

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和4年10月26日(2022.10.26)

【国際公開番号】WO2020/082041
 【公表番号】特表2022-512726(P2022-512726A)
 【公表日】令和4年2月7日(2022.2.7)
 【年通号数】公開公報(特許)2022-022
 【出願番号】特願2021-521097(P2021-521097)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/11(2006.01)
 C 1 2 N 5/10(2006.01)
 C 1 2 N 15/864(2006.01)
 A 6 1 K 35/761(2015.01)
 A 6 1 K 45/00(2006.01)
 A 6 1 K 48/00(2006.01)
 A 6 1 K 38/02(2006.01)
 A 6 1 K 38/46(2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 C 1 2 N 5/077(2010.01)
 C 1 2 N 5/0793(2010.01)
 C 1 2 N 15/54(2006.01)

20

【F I】

C 1 2 N 15/11 Z Z N A
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
 A 6 1 K 35/761
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 38/02
 A 6 1 K 38/46
 A 6 1 K 31/7088
 C 1 2 N 5/077
 C 1 2 N 5/0793
 C 1 2 N 15/54

30

【手続補正書】

【提出日】令和4年10月18日(2022.10.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

40

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

双方向性核酸構築物であって、

a) 第1のポリペプチドのコード配列を含む第1のセグメント、及び

b) 第2のポリペプチドのコード配列の逆相補体を含む第2のセグメント

を含み、前記構築物が、(i) 相同性アーム、(ii) 第1のポリペプチドのコード配列の発現を駆動するプロモーター、または(iii) 第2のポリペプチドのコード配列の発

50

現を駆動するプロモーターのいずれも含まない、前記双方向性核酸構築物。

【請求項 2】

前記第 2 のセグメントが、前記第 1 のセグメントの 3' である、請求項 1 に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 3】

前記第 1 のポリペプチド及び前記第 2 のポリペプチドが同一である、請求項 1 または 2 に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 4】

前記第 2 のポリペプチドのコード配列が、前記第 1 のポリペプチドのコード配列のものとは異なるコドン使用頻度を採用する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

10

【請求項 5】

前記第 2 のセグメントが、前記第 1 のセグメントにおける前記コード配列に対して少なくとも約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 97%、または約 99% 相補性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 6】

前記第 2 のセグメントが、前記第 1 のセグメントの前記コード配列の逆相補体、またはその断片を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

20

【請求項 7】

前記第 1 のセグメントが、リンカーによって前記第 2 のセグメントに連結される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 8】

前記リンカーが、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、500、1000、1500、2000 のヌクレオチド長である、請求項 7 に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 9】

前記第 1 及び第 2 のセグメントの各々が、ポリアデニル化シグナル配列またはポリアデニル化テール配列などのポリアデニル化配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

30

【請求項 10】

前記構築物が、スプライスアクセプター部位を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 11】

前記構築物が、前記第 1 のセグメントの 5' に第 1 のスプライスアクセプター部位及び前記第 2 のセグメントの 3' に第 2 のスプライスアクセプター部位を含む、請求項 10 に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 12】

前記構築物が、二本鎖である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

40

【請求項 13】

前記構築物が、二本鎖 DNA である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 14】

前記構築物が、一本鎖である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 15】

前記構築物が、一本鎖 DNA である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

50

【請求項 16】

前記ポリペプチドをコードする配列が、コドン最適化される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 17】

前記構築物が、次の末端構造：ヘアピン、ループ、末端逆位反復（ITR）、またはトロイドのうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 18】

前記構築物が、1、2、または 3 つの末端逆位反復（ITR）を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

10

【請求項 19】

前記構築物が、2 つ以下の ITR を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 20】

前記ポリペプチドが、分泌ポリペプチド、細胞内ポリペプチド、バリエーションポリペプチド、肝臓タンパク質、または非肝臓タンパク質である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 21】

前記ポリペプチドが、発現されたときに、シグナルペプチドを含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

20

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の構築物を含むベクター。

【請求項 23】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 22 に記載のベクター。

【請求項 24】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項 23 に記載のベクター。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の構築物を含む脂質ナノ粒子。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の構築物を含む細胞または細胞集団。

30

【請求項 27】

前記細胞または細胞集団が、肝臓細胞、筋肉細胞、またはニューロン細胞、またはその集団である、請求項 26 に記載の細胞または細胞集団。

【請求項 28】

対象において疾患または障害を治療する方法における使用のための、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のベクター、または請求項 25 に記載の脂質ナノ粒子であって、前記方法は、対象における細胞または細胞集団を前記構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子と接触させて、前記細胞または細胞集団が前記第 1 のポリペプチド及び/または前記第 2 のポリペプチドを発現するように、前記細胞または細胞集団における標的遺伝子座を修飾することを含む、前記構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

40

【請求項 29】

前記方法が、前記細胞または細胞集団にヌクレアーゼを提供することをさらに含み、前記ヌクレアーゼが、dsDNA 切断を導入することができる、請求項 28 に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

【請求項 30】

前記方法が、前記細胞または細胞集団に RNA ガイド DNA 結合剤及びガイド RNA（gRNA）を提供することを含む、請求項 28 または 29 に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

50

【請求項 3 1】

前記 gRNA が、シングル gRNA (sgRNA) である、請求項 3 0 に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

【請求項 3 2】

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする核酸として提供される、請求項 3 0 または 3 1 に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

【請求項 3 3】

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、酵素、または RNA ガイド DNA 結合剤をコードする mRNA として提供される、請求項 3 0 または 3 1 に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

10

【請求項 3 4】

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、Casヌクレアーゼである、請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

【請求項 3 5】

前記 Casヌクレアーゼが、クラス 2 の Casヌクレアーゼ、またはそのバリエーションである、請求項 3 4 に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

【請求項 3 6】

前記クラス 2 の Casヌクレアーゼが、Cas9ヌクレアーゼである、請求項 3 5 に記載の使用のための構築物、ベクター、または脂質ナノ粒子。

20

【請求項 3 7】

対象において疾患または障害を治療する方法における使用のための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のベクター、または請求項 2 5 に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 3 8】

細胞または細胞集団が前記第 1 のポリペプチド及び/または前記第 2 のポリペプチドを発現するように、前記細胞または細胞集団における標的遺伝子座を修飾する使用のための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のベクター、または請求項 2 5 に記載の脂質ナノ粒子。

30

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 9】

この説明及び例示的な実施形態は、限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書及び添付の請求項の目的について、特に明記しない限り、本明細書及び請求項で使用される量、パーセンテージ、または割合、及び他の数値を表す全ての数字は、どの場合においても「約」という用語によって、まだそれほど修飾されていない程度まで修飾されていると理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書及び添付の請求項に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。非常に少なくとも、及び均等論の適用を請求項の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

40

本発明はまた、以下に関する。

[項目 1]

双方向性核酸構築物であって、

a) ポリペプチドなどの薬剤のコード配列を含む第 1 のセグメント、及び

b) 前記薬剤のコード配列の逆相補体を含む第 2 のセグメント

を含み、前記構築物が、ポリペプチドなどの前記薬剤の発現を駆動するプロモーターを含

50

まない、前記双方向性核酸構築物。

[項目 2]

双方向性核酸構築物であって、

a) 第 1 のポリペプチドなどの第 1 の薬剤のコード配列を含む第 1 のセグメント、及び
b) 第 2 のポリペプチドなどの第 2 の薬剤のコード配列の逆相補体を含む第 2 のセグメン
ト

を含み、前記構築物が、前記薬剤 (複数可) の発現を駆動するプロモーターを含まない、
前記双方向性核酸構築物。

[項目 3]

前記第 2 のセグメントが、前記第 1 のセグメントの 3 ' である、項目 1 または 2 に記載
の双方向性核酸構築物。

10

[項目 4]

前記第 2 のセグメントにおける前記逆相補体の前記コード配列が、前記第 1 のセグメン
トの前記第 1 のコード配列のものとは異なるコドン使用頻度を採用する、項目 1 ~ 3 のい
ずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 5]

前記第 2 のセグメントが、前記第 1 のセグメントにおける前記コード配列に対して少な
くとも約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 6
5 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 97 %、また
は約 99 % 相補性を有するヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の
双方向性核酸構築物。

20

[項目 6]

前記第 2 のセグメントの前記コード配列が、前記第 1 のセグメントにおける前記コード
配列によってコードされる 1 つ以上のアミノ酸の 1 つ以上の代替コドンを使用して前記ポ
リペプチドをコードする、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 7]

前記第 2 のセグメントが、前記第 1 のセグメントの前記コード配列の逆相補体、または
その断片を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 8]

前記逆相補体が、

30

a. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列に対して実質的に相補的ではない、

b. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列の断片に対して実質的に相補的ではない、

c. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列に対して高度に相補的である、

d. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列の断片に対して高度に相補的である、

e. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列の前記逆相補体と少なくとも 60 % 同一で
ある、

f. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列の前記逆相補体と少なくとも 70 % 同一で
ある、

f. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列の前記逆相補体と少なくとも 90 % 同一で
ある、

40

g. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列の前記逆相補体と 50 ~ 80 % 同一である
、及び / または

h. 前記第 1 のセグメントの前記コード配列の前記逆相補体と 60 ~ 100 % 同一であ
る、

項目 7 に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 9]

前記構築物が、相同性アームを含まない、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の双方向性
核酸構築物。

[項目 10]

前記第 1 のセグメントが、リンカーによって前記第 2 のセグメントに連結される、項目

50

1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 1]

前記リンカーが、約 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、500、1000、1500、2000 のヌクレオチド長である、項目 10 に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 2]

前記第 1 及び第 2 のセグメントの各々が、ポリアデニル化シグナル配列またはポリアデニル化テール配列などのポリアデニル化配列を含む、項目 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 3]

前記構築物が、スプライスアクセプター部位を含む、項目 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 4]

前記構築物が、前記第 1 のセグメントの 5' に第 1 のスプライスアクセプター部位及び前記第 2 のセグメントの 3' に第 2 のスプライスアクセプター部位を含む、項目 13 に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 5]

前記構築物が、二本鎖、場合により二本鎖 DNA である、項目 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 6]

前記構築物が、一本鎖、場合により一本鎖 DNA である、項目 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 7]

前記ポリペプチドをコードする配列が、コドン最適化される、項目 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 8]

前記構築物が、次の末端構造：ヘアピン、ループ、末端逆位反復 (ITR)、またはトロイドのうちの 1 つ以上を含む、項目 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 1 9]

前記構築物が、1、2、または 3 つの末端逆位反復 (ITR) を含む、項目 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 0]

前記構築物が、2 つ以下の ITR を含む、項目 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 1]

前記ポリペプチドが、分泌ポリペプチドである、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 2]

前記ポリペプチドが、細胞内ポリペプチドである、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 3]

前記第 1 のポリペプチド及び前記第 2 のポリペプチドが異なる、項目 2 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 4]

前記ポリペプチドが、バリエーションポリペプチドである、項目 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 5]

前記ポリペプチドが、肝臓タンパク質である、項目 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

10

20

30

40

50

[項目 2 6]

前記ポリペプチドが、非肝臓タンパク質である、項目 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 7]

前記構築物が、相同性非依存性構築物である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 8]

前記ポリペプチドが、発現されたときに、異種シグナルペプチドを含む、項目 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 2 9]

前記核酸が、異種シグナルペプチドをコードする、項目 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 3 0]

前記核酸が、シグナルペプチドをコードしない、項目 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 3 1]

前記ポリペプチドが、発現されたときに、それ自身のシグナルペプチドを含む、項目 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 3 2]

前記核酸が、異種ペプチドをコードする、項目 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 3 3]

前記異種ペプチドが、2 A である、項目 3 2 に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 3 4]

項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物を含むベクター。

[項目 3 5]

前記ベクターが、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである、項目 3 4 に記載のベクター。

[項目 3 6]

前記 A A V が、一本鎖ゲノム (s s A A V) または自己相補性ゲノム (s c A A V) を含む、項目 3 4 または 3 5 に記載のベクター。

[項目 3 7]

前記 A A V ベクターが、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 3 B、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 6 . 2、A A V 7、A A V r h . 6 4 R 1、A A V h u . 3 7、A A V r h . 8、A A V r h . 3 2 . 3 3、A A V 8、A A V 9、A A V - D J、A A V 2 / 8、A A V r h 1 0、A A V L K 0 3、A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、r h 1 0、及びそれらのハイブリッドからなる群から選択される、項目 3 4 または 3 5 に記載のベクター。

[項目 3 8]

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む自己相補性 (または二本鎖) 核酸構築物を含むウイルスベクターであって、前記ベクターが、前記ポリペプチドの発現を駆動するプロモーターを含まない、前記ウイルスベクター。

[項目 3 9]

前記ベクターが、相同性アームを含まない、項目 3 8 に記載のベクター。

[項目 4 0]

項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物を含む脂質ナノ粒子。

[項目 4 1]

項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物を含む宿主細胞。

[項目 4 2]

前記宿主細胞が、肝臓細胞、筋肉細胞、またはニューロン細胞である、項目 4 1 に記載

10

20

30

40

50

の宿主細胞。

[項目 4 3]

前記宿主細胞が、非分裂細胞型である、項目 4 1 に記載の宿主細胞。

[項目 4 4]

前記宿主細胞が、前記構築物によってコードされる前記ポリペプチドを発現する、項目 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

[項目 4 5]

前記宿主細胞が、肝細胞である、項目 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

[項目 4 6]

細胞に、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物、項目 3 4 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のベクター、または項目 4 0 に記載の L N P を提供することを含む、標的遺伝子座を修飾する方法。

10

[項目 4 7]

構築物を細胞に導入する方法であって、前記細胞に、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物、項目 3 4 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のベクター、または項目 4 0 に記載の L N P を提供することを含む、前記方法。

[項目 4 8]

細胞においてポリペプチドを発現する方法であって、前記細胞に、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物、項目 3 4 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のベクター、または項目 4 0 に記載の L N P を提供することを含む、前記方法。

20

[項目 4 9]

細胞においてポリペプチドの発現を増加させる方法であって、前記細胞に、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物、項目 3 4 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のベクター、または項目 4 0 に記載の L N P を提供することを含む、前記方法。

[項目 5 0]

前記構築物、ベクター、または L N P が、インピボで提供される、項目 4 6 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 5 1]

前記構築物、ベクター、または L N P が、インピトロで提供される、項目 4 6 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

[項目 5 2]

細胞に、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の構築物、項目 3 4 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のベクター、または項目 4 0 に記載の L N P を提供することを含む、標的遺伝子座を修飾するエクスピボ方法。

[項目 5 3]

前記細胞が、非分裂細胞型である、項目 4 6 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。

[項目 5 4]

前記細胞にヌクレアーゼを提供することをさらに含み、前記ヌクレアーゼが、部位特異的 s s D N A または d s D N A 切断を導入することができる、項目 4 6 ~ 5 3 のいずれかに記載の方法。

40

[項目 5 5]

前記細胞に、RNA ガイド DNA 結合剤及びガイド RNA (g R N A) を提供することを含む、項目 4 6 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 5 6]

前記 g R N A が、シングル g R N A (s g R N A) である、項目 5 5 に記載の方法。

[項目 5 7]

前記構築物、RNA ガイド DNA 結合剤、及び前記 g R N A が、前記細胞に同時に提供される、項目 5 5 または 5 6 に記載の方法。

[項目 5 8]

前記構築物、RNA ガイド DNA 結合剤、及び前記 g R N A が、任意の順序で、前記細胞

50

胞に逐次的に提供される、項目 5 5 または 5 6 に記載の方法。

[項目 5 9]

前記構築物が、前記 gRNA 及び RNA ガイド DNA 結合剤を提供する前に、前記細胞に提供される、項目 5 8 に記載の方法。

[項目 6 0]

前記 RNA ガイド DNA 結合剤、または組み合わせた RNA ガイド DNA 結合剤及び gRNA が、前記構築物を提供する前に、前記細胞に提供される、項目 5 8 に記載の方法。

[項目 6 1]

前記構築物が、ベクターで提供される、項目 5 4 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 6 2]

前記構築物が、脂質ナノ粒子で提供される、項目 5 4 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 6 3]

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする核酸として提供される、項目 5 4 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 6 4]

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、Cas 酵素または RNA ガイド DNA 結合剤をコードする mRNA として提供される、項目 5 4 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 6 5]

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、Cas 9ヌクレアーゼなどの Casヌクレアーゼである、項目 5 4 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 6 6]

前記 Casヌクレアーゼが、クラス 2 の Casヌクレアーゼ、またはそのバリエーションである、項目 6 5 に記載の方法。

[項目 6 7]

前記 Casヌクレアーゼが、S. pyogenes Cas 9、またはそのバリエーションである、項目 5 4 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 6 8]

前記 Casヌクレアーゼが、ニッカーゼである、項目 5 4 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 6 9]

前記遺伝子座が、アルブミン遺伝子座である、項目 5 4 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 7 0]

前記細胞が、非分裂細胞型である、項目 5 4 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 7 1]

前記細胞が、肝臓細胞、ニューロン細胞、または筋肉細胞である、項目 5 4 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

[項目 7 2]

項目 4 6 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法によって作製される細胞。

[項目 7 3]

前記細胞が、宿主細胞である、項目 7 2 に記載の細胞。

[項目 7 4]

前記宿主細胞が、肝臓細胞、筋肉細胞、またはニューロン細胞である、項目 7 3 に記載の宿主細胞。

[項目 7 5]

前記宿主細胞が、非分裂細胞型である、項目 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。

[項目 7 6]

前記宿主細胞が、前記構築物によってコードされる前記ポリペプチドを発現する、項目 7 2 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の細胞。

10

20

30

40

50

[項目 7 7]

前記宿主細胞が、肝細胞である、項目 7 2 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

[項目 7 8]

前記薬剤が、治療用薬剤である、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 7 9]

前記薬剤が、機能性 RNA、mRNA、またはポリペプチドのうちのいずれか 1 つ以上である、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[項目 8 0]

前記薬剤が、ポリペプチドである、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

10

[項目 8 1]

前記薬剤が、治療用ポリペプチドである、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

20

30

40

50