

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-548320

(P2022-548320A)

(43)公表日 令和4年11月17日(2022.11.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/00 (2006.01)	C 1 2 N	15/00		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全89頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-518345(P2022-518345)	(71)出願人	522110223	オメガ セラピューティクス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140, ケンブリッジ, エイコーンパーク ドライブ 20	
(86)(22)出願日	令和2年9月23日(2020.9.23)	(74)代理人	100107489		
(85)翻訳文提出日	令和4年5月17日(2022.5.17)	(72)発明者	弁理士 大塩 竹志		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/052119	(72)発明者	パティル, ヴィシュウィシュ アショク		
(87)国際公開番号	WO2021/061707	(72)発明者	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02474, アーリントン, ワシントンストリート 304	ファレリ, ジェレミア ディー. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01945, マーブルヘッド, ブルックハ	
(87)国際公開日	令和3年4月1日(2021.4.1)				
(31)優先権主張番号	62/904,325				
(32)優先日	令和1年9月23日(2019.9.23)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,				
	最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 アポリポタンパク質B (A P O B) 遺伝子発現をモジュレートするための組成物および方法

(57)【要約】

本発明は、アポリポタンパク質B (A P O B) 遺伝子の発現を、A P O B発現制御領域を標的とすることによってモジュレートする（例えば、発現を増強するまたは低減させる）ための作用剤および組成物、ならびに、A P O B関連障害、例えば高コレステロール血症を処置するための、その使用方法を提供する。A P O B遺伝子は、細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば哺乳動物体細胞、例えばマウスまたはヒト体細胞などに存在するものであり得る。本発明は、A P O B遺伝子の発現をモジュレートするため、またはA P O B遺伝子の発現をモジュレートすることが有益であろう対象、例えば、A P O B関連疾患に罹患しているもしくは罹患しやすい対象を処置するために、本発明の作用剤および組成物を使用する方法も提供する。

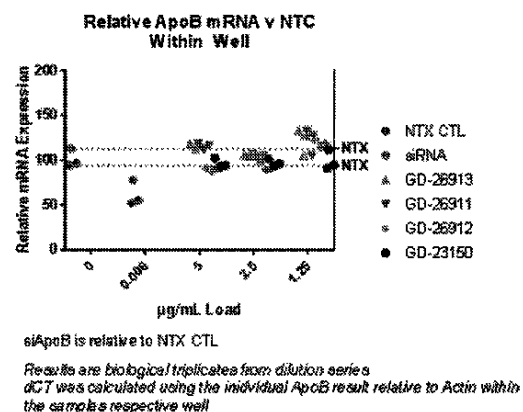


FIG. 4A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

APOB 発現制御領域を標的とする部位特異的 APOB 標的化成分を含む部位特異的アポリポタンパク質 B (APOB) 遮断剤。

【請求項 2】

前記部位特異的 APOB 標的化成分が、ポリマー分子を含む、請求項 1 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 3】

前記ポリマー分子が、ポリアミドを含む、請求項 2 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

10

【請求項 4】

前記ポリマー分子が、ポリヌクレオチドを含む、請求項 2 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 5】

前記発現制御領域が、APOB 関連アンカー配列を含む、請求項 1 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 6】

前記 APOB 関連アンカー配列が、CCCTC 結合性因子 (CTCF) 結合性モチーフを含む、請求項 5 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 7】

前記 APOB 関連 CTCF 結合性モチーフが、APOB CTCF 部位 3 のヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

20

【請求項 8】

前記発現制御領域が、APOB 関連アンカー配列媒介性接続を含む、請求項 5 から 7 までのいずれか一項に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 9】

前記 APOB 関連アンカー配列媒介性接続が、1 つまたは複数の転写制御エレメントを前記接続の内側に含む、請求項 8 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 10】

前記 APOB 関連アンカー配列媒介性接続が、1 つまたは複数の転写制御エレメントを前記接続の外側に含む、請求項 8 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

30

【請求項 11】

前記 APOB 関連アンカー配列が、前記転写制御エレメントに対して約 300 kb 以内に位置する、請求項 8 から 10 までのいずれか一項に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 12】

前記アンカー配列が、前記転写制御エレメントに対して 10 kb 以内に位置する、請求項 11 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 13】

前記発現制御領域が、APOB 特異的転写制御エレメントを含む、請求項 1 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

40

【請求項 14】

前記転写制御エレメントが、APOB プロモーターを含む、請求項 13 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 15】

前記転写制御エレメントが、転写エンハンサーを含む、請求項 13 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 16】

前記転写制御エレメントが、転写リプレッサーを含む、請求項 13 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 17】

50

表 2 のヌクレオチド配列のいずれかのヌクレオチド配列全体に対して少なくとも 85 % のヌクレオチド同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 16 までのいずれか一項に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 18】

前記 APOB 発現制御領域に特異的に結合するジンクフィンガーポリペプチド (ZNF) または転写活性化因子様エフェクター (TALE) ポリペプチドの DNA 結合ドメインまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 19】

ヌクレオチド修飾を含む、請求項 1 から 18 までのいずれか一項に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 20】

ポリマー分子が、ペプチド核酸 (PNA) を含む、請求項 1 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 21】

請求項 1 から 19 までのいずれか一項に記載の部位特異的 APOB 遮断剤を含むベクター。

【請求項 22】

ウイルス発現ベクターである、請求項 21 に記載のベクター。

【請求項 23】

請求項 1 から 20 までのいずれか一項に記載の部位特異的 APOB 遮断剤または請求項 21 または 22 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 24】

組成物中に存在する、請求項 1 から 20 までのいずれか一項に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 25】

前記組成物が、医薬組成物を含む、請求項 24 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 26】

前記医薬組成物が、脂質製剤を含む、請求項 25 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 27】

前記脂質製剤が、1 つまたは複数のカチオン性脂質、1 つまたは複数の非カチオン性脂質、1 つまたは複数のコレステロールに基づく脂質、または 1 つまたは複数の PEG 修飾された脂質、または前記のいずれかの組合せを含む、請求項 26 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 28】

前記医薬組成物が、脂質ナノ粒子を含む、請求項 26 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 29】

APOB 発現制御領域を標的とする部位特異的 APOB 標的化成分とエフェクター分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸分子を含む部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 30】

前記部位特異的 APOB 標的化成分が、前記 APOB 発現制御領域に特異的に結合するジンクフィンガーポリペプチド (ZNF) または転写活性化因子様エフェクター (TALE) ポリペプチドの DNA 結合ドメインまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 29 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 31】

前記エフェクター分子が、ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 29 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 32】

前記融合タンパク質が、ペプチド核酸融合物を含む、請求項 29 に記載の部位特異的 A

10

20

30

40

50

P O B 遮断剤。

【請求項 3 3】

前記エフェクターが、ヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、およびエピジェネティック C p G 修飾因子、および前記のいずれかの組合せからなる群から選択される、請求項 2 9 から 3 2 までのいずれか一項に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

【請求項 3 4】

前記エフェクターが、C R I S P R 関連タンパク質 (C a s) ポリペプチドまたは前記 C a s ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 3 0 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

10

【請求項 3 5】

前記 C a s ポリペプチドが、酵素的に不活性な C a s ポリペプチドである、請求項 3 1 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

【請求項 3 6】

ヒトエキソヌクレアーゼ 1 (h E X O 1) の触媒として活性なドメインをさらに含む、請求項 3 1 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

【請求項 3 7】

前記エピジェネティック動員因子が、転写エンハンサーまたは転写リプレッサーを含む、請求項 3 3 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

【請求項 3 8】

前記エピジェネティック C p G 修飾因子が、D N A メチラーゼ、D N A デメチラーゼ、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素を含む、請求項 3 3 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

20

【請求項 3 9】

前記エフェクター分子が、ジンクフィンガーポリペプチドを含む、請求項 2 9 から 3 3 までのいずれか一項に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

【請求項 4 0】

前記エフェクター分子が、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) ポリペプチドを含む、請求項 2 9 から 3 3 までのいずれか一項に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

30

【請求項 4 1】

請求項 2 9 から 4 0 までのいずれか一項に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤をコードする核酸分子を含むベクター。

【請求項 4 2】

ウイルス発現ベクターである、請求項 4 1 に記載のベクター。

【請求項 4 3】

請求項 2 9 から 4 0 までのいずれか一項に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤または請求項 4 1 または 4 2 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 4 4】

組成物中に存在する、請求項 2 9 から 4 0 までのいずれか一項に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

40

【請求項 4 5】

前記組成物が、医薬組成物を含む、請求項 4 4 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

【請求項 4 6】

前記医薬組成物が、脂質製剤を含む、請求項 4 5 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

【請求項 4 7】

前記脂質製剤が、1 つまたは複数のカチオン性脂質、1 つまたは複数の非カチオン性脂質、1 つまたは複数のコレステロールに基づく脂質、または 1 つまたは複数の P E G 修飾された脂質、または前記のいずれかの組合せを含む、請求項 4 6 に記載の部位特異的 A P O B 遮断剤。

50

【請求項 48】

前記医薬組成物が、脂質ナノ粒子を含む、請求項 46 に記載の部位特異的 APOB 遮断剤。

【請求項 49】

細胞におけるアポリポタンパク質 B (APOB) の発現をモジュレートする方法であって、前記細胞を、APOB 発現制御領域を標的とする部位特異的 APOB 標的化成分およびエフェクター分子を含む部位特異的 APOB 遮断剤と接触させるステップを含み、それにより、前記細胞における APOB の発現をモジュレートする、方法。

【請求項 50】

前記発現のモジュレーションが、前記細胞における APOB の発現の増強である、請求項 49 に記載の方法。

10

【請求項 51】

前記発現のモジュレーションが、前記細胞における APOB の発現の低減である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

前記部位特異的 APOB 標的化成分が、ポリマー分子を含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 53】

前記ポリマー分子が、ポリアミドを含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記ポリマー分子が、ポリヌクレオチドを含む、請求項 52 に記載の方法。

20

【請求項 55】

前記発現制御領域が、APOB 関連アンカー配列を含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 56】

前記 APOB 関連アンカー配列が、CCTC 結合性因子 (CTCF) 結合性モチーフを含む、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記 APOB 関連 CTCF 結合性モチーフが、APOB CTCF 部位 3 のヌクレオチド配列を含む、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記発現制御領域が、APOB 関連アンカー配列媒介性接続を含む、請求項 55 から 57 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 59】

前記 APOB 関連アンカー配列媒介性接続が、1 つまたは複数の転写制御エレメントを前記接続の内側に含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記 APOB 関連アンカー配列媒介性接続が、1 つまたは複数の転写制御エレメントを前記接続の外側に含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

前記アンカー配列が、前記転写制御エレメントに対して約 300 kb 以内に位置する、請求項 54 から 60 までのいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 62】

前記アンカー配列が、前記転写制御エレメントに対して 10 kb 以内に位置する、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 63】

前記発現制御領域が、APOB 特異的転写エレメントを含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 64】

前記転写エレメントが、APOB プロモーターを含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

50

前記転写制御エレメントが、転写エンハンサーを含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記転写制御エレメントが、転写リプレッサーを含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記部位特異的 A P O B 遮断剤が、表 2 のヌクレオチド配列のいずれかのヌクレオチド配列全体に対して少なくとも 8 5 % のヌクレオチド同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 4 9 から 6 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記部位特異的 A P O B 遮断剤が、前記 A P O B 発現制御領域に特異的に結合するジンクフィンガーポリペプチド (Z N F) または転写活性化因子様エフェクター (T A L E) ポリペプチドの D N A 結合ドメインまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

10

【請求項 6 9】

前記部位特異的 A P O B 遮断剤が、ヌクレオチド修飾を含む、請求項 4 9 から 6 8 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記ポリマー分子が、ペプチド核酸 (P N A) を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記エフェクター分子が、ポリペプチドを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記ポリペプチドが、A P O B 発現調節領域を標的とする前記部位特異的 A P O B 標的化成分と前記エフェクター分子とを含む融合タンパク質を含む、請求項 7 1 に記載の方法。

20

【請求項 7 3】

前記融合タンパク質が、ペプチド核酸融合分子を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記エフェクターが、ヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、およびエピジェネティック C p G 修飾因子、および前記のいずれかの組合せからなる群から選択される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 7 5】

30

前記エフェクターが、C R I S P R 関連タンパク質 (C a s) ポリペプチドまたは前記 C a s ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記 C a s ポリペプチドが、酵素的に不活性な C a s ポリペプチドである、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

ヒトエキソヌクレアーゼ 1 (h E X O 1) の触媒として活性なドメインをさらに含む、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記エピジェネティック動員因子が、転写エンハンサーまたは転写リプレッサーを含む、請求項 7 4 に記載の方法。

40

【請求項 7 9】

前記エピジェネティック C p G 修飾因子が、D N A メチラーゼ、D N A デメチラーゼ、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素を含む、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記エフェクター分子が、ジンクフィンガーポリペプチドを含む、請求項 7 1 から 7 4 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記エフェクター分子が、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) ポリペプチドを含む、請求項 7 1 から 7 4 までのいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 8 2】

前記融合タンパク質が、酵素的に不活性な C a s ポリペプチドおよびエピジェネティック動員因子ポリペプチドを含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記融合タンパク質が、酵素的に C a s ポリペプチドおよびエピジェネティック C p G 修飾因子ポリペプチドを含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記部位特異的遮断剤、前記エフェクター、または前記部位特異的遮断剤と前記エフェクターの両方が、ベクター内に存在する、請求項 4 9 から 8 3 までのいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8 5】

前記部位特異的遮断剤と前記エフェクターが、同じベクター内に存在する、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記部位特異的遮断剤と前記エフェクターが、異なるベクター内に存在する、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記ベクターが、ウイルス発現ベクターである、請求項 8 4 から 8 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記部位特異的遮断剤、前記エフェクター、または前記部位特異的遮断剤と前記エフェクターの両方が、組成物中に存在する、請求項 4 9 から 8 3 までのいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8 9】

前記部位特異的遮断剤と前記エフェクターが、同じ組成物中に存在する、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記部位特異的遮断剤と前記エフェクターが、異なる組成物中に存在する、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記組成物が、医薬組成物を含む、請求項 8 8 から 9 0 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9 2】

前記医薬組成物が、脂質製剤を含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記脂質製剤が、1 つまたは複数のカチオン性脂質、1 つまたは複数の非カチオン性脂質、1 つまたは複数のコレステロールに基づく脂質、または 1 つまたは複数の P E G 修飾された脂質、または前記のいずれかの組合せを含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記医薬組成物が、脂質ナノ粒子を含む、請求項 9 2 に記載の方法。

40

【請求項 9 5】

前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記哺乳動物細胞が、体細胞である、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記哺乳動物細胞が、初代細胞である、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記接触させるステップが、i n v i t r o で実施される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記接触させるステップが、i n v i v o で実施される、請求項 4 9 に記載の方法。

50

【請求項 100】

前記接触させるステップが、*ex vivo*で実施される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 101】

前記細胞を対象に投与するステップをさらに含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記細胞が、対象内に存在する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 103】

前記対象が、APOB 関連疾患を有する、請求項 101 または 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記 APOB 関連疾患が、高脂血症、高コレステロール血症、高 LDL コレステロール血症、低 HDL コレステロール、高トリグリセリド血症、食後高トリグリセリド血症、インスリンに対する免疫応答に関連しないインスリン抵抗性、2 型糖尿病、高血圧症、内皮細胞機能障害、心疾患、およびアテローム性動脈硬化症からなる群から選択される、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

APOB 関連疾患を有する対象を処置するための方法であって、前記対象に、APOB 発現制御領域を標的とする部位特異的 APOB 標的化成分およびエフェクター分子を含む部位特異的 APOB 遮断剤を治療有効量で投与するステップを含み、それにより、前記対象を処置する、方法。

【請求項 106】

前記 APOB 関連疾患が、高コレステロール血症であり、前記部位特異的 APOB 遮断剤が、前記対象における APOB の発現を低減するものである、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】

前記部位特異的 APOB 遮断剤および前記エフェクター分子が、前記対象に併せて投与される、請求項 105 または 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記部位特異的 APOB 遮断剤および前記エフェクター分子が、前記対象に逐次的に投与される、請求項 105 または 106 に記載の方法。

【請求項 109】

前記エフェクター分子が、前記対象に、前記部位特異的 APOB 遮断剤の投与の前に投与される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記部位特異的 APOB 遮断剤が、前記対象に、前記エフェクター分子の投与の前に投与される、請求項 108 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる 2019 年 9 月 23 日出願の米国仮出願第 62 / 904, 325 号に対する優先権の利益を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

高脂血症は、血液中の任意のまたは全ての脂質またはリポタンパク質のレベルの異常な上昇である。高脂血症の 1 つである高コレステロール血症は高コレステロールとも称され、血液中に高レベルのコレステロールが存在していることである。高コレステロール血症などの高脂血症は、食事、肥満、遺伝性（遺伝子）疾患（例えば、家族性高コレステロール血症における LDL 受容体の変異など）、または 2 型糖尿病および甲状腺機能低下症などの他の疾患の存在の結果であり得る。

【0003】

アポリポタンパク質B (ApoB) は、カイロミクロン、VLDL、IDL、およびLDL粒子の主要なアポリポタンパク質であり、コレステロールを含む脂質を、脂質粒子内で体内を全ての組織内の全ての細胞に輸送することを担う。ApoBは前記粒子の主要な組織化タンパク質構成成分であり、これらの粒子の形成に重要である。特に、LDL粒子のApoBは、全身の種々の細胞におけるLDL受容体のリガンドとして作用する。ApoBの過剰発現試験により、ApoBのレベルの上昇により、低βリポ蛋白血症、正常トリグリセリド性低βリポ蛋白血症 (normotriglyceridemic hypobetalipoproteinemia)、および高コレステロール血症、血漿コレステロールに影響を及ぼす疾患が引き起こされる可能性があることが示唆される。

10

【0004】

高コレステロール血症自体は無症候性であるが、長期にわたる血清コレステロールの上昇はアテローム性動脈硬化症に至る恐れがあり、これは、そのうちに進行性狭窄症またはさらには関与する動脈の完全閉塞に至る恐れがある。さらに、より小さなプラークが破裂し、血餅の形成が引き起こされ、血流が妨害され、その結果、例えば、心筋梗塞および／または脳卒中が生じる恐れがある。

【0005】

成人における総血中コレステロールおよびLDLを低下させるための推奨される食事上の措置は、トランス脂肪を回避し、飽和脂肪を多価不飽和脂肪で置き換えることである。しかし、コレステロールが非常に多い (例えば、高コレステロール血症) 対象では、食事の改変では所望のLDLの低下には実現に十分でないことも多く、脂質を減少させる薬物適用が通常必要とされる。しかし、多くの対象は脂質を減少させる薬物適用に対する有害反応を有する。

20

【0006】

したがって、高コレステロール血症などのApoB関連疾患を処置する組成物および方法が当技術分野において必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本発明は、アポリポタンパク質B (APOB) 遺伝子の発現を、APOB発現制御領域を標的とすることによってモジュレートする (例えば、発現を増強するまたは低減させる) ための作用剤および組成物を提供する。APOB遺伝子は、細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば哺乳動物体細胞、例えばマウスまたはヒト体細胞などに存在するものであり得る。本発明は、APOB遺伝子の発現をモジュレートするため、またはAPOB遺伝子の発現をモジュレートすることが有益であろう対象、例えば、APOB関連疾患に罹患しているもしくは罹患しやすい対象を処置するために、本発明の作用剤および組成物を使用する方法も提供する。

30

【0008】

したがって、一態様では、本発明は、部位特異的アポリポタンパク質B (apolipoprotein B) (APOB) 遮断剤を提供する。遮断剤は、APOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分 (targeting moiety) を含む。一実施形態では、部位特異的APOB標的化成分はポリマー分子を含む。別の実施形態では、ポリマー分子はポリアミドを含む。さらに別の実施形態では、ポリマー分子はポリヌクレオチドを含む。

40

【0009】

一実施形態では、発現制御領域はAPOB関連アンカー配列を含む。別の実施形態では、APOB関連アンカー配列はCCCTC結合性因子 (CTCF) 結合性モチーフを含む。さらに別の実施形態では、APOB関連CTCF結合性モチーフはAPOB CTCF部位3のヌクレオチド配列を含む。

50

【0010】

別の実施形態では、発現制御領域はAPOB関連アンカー配列媒介性接続を含む。別の実施形態では、APOB関連アンカー配列媒介性接続は1つまたは複数の転写制御エレメントを接続の内側に含む。さらに別の実施形態では、APOB関連アンカー配列媒介性接続は1つまたは複数の転写制御エレメントを接続の外側に含む。

【0011】

さらに別の実施形態では、APOB関連アンカー配列は転写制御エレメントに対して約300kb以内に位置する。別の実施形態では、アンカー配列は転写制御エレメントに対して10kb以内に位置する。

【0012】

さらに別の実施形態では、発現制御領域はAPOB特異的転写制御エレメントを含む。別の実施形態では、転写制御エレメントはAPOBプロモーターを含む。さらに別の実施形態では、転写制御エレメントは転写エンハンサーを含む。さらに別の実施形態では、転写制御エレメントは転写リプレッサーを含む。

【0013】

一実施形態では、部位特異的APOB遮断剤は表2のヌクレオチド配列のいずれかのヌクレオチド配列全体に対して少なくとも85%のヌクレオチド同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0014】

別の実施形態では、部位特異的APOB遮断剤はAPOB発現制御領域に特異的に結合するジンクフィンガーポリペプチド(ZNF)または転写活性化因子様エフェクター(TALE)ポリペプチドのDNA結合ドメインまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0015】

さらに別の実施形態では、部位特異的APOB遮断剤はヌクレオチド修飾を含む。

【0016】

さらに別の実施形態では、部位特異的APOB遮断剤はペプチド核酸(PNA)を含む。

【0017】

一態様では、本発明は、任意の態様および種々の実施形態の部位特異的APOB遮断剤を含むベクターを提供する。一実施形態では、ベクターはウイルス発現ベクターである。

【0018】

別の態様では、本発明は、任意の態様および種々の実施形態の部位特異的APOB遮断剤またはベクター(vactor)を含む細胞を提供する。

【0019】

一実施形態では、部位特異的APOB遮断剤は組成物中に存在する。別の実施形態では、組成物は医薬組成物を含む。さらに別の実施形態では、医薬組成物は脂質製剤を含む。さらに別の実施形態では、脂質製剤は1つまたは複数のカチオン性脂質、1つまたは複数の非カチオン性脂質、1つまたは複数のコレステロールに基づく脂質、または1つまたは複数のPEG修飾された脂質、または前記のいずれかの組合せを含む。一実施形態では、医薬組成物は脂質ナノ粒子を含む。

【0020】

一態様では、本発明は、部位特異的APOB遮断剤を提供する。遮断剤はAPOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分とエフェクター分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。一実施形態では、部位特異的APOB標的化成分はAPOB発現制御領域に特異的に結合するジンクフィンガーポリペプチド(ZNF)または転写活性化因子様エフェクター(TALE)ポリペプチドのDNA結合ドメインまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む。別の実施形態では、エフェクター分子はポリペプチドをコードする核酸分子を含む。さらに別の実施形態では、融合タンパク質はペプチド核酸融合物を含む。

10

20

30

40

50

【0021】

一実施形態では、エフェクターはヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、およびエピジェネティックCpG修飾因子、および前記のいずれかの組合せからなる群から選択される。別の実施形態では、エフェクターはCRISPR関連タンパク質(Cas)ポリペプチドまたはCasポリペプチドをコードする核酸分子を含む。さらに別の実施形態では、Casポリペプチドは酵素的に不活性なCasポリペプチドである。さらに別の実施形態では、部位特異的APOB遮断剤はヒトエキソヌクレアーゼ1(hEXO1)の触媒として活性なドメインをさらに含む。一実施形態では、エピジェネティック動員因子は転写エンハンサーまたは転写リプレッサーを含む。別の実施形態では、エピジェネティックCpG修飾因子はDNAメチラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素を含む。

10

【0022】

一実施形態では、エフェクター分子はジンクフィンガーポリペプチドを含む。別の実施形態では、エフェクター分子は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)ポリペプチドを含む。

【0023】

一態様では、本発明は、ベクターを提供する。ベクターは本発明の態様および種々の実施形態のいずれかの部位特異的APOB遮断剤をコードする核酸分子を含む。一実施形態では、ベクターはウイルス発現ベクターである。

【0024】

別の態様では、本発明は、本発明の任意の態様および種々の実施形態の部位特異的APOB遮断剤またはベクターを含む細胞を提供する。

20

【0025】

一実施形態では、部位特異的APOB遮断剤は組成物中に存在する。別の実施形態では、組成物は医薬組成物を含む。さらに別の実施形態では、医薬組成物は脂質製剤を含む。さらに別の実施形態では、脂質製剤は1つまたは複数のカチオン性脂質、1つまたは複数の非カチオン性脂質、1つまたは複数のコレステロールに基づく脂質、または1つまたは複数のPEG修飾された脂質、または前記のいずれかの組合せを含む。一実施形態では、医薬組成物は脂質ナノ粒子を含む。

【0026】

一態様では、本発明は、細胞におけるアポリポタンパク質B(APOB)の発現をモジュレートする方法を提供する。当該方法は、細胞を、APOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分およびエフェクター分子を含む部位特異的APOB遮断剤と接触させるステップを含み、それにより、細胞におけるAPOBの発現をモジュレートする。一実施形態では、発現のモジュレーションは細胞におけるAPOBの発現の増強である。別の実施形態では、発現のモジュレーションは細胞におけるAPOBの発現の低減である。さらに別の実施形態では、部位特異的APOB標的化成分はポリマー分子を含む。さらに別の実施形態では、ポリマー分子はポリアミドを含む。一実施形態では、ポリマー分子はポリヌクレオチドを含む。

30

【0027】

一実施形態では、発現制御領域はAPOB関連アンカー配列を含む。別の実施形態では、APOB関連アンカー配列はCCCTC結合性因子(CTCF)結合性モチーフを含む。なお別の実施形態では、APOB関連CTCF結合性モチーフはAPOBCTCF部位3のヌクレオチド配列を含む。

40

【0028】

一実施形態では、発現制御領域はAPOB関連アンカー配列媒介性接続を含む。別の実施形態では、APOB関連アンカー配列媒介性接続は1つまたは複数の転写制御エレメントを接続の内側に含む。さらに別の実施形態では、APOB関連アンカー配列媒介性接続は1つまたは複数の転写制御エレメントを接続の外側に含む。

【0029】

50

一実施形態では、アンカー配列は転写制御エレメントに対して約 300 kb 以内に位置する。別の実施形態では、アンカー配列は転写制御エレメントに対して 10 kb 以内に位置する。

【0030】

別の実施形態では、発現制御領域は APOB 特異的転写エレメントを含む。一実施形態では、転写エレメントは APOB プロモーターを含む。別の実施形態では、転写制御エレメントは転写エンハンサーを含む。さらに別の実施形態では、転写制御エレメントは転写リプレッサーを含む。

【0031】

さらに別の実施形態では、部位特異的 APOB 遮断剤は表 2 のヌクレオチド配列のいずれかのヌクレオチド配列全体に対して少なくとも 85 % のヌクレオチド同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0032】

さらに別の実施形態では、部位特異的 APOB 遮断剤は APOB 発現制御領域に特異的に結合するジンクフィンガーポリペプチド (ZNF) または転写活性化因子様エフェクター (TALE) ポリペプチドの DNA 結合ドメインまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0033】

一実施形態では、部位特異的 APOB 遮断剤はヌクレオチド修飾を含む。

【0034】

別の実施形態では、ポリマー分子はペプチド核酸 (PNA) を含む。

【0035】

さらに別の実施形態では、エフェクター分子はポリペプチドを含む。一実施形態では、ポリペプチドは、APOB 発現調節領域を標的とする部位特異的 APOB 標的化成分とエフェクター分子とを含む融合タンパク質を含む。別の実施形態では、融合タンパク質はペプチド核酸融合分子を含む。

【0036】

さらに別の実施形態では、エフェクターはヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、およびエピジェネティック CpG 修飾因子、および前記のいずれかの組合せからなる群から選択される。一実施形態では、エフェクターは CRISPR 関連タンパク質 (Cas) ポリペプチドまたは Cas ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。別の実施形態では、Cas ポリペプチドは酵素的に不活性な Cas ポリペプチドである。さらに別の実施形態では、エフェクター分子はヒトエキソヌクレアーゼ 1 (hEXO1) の触媒として活性なドメインをさらに含む。さらに別の実施形態では、エピジェネティック動員因子は転写エンハンサーまたは転写リプレッサーを含む。一実施形態では、エピジェネティック CpG 修飾因子は DNA メチラーゼ、DNA デメチラーゼ、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素を含む。

【0037】

一実施形態では、エフェクター分子はジンクフィンガーポリペプチドを含む。別の実施形態では、エフェクター分子は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) ポリペプチドを含む。

【0038】

別の実施形態では、融合タンパク質は酵素的に不活性な Cas ポリペプチドおよびエピジェネティック動員因子ポリペプチドを含む。一実施形態では、融合タンパク質は酵素的に不活性な Cas ポリペプチドおよびエピジェネティック CpG 修飾因子ポリペプチドを含む。

【0039】

一実施形態では、部位特異的遮断剤、エフェクター、または部位特異的遮断剤とエフェクターの両方がベクター内に存在する。別の実施形態では、部位特異的遮断剤とエフェクターは同じベクター内に存在する。さらに別の実施形態では、部位特異的遮断剤とエフェ

10

20

30

40

50

クターは異なるベクター内に存在する。さらに別の実施形態では、ベクターはウイルス発現ベクターである。

【0040】

別の実施形態では、部位特異的遮断剤、エフェクター、または部位特異的遮断剤とエフェクターの両方が組成物中に存在する。一実施形態では、部位特異的遮断剤とエフェクターは同じ組成物中に存在する。別の実施形態では、部位特異的遮断剤とエフェクターは異なる組成物中に存在する。さらに別の実施形態では、組成物は医薬組成物を含む。さらに別の実施形態では、医薬組成物は脂質製剤を含む。一実施形態では、脂質製剤は1つまたは複数のカチオン性脂質、1つまたは複数の非カチオン性脂質、1つまたは複数のコレステロールに基づく脂質、または1つまたは複数のPEG修飾された脂質、または前記のい

10

【0041】

一態様では、細胞は哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は体細胞である。別の実施形態では、哺乳動物細胞は初代細胞である。

【0042】

一実施形態では、接触させるステップは、*in vitro*で実施される。別の実施形態では、接触させるステップは、*in vivo*で実施される。さらに別の実施形態では、接触させるステップは、*ex vivo*で実施される。さらに別の実施形態では、方法は、細胞を対象に投与するステップをさらに含む。一実施形態では、細胞は対象内に存在する。別の実施形態では、対象は、APOB関連疾患を有する。さらに別の実施形態では、APOB関連疾患は、高脂血症、高コレステロール血症、高LDLコレステロール、低HDLコレステロール、高トリグリセリド血症、食後高トリグリセリド血症、インスリンに対する免疫応答に関連しないインスリン抵抗性、2型糖尿病、高血圧症、内皮細胞機能障害、心疾患、およびアテローム性動脈硬化症からなる群から選択される。

20

【0043】

一態様では、本発明は、APOB関連疾患を有する対象を処置するための方法であって、対象に、APOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分およびエフェクター分子を含む部位特異的APOB遮断剤を治療有効量で投与するステップを含み、それにより、対象を処置する、方法を提供する。一実施形態では、APOB関連疾患は高コレステロール血症であり、部位特異的APOB遮断剤は対象におけるAPOBの発現を低減するものである。別の実施形態では、部位特異的APOB遮断剤およびエフェクター分子は、対象に併せて投与される。さらに別の実施形態では、部位特異的APOB遮断剤およびエフェクター分子は、対象に逐次的に投与される。さらに別の実施形態では、エフェクター分子は、対象に、部位特異的APOB遮断剤の投与の前に投与される。一実施形態では、部位特異的APOB遮断剤は、対象に、エフェクター分子の投与の前に投与される。

30

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1は、APOB遺伝子上流領域およびコード領域の一部ならびにAPOB遺伝子の種々の調節エレメントの位置、例えばCTCF部位3を示すAPOBゲノム近傍を示す。

40

【0045】

【図2】図2は、APOB遺伝子のCTCF部位3の場所および本明細書に記載のガイドRNAの相対的な位置を概略的に示す。

【0046】

【図3-1】図3Aは、T7E1アッセイによって測定した、PMH細胞における、示されている部位特異的標的化成分およびCas9を含むエフェクター分子を含むAPOB遮断剤を示されている濃度で細胞と接触させた72時間後の編集のパーセンテージを示すグラフである。

【0047】

50

【図 3-2】図 3 B は、図 3 A に記載されている T 7 E 1 アッセイの結果を示す電気泳動ゲルの画像である。陰性結果、すなわち、ゲル上に DNA バンドが存在しないことにより、対応する細胞のゲノム DNA が Cas 9 によって破壊されたことが示される。

【0048】

【図 3-3】図 3 C は、PMH 細胞における、示されている部位特異的標的化成分（すなわち、sgRNA）および Cas 9 を含むエフェクター分子を含む APOB 遮断剤を示されている濃度で細胞と接触させた 72 時間後の生産的編集のパーセンテージを示すグラフである。「生産的編集」は、ApoB 発現制御領域の機能的変化、例えば、CTCF 3 部位の DNA トポロジカル立体配置、例えばループを形成する能力の喪失をもたらす Cas 9 誘導ゲノム編集を指す。

10

【0049】

【図 3-4】図 3 D は、PMH 細胞における、示されている部位特異的標的化成分および Cas 9 を含むエフェクター分子を含む APOB 遮断剤を示されている濃度で細胞と接触させた 72 時間後の生産的編集の比を示すグラフである。

【0050】

【図 4-1】図 4 A ~ 4 D は、部位特異的 APOB 標的化成分（すなわち、sgRNA）と Cas 9 をコードする mRNA の組合せにより、APOB mRNA レベルが低下したことを実証するグラフである。2 種の sgRNA、GD-26911 および GD-26912 では、5 μ g/ml の濃度の sgRNA と Cas 9 をコードする mRNA の組合せで ApoB 発現が 50 % よりも大きく低減した。グラフは、示されている sgRNA および Cas 9 を含むエフェクターを細胞と接触させた 72 時間後の APOB mRNA レベルを示す。結果は 3 連の実験からのものである。APOB 遺伝子を標的とする siRNA (siApoB) のレベルは NTX 対照に対するものである。sgRNA 処理群における ApoB mRNA レベルを非標的化ガイド RNA 製剤 (GD-23150 群) (非標的対照) に対してグラフ化する。NTX CTL は無処理群を示し、NTX CTL における ApoB レベルはベースライン PMH を示す。GD-23150 群は、非標的化 sgRNA を含有する LNP で処理した PMH を示す。siRNA 群は、ApoB siRNA を含有する LNP で処理した群を示す。相対的な ApoB レベルを LNP 処理における全 RNA 濃度（すなわち、sgRNA と Cas 9 をコードする mRNA の組合せ）に対してグラフ化した。NTX CTL：無処理対照；NTC：非標的対照。図 4 A および 4 B は、NTC と比較した相対的な APOB mRNA レベルを示す。図 4 A は、ウェル内の結果を示すグラフである。試料のそれぞれのウェル内でのアクチンに対する個々の APOB の結果を使用してデルタサイクル閾値 (dCT 値) を算出した。図 4 B は、プレート間にわたる結果を示すグラフである。各希釈点での全ての試料におけるアクチンの平均に対する個々の APOB の結果を使用して dCT 値を算出した。図 4 C および 4 D は、正規化された mRNA インプットを用いた NTC と比較した相対的な APOB mRNA レベルを示す。PMH 試料からの群にわたって同量の全 RNA を qPCR 解析に使用した。図 4 C は、ウェル内の結果を示すグラフである。試料のそれぞれのウェル内でのアクチンに対する個々の APOB の結果を使用して dCT 値を算出した。図 4 D は、プレート間にわたる結果を示すグラフである。全ての試料におけるアクチンの平均に対する個々の APOB の結果を使用して dCT 値を算出した。

20

30

40

【0051】

【図 4-2】同上。

【0052】

【図 4-3】同上。

【図 4-4】同上。

【0053】

【図 4-5】図 4 E および 4 F は、示されている sgRNA と Cas 9 をコードする mRNA の組合せをトランスフェクトした細胞における APOB mRNA レベルを示す。図 4 E および 4 F では、5 μ g/ml の全 RNA、すなわち、sgRNA と Cas 9 をコー

50

ドする mRNA の組合せを細胞にトランスフェクトした。さらに、APOB 遺伝子のエクソンを標的とする sgRNA、GD-27723 を陽性対照として使用し、一方、無関係の遺伝子を標的とする sgRNA、GD-23149 を陰性対照として使用した。

【0054】

【図5】図5Aおよび5Bは、ApoBタンパク質の発現レベルを示すグラフである。図5Aは、示されている sgRNA と Cas9 をコードする mRNA の組合せをトランスフェクトした培養細胞の上清中の ApoB のタンパク質濃度を示す。図5Bは、示されている sgRNA と Cas9 をコードする mRNA の組合せによって誘導されたタンパク質レベルの低下のパーセンテージを示す。

【発明を実施するための形態】

【0055】

発明の詳細な説明

本発明は、アポリポタンパク質 B (APOB) 遺伝子の発現を、APOB 発現制御領域を標的とすることによってモジュレートする（例えば、発現を増強するまたは低減させる）ための作用剤および組成物を提供する。APOB 遺伝子は、細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば哺乳動物体細胞、例えばマウスまたはヒト体細胞などに存在するものであり得る。本発明は、APOB 遺伝子の発現をモジュレートするため、または APOB 遺伝子の発現をモジュレートすることが有益であろう対象、例えば、APOB 関連疾患に罹患しているまたは罹患しやすい対象を処置するために、本発明の作用剤および組成物を使用する方法も提供する。

【0056】

本発明の作用剤は、本明細書では、部位特異的 APOB 遮断剤と称され、下の第 I I 節に記載されている。

【0057】

I. 定義

本発明をより容易に理解することができるように、最初に特定の用語を定義する。さらに、パラメータの値または値の範囲が記載されている場合は常に、値および記載されている値の中間の範囲も本発明の一部であることが意図されていることに留意するべきである。

【0058】

「1つの (a)」および「1つの (an)」という冠詞は、本明細書では、1つ、または1つよりも多く（すなわち、少なくとも1つ）のその冠詞の文法上の目的語を指すように使用される。例として、「1つの (an) エlement」は、1つのElementまたは1つよりも多くのElement、例えば複数のElementを意味する。

【0059】

「を含む (including)」という用語は、本明細書では、「を含むがこれだけに限定されない (including but not limited to)」という句を意味するように使用され、それと互換的に使用される。「または (or)」という用語は、本明細書では、文脈によりそうでないことが明らかでない限り、「および／または」という用語を意味するように使用され、それと互換的に使用される。

【0060】

「約」という用語は、本明細書では、当技術分野における典型的な許容範囲内に入ることの意味するように使用される。例えば、「約」は、平均から約2標準偏差と理解することができる。ある特定の実施形態では、約は±10%を意味する。ある特定の実施形態では、約は±5%を意味する。約が数の一続きまたは範囲の前にある場合、「約」はその一続きまたは範囲内の数のそれぞれを変更し得る (can modify) ことが理解される。

【0061】

数または数の一続きの前の「少なくとも」という用語は、「少なくとも」という用語の隣の数、および、文脈から明らかになる通り論理的に含まれ得るその後の数または整数の

10

20

30

40

50

全てを包含するものと理解される。例えば、核酸分子内のヌクレオチドの数は整数でなければならない。例えば、「21ヌクレオチドの核酸分子の少なくとも18ヌクレオチド」は、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、または21ヌクレオチドが示されている特性を有することを意味する。少なくともが数の一続きまたは範囲の前にある場合、「少なくとも」はその一続きまたは範囲内の数のそれぞれを変更し得ることが理解される。

【0062】

本明細書で使用される場合、「以下 (no more than)」または「未満 (less than)」は、その句の隣の値、および、文脈から論理的である場合、ゼロまでの論理的なより小さい値または整数と理解される。「以下 (no more than)」が数の一続きまたは範囲の前にある場合、「以下 (no more than)」はその一続きまたは範囲内の数のそれぞれを変更し得ることが理解される。

10

【0063】

本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、目的の特徴または特性の全程度もしくは度合いまたはほぼ全程度もしくは度合いを示す定性的な状態を指す。生物学的現象および化学的現象は、たとえあったとしても、完了することおよび／もしくは完全に進行すること、あるいは絶対的結果を達成するまたは回避することが、めったにないことが当業者には理解されよう。したがって、「実質的に」という用語は、本明細書の一部の実施形態では、多くの生物学的現象および化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如を捕捉するために使用され得る。

20

【0064】

本明細書で使用される場合、「アポリポタンパク質B」または「APOB」という用語は、カイロミクロン、VLDL、IDL、およびLDL粒子の周知のアポリポタンパク質をコードする遺伝子を指す。コードされるタンパク質は前記粒子の主要な組織化タンパク質構成成分であり、これらの粒子の形成のために重要である。LDL粒子のAPOBは全身の種々の細胞におけるLDL受容体のリガンドとしても作用する。高レベルのAPOBは心疾患に関連する。低βリポ蛋白血症は、APOB遺伝子、APOBの変異によって引き起こされ得る遺伝障害である。遺伝子APOB100の変異では代謝障害である高コレステロール血症の遺伝性（常染色体優性）形態である家族性高コレステロール血症も引き起こされ得る。アポリポタンパク質Bの過剰産生の結果、肝臓における脂質誘導性小胞体ストレスおよびインスリン抵抗性が生じ得る。APOBのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は公知であり、例えば、それぞれの全内容が参照により本明細書に組み込まれるGenBank受託番号NM__009693、XM__001000646、XM__001000659、XM__001000667、XM__137955、XM__894981、XM__906759、NP__033823.2、XP__001000646、XP__001000659、XP__001000667、XP__137955、XP__900074、XP__911852、NM__000384.3、NP__000375.3に見いだすことができる。APOBの内因性プロモーターおよびAPOBコード配列を含む、ヒトにおける2番染色体またはマウスにおける12番染色体のゲノム領域のヌクレオチド配列も公知であり、マウス-mm10 genome build: chr12:7968110-8023150、ヒト-hg19 genome build: chr2:21160333-21330910に見いだすことができる。

30

40

【0065】

「部位特異的APOB遮断剤」という用語は、本明細書で使用される場合、標的APOB発現制御領域に特異的に結合し、例えば、APOB遺伝子の発現をモジュレートする任意の作用剤を指す。本発明の部位特異的APOB遮断剤は、「部位特異的APOB標的化成分」を含み得る。

【0066】

本明細書で使用される場合、「部位特異的APOB標的化成分」という用語は、APOB発現制御領域、例えば、APOB遺伝子の転写制御領域、例えば、プロモーター、エン

50

ハンサー、もしくはリプレッサー；またはA P O B 関連アンカー配列、例えば、A P O B 関連アンカー配列媒介性接続内にあるものなどに特異的に結合する成分を指す。例示的な「部位特異的A P O B 標的化成分」としては、これだけに限定されないが、ポリアミド、核酸分子、例えば、R N A、D N A、または修飾されたR N AもしくはD N A、ポリペプチド、タンパク質核酸分子、および融合タンパク質が挙げられる。

【0067】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語は、結合が生じる環境において、可能性のある結合パートナーを識別できることを指す。一部の実施形態では、他の潜在的な遮断剤が存在する場合に1つの特定の標的と相互作用する、例えば優先的に相互作用する遮断剤は、それが相互作用する標的（すなわち、発現制御領域）に「特異的に結合する」といえる。一部の実施形態では、遮断剤とその標的の会合の度合いを検出または決定することによって特異的結合を評価する。一部の実施形態では、遮断剤－標的複合体の解離の度合いを検出または決定することによって特異的結合を評価する。一部の実施形態では、遮断剤の、その標的と別の実体との間の代替的相互作用と競合する能力を検出または決定することによって特異的結合を評価する。一部の実施形態では、そのような検出または決定を様々な濃度にわたって実施することによって特異的結合を評価する。

【0068】

本明細書で使用される場合、「発現制御領域」または「発現制御ドメイン」という用語は、細胞内の標的遺伝子の発現をモジュレートする、ゲノムD N A内に存在する領域またはドメインを指す。発現制御領域に関連する機能性は、例えば、標的遺伝子の発現を刺激する転写因子を動員することまたは動員を遮断することにより、標的遺伝子の発現に直接影響を及ぼし得る。発現制御領域に関連する機能性は、例えば、エピジェネティック修飾を導入することにより、または標的遺伝子の発現をモジュレートする染色体トポロジーの変化を誘導するエピジェネティック修飾を導入する他の因子を動員することにより、標的遺伝子の発現に間接的に影響を及ぼし得る。発現制御領域は、遺伝子のタンパク質コード配列の上流および／または下流であり得、例えば、転写制御エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、またはリプレッサー；ならびにアンカー配列、およびアンカー配列媒介性接続を含む。

【0069】

「転写制御エレメント」という用語は、本明細書で使用される場合、遺伝子の転写を制御する核酸配列を指す。転写制御エレメントとしては、例えば、アンカー配列、アンカー配列媒介性接続、プロモーター、転写エンハンサー、および転写リプレッサーが挙げられる。

【0070】

プロモーターは、特定の遺伝子の転写を開始するためにR N Aポリメラーゼによって認識されるD N Aの領域であり、一般に、遺伝子の転写開始部位の5'末端の上流に位置する。

【0071】

「転写エンハンサー」は遺伝子転写を増加させるものである。「転写サイレンサー」または「転写リプレッサー」は遺伝子転写を低減するものである。強化配列およびサイレンシング配列は、約50～3500塩基対の長さであり得、最大約1メガ塩基離れた遺伝子転写に影響を及ぼし得る。

【0072】

「遺伝子」という用語は、本明細書で使用される場合、機能を有するタンパク質などの分子をコードするヌクレオチドの配列を指す。遺伝子は、転写される配列（例えば、3' U T R）、転写されない配列（例えば、プロモーター）、翻訳される配列（例えば、エクソン）、および翻訳されない配列（例えば、イントロン）を含有する。

【0073】

本明細書で使用される場合、「標的遺伝子」という用語は、発現のモジュレーション、

10

20

30

40

50

例えば、増大または低減の標的とされるAPOB遺伝子を意味する。一部の実施形態では、APOB標的遺伝子は標的とされるゲノム複合体の一部（例えば、そのゲノム配列の少なくとも一部を標的ゲノム複合体の一部として、例えばアンカー配列媒介性接続の内側に有するAPOB遺伝子）であり、ゲノム複合体は本明細書に記載の1つまたは複数の部位特異的遮断剤の標的とされる。一部の実施形態では、モジュレーションは、標的遺伝子の発現の阻害を含む。一部の実施形態では、APOB遺伝子またはAPOB遺伝子に作動可能に連結した転写制御エレメントを本明細書に記載の1つまたは複数の部位特異的遮断剤と接触させることにより、APOB遺伝子をモジュレートする。一部の実施形態では、APOB遺伝子を細胞、例えば、対象（例えば、APOB関連疾患を有する対象）内の細胞において異常に発現（例えば、過剰発現）させる。一部の実施形態では、APOB遺伝子を細胞、例えば、対象（例えば、APOB関連疾患を有する対象）内の細胞において異常に発現（例えば、過少発現）させる。

10

【0074】

「アンカー配列」という用語は、本明細書で使用される場合、アンカー配列媒介性接続、例えば複合体が形成されるように十分に結合する核形成剤（*nucleating agent*）によって認識される核酸配列を指す。一部の実施形態では、アンカー配列は1つまたは複数のCTCF結合性モチーフを含む。一部の実施形態では、アンカー配列は遺伝子コード領域内には位置しない。一部の実施形態では、アンカー配列は遺伝子間領域内に位置する。一部の実施形態では、アンカー配列はエンハンサー内にもプロモーター内にも位置しない。一部の実施形態では、アンカー配列は任意の転写開始部位から少なくとも400bp、少なくとも450bp、少なくとも500bp、少なくとも550bp、少なくとも600bp、少なくとも650bp、少なくとも700bp、少なくとも750bp、少なくとも800bp、少なくとも850bp、少なくとも900bp、少なくとも950bp、または少なくとも1kb離れたところに位置する。一部の実施形態では、アンカー配列はゲノム刷り込み、単一对立遺伝子発現、および／または単一对立遺伝子エピジェネティックマークに関連しない領域内に位置する。一部の実施形態では、アンカー配列は内因性の核形成ポリペプチド（例えば、CTCF）に結合すること、第2のアンカー配列と相互作用してアンカー配列媒介性接続を形成すること、またはアンカー配列媒介性接続の外側にあるエンハンサーに対して遮断することから選択される1つまたは複数の機能を有する。本発明の一部の実施形態では、特定のアンカー配列（1つまたは複数）を特異的に標的とし、他のアンカー配列（例えば、異なる状況にある核形成剤（例えば、CTCF）結合性モチーフを含有し得る配列）は標的としないようにできる技術が提供される；そのような標的とされるアンカー配列は「標的アンカー配列」と称することができる。一部の実施形態では、標的アンカー配列の配列および／または活性をモジュレートし、一方、他の標的とされるアンカー配列と同じ系（例えば、同じ細胞および／または一部の実施形態では、同じ核酸分子、例えば同じ染色体）に存在し得る1つまたは複数の他のアンカー配列の配列および／または活性はモジュレートしない。一部の実施形態では、アンカー配列は核形成ポリペプチド結合性モチーフを含む、または核形成ポリペプチド結合性モチーフである。一部の実施形態では、アンカー配列は核形成ポリペプチド結合性モチーフに隣接している。

20

30

40

【0075】

「アンカー配列媒介性接続」という用語は、本明細書で使用される場合、DNA内の少なくとも2つのアンカー配列と、アンカー配列に結合して、アンカー配列間の空間的近傍および機能的連結を可能にする核形成ポリペプチドなどの1つもしくは複数のポリペプチド、もしくは1つもしくは複数のタンパク質および／または核酸実体（例えばRNAもしくはDNAなど）との物理的な相互作用または結合によって生じ、かつ／または維持されるDNA構造、一部の場合では、複合体を指す。

【0076】

本明細書で使用される場合、「ゲノム複合体」という用語は、1つまたは複数の染色体上の互いから間隔があいている2つのゲノム配列エレメントを、複数のタンパク質および

50

／または他の構成成分（ゲノム配列エレメントを潜在的に含む）の間およびその中での相互作用を介して一緒にする複合体である。一部の実施形態では、ゲノム配列エレメントは、複合体の1つまたは複数のタンパク質構成成分が結合するアンカー配列である。一部の実施形態では、ゲノム複合体は、アンカー配列媒介性接続を含み得る。一部の実施形態では、ゲノム配列エレメントは、CTCF結合性モチーフ、プロモーターおよび／またはエンハンサーであり得る、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、ゲノム配列エレメントは、プロモーターおよび／または調節領域（例えば、エンハンサー）のうちの少なくとも一方または両方を含む。一部の実施形態では、複合体の形成は、ゲノム配列エレメント（複数可）において、および／またはタンパク質構成成分の1つまたは複数のゲノム配列エレメント（複数可）と結合することによってその核が形成される。当業者には理解される通り、一部の実施形態では、複合体の形成を介したゲノム部位の共局在（例えば、接続）により、ゲノム配列エレメント（複数可）またはその付近、一部の実施形態ではそれらの間を含むところでDNAトポロジーが変更される。一部の実施形態では、ゲノム複合体はアンカー配列媒介性接続を含み、アンカー配列媒介性接続は1つまたは複数のループを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム複合体は、例えばCTCFおよび／またはコヒーシンの核形成ポリペプチドによって核が形成される。一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム複合体は、例えば、CTCF、コヒーシン、非コードRNA（例えば、eRNA）、転写機構タンパク質（例えば、RNAポリメラーゼ、1つまたは複数の転写因子、例えば、TFIIA、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIHなどからなる群から選択されるもの）、転写調節因子（例えば、メディエーター、P300、エンハンサー結合性タンパク質、リプレッサー結合性タンパク質、ヒストン修飾因子など）などのうちの1つまたは複数を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム複合体は、1つまたは複数のポリペプチドである構成成分および／または1つまたは複数の核酸である構成成分（例えば、1つまたは複数のRNAである構成成分）を含み、これらは、一部の実施形態では、互いにおよび／または1つもしくは複数のゲノム配列エレメント（例えば、アンカー配列、プロモーター配列、調節配列（例えば、エンハンサー配列））と相互作用して、複合体が形成されない場合にひと続きのゲノムDNAが採用しないトポロジカル立体配置（例えばループ）にひと続きのゲノムDNAを制約し得る。

10

20

30

【0077】

「エフェクター分子」は、本明細書で使用される場合、酵素活性、遺伝子発現、アンカー配列媒介性接続または細胞シグナル伝達などの生物活性を調節することができる分子を指す。例示的なエフェクターは以下の第II節に記載されており、また、一部の実施形態では、それらとして、例えば、ヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、例えば、転写エンハンサーまたは転写リプレッサー、およびエピジェネティックCpG修飾因子、例えば、DNAメチラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素、ならびに前記のいずれかの組合せが挙げられる。

【0078】

II. 本発明の部位特異的APOB遮断剤

本発明は、本発明の一態様ではAPOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分を含む部位特異的APOB遮断剤を提供する。別の態様では、本発明の部位特異的遮断剤は、APOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分およびエフェクター分子を含む。当業者には理解されるように、そのような遮断剤は、部位特異的であり、したがって、例えば細胞内のAPOB発現制御領域（例えば、1つまたは複数の転写制御エレメントおよび／または1つまたは複数の標的アンカー配列）に特異的に結合し、標的とされない発現制御領域（例えば、同じ細胞内の）には結合しない。

40

【0079】

本発明の部位特異的APOB遮断剤は、APOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分を含む。部位特異的標的化成分によって標的とされる発現制御領域は、例えば、転写制御エレメント、またはアンカー媒介性接続内のアンカー配列などのアン

50

カー配列であり得る。

【0080】

したがって、本発明の部位特異的APOB遮断剤により、遺伝子、すなわちAPOBの発現を、例えば、内因性プロモーター、エンハンサー、またはリプレッサーからの遺伝子の発現をモジュレートすることによってモジュレートすることができる、制御領域のメチル化を変更することができる、少なくとも1つのアンカー配列を変更することができる；少なくとも1つの接続核形成分子結合部位 (c o n j u n c t i o n n u c l e a t i n g m o l e c u l e b i n d i n g s i t e) を、例えば、接続核形成分子に対する結合親和性を変更することによって変更することができる；CTCF結合性モチーフなどの少なくとも1つの共通のヌクレオチド配列の配向を、例えば、CTCF結合性モチーフなどの少なくとも1つのアンカー配列内の置換、付加または欠失によって変更することができる。

10

【0081】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の部位特異的遮断剤および組成物は、細胞における発現をモジュレートするために、1つまたは複数のAPOB特異的転写制御エレメントを含む発現制御領域を標的とする。標的とすることができるAPOB特異的転写制御エレメントとしては、APOB特異的プロモーター、APOB特異的エンハンサー、APOB特異的リプレッサー、およびAPOB関連アンカー配列、例えば、CTCF部位が挙げられる。一実施形態では、APOB関連CTCF部位は、肝臓の細胞における発現を調節するもの、例えば、CTCF部位3である。APOB CTCF部位3のヌクレオチド配列は、例えば、GenBank受託番号M96151に見いだすことができる。

20

【0082】

例えば、部位特異的遮断剤は、部位特異的標的化成分、例えば、核酸分子、例えばAPOB内因性CTCF部位、例えばCTCF部位3を標的とするガイドRNAなど、および、エフェクター分子、例えば、内因性プロモーターからの標的遺伝子の発現をモジュレート、例えば、増強または抑止して遺伝子発現をモジュレートする転写エンハンサーまたは転写リプレッサーを含むエフェクター分子などを含み得る。

【0083】

本発明のある特定の実施形態では、本明細書に記載の部位特異的遮断剤および組成物は、2次元クロマチン構造を変更するために、1つまたは複数のAPOB関連アンカー配列を含む、例えば、アンカー配列媒介性接続内に第1のAPOB関連アンカー配列および第2のAPOB関連アンカー配列を含む発現制御領域を標的とする（例えば、例えばDNA、例えばゲノムDNAにおけるアンカー配列媒介性接続を改変することにより、細胞、例えば対象内の細胞における発現をモジュレートするためにアンカー配列媒介性接続）。

30

【0084】

一態様では、本発明は、アンカー配列媒介性接続内に1つまたは複数のAPOB関連アンカー配列を含むAPOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分を含む部位特異的APOB遮断剤を含む。遮断剤は、特定のアンカー配列媒介性接続に結合、例えば、特異的に結合して、アンカー配列媒介性接続、例えば、接続核形成分子が結合した2つまたはそれよりも多くのDNA遺伝子座の物理的な相互作用を有するアンカー配列媒介性接続のトポロジーを変更する。

40

【0085】

アンカー配列媒介性接続の形成により、転写制御エレメントがAPOB遺伝子と相互作用するように強制され得る、または転写制御エレメントの活性が空間的に制約され得る。したがって、アンカー配列媒介性接続を変更することにより、モジュレートされるAPOB遺伝子のコード配列を変更せずにAPOB発現をモジュレートすることが可能になる。

【0086】

一部の実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤および組成物により、アンカー配列媒介性接続に関連するAPOB遺伝子の発現を、1つまたは複数のアンカー配列と接続核形成分子の間に物理的に干渉することによってモジュレートする。例えば、DNA結合性小

50

分子（例えば、副溝もしくは主溝結合物質）、ペプチド（例えば、ジンクフィンガー、T A L E、新規もしくは修飾されたペプチド）、タンパク質（例えば、C T C F、C T C F 結合性および／もしくは凝集結合親和性が損なわれた修飾されたC T C F）、または核酸（例えば、s s D N A、修飾されたD N AまたはR N A、ペプチドオリゴヌクレオチドコンジュゲート、ロックド核酸、架橋型核酸、ポリアミド、および／または三重鎖形成性オリゴヌクレオチド）により、接続核形成分子が1つまたは複数のアンカー配列と相互作用することを物理的に妨げて、A P O B 遺伝子発現をモジュレートすることができる。

【0087】

一部の実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤および組成物により、アンカー配列媒介性接続に関連するA P O B 遺伝子の発現を、アンカー配列の修飾、例えばエピジェネティック修飾、例えばヒストンタンパク質の修飾、またはゲノム編集（g e n o m i c e d i t i n g）の改変によってモジュレートする。例えば、A P O B 遺伝子を含むアンカー配列媒介性接続に関連する1つまたは複数のアンカー配列をゲノム編集、例えばC a s 9 媒介性ゲノム編集の標的とすることができる。

10

【0088】

一部の実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤および組成物により、アンカー配列媒介性接続に関連するA P O B 遺伝子の発現をモジュレートする、例えば、転写を活性化または抑止する、例えば、クロマチンまたはゲノム編集に対するエピジェネティック変化を誘導する。

【0089】

20

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、1つまたは複数のアンカー配列、A P O B 遺伝子、および強化エレメントまたはサイレンシングエレメントなどの1つまたは複数の転写制御エレメントを含む。一部の実施形態では、転写制御エレメントはアンカー配列媒介性接続の内部に存在する、部分的にアンカー配列媒介性接続の内部に存在する、またはアンカー配列媒介性接続の外側に存在する。

【0090】

一実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、染色体内ループなどのループを含む。ある特定の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は複数のループを有する。1つまたは複数のループは、第1のアンカー配列、核酸配列、転写制御エレメント、および第2のアンカー配列を含み得る。別の実施形態では、少なくとも1つのループは、順番に、第1のアンカー配列、転写制御エレメント、および第2のアンカー配列；または第1のアンカー配列、核酸配列、および第2のアンカー配列を含む。さらに別の実施形態では、核酸配列および転写制御エレメントのいずれか一方または両方がループの内部または外側に位置する。さらに別の実施形態では、ループの1つまたは複数の転写制御エレメントを含む。

30

【0091】

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、T A T A ボックス、C A A T ボックス、G C ボックス、またはC A P 部位を含む。

【0092】

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は複数のループを含み、アンカー配列媒介性接続は、ループの1つまたは複数のアンカー配列、核酸配列、および転写制御エレメントのうちの少なくとも1つを含む。

40

【0093】

一態様では、本発明の部位特異的遮断剤および組成物により、アンカー配列媒介性接続に標的化変更を導入して、アンカー配列に結合する遮断剤で核酸配列の発現をモジュレートすることができる。一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続内の1つまたは複数のヌクレオチドを置換、付加または欠失のための標的とすることによってアンカー配列媒介性接続を変更する。

【0094】

一部の実施形態では、発現、例えば転写を、活性化ループを含めることまたは抑止性ループを除外することによって活性化する。そのような実施形態の1つでは、アンカー配列

50

媒介性接続は、核酸配列、例えばAPOBをコードする核酸などの転写を増加させる転写制御配列を含む。別のそのような実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、核酸配列、例えばAPOBをコードする核酸などの発現、例えば転写を低減する転写制御エレメントを除外する。

【0095】

一部の実施形態では、発現、例えば転写を、抑止性ループを含めることまたは活性化ループを除外することによって抑止する。その実施形態の1つでは、アンカー配列媒介性接続は、核酸配列、例えばAPOBをコードする核酸配列などの発現、例えば転写を低減する転写制御エレメントを含む。別のそのような実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、核酸配列、例えばAPOBをコードする核酸などの転写を増加させる転写制御配列を除外する。

10

【0096】

各アンカー配列媒介性接続は、1つまたは複数、例えば複数のアンカー配列を含む。アンカー配列を操作または変更して、天然に存在するループを中断するまたは新しいループを形成する（例えば、外因性ループを形成するもしくは外因性もしくは変更されたアンカー配列を有する天然に存在しないループを形成する）ことができる。そのような変更により、APOB遺伝子の全部または一部を含有するDNAの2次元構造を変化させることによって、例えば、それにより、APOB遺伝子の転写制御エレメント（例えば、強化配列およびサイレンシング／抑止性配列）と相互作用する能力をモジュレートすることによって、APOB遺伝子発現をモジュレートする。一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続のアンカー配列内の1つまたは複数のヌクレオチドの置換、付加または欠失によってクロマチン構造を改変する。

20

【0097】

アンカー配列は互いに連続していなくてよい。連続していないアンカー配列を用いる実施形態では、第1のアンカー配列と第2のアンカー配列は約500bp～約500Mb、約750bp～約200Mb、約1kb～約100Mb、約25kb～約50Mb、約50kb～約1Mb、約100kb～約750kb、約150kb～約500kb、または約175kb～約500kb離れ得る。一部の実施形態では、第1のアンカー配列と第2のアンカー配列は約500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、5kb、10kb、15kb、20kb、25kb、30kb、35kb、40kb、45kb、50kb、55kb、60kb、65kb、70kb、75kb、80kb、85kb、90kb、95kb、100kb、125kb、150kb、175kb、200kb、225kb、250kb、275kb、300kb、350kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1Mb、2Mb、3Mb、4Mb、5Mb、6Mb、7Mb、8Mb、9Mb、10Mb、15Mb、20Mb、25Mb、50Mb、75Mb、100Mb、200Mb、300Mb、400Mb、500Mb、またはこれらの間の任意のサイズだけ離れている。

30

【0098】

一実施形態では、アンカー配列は共通のヌクレオチド配列、例えば、CTCF結合性モチーフ：N(T/C/G)N(G/A/T)CC(A/T/G)(C/G)(C/T/A)AG(G/A)(G/T)GG(C/A/T)(G/A)(C/G)(C/T/A)(G/A/C)（配列番号1）を含み、ここで、Nは任意のヌクレオチドである。

40

CTCF結合性モチーフは、逆の配向、例えば、(G/A/C)(C/T/A)(C/G)(G/A)(C/A/T)GG(G/T)(G/A)GA(C/T/A)(C/G)(A/T/G)CC(G/A/T)N(T/C/G)N（配列番号2）であってもよい。

【0099】

一実施形態では、アンカー配列は配列番号1または配列番号2または配列番号1または配列番号2のいずれかと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少

50

なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 同一のヌクレオチド配列を含む。

【0100】

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、少なくとも第 1 のアンカー配列および第 2 のアンカー配列を含む。第 1 のアンカー配列および第 2 のアンカー配列はそれぞれが共通のヌクレオチド配列を含み得る、例えば、それぞれが CTCF 結合性モチーフを含む。一部の実施形態では、第 1 のアンカー配列および第 2 のアンカー配列は異なる配列を含む、例えば、第 1 のアンカー配列は CTCF 結合性モチーフを含み、第 2 のアンカー配列は CTCF 結合性モチーフ以外のアンカー配列を含む。一部の実施形態では、各アンカー配列が共通のヌクレオチド配列および共通のヌクレオチド配列の一端または両端の 1 つまたは複数の隣接ヌクレオチドを含む。

10

【0101】

接続を形成し得る 2 つの CTCF 結合性モチーフ（例えば、連続したまたは連続していない CTCF 結合性モチーフ）は、ゲノム内に任意の配向、例えば、5' → 3'（左タンデム、例えば、配列番号 1 を含む 2 つの CTCF 結合性モチーフ）もしくは 3' → 5'（右タンデム、例えば、2 つの CTCF 結合性モチーフが配列番号 2 を含む）のいずれかの同じ配向（タンデム）で、または、一方の CTCF 結合性モチーフが配列番号 1 を含み、他方が配列番号 2 を含む、収束配向で存在し得る。CTCFB SDB 2.0: Database For CTCF binding motifs And Genome Organization (<http://insulatordb.uthsc.edu/>) を使用して、標的遺伝子、例えば APOB に関連する CTCF 結合性モチーフを同定することができる。

20

【0102】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つの共通のヌクレオチド配列、例えば、接続核形成分子結合部位の配向を変化させることによってアンカー配列媒介性接続を変更する。

【0103】

一部の実施形態では、アンカー配列は接続核形成分子結合部位、例えば CTCF 結合性モチーフを含み、本発明の部位特異的遮断剤により、少なくとも 1 つの接続核形成分子結合部位の変更、例えば、接続核形成分子に対する結合親和性の変更が導入される。

【0104】

一部の実施形態では、外因性アンカー配列を導入することによってアンカー配列媒介性接続を変更する。天然に存在しないアンカー配列または外因性アンカー配列の付加により、例えば、核酸配列の転写を変更する天然に存在しないループの形成が誘導されることによって天然に存在するアンカー配列媒介性接続が形成されるまたは中断される。

30

【0105】

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、1 つの APOB 遺伝子、および 1 つまたは複数、例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または APOB 遺伝子以外の他の遺伝子を含む。

【0106】

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、1 つまたは複数の、例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、またはそれよりも多くの転写制御エレメントと関連する。一部の実施形態では、APOB 遺伝子は転写制御エレメントの 1 つまたは複数と連続していない。APOB 遺伝子が転写制御エレメントと連続していない一部の実施形態では、前記遺伝子は、1 つまたは複数の転写制御エレメントから約 100 bp ~ 約 500 Mb、約 500 bp ~ 約 200 Mb、約 1 kb ~ 約 100 Mb、約 25 kb ~ 約 50 Mb、約 50 kb ~ 約 1 Mb、約 100 kb ~ 約 750 kb、約 150 kb ~ 約 500 kb、または約 175 kb ~ 約 500 kb 離れ得る。一部の実施形態では、前記遺伝子は転写制御エレメントから約 100 bp、300 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1 kb、5 kb、10 kb、15 kb、20 kb、25 kb、30 kb、35 kb、40 kb、45 kb、50 kb、55 kb、60 kb、65 kb、70 kb、75 kb、

40

50

80kb、85kb、90kb、95kb、100kb、125kb、150kb、175kb、200kb、225kb、250kb、275kb、300kb、350kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1Mb、2Mb、3Mb、4Mb、5Mb、6Mb、7Mb、8Mb、9Mb、10Mb、15Mb、20Mb、25Mb、50Mb、75Mb、100Mb、200Mb、300Mb、400Mb、500Mb、またはこれらの間の任意のサイズだけ離れている。

【0107】

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続を変更することによって遺伝子発現をどのようにモジュレートするかの決定、例えば、部位特異的標的化成分の選択に、アンカー配列媒介性接続の型が役立ち得る。例えば、一部の型のアンカー配列媒介性接続はアンカー配列媒介性接続内に1つまたは複数の転写制御エレメントを含む。そのようなアンカー配列媒介性接続を、アンカー配列媒介性接続の形成を中断すること、例えば、1つまたは複数のアンカー配列を変更することによって中断することにより、アンカー配列媒介性接続内のAPOB遺伝子の転写が低減する可能性がある。

10

【0108】

一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続に付随する1つまたは複数の転写制御エレメントによってAPOB遺伝子の発現を調節する、モジュレートする、または発現に影響を及ぼす。一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、APOB遺伝子および1つまたは複数の転写制御エレメントを含む。例えば、APOB遺伝子および1つまたは複数の転写制御配列は、少なくとも部分的に、アンカー配列媒介性接続内、例えば、1型アンカー配列媒介性接続内に位置する。アンカー配列媒介性接続は「1型、EP垂型」とも称され得る。一部の実施形態では、APOB遺伝子は定義された発現の状態を有する、例えば、そのネイティブな状態にある、例えば、病的な状態にある。例えば、APOB遺伝子は高レベルの発現を有し得る。アンカー配列媒介性接続を中断することにより、APOB遺伝子の発現を低減すること、例えば、アンカー配列媒介性接続内の以前は転写に対して開かれていたDNAのコンフォメーションの変化によって転写を低減すること、例えば、APOB遺伝子と強化配列(enhancing sequence)の間に追加の距離を作り出すDNAのコンフォメーションの変化によって転写を低減することができる。一実施形態では、関連するAPOB遺伝子および1つまたは複数の転写制御配列、例えば、強化配列の両方がアンカー配列媒介性接続の内側に存在する。アンカー配列媒介性接続の中断により、APOB遺伝子の発現が低減する。一実施形態では、アンカー配列媒介性接続に関連するAPOB遺伝子には、少なくとも部分的にアンカー配列媒介性接続の内側に存在する1つまたは複数の転写制御エレメントがアクセス可能である。

20

30

【0109】

一部の実施形態では、関連するが、アンカー配列媒介性接続に起因してアクセス不可能な1つまたは複数の転写制御エレメントによってAPOB遺伝子の発現を調節する、モジュレートする、または発現に影響を及ぼす。例えば、APOB遺伝子に関連するアンカー配列媒介性接続により、1つまたは複数の転写制御エレメントのAPOB遺伝子の発現を調節する、モジュレートする、または発現に影響を及ぼす能力が中断される。転写制御配列はAPOB遺伝子から分離されていてよい、例えば、APOB遺伝子とは逆の側面に、少なくとも部分的に、例えばアンカー配列媒介性接続の内側または外側に存在する、例えば、APOB遺伝子は、アンカー配列媒介性接続の近傍にあることに起因して、転写制御エレメントにアクセス不可能である。一部の実施形態では、1つまたは複数の強化配列はアンカー配列媒介性接続、例えば2型アンカー配列媒介性接続によってAPOB遺伝子から分離されている。

40

【0110】

一部の実施形態では、APOB遺伝子はアンカー配列媒介性接続に起因して1つまたは複数の転写制御エレメントにアクセス不可能であり、アンカー配列媒介性接続の中断により、転写制御エレメントによりAPOB遺伝子の発現を調節する、モジュレートする、または発現に影響を及ぼすことが可能になる。一実施形態では、APOB遺伝子はアンカー

50

配列媒介性接続の内側および外側にあり、1つまたは複数の転写制御エレメントにアクセス不可能である。アンカー配列媒介性接続の中断により、転写制御エレメントのアクセスが増大して、APOB遺伝子の発現が調節される、モジュレートされる、または発現が影響を受ける、例えば、転写制御エレメントによりAPOB遺伝子の発現が増大する。一実施形態では、APOB遺伝子はアンカー配列媒介性接続の内側にあり、少なくとも部分的にアンカー配列媒介性接続の外側に存在する1つまたは複数の転写制御エレメントにアクセス不可能である。アンカー配列媒介性接続の中断により、APOB遺伝子の発現が増大する。一実施形態では、APOB遺伝子は少なくとも部分的にアンカー配列媒介性接続の外側にあり、アンカー配列媒介性接続の内側に存在する1つまたは複数の転写制御エレメントにアクセス不可能である。アンカー配列媒介性接続の中断によりAPOB遺伝子の発現が増大する。

10

【0111】

A. APOB部位特異的標的化成分

本発明の部位特異的APOB標的化成分は、APOB発現制御領域を標的とし、ポリマーまたはポリマー分子、例えば、ポリアミド（すなわち、アミド結合によって連結したリピート単位の分子、例えば、ポリペプチド）、ヌクレオチドのポリマー（例えば、ガイドRNA）、ペプチド核酸（PNA）、またはペプチドもしくはポリペプチドなどのアミノ酸のポリマー、例えば、融合タンパク質などを含み得る。適切な部位特異的APOB標的化成分、組成物、およびそのような作用剤および組成物の使用方法は下に、およびその内容全体が明白に参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2018/049073号に記載されている。

20

【0112】

一実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤は、ガイドRNA（もしくはgRNA）などの核酸分子またはガイドRNAおよびエフェクターもしくはその断片もしくはエフェクターもしくはその断片をコードする核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む。

【0113】

別の実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤は、APOB発現制御領域を特異的に標的にしてAPOB遺伝子の発現をモジュレートするように操作されたものであるジンクフィンガーポリペプチド（ZNF）または転写活性化因子様エフェクター（TALE）ポリペプチドのDNA結合ドメインまたはその断片などのポリペプチドをコードする核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む。

30

【0114】

別の実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤は、PNA、例えば、エフェクターポリペプチドまたはその断片と連結した核酸gRNAなどのポリヌクレオチドを含む部位特異的APOB標的化成分を含む。

【0115】

別の実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤は、Casポリペプチドと、例えば、エピジェネティック動員因子またはエピジェネティックCpG修飾因子とを含む融合タンパク質をコードする核酸分子などの融合分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む。

40

【0116】

さらに別の実施形態では、本発明の部位特異的遮断剤は、Casポリペプチドと、例えば、エピジェネティック動員因子またはエピジェネティックCpG修飾因子とを含む融合タンパク質などの融合分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む。

【0117】

本明細書で使用される場合、その最も広範な意味で、「核酸」という用語は、オリゴヌクレオチド鎖であるかまたはオリゴヌクレオチド鎖に組み入れることができる任意の化合物および／または物質を指す。一部の実施形態では、核酸は、ポリヌクレオチド鎖であるかまたはポリヌクレオチド鎖にリン酸ジエステル連結を介して組み入れることができる化合物および／または物質である。文脈から明らかになる通り、一部の実施形態では、「核

50

酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオシド）を指す；一部の実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むポリヌクレオチド鎖を指す。一部の実施形態では、「核酸」はRNAであるかまたはRNAを含む；一部の実施形態では、「核酸」はDNAであるかまたはDNAを含む。一部の実施形態では、「核酸」は、ロッキング核酸分子およびデオキシ核酸分子を含む「ミクスマー（mixmer）」である。一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数の天然の核酸残基であるか、それを含むか、またはそれからなる。一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数の核酸類似体であるか、それを含むか、またはそれからなる。一部の実施形態では、核酸類似体は、リン酸ジエステル骨格を利用しないという点で核酸とは異なる。例えば、一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数の「ペプチド核酸」であるか、それを含むか、またはそれからなり、ペプチド核酸は、当技術分野で公知であり、骨格内にリン酸ジエステル結合の代わりにペプチド結合を有するものであり、本発明の範囲内に入るとみなされる。その代わりにまたはそれに加えて、一部の実施形態では、核酸は、リン酸ジエステル結合ではなく、1つまたは複数のホスホロチオエートおよび／または5'-N-ホスホラミダイト連結を有する。一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数の天然のヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシシチジン）であるか、それを含むか、またはそれからなる。一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数のヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、挿入塩基（intercalated base）、およびこれらの組合せ）であるか、それを含むか、またはそれからなる。一部の実施形態では、核酸は、天然の核酸におけるものと比較して修飾された糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）を1つまたは複数含む。一部の実施形態では、核酸は、RNAまたはタンパク質などの機能的な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸は1つまたは複数のイントロンを含む。一部の実施形態では、核酸を、天然の供給源からの単離、相補的な鋳型に基づく重合による酵素的合成（*in vivo*または*in vitro*）、組換え細胞または系における再生、および化学合成のうちの1つまたは複数によって調製する。一部の実施形態では、核酸は、少なくとも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、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000またはそれよりも多くの残基の長さである。一部の実施形態では、核酸は、部分的にまたは全体として一本鎖である；一部の実施形態では、核酸は、部分的にまたは全体として二本鎖である。一部の実施形態では、核酸は、ポリペプチドをコードする少なくとも1つのエレメントを含むヌクレオチド配列を有するか、またはポリペプチドをコードする配列の相補物である。一部の実施形態では、核酸は酵素活性を有する。

【0118】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、ペプチド結合によって、またはペプチド結合以外の手段によって共有結合で連結したアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数に対する制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合によってまた

10

20

30

40

50

はペプチド結合以外の手段によって互いに接合した2つまたはそれよりも多くのアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書で使用される場合、この用語は、当技術分野において一般に例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短い鎖と、当技術分野において一般にタンパク質と称される長い鎖の両方を指し、多くの型が存在する。

【0119】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、キメラまたは「融合タンパク質」であるかまたはそれを含み得る。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、異種の第2のポリペプチド（すなわち、第1のタンパク質以外のポリペプチド）と作動可能に連結した第1のタンパク質の全部または一部（好ましくは生物活性のある部分）を含む。融合タンパク質の範囲内で、「作動可能に連結した」という用語は、第1のタンパク質またはそのセグメントと異種ポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すことが意図されている。異種ポリペプチドを第1のタンパク質またはセグメントのアミノ末端またはカルボキシル末端と融合することができる。

10

【0120】

「ポリアミド」は、アミド結合によって連結したリピート単位を有するポリマー分子である。天然に存在するポリアミドの例はタンパク質である。一部の実施形態では、ポリアミドはペプチド核酸（PNA）を含む。

【0121】

「ペプチド核酸」（「PNA」）は、PNA内の1つまたは複数のアミノ酸単位がペプチド骨格と同様のアミド含有骨格、例えば、アミノエチルグリシンを有し、アミノ酸側鎖の代わりに核酸側鎖を有する分子である。ペプチド核酸（PNA）は相補DNAおよびRNAとそれらのオリゴヌクレオチド対応物よりも高い親和性でハイブリダイズすることが分かっている。PNAはこの特質により核酸側鎖と安定なハイブリッドになるだけでなく、同時に、中性骨格および疎水性側鎖によりポリペプチド内に疎水性単位がもたらされる。核酸側鎖としては、これだけに限定されないが、アデニン、シトシン、グアニン、チミンおよびウラシルなどのプリン側鎖またはピリミジン側鎖が挙げられる。一実施形態では、核酸側鎖は本明細書に記載のヌクレオシド類似体を含む。

20

【0122】

一実施形態では、本発明の部位特異的APOB標的化成分はポリアミドを含む。本発明の作用剤および組成物への使用に適したポリアミドは当技術分野で公知である。

30

【0123】

一実施形態では、本発明の部位特異的APOB標的化成分はポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列はAPOB遺伝子またはAPOB発現産物をコードする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、APOBコード配列もAPOB発現産物も含まない。例えば、一部の実施形態では、本発明の部位特異的APOB標的化成分は、標的発現制御領域、例えばプロモーターまたはアンカー配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、標的アンカー配列の相補物であるか、または、標的配列の相補物と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一である配列を有する。

40

【0124】

本発明のポリヌクレオチドは、デオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたデオキシヌクレオチド、修飾されたリボヌクレオチド（例えば、骨格連結、糖分子、および／または核酸塩基を変更する修飾などの化学修飾）、ならびに人工的な核酸を含み得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドとしては、これだけに限定されないが、ゲノムDNA、cDNA、ペプチド核酸（PNA）またはペプチドオリゴヌクレオチドコンジュ

50

ゲート、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、ポリアミド、三重鎖形成性オリゴヌクレオチド、修飾されたDNA、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド、tRNA、mPvNA、rPvNA、修飾されたRNA、miRNA、gRNA、およびsiRNAまたは他のRNA分子またはDNA分子が挙げられる。

【0125】

一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、約2～約5000nt、約10～約100nt、約50～約150nt、約100～約200nt、約150～約250nt、約200～約300nt、約250～約350nt、約300～約500nt、約100～約1000nt、約50～約1000nt、約100～約1000nt、約1000～約2000nt、約2000～約3000nt、約3000～約4000nt、約4000～約5000nt、またはこれらの間の任意の範囲の長さを有する。

10

【0126】

本発明のポリヌクレオチドは、ヌクレオシド、例えば、プリンまたはピリミジン、例えば、アデニン、シトシン、グアニン、チミンおよびウラシルを含み得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のヌクレオシド類似体を含む。ヌクレオシド類似体としては、これだけに限定されないが、ヌクレオシド類似体、例えば、5-フルオロウラシル；5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、4-メメチルベンズイミダゾール、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ジヒドロウリジン、ベータ-D-ガラクトシルキューオシン (beta-D-galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2,6-ジアミノプリン、3-ニトロピロール、イノシン、チオウリジン、キューオシン、ワイオシン、ジアミノプリン、イソグアニン、イソシトシン、ジアミノピリミジン、2,4-ジフルオロトルエン、イソキノリン、ピロロ[2,3-]ピリジン、およびプリン側鎖またはピリミジン側鎖と塩基対合し得る任意の他のものが挙げられる。

20

30

【0127】

一部の実施形態では、APOB発現制御領域を特異的に標的にしてAPOB遺伝子の発現をモジュレートするように操作されたものであるジンクフィンガーポリペプチド (ZNF) または転写活性化因子様エフェクター (TALE) ポリペプチドのDNA結合ドメインまたはその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、本発明の部位特異的APOB標的化成分。

40

【0128】

APOB発現制御領域などの目的のDNA標的領域に特異的に結合するそのようなジンクフィンガーポリヌクレオチドの設計および調製は当技術分野において周知である。例えば、ジンクフィンガー (ZNF) タンパク質は、ヌクレオチドのトリプレットに特異的に結合するDNA結合性モチーフを含有する。したがって、本発明の部位特異的APOB標的化成分を設計および調製するために、それぞれが特定の3塩基対のDNA配列を認識し得る別々のジンクフィンガーDNA結合ドメインを組み合わせ、9塩基対から18塩基対までにわたる長さの標的部位を認識する3フィンガーアレイ、4フィンガーアレイ、5

50

フィンガーアレイ、または6フィンガーアレイを生成することを含むモジュラーアセンブリプロセスを使用することができる。別の適切な方法は、最大6つの個々のジンクフィンガーを有するZNFポリヌクレオチドを生成するための2フィンガーモジュールを含み得る。例えば、Shukla VK, et al., Nature. 459 (7245) 2009: 437-41; Dreier B, et al., JBC. 280 (42) 2005: 35588-97; Dreier B, et al, JBC 276 (31) 2001: 29466-78; Bae KH, et al., Nature Biotechnology. 21 (3) 2003: 275-80を参照されたい。

【0129】

一部の実施形態では、本発明の部位特異的APOB標的化成分は、ApoB発現制御領域を特異的に標的にして、ApoB遺伝子の発現をモジュレートするように操作されたものであるジンクフィンガーのDNA結合ドメイン(DBD)またはその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。本発明における使用に適した、ヌクレオチドトリプレットに結合するジンクフィンガーをコードする例示的なアミノ酸配列を以下の表1に提示する(例えば、Gersbach et al., Synthetic Zinc Finger Proteins: The Advent of Targeted Gene Regulation and Genome Modification Technologiesを参照されたい)。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1.

ジンクフィンガー DNA結合ドメイン (フィンガー) のアミノ酸配列	ヌクレオチド トリプレット	配列番号
RKDALRG	TTG	1
TTGALTE	CTT	2
QRHHLVE	CTC	3
QNSTLTE	CTA	4
RNDALTE	CTG	5
HKNALQN	ATT	6
RRSACRR	ATC	7
QKSSLIA	ATA	8
RRDELNV	ATG	9
TSGSLVR	GTT	10
DPGALVR	GTC	11
QSSSLVR	GTA	12
RSDELVR	GTG	13
RLRDIQF	TCT	14
RSDEKRR	TCC	15
RSDHLTT	TCA	16
RLRALDR	TCG	17
TKNSLTE	CCT	18
SKKHLAE	CCC	19
TSHSLTE	CCA	20
RNDTLTE	CCG	21
THLDLIR	ACT	22
DKKDLTR	ACC	23
SPADLTR	ACA	24
RTDTLRD	ACG	25

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

TSGELVR	GCT	26
DCRDLAR	GCC	27
QSGDLRR	GCA	28
RSDDLVR	GCG	29
ARGNLRT	TAT	30
SRGNLKS	TAC	31
QASNLIS	TAA	32
REDNLHT	TAG	33
TSGNLTE	CAT	34
SKKALTE	CAC	35
QSGNLTE	CAA	36
RADNLTE	CAG	37
TTGNLTV	AAT	38
DSGNLRV	AAC	39
QRANLRA	AAA	40
RKDNLKN	AAG	41
TSGNLVR	GAT	42
DPGNLVR	GAC	43
QSSNLVR	GAA	44
RSDNLVR	GAG	45
APKALGW	TGC	46
QAGHLAS	TGA	47
RSDHLTT	TGG	48
SRRTCRA	CGT	49
HTGHLE	CGC	50
QSGHLTE	CGA	51
RSDKLTE	CGG	52
HRTTLTN	AGT	53
ERSHLRE	AGC	54
QLAHLRA	AGA	55
RSDHLTN	AGG	56
TSGHLVR	GGT	57
DPGHLVR	GGC	58
QRAHLER	GGA	59
RSDKLVR	GGG	60

10

20

30

40

50

【0130】

ジंकフィンガーDNA結合ドメインは、N末端領域およびC末端領域を含み、間に、標的DNA配列に結合する「フィンガー」を有する。N末端領域は、一般に7アミノ酸長である。C末端領域は一般に6アミノ酸長である。したがって、N末端領域は一般にX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇（配列番号）のアミノ酸配列を含む。「X」は任意のアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、N末端領域は例示的なアミノ酸配列LEPGEKP（配列番号）を含む。「X」は任意のアミノ酸であり得る。C末端領域は一般にX₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀（配列番号）のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、C末端領域は例示的なアミノ酸配列TGKKTS（配列番号）を含む。

【0131】

DNA結合ドメイン内の各フィンガーは、フィンガーのN末端に位置するN末端骨格とフィンガーのC末端に位置するC末端骨格に挟まれている。フィンガーのN末端骨格は一般に11アミノ酸長であり、2つの保存的システイン（C）が3位および6位の位置にある。したがって、フィンガーのN末端骨格は一般にX₈X₉CX₁₀X₁₁CX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆（配列番号）のアミノ酸配列を含む。「X」は任意のアミノ酸であり得る。フィンガーのC末端骨格は一般に5アミノ酸長であり、2つの保存的ヒスチジン（

histine) (H) が 1 位および 5 位に位置する。したがって、フィンガーの C 末端骨格は一般に $HX_{17}X_{18}X_{19}H$ (配列番号) のアミノ酸配列を含む。「X」は任意のアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、N 末端骨格は例示的なアミノ酸配列 $YKCP ECGKSF S$ (配列番号 61) を含み、C 末端骨格は例示的なアミノ酸配列 $HQRTH$ (配列番号 62) を含む。2 つの「フィンガー」はリンカーを通じて連結している。リンカーは、一般に 5 アミノ酸長であり、 $X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号) のアミノ酸配列を含む。「X」は任意のアミノ酸であり得る。ある特定の実施形態では、リンカーは例示的なアミノ酸配列 $TGEKP$ (配列番号 63) を含む。したがって、部位特異的 A p o B 部位特異的遮断剤のジंकフィンガーは以下の構造：(N 末端骨格ーフィンガーー C 末端骨格ーリンカー) n を有し、部位特異的 A p o B 部位特異的遮断剤のジंकフィンガー DNA 結合ドメインは以下の構造：[N 末端領域 (N 末端骨格ーフィンガーー C 末端骨格ーリンカー) n ー C 末端領域] を有する。「N」は、ジंकフィンガー DNA 結合ドメインが結合する、したがって A p o B 部位特異的遮断剤が結合するヌクレオチドのトリプレットの数を表す。

10

20

30

40

50

【0132】

4 つのヌクレオチドトリプレットに対する「フィンガー」アミノ酸配列が分かっているが、そのようなトリプレットが目的の標的領域内で同定された場合、この問題を回避するために 2 つの「リンカースパン配列」ーリンカースパン 1 およびリンカースパン 2 ーが有用である。リンカースパン 1 は、トリプレットに対する「フィンガー」アミノ酸配列が利用不可能な場合に 1 塩基対をスキップするために使用される。リンカースパン 2 は、トリプレットに対する「フィンガー」アミノ酸配列が利用不可能な場合に 2 塩基対をスキップするために使用される。リンカースパン 1 は一般に 12 アミノ酸長である。リンカースパン 2 は一般に 16 アミノ酸長である。したがって、リンカースパン 1 は一般に $X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}$ (配列番号) のアミノ酸配列を含む。リンカースパン 2 は一般に $X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}X_{57}X_{58}$ (配列番号) のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカースパン 1 は、 $THPRAPIPKPFQ$ (配列番号) のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、リンカースパン 2 は $TPNPHRRTPDPSHKPFQ$ (配列番号) のアミノ酸配列を含む。リンカースパン 1 および／またはリンカースパン 2 を使用する場合、フィンガーーリンカースパン 1／スパン 2ーフィンガーは、以下の構造を含む：N 末端骨格ーフィンガーー C 末端骨格ーリンカースパン 1／スパン 2ーN 末端骨格ーフィンガーー C 末端骨格ーリンカー。同様に、A P O B 発現制御領域などの目的の DNA 標的領域に特異的に結合するそのような T A L E ポリペプチドの設計および調製は当技術分野において周知である。例えば、T A L E の DNA 結合ドメインは、繰り返される高度に保存された 33～34 アミノ酸配列を含有し、12 番目および 13 番目のアミノ酸は多岐にわたる。これらの 2 つの位置は反復可変二残基 (repeat variable diresidue) (RVD) と称され、高度に可変性であり、特定のヌクレオチド認識との強力な相関を示す。アミノ酸配列と DNA 認識のこの直接的な関連性により、適当な RVD を含有するリピートセグメントの組合せを選択することによって特定の DNA 結合ドメインを操作することが可能になっている。例えば、Boch J Nature Biotechnology. 29 (2) 2011: 135-6; Boch J, et al., Science. 326 (5959) 2009: 1509-12; Moscou MJ & Bogdanove AJ Science. 326 (5959) 2009: 1501 を参照されたい。

【0133】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドを含む本発明の部位特異的 A P O B 標的化成分は、ガイド RNA (もしくは gRNA) またはガイド RNA をコードする核酸を含む。gRNA は、例えば、エフェクターを A P O B 発現制御エレメントに方向づけるために必要な、例えば、A P O B 発現制御エレメントを含むゲノム標的配列を標的とする約 20 ヌクレオチドの部位特異的配列を含み得る「足場」配列を含む短い合成 RNA 分子である。

【0134】

一般に、ガイドRNA配列は、約17ヌクレオチドから約24ヌクレオチドの間（例えば、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、または21ヌクレオチド）の長さを有し、標的配列と相補的になるように設計される。有効なガイドRNAの設計に使用するためのカスタムgRNA生成装置およびアルゴリズムが市販されている。遺伝子編集はまた、天然に存在するcrRNA-tracrRNA複合体を模倣する、tracrRNA（ヌクレアーゼとの結合のため）および少なくとも1つのcrRNA（ヌクレアーゼを編集のために標的とした配列にガイドするため）の両方を含有する操作された（合成）単一RNA分子であるキメラ「単一ガイドRNA」（「sgRNA」）を使用しても実現されている。化学修飾されたsgRNAもゲノム編集において有効であることが実証されている；例えば、Hendel et al. (2015) Nature Biotechnol., 985-991を参照されたい。

10

【0135】

ポリヌクレオチド、例えばgRNAを含む例示的な部位特異的APOB標的化成分を下の表2に提示する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、表2のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列全体と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を含む。

20

【0136】

表2の配列は修飾されたもの（または修飾されていないもの）として記載されているが、本発明の（the of the invention）、例えば部位特異的遮断剤に包含される核酸分子は、修飾されてないかまたは表2に記載されているものと違うように修飾されている表2に記載の配列のうちのいずれか1つも含み得ることが理解されよう。

【0137】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド、例えばgRNAを含む部位特異的APOB標的化成分は、アンカー配列と相補的なヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、アンカー配列はCTCF結合性モチーフまたはコンセンサス配列：N（T/C/G）N（G/A/T）CC（A/T/G）（C/G）（C/T/A）AG（G/A）（G/T）GG（C/A/T）（G/A）（C/G）（C/T/A）（G/A/C）（配列番号1）を含み、ここで、Nは任意のヌクレオチドである。CTCF結合性モチーフまたはコンセンサス配列はまた、逆の配向、例えば、（G/A/C）（C/T/A）（C/G）（G/A）（C/A/T）GG（G/T）（G/A）GA（C/T/A）（C/G）（A/T/G）CC（G/A/T）N（T/C/G）N（配列番号2）であり得る。一部の実施形態では、核酸配列は、CTCF結合性モチーフまたはコンセンサス配列と相補的な配列を含む。

30

【0138】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、アンカー配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%相補的なヌクレオチド配列を含む。

40

【0139】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、CTCF結合性モチーフまたはコンセンサス配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、gRNA、およびアンカー配列と相補

50

的な配列またはアンカー配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%相補的な配列を含む配列からなる群から選択される。

【0140】

一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを含む部位特異的APOB標的化成分はRNAi分子である。RNAi分子は、一般には15~50塩基対（例えば、約18~25塩基対）を含有し、細胞内で発現される標的遺伝子内のコード配列と同一の（相補的な）またはほぼ同一の（実質的に相補的な）核酸塩基配列を有するRNAまたはRNA様構造を含む。RNAi分子としては、これだけに限定されないが、低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、メロ二重鎖（meroduplex）、およびダイサー基質が挙げられる（米国特許第8,084,599号、同第8,349,809号、および同第8,513,207号）。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載のポリペプチド、例えば接続核形成分子をコードする遺伝子の発現を阻害するための組成物を含む。

【0141】

RNAi分子は、標的遺伝子の全てまたは断片と実質的に相補的な、または完全に相補的な配列を含む。RNAi分子は、特定の遺伝子の新しく生成される核内RNA転写物が転写のために成熟化してmRNAになることを妨げるために、イントロンとエクソンの境界において配列を補完し得る。特定の遺伝子と相補的なRNAi分子はその遺伝子のmRNAとハイブリダイズし、その翻訳を妨げ得る。アンチセンス分子は、DNA、RNA、またはその誘導体もしくはハイブリッドであり得る。そのような誘導体分子の例としては、これだけに限定されないが、ペプチド核酸（PNA）およびデオキシリボ核酸グアニジン（DNG）またはリボ核酸グアニジン（R G）などのホスホロチオエートに基づく分子が挙げられる。

【0142】

RNAi分子は、in vitroで合成された「すぐに使える」RNAとして、または、転写されるとRNAi分子を生じる、細胞にトランスフェクトされるアンチセンス遺伝子として細胞に提供することができる。mRNAとのハイブリダイゼーションにより、ハイブリダイズした分子のRNAse Hによる分解および／または翻訳複合体の形成の阻害がもたらされる。どちらによっても、元の遺伝子の産物の産生ができなくなる。

【0143】

目的の転写物とハイブリダイズするRNAi分子の長さは、およそ10ヌクレオチド、約15ヌクレオチドから30ヌクレオチドの間、または約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれよりも多くのヌクレオチドであるべきである。アンチセンス配列の標的とされる転写物との同一性の程度は、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95であるべきである。

【0144】

RNAi分子は、突出、すなわち、一般には対合していない、通常は本明細書において定義されているセンス鎖とアンチセンス鎖の対のコア配列によって形成される2重ヘリックス構造には直接関与しない、突出したヌクレオチドも含み得る。RNAi分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖のそれぞれに独立に存在する約1~5塩基の3'突出および／または5'突出を含有し得る。一実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方が3'突出および5'突出を含有する。一実施形態では、1つの鎖の1つまたは複数の3'突出ヌクレオチドと他の鎖の1つまたは複数の5'突出ヌクレオチドが塩基対合する。別の実施形態では、一方の鎖の塩基の1つまたは複数の3'突出ヌクレオチドは他方の鎖の1つまたは複数の5'突出ヌクレオチドと対合しない。RNAi分子のセンス鎖とアンチセンス鎖は同じ数のヌクレオチド塩基を含む場合もあり、同じ数のヌクレオチド塩基を含ま

ない場合もある。アンチセンス鎖とセンス鎖は2重鎖を形成し得、5'末端だけが平滑末端を有するか、3'末端だけが平滑末端を有するか、5'末端と3'末端の両方が平滑末端を有するか、または5'末端も3'末端も平滑末端ではない。別の実施形態では、突出内のヌクレオチドの1つまたは複数は、チオホスフェート、ホスホロチオエート、デオキシヌクレオチド逆位(3'-3'連結)ヌクレオチドを含有する、または修飾されたリボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドである。

【0145】

低分子干渉RNA(sirRNA)分子は、標的mRNAの約15~約25個の連続したヌクレオチドと同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、sirRNA配列はジヌクレオチドAAで始まり、約30~70%(約50~60%、約40~60%、または約45%~55%)のGC含量を含み、例えば標準のBLAST検索によって決定して、それが導入される哺乳動物のゲノム内の標的以外のいかなるヌクレオチド配列に対しても高いパーセンテージ同一性を有さない。

【0146】

sirRNAおよびshRNAは、内因性マイクロRNA(miRNA)遺伝子のプロセッシング経路の中間体に似ている(Bartel, Cell 116: 281-297, 2004)。一部の実施形態では、sirRNAはmiRNAとして機能し得る、または逆も同様に、miRNAはsirRNAとして機能し得る(Zeng et al., Mol Cell 9: 1327-1333, 2002; Doench et al., Genes Dev 17: 438-442, 2003)。マイクロRNAは、sirRNAと同様に、RISCを使用して標的遺伝子をダウンレギュレートするが、sirRNAとは異なり、大多数の動物miRNAはmRNAを切断しない。その代わりに、miRNAは、翻訳抑制またはポリA除去およびmRNA分解を通じてタンパク質アウトプットを減少させる(Wu et al., Proc Natl Acad Sci U S A 103: 4034-4039, 2006)。公知のmiRNA結合部位はmRNA 3'UTR内にある;miRNAは、miRNAの5'末端からヌクレオチド2~8に対してほぼ完全な相補性を有する部位を標的にしているようである(Rajewsky, Nat Genet 38 Suppl: S8-13, 2006; Lim et al., Nature 433: 769-773, 2005)。この領域はシード領域として公知である。sirRNAとmiRNAは互換的であるので、外因性sirRNAはsirRNAに対するシード相補性でmRNAをダウンレギュレートする(Birmingham et al., Nat Methods 3: 199-204, 2006)。3'UTR内の複数の標的部位により、より強力なダウンレギュレーションが生じる(Doench et al., Genes Dev 17: 438-442, 2003)。

【0147】

公知のmiRNA配列の一覧は、とりわけ、Wellcome Trust Sanger Institute、Perm Center for Bioinformatics、Memorial Sloan Kettering Cancer Center、およびEuropean Molecule Biology Laboratoryなどの研究組織によって維持されているデータベースに見いだすことができる。公知の有効なsirRNA配列および同類の結合部位は関連性のある文献にも十分に示されている。RNAi分子は当技術分野で公知の技術によって容易に設計され、生成される。さらに、有効かつ特異的な配列モチーフを発見する見込みを増大させるコンピューターツールが存在する(Pei et al., 2006, Reynolds et al., 2004, Khvorova et al., 2003, Schwarz et al., 2003, Uiterlinden et al., 2004, Heale et al., 2005, Chalk et al., 2004, Amarzguioui et al., 2004)。

【0148】

RNA i 分子は遺伝子にコードされるRNAの発現をモジュレートする。複数の遺伝子が互いにある程度の配列相同性を共有し得るので、一部の実施形態では、RNA i 分子を、十分な配列相同性を有する遺伝子のクラスを標的とするように設計することができる。一部の実施形態では、RNA i 分子は、異なる遺伝子標的の間で共有される配列または特定の遺伝子標的に特有の配列に対する相補性を有する配列を含有し得る。一部の実施形態では、RNA i 分子を、いくつかの遺伝子の間で相同性を有し、それにより、遺伝子ファミリー内のいくつかの遺伝子（例えば、異なる遺伝子アイソフォーム、スプライスバリエント、変異体遺伝子など）を標的とするRNA配列の保存された領域を標的とするように設計することができる。一部の実施形態では、RNA i 分子を、単一の遺伝子の特定のRNA配列に特有の配列を標的とするように設計することができる。

10

【0149】

一部の実施形態では、RNA i 分子は、接続核形成分子、例えばCTCF、コヒーシン、USF1、YY1、TATAボックス結合タンパク質関連因子3（TAF3）、ZNF143、もしくはアンカー配列媒介性接続の形成を促進する別のポリペプチド、またはエピジェネティック修飾剤、例えば、これだけに限定されないが、DNAMethylase（例えば、DNMT3a、DNMT3b、DNMTL）、DNAの脱メチル化（例えば、TETファミリー酵素は、5-メチルシトシンの5-ヒドロキシメチルシトシンおよびより高次の酸化誘導体への酸化を触媒する）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストン脱アセチル化酵素（例えば、HDAC1、HDAC2、HDAC3）、サーチュイン1、2、3、4、5、6、もしくは7、リシン特異的ヒストンデメチラーゼ1（LSD1）、ヒストン-リシン-N-メチルトランスフェラーゼ（Setdb1）、真性染色質ヒストン-リシン-N-メチルトランスフェラーゼ2（G9a）、ヒストン-リシン-N-メチルトランスフェラーゼ（SUV39H1）、ゼステホモログ2（EZH2）のエンハンサー、ウイルスリシンメチルトランスフェラーゼ（vSET）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（SET2）、タンパク質-リシン-N-メチルトランスフェラーゼ（SMYD2）などを含む、翻訳後修飾に関与する酵素内の配列を標的とする。一実施形態では、RNA i 分子は、タンパク質脱アセチル化酵素、例えば、サーチュイン1、2、3、4、5、6、または7を標的とする。一実施形態では、本発明は、接続核形成分子、例えばCTCFを標的とするRNA i を含む組成物を含む。

20

【0150】

一部の実施形態では、部位特異的APOB標的化成分はペプチドまたはタンパク質成分（protein moiety）を含む。一部の実施形態では、部位特異的遮断剤は融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、エフェクターはcαペプチドまたはタンパク質成分である。ペプチドまたはタンパク質成分としては、これだけに限定されないが、細胞外受容体などの受容体に結合するペプチドリガンド、抗体断片、または標的化アプタマー、神経ペプチド、ホルモンペプチド、ペプチド薬物、毒性ペプチド、ウイルスまたは微生物ペプチド、合成ペプチド、およびアゴニストまたはアンタゴニストペプチドを挙げることができる。

30

【0151】

例示的なペプチドまたはタンパク質としては、DNA結合性タンパク質、CRISPR構成成分タンパク質、接続核形成分子、ドミナントネガティブな接続核形成分子、エピジェネティック修飾剤、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。一部の実施形態では、ペプチドは、ヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、およびエピジェネティックCpG修飾因子、ならびに前記のいずれかの断片および組合せを含む。一部の実施形態では、ペプチドは、ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフ、ロイシンジッパー、Znフィンガー、TATAボックス結合性タンパク質、転写因子などのタンパク質のDNA結合ドメインを含む。

40

【0152】

ペプチドまたはタンパク質は、直鎖または分岐型であり得る。ペプチドまたはタンパク質成分は、約5～約200アミノ酸、約15～約150アミノ酸、約20～約125アミ

50

ノ酸、約 25 ～ 約 100 アミノ酸、またはこれらの間の任意の範囲の長さを有し得る。

【0153】

上記の通り、一部の実施形態では、本発明の部位特異的 APOB 標的化成分は融合タンパク質を含む。

【0154】

一部の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、APOB 発現制御領域を標的とする部位特異的 APOB 標的化成分およびエフェクター分子を含む。他の実施形態では、本発明の融合タンパク質はエフェクター分子を含む。含まれる例示的なエフェクター分子は下に記載されており、一部の実施形態では、例えば、ヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、例えば、転写エンハンサーまたは転写リプレッサー、およびエ

10

【0155】

例えば、部位特異的標的化成分は、gRNA、およびエフェクター、例えば、ヌクレアーゼ、例えば Cas9、例えば、野生型 Cas9、ニックアーゼ Cas9（例えば Cas9 D10A）、不活性型 Cas9（dCas9）、eSpCas9、Cpf1、C2C1、もしくは C2C3、またはそのようなヌクレアーゼをコードする核酸を含み得る。ヌクレアーゼおよび gRNA（複数可）の選択は、標的とされる変異がヌクレオチドの欠失であるか、置換であるか、または付加であるか、例えば、標的とされる配列に対するヌクレオチドの欠失であるか、置換であるか、または付加であるかによって決定される。触媒として不活性なエンドヌクレアーゼ、例えば不活性型 Cas9（dCas9、例えば D10A；H840A）と（1つまたは複数の）エフェクタードメインの全部または一部（例えば、生物学的に活性な部分）が繋がった融合物により、1つまたは複数の RNA 配列（例えば、これだけに制限されないが、本明細書に記載のジンクフィンガーアレイ、sgRNA、TALアレイ、ペプチド核酸を含む DNA 認識エレメント）によって組成物を特定の DNA 部位にガイドして、1つまたは複数の標的核酸配列の活性および／または発現をモジュレートする（例えば、DNA 配列をメチル化または脱メチル化する）ためにポリペプチドと連結することができるキメラタンパク質が作り出される。

20

【0156】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質は、例えば、CRISPR 関連タンパク質（Cas）ポリペプチドまたはその断片（例えば Cas9 ポリペプチドまたはその断片）およびエピジェネティック動員因子またはエピジェネティック CpG 修飾因子を含むエフェクター分子を含み得る。

30

一実施形態では、適切な Cas ポリペプチドは、酵素的に不活性な Cas ポリペプチド、例えば「不活性型 Cas ポリペプチド」または「dCas」ポリペプチドである。

【0157】

本明細書に記載の方法および組成物に適応可能な例示的な Cas ポリペプチドは下に記載されている。当技術分野で公知の方法を使用して、Cas ポリペプチドを本明細書に記載の種々の作用剤および／または分子のいずれかと融合することができる；そのように得られる融合分子は、種々の開示される方法に有用であり得る。

40

【0158】

一態様では、本発明は、DNA に作用するドメイン、例えばエフェクター（例えば、ヌクレアーゼドメイン、例えば Cas9 ドメイン、例えば、dCas9 ドメイン；DNA メチルトランスフェラーゼ、デメチラーゼ、デアミナーゼ）を含むタンパク質と、タンパク質を部位特異的標的配列にターゲティングする少なくとも 1 つのガイド RNA（gRNA）またはアンチセンス DNA オリゴヌクレオチドの組合せを含む組成物であって、ヒト細胞において、標的遺伝子の発現を変更するために有効である、組成物を含む。一部の実施形態では、酵素ドメインは Cas9 または dCas9 である。一部の実施形態では、タンパク質は 2 つの酵素ドメイン、例えば、dCas9 ドメインとメチラーゼドメインまたは

50

デメチラーゼドメインを含む。

【0159】

一態様では、本発明は、転写制御エレメント（例えば、ヌクレアーゼドメイン、例えば Cas9 ドメイン、例えば、dCas9 ドメイン；転写エンハンサー；転写リプレッサー）を含むドメイン、例えばエフェクターを含むタンパク質と、前記タンパク質を部位特異的標的配列にターゲティングする少なくとも1つのガイドRNA（gRNA）またはアンチセンスDNAオリゴヌクレオチドの組合せを含む組成物であって、ヒト細胞において、標的遺伝子の発現を変更するために有効である、組成物を含む。一部の実施形態では、酵素ドメインはCas9またはdCas9である。一部の実施形態では、タンパク質は、2つの酵素ドメイン、例えば、dCas9 ドメインと転写エンハンサードメインまたは転写リプレッサードメインを含む。

10

【0160】

本明細書で使用される場合、「エフェクタードメインの生物学的に活性な部分」は、エフェクタードメインの機能を維持する部分である（例えば、完全に、部分的に、最小に）（例えば、「最小」または「コア」ドメイン）。

【0161】

本明細書に記載のキメラタンパク質は、リンカー、例えばアミノ酸リンカーも含み得る。一部の態様では、リンカーは、2つまたはそれよりも多くのアミノ酸、例えば、1つまたは複数のGS配列を含む。一部の態様では、Cas9（例えば、dCas9）と2つまたはそれよりも多くのエフェクタードメイン（例えば、DNAメチラーゼまたはDNAの脱メチル化において役割を有する酵素またはタンパク質アセチルトランスフェラーゼまたは脱アセチル化酵素のもの）の融合物は、前記ドメイン間に散在するリンカー（例えば、GSリンカー）を1つまたは複数含む。一部の態様では、dCas9を2～5つのエフェクタードメインと散在するリンカーを用いて融合する。

20

【0162】

一部の実施形態では、部位特異的APOB標的化成分は、接続核形成分子、接続核形成分子をコードする核酸、またはこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続は、第1のアンカー配列と結合した第1の接続核形成分子、連続していない第2のアンカー配列と結合した第2の接続核形成分子、および第1の接続核形成分子と第2の接続核形成分子の会合によって媒介される。一部の実施形態では、接続核形成分子により、例えば競合的結合により、内因性の接続核形成分子とその結合部位の結合を中断することができる。

30

【0163】

接続核形成分子は、例えば、CTCF、コヒーシン、USF1、YY1、TATAボックス結合タンパク質関連因子3（TAF3）、ZNF143結合モチーフ、またはアンカー配列媒介性接続の形成を促進する別のポリペプチドであり得る。接続核形成分子は、内因性ポリペプチドまたは他のタンパク質、例えば転写因子、例えば自己免疫調節因子（AIRE）、別の因子、例えばX-不活化特異的転写物（XIST）、または目的の特定のDNA配列を認識するように、例えば、配列認識のためのジンクフィンガー、ロイシンジッパーまたはbHLHドメインを有するように操作された、操作されたポリペプチドであり得る。接続核形成分子により、アンカー配列媒介性接続の内部またはその周囲におけるDNA相互作用をモジュレートすることができる。例えば、接続核形成分子は、アンカー配列媒介性接続の形成または攪乱を変更する他の因子をアンカー配列に動員し得る。

40

【0164】

接続核形成分子はまた、ホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成のための二量体形成ドメインも有し得る。1つまたは複数の接続核形成分子、例えば、内因性のものおよび操作されたものは、相互作用してアンカー配列媒介性接続を形成し得る。一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続を安定化するために、接続核形成分子を、安定化ドメイン、例えば、凝集相互作用ドメインをさらに含むように操作する。一部の実施形態では、接続核形成分子を、標的配列を結合するように操作する、例えば、標的配列との結合親和性をモ

50

ジュレートする。一部の実施形態では、アンカー配列媒介性接続内のアンカー配列に対する選択された結合親和性を有する接続核形成分子を選択するかまたは操作する。接続核形成分子およびそれらの対応するアンカー配列は、CTCFに不活化変異を有する細胞および染色体コンフォメーション捕捉または3Cに基づく方法、例えば、Hi-Cまたはハイスループット配列決定を使用して、トポロジカルに関連するドメイン、例えば、CTCFの非存在下での遠位DNA領域または遺伝子座の間のトポロジカル相互作用を調査することによって同定することができる。長距離DNA相互作用も同定することができる。追加の解析は、コヒーシン、YY1またはUSF1、ZNF143結合モチーフなどのベイトを使用したChLA-PE T解析、およびベイトと関連する複合体を同定するためのMSを含み得る。

10

【0165】

B. エフェクター分子

本発明の組成物および方法に使用するためのエフェクター分子としては、生物活性をモジュレートする、例えば、酵素活性、遺伝子発現、細胞シグナル伝達、および細胞または器官の機能を増大または低減するものが挙げられる。本発明の好ましいエフェクター分子は、ヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、例えば、転写エンハンサーまたは転写リプレッサー、およびエピジェネティックCpG修飾因子、例えば、DNAメチラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素、および前記のいずれかの組合せである。

【0166】

20

追加のエフェクター活性は、転写または翻訳などの調節因子の活性をモジュレートするための結合性調節タンパク質も含み得る。エフェクター分子は、本明細書に記載の活性化因子または阻害剤（または「負のエフェクター」）機能も含み得る。別の例では、エフェクター分子は受容体への基質の結合を阻害し得、その活性化を阻害し得る、例えば、ナルトレキソンおよびナロキソンはオピオイド受容体に、それらを活性化することなく結合し、受容体のオピオイドと結合する能力を遮断する。エフェクター分子はまた、タンパク質の安定性／分解および／または転写物の安定性／分解もモジュレートし得る。例えば、ポリペプチド補因子であるユビキチンによりタンパク質に分解の印をつけることにより、タンパク質を分解の標的とすることができる。別の例では、エフェクター分子は酵素の活性部位を遮断することによって酵素活性を阻害する。例えば、メトトレキサートは、ジヒドロ葉酸レダクターゼに天然の基質よりも1000倍大きく密接に結合する、酵素ジヒドロ葉酸レダクターゼの補酵素であるテトラヒドロ葉酸の構造類似体であり、ヌクレオチド塩基合成を阻害する。

30

【0167】

一部の実施形態では、エフェクター分子は化学物質、例えば、シトシン（C）またはアデニン（A）をモジュレートする化学物質（例えば、亜硫酸水素Na、亜硫酸水素アンモニウム）である。一部の実施形態では、エフェクター分子は酵素活性を有する（メチルトランスフェラーゼ、デメチラーゼ、ヌクレアーゼ（例えばCas9）、デアミナーゼ）。一部の実施形態では、エフェクター分子はアンカー配列媒介性接続の形成またはRNAポリメラーゼとプロモーターの結合を立体的に妨げる。

40

【0168】

エフェクター活性を有するエフェクター分子は、本明細書に記載のPK／PDが低い小分子、ペプチド、融合タンパク質、核酸、ナノ粒子、アプタマー、または薬剤（pharmacological agent）のうちのいずれか1つであり得る。

【0169】

一部の実施形態では、エフェクター分子は阻害剤または「負のエフェクター分子」である。アンカー配列媒介性接続の形成をモジュレートする負のエフェクター分子に関しては、一部の実施形態では、負のエフェクター分子は、負のエフェクター分子が存在すると、存在しない場合と比較して内因性の核形成ポリペプチドの二量体化が減少することの特徴とする。例えば、一部の実施形態では、負のエフェクター分子は、内因性の核形成ポリペ

50

プチドの二量体形成ドメインまたはその二量体形成部分のバリエーションであるかまたはそれを含む。

【0170】

例えば、ある特定の実施形態では、ドミナントネガティブエフェクター、例えば、アンカー配列（例えば、CTCF結合性モチーフ）を認識し、それに結合するが、不活性（例えば、変異した）二量体形成ドメイン、例えば、機能的なアンカー配列媒介性接続を形成することができない二量体形成ドメインを有するタンパク質を使用することにより、アンカー配列媒介性接続を変更する（例えば、中断する）。例えば、CTCFのジンクフィンガードメインを、特定のアンカー配列に結合するように変更することができる一方で（隣接核酸を認識するジンクフィンガーを付加することによって）、操作されたCTCFと内因性形態のCTCFの相互作用が妨げられるようにホモ二量体化ドメインを変更する。

10

【0171】

一部の実施形態では、エフェクター分子は標的アンカー配列媒介性接続内のアンカー配列に対して選択された結合親和性を有する合成の接続核形成分子を含む（結合親和性は、標的アンカー配列に関連する内因性の接続核形成分子の親和性よりも少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれより高いまたは低いものであり得る。合成の接続核形成分子は、内因性の接続核形成分子に対して30~90%、30~85%、30~80%、30~70%、50~80%、50~90%のアミノ酸配列同一性を有し得る）。接続核形成分子は、例えば競合的結合を通じて、内因性の接続核形成分子とそのアンカー配列の結合を中断させ得る。一部のさらなる実施形態では、接続核形成分子を、アンカー配列媒介性接続内の新規のアンカー配列に結合するように操作する。

20

【0172】

一部の実施形態では、ドミナントネガティブエフェクター分子は、特定のDNA配列を認識するドメイン（例えば、配列特異性を付与する配列に挟まれた、アンカー配列、CTCFアンカー配列）、およびアンカリング配列の付近に立体的存在をもたらす第2のドメインを有する。第2のドメインは、ドミナントネガティブな接続核形成分子またはその断片、接続核形成分子配列認識に干渉するポリペプチド（例えば、ペプチド／核酸またはPNAのアミノ酸骨格）、立体的干渉を付与する小分子とライゲーションした核酸配列、またはDNA認識エレメントと立体的遮断物の任意の他の組合せを含み得る。

30

【0173】

一部の実施形態では、エフェクター分子はエピジェネティック修飾剤である。本明細書に記載の方法および組成物に有用なエピジェネティック修飾剤としては、例えば、DNAメチル化、ヒストンアセチル化、およびRNA関連サイレンシングに影響を及ぼす作用剤が挙げられる。一部の実施形態では、エフェクターはエピジェネティック酵素（例えば、エピジェネティックマーク、例えばアセチル化および／またはメチル化を生成または除去する酵素）を配列特異的に標的とする。例示的なエピジェネティックエフェクターは、例えば転写制御エレメントまたはアンカー配列を含む発現制御領域を、部位特異的標的化成分を含む部位特異的遮断剤によって標的とし得る。

40

【0174】

一部の実施形態では、エフェクター分子は遺伝子編集系の1つまたは複数の構成成分を含む。遺伝子編集系の構成成分は、遺伝子編集を含むがこれだけに限定されない種々の状況において使用することができるものである。例えば、そのような構成成分を使用して、APOB配列を物理的に改変する、遺伝子改変する、および／またはエピジェネティックに改変する作用剤を標的とすることができる。

【0175】

例示的な遺伝子編集系としては、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）系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、および転写活性化因子様エフェクターに基づくヌクレアーゼ（TALEN）が挙げられる。ZFN、TALEN

50

N、およびCRISPRに基づく方法は、例えば、Gaj et al. Trends Biotechnol. 31.7 (2013): 397-405に記載されている；遺伝子編集のCRISPR法は、例えば、Guan et al., Application of CRISPR-Cas system in gene therapy: Pre-clinical progress in animal model. DNA Repair 2016 July 30 [Epub ahead of print]；Zheng et al., Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. BioTechniques, Vol. 57, No. 3, September 2014, pp. 115-124；に記載されている。

10

【0176】

CRISPR系は、初めは細菌および古細菌において発見された適応性の防御系である。CRISPR系では、CRISPR関連エンドヌクレアーゼまたは「Cas」エンドヌクレアーゼと称されるRNA誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Cas9またはCpf1）が外来DNAを切断するために使用される。典型的なCRISPR/Cas系では、一本鎖DNAまたは二本鎖DNA配列を標的とする配列特異的な非コード「ガイドRNA」により、エンドヌクレアーゼが標的ヌクレオチド配列（例えば、配列が編集されるゲノム内の部位）に方向づけられる。3つのクラス（I~III）のCRISPR系が同定されている。クラスII CRISPR系では、単一のCasエンドヌクレアーゼ（複数のCasタンパク質ではなく）が使用される。クラスII CRISPR系の1つは、Cas9などのII型Casエンドヌクレアーゼ、CRISPR RNA（「crRNA」）、およびトランス活性化crRNA（「tracrRNA」）を含む。crRNAは、標的DNA配列に対応する、一般には約20ヌクレオチドのRNA配列である「ガイドRNA」を含有する。crRNAは、tracrRNAに結合して部分的に二本鎖の構造を形成する領域も含有し、当該領域がRNase IIIによって切断され、それにより、crRNA/tracrRNAハイブリッドが生じる。次いで、crRNA/tracrRNAハイブリッドによりCas9エンドヌクレアーゼが標的DNA配列を認識し、切断するように方向づけられる。標的DNA配列は、一般に、所与のCasエンドヌクレアーゼに特異的である「プロトスペーサー隣接モチーフ」（「PAM」）に隣接していなければならない；しかし、PAM配列は所与のゲノム全体を通して出現する。種々の原核生物種から同定されたCRISPRエンドヌクレアーゼは特有のPAM配列要件を有する；PAM配列の例としては、5'-NGG (*Streptococcus pyogenes*)、5'-NNAGAA (*Streptococcus thermophilus* CRISPR1)、5'-NGGNG (*Streptococcus thermophilus* CRISPR3)、および5'-NNNGATT (*Neisseria meningitidis*) が挙げられる。一部のエンドヌクレアーゼ、例えばCas9エンドヌクレアーゼはGに富むPAM部位、例えば5'-NGGに関連し、PAM部位の3ヌクレオチド上流（5'側）の場所において標的DNAの平滑末端切断を行う。別のクラスII CRISPR系は、Cas9よりも小さいV型エンドヌクレアーゼCpf1を含む；例としては、AsCpf1 (*Acidaminococcus* sp. 由来) およびLbCpf1 (*Lachnospiraceae* sp. 由来) が挙げられる。Cpf1関連CRISPRアレイはtracrRNAを必要とせずに成熟crRNAにプロセッシングされる；言い換えれば、Cpf1系では、標的DNA配列を切断するためにCpf1ヌクレアーゼおよびcrRNAのみが必要である。Cpf1エンドヌクレアーゼはTに富むPAM部位、例えば5'-TTNと関連する。Cpf1は5'-CTA PAMモチーフも認識する。Cpf1は、4ヌクレオチドまたは5ヌクレオチドの5'突出を伴うオフセットまたは互い違いの二本鎖切断を導入することによって標的DNAを切断する、例えば、コード鎖のPAM部位の18ヌクレオチド下流（3'側）および相補鎖のPAM部位の23ヌクレオチド下流に位置する5ヌクレオチドのオフセットまたは互い違いの切断で標的DNAを切断す

20

30

40

50

る；そのようなオフセット切断の結果生じる5ヌクレオチド突出により、平滑末端切断DNAにおける挿入によるよりも相同組換えによるDNA挿入による正確なゲノム編集が可能になる。例えば、Zetsche et al. (2015) Cell, 163: 759-771を参照されたい。

【0177】

種々のCRISPR関連(Cas)遺伝子またはタンパク質を本発明に使用することができ、Casタンパク質の選択は方法の特定の条件に依存する。

【0178】

Casタンパク質の特定の例としては、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Cpf1、C2C1、またはC2C3を含むクラスII系が挙げられる。一部の実施形態では、Casタンパク質、例えばCas9タンパク質は種々の原核生物種のいずれに由来するものであってもよい。一部の実施形態では、特定のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を認識するように、特定のCasタンパク質、例えば、特定のCas9タンパク質を選択する。一部の実施形態では、部位特異的標的化成分は、ポリペプチド、例えば酵素、例えばCas9を標的とする配列を含む。ある特定の実施形態では、Casタンパク質、例えばCas9タンパク質を細菌または古細菌から得ることもでき、公知の方法を使用して合成することもできる。ある特定の実施形態では、Casタンパク質はグラム陽性菌またはグラム陰性菌に由来し得る。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、Streptococcus (例えば、S. pyogenes、S. thermophilus)、Corynebacterium、Haemophilus、Eubacterium、Pasteurella、Prevotella、Veillonella、またはMarinobacterに由来するものであってもよい。一部の実施形態では、例えば、同じ、同様のまたは異なるPAMモチーフを含む部位の認識および改変を可能にするために、2つもしくはそれよりも多くの異なるCasタンパク質または2つもしくはそれよりも多くのCasタンパク質をコードする核酸を細胞、接合子、胚、または動物に導入することができる。一部の実施形態では、Casタンパク質は、ヌクレアーゼが不活化されるように改変されたもの、例えば、ヌクレアーゼ欠損Cas9、および転写活性化因子またはリプレッサー、例えば、E. coli Polの共サブユニット、VP64、p65の活性化ドメイン、KRAB、またはSID4Xを動員するように改変されたもの、エピジェネティック修飾を誘導するように改変されたもの、例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼおよびデメチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼおよびDNAの脱メチル化において役割を有する酵素(例えば、TEFファミリー酵素は、5-メチルシトシンの5-ヒドロキシメチルシトシンおよびより高次の酸化誘導体への酸化を触媒する)である。

【0179】

遺伝子編集のために、CRISPRアレイを、所望の標的DNA配列に対応する1つまたは複数のガイドRNA配列を含有するように設計することができる；例えば、Cong et al. (2013) Science, 339: 819-823; Ran et al. (2013) Nature Protocols, 8: 2281-2308を参照されたい。Cas9ではDNA切断を生じさせるために少なくとも約16または17ヌクレオチドのgRNA配列が必要であり、Cpf1に関しては検出可能なDNA切断を実現するために少なくとも約16ヌクレオチドのgRNA配列が必要である。

【0180】

野生型Cas9はgRNAにより標的とされる特定のDNA配列における二本鎖切断(DSB)を生じさせるが、機能性が改変されたいくつかのCRISPRエンドヌクレアーゼが利用可能であり、例えば、Cas9の「ニッカーゼ」バージョンは一本鎖切断のみを生じさせ、触媒として不活性なCas9(「dCas9」)は標的DNAをカットしないが、立体的障害によって転写に干渉する。dCas9を異種エフェクターとさらに融合して、標的遺伝子の発現を抑止する(CRISPRi)または活性化する(CRISPRa

）ことができる。例えば、Cas9を転写サイレンサー（例えば、KRABドメイン）または転写活性化因子（例えば、dCas9-VP64融合物）と融合することができる。FokIヌクレアーゼと融合した触媒として不活性なCas9（dCas9）（「dCas9-FokI」）を使用して、2つのgRNAと相同な標的配列においてDSBを生じさせることができる。例えば、Addgene repository（Addgene、75 Sidney St.、Suite 550A、Cambridge、MA 02139；addgene.org/crispr）に開示されており、公的に入手可能な多数のCRISPR/Cas9プラスミドを参照されたい。それぞれが別々のガイドRNAによって方向づけられる2つの別々の二本鎖切断を導入する「2重ニックーゼ」Cas9が、より正確なゲノム編集を実現するものとしてRan et al.（2013）Cell，154：1380-1389に記載されている。

10

【0181】

真核生物の遺伝子を編集するためのCRISPR技術は、米国特許出願公開第2016/0138008A1号およびUS2015/0344912A1、ならびに米国特許第8,697,359号、同第8,771,945号、同第8,945,839号、同第8,999,641号、同第8,993,233号、同第8,895,308号、同第8,865,406号、同第8,889,418号、同第8,871,445号、同第8,889,356号、同第8,932,814号、同第8,795,965号、および同第8,906,616号に開示されている。Cpf1エンドヌクレアーゼおよび対応するガイドRNAおよびPAM部位は米国特許出願公開第2016/0208243 A1号に開示されている。

20

【0182】

一部の実施形態では、エフェクターは本明細書で前記のCRISPR系の1つまたは複数の構成成分を含む。

【0183】

一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエフェクターとしては、例えば、ヌクレアーゼ、物理的遮断因子、エピジェネティック動員因子、例えば、転写エンハンサーまたは転写リプレッサー、およびエピジェネティックCpG修飾因子、例えば、DNAメチラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストン修飾剤、またはヒストン脱アセチル化酵素、および前記のいずれかの組合せが挙げられる。

30

【0184】

例示的なエフェクターとしては、ユビキチン、ユビキチンリガーゼ阻害剤のような二環式ペプチド、転写因子、DNAおよびタンパク質修飾酵素、例えば、トポイソメラーゼ、トポカンなどのトポイソメラーゼ阻害剤、DNMTファミリー（例えば、DNMT3a、DNMT3b、DNMTL）などのDNAメチルトランスフェラーゼ、タンパク質メチルトランスフェラーゼ（例えば、ウイルスリシンメチルトランスフェラーゼ（vSET）、タンパク質-リシンN-メチルトランスフェラーゼ（SMYD2）、デアミナーゼ（例えば、APOBEC、UG1）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、例えば、ゼステホモログ2（EZH2）のエンハンサー、PRMT1、ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ（Setdb1）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（SET2）、真性染色質ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ2（G9a）、ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ（SUV39H1）、およびG9a）、ヒストン脱アセチル化酵素（例えば、HDAC1、HDAC2、HDAC3）、DNAの脱メチル化において役割を有する酵素（例えば、TETファミリー酵素は、5-メチルシトシンの5-ヒドロキシメチルシトシンおよびより高次の酸化誘導体への酸化を触媒する）、KDMAおよびリシン特異的ヒストンデメチラーゼ1（LSD1）などのタンパク質デメチラーゼ、DHX9などのヘリカーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、脱アセチル化酵素（例えば、サーチュイン1、2、3、4、5、6、または7）、キナーゼ、ホスファターゼ、臭化エチジウム、sybrグリーン、およびプロフラビンなどのDNA挿入剤、ペプチド模倣体様フェニルアラニンアルギニル-ナフチルアミドまたはキノリン誘導体、核受容体活

40

50

性化因子および阻害剤などの排出ポンプ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、リソソーム蓄積症に關与するものなどの酵素の競合阻害剤、ジンクフィンガータンパク質、T A L E N、K R A Bドメイン、V P 6 4ドメイン、p 3 0 0ドメイン（例えば、p 3 0 0コアドメイン）、M e C P 2ドメイン、M Q 1ドメイン、D N M T 3 a - 3 Lドメイン、T E T 1ドメイン、および／またはT E T 2ドメインなどのタンパク質由来の特定のドメイン、タンパク質合成阻害剤、ヌクレアーゼ（例えば、C p f 1、C a s 9、ジンクフィンガーヌクレアーゼ）、これらの1つまたは複数の融合物（例えば、d C a s 9 - D N M T、d C a s 9 - A P O B E C、d C a s 9 - U G L、d C a s 9 - V P 6 4、d C a s 9 - p 3 0 0コア、d C a s 9 - K R A B、d C a s 9 - K R A B - M e C P 2、d C a s 9 - M Q 1、d C a s 9 - D N M T 3 a - 3 L、およびd C a s 9 - T E T 1 / T E T 2）が挙げられる。

10

【0185】

一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なヌクレアーゼは、C a s 9ポリペプチドまたは酵素的に活性なその一部を含む。一実施形態では、C a s 9ポリペプチドまたは酵素的に活性なその一部は、ヒトエキソヌクレアーゼ1（h E X O 1）の触媒として活性なドメイン、例えば、5' → 3'エキソヌクレアーゼ活性および／またはR N a s e H活性をさらに含む。他の実施形態では、適切なヌクレアーゼは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）を含む。さらに他の実施形態では、適切なヌクレアーゼはジンクフィンガータンパク質を含む。

【0186】

T A L E Nという用語は、本明細書で使用される場合、広範なものであり、別のT A L E Nの補助なしで二本鎖DNAを切断することができる単量体T A L E Nを含む。T A L E Nという用語は、また、共に働いて同じ部位のDNAを切断する操作されたT A L E Nの対の一方のメンバーまたは両方のメンバーを指すようにも使用される。共に働くT A L E Nは、左側T A L E Nおよび右側T A L E Nと称される場合があり、これはDNAの掌性に言及するものである。全てその全体が参照により本明細書に組み込まれるU S S N 1 2 / 9 6 5, 5 9 0; U S S N 1 3 / 4 2 6, 9 9 1 (U S 8, 4 5 0, 4 7 1); U S S N 1 3 / 4 2 7, 0 4 0 (U S 8, 4 4 0, 4 3 1); U S S N 1 3 / 4 2 7, 1 3 7 (U S 8, 4 4 0, 4 3 2); およびU S S N 1 3 / 7 3 8, 3 8 1を参照されたい。

20

【0187】

T A Lエフェクターは、X a n t h o m o n a s細菌によって分泌されるタンパク質である。DNA結合ドメインは、12番目および13番目のアミノ酸は例外として高度に保存された33～34アミノ酸の配列を含有する。これらの2つの場所は高度に可変性であり（反復可変二残基（R V D））、特定のヌクレオチド認識との強力な相関を示す。アミノ酸配列とDNA認識のこの単純な関連性により、適当なR V Dを含有するリピートセグメントの組合せを選択することによって特定のDNA結合ドメインを操作することが可能になっている。

30

【0188】

F o k Iエンドヌクレアーゼの末端由来の非特異的DNA切断ドメインを使用して、酵母アッセイにおいて活性なハイブリッドヌクレアーゼを構築することができる。これらの試薬は、植物細胞および動物細胞においても活性である。最初のT A L E N試験では、野生型F o k I切断ドメインを使用した。一部のその後のT A L E N試験では、切断特異性および切断活性が改善されるように設計された変異を有するF o k I切断ドメインバリエーションも使用した。F o k Iドメインは二量体として機能し、標的ゲノム内の部位に対する特有のDNA結合ドメインを有する2つの構築物を適当な配向および間隔で必要とする。T A L E N DNA結合ドメインとF o k I切断ドメインの間のアミノ酸残基の数および2つの個々のT A L E N結合部位の間の塩基の数はどちらも高レベルの活性の実現に關するパラメータである。T A L E N DNA結合ドメインとF o k I切断ドメインの間のアミノ酸残基の数は、複数のT A Lエフェクターリピート配列とF o k Iエンドヌクレアーゼドメインの間にスペーサー（スペーサー配列とは別個のもの）を導入することによ

40

50

て改変することができる。スパーサー配列は、12ヌクレオチドから30ヌクレオチドの間であり得る。

【0189】

アミノ酸配列とTALEN結合ドメインによるDNA認識との間の関連性により、設計可能なタンパク質が可能になる。この場合、TALE結合ドメイン内で反復配列の不適當なアニーリングが見いだされるので、人工的な遺伝子合成には問題がある。この解決法の1つは、公的に入手可能なソフトウェアプログラム(DNAWorks)を使用して、二段階PCR；オリゴヌクレオチドアセンブリ、その後、全遺伝子増幅でのアセンブリに適したオリゴヌクレオチドの算出を行うことである。操作されたTALE構築物を生成するためのいくつかのモジュラーアセンブリスキームも報告されている。どちらの方法も、ジンクフィンガーDNA認識ドメインを生成するためのモジュラーアセンブリ方法と概念的に同様のDNA結合ドメインを操作するための系統的手法をもたらすものである。

10

【0190】

TALEN遺伝子がアセンブリされたら、それらをプラスミドに挿入する；次いで、プラスミドを使用して標的細胞にトランスフェクトし、そこで遺伝子産物が発現し、核内に進入してゲノムにアクセスする。TALENを使用して、細胞が修復機構で応答する二本鎖切断(DSB)を誘導することによってゲノムを編集することができる。このように、TALENを、例えば、疾患を引き起こすゲノム内の変異を補正するために使用することができる。

20

【0191】

本明細書で使用される場合、「ジンクフィンガーポリペプチド」または「ジンクフィンガータンパク質」は、ジンクフィンガーとして公知の金属により安定化されたドメインによってDNA、RNAおよび／またはタンパク質に配列特異的に結合するタンパク質である。ジンクフィンガータンパク質は、DNA切断ドメインおよびDNA結合性ジンクフィンガードメインを有するヌクレアーゼである。ジンクフィンガーポリペプチドは、エンドヌクレアーゼの非特異的DNA切断ドメインと部位特異的DNA結合性ジンクフィンガードメインを融合することによって作製することができる。そのようなヌクレアーゼは、遺伝子編集のための強力なツールであり、ゲノムDNA内に二本鎖切断(DSB)を部位特異的に誘導するためにアセンブリすることができる。ZFNにより、DNA修復の間の特定の遺伝子破壊が可能になり、標的とする遺伝子を変異原性非相同末端結合(NHEJ)によって中断すること、または、密接に関連するDNA鑄型が供給される場合には相同組換え(HR)によって改変することができる。

30

【0192】

ジンクフィンガーヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼFokIの非特異的DNA切断ドメインと部位特異的DNA結合性ジンクフィンガードメインを融合することによって作製されたキメラ酵素である。ジンクフィンガータンパク質(ZFP)の柔軟な性質に起因して、ゲノムDNA内に二本鎖切断(DSB)を部位特異的に誘導するZFNをアセンブルすることができる。ZFNにより、DNA修復の間の特定の遺伝子破壊が可能になり、標的とする遺伝子を変異原性非相同末端結合(NHEJ)によって中断すること、または、密接に関連するDNA鑄型が供給される場合には相同組換え(HR)によって改変することができる。

40

【0193】

一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切な物理的遮断因子は、gRNA、アンチセンスDNA、または転写制御エレメントまたはアンカリング配列を立体的に遮断する三重鎖形成性オリゴヌクレオチド(発現制御単位を標的とし得る)を含む。gRNAは特定のDNA配列を認識し、例えば接続核形成分子配列に干渉して、立体的遮断物として作用する配列をさらに含む。一部の実施形態では、gRNAを、立体的存在として作用する1つまたは複数のペプチド、例えばS-アデノシルメチオニン(SAM)と組み合わせる。他の実施形態では、物理的遮断因子は、酵素的に不活性なCas9ポリペプチドまたはその断片(例えば、dCas9)を含む。

50

【0194】

一実施形態では、エピジェネティック動員因子により、標的遺伝子の転写を活性化させるまたは増強する。一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエピジェネティック動員因子は、VP64ドメインまたはp300コアドメインを含む。

【0195】

一実施形態では、エピジェネティック動員因子により、標的遺伝子の転写をサイレンシングするまたは抑止する。一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエピジェネティック動員因子は、KRABドメイン、またはMeCP2ドメインを含む。

10

【0196】

一実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエピジェネティック動員因子は、dCas9-VP64融合物、dCas9-p300コア融合物、dCas9-KRAB融合物、またはdCas9-KRAB-MeCP2融合物を含む。

【0197】

本明細書で使用される場合、「VP64」は、グリシン-セリン（GS）リンカーで接続したVP16（単純ヘルペスウイルスタンパク質16、アミノ酸437～447*：DALDDFDLDM L）の4つのタンデムなコピーで構成される転写活性化因子である。一実施形態では、VP64は、C末端に転写因子p65およびRtaをさらに含む。

20

【0198】

本明細書で使用される場合、「p300コアドメイン」は、ヒトアセチルトランスフェラーゼp300の触媒コアを指す。

【0199】

本明細書で使用される場合、「KRAB」は、ヒトジンクフィンガータンパク質に基づく転写因子（KRABジンクフィンガータンパク質）内に存在するクルッペル関連ボックス（KRAB）転写抑止ドメインを指す。

【0200】

本明細書で使用される場合、「MeCp2」は、例えば、メチル化DNAを含むプロモーターに結合することによって転写を抑止するメチルCpG結合性タンパク質2を指す。

30

【0201】

一実施形態では、エピジェネティックCpG修飾因子によりDNAをメチル化し、転写を不活化するまたは抑止する。一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエピジェネティックCpG修飾因子は、MQ1ドメインまたはDNMT3a-3Lドメインを含む。

【0202】

一実施形態では、エピジェネティックCpG修飾因子によりDNAを脱メチル化し、転写を活性化するまたは刺激する。一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエピジェネティック動員因子は、TET1またはTET2ドメインを含む。

40

【0203】

本明細書で使用される場合、「MQ1」は、原核生物DNAメチルトランスフェラーゼを指す。

【0204】

本明細書で使用される場合、「DNMT3a-3L」は、DNAメチルトランスフェラーゼであるDnmt3aと、触媒として不活性であるがDnmt3aの触媒ドメインと直接相互作用するDnmt3Lの融合物を指す。

【0205】

本明細書で使用される場合、「TET1」は、TET1遺伝子によってコードされるTETファミリーの酵素のメンバーである「10-11転座メチルシトシンジオキシゲナー

50

ゼ1」を指す。TET1は、哺乳動物における活性なDNAの脱メチル化の最初のステップである、修飾されたDNA塩基5-メチルシトシン(5-mC)の5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)への、鉄およびアルファ-ケトグルタル酸依存的な5-mCの酸化による変換を触媒するジオキシゲナーゼである。シトシン塩基のC5位におけるメチル化は、転写調節において重要な役割を果たす哺乳動物ゲノムのエピジェネティック修飾である。DNAの脱メチル化におけるその役割に加えて、クロマチン調節においてより一般的な役割を果たす。転写的に活性な遺伝子およびポリコムにより抑止された遺伝子の両方のプロモーターのCpGに富む配列に優先的に結合する。活性な遺伝子のCpGに富む転写開始部位へのO-GlcNAcトランスフェラーゼOGTの動員に関与し、それにより、OGTによるヒストンH2B GlcNAc化を促進する。例示的なTET1ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、GenBank受託番号：NM_030625.3、NP_085128.2に見いだすことができる。

10

【0206】

本明細書で使用される場合、「TET2」は、TET1遺伝子によってコードされるTETファミリーの酵素のメンバーである「10-11転座2(TET2)」を指す。TET1と同様に、TET2は、修飾されたゲノム塩基5-メチルシトシン(5mC)の5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)への変換を触媒するジオキシゲナーゼであり、活性なDNAの脱メチル化において重要な役割を果たす。TET2はCpGモチーフ内の5-ヒドロキシメチルシトシンを優先。TET2はまた、その後の5hmCの5-ホルミルシトシン(5fC)への変換、および5fCの5-カルボキシルシトシン(5caC)への変換も媒介する。5mCの5hmC、5fCおよび5caCへの変換は、おそらくシトシン脱メチル化の第1のステップを構成する。シトシン塩基のC5位におけるメチル化は、転写調節において重要な役割を果たす哺乳動物ゲノムのエピジェネティック修飾である。DNAの脱メチル化におけるその役割に加えて、活性な遺伝子のCpGに富む転写開始部位へのO-GlcNAcトランスフェラーゼOGTの動員にも関与し、それにより、OGTによるヒストンH2B GlcNAc化を促進する。例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列はGenbank受託番号：NM_001127208.2、NP_001120680.1に見いだすことができる。

20

【0207】

一部の実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエピジェネティック動員因子は、MQ1ドメイン、DNMT3a-3L、TET1またはTET2ドメインを含む。一実施形態では、本発明の作用剤、組成物、および方法に使用するための適切なエピジェネティック動員因子は、dCas9-MQ1融合物、dCas9-DNMT3a-3L融合物、またはdCas9-TET1融合物またはdCase9-TET2融合物を含む。

30

【0208】

III. 本発明の部位特異的APOB遮断剤および本発明の部位特異的APOB遮断剤を含む組成物の送達

本発明の遮断剤の、細胞、例えばヒト対象(例えば、APOB関連障害、例えば硬変症を有する対象などの、それを必要とする対象)などの対象内の細胞への送達は、いくつかの異なるやり方で実現することができる。例えば、細胞に本発明の遮断剤を*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*のいずれかで接触させることによって送達を実施することができる。*in vivo*送達は、遮断剤を含む脂質組成物などの組成物を対象に投与することによって直接実施することができる。あるいは、*in vivo*送達を、遮断剤をコードし、その発現を方向づける1つまたは複数のベクターを投与することによって間接的に実施することができる。これらの代替を下でさらに考察する。

40

【0209】

一部の実施形態では、遮断剤は、融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、融合タンパク質は、APOB発現制御領域を特異的に標的とし、それに結合する転写活性化因子様エフェクター(TALE)ポリペプチドまたはジンクフィンガー(ZNF)ポリペプチ

50

ドのDNA結合ドメインまたはその断片をコードするポリヌクレオチドなどの部位特異的APOB標的化成分と、VPRなどのエフェクター分子とを含む。

【0210】

他の実施形態では、遮断剤は、ガイドRNAおよびエフェクター分子をコードするmRNAを含む。ガイドRNAとmRNAの比は、約100:1~約1:100 (wt:wt) であり得る。

【0211】

一般に、本発明の部位特異的APOB遮断剤を送達する任意の方法 (in vitro、ex vivo、またはin vivo) を本発明の遮断剤との使用に適応させることができる (例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれるAkhtar S. and Julian R.L., (1992) Trends Cell. Biol. 2 (5) : 139-144およびWO94/02595を参照されたい)。

in vivo送達に関しては、本発明の部位特異的APOB遮断剤の送達のために考慮すべき因子としては、例えば、遮断剤の生物学的安定性、非特異的影響の防止、および標的組織内への遮断剤の蓄積が挙げられる。遮断剤の非特異的影響は、局部投与によって、例えば、組織に直接注射するかもしれない埋め込むこと、または遮断剤を含む組成物を局所に投与することによって最小化することができる。処置部位への局部投与により、遮断剤の局部濃度が最大になり、そうでなければ遮断剤によって害される恐れがあるかまたは遮断剤が分解される恐れがある、全身組織への遮断剤の曝露が制限され、投与される遮断剤の総用量を少なくすることが可能になる。

【0212】

APOB関連疾患などの疾患を処置するために部位特異的APOB遮断剤を全身性に投与することに関しては、遮断剤、例えば、核酸分子を含む部位特異的標的化成分を含む遮断剤を改変すること、あるいは薬物送達システムを使用して送達することができる; どちらの方法も、核酸分子を含む部位特異的標的化成分がin vivoでエンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼによって迅速に分解されることを防ぐように作用する。核酸分子を含む部位特異的標的化成分を含む遮断剤または医薬担体の改変により、遮断剤を標的組織にターゲティングすることおよび望ましくないオフターゲットの影響を回避することも可能になる。例えば、本発明の遮断剤を、細胞内取り込みを増強し、分解を防ぐために、コレステロールなどの親油基への化学的なコンジュゲーションによって改変することが

【0213】

あるいは、本発明の遮断剤を、ナノ粒子、デンドリマー、ポリマー、リポソーム、またはカチオン性送達系などの薬物送達システムを使用して送達することができる。正に荷電したカチオン性送達系では、遮断剤 (例えば、負に荷電した分子) の結合が容易になり、また、負に荷電した細胞膜における相互作用も増強されて、細胞による遮断剤の効率的な取り込みが可能になる。カチオン性脂質、デンドリマー、またはポリマーを、遮断剤と結合させること、または遮断剤を包む小胞もしくはミセルを形成するように誘導することができる (例えば、Kim S.H. et al., (2008) Journal of Controlled Release 129 (2) : 107-116を参照されたい)。小胞またはミセルの形成により、さらに、全身性に投与された場合の遮断剤の分解が防止される。カチオン性複合体を作製し、投与するための方法は十分に当業者の能力の範囲内に入る (例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるSorensen, D.R., et al. (2003) J. Mol. Biol. 327: 761-766; Verma, U.N. et al., (2003) Clin. Cancer Res. 9: 1291-1300; Arnold, A.S. et al. (2007) J. Hypertens. 25: 197-205を参照されたい)。本発明の遮断剤の全身送達に有用な薬物送達システムのいくつかの非限定的な例としては、DOTAP (Sorensen, D.R., et al. (2003), supra; Verma, U.N. et al., (2003), supra)、

Oligofectamine、「固体核酸脂質粒子」(Zimmermann, T S. et al., (2006) Nature 441: 111-114)、カルジオリピン(Chien, P Y. et al., (2005) Cancer Gene Ther. 12: 321-328; Pal, A. et al., (2005) Int J. Oncol. 26: 1087-1091)、ポリエチレンイミン(Bonnet ME. et al., (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)ペプチド(Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3: 472-487)、およびポリアミドアミン(Tomalita, DA. et al., (2007) Biochem. Soc. Trans. 35: 61-67; Yoo, H. et al., (1999) Pharm. Res. 16: 1799-1804)が挙げられる。一部の実施形態では、全身投与のために、遮断剤(例えば、gRNA、またはmRNA)をシクロデキストリンとの複合体にする。シクロデキストリンを投与するための方法およびシクロデキストリンを含む医薬組成物は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,427,605号に見いだすことができる。

10

【0214】

本発明の遮断剤を投与に適した医薬組成物に組み入れることができる。そのような組成物は、一般には、1つまたは複数の種の遮断剤および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という語は、医薬投与に適合するありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含むものとする。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および作用剤の使用は当技術分野において周知である。任意の従来媒体または作用剤が活性化合物と適合しない場合を除いて、の組成物へのそれらの使用が意図されている。補足的な活性化合物を組成物に組み入れることもできる。

20

【0215】

本発明の医薬組成物は、局所的処置が望まれるかまたは全身処置が望まれるかに応じて、および処置される領域に応じて、いくつかのやり方で投与することができる。投与は、局所(点眼、膣、直腸、鼻腔内、経皮)、経口、または非経口であり得る。非経口投与は、点滴静注、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射、または髄腔内もしくは脳室内投与を含む。

30

【0216】

投与の経路および部位は、部位特異的標的化成分を含む遮断剤の特定の場所への送達またはターゲティングが増強されるように選択することができる。例えば、肝細胞を標的とするためには、静脈内注射を使用することができる。肺細胞は遮断剤をエアロゾル形態で投与することによって標的とすることができる。空腸細胞は肛門への投与によって標的とすることができる。

【0217】

局所投与用の製剤としては、経皮吸収パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤(liquid)、および散剤を挙げることができる。従来の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが必要であり得るまたは望ましい。コーティングされたコンドーム、手袋なども有用であり得る。

40

【0218】

経口投与用の組成物としては、散剤または顆粒剤、水中懸濁剤または液剤(solution)、シロップ剤、エリキシル剤または非水性媒体、錠剤、カプセル剤、ロゼンジ剤、またはトロッチ剤が挙げられる。錠剤の場合では、使用することができる担体として、ラクトース、クエン酸ナトリウムおよびリン酸の塩が挙げられる。デンプン、ならびにステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなどの滑沢剤などの種々の崩壊剤が錠剤に一般に使用される。カプセル剤形態での経口投与に関しては、有用な希

50

釈剤はラクトースおよび高分子量のポリエチレングリコールである。経口使用のために水性懸濁剤が必要な場合には、核酸組成物を乳化剤および懸濁化剤と組み合わせることができる。所望であれば、ある特定の甘味剤または香味剤を添加することができる。

【0219】

静脈内投与用の組成物は、バッファー、希釈剤、および他の適切な添加剤も含有し得る滅菌水性液剤を含み得る。

【0220】

非経口投与用の製剤は、バッファー、希釈剤、および他の適切な添加剤も含有し得る滅菌水性液剤を含み得る。静脈内使用に関しては、調製物を等張にするように溶質の総濃度を制御することができる。

【0221】

一実施形態では、本発明の遮断剤組成物の投与は、非経口、例えば、静脈内（例えば、ボラスとしてまたは拡散注入として）、皮内、腹腔内、筋肉内、髄腔内、脳室内、頭蓋内、皮下、経粘膜、頬側、舌下、内視鏡的、直腸、経口、膈、局所、肺、鼻腔内、尿道、または眼である。投与は、対象によって、または別の人、例えば、健康管理提供者によってもたらされる。組成物は、正確に測られた用量で、または正確に測られた用量を送達するディスペンサー中に入れて提供することができる。選択される送達方式を下でより詳細に考察する。

【0222】

ある特定の実施形態では、本発明の遮断剤はmRNAなどのポリヌクレオチドであり、脂質ナノ粒子（LNP）として製剤化される。

【0223】

A. 本発明の部位特異的APOB遮断剤を含む組成物

本発明の部位特異的APOB遮断剤を、（1）安定性を増大させるため；（2）細胞トランスフェクションを増加させるため；（3）持続放出もしくは遅延放出（例えば、デポ製剤からの）を可能にするため；（4）体内分布を変更するため（例えば、遮断剤を特定の組織もしくは細胞型にターゲティングするため）；（5）コードされるタンパク質のin vivoでの翻訳を増加させるため；および／または（6）コードされるタンパク質のin vivoでの放出プロファイルを変更するために、1つまたは複数の賦形剤を使用して医薬組成物などの組成物へと製剤化することができる。ありとあらゆる溶媒、分散媒、希釈剤、または他の液体ビヒクルなどの従来の賦形剤に加えて、本発明の組成物に使用するための分散または懸濁補助剤、表面活性剤、等張化剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、賦形剤として、限定することなく、リピドイド（lipidoid）、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス、コアシェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、核酸分子、修飾された核酸分子、またはRNAをトランスフェクトした細胞（例えば、対象への移植用）、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣物およびこれらの組合せを挙げることができる。したがって、本発明の医薬組成物は、1つまたは複数の賦形剤を、それぞれ、一緒になって遮断剤の安定性を増大させる、遮断剤による細胞トランスフェクションを増加させる、修飾された核酸またはmRNAにコードされるタンパク質の発現を増加させる、および／または遮断剤の放出プロファイルを変更する量で含み得る。さらに、本発明の遮断剤は、自己組織化核酸ナノ粒子を使用して製剤化することができる（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0038612 A1号を参照されたい）。

【0224】

i. リピドイド

リピドイドの合成は、広範囲にわたって記載されており、これらの化合物を含有する製剤は、核酸分子を含む、例えば、修飾された核酸分子またはmRNAを含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤などの本発明の遮断剤の送達に特に適する（全てそれらの全体が本明細書に組み込まれるMahon et al., Bioconjug Chem. 2010 21: 1448-1454; Schroeder et al.,

10

20

30

40

50

J Intern Med. 2010 267: 9-21; Akin et al., Nat Biotechnol. 2008 26: 561-569; Love et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107: 1864-1869; Siegwart et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2011 108: 12996-3001を参照されたい)。
【0225】

例えば、リポイドは、二本鎖低分子干渉RNA分子、一本鎖核酸分子、修飾された核酸分子または修飾されたmRNAを有効に送達するために使用されている（例えば、米国特許公開第2016/0038612A1号を参照されたい）。これらのリポイドを含む有する複合体、ミセル、リポソームまたは粒子を調製し、したがって、核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分の有効な送達をもたらすことができ、これは、リポイド製剤を例えば局部投与および／または全身投与によって投与した後のコードされるタンパク質の産生によって判断される。リポイド複合体は、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、腹腔内経路または皮下経路を含むがこれだけに限定されない種々の手段によって投与することができる。

【0226】

例えば核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分のin vivo送達は、製剤の組成、粒子PEG化の性質、負荷の度合い、ポリヌクレオチドと脂質の比、および、これだけに限定されないが、粒子サイズなどの生物物理的パラメータを含むがこれだけに限定されない多くのパラメータの影響を受け得る（Akin et al., Mol Ther. 2009 17: 872-879；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。例として、ポリ（エチレングリコール）（PEG）脂質のアンカー鎖長の小さな変化により、in vivoにおける有効性に対する有意な影響が生じ得る。ペンタ[3-（1-ラウリルアミノプロピオニル）]ートリエチレンテトラミン塩酸塩（TEA-5LAP；別名98NI2-5、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるMurugai et al., Analytical Biochemistry, 401: 61（2010）を参照されたい）、C12-200（誘導体およびバリエーションを含む）、およびMD1を含むがこれだけに限定されない、異なるリポイドを用いた製剤を使用することができる。

【0227】

一実施形態では、例えば核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を、リポイドを用いて、肝臓の細胞を標的とするための全身静脈内投与用に製剤化する。例えば、核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤、および42%98NI2-5、48%コレステロール、および10%PEG-脂質のモル組成の脂質を含み、総脂質と核酸分子の最終的な重量比が約7.5:1であり、PEG脂質上のアルキル鎖長がC14であり、平均粒子サイズが大まかに50~60nmである最終的な最適化された静脈内製剤では、肝臓に対して90%を超える製剤の分布がもたらされ得る（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるAkin et al., Mol Ther. 2009 17: 872-879を参照されたい）。別の例では、C12-200/ジステロイルホスファチジルコリン/コレステロール/PEG-DMGのモル比が50/10/38.5/1.5であり、総脂質と核酸分子の重量比が7:1であり、平均粒子サイズが80nmである、C12-200リポイド（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2010/129709号を参照されたい）を使用した静脈内製剤を使用して、核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を肝細胞に送達することができる（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるLove et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107: 1864-1869を参照されたい）。別の実施形態では、MD1リポイドを含む製剤を使用して、核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤をin vivoで肝細胞に有効に送達することができる。筋肉内または皮下経路用の最適化されたリポイド製剤の特徴は標的細胞型および製剤の細胞外マトリックスを通

10

20

30

40

50

じて血流中に拡散する能力に応じて有意に変動し得る。有効な肝細胞への送達のためには、内皮窓のサイズに起因して、150nm未満の粒子サイズが所望であり得るが（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるAkinc et al., Mol Ther. 2009 17: 872-879を参照されたい）、内皮細胞、骨髄性細胞、および筋肉細胞を含むがこれだけに限定されない他の細胞型に製剤を送達するためのリポイドにより製剤化された核酸分子の使用は同様にサイズが限定されない場合がある。骨髄性細胞および内皮などの他の肝細胞ではない細胞にsiRNAをin vivoで送達するためのリポイド製剤の使用が報告されている（それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるAkinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26: 561-569; Leuschner et al., Nat Biotechnol. 2011 29: 1005-1010; Cho et al. Adv. Funct. Mater. 2009 19: 3112-3118; 8th International Judah Folkman Conference, Cambridge, Mass. Oct. 8-9, 2010を参照されたい）。単球などの骨髄性細胞への送達に関して、リポイド製剤は同様の構成成分のモル比を有し得る。肝細胞、骨髄性細胞、筋肉細胞などを含むがこれだけに限定されない異なる細胞型への送達のために製剤を最適化するために、異なる比のリポイドならびにジステロイルホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG-DMGを含むがこれだけに限定されない他の構成成分を使用することができる。例えば、構成成分モル比としては、これだけに限定されないが、50%CI2-200、10%ジステロイルホスファチジルコリン、38.5%コレステロール、および1.5%PEG-DMGを挙げることができる（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるLeuschner et al., Nat Biotechnol 2011 29: 1005-1010を参照されたい）。細胞（例えば、これだけに限定されないが、脂肪細胞および筋肉細胞など）への皮下送達、皮内送達または筋肉内送達のいずれかによる局部送達のためのリポイド製剤の使用では、全身送達のために所望の製剤の構成成分の全てが必要であるとは限らない場合があり、したがって、リポイドおよび本明細書に記載の例えば核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む含む遮断剤のみを含む場合がある。

10

20

30

40

50

【0228】

細胞トランスフェクションを増加させることおよび／または含有されるコードされるタンパク質の翻訳を増加させることによって製剤の有効性を改善するために、異なるリポイドの組合せを使用することができる（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるWhitehead et al., Mol. Ther. 2011, 19: 1688-1694を参照されたい）。

【0229】

一実施形態では、アルクラミン（alkaline）のアクリレートへの共役付加によってリポイドを調製することができる。非限定的な例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT特許出願公開第WO2014/028487号に記載されている方法によってリポイドを調製することができる。一実施形態では、リポイドは、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT特許出願公開第WO2014/028487号に記載されている式（I）、式（II）、式（III）、式（IV）または式（V）を有する化合物を含み得る。一実施形態では、リポイドは生分解性であり得る。

【0230】

i i. リポソーム、リポプレックス、および脂質ナノ粒子

本発明の遮断剤を、1つまたは複数のリポソーム、リポプレックス、または脂質ナノ粒子を使用して製剤化することができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物はリポソームを含む。リポソームは、主に脂質二重層で構成され、栄養分および医薬製剤を投与するための送達ビヒクルとして使用することができる人工的に調製された小胞である。リポソームは、これだけに限定されないが、直径が数百ナノメートルであり得、狭い水性区画で

区切られた一連の同心二重層を含有し得る多重膜小胞 (MLV)、直径が50 nmよりも小さいものであり得る小型単細胞小胞 (small unicellular vesicle) (SUV)、および直径が50 nmから500 nmの間であり得る大型単層小胞 (LUV) などの、サイズが異なるものであり得る。リポソーム設計としては、これだけに限定されないが、健康でない組織へのリポソームの付着を改善するため、またはこれだけに限定されないがエンドサイトーシスなどのイベントを活性化するためのオプソニンまたはリガンドを挙げることができる。リポソームは、医薬製剤の送達を改善するために低pHまたは高pHを含有し得る。リポソームの形成は、これだけに限定されないが、封入された医薬製剤およびリポソーム成分などの物理化学的特徴、脂質小胞を分散させる媒体の性質、封入された物質の有効濃度およびその潜在的な毒性、小胞の適用および／または送達に伴う任意の追加のプロセス、最適化サイズ、意図された適用のための小胞の多分散性および貯蔵寿命、ならびにバッチ間の再現性および安全かつ効率的なリポソーム製品の大規模生産の可能性に依存し得る。

10

20

30

40

50

【0231】

非限定的な例として、合成膜小胞などのリポソームを、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0177638号、同第2013/0177637号、同第2013/0177636号、同第2013/0177635号、同第2013/0177634号、同第2013/0177633号、同第2013/0183375号、同第2013/0183373号、同第2013/0183372号および同第2016/0038612号)ならびにPCT特許出願公開第WO2008/042973号に記載されている方法、器具およびデバイスによって調製することができる。

【0232】

一実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物としては、限定することなく、1, 2-ジオレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DODMA) リポソーム、Marina Biotech (Bothell, Wash.) のDiLa2リポソーム、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1, 3]-ジオキソラン (DLin-KC2-DMA)、およびMC3から形成されたものなどのリポソーム (US20100324120; その全体が参照により本明細書に組み込まれる) ならびにこれだけに限定されないが、Janssen Biotech, Inc. (Horsham, Pa.) のDOXIL (登録商標) などの、小分子薬物を送達することができるリポソームを挙げることができる。一実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物としては、限定することなく、以前に記載されており、in vitroおよびin vivoにおけるオリゴヌクレオチド送達に適することが示されている安定化されたプラスミド-脂質粒子 (SPLP) または安定化された核酸脂質粒子 (SNALP) の合成により形成されたものなどのリポソームを挙げることができる (それぞれの内容全体が本明細書に組み込まれる Wheeler et al. Gene Therapy. 1999 6: 271-281; Zhang et al. Gene Therapy. 1999 6: 1438-1447; Jeffs et al. Pharm Res. 2005 22: 362-372; Morrissey et al., Nat Biotechnol. 2005 2: 1002-1007; Zimmermann et al., Nature. 2006 441: 111-114; Heyes et al. J Contr Rel. 2005 107: 276-287; Semple et al. Nature Biotech. 2010 28: 172-176; Judge et al. J Clin Invest. 2009 119: 661-673; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19: 125-132; 米国特許出願公開第2013/0122104号、同第2013/0303587号、および同第2016/0038612号を参照されたい)。Wheelerらによる当初の製造方法は界面活性剤透析法であり、これが後にJeffsらによって改善され、

自発性小胞形成法と称されている。本発明のリポソーム製剤は、部位特異的 A P O B 標的化成分を含む遮断剤に加えて 3 ~ 4 つの脂質構成成分で構成されたものであり得る。例として、本発明のリポソームは、これだけに限定されないが、J e f f s らにより記載されている通り、55 % コレステロール、20 % ジステロイルホスファチジルコリン (D S P C)、10 % P E G - S D S G、および 15 % 1, 2 - ジオレイルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (D O D M A) を含有し得る。別の例として、本発明のリポソーム製剤は、これだけに限定されないが、H e y e s らにより記載されている通り、48 % コレステロール、20 % D S P C、2 % P E G - c - D M A、および 30 % カチオン性脂質を含有し得、ここで、カチオン性脂質は、1, 2 - ジステアシルオキシ (d i s t e a r l o x y) - N, N - ジメチルアミノプロパン (D S D M A)、D O D M A、D L i n - D M A、または 1, 2 - ジリノレニルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L e n d M A) であり得る。一部の実施形態では、リポソーム製剤は、約 25.0 % コレステロール ~ 約 40.0 % コレステロール、約 30.0 % コレステロール ~ 約 45.0 % コレステロール、約 35.0 % コレステロール ~ 約 50.0 % コレステロールおよび / または約 48.5 % コレステロール ~ 約 60 % コレステロールを含み得る。別の実施形態では、本発明の製剤は、28.5 %、31.5 %、33.5 %、36.5 %、37.0 %、38.5 %、39.0 % および 43.5 % からなる群から選択されるパーセンテージのコレステロールを含み得る。一部の実施形態では、本発明のリポソーム製剤は、約 5.0 % ~ 約 10.0 % D S P C および / または約 7.0 % ~ 約 15.0 % D S P C を含み得る。

10

20

【0233】

一実施形態では、医薬組成物は、本発明の遮断剤を送達するために形成することができるリポソームを含み得る。部位特異的 A P O B 標的化成分を含む遮断剤をリポソームで被包することができ、かつ / または、それを、リポソームで被包され得る水性コア中に含ませ得る (例えば、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる P C T 特許出願公開第 W O 2012 / 031046 号、同第 W O 2012 / 031043 号、同第 W O 2012 / 030901 号および同第 W O 2012 / 006378 号ならびに米国特許出願公開第 2013 / 0189351 号、同第 2013 / 0195969 号および同第 201 / 30202684 号を参照されたい)。

30

【0234】

別の実施形態では、本発明において使用するためのリポソームは、標的化送達用に製剤化されたものであり得る。非限定的な例として、リポソームは、肝臓への標的化送達用に製剤化されたものであり得る。そのようなリポソームとしては、これだけに限定されないが、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2013 / 0195967 号に記載されているリポソームを挙げることができる。

40

【0235】

一実施形態では、リポソームおよび遮断剤を含む製剤を筋肉内投与、皮内投与、または静脈内投与することができる。

【0236】

別の実施形態では、本発明の脂質製剤は、少なくとも 1 つのカチオン性脂質、トランスフェクションを増強する脂質、および、少なくとも 1 つの、脂質部分に連結した親水性頭部基を含有する脂質を含み得る (国際特許公開第 W O 2011076807 号および米国特許出願公開第 20110200582 号; それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる)。別の実施形態では、本発明の脂質製剤は、官能化された脂質二重層間に架橋を有し得る脂質小胞である (その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2012 / 0177724 号を参照されたい)。

50

【0237】

一実施形態では、遮断剤を含む製剤は、少なくとも 1 つの脂質を含み得る脂質ナノ粒子 (L N P) である。脂質は、これだけに限定されないが、D L i n - D M A、D L i n - K - D M A、98 N I 2 - 5、C I 2 - 200、D L i n - M C 3 - D M A、D L i n - K C 2 - D M A、D O D M A、P L G A、P E G、P E G - D M G、P E G 化脂質および

50

アミノアルコール脂質から選択することができる。別の態様では、脂質は、これだけに限定されないが、DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMAおよびアミノアルコール脂質などのカチオン性脂質であり得る。アミノアルコールカチオン性脂質は、米国特許出願公開第2013/0150625号に記載されている脂質であり得、かつ／または、そこに記載されている方法によって作製することができる。

【0238】

一実施形態では、カチオン性脂質は、これだけに限定されないが、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2012/040184号、同第WO2011/153120号、同第WO2011/149733号、同第WO2011/090965号、同第WO2011/043913号、同第WO2011/022460号、同第WO2012/061259号、同第WO2012/054365号、同第WO2012/044638号、同第WO2010/080724号、同第WO2010/21865号、同第WO2008/103276号、同第WO2013/086373号およびWO2013/086354号、米国特許第7,893,302号、同第7,404,969号、同第8,283,333号、同第8,466,122号および8,569,256号、ならびに米国特許出願公開第2010/0036115号、同第2012/0202871号、同第2013/0064894号、同第2013/0129785号、同第2013/0150625号、同第2013/0178541号、同第2013/0225836号および同第2014/0039032号に記載されているカチオン性脂質から選択することができる。別の実施形態では、カチオン性脂質は、これだけに限定されないが、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2012/040184号、同第WO0111/53120号、同第WO2011/149733号、同第WO2011/090965号、同第WO2011/043913号、同第WO2011/022460号、同第WO2012/061259号、同第WO2012/054365号、同第WO2012/044638号および同第WO2013/116126号または米国特許出願公開第2013/0178541号および同第2013/0225836号に記載されている式Aから選択することができる。さらに別の実施形態では、カチオン性脂質は、これだけに限定されないが、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2008/103276号の式CLICLXXIX、米国特許第7,893,302号の式CLICLXXIX、米国特許第7,404,969号の式CLICLXXXXIIおよび米国特許出願公開第2010/0036115号の式I~VI、米国特許出願公開第2013/0123338号の式Iから選択することができる。

【0239】

一実施形態では、カチオン性脂質を当技術分野で公知の方法によって、および／または、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2012/040184号、同第WO2011/153120号、同第WO2011/149733号、同第WO2011/090965号、同第WO2011/043913号、同第WO2011/022460号、同第WO2012/061259号、同第WO2012/054365号、同第WO2012/044638号、同第WO2010/080724号、同第WO2010/21865号、同第WO2013/126803号、同第WO2013/086373号、および同第WO2013/086354号に記載されている通り合成することができる。

【0240】

一実施形態では、本明細書に記載の遮断剤の製剤化および／または送達に使用することができる脂質は、切断可能な脂質であり得る。非限定的な例として、切断可能な脂質および／または切断可能な脂質を含む医薬組成物としては、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT特許出願公開第WO2012/170889号に記載されているものが挙げられる。別の非限定的な例として、切断可能な脂質は、その内容全体が参照に

より本明細書に組み込まれるPCT特許出願公開第WO2012/170889号に記載されているHGT4001、HGT4002、HGT4003、HGT4004および／またはHGT4005であり得る。

【0241】

一実施形態では、本明細書に記載の遮断剤の製剤化および／または送達に使用することができるポリマーとしては、これだけに限定されないが、ポリ(エチレン)グリコール(PEG)、ポリエチレンジイミン(PEI)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート(DTBP)、ポリ(エチレンジイミン)ビスカルバメート(PEIC)、ポリ(L-リシン)(PLL)、ヒスチジン修飾PLL、ポリ(N-ビニルピロリドン(vinyl pyrrolidone))(PVP)、ポリ(プロピレンジイミン(propylenimine))(PI)、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)、ポリ(アミドエチレンジイミン)(SS-PAEI)、トリエチレントトラミン(TETA)、ポリ(β-アミノエステル)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリン(proline)エステル)(PHP)、ポリ(アリルアミン)、ポリ(α-[4-アミノブチル]-L-グリコール酸(PAGA)、ポリ(D,L-乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)、ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウムブロミド)、ポリ(ホスファゼン)(PPZ)、ポリ(リン酸エステル)(PPE)、ポリ(ホスホラミデート)(PPA)、ポリ(N-2-ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)(pHPMA)、ポリ(2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート)(pDMAEMA)、ポリ(2-アミノエチルプロピレンホスフェート)PPE-EA)、キトサン、ガラクトシル化キトサン、N-ドデシル化キトサン、ヒストン、コラーゲンおよびデキストラン-スベルミンを挙げることができる。一実施形態では、ポリマーは、これだけに限定されないが、PEGなどの不活性ポリマーであり得る。一実施形態では、ポリマーは、これだけに限定されないが、PEI、PLL、TETA、ポリ(アリルアミン)、ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウムブロミド)、pHPMAおよびpDMAEMAなどのカチオン性ポリマーであり得る。一実施形態では、ポリマーは、これだけに限定されないが、DSP、DTBPおよびPEICなどの生分解性PEIであり得る。一実施形態では、ポリマーは、これだけに限定されないが、ヒスチジン修飾PLL SS-PAEI、ポリ(β-アミノエステル)、PHP、PAGA、PLGA、PPZ、PPE、PPAおよびPPE-EAなど生分解性であり得る。

【0242】

一実施形態では、本発明のLNP製剤を、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2011/127255号または同第WO2008/103276号に記載されている方法に従って調製することができる。非限定的な例として、部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2011/127255号および／または同第WO2008/103276号に記載されている通りLNP製剤に被包することができる。別の非限定的な例として、本明細書に記載の部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2012/0207845号およびPCT公開第WO2014/008334号に記載されている通り、非経口経路によって送達されるナノ粒子として製剤化することができる。

【0243】

一実施形態では、本明細書に記載のLNP製剤を筋肉内(intramuscular)投与することができる。LNP製剤は、これだけに限定されないが、DLin-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA、DODMAおよびC12-200などの本明細書に記載のカチオン性脂質を含み得る。

【0244】

一実施形態では、本明細書に記載の遮断剤を含む本明細書に記載のLNP製剤を皮内投与することができる。LNP製剤は、これだけに限定されないが、DLin-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA、DODMAおよびC12-200

などの本明細書に記載のカチオン性脂質を含み得る。

【0245】

ナノ粒子製剤は、米国特許出願公開第US20160038612A1号に記載されているリン酸コンジュゲート、ポリマーコンジュゲート、ナノ粒子の送達を増強するコンジュゲートなどのコンジュゲートを含み得る。

【0246】

一実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、米国特許出願公開第US20100324120号に記載されているDLin-MC3-DMAを含む。

【0247】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第US10723692B2号、米国特許出願公開第US20200172472A1号、同第US20200163878A1号、同第US20200046838A1号、同第US20190359556A1号、同第US20190314524A1号、同第US20190274968A1号、同第US20190022247A1号、同第US20180303925A1号、同第US20180185516A1号、同第US20160317676A1号、国際特許公開第WO20200146805A1号、同第WO2020081938A1号、同第WO2019089828A1号、同第WO2019036030A1号、同第WO2019036028A1号、同第WO2019036008A1号、同第WO2018200943A1号、同第WO2018191719A1号、同第WO2018107026A1号、同第WO2018081480A1号（Acuitas Therapeutics, Inc.）に記載されている脂質化合物、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体、または脂質ナノ粒子製剤を含む。

【0248】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、Tekmira Pharmaceuticals Corp. により、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるUS9139554B2、US9051567B2、US8883203B2、米国特許出願公開第US20110117125A1号において記載されているアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体、または脂質ナノ粒子製剤を含む。特定の一実施例では、US9139554B2に記載されている化合物はDLin-kC2-DMAである。

【0249】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、Arbutus Biopharma Corp. により、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるUS10561732B2、US9938236B2、US9687550B2、米国特許出願公開第US20190240354A1号、同第US20170027658A1号、WO2020097493A1、WO2020097520A1、WO2020097540A1、WO2020097548A1において記載されているアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩、互変異性体もしくは立体異性体、または脂質ナノ粒子製剤を含む。

【0250】

脂質ナノ粒子を操作して、脂質ナノ粒子が粘膜関門を透過することができるように粒子の表面特性を変更することができる。粘液は、例えば、これだけに限定されないが、口腔（例えば、頬および食道の膜ならびに扁桃組織）、眼、胃腸（例えば、胃、小腸、大腸、結腸、直腸）、鼻、呼吸器（例えば、鼻、咽頭、気管および気管支の膜）、生殖器（例えば、膣、子宮頸部および尿道の膜）などの粘膜組織に位置する。広範な薬物に対するより高い薬物被包効率および持続的送達をもたらす能力のために好ましい10~200nmよりも大きなナノ粒子は、粘膜関門を通して迅速に拡散するには大きすぎると考えられている。粘液は絶え間なく分泌され、排出、廃棄または消化され、再利用され、したがって、捕捉されている粒子の大多数が数秒以内または数時間以内に粘膜組織（mucosal tissue）から除去され得る。低分子量ポリエチレングリコール（PEG）で高密度

10

20

30

40

50

にコーティングされた大きなポリマーナノ粒子（直径200nm～500nm）は同じ粒子が水中で拡散するよりもわずかに4～6倍低く、粘液を通じて拡散した（Lai et al. PNAS 2007 104 (5): 1482-487; Lai et al. Adv Drug Deliv Rev. 2009 61 (2): 158-171; それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ナノ粒子の輸送は、光退色後の蛍光の回復（FRAP）および高分解能多粒子追跡（MPT）を含むがこれだけに限定されない、透過速度および／または蛍光顕微鏡技法を使用して決定することができる。非限定的な例として、粘膜関門を透過することができる組成物を、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,241,670号または国際特許公開第WO2013110028号に記載されている通り作製することができる。

10

【0251】

一実施形態では、本明細書に記載の部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を、これだけに限定することなく、リポプレックス、例えば、Silence Therapeutics (London, United Kingdom) のATUPLEX (商標) 系、DACC系、DBTC系および他のsiRNA lipoplex技術、STEMGENT (登録商標) (Cambridge, Mass.) のSTEMFECFM、ならびにポリエチレンイミン (PEI) またはプロタミンに基づく核酸 (nucleic acids) の標的化送達および非標的化送達として製剤化する (Aleku et al. Cancer Res. 2008 68: 9788-9798; Strumberg et al. Int J Clin Pharmacol Ther 2012 50: 76-78; Santel et al., Gene Ther 2006 13: 1222-1234; Santel et al., Gene Ther 2006 13: 1360-1370; Gutbier et al., Pulm Pharmacol. Ther. 2010 23: 334-344; Kaufmann et al. Microvasc Res 2010 80: 286-293; Weide et al. J Immunother. 2009 32: 498-507; Weide et al. J Immunother. 2008 31: 180-188; Pascolo Expert Opin. Biol. Ther. 4: 1285-1294; Fotin-Mleczek et al., 2011 J. Immunother. 34: 1-15; Song et al., Nature Biotechnol. 2005, 23: 709-717; Peer et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 6; 104: 4095-4100; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19: 125-132; 全てその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

20

30

【0252】

一実施形態では、そのような製剤はまた、in vivoにおいて、肝細胞、免疫細胞、腫瘍細胞、内皮細胞、抗原提示細胞、および白血球を含むがこれだけに限定されない異なる細胞型に受動的にまたは能動的に向けられるように構築されるかまたは組成が変更され得る (Akin et al. Mol Ther. 2010 18: 1357-1364; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23: 709-717; Judge et al., J Clin Invest. 2009 119: 661-673; Kaufmann et al., Microvasc Res 2010 80: 286-293; Santel et al., Gene Ther 2006 13: 1222-1234; Santel et al., Gene Ther 2006 13: 1360-1370; Gutbier et al., Pulm Pharmacol. Ther. 2010 23: 334-344; Basha et al., Mol. Ther. 2011 19: 2186-2200; Fenske and Cullis, Expert Opin Drug Deliv. 2008 5: 25-44; Peer et al., Science. 2008 319: 627-630; Peer and Lieberma

40

50

n, Gene Ther. 2011 18: 1127-1133; 全てその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。製剤の肝細胞への受動的ターゲティングの1つの例として、アポリポタンパク質Eに結合し、in vivoにおけるこれらの製剤の肝細胞への結合および取り込みを促進することが示されている、DLin-DMA、DLin-KC2-DMAおよびDLin-MC3-DMAに基づく脂質ナノ粒子製剤が挙げられる(Akinc et al. Mol Ther. 2010 18: 1357-1364; その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)。製剤を、これらに限定されないが、フォレート、トランスフェリン、N-アセチルガラクトサミン(GaINAc)、および抗体を標的とした手法によって例示される異なるリガンドを表面上に発現させることによって選択的にターゲティングすることもできる(Kolhatkar et al., Curr Drug Discov Technol. 2011 8: 197-206; Musacchio and Torchilin, Front Biosci. 2011 16: 1388-1412; Yu et al., Mol Membr Biol. 2010 27: 286-298; Patil et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2008 25: 1-61; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12: 2708-2714; Zhao et al., Expert Opin Drug Deliv. 2008 5: 309-319; Akinc et al., Mol Ther. 2010 18: 1357-1364; Srinivasan et al., Methods Mol Biol. 2012 820: 105-116; Ben-Arie et al., Methods Mol Biol. 2012 757: 497-507; Peer 2010 J Control Release. 20: 63-68; Peer et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104: 4095-4100; Kim et al., Methods Mol Biol. 2011 721: 339-353; Subramanya et al., Mol Ther. 2010 18: 2028-2037; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23: 709-717; Peer et al., Science. 2008 319: 627-630; Peer and Lieberman, Gene Ther. 2011 18: 1127-1133; 全てその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

10

20

30

【0253】

一実施形態では、本発明の部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を固体脂質ナノ粒子として製剤化することができる。固体脂質ナノ粒子(SLN)は、平均直径が10nmから1000nmの間の球状であり得る。SLNは、親油性分子を可溶化することができ、界面活性剤および／または乳化剤を用いて安定化することができる固体脂質コアマトリックスを有する。さらなる実施形態では、前記脂質ナノ粒子は、自己組織化脂質-ポリマーナノ粒子であり得る(その全体が参照により本明細書に組み込まれるZhang et al., ACS Nano, 2008, 2 (8), pp 1696-1702を参照されたい)。非限定的な例として、SLNは、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2013/105101号に記載されているSLNであり得る。別の非限定的な例として、SLNを、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2013/105101号に記載されている方法またはプロセスによって作製することができる。

40

【0254】

リボソーム、リボプレックス、または脂質ナノ粒子により、核酸分子による細胞トランスフェクションを増加させること; および／またはコードされるタンパク質(例えば、本発明のエフェクター)の翻訳を増加させることができるので、これらの製剤を使用して、例えば核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤の有効性を改善して、タンパク質産生を指示することができる。そのような例の1つは、ポリプレックスプラス

50

ミドDNAの有効な全身送達を可能にする脂質被包の使用を伴う (Heyes et al., Mol Ther. 2007 15: 713-720; その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる)。本発明のリボソーム、リボプレックス、または脂質ナノ粒子により、例えば核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤の安定性を増大させることもできる。リボソーム、リボプレックス、または脂質ナノ粒子は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2016/0038612号に記載されている。

【0255】

一実施形態では、部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を制御放出および／または標的化送達用に製剤化することができる。本明細書で使用される場合、「制御放出」は、治療転帰をもたらすための特定の放出パターンに従った医薬組成物または化合物放出プロファイルを指す。一実施形態では、本明細書に記載の部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を、制御放出および／または標的化送達のための本明細書に記載のおよび／または当技術分野で公知の送達用作用剤で被包することができる。本明細書で使用される場合、「被包する」という用語は、封入すること、囲むことまたは包むことを意味する。それが本発明の化合物の製剤化に関する場合、被包は、実質的なもの、完全なものまたは部分的なものであり得る。「実質的に被包された」という用語は、本発明の医薬組成物または遮断剤の少なくとも50%よりも多く、少なくとも60%よりも多く、少なくとも70%よりも多く、少なくとも80%よりも多く、少なくとも85%よりも多く、少なくとも90%よりも多く、少なくとも95%よりも多く、少なくとも96%よりも多く、少なくとも97%よりも多く、少なくとも98%よりも多く、少なくとも99%よりも多く、少なくとも99.9%よりも多く、少なくとも99.9%よりも多く、または99.999%よりも多くが送達用作用剤中に封入されていてよい、囲まれていてよいまたは包まれていてよいことを意味する。「部分的な被包」または「部分的に被包されている」とは、本発明の医薬組成物または遮断剤の10未満、10未満、20未満、30未満、40未満、50未満またはそれ未満が送達用作用剤中に封入されていてよい、囲まれていてよいまたは包まれていてよいことを意味する。有利に、被包は、本発明の医薬組成物または化合物のエスケープまたは活性を蛍光および／または電子顕微鏡写真を使用して測定することによって決定することができる。例えば、本発明の医薬組成物または遮断剤の少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%または99.99%よりも多くが送達用作用剤に被包される。

【0256】

一実施形態では、本明細書に記載されるように含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を治療用ナノ粒子（例えば、BIND Therapeuticsからの治療用ナノ粒子）で被包することができる。治療用ナノ粒子は、これだけに限定されないが、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2010/005740号、同第WO2010/030763号、同第WO2010/005721号、同第WO2010/005723号、同第WO2012/054923号、米国特許出願公開第2201/10262491号、同第2010/0104645号、同第2010/0087337号、同第2010/0068285号、同第2011/0274759号、同第2010/0068286号、同第2012/0288541号、同第2013/0123351号、同第2013/0230567号、同第2013/0236500号、同第2013/0302433号、同第2013/0302432号、同第1013/0280339号および同第2013/0251757号、および米国特許第8,206,747号、同第8,293,276号、同第8,318,208号、同第8,318,211号、同第8,623,417号、同第8,617,608号、同第8,613,954号、同第8,613,951号、同第8,609,142号、同第8,603,534号および同第8,563,041号などの本明細書に記載のおよび当技術分野で公知の方法によって製剤化することができる。別の実施形態では、治療用ポリマーナノ粒子を

、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2012/0140790号に記載されている方法によって調製することができる。非限定的な例として、治療用ナノ粒子は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0236500号(Bind)に記載されている通り、約4～約25重量パーセントの遮断剤、および、約10～約99重量パーセントの、ポリ(乳酸)を含むジブロックポリ(乳酸)ーポリ(エチレン)グリコール共重合体を含み得る。別の非限定的な例として、ナノ粒子は、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0280339号(Bind)および同第2010251757号ならびに米国特許第8,652,528号に記載されている通り、約0.2～約35重量パーセントの遮断剤、および、約10～約99重量パーセントの、ジブロックポリ(乳酸)ーポリ(エチレン)グリコール共重合体を含み得る。

10

【0257】

一実施形態では、治療用ナノ粒子として製剤化された遮断剤を筋肉内投与、皮内(intrademrally)投与、または静脈内投与することができる。

【0258】

一実施形態では、ACCURINS(商標)ナノ粒子として製剤化された遮断剤を筋肉内投与、皮内(intrademrally)投与、または静脈内投与することができる。

【0259】

一実施形態では、遮断剤は、これだけに限定されないが、そのそれぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2014/0030351号および同第2011/0294717号に記載されているナノ粒子などの、ガラス転移温度が高い治療用ナノ粒子として送達することができる。

20

【0260】

一実施形態では、治療用ナノ粒子を持続放出用に製剤化することができる。本明細書で使用される場合、「持続放出」は、特定の期間にわたる放出速度に従う医薬組成物または化合物を指す。期間としては、これだけに限定されないが、数時間、数日間、数週間、数カ月間および数年間を挙げることができる。非限定的な例として、持続放出ナノ粒子は、本発明のポリマーおよび遮断剤を含み得る(それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2010075072号および米国特許出願公開第2010/0216804号、同第2011/0217377号、同第2012/0201859号、同第2013/0243848号および同第2013/0243827号を参照されたい)。

30

【0261】

一実施形態では、本発明の遮断剤を合成ナノ担体で被包すること、それと連結すること、および／またはそれと会合させることができる。合成ナノ担体としては、これだけに限定されないが、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2010/005740号、同第WO2010/030763号、同第WO2012/13501号、同第WO2012/149252号、同第WO2012149255号、同第WO2012149259号、同第WO2012149265号、同第WO2012149268号、同第WO2012149282号、同第WO2012149301号、同第WO2012149393号、同第WO2012149405号、同第WO2012149411号および同第WO2012149454号ならびに米国特許出願公開第20110262491号、同第20100104645号、同第20100087337号、同第20120244222号およびUS20130236533、ならびに米国特許第8,652,487号に記載されているものが挙げられる。合成ナノ担体は、当技術分野で公知のおよび／または本明細書に記載の方法を使用して製剤化することができる。非限定的な例として、合成ナノ担体を、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2010005740号、同第WO2010030763号および同第WO201213501号ならびに米国特許出願公開第20110262491号

40

50

、同第20100104645号、同第20100087337号および同第20120244222号に記載されている方法によって製剤化することができる。別の実施形態では、合成ナノ担体制剤を、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2011072218号および米国特許第8,211,473号に記載されている方法によって凍結乾燥することができる。さらに別の実施形態では、合成ナノ担体を含むがこれだけに限定されない本発明の製剤を、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20130230568号に記載されている方法によって凍結乾燥または再構成することができる。

【0262】

一実施形態では、遮断剤を含む合成ナノ担体を筋肉内投与、皮内（intradermally）投与、または静脈内投与することができる。

【0263】

一部の実施形態では、遮断剤を、より小さなLNPを使用して送達用に製剤化することができる。そのような粒子は、0.1μm未満から最大1000μmまで、例えば、これだけに限定されないが、0.1μm未満、1.0μm未満、5μm未満、10μm未満、15μm未満、20μm未満、25μm未満、30μm未満、35μm未満、40μm未満、50μm未満、55μm未満、60μm未満、65μm未満、70μm未満、75μm未満、80μm未満、85μm未満、90μm未満、95μm未満、100μm未満、125μm未満、150μm未満、175μm未満、200μm未満、225μm未満、250μm未満、275μm未満、300μm未満、325μm未満、350μm未満、375μm未満、400μm未満、425μm未満、450μm未満、475μm未満、500μm未満、525μm未満、550μm未満、575μm未満、600μm未満、625μm未満、650μm未満、675μm未満、700μm未満、725μm未満、750μm未満、775μm未満、800μm未満、825μm未満、850μm未満、875μm未満、900μm未満、925μm未満、950μm未満、975μm未満の直径を含み得る。

【0264】

別の実施形態では、遮断剤を、約1nmから約100nmまで、約1nmから約10nmまで、約1nmから約20nmまで、約1nmから約30nmまで、約1nmから約40nmまで、約1nmから約50nmまで、約1nmから約60nmまで、約1nmから約70nmまで、約1nmから約80nmまで、約1nmから約90nmまで、約5nmから約100nmまで（from about 5 nm to about from 100 nm）、約5nmから約10nmまで、約5nmから約20nmまで、約5nmから約30nmまで、約5nmから約40nmまで、約5nmから約50nmまで、約5nmから約60nmまで、約5nmから約70nmまで、約5nmから約80nmまで、約5nmから約90nmまで、約10nmから約50nmまで、約20nmから約50nmまで、約30nmから約50nmまで、約40nmから約50nmまで、約20nmから約60nmまで、約30nmから約60nmまで、約40nmから約60nmまで、約20nmから約70nmまで、約30nmから約70nmまで、約40nmから約70nmまで、約50nmから約70nmまで、約60nmから約70nmまで、約20nmから約80nmまで、約30nmから約80nmまで、約40nmから約80nmまで、約50nmから約80nmまで、約60nmから約80nmまで、約20nmから約90nmまで、約30nmから約90nmまで、約40nmから約90nmまで、約50nmから約90nmまで、約60nmから約90nmまでおよび／または約70nmから約90nmまでの直径を含み得るより小さなLNPを使用して送達用に製剤化することができる。

【0265】

一実施形態では、遮断剤をより小さなLNPとして製剤化し、筋肉内投与、皮内（intradermally）投与、または静脈内投与することができる。

【0266】

一実施形態では、遮断剤を、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる P C T 特許出願公開第 W O 2 0 1 3 0 6 3 4 6 8 号または米国特許第 8, 4 4 0, 6 1 4 号に記載されている薬物被包マイクロスフェアを使用して送達用に製剤化することができる。別の態様では、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、脂質 (A P P L) は、本発明の遮断剤を細胞に送達することにおいて有用である (その全体が参照により本明細書に組み込まれる P C T 特許出願公開第 W O 2 0 1 3 0 6 3 4 6 8 号を参照されたい)。

【0267】

一態様では、脂質ナノ粒子は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる P C T 特許出願公開第 W O 2 0 1 3 0 5 9 9 2 2 号に記載されている、限界サイズの脂質ナノ粒子であり得る。限界サイズの脂質ナノ粒子は、水性コアまたは疎水性コアを取り囲む脂質二重層を含み得る；脂質二重層は、これだけに限定されないが、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、セレブロシド、C 8 ~ C 2 0 脂肪酸ジアシルホスファチジルコリン (d i a c y l p h o s p h a t i d y l c h o l i n e)、および 1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン (I - p a l m i t o y l - 2 - o I e o y l p h o s p h a t i d y l c h o l i n e) (P O P C) などのリン脂質を含み得る。別の態様では、限界サイズの脂質ナノ粒子は、これだけに限定されないが、D L P E P E G、D M P E - P E G、D P P C - P E G および D S P E - P E G などのポリエチレングリコール-脂質を含み得る。

【0268】

一実施形態では、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる P C T 特許出願公開第 W O 2 0 1 3 0 6 3 5 3 0 号に記載されている送達方法を使用して、本発明の遮断剤を特定の場所に、送達する、局在化させる、かつ／または集めることができる。非限定的な例として、対象に遮断剤を送達する前、それと同時にまたはその後に、対象に空のポリマー粒子を投与することができる。空のポリマー粒子は対象と接触すると体積が変化し、対象の特定の場所で留まる、包埋される、固定されるまたは封入される。

【0269】

一実施形態では、遮断剤を活性物質放出系 (例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 1 3 0 1 0 2 5 4 5 号を参照されたい) として製剤化することができる。活性物質放出系は、1) 触媒として活性な核酸とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド阻害剤鎖と結合した少なくとも 1 つのナノ粒子、および、2) 治療的に活性な物質 (例えば、本発明の遮断剤) と結合した少なくとも 1 つの基質分子と結合した化合物を含み得、触媒として活性な核酸による基質分子の切断により、治療的に活性な物質が放出される。

【0270】

一実施形態では、本発明のナノ粒子は、これだけに限定されないが、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる P C T 公開第 W O 2 0 1 3 0 9 0 6 0 1 号に記載されているものなどの水溶性ナノ粒子であり得る。ナノ粒子は、良好な水溶性を示すために緻密な双性イオンリガンドを有する無機ナノ粒子であり得る。ナノ粒子は小さな流体力学的直径 (H D)、時間、p H、および塩度に対する安定性、ならびに低レベルの非特異的タンパク質結合も有し得る。

【0271】

一実施形態では、本発明のナノ粒子は、これだけに限定されないが、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 1 3 0 1 7 2 4 0 6 号 (B i n d)、同第 2 0 1 3 0 2 5 1 8 1 7 号 (B i n d)、同第 2 0 1 3 2 5 1 8 1 6 号 (B i n d) および同第 2 0 1 3 0 2 5 1 7 6 6 号 (B i n d) に記載されているものなどのステルスナノ粒子または標的特異的ステルスナノ粒子である。ステルスナノ粒子は、ジブロック共重合体および化学療法剤を含み得る。これらのステルスナノ粒子は、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 1 3 0 1 7 2 4 0 6 号、同第 2 0 1 3 0 2 5 1 8 1 7 号、同第 2 0 1 3 2 5 1 8 1 6 号および同第 2 0

130251766号に記載されている方法によって作製することができる。非限定的な例として、ステルスナノ粒子は、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20130172406号、同第20130251817号、同第2013251816号および同第20130251766号に記載されているナノ粒子などの、がん細胞を標的とするものであり得る。

【0272】

一実施形態では、本発明の遮断剤を含むステルスナノ粒子を筋肉内投与、皮内投与、または静脈内投与することができる。

【0273】

一実施形態では、本発明の遮断剤を、これだけに限定されないが、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20130017223号に記載されている脂質ナノ粒子などの複数のカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子として製剤化し、かつ／または送達することができる。非限定的な例として、LNP製剤は、第1のカチオン性脂質および第2のカチオン性脂質を含み得る。別の非限定的な例として、LNP製剤は、DLin-MC2-DMAおよびDLinMC4-DMAを含み得る。さらに別の非限定的な例として、LNP製剤は、DLin-MC3-DMAおよびCI2-200を含み得る。一実施形態では、複数のカチオン性脂質を含むLNP製剤（例えば、これだけに限定されないが、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第US20130017223号に記載されているもの）を筋肉内投与、皮内投与、または静脈内投与することができる。

【0274】

一実施形態では、本明細書に記載の遮断剤を、カチオン性脂質DLin-MC3-DMAおよび中性脂質DOPEを含む脂質ナノ粒子として製剤化し、かつ／または送達することができる。脂質ナノ粒子は、PEGに基づく脂質およびコレステロールまたは抗酸化剤も含み得る。DLin-MC3-DMAおよびDOPEおよび遮断剤を含むこれらの脂質ナノ粒子製剤を筋肉内投与、皮内投与、または静脈内投与することができる。

【0275】

一実施形態では、DLin-MC3-DMAおよびDOPEを含む脂質ナノ粒子は、これだけに限定されないが、ペンタエリスリトールPEGエステルテトラスクシンイミジルおよびペンタエリスリトールPEGエーテルテトラチオール、PEGc-DOMG、PEG-DMG（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）、PEG-DSG（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）、PEG-DPG（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）、PEG-DSA（1,2-ジステアリルオキシプロピル-3-アミンとカップリングしたPEG）、PEG-DMA（1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-アミンとカップリングしたPEG）、PEG-c-DNA、PEG-c-DMA、PEG-S-DSG、PEG-c-DMA、PEG-DPG、PEG-DMG 2000および本明細書に記載のものおよび／または当技術分野で公知のものなどのPEG脂質を含み得る。

【0276】

一実施形態では、DLin-MC3-DMAおよびDOPEを含む脂質ナノ粒子は、PEG脂質を0.5%から約3.0%まで、約1.0%から約3.5%まで、約1.5%から約4.0%まで、約2.0%から約4.5%まで、約2.5%から約5.0%までおよび／または約3.0%から約6.0%までの脂質モル比で含み得る。

【0277】

一実施形態では、DLin-MC3-DMAおよびDOPEを含む脂質ナノ粒子は、25.0%コレステロール～約50.0%コレステロール、約30.0%コレステロール～約45.0%コレステロール、約35.0%コレステロール～約50.0%コレステロールおよび／または約48.5%コレステロール～約60%コレステロールを含み得る。一実施形態では、製剤は、28.5%、31.5%、33.5%、36.5%、37.0%

、38.5%、39.0%、43.5%および48.5%からなる群から選択されるパーセンテージのコレステロールを含み得る。

【0278】

一実施形態では、DLin-MC3-DMAおよびDOPEを含む脂質ナノ粒子は、25.0%抗酸化剤～約50.0%抗酸化剤、約30.0%抗酸化剤～約45.0%抗酸化剤、約35.0%抗酸化剤～約50.0%抗酸化剤および／または約48.5%抗酸化剤～約60%抗酸化剤を含み得る。一実施形態では、製剤は、28.5%、31.5%、33.5%、36.5%、37.0%、38.5%、39.0%、43.5%および48.5%からなる群から選択されるパーセンテージの抗酸化剤を含み得る。

【0279】

本発明の遮断剤は、天然および／または合成ポリマーを使用して製剤化することができる。送達のために使用することができるポリマーの非限定的な例としては、これだけに限定されないが、MIRUS（登録商標）Bio（Madison、Wis.）およびRoche Madison（Madison、Wis.）のDYNAMIC POLYCONJUGATE（登録商標）（Arrowhead Research Corp.、Pasadena、Calif.）製剤、これだけに限定することなく、SMARTT POLYMER TECHNOLOGY（商標）（Seattle、Wash.）などのPHASERX（商標）ポリマー製剤、DMRIIDOPE、ポロキサマー、Vical（San Diego、Calif.）のVAXFECTIN（登録商標）アジュバント、キトサン、Calando Pharmaceuticals（Pasadena、Calif.）のシクロデキストリン、デンドリマーおよびポリ（乳酸-co-グリコール酸）（PLGA）ポリマー、RONDEL（商標）（RNAi/Oligonucleotide Nanoparticle Delivery）ポリマー（Arrowhead Research Corporation、Pasadena、Calif.）、ならびに、これだけに限定されないが、PHASERX（商標）（Seattle、Wash.）などのpH応答性共ブロックポリマーが挙げられる。

【0280】

ポリマー製剤により、遮断剤の持続放出または遅延放出を可能にすることができる（例えば、筋肉内注射後、皮内注射後または皮下注射後）。遮断剤の放出プロファイルの変更の結果、例えば、コードされるタンパク質の長期間にわたる翻訳がもたらされ得る。ポリマー製剤を使用して遮断剤の安定性を増大させることもできる。例えば、修飾されたmRNA以外の核酸を分解から保護するために生分解性ポリマーが以前に使用されており、in vivoにおけるペイロードの持続放出がもたらされることが示されている（Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104: 12982-12887; Sullivan et al., Expert Opin Drug Deliv. 2010 7: 1433-1446; Conve rtine et al., Biomacromolecules. 2010 Oct. 1; Chu et al., Acc Chern Res. 2012 Jan. 13; Manganiello et al et al., Biomaterials. 2012 33: 2301-2309; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12: 2708-2714; Singha et al., Nucleic Acid Ther. 2011 2: 133-147; deFougerolles Hnm Gene Ther. 2008 19: 125-132; Schaffert and Wagner, Gene Ther. 2008 16: 1131-1138; Chaturvedi et al., Expert Opin Drug Deliv. 2011 8: 1455-1468; Davis, Mol Pharm. 2009 6: 659-668; Davis, Nature 201 0464: 1067-1070;それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0281】

10

20

30

40

50

一実施形態では、医薬組成物は持続放出製剤であり得る。さらなる実施形態では、持続放出製剤は皮下送達用のものであり得る。持続放出製剤としては、これだけに限定されないが、PLGAマイクロスフェア、エチレン酢酸ビニル（EVAc）、ポロキサマー、GELSITE（登録商標）（Nanotherapeutics, Inc. Alachua, Fla.）、HYLENEX（登録商標）（Halozyme Therapeutics, San Diego Calif.）、外科用シーラント、例えば、フィブリノーゲンポリマー（Ethicon Inc. Cornelia, Ga.）、TISSELL（登録商標）（Baxter International, Inc Deerfield, Ill.）、PEGに基づくシーラント、およびCOSEAL（登録商標）（Baxter International, Inc Deerfield, Ill.）を挙げることができる。

10

【0282】

B. ベクターにコードされる本発明の部位特異的APOB遮断剤

例えば核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を、DNAベクターまたはRNAベクターに挿入された転写ユニットから発現させることができる（例えば、Couture, A, et al., TIG. (1996), 12: 5-10; WO00/22113、WO00/22114、およびUS6,054,299を参照されたい）。一部の実施形態では、発現は、使用される特定の構築物および標的組織または細胞型に応じて持続する（数カ月間またはそれよりも長く）。これらの導入遺伝子は、直鎖状構築物、環状プラスミド、または、組込み型もしくは非組込み型ベクターであり得るウイルスベクターとして導入することができる。導入遺伝子を、染色体外プラスミドとして遺伝されることが可能になるように構築することもできる（Gassmann, et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1292）。遮断剤の異なる構成成分、例えば、gRNAとエフェクターは、別々の発現ベクターに位置していてよく、それらを標的細胞に共導入する（例えば、トランスフェクションまたは感染によって）ことができる。あるいは、個々の構成成分をそれぞれ、どちらも同じ発現プラスミドに位置するプロモーターによって転写させることもできる。

20

【0283】

遮断剤を発現するベクターの送達は、静脈内もしくは筋肉内投与による、患者から外植した標的細胞に投与し、その後、標的細胞を患者に再導入することによる、または所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段によるなどの全身性のものであり得る。

30

【0284】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の核酸または本明細書に記載のタンパク質、例えばエフェクターをコードする核酸を、ベクター、例えばウイルスベクターに組み入れる。

【0285】

核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤の個々の鎖または複数の鎖を発現ベクター内のプロモーターから転写させることができる。例えばdsRNAを生成するために2つの別々の鎖を発現させる場合、2つの別々の発現ベクターを標的細胞に共導入することができる（例えば、トランスフェクションまたは感染によって）。あるいは、核酸分子の個々の鎖をそれぞれ、どちらも同じ発現プラスミド上にあるプロモーターによって転写することができる。一実施形態では、核酸分子を、リンカーポリヌクレオチド配列によって接合した逆方向反復ポリヌクレオチドとして発現させ、したがって、核酸分子はステム・ループ構造を有する。

40

【0286】

発現ベクターは、一般に、DNAプラスミドまたはウイルスベクターである。真核細胞と適合する、好ましくは脊椎動物細胞と適合する発現ベクターを使用して、本明細書に記載の遮断剤を発現させるための組換え構築物を生成することができる。

【0287】

50

遮断剤の組換え発現のための構築物には、一般に、標的細胞における遮断剤の発現を確実にするために、調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサーなどが必要である。

【0288】

天然核酸または合成核酸の発現は、一般には、目的の核酸をコードする核酸をプロモーターなどの調節領域と作動可能に連結し、構築物を発現ベクターに組み入れることによって実現される。ベクターは、真核生物における複製および組込みに適したものであり得る。

【0289】

核酸分子への作動可能な連結に適したプロモーターなどの調節領域は、プロモーターなどの調節領域に作動可能に連結することができ、任意の種に由来するものであってよい。任意の型のプロモーターを核酸配列に作動可能に連結することができる。プロモーターの例としては、限定することなく、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、および特定の刺激に対して応答性または不応答性のプロモーター（例えば、誘導性プロモーター）が挙げられる。追加のプロモーターエレメント、例えば強化配列は、転写開始の頻度を調節する。一般には、これらは開始部位の30～110bp上流の領域に位置するが、いくつかのプロモーターが開始部位の下流にも機能的なエレメントを含有することが最近示された。プロモーターエレメント間の間隔はしばしば柔軟であり、したがって、エレメントが互いに対して逆になるかまたは移動した場合にもプロモーター機能は保存される。チミジンキナーゼ（tk）プロモーターでは、活性が減退し始める前にプロモーターエレメント間の間隔を50bpに増大させることができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントは、転写を活性化するために協同的に機能する場合もあり、独立に機能する場合もある。

【0290】

適切なプロモーターの1つの例は、最初期サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それと機能的に（operatively）連結した任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強力な構成的プロモーター配列である。適切なプロモーターの別の例は、伸長成長因子-1a（EF-1a）である。しかし、シミアンウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）長鎖末端反復配列（LTR）プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびに、例えば、これだけに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを含むがこれだけに限定されない他の構成的プロモーター配列を使用することもできる。

【0291】

さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターも本発明の一部として意図されている。誘導性プロモーターの使用により、当該プロモーターと機能的に連結したポリヌクレオチド配列の発現を、そのような発現が望まれる場合にオンにすること、または発現が望まれない場合には発現をオフにすることができる分子スイッチがもたらされる。誘導性プロモーターの例としては、これだけに限定されないが、メタロチオネイン（metallothione）プロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーターが挙げられる。

【0292】

核酸構築物に有用であり得る追加の調節領域としては、これだけに限定されないが、転写および翻訳ターミネーター、開始配列、ポリアデニル化配列、翻訳制御配列（例えば、配列内リボソーム進入セグメント、IRES）、エンハンサー、誘導性エレメント、またはイントロンが挙げられる。そのような調節領域は必要でない場合もあるが、そのような

調節領域により、転写、mRNAの安定性、翻訳効率などに影響を及ぼすことによって発現を増大させることができる。そのような調節領域を細胞（複数可）における核酸の最適な発現を得るために所望の通り核酸構築物に含めることができる。しかし、時には、そのような追加のエLEMENTなしで十分な発現を得ることができる。

【0293】

導入される発現ベクターは、ウイルスベクターを介してトランスフェクトしようとするまたは感染させようとした細胞の集団からの発現細胞の同定および選択を容易にするために、選択マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子のいずれかまたはその両方を含有し得る。他の態様では、選択マーカーに別のDNA片を載せ、共トランスフェクション手順に使用することができる。選択マーカーおよびレポーター遺伝子の両方を適当な転写制御配列で挟んで、宿主細胞における発現を可能にすることができる。有用な選択マーカーとしては、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子などが挙げられる。選択マーカーの非限定的な例としては、ピューロマイシン、ガンシクロビル、アデノシンデアミナーゼ（ADA）、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ（neo、G418、APH）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ（phosphotransferase）、チミジンキナーゼ（TK）、およびキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XGPRT）が挙げられる。そのようなマーカーは、培養物中の安定な形質転換体の選択に有用である。他の選択マーカーとしては、緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質などの蛍光ポリペプチドが挙げられる。

【0294】

シグナルペプチドを含めることもでき、コードされるポリペプチドが細胞の特定の場所（例えば、細胞表面）に向けられるように使用することができる。

【0295】

潜在的にトランスフェクトされた細胞を同定するため、および転写制御配列の機能性を評価するために、レポーター遺伝子を使用することができる。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント供給源には存在しないかまたはレシピエント供給源によって発現されず、かつ、いくつかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性によって発現が顕在化するポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現を、DNAがレシピエント細胞に導入された後の適切な時点でアッセイする。適切なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、ベータガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子を含み得る（例えば、Uiet al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82）。適切な発現系は周知であり、公知の技法を使用して調製することもでき、商業的に入手することもできる。一般に、最高レベルのレポーター遺伝子の発現を示す最小の5'隣接領域を有する構築物をプロモーターとして同定する。そのようなプロモーター領域をレポーター遺伝子と連結し、作用剤をプロモーターにより駆動される転写をモジュレートする能力について評価するために使用することができる。

【0296】

ベクターおよび構築物に関して考慮すべき他の態様は当技術分野で公知である。

【0297】

一部の実施形態では、ベクター、例えば、ウイルスベクターは、核酸分子を含む部位特異的APOB標的化成分を含む遮断剤を含む。

【0298】

本明細書に記載の方法および組成物に利用することができるウイルスベクター系としては、これだけに限定されないが、(a) アデノウイルスベクター（例えば、Ad5/F35ベクター）；(b) レンチウイルスベクター（組込みコンピテントまたは組込み欠損レンチウイルスベクターを含む）、モロニー Maus 白血病ウイルスなどを含むがこれだけに限定されないレトロウイルスベクター；(c) アデノ随伴ウイルスベクター；(d) 単純ヘルペスウイルスベクター；(e) SV40ベクター；(f) ポリオーマウイルスベクター；(g) パピローマウイルスベクター；(h) ピコルナウイルスベクター；(i) オル

ソボックス、例えば、ワクシニアウイルスベクターまたはアピボックス、例えば、カナリアボックスまたは鶏痘などのボックスウイルスベクター；および（j）ヘルパー依存性またはガットレスアデノウイルスが挙げられる。複製欠損ウイルスも有利であり得る。種々のベクターが細胞のゲノムに組み入れられるようになる、または細胞のゲノムに組み入れられるようにはならない。構築物は、所望であればトランスフェクションのためのウイルス配列を含み得る。あるいは、構築物は、エピソーム複製が可能なベクター（例えばEPVベクターおよびEBVベクター）に組み入れることができる。例えば、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,534,261号；同第6,607,882号；同第6,824,978号；同第6,933,113号；同第6,979,539号；同第7,013,219号；および同第7,163,824号を参照されたい。

10

【0299】

アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどのレトロウイルスならびにレンチウイルスに由来するものを含むベクターは、導入遺伝子の長期間の安定な組み込みおよび娘細胞での繁殖を可能にするので、長期にわたる遺伝子移入を実現するために適したツールである。ベクターの例としては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、および配列決定ベクターが挙げられる。発現ベクターはウイルスベクターの形で細胞に提供することができる。ウイルスベクター技術は当技術分野において周知であり、種々のウイルス学および分子生物学のマニュアルに記載されている。

【0300】

一実施形態では、本発明において使用するための適切なウイルスベクターは、組換えアデノ随伴ウイルスベクターなどのアデノ随伴ウイルスベクターである。

20

【0301】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター（rAAV）は、欠損かつ非病原性パルボウイルスアデノ随伴2型ウイルスに基づく遺伝子送達系である。ベクターは全て、導入遺伝子発現カセットに隣接するAAV 145bp末端逆位反復配列のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入された細胞のゲノムへの組み込みに起因した効率的な遺伝子移入および安定な導入遺伝子送達がこのベクター系の重要な特色である（Wagner et al., Lancet 351: 9117-1702-3 (1998), Kearns et al., Gene Ther. 9: 748-55 (1996)）。AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8およびAAV 9を含めたAAV血清型を本発明に従って使用することができる。

30

【0302】

複製欠陥組換えアデノウイルスベクター（Ad）は高力価で産生することができ、いくつかの異なる細胞型に容易に感染する。大多数のアデノウイルスベクターは、Ad E1a遺伝子、E1b遺伝子、および／またはE3遺伝子が導入遺伝子に置き換わるように操作される；その後、複製欠損ベクターを、欠失した遺伝子機能をトランスに供給するヒト293細胞において繁殖させる。Adベクターにより、肝臓、腎臓および筋肉に見いだされるものなどの非分裂性の分化細胞を含めた複数の型の組織をin vivoで形質導入することができる。従来Adベクターは大きな運搬能を有する。臨床試験におけるAdベクターの使用の例は、筋肉内注射を用いた抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド治療を伴うものであった（Stermann et al., Hum. Gene Ther. 7: 1083-9 (1998)）。臨床試験における遺伝子移入のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例としては、Rosenecker et al., Infection 24: 15-10 (1996)；Stermann et al., Hum. Gene Ther. 9: 71083-1089 (1998)；Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2: 205-18 (1995)；Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5: 597-613 (1997)；Topf et al., Gene Ther. 5: 507-513 (1998)；Stermann et al., Hum. Gene

40

50

Ther. 7: 1083-1089 (1998) が挙げられる。

【0303】

宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成するためにパッケージング細胞を使用する。そのような細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングするψ2細胞またはPA317細胞が挙げられる。遺伝子治療に使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする産生細胞株によって生成される。前記ベクターは、一般には、パッケージングおよびその後の宿主への組込み（該当する場合）に必要な最小のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は発現させるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられる。失われたウイルスの機能はパッケージング細胞株によってトランスに供給される。例えば、遺伝子治療に使用されるAAVベクターは、一般には、パッケージングおよび宿主ゲノムへの組込みに必要なAAVゲノム由来の末端逆位反復（ITR）配列のみを有する。他のAAV遺伝子、すなわちrepおよびcapをコードするヘルパープラスミドを含有するがITR配列を欠く細胞株にウイルスDNAをパッケージングする。細胞株にアデノウイルスもヘルパーとして感染させる。ヘルパーウイルスによりAAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現が促進される。ヘルパープラスミドはITR配列を欠くので有意な量ではパッケージングされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがAAVよりも高い感受性をもつ加熱処理によって減少させることができる。

10

【0304】

20

IV. 本発明の方法

本発明は、細胞におけるアポリポタンパク質B（APOB）の発現をモジュレートするための、本明細書に記載の作用剤および組成物の使用方法も提供する。当該方法は、細胞を、APOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分およびエフェクター分子を含む部位特異的APOB遮断剤と接触させるステップを含み、それにより、細胞におけるAPOBの発現をモジュレートする。部位特異的遮断剤、エフェクター、または部位特異的遮断剤とエフェクターの両方が上記の組成物などの組成物中に存在し得る。一部の実施形態では、部位特異的遮断剤とエフェクターは、同じ組成物中に存在する。他の実施形態では、部位特異的遮断剤とエフェクターは、異なる組成物中に存在する。

【0305】

30

例えば、部位特異的APOB遮断剤と接触させなかった細胞と比較して、APOBの発現が増強または低減し得る。遺伝子発現のモジュレーションを当技術分野で公知の任意の方法によって評価することができる。例えば、発現のモジュレーションを、例えば細胞、複数の細胞、および／または組織試料における遺伝子のmRNA発現レベルを当業者にとって常套的な方法、例えば、ノーザンブロット法、qRT-PCRを使用して決定することによって；遺伝子のタンパク質レベルをウェスタンブロットティング、免疫学的技法などの当業者にとって常套的な方法を使用して決定することによって、決定することができる。

【0306】

「低下／低減／減少（reduced）」という用語は、対象におけるAPOB遺伝子発現またはAPOBタンパク質産生のレベル、または疾患マーカーもしくは症状に関しては、そのようなレベルの統計的に有意な低下を指す。低下／低減／減少（decrease）は、例えば、少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、または検出方法の検出レベルを下回るものであり得る。ある特定の実施形態では、標的の発現が正常化する、すなわち、そのような障害を有さない個体に対して正常な範囲内として許容されるレベルに向かってまたはそのレベルまで低下する。本明細書で使用される場合、対象において「より低い」とは、対象の細胞における遺伝子発現またはタンパク質産生の低下が、対象の全ての細胞または組織における発現の低下を必要とするものではないことを指し得る。例えば、本明細書で使用される場合、対象における低下は、対象の肝臓

40

50

における遺伝子発現またはタンパク質産生の低下を含み得る。

【0307】

「低下／低減／減少 (reduced)」という用語は、疾患または状態の症状の正常化との関連でも使用され得る、すなわち、APOB関連疾患に罹患していない正常な対象におけるレベルに向かうまたはそのレベルまでのAPOB関連疾患に罹患している対象におけるレベルの間の差異が減少する。本明細書で使用される場合、疾患が症状に関して値の上昇と関連する場合、「正常」は正常の上限とみなされる。疾患が症状に関して値の低下と関連する場合、「正常」は正常の下限とみなされる。

【0308】

「増強」という用語は、対象におけるAPOB遺伝子発現またはAPOBタンパク質産生のレベル、または疾患マーカーもしくは症状に関しては、そのようなレベルの統計的に有意な上昇を指す。上昇は、例えば、少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、または検出方法の検出レベルを上回るものであり得る。ある特定の実施形態では、標的の発現が正常化する、すなわち、そのような障害を有さない個体に対して正常な範囲内として許容されるレベルに向かってまたはそのレベルまで上昇する。本明細書で使用される場合、対象において「より高い」とは、対象の細胞における遺伝子発現またはタンパク質産生の上昇が、対象の全ての細胞または組織における発現の上昇を必要とするものではないことを指し得る。例えば、本明細書で使用される場合、対象における上昇は、対象の肝臓における遺伝子発現またはタンパク質産生の上昇を含み得る。

【0309】

「増強」という用語は、疾患または状態の症状の正常化との関連でも使用され得る、すなわち、APOB関連疾患に罹患していない正常な対象におけるレベルに向かうまたはそのレベルまでのAPOB関連疾患に罹患している対象におけるレベルの間の差異が増大する。本明細書で使用される場合、疾患が症状に関して値の上昇と関連する場合、「正常」は正常の上限とみなされる。疾患が症状に関して値の低下と関連する場合、「正常」は正常の下限とみなされる。

【0310】

一部の実施形態では、本発明の方法における使用に適した細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、細胞は体細胞である。一部の実施形態では、細胞は初代細胞である。例えば、一部の実施形態では、細胞は哺乳動物体細胞である。一部の実施形態では、哺乳動物体細胞は初代細胞である。一部の実施形態では、哺乳動物体細胞は非胚細胞である。

【0311】

接触させるステップは、in vitro、in vivo（すなわち、細胞が対象内に存在し得る）、またはex vivoで実施することができる。一部の実施形態では、細胞を接触させるステップをex vivoで実施し、当該方法は、接触させるステップの前に、細胞（例えば、哺乳動物細胞）を対象から取り出すステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、接触させるステップの後に、(b)細胞（例えば、哺乳動物細胞）を対象に投与するステップをさらに含む。

【0312】

本発明のin vivo方法は、対象に本発明の作用剤または組成物を投与することを含み得る。

【0313】

「対象」という用語は、本明細書で使用される場合、生物体、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト哺乳動物、非ヒト霊長類、霊長類、実験動物、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、ネコ、またはイヌ）を指す。一部の実施形態では、ヒト対象は、成人対象、青年対象、または小児対象である。一部の実施形態では、対象は疾患または状態を有していた。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害または状態、例えば、本明細書に提示されている通り処置することができる疾患、障害または状態に罹患している。一部の

実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態にかかりやすい；一部の実施形態では、かかりやすい対象は、疾患、障害または状態の素因があるおよび／またはそれが発生するリスクの増大を示している（参照対象または集団における観察される平均リスクと比較して）。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状を示している。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態の特定の症状（例えば、疾患の臨床像）も特徴も示していない。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態のいかなる症状も特徴も示していない。一部の実施形態では、対象は患者である。一部の実施形態では、対象は、診断および／または治療が施行されるおよび／または施行されている個体である。

【0314】

10

本発明の方法が有益であろう対象としては、「APOB関連疾患」を有する対象または「APOB関連疾患」のリスクがある対象が挙げられる。

したがって、本発明は、それを必要とする対象を処置する方法をさらに提供する。本発明の処置方法は、本発明の作用剤または組成物を、対象、例えば、APOB関連疾患を有する対象などの、APOB発現のモジュレーションが有益であろう対象に、治療有効量で投与することを含む。

【0315】

さらに、本発明は、APOB関連疾患を有する対象などの、APOB発現のモジュレーションが有益であろう対象における少なくとも1つの症状を、対象に本発明の作用剤または組成物を予防有効量で投与することによって防止する方法を提供する。

20

【0316】

「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、APOB関連疾患を有する対象を処置するために患者に投与した場合に、疾患の処置をもたらすため（例えば、既存の疾患または疾患またはその関連する共存症の1つまたは複数の症状を減弱させる、好転させる、または維持することによって）に十分である、作用剤または組成物の量を含むものとする。

「治療有効量」は、作用剤または組成物、投与の仕方、疾患およびその重症度、ならびに処置を受ける患者の病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、APOB遺伝子発現によって媒介される病理学的プロセスのステージ、もしあれば先行する処置または併用処置の型、および他の個々の特徴に応じて変動し得る。

【0317】

30

「予防有効量」は、本明細書で使用される場合、APOB関連疾患の症状をまだ経験していてもいないし示していてもいないが、APOB関連疾患の素因を有し得る対象に投与した場合に、疾患または疾患の1つまたは複数の症状の発生または増悪を臨床的に有意な期間にわたって防止するまたは遅延させるために十分である作用剤または組成物の量を含むものとする。「予防有効量」は、作用剤または組成物、投与の仕方、疾患のリスクの度合い、ならびに処置を受ける患者の病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、もしあれば先行する処置または併用処置の型、および他の個々の特徴に応じて変動し得る。

【0318】

本明細書で使用される場合、「防止」または「防止すること」は、APOB遺伝子の発現またはAPOBタンパク質の産生の低減が有益であろう疾患、障害または状態に関して使用される場合、対象においてそのような疾患、障害、または状態に関連する症状、例えば、APOB遺伝子発現またはAPOB活性の徴候または症状が発生する尤度の低下を指す。

40

【0319】

「治療有効量」または「予防有効量」は、任意の処置に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比でいくらかの所望の局部効果または全身性効果を生じる作用剤または組成物の量も含む。本発明の方法に使用する作用剤および組成物は、そのような処置に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比を生じさせるのに十分な量で投与することができる。一部の実施形態では、治療有効量または予防有効量を単回用量で投与する（*t i s a d m i n i s t e r e d*）；一部の実施形態では、治療有効量または予防有効量を送達する

50

ためには複数の単位用量が必要である。

【0320】

本明細書で使用される場合、「症状が低減する」という句は、特定の疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状の大きさ（例えば、強度、重症度など）および／または頻度が低減する場合に使用することができる。一部の実施形態では、特定の症状の発症の遅延は、その症状の頻度の減少の一形態とみなされる。

【0321】

処置を受ける対象がヒトなどの哺乳動物である場合、組成物を、頭蓋内（例えば、脳室内、実質内、および髄腔内）、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、経鼻、直腸、および局所（頬側および舌下を含む）投与を含めた経口経路、腹腔内経路、または非経口経路を含むがこれだけに限定されない当技術分野で公知の任意の手段によって投与することができる。ある特定の実施形態では、組成物を静脈内注入または静脈内注射によって投与する。ある特定の実施形態では、組成物を皮下注射によって投与する。

【0322】

本明細書で使用される場合、「APOB関連疾患」という用語は、APOB遺伝子発現またはAPOBタンパク質産生によって引き起こされる、またはそれに関連する疾患または障害である。「APOB関連疾患」という用語は、APOB遺伝子発現、複製、またはタンパク質活性の低下が有益であろう疾患、障害または状態を含む。APOB関連疾患の非限定的な例としては、例えば、脂質異常症（例えば、高脂血症、高LDLコレステロール、低HDLコレステロール、高トリグリセリド血症、食後高トリグリセリド血症）、血糖制御の障害（例えば、インスリンに対する免疫応答に関連しないインスリン抵抗性、2型糖尿病）、心血管疾患（例えば、高血圧症、内皮細胞機能障害）、メタボリックシンドローム、脂質沈着の疾患または機能障害（例えば、脂肪細胞機能障害、内臓脂肪沈着、肥満）、尿酸上昇の疾患（例えば、高尿酸血症、痛風）、および糖分を過剰に欲することなどの摂食障害が挙げられる。種々の疾患または状態の徴候および症状に関するさらなる詳細は本明細書に提示されており、また、当技術分野で周知である。

【0323】

APOB関連疾患または障害を有する患者における本発明の方法に従った作用剤または組成物の投与により、APOB関連疾患または障害の重症度、徴候、症状、またはマーカーの低減をもたらすことができる。この文脈での「低下／低減／減少（reduction）」は、そのようなレベルの統計的に有意な低下を意味する。低下（絶対的な低下、または対象における上昇したレベルと正常なレベルの差異の減少）は、例えば、少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、または使用するアッセイの検出レベルを下回るまでであり得る。

【0324】

本発明の方法に従った作用剤または組成物の投与により、標的遺伝子の発現を安定にまたは一過性にモジュレートすることができる。一部の実施形態では、発現のモジュレーションは少なくとも約1時間～約30日間、または少なくとも約2時間、6時間、12時間、18時間、24時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、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、またはより長い期間またはこれらの間の任意の時間にわたって持続する。一部の他の実施形態では、発現のモジュレーションは、約30分～約7日間以下、または約1時間以下、約2時間以下、約3時間以下、約4時間以下、約5時間以下、約6時間以下、約7時間以下、約8時間以下、約9時間以下、約10時間以下、約11時間以下、約12時間以下、約13時間以下、約14時間以下、約15時間以下、約16時間以下、約17時間以下、約18時間以下、約19時間以下、約20時間以下、約21時間以下、約22時間以下、約24時間以下、約36時間以下、約48時間以下、約60時間以下、約72時間以下、約4日間以下、約5日間以下

下、約 6 日間以下、約 7 日間以下、またはこれらの間の任意の時間にわたって持続する。

【0325】

作用剤または組成物を対象に 1 回投与することができる、あるいは、ある期間にわたって複数回の投与を実施することができる。例えば、1 回の処置の間にまたはある期間にわたって 2 回、3 回、4 回、5 回、またはそれよりも多くの投与を対象に対して行うことができる。一部の実施形態では、処置レジメンの通りに 1 回の処置の間にまたはある期間にわたって 6 回、8 回、10 回、12 回、15 回または 20 回またはそれよりも多くの投与を対象に対して行うことができる。

【0326】

一部の実施形態では、投与を、必要に応じて、例えば、疾患、障害または状態に関連する症状が持続する限り行うことができる。一部の実施形態では、対象の残りの生涯にわたって反復投与が必要になり得る。処置期間は変動し得、例えば、1 日、2 日間、3 日間、1 週間、2 週間、1 カ月間、2 カ月間、3 カ月間、6 カ月間、1 年間、またはより長い期間であり得る。

【0327】

疾患の処置または防止の有効性は、例えば、疾患の増悪、疾患の寛解、症状の重症度、疼痛の低減、生活の質、処置効果を持続させるために必要な薬物適用の用量、疾患マーカーのレベル、または処置されるまたは防止の標的とされる所与の疾患に適した任意の他の測定可能なパラメータを測定することによって評価することができる。そのようなパラメータのいずれか 1 つ、またはパラメータの任意の組合せを測定することによって処置または防止の有効性をモニタリングすることは十分に当業者の能力の範囲内に入る。本明細書で考察されている通り、測定される特定のパラメータは、対象が罹患している APOB 関連疾患に依存する。

【0328】

後の読み取りと最初の読み取りを比較することにより、処置が有効であるかどうかの指標が医師にもたらされる。そのようなパラメータのいずれか 1 つ、またはパラメータの任意の組合せを測定することによって処置または防止の有効性をモニタリングすることは十分に当業者の能力の範囲内に入る。作用剤または組成物の投与に関して、APOB 関連障害「に対して有効」とは、臨床的に適当な様式での投与により、少なくとも統計的に有意な割合の患者に有益な効果、例えば、症状の改善、治癒、疾患の低減、寿命の延長、生活の質の改善、または APOB 関連障害の処置に詳しい医師によって有益であると一般に認められる他の効果がもたらされることを示す。

【0329】

処置効果または防止効果は、病状の 1 つまたは複数のパラメータの統計的に有意な改善が存在する場合に、またはそうでなければ予測されるであろう症状の悪化も発生も起こらないことによって明らかである。例として、測定可能な疾患のパラメータの少なくとも 10 %、および好ましくは少なくとも 20 %、30 %、40 %、50 % またはそれよりも大きな好都合な変化により、有効な処置が示され得る。所与の作用剤または組成物の有効性は、当技術分野で公知の所与の疾患の実験動物モデルを使用して判断することもできる。実験動物モデルを使用する場合、処置の有効性は、マーカーまたは症状の統計的に有意な低減が観察される場合に証明される。

【0330】

あるいは、有効性を、臨床的に許容される疾患重症度に関する悪性度分類尺度に基づいて診断の分野の当業者によって決定されるとおり疾患の重症度の低下によって測定することができる。例えば適当な尺度を使用して測定される疾患の重症度の低下をもたらす任意の有益な変化は、本明細書に記載の作用剤または組成物を使用した処置が十分であることを表す。

【0331】

本明細書で使用される場合、「処置すること」または「処置」という用語は、APOB 遺伝子発現または APOB タンパク質産生に関連する 1 つまたは複数の徴候または症状の

10

20

30

40

50

緩和または好転を含むがこれだけに限定されない、有益なまたは所望の結果を指す。「処置」は、処置を行わない場合に予測される生存と比較して生存が長くなることも意味する。

【0332】

次に、本発明を以下の実施例によって説明する。しかし、本明細書の任意の箇所でのこれらおよび他の実施例の使用は単に例示的なものであり、決して本発明または任意の例示された形態の範囲および意味を限定するものではない。本発明は、本明細書に記載の特定の好ましい実施形態のいずれにも限定されない。本発明の多くの改変および変形が当業者には明らかになり得、本発明の主旨および範囲から逸脱することなく行うことができる。図面を含めた本出願全体を通して引用されている全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【実施例】

【0333】

(実施例1)

材料および方法

ここに記載する材料および方法を実施例2～4で使用する。

【0334】

初代マウス肝細胞培養および処置

初代雌マウス(CD-1)凍結保存肝細胞(PMH)をGibcoから購入した(Lot#:770)。特別に配合された解凍用培地(Gibco(商標)、CM7500)中で細胞を解凍した。PMHを60gで6分間遠心分離し、デカントによって上清を廃棄した。PMHペレットを特別に配合された肝細胞プレーティング培地(5%ウシ胎仔血清、1μMのデキサメタゾン、10,000U/mLのペニシリン、10,000μg/mLのストレプトマイシン、4μg/mLのヒト組換えインスリン、2mMのGlutaMAX(商標)および15mMのHEPESを補充したウィリアムズE培地)に再懸濁させた。トリパンブルー染色を用いて生PMHを計数し、細胞を、ラット尾部I型コラーゲンをコーティングした96ウェルプレートに生PMH30,000個/ウェルの濃度で播種した。5%CO₂の湿度制御インキュベーター中、37℃で4時間にわたってPMHをウェルに付着させた。その後、培地(the medium)を肝細胞インキュベーション培地(0.1μMのデキサメタゾン、10,000U/mLのペニシリン、10,000μg/mLのストレプトマイシン、1%ITS+、2mMのGlutaMAX(商標)および15mMのHEPESを補充したウィリアムズE培地)に置き換えた。細胞を、処理前に、湿度制御インキュベーター中、5%CO₂雰囲気下、37℃で24時間インキュベートした。

20

30

【0335】

処理のために、ウェル中のPMH培地を、LNP製剤を種々の濃度の全RNA(すなわち、sgRNAとCas9をコードするmRNAの組合せ)で含有する肝細胞インキュベーション培地に置き換えた。20μg/mLの全RNAから開始する各濃度を3連でアッセイした。簡単に述べると、LNPを、別の96ウェルプレート中、インキュベーション培地中に必要な濃度に希釈した。LNPを、プレート中、インキュベーション培地を使用して2倍に段階希釈した。次いで、LNPを含有する培地100μLを調製プレートからPMHプレートに移した。細胞を、製剤と一緒に72時間にわたって連続的にインキュベートした。処理時間の最後に、ウェル中の培地をApob ELISAのために採取し、PMHをPBSで3回洗浄して細胞片および培地を取り除いた。AllPrep DNA/RNAキット(Qiagen)を使用してPMHからゲノムDNAおよびmRNAを抽出し、試料をさらに処理した。

40

【0336】

(実施例2)

APOB発現制御領域の編集

本実施例では、APOB発現制御領域を標的とする部位特異的APOB標的化成分、す

50

なわち、単一ガイドRNA (sgRNA) =、およびCas9を含むエフェクターを含む部位特異的APOB遮断剤を用いたAPOB発現制御領域の編集を記載する。いかなる理論にも縛られることを望まずに、標的化成分によりエフェクターが標的部位にガイドされ、Cas9を含むエフェクターにより、ゲノムDNAがAPOB遺伝子発現制御領域において切断されると仮定した。Cas9誘導切断の非相同末端結合 (NHEJ) 修復では種々の異なる変異が残され、配列決定または他の方法によって検出することができる。したがって、部位特異的遮断剤により、ゲノムDNAが標的発現制御領域で編集される。編集の一部は生産的である、すなわち、これらの編集 (すなわち、変異) は発現調節配列の機能を中断する、例えば、CTCF部位によって媒介されるトポロジカル立体配置 (例えばループ) の形成を中断するものである。

10

【0337】

ガイドRNAを、APOB遺伝子のCTCFアンカー部位3 (転写開始部位の付近) を含む転写制御領域を部位特異的に標的とするように設計し (例えば、図1および2を参照されたい)、オリゴヌクレオチド合成のための標準の方法に従って合成した。単一ガイドRNAのヌクレオチド配列を表2に提示する。

【0338】

細胞培養およびトランスフェクションを実施例1に記載の通り行った。

【0339】

個々のsgRNA (図2を参照されたい) およびCas9をコードするmRNAを使用してLNP製剤を調製した。LNP製剤を細胞に全RNA (すなわち、sgRNAおよびmRNA) の最終濃度20.00 μg/ml、10.00 μg/ml、5.00 μg/ml、2.50 μg/ml、1.25 μg/ml、または0.630 μg/mlで添加した。72時間後に実験を終了した。細胞培養物の上清をタンパク質アッセイのために採取した。下流のmRNAおよび/またはDNA精製のために細胞を溶解させた。非標的sgRNA、GD-23150を陰性対照として使用した。GD-23150は以下の配列を有する：GTATTACTGATATTGGTGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTT

20

【0340】

APOB発現制御領域の編集をT7E1アッセイおよび配列決定に基づくアッセイを使用して分析した。周知のプロトコールに従ってアッセイを実施した。簡単に述べると、PMH由来のゲノムDNA (上記) を、CTCF部位3領域に対するプライマーを使用して増幅し、アンプリコン配列決定 (MiSeq、Illumina) によって配列決定した。使用したプライマーは以下の配列を有する：

30

フォワード：CCCCCTCCACCCCTTTCCTATT

リバース：CAAGGGACAGGGCTAAGTG

フォワードアダプター配列：CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

リバースアダプター配列：GGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

40

【0341】

野生型アンプリコン、すなわち、Cas9による編集によって生成した変異を含有しないアンプリコンは以下に示される配列を有する：

CCCCCTCCACCCCTTTCCTATTCTACTACCCCTAGGGGGTCA
GAGGATCAGGCTTTGCGCGCAATACCCAGCTTCTCTCCGCGAG
AGCGCTAGGATTGGCCTCTCTCTGATGGGGCAGCATCTC
CATCTGGTGGCCATATGGGCAGTACTACATCCGGGGTTCTTA
ACCAAGTTATTCTTCTCACAATCAAAAAATTCCTGTCAATGG
ACAGTGGAAATCTGCGCAGAAAGTTTCTTTTATGGAGGGGGT
TTCTAGAAAGTCAACCAAGACAGCCTTAACAGCTAACTTTGT

50

G T C C G G T A C T T C A T A G G T T C T A G T C A C G A T A G C A T T T T C A
A A C T G A G A A A C A C T T A G C C C T G T C C C T T T G

【0342】

PCR産物を精製し、T7エンドヌクレアーゼ消化またはアンプリコン配列決定に供した。T7エンドヌクレアーゼは、標的部位におけるCas9誘導切断のNH₂修復によって生成される変異によって引き起こされたミスマッチの位置で二本鎖DNAを切断する。

【0343】

図3A～3Dに示されている通り、sgRNAとCas9の組合せにより、APOB遺伝子の発現制御領域が編集された。図3A～3Dの実験の材料および方法は実施例1に記載されているものとはわずかに異なるものであった。簡単に述べると、PMH細胞の解凍後、トリパンブルー染色を用いて生PMHを計数し、細胞を、ラット尾部I型コラーゲンをコーティングした24ウェルプレートに生PMH180,000個／ウェルの濃度で播種した。5%CO₂の湿度制御インキュベーター中、37℃で4時間にわたってPMHをウェルに付着させた。次いで、培地を肝細胞インキュベーション培地（0.1μMのデキサメタゾン、10,000U／mLのペニシリン、10,000μg／mLのストレプトマイシン、1%ITS+、2mMのGlutaMAX（商標）および15mMのHEPESを補充したウイリアムズE培地）に置き換えた。細胞を、処理を行う前に、湿度制御インキュベーター中、5%CO₂雰囲気下、37℃で24時間インキュベートした。

【0344】

処理のために、ウェル中のPMH培地を、本明細書の他の箇所で説明されている結果に基づいて5μg／mLの全RNA濃度のLNP製剤を含有する肝細胞インキュベーション培地に置き換えた。PMH処理を3連で行った。簡単に述べると、LNPを、別の24ウェルプレート中、インキュベーション培地中に必要な濃度に希釈した。PMHプレートのウェルから培地を採取した。次いで、LNPを含有する培地500μLを調製プレートからPMHプレートに移した。細胞を、製剤と一緒に24時間インキュベートした。次いで、ApoB ELISAのためにウェルから培地を採取し、LNPを伴わない新鮮なインキュベーション培地を細胞に添加した。48時間後および96時間後（それぞれ処理の72時間後および120時間後に対応する）、ウェル中の培地を採取し、PMHをPBSで3回洗浄して細胞片および培地を取り除いた。次いで、AllPrep DNA／RNAキット（Qiagen）を使用してPMHからゲノムDNAおよびmRNAを抽出し、試料をさらに処理した。PCRプライマーおよび予測される野生型アンプリコン配列は上記と同じであった。

【0345】

図3Aおよび3Bに示されている通り、sgRNAとCas9をコードするmRNAの組合せにより、APOB遺伝子の発現制御領域が編集された。図3Aは、T7E1アッセイによって決定された、5μg／mLの濃度の示されているsgRNAおよびCas9をコードするmRNAについての発現制御領域のCas9誘導編集のパーセンテージを示す。図3Bは、代表的な電気泳動ゲル画像であり、T7エンドヌクレアーゼによって切断可能なPCR産物がゲル上に存在しないことが示されている。

【0346】

図3Cおよび3Dに示されている通り、sgRNAとCas9の組合せにより、APOB遺伝子の発現制御領域が編集された。図3Cは、5μg／mLの濃度の、示されているsgRNAおよびCas9をコードするmRNAによる発現制御領域のCas9誘導生産的編集のパーセンテージを示す。図3Dは、示されているsgRNAによる生産的編集の比を示す。

【0347】

（実施例3）

APOB発現のモジュレーションーmRNA

本実施例では、APOB mRNAレベルの低下によって測定される、APOB発現制

10

20

30

40

50

御領域を標的とする部位特異的 A P O B 標的化成分、すなわち s g R N A、および C a s 9 を含むエフェクターを含む部位特異的 A P O B 遮断剤を使用した A P O B 発現の抑止を記載する。

【0348】

実施例 1 に記載の通り、細胞を培養し、s g R N A および C a s 9 をコードする m R N A をトランスフェクトした。A P O B 特異的 s i R N A を陽性対照として使用し、細胞培養物に 0.63 ng / ml で添加した。s i R N A は以下の配列を有する。

【表 3】

ガイド鎖: 5'-AUUUfCfaggaaUfUfgUfUfaaguu-3'

パッセンジャー鎖: 5'-iBCfUfUfUfdAdACfdAdAUfUfCfCfUfdGdAdAdAUfdTdTtB-3'

N: RNA 残基 n: 2'-O-メチル残基 Nf: 2'-F 残基 dT: デスオキシT iB: 逆無塩基残基

10

【0349】

P M H 処理由来の A p o B m R N A を、処理細胞から得た R N A 抽出物を使用した q P C R によって分析した。相対的な A p o B m R N A レベルを算出するためのハウスキーピング陽性対照として β -アクチンを使用した。

【0350】

予備試験において、全体的な細胞の健康の指標として処理が β -アクチンレベルに負の影響を及ぼさないことを決定するために処理群の全ての濃度からのデータを使用した（データは示していない）。これらの結果に従って、5 μ g / ml を超える全 R N A 濃度（すなわち、s g R N A と C a s 9 をコードする m R N A の組合せ）はハウスキーピング遺伝子レベルに負の影響を及ぼし、したがって細胞ストレスを引き起こすと考えられることが決定され、さらなる分析から排除した。

20

【0351】

したがって、図 4 A ~ 4 D は、予備試験に基づいて安全であるとして許容される全 R N A 濃度内の処理群の相対的な A p o B レベルを示す。図 4 A ~ 4 D に示されている通り、s g R N A と C a s 9 をコードする m R N A の組合せにより、m R N A レベルの低下によって測定された通り、培養された P M H における A P O B 遺伝子の発現が低減した。図 4 A ~ 4 D は、ある特定の部位特異的 A P O B 標的化成分（G D - 2 6 9 1 1 および G D - 2 6 9 1 2）と C a s 9 をコードする m R N A の組合せにより、5 μ g / ml の全 R N A （すなわち、s g R N A と C a s 9 をコードする m R N A の組合せ）の濃度で A p o B 発現の 50% を超える低減をもたらされたことを示すグラフである。グラフは、細胞を示されている s g R N A および C a s 9 を含むエフェクターと接触させた 72 時間後の A P O B m R N A レベルを示す。結果は 3 連の実験からのものである。A P O B 遺伝子を標的とする s i R N A （s i A p o B）のレベルは N T X 対照に対するものである。N T X 対照に関しては、培養細胞に L N P のみをトランスフェクトした、すなわち、L N P 製剤は R N A を含有しないものであった。

30

【0352】

図 4 A および 4 B は、相対的な A P O B m R N A レベルを示す。A p o B m R N A レベルを非標的化ガイド R N A 製剤（G D - 2 3 1 5 0 群）に対してグラフ化した。図 4 A は、ウェル内の結果を示すグラフである。試料のそれぞれのウェル内のアクチンに対する個々の A P O B の結果を使用してデルタサイクル閾値（d C T 値）が算出された（w e r e w a s c a l c u l a t e d）。図 4 B は、プレート間にわたる結果を示すグラフである。各希釈点での全ての試料におけるアクチンの平均に対する個々の A P O B の結果を使用して d C T 値を算出した。

40

【0353】

図 4 C および 4 D は、正規化された m R N A インプットを用いた N T C と比較した相対的な A P O B m R N A レベルを示す。図 4 C は、ウェル内の結果を示すグラフである。試料のそれぞれのウェル内でのアクチンに対する個々の A P O B の結果を使用して d C T

50

値を算出した。図 4 D は、プレート間にわたる結果を示すグラフである。全ての試料中のアクチンの平均に対する個々の A P O B の結果を使用して d C T 値を算出した。

【 0 3 5 4 】

図 4 E および 4 F により、A P O B 発現制御領域を標的とする部位特異的 A P O B 標的化成分、すなわち s g R N A、および C a s 9 を含むエフェクターを含む部位特異的 A P O B 遮断剤を用いた A P O B 発現のダウンレギュレーションがさらに確認される。図 4 E および 4 F では、5 μ g / m l の全 R N A、すなわち、s g R N A と C a s 9 をコードする m R N A の組合せを細胞にトランスフェクトした。さらに、A P O B 遺伝子のエクソンを標的とする s g R N A、G D - 2 7 7 2 3 を陽性対照として使用し、一方、異なる無関係の遺伝子を標的とする s g R N A、G D - 2 3 1 4 9 を陰性対照として使用した。G D - 2 7 7 2 3 および G D 2 3 1 4 9 は以下の配列を有する：

【表 4】

GD-27723: TCAAGCTGGCCATTCCTGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG
GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTT

GD-23149: TTACAGCCACGTCTACAGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG
GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTT

【 0 3 5 5 】

図 4 E および 4 F に示されている通り、A P O B 発現制御領域を標的とする s g R N A と C a s 9 を含むエフェクターの組合せにより、A P O B の m R N A レベルが特異的に低下した。P M H 細胞において A P O B 特異的 s g R N A により A P O B の m R N A レベルが低下したが、無関係の遺伝子を標的とする s g R N A では A P O B の発現をダウンレギュレートすることはできなかった。

【 0 3 5 6 】

(実施例 4)

A P O B 発現のモジュレーションータンパク質

本実施例では、A P O B 発現制御領域を標的とする部位特異的 A P O B 標的化成分、すなわち s g R N A、および C a s 9 を含むエフェクターを含む部位特異的 A P O B 遮断剤を使用した、A P O B タンパク質レベルの低下によって測定される A P O B 発現の抑止を記載する。

【 0 3 5 7 】

わずかな改変を伴って実施例 1 に記載の通り細胞を培養し、部位特異的 s g R N A および C a s 9 をコードする m R N A を用いて処理した。5 μ g / m l の全 R N A、すなわち、s g R N A と C a s 9 をコードする m R N A の組合せを細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの 7 2 時間後、細胞培養物からの上清を採取し、E L I S A アッセイを実施して、上清中の A P O B タンパク質の濃度を決定した。

【 0 3 5 8 】

図 5 A および 5 B に示されている通り、A P O B 発現制御領域を標的とする s g R N A と C a s 9 の組合せにより、タンパク質レベルの低下によって測定された通り、培養した P M H における A P O B 遺伝子の発現が低減した。図 5 A は、培養細胞の上清中の A p o B タンパク質の濃度を示す。図 5 B は、示されている s g R N A と C a s 9 をコードする m R N A の組合せを使用した低減のパーセンテージを示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

表2. 部位特異的APOB標的化成分-以下の各成分の最初の20ヌクレオチドが成分の標的化部分を含む。

識別子	ヌクレオチド配列5'-3'
GD-26911 (修飾されていない)	GATGGGGCAGCATCTCCATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
GD-26911	mGs;mAs;mUs;rG;rG;rG;rG;rC;rA;rG;rC;rA;rU;rC;rU;rC;rC;rA;rU;rC;rG;rU;rU;rU;rU;r A;rG;mA;mG;mC;mU;mA;mG;mA;mA;mA;mU;mA;mG;rC;rA;rA;rG;rU;rU;rA;rA;rA;r A;rU;rA;rA;rG;rG;rC;rU;rA;rG;rU;rC;rC;rG;rU;rU;rA;rU;rC;mA;mA;mC;mU;mU;mG; mA;mA;mA;mA;mA;mG;mU;mG;mG;mC;mA;mC;mC;mG;mA;mG;mU;mC;mG;mG; mU;mG;mC;mU;mUs;mUs;mUs
GD-26912 (修飾されていない)	GGGGCAGCATCTCCATCTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
GD-26912	mGs;mGs;mGs;rG;rC;rA;rG;rC;rA;rU;rC;rU;rC;rC;rA;rU;rC;rU;rG;rG;rG;rU;rU;rU;rU;r A;rG;mA;mG;mC;mU;mA;mG;mA;mA;mA;mU;mA;mG;rC;rA;rA;rG;rU;rU;rA;rA;rA;r A;rU;rA;rA;rG;rG;rC;rU;rA;rG;rU;rC;rC;rG;rU;rU;rA;rU;rC;mA;mA;mC;mU;mU;mG; mA;mA;mA;mA;mA;mG;mU;mG;mG;mC;mA;mC;mC;mG;mA;mG;mU;mC;mG;mG; mU;mG;mC;mU;mUs;mUs;mUs
GD-26913 (修飾されていない)	ACTGCCATATGGCCACCAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT
GD-26913	mAs;mCs;mUs;rG;rC;rC;rA;rU;rA;rU;rG;rG;rC;rC;rA;rC;rC;rA;rG;rA;rG;rU;rU;rU;rU;r A;rG;mA;mG;mC;mU;mA;mG;mA;mA;mA;mU;mA;mG;rC;rA;rA;rG;rU;rU;rA;rA;rA;r A;rU;rA;rA;rG;rG;rC;rU;rA;rG;rU;rC;rC;rG;rU;rU;rA;rU;rC;mA;mA;mC;mU;mU;mG; mA;mA;mA;mA;mA;mG;mU;mG;mG;mC;mA;mC;mC;mG;mA;mG;mU;mC;mG;mG; mU;mG;mC;mU;mUs;mUs;mUs

10

20

30

40

50

【表 A】

表 A. 核酸配列表示に使用したヌクレオチド単量体の略語。これらの単量体は、オリゴヌクレオチド内に存在する場合には 5'-3'リン酸ジエステル結合によって相互に連結していることが理解されよう。

略語	ヌクレオチド
A	アデノシン-3'-リン酸
As	アデノシン-3'-ホスホロチオエート
C	シチジン-3'-リン酸
Cs	シチジン-3'-ホスホロチオエート
G	グアノシン-3'-リン酸
Gs	グアノシン-3'-ホスホロチオエート
U	ウリジン-3'-リン酸
Us	ウリジン-3'-ホスホロチオエート
N	任意のヌクレオチド、修飾されたものまたは修飾されていないもの
mA	2'-O-メチルアデノシン-3'-リン酸
mAs	2'-O-メチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
mC	2'-O-メチルシチジン-3'-リン酸
mCs	2'-O-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
mG	2'-O-メチルグアノシン-3'-リン酸
mGs	2'-O-メチルグアノシン-3'-ホスホロチオエート
mU	2'-O-メチルウリジン-3'-リン酸
mUs	2'-O-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
s	ホスホロチオエート連結
r	リボヌクレオチド

10

20

30

40

50

【図 3 - 3】

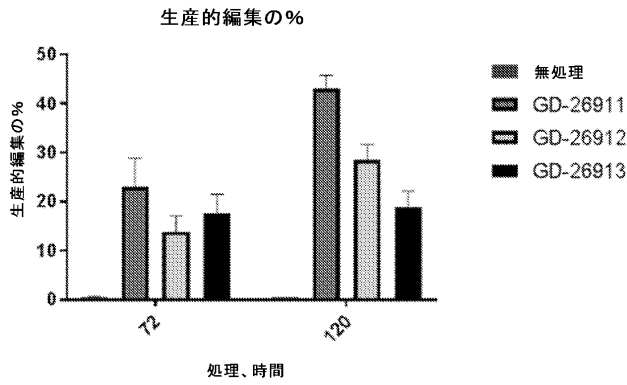


FIG. 3C

【図 3 - 4】

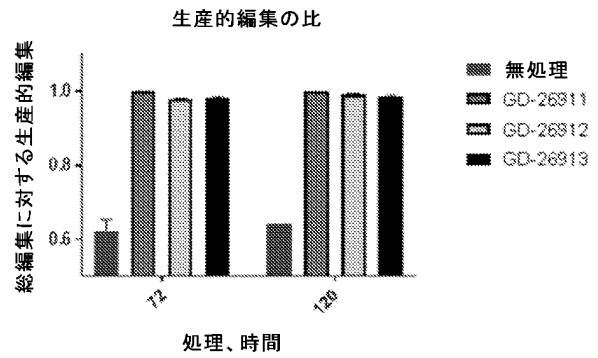
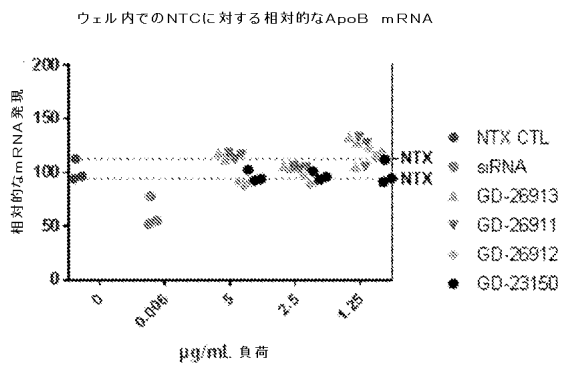


FIG. 3D

10

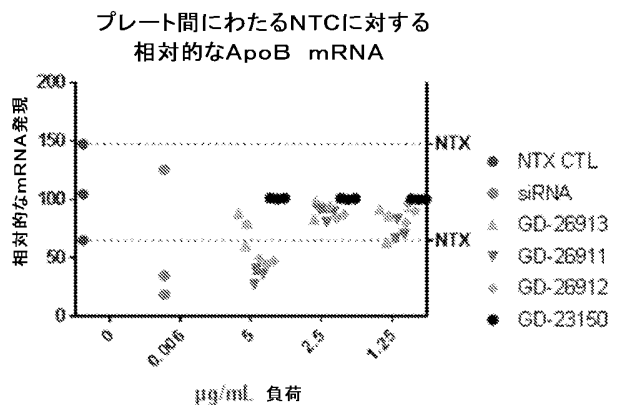
【図 4 - 1】



siApoBはNTX CTLに対するものである
結果は、希釈系列による生物学的3連である
試料のそれぞれのウェル内でのアクチンに対する個々のApoBの結果を
使用してdCTを算出した

FIG. 4A

【図 4 - 2】



siApoBはNTX CTLに対するものである
結果は、希釈系列による生物学的3連である
各希釈点での全ての試料におけるアクチンの平均に対する個々のApoBの結果を
使用してdCTを算出した

FIG. 4B

20

30

40

50

【図 4 - 3】

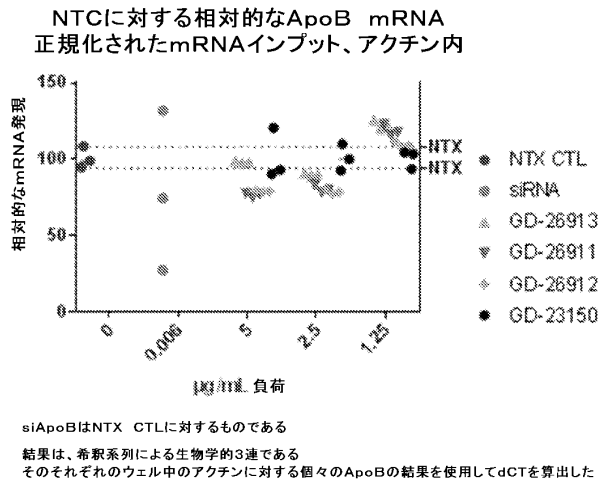


FIG. 4C

【図 4 - 4】

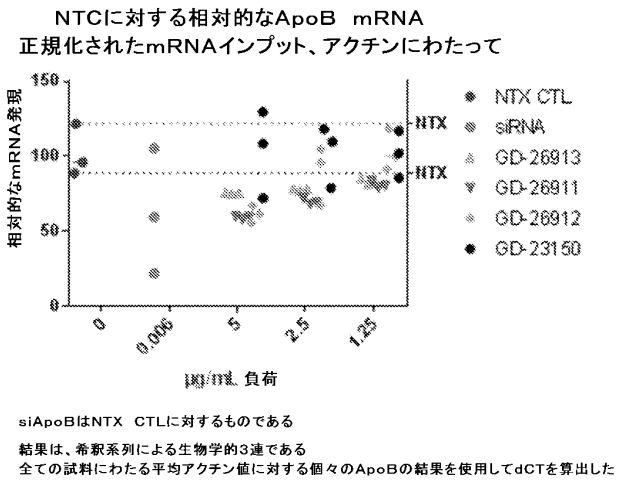


FIG. 4D

【図 4 - 5】

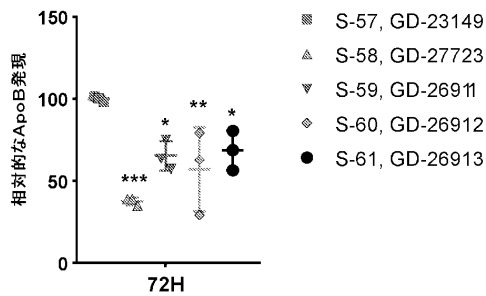


FIG. 4E

【図 5】

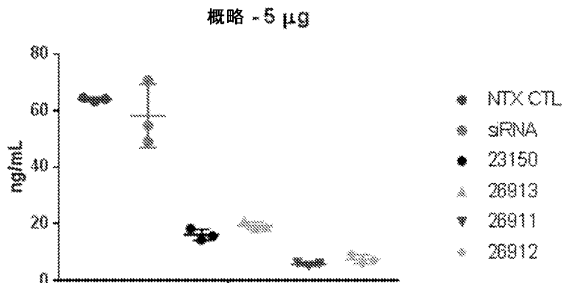


FIG. 5A

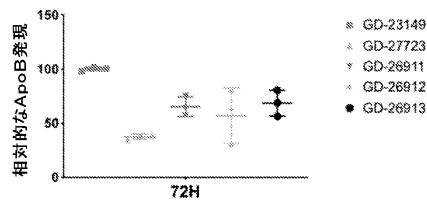


FIG. 4F

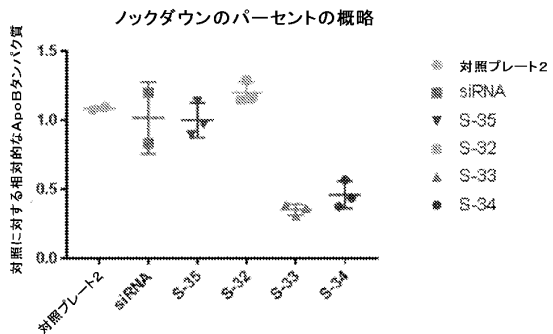


FIG. 5B

10

20

30

40

50

【配列表】

2022548320000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/052119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9 C12Q1/68 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) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/053430 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC [CA]; MACLACHLAN IAN [CA] ET AL.) 26 May 2006 (2006-05-26) claims 1,13	1-5,21, 23-29, 41, 44-55, 105-110
☒ 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 1 December 2020		Date of mailing of the international search report 09/12/2020
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 Aslund, Fredrik

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/052119

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Catherine McLaughlin ET AL: "Development of novel therapeutic approaches for the reduction of apolipoprotein B expression", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055755300, DOI: 10.13140/rg.2.1.3104.7840 Retrieved from the Internet: URL:https://www.researchgate.net/profile/Catherine_McLaughlin/publication/278524013_Development_of_novel_therapeutic_approaches_for_the_reduction_of_apolipoprotein_B_expression/links/5581468908ae607ddc3243e3/Development-of-novel-therapeutic-approaches-for-the-reduction-of-apolipoprotein-B-expression.pdf abstract -----	1,2, 49-55, 105-110
X	WO 2014/204726 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US] ET AL.) 24 December 2014 (2014-12-24) figures 78A, 78B; examples 38, 39 -----	1-5, 8-55, 58-110
X	KELSEY E. JARRETT ET AL: "Somatic genome editing with CRISPR/Cas9 generates and corrects a metabolic disease", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 16 March 2017 (2017-03-16), pages 1-12, XP055566917, DOI: 10.1038/srep44624 abstract; figure 2 -----	1-5, 8-55, 58-110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/052119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006053430 A1	26-05-2006	AU 2005306533 A1	26-05-2006
		CA 2587411 A1	26-05-2006
		EP 1828219 A1	05-09-2007
		EP 2199298 A1	23-06-2010
		US 2006134189 A1	22-06-2006
		US 2011189300 A1	04-08-2011
		WO 2006053430 A1	26-05-2006

WO 2014204726 A1	24-12-2014	AU 2014281028 A1	28-01-2016
		CA 2915842 A1	24-12-2014
		CN 107995927 A	04-05-2018
		EP 3011031 A1	27-04-2016
		IL 243196 A	30-06-2020
		JP 6738728 B2	19-08-2020
		JP 2016524472 A	18-08-2016
		JP 2020026438 A	20-02-2020
		KR 20160030187 A	16-03-2016
		RU 2016101200 A	28-03-2019
		SG 10201710486X A	30-01-2018
		SG 11201510284X A	28-01-2016
		US 2016153005 A1	02-06-2016
		WO 2014204726 A1	24-12-2014

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)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)
 C 0 7 K 2/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 P 3/06 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 9/12 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/06 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 15/11 Z
 C 0 7 K 2/00
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 P 3/06
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 9/12
 A 6 1 P 9/10 1 0 1
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 K 45/06
 A 6 1 P 43/00 1 0 5

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,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ウス ドライブ 4 6

(72)発明者 カルニク, ラーフル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, ブロードウェイ 4 1 9

(72)発明者 スミス, ジェシー ジェローム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 3, ウォルサム, ビール ロード 2 2 6

(72)発明者 サリソゼン, キャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 8 6, ウェストフォード, ヴァイン ブルック ロード
 4 6

(72)発明者 シャイデッガー, アダム ウォルター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 5, サマービル, グレート リバー ロード 3 3 3
 , ナンバー 3 0 6

(72)発明者 ベネット, バーバラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 8 0, ウェイクフィールド, アルパイン サークル 2

F ターム (参考) 4C084 AA20 MA02 NA14 ZA36 ZA42 ZA45 ZB21 ZC33 ZC35

4C087 BB64 BB65 CA04 CA12 MA02 NA14 ZA36 ZA42 ZA45 ZB21
 ZC33 ZC35

4H045 AA10 AA30 BA56 EA27 FA74