

【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27日(2022.10.27)

【国際公開番号】WO2020/082047
 【公表番号】特表2022-505381(P2022-505381A)
 【公表日】令和4年1月14日(2022.1.14)
 【年通号数】公開公報(特許)2022-006
 【出願番号】特願2021-521383(P2021-521383)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/09(2006.01)
 C 1 2 N 15/12(2006.01)
 C 1 2 N 15/864(2006.01)
 C 1 2 N 15/88(2006.01)
 C 1 2 N 5/10(2006.01)
 C 1 2 N 5/071(2010.01)
 A 6 1 P 43/00(2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 48/00(2006.01)
 A 6 1 K 47/54(2017.01)
 A 6 1 K 35/76(2015.01)
 A 6 1 K 35/761(2015.01)
 A 6 1 P 1/16(2006.01)

20

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 15/12 Z N A
 C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
 C 1 2 N 15/88 Z
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 5/071
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 47/54
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 35/761
 A 6 1 P 1/16

30

【手続補正書】

【提出日】令和4年10月18日(2022.10.18)

40

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【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】

以下：

- a) A A Tポリペプチドの第1のコード配列を含む第1のセグメント、及び
- b) A A Tポリペプチドの第2のコード配列の逆相補体を含む第2のセグメント

50

を含み、

(i) 相同性アーム、(i i) A A T ポリペプチドの第 1 のコード配列の発現を促進するプロモーター、または(i i i) A A T ポリペプチドの第 2 のコード配列の発現を促進するプロモーターのいずれかを含まない、
双方向性核酸構築物。

【請求項 2】

第 2 のコード配列が、第 1 のコード配列とは異なるコドン使用頻度を採用する、請求項 1 に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 3】

細胞または細胞集団において A A T ポリペプチドをコードする核酸を挿入する方法に使用するための請求項 1 または 2 に記載の双方向性核酸構築物であって、

前記方法が、

- i) 前記双方向性核酸構築物と、
- i i) R N A ガイド D N A 結合剤と、
- i i i) アルブミンガイド R N A (g R N A) と

を細胞または細胞集団に送達することを含み、

双方向性核酸構築物。

【請求項 4】

A A T タンパク質を必要とする対象においてアルファ 1 アンチトリプシン欠乏症 (A A T D) を治療する方法に使用するための請求項 1 または 2 に記載の双方向性核酸構築物であって、

前記方法は、

- i) 前記双方向性核酸構築物と、
- i i) R N A ガイド D N A 結合剤と、
- i i i) アルブミンガイド R N A (g R N A) と

を対象に投与することを含み、

双方向性核酸構築物。

【請求項 5】

前記アルブミン g R N A が、配列番号 4 0 の配列を含む、請求項 3 または 4 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 6】

前記アルブミン g R N A が、以下：

m U * m A * m A * A G C A U A G U G C A A U G G A U G U U U U A G A m G m C m U
m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G
U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C
m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U (配列番号 7 2)

(式中、「m A」、「m C」、「m U」、及び「m G」は、2' - O - M e で置換されているヌクレオチドを表し、* は、ホスホロチオエート (P S) 結合を示す。)

の配列を含む、請求項 5 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 7】

請求項 3 または 4 に記載の使用のための双方向性核酸構築物であって、

前記アルブミンガイド R N A (g R N A) が、

a) 配列番号 8、2、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、

b) 配列番号 8、2、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、

c) 配列番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択される配列、

10

20

30

40

50

- d) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、
- e) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、
- f) 配列番号 34 ~ 97 からなる群から選択される配列、ならびに
- g) 配列番号 2 ~ 33 について列挙されるゲノム座標の 15 個の連続ヌクレオチド + / - 10 個のヌクレオチドに対して相補的である配列

から選択される配列を含み、
それにより、前記対象において A A T D を治療する、
双方向性核酸構築物。

【請求項 8】

内因性ヒト S E R P I N A 1 遺伝子のエクソン 2、3、4、または 5 に存在する標的配列に対して少なくとも部分的に相補的である S E R P I N A 1 ガイド R N A と組み合わせ投与される、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 9】

前記対象の前記内因性 S E R P I N A 1 遺伝子内に二本鎖切断 (D S B) が誘導される、請求項 8 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 10】

前記対象の前記内因性 S E R P I N A 1 遺伝子内に修飾 (改変) が誘導される、請求項 8 または 9 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 11】

前記双方向性核酸構築物、前記 R N A ガイド D N A 結合剤、及び前記アルブミン g R N A が前記対象に投与される前または後に、前記 S E R P I N A 1 ガイド R N A が前記対象に投与される、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 12】

前記 S E R P I N A 1 ガイド R N A が、配列番号 1000 ~ 1128 から選択されるガイド配列、または配列番号 1000 ~ 1128 から選択される配列の 17、18、19、及び / または 20 個の連続ヌクレオチドと少なくとも 95%、90%、85%、80%、もしくは 75% 同一であるガイド配列を含む、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 13】

前記 S E R P I N A 1 ガイド R N A と共に R N A ガイド D N A 結合剤が投与される、請求項 8 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 14】

前記双方向性核酸構築物、前記 R N A ガイド D N A 結合剤、前記アルブミン g R N A、及び / または前記 S E R P I N A 1 ガイド R N A が、核酸ベクター及び / または脂質ナノ粒子中で投与される、請求項 3 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 15】

前記双方向性核酸構築物、前記 R N A ガイド D N A 結合剤、前記アルブミン g R N A、及び / または前記 S E R P I N A 1 ガイド R N A が、核酸ベクター中で投与され、前記核酸ベクターがウイルスベクターである、請求項 14 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 16】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 15 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 17】

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

10

20

30

40

50

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、請求項 1 6 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 1 8】

前記 R N A ガイド D N A 結合剤が、クラス 2 の C a s ヌクレアーゼである、請求項 3 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 1 9】

前記 C a s ヌクレアーゼが、C a s 9 ヌクレアーゼである、請求項 1 8 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。 10

【請求項 2 0】

前記 C a s 9 ヌクレアーゼが、S . p y o g e n e s C a s 9 ヌクレアーゼである、請求項 1 9 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 2 1】

前記対象の機能性 A A T のレベルが、投与前の前記対象の機能性 A A T のレベルと比較して、少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、またはそれ以上増加する、請求項 3 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 2 2】

前記 A A T のレベルが、血清、血漿、又は血液で測定される、請求項 2 1 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。 20

【請求項 2 3】

前記対象における細胞または細胞集団が、投与前のレベルと比較して、少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、またはそれ以上増加したレベルで機能性 A A T を発現する、請求項 3 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 2 4】

前記細胞または細胞集団が、前記対象の肝臓に由来する、請求項 2 3 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。 30

【請求項 2 5】

前記細胞または細胞集団が、肝臓細胞を含む、請求項 2 3 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 2 6】

前記肝臓細胞が、肝細胞である、請求項 2 5 に記載の使用のための双方向性核酸構築物。

【請求項 2 7】

前記治療が、S E R P I N A 1 の内因性発現を低減することができる遺伝子編集系を投与することをさらに含む、請求項 3 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物。 40

【請求項 2 8】

請求項 1 または 2 に記載の双方向性核酸構築物を含む、ベクター。

【請求項 2 9】

アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである、請求項 2 8 に記載のベクター。

【請求項 3 0】

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、請求項 2 9 に記載のベクター。

【請求項 3 1】

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、 50

AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッドからなる群から選択される、請求項30に記載のベクター。

【請求項32】

請求項1または2に記載の双方向性核酸構築物を含む、ウイルスベクター。

【請求項33】

請求項1または2に記載の双方向性核酸構築物を含む、脂質ナノ粒子。

【請求項34】

請求項1または2に記載の双方向性核酸構築物を含む、細胞。

10

【請求項35】

前記細胞が、非分裂細胞型である、請求項34に記載の細胞。

【請求項36】

前記細胞が、肝臓細胞である、請求項34に記載の細胞。

【請求項37】

前記細胞が、肝細胞である、請求項36に記載の細胞。

【請求項38】

前記細胞が、前記双方向性構築物によってコードされる前記AATポリペプチドを発現する、請求項34～37のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項39】

細胞または細胞集団においてAATポリペプチドをコードする核酸を挿入する方法に使用するための請求項1または2に記載の双方向性核酸構築物。

20

【請求項40】

AATタンパク質を必要とする対象においてアルファ1アンチトリプシン欠乏症(AATD)を治療する方法に使用するための請求項1または2に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項41】

- i) 請求項1に記載の双方向性核酸構築物と、
- ii) RNAガイドDNA結合剤と、
- iii) アルブミンガイドRNA(gRNA)と

を含む、キットまたは組成物。

30

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0254

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0254】

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実施形態の目的について、特に明記しない限り、本明細書及び実施形態で使用される量、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実施形態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実施形態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

本発明は以下の態様も提供する。

[1] SERPINA1核酸を細胞または細胞集団に導入する方法であって、

- i) 異種AATタンパク質コード配列を含む核酸構築物と、
- ii) RNAガイドDNA結合剤と、
- iii) アルブミンガイドRNA(gRNA)であって、

50

a) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、

b) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、

c) 配列番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択される配列、

d) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、

e) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、 10

f) 配列番号 34 ~ 97 からなる群から選択される配列、ならびに

g) 配列番号 2 ~ 33 について列挙されるゲノム座標の 15 個の連続ヌクレオチド + / - 10 個のヌクレオチドに対して相補的である配列から選択される配列を含む、前記アルブミンガイド RNA (gRNA) と、を投与することを含み、

それにより、前記 SERPINA1 核酸を前記細胞または細胞集団に導入する、前記方法。

[2] AAT を必要とする対象においてそれを発現する方法であって、

i) 異種 AAT タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、

ii) RNA ガイド DNA 結合剤と、 20

iii) アルブミンガイド RNA (gRNA) であって、

a) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、

b) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、

c) 配列番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択される配列、

d) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、 30

e) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、

f) 配列番号 34 ~ 97 からなる群から選択される配列、ならびに

g) 配列番号 2 ~ 33 について列挙されるゲノム座標の 15 個の連続ヌクレオチド + / - 10 個のヌクレオチドに対して相補的である配列から選択される配列を含む、前記アルブミンガイド RNA (gRNA) と、を投与することを含み、

それにより、AAT を必要とする対象においてそれを発現する、前記方法。

[3] AAT タンパク質を必要とする対象においてアルファ 1 アンチトリプシン欠乏症 (AATD) を治療する方法であって、

i) 異種 AAT タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、 40

ii) RNA ガイド DNA 結合剤と、

iii) アルブミンガイド RNA (gRNA) であって、

a) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、

b) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、

c) 配列番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択される配列、

d) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、 50

85%、80%、または75%同一である配列、

e) 配列番号2~33からなる群から選択される配列の少なくとも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチド、

f) 配列番号34~97からなる群から選択される配列、ならびに

g) 配列番号2~33について列挙されるゲノム座標の15個の連続ヌクレオチド+/-10個のヌクレオチドに対して相補的である配列から選択される配列を含む、前記アルブミンガイドRNA (gRNA) と、を投与することを含み、

それにより、前記対象においてAATDを治療する、前記方法。

[4] 肝臓細胞または細胞集団からのAAT分泌を増加させる方法であって、

i) 異種AATタンパク質コード配列を含む核酸構築物と、

ii) RNAガイドDNA結合剤と、

iii) アルブミンガイドRNA (gRNA) であって、

a) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

b) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択される配列の少なくとも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチド、

c) 配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択される配列、

d) 配列番号2~33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

e) 配列番号2~33からなる群から選択される配列の少なくとも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチド、

f) 配列番号34~97からなる群から選択される配列、ならびに

g) 配列番号2~33について列挙されるゲノム座標の15個の連続ヌクレオチド+/-10個のヌクレオチドに対して相補的である配列から選択される配列を含む、前記アルブミンガイドRNA (gRNA) と、を投与することを含み、

それにより、前記肝臓細胞または前記細胞集団からのAAT分泌を増加させる、前記方法。

[5] 前記方法が、内因性SERPINA1遺伝子内で二本鎖切断(DSB)を誘導することをさらに含む、[1]~[4]のいずれか1項に記載の方法。

[6] 前記方法が、前記内因性SERPINA1遺伝子を修飾(改変)することをさらに含む、[1]~[4]のいずれか1項に記載の方法。

[7] 異種AATタンパク質コード配列を含む前記核酸構築物、前記RNAガイドDNA結合剤、及び前記アルブミンgRNAを投与する前または後に、前記DSBが前記内因性SERPINA1遺伝子内で誘導され、及び/または前記内因性SERPINA1遺伝子が修飾(改変)される、[5]または[6]に記載の方法。

[8] 前記方法が、内因性ヒトSERPINA1遺伝子のエクソン2、3、4、または5に存在する標的配列に対して少なくとも部分的に相補的であるSERPINA1ガイドRNAを投与することをさらに含む、[1]~[7]のいずれか1項に記載の方法。

[9] 前記SERPINA1ガイドRNAが、配列番号1000~1128から選択されるガイド配列、または配列番号1000~1128から選択される配列の17、18、19、及び/または20個の連続ヌクレオチドと少なくとも95%、90%、85%、80%、もしくは75%同一であるガイド配列を含む、[8]に記載の方法。

[10] 前記方法が、RNAガイドDNA結合剤を、前記SERPINA1ガイドRNAと共に投与することをさらに含む、[8]に記載の方法。

[11] 非相同末端結合(NHEJ)が、前記内因性SERPINA1遺伝子におけるDSBの修復中に変異をもたらす、[8]に記載の方法。

[12] NHEJが、前記内因性SERPINA1遺伝子におけるDSBの修復中にヌクレオチド(複数可)の欠失または挿入をもたらす、[11]に記載の方法。

10

20

30

40

50

- [1 3] ヌクレオチド (複数可) の前記欠失または挿入が、前記内因性 S E R P I N A 1 遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス変異を誘導する、[1 2] に記載の方法。
- [1 4] 前記投与が、インビトロである、[1] ~ [1 3] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [1 5] 前記投与が、インビボである、[1] ~ [1 3] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [1 6] 前記アルブミン g R N A が、
 a) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、
 b) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、
 c) 配列番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択される配列から選択される配列を含むガイド配列を含む、[1] ~ [1 5] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [1 7] 前記核酸構築物が、核酸ベクター及び/または脂質ナノ粒子中で投与される、[1] ~ [1 6] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [1 8] 前記 RNA ガイド DNA 結合剤及び/またはアルブミン g R N A が、核酸ベクター及び/または脂質ナノ粒子中で投与される、[1] ~ [1 7] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [1 9] 前記 RNA ガイド DNA 結合剤及び/または S E R P I N A 1 g R N A が、核酸ベクター及び/または脂質ナノ粒子中で投与される、[1] ~ [1 8] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [2 0] 前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、[1 7] ~ [1 9] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [2 1] 前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、[2 0] に記載の方法。
- [2 2] 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、[2 1] に記載の方法。
- [2 3] 前記核酸構築物、RNA ガイド DNA 結合剤、アルブミン g R N A、及び S E R P I N A 1 g R N A が、任意の順序及び/または任意の組み合わせで逐次的に投与される、[1] ~ [2 2] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [2 4] 前記核酸構築物、RNA ガイド DNA 結合剤、アルブミン g R N A、及び S E R P I N A 1 g R N A が、個々にまたは任意の組み合わせで、同時に投与される、[1] ~ [2 3] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [2 5] 前記 RNA ガイド DNA 結合剤、または組み合わせた RNA ガイド DNA 結合剤及びアルブミン g R N A が、前記核酸構築物を投与する前に投与される、[1] ~ [2 4] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [2 6] 前記核酸構築物が、前記アルブミン g R N A 及び/または RNA ガイド DNA 結合剤を投与する前に投与される、[1] ~ [2 5] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [2 7] 前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、クラス 2 の C a s ヌクレアーゼである、[1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [2 8] 前記 C a s ヌクレアーゼが、C a s 9 ヌクレアーゼである、[2 7] に記載の方法。
- [2 9] 前記 C a s 9 ヌクレアーゼが、S . p y o g e n e s C a s 9 ヌクレアーゼである、[2 8] に記載の方法。

[3 0] 前記 C a s ヌクレアーゼが、クリベースである、[2 8] ~ [3 0] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 1] 前記 C a s ヌクレアーゼが、ニッカーゼである、[2 8] ~ [3 0] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 2] 前記核酸構築物が、双方向性核酸構築物である、[1] ~ [3 1] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 3] 前記核酸構築物が、一本鎖または二本鎖である、[1] ~ [3 2] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 4] 前記核酸構築物が、一本鎖 DNA または二本鎖 DNA である、[1] ~ [3 3] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 5] 前記双方向性構築物が、前記異種 A A T タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない、[1] ~ [3 4] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 6] 前記対象の機能性 A A T のレベルが、少なくとも約 5 0 0 μ g / m l に増加する、[2 1] ~ [3 5] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 7] 前記対象の機能性 A A T のレベルが、投与前の前記対象の機能性 A A T のレベルと比較して、少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、またはそれ以上増加する、[1] ~ [3 5] のいずれか 1 項に記載の方法。

[3 8] 前記 A A T のレベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、及び / または痰で測定される、[3 6] または [3 7] に記載の方法。

[3 9] 前記細胞または細胞集団が、投与前のレベルと比較して、少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、またはそれ以上増加したレベルで機能性 A A T を発現する、[1] ~ [3 8] のいずれか 1 項に記載の方法。

[4 0] 前記細胞または細胞集団が、A A T を発現することができる、[1] ~ [3 9] のいずれか 1 項に記載の方法。

[4 1] A A T を発現することができる前記細胞または細胞集団が、肝臓、肺、胃器官、腎臓、胃、近位および遠位の小腸、膵臓、副腎、または脳のうちのいずれか 1 つ以上の組織に由来する、[4 0] に記載の方法。

[4 2] 前記細胞または細胞集団が、肝臓細胞（例えば、肝細胞）または肺細胞を含む、[4]、[5]、[8] ~ [3 7]、または [4 1] のいずれかに記載の方法。

[4 3] 前記肝臓細胞が、肝細胞である、[4 2] に記載の方法。

[4 4] 前記肝臓における A A T 蓄積が、低減される、[1] ~ [4 3] のいずれか 1 項に記載の方法。

[4 5] 前記核酸構築物が、野生型 A A T タンパク質、またはその機能的断片をコードする配列を含む、[1] ~ [4 4] のいずれか 1 項に記載の方法。

[4 6] A A T を必要とする対象においてそれを発現する方法であって、異種 A A T タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を前記対象に投与することを含み、それにより、前記対象において A A T を発現する、前記方法。

[4 7] A A T タンパク質を必要とする対象においてアルファ 1 アンチトリプシン欠乏症（A A T D）を治療する方法であって、異種 A A T タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を投与することを含み、それにより、前記対象において A A T D を治療する、前記方法。

[4 8] 細胞または細胞集団において A A T を発現する方法であって、異種 A A T タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を前記細胞または細胞集団に投与することを含み、それにより、前記細胞または細胞集団において A A T を発現する、前記方法。

[4 9] 肝臓細胞または細胞集団からの A A T 分泌を増加させる方法であって、異種 A A T タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を前記細胞または細胞集団に投与することを含み、それにより、前記肝臓細胞または細胞集団からの A A T 分泌を増加させる、前記方法。

10

20

30

40

50

- [5 0] 前記双方向性核酸構築物が、
 a) 異種 A A T のコード配列を含む第 1 のセグメント、及び
 b) 前記異種 A A T 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、前記異種 A A T の発現を駆動するプロモーターを含まない、[4 6] ~ [4 9] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [5 1] 前記双方向性核酸構築物が、
 a) 異種 A A T 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、前記異種 A A T 及び / または前記第 2 の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、[4 6] ~ [4 9] のいずれか 1 項に記載の方法。 10
- [5 2] R N A ガイド D N A 結合剤を投与することをさらに含む、[4 6] ~ [5 1] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [5 3] アルブミン g R N A を投与することをさらに含む、[4 6] ~ [5 2] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [5 4] 前記方法が、内因性 S E R P I N A 1 遺伝子内で二本鎖切断 (D S B) を誘導することをさらに含む、[4 6] ~ [5 3] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [5 5] 前記方法が、前記内因性 S E R P I N A 1 遺伝子を修飾 (改変) することをさらに含む、[4 6] ~ [5 4] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [5 6] 前記方法が、前記内因性ヒト S E R P I N A 1 遺伝子のエクソン 2、3、4、または 5 に存在する標的配列に対して少なくとも部分的に相補的である S E R P I N A 1 ガイド R N A を投与することをさらに含む、[4 6] ~ [5 5] のいずれか 1 項に記載の方法。 20
- [5 7] 前記 S E R P I N A 1 ガイド R N A が、配列番号 1 0 0 0 ~ 1 1 2 8 から選択されるガイド配列、または配列番号 1 0 0 0 ~ 1 1 2 8 から選択される配列と少なくとも 9 5 %、9 0 %、8 5 %、8 0 %、もしくは 7 5 % 同一であるガイド配列を含む、[5 6] に記載の方法。
- [5 8] 前記方法が、R N A ガイド D N A 結合剤を投与することをさらに含む、[5 4] ~ [5 7] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [5 9] 非相同末端結合 (N H E J) が、前記内因性 S E R P I N A 1 遺伝子における D S B の修復中に変異をもたらす、[5 4] ~ [5 8] のいずれか 1 項に記載の方法。 30
- [6 0] N H E J が、前記内因性 S E R P I N A 1 遺伝子における D S B の修復中にヌクレオチド (複数可) の欠失または挿入をもたらす、[5 9] に記載の方法。
- [6 1] ヌクレオチド (複数可) の前記欠失または挿入が、前記内因性 S E R P I N A 1 遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス変異を誘導する、[6 0] に記載の方法。
- [6 2] 前記投与が、インビトロである、[4 6] ~ [6 1] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [6 3] 前記投与が、インビボである、[4 6] ~ [6 1] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [6 4] 前記アルブミン g R N A が、
 a) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列と少なくとも 9 5 %、9 0 %、8 5 %、8 0 %、または 7 5 % 同一である配列、
 b) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、
 c) 配列番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択される配列から選択される配列を含むガイド配列を含む、[4 6] ~ [6 3] のいずれか 1 項に記載の方法。 40
- [6 5] 前記双方向性構築物が、核酸ベクター及び / または脂質ナノ粒子中で投与される、[4 6] ~ [6 4] のいずれか 1 項に記載の方法。
- [6 6] 前記 R N A ガイド D N A 結合剤及び / またはアルブミン g R N A が、核酸ベク 50

ター及び/または脂質ナノ粒子中で投与される、[46]~[65]のいずれか1項に記載の方法。

[67] 前記RNAガイドDNA結合剤及び/またはSERPINA1 gRNAが、核酸ベクター及び/または脂質ナノ粒子中で投与される、[46]~[66]のいずれか1項に記載の方法。

[68] 前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、[46]~[67]のいずれか1項に記載の方法。

[69] 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、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、[68]に記載の方法。

10

[70] 前記AAVベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッドからなる群から選択される、[69]に記載の方法。

[71] 前記双方向性構築物、RNAガイドDNA結合剤、アルブミンgRNA、及びSERPINA1 gRNAが、任意の順序及び/または任意の組み合わせで逐次的に投与される、[46]~[70]のいずれか1項に記載の方法。

[72] 前記双方向性構築物、RNAガイドDNA結合剤、アルブミンgRNA、及びSERPINA1 gRNAが、個々にまたは任意の組み合わせで、同時に投与される、[46]~[70]のいずれか1項に記載の方法。

20

[73] 前記RNAガイドDNA結合剤、または組み合わせたRNAガイドDNA結合剤及びアルブミンgRNAが、前記核酸構築物を投与する前に投与される、[46]~[70]のいずれか1項に記載の方法。

[74] 前記双方向性構築物が、前記アルブミンgRNA及び/またはRNAガイドDNA結合剤を投与する前に投与される、[46]~[70]のいずれか1項に記載の方法。

[75] 前記RNAガイドDNA結合剤が、クラス2のCasヌクレアーゼである、[46]~[74]のいずれか1項に記載の方法。

[76] 前記Casヌクレアーゼが、Cas9である、[75]に記載の方法。

30

[77] 前記Casヌクレアーゼが、Spyogenes Cas9ヌクレアーゼである、[76]に記載の方法。

[78] 前記Casヌクレアーゼが、クリベースである、[75]~[77]のいずれか1項に記載の方法。

[79] 前記Casヌクレアーゼが、ニッカーゼである、[75]~[77]のいずれか1項に記載の方法。

[80] 前記双方向性構築物が、一本鎖DNAである、[46]~[79]のいずれか1項に記載の方法。

[81] 前記双方向性構築物が、二本鎖DNAである、[46]~[80]のいずれか1項に記載の方法。

40

[82] 前記対象の機能性AATのレベルが、少なくとも約500ug/mlに増加する、[46]、[47]、または[50]~[81]のいずれかに記載の方法。

[83] 前記対象の機能性AATのレベルが、投与前の前記対象の機能性AATのレベルと比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれ以上増加する、[46]、[47]、または[50]~[81]のいずれかに記載の方法。

[84] 前記AATのレベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、及び/または痰で測定される、[82]または[83]に記載の方法。

[85] 前記細胞または細胞集団が、投与前のレベルと比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、また

50

はそれ以上増加したレベルで機能性 A A T を発現する、[4 8] ~ [8 1] のいずれか 1 項に記載の方法。

[8 6] 前記細胞または細胞集団が、肝臓細胞を含む、[4 8] ~ [8 1] または 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

[8 7] 前記肝臓における A A T 蓄積が、低減される、[4 6] ~ [8 6] のいずれか 1 項に記載の方法。

[8 8] 前記核酸構築物が、野生型 A A T タンパク質、またはその機能的断片をコードする配列を含む、[4 6] ~ [8 7] のいずれか 1 項に記載の方法。

[8 9] A A T タンパク質を必要とする対象においてアルファ 1 アンチトリプシン欠乏症 (A A T D) を治療する方法であって、

10

i) S E R P I N A 1 の内因性発現を低減することができる遺伝子編集系と、

i i) 異種 A A T タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、

i i i) R N A ガイド D N A 結合剤と、

i v) アルブミンガイド R N A (g R N A) であって、

a) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、及び 33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、

b) 配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、及び 33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、

c) 配列番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択される配列、

20

d) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列、

e) 配列番号 2 ~ 33 からなる群から選択される配列の少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、

f) 配列番号 34 ~ 97 からなる群から選択される配列、ならびに

g) 配列番号 2 ~ 33 について列挙されるゲノム座標の 15 個の連続ヌクレオチド + / - 10 個のヌクレオチドに対して相補的である配列から選択される配列を含む、前記アルブミンガイド R N A (g R N A) と、を投与することを含み、

それにより、前記対象において A A T D を治療する、前記方法。

30

[9 0] 前記遺伝子編集系が、配列番号 1000 ~ 1128 から選択されるガイド配列、または配列番号 1000 ~ 1128 から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、もしくは 75% 同一であるガイド配列を含む S E R P I N A 1 ガイド R N A を含む、[8 8] に記載の方法。

[9 1] 双方向性核酸構築物であって、

a) A A T 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) 前記 A A T 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、前記 A A T 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、前記双方向性核酸構築物。

[9 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、[9 1] に記載の双方向性核酸構築物。

40

[9 3] 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、ヘアピン形成を低減するために前記第 1 のセグメントの前記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、[9 1] ~ [9 2] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[9 4] 前記逆相補体が、

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

50

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 7 0 % 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 9 0 % 同一である、

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 5 0 ~ 8 0 % 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 6 0 ~ 1 0 0 % 同一である、双方向性構築物。

[9 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約 3 0 %、約 3 5 %、約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 7 %、または約 9 9 % 相補性を有するヌクレオチド配列を含む、[9 1] ~ [9 3] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。 10

[9 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 A A T ポリペプチドをコードする、[9 1] ~ [9 4] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[9 7] 前記第 2 のセグメントの前記配列が、前記第 1 のセグメントの前記コード配列の逆相補体である、[9 1] ~ [9 6] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。 20

[9 8] 前記構築物が、相同性アームを含まない、[9 1] ~ [9 7] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[9 9] 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、[9 1] ~ [9 8] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 0] 前記リンカーが、約 5、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0、3 0 0、5 0 0、1 0 0 0、1 5 0 0、2 0 0 0 のヌクレオチド長である、[9 9] に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 1] 前記第 1 及び第 2 のセグメントの各々が、ポリアデニル化テール配列を含む、[9 1] ~ [1 0 0] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 2] 前記構築物が、スプライスアクセプター部位を含む、[9 1] ~ [1 0 1] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。 30

[1 0 3] 前記構築物が、前記第 1 のセグメントの上流の第 1 のスプライスアクセプター部位及び前記第 2 のセグメントの下流の第 2 の（逆）スプライスアクセプター部位を含む、[1 0 2] に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 4] 前記構築物が、二本鎖、任意に二本鎖 D N A である、[1] ~ [1 0 3] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 5] 前記構築物が、一本鎖、任意に一本鎖 D N A である、[1] ~ [1 0 4] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 6] 前記 A A T ポリペプチドをコードする配列が、コドン最適化される、[1] ~ [1 0 5] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。 40

[1 0 7] 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（I T R）、またはトロイドのうちの 1 つ以上を含む、[1] ~ [1 0 6] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 8] 前記構築物が、1、2、または 3 つの末端逆位反復（I T R）を含む、[1] ~ [1 0 7] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[1 0 9] 前記構築物が、2 つ以下の I T R を含む、[1] ~ [1 0 8] のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

[1 1 0] [9 1] ~ [1 0 9] のいずれか 1 項に記載の構築物を含むベクター。

[1 1 1] 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、[1 1 0] に記載のベクター。 50

[1 1 2] 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、[1 1 0] に記載のベクター。

[1 1 3] 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、[1 1 2] に記載のベクター。

[1 1 4] A A T 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 A A T 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。 10

[1 1 5] 前記ベクターが、相同性アームを含まない、[1 1 4] に記載のベクター。

[1 1 6] [9 1] ~ [1 0 9] のいずれか 1 項に記載の構築物を含む脂質ナノ粒子。

[1 1 7] [9 1] ~ [1 0 9] のいずれか 1 項に記載の構築物を含む宿主細胞。

[1 1 8] [1] ~ [9 0] のいずれかに記載の方法によって作製される宿主細胞。

[1 1 9] 前記宿主細胞が、肝臓細胞である、[1 1 7] に記載の宿主細胞。

[1 2 0] 前記宿主細胞が、非分裂細胞型である、[1 1 7] ~ [1 1 9] に記載の宿主細胞。

[1 2 1] 前記宿主細胞が、前記双方向性構築物によってコードされる前記 A A T ポリペプチドを発現する、[1 1 7] ~ [1 2 0] のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。 20

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

[1 2 3] 前記 g R N A が、配列番号 9 0 1 を含む、[1] ~ [1 2 2] のいずれかに記載の方法、構築物、または宿主細胞。