

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-527525
(P2024-527525A)

(43)公表日 令和6年7月25日(2024.7.25)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/02	
A 6 1 K 31/423(2006.01)	A 6 1 K 31/423	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全160頁) 最終頁に続く

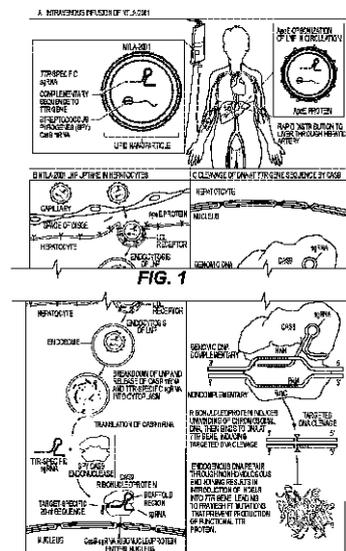
(21)出願番号 特願2023-579195(P2023-579195)	(71)出願人 518196169
(86)(22)出願日 令和4年6月22日(2022.6.22)	インテリア セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日 令和6年2月20日(2024.2.20)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(86)国際出願番号 PCT/US2022/034454	2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0, スイート 1 3 0
(87)国際公開番号 WO2022/271780	
(87)国際公開日 令和4年12月29日(2022.12.29)	
(31)優先権主張番号 63/202,744	(74)代理人 100092783
(32)優先日 令和3年6月22日(2021.6.22)	弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74)代理人 100120134
(31)優先権主張番号 63/202,812	弁理士 大森 規雄
(32)優先日 令和3年6月25日(2021.6.25)	(74)代理人 100196966
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	弁理士 植田 涉
(31)優先権主張番号 63/263,466	(72)発明者 レブウォール, デイビッド
最終頁に続く	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
	2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝遺伝子のインビボ編集のための方法

(57)【要約】

臨床試験におけるインビボ編集のためのCRISPR/Cas9ベースの治療薬の初めての全身投与が記載されている。本明細書に記載されるのは、CasヌクレアーゼをコードするmRNAと、肝遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む脂質ナノ粒子組成物を全身投与することによる、当該遺伝子のインビボ編集のための方法である。例えば、本明細書で開示されるのは、CasヌクレアーゼをコードするmRNAと、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む脂質ナノ粒子組成物を全身投与することによる、トランスサイレチン遺伝子のインビボ編集のための方法である。バイオセーフティ尺度及び臨床有効性尺度の評価、ならびに処置方法も、本明細書に記載される。

【選択図】図1-1、図1-2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト対象における T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を処置する方法であつて、

a . 前記ヒト対象に、有効量の、

i . C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び

i i . T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A

を含む L N P 組成物を全身投与することを含み、

前記組成物の前記投与が、ベースライン血清 T T R と比べて血清 T T R を低下させる、前記方法。

10

【請求項 2】

前記 A T T R が、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 A T T R が、野生型トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 A T T R が、多発神経障害を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 A T T R が、心筋症を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項 1 または 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記 A T T R が、心筋症を伴う野生型トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象が、New York Health Association (N Y H A) 分類の下でクラス I、クラス I I、またはクラス I I I に分類される、請求項 1、5、または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象が、A T T R v - P N 及び / または A T T R - C M を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記 L N P が、(9 Z , 1 2 Z) - 3 - ((4 , 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ((((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ - 9 , 1 2 - ジエノエートを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 L N P が、P E G 脂質を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記 P E G 脂質が、ジミリスチルグリセロール (D M G) を含む、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記 P E G 脂質が、P E G - 2 k を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 L N P 組成物が、約 5 ~ 7 の N / P 比を有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記ガイド R N A 及び前記 C a s ヌクレアーゼが、重量基準で約 5 : 1 から約 1 : 5 までの範囲をとる比率で存在する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記 mRNA が、クラス 2 Casヌクレアーゼをコードする、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 mRNA が、Cas9ヌクレアーゼをコードする、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 mRNA が、Spyogenes Cas9 をコードする、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 Casヌクレアーゼをコードする前記 mRNA が、コドン最適化されている、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 19】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 0.3 mg/kg ~ 約 2 mg/kg の合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 0.3 mg/kg ~ 約 1 mg/kg の合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 21】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 0.3 mg/kg の合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 0.7 mg/kg の合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 1.0 mg/kg の合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 24】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 25 mg ~ 約 150 mg の全RNAの合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 25 mg ~ 約 100 mg の全RNAの合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 26】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 50 mg ~ 約 90 mg の全RNAの合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約 60 mg の全RNAの合計用量である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングする前記

50

ガイドRNAの前記有効量が、約70mgの全RNAの合計用量である、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約80mgの全RNAの合計用量である、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAの前記有効量が、約90mgの全RNAの合計用量である、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項31】

前記組成物の投与が、前記組成物の投与前のベースライン血清TTRと比較して、血清TTRを60～70%、70～80%、80～90%、90～95%、95～98%、98～99%、または99～100%低下させる、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記血清TTRレベルが、前記組成物の投与後に約50μg/mL未満である、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

前記血清TTRレベルが、前記組成物の投与後に約40μg/mL未満である、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項34】

前記血清TTRレベルが、前記組成物の投与後に約30μg/mL未満である、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

前記血清TTRレベルが、前記組成物の投与後に約20μg/mL未満である、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

前記血清TTRレベルが、前記組成物の投与後に約10μg/mL未満である、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項37】

前記LNP組成物の第2の用量を投与することをさらに含み、前記第2の用量の投与が、前記第1の用量の投与前の前記ベースライン血清TTRレベルと比べて血清TTRレベルを少なくとも80%低下させる、請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

前記LNP組成物の第2の用量を投与することをさらに含み、前記第2の用量の投与が、前記第2の用量の投与前かつ前記第1の用量の投与後の前記ベースライン血清TTRレベルと比べて血清TTRレベルを少なくとも80%低下させる、請求項1～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

前記組成物が、第2の治療薬と共に投与される、請求項1～37のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項40】

前記第2の治療薬が、ジフルニサルまたはタファミジスである、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

トランスサイレチン(TTR)に関連するアミロイドーシス(ATTR)を有するヒト対象におけるTTR遺伝子のインピボ編集のための方法であって、

a. 前記ヒト対象に、

i. CasヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

50

i i . T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNA

を含む脂質ナノ粒子 (L N P) 組成物を全身投与することと、

b . 前記対象の肝細胞において前記ガイドRNAによってターゲティングされる部位において前記T T R 遺伝子を編集することと

を含み、前記組成物の前記投与が、前記対象におけるバイオセーフティ尺度のレベルにおいて、前記バイオセーフティ尺度のベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす、前記方法。

【請求項42】

A T T R を有するヒト対象におけるトランスサイレチン (T T R) 遺伝子のインビボ編集のための方法であって、

10

a . 前記ヒト対象に、有効量の、

i . C a s ヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

i i . T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNA

を含むL N P 組成物を全身投与することと、

b . 前記対象の肝細胞において前記ガイドRNAによってターゲティングされる部位においてT T R 遺伝子を編集することと

を含み、前記組成物の前記投与が、前記対象における臨床尺度のレベルにおいて、ベースラインレベルと比較して臨床的に有意な向上をもたらす、前記方法。

【請求項43】

ヒト対象におけるT T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を処置する方法であって、

20

a . 前記ヒト対象に、有効量の、

i . C a s ヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

i i . T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNA

を含むL N P 組成物を全身投与することを含み、

前記組成物の前記投与が、前記対象におけるバイオセーフティ尺度のレベルにおいて、ベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす、前記方法。

【請求項44】

ヒト対象におけるT T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を処置する方法であって、

30

a . 前記ヒト対象に、有効量の、

i . C a s ヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

i i . T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNA

を含むL N P 組成物を全身投与することを含み、

前記組成物の前記投与が、前記対象における臨床尺度のレベルにおいて、前記臨床尺度のベースラインレベルと比較して臨床的に有意な向上をもたらす、前記方法。

【請求項45】

ヒト対象におけるT T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を処置する方法であって、

40

a . 前記ヒト対象に、有効量の、

i . C a s ヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

i i . T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNA

を含むL N P 組成物を全身投与することを含み、

C a s ヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びT T R 遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約25~約100mgの合計用量で投与される、前記方法。

【請求項46】

単一遺伝子障害を有するヒト対象の肝臓における遺伝子のインビボ編集のための方法であって、

a . 前記ヒト対象に、

i . C a s ヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

50

i i . 肝臓における遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含むLNP組成物を全身投与することと、

b . 前記対象の肝細胞において前記ガイドRNAによってターゲティングされる部位において前記遺伝子を編集することと
を含み、前記組成物の前記投与が、前記対象におけるバイオセーフティ尺度のレベルにおいて、前記バイオセーフティ尺度のベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす、前記方法。

【請求項47】

単一遺伝子障害を有するヒト対象を処置する方法であって、

a . 前記ヒト対象に、有効量の、

i . CasヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

i i . 肝臓における遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含むLNP組成物を全身投与することと、

b . 肝臓における前記遺伝子を編集し、それによって前記単一遺伝子障害を処置することとを含み、前記処置が安全かつ忍容性良好である、前記方法。

10

【請求項48】

単一遺伝子障害を有するヒト対象を処置する方法であって、

a . 前記ヒト対象に、有効量の、

i . CasヌクレアーゼをコードするmRNA、及び

i i . 肝臓における遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含むLNP組成物を全身投与することと、

b . 投与前の前記対象におけるバイオセーフティ尺度の第1のレベルを判定することと、

c . 投与後のある期間の前記対象における前記バイオセーフティ尺度の第2のレベルを判定することと、

d . 前記バイオセーフティ尺度の前記第1のレベルと前記第2のレベルとの間の変化を評価することとを含み、前記組成物の前記投与が、前記対象におけるバイオセーフティ尺度のレベルにおいて、ベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす、それによってATTRを処置する、前記方法。

20

【請求項49】

前記全身投与の前に、ATTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を有するヒト対象を選択することを含む、請求項41~45のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項50】

前記全身投与の前に、単一遺伝子障害を有するヒト対象を選択することを含む、請求項46~48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項51】

前記LNPが、(9Z,12Z)-3-(4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9,12-ジエノエートを含む、請求項41~50のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項52】

前記LNPが、PEG脂質を含む、請求項41~51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

前記PEG脂質が、ジミリストイルグリセロール(DMG)を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

前記PEG脂質が、PEG-2kを含む、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記LNP組成物が、約5~7のN/P比を有する、請求項41~54のいずれか1項に記載の方法。

50

【請求項 56】

前記ガイドRNA及び前記Casヌクレアーゼが、重量基準で約5：1から約1：5までの範囲をとる比率で存在する、請求項41～55のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 57】

前記mRNAが、クラス2 Casヌクレアーゼをコードする、請求項41～56のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 58】

前記mRNAが、Cas9ヌクレアーゼをコードする、請求項41～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 59】

前記mRNAが、S. pyogenes Cas9をコードする、請求項41～58のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 60】

前記Casヌクレアーゼをコードする前記mRNAが、コドン最適化されている、請求項41～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 61】

前記ガイドRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項41～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 62】

前記ガイドRNAに対する前記少なくとも1つの修飾が、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項 63】

前記mRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項41～62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 64】

前記単一遺伝子障害が、ATTRである、請求項46～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 65】

肝臓における前記遺伝子が、ATTRである、請求項46～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 66】

前記ATTRが、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項41～65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 67】

前記ATTRが、野生型トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項41～65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 68】

前記ATTRが、多発神経障害を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項41～66のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 69】

前記ATTRが、心筋症を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項41～66または68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 70】

前記ATTRが、心筋症を伴う野生型トランスサイレチンアミロイドーシスである、請求項67に記載の方法。

【請求項 71】

前記対象が、New York Health Association (NYHA) 分類の下でクラスI、クラスII、またはクラスIIIに分類される、請求項69または70に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 2】

前記対象が、A T T R v - P N 及び / または A T T R - C M を有する、請求項 4 1 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記バイオセーフティ尺度が、プロトンピンである、請求項 4 1 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記組成物の投与が、前記対象におけるバイオセーフティ尺度のレベルにおいて、前記バイオセーフティ尺度のベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす、請求項 4 1、4 3、または 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7 5】

前記バイオセーフティ尺度が、活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T) である、請求項 4 1、4 3、4 6、または 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 6】

前記バイオセーフティ尺度が、フィブリノゲンである、請求項 4 1、4 3、4 6、または 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記バイオセーフティ尺度が、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) である、請求項 4 1、4 3、4 6、または 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記バイオセーフティ尺度が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) である、請求項 4 1、4 3、4 6、または 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 9】

C a s ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングする前記ガイド R N A が、約 0 . 3 m g / k g ~ 約 2 m g / k g の合計用量で投与される、請求項 4 1 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

C a s ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングする前記ガイド R N A が、約 0 . 3 m g / k g ~ 約 1 m g / k g の合計用量で投与される、請求項 4 1 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8 1】

C a s ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングする前記ガイド R N A が、約 0 . 3 m g / k g の合計用量で投与される、請求項 4 1 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】

C a s ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングする前記ガイド R N A が、約 0 . 7 m g / k g の合計用量で投与される、請求項 4 1 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 3】

C a s ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングする前記ガイド R N A が、約 1 . 0 m g / k g の合計用量で投与される、請求項 4 1 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 8 4】

C a s ヌクレアーゼをコードする前記 m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングする前記ガイド R N A が、約 5 0 m g ~ 9 0 m g の全 R N A の合計用量で投与される、請求項 4 1 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記 L N P 組成物の第 2 の用量を投与することをさらに含み、前記第 2 の用量の投与が、ベースライン血清 T T R レベルと比べて血清 T T R レベルを少なくとも 8 0 % 低下させる、請求項 8 4 に記載の方法。

50

【請求項 86】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約15mg～100mgの全RNAの合計用量で投与される、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 87】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約70mg～約90mgの全RNAの合計用量で投与される、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 88】

前記LNP組成物の第2の用量を投与することをさらに含み、前記第2の用量の投与が、(i)前記第1の用量の投与前または(2)前記第2の用量の投与前かつ前記第1の用量の投与後のベースライン血清TTRレベルと比べて血清TTRレベルを少なくとも80%低下させる、請求項87に記載の方法。

10

【請求項 89】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約25mg～約27mgの全RNAの合計用量で投与される、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 90】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約25mg～約150mgの全RNAの合計用量で投与される、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 91】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約25mg～約100mgの全RNAの合計用量で投与される、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 92】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約50mg～約90mgの全RNAの合計用量で投与される、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 93】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約35mg～65mgの全RNAの合計用量である、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 94】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約40mgの全RNAの合計用量である、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 95】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約50mgの全RNAの合計用量で投与される、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 96】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約60mgの全RNAの合計用量である、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 97】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約70mgの全RNAの合計用量である、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 98】

50

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約80mgの全RNAの合計用量である、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項99】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約90mgの全RNAの合計用量である、請求項41～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項100】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、約100mgの全RNAの合計用量である、請求項41～78のい

10

【請求項101】

前記全RNAが、前記合計mg用量の約±5%以内である、請求項84～100のいずれか1項に記載の方法。

【請求項102】

前記全RNAが、前記合計mg用量の約±10%以内である、請求項84～100のい

【請求項103】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、75mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

20

【請求項104】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、76mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

【請求項105】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、77mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

【請求項106】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、78mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

30

【請求項107】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、79mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

【請求項108】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、80mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

40

【請求項109】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、81mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

【請求項110】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、82mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のい

【請求項111】

50

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、83mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

【請求項112】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、84mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

【請求項113】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、85mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項114】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、86mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

【請求項115】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、87mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

【請求項116】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、88mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項117】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、89mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

【請求項118】

C a sヌクレアーゼをコードする前記mRNA及びTTR遺伝子をターゲティングする前記ガイドRNAが、90mgの全RNAの合計用量である、請求項41～102のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項119】

前記臨床尺度が、血清TTRレベルである、請求項42または44に記載の方法。

【請求項120】

前記組成物の投与が、TTR遺伝子の発現を低下させるかまたはロックダウンする、請求項41～119のいずれか1項に記載の方法。

【請求項121】

前記組成物の投与が、前記組成物の投与前のベースラインと比較して、TTR遺伝子の発現を60～70%、70～80%、80～90%、90～95%、95～98%、98～99%、または99～100%低下させるかまたはロックダウンする、請求項41～120のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項122】

前記組成物の投与が、前記組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、前記対象におけるTTR血清レベルを少なくとも60%低下させる、請求項41～120のいずれかに記載の方法。

【請求項123】

前記組成物の投与が、前記組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、前記対象におけるTTR血清レベルを60～70%、70～80%、80～90%、90～95%、95～98%、98～99%、または99～100%低下させる、請求項41～120のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 1 2 4】

前記血清 T T R レベルが、ベースライン血清 T T R レベルと比べて少なくとも 6 0 % 低下する、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記血清 T T R レベルが、ベースライン血清 T T R レベルと比べて少なくとも 8 0 % 低下する、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記血清 T T R レベルが、ベースライン血清 T T R レベルと比べて少なくとも 9 0 % 低下する、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記血清 T T R レベルが、ベースライン血清 T T R レベルと比べて少なくとも 9 5 % 低下する、請求項 1 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 8】

前記血清 T T R レベルが、前記組成物の投与後に約 5 0 μ g / m L 未満である、請求項 4 1 ~ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記血清 T T R レベルが、前記組成物の投与後に約 4 0 μ g / m L 未満である、請求項 4 1 ~ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記血清 T T R レベルが、前記組成物の投与後に約 3 0 μ g / m L 未満である、請求項 4 1 ~ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 3 1】

前記血清 T T R レベルが、前記組成物の投与後に約 2 0 μ g / m L 未満である、請求項 4 1 ~ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記血清 T T R レベルが、前記組成物の投与後に約 1 0 μ g / m L 未満である、請求項 4 1 ~ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記組成物が、第 2 の治療薬と共に投与される、請求項 4 1 ~ 1 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 3 4】

前記第 2 の治療薬が、ジフルニサルまたはタファミジスである、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

ヒト対象における T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を処置する方法であって、前記対象における血清 T T R レベルをベースライン血清 T T R レベルと比較して少なくとも 9 5 % 低下させる有効量の組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 1 3 6】

前記組成物の単回投与後、前記遺伝子の発現を永続的に低下させることを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 1 3 7】

前記遺伝子が T T R 遺伝子である、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記組成物が、(i) C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び(i i) T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A を含む、請求項 1 3 6 または 1 3 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、2 0 2 1 年 6 月 2 2 日に出願された米国仮出願第 6 3 / 2 0 2 , 7 4 4 号、2

50

021年6月25日に出願された米国仮出願第63/202,812号、2021年11月3日に出願された米国仮出願第63/263,466号、2021年11月22日に出願された米国仮出願第63/264,435号、及び2022年2月28日に出願された米国仮出願第63/314,878号の利益を主張し、それらの内容を全体として参照により本明細書に援用するものである。

【背景技術】

【0002】

ミスフォールディングしたトランスサイレチン(TTR)タンパク質から構成されたアミロイド原線維が組織に蓄積することを特徴とするアミロイドーシスは、ATTRと呼ばれる場合があり、進行性致死性疾患である(Marcoux et al., *EMBO Mol Med* 2015、Gertz et al., *J Am Coll Cardiol* 2015)。ATTRは幅広い症状を呈する可能性があり、異なるクラスのATTRを有する対象は、異なる特徴及び予後を有し得る。ATTRのいくつかのクラスには、家族性アミロイド多発神経障害(FAP)、家族性アミロイド心筋症(FAC)、及び野生型TTRアミロイドーシス(wt-TTRアミロイドーシス)が含まれる。FAPは一般的に感覚運動神経障害を呈し、FAC及びwt-TTRアミロイドーシスは一般的にうっ血性心不全を呈する。ATTRアミロイドーシスは、後天性の場合があり(野生型ATTRアミロイドーシス; ATTRwt)、心筋症及び心不全の原因として認識されている(Gertz et al., *J Am Coll Cardiol* 2015)。TTRアミロイドーシスは、遺伝性の場合があり(変異型ATTR; ATTRv; hATTR)、TTR遺伝子における100を超える病原性突然変異によって誘発され得る(Ando et al., *Orphanet J Rare Dis* 2013)。ATTRvアミロイドーシスは、世界中でおよそ50,000人に存在すると考えられており(Hawkins et al., *Ann Med*, 2015、Schmidt et al., *Muscle Nerve*, 2018)、常染色体優性の遺伝パターンと、アミロイド多発神経障害または心筋症が支配的な臨床表現型とを有し、ほとんどの対象が2つの組み合わせ(ATTR-PN-CM)を示す(Dohrn et al., *J Neurochem* 2021)。症状の発症後、ATTRアミロイドーシスは進行性であり、アミロイド心筋症を有する対象では診断後2~6年以内(Maurer et al., *Circ Heart Fail*, 2019)、心筋症のないアミロイド多発神経障害を有する対象では症状発症後4~17年以内の中央値で死に至る(Merlini et al., *Neurol Ther* 2020)。

【0003】

TTRは、TTR遺伝子によって生産されるタンパク質であり、通常はレチノール及びチロキシンを全身に輸送するように機能する。TTRは主に肝臓で合成され、ごく一部は脈絡叢及び網膜で生産される。TTRは、通常、可溶性四量体タンパク質として血液中を循環する。四量体の安定性を妨害する可能性があるTTRの病原性変異型は、TTR遺伝子の突然変異アレルによってコードされ得る。突然変異型TTRは、ミスフォールディングしたTTRをもたらし得、これはアミロイド(すなわち、ミスフォールディングしたTTRタンパク質の凝集体)を生成し得る。場合によっては、TTRの病原性変異型は、アミロイドーシス、またはアミロイドの蓄積に起因する疾患につながる可能性がある。例えば、ミスフォールディングしたTTR単量体は、末梢神経、心臓、及び消化管などの組織内で重合してアミロイド原線維になり得る。アミロイド原線維は、ミスフォールディングしたTTRに沈着した野生型TTRを含むこともある。

【0004】

ATTRアミロイドーシスに対する現行処置は、四量体型のTTRの安定化を介して(ジフルニサル、タファミジス)(Maurer et al., *NEJM* 2018、Berk et al., *Jama* 2013)、またはTTR mRNAの分解によるTTRタンパク質合成の阻害を介して(イノテルセン、パチシラン)(Benson et al., *NEJM* 2018、Adams et al., *NEJM* 2018)

)、進行中のアミロイド形成を低下させることに依存する。そのような処置は、症状緩和、機能向上、及び生存期間延長をもたらすが (Adams et al., NEJM 2018、Adams et al., Lancet Neurol 2021、Solomon et al., Circulation 2019)、TTRノックダウンを維持するための生涯にわたる投与の必要性によって制限される。より一般的に言えば、多くの障害に対する既存の遺伝子編集手法は、遺伝子発現において短期的な効果をもたらすが、遺伝子発現において所望の効果を維持するために慢性投与を必要とする。パチシランの場合、慢性処置は、グルココルチコイド及び抗ヒスタミン薬による前投薬に関連する (Urits et al., Neurol Ther 2020)。さらに、TTR安定化剤を投与されている対象は、疾患の進行を経験する (Lozeron et al., Eur J Neurol 2013)。イノテルセンは、糸球体腎炎及び血小板数減少を含む重篤な副作用に関連している (Gertz et al., Expert Rev Clin Pharmacol 2019)。より高度のTTRノックダウンは、hATTR多発神経障害を有する対象における神経障害エンドポイントのより大きな向上に関連している (Adams et al., NEJM 2018)。持続的ノックダウンを含むTTR低下の増進は、ATTRアミロイドーシスを有する対象の転帰向上につながり得る。したがって、慢性投与を必要とすることなく、TTRのノックダウンなどの遺伝子発現における長期的な効果をもたらすことができる遺伝子編集療法に対する満たされていないニーズが残っている。

10

【発明の概要】

20

【0005】

本開示は、臨床試験におけるインビボ編集のためのCRISPR/Cas9ベースの治療薬の初めての全身投与を記載する。いくつかの実施形態において、本発明は、CRISPR/CasシステムなどのCasヌクレアーゼを含むガイドRNAを使用して、TTR遺伝子の発現を実質的に低下させるかまたはノックダウンし、それによって、ATTRに関連するTTRタンパク質の生産を実質的に低下または消失させるための方法を提供する。TTR遺伝子の改変による、ATTRに関連するTTRタンパク質の生産の実質的な低下または消失は、血清TTRレベルの長期的な低下または消失、例えば血清TTRの永続的な低下であり得る。追加の実施形態には、ヒト対象に対する、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼをコードするmRNAなどのCRISPR/Cas RNA成分の、インビボで肝臓をターゲットとした送達において使用するための脂質ナノ粒子システム、ならびにそれを使用する方法が含まれる。

30

【0006】

一態様において、本明細書で提供されるのは、ヒト対象におけるTTRに関連するアミロイドーシス (ATTR) を処置する方法であって、ヒト対象にLNP組成物を全身投与することであって、LNP組成物が、有効量の、(i) CasヌクレアーゼをコードするmRNA、及び(ii) TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む、全身投与することを含み、それによってATTRを処置し、組成物の投与が、血清TTRをベースライン血清と比べて低下させる、方法である。

【0007】

40

一態様において、本明細書で提供されるのは、トランスサイレチン (TTR) に関連するアミロイドーシス (ATTR、別称トランスサイレチンアミロイドーシス) を有するヒト対象におけるTTR遺伝子のインビボ編集のための方法であって、ヒト対象に、(i) CasヌクレアーゼをコードするmRNA、及び(ii) TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む脂質ナノ粒子 (LNP) 組成物を全身投与することと、対象の肝細胞においてガイドRNAによってターゲティングされる部位において遺伝子を編集することを含み、組成物の投与が、対象におけるバイオセーフティ尺度のレベルにおいて、バイオセーフティ尺度のベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす、方法である。

【0008】

50

一態様において、本明細書で提供されるのは、トランスサイレチン (T T R) に関連するアミロイドーシス (A T T R) を有するヒト対象における T T R 遺伝子のインビボ編集のための方法であって、ヒト対象に L N P 組成物を全身投与することであって、L N P 組成物が、有効量の、(i) C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び (i i) T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A を含む、全身投与することと、対象の肝細胞においてガイド R N A によってターゲティングされる部位において T T R 遺伝子を編集することとを含み、組成物の投与が、対象における臨床尺度のレベルにおいて、ベースラインレベルと比較して臨床的に有意な向上をもたらす、方法である。

【 0 0 0 9 】

一態様において、本明細書で提供されるのは、ヒト対象における T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を処置する方法であって、ヒト対象に L N P 組成物を全身投与することであって、L N P が、有効量の、(i) C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び (i i) T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A を含む、全身投与することを含み、それによって A T T R を処置し、組成物の投与が、対象における臨床尺度のレベルにおいて、臨床尺度のベースラインレベルと比較して臨床的に有意な向上をもたらす、方法である。

10

【 0 0 1 0 】

一態様において、本明細書で提供されるのは、ヒト対象における T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を処置する方法であって、ヒト対象に L N P 組成物を全身投与することであって、L N P 組成物が、有効量の、(i) C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び (i i) T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A を含む、全身投与することを含み、それによって A T T R を処置し、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A が、約 2 5 ~ 約 1 0 0 m g の合計用量で投与される、方法である。

20

【 0 0 1 1 】

一態様において、本明細書で提供されるのは、単一遺伝子障害を有するヒト対象の肝臓における遺伝子のインビボ編集のための方法であって、ヒト対象に L N P 組成物を全身投与することであって、L N P 組成物が、(i) C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び (i i) 肝臓における遺伝子をターゲティングするガイド R N A を含む、全身投与することと、対象の肝細胞においてガイド R N A によってターゲティングされる部位において遺伝子を編集することとを含み、組成物の投与が、対象におけるバイオセーフティ尺度のレベルにおいて、バイオセーフティ尺度のベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす、方法である。いくつかの実施形態において、単一遺伝子障害は、A T T R である。いくつかの実施形態において、遺伝子は、T T R である。

30

【 0 0 1 2 】

一態様において、本明細書で提供されるのは、単一遺伝子障害を有するヒト対象を処置する方法であって、ヒト対象に L N P 組成物を全身投与することであって、L N P 組成物が、有効量の、(i) C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び (i i) 肝臓における遺伝子をターゲティングするガイド R N A を含む、全身投与することと、肝臓における遺伝子を編集し、それによって単一遺伝子障害を処置することとを含み、処置が安全かつ忍容性良好である、方法である。いくつかの実施形態において、単一遺伝子障害は、A T T R である。いくつかの実施形態において、遺伝子は、T T R である。

40

【 0 0 1 3 】

一態様において、本明細書で提供されるのは、単一遺伝子障害を有するヒト対象を処置する方法であって、ヒト対象に L N P 組成物を全身投与することを含み、L N P 組成物が、有効量の、(i) C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び (i i) 肝臓における遺伝子をターゲティングするガイド R N A を含む、方法である。この方法は、投与前の対象におけるバイオセーフティ尺度の第 1 のレベルを判定することと、投与後のある期間の対象におけるバイオセーフティ尺度の第 2 のレベルを判定することと、バイオセーフティ尺度の第 1 のレベルと第 2 のレベルとの間の変化を評価することとをさらに含む。いく

50

つかの実施形態において、バイオセーフティ尺度の第1のレベルと第2のレベルとの間の変化は、許容可能な変化である。いくつかの実施形態において、単一遺伝子障害は、ATTRである。いくつかの実施形態において、遺伝子は、TTRである。

【0014】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNPは、(9Z, 12Z) - 3 - ((4, 4 - ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ) - 2 - (((3 - (ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ - 9, 12 - ジエノエートを含む。

【0015】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNPは、PEG脂質を含む。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、ジミリストイルグリセロール(DMG)を含む。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG - 2kを含む。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG - DMG 2000である。

10

【0016】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物は、約5~7のN/P比を有する。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物のN/P比は、約4~6である。

【0017】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼは、重量基準で約5:1から約1:5までの範囲をとる比率で存在する。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼは、重量基準で約3:1から約1:3までの範囲をとる比率で存在する。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼは、重量基準で約2:1から約1:2までの範囲をとる比率で存在する。

20

【0018】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、mRNAは、クラス2 Casヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態において、mRNAは、Cas9ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態において、mRNAは、Spyogenes Cas9をコードする。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNAは、コドン最適化されている。いくつかの実施形態において、mRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。

30

【0019】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ガイドRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態において、ガイドRNAに対する少なくとも1つの修飾は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド及び/またはヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。

【0020】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ATTRは、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ATTRは、野生型トランスサイレチンアミロイドーシスである。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ATTRは、多発神経障害を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ATTRは、心筋症を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、ATTRは、心筋症を伴う野生型トランスサイレチンアミロイドーシスであり、例えば、対象は、New York Health Association (NYHA) 分類の下でクラスI、クラスII、またはクラスIIIに分類される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、対象は、ATTRv - PN及び/またはATTR - CMを有する。

40

【0021】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、対象におけるバ

50

イオセーフティ尺度のレベルにおいて、バイオセーフティ尺度のベースラインレベルと比較して許容可能である変化をもたらす。

【0022】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、バイオセーフティ尺度は、プロトロンビンである。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、バイオセーフティ尺度は、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) である。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、バイオセーフティ尺度は、フィブリノゲンである。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、バイオセーフティ尺度は、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) である。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、バイオセーフティ尺度は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) である。

10

【0023】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約0.3mg/kg~約2mg/kgの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約0.3mg/kg~約1mg/kgの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約0.3mg/kgの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約0.7mg/kgの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約1.0mg/kgの合計用量で投与される。

20

【0024】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約5mg~約9mgの全RNAの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約15mg~約27mgの全RNAの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約7mg~約9mgの全RNAの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約25mg~約27mgの全RNAの合計用量で投与される。

30

【0025】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約25mg~約150mgの全RNAの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約25mg~約100mgの全RNAの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約50mg~約90mgの全RNAの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約50mgの全RNAの合計用量で投与される。

40

【0026】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、約35mg~65mgの全RNAの合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、

50

約 40 mg の全 RNA の合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングするガイド RNA は、約 60 mg の全 RNA の合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングするガイド RNA は、約 70 mg の全 RNA の合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングするガイド RNA は、約 80 mg の全 RNA の合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングするガイド RNA は、約 90 mg の全 RNA の合計用量で投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、Casヌクレアーゼをコードする mRNA 及び TTR 遺伝子をターゲティングするガイド RNA は、約 100 mg の全 RNA の合計用量で投与される。

10

【0027】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、臨床尺度は、血清 TTR レベルである。

【0028】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、臨床尺度は、血清プレアルブミンレベルである。

【0029】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、TTR 遺伝子の発現を低下させるかまたはロックダウンする。

20

【0030】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、組成物の投与前のベースラインと比較して、TTR 遺伝子の発現を 60 ~ 70 %、70 ~ 80 %、80 ~ 90 %、90 ~ 95 %、95 ~ 98 %、98 ~ 99 %、または 99 ~ 100 % 低下させるかまたはロックダウンする。

【0031】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、組成物の投与前のベースラインと比較して、TTR 遺伝子の発現を 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 低下させるかまたはロックダウンする。

30

【0032】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、組成物の投与前の血清 TTR レベル（例えばベースライン）と比較して、対象における TTR 血清レベルを少なくとも 60 % 低下させる。

【0033】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、組成物の投与前の血清 TTR レベル（例えばベースライン）と比較して、対象における TTR 血清レベルを少なくとも 70 % 低下させる。

【0034】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、組成物の投与前の血清 TTR レベル（例えばベースライン）と比較して、対象における TTR 血清レベルを少なくとも 80 % 低下させる。

40

【0035】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、組成物の投与前の血清 TTR レベル（例えばベースライン）と比較して、対象における TTR 血清レベルを少なくとも 84 % 低下させる。

【0036】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP 組成物の投与は、組成物の投与前の血清 TTR レベル（例えばベースライン）と比較して、対象における TTR 血清レベル

50

を少なくとも90%低下させる。

【0037】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清TTRレベル（例えばベースライン）と比較して、対象におけるTTR血清レベルを少なくとも95%低下させる。

【0038】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清TTRレベル（例えばベースライン）と比較して、対象におけるTTR血清レベルを少なくとも96%低下させる。

【0039】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清TTRレベル（例えばベースライン）と比較して、対象におけるTTR血清レベルを60~70%、70~80%、80~90%、90~95%、95~98%、98~99%、または99~100%低下させる。

【0040】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、LNP組成物の投与後7日目に、対象におけるTTR血清レベルを前述のいずれかの量だけ低下させる。

【0041】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、LNP組成物の投与後14日目に、対象におけるTTR血清レベルを前述のいずれかの量だけ低下させる

10

20

【0042】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、LNP組成物の投与後28日目に、対象におけるTTR血清レベルを前述のいずれかの量だけ低下させる

【0043】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを少なくとも60%低下させる。

【0044】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを少なくとも70%低下させる。

30

【0045】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを少なくとも80%低下させる。

【0046】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを少なくとも84%低下させる。

40

【0047】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを少なくとも90%低下させる。

【0048】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、LNP組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを少なくとも95%低下させる。

【0049】

50

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを少なくとも96%低下させる。

【0050】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、組成物の投与前の血清プレアルブミンレベル（例えばベースライン）と比較して、対象における血清プレアルブミンレベルを60~70%、70~80%、80~90%、90~95%、95~98%、98~99%、または99~100%低下させる。

【0051】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、血清T T Rレベルを約50 μg / mL未満に低下させる。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、血清T T Rレベルを約40 μg / mL未満に低下させる。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、血清T T Rレベルを約30 μg / mL未満に低下させる。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、血清T T Rレベルを約20 μg / mL未満に低下させる。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、血清T T Rレベルを約10 μg / mL未満に低下させる。

10

【0052】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物はまた、第2の治療剤と共に投与される。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、第2の治療剤は、四量体型のT T Rの安定化剤である。前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、第2の治療薬は、ジフルニサルまたはタファミジスである。

20

【0053】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、L N P 組成物の投与後14日目に、対象における血清プレアルブミンレベルを前述のいずれかの量だけ低下させる。

【0054】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与は、L N P 組成物の投与後28日目に、対象における血清プレアルブミンレベルを前述のいずれかの量だけ低下させる。

30

【0055】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、本方法は、L N P 組成物の単回投与後、T T R 遺伝子などの遺伝子の発現を永続的に低下させることをさらに含む。

【0056】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与後28日目の血清T T Rレベルまたは血清プレアルブミンレベルは、永続的である。

【0057】

前述の態様及び実施形態のいずれかにおいて、L N P 組成物の投与後28日目の血清T T Rレベルまたは血清プレアルブミンレベルは永続的であり、例えば、2か月目、3か月目、4か月目、5か月目、6か月目、7か月目、8か月目、9か月目、10か月目、11か月目、及び/または12か月目に永続的である。

40

【0058】

一態様において、本明細書で開示されるのは、ヒト対象におけるT T Rに関連するアミロイドーシス（A T T R）を処置する方法であって、対象における血清T T Rレベルをベースライン血清T T Rレベルと比較して少なくとも95%低下させる有効量の組成物を対象に投与することを含む、方法である。

【0059】

本特許または出願書類は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面（複数可）を含む本特許または特許出願公開の写しは、要請及び必要手数料の支払いに応じて特許庁により提供される。

50

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1-1】NTLA-2001 LNPベースの遺伝子療法のための方法の概要。パネルAは、LNP粒子の組成及び注入療法を表し、パネルBは、提唱される遺伝子療法送達機構を説明し、パネルCは、TTR遺伝子のCRISPR-Cas9ベースの遺伝子編集を表す。

【図1-2】図1-1の続きである。

【図2】sgRNA濃度の関数としてのTTR遺伝子のNTLA-2001編集についての初代ヒト肝細胞の細胞培養ベースの評価。示されている一次尺度は、コントロールと比較したパーセンテージとしてのTTR遺伝子編集、TTR mRNAレベル、及びTTRタンパク質レベルである。

10

【図3】Aは、非ヒト霊長動物におけるCyn-LNPを使用したTTR編集頻度及び遺伝子編集パターンのインビボ評価。Bは、非ヒト霊長動物におけるCyn-LNPを使用したTTR編集頻度及び遺伝子編集パターンのインビボ評価。

【図4A】NTLA-2001で処置したヒトにおける、時間の関数としての血清TTRタンパク質濃度の変化（コントロールと比較した）（データは28日目まで示されている）。示されている尺度は、コホートA及びBの両方からのものである。

【図4B】NTLA-2001で処置したヒトにおける、時間の関数としての血清TTRタンパク質濃度の変化（コントロールと比較した）（データは28日目まで示されている）。示されている尺度は、コホートA及びBの両方からのものである。

20

【図4C】NTLA-2001で処置したヒトにおける、時間の関数としての血清TTRタンパク質濃度の変化（コントロールと比較した）（データは28日目まで示されている）。示されている尺度は、コホートA及びBの両方からのものである。

【図5】Cas-Offinder、GUIDE-seq、及びSITE-Seqによって特定された、NTLA-2001のsgRNAの潜在的なオフターゲット部位。

【図6A】NTLA-2001で処置した初代ヒト肝細胞の細胞培養物において評価した、オンターゲット及びオフターゲットの遺伝子編集頻度。

【図6B】NTLA-2001で処置した初代ヒト肝細胞の細胞培養物において評価した、オンターゲット及びオフターゲットの遺伝子編集頻度。

【図7】NTLA-2001によって誘導された遺伝子突然変異の特性解析を行うために使用される方法を説明する概略図。

30

【図8A】ハイスループットシーケンシングのために使用されるPCR法を説明する概略図。

【図8B】ハイスループットシーケンシングのために使用されるPCR法を説明する概略図。

【図9】NTLA-2001で処置した初代ヒト肝細胞からTTR座位の周囲で検出された構造変異型の評価。

【図10A】肝臓におけるTTR遺伝子編集のパーセンテージとして測定された、マウスモデルにおけるNTLA-2001編集の用量依存的評価。

【図10B】血清タンパク質レベルとして測定された、マウスモデルにおけるNTLA-2001編集の用量依存的評価。

40

【図11】マウスにおける部分肝切除後の血清TTRレベルにより測定したTTR遺伝子のNTLA-2001ベースの編集の永続性の評価。

【図12】Cyn-LNP処置した非ヒト霊長動物における時間の関数としての血清RNA濃度。

【図13A】Cyn-LNP処置した非ヒト霊長動物における遺伝子編集率によって測定したTTR編集の評価。

【図13B】Cyn-LNP処置した非ヒト霊長動物における血清TTRレベルによって測定したTTR編集の評価。

【図14】Cyn-LNPで処置した非ヒト霊長動物の肝臓におけるTTR血清タンパク

50

質レベルと遺伝子編集率との相関。

【図15A】プロトロンビン時間 (PT) として測定した、NTLA-2001 処置対象における肝臓パラメータ及び凝固パラメータ。

【図15B】活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) として測定した、NTLA-2001 処置対象における肝臓パラメータ及び凝固パラメータ。

【図15C】フィブリノゲンとして測定した、NTLA-2001 処置対象における肝臓パラメータ及び凝固パラメータ。

【図15D】アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) として測定した、NTLA-2001 処置対象における肝臓パラメータ及び凝固パラメータ。

【図15E】アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) として測定した、NTLA-2001 処置対象における肝臓パラメータ及び凝固パラメータ。 10

【図16】非ヒト霊長動物における Cyn-LNP の成分の血漿濃度。

【図17】NTLA-2001 処置有害事象。

【図18】登録された臨床試験対象の特徴。

【図19A】多発神経障害の用量漸増研究のための臨床試験対象データ。

【図19B】多発神経障害の用量漸増研究のための臨床試験対象データ。

【図19C】多発神経障害の用量漸増研究のための臨床試験対象データ。

【図19D】多発神経障害の用量漸増研究のための臨床試験対象データ。

【図20】用量別の TTR の低下。SE、標準誤差。(*) 2 か月目には N = 2。(†) 2 か月目には N = 5。 20

【図21A】プロトロンビン時間 (PT) のデータ。SE = 標準誤差。

【図21B】活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) のデータ。SE = 標準誤差。

【図21C】フィブリノゲンのデータ。SE = 標準誤差。

【図21D】アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) のデータ。SE = 標準誤差。

【図21E】アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) のデータ。SE = 標準誤差。

【図21F】dダイマーのデータ。SE = 標準誤差。

【図22】コホート3及び4を含むNTLA-2001 処置有害事象。

【図23A】登録された臨床試験対象の人口構成及びベースラインの特徴。 30

【図23B】登録された臨床試験対象の人口構成及びベースラインの特徴。

【図24】NTLA-2001 の単一用量 IV 注入後の LP01 の中間平均血漿濃度 - 時間プロファイル。NTLA-2001 は、ピークから急速に低下し、その後、二次ピーク及び対数線形相を呈する。入手可能な LP01 の PK データが投薬後 48 時間まで表されている。

【図25】NTLA (AUC $\text{mg}^* \text{h} / \text{mL}$) に対する 28 日目の TTR の中間平均 (SE) の観察 (点) 及びモデル予測 (線) は、NTLA-2001 曝露が増加するにつれて 28 日目の血清 TTR が減少することを示している。投薬前 TTR 濃度データが AUC = 0 で示されている。データは、示された各用量レベルにおける観察された個々の TTR 及び AUC 値の分布の平均として示されている。 40

【図26】示されている体重四分位別の 1.0 mg / kg 及び 80 mg の後の NTLA-2001 AUC ($\text{mg}^* \text{h} / \text{mL}$) の中間モデル予測分布。シミュレーションにより、NTLA-2001 80 mg が 1.0 mg / kg に相当する固定用量として特定された。

【図27】NTLA-2001 注入後に観察された AST 及び ALT のレベルにおける軽微な一時的変化。

【発明を実施するための形態】

【0061】

ここで、本発明のある特定の実施形態について詳細に説明する。その例は添付の図面に示す。本発明を示された実施形態と併せて説明するが、これらの実施形態が、本発明をこれらの実施形態に限定するように意図されていないことは理解されよう。そうではなく、 50

本発明は、添付の実施形態によって定義されるような本発明に含まれ得る全ての代替形態、修飾形態、及び均等物を網羅するように意図されている。

【0062】

本件の教示内容を詳細に説明する前に、組成物またはプロセスステップは様々であり得るため、本開示が特定の組成物またはプロセスステップに限定されないことを理解されたい。本明細書及び添付の実施形態で使用されているように、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容による別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を含むことに注意しなければならない。したがって、例えば、「(1つの)結合体」に言及された場合は複数の結合体を含み、「(1つの)細胞」に言及された場合は複数の細胞または細胞集団を含む、などとなる。本明細書で使用する場合、「含む(include)」という用語及びその文法的変形は、非限定的であるように意図されており、リスト内の項目の列挙は、挙げられた項目に対し置き換えまたは追加され得る他の同様の項目を除外するものではない。

10

【0063】

数値範囲は、その範囲を画定する数字を含む。測定値及び測定可能値は、有効数字及び測定に伴う誤差を考慮した概算値であると理解される。また、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含む(contains)」、「含む(containing)」、「含む(include)」、「含む(includes)」、及び「含む(including)」の使用は、限定的であるようには意図されていない。以上の全般的説明及び発明を実施するための形態は、いずれも例示的かつ説明的なものに過ぎず、本教示を制限するものではないことを理解されたい。

20

【0064】

本明細書内で特に注記しない限り、本明細書内で、様々な構成要素を「含む」と記載している実施形態は、記載された構成要素から「なる」または「本質的になる」ことも企図されており、本明細書内で様々な構成要素から「なる」と記載されている実施形態は、記載された構成要素を「含む」またはそれから「本質的になる」ことも企図されている。また、本明細書内で、様々な構成要素から「本質的になる」と記載している実施形態は、記載された構成要素から「なる」またはそれを「含む」ことも企図されている(この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない)。「または」という用語は、内容による別段の明確な指示がない限り、包括的な意味で、すなわち「及び/または」と同等の意味で使用される。「約」という用語は、リストの前に使用される場合は、リストの各メンバーを修飾する。「約」または「およそ」という用語は、当業者による判定で特定の値に対し許容可能な誤差を意味し、この誤差は、部分的には、値がどのように測定または判定されるかに依存する。本発明のいくつかの実施形態において、「約」は、記載された値の $\pm 10\%$ 、または場合により $\pm 5\%$ を含む。

30

【0065】

数または一連の数に先行する「少なくとも」という用語は、内容から明らかであるように、「少なくとも」という用語に隣接する数、及び論理的に含まれ得る全ての後続の数または整数を含むものと理解される。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、「20ヌクレオチド核酸分子のうち少なくとも18のヌクレオチド」とは、18、19、または20のヌクレオチドが示された特性を有することを意味する。少なくとも、一連の数または範囲の前に存在する場合、「少なくとも」は、一連の数または範囲内の数の各々を修飾し得ると理解される。

40

【0066】

本明細書で使用する場合、「以下」または「未満」は、文脈から論理的な、当該表現及び論理的な低いゼロまでの値または整数に隣接する値と理解される。例えば、「2ヌクレオチド塩基対以下」の二重鎖領域は、2、1、または0ヌクレオチド塩基対を有する。「以下」または「未満」が一連の数または範囲の前に存在する場合、その一連の数または範囲の各々が修飾されるものと理解される。

50

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用する場合、範囲は、上限及び下限の両方を含む。

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用する場合、ある値の最大量が 1 0 0 % (例えば、1 0 0 % 阻害または 1 0 0 % 封入) によって表される場合、その値は検出方法によって限定されるものと理解される。例えば、1 0 0 % 阻害は、アッセイの検出レベル未満のレベルに対する阻害と理解され、1 0 0 % 封入は、封入を意図された物質が小胞外で検出することができないものと理解される。

【 0 0 6 9 】

別段の記載がない限り、本明細書で使用される以下の用語及び表現は、以下の意味を有することが意図されている。 10

【 0 0 7 0 】

「mRNA」は、本明細書では、ポリペプチドに翻訳され得る(すなわち、リボソーム及びアミノアシル化 tRNA による翻訳のための基質となり得る)オープンリーディングフレームを含む RNA または修飾型 RNA を含むポリヌクレオチドを指すために使用される。mRNA は、リボース残基またはそのアナログ、例えば、2'-メトキシリボース残基を含む、リン酸-糖骨格を含むことができる。いくつかの実施形態において、核酸リン酸-糖骨格の糖は、リボース残基、2'-メトキシリボース残基、またはそれらの組み合わせから本質的になる。一般的に、mRNA は、相当量のチミジン残基を含有しない(例えば、0 残基、または 3 0、2 0、1 0、5、4、3、もしくは 2 個より少ないチミジン残基; または 1 0 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0.5 %、0.2 %、もしくは 0.1 % 未満のチミジン含有量)。mRNA は、そのウリジン位置の一部または全部に修飾ウリジンを含むことができる。 20

【 0 0 7 1 】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、本明細書では、従来の RNA、DNA、混合 RNA-DNA、及びこれらのアナログであるポリマーを含む、骨格に沿って共に結合している窒素含有複素環の塩基または塩基アナログを有するヌクレオシドまたはヌクレオシドアナログを含む多量体化合物を指すために使用される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、化学的に合成されるか、またはインビトロ転写される。ポリヌクレオチドは、修飾ウリジンを含むインビトロ転写された RNA などの mRNA であり得る。核酸「骨格」は、糖-ホスホジエステル結合、ペプチド-核酸結合(「ペプチド核酸」または PNA; PCT 第 WO 9 5 / 3 2 3 0 5 号)、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、またはそれらの組み合わせのうち 1 つ以上を含む種々の結合から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または 2'-メトキシ置換もしくは 2'-ハライド置換などの置換を伴う同様の化合物であり得る。RNA は、DNA または 1 つ以上のデオキシヌクレオシドもしくはデオキシヌクレオシドアナログを含み得る。「ガイド RNA」、「gRNA」、及び「ガイド」は、本明細書では、Casヌクレアーゼをゲノム位置にターゲティングする、crRNA(別称 CRISPR RNA)などの RNA、または crRNA と trRNA との組み合わせ(別称 tracrRNA)を指すために互換的に使用される。Cas9ヌクレアーゼなどの Casヌクレアーゼのための同族ガイド RNA 構造は、当技術分野において公知である。ガイド RNA の crRNA 及び trRNA 配列は、単一の RNA 分子(シングルガイド RNA、sgRNA)として、または例えば別個の RNA 分子(デュアルガイド RNA、dgRNA)として関連していてもよい。trRNA は、天然発生の配列でもよいし、天然発生の配列と比較して修飾または差異を有する trRNA 配列でもよい。ガイド RNA は、本明細書に記載されるような修飾型 RNA を含み得る。 30

【 0 0 7 2 】

本明細書で 사용되는場合、「ガイド配列」とは、ターゲット配列に対し相補的であり、Casヌクレアーゼによる結合または修飾(例えば、切断)のためにガイド RNA をターゲット配列に導くように機能する、ガイド RNA 内の配列を指す。「ガイド配列」は、 40 50

「ターゲティング配列」または「スパーサー配列」と称されることもある。ガイド配列は、例えば、*Streptococcus pyogenes*（すなわち、Spy Cas 9）及び関連するCas 9ホモログ/オルソログの場合、20塩基対の長さであり得る。これより短い配列または長い配列、例えば、15、16、17、18、19、21、22、23、24、または25ヌクレオチドの長さの配列も、ガイドとして使用することができる。ガイド配列は、18~25または18~20のヌクレオチドの長さでもよい。いくつかの実施形態において、ガイド配列及びターゲット領域は、100%相補的または同一であり得る。他の実施形態において、ガイド配列及びターゲット領域は、少なくとも1つのミスマッチを含み得る。例えば、ガイド配列及びターゲット配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでもよく、このときターゲット配列の全長は、少なくとも18、19、20、またはそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態において、ガイド配列及びターゲット領域は、0個または1~4個のミスマッチを含んでもよく、このときガイド配列は、少なくとも18、19、20、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ガイド配列及びターゲット領域は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでもよく、このときガイド配列は、20ヌクレオチドを含む。

10

【0073】

Casタンパク質の核酸基質が二本鎖核酸であることから、Casタンパク質のターゲット配列は、ゲノムDNAのプラス鎖及びマイナス鎖の両方（すなわち、所定の配列及び配列の逆相補配列）を含む。したがって、ガイド配列が「ターゲット配列に対し相補的」とであると述べられている場合、ガイド配列はガイドRNAをターゲット配列の逆相補配列と結合させるよう誘導し得ることを理解されたい。よって、いくつかの実施形態において、ガイド配列がターゲット配列の逆相補配列に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列中でTがUに置換されていることを除いて、ターゲット配列（例えば、PAMを含まないターゲット配列）におけるある特定のヌクレオチドと同一である。

20

【0074】

本明細書で使用される場合、「Casヌクレアーゼ」とは、RNA及びDNAの結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはこのような複合体のDNA結合サブユニットを意味し、このときDNA結合活性は配列特異的であり、ガイドRNAの配列に依存する。例示的なCasヌクレアーゼ（及び「Casタンパク質」）には、Casクリーパーゼ/ニッカーゼが含まれる。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、DNAの1つまたは2つの鎖を切断する。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、ニッカーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、dsDNAクリーパーゼである。Casヌクレアーゼは、III型CRISPRシステムのCsmまたはCmr複合体、そのCas10、Csm1、またはCmr2サブユニット、I型CRISPRシステムのカスケード複合体、そのCas3サブユニット、及びクラス2 Casヌクレアーゼを含む。本明細書で使用される場合、「クラス2 Casヌクレアーゼ」は、Cas9ヌクレアーゼまたはCpf1ヌクレアーゼなどの、RNAガイド下DNA結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス2 Casヌクレアーゼには、クラス2 Casクリーパーゼ及びクラス2 Casニッカーゼ（例えば、H840A、D10A、またはN863A変異型）が含まれ、これらはさらに、RNAガイド下DNAクリーパーゼまたはニッカーゼ活性を有する。クラス2 Casヌクレアーゼとしては、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9（例えば、N497A、R661A、Q695A、Q926A変異型）、HypaCas9（例えば、N692A、M694A、Q695A、H698A変異型）、eSPCas9（1.0）（例えば、K810A、K1003A、R1060A変異型）、及びeSPCas9（1.1）（例えば、K848A、K1003A、R1060A変異型）のタンパク質ならびにこれらの修飾物が挙げられる。Cpf1タンパク質（Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015)）は、Cas9に相同であり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含む。ZetscheのCpf1配列は、参照により全体として援用される。例えば、Zetscheの表S1及びS3を参照された

30

40

50

い。「Cas9」は、Spy Cas9、本明細書に記載するCas9の変異型、及びそれらの均等物を包含する。例えば、Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照されたい。本明細書で使用される場合、Casヌクレアーゼ(例えば、Cas9ヌクレアーゼ、またはSpyogenes Cas9ヌクレアーゼ)の送達は、ポリペプチドまたはmRNAの送達を含む。例えば、本明細書に記載されるLNP組成物は、CasヌクレアーゼをコードするmRNAを含み得る。

【0075】

本明細書では、「修飾ウリジン」は、ウリジンと同じ水素結合アクセプター及びウリジンとの1つ以上の構造差を有するチミジン以外のヌクレオシドを指すために使用される。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、すなわち、1つ以上の非プロトン置換基(例えば、メトキシなどのアルコキシ)がプロトンに取って代わるウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換シュードウリジン、すなわち、1つ以上の非プロトン置換基(例えば、メチルなどのアルキル)がプロトンに取って代わるシュードウリジン、例えば、N1-メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、シュードウリジン、または置換シュードウリジンのいずれかである。

【0076】

本明細書で使用される「ウリジン位置」とは、ポリヌクレオチドにおいてウリジンまたは修飾ウリジンが占める位置を指す。したがって、例えば、「ウリジン位置の100%が修飾ウリジンである」ポリヌクレオチドは、それと同じ配列の従来のRNA(全塩基が標準的なA、U、C、またはG塩基である)ではウリジンであるはずの全て位置に修飾ウリジンを含む。別段の記載がない限り、本開示におけるまたは本開示に付随する配列表または配列一覧のポリヌクレオチド配列中のUは、ウリジンまたは修飾ウリジンであり得る。

【0077】

本明細書で使用される場合、「処置」は、対象における疾患または障害のための治療薬のあらゆる投与または適用を指し、疾患の阻害、疾患の進行の緩徐化、その発生の抑止、疾患の進行の逆転(例えば、アミロイド原線維の蓄積の逆転)、疾患の1つ以上の症状の緩和、疾患の治癒、本明細書に記載される1つ以上の臨床尺度の向上、または疾患の1つ以上の症状の再発の防止を含む。いくつかの実施形態において、ATTRの処置は、ATTRの症状の軽減を含み得る。いくつかの実施形態において、ATTRの処置は、TTR遺伝子の発現の実質的な低下またはノックダウン、例えば、少なくとも95%の永続的な低下を含み得、それによって、ATTRに関連するTTRタンパク質の生産が実質的に低下または消失し得る。

【0078】

本明細書で使用される場合、「アミロイド」は、通常可溶性のタンパク質またはペプチドの異常な凝集体を指す。アミロイドは不溶性であり、アミロイドは臓器及び組織においてタンパク質性沈着物を生じさせ得る。アミロイド中のタンパク質またはペプチドは、タンパク質の多くのコピーが付着して原線維を形成することができる形態にミスフォールディングし得る。いくつかの形態のアミロイドは人体において正常な機能を有し得るが、本明細書で使用される「アミロイド」は、タンパク質の異常または病的な凝集体を指す。アミロイドは、TTRなどの単一のタンパク質またはペプチドを含む場合もあれば、TTR及び追加のタンパク質などの複数のタンパク質またはペプチドを含む場合もある。

【0079】

本明細書で使用される場合、「アミロイド原線維」は、分解に対する抵抗性があるアミロイドの不溶性線維を指す。アミロイド原線維は、特定のタンパク質またはペプチドならばこれが凝集した組織及び細胞型に基づいて症状を生じさせ得る。

10

20

30

40

50

【0080】

本明細書で使用される場合、「アミロイドーシス」とは、アミロイドまたはアミロイド原線維の沈着により引き起こされる症状を特徴とする疾患を指す。アミロイドーシスは、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、神経系、及び消化路を含む多数の臓器に影響を及ぼし得る。

【0081】

本明細書で使用される場合、「TTR」は、TTR遺伝子の遺伝子産物であるトランスサイレチンを指す。TTRは、当技術分野において、CTS、CTS1、HEL111、HsT2651、PALB、プレアルブミン、TBPA、及びATTNとしても知られている。例えば、HGNC:HGNC:12405 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7276>)を参照されたい。

10

【0082】

本明細書で使用される場合、「ATTR」、「TTR関連アミロイドーシス」、「TTRアミロイドーシス」、「ATTRアミロイドーシス」、「TTRに関連するアミロイドーシス」、または「トランスサイレチンアミロイドーシス」は、複数の組織（主に神経及び筋肉）においてアミロイド原線維として蓄積するミスフォールディングしたTTRタンパク質に起因し、主な多発神経障害（PN）及び/または心筋症（CM）の疾病表現型につながる状態を指す。PNの症状としては、末梢神経障害による四肢の無感覚、眩暈感、及び自律神経障害による胃腸の乱れが挙げられる。CMの症状としては、息切れ、及びうっ血性心不全を含む心機能障害の他の症状が挙げられる。両方の表現型が、遺伝性（家族性）ATTR（ATTRv）と関連している。ATTR-CMは、TTR遺伝子（ATTRv-CM）における突然変異（複数可）及び/または野生型TTR遺伝子（ATTR-CM）から生じ得る。野生型ATTR（ATTR-wt）は、主にCMと関連している。ATTRvを有する対象は、神経及び心臓の両方の機能障害からなる混合型臨床表現型を呈することがある。

20

【0083】

本明細書で使用される場合、「遺伝性ATTR」は、TTR遺伝子の配列における突然変異に関連するATTRを指す。ATTRに関連するTTR遺伝子における既知の突然変異には、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122(-)の置換を含むTTRをもたらすものが含まれる。遺伝性ATTRには、拘束型心筋症を特徴とする家族性アミロイド心筋症（「FAC」）が含まれ、これは、心筋症を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（「ATTRv-CM」）としても知られている。うっ血性心不全は、FACにおいてよく見られる。平均発症年齢はおよそ60~70歳であり、推定平均余命は診断後4~5年である。遺伝性ATTRには、家族性アミロイド多発神経障害（「FAP」）も含まれ、これは、主に感覚運動神経障害を特徴とする多発神経障害を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（「ATTRv-PN」）としても知られている。自律神経障害は、FAPにおいてよく見られる。神経障害が主な特徴であるが、FAPの症状は、悪液質、腎不全、及び心疾患を含む場合もある。FAPの平均発症年齢はおよそ30~50歳であり、推定平均余命は診断後5~15年である。本明細書で使用される場合、「遺伝性ATTR」は、ATTRv-PN及び/またはATTRv-CMを指す。

30

40

【0084】

本明細書で使用される場合、「野生型ATTR」及び「ATTRwt」は、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122(-)などの病的なTTR突然変異に関連していないATTRを指す。ATTRwtは、老人性全身性アミロイドーシスとも呼ばれている。発症は典型的には60歳以上の男性で起こり、最も一般的な症状は、うっ血性心不全及び心房細胞などの異常な心拍リズムである。追加の症状には、心機能障害の帰結、例えば息切れ、疲労、眩暈感、腫脹（特に脚）、悪心、狭心症、睡眠の乱れ、及び体重減少などが含まれる。本明細書で使用される場合、「野生型ATTR」は、TTR突然変異に関連していない、多発神経障害及び/または心筋症の疾病表現型を指す。

50

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、既に A T T R と診断されているか、または同時に A T T R と診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、遺伝子検査（例えば、T T R 突然変異の記録）に基づいて A T T R と診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、感覚運動末梢神経障害の臨床診断に基づいて A T T R と診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、5 以上かつ 1 3 0 以下の神経障害スコア（N I S）に基づいて A T T R と診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、生検または妥当性確認済みの非侵襲的イメージングによる T T R アミロイドの組織沈着の記録に基づいて A T T R と診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、3 b 以下の多発神経障害性能力障害（P N D）スコアに基づいて A T T R と診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、心筋症を伴う遺伝性 A T T R（A T T R v）アミロイドーシスまたは野生型心筋症（A T T R w t）と分類される、心筋症を伴う A T T R アミロイドーシスと診断される。いくつかの実施形態において、A T T R - C M を有するヒト対象は、New York Health Association（N Y H A）分類の下でクラス I またはクラス II に分類される。いくつかの実施形態において、A T T R - C M を有するヒト対象は、New York Health Association（N Y H A）分類の下でクラス III に分類される。

10

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、症状（例えば、多発神経障害症状）の進行がある。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、多発神経障害性能力障害（P N D）スコアにおける 1 ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、家族性アミロイド多発神経障害（F A P）ステージにおける 1 ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、神経障害スコア（N I S）における 5 ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、N I S - 下肢（L L）における 5 ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、補正体格指数（m B M I）における $25 \text{ kg} / \text{m}^2 \times \text{g} / \text{L}$ 以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、6 分間歩行試験における 3 0 メートル以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、1 0 メートル歩行試験における $0.1 \text{ m} / \text{s}$ 以上の減少を有する。本明細書で使用される場合、「突然変異型 T T R」とは、T T R のアミノ酸配列において、T T R の野生型アミノ酸配列と比較して変化を有する T T R の遺伝子産物（すなわち、T T R タンパク質）を指す。ヒト野生型 T T R 配列は、N C B I Gene ID : 7 2 7 6 ; E n s e m b l : E n s e m b l : E N S G 0 0 0 0 0 1 1 8 2 7 1 で入手可能である。例えばヒトにおける A T T R に関連する T T R の突然変異型は、シグナル配列を含まない成熟タンパク質配列に基づくアミノ酸位置に従って表記される（例えば、T 6 0 A は T 8 0 A に相当し、これは p . T 8 0 A とともに表記される）、T 6 0 A、V 3 0 M、V 3 0 A、V 3 0 G、V 3 0 L、V 1 2 2 I、V 1 2 2 A、または V 1 2 2 (-) を含むが、これらに限定されない。

20

30

【 0 0 8 7 】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」とは、遺伝子編集により、例えば、細胞、細胞集団、組織、または臓器において、特定の遺伝子産物（例えば、T T R）の発現を減少させることを指す。いくつかの実施形態において、遺伝子編集は、シーケンシング、例えば次世代シーケンシング（N G S）によって評価することができる。発現は、好適なコントロール、例えば対象のベースラインまたは処置前と比較して、少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、またはアッセイの検出レベル未満まで減少し得る。m R N A のノックダウンを測定する方法は公知であり、目的の組織または細胞集団から単離された m R N A のシーケンシングを含む。タンパク質のノックダウンは、目的の組織、細胞集団、または液体からタンパク質の量を検出することによって測定することができる。フローサイトメトリー分析は、タンパク質発現のノックダウンを測定するための公知の方法である。分泌タンパク質の場合、ノックダウンは、組織培養培地もしくは血液、またはこれらに由来する血清もしくは血漿などの液体中で評価

40

50

することができる。血清タンパク質レベルは、例えばE L I S Aによる定量アッセイによって測定することができ、ノックダウンを検出するために使用することができる。いくつかの実施形態において、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物の発現のいくらかの損失、例えば、完全長タンパク質に転写もしくは翻訳される完全長野生型m R N A量の減少、または細胞の集団によって発現されるタンパク質量の減少を指すことがある。m R N A配列におけるどのような変化が野生型または完全長タンパク質の発現減少をもたらすかについては、十分に理解されている。いくつかの実施形態において、「ノックダウン」は、T T Rなどの特定の遺伝子産物の発現のいくらかの損失を指す場合がある。

【0088】

本明細書で使用される場合、血清T T Rもしくは血清プレアルブミンのノックダウン（例えば、永続的なノックダウン）の文脈における「永続的な」、または遺伝子（例えばT T R遺伝子）の発現を「永続的に」低下させることは、遺伝子発現における持続的なノックダウンまたは持続的な低下などの持続的効果を指す。いくつかの実施形態において、血清T T Rまたは血清プレアルブミンの永続的なノックダウンは、L N P組成物の投与後14日目または28日目に測定され、例えば、少なくとも6か月間、9か月間、1年間、2年間、3年間、4年間、5年間、またはそれ以上にわたって維持される低下（ベースラインと比べたレベル）を指す。いくつかの実施形態において、維持されるレベルは様々であり得る。いくつかの実施形態において、低下は、処置される障害に対する所望の臨床有効性と相関する。A T T Rなどの所定の障害に対して所望の臨床有効性を達成するための低下のレベルは、当技術分野では公知である。例えば、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上の低下が、特定の障害に対する所望の臨床有効性と相関する。例えば、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上の低下が、A T T Rに対する所望の臨床有効性と相関する。

【0089】

本明細書で使用される場合、「単一遺伝子障害」は、肝遺伝子産物の異常な発現または活性から生じる障害を指す。単一遺伝子障害は、肝臓内の遺伝子または肝遺伝子産物の異常な発現もしくは活性を引き起こす非コード領域に対する編集によって処置され得る。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、タンパク質である。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、R N A分子である。いくつかの実施形態において、肝臓内の遺伝子または肝遺伝子産物の異常な発現もしくは活性を引き起こす非コード領域に対する編集は、遺伝子産物のレベル（例えば、血清レベル）を低下させる。いくつかの実施形態において、遺伝子は、野生型と比べた遺伝子内の1つ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子は、野生型である。単一遺伝子障害は、単一の遺伝子編集による処置に適した遺伝子障害であり得る。

【0090】

本明細書で使用される場合、「有効量」は、C a sヌクレアーゼをコードするm R N A及びガイドR N Aの投与後の、対象における血清T T Rレベルをベースライン血清T T Rレベルと比べて少なくとも60%低下させる、及び/または血清T T Rを約50 μ g / m L未満に低下させる、C a sヌクレアーゼをコードするm R N A及びガイドR N Aの量を指す。例えば、L N P組成物は、有効量の、C a sヌクレアーゼをコードするm R N A、及びT T RをターゲティングするガイドR N AなどのガイドR N A（合計R N Aまたは全R N A）を含み得る。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、全R N Aとして測定される「有効量」のR N Aを含み得る、C a sヌクレアーゼをコードするm R N A及びガイドR N Aを送達する。いくつかの実施形態において、C a sヌクレアーゼをコードするm R N A及びガイドR N Aの有効量は、対象において血清T T Rレベルをベースライン血清T T Rレベルと比べて少なくとも60~70%、70~80%、80~90%、90~95%、95~98%、98~99%、または99~100%低下させる。いくつかの実施形態において、C a sヌクレアーゼをコードするm R N A及びガイドR N Aの有効量は、対象において血清プレアルブミンレベルをベースライン血清プレアルブミンレベルと

10

20

30

40

50

比べて少なくとも60%低下させる。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びガイドRNAの有効量は、対象において血清プレアルブミンレベルをベースライン血清プレアルブミンレベルと比べて少なくとも60~70%、70~80%、80~90%、90~95%、95~98%、98~99%、または99~100%低下させる。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びガイドRNAの有効量は、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びガイドRNAの投与後、血清TTRを約50µg/mL未満、約40µg/mL未満、約30µg/mL未満、約20µg/mL未満、または約10µg/mL未満に低下させる。

【0091】

本明細書で使用される場合、「バイオセーフティ尺度」は、本明細書に記載されるLNP組成物のヒト対象への投与に関連する安全性事象をモニターするために使用される臨床尺度を指す。バイオセーフティ尺度は、本明細書に記載されるような、有害事象（NCI-CTCAEグレード3以上）、重篤な有害事象、特に注目すべき有害事象、及び/または処置下で発現した有害事象（CTCAEグレード3以上）を含む、安全性事象の判定を可能にし得る。安全性事象（例えば、有害事象）の重篤性を定義するためのガイドラインは、当技術分野では公知である（例えば、National Cancer Institute（NCI）の有害事象共通語規準（CTCAE）、バージョン5.0を含むCTCAE）。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与前に測定される。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定される。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与前及び投与後に測定され、それによって、LNP組成物による処置前及び処置後のバイオセーフティ尺度のレベルの比較を行い、許容可能な変化などの変化を判定することが可能になる。本明細書で使用される場合、「許容可能な」変化とは、バイオセーフティ尺度レベルにおける変化であって、結果として生じる変化が、安全性事象（例えば、有害事象（NCI-CTCAEグレード3以上）、重篤な有害事象、特に注目すべき有害事象、処置下で発現した有害事象（CTCAEグレード3以上）、及び/または臨床医による判定で治験薬の中止を別途必要とする事象に該当しない変化を指す。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与前に測定されたバイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定されたバイオセーフティ尺度の1つ以上のレベルに対する比較のためのベースラインとなり得る（例えば、投与後に特定の間隔で得られた測定値がベースラインレベルに対して比較され得る）。いくつかの実施形態において、ベースラインは、LNP組成物の投与前に得られた、入手可能な最後の測定値である。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度は、値だけを使用して安全性事象を判定することができる場合には、ベースラインに対して比較されない。

【0092】

本明細書で使用される場合、「安全かつ忍容性良好」とは、本明細書に記載される安全性事象がないこと、例えば、有害事象（NCI-CTCAEグレード3以上）、重篤な有害事象、特に注目すべき有害事象、処置下で発現した有害事象（CTCAEグレード3以上）、及び/または臨床医による判定で治験薬の中止を別途必要とする事象がないことを指す。いくつかの実施形態において、「安全かつ忍容性良好」には、本明細書に記載される組成物、例えば、有効量のCasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTRをターゲティングするガイドRNAを含むLNP組成物の投与と無関係であるNCI-CTCAEグレード3以上を経験する患者、及び/または、例えば、前記事象について許容可能な期間の後に介入の有無を問わず解消する患者が含まれる。

【0093】

いくつかの実施形態において、特に注目すべき有害事象は、例えば、注入関連反応（IRR）（例えば、処置もしくは注入中止を必要とするもの、及び/またはグレード3以上）；サイトカイン放出症候群の発生；臨床的に意義のある異常出血によって定義される異常な凝固の所見または血栓もしくは出血の発生またはCTCAEグレード2以上の異常な血液検査結果；CTCAEグレード2以上のALT上昇、CTCAEグレード2以上のA

ST上昇、CTCAEグレード2以上の総ビリルビン上昇、CTCAEグレード2以上のGLDH上昇を根拠とする急性肝傷害；脾臓への影響に起因する事象（脾臓出血、脾臓梗塞、ときに血小板減少症、ときに貧血、または血球の顕微鏡検査で特定の異常所見を認めるリンパ球減少症）；副腎への影響に起因する事象；甲状腺機能低下の臨床的に意義のある症状；正常範囲を下回るチロキシン（T4レベル）低下；及びビタミンA欠乏症と一致する眼事象を含む。

【0094】

いくつかの実施形態において、有害事象は、必ずしも処置との因果関係を有するとは限らない、治験薬を投与されたかまたは研究上の措置を受けた対象における、あらゆる不都合な医学的出来事である。いくつかの実施形態において、有害事象は、医薬（治験）品に関連するか否かにかかわらず、処置に時間的に関連する、意図されない兆候（異常な検査所見を含む）、症状、または疾患である。いくつかの実施形態において、有害事象は、臨床兆候または症状を誘導する。いくつかの実施形態において、有害事象は、積極的介入を必要とする。いくつかの実施形態において、有害事象は、処置の中断または中止を必要とする。いくつかの実施形態において、有害事象は、治験責任医師の意見において臨床的に有意な異常である。有害事象のグレーディング基準は、例えば、National Cancer Institute（NCI）の有害事象共通用語規準（CTCAE）を含むCTCAEなど、当技術分野では公知である。

10

【0095】

バイオセーフティ尺度には、例えば、凝固、血液学、臨床化学、尿検査、及び他の生物分析評価（例えば、サイトカイン、補体）に広く関連する公知の検査評価項目が含まれる。特定のバイオセーフティ尺度は、肝酵素レベル（例えば、処置投与後4週間超にわたるアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）またはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST） $> 5 \times ULN$ の上昇、処置投与後のALTまたはAST $> 3 \times ULN$ 及び総ビリルビン $> 2 \times ULN$ （Hyの法則））、処置投与後4週間超にわたる活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のレベル（例えば、aPTTの上昇） $> 5 \times ULN$ ）、プロトロンビン時間（PT）のレベル、トロンビン生成時間（TGT）のレベル（例えば、ピーク高さ、ラグタイム、及び/または内因性トロンビン産生能）、フィブリノゲンのレベル、プロトロンビン国際標準化（INR）比、レベル、dダイマーのレベル、播種性血管内凝固と一致する検査パラメータ、血液学検査値の変化（例えば、処置投与後のCTCAEグレード2を超える異常な血液検査結果）、化学検査値の変化、凝固の変化、尿検査における変化、グルタミン酸デヒドロゲナーゼのレベル、C反応性タンパク質のレベル、補体（C3、C4、C3a、C5a、Bb）のレベル、サイトカイン（GM-CSF、INF-、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-23、TNF-、IL-17、MCP-1）のレベル、チロキシン（T4レベル）（例えば、処置投与後の正常範囲を下回るレベル低下または甲状腺機能低下の臨床的に意義のある症状/兆候）、急性肝傷害（例えば、処置投与後の、CTCAEグレード2を超えるALT、AST、総ビリルビンもしくはGLDHの上昇、または肝傷害の臨床的に意義のある症状/兆候）、及び12誘導心電図の変化を含むが、これらに限定されない。LNP組成物の投与に関連するものを含め、追加のバイオセーフティ尺度が、当技術分野では公知である。同様に、バイオセーフティ尺度の許容可能なレベル及び/または変化は、当技術分野では公知であり、慣例的方法によって、例えば、臨床医または試験所によって評価され得る。

20

30

40

【0096】

本明細書で使用される場合、「臨床有効性尺度」は、本明細書に記載されるLNP組成物で処置されるヒト対象における疾患の改善を評価するために使用される尺度を指す。いくつかの実施形態において、臨床有効性尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定される。いくつかの実施形態において、臨床有効性尺度のレベルは、LNP組成物の投与前及び投与後に測定され、それによって、LNP組成物による処置前及び処置後の臨床有効性尺度のレベルの比較が可能になる。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与

50

前に測定された臨床尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定された臨床尺度の1つ以上のレベルに対する比較のためのベースラインまたはコントロールとなり得る。いくつかの実施形態において、ベースラインは、LNP組成物の投与前に得られた、入手可能な最後の測定値である。

【0097】

トランスサイレチンアミロイドによって特徴付けられる障害の場合、臨床有効性尺度は、血清TTRの減少（例えば、処置投与後にELISAによる測定で血清TTRの60%の減少）、血清TTRの減少（例えば、処置投与後に質量分析による測定で血清TTRの少なくとも60%の減少）、血清プレアルブミンの減少、多発神経障害性能力障害（PND）スコアの低下、家族性アミロイド多発神経障害（FAP）ステージの低下、神経障害スコア（NIS）の減少、補正神経障害スコア（mNIS+7）の減少、神経障害スコア（NIS）-下肢（LL）の減少、補正体格指数（mBMI）における25kg/m² × g/L以上の増加、6分間歩行試験（6-MWT）における30メートル以上の増加、及び10メートル歩行試験（10-MWT）における0.1メートル/秒以上の増加を含むが、これらに限定されない。追加の臨床有効性尺度としては、血清ニューロフィラメント軽鎖（NfL）レベルの向上、Norfolk Quality of Life - Diabetic Neuropathyによって評価される生活の質の向上、EuroQOL（EQ）-5D-5Lによって評価される生活の質の向上、心臓MRIの向上、脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端プロホルモン（NT-proBNP）レベルの向上、トロポニンIレベルの向上、New York Health Association（NYHA）分類の向上、Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire（KCCQ）によるスコアの向上が挙げられる。TTRアミロイドーシスを含め、追加の臨床有効性尺度が、当技術分野では公知である。同様に、臨床有効性尺度における「臨床的に有意な向上」、すなわち、TTRアミロイドーシスを含む疾患の改善を示す臨床有効性尺度（複数可）のレベル及び/または変化は、当技術分野では公知であり、慣例的方法によって、例えば、臨床医または試験所によって評価され得る。例えば、血清TTRレベルは、TTRアミロイドーシスに関する臨床有効性尺度である。TTRアミロイドーシスの処置に関するこの臨床有効性尺度における「臨床的に有意な向上」には、ベースライン、例えば、本書に記載されるLNP組成物などでの処置前と比較した、処置後の血清TTRレベルの少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、または95%の低下が含まれる。例えば、血清プレアルブミンレベルも、TTRアミロイドーシスに関する臨床有効性尺度である。TTRアミロイドーシスの処置に関するこの臨床有効性尺度における「臨床的に有意な向上」には、ベースライン、例えば、本明細書に記載されるLNP組成物などでの処置前と比較した、処置後の血清プレアルブミンレベルの少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、または95%の低下が含まれる。「TTR」は「プレアルブミン」と同義であるが、「血清プレアルブミンレベル」は、「血清TTRレベル」を測定するためのアッセイと比較した場合、このタンパク質レベルを測定するための異なるアッセイを示す。両アッセイが同じタンパク質を測定する。

【0098】

本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」（LNP）という用語は、分子間力によって互いに物理的に会合した複数の（すなわち、2つ以上の）脂質分子を含む粒子を指す。LNPは、例えば、ミクロスフェア（これには、単層小胞及び多層小胞、例えば、「リポソーム」というラメラ相脂質二重層が含まれ、このラメラ相脂質二重層は、いくつかの実施形態では実質的に球状であり、さらに特定の実施形態では、例えばRNA分子のかなりの部分を含む、水性核を含むことができる）、エマルジョンの分散相、ミセル、または懸濁液の内相であり得る。例えば、内容が全体として参照により本明細書に援用される、WO2017173054A1及びWO2019067992A1も参照されたい。

【0099】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な」という表現は、概ね非毒性であり、生物学的に望ましくないものではなく、かつその他の点で薬学的使用のために許容不可

10

20

30

40

50

能なものではない医薬組成物を調製する際に有用であることを意味する。

【0100】

本明細書で使用される場合、全身投与は、静脈内注入によるものであり得る。「注入」とは、例えばおよそ2時間の注入時間を用いる1つ以上の薬剤の能動的投与を指す。いくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載されるCasヌクレアーゼ(Cas9など)をコードするmRNA及び本明細書に記載されるgRNAを含むLNPが、ヒト対象に全身投与される。

【0101】

本明細書で使用される場合、「注入予防法」とは、例えば、静脈内ステロイド(例えば、デキサメタゾン10mg)、静脈内H1ブロッカー(例えば、ジフェンヒドラミン50mg)または経口H1ブロッカー(例えば、セチリジン10mg)、及び静脈内または経口のH2ブロッカー(例えば、ファモチジン20mg)の投与を含む、処置(例えば、LNPの投与を含む)の前に対象に投与されるレジメンを指す。

【0102】

I. 遺伝子をターゲティングする組成物

本明細書で開示されるのは、ヒト対象の肝臓における目的の遺伝子(例えば、TTR)を編集するための方法、対象の肝細胞における遺伝子を修飾するための方法、または疾患を処置するための方法、及びかかる方法において使用するための組成物を含む関連する組成物である。概して、本明細書で開示されるのは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む、LNP組成物である。かかる方法及び組成物で処置される対象は、例えば、ATTRwtまたは遺伝性(もしくは家族性)形態のATTRであり得るATTRを有する対象のように、目的の配列の野生型または非野生型遺伝子を有し得る。

【0103】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法は、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼをコードするmRNAのインピボで肝臓をターゲットとした送達のための脂質ナノ粒子システムの全身投与を含む。

【0104】

1. ガイドRNA (gRNA)

本開示の方法及び組成物で使用されるガイドRNAは、目的の遺伝子(例えば、TTR遺伝子)をターゲティングするガイド配列を含む。TTR遺伝子をターゲティングする例示的なガイド配列が、例示的な一般的sgRNA構造及びガイドRNAの保存部分と共に、配列表に示されている。ガイド配列は、例えば、ガイド配列の3'末端に続く次の例示的なヌクレオチド配列: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG(配列番号33)を有する、crRNAを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含み得る。sgRNAの場合、上記のガイド配列は、例えば、ガイド配列の3'末端に続く次の例示的なヌクレオチド配列(5' 3'方向): GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU(配列番号32)を有する、sgRNAを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、gRNAは、一般的なsgRNA構造内にガイド配列を含んでもよいし、ガイド配列及びsgRNA保存領域、例えば配列表に示される例示的な配列を含んでもよい。いくつかの実施形態において、sgRNAは修飾されている。いくつかの実施形態において、sgRNAは、以下の配列番号19に示される修飾パターンを含み、ここで、Nは、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Nの全体が、本明細書に記載されるガイド配列を構成し、修飾型sgRNAは、次の配列: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m

10

20

30

40

50

U* mU (配列番号19)を含み、ここで、「N」は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり得る。例えば、本明細書には、Nが本明細書で開示されるガイド配列のいずれかに置き換えられている配列番号19が包含される。修飾は、ガイドのヌクレオチドでNを置換しても、配列番号19に示したとおりのままであり得る。すなわち、ガイドのヌクレオチドが「N」に置き換わるが、最初の3つのヌクレオチドは2' OMe修飾されており、第1及び第2のヌクレオチド、第2及び第3のヌクレオチド、ならびに第3及び第4のヌクレオチドの間にはホスホロチオエート結合がある。

【0105】

いくつかの実施形態において、gRNAは、ヌクレアーゼ(例えば、SpyCas9などのCas9ヌクレアーゼ)であり得るCasヌクレアーゼをターゲットDNA配列に導くガイド配列を含む。gRNAは、ガイド配列の18、19、または20個の連続したヌクレオチドを含むcrRNAを含み得る。いくつかの実施形態において、gRNAは、ガイド配列の少なくとも18、19、または20個の連続したヌクレオチドに対し約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むcrRNAを含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、ガイド配列に対し約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むcrRNAを含む。gRNAは、trRNAをさらに含み得る。本明細書に記載される各組成物及び方法の実施形態において、crRNA及びtrRNAは、単一のRNA(sgRNA)として会合していてもよく、別々のRNA(dgRNA)上にあってもよい。sgRNAとの関連において、crRNA及びtrRNAの構成要素は、例えば、ホスホジエステル結合または他の共有結合を介し、共有結合することができる。

【0106】

いくつかの実施形態において、配列表におけるsgRNA配列及び修飾された配列を含むガイド配列が包含される。

【0107】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号15、16、34、35、及び38~54、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号15、16、34、35、及び38~54、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号15、16、34、35、及び38~54、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

【0108】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号15、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号15、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号15、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

【0109】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号16、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号16、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号16、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号34、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号34、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるL N P 組成物は、配列番号34、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

【 0 1 1 1 】

いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号35、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号35、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるL N P 組成物は、配列番号35、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

10

【 0 1 1 2 】

いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号38、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号38、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるL N P 組成物は、配列番号38、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

20

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号39、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号39、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるL N P 組成物は、配列番号39、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

30

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号40、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号40、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるL N P 組成物は、配列番号40、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

40

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号41、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号41、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるL N P 組成物は、配列番号41、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

【 0 1 1 6 】

いくつかの実施形態において、T T R 遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配

50

たはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号48、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

【0123】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号49、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号49、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号49、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

10

【0124】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号50、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号50、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号50、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

20

【0125】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号51、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号51、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号51、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

【0126】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号52、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号52、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号52、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

30

【0127】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号53、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号53、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号53、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

40

【0128】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAは、配列番号54、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子をターゲティングするsgRNAは、配列番号54、またはその18、19、もしくは20ヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNP組成物は、配列番号54、またはその18、19、もし

50

くは20ヌクレオチド部分のいずれか1つ以上を含む、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAを含む。

【0129】

上記のTTRガイドRNAのいずれも、配列表の一般的なsgRNA構造、または、例えば、配列表に示されるガイドRNA保存領域構造を含み得る。

【0130】

本明細書に記載される組成物、使用、及び方法の実施形態の各々において、ガイドRNAは、「デュアルガイドRNA」または「dgRNA」として2つのRNA分子を含むことができる。dgRNAは、例えばガイド配列を含むcrRNAを含む第1のRNA分子と、例えばtrRNAを含む第2のRNA分子とを含む。第1及び第2のRNA分子は、共有結合していない場合があるが、crRNAの一部とtrRNAの一部との間の塩基対合を介してRNA二重鎖を形成することができる。

10

【0131】

本明細書に記載される組成物、使用、及び方法の実施形態の各々において、ガイドRNAは、「シングルガイドRNA」または「sgRNA」として単一のRNA分子を含むことができる。sgRNAは、trRNAと共有結合しているガイド配列を含むcrRNA（またはその一部）を含むことができる。sgRNAは、ガイド配列の18、19、または20個以上の連続したヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、sgRNAは、ガイド配列の20個の連続したヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、crRNA及びtrRNAは、リンカーを介して共有結合している。いくつかの実施形態において、sgRNAは、crRNAの一部とtrRNAの一部との間の塩基対合を介してステムループ構造を形成する。いくつかの実施形態において、crRNA及びtrRNAは、ホスホジエステル結合ではない1つ以上の結合を介して共有結合している。

20

【0132】

いくつかの実施形態において、trRNAは、天然発生のCRISPR/Casシステムに由来するtrRNA配列の全てまたは一部を含むことができる。いくつかの実施形態において、trRNAは、切断または修飾された野生型trRNAを含む。trRNAの長さは、使用されるCRISPR/Casシステムに依存する。いくつかの実施形態において、trRNAは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上のヌクレオチドを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態において、trRNAは、例えば、1つ以上のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または1つ以上のバルジ構造など、ある特定の二次構造を含むことができる。

30

【0133】

本明細書で提供されるガイドRNAは、目的の遺伝子内のターゲット配列を認識する（例えば、それにハイブリダイズする）のに有用であり得る。例えば、目的の遺伝子のターゲット配列は、提供される、ガイドRNAを含むCasクリーバーゼによって認識及び切断され得る。したがって、CasクリーバーゼなどのCasヌクレアーゼをガイドRNAによって目的の遺伝子のターゲット配列に導くことができ、ここで、ガイドRNAのガイド配列がターゲット配列とハイブリダイズし、CasクリーバーゼなどのCasヌクレアーゼがターゲット配列を切断する。

40

【0134】

いくつかの実施形態において、1つ以上のガイドRNAの選択は、目的の遺伝子内のターゲット配列に基づいて決定される。

【0135】

いずれかの特定の理論に拘束されるものではないが、遺伝子のある特定の領域における突然変異（例えば、ヌクレアーゼ媒介DSBまたは目的の遺伝子の編集の結果として生じるインデルに起因するフレームシフト突然変異）は、遺伝子の他の領域における突然変異ほど忍容できない場合があり、したがって、DSBの位置は、結果として生じ得るタンパ

50

ク質ノックダウンの量またはタイプにおける重要な要素である。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子内のターゲット配列に相補的であるまたはそれに対する相補性を有する gRNA が、目的の遺伝子における特定の位置に Casヌクレアーゼを導くために使用される。

【0136】

2. gRNA の修飾

いくつかの実施形態において、gRNA は、化学的に修飾されている。1つ以上の修飾されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む gRNA は、カノニカルな A、G、C、及び U 残基の代わりに、またはそれに加えて使用される 1つ以上の非天然発生及び/または天然発生の構成要素または構成の存在を表すために、「修飾型」gRNA または「化学修飾型」gRNA と呼ばれる。いくつかの実施形態において、修飾型 gRNA は、ノンカノニカルなヌクレオシドまたはヌクレオチドを含んで合成され、ここでは「修飾型」と呼ばれる。

10

【0137】

修飾型ガイド RNA は、従来の RNA、DNA、混合 RNA - DNA、及びこれらのアナログであるポリマーを含む、骨格に沿って共に結合している窒素含有複素環の塩基または塩基アナログを有するヌクレオシドまたはヌクレオシドアナログを含み得る。ガイド RNA 「骨格」は、糖 - ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、またはそれらの組み合わせのうち 1つ以上を含む種々の結合から構成され得る。ガイド RNA の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または 2'メトキシなどの置換を伴う同様の化合物であり得る。窒素含有塩基は、従来の塩基 (A、G、C、T、U)、そのアナログ (例えば、修飾ウリジン、例えば、5 - メトキシウリジン、シュードウリジン、または N1 - メチルシュードウリジンなど) ; イノシン ; プリンまたはピリミジンの誘導體 (例えば、N⁴ - メチルデオキシグアノシン、デアザ - プリンまたはアザ - プリン、デアザ - ピリミジンまたはアザ - ピリミジン、5 位または 6 位に置換基を伴うピリミジン塩基 (例えば、5 - メチルシトシン)、2 位、6 位、または 8 位に置換基を伴うプリン塩基、2 - アミノ - 6 - メチルアミノプリン、O⁶ - メチルグアニン、4 - チオ - ピリミジン、4 - アミノ - ピリミジン、4 - ジメチルヒドラジン - ピリミジン、及び O⁴ - アルキル - ピリミジン ; 米国特許第 5, 378, 825 号及び PCT 第 WO 93 / 13121 号) であり得る。ガイド RNA の化学修飾に関する一般的な説明については、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5 - 36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992) を参照されたい。ガイド RNA は、従来の RNA または DNA の糖、塩基、及び結合のみを含むこともあれば、従来の構成要素及び置換の両方 (例えば、2'メトキシ結合を有する従来の塩基、または従来の塩基及び 1つ以上の塩基アナログの両方を含有するポリマー) を含むこともある。RNA 及び DNA は異なる糖部分を有し、RNA ではウラシルまたはそのアナログの存在により、また DNA ではチミンまたはそのアナログの存在により異なり得る。

20

30

【0138】

未修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中に見られるヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。例えば、ヌクレアーゼは、核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様では、本明細書に記載される gRNA は、例えば、細胞内または血清にあるヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1つ以上の修飾されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含有することができる。

40

【0139】

ホスホロチオエート (PS) 結合 (linkage) または結合 (bond) とは、ホスホジエステル結合、例えばヌクレオチド塩基間の結合において、硫黄が 1つの非架橋リン酸酸素を置換している結合を指す。オリゴヌクレオチドを生成するためにホスホロチオエートを使用する場合、修飾されたオリゴヌクレオチドは、S - オリゴと呼ばれることもある。

【0140】

50

PS修飾を表すために「*」が使用され得る。本願において、A*、C*、U*、またはG*という用語は、次の(例えば、3')ヌクレオチドにPS結合で連結されているヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0141】

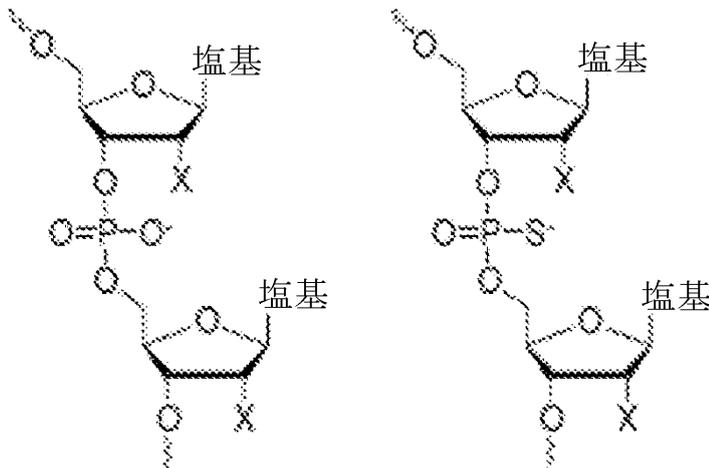
本願において、「mA*」、「mC*」、「mU*」、または「mG*」という用語は、2'-O-Meで置換され、かつ次の(例えば、3')ヌクレオチドにPS結合で連結されているヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0142】

以下の図は、ホスホジエステル結合の代わりにPS結合を生成する、非架橋リン酸酸素へのS-の置換を示す：

10

【化1】



20

ホスホジエステル RNAの天然のホスホ
 ジエステル結合 ホスホロチオエート(PS)
 修飾されたホスホ
 ロチオエート(PS)結合

【0143】

30

いくつかの実施形態において、5'末端の最初の3つ、4つ、または5つのヌクレオチドのうち1つ以上、及び3'末端の最後の3つ、4つ、または5つのヌクレオチドのうち1つ以上が修飾される。いくつかの実施形態において、修飾は、2'-O-Me、2'-F、逆位脱塩基ヌクレオチド、PS結合、あるいは安定性及び/または性能を高めることが当技術分野においてよく知られている他のヌクレオチド修飾である。

【0144】

いくつかの実施形態において、5'末端の最初の4つのヌクレオチドと、3'末端の最後の4つのヌクレオチドとが、ホスホロチオエート(PS)結合で連結されている。

【0145】

いくつかの実施形態において、5'末端の最初の3つのヌクレオチドと、3'末端の最後の3つのヌクレオチドとが、例えば、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む。

【0146】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、修飾型sgRNAを含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号19に示す修飾パターンを含み、ここで、Nは、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Nの全体が、ヌクレアーゼをターゲット配列に導くガイド配列を構成する。

【0147】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、WO0201906787(その内容は全体として本明細書に援用される)の表2のいずれか1つに示されるsgRNAを含む

50

。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、WO 2019067872（その内容は全体として本明細書に援用される）の表1のガイド配列のいずれか1つと、配列番号32のヌクレオチドとを含むsgRNAを含み、ここで、配列番号32のヌクレオチドは、ガイド配列の3'末端にあり、ガイド配列は、配列番号19に示されるように修飾されていてもよい。

【0148】

3. Casヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含むRNA
本明細書で開示される、*S. pyogenes* Cas9のようなCas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼをコードするORFを含むRNAはいずれも、組成物または方法において、本明細書で開示されるgRNAのいずれかと組み合わせることができる。本明細書に記述される実施形態のいずれにおいても、Casヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸は、mRNAであり得る。

10

【0149】

翻訳を増加させるコドン及び/または高度に発現されるtRNAに対応するコドン；例示的なコドンセット

いくつかの実施形態において、核酸は、ヒトなどの哺乳動物における翻訳を増加させるコドンを有するORFを含む。さらなる実施形態では、核酸は、ヒトの肝臓などの臓器における翻訳を増加させるコドンを有するORFを含む。さらなる実施形態では、核酸は、ヒトの肝細胞などの細胞型における翻訳を増加させるコドンを有するORFを含む。肝細胞、肝臓、またはヒトなどにおける翻訳の増加は、ORFの野生型配列の翻訳の程度と比べて、あるいは、ORFの由来となった生物もしくはアミノ酸レベルで最も類似したORFを含有する生物、例えば*S. pyogenes*、*S. aureus*、または後述する他の原核生物からのCasヌクレアーゼなどの原核生物由来Casヌクレアーゼの場合には別の原核生物のコドン分布に合致するコドン分布を有するORFと比べて、判定することができる。あるいは、いくつかの実施形態において、哺乳動物、細胞型、哺乳動物の臓器、ヒト、ヒトの臓器などにおける、Cas9配列の翻訳の増加は、あらゆる適用可能な点突然変異、異種ドメインなどを含む、他の全ての条件が同じである、配列番号36の配列を有するORFの翻訳と比べて判定される。ヒト肝臓及びヒト肝細胞を含むヒトにおける発現を増加させるのに有用なコドンは、ヒト肝臓/肝細胞において高度に発現されるtRNAに対応するコドンであり得、これらについては、Dittmar KA, PLoS Genetics 2(12): e221 (2006)に記載されている。いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、ヒトなどの哺乳動物において高度に発現されるtRNA（例えば、各アミノ酸について最も高度に発現されるtRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、ヒトの臓器などの哺乳動物の臓器において高度に発現されるtRNA（例えば、各アミノ酸について最も高度に発現されるtRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、ヒトの肝臓などの哺乳動物の肝臓において高度に発現されるtRNA（例えば、各アミノ酸について最も高度に発現されるtRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、ヒトの肝細胞などの哺乳動物の肝細胞において高度に発現されるtRNA（例えば、各アミノ酸について最も高度に発現されるtRNA）に対応するコドンである。

20

30

40

【0150】

あるいは、生物（例えば、ヒト）全般で高度に発現されるtRNAに対応するコドンを使用してもよい。

【0151】

50

いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、表3に示すコドンセット(例えば、低U、低A、または低A/Uコドンセット)からのコドンである。低A及び低A/Uセットにおけるコドンは、示されているヌクレオチドを最小限に抑えるコドンを使用し、また、2つ以上の選択肢が利用可能である場合には、高度に発現されるtRNAに対応するコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、表3に示す低Uコドンセットからのコドンである。いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、表3に示す低Aコドンセットからのコドンである。いくつかの実施形態において、ORF内のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、表3に示す低A/Uコドンセットからのコドンである。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 3.例示的なコ ドンセット。ア ミノ酸	低 U	低 A	低 A/U
Gly	GGC	GGC	GGC
Glu	GAG	GAG	GAG
Asp	GAC	GAC	GAC
Val	GTG	GTG	GTG
Ala	GCC	GCC	GCC
Arg	AGA	CGG	CGG
Ser	AGC	TCC	AGC
Lys	AAG	AAG	AAG
Asn	AAC	AAC	AAC
Met	ATG	ATG	ATG
Ile	ATC	ATC	ATC
Thr	ACC	ACC	ACC
Trp	TGG	TGG	TGG
Cys	TGC	TGC	TGC
Tyr	TAC	TAC	TAC
Leu	CTG	CTG	CTG
Phe	TTC	TTC	TTC
Gln	CAG	CAG	CAG
His	CAC	CAC	CAC

10

20

30

40

【 0 1 5 2 】

例示的な配列

いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするORFは、配列番号1～12及び36のいずれかに対し少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の同一性を有する配列を含む。

【 0 1 5 3 】

いくつかの実施形態において、mRNAは、CasヌクレアーゼをコードするORFを含み、このCasヌクレアーゼは、配列番号13～14のいずれかに対し少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の同一性を有するア

50

ミノ酸配列を含む。

【0154】

いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするORFは、配列番号1～12及び36のいずれかから表3に示す配列に従ってコドン最適化されている配列、または配列番号1～12及び36のいずれかに対し少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%の同一性を有する配列を含む。

【0155】

本明細書で使用される場合、第1の配列の第2の配列へのアラインメントにより、全体で第2の配列の位置のX%以上が第1の配列にマッチすることが示される場合、第1の配列は、第2の配列「に対し少なくともX%の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例示的なアラインメントアルゴリズムには、当技術分野でよく知られているSmith-Waterman及びNeedleman-Wunschアルゴリズムがある。当業者には、所定の配列ペアをアラインするのにどのアルゴリズム及びパラメータ設定の選択が適切であるかが分かるであろう。概ね同様の長さであり、予想される同一性がアミノ酸について>50%、またはヌクレオチドについて>75%である配列に関しては、EBIによりwww.ebi.ac.ukのwebサーバーにて提供されているNeedleman-Wunschアルゴリズムインターフェイスのデフォルト設定を用いたNeedleman-Wunschアルゴリズムが概して適切である。

【0156】

RNA、mRNA、及びORFの追加の特徴

本明細書に記載される追加の特徴はいずれも、上述の実施形態のいずれかで実現可能である限り、組み合わせることができる。

【0157】

コードされたCasヌクレアーゼ

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、クラス2 Casヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、クリーパーゼ活性を有し、これは二本鎖エンドヌクレアーゼ活性またはニッカーゼ活性と称されることもある。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、クラス2 Casヌクレアーゼである（これは、例えばII型、V型、またはVI型のCasヌクレアーゼであり得る）。クラス2 Casヌクレアーゼには、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、及びC2c3タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Cas9ヌクレアーゼの例としては、S.pyogenes、S.aureus、及び他の原核生物のII型CRISPRシステムのもの（例えば、次の段落の一覧を参照されたい）、ならびにそれらの修飾された（例えば、エンジニアリングされた、または突然変異型の）バージョンが挙げられる。例えば、US2016/0312198A1、US2016/0312199A1を参照されたい。Casヌクレアーゼの他の例としては、III型CRISPRシステムのCsmもしくはCmr複合体、またはそのCas10、Csm1、もしくはCmr2サブユニット、及びI型CRISPRシステムのカスケード複合体、またはそのCas3サブユニットが挙げられる。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、IIA型、IIB型、またはIIC型システムからのものであり得る。様々なCRISPRシステム及びCasヌクレアーゼの説明については、例えば、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol., 9:467-477 (2011)、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol., 13:722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照されたい。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Casクリーパーゼ、例えばCas9クリーパーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Casニッカーゼ、例えばCas9ニッカーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、S.pyogenes Cas9ヌクレアーゼ、例えばクリーパーゼである。

【0158】

10

20

30

40

50

Cas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼの由来となり得る非限定的で例示的な種としては、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria innocua*、*Lactobacillus gasserii*、*Francisella novicida*、*Wolliella succinogenes*、*Sutterella wadsworthensis*、*Gammaproteobacterium*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Pasteurella multocida*、*Fibrobacter succinogenes*、*Rhodospirillum rubrum*、*Nocardiaopsis dassonvillei*、*Streptomyces pristinaespiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Streptosporangium roseum*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Bacillus pseudomycoloides*、*Bacillus selenitireducens*、*Exiguobacterium sibiricum*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus salivarius*、*Lactobacillus buchneri*、*Treponema denticola*、*Microscilla marina*、*Burkholderiales bacterium*、*Polaromonas naphthalenivorans*、*Polaromonas sp.*、*Crocospaera watsonii*、*Cyanothece sp.*、*Microcystis aeruginosa*、*Synechococcus sp.*、*Acetohalobium arabaticum*、*Ammonifex degensii*、*Caldicelulosiruptor becsicii*、*Candidatus Desulforudis*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Finnegoldia magna*、*Natran aerobius thermophilus*、*Pelotomaculum thermopropionicum*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Allochromatium vinosum*、*Marinobacter sp.*、*Nitrosococcus halophilus*、*Nitrosococcus watsoni*、*Pseudoalteromonas haloplanktis*、*Ktedonobacter racemifer*、*Methanohalobium evestigatum*、*Anabaena variabilis*、*Nodularia spumigena*、*Nostoc sp.*、*Arthrospira maxima*、*Arthrospira platensis*、*Arthrospira sp.*、*Lyngbya sp.*、*Microcoleus chthonoplastes*、*Oscillatoria sp.*、*Petrotoga mobilis*、*Thermosiphon africanus*、*Streptococcus pasteurianus*、*Neisseria cinerea*、*Campylobacter lari*、*Parvibaculum lavamentivorans*、*Corynebacterium diphtheria*、*Acidaminococcus sp.*、*Lachnospiraceae bacterium ND2006*、及び*Acaryochloris marina*が挙げられる。

【0159】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus pyogenes*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus thermophilus*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Ne 50

*isseria meningitidis*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Staphylococcus aureus*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Francisella novicida*由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus* sp由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Lachnospiraceae bacterium ND2006*由来のCpf1ヌクレアーゼである。さらなる実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Francisella tularensis*、*Lachnospiraceae bacterium*、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregrinibacteria bacterium*、*Parcubacteria bacterium*、*Smithella*、*Acidaminococcus*、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovoculi*、*Leptospira inadai*、*Porphyromonas crevioricanis*、*Prevotella disiens*、または*Porphyromonas macacae*由来のCpf1ヌクレアーゼである。ある特定の実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus*または*Lachnospiraceae*由来のCpf1ヌクレアーゼである。

10

【0160】

20

野生型Cas9は、RuvC及びHNHという2つのヌクレアーゼドメインを有する。RuvCドメインは非ターゲットDNA鎖を切断し、HNHドメインはDNAのターゲット鎖を切断する。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、2つ以上のRuvCドメイン及び/または2つ以上のHNHドメインを含む。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは野生型Cas9である。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、ターゲットDNAにおける二本鎖切断を誘導することができる。

【0161】

いくつかの実施形態において、タンパク質の1つのドメインまたは領域が異なるタンパク質の一部で置き換えられているキメラCasヌクレアーゼが使用される。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼドメインは、Fok1のような異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは修飾ヌクレアーゼであり得る。

30

【0162】

他の実施形態において、Casタンパク質は、I型CRISPR/Casシステム由来であってもよい。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Casシステムのカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Cas3タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、III型CRISPR/Casシステムからのものであり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、RNA切断活性を有し得る。

40

【0163】

ポリA尾部

いくつかの実施形態において、RNA（例えばmRNA）は、ポリアデニル化（ポリA）尾部をさらに含む。場合によっては、ポリA尾部は、それがプラスミドによりコードされている場合、ポリA尾部内の1つ以上の位置において1つ以上の非アデニンヌクレオチド「アンカー」で「中断」される。ポリA尾部は、少なくとも8個の連続したアデニンヌクレオチドを含み得、いくつかの実施形態において、ポリA尾部は、1つ以上の非アデニンヌクレオチドも含む。本明細書で使用される場合、「非アデニンヌクレオチド」とは、アデニンを含まない任意の天然または非天然のヌクレオチドを指す。グアニンヌクレオチド、チミンヌクレオチド、及びシトシンヌクレオチドは、例示的な非アデニンヌクレオチ

50

ドである。したがって、本明細書に記載されるポリヌクレオチド（例えばmRNA）のポリA尾部は、Casヌクレアーゼまたは目的の配列をコードするヌクレオチドの3'に位置する連続したアデニンヌクレオチドを含み得る。場合によっては、mRNAのポリA尾部は、Casヌクレアーゼまたは目的の配列をコードするヌクレオチドの3'に位置する非連続アデニンヌクレオチドを含み、ここで、非アデニンヌクレオチドは、規則的または不規則な間隔でアデニンヌクレオチドを中断する。

【0164】

いくつかの実施形態において、ポリA尾部は、mRNAのインビトロ転写に使用されるプラスミドにコードされており、転写産物の一部となる。プラスミドにコードされたポリA配列、すなわち、ポリA配列中の連続したアデニンヌクレオチドの数は、正確ではない可能性があり、例えば、プラスミド中の100ポリA配列は、転写されたmRNA中に最大100のポリA配列をもたらし得る。いくつかの実施形態において、ポリA尾部は、プラスミドにコードされておらず、PCRテーリングまたは酵素テーリングによって、例えばE.coliポリ(A)ポリメラーゼを使用して付加される。

10

【0165】

UTR; Kozak配列

いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするRNA（例えばmRNA）は、5'UTR、3'UTR、または5'UTR及び3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、RNA（例えばmRNA）は、ヒドロキシステロイド17-βデヒドロゲナーゼ4（HSD17B4またはHSD）からの少なくとも1つのUTR、例えば、HSDからの5'UTRを含む。いくつかの実施形態において、RNA（例えばmRNA）は、グロビンmRNA、例えば、ヒトアルファグロビン（HBA）mRNA、ヒトβグロビン（HBB）mRNA、またはXenopus laevis βグロビン（XBG）mRNAからの少なくとも1つのUTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、HBA、HBB、またはXBGなどのグロビンmRNAからの5'UTR、3'UTR、または5'UTR及び3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス（CMV）、マウスHba-a1、HSD、アルブミン遺伝子、HBA、HBB、またはXBGからの5'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスHba-a1、HSD、アルブミン遺伝子、HBA、HBB、またはXBGからの3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスHba-a1、HSD、アルブミン遺伝子、HBA、HBB、XBG、熱ショックタンパク質90（Hsp90）、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、β-アクチン、アルファ-チューブリン、腫瘍タンパク質（p53）、または上皮成長因子受容体（EGFR）からの5'UTR及び3'UTRを含む。

20

30

【0166】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、同じ供給源、例えば、アクチン、アルブミン、またはHBA、HBB、もしくはXBGなどのグロビンなどの構造的に発現されたmRNAからの5'UTR及び3'UTRを含む。

40

【0167】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、Kozak配列を含む。Kozak配列は当技術分野において公知である。Kozak配列は、翻訳開始、及び核酸から翻訳されるポリペプチドの全体的収率に影響を与え得る。Kozak配列は、開始コドンとして機能し得るメチオニンコドンを含む。最小Kozak配列はNNNRUGNであり、ここで、次のうちの少なくとも1つが真である：第1のNはAまたはGである、及び第2のNはGである。ヌクレオチド配列との関連において、Rはプリン（AまたはG）を意味する。いくつかの実施形態では、Kozak配列はgccgccRccAUGG（配列番号37）であり、ミスマッチがゼロであるか、または小文字の位置に

50

対するミスマッチが最大1つ、2つ、3つ、もしくは4つである。

【0168】

修飾ヌクレオチド

いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするORFを含むmRNAは、一部または全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含む。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5位において、例えば、ハロゲンまたはC1-C3アルコキシで修飾されているウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、1位において、例えば、C1-C3アルキルで修飾されているシュードウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、シュードウリジン、N1-メチル-シュードウリジン、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは5-メトキシウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは5-ヨードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンはシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンはN1-メチル-シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンとN1-メチル-シュードウリジンの組み合わせである。

10

【0169】

いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の少なくとも90%、95%、98%、99%、または100%は修飾ウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の85~95%、または90~100%は、修飾ウリジン、例えば、N1-メチルシュードウリジン、シュードウリジン、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の85~95%、または90~100%は、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の85~95%、または90~100%は、N1-メチルシュードウリジンである。

20

【0170】

5'キャップ

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼ(例えばCas9)をコードするORFを含むmRNAは、5'キャップ、例えばCap0、Cap1、またはCap2を含む。5'キャップは一般に、核酸の5'から3'方向の鎖の1番目のヌクレオチド、すなわち、第1のキャップ近位ヌクレオチドの5'位に5'-三リン酸を介して連結されている7-メチルグアニンリボヌクレオチドである(これは、以下に記述するように、例えばARCAに関して、さらに修飾されていてもよい)。Cap0では、mRNAの第1及び第2のキャップ近位ヌクレオチドのリボースがいずれも2'-ヒドロキシルを含む。Cap1では、mRNAの第1及び第2の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ2'-メトキシ及び2'-ヒドロキシルを含む。Cap2では、mRNAの第1及び第2のキャップ近位ヌクレオチドのリボースがいずれも2'-メトキシを含む。例えば、Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30、Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106-E2115を参照されたい。

30

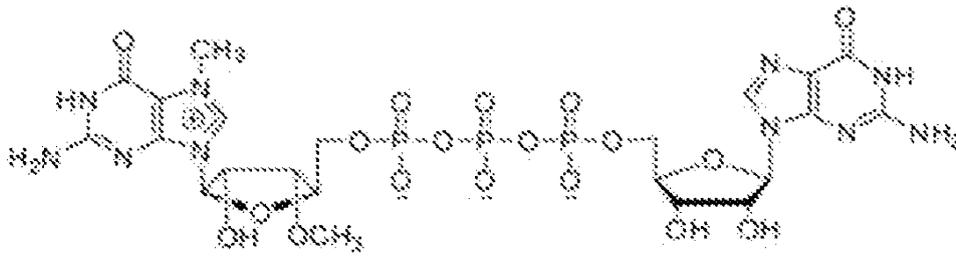
【0171】

キャップは、共転写によりRNAに含まれ得る。例えば、ARCA(アンチリバースキャップアナログ(anti-reverse cap analog); ThermoFisher Scientific型番AM8045)は、開始時に転写産物にインビトロで組み込まれ得るグアニンリボヌクレオチドの5'位に連結された7-メチルグアニン3'-メトキシ-5'-三リン酸を含むキャップアナログである。ARCAは、第1のキャップ近位ヌクレオチドの2'位がヒドロキシルであるCap0キャップをもたらす。例えば、Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)Gppp

40

50

G, " RNA 7 : 1 4 8 6 - 1 4 9 5 を参照されたい。A R C A 構造を以下に示す。
【化 2】



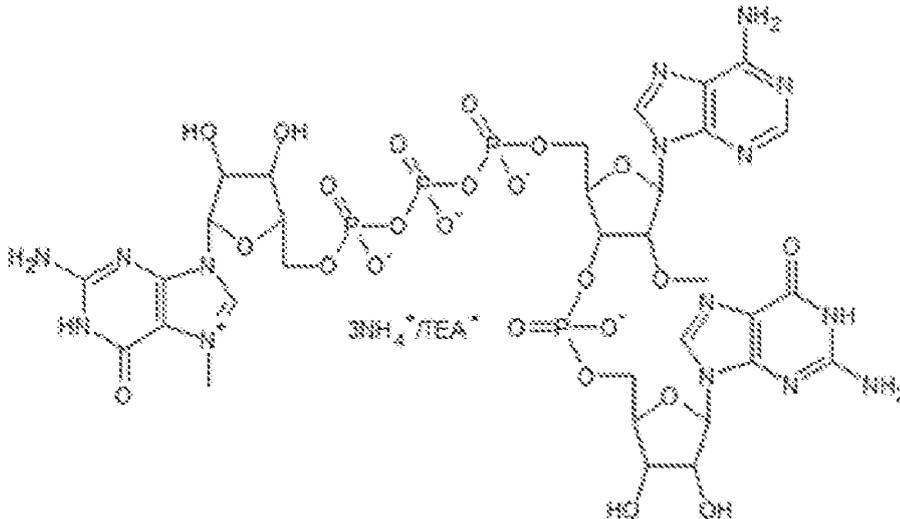
10

【0172】

CleanCap (商標) AG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeA) pG ; TriLink Biotechnologies 型番 N - 7113) または CleanCap (商標) GG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeG) pG ; TriLink Biotechnologies 型番 N - 7133) を使用することで、Cap1 構造を共転写により得ることができる。CleanCap (商標) AG 及び CleanCap (商標) GG の 3' - O - メチル化型も、TriLink Biotechnologies からそれぞれ型番 N - 7413 及び N - 7433 として入手可能である。CleanCap (商標) AG の構造を以下に示す。CleanCap (商標) の構造は、本明細書では、上記の型番の最後の 3 桁を使用して言及されることもある (例えば、TriLink Biotechnologies 型番 N - 7113 については「CleanCap (商標) 113」)。

20

【化 3】



30

【0173】

あるいは、キャップを転写後に RNA に付加することもできる。例えば、ワクシニアキャッピング酵素が市販されており (New England Biolabs 型番 M2080S)、これは、その D1 サブユニットによりもたらされる RNA トリホスファターゼ活性及びグアニリルトランスフェラーゼ活性、ならびにその D12 サブユニットによりもたらされるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、これは、S - アデノシルメチオニン及び GTP の存在下で、Cap0 をもたらすよう RNA に 7 - メチルグアニンを付加することができる。例えば、Guo, P. and Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023 - 4027、Mao, X. and Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472 - 24479 を参照されたい。キャップ及びキャッピング手法に関する追加の説明については、例えば、WO2017/05329

40

50

7及びIshikawa et al., Nucl. Acids. Symp. Ser. (2009) No. 53, 129-130を参照されたい。

【0174】

4. 核酸組成物の送達

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるガイドRNAを含む組成物を投与することを含む、目的の遺伝子（例えばTTR）内で二本鎖切断（DSB）または遺伝子編集を誘導する方法が提供される。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子においてDSBを誘導するために、ガイド配列の1つ以上が投与される。ガイドRNAは、Casヌクレアーゼ（例えばCas9）をコードするRNA（例えばmRNA）と共に投与される。Casヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であり得る。特定の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼをコードするRNAは、本明細書に記載されるLNP、例えばリポドAを含むLNPにおいて投与される。さらなる実施形態では、LNPは、リポドAと、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）と、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）と、場合により中性脂質（例えば、DSPC）とを含む、脂質成分を含む。

10

【0175】

いくつかの実施形態において、化学修飾型ガイドRNAなどのガイドRNAを含むLNP組成物を投与することを含む、目的の遺伝子（例えばTTR）内で二本鎖切断（DSB）を誘導する方法が提供される。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子においてDSBを誘導するために、sgRNAの1つ以上が投与される。ガイドRNAは、Casヌクレアーゼ（例えばCas9）をコードする、本明細書に記載されるRNAと共に投与される。Casヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であり得る。特定の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼをコードするRNAは、本明細書に記載されるLNP、例えば、リポドAと、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）と、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）と、場合により中性脂質（例えば、DSPC）とを含むLNPにおいて投与される。

20

【0176】

いくつかの実施形態において、化学修飾型ガイドRNAなどのガイドRNAを含む組成物を投与することを含む、目的の遺伝子（例えばTTR）を修飾する方法が提供される。いくつかの実施形態において、目的の遺伝子を修飾するために、sgRNAの1つ以上が投与される。ガイドRNAは、Casヌクレアーゼ（例えばCas9）をコードする、本明細書に記載されるRNAと共に投与される。Casヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であり得る。特定の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼをコードするRNAは、本明細書に記載されるLNP、例えば、リポドAと、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）と、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）と、場合により中性脂質（例えば、DSPC）とを含むLNPにおいて投与される。

30

【0177】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAの1つ以上を含む組成物を投与することを含む、疾患（例えばATTR）を処置する方法が提供される。ガイドRNAは、例えばCas9などのCasヌクレアーゼをコードする、本明細書に記載されるRNAと共に投与される。Casヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であり得る。特定の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載されるLNP、例えば、リポドAと、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）と、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）と、場合により中性脂質（例えば、DSPC）とを含むLNPにおいて投与される。

40

【0178】

50

いくつかの実施形態において、1つ以上のガイドRNAを投与することを含む、遺伝子産物（例えばTTR）を低下させる方法が提供される。いくつかの実施形態において、遺伝子産物の蓄積を低下させるまたは防止するために、ガイド配列の1つ以上を含むgRNAが投与される。gRNAは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードする核酸と共に投与される。Casヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であり得る。特定の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼをコードするRNAは、本明細書に記載されるLNP、例えば、リポドAと、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）と、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）と、場合により中性脂質（例えば、DSPC）とを含むLNPにおいて投与される。

10

【0179】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるような1つ以上のガイドRNAを投与することを含む、遺伝子産物の濃度を低下させる方法が提供される。いくつかの実施形態において、この遺伝子産物の蓄積を低下させるまたは防止するために、ガイド配列の1つ以上を含むgRNAが投与される。gRNAは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードする核酸と共に投与される。Casヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であり得る。特定の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼをコードするRNAは、本明細書に記載されるLNP、例えば、リポドA）と、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）と、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）と、場合により中性脂質（例えば、DSPC）とを含むLNPにおいて投与される。

20

【0180】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるような1つ以上のガイドRNAを含む、対象の遺伝子産物の蓄積を低下させるまたは防止する方法が提供される。いくつかの実施形態において、sgRNAの1つ以上を含む組成物を投与することを含む、対象の遺伝子産物の蓄積を低下させるまたは防止する方法が提供される。いくつかの実施形態において、アミロイドまたはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低下させるまたは防止するために、1つ以上のガイド配列を含むgRNAが投与される。gRNAは、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするRNAと共に投与される。Casヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であり得る。特定の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載されるLNP、例えば、リポドA）と、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）と、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）と、場合により中性脂質（例えば、DSPC）とを含むLNPにおいて投与される。

30

【0181】

いくつかの実施形態において、核酸から翻訳されたCasヌクレアーゼと共にガイド配列を含むgRNAが、DSBを誘導し、修復中の非相同末端結合（NHEJ）が、TTR遺伝子における突然変異をもたらす。いくつかの実施形態において、NHEJは、ヌクレオチド（複数可）の欠失または挿入をもたらす、これによってTTR遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス突然変異が誘導される。

40

【0182】

5. 脂質組成物

いくつかの実施形態において、gRNAと、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードする本明細書に記載される核酸とを含む、本明細書に記載される核酸組成物は、脂質ナノ粒子として製剤されるか、または脂質ナノ粒子によって投与される。例えば、「LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS」と題するWO2017173054A1、及び「FORMULATIONS」と題するWO2019067992A1を参照されたい。これらの文献の内容、特に文献中で開示されているLNP組成物は、全体として参照により本明細

50

書に援用される。対象に治療用RNAを送達できることが当業者に知られている脂質ナノ粒子(LNP)は、本明細書に記載されるガイドRNA及びCasヌクレアーゼをコードする核酸と共に利用され得る。

【0183】

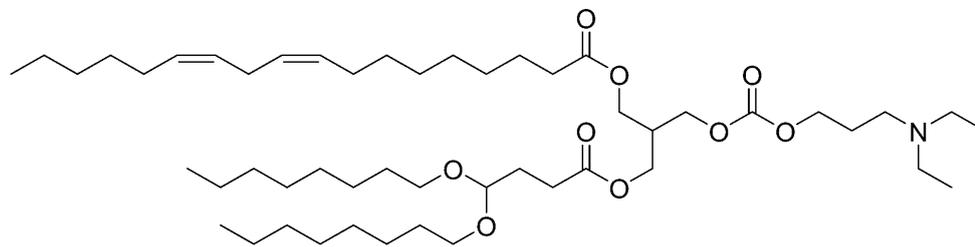
LNPを含む組成物は、2つの活性物質、すなわちガイドRNA及びCasヌクレアーゼをコードするRNAを、イオン化可能脂質を含む脂質成分と共に含むことができる。脂質ナノ粒子とは、分子間力によって互いに物理的に会合した複数の(すなわち、2つ以上の)脂質分子を含む粒子を意味する。

【0184】

イオン化可能脂質

CRISPR/Cas mRNA及びガイドRNA成分を肝臓細胞に送達するための脂質組成物は、(9Z, 12Z) - 3 - ((4, 4 - ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ) - 2 - (((3 - (ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ - 9, 12 - ジエノエートであるリピドAを含むことができ、これは、3 - ((4, 4 - ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ) - 2 - (((3 - (ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエノエートとも呼ばれる。リピドAは、

【化4】



として表すことができる。

【0185】

リピドAは、WO2015/095340(例えば、pp.84~86)に従って合成され得る。

【0186】

追加の脂質

本開示の脂質組成物における使用に好適な「中性脂質」としては、例えば、種々の中性脂質、非荷電脂質または双性イオン脂質が挙げられる。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例は、5 - ヘプタデシルベンゼン - 1, 3 - ジオール(レゾルシノール)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ホスホコリン(DOPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ホスファチジルコリン(PLPC)、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン(DAPC)、ホスファチジエタノールアミン(PE)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、ジラウリロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、1 - ミリストイル - 2 - パルミトイルホスファチジルコリン(MPPC)、1 - パルミトイル - 2 - ミリストイルホスファチジルコリン(PMPC)、1 - パルミトイル - 2 - ステアロイルホスファチジルコリン(PSPC)、1, 2 - ジアラキドイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン(DBPC)、1 - ステアロイル - 2 - パルミトイルホスファチジルコリン(SPPC)、1, 2 - ジエイコセノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン(DEPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、リゾホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジエタノールアミン(DOPE)、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジエタノールアミン(DSPE)、ジミリストイルホスファチジエタノールアミン(DMPE)。

ールアミン (DMPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、パルミトイルオレイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。一実施形態では、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) 及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPE) からなる群から選択される。別の実施形態では、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) であり得る。

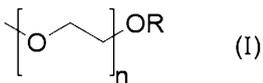
【0187】

「ヘルパー脂質」には、ステロイド、ステロール、及びアルキルレゾルシノールが含まれる。本開示における使用に好適なヘルパー脂質は、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、及びヘミコハク酸コレステロールを含むが、これらに限定されない。一実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールであり得る。

【0188】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子がインビボ (例えば、血液中) で存在し得る時間の長さを変化させる脂質であり、ステルス脂質は、PEG脂質であり得る。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低下させ、粒径をコントロールすることにより、製剤プロセスを補助し得る。本明細書で使用されるステルス脂質は、LNPの薬物動態学的特性を調節し得る。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質は、脂質部分とPEGに基づくポリマー部分とを含むPEG脂質を含むが、これは典型的ではない。約2,000ダルトンの平均分子量を有する、「PEG-2K」、別名「PEG 2000」を含む脂質を含め、当技術分野において公知のPEG脂質が企図される。PEG-2Kは、本明細書では以下の式 (I) によって表され、式中、nは45であり、これは、数平均重合度が約45のサブユニットを含むことを意味する。しかし、当技術分野で公知である他のPEG実施形態を使用してもよい。

【化5】



【0189】

本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、PEG脂質は、PEG-ジラウリルグリセロール、PEG-ジミリストイルグリセロール (PEG-DMG) (型番GM-020、NOF (Tokyo, Japan) 製)、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール (PEG-DSPG) (型番DSPG-020CN、NOF, Tokyo, Japan)、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、及びPEG-ジステアロイルグリカミド、PEG-コレステロール (1-[8'-(コレスタ-5-エン-3[ベータ]-オキシ)カルボキサミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)、PEG-DMB (3,4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)エーテル)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG2k-DMPE)、または1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG2k-DMG)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG2k-DSPG) (型番880120C、Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) 製)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (PEG2k-DSG; GS-020、NOF Tokyo, Japan)、ポリ(エチレングリコール)-2000-ジメタクリレート (PEG2k

- DMA)、及び1,2-ジステアリルオキシプロピル-3-アミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000](PEG2k-DSA)から選択され得る。一実施形態では、PEG脂質は、PEG2k-DMGであり得る。

【0190】

いくつかの実施形態において、PEG脂質は、グリセロール基を含む。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、ジミリストイルグリセロール(DMG)基を含む。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2kを含む。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG-DMGである。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000である。いくつかの実施形態において、PEG2k-DMGは、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000である。

10

【0191】

LNP製剤

LNP組成物は、脂質成分と、CasヌクレアーゼmRNA(例えば、Cas9 mRNAなどのクラス2 CasヌクレアーゼmRNA)及びgRNAを含むRNA成分とを含み得る。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、RNA成分として、クラス2 CasヌクレアーゼをコードするmRNAと、gRNAとを含む。ある特定の実施形態において、LNP組成物は、RNA成分、リポドA、ヘルパー脂質、中性脂質、及びステルス脂質を含み得る。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質はコレステロールである。ある特定の実施形態において、中性脂質はDSPCである。追加の実施形態において、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。

20

【0192】

ある特定の実施形態において、脂質組成物は、製剤中の成分脂質のそれぞれのモル比に従って表される。本開示の諸実施形態は、製剤中の成分脂質のそれぞれのモル比に従って表される脂質組成物を提供する。一実施形態では、リポドAなどのイオン化可能脂質のモル%は、約40モル%~60モル%、場合により約50モル%であり得る。一実施形態では、イオン化可能脂質のモル%は、約55モル%であり得る。いくつかの実施形態において、LNPバッチのイオン化可能脂質モル%は、ターゲットモル%の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 2.5\%$ となる。いくつかの実施形態において、LNPバッチのイオン化可能脂質モル%は、ターゲットモル%の ± 4 モル%、 ± 3 モル%、 ± 2 モル%、 ± 1.5 モル%、 ± 1 モル%、 ± 0.5 モル%、または ± 0.25 モル%となる。全てのモル%の数字は、LNP組成物中の脂質成分の割合として与えられる。

30

【0193】

一実施形態では、中性リン脂質などの中性脂質のモル%は、約5モル%~15モル%、場合により約9モル%であり得る。いくつかの実施形態において、LNPバッチの中性脂質モル%は、ターゲット中性脂質モル%の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 2.5\%$ となる。

【0194】

一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約20モル%~60モル%であり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、約25モル%~55モル%であり得、場合により、ヘルパー脂質のモル%は、約30モル%~40モル%であり得る。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、脂質成分を100モル%にするように、イオン化可能脂質、中性脂質、及びPEG脂質の濃度に基づいて調整される。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル%は、脂質成分を少なくとも99モル%にするように、イオン化可能脂質及びPEG脂質の濃度に基づいて調整される。いくつかの実施形態において、LNPバッチのヘルパーモル%は、ターゲットモル%の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 2.5\%$ となる。

40

【0195】

50

一実施形態では、PEG脂質のモル%は、約1モル%~10モル%であり得る。一実施形態では、PEG脂質のモル%は、約2モル%~4モル%であり得る。一実施形態では、PEG脂質のモル%は、約2.5モル%~4モル%であり得る。一実施形態では、PEG脂質のモル%は、約3モル%であり得る。いくつかの実施形態において、LNPバッチのPEG脂質モル%は、ターゲットPEG脂質モル%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。

【0196】

ある特定の実施形態において、カーゴは、Casヌクレアーゼ（例えば、Casヌクレアーゼ、クラス2 Casヌクレアーゼ、またはCas9）をコードする核酸（例えば、mRNA）と、gRNAとを含む。一実施形態では、イオン化可能脂質はリポドAである。様々な実施形態において、LNP組成物は、イオン化可能脂質（例えばリポドA）、中性脂質、ヘルパー脂質、及びPEG脂質を含む。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質はコレステロールである。ある特定の実施形態において、中性脂質はDSPCである。特定の実施形態において、PEG脂質はPEG2k-DMGである。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、リポドA、ヘルパー脂質、中性脂質、及びPEG脂質を含み得る。追加の実施形態において、LNP組成物は、リポドA、コレステロール、DSPC、及びPEG2k-DMGを含む。

10

【0197】

本開示の諸実施形態は、イオン化可能脂質の正に荷電されたイオン化可能基（N）と、封入される核酸の負に荷電されたリン酸基（P）との間のモル比に従って表される脂質組成物も提供する。これは、N/Pの比によって数学的に表され得る。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、イオン化可能脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びPEG脂質を含む脂質成分と、核酸成分とを含み得、N/P比は約3~10である。一実施形態では、N/P比は約5~7であり得、場合により、N/P比は約6であり得る。一実施形態では、N/P比は6±1であり得る。一実施形態では、N/P比は6±0.5であり得る。いくつかの実施形態において、N/P比は、ターゲットN/P比の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%となる。

20

【0198】

いくつかの実施形態において、RNA成分は、例えば、本明細書に記載されるCasヌクレアーゼをコードする、本明細書で開示される核酸などのRNA（例えば本明細書に記載されるCas9 mRNA）、及び本明細書に記載されるgRNAを含み得る。いくつかの実施形態において、RNA成分は、本明細書に記載されるCasヌクレアーゼmRNA及び本明細書に記載されるgRNAを含む。いくつかの実施形態において、RNA成分は、本明細書に記載されるクラス2 CasヌクレアーゼmRNA及び本明細書に記載されるgRNAを含む。前述の実施形態のいずれかにおいて、gRNAは、本明細書に記載されるsgRNA、例えば本明細書に記載される化学修飾型sgRNAであり得る。

30

【0199】

ある特定の実施形態において、LNP組成物は、本明細書に記載されるCasヌクレアーゼmRNA（例えばクラス2 Cas mRNA）及び少なくとも1つの本明細書に記載されるgRNAを含む。ある特定の実施形態において、LNP組成物は、gRNAと、クラス2 CasヌクレアーゼmRNAなどのCasヌクレアーゼmRNAとを、約10:1~1:10の比で含む。いくつかの実施形態において、gRNAと、クラス2 CasヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼmRNAとの比は、約1:1である。いくつかの実施形態において、gRNAと、クラス2 CasヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼmRNAとの比は、約1:2である。いくつかの実施形態において、gRNAと、クラス2 CasヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼmRNAとの比は、約1:3である。

40

【0200】

いくつかの実施形態において、LNPは、RNA水溶液を100%エタノールなどの有機溶媒系の脂質溶液と混合することによって形成される。好適な溶液または溶媒は、水、

50

PBS、Tris緩衝液、NaCl、クエン酸緩衝液、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールを含むか、またはそれらを含み得る。例えばLNPのインビボ投与用の、薬学的に許容可能な緩衝液が使用され得る。

【0201】

いくつかの実施形態において、マイクロ流体混合、T字混合、または交差混合が使用される。ある特定の態様では、流量、合流部サイズ、合流部の幾何形状、合流部形状、管径、溶液、及び/またはRNA及び脂質の濃度は変動し得る。LNPまたはLNP組成物は、例えば、透析、タンジェンシャルフロー濾過、またはクロマトグラフィーにより濃縮または精製され得る。LNPは、リポドA、DSPC、コレステロール、及びDMG-PEG2kを含む4つの脂質から構成され得る。いくつかの実施形態において、LNPを、50mM Tris、45mM NaCl、及び5% (w/v) スクロース、pH7.4の水性緩衝液中に懸濁させて製剤する。

10

【0202】

本開示のLNPの多分散指数(pdi)及びサイズ特性解析を行うために動的光散乱法(「DLS」)が使用され得る。DLSでは、サンプルを光源に晒すことから得られる光の散乱を測定する。DLS測定から決定されるPDIは、ある集団における粒径(およそその平均粒径)分布を表し、完全に均一な集団では、PDIはゼロである。

【0203】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるLNPは、50~100nmのサイズを有する。いくつかの実施形態において、LNPは、85~90nmのサイズを有する。別段の記載がない限り、本明細書で言及されるサイズはいずれも、Malvern Zetasizerでの動的光散乱法により測定される、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ(直径)である。ナノ粒子サンプルは、計数率がおおよそ200~400kctsとなるようリン酸緩衝食塩水(PBS)中に希釈される。データは、強度測度の加重平均として提示される。

20

【0204】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるgRNA及び本明細書で開示されるCasヌクレアーゼ(例えばCas9、SpyCas9)をコードするRNA(例えば、mRNA)に関連するLNPは、ATTRを処置するための薬品を調製する際に使用するものである。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるgRNA及び本明細書で開示されるCasヌクレアーゼ(例えばCas9、SpyCas9)をコードするRNA(例えば、mRNA)に関連するLNPは、ATTRを有する対象においてアミロイドまたはアミロイド原線維におけるATTRの蓄積及び凝集を低下させるまたは防止するための薬品を調製する際に使用するものである。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるgRNA及び本明細書で開示されるCasヌクレアーゼ(例えばCas9、SpyCas9)をコードするRNA(例えば、mRNA)に関連するLNPは、血清ATTR濃度を低下させるための薬品を調製する際に使用するものである。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるgRNA及び本明細書で開示されるCasヌクレアーゼ(例えばCas9、SpyCas9)をコードするRNA(例えば、mRNA)に関連するLNPは、血清プレアルブミン濃度を低下させるための薬品を調製する際に使用するものである。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるgRNA及び本明細書で開示されるCasヌクレアーゼ(例えばCas9、SpyCas9)をコードするRNA(例えば、mRNA)に関連するLNPは、哺乳動物などの対象、例えばヒトなどの霊長動物において、ATTRを処置する際に使用するものである。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるgRNA及び本明細書で開示されるCasヌクレアーゼ(例えばCas9、SpyCas9)をコードするRNA(例えば、mRNA)に関連するLNPは、ATTRを有する対象、例えば哺乳動物、例えばヒトなどの霊長動物において、アミロイドまたはアミロイド原線維におけるATTRの蓄積及び凝集を低下させるまたは防止する際に使用するものである。いく

30

40

50

つかの実施形態において、本明細書で開示される gRNA 及び本明細書で開示される Casヌクレアーゼ（例えば Cas9、Spy Cas9）をコードする RNA（例えば、mRNA）に関連する LNP は、哺乳動物などの対象、例えばヒトなどの霊長動物において、血清 TTR 濃度を低下させる際に使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される gRNA 及び本明細書で開示される Casヌクレアーゼ（例えば Cas9、Spy Cas9）をコードする RNA（例えば、mRNA）に関連する LNP は、哺乳動物などの対象、例えばヒトなどの霊長動物において、血清プレアルブミン濃度を低下させる際に使用するためのものである。

【0205】

場合によっては、脂質成分は、48～53モル%のリピドA；約8～10モル%のDSPC；及び1.5～10モル%のPEG脂質（PEG2k-DMG）を含み、残りの脂質成分はコレステロールであり、LNP組成物のN/P比は3～8±0.2である。

【0206】

いくつかの実施形態において、LNPは脂質成分を含み、脂質成分は、約50モル%のイオン化可能脂質、例えばリピドA；約9モル%の中性脂質、例えばDSPC；約3モル%のステルス脂質、例えばPEG脂質、例えばPEG2k-DMGを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなり、残りの脂質成分はヘルパー脂質、例えばコレステロールであり、LNP組成物のN/P比は約6である。いくつかの実施形態において、イオン化可能脂質はリピドAである。いくつかの実施形態において、中性脂質はDSPCである。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、PEG脂質である。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかの実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態において、LNPは脂質成分を含み、脂質成分は、約50モル%のリピドA；約9モル%のDSPC；約3モル%のPEG2k-DMGを含み、残りの脂質成分はコレステロールであり、LNP組成物のN/P比は約6である。

【0207】

II. 全身送達の方法

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）は、全身投与される。本明細書で使用される場合、全身投与とは、生物における広い体内分布、例えば、静脈内投与、腹腔内注射などを指す。

【0208】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物の単回投与は、ターゲットタンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。いくつかの実施形態において、LNP組成物の単回投与は、細胞集団におけるターゲットタンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。他の実施形態では、LNP組成物の2回以上の投与が、累積効果によって編集を最大化するために有益であり得る。例えば、LNP組成物を2回または3回（「追加用量」）、例えば、第2の用量または第3の用量で投与することができる。第2の用量または第3の用量の用量は、例えば、血清TTR及び/または血清プレアルブミンをベースラインレベル（例えば、第1のLNP投与前のレベル）と比較して約60%、70%、80%、もしくは90%、またはそれよりも大きく低下させるように、臨床医によって決定され得る。2回以上の投与（第2の用量または第3の用量）は、第1の用量がどのように投与されたか（重量ベースまたは固定用量）にかかわらず、重量ベース（例えば、0.7mg/kgまたは1.0mg/kg）または固定用量（例えば、約60mg、70mg、80mg、または90mg）として投与され得る。

【0209】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物は、約2時間～4時間の注入時間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物は、約2時間～3時間の注入時間の注入によって投与される。いくつか

かの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物は、約 3 時間 ~ 4 時間の注入時間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物は、約 4 時間 ~ 5 時間の注入時間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物は、約 4 時間の注入時間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物は、少なくとも 2 時間の注入時間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物は、少なくとも 3 時間の注入時間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物は、少なくとも 4 時間の注入時間の注入によって投与される。

【 0 2 1 0 】

10

I I I . 用量

1 . 重量ベースの用量

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物（例えば、有効量の、C a s 9 などの C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び遺伝子をターゲティングするガイド R N A、例えば、T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A（全 R N A または合計 R N A）を含む）は、重量ベースの用量を使用して投与される。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 0 . 1 m g / k g ~ 2 m g / k g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 0 . 3 m g / k g ~ 1 m g / k g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 0 . 1 m g / k g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 0 . 3 m g / k g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 0 . 7 m g / k g の合計用量である。L N P 組成物は、L N P 組成物が全 R N A に基づいて投薬される場合、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量を投与するという意味で、有効量で投与され得る。

20

30

【 0 2 1 1 】

他の実施形態において、0 . 1 m g / k g 用量を受ける対象は、累積効果によって編集を最大化するために、L N P 組成物の 2 回以上の投与を受けてもよい。例えば、L N P 組成物は、2 回、3 回、4 回、5 回、またはそれ以上の回数、例えば 2 回投与されてもよく、例えば、第 2 の投与、第 3 の投与、第 4 の投与、または第 5 の投与が行われてもよい。いくつかの実施形態において、L N P 組成物は、L N P 組成物を以前に投与されたヒト対象に投与される。いくつかの実施形態において、L N P 組成物を以前に投与されており、かつ、例えば第 1 の L N P 投与後 2 8 日目に判定して、血清 T T R の 6 0 % 超、7 0 % 超、または 8 0 % 超の低下を達成していない（例えば、L N P 組成物の投与後に E L I S A により測定された血清 T T R の減少が 6 0 % 未満、7 0 % 未満、または 8 0 % 未満である）ヒト対象に、L N P 組成物が投与される。いくつかの実施形態において、L N P 組成物を以前に投与されており、かつ、例えば第 1 の L N P 投与後 2 8 日目に判定して、血清 T T R の 6 0 % 超、7 0 % 超、または 8 0 % 超の低下を達成していない（例えば、L N P 組成物の投与後に質量分析または E L I S A により測定された血清 T T R の減少が 6 0 % 未満、7 0 % 未満、または 8 0 % 未満である）ヒト対象に、L N P 組成物が投与される。いくつかの実施形態において、L N P 組成物を以前に投与されており、かつ、例えば第 1 の L N P 投与後 2 8 日目に判定して、血清プレアルブミンの 6 0 % 超、7 0 % 超、または 8 0 % 超の低下を達成していない（例えば、L N P 組成物の投与後に濁度アッセイなどにより測定された血清プレアルブミンの減少が 6 0 % 未満、7 0 % 未満、または 8 0 % 未満で

40

50

ある) ヒト対象に、L N P 組成物が投与される。いくつかの実施形態において、L N P 組成物を以前に投与されており、かつ、例えば第 1 の L N P 投与後 2 8 日目に判定して、血清プレアルブミンの 6 0 % 超、7 0 % 超、または 8 0 % 超の低下を達成していない(例えば、L N P 組成物の投与後に血清プレアルブミンにおける減少が 6 0 % 未満、7 0 % 未満、または 8 0 % 未満である) ヒト対象に、L N P 組成物が投与される。

【 0 2 1 2 】

2 . 固定用量

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物(例えば、有効量の、C a s 9 などの C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び遺伝子をターゲティングするガイド R N A、例えば、T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A (総用量または合計用量)を含む)は、固定用量を使用して投与される。固定用量は、ヒト対象において約 2 5 ~ 1 5 0 m g であり得る。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 5 m g ~ 7 5 m g、場合により約 2 5 m g ~ 7 5 m g、約 2 5 m g ~ 6 0 m g、約 2 5 m g ~ 8 0 m g、または約 2 5 m g ~ 1 1 5 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 5 0 m g ~ 1 5 0 m g、場合により約 5 0 m g ~ 1 0 0 m g または約 7 5 m g ~ 1 5 0 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 5 m g ~ 9 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 1 5 m g ~ 2 7 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 5 0 m g ~ 9 0 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 3 5 m g ~ 6 5 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 5 m g ~ 1 8 0 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 5 0 m g ~ 7 0 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 6 0 m g ~ 8 0 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 7 0 m g ~ 9 0 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、約 8 0 m g ~ 1 0 0 m g の合計用量である。L N P 組成物は、L N P 組成物が全 R N A に基づいて投薬される場合、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量を投与するという意味で、有効量で投与され得る。

【 0 2 1 3 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される L N P 組成物(例えば、有効量の、C a s 9 などの C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A、及び遺伝子をターゲティングするガイド R N A、例えば、T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A (総用量または合計用量)を含む)は、固定用量を使用して投与される。固定用量は、ヒト対象において 2 5 ~ 1 5 0 m g であり得る。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、5 m g ~ 7 5 m g、場合により 2 5 m g ~ 7 5 m g、2 5 m g ~ 6 0 m g、2 5 m g ~ 8 0 m g、または 2 5 m g ~ 1 1 5 m g の合計用量である。いくつかの実施形態において、C a s ヌクレアーゼをコードする m R N A 及び T T R 遺伝子をターゲティングするガイド R N A の有効量は、5 0 m g ~ 1 5 0 m g、場合により 5 0 m g ~ 1 0 0 m g または 7 5

mg ~ 150 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、5 mg ~ 9 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、15 mg ~ 27 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、50 mg ~ 90 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、35 mg ~ 65 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、5 mg ~ 180 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、50 mg ~ 70 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、60 mg ~ 80 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、70 mg ~ 90 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、80 mg ~ 100 mg の合計用量である。

10

【0214】

20

いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約7 mg ~ 9 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約25 mg ~ 27 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約44 mg ~ 68 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約59 mg ~ 111 mg の合計用量である。

【0215】

30

いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、7 mg ~ 9 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、25 mg ~ 27 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、44 mg ~ 68 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、59 mg ~ 111 mg の合計用量である。

【0216】

40

いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約25 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、55 mg、60 mg、65 mg、70 mg、75 mg、80 mg、85 mg、90 mg、95 mg、100 mg、105 mg、110 mg、115 mg、120 mg、125 mg、130 mg、135 mg、140 mg、145 mg、または150 mg の合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、31 mg、32 mg、33 mg、34 mg、35 mg、36 mg、37 mg、38 mg、39 mg、40 mg、41 mg、42 mg、43 mg、44 mg、45 mg、46 mg、47 mg、48 mg、49 mg、

50

50 mg、51 mg、52 mg、53 mg、54 mg、55 mg、56 mg、57 mg、58 mg、59 mg、60 mg、61 mg、62 mg、63 mg、64 mg、65 mg、66 mg、67 mg、68 mg、69 mg、70 mg、71 mg、72 mg、73 mg、74 mg、75 mg、76 mg、77 mg、78 mg、79 mg、80 mg、81 mg、82 mg、83 mg、84 mg、85 mg、86 mg、87 mg、88 mg、89 mg、90 mg、91 mg、92 mg、93 mg、94 mg、95 mg、96 mg、97 mg、98 mg、99 mg、100 mg、101 mg、102 mg、103 mg、104 mg、105 mg、106 mg、107 mg、108 mg、109 mg、110 mg、111 mg、112 mg、113 mg、114 mg、115 mg、116 mg、117 mg、118 mg、119 mg、120 mg、121 mg、122 mg、123 mg、124 mg、125 mg、126 mg、127 mg、128 mg、129 mg、130 mg、131 mg、132 mg、133 mg、134 mg、135 mg、136 mg、137 mg、138 mg、139 mg、140 mg、141 mg、142 mg、143 mg、144 mg、145 mg、146 mg、147 mg、148 mg、または150 mgの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約80 mgの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、80 mgの合計用量である。

【0217】

他の実施形態において、約5 mg ~ 9 mgの用量を受ける対象は、累積効果によって編集を最大化するために、LNP組成物の2回以上の投与を受けてもよい。例えば、LNP組成物は、2回、3回、4回、5回、またはそれ以上の回数、例えば2回投与されてもよく、例えば、第2の投与、第3の投与、第4の投与、または第5の投与が行われてもよい。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、LNP組成物を以前に投与されたヒト対象に投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物を以前に投与されており、かつ、例えば第1のLNP投与後28日目に判定して、血清TTRの60%超、70%超、または80%超の低下を達成していない（例えばLNP組成物の投与後にELISAにより測定された血清TTRの減少が60%未満、70%未満、または80%未満である）ヒト対象に、LNP組成物が投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物を以前に投与されており、かつ、例えば第1のLNP投与後28日目に判定して、血清TTRの60%超、70%超、または80%超の低下を達成していない（例えば、LNP組成物の投与後にELISAまたは質量分析により測定された血清TTRの減少が60%未満、70%未満、または80%未満である）ヒト対象に、LNP組成物が投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物を以前に投与されており、かつ、例えば第1のLNP投与後28日目に判定して、血清プレアルブミンの60%超、70%超、または80%超の低下を達成していない（例えば、LNP組成物の投与後に濁度アッセイなどにより測定された血清プレアルブミンの減少が60%未満、70%未満、または80%未満である）ヒト対象に、LNP組成物が投与される。

【0218】

本発明のいくつかの実施形態において、「約」は、記載された値の±5%以内、例えば約80 mgである値の場合には76 mg ~ 84 mgの範囲を意味する。本発明のいくつかの実施形態において、「約」は、記載された値の±10%以内を意味する。

【0219】

IV. 使用方法

1. インビボ編集の方法

単一遺伝子障害を有するヒト対象の肝臓における遺伝子のインビボ編集の方法が、本明 50

細書で提供される。いくつかの実施形態において、遺伝子のインビボ編集の方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与することを含む。いくつかの実施形態において、インビボ編集は、対象の肝細胞においてガイドRNAによってターゲティングされる部位において起こる。

【0220】

ヒト対象の肝臓におけるTTR遺伝子のインビボ編集の方法も、本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子のインビボ編集の方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与することを含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子のインビボ編集は、対象の肝細胞においてガイドRNAによってターゲティングされる部位において起こる。

10

【0221】

これらの実施形態において、対象へのLNP組成物の投与は、バイオセーフティ尺度における変化に関連し得る。いくつかの実施形態において、対象は、バイオセーフティ尺度における変化が許容可能な変化であるかどうかを判定するために評価される。いくつかの実施形態において、許容可能な変化は、臨床医及び/または試験所によって判定され得る。いくつかの実施形態において、許容可能な変化は、本明細書に記載されるような、有害事象（NCI-CTCAEグレード3以下）、重篤な有害事象、特に注目すべき有害事象、及び/または処置下で発現した有害事象（CTCAEグレード3以下）を含む、安全性事象として適格でないものであり得る。バイオセーフティ尺度は、LNP組成物の投与に関連するものを含め、当技術分野において公知である。バイオセーフティ尺度の許容可能なレベル及び/または変化は、当技術分野において公知であり、慣例的方法によって評価され得る。

20

【0222】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベルは、本明細書に記載される対象組み入れ基準に含まれるもの及び/または対象除外基準に含まれないものである。

【0223】

いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化は、ある期間の後に許容可能である変化、例えば、最初は許容可能なレベルを外れるが、例えば投与後2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目、14日目、または28日目までに許容可能なレベルに安定化する変化である。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化は、前記バイオセーフティ尺度の正常上限の150%以内及び/または前記バイオセーフティ尺度の正常下限の50%以内、例えば、プロトロンビンULNの150%以内及び/またはフィブリノゲンのLLNの50%以内に入るレベルの変化である。

30

【0224】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、National Cancer Institute（NCI）-CTCAEガイドライン、バージョン5.0を含むCTCAEガイドラインによるグレード3以上の有害事象に該当しないものである。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度レベル（例えば、本明細書に記載されるような、検査パラメータ、バイタルサイン、ECGデータ、身体検査などに関連する1つ以上のレベル）における変化は、その変化が、例えば、臨床兆候もしくは症状を誘導する；積極的介入を必要とする；LNP組成物の中断もしくは中止を必要とする；及び/またはバイオセーフティ尺度における変化が臨床的に有意であると臨床医が判定した場合に、有害事象に該当する。

40

【0225】

50

いくつかの実施形態において、有害事象は、必ずしも処置との因果関係を有するとは限らない、治験薬を投与されたかまたは研究上の措置を受けた対象における、あらゆる不都合な医学的出来事である。いくつかの実施形態において、有害事象は、医薬（治験）品に関連するか否かにかかわらず、処置に時間的に関連する、意図されない兆候（異常な検査所見を含む）、症状、または疾患である。いくつかの実施形態において、有害事象は、臨床兆候または症状を誘導する。いくつかの実施形態において、有害事象は、積極的介入を必要とする。いくつかの実施形態において、有害事象は、処置の中断または中止を必要とする。いくつかの実施形態において、有害事象は、治験責任医師の意見において臨床的に有意な異常である。有害事象のグレーディング基準は、例えば、National Cancer Institute (NCI) の有害事象共通用語規準 (CTCAE) を含む CTCAE など、当技術分野では公知である。 10

【0226】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、重篤な有害事象に該当しないものである。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、死に至る。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、生命を脅かす（例えば、臨床医により判定される差し迫った死亡リスクに対象を晒す）。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、持続的または重大な能力障害をもたらす。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、普通の生活機能を行う能力の欠如または実質的な妨害をもたらす。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、先天異常または出生時欠損をもたらす。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、患者の入院を必要とするか、または入院延長につながる。 20

【0227】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、特に注目すべき有害事象に該当しないものである。いくつかの実施形態において、特に注目すべき有害事象は、例えば、注入関連反応 (IRR)（例えば、処置もしくは注入中止を必要とするもの、及び/またはグレード3以上）、血栓の発生、出血の発生、CTCAEグレード2以上の異常な血液検査結果、CTCAEグレード2以上のALT上昇、CTCAEグレード2以上のAST上昇、CTCAEグレード2以上の総ビリルビン上昇、CTCAEグレード2以上のGLDH上昇、サイトカイン放出症候群の発生、脾臓への影響に起因する事象（脾臓出血、脾臓梗塞、ときに血小板減少症、ときに貧血、または血球の顕微鏡検査で特定の異常所見を認めるリンパ球減少症）、副腎への影響に起因する事象、臨床的に意義のある症状または甲状腺機能低下、及びビタミンA欠乏症と一致する眼事象を含む。 30

【0228】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、処置下で発現した有害事象の有害事象共通用語規準 (CTCAE) グレード3以上に該当しないものである。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、神経系障害（例えば、頭痛、末梢性感覚神経障害）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、胃腸障害（例えば、下痢、悪心）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、傷害、被毒、及び手技上の合併症（例えば、注入関連反応、皮膚擦過傷）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、耳及び迷路器官の障害（例えば、頭位性眩暈）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、眼障害（例えば眼内異物感）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、全身性障害または投与部位の状態（例えば、カテーテル部位腫脹）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、感染または外寄生（例えば、急性副鼻腔炎）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、チロキシンの減少である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、呼吸器、胸部、または縦隔の障害（例えば、鼻漏）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、皮膚及び皮下組織の障害（例えば、そう痒、発疹）であ 40 50

る。

【0229】

インビボ編集の方法は、例えば、凝固、血液学、臨床化学、尿検査、及び他の生物分析評価（例えば、サイトカイン、補体）に広く関連する公知の検査評価項目を測定することを含み得る。特定のバイオセーフティ尺度は、次の非限定的なバイオセーフティ尺度：肝酵素、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のレベル、プロトロンビン時間（PT）のレベル、トロンビン生成時間（TGT）のレベル（例えば、ピーク高さ、ラグタイム、及び/または内因性トロンビン産生能）、フィブリノゲンのレベル、プロトロンビン国際標準化（INR）比、dダイマーのレベル、ビタミンA、ビタミンB12、レチノール結合タンパク質（RBP）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、遊離チロキシン、遊離トリヨードチロニン（T3）、HBV、HBsAg、HCV Ab、播種性血管内凝固と一致する検査パラメータ、血液学検査値の変化、化学検査値の変化、凝固の変化、尿検査における変化、グルタミン酸デヒドロゲナーゼのレベル、C反応性タンパク質のレベル、補体（C3、C4、C3a、C5a、Bb）のレベル、サイトカイン（GM-CSF、INF-、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-23、TNF-、IL-17、MCP-1）のレベル、チロキシン（T4レベル）（例えば、処置投与後の正常範囲を下回るレベル低下または甲状腺機能低下の臨床的に意義のある症状/兆候）、急性肝傷害（例えば、処置投与後の、CTCAEグレード2を超えるALT、AST、総ビリルビンもしくはGLDHの上昇、または肝傷害の臨床的に意義のある症状/兆候）、及び12誘導心電図の変化のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。

10

20

【0230】

例えば、血液学、凝固、臨床化学、及び尿検査に関連する他のバイオセーフティ尺度は、当技術分野において公知である。例えば、血液学に関連するバイオセーフティ尺度は、血小板数、RBC数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、RBC指数（MCV、MCH、MCHC、RDW）、網赤血球率（%）、WBC数と分画（好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球）を含むが、これらに限定されない。例えば、凝固に関連するバイオセーフティ尺度は、aPTT、PT、INR、フィブリノゲン、dダイマー、及びTGTを含むが、これらに限定されない。例えば、臨床化学に関連するバイオセーフティ尺度は、アルブミン、血中尿素窒素、クレアチニン、非絶食時グルコース、カリウム、ナトリウム、塩化物、二酸化炭素、カルシウム、AST、ALT、アルカリホスファターゼ、総ビリルビン及び直接ビリルビン、総タンパク質、クレアチンキナーゼ、ラクトースデヒドロゲナーゼ、総コレステロール、ならびにLDLコレステロールを含むが、これらに限定されない。例えば、尿検査に関連するバイオセーフティ尺度は、比重、pH、グルコース、タンパク質、血液、ケトン、ビリルビン、ウロビリノゲン、亜硝酸塩、及び白血球エステラーゼを含むが、これらに限定されない。

30

【0231】

いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定される。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与前及び投与後に測定され、それによって、LNP組成物による処置前及び処置後のバイオセーフティ尺度のレベルの比較が可能になる。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与前に測定されたバイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定されたバイオセーフティ尺度の1つ以上のレベルに対する比較のためのベースラインとなり得る。いくつかの実施形態において、ベースラインは、LNP組成物の投与前に得られた、入手可能な最後の測定値である。これらの実施形態において、LNP組成物の投与は、肝酵素レベルにおける許容可能な変化（例えば、処置投与後4週間超にわたるALTまたはAST $> 5 \times ULN$ を超えない上昇、処置投与後のALTまたはAST $> 3 \times ULN$ 及び総ビリルビン $> 2 \times ULN$ （Hyの法則）を超えない上昇）をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のレベル（例えば、処置投与後4週間超にわたるaPTT $> 5 \times ULN$ の上昇

40

50

)における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、プロトロンビン時間 (P T) のレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、トロンビン生成時間 (T G T) のレベル (例えば、ピーク高さ、ラグタイム、及び/または内因性トロンビン産生能) における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、フィブリノゲンのレベルにおける許容可能な変化をもたらす。いくつかの実施形態において、組成物の投与は、プロトロンビン国際標準化 (I N R) 比における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、dダイマーのレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、播種性血管内凝固と一致する検査パラメータにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、血液学検査値 (例えば、処置投与後の C T C A E グレード 2 を超える異常な血液検査結果) における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、化学検査値における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、臨床的に意義のある異常出血によって定義される異常な凝固の所見における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、尿検査における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼのレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、C 反応性タンパク質のレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、補体のレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、サイトカインのレベルにおける許容可能な変化を

【 0 2 3 2 】

これらの実施形態において、組成物の投与は、C T C A E ガイドラインによるグレード 3 以上の処置下で発現した有害事象に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、血栓の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、出血の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、播種性血管内凝固の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、サイトカイン放出症候群の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、脾臓への影響に起因する所見 (脾臓出血、脾臓梗塞、ときに血小板減少症、ときに貧血、または血球の顕微鏡検査で特定の異常所見を認めるリンパ球減少症) に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、副腎への影響に起因する所見に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、ビタミン A 欠乏症と一致する眼科的所見に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、チロキシンのレベル (T 4 レベル) における許容可能な変化をもたらす (例えば、処置投与後、レベルを正常範囲未満に低下させることもなければ、甲状腺機能低下の臨床的に意義のある症状 / 兆候に該当することもない)。これらの実施形態において、組成物の投与は、急性肝傷害 (例えば、処置投与後の、C T C A E グレード 2 を超える A L T、A S T、総ビリルビンもしくは G L D H の上昇、または肝傷害の臨床的に意義のある症状 / 兆候) に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、臨床医によって判定される 1 2 誘導心電図における許容可能な変化をもたらす。

【 0 2 3 3 】

いくつかの実施形態において、遺伝子のインビボ編集の方法は、ヒト対象に、有効量の、C a s 9 をコードする m R N A を含む L N P 組成物を全身投与することを含み、投与は、抗 C a s 抗体 (例えば、抗 C a s 9 抗体) のレベルにおける許容可能な変化をもたらす

【0234】

いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、リポドAの薬物動態における許容可能な変化をもたらす。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、DMG-PEG2kの薬物動態における許容可能な変化をもたらす。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、Cas9 mRNAの薬物動態における許容可能な変化をもたらす。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、sgRNAの薬物動態における許容可能な変化をもたらす。

【0235】

2. 処置方法

遺伝子のインビボ編集によってヒト対象を処置する方法が、本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、肝遺伝子産物の異常な発現または活性から生じる単一遺伝子障害を処置する。単一遺伝子障害は、肝臓内の遺伝子または肝遺伝子産物の異常な発現もしくは活性を引き起こす非コード領域に対する編集（例えば、単一の編集）によって処置され得る。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、タンパク質である。いくつかの実施形態において、遺伝子産物は、RNA分子である。いくつかの実施形態において、肝臓内の遺伝子または肝遺伝子産物の異常な発現もしくは活性を引き起こす非コード領域に対する編集は、遺伝子産物のレベル（例えば、血清レベル）を低下させる。いくつかの実施形態において、本方法は、肝臓における（例えば、肝細胞における）TTR遺伝子をターゲティングし、編集する。いくつかの実施形態において、単一遺伝子障害は、ATTRである。

【0236】

いくつかの実施形態において、遺伝子のインビボ編集の方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与することと、バイオセーフティ尺度のレベルを判定することとを含む。いくつかの実施形態において、処置方法は、対象の肝細胞においてガイドRNAによってターゲティングされる部位において起こる遺伝子のインビボ編集を含む。

【0237】

いくつかの実施形態において、単一遺伝子障害を有するヒト対象を処置する方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与することと、投与前の対象におけるバイオセーフティ尺度の第1のレベルを判定することと、投与後のある期間の対象におけるバイオセーフティ尺度の第2のレベルを判定することと、バイオセーフティ尺度の第1のレベルと第2のレベルとの間の変化を評価することとを含む。

【0238】

いくつかの実施形態において、処置方法は、対象の肝細胞における遺伝子をターゲティングするガイドRNAを投与することを含む。

【0239】

いくつかの実施形態において、単一遺伝子障害を有するヒト対象を処置する方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与して、肝臓内の遺伝子を編集することを含む。いくつかの実施形態において、単一遺伝子障害を有するヒト対象を処置する方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与して、異常な肝遺伝子産物の生産をロックダウンすることを含む。

いくつかの実施形態において、処置方法は、細胞集団における肝遺伝子産物の生産をロックダウンする。いくつかの実施形態において、処置方法は、肝臓における単一の編集後に、肝遺伝子産物の長期的なロックダウン（例えば、永続的なロックダウン）をもたらす。いくつかの実施形態において、処置方法は、例えば累積効果によって編集を最大化するために、本明細書に記載されるLNP組成物を2回以上、例えば、1、2、3、4、または5回投与することを含む。いくつかの実施形態において、処置方法は、有効な低下を達成する（例えば、ベースラインレベルと比べた肝遺伝子産物のレベルにおける少なくとも60%の低下を達成する）ために、本明細書に記載されるLNP組成物を2回以上（例えば2回）投与することを含む。

【0240】

処置方法は、本明細書に記載されるLNP組成物を投与することと、さらにバイオセーフティ尺度のレベルを判定することとを含む。これらの実施形態において、対象へのLNP組成物の投与は、バイオセーフティ尺度における変化に関連し得る。いくつかの実施形態において、対象は、バイオセーフティ尺度における変化が許容可能な変化であるかどうかを判定するために評価される。いくつかの実施形態において、許容可能な変化は、臨床医及び/または試験所によって判定され得る。いくつかの実施形態において、許容可能な変化は、本明細書に記載されるような、有害事象（NCI-CTCAEグレード3以下）、重篤な有害事象、特に注目すべき有害事象、及び/または処置下で発現した有害事象（CTCAEグレード3以下）を含む、安全性事象として適格でないものであり得る。バイオセーフティ尺度は、LNP組成物の投与に関連するものを含め、当技術分野において公知である。バイオセーフティ尺度の許容可能なレベル及び/または変化は、当技術分野において公知であり、慣例的方法によって評価され得る。

【0241】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベルは、本明細書に記載される対象組み入れ基準に含まれるもの及び/または対象除外基準に含まれないものである。

【0242】

いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化は、ある期間の後に許容可能である変化、例えば、最初は許容可能なレベルを外れるが、例えば投与後2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目、14日目、または28日目までに許容可能なレベルに安定化する変化である。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化は、前記バイオセーフティ尺度の正常上限の150%以内及び/または前記バイオセーフティ尺度の正常下限の50%以内、例えば、プロトンピンULNの150%以内及び/またはフィブリノゲンのLLNの50%以内に入るレベルの変化である。

【0243】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、National Cancer Institute（NCI）-CTCAEガイドライン、バージョン5.0を含むCTCAEガイドラインによるグレード3以上の有害事象に該当しないものである。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度レベル（例えば、本明細書に記載されるような、検査パラメータ、バイタルサイン、ECGデータ、身体検査などに関連する1つ以上のレベル）における変化は、その変化が、例えば、臨床兆候もしくは症状を誘導する；積極的介入を必要とする；LNP組成物の中断もしくは中止を必要とする；及び/またはバイオセーフティ尺度における変化が臨床的に有意であると臨床医が判定した場合に、有害事象に該当する。

【0244】

いくつかの実施形態において、有害事象は、必ずしも処置との因果関係を有するとは限らない、治験薬を投与されたかまたは研究上の措置を受けた対象における、あらゆる不都合な医学的出来事である。いくつかの実施形態において、有害事象は、医薬（治験）品に

10

20

30

40

50

関連するか否かにかかわらず、処置に時間的に関連する、意図されない兆候（異常な検査所見を含む）、症状、または疾患である。いくつかの実施形態において、有害事象は、臨床兆候または症状を誘導する。いくつかの実施形態において、有害事象は、積極的介入を必要とする。いくつかの実施形態において、有害事象は、処置の中断または中止を必要とする。いくつかの実施形態において、有害事象は、治験責任医師の意見において臨床的に有意な異常である。有害事象のグレーディング基準は、例えば、National Cancer Institute (NCI) の有害事象共通用語規準 (CTCAE) を含む CTCAE など、当技術分野では公知である。

【0245】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、重篤な有害事象に該当しないものである。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、死に至る。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、生命を脅かす（例えば、臨床医により判定される差し迫った死亡リスクを対象を晒す）。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、持続的または重大な能力障害をもたらす。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、普通の生活機能を行う能力の欠如または実質的な妨害をもたらす。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、先天異常または出生時欠損をもたらす。いくつかの実施形態において、重篤な有害事象は、患者の入院を必要とするか、または入院延長につながる。

10

【0246】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、特に注目すべき有害事象に該当しないものである。いくつかの実施形態において、特に注目すべき有害事象は、例えば、注入関連反応 (IRR)（例えば、処置もしくは注入中止を必要とするもの、及び/またはグレード3以上）、血栓の発生、出血の発生、CTCAEグレード2以上の異常な血液検査結果、CTCAEグレード2以上のALT上昇、CTCAEグレード2以上のAST上昇、CTCAEグレード2以上の総ビリルビン上昇、CTCAEグレード2以上のGLDH上昇、サイトカイン放出症候群の発生、脾臓への影響に起因する事象（脾臓出血、脾臓梗塞、ときに血小板減少症、ときに貧血、または血球の顕微鏡検査で特定の異常所見を認めるリンパ球減少症）、副腎への影響に起因する事象、臨床的に意義のある症状または甲状腺機能低下、及びビタミンA欠乏症と一致する眼事象を含む。

20

30

【0247】

いくつかの実施形態において、許容可能なバイオセーフティ尺度レベル（またはバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化）は、処置下で発現した有害事象の有害事象共通用語規準 (CTCAE) グレード3以上に該当しないものである。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、神経系障害（例えば、頭痛、末梢性感覚神経障害）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、胃腸障害（例えば、下痢、悪心）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、傷害、被毒、及び手技上の合併症（例えば、注入関連反応、皮膚擦過傷）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、耳及び迷路器官の障害（例えば、頭位性眩暈）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、眼障害（例えば眼内異物感）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、全身性障害または投与部位の状態（例えば、カテーテル部位腫脹）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、感染または外寄生（例えば、急性副鼻腔炎）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、チロキシンの減少である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、呼吸器、胸部、または縦隔の障害（例えば、鼻漏）である。いくつかの実施形態において、処置下で発現した有害事象は、皮膚及び皮下組織の障害（例えば、そう痒、発疹）である。

40

【0248】

インビボ編集の方法は、例えば、凝固、血液学、臨床化学、尿検査、及び他の生物分析

50

評価（例えば、サイトカイン、補体）に広く関連する公知の検査評価項目を測定することを含み得る。特定のバイオセーフティ尺度は、次の非限定的なバイオセーフティ尺度：肝酵素、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のレベル、プロトロンビン時間（PT）のレベル、トロンビン生成時間（TGT）のレベル（例えば、ピーク高さ、ラグタイム、及び/または内因性トロンビン産生能）、フィブリノゲンのレベル、プロトロンビン国際標準化（INR）比、dダイマーのレベル、ビタミンA、ビタミンB12、レチノール結合タンパク質（RBP）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、遊離チロキシン、遊離トリヨードチロニン（T3）、HBV、HBsAg、HCV Ab、播種性血管内凝固と一致する検査パラメータ、血液学検査値の変化、化学検査値の変化、凝固の変化、尿検査における変化、グルタミン酸デヒドロゲナーゼのレベル、C反応性タンパク質のレベル、補体（C3、C4、C3a、C5a、Bb）のレベル、サイトカイン（GM-CSF、INF- α 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-23、TNF- α 、IL-17、MCP-1）のレベル、チロキシン（T4レベル）（例えば、処置投与後の正常範囲を下回るレベル低下または甲状腺機能低下の臨床的に意義のある症状/兆候）、急性肝傷害（例えば、処置投与後の、CTCAEグレード2を超えるALT、AST、総ビリルビンもしくはGLDHの上昇、または肝傷害の臨床的に意義のある症状/兆候）、及び12誘導心電図の変化のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。

10

【0249】

例えば、血液学、凝固、臨床化学、及び尿検査に関連する他のバイオセーフティ尺度は、当技術分野において公知である。例えば、血液学に関連するバイオセーフティ尺度は、血小板数、RBC数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、RBC指数（MCV、MCH、MCHC、RDW）、網赤血球率（%）、WBC数と分画（好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球）を含むが、これらに限定されない。例えば、凝固に関連するバイオセーフティ尺度は、aPTT、PT、INR、フィブリノゲン、dダイマー、及びTGTを含むが、これらに限定されない。例えば、臨床化学に関連するバイオセーフティ尺度は、アルブミン、血中尿素窒素、クレアチニン、非絶食時グルコース、カリウム、ナトリウム、塩化物、二酸化炭素、カルシウム、AST、ALT、アルカリホスファターゼ、総ビリルビン及び直接ビリルビン、総タンパク質、クレアチンキナーゼ、ラクトースデヒドロゲナーゼ、総コレステロール、ならびにLDLコレステロールを含むが、これらに限定されない。例えば、尿検査に関連するバイオセーフティ尺度は、比重、pH、グルコース、タンパク質、血液、ケトン、ビリルビン、ウロビリノゲン、亜硝酸塩、及び白血球エステラーゼを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0250】

いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定される。いくつかの実施形態において、バイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与前及び投与後に測定され、それによって、LNP組成物による処置前及び処置後のバイオセーフティ尺度のレベルの比較が可能になる。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与前に測定されたバイオセーフティ尺度のレベルは、LNP組成物の投与後に測定されたバイオセーフティ尺度の1つ以上のレベルに対する比較のためのベースラインとなり得る。いくつかの実施形態において、ベースラインは、LNP組成物の投与前に得られた、入手可能な最後の測定値である。これらの実施形態において、LNP組成物の投与は、肝酵素レベルにおける許容可能な変化（例えば、処置投与後4週間超にわたるALTまたはAST $> 5 \times ULN$ を超えない上昇、処置投与後のALTまたはAST $> 3 \times ULN$ 及び総ビリルビン $> 2 \times ULN$ （Hyの法則）を超えない上昇）をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のレベル（例えば、処置投与後4週間超にわたるaPTT $> 5 \times ULN$ の上昇）における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、プロトロンビン時間（PT）のレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、トロンビン生成時間（TGT）のレベル（例えば、ピーク

40

50

高さ、ラグタイム、及び/または内因性トロンビン産生能)における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、フィブリノゲンのレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、プロトロンビン国際標準化(INR)比における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、dダイマーのレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、播種性血管内凝固と一致する検査パラメータにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、血液学検査値(例えば、処置投与後のCTCAEグレード2を超える異常な血液検査結果)における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、臨床的に意義のある異常出血によって定義される異常な凝固の所見における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、尿検査における許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼのレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、C反応性タンパク質のレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、補体のレベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、サイトカインのレベルにおける許容可能な変化をもたらす。

10

【0251】

これらの実施形態において、組成物の投与は、CTCAEガイドラインによるグレード3以上の処置下で発現した有害事象に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、血栓の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、出血の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、播種性血管内凝固の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、サイトカイン放出症候群の発生に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、脾臓への影響に起因する所見(脾臓出血、脾臓梗塞、ときに血小板減少症、ときに貧血、または血球の顕微鏡検査で特定の異常所見を認めるリンパ球減少症)に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、副腎への影響に起因する所見に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、ビタミンA欠乏症と一致する眼科的所見に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、チロキシンのレベル(T4レベル)における許容可能な変化をもたらす(例えば、処置投与後、レベルを正常範囲未満に低下させることもなければ、甲状腺機能低下の臨床的に意義のある症状/兆候に該当することもない)。これらの実施形態において、組成物の投与は、急性肝傷害(例えば、処置投与後の、CTCAEグレード2を超えるALT、AST、総ビリルビンもしくはGLDHの上昇、または肝傷害の臨床的に意義のある症状/兆候)に該当しないバイオセーフティ尺度レベルにおける許容可能な変化をもたらす。これらの実施形態において、組成物の投与は、臨床医によって判定される12誘導心電図における許容可能な変化をもたらす。

20

30

40

【0252】

TTR遺伝子のインビボ編集によってヒト対象を処置する方法が、本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子のインビボ編集の方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物(例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む)を全身投与することと、上述のようなバイオセーフティ尺度のレベルを判定することとを含む。いくつかの実施形態において、TTR遺伝子のインビボ編集は、対象の肝細胞に

50

においてガイドRNAによってターゲティングされる部位において起こる。

【0253】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されるようなATTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)に罹患したヒト対象を処置する方法である。いくつかの実施形態において、本方法は、遺伝性ATTR(ATTRv)に罹患したヒト対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、本方法は、非遺伝性(野生型)ATTR(ATTRwt)に罹患したヒト対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、本方法は、ATTRv-PNに罹患したヒト対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、本方法は、家族性アミロイド心筋症(FAC、別称ATTRv-CM)に罹患したヒト対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、本方法は、野生型ATTR(ATTRwt-CM)に罹患したヒト対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、本方法は、ATTR-CM、NYHAクラスI、クラスII、またはクラスIIIに罹患したヒト対象を処置するためのものである。

10

【0254】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、ヒト対象におけるATTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を処置する方法であって、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物(例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、ATTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む)を全身投与することを含み、それによってATTRを処置し、組成物の投与が、対象における臨床尺度のレベルにおいて、臨床尺度のベースラインレベルと比較して臨床的に有意な向上をもたらす、方法である。

20

【0255】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、ヒト対象におけるATTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を処置する方法であって、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物(例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、ATTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む)を全身投与することを含み、それによってATTRを処置し、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びATTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAが、約25~約100mgの合計用量で投与される、方法である。

30

【0256】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、ヒト対象におけるATTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を処置する方法であって、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物(例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、ATTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む)を全身投与することを含み、それによってATTRを処置し、組成物の投与が、血清ATTRをベースライン血清と比べて低下させる、方法である。いくつかの実施形態において、ATTRは、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである。いくつかの実施形態において、ATTRは、野生型トランスサイレチンアミロイドーシスである。いくつかの実施形態において、ATTRは、多発神経障害を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである。いくつかの実施形態において、ATTRは、心筋症を伴う遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスである。ATTRが心筋症を伴う野生型トランスサイレチンアミロイドーシスである実施形態において、対象は、New York Health Association(NYHA)分類の下でクラスI、クラスII、またはクラスIIIに分類される。いくつかの実施形態において、ATTRは、ATTRv-PN及び/またはATTR-CMである。いくつかの実施形態において、LNPは、(9Z,12Z)-3-(4,4-ピス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9,12-ジエノートを含む。いくつかの

40

50

実施形態において、LNPは、PEG脂質を含む。LNPがPEG脂質を含む実施形態において、PEG脂質は、ジミリストイルグリセロール(DMG)を含む。PEG脂質がジミリストイルグリセロール(DMG)を含む実施形態において、PEG脂質は、PEG-2kを含む。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約5~7のN/P比を有する。いくつかの実施形態において、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼは、重量基準で約5:1から約1:5までの範囲をとる比率で存在する。いくつかの実施形態において、mRNAは、クラス2 Casヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態において、mRNAは、Cas9ヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、コドン最適化されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、少なくとも1つの修飾を含む。ガイドRNAが少なくとも1つの修飾を含む実施形態において、ガイドRNAは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約0.3mg/kg~約2mg/kgの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約0.3mg/kg~約1mg/kgの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約0.3mg/kgの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約0.7mg/kgの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約1.0mg/kgの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約25mg~約150mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約25mg~約100mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約50mg~約90mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約40mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約50mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約60mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約70mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約80mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約90mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼをコードするmRNA及びTTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAの有効量は、約100mgの全RNAの合計用量である。いくつかの実施形態において、組成物の投与は、組成物の投与前のベースライン血清TTRと比較して、血清TTRを60~70%、70~80%、80~90%、90~95%、95~98%、98~99%、または99~100%低下させる。いくつかの実施形態において、血清TTRレベルは、組成物の投与後に約50µg/mL未満である。いくつかの実施形態において、血清TTRレベルは、組成物の投与後に約40µg/mL未満である。いくつかの実施形態において、血清TTRレベルは、組成物の投与後に約30µg

／mL未満である。いくつかの実施形態において、血清TTRレベルは、組成物の投与後に約20μg/mL未満である。いくつかの実施形態において、血清TTRレベルは、組成物の投与後に約10μg/mL未満である。いくつかの実施形態において、本方法は、LNP組成物の第2の用量を投与することをさらに含み、第2の用量の投与は、第1の用量の投与前のベースライン血清TTRレベルと比べて血清TTRレベルを少なくとも80%低下させる。いくつかの実施形態において、本方法は、LNP組成物の第2の用量を投与することをさらに含み、第2の用量の投与は、第2の用量の投与前かつ第1の用量の投与後のベースライン血清TTRレベルと比べて血清TTRレベルを少なくとも80%低下させる。いくつかの実施形態において、組成物は、第2の治療薬と共に投与される。いくつかの実施形態において、第2の治療薬は、ジフルニサルまたはタファミジスである。

10

【0257】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に既にATTRと診断されているか、または処置と同時にATTRと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、遺伝子検査（例えば、TTR突然変異の記録）に基づいてATTRと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、感覚運動末梢神経障害の臨床診断に基づいてATTRと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、5以上かつ130以下の神経障害スコア（NIS）に基づいてATTRと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、生検または妥当性確認済みの非侵襲的イメージングによるTTRアミロイドの組織沈着の記録に基づいてATTRと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、3b以下の多発神経障害性能力障害（PND）スコアに基づいてATTRと診断される。

20

【0258】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、ATTRv-PN症状の進行がある。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、多発神経障害性能力障害（PND）スコアにおける1ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、家族性アミロイド多発神経障害（FAP）ステージにおける1ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、神経障害スコア（NIS）における5ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、NIS-下肢（LL）における5ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、補正体格指数（mBMI）における25kg/m²×g/L以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、6分間歩行試験における30メートル以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、10メートル歩行試験における0.1m/s以上の減少を有する。

30

【0259】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、TTR低下療法を受けている間にATTRの進行がある対象を処置する方法である。いくつかの実施形態において、処置方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与することを含み、対象は、異なるATTR療法によって処置されたことがあるか、または現在処置されている。いくつかの実施形態において、対象は、例えば、mNIS+7スコアなどの臨床有効性尺度によって測定した場合、異なるATTR療法を受けている間にATTRの進行がある。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物が投与される対象は、イノテルセンで処置されたことがあるか、または現在処置されており、かつATTRの進行を呈する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物が投与される対象は、パチシランで処置されたことがあるか、または現在処置されており、かつATTRの進行がある。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物が投与される対象は、ジフルニサルで処置されたことがあるか、または現在処置されており、かつATTRの進行がある。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるLNP組成物が投与される対象は、タファミジスで処置されたこ

40

50

とがあるか、または現在処置されており、かつATTRの進行がある。

【0260】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子のインビボ編集の方法は、ヒト対象に、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、有効量の、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）を全身投与することを含み、臨床尺度のレベルにおける臨床的に有意な向上をもたらす。

【0261】

いくつかの実施形態において、TTRに関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載されるLNP組成物を投与することと、さらに1つ以上の臨床有効性尺度を判定することとを含み、臨床有効性尺度は、血清TTRの減少（例えば、処置投与後にELISAによる測定で血清TTRの60%の減少）、血清TTRの減少（例えば、処置投与後に質量分析による測定で血清TTRの60%の減少）、血清プレアルブミンの減少、多発神経障害性能力障害（PND）スコアの低下、家族性アミロイド多発神経障害（FAP）ステージの低下、神経障害スコア（NIS）の減少、補正神経障害スコア（mNIS+7）の減少、神経障害スコア（NIS）-下肢（LL）の減少、補正体格指数（BMI）における25kg/m²×g/L以上の増加、6分間歩行試験（6-MWT）における30メートル以上の増加、及び10メートル歩行試験（10-MWT）における0.1メートル/秒以上の増加を含むが、これらに限定されない。追加の臨床有効性尺度としては、血清ニューロフィラメント軽鎖（NfL）レベルの向上、Norfolk Quality of Life - Diabetic Neuropathyによって評価される生活の質の向上、EuroQOL（EQ）-5D-5Lによって評価される生活の質の向上、心臓MRIの向上（例えば、細胞外容積の減少）、脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端プロホルモン（NT-proBNP）レベルの向上、トロポニンIレベルの向上、New York Health Association（NYHA）分類の向上、及びKansas City Cardiomyopathy Questionnaire（KCCQ）によるスコアの向上が挙げられる。TTRアミロイドーシスに対する有効性を評価するための尺度を含め、追加の臨床有効性尺度が、当技術分野では公知である。同様に、TTRアミロイドーシスを含む疾患の改善を示す臨床有効性尺度のレベル及び/または変化は、当技術分野では公知であり、慣例的方法によって、例えば、臨床医または試験所によって評価され得る。

【0262】

いくつかの実施形態において、TTRに関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載されるLNP組成物を投与することと、LNP組成物の投与後に臨床有効性尺度を測定することとを含む。いくつかの実施形態において、TTRに関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載されるLNP組成物を投与することと、LNP組成物の投与前及び投与後に臨床有効性尺度を測定することとを含み、それによって、LNP組成物による処置前及び処置後の臨床有効性尺度のレベルの比較が可能になる。

【0263】

例えば、血清TTRレベルは、TTRアミロイドーシスに関する臨床有効性尺度である。いくつかの実施形態において、TTRに関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載されるLNP組成物を投与することと、対象における血清TTRレベルなどのTTRレベルを低下させることとを含む。いくつかの実施形態において、TTRに関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載されるLNP組成物を投与することと、処置後（例えば、LNP組成物の投与から14日後または28日後）に、対象における血清TTRレベルなどのTTRレベルを、例えば処置前のベースラインと比較して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上低下させることとを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるTTRに関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、LNP組成物の投与から14日後または28日後）の血清TTRレベルなどのTTRレベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも60%の低下をもたらす。いくつかの実施形態におい

10

20

30

40

50

て、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清 T T R レベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 7 0 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清 T T R レベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 8 0 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清 T T R レベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 8 5 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清 T T R レベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 9 0 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清 T T R レベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 9 5 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載される L N P 組成物を投与することと、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）に、対象における血清 T T R レベルなどの T T R レベルを、ベースラインと比較して少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 低下させることとを含む。

10

20

【 0 2 6 4 】

T T R の血清レベルを測定する方法は、例えば E L I S A など、当技術分野では公知である。

【 0 2 6 5 】

例えば、血清プレアルブミンレベルは、T T R アミロイドーシスに関する臨床有効性尺度である。いくつかの実施形態において、T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載される L N P 組成物を投与することと、対象における血清プレアルブミンレベルなどの T T R レベルを低下させることとを含む。いくつかの実施形態において、T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、本明細書に記載される L N P 組成物を投与することと、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）に、対象における血清プレアルブミンレベルなどの T T R レベルを、例えば処置前のベースラインと比較して少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、またはそれ以上低下させることとを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清プレアルブミンレベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 6 0 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清プレアルブミンレベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 7 0 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清プレアルブミンレベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 8 0 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日後または 2 8 日後）の血清プレアルブミンレベルなどの T T R レベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも 8 5 % の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T T R に関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後（例えば、L N P 組成物の投与から 1 4 日

30

40

50

後または28日後)の血清プレアルブミンレベルなどのTTRレベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも90%の低下をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるTTRに関連するアミロイドーシスを処置する方法は、処置後(例えば、LNP組成物の投与から14日後または28日後)の血清プレアルブミンレベルなどのTTRレベルにおいて、ベースラインと比較して少なくとも95%の低下をもたらす。プレアルブミンの血清レベルを測定する方法は、例えばELISAなど、当技術分野では公知である。

【0266】

他の実施形態において、LNP組成物の投与は、対象における血清TTRレベルを約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満に低下させる。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、血清TTRレベルを約40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満に低下させる。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、血清TTRレベルを約30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満に低下させる。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、血清TTRレベルを約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満に低下させる。いくつかの実施形態において、LNP組成物の投与は、血清TTRレベルを約10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満に低下させる。

【0267】

いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインレベルと比較した血清プレアルブミンの減少をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、多発神経障害性能力障害(PND)スコアをベースラインから少なくとも1ポイント減少させる。いくつかの実施形態において、処置は、家族性アミロイド多発神経障害(FAP)ステージをベースラインから少なくとも1ポイント減少させる。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した神経障害スコア(NIS)における少なくとも1ポイントの減少をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した補正神経障害スコア($mNIS + 7$)における減少をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した神経障害スコア(NIS) - 下肢(LL)における減少をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した補正体格指数の増加(例えば、($mBMI$) $25 \text{ kg}/\text{m}^2 \times \text{g}/\text{L}$)をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した6分間歩行試験(6-MWT)における30メートル以上の増加をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した10メートル歩行試験(10-MWT)における0.1メートル/秒以上の増加をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した血清ニューロフィラメント軽鎖(NfL)レベルの向上をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した、Norfolk Quality of Life - Diabetic Neuropathyによって評価される生活の質の向上をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した、EuroQOL(EQ) - 5D - 5Lによって評価される生活の質の向上をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した心臓MRI(例えば、アミロイド原線維の心臓イメージング)の向上をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端プロホルモン(NT-proBNP)レベルの向上をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較したトロポニンIレベルの向上をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較したNew York Health Association(NYHA)分類の向上をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、ベースラインと比較した、Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire(KCCQ)によるスコアの向上をもたらす。

【0268】

いくつかの実施形態において、処置は、FAPの進行を緩徐化または停止させる。いくつかの実施形態において、処置は、感覚運動神経障害または自律神経障害の症状における変化の向上、安定化、または緩徐化をもたらす。

【0269】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、処置は、F A Cの症状における変化の向上、安定化、または緩徐化をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、拘束型心筋症またはうっ血性心不全の症状の変化の向上、安定化、または緩徐化をもたらす。

【0270】

いくつかの実施形態において、処置の有効性は、感覚運動または自律神経障害の症状における向上、または進行の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、身体の一領域の運動能力もしくは身体のいずれかの領域の知覚能力における増加、または当該能力の減少の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、嚥下能力、呼吸能力、腕、手、脚、もしくは足の使用能力、または歩行能力における向上、または当該能力の減少の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、神経痛の向上、または進行の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、神経痛は、疼痛、灼熱感、刺痛、または異常感を特徴とする。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、体位性低血圧、眩暈感、消化管運動障害、膀胱機能異常、もしくは性機能異常における向上、または増大の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、脱力感の向上、または進行の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、筋電図、神経伝導検査、または対象により報告された転帰を使用して測定される。

10

【0271】

いくつかの実施形態において、処置の有効性は、うっ血性心不全またはC H Fの症状の向上、または進行の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、息切れ、呼吸困難、疲労、または足首、足、腹部、もしくは頸部静脈の腫脹の減少、または増大の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、体重増加、頻尿、または夜間の咳などの測度によって評価され得る体内の液体蓄積の向上、または進行の緩徐化によって測定される。いくつかの実施形態において、処置の有効性は、心臓バイオマーカー検査（B型ナトリウム利尿ペプチド[BNP]またはN末端プロb型ナトリウム利尿ペプチド[NT-proBNP]など）、肺機能検査、胸部x線、または心電図検査を使用して測定される。

20

【0272】

いくつかの実施形態において、処置は、対象の生存期間の延長をもたらす。いくつかの実施形態において、処置は、疾患進行を緩徐化または停止させる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物による処置の有効性は、送達後2週目、4週目、2か月目、4か月目、6か月目、9か月目、1年目、2年目、3年目、4年目、5年目、または10年目に見られる。

30

【0273】

他の実施形態において、L N P組成物はまた、第2の治療剤と共に投与される。いくつかの実施形態において、第2の治療剤は、四量体型のT T Rの安定化剤である。いくつかの実施形態において、第2の治療薬は、ジフルニサルまたはタファミジスである。

【0274】

a. 対象組み入れ基準

いくつかの実施形態において、T T Rアミロイドーシス（A T T R v - P N及びA T T R - C M）を有し、本明細書に記載されるL N P組成物（例えば、C a s 9などのC a sヌクレアーゼをコードするm R N Aと、遺伝子をターゲティングするガイドR N A、例えば、T T R遺伝子をターゲティングするガイドR N Aとを含む）が投与される対象は、以下の対象組み入れ基準のうちの一つ以上について評価される。

40

【0275】

i. A T T R v - P N対象組み入れ基準

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、既にA T T Rと診断されているか、または同時にA T T Rと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、遺伝子検査（例えば、T T R突然変異の記録）に基づいてA T T Rと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、感覚運動末梢神経障害の臨床診断に基づいてA T T

50

Rと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、5以上かつ130以下の神経障害スコア(NIS)に基づいてATTRと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、生検または妥当性確認済みの非侵襲的イメージングによるATTRアミロイドの組織沈着の記録に基づいてATTRと診断される。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、3b以下の多発神経障害性能力障害(PND)スコアに基づいてATTRと診断される。

【0276】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置の前に、ATTRv-PN症状の進行がある。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、多発神経障害性能力障害(PND)スコアにおける1ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、家族性アミロイド多発神経障害(FAP)ステージにおける1ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、神経障害スコア(NIS)における5ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、NIS-下肢(LL)における5ポイント以上の増加を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、補正体格指数(mBMI)における $25\text{ kg/m}^2 \times \text{g/L}$ 以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、6分間歩行試験における30メートル以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、10メートル歩行試験における 0.1 m/s 以上の減少を有する。これら及び他の組み入れ基準の評価は、当技術分野では公知である。

【0277】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、投与時に18歳~80歳である。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、ATTR突然変異の記録(例えば、全ATTR遺伝子シーケンシング情報)に基づく、ATTRアミロイドーシス(ATTR)に起因する末梢神経障害(PN)の診断を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、感覚運動末梢神経障害の診断を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、5以上かつ130以下の神経障害スコア(NIS)を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、生検または妥当性確認済みの非侵襲的イメージングによるATTRアミロイドの組織沈着の記録を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、3b以下の多発神経障害性能力障害(PND)スコアを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、約 $50\text{ kg} \sim 90\text{ kg}$ の体重を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、約 $50\text{ kg} \sim 120\text{ kg}$ の体重を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に正常上限(ULN)以下のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)レベルを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に正常上限(ULN)以下のアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)レベルを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に正常上限(ULN)以下の総ビリルビンレベルを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に正常上限(ULN)以下の国際標準化比(INR)を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に 45 mL/min/1.73m^2 を超える(例えば、Modification of Diet in Renal Disease方程式によって測定された)推定糸球体濾過率(GFR)を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に $100,000$ 細胞/ mm^3 以上の血小板数を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に $2,000\text{ pg/mL}$ 未満の脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端プロホルモン(NT-proBNP)を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に 200 mg/dL 未満の低密度リポタンパク質(LDL)コレステロールを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に正常下限(LLN)以上のビタミンAを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に正常範囲以内の甲状腺刺激ホルモン(TSH)を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時にLLN以上のビタミンB12レベルを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、心エコー図を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は男性であ

10

20

30

40

50

り、投与後 8 4 日間にわたり精子を寄付しないことに同意しなければならない。

【 0 2 7 8 】

i i . A T T R - C M 対象組み入れ基準

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、心筋症を伴う遺伝性 A T T R (A T T R v) アミロイドーシスまたは野生型心筋症 (A T T R w t) と分類される、心筋症を伴うトランスサイレチン (A T T R) アミロイドーシスの診断の記録を有する。

【 0 2 7 9 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、少なくとも 1 つの心不全入院歴及び / または心不全の臨床的証拠を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、New York Heart Association (N Y H A) クラス I ~ I I I の心不全を

10

【 0 2 8 0 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング前に少なくとも 2 1 日間にわたり一貫して維持された (または変化が 5 0 % 以下であった) 用量で少なくとも週 3 回の経口利尿薬療法を受ける。

【 0 2 8 1 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、本明細書に記載される組成物の投与前の 4 週間以内に心血管関連の入院がなく臨床的に安定している。

【 0 2 8 2 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象の心不全症状は、治験責任医師による評価で最適に管理され、臨床的に安定している。

20

【 0 2 8 3 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング期間中に 6 分間歩行試験 (6 - M W T) で 1 5 0 メートル以上を完了することができる。

【 0 2 8 4 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に少なくとも 4 5 k g の体重を有する。

【 0 2 8 5 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニングの間、ある特定の検査基準を満たす。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、正常上限 (U L N) 範囲以下のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) 、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) 、及び総ビリルビンを有する (対象がギルバート症候群を有する場合を除く) 。いくつかの実施形態において、ギルバート症候群の病歴を有するヒト対象については、対象は、スクリーニング時に $2 \times U L N$ 以下の総ビリルビンを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、C K D - E P I による測定で $3 0 \text{ mL} / \text{min} / 1.73 \text{ m}^2$ 超の推定糸球体濾過率 (e G F R) を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、 $1 0 0 , 0 0 0$ 細胞 / mm^3 以上の血小板数を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、正常範囲以内か、または治験責任医師によって臨床的に有意でないと思なされる、活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T) 、プロトロンビン時間 (P T) 、フィブリノゲン、及び d ダイマーレベルを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、 $6 0 0 \text{ pg} / \text{mL}$ 超の N T - p r o B N P (または、患者が既知の心房細胞の診断を有する場合、 $1 , 0 0 0 \text{ pg} / \text{mL}$ 超の N T - p r o B N P) を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、薬物療法の有無にかかわらず、スクリーニング時に $2 0 0 \text{ mg} / \text{dL}$ 未満の低密度リポタンパク質 (L D L) コレステロールを有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、正常下限 (L L N) 以上のビタミン A を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、正常範囲以内の甲状腺刺激ホルモン (T S H) 測定値を有する。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に、上述の検査基準の全てを満たす。

30

40

【 0 2 8 6 】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニングの間、及び本明細書に記載

50

される組成物による処置の28日後まで、アルコール消費を1日当たり1アルコール飲料に制限する。

【0287】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、例えばインフォームドコンセントに署名する時点で18～90歳（端点を含む）である男性及び/または女性の対象である。いくつかの実施形態において、女性対象は、閉経後である（例えば、スクリーニング前に別の医学的原因がない状態で12か月にわたり月経がない。いくつかの実施形態において、ホルモン避妊法またはホルモン補充療法を使用していない女性において閉経後状態を確認するために、閉経後範囲内の高い卵胞刺激ホルモン（FSH）レベルが使用され得る。いくつかの実施形態において、12か月間の無月経がない場合、単一のFSH測定は不十分である）。いくつかの実施形態において、女性対象は、スクリーニングの少なくとも1か月前に不妊手術（例えば、子宮摘出術、両側卵管切除術、及び両側卵巢摘出術）をしたものである。いくつかの実施形態において、妊娠可能なまたは妊娠中のパートナー（複数可）がいる男性対象は、スクリーニング前及び治験薬投与後84日間にわたってコンドームを使用することに同意する。いくつかの実施形態において、男性対象は、治験薬投与後84日間にわたり精子を寄付しないことに同意する。国別のガイドラインに基づき精子の寄付が禁忌である場合には、この時間枠は84日間を超えて延長され得る。

10

【0288】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、医療施設における待機的手技の続行が許容可能と判定されるSARS-CoV-2の伝染または罹患のリスク（例えば、一連のワクチン接種が完了したこと、最近のPCR検査結果が陰性であったこと、またはそのような検査がもはや必要ないことの記録など）について評価される。

20

【0289】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、投薬後少なくとも28日間は別の介入的研究に参加しないことに同意する。

【0290】

いくつかの実施形態において、スクリーニング期間中、ヒト対象は、適切なサイズの cuff を用いて3つの血圧測定値の記録を行い、その各々が140/90 mmHg未満である。スクリーニング中に血圧が140/90 mmHg以上であれば、対象は、本明細書に記載される組成物の投与に進む前に、対象の3つの血圧測定値が140/90 mmHg未満になるまで、新しいまたは変更された血圧降下療法を受け、スクリーニングを続けることができる。

30

【0291】

b. 対象除外基準

いくつかの実施形態において、TTRアミロイドーシス（ATTRv-PN及びATTR-CM）を有し、本明細書に記載されるLNP組成物（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼをコードするmRNAと、遺伝子をターゲティングするガイドRNA、例えば、TTR遺伝子をターゲティングするガイドRNAとを含む）が投与される対象は、以下の対象除外基準のうち1つ以上について評価される。

【0292】

i. ATTRv-PN対象除外基準

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、非TTRタンパク質に起因するアミロイドーシス、例えば、アミロイド軽鎖（AL）アミロイドーシスを有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、軟髄膜トランスサイレチンアミロイドーシスを有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、いかなる脂質ナノ粒子（LNP）成分に対しても過敏性を有しないか、または以前にLNPを受け、何らかの処置関連検査異常もしくは有害事象（例えば、LNP含有生成物を受けた後、ベースラインが正常であった場合はALTもしくはAST > 3 × ULN、またはベースラインが正常を超えた場合は > 3 × ベースライン、LNP含有生成物を受けた後、ベースラインが正常であった場合はINR、aPTTもしくはdダイマー > 1.5 × ULN、またはベースラインが正常を超えた場合は

40

50

> 1. 5 × ベースライン、CTCAEグレード3以上に分類されるLNP処置関連有害事象、処置または注入中止を必要とするLNP含有生成物に対する注入関連反応（IRR）を経験している。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、感覚運動神経障害または自律神経障害（例えば、糖尿病性神経障害、自己免疫疾患関連神経障害）の他の既知の原因を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、1型真性糖尿病または2型真性糖尿病の5年以上にわたる診断を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング前の90日以内またはスクリーニング中に、心不全または心不全症状の悪化に起因する、現在または過去のNYHAクラスIIIまたはIV症状を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、90日以内に心血管系入院または侵襲的手技をしていない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、侵襲的心血管系手技（例えば、冠動脈ステント、ペースメーカーの留置など）をしていない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、ビタミンA補充を受けない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、処置前の投薬レジメンを受けない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、投与14日以内の抗血小板物質（例えば、アスピリン、クロピドグレル）または抗血栓療法（例えば、ワルファリン、ダビガトラン、アピキサバン）の使用歴を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、血栓形成傾向の既往、あるいは第V因子Leiden及び/またはプロトロンビン20210の遺伝子検査陽性結果を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、2年未満の予想生存期間を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、ビタミンA欠乏症と一致する眼科的所見を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、硬変の既往を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、ウイルス、寄生虫、または真菌の全身感染の既往または疑いを有せず、細菌感染のための抗生物質を受けてもいない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、B型肝炎もしくはC型肝炎の感染歴、またはB型肝炎表面抗原（HBsAg）もしくはC型肝炎ウイルス抗体（HCV Ab）の陽性検査結果を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、陽性ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ステータスの履歴を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、肝臓、心臓もしくは他の固形臓器の移植もしくは骨髄移植の既往、または投与から1年以内の移植の予定を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング前の5年以内またはスクリーニング期間中に、皮膚の基底細胞癌、治癒的に切除された皮膚扁平上皮癌、治癒的に切除された子宮頸部上皮内癌、または適切な管理が観察のみである低悪性度前立腺腺癌を除いて、活動性悪性腫瘍の既往を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング前の3年以内にアルコールまたは薬物の乱用歴を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、妊娠可能なまたは授乳中の女性ではない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、投与7日以内に重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2（SARS-CoV-2）ポリメラーゼ変化反応（PCR）検査の陽性結果を有しない。

【0293】

これら及び他の除外基準の評価は、当技術分野では公知である。

【0294】

ii. ATTR-CM対象除外基準

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、非TTRタンパク質に起因するアミロイドーシス、例えば、アミロイド軽鎖（AL）アミロイドーシスを有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、既知の軟髄膜トランスサイレチンアミロイドーシスを有しない。

【0295】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、いかなる脂質ナノ粒子（LNP）成分に対しても過敏性の既往を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、以前にLNPを受けておらず、またいかなる処置関連検査異常または有害事象（AE）（例えば、LNP含有生成物を受けた後、ベースラインが正常であった場合はALTもしくはAST > 3 × ULN、またはベースラインが正常を超えた場合は > 3 × ベースライン；LNP含有生成物を受けた後、ベースラインが正常であった場合はINR、aPTTもしくはdダイ

マー > 1.5 × ULN、またはベースラインが正常を超えた場合は > 1.5 × ベースライン；CTCAEグレード3以上と分類される何らかのLNP処置関連有害事象；処置または注入中止を必要とするLNP含有生成物に対する注入関連反応（IRR）（いくつかの実施形態において、注入関連反応を軽減するための注入速度の緩徐化は除外対象とみなされない）；及び/または治験責任医師の意見において除外対象となるべきである何らかのLNP処置関連有害事象）も経験していない。

【0296】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、規定の時間枠内で、ATTRに対する以下のTTR指向療法を使用しない：

パチシラン（低分子干渉リボ核酸（siRNA）治療製剤LNP）、例えば、過去の使用歴及び/または治験薬投与前90日以内の最後の用量の投与。 10

イノテルセン（アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO））、例えば、過去の使用歴及び/または治験薬投与前160日以内の最後の用量の投与。

ブトリシラン（治験中のsiRNA治療用GalNAcコンジュゲート）、例えば、過去の使用歴。

タファミジス（TTR安定化剤）、例えば、対象が治験薬投与前に少なくとも14日間にわたり継続投与を受けている。

ジフルニサル（TTR安定化剤）、例えば、治験薬投与前14日以内の最後の用量の投与。

ドキシサイクリン及び/またはタウロウルソデオキシコール酸（TTR基質溶媒）、例えば、治験薬投与前14日以内の最後の用量の投与。 20

実験的TTR安定化剤（例えば、AG-10）、例えば、治験薬投与前6か月以内の最後の用量の投与。

ATTRv-CMの処置のための任意の他の治験剤、例えば、治験薬投与前30日以内または5半減期以内のいずれか長い方での最後の用量の投与。

【0297】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、治験責任医師の意見において、虚血性心臓病（例えば、心筋酵素及びECG変化の記録歴がある心筋梗塞の既往）、高血圧、または未解消の弁膜疾患によって引き起こされ、主としてトランスサイレチンアミロイド心筋症に起因するものではない、心不全を有しない。 30

【0298】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、持続性心室頻拍もしくは心室細動の停止の既往、またはペースメーカーが適応となるが留置されない房室（AV）結節性もしくは洞房（SA）結節性の機能異常の既往を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、治験薬投与前28日以内に、ペースメーカーまたは除細動器の留置、抗不整脈薬の開始または変更がない。

【0299】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、ビタミンA補充を受けられないまたは受ける意思がないものではない。

【0300】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、必要な前投薬のATTR-CMステータス管理に関連する有意義なリスクを示す臨床評価を有しない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、必要な処置前の投薬レジメンを受けられないまたは受ける意思がないものではない。 40

【0301】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、治験薬投与前14日以内のワルファリンもしくはヘパリン/ヘパリン誘導体による抗血栓療法、または治験薬投薬後期間中にワルファリン抗血栓療法を必要とする見込みがない。いくつかの実施形態において、アピキサバン、ダビガトラン、エドキサバン、またはリバーロキサバンの使用は、用量がスクリーニング前の28日間にわたって安定であり、スクリーニング中に安定であり、かつ治験薬投 50

与後 90 日間にわたって安定なままであると予想される場合に許可される。

【0302】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、血栓形成傾向の既往、あるいは第 V 因子 Leiden、プロトロンビン 20210 の遺伝子検査陽性歴、あるいはプロテイン S 欠乏症及び/またはプロテイン C 欠乏症のいずれかの検査陽性結果を有しない。

【0303】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、治験責任医師の意見において、1 年未満の予想生存期間を有しない。

【0304】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、眼科検査のスクリーニングにおいてビタミン A 欠乏症と一致する眼科的所見を有しない。 10

【0305】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、硬変の既往を有しない。

【0306】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニングの 14 日以内に、ウイルス、寄生虫、または真菌の全身感染の既往または疑いを有せず、細菌感染のための抗生物質を受けてもいない。

【0307】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング時に、B 型肝炎もしくは C 型肝炎の感染歴、または B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) もしくは C 型肝炎ウイルス抗体 (HCV Ab) の陽性検査結果を有しない。いくつかの実施形態において、硬変の証拠を有せず、C 型肝炎の治療を意図したレジメンを完了し、かつ活動性 C 型肝炎も上昇した肝毒性リスクも有しないと胃腸科医によって判断された対象は、除外されない。 20

【0308】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、陽性ヒト免疫不全ウイルス (HIV) ステータスの履歴を有しない。

【0309】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、肝臓、心臓もしくは他の固形臓器の移植もしくは骨髄移植の既往、またはスクリーニングから 1 年以内の移植の予定を有しない。いくつかの実施形態において、角膜移植の既往歴または予定は、除外対象ではない。 30

【0310】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング前の 3 年以内またはスクリーニング期間中に、皮膚の基底細胞癌、治癒的に切除された皮膚扁平上皮癌、治癒的に切除された子宮頸部上皮内癌、または適切な管理が観察である低悪性度前立腺腺癌を除いて、活動性悪性腫瘍の既往を有しない。

【0311】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、スクリーニング前の 3 年以内にアルコールまたは薬物の乱用歴を有しない。いくつかの実施形態において、女性対象は、妊娠可能でも授乳中でもない。いくつかの実施形態において、ヒト対象は、治験責任医師の意見において、対象の安全性に悪影響を与える、研究結果の評価に支障を来す、または研究への準備を妨げる可能性がある、何らかの状態、検査異常、または他の理由を有しない。 40

【0312】

3. 注入予防法

いくつかの実施形態において、対象に、本明細書に記載される LNP 組成物 (例えば、Cas9 などの Cas ヌクレアーゼをコードする mRNA と、遺伝子をターゲティングするガイド RNA、例えば、TTR 遺伝子をターゲティングするガイド RNA とを含む) を投与することを含む、本明細書に記載される方法は、注入予防法をさらに含む。いくつかの実施形態において、注入予防法は、遺伝子編集組成物の投与前に対象に施与される。いくつかの実施形態において、LNP 組成物を投与前に対象に施与される注入予防法レジメンは、静脈内ステロイド、静脈内 H1 ブロッカーまたは経口 H1 ブロッカー、及び静 50

脈内または経口のH2ブロッカーを投与することを含む。静脈内ステロイドは、デキサメタゾン、例えば10mgであり得る。静脈内H1ブロッカーは、ジフェンヒドラミン、例えば50mgであり得る。経口H1ブロッカーは、セチリジン、例えば10mgであり得る。静脈内または経口のH2ブロッカーは、ファモチジン、例えば20mgであり得る。

【実施例】

【0313】

実施例1。TTR遺伝子編集のためのLNP粒子ベースの組成物

ヌクレアーゼmRNAのインビトロ転写(「IVT」)

N1-メチルシュード-Uを含有するキャッピング及びポリアデニル化されたmRNAを、慣例的方法を使用したインビトロ転写により生成した。簡潔に述べると、線状化プラスミドDNA鋳型及びT7 RNAポリメラーゼ。T7プロモーター、転写用の配列、及びポリアデニル化領域を含有するプラスミドDNAを、製造元のプロトコルに従ってXbaIで線状化した。XbaIは加熱により失活させた。線状化されたプラスミドを酵素及び緩衝塩から精製した。修飾されたmRNAを生成するためのIVT反応を、50ng/μLの線状化プラスミド；各2~5mMのGTP、ATP、CTP、及びN1-メチルシュード-UTP(Trilink)；10~25mMのARCA(Trilink)；5U/μLのT7 RNAポリメラーゼ；1U/μLのマウスRNase阻害剤(NEB)；0.004U/μLの無機E.coliピロホスファターゼ(NEB)；ならびに1x反応緩衝液を37°Cでインキュベートすることによって行った。TURBO DNase(ThermoFisher)を加えて最終濃度を0.01U/μLとし、反応物を37°CでインキュベートしてDNA鋳型を除去した。

【0314】

MegaClear Transcription Clean-upキット(ThermoFisher)またはRNeasy Maxiキット(Qiagen)を製造元のプロトコルに従って使用して、mRNAを精製した。あるいは、mRNAを沈殿プロトコルにより精製し、その後、場合によってはHPLCベースの精製を行った。簡潔に述べると、DNase消化の後、LiCl沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、及び酢酸ナトリウム沈殿を使用してmRNAを精製した。HPLCで精製したmRNAの場合、LiCl沈殿及び再構成の後、mRNAをRP-IP HPLCによって精製した(例えば、Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21, e142を参照されたい)。プーリングのために選択された画分を合わせ、上記のように、酢酸ナトリウム/エタノール沈殿により脱塩した。さらに別の方法では、mRNAをLiCl沈殿法により精製し、続いてタンジェンシャルフロー濾過によってさらに精製した。260nmでの吸光度を測定することによってRNA濃度を決定し(Nanodrop)、Bioanalyzer(Agilent)によるキャピラリー電気泳動によって転写産物を分析した。

【0315】

配列表に記載のオープンリーディングフレームをコードするプラスミドDNAから、Streptococcus pyogenes(「Spy」)Cas9 mRNAを生成した。本段落で引用されている配列が以下でRNAに関して言及される場合、TをUで置き換えるべきであることが理解される(これは、上記のような修飾ヌクレオシドであり得る)。実施例において使用されるメッセンジャーRNAには、5'キャップ及び3'ポリアデニル化配列(例えば最大100nt)が含まれ、それらは表3で確認される。ガイドRNAは、当技術分野において公知の方法によって化学的に合成される。

【0316】

sgRNA及びCas9 mRNAを含有するLNP製剤の調製

概して、脂質ナノ粒子成分を様々なモル比で100%エタノールに溶解させた。RNAカーゴ(例えば、Cas9 mRNA及びsgRNA)を25mMクエン酸、100mM NaCl、pH5.0に溶解させ、RNAカーゴの濃度をおよそ0.45mg/mLとした。使用したLNPは、3-(4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ

- 2 - ((((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピル (9 Z , 1 2 Z) - オクタデカ - 9 , 1 2 - ジエノエート) といい、本明細書ではリピド A といい、イオン化可能脂質 ((9 Z , 1 2 Z) - 3 - ((4 , 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - ((((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ - 9 , 1 2 - ジエノエート と、コレステロール と、D S P C と、P E G 2 k - D M G とを、それぞれ 5 0 : 3 8 : 9 : 3 のモル比で含むものであった。L N P は、脂質アミン対 R N A リン酸 (N : P) モル比を約 6 とし、g R N A 対 m R N A の重量比を 1 : 2 とし、使用した L N P は、C a s 9 m R N A 及び s g R N A を含む。

【 0 3 1 7 】

L N P は、脂質含有エタノールと、2 倍容の R N A 溶液及び 1 倍容の水との衝突噴流混合を利用するクロスフロー技術を使用して調製した。脂質含有エタノールを、混合十字部によって 2 倍容の R N A 溶液と混合した。インライン T 字部を介して第 4 流の水を十字部からの出口流と混合した (W O 2 0 1 6 0 1 0 8 4 0 の図 2 を参照のこと)。L N P を室温で 1 時間保持し、水でさらに希釈した (およそ 1 : 1 v / v)。フラットシートカートリッジ (S a r t o r i u s , 1 0 0 k D M W C O) 上でのタンジェンシャルフロー濾過を使用して希釈後の L N P を濃縮し、次いで、P D - 1 0 脱塩カラム (G E) を使用して 5 0 m M の T r i s , 4 5 m M の N a C l , 5 % (w / v) のスクロース、p H 7 . 5 (T S S) にバッファー交換した。得られた混合物を、その後、0 . 2 μ m 滅菌フィルターの使用により濾過した。最終的な L N P の特性解析を行って、封入効率、多分散指数、及び平均粒径を決定した。最終的な L N P を以後の使用まで 4 または - 8 0 で保管した。

【 0 3 1 8 】

次世代シーケンシング (「 N G S 」) 及び編集効率の分析

当技術分野において公知の方法に従って、例えば Q u i c k E x t r a c t D N A E x t r a c t i o n 溶液 (E p i c e n t r e , 型番 Q E 0 9 0 5 0) または Q u i c k E x t r a c t (L u c i g e n , 型番 S S 0 0 0 0 3 5 - D 2) を使用して、ゲノム D N A を細胞または組織から抽出した。ゲノム内のターゲット位置における編集効率を定量的に決定するため、シーケンシングを用いて、遺伝子編集により導入された挿入及び欠失の存在を特定した。目的の遺伝子 (例えば、T T R) 内のターゲット部位の周辺に P C R プライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅させた。プライマー配列設計は、当技術分野で標準となっているように行った。

【 0 3 1 9 】

製造元のプロトコル (I l l u m i n a) に従ってさらなる P C R を行って、シーケンシングのための化学物質を追加した。I l l u m i n a M i S e q 機器でアンプリコンのシーケンシングを行った。クオリティスコアが低いものを除去した後、リードを参照ゲノム (例えば、h g 3 8) に対してアラインした。リードを含む結果ファイルを参照ゲノムにマッピングし (B A M ファイル)、目的のターゲット領域と重なるリードを選択し、野生型のリード数に対し挿入または欠失 (「インデル」) を含むリード数を計算した。

【 0 3 2 0 】

編集パーセンテージ (例えば、「編集効率」または「編集率」) は、野生型を含む配列リードの総数に対する、挿入または欠失 (「インデル」) のある配列リードの総数と定義される。

【 0 3 2 1 】

実施例 2。T T R 遺伝子をターゲットにする s g R N A の選択

T T R 遺伝子配列 A A A G G C U G C U G A U G A C A C C U (配列番号 1 5 ; ヒトゲノムビルド h g 3 8 染色体 1 8 : 3 1 5 9 2 9 8 7 ~ 3 1 5 9 3 0 0 7) をターゲットにする s g R N A を、i n s i l i c o 手法及び経験的手法の両方の組み合わせを適用した包括的なオフターゲット特性解析ワークフローの後に、効率的なノックアウト及び特

10

20

30

40

50

異性のために選択した。高い治療指数（オンターゲット編集とオフターゲット編集の比率）を選択するために、ゲノムワイド分析及びターゲットシーケンシングを行って、候補 sgRNA オフターゲット部位を特定し、検証した。

【0322】

相補的な計算及び試験所ベースの手法（Cas-Offinder、GUIDE-seq 及び SITE-Seq）を使用して、オフターゲット編集の可能性のあるゲノム座位を発見した。その後、NTLA-2001における潜在的なオフターゲット部位とシングルガイドRNA（sgRNA）ターゲティング配列との間のミスマッチを調べた。インターバルツリーアルゴリズムを使用して、タンパク質をコードするエクソンと重なる部位を検出した。タンパク質をコードするエクソンと少なくとも1つのヌクレオチドが重なるものについては、プロトスペーサー配列とのミスマッチが4つ以下であれば保持した。コーディングDNA配列（CDS）からのエクソンと重ならない潜在的なオフターゲット部位については、3つのミスマッチを許容した。これら両セットの部位を合わせて、NTLA-2001の予測される潜在的なオフターゲット編集座位のキュレーションに含めた。

10

【0323】

CRISPR/Cas9 オフターゲット発生アッセイGUIDE-seqを、既報のように、軽微な変更を加えて行った。公開されているプロトコルに従ってIllumina次世代シーケンシング（NGS）ライブラリの調製を行い、150塩基対（bp）のペアエンドリードを用いて、IlluminaのMiSeq及びHiSeq 2,500の両方でシーケンシングを行った。NTLA-2001のGUIDE-seqは、SpyCas9 緑色蛍光タンパク質（SpyCas9-GFP）融合タンパク質を構成的に発現するようにエンジニアリングされたHEK293細胞株（HEK293-Cas9）において行った。

20

【0324】

CRISPR/Cas9 オフターゲット発見アッセイSITE-Seqは、CRISPR/Cas9 酵素活性に対するあらゆる基質制限をなくすために除タンパク及び精製されたゲノムDNA（gDNA）に対して実行されるため、このアッセイは、潜在的なオフターゲット編集の発見感度が最も高い無細胞の生化学的方法のひとつである。2名のユニークな男性血液ドナーの末梢血単核細胞に由来するヒトgDNAに対してSITE-Seqを実行した。インビトロでアセンブルされたCas9のリボ核タンパク質及びトランスサイレチン[TR]ターゲティングsgRNAを含有するNTLA-2001によって各gDNAサンプルを消化して、オンターゲット部位及びsgRNA配列に対する相同性を有する潜在的なオフターゲット部位におけるDNA切断を誘導した。gDNA消化の後、遊離gDNA断片の末端をアダプターとライゲートして、編集された断片の濃縮及びNGSライブラリの構築を容易にした。実施例1に記載のようにNGSライブラリのシーケンシングを行い、バイオインフォマティクス分析によってリードを分析して、遊離DNA末端のゲノム座標を決定した。次に、リードの蓄積があるヒトゲノム内の位置を潜在的なオフターゲット部位としてアノテートした。

30

【0325】

Cas-Offinderによる計算的予測ならびに経験的発見アッセイGUIDE-seq 及び SITE-Seq によって発見された全ての潜在的なオフターゲット編集座位について、NTLA-2001ゲノム編集細胞における妥当性が確認されたオフターゲット編集に関するキュレーション及びアノテーションを行った。Cas-Offinder、GUIDE-seq 及び SITE-Seq からのNTLA-2001に関する潜在的なオフターゲット編集の発見により、NTLA-2001オンターゲット部位を含む合計658の部位が得られた。SITE-Seqでは476（72.3%）の部位が発見され、そのうち431（65.5%）は、この方法によってのみ発見された。Cas-Offinderでは222（33.7%）の部位が発見され、そのうち178（27.1%）は、この方法によってのみ発見された。GUIDE-seqでは12（1.8%）の部位が発見され、そのうち4（0.6%）は、この方法によってのみ発見された（図5）。

40

50

【0326】

偽発見率は、各発見アッセイに合わせて一意的にコントロールした：(1) Cas - OFFinder は、ゲノム全体で最大3つのミスマッチ及びエクソンDNA内で最大4つのミスマッチを有する座位を特定するように調整した、(2) 細胞ベースのアッセイであるGUIDE - Seq は、Cas9を構成的に発現するようにエンジニアリングされたHEK293細胞株において最適化し、最大忍容用量の二本鎖ドナーオリゴヌクレオチドを使用した、(3) 生化学ベースのアッセイであるSITE - Seq は、16 nM、64 nM、及び256 nMのCas9 RNP濃度でのオフターゲット発見について適格性評価を行い、より多くの潜在的なオフターゲット座位の負荷によって妥当性確認感度を低下させずに編集された細胞において妥当性が確認され得る潜在的なオフターゲット座位の全ての捕捉を確実にするために最適なものとして64 nMでのCas9 RNP消化を選択した。

【0327】

誤分類率は次のとおりであった。

ゲノム全体で最大3つのミスマッチ及びエクソンDNA内で最大4つのミスマッチを許容するCas - OFFinder結果により、221の潜在的なオフターゲット座位が特定された。編集された細胞における妥当性確認データに基づくと：

$$\text{偽陽性率} = 1 - (3 \div 221) = 98.6\%$$

$$\text{偽陰性率} = 1 - (3 \div 7) = 57.1\%$$

GUIDE - Seqでは、11の潜在的なオフターゲット座位が特定された。編集された細胞におけるインデル検出の妥当性確認データに基づくと：

$$\text{偽陽性率} = 1 - (3 \div 11) = 72.7\%$$

$$\text{偽陰性率} = 1 - (3 \div 7) = 57.1\%$$

SITE - Seqでは、475の潜在的なオフターゲット座位が特定された。編集された細胞におけるインデル検出の妥当性確認データに基づくと：

$$\text{偽陽性率} = 1 - (7 \div 475) = 98.5\%$$

$$\text{偽陰性率} = 1 - (7 \div 7) = 0\%$$

【0328】

実施例3。初代ヒト肝細胞における潜在的なオフターゲット編集の妥当性確認

オフターゲットの可能性を評価するために使用した脂質ナノ粒子[LNP]の最高濃度は、初代ヒト肝細胞(PHH)において細胞毒性を誘導しないNTLA - 2001の最高濃度に基づいて選択した。この濃度は、90%有効濃度(EC₉₀; PHHにおいて90%超のTTRタンパク質のノックダウンを達成した濃度)の27倍であった。

【0329】

PHHにおける潜在的なオフターゲット編集の妥当性を確認するために、2つの相補的技術を使用した。1つ目は、RNase H2依存性PCR増幅及びNGS(rhAMPSeq)と呼ばれるマルチプレックスPCR技術である。このアッセイは、NGSを用いたアンプリコンシーケンシングのために単一のPCR反応においてオフターゲット座位及び潜在的なオフターゲット座位を同時に濃縮することを可能にする。第2の技術は、実施例1に記載したような標準的なシングルプレックスアンプリコンシーケンシング(Amp - Seq)であり、これを使用して、rhAMPSeqに適用された組み入れ基準に適合しなかった座位の特性解析を行った。

【0330】

Illumina Next Seq機器を使用して、150塩基bpペアエンドシーケンシングリードに加えて2つの8bpデュアルインデックスリードを含むrhAMPSeqライブラリのシーケンシングを行った。次に、サンプルに特異的なシーケンシングリードをスティッチし、bowtie2(v2.2.6)を使用してヒトゲノム参照配列(ビルドGRCh38)にアラインし、Smith - Watermanアルゴリズムを使用した局所的リアライメントを行った。潜在的なCas9切断部位の10塩基対以内のヌクレオチドを、ヒトゲノム参照配列に対するインデルについて評価した。部位編集

パーセンテージは、インデルを含むシーケンシングリードの総数をシーケンシングリードの総数で割ったものとして定義した。

【0331】

超飽和濃度のNTLA-2001への曝露後、2つのPHHドナーロットで妥当性が確認されたオフターゲットインデルが7つ検出された(表1)。オフターゲット編集がオンターゲット編集に正比例することからこの手法が選択され、したがって、妥当性が確認されたオフターゲット編集の検出がNTLA-2001による過飽和ゲノム編集によって最大化された。

【表2】

10

表1. 超飽和濃度のNTLA-2001を用いた初代ヒト肝細胞の2つのドナーロットにおけるゲノム編集のオフターゲット及びオンターゲットのインデル検出の妥当性確認

部位の説明	アノテーション	PHH ロット 1		PHH ロット 2	
		平均 Δ インデル (%)	p 値	平均 Δ インデル (%)	p 値
オンターゲット	オンターゲット	92.57 ± 7.85	0.001	93.50 ± 0.10	1.91E-07
オフターゲット 1	遺伝子間	7.37 ± 0.72	0.002	1.43 ± 0.12	1.99E-04
オフターゲット 2	イントロン	3.70 ± 0.10	3.90E-06	1.07 ± 0.15	4.11E-03
オフターゲット 3	遺伝子間	0.87 ± 0.06	3.50E-05	0.50 ± 0.20	0.037
オフターゲット 4	遺伝子間	1.50 ± 0.69	0.03	0.33 ± 0.06	0.001
オフターゲット 5	遺伝子間	0.30 ± 0.10	0.02	0.13 ± 0.06	0.029
オフターゲット 6	イントロン	0.27 ± 0.06	0.01	0.10 ± 0.00	0.211
オフターゲット 7	遺伝子間	0.27 ± 0.06	0.01	0.10 ± 0.00	0.091

20

太字の値は、妥当性が確認されたオフターゲットインデルを表す。PHHは初代ヒト肝細胞を意味する。

30

【0332】

座位のうち5つはヒトゲノムの遺伝子間領域に位置し、2つはタンパク質コード遺伝子のイントロンに位置していた。妥当性が確認されたこれらのオフターゲット編集座位について、さらに、NTLA-2001曝露の用量に応じた特性解析を行った(図6)。この手法により、治療上意義のあるTTRタンパク質低下におけるオフターゲットインデル形成の検出及び頻度のより詳細な特性解析を行うことができた。

【0333】

これらの特定のオフターゲットシーケンシングデータをNGSで分析したところ、PHHにおいて平均90%のTTRタンパク質低下を達成したEC90よりも最大3倍高いNTLA-2001でPHHを処置した場合、妥当性が確認されたオフターゲットインデルの検出数がゼロであることが判明した。

40

【0334】

潜在的なオフターゲット座位の偽分類率を決定するためのツールセットは存在しない。現在利用可能な全ゲノムシーケンシング技術は、ターゲットインデルの感度と比較して不十分である。合計657の潜在的なオフターゲットを、0.2%の頻度までインデルの90%超を検出するのに適格であると評価されたアンプリコンシーケンシング妥当性確認に供した。

妥当性確認に失敗した部位の合計 = 98.93%

50

妥当性が確認されたオフターゲット座位 = 1.07%

【0335】

実施例4。NTLA-2001の効力のインビトロ評価

ヒト肝細胞の初代細胞培養物において、NTLA-2001のインビトロ用量応答及び遺伝子編集効力を評価した。

【0336】

初代ヒト肝細胞では、NTLA-2001は非常に強力であり(EC₅₀; 0.05 ~ 0.15 nM; EC₉₀; 0.17 ~ 0.67 nM)、飽和レベルのTTR遺伝子編集を示し(93.7%)、TTR mRNAの91%以上の低下及びTTRタンパク質の95%以上の低下をもたらした(図2)。NGSデータは、NTLA-2001がTTR遺伝子のノックアウトを誘導したことを示した。

10

【0337】

図2は、ガイドRNAの濃度上昇と、結果として生じるTTR遺伝子編集のパーセンテージとの間の関係、ならびに単一ロットの初代ヒト肝細胞におけるTTR mRNA及びタンパク質の低下を示す。主なインデルパターンは、フレームシフト突然変異を誘導する切断部位での一塩基の欠失または挿入であった(データは示さない)。

【0338】

実施例5。ゲノム編集後のDNA構造変異型の特性解析

CRISPR/Cas9ゲノム編集は、二本鎖DNA切断修復の自然な結果としてDNAの構造変化(SV)をもたらす可能性がある。潜在的なDNA SVには、染色体間転座、逆位、重複、及び欠失が含まれる。NTLA-2001によるゲノム編集後に起こり得る潜在的なDNA SVの包括的な特性解析を実行するために、Intelliaは、(1)SV特性解析アッセイを用いるショートリードNGS、(2)ロングレンジPCRを用いるロングリードNGSという2つの相補的な手法を開発し、それらの適用の適格性評価を行った(図7)。これらの手法の結果から、公開されている高効率CRISPR/Cas9ゲノム編集の結果と一致した、DNA SVの調和性のある低い(<1%)レベルが明らかになった。

20

【0339】

SV特性解析アッセイのペアエンドNGSデータの分析では、可能性のある2つの結果が得られる。1つは、ペアエンドシーケンシングリードの調和性のあるマッピングである。調和性のあるリードのマッピングは、バランスの取れた再編成を潜在的に示し得る。しかし、バランスの取れた再編成は、天然の染色体構造を保存する通常のオンターゲット編集から区別不能なものとなる。代替的な結果は、ペアエンドシーケンシングリードの不調和なマッピングである。不調和なマッピングは、染色体間転座、逆位、または重複など、DNA修復後の構造変化の存在を潜在的に示し得る。

30

【0340】

SV特性解析アッセイは、NTLA-2001で処置した2つのドナーロットのPHHに対して行った。高分子量gDNAを単離し、上述のようにライブラリを調製した。150bpペアエンドシーケンシングリード及び2つの8bpデュアルインデックスリードを使用し、Illumina MiSeqまたはNextSeq NGS技術を使用して、NGSライブラリのシーケンシングを行った。インハウスで開発したコードを使用して、NGSリードをDNA SVについて分析した。簡潔に述べると、各リードまたはリードペアを参照ゲノム(GRCh38)にアラインした。不調和なリード、または分割されたNGSアラインメントは、5'末端及び3'末端が、野生型ゲノムから予想されるDNAインサートの最大サイズ(シングルリードでは300bp、リードペアでは1,000bp)よりも大きいゲノム内の2つの異なる位置にアラインした、リードまたはリードペアとして定義した。NGSがゲノム内の2つ以上の座位にアラインした場合、関与する2つの断片を使用して、(1)染色体間転座、(2)染色体間、(3)逆位、及び(4)重複の基準でSVを分類した。アラインメントが2つ以上のクラスのシグネチャーと一致した場合、これを「複合体」と分類した。反復性DNA SVは、検出されたDNA SV

40

50

を表す2つ以上のユニークな分子識別子を有するものとして定義した。

【0341】

N T L A - 2 0 0 1でゲノム編集されたP H Hは、超飽和レベルのオンターゲット編集において低い(<1%)DNA S V修復結果を示した。N T L A - 2 0 0 1でのゲノム編集後に検出されたDNA S Vの頻度は、高効率編集g R N Aについての既報の結果と調和している。特定された転座はいずれも既知のリスクに関連せず、検出された唯一の反復性転座は、姉妹染色体のオンターゲット部位間の無動原体及び二動原体の融合であった。

【0342】

C R I S P R / C a s 9によるゲノム編集後に潜在的な修復結果としてDNAのキロベースペア(Kb)欠失が生じる可能性は、マウス胚性幹細胞、マウス造血前駆細胞、及びヒト分化細胞株で以前に報告されている。I l l u m i n aベースのN G Sを用いるターゲティングされたP C Rベースのアンプリコンシークエンシングは、100bpを超える欠失などの大きな構造変異型の特性解析及び数量化を行う能力が限られている。したがって、N T L A - 2 0 0 1によるゲノム編集後にDNA修復の結果として大きな欠失が生じる可能性の特性解析を行うために、New York (USA)のI c a h n S c h o o l o f M e d i c i n e a t M t S i n a iにおいて、P a c i f i c B i o s c i e n c e sの技術を用いたロングレンジP C Rとそれに続くロングリードシークエンシングを実施し、966bp欠失の検出限界を決定することによって適格性評価を行った(図8)。

【0343】

2つのドナーロットのP H HをN T L A - 2 0 0 1で処置し、g D N AをロングレンジP C Rのために単離し、I c a h n S c h o o l o f M e d i c i n e a t M t S i n a i , N e w Y o r k (U S A)においてP a c i f i c B i o s c i e n c e s S e q u e l I I機器を使用してシークエンシングを行った。P H HにおけるN T L A - 2 0 0 1によるゲノム編集後の標準的なショートリードAmp-Seqを用いたオンターゲットインデル頻度の分析は、92.57±7.85%(ロット1)及び93.50±0.10%(ロット2)のオンターゲットインデル編集頻度を明らかにした。超飽和ゲノム編集用量においてインビトロでゲノム編集されたP H HにおけるN T L A - 2 0 0 1についてのP a c i f i c B i o s c i e n c e s技術を用いたロングレンジP C Rとそれに続くロングリードシークエンシングの分析は、2名のP H Hドナーの1名において、471bp及び1,065bpのサイズの2つの欠失の頻度が、それぞれリードの0.26%及び0.48%と低いことを明らかにした(図9)。N T L A - 2 0 0 1のオンターゲット部位に最も近い遺伝子は約28Kb離れており、したがって、この報告で特性解析されたDNA構造変異型は、コーディングDNA配列に意図しないゲノム改変を追加することなくT T R遺伝子の破壊をもたらしたN T L A - 2 0 0 1の生産的ゲノム編集の結果であると考えられる。

【0344】

実施例6。トランスジェニックマウスにおける用量依存性かつ永続的な効果

トランスジェニックマウスの研究から、N T L A - 2 0 0 1の用量依存性かつ永続的な効果が明らかになった。

【0345】

第1の実験では、h u T T Rトランスジェニックマウスを、0.1、0.3、もしくは1mg/kgのN T L A - 2 0 0 1、1mg/kgの非ターゲティングコントロール脂質ナノ粒子(LNP)、またはt r i sスクロース食塩水緩衝液コントロール(各群n=5マウス)で処置した。肝臓T T R遺伝子編集(パネルA)及び血清ヒトT T Rタンパク質(パネルB)を、投薬7日後にそれぞれ次世代シークエンシング及びヒトトランスサイレチン酵素結合免疫吸着アッセイによって測定した。各群で処置した5匹のマウスからの平均及び標準誤差の値を示している(図10)。

【0346】

10

20

30

40

50

T T R 遺伝子の編集は循環血清 T T R タンパク質レベルを低下させ、このレベルは投薬後 4 週までに最下点に達し、12 か月時点の観察で依然として最大限に抑制されていた。

【0347】

第 2 の実験では、肝臓の 2 / 3 の切除及びその後の全肝再生の後、遺伝子編集パーセンテージ及び対応するタンパク質レベルは変化しておらず、編集の恒久的性質が裏付けられた (図 11)。C R I S P R / C a s 9 mRNA 及び T T R 遺伝子をターゲティングするシングルガイド RNA を含有する脂質ナノ粒子 (L N P) 1 m g / k g、または t r i s スクロース食塩水 (T S S) コントロールにより、C D 1 マウスを処置した (各群 n = 5 マウス)。7 日目に、マウスに部分肝切除 (P H x) を行って、肝臓のおよそ 70 % を除去した。血清 T T R タンパク質濃度を、投薬後 0 日目、7 日目 (P H x 前)、及び 17 日目 (P H x 後 4 日目) に、T T R 酵素結合免疫吸着アッセイによって測定した。各群で処置した 5 匹のマウスからの平均及び標準誤差の値を示している。

10

【0348】

L N P 製剤の投与の 7 日後、動物は血清 T T R の 98 % のノックダウンを示し、これは P H x 後の肝臓の再生後に維持された。これらの L N P 処置動物はまた、P H x の前後の両方で同一の T T R 遺伝子編集パーセンテージ (73 %) を示し、このことは、遺伝子編集が肝臓再生プロセスを通して維持されることを示している。

【0349】

実施例 7。非ヒト霊長動物における L N P 媒介性編集

用量群 (1、2、3、及び 6 m g / k g) ごとに 3 匹のカニクイザルを C y n - L N P 注入の少なくとも 1 時間前にデキサメタゾンで前処置して、計画された臨床前処置を模倣した。29 日目に次世代シーケンシングを使用して、肝臓におけるトランスサイレチン (T T R) 遺伝子編集を評価した。血清 T T R タンパク質濃度を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析によってアッセイし、基底 (0 日目) 値に対するパーセンテージとして報告した。T T R 遺伝子編集は 1 ~ 6 m g / k g で用量応答性を示し (パネル A)、これは、ベースラインと比べた血清 T T R タンパク質レベルの低下に対応した (パネル B)。各処置群について、平均及び標準偏差の値を示している。パネル B の斜線枠内は、T T R タンパク質低下の治療上意義のある範囲を示す (図 13)。

20

【0350】

カニクイザル研究は、L N P 成分の急速な初期分布及びクリアランスを示した (図 16 及び図 12)。

30

【0351】

図 14 は、カニクイザルにおける C y n - L N P 単一用量の薬物動態の統合された要約プロットである。

【0352】

さらに、3 m g / k g または 6 m g / k g の単一用量の C y n - L N P は、全肝臓における 73 % の遺伝子編集パーセンテージ (最大) 及び 12 か月にわたり持続した血清 T T R のほぼ完全な低下 (> 94 %) と関連していた (図 3 A)。T T R 遺伝子の編集を肝組織の N G S 分析によって確認した (図 3 B)。

【0353】

40

図 3 A は、0 日目に 1.5、3.0、及び 6.0 m g / k g (全 RNA / 体重) の用量で C y n - L N P の静脈内投与を与え、367 日間追跡したカニクイザル (各コホート n = 3) における、ベースラインに対する割合としての血清トランスサイレチン (T T R) タンパク質濃度の平均低下を示す。処置を受けていないコントロールコホートを比較のために提示している。それぞれの点に対する垂直線は、各群 3 匹についての標準偏差を示す。パネル B は、カニクイザルに対する C y n - L N P 投与後の次世代シーケンシングデータの結果を示す。ガイド RNA ターゲット配列は、赤色の必要な P A M 配列の隣に青色で示されている。[G / A] は、研究に使用したカニクイザルの間で天然に発生する S N P を表す。カニクイザルゲノムビルド m f 5 染色体 18 に対するインデルのヌクレオチド位置は次のとおりである: + 1 : 5 0 6 8 1 5 4 9 - 5 0 6 8 1 5 5 0。

50

【 0 3 5 4 】

主なインデルパターンは、フレームシフト突然変異を誘導する切断部位での一塩基の挿入であった。挿入部位における「N」は、全体として全インデルの1.03%を構成した複数塩基挿入(AA、AGGなど)を指す。残りの画分は、様々な長さの欠失を含んでいた。sgRNAは、シングルガイドRNAを意味する。

【表3】

表2. 非ヒト霊長動物研究からのモデリングに基づくヒトにおけるトランスサイレチンタンパク質低下の予測

カーゴ用量(mg/kg)	予測される TTR タンパク質の低下、%	
	等効力*	ヒトにおいて 4.6 倍の効力*
0.1	24	58
0.3	48	80

10

予測は、ヒト対象の70キログラムの体重に基づく。

【 0 3 5 5 】

実施例 8。臨床試験

全体的な処置設計を図1にまとめる。パネルAは、NTLA-2001の主要な成分を示す。NTLA-2001の担体系は脂質ナノ粒子(LNP)である。LNP製剤については本明細書に記載されている。NTLA-2001の活性成分は、Streptococcus pyogenes (Spy) Cas9タンパク質をコードするヒト最適化メッセンジャーRNA(mRNA)分子(およそ1.5MDaの分子量を有するおよそ4400ヌクレオチドの配列)、及びトランスサイレチン(TTR)をコードするヒト遺伝子に特異的なシングルガイドRNA(sgRNA)分子(およそ35kDaの分子量)である。これらの成分は、薬物投与のためのLNPのカーゴを形成する。NTLA-2001の静脈内投与及び循環への進入後、LNPは、全身循環を通過して肝臓内に直接輸送され、肝臓内に優先的に分布する。パネルBは、肝臓内の肝類洞の毛細血管へのNTLA-2001 LNPの輸送を示す。他の臨床認可されたLNPと同様に、NTLA-2001は、循環中でアポリポタンパク質E(ApoE)によってオプソニン化され、次いで、肝細胞の表面に発現した低密度リポタンパク質(LDL)受容体による取り込みを受け、その後エンドサイトーシス及びエンドソーム形成が起こると見込まれる。LNPの分解及びエンドソーム膜の破壊の後、活性成分(TTR特異的sgRNA及びCas9をコードするmRNA)が細胞質内に放出される。Cas9 mRNA分子は、天然のリボソームプロセスを通じて翻訳され、Cas9エンドヌクレアーゼ酵素を生産する。TTR特異的sgRNAはCas9エンドヌクレアーゼと相互作用し、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)とCas9リボ核タンパク質(RNP)の複合体を形成する。パネルCは、Cas9 RNP複合体が核内移行のターゲットになって核に進入し、核内でTTRの非相補的DNA鎖上のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を認識することを示す。sgRNAの5'末端にあるターゲット特異的な20ヌクレオチド配列は、ターゲット部位でDNA二重らせんに結合し、CRISPR-Cas9複合体がらせんを巻き戻してターゲット遺伝子にアクセスすることを可能にする。Cas9は、一連の立体構造変化及びヌクレアーゼドメイン活性化(HNH及びRuvCドメイン)を起こし、sgRNA相補配列により定義されるようにTTR配列を正確にターゲットとしたDNA切断をもたらす。内因性DNA修復機構は切断の末端をライゲートし、場合によっては塩基の挿入または欠失(インデル)を導入する。インデルの生成は、完全長mRNAの量を減少させるミスセンスまたはナンセンス突然変異の結果として、機能的なターゲット遺伝子のmRNAレベルの低下をもたらし、最終的にターゲットタンパク質のレベル低下をもたらし得る。ターゲットタンパク質(この場合はTTR)の生産抑止をもたらすイン

20

30

40

50

デルは、ノックアウト突然変異と呼ばれる。

【0356】

A. 多発神経障害の用量漸増研究

多発神経障害コホート1及び2

登録

1つの研究施設では、3名の対象がスクリーニングされ、そのうち2名が適格であり、リクルートされた。1名の対象は、体重がその時点で研究プロトコルにより許容される上限を上回っていた。他方の研究施設では、4名の患者がスクリーニングされ、そのうち4名が適格であり、リクルートされた。患者は46～64歳であり、4/6は男性であった。体重は70～90kgであった。3名の患者がp.T80A突然変異を有し、2名がp.S97Y突然変異を有し、1名がp.H110D突然変異を有していた。3名の患者は以前に治療を受けておらず、3名は以前にジフルニサルを受けていた。6名の患者全員が多発神経障害性能力障害スコア1及びNew York Heart Association機能分類Iを有していた。N末端プロB型ナトリウム利尿ペプチド(NT-proBNP)は50～596ng/Lの範囲であった。

10

【0357】

臨床試験設計及び適格性

2部構成、国際共同、第1相、非盲検、多施設共同研究の第1部から、2つの初期コホート(コホート1及び2)を報告する。患者は、2020年11月から2021年4月の間に、全RNA/体重で0.1mg/kgまたは0.3mg/kgの単一用量のNTLA-2001の静脈内投与によって処置された。本明細書では、その後処置されたこれらの患者からのデータも報告する。第1部の主な適格性基準には、年齢18～80歳、hATTRアミロイドーシスによる多発神経障害の診断(心筋症の有無を問わない)、スクリーニング来診時の体重50～90kg、及びATTRアミロイドーシスのための認可済み処置へのアクセスがないことが含まれた。非ATTRアミロイドーシス、既知の軟髄膜ATTRアミロイドーシス、またはRNAサイレンシング療法の既往歴を有する患者は除外した。ATTR安定化剤の使用歴は、ウォッシュアウト期間(ジフルニサル:3日間)を設けて許容した(図18)。

20

【0358】

臨床試験安全性

カニクイザルにおける安全性研究により、無有害作用レベル(no-observed-adverse-effect-level:NOAEL)は、ヒトにおける1mg/kgの用量に相当する3mg/kg静脈内注入の単回投与と決定された。総体表面積に基づくアロメトリックスケーリング及び安全係数10の適用の後、本研究でのNTLA-2001の最大推奨開始用量は0.1mg/kgであった。静脈内LNP注入の潜在的な炎症促進作用を軽減するために、注入前に患者にグルココルチコイドならびにヒスタミン受容体1型及び2型遮断薬を与えた。

30

【0359】

NTLA-2001処置は、注入を中断することなく完了した。プロトコルにより規定された停止事象は観察されなかった。処置下で発現した有害事象は6名中3名の患者で報告され、その全ての重篤度が軽度(グレード1)であった。患者1名は特に注目すべき有害事象を経験した(グレード1注入関連反応;図17参照)。重篤な有害事象は観察されなかった。

40

【0360】

Dダイマーレベルは、当技術分野で公知の方法によって評価した。上昇したdダイマーレベルは、6名中5名の患者において注入の4～24時間後に観察された。上昇は、非ヒト霊長動物においてNOAEL用量で観察されたものよりも低かった。値は、6名の患者全員において7日目までにベースラインに戻った。凝固パラメータである活性化部分トロンボプラスチン時間及びプロトロンビン時間を当技術分野で公知の方法によって評価したところ、結果は基準範囲の上限の1.2倍以内に留まった。フィブリノゲン及び血小板の

50

計数は、当技術分野で公知の方法によって行われ、基準範囲の下限を上回る状態を保った。肝機能検査（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼ）は、当技術分野で公知の方法によって行われ、結果は正常範囲内に留まった（図15）。

【0361】

図15Aはプロトロンビン時間を示し、図15Bは活性化部分トロンボプラスチン時間を示し、図15Cはフィブリノゲンを示し、図15Dはアラニンアミノトランスフェラーゼを示し、図15Eはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを示す。青線は、経時的な個々の対象の結果を示す。単一の赤線は、経時的な平均結果を示す。水平の破線は、各パラメータについて、適宜ULNまたはLLNのいずれかを示す。ベースラインは、治験薬の注入開始前に得られた入手可能な最後の測定値と定義される。中央試験所から28日目までに得られた結果のみをプロットしている。

10

【0362】

ALTはアラニンアミノトランスフェラーゼを意味し、aPTTは活性化部分トロンボプラスチン時間を意味し、ASTはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを意味し、BLはベースラインを意味し、PTはプロトロンビン時間を意味し、LLNは正常下限を意味し、ULNは正常上限を意味する。処置下で発現した有害事象及び検査所見の評価のために患者をモニターした。ベースライン、ならびに1週目、2週目、及び4週目に、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によるTTRタンパク質レベルの分析のために血清サンプルを得た。患者は、NTLA-2001注入から24か月にわたり、安全性及び治療活性結果について評価されている。

20

【0363】

薬物動態

中間薬物動態データは、静脈内（IV）注入後、NTLA-2001イオン化可能脂質がピークレベルからの急速な低下を示し、その後二次ピーク、そして対数線形相が続くことを示唆している。

【0364】

臨床試験有効性

NTLA-2001の薬力学的効果を判定するために、複数の血清TTRレベルを評価した。標準物質として健康な対象のヒト血漿TTR（Sigma、P1742）を使用した定量的アッセイとしてサンドイッチELISA法を開発し、妥当性を確認した。

30

【0365】

簡潔に述べると、アッセイマイクロプレート（Nunc、446612）を、0.05M炭酸塩コーティング緩衝液pH9.6中で1ug/mlのポリクローナルウサギ抗ヒトプレアルブミン抗体（Dako、A0002）と共に一晩インキュベートした。プレートをTTR洗浄溶液（TTRWS：0.05% Tween-20、1xダルベッコPBS）で4回洗浄し、1X Powerblock（Biogenix、HK085-5k）で1時間ブロッキングし、TTRWSで4回洗浄した。調製したプレートで、標準、コントロール、及び希釈した試験サンプルを約2時間インキュベートした。プレートをTTRWSで4回洗浄し、次いで、1X Powerblockで1:2, 500に希釈したヒツジ抗ヒトプレアルブミン抗体（Bio-Rad、AHP1837）と共に1時間インキュベートした。このプレートをTTRWSで4回洗浄し、次いで、1X Powerblockで1:10, 000に希釈した抗ヒツジアルカリホスファターゼ共役抗体（Sigma、A5187）と共に1時間インキュベートした。このプレートをTTRWSで4回洗浄した。SIGMAFAST（商標）p-ニトロフェニルホスフェータブレット（Sigma-Aldrich、N1891）を製造元の説明に従って使用して、プレートを現像した。現像試薬との30分間のインキュベーション後、2N水酸化ナトリウム溶液を使用して反応を停止させた。吸光度を分光光度法によって評価した。ヒト血漿TTR（Sigma、P1742）を使用してシグナル（OD）対濃度の標準曲線を生成して、QC及び未知のサンプルを数量化した。

40

50

【0366】

ベースラインからの血清 T T R タンパク質濃度の低下が 14 日目までに観察され、28 日目まで進行した (図 4 A)。28 日目には、N T L A - 2001 は、コホート 1 (用量レベル 0.1 mg / kg) では 52%、コホート 2 (0.3 mg / kg ; 図 4 B) では 87% の平均 T T R 低下と関連していた。効果は用量依存的であり、より高い用量の N T L A - 2001 を受けた患者では T T R 濃度がさらに大きく低下した。さらに、N T L A - 2001 の効果は、各用量レベルで全員について再現可能であり、28 日目の低下は、コホート 1 では 47 ~ 56% (47%、52%、及び 56%)、コホート 2 では 80 ~ 96% (80%、84%、及び 96%) の範囲であった (図 4 C)。

【0367】

パネル A は、コホート 1 (0.1 mg / kg) についてのベースラインからの総循環血清トランスサイレチン (T T R) タンパク質における変化のパーセンテージを示す。T T R タンパク質は、バイオマーカー法妥当性確認の規制ガイドラインに従った、妥当性確認済みの酵素結合免疫吸着アッセイ法によって数量化した。血清サンプルは、各サンプルを二連で試験して 1 回測定した。優良試験所規範に従い、アッセイ実行を成功させるために再検査は行わなかった。コホート 1 (0.1 mg / kg) の各患者について、投薬前ベースラインと比べた血清 T T R タンパク質における低下のパーセンテージについての投薬後 7 日目、14 日目、及び 28 日目におけるデータを示している (3 つのサンプリング時点からの平均濃度)。パネル B は、コホート 2 (0.3 mg / kg) についてのベースラインからの総循環血清 T T R タンパク質における変化のパーセンテージを示す。方法及び分析は、パネル A に示したものと同一である。パネル C は、コホート 1 及びコホート 2 の両方についての、28 日目の総循環血清 T T R タンパク質におけるベースラインからの変化のパーセンテージの平均 (各コホート N = 3) を示す。

【0368】

上記のように、ベースラインからの血清 T T R タンパク質濃度の低下が 28 日目まで観察された。また、ベースラインからの血清 T T R タンパク質濃度の低下は、N T L A - 2001 による処置の後、9 か月目まで (コホート 1 対象 1 及びコホート 1 対象 3、図 19 A)、または 12 か月目まで (コホート 1 対象 2、図 19 A) 観察された。28 日目の平均 T T R 低下率は、コホート 1 (用量レベル 0.1 mg / kg) で 52%、コホート 2 (用量レベル 0.3 mg / kg) で 87% であった。2 か月目の平均 T T R 低下率は、コホート 1 で 54%、コホート 2 で 81% であった。処置後 9 か月目には、コホート 2 の平均血清 T T R 低下は 86% であった (図 19 A 及び 19 B)。12 か月目の平均 T T R 低下率は、コホート 2 では 89% に維持された (表 4)。

【0369】

多発神経障害コホート 3 及び 4
登録

コホート 3 については 6 名の対象をリクルートし、コホート 4 については 3 名の対象をリクルートした。対象は年齢 19 ~ 70 歳であり、9 名中 5 名の対象が男性であり、体重は 59 ~ 111 kg であった。3 名の対象が p . T 80 A 突然変異を有し、2 名が p . E 62 D 突然変異を有し、1 名が p . S 70 R 突然変異を有し、1 名が p . V 50 M 突然変異を有し、1 名が p . E 94 G 突然変異を有していた。7 名の対象は多発神経障害性能力障害スコア 1 を有し、2 名は多発神経障害性能力障害スコア 2 を有していた。7 名の対象は New York Heart Association 機能分類 I を有し、1 名は分類 II を有し、1 名は心不全の診断を有しなかった。N 末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド (NT - proBNP) は 50 ~ 544 ng / L の範囲であった (図 23 A 及び 23 B)。

【0370】

臨床試験設計及び適格性

本明細書に含まれるのは、2 部構成、国際共同、第 1 相、非盲検、多施設共同研究の第 1 部からのコホート 3 及び 4 の中間結果である。患者は、全 RNA / 体重で 1.0 mg /

10

20

30

40

50

kg (コホート3の患者6名)または0.7 mg/kg (コホート4の患者3名)の単一用量のNTLA-2001の静脈内投与によって処置された。登録及び適格性基準は、本明細書に記載されるとおりである。

【0371】

臨床試験安全性

カニクイザルにおける安全性研究により、無有害作用レベル (no-observed-adverse-effect level: NOAEL) は、ヒトにおける1 mg/kgの用量に相当する3 mg/kg 静脈内注入の単回投与と決定された。静脈内LNP注入の潜在的な炎症促進作用を軽減するために、注入前に患者にグルココルチコイドならびにヒスタミン受容体1型及び2型遮断薬を与えた。

10

【0372】

NTLA-2001処置は、注入を中断することなく完了した。処置下で発現した有害事象が9名の対象全員で報告された。有害事象の大多数は重篤度が軽度であった(図22)。全ての注入関連反応が臨床的続発症なく解消し、軽度とみなされた。潜在する胃不全麻痺を有する一患者で1.0 mg/kg用量において、関連ある嘔吐のグレード3事象(SAE)が1回報告された。臨床的に有意な検査所見は観察されず、一過性のグレード1の肝酵素上昇が観察された。プロトコルにより規定された停止事象は観察されなかった。

【0373】

肝機能(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼ)、凝固パラメータ(活性化部分プロトロンビン時間、プロトロンビン時間、フィブリノゲン)、及びdダイマー値を当技術分野で公知の方法によって評価した。結果は正常範囲内に留まった(図21)。

20

【0374】

図21Aはプロトロンビン時間を示し、図21Bは活性化部分プロトロンビン時間を示し、図21Cはフィブリノゲンを示し、図21Dはアラニンアミノトランスフェラーゼを示し、図21Eはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを示し、図21Fはdダイマー比を示す。データは、各コホートについての経時的な平均結果として示されている。ベースラインは、治験薬の注入開始前に得られた入手可能な最後の測定値と定義される。中央試験所から7日目までに得られた結果のみをプロットしている。

【0375】

ALTはアラニンアミノトランスフェラーゼを意味し、aPTTは活性化部分プロトロンビン時間を意味し、ASTはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを意味し、BLはベースラインを意味し、PTはプロトロンビン時間を意味する。処置下で発現した有害事象及び検査所見の評価のために患者をモニターした。ベースライン、ならびに1週目、2週目、及び4週目、ならびに2か月目に、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によるTTRタンパク質レベルの分析のために血清サンプルを得た。患者は、NTLA-2001注入から24か月にわたり、安全性及び治療活性結果について評価されている。

30

【0376】

臨床試験有効性

NTLA-2001の薬力学的効果を判定するために、複数の血清TTRレベルを評価した。標準物質として健康な対象のヒト血漿TTR(Sigma、P1742)を使用した定量的アッセイとしてサンドイッチELISA法を開発し、妥当性を確認した。

40

【0377】

簡潔に述べると、アッセイマイクロプレート(Nunc、446612)を、0.05 M炭酸塩コーティング緩衝液pH9.6中で1 µg/mlのポリクローナルウサギ抗ヒトプレアルブミン抗体(Dako、A0002)と共に一晩インキュベートした。プレートをTTR洗浄溶液(TTRWS: 0.05% Tween-20、1xダルベッコPBS)で4回洗浄し、1X Powerblock(Biogenix、HK085-5k)で1時間ブロッキングし、TTRWSで4回洗浄した。調製したプレートで、標準、コン

50

トロール、及び希釈した試験サンプルを約2時間インキュベートした。プレートをTTRWSで4回洗浄し、次いで、1X Power blockで1:2, 500に希釈したヒツジ抗ヒトプレアルブミン抗体 (Bio-Rad、AHP1837) と共に1時間インキュベートした。このプレートをTTRWSで4回洗浄し、次いで、1X Power blockで1:10, 000に希釈した抗ヒツジアルカリホスファターゼ共役抗体 (Sigma、A5187) と共に1時間インキュベートした。このプレートをTTRWSで4回洗浄した。SIGMAFAST (商標) p-ニトロフェニルホスフェータブレット (Sigma-Aldrich、N1891) を製造元の説明に従って使用して、プレートを現像した。現像試薬との30分間のインキュベーション後、2N水酸化ナトリウム溶液を使用して反応を停止させた。吸光度を分光光度法によって評価した。ヒト血漿TTR (Sigma、P1742) を使用してシグナル (OD) 対濃度の標準曲線を生成して、QC及び未知のサンプルを数量化した。

10

【0378】

コホート3の対象6名中3名及びコホート4の対象3名中1名について報告する中間結果

ベースラインからの血清TTRタンパク質濃度の低下が14日目までに観察され、28日目まで進行した。7日目には、コホート4の対象1名 (0.7 mg/kg; 図19Cの対象3) について、血清TTRの78%の低下が報告された。この対象の血清TTRは、14日目までに94%低下し、28日目までに97%低下した。7日目には、コホート3の対象3名が43~88%の範囲の低下を示した (対象1で43%、対象2で80%、対象3で88%)。14日目には、血清TTRのさらなる低下が観察された (対象1で80%、対象2で88%、対象3で97%)。28日目には、低下は88~98%の範囲であった (対象1で88%、対象2で88%、対象3で98%; 図19)。

20

【0379】

コホート3の対象6名中6名及びコホート4の対象3名中3名について報告する中間結果

血清TTRタンパク質濃度におけるベースラインからの低下が、7日目、14日目、28日目、56日目 (2か月目)、4か月目 (一部の対象)、6か月目 (一部の対象)、及び6か月目 (一部の対象) に観察された。この中間結果の時点で入手可能な各対象の値の全てが図19B~19Dに示されている。28日目の平均TTR低下率は、コホート3 (用量レベル1 mg/kg) で93%、コホート4 (用量レベル0.7 mg/kg) で86%であった。2か月目の平均TTR低下率は、コホート3で93%、コホート4で88%であった。図20に示すように、低下は2か月目に維持されていた。パーセンテージにおける低下は、コホート3 (1 mg/kg) 及びコホート4 (0.7 mg/kg) の各対象についての総循環血清トランスサイレチン (TTR) タンパク質におけるベースラインからの変化を表す。図19A~19Dに示した結果に対してさらに更新された血清TTR低下の情報を以下の表4に示す。6か月目の平均TTR低下率は、コホート3 (用量レベル1 mg/kg) の全対象で93%、コホート4 (用量レベル0.7 mg/kg) の全対象で87%であった。この更新時点では、コホート3の対象6名中3名に関する9か月目の平均TTR低下率は93%のままであった。ATTRタンパク質は、バイオマーカー法妥当性確認の規制ガイドラインに従った、妥当性確認済みの酵素結合免疫吸着アッセイ法によって数量化した。血清サンプルは、各サンプルを二連で試験して1回測定した。優良試験所規範に従い、アッセイ実行を成功させるために再検査は行わなかった。

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4. 多発神経障害の用量漸増研究のための更新された臨床試験対象データ

用量 mpk	患者	体重 (kg)	TTR 遺伝 子型	NT- proBNP ベース ライン (ng/L)	TTR (ug/mL)	時点	TTR 低下 率(%)
0.1	コホート 1 対象 1 (C1S1)	82.1	S77Y	89.0	149.94	7 日目	-19.00
					100.64	14 日目	-45.63
					80.58	28 日目	-56.47
					87.61	56 日目	-52.67
					97.7	4 か月目	-47.22
					99.3	6 か月目	-46.36
					86.36	9 か月目	-53.35
					105.66	12 か月目	-42.92
0.1	C1S2	70.4	T60A	596.0	208.23	7 日目	-16.34
					174.31	14 日目	-29.97
					132.54	28 日目	-46.75
					201.88	4 か月目	-18.89
					203.72	6 か月目	-18.15
					283.50	9 か月目	13.90
					198.51	12 か月目	-20.24
					236.53	18 か月目	-4.97
0.1	C1S3	89.1	T60A, T80A	127.0	234.60	7 日目	-14.12
					149.47	14 日目	-45.28
					130.28	28 日目	-52.30
					123.75	56 日目	-54.69
					153.35	4 か月目	-43.86
					184.25	6 か月目	-32.55
					142.57	9 か月目	-47.81
					150.61	12 か月目	-44.86
0.3	C2S1	83.3	S77Y	118.0	130.94	7 日目	-43.78
					61.95	14 日目	-73.40
					45.78	28 日目	-80.34
					56.26	56 日目	-75.84
					51.62	4 か月目	-77.84

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

用量 mpk	患者	体重 (kg)	TTR 遺伝 子型	NT- proBNP ベース ライン (ng/L)	TTR (ug/mL)	時点	TTR 低下 率(%)
					44.81	6 か月目	-80.76
					33.34	9 か月目	-85.69
					29.90	12 か月目	-87.16
0.3	C2S2	84.0	T60A	359.0	100.02	7 日目	-30.43
					30.57	14 日目	-78.74
					23.31	28 日目	-83.79
					33.47	56 日目	-76.72
					35.25	4 か月目	-75.48
					31.88	6 か月目	-77.83
					28.71	9 か月目	-80.03
					20.03	12 か月目	-86.07
0.3	C2S3	89.9	H90D	<50.0	84.08	7 日目	-71.98
					20.00	14 日目	-93.34
					12.81	28 日目	-95.73
					28.37	56 日目	-90.55
					25.61	4 か月目	-91.47
					17.87	6 か月目	-94.04
					21.97	9 か月目	-92.68
					21.34	12 か月目	-92.89
0.7	C4S1	62.4	E42D	58.0	120.35	7 日目	-21.34
					58.76	14 日目	-61.60
					51.72	28 日目	-66.19
					41.26	56 日目	-73.03
					48.44	4 か月目	-68.34
					46.19	6 か月目	-69.81
0.7	C4S2	97.6	E74G	<50.0	77.36	7 日目	-63.17
					22.40	14 日目	-89.34

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

用量 mpk	患者	体重 (kg)	TTR 遺伝 子型	NT- proBNP ベース ライン (ng/L)	TTR (ug/mL)	時点	TTR 低下 率(%)
					11.66	28 日目	-94.45
					10.94	56 日目	-94.79
					8.33	4 か月目	-96.03
					10.26	6 か月目	-95.12
0.7	C4S3	86.7	T60A	195.0	71.80	7 日目	-78.34
					18.39	14 日目	-94.45
					8.72	28 日目	-97.37
					15.93	56 日目	-95.20
					20.37	4 か月目	-93.86
					16.36	6 か月目	-95.07
					18.48	9 か月目	-94.43
1.0	C3S1	75.9	E42D	56.0	121.91	7 日目	-42.92
					43.08	14 日目	-79.83
					25.10	28 日目	-88.25
					該当な し	規定外来 院	-89.51
					24.34	4 か月目	-88.60
					25.30	6 か月目	-88.16
					34.48	9 か月目	-83.86
1.0	C3S2	74.6	E62D	140.0	65.55	7 日目	-69.24
					22.43	14 日目	-89.47
					12.54	28 日目	-94.11
					11.75	56 日目	-94.48
					12.10	4 か月目	-94.32
					10.43	6 か月目	-95.11
1.0	C3S3	111.0	T80A	<50.0	36.70	7 日目	-76.51
					8.49	14 日目	-94.56
					6.33	28 日目	-95.95
					6.74	56 日目	-95.69
					5.98	4 か月目	-96.17
					7.99	6 か月目	-94.88
1.0	C3S4	59.1	V30M	193.0	64.14	7 日目	-77.97

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

用量 mpk	患者	体重 (kg)	TTR 遺伝 子型	NT- proBNP ベース ライン (ng/L)	TTR (ug/mL)	時点	TTR 低下 率(%)
					16.07	14 日目	-94.48
					9.72	28 日目	-96.66
					10.07	56 日目	-96.54
					11.34	4 か月目	-96.11
					9.97	6 か月目	-96.58
1.0	C3S5	69.2	S50R	544.0	43.01	7 日目	-79.84
					26.61	14 日目	-87.53
					26.74	28 日目	-87.47
					42.54	56 日目	-80.06
					21.70	4 か月目	-89.83
					35.50	6 か月目	-83.36
					8.94	9 か月目	-95.81
1.0	C3S6	88.6	T60A	84.0	44.95	7 日目	-87.13
					11.39	14 日目	-96.74
					8.26	28 日目	-97.64
					4.10	56 日目	-98.83
					4.75	4 か月目	-98.64
					4.30	6 か月目	-98.77
					4.65	9 か月目	98.67

10

20

30

【0380】

B. 多発神経障害の 80 mg 一定用量研究

この更新時点で、1名の対象を 80 mg 一定用量研究にリクルートした。この対象は 36 歳の男性であった。臨床試験設計及び適格性は、対象を全 RNA (ガイド RNA とメッセンジャー RNA) 80 mg の一定用量における NTLA-2001 の単一用量で処置したことを除いては、多発神経障害研究について本明細書に記載されるとおりである。

40

【0381】

NTLA-2001 の薬力学的効果を判定するために、血清 TTR レベルを評価した。本明細書に記載されるように、標準物質として健康な対象のヒト血漿 TTR (Sigma、P1742) を使用した定量的アッセイとしてサンドイッチ ELISA 法を開発し、妥当性を確認した。血清 TTR タンパク質濃度におけるベースラインからの低下が 7 日目までに観察された。7 日目に、対象は、血清 TTR の 58% の低下を報告した (絶対 TTR 濃度 139 ug/ml)。

【0382】

C. 心筋症の用量漸増研究

50

登録コホート1 a 及び 2 a

コホート1 a 及びコホート2 a のリクルートメントは現在進行中である。本明細書では、TTR 低下データが入手可能であるコホート1 a 及び2 a における対象のリクルートメント情報を提供する。コホート1 a 対象は3名がリクルートされ、これらの対象は71~75歳であり、3名の対象全員が男性であり、体重範囲は63~88kgであった。コホート1 a については、対象3名中2名が野生型TTRを有し、対象2名がNew York Heart Association (NYHA) 機能分類IIを有し、対象1名がNYHA 機能分類Iを有していた。NT-proBNPベースラインレベルは2103 pmol/L~3637 pmol/Lの範囲であった。コホート2 a 対象は1名がリクルートされ、この患者は、体重71kgの75歳男性であった。コホート2 a の対象は、野生型TTR、及びNYHA 機能分類IIIを有していた。

10

【0383】

臨床試験設計及び適格性

本明細書に含まれるのは、2部構成、国際共同、第1相、非盲検、多施設共同研究の第1部からのコホート1 a 及び2 a における現在進行中の研究の中間結果である。対象は、全RNA/体重で0.7mg/kg (コホート1 a の対象3名) または0.7mg/kg (コホート2 a の対象1名) の単一用量のNTLA-2001の静脈内投与によって処置された。登録及び適格性基準は、本明細書に記載されるとおりである。

【0384】

NTLA-2001の薬力学的効果を判定するために、複数の血清TTRレベルを評価した。本明細書に記載されるように、標準物質として健康な対象のヒト血漿TTR (Sigma、P1742) を使用した定量的アッセイとしてサンドイッチELISA法を開発し、妥当性を確認した。血清TTRタンパク質濃度におけるベースラインからの低下が、以下の表5にまとめるように観察された。

20

【表5】

表5. 心筋症の用量漸増研究のための臨床試験対象データ

用量 mpk	患者	体重 (kg)	TTR 遺伝子型	NT-proBNP ベースライン (pmol/L)	TTR (ug/ml)	時点	TTR 低下率(%)
0.7	コホート 1a 対象 1 (C1aS1)	85	該当なし	3637	115.37	7日目	-57.93
					37.94	14日目	-86.16
0.7	C1aS2	63	野生型	2103	73.09	7日目	-59.15
					18.83	14日目	-89.48
0.7	C1aS3	88	野生型	2480	86.96	7日目	-70.71
					23.76	14日目	-92.00
					16.32	28日目	-94.50
0.7	C2aS1	71	野生型	16690	127.89	7日目	-50.04
					43.22	14日目	-83.12
					17.90	28日目	-93.01

30

40

【0385】

実施例 9. 追加の臨床アッセイ

50

生物分析法及び臨床薬理

N T L A - 2 0 0 1 の 4 成分、すなわちイオン化可能リポド A (別称 L P 0 1)、D M G - P E G 2 k 脂質、ガイド RNA、及び mRNA を数量化するために、血漿薬物動態法を開発し、妥当性を確認した。リポド A 及び D M G - P E G 2 k は、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (L C - M S / M S) 法によって数量化する。アッセイシグナル [内部標準 (I S、同位体標識された標準物質を使用) に対する標準物質の曲線下面積の比] 対濃度応答の標準曲線を使用する。Q C 及び未知のサンプルシグナルを標準曲線から補間して血漿濃度を決定する。ガイド RNA 及び mRNA の両方を、q R T - P C R によって数量化する。シグナルサイクル閾値 (C t) 対濃度の標準曲線を使用する。Q C 及び未知のサンプルを標準曲線から補間して血漿濃度を数量化した。リポド A 及び D M G - P E G 2 k について、排出の特性解析を行うために、尿 P K 法を開発し、妥当性を確認した。

10

【 0 3 8 6 】

N T L A - 2 0 0 1 に対する抗薬物抗体 (A D A) 及び抗 C a s 9 タンパク質 (C a s 9 m R N A 導入遺伝子産物) 抗体を評価するために、免疫原性法を開発し、妥当性を確認した。両方法でサンドイッチ形式の M e s o S c a l e D i s c o v e r y E l e c t r o c h e m i l u m i n e s c e n c e (M S D - E C L) アッセイを使用し、N T L A - 2 0 0 1 L N P または C a s 9 タンパク質を捕捉抗原としてコーティングした。薬物または C a s 9 タンパク質に対する固定化された抗体を抗ヒト I g M / I g G - スルホタグ検出抗体により検出した。サンプル分析は、抗体応答のスクリーニング、確認、及び力価測定のための規制ガイドラインに従ったカットポイントを使用した階層別分析として計画される。確認のためのアッセイは、カットポイントに基づく薬物または C a s 9 タンパク質の競合的阻害に基づく。確認された陽性サンプルをエンドポイント力価について試験する。

20

【 0 3 8 7 】

追加の薬力学的方法には、一次 P D としての E L I S A による血清 T T R、及び二次 P D としての L C - M S / M S、ならびに患者管理及び P D のためのプレアルブミンインビトロ診断法 (I V D) が含まれた。標準物質として健康な対象のヒト血漿 T T R を使用した定量的アッセイとしてサンドイッチ E L I S A 法を開発し、妥当性を確認した。ポリクローナル抗体は、捕捉抗体及び検出抗体の両方として使用される。シグナル (O D) 対濃度の標準曲線を生成して、Q C 及び未知のサンプルを数量化する。V 3 0 M 突然変異型及び対応する野生型 V 3 0 V、ならびに N H P データをブリッジングするための N H P L C - M S / M S ペプチド位置と同様の上流の第 3 のペプチドを含む、T T R を数量化するための 3 つのサロゲートペプチドを使用して、L C - M S / M S 法を開発し、妥当性を確認した。シグナル (各ペプチドについての標準物質 / 同位体標識 I S の比) 対濃度応答を標準曲線として使用して、Q C 及び未知のサンプルを補間して、血清濃度を決定した。プレアルブミン法は、I V D 法としての比濁原理に基づいており、T T R に対するポリクローナル抗血清を添加することで免疫複合体が生成されると、T T R の存在により混濁が生じる。探索の目的で、サンドイッチ E L I S A によるレチノイド結合タンパク質 (R B P) を含む追加の P D バイオマーカーアッセイを開発し、妥当性を確認した。Q u a n t e r i x S i m o a プラットフォームに基づく適格性評価済みの方法を使用して、探索的 P D バイオマーカーとしての循環ニューロフィラメント軽鎖 (N f L) を数量化した。このバイオマーカーは A T T R - P N 特異的である。

30

40

【 0 3 8 8 】

N T L A - 2 0 0 1 注入後のサイトカイン応答を評価するために、L u m i n e x によるマルチプレックスサイトカイン (G M - C S F、I F N g、I L - 1 b、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 8、I L - 1 0、I L - 1 2 (p 7 0)、I L - 1 3、I L - 1 7 A、I L - 2 3、T N F a) 及び E L I S A による M C P - 1 を開発し、妥当性を確認した。補体活性化を評価するために、E L I S A による補体成分 C 3 a、C 5 a、及び B b 法を開発し、妥当性を確認した。

50

【0389】

予備的な血漿PKデータが、NTLA-2001の4成分（イオン化可能リピドA、DMG-PEG2k脂質、ガイドRNA、及びmRNA）について利用可能である。0.1～1.0mg/kgの用量におけるNTLA-2001の単回IV注入後、LP01は、ピークレベルからの急速な低下を呈し、その後、二次ピーク、そしてこの用量範囲にわたって19.74(16.57)から24.81(23.55)(時間)の範囲の平均(%CV)終末相 $t_{1/2}$ によって特徴付けられる対数線形相が続いた。図24。他の成分に関するデータは示されていない。

【0390】

実施例10。曝露応答(ER)分析

NTLA-2001について、28日目のTTR(%ベースライン)を使用して、式1に従ってS字形関係を仮定し、R4.0.5(The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)による非線形最小二乗を使用することにより、中間ERモデルを開発した。

【数1】

$$TTR(\% \text{ベースライン}) = 100 - E_{max} \cdot \frac{EC_{50}^Y}{EC_{50}^Y + AUC^Y} + \varepsilon \quad \text{式1}$$

式中、 ε は、Hill係数であり、 E_{max} は、D28 TTR(%ベースライン)における最大の低下であり、 EC_{50} は、D28 TTR(%ベースライン)に対する半値効果に対応するNTLA-2001曝露であり、 AUC^Y は、平均0及び分散 σ^2 で正規分布している。平均予測に対するブートストラップ(用量群によって層別化、 $n=1000$)の信頼区間(CI)を生成した。ブートストラップ推定値($n=1000$)及び σ^2 からシミュレーションによって予測区間(PI)を生成した。

【0391】

モデルの当てはめは、NTLA-2001についての飽和ER関係を示す図25に示されている。

【0392】

実施例11。母集団薬物動態(POPPK)

NTLA-2001分析物LP01について、公開されているモデルに基づき、NONMEMソフトウェア(バージョン7.5.0、ICON Clinical Research LLC, Blue Bell, PA)を使用して、中間POPPKモデルを開発した。この分析では、15名のATTRv-PN対象において290の観察があった。このモデルについてのパラメータ値及び当てはめの良さ(goodness of fit)のプロットを求めた(図示せず)。モデル化された直線関係と共に、体重と推定消失クリアランスとの間の関係を決定した。この関係は比例関係を満たさず、すなわち、体重の倍加は、クリアランスにおける2倍未満の変化につながる。

【0393】

図26は、1mg/kg(左パネル)及び80mg(右パネル)のNTLA-2001の投与後の体重四分位別のシミュレートされたAUCの分布を提供する。体重の中央値[5%、95%]が81[48、146]kgである10000の仮想の対象において実施されたPOPPKシミュレーションは、体重四分位間で1mg/kgのNTLA-2001後のLP01 AUCが大きく重なるが、体重と共に曝露中央値が増加する僅かな傾向があることを示唆している。同様に、80mgのNTLA-2001の後にも、体重四分位間でシミュレートされたLP01 AUCが重なる。固定重量ベースの投与後のNTLA-2001 AUC推定値の幾何平均ならびに個々の比(GMR)の5パーセンタイル及び95パーセンタイルの範囲は、0.98[0.74、1.28]である。第4の体重

10

20

30

40

50

四分位（[90 . 3 ~ 1 4 6] k g）の、第 1 の体重四分位（[4 8 ~ 7 1 . 7] k g）に対する、シミュレートされた平均曝露の比は、1 m g / k g の N T L A - 2 0 0 1 については 1 . 2 5 であり、8 0 m g の N T L A - 2 0 0 1 については 0 . 8 1 である。シミュレーションにより、N T L A - 2 0 0 1 8 0 m g が 1 . 0 m g / k g に相当する固定用量として特定された。

【 0 3 9 4 】

配列表

以下の配列表は、本明細書で開示される配列の一覧を提供する。D N A 配列（T を含む）が R N A に関して言及される場合、T は、U（内容に応じて修飾されていても修飾されていなくてもよい）で置き換えられるべきであり、逆もまた同様であると理解される。

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

配列番号	説明	配列
1	Sp. Cas9 をコードする ORF	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAG CGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCA AGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAG AAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGC AGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACA AGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAA CGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAG AAAGCTTCTGGTGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCG ATCTTCGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGA CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT CAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGA CAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATA CAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGA CTGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACTGTTTCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCT GAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCAC AGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAAC CTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACA GAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATA CGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCA GACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAG AGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCA GGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGA CGAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGC TGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAG ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGA CTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGAT CCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGG AAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAA TCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGGAGCAAGC GCACAGAGCTTCATCGAAAAGAATGACAAAACCTTCGACAAGAACC GCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAT ACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAG AAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAG GCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAAGGTCACAGTC AAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGA CAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCC TGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGAC TTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGT CCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAA</p>

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

配列番号	説明	配列
		GACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGC AGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGA AAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCAT GCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCA GAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACA TCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTG CAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAG ACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAATGAA GAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGA AGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTG TACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAG GAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATC GTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTC CTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAAGAGCGACAACGTCCC GAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGC TGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTG ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAG GATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAG CACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGA CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGA AGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACA AGGTCAGAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACACGACGCATAC CTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAA GCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGT CAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAA CAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGA CAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTG ATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGG AAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGG TCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGC AAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGC AAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACA GCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAA AGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGA ATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGA CTTCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAA GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGA ACTGCAGAAGGGAAAC GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCA AGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACA GAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

配列番号	説明	配列
		CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAG ACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGA GACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTT CACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGA CACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCC TGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAA ACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAG CCCGAAGAAGAAGAGAAAAGGTCTAG
2	Sp. Cas9 をコードする ORF	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGACATCGGCCACCAACTCC GTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAG AAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAA GAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACTCCGGCGAGACCGCCGA GGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGC GGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGA TGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTT TCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTC GGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGC CGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTT CCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTC CGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCA GCTGTTTCGAGGAGAACCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAA GGCCATCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAA CCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGG CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGTCC AACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGAC ACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGAC CAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCAAGAACCTGTCCGACGCC ATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAG GCCCCCTGTCCGCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAC CAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCAGGAGGAGTCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTAC GCCGGTACATCGACGGCGGCGCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAG TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTG CTGGTGAAGCTGAACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGAC CTTGACAACGGCTCCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCT GCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGACTTCTACCCCTTCTGAA GGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCC CCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGCAACTCCCGGTTTCGCT GGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATACCCCTGGAACCTTCG AGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCAGTCTTCATCGAGC GGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG CCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAG

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

配列番号	説明	配列
		CTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGC CTTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTT CAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACT ACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCG TGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGC TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTCGAG GACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCACCT GTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACA CCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGG ACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACG GCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCC TGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAG GCGGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCC GCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGA GCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGA TCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAG AACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGA GCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCA GCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCG GGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGA CTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCTTCCTGAAGGACGA CTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGG GCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATG AAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAG CGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTC CGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGA CCCGGCAGATACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACTCCCGGA TGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTG AAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAG GACTTCCAGTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAC GCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATC AAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTAC AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGA GATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCAT GAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCG GAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCG TGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCAGGAAGGTGCTGT CCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACC GGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCAAGCGGAACCTCCGAC AAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGG CGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCC AAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGA

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

配列番号	説明	配列	
		<p>GCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCCTTCGAGAAGAA CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGG AGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAG AAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCCTG TACCTGGCCTCCCCTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGAC AACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCT GGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGAT CCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCTACAACAA GCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCC ACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGT ACTTCGACACCACATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGCCTGT ACGAGACCCGGATCGACCTGTCCAGCTGGGCGGGCAGCGCGGC GGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA</p>	10
3	Sp. Cas9 をコードする ORF	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCGGCACGAACA GCGUUGGCUGGGCUGUGAUCACGGACGAGUACAAGGUUCCUC AAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACGGACCGGCACAGCAUC AAGAAGAAUCUCAUCGGUGCACUGCUGUUCGACAGCGGUGAGA CGGCCGAAGCCACGCGGCUGAAGCGGACGGCCCCGCCGGCGGUAC ACGCGGCGGAAGAACCAGUUCUACCUGCAGGAGAUUCUUA GCAACGAGAUUGGCAAGGUGGACGACAGCUUCUUCACCGGCUG GAGGAGAGCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGC ACCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAAGUCGCCUACCACGAG AAGUACCCACCAUCUACCACCGGCGGAAGAAGCUGGUGGACUC GACUGACAAGGCCGACCGGCGGUGAUCUACCUGGCACUGGCC ACAUGAUAAAGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACCU GAACCCUGACAACAGCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGG UGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCAUCAACGCC AGCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUCAGCGCCCGCCUCAGCAA GAGCCGGCGGCGUGGAGAAUCUCAUCGCCAGCUUCCAGGUGAGA AGAAGAAUGGGCUGUUCGGCAAUCUCAUCGCACUCAGCCUGGG CCUGACUCCCAACUUAAGAGCAACUUCGACCGGCGGAGGACG CCAAGCUGCAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCGGAC AAUCUCCUGGCCAGAUCCGGCGACCAGUACGCCGACCGUUCU GGCUGCCAAGAAUCUCAGCGACGCCAUCCUGCUCAGCGACAUC UGCGGGUGAACACAGAGAUACGAAGGCCCCCUACGCGCCAGC AUGAUAAAGCGGUACGACGAGCACCACAGGACCGACCGCUGCU GAAGGCACUGGUGCGGACGAGCUUCCAGAGAAGUACAAGGAG AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAUGGGUACGCCGGGUACAUCG ACGGUGGUGCCAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCC CAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACAGAGGAGCUGCUGGUGAAG CUGAACAGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACGUUCGACA</p>	20
			30
			40

【表 6 - 6】

配列 番号	説明	配列
		AUGGGAGCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGUGAGCUGCACGCC AUCCUGCGGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCUUCUGAAGGACAA CAGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCUGACGUUCCGGAUCCCUAC UACGUUGGCCCCUGGCCCGCGGCAACAGCCGGUUCGCCUGGAU GACGCGGAAGAGCGAGGAGACGAUCACUCCUGGAACUUCGAG GAAGUCGUGGACAAGGGUGCCAGCGCCCAGAGCUUCAUCGAGC GGAUGACGAACUUCGACAAGAAUCUCCAACGAGAAGGUGCU UCCAAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACGGUGUACAACG AGCUGACGAAGGUGAAGUACGUGACAGAGGGCAUGCAGGAGCC CGCCUUCUCAGCGGUGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGC UGUUCAAGACGAACCGGAAGGUGACGGUGAAGCAGCUGAAGGA GGACUACUUAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAUC AGCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCAGCCUGGGCACCUACCA CGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAGGAGAACGAGGACAUCUGGAGGACAUCGUGCUGACGCUGA CGCUGUUCGAGGACAGGGAGAUGAUAGAGGAGCGGCUGAAGAC CUACGCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGC GCGGCGGUACACGGGCUUGGGGCCGUCAGCCGGAAGCUGAUC AAUGGGAUCCGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACGAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUAUGCAGCUG AUCCACGACGACAGCCUGACGUUCAAGGAGGACAUCAGAAAGC CCAGGUCAGCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAGCACAUCGCCA AUCUCGCCGGGAGCCCCGCCAUCAAGAAGGGGAUCCUGCAGACG GUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACA AGCCAGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCAGGGAGAACCAGAC GACUCAAAAGGGGCAGAAGAACAGCAGGGAGCGGAUGAAGCGG AUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAGG AGCACCCCGUGGAGAACACUCAACUGCAGAACCAGAAGCUGUAC CUGUACUACCUGCAGAAUGGGCGAGACAUGUACGUGGACCAGG AGCUGGACAUCAACCGGCUCAGCGACUACGACGUGGACCACAUC GUUCCCCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGU GCUGACGCGGAGCGACAAGAACCAGGGCAAGAGCGACAACGUU CCCUCAGAGGAAGUCGUGAAGAAGAUAGAACAUCUGGCGGC AGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACUCAACGGAAGUUCGACAA UCUCACGAAGGCCGAGCGGGGUGGCCUCAGCGAGCUGGACAAG GCCGGGUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACGCGGCAGAUCA CGAAGCACGUGGCCAGAUCCUGGACAGCCGGAUGAACACGAAG UACGACGAGAACGACAAGCUGAUCAGGGAAGUCAAGGUGAUC CGCUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCGGAAGGACUCCA GUUCUACAAGGUGAGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCACG ACGCCUACCUGAACGCUGUGGUUGGCACGGCACUGAUCAGAA GUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAG GUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUAGCCAAGAGCGAGCAGGAGA

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

配列番号	説明	配列
		UCGGCAAGGCCACGGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUG AACUUCUUCAAGACAGAGAUACACGUCGGCCAAUGGUGAGAUC GGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACGAAUGGUGAGACGGGUGAGAU CGUGUGGGACAAGGGGCGAGACUUCGCCACGGUGCGGAAGGUG CUCAGCAUGCCCCAGGUGAACAUUCGUGAAGAAGACAGAAGUCC AGACGGGUGGCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUCCAAAGCGGAA CAGCGACAAGCUGAUCGCCCCGCAAGAAGGACUGGGACCCCAAGA AGUACGGUGGCUUCGACAGCCCCACCGUGGCUACAGCGUGCUG GUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGGAAGAGCAAGAAGCUGAAGA GCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACGAUCAUGGAGCGGAGCAG CUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUCCUGGAAGCCAAGGGGUACA AGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUCCAAAGUACAG CCUGUUCGAGCUGGAGAAUGGGCGGAAGCGGAUGCUGGCCAGC GCCGGUGAGCUGCAGAAGGGGAACGAGCUGGCACUUCCUCUAA AGUACGUGAACUUCUGUACCUUGGCCAGCCACUACGAGAAGCUG AAGGGGAGCCCAGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGG AGCAGCACAAAGCACUACCUUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACAG GAGUUCAGCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAAUCUCGACAA GGUGCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGAGACAAGCCCAUCAGGG AGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACGCUGACGAAUCUC GGUGCCCCCGCUGCCUUAAGUACUUCGACACGACGAUCGACCCG GAAGCGGUACACGUCGACUAAGGAAGUCCUGGACGCCACGCUG AUCCACCAGAGCAUCACGGGCCUGUACGAGACGCGGAUCGACCU CAGCCAGCUGGGUGGCGACGGUGGUGGCAGCCCCAAGAAGAAG CGGAAGGUGUAG
4	Sp. Cas9 をコードする ORF	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUCGACAUCGGCACCAACAG CGUCGGCUGGGCCGUAUCACCGACGAGUACAAGGUCCCCAGCA AGAAGUUCAAGGUCCUCGGCAACACCGACCGCCACAGCAUCAAG AAGAACCUCAUCGGCGCCUCCUCUUCGACAGCGGGGAGACCCG CGAGGCCACCCGCCUCAAGCGCACCGCCCCGCCGCCUACACCC GCCGCAAGAACCGAUCUGCUACCUCCAGGAGAUUCUACGCAAC GAGAUGGCCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUCGAGGA GAGCUUCCUCGUCGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGCCACCCCA UCUUCGGCAACAUCGUCGACGAGGUCGCCUACCACGAGAAGUAC CCCACCAUCUACCACCUCCGCAAGAAGCUCGUCGACAGCACCGA CAAGGCCGACCUCGCCUCAUCUACCUCGCCUCGCCACAUGA UCAAGUCCGCGGCCACUUCUCAUCGAGGGCGACCUCAACCCC GACAACAGCGACGUCGACAAGCUUCUUCUCCAGCUCGUCCAGAC CUACAACCAGCUCUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCAGCGGGC UCGACGCCAAGGCCAUCCUCAGCGCCCCGCCUCAGCAAGAGCCGC CGCCUCGAGAACCUCAUCGCCCAGCUCGCCGCGAGAAGAAGAA CGGCCUCUUCGGCAACCUCAUCGCCUCAGCCUCGGCCUCACCC CCAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUCGCCGAGGACGCCAAGCUC

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

配列番号	説明	配列
		CAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUCGACAACCUCCU CGCCAGAU CGGGCACCAGUACGCCGACCUCU UCCUCGCCGCCA AGAACCU CAGCGACGCCAUCCUCCUCAGCGACA UCCUCCGCGUC AACACCGAGAUACCAAGGCCCCCU CAGCGCCAGCAUGAUCAA GCGCUACGACGAGCACCACCAGGACCUCACCCUCCUCAAGGCC UCGUCCGCCAGCAGCUCCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUC GACCAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGGCGC CAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUCGAGA AGAUGGACGGCACCGAGGAGCUCCUCGUCAAGCUCAACCGCGAG GACCUCUCCGCAAGCAGCGCACCUUCGACAACGGCAGCAUCCC CCACCAGAUCCACCUCGGCGAGCUCCACGCCAUCCUCCGCCGCC AGGAGGACUUCUACCCUUCUACAAGGACAACCGCGAGAAGAUC GAGAAGAUCCUACCUUCCGCAUCCCUACUACGUCGGCCCCCU CGCCCGGGCAACAGCCGCUUCGCCUGGAUGACCCGCAAGAGCG AGGAGACCAUACCCCUUGGAACUUCGAGGAGGUCGUCGACAAG GCGGCCAGCGCCAGAGCUUCAUCGAGCGCAUGACCAACUUCGA CAAGAACCUCCCAACGAGAAGGUCCUCCCAAGCACAGCCUCC UCUACGAGUACUUCACCGUCUACAACGAGCUCACCAAGGUCAAG UACGUCACCGAGGGCAUGCGCAAGCCCGCCUUCUUCAGCGGGCA GCAGAAGAAGGCCAUUCGUCGACCUCUUCUUAAGACCAACCGCA AGGUCACCGUCAAGCAGCUCUAAAGGAGGACUACUUAAGAAGAU CGAGUGCUUCGACAGCGUCGAGAUACGCGGGUCGAGGACCGCU UCAACGCCAGCCUCGGCACCUACCACGACCUCUCAAGAUCAUC AAGGACAAGGACUUCUCGACAACGAGGAGAACGAGGACAUC UCGAGGACAUCGUCCUACCCUACCCUCUUCGAGGACCGCGAG AUGAUCGAGGAGCGCCUCAAGACCUACGCCACCUCUUCGACGA CAAGGUCAUGAAGCAGCUCUAAAGCGCCGCCUACACCGGCGGG GCCGCCUCAGCCGCAAGCUCUACAACGGCAUCCGCGACAAGCG AGCGCAAGACCAUCCUCGACUUCUCAAGAGCGACGGCUUCGC CAACCGCAACUUAUGCAGCUCUACACGACGACAGCCUACCU UCAAGGAGGACAUCAGAAAGGCCAGGUCAGCGGCCAGGGCGAC AGCCUCCACGAGCACAUCCGAACCUCCGCCGAGCCCCGCCAU CAAGAAGGGCAUCCUCCAGACCGUCAAGGUCGUCGACGAGCUCG UCAAGGUCAUGGGCCGCCACAAGCCGAGAACAUUCGUAUCGAG AUGGCCCGGAGAAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAG CCGCGAGCGCAUGAAGCGCAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUC GGCAGCCAGAUCCUCAAGGAGCACCCCGUCGAGAACACCCAGCU CCAGAACGAGAAGCUCUACCUCUACUACCUCCAGAACGGCCGCG ACAUGUACGUCGACCAGGAGCUCGACAUCAACCGCCUCAGCGAC UACGACGUCGACCACAUCGUCCCCAGAGCUUCCUCAAGGACGA CAGCAUCGACAACAAGGUCCUACCCGCGAGCGACAAGAACCGCG GCAAGAGCGACAACGUCCCCAGCGAGGAGGUCGUAAGAAGAU GAAGAACUACUGGGGCCAGCUCCUCAACGCCAAGCUCAUACCC

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

配列番号	説明	配列
		AGCGCAAGUUCGACAACCUCACCAAGGCCGAGCGCGGCCGCCUC AGCGAGCUCGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGCCAGCUCGUCGA GACCCGCCAGAUACCAAGCAGUCGCCCAGAUCCUCGACAGCC GCAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUCAUCCGCGAG GUCAAGGUCAUACCCUCAAGAGCAAGCUCGUCAGCGACUCCG CAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCCGCGAGAUAACAACUACC ACCACGCCACGACCCUACCUCACGCCGUCGUCGGCACCGCC CUCAUCAAGAAGUACCCCAAGCUCGAGAGCGAGUUCGUCUACGG CGACUACAAGGUCUACGACGUCCGCAAGAUGAUCGCCAAGAGCG AGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACAGC ACAUCAUGAACUUCUUAAGACCGAGAUCACCCUCGCCAACGG CGAGAUCGCAAGCGCCCCUCAUCGAGACCAACGGCGAGACCG GCGAGAUCGUCUGGGACAAGGGCCGCGACUUCGCCACCGUCCGC AAGGUCCUCAGCAUGCCCCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACCGA GGUCCAGACCGGCCGGCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUCCCCAAGC GCAACAGCGACAAGCUCAUCGCCCGCAAGAAGGACUGGGACCCC AAGAAGUACGGCGGCUUCGACAGCCCCACCGUCGCCUACAGCGU CCUCGUCGUCGCCAAGGUCGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCUC AAGAGCGUCAAGGAGCUCCUCGGCAUCACCAUCAUGGAGCGCAG CAGCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCUCCGAGGCCAAGGGCU ACAAGGAGGUCAAGAAGGACCUCAUCAUAAGCUCCCCAAGUAC AGCCUCUUCGAGCUCGAGAACGGCCGCAAGCGCAUGCUCGCCAG CGCCGGCGAGCUCCAGAAGGGCAACGAGCUCGCCUCCCCAGCA AGUACGUCAACUCCUCUACCUCGCCAGCCACUACGAGAAGCUC AAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUCUUCGUCGA GCAGCACAAGCACUACCUCGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCG AGUUCAGCAAGCGGCUAUCUCCUCGCCGACGCCAACCUCGCAAG GUCCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGCGACAAGCCCAUCCGCGA GCAGGCCGAGAACAUAUCCACCUCUACCCUCACCAACCUCG GCGCCCCCGCCGCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGC AAGCGCUACACCAGCACCAAGGAGGUCCUCGACGCCACCCUCAU CCACCAGAGCAUACCCGCCUCUACGAGACCCGCAUCGACCUCA GCCAGCUCGGCGGGCAGGGCGGCGCAGCCCCAAGAAGAAGCGC AAGGUCUAG
5	Sp. Cas9 をコードする ORF	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAG CGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCA AGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAG AAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCC GAGGCCACCCGGTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCG GCGGAAGAACC GGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGA GATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGA GCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATC TTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 0】

配列番号	説明	配列
		ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAA GGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAA GTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAA CAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAA CCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGC CAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGG AGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCCTG TTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTC AAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAG CAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGAT CGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCCTGGCCGCCAAGAACCTGAG CGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGAT CACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACG AGCACCACCAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGC AGCTGCCCAGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAG AACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGA GTTCTACAAGTTCATCAAGCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCAC CGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGA AGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACC TGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACC CCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCT TCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCC GGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCT GGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAG AAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCG GAAGCCCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGG ACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGA AGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAG ATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTAC CACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAAC GAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGAC CCTGTTTCGAGGACCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCT ACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAA CGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCT GAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCA CGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGG TGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTG GCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAA GGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCG AGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAACCAGACCACCCAG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

配列番号	説明	配列
		AAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG AGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGACCCC GTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTAC CTGCAGAACCGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACAT CAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAG CTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGA GCGACAAGAACCGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAG GTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGCAGCTGCTGAACGC CAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCG AGCGGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAG CGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAGCACGTGGCCCA GATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTG GTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAG ATCAACAATAACCACCGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTG GTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGA GTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGAT CGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCT GGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGACTTCGCC ACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAA GAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCC TGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGAC TGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGCC TACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAA GAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGG AGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCATCGACTTCCTGGAGGCCA AGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCC AAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCT GGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGC CCAGCAAGTACGTGAACTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGA AGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTC GTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGAT CAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGA CAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCC GGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACC TGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACC GGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTG ATCCACCAGAGCATCACCGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTG AGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCG GAAGGTGTGA

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 2】

配列番号	説明	配列
6	Sp. Cas9 ニッカーゼをコードする ORF	<p>ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCC GTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAG AAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAA GAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTGACTCCGGCGAGACCGCCGA GGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGC GGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGA TGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCT TCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTC GGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCAC CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGC CGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTT CCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTC CGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCA GCTGTTGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAA GGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAA CCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCCG CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGTCC AATTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGAC ACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGAC CAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCC ATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATACCAAG GCCCCCTGTCCGCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAC CAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGCAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTAC GCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAG TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTG CTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGAC CTTCGACAACGGCTCCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCT GCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAA GGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTCCGGATCC CCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGCAACTCCCGGTTCCGCT GGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATACCCCTGGAACCTTCG AGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCAGTCTTCATCGAGC GGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTG CCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTACCCTGTACAACGAG CTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGC CTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTT CAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACT ACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCG TGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGC TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAAC GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTCGAG GACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCACCT</p>

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 3】

配列 番号	説明	配列
		GTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACA CCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGG ACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACG GCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCC TGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAG GCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCC GCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGA GCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGA TCGAGATGGCCCGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAG AACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGA GCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGACCCCGTGGAGAACACCCA GCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCG GGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGA CTACGACGTGGACCACATCGTGCCCAAGTCCCTTCCTGAAGGACGA CTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACC GGAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATG AAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAG CGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTC CGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGA CCCGGCAGATACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACTCCCGGA TGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTG AAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAG GACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACC GCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATC AAGAAGTACCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTAC AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGA GATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCAT GAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCG GAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCG TGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGT CCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACC GCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCAAGCGGAACTCCGAC AAGTGATCGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGG CGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCC AAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGA GCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTCCTTCGAGAAGAA CCCATCGACTTCTGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACTCCCTGTTGAGCTGG AGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAG AAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCTG TACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGAC AACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCT GGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTAT

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 4】

配列番号	説明	配列
		CCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCCTACAACAA GCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCC ACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGT ACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGT ACGAGACCCGGATCGACCTGTCCAGCTGGGGCGGCGACGGCGGC GGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
7	Sp. Cas9 ニッカーゼをコードする ORF	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAG CGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCA AGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAG AAGAACCTGATCGGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCC GAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCG GCGGAAGAACC GGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGA GATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGA GCTTCTGTTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATC TTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAA GGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAA GTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAA CAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAA CCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGC CAAGGCCATCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGG AGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTG TTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTC AAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAG CAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGAT CGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAG CGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGAT CACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACG AGCACCACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGC AGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAG AACGGCTACGCCGGTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGA GTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCAC CGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGA AGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACC TGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCGAGGAGACTTCTACC CCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCT TCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGCAACAGCC GGTTTCGCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCT GGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAG AAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCGTG TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 5】

配列番号	説明	配列
		GAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGG ACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGA AGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAG ATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTAC CACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAC GAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGAC CCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCT ACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAA CGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCT GAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCA CGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGG TGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTG GCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAA GGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCG AGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAG AAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG AGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCC GTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTAC CTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACAT CAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAG CTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGA GCGACAAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAG GTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCCGGCAGCTGCTGAACCG CAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCG AGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA CGGACAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCAGTGGCCCA GATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTG GTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAG ATCAACAATAACACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTG GTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGA GTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGAT CGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCT GGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCC ACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAA GAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCC TGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGAC TGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCC TACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAA GAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 6】

配列番号	説明	配列	
		AGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCA AGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC AAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCT GGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGC CCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGA AGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTC GTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGAT CAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGTATCCTGGCCGACGCCAACCTGGA CAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCC GGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACC TGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACC GGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTG ATCCACCAGAGCATCACCGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTG AGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCG GAAGGTGTGA	10
8	Sp. Cas9 をコードする mRNA	GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUG UGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGACAAGAA GUACAGCAUCGGACUGGACAUUCGGAACAAACAGCGUCGGAUUG GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCA AGGUCCUGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCU GAUCGGAGCACUGCUUUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAA AGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAU GGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGC UUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUUCUACCACUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACA AGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUC AAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCTGG ACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACA UACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAG AAGACUGGAAAACCUAGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAG AACGGACUGUUCGGAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGA CACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAG CUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACCU GCUGGCACAGAUUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCUGGCAG CAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGA GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGA UCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAG GCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCU UCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGG AGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUC	20
			30
			40

【表 6 - 1 7】

配列番号	説明	配列
		CUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGA ACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGG AAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAG AGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUAC GUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGA CAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGA AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAAC UGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGC AUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAACG AAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGAC ACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACA UACGCACACCGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGA GAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAU CAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCG CAAACCUGGCAGGAAGCCC GGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCA GACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGGAAGA CACAAGCCGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUG AAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGC UGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGA CCAGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACC ACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAAC AAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACA ACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUG GAGACAGCUGCUGAACCGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUC GACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGG ACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACA GAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAAUGAAC ACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGG UCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGA CUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCAG CACACGACGCAUACCGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUC

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 8】

配列番号	説明	配列
		<p>AAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACU ACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACA GGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAAC AUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGA AAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAG AAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAA GAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGAC CCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACA GCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAA GCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAA AGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAA AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCC GAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCAC UGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUAC GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGC UGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGA ACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCA AACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACAC AACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAC AAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAGCUAGCCAUCACAUUUAAAA GCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAUGAAGAU CAAUAGCUUAUUCAUUCUUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGC CAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUCUUUUAUCAUUUUGC CUCUUUUCUGUGCUUCAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCU CGAGAAA AAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>
9	Sp. Cas9 をコードする mRNA	<p>GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUGGCCGGAUCUGCCACC AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUC CGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCA AGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAG AAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGC CGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGGCGGUACACCC GGCGGAAGAACCUGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAAC GAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCGGCUGGAGG AGUCCUUCUGGUGGAGGAGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCC</p>

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 9】

配列番号	説明	配列
		AUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGU ACCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACC GACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCUGGCCACA GAUCAAGUUCGGGGCCACUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACC CCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAG ACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCAUCAACGCCUCCGG CGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCC GGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCAGGCGAGAAGAAG AACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCUGUCCUGGGCCUGAC CCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGC UGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUG CUGGCCCAGAUCCGGCACCAGUACGCCGACCUGUUCUGGCCGC CAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGG UGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUC AAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCUGCUGAAGGC CCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCAGAGAAGUACAAGGAGAUCUUC UUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGG CGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGG AGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACC GGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCA UCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGG CGGCAGGAGGACUUCUACCCUUCUGAAGGACAACCGGGAGAA GAUCGAGAAGAUCUCCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCC CCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAG UCCGAGGAGACCAUCACCCCGGAACUUCGAGGAGGUGGUGG ACAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUAUCGAGCGGAUGACCAAC UUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUC CCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGG UGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUCCUGUCC GGCGAGCAGAAGAAGGCCAUUCGUGGACCUGCUGUUAAGACCA ACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUCAA GAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAG GACCGGUUCAACGCCUCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAA GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAG GACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGA CCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCACCUGU UCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGGUACAC CGGCUGGGGCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUAACGGCAUCCGGG ACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGUCCGAC GGCUUCGCCAACCAGGAAUCUUAUGCAGCUGAUCACGACGACUC CCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCCGGCC AGGGCGACUCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCC CCCGCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 0】

配列番号	説明	配列
		ACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUUGCCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACC
		GGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGGCCAGAUCCUGGACUCCCAGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCGGAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGGGCACCGCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAU
		GAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAU
		CGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAA
		GAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCA
		CCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAU
		ACCAUCAUUGGAGCGGUCCUUCGAGAAGAACCCAUUCGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUC
		AUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCG
		GAAGCGGAUCGUGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUCCUGUACCUGGCC
		UCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACGAGCA
		GAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAG
		AUCAUCGAGCAGAUUCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGC
		CGACGCCAACCGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACC
		GGGACAAGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUG
		UUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCUUCAAGUACUU
		CGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGG
		UGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUAC
		GAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 1】

配列番号	説明	配列
		CUCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGACUAGCACCAGCCUCAA GAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUACCAACUUAC ACUUUACAAAAUGUUGUCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUUACU GCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAA AA AA AAA
10	Sp. Cas9 をコードする mRNA	GGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACC AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACA GCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCAGC AAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACAGCAUCA AGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACAGCGGCGAGACC GCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACAC CCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCAGCA ACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACAGCUUCUCCACCGGCUUGGA GGAGAGCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCAC CCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAA GUACCCACCAUCUACCACCGUGCGGAAGAAGCUGGUGGACAGCA CCGACAAGGCCGACCGUGCGGCUGAUCUACCUGGCCUUGGCCAC AUGAUC AAGUCCGGGGCCACUCCUGAUCGAGGGCGACCGUGA ACCCGACAACAGCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUG CAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCAG CGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGAGCGCCCGGCGUGAGCAAGA GCCGGCGGCUUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGGCGAGAAG AAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCUUGAGCCUGGGCCU GACCCCAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAAC CUGCUGGCCAGAUCCGGCGACCAAGUACGCCGACCGUUCUCCUGGC CGCCAAGAACCUGAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCUCCUGC GGGUGAACACCGAGAUACCAAGGCCCCCGAGCGCCAGCAUG AUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAA GGCCUUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGG CGGCGCCAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCCAUCC UGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAA CCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCA GCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUG CGGCGGACAGGAGACUUCUACCCUUCUGAAGGACAACCGGGA GAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGG GCCCCUGGCCCGGGGCAACAGCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGG AAGAGCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGG UGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCUUCAUCGAGCGGAUGACC AACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCA

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 2】

配列番号	説明	配列
		CAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCA AGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCUGCCUCCU GAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUAAG ACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACU UCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAUACAGCGGCGU GGAGGACCGGUUCAACGCCAGCCUGGGCACCUACCACGACCUGC UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAA CGAGGACAUCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCG AGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCA CCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGGCGG UACACCGGCUGGGGCGGCUGAGCCGGAAGCUGAUAACGGCAU CCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAUCCUGGACUCCUGAAGA GCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGAC GACAGCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGA GCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAGCACAUCCGCAACCUGGCC GGCAGCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGU GGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCAG AACAUUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGAGAACAGACCACCCAGAA GGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAG GGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAGGAGCACCCCGU GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACC UGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAU CAACCGGCUGAGCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGG AGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGUGCCCAGCGAGG AGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCGAA CGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGG CCGAGCGGGGCGGCCUGAGCGAGCUGGACAAGGCCGCUUCAUC AAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGC CCAGAUCCUGGACAGCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACG ACAAGCUGAUCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGAGCAA GCUGGUGAGCGACUUCGGGAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUG CGGGAGAUACAACUACCACCACGCCACGACGCCUACCUGAA CGCCGUGGUGGGCACCGCCUGAUCAGAAGUACCCCAAGCUGG AGAGCGAGUUCGUGUACGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCG GAAGAUGAUCGCAAGAGCGAGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACC GCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGAC CGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGA UCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUUCGUGUGGGACAAGGG CCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGAGCAUGCCCCAGG UGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCAG CAAGGAGAGCAUCCUGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCUGAUCG CCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGAC

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 3】

配列番号	説明	配列
		AGCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGA GAAGGGCAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUGAAGGAGCUGCUG GGCAUCACCAUCAUGGAGCGGAGCAGCUUCGAGAAGAACCCCAU CGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGAC CUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGA ACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCAGCGCCGCGGAGCUGCAGAAG GGCAACGAGCUGGCCUGGCCAGCAAGUACGUGAACUUCUGUA CCUGGCCAGCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCAGCCCCGAGGACA ACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCU GGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACGCGAGUUCAGCAAGCGGGUG AUCCUGGCCGACGCCAACCUUGGACAAGGUGCUGAGCGCCUACAA CAAGCACCGGGACAAGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCA UCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUC AAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCAGCAC CAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUACCCG GCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGAGCCAGCUGGGCGGGCGAC GCGGGCGGACGCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGACUAGCAC CAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUAC CAACUACACUUUACAAAUGUUGUCCCCAAAUGUAGCCAU UCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCU CGAGAAA AA AAAAAAAAAA
11	Sp. Cas9 をコードする mRNA	GGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUGGCCGGAUCUGCCACC AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCGGCACGAACA GCGUUGGCUGGGCUGUGAUCACGGACGAGUACAAGGUUCCUC AAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACGGACCGGCACAGCAUC AAGAAGAAUCUCAUCGGUGCACUGCUGUUCGACAGCGGUGAGA CGGCCGAAGCCACGCGGCUGAAGCGGACGGCCCCGCGGCGGUAC ACGCGGCGGAAGAACCAGAUUCGUAACCUGCAGGAGAUCUUA GCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACAGCUUCUCCACCGGUG GAGGAGAGCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGC ACCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAAGUCGCCUACCACGAG AAGUACCCACCAUCUACCACCGGGAAGAAGCUGGUGGACUC GACUGACAAGGCCGACCUUGCGGCUGAUCUACCUGGCACUGGCC ACAUGAUAAAGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACCU GAACCCUGACAACAGCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGG UGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCAUCAACGCC AGCGGGUGGACGCCAAGGCCAUCCUAGCGCCCCGCCUAGCAA GAGCCGGCGGCUGGAGAAUCUCAUCGCCAGCUUCCAGGUGAGA AGAAGAAUGGGCUGUUCGGCAAUCUCAUCGCACUCAGCCUGGG CCUGACUCCCAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCCGAGGACG CCAAGCUGCAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGAC

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 4】

配列番号	説明	配列
		AAUCUCCUGGCCAGAUCCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCU GGCUGCCAAGAAUCUCAGCGACGCCAUCCUGCUCAGCGACAUC UGC GGUGAACACAGAGAUACGAAGGCCCCUCAGCGCCAGC AUGAUAAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACGCUGCU GAAGGCACUGGUGCGGCAGCAGCUUCCAGAGAAGUACAAGGAG AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAUGGGUACGCCGGGUACAUCG ACGGUGGUGCCAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAAGCC CAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACAGAGGAGCUGCUGGUGAAG CUGAACAGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACGUUCGACA AUGGGAGCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGUGAGCUGCACGCC AUCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCUUCUGAAGGACAA CAGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCUGACGUUCCGGAUCCCUAC UACGUUGGCCCCUGGCCCGCGCAACAGCCGGUUCGCCUGGAU GACGCGGAAGAGCGAGGAGACGAUCACUCCUGGAACUUCGAG GAAGUCGUGGACAAGGGUGCCAGCGCCAGAGCUUCAUCGAGC GGAUGACGAACUUCGACAAGAAUCUCCAAACGAGAAGGUGCU UCCAAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACGGUGUACAACG AGCUGACGAAGGUGAAGUACGUGACAGAGGGCAUGCGGAAGCC CGCCUUCUCAGCGGUGAGCAGAAGAAGGCCAUCCUGGACCUGC UGUUCAAGACGAACCGGAAGGUGACGGUGAAGCAGCUGAAGGA GGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAUC AGCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCAGCCUGGGCACCUACCA CGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAGGAGAACGAGGACAUCUGGAGGACAUCGUGCUGACGCUGA CGCUGUUCGAGGACAGGGAGAUGAUAGAGGAGCGGCUGAAGAC CUACGCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGC GGCGGCGGUACACGGGCGGGGCCGUCAGCCGGAAGCUGAUC AAUGGGAUCCGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACGAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUG AUCCACGACGACAGCCUGACGUUCAAGGAGGACAUC CAGAAGGC CCAGGUCAGCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAGCACAUCGCCA AUCUCGCCGGGAGCCCCGCCAUCAAGAAGGGGAUCCUGCAGACG GUGAAGGUGGUGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACA AGCCAGAGAACAUCGUGAUCGAGAUUGCCAGGGAGAACCAGAC GACUCAAAAGGGCAGAAGAACAGCAGGGAGCGGAUGAAGCGG AUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUC CUGAAGG AGCACCCCGUGGAGAACACUCAACUGCAGAACGAGAAGCUGUAC CUGUACUACCUGCAGAAUGGGCGAGACAUGUACGUGGACCAGG AGCUGGACAUCAACCGGCUCAGCGACUACGACGUGGACCACAUC GUUCCCCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGU GCUGACGCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGUU CCCUCAGAGGAAGUCGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGC AGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACUCAACGGAAGUUCGACAA

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 5】

配列番号	説明	配列
		UCUCACGAAGGCCGAGCGGGGUGGCCUCAGCGAGCUGGACAAG GCCGGGUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACGCGGCAGAUA CGAAGCACGUGGCCCAUAUCCUGGACAGCCGGAUGAACACGAAG UACGACGAGAACGACAAGCUGAUCAGGGAAGUCAAGGUGAUA CGCUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUCCGGAAGGACUCCA GUUCUACAAGGUGAGGGGAGAUACAACAACUACCACCACGCCACG ACGCCUACCUGAACGCUGUGGUUGGCACGGCACUGAUAAGAA GUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAG GUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUAGCCAAGAGCGAGCAGGAGA UCGGCAAGGCCACGGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUAUG AACUUCUUAAGACAGAGAUACCGCUGGCCAAUGGUGAGAUC GGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACGAAUGGUGAGACGGGUGAGAU CGUGUGGGACAAGGGGCGAGACUUCGCCACGGUGCGGAAGGUG CUCAGCAUGCCCCAGGUGAACAUCCGUGAAGAAGACAGAAGUCC AGACGGGUGGCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUCCAAAGCGGAA CAGCGACAAGCUGAUCGCCCGCAAGAAGGACUGGGACCCCAAGA AGUACGGUGGCUUCGACAGCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCUG GUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGGAAGAGCAAGAAGCUGAAGA GCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACGAUCAUGGAGCGGAGCAG CUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCUGGAAGCCAAGGGGUACA AGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUAUCAAGCUUCCAAAGUACAG CCUGUUCGAGCUGGAGAAUGGGCGGAAGCGGAUGCUGGCCACG GCCGGUGAGCUGCAGAAGGGGAACGAGCUGGCACUCCCUCAA AGUACGUGAACUUCUGUACCGGCCAGCCACUACGAGAAGCUG AAGGGGAGCCCAGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGG AGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACAG GAGUUCAGCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAAUCUCGACAA GGUGCUCAGCGCCUACAACAAGCACCCGAGACAAGCCCAACGAGG AGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACGCUGACGAAUCUC GGUGCCCCCGCUGCCUUAAGUACUUCGACACGACGAUCGACCG GAAGCGGUACACGUCGACUAAGGAAGUCCUGGACGCCACGCUG AUCCACCAGAGCAUCACGGGCCUGUACGAGACGCGGAUCGACCU CAGCCAGCUGGGUGGCGACGGUGGUGGCAGCCCCAAGAAGAAG CGGAAGGUGUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGA GUCUCUAAGCUACAUAUACCAACUACACUUAACAAAUGUU GUCCCCAAAAGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAG AAAGUUUCUUCACAUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA AA
12	Sp. Cas9 をコードする mRNA	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUGGCCGGAUCUGCCACC AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUCGACUCCGGCACCAACAG CGUCGGCUGGGCCGUAUCACCGACGAGUACAAGGUCCCCAGCA AGAAGUUCAAGGUCCUCGGCAACACCGACCGCCACAGCAUCAAG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 6】

配列番号	説明	配列
		AAGAACCUCAUCGGCGCCCUCCUCUUCGACAGCGGCGAGACCGC CGAGGCCACCCGCCUCAAGCGCACCGCCCGCCGCCUCACACC GCCGCAAGAACCGCCAUCUGCUACCUCCAGGAGAUCUUCAGCAAC GAGAUGGCCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUCGAGGA GAGCUUCCUCGUCGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGCCACCCCA UCUUCGGCAACAUCGUCGACGAGGUCGCCUACCACGAGAAGUAC CCCACCAUCUACCACCUCCGCAAGAAGCUCGUCGACAGCACCGA CAAGGCCGACCUCCGCCUCAUCUACCUCGCCUCGCCACAUGA UCAAGUUCGCGGCCACUUCUCAUCGAGGGCGACCUCAACCCC GACAACAGCGACGUCGACAAGCUCUUAUCCAGCUCGUCCAGAC CUACAACCAGCUCUUCGAGGAGAACCCEAUAACGCCAGCGGCG UCGACGCCAAGGCCAUCCUCAGCGCCCGCCUCAGCAAGAGCCGC CGCCUCGAGAACCUCAUCGCCAGCUCGCCGCGAGAAGAAGAA CGGCCUCUUCGGCAACCUCAUCGCCUCAGCCUCGGCCUCACCC CCAACUUAAGAGCAACUUCGACCUCGCCGAGGACGCCAAGCUC CAGCUCAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUCGACAACCUCCU CGCCAGAUUCGGCGACCAGUACGCCGACCUCUCCUCGCCGCCA AGAACCUCAGCGACGCCAUCCUCCUCAGCGACAUCUCCGCGUC AACACCGAGAUACCAAGGCCCCCUAGCGCCAGCAUGAUCAA GCGCUACGACGAGCACCACCAGGACCUCACCCUCCUCAAGGCC UCGUCCGCCAGCAGCUCGCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUC GACCAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGC CAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUCGAGA AGAUGGACGGCACCGAGGAGCUCUUCGUAAGCUAACCGCGAG GACCUCUCCGCAAGCAGCGCACCUUCGACAACGGCAGCAUCC CCACCAGAUCACCUCGGCGAGCUCACGCCAUCCUCCGCCGCC AGGAGGACUUCUACCCUUCUCAAGGACAACCGCGAGAAGAU GAGAAGAUCCUACCUUCCGUAUCCCUACUACGUCGGCCCCCU CGCCCGGGCAACAGCCGCUUCGCCUGGAUGACCCGCAAGAGCG AGGAGACCAUACCCCUUGAACUUCGAGGAGGUCGUCGACAAG GGCGCCAGCGCCAGAGCUUCAUCGAGCGCAUGACCAACUUCGA CAAGAACCUCCCAACGAGAAGGUCCUCCCAAGCACAGCCUCC UCUACGAGUACUUCACCGUCUACAACGAGCUCACCAAGGUCAAG UACGUCACCGAGGGCAUGCGAAGCCCGCCUCCUCAGCGGCGA GCAGAAGAAGGCCAUCGUCGACCUCCUCUUAAGACCAACCGCA AGGUCACCGUCAAGCAGCUCAAGGAGGACUACUUAAGAAGAU CGAGUGCUUCGACAGCGUCGAGAUACGCGGCGUCGAGGACCGCU UCAACGCCAGCCUCGGCACCUACCACGACCUCUCAAGAUCAUC AAGGACAAGGACUCCUCGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCC UCGAGGACAUCGUCCUACCCUCACCCUCUUCGAGGACCGCGAG AUGAUCGAGGAGCGCCUCAAGACCUACGCCACCUCUUCGACGA CAAGGUCAUGAAGCAGCUCAAGCGCCGCCGCUACACCGGCUGGG GCCGCCUCAGCCGCAAGCUCUCAACGGCAUCCGCGACAAGCAG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 7】

配列番号	説明	配列
		AGCGGCAAGACCAUCCUCGACUCCUCAAGAGCGACGGCUUCGC CAACCGCAACUUCAUGCAGCUAUCCACGACGACAGCCUACCU UCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUCAGCGGCCAGGGCGAC AGCCUCCACGAGCACAUCCGCAACCUCGCCGGCAGCCCCGCCAU CAAGAAGGGCAUCCUCCAGACCGUCAAGGUCGUCGACGAGCUCG UCAAGGUCAUGGGCCGCCACAAGCCCCGAGAACAUCGUCAUCGAG AUGGCCCGCGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAG CCGCGAGCGCAUGAAGCGCAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUC GGCAGCCAGAUCCUCAAGGAGCACCCCGUCGAGAACACCCAGCU CCAGAACGAGAAGCUCUACCUCUACUACCUCAGAACGGCCGCG ACAUGUACGUCGACCAGGAGCUCGACAUCAACCGCCUCAGCGAC UACGACGUCGACCACAUCGUCCCCAGAGCUUCCUCAAGGACGA CAGCAUCGACAACAAGGUCCUACCCCGCAGCGACAAGAACC GCGCAAGAGCGACAACGUCCCCAGCGAGGAGGUCGUCAAGAAGAU GAAGAACUACUGGCGCCAGCUCCUCAACGCCAAGCUCAUACCC AGCGCAAGUUCGACAACCUCACCAAGGCCGAGCGCGGGCCUC AGCGAGCUCGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGCCAGCUCGUCGA GACCCGCCAGAUACCAAGCACGUCGCCCAGAUCCUCGACAGCC GCAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUCAUCCGCGAG GUCAAGGUCAUACCCUCAAGAGCAAGCUCGUCAGCGACUCCG CAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCCGCGAGAUCAACAACUACC ACCACGCCACGACGCCUACCUCAACGCCGUCGUCGGCACCCGCC CUCAUCAAGAAGUACCCCAAGCUCGAGAGCGAGUUCGUCAACGG CGACUACAAGGUCUACGACGUCCGCAAGAUGAUCGCCAAGAGCG AGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACAGC AACAUCAUGAACUUCUUAAGACCCGAGAUACCCUCGCCAACGG CGAGAUCCGCAAGCGCCCCUCAUCGAGACCAACGGCGAGACCG GCGAGAUUCGUUGGACAAGGGCCGCGACUUCGCCACCGUCCGC AAGGUCCUCAGCAUGCCCCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACCGA GGUCCAGACCGCGGCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUCCCAAGC GCAACAGCGACAAGCUCAUCGCCCGAAGAAGGACUGGGACCCC AAGAAGUACGGCGGCUUCGACAGCCCCACCGUCGCCUACAGCGU CCUCGUCGUCGCAAGGUCGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCUC AAGAGCGUCAAGGAGCUCUCGGCAUCACCAUCAUGGAGCGCAG CAGCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCUCGAGGCCAAGGGCU ACAAGGAGGUCAAGAAGGACCUCAUCAUCAAGCUCCCAAGUAC AGCCUCUUCGAGCUCGAGAACGGCCGCAAGCGCAUGCUCGCCAG CGCCGGCGAGCUCAGAAAGGGCAACGAGCUCGCCUCCCCAGCA AGUACGUCAACUUCUCUACCUCGCCAGCCACUACGAGAAGCUC AAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUCUUCGUCGA GCAGCACAAGCACUACCUCGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACGCG AGUUCAGCAAGCGGCUCAUCCUCGCCGACGCCAACCUAGCAAG GUCCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGCGACAAGCCCAUCCGCGA

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 8】

配列番号	説明	配列
		GCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUCUUCACCCUCACCAACCUCG GCGCCCCCGCCGCCUUAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGC AAGCGCUACACCAGCACCAAGGAGGUCCUCGACGCCACCCUCAU CCACCAGAGCAUACCCGGCCUCUACGAGACCCGCAUCGACCUCA GCCAGCUCGGCGGCGACGGCGGCGGAGCCCAAGAAGAAGCGC AAGGUCUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCU CUAAGCUACAUAUACCAACUACACUUUACAAAAUGUUGUCC CCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAG UUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA AA
13	Sp. Cas9 のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNL IGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD DSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL VDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQ TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDF YPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNEL TKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRK LINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQLKEHPVENTQLQ NEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFD NLTKAERGGELSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDE NDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFY SNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKLKSVELLGITIMERSSEKPNIDFL EAKGYKEVKKDLIHKLPKYSLENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSP KKKRKV

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 9】

配列番号	説明	配列
14	Sp. Cas9 ニッカーゼのアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNL IGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD DSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL VDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQ TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDLNLLAQIGDQ YADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDF YPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGGASAQSFIERMTNFDKSNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNEL TKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRK LINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQ NEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFD NLTKAERGGLSELDKAGFIKQRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDE NDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFY SNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFL EAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSP KKKRKV
15	TTR ガイド配列	AAAGGCUGCUGAUGACACCU
16	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGCUUUU
17	不使用	不使用
18	一般的 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGCUUUU

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 0】

配列番号	説明	配列
19	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
20	一般的 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
21	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
22	一般的 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
23	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
24	一般的 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
25	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAA AUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
26	一般的 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGGUGC
27	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
28	一般的 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
29	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAA AUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
30	一般的 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
31	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 1】

配列番号	説明	配列
32	sgRNA 保存領域	UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
33	crRNA 保存領域	GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
34	TTR ターゲティングガイド	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
35	TTR ターゲティングガイド	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
36	Sp. Cas9 をコードする ORF	AUGGAUAAGAAGUACUCAAUCCGGGCUUGGAUAUCGGAACUAAUUCUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUC CAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUC AAGAAAAUCUCAUCGGAGCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAA CCGCAGAAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUAC ACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUU CGAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUG GAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGC AUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGA AAAGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGAC UCAACUGACAAGGCCGACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCCUCCG CCAUAUGAUCAAAUCCGCGGACACUCCUGAUCGAAGGCGAUC UGAACCCUGAUAAUCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUAACU GGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAU GCUAGCGGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCGUC GAAGUCGCGGCCUCGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAG AGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGAUCGCUCUCUCACU GGGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAUUUUGACCUGGCCGAGG ACGCGAAGCUGCAACUCUCAAAAGGACACCUACGACGACGACUUG GACAAUUUGCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGU UCCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAU AUCCUGCGGUGAACACCGAAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGC CUCGAUGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUACCAGGAUCUCACGC UGCUCAAGCGCUCGUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAA GGAGAUCUUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGGUAC AUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCA AGCCAAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGU CAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCCGGAACAGAGAACCUUU GACAACGGAUCCAUCCCCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCA CGCCAUCUUGCGGCGCCAGGAGGACUUUUACCCAUCCUCAAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 2】

配列番号	説明	配列
		ACAACCGGGAAAAGAUCGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCC GUAUUACGUGGGCCACUGGCGCGGGCAAUUCGCGCUUCGCGU GGAUGACUAGAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUU CGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUUCAUC GAACGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGG UGCUUCCUAAGCACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUAC AACGAACUGACUAAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGA AGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGA UCUGCGUUCAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUA AAGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUGGA AAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCUGGGAACC UAUCAUGAUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUUG ACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAAGAUUUCGUCCUGAC CUUGACCCUUUUCGAGGAUCGCGAGAUUGAUCGAGGAGAGGCUU AAGACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAAC UCAAGCGCCCGCGUACACUGGUUUGGGCCGCCUCUCCCGCAAG CUGAUAACGGUAUUCGCGAUAAACAGAGCGGUAAAACUAUCC UGGAUUCCUCAAAUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAU GCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUC AAAAAGCACAAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACA CAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAUU CUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUGAAGGUCAUGG GACGGCACAAACCGGAGAAUUCGUGAUUGAAAUGGCCCGAGA AAACCAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAAACUCCCGCGAAAGGA UGAAGCGGAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAU CCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAGCUGCAGAACGAG AAGCUCUACCGUACUUAUUUGCAAAAUGGACGGGACAUGUACG UGGACCAAGAGCUGGACAUCAAUUCGGUUGUCUGAUUACGACGU GGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGAUGACUCGAUCG AUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUC AGAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAU UACUGGCGGCAGCUCUUGAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAA AGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGCGGGGACUCUCAGA GCUGGAUAAGGCUGGAUUCAUCAACGGCAGCUGGUCGAGACU CGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUUCUUGGACUCCCGCAU GAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAAGUG AAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGA AGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCA UCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCC UGAUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGG AGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAUAGCCAAGUCC GAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUACUUCUUUACU CAAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUAACGCUGGCCAA

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 3】

配列番号	説明	配列
		UGGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGAA ACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUG UUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAUUUGUGAAGAA AACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUCAAAGGAAUCGAUCCUC CCAAAGAGAAAUAGCGACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACU GGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGC AUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGC AAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCA UGGAACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUCCUCGA GCGGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUCUGAUCAUCAA CUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAUGGUCGGAAGC GCAUGCUGGCUUCGGCCGAGAACUCCAAAAGGAAAUGAGCU GGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAACUCCUCUAUCUUGCUUCGC ACUACGAAAAACUCAAAGGGUCACCGGAAGUAACGAACAGAA GCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAAGCAUUAUCUGGAUGAAUC AUCGAACAAAUCUCCGAGUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGA CGCCAACCUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAG AUAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUAUCCACUUGUU CACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAGUACUUCG AUACUACUAUCGAUCGAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGU UCUGGACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACG AAACUAGGAUCGAUCUGUCGCAGCUGGGUGGCGAUGGCGGUGG AUCUCCGAAAAGAAGAGAAAGGUGUAAUGA
37	例示的な Kozak 配列	gccgccRccAUGG
38	TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU
39	TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
40	TTR sgRNA	mA*mA*mA*mGGC*U*fG*fC*fU*fGAfUfGAC*fAfCCUmGUUUfUAG mAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAm UAmAmGmGmCmUmAGUmCmCGUfUAmUmCmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
41	TTR sgRNA	mA*mA*mA*GGC*U*fG*fC*fU*fGAfUfGAC*fAfCCUmGUUUfUAGm AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmU AmAmGmGmCmUmAGUmCmCGUfUAmUmCmAmCmUmUmGmA AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 4】

配列番号	説明	配列
42	TTR sgRNA	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU
43	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
44	TTR sgRNA 修飾型	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
45	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGUGUC
46	TTR sgRNA 修飾型	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
47	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
48	TTR sgRNA 修飾型	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
49	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGGUGC
50	TTR sgRNA 修飾型	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
51	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
52	TTR sgRNA 修飾型	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
53	TTR sgRNA	AAAGGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
54	TTR sgRNA 修飾型	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
55	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 5】

配列番号	説明	配列
56	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNmGUUUfUAGm AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmU AmAmGmGmCmUmAGUmCmCGUfUmUmCmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU
57	一般的 sgRNA 修飾型	mN*mN*mN*NNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNmGUUUfUAGm AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmU AmAmGmGmCmUmAGUmCmCGUfUmUmCmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU

*=PS 結合、「m」=2'-O-Meヌクレオチド、「f」=2'-Fヌクレオチド

10

【図面】

【図 1 - 1】

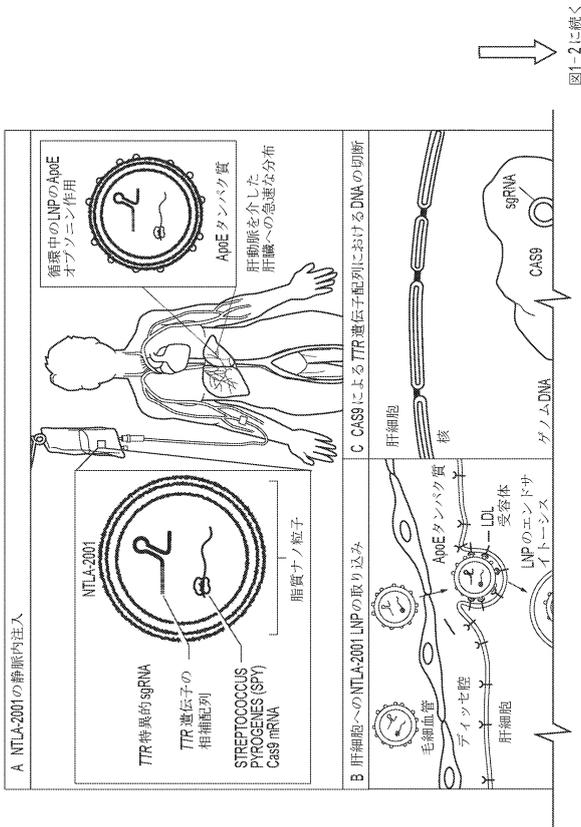


図1-2に続く

【図 1 - 2】

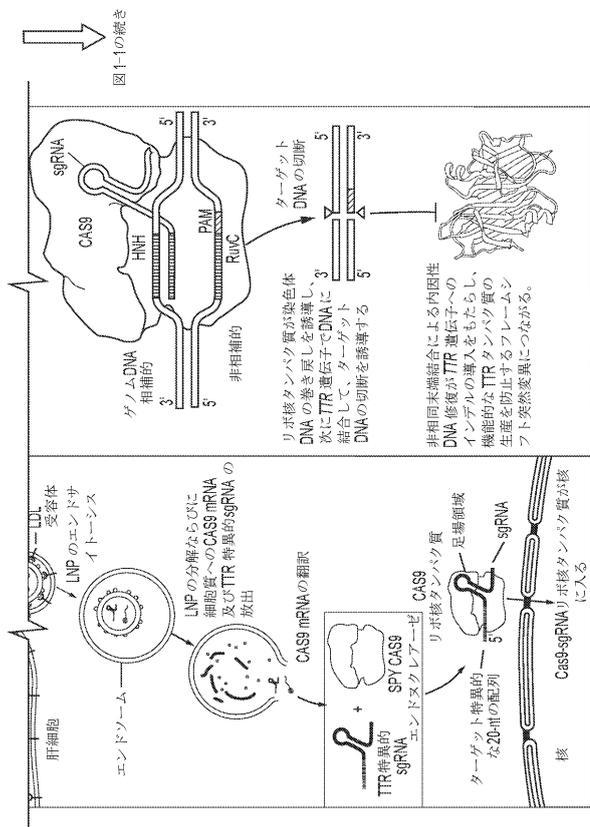


図1-1の続き

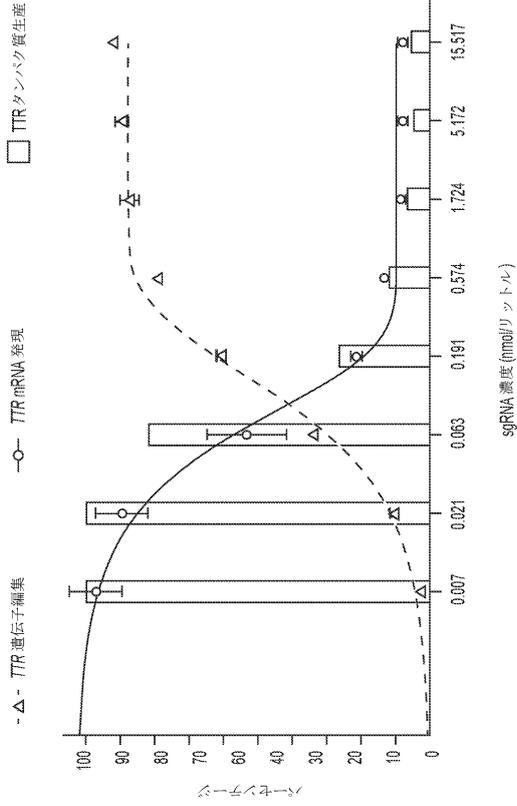
20

30

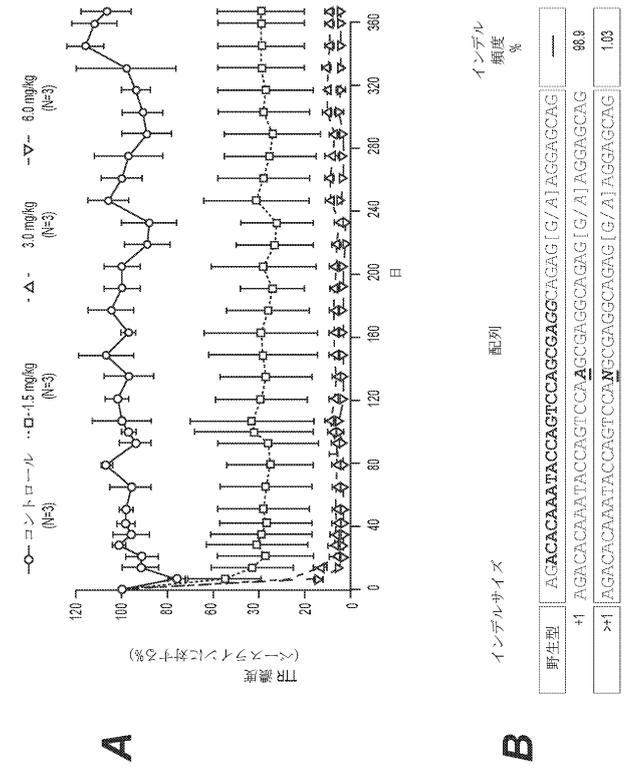
40

50

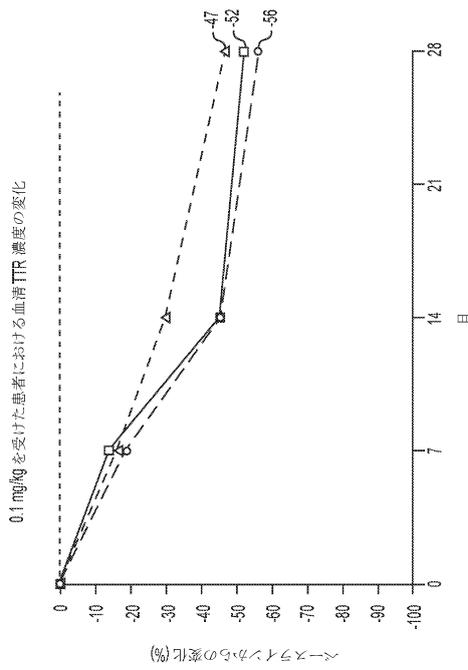
【 図 2 】



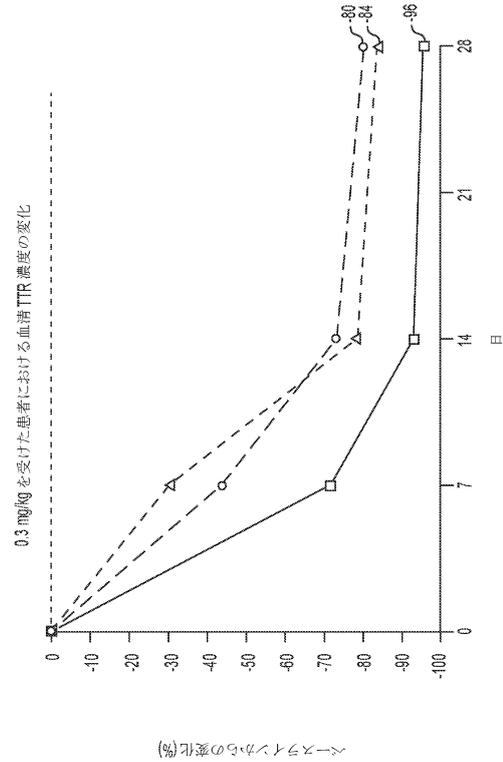
【 図 3 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



10

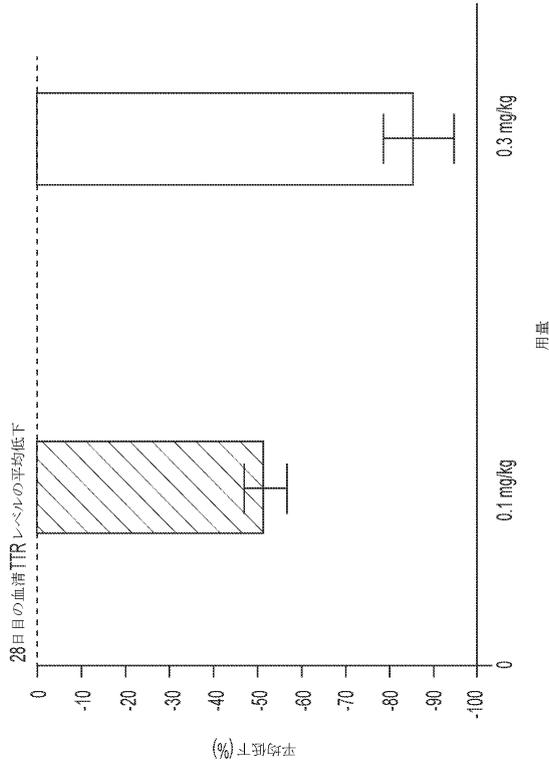
20

30

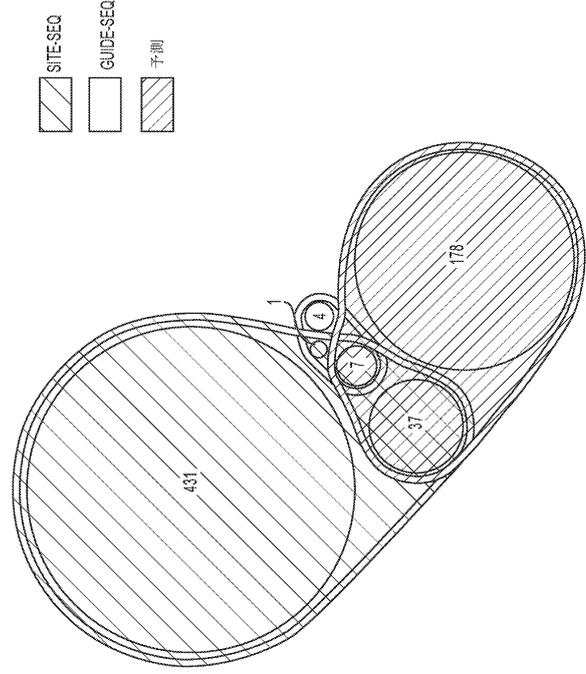
40

50

【 図 4 C 】



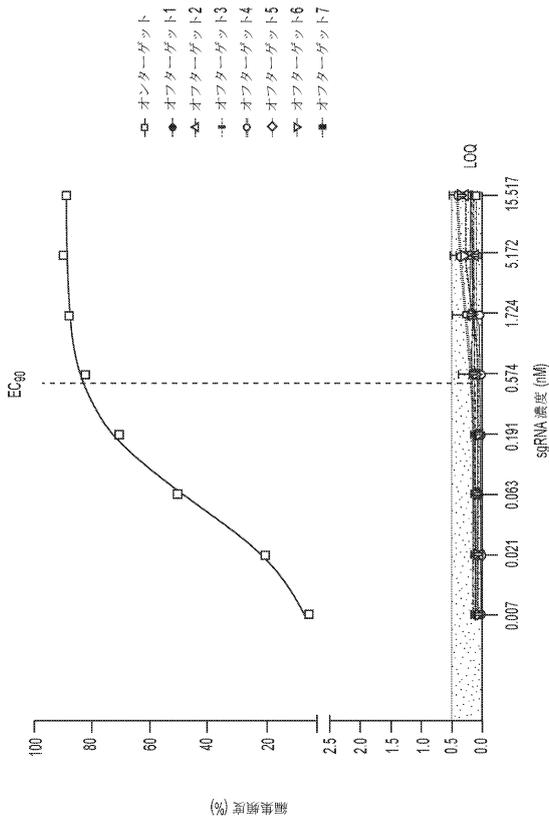
【 図 5 】



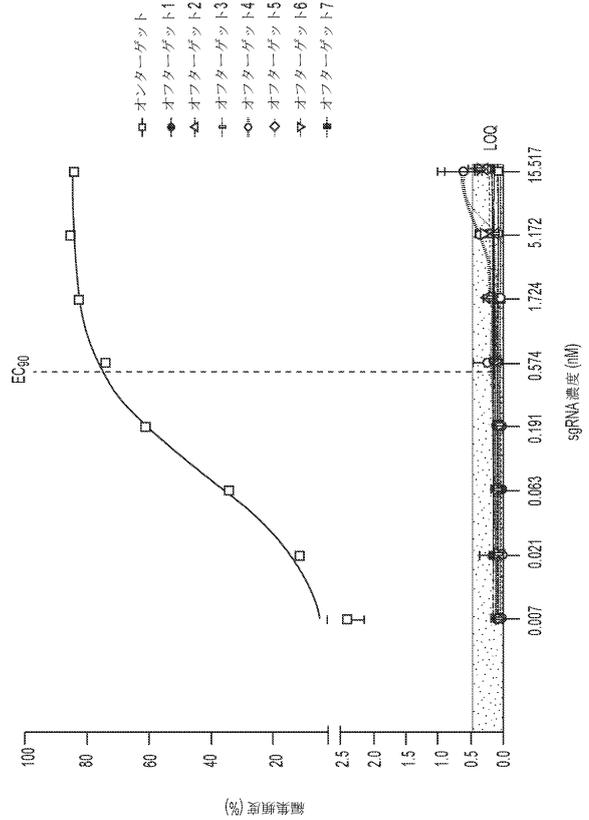
10

20

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

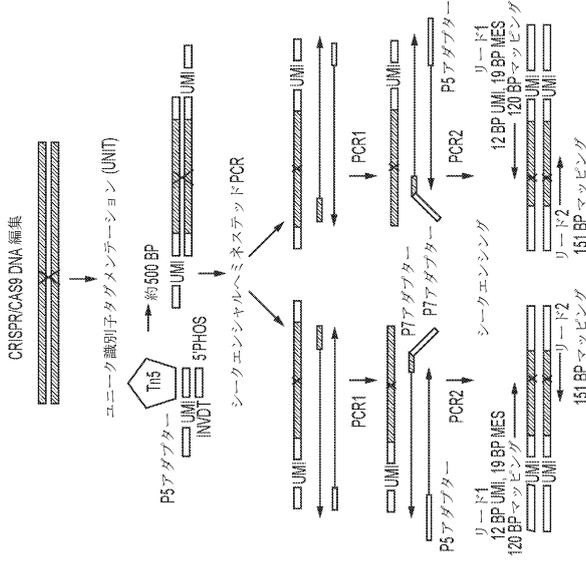


30

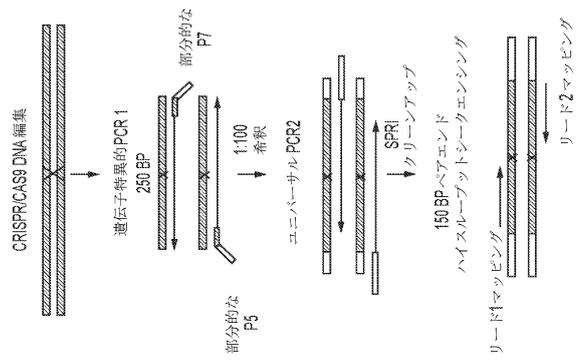
40

50

【 図 7 】

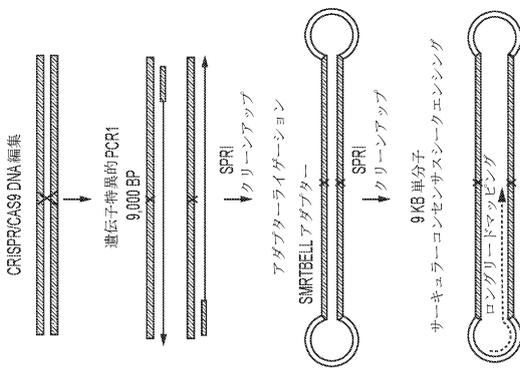


【 図 8 A 】

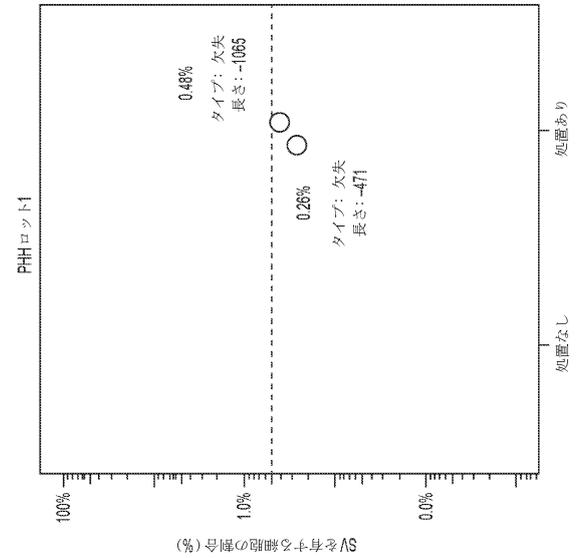


10

【 図 8 B 】



【 図 9 】



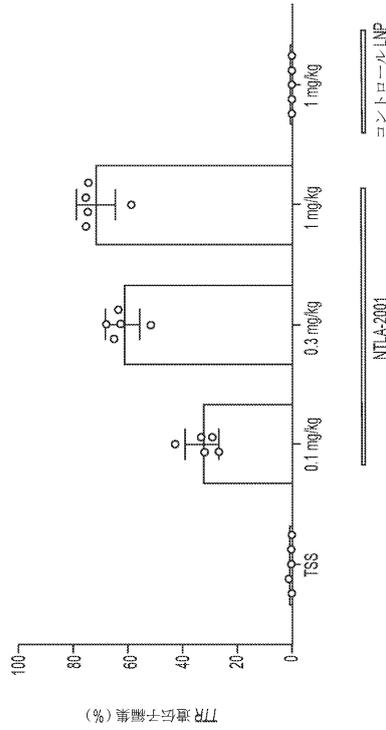
20

30

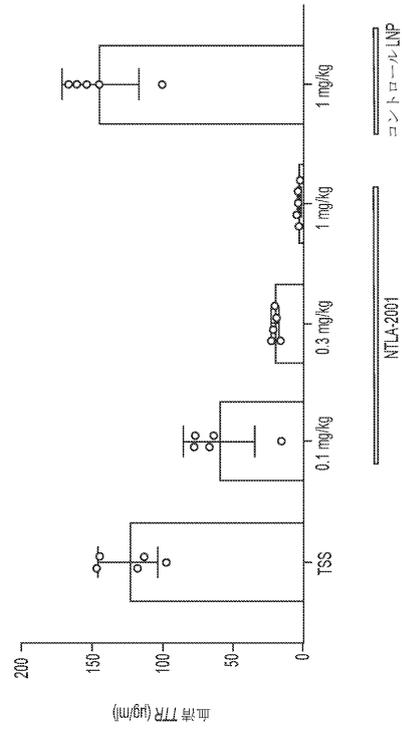
40

50

【 図 1 0 A 】



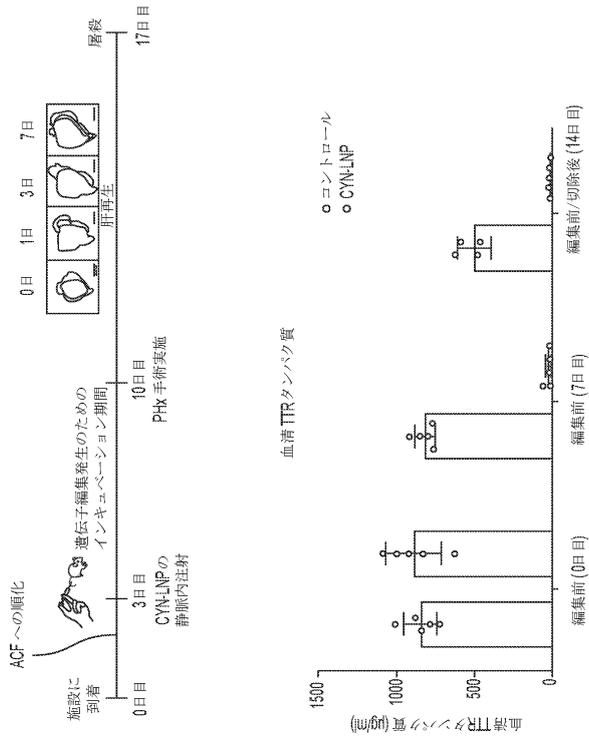
【 図 1 0 B 】



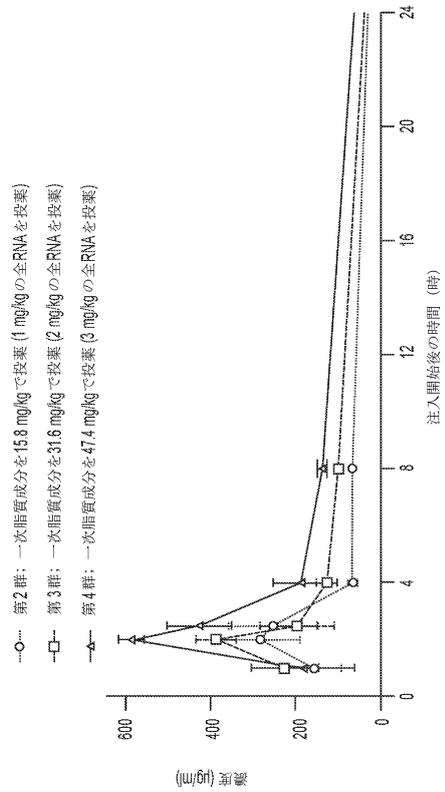
10

20

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

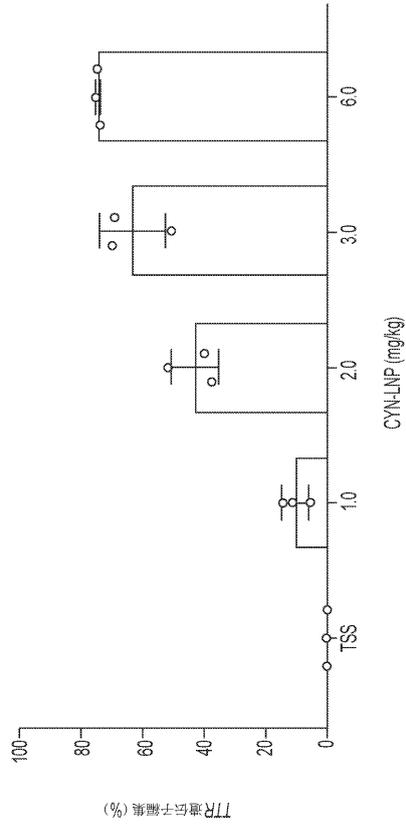


30

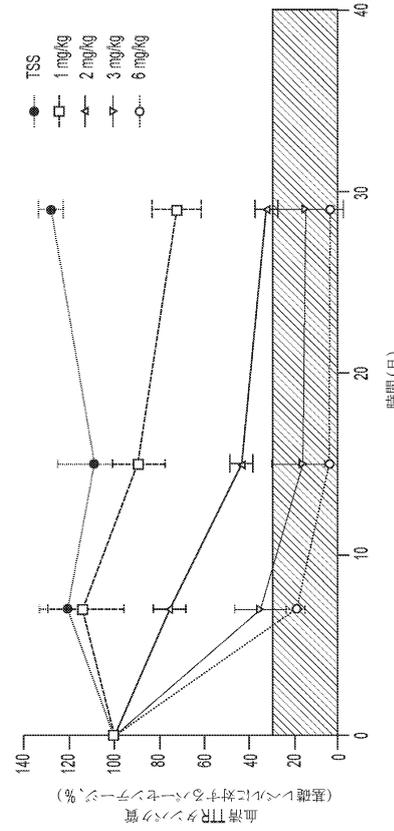
40

50

【 図 1 3 A 】



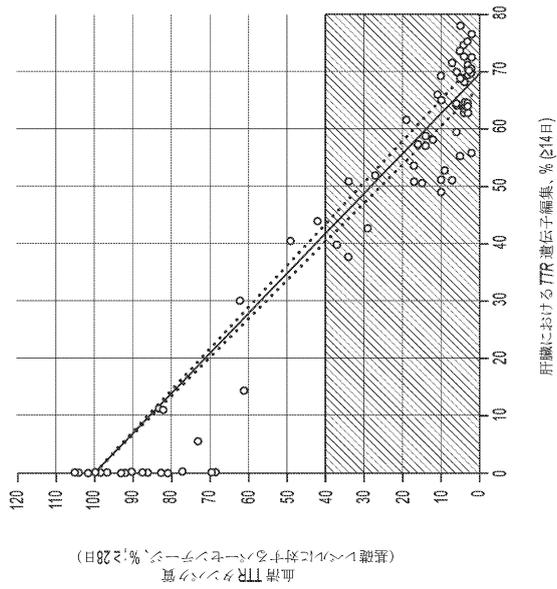
【 図 1 3 B 】



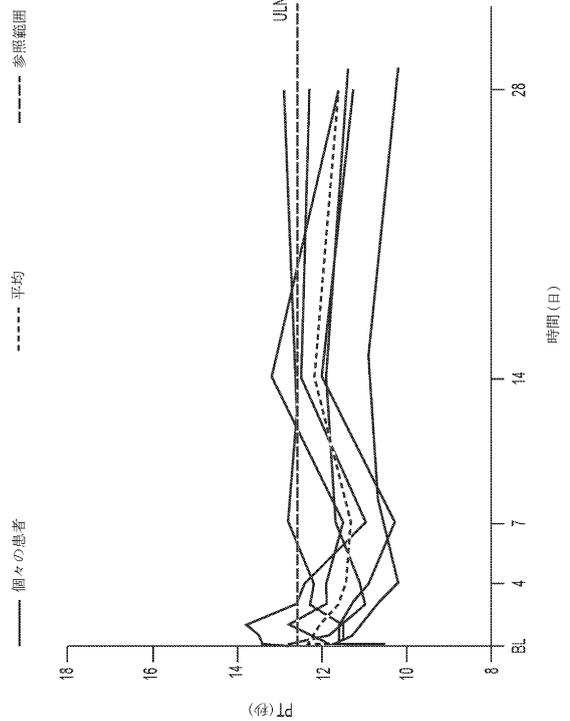
10

20

【 図 1 4 】



【 図 1 5 A 】

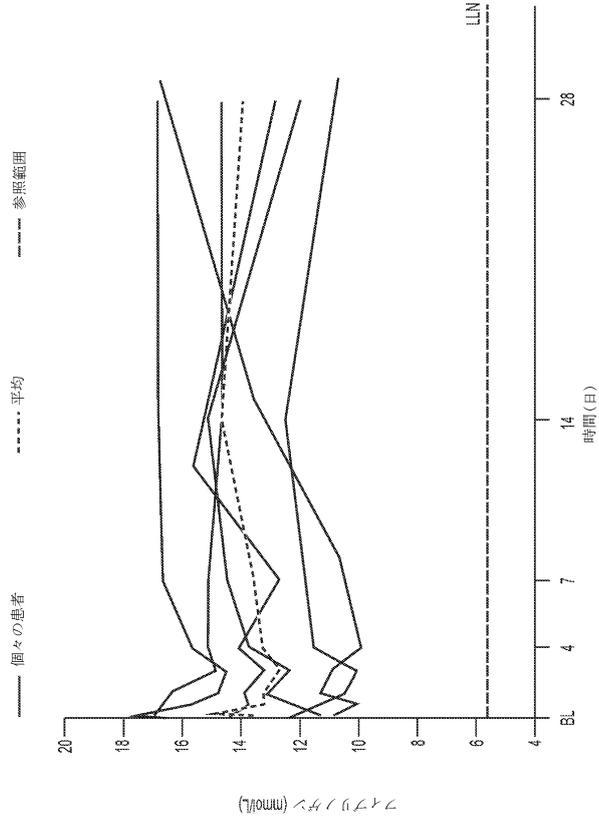


30

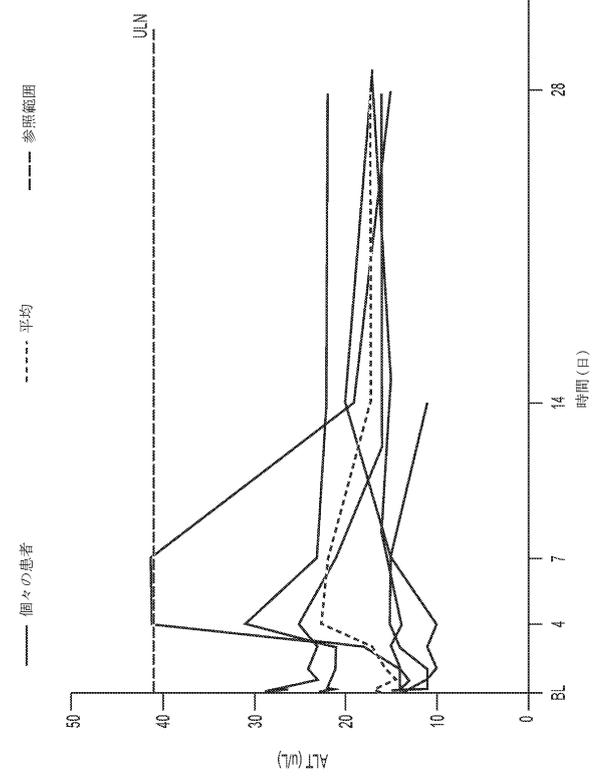
40

50

【 図 1 5 B 】



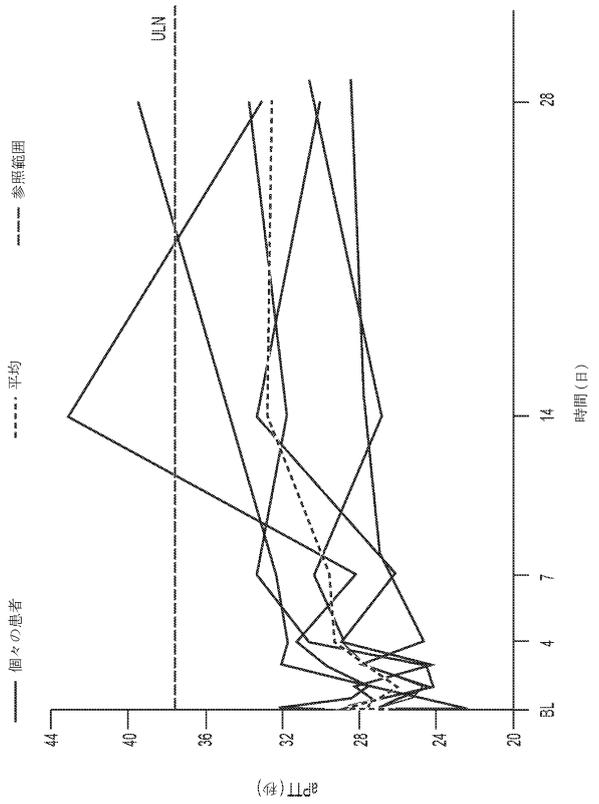
【 図 1 5 C 】



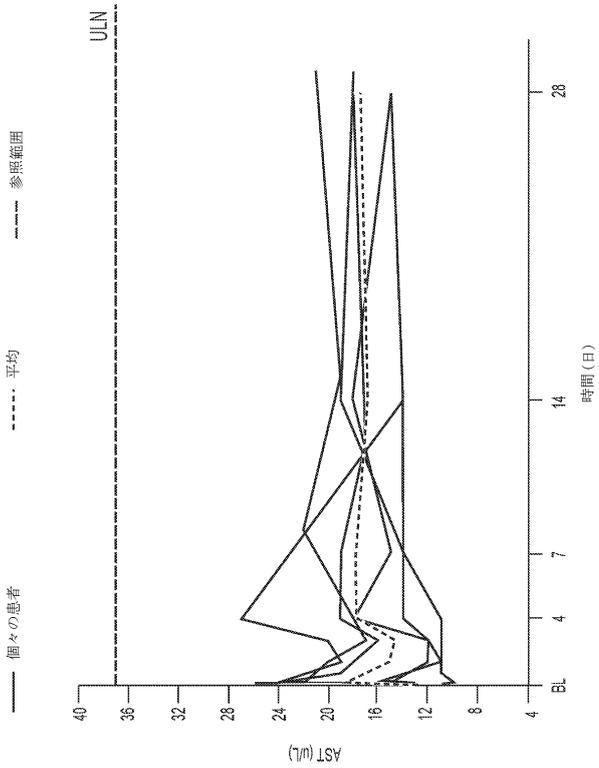
10

20

【 図 1 5 D 】



【 図 1 5 E 】



30

40

50

【 図 1 6 】

群	全RNA用量 (MG/KG)	分析物	分析物 用量 (MG/KG)	Cmax (MG/ML)	Tmax (HR)	AUC ₀₋₂₄ (HR*MG/ML)	AUC ₀₋₁₂ (HR*MG/ML)	CI (ML/ML/KG)	T _{1/2} (HR)	VZ (L/KG)
2	1	一次脂質	15.8	346,000 (7.28)	2	2,100,000 (11.1)	2,100,000 (11.1)	0.127 (11.5)	13.6 (7.79)	0.15 (15.5)
				50,500 (16.9)	2	136,000 (15.7)	136,000 (15.7)	0.335 (15.6)	2.82 (22)	0.0811 (22.5)
2	1	CYN-sgRNA	0.333	2,750 (38.7)	2.25	26,000 (13.5)	26,000 (13.5)	NC	NC	0.388 (19.1)
				0.667	4,400 (62.1)	2	32,300 (62.1)	32,300 (62.1)	NC	NC
3	2	一次脂質	31.6	388,000 (12.1)	2	2,780,000 (13.4)	2,780,000 (13.4)	0.191 (13.2)	13.5 (8.63)	0.224 (19)
				71,900 (23.2)	2	216,000 (6.36)	216,000 (6.36)	0.418 (6.46)	3.26 (37.7)	0.121 (64.3)
3	2	CYN-sgRNA	0.667	4,470 (16)	2	30,600 (7.69)	30,600 (7.69)	0.362 (7.44)	16.8 (7.2)	0.327 (8)
				6,670 (37.5)	2	47,700 (8.65)	47,700 (8.65)	0.468 (9.79)	15.1 (4.91)	0.614 (13.7)
4	3	一次脂質	47.4	586,000 (5.28)	2	4,450,000 (7.79)	4,450,000 (7.79)	0.178 (8.03)	14.9 (6.45)	0.187 (10)
				94,600 (20.1)	2	312,000 (20)	312,000 (20)	0.444 (22.3)	5.17 (42.5)	0.187 (25.6)
4	3	CYN-sgRNA	1.00	7,170 (3.61)	2	57,100 (65.9)	57,100 (65.9)	0.403 (62.7)	20.7 (25.9)	0.126 (71.6)
				14,400 (23.1)	2	130,000 (130,000)	130,000 (130,000)	0.305 (46.1)	14.9 (31)	0.367 (36.4)

NTLA2001のヒト特異的な薬理的活性を考慮して、sgRNAのターゲットインジキング領域のヌクレオチド配列のみが異なるカログラート生成物であるCYN-sgRNAをカニザル研究のために使用した。
 中央値(最小-最大)として示されたT_{max}を除き、データは平均(CV%)として示されている。注入は全て2時間行った。
 分析物用量はノンコンパートメント分析で使用した。

【 図 1 7 】

基本語	0.1 MG/KG用量を受けた全患者 (N=9)		0.3 MG/KG用量を受けた全患者 (N=9)	
	関連あり	関連なし	関連あり	関連なし
下痢	0	1(33.3%)	0	0
悪心	1(33.3%)	0	0	0
注入関連反応	1(33.3%)	0	0	0
皮膚癢/過熱	0	0	0	0
頭痛	1(33.3%)	1(33.3%)	0	0
頭位性眩暈	0	1(33.3%)	0	0
眼内異物感	0	1(33.3%)	0	0
カテーテル部位腫脹	0	1(33.3%)	0	0
急性副鼻腔炎	1(33.3%)	0	0	0
チロキシン減少	1(33.3%)	0	0	0
鼻漏	1(33.3%)	0	0	0
そう痒	0	1(33.3%)	0	0
発疹	0	1(33.3%)	0	0

各基本語について2つ以上の有害事象を報告した対象は、治療との最も近い関係性を使用して1回だけカウントされている。
 有害事象は、MedDRAバージョン23.0を使用して器管別/分類及び基本語にコード分類されている。「関連あり」は、治験責任医師による評価後に治療薬に「関連あるかもしれない」または「多分関連あり」として報告された全事象を含む。

10

20

【 図 1 8 】

パラメータ	0.1 MG/KG用量を受けた全患者 (N=3)	0.3 MG/KG用量を受けた全患者 (N=3)	全患者 (N=6)
年齢、歳	54 (50.63)	53 (46.64)	53.5 (46.64)
性別、N (%)	1 (33.3%) 2 (66.7%)	3 (100%) 0	4 (66.7%) 2 (33.3%)
体重、KG	82 (70.89)	84 (83.90)	84 (70.90)
突然変異ステータス、N (%)	0	1 (33%)	1 (17%)
P.H110D	1 (33%)	1 (33%)	2 (33%)
P.S97Y	2 (67%)	1 (33%)	3 (50%)
P.T80A	1 (33%)	2 (67%)	3 (50%)
以前の治療、N (%)	なし	1 (33%)	3 (50%)
ジフルニサル	2 (67%)	1 (33%)	3 (50%)
臨床スコア、N (%)	3 (100%)	3 (100%)	6 (100%)
多発神経障害性能力障害スコア1	3 (100%)	3 (100%)	6 (100%)
NYHA機能分類 I	127 (89.596)	119 (50.359)	123 (50.596)
NT-PROBNP (ng/L)、中央値 (最小、最大)	2 (2.9)	3 (1.1)	2.5 (1.1)
診断後年数 (最小、最大)			

【 図 1 9 A 】

用量 (mg/kg)	患者	体重 (kg)	実用量 (mg)	TTR 遺伝子型	TTR 低下率 (%)	時点
0.1	コホート1対象1 (C1S1)	82.1	8.2	S77Y	89.0	7日目
						14日目
						28日目
						56日目
						84日目
						112日目
						140日目
						168日目
						196日目
						224日目
0.1	C1S2	70.4	7.0	T80A	596.0	7日目
						14日目
						28日目
						56日目
						84日目
						112日目
						140日目
						168日目
						196日目
						224日目
0.1	C1S3	89.1	8.9	T80A, T80A	127.0	7日目
						14日目
						28日目
						56日目
						84日目
						112日目
						140日目
						168日目
						196日目
						224日目
0.3	C2S1	83.3	25.0	S77Y	118.0	7日目
						14日目
						28日目
						56日目
						84日目
						112日目
						140日目
						168日目
						196日目
						224日目

30

40

50

【 図 1 9 B 】

用量(mg/kg)	患者	体重(kg)	実用量(mg)	TTR 遺伝子型	NT-PROBNPX ペーンスライン(ng/L)	時点	TTR 低下率(%)
0.3	C352	84.0	25.2	T60A	359.0	7日目	-30.43
						14日目	-78.74
						28日目	43.79
						56日目	-76.72
						4ヵ月目	-75.48
						6ヵ月目	-77.83
0.3	C353	89.9	27.0	H60D	<50.0	7日目	-71.98
						14日目	49.34
						28日目	35.73
						56日目	-91.55
						4ヵ月目	91.47
						6ヵ月目	-94.04
0.7	C451	82.4	43.7	E42D	58.0	7日目	-21.34
						14日目	-61.60
						28日目	-66.19
						56日目	-73.03
						7日目	-63.17
						14日目	49.34
0.7	C452	97.6	68.3	E74G	<50.0	28日目	-94.45
						56日目	-94.79

【 図 1 9 C 】

用量(mg/kg)	患者	体重(kg)	実用量(mg)	TTR 遺伝子型	NT-PROBNPX ペーンスライン(ng/L)	時点	TTR 低下率(%)
0.7	C453	86.7	60.7	T60A	195.0	7日目	-76.34
						14日目	-94.45
						28日目	-87.37
						56日目	-95.20
						4ヵ月目	-93.88
						6ヵ月目	-95.07
1.0	C451	75.9	75.9	E42D	58.0	7日目	-42.92
						14日目	-79.83
						28日目	-82.25
						56日目	-98.51
						4ヵ月目	舘外米院
						6ヵ月目	-86.60
1.0	C352	86.2	69.2	S50R	544.0	7日目	-79.84
						14日目	-87.53
						28日目	-87.47
						56日目	-80.06
						4ヵ月目	-88.63
						6ヵ月目	-85.96
1.0	C353	88.6	88.6	T60A	84.0	7日目	-87.13
						14日目	-96.74
						28日目	-97.64
						56日目	-98.83
						4ヵ月目	-98.64
						6ヵ月目	-98.64

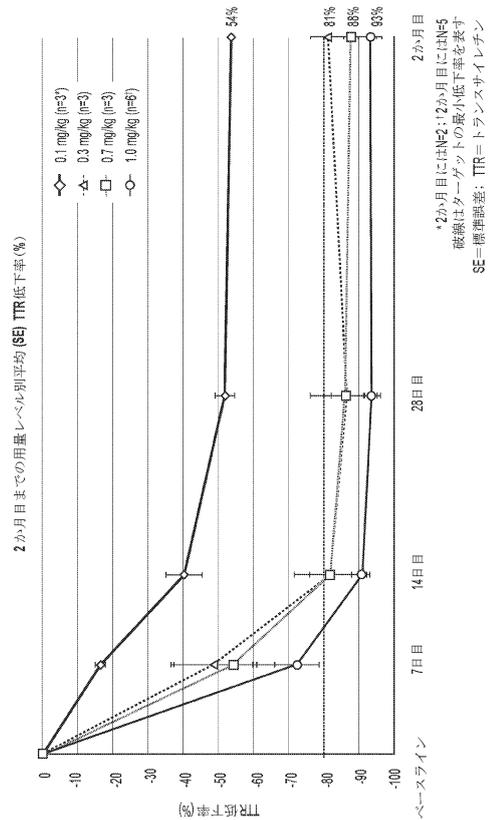
10

20

【 図 1 9 D 】

用量(mg/kg)	患者	体重(kg)	実用量(mg)	TTR 遺伝子型	NT-PROBNPX ペーンスライン(ng/L)	時点	TTR 低下率(%)
1.0	C354	59.1	59.1	V30M	193.0	7日目	-77.97
						14日目	-94.48
						28日目	-96.86
						56日目	-96.54
						7日目	-69.24
						14日目	-89.47
1.0	C355	74.6	74.6	E62D	140.0	7日目	-94.11
						14日目	-94.11
						28日目	-94.48
						56日目	-94.48
						7日目	-76.51
						14日目	-94.56
1.0	C356	111.0	111.0	T60A	<50.0	28日目	-95.95
						56日目	-95.89

【 図 2 0 】

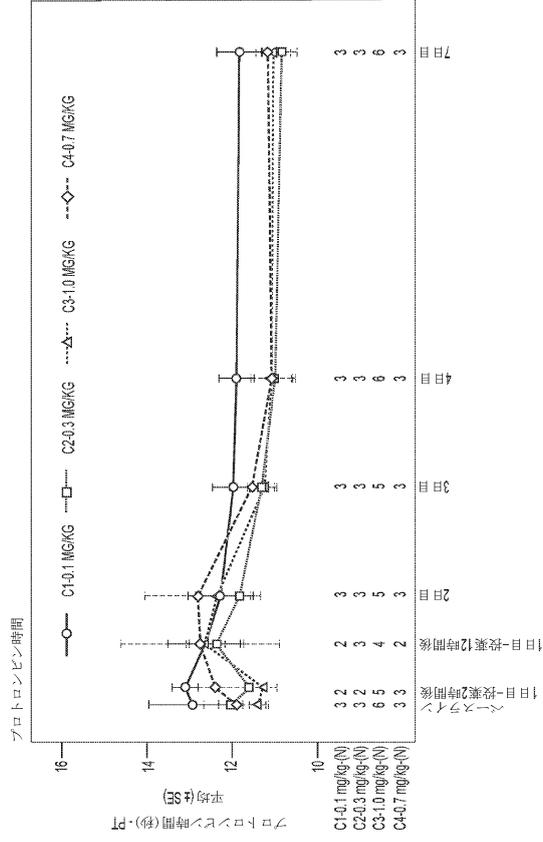


30

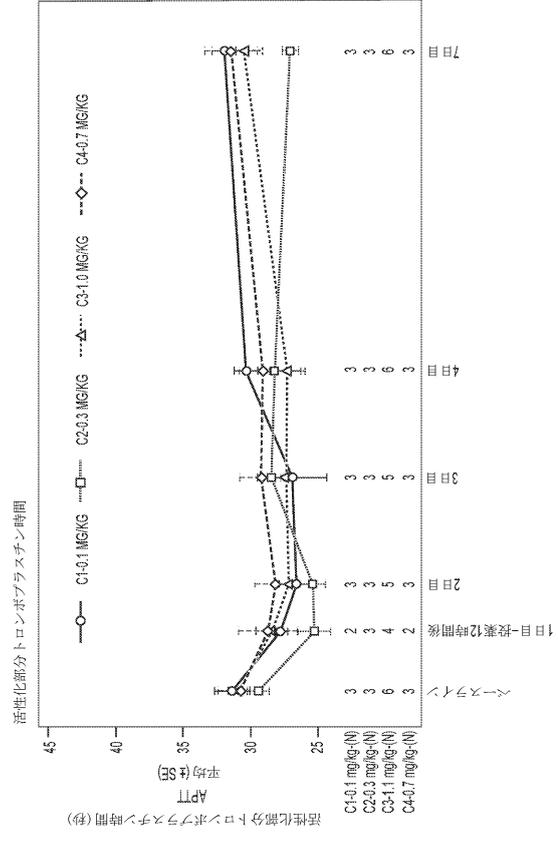
40

50

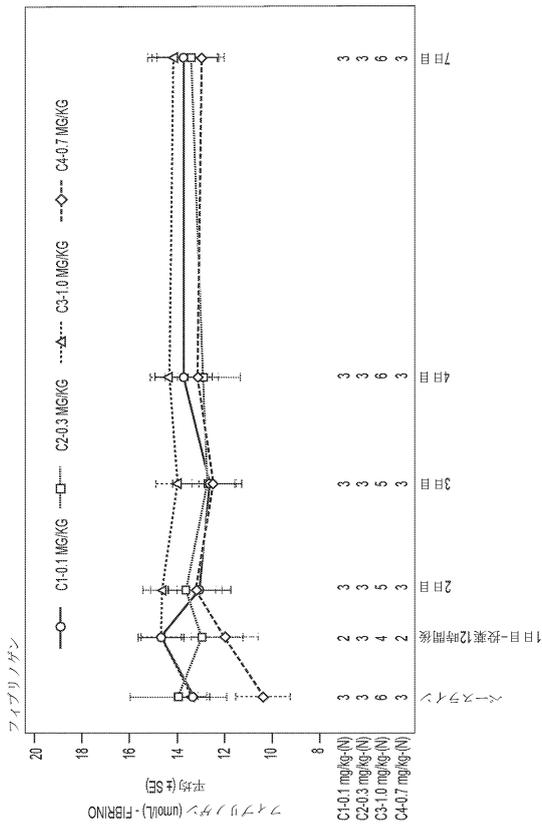
【 2 1 A 】



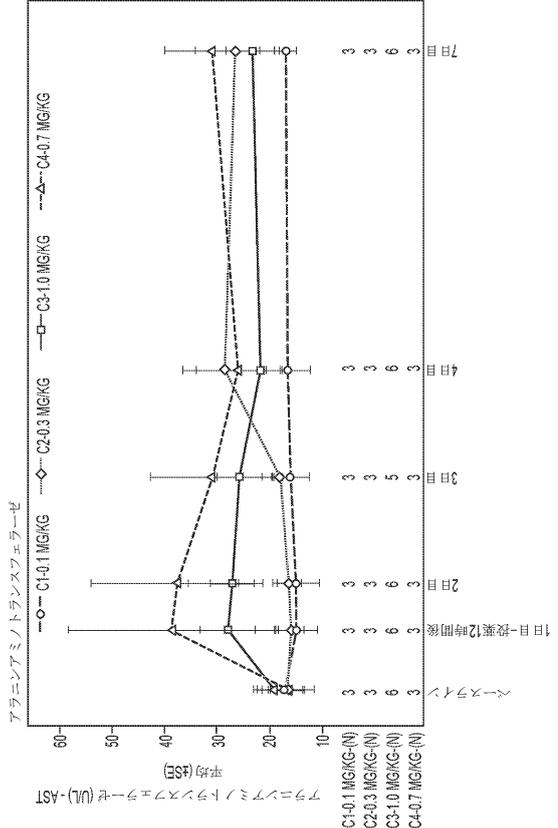
【 2 1 B 】



【 2 1 C 】



【 2 1 D 】



10

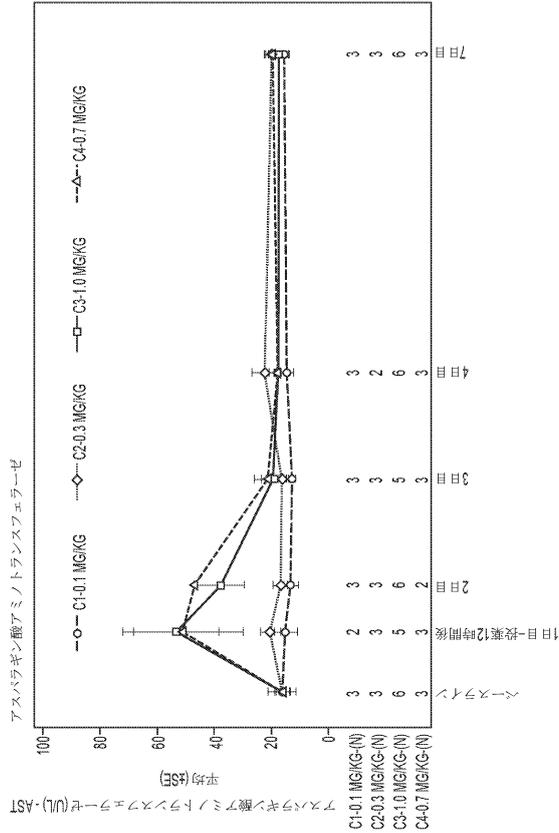
20

30

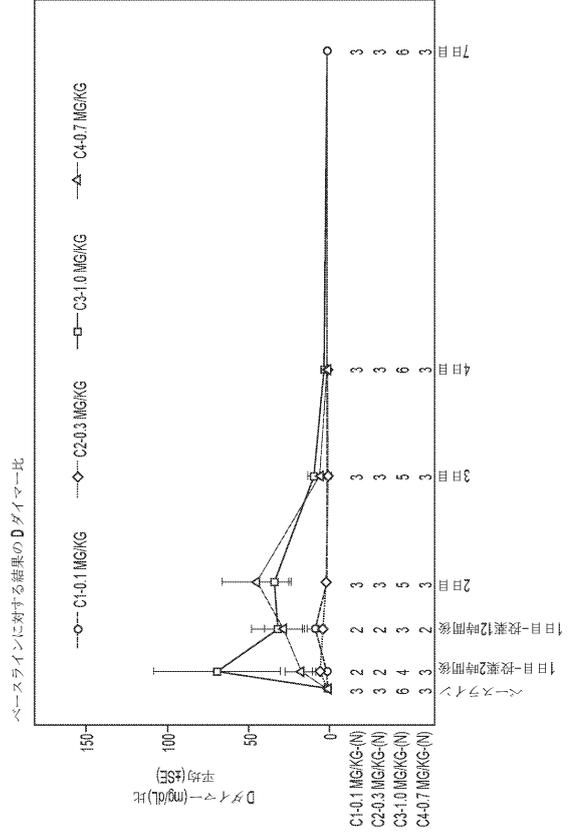
40

50

【 図 2 1 E 】



【 図 2 1 F 】



【 図 2 2 】

パラメータ	0.1 mg/kg N=3			0.3 mg/kg N=3			0.7 mg/kg N=3			1.0 mg/kg N=6			全て N=15		
	GR.1	GR.2	GR.3	GR.1	GR.2	GR.3									
少なくとも1つのTEAEがあった患者	3	—	—	3	—	—	2	1*	—	3	2	1†	11	2	2
頭痛	2	—	—	—	—	—	2	—	—	3	—	—	7	—	—
注入関連反応	1	—	—	—	—	—	2	—	—	4	—	—	7	—	—
腰痛	1	—	—	—	—	—	2	1	—	1	—	—	4	1	—
発疹	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	4	—	—
悪心	1	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	3	—	—

患者3名以上で報告された有害事象
 患者は個別ごと用量レベルごとに1回、報告された最も高いグレードとしてカウントされている
 * 無関係のグレード3 (SAE) のCOVID-19 肺炎
 † 胃不全麻痺の併存病態を有する患者における関連あるグレード3 (SAE) の嘔吐

【 図 2 3 A 】

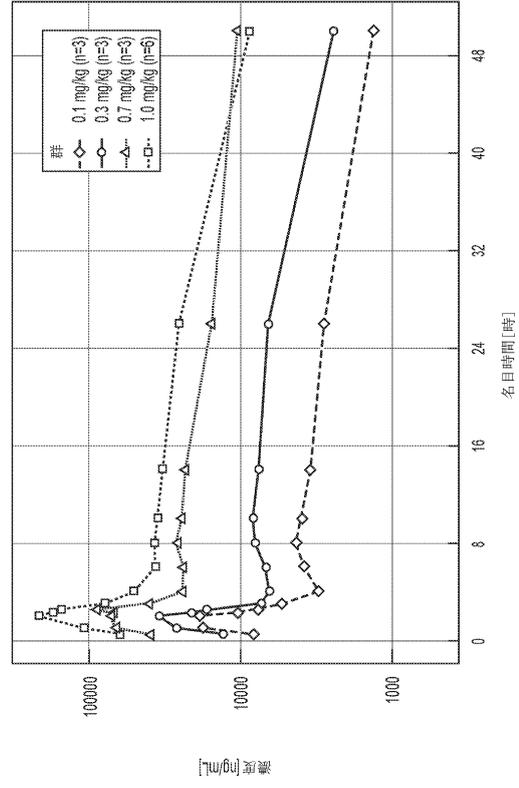
パラメータ	0.1 mg/kg N=3	0.3 mg/kg N=3	0.7 mg/kg N=3	1.0 mg/kg N=6	全患者 N=15
年齢、歳 中央値 (最小, 最大)	54 (50, 63)	53 (46, 64)	51 (19, 58)	61 (49, 70)	55 (19, 70)
性別, N (%) 男性 女性	1 (33%) 2 (67%)	3 (100%) —	2 (67%) 1 (33%)	3 (50%) 3 (50%)	9 (60%) 8 (40%)
自己申告による人種, N (%) 白人またはヒスパニック系 西欧人 アジア人 ハワイ先住民/ 他の太平洋諸島先住民	1 (33%) 2 (67%) — —	3 (100%) — — —	2 (67%) — — 1 (33%)	4 (67%) 1 (17%) 1 (17%) —	10 (67%) 3 (20%) 1 (7%) 1 (7%)
体重, kg 中央値 (最小, 最大)	82 (70, 89)	84 (83, 90)	87 (82, 90)	75 (59, 111)	83 (59, 111)

【 図 2 3 B 】

パラメータ	0.1 mg/kg n=3	0.3 mg/kg n=3	0.7 mg/kg n=3	1.0 mg/kg n=6	全患者 n=15
TTR 遺伝子型, N (%)					
PH100	0	1 (33%)	0	0	1 (7%)
PS97Y	1 (33%)	1 (33%)	0	0	2 (13%)
PE94G	0	0	1 (33%)	0	1 (7%)
P.T80A	2 (67%)	1 (33%)	1 (33%)	2 (33%)	6 (40%)
PS70R	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
DE62D	0	0	1 (33%)	2 (33%)	3 (20%)
D.V50M	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
臨床スコア, N (%)					
PN 能力障害スコア					
1	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	4 (67%)	13 (87%)
2	0	0	0	2 (33%)	2 (13%)
NHHA 分類					
I	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	4 (67%)	13 (87%)
II	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
HF の診断なし	0	0	0	1 (17%)	1 (7%)
NT-PROBNP (ng/L), 中央値 (最小, 最大)	127 (89, 396)	118 (<50, 359)	56 (<50, 195)	112 (<50, 544)	118 (<50, 596)

* NT-PROBNP ULN = 125 ng/L
 HF = 心不全; NT-PROBNP = N 末端プロ B 型ナトリウム利尿作用ペプチド;
 NHHA = NEW YORK HEART ASSOCIATION; PN = 末梢神経障害;
 TTR = トランススライレンチン; ULN = 正常上限

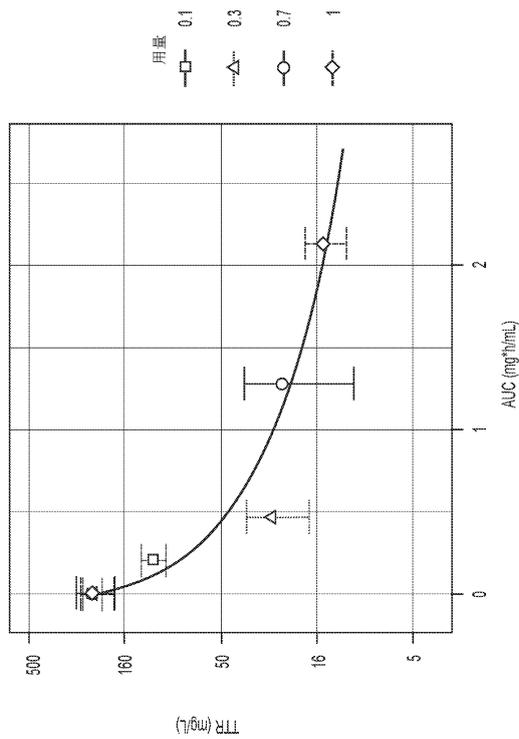
【 図 2 4 】



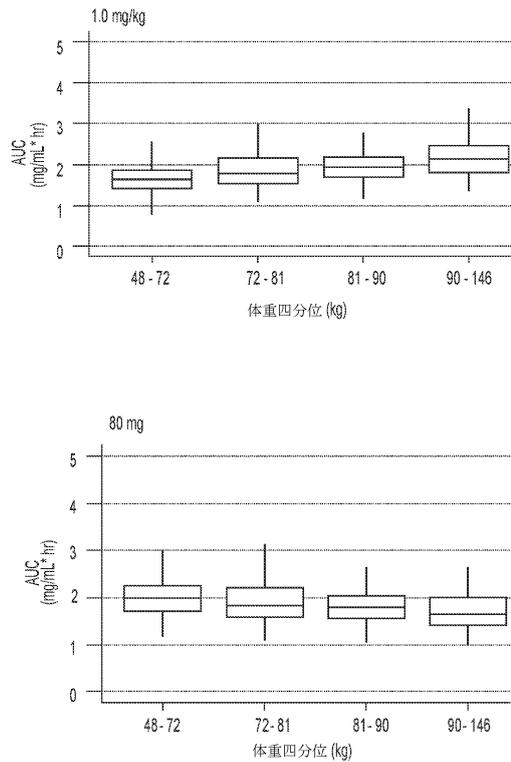
10

20

【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

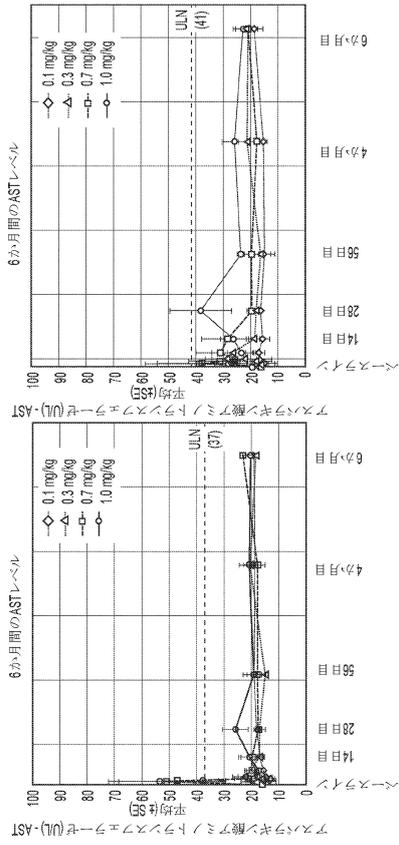


30

40

50

【 27 】



10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/034454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N15/113 C12N9/22	A61K9/127 A61K31/7088 A61P25/28
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/198697 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 1 October 2020 (2020-10-01) claims 1-37, 47, 59; examples 1-4 paragraphs [0150], [0298] - [0302], [0367], [0368] paragraphs [0471], [0473], [0484] - [0486], [0490], [0499], [0514], [0515], [0545] ----- -/--	1-138
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 November 2022		Date of mailing of the international search report 22/11/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/034454

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MAJA SEDIC ET AL: "Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey", VETERINARY PATHOLOGY., vol. 55, no. 2, 30 November 2017 (2017-11-30), pages 341-354, XP055759990, US ISSN: 0300-9858, DOI: 10.1177/0300985817738095 page 352; figure 19</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>JONATHAN D. FINN ET AL: "A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing", CELL REPORTS, vol. 22, no. 9, 27 February 2018 (2018-02-27), pages 2227-2235, XP055527484, US ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.014 figures 1,2,3</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>WO 2019/067872 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 4 April 2019 (2019-04-04) paragraphs [0099], [0136]; claims 1-20,66-82,106-113,209; examples 2,4-13</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>Anonymous: "Intellia Therapeutics to Present Interim Clinical Data from Ongoing Phase 1 Study of NTLA-2001 for the Treatment of Transthyretin (ATTR) Amyloidosis at the 2021 Peripheral Nerve Society Annual Meeting", 4 June 2021 (2021-06-04), XP55978922, Retrieved from the Internet: URL:https://ir.intelliata.com/node/9421/pdf [retrieved on 2022-11-08] the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-138

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/034454

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Anonymous: "Study: NCT04601051 - Study to Evaluate Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of NTLA-2001 in Patients With Hered Amyloidosis With Polyneuropathy (ATTRv-PN)", ClinicalTrials.gov archive, 3 December 2020 (2020-12-03), XP55978887, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT04601051?V_3=View#StudyPageTop [retrieved on 2022-11-08] the whole document</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>WO 2020/072605 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 9 April 2020 (2020-04-09) examples 19, 55-64</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>WO 2021/119275 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 17 June 2021 (2021-06-17) examples 5, 6</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>WO 2020/198706 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 1 October 2020 (2020-10-01) paragraphs [0565], [0601]; claims 1-72, 86-91; examples 8-15</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>Chang Yong: "Delivering on the therapeutic potential of CRISPR/Cas9: Development of an LNP- mediated genome editing therapeutic for the treatment of ATTR", 26th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, 18 October 2018 (2018-10-18), XP55978857, Retrieved from the Internet: URL:https://www.intelliata.com/wp-content/uploads/Intellia_ESGCT_TTR_FINAL2-10.18.2018.pdf [retrieved on 2022-11-08] pages 4, 5, 7 page 11 - page 14</p> <p>-----</p>	1-138
A	<p>WO 2021/046265 A1 (GENERATION BIO CO [US]) 11 March 2021 (2021-03-11) example 11</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-138

10

20

30

40

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/034454

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>QIU MIN ET AL: "Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angpt13", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 118, no. 10, 1 March 2021 (2021-03-01), XP55979968, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.2020401118 Retrieved from the Internet: URL:https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.2020401118> page 5, right-hand column</p> <p>-& Qiu Min ET AL: "Supplementary Information for Lipid nanoparticle-mediated co-delivery of Cas9 mRNA and single guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angpt13", Proceedings of the National Academy of Sciences, 1 March 2021 (2021-03-01), XP55979995, Retrieved from the Internet: URL:https://www.pnas.org/doi/suppl/10.1073/pnas.2020401118/suppl_file/pnas.2020401118.sapp.pdf [retrieved on 2022-11-10] figure S8</p>	1-138
X,P	<p>GILLMORE JULIAN D. ET AL: "CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 385, no. 6, 26 June 2021 (2021-06-26) , pages 493-502, XP55978811, US ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoa2107454 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa2107454?articleTools=true> the whole document</p>	1-138
X,P	<p>Leonard John ET AL: "NTLA-2001 for ATTR Amyloidosis: Interim Clinical Results from Ongoing Phase 1 Trial", 28 February 2022 (2022-02-28), XP55978920, Retrieved from the Internet: URL:https://www.intelliactx.com/wp-content/uploads/Intellia_NTLA-2001-IR-Event_vF.pdf [retrieved on 2022-11-08] page 16 - page 29</p>	1-138

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/034454

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/034454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020198697 A1	01-10-2020	AU 2020244887 A1	11-11-2021
		BR 112021019196 A2	18-01-2022
		CA 3134271 A1	01-10-2020
		CN 113874076 A	31-12-2021
		CO 2021014559 A2	19-11-2021
		EA 202192636 A1	17-03-2022
		EP 3946598 A1	09-02-2022
		IL 286524 A	31-10-2021
		JP 2022525428 A	13-05-2022
		KR 20220004648 A	11-01-2022
		SG 11202110434P A	28-10-2021
WO 2020198697 A1	01-10-2020		
WO 2019067872 A1	04-04-2019	AU 2018338787 A1	16-04-2020
		BR 112020005287 A2	24-09-2020
		CA 3077251 A1	04-04-2019
		CN 111417728 A	14-07-2020
		CO 2020005116 A2	15-05-2020
		EP 3688161 A1	05-08-2020
		IL 273317 A	30-04-2020
		JP 2021500864 A	14-01-2021
		KR 20200058509 A	27-05-2020
		PH 12020550364 A1	15-02-2021
		SG 11202002565Y A	29-04-2020
		TW 201932479 A	16-08-2019
		US 2020248180 A1	06-08-2020
WO 2019067872 A1	04-04-2019		
WO 2020072605 A1	09-04-2020	AU 2019351917 A1	29-04-2021
		BR 112021006270 A2	06-07-2021
		CA 3114032 A1	09-04-2020
		CN 113039174 A	25-06-2021
		CO 2021005774 A2	30-07-2021
		EA 202190916 A1	09-07-2021
		EP 3860972 A1	11-08-2021
		IL 281948 A	31-05-2021
		JP 2022501412 A	06-01-2022
		KR 20210093871 A	28-07-2021
		PH 12021550701 A1	03-11-2021
		SG 11202102921W A	29-04-2021
		TW 202028170 A	01-08-2020
US 2022009878 A1	13-01-2022		
WO 2020072605 A1	09-04-2020		
WO 2021119275 A1	17-06-2021	AU 2020401206 A1	14-07-2022
		BR 112022011214 A2	23-08-2022
		CA 3164192 A1	17-06-2021
		CN 115176001 A	11-10-2022
		CO 2022009562 A2	30-08-2022
		EP 4073249 A1	19-10-2022
		IL 293569 A	01-08-2022
		KR 20220126725 A	16-09-2022
		TW 202136509 A	01-10-2021
		WO 2021119275 A1	17-06-2021
WO 2020198706 A1	01-10-2020	AU 2020248337 A1	04-11-2021
		CA 3134544 A1	01-10-2020
		CN 113874004 A	31-12-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/034454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CO 2021014562 A2	19-11-2021
		EP 3946285 A1	09-02-2022
		JP 2022525429 A	13-05-2022
		KR 20220004984 A	12-01-2022
		WO 2020198706 A1	01-10-2020

WO 2021046265 A1	11-03-2021	AU 2020342668 A1	03-03-2022
		CA 3150452 A1	11-03-2021
		CN 114929205 A	19-08-2022
		EP 4025196 A1	13-07-2022
		IL 291038 A	01-05-2022
		JP 2022546597 A	04-11-2022
		US 2022280427 A1	08-09-2022
		WO 2021046265 A1	11-03-2021

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/603 (2006.01)	A 6 1 K 31/603	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/14 (2017.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/10 (2017.01)	A 6 1 K 47/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	

(32)優先日 令和3年11月3日(2021.11.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/264,435

(32)優先日 令和3年11月22日(2021.11.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/314,878

(32)優先日 令和4年2月28日(2022.2.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

リート 4 0

(72)発明者 メートランド, マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 シュトロウ, マーク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 シュー, ユエンシン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

F ターム (参考) 4C076 AA65 BB11 CC01 CC11 DD44 DD46 EE23 FF12 FF16

4C084 AA13 MA38 NA05 NA14 ZA011 ZA012 ZA361 ZA362 ZC751 ZC752

4C086 AA01 AA02 BC70 DA17 EA16 MA03 MA05 NA05 NA14 ZA01

ZA36 ZC75