

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-507751

(P2025-507751A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(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	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	3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全115頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-550760(P2024-550760)	(71)出願人	518192998	クリスパー・セラピューティクス・アク チェンゲゼルシャフト CRISPR Therapeutics AG スイス6300ツーク、バーラーシュト ラーセ14番	
(86)(22)出願日	令和5年2月28日(2023.2.28)	(74)代理人	100145403		
(85)翻訳文提出日	令和6年10月24日(2024.10.24)	(74)代理人	100106518		
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/051870	(74)代理人	100138911		
(87)国際公開番号	WO2023/166425	(72)発明者	チェン, イーシャン		
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)		アメリカ合衆国02127マサチューセ	最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	63/315,372				
(32)優先日	令和4年3月1日(2022.3.1)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/332,234				
(32)優先日	令和4年4月18日(2022.4.18)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/352,747				
		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 アンジオポエチン様3 (ANGPTL3) 関連状態を処置するための方法および組成物

(57)【要約】

本開示は、遺伝子編集によってアンジオポエチン様3 (ANGPTL3) に関連する状態を処置するための方法、組成物およびキットに関する。

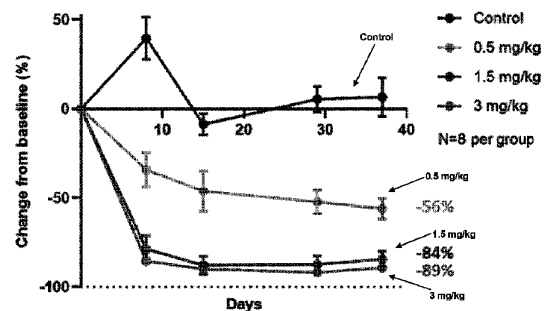


FIG. 12D

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

その必要に迫られている対象においてアンジオポエチン様 3 (ANGPTL3) 関連疾患または障害を処置するための方法であって、(a) ANGPTL3 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 ガイド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、それにより対象において ANGPTL3 関連疾患または障害を処置することを含む方法。

【請求項 2】

対象における ANGPTL3 発現が投与後に少なくとも 20%、少なくとも 40% または少なくとも 70% 低減される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

対象の血漿中の ANGPTL3 タンパク質の濃度が投与後に少なくとも 20%、少なくとも 40% または少なくとも 70% 低減される、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

低減が、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中の ANGPTL3 発現もしくは ANGPTL3 タンパク質の濃度；(b) 1 または複数の未処置対象における ANGPTL3 発現もしくは ANGPTL3 タンパク質の濃度；および／または (3) 健康な対象の ANGPTL3 発現もしくは ANGPTL3 タンパク質の濃度の基準レベルと比較した低減である、請求項 2～3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

対象の 1 つまたは複数の非高密度リポタンパク質 (non-HDL) 脂質の血漿レベルが、投与後に少なくとも 20%、少なくとも 40% または少なくとも 70% 低減される、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

1 つまたは複数の non-HDL 脂質が、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、またはこれらの組合せである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

non-HDL レベルの低減が、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中の non-HDL レベル；(b) 1 もしくは複数の未処置対象における non-HDL レベル；および／または (3) 健康な対象における基準 non-HDL レベルと比較した低減である、請求項 5～6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

対象の血漿中のアポリポタンパク質 B (ApoB) タンパク質の濃度が、投与後少なくとも 20%、少なくとも 40% または少なくとも 70% 低減される、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

低減が、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中の ApoB タンパク質の濃度；(b) 1 もしくは複数の未処置対象における ApoB タンパク質の濃度；および／または (3) 健康な対象の ApoB タンパク質の濃度の基準レベルと比較した低減である、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

ANGPTL3 タンパク質の濃度、1 つまたは複数の非高密度リポタンパク質 (non-HDL) 脂質のレベルおよび／または ApoB タンパク質の濃度の低減が、投与後 3 週間、4 週間、5 週間、1 カ月間、2 カ月間、3 カ月間、4 カ月間、5 カ月間、6 カ月間、7 カ月間、8 カ月間、9 カ月間、10 カ月間、11 カ月間、12 カ月間またはこれより長く、少なくとも 20%、少なくとも 40% または少なくとも 70% である、請求項 2～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

50

ANGPTL3タンパク質の濃度、1つまたは複数の非高密度リポタンパク質（non-HDL）脂質のレベルおよび／またはApoBタンパク質の濃度の少なくとも20%、少なくとも40%または少なくとも70%の低減が、投与後4週間、2カ月間、3カ月間、6カ月間、1年間、3年間、6年間、10年間またはこれより長い間にわたる、請求項2～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

必要に迫られている対象が、300mg/dLを超えるトリグリセリドレベル、160mg/dLを超える非高密度リポタンパク質（HDL）レベル、100mg/dLより高い低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベル、100mg/dLを超えるApoBレベル、またはこれらの組合せを有する、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項13】

投与前、投与中および／または投与後に対象においてANGPTL3、ApoB、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、LDL-C、HDLおよびnon-HDL脂質の1つまたは複数の血中レベルを測定することを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

処置の必要に迫られている対象を同定することを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

20

ANGPTL3関連疾患または障害が、代謝疾患、心血管疾患、脂質代謝疾患、またはこれらの組合せである、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

対象におけるANGPTL3関連疾患または障害の1つまたは複数の症状が、低減されるかまたは軽減される、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

ANGPTL3関連疾患または障害が、肥満、糖尿病、アテローム性動脈硬化、脂質異常症、冠動脈心疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、高脂肪酸血症、メタボリック症候群またはこれらの組合せである、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項18】

脂質異常症が、高脂血症であり、高脂血症が高コレステロール血症、高トリグリセリド血症または両方であってもよい、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

ANGPTL3関連疾患または障害が、家族性高コレステロール血症、家族性複合型高脂血症、家族性カイロミクロン血症症候群、多因子カイロミクロン血症症候群、Lp(a)上昇またはこれらの組合せである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

NAFLDが、肝臓脂肪症または脂肪性肝炎である、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

40

糖尿病が、2型糖尿病または脂質異常症を伴う2型糖尿病である、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

複数のナノ粒子を対象に投与することが、脂質異常症、心血管系リスク、心血管系事象に関連する死亡の可能性、またはこれらの組合せを低減する、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

RNAガイド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1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

50

RNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸が、RNAガイドエンドヌクレアーゼのmRNAである、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

Cas9エンドヌクレアーゼが、化膿性連鎖球菌Cas9、黄色ブドウ球菌Cas9、髄膜炎菌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またはこれらの変異体である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

gRNAが、単一ガイドRNA (sgRNA) である、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

gRNAが、ANGPTL3遺伝子のエクソン1を標的とする、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

gRNAが、配列番号3～9および配列番号20～26のいずれか1つのスペーサー配列を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

gRNAまたはgRNAをコードする核酸およびRNAガイドヌクレアーゼがナノ粒子にカプセル化され；ナノ粒子が脂質ナノ粒子であってよい、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

対象が霊長類であり、対象がヒトでもよい、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

投与前、投与後または両方で、対象において(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)、ガンマーグルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、ビリルビン、アルカリフォスファターゼ(Alk Phos)およびアルブミンの1つもしくは複数のレベル；(ii)プロトロンビン時間(PT)、ならびに／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1～30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

決定することが、投与後に対象において28日目までに1回、2回、3回または毎日(i)、(ii)および／または(iii)を決定することを含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

決定することが、投与後に少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間または少なくとも12カ月間対象において毎日、毎週または毎月(i)、(ii)および／または(iii)を決定することを含む、請求項31に記載の方法。

【請求項34】

複数のナノ粒子が、核酸(a)および(b)の約0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kgまたは3.0mg/kgの単一用量で対象に投与される、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

その必要に迫られている対象においてアンジオポエチン様3(ANGPTL3)関連疾患または障害を処置するための方法であって、(a)ANGPTL3遺伝子標的とするgRNA(ANGPTL3 gRNA)、および(b)Cas9 mRNAと複合体化した複数のナノ粒子を、核酸(a)および(b)の約0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kgまたは3.0mg/kgの単一用量で対象に投与し、それにより対象においてANGPTL3関連疾患または障害を処置することを含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

複数のナノ粒子が、核酸 (a) および (b) の 0.5 mg/kg 、 0.6 mg/kg 、 1 mg/kg 、 1.5 mg/kg 、 2.0 mg/kg 、 2.5 mg/kg または 3.0 mg/kg の用量かまたは約この用量での単回投与で対象に投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

対象が、複数のナノ粒子を 2 回以上投与され、2 回以上の投与の内の各 2 回が約 2 週間から約 4 週間離れていてよい、または 2 回以上の投与の内の各 2 回が少なくとも約 1 年間、約 2 年間または約 5 年間離れていてもよい、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 39】

対象が追加的処置を投与され、追加的処置が副腎皮質ステロイド、抗 H1 抗ヒスタミン、抗 H2 抗ヒスタミンまたはこれらの任意の組合せの投与を含む、請求項 1～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

追加的処置が、複数のナノ粒子の対象への投与の 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 週間またはこれよりも前に対象に投与される、請求項 39 に記載の方法。

20

【請求項 41】

追加的処置および複数のナノ粒子が同時に投与される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

gRNA が、配列番号 3、配列番号 20 または配列番号 12 のスペーサー配列を含む、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

gRNA が配列番号 10 または配列番号 13 の配列を含む、請求項 1～42 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 44】

単一用量の複数のナノ粒子が、(a) 約 1.5 mg/mL の ANGPTL3 gRNA、および (b) 約 0.5 mg/mL の Cas9 mRNA と複合体化され；単一用量の複数のナノ粒子が約 58.2 mg/mL であってもよい、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

(a) ANGPTL3 遺伝子を標的とするガイド RNA (gRNA) (ANGPTL3 gRNA) および (b) Cas9 エンドヌクレアーゼをコードする mRNA と複合体化された複数のナノ粒子を含む組成物であって、gRNA が配列番号 3、配列番号 20 または配列番号 12 のスペーサー配列を含む、組成物。

40

【請求項 46】

gRNA が、配列番号 10 または配列番号 13 の配列を含む、請求項 45 に記載の組成物。

【請求項 47】

Cas9 エンドヌクレアーゼが、化膿性連鎖球菌 Cas9 エンドヌクレアーゼである、請求項 45～46 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 48】

複数のナノ粒子の濃度が約 58.2 mg/mL であり、(a) ANGPTL3 gRNA および (b) Cas9 mRNA の核酸の合計約 2 mg/mL と複合体化される、請求

50

項 45～47 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 49】

複数のナノ粒子の濃度が約 58.2 mg/mL であり、(a) 約 1.5 mg/mL の ANGPTL3 gRNA、および (b) 約 0.5 mg/mL の Cas9 mRNA と複合体化される、請求項 45～47 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

本出願は、2022年3月1日出願の米国仮特許出願第63/315,372号、2022年4月18日出願の米国仮特許出願第63/332,234号、2022年6月16日出願の米国仮特許出願第63/352,747号および2022年10月21日出願の米国仮特許出願第63/380,557号に基づく優先権を主張する。これらの出願の内容全体は、それら全体が参照により明確に本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

配列表の参照

本出願は、電子書式での配列表と共に出願される。配列表は、2023年2月25日に作成された、サイズ375キロバイトである表題80EM-341711-WO__Seq Listingのファイルとして提出される。配列表の電子書式での情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0003】

分野

本開示は、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一般に関する。

【0004】

関連技術分野の記載

アンジオポエチン様3 (ANGPTL3) は、脂質代謝を制御し、主に肝臓において発現される分泌因子のアンジオポエチン様ファミリーのメンバーである。ANGPTL3は、トリグリセリドの加水分解を触媒するリポタンパク質リパーゼ (LPL) および高密度リポタンパク質 (HDL) リン脂質を加水分解する内皮リパーゼ (EL) の触媒活性を二重に阻害する。ANGPTL3は、脂質代謝障害 (例えば、高脂血症) を含む種々の状態と関連する。

30

【0005】

RNAガイドを使用するDNAの標的化、CRISPR (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート) - Cas (CRISPR関連) システムのDNA標的化原理は広範に使用されている。CRISPR-Casシステムは、複数のCasタンパク質の複合体を利用するクラス1システム (I、IIIおよびIV型CRISPR-Casシステムなど)、および単一のCasタンパク質を利用するクラス2システム (II、VおよびVI型CRISPR-Casシステムなど)、の2つのクラスに分類できる。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、プログラム可能なDNA標的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変異体を必要とする。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ANGPTL3関連疾患および障害を処置するための安全で有効な治療を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

50

概要

本明細書に開示されるものは、ANGPTL3 関連疾患または障害を処置するための方法、組成物およびキットを含む。一部の実施形態では、ANGPTL3 関連疾患または障害を処置する方法は、(a) ANGPTL3 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 ガイドエンドヌクレアーゼ (RNA-guided endonuclease) 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 (例えば、霊長類対象) に投与し、それにより対象において ANGPTL3 関連疾患または障害を処置することを含む。一部の実施形態では、対象は、複数のナノ粒子を 2 回以上投与される。一部の実施形態では、2 回以上の投与の内の各 2 回は、約 1 年間、約 2 年間または約 5 年間離れている。一部の実施形態では、2 回以上の投与の内の各 2 回は、約 2 週間から約 4 週間離れている。一部の実施形態では、複数のナノ粒子は、投与あたり、0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3mg/kg、3.5mg/kg、4mg/kg、4.5mg/kg もしくは 5mg/kg またはこれらの値の任意の 2 つの間の数字もしくは範囲を含む、約 0.01~5mg/kg [合計核酸 (例えば、ANGPTL3 gRNA と Cas9 mRNA との合計) によって決定される] の用量で対象に投与される。一部の実施形態では、複数のナノ粒子は、0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg または 3.0mg/kg (ANGPTL3 gRNA と SpCas9 mRNA との合計によって決定される) の用量かまたは約この用量で対象に投与される。

【0008】

対象における ANGPTL3 発現 (例えば、ANGPTL3 遺伝子発現または NGPTL3 タンパク質発現) は、投与後に例えば、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% または少なくとも 70% 低減され得る。対象における (例えば、対象の血中または血漿中) ANGPTL3 タンパク質の濃度は、投与後に例えば、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% または少なくとも 70% 低減され得る。低減は、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中の ANGPTL3 発現もしくは ANGPTL3 タンパク質の濃度; (b) 1 または複数の未処置対象における ANGPTL3 発現もしくは ANGPTL3 タンパク質の濃度; および/または (3) 健康な対象の ANGPTL3 発現もしくは ANGPTL3 タンパク質の濃度の基準レベルと比較した低減であり得る。

【0009】

対象の非高密度リポタンパク質 (non-HDL) 脂質の 1 つまたは複数のレベル (例えば、血漿レベル) 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% または少なくとも 70% 低減され得る。1 つまたは複数の non-HDL 脂質は、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、またはこれらの組合せであり得る。一部の実施形態では、non-HDL レベルの低減は、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中の non-HDL レベル; (b) 1 または複数の未処置対象における non-HDL レベル; および/または (3) 健康な対象での基準 non-HDL レベルと比較した低減である。

【0010】

一部の実施形態では、対象の血漿中のアポリポタンパク質 B (ApoB) タンパク質の

濃度は、投与後に少なくとも20%、少なくとも40%または少なくとも70%低減される。一部の実施形態では、低減は、(a)複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中のApoBタンパク質の濃度；(b)1もしくは複数の未処置対象におけるApoBタンパク質の濃度；および／または(3)健康な対象のApoBタンパク質の濃度の基準レベルと比較した低減である。

【0011】

一部の実施形態では、ANGPTL3タンパク質の濃度、1つまたは複数の非高密度リポタンパク質(non-HDL)脂質のレベルおよび／またはApoBタンパク質の濃度の低減は、投与後3週間、4週間、5週間、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間またはこれより長く、少なくとも20%、少なくとも40%または少なくとも70%である。一部の実施形態では、ANGPTL3タンパク質の濃度、1つまたは複数の非高密度リポタンパク質(non-HDL)脂質のレベルおよび／またはApoBタンパク質の濃度の少なくとも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70%、少なくとも80%またはこれらの値の任意の2つの間の数字もしくは範囲の低減は、投与後3週間、4週間、5週間、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、18カ月間、2年間、3年間、4年間、5年間、6年間、7年間、8年間、9年間、10年間、12年間、15年間、20年間またはこれより長い間にわたる。

【0012】

一部の実施形態では、必要に迫られている対象は、150mg/dLを超えるトリグリセリドレベルを有する。一部の実施形態では、必要に迫られている対象は、300mg/dLを超えるトリグリセリドレベル、160mg/dLを超える非高密度リポタンパク質(HDL)レベル、100mg/dLより高い低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-C)レベル、100mg/dLを超えるApoBレベル、またはこれらの組合せを有する。方法は、投与前、投与中および／または投与後に対象においてANGPTL3、ApoB、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質(VLDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、LDL-C、HDLおよびnon-HDL脂質の1つまたは複数の血中レベルを測定することを含み得る。方法は、例えば、処置の必要に迫られている対象を同定することをさらに含み得る。

【0013】

一部の実施形態では、ANGPTL3関連疾患または障害は、代謝疾患、心血管疾患、脂質代謝疾患またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、対象におけるANGPTL3関連疾患または障害の1つまたは複数の症状は、低減されるかまたは軽減される。ANGPTL3関連疾患または障害の非限定的例として、肥満、糖尿病、アテローム性動脈硬化、脂質異常症、冠動脈心疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、高脂血症(hyperfatty acidemia)、メタボリック症候群およびこれらの組合せが挙げられる。脂質異常症は、高脂血症、例えば高コレステロール血症、高トリグリセリド血症または両方であり得る。一部の実施形態では、ANGPTL3関連疾患または障害は、家族性高コレステロール血症、家族性複合型高脂血症、家族性カイロミクロン血症症候群、多因子カイロミクロン血症症候群、Lp(a)上昇、またはこれらの組合せである。NAFLDは、肝臓脂肪症または脂肪性肝炎であり得る。糖尿病は、2型糖尿病または脂質異常症を伴う2型糖尿病であり得る。一部の実施形態では、対象に複数のナノ粒子を投与することは、脂質異常症、心血管系リスク、心血管系事象に関連する死亡の可能性、またはこれらの組合せを低減する。

【0014】

一部の実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸は、RNAガイドエンドヌクレアーゼのmRNAである。RNAガイドエンドヌクレアーゼは、例えば、Cas9エンドヌクレアーゼであり得る。Cas9エンドヌクレアーゼの非限定的例と

して、化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) Cas 9、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) Cas 9、髄膜炎菌 (*N. meningitides*) Cas 9、*S. サーマフィルス* (*S. thermophilus*) Cas 9、*S. サーマフィルス* 3 Cas 9、*T. デンティコラ* (*T. denticola*) Cas 9 およびこれらの変異体が挙げられる。

【0015】

gRNA は、例えば、単一ガイドRNA (sgRNA) であり得る。一部の実施形態では、gRNA は、ANGPTL3 遺伝子のエクソン1を標的とする。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号3～9および配列番号20～26のいずれか1つのスパーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNA または gRNA をコードする核酸およびRNA

10

【0016】

一部の実施形態では、方法は、対象において (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)、ガンマーグルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、ビリルビン、アルカリフォスファターゼ (Alk Phos) およびアルブミンの1つもしくは複数のレベル; (ii) プロトンポンプ時間 (PT)、ならびに/または (iii) 部分プロトンポンプ時間 (PTT) を決定することをさらに含む。決定することは、投与の前、投与の後、投与中またはこれらの任意の組合せで行われ得る。一部の実施形態では、決定することは、望ましい期間中に対象において1回、2回、3回、4回またはこれより多く (i)、(ii) および/または (iii) を決定することを含む。例えば、決定することは、投与後7日目、14日目、21日目、28日目、35日目、42日目、49日目、56日目、63日目までに1回または毎日 (i)、(ii) および/または (iii) を決定することを含む得る。一部の実施形態では、決定することは、投与後に少なくとも3カ月間、少なくとも6カ月間または少なくとも12カ月間、毎日、毎週または毎月対象において (i)、(ii) および/または (iii) を決定することを含む。一部の実施形態では、複数のナノ粒子は、核酸 (a) および (b) の約0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg または 3.0mg/kg

20

30

【0017】

本明細書の開示は、その必要に迫られている対象においてANGPTL3関連疾患または障害を処置するための方法であって、(a) ANGPTL3 遺伝子を標的とするgRNA (ANGPTL3 gRNA)、および (b) Cas 9 mRNA と複合体化した複数のナノ粒子を、核酸 (a) および (b) の約0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg または 3.0mg/kg の単一用量で対象に投与し、それにより対象においてANGPTL3関連疾患または障害を処置することを含む方法を含む。

【0018】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む。例えば、一部の実施形態では、複数のナノ粒子は、(a) ANGPTL3 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 ガイドエンドヌクレアーゼ (例えば、Cas 9) をコードする核酸のRNA 内容物を、0.5mg/kg、0.6mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg または 3.0mg/kg の用量かまたは約この用量の単回投与で対象に投与される。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号3、配列番号20または配列番号12のスパーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号10または配列番号13の配列を含む。一部の実施形態では、単一用量の複数のナノ粒子は、(a) 約1.5mg/mLのANGPTL3 gRNA、および (b) 約0.5m

40

50

g / m L の C a s 9 m R N A と複合体化される。一部の実施形態では、複数のナノ粒子の単一用量は約 58.2 mg / m L である。

【0019】

一部の実施形態では、対象は、追加的処置を投与される。一部の実施形態では、追加的処置は、副腎皮質ステロイド、抗 H 1 抗ヒスタミン、抗 H 2 抗ヒスタミンまたはこれらの任意の組合せの投与を含む。一部の実施形態では、追加的処置は、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 週間またはこれを超えた前または後に対象に投与される。一部の実施形態では、追加的処置および複数のナノ粒子は、同時に投与される。

10

【0020】

同様に本明細書の開示は、組成物を含む。一部の実施形態では、組成物は、(a) A N G P T L 3 遺伝子を標的とするガイド RNA (g RNA) (A N G P T L 3 g RNA)、および (b) C a s 9 エンドヌクレアーゼをコードする mRNA と複合体された複数のナノ粒子を含み、g RNA は配列番号 3、配列番号 20 または配列番号 12 のスパーサー配列を含む。一部の実施形態では、g RNA は配列番号 10 または配列番号 13 の配列を含む。一部の実施形態では、C a s 9 エンドヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌 C a s 9 エンドヌクレアーゼである。一部の実施形態では、複数のナノ粒子の濃度は約 58.2 mg / m L であり、(a) A N G P T L 3 g RNA および (b) C a s 9 mRNA の核酸の合計約 2 mg / m L と複合体化される。一部の実施形態では、複数のナノ粒子の濃度は約 58.2 mg / m L であり、(a) 約 1.5 mg / m L の A N G P T L 3 g RNA、および (b) 約 0.5 mg / m L の C a s 9 mRNA と複合体化される。

20

【0021】

一部の実施形態では C a s 9 mRNA は、配列番号 16 を含み得る。一部の実施形態では、C a s 9 mRNA の 2 つ以上のウラシル残基は、N 1 -メチルプソイドウリジンである。一部の実施形態では、C a s 9 mRNA は、配列番号 18 の配列を含む。一部の実施形態では、C a s 9 mRNA は、配列番号 19 の配列を含む。

【0022】

本明細書の開示は、その必要に迫られている対象において A N G P T L 3 関連疾患または障害を処置するための方法を含む。一部の実施形態では、方法は、(a) A N G P T L 3 遺伝子を標的とするガイド RNA (g RNA) (A N G P T L 3 g RNA) または g RNA をコードする核酸であって、A N G P T L 3 g RNA が配列番号 20 のスパーサー配列を含む核酸、および (b) 配列番号 16 の配列を含む C a s 9 mRNA と複合体化された複数のナノ粒子を対象に投与し、それにより対象において A N G P T L 3 関連疾患または障害を処置することを含む。本明細書の開示は、A N G P T L 3 関連疾患または障害の処置における使用のための組成物を提供する。一部の実施形態では、組成物は、(a) A N G P T L 3 遺伝子を標的とするガイド RNA (g RNA) (A N G P T L 3 g RNA) または g RNA をコードする核酸であって、A N G P T L 3 g RNA が配列番号 20 のスパーサー配列を含む核酸、および (b) 配列番号 16 の配列を含む C a s 9 mRNA と複合体化された複数のナノ粒子を含む。一部の実施形態では、A N G P T L 3 g RNA は、配列番号 12 のスペース配列 (space sequence) を含む。一部の実施形態では、A N G P T L 3 g RNA は、配列番号 13 の配列を含む単一ガイド RNA (sg RNA) である。C a s 9 mRNA の 2 つ以上のウラシル残基は、修飾ウラシル残基、例えば、N 1 -メチルプソイドウリジンであり得る。一部の実施形態では、C a s 9 mRNA は、配列番号 18 の配列を含む。一部の実施形態では、方法は、(a) および (b) の合計の核酸の約 0.1 mg / k g、0.3 mg / k g、0.6 mg / k g または 1 mg / k g の単一用量で複数のナノ粒子を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、対象における A N G P T L 3 の発現は、投与後に少なくとも 20 % 低減される、対象の血漿中の A N G P T L 3 タンパク質の濃度は、投与後に少なくとも 20 % 低

30

40

50

減される、または両方である。一部の実施形態では、低減は、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中のANGPTL3発現もしくはANGPTL3タンパク質の濃度；(b) 1または複数の未処置対象におけるANGPTL3発現もしくはANGPTL3タンパク質の濃度；および／または(3) 健康な対象のANGPTL3発現もしくはANGPTL3タンパク質の濃度の基準レベルと比較した低減である。一部の実施形態では、対象の血漿中のANGPTL3タンパク質の濃度における低減は、投与の1カ月後に少なくとも70%である。一部の実施形態では、対象の1つまたは複数の非高密度リポタンパク質(non-HDL)脂質の血漿レベルは、投与後に少なくとも20%低減される。一部の実施形態では、1つまたは複数のnon-HDL脂質は、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質(VLDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、non-HDLレベルの低減は、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中のnon-HDLレベル；(b) 1または複数の未処置対象におけるnon-HDLレベル；および／または(3) 健康な対象での基準non-HDLレベルと比較した低減である。一部の実施形態では、対象における血漿トリグリセリドレベルの低減は、投与後1カ月、2カ月、3カ月、6カ月またはそれより長く少なくとも30%である。一部の実施形態では、対象の血漿中のアポリポタンパク質B(ApoB)タンパク質の濃度は、投与後に少なくとも20%低減される。一部の実施形態では、低減は、(a) 複数のナノ粒子を投与される前の対象の血漿中のApoBタンパク質の濃度；(b) 1または複数の未処置対象におけるApoBタンパク質の濃度；および／または(3) 健康な対象でのApoBタンパク質の濃度の基準レベルと比較した低減である。本明細書に記載される方法または組成物によって生じる低減は、例えば、少なくとも4週間、2カ月間、6カ月間、1年間、2年間、5年間、10年間またはこれを超え得る。一部の実施形態では、必要に迫られている対象は、300mg/dLを超えるトリグリセリドレベル、160mg/dLを超える非高密度リポタンパク質(HDL)レベル、100mg/dLより高い低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-C)レベル、100mg/dLを超えるApoBレベル、またはこれらの組合せを有する。ANGPTL3関連疾患または障害は、例えば、代謝疾患、心血管疾患、脂質代謝疾患またはこれらの組合せであり得る。一部の実施形態では、ANGPTL3関連疾患または障害は、肥満、糖尿病、アテローム性動脈硬化、脂質異常症、冠動脈心疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、高脂肪酸血症、メタボリック症候群、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、方法は、対象への複数のナノ粒子の単回投与を含む。一部の実施形態では、単一用量の複数のナノ粒子は、2.0mg/mL合計RNAの濃度で(a) ANGPTL3 gRNAおよび(b) Cas9 mRNAと複合体化される。一部の実施形態では、合計RNAは、(a) 約1.5mg/mLのANGPTL3 gRNA、および(b) 約0.5mg/mLのCas9 mRNAを含む。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、1つまたは複数の中性脂質、荷電脂質、イオン化可能な脂質、ステロイドおよびポリマーコンジュゲートされた脂質を含む。一部の実施形態では、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。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、非限定的で例示的な非ヒト霊長類(NHP)研究設計を示す。

【図2】図2は、群1および群3 NHPにおけるベースラインからの血漿ANGPTL3タンパク質の百分率変化を示すグラフである。

【図3A】図3A～図3Bは、トリグリセリドレベルの測定値を示す。図3Aは、処置前後の群1におけるNHPの血漿トリグリセリドレベルを示すグラフである。図3Bは、群1におけるNHPのベースラインからの血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。

【図3B】同上。

【図4A】図4A～図4Bは、血漿トリグリセリドレベルに関する非限定的で例示的なデータを示す。図4Aは、処置前後の群3におけるNHPの血漿トリグリセリドレベルを示す

10

20

30

40

50

すグラフである。図 4 B は、群 3 における N H P のベースラインからの血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。

【図 4 B】同上。

【図 5 A】図 5 A ～図 5 D は、トリグリセリドレベルに関する非限定的で例示的なデータを示す。図 5 A ～図 5 B は、群 1 (図 5 A) および群 3 (図 5 B) における N H P の血漿トリグリセリドレベルの最大百分率変化を示す 2 つのグラフである。図 5 C ～図 5 D は、群 1 (図 5 C) および群 3 (図 5 D) における 3 6 日目でのベースラインからの血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。

【図 5 B】同上。

【図 5 C】同上。

【図 5 D】同上。

【図 6 A】図 6 A ～図 6 D は、さまざまな器官組織における A N G P T L 3 遺伝子編集効率を示すグラフである。

【図 6 B】同上。

【図 6 C】同上。

【図 6 D】同上。

【図 7】図 7 は、群 1 および群 3 N H P における肝生検での A N G P T L 3 遺伝子編集の百分率を示すグラフである。

【図 8 A】図 8 A ～図 8 E は、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) (図 8 A)、アルカリフォスファターゼ (A L P) (図 8 B)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) (図 8 C)、血中アルブミン (A L B) (図 8 D) およびビリルビン (T B I L) (図 8 E) の肝機能検査を示すグラフである。

【図 8 B】同上。

【図 8 C】同上。

【図 8 D】同上。

【図 8 E】同上。

【図 9】図 9 は、非限定的で例示的な N H P 研究設計を示す。

【図 10 A】図 10 A ～図 10 D は、0.5 mg / k g (図 10 A)、1.5 mg / k g (図 10 B) および 3.0 mg / k g C T X 3 1 0 製剤 (図 10 C) を用いて処置された N H P のさまざまな器官組織における A N G P T L 3 遺伝子編集の百分率を示すグラフである。図 10 D は、0.5 mg / k g、1.5 mg / k g および 3.0 mg / k g C T X 3 1 0 製剤を用いて処置された N H P のさまざまな器官組織における A N G P T L 3 遺伝子編集の投与約 3 カ月後の百分率を示す。

【図 10 B】同上。

【図 10 C】同上。

【図 10 D】同上。

【図 11】図 11 は、0.5 mg / k g、1.5 mg / k g および 3.0 mg / k g C T X 3 1 0 製剤を用いて処置された N H P の肝細胞における A N G P T L 3 遺伝子編集の百分率を示すグラフである。

【図 12 A】図 12 A ～図 12 E は、血漿 A N G P T L 3 レベルに関する例示的なデータを示す。図 12 A は、3 つの異なる用量の C T X 3 1 0 製剤 (0.5、1.5 および 3.0 mg / k g) を用いて処置されたカニクイザルの血漿 A N G P T L 3 タンパク質レベルを対照群と比較して示すグラフである。図 12 B は、3 つの異なる用量の C T X 3 1 0 製剤 (0.5、1.5 および 3.0 mg / k g) を用いて処置されたカニクイザルの血漿 A N G P T L 3 タンパク質レベルのベースラインに対する百分率変化を対照群と比較して示すグラフである。図 12 C は、C T X 3 1 0 処置後 3 7 日目のカニクイザルの血漿 A N G P T L 3 タンパク質のベースラインからの百分率変化を示すグラフである。図 12 D は、C T X 3 1 0 処置後の血清 A N G P T L 3 タンパク質の百分率変化を示すグラフである。図 12 E は、C T X 3 1 0 処置約 3 カ月後の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の百分率変化を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 1 2 B】 同上。

【図 1 2 C】 同上。

【図 1 2 D】 同上。

【図 1 2 E】 同上。

【図 1 3 A】 図 1 3 A～図 1 3 I は、トリグリセリドレベルに関する例示的データを示す。図 1 3 A～図 1 3 C は、3 つの異なる用量の C T X 3 1 0 製剤：0.5 mg/kg (図 1 3 A)、1.5 mg/kg (図 1 3 B) および 3.0 mg/kg (図 1 3 C) を用いた処置後のカニクイザルのベースラインに標準化した血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。図 1 3 D は、C T X 3 1 0 処置後 37 日目のカニクイザルの血漿トリグリセリドレベルのベースラインからの百分率変化を示すグラフである。図 1 3 E は、C T X 3 1 0 処置後 1 カ月での血清トリグリセリドレベルのベースラインからの百分率変化を示すグラフである。図 1 3 F～図 1 3 H は、3 つの異なる用量の C T X 3 1 0 製剤：0.5 mg/kg (図 1 3 F)、1.5 mg/kg (図 1 3 G) および 3.0 mg/kg (図 1 3 H) を用いたトリグリセリドレベルにおける変化を mg/dL として示す。図 1 3 I は、C T X 3 1 0 処置約 3 カ月後のカニクイザルの血漿トリグリセリドレベルのベースラインからの百分率変化を示すグラフである。

10

【図 1 3 B】 同上。

【図 1 3 C】 同上。

【図 1 3 D】 同上。

【図 1 3 E】 同上。

20

【図 1 3 F】 同上。

【図 1 3 G】 同上。

【図 1 3 H】 同上。

【図 1 3 I】 同上。

【図 1 4 A】 図 1 4 A～図 1 4 B は、脂質レベルと遺伝子編集との間の相関に関するデータを示す。図 1 4 A は、肝臓におけるトリグリセリド低減と A N G P T L 3 遺伝子編集百分率との間の相関を示すプロットである。図 1 4 B は、肝臓における A N G P T L 3 タンパク質低減と A N G P T L 3 遺伝子編集百分率との間の相関を示すプロットである。

【図 1 4 B】 同上。

【図 1 5 A】 図 1 5 A～図 1 5 C は、マウス A N G P T L 3 遺伝子を標的とする g R N A を含む 2 つの例示的な脂質ナノ粒子 (R I V - 0 0 0 0 0 5 および R I V - 0 0 0 0 0 6) を用いて処置された野生型 (W T)、L D L R⁺/ - マウス (H e t) および L D L R⁻/ - マウス (H o m) の肝臓における遺伝子編集効率 (図 1 5 A)、A N G P T L 3 タンパク質レベル (図 1 5 B) およびトリグリセリドレベル (図 1 5 C) を示すグラフである。n s : 有意でない

30

【図 1 5 B】 同上。

【図 1 5 C】 同上。

【図 1 6 A】 図 1 6 A～図 1 6 H は、L D L R 経路に関する例示的データを示す。図 1 6 A～図 1 6 D に示されるのは、マウス A N G P T L 3 遺伝子を標的とする g R N A を含む 3 つの例示的な脂質ナノ粒子 (R I V - 0 0 0 0 0 4、R I V - 0 0 0 0 0 5 および R I V - 0 0 0 0 0 6) を用いて処置された野生型 (W T)、L D L R⁺/ - マウス (H e t) および L D L R⁻/ - マウス (H o m) の、肝臓での遺伝子編集効率 (図 1 6 A)、A N G P T L 3 タンパク質レベル (図 1 6 B)、トリグリセリドレベル (図 1 6 C) および L D L レベル (図 1 6 D) を示すグラフである。図 1 6 E～図 1 6 H は、R I V - 0 0 0 0 0 5 の投与 1 カ月後の L D L R 突然変異体マウスからのデータを示す。図 1 6 E は肝臓での編集を示し、図 1 6 F は A N G P T L 3 タンパク質レベルの低減を示し、図 1 6 G は未処置対照マウスと比較した R I V - 0 0 0 0 0 5 処置後のオス群およびメス群の両方における血漿 T G レベルを示す。図 1 6 H は、対照メスマウスと比較して R I V - 0 0 0 0 0 5 を投与されたメスマウスでは L D L における中程度の減少が観察されたが、R I V - 0 0 0 0 0 5 を投薬されたオスマウスでは同様の効果が見られなかったことを示す。

40

50

【図 1 6 B】 同上。

【図 1 6 C】 同上。

【図 1 6 D】 同上。

【図 1 6 E】 同上。

【図 1 6 F】 同上。

【図 1 6 G】 同上。

【図 1 6 H】 同上。

【図 1 7】 図 1 7 は、本明細書に記載される 1 つまたは複数の A N G P T L 3 遺伝子編集ナノ粒子（例えば、C T X 3 1 0）についての第 1 相安全性および認容性臨床研究のための非限定的で例示的な設計、および第 2 相臨床研究に進むために第 1 相研究の結果に基づいてどの様に決定が行われ得るかを示す。

10

【図 1 8】 図 1 8 は、本明細書に記載される 1 つまたは複数の A N G P T L 3 遺伝子編集ナノ粒子（例えば、C T X 3 1 0）についての第 1 相安全性および認容性臨床研究のための非限定的で例示的な設計、および第 2 相臨床研究に進むために第 1 相研究の結果に基づいてどの様に決定が行われ得るかを示す。

【図 1 9】 図 1 9 は、用量漸増結果（例えば、処置後 6 カ月）に基づく非限定的で例示的な第 2 相臨床研究患者集団を示す。

【図 2 0 A】 図 2 0 A ～ 図 2 0 B は、非優良試験所基準（G L P）毒性研究に関する例示的なデータを示す。図 2 0 A に示されるのは、示される投薬量で処置された動物における投与後約 3 カ月での A S T レベルである。図 2 0 B に示されるのは、示される投薬量で処置された動物における投与後約 3 カ月でのビリルビンレベルである。

20

【図 2 0 B】 同上。

【図 2 1 A】 図 2 1 A ～ 図 2 1 B は、処置された動物における A S T（図 2 1 A）およびビリルビン（図 2 1 B）レベルを示す優良試験所基準（G L P）毒性研究に関する例示的なデータを示す。投与前後約 1 0 日間のデータが示される。

【図 2 1 B】 同上。

【図 2 2 A】 図 2 2 A ～ 図 2 2 B は、インビボ（i n v i v o）（図 2 2 A）およびインビトロ（i n v i t r o）（図 2 2 B）研究における編集についての E C 9 0 値を示す。

【図 2 2 B】 同上。

30

【図 2 3】 図 2 3 は、例示的な臨床試験研究設計を示す。

【図 2 4】 図 2 4 は、前処置を行った、および行わなかった A N G P T L 3 血漿タンパク質（n g / m L）の低減を示す非限定的で例示的なデータを示す。群あたり N = 動物 4 匹。示されるのは、平均および S D である。

【図 2 5】 図 2 5 は、図 2 4 に示されるのと同じ実験からの結果を前処置を行った、および行わなかった A N G P T L 3 血漿タンパク質の低減のパーセント変化として示す。群あたり N = 動物 4 匹。示されるのは、平均および S D である。

【図 2 6】 図 2 6 は、投与 2 カ月後からのデータを示す。示されるのは、前処置を行った、および行わなかった A N G P T L 3 血漿タンパク質の低減である。群あたり N = 動物 4 匹。示されるのは、平均および S D である。

40

【図 2 7】 図 2 7 は、投与 2 カ月後からのデータを示す。示されるのは、前処置を行った、および行わなかった A N G P T L 3 血漿タンパク質のパーセント変化としての低減である。群あたり N = 動物 4 匹。示されるのは、平均および S D である。

【図 2 8】 図 2 8 は、第 I 相臨床試験設計の例示的な模式図を示す。

【図 2 9】 図 2 9 は、非ヒト霊長類（N H P）研究設計における C T X 3 1 0 優良試験所基準（G L P）毒性の非限定的で例示的な模式図を示す。

【図 3 0】 図 3 0 は、C T X 3 1 0 の投与後の A N G P T L 3 総血漿タンパク質の用量依存的低減についての非限定的で例示的なデータを示す。データは n g / m L で示される。0 から 1 カ月：群あたり N H P 8 ～ 1 0 匹、1 から 6 カ月：群あたり N H P 5 匹；平均 S D が示される。

50

【図 3 1】図 3 1 は、図 3 0 からのデータをパーセント変化として示す。0 から 1 カ月：群あたり N H P 8 ～ 1 0 匹、1 から 6 カ月：群あたり N H P 5 匹；平均 S D が示される。

【図 3 2】図 3 2 は、図 3 1 の 1 カ月時点を示す。群あたり N H P 8 ～ 1 0 匹；平均 S D が示される。

【図 3 3】図 3 3 は、図 3 1 の 6 カ月時点を示す。群あたり N H P 5 匹；平均 S D が示される。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 4】

詳細な記載

以下の詳細な記載では、その一部を形成する添付の図面を参照する。図面では、そうでないと文脈が示さない限り、同様の記号は典型的には同様の構成成分を示す。詳細な記載、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、限定を意味しない。他の実施形態は利用可能であり、他の変化は、本明細書に示される主題の趣旨および範囲から逸脱することなく作成され得る。本明細書に一般に記載され、図面に例示される本開示の態様は、多種多様な異なる配置に整えられ、置換され、組み合わせられ、分離され、および設計されてよく、そのすべてが本明細書において明らかに企図され、本明細書の開示の一部を形成することは容易に理解される。

【0 0 2 5】

本明細書で参照されるすべての特許、公開された特許出願、他の刊行物ならびに G e n B a n k および他のデータベース由来の配列は、関連技術に関してそれら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 2 6】

アンジオポエチン様 3 (A N G P T L 3) タンパク質は、トリグリセリドおよびリン脂質のリポタンパク質リパーゼおよび内皮リパーゼ媒介加水分解に影響を与えることを介して血漿脂質レベルを制御する分泌型タンパク質である。ヒトでは、A N G P T L 3 は、高密度リポタンパク質 (H D L) コレステロールレベルならびに、低密度リポタンパク質 (L D L) コレステロール、トリグリセリドおよび超低密度リポタンパク質 (V L D L) コレステロールなどの n o n - H D L レベルの決定因子である。A N G P T L 3 は、脂質異常症、低ベータリポ蛋白血症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、高脂血症および冠動脈心疾患などの異常なリポタンパク質代謝が関与する疾患および障害と関連する。A N G P T L 3 は、種々の A N G P T L 3 関連疾患および障害の処置のための有望な治療標的である可能性がある。

【0 0 2 7】

本明細書の開示は、対象（例えば、霊長類）において A N G P T L 3 関連疾患または障害を処置するための方法、組成物およびキットを含む。一部の実施形態では、方法は、（a）A N G P T L 3 遺伝子を標的とするガイド RNA (g R N A) または g R N A をコードする核酸、および（b）RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸と複合体化された複数のナノ粒子を、その必要に迫られている霊長類対象に投与し、それにより霊長類対象において A N G P T L 3 関連疾患または障害を処置することを含む。

【0 0 2 8】

定義

本明細書において使用される場合、用語「約」は、示される値のプラスまたはマイナス 5 % を意味する。

【0 0 2 9】

本明細書において使用される場合、用語「RNA ガイドエンドヌクレアーゼ」は、特定の DNA 配列（例えば、標的 DNA 中）に標的化される複合体を形成するように RNA （例えば、g R N A ）に結合することができるポリペプチドを指す。RNA ガイドエンドヌクレアーゼの非限定的例は、C a s ポリペプチド（例えば、C a s エンドヌクレアーゼ、例えば、C a s 9 エンドヌクレアーゼ）である。一部の実施形態では、本明細書に記載さ

10

20

30

40

50

れるRNAガイドエンドヌクレアーゼは、それが結合する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内の標的配列に相補性であり、ハイブリダイズすることができる配列を含むことができ、それにより、標的DNA内の特定の位置への結合ポリペプチドの標的化を可能にする。

【0030】

本明細書において使用される場合、用語「ガイドRNA」または「gRNA」は、複合体を形成するようにRNAガイドエンドヌクレアーゼと結合でき、結合したRNAガイドエンドヌクレアーゼ（Casエンドヌクレアーゼなど）の活性を標的核酸内の特定の標的配列に方向付けられる部位特異的標的化RNAを指す。ガイドRNAは、1つまたは複数のRNA分子を含み得る。

10

【0031】

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、核酸分子内の塩基対合相互作用を指す。

【0032】

本明細書において使用される場合、用語「標的DNA」は、「標的部位」または「標的配列」を含むDNAを指す。用語「標的配列」は、ハイブリダイゼーションのための十分な条件が存在する条件で、gRNAのDNA標的化配列またはセグメント（本明細書において「スペーサー」とも称される）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して本明細書において使用される。例えば、標的DNA内の標的配列5'-GAGCATATC-3'は、RNA配列5'-GAUAUGCUC-3'によって標的化される（またはそれとハイブリダイズできる、またはそれに相補性である）。gRNAのDNA標的化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、DNA標的化配列またはセグメントにおけるプログラムを可能にするワトソン・クリック塩基対合規則に基づいてよい。gRNAのDNA標的化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。

20

【0033】

本明細書において使用される場合。用語「Casエンドヌクレアーゼ」または「Casヌクレアーゼ」は、CRISPR適応免疫系に関連するRNAガイドDNAエンドヌクレアーゼを指す。

【0034】

他に示さない限り「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ヌクレオチド鎖切断の触媒活性を保有する酵素を指して本明細書において互換的に用いられる。

30

【0035】

本明細書において使用される場合、用語、gRNAの「不変領域」は、RNAガイドエンドヌクレアーゼと会合するgRNAのヌクレオチド配列を指す。一部の実施形態では、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、二重鎖を形成するように互いにハイブリダイズする。一部の実施形態では、crRNAは5'から3'へ：スペ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」とも称される）を含み；tracrRNAは最小CRISPR反復配列（本明細書において「tracrRNAアンチリピート配列」とも称される）に相補性の最小tracrRNA配列および3'tracrRNA配列を含む。一部の実施形態では、gRNAの不変領域は、最小CRISPR反復配列であるcrRNAの一部およびtracrRNAを指す。

40

【0036】

本明細書において使用される場合、用語「ドナーテンプレート」は、外来性遺伝材料の標的化組込みを生じるようにゲノムに導入され得る〔例えば、相同組換え修復（homology directed repair）によって〕外来性遺伝材料を含有する核酸鎖を指す。一部の実施形態では、ドナーテンプレートは、DNA中の標的化位置に相同性の領域を有しない場合があり、標的部位での切断に続くNHEJ依存性末端結合によって

50

組み込まれ得る。ドナーテンプレートは、DNAまたはRNA、一本鎖または二本鎖であってよく、直鎖状または環状形態で細胞に導入され得る。

【0037】

用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において互換的に用いられ、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任意の長さのポリマー性形態を指す。ポリヌクレオチドは、1本鎖、2本鎖もしくは多鎖DNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド／トリプルヘリックスまたはプリンおよびピリミジン塩基もしくは他の天然で、化学的にもしくは生化学的に修飾された、非天然もしく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ってよい。

10

【0038】

本明細書において使用される場合、用語「結合すること」は、高分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の非コバレント相互作用を指す。非コバレント相互作用の状態にある間は、高分子は、「会合」または「相互作用」または「結合すること」していると述べられる（例えば、分子Xが分子Yと相互作用すると述べられる場合、それは、分子Xが分子Yに非コバレント様式で結合することを意味する）。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任意の2つの間の数字もしくは範囲の K_d 、またはこれら未満の K_d によって特徴付けられ得る。 K_d は、環境条件、例えば、pHおよび温度に依存する場合がある。「親和性」は結合の強度を指し、結合親和性の増加は K_d の低下と相関する。

20

【0039】

本明細書において使用される場合、用語「ハイブリダイズすること」または「ハイブリダイズ」は、2つの異なる分子内の実質的に相補性のまたは相補性の核酸配列の対合を指す。対合は、核酸配列がハイブリダイゼーション複合体を形成するように塩基対合を通じて実質的にまたは完全に相補性の配列と連結する任意の工程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」は、分子中の分子内構造（複数可）[例えば、二次構造（複数可）]を破壊するように分子を変性することを含み得る。一部の実施形態では、分子を変性することは、分子を含む溶液を分子の分子内構造を破壊するために十分な温度に加熱することを含む。一部の場では、分子を変性することは、分子を含む溶液のpHを分子の分子内構造を破壊するために十分なpHに調整することを含む。ハイブリダイゼーションの目的のために、配列の2つの核酸配列またはセグメントは、それらの個々の塩基の少なくとも80%が互いに相補性である場合に「実質的に相補性」である。一部の実施形態では、スプリントオリゴヌクレオチド配列（*splint oligonucleotide sequence*）は、相補性であるように設計される2つのポリヌクレオチド（例えば、RNA断片）のうちの1つと約50%を超えて同一ではない。各配列の相補性部分は、本明細書において「セグメント」と称されることがあり、セグメントは、それらが80%またはこれを超える同一性を有する場合、実質的に相補性である。

30

【0040】

用語「相補性」および「相補性の」は、核酸が、伝統的ワトソン・クリック塩基対合規則、すなわちアデニン（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、に基づいて別の核酸と水素結合（複数可）を形成できることを意味する。相補性は、パーフェクト（例えば、完全に相補性）またはパーフェクトではなく（例えば、部分的相補性）てもよい。パーフェクトなまたは完全な相補性は、一方の鎖のそれぞれおよびすべての核酸塩基が、別の逆平行核酸配列中の対応する塩基とワトソン・クリックの基準の塩基対合に従って水素結合を形成できることを示す。部分的相補性は、核酸配列の連続する残基の一部だけが、別の逆平行核酸配列中の同じ数の連続する残基とワトソン・クリック塩基対合を形成できることを示す。一部の実施形態では、相補性は、少なくとも70%、80%、90%、100%またはこれらの値の任意の2つの間の数字もしくは範

40

50

囲であり得る。一部の実施形態では、相補性はパーフェクト、すなわち100%である。例えば、相補性候補配列セグメントは、候補配列セグメントにパーフェクトに相補性であり、その配列は、ワトソン・クリック塩基対合規則を使用する候補配列セグメントから推論され得る。

【0041】

本明細書において使用される場合、用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、互換的であり、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホロアミデート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホロアミデート、架橋ホスホロアミデート、架橋メチレンホスホネート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエートまたはスルトンリンケージ、およびこのようなリンケージの組合せなどのホスホジエステルリンケージまたは修飾リンケージから構成される任意の核酸を指す。用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、5個の生物学的に存在する塩基（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明確に含む。

【0042】

本明細書において使用される場合、用語「トランスフェクション」または「感染」は、細胞を本明細書に記載されるリポソームまたはナノ粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に接触させることによってなどの、宿主細胞への核酸の導入を指す。

【0043】

本明細書において使用される場合、「処置」は患者によって示されるまたは患者が罹患しやすい疾患、障害もしくは生理学的状態への応答で行われる臨床的介入を指す。処置の目的として、これだけに限らないが、症状の軽減もしくは予防、疾患、障害もしくは状態の進行もしくは悪化を遅らせることもしくは止めること、および／または疾患、障害もしくは状態の軽快が挙げられる。「処置」は、治療処置および予防的もしくは予防に寄与する手段の一方または両方を指す。処置の必要に迫られている対象として、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罹患している者および疾患または障害または望ましくない生理学的状態が予防される者が挙げられる。

【0044】

本明細書において使用される場合、用語「有効量」または「薬学的有効量」または「治療有効量」は、有益なもしくは望ましい生物学的および／または臨床的結果をもたらすために十分な量を指す。

【0045】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的に許容される賦形剤」は、対象への目的の化合物（複数可）の投与の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好適な物質を指す。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できる。

【0046】

本明細書において使用される場合「対象」は、その診断、処置または治療が望ましい動物を指す。一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。本明細書において使用される場合、「哺乳動物」は、哺乳綱に属する個体を指し、これだけに限らないが、ヒト、飼育動物および家畜、動物園動物、スポーツ動物および愛玩動物が挙げられる。哺乳動物の非限定的例として、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；霊長類、例えばサル、チンパンジーおよび類人猿および特に、ヒトが挙げられる。一部の実施形態では、哺乳動物は霊長類である。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトではない。一部の態様では、対象は、ANGPTL3関連疾患または障害を有するかまたは有すると疑われる。

【0047】

本明細書で使用される場合、用語「血漿レベル」は分子の文脈では、分子の濃度または

10

20

30

40

50

量、例えば、所与の容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。

【0048】

ANGPTL3は、トリグリセリドおよびリン脂質のリポタンパク質リパーゼおよび内皮リパーゼ媒介加水分解に影響を与えることを介して血漿脂質レベルを制御する分泌型タンパク質である。ANGPTL3は、脂質異常症、低ベータリポ蛋白血症、高脂血症、高トリグリセリド血症および家族性高コレステロール血症などの異常なリポタンパク質代謝が関与する疾患および障害と関連する。長期間にわたって血中のANGPTL3タンパク質および脂質（例えば、コレステロール、HDL、LDL、トリグリセリドおよびnon-HDL）のレベルを安定に低減できる、またはANGPTL3タンパク質レベルを持続的に低下できる新規遺伝子治療についての必要性がある。本開示は、ANGPTL3遺伝子またはその変異体を直接化標的し、ANGPTL3遺伝子の発現、機能または活性を持続的に低減する非常に効率的な遺伝子編集法ならびに関連する組成物およびキットを提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法、組成物およびキットは、血漿ANGPTL3タンパク質レベルを少なくとも70%またはこれを超えて低減できる。一部の実施形態では、方法を実行した後の脂質レベル（例えば、トリグリセリド）は、40mg/dL以下に低減され得る。本明細書において使用されるgRNA配列は、オフターゲット効果の数および頻度も顕著に最小化でき、それにより遺伝毒性のリスクを低減する。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ANGPTL3関連疾患または障害を処置するために使用され得る。

【0049】

アンジオポエチン様タンパク質3（ANGPTL3）

本明細書で提供するものは、細胞においてANGPTL3遺伝子の発現、機能または活性を調節する（例えば、減少させる）ために細胞ゲノムにおいてANGPTL3遺伝子またはその変異体を編集するためのベクター、組成物、方法およびキットを含む。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、血液中のANGPTL3タンパク質、ApoBタンパク質ならびに脂質、例えば総コレステロール、トリグリセリド、LDL、HDL、および／または他のnon-HDLのレベルを持続的に低減することによって、ANGPTL3関連疾患および状態、例えば、脂質異常症、低ベータリポ蛋白血症、家族性高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、家族性複合型高脂血症、家族性カイロミクロン血症症候群および多因子カイロミクロン血症症候群を処置するために特に有用であり得る。

【0050】

ANGPTL3遺伝子は、ANGPTL3タンパク質、血管新生において機能する分泌タンパク質のファミリーのメンバーをコードする。主に肝臓において発現されるANGPTL3タンパク質は、特徴的なシグナルペプチド配列、N末端らせんドメイン（二量体のまたは三量体のコイルドコイル構造を形成すると予測される）およびC末端球状フィブリノーゲン相同性ドメインを含む。N末端コイルドコイル領域は、リポタンパク質リパーゼの触媒活性を可逆的に阻害することを介して血漿トリグリセリドレベルに影響を与える。フィブリノーゲン様ドメインは、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 受容体に結合し、血管新生に影響を与える。N末端ドメインとC末端ドメインとの間の短いリンカー領域は、フューリン切断部位として機能する。分泌において、ANGPTL3は、脂肪組織および筋肉を標的とし、前者において脂肪分解を活性化し、脂肪細胞からの脂肪遊離酸（fatty free acids）およびグリセリンの放出を増加させ、後者においてリポタンパク質リパーゼを阻害し、トリグリセリドリッチリポタンパク質を増加させる。

【0051】

ANGPTL3は、リポタンパク質リパーゼ（LPL）および内皮リパーゼ（EL）の二重阻害剤として作用し、血漿トリグリセリド、低密度リポタンパク質（LDL）コレステロールおよび高密度リポタンパク質（HDL）コレステロールの強力な調節因子と考えられている。実験的証拠から、ANGPTL3遺伝子に機能欠失型突然変異を有する個体が、突然変異を有しない個体と比較して、家族性複合型低脂血症を罹患し、非常に低いレ

10

20

30

40

50

ベルのアポリポタンパク質B、アポリポタンパク質A1およびこれらの関連リポタンパク質（例えば、超低密度リポタンパク質、LDLおよびHDL）によって特徴付けられることが観察されている。これらの対象は、心血管系事象から保護されており、したがって、ANGPTL3は、心血管系リスクを低減するための重要な薬理的標的である。

【0052】

ANGPTL3遺伝子（ANL3、ANG-5、FHBL2およびANGPT5としても周知）は、lp31.3の細胞遺伝学的位置を有し、ゲノム座標は第1染色体のフォワード鎖、位置62,597,520~62,606,313である。ANGPTL3のヌクレオチド配列は、NCBIウェブサイト、NCBI参照配列：NC_000001.11で見出すことができる。USP1はフォワード鎖上のANGPTL3の上流の遺伝子であり、ATG4Cはフォワード鎖上のANGPTL3の下流の遺伝子である。DOCK7はANGPTL3と反対のリバース鎖に位置する遺伝子である。ANGPTL3は、NCBI gene ID 27329、Uniprot ID Q9Y5C1 および Ensembl Gene ID ENSG00000132855を有する。ANGPTL3は、2個のSNP、9個のイントロンおよび12個のエクソンを有する。エクソン、イントロンおよびエクソンの開始／終止部位を含むANGPTL3遺伝子についての追加的な情報ならびにANGPTL3遺伝子の転写物についての情報は、その内容が本明細書に参照により組み込まれるWO2018154387に詳細に記載されている。

10

【0053】

遺伝子編集

本明細書で提供するものは、ANGPTL3遺伝子を編集し、それにより対象においてANGPTL3タンパク質の発現レベル（例えば、ANGPTL3タンパク質の血漿濃度）、ApoBタンパク質のレベル（例えば、ApoBタンパク質の血漿濃度）ならびに脂質レベル（例えば、またはトリグリセリド、LDL、HDLおよびnon-HDLなど）を低減するための方法、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、標的化細胞のゲノムなどのDNA配列にヌクレオチド（複数可）／核酸（複数可）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、標的化細胞のゲノム中の予め選択された部位（例えば、標的化遺伝子または標的化DNA配列中）での挿入、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（複数可）／核酸（複数可）の欠失、挿入または置換によって、内在性遺伝子の配列が編集される場合、影響を受ける配列を含む内在性遺伝子は、配列変更のためにノックアウトまたはノックダウンされる場合がある。したがって、標的化編集は、内在性遺伝子発現を破壊するために使用され得る。「標的化組込み」は、挿入部位での内在性配列の欠失を伴うまたは伴わない1つまたは複数の外来性配列の挿入に関与する工程を指す。外来性配列を含むドナーテンプレートが存在する場合、標的化組込みは標的化遺伝子編集から生じる場合がある。

20

30

【0054】

標的化編集は、ヌクレアーゼ非依存性アプローチを通じて、またはヌクレアーゼ依存性アプローチを通じてのいずれかで達成され得る。ヌクレアーゼ非依存性標的化編集アプローチでは、相同組換えは、宿主細胞の酵素機構を通じて内在性配列に導入される外来性ポリヌクレオチドに隣接する相同配列によってガイドされる。外来性ポリヌクレオチドは、内在性配列にヌクレオチドの欠失、挿入または置き換えを導入できる。

40

【0055】

代替的に、ヌクレアーゼ依存性アプローチは、特異的な低頻度切断ヌクレアーゼ（例えば、エンドヌクレアーゼ）による二本鎖切断（DSB）の特異的導入を通じて高頻度での標的化編集を達成できる。そのようなヌクレアーゼ依存性標的化編集は、DNA修復機構、例えば、DSBへの応答で生じる非同源性末端結合（NHEJ）も利用する。NHEJによるDNA修復は、少数の内在性ヌクレオチドの無作為挿入または欠失（インデル）をしばしば生じる。NHEJ媒介修復とは対照的に、修復は、相同組換え修復（HDR）によっても生じ得る。相同腕の対に隣接して外来性遺伝材料を含有するドナーテンプレート

50

が存在する場合、外来性遺伝材料は、HDRによってゲノムに導入され、外来性遺伝材料の標的化組込みが生じる。

【0056】

特異的で標的化された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として、これだけに限らないが、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ガイドCRISPR-Cas9ヌクレアーゼ（CRISPR/Cas9；クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート関連9）が挙げられる。追加的に、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）システムも、標的化組込みのために使用され得る。

10

【0057】

ZFNは、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン（ZFBD）に融合されたヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼであり、1つまたは複数のジンクフィンガーを通じて配列特異的様式で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を通じて安定化される、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として、これだけに限らないが、C2H2ジンクフィンガー、C3HジンクフィンガーおよびC4ジンクフィンガーが挙げられる。設計されたジンクフィンガードメインは、その設計／組成物が合理的な判断基準、例えば、置換規則および既存のZFP設計および結合データのデータベース保存情報中の処理情報に関するコンピューター処理されたアルゴリズムの適用、から主に生じる天然に存在しないドメインである。例えば、その内容はその全体が参照により組み込まれる米国特許第6,140,081号；第6,453,242号；および第6,534,261号；WO98/53058；WO98/53059；WO98/53060；WO02/016536およびWO03/016496を参照されたい。選択されたジンクフィンガードメインは、その産生が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な工程から主に生じる、天然で見出されないドメインである。ZFNは、米国特許第7,888,121号および第7,972,854号に詳細に記載されている。ZFNの最も認められた例は、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物である。

20

【0058】

TALENは、TALEエフェクターDNA結合ドメインに融合され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、TALEエフェクタータンパク質のDNAへの結合の原因となる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際に分泌される。これらのタンパク質は、植物細胞の核に進入し、それらの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、それらのトランス活性化ドメインを介してこれらの配列で遺伝子転写を活性化する。TALEエフェクターDNA結合ドメイン特異性は、リピート可変2残基（repeat variable di-residues）（RVD）と呼ばれる選択リピート位置での多型を含む、エフェクター可変数の不完全な34アミノ酸リピート、に依存する。TALENは、US2011/0145940にさらに詳細に記載されている。TALENの当技術分野において最も認められている例は、FokIヌクレアーゼのTALEエフェクターDNA結合ドメインへの融合ポリペプチドである。

30

40

【0059】

本明細書で提供する使用のために好適な標的化ヌクレアーゼの追加的例として、これだけに限らないが、個々にまたは組合せで使用されるかにかかわらず、Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1およびWb/SPBc/TP901-1が挙げられる。標的化ヌクレアーゼの他の非限定的例として、天然に存在するおよび組換えのヌクレアーゼ、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

50

エンドヌクレアーゼなどが挙げられる。

【0060】

C R I S P R - C a s 遺伝子編集システムおよびRNAガイドヌクレアーゼ

一部の実施形態では、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、A N G P T L 3 遺伝子を遺伝子的に編集するためにC R I S P R - C a s 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使用され得る。例えば、C R I S P R - C a s 9 システムは、原核生物に天然に存在する防御機構であり、遺伝子編集のために使用されるRNAガイドDNA-標的化プラットフォームとして別の目的で使われている。これは、DNAの切断を標的とするために、DNAヌクレアーゼC a s 9、および2つの非コードRNA s - c r i s p r RNA (c r RNA) およびトランス活性化RNA (t r a c r RNA) に依存する。c r RNAは、標的DNA中の典型的には20ヌクレオチド(n t) 配列でのワトソン・クリック塩基対合を通じてC R I S P R - C a s 9 複合体の配列認識および特異性を駆動する。標的配列にプロトスペーサー近接モチーフ(P A M) と称される特定の短いDNAモチーフ(配列N G Gを有する)が続く場合、c r RNA、単一ガイドRNA (s g RNA) の最初の20 n t への配列マッチを含有するDNA配列にだけC R I S P R - C a s 9 複合体は結合する。T r a c r RNAは、c r RNAの3'末端とハイブリダイズし、触媒的に活性なC R I S P R - C a s 9 複合体を形成するようにC a s 9 エンドヌクレアーゼが結合するRNA二重鎖構造を形成し、次いでそれは、標的DNAを切断できる。C R I S P R - C a s 9 複合体が標的部位でDNAに結合すると、C a s 9 酵素内の2つの独立したヌクレアーゼドメインは、P A M部位の上流のDNA鎖の1つをそれぞれ切断し、DNAの両鎖が塩基対で終結する(平滑末端)二本鎖鎖切断(D S B)をもたらす。特異的標的部位でのC R I S P R - C a s 9 複合体のDNAへの結合、および部位特異的D S Bの形成後の次の重要なステップは、D S Bの修復である。細胞は、D S Bを修復するために2つの主なDNA修復経路：非相同性末端結合(N H E J) および相同組換え修復(H D R)を使用する。一部の実施形態では、C R I S P R - C a s 9 遺伝子編集システムは、RNAガイドヌクレアーゼおよび1つまたは複数の標的遺伝子を標的とする1つまたは複数のガイドRNAを含む。

【0061】

本明細書に記載される場合、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、天然に存在する場合と天然に存在しない場合とがある。RNAガイドエンドヌクレアーゼの非限定的例として、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 6、C a s 7、C a s 8、C a s 9 (C s n 1 およびC s x 1 2としても周知)、C a s 1 0 0、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4 およびC p f 1 エンドヌクレアーゼならびにこれらの機能性誘導体が挙げられる。一部の場では、RNAガイドエンドヌクレアーゼはC a s 9 エンドヌクレアーゼである。C a s 9 エンドヌクレアーゼは、例えば、化膿性連鎖球菌(S p y C a s 9)、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス(S t a p h y l o c o c c u s l u g d u n e n s i s) (S l u C a s 9) または黄色ブドウ球菌(S a C a s 9) 由来であってよい。一部の実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼはC a s 9 の変異体であり、これだけに限らないが、低分子C a s 9、デッドC a s 9 (d C a s 9) およびC a s 9 ニッカーゼが挙げられる。一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、R u v CもしくはR u v C様ヌクレアーゼドメイン(例えば、C p f 1) および/またはH N HもしくはH N H様ヌクレアーゼドメイン(例えば、C a s 9)を含み得る。一部の実施形態では、C a s 9 エンドヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌C a s 9、黄色ブドウ球菌C a s 9、髄膜炎菌C a s 9、S. サーマフィルスC a s 9、S. サーマフィルス3 C a s 9、T. デンティコラC a s 9 またはこれらの変異体である。

【0062】

RNAガイドエンドヌクレアーゼは、低分子RNAガイドエンドヌクレアーゼであり得る。低分子RNAガイドエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載されるおよび当技術分野において周知のRNAガイドエンドヌクレアーゼのいずれかに由来するRNAガイドエンドヌクレアーゼの一部から操作されてよい。低分子RNAガイドエンドヌクレアーゼは、例えば、低分子Casエンドヌクレアーゼであり得る。一部の場合では、低分子RNAガイドエンドヌクレアーゼは、長さ約1,100アミノ酸より短い。

【0063】

RNAガイドエンドヌクレアーゼは、突然変異体RNAガイドエンドヌクレアーゼであり得る。例えば、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、天然に存在するRNAガイドエンドヌクレアーゼの突然変異体であり得る。突然変異体RNAガイドエンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ活性の変化（例えば、DNAへの結合親和性を実質的に減少させることなく変化したまたは抑制されたDNAエンドヌクレアーゼ活性）などの天然に存在するRNAガイドエンドヌクレアーゼと比較して、活性が変化した突然変異体RNAガイドエンドヌクレアーゼでもあり得る。そのような修飾は、メチル化、脱メチル化、アセチル化もしくは脱アセチル化、または当技術分野において周知のDNA結合および／もしくはDNA修飾タンパク質の任意の他の修飾によって、転写調節（例えば、活性化または抑制）、エピジェネティック修飾もしくはクロマチン修飾の目的のために突然変異体RNAガイドエンドヌクレアーゼの配列特異的DNA標的化を可能にできる。一部の実施形態では、突然変異体RNAガイド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。

【0064】

RNAガイドエンドヌクレアーゼは、標的DNAの相補鎖を切断するが標的DNAの非相補鎖を切断する能力が低減しているか、または標的DNAの非相補鎖を切断するが標的DNAの相補鎖を切断する能力が低減しているニックアーゼであり得る。一部の実施形態では、RNAガイド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減している。

【0065】

一部の実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸は、対象に投与される。一部の実施形態では、核酸は、インビトロ転写反応によって生成され得る。一部の実施形態では、インビトロ転写RNAを生成することは、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共に（ランオフ）RNAインビトロ転写を可能にする条件下で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。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼは、T7 RNAポリメラーゼである。

【0066】

RNAインビトロ転写において使用されヌクレオチド混合物は、下に定義される修飾ヌクレオチドを追加的に含有してよい。一部の実施形態では、RNAインビトロ転写反応のために使用されるヌクレオチド混合物（例えば、混合物中の各ヌクレオチドの画分）は、所与のRNA配列に最適化され得る（最適化NTPミックス）。そのような方法は、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工程によって得られたRNAは、一部の実施形態では、免疫刺激特性の低減によって特徴付けられる。

【0067】

一部の実施形態では、ヌクレオチド混合物は、（化学的）未修飾リボヌクレオシドトリホスフェート（NTP）GTP、ATP、CTPおよびUTPから構成される。一部の実施形態では、インビトロ転写は、少なくとも1つのcap類似物、例えば、cap1トリヌクレオチドcap類似物、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。一部の実施形態では、5'-cap構造は、cap0またはcap1また

10

20

30

40

50

はcap2構造を生成するキャッピング酵素（例えば、ワクチニアウイルスキャッピング酵素および／またはcap依存性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ピングを介して形成される。5'cap構造（cap0またはcap1）は、WO2016/193226に開示される方法および手段を使用して、固定されたキャッピング酵素および／またはcap依存性2'-O-メチルトランスフェラーゼを使用しても付加され得る。一部の実施形態では、少なくとも1つの（リボ）ヌクレオシドトリホスフェートの一部またはすべては、修飾ヌクレオシドトリホスフェートによって置き換えられる。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドトリホスフェートは、プソイドウリジン（ψ）、N1-メチルプソイドウリジン（m1 ψ）、5-メチルシトシンまたは5-メトキシウリジンを含む。一部の実施形態では、ヌクレオチド混合物中のウラシルヌクレオチドは、修飾RNAを得るためにプソイドウリジン（ψ）および／またはN1-メチルプソイドウリジン（m1 ψ）によって（部分的または完全のいずれかで）置き換えられる。一部の実施形態では、化学修飾ヌクレオチドはプソイドウリジン（ψ）である。一部の実施形態では、化学修飾ヌクレオチドはN1-メチルプソイドウリジン（m1 ψ）である。一部の実施形態では、ヌクレオチド混合物は、RNAへの組み込みのための少なくとも1つの修飾ヌクレオチドおよび／または少なくとも1つのヌクレオチド類似物もしくはヌクレオチド誘導体を含む。例えば、本明細書において定義される修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド類似物／修飾、例えば、骨格修飾、糖修飾または塩基修飾を含み得る。骨格修飾は、ヌクレオチドの骨格のリン酸が化学修飾されている修飾を含み得る。糖修飾は、ヌクレオチドの糖の化学修飾を含み得る。さらに、塩基修飾は、ヌクレオチドの塩基部分の化学修飾を含み得る。この文脈では、ヌクレオチド類似物または修飾は、転写および／または翻訳に適用可能であるヌクレオチド類似物を含み得る。一部の実施形態では、ヌクレオチド混合物は、少なくとも1つの（least one）修飾ヌクレオチドを含む、ならびに／または少なくとも1つのヌクレオチド類似物は、骨格修飾ヌクレオチド、糖修飾ヌクレオチドおよび／または塩基修飾ヌクレオチドもしくはこれらの組合せから選択される。

10

20

30

40

【0068】

ヌクレオチド混合物に含まれ、RNAに組み込まれる場合がある修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、糖部分で修飾される場合がある。例えば、2'ヒドロキシ基（OH）は、多数の異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基を用いて修飾または置き換えられる場合がある。「オキシ」-2'ヒドロキシ基修飾の例として、これだけに限らないが、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、アラルキル、ヘテロアリールもしくは糖）；ポリエチレングリコール（PEG）、-O（CH₂CH₂O）_nCH₂CH₂OR；2'ヒドロキシルが、例えば、メチレン架橋によって同じリボース糖の4'炭素に繋がれている「ロックド」核酸（LNA）；およびアミノ基（-O-アミノ、ここでアミノ基は、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル（heterocyclic）、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もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノであってよい）またはアミノアルコキシが挙げられる。「デオキシ」修飾として、水素、アミノ（例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノもしくはアミノ酸）が挙げられ；またはアミノ基は、リンカーを通じて糖に付着されてもよく、ここでリンカーは、C、NおよびO原子の1つまたは複数を含む。糖基は、リボースにおける対応する炭素のものとは反対の立体化学的配置を保有する1つまたは複数の炭素も含有してよい。したがって、修飾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。

【0069】

リン酸骨格は、ヌクレオチド混合物に含まれ、修飾インビトロ転写RNAに組み込まれ得る修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドにおいてさらに修飾され得る。骨格のリン酸基は、1つまたは複数の酸素原子をさまざまな置換基で置き換えることによって修飾され得る。さらに、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、本明細書に記載される修飾リン酸

50

を用いた未修飾リン酸部分の完全な置き換えも含み得る。修飾リン酸基の例として、これだけに限らないが、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート (phosphoramidates)、アルキルまたはアリールホスホネートおよびホスホトリエステルが挙げられる。ホスホロジチオエートは、両方の非連結酸素がイオウによって置き換えられている。リン酸リンカーは、連結酸素の窒素 (架橋ホスホロアミデート)、イオウ (架橋ホスホロチオエート) および炭素 (架橋メチレン-ホスホネート) を用いた置き換えによって修飾されてもよい。

【0070】

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修飾されてよい。RNA 10
において見出される核酸塩基の例として、これだけに限らないが、アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルが挙げられる。例えば、本明細書に記載されるヌクレオチドおよびヌクレオチドは、主溝面で化学的に修飾され得る。一部の実施形態では、主溝化学修飾として、アミノ基、チオール基、アルキル基またはハロ基が挙げられる。

【0071】

一部の実施形態では、ヌクレオチド類似物／修飾は、2-アミノ-6-クロロプリンリ
ボシド-5'-トリホスフェート、2-アミノプリン-リボシド-5'-トリホスフェート
； 2-アミノアデノシン-5'-トリホスフェート、2'-アミノ-2'-デオキシシチジ
ン-トリホスフェート、2-チオシチジン-5'-トリホスフェート、2-チオウリジン
-5'-トリホスフェート、2'-フルオロチミジン-5'-トリホスフェート、2'-O-20
メチル-イノシン-5'-トリホスフェート、4-チオウリジン-5'-トリホスフェート
、 5-アミノアシルシチジン-5'-トリホスフェート、5-アミノアシルウリジン-5'
-トリホスフェート、5-ブロモシチジン-5'-トリホスフェート、5-ブロモウリジ
ン-5'-トリホスフェート、5-ブロモ-2'-デオキシシチジン-5'-トリホスフェ
ート、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン-5'-トリホスフェート、5-ヨードシチジ
ン-5'-トリホスフェート、5-ヨード (Iodo) -2'-デオキシシチジン-5'-
トリホスフェート、5-ヨードウリジン-5'-トリホスフェート、5-ヨード-2'-デ
オキシウリジン-5'-トリホスフェート、5-メチルシチジン-5'-トリホスフェート
、 5-メチルウリジン-5'-トリホスフェート、5-プロピニル-2'-デオキシシチジ
ン-5'-トリホスフェート、5-プロピニル-2'-デオキシウリジン-5'-トリホス 30
フェート、6-アザシチジン-5'-トリホスフェート、6-アザウリジン-5'-トリホ
スフェート、6-クロロプリンリボシド-5'-トリホスフェート、7-デアザアデノシ
ン-5'-トリホスフェート、7-デアザグアノシン-5'-トリホスフェート、8-アザ
アデノシン-5'-トリホスフェート、8-アジダアデノシン-5'-トリホスフェート、
ベンズイミダゾール-リボシド-5'-トリホスフェート、N1-メチルアデノシン-5'
-トリホスフェート、N1-メチルグアノシン-5'-トリホスフェート、N6-メチル
アデノシン-5'-トリホスフェート、O6-メチルグアノシン-5'-トリホスフェート
、 プソイドウリジン-5'-トリホスフェート、ピューロマイシン-5'-トリホスフェ
ート、キサントシン-5'-トリホスフェートを含む。塩基修飾ヌクレオチドは、5-メチ
ルシチジン-5'-トリホスフェート、7-デアザグアノシン-5'-トリホスフェート、 40
5-ブロモシチジン-5'-トリホスフェートおよびプソイドウリジン-5'-トリホスフ
ェート、ピリジン-4-オンリボヌクレオチド、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-プソイドウリジン、2-チオ-プソイドウ
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-プソイドウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピ
ニル-プソイドウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-プソイド
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-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチ
ル-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、1-メチル-1-デ
アザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、ジヒ 50

ドロウリジン、ジヒドロブソイドウリジン、2-チオージヒドロウリジン、2-チオージ
 ヒドロブソイドウリジン、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-ブソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-ブソイドウリジン、5-ア
 ザ-シチジン、ブソイドイソシチジン、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-ブソイドイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-ブソイドイソシチジン、2-
 チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-ブソイドイソシチジン
 、4-チオ-1-メチル-ブソイドイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-
 ブソイドイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-ブソイドイソシチジン、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-ブソイドイソシチジンおよび4-メトキシ-1-メチル-ブソイドイソシ
 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-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチ
 オ-N6-(cis-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-チオホスフェート)-
 グアノシン、5'-O-(1-チオホスフェート)-ウリジン、5'-O-(1-チ
 オホスフェート)-ブソイドウリジン、6-アザ-シチジン、2-チオ-シチジン、アル
 ファ-チオ-シチジン、ブソイド-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-ブソイドウリジン、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(5-methy
 l-cytidine)、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、ブソイド-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-アデノシンまたは7-デアザ-アデノシンを
 含み得る。

【0072】

少なくとも1つの修飾ヌクレオチドおよび／または少なくとも1つのヌクレオチド類似
 物は、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、N
 6-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、ライシジン、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、キューオシン、エポキシキューオシン、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、プソイドウリジン、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。

10

【0073】

一部の実施形態では、化学修飾は、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、N1-エチルプソイドウリジン、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-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、4-チオ-プソイドウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、5-メトキシウリジンまたは2'-O-メチルウリジンを含む。

20

【0074】

一部の実施形態では、本明細書において定義されるとおりコード配列中のウラシルの100%は、化学修飾を有し得る。一部の実施形態では、化学修飾は、ウラシルの5'位置においてである。一部の実施形態では、RNAのコード配列(cds)中のウラシルの100%は、化学修飾、例えば、ウラシルの5'位置においてである化学修飾を有し得る。他の実施形態では、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%は化学修飾、例えば、前記ウラシルヌクレオチドの5'位置においてである化学修飾を有する。そのような修飾は、自然免疫系の刺激を低減できる(そのような修飾ヌクレオチドを含むRNAのインビボ投与後)。

30

【0075】

本明細書において使用される場合、用語「cds」または「コード配列」または「コード領域」は、当業者によって認識および理解され、ペプチドまたはタンパク質に翻訳され得るいくつかのヌクレオチドトリプレットの配列であり、例えば指し得る。RNAのcdsは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含んでよく、ここで前記少なくとも1つの修飾ヌクレオチドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン(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得る。

40

【0076】

本明細書において使用される場合、用語「修飾ヌクレオチド」または「化学修飾ヌクレオチド」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のすべての可能性がある天然および非天然化学修飾を指すことができる。

【0077】

種々の実施形態では、インビトロ転写反応物中のヌクレオチド混合物は、cap類似物を含む。したがって、一部の実施形態では、cap類似物はcap0、cap1、cap2、修飾cap0もしくは修飾cap1類似物または下に記載されるcap1類似物である。

50

【0078】

本明細書において使用される場合、用語「cap類似物」または「5' - cap構造」は、RNAの5'構造、特にRNA、例えばmRNAの5'末端に位置するグアニンヌクレオチドを指し得る。一部の実施形態では、5' - cap構造は、RNAに5' - 5' - トリホスフェートリンケージを介して繋がれる。一部の実施形態では、「5' - cap構造」または「cap類似物」は、「修飾ヌクレオチド」または「化学修飾ヌクレオチド」であるとは考えられない。好適であり得る5' - cap構造として、cap0（最初の核酸塩基のメチル化、例えば、m7GpppN）、cap1（m7GpppNの近接のヌクレオチドのリボースの追加的メチル化）、cap2（m7GpppNの下流の2番目のヌクレオチドのリボースの追加的メチル化）、cap3（m7GpppNの下流の3番目のヌクレオチドのリボースの追加的メチル化）、cap4（m7GpppNの下流の4番目ヌクレオチドのリボースの追加的メチル化）、ARCA（アンチリバースcap類似物）、modARCA（例えば、ホスホチオエート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-アジドグアノシンが挙げられる。

【0079】

5' - cap（cap0またはcap1）構造は、キャッピング酵素を使用して化学RNA合成において、またはcap類似物を使用してRNAインビトロ転写（同時転写でのキャッピング）において形成され得る。本明細書において使用される場合、用語「cap類似物」は、RNAの5'末端に組み込まれた場合に翻訳または局所化を促進する、および／またはRNAの分解を妨げる、cap機能を有するポリマー化可能ではないジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを指し得る。ポリマー化可能でない、cap類似物が5'トリホスフェートを有しないことから5'末端でだけ組み込まれ、それによりテンプレート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'方向には伸長され得ないことを意味する。cap類似物の例として、m7GpppG、m7GpppA、m7GpppC；非メチル化cap類似物（例えば、GpppG）；ジメチル化cap類似物（例えば、m2, 7GpppG）、トリメチル化cap類似物（例えば、m2, 2, 7GpppG）、ジメチル化対称性cap類似物（例えば、m7Gpppm7G）またはアンチリバースcap類似物（例えば、ARCA；m7, 2'OmeGpppG、m7, 2'dGpppG、m7, 3'OmeGpppG、m7, 3'dGpppGおよびこれらのテトラホスフェート誘導体）が挙げられる。さらなるcap類似物は、例えば、WO2008/016473、WO2008/157688、WO2009/149253、WO2011/015347およびWO2013/059475に以前記載された。この文脈におけるさらに好適なcap類似物は、例えば、cap類似物に関する開示が参照により本明細書に組み込まれるWO2017/066793、WO2017/066781、WO2017/066791、WO2017/066789、WO2017/053297、WO2017/066782、WO2018/075827およびWO2017/066797に記載されている。

【0080】

一部の実施形態では、cap1構造は、WO2017/053297、WO2017/066793、WO2017/066781、WO2017/066791、WO2017/066789、WO2017/066782、WO2018/075827およびWO2017/066797に開示されるトリヌクレオチドcap類似物を使用して生成される。例えば、WO2017/053297の請求項1〜5に開示された構造に由来する任意のcap類似物は、cap1構造を同時転写で生成するために好適に使用され得る。一部の実施形態では、WO2018/075827に記載された構造に由来する任意のcap類似物は、cap1構造を同時転写で生成するために好適に使用され得る。一部の実施形態では、cap1類似物は、cap1トリヌクレオチドcap類似物である。一部の実施形態では、インビトロ転写されたRNAのcap1構造は、トリヌクレオチドc

a p 類似物 m 7 G (5 ') p p p (5 ') (2 ' O M e A) p G または m 7 G (5 ') p p p (5 ') (2 ' O M e G) p G を使用する同時転写でのキャッピングを使用して形成される。一部の実施形態では、c a p 1 類似物は m 7 G (5 ') p p p (5 ') (2 ' O M e A) p G である。

【0081】

一部の実施形態では、RNA (例えば、mRNA) は、5' c a p 構造、例えば、c a p 1 構造を含む。一部の実施形態では、5' c a p 構造は、mRNA の安定性および／または発現を改善する。c a p 1 構造を含む mRNA (例えば、インビトロ転写によって産生された) は、翻訳効率の増加および自然免疫系の刺激の低減を含むいくつかの有利な特性を有する。一部の実施形態では、インビトロ転写された 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。一部の実施形態では、タンパク質は、RNA ガイドエンドヌクレアーゼである。一部の実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、C a s 9 またはその誘導体である。

【0082】

本開示は、化膿性連鎖球菌 (C a s 9 エンドヌクレアーゼ (「S p C a s 9 mRNA」) をコードし、化学修飾ヌクレオチドを適宜含み、1つまたは複数の g RNA と共に投与された場合に標的細胞集団の有効なゲノム編集をもたらす最適化された mRNA を提供する。一部の実施形態では、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翻訳領域 (ORF) ; および (iii) 3' 非翻訳領域 (UTR) を含む mRNA を提供する。一部の実施形態では、部位特異的エンドヌクレアーゼは C a s ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼは C a s 9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、C a s 9 ポリペプチドは、化膿性連鎖球菌由来 C a s 9 (S p C a s 9) ポリペプチドである。一部の実施形態では、ORF は、本明細書に記載されるものなどの核局在化シグナルをコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、ORF は、S p C a s 9 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 S V 40 N L S である少なくとも1つの N L S をコードするヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ORF は、S p C a s 9 ポリペプチドなどの部位特異的エンドヌクレアーゼに作動可能に連結された N 末端および／または C 末端 N L S をコードするヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ORF は、S p C a s 9 ポリペプチドなどの部位特異的エンドヌクレアーゼに作動可能に連結された N 末端 S V 40 N L S、および S p C a s 9 ポリペプチドなどの部位特異的エンドヌクレアーゼに作動可能に連結された C 末端ヌクレオプラスミン N L S をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0083】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号 17 のヌクレオチド配列と少なくとも 85 % 以上 (例えば、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %) 同一であるヌクレオチド配列を含む mRNA を提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号 17 のヌクレオチド配列と 100 % 同一であるヌクレオチド配列を含む mRNA を提供する。一部の実施形態では、mRNA は、配列番号 17 のヌクレオチド配列と少なくとも 85 % 以上 (例えば、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %) 同一であるヌクレオチド配列を含むコドン最適化配列を含む。

【0084】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号 16 のヌクレオチド配列と少なくとも 85 % 以上 (例えば、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %) 同一であるヌクレオチド配列を含む mRNA を提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号 16 のヌクレオチド配列と 100 % 同一であるヌクレオチド配列を含む mRNA を提供する。

【0085】

一部の実施形態では、mRNAは、少なくとも1つの化学修飾ヌクレオシドおよび／またはヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、化学修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジンおよび5-メトキシウリジンから選択される。一部の実施形態では、化学修飾ヌクレオシドはN1-メチルプソイドウリジン（例えば、1-メチルプソイドウリジン）である。一部の実施形態では、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%）は、N1-メチルプソイドウリジンを用いて修飾されているかまたは置き換えられている。一部の実施形態では、mRNA中のウリジン（例えば、ウラシル）の100%は、N1-メチルプソイドウリジンを用いて修飾されているかまたは置き換えられている。一部の実施形態では、本開示は、配列番号16のヌクレオチド配列と少なくとも85%以上（例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一であるヌクレオチド配列を含むmRNAを提供し、ここでmRNAのウリジンまたはウラシルの100%は、N1-メチルプソイドウリジンを用いて修飾されているかまたは置き換えられている。一部の実施形態では、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以上）のウリジンまたはウラシル残基は、N1-メチルプソイドウリジンである。

10

20

30

40

50

【0086】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号18のヌクレオチド配列と少なくとも85%以上（例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一であるヌクレオチド配列を含むmRNAを提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号18のヌクレオチド配列に1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列を含むmRNAを提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号18のヌクレオチド配列と100%同一であるヌクレオチド配列を含むmRNAを提供する。

【0087】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号19のヌクレオチド配列と少なくとも85%以上（例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一であるヌクレオチド配列を含むmRNAを提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号19のヌクレオチド配列に1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのミスマッチを有するヌクレオチド配列を含むmRNAを提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号19のヌクレオチド配列と100%同一であるヌクレオチド配列を含むmRNAを提供する。

【0088】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号16のヌクレオチド配列と100%同一であるヌクレオチド配列を含むmRNAであって、mRNAのウリジン（例えば、ウラシル）の100%がN1-メチルプソイドウリジンを用いて修飾されているかまたは置き換えられているmRNAを提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号18のヌクレオチド配列を含むかまたはからなるmRNAを提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号19のヌクレオチド配列を含むかまたはからなるmRNAを提供する。一部の実施形態では、mRNAは、本明細書に記載されるものなどの5' capをさらに含み得る。一部の実施形態では、5' capは、cap-0、cap-1またはcap-2構造である。配列番号17は、非限定的で例示的な親Cas9 mRNAの配列である。配列番

号18および19は、親Cas9 mRNAに由来するコドン最適化配列であり、配列番号18および19におけるいくつかのuはN1-メチルプソイドウリジンである。

【0089】

ガイドRNA (gRNA)

一部の実施形態では、ANGPTL3遺伝子を遺伝的に編集するために使用されるCRISPR/Cas媒介遺伝子編集システムは、RNAガイドエンドヌクレアーゼの活性をANGPTL3遺伝子内の特定の標的配列に方向付けることができるゲノム標的化核酸（例えば、ガイドRNA）を含む。ガイドRNAは、目的の標的核酸配列およびCRISPR反復配列にハイブリダイズするスペーサー配列を少なくとも含む。gRNAは、単一分子ガイドRNA (sgRNA) または二重分子ガイドRNAであり得る。RNAガイド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。一部の実施形態では、RNAエンドヌクレアーゼはCas9変異体である。一部の実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは低分子RNAガイドエンドヌクレアーゼである。一部の実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、低分子Casエンドヌクレアーゼである。

10

【0090】

一部の実施形態では、gRNAは、5'から3'へ：crRNAおよびtracrRNAを含み、ここでcrRNAおよびtracrRNAは二重鎖を形成するようにハイブリダイズする。一部の実施形態では、crRNAは、標的核酸（例えば、ゲノムDNA分子）中の標的配列を標的とすることができるスペーサー配列およびcrRNA反復配列を含む。一部の実施形態では、tracrRNAは、tracrRNAアンチリピート配列および3' tracrRNA配列を含む。一部の実施形態では、crRNA反復配列の3'末端は、tracrRNAアンチリピート配列の5'末端に、例えば、テトラループによって連結され、ここでcrRNA反復配列およびtracrRNAアンチリピート配列は、sgRNAを形成するようにハイブリダイズする。一部の実施形態では、sgRNAは、5'から3'へ：スペーサー配列、crRNA反復配列、テトラループ、tracrRNAアンチリピート配列および3' tracrRNA配列を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、5'スペーサー伸長配列を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3' tracrRNA伸長配列を含む。3' tracrRNAは、1つまたは複数のステムループ、例えば、1つ、2つ、3つまたはこれを超えるステムループを含むかまたはからなる場合がある。

20

30

【0091】

一部の実施形態では、sgRNAの不変配列は、GUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU（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もしくは10個までのヌクレオチド欠失、挿入もしくは置換を有するヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、SpyCas9エンドヌクレアーゼと合わせた使用のためである。

【0092】

本明細書で開示されるガイドRNAは、crRNA中のスペーサー配列を介して任意の目的の配列を標的とすることができる。gRNA中のスペーサー配列は、目的の標的遺伝子（例えば、ANGPTL3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）を決める配列（例えば、20ヌクレオチド配列）である。一部の実施形態では、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、長さ10、15、16、17、18、19、29、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50またはこれらの値のいずれかの間の数字もしくは範囲のヌクレオチドであり得る、約あり得る、少なくとも得るまたは最大あり得る。一部の実施形態では、スペーサー配列は、20ヌクレオチドを含有する。一部の実施形態では、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。

40

50

一部の実施形態では、gRNAは、標的dsDNAのリバース鎖にハイブリダイズすることができる。

【0093】

用語「標的核酸」、「標的部位」および「標的配列」は、全体を通じて互換的に使用されてよく、本明細書に記載されるgRNA配列によって標的とされ得る任意の核酸配列を指し得る。一部の実施形態では、「標的配列」は、PAM配列に隣接しており、RNAガイドヌクレアーゼ（例えば、Cas9）によって修飾される配列である標的遺伝子中にある。「標的配列」は、「標的核酸」中のいわゆるPAM鎖にあり、PAM鎖および相補性非PAM鎖を含有する二本鎖分子である。当業者は、gRNAスペーサー配列が目的の標的核酸の非PAM鎖に位置する相補性配列にハイブリダイズすることを認識する。したがって、gRNAスペーサー配列は、標的配列のRNA等価物である。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様式で目的の標的核酸と相互作用する。それにより、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依存して変動する。一部の実施形態では、ANGPTL3遺伝子の標的配列は、ANGPTL3遺伝子のエクソン1、2、3、4、5、6または7内にある。一部の実施形態では、ANGPTL3遺伝子の標的配列は、ANGPTL3遺伝子のエクソン1内にある。一部の実施形態では、gRNAのスペーサーは、chr1:62597719-62597738（-）（PAMを含まない）に、またはchr1:62597716-62597738（-）（PAMを含む）に位置する標的配列に相補性に結合する。

10

20

【0094】

本明細書で使用されるCRISPR/Casシステムでは、スペーサー配列は、システムにおいて使用されるCas9酵素によって認識可能であるPAMの5'に位置する標的核酸の領域にハイブリダイズするように設計される。スペーサーは、標的配列にパーフェクトにマッチする場合がある、またはミスマッチを有する場合がある。各Cas9酵素は、それが認識する特定のPAM配列を標的DNA中に有する。例えば、化膿性連鎖球菌は、標的核酸において、配列5'-NRG-3'含むPAMを認識し、式中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、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'である。

【0095】

一部の実施形態では、標的核酸配列は、長さ20ヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的核酸は、長さ20ヌクレオチド未満である。一部の実施形態では、標的核酸は、長さ20ヌクレオチドを超える。一部の実施形態では、標的核酸は、少なくとも長さ：5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30またはこれを超えるヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的核酸は、最大で長さ：5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30またはこれを超えるヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的核酸配列は、PAMの最初のヌクレオチドのすぐ5'に20塩基を有する。例えば、5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3'を含む配列では、標的核酸は、Nに対応する配列であってよく、式中、Nは任意のヌクレオチドであってよく、下線付きNRG配列（RはGまたはA）は化膿性連鎖球菌PAMである。一部の実施形態では、SpCas9によって認識される配列として本開示の組成物および方法において使用されるPAM配列は、NGGであり、式中NはA、T、CまたはGであってよい。

30

40

【0096】

一部の実施形態では、スペーサー配列と標的核酸との間の相補性パーセントは、約、少なくとも、少なくとも約、最大でまたは最大で約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%である。一部の実施形態では、ガイドRNAのスペーサー配列と標的遺伝子中の標的核酸は、100%相補性である。一部の実施形態では、スペーサー配列と標的核酸との間の相補性パーセントは、標的核酸の相補鎖の標的配列の6個の連続する最も5'のヌクレオチドについて100%である。一部の実施形態では、スペーサー配列と標的核酸と

50

の間の相補性パーセントは、約 20 個の連続するヌクレオチドについて少なくとも 60 % である。他の実施形態では、ガイド RNA のスペーサー配列および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する場合がある。

【0097】

一部の実施形態では、gRNA は、表 1 に列挙される配列番号 3～9 および配列番号 20～26 から選択されるスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNA は、表 1 に列挙される配列番号 3～9 から選択される配列、または配列番号 3～9 から選択される配列に相補性である配列にハイブリダイズすることができるスペーサー配列を含む。

10

【0098】

【表 1】

表 1: 例示的スペーサー配列

ガイド RNA	ガイドスペーサー配列/標的部位	*配列番号	PAM
ANGPTL3_T10	TAAGACCATGTCCCAACTGA	3, 20	AGG
ANGPTL3_T6	GCCAATGGCCTCCTTCAGTT	4, 21	GGG
ANGPTL3_T1	TATATTGGTCTTCCACGGTC	5, 22	TGG
ANGPTL3_T7	CCAGAAAAGGTAAGGTTGGT	6, 23	AGG
ANGPTL3_T3	GGTCTTCCACGGTCTGGAGA	7, 24	AGG
ANGPTL3_T9	GGCCTCCTTCAGTTGGGACA	8, 25	TGG
A4	TTACTAAAGGAACAACAAAA	9, 26	
*配列番号 3-9 は DNA であり、配列番号 20-26 は RNA である			

20

【0099】

一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3～9 および配列番号 20～26 のいずれか 1 つ由来のスペーサー配列または、配列番号 3～9 および配列番号 20～26 の任意のスペーサーに約、少なくとも、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3～9 および配列番号 20～26 のいずれか 1 つのスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNA は sgRNA である。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3～9 および配列番号 20～26 のいずれか 1 つ由来のスペーサー配列または、配列番号 3～9 および配列番号 20～26 のいずれか 1 つと比較して 3 個以下のミスマッチを有するその変異体を含む。

30

【0100】

一部の実施形態では、ANGPTL3 遺伝子の標的配列に相補性のスペーサーを含む 2 つの gRNA は、細胞に提供される。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3～9 および配列番号 20～26 からなる群から選択されるスペーサーまたは、配列番号 3～9 および配列番号 20～26 のスペーサーに少なくとも 85 % 相同性を有するその変異体、または配列番号 3～9 および配列番号 20～26 のいずれか 1 つと比較して 3 個以下のミスマッチを有する変異体を含む任意の 2 つの gRNA である。

40

【0101】

一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 4 もしくは配列番号 21 のスペーサー配列または、配列番号 4 もしくは配列番号 21 のスペーサーに約、少なくとも、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % 相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 4 もしくは配列番号 21 のスペーサー配列または、配列番号 4 もしくは配列番号 21 と比較して 3 個以下のミスマッチを有するその変異体を含む。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 4 または配列番号 21 のスペーサー配列を含む。

【0102】

一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3 もしくは配列番号 20 のスペーサー配列

50

または、配列番号 3 もしくは配列番号 20 のスペーサーに約、少なくとも、もしくは少なくとも約 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% もしくは 100% 相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3 もしくは配列番号 20 のスペーサー配列または、配列番号 3 もしくは配列番号 20 と比較して 3 個以下のミスマッチを有するその変異体を含む。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3 または配列番号 20 のスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNA は sgRNA である。

【0103】

一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 3 または配列番号 20 のスペーサー配列（または配列番号 3 または配列番号 20 に約、少なくともまたは少なくとも約 85% 相同性を有するその変異体）を含む第 1 の gRNA、および配列番号 4 または配列番号 21 のスペーサー配列（または配列番号 4 または配列番号 21 に約、少なくともまたは少なくとも約 85% 相同性を有する変異体）を含む第 2 の gRNA を含む。gRNA は、配列番号 5 ～ 8 および配列番号 22 ～ 25 のいずれか 1 つのスペーサー配列または、配列番号 5 ～ 8 および配列番号 22 ～ 25 のいずれか 1 つに約、少なくとももしくは少なくとも約 85% 相同性を有する変異体を有する 1 つまたは複数の gRNA さらに含み得る。

10

【0104】

一部の実施形態では、gRNA は化学修飾 gRNA である。種々の種類の RNA 修飾は、安定性を増強する、自然免疫応答の可能性もしくは程度を低減する、および／または当技術分野において記載される他の特質を増強するために gRNA に導入され得る。本明細書に記載される gRNA は、ヌクレオシド間リンケージ、プリンピリミジン塩基または糖を含む 1 つまたは複数の修飾を含み得る。一部の実施形態では、修飾は、化学合成を用いて、またはポリメラーゼ酵素を用いて gRNA の末端に導入される。修飾核酸およびそれらの合成の例は、WO 2013/052523 に開示されている。修飾ポリヌクレオチドの合成は、Verma and Eckstein、Annual Review of Biochemistry, vol. 76、99-134 (1998) にも記載されている。

20

【0105】

一部の実施形態では、化学修飾 gRNA は、gRNA の 3' 末端および 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。一部の実施形態では、化学修飾 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。一部の実施形態では、化学修飾 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。一部の実施形態では、化学修飾 gRNA は、gRNA の 3' 末端に 3 もしくは 4 個のホスホロチオエート化 2'-O-メチルヌクレオチドを、および／または 5' 末端に 3 もしくは 4 個を含む。一部の実施形態では、配列番号 3 ～ 9 および配列番号 20 ～ 26 のいずれかを含む gRNA のいずれか 1 つは、gRNA の 3' 末端に 4 個のホスホロチオエート化 2'-O-メチルヌクレオチドを、および／または 5' 末端に 3 個を含むように化学修飾され得る。

30

【0106】

ホスホロチオエートリンケージの数および位置は、変動する場合がある。一部の実施形態では、リンケージは、gRNA の 5' 末端から 1 番目と 2 番目、2 番目と 3 番目、3 番目と 4 番目の間の位置、4 番目と 5 番目、5 番目と 6 番目、6 番目と 7 番目、7 番目と 8 番目、8 番目と 9 番目の間、9 番目または 10 番目またはさらなる位置であり得る。一部の実施形態では、リンケージは、gRNA の 3' 末端から 1 番目と 2 番目、2 番目と 3 番目、3 番目と 4 番目の間の位置、4 番目と 5 番目、5 番目と 6 番目、6 番目と 7 番目、7 番目と 8 番目、8 番目と 9 番目の間、9 番目または 10 番目またはさらなる位置であり得る。

40

【0107】

一部の実施形態では、ヌクレオチド類似物／修飾は、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド-5'-トリホスフェート、2-アミノプリン-リボシド-5'-トリホスフェート；2-アミノアデノシン-5'-トリホスフェート、2'-アミノ-2'-デオキシシチジ

50

ンートリホスフェート、2-チオシチジン-5'-ートリホスフェート、2-チオウリジン
 -5'-ートリホスフェート、2'-フルオロチミジン-5'-ートリホスフェート、2'-O-
 メチル-イノシン-5'-ートリホスフェート、4-チオウリジン-5'-ートリホスフェート
 、5-アミノアリルシチジン-5'-ートリホスフェート、5-アミノアリルウリジン-5'
 -ートリホスフェート、5-ブロモシチジン-5'-ートリホスフェート、5-ブロモウリジ
 ン-5'-ートリホスフェート、5-ブロモ-2'-デオキシシチジン-5'-ートリホスフェ
 ート、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン-5'-ートリホスフェート、5-ヨードシチジ
 ン-5'-ートリホスフェート、5-ヨード-2'-デオキシシチジン-5'-ートリホスフェ
 ート、5-ヨードウリジン-5'-ートリホスフェート、5-ヨード-2'-デオキシウリジ
 ン-5'-ートリホスフェート、5-メチルシチジン-5'-ートリホスフェート、5-メチル 10
 ウリジン-5'-ートリホスフェート、5-プロピニル-2'-デオキシシチジン-5'-ート
 リホスフェート、5-プロピニル-2'-デオキシウリジン-5'-ートリホスフェート、6
 -アザシチジン-5'-ートリホスフェート、6-アザウリジン-5'-ートリホスフェート、
 6-クロロプリンリボシド-5'-ートリホスフェート、7-デアザアデノシン-5'-ートリ
 ホスフェート、7-デアザグアノシン-5'-ートリホスフェート、8-アザアデノシン-
 5'-ートリホスフェート、8-アジダデノシン-5'-ートリホスフェート、ベンズイミダ
 ザール-リボシド-5'-ートリホスフェート、N1-メチルアデノシン-5'-ートリホスフ
 ェート、N1-メチルグアノシン-5'-ートリホスフェート、N6-メチルアデノシン-
 5'-ートリホスフェート、O6-メチルグアノシン-5'-ートリホスフェート、プソイドウ
 リジン-5'-ートリホスフェート、ピューロマイシン-5'-ートリホスフェート、またはキ 20
 サントシン-5'-ートリホスフェートを含み得る。塩基修飾ヌクレオチドは、5-メチル
 シチジン-5'-ートリホスフェート、7-デアザグアノシン-5'-ートリホスフェート、5
 -ブロモシチジン-5'-ートリホスフェートおよびプソイドウリジン-5'-ートリホスフェ
 ート、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-プソイドウリジン、2-チオ-プソイドウリ
 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-プソイドウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニ
 ル-プソイドウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-プソイドウ
 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-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル 30
 -プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、1-メチル-1-デア
 ザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、ジヒド
 ロウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒ
 ドロプソイドウリジン、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-プソイドウリジンおよび4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、5-
 アザ-シチジン、プソイドイソシチジン、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-プソイドイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-プソイドイソシチジン、
 2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-プソイドイソシチジ
 ン、4-チオ-1-メチル-プソイドイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ 40
 -プソイドイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン、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-プソイドイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-プソイドイソシチ
 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-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ
 -N6-(cis-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 50

イルアデノシン、N 6－スレオニルカルバモイルアデノシン、2－メチルチオ－N 6－スレオニルカルバモイルアデノシン、N 6，N 6－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、ワイプトシン、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、N 2－メチルグアノシン、N 2，N 2－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、N 2－メチル－6－チオ－グアノシンおよびN 2，N 2－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－チオホスフェート)－グアノシン、5'－O－(1－チオホスフェート)－ウリジン、5'－O－(1－チオホスフェート)－プソイドウリジン、6－アザ－シチジン、2－チオ－シチジン、アルファ－チオ－シチジン、プソイド－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、N 1－メチル－プソイドウリジン、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、N 1－メチル－アデノシン、2－アミノ－6－クロロ－プリン、N 6－メチル－2－アミノ－プリン、プソイド－イソ－シチジン、6－クロロ－プリン、N 6－メチル－アデノシン、アルファ－チオ－アデノシン、8－アジド－アデノシンまたは7－デアザ－アデノシンを含み得る。

10

20

30

40

50

【0108】

少なくとも1つの修飾ヌクレオチドおよび／または少なくとも1つのヌクレオチド類似物は、1－メチルアデノシン、2－メチルアデノシン、N 6－メチルアデノシン、2'－O－メチルアデノシン、2－メチルチオ－N 6－メチルアデノシン、N 6－イソペンテニルアデノシン、2－メチルチオ－N 6－イソペンテニルアデノシン、N 6－スレオニルカルバモイルアデノシン、2－メチルチオ－N 6－スレオニルカルバモイルアデノシン、N 6－メチル－N 6－スレオニルカルバモイルアデノシン、N 6－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－N 6－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、N 4－アセチルシチジン、ライシジン、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、キューオシン、エポキシキューオシン、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、プソイドウリジン、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。

【0109】

一部の実施形態では、化学修飾は、プソイドウリジン、N 1－メチルプソイドウリジン、N 1－エチルプソイドウリジン、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－プソイドウリジン、2－チオ－1－メチル－プソイドウリジン、2－チオ－5－アザ－ウリジン、2－チオ

ージヒドロブソイドウリジン、2-チオージヒドロウリジン、2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、4-チオ-プソイドウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロブソイドウリジン、5-メトキシウリジンまたは2'-O-メチルウリジンを含む。一部の実施形態では、修飾は、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。

【0110】

gRNAは、任意の数の修飾核酸を含み得る。一部の実施形態では、gRNA分子中の修飾される核酸の百分率は、gRNA配列の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、少なくともあり得る、約あり得るかまたは少なくとも約あり得る。

【0111】

例えば、配列番号20は：「u*a*a* GAC CAU GUC CCA ACU GA」(配列番号12)(TはUに変換される)のとおりに化学修飾され得る、式中u=2'OMe-rU；a=2'OMe-rA*；=チオール化リン酸。

【0112】

一部の実施形態では、gRNAは、配列番号10の配列を含み、RNA配列は：5'-u*a*a* GAC CAU GUC CCA ACU GAG UUU UAG Agc uag aaa uag cAA GUU AAA AUA AGG CUA G UC CGU UAU Caa cuu gaa aaa gug gca ccg ag u cgg ugc u*u*u*u-3' (配列番号13)のとおりに修飾され得る、式中、u=2'OMe-rU；a=2'OMe-rA；c=2'OMe-rC；g=2'OMe-rG；*=チオール化リン酸。下線付き配列はスパーサーに対応する。

【0113】

別の例では、配列番号9のgRNAスパーサー配列は：「u*u*a* CUA AAG GAA CAA CAA AA」(配列番号14)(TはUに変換される)のとおりに化学修飾され得る、式中、u=2'OMe-rU；a=2'OMe-rA*；=チオール化リン酸。

【0114】

一部の実施形態では、gRNAは、配列番号11の配列を含み：5'-u*u*a* CUA AAG GAA CAA CAA AAG UUU UAG Agc uag aaa uag cAA GUU AAA AUA AGG CUA G UC CGU UAU CAa cuu gaa aaa gug gca ccg ag u cgg ugc u*u*u* u-3' (配列番号15)のとおりに化学修飾され得る、式中、u=2'OMe-rU；a=2'OMe-rA；c=2'OMe-rC；g=2'OMe-rG；*=チオール化リン酸。下線付き配列はスパーサーに対応する。

【0115】

一部の実施形態では、1つより多いガイドRNAは、CRISPR/Casヌクレアーゼシステムと共に使用され得る。各ガイドRNAは、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異なる標的化配列を含み得る。一部の実施形態では、1つまたは複数のガイドRNAは、Cas9 RNP複合体内の活性または安定性などの同じ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、同じまたは異なるベクターにコードされていてよい。

【0116】

一部の実施形態では、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、またはこれらの組合せによって產生され得る。酵素的 IVT、固相、液相、組合せ合成法 (combined synthetic method)、小領域合成 (small region synthesis) およびライゲーシオン法の 1 つまたは複数は、利用され得る。一部の実施形態では、gRNA は、IVT 酵素的合成法を使用して作製される。IVT によってポリヌクレオチドを作製する方法は、当技術分野において周知であり、WO2013/151666 に記載されている。ポリヌクレオチドコンストラクトおよびベクターは、本明細書に記載される gRNA をインビトロ転写するために使用され得る。

10

【0117】

ANGPTL3 を編集する方法

本明細書で提供するものは、細胞のゲノムにおいて ANGPTL3 遺伝子を機能的にノックアウトすること、またはその発現を低減することによって ANGPTL3 を編集するためにゲノム編集を使用する方法を含む。方法は、対象、例えば、ANGPTL3 関連疾患または状態を有する患者を処置するために使用され得る。

【0118】

本明細書で提供するものは、その必要に迫られている対象 (例えば、霊長類対象) において ANGPTL3 関連疾患または障害を処置するための方法を含む。一部の実施形態では、方法は、(a) ANGPTL3 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 ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸と複合体化された複数のナノ粒子を霊長類対象に投与することを含み、それにより ANGPTL3 関連疾患または障害を霊長類対象において軽減する。対象は、2 回以上、例えば 2 回、処置のために複数のナノ粒子を投与され得る。対象へのナノ粒子の 2 回の投与は、好適な期間によって離されていてよい。一部の実施形態では、好適な期間は、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 カ月間、4 カ月間、5 カ月間、6 カ月間、1 年間、2 年間、3 年間またはさらに長く、または約これらである。一部の実施形態では、2 回以上の投与の内の 2 回は、約 2 週間から約 2 カ月、例えば約 3 週間離される。一部の実施形態では、2 回以上の投与の内の各 2 回は、約 2 週間から約 2 カ月、例えば、約 3 週間離される。2 回の投与の間の好適な期間は、別の 2 回の投与の間の好適な期間と同じまたは異なっていてよい。一部の実施形態では、複数のナノ粒子は、投与あたり約 0.01~5 mg/kg、例えば 0.05~2 mg/kg、0.5~3 mg/kg または 0.1~1 mg/kg の用量で対象に投与される。一部の実施形態では、ANGPTL3 gRNA または ANGPTL3 gRNA をコードする核酸は、投与あたり 0.01~5 mg/kg、例えば 0.1~1 mg/kg gRNA の用量で、または約これらの用量で対象に投与される。一部の実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸は、投与あたり 0.1~5 mg/kg、例えば 0.5~3 mg/kg または 0.3~2 mg/kg の用量で、または約これらの用量で対象に投与される。用量は、対象への各投与について同じまたは異なっていてよい。

20

30

【0119】

一部の実施形態では、gRNA は、ANGPTL3 遺伝子中のコード配列内または近くを標的とする。一部の実施形態では、gRNA は、ANGPTL3 遺伝子の 12 エクソンのうちの 1 つの中の配列を標的とする。一部の実施形態では、gRNA は、ANGPTL3 遺伝子のエクソン 1 内の配列を標的とする。一部の実施形態では、gRNA は、ANGPTL3 遺伝子のエクソン 1 内の配列を標的とする。gRNA は、ANGPTL3 遺伝子のエクソン 1 内の標的配列に相補性のスペーサー配列を含み得る。一部の実施形態では、スペーサー (複数可) は、ANGPTL3 遺伝子のエクソン 1 内または近く (例えば、それから 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 のいずれかまたはこれ以上の塩基内) の配列に相補性である。一部の実施形態では、gRNA

40

50

のスペーサーは、chr1:62597719-62597738(-) (PAMを含まない)に、またはchr1:62597716-62597738(-) (PAMを含む)に位置する標的配列に相補性に結合する。gRNAのスペーサーとANGPTL3遺伝子中の標的配列との間の相補性は、パーフェクトであってよい、またはパーフェクトでなくてよい。一部の実施形態では、相補性は、少なくとも70%、80%、90%、100%またはこれらの値の任意の2つの間の数字もしくは範囲であり得る。一部の実施形態では、相補性はパーフェクト、すなわち100%である。

【0120】

一部の実施形態では、gRNAは、配列番号3~9および配列番号20~26から選択されるスペーサー配列または、配列番号3~9および配列番号20~26の任意のスペーサーに約、少なくとも、少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%相同性を有するこれらの変異体を含む。一部の実施形態では、gRNAは、配列番号3~9および配列番号20~26から選択されるスペーサー配列または、配列番号3~9および配列番号20~26のいずれか1つと比較して3個以下のミスマッチを有するその変異体を含む。一部の実施形態では、gRNAは、配列番号3~9および配列番号20~26から選択されるスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNAは、配列番号12のスペーサー配列を含むかまたはからなる。

10

【0121】

一部の実施形態では、本明細書の方法において使用されるgRNAは、それぞれANGPTL3遺伝子(例えば、配列番号3~9および配列番号20~26のいずれか1つ、または配列番号3~9および配列番号20~26のいずれか1つに少なくとも85%相同性を有するその変異体または、配列番号3~9および配列番号20~26のいずれか1つと比較して3個以下のミスマッチを有する変異体)の標的配列に相補的なスペーサーを含む2つ以上のgRNAを含み得る。

20

【0122】

一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号4もしくは配列番号21のスペーサー配列、または配列番号4もしくは配列番号21のスペーサーに約、少なくとも、少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%もしくは100%相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号4または配列番号21のスペーサー配列を含む。

30

【0123】

一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号3、配列番号20のスペーサー配列または、配列番号3または配列番号20のスペーサーに約、少なくとも、少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%もしくは100%相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号3または配列番号20のスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号12のスペーサー配列を含むかまたはからなる。一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号10の配列または、配列番号10の配列に約、少なくとも、少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%もしくは100%相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号10の配列を含む。一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号13の配列を含むかまたはからなる。

40

【0124】

本明細書で使用されるgRNAは、潜在的なオフターゲット効果(すなわち、ANGPTL3遺伝子以外の望ましくない位置でゲノムDNAを切断すること)を顕著に低減する一方で、オンターゲット活性を増強できる。一部の実施形態では、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%低減される。

【0125】

一部の実施形態では、DNAエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される、または当技術分野において周知のCasエンドヌクレアーゼである。Casエンドヌクレアーゼは

50

、天然に存在する場合と天然に存在しない場合とがある（例えば、組換えかまたは突然変異を含む）。一部の実施形態では、DNAエンドヌクレアーゼは、Cas 1、Cas 1B、Cas 2、Cas 3、Cas 4、Cas 5、Cas 6、Cas 7、Cas 8、Cas 9（Csn 1およびCsx 12としても周知）、Cas 100、Csy 1、Csy 2、Csy 3、Cse 1、Cse 2、Csc 1、Csc 2、Csa 5、Csn 2、Csm 2、Csm 3、Csm 4、Csm 5、Csm 6、Cmr 1、Cmr 3、Cmr 4、Cmr 5、Cmr 6、Csb 1、Csb 2、Csb 3、Csx 17、Csx 14、Csx 10、Csx 16、Csa X、Csx 3、Csx 1、Csx 15、Cs f 1、Cs f 2、Cs f 3、Cs f 4もしくはCp f 1エンドヌクレアーゼ、またはそれらの機能性誘導体からなる群から選択される。一部の実施形態では、DNAエンドヌクレアーゼは、Cas 9エンドヌクレアーゼまたはその変異体である。一部の実施形態では、Cas 9エンドヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌（Spy Cas 9）由来である。一部の実施形態では、Cas 9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（Slu Cas 9）由来である。

10

【0126】

一部の実施形態では、ANGPTL 3遺伝子の遺伝子修飾は、対象（例えば、哺乳動物、NHP、ヒト対象）において血漿ANGPTL 3タンパク質、血漿ApoBタンパク質、および／またはトリグリセリドレベルなどの脂質レベルの顕著な低減を生じる。一部の実施形態では、血漿ANGPTL 3タンパク質レベルは、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%、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任意の2つの間の数字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、約、少なくともまたは少なくとも約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任意の2つの間の数字もしくは範囲血漿ANGPTL 3タンパク質レベルを減少させ得る。

20

30

【0127】

一部の実施形態では、ANGPTL 3遺伝子の遺伝子修飾は、対象（例えば、哺乳動物、NHP、ヒト対象）において顕著に低減した脂質レベル（例えば、総コレステロール、トリグリセリド、HDL、LDLおよび他のnon-HDL脂質）を生じる。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子編集法は、non-HDL脂質レベル（例えば、LDL、VLDLおよび／またはトリグリセリド）を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任意の2つの間の数字もしくは範囲低減させ得る。一部の実施形態では、血漿トリグリセリドレベルは、約、少なくともまたは少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、

40

50

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任意の2つの間の数字もしくは範囲低減される。

【0128】

一部の実施形態では、ANGPTL3遺伝子の遺伝子修飾は、対象（例えば、哺乳動物、NHP、ヒト対象）において顕著に低減した血漿ApoBタンパク質レベルを生じる。一部の実施形態では、血漿ApoBタンパク質レベルは、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%、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任意の2つの間の数字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、約、少なくともまたは少なくとも約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任意の2つの間の数字もしくは範囲血漿ApoBタンパク質レベルを減少させ得る。

【0129】

一部の実施形態では、遺伝子修飾された対象（例えば、哺乳動物、NHP、ヒト対象）における血漿ANGPTL3タンパク質、ApoBタンパク質および／またはnon-HDL脂質レベル（例えば、トリグリセリド）は、対応する未修飾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%または100%、これら未満または約これら未満である。

【0130】

一部の実施形態では、対象（例えば、哺乳動物、NHP、ヒト対象）におけるANGPTL3タンパク質の濃度、1つもしくは複数の非高密度リポタンパク質（non-HDL）脂質のレベル、および／またはApoBタンパク質の濃度の低減は、投与後3週間、4週間、5週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、12カ月またはこれより長く少なくとも20%、少なくとも40%または少なくとも70%である。一部の実施形態では、ANGPTL3タンパク質の濃度、1つまたは複数の非高密度リポタンパク質（non-HDL）脂質のレベル、および／またはApoBタンパク質の濃度の低減は、単回投与後3週間、4週間、5週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、12カ月またはこれより長く少なくとも20%、少なくとも40%または少

なくとも70%である。

【0131】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法についての適格性およびエンドポイント（例えば、6カ月での）は：処置前に対象が、 $\text{non-HDL-C} > 160 \text{ mg/dL}$ 、トリグリセリド $> 300 \text{ mg/dL}$ 、および／または $\text{ApoB} > 100 \text{ mg/dL}$ であり、ならびに方法の結果が、ベースラインからの non-HDL-C （総コレステロール-HDL）における変化、ベースラインからのトリグリセリドにおける変化、および／またはベースラインからの ApoB における変化を測定することによって決定されることを含む。 non-HDL レベルは LDL より 30 mg/dL 上である。 $\text{non-HDL} = \text{LDL}$ 、 VLDL 、 IDL および Lp(a) 。一部の実施形態では、対象は、 300 mg/dL を超えるトリグリセリドレベル、 160 mg/dL を超える非高密度リポタンパク質（HDL）レベル、 100 mg/dL より高い低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベル、 100 mg/dL を超える ApoB レベル、またはこれらの組合せを有する。方法は、対象において投与の前、途中および／または後に ANGPTL3 、 ApoB 、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、LDL-C、HDL および non-HDL 脂質の1つまたは複数の血中レベルを測定することを含み得る。

10

【0132】

一部の実施形態では、対象は、スクリーニング前の少なくとも12週間について、エゼチミブおよび／または PCSK9 阻害剤が挙げられる利用可能なSOC系の処置の1つもしくは複数（またはすべて）に抵抗性である。一部の実施形態では、エビナクマブ処置中で、処置関連標的脂質目標に達しておらず、登録のための non-HDL 適格性判断基準に合致している HofH 対象は、処置され得る。対象は、先行して PCSK9 阻害剤処置されてよい。一部の実施形態では、対象は、 PCSK9 阻害剤によって処置されない。

20

【0133】

医薬組成物および治療適用

本明細書で提供するものは、本明細書で開示される方法を実行するための医薬組成物を含む。組成物は、1つまたは複数の gRNA （複数可）、 RNA ガイドエンドヌクレアーゼまたは本明細書に記載される RNA ガイド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。一部の実施形態では、組成物は、本明細書で開示される方法の望ましい遺伝子修飾に影響を与えるように ANGPTL3 遺伝子中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。

30

【0134】

一部の実施形態では、1つまたは複数の gRNA （複数可）は、 ANGPTL3 遺伝子の任意のエクソン内または近く（例えば、それから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またはこれを超える塩基のいずれか以内）のゲノム配列に相補的なスパーサーをそれぞれ含む。一部の実施形態では、 gRNA は、 ANGPTL3 遺伝子のエクソン1内の配列を標的とする。 gRNA は、 ANGPTL3 遺伝子のエクソン1内の標的配列に相補的なスパーサー配列を含み得る。一部の実施形態では、 gRNA は、配列番号3～9および配列番号20～26のいずれか1つのスパーサー配列または、配列番号3～9および配列番号20～26のいずれか1つのスパーサー配列に少なくとも85%相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、 gRNA は、配列番号3もしくは配列番号20のスペース（space）または、配列番号3もしくは配列番号20の配列を有するスパーサーに少なくとも85%相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、 gRNA は、配列番号4、配列番号21のスパーサーまたは、配列番号4もしくは配列番号21の配列を有するスパーサーに少なくとも85%相同性を有するその変異体を含む。一部の実施形態では、 gRNA は、配列番号12の配列を含むかまたはからなるスパーサーを含む。一部の実施形態では、 gRNA は、配列番号10の配列または配列番号10の配列に少なくとも85%相同性を有するその変異体を含む。一

40

50

部の実施形態では、gRNAは、配列番号13の配列を含むかまたはからなる。

【0135】

一部の実施形態では、RNAガイドエンドヌクラーゼは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9（Csn1およびCsx12としても周知）、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、Cs f1、Cs f2、Cs f3、Cs f4およびCpf1エンドヌクラーゼまたはその機能性誘導体である。一部の実施形態では、DNAエンドヌクラーゼはCas9である。一部の実施形態では、Cas9エンドヌクラーゼは、化膿性連鎖球菌（SpyCas9）由来である。一部の実施形態では、Cas9エンドヌクラーゼは、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス（SluCas9）由来である。一部の実施形態では、DNAエンドヌクラーゼをコードする核酸に転写されるDNA配列は、コドン最適化される。一部の実施形態では、DNAエンドヌクラーゼをコードする核酸（例えば、mRNA）は、5'CAP構造および3'ポリAテールを含む。一部の実施形態では、DNAエンドヌクラーゼをコードする核酸は、コバレントボンドを介してgRNAに連結される。

10

【0136】

一部の実施形態では、1つまたは複数の核酸配列および／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、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポックスウイルス、ネイキッドDNA投与、プラスミド、コスミド、ファージ、カプセル化細胞技術（encapsulated cell technology）などが挙げられるウイルスに基づく、またはウイルスに基づかないデリバリーシステムを介して細胞にデリバリーされ得る。

20

【0137】

一部の実施形態では、本明細書において開示される組成物の化合物（例えば、ANGPTL3 gRNAまたはANGPTL3 gRNAをコードする核酸およびRNAガイドエンドヌクラ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中に製剤化され得る。一部の実施形態では、組成物の化合物は、脂質ナノ粒子（LNP）に製剤化される。LNPは、標的器官（例えば、肝臓）に核酸を安全かつ効果的にデリバリーする非ウイルス性デリバリーシステムである。用語「脂質ナノ粒子」は、ナノメートル（例えば、1〜5,000nm）で測定されるサイズ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。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子に含まれる脂質は、カチオン性脂質および／またはイオン化可能な脂質を含む。当技術分野において周知の任意の好適なカチオン性脂質および／またはイオン化可能な脂質は、細胞へのgRNAおよびCasエンドヌクラーゼのデリバリーのためのLNPを製剤化するために使用され得る。例示的カチオン性脂質は、陽電荷を保有する1つまたは複数のアミン基（複数可）を含む。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、pHに応じて正に荷電して、または中性で存在できるようにイオン化可能である。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子のカチオン性脂質は、低pHで正電荷を示すプロトン化可能な三次アミン頭部を含む。脂質ナノ粒子は、1つまたは複数の中性脂質〔例えば、ヘルパー脂質として、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DMPE）、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルエタノールアミン（DPPE）など〕、荷電脂質、ステロイドおよびポリマーコンジュゲート脂質をさらに含み得る。一部の実施形態では、LNPは、コレステロールを含み得る。一部の実施形態では、LNPは、ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含み得る。

30

40

【0138】

50

脂質ナノ粒子は、構成脂質の濃度が変動する場合がある。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子の総脂質中のイオン化可能な脂質のモルパーセントは、約、少なくとも、少なくとも約、最大で、または最大で約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%またはこれらの値のいずれか2つの間の数字または範囲である。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子中のイオン化可能な脂質のモルパーセントは、約40~70%の間の範囲内（例えば、約60%）である。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、ヘルパー脂質（例えば、DSPC）、ステロール脂質（例えば、コレステロール）およびPEG脂質またはリン脂質PEGコンジュゲートをさらに含み得る。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子中のヘルパー脂質のモルパーセントは約5%~20%（例えば、約10.5%）であり、ステロール脂質のモルパーセントは約10%~40%（例えば、約21%）であり、PEG脂質のモルパーセントは約0.5%~10%（例えば、約8.5%）である。

10

【0139】

肝細胞へのLNP取り込みは、アポリポタンパク質E-低密度リポタンパク質受容体（ApoE-LDLR）またはN-アセチル-D-ガラクトサミン／アシアロ糖タンパク質受容体経路（GalNAc-ASGPR）（Sato et al., 2020, Journal of Controlled Release, 322, 217-226.）によって媒介され得る。一部の実施形態では、gRNAおよびCasエンドヌクレアーゼの細胞へのデリバリーのための本明細書に記載されるLNPは、ApoE-LDLR取り込み経路に従って製剤化され得る。一部の実施形態では、gRNAおよびCasエンドヌクレアーゼの細胞へのデリバリーのための本明細書に記載されるLNPは、GalNAc-ASGPR取り込み経路に従って製剤化され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるLNP製剤は、低密度リポタンパク質受容体（LDLR）の減少についてヘテロ接合性（HeFH）またはホモ接合性（HoFH）を示す疾患または障害を有する対象を処置するために使用され得る。

20

【0140】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、ガラクトースのアミノ糖誘導体を含む。一部の実施形態では、GalNAcは、LNPにおいて約、少なくとも、少なくとも約、最大で、または最大で約1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%または6.0%のモル百分率で存在する。一部の実施形態では、GalNAcは、LNPにおいて約2.5%のモル百分率で存在する。

30

【0141】

一部の実施形態では、本明細書で開示される組成物中のナノ粒子の濃度は（例えば、総脂質の）約58.2mg/mLであり、ナノ粒子は、（a）ANGPTL3 gRNAおよび（b）Cas9 mRNAの核酸の合計約2mg/mLと複合体化される。一部の実施形態では、複数のナノ粒子の濃度は約58.2mg/mLであり、ナノ粒子は、（a）約1.5mg/mLのANGPTL3 gRNA、および（b）約0.5mg/mLのCas9 mRNAと複合体化される。

【0142】

合計RNA [（a）ANGPTL3遺伝子を標的とするANGPTL3 gRNAまたはgRNAをコードする核酸、および（b）RNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸]の相対量ならびにナノ粒子中の総脂質は、異なる実施形態において変動する場合がある。例えば、ナノ粒子は、重量比で約15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1または30:1の総脂質および総RNAを含み得る。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約30:1の重量比で総脂質および総RNAを含み得る。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、36:1、37:1、38:1、39:1、40:1、41:1、42:1、43:1、44:1、45:1、46:1、47:1、48:1、49:1または50:1のモル比で総脂質および総RNAを含み得る。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約

40

50

40 : 1 のモル比で総脂質および総 RNA を含み得る。

【0143】

一部の実施形態では、本明細書で開示される組成物中のナノ粒子の濃度は（例えば、総脂質の）約、少なくとも、少なくとも約、最大でまたは最大で約 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、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 mg/mL、またはこれらの値の任意の 2 つの間の数字もしくは範囲である。一部の実施形態では、ナノ粒子中の RNA は、約、少なくとも、少なくとも約、最大で、または最大で約 50、75、100、200、400、600、800、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000 $\mu\text{g/mL}$ またはこれらの値の任意の 2 つの間の数字もしくは範囲の濃度で製剤化される。

10

【0144】

ナノ粒子中の量 [例えば、(a) ANGPTL3 遺伝子を標的とする ANGPTL3 gRNA または gRNA をコードする核酸、および (b) RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸 [例えば、Cas タンパク質をコードする mRNA (例えば、Cas9 mRNA) の相対量] は、変動する場合がある。例えば、ナノ粒子は、RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸 (例えば、SpCas9 mRNA) および ANGPTL3 gRNA を 1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1 または 5 : 1 の比 (重量による) で含み得る。一部の実施形態では、ナノ粒子は、RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸および ANGPTL3 gRNA を 3 : 1 の比 (重量による) で含み得る。

20

【0145】

一部の実施形態では、複数のナノ粒子は、対象に投与あたり約 0.01 ~ 5 mg/kg [合計核酸 (例えば、ANGPTL3 gRNA と Cas9 mRNA との合計) によって決定される] の用量で投与される。例えば、対象に投与される複数のナノ粒子の単一用量または各用量は、0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、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任意の 2 つの間の数字もしくは範囲の合計 RNA (例えば、ANGPTL3 gRNA と Cas9 mRNA との合計) と複合体化されたナノ粒子であってよい。一部の実施形態では、複数のナノ粒子は、0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg または 3 mg/kg (ANGPTL3 gRNA と SpCas9 mRNA との合計によって決定される) の用量で、または約この用量で対象に投与される。

30

40

【0146】

本明細書の開示は、組成物を含む。一部の実施形態では、組成物は、(a) ANGPTL3 遺伝子を標的とするガイド RNA (gRNA) (ANGPTL3 gRNA)、および (b) Cas9 エンドヌクレアーゼをコードする mRNA と複合体化された複数のナノ

50

粒子を含み、ここで gRNA は、配列番号 3、配列番号 20 または配列番号 12 のスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNA は、配列番号 10 または配列番号 13 の配列を含む。Cas9 エンドヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌 Cas9 エンドヌクレアーゼであってよい。一部の実施形態では、複数のナノ粒子の濃度は、約 58.2 mg/mL であり、(a) ANGPTL3 gRNA および (b) Cas9 mRNA の核酸の合計約 2 mg/mL と複合体化される。一部の実施形態では、複数のナノ粒子の濃度は、約 58.2 mg/mL であり、(a) 約 1.5 mg/mL の ANGPTL3 gRNA、および (b) 約 0.5 mg/mL の Cas9 mRNA と複合体化される。

【0147】

本明細書で開示される組成物（例えば、ANGPTL3 gRNA または ANGPTL3 gRNA をコードする核酸、および RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸と複合体化された脂質ナノ粒子）の用量漸増の非限定的な例は、表 2 に提供される。用量は、ナノ粒子と複合体化された ANGPTL3 gRNA と Cas9 mRNA との合計によって決定される。

【0148】

【表 2】

表2: ANGPTL3用量漸増

用量(mg/kg)	患者体重(kg)	単一用量(mg)	患者数
0.1	80	8	3
0.3	80	24	3
0.6	80	48	3
1	80	80	3

【0149】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、約、少なくとも、少なくとも約、最大でまたは最大で約 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字もしくは範囲の平均直径を有し得る。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子粒子サイズは、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。

【0150】

一部の実施形態では、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に、または脂質ナノ粒子の脂質部分の一部もしくは全部によって包まれた水性部分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ってよい。一部の実施形態では、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または実質的に（例えば、RNA の 90 % を超えて）カプセル化される。

【0151】

一部の実施形態では、本明細書に記載される 1 つまたは複数の化合物は、コバレント bond または非コバレント bond を介してリボソームまたは脂質ナノ粒子と会合する。一部の実施形態では、組成物中のいずれかの化合物は、別々にまたは合わせてリボソームまたは脂質ナノ粒子に含有され得る。

【0152】

上に記載される組成物は、1 つまたは複数の追加的試薬をさらに含む場合があり、そのような追加的試薬は、緩衝剤、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緩衝剤、洗浄緩衝剤、対照試薬、対照ベクター、対照 RNA ポリヌクレオチド、DNA からポリペプチドをインビトロ産生するための試薬、配列決定のためのアダプターなどから選択される。緩衝剤は、安定化緩衝剤、還元緩衝剤、希釈緩衝剤などであり得る。一部の実施形態では、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 つまたは複数の構成成分も含み得る。

【0153】

一部の実施形態では、組成物の任意の構成成分は、具体的な投与の様式および剤形に応じて、薬学的に許容される賦形剤、例えば、担体、溶媒、安定化剤、アジュバント、希釈剤などと共に製剤化される。一部の実施形態では、ガイドRNA組成物は、生理学的に適合性のpH、製剤および投与の経路に応じて約pH3から約pH11、約pH3から約pH7の範囲を達成するように一般に製剤化される。一部の実施形態では、pHは、約pH5.0から約pH8の範囲に調整される。

【0154】

好適な賦形剤は、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸共重合体および不活化ウイルス粒子などの大きく、ゆっくり代謝される高分子を含む担体分子を含み得る。他の例示的賦形剤として、抗酸化物質（例えば、限定的することなくアルコールビン酸）、キレート剤（例えば、限定的することなくEDTA）、炭水化物（例えば、限定的することなく、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、液剤（例えば、限定的することなく、油、水、生理食塩水、グリセリンおよびエタノール）、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などが挙げられる。

【0155】

生理学的に耐容される担体は、当技術分野において十分周知である。例示的な液体担体は、活性成分および水の他に他の材料を含有しない、または生理学的pH値でリン酸ナトリウムなどの緩衝剤、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水のように両方を含有する、滅菌水性溶液である。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カリウムなどの塩、ブドウ糖、ポリエチレングリコールならびに他の溶質を含有し得る。液体組成物は、水に加えて、および水を排除した液相も含有し得る。例示的なそのような追加的液相は、グリセリン、綿実油などの植物油および水油乳剤である。特定の障害または状態の処置において有効である、細胞組成物において使用される活性化合物の量は、障害または状態の性質に依存し、標準的臨床技術によって決定され得る。

【0156】

本明細書において使用される場合、用語「安定」または「安定性」は、長期間にわたって治療有効性（例えば、その目的の生物学的活性および／または生理化学的完全性のすべてまたは大部分）を維持する本明細書に記載される化合物（例えば、RNAガイドエンドヌクレアーゼまたはRNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸および／またはgRNA）の能力を指す。本明細書に記載される1つまたは複数の化合物（例えば、RNAガイドエンドヌクレアーゼもしくはRNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸および／またはgRNAおよびナノ粒子）の安定性は、2週間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、3週間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、28日間、29日間、30日間、31日間、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、1年間、13カ月間、14カ月間、15カ月間、16カ月間、17カ月間、18カ月間、19カ月間、20カ月間、21カ月間、22カ月間、23カ月間、2年間、3年間または3年間より長くであってよい。保存の温度は変動してよい。例えば、保存温度は、 -80°C 、 -65°C 、 -20°C 、 5°C またはこれらの値の任意の2つの間の数字または範囲であってよい、約これらであってよい、少なくともこれらであってよい、または少なくとも約これらであってよい。一部の実施形態では、保存温度は、 -65°C 以下である。

【0157】

本明細書の化合物の安定性は、これらの相対的強度（例えば、基準に対する）を測定することによって評価され得る。一部の実施形態では、さまざまな標的：エフェクター比での、例えばCTX310による標的細胞（例えば、Hep3B肝細胞株）の編集は、決定され得る。編集の百分率は、陰性対照（すなわち、CTX310を含まない）調製物に対して算出され得る。一部の実施形態では、CTX310の濃度は、強度曲線を生成するた

10

20

30

40

50

めに4-パラメーターロジスティックフィットを使用してNGSまたはサンガー配列決定によって決定された編集の百分率に対してプロットされる。試料の相対的強度は、参照標準に対して算出される。

【0158】

一部の実施形態では、組成物の本明細書に記載される化合物（例えば、RNAガイドエンドヌクレアーゼもしくはRNAガイド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、トランスフェクション、例えば、リン酸カルシウム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、電気穿孔法、電氣的核輸送（electrical nuclear transport）、化学的形質導入、電気形質導入（electrotransduction）、リポフェクタミン媒介トランスフェクション、エフェクテン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合せを介してデリバリーされ得る。一部の実施形態では、組成物は、脂質ナノ粒子を使用する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。

10

【0159】

本明細書に記載される組成物は、ANGPTL3関連状態を処置するために、その必要に迫られている対象に投与され得る。したがって、本開示は、対象のANGPTL3遺伝子を編集することによって対象におけるANGPTL3関連状態を処置するための遺伝子治療アプローチも提供する。一部の実施形態では、遺伝子治療アプローチは、患者における関連する細胞型（例えば、肝臓）のゲノム中のANGPTL3遺伝子を機能的にノックアウトする。対象における関連する細胞（例えば、肝臓）のANGPTL3遺伝子は、ゲノムの標的配列を持続的に欠失させ、それを挿入し、編集し、修正し、もしくは置き換え、または外来性配列を挿入し、それにより、ANGPTL3遺伝子を機能的にノックアウトするためにCas9などのRNAガイドエンドヌクレアーゼを使用する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る。これは、血中のANGPTL3タンパク質、ApoBタンパク質ならびにトリグリセリド、LDL、VLDL、総コレステロール、HDL、non-HDLおよび／または他の脂肪リン脂質などの脂質のレベルを持続的に低減することによって、ANGPTL3関連状態のための持続性の治療を提供できる。本明細書において使用される場合、2つの項目（例えば、ANGPTL3および疾患／状態）を参照する用語「関連」は、一方の項目（例えば、ANGPTL3タンパク質レベル）の発生が他方の項目（例えば、疾患または状態）の発生を伴うような2つの項目の間の関係を示し、これだけに限らないが、原因と結果の関係および徴候／症状－疾患関係が挙げられる。

20

30

【0160】

本明細書に記載されるとおり、一部の実施形態では、（a）ANGPTL3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ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、Cas9 mRNA）と複合体化されたナノ粒子（例えば、イオン化可能な脂質を含むLNP）は、必要とする対象にIV注入によって投与される。投与は、例えば、単一用量、または2以上の用量であってよい。例えばナノ粒子は、例えば対象の肝臓に急速に分布されてよく、ナノ粒子は、対象の肝細胞に（例えば、エンドサイトーシスを介して、進入できる。一部の実施形態では、エンドソームのイオン化可能な脂質破壊は、ナノ粒子を壊すことができ、それによりRNAガイドエンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9 mRNA）をコードする核酸をナノ粒子から放出する。RNAガイドエンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9）は、合成され、遺伝子編集を達成するようにエンドヌクレアーゼ－gRNA RNP複合体を形成する。一部の実施形態では、非相同性末端結合（NHEJ）を通じた内在性DNA修復は、ANGPTL3遺伝子へのインデルの導入を生じ、機能性ANGPTL3タンパク質の産生を妨げるフレームシフト突然変異をもたらす。本明細書において実証したとおり、本明細書に記載される方法、組成物、システムおよびキットを使用して、ANGPTL3遺伝子のロバストなオンターゲット編集は、オフターゲット編集を伴わずに達成され得る。

40

50

【0161】

一部の実施形態では、ANGPTL3 関連疾患または障害を処置する方法は、その必要に迫られている対象（例えば、霊長類対象）に、（a）ANGPTL3 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ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸と複合体化された複数のナノ粒子を投与することを含み、それにより霊長類対象においてANGPTL3 関連疾患または障害を軽減する。

【0162】

ANGPTL3 関連疾患および障害として、これだけに限らないが、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、心血管疾患、冠動脈心疾患、糖尿病、真性糖尿病、非インスリン依存性真性糖尿病、脂肪肝、高インスリン症、高脂血症、高トリグリセリド血症、低ベータリポ蛋白血症、炎症、インスリン抵抗性、代謝疾患、肥満、口腔の悪性新生物、脂質代謝障害、口唇および口腔癌、脂質異常症、メタボリック症候群X、低トリグリセリド血症（Hypotriglyceridemia）、オピッツ三角頭蓋症候群、虚血性発作、高トリグリセリド血症結果、家族性2低ベータリポ蛋白血症、家族性低ベータリポ蛋白血症および虚血性脳血管性発作が挙げられる。本明細書に記載されるいずれかの方法を使用してANGPTL3 遺伝子を編集することは、本明細書に記載される疾患および障害の症状を処置、予防および／または緩和するために使用され得る。

【0163】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物は、血中のANGPTL3 タンパク質ならびに、総コレステロール、トリグリセリド、LDL、HDL、および／または他のnon-HDLなどの脂質のレベルを持続的に低減することによって、脂質異常症、低ベータリポ蛋白血症、家族性高コレステロール血症〔ホモ接合性家族性高コレステロール血症（HoFH）およびヘテロ接合性家族性高コレステロール血症（HeFH）を含む〕、高トリグリセリド血症、家族性複合型高脂血症、家族性カイロミクロン血症症候群、多因子カイロミクロン血症症候群、家族性複合型高脂血症（FCHL）、メタボリック症候群（MetS）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、リポタンパク質（a）および総コレステロールの上昇を処置するために使用され得る。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、患者に遺伝子スクリーニングを実施することを含む。例えば、HoFHおよび／またはHeFHについて、遺伝子スクリーニングは、LDLR、APOBおよびPCSK9の1つまたは複数に実施され得る。FCSおよび／またはMCSについて、遺伝子スクリーニングは、LPL、ApoCII、ApoV、LMF-1およびGP1HBP1の1つまたは複数に実施され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるANGPTL3 遺伝子編集処置を受ける対象は、処置を受ける前に遺伝的にスクリーニングされた、例えば、LDLR、APOBおよびPCSK9の1つまたは複数（例えば、HoFHおよび／またはHeFHの処置のため）について遺伝子スクリーニングされた、またはLPL、ApoCII、ApoV、LMF-1およびGP1HBP1 遺伝子型の1つまたは複数について遺伝的にスクリーニングされた（例えば、FCSおよび／またはMCSの処置のため）。一部の実施形態では、対象は、LPL突然変異、GP1HBP1 突然変異、またはこれらの組合せを保有しない。対象は、一遺伝子性、異型遺伝子性または多遺伝子性バックグラウンドを有してよい。

【0164】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法、組成物およびキットは、脂質異常症を処置するために使用され得る。脂質異常症は、動脈の詰まり（アテローム性動脈硬化）の発達に寄与する、血中の脂質のレベルの上昇によって特徴付けられる遺伝的疾患である。これらの脂質として、血漿コレステロール、トリグリセリド、または高密度リポタンパク質が挙げられる。脂質異常症は、心臓発作、脳卒中または他の循環の懸念のリスクを増加させる。現在の管理として、運動および食生活改善などの生活様式の変更ならびにスタチンなどの脂質低下剤の使用が挙げられる。非スタチン脂質低下薬として、胆汁酸捕捉剤、コレステロール吸収阻害剤、ホモ接合性家族性高コレステロール血症に対する薬物、フィブラート、ニコチン酸、オメガ3 脂肪酸および／または併用産生物が挙げられる。処置

の選択肢は、具体的な脂質異常に通常応じるが、異なる脂質異常がしばしば共存する。小児の処置は、食事の変更が実行困難である場合があり、脂質低下治療が有効であると証明されていないことから、さらに困難である。

【0165】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法、組成物およびキットは低ベータリポ蛋白血症を処置するために使用され得る。低ベータリポ蛋白血症は、世界で1000名中1名から3000名中1名の間で罹患する遺伝性疾患（常染色体性潜性）である。低ベータリポ蛋白血症の一般的症状として、脂肪を吸収および輸送する身体的能力を損なう5パーセントより低いLDLコレステロールまたはアポリポタンパク質Bの血漿レベルが挙げられ、網膜変性、ニューロパチー、凝固障害または、肝臓脂肪症と呼ばれる、肝臓における脂肪の異常な蓄積を生じる場合がある。重度に罹患した患者では、肝臓脂肪症は慢性肝疾患（肝硬変）に進行する場合がある。低ベータリポ蛋白血症の現在の処置は、脂肪吸収を改善するための1日あたり15グラムの長鎖脂肪酸の厳密な制限を含む。低ベータリポ蛋白血症を有する乳児では中鎖トリグリセリドの短期の補充が有効である場合があるが、肝毒性を回避するために量は厳密にモニターされなければならない。低ベータリポ蛋白血症を処置するための別の選択肢は、神経学的合併症を予防するための高用量のビタミンE投与である。代替的に、プロトロンビン時間の上昇がビタミンK枯渇を示唆する場合は、ビタミンA（10,000~25,000IU/d）補充が有効である場合がある。

10

【0166】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法、組成物およびキットは、家族性高コレステロール血症を処置するために使用され得る。家族性高コレステロール血症（「FH」）は、出生時からのコレステロールレベルの上昇および早発性冠動脈心疾患の高いリスクによって特徴付けられる低密度リポタンパク質コレステロールの遺伝性障害である。3つの遺伝子（LDLR、APOBおよびPCSK9）のいずれかにおける突然変異が常染色体性顕性FHを生じることが周知である。

20

【0167】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法、組成物およびキットは、高トリグリセリド血症を処置するために使用され得る。高トリグリセリド血症は、血中のトリグリセリドの異常な濃度として定義される。高トリグリセリド血症は、本質的に原発性または二次性である場合がある。原発性高トリグリセリド血症は、トリグリセリド代謝の障害を生じる種々の遺伝的欠損の結果である。二次性の原因は、高脂肪食、肥満、糖尿病、甲状腺機能低下症およびある種の薬物療法などの後天的な原因である。

30

【0168】

一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法についての標的組織は、肝組織である。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法についての標的細胞は、肝細胞である。

【0169】

一部の実施形態では、これらの医薬組成物は、エアロゾルデリバリー、経鼻デリバリー、経膣デリバリー、直腸内デリバリー、バツカルデリバリー、口腔デリバリー、局所デリバリー、外用デリバリー、大槽内デリバリー、腹腔内デリバリー、経口デリバリー、筋肉注射、静脈注射、皮下注射、リンパ節内注射、腫瘍内注射、腹腔内注射および／もしくは皮内注射またはこれらの任意の組合せによって投与され得る。投与は、局所または全身的であり得る。全身投与は、経腸的および非経口投与を含む。一部の実施形態では、1回より多い投与は、種々の間隔の期間、例えば、毎日、毎週、毎月または毎年にもわたって遺伝子発現の望ましいレベルを達成するために使用され得る。

40

【0170】

これらの医薬組成物は、その必要に迫られている対象に薬学的有効量で投与され得る。本明細書において使用される場合、用語「薬学的有効量」は、組織、システム、動物またはヒトの望ましい治療効果および／または生物学的もしくは医学的応答をもたらすであろう医薬組成物の量を意味する。投与は、血液中のANGPTL3タンパク質ならびに脂質

50

、例えば、トリグリセリド、コレステロールおよび／または脂肪リン脂質のレベルにおける望ましい低減など、ANGPTL3遺伝子の発現における望ましい低減を生じ得る。

【0171】

一部の実施形態では、対象は、追加的処置を投与される。追加的処置は、副腎皮質ステロイド、抗H1抗ヒスタミン、抗H2抗ヒスタミンまたはこれらの任意の組合せの投与を含み得る。一部の実施形態では、追加的処置は、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週間またはこれよりも前に対象に投与される。一部の実施形態では、追加的処置は、複数のナノ粒子の投与の最大2時間前に対象に投与される。一部の実施形態では、追加的処置および複数のナノ粒子は、同時に投与される。

10

【0172】

一部の実施形態では、追加的処置は、肝保護薬（シリマリン、ポリエンホスファチジルコリン、ピシクロール、グリチルリチン酸調製物、N-アセチル化L-システイン（NAC）およびグルタチオン（GSH））；抗胆汁うっ滞薬（Anticholestatic drug）（ウルソデオキシコール酸、S-アデノシルメチオニン、コレステラミン）；免疫抑制剤（グルココルチコイド）、および／または抗ヒスタミンの1つまたは複数を含む。一部の実施形態では、抗ヒスタミンは、アクリバスチン、アゼラスチン、エマダスチン（emadastine）、エピナスチン、ブロムフェニラミン、カルビノキサミン、セチリジン、クロルフェニラミン、クラマスチン（clamastine）、シプロヘプタジン、デスロラチジン（desloratidine）、ジフェンヒドラミン、ナファゾリン、フェキソフェナジン、ヒドロキシジン、ケトチフェン、レボシテリジン（levoceterizine）、ロラタジン、オロパタジンおよび／またはこれらの薬学的に許容される塩を含む。一部の実施形態では、副腎皮質ステロイドは、ヒドロコルチゾン、ヒドロキシルトリウムシノロン、アルファ-メチルデキサメタゾン、デキサメタゾン-リン酸、ベクロメタゾンジプロピオネート、クロベタゾールバレレート、デソニド、デソキシメタゾン（desoxymethasone）、デソキシコルチコステロンアセテート、デキサメタゾン、ジクロリゾン、ジフロラゾンジアセテート、ジフルコルトロンバレレート、フルアドレノロン（fludrenolone）、フルクロロロンアセトニド、フルドロコルチゾン、フルメタゾンピバレート、フルシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルコルチンブチルエステル（flucortine butylester）、フルオコルトロン、フルプレドニデン〔フルプレドニリデン（fluprednylidene）〕アセテート、フルランドレノリド、ハルシノニド、ヒドロコルチゾンアセテート、ヒドロコルチゾンブチレート、メチルプレドニゾロン、トリウムシノロンアセトニド、コルチゾン、コルトドキソン、フルセトニド（flucetonide）、フルドロコルチゾン、ジフルオロゾンジアセテート（difluorosone diacetate）、フルアドレノロン（fluradrenolone）、フルドロコルチゾン、ジフルロゾンジアセテート（difluorosone diacetate）、フルアドレノロンアセトニド、メドリゾン、アムシナフェル（amcinafel）、アムシダフィド（amcinafide）、ベタメタゾンおよびそのエステルのバランス、クロロプレドニゾン、クロロプレドニゾンアセテート（chlorprednisone）、クロコルテロン（locortelone）、クレスシノロン（clescinolone）、ジクロリゾン、ジフルプレドネート（difluprednate）、フルクロロニド（flucoronide）、フルニソリド、フルオロメタロン（fluoromethalone）、フルペロロン、フルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾンバレレート、ヒドロコルチゾンシクロペンチルプロピオネート、ヒドロコルタメート、メプレドニゾン、パラメタゾン、プレドニゾロン、プレドニゾン、ベクロメタゾンジプロピオネート、トリウムシノロンなどの副腎皮質ステロイドまたはこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、副腎皮質ステロイドはデキサメタゾンである。一部の実施形態で

20

30

40

50

は、抗ヒスタミンは、ジフェンヒドラミン、セチリジン、ファモチジンまたはこれらの任意の組合せを含む。

【0173】

追加的処置（例えば、副腎皮質ステロイドおよび／または抗ヒスタミン）は、経口で、筋肉内に、静脈内に、皮下にまたはこれらの任意の組合せで投与され得る。一部の実施形態では、副腎皮質ステロイドおよび抗ヒスタミンの投与の経路は異なる。一部の実施形態では、副腎皮質ステロイドと抗ヒスタミンとの投与の経路は同じである。一部の実施形態では、副腎皮質ステロイドは、用量、約、少なくとも、または最大で10mgで静脈内投与される。一部の実施形態では、副腎皮質ステロイドは、10mg以下（例えば、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1または0.5mgまたはこれらの値の任意の2つの間の数字もしくは範囲）の用量で投与される。一部の実施形態では、副腎皮質ステロイドは、用量、約、少なくとも、または最大で5から約60mg（例えば、約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、60mgまたはこれらの値の任意の2つの間の数字もしくは範囲）で投与される。一部の実施形態では、対象は、デキサメタゾンを静脈内に10mgの用量で投与される。

10

【0174】

一部の実施形態では、抗ヒスタミンは、約10mg、約20mgまたは約50mg（例えば、約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、50mgまたはこれらの値の任意の2つの間の数字もしくは範囲）の用量で投与される。一部の実施形態では、対象は、H1-抗ヒスタミンおよびH2-抗ヒスタミンの少なくとも1つを投与される。一部の実施形態では、H1-抗ヒスタミンは、ジフェンヒドラミンである。一部の実施形態では、ジフェンヒドラミンは静脈内に約50mgの用量で投与される。一部の実施形態では、H1-抗ヒスタミンは、セチリジンであり、セチリジンは経口で約10mgの用量で投与される。一部の実施形態では、H2-抗ヒスタミンはファモチジンである。一部の実施形態では、ファモチジンは経口でまたは静脈内に約20mgの用量で投与される。

20

30

【0175】

一部の実施形態では、処置の必要に迫られている対象は、高レベルのANGPTL3タンパク質（例えば、血漿ANGPTL3タンパク質）を有する。高レベルのANGPTL3を有する対象として、例えば、ヒト集団の90%より高いANGPTL3レベルを有する対象が挙げられる。一部の実施形態では、対象は、ANGPTL3関連疾患または状態の症状を有する。一部の実施形態では、対象は、ANGPTL3関連疾患または状態の症状を有しない。一部の実施形態では、対象は、ANGPTL3関連疾患または状態を発症するリスクがある。一部の実施形態では、対象は、ANGPTL3関連疾患または状態を有するか、または発症すると疑われる。

40

【0176】

一部の実施形態では、対象は、異常なレベルのApoBタンパク質（例えば、血漿ApoBタンパク質）を有する。一部の実施形態では、対象は、100mg/dLを超える（例えば、約100mg/dL、110mg/dL、120mg/dL、130mg/dL、140mg/dL、150mg/dL、160mg/dL、180mg/dL、200mg/dL、250mg/dL、300mg/dL、350mg/dL、400mg/dL、500mg/dL、750mg/dL、1000mg/dLまたはこれより高い、のいずれかを超える）血漿ApoBレベルを有する。

【0177】

一部の実施形態では、対象は、異常なレベルの脂質（例えば、総コレステロール、HDL

50

L、トリグリセリド、LDL、VLDLおよび他のnon-HDL)を有する。血液および尿臨床検査などの診断検査は、脂質レベルを測定するために実施され得る。一部の実施形態では、対象は、200mg/dLを超える(例えば、約225mg/dL、250mg/dL、300mg/dL、350mg/dL、400mg/dL、500mg/dL、750mg/dL、1000mg/dLまたはこれより高い、のいずれかを超える)総コレステロールレベルを有する。一部の実施形態では、対象は、約150mg/dLを超える(例えば、約160mg/dL、180mg/dL、200mg/dL、250mg/dL、300mg/dL、350mg/dL、400mg/dL、500mg/dL、750mg/dL、1000mg/dLまたはこれより高い、のいずれかを超える)血漿トリグリセリドレベルを有する。一部の実施形態では、対象は、約60mg/dLを超える(例えば、約65mg/dL、70mg/dL、80mg/dL、90mg/dL、100mg/dL、150mg/dLまたはこれより高い値を超える)血漿HDLレベルを有する。一部の実施形態では、対象は、約30mg/dLを超える(例えば、約35mg/dL、40mg/dL、50mg/dL、60mg/dL、70mg/dL、80mg/dL、90mg/dL、100mg/dLまたはこれより高い値を超える)血漿VLDLレベルを有する。一部の実施形態では、対象は、約50mg/dLを超える(例えば、約60mg/dL、70mg/dL、75mg/dL、80mg/dL、90mg/dL、100mg/dL、130mg/dL、150mg/dL、200mg/dLまたはこれより高い値を超える)血漿LDLレベルを有する。一部の実施形態では、対象は、100mg/dLを超える(例えば、約100mg/dL、110mg/dL、120mg/dL、130mg/dL、140mg/dL、150mg/dL、160mg/dL、180mg/dL、200mg/dL、250mg/dL、300mg/dL、350mg/dL、400mg/dL、500mg/dL、750mg/dL、1000mg/dLまたはこれより高いのいずれかを超える)血漿LDL-Cレベルを有する。一部の実施形態では、対象は、約50mg/dLを超える(例えば、約60mg/dL、70mg/dL、80mg/dL、90mg/dL、100mg/dL、125mg/dL、150mg/dLまたはこれより高い値を超える)血漿Lp(a)レベルを有する。一部の実施形態では、脂質(例えば、トリグリセリドおよびLDL)のレベルは、脂質の血中レベルである。一部の実施形態では、脂質(例えば、トリグリセリドおよびLDL)のレベルは、脂質の血漿レベルである。

10

20

30

【0178】

一部の実施形態では、対象は、ANGPTL3タンパク質の発現レベルまたは機能性を含む活性を正常で健康な対象と比較して実質的に増加させるような、1つまたは複数の遺伝的マーカー(例えば、欠失、挿入、および/または突然変異)を内在性ANGPTL3遺伝子またはその制御配列に有する。一部の実施形態では、対象は、脂質またはリポタンパク質代謝に直接または間接的に関連する遺伝子中に1つまたは複数の遺伝的突然変異を有する(例えば、家族性高コレステロール血症)。一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。一部の実施形態では、対象はヒトである。

【0179】

一部の実施形態では、必要とする対象は、臨床的ASCVD(アテローム硬化性心血管疾患)を有する。臨床的ASCVDは、冠動脈心疾患、心血管疾患、脳卒中または末梢動脈疾患の確定診断を有する患者として定義される。一部の実施形態では、ASCVDを有する対象は、トリグリセリドおよび/またはLDLコレステロールレベルが上昇している。一部の実施形態では、トリグリセリドおよび/またはLDLコレステロールレベルが上昇しているASCVDを有する対象は、2型糖尿病、慢性腎疾患、および/または肝臓脂肪症(例えば、非アルコール性脂肪性肝疾患)も有する。

40

【0180】

一部の実施形態では、必要とする対象は、約、少なくとも、少なくとも約、最大でまたは最大で約5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10.0%、10.5%、11%またはこれらの値のい

50

いずれかの間の数字もしくは範囲の血糖レベル（例えば、糖コートされたヘモグロビンを有する赤血球の百分率を測定するヘモグロビンA1C）を有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、約、少なくとも、少なくとも約、最大でまたは最大で約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350mg/dLまたはこれらの値のいずれかの間の数字もしくは範囲の推定平均グルコースレベルを有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、正常な血糖レベルを有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、前糖尿病または糖尿病を有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、約5.7%から約6.4%の範囲のヘモグロビンA1Cを有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、約6.5%またはこれを超えるヘモグロビンA1Cを有する。

10

【0181】

一部の実施形態では、必要とする対象は、約、少なくとも、少なくとも約、最大でまたは最大で約10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40またはこれらの値のいずれかの間の数字もしくは範囲の肥満度指数（BMI）を有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、約18.5から約24.9の範囲のBMIの健康体重を有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、約25から約29.9の範囲のBMIの過体重である。一部の実施形態では、必要とする対象は、約30またはこれを超えるBMIの肥満を有する。

【0182】

20

一部の実施形態では、必要とする対象は、約、少なくとも、少なくとも約、最大でまたは最大で約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120またはこれらの値のいずれかの間の数字もしくは範囲の推定糸球体濾過量を有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、60～90の範囲（すなわち、腎機能の軽度の減少）の推定糸球体濾過量を有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、軽度から中程度、中程度から重度または重度の腎機能の減少を有する。例えば、必要とする対象は、60より低い、例えば、45～59、30～44、15～29の範囲または15未満の推定糸球体濾過量を有する。

【0183】

30

一部の実施形態では、必要とする対象は、アルコール性肝疾患および非アルコール性脂肪性肝疾患を含む脂肪性肝疾患または肝臓脂肪症を有する。一部の実施形態では、必要とする対象は、肝臓の重量と比較して約、少なくともまたは少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%または10%の肝臓脂肪を有する。対象は、肝臓酵素レベルの上昇、超音波、磁気共鳴画像法（MRI）コンピューター断層撮影（CTスキャン）または肝生検によって脂肪性肝疾患を有するとして診断され得る。

【0184】

一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿ANGPTL3タンパク質レベルは、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字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿ANGPTL3タンパク質レベルは、約、少なくともまたは少なくとも約75%、80%、90%、95%、98%、99%またはこれより大きく低減される。

40

【0185】

一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿Apobタンパク質レベルは、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字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿Apobタンパク質レベルは、約、少なくともまたは少なくとも約75%、80%、90%、95%、98%、99%またはこれより大きく低減される。

50

【0186】

一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法は、心血管疾患についてのリスク因子として示されている、トリグリセリドおよび他の non-HDL のコレステロール含有量の低減を生じ得る。

【0187】

一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿トリグリセリドレベルは、約 150 mg/dL 以下（例えば、約、最大でまたは最大で約 145 mg/dL 、 140 mg/dL 、 130 mg/dL 、 120 mg/dL 、 110 mg/dL 、 100 mg/dL 、 90 mg/dL 、 80 mg/dL 、 70 mg/dL 、 60 mg/dL 、 50 mg/dL 、 40 mg/dL 、 30 mg/dL 、 20 mg/dL 以下）に低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿トリグリセリドレベルは、約 40 mg/dL 以下に低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿トリグリセリドレベルは、約 30 mg/dL 以下に低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿トリグリセリドレベルは、約 20 mg/dL 以下に低減される。

10

【0188】

一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿トリグリセリドレベルは、約、少なくともまたは少なくとも約 30% 、 35% 、 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字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿トリグリセリドレベルは、約、少なくともまたは少なくとも約 75% 、 80% 、 90% 、 95% 、 98% 、 99% またはこれを超えて低減される。

20

【0189】

一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿 LDL レベルは、約、最大でまたは最大で約 130 mg/dL 、 100 mg/dL 、 70 mg/dL 、 50 mg/dL またはこれらの値の任意の2つの間の数字に低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿 LDL-C レベルは、約、最大でまたは最大で約 90 mg/dL 、 80 mg/dL 、 70 mg/dL 、 60 mg/dL 、 50 mg/dL またはこれらの値の任意の2つの間の数字に低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿 VLDL レベルは、約、最大でまたは最大で約、最大でまたは最大で約 30 mg/dL 、 25 mg/dL 、 20 mg/dL 、 10 mg/dL またはこれらの値の任意の2つの間の数字に低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における総コレステロールレベルは、約、最大でまたは最大で約 200 mg/dL 、 175 mg/dL 、 150 mg/dL 、 100 mg/dL 、 75 mg/dL またはこれらの値の任意の2つの間の数字に低減される。

30

【0190】

一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿 LDL 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字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿 LDL-C 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字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における血漿 VLDL 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字もしくは範囲低減される。一部の実施形態では、方法を実行した後の対象における総コレステロールレベルは、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字もしくは範囲低減される。

40

【0191】

一部の実施形態では、臨床研究は、本明細書に記載される医薬製剤および組成物の安全

50

性および有効性を決定するために使用される。前記研究についての組み入れ／除外基準は、変動する場合がある（同様に、下記実施例 5 を参照されたい）。一部の実施形態では、組み入れ基準は、以下の 1 つまたは複数を含み得る：

【0192】

1. 対象は、18 から 70 歳の間のヒト対象であり、最大体重は 100 kg を超えない。

【0193】

2. 対象は、書面のインフォームドコンセントを提出することができる。

【0194】

3. 対象は、臨床的アテローム硬化性心血管疾患（ASCVD）を確定診断されており、200 mg / d l を超える高い TG レベル、および／または 100 mg / d l を超える高い LDL レベルを有する。研究集団は、冠動脈心疾患、心血管疾患、脳卒中または末梢動脈疾患の病歴を有する患者を含む。

【0195】

4. スタチンを受けている対象は、スタチンの最大耐用量を受けているべきである。スタチンに不耐容と見なされる場合、患者は、2 つの異なるスタチン製剤のすべての用量に不耐容であるべきである。

ー エゼチミブ、PCSK9 阻害剤などを含む処置の追加的な現在の標準治療（SOC）ラインへの抵抗性、調査者の判断による。

ー スタチンまたはエゼチミブを受けている対象は、研究参加の際は、計画された薬物療法または用量増加を伴わずに、スクリーニング前 > 30 日間は安定用量にあるべきである。

【0196】

5. 妊娠の可能性がある対象（初経後、未処置の子宮および少なくとも 1 個の卵巣を有する、および閉経後 1 年未満である）および生物学的男性対象は、同意から薬物注入（例えば、CTX 310 注入）後少なくとも 6 カ月間にわたって避妊の許容可能な方法（複数可）を使用することに同意しなければならない。

【0197】

6. 対象は、スケジュールされた来診、処置プラン、臨床検査、避妊ガイドラインおよび他の研究手順に応じる意思があり、可能である。

【0198】

7. 対象は、本研究の完了後の追加的な長期経過観察研究に参加する意思がある。

【0199】

除外基準は、以下の基準の 1 つまたは複数を含み得る。一部の実施形態では、臨床研究への登録に適格であるために、対象は、下に列挙される除外基準のいずれにも合致してはならない。

【0200】

1. 対象が、顕著な凝固障害の病歴を有する。

【0201】

2. 対象が、調査者の所見で、研究の結果を混乱させ得るか、または対象に研究薬を投与することに追加的なリスクを保有し得る、任意の病気または任意の臨床的状態の病歴を有する。これは、これだけに限らないが、以下を含み得る：関連薬物アレルギーの病歴；中枢神経系疾患の病歴；臨床的に重要な病態の病歴もしくは存在；または精神医学的病気の病歴、または家族性がん症候群の病歴。

【0202】

3. 対象が、任意の以前のまたは現在の悪性腫瘍もしくは骨髄増殖性障害または顕著な免疫不全障害を有する。

【0203】

4. 対象が、ホモ接合性家族性高コレステロール血症の確定診断を有する患者である。

【0204】

5. 対象が、以下の全血球数 (CBC) : 正常白血球 (WBC) 細胞 $2,500$ 個 / m c L 未満、ヘモグロビン (Hb) 男性 $11 \text{ g} / \text{d L}$ 未満、女性 $10 \text{ g} / \text{d L}$ 未満、血小板数 $100,000 / \text{m c L}$ 未満を有する。

【0205】

6. 対象が：(a) 正常の上限 (ULN) の $3 \times$ を超えるアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、もしくは ULN の $2 \times$ を超える直接ビリルビン値、または (b) $1.5 \times \text{ULN}$ を超えるベースラインプロトロンビン時間 (国際標準化比 [INR])、または (c) 肝硬変の病歴として定義される、進行性肝疾患を有する。

【0206】

7. 対象が、心エコー図によって 40% 未満の心臓左室駆出率 (LVEF) を有する。

【0207】

8. 対象が、管理されていない高血圧、管理されていない不整脈またはニューヨーク心臓協会 (NYHA) クラス II、III および IV 心不全 (HF) を有する。

【0208】

9. 対象が、1日目までの24週間以内に急性冠状動脈症候群事象を有する。

【0209】

10. 対象が、1日目までの24週間以内に中枢神経系 (CNS) 発作を有する。

【0210】

11. 対象が、 $60 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ 未満のベースライン推定糸球体濾過量を有する。

【0211】

12. 対象が、遺伝子治療／編集産生物を用いた先行する処置を受けた。

【0212】

13. 対象が、ヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1) またはヒト免疫不全ウイルス-2 (HIV-2)、B型肝炎ウイルス (HBV) (B型肝炎コア抗体 [HBcAb] もしくは核酸 (nucleic acid) 検査 [NAT]) またはC型肝炎ウイルス (HCV) (NAT) について血清学的検査陽性を有する。

【0213】

14. 対象が、肝細胞を標的とする任意の siRNA またはアンチセンスオリゴヌクレオチド分子を現在使用しているか、または1日目までの365日間以内に使用した。

【0214】

15. 対象が、任意のモノクローナル Ab 処置を現在使用しているか、または1日目までの90日間以内に使用していた。

【0215】

16. 対象が、スクリーニングまでの30日間以内、または調査薬剤の半減期の5倍未満、のスクリーニングからいずれかより長い方で、調査薬物／産生物を用いる別の臨床研究に参加した。

【0216】

17. 対象が、プロトコールに概要を述べた研究手順に対象が応じないという、調査者による評価を有する。

【0217】

18. 対象が、妊娠中または授乳中の女性である。

【0218】

19. 対象が、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を有する。

【0219】

本明細書で開示される方法、システム、キットおよび組成物は、臨床的アテローム硬化性心血管疾患 (ASCVD)、ホモ接合性家族性高コレステロール血症 (HoFH)、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症 (HeFH)、家族性カイロミクロン血症症候群 (FCS)、多因子カイロミクロン血症症候群 (MCS)、家族性複合型高脂血症 (FC

10

20

30

40

50

H または F C H L)、メタボリック症候群 (M e t S)、2 型糖尿病 (T 2 D) および非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) の 1 つまたは複数を有する対象を処置するために使用され得る。H o F H および F C S は希少疾患である。一部の実施形態では、方法は、L D L を低下させるために有効であり、それにより、家族性高コレステロール血症 (F H) を処置する。一部の実施形態では、対象は、A S C V D ならびにトリグリセリド (T G) レベルの増加および／または高い低密度ーリポタンパク質コレステロール (L D L - C) レベルを有する対象であり、現在利用可能な処置に抵抗性である対象 (例えば、エビナクマブ、インクリシラン、エゼチミブおよびスタチンの 1 つまたは複数に対する非応答者) などを含む。

【0220】

本明細書で提供するのは、本明細書に記載される方法を実行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、A N G P T L 3 遺伝子を標的とする g R N A) および R N A ガイドエンドヌクレアーゼ (例えば、C a s 9) または R N A ガイド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では、キットは、望ましい遺伝子修飾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。キットの構成成分は、別々の容器中にあってよく、または単一の容器中に組み合わされてもよい。

【0221】

上に記載される任意のキットは、緩衝剤、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを細胞に導入するための緩衝剤、洗浄緩衝剤、対照試薬、対照ベクター、対照 R N A ポリヌクレオチド、D N A からのポリペプチドのインビトロ産生のための試薬、配列決定のためのアダプターなどから選択される 1 つまたは複数の追加的試薬をさらに含み得る。緩衝剤は、安定化緩衝剤、還元緩衝剤、希釈緩衝剤などであり得る。キットは、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 D N A 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 つまたは複数の構成成分も含み得る。

【0222】

一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法を実行するためにキットの構成成分を使用するための説明書をさらに含み得る。方法を実行するための説明書は、好適な記録メディアに一般に記録される。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、キットまたはその構成成分の容器のラベルに (すなわち、パッケージングまたはサブパッケージングと関連して) 添付文書としてキットに存在してよい。説明書は、好適なコンピューター読み取り可能な保存メディア、例えば、C D - R O M、ディスク、フラッシュドライブなどに存在する電子的保存データファイルとして存在してよい。一部の場合では、実際の説明書は、キットに存在せず、遠隔情報源から (例えば、インターネットを通じて) 説明書を得るための手段が提供される場合がある。本実施形態の例は、説明書が閲覧できる、および／またはそこから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。説明書と共に、説明書を得るためのこの手段は、好適な基剤に記録されてよい。

上で考察した実施形態の一部の態様は、本開示の範囲をいかなる方法においても限定することを意図しない続く実施例においてさらに詳細に開示される。

【実施例】

【0223】

【実施例 1】

【0224】

非ヒト霊長類 (N H P) における A N G P T L 3 遺伝子編集効率の評価

本実施例は、処置前後で A N G P T L 3 タンパク質レベルおよびトリグリセリドレベルを測定することによって、非ヒト霊長類 (N H P) (例えば、カニクイザル) における A N G P T L 3 遺伝子編集効率を評価する。

【0225】

多数の C R I S P R - C a s 9 / g R N A 組合せを評価し、実質的に低いオフターゲット

10

20

30

40

50

ト効果を有し、ANGPTL3遺伝子の高効率の欠失を生じるリード製剤をNHPでインビボにおいて試験した。配列番号4のgRNA分子（例えば、配列番号21）およびCas9 mRNAをカプセル化している脂質ナノ粒子をNHPに注射し、血漿試料を図1に示す研究設計に従って投薬後1日目は1時間ごとに回収した。

【0226】

表3に示すとおり、5群の動物（動物2匹／群）を図1の研究設計に従って1用量または2用量を用いて処置した（表3の最後の欄も参照されたい）。例えば、群1のNHP（表3）を1日目に第1の用量（例えば、2mg/kg）で、および22日目に第2の用量（例えば、2mg/kg）を用いて処置した。血漿試料を4日目、8日目、15日目、22日目、29日目および36日目に回収した。群IIのNHP（表3）を1日目の第1の用量だけで処置した。血漿試料を4日目、8日目、15日目および22日目に回収した。ANGPTL3タンパク質についてのサンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を回収した血漿におけるANGPTL3タンパク質の濃度を検出するために使用し、EasyRA分析を試料の脂質プロファイルを分析するために使用した。

【0227】

【表3】

表3: 非限定的例示的 NHP 研究設計

群番号	群当たりの動物数	製剤	動物 ID	投薬数	施設での血漿試料*
1	2	FM-1746C (T6.02/RNA097)	6925939304 6076075382	2	ベースライン: -14 日目、-10 日目、1 日目(投薬前) 処置: 4 日目、8 日目、15 日目、22 日目(2 回目の投薬前)、29 日目、36 日目
2	2	FM-1796A (T39.02/RNA010)	9113322743 8101164842	2	ベースライン: -14 日目(2 セット)、-10 日目(2 セット)、1 日目(投薬前) 処置: 4 日目、8 日目、15 日目、22 日目
3	2	FM-1796C (T6.02/RNA010)	7084909232 8956929929	2	ベースライン: -14 日目、-10 日目、1 日目(投薬前) 処置: 4 日目、8 日目、15 日目、22 日目
4	2	FM-1746B (T4.01/RNA097)	4796156004 9427798992	2	ベースライン: -14 日目(2 セット)、-10 日目(2 セット)、1 日目(投薬前) 処置: 4 日目、8 日目、15 日目、22 日目
5	2	FM-1796B (T4.01/RNA010)	3434257266 3539408714	1	ベースライン: -14 日目、-10 日目、1 日目(投薬前) 処置: 4 日目、8 日目、15 日目、22 日目

【0228】

図2は、群1 NHPおよび群3 NHPにおけるベースラインからの血漿ANGPTL3タンパク質の百分率変化を示すグラフである。結果は、NHP血漿ANGPTL3レベルが、Cas9 mRNAおよびANGPTL3遺伝子を標的とするgRNAを使用して顕著に減少することを実証している。一般に、ベースラインからの約70%~90%減

少が NHP において観察された。例えば、群 I では、ベースラインからの ANGPTL3 タンパク質の 73% および 90% 低減が観察された。

【0229】

図 3A は、処置前後での群 1 における NHP の血漿トリグリセリドレベルを示すグラフである。図 3B は、群 1 における NHP のベースラインからの血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。図 4A は、処置前後での群 3 における NHP の血漿トリグリセリドレベルを示すグラフである。図 4B は、群 3 における NHP のベースラインからの血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。図 5A ~ 図 5B は、群 1 (図 5A) および群 3 (図 5B) における NHP の血漿トリグリセリドレベルの最大百分率変化を示す 2 つのグラフである。図 5C ~ 図 5D は、群 I (図 5C) および群 3 (図 5D) における 36 日目でのベースラインからの血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示す 2 つのグラフである。36 日目での、群 1 ではベースラインからのトリグリセリドレベルの 50% および 76% 低減が、群 3 では約 31% が観察された。

10

【0230】

結果は、ANGPTL3 タンパク質および血漿トリグリセリドレベルの両方が、Cas9 mRNA および ANGPTL3 遺伝子での gRNA 標的化を使用して顕著に減少されることを実証している。

【実施例 2】

【0231】

肝臓および他の器官組織における ANGPTL3 遺伝子編集効率の評価

20

本実施例では、ANGPTL3 遺伝子編集効率 (例えば、インデル編集百分率) を肝臓ならびに、脾臓、脳、心臓、腎臓、肺および精巣を含む他の器官組織において測定した。

【0232】

NHP の器官の生検を実施し、細胞を生検した材料から単離し、染色体 DNA をこれらの細胞から抽出し、オンターゲット切断頻度を TIDES 分析を使用してインデル頻度を決定することによって測定した。

【0233】

図 6A ~ 図 6D は、さまざまな器官組織における ANGPTL3 遺伝子編集効率を示すグラフである。結果は、ANGPTL3 遺伝子編集効率が他の器官組織 (issues) においてよりも肝臓において顕著に高いことを実証している。インデル頻度は、他の器官細胞において実質的に低いインデル頻度 (例えば、0% から 10% の間) を有して、検査した 4 匹の NHP の肝細胞において 30% から 65% の範囲である。図 7 は、群 I および群 III の NHP の肝細胞における ANGPTL3 遺伝子編集の百分率を示すグラフである。

30

【0234】

NHP の肝臓の状態についての情報を提示するために処置前後で肝機能検査も実行した。図 8A ~ 図 8E は、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) (図 8A)、アルカリフォスファターゼ (ALP) (図 8B)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (図 8C)、血中アルブミン (ALB) (図 8D) およびビリルビン (TBIL) (図 8E) の肝機能検査を示すグラフである。ANGPTL3 遺伝子編集後に肝臓機能障害または損傷は検出しなかった。

40

【実施例 3】

【0235】

ANGPTL3 gRNA 製剤の毒性研究

本実施例では、毒性研究を NHP において実行した。配列番号 3 の gRNA 分子 (ANGPTL3 __T10、例えば、配列番号 20) および Cas9 mRNA をカプセル化した脂質ナノ粒子を「CTX310」と称される ANGPTL3 gRNA 製剤に製剤化した。CTX310 製剤を 1 日目に 60 分間 IV 注入を介して単一用量で 3 つの群の NHP (例えば、カニクイザル) に 0.5 mg/kg、1.5 mg/kg、および 3.0 mg/kg の用量レベルでそれぞれ投与した。各群の NHP は、4 匹のメスおよび 4 匹のオス

50

ニクイザルを含む。血漿試料を図 9 に示す研究設計に従って回収した。中間剖検を 37 日目に、最終剖検を 103 日目に実施した。

【0236】

CTX310 パイロット毒性研究から得られたデータを実施例 1 で実行した ANGPTL3 NHP 研究からのデータと共に示す。

【0237】

【表 4】

表4: CTX310パイロット毒性研究の結果

	ANGPTL3概念 実証	CTX310パイロット毒性研究		
時点	5週間	1カ月	1カ月	1カ月
用量レベル	2 mg/kg	0.5 mg/kg	1.5 mg/kg	3 mg/kg
対象の数	4	8	8	8
ANGPTL3低下の%	76 ± 9 %	56 ± 16 %	84 ± 13 %	89 ± 5 %
肝臓編集 (剖検)	53 ± 11 %	41.18 ± 15.09%	64.76 ± 11.02 %	71.35 ± 1.80%
トリグリセリド(変 化の%)	47 ± 21 %	26 ± 27 %	58 ± 11 %	52 ± 15 %
トリグリセリド 絶対値	22 ± 4 mg/dL	39 ± 11 mg/dL	23 ± 9 mg/dL	25 ± 7 mg/dL
LDL (変化の%)	データなし (NHP食餌)			
データ:平均 ± SD				

10

20

【0238】

CTX310 処置カニクイザルにおける遺伝子編集の組織分布も決定した（例えば、図 10A～図 10Dを参照されたい）。カニクイザルを3つの異なる用量のCTX310：0.5 mg/kg（図 10A）、1.5 mg/kg（図 10B）および3.0 mg/kg（図 10C）を用いてIV注入した。各処置群からのサル4匹を37日目に殺し、さまざまな組織を回収し、編集頻度を次世代配列決定を使用して剖検試料において測定した。0.5、1.5および3 mg/kg 処置コホートについての37日目のデータを図 10A、図 10Bおよび図 10Cにそれぞれ示す。データは、平均 ± SDとして表す。図 10Dは、各投薬コホートについて投与後3カ月での遺伝子編集効率データを示す。結果は、ANGPTL3 遺伝子編集効率が他の器官組織においてよりも肝臓において顕著に高いことを実証している。1カ月（表 10A）および3カ月（表 10B）についての編集効率も下に示す。

30

【0239】

40

50

【表 5】

表 10A: オフターゲット評価のための組織及び細胞型-1 カ月コホート

組織	対照		CTX310 0.5 mg/kg		CTX310 1.5 mg/kg		CTX310 3.0 mg/kg	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
肝臓	0.06	0.01	41.18	15.09	64.76	11.02	71.35	1.80
脾臓	0.04	0.01	1.87	2.52	7.19	2.99	9.42	2.14
副腎	0.05	0.02	0.47	0.70	0.44	0.18	2.02	0.79
脳	0.09	0.05	0.09	0.04	0.10	0.04	0.18	0.14
心臓	0.04	0.01	0.09	0.03	0.12	0.03	0.23	0.03
腎臓	0.07	0.02	0.11	0.03	0.36	0.21	0.76	0.53
肺	0.06	0.01	0.05	0.01	0.14	0.10	0.12	0.05
精巣上体	0.08	0.03	0.19	0.20	0.09	0.02	0.18	0.10
精巣	0.05	0.01	0.11	0.03	0.32	0.16	0.25	NA
卵巣	0.06	0.02	0.13	0.08	0.23	0.12	0.81	0.20

10

【 0 2 4 0 】

【表 6】

表 10B: オフターゲット評価のための組織及び細胞型-3 カ月コホート

組織	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
肝臓	0.07	0.02	41.89	16.37	64.43	5.46	63.46	3.85
脾臓	0.09	0.08	0.62	0.06	3.02	1.2	7.79	2.18
副腎	0.14	0.12	0.16	0.02	0.51	0.14	2.22	1.36
脳	0.22	0.23	0.12	0.08	0.15	0.08	0.28	0.22
心臓	0.07	0.03	0.23	0.18	0.26	0.16	0.29	0.15
腎臓	0.06	0.02	0.15	0.1	0.51	0.33	0.83	0.43
肺	0.11	0.03	0.07	0.03	0.09	0.04	0.25	0.1
精巣上体	0.07	0.02	0.38	0.01	0.24	0.13	0.36	0.03
精巣	0.04	0.01	0.16	0.03	0.36	0.21	0.3	0.03
卵巣	0.29	0.35	0.09	0.05	0.08	0.03	0.68	0.82

20

30

【 0 2 4 1 】

図 1 1 および下の表 5 は、0.5、1.5 および 3 mg/kg CTX310 を用いて処置したカニクイザルの肝細胞における ANGPTL3 遺伝子編集の百分率を示す。肝臓において効率的な編集は達成された。図 1 1 は、NHP における最大で 70% の用量依存的肝臓編集を示す。

【 0 2 4 2 】

【表 7】

表5: 肝臓におけるANGPTL3遺伝子編集の百分率

0.5 mg/kg	1.5 mg/kg	3 mg/kg
31	66	73
51	49	69
26	72	71
57	73	72

40

【 0 2 4 3 】

表 6 および図 1 2 A は、3 つの異なる用量の CTX310 (0.5、1.5 および 3.0 mg/kg) を用いて処置したカニクイザルの ANGPTL3 タンパク質の血漿レベル

50

を対照群と比較して示す。表 7 および図 1 2 B は、C T X 3 1 0 処置カニクイザルのベースラインからの A N G P T L 3 タンパク質の血漿レベルの百分率変化を示す。ベースラインは、処置 1 3 日前（- 1 3 日目）および 1 0 日前（- 1 0 日目）ならびに 1 日目（投薬前）の A N G P T L 3 タンパク質レベルの平均である。

【 0 2 4 4 】

【 表 8 】

表6: ANGPTL3血漿タンパク質レベル(NG/ML)

	投薬前		処置期間				
	-13日目	-10日目	1日目	8日目	15日目	29日目	37日目
対照	56	50	76	80	54	62	62
0.5 mg/kg	60	50	72	39	33	29	27
1.5 mg/kg	60	50	47	11	7	7	8
3 mg/kg	45	32	35	5	4	3	4

10

【 0 2 4 5 】

【 表 9 】

表7: ANGPTL3 血漿タンパク質レベルのベースラインからの百分率変化

	8日目	15日目	29日目	37日目
対照	40	-9	5	7
0.5 mg/kg	-34	-46	-52	-56
1.5 mg/kg	-79	-88	-87	-84
3 mg/kg	-85	-90	-92	-89

20

【 0 2 4 6 】

図 1 2 A および 1 2 B の両方は C T X 3 1 0 投薬後の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の用量依存的低減を実証している。ベースラインからの A N G P T L 3 タンパク質の約 5 6 % 低減を、0 . 5 m g / k g C T X 3 1 0 を用いて処置したカニクイザルにおいて観察し、ベースラインからの約 8 4 % ~ 8 9 % 低減を 1 . 5 m g / k g および 3 m g / k g C T X 3 1 0 を用いて処置したカニクイザルにおいて観察した（例えば、図 1 2 B を参照されたい）。図 1 2 C は、C T X 3 1 0 処置後 3 7 日目のカニクイザルのベースラインからの血漿 A N G P T L 3 タンパク質の百分率変化を示すグラフである。図 1 2 D は、血清 A N G P T L 3 タンパク質における約 9 0 % 低減を実証する血清 A N G P T L 3 タンパク質の百分率変化を示すグラフである。図 1 2 E は、C T X 3 1 0 処置後約 3 カ月でのカニクイザルのベースラインからの血漿 A N G P T L 3 タンパク質の百分率変化を示すグラフである。

30

【 0 2 4 7 】

図 1 3 A ~ 図 1 3 C は、3 つの異なる用量：0 . 5 m g / k g （図 1 3 A）、1 . 5 m g / k g （図 1 3 B）および 3 . 0 m g / k g （図 1 3 C）を用いた C T X 3 1 0 処置後のカニクイザルのベースラインに標準化した血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。ベースラインは、処置 1 0 日前（- 1 0 日目）のトリグリセリドレベルと 1 日目（投薬前）のトリグリセリドレベルとの平均である。表 8 および図 1 3 D は、C T X 3 1 0 処置後 3 7 日目のカニクイザルのベースラインからの血漿トリグリセリドレベルの百分率変化を示す。3 7 日目に、ベースラインからのトリグリセリドレベルの 5 0 % を超える低減が、1 . 5 m g / k g および 3 m g / k g C T X 3 1 0 製剤を用いて処置した N H P において観察された。図 1 3 E は、C T X 3 1 0 処置 1 カ月後のベースラインからの血清トリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフであり、1 カ月で血清トリグリセリドにおける > 5 0 % 低減を実証している。図 1 3 F ~ 図 1 3 H は、3 つの異なる用量：0 . 5 m g / k g （図 1 3 F）、1 . 5 m g / k g （図 1 3 G）および 3 . 0 m g / k g （図 1 3 H）を用いた C T X 3 1 0 処置後のカニクイザルにおける m g / d L での血漿トリグリセリドレベルを示す。図 1 3 I は、C T X 3 1 0 処置 3 カ月後のベースライン

40

50

からのトリグリセリドレベルの百分率変化を示すグラフである。

【0248】

【表10】

表8: ベースラインからのトリグリセリド百分率変化

群	変化の%
対照	-0.2
0.5 mg/kg	-26.1
1.5 mg/kg	-57.7
3 mg/kg	-51.5

10

【0249】

図14Aは、肝臓におけるトリグリセリド低減とANGPTL3遺伝子編集百分率との相関を示すプロットである。図14Bは、肝臓におけるANGPTL3タンパク質低減とANGPTL3遺伝子編集百分率との間の相関を示すプロットである。結果は、肝臓におけるANGPTL3遺伝子編集効率が、トリグリセリドレベルおよびANGPTL3タンパク質レベルにおける低減と正に相関することを実証している。

【0250】

NHPの肝臓の状態についての情報を提示するために肝機能検査も処置前後で実行した。データは、CTX310がALT、AST、ALPおよびビリルビンにおいて用量依存的一過性上昇を生じることを示す。投与後に肝臓機能障害または損傷は検出されなかった（例えば、投与14日後）（図20A～図21B）。図20A～図20Bに示すデータは非優良試験所基準（GLP）毒性研究（下に示す）由来であり、図21A～図21BはGLP毒性学研究からのデータである。

20

【0251】

非GLP用量範囲設定毒性研究をCTX310について実施した。本研究は、安全性薬理学についてのデータを含む。3カ月用量範囲設定研究を、カニクイザルにおけるCTX310の単一用量の毒性を評価するために実施した（非GLP、表11）。本研究でのエンドポイントは、臨床所見、臨床病理学（血液学、血清化学および凝固）、スナップショットECGおよび組織学を含む。

【0252】

【表11】

表 11: 用量範囲設定研究設計						
試験品	用量レベル (mg/kg)	中間剖検 (5 週間)		最終剖検 (12 週間)		エンドポイント
		オス	メス	オス	メス	
媒体	0	2	2	2	2	臨床観察、体重、血液学、血清化学、凝固、病理組織学、心電図検査
CTX310	0.5	2	2	2	2	
	1.5	2	2	2	2	
	3.0	2	2	2	2	

40

【0253】

本研究では、スケジュール外の死はなかった。CTX310に関連する異常な臨床徴候または体重における変化は観察されなかった。図20A～図20Bに示すとおり、肝酵素（アルカリフォスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニントランスアミナーゼ）における一過的な増加が用量依存の様式で1.5または3.0 mg/kgのCTX310のいずれかを用いて処置した動物において観察された。この増加は、3日目にピークになり、8日目に一部回復し、15日目にベースラインレベルに戻った。ビリルビンレベルは、3.0 mg/kg群においてだけ上昇し、15日目に完全に回復した。TGレベルは、3.0 mg/kg群の動物2匹において3日目に鋭く上昇したが、8日

50

目に急速に回復した。TGレベルおよび総コレステロールレベルの両方は、CTX310を用いて処置したすべての動物において用量依存的様式で減少した。いかなる血液学または凝固パラメーターにもCTX310関連の変化はなかった。

【0254】

ECG追跡を－6日目の順化の際に1回、次いで28日目に1回および79日目に1回捕捉した。本研究で評価したすべての心電図は、定性的におよび定量的に正常であると考えられた。－6日目の順化の際の1回、28日目および79日目での投薬後平均値の1回および対照値との比較に基づいて、すべての用量レベルで律動および波形形態における異常は見出されなかった。心拍数へのCTX310に関連する影響は、いずれのレベルでも観察されなかった。

10

【0255】

中間および最終剖検の両方で、組織を回収し、秤量し、病理組織学を評価した。12週間の研究を通じて、全体的な病理学または器官重量に異常な所見は観察されなかった。3mg/kg群で高頻度だが（媒体群の動物1/4匹、3mg/kg群の動物4/4匹）、対照群および処置群の両方に存在した最小の混合炎症性細胞浸潤の特異な異常な病理組織学所見があった。この所見は、変性とも壊死とも関連しておらず、それにより有害でないと考えられた。この所見の発生率および重症度は、1カ月および3カ月剖検で同様であった。投与後のLNP残留性を分析する研究は、大部分のLNPが投与1週間以内に循環から除去されることを見出した。

20

【実施例4】

【0256】

脂質ナノ粒子取り込みへのLDL受容体の効果

肝細胞への伝統的LNP取り込みは、アポリポタンパク質E－低密度リポタンパク質受容体（ApoE－LDLR）またはN－アセチル－D－ガラクトサミン／アシアロ糖タンパク質受容体経路（GalNAc－ASGPR）によって媒介される。ApoE－LDLR経路は、標的肝細胞にLDLRの存在を必要とする一方で、GalNAc－ASGPR経路は、投薬されるLNP上にGalNAcの存在を必要とする。これらの経路は、遺伝性障害を有する患者がLDLRの欠失についてヘテロ接合性（HeFH）またはホモ接合性（HoFH）として典型的には存在することから、家族性高コレステロール血症のLNPに基づく処置のために特に興味を持たれている。肝細胞でのLDLRの存在なしでは、これらの患者においてLNPに基づく処置はできないであろう。代替的にLDLR欠損患者では、GalNAc－ASGPR経路を介して取り込ませるためにGalNAcをLNPに組み込む場合がある。

30

【0257】

本実施例では、マウスANGPTL3遺伝子を標的とするgRNAを含むさまざまなLNPをマウスに投与し、肝臓へのLNPのデリバリーがLDL受容体に依存するかどうかを決定した。2つのLNP（RIV－000005およびRIV－000006）をGalNAc－ASGPR取り込み経路に従うように製剤化した、一方はGalNAcを含まず（RIV－000005）、他方は2.5% GalNAcを含んだ（RIV－000006）。第3のLNP（RIV－000004）をALN－369／DSPC／コレステロール／DMPE－PEGを用いて製剤化した。RIV－000004は、ApoE－LDLR取り込み経路に従うことが周知であり、ホモ接合性LDLR欠失を有するマウスにおいて有効であることは期待できない。3つすべてのLNPは、マウスANGPTL3遺伝子を標的とする同じgRNAおよび本明細書に記載されるSpCas9 RNAを含む。製剤RIV－000004、RIV－000005およびRIV－000006の肝臓における編集効率、血漿ANGPTL3タンパク質レベルおよび血漿脂質レベルを本実施例で評価した。

40

【0258】

20～25gの間の体重の4～5週齢のメスマウス合計71匹をこれらの研究で使用した。C57BL／6Jまたは野生型マウス（ストック番号000664）21匹、B6．

50

LDLR^{tm1Her}/JまたはLDLR KOマウス(LDLR^{-/-}) (ストック番号002207) 25匹およびLDLRヘテロ接合性(LDLR^{+/-}) マウス25匹はすべてThe Jackson Laboratory (Bar Harbor、ME) から得た。LDLRヘテロ接合性マウスをThe Jackson Laboratory (Bar Harbor、ME) に特別注文し、C57BL/6Jまたは野生型系統とLDLR KOマウスとの交雑によって作製した。

【0259】
インビボ実験設計を表9に要約する。
【0260】
【表12】

表 9: 研究の詳細の要約

研究の詳細	説明																																	
原材料	LNP製剤: RIV-000004、RIV-000005およびRIV-000006																																	
群および群のサイズ	研究1: 2 mg/kg 静脈内投与																																	
	<table><tr><th>試験品</th><th>マウス系統</th><th>試料サイズ(n)</th></tr><tr><td rowspan="3">RIV-000005</td><td>WT</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{-/-}</td><td>5</td></tr><tr><td>LDLR^{+/-}</td><td>5</td></tr><tr><td rowspan="3">RIV-000006</td><td>WT</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{-/-}</td><td>5</td></tr><tr><td>LDLR^{+/-}</td><td>5</td></tr><tr><td rowspan="3">対照 (PBS)</td><td>WT</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{-/-}</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{+/-}</td><td>3</td></tr></table>	試験品	マウス系統	試料サイズ(n)	RIV-000005	WT	3	LDLR ^{-/-}	5	LDLR ^{+/-}	5	RIV-000006	WT	3	LDLR ^{-/-}	5	LDLR ^{+/-}	5	対照 (PBS)	WT	3	LDLR ^{-/-}	3	LDLR ^{+/-}	3									
	試験品	マウス系統	試料サイズ(n)																															
	RIV-000005	WT	3																															
		LDLR ^{-/-}	5																															
		LDLR ^{+/-}	5																															
	RIV-000006	WT	3																															
		LDLR ^{-/-}	5																															
		LDLR ^{+/-}	5																															
	対照 (PBS)	WT	3																															
		LDLR ^{-/-}	3																															
		LDLR ^{+/-}	3																															
	研究 2: 1 mg/kg 静脈内投与																																	
	<table><tr><th>試験品</th><th>マウス系統</th><th>試料サイズ(n)</th></tr><tr><td rowspan="3">RIV-000004</td><td>WT</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{-/-}</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{+/-}</td><td>3</td></tr><tr><td rowspan="3">RIV-000005</td><td>WT</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{-/-}</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{+/-}</td><td>3</td></tr><tr><td rowspan="3">RIV-000006</td><td>WT</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{-/-}</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{+/-}</td><td>3</td></tr><tr><td rowspan="3">対照 (PBS)</td><td>WT</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{-/-}</td><td>3</td></tr><tr><td>LDLR^{+/-}</td><td>3</td></tr></table>	試験品	マウス系統	試料サイズ(n)	RIV-000004	WT	3	LDLR ^{-/-}	3	LDLR ^{+/-}	3	RIV-000005	WT	3	LDLR ^{-/-}	3	LDLR ^{+/-}	3	RIV-000006	WT	3	LDLR ^{-/-}	3	LDLR ^{+/-}	3	対照 (PBS)	WT	3	LDLR ^{-/-}	3	LDLR ^{+/-}	3		
	試験品	マウス系統	試料サイズ(n)																															
	RIV-000004	WT	3																															
		LDLR ^{-/-}	3																															
		LDLR ^{+/-}	3																															
	RIV-000005	WT	3																															
		LDLR ^{-/-}	3																															
LDLR ^{+/-}		3																																
RIV-000006	WT	3																																
	LDLR ^{-/-}	3																																
	LDLR ^{+/-}	3																																
対照 (PBS)	WT	3																																
	LDLR ^{-/-}	3																																
	LDLR ^{+/-}	3																																
分析方法	EasyRA血漿分析: LDLおよびトリグリセリドレベル TIDE分析:肝臓における編集効率 mANGPTL3 ELISA:循環 mANGPTL3 タンパク質レベル																																	

【0261】
研究1（研究設計について表9を参照されたい）では、野生型およびLDLR欠損マウスに2 mg/kgのRIV-000005またはRIV-000006を投薬した。投薬96時間後、マウスを殺した。編集効率、循環mANGPTL3レベルおよびトリグリセリドを決定するために肝臓および血漿を殺後直ちに回収した。
【0262】
図15A～図15Cは、マウスANGPTL3遺伝子を標的とするgRNAを含む2つの例示的脂質ナノ粒子（RIV-000005およびRIV-000006）を用いて処置した野生型（WT）およびLDLR^{-/-}マウス（Hom）の肝臓における遺伝子編集

効率（図15A）、Angptl3タンパク質レベル（図15B）およびトリグリセリドレベル（図15C）を示すグラフである。肝臓における編集効率は、投薬96時間後にTIDEによって決定した（図15A）。循環mANGPTL3タンパク質レベルを回収した血漿試料においてELISAによって決定した（図15B）。回収した血漿において血漿トリグリセリドをEasyRAによって決定した（図15C）。

【0263】

RIV-000005またはRIV-000006を投薬した野生型とLDLR欠損マウスとの間で同等の編集効率が観察される（図15A）。編集効率と一致して、循環mANGPTL3タンパク質および血漿トリグリセリドの両方が、未処置対照と比較してLNP投薬マウスにおいて低減している（図15B～図15C）。

10

【0264】

研究1においてと同様に、研究2において野生型およびLDLR欠損マウスに1mg/kgのRIV-000005またはRIV-000006を投薬した。WTおよびLDLR欠損マウスの追加的研究群にRIV-000004 LNPを投薬した。投薬96時間後、マウスを殺した。編集効率、循環mANGPTL3レベル、トリグリセリドおよびLDLを決定するために殺後直ちに肝臓および血漿を回収した。

【0265】

図16A～図16Cは、マウスANGPTL3遺伝子を標的化するgRNAを含む3つの例示的脂質ナノ粒子（RIV-000004、RIV-000005およびRIV-000006）を用いて処置した野生型（WT）およびLDLR^{-/-}マウス（Hom）において肝臓における遺伝子編集効率（図16A）、Angptl3タンパク質レベル（図16B）およびトリグリセリドレベル（図16C）を示すグラフである。肝臓における肝臓編集効率をTIDEによって投薬96時間後に決定した。循環mANGPTL3タンパク質レベルを回収した血漿試料においてELISAによって決定した。血漿トリグリセリドを回収した血漿においてEasyRAによって決定した。RIV-000005およびRIV-000006を用いて処置した野生型およびLDLR欠損マウスにおいて肝臓編集効率において差異は検出されなかった（図16A）。しかし編集は、RIV-000004を投薬したLDLRホモ接合性マウスにおいて観察されず、このLNPがLDLRの存在なしでは取り込まれないことを示唆している。循環mANGPTL3および血漿トリグリセリドの低減は、編集データと一致する（図16B～図16C）。

20

30

【0266】

血漿LDLレベルも研究2動物について決定し、図16Dに示す。LDLレベルをEasyRAを使用して決定した。赤色点線は、LDLについてのEasyRAの検出限界6mg/dLを表す。

【0267】

図16E～図16Hは、表示の処置を受けたLDLRホモ接合性マウスにおける1カ月後の編集効率（図16E）、ANGPTL3レベル（図16F）、トリグリセリドレベル（図16G）およびLDLレベル（図16H）データを示す。

【0268】

野生型マウスは、本来は低レベルのLDLを有し、野生型マウスのLDL測定値は検出限界を下回った（データ未記載）。LDLのヘテロ接合性欠失は、検出されるために十分に血漿LDLを上昇させるが、レベルは処置群間の差異を決定するためには低すぎる。LDLRのホモ接合性の欠失は、血漿LDLレベルの明確な増加を生じる。RIV-000005を用いて処置したホモ接合性マウスは、検出限界を下回って低減した血漿レベルを有した。RIV-000006を用いて処置された3匹のマウスの内の2匹は、検出限界を下回る血漿LDLレベルの低減を有したが、マウス1匹は未処置ホモ接合性マウスと一致するLDLレベルを有した。高LDLレベルを有するマウスが、LDLレベルが低減したマウスと同様の肝臓編集効率を示したことに注目されたい。編集データと一致して、RIV-000004処置ホモ接合性マウスは、血漿LDLの低減を示さなかった（図16D）。

40

50

【0269】

合わせて、両方の研究において、本明細書に記載されるLNP製剤を用いて処置した野生型マウスおよびLDLR欠損マウスは、GalNAcの存在にかかわらず、同等の肝臓におけるmANGPTL3編集および循環マウスANGPTL3タンパク質および血漿トリグリセリドレベルにおける低減を示した。これらのデータは、GalNAc-ASGPR取り込み経路に従うように製剤化したLNPが、ヘテロ接合性およびホモ接合性LDLR欠損設定の両方において有効であり、GalNAcの付加を必要としない一方で、Apoe-LDLR取り込み経路に従うように製剤化したLNPは、ホモ接合性LDLR欠失を有するマウスにおいては有効でないことを示す。

【実施例5】

【0270】

臨床研究における例示的組み込みおよび除外基準

本実施例は、本明細書に記載される医薬製剤の安全性および有効性を決定するための臨床試験への患者の組み込みおよび除外のための非限定的で例示的な判断基準を記載する。

【0271】

組み入れ基準は、以下の判断基準の1つまたは複数を含み得る。一部の実施形態では、対象は、臨床研究への参加に適合性であると見なされるために以下のすべての判断基準に合致していなければならない。

【0272】

1. 年齢 ≥ 18 および ≤ 75 歳；2. 書面のインフォームドコンセントを提出することができる；3. 高いTGレベル $> 300 \text{ mg/dL}$ および/または高いLDL-Cレベル $> 100 \text{ mg/dL}$ （ASCVDについて $> 70 \text{ mg/dL}$ ）およびまたはnon-HDLレベル $> 160 \text{ mg/dL}$ および/またはApoBレベル $> 100 \text{ mg/dL}$ の文書化された病歴によって定義される持続性の脂質異常症を有すると診断された対象；4. スタチンを受けている対象は、スクリーニング前 > 30 日間について安定用量でなければならず、スクリーニング前の少なくとも26週間について、エゼチミブおよび/またはベンパド酸および/またはPCSK9（アリロクマブもしくはエボロクマブ）および/またはANGPTL3（エビナクマブ）モノクローナル抗体を含めて、日常的な臨床診療を通じて利用可能な標準治療ラインの処置に抵抗性でなければならない；5. ホモ接合性高コレステロール血症を有し、PCSK9標的化干渉RNA療法（インクリシラン）を受けている対象は、スクリーニングの前の少なくとも365日間の曝露に対して抵抗性でなければならない；6. スタチン、エゼチミブ、および/またはベンパド酸および/またはPCSK9および/またはANGPTL3阻害剤を含む利用可能な標準治療ラインを受けている対象は、研究参加の際は、計画された薬物療法または用量増加を伴わずに、スクリーニング前 > 30 日間は安定用量でなければならない；7. 妊娠の可能性がある対象（初経後、未処置の子宮および少なくとも1個の卵巣を有する、および閉経後1年未満である）および生物学的男性対象は、同意からCTX310注入後少なくとも1年間にわたってプロトコールに定義された避妊の許容可能な方法（複数可）を使用することに同意しなければならない；8. スケジュールされた来診、処置プラン、臨床検査、避妊ガイドラインおよび他の研究手順に応じる意思があり、可能である；ならびに9. 本研究の完了後、最大15年間の長期経過観察研究に参加する意思がある。

【0273】

研究への登録に適格であるために、対象は、下に列挙される除外基準のいずれにも合致してはならない：1. 両アレル性LPLまたはGP1HBP1突然変異の確定診断を有するFCS患者；2. 全血球数（CBC）：正常白血球（WBC） $< 2,500$ 個/ mcL 、ヘモグロビン（Hb） 男性 $< 11 \text{ g/dL}$ 、女性 $< 10 \text{ g/dL}$ 、血小板数 $< 100,000$ / mcL ；3. 肝疾患の証拠：アスパラギン酸トランスアミナーゼ、アラニントランスアミナーゼ $> 2 \times$ 正常の上限（ULN）、または総ビリルビン値 $> 2 \times$ ULN、または：ベースラインプロトロンビン時間（国際標準化比） $> 1.5 \times$ ULN、または線維症スコア ≥ 2 （NAFLD活性スコア）として定義；4. 任意の肝細胞標的化低分子

10

20

30

40

50

干渉RNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド分子（の現在の使用または1日目までの365日以内の使用インクリシランを除く）；5．任意のモノクローナル抗体処置（エボロクマブ、アリロクマブもしくはエビナクマブを除く）の現在の使用または1日目までの90日以内の使用；6．スクリーニングの30日間以内、または調査薬剤の半減期の5倍より短い間、のスクリーニングからいずれかより長い方で、調査薬物／産生物を用いる別の臨床研究への参加、7．心エコー図による心臓左室駆出率＜50％；8．管理されていない高血圧または管理されていない不整脈；9．1日目の前24週間以内の急性冠状動脈症候群事象、8．1日目の前24週間以内のCNS発作；10．1日目の前12週間以内の急性膵炎；11．ベースライン推定糸球体濾過量＜60mL／分／1.73m²；12．ネフローゼ症候群の診断または尿試験紙でのアルブミン尿症＞2+；13．グリコヘモグロビン（HbA1C）＞10％を伴う不十分な糖尿病管理；14．アルコールまたは薬物乱用の病歴および研究期間中の離脱へのノンアドヒアランス；15．顕著な凝固障害の病歴；16．管理されていないまたは未処置の甲状腺疾患；17．選択的セロトニン再取り込み阻害剤薬物療法または慢性的な全身副腎皮質ステロイド療法を受けている患者；18．遺伝子治療／編集産生物を用いた先行する処置；19．スクリーニング来診の前＞30日間の安定しない用量／量での脂質レベルに影響を与える場合があるナイアシンに基づく補充剤または栄養補助食品の現在の使用；20．ヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1）またはHIV-2、B型肝炎ウイルス（肝炎Bコア抗体もしくは核酸検査〔NAT〕）、またはC型肝炎ウイルス（NAT）の陽性血清；21．調査者の所見で、研究の結果を混乱させ得るか、または対象に研究薬を投与することに追加的リスクを保有し得る、任意の病気または任意の臨床的状態の病歴。これは、これだけに限らないが、関連薬物アレルギーの病歴；中枢神経系（CNS）疾患の病歴；臨床的に重要な病態の病歴もしくは存在；または精神医学的病気の病歴、または家族性がん症候群の病歴を含み得る；22．任意の以前のまたは現在の悪性腫瘍もしくは骨髄増殖性障害または顕著な免疫不全障害；23．妊娠中または授乳中の女性；24．プロトコールに概要を述べた研究手順に対象が応じないという、調査者による評価。

〔実施例6〕

〔0274〕

第1相研究設計

本明細書に記載される1つまたは複数のANGPTL3遺伝子編集ナノ粒子（例えば、CTX310）についての第1相安全性および認容性臨床研究のための非限定的で例示的な設計、および第2相臨床研究に進むために第1相研究の結果に基づいてどの様に決定が行われ得るかを、図17および図18に示す。図17および図18において、第2相において探求される、適応症1～4およびコホート1～4として、これだけに限らないが、以下が挙げられる：臨床的アテローム硬化性心血管疾患（ASCVD）、ホモ接合性家族性高コレステロール血症（HoFH）、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症（HeFH）、家族性カイロミクロン血症症候群（FCS）、多因子カイロミクロン血症症候群（MCS）、家族性複合型高脂血症（FCHまたはFCHL）、およびメタボリック症候群（MetS）、他（2型糖尿病（T2D）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD））。HoFHおよびFCSは、希少疾患である。最大耐用量の利用可能な脂質低下処置、食事および生活習慣の修正にもかかわらずACCおよびAHAガイドラインによって推奨される許容限界を超える持続的に高レベルのTGならびに／またはnon HDL-C〔LDL、VLDL、IDLおよびLp（a）を含む〕ならびに／またはApoBレベルを伴う脂質異常症を有する年齢18から75（包括的）の対象（難治性集団）。一般的なHeFH突然変異は、LDLR、ApoB、PCSK9およびLDLRAP1を含み得る。

〔0275〕

一部の実施形態では、目標として以下が挙げられる：肝臓におけるANGPTL3のインビボ編集のためのLNP製剤化CRISPR-ガイドRNA-Cas9ヌクレアーゼの安全性評価、第2相研究のための最適な生物学的用量（OBD）または最大耐用量（MTD）を確立するための用量設定安全性研究、ならびにANGPTL3レベルにおけるパー

セント低減および脂質のパーセント低下を評価することによる活性の評価。例示的研究目標およびエンドポイントを下記表 13 に記載する。非限定的研究模式図を図 23 に示す。

【0276】

【表 13】

表 13: 研究目的およびエンドポイント

主な目的	主なエンドポイント
TG レベルの上昇および/または non-HDL-C レベルの上昇および/または ApoB レベルの上昇および/または LDL-C を伴う難治性脂質異常症を有する対象において、単回の上昇する用量の CTX310 の安全性および耐容性を評価すること	TEAE、AESI および DLT を含む AE の発生率 臨床的に重要な安全性測定
第 2 の目的	第 2 のエンドポイント
CTX310 の予備的有効性を評価すること	ベースラインと比較した 26 および 52 週での TG、ApoB、non-HDL-C [LDL、VLDL、IDL、および Lp(a)を含む]ならびに HDL-C 濃度における百分率変化
CTX310 の PK を評価すること	LNP の血漿レベル、Cas9 タンパク質の血漿レベル
CTX310 の PD を評価すること	ベースラインと比較した経時的な ANGPTL3 濃度における百分率変化
AE、有害事象; TEAE、治療下で発現した有害事象; AESI、特に注目すべき有害事象; DLT、用量規制毒性	

10

20

【0277】

図 23 に示すとおり、経口ステロイドおよび/または抗ヒスタミンは、対象に提供されてよい。経口ステロイドおよび抗ヒスタミンは、炎症性応答 (IR) および LFT を管理するための LNP 製剤化薬 Tx (Onpatro、NTLA-2001 および Verve 101) についての標準処置である。経過観察のために、各対象を有害事象 (AE)、特に注目すべき有害事象 (AESI)、および脂質パラメーターへの影響について、注入後 12 カ月間モニターする。長期経過観察のために、対象は、最長 15 年間の別の経過観察研究に繰り越されてもよい。

30

【0278】

一部の場合では、CTX310 の第 1 相安全性および認容性臨床研究を臨床的アテローム硬化性心血管疾患 (ASCVD) ならびに、利用可能な処置に抵抗性であるトリグリセリド (TG) レベルの上昇および/または高い低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-C) レベルを有する患者において実施する (図 17)。臨床的 ASCVD は、冠動脈心疾患、心血管疾患、脳卒中または末梢動脈疾患の確定診断を有する患者として定義される。例えば、患者は、 $TG \geq 200 \text{ mg/dL}$ 、 $LDL-C \geq 100 \text{ mg/dL}$ または両方を有する。患者は、18 から 70 歳の間であり得る。一部の場合では、CTX310 の第 1 相安全性および認容性臨床研究は、トリグリセリドレベルの上昇および/または ApoB レベルの上昇および/または non-HDL レベルの上昇を伴う難治性脂質異常症を有する患者において実施する (図 18)。例えば、一部の場合では、患者は、 $non-HDL-C \geq 160 \text{ mg/dL}$ 、 $TG \geq 300 \text{ mg/dL}$ 、 $ApoB \geq 100 \text{ mg/dL}$ 、またはこれらの組合せを有するかまたは有することが求められる。

40

【0279】

Canadian Cardiology Society、American Heart Association および European Society of Ca

50

rdiologyのガイドラインに従って、ApoBおよびnon-HDLは、LDL-Cと比較してCVDリスクを算出するための優れたマーカーである。組み入れのために下の表14に示す次のカットオフを提案する。カットオフとして：TGレベル>300mg/dLおよび／またはLDL-C>100mg/dL（または、ASCVDについて>70mg/dL）および／またはnon-HDLレベル>160mg/dLおよび／またはApoBレベル>100mg/dLが挙げられる。

【0280】

【表14】

表 14: APOB および NON-HDL-C 許容限界選択

LDL-C (nmol/L)	LDL-C (mg/dL)	Non- HDL-C (nmol/L)	Non- HDL-C (mg/dL)	apoB (nmol/L)	apoB (mg/dL)	apoB (g/L)
1.8	70	2.4	93	1.8	70	0.7
2.6	100	4.1	160	2.6	100	1
3.5	135	4.2	162	2.7	105	1.05
5	193	*5.8	224	3.7	145	*1.45

* FH について the 2021 CCS ガイドラインによって定義されたとおり 95 パーセンタイル近くで残すように選択された値。列 1 および 3~4 の値は LDL-C に等しい同じパーセンタイルを表す。列 2 の値は組み入れカットオフを表す。

【0281】

正常TGレベルは<150mg/dL（1.7mmol/L）、境界域高レベルは150~199、高200~500であり、500は非常に高い。HoFHについて、TGレベル>300およびHeFHについてTGレベルは>130である場合がある。

【0282】

一部の患者では、患者は、スタチン、エゼチミブおよび／またはPCSK9阻害剤による先行する1つまたは複数の処置が上手くいかなかった。一部の患者では、患者は、スクリーニング前の少なくとも12週間、スタチン、エゼチミブおよび／またはPCSK9阻害剤による1つまたは複数の先行する処置を受けた。一部の患者では、患者は、難治性脂質異常症を有する。一部の患者では、スタチンを受けている対象は、スタチンの最大耐用量を受けているか、またはスタチンに不耐容と考えられる場合、対象は2つの異なるスタチン製剤のすべての用量に不耐容である。難治性：生活習慣の変更、食事介入およびすべての入手可能で利用可能な薬物療法にもかかわらず推奨される標的脂質レベルに達しなかった対象。

【0283】

スタチンを受けている対象は、スクリーニング前>30日間について安定用量でなければならない、スクリーニング前の少なくとも26週間について、スタチン、エゼチミブおよび／またはベンベド酸および／またはPCSK9（アリロクマブもしくはエボロクマブ）および／またはANGPTL3（エビナクマブ）モノクローナル抗体を含めて、日常的な臨床診療を通じて利用可能な標準治療ラインの処置に抵抗性でなければならない。

【0284】

ホモ接合性高コレステロール血症を有し、PCSK9標的化干渉RNA療法（インクリラン）を受けている対象は、スクリーニングの前の少なくとも365日間の処置について前記治療に抵抗性でなければならない。

【0285】

本研究では、単一用量漸増3+3を実施する。提案する用量レベルを表2に示す。前臨床パイロット毒性に基づいて、3mg/kgを無毒性量（NOAEL）として決定した。GLP研究において3mg/kgが予測されたNOAELである場合、その用量の1/3に1/10安全係数を考慮して=0.1mg/kg開始用量。GLP研究において1mg/kgをNOAELと決定する場合、1/3アロメトリックスケーリング（allome

tr i c s c a l i n g) に約 3 x 安全係数が続き = 0.1 mg / kg 開始用量。

【0286】

安全性モニタリングおよび毒性管理のために、次の用量レベル (DL) への増大のための 30 日用量規制毒性 (DLT) 急性毒性モニタリング期間を使用する。このことは、次の患者 / DL に進む前に LFT がベースラインレベルに戻ることを確実にする。適格性判断基準は、厳密な肝機能判断基準に基づいて対象を除外する。スクリーニング時に、ALT / AST > 2 × 正常の上限 (ULN)、または総ビリルビン値 > 2 × ULN、またはベースラインプロトロンビン時間 (国際標準化比) > 1.5 × ULN、または線維症スコア ≥ 2 (NAFLD 活性スコア)。LFT および凝固は、各評価時点、例えば、1、2、3、4 日目；1、2、3 週間目；30 日目；ならびに 2、3、6、9 および 12 日目でモニターする。注入前に予防的ステロイドおよび抗ヒスタミンを注入関連反応の可能性および LFT の上昇を緩和するために使用する。

10

【0287】

第 1 相研究の 1 つまたは複数のエンドポイントは、6 カ月エンドポイント (または、3 カ月、4 カ月、5 カ月、7 カ月、8 カ月、9 カ月、10 カ月、11 カ月または 12 カ月エンドポイント)、例えば、70 mg / dL 以下の LDL-C レベルのエンドポイントであり得る。一部の場合では、LDL-C レベルのエンドポイントは、80 mg / dL、75 mg / dL、65 mg / dL、60 mg / dL、55 mg / dL または 50 mg / dL 以下である。一部の実施形態では、non-HDL のエンドポイントは、約、少なくともまたは少なくとも約 20 mg / dL、25 mg / dL、30 mg / dL、35 mg / dL または 40 mg / dL を超える LDL レベルである。一部の場合では、患者は、処置後 3 カ月、4 カ月、5 カ月、6 カ月、7 カ月、8 カ月、9 カ月、10 カ月、11 カ月、12 カ月またはこれより後で肝生検を受ける。

20

【0288】

用量漸増結果に基づく例示的な第 2 相患者集団 (例えば、処置 6 カ月後) を図 19 に示す。

【実施例 7】

【0289】

ゲノム編集特徴付け

意図されたものではないゲノム変更を導入する CTX310 の可能性を評価するためにコンピューターによるおよび実験的な方法を使用する (表 12)。CTX310 sgRNA が導入するオフターゲット編集の可能性を有するゲノム部位を相同性依存のおよびゲノム全体の相同性非依存的方法を使用して指定する。ハイブリッド捕捉に続いてディープ配列決定を使用して、これらの候補部位でのインデル形成を、編集のための意図する細胞型 PHH において評価し、NHP 研究においてインビボで顕著なオンターゲット編集が観察された組織、脾臓および副腎組織の代表的な細胞型は、CTX310 編集構成成分への、意図されたものではない曝露を示す。重要なことに、ハイブリッド捕捉配列決定実験は、オンターゲット編集の測定を含み、試料は ANGPTL3 タンパク質低減についても評価する。オフターゲット評価は、薬理学的に関連するインビトロ編集条件を使用する。統計的に確認された編集を有するオフターゲット部位を決定し、近位ゲノムエレメントの機能破壊の可能性および安全性のリスクの全体的な評価の考察と共に示す。

30

40

【0290】

CTX310 編集に関連する染色体再編を 2 つの相補性アッセイを用いて特徴付ける：相同性移行の定量のための ddPCR、および大きな挿入および欠失の特徴付けのためのロングリード配列決定。各アッセイを薬理学的に関連する CTX310 濃度を用いて処置した PHH の 3 つのドナーロットに実施する。計画したゲノム研究の概要を下の表 12 に示す。

【0291】

50

【表 15】

表 12: ゲノム研究の概要

研究	薬理的に関連する条件で CTX310 を用いて編集された細胞型
相同性依存性及び非依存性の方法を用いて指定した部位のディープ配列決定を用いたオフターゲット編集評価	初代ヒト幹細胞(PHH),初代脾臓細胞,初代副腎細胞
構造変異体について PacBio ロングリード配列決定を用いたオンターゲット編集特徴付け	PHH
相同性移行について ddPCR アッセイを用いた移行定量	PHH

10

【0292】

計画したインビトロ編集条件は、サルでのインビボ条件に適するように選択でき、オンターゲット編集によって校正する（図 22A～図 22B）。合致するインビボ条件は、ヒトにおいて提案された最も高い CTX310 用量レベル $1 \text{ mg} / \text{kg}$ の $3 \times$ アロメトリックスケールングであり、サルにおいて $3 \text{ mg} / \text{kg}$ 用量を導く。ロジスティック曲線をインビボ編集率（サルでの 3 倍 CTX310 用量）およびインビトロ編集率（4つの PHH ドナーでの CTX310 用量タイトレーション）にフィットさせる。EC90 をすべての曲線から算出し、PHH ドナーからの最高値を記録する。倍率 c は、EC90 を望ましい条件に調整するようにインビボデータから算出できる： $c = (3 \text{ mg} / \text{kg}) / \text{EC90} = 2.7$ 。倍率 c をインビトロ EC90 に乗じ、最終インビトロ CTX310 濃度、 $\text{EC90} \times c$ ($0.43 \text{ ng} / \mu\text{L}$) を導くことができる。

20

【0293】

最も高いリスクを有する組織をオフターゲット編集について評価する。意図されたものではない組織、脾臓および副腎は、CTX310 への曝露の上昇を有する（図 10A～図 10D および表 10A～表 10B を参照されたい）。オフターゲット編集を PHH、脾臓初代細胞および副腎初代細胞において評価する。脾臓および副腎細胞について、計画された編集は $3 \text{ mg} / \text{kg}$ 用量でサルにおいて観察された平均率を超えるオンターゲット編集を達成すると予測される。低率のオンターゲット編集を有する組織は、オフターゲット編集について低いリスクを有する。

30

【0294】

潜在的なオフターゲット編集のゲノム部位を同定するために、相同性依存性および非依存性の両方の方法を使用する。相同性依存部位指定のために、ヒトゲノムを sgRNA 標的配列に類似の部位について探索する。これは、ミスマッチ 4 個までの相同距離および N G G ならびに 7 個の非標準 P A M を含む。相同性非依存性部位指定のために、Digenome-seq を用いた無細胞アッセイは高感度で切断部位を同定する。クロマチンの欠如は、部位がいずれの細胞型に特異的でないことを意味する。3 名の固有のドナー由来の DNA を使用する。

40

【0295】

オフターゲット編集の評価のために、インビトロ編集を評価する。インビトロ編集のために、初代ヒト肝細胞（PHH）ならびに脾臓および副腎組織由来の細胞型を使用する。PHH について、4 名のドナーおよび、ドナー適合-未処置対照を含む各ドナーの 3 回の技術的繰り返し。組織型に特異的で予測されるインビボ条件に合致する CTX310 LNP 条件を用いた編集を実施する。NGS 評価のために、指定したオフターゲット部位でハイブリッド捕捉に続いてディープ配列決定を実施する。オフターゲット編集は、編集が未処置対照を $\geq 0.2\%$ 超え、処置と未処置との間の t 検定が有意である場合に、任意のドナーにおいて確認される。

50

【0296】

構造的変異体および染色体再編特徴付けも評価する。構造的変異体および染色体再編は、オンターゲット編集によって生じる可能性がある。インビトロ編集のために、PHH細胞をCTX310を用いてEC90xcの濃度、オフターゲット評価由来の条件で編集する。染色体再編を評価するために、相同性移行（2種）の割合をddPCRアッセイを用いて定量する。オンターゲット部位での構造的変異体について、標的部位での約10kb増副産物のPacBio配列決定を割合の半定量的測定と共に大きな挿入および欠失を特徴付けるために使用する。

【実施例8】

【0297】

永続性研究

血漿におけるANGPTL3タンパク質ノックダウンの永続性を評価する（ELISA）、および肝組織におけるANGPTL3破壊を評価する（>1年間）ための研究が本実施例に記載される。一部の実施形態では、CTX310（例えば、Cas9配列およびANGPTL3の標的化のためのgRNAを含むLNP）の1回の投与2カ月後の結果が本明細書に記載される。一部の実施形態では、ステロイドおよび／または抗ヒスタミンを用いた前処置を投与する。下の表15は、本明細書に記載される永続性研究の概要を示す。

【0298】

【表16】

表15: 永続性研究概要

	群サイズ	用量レベル	ANGPTL3 ELISA	ANGPTL3編集
CTX310 - 前処 置なし	4 (オス2匹 + メ ス2匹)	2.0 mg/kg	7d, 14d, 21d, 28d, 6wk, 8wk, 10wk, 12wk, 毎月 (4 mos - 24 mos)	12 mos, 18 mos, 24 mos - 肝臓のみ
CTX310 - 前処 置				

【0299】

表16に永続性研究のための投薬およびエンドポイントを示す。一部の実施形態では、デキサメタゾン、ジフェンヒドラミンおよびファモチジンを用いた前処置を投与した。一部の実施形態では、1mg/kgデキサメタゾン、0.5mg/kgファモチジンおよび5mg/kgジフェンヒドラミンをLNP投与の前日に、および次いでLNP投与の30～60分前に再度投与した。

【0300】

【表17】

表16: 永続性研究概要-投薬

群	処置	用量 (mg/kg)	研究用動物		エンドポイント
			オス	メス	
1	CTX310*	2	2	2	剖検: 2年間
2	CTX310	2	2	2	生検: 12および18カ月 血清化学 PD試料 生体分析/毒物動態学(TK)試料

*前処置薬物療法を受けた、筋肉内投与: 5 mg/kgジフェンヒドラミン; 1mg/kgコルチコステロイド; 0.5 mg/kgファモチジン

【0301】

研究目的

一部の実施形態では、本明細書に記載される研究の主な目的は、ANGPTL3のノックダウンの永続性および脂質レベルの調節における有効性を決定することである。

【0302】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、LFT（例えば、AST）は、CTX310投与のおよそ1週間後に上昇したことが観察された、しかし1週間後にレベルは、ベースラインに戻った。一部の実施形態では、CTX310の投与は、投与1から5週間後に総コレステロールレベル、トリグリセリドレベルおよびHDLレベルにおいて少なくとも40%減少を生じた。

【0303】

図24～図27に示すとおり、ANGPTL3レベルは、CTX310の投与に減少した。脂質血症（lipidemia）に関与する異なるタンパク質を標的化する対照の投与がANGPTL3レベルにいかなる影響も有しなかったことから、効果は特異的である。抗ヒスタミンおよびステロイドを用いる前処置は、CTX310の活性に影響を有しない。2mg/kg用量は、血漿ANGPTL3タンパク質レベルのおよそ90%低減を生じる。対照標的化LNPを投与したNHP群を比較のために使用した。

【実施例9】

【0304】

例示的第I相試験プロトコール

対象、例えば、難治性脂質異常症を有する対象を処置するための本明細書で開示される組成物および方法の有効性および安全性を試験するための例示的な臨床試験プロトコールが本先見の実施例において提供される（図28を参照されたい）。

【0305】

CTX310は、標的遺伝子ANGPTL3のインビボ編集のためのCRISPR-Cas9（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート-CRISPR関連タンパク質9）構成成分のLNP製剤である。一部の実施形態では、調査薬産生物は、N1-メチルプソイドウリジンを含むキャップされポリアデニル化されたスパーサーCas9 mRNAおよび目的の遺伝子を標的化する100ヌクレオチド長単一ガイドRNAを含む。CTX310は、肝臓においてヒトANGPTL3のエクソン1を破壊するためにCRISPR-Cas9を利用するように設計され、ANGPTL3タンパク質レベルの減少を生じる。

【0306】

理論的根拠

世界的に心血管疾患（CVD）は、死亡の主因のままであり、脂質異常症の管理はCVD予防の基本のままである。2021年にthe American Heart Association（AHA）によって報告されたとおり、合衆国では、2013年から2016年の間に成人の29%において低密度リポタンパク質コレステロールのレベルの上昇（LDL-C； $\geq 130 \text{ mg/dL}$ ）が報告され、2015年から2018年に成人の38%（9390万人）が総コレステロールレベル $\geq 200 \text{ mg/dL}$ を有した。LDL-C（高コレステロール血症）、トリグリセリド（TG；高トリグリセリド血症〔HTG〕）または両方のレベルの上昇を含む脂質異常症はCVDに寄与し、2型糖尿病、慢性腎疾患および非アルコール性脂肪性肝疾患が挙げられるリスクに関連する。追加的な臨床的帰結は、膵炎のリスクを増加させるTGの重度の上昇などの希少脂質異常症に関連する。

【0307】

カナダ、オーストラリア、ヨーロッパおよびアメリカの心臓病学協会の最新の勧告は、LDL-CおよびTGよりむしろCVDのリスクを評価することにおける非高密度リポタンパク質コレステロール（non-HDL-C）およびアポリポタンパク質B（ApoB）のレベル増加の役割を強調している。non-HDLコレステロール（すなわち、総コレステロール-HDL-C）は、LDL、中間密度リポタンパク質（IDL）、超低密度リポタンパク質（VLDL）およびリポタンパク質（a）〔Lp（a）〕コレステロールの複合物である。VLDL、IDL、LDL-CおよびLp（a）における主な構造タンパク質、ApoBは、その貯留のために高度にアテローム生成的なリポタンパク質であり、経時的に動脈壁においてプラーク蓄積を生じる。CVDリスクを算出することにおいて、LDL-CとApoBとの間には典型的には良い相関があるが、およそ20%の症例に

において2つのパラメーター間に不一致がある。したがって、non-HDL-C（間接）およびApoB（直接）は、非絶食時試料において、および低LDL-C濃度を有する個体におけるアテローム生成的粒子の総濃度、特に高いTG濃度でのさらに正確な評価を提供する。2021年のCanadian Cardiovascular Societyガイドラインは、リスクの評価のためにnon-HDL-CまたはApoBのいずれかを好ましいパラメーターとして使用する。すべての推奨される許容限界についてLDL-Cと同じパーセンタイル等価性を正確に表すためにApoBおよびnon-HDL-Cについての処置目標値の達成は、これらのガイドラインの以前のバージョンから改変されており（下の表17に作表のとおり）、本研究ではnon-HDL-CおよびApoBを含むことを通知する。

10

【0308】

【表18】

表 17: APOB および NON-HDL-C 許容限界選択

LDL-C		non-HDL-C		ApoB		
mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL	g/L
1.8	70	2.4	93	1.8	70	0.7
2.0	78	2.6	101	2.1	80	0.8
3.5	135	4.2	162	2.7	105	1.05
5	193	5.8	224	3.7	145	1.45
ApoB: アポリポタンパク質 B; CCS: Canadian Cardiovascular Society; HDL-C: 高密度リポタンパク質コレステロール; LDL-C: 低密度リポタンパク質コレステロール the 2021 CCS ガイドラインから適応						

20

【0309】

脂質異常症を有する患者は、適応となり利用できる場合、スタチン、エゼチミブおよびプロタンパク質転換酵素サプチリン／ケキシン9型（PCSK9）阻害剤、モノクローナル抗体およびRNA阻害剤ならびにANGPTL3モノクローナル抗体が挙げられる脂質低下療法を用いて典型的には処置される。すべての利用可能な処置にもかかわらず、45%の患者だけが、AHAおよびAmerican College of Cardiology（ACC）ガイドラインによって、特に心血管系事象の非常に高いリスクを有する患者に提案される目標脂質レベルを達成する。

30

【0310】

本明細書に開示される方法は、肝臓で発現されるリポタンパク質代謝の制御因子をコードし、混合型脂質異常症を有する患者のための治療標的として現れたANGPTL3を特異的に標的とし、破壊するCRISPR-Cas9を利用する遺伝子編集治療を含む。ANGPTL3は、TG-リッチリポタンパク質の加水分解に関与する主な酵素、リポタンパク質リパーゼ（LPL）活性および、HDLリン脂質を加水分解し、それによりTGおよび他の脂質のレベルを増加させる内皮リパーゼ（EL）を阻害することが示された。ANGPTL3レベルの減少は、さらに高いLPL活性を呈することが示され、それによりTGのレベルを低減する。ANGPTL3阻害は、LDL受容体（LDLR）非依存性機構におけるELの活性化を介してVLDL粒子の効率的なクリアランスももたらしことができ、LDL-C、non-HDL-CおよびApoBレベルの低減を生じる。

40

【0311】

ANGPTL3は、低い空腹時血漿TGレベルならびに低いLDL-CおよびHDL-Cレベルによって特徴付けられる家族性複合型低脂血症において突然変異している遺伝子として同定された。ヒトにおける大規模遺伝研究は、ANGPTL3の機能欠失型変異体が低レベルのTGおよびLDL-C、ならびにアテローム動脈硬化性心血管疾患（ASCVD）のリスクの減少を有することを示している。加えて、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはモノクローナル抗体処置を通じて低下または不活性化させることによってAN

50

G P T L 3を標的とする臨床研究は、種々の形態の脂質異常症を有する対象において血漿 L D L - C および T G レベルを著しく低減させる有効性を実証した。

【 0 3 1 2 】

V L D L および L D L (n o n - H D L) コレステロールならびに T G を除去するおよび低下させることに加えて、A N G P T L 3 阻害は、A p o B レベルを実質的に低下させ、C V D リスクを比例して減少させることが示された。合わせてこれらの研究は、現在利用可能な処置を用いて脂質の最小限の許容可能な標的レベルを達成することができず、C V D のリスクが高いままである脂質異常症を有する患者のために A N G P T L 3 が、血漿 n o n - H D L - C 、 A p o B および T G レベルを低下させるための効果的な治療用標的であることを示している。

10

【 0 3 1 3 】

非ヒト霊長類 (N H P) 研究では、単一用量の C T X 3 1 0 は、用量依存的様式で T G レベルにおいて顕著で持続性の低減を生じ、マウス L D L R ノックアウトモデルでは、C T X 3 1 0 のマウス代替物は、L D L - C の顕著な低下を生じた。合わせて、これらの理論的根拠および前臨床データは、アテローム生成的脂質のレベルを低下させる 1 回処置としての C T X 3 1 0 の使用を支持する。

【 0 3 1 4 】

投与の様式

一部の実施形態では、対象は、単回静脈内 (I V) 注入を受ける。

【 0 3 1 5 】

20

研究集団

研究集団は、最大耐用量の利用可能な脂質低下処置、食事および生活習慣の修正にもかかわらず A C C および A H A ガイドラインによって推奨される許容限界を超える持続的に高レベルの T G ならびに／または、L D L 、 V L D L 、 I D L および L p (a) を含む n o n - H D L - C 、ならびに／または A p o B を有する脂質異常症を有する年齢 1 8 から 7 5 (包括的) の対象からなる (難治性集団) 。一部の実施形態では、本明細書に記載される第 1 相研究は、以下の、H T G 伴う A S C V D を有するかもしれない一遺伝子性もしくは多遺伝子性難治性脂質異常症ならびに／または高コレステロール血症症候群：家族性カイロミクロン血症症候群 (F C S) 、多因子カイロミクロン血症症候群、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症および他の原因未確定の H T G ／高コレステロール血症症候群を有する対象を含む。

30

【 0 3 1 6 】

登録した大部分の対象は、多遺伝子性高コレステロール血症および H T G の高い有病率から、多遺伝子性バックグラウンドであると予測される。原因が未確定の脂質の上昇を有する対象も、C V D リスクの低減において脂質低下処置の周知の利益全体に基づいて登録に適格である。対象に、C T X 3 1 0 の顕著に有益な効果 (すなわち、目標脂質ゴールの達成) が観察されるまで、研究期間を通じて同じ用量でのベースライン脂質低下薬物療法を受け続けることを依頼する。

【 0 3 1 7 】

対象参加期間

40

すべての対象を、治験において注入後 1 2 カ月間、安全性、認容性、薬物動態 (P K) および薬力学的 (P D) 効果についてモニターする。すべての対象に完了または中止／中断後に別の長期経過観察への参加を依頼する。

【 0 3 1 8 】

50

【表 19】

表 18: 目的およびエンドポイント

主な目的	主なエンドポイント
TGおよび/またはnon-HDL-Cおよび/またはApoBおよび/またはLDL-Cのレベルの上昇を伴う難治性脂質異常症を有する対象において、単回の上昇する用量のCTX310の安全性および耐容性を評価すること、ならびに推奨される第2相用量を決定すること	TEAE、AESI、DLTを含むAE; 臨床的に重要な臨床検査異常および臨床的に重要な異常なバイタルサインの発生率
第2の目的	第2のエンドポイント
ヒト対象でのCTX310の予備的有効性を評価すること	ベースラインと比較した経時的なTG、ApoB、non-HDL-C [LDL、VLDL、IDLおよびLp(a)を含む]、ならびにHDL-C濃度における百分率変化
CTX310のPKを評価すること	LNPの血漿レベル Cas9タンパク質の血漿レベル
CTX310のPDを評価すること	ベースラインと比較した経時的なANGPTL3濃度における百分率変化
調査目的	調査エンドポイント
臨床応答、免疫原性、安全性、またはPD活性を示すかまたは予測する可能性があるCTX310に関連する変化を同定すること	ベースラインと比較した経時的なFFAレベルにおける百分率変化 脂肪肝疾患における変化 CTX310の免疫原性(試料は保存され、必要に応じてADAからLNPおよびCas9について評価される)
ADA:抗薬物抗体; AE: 有害事象; AESI: 特に注目すべき有害事象; ALC-0159: CTX310のアミノおよびPEG脂質構成成分; ALC-0307: CTX310のアミノおよびPEG脂質構成成分; ANGPTL3: アンジオポエチン様3; ApoB: アポリポタンパク質B; Cas9: CRISPR関連タンパク質9; CRISPR: クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート; DLT: 用量規制毒性; FFA: 遊離脂肪酸; HDL-C: 高密度リポタンパク質コレステロール; IDL: 中間密度リポタンパク質; LDL-C: 低密度リポタンパク質コレステロール; LNP: 脂質ナノ粒子; Lp(a): リポタンパク質(a); PD: 薬力学; PEG: ポリエチレングリコール; PK: 薬物動態; TEAE: 治療下で発現した有害事象; TG: トリグリセリド; VLDL: 超低密度リポタンパク質	

10

20

30

40

【0319】

研究設計

単一アーム、非盲検、多施設、漸増単一用量第1相研究が本明細書に記載され、脂質異常症を有し、適応となり利用可能な処置に抵抗性であるTG ($> 300 \text{ mg/dL}$) および/またはLDL-C ($> 100 \text{ mg/dL}$; ASCVDについて $> 70 \text{ mg/dL}$) および/またはnon-HDL-C ($> 160 \text{ mg/dL}$) および/またはApoB ($> 100 \text{ mg/dL}$) のレベルの増加を有する18から70歳の24名までの対象を登録する。

【0320】

3から6名の対象を各用量レベル: LNP製剤中の合計RNA、0.1、0.3、0.

50

6 および 1 mg / kg に登録する。各対象は、CTX310 の単回 IV 投薬を受け、一部の実施形態では、CTX310 注入後最小限で 72 時間（または、地域の規制または施設の習慣によって必要な場合はさらに長く）入院し、30 日間の急性安全性評価期間の間は、用量規制毒性（DLT）を定義する有害事象（AE）について注入後に厳密にモニターする。一部の実施形態では、すべての対象は、CTX310 を受ける前に副腎皮質ステロイドならびに抗ヒスタミン（H1 および H2 遮断薬）を用いる前投薬を受ける。

【0321】

CTX310 注入後、対象を理学的検査、定期的な検査評価ならびに AE および ANGPTL3 発現および脂質プロファイルへの効果についての評価について 12 カ月間経過観察する。本研究の完了後、すべての対象は、注入後 15 年間の別の長期経過観察研究に参加することを依頼される。各用量レベルで、特に注目すべき有害事象（AE SI）を含むすべての AE は、次のコホートに進む前に安全性審査委員会（SRC）によって審査される。用量漸増が完了したら、推奨用量を決定し、安全性および PD 効果を確認するために 3 から 6 名以上の対象を同じ用量レベルに登録する（確認コホート）。各対象は、以下のステージを受ける：（1）スクリーニング：6 週間、（2）CTX310 の注入（1 日目）および急性安全性評価期間（注入後 30 日間）、（3）経過観察：各対象を AE、AE SI および脂質パラメーターへの効果について注入後合計 12 カ月間モニターする。対象は、長期経過観察のために注入後最大 15 年間の別の長期経過観察研究に繰り越すことができる。

10

【0322】

研究処置

CTX310 の投与

一部の実施形態では、対象は、1 日目に 1 時間以内での単回 IV 注入を、患者入院加療の際の医学的管理下で投与されて受ける。

20

【0323】

注入前の追加的処置

研究薬の投与の 1 から 2 時間前以内に、追加的処置注入レジメンを対象に投与する。一部の実施形態では、レジメンは：IV ステロイド（例えば、デキサメタゾン 10 mg もしくは等価物）；IV H1 遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン 50 mg もしくは等価物）または経口 H1 遮断薬（例えば、セチリジン 10 mg もしくは等価物）；および IV または経口 H2 遮断薬（例えば、ファモチジン 20 mg もしくは等価物）からなる。

30

【0324】

CTX310 注入後モニタリング

一部の実施形態では、投与完了後、対象を、72 時間または、地域の規制または施設の習慣によって必要な場合はさらに長く入院患者として観察する。一部の実施形態では、安全性および臨床検査評価ならびに PK 分析のための血液および尿試料の回収を実施する。一部の実施形態では、AE および併用の薬物療法を記録する。観察のための患者入院加療は、必要に応じて延長され得る。

【0325】

調査産生物調製、取り扱い、保存および説明責任

CTX310 薬産生物（例えば、ANGPTL3 を標的とする gRNA、および Cas9 をコードする mRNA を含むナノ粒子）を 2.0（±0.4）mg / mL 合計 RNA の標的濃度でリン酸緩衝生理食塩水中の 300 mM ショ糖からなる凍結液体製剤として提供する。一部の実施形態では、CTX310 は、使用時までガラスバイアル中 ≤ -60 °C で凍結保存されなければならず、施設内で保存され、融解され、投与直前に製剤化される。

40

【0326】

一部の実施形態では、インクリシランは、CTX310 の注入の 60 日前から 1 日目の 60 日後まで投与しない。一部の実施形態では、アフエーシス手順は、CTX310 の注入の 14 日前から 1 日目の 14 日後まで実施しない場合がある。

【0327】

50

研究過程において脂質（LDL-CまたはTG）の顕著な低下が観察された、すなわち、望ましいレベル（例えば、LDL-C<70mg/dL、TG<150mg/dLまたはnon-HDL-C<160mg/dL）に脂質レベルが減少した場合、関連薬物療法またはアフエーシス手順の頻度の調整が開始される場合がある。一部の実施形態では、他の脂質低下薬物療法またはアフエーシス手順を漸減するための計画は、研究処置への反応、その基礎にある遺伝子型、および将来の心血管系事象についてのリスク因子の評価に応じて、各対象に個別化されることが予測される。

【0328】

研究手順

下に研究手順の説明を記載する。本明細書に記載される評価に加えて、対象は、施設ごとのガイドラインに従う場合があり、臨床的に必要と示された場合はスケジュールされていない評価を実施する場合がある。欠けた評価は、スケジュールを変更し、調査者の所見で、スケジュール変更が医学的に必要でないかまたは次のスケジュールされた評価時期に近すぎるために安全でない場合を除いて、元のスケジュール日に可能な限り近い日で実施する。この場合、欠けた評価は、プロトコル逸脱として記録し、中止されるべきである。このプロトコルの目的のために、0日目はない。すべての来診日およびウィンドウは、CTX310注入の日を1日目として使用して算出する。

【0329】

スクリーニングおよび登録

一部の実施形態では、研究参加について審査され、評価されたすべての潜在的な対象の記録は保存する。一部の実施形態では、スクリーニング期間は、対象がインフォームド Consent 文書（ICF）に署名した日に開始し、研究への適格性の確認および登録を通じて継続する。一部の実施形態では、インフォームド Consent が得られたら研究適格性を確認するために対象をスクリーニングする。一部の実施形態では、すべてのスクリーニング評価は、対象がICFに署名した後42日間以内に完了するべきである。医学的監視者は、適格性パッケージを審査し、対象が登録に適格であることを確認するために施設によって提供された情報を確認できる。

【0330】

CTX310の注入

一部の実施形態では、すべての対象は、上に記載のとおり前処置レジメンおよび研究処置を受ける。急性安全性評価期間には、各対象についてCTX310の注入後30日間である。30日間急性安全性評価期間に続いて、対象を追加的に11カ月間経過観察する場合がある。一部の実施形態では、対象は、12カ月目に研究完了（EOS）来診を完了した後に研究を完了したと考えられる。一部の実施形態では、研究の完了は、最後の対象が12カ月目来診を完了した、経過観察を逃したと考えられる、同意を撤回するまたは死亡したときと定義される。一部の実施形態では、遺伝子治療を投与される対象に対する局所地域の法的規制／指針に従うために、CTX310の注入を受け、本研究を中断するかまたは完了するかのいずれかであるすべての対象は、長期安全性、永続性および心血管系事象への効果を評価するために注入後15年間までの別の長期経過観察研究に参加することを依頼される。

【0331】

研究評価および手順

生年月日、性別、人種および民族を含む人口動態データは、回収され得る。対象の疾患の完全な病歴および診断日からの処置への応答を含む病歴は得られる。心臓のおよび外科の病歴も得られる。全身外観、皮膚、頸部、頭部、眼、耳、鼻、のど、心臓、肺、腹部、リンパ節、四肢および神経系を含む完全な理学的検査は、スクリーニング時、30日目および研究完了時（EOS）来診で実施されてよく、結果は文書に記録される。症状に基づく簡易な理学的検査は、すべての他の研究来診で実施され得る。スクリーニング時に実施された検査からの認められた変化は、AEとして記録され得る。体重も得てよい。一部の実施形態では、身長、肥満度指数およびウエスト／ヒップ比は、スクリーニングおよび研

10

20

30

40

50

究完了時に得る。

【0332】

一部の実施形態では、バイタルサインを研究来診ごとに記録し、血圧、心拍数、呼吸数、パルス酸素測定による酸素飽和度および体温を含み得る。一部の実施形態では、肝臓画像化を実施する。標準的な地域の手順を画像取得および分析のために使用してよい。一部の実施形態では、3時間絶食が、続く画像化手順の前に推奨される。肝臓のFibroScanまたはMRE（利用可能性に応じる）は、スクリーニング時に実施されてよく、結果は、線維症の徴候と一致する肝臓の硬化を有する患者を除外するために使用できる（除外基準を参照されたい）。肝臓MRI-プロトン密度脂肪分率または超音波（脂肪肝／脂肪症の評価のため）をスクリーニングおよびEOS来診時に実施してよい。肝臓脂肪症におけるベースライン肝臓脂肪状態および定量的変化は、必要に応じて病歴またはAEとして報告された臨床的に重要な所見と共に症例報告書（CRF）に回収されてよい。

10

【0333】

1つまたは複数の経胸壁心エコー図（左室駆出率の評価のため）を実施できる。追加的心エコー図を得てよい。一部の実施形態では、12誘導ECGを得る。補正QT時間（QTc）およびQRS間隔をECGから決定する。追加的ECGを得てもよい。

【0334】

検査試料を回収し、分析してよい。検査評価を表21および表22を列挙する。

【0335】

【表20】

20

表21: 地域の臨床検査

血清化学	ALT (SGPT)、AST (SGOT)、ビリルビン (合計および直接)、総蛋白、アルブミン、アルカリフォスファターゼ、バイカーボネート、BUN、カルシウム、クロール、クレアチニン、eGFR、グルコース、マグネシウム、リン、カリウム、ナトリウム、HbA1c、C-反応性タンパク質
尿検査	比重、pH、グルコース、蛋白、血液、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、亜硝酸塩、白血球エステラーゼ、顕微鏡検査 (血液または蛋白が異常である場合)
凝固	PT、PTT、フィブリノーゲン
血清または尿妊娠検査	hCG
鑑別を伴うCBC	ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数、白血球数、好中球、リンパ球、単球、好塩基球、好酸球、血小板数、好中球絶対数
甲状腺機能	T3、T4、TSH
ウイルス血清学	HIV-1、HIV-2、HCV抗体およびRNA、HBV表面抗原、HBV表面抗体、HBVコア抗体
ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ; AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; BUN: 血中尿素窒素; CBC: 全血球数; eGFR: 推定糸球体濾過量; HbA1c: グリコヘモグロビン; HBV: B型肝炎ウイルス; hCG: ヒト絨毛性ゴナドトロピン; HCV: C型肝炎ウイルス; HIV: ヒト免疫不全ウイルス; PT: プロトロンビン時間; PTT: 部分トロンボプラスチン時間; SGOT: 血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ; SGPT: 血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ; T3: トリヨードチロニン; T4: チロキシン; TSH: 甲状腺刺激ホルモン	

30

40

【0336】

50

【表 2 1】

表22: 中央での検査

遺伝子検査	HoFH/HeFH: <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> , <i>PCSK9</i> FCS/MCS: <i>LPL</i> , <i>APOC2</i> , <i>APOA5</i> , <i>LMF-1</i> , <i>GPIHBP1</i>
脂質パネル	総コレステロール、トリグリセリド、non-HDL-C、LDL-C、VLDL、ApoB、ApoC-III、リポタンパク質 (a) ^{1,2}

APOA5: アポリポタンパク質A5; *ApoB*または*APOB*: アポリポタンパク質B; *APOC2*: アポリポタンパク質C2; *ApoC-III*: アポリポタンパク質C-III; FCS:家族性カイロミクロン血症症候群; *GPIHBP1*: グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー高密度リポタンパク質結合タンパク質1; HDL:高密度リポタンパク質; HoFH/HeFH: ホモ接合性家族性高コレステロール血症/ヘテロ接合性家族性高コレステロール血症; LDL-C:低密度リポタンパク質コレステロール; *LDLR*: 低密度リポタンパク質受容体; *LMF-1*:リパーゼ成熟因子1; *LPL*:リポタンパク質リパーゼ; MCS: 多因子カイロミクロン血症症候群; *PCSK9*: プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型; VLDL: 超低密度リポタンパク質

¹アフエレーシスを受ける対象は、手順に先行する5日以内に試料採取された脂質レベルを有すべきである (アフエレーシスの日のアフエレーシス前の試料も適切である)。

² すべての脂質パネル試料試験は空腹時に実施される。

10

【0337】

免疫原性

20

CTX310は、LNPにカプセル化されたSpCas9をコードするmRNAおよび目的の遺伝子（例えば、ANGPTL3）を標的化するsgRNAから構成される。一部の実施形態では、血液試料を、回収し、必要に応じて将来の免疫原性評価（LNPおよびCas9に対する抗薬物抗体）の可能性のために保存する。

【0338】

CTX310 薬物動態分析

一部の実施形態では、ナノ粒子およびCas9タンパク質レベルのPK分析を回収された血液試料で実施する。一部の実施形態では、1日目に、試料を注入前の5分以内、ならびにCTX310注入の完了の1、2および7時間後に回収する。一部の実施形態では、すべての他の時点について、単一試料が回収される。

30

【0339】

ANGPTL3

一部の実施形態では、血漿試料をANGPTL3濃度を追跡するために得る。

【0340】

探索的バイオマーカー調査

一部の実施形態では、探索的バイオマーカー調査を臨床応答、抵抗性、安全性、PD活性および／または処置の作用機構を示すかまたは予測する可能性がある、ゲノム、代謝、および／またはプロテオミクスバイオマーカーを同定するために実行してよい。加えて、プロトコールに特異的なエンドポイントのために回収された試料は、探索的調査、過剰な試料の未決定の利用可能性のために使用してよい。

40

【0341】

スクリーニング時に全血試料を得て、PAXgene（登録商標）チューブ（PreAnalytiX GmbH、Hombrechtikon、スイス）に保存してよい。保存のための血漿試料をスクリーニングに得る。血清試料を探索的バイオマーカー（例えば、サイトカイン）を追跡するために得る。

【0342】

研究監督

安全性審査委員会

一部の実施形態では、安全性審査委員会（SRC）は、DLT観察期間が各コホートに登録された最後の対象について終了したときにすべての入手可能な安全性データを審査し

50

、用量漸増または漸減に関する判断を行う責任がある。用量漸増の間は、用量がコホートにおいてクリアされ、用量漸増が可能である症例について、追加的な安全性データを集めるために現在の用量レベルで合計6名までの対象について追加的な数の対象を登録するように、SRCと協議して代替的に決定することができる。SRCは、毒性管理アルゴリズムを考察し、個別の対象症例を審査するために用量漸増相の際に継続して定期的に開かれる。

【0343】

SRCとの討議に続いて、独立したデータ安全性監視委員会(DSMB)は、緊急安全性データに関して相談を受け、DLT判断基準の修正可能性、または代替的投薬計画について討議することができる。利益とリスクの進行中の評価に基づいて、SRCは、最大耐用量(MTD)が決定される前に用量漸増を停止できる。

10

【0344】

データ安全性監視委員会

適切な科学的小および医学的専門知識を有する少なくとも3名の医師および1名の統計学者から構成される、独立したデータ安全性監視委員会(DSMB)は、研究の開始時に作られ、役割および責任はDSMB設立認可書に記載されている。研究を通じてDSMBは、用量漸増からの安全性および有効性データを審査し、推奨される第2相用量(RP2D)を承認する。一部の実施形態では、DSMBは、CTX310に関連するすべての疑われる、予測外の、重篤な有害反応に関して通報を受ける。

20

【0345】

提案された開始用量および用量漸増

下の表19に示す下記の用量が、本研究における4つの計画された用量漸増レベルでの評価のために提案されており、用量レベル(DL)あたり最少3名および最大6名の評価可能な対象を含む。ヒトでの最初の開始用量は、NHP優良試験所基準安全性および毒理学研究において決定された無毒性量(NOAE L)から推定する。CTX310の0.1 mg/kgの最初の開始用量は、1 mg/kgの予測NOAE Lに基づく合計RNA用量を指す。NHPからヒトへの3分の1アロメトリックスケーリングは、総体表面および安全係数3の適用に基づき、開始用量0.1 mg/kgを導く。全身に注入されたLNP関連治療剤について明らかになった臨床データは、比較的安全なプロファイルを実証している。3倍安全係数は、非臨床研究に基づいてヒトにおける肝臓関連AEが無いと予測されることに基づいて提案される。用量レベルにおける予測された3から2倍の増加と共に、用量漸増は、0.1から ≤ 1 mg/kgに進むと予測される。一部の実施形態では、用量漸増の判断は、安全性、認容性および活性データの全体に基づいて、調査者およびSRCと協力して行われる。

30

【0346】

【表22】

表 19: CTX310 の用量漸増

用量レベル	計画される用量(mg/kg) ⁽¹⁾
1	0.1
2	0.3
3	0.6
4	1 ⁽²⁾

40

DL: 用量レベル

¹ CTX310の用量は、体重kgあたりのガイドRNA+メッセンジャーRNAの合計量である投与される総RNAの量によるとされる。

² DL3 についての後援者および安全性審査委員会による臨床データの審査後に、0.7から ≤ 1 mg/kg の範囲の用量が DL4 で調査され得る。

【0347】

用量レベルコホート内での投薬

50

用量漸増をDLTの発生率に応じて3から6名の対象が各用量レベルで処置される、標準的3+3設計を使用して実施する。

【0348】

CTX310の投薬後の肝機能検査(LFT)の一過的な上昇が、14日以内に解決したNHP研究に基づいて、コホート内の各対象間の投薬は、潜在的な毒性を評価するために、最短14日間、または検査値(LFTを含む)が<2×ベースラインにもしくは正常レベルに戻るまで、のどちらか遅い方に調整される。対象の安全性評価が許容できる場合、コホート中の次の対象は投薬されてよい。先行する用量のコホートのすべての対象が投薬を終了し、最後の対象が≥30日安全性評価を完了し、この用量レベルで処置したすべての対象の累積安全性データが、一部の実施形態では、SRCによって決定された許容可能な安全性プロファイルを実証した場合に、用量漸増は進行してよい。

10

【0349】

用量規制毒性評価

対象は、DLTについて評価するためにCTX310を受けなければならない。DLT評価可能な対象(すなわち、CTX310を投与され、30日DLT評価期間を完了した対象)が潜在的なDLTの徴候または症状を有する場合、DLT評価期間は、DLTを発表する前に改善または解決を可能にするようにプロトコルに定義したウィンドウに従って延長される。コホートあたり最少3名の評価可能な対象が必要である。対象が受けている現在の脂質低下処置(すなわち、モノクローナル抗体および/または阻害RNA治療)とCTX310注入との間には、毒性の重複を回避するために、適切な間隔が適用される。DLTを経験した対象は、評価可能と考えられる。CTX310を受けたすべての対象についてのデータは、安全性分析セットの一部である。

20

【0350】

用量漸増は、以下の規則に従って実施する：(1)3名の対象の内0名がDLTを経験した場合、次の用量レベルに上昇させる、(2)3名の対象の内1名がDLTを経験した場合、現在の用量レベルを対象6名に拡張する、(3)6名の対象の内1名がDLTを経験した場合、次の用量レベルに上昇させる、(4)6名の対象の内≥2名がDL 2、3または4でDLTを経験した場合、先の用量レベルに減少させるか、または6名の対象が先の用量レベルで既に検査されている場合は、先の用量レベルをMTDと発表する、(5)3名の対象の内≥2名がDL 2、3または4でDLTを経験した場合、先の用量レベルに減少させるか、または6名の対象が先の用量レベルで既に検査されている場合は、先の用量レベルをMTDと発表する、(6)研究のために計画されたまたは列挙された最も高い用量を超えた用量漸増は行わない(上の用量レベル表を参照されたい)。

30

【0351】

RP2Dは、MTDでもしくはこれより少なくで、または代替的にMTDが達成されない場合、二次エンドポイントの分析に基づいて最適生物学的用量で公表される。少なくとも3名より多い対象は、RP2Dが選択される前にCTX310をこの用量レベルで投与される(確認コホート)。一部の実施形態では、CTX310に関連するとして評価される、DLT評価期間外で生じたすべての累積的AEも、DSMBで考察される。

【0352】

40

用量規制毒性：理論的根拠および判断基準

本明細書で使用するDLT定義は、CTX310の非臨床研究および、LNPカプセル化、CRISPR-Cas-9ベースゲノム編集治療を用いた臨床経験の公表された報告によって通知される。CTX310との真実らしい原因の関係を有しないAEは、DLTと見なされない。DLTは、有害事象共通用語規準(CTCAE)バージョン5.0に従って段階分けし、記述する。DLTとして分類するために、投薬後の最初の30日間に生じたAEの評価のための判断基準は、以下を含む：(1)任意のCTCAEグレード≥3の研究薬に関連するAE、(2)≥7日間持続し、研究薬に関連する、任意のCTCAEグレード3検査異常、(3)研究薬に関連する、任意のCTCAEグレード4検査異常。

50

【0353】

研究適格性

組み入れ基準

本研究に参加するために適格と考えられるために、対象は、下に列挙するすべての組み入れ基準に合致しなければならない：（１）インフォームドコンセントに署名する時点で年齢 ≥ 18 および ≤ 70 歳；（２）書面のインフォームドコンセントを提出することができる；（３）持続性の脂質異常症を有すると診断された；空腹（および該当する場合、アフエーシス前）のTG ($> 300 \text{ mg/dL}$) および／またはLDL-C ($> 100 \text{ mg/dL}$)；ASCVDを有する対象について $> 70 \text{ mg/dL}$) および／またはnon-HDL-C ($> 160 \text{ mg/dL}$) および／またはApoB ($> 100 \text{ mg/dL}$) のレベルの上昇によって定義される；（４）対象は、スクリーニング前の少なくとも26週間について、スタチン、エゼチミブ、および／またはベンパド酸、イコサペントエチルおよびPCSK9に対するモノクローナル抗体（アリロクマブもしくはエボロクマブ）またはANGPTL3（エビナクマブ）を含めて、日常的な臨床診療を通じて適応となり利用可能な場合、標準治療ラインの処置の最大耐用量に抵抗性でなければならない；（５）ホモ接合性家族性高コレステロール血症を有し、PCSK9標的化干渉RNA療法（インクリシラン）を受けている対象は、スクリーニングの前の少なくとも365日間の曝露に対して抵抗性でなければならない；（６）スタチン、エゼチミブ、および／またはベンパド酸および／またはPCSK9および／またはANGPTL3阻害剤を含む、利用可能な標準治療ラインの処置を受けている対象は、研究参加の際に計画されていない用量増加を伴わずに、スクリーニング前 > 30 日間最大耐用量および安定用量でなければならない；（７）アフエーシスを受ける対象は、研究参加の際に計画されていない頻度の変化を伴わずに、スクリーニング前少なくとも12週間は安定した頻度の手順にあるべきである；（８）女性対象は、閉経後〔例えば、子宮を有する女性では、別の医学的原因を有せずに少なくとも12カ月連続で無月経、または外科的に生殖不能（すなわち、スクリーニング少なくとも1カ月前の子宮摘出、両側性卵管摘除および／または両側卵巢摘出の記録）〕でなければならない；（９）すべての男性対象は、有効な避妊の許容される方法の使用に合意しなければならない、彼らの女性パートナーも、合意からCTX310注入後12カ月を通じて、プロトコールにおいて定義されたとおりの避妊の有効な方法の使用に合意しなければならない；（１０）スケジュールされた来診、処置プラン、臨床検査、避妊ガイドラインおよび他の研究手順に応じる意思があり、可能である；（１１）本研究の完了後、最大15年間の長期経過観察研究に参加する意思がある。

【0354】

除外基準

研究への登録に適格であるために、対象は、下に列挙される除外基準のいずれにも合致してはならない：（１）両アレル性LPLまたはGP1HBP1突然変異の確定された遺伝子型診断を有するFCS患者；（２）肝疾患の証拠〔例えば、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、アラニントランスアミナーゼ $> 2 \times$ 正常の上限（ULN）、または総ビリルビン値 $> 2 \times$ ULN、またはベースラインプロトロンビン時間（国際標準化比） $> 1.5 \times$ ULN、またはFibroScanでの肝臓エラストグラフィー測定 $\geq 7.5 \text{ kPa}$ または磁気共鳴エラストグラフィーでの肝臓の硬さの測定 $> 4.15 \text{ kPa}$ 〕；（３）全血球数：白血球 $< 2,500$ 個/ μL 、ヘモグロビン 男性 $< 11 \text{ g/dL}$ 、女性 $< 10 \text{ g/dL}$ ；または血小板数 $< 100,000$ / μL ；（４）ベースライン推定糸球体濾過量 $< 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ 、MDRD式（Modification of Diet in Renal Disease equation）による測定；（５）ネフローゼ症候群の診断または尿試験紙でのアルブミン尿症 $> 2+$ ；（６）グリコヘモグロビン $> 9\%$ を伴う不十分な糖尿病管理；（７）アルコールまたは薬物乱用の病歴および研究期間中の離脱へのノンアドヒアランス；（８）顕著な凝固障害の病歴；（９）管理されていないまたは未処置の甲状腺疾患（甲状腺刺激ホルモン $< 0.1 \text{ mIU/L}$ または $> 10 \text{ mIU/L}$ ）；（１０）心エコー図による心臓左室駆出率 $< 50\%$ ；（１１）末梢パ

ルスオキシメトリ飽和度<90%；(12)管理されていない血圧、平均収縮期>160 mmHgおよび拡張期>90 mmHgと定義される；(13)例えば、スクリーニング時
でQTc、男性>450 ms、女性>470 msを示す12誘導心電図(ECG)所見、
および／または調査者によって臨床的に重要と考えられる任意の他のECG所見；(14)
)1日目の前24週間以内の急性冠状動脈症候群事象；(15)1日目の24週間以内の
中枢神経系(CNS)発作；(16)1日目の前12週間以内の急性膵炎；(17)任意
の肝細胞標的化低分子干渉RNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド分子(インクリ
シランを除く)の現在の使用または1日目までの365日以内の使用；(18)任意のモ
ノクローナル抗体処置(エボロクマブ、アリロクマブもしくはエビナクマブを除く)の現
在の使用または1日目までの90日以内の使用；(19)スクリーニングの30日間以内
、または調査薬剤の半減期の<5、のスクリーニングからいずれかより長い方で、調査薬
物／産生物を用いる別の臨床研究への参加；(20)選択的セロトニン取り込み阻害剤、
慢性全身副腎皮質ステロイド治療またはタンパク質同化剤の現在の使用；(21)スクリ
ーニング来診の前>30日間安定しない用量／量での脂質レベルに影響を与える場合が
あるナイアシンに基づく補充剤または栄養補助食品の現在の使用；(22)遺伝子治療／
編集産生物を用いた先行する処置；(23)ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)また
はHIV-2、B型肝炎ウイルス(肝炎Bコア抗体もしくは核酸検査[NAT])、また
はC型肝炎ウイルス(NAT)の陽性血清(24)調査者の所見で、研究の結果を混乱
させ得るか、または対象に研究薬を投与することに追加的リスクを保有し得る、任意の病
気または任意の臨床的状態の病歴。これは、これだけに限らないが、関連薬物アレルギー
の病歴；CNS疾患の病歴、臨床的に重要な病態の病歴もしくは存在、または精神医学的
病気の病歴、または家族性がん症候群の病歴；(25)任意の以前のまたは現在の悪性腫
瘍もしくは骨髄増殖性障害または顕著な免疫不全障害；(26)妊娠の可能性がある女性
(初経後(postmenarchal)、未処置の子宮および少なくとも1個の卵巣を
有する、および閉経後1年未満)または授乳中の女性；(27)プロトコールに概要を述
べた研究手順に対象が応じないという、調査者による評価。

10

20

【0355】

統計的方法

研究は、CTX310の安全性および有効性の予備的評価を提供するためにおよそ24
名の対象を最初に登録する。CTX310の安全性および認容性を記述的要約を使用して
安全性分析セットにおいて評価する。AE、AESI、臨床検査データおよび他の適用可
能な安全性測定(例えば、ECG)の要約をCTX310の各用量レベルおよび全体につ
いて提供する。一部の実施形態では、AEの要約は、治療下で発現したAE(TEAE)
に注目する。TEAEの発生率を、器官別大分類および基本語、プロトコール特異的重症
度グレードおよび、CTX310との関連によって要約する。DLT、重度の有害事象お
よびAESIの発生も要約する。臨床検査データの要約は、絶対値および／または選択さ
れた検査パラメーターについてのスケジュールされた来診でのベースラインからの変化の
記述統計学を含む。臨床的に重要な検査異常の発生および他の臨床的に重要な安全性測定
異常(例えば、ECG)を要約する。

30

【0356】

CTX310の予備的有効性を記述的要約を使用して完全分析セットにおいて評価する
。ベースラインと経時的に比較した、TG、ApoB、non-HDL-C[LDL、V
LDL、IDLおよびLp(a)を含む]ならびにHDL-Cを含む脂質濃度における百
分率変化を各用量レベルについて記述統計学を使用して要約する。注入後26および52
週間を含む選択した時点での、適切なカットオフに基づく分類別の要約を提供する。PK
およびPDデータを記述的に評価し、該当する場合は探索的モデリングによって評価する
。

40

【0357】

研究目的および仮説

一部の実施形態では、主な目的は、TGおよび／またはnon-HDL-Cおよび／ま

50

たはLDL-Cおよび／またはApoBのレベルの上昇を伴う難治性脂質異常症を有する対象において、単一の上昇する用量のCTX310の安全性および認容性を評価することおよびRP2Dを決定することである。一部の実施形態では、第2の目的は、CTX310の予備的な有効性、PKおよびPDを評価することである。正式な仮説検定は実施されない。

【0358】

研究エンドポイント

一部の実施形態では、主なエンドポイントとして：治療下で発現した有害事象（TEAE）、AESI、DLTを含むAEの発生率；臨床的に重要な検査異常値；および臨床的に重要な異常なバイタルサインが挙げられる。

10

【0359】

一部の実施形態では、二次有効性エンドポイントは：ベースラインと比較した経時的なTG、ApoB、non-HDL-C [LDL、VLDL、IDLおよびLp(a)を含む]ならびにHDL-C濃度における百分率変化を含む。一部の実施形態では、二次薬物動態／薬力学エンドポイントは：ベースラインと比較した経時的なLNPの血漿レベル、Cas9タンパク質の血漿レベルおよびANGPTL3濃度における百分率変化を含む。

【0360】

一部の実施形態では、探索的エンドポイントは：ベースラインと比較したFFAレベルにおける経時的な百分率変化、脂肪性肝疾患における変化、およびCTX310の免疫原性（必要に応じて試料は保存し、LNPおよびCas9への抗薬物抗体について評価する）を含む。

20

【0361】

分析セット

一部の実施形態では、以下の分析セットを評価し、データの提示のために使用する。一部の実施形態では、登録セットは、インフォームドコンセントに署名し、組み入れ／除外基準に合致するすべての対象を含む。一部の実施形態では、安全性分析セットは、CTX310注入を受けた対象を含む登録セットのサブセットである。安全性評価の分析は、安全性分析セットに基づく。安全性分析セットにおいて対象は、受けたCTX310用量レベルによって分類する。一部の実施形態では、完全分析セット（FAS）は、CTX310注入を受け、少なくとも1回ベースライン後脂質評価を受けたか、または早期に中断した対象を含む、安全性分析セットのサブセットである。有効性分析をFASに基づいて実施する。FAS中の対象は、受けたCTX310用量レベルによって分類する。

30

【0362】

標本サイズ

研究の標本サイズは、対象およそ24名である。

【0363】

中間分析

一部の実施形態では、正式な有効性中間分析は計画されない。安全性および有効性データは、停止規則をモニターし、登録またはプロトコル修正への勧告を提供するために研究中に必要なに応じて審査する。

40

【0364】

分析の計画した方法

一部の実施形態では、主な分析は、すべての対象がCTX310注入後の26週間の経過観察を完了したか、または早期に中断した後に行う。最終分析は、すべての対象が完了したか、または研究を中止したときに行う。一部の実施形態では、作表が、適切な体内動態、人口動態、ベースライン、有効性および安全性パラメーターのために行われる。他に特に規定のない限り項目別リスト作成がすべてのデータについて行われる。

【0365】

有効性分析

完全分析セット（FAS）を有効性についての分析セットとして使用する。ベースライ

50

ンと経時的に比較した、TG、ApoB、non-HDL-C [LDL、VLDL、IDLおよびLp (a)を含む]ならびにHDL-Cを含む脂質濃度の百分率変化の有効性エンドポイントを各用量レベルについての記述統計学を使用して要約する。適切なカットオフに基づく、26および52週間を含む選択した時点での分類別の要約を提供する。

【0366】

安全性分析

安全性分析を安全性分析セットについて実施する。AE、AESI、臨床検査データおよび他の適用可能な安全性測定（例えば、ECG）の要約をCTX310の各用量レベルおよび全体について提供する。一部の実施形態では、AEの要約は、CTX310注入でまたはその後始まったかまたは悪化したAEとして定義されるTEAEに注目する。AEをCTCAE v5.0に従ってグレード分けする。TEAEの発生は、器官別大分類および基本語、グレードおよびCTX310との関連によって要約する。DLT、AESI、グレード ≥ 3 AE、関連AEおよびSAEが挙げられるTEAEの重要なサブセットを別々に要約する。一部の実施形態では、臨床検査データの要約は、絶対値および／または選択された検査パラメーターについてのスケジュールされた来診でのベースラインからの変化の記述統計学を含む。臨床的に重要な臨床検査異常および臨床的に重要な異常なバイタルサインの発生を要約する。他の臨床的に重要な安全性測定異常（例えば、ECG）の発生も、該当する場合は要約されてもよい。

10

【0367】

薬物動態および薬力学的分析

経時的なLNPおよびCas9タンパク質の血漿レベルを記述統計学を使用して要約する。適用可能なPKモデルに基づく探索的分析を実施してよい。ベースラインと比較した経時的なANGPTL3濃度における百分率変化を記述統計学を使用して要約する。

20

【0368】

バイオマーカー分析

データが入手可能な場合、例えば、FFAレベル、脂肪性肝疾患マーカー（複数可）および免疫原性マーカー（複数可）を含む追加的な探索的バイオマーカーを、記述統計学を使用して要約する。

【実施例10】

【0369】

ANGPTL3 GLP 毒性研究血漿タンパク質レベル

本明細書において開示される方法および組成物（例えば、ANGPTL3を標的化するsgRNAおよびCas9をコードする核酸を含むCTX310薬産生物）を使用して処置した非ヒト霊長類におけるANGPTL3血漿タンパク質レベルの低下を示すデータが本実施例において提供される。

30

【0370】

下の表23は、例示的研究設計を示す（図29も参照されたい）。

【0371】

【表23】

表23: CTX310 GLP TOX NHP研究設計

用量	数	1カ月	6カ月
3 mg/kg	10 (5F/5M)	4 (2F/2M)	5 (2F/3M)
1 mg/kg	10 (5F/5M)	5 (3F/2M)	5 (2F/3M)
0.5 mg/kg	10 (5F/5M)	5 (3F/2M)	5 (2F/3M)
媒体対照	10 (5F/5M)	5 (3F/2M)	5 (2F/3M)
M、オス; F、メス			

40

【0372】

図30～図33に示されるのは、NHPへのCTX310の投与後、0から6カ月での、ng/mLとしてのANGPTL3血漿タンパク質レベルまたはベースラインからの変

50

化の%である。

【0373】

用語

既に記載した実施形態の少なくとも一部では、一実施形態において使用された1つまたは複数の要素は、そのような置き換えが技術的に実行できない場合を除いて、別の実施形態において互換的に使用され得る。種々の他の省略、付加および改変が、特許請求される主題の範囲から逸脱することなく上に記載された方法および構造に行われ得ることは、当業者によって理解されるであろう。すべてのそのような改変および変更は、添付の特許請求の範囲によって定義される主題の範囲内にあると意図される。

【0374】

本明細書における実質的にすべての複数形の、および／または単数形の用語の使用に関して、当業者は、文脈および／または適用に適切である場合、複数形から単数形へ、および／または単数形から複数形へ解釈できる。種々の単数形／複数形交換は、明確にするために本明細書において特に記載される場合がある。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈がそうでないと明確に示さない限り、複数の参照物を含む。本明細書における「または」への任意の参照は、そうでないと述べない限り「および／または」を包含することが意図される。

【0375】

一般に、本明細書および特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本文）において使用される用語は、一般に「オープン」な用語（例えば、用語「含んでいる」は「これだけに限らないが含んでいる」と解釈されるべきであり、用語「有する」は「少なくとも有する」として解釈されるべきであり、用語「含む」は「これだけに限らないが含む」として解釈されるべきであるなど）として意図されることは当業者によって理解されるであろう。特定の数の導入された請求項の記載が意図される場合、そのような意図は請求項に明確に記載され、そのような記載がない場合、そのような意図が存在しないことは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、以下の添付の特許請求の範囲は、請求項記載を導入するために導入句「少なくとも1つの」および「1つまたは複数の」の使用を含む場合がある。しかし、そのような句の使用は、同じ請求項が、導入句「1つまたは複数の」または「少なくとも1つの」および不定冠詞「a」または「an」などを含む場合でさえ、不定冠詞「a」または「an」による請求項記載の導入が、そのような導入された請求項の記載を含む任意の特定の請求項を、1つだけのそのような記載を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い（例えば、「a」および／または「an」は「少なくとも1つの」または「1つまたは複数の」を意味するものと解釈されるべきであるなど）；同じことが、請求項記載を導入するために使用される定冠詞の使用についても有効である。加えて、特定の数の導入された請求項の記載が明示的に記載されている場合でさえも、そのような記載が、少なくとも記載される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理解するであろう（例えば、他の修飾語句を伴わない「2つの記載」という記載だけで、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など）。さらに、「A、B、およびCのうちの少なくとも1つなど」に類似する慣用表現が使用される場合、一般にそのような構文は、当業者がその慣用表現を理解する意味として意図されるものである（例えば、「A、B、およびCのうちの少なくとも1つを有するシステム」は、これだけに限らないが、Aだけを、Bだけを、Cだけを、AとBとを合わせて、AとCとを合わせて、BとCとを合わせて、ならびに／またはA、B、およびCを合わせて有するシステムを含むなど）。「A、B、またはCのうちの少なくとも1つなど」に類似した慣用表現が使用される場合、一般にそのような構文は、当業者がその慣用表現を理解するはずの意味として意図されるものである（例えば、「A、B、またはCのうちの少なくとも1つを有するシステム」は、これだけに限らないが、Aだけを、Bだけを、Cだけを、AとBとを合わせて、AとCとを合わせて、BとCとを合わせて、ならびに／またはA、B、およびCを合わせて有するシステムを含むなど）。2つ以上の代替用語を表す事実上任意の離接語および／または句は、記載

10

20

30

40

50

、特許請求の範囲、図面のいずれにおいてもその用語のうちの1つ、用語のいずれか、または両方の用語を含む可能性を企図すると理解されるべきであることも当業者にはさらに理解されるであろう。例えば、句「AまたはB」は、「A」または「B」または「AおよびB」の可能性を含むものと理解される。

【0376】

加えて、本開示の特性または態様がマーカッシュ群の観点から記載される場合、当業者は、本開示がマーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブ群の観点からも記載されることを理解する。

【0377】

当業者に理解されたとおり、任意のおよびすべての目的のために、例えば書面による説明を提供することに関して、本明細書において開示されるすべての範囲は、任意のおよびすべての可能な部分範囲およびこれらの部分範囲の組み合わせも包含する。任意の列挙された範囲は、同じ範囲が、少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分などに分割されることを十分記載し、可能にするとして容易に理解され得る。非限定的例として、本明細書において考察される各範囲は、下3分の1、中3分の1および上3分の1に容易に分割され得る。当業者によって同様に理解されたとおり、「最大で」、「少なくとも」「を超える」「より少なく」などのすべての語は、記載される数を含み、上で考察したとおり後で部分範囲に分割され得る範囲を指す。最後に、当業者によって理解されたとおり、範囲は個々の各メンバーを含む。それにより、例えば、1～3個の要素を有する群は、1個、2個、または3個の要素を有する群を指す。同様に、1～5個の要素を有する群は、1個、2個、3個、4個または5個の要素を有する群を指すなど。

【0378】

本明細書では種々の態様および実施形態が開示されたが、他の態様および実施形態も当業者に明らかであろう。本明細書において開示される種々の態様および実施形態は例示の目的のためであり、限定されることを意図せず、真の範囲および趣旨は以下の特許請求の範囲によって示される。

10

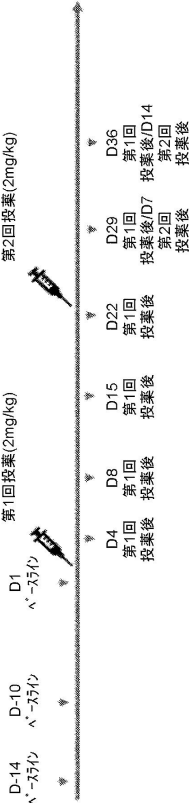
20

30

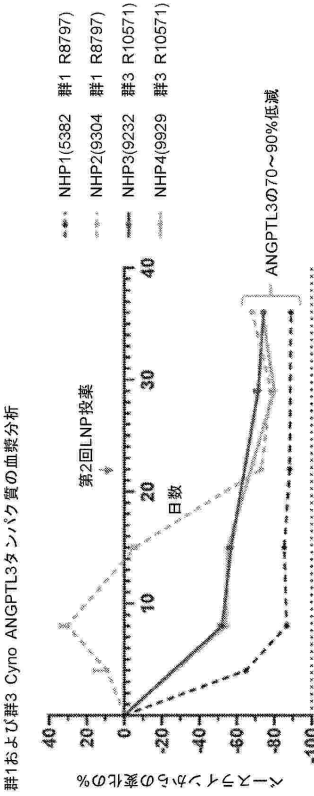
40

50

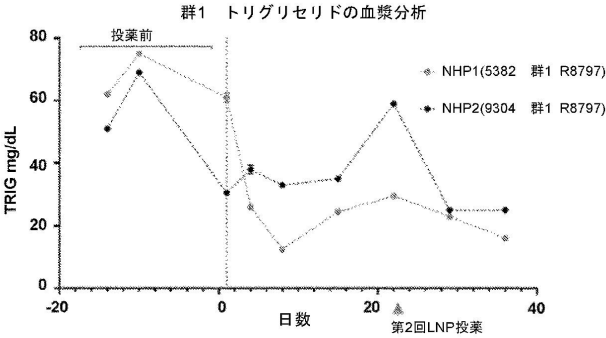
【図面】
【図 1】



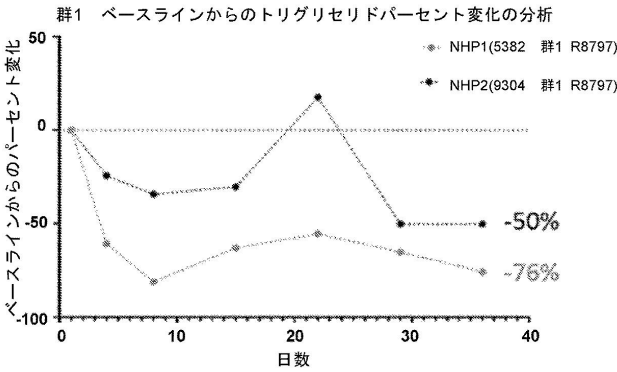
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

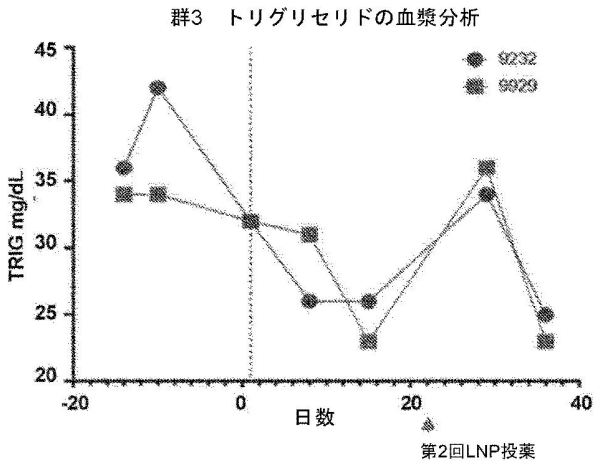
20

30

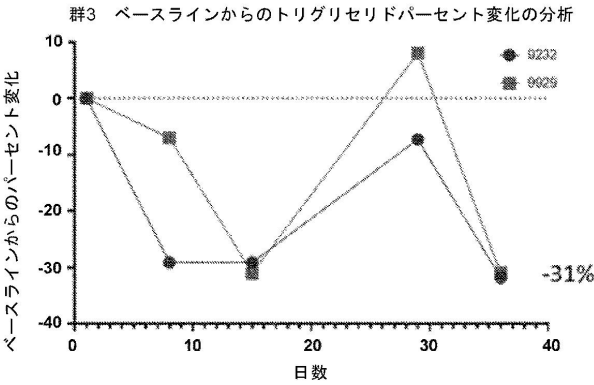
40

50

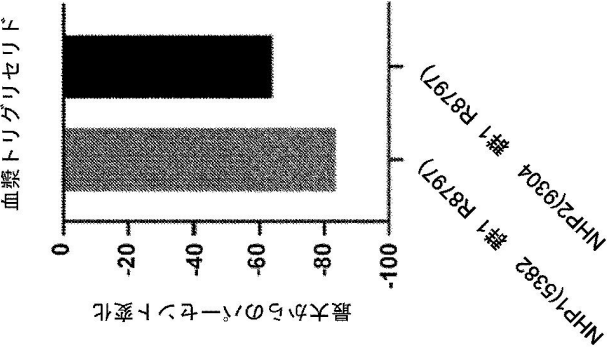
【図 4 A】



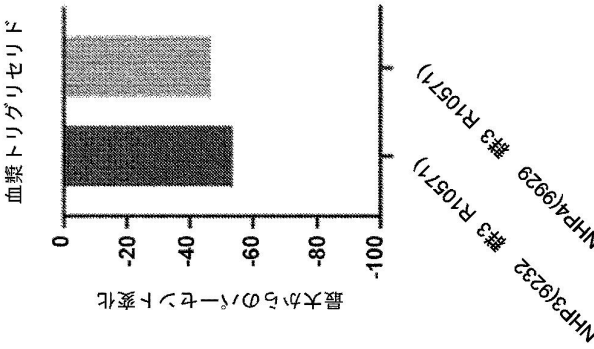
【図 4 B】



【図 5 A】



【図 5 B】



10

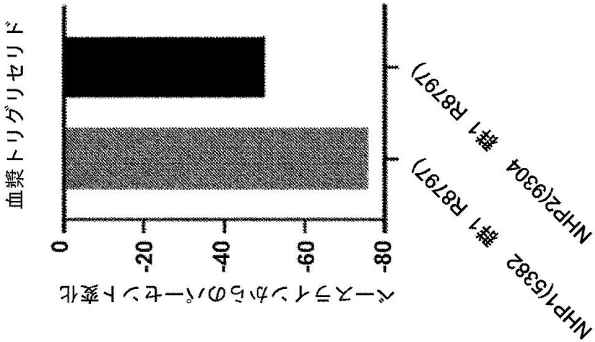
20

30

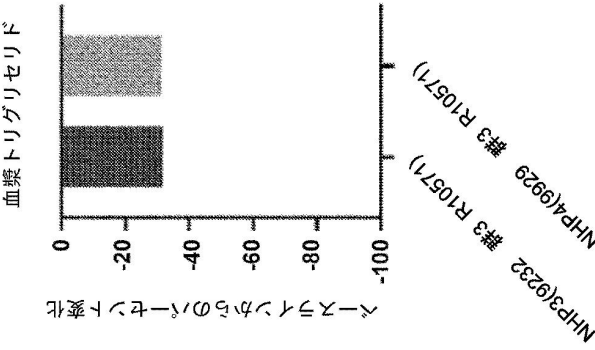
40

50

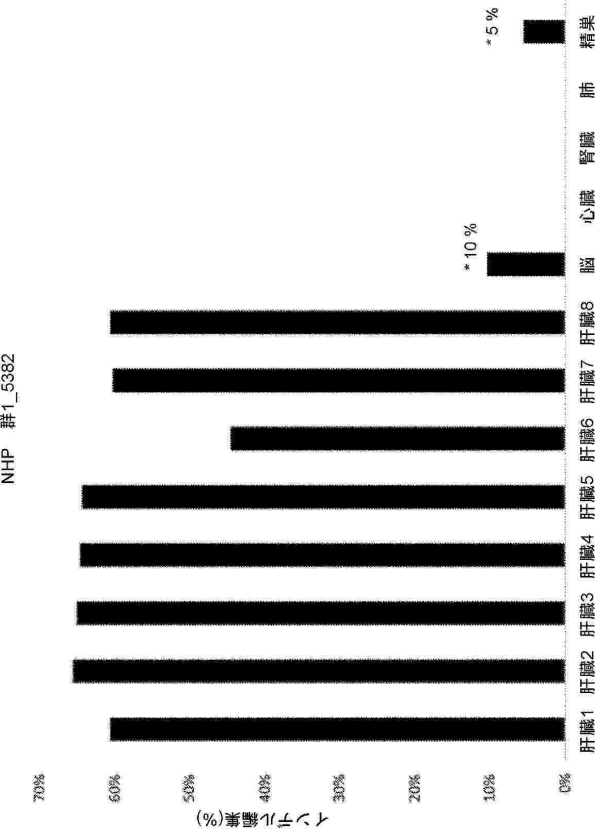
【図 5 C】



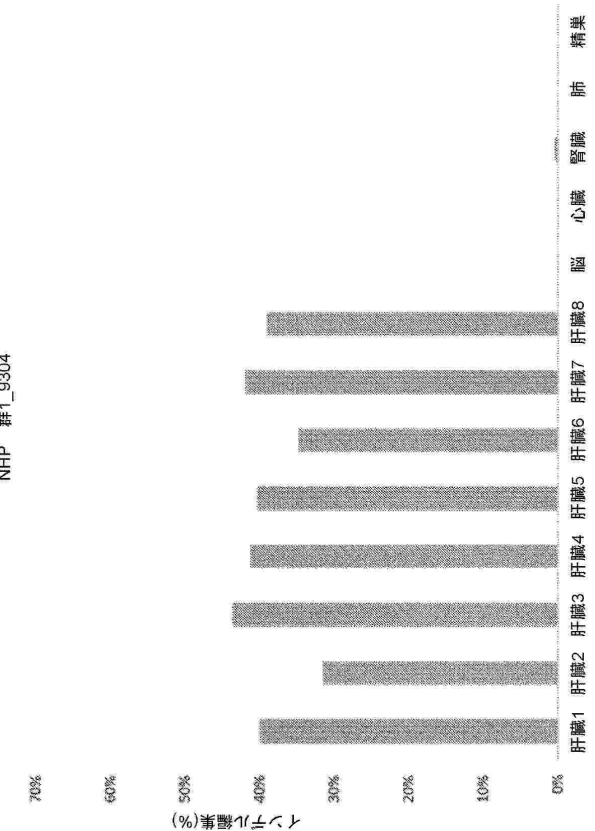
【図 5 D】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

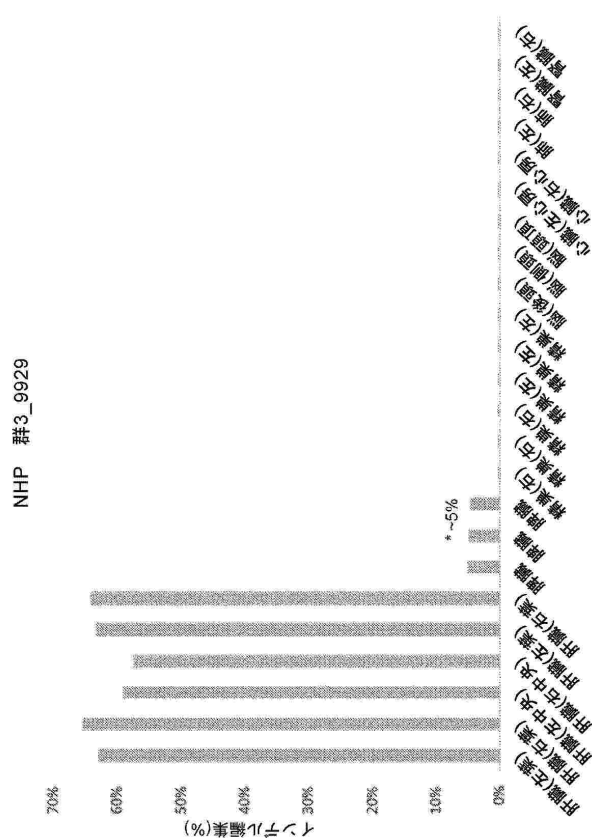
20

30

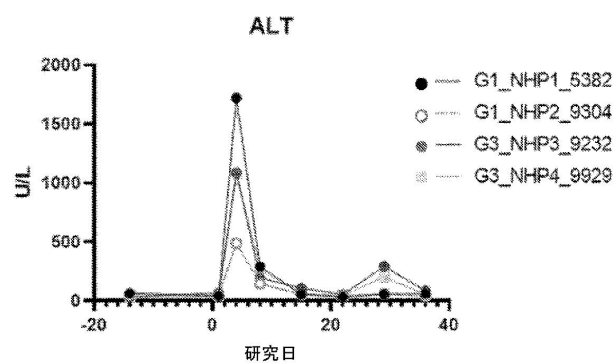
40

50

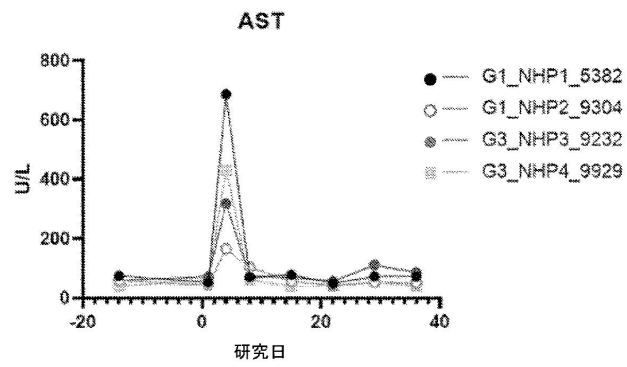
【図 6 D】



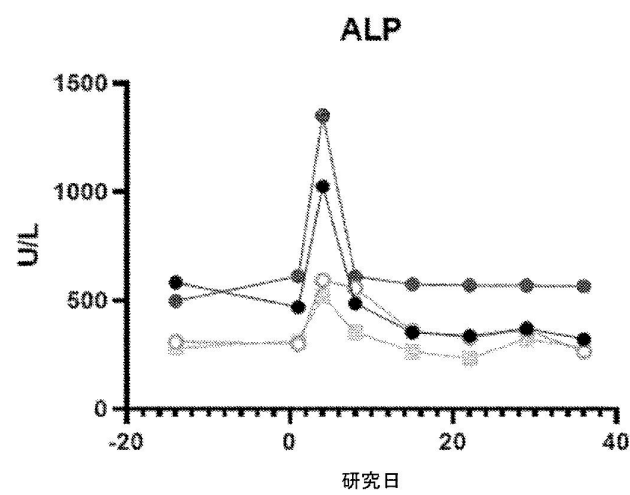
【図 8 A】



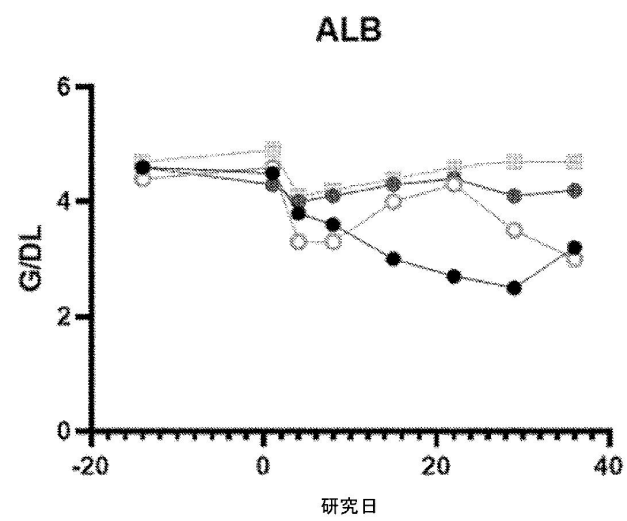
【図 8 B】



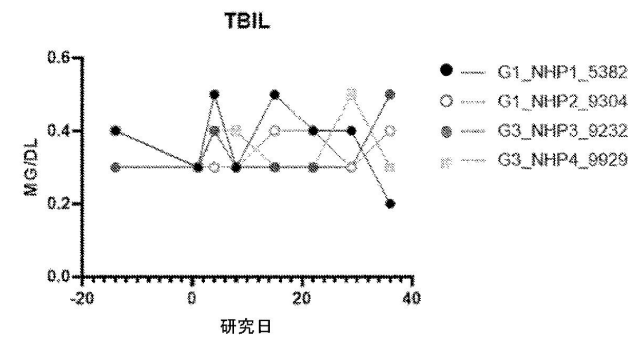
【図 8 C】



【図 8 D】



【図 8 E】



10

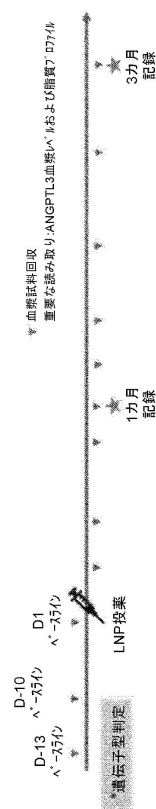
20

30

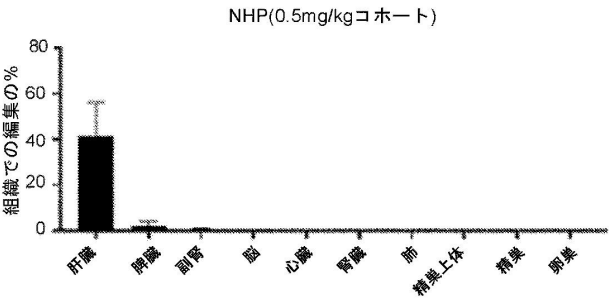
40

50

【図 9】



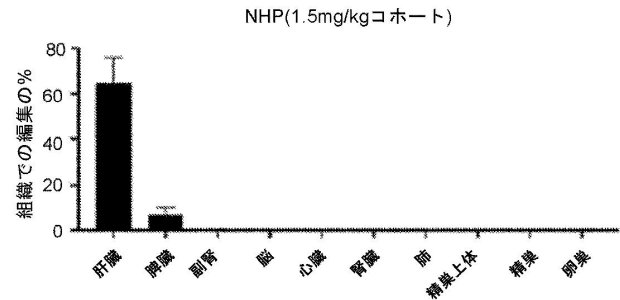
【図 10 A】



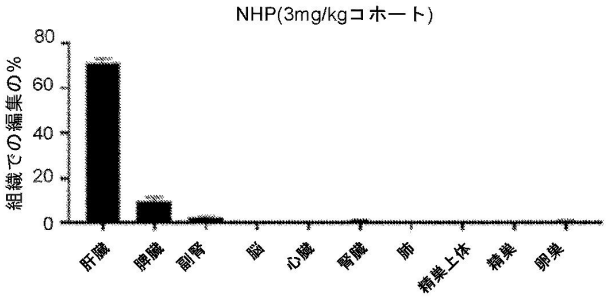
10

20

【図 10 B】



【図 10 C】

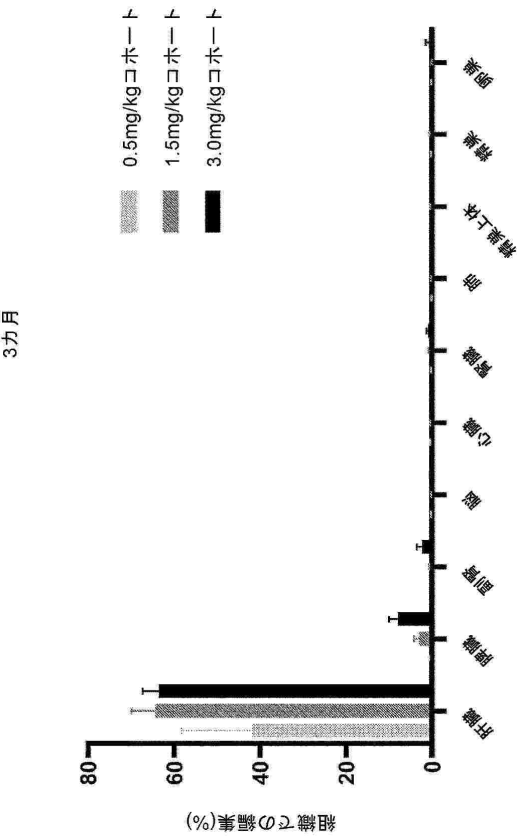


30

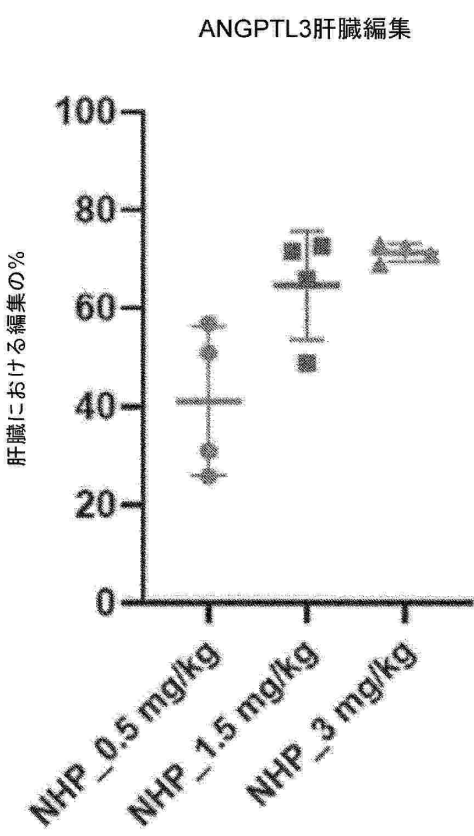
40

50

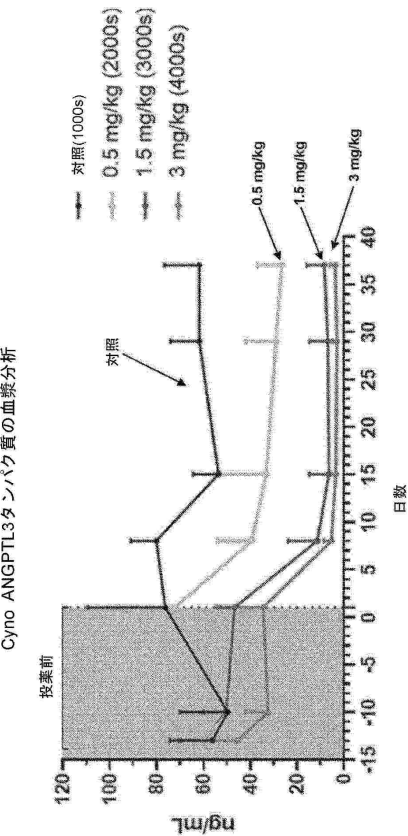
【図 1 0 D】



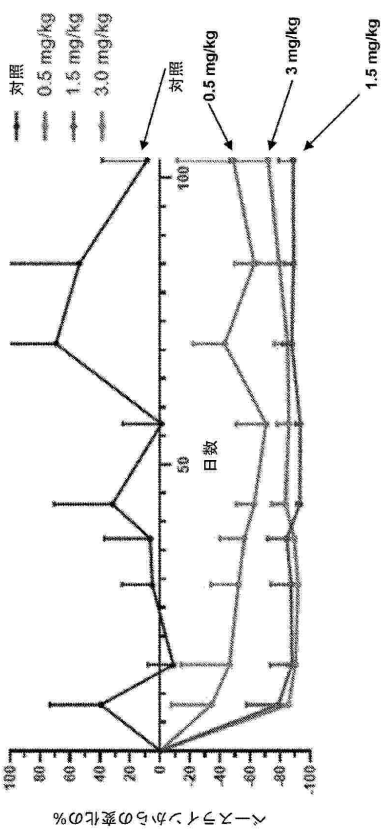
【図 1 1】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



10

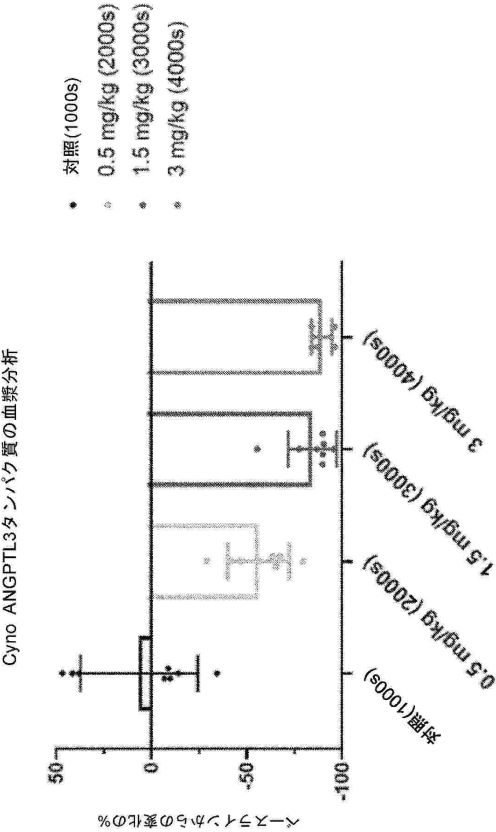
20

30

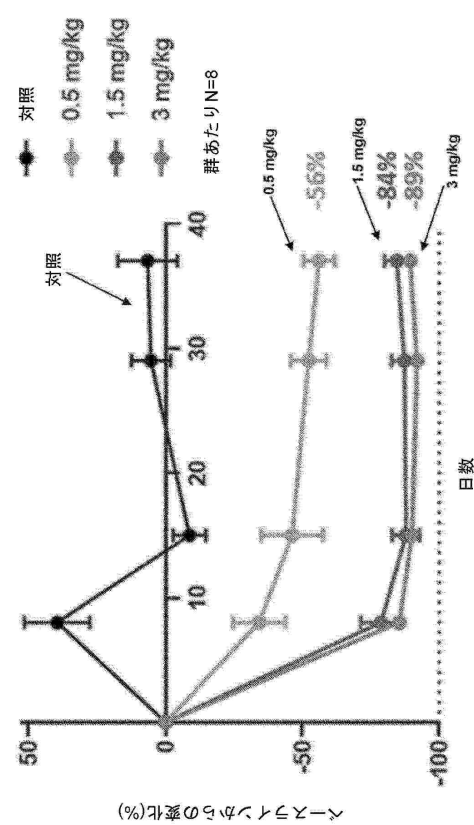
40

50

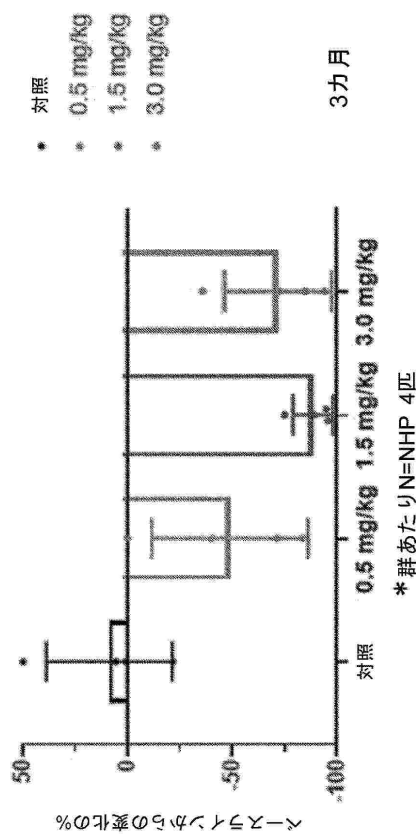
【図 1 2 C】



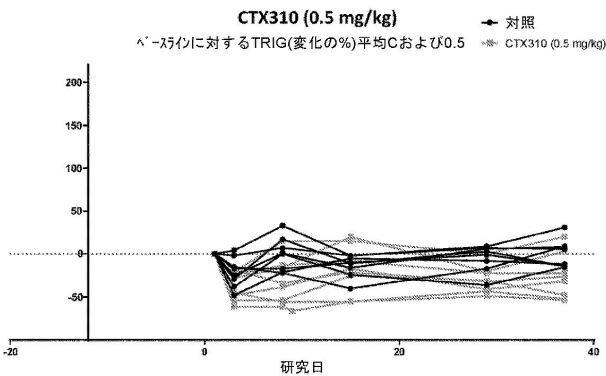
【図 1 2 D】



【図 1 2 E】



【図 1 3 A】



10

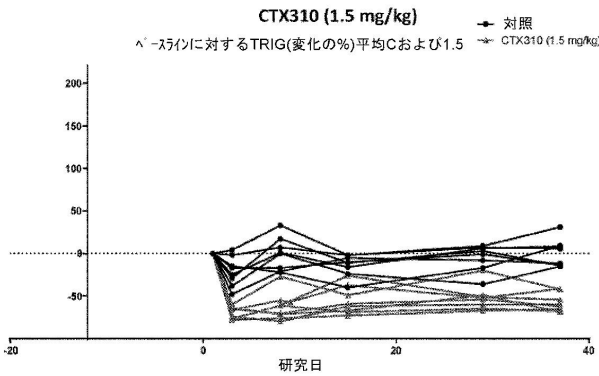
20

30

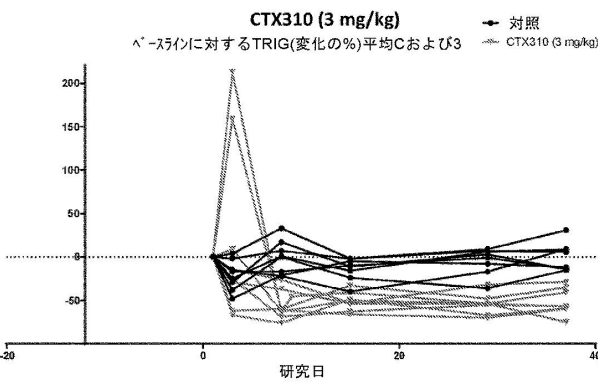
40

50

【図 1 3 B】

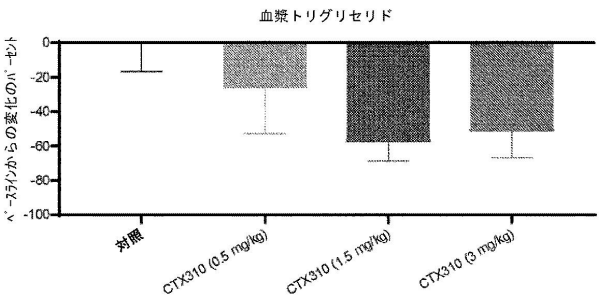


【図 1 3 C】

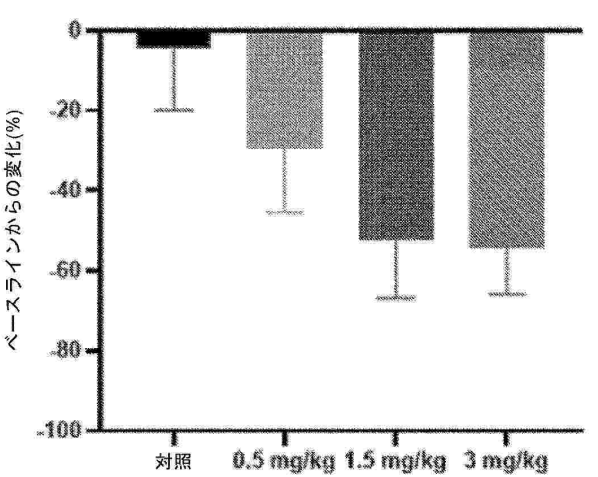


10

【図 1 3 D】



【図 1 3 E】



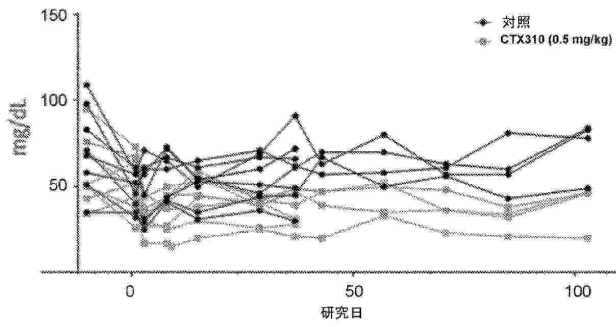
20

30

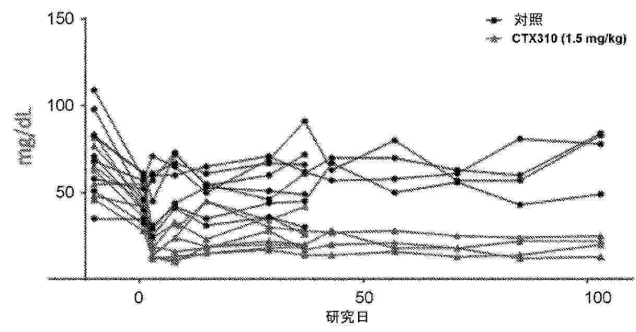
40

50

【図 13 F】

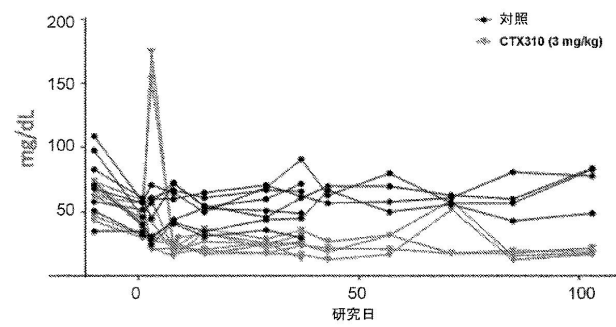


【図 13 G】

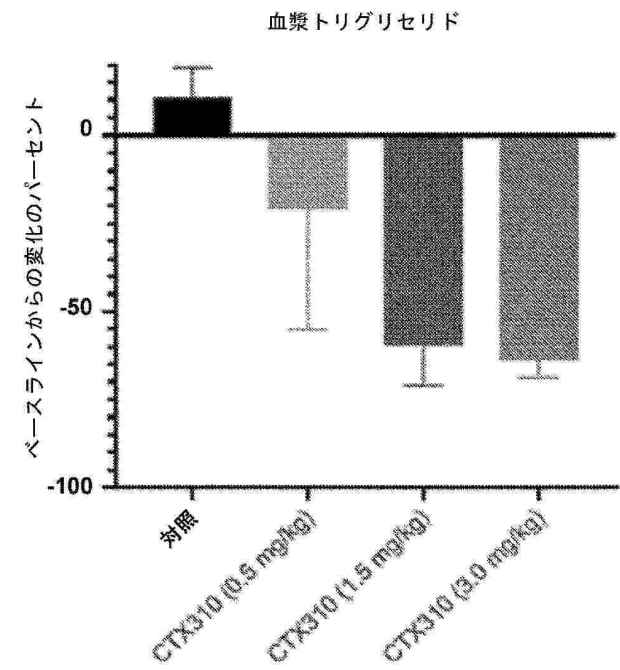


10

【図 13 H】



【図 13 I】



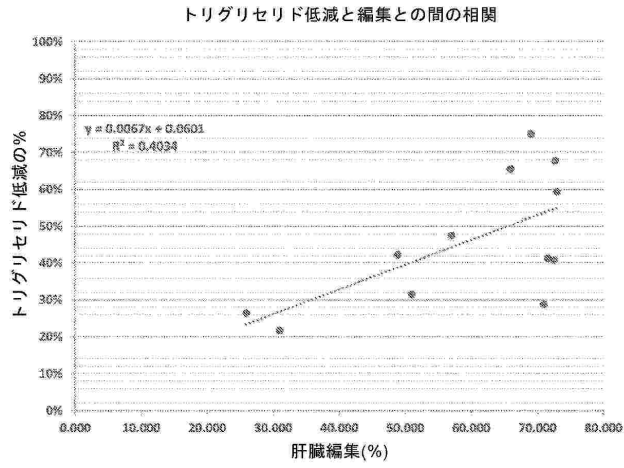
20

30

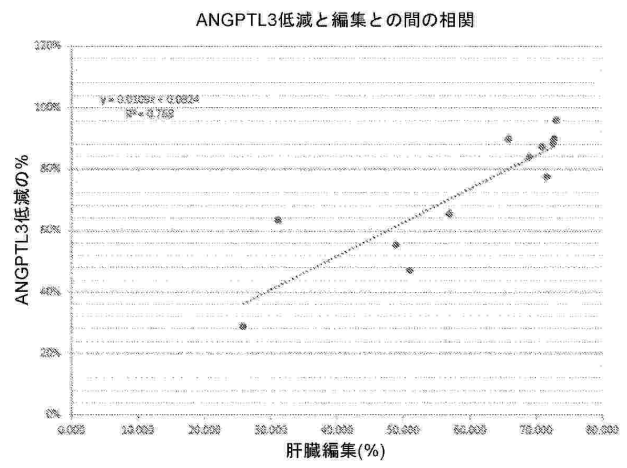
40

50

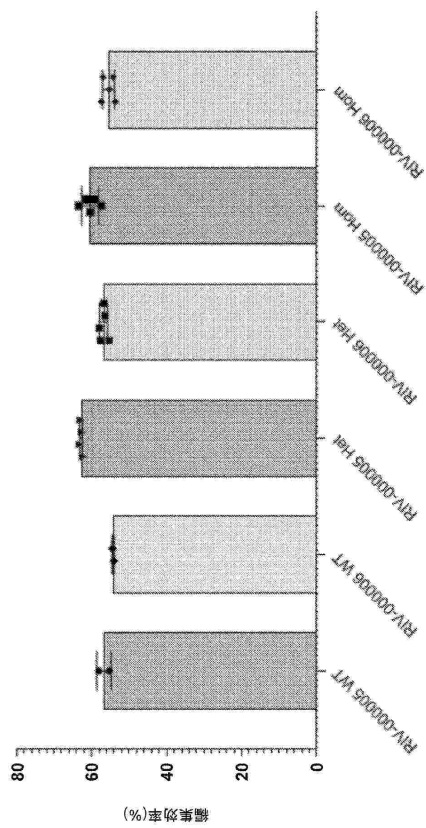
【図 14 A】



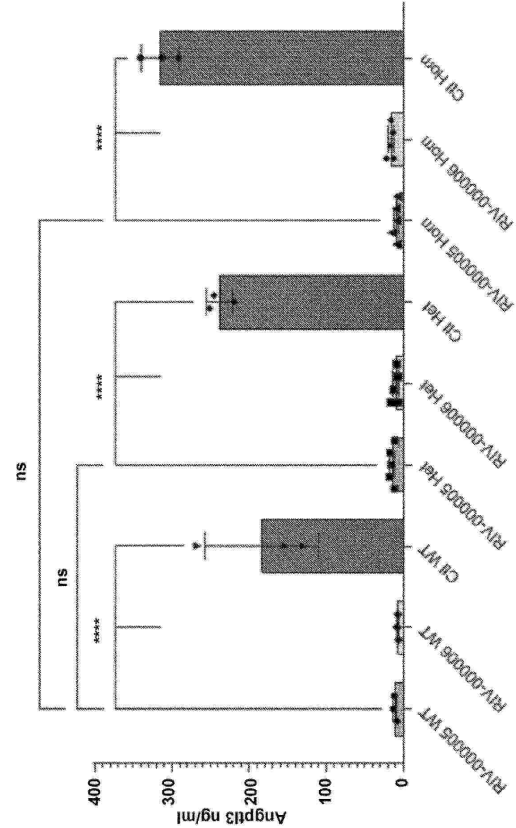
【図 14 B】



【図 15 A】



【図 15 B】



10

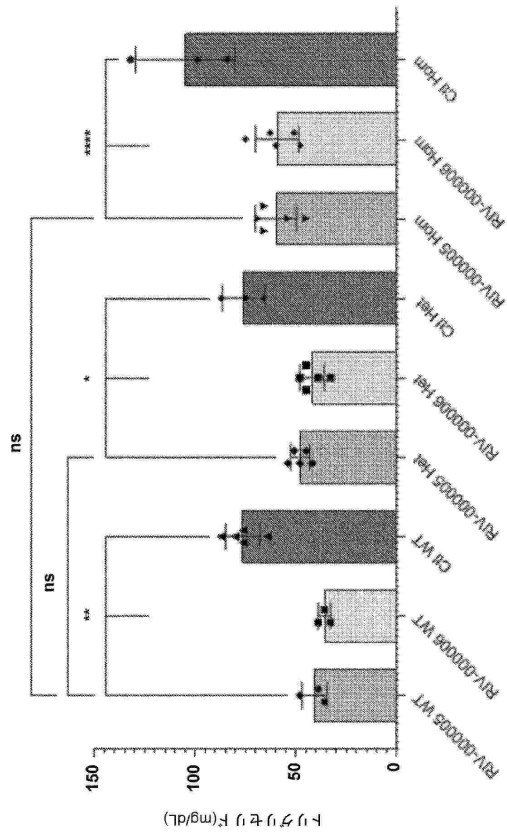
20

30

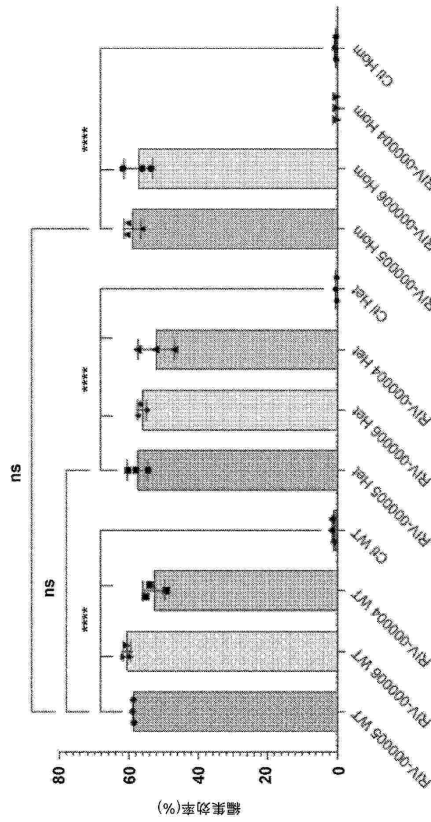
40

50

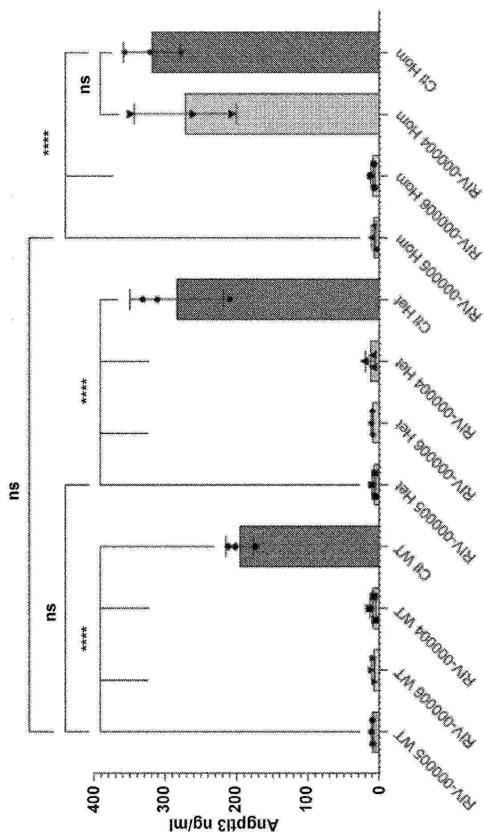
【図 15 C】



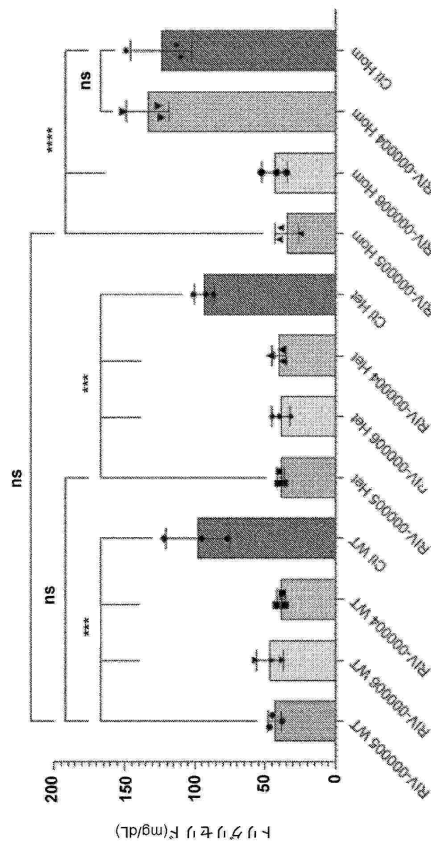
【図 16 A】



【図 16 B】



【図 16 C】



10

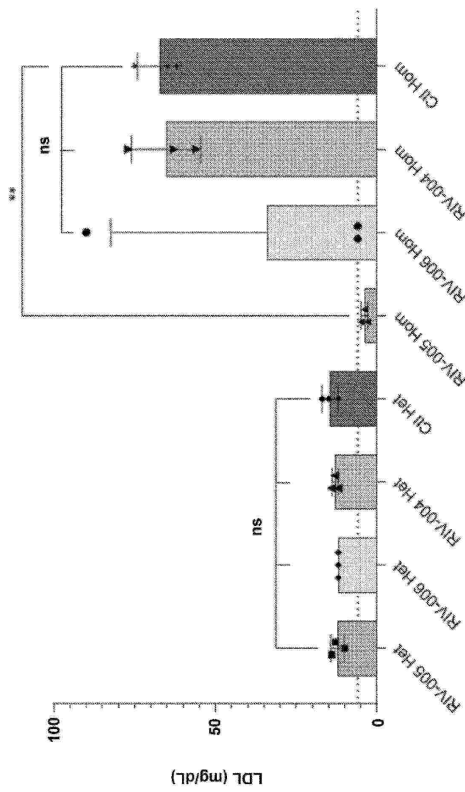
20

30

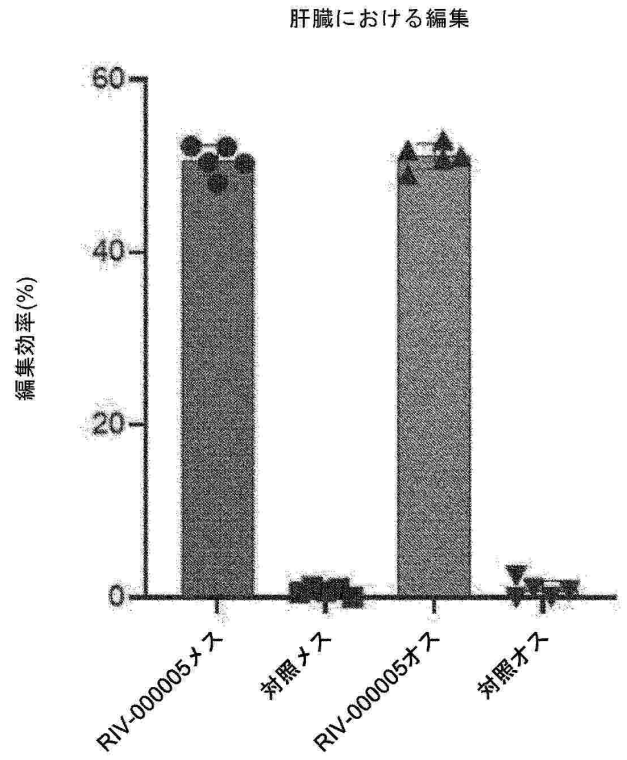
40

50

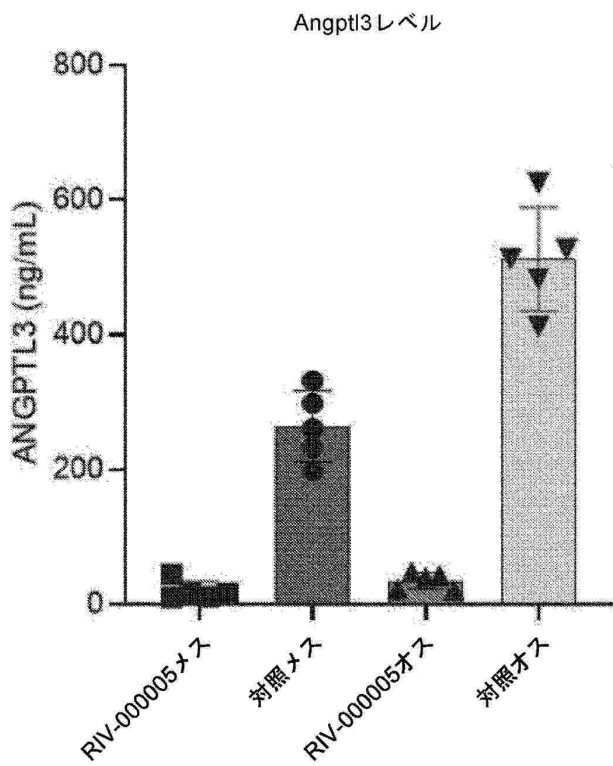
【図 16 D】



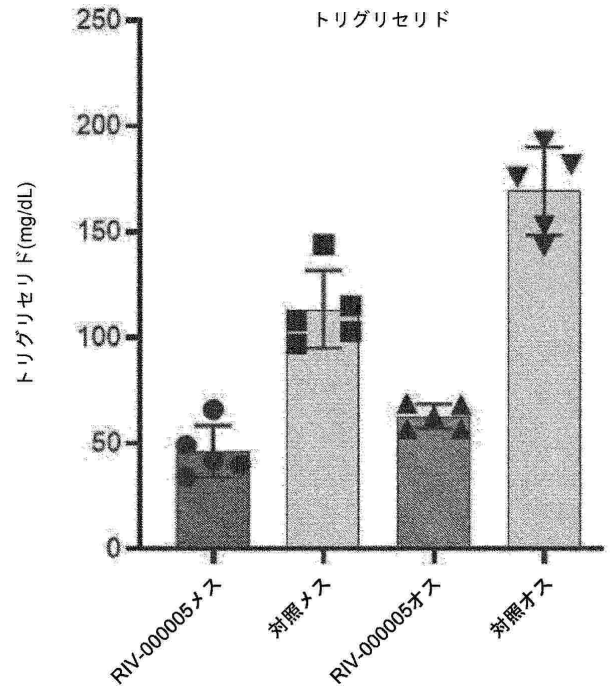
【図 16 E】



【図 16 F】



【図 16 G】



10

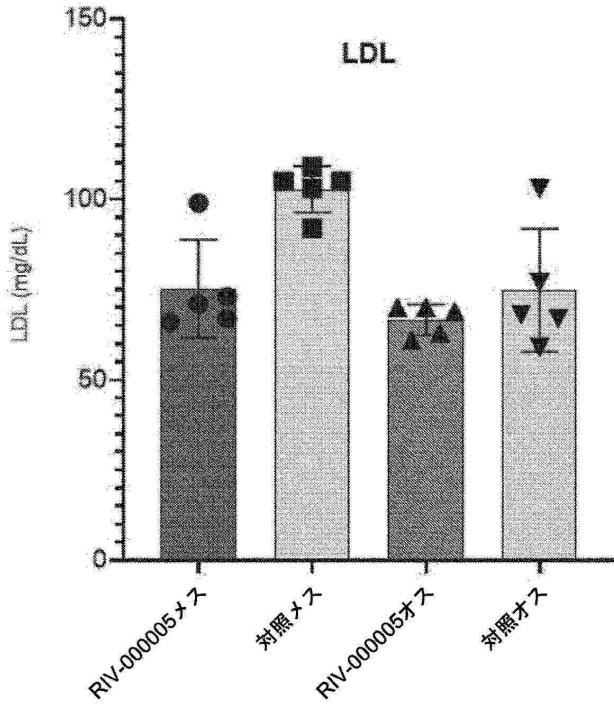
20

30

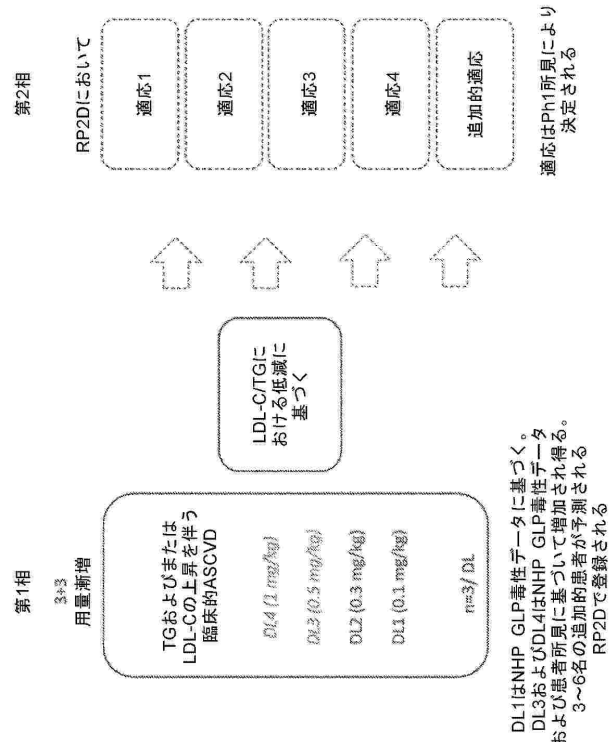
40

50

【図 16 H】



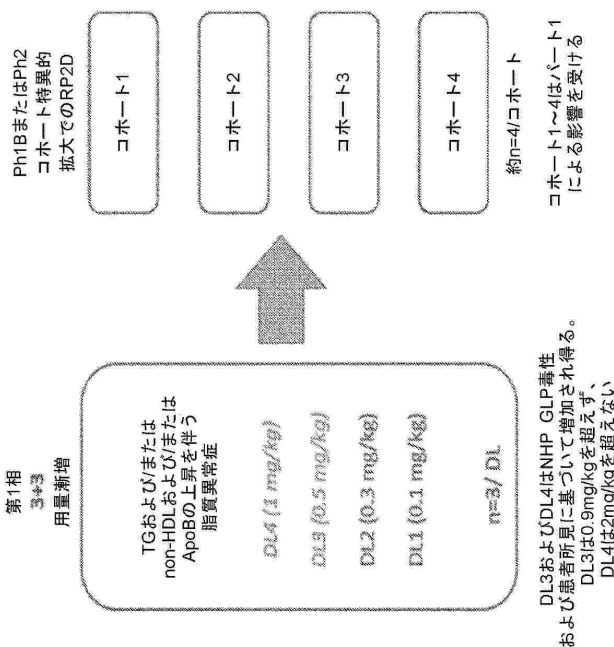
【図 17】



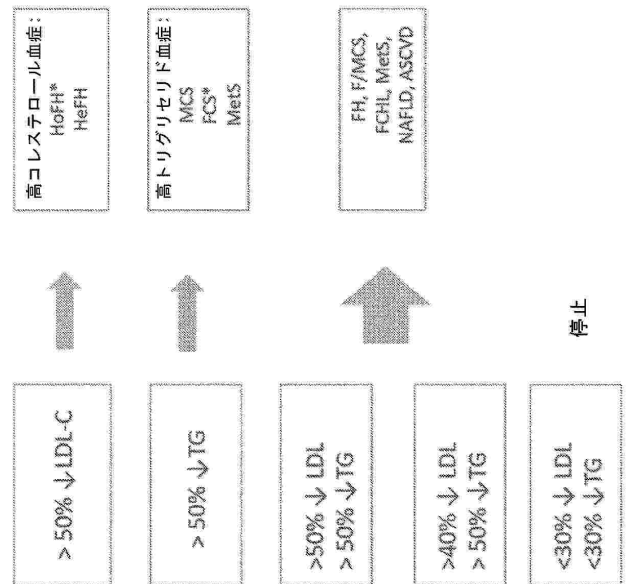
10

20

【図 18】



【図 19】

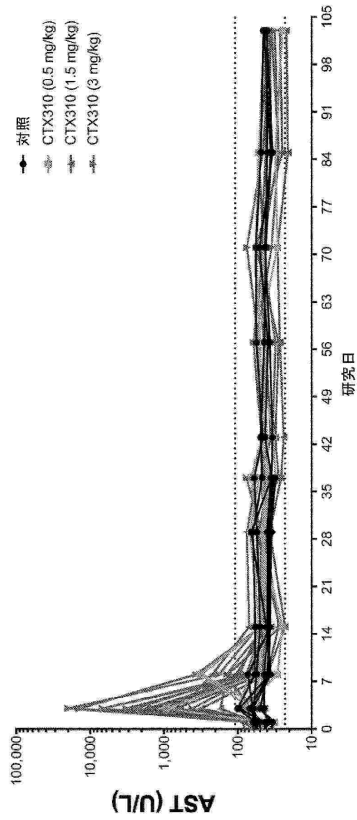


30

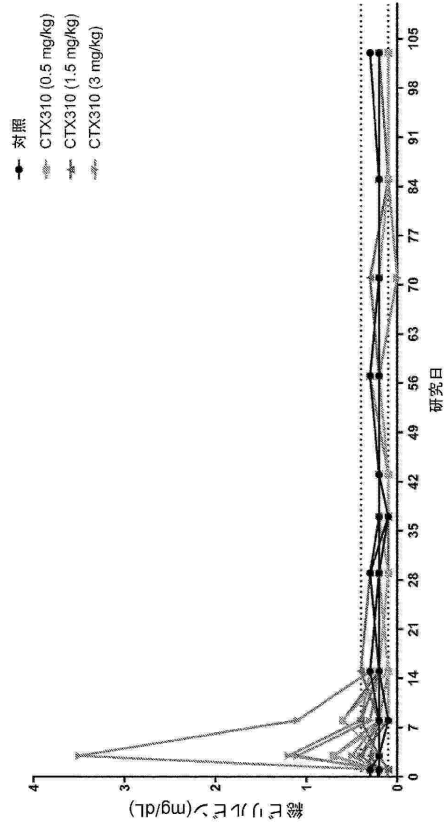
40

50

【図 20 A】



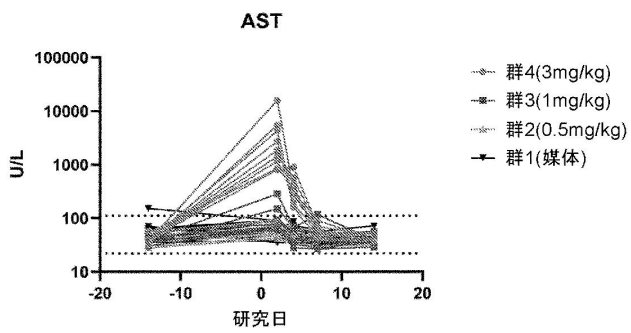
【図 20 B】



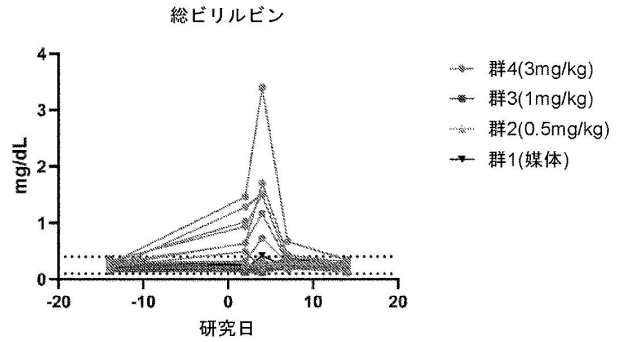
10

20

【図 21 A】



【図 21 B】

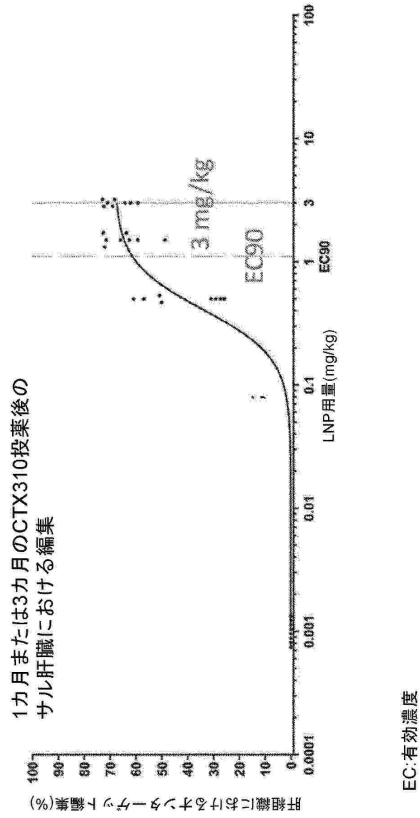


30

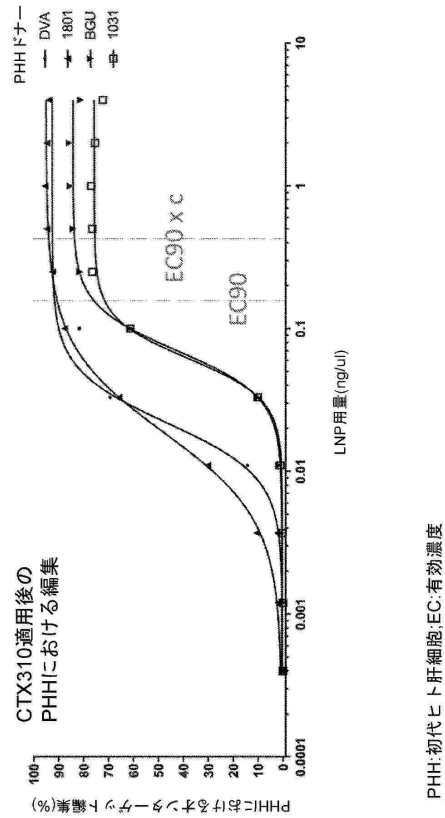
40

50

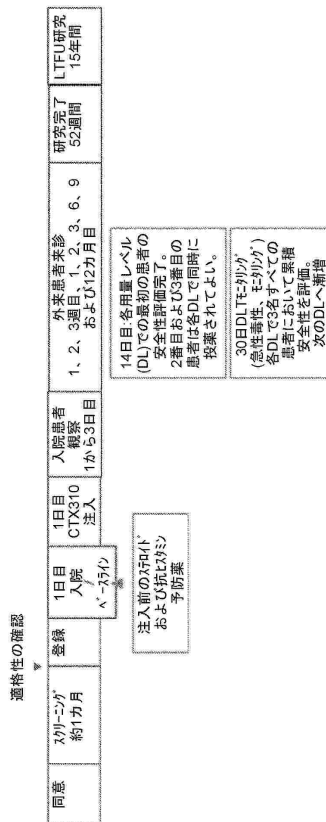
【図 2 2 A】



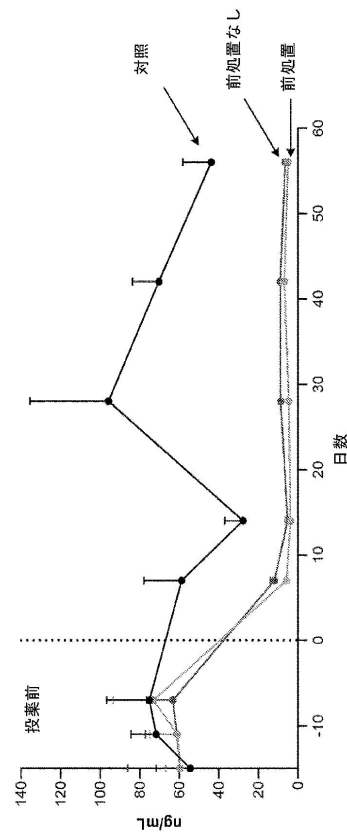
【図 2 2 B】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

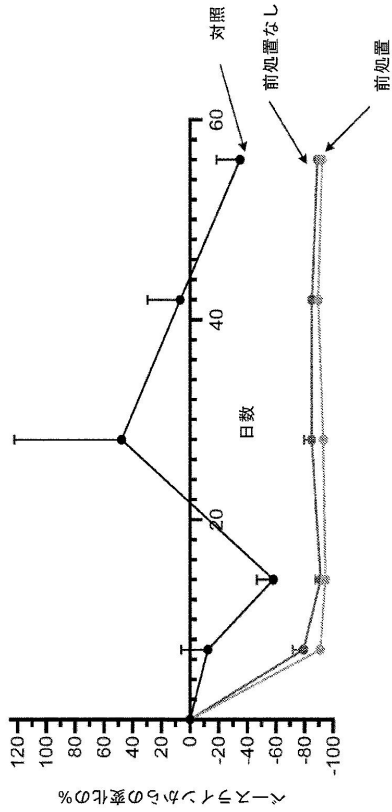
20

30

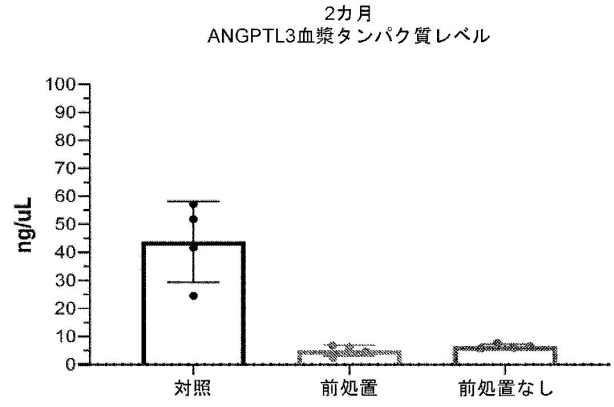
40

50

【図 2 5】



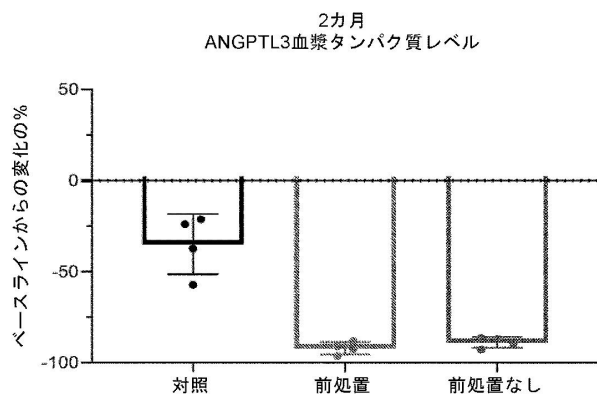
【図 2 6】



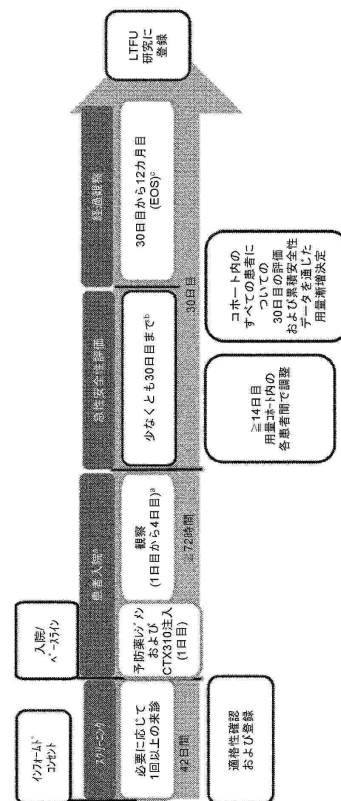
10

20

【図 2 7】



【図 2 8】

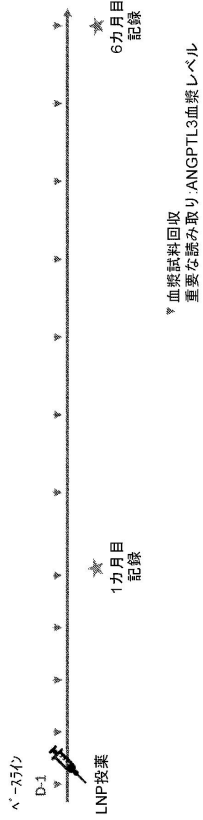


30

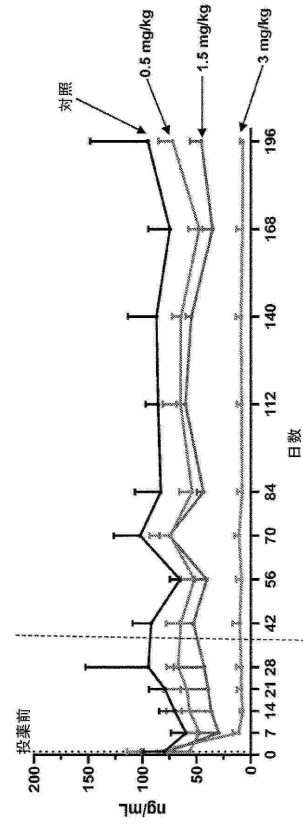
40

50

【図 29】



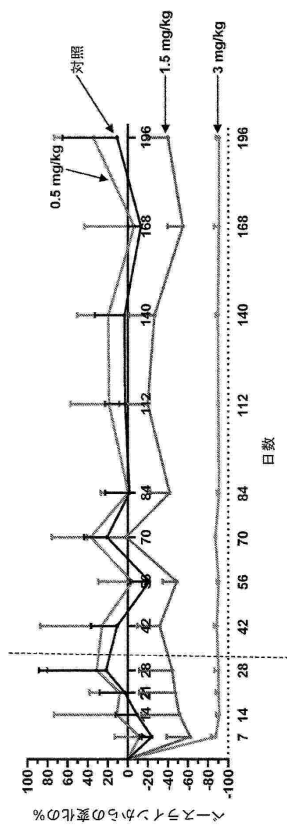
【図 30】



10

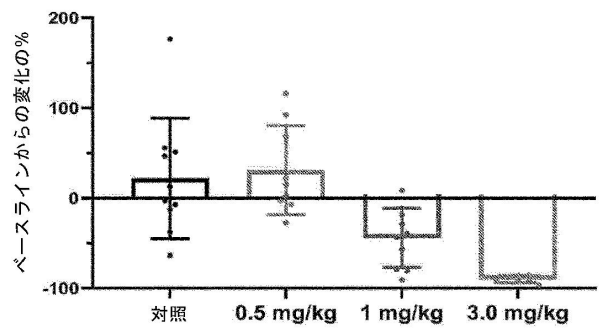
20

【図 31】



【図 32】

1カ月でのCyno ANGPTL3
タンパク質の血漿分析



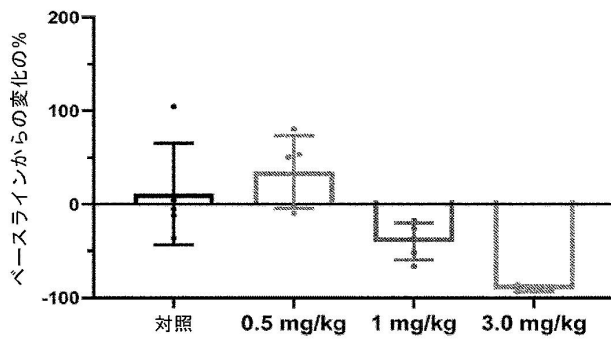
30

40

50

【図 3 3】

6カ月でのCyno ANGPTL3
タンパク質の血漿分析



10

【配列表】

2025507751000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/051870

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/113 A61K31/7088 A61K9/127 A61P3/06
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 A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/247604 A1 (TUFTS COLLEGE [US]) 10 December 2020 (2020-12-10) claims 1-36; figures 18,19; examples 3,7 -----	1-49
X	WO 2018/154387 A1 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 30 August 2018 (2018-08-30) paragraphs [0305] - [0313], [0336]; claims 1-21; figures 6-8; examples 8,13; table 7; sequences 7094,9109,11237 paragraph [0350] - paragraph [0354] -----	1-49
X	WO 2021/207711 A2 (VERVE THERAPEUTICS INC [US]) 14 October 2021 (2021-10-14) paragraph [0683]; claims 28-58; example 2; sequences 50,116,1600,1636 page 2 - page 7 page 36 - page 41 page 648 - page 681 ----- -/--	1-49

☒ 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

2 June 2023

Date of mailing of the international search report

12/06/2023

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

Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/051870

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	QIU MIN ET AL: "Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angptl3", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 118, no. 10, 1 March 2021 (2021-03-01), XP055981115, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.2020401118 Retrieved from the Internet: URL:https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.2020401118> figures 1-6 -& Qiu Min ET AL: "Supplementary Information for Lipid nanoparticle-mediated co-delivery of Cas9 mRNA and single guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angptl3", Proceedings of the National Academy of Sciences, 1 March 2021 (2021-03-01), XP055979993, Retrieved from the Internet: URL:https://www.pnas.org/doi/suppl/10.1073/pnas.2020401118/suppl_file/pnas.2020401118.sapp.pdf [retrieved on 2022-11-10] figures S6-S8	1-19, 22-26, 29-38
A	ELSEWEIDY MOHAMED M ET AL: "Losartan and azelastine either alone or in combination as modulators for endothelial dysfunction and platelets activation in diabetic hyperlipidemic rats", JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY : JPP, vol. 72, no. 12, 3 September 2020 (2020-09-03), pages 1812-1821, XP93041629, GB ISSN: 0022-3573, DOI: 10.1111/jphp.13363 Retrieved from the Internet: URL:https://academic.oup.com/jpp/article-pdf/72/12/1812/36589970/jphp13363.pdf> abstract	1-49
1 A	WO 2017/141109 A1 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 24 August 2017 (2017-08-24) paragraphs [0059], [0601]; claims 1,13,19,20,56; example 18; sequences 4319,4393,5316	1-49
1	----- -/--	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/051870

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JING GONG ET AL: "A Versatile Nonviral Delivery System for Multiplex Gene-Editing in the Liver", ADVANCED MATERIALS, VCH PUBLISHERS, DE, vol. 32, no. 46, 14 October 2020 (2020-10-14), page n/a, XP071876355, ISSN: 0935-9648, DOI: 10.1002/ADMA.202003537 figure 1 -----	1-49
A	Kasiewicz Lisa N. ET AL: "Lipid nanoparticles incorporating a GalNAc ligand enable in vivo liver ANGPTL3 editing in wild-type and somatic LDLR knockout non-human primates", bioRxiv, 8 November 2021 (2021-11-08), XP93041255, DOI: 10.1101/2021.11.08.467731 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.08.467731v1.full.pdf [retrieved on 2023-04-21] figures 1,3 -& Kasiewicz Lisa N. ET AL: "Supplemental Information: Lipid nanoparticles incorporating a GalNAc ligand enable in vivo liver ANGPTL3 editing in wild-type and somatic LDLR knockout non-human primates", bioRxiv, 8 November 2021 (2021-11-08), XP93041348, Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2021/11/08/2021.11.08.467731/DC1/embed/media-1.pdf?download=true [retrieved on 2023-04-24] page 10 -----	1-49
A	ELSEWEIDY MOHAMED M ET AL: "Azelastine a potent antihistamine agent, as hypolipidemic and modulator for aortic calcification in diabetic hyperlipidemic rats model", ARCHIVES OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY,, vol. 128, no. 6, 30 June 2020 (2020-06-30), pages 1611-1618, XP009543976, ISSN: 1744-4160, DOI: 10.1080/13813455.2020.1786129 abstract -----	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/051870

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2023/051870

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020247604 A1	10-12-2020	AU 2020287624 A1	06-01-2022
		CA 3142725 A1	10-12-2020
		CN 114173762 A	11-03-2022
		EP 3979988 A1	13-04-2022
		JP 2022535535 A	09-08-2022
		KR 20220017466 A	11-02-2022
		US 2022168231 A1	02-06-2022
		WO 2020247604 A1	10-12-2020
WO 2018154387 A1	30-08-2018	AU 2018224387 A1	05-09-2019
		CA 3054031 A1	30-08-2018
		CN 110662838 A	07-01-2020
		EP 3585895 A1	01-01-2020
		JP 2020508056 A	19-03-2020
		US 2020157565 A1	21-05-2020
		WO 2018154387 A1	30-08-2018
WO 2021207711 A2	14-10-2021	AU 2021252991 A1	17-11-2022
		AU 2021253959 A1	17-11-2022
		BR 112022020407 A2	02-05-2023
		BR 112022020428 A2	07-03-2023
		CA 3179862 A1	14-10-2021
		CA 3179863 A1	14-10-2021
		CN 116096429 A	09-05-2023
		CN 116096883 A	09-05-2023
		EP 4132591 A2	15-02-2023
		EP 4133071 A2	15-02-2023
		EP 4133072 A2	15-02-2023
		GB 2612452 A	03-05-2023
		GB 2613457 A	07-06-2023
		IL 297193 A	01-12-2022
		IL 297194 A	01-12-2022
		JP 2023518914 A	08-05-2023
		JP 2023518915 A	08-05-2023
		KR 20230016175 A	01-02-2023
		KR 20230016176 A	01-02-2023
		US 2023158174 A1	25-05-2023
		US 2023159926 A1	25-05-2023
		WO 2021207710 A2	14-10-2021
		WO 2021207711 A2	14-10-2021
		WO 2021207712 A2	14-10-2021
WO 2017141109 A1	24-08-2017	EP 3416689 A1	26-12-2018
		US 2019112353 A1	18-04-2019
		WO 2017141109 A1	24-08-2017

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	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51		
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17		
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46		

(32)優先日 令和4年6月16日(2022.6.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/380,557

(32)優先日 令和4年10月21日(2022.10.21)

(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,R
U,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,N
E,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,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ
,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
ツツ州サウス・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 ソニ，サンディーブ

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 ソーワ，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 AA65 CC11 CC16 CC21

4C084 AA13 DC22 DC50

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 MA38 NA14 ZA36 ZA45 ZA70
ZA75 ZC21 ZC33 ZC35