR-Cas9 複合体が標的部位においてDNAに結合すると、Cas9酵素中の2つの独立したヌクレアーゼドメインがそれぞれPAM部位上流のDNA鎖の一方を切断し、DNAの両方の鎖が塩基対の形で終結する二重鎖切断 (DSB) (平滑末端) が残る。特定の標的部位におけるCRISPR-Cas9 複合体とDNAとの結合および部位特異的DSBの形成の後、次の重要なステップは、DSBの修復である。細胞はDSBを修復するために2つの主要なDNA修復経路を使用する：非相同末端結合 (NHEJ) および相同性指向性修復 (HDR)。いくつかの実施形態において、CRISPR-Cas9 遺伝子編集システムは、RNA誘導型ヌクレアーゼおよび1つ以上の標的遺伝子を標的とする1つ以上のガイドRNAを含む。

【0076】

本明細書に記載されるように、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、天然または非天然のものであり得る。RNA誘導型エンドヌクレアーゼの非限定的な例は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Csn1およびCsx12としても知られる)、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、およびCpf1エンドヌクレアーゼ、ならびにそれらの機能的な誘導体を含む。いくつかの場合において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼはCas9エンドヌクレアーゼである。Cas9エンドヌクレアーゼは、例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) (SpyCas9)、ストレプトコッカス・ルグドゥネンシス (Staphylococcus lugdunensis) (SluCas9)、P. ニューモトロピカ (P. pneumotropica) Cas9 (PpCas9)、スタフィロコッカス・アウリクラリス (Staphylococcus auricularis) Cas9 (SauriCas9)、

スタフィロコッカス・ルグドウネンシス (*Staphylococcus lugdunensis*) Cas9 (SlugCas9)、スタフィロコッカス・ルトラエ (*Staphylococcus lutrae*) Cas9 (SlutrCas9)、スタフィロコッカス・ヘモリティクス (*Staphylococcus haemolyticus*) Cas9 (ShacCas9)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) (CjCas9)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) (SaCas9)、またはそれらのバリエーションであり得る。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、小さいCas9、dead Cas9 (dCas9)、およびCas9ニッカーゼを含むがこれらに限定されない、Cas9のバリエーションである。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、RuvCもしくはRuvC様ヌクレアーゼドメイン (例えばCpf1)、および／またはHNHもしくはHNH様ヌクレアーゼドメイン (例えばCas9) を含む得る。いくつかの実施形態において、Cas9エンドヌクレアーゼは、S. ピオゲネスCas9、S. アウレウスCas9、N. メニンギティディスCas9、S. サーマフィルスCas9、S. サーマフィルス3 Cas9、T. デンティコラCas9、またはそれらのバリエーションである。

10

20

30

40

50

【0077】

RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、小さいRNA誘導型エンドヌクレアーゼであり得る。小さいRNA誘導型エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載されているRNA誘導型エンドヌクレアーゼおよび当技術分野において知られているRNA誘導型エンドヌクレアーゼのいずれかに由来するRNA誘導型エンドヌクレアーゼの部分から設計され得る。小さいRNA誘導型エンドヌクレアーゼは、例えば小さいCas9エンドヌクレアーゼであり得る。いくつかのケースにおいて、小さいRNA誘導型ヌクレアーゼは、長さ約1,100アミノ酸より短い。

【0078】

RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、変異型RNA誘導型エンドヌクレアーゼであり得る。例えば、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、天然のRNA誘導型エンドヌクレアーゼの変異体であり得る。また、変異型RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、変化したエンドヌクレアーゼ活性 (例えばDNAに対する結合親和性を実質的に低下させることなく変化または抑制されたDNAエンドヌクレアーゼ活性) などの、天然のRNA誘導型エンドヌクレアーゼと比較して変化した活性を有する変異型RNA誘導型エンドヌクレアーゼであり得る。このような改変は、転写調節 (例えば活性化または抑制) を目的とする変異型RNA誘導型エンドヌクレアーゼの配列特異的DNA標的化；メチル化、脱メチル化、アセチル化または脱アセチル化によるエピジェネティック修飾またはクロマチン修飾；あるいは当技術分野で知られるDNA結合タンパク質および／またはDNA改変タンパク質の任意の他の改変を可能にし得る。いくつかの実施形態において、変異型RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、DNAエンドヌクレアーゼ活性を有しない。

【0079】

RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、標的DNAの相補鎖を切断する一方で標的DNAの非相補鎖を切断する能力が低下しているか、または、標的DNAの非相補鎖を切断する一方で標的DNAの相補鎖を切断する能力が低下している、ニッカーゼであり得る。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、標的DNAの相補鎖および非相補鎖の両方を切断する能力が低下している。

【0080】

いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸が対象に投与される。いくつかの実施形態において、核酸はインビトロ (in vitro) 転写反応によって生成され得る。いくつかの実施形態において、インビトロで転写されたRNAを生成することは、(ランオフ) RNAインビトロ転写を可能にする条件下で直鎖状DNAテンプレートをRNAポリメラーゼおよびヌクレオチド混合物とインキュベートすることを含む。ヌクレオチド混合物は、インビトロ転写ミックス (IVTミックス) の一部であり得る。いくつかの実施形態において、RNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラー

ぜである。RNAインビトロ転写に使用するヌクレオチド混合物は、追加で以下に定める改変ヌクレオチドを含有し得る。いくつかの実施形態において、RNAインビトロ転写反応に使用するヌクレオチド混合物（例えば、微量の各ヌクレオチドを混合物としたもの）は、所定のRNA配列に対して最適化され得る（最適化NTPミックス）。このような方法は、例えばWO2015/188933に記載されている。最適化NTPミックスを使用するプロセスによって得られたRNAは、いくつかの実施形態において、低下した免疫刺激特性を特徴とする。

【0081】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド混合物は非改変リボヌクレオシド三リン酸（NTP）であるGTP、ATP、CTP、およびUTPを含む。いくつかの実施形態において、インビトロ転写は、少なくとも1つのキャップアナログ、例えばcap1トリヌクレオチドキャップアナログ、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pGまたはm7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、またはrn7(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pGの存在を含み得る。いくつかの実施形態において、5'キャップ構造は、cap0またはcap1またはcap2構造を生成するために、キャップ化酵素（例えば、ワクシニアウイルスキャップ化酵素および／またはキャップ依存的2'-O-メチルトランスフェラーゼ）を使用する酵素的キャップ化を介して形成される。5'キャップ構造（cap0またはcap1）は、固定化したキャップ化酵素および／またはキャップ依存的2'-O-メチルトランスフェラーゼを使用し、WO2016/193226に開示される方法および手段を使用して付加されてもよい。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの（リボ）ヌクレオシド三リン酸の一部または全部が、改変ヌクレオシド三リン酸によって置換される。いくつかの実施形態において、改変ヌクレオシド三リン酸は、シュードウリジン（ψ）、N1-メチルシュードウリジン（m1ψ）、5-メチルシトシン、または5-メトキシウリジンを含む。いくつかの実施形態において、改変RNAを得るために、ヌクレオチド混合物中のウラシルヌクレオチドが、シュードウリジン（ψ）およびまたはN1-メチルシュードウリジン（m1ψ）によって（部分的または完全に）置換される。いくつかの実施形態において、化学改変ヌクレオチドはシュードウリジン（ψ）である。いくつかの実施形態において、化学改変ヌクレオチドはN1-メチルシュードウリジン（m1ψ）である。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド混合物は、RNAに組み込むための、少なくとも1つの改変ヌクレオチドおよび／または少なくとも1つのヌクレオチドアナログもしくはヌクレオチド誘導体を含む。例えば、本明細書で定義する改変ヌクレオチドは、ヌクレオチドアナログ／改変体、例えば骨格改変体、糖改変体、または塩基改変体を含み得る。骨格改変体は、ヌクレオチド骨格のリン酸が化学的に改変される改変を含み得る。糖改変体は、ヌクレオチドの糖の化学改変を含み得る。さらに、塩基改変体は、ヌクレオチドの塩基部分の化学改変を含み得る。この文脈において、ヌクレオチドアナログまたは改変体は、転写および／または翻訳に適用可能なヌクレオチドアナログを含み得る。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド混合物は少なくとも1つの改変ヌクレオチドを含み、かつ／または、少なくとも1つのヌクレオチドアナログは、骨格改変ヌクレオチド、糖改変ヌクレオチド、および／または塩基改変ヌクレオチド、またはそれらの任意の組み合わせから選択される。

【0082】

ヌクレオチド混合物に含まれRNAに組み込まれてもよい改変ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、糖部分を改変され得る。例えば、2'ヒドロキシ基（OH）は、いくつかの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で改変または置換され得る。「オキシ」-2'ヒドロキシ基改変の例は、アルコキシまたはアリールオキシ（-OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリールまたは糖）；ポリエチレングリコール（PEG）、-O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR；例えばメチレン架橋によって2'ヒドロキシ基が同じリボース糖の4'炭素に連結されている「ロック」核酸（LNA）；およびアミノ基（-O-アミノ、ここでアミノ基は、アルキルアミ

10

20

30

40

50

ノ、ジアルキルアミノ、ヘテロ環式、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、ポリアミノであり得る) またはアミノアルコキシを含むが、これらに限定されない。「デオキシ」改変は、水素、アミノ(例えば、 NH_2 ; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロ環式、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)を含み; またはアミノ基は、リンカーを介して糖に連結され得、ここで、リンカーは、原子C、N、およびOのうちの1つ以上を含む。また、糖基は、リボースの対応する炭素の立体化学配置に対して反対の立体化学配置を有する1つ以上の炭素を含有し得る。したがって、改変RNA分子は、例えば糖としてアラビノースを含有するヌクレオチドを含み得る。

10

【0083】

リン酸骨格は改変ヌクレオシドおよび改変ヌクレオチドにおいてさらに改変され得、これらはヌクレオチド混合物に含まれ改変インビトロ転写RNAに組み込まれ得る。骨格のリン酸基は、1つ以上の酸素原子を異なる置換基で置換することによって改変され得る。さらに、改変ヌクレオシドおよび改変ヌクレオチドは、改変されていないリン酸部分を本明細書に記載される改変リン酸で完全に置換したものを含み得る。改変リン酸基の例は、ホスホロチオエート、ホスホロセレナート、リン酸ホウ素、リン酸ホウ素エステル、ホスホン酸水素(hydrogen phosphonate)、ホスホロアミダート、アルキルまたはアリールホスホン酸、およびホスホトリエステルを含むが、これらに限定されない。ホスホロジチオエートは、連結に関わらない酸素の両方が硫黄によって置換されている。リン酸リンカーは、連結に関わる酸素を窒素(架橋ホスホロアミダート)、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ン酸)で置換することによっても改変され得る。

20

【0084】

本明細書に記載されるヌクレオチドは、核酸塩基部分において改変され得る。RNAにおいて見られる核酸塩基の例は、アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルを含むが、これらに限定されない。例えば、本明細書に記載されるヌクレオシドおよびヌクレオチドは、主溝側において化学改変され得る。いくつかの実施形態において、主溝化学改変は、アミノ基、チオール基、アルキル基、またはハロゲン基を含む。

【0085】

ヌクレオチドアナログ/改変体は、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド-5'-三リン酸、2-アミノプリンリボシド-5'-三リン酸; 2-アミノアデノシン-5'-三リン酸、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン-三リン酸、2-チオシチジン-5'-三リン酸、2-チオウリジン-5'-三リン酸、2'-フルオロチミジン-5'-三リン酸、2'-O-メチルイノシン-5'-三リン酸、4-チオウリジン-5'-三リン酸、5-アミノアリルシチジン-5'-三リン酸、5-アミノアリルウリジン-5'-三リン酸、5-ブロモシチジン-5'-三リン酸、5-ブロモウリジン-5'-三リン酸、5-ブロモ-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸、5-ヨードシチジン-5'-三リン酸、5-ヨード-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸、5-ヨードウリジン-5'-三リン酸、5-ヨード-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸、5-メチルシチジン-5'-三リン酸、5-メチルウリジン-5'-三リン酸、5-プロピニル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸、5-プロピニル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸、6-アザシチジン-5'-三リン酸、6-アザウリジン-5'-三リン酸、6-クロロプリンリボシド-5'-三リン酸、7-デアザアデノシン-5'-三リン酸、7-デアザグアノシン-5'-三リン酸、8-アザアデノシン-5'-三リン酸、8-アジダアデノシン-5'-三リン酸、ベンゾイミダゾールリボシド-5'-三リン酸、N1-メチルアデノシン-5'-三リン酸、N1-メチルグアノシン-5'-三リン酸、N6-メチルアデノシン-5'-三リン酸、O6-メチルグアノシン-5'-三リン酸、シュドウリジン-5'-三リン酸、ピューロマイシン-5'-三リン酸、キサントシン-5'-三リン酸を含み得る。塩基改変ヌクレオチドは、5-メチルシチジン-5'

30

40

50

-三リン酸、7-デアザグアノシン-5'-三リン酸、5-ブロモシチジン-5'-三リン酸、およびシュードウリジン-5'-三リン酸、ピリジン-4-オン リボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、および4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、N6,N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオアデニン、および2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ワイオシン(wyosine)、ワイブトシン(wybutosine)、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチルグアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシグアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2,N2-ジメチルグアノシン、8-オキソグアノシン、7-メチル-8-オキソグアノシン、1-メチル-6-チオグアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシン、およびN2,N2-ジメチル-6-チオ-グアノシン、5'-O-(1-チオリン酸)-アデノシン、5'-O-(1-チオリン酸)-シチジン、5'-O-(1-チオリン酸)-グアノシン、5'-O-(1-チオリン酸)-ウリジン、5'-O-(1-チオリン酸)-シュードウリジン、6-アザ-シチジン、2-チオ-シチジン、アルファ-チオ-シチジン、シュード-イソ-シチジン、5-アミノアシル-ウリジン、5-ヨード-ウリジン、N1-メチル-シュードウリジン、5,6-ジヒドロウリジン、アルファ-チオ-ウリジン、4-チオウリジン、6-アザ-ウリジン、5-ヒドロキシ-ウリジン、デオキシ-チミジン、5-メチル-ウリジン、ピロロ-シチジン、イノシン、アルファ-チオ-グアノシン、6-メチル-グアノシン、5-メチル-シチジン、8-オキソ-グアノシン、7-デアザ-グアノシン、N1-メチル-アデノシン、2-アミノ-6-クロロ-プリン、N6-メチル-2-アミノ-プリン、シュード-イソ-シチジン、6-クロロ-プリン、N6-メチル-アデノシン、アルファ-チオ-アデノシン、8-アジド-アデノシン、

10

20

30

40

50

または 7-デアザ-アデノシンを含み得る。

【0086】

本明細書に記載される、少なくとも 1 つの改変ヌクレオチドおよび／または少なくとも 1 つのヌクレオチドアナログは、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、2'-O-メチルアデノシン、2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、N6-メチル-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン、イノシン、3-メチルシチジン、2-O-メチルシチジン、2-チオシチジン、N4-アセチルシチジン、リシジン (lysidine)、1-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2'-O-メチルグアノシン、ケオシン、エポキシケオシン、7-シアノ-7-デアザグアノシン、7-アミノメチル-7-デアザグアノシン、シュードウリジン、ジヒドロウリジン、5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチル-2-チオウリジン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン、5-ヒドロキシウリジン、5-メトキシウリジン、5-オキシ酢酸ウリジン、5-オキシ酢酸ウリジンメチルエステル、5-アミノメチル-2-チオウリジン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-(イソペンテニルアミノメチル)ウリジン、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオウリジン、または 5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-O-メチルウリジンを含み得る。

10

20

【0087】

いくつかの実施形態において、化学改変は、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、N1-エチルシュードウリジン、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、5-メチルシトシン、5-メチルウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-シュードウリジン、5-アザウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5-メトキシウリジン、2'-O-メチルウリジン、またはそれらの組み合わせを含む。

30

【0088】

いくつかの実施形態において、コード配列中のウラシルの 100% が化学改変を有し得る。いくつかの実施形態において、化学改変は、ウラシルの 5' 位にある。いくつかの実施形態において、RNA のコード配列 (cds) 中のウラシルの 100% が化学改変、例えばウラシルの 5' 位における化学改変を有し得る。いくつかの実施形態において、cds 中のウラシルヌクレオチドの少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または 90% が、化学改変、例えば前記ウラシルヌクレオチドの 5 位における化学改変を有する。このような改変により、(このような改変ヌクレオチドを含む RNA のインビボ投与後の) 自然免疫系の刺激が低下してもよい。

40

【0089】

本明細書において使用される「cds」または「コード配列」または「コード領域」という用語は、当業者によって認識および理解され、かつ、例えばペプチドまたはタンパク質に翻訳される可能性がある複数のヌクレオチドトリプレットの配列を指し得る。RNA の cds は少なくとも 1 つの改変ヌクレオチドを含んでもよく、前記少なくとも 1 つの改変ヌクレオチドは、シュードウリジン (ψ)、N1-メチルシュードウリジン (m1 ψ)、5-メチルシトシン、および 5-メトキシウリジンから選択されてもよい。

【0090】

50

本明細書において使用される場合、「改変ヌクレオチド」または「化学改変ヌクレオチド」という用語は、RNAの構成要素、すなわちリボヌクレオチドA、G、C、およびUの、全ての潜在的な天然および非天然の化学改変体を指し得る。

【0091】

いくつかの実施形態において、インビトロ転写反応におけるヌクレオチド混合物は、キャップアナログを含む。したがって、いくつかの実施形態において、キャップアナログは、cap0、cap1、cap2、改変cap0もしくは改変cap1アナログ、または以下に記載されるようなcap1アナログである。本明細書において使用される「キャップアナログ」または「5'キャップ構造」という用語は、RNAの5'構造、特に、例えばmRNAなどのRNAの5'末端に位置するグアニンヌクレオチドを指し得る。いくつかの実施形態において、5'キャップ構造は、5'-5'-三リン酸結合を介してRNAに連結される。いくつかの実施形態において、「5'キャップ構造」または「キャップアナログ」は、「改変ヌクレオチド」または「化学改変ヌクレオチド」とはみなされない。適切な5'キャップ構造は、cap0（1番目の核酸塩基のメチル化、例えばm7GpppN）、cap1（m7GpppNの隣接ヌクレオチドのリボースのさらなるメチル化）、cap2（m7GpppNの下流の2番目のヌクレオチドのリボースのさらなるメチル化）、cap3（m7GpppNの下流の3番目のヌクレオチドのリボースのさらなるメチル化）、cap4（m7GpppNの下流の4番目のヌクレオチドのリボースのさらなるメチル化）、ARCA（アンチリバースキャップアナログ）、modARCA（例えばホスホチオエート（phosphothioate）modARCA）、イノシン、N1-メチルグアノシン、2'-フルオログアノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソグアノシン、2-アミノグアノシン、LNA-グアノシン、および2-アジドグアノシンを含む。

【0092】

5'キャップ（cap0またはcap1）構造は、RNA化学合成においてキャップ化酵素を使用して形成されるか、またはRNAインビトロ転写（共転写キャップ化）においてキャップアナログを使用して形成され得る。本明細書において使用される「キャップアナログ」という用語は、RNAの5'末端に組み込まれた場合、RNAの翻訳または局在化を促進し、かつ／または分解を阻害するキャップ機能を有する、非重合性のジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを指し得る。非重合性とは、そのキャップアナログが5'三リン酸を有さずしたがって鋳型依存性ポリメラーゼ（例えばDNA依存性RNAポリメラーゼ）によって3'方向に伸長し得ないため、キャップアナログが5'末端のみに組み込まれるであろうことを意味する。キャップアナログの例は、m7GpppG、m7GpppA、m7GpppC；非メチル化キャップアナログ（例えばGpppG）；ジメチル化キャップアナログ（例えばm2,7GpppG）、トリメチル化キャップアナログ（例えば、m2,2,7GpppG）、ジメチル化対称キャップアナログ（例えば、m7Gpppm7G）、またはアンチリバースキャップアナログ（例えばARCA；m7,2'OmeGpppG、m7,2'dGpppG、m7,3'OmeGpppG、m7,3'dGpppGおよびそれらの四リン酸誘導体）を含む。さらなるキャップアナログは、以前より、例えばWO2008/016473、WO2008/157688、WO2009/149253、WO2011/015347、およびWO2013/059475に記載されている。その文脈におけるさらなる適切なキャップアナログは、例えばWO2017/066793、WO2017/066781、WO2017/066791、WO2017/066789、WO2017/053297、WO2017/066782、WO2018/075827およびWO2017/066797に記載されており、これらのキャップアナログに関する開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

いくつかの実施形態において、cap1構造は、WO2017/053297、WO2017/066793、WO2017/066781、WO2017/066791、WO2017/066789、WO2017/066782、WO2018/075827

およびWO2017/066797において開示されるようなトリヌクレオチドキャップアナログを使用して生成される。例えば、WO2017/053297の請求項1～5に開示される構造から誘導できる任意のキャップアナログが、cap1構造を共転写的に生成するために適切に使用されてもよい。いくつかの実施形態において、WO2018/075827に記載される構造から誘導できる任意のキャップアナログが、cap1構造を共転写的に生成するために適切に使用され得る。いくつかの実施形態において、cap1アナログは、cap1トリヌクレオチドキャップアナログである。いくつかの実施形態において、インビトロ転写RNAのcap1構造は、トリヌクレオチドキャップアナログであるm7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pGまたはm7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pGを使用する共転写キャップ化を使用して形成される。いくつかの実施形態において、cap1アナログは、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pGである。

10

【0094】

いくつかの実施形態において、RNA（例えばmRNA）は、5'キャップ構造、例えばcap1構造を含む。いくつかの実施形態において、5'キャップ構造は、mRNAの安定性および／または発現を改善し得る。mRNA（例えばインビトロ転写によって生産されたもの）を含むcap1構造は、翻訳効率の上昇および自然免疫系の刺激の低下を含む、複数の有利な特徴を有する。いくつかの実施形態において、インビトロ転写RNAは、少なくとも1つのペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも1つのコード配列を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質はRNA誘導型エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼはCas9またはその誘導体である。

20

【0095】

本開示は、S.ピオゲネスCas9エンドヌクレアーゼをコードする最適化されたmRNA（「SpCas9 mRNA」）を提供し、これは場合により化学改変ヌクレオチドを含み、1つ以上のgRNAと共に投与された場合、標的細胞集団の効果的なゲノム編集を提供する。いくつかの実施形態において、本開示は、(i) 5'非翻訳領域(UTR)；(ii) 部位特異的エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレーム(ORF)；および(iii) 3'非翻訳領域(UTR)を含むmRNAを提供する。いくつかの実施形態において、部位特異的エンドヌクレアーゼはCasヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼはCas9ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、Cas9ポリペプチドはストレプトコッカス・ピオゲネス由来Cas9(SpCas9)ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、ORFは、本明細書に記載されているものなどの核局在化シグナルをコードする1つ以上のヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、ORFは、SpCas9ポリペプチドなどの部位特異的エンドヌクレアーゼ、ならびにヌクレオプラスミンおよび／またはSV40 NLSである少なくとも1つのNLSをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ORFは、SpCas9ポリペプチドなどの部位特異的エンドヌクレアーゼに動作可能に連結された、N末端および／またはC末端NLSをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ORFは、SpCas9ポリペプチドなどの部位特異的エンドヌクレアーゼに動作可能に連結されたN末端SV40 NLS、およびSpCas9ポリペプチドなどの部位特異的エンドヌクレアーゼに動作可能に連結されたC末端ヌクレオプラスミンNLSをコードするヌクレオチド配列を含む。

30

40

【0096】

いくつかの実施形態において、mRNAは少なくとも1つの化学改変ヌクレオシドおよび／またはヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、化学改変ヌクレオシドは、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、および5-メトキシウリジンから選択される。いくつかの実施形態において、化学改変ヌクレオシドは、N1-メチルシュードウリジン（例えば1-メチルシュードウリジン）である。いくつかの実施形態に

50

において、mRNA中のウリジンの少なくとも約80%以上（例えば、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）が、N1-メチルシュードウリジンで改変または置換される。いくつかの実施形態において、mRNA中のウリジン（例えばウラシル）の100%が、N1-メチルシュードウリジンで改変または置換される。いくつかの実施形態において、mRNA中のウリジンまたはウラシル残基の2つ以上（例えば2、3、4、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、200、300、400、500、600、700、800、またはそれ以上）が、N1-メチルシュードウリジンである。

10

20

30

40

50

【0097】

ガイドRNA (gRNA)

いくつかの実施形態において、LPA遺伝子を遺伝子編集するために使用されるCRISPR/Casを介した遺伝子編集システムは、RNA誘導型エンドヌクレアーゼの活性をLPA遺伝子内の特定の標的配列に指向させ得る、ゲノム標的化核酸（例えばガイドRNA）を含む。ガイドRNAは、少なくとも、目的の標的核酸配列にハイブリダイズするスペーサー配列、およびCRISPR反復配列を含む。gRNAは、1分子ガイドRNAまたは2分子ガイドRNAであり得る。RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、例えば、Cas9エンドヌクレアーゼを含むCasエンドヌクレアーゼであり得る。Cas9エンドヌクレアーゼは、例えば、SpyCas9、SaCas9、またはSluCas9エンドヌクレアーゼであり得る。いくつかの実施形態において、RNAエンドヌクレアーゼ（RNA-endonuclease）はCas9バリエーションである。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは小さいRNA誘導型エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは小さいCasエンドヌクレアーゼである。

【0098】

いくつかの実施形態において、gRNAは、5'から3'の順に、crRNAおよびtracrRNAを含み、ここでcrRNAおよびtracrRNAはハイブリダイズして二重鎖を形成する。いくつかの実施形態において、crRNAは、標的核酸（例えばゲノムDNA分子）中の標的配列を標的化できるスペーサー配列、およびcrRNA反復配列を含む。いくつかの実施形態において、tracrRNAは、tracrRNAアンチ反復配列および3' tracrRNA配列を含む。いくつかの実施形態において、crRNA反復配列の3'末端は、例えばテトラループ（tetraloop）によってtracrRNAのアンチ反復配列の5'末端に連結され、ここでcrRNA反復配列およびtracrRNAアンチ反復配列はハイブリダイズしてsgRNAを形成する。いくつかの実施形態において、sgRNAは、5'から3'の順に、スペーサー配列、crRNA反復配列、テトラループ、tracrRNAアンチ反復配列、および3' tracrRNA配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは5'スペーサー伸長配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは3' tracrRNA伸長配列を含む。3' tracrRNAは、1つ以上のステムループ、例えば、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のステムループを含むか、またはこれらからなり得る。

【0099】

いくつかの実施形態において、sgRNAの不変配列は、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号1）のヌクレオチド配列、または配列番号1と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10

ヌクレオチドまでの欠失、挿入、または置換を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、SpCas9またはSpyCas9エンドヌクレアーゼと共に使用するためのものである。

【0100】

本明細書で開示されるガイドRNAは、crRNAのスペーサー配列を介して、任意の目的配列を標的とし得る。gRNAのスペーサー配列は、目的の標的遺伝子（例えばLPA遺伝子）の標的配列（例えばゲノム標的配列などのDNA標的配列）を定める配列（例えば20ヌクレオチドの配列）である。いくつかの実施形態において、スペーサー配列は、15から30ヌクレオチドの範囲である。例えば、スペーサー配列は、ちょうど、約、少なくとも、または最大、長さ10、15、16、17、18、19、29、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50ヌクレオチド、またはこれらの値のうち任意の値の間の数もしくは範囲のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、スペーサー配列は20ヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態において、gRNAは、標的dsDNAのフォワード鎖にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、gRNAは標的dsDNAのリバーズ鎖にハイブリダイズすることができる。

10

【0101】

「標的配列」は、PAM配列に隣接している標的遺伝子中の配列であり、かつRNA誘導型ヌクレアーゼ（例えばCas9）によって改変される配列である。「標的配列」は「標的核酸」のいわゆるPAM鎖上にあり、これはPAM鎖および相補的非PAM鎖を含有する二重鎖分子である。当業者は、gRNAスペーサー配列が目的の標的核酸配列の非PAM鎖に位置する相補的配列にハイブリダイズすることを認識している。したがって、gRNAスペーサー配列は、標的配列と等価なRNAである。gRNAのスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち塩基対合）を介して配列特異的に目的の標的核酸と相互作用する。したがって、スペーサーのヌクレオチド配列は、目的の標的核酸の標的配列によって異なる。いくつかの実施形態において、LPA遺伝子の標的配列はLPA遺伝子のエクソン3内にある。

20

【0102】

本明細書で使用されるCRISPR/Casシステムにおいて、スペーサー配列は、システムで使用されるCas9酵素によって認識され得るPAMの5'に位置する標的核酸の領域とハイブリダイズするよう設計される。スペーサーは、標的配列と完全に一致するか、またはミスマッチを有し得る。各Cas9酵素は、標的DNAにおいて認識する特定のPAM配列を有する。例えば、S.ピオゲネスは、標的核酸において5'-NRG-3'配列を含むPAMを認識し、ここでRはAまたはGのいずれかを含み、Nは任意のヌクレオチドであり、かつNはスペーサー配列によって標的とされる標的核酸配列のすぐ3'側である。

30

【0103】

いくつかの実施形態において、標的核酸配列は、20ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態において、標的核酸は、20ヌクレオチド未満の長さを有する。いくつかの実施形態において、標的核酸は、20ヌクレオチド超の長さを有する。いくつかの実施形態において、標的核酸は、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30ヌクレオチドまたはそれ以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、標的核酸は、最大で5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30ヌクレオチドまたはそれ以上の長さを有する。いくつかの実施形態において、標的核酸配列は、PAMの第1のヌクレオチドのすぐ5'側に20塩基を有する。例えば、5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3'（配列番号2）を含む配列において、標的核酸はNに対応する配列であり得、ここでNは任意のヌクレオチドであり得、かつ下線を付したNRG配列（RはGまたはA）は、S.ピオゲネスのPAMである。いくつかの実施形態において、本開示の組成物および方法においてSpCas9によって認識される配列として使用されるPAM配列

40

50

は N G G であり、ここで N は A、T、C、または G であり得る。

【0104】

スパーサー配列と標的核酸との間のパーセント相補性は、約、少なくとも、少なくとも約、最大、または最大約、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%であり得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAのスパーサー配列と標的遺伝子中の標的核酸は、100%相補的である。いくつかの実施形態において、スパーサー配列と標的配列との間のパーセント相補性は、標的核酸の相補鎖の標的配列の6つの連続する5'末端ヌクレオチド(5'-most nucleotide)にわたって、100%である。いくつかの実施形態において、スパーサー配列と標的核酸との間のパーセント相補性は、連続する約20ヌクレオチドにわたって少なくとも60%である。他の実施形態において、ガイドRNAのスパーサー配列と標的遺伝子中の標的配列は、10個までのミスマッチ、例えば9個まで、8個まで、7個まで、6個まで、5個まで、4個まで、3個まで、2個まで、または1個までのミスマッチを含有し得る。

10

【0105】

LPA gRNAは、LPA遺伝子のエクソン3内の標的配列を標的とし得る。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは、表1に列挙される、配列番号3~10に表す標的配列のいずれか1つに対応するスパーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは、表1に列挙される、配列番号18~25から選択されるスパーサー配列を含む。

20

【表1】

表1：例示的な標的／スパーサー配列			
ガイド	標的／スパーサー配列	PAM	配列番号
T4	GATTAATGACATACGCATTT (標的) GAUUAAGACAUACGCAUUU (スパーサー)	GGG	3 (標的) 18 (スパーサー)
T1 (T5513)	TGGACCACATGGCTTTGCTC (標的) UGGACCACAUGGCUUUGCUC (スパーサー)	AGG	4 (標的) 19 (スパーサー)
T2 (T13789)	TGAGCAAAGCCATGTGGTCC (標的) UGAGCAAAGCCAUGTGGUCC (スパーサー)	AGG	5 (標的) 20 (スパーサー)
T10762	GTGGTCCTATTATGTTGATG (標的) GUGGUCCUAUUAUGUUGAUG (スパーサー)	TGG	6 (標的) 21 (スパーサー)
T3893	CATAGATGACCAAGCTTGGC (標的) CAUAGAUGACCAAGCUUGGC (スパーサー)	AGG	7 (標的) 22 (スパーサー)
T3894	CATAGATGACCAAGCTTGGC (標的) CAUAGAUGACCAAGCUUGGC (スパーサー)	AGG	8 (標的) 23 (スパーサー)
T14467	AGCACCTGAGCAAAGCCATG (標的) AGCACCUGAGCAAAGCCAUG (スパーサー)	TGG	9 (標的) 24 (スパーサー)
T5 (T1530)	AGATTAATGACATACGCATT (標的) AGAUUAAGACAUACGCAUU (スパーサー)	TGG	10 (標的) 25 (スパーサー)

30

40

【0106】

いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号3~10に表す標的配列またはそれらのバリエーションのいずれか1つに対応するスパーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号3~10に表す標的配列のいずれか1つに対応するスパーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号3~10に表す標的配列のいずれか1つに対応するRNA配列に対して、1つ、2つ、または3つのミスマッチを有するスパーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18~25に表すスパーサー配列またはそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18~25から選択されるスパーサー配列を含む。いく

50

つかの実施形態において、gRNAは、配列番号18～25から選択される配列に対して1つ、2つ、または3つのミスマッチを有するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAはsgRNAである。

【0107】

いくつかの実施形態において、LPA遺伝子の標的配列に対して相補的なスペーサーを含む2つのgRNAが細胞に提供される。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号3～10に表す標的配列またはそれらのバリエーションのいずれか1つに対応するスペーサーを含む任意の2つのgRNAである。いくつかの実施形態において、2つのgRNAのうち一方または両方は、配列番号3～10に表す標的配列のいずれか1つに対応するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、2つのgRNAのうち一方または両方は、配列番号3～10に表す標的配列のいずれか1つに対応するRNA配列に対して1つ、2つ、または3つのミスマッチを有するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、2つのgRNAのうち一方または両方は、配列番号18～25に表すスペーサー配列またはそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態において、2つのgRNAのうち一方または両方は、配列番号18～25から選択されるスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、2つのgRNAのうち一方または両方は、配列番号18～25から選択される配列に対して1つ、2つ、または3つのミスマッチを有するスペーサー配列を含む。

10

【0108】

いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18の配列または配列番号18に対して少なくとも85%（例えば少なくとも90%、または少なくとも95%）の相同性を有する配列を有するスペーサーを含む第1のgRNA、および配列番号19～25のいずれか1つの配列または配列番号19～25のいずれか1つに対して少なくとも85%（例えば少なくとも90%または少なくとも95%）の相同性を有する配列を有するスペーサーを含む第2のgRNAを含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18の配列を有するスペーサーを含む第1のgRNA、および配列番号19～25のいずれか1つの配列を有するスペーサーを含む第2のgRNAを含む。

20

【0109】

いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18に表すスペーサー配列、または配列番号18に対して約、少なくとも、または少なくとも約、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%の相同性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18と比較して3つ以下のミスマッチ（例えば1つまたは2つのミスマッチ）を有するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは配列番号18のスペーサー配列を含む。

30

【0110】

いくつかの実施形態において、LPA gRNAは、下記の表2に列挙される、配列番号12～17に表す標的配列のいずれか1つに対応するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは、表2に列挙される、配列番号26～31から選択されるスペーサー配列を含む。

40

【表 2】

表 2：例示的なガイドRNA標的／スパーサー配列			
遺伝子の領域	ガイド	ガイドRNA標的／スパーサー配列	配列番号
クリングルIV エクソン4	T146	GGATCCCTCGTATAACAATA (標的) GGAUCCCUCCGUAAACAAUA (スパーサー)	12(標的) 26(スパーサー)
クリングルIV エクソン18	T146	GGATCCCTCGTATAACAATA (標的) GGAUCCCUCCGUAAACAAUA (スパーサー)	12(標的) 26(スパーサー)
調節性	T4110	TGGACTACATAGTTGTGTGA (標的) UGGACUACAUAGUUGUGUGA (スパーサー)	13(標的) 27(スパーサー)
調節性	T7918	TTCAATCCTCTTGTCACCTG (標的) UUCAAUCCUCUUGUCACCUG (スパーサー)	14(標的) 28(スパーサー)
調節性	T14868	CTGCCAGACTCTCTGAACCC (標的) CUGCCAGACUCUCUGAACCC (スパーサー)	15 (標的) 29 (スパーサー)
調節性	T524	AAAACCTACCGCAAGTTGCC (標的) AAAACCUACCGCAAGUUGCC (スパーサー)	16 (標的) 30 (スパーサー)
調節性	T221	GACATCTCTATGTCGGCCAC (標的) GACAUCUCUAUGUCGGCCAC (スパーサー)	17 (標的) 31 (スパーサー)

10

【0111】

20

いくつかの実施形態において、gRNAは、化学改変gRNAである。安定性を増強するため、自然免疫応答の可能性もしくは程度を低下させるため、および／または当技術分野で知られるその他の性質を増強するために、様々なタイプのRNA改変がgRNAに導入され得る。本明細書に記載されるgRNAはヌクレオシド間の連結、プリンまたはピリミジン塩基、または糖を含む、1つ以上の改変を含み得る。いくつかの実施形態において、改変は、化学合成またはポリメラーゼ酵素でgRNAの末端に導入される。改変核酸の例およびその合成については、WO 2013 / 052523において開示されている。改変ポリヌクレオチドの合成については、Verma and Eckstein, Annual Review of Biochemistry, vol. 76, 99-134 (1998)にも記載されている。

【0112】

30

化学改変gRNAは、gRNAの3'末端および／または5'末端に、1つ以上のホスホロチオエート化2'-O-メチルヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、化学改変gRNAは、gRNAの3'末端にホスホロチオエート化2'-O-メチルヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、化学改変gRNAは、gRNAの5'末端にホスホロチオエート化2'-O-メチルヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、化学改変gRNAは、gRNAの3'末端に3つまたは4つ、および／または5'末端に3つまたは4つの、ホスホロチオエート化2'-O-メチルヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、配列番号18～25および26～31のいずれか1つは、gRNAの3'末端に1つ、2つ、3つ、または4つのホスホロチオエート化2'-O-メチルヌクレオチドを；gRNAの5'末端に1つ、2つ、または3つのホスホロチオエート化2'-O-メチルヌクレオチドを、あるいはそれらの組み合わせを有するよう、化学的に改変され得る。ホスホロチオエート結合の数および位置は様々であり得る。いくつかの実施形態において、ホスホロチオエート結合は、gRNAの5'末端から1番目と2番目との間、2番目と3番目との間、3番目と4番目との間の位置、4番目と5番目との間、5番目と6番目との間、6番目と7番目との間、7番目と8番目との間、8番目と9番目との間、9番目もしくは10番目、またはそれ以降の位置にあり得る。いくつかの実施形態において、ホスホロチオエート結合は、gRNAの3'末端から1番目と2番目との間、2番目と3番目との間、3番目と4番目との間の位置、4番目と5番目との間、5番目と6番目との間、6番目と7番目との間、7番目と8番目との間、8番目と9番目との間、9番目もしくは10番目、またはそれ以降の位置にあり得る。いくつかの実施形態に

40

50

において、化学改変 gRNA は、本明細書に記載される gRNA のいずれか 1 つ（例えば配列番号 32）の配列を有し、かつ本明細書に記載される 1 つ以上の化学改変ヌクレオチドおよび／または 1 つ以上のホスホロチオエート結合を有する。例として、化学改変 gRNA は、配列番号 11 である。

【0113】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログ／改変体は、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド-5'-三リン酸、2-アミノプリンリボシド-5'-三リン酸、2-アミノアデノシン-5'-三リン酸、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン-三リン酸、2-チオシチジン-5'-三リン酸、2-チオウリジン-5'-三リン酸、2'-フルオロチミジン-5'-三リン酸、2'-O-メチルイノシン-5'-三リン酸、4-チオウリジン-5'-三リン酸、5-アミノアシルシチジン-5'-三リン酸、5-アミノアシルウリジン-5'-三リン酸、5-プロモシチジン-5'-三リン酸、5-プロモウリジン-5'-三リン酸、5-プロモ-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸、5-プロモ-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸、5-ヨードシチジン-5'-三リン酸、5-ヨード-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸、5-ヨードウリジン-5'-三リン酸、5-ヨード-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸、5-メチルシチジン-5'-三リン酸、5-メチルウリジン-5'-三リン酸、5-プロピニル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸、5-プロピニル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸、6-アザシチジン-5'-三リン酸、6-アザウリジン-5'-三リン酸、6-クロロプリンリボシド-5'-三リン酸、7-デアザアデノシン-5'-三リン酸、7-デアザグアノシン-5'-三リン酸、8-アザアデノシン-5'-三リン酸、8-アジドアデノシン-5'-三リン酸、ベンズイミダゾールリボシド-5'-三リン酸、N1-メチルアデノシン-5'-三リン酸、N1-メチルグアノシン-5'-三リン酸、N6-メチルアデノシン-5'-三リン酸、O6-メチルグアノシン-5'-三リン酸、シュードウリジン-5'-三リン酸、ピューロマイシン-5'-三リン酸、またはキサントシン-5'-三リン酸を含み得る。塩基改変ヌクレオチドは、5-メチルシチジン-5'-三リン酸、7-デアザグアノシン-5'-三リン酸、5-プロモシチジン-5'-三リン酸、およびシュードウリジン-5'-三リン酸、ピリジン-4-オン リボヌクレオシド、5-アザウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチルウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニルウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオウリジン、4-メトキシシュードウリジン、4-メトキシ-2-チオシュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ

-2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、N6, N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ウィオシン、ウィプトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチルグアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシグアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2, N2-ジメチルグアノシン、8-オキソグアノシン、7-メチル-8-オキソグアノシン、1-メチル-6-チオグアノシン、N2-メチル-6-チオグアノシン、およびN2, N2-ジメチル-6-チオグアノシン、5'-O-(1-チオホスフェート)-アデノシン、5'-O-(1-チオホスフェート)-シチジン、5'-O-(1-チオリン酸)-グアノシン、5'-O-(1-チオリン酸)-ウリジン、5'-O-(1-チオリン酸)-シュードウリジン、6-アザ-シチジン、2-チオ-シチジン、 α -チオ-シチジン、シュード-イソ-シチジン、5-アミノアリル-ウリジン、5-ヨード-ウリジン、N1-メチル-シュードウリジン、5, 6-ジヒドロウリジン、 α -チオ-ウリジン、4-チオ-ウリジン、6-アザ-ウリジン、5-ヒドロキシ-ウリジン、デオキシ-チミジン、5-メチル-ウリジン、ピロロ-シチジン、イノシン、 α -チオ-グアノシン、6-メチル-グアノシン、5-メチル-シチジン、8-オキソ-グアノシン、7-デアザ-グアノシン、N1-メチル-アデノシン、2-アミノ-6-クロロ-プリン、N6-メチル-2-アミノ-プリン、シュード-イソ-シチジン、6-クロロ-プリン、N6-メチル-アデノシン、 α -チオ-アデノシン、8-アジド-アデノシン、または7-デアザ-アデノシンを含み得る。

10

20

【0114】

少なくとも1つの改変ヌクレオチドおよび／または少なくとも1つのヌクレオチドアナログは、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、2'-O-メチルアデノシン、2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、N6-メチル-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン、イノシン、3-メチルシチジン、2-O-メチルシチジン、2-チオシチジン、N4-アセチルシチジン、リシジン、1-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2'-O-メチルグアノシン、ケオシン、エポキシケオシン、7-シアノ-7-デアザグアノシン、7-アミノメチル-7-デアザグアノシン、シュードウリジン、ジヒドロウリジン、5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチル-2-チオウリジン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン、5-ヒドロキシウリジン、5-メトキシウリジン、ウリジン5-オキシ酢酸、ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル、5-アミノメチル-2-チオウリジン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-(イソペンテニルアミノメチル)ウリジン、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオウリジン、または5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-O-メチルウリジンを含み得る。

30

40

【0115】

いくつかの実施形態において、化学改変は、シュードウリジン、N1-メチル-シュー

50

ドウリジン、N1-エチル-シュードウリジン、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、5-メチルシトシン、5-メチルウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザーシュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-5-アザーウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-シュードウリジン、5-アザーウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5-メトキシウリジン、または2'-O-メチルウリジンを含む。いくつかの実施形態において、改変は、2'-O-メチルウリジン(2'-OMe-rU)、2-O-メチルシチジン(2'-OMe-rC)、2'-O-メチルアデノシン(2'-OMe-rA)、または2'-O-メチルグアノシン(2'-OMe-rG)を含む。

【0116】

gRNAは改変ヌクレオチドを任意の数含み得る。例えば、gRNAにおける改変されたヌクレオチドの割合は、ちょうど、少なくとも、約、または少なくとも約、1%、2%、3%、4%、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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、または75%であり得る。

【0117】

例として、配列番号3は「g*a*u* UAA UGA CAU ACG CAU UU」として改変され得(TがUに変換される)、ここでu=2'-OMe-rU; a=2'-OMe-rA; g=2'-OMe-rG;*=チオール化リン酸である。いくつかの実施形態において、LPA gRNAは化学改変された配列番号18、例えば「g*a*u* UAA UGA CAU ACG CAU UU」を含み、ここでu=2'-OMe-rU; a=2'-OMe-rA; g=2'-OMe-rG;*=チオール化リン酸である。

【0118】

いくつかの実施形態において、gRNAは、GAUUAAUGACAUAACGCAUUUGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUU(配列番号32)を含むか、またはこの配列からなる。gRNA(例えば配列番号32)のヌクレオチドの1つ以上が改変ヌクレオチドであり得、例えばgRNA(例えば配列番号32)の1つ以上のUが2'-OMe-rUであり得、gRNA(例えば配列番号32)の1つ以上のAが2'-OMe-rAであり得、gRNA(例えば配列番号32)の1つ以上のCが2'-OMe-rCであり得、かつgRNA(例えば配列番号32)の1つ以上のGが2'-OMe-rGであり得る。gRNA(例えば配列番号32)の1つ以上の位置が改変され得る;例えば、チオール化リン酸など。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号11の配列:5'-g*a*u* UAA UGA CAU ACG CAU UUG UUU UAG Agc uag aaa uag cAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC CGU UAU Caa cuu gaa aag u g g c a c c g a g u c g g u g c u*u*u*u-3'を含むか、またはこの配列からなり、ここでu=2'-OMe-rU; a=2'-OMe-rA; c=2'-OMe-rC; g=2'-OMe-rG;*=チオール化リン酸である。下線を付した配列はスパーサーに対応する。

【0119】

いくつかの実施形態において、1つより多いガイドRNAをCRISPR/Casヌクレアーゼシステムと共に使用し得る。CRISPR/Casシステムが1つより多い標的

核酸を切断するように、各ガイドRNAは異なる標的化配列を含有し得る。いくつかの実施形態において、1つ以上のガイドRNAは、活性またはCas9 RNP複合体内における安定性などに関して、同じかまたは異なる特性を有し得る。1つより多いガイドRNAが使用される場合、各ガイドRNAは、同一または異なるベクター上でコードされ得る。

【0120】

本明細書に記載されるgRNAは、インビトロ転写（IVT）、合成および／または化学合成法、あるいはこれらの組み合わせによって生産され得る。酵素法（IVT）、固相、液相、組み合わせ合成法、小領域合成（small region synthesis）、およびライゲーション法が利用される。ある実施形態において、gRNAはIVT酵素合成法を使用して作成される。IVTによってポリヌクレオチドを作成する方法は当技術分野で知られており、かつWO2013/151666に記載されている。本明細書に記載されるgRNAをインビトロ転写するために、ポリヌクレオチドコンストラクトおよびベクターが使用され得る。

10

【0121】

LPAを編集する方法

本明細書で提供されるものは、細胞のゲノムにおいてLPA遺伝子を機能的にノックアウトするかまたは発現を低下させることによってLPAを編集するためにゲノム編集を使用する方法を含む。この方法は、リポタンパク質に関連する疾患または障害を有する対象、例えば心血管疾患を有する患者を処置するために使用され得る。いくつかの実施形態において、方法は、対象（例えば霊長類の対象）に、（a）LPAを標的とするガイドRNA（gRNA）またはgRNAをコードする核酸および（b）RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸と複合体化した複数のナノ粒子を投与し、それによって霊長類の対象の心血管疾患を処置することを含む。

20

【0122】

対象は、処置のために、複数のナノ粒子を2回以上、例えば2回、投与され得る。対象へのナノ粒子の2回の投与は、適切な期間、例えば1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、3か月、4か月、5か月、6か月、1年、18か月、2年、3年、5年、10年、15年、またはそれ以上、離れていてもよい。いくつかの実施形態において、2回以上の投与のうちの2回は、約2週間から約2か月、例えば約3週間離れている。いくつかの実施形態において、2回以上の投与の各々は、お互いに約2週間から約2か月、例えば約3週間離れている。2回の投与間の適切な期間は、別の2回の投与間の適切な期間と同じであり得、または異なり得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、所定の時間、例えば1年、2年、3年、5年、6年、8年、10年、15年、20年、またはそれ以上の間に1回、対象に複数のナノ粒子の単回用量を投与することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、対象の生涯の間に1回、対象に複数のナノ粒子の単回用量を投与することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、対象に複数のナノ粒子の単回用量を投与することを含む。いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、投与1回あたり約0.01–5mg/kg、例えば0.05–2mg/kg、0.5–3mg/kg、または0.1–1mg/kgのgRNAの用量で対象に投与される。いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、投与1回あたり総核酸（すなわちLPA gRNAおよびRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードするRNA（例えばCas9 mRNA）の総量）約0.01–5mg/kg、例えば0.05–2mg/kg、0.5–3mg/kg、または0.1–1mg/kgの用量で対象に投与される。

30

40

【0123】

いくつかの実施形態において、gRNAはLPA遺伝子のコード配列内またはその近くを標的とする。いくつかの実施形態において、gRNAはLPA遺伝子のエクソンのいずれか1つを標的とする。いくつかの実施形態において、gRNAはLPA遺伝子のエクソン3内の配列を標的とする。gRNAは、LPA遺伝子のエクソン3内の標的配列に対し

50

て相補的なスペーサー配列を含み得る。いくつかの実施形態において、スペーサーは、LPA遺伝子のエクソン3内またはその近く（例えばエクソン3から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100塩基またはそれ以上の範囲内）の配列に対して相補的である。gRNAのスペーサーとLPA遺伝子内の標的配列との間の相補性は、完全または不完全であり得る。いくつかの実施形態において、相補性は、少なくとも70%、80%、90%、100%、またはそれらの値のうち任意の2つの間の数値もしくは範囲であり得る。いくつかの実施形態において、相補性は完全、すなわち100%である。

【0124】

いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18~25のいずれか1つ、あるいは配列番号18~25のいずれか1つに対して少なくとも、または少なくとも約、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有する配列からのスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18~25のいずれか1つ、または配列番号18~25のいずれか1つと比較して1つ、2つ、もしくは3つのミスマッチを有する配列からのスペーサー配列を含む。

【0125】

いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号11の配列、あるいは配列番号11に対して約、少なくとも、または少なくとも約、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列相同性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは配列番号11の配列を含む。

【0126】

本明細書において使用されるgRNAは、潜在的なオフターゲット効果（すなわち、LPA遺伝子以外の望ましくない位置のゲノムDNAの切断）を顕著に低下させつつ、オンターゲット効果を増強し得る。いくつかの実施形態において、オフターゲット結合は、約、少なくとも、または少なくとも約、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%低下する。

【0127】

RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載されるかまたは当技術分野で知られているCasエンドヌクレアーゼであり得る。Casエンドヌクレアーゼは天然または非天然（例えば組み換え型、または変異を有するもの）であり得る。いくつかの実施形態において、Casエンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼまたはそのバリエーションである。いくつかの実施形態において、DNAエンドヌクレアーゼは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9（Csn1およびCsn2としても知られる）、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Cse1、Cse2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csl17、Csl14、Csl10、Csl16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csfl、Csf2、Csf3、Csf4、またはCpf1エンドヌクレアーゼあるいはそれらの機能的誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、DNAエンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼまたはそのバリエーションである。いくつかの実施形態において、Cas9エンドヌクレアーゼはストレプトコッカス・ピオゲネス由来である（SpyCas9）。いくつかの実施形態において、Cas9エンドヌクレアーゼはスタフィロコッカス・ルグドゥネンシス由来である（SluCas9）。

【0128】

いくつかの実施形態において、LPA遺伝子の遺伝子改変は、結果として、対象（例えば哺乳動物、NHP、ヒト対象）における顕著に低下した血中または血漿Lp(a)レベルをもたらす。いくつかの実施形態において、血漿Lp(a)レベルは、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%

10

20

30

40

50

、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこれらの値のうち任意の2つの間の数値もしくは範囲、低下する。いくつかの実施形態において、血漿Lp(a)レベルの低下は、約、少なくとも、または少なくとも約、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、100%、またはこれらの値のうち任意の2つの間の数値もしくは範囲である。

10

【0129】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された対象（例えば哺乳動物、NHP、ヒト対象）における血漿Lp(a)レベルは、対応する改変されていない哺乳動物と比較して、約20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこれらの値のうち任意の2つの間の数値もしくは範囲、これらの値未満、あるいは約これらの値未満である。

20

【0130】

いくつかの実施形態において、低下は、複数のナノ粒子を投与される前の対象（例えば哺乳動物、NHP、ヒト対象）の血漿におけるLPA発現またはLPAタンパク質濃度に対する低下である。いくつかの実施形態において、低下は、1以上の未処置の対象におけるLPA発現またはLPAタンパク質濃度に対する低下である。いくつかの実施形態において、低下は、健常かつ／または改変されていない対象のLPA発現またはLPAタンパク質濃度の参照レベルに対する低下である。

30

【0131】

いくつかの実施形態において、方法を実施した後の血漿Lp(a)レベルは、約50mg/dL以下（例えば、約、最大、または最大約、40mg/dL、30mg/dL、20mg/dL、またはそれ以下）まで低下する。いくつかの実施形態において、方法を実施した後の血漿Lp(a)レベルは、約40mg/dL以下まで低下する。いくつかの実施形態において、方法を実施した後の血漿Lp(a)レベルは、約30mg/dL以下まで低下する。いくつかの実施形態において、方法を実施した後の血漿Lp(a)レベルは、約20mg/dL以下まで低下する。

【0132】

医薬組成物および治療適用

本明細書において提供されるものは、本明細書で開示される方法を実施するための医薬組成物も含む。組成物は、本明細書に記載される1つ以上のgRNA、RNA誘導型エンドヌクレアーゼまたはRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書で開示される方法の所望の遺伝子改変に影響を及ぼすために挿入するポリヌクレオチド（例えばドナーテンプレート）をさらに含み得る。

40

【0133】

いくつかの実施形態において、1つ以上のgRNAは、それぞれが、LPA遺伝子のエクソン3内またはその近く（例えば、エクソン3から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70

50

、75、80、85、90、95、100塩基またはそれ以上の範囲内)のゲノム配列に対して相補的なスパーサーを含む。gRNAは、LPA遺伝子のエクソン3内の標的配列に対して相補的なスパーサー配列を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書の方法に使用されるgRNAは、配列番号18~25のいずれか1つのスパーサー配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号18のスパーサー配列、または配列番号18の配列に対して少なくとも85%の相同性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号11の配列、または配列番号11の配列に対して少なくとも85%の相同性を有する配列を含む。

【0134】

いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Csn1およびCsx12としても知られる)、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf2、Csf3、Csf4、およびCpf1エンドヌクレアーゼ、またはそれらの機能的誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、DNAエンドヌクレアーゼはCas9である。いくつかの実施形態において、Cas9エンドヌクレアーゼはストレプトコッカス・ピオゲネス由来である (SpyCas9)。いくつかの実施形態において、Cas9エンドヌクレアーゼはスタフィロコッカス・ルグドゥネンシス由来である (SluCas9)。いくつかの実施形態において、DNAエンドヌクレアーゼをコードする核酸へと転写されるDNA配列は、コドン最適化されている。いくつかの実施形態において、DNAエンドヌクレアーゼをコードする核酸は、5'キャップ構造および3'ポリ(A)テールを含む。いくつかの実施形態において、DNAエンドヌクレアーゼをコードする核酸は、共有結合を介してgRNAに連結されている。

【0135】

いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸配列および／またはポリペプチドは、インビトロまたはインビボのいずれかで、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ナノ粒子、リポソーム、脂質ナノ粒子、ボックスウイルス、ネイキッドDNA投与、プラスミド、コスミド、ファージ、カプセル化細胞テクノロジーなどを含むウイルススペースまたは非ウイルススペースの送達システムを介して、細胞に送達され得る。

【0136】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される組成物中の化合物 (例えば、LPA gRNAおよびRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸) は、リポソームまたは脂質ナノ粒子に製剤化され得る。いくつかの実施形態において、組成物中の化合物は、脂質ナノ粒子 (LNP) に製剤化される。「脂質ナノ粒子」という用語は、ナノメートル単位で測定されるサイズ (例えば1-5, 000 nm) を有する、脂質から構成されるナノスケールの粒子を指す。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子に含まれる脂質は、カチオン性脂質および／またはイオン化脂質を含む。当技術分野で知られている任意の適切なカチオン性脂質および／またはイオン化脂質が、細胞へのgRNAおよびCas9エンドヌクレアーゼの送達のためのLNPを製剤化するために使用され得る。例示的なカチオン性脂質は、正電荷を有する1つ以上のアミノ基を含む。いくつかの実施形態において、カチオン性脂質はイオン化可能であり、pHに依存して、正電荷を有する状態または中性の状態で存在し得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のカチオン性脂質は、低pHにおいて正電荷を示す、プロトン化可能な三級アミン基ヘッドを含む。脂質ナノ粒子は、1つ以上の中性脂質、荷電脂質、ステロイド、およびポリマーにコンジュゲートした脂質をさらに含み得る。

【0137】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、約、少なくとも、少なくとも約、最大、または最大約、30 nm、40 nm、50 nm、60 nm、70 nm、80 nm、90 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm、またはこれらの値のいずれかの間の数値もしくは範囲の平均直径を有し得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のサイズは、直径約50から約100 nm、または直径約70から約90 nm、または直径約55から約95 nmである。いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、投与1回あたり約0.1–5 mg/kgの用量（総核酸（例えばLPAGRNAおよびCas9 mRNAの総量）によって決定される）で対象に投与され、これは0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg、1.6 mg/kg、1.7 mg/kg、1.8 mg/kg、1.9 mg/kg、2 mg/kg、2.1 mg/kg、2.2 mg/kg、2.3 mg/kg、2.4 mg/kg、2.5 mg/kg、2.6 mg/kg、2.7 mg/kg、2.8 mg/kg、2.9 mg/kg、3 mg/kg、3.5 mg/kg、4 mg/kg、4.5 mg/kg、もしくは5 mg/kg、またはこれらの値のうち任意の2つの間の数値もしくは範囲を含む。いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、ちょうど、または約、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、または3.0 mg/kgの用量で対象に投与される（いくつかの実施形態においては、LPAGRNAおよびSpCas9 mRNAの総量によって決定される）。

10

20

【0138】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物の化合物は、脂質ナノ粒子の脂質部分、または脂質ナノ粒子の脂質部分の一部または全てに包まれた水性の空間にカプセル化される。カプセル化は、完全なカプセル化、部分的なカプセル化、または両方であり得る。いくつかの実施形態において、核酸および／またはポリペプチドは、脂質ナノ粒子中に完全にカプセル化される。

30

【0139】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される1つ以上の化合物は、共有結合または非共有結合を介してリボソームまたは脂質ナノ粒子と会合している。いくつかの実施形態において、組成物中の任意の化合物は、リボソームまたは脂質ナノ粒子に、別々または一緒に含有され得る。

【0140】

いくつかの実施形態において、上記の組成物は1つ以上の追加の試薬をさらに含み得、ここで、このような追加の試薬は、バッファー、細胞にポリペプチドまたはポリヌクレオチドを導入するためのバッファー、洗浄バッファー、コントロール試薬、コントロールベクター、コントロールRNAポリヌクレオチド、DNAからポリペプチドをインビトロ生産するための試薬、シーケンシングのためのアダプターなどから選択される。バッファーは、安定化バッファー、再構成バッファー、希釈バッファーなどであり得る。いくつかの実施形態において、組成物は、オンターゲット結合もしくはエンドヌクレアーゼによるDNAの切断を促進または増強するため、あるいは標的化の特異性を改善するために使用され得る1つ以上の構成要素も含み得る。

40

【0141】

いくつかの実施形態において、組成物の任意の構成要素が、特定の投与様式および投与形態に応じて、担体、溶媒、安定化剤、アジュバント、希釈剤などの薬学的に許容される賦形剤と共に製剤化される。いくつかの実施形態において、ガイドRNA組成物は、一般的には生理的に適合性のあるpHを達成するように製剤化され、かつ、配合および投与経路に応じて、約3のpHから約11のpH、約pH3から約pH7の範囲である。いくつ

50

かの実施形態において、pHは約pH5.0から約pH8の範囲に調節される。

【0142】

適切な賦形剤は、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合体アミノ酸、アミノ酸共重合体、および不活性ウイルス粒子などの大きくて代謝の遅い高分子を含む、担体分子を含み得る。その他の例示的な賦形剤は、抗酸化剤（例えば、限定されないが、アスコルビン酸）、キレート化試薬（例えば、限定されないが、EDTA）、炭水化物（例えば、限定されないが、デキストリン、ヒドロキシアルキルセルロース、およびヒドロキシアルキルメチルセルロース）、ステアリン酸、液体（例えば、限定されないが、油、水、生理食塩水、グリセロール、およびエタノール）、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などを含む。

10

【0143】

生理学的に忍容性のある担体は、当技術分野で良く知られている。例示的な液体担体は、活性成分および水の他に物質を含有しない無菌水溶液、または生理的pH値のリン酸ナトリウム、生理食塩水などのバッファーを含有する無菌水溶液もしくはリン酸緩衝生理食塩水などのこれら両方を含有する無菌水溶液である。水性担体は、1つより多い緩衝塩、ならびに塩化ナトリウムおよび塩化カリウム等の塩、デキストロース、ポリエチレングリコール、およびその他の溶質を含有し得る。また、液体組成物は、水に加えて、または水を除く、液相を含有し得る。このような追加の液相の例は、グリセリン、綿実油などの植物油、および水-油エマルジョンである。細胞組成物において使用される活性化化合物の、特定の障害または状態の処置に有効な量は、その障害または状態の性質に依存し、かつ標準的な臨床的手法によって決定され得る。

20

【0144】

いくつかの実施形態において、組成物の本明細書に記載される化合物（例えばRNA誘導型エンドヌクレアーゼもしくはRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸、および／またはgRNA）は、カルシウムリン酸トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、電気的核輸送（electrical nuclear transport）、化学的形質導入、電気的形質導入、リポフェクタミン媒介トランスフェクション、Effectene媒介トランスフェクション、脂質ナノ粒子（LNP）媒介トランスフェクション、またはこれらの任意の組み合わせなどの、トランスフェクションを介して送達され得る。いくつかの実施形態において、組成物は、脂質ナノ粒子を使用した脂質媒介トランスフェクションを介して細胞に導入される。

30

【0145】

本明細書に記載される組成物は、心血管疾患を処置するため、または心血管疾患の発症リスクを低下させるために、投与を必要とする対象に投与され得る。したがって、本開示はまた、対象のLPA遺伝子を編集することによって、患者の心血管疾患を処置するための、または対象の心血管疾患の発症リスクを低下させるための、遺伝子治療アプローチを提供する。いくつかの実施形態において、遺伝子治療アプローチは、患者の関連する細胞タイプのゲノムにおいてLPA遺伝子を機能的にノックアウトする。対象の関連する細胞（例えば肝細胞）のLPA遺伝子は、本明細書に記載される材料および方法を使用して編集され、これは、ゲノムの標的配列を永続的に欠失、挿入、編集、修正、もしくは置換、または外因性配列を挿入して、それによりLPA遺伝子を機能的にノックアウトするために、Cas9などのRNA誘導型エンドヌクレアーゼを使用した。これは、血中のLp(a)のレベルを永続的に低下させることによって、心血管疾患の永続的な治療を提供し得る。

40

【0146】

いくつかの実施形態において、心血管疾患または障害の処置を必要とする対象（例えば霊長類の対象）において心血管疾患または障害を処置するための方法が開示される。方法は、(a) LPA遺伝子を標的とするガイドRNA（gRNA）またはgRNAをコードする核酸、および(b) RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸と複合体化し

50

た複数のナノ粒子を霊長類の対象に投与し、それによって霊長類の対象の心血管疾患または障害を緩和することを含み得る。対象は、処置のために、複数のナノ粒子を2回以上、例えば2回、投与され得る。対象へのナノ粒子の2回の投与は、適切な時間離れていてもよい。いくつかの実施形態において、適切な時間は、ちょうど、または約、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、3か月、4か月、5か月、6か月、1年、2年、3年、またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、2回以上の投与のうちの2回は、約2週間から約2か月、例えば約3週間離れている。いくつかの実施形態において、2回以上の投与の各々は、お互いに約2週間から約2か月、例えば3週間離れている。いくつかの実施形態において、2回以上の投与のうちの2回は、約1か月から約4か月、例えば約2か月もしくは3か月、またはそれ以上離れている。いくつかの実施形態において、2回以上の投与の各々は、お互いに約1か月から約4か月、例えば約2か月または3か月離れている。いくつかの実施形態において、2回以上の投与のうちの2回は、少なくとも2か月または3か月離れている。いくつかの実施形態において、2回以上の投与の各々は、お互いに少なくとも2か月または3か月離れている。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物の単回投与を受けた対象におけるLp(a)レベルは、実質的に低下し得（例えば、少なくとも20%、30%、40%、50%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）、かつ投与後少なくとも2か月、3か月、4か月、6か月、10か月、1年、18ヶ月、2年、3年、4年、5年、10年、15年、20年、またはそれ以上、低下したレベルを維持する。2回の投与間の適切な期間は、別の2回の投与間の適切な期間と同じであり得、または異なり得る。いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、投与1回あたり、約0.1–5mg/kg総RNA（例えばLPA g RNAおよびCas9 mRNA）、例えば0.5–3mg/kg総RNAの用量で対象に投与される。いくつかの実施形態において、LPA g RNAまたはLPA g RNAをコードする核酸は、投与1回あたり、ちょうど、または約、0.1–5mg/kg、例えば0.1mg/kgから5mg/kg g RNAの用量で、対象に投与される。いくつかの実施形態において、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸は、投与1回あたり、ちょうど、または約、0.1–5mg/kg g RNA、例えば0.5–3mg/kg g RNAの用量で対象に投与される。用量は、対象への投与の各々で同じであり得、または異なり得る。いくつかの実施形態において、複数のナノ粒子は、投与1回あたり、約0.02から約1mg/mL 総RNA（例えばLPA g RNAおよびCas9 mRNAの総量）、例えば約0.1–0.6mg/mL 総RNAの用量で対象に投与される。本明細書で開示される方法は、いくつかの実施形態において、対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む。例えば、複数のナノ粒子は、(a) LPA g RNAまたはLPA g RNAをコードする核酸、および(b) RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸のRNA含量約0.5mg/kg、0.6mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、または3.0mg/kgの用量で、対象に単回投与で投与され得る。本明細書に記載されるように、単回投与処置は対象に有効であり得、したがって対象はいかなる追加の処置も必要としない。例えば、いくつかの実施形態において、対象は、3か月、4か月、5か月、6か月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年、25年、30年、35年、40年、50年、60年、もしくはそれ以上、またはこれらの値のうち任意の2つの間の数値もしくは範囲の期間に1回、複数のナノ粒子の単回投与を受ける。

10

20

30

40

50

【0147】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物および方法の標的組織は、肝組織である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物および方法の標的細胞は、肝細胞である。

【0148】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、エアロゾル送達、経鼻送達、経膈送達、経直腸送達、口腔内送達、眼内送達、局所送達、局所送達、大槽内送達、腹腔内送達、経

口送達、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射、リンパ節内注射、腫瘍内注射、腹腔内注射、および／または皮内注射、あるいはそれらの任意の組み合わせによって投与され得る。投与は局所的または全身性であり得る。全身性投与は、経腸投与および非経口投与を含む。いくつかの実施形態において、所望のレベルの遺伝子発現を達成するために、様々な間隔、例えば日ごと、週ごと、月ごと、または年ごとの期間にわたって、1回よりも多い投与が採用され得る。

【0149】

医薬組成物は、投与を必要とする対象に、薬学的に有効な量投与され得る。本明細書で使用される「薬学的に有効な量」という用語は、所望の治療効果および／または組織、系、動物もしくは人間の生物学的もしくは医学的な応答を惹起するであろう、医薬組成物の量を意味する。投与は、結果として、 $Lp(a)$ の血漿レベルにおける所望の低下などの、 $LP A$ 遺伝子の発現における所望の低下をもたらし得る。

【0150】

本明細書において使用される場合、「心血管疾患」という用語は、心臓および血管壁の障害を指し、かつ、動脈、静脈、細動脈、細静脈、および毛細血管の障害を含む。いくつかの実施形態において、心血管疾患は、脳卒中、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化、家族性高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化、血栓症、石灰沈着性大動脈弁疾患、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、腎動脈狭窄症、大動脈瘤、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心疾患、先天性心疾患、またはリウマチ性心疾患である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法および組成物は、石灰沈着性大動脈弁疾患、心筋梗塞、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化、血栓症、脳卒中、またはこれらの組み合わせを処置するために使用され得る。

【0151】

いくつかの実施形態において、対象は、心臓、脳、一方もしくは両方の脚、骨盤、一方もしくは両方の腕、および／または肩に影響を及ぼす心血管障害症状を1つ以上有する。心臓に影響を及ぼす心血管障害の症状は、胸痛、胸部違和感、および一方もしくは両方の腕、一方もしくは両方の肩、首、顎、もしくは背中での痛み、呼吸困難、めまい、心拍数の上昇、吐き気、不整脈、疲労、および／または心筋梗塞を含むが、これらに限定されない。脳に影響を及ぼす心血管障害の症状は、顔、一方もしくは両方の腕、または一方もしくは両方の脚の突然の痺れまたは脱力、突然の混乱または発話もしくは会話の理解の困難、一方もしくは両方の目における突然の視力障害、突然のめまい、歩行困難、またはバランスもしくは協調運動の喪失、および／または突然の原因不明の重篤な頭痛を含むが、これらに限定されない。一方もしくは両方の脚、骨盤、一方もしくは両方の腕、および／または肩に影響を及ぼす心血管障害の症状は、筋肉痛、筋肉のけいれん、一方もしくは両方の足および／またはつま先、一方もしくは両方の手および／または指の冷感、ならびに／または、一方もしくは両方の足および／またはつま先、一方もしくは両方の手および／または指の痺れまたは脱力を含むが、これらに限定されない。

【0152】

いくつかの実施形態において、処置を必要とする対象は、異常なレベル（健常な個体におけるレベルよりも高いかまたは低いレベル）の総コレステロール、トリグリセリド、高密度リポタンパク質、低密度リポタンパク質、部分血球計算（differential）を伴う全血球計算、 $Lp(a)$ 、アポリポタンパク質B、ホモシステイン、ヘムグロブリンA1c、空腹時血糖、インスリン、クレアチンキナーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、フィブログエン（fibrogen）、甲状腺刺激ホルモン、高感度C反応性タンパク質、尿アルブミンクレアチニン比、 $MP O$ 、ビタミンD、トリメチルアミンN-オキシド、アミノ末端、プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド、血清クレアチニン、グローバルリスクスコア、またはこれらの組み合わせを有し得る。

【0153】

いくつかの実施形態において、対象は、ステロイドおよび／または抗ヒスタミン薬で前処置されていてもよい。例えば、対象は、デキサメタゾン、ファモチジン、ジフェンヒド

10

20

30

40

50

ラミン、またはこれらの組み合わせで前処置されていてもよい。前処置は、投与の約、少なくとも、少なくとも約、最大、または最大約、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、16時間、1日、2日、5日、10日前に行われ得る。

【0154】

いくつかの実施形態において、方法は、処置を必要とする対象を特定することをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、投与前、投与中、および／または投与後に、霊長類の対象におけるLp(a)の血中レベルを測定することをさらに含む。

【0155】

いくつかの実施形態において、対象は投与の前にLp(a)（例えば血漿Lp(a)）の高いレベルを有する。Lp(a)の高いレベルを有する対象は、例えば、ヒト集団の90%よりも高いLp(a)レベルを有する対象を含み得る。いくつかの実施形態において、対象は、心血管疾患の症状を有する。いくつかの実施形態において、対象は心血管疾患の症状を有しない。いくつかの実施形態において、対象は心血管疾患の発症リスクを有する。いくつかの実施形態において、対象は、心血管疾患を有しているかまたは発症していることが疑われる。

【0156】

いくつかの実施形態において、投与前の対象は、約30mg/dLを超える血漿Lp(a)レベル（約40mg/dL、50mg/dL、60mg/dL、70mg/dL、80mg/dL、100mg/dL、125mg/dL、150mg/dL、175mg/dL、200mg/dL、225mg/dL、250mg/dL、275mg/dL、300mg/dLまたはそれ以上のいずれかを超えるレベルなど）を有する。いくつかの実施形態において、処置を必要とする対象は、50mg/dLより高い血漿Lp(a)レベルを有する。いくつかの実施形態において、投与前の対象は、約30mg/dLを超える血漿Lp(a)レベル（約100nmol/L、125nmol/L、150nmol/L、175nmol/L、200nmol/L、225nmol/L、250nmol/L、275nmol/L、300nmol/L、350nmol/L、400nmol/Lまたはそれ以上のいずれかを超えるレベルなど）を有する。いくつかの実施形態において、対象は、内因性LPA遺伝子またはその調節性配列に1つ以上の遺伝的マーカー（例えば欠失、挿入、および／または変異）を有し、apo(a)タンパク質の発現レベルまたは機能性を含む活性が、通常の健常な対象と比較して実質的に上昇している。

【0157】

いくつかの実施形態において、処置を必要とする対象は、ヒト集団の90%よりも高いLp(a)レベル（例えば60mg/dLより高いレベル）として定義されるLp(a)の高いレベル、およびリポタンパク質関連疾患（例えば心血管疾患）の症状を有する患者である。いくつかの実施形態において、対象は、リポタンパク質関連疾患を有することが疑われるヒトであり得る。あるいは、対象は、60mg/dLまたは70mg/dLまたは80mg/dLまたは100mg/dLまたは200mg/dLまたは300mg/dLを超えるLp(a)レベルの存在に基づきリポタンパク質関連疾患のリスクを有すると診断されたヒトであり得る。いくつかの実施形態において、処置を必要とする対象は、リポタンパク質関連疾患リスクの増加および／またはLp(a)発現の増加に関連するLPA遺伝子バリエーションを有し得る。いくつかの実施形態において、対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、対象は霊長類である。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。

【0158】

本明細書に記載される方法および組成物は、血漿Lp(a)レベルなどの血漿低密度リポタンパク質(LDL)を低下させ、それによって、心臓発作、脳卒中、血栓、静脈への脂肪の蓄積、および他の冠動脈疾患などの心血管疾患のリスク、心血管イベントに関連する死亡確率、またはこれらの組み合わせを低下させ得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法および組成物は、心血管疾患の1つ以上の症状を軽減または緩和し得る。

10

20

30

40

50

【0159】

いくつかの実施形態において、方法を実施した後の対象における血漿 Lp (a) レベルは、約 50 mg / dL 以下（例えば約、最大、または最大約、40 mg / dL、30 mg / dL、20 mg / dL、またはそれ以下）まで低下する。いくつかの実施形態において、方法を実施した後の対象における血漿 Lp (a) レベルは、約 40 mg / dL 以下まで低下する。いくつかの実施形態において、方法を実施した後の対象における血漿 Lp (a) レベルは、約 30 mg / dL 以下まで低下する。いくつかの実施形態において、方法を実施した後の対象における血漿 Lp (a) レベルは、約 20 mg / dL 以下まで低下する。

【0160】

いくつかの実施形態において、方法を実施した後の対象における血漿 Lp (a) レベルは、約、少なくとも、または少なくとも約、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、またはこれらの値のいずれかの間の数値もしくは範囲、低下する。

【0161】

いくつかの実施形態において、方法を実施した後の対象における血漿 LDL レベルは、約、少なくとも、少なくとも約、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、またはこれらの値のいずれかの間の数値もしくは範囲、低下する。

【0162】

本明細書で提供されるものは、本明細書に記載される方法を実施するためのキットも含む。キットは、ゲノム標的化核酸（例えば LPA 遺伝子を標的とする gRNA）、および RNA 誘導型エンドヌクレアーゼ（例えば Cas9）または RNA 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸を含み得る。上記キットのいずれかにおいて、キットは、所望の遺伝子改変をもたらすために挿入されるポリヌクレオチド（例えばドナーテンプレート）をさらに含み得る。キットの構成要素は、別々の容器に入っているか、または単一の容器中に組み合わせられ得る。

【0163】

上記の任意のキットは、バッファー、細胞にポリペプチドまたはポリヌクレオチドを導入するためのバッファー、洗浄バッファー、コントロール試薬、コントロールベクター、コントロール RNA ポリヌクレオチド、DNA からポリペプチドをインビトロ生産するための試薬、シーケンシングのためのアダプターなどから選択される、1つ以上の追加の試薬をさらに含み得る。バッファーは、安定化バッファー、再構成バッファー、希釈バッファーなどであり得る。また、キットは、オンターゲット効果もしくはエンドヌクレアーゼによる DNA の切断を促進もしくは増強するため、または標的化の特異性を改善するために使用され得る、1つ以上の構成要素を含んでもよい。

【0164】

いくつかの実施形態において、キットは、本明細書に記載される方法を実施するためのキットの構成要素を使用するための説明書をさらに含み得る。方法を実施するための説明書は、一般的には適切な記録媒体に記録される。例えば、説明書は、紙またはプラスチックなどの基材に印刷され得る。説明書は添付文書、キットの容器のラベル、またはそれらの構成要素などとして（すなわち、パッケージまたはサブパッケージに紐づけて）キットに含まれ得る。説明書は、コンピュータで読み取り可能な適切な記録媒体、例えば CD-ROM、フロッピーディスク、フラッシュドライブなどに含まれる電子保存データファイルとして含まれ得る。いくつかの場合において、実際の説明書はキットに含まれず、しかし（例えばインターネットを介して）遠隔の供給源から説明書を入手するための手段が提供され得る。この実施形態の例は、説明書を閲覧することができかつ／または説明書をダウンロードできるウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様に、説明書を入手するためのこの手段は適切な基材に記録され得る。

【実施例】

【0165】

上に述べた実施形態のいくつかの態様が、下記の実施例でさらに詳しく開示されるが、本開示の範囲を限定することは一切意図されない。

【0166】

実施例 1LPAを標的とするgRNAスパーサーのインビトロ検証

標的化切断に影響を及ぼすgRNAの能力を評価するために、本明細書で表1に記載されるスパーサー配列をインビトロ転写によって合成し（IVT gRNA）、構成的にSpCas9ヌクレアーゼを発現するよう操作されたヒト胚性腎（HEK）細胞株へのトランスフェクションを使用するシステムで評価した。各gRNAについてのオンターゲット部位における切断効率を、TIDESプロトコル（Brinkman, E. K. et al. (2014), Nucleic Acids Research, 42(22):e168）を使用して測定し、ここで、処置した細胞のゲノムDNAを増幅するために、予想される切断部位を挟むPCRプライマーを使用し、次にPCR産物に対してサンガーシーケンシングを行った。細胞のゲノムに二重鎖切断が作成される場合、細胞はその二重鎖切断を修復しようとする。この修復プロセスはエラーを起こしやすく、結果として二重鎖切断部位におけるヌクレオチドの欠失または挿入が起こり得る。完全に修復された切断はCas9ヌクレアーゼによって再度切断される一方、ヌクレオチドの挿入または欠失はCas9切断を阻害するため、切断効率の指標である挿入および欠失の蓄積が起こるであろう。次に、予想される切断部位において挿入または欠失を受けた塩基の頻度を計算するコンピュータアルゴリズムを使用して、シーケンシングクロマトグラムデータを分析した。挿入または欠失を受けた塩基（INDEL）の頻度を、全切断頻度を計算するために使用した。しかしながら、クリングルIV領域のいくつかは反復性であるため、PCR増幅が不可能であった。これらのガイドRNA標的については、この方法を使用してINDELをアッセイすることはできなかった。HEK細胞におけるIVT gRNA実験の結果を表3に示し、ここでは観察された切断効率に従ってgRNAを順位付けしている。表3において、Y＝マカカ・ファシキュラリス（*Macaca fascicularis*）に対する100%一致。

【表3】

表3：HEK細胞のLPA遺伝子を標的とするガイドRNA分子の切断効率			
ガイド	遺伝子の領域	NHP 一致	INDEL 頻度(%)
T4	エクソン3	Y	1.7
T1 (T5513)	エクソン3	Y	6.1
T2 (T13789)	エクソン3	Y	2.4
T10762	エクソン3	—	1.9
T3893	エクソン3	—	2.2
T3894	エクソン3	—	1.9
T14467	エクソン3	—	1.5
T5 (T1530)	エクソン3	Y	0.9

【0167】

実施例 2非ヒト霊長類（NHP）におけるLPA遺伝子編集効率の評価

この実施例では、処置の前および後の血漿Lp(a)レベルを測定することによって、NHPにおけるLPA遺伝子編集効率を評価する。

【0168】

NHPをLPA遺伝子内のSNPについてプレスクリーニングし、Lp(a)血漿ベースレベルを測定した。NHPのLPA遺伝子に合わせるために、T4 gRNA（配列番号3）を選択した。Cas9 mRNAおよびT4 gRNA分子をNHPに送達するために、脂質ナノ粒子（LNP）送達媒体を使用した。図2に示す試験デザインに従って、

gRNA分子およびCas9 mRNAをカプセル化したLNPをNHPに注射した。特に、Gen3 LNP中にカプセル化したRNA097 Cas9 mRNA（シュードウリジン改変型）およびT4 gRNAの2回用量（群4）、またはGen3 LNP中にカプセル化したRNA010 Cas9 mRNA（N-メチルシュードウリジン改変型）およびT4 gRNAの1回用量（群5）を、各NHPに注射した。血漿サンプルを収集し、処置の前および後に血漿Lp（a）レベルをモニタリングした。収集した血漿中のLp（a）タンパク質濃度を検出するために、サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を使用した。2mg/kg用量における約50%の肝臓編集を含む、効率的な編集が見られた。

【0169】

図3A-Bは、群4のNHP（図3A）および群5のNHP（図3B）の血漿Lp（a）レベルを示す2つのグラフである。図4A-4Bは、群4のNHP（図4A）および群5のNHP（図4B）の血漿Lp（a）のベースラインからのパーセント変化を示す2つのグラフである。

【0170】

結果から、T4 gRNAおよびCas9 mRNAを使用することでNHPの血漿Lp（a）レベルが顕著に低下することが実証される。群4においてはベースラインから66%および87%の低下が見られ、群5においては75%および86%の低下が見られた。

【0171】

実施例3

LPA gRNA製剤の毒性試験

この実施例においては、NHPにおいて毒性試験を実施した。配列番号3のgRNA分子（T4 gRNA）およびCas9 mRNAをカプセル化した脂質ナノ粒子を、「CTX320」と称されるLPA gRNA製剤に製剤化した。CTX320製剤を、NHP（例えばカニクイザル）の3つの群に、それぞれ0.5mg/kg、1.5mg/kg、および3.0mg/kgの投与レベルで、単回用量で投与した。MercoDia ELISAアッセイを使用して、血漿Lp（a）タンパク質レベルを測定した。図5は、非限定的な実験デザインを描写する。

【0172】

図6は、処置の14日前（-14日目）におけるNHP血漿中のベースラインLp（a）レベルを示すグラフである。クリングルIV-2反復の数に起因して、個々のNHP間でベースライン値は異なる。

【0173】

図7は、非限定的なNHP試験デザインの例を描写する。血漿Lp（a）タンパク質レベルを処置の7日前ならびに処置の8日後、15日後、および29日後に測定した。

【0174】

図8Aは、コントロール群と比較した、3つの異なる用量：0.5mg/kg、1.5mg/kg、および3mg/kgによるCTX320処置後の、NHPの血漿Lp（a）タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。図8Bは、コントロール群と比較した、3つの異なる用量：0.5mg/kg、1.5mg/kg、および3mg/kgによるCTX320処置後の、NHPの血清Lp（a）タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。このデータは、CTX320投与後の、血漿および血清のLp（a）タンパク質の用量依存的な低下を実証している。1.5mg/kgのCTX320で処置したNHPにおいてはLp（a）タンパク質のベースラインからの約66%の低下が見られ、かつ3.0mg/kgのCTX320で処置したNHPにおいては約92%の低下が見られた。0.5mg/kgのCTX320投与では、血漿Lp（a）タンパク質の顕著な低下は見られなかった。

【0175】

図9A-Cは、CTX320の3つの異なる用量：0.5mg/kg（図9A）、1.

10

20

30

40

50

5 mg / kg (図 9 B)、および 3.0 mg / kg (図 9 C) による処置前後の NHP の血漿 Lp (a) タンパク質レベルを示すグラフである。図 9 D は、CTX 320 処置の 29 日後における、NHP の血漿 Lp (a) レベルのベースラインからのパーセント変化を示す。1.5 mg / kg および 3 mg / kg の CTX 320 製剤で処置した NHP において、平均で 50 % 以上の、血漿 Lp (a) レベルのベースラインからの低下が見られた。
【0176】

CTX 320 処置後の NHP に対して血清テストも行った。これは肝機能テスト、脂質 (例えばトリグリセリド、HDL、LDL、および総コレステロール) の血漿レベル、腎機能テスト (例えば血中尿素窒素、クレアチニン、グルコース、およびカルシウム)、損傷マーカー (例えば乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ、および C 反応性タンパク質 (CRP))、白血球、電解質パネル、赤血球指数、凝固プロファイル、および尿検査を含む。データ (ここでは示さない) は、肝臓酵素および総ビリルビンが用量依存的に一過性に上昇して処置後約 2 ~ 4 日でピークに達し、15 日目までにベースラインに戻ることを実証している。LDH および CRP の一過性の上昇は 2 日目でピークに達し、7 日目までにベースラインに戻った。NHP の体重は、CTX 320 処置後も安定したままである。データは、3 mg / kg の CTX 320 製剤がコレステロールレベルを変化させないこと、トリグリセリドおよび LDL のレベルの一過性の上昇を誘導してこれが処置後 2 ~ 4 日目でピークに達すること、ならびに処置後 4 日目において HDL レベルの急峻な低下を誘導することも示唆している。さらに、CTX 320 による処置が腎臓のマーカー (血中尿素窒素およびクレアチニンを含む) の機能を変化させないことが分かった。

【0177】

実施例 4

LPA gRNA 製剤の有効性評価および毒性試験

この実施例では、実施例 3 の CTX 320 製剤の有効性および毒性評価の別の非限定的な例を報告する。

【0178】

図 5 の実験デザインに従って、CTX 320 製剤を、NHP (例えばカニクイザル) の 3 つの群に、それぞれ 0.5 mg / kg、1.5 mg / kg、および 3.0 mg / kg の投与レベルで、単回用量で投与した。Merco dia ELISA アッセイを使用して、試験全体を通して血漿 Lp (a) タンパク質レベルを測定した。処置の 85 日後に動物を安楽死させた。

【0179】

図 10 A は、コントロール群と比較した、3 つの異なる用量：0.5 mg / kg、1.5 mg / kg、および 3.0 mg / kg における CTX 320 処置後の NHP の血清 Lp (a) タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。このデータは、CTX 320 投与後の、血漿および血清の Lp (a) タンパク質の用量依存的な低下を実証している。1.5 mg / kg の CTX 320 で処置した NHP においては Lp (a) タンパク質のベースラインからの約 78 % の低下が見られ、3.0 mg / kg の CTX 320 で処置した NHP においては約 90 % の低下が見られた。0.5 mg / kg の CTX 320 投与では、血漿 Lp (a) タンパク質の約 19 % の低下が見られた。図 10 A に示すように、CTX 320 の単回投与は結果として Lp (a) の持続的な低下をもたらし、Lp (a) レベルの顕著な低下は、中間用量および高用量で、試験期間の間にもたって持続した。

【0180】

図 10 B は、CTX 320 処置から約 3 か月後における NHP の血漿 Lp (a) レベルのベースラインからのパーセント変化を示す。1.5 mg / kg および 3 mg / kg の CTX 320 製剤で処置した NHP において、Lp (a) レベルのベースラインからの顕著な低下が見られた。結果から、CTX 320 の単回投与は、中間用量および高用量で、処置の 3 か月後に至っても Lp (a) のベースラインからの持続的な低下をもたらすことが

実証される。

【0181】

図11は、肝臓ならびに脾臓、副腎、脳、腎臓、肺、精巣上体、精巣、および卵巣を含む他の臓器組織におけるLPA遺伝子編集の割合を示すプロットである。結果は、CTX320処置の約3か月後において、肝臓はLPA遺伝子編集の主な臓器であり、一方で脾臓においてはLPA遺伝子編集が約0.1～5%しか見られないことを実証している。加えて、処置の85日後に、肝臓においても用量依存的な編集が見られた。1.5 mg/kgのCTX320および3 mg/kgのCTX320による処置後、それぞれ約40%および65%のLPA遺伝子編集が見られた。組織におけるLPAオンターゲット編集のいくつかの結果を表4に示す。

表4：組織におけるLPAオンターゲット編集の3か月（%インデル）データ

【表4】

組織	コントロール		0.5 mg/kg		1.5 mg/kg		3.0 mg/kg	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
肝臓	0.22	0.15	9.96	8.55	43.34	11.87	64.80	5.77
脾臓	0.10	0.01	0.13	0.05	0.44	0.32	3.10	1.87
副腎	0.25	0.29	0.20	0.11	0.14	0.12	2.72	2.68
脳	0.12	0.05	0.08	0.04	0.10	0.06	0.20	0.07
腎臓	0.14	0.00	0.10	0.07	0.10	0.03	0.30	0.12
肺	0.12	0.04	0.13	0.06	0.22	0.12	0.24	0.11
精巣上体	0.12	N/A	0.08	0.01	0.10	0.02	0.15	0.19
精巣	0.06	N/A	0.18	0.01	0.18	0.12	0.27	0.17
卵巣	0.15	N/A	0.12	0.09	0.14	0.01	0.23	0.20

【0182】

また、追加データ（図12A－12C）は、精巣、精巣上体、および卵巣の生殖組織における用量依存的な編集を実証しており、3 mg/kgのCTX320による処置の85日後には0.5%未満、0.5 mg/kgおよび1.5 mg/kgのCTX320ではさらに低い編集であった。

【0183】

図13A－Bは、処置後におけるLNP構成要素Aの血漿レベルを示すプロットである。図14A－Bは、処置後におけるLNP構成要素Bの血漿レベルを示すプロットである。毒性動態学分析は、LNP構成要素AおよびBのほとんどがCTX320の処置後1週間で血漿から除去されていることを示唆する。LNP構成要素AおよびBの両方が、注射後168時間までに排泄される。

【0184】

データ（ここでは示さない）は、CTX320が、肝機能テスト（例えばアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、およびビリルビン）における一過性の用量依存的な上昇を引き起こすことを示している。処置後（例えば投与の85日後）に肝機能の障害または損傷は検出されなかった。

【0185】

体重、臨床兆候（例えばアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アルカリホスファターゼ（ALP）、総ビリルビン）尿検査、血液学および凝固、心電図、ならびに組織病理学（肉眼および顕微鏡評価の両方）を含む追加のエンドポイント分析は、試験期間全体にわたってCTX320に関連する変化がないことを明らかにしている。

【0186】

実施例5

フェーズ1試験デザイン

本明細書に記載される L P A 遺伝子編集ナノ粒子のうち 1 つ以上（例えば C T X 3 2 0）のための、フェーズ 1 安全性・忍容性臨床試験の非限定的なデザインの例を、図 1 5 に示す。

【 0 1 8 7 】

いくつかのケースにおいて、C T X 3 2 0 のフェーズ 1 臨床試験は、上昇した L p (a) レベルを有する患者において実施される。例えば患者は、確立された C V D リスク因子と無関係に、心筋梗塞 (M I) のリスク増加を伴い 5 0 m g / d L 以上または 1 0 0 n m o l / L 以上の L p (a) を有し得る。いくつかのケースにおいて、患者は 5 0 m g / d L 以上または 1 2 5 n m o l / L 以上の L p (a) を有し得る。いくつかのケースにおいて、患者は、アテローム性動脈硬化性心血管疾患 (A S C V D) の生涯リスクの増加を伴い 1 8 0 m g / d L 超 (4 3 0 n m o l / L 超) の L p (a) レベルを有し得る。患者は 1 8 歳から 7 5 歳の間であり得る。いくつかのケースにおいて、患者について約 3 か月ごとに H B A 1 C テストを行う。

【 0 1 8 8 】

いくつかのケースにおいて、進行した肝疾患を有する対象は、試験から除外される。進行した肝疾患は、(a) 正常値の上限 (U L N) の 3 倍超のアスパラギン酸トランスアミナーゼ (A S T) 、アラントランスアミナーゼ (A L T) 、もしくは U L N の 2 倍超の直接ビリルビン値、および／または (b) U L N の 1 . 5 倍超のベースラインプロトロンビン時間 (国際標準比 [I N R]) 、および／または (c) 7 . 5 k p a 以上のフィブロスキャンもしくは M R E 測定値、および／または (d) 肝硬変の病歴、および／または (e) アルコールもしくは薬物の乱用歴、および／または (f) D 3 0 を通した A L T 、 A S T 、 G G T 、 B i l i . 、 A l k . 、 P h o s . 、アルブミン、I N R 、 P T 、および P T T の急性モニタリングを含み得る。モニタリングは試験の終了まで継続されるであろう (1 2 か月) 。

【 0 1 8 9 】

実施例 6

L P A g R N A 製剤の持続性試験

この実施例においては、実施例 3 の C T X 3 2 0 製剤の持続性検証試験の非限定的な例を報告する。特に、この実施例では、E L I S A を使用して血漿中の L P A タンパク質ノックダウンの持続性を評価し、肝臓組織における L P A の破壊を評価する。持続性試験では、ステロイドおよび／または抗ヒスタミンによる前処置が肝機能テストにおける上昇量を減少させるか否かも評価する。表 5 は、この実施例で使用される持続性試験デザインを示す。

【 表 5 】

表 5 : 例示的な持続性試験デザイン					
製剤	群サイズ	用量 レベル	LPA ELISA	LPA 編集	エンドポイント
前処置を伴う CTX320	4 (男性 2 + 女性 2)	2.0 mg/kg	7 日、14 日、21 日、28 日、6 週、8 週、10 週、12 週、月 ごと (4 か月－ 24 か月)	12 か月、 18 か月、 24 か月 (肝臓の み)	剖検: 2 年 生検: 12 および 18 か月 血清化学 PD サンプル バイオアナライシス/ TK サンプル

【 0 1 9 0 】

選択された患者は、1 0 0 m g / d L 超の上昇した L P (a) レベルを有する。患者は、ステロイドおよび／または抗ヒスタミン薬で前処置され得る。例えば患者は、L N P 投与の前日に 1 m g / k g のデキサメタゾン、0 . 5 m g / k g のファモチジン、および 5 m g / k g のジフェンヒドラミンで前処置され得、次に L N P 投与の 3 0 ～ 6 0 分前に再度前処置され得る。

【0191】

図16は、CTX320処置後における患者の血清Lp(a)タンパク質レベルのベースラインからのパーセント変化を示すグラフである。投与の56日後においてもなお、CTX320で処置された患者において、Lp(a)タンパク質のベースラインからの少なくとも90%の低下が見られた。

【0192】

肝機能テスト(LFT)および脂質(例えばトリグリセリド、HDL、LDL、および総コレステロール)の血漿レベルを含め、CTX320処置後の患者に対して血清テストも実施した。

【0193】

図17では、前処置および2.0mg/kgのCTX320製剤を受けた患者、ならびに前処置なしで1.5mg/kgおよび3mg/kgのCTX320製剤を受けた患者における、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ALT)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、および総ビリルビンレベルを比較する。データは、前処置を伴うCTX320製剤が、前処置を伴わない過去の試験で見られたものと類似したLFT上昇を誘導すること、および抗ヒスタミンによる前処置は患者においてLFT応答を弱めないことを示唆している。

【0194】

CTX320は総コレステロールおよびLDLの低下も誘導することが観察された。CTX320製剤によって誘導されたことが分かった血清化学マーカーの認識可能な違いは他になかった。

【0195】

用語

前記の実施形態の少なくともいくつかにおいて、そのような置換が技術的に実現不可能でない限り、ある実施形態で使用されている1つ以上の要素は、別の実施形態で互換的に使用され得る。請求項に記載した対象の範囲から離れることなく上記の方法及び構造に対して他の様々な省略、付加、および改変がなされてもよいことが、当業者に理解されるであろう。このような改変および変更の全ては、付属の特許請求の範囲によって定義される対象の範囲内であることが意図される。

【0196】

本明細書における実質的に任意の複数形および／または単数形の用語の使用に関して、当業者は、文脈上および／または適用上適切である限り、複数形を単数形に、および／または単数形を複数形に読み替えることができる。明確性のために、様々な単数形／複数形の置き換えが、本明細書で明示的に表されてもよい。本明細書および付属の特許請求の範囲において使用される限り、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上明確にそうでないことが述べられない限り、複数に対する言及を含む。本明細書における「または」に対する任意の言及は、そうでないことが記載されない限り「および／または」を包含することが意図される。

【0197】

本明細書、および特に付属の特許請求の範囲(例えば付属の特許請求の範囲の本体)において使用される用語は総じて、一般的には「オープン」な用語であることが意図される(例えば、「含む(including)」という用語は「含むが限定されない」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む(include)」という用語は「含むが限定されない」と解釈されるべきである、等)と、当業者に理解されるであろう。導入される請求項の記載事項の特定の数が意図される場合、そのような意図は請求項に明確に記載されるであろうこと、およびそのような記載が存在しない場合そのような意図は存在しないであろうことが、当業者によってさらに理解されるであろう。例えば、理解の一助として、付属の特許請求の範囲は、請求項の記載事項を導入するために、「少なくとも1つの」および「1つ以上の」という前置きの語句の使用を含み得る。しかしながら、このような語句の使用は、たとえ同一の

10

20

30

40

50

請求項が「1つ以上の」または「少なくとも1つの」という前置きの語句および「a」または「an」などの不定冠詞の両方を含んでいたとしても、不定冠詞「a」または「an」による請求項の記載事項の導入が、このような請求項の記載事項を含む特定の請求項をこのような記載事項を1つだけ含む実施形態に限定することを意味するものと解釈されるべきではなく（例えば、「a」および／または「an」は「少なくとも1つの」または「1つ以上の」を意味すると解釈されるべきである）、請求項の記載事項を導入するために使用される定冠詞の使用についても同じことがいえる。加えて、導入される請求項の記載事項の特定の数が明示的に記載されている場合であっても、このような記載は、少なくとも記載された数を意味するものと解釈されるべきであることを、当業者は認識するであろう（例えば、「2つの記載」という、他の修飾語を伴わない単なる記載は、少なくとも2つの記載、または2つ以上の記載を意味する）。さらに、「A、B、およびCなどのうち少なくとも1つ」に類似した集合が使用される場合において、一般的には、このような構文は、当業者がその集合を理解するであろう意味を意図される（例えば、「A、B、およびCのうち少なくとも1つを有するシステム」は、Aを単独で、Bを単独で、Cを単独で、AおよびBを共に、AおよびCを共に、BおよびCを共に、および／またはA、B、およびCを共に有するシステムを含むが、これらに限定されない）。「A、B、またはCなどのうち少なくとも1つ」に類似した集合が使用される場合において、一般的には、このような構文は当業者がその集合を理解するであろう意味を意図される（例えば、「A、B、またはCのうち少なくとも1つを有するシステム」は、Aを単独で、Bを単独で、Cを単独で、AおよびBを共に、AおよびCを共に、BおよびCを共に、および／またはA、B、およびCを共に有するシステムを含むが、これらに限定されない）。さらに、2つ以上の代替的な用語を提示する実質的に任意の選言的な語句および／または語句は、明細書、特許請求の範囲、または図面のいずれにおいても、それらの用語の一方、それらの用語のいずれか、またはそれらの用語の両方を含む可能性を企図するものと理解されるべきであることが、当業者に理解されるであろう。例えば、「AまたはB」という語句は、「A」または「B」または「AおよびB」の可能性を含むことが理解されるであろう。

10

20

30

40

【0198】

加えて、開示の特徴または態様がマーカッシュ形式の群の用語で記載される場合、それによって、その開示がマーカッシュ形式の群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループの用語によっても記載されているものと、当業者は認識するであろう。

【0199】

当業者であれば理解できるように、例えば意見書の提供に関することなどあらゆる目的のために、本明細書において開示される全ての範囲は、その可能なあらゆるサブ範囲（sub-range）およびサブ範囲の組み合わせも包含する。列挙された範囲は、同じ範囲が少なくとも半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1などに分割されることを十分に記載しかつ可能にするものとして、容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書に記載する各範囲は、下の3分の1、中間の3分の1、および上の3分の1などに容易に分割され得る。これも当業者であれば理解できるように、「まで」、「少なくとも」、「超」、「未満」などの全ての語は、記載されている数を含み、かつ上に述べたように、さらにサブ範囲に分割され得る範囲を指す。最後に、当業者であれば理解できるように、範囲は個別のメンバー各々を含む。したがって、例えば、1～3個の物を有する群は、1、2、または3個の物を有する群を指す。同様に、1～5個の物を有する群は、1、2、3、4、または5個の物を有する群を指し、他も同様である。

【0200】

様々な態様および実施形態が本明細書に開示されている一方、当業者には他の態様および実施形態が明らかであろう。本明細書で開示される様々な態様および実施形態は、例示を目的とし、限定的であるとは意図されず、真の範囲および精神は以下の特許請求の範囲によって示される。

【図面】
【図 1】

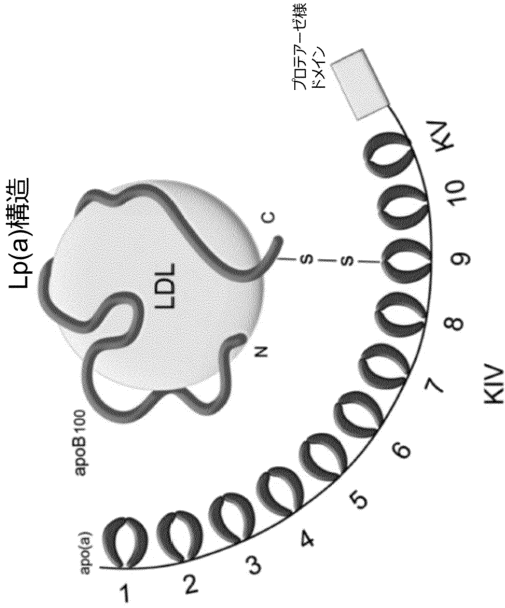


図 1

【図 2】

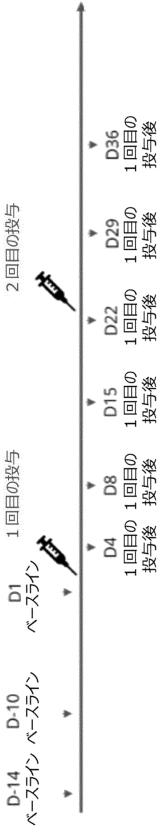


図 2

10

20

30

40

50

【 図 3 - 1 】

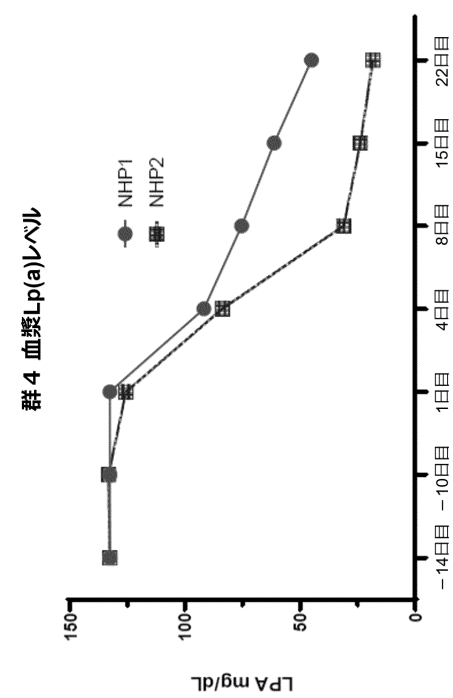


図 3 A

【 図 3 - 2 】

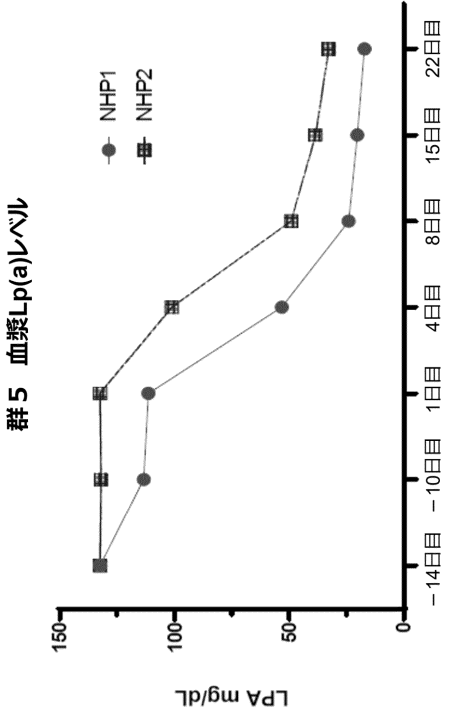


図 3 B

【 図 4 - 1 】

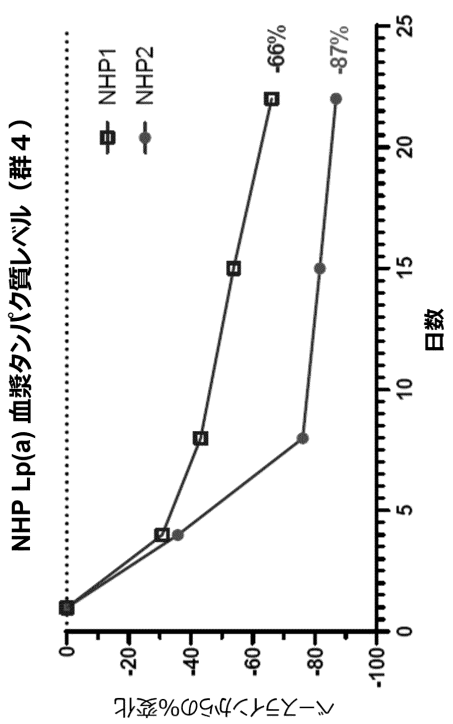


図 4 A

【 図 4 - 2 】

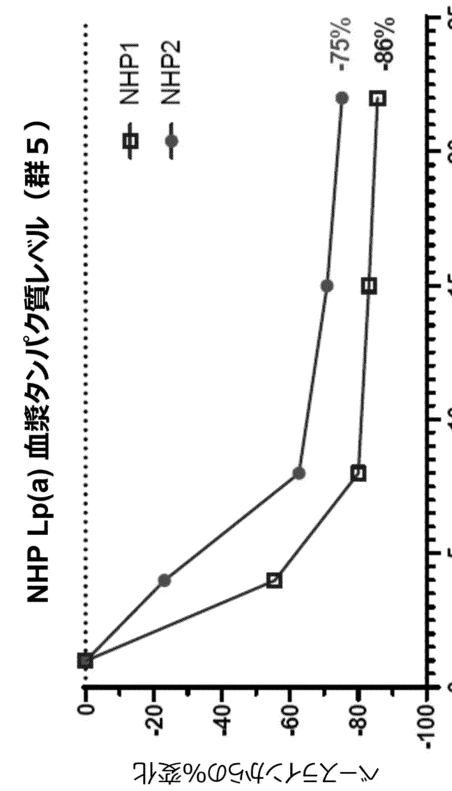


図 4 B

10

20

30

40

50

【 図 5 】

実験デザイン						
群番号	試験物質	投与レベル (mg/kg) ^a	投与容量 (mL/kg)	投与濃度 (mg/mL)	動物の数 ^b	
1	コントロール	0	5	0	雄	1
2	CTX320	0.5		0.1	雄	2
3		1.5		0.3	雄	2
4		3		0.6	雄	2

^a 直近の体重測定に基づく。
^b 動物は 8 5 日目に安楽死させる。

図 5

【 図 6 】

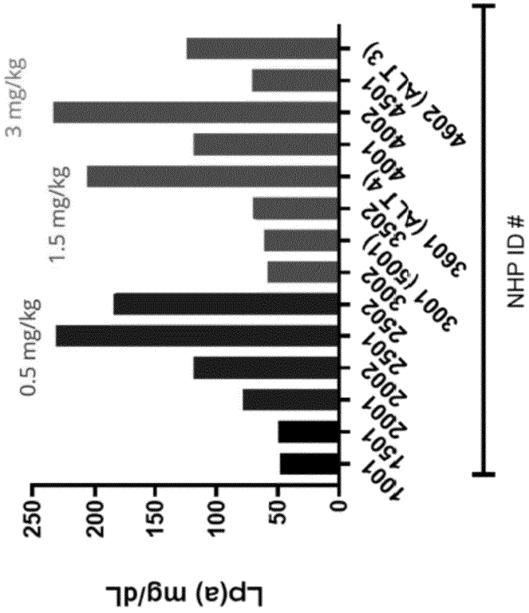


図 6

【 図 7 】

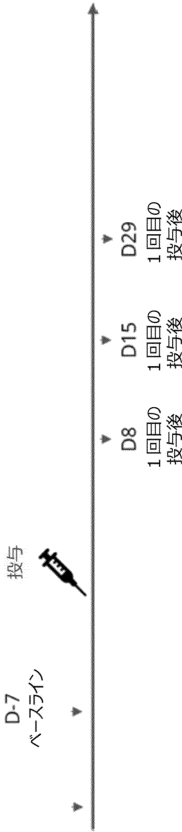


図 7

【 図 8 - 1 】

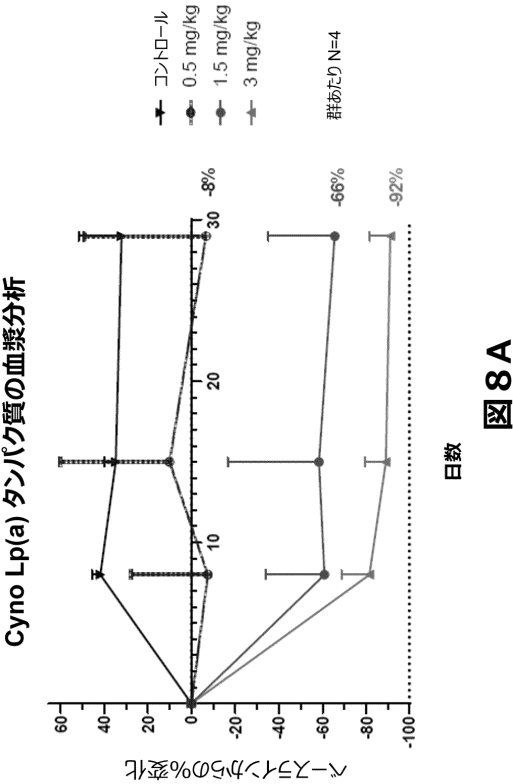


図 8 A

【図 8 - 2】

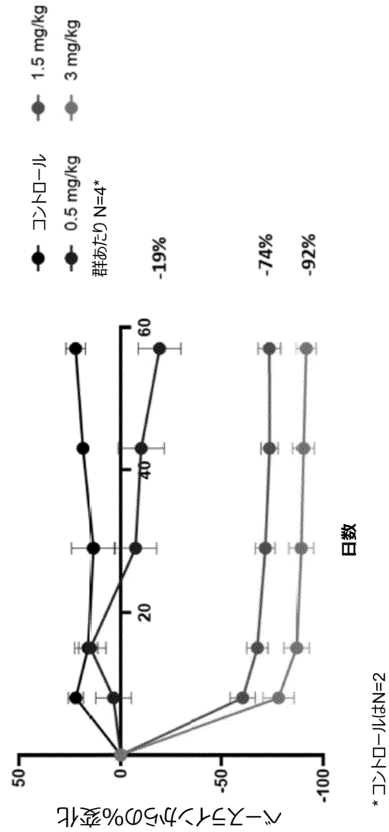


図 8B

【図 9 - 1】

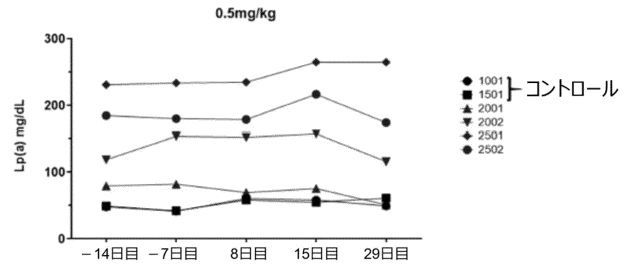


図 9A

10

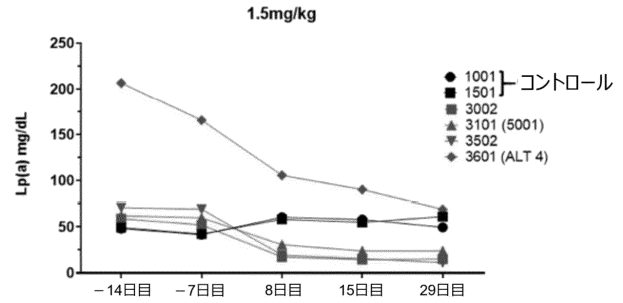


図 9B

20

【図 9 - 2】

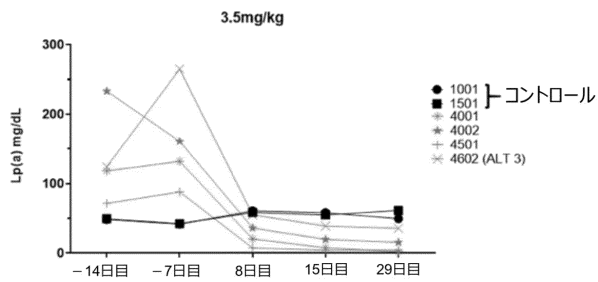


図 9C

【図 10】

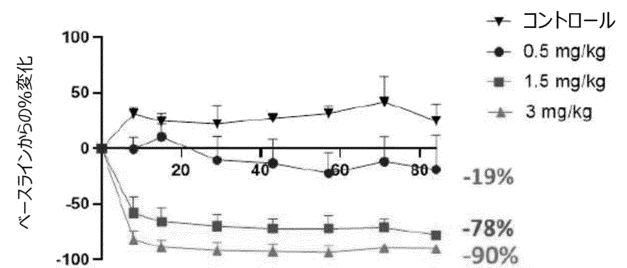


図 10A

30

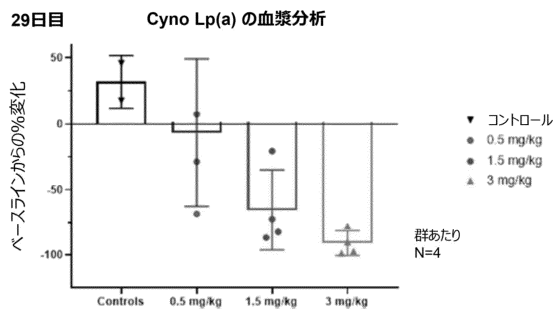


図 9D

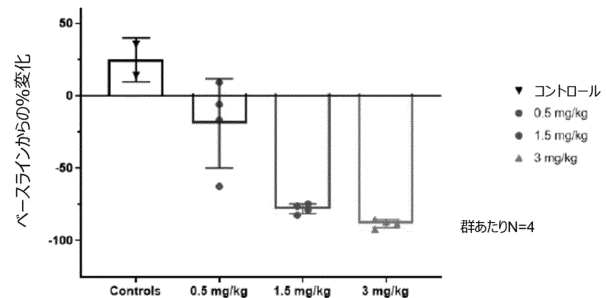


図 10B

40

50

【図 1 1】

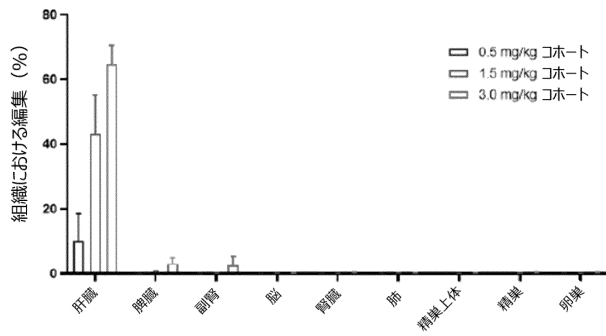


図 1 1

【図 1 2 - 1】

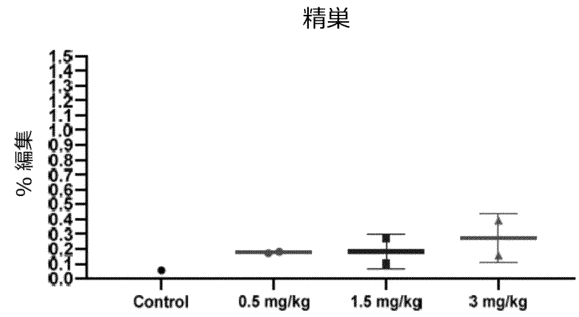


図 1 2 A

【図 1 2 - 2】

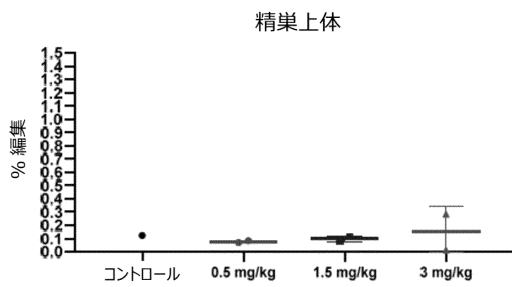


図 1 2 B

【図 1 3】

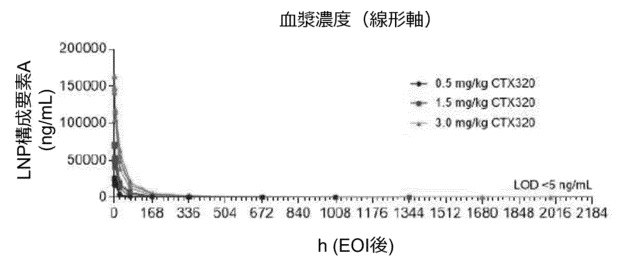


図 1 3 A

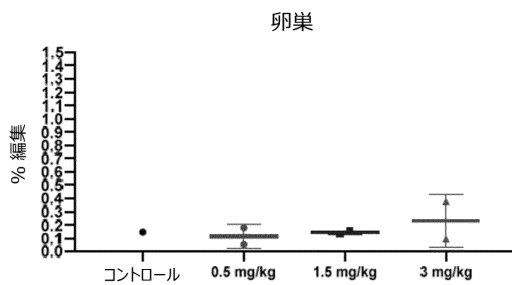


図 1 2 C

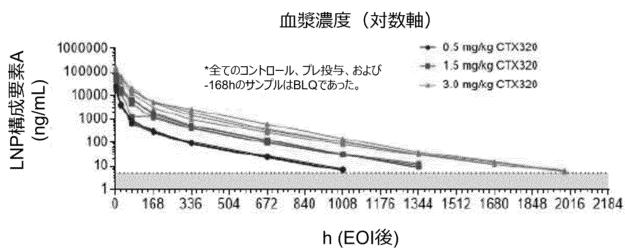


図 1 3 B

10

20

30

40

50

【 図 1 4 】

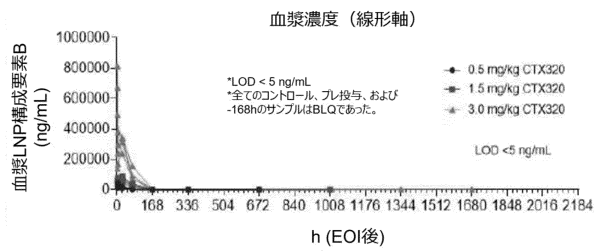


図 1 4 A

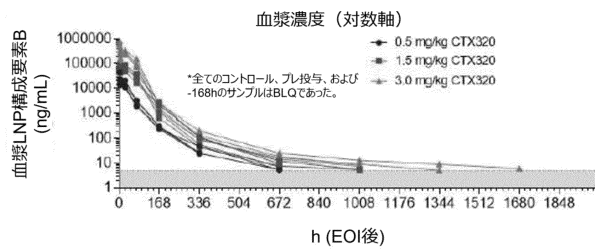


図 1 4 B

【 図 1 5 】

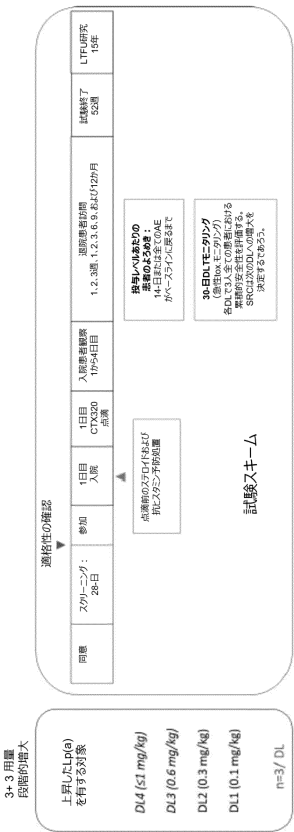


図 1 5

【 図 1 6 】

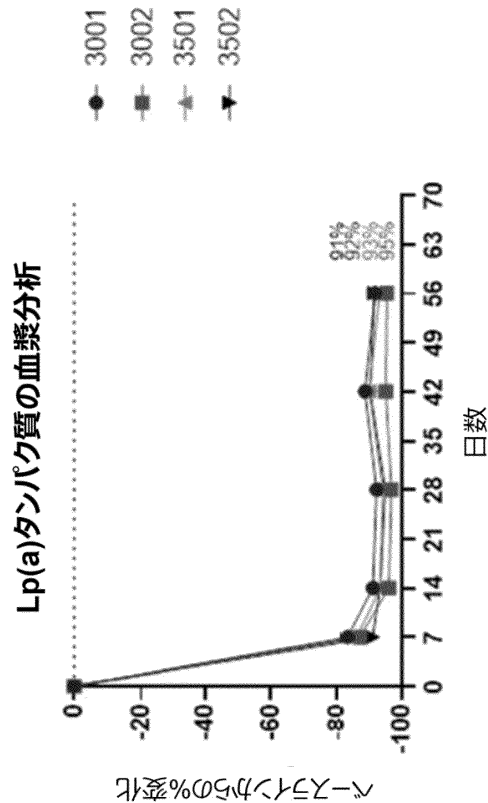


図 1 6

【 図 1 7 】

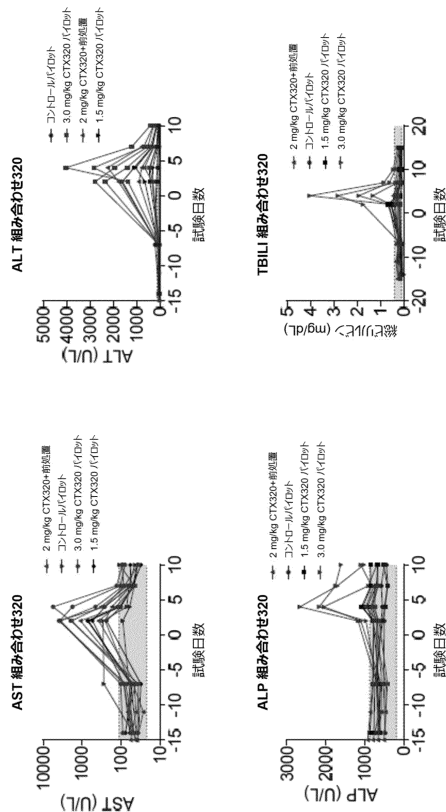


図 1 7

10

20

30

40

50

【配列表】
2025510739000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2023/052720

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/113

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/204668 A1 (CASEBIA THERAPEUTICS LTD LIABILITY PARTNERSHIP [US]) 24 October 2019 (2019-10-24) paragraph [0309]; claims 1, 3, 30, 40-42, 38; sequences 13-16, 18-19, 122 -----	1-53
A	KING ANTHONY: "A CRISPR edit for heart disease", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 555, no. 7695, 1 March 2018 (2018-03-01), pages S23-S25, XP037038639, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/D41586-018-02482-4 [retrieved on 2018-03-07] ----- -/--	1-53

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2023

Date of mailing of the international search report

23/06/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Piret, Bernard

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2023/052720

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Anonymous: "LPA CRISPR guide RNA - GenScript", , 6 August 2019 (2019-08-06), XP055611280, Retrieved from the Internet: URL: https://www.genscript.com/gRNA-detail/4018/LPA-CRISPR-guide-RNA.html [retrieved on 2019-08-06] -----	1-53
A	TOKGOZOGLU LALE ET AL: "The year in cardiovascular medicine 2021: dyslipidaemia", EUROPEAN HEART JOURNAL, vol. 43, no. 8, 22 February 2022 (2022-02-22), pages 807-817, XP093045298, GB ISSN: 0195-668X, DOI: 10.1093/eurheartj/ehab875 Retrieved from the Internet: URL: ">https://watermark.silverchair.com/ehab875.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAUQwggLgBgkqhkiG9w0BBwagggLRMIICzQIBADCCAsYGCsQGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQM5MYgnbJUL-0dKSbEAgEQgIICl14cIMZXfkSK7r_mzQR5wFoGCD4jc-vZO-wZKh9_s_7mPgD3MLf5GlyIqVxXYifpFAXj44_nK7GTVm5aQwAhxez09Y-K> -----	1-53
A	TIRRONEN ANNAKAISA ET AL: "Recent advances in novel therapies for lipid disorders", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 28, no. R1, 1 October 2019 (2019-10-01), pages R49-R54, XP093045299, GB ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddz132 Retrieved from the Internet: URL: ">https://watermark.silverchair.com/ddz132.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAtEwggLNBgkqhkiG9w0BBwagggK-MIICugIBADCCArMGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMjMnWq4PfYuHert3AgEQgIICHT9KPcNERQNePfGqs6_ALq5HczKmc2GipmEiVi2SIXf1Cx6FyowIRuhBy4ML-B4njj9sgUQWYipfHUAf1UBz6uZwGYb> ----- -/--	1-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2023/052720

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VALENCIA-ENCISO NATALIA ET AL: "New Biotechnological Treatments for Lipid Disorders", REVISTA DE INVESTIGACION CLINICA, vol. 70, no. 5, 4 October 2018 (2018-10-04), XP093045300, ISSN: 0034-8376, DOI: 10.24875/RIC.18002577 Retrieved from the Internet: URL:https://www.clinicalandtranslationalinvestigation.com/files/p4392ax185-ric-05-18_-244-254.pdf> -----	1-53
A	TROMP TYCHO R. ET AL: "Gene-based therapy in lipid management: the winding road from promise to practice", EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, vol. 29, no. 5, 29 April 2020 (2020-04-29) , pages 483-493, XP093045302, UK ISSN: 1354-3784, DOI: 10.1080/13543784.2020.1757070 -----	1-53

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/052720

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

Information on patent family members

PCT/IB2023/052720

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/10 (2017.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 38/46	
	C 1 2 N 15/09	1 1 0

(32)優先日 令和4年11月28日(2022.11.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
 ッツ州サウス・ボストン、ウエスト・ファースト・ストリート 1 0 5

(72)発明者 ソーワー, ローラ

アメリカ合衆国 0 2 1 2 7 マサチューセッツ州サウス・ボストン、ウエスト・ファースト・ストリート 1 0 5

(72)発明者 テレット, ジョナサン

アメリカ合衆国 0 2 1 2 7 マサチューセッツ州サウス・ボストン、ウエスト・ファースト・ストリート 1 0 5

(72)発明者 カルマン, ジョン

アメリカ合衆国 0 2 1 2 7 マサチューセッツ州サウス・ボストン、ウエスト・ファースト・ストリート 1 0 5

F ターム (参考) 4C076 AA29 AA65 CC11 CC21 DD09 DD70 EE23

4C084 AA13 AA19 DC22 MA38 MA41 MA52 MA55 MA66 NA05 NA14
ZA361 ZA362 ZC211 ZC212 ZC331 ZC332 ZC442 ZC452 ZC751

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA38 NA14 ZA36 ZC21 ZC33