(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-502124
(P2020-502124A)
(43)公表日　令和2年1月23日(2020.1.23)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 9/51	(2006.01)	A61K	9/51	4C076
A61K 9/14	(2006.01)	A61K	9/14	4C084
A61K 47/34	(2017.01)	A61K	47/34	4C086
A61K 47/04	(2006.01)	A61K	47/04	
A61K 47/02	(2006.01)	A61K	47/02	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 200 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-531758 (P2019-531758)
(86)(22)出願日　平成29年12月14日 (2017.12.14)
(85)翻訳文提出日　令和1年8月8日 (2019.8.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/066545
(87)国際公開番号　WO2018/112282
(87)国際公開日　平成30年6月21日 (2018.6.21)
(31)優先権主張番号　62/434,344
(32)優先日　平成28年12月14日 (2016.12.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/443,522
(32)優先日　平成29年1月6日 (2017.1.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

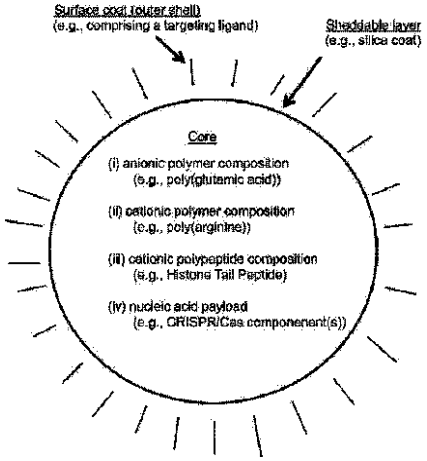
(71)出願人　519208362
リガンダル　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　９４７１０　カリフォルニア州　バークレー　ハインツ　アベニュー　８２０
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸および／またはタンパク質ペイロード送達のための組成物および方法

(57)【要約】
ペイロード（例えば、核酸および／またはタンパク質ペイロード）を細胞にナノ粒子送達するための方法および組成物が提供される。いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子が、コアとコアを封入している脱落可能層とを含み、コアが、（ｉ）アニオン性ポリマー組成物と、（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物と、（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物と、（ｉｖ）核酸および／またはタンパク質ペイロードとを含み、（ａ）アニオン性ポリマー組成物が、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、ならびに／または（ｂ）カチオン性ポリマー組成物が、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含む。いくつかの場合では、アニオン性および／またはカチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーが、Ｌ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する。
【選択図】図８

FIG. 8



【特許請求の範囲】
【請求項１】
コアと、該コアを封入している脱落可能層とを含むナノ粒子であって、該コアが、
（ｉ）アニオン性ポリマー組成物と、
（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物と、
（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物と、
（ｉｖ）核酸および／またはタンパク質ペイロードと
を含み、
（ａ）該アニオン性ポリマー組成物が、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、ならびに／または
（ｂ）該カチオン性ポリマー組成物が、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含む、
ナノ粒子。
【請求項２】
前記アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される第１のアニオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択される第２のアニオン性ポリマーを含む、請求項１に記載のナノ粒子。
【請求項３】
前記カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択される第１のカチオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択される第２のカチオン性ポリマーを含む、請求項１または請求項２に記載のナノ粒子。
【請求項４】
前記アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーが、前記アニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する、請求項１～３のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項５】
前記カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーが、前記カチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する、請求項１～４のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項６】
前記脱落可能層がアニオン性コートである、請求項１～５のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項７】
前記脱落可能層がｐＨおよび／またはグルタチオン感受性である、請求項１～６のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項８】
前記脱落可能層が、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンガン、リン酸マンガン、硫酸マンガン、マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、鉄、リン酸鉄、硫酸鉄、リチウム、リン酸リチウム、および硫酸リチウムのうちの１つ以上を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項９】
前記脱落可能層がシリカコートである、請求項８に記載のナノ粒子。
【請求項１０】
前記脱落可能層を囲む表面コートをさらに含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項１１】
前記表面コートが、前記脱落可能層と静電的に相互作用するカチオン性成分を含む、請求項１０に記載のナノ粒子。
【請求項１２】
前記表面コートが、カチオン性アミノ酸のポリマー、ポリ（アルギニン）、アンカードメイン、カチオン性アンカードメイン、細胞透過性ペプチド、ウイルス糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、および標的指向リガンドのうちの１つ以上を含む、請求項１０または請求項１１に記載のナノ粒子。
【請求項１３】
前記表面コートが双性イオン性および多価である、請求項１０～１２のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１４】
前記表面コートが、１つ以上の標的指向リガンドを含む、請求項１０～１３のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１５】
前記１つ以上の標的指向リガンドのうちの少なくとも１つが、前記脱落可能層と相互作用するアンカードメインにコンジュゲートしている、請求項１４に記載のナノ粒子。
【請求項１６】
前記アンカードメインが、
RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 15) およびHHHHHH (SEQ ID NO: 16)
から選択されるカチオン性アンカードメインである、請求項１５に記載のナノ粒子。
【請求項１７】
前記アンカードメインが、リンカーを介して前記１つ以上の標的指向リガンドのうちの前記少なくとも１つにコンジュゲートしている、請求項１５または請求項１６に記載のナノ粒子。
【請求項１８】
前記リンカーがポリペプチドでない、請求項１７に記載のナノ粒子。
【請求項１９】
前記リンカーがポリペプチドである、請求項１７に記載のナノ粒子。
【請求項２０】
前記リンカーが、スルフヒドリル化学的性質もしくはアミン反応性化学的性質を介して前記標的指向リガンドにコンジュゲートし、かつ／または前記リンカーが、スルフヒドリル化学的性質もしくはアミン反応性化学的性質を介して前記アンカードメインにコンジュゲートしている、請求項１７～１９のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項２１】
前記１つ以上の標的指向リガンドのうちの前記少なくとも１つがシステイン残基を含み、該システイン残基を介して前記リンカーにコンジュゲートしている、請求項１７～２０のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項２２】
前記１つ以上の標的指向リガンドが、ファミリーＢのＧタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）への標的指向された結合を提供する、請求項１４～２１のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項２３】
前記標的指向リガンドが、対応する野生型アミノ酸配列に対して１つ以上の内部アミノ酸位置にシステイン置換を含む、請求項２２に記載のナノ粒子。
【請求項２４】
前記標的指向リガンドが、アミノ酸配列
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1)
に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２または請求項２３に記載のナノ粒子。

【請求項２５】
前記標的指向リガンドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載のアミノ酸配列の位置Ｌ１０、Ｓ１１、およびＫ１２のうちの１つ以上にシステイン置換を含む、請求項２４に記載のナノ粒子。
【請求項２６】
前記標的指向リガンドが、アミノ酸配列
HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2)
を含む、請求項２５に記載のナノ粒子。
【請求項２７】
前記表面コートが、ｃ－Ｋｉｔ、ＣＤ２７、およびＣＤ１５０から選択される細胞表面タンパク質への標的指向された結合を提供する１つ以上の標的指向リガンドを含む、請求項１４～２６のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項２８】
前記表面コートが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）フラグメント、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン（ｍｅｌａｎｏｆｅｒｒｉｔｉｎ）、オボトランスフェリチン（ｏｖｏｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｔｉｎ）、Ｌ－セレクチン、Ｅ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、細胞死受容体－３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン－４、ＧＬＰ１、α５β１を標的指向する標的指向リガンド、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦフラグメント、コハク酸、ビスホスホネート、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン－１－ホスフェート、セラミド－１－ホスフェート、および上記のうちのいずれかの活性標的指向フラグメントからなる群から選択される１つ以上の標的指向リガンドを含む、請求項１４～２７のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項２９】
前記表面コートが、幹細胞因子（ＳＣＦ）またはその標的指向フラグメント、ＣＤ７０またはその標的指向フラグメント、およびＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）またはその標的指向フラグメントを含む、請求項１４～２８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項３０】
前記表面コートが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される標的細胞への標的指向された結合を提供する１つ以上の標的指向リガンドを含む、請求項１４～２９のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項３１】
前記表面コートが、２つ以上の標的指向リガンドを含み、それらの組み合わせが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細

胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される細胞への標的指向された結合を提供する、請求項１４～２９のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項３２】
前記カチオン性ポリペプチド組成物が、核局在シグナル（ＮＬＳ）を含むポリペプチドを含む、請求項１～３１のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項３３】
前記ＮＬＳが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５１～１５７および２０１～２６４のうちのいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項３２に記載のナノ粒子。
【請求項３４】
前記カチオン性ポリペプチド組成物が、ヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）を含む、請求項１～３３のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項３５】
前記ＨＴＰが、カチオン性アミノ酸ポリマーにコンジュゲートしている、請求項３４に記載のナノ粒子。
【請求項３６】
前記ＨＴＰがシステイン残基を介してカチオン性アミノ酸ポリマーにコンジュゲートしている、請求項３５に記載のナノ粒子。
【請求項３７】
前記カチオン性アミノ酸ポリマーがポリ（リジン）を含む、請求項３５または請求項３６に記載のナノ粒子。
【請求項３８】
前記カチオン性ポリペプチド組成物が、分枝構造を有するヒストンペプチドを含む、請求項３３～３７のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項３９】
前記ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）をコードする核酸分子、（ｖｉｉ）ＺＦＰ、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質をコードする核酸分子、（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質、および（ｘ）ＤＮＡドナーテンプレートのうちの１つ以上を含む、請求項１～３８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項４０】
前記ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡおよび／または前記ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ならびに（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドおよび／または前記ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、請求項１～３９のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項４１】
前記ペイロードが、ＤＮＡドナーテンプレートをさらに含む、請求項４０に記載のナノ粒子。
【請求項４２】
（ａ）請求項１～４１のいずれか一項に記載の第１のナノ粒子であって、前記ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）をコードする核酸分子、（ｖｉｉ）ＺＦＰ、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質

をコードする核酸分子、および（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質のうちの１つ以上を含む、第１のナノ粒子と、
（ｂ）ＤＮＡドナーテンプレートを含む核酸ペイロードを含む第２のナノ粒子と
を含む、ナノ粒子製剤。
【請求項４３】
（ａ）ＤＮＡドナーテンプレートを含むペイロードを含む内部コアと、
（ｂ）該内部コアを囲む第１の脱落可能層と、
（ｃ）該第１の脱落可能層を囲む中間コアであって、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）、（ｖｉｉ）ＺＦＰをコードするＤＮＡ分子、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質、および（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質をコードするＤＮＡ分子のうちの１つ以上を含む、中間コアと、
（ｄ）該中間コアを囲む第２の脱落可能層と
を含む、多層ナノ粒子。
【請求項４４】
前記第１および／または第２の脱落可能層が、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンガン、リン酸マンガン、硫酸マンガン、マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、鉄、リン酸鉄、硫酸鉄、リチウム、リン酸リチウム、および硫酸リチウムのうちの１つ以上を含む、請求項４３に記載の多層ナノ粒子。
【請求項４５】
前記第２の脱落可能層を囲む表面コートを含む、請求項４３または請求項４４に記載の多層ナノ粒子。
【請求項４６】
前記表面コートが、前記第２の脱落可能層と静電的に相互作用するカチオン性成分を含む、請求項４５に記載の多層ナノ粒子。
【請求項４７】
前記表面コートが、カチオン性アミノ酸のポリマー、ポリ（アルギニン）、細胞透過性ペプチド、ウイルス性糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、および標的指向リガンドのうちの１つ以上を含む、請求項４５または請求項４６に記載の多層ナノ粒子。
【請求項４８】
前記表面コートが双性イオン性および多価である、請求項４３～４７のいずれか一項に記載の多層ナノ粒子。
【請求項４９】
前記表面コートが、１つ以上の標的指向リガンドを含む、請求項４３～４８のいずれか一項に記載の多層ナノ粒子。
【請求項５０】
核酸および／またはタンパク質ペイロードを標的細胞に送達する方法であって、
真核生物の標的細胞と、請求項１～４１のいずれか一項に記載のナノ粒子、請求項４２に記載のナノ粒子製剤、および／または請求項４３～４９のいずれか一項に記載の多層ナノ粒子とを接触させる工程
を含む、方法。
【請求項５１】
前記ペイロードが、遺伝子編集ツールを含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、ＣＲ

ＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする核酸分子、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮ、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮをコードする核酸分子、およびＤＮＡドナーテンプレートのうちの１つ以上を含む、請求項５０または請求項５１に記載の方法。

【請求項５３】

前記標的細胞が哺乳動物細胞である、請求項５０～５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５４】

前記標的細胞がヒト細胞である、請求項５０～５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５５】

前記標的細胞がインビトロで培養下にある、請求項５０～５４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５６】

前記標的細胞がインビボである、請求項５０～５４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５７】

前記接触させる工程が、前記ナノ粒子を個体に投与することを含む、請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

前記個体が、ハンチントン病、ＡＬＳ、パーキンソン病、膵臓癌、糖尿病、またはフォンヴィレブランド病を有する、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

前記ナノ粒子が、標的指向リガンドを含む表面コートを含む、請求項５０～５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６０】

前記標的指向リガンドが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される細胞への標的指向された結合を提供する、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】

前記標的細胞が、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される、請求項５０～６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６２】

カチオン性ポリマーの側鎖にコンジュゲートした１つ以上のヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）を含む、分枝ヒストン分子。

【請求項６３】

前記カチオン性ポリマーが、ポリ（アルギニン）またはポリ（リジン）を含む、請求項６２に記載の分枝ヒストン分子。

【請求項６４】

前記カチオン性ポリマーの前記側鎖の最大４０％が、前記１つ以上のＨＴＰにコンジュ

ゲートしている、請求項６３に記載の分枝ヒストン分子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０１７年６月９日に出願された米国特許仮出願第６２／５１７，３４６号、２０１７年１月６日に出願された米国仮特許出願第６２／４４３，５６７号、２０１７年１月６日に出願された米国仮特許出願第６２／４４３，５２２号、および２０１６年１２月１４日に出願された米国仮特許出願第６２／４３４，３４４号の優先権を主張し、これらの出願は全て、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
テキストファイルとして提供される配列表の参照による組み込み
２０１７年１２月１４日に作成され、１２８ＫＢのサイズを有するテキストファイル「ＬＧＤＬ－００４＿ＳｅｑＬｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」として、配列表が本明細書と共に提供される。テキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
序論
例えばゲノム編集および／または遺伝子発現の変化のための、核酸および／またはタンパク質ペイロードの細胞への効果的な導入は、治療戦略および研究方法論にとって重要な目的である。ペイロードを効果的に導入するためには、ペイロードを適切にパッケージして、細胞内移行前の劣化から保護し、細胞への侵入を可能にし、ペイロードをリソソーム分解経路から遠ざけ、および適切な細胞内区画に直接送達することが重要である。さらに、細胞侵入後のパッケージ化からのペイロードの放出のタイミングは、ペイロードの有効性に影響を及ぼす。
【０００４】
ペイロード送達のための多くのナノ粒子系の技術は、低レベルの細胞トランスフェクションおよびトランスフェクション時の限られた有効性を提示する。細胞へのペイロード送達の有効性を向上する組成物および方法が必要とされている。
【発明の概要】
【０００５】
概要
ペイロード（例えば、核酸および／またはタンパク質ペイロード）を細胞に送達するための組成物および方法（例えば、細胞へのペイロードのナノ粒子、ウイルス、および非ウイルス送達）が提供される。血清安定性、特定の細胞型への標的指向された送達、ヒストンおよびヌクレオソーム様分枝ポリマーを介した内因性核酸パッケージ化の生物学的類似性、核内での区画特定の開封、可変持続放出動態、のために設計されたナノ粒子、およびその使用方法が提供される。いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子が、コアとコアを封入している脱落可能層とを含み（例えば、細胞送達中にコアの一時的安定化を提供する）、コアが、（ｉ）アニオン性ポリマー組成物と、（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物と、（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物と、（ｉｖ）核酸および／またはタンパク質のペイロードとを含み、（ａ）アニオン性ポリマー組成物が、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、ならびに／または（ｂ）カチオン性ポリマー組成物が、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含む。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーは、アニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーは、カチオン性アミノ酸のＬ－異性体の該ポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する。

【０００６】
いくつかの場合では、本開示のナノ粒子は、脱落可能層を囲む表面コートを含む。表面コートは、標的細胞の表面分子への標的指向された結合を提供する標的指向リガンドを含み得る。いくつかの場合では、例えば、標的指向リガンドをナノ粒子の脱落可能層に固定するために、標的指向リガンドをアンカードメインに（リンカーを用いてまたは用いずに）コンジュゲートさせる。
【０００７】
コアの一部として第１のペイロード（例えば、ＤＮＡドナーテンプレート）を含む多層ナノ粒子もまた提供され、コアは、第１の脱落可能層に囲まれ、第１の脱落可能層は、第２のペイロードを含む中間層（例えば、遺伝子編集ツール）に囲まれ、および中間層は第２の脱落可能層に囲まれている。いくつかの場合では、第２の脱落可能層は表面コート（例えば、標的指向リガンドを含む表面コート）でコートされる。
【０００８】
第１のナノ粒子のペイロードがドナーＤＮＡテンプレートを含み、第２のナノ粒子のペイロードが遺伝子編集ツールを含む、２つ以上のナノ粒子を含むナノ粒子製剤も提供される（例えば、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、（ｉｉｉ）プログラム可能な遺伝子編集タンパク質をコードするＤＮＡおよび／もしくはＲＮＡ、ならびに／または（ｉｖ）プログラム可能な遺伝子編集タンパク質）。
【０００９】
同じパッケージの一部として複数のペイロード（例えば、２つ以上のペイロード）を同時送達する方法も提供される。例えば、核酸および／またはタンパク質ペイロードを標的細胞に送達する方法であり、この方法は真核生物の標的細胞をウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクルと接触させる工程を含み、（ａ）遺伝子編集ツール、および（ｂ）標的細胞の増殖を誘導するかつ／または標的細胞の分化を偏らせる核酸剤もしくはタンパク質剤が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
本発明は、添付の図面と併せて読まれるとき、以下の詳細な説明から最もよく理解される。一般的な慣例に従って、図面の種々の特徴は縮尺通りではないことを強調する。寧ろ、種々の特徴の寸法は、明確性のために任意に拡大または縮小される。図面には以下の図が含まれる。
【００１１】
【図１】核酸ペイロードの縮合に関する様々なパラメータ（例えば、カチオン：アニオン電荷比）を試験する蛍光アッセイの結果を示す。結果は、例えば、２の電荷比が、Ｃａｓ９をコードするプラスミドとガイドＲＮＡ分子との縮合にうまく機能することを示した。
【図２】生成したナノ粒子コアの粒径とゼータ電位分布を示す。データは、Ｐａｒｔｉｃｌｅ Ｍｅｔｒｉｘ ＺｅｔａＶｉｅｗ ＮＴＡ装置を用いて得た。ナノ粒子サイズ（ピーク）は１２８．８ｎｍであり、ゼータ電位（ピーク）は＋１０．５ｍＶ（１００％）であった。
【図３】安定化ナノ粒子コア（脱落可能層で封入されたコア）の粒子サイズとゼータ電位分布を示す。データは、Ｐａｒｔｉｃｌｅ Ｍｅｔｒｉｘ ＺｅｔａＶｉｅｗ ＮＴＡ装置を用いて得た。安定化されたコアは、１１０．６ｎｍのサイズであり、－４２．１ｍＶ（９５％）のゼータ電位を有した。
【図４】ＲＶＧ９Ｒを含む外殻（外側コート）を有するナノ粒子であり、ナノ粒子は９－Ａｒｇペプチド配列（カチオン性アンカードメインとして）に融合した狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）であり、１１５．８ｎｍの特徴的な粒子サイズ、－３．１ｍＶ（１００％）のゼータ電位を有することを示す。最適な外側コーティングは、－５０ｍＶ（シリカコートされたコアへ）から０～－１０ｍＶ（外殻を追加した後）の間へのゼータ電位の遷移をもたらす。

【図５】核酸ペイロードを送達するために異なるナノ粒子が使用された細胞培養実験の結果を示す。この図では、コアの一部としてポリ（Ｄ－グルタミン酸）を含むナノ粒子（ポリ（Ｌ－アルギニン）付加）と、含まないナノ粒子とを比較している。３行は複製を表す。

【図６Ａ】（パネルＡ～Ｄ）核酸ペイロードとしてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９発現ベクターを含むナノ粒子と接触させた神経幹細胞の顕微鏡画像を示す。ナノ粒子のコアは、フルオロフォア（ＦＩＴＣ）でタグ付けされたポリ（Ｌ－アルギニン）（カチオン性ポリマー）を含んでいた。エンドソームと核はそれぞれＬｙｓｏｔｒａｃｋｅｒ（赤）とＨｏｅｓｃｈｔ　３３４２（青）を使って染色した。ナノ粒子（および対照としてのリポフェクタミン３０００）を播種の１６時間後に細胞に導入した。画像化の前に、細胞をＨｏｅｓｃｈｔ　３３４２およびＬｙｓｏｔｒａｃｋｅｒ　Ｒｅｄを共に培養した。パネルＣ～Ｄは、ナノ粒子コアと核およびエンドソームとの共局在を定量化する棒グラフを提示する。

【図６Ｂ】図６Ａの説明を参照のこと。

【図６Ｃ】図６Ａの説明を参照のこと。

【図６Ｄ】図６Ａの説明を参照のこと。

【図７】（パネルＡ～Ｂ）核酸ペイロードとしてＧＦＰをコードするｍＲＮＡを含むナノ粒子をトランスフェクトした末梢血単核球（ＰＢＭＣ）の顕微鏡画像を示す。画像は、ｍＲＮＡ発現が、定義された比で、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを有するコアを含むナノ粒子を用いて１６日まで延長され得ることを実証する。この場合、２：１の比のポリ（Ｄ－グルタミン酸）対ポリ（Ｌ－グルタミン酸）を有するナノ粒子コアの使用は、１６日で最大発現であった（パネルＡ＝４日；パネルＢ＝１６日）。

【図８】本発明のナノ粒子の一実施形態例の概略図を示す。

【図９】本発明のナノ粒子の一実施形態例の概略図を示す。この場合、ナノ粒子は多層であり、表面コートされた（すなわち、外殻を含む）第２の脱落可能層、第２の脱落可能層に囲まれた中間層、中間層（追加のペイロードを含む）に囲まれた第１の脱落可能層、で囲まれたコア（第１のペイロードを含む）を有する。

【図１０】（パネルＡ～Ｂ）主題のナノ粒子の表面コートの送達分子の例示的な構成の概略図を示す。示された送達分子は、ナノ粒子の脱落可能層と静電的に相互作用しているアンカードメインにコンジュゲートした標的指向リガンドを含む。標的指向リガンドは、Ｎ末端またはＣ末端でコンジュゲートし得る（各パネルの左）が、内部位置でもコンジュゲートし得る（各パネルの右）ことに留意されたい。パネルＡの分子はリンカーを含むがパネルＢの分子は含まない。

【図１１－１】標的指向リガンドを評価する際に考慮すべき別々のドメインを強調する、ファミリーＢのＧＰＣＲの概略図を提供する。例えば、アロステリック／親和性Ｎ末端ドメインおよびオルソステリックエンドソームソーティング／シグナル伝達ドメインへの結合。（図は、Ｓｉｕ，Ｆａｉ　Ｙｉｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ４９９．７４５９（２０１３）：４４４－４４９を出典とする）。

【図１１－２】図１１－１の説明を参照のこと。

【図１２－１】核酸の放出を促進および核酸の分解を制限する、親和性が維持され、標的指向リガンドが長いエンドソーム再利用経路に関与するように、標的指向リガンドの挿入および／または置換のための（例えばシステイン残基による）内部アミノ酸位置の同定の一例を提供する。この場合、標的指向リガンドはエキセンディン－４であり、アミノ酸位置１０、１１、および１２は、可能な挿入および／または置換のための部位として同定された（例えば、システイン残基、例えばＳ１１Ｃ突然変異を有する）。図は、三次元空間で回転された、グルカゴン－ＧＣＧＲ（４ＥＲＳ）およびＧＬＰ１－ＧＬＰ１Ｒ－ＥＣＤ複合体（ＰＤＢ：３ＩＯＬ）の既知の結晶構造に対するシミュレートされたエキセンディン－４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）のアライメント、およびＰＤＢレンダリングを示す。

【図１２－２】図１２－１の説明を参照のこと。

【図１３】三つ組みのＦＧＦ２－ＦＧＦＲ１－ＨＥＰＡＲＩＮ複合体（ＰＤＢ上の１ｆｑ

９）の一部としてのｔｂＦＧＦフラグメントを示す。ＣＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳ（強調された）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３）は、ＦＧＦＲ１に対する親和性にとって重要であると決定された。
【図１４】ＨＦＫＤＰＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）が、リガンド－受容体オルソステリック活性および親和性に使用できるペプチドであることを決定するために使用されるアラインメントおよびＰＤＢ　３Ｄレンダリングを提供する。
【図１５】ＬＥＳＮＮＹＮＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）が、リガンド－受容体オルソステリック活性および親和性に使用できるペプチドであることを決定するために使用されるアラインメントおよびＰＤＢ　３Ｄレンダリングを提供する。
【図１６】本発明のナノ粒子の一部として使用することができる核局在シグナル（ＮＬＳ）の非限定的な例を提供する（例えば、ＮＬＳ含有ペプチド；ＮＬＳ含有ペプチドの一部として／ＮＬＳ含有ペプチドにコンジュゲートした、アニオン性ポリマー、カチオン性ポリマー、および／またはカチオン性ポリペプチドなど）。図は、Ｋｏｓｕｇｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　ＢｉｏｌＣｈｅｍ．２００９　Ｊａｎ　２；２８４（１）：４７８－８５を出典とする。［クラス１、上から下へ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０１～２２１）；クラス２、上から下へ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２２～２２４）；クラス４、上から下へ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２５～２３０）；クラス３、上から下へ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３１～２４５）；クラス５、上から下へ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４６～２６４）］。
【図１７Ａ】（パネルＡ～Ｂ）マウス（パネルＡ）およびヒト（パネルＢ）の造血細胞系列の概略図、かつその系列内の様々な細胞について同定されているマーカーを示す。
【図１７Ｂ】図１７Ａの説明を参照のこと。
【図１８Ａ】（パネルＡ～Ｂ）細胞の分化かつ／または増殖に影響を与えるために使用することができるｍｉＲＮＡ（パネルＡ）およびタンパク質（パネルＢ）因子の概略図を示す。
【図１８Ｂ】図１８Ａの説明を参照のこと。
【図１９】ペイロード：ペプチド核酸（ＰＮＡ）結合部位を有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを含むナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２０Ａ】ペイロード：ＨＢＢ　ｇＲＮＡと複合したＮＬＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳ　ＲＮＰを含むナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２０Ｂ】図２０Ａの説明を参照のこと。
【図２０Ｃ】図２０Ａの説明を参照のこと。
【図２０Ｄ】図２０Ａの説明を参照のこと。
【図２１】ペイロード：ＨＢＢ　ｇＲＮＡを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２２】ペイロード：ＨＢＢ　ｇＲＮＡを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２３】ペイロード：ＨＢＢ　ｇＲＮＡと複合したＮＬＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳ　ＲＮＰを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２４】ペイロード：ペプチド核酸（ＰＮＡ）結合部位を有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２５】ペイロード：ペプチド核酸（ＰＮＡ）結合部位を有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２６】ペイロード：ＨＢＢ　ｇＲＮＡを有するＮＬＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳのＲＮＰを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２７】ペイロード：ペプチド核酸（ＰＮＡ）結合部位を有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２８】ペイロード：Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図２９】ペイロード：ＢＬＯＣＫ－ｉＴ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５５５　ｓｉＲＮＡ有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。
【図３０】ペイロード：ＨＢＢ　ｇＲＮＡと複合したＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＲＮＰを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図３１Ａ】ペイロードとしてＡｌｅｘａ　５５５　Ｂｌｏｃｋ－ＩＴ　ｓｉＲＮＡを有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する。
【図３１Ｂ】図３１Ａの説明を参照のこと。
【図３１Ｃ】図３１Ａの説明を参照のこと。
【図３２－１】ペイロードとしてＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＧＦＰとＨＢＢガイドＲＮＡとによって形成されたリボ核タンパク質（ＲＮＰ）を有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する。
【図３２－２】図３２－１の説明を参照のこと。
【図３２－３】図３２－１の説明を参照のこと。
【図３３－１】ペイロードとしてＣｙ５　ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡを有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する。
【図３３－２】図３３－１の説明を参照のこと。
【図３４－１】ペイロードを有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する：Ｃｙ５標識されたペプチド核酸（ＰＮＡ）結合部位を有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡ。
【図３４－２】図３４－１の説明を参照のこと。
【図３４－３】図３４－１の説明を参照のこと。
【図３５】カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加し、さらにＲＮＰにカチオン性ポリペプチドを添加することによって蛍光強度が低下することを示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図３６】カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加し、さらにｓｉＲＮＡおよびＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄにカチオン性ポリペプチドを添加することによって蛍光強度が変動することを示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図３７】カチオン性ポリペプチドヒストンペプチドＨ２Ａを添加し、続いてＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、さらにＨＢＢ　ｇＲＮＡおよびＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄを有するＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰのＲＮＰにＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度が変動することを示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図３８】カチオン性ポリペプチドヒストンペプチドＨ４をＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃと一緒に添加し、さらにＨＢＢ　ｇＲＮＡおよびＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄを有するＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰのＲＮＰにＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度が変動することを示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図３９】カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、さらにｍＲＮＡにＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度が変動することを示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図４０】ヒストンＨ４を添加し、さらにｍＲＮＡにＣＤ４５－ｍＳｉｇｌｅｃ－（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿ｃとＰＬＥ１００とを添加することによって蛍光強度が変動することを示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図４１】ヒストンＨ２Ａを添加し、さらにｍＲＮＡにＣＤ４５－ｍＳｉｇｌｅｃ－（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿ｃとＰＬＥ１００とを添加することによって蛍光強度が変動することを示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図４２】カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度が変動することを示すＶＷＦ＿ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡとのインターカレーションからのＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図４３】ヒストンＨ４を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度が変動することを示すＶＷＦ＿ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡとのインターカレーションから

のＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図４４】ヒストンＨ４を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度が変動することを示すＶＷＦ＿ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡとのインターカレーションからのＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイのデータを提供する。
【図４５Ａ】（パネルＡ～Ｃ）ポリプレックスサイズ分布、シリカコーティングサイズおよびゼータ電位分布、ならびにリガンドコーティング／官能化粒子サイズおよびゼータ電位分布に関するデータを提供する。
【図４５Ｂ－１】図４５Ａの説明を参照のこと。
【図４５Ｂ－２】図４５Ａの説明を参照のこと。
【図４５Ｃ－１】図４５Ａの説明を参照のこと。
【図４５Ｃ－２】図４５Ａの説明を参照のこと。
【図４６】分枝ヒストンペプチドにコンジュゲートするパイロット粒子に関するデータを提供する。
【図４７－１】プロジェクトＨＳＣ．００１．００１に関するデータを提供する（表５参照）。
【図４７－２】図４７－１の説明を参照のこと。
【図４８】プロジェクトＨＳＣ．００１．００２に関するデータを提供する（表５参照）。
【図４９－１】プロジェクトＨＳＣ．００２．０１（標的指向リガンド－ＥＳＥＬＬｇ＿ｍＥＳＥＬ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｎ）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図４９－２】図４９－１の説明を参照のこと。
【図５０－１】プロジェクトＨＳＣ．００２．０２（標的指向リガンド－ＥＳＥＬＬｇ＿ｍＥＳＥＬ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５０－２】図５０－１の説明を参照のこと。
【図５１－１】プロジェクトＨＳＣ．００２．０３（標的指向リガンド－ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５１－２】図５１－１の説明を参照のこと。
【図５２－１】プロジェクトＨＳＣ．００２．０４（標的指向リガンド－Ｃｙ５ｍＲＮＡ－ＳｉＯ２－ＰＥＧ）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５２－２】図５２－１の説明を参照のこと。
【図５３－１】プロジェクトＢＬＯＯＤ．００２．８８（標的指向リガンド－ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５３－２】図５３－１の説明を参照のこと。
【図５４－１】プロジェクトＢＬＯＯＤ．００２．８９（標的指向リガンド－ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５４－２】図５４－１の説明を参照のこと。
【図５５－１】プロジェクトＢＬＯＯＤ．００２．９０に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５５－２】図５５－１の説明を参照のこと。
【図５６－１】プロジェクトＢＬＯＯＤ．００２．９１（ＰＬＲ５０）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５６－２】図５６－１の説明を参照のこと。
【図５７－１】プロジェクトＢＬＯＯＤ．００２．９２（標的指向リガンド－ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５７－２】図５７－１の説明を参照のこと。
【図５８－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．１に関するデータを提供する（表５参照）。
【図５８－２】図５８－１の説明を参照のこと。
【図５９－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．３に関するデータを提供する（表５参

照）。
【図５９－２】図５９－１の説明を参照のこと。
【図６０－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．１３に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６０－２】図６０－１の説明を参照のこと。
【図６１－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．１４に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６１－２】図６１－１の説明を参照のこと。
【図６２－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．１６に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６２－２】図６２－１の説明を参照のこと。
【図６３－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．１８に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６３－２】図６３－１の説明を参照のこと。
【図６４－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．２８に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６４－２】図６４－１の説明を参照のこと。
【図６５－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．２９に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６５－２】図６５－１の説明を参照のこと。
【図６６－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．３１に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６６－２】図６６－１の説明を参照のこと。
【図６７－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．３３に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６７－２】図６７－１の説明を参照のこと。
【図６８】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．４３に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６９－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．４４に関するデータを提供する（表５参照）。
【図６９－２】図６９－１の説明を参照のこと。
【図７０－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．４６に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７０－２】図７０－１の説明を参照のこと。
【図７１－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．４８に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７１－２】図７１－１の説明を参照のこと。
【図７２－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．５８に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７２－２】図７２－１の説明を参照のこと。
【図７３－１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１．５９に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７３－２】図７３－１の説明を参照のこと。
【図７４－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．８２に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７４－２】図７４－１の説明を参照のこと。
【図７５－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．８３に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７５－２】図７５－１の説明を参照のこと。
【図７６－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．８４に関するデータを提供する（表

５参照）。
【図７６－２】図７６－１の説明を参照のこと。
【図７７－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．８５に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７７－２】図７７－１の説明を参照のこと。
【図７８－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．８６に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７８－２】図７８－１の説明を参照のこと。
【図７９－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．７６に関するデータを提供する（表５参照）。
【図７９－２】図７９－１の説明を参照のこと。
【図８０】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．７７に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８１－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．７８に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８１－２】図８１－１の説明を参照のこと。
【図８２】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．７９に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８３】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．８０に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８４－１】ＣｙｎｏＢＭ．００２試料についての非トランスフェクト対照に関するデータを提供する。
【図８４－２】図８４－１の説明を参照のこと。
【図８４－３】図８４－１の説明を参照のこと。
【図８４－４】図８４－１の説明を参照のこと。
【図８５－１】ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰのリポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸ送達に関するデータを提供する。
【図８５－２】図８５－１の説明を参照のこと。
【図８５－３】図８５－１の説明を参照のこと。
【図８５－４】図８５－１の説明を参照のこと。
【図８６－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２　ＲＮＰのみ対照に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８６－２】図８６－１の説明を参照のこと。
【図８６－３】図８６－１の説明を参照のこと。
【図８７－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．８２に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８７－２】図８７－１の説明を参照のこと。
【図８７－３】図８７－１の説明を参照のこと。
【図８７－４】図８７－１の説明を参照のこと。
【図８７－５】図８７－１の説明を参照のこと。
【図８８－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．８３に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８８－２】図８８－１の説明を参照のこと。
【図８８－３】図８８－１の説明を参照のこと。
【図８８－４】図８８－１の説明を参照のこと。
【図８８－５】図８８－１の説明を参照のこと。
【図８９－１】プロジェクトＣＹＮＯＢＭ．００２．８４に関するデータを提供する（表５参照）。
【図８９－２】図８９－１の説明を参照のこと。
【図８９－３】図８９－１の説明を参照のこと。

【図８９－４】図８９－１の説明を参照のこと。
【図８９－５】図８９－１の説明を参照のこと。
【図９０－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．８５に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９０－２】図９０－１の説明を参照のこと。
【図９０－３】図９０－１の説明を参照のこと。
【図９０－４】図９０－１の説明を参照のこと。
【図９０－５】図９０－１の説明を参照のこと。
【図９１－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．８６に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９１－２】図９１－１の説明を参照のこと。
【図９１－３】図９１－１の説明を参照のこと。
【図９１－４】図９１－１の説明を参照のこと。
【図９１－５】図９１－１の説明を参照のこと。
【図９２－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．７５に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９２－２】図９２－１の説明を参照のこと。
【図９２－３】図９２－１の説明を参照のこと。
【図９２－４】図９２－１の説明を参照のこと。
【図９３－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．７６に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９３－２】図９３－１の説明を参照のこと。
【図９３－３】図９３－１の説明を参照のこと。
【図９３－４】図９３－１の説明を参照のこと。
【図９４－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．７７に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９４－２】図９４－１の説明を参照のこと。
【図９４－３】図９４－１の説明を参照のこと。
【図９４－４】図９４－１の説明を参照のこと。
【図９５－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．７８に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９５－２】図９５－１の説明を参照のこと。
【図９５－３】図９５－１の説明を参照のこと。
【図９５－４】図９５－１の説明を参照のこと。
【図９６－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．７９に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９６－２】図９６－１の説明を参照のこと。
【図９６－３】図９６－１の説明を参照のこと。
【図９６－４】図９６－１の説明を参照のこと。
【図９７－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．８０に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９７－２】図９７－１の説明を参照のこと。
【図９７－３】図９７－１の説明を参照のこと。
【図９７－４】図９７－１の説明を参照のこと。
【図９８－１】プロジェクトＣｙｎｏＢＭ．００２．８１に関するデータを提供する（表５参照）。
【図９８－２】図９８－１の説明を参照のこと。
【図９８－３】図９８－１の説明を参照のこと。
【図９８－４】図９８－１の説明を参照のこと。
【図９９】ＣｙｎｏＢＭ．００２　ＲＮＰのみ対照の定性的画像を提供する。

【図１００】プロジェクトＨＳＣ．００４のハイコンテントスクリーニングに関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０１】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１のハイコンテントスクリーニングに関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０２】プロジェクトＴＣＥＬＬ．００１のリポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸ対照に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０３】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．１に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０４】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．２に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０５－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．３に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０５－２】図１０５－１の説明を参照のこと。
【図１０６－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．４に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０６－２】図１０６－１の説明を参照のこと。
【図１０７－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．５に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０７－２】図１０７－１の説明を参照のこと。
【図１０８－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．６に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０８－２】図１０８－１の説明を参照のこと。
【図１０９－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．７に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１０９－２】図１０９－１の説明を参照のこと。
【図１１０－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．８に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１０－２】図１１０－１の説明を参照のこと。
【図１１１－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．９に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１１－２】図１１１－１の説明を参照のこと。
【図１１２－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．１０に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１２－２】図１１２－１の説明を参照のこと。
【図１１３－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．１１に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１３－２】図１１３－１の説明を参照のこと。
【図１１４－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．１２に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１４－２】図１１４－１の説明を参照のこと。
【図１１５－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．１３に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１５－２】図１１５－１の説明を参照のこと。
【図１１６－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．１４に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１６－２】図１１６－１の説明を参照のこと。
【図１１７－１】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．１５に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１７－２】図１１７－１の説明を参照のこと。
【図１１８】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１についてのネガティブ対照に関するデータ

を提供する（表５参照）。
【図１１９－１】プロジェクトＢｌｏｏｄ．００２に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１１９－２】図１１９－１の説明を参照のこと。
【図１１９－３】図１１９－１の説明を参照のこと。
【図１２０】プロジェクトＴＣｅｌｌ．００１．２７に関するデータを提供する（表５参照）。
【図１２１－１】タンパク質表面に安定な荷電層を形成するためにアニオン性またはカチオン性ペプチド／材料を添加すべきかどうかを決定することを可能にするＣＲＩＳＰＲ ＲＮＰ（可能なペイロード）の電荷密度プロットを示す。
【図１２１－２】図１２１－１の説明を参照のこと。
【図１２２－１】タンパク質表面に安定な荷電層を形成するためにアニオン性またはカチオン性ペプチド／材料を添加すべきかどうかを決定することを可能にするスリーピングビューティートランスポゾン（可能なペイロード）の電荷密度プロットを示す。
【図１２２－２】図１２２－１の説明を参照のこと。
【図１２３－１】（２ｂ）その後の多層化学の付加、複数の核酸もしくは荷電治療薬の同時送達、または架橋による層安定化の有無を問わず、（２ａ）アンカー－リンカー－リガンドまたは独立型カチオン性アンカーのようなカチオン性アンカーの付加（２）の前にＣＲＩＳＰＲ ＲＮＰ表面上のカチオン性部位に固定する例示的なアニオン性ペプチド（長さ９～１０アミノ酸、直径約１０ｎｍまでのＣＲＩＳＰＲ ＲＮＰ）（１）を示す。
【図１２３－２】図１２３－１の説明を参照のこと。
【図１２４】Ｃａｓ９ ＲＮＰまたは任意の均質または双性イオン的に帯電した表面を含み得るコアテンプレートに基づく添加順序および静電マトリックス組成物の例を示す。
【図１２５－１】ＩＬ２Ｒに結合したＩＬ２のモデル化構造を提供する。
【図１２５－２】図１２５－１の説明を参照のこと。
【図１２６－１】一本鎖ＣＤ３抗体フラグメントのモデル化構造を提供する。
【図１２６－２】図１２６－１の説明を参照のこと。
【図１２７】Ｎ－アセチルノイラミン酸（Ｎｅｕ５Ａｃ）と複合体したシアロアドヘシンのＮ－末端のモデル化構造を提供する。
【図１２８】幹細胞因子（ＳＣＦ）のモデル化構造を提供する。
【図１２９】ｃＫｉｔ受容体フラグメントの合理的設計中に生成された画像の例を提供する。
【図１３０】ｃＫｉｔ受容体フラグメントの合理的設計中に生成された画像の例を提供する。
【図１３１】ｃＫｉｔ受容体フラグメントの合理的設計中に生成された画像の例を提供する。
【図１３２】合理的に設計されたｃＫｉｔ受容体フラグメントの分析からの円二色性データを提供する。
【図１３３】合理的に設計されたｃＫｉｔ受容体フラグメントの安定化された立体配座のモデリングを示す。
【図１３４－１】ＨＴＰがカチオン性ポリマー骨格の側鎖にコンジュゲートしている分枝ヒストン構造の一例を示す。右側のポリマーは前駆体骨格分子を表し、左側の分子は分枝構造のセグメントの一例である。
【図１３４－２】図１３４－１の説明を参照のこと。
【図１３４－３】図１３４－１の説明を参照のこと。
【図１３４－４】図１３４－１の説明を参照のこと。
【図１３４－５】図１３４－１の説明を参照のこと。
【図１３４－６】図１３４－１の説明を参照のこと。
【発明を実施するための形態】
【００１２】

詳細な説明

上記に要約したように、ペイロード（例えば、核酸および／またはタンパク質ペイロード）を細胞にナノ粒子送達するための組成物および方法が提供される。いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子が、コアとコアを封入している脱落可能層とを含み（例えば、細胞送達中にコアの一時的安定化を提供する）、コアが、（ｉ）アニオン性ポリマー組成物と、（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物と、（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物と、（ｉｖ）核酸および／またはタンパク質のペイロードとを含み、（ａ）アニオン性ポリマー組成物が、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、ならびに／または（ｂ）カチオン性ポリマー組成物が、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含む。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーは、アニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーは、カチオン性アミノ酸のＬ－異性体の該ポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する。

【００１３】

いくつかの場合では、本開示のナノ粒子が、脱落可能層を囲む表面コートを含む。表面コートは、標的細胞の表面分子への標的指向された結合を提供する標的指向リガンドを含み得る。いくつかの場合では、例えば、標的指向リガンドをナノ粒子の脱落可能層に固定するために、標的指向リガンドをアンカードメインに（リンカーを用いてまたは用いずに）コンジュゲートさせる。

【００１４】

コアの一部として第１のペイロード（例えば、ＤＮＡドナーテンプレート）を含む多層ナノ粒子もまた提供され、コアは、第１の脱落可能層に囲まれ、第１の脱落可能層は、第２のペイロードを含む中間層（例えば、遺伝子編集ツール）に囲まれ、および中間層は第２の脱落可能層に囲まれている。いくつかの場合では、第２の脱落可能層は表面コート（例えば、標的指向リガンドを含む表面コート）でコートされる。

【００１５】

第１のナノ粒子のペイロードがドナーＤＮＡテンプレートを含み、第２のナノ粒子のペイロードが遺伝子編集ツールを含む、２つ以上のナノ粒子を含むナノ粒子製剤も提供される（例えば、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、（ｉｉｉ）プログラム可能な遺伝子編集タンパク質をコードするＤＮＡおよび／もしくはＲＮＡ、ならびに／または（ｉｖ）プログラム可能な遺伝子編集タンパク質）。

【００１６】

本方法および組成物を説明する前に、本発明は記載された特定の方法または組成物に限定されず、当然のことながら変動し得ることを理解されたい。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲のみによって限定されるため、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のみのものであり、限定的であることは意図されないこともまた理解されたい。

【００１７】

値の範囲が提供される場合、文脈上別段に明確に記載していない限り、その範囲の上限と下限の間にある各それぞれの介在値はまた、下限の単位の１０分の１まで、具体的に開示されることは理解される。記載された何らかの値または介在値と、記載された範囲が本発明内に包含される記載された何らかの値または介在値との間にある、より小さな各範囲は、本発明に包含される。これらのより小さい範囲の上限および下限は、独立してこの範囲の中に含まれ得または除外され得、こうした限界のいずれかが、またはいずれもが、より小さな範囲に含まれる各範囲、またはいずれも含まれない各範囲も、本発明の範囲内に包含され、記載された範囲内で何らかの具体的に除外された制限を受ける。記載された範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のうちのいずれかまたは両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

【００１８】
別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の任意の方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、いくつかの可能性のある好ましい方法および材料をここに記載する。本明細書で言及された全ての公開物は、それらの公開物が引用されることに関連して方法かつ／または材料を開示および説明するために参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、矛盾が存在する限り、組み込まれた公開物のいかなる開示にも優先することが理解される。
【００１９】
本開示を読むと当業者には明らかであるように、本明細書に説明され例証された個々の実施形態のそれぞれは、本発明の範囲または趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴から容易に分離され得るか、または組み合わせられ得る個別の要素および特徴を有する。すべての列挙された方法は、列挙された事象の順序で、または論理的に可能な他の任意の順序で実行することができる。
【００２０】
本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「細胞」への言及は、複数のそのような細胞を含み、「エンドヌクレアーゼ」への言及は、１つ以上のエンドヌクレアーゼおよび当業者に既知のその等価物などへの言及を含む。特許請求の範囲は任意の要素、例えば任意の任意選択の要素を排除するように作成されてもよいことにさらに留意されたい。このように、この記述は、特許請求の要素の列挙に関連して「専ら」、「唯一の」などのような排他的な用語の使用または「否定的な」制限の使用のための先行基準としての役割を果たすことを意図している。
【００２１】
本明細書に論じられる公開物は、本出願の出願日前のそれらの開示のためだけに提供される。本明細書中のいかなるものも、本発明がそのような公開物に先行する権利がないという承認として解釈されるべきではない。さらに、提示された公開日は実際の公開日とは異なる場合があり、別個に確認する必要があり得る。
【００２２】
方法および組成物
核酸、タンパク質、および／またはリボ核タンパク質ペイロードを細胞に送達するための方法および組成物が提供される。いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子は、（ｉｉ）脱落可能層によって封入されている（ｉ）コアを含み、いくつかの場合において、脱落可能層は、標的指向リガンドを含むことのできる（ｉｉｉ）表面コートによって囲まれている。以下の説明に加えて、国際特許出願公開番号ＷＯ２０１５０４２５８５は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【００２３】
ｉ．ナノ粒子コア
本発明のナノ粒子のコアは、アニオン性ポリマー組成物（例えば、ポリ（グルタミン酸））、カチオン性ポリマー組成物（例えば、ポリ（アルギニン）、カチオン性ポリペプチド組成物（例えば、ヒストンテールペプチド）、およびペイロード（例えば、核酸および／またはタンパク質ペイロード）を含む。いくつかの場合では、コアは、アニオン性アミノ酸ポリマーの存在下でカチオン性アミノ酸ポリマーとペイロードとの縮合によって生成される（いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドの存在下）。いくつかの実施形態では、コアを構成する成分の縮合は、カチオン性ポリマーとペイロードとのコンジュゲートと比較して、トランスフェクション効率の増加を媒介することができる。ナノ粒子コア中にアニオン性ポリマーを包含することは、ナノ粒子の細胞内滞留およびペイロードの放出の期間を延長し得る。

【００２４】
コアのカチオン性およびアニオン性ポリマー組成物については、ペイロードの持続放出を制御するために、Ｌ－異性体ポリマーに対するＤ－異性体ポリマーの比率を制御することができ、Ｌ－異性体ポリマーに対するＤ－異性体ポリマーの比率の増加が安定性の増加（ペイロード放出速度の減少）をもたらし、これは、例えば、対象ナノ粒子によって送達されたペイロードからのより長期の遺伝子発現を可能にする。いくつかの場合では、ナノ粒子コア内のＤ－異性体対Ｌ－異性体ポリペプチドの比率を変更することにより、遺伝子発現プロファイル（例えば、ペイロード分子によってコードされるタンパク質の発現）を１～９０日程度にすることができる（例えば：１～８０、１～７０、１～６０、１～５０、１～４０、１～３０、１～２５、１～２０、１～１５、１～１０、３～９０、３～８０、３～７０、３～６０、３～５０、３～４０、３～３０、３～２５、３～２０、３～１５、３～１０、５～９０、５～８０、５～７０、５～６０、５～５０、５～４０、５～３０、５～２５、５～２０、５～１５、または５～１０日）。ペイロード放出の制御（例えば、遺伝子編集ツールを送達するとき）は、例えば相同性指向の修復が望まれるいくつかの場合において、ゲノム編集を行うために特に有効であり得る。

【００２５】
いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、コアとコアを封入している脱落可能層とを含み、コアは、（ａ）アニオン性ポリマー組成物と、（ｂ）カチオン性ポリマー組成物と、（ｃ）カチオン性ポリペプチド組成物と、（ｄ）核酸および／またはタンパク質のペイロードとを含み、（ａ）および（ｂ）のうちの一方はアミノ酸のＤ－異性体ポリマーを含み、（ａ）および（ｂ）のうちの他方は、アミノ酸のＬ－異性体ポリマーを含み、Ｌ－異性体ポリマーに対するＤ－異性体ポリマーの比は１０：１～１．５：１の範囲内である（例えば、８：１～１．５：１、６：１～１．５：１、５：１～１．５：１、４：１～１．５：１、３：１～１．５：１、２：１～１．５：１、１０：１～２：１、８：１～２：１、６：１～２：１、５：１～２：１、１０：１～３：１、８：１～３：１、６：１～３：１、５：１～３：１、１０：１～４：１、４：１～２：１、６：１～４：１、または１０：１～５：１）、もしくは１：１．５～１：１０（例えば、１：１．５～１：８、１：１．５～１：６、１：１．５～１：５、１：１．５～１：４、１：１．５～１：３、１：１．５～１：２、１：２～１：１０、１：２～１：８、１：２～１：６、１：２～１：５、１：２～１：４、１：２～１：３、１：３～１：１０、１：３～１：８、１：３～１：６、１：３～１：５、１：４～１：１０、１：４～１：８、１：４～１：６、または１：５～１：１０）。いくつかのそのような場合では、Ｄ－異性体ポリマー対Ｌ－異性体ポリマーの比は１：１ではない。そのような場合では、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択されるアニオン性ポリマーを含むアニオン性ポリマー組成物であり、それは（任意に）、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含むことのできるカチオン性ポリマー組成物である。いくつかの場合では、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含むカチオン性ポリマー組成物であり、それは（任意に）ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択されるアニオン性ポリマーを含むことのできるアニオン性ポリマー組成物である。

【００２６】
いくつかの実施形態では、ナノ粒子が、コアとコアを封入している脱落可能層とを含み、コアが、（ｉ）アニオン性ポリマー組成物と、（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物と、（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物と、（ｉｖ）核酸および／またはタンパク質のペイロードとを含み、（ａ）該アニオン性ポリマー組成物が、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、ならびに／または（ｂ）該カチオン性ポリマー組成物が、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含む。そのような場合では、アニ

オン性ポリマー組成物は、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される第１のアニオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択される第２のアニオン性ポリマーを含む。いくつかの場合では、カチオン性ポリマー組成物は、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択される第１のカチオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択される第２のカチオン性ポリマーを含む。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーは、アニオン性アミノ酸のＬ－異性体の該ポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーは、カチオン性アミノ酸のＬ－異性体の該ポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する。

【００２７】

ナノ粒子成分の感受性

いくつかの実施形態では、ペイロード放出のタイミングは、例えばコアの一部として（例えば、カチオン性ポリペプチド組成物の一部、カチオン性ポリマー組成物の一部、および／またはアニオン性ポリマー組成物の一部）、特定の種類のタンパク質を選択することによって制御され得る。例えば、特定の時間範囲またはペイロードが特定の細胞位置（例えば、サイトゾル、核、リソソーム、エンドソーム）に存在するまで、または特定の条件下（例えば、低ｐＨ、高ｐＨなど）でのペイロード放出を遅延することは望ましい可能性がある。したがって、いくつかの場合では、特定のタンパク質活性（例えば酵素活性）に感受性のある、例えば特定のタンパク質活性（例えば酵素活性）の基質であるタンパク質が（例えばコアの一部として）使用され、これは、一般的なユビキタス細胞機構、例えば一般的な分解機構に感受性であることとは対照的である。特定のタンパク質活性に感受性のあるタンパク質は、本明細書では「酵素感受性タンパク質」（ＥＳＰ）と呼ばれる。実例のＥＳＰの例では、（ｉ）マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）活性（細胞外活性の一例）の基質であるタンパク質、例えばＭＭＰによって認識されるモチーフを含むタンパク質と、（ｉｉ）カテプシン活性（細胞内エンドソーム活性の一例）の基質であるタンパク質、例えばカテプシンによって認識されるモチーフを含むタンパク質と、（ｉｉｉ）メチルトランスフェラーゼおよび／またはアセチルトランスフェラーゼ活性（細胞内核活性の一例）の基質であるヒストンテイルペプチド（ＨＴＰ）などのタンパク質、例えば酵素的にメチル化／脱メチル化することができるモチーフおよび／または酵素的にアセチル化／脱アセチル化することができるモチーフを含むタンパク質とを含むが、これらに限定されない。例えば、いくつかの場合では、核酸ペイロードは、アセチルトランスフェラーゼ活性の基質であるタンパク質（例えばヒストンテイルペプチド）と縮合し、タンパク質のアセチル化はタンパク質にペイロードを放出させ、このように、多少のアセチル化を受けやすいタンパク質を使用することを選択することによって、ペイロード放出に対する制御を行使することができる。

【００２８】

いくつかの場合では、主題のナノ粒子のコアは、ポリペプチドホモポリマー（すなわち、反復配列を有するタンパク質）である酵素的に中性のポリペプチド（ＥＮＰ）を含み、ポリペプチドは特定の活性を有さず、中性である。例えば、どちらも特定の活性を有するＮＬＳ配列およびＨＴＰとは異なり、ＥＮＰは特定の活性を有しない。

【００２９】

いくつかの場合では、主題のナノ粒子のコアは、酵素活性に対して耐性のあるタンパク質であり、酵素的に保護されたポリペプチド（ＥＰＰ）を含む。ＰＰの例は、（ｉ）タンパク質分解に抵抗することができる、Ｄ－異性体アミノ酸を含むポリペプチド（例えば、Ｄ－異性体ポリマー）と、（ｉｉ）ポリグルタミンリピートドメイン（例えば、ＱＱＱＱＱＱＱＱＱＱ）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７０）などの自己保護ドメインとを含むが、こ

れらに限定されない。

【００３０】

主題のナノ粒子の一部（例えば、ナノ粒子コアの一部）である、感受性タンパク質（ＥＳＰ）と、中性タンパク質（ＥＮＰ）と、保護タンパク質（ＥＰＰ）との相対量を制御することによって、ペイロードの放出を制御することができる。たとえば、より多くのＥＳＰの使用は、より多くのＥＰＰの使用よりも一般的にペイロードの放出を早く誘導する。さらに、より多くのＥＳＰの使用は、特定の条件／状況のセット、例えばＥＳＰが感受性であるタンパク質（例えば酵素）の活性を誘導する条件／状況に応じて、一般的にペイロードの放出を誘導する。

【００３１】

アニオン性ポリマー組成物

アニオン性ポリマー組成物は、１つ以上のアニオン性アミノ酸ポリマーを含むことができる。例えば、いくつかの場合では、主題のアニオン性ポリマー組成物は、ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、およびそれらの組み合わせから選択されるポリマーを含む。いくつかの場合では、所与のアニオン性アミノ酸ポリマーは、アスパラギン酸残基とグルタミン酸残基との混合物を含むことができる。各ポリマーは、Ｌ－異性体またはＤ－異性体のポリマーとして組成物中に存在し得、Ｄ－異性体はそれらが分解するのにより長い時間がかかるため標的細胞内でより安定である。したがって、ナノ粒子コア中にＤ－異性体ポリ（アミノ酸）を包含することは、コアの分解およびその後のペイロード放出を遅延させる。したがって、ペイロード放出速度は制御することができ、Ｌ－異性体のポリマーに対するＤ－異性体のポリマーの比に比例し、それは、Ｌ－異性体に対するＤ－異性体の比率が高いほどペイロード放出の持続時間が長くなる（すなわち放出速度が低下する）。言い換えれば、Ｄ－異性体とＬ－異性体の相対量は、ナノ粒子コアの持続放出動態と、分解およびペイロード放出に対する酵素的感受性とを調整することができる。

【００３２】

いくつかの場合では、主題のナノ粒子のアニオン性ポリマー組成物は、アニオン性アミノ酸ポリマーのＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸ポリマーのＬ－異性体のポリマーを含む（例えば、ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）およびポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ））。いくつかの場合では、Ｄ－異性体対Ｌ－異性体比は、１０：１～１：１０の範囲内である（例えば、８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１、または２：１～１：１）。

【００３３】

したがって、いくつかの場合では、アニオン性ポリマー組成物は、Ｄ－異性体のポリマーである第１のアニオン性ポリマー（例えばアミノ酸ポリマー）（例えば、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される）を含み、Ｌ－異性体のポリマーである第２のアニオン性ポリマー（例えば、アミノ酸ポリマー）（例えば、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択される）を含む。いくつかの場合では、第１のアニオン性ポリマー（Ｄ－異性体）対第２のアニオン性ポリマー（Ｌ－異性体）の比は１０：１～１：１０の範囲内である（例えば、８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１

０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１、または２：１～１：１）。

【００３４】

いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子のコアのアニオン性ポリマー組成物は、（例えば、アニオン性ポリマーの前述の例のうちのいずれかに加えて、または代わりに）、グリコサミノグリカン、糖タンパク質、多糖類、ポリ（マンヌロン酸）、ポリ（グルロン酸）、ヘパリン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ケラタン、ケラタン硫酸、アグリカン、ポリ（グルコサミン）、またはそれらの任意の組み合わせを含むアニオン性ポリマーを含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、コア内のアニオン性ポリマーは、１～２００ｋＤａの範囲の分子量を有することができる（例えば、１～１５０、１～１００、１～５０、５～２００、５～１５０、５～１００、５～５０、１０～２００、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１５～２００、１５～１５０、１５～１００、または１５～５０ｋＤａ）。一例として、いくつかの場合では、アニオン性ポリマーは、約１５ｋＤａの分子量を有するポリ（グルタミン酸）を含む。

【００３６】

いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーはシステイン残基を含み、これは、例えばリンカー、ＮＬＳ、および／またはカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ）に対してコンジュゲーションを容易にすることができる。例えば、システイン残基は、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）および／またはアミン反応性化学的性質を介した架橋（コンジュゲーション）に使用することができる。したがって、いくつかの実施形態では、アニオン性ポリマー組成物の、アニオン性アミノ酸ポリマー（例えば、ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、ポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））はシステイン残基を含む。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ末端および／またはＣ末端にシステイン残基を含む。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーは内在性システイン残基を含む。

【００３７】

いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーは、核局在シグナル（ＮＬＳ）を含む（および／またはそれにコンジュゲートしている）（以下により詳細に記載される）。したがって、いくつかの実施形態では、アニオン性ポリマー組成物の、アニオン性アミノ酸ポリマー（例えば、ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、ポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））は、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上、または４つ以上）のＮＬＳを含む（および／またはそれにコンジュゲートされる）。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ末端および／またはＣ末端にＮＬＳを含む。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーは内在性ＮＬＳを含む。

【００３８】

いくつかの場合では、主題のナノ粒子コアを生成するとき、アニオン性ポリマーがカチ

オン性ポリマーの前に追加される。
【００３９】
カチオン性ポリマー組成物
カチオン性ポリマー組成物は、１つ以上のカチオン性アミノ酸ポリマーを含むことができる。例えば、いくつかの場合では、主題のカチオン性ポリマー組成物は、ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リジン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン）、およびそれらの組み合わせから選択されるポリマーを含む。いくつかの場合では、所与のカチオン性アミノ酸ポリマーは、アルギニン残基と、リジン残基と、ヒスチジン残基と、オルニチン残基と、シトルリン残基との混合物を（任意の適宜な組み合わせで）含むことができる。各ポリマーは、Ｌ－異性体またはＤ－異性体のポリマーとして組成物中に存在し得、Ｄ－異性体はそれらが分解するのにより長い時間がかかるため標的細胞内でより安定である。したがって、ナノ粒子コア中にＤ－異性体ポリ（アミノ酸）を包含することは、コアの分解およびその後のペイロード放出を遅延させる。したがって、ペイロード放出速度は制御することができ、Ｌ－異性体のポリマーに対するＤ－異性体のポリマーの比に比例し、それは、Ｌ－異性体に対するＤ－異性体の比率が高いほどペイロード放出の持続時間が長くなる（すなわち放出速度が低下する）。言い換えれば、Ｄ－異性体とＬ－異性体の相対量は、ナノ粒子コアの持続放出動態と、分解およびペイロード放出に対する酵素的感受性とを調整することができる。
【００４０】
いくつかの場合では、主題のナノ粒子のカチオン性ポリマー組成物は、カチオン性アミノ酸ポリマーのＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸ポリマーのＬ－異性体のポリマーを含む（例えば、ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リジン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン））。いくつかの場合では、Ｄ－異性体対Ｌ－異性体比は、１０：１～１：１０の範囲内である（例えば、８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１、または２：１～１：１）。
【００４１】
したがって、いくつかの場合では、カチオン性ポリマー組成物は、Ｄ－異性体のポリマーである第１のカチオン性ポリマー（例えばアミノ酸ポリマー）（例えば、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択される）を含み、Ｌ－異性体のポリマーである第２のカチオン性ポリマー（例えばアミノ酸ポリマー）（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択される）を含む。いくつかの場合では、第１のカチオン性ポリマー（Ｄ－異性体）対第２のカチオン性ポリマー（Ｌ－異性体）の比は１０：１～１：１０の範囲内である（例えば、８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、

２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１、または２：１～１：１）。

【００４２】

いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子のコアのカチオン性ポリマー組成物は、（例えば、カチオン性ポリマーの前述の例のうちのいずれかに加えて、または代わりに）ポリ（エチレンイミン）、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭ）、ポリ（アスパルトアミド）、ポリペプトイド（例えばコア縮合のための「クモの巣」様の枝を形成するため）、電荷官能化ポリエステル、カチオン性多糖、アセチル化アミノ糖、キトサン、またはそれらの任意の組み合わせを含むカチオン性ポリマーを含む（例えば、直鎖状または分枝状）。

【００４３】

いくつかの実施形態では、コア内のカチオン性ポリマーは、１～２００ｋＤａの範囲の分子量を有することができる（例えば、１～１５０、１～１００、１～５０、５～２００、５～１５０、５～１００、５～５０、１０～２００、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１５～２００、１５～１５０、１５～１００、または１５～５０ｋＤａ）。一例として、いくつかの場合では、カチオン性ポリマーは、例えば約２９ｋＤａの分子量を有するポリ（Ｌ－アルギニン）を含む。別の例として、いくつかの場合では、カチオン性ポリマーは、約２５ｋＤａの分子量を有する直鎖状ポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）を含む。別の例として、いくつかの場合では、カチオン性ポリマーは、約１０ｋＤａの分子量を有する分枝状ポリ（エチレンイミン）を含む。別の例として、いくつかの場合では、カチオン性ポリマーは、約７０ｋＤａの分子量を有する分枝状ポリ（エチレンイミン）を含む。いくつかの場合では、カチオン性ポリマーは、ＰＡＭＡＭを含む。

【００４４】

いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーはシステイン残基を含み、これは、例えばリンカー、ＮＬＳ、および／またはカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ）に対してコンジュゲーションを容易にすることができる。例えば、システイン残基は、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）および／またはアミン反応性化学的性質を介した架橋（コンジュゲーション）に使用することができる。したがって、いくつかの実施形態では、カチオン性アミノ酸ポリマーの（例えば、ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リジン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、およびポリ（シトルリン）、ポリ（Ｄ－アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（Ｄ－リジン）（ＰＤＫ）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）、ポリ（Ｌ－アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（Ｌ－リジン）（ＰＬＫ）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン））は、システイン残基を含む。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ末端および／またはＣ末端にシステイン残基を含む。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーは内在性システイン残基を含む。

【００４５】

いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーは、核局在シグナル（ＮＬＳ）を含む（および／またはそれにコンジュゲートしている）（以下により詳細に記載される）。したがって、いくつかの実施形態において、カチオン性アミノ酸ポリマーの（例えば、ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リジン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、およびポリ（シトルリン）、ポリ（Ｄ－アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（Ｄ－リジン）（ＰＤＫ）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）、ポリ（Ｌ－アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（Ｌ－リジン）（ＰＬＫ）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン））は、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上、または４つ以上）のＮＬＳを含む（および／またはそれにコンジュゲートされる）。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ末端および／またはＣ末端にＮＬＳを含む。い

くつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーは、内在性ＮＬＳを含む。
【００４６】
カチオン性ポリペプチド組成物
いくつかの実施形態では、ナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物は、安定性、細胞内区画化、および／またはペイロード放出を媒介できる。一例として、ヒストンタンパク質のＮ末端フラグメントは、一般にヒストンテールペプチドと呼ばれ、主題のナノ粒子コア内では、いくつかの場合において、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ媒介アセチル化の場合のように、様々なヒストン修飾によって脱プロトン化できるだけではなく、ナノ粒子コアの成分（例えば、ペイロード）の有効な核特異的開封もまた媒介し得る。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物は、ヒストンおよび／またはヒストンテールペプチドを含む（例えば、カチオン性ポリペプチドは、ヒストンおよび／またはヒストンテールペプチドであり得る）。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物は、ＮＬＳ含有ペプチドを含む（例えば、カチオン性ポリペプチドはＮＬＳ含有ペプチドであり得る）。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物は、ミトコンドリア局在シグナルを含むペプチドを含む（例えば、カチオン性ポリペプチドは、ミトコンドリア局在シグナルを含むペプチドであり得る）。
【００４７】
ヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）
いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物は、ヒストンペプチドまたはヒストンペプチドのフラグメント、例えば、Ｎ末端ヒストンテール（例えば、Ｈ１、Ｈ２（例えば、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ）、Ｈ３、またはＨ４ヒストンタンパク質のヒストンテール）などを含む。ヒストンタンパク質のテールフラグメントは、本明細書においてヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）と呼ばれる。そのようなタンパク質（ヒストンおよび／またはＨＴＰ）は、主題のナノ粒子のコアの一部として核酸ペイロードと縮合することができるので、１つ以上のヒストンまたはＨＴＰを含むコア（例えば、カチオン性ポリペプチド組成物の一部として）は、本明細書ではヌクレオソーム模倣コアと呼ばれることがある。ヒストンおよび／またはＨＴＰをモノマーとして含めることができ、場合によっては、核酸ペイロードをナノ粒子コアに縮合すると、ダイマー、トリマー、テトラマーおよび／またはオクタマーを形成する。いくつかの場合では、ＨＴＰは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ媒介アセチル化の場合のように、様々なヒストン修飾によって脱プロトン化できるだけではなく、コアの成分の有効な核固有の開封もまた媒介し得る（例えば、ペイロードの放出）。ヒストンおよび／またはＨＴＰを含むコアの輸送は、ゴルジ体および小胞体を通る逆行性輸送を利用する代替のエンドサイトーシス経路に依存し得る。さらに、いくつかのヒストンは、先天的核局在配列を含み、コア内にＮＬＳを包含することはコア（ペイロードを含む）を標的細胞の核に向けることができる。
【００４８】
いくつかの実施形態では、主題のカチオン性ポリペプチド組成物は、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４タンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。いくつかの場合では、主題のカチオン性ポリペプチド組成物は、ヒストンタンパク質のＮ末端領域に対応するアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。例えば、フラグメント（ＨＴＰ）は、ヒストンタンパク質の最初の５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０のＮ末端アミノ酸を含み得る。いくつかの場合では、主題のＨＴＰはヒストンタンパク質のＮ末端領域由来の５～５０のアミノ酸を含む（例えば、５～４５、５～４０、５～３５、５～３０、５～２５、５～２０、８～５０、８～４５、８～４０、８～３５、８～３０、１０～５０、１０～４５、１０～４０、１０～３５、または１０～３０アミノ酸）。いくつかの場合では、主題のカチオン性ポリペプチドは、５～１５０のアミノ酸を含む（例えば、５～１００、５～５０、５～３５、５～３０、５～２５、５～２０、８～１５０、８～１００、８～５０、８～４０、８～３５、８～３０、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１０～４０、１０～３５、または１０～３０アミノ酸）。
【００４９】

いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えばヒストンまたはＨＴＰ、例えばＨ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）は翻訳後修飾を含む（例えば、いくつかの場合において、１つ以上のヒスチジン、リジン、アルギニン、または他の相補的残基上）。例えば、いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチドはメチル化（および／またはメチル化／脱メチル化に対して感受性）、アセチル化（および／またはアセチル化／脱アセチル化に対して感受性）、クロトニル化（および／またはクロトニル化／脱クロトニル化に対して感受性）、ユビキチン化（および／またはユビキチン化／脱ユビキチン化に対して感受性）、リン酸化（および／またはリン酸化／脱リン酸化に対して感受性）、ＳＵＭＯ化（および／またはＳＵＭＯ化／脱ＳＵＭＯ化に対して感受性）、ファルネシル化（および／またはファルネシル化／デファネシル化に対して感受性）、硫酸化（および／または硫酸化／脱硫酸化に対して感受性）されており、または、それ以外の場合では、翻訳後修飾される。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えばヒストンまたはＨＴＰ、例えばＨ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）はｐ３００／ＣＢＰ基質である（例えば、下記のＨＴＰの例、例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２９～１３０を参照）。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）は、硫酸化されているかまたは硫酸化に感受性である（例えば、チオ硫酸スルフトランスフェラーゼ基質として）１つ以上のチオール残基を含む（例えば、システインおよび／またはメチオニン残基を含むことができる）。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチドのカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）は、Ｃ末端でアミド化されている。ヒストンＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、およびＨ４（および／またはＨＴＰ）は、それらのリジンのいずれかにおいてモノメチル化、ジメチル化、またはトリメチル化されて、転写活性を促進または抑制し、核特異的放出動態を変えることができる。

【００５０】

カチオン性ポリペプチドは、所望の修飾を用いて合成され得るか、またはインビトロ反応において修飾され得る。あるいは、カチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ）を細胞集団内で発現させることができ、所望の修飾タンパク質を単離／精製することができる。いくつかの場合では、主題のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物はメチル化ＨＴＰを含む（例えば、Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）のＨＴＰ配列を含み、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７５または８８として記載のアミノ酸配列を含む）。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）は、Ｃ末端アミドを含む。

【００５１】

ヒストンおよびＨＴＰの例

例として、以下の配列が含まれるが、これらに限定されない。

H2A

SGRGKQGGKARAKAKTRSSR (SEQ ID NO: 62) [1-20]

SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGGG (SEQ ID NO: 63) [1-39]

MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLAAVL

EYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLLGKVTIAQGGVLPNIQAVLL

PKKTESHHKAKGK(SEQ ID NO: 64) [1-130]

H2AX

CKATQASQEY (SEQ ID NO: 65) [134 – 143]

KKTSATVGPKAPSGGKKATQASQEY(SEQ ID NO: 66) [KK 120-129]

MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGHYAERVGAGAPVYLAAVL
EYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLL
PKKTSATVGPKAPSGGKKATQASQEY(SEQ ID NO: 67) [1-143]

H2B

PEPA - K(cr) – SAPAPK (SEQ ID NO: 68) [1-11 H2BK5(cr)]

[cr: クロトニル化]

PEPAKSAPAPK (SEQ ID NO: 69) [1-11]

AQKKDGKKRKRSRKE (SEQ ID NO: 70) [21-35]

MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSIYVYKVLKQVHPDTGISSK
AMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKA
VTKYTSSK (SEQ ID NO: 71) [1-126]

H3

ARTKQTAR (SEQ ID NO: 72) [1-8]

ART - K(Me1) - QTARKS (SEQ ID NO: 73) [1-8 H3K4(Me1)]

ART - K(Me2) - QTARKS (SEQ ID NO: 74) [1-8 H3K4(Me2)]

ART - K(Me3) - QTARKS (SEQ ID NO: 75) [1-8 H3K4(Me3)]

ARTKQTARK - pS - TGGKA (SEQ ID NO: 76) [1-15 H3pS10]

ARTKQTARKSTGGKAPRKWC - NH2 (SEQ ID NO: 77) [1-18 WC,アミド]

ARTKQTARKSTGG - K(Ac) - APRKQ (SEQ ID NO: 78) [1-19 H3K14(Ac)]

ARTKQTARKSTGGKAPRKQL (SEQ ID NO: 79) [1-20]

ARTKQTAR - K(Ac) - STGGKAPRKQL (SEQ ID NO: 80) [1-20 H3K9(Ac)]

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 81) [1-21]

ARTKQTAR - K(Ac) - STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 82) [1-21 H3K9(Ac)]

ARTKQTAR - K(Me2) - STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 83) [1-21 H3K9(Me1)]

ARTKQTAR - K(Me2) - STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 84) [1-21 H3K9(Me2)]

ARTKQTAR - K(Me2) - STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 85) [1-21 H3K9(Me3)]

ART - K(Me1) - QTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 86) [1-21 H3K4(Me1)]

ART - K(Me2) - QTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 87) [1-21 H3K4(Me2)]

ART - K(Me3) - QTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 88) [1-21 H3K4(Me3)]

ARTKQTAR - K(Ac) - pS - TGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 89) [1-21 H3K9(Ac), pS10]

ART - K(Me3) - QTAR - K(Ac) - pS - TGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 90) [1-21 H3K4(Me3), K9(Ac), pS10]

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC (SEQ ID NO: 91) [1-21 Cys]

ARTKQTAR - K(Ac) - STGGKAPRKQLATKA (SEQ ID NO: 92) [1-24 H3K9(Ac)]

ARTKQTAR - K(Me3) - STGGKAPRKQLATKA (SEQ ID NO: 93) [1-24 H3K9(Me3)]

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAA (SEQ ID NO: 94) [1-25]

ART - K(Me3) – QTARKSTGGKAPRKQLATKAA (SEQ ID NO: 95) [1-25 H3K4(Me3)]

TKQTAR - K(Me1) - STGGKAPR (SEQ ID NO: 96) [3-17 H3K9(Me1)]

TKQTAR - K(Me2) - STGGKAPR (SEQ ID NO: 97) [3-17 H3K9(Me2)]

TKQTAR - K(Me3) - STGGKAPR (SEQ ID NO: 98) [3-17 H3K9(Me3)]

KSTGG - K(Ac) – APRKQ (SEQ ID NO: 99) [9-19 H3K14(Ac)]

QTARKSTGGKAPRKQLASK (SEQ ID NO: 100) [5-23]

APRKQLATKAARKSAPATGGVKKPH (SEQ ID NO: 101) [15-39]

ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPG (SEQ ID NO: 102) [21-44]

KAARKSAPA (SEQ ID NO: 103) [23-31]

KAARKSAPATGG (SEQ ID NO: 104) [23-34]

KAARKSAPATGGC (SEQ ID NO: 105) [23-34 Cys]

KAAR - K(Ac) - SAPATGG (SEQ ID NO: 106) [H3K27(Ac)]

KAAR - K(Me1) - SAPATGG (SEQ ID NO: 107) [H3K27(Me1)]

KAAR - K(Me2) - SAPATGG (SEQ ID NO: 108) [H3K27(Me2)]

KAAR - K(Me3) - SAPATGG (SEQ ID NO: 109) [H3K27(Me3)]

AT - K(Ac) – AARKSAPSTGGVKKPHRYRPG (SEQ ID NO: 110) [21-44 H3K23(Ac)]

ATKAARK - pS – APATGGVKKPHRYRPG (SEQ ID NO: 111) [21-44 pS28]

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGV (SEQ ID NO: 112) [1-35]

STGGV - K(Me1) - KPHRY (SEQ ID NO: 113) [31-41 H3K36(Me1)]

STGGV - K(Me2) - KPHRY (SEQ ID NO: 114) [31-41 H3K36(Me2)]

STGGV - K(Me3) - KPHRY (SEQ ID NO: 115) [31-41 H3K36(Me3)]

GTVALREIRRYQ - K(Ac) - STELLIR (SEQ ID NO: 116) [44-63 H3K56(Ac)]

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE (SEQ ID NO: 117) [1-50]

TELLIRKLPFQRLVREIAQDF - K(Me1) - TDLRFQSAAI (SEQ ID NO: 118) [H3K79(Me1)]

EIAQDFKTDLR (SEQ ID NO: 119) [73-83]

EIAQDF - K(Ac) - TDLR (SEQ ID NO: 120) [73-83 H3K79(Ac)]

EIAQDF - K(Me3) - TDLR (SEQ ID NO: 121) [73-83 H3K79(Me3)]

RLVREIAQDFKTDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 122) [69-89]

RLVREIAQDFK - (Me1) - TDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 123) [69-89 H3K79 (Me1), アミド]
RLVREIAQDFK - (Me2) - TDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 124) [69-89 H3K79 (Me2), アミド]
RLVREIAQDFK - (Me3) - TDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 125) [69-89 H3K79 (Me3), アミド]
KRVTIMPKDIQLARRIRGERA (SEQ ID NO: 126) [116-136]
MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQK STELLIRKLPFQRLMREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACESYLVGLFEDTNLCVIHAKR VTIMPKDIQLARRIRGERA(SEQ ID NO: 127) [1-136]

H4
SGRGKGG (SEQ ID NO: 128) [1-7]
RGKGGKGLGKGA (SEQ ID NO: 129) [4-12]
SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV (SEQ ID NO: 130) [1-21]
KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC - NH2 (SEQ ID NO: 131) [8-25 WC, アミド]
SGRG - K(Ac) - GG - K(Ac) - GLG - K(Ac) - GGA - K(Ac) – RHRKVLRDNGSGSK (SEQ ID NO: 132) [1-25 H4K5,8,12,16(Ac)]
SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK - NH2 (SEQ ID NO: 133) [1-20 H4 PRMT7 (タンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ 7) 基質, M1]
SGRG - K(Ac) – GGKGLGKGGAKRHRK (SEQ ID NO: 134) [1-20 H4K5 (Ac)]
SGRGKGG – K(Ac) - GLGKGGAKRHRK (SEQ ID NO: 135) [1-20 H4K8 (Ac)]
SGRGKGGKGLG - K(Ac) - GGAKRHRK (SEQ ID NO: 136) [1-20 H4K12 (Ac)]
SGRGKGGKGLGKGGA - K(Ac) - RHRK (SEQ ID NO: 137) [1-20 H4K16 (Ac)]
KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC - NH2 (SEQ ID NO: 138) [1-25 WC, アミド]
MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG (SEQ ID NO: 139) [1-103]

【００５２】
したがって、主題のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６２～１３９のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの場合では、主題のカチオン性ポリペプチドカチオン性ポリペプチド組成物は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６２～１３９のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）。いくつかの場合では、主題のカチオン性ポリペプチドカチオン性ポリペプチド組成物は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６２～１３９のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば、９５％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）。カチオン性ポリペプチドは任意の都合のよい修飾を含むことができ、多数のそのような企図された修飾、例えばメチル化、アセチル化、クロトニル化、ユビキチン化、リン酸化、ＳＵＭＯ化、ファルネシル化、硫酸化などが上記されている。

【００５３】
いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチドカチオン性ポリペプチド組成物は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９４に記載のアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチドカチオン性ポリペプチド組成物は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９４に記載のアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば、９８％以上、９９％以上、または１００％の配列同一性）。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９４に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、ヒトヒストン３タンパク質の最初の２５アミノ酸を含み、リジン４上でトリメチル化されたＨ３Ｋ４（Ｍｅ３）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９５）によって表される配列を含む（例えば、いくつかの場合ではＣ末端でアミド化されている）。

【００５４】
いくつかの実施形態にでは、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）は、システイン残基を含み、カチオン性（またはいくつかの場合ではアニオン性）アミノ酸ポリマー、リンカー、ＮＬＳ、および／または他のカチオン性ポリペプチド（例えば、いくつかの場合では分枝ヒストン構造を形成する）へのコンジュゲーションを容易にすることができる。例えば、システイン残基は、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）および／またはアミン反応性化学的性質を介した架橋（コンジュゲーション）に使用することができる。いくつかの場合では、システイン残基は内在性である。いくつかの場合では、システイン残基は、Ｎ末端および／またはＣ末端に位置する。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）は、システイン残基を付加する突然変異（例えば、挿入または置換）を含む。システインを含むＨＴＰの例として、

CKATQASQEY (SEQ ID NO: 140) - H2AX から

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC (SEQ ID NO: 141) - H3 から

ARTKQTARKSTGGKAPRKWC (SEQ ID NO: 142)

KAARKSAPATGGC (SEQ ID NO: 143) - H3 から

KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC (SEQ ID NO: 144) – H4 から

MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQK

STELLIRKLPFQRLMREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACESYLVGLFEDTNLCVIHAKR

VTIMPKDIQLARRIRGERA (SEQ ID NO: 145) – H3 から

が含まれるが、これらに限定されない。

【００５５】
いくつかの実施形態では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）は、主題のナノ粒子のコアのカチオン性（および／またはアニオン性）アミノ酸ポリマーにコンジュゲートされている。一例として、ヒストンまたはＨＴＰは、例えば、ポリマーのリジン（複数可）のピリジルジスルフィド基（複数可）が、ヒストンまたはＨＴＰのシステインへのジスルフィド結合で置換されている場合に、システイン残基を介してカチオン性アミノ酸ポリマー（例えば、ポリ（リジン）を含むもの）にコンジュゲートされることができる。

【００５６】
修飾／分枝構造
いくつかの実施形態では、主題のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプ

チドは、直鎖状構造を有する。いくつかの実施形態では、主題のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、分枝状構造を有する。

【００５７】

例えば、いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド（例えば、ＨＴＰ、例えば、システイン残基を有するＨＴＰ）は、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｄ－リジン））の末端にコンジュゲートされ（例えば、そのＣ末端に）、それにより伸長した直鎖状ポリペプチドを形成する。いくつかの場合では、１つ以上（２つ以上、３つ以上など）のカチオン性ポリペプチド（例えば、ＨＴＰ、例えば、システイン残基を有するＨＴＰ）は、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｄ－リジン））の末端（複数可）にコンジュゲートされ（例えば、それらのＣ末端に）、それにより伸長した直鎖状ポリペプチドを形成する。いくつかの場合では、カチオン性ポリマーは、４，５００～１５０，０００Ｄａ）の範囲の分子量を有する。

【００５８】

別の例として、いくつかの場合では、１つ以上（２つ以上、３つ以上など）のカチオン性ポリペプチド（例えば、ＨＴＰ、例えばシステイン残基を有するＨＴＰ）は、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｄ－リジン））の側鎖にコンジュゲートされ（例えば、それらのＣ末端に）、それにより分枝構造（分枝ポリペプチド）を形成する。ナノ粒子コアの成分（例えば、主題のカチオン性ポリペプチド組成物の成分）による分枝構造の形成は、いくつかの場合では、コア縮合（例えば、核酸ペイロードの）の量の増加を達成することができる。したがって、いくつかの場合では、分枝構造を形成する成分を使用することが望ましい。様々な種類の分枝構造が重要であり、生成することができる分枝構造の例（例えば、ＨＴＰなどの主題のカチオン性ポリペプチド、例えば、システイン残基を有するＨＴＰ、ペプトイド、およびポリアミドなどを使用して）は、ブラシポリマー、ウェブ（例えば、スパイダーウェブ）、グラフトポリマー、星形ポリマー、くし形ポリマー、ポリマー網目、デンドリマーなど、が含まれるがこれらに限定されない。

【００５９】

一例として、図１３４にブラシタイプの分枝構造を示す。いくつかの場合では、分枝構造は、２～３０のカチオン性ポリペプチド（例えば、ＨＴＰ）（例えば、２～２５、２～２０、２～１５、２～１０、２～５、４～３０、４～２５、４～２０、４～１５、または４～１０カチオン性ポリペプチド）を含み、それぞれが分枝構造の他のカチオン性ポリペプチドと同じまたは異なり得る（例えば、図１３４参照）。いくつかの場合では、カチオン性ポリマーは、４，５００～１５０，０００Ｄａ）の範囲の分子量を有する。いくつかの場合では、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｄ－リジン））の側鎖の５％以上（例えば、１０％以上、２０％以上、２５％以上、３０％以上、４０％以上、または５０％以上）は、主題のカチオン性ポリペプチド（例えば、ＨＴＰ、例えば、システインを有するＨＴＰ）にコンジュゲートされる。いくつかの場合では、カチオン性ポリマー（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｄ－リジン））の側鎖の最大５０％（例えば、最大４０％、最大３０％、最大２５％、最大２０％、最大１５％、最大１０％、または最大５％）は、主題のカチオン性ポリペプチド（例えば、ＨＴＰ、例えば、システインを有するＨＴＰ）にコンジュゲートされる。したがって、ＨＴＰは、カチオン性アミノ酸ポリマーなどのポリマーの主鎖から分枝することができる。

【００６０】

いくつかの場合では、ペプトイド（ポリペプトイド）、ポリアミド、デンドリマーなどのような成分を使用して分枝構造の形成を容易にすることができる。例えば、いくつかの場合では、例としてウェブ（例えば、クモの巣）構造を生成するために、ペプトイド（例えば、ポリペプトイド）は、ナノ粒子コアの成分として使用され、いくつかの場合では、ナノ粒子コアの縮合を容易にすることができる。

【００６１】
本明細書中の１つ以上の天然のまたは修飾されたポリペプチド配列は、末端もしくは間欠性のアルギニン、リジン、またはヒスチジン配列で修飾され得る。一実施形態では、各ポリペプチドは、ナノ粒子コア内に等しいアミンモル濃度で含まれる。この実施形態では、各ポリペプチドのＣ末端は５Ｒ（５アルギニン）で修飾することができる。いくつかの実施形態では、各ポリペプチドのＣ末端は９Ｒ（９アルギニン）で修飾することができる。いくつかの実施形態では、各ポリペプチドのＮ末端は５Ｒ（５アルギニン）で修飾することができる。いくつかの実施形態では、各ポリペプチドのＮ末端は９Ｒ（９アルギニン）で修飾することができる。いくつかの場合では、Ｈ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３および／またはＨ４ヒストンフラグメント（例えば、ＨＴＰ）は、ＦＫＦＬカテプシンＢタンパク質分解性切断ドメインまたはＲＧＦＦＰカテプシンＤタンパク質分解性切断ドメインとそれぞれ直列に架橋されている。いくつかの場合では、Ｈ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３および／またはＨ４ヒストンフラグメント（例えば、ＨＴＰ）は、５Ｒ（５アルギニン）、９Ｒ（９アルギニン）、５Ｋ（５リジン）、９Ｋ（９リジン）、５Ｈ（５ヒスチジン）、または９Ｈ（９ヒスチジン）カチオン性スペーサードメインによって直列に架橋され得る。いくつかの場合では、１つ以上のＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３および／またはＨ４ヒストンフラグメント（例えば、ＨＴＰ）は、それらのＮ末端でプロタミンにジスルフィド結合している。

【００６２】
分枝ヒストン構造をどのように生成するかを説明するために、例示的な調製方法が提供される。そのような方法の一例は以下を含む：等モル比率のヒストンＨ２ＡＸ［１３４～１４３］、ヒストンＨ３［１～２１Ｃｙｓ］、ヒストンＨ３［２３～３４Ｃｙｓ］、ヒストンＨ４［８～２５ＷＣ］、およびＳＶ４０Ｔ－Ａｇ由来ＮＬＳの共有結合修飾は、１０％ピリジルジスルフィド修飾ポリ（Ｌ－リジン）との反応で実施することができる［ＭＷ＝５４００、１８０００、または４５０００Ｄａ；ｎ＝３０、１００、または２５０］。典型的な反応では、７００μＭのＣｙｓ修飾されたヒストン／ＮＬＳ（２０ｎｍｏｌ）の２９μＬの水溶液は、５７μＬの０．２Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）に追加され得る。次に、１４μＬの１００μＭピリジルジスルフィドで保護されたポリ（リジン）溶液は、１：２の比のピリジルジスルフィド基対システイン残基を有するヒストン溶液に追加され、最終容量を１００μＬにすることができる。この反応は室温で３時間実施することができる。反応は４回繰り返すことができ、コンジュゲーションの程度は３４３ｎｍでのピリジン－２－チオンの吸光度を介して決定することができる。

【００６３】
別の例として、モル比率０：１、１：４、１：３、１：２、１：１、１：２、１：３、１：４、または１：０のヒストンＨ３［１～２１Ｃｙｓ］ペプチドおよびヒストンＨ３［２３～３４　Ｃｙｓ］ペプチドの共有結合修飾は、１０％ピリジルジスルフィド修飾ポリ（Ｌ－リジン）またはポリ（Ｌ－アルギニン）との反応で実施することができる［ＭＷ＝５４００、１８０００、または４５０００Ｄａ；ｎ＝３０、１００、または２５０］。典型的な反応では、７００μＭのＣｙｓ修飾されたヒストン（２０ｎｍｏｌ）の２９μＬの水溶液は、５７μＬの０．２Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）に追加され得る。次に、１４μＬの１００μＭピリジルジスルフィドで保護されたポリ（リジン）溶液は、１：２の比のピリジルジスルフィド基対システイン残基を有するヒストン溶液に追加され、最終容量を１００μＬにすることができる。この反応は室温で３時間実施することができる。反応は４回繰り返すことができ、コンジュゲーションの程度は３４３ｎｍでのピリジン－２－チオンの吸光度を介して決定することができる。

【００６４】
いくつかの場合では、アニオン性ポリマーは、標的指向リガンドにコンジュゲートされる。

【００６５】
核局在配列（ＮＬＳ）
いくつかの実施形態では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（

例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、もしくはＨ４）は（例えば、および／またはそれに対してコンジュゲートされる）、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上、または４つ以上）の核局在配列（ＮＬＳ）を含む。したがって、いくつかの場合では、主題のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物は、ＮＬＳを含むペプチドを含む。いくつかの場合では、主題のナノ粒子のヒストンタンパク質（またはＨＴＰ）は、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上）の天然核局在シグナル（ＮＬＳ）を含む。いくつかの場合では、主題のナノ粒子のヒストンタンパク質（またはＨＴＰ）は、ヒストンタンパク質に対して異種性である１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上）のＮＬＳを含む（すなわち、ヒストン／ＨＴＰの一部として天然には存在しないＮＬＳ、例えば、ＮＬＳはヒトによって付加され得る）。いくつかの場合では、ＨＴＰは、Ｎ末端および／またはＣ末端にＮＬＳを含む。

【００６６】

いくつかの実施形態では、カチオン性アミノ酸ポリマーの（例えば、ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リジン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン）、ポリ（Ｄ－アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（Ｄ－リジン）（ＰＤＫ）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、ポリ（Ｄ－シトルリン）、ポリ（Ｌ－アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（Ｌ－リジン）（ＰＬＫ）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、またはポリ（Ｌ－シトルリン））は、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上、または４つ以上）のＮＬＳを含む（および／またはそれにコンジュゲートされる）。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ末端および／またはＣ末端にＮＬＳを含む。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸ポリマーは、内在性ＮＬＳを含む。

【００６７】

いくつかの実施形態では、アニオン性ポリマー組成物の、アニオン性アミノ酸ポリマー（例えば、ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、またはポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））は、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上、もしくは４つ以上）のＮＬＳを含む（および／またはそれにコンジュゲートされる）。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ末端および／またはＣ末端にＮＬＳを含む。いくつかの場合では、アニオン性アミノ酸ポリマーは内在性ＮＬＳを含む。

【００６８】

任意の好適なＮＬＳを使用することができる（例えば、ヒストン、ＨＴＰ、カチオン性アミノ酸ポリマー、アニオン性アミノ酸ポリマーなどにコンジュゲートする）。例は、クラス１およびクラス２の「単節型ＮＬＳ」、同様にクラス３～５のＮＬＳが含まれるが、これらに限定されない（例えば、Ｋｏｓｕｇｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ ＢｉｏｌＣｈｅｍ．２００９ Ｊａｎ ２；２８４（１）：４７８－８５から適合された図１６を参照）。いくつかの場合では、ＮＬＳは、式：（Ｋ／Ｒ）（Ｋ／Ｒ）X_{10-12}（Ｋ／Ｒ）$_{3-5}$を有する。いくつかの場合では、ＮＬＳは、式：Ｋ（Ｋ／Ｒ）Ｘ（Ｋ／Ｒ）を有する。

【００６９】

いくつかの実施形態では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、もう１つ（例えば、２つ以上、３つ以上、または４つ以上）のＮＬＳを含む。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチドは、ヒストンタンパク質または、ヒストンフラグメントではない（例えば、ＨＴＰではない）。したがって、いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、ＮＬＳ含有ペプチドである。

【００７０】

いくつかの場合では、ＮＬＳ含有ペプチドはシステイン残基を含み、カチオン性（または、場合によってはアニオン性）アミノ酸ポリマー、リンカー、ＨＴＰのためのヒストンタンパク質、および／または他のカチオン性ポリペプチドに対するコンジュゲーションを容易にすることができる（例えば、いくつかの場合では、分枝ヒストン構造の一部として

）。例えば、システイン残基は、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）および／またはアミン反応性化学的性質を介した架橋（コンジュゲーション）に使用することができる。いくつかの場合では、システイン残基は内在性である。いくつかの場合では、システイン残基は、Ｎ末端および／またはＣ末端に位置する。いくつかの場合では、カチオン性ポリペプチド組成物のＮＬＳ含有ペプチドは、システイン残基を付加する（例えば、野生型アミノ酸配列と比較して）突然変異（例えば、挿入または置換）を含む。

【００７１】

ＮＬＳ含有ペプチドとして使用する（または、ＨＴＰもしくはカチオン性ポリマーもしくはカチオン性アミノ酸ポリマーもしくはアニオン性アミノ酸ポリマーなどの任意の好適なカチオン性ポリペプチドにコンジュゲートする）ことができるＮＬＳの例は、

PKKKRKV (SEQ ID NO: 151) (T-ag NLS)

PKKKRKVEDPYC (SEQ ID NO: 152) - SV40 T-Ag由来NLS

PKKKRKVGPKKKRKVGPKKKRKVGPKKKRKVGC (SEQ ID NO: 153) (NLS SV40)

CYGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 154) - システインーＴＡＴのN末端システイン

CSIPPEVKFNKPFVYLI (SEQ ID NO: 155)

DRQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 156)

PKKKRKVEDPYC (SEQ ID NO: 157) - ＳＶ４０ Ｔ－Ａｇ由来ＮＬＳのC末端システイン

PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 158) [cMyc NLS]

を含むが、それらに限定されない（そのうちのいくつかはシステイン残基を含む）。使用され得るＮＬＳの非限定的な例は、例えば、Ｋｏｓｕｇｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ ＢｉｏｌＣｈｅｍ．２００９ Ｊａｎ ２；２８４（１）：４７８－８５を参照、例えば、本開示の図１６を参照。

【００７２】

ミトコンドリア局在シグナル

いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストンまたはＨＴＰ、例えば、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、またはＨ４）、アニオン性ポリマー、および／またはカチオン性ポリマーは、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上、または４つ以上）のミトコンドリア局在配列を含む（かつ/またはこれらにコンジュゲートする）。任意好適なミトコンドリア局在配列を使用することができる。ミトコンドリア局在配列の例は、

PEDEIWLPEPESVDVPAKPISTSSMMMP (SEQ ID NO: 149)

、ＳＤＨＢのミトコンドリア局在配列、モノ／ジ／トリのフェニルホスホニウムまたは他のホスホニウム、ＶＡＭＰ １Ａ、ＶＡＭＰ １Ｂ、ＤＧＡＴ２の６７のＮ末端アミノ酸、およびＢａｘの２０のＮ末端アミノ酸、が含まれるがこれらに限定されない。

【００７３】

ペイロード

本開示のナノ粒子はペイロードを含み、ペイロードは核酸および／またはタンパク質から作製することができる。例えば、いくつかの場合では、主題のナノ粒子は、核酸ペイロード（例えば、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡ）を送達するために使用される。核酸ペイロードは、重要な任意の核酸であり得、例えば、核酸ペイロードは直鎖状または環状であり得、およびプラスミド、ウイルスゲノム、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡなどのコーディングＲＮＡもしくはガイドＲＮＡなどの非コーディングＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）など）、ＤＮＡなど、であり得る。いくつかの場合では、核酸ペイロードは、ＲＮＡｉ剤（例えば、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡなど）またはＲＮＡｉ剤をコードするＤＮＡテンプレートである。いくつかの場合では、核酸ペイロードは、ｓｉＲＮＡ分子である（例えば、ｍＲＮＡを標的指向するもの、ｍｉＲＮＡを標的指向するもの）。いくつかの場合では、核酸ペイロードはＬＮＡ分子である（例えば、ｍｉＲＮＡを標的指向するもの）。い

くつかの場合では、核酸ペイロードはｍｉＲＮＡである。いくつかの場合では、核酸ペイロードは、目的のタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む（例えば、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃ、Ｎａｎｏｇ、およびＬｉｎ２８などのような１つ以上の再プログラミングおよび／または分化転換因子、例えば、（ｉ）Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃ（ｉｉ）Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｎａｎｏｇ、およびＬｉｎ２８など、遺伝子編集エンドヌクレアーゼ、治療用タンパク質などのような単独または任意の所望の組み合わせ）。いくつかの場合では、核酸ペイロードは、非コードＲＮＡ（例えば、ＲＮＡｉ剤、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡなど）および／または非コードＲＮＡをコードするＤＮＡ分子を含む。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、ＩＬ２Ｒαおよびｌｌ２Ｒγをコードする核酸（ＤＮＡおよび／またはｍＲＮＡ）を含み（例えば、標的細胞の挙動または生存を調節するために）、およびいくつかの場合では、ペイロードは、７～９０日（例えば、７～８０、７～６０、７～５０、７～４０、７～３５、または７～３０日）の過程で主題のナノ粒子から細胞内に放出される。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、ＢＣＬ－ＸＬをコードする核酸（ＤＮＡおよび／またはｍＲＮＡ）を含む（例えば、ＦａｓまたはＴＮＦα受容体の関与による標的細胞のアポトーシスを防止する）。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、Ｆｏｘｐ３をコードする核酸（ＤＮＡおよび／またはｍＲＮＡ）を含む（例えば、標的指向されたＴ細胞における免疫エフェクター表現型を促進する）。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、ＳＣＦをコードする核酸（ＤＮＡおよび／またはｍＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、ＨｏｘＢ４をコードする核酸（ＤＮＡおよび／またはｍＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、ＳＩＲＴ６をコードする核酸（ＤＮＡおよび／またはｍＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、ｍｉＲ－１５５のようなマイクロＲＮＡを標的指向する（発現を減少させる）核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＬＮＡなど）を含む（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００６８１およびＭＩ０００００１７７を参照）。いくつかの実施形態では、核酸ペイロードは、ｋｕ７０を標的指向するｓｉＲＮＡおよび／またはｋｕ８０を標的指向するｓｉＲＮＡを含む。

【００７４】

「核酸ペイロード」という用語は修飾核酸を包含する。同様に、「ＲＮＡｉ剤」および「ｓｉＲＮＡ」という用語は修飾核酸を包含する。例えば、核酸分子は、模倣物であり得、修飾糖バックボーン、１つ以上の修飾ヌクレオシド間結合、１つ以上の修飾塩基などを含み得る（例えば、１つ以上のホスホロチオエートおよび／またはヘテロ原子ヌクレオシド間結合）。いくつかの実施形態では、本発明のペイロードは、三重鎖形成ペプチド核酸（ＰＮＡ）を含む（例えば、ＭｃＮｅｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２０１３　Ｊｕｎ；２０（６）：６５８－６９を参照）。したがって、いくつかの場合では、主題のコアはＰＮＡを含む。いくつかの場合では、主題のコアはＰＮＡおよびＤＮＡを含む。

【００７５】

主題の核酸ペイロード（例えばｓｉＲＮＡ）はモルホリノバックボーン構造を有することができる。いくつかの場合では、主題の核酸ペイロード（例えば、ｓｉＲＮＡ）は、１つ以上のロックされた核酸（ｌｏｃｋｅｄ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）（ＬＮＡ）を有することができる。適切な糖置換基は、メトキシ（－Ｏ－CH_3）、アミノプロポキシ（－Ｏ　CH_2　CH_2　CH_2NH_2）、アリル（－CH_2－ＣＨ＝CH_2）、－Ｏ－アリル（－Ｏ－CH_2－ＣＨ＝CH_2）およびフルオロ（Ｆ）が含まれる。２’－糖置換基は、アラビノ（上）位置またはリボ（下）位置であり得る。適切な塩基修飾は、アデニンおよびグアニンの５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、６－メチル、ならびに他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピル、ならびに他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、および２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、ピリミジン塩基の５－プロピニル（－Ｃ＝Ｃ－CH_3）ウラシルおよびシトシン、ならびに他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシ

ル（シュードウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシル、ならびに他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチル、ならびに他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニンならびに３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニンのような、合成および天然の核酸塩基が含まれる。さらなる修飾核酸塩基は、フェノキサジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、置換フェノキサジンシチジン（例えば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド（５，４－（ｂ）（１，４）ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）のようなＧ－クランプ、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド（４，５－ｂ）インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド（３’，２’：４，５）ピロロ（２，３－ｄ）ピリミジン－２－オン）のような、三環式ピリミジンを含む。

【００７６】

いくつかの場合では、核酸ペイロードは、コンジュゲートする部分を含むことができる（例えば、核酸ペイロードの活性の増強、安定性、細胞内分布または細胞内取り込みを増強するもの）。これらの部分またはコンジュゲートすることは、一級または二級ヒドロキシル基などの官能基に共有結合した共役基を含むことができる。共役基は、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的特性を増強する基、およびオリゴマーの薬物動態特性を増強する基を含むが、これらに限定されない。適切な共役基は、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および染料を含むがこれらに限定されない。薬力学的性質を増強する基は、取り込みを改善し、分解に対する耐性を増強し、および／または標的核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基が含まれる。薬物動態学的特性を増強する基は、主題の核酸の取り込み、分布、代謝または排泄を改善する基を含む。

【００７７】

任意の好適なポリヌクレオチドを主題の核酸ペイロードとして使用することができる。例は、ｍＲＮＡを含むＲＮＡおよびＤＮＡの種、ｍ１Ａ修飾ｍＲＮＡ（アデノシンの１位置のモノメチル化）、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アプタマー、ｓｈＲＮＡ、ＡＡＶ由来の核酸およびスキャフォールド（ｓｃａｆｆｏｌｄｓ）、モルホリノＲＮＡ、ペプトイドおよびペプチド核酸、ｃＤＮＡ、ＤＮＡオリガミ、合成ヌクレオチドを含むＤＮＡおよびＲＮＡ、所定の二次構造を有するＤＮＡおよびＲＮＡ、前述の多量体およびオリゴマー、ならびにペイロードを含むがそれらに限定されず、その配列は、その発現が望まれる任意のタンパク質またはポリペプチドなどの他の産物をコードし得る。

【００７８】

いくつかの場合では、主題のナノ粒子のペイロードはタンパク質を含む。タンパク質ペイロードの例は、プログラム可能な遺伝子編集タンパク質（例えば、転写アクチベーター様（ＴＡＬ）エフェクター（ＴＡＬＥ）、ＴＡＬＥヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、Ｎａｔｒｏｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｒｅｇｏｒｙｉのアルゴノート（ＮｇＡｇｏ）などのＤＮＡ誘導ポリペプチド、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１のようなＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導ポリペプチドなど）；トランスポゾン（例えば、クラスＩまたはクラスＩＩトランスポゾン、例えば、ｐｉｇｇｙｂａｃ、ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙ、Ｔｃ１／ｍａｒｉｎｅｒ、Ｔｏｌ２、ＰＩＦ／ｈａｒｂｉｎｇｅｒ、ｈＡＴ、ｍｕｔａｔｏｒ、ｍｅｒｌｉｎ、ｔｒａｎｓｉｂ、ｈｅｌｉｔｒｏｎ、ｍａｖｅｒｉｃｋ、ｆｒｏｇ ｐｒｉｎｃｅ、ｍｉｎｏｓ、Ｈｉｍａｒ１１など）；メガヌクレアーゼ（例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＤｍｏＩ、Ｉ－ＣｈｕＩ、Ｉ－ＤｉｒＩ、

Ｉ－ＦｌｍｕＩ、Ｉ－ＦｌｍｕＩＩ、Ｉ－Ａｎｉｌ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＰａｎＩＩ、Ｉ－ＰａｎＭＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＬｔｒＩ、Ｉ－ＧｐｉＩ、Ｉ－ＧＺｅＩ、Ｉ－ＯｎｕＩ、Ｉ－ＨｊｅＭＩ、Ｉ－ＭｓｏＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩＩ、ＰＩ－ＭｌｅＩ、ＰＩ－ＭｔｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、ＰＩ－ＴｌｉＩ、ＰＩ－ＴｌｉＩＩ、ＰＩ－ＳｃｅＶ、など）；メガＴＡＬ（例えば、Ｂｏｉｓｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１４ Ｆｅｂ；４２（４）：２５９１－２６０１を参照）、ＳＣＦ、ＢＣＬ－ＸＬ、Ｆｏｘｐ３、ＨｏｘＢ４、およびＳｉＲＴ６を含むが、これらに限定されない。上記のタンパク質うちのいずれについても、主題のナノ粒子のペイロードは、タンパク質をコードする核酸（ＤＮＡかつ／またはｍＲＮＡ）を含むことができ、および／または実際のタンパク質を含むことができる。

【００７９】

遺伝子編集ツール

いくつかの場合では、核酸ペイロードは遺伝子編集ツールを含むかまたはコードする（すなわち、遺伝子編集システムの要素、例えばプログラム可能遺伝子編集システムのような部位特異的遺伝子編集システム）。例えば、核酸ペイロードは、以下（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡガイドをコードするＤＮＡ、（ｉｉｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ－ＺＦＮ）、転写アクチベーター様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ－ＴＡＬＥＮに対して融合した）、Ｎａｔｒｏｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｒｅｇｏｒｙｉのアルゴノート（ＮｇＡｇｏ）のようなＤＮＡ誘導ポリペプチド、および／またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１など）のような、プログラム可能遺伝子編集タンパク質をコードするＤＮＡおよび／またはＲＮＡ、（ｉｖ）ＤＮＡドナーテンプレート、（ｖ）部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸分子（ＤＮＡ、ＲＮＡ）（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＫＤリコンビナーゼ、Ｂ２リコンビナーゼ、Ｂ３リコンビナーゼ、Ｒリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＰｈｉＣ３１インテグラーゼ、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ラムダインテグラーゼ、ＨＫ０２２インテグラーゼ、ＨＰ１インテグラーゼなど）、（ｖｉ）レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼをコードするＤＮＡ（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータなど）、ならびに（ｖｉｉ）トランスポゾンおよび／またはトランスポゾン由来のＤＮＡ（例えば、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１６８１などのような細菌性トランスポゾン、Ｔｃ１／ｍａｒｉｎｅｒスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃスーパーファミリートランスポゾン、ｈＡＴスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ、Ｆｒｏｇ Ｐｒｉｎｃｅ、Ｍｉｎｏｓ、Ｈｉｍａｒ１などのような真核生物トランスポゾン）のうちの１つ以上を含むことができる。いくつかの場合では、主題のナノ粒子は、タンパク質ペイロードを送達するために使用され、例えば、ＺＦＰ（例えば、ＺＦＮ）、ＴＡＬＥ（例えば、ＴＡＬＥＮ）、Ｎａｔｒｏｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｒｅｇｏｒｙｉのアルゴノート（ＮｇＡｇｏ）のようなＤＮＡ誘導ポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１など）、部位特異的リコンビナーゼ（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＫＤリコンビナーゼ、Ｂ２リコンビナーゼ、Ｂ３リコンビナーゼ、Ｒリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＰｈｉＣ３１インテグラーゼ、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ラムダインテグラーゼ、ＨＫ０２２インテグラーゼ、ＨＰ１インテグラーゼなど）、レゾルバーゼ／インベルターゼ（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータなど）、および／またはトランスポザーゼ（例えば、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１６８１のようなトランスポゾンに関連するトランスポザーゼ、またはＴｃ１／ｍａｒｉｎｅｒスーパーファミリートランスポゾン、Ｐｉｇｇ

ｙＢａｃスーパーファミリートランスポゾン、ｈＡＴスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ、Ｆｒｏｇ Ｐｒｉｎｃｅ、Ｍｉｎｏｓ、Ｈｉｍａｒ１などのような真核生物トランスポゾン）のような遺伝子編集タンパク質である。いくつかの場合では、ナノ粒子は核酸ペイロードおよびタンパク質ペイロードを送達するために使用され、いくつかのそのような場合では、ペイロードはリボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）を含む。

【００８０】

システムの性質および所望の結果に応じて、遺伝子編集システム（例えば、プログラム可能遺伝子編集システムなどの部位特異的遺伝子編集システム）は、単一の要素を含むことができ（例えば、ＺＦＰ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ、ＴＡＬＥＮ、部位特異的リコンビナーゼ、レゾルバーゼ／インテグラーゼ、トランスポーズ、トランスポゾンなど）、または複数の要素を含むことができる。いくつかの場合では、遺伝子編集システムは少なくとも２つの要素を含む。例えば、いくつかの場合では、遺伝子編集システム（例えばプログラム可能遺伝子編集システム）は、（ｉ）ドナーテンプレート核酸および（ｉｉ）遺伝子編集タンパク質（例えば、ＺＦＰ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ、ＴＡＬＥＮ、Ｎａｔｒｏｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｒｅｇｏｒｙｉのアルゴノート（ＮｇＡｇｏ）のようなＤＮＡ誘導ポリペプチド、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、もしくはＣｐｆ１のようなＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓＲＮＡ誘導ポリペプチドなどのようなプログラム可能遺伝子編集タンパク質）、または遺伝子編集タンパク質をコードする核酸分子（例えば、プラスミドまたはｍＲＮＡのようなＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む。別の例として、いくつかの場合では、遺伝子編集システム（例えばプログラム可能遺伝子編集システム）は、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、またはＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、および（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１など）、またはＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、プラスミドまたはｍＲＮＡのようなＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む。別の例として、いくつかの場合では、遺伝子編集システム（例えばプログラム可能遺伝子編集システム）は、（ｉ）ＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡ、および（ｉｉ）ＤＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、ＮｇＡｇｏ）、またはＤＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、プラスミドまたはｍＲＮＡのようなＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む。いくつかの場合では、遺伝子編集システム（例えばプログラム可能遺伝子編集システム）は、（ｉ）ドナーＤＮＡテンプレート、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、またはＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、および（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、もしくはＣｐｆ１）、またはＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、プラスミドまたはｍＲＮＡのようなＤＮＡまたはＲＮＡ）の少なくとも３つの要素を含む。いくつかの場合では、遺伝子編集システム（例えばプログラム可能遺伝子編集システム）は、（ｉ）ドナーＤＮＡテンプレート、（ｉｉ）ＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡ、またはＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡをコードするＤＮＡ、および（ｉｉｉ）ＤＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、ＮｇＡｇｏ）、またはＤＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、プラスミドまたはｍＲＮＡのようなＤＮＡまたはＲＮＡ）の少なくとも３つの要素を含む。

【００８１】

いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子は、遺伝子編集ツールを送達するために使用される。言い換えれば、いくつかの場合では、ペイロードは１つ以上の遺伝子編集ツールを含む。「遺伝子編集ツール」という用語は、本明細書では遺伝子編集システムの１つ以上の要素を言及するために使用される。したがって、いくつかの場合では、ペイロードは、遺伝子編集システムを含み、いくつかの場合では、ペイロードは遺伝子編集システムの１つまたは複数の要素を含む（すなわち、１つ以上の遺伝子編集ツール）。例えば、標的細胞はすでに遺伝子編集システムの要素のうちの１つを含み得、ユーザは残りの要素を追加するだけが必要である。そのような場合は、主題のナノ粒子のペイロードは、所与の遺伝子編集システムの全ての要素を必ずしも含む必要がない。そのため、いくつかの場合で

は、ペイロードは、１つ以上の遺伝子編集ツールを含む。

【００８２】

実例として、標的細胞はすでに遺伝子編集タンパク質（例えば、ＺＦＰ、ＴＡＬＥ、ＤＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、ＮｇＡｇｏ）、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１のようなＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドなど、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＫＤリコンビナーゼ、Ｂ２リコンビナーゼ、Ｂ３リコンビナーゼ、Ｒリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＰｈｉＣ３１インテグラーゼ、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ラムダインテグラーゼ、ＨＫ０２２インテグラーゼ、ＨＰ１インテグラーゼなどのような部位特異的リコンビナーゼ、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータなどのようなレゾルバーゼ／インベルターゼ、トランスポザーゼなど）および／またはタンパク質をコードするＤＮＡもしくはＲＮＡを含み得、したがって、ペイロードには、（ｉ）ドナーテンプレートＲＮＡおよび（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、またはＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、またはＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡのうちの１つ以上を含むことができる。同様に、標的細胞は、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡおよび／またはガイドＲＮＡをコードするＤＮＡもしくはＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡをすでに含み得、ペイロードは、（ｉ）ドナーテンプレートおよび（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１など）、またはＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、プラスミドまたはｍＲＮＡのようなＤＮＡまたはＲＮＡ）、またはＤＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、ＮｇＡｇｏ）、またはＤＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子のうちの１つ以上を含むことができる。

【００８３】

当業者によって理解されるように、遺伝子編集システムは、核酸を「編集する」システムである必要はない。例えば、遺伝子編集システムが使用され得、標的ＤＮＡ中に二本鎖切断（ＤＳＢ）を生じさせることなく、様々な方法で標的核酸（例えば、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡ）を修飾することがよく認識されている。例えば、いくつかの場合では、二本鎖の標的ＤＮＡにニックが入っており（一方の鎖が切断されている）、いくつかの場合では、標的核酸は全く切断されない（例えば、遺伝子編集タンパク質がヌクレアーゼ活性を欠いている場合、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドは、触媒ヌクレアーゼドメインに突然変異を潜在することがあり得る場合）。例えば、いくつかの場合では、ヌクレアーゼ活性を伴うまたは伴わないＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、異種性タンパク質ドメインに融合される。異種性タンパク質ドメインは、融合タンパク質に対して、（ｉ）ＤＮＡ修飾活性（例えば、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ＤＮＡ修復活性、ＤＮＡ損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性またはグリコシラーゼ活性）、（ｉｉ）転写調節活性（例えば、転写抑制因子または活性化因子への融合）、または（ｉｉｉ）標的ＤＮＡと関連するタンパク質（例えば、ヒストン）を修飾する活性（例えば、メチルトランスフェラーゼ活性、脱メチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、脱アセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、ＳＵＭＯ化活性、脱ＳＵＭＯ化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性、または脱ミリストイル化）のような活性を提供することができる。それにより、遺伝子編集システムは、標的核酸を切断しないように標的核酸を修飾する用途において使用することができ、標的ＤＮＡからの転写を調節する用途においても使用することができる。

【００８４】

プログラム可能な遺伝子編集ツールに関連する追加情報（Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、Ｃａｓ

Y、およびＣｐｆ１のようなＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮａ誘導タンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼのようなジンクフィンガータンパク質、ＴＡＬＥＮのようなＴＡＬＥタンパク質、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡなど）は、例えば、Ｄｒｅｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（２００１）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７６：２９４６６－７８、Ｄｒｅｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３０３：４８９－５０２、Ｌｉｕ，ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７：３８５０－６）、Ｄｒｅｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２８０：３５５８８－９７、Ｊａｍｉｅｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，（２００３）Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ ２：３６１－８、Ｄｕｒａｉ，ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３３：５９７８－９０、Ｓｅｇａｌ，（２００２）Ｍｅｔｈｏｄｓ ２６：７６－８３、Ｐｏｒｔｅｕｓ ａｎｄ Ｃａｒｒｏｌｌ，（２００５）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２３：９６７－７３、Ｐａｂｏ，ｅｔ ａｌ．，（２００１）Ａｎｎ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ ７０：３１３－４０、Ｗｏｌｆｅ，ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ａｎｎ Ｒｅｖ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｂｉｏｍｏｌ Ｓｔｒｕｃｔ ２９：１８３－２１２、Ｓｅｇａｌ ａｎｄ Ｂａｒｂａｓ，（２００１）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １２：６３２－７、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ ａｌ．，（２００３）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４２：２１３７－４８、Ｂｅｅｒｌｉ ａｎｄ Ｂａｒｂａｓ，（２００２）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０：１３５－４１、Ｃａｒｒｏｌｌ，ｅｔ ａｌ．，（２００６）Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ １：１３２９、Ｏｒｄｉｚ，ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９９：１３２９０－５、Ｇｕａｎ，ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９９：１３２９６－３０１、Ｓａｎｊａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，７：１７１－１９２（２０１２）、Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ．２０１５ Ｏｃｔ ２２；１６３（３）：７５９－７１、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１５ Ｎｏｖ；１３（１１）：７２２－３６、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２０１５ Ｎｏｖ ５；６０（３）：３８５－９７、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１２ Ａｕｇ １７；３３７（６０９６）：８１６－２１、Ｃｈｙｌｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ Ｂｉｏｌ．２０１３ Ｍａｙ；１０（５）：７２６－３７、Ｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍｅｄ Ｒｅｓ Ｉｎｔ．２０１３；２０１３：２７０８０５、Ｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ｓｅｐ ２４；１１０（３９）：１５６４４－９、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｅｌｉｆｅ．２０１３；２：ｅ００４７１、Ｐａｔｔａｎａｙａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３ Ｓｅｐ；３１（９）：８３９－４３、Ｑｉ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｆｅｂ ２８；１５２（５）：１１７３－８３、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｍａｙ ９；１５３（４）：９１０－８、Ａｕｅｒ ｅｔ．ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０１３ Ｏｃｔ ３１、Ｃｈｅｎ ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ １；４１（２０）：ｅ１９、Ｃｈｅｎｇ ｅｔ．ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２０１３ Ｏｃｔ；２３（１０）：１１６３－７１、Ｃｈｏ ｅｔ．ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．２０１３ Ｎｏｖ；１９５（３）：１１７７－８０、ＤｉＣａｒｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ａｐｒ；４１（７）：４３３６－４３、Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１３ Ｏｃｔ；１０（１０）：１０２８－３４、Ｅｂｉｎａ ｅｔ．ａｌ．，Ｓｃｉ Ｒｅｐ．２０１３；３：２５１０、Ｆｕｊｉｉ ｅｔ．ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ １；４１（２０）：ｅ１８７、Ｈｕ ｅｔ．ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ；２３（１１）：１３２２－５、Ｊｉａｎｇ ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１３ Ｎｏｖ １；４１（２０）：ｅ１８８、Ｌａｒｓｏｎ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２１８０－９６、Ｍａｌｉ ｅｔ．ａｔ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１３ Ｏｃｔ；１０（１０）：９５７－６３

、Ｎａｋａｙａｍａ ｅｔ．ａｌ．，Ｇｅｎｅｓｉｓ．２０１３ Ｄｅｃ；５１（１２）：８３５－４３、Ｒａｎ ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２２８１－３０８、Ｒａｎ ｅｔ．ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｓｅｐ １２；１５４（６）：１３８０－９、Ｕｐａｄｈｙａｙ ｅｔ．ａｌ．，Ｇ３（Ｂｅｔｈｅｓｄａ）．２０１３ Ｄｅｃ ９；３（１２）：２２３３－８、Ｗａｌｓｈ ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ｓｅｐ ２４；１１０（３９）：１５５１４－５、Ｘｉｅ ｅｔ．ａｌ．，Ｍｏｌ Ｐｌａｎｔ．２０１３ Ｏｃｔ ９、Ｙａｎｇ ｅｔ．ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｓｅｐ １２；１５４（６）：１３７０－９、Ｂｒｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２０１４ Ｏｃｔ ２３；５６（２）：３３３－９、Ｂｕｒｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２０１６ Ｄｅｃ ２２、出版前のＥＰＵＢ、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６ Ｊｕｌ ３４（７）：７６８－７３、同様に、国際特許出願公開番号ＷＯ２００２０９９０８４、ＷＯ００／４２２１９、ＷＯ０２／４２４５９、ＷＯ２００３０６２４５５、ＷＯ０３／０８０８０９、ＷＯ０５／０１４７９１、ＷＯ０５／０８４１９０、ＷＯ０８／０２１２０７、ＷＯ０９／０４２１８６、ＷＯ０９／０５４９８５、およびＷＯ１０／０６５１２３、米国特許出願公開番号、２００３００５９７６７、２００３０１０８８８０、２０１４００６８７９７、２０１４０１７０７５３、２０１４０１７９００６、２０１４０１７９７７０、２０１４０１８６８４３、２０１４０１８６９１９、２０１４０１８６９５８、２０１４０１８９８９６、２０１４０２２７７８７、２０１４０２３４９７２、２０１４０２４２６６４、２０１４０２４２６９９、２０１４０２４２７００、２０１４０２４２７０２、２０１４０２４８７０２、２０１４０２５６０４６、２０１４０２７３０３７、２０１４０２７３２２６、２０１４０２７３２３０、２０１４０２７３２３１、２０１４０２７３２３２、２０１４０２７３２３３、２０１４０２７３２３４、２０１４０２７３２３５、２０１４０２８７９３８、２０１４０２９５５５６、２０１４０２９５５５７、２０１４０２９８５４７、２０１４０３０４８５３、２０１４０３０９４８７、２０１４０３１０８２８、２０１４０３１０８３０、２０１４０３１５９８５、２０１４０３３５０６３、２０１４０３３５６２０、２０１４０３４２４５６、２０１４０３４２４５７、２０１４０３４２４５８、２０１４０３４９４００、２０１４０３４９４０５、２０１４０３５６８６７、２０１４０３５６９５６、２０１４０３５６９５８、２０１４０３５６９５９、２０１４０３５７５２３、２０１４０３５７５３０、２０１４０３６４３３３、２０１４０３７７８６８、２０１５０１６６９８３、および２０１６０２０８２４３、ならびに米国特許番号、６，１４０，４６６、６，５１１，８０８、６，４５３，２４２ ８，６８５，７３７、８，９０６，６１６、８，８９５，３０８、８，８８９，４１８、８，８８９，３５６、８，８７１，４４５、８，８６５，４０６、８，７９５，９６５、８，７７１，９４５、および８，６９７，３５９を参照し、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００８５】

いくつかの実施形では、２つ以上のペイロードは、同じパッケージ（例えば、ナノ粒子）の一部として送達され、例えば、いくつかの場合では、異なるペイロードは、異なるコアの一部である。同じパッケージ（例えば、ナノ粒子）の一部として複数のペイロードを送達することの１つの利点は、各ペイロードの効率が希薄されないことである。実例として、ペイロードＡとペイロードＢとが、２つの別々のパッケージ（それぞれパッケージＡおよびパッケージＢ）で送達される場合、効率は乗法的であり、例えば、パッケージＡとパッケージＢとが、それぞれ１％のトランスフェクション効率を有する場合、ペイロードＡとペイロードＢとを同じ細胞に送達する可能性は０．０１％（１％Ｘ１％）である。しかしながら、ペイロードＡとペイロードＢとが、両方とも同じパッケージの一部（例えば、同じナノ粒子の一部－パッケージＡ）として送達される場合、ペイロードＡとペイロードＢとを同じ細胞に送達する可能性は１％であり、それは０．０１％以上で、１００倍の改善である。

【００８６】

同様に、パッケージＡとパッケージＢとが、それぞれ０．１％のトランスフェクション効率を持つシナリオでは、ペイロードＡとペイロードＢとを同じ細胞に送達する可能性は０．０００１％（０．１％Ｘ０．１％）である。しかしながら、ペイロードＡとペイロードＢとが、両方とも同じパッケージの一部（例えば、同じナノ粒子の一部－パッケージＡ）として送達される場合のシナリオでは、ペイロードＡとペイロードＢとを同じ細胞に送達する可能性は０．１％であり、それは０．０００１％以上で、１０００倍の改善である。

【００８７】

そのため、いくつかの実施形態では、ゲノム編集効率を高めるタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）および／または非コードＲＮＡと組み合わせて１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、上記のような）が送達される（例えば、同じナノ粒子の一部として）。いくつかの場合では、１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、上記のような）が、細胞分裂および／もしくは分化を制御するタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）ならびに／または非コードＲＮＡと組み合わせて送達される（例えば、同じナノ粒子の一部として）。いくつかの場合では、１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、上記のような）が、細胞ＤＮＡ修復機構を非相同末端結合（ＮＨＥＪ）もしくは相同性指向修復（ＨＤＲ）に偏らせるタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）および／または非コードＲＮＡと組み合わせて送達される（例えば、同じナノ粒子の一部として）。

【００８８】

上記の非限定的な例として、いくつかの実施形態では、１つ以上の遺伝子編集ツールは、ＳＣＦ（および／またはＳＣＦをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ＨｏｘＢ４（および／またはＨｏｘＢ４をコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ＢＣＬ－ＸＬ（および／またはＢＣＬ－ＸＬをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ＳＩＲＴ６（および／またはＳＩＲＴ６をコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ｍｉＲ－１５５を抑制する核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡおよび／またはＬＮＡ）、ｋｕ７０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、およびｋｕ８０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ）のうちの１つ以上と組み合わせて送達され得る。

【００８９】

遺伝子編集ツールと組み合わせて送達され得るマイクロＲＮＡの例については、図１８Ａを参照。例えば、以下のマイクロＲＮＡを以下の目的に使用されることができる：多能性幹細胞の外胚葉系への分化を阻止：ｍｉＲ－４３０／４２７／３０２（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００７３８、ＭＩ０００００７７２、ＭＩ０００００７７３、ＭＩ０００００７７４、ＭＩ０００６４１７、ＭＩ０００６４１８、ＭＩ０００００４０２、ＭＩ０００３７１６、ＭＩ０００３７１７、およびＭＩ０００３７１８を参照）、多能性幹細胞の内胚葉系への分化を阻止：ｍｉＲ－１０９および／またはｍｉＲ－２４（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００８０、ＭＩ０００００８１、ＭＩ０００００２３１、およびＭＩ０００００５７２を参照）、多能性幹細胞の内胚葉系への分化を促進：ｍｉＲ－１２２（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００４４２およびＭＩ０００００２５６を参照）、および／またはｍｉＲ－１９２（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００２３４およびＭＩ０００００５５１を参照）、外胚葉前駆細胞のケラチノサイト運命への分化を促進：ｍｉＲ－２０３（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００２８３、ＭＩ００１７３４３、およびＭＩ０００００２４６を参照）、神経堤幹細胞の平滑筋運命への分化を促進：ｍｉＲ－１４５（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００４６１、ＭＩ０００００１６９、およびＭＩ００２１８９０を参照）、神経幹細胞のグリア細胞運命へおよび／またはニューロン運命への分化を促進：ｍｉＲ－９（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００４６６、ＭＩ０００００４６７、ＭＩ０００００４６８、ＭＩ０００００１５７、ＭＩ０００００７２０、およびＭＩ０００００７２１を参照）、および／またはｍｉＲ－１２４ａ（例えば、ＭｉＲ Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００４４３、ＭＩ０００００４４４

、ＭＩ００００４４５、ＭＩ００００１５０、ＭＩ００００７１６、およびＭＩ００００７１７を参照）、中胚葉前駆細胞の軟骨細胞運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１９９ａ（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２４２、ＭＩ００００２８１、ＭＩ００００２４１、およびＭＩ００００７１３を参照）、中胚葉前駆細胞の骨芽細胞運命への分化を促進：ｍｉＲ－２９６（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００７４７およびＭＩ００００３９４）、および／またはｍｉＲ－２８６１（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００１３００６およびＭＩ００１３００７）、中胚葉前駆細胞の心筋運命への分化を促進：ｍｉＲ－１（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４３７、ＭＩ００００６５１、ＭＩ００００１３９、ＭＩ００００６５２、ＭＩ０００６２８３を参照）、中胚葉前駆細胞の心筋運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１３３（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４５０、ＭＩ００００４５１、ＭＩ００００８２２、ＭＩ００００１５９、ＭＩ００００８２０、ＭＩ００００８２１、およびＭＩ００２１８６３を参照）、中胚葉前駆細胞の骨格筋運命への分化を促進：ｍｉＲ－２１４（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２９０およびＭＩ００００６９８を参照）、ｍｉＲ－２０６（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４９０およびＭＩ００００２４９を参照）、ｍｉＲ－１および／またはｍｉＲ－２６ａ（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００８３、ＭＩ００００７５０、ＭＩ００００５７３、およびＭＩ００００７０６を参照）、中胚葉前駆細胞の骨格筋運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１３３（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４５０、ＭＩ００００４５１、ＭＩ００００８２２、ＭＩ００００１５９、ＭＩ００００８２０、ＭＩ００００８２１、およびＭＩ００２１８６３を参照）、ｍｉＲ－２２１（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２９８およびＭＩ０００７０９を参照）、および／またはｍｉＲ－２２２（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２９９およびＭＩ００００７１０を参照）、造血前駆細胞の分化を促進：ｍｉＲ－２２３（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００３００およびＭＩ０００００３を参照）、造血前駆細胞の分化を阻止：ｍｉＲ－１２８ａ（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４４７およびＭＩ００００１５５を参照）、および／またはｍｉＲ－１８１ａ（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２６９、ＭＩ００００２８９、ＭＩ００００２２３、およびＭＩ００００６９７）、造血前駆細胞のリンパ球前駆細胞への分化を促進：ｍｉＲ－１８１（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２６９、ＭＩ００００２７０、ＭＩ００００２７１、ＭＩ００００２８９、ＭＩ００００６８３、ＭＩ０００３１３９、ＭＩ００００２２３、ＭＩ００００７２３、ＭＩ００００６９７、ＭＩ００００７２４、ＭＩ００００８２３、およびＭＩ０００５４５０を参照）、造血前駆細胞のリンパ球前駆細胞への分化を阻止：ｍｉＲ－１４６（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４７７、ＭＩ０００３１２９、ＭＩ０００３７８２、ＭＩ００００１７０、およびＭＩ０００４６６５を参照）、造血前駆細胞の骨髄前駆細胞への分化を阻止：ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２４ａ、および／またはｍｉＲ－１７（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００７１およびＭＩ００００６８７を参照）、リンパ球前駆細胞のＴ細胞運命への分化を促進：ｍｉＲ－１５０（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４７９およびＭＩ００００１７２を参照）、骨髄前駆細胞の顆粒球運命への分化を阻止：ｍｉＲ－２２３（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００３００およびＭＩ０００００３を参照）、骨髄前駆細胞の単球運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１７－５ｐ（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩＭＡＴ０００００７０およびＭＩＭＡＴ０００００６４９を参照）、ｍｉＲ－２０ａ（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００７６およびＭＩ００００５６８を参照）、および／またはｍｉＲ－１０６ａ（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００１１３およびＭＩ００００４０６を参照）、骨髄前駆細胞の赤血球運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１５０（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００４７９およびＭＩ００００１７２を参照）、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２２１（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２９８およびＭＩ００００７０９を参照）、および／またはｍｉＲ－２２２（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ００００２９９およびＭＩ００００７１０を参照）、ならびに、骨髄前駆細胞の赤血球運命への分化を促

進：ｍｉＲ－４５１（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００１７２９、ＭＩ００１７３６０、ＭＩ０００１７３０、およびＭＩ００２１９６０を参照）および／またはｍｉＲ－１６（例えば、ＭｉＲ　Ｂａｓｅ登録：ＭＩ０００００７０、ＭＩ０００００１１５、ＭＩ０００００５６５、およびＭＩ０００００５６６を参照）。

【００９０】

遺伝子編集ツールと組み合わせて送達することができる（例えば、タンパク質として、またはタンパク質をコードするＤＮＡもしくはＲＮＡとして）シグナル伝達タンパク質の例（例えば、細胞外シグナル伝達タンパク質）については、図１８Ｂを参照。例えば、ナノ粒子を受容する標的細胞における分化を偏らせる目的で、標的指向リガンドと同様に、同じタンパク質を主題のナノ粒子の外殻の一部として使用することができる。例えば、以下のシグナル伝達タンパク質（例えば、細胞外シグナル伝達タンパク質）を以下の目的に使用することができる：造血幹細胞のリンパ球共通前駆細胞系への分化を促進：ＩＬ－７（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５７４を参照）、造血幹細胞の骨髄共通前駆細胞系への分化を促進：ＩＬ－３（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５６２を参照）ＧＭ－ＣＳＦ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号１４３７を参照）、および／またはＭ－ＣＳＦ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号１４３５を参照）、リンパ球共通前駆細胞のＢ細胞運命への分化を促進：ＩＬ－３、ＩＬ－４（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５６５を参照）、および／またはＩＬ－７、リンパ球共通前駆細胞のナチュラルキラー細胞運命への分化を促進：ＩＬ－１５（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３６００を参照）、リンパ球共通前駆細胞のＴ細胞運命への分化を促進：ＩＬ－２（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５５８を参照）、ＩＬ－７および／またはＮｏｔｃｈ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号４８５１、４８５３、４８５４、４８５５を参照）、リンパ球共通前駆細胞の樹状細胞運命への分化を促進：Ｆｌｔ－３リガンド（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号２３２３を参照）、骨髄共通前駆細胞の樹状細胞運命への分化を促進：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ、および／またはＴＮＦ－アルファ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号７１２４を参照）、骨髄共通前駆細胞の顆粒球－マクロファージ前駆細胞系への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦ、骨髄共通前駆細胞の巨核球－赤血球前駆細胞系への分化を促進：ＩＬ－３、ＳＣＦ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号４２５４を参照）、および／またはＴｐｏ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号７１７３を参照）、巨核球－赤血球前駆細胞の巨核球運命への分化を促進：ＩＬ－３、ＩＬ－６（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５６９を参照）、ＳＣＦ、および／またはＴｐｏ、巨核球－赤血球前駆細胞の赤血球運命への分化を促進：エリスロポエチン（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号２０５６を参照）、巨核球の血小板運命への分化を促進：ＩＬ－１１（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５８９を参照）、および／またはＴｐｏ、顆粒球－マクロファージ前駆細胞の単球への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦおよび／またはＭ－ＣＳＦ、顆粒球－マクロファージ前駆細胞の骨髄芽球系への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦ、単球の単球由来樹状細胞運命への分化を促進：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－アルファ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３４３９を参照）、および／またはＩＬ－４、単球のマクロファージ運命への分化を促進：ＩＦＮ－ガンマ、ＩＬ－６、ＩＬ－１０（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５８６を参照）、および／またはＭ－ＣＳＦ、骨髄芽球の好中球運命への分化を促進：Ｇ－ＣＳＦ（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号１４４０を参照）、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－６、および／またはＳＣＦ、骨髄芽球の好酸球運命への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３、および／またはＩＬ－５（例えば、ＮＣＢＩ遺伝子番号３５６７を参照）、ならびに骨髄芽球の好塩基性運命への分化を促進：Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、および／またはＩＬ－３。

【００９１】

遺伝子編集ツールと組み合わせて送達することができるタンパク質（例えば、タンパク質をコードするＤＮＡもしくはＲＮＡのようなタンパク質および／または核酸として）の例は、ＳＯＸ１７、ＨＥＸ、ＯＳＫＭ（Ｏｃｔ４／Ｓｏｘ２／Ｋｌｆ４／ｃ－ｍｙｃ）、および／またはｂＦＧＦ（例えば、幹細胞系への分化を促進する）、ＨＮＦ４ａ（例えば、肝細胞運命への分化を促進）、ポリ（Ｉ：Ｃ）、ＢＭＰ－４、ｂＦＧＦ、および／または８－Ｂｒ－ｃＡＭＰ（例えば、内皮幹細胞／前駆細胞系への分化を促進）、ＶＥＧＦ（

例えば、動脈内皮細胞運命への分化を促進）、Ｓｏｘ－２、Ｂｒｎ４、Ｍｙｔ１ｌ、Ｎｅｕｒｏｄ２、Ａｓｃｌ１（例えば、神経幹細胞／前駆細胞系への分化を促進）、ならびにＢＤＮＦ、ＦＣＳ、Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ、および／またはＳＨＨ（例えば、ニューロン、アストロサイト、および／またはオリゴデンドロサイト運命への分化を促進）が含まれるがこれらに限定されない。

【００９２】

遺伝子編集ツールと組み合わせて送達することができるシグナル伝達タンパク質（例えば、細胞外シグナル伝達タンパク質）の例は（例えば、タンパク質をコードするＤＮＡもしくはＲＮＡのようなタンパク質および／または核酸として）、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２および／またはＩＬ－１５、例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞を活性化するため）、リガンド、およびまたはＮｏｔｃｈ、Ｗｎｔ、および／もしくはＳｍａｄシグナル伝達経路の１つ以上を調節するシグナル伝達タンパク質、ＳＣＦ、幹細胞分化因子（例えば、Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃなど）、ならびにその後の単離／精製／濃縮のための一時的表面マーカー「タグ」および／または蛍光レポーターが含まれるがこれらに限定されない。例えば、線維芽細胞は、Ｓｏｘ２の送達を介して神経幹細胞に変換され得る一方、それは、Ｏｃｔ３／４および小分子「エピジェネティックリセット因子」の存在下で心筋細胞に変わるであろう。ハンチントン病またはＣＸＣＲ４突然変異を有する患者では、これらの線維芽細胞はニューロンおよび心臓細胞に関連する罹患表現型形質をそれぞれコードし得る。遺伝子編集の修正とこれらの要素とを単一のパッケージで提供することによって、１つ以上しかしすべてではない要素／ペイロードに起因する有害な影響のリスクが導入されることを大幅に減らすことができる。

【００９３】

ペイロード放出のタイミングおよび／または位置は制御され得るため（本開示の他の場所でより詳細に説明される）、同じパッケージ（例えば、同じナノ粒子）内に複数のペイロードをパッケージすることは、異なるペイロードについて異なる放出時間および／または位置を達成することを妨げるものではない。例えば、上記のタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）および／または非コードＲＮＡの放出は、同じパッケージの一部である１つ以上の遺伝子編集ツールの放出とは別に制御することができる。例えば、細胞の増殖および／もしくは分化を制御し、またはＮＨＥＪもしくはＨＤＲへの偏りを制御する、タンパク質および／または核酸（例えば、ＤＮＡ、ｍＲＮＡ、非コードＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）は、１つ以上の遺伝子編集ツールよりも早く放出されることができ、または１つ以上の遺伝子編集ツールより後に放出されることができる。これは、例えば、２つ以上の脱落可能層を使用することによって、および／または２つ以上のコアを使用することによって達成することができる（例えば、１つのコアが他と異なる放出プロファイルを有する場合、例えば、異なるＤ－対Ｌ－異性体比を使用する、異なるＥＳＰ：ＥＮＰ：ＥＰＰプロファイルを使用するなど）。

【００９４】

ｉｉ．脱落可能層（脱落可能コート）

いくつかの実施形態では、主題のナノ粒子は、コアを囲む（封入する）脱落可能層（本明細書では「過渡安定化層」とも呼ばれる）を含む。いくつかの場合では、主題の脱落可能層は、最初の細胞取り込みの前およびその間にペイロードを保護することができる。例えば、脱落可能層がないと、ペイロードの大部分は、細胞内部移行中に失われる可能性があり得る。細胞環境に入ると、脱落可能な層が「脱落」し（例えば、この層はｐＨおよび／またはグルタチオン感受性であり得る）、コアの成分を露出させる。

【００９５】

いくつかの場合では、主題の脱落可能層はシリカを含む。いくつかの場合では、主題のナノ粒子が（例えば、シリカの）脱落可能層を含む場合、細胞取り込みの可能性が減少するにもかかわらず、より大きい細胞内送達効率が観察され得る。特定の理論に縛られることを望まないが、ナノ粒子コアを脱落可能な層でコーティングすること（例えば、シリカコーティング）は、コアを密封し、層が脱落するまでそれを安定化させることができ、ペ

イロードの放出に導く（例えば、意図された細胞内区画で処理）。受容体媒介エンドサイトーシスによる細胞侵入の後、ナノ粒子がその最外層を脱落させ、脱落可能層はエンドソームの酸性環境またはサイトゾルの還元環境で分解し、いくつかの場合では、核局在シグナル（ＮＬＳ）および／またはミトコンドリア局在シグナルのような局在シグナルを露出させるコアを露出させる。さらに、脱落可能層によって封入されたナノ粒子コアは、血清中で安定であり得、そしてインビボでの投与に適切であり得る。

【００９６】

任意の所望の脱落可能層を使用することができ、当業者は、標的細胞内のどこで（例えば、低ｐＨなどの条件下）ペイロードを放出されることを望むかを考慮に入れることができる（例えば、エンドソーム、サイトゾル、核、リソソームなど）。いつ、どこで、および／またはどのような条件下で、脱落可能コートが脱落する（したがってペイロードを放出する）ことが望ましいかに応じて、異なる脱落可能層がより望ましい可能性がある。例えば、脱落可能層は、酸に不安定性であり得る。いくつかの場合では、脱落可能層は、アニオン性脱落可能層（アニオン性コート）である。いくつかの場合では、脱落可能層は、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、および／またはセラミック（例えばバイオセラミック）を含む。いくつかの場合では、脱落可能物は、カルシウム、マンガン、マグネシウム、鉄（例えば、脱落可能層は磁性、例えばFe_3MnO_2）、およびリチウムのうちの１つ以上を含む。これらのそれぞれは、ホスフェートまたはスルフェートを含む。そのため、いくつかの場合では、脱落可能物は、カルシウムホスフェート、カルシウムスルフェート、マンガンホスフェート、マンガンスルフェート、マグネシウムホスフェート、マグネシウムスルフェート、鉄ホスフェート、鉄スルフェート、リチウムホスフェート、リチウムスルフェートのうちの１つ以上を含み、それらそれぞれが、どのようにおよび／またはどのような条件下で「脱落」するか特定の影響を有することができる。したがって、いくつかの場合では、脱落可能層は、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、セラミック（例えば、バイオセラミック）、カルシウム、カルシウムホスフェート、カルシウムスルフェート、マンガン、マンガンホスフェート、マンガンスルフェート、マグネシウム、マグネシウムホスフェート、マグネシウムスルフェート、鉄、鉄ホスフェート、鉄スルフェート、リチウム、リチウムホスフェート、およびリチウムスルフェート（それらの任意の組み合わせで）のうちの１以上を含む（例えば、脱落可能層は、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、セラミック（例えば、バイオセラミック）、カルシウムホスフェート、カルシウムスルフェート、マンガンホスフェート、マンガンスルフェート、マグネシウムホスフェート、マグネシウムスルフェート、鉄ホスフェート、鉄スルフェート、リチウムホスフェート、リチウムスルフェート、またはそれらの組み合わせのうちのコーティングであり得る）。いくつかの場合では、脱落可能層は、シリカを含む（例えば、脱落可能層はシリカコートであり得る）。いくつかの場合では、脱落可能層は、アルジネートゲルを含む。

【００９７】

いくつかの場合では、異なるペイロードごとに異なる放出時間が望ましい。例えば、いくつかの場合では、ペイロードを早く（例えば、標的細胞と接触してから０．５～７日以内に）放出することが望ましく、いくつかの場合では、ペイロードを遅く（例えば、標的細胞と接触してから６日～３０日以内に）放出することが望ましい。例えば、いくつかの場合では、標的細胞と接触してから０．５～７日以内（例えば、標的細胞と接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日、または１～３日以内）にペイロード（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、該ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、および／または該ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子のような遺伝子編集ツール）を放出することが望ましい場合がある。いくつかの場合では、標的細胞と接触してから６～４０日以内（例えば、標的細胞と接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０、または９～１５日以内）にペイロード（例えば、ＤＮＡドナーテンプレート、例えば、相同

組み換え修復－ＨＤＲのための）を放出することが望ましい場合がある。いくつかの場合では、放出時間は、異なる時間に異なるペイロードを有するナノ粒子を送達することによって制御されることができる。いくつかの場合では、放出時間は、ナノ粒子の成分が所望の放出時間を達成するように設計されている場合に、同時にナノ粒子を送達することによって制御することができる（異なる製剤の一部としてまたは同じ製剤の一部として）。例えば、より速くまたはより遅く劣化する脱落可能層、劣化に対して多少の耐性があるコア成分、脱縮合に対して多少の感受性があるコア成分、などを使用することができ、所望のタイミングを達成するために、任意のまたはすべての成分を任意の好適な組み合わせで選択することができる。

【００９８】

いくつかの場合では、ペイロード（例えば、ＤＮＡドナーテンプレート）の放出を別のペイロード（例えば１つ以上の遺伝子編集ツール）に対して遅らせることが望ましい。一例として、いくつかの場合では、第１のナノ粒子は、ペイロードが標的細胞と接触してから６～４０日以内（例えば、標的細胞と接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０、または９～１５日以内）に放出されるように設計される、ペイロードとしてのドナーＤＮＡテンプレートを含み、一方で第２のナノ粒子は、ペイロードが標的細胞と接触してから０．５～７日以内（例えば、標的細胞と接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日、または１～３日以内）に放出されるように設計される、ペイロードとしての１つ以上の遺伝子編集ツールを含む（例えば、ＺＦＰまたはＺＦＰをコードする核酸、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥをコードする核酸、ＺＦＮまたはＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮまたはＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡまたはＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子など）。第２のナノ粒子は、第１のナノ粒子と同じ製剤の一部または異なる製剤の一部であり得る。

【００９９】

いくつかの場合では、ナノ粒子は、ペイロードが異なる時間に放出されることが望ましい場合に、２つ以上のペイロードを含む。これはさまざまな方法で実現されることができる。例えば、ナノ粒子は２つ以上のコアを有することができ、１つのコアはペイロードを早く（例えば、標的細胞と接触してから０．５～７日以内、例えば、標的細胞と接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日、または１～３日以内）放出することができる成分で作製され（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、および／またはＺＦＰもしくはＺＦＰをコードする核酸のようなゲノム編集ツール、ＴＡＬＥもしくはＴＡＬＥをコードする核酸、ＺＦＮもしくはＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮもしくはＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡもしくはＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドもしくはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、など）、もう１つはペイロードを遅く（例えば、標的細胞に接触してから６～４０日以内、例えば、標的細胞に接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０、または９～１５日以内）放出することができる成分（例えば、ＤＮＡドナーテンプレート）で作製される。

【０１００】

別の例では、ナノ粒子は、２つ以上の脱落可能層を含むことができ、内側脱落可能層が脱落する前に（別のペイロードを放出する）、外側脱落可能層が脱落する（ペイロードを放出する）。いくつかの場合では、内側ペイロードはＤＮＡドナーテンプレートであり（例えば、相同組み換え修復－ＨＤＲのための）、外側のペイロードは１つ以上の遺伝子編集ツールである（例えば、ＺＦＰまたはＺＦＰをコードする核酸、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥをコードする核酸、ＺＦＮまたはＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮまたはＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガ

イドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子など）。内側ペイロードおよび外側ペイロードは、任意の所望のペイロードであり得、一方または両方は、例えば、１つ以上のｓｉＲＮＡおよび／または１つ以上のｍＲＮＡを含むことができる。したがって、いくつかの場合では、ナノ粒子は２つ以上の脱落可能層を有することができ、１つのペイロードが早く（例えば、標的細胞と接触してから０．５～７日以内、例えば、標的細胞と接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日、または１～３日以内）（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＺＦＰまたはＺＦＰをコードする核酸のようなゲノム編集ツール、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥをコードする核酸、ＺＦＮまたはＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮまたはＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡまたはＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、など）、別のペイロードが遅く（例えば、標的細胞に接触してから６～４０日以内、例えば、標的細胞に接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０、または９～１５日以内）（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＤＮＡドナーテンプレート）放出するように設計されることができる。

【０１０１】

いくつかの実施形態では（例えば、上記の実施形態では）、遺伝子発現が変化した時間をペイロード放出時間の代わりとして使用することができる。実例として、ペイロードが１２日目までに放出されたかを判断を望む場合は、１２日目にナノ粒子送達の所望の結果についてアッセイすることができる。例えば、所望の結果が、例えばｓｉＲＮＡを送達することによって標的細胞の標的遺伝子の発現を低下させた場合、標的遺伝子の発現をアッセイ／モニターしてｓｉＲＮＡが放出されたかを判定することができる。別の例として、所望の結果が、例えば、目的のタンパク質をコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡを送達することによって、目的のタンパク質を発現した場合、目的のタンパク質の発現をアッセイ／モニターしてペイロードが放出されたかを判定することができる。さらに別の例では、例えば、ゲノムＤＮＡの切断および／またはドナーＤＮＡテンプレートの配列の挿入を介して、所望の結果が標的細胞のゲノムを変更した場合、標的指向された遺伝子座からの発現および／またはゲノム変更の存在をアッセイ／モニターしてペイロードが放出されたかを判定することができる。

【０１０２】

したがって、いくつかの場合では、脱落可能層はナノ粒子成分の段階的放出を提供する。例えば、いくつかの場合では、ナノ粒子は、２つ以上（例えば、２つ、３つ、または４つ）の脱落可能層を有する。２つの脱落可能層を有するナノ粒子の場合、そのようなナノ粒子は、最も内側から最も外側へ、例えば、第１のペイロードを有するコア、第１の脱落可能層、例えば、第２のペイロードを有する中間層、および中間層を囲む第２の脱落可能層を有することができる（例えば、図９参照）。そのような構成（複数の脱落可能層）は、様々な所望のペイロードの段階的放出を容易にする。さらなる実例では、２つの脱落可能層を有するナノ粒子は（上記のように）、コア内に１つ以上の所望の遺伝子編集ツール（例えば、ＤＮＡドナーテンプレート、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡなどのうちの１つ以上）、および中間層内に別の所望の遺伝子編集ツール（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質、ＺＦＰ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ、ＴＡＬＥＮのようなプログラム可能な遺伝子編集タンパク質、プログラム可能な遺伝子編集タンパク質をコードするＤＮＡまたはＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡなどのうちの１つ以上）を任意の所望の組み合わせで含むことができる。

【０１０３】

脱落可能層を追加する例は（例えば、２つの溶液が適切な滞留時間（流量）でマイクロ流体混合チップを通過した）、実施例の段落に見出される。

【０１０４】
代替パッケージング（例えば、脂質製剤）
いくつかの実施形態では、主題のコア（例えば、上記の成分および／または構成の任意の組み合わせを含む）は、脂質系の送達システム、例えばカチオン性脂質送達システムの一部である（例えば、Ｃｈｅｓｎｏｙ ａｎｄ Ｈｕａｎｇ，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｂｉｏｍｏｌ Ｓｔｒｕｃｔ．２０００，２９：２７－４７、Ｈｉｒｋｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ ＭｅｄＣｈｅｍ．２００３ Ｊｕｌ １０（１４）：１１８５－９３、およびＬｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ ＭｅｄＣｈｅｍ．２００３ Ｊｕｌ １０（１４）：１３０７－１５を参照）。いくつかの場合では、主題のコア（例えば、上記の成分および／または構成の任意の組み合わせを含む）は、脱落可能層によって囲まれていない。上記のコアは、アニオン性ポリマー組成物（例えば、ポリ（グルタミン酸））、カチオン性ポリマー組成物（例えば、ポリ（アルギニン）、カチオン性ポリペプチド組成物（例えば、ヒストンテールペプチド）、およびペイロード（例えば、核酸かつ／またはタンパク質ペイロード）を含むことができる。

【０１０５】
コアが脂質系の送達システムの一部であるいくつかの場合では、コアは、放出の持続性および／または位置を考慮して設計された。例えば、いくつかの場合では、コアは、ＥＳＰ、ＥＮＰ、および／またはＥＰＰを含み、そのようないくつかの場合では、それらの成分は、ペイロードの放出がコアによって所望の条件（例えば、細胞位置、ｐＨなどの細胞状態、特定の酵素の存在など）に接するまで遅くなるような比率で存在する（例えば、上記）。いくつかのそのような実施形態では、コアは、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、いくつかの場合では、Ｄ－異性体のポリマーおよびＬ－異性体のポリマーは、互いに対して特定の範囲の比で存在する（例えば、上記）。いくつかの場合では、コアは、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、いくつかの場合では、Ｄ－異性体のポリマーおよびＬ－異性体のポリマーは、互いに対して特定の範囲の比で存在する（例えば、上記）。いくつかの場合では、コアは、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、いくつかの場合では、Ｄ－異性体のポリマーおよびＬ－異性体のポリマーは、互いに対して特定の範囲の比で存在する（例えば、上記）。いくつかの場合では、コアは、アニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーを含み、いくつかの場合では、Ｄ－異性体のポリマーおよびＬ－異性体のポリマーは、互いに対して特定の範囲の比で存在する（例えば、上記）。いくつかの場合では、コアは、ＮＬＳを含むタンパク質を含む（例えば、上記）。いくつかの場合では、コアは、ＨＴＰを含む（例えば、上記）。

【０１０６】
カチオン性脂質は、遺伝子送達に使用することができかつプラスミドＤＮＡを縮合する能力を有する非ウイルスベクターである。リポフェクションのためのＮ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリドの合成後、カチオン性脂質の分子構造を改善することは、頭部基、リンカー、および疎水性ドメイン修飾を含む活発な領域である。修飾は、表面電荷密度の増強を介してＤＮＡ結合および送達を改善することができる多価ポリアミンの使用、および毒性を制限できる、３Ｂ－［Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロールのようなステロール系疎水性基の使用を含む。ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）のようなヘルパー脂質は、エンドソーム逃避を容易にするために増強されたリポソーム疎水性および六方晶系逆相転移を介して導入遺伝子発現を改善するために使用され得る。いくつかの場合では、脂質製剤は、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、コレステロール、ＰＥＧ－脂質、リピオポリアミン（ｌｉｐｉｏｐｏｌｙａｍｉｎｅ）、デキサメタゾン－スペルミン（ＤＳ）、および二置換スペルミン（$Ｄ_{2}$Ｓ）のうちの１

つ以上を含む（例えば、デキサメタゾンに対するポリアミンスペルミンのコンジュゲーションから生じる）。ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００およびＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡは、当分野で概説されている方法によって合成されることができる（例えば、Ｈｅｙｅｓ　ｅｔ．ａｌ，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ，２００５，１０７，２７６－２８７、Ｓｅｍｐｌｅ　ｅｔ．ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０１０，２８，１７２－１７６、Ａｋｉｎｃ　ｅｔ．ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２００８，２６，５６１－５６９、Ｌｏｖｅ　ｅｔ．ａｌ，ＰＮＡＳ，２０１０，１０７，１８６４－１８６９、国際特許出願公開ＷＯ２０１００５４４０１を参照し、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１０７】

様々な脂質ベースの送達システムの例としては、以下の出版物、国際特許公開番号ＷＯ２０１６０８１０２９、米国特許出願公開番号ＵＳ２０１６０２６３０４７およびＵＳ２０１６０２３７４５５、ならびに米国特許番号９，５３３，０４７、９，５０４，７４７、９，５０４，６５１、９，４８６，５３８、９，３９３，２００、９，３２６，９４０、９，３１５，８２８、および９，３０８，２６７に記載されているものが含まれるがこれらに限定されず、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１０８】

したがって、いくつかの場合では、主題のコアは、脂質（例えば、リポフェクタミントランスフェクション試薬のようなカチオン性脂質）に囲まれている。いくつかの場合では、主題のコアは脂質製剤中に存在する（例えば、脂質ナノ粒子製剤）。脂質製剤は、リポソームおよび／またはリポプレックスを含むことができる。脂質製剤は、エタノール希釈による自発的小胞形成（ＳＮＡＬＰ）リポソームを含み得る（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）および／またはプロタミンでコートされることができる中性ヘルパー脂質と共にカチオン性脂質を含むもの）。

【０１０９】

脂質製剤は、リピドイド系製剤であり得る。リピドイドの合成は広く記載されており、これらの化合物を含有する製剤は主題の脂質製剤に含まれることができる（例えば、Ｍａｈｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏｃｏｎｊｕｇＣｈｅｍ．２０１０　２１：１４４８－１４５４、Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｎｔｅｒｎ　Ｍｅｄ．２０１０　２６７：９－２１、Ａｋｉｎｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８　２６：５６１－５６９、Ｌｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０１０　１０７：１８６４－１８６９、およびＳｉｅｇｗａｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０１１　１０８：１２９９６－３００１を参照し、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。いくつかの場合では、主題の脂質製剤は、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）；１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）；Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロフィル］Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロライド（ＤＯＴＭＡ）；１，２－ジオレオイルオキシ－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）；ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン（ＤＯＧＳ）；Ｎ－（３－アミノプロピル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，３－ビス（ドデシルオキシ）－１（ＧＡＰ－ＤＬＲＩＥ）；プロパンアミニウムブロマイド；セチルトリメチルアンモニウムブロマイド（ＣＴＡＢ）；６－ラウロキシヘキシルオルニチナト（ＬＨＯＮ）；１－（２，３－ジオレオイルオキシプロピル）－２，４，６－トリメチルピリジニウム（２Ｏｃ）；２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ－［２（スペルミンカルボキシアミド－エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１（ＤＯＳＰＡ）；プロパンアミニウムトリフルオロアセテート；１，２－ジオレイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＰＡ）；Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，３－ビス（テトラデシルオキシ）－１（ＭＤＲＩＥ）；プロパンアミニウムブロマイド；ジミリストオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド（ｄｉｍｙｒｉｓｔ

ｏｏｘｙｐｒｏｐｙｌ ｄｉｍｅｔｈｙｌ ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌ ａｍｍｏｎｉｕｍ ｂｒｏｍｉｄｅ）（ＤＭＲＩ）；３．ベータ．－［Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロールＤＣ－Ｃｈｏｌ；ビス－グアニジウム－トレン－コレステロール（ＢＧＴＣ）；１，３－ジオードオキシ－２－（６－カルボキシ－スペルミル）－ピロピルアミド（１，３－Ｄｉｏｄｅｏｘｙ－２－（６－ｃａｒｂｏｘｙ－ｓｐｅｒｍｙｌ）－ｐｒｏｐｙｌａｍｉｄｅ）（ＤＯＳＰＥＲ）；ジメチルオクタデシルアンモニウムブロマイド（ＤＤＡＢ）；ジオクタデシルアミドグリシルスペルミジン（Ｄｉｏｃｔａｄｅｃｙｌａｍｉｄｏｇｌｉｃｙｌｓｐｅｒｍｉｄｉｎ）（ＤＳＬ）；ラック－［（２，３－ジオクタデシルオキシプロピル）（２－ヒドロキシエチル）］－ジメチルアンモニウム（ＣＬＩＰ－１）；クロライドラック－［２（２，３－ジヘキサデシルオキシプロピル（ｃｈｌｏｒｉｄｅ ｒａｃ－［２（２，３－Ｄｉｈｅｘａｄｅｃｙｌｏｘｙｐｒｏｐｙｌ（ＣＬＩＰ－６）；オキシメチルオキシ）エチル］トリメチルアンモニウムブロマイド；エチルジミリストイルホスファチジルコリン（ＥＤＭＰＣ）；１，２－ジステアリルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）；１，２－ジミリストイル－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＭＴＡＰ）；Ｏ，Ｏ’－ジミリスチル－Ｎ－リジルアスパルテート（ＤＭＫＥ）；１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－エチルホスホコリン（ＤＳＥＰＣ）；Ｎ－パルミトイルＤ－エリスロ－スフィンゴシルカルバモイル－スペルミン（ＣＣＳ）；Ｎ－ｔ－ブチル－Ｎ０－テトラデシル－３－テトラデシルアミノプロピオンアミジン；ｄｉＣ１４－アミジン；オクタデセノイルオキシ（ｏｃｔａｄｅｃｅｎｏｌｙｏｘｙ）［エチル－２－ヘプタデセニル－３ヒドロキシエチル］イミダゾリニウム（ＤＯＴＩＭ）；クロライドＮ１－コレステリルオキシカルボニル－３，７－ジアザノナン－１，９－ジアミン（ＣＤＡＮ）；２－［３－［ビス（３－アミノプロピル）アミノ］プロピルアミノ］－Ｎ－［２－［ジ（テトラデシル）アミノ］－２－オキソエチル］アセトアミド（ＲＰＲ２０９１２０）；ジテトラデシルカルバモイルメ－エチル－アセトアミド（ｄｉｔｅｔｒａｄｅｃｙｌｃａｒｂａｍｏｙｌｍｅ－ｅｔｈｙｌ－ａｃｅｔａｍｉｄｅ）；１，２－ジリノレイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）；２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン；ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ；ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート；ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ；ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ；９８Ｎ１２－５；Ｃ１２－２００；コレステロール；ＰＥＧ－脂質；リピオポリアミン（ｌｉｐｉｏｐｏｌｙａｍｉｎｅ）；デキサメタゾン－スペルミン（ＤＳ）；および二置換スペルミン（D_2S）のうちの１つ以上（任意の所望の組み合わせで）を含むことができる。

【０１１０】

ｉｉｉ．表面コート（外殻）

いくつかの場合では、脱落可能層（コート）は、本明細書で「外殻」、「外側コート」、または「表面コート」と呼ばれる追加の層によってそれ自体がコートされている。表面コートは、複数の異なる機能を果たすことができる。例えば、表面コートは送達効率を高めることができ、かつ／または主題のナノ粒子を特定の細胞型に標的指向することができる。表面コートは、ペプチド、ポリマー、またはリガンド－ポリマーコンジュゲートを含み得る。表面コートは、標的指向リガンドを含み得る。例えば、１つ以上の標的指向リガンド（リンカードメインを有するかまたは有さない）の水溶液を、コートされたナノ粒子の懸濁液（脱落可能層でコートされたナノ粒子の懸濁液）に添加してもよい。例えば、いくつかの場合では、（アンカードメインの）プロトン化アンカー残基の最終濃度は、２５～３００μＭである。いくつかの場合では、表面コートを添加するプロセスは、５０～１５０ｎｍの平均粒径および０～－１０ｍＶのゼータ電位を有する粒子の単分散懸濁液を生じる。

【０１１１】

いくつかの場合では、表面コートは最も外側の脱落可能層と静電的に相互作用する。例えば、いくつかの場合では、ナノ粒子は、２つの脱落可能層（例えば、最も内側から最も外側へ、例えば、第１のペイロードを有するコア、第１の脱落可能層、例えば、第２のペ

イロードを有する中間層、および中間層を囲む第２の脱落可能層）を有し、外殻（表面コート）は、第２の脱落可能層と相互作用することができる（例えば、静電的に）。いくつかの場合では、ナノ粒子は、１つの脱落可能層（例えば、アニオン性シリカ層）のみを有し、いくつかの場合では、外殻は、脱落可能層と静電的に相互作用することができる。

【０１１２】

したがって、脱落可能層（例えば、最も外側の層）がアニオン性である場合（例えば、いくつかの場合では、脱落可能層がシリカコートである場合）、表面コートがカチオン性成分を含む場合には、表面コートは脱落可能層と静電的に相互作用することができる。例えば、いくつかの場合では、表面コートは、標的指向リガンドがカチオン性アンカードメインにコンジュゲートされている送達分子を含む。カチオン性固定ドメインは、脱落可能層と静電的に相互作用し、送達分子をナノ粒子に固定する。同様に、脱落可能層（例えば、最も外側の脱落層）がカチオン性である場合、表面コートがアニオン性成分を含む場合には、表面コートは脱落可能層と静電的に相互作用することができる。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、表面コートは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）を含む。いくつかの場合では、カチオン性アミノ酸のポリマーは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、オルガネラ膜、または小胞膜の横断を促進するポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または有機もしくは無機化合物を指すために使用される用語であるＣＰＰ（「タンパク質導入ドメイン」（ＰＴＤ）とも呼ばれる）として機能し得る。極性小分子から大きな高分子および／またはナノ粒子まで及び得る別の分子（例えば、主題のナノ粒子の脱落可能層に埋め込まれ、かつ／またはそれと相互作用する）に結合したＰＴＤは、分子が膜を横断すること、例えば、細胞外空間から細胞内空間へ、またはサイトゾルからオルガネラ内（例えば、細胞核）へ移動することを促進し得る。

【０１１４】

ＣＰＰの例としては、最小のウンデカペプチドタンパク質導入ドメイン（
YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 160)
を含むＨＩＶ－１　ＴＡＴの残基４７～５７に対応する）、細胞内への進入を指示するのに十分な数のアルギニン（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１０～５０個のアルギニン）を含むポリアルギニン配列、ＶＰ２２ドメイン（Ｚｅｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．９（６）：４８９－９６）、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ａｎｔｅｎｎａｐｅｄｉａタンパク質導入ドメイン（Ｎｏｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｄｉａｂｅｔｅｓ　５２（７）：１７３２－１７３７）、欠損ヒトカルシトニンペプチド（Ｔｒｅｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２１：１２４８－１２５６）、ポリリジン（Ｗｅｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：１３００３－１３００８）、ＲＲＱＲＲＴＳＫＬＭＫＲ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６１）、トランスポータン
GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
(SEQ ID NO: 162); KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO: 163);および
RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 164)
が含まれるが、これらに限定されない。例示的なＣＰＰとしては、
YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 160), RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 165)
、３個のアルギニン残基～５０個のアルギニン残基のアルギニンホモポリマー、
RKKRRQRR (SEQ ID NO:
166), YARAAARQARA (SEQ ID NO: 167), THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 168), および
GGRRARRRRRR (SEQ ID NO: 169)
が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＣＰＰは、活性化可能なＣＰＰ（ＡＣＰＰ）である（Ａｇｕｉｌｅｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｉｎｔｅｇ

ｒ　Ｂｉｏｌ（Ｃａｍｂ）Ｊｕｎｅ；１（５－６）：３７１－３８１）。ＡＣＰＰは、開裂可能なリンカーを介して対応するポリアニオン（例えば、Ｇｌｕ９または「Ｅ９」）に結合したポリカチオン性ＣＰＰ（例えば、Ａｒｇ９または「Ｒ９」）を含み、これは、正味荷電をほぼゼロに低減させ、それにより、接着および細胞への取り込みを阻害する。リンカーが切断されると、ポリアニオンが放出され、ポリアルギニンおよびその固有の接着性が曝露され、したがって、膜を横断するようにＡＣＰＰを活性化させる。

【０１１５】

いくつかの場合では、コートされたコア（脱落可能層によって囲まれたコア）を、ＣＰＰを含む組成物（例えば、溶液）と接触させることによってＣＰＰをナノ粒子に添加することができる。ＣＰＰはその後、脱落可能層と相互作用することができる（例えば、静電的に）。

【０１１６】

いくつかの場合では、表面コートは、カチオン性アミノ酸（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）および／またはポリ（Ｄ－アルギニン）などのポリ（アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）および／またはポリ（Ｄ－リジン）などのポリ（リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）および／またはポリ（Ｄ－ヒスチジン）などのポリ（ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）および／またはポリ（Ｄ－オルニチン）などのポリ（オルニチン）、ポリ（Ｌ－シトルリン）および／またはポリ（Ｄ－シトルリン）などのポリ（シトルリン）など）を含む。そのため、いくつかの場合では、表面コートは、ポリ（アルギニン）、例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）を含む。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、表面コートは、セランク（ｓｅｌａｎｋ）（ＴＫＰＲＰＧＰ－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４７）（例えば、Ｎ－アセチルセランク）および／またはセマックス（ｓｅｍａｘ）（ＭＥＨＦＰＧＰ－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４８）（例えば、Ｎ－アセチルセマックス）などのヘプタペプチドを含む。そのため、いくつかの場合では、表面コートは、セランク（例えば、Ｎ－アセチルセランク）を含む。いくつかの場合では、表面コートは、セマックス（例えば、Ｎ－アセチルセマックス）を含む。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、表面コートは、送達分子を含む。表面コートは、標的指向リガンドを含み、いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）にコンジュゲートされている。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、介在リンカーを介してアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）にコンジュゲートされている。

【０１１９】

標的指向リガンド

種々の標的指向リガンド（主題の送達分子の一部として）を表面コートの一部として使用することができ、多数の異なる標的指向リガンドが想定される。いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、野生型タンパク質のフラグメント（例えば、結合ドメイン）である。例えば、いくつかの場合では、主題の送達分子のペプチド標的指向リガンドは、４～５０アミノ酸（例えば、４～４０、４～３５、４～３０、４～２５、４～２０、４～１５、５～５０、５～４０、５～３５、５～３０、５～２５、５～２０、５～１５、７～５０、７～４０、７～３５、７～３０、７～２５、７～２０、７～１５、８～５０、８～４０、８～３５、８～３０、８～２５、８～２０、または８～１５アミノ酸）の長さを有し得る。標的指向リガンドは、野生型タンパク質のフラグメントであり得るが、いくつかの場合では、野生型アミノ酸配列に対する変異（例えば、挿入、欠失、置換）（すなわち、対応する野生型タンパク質配列に対する変異）を有する。例えば、標的指向リガンドは、標的細胞表面タンパク質との結合親和性を増加または減少させる変異を含み得る。

【０１２０】

いくつかの場合では、標的指向リガンドは、抗体の抗原結合領域（例えば、ＳｃＦｖ）である。「Ｆｖ」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含有する最小の抗体フラ

グメントである。二本鎖Ｆｖ種では、この領域は、緊密な非共有結合にある１つの重鎖可変ドメインおよび１つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Ｆｖ種（ｓｃＦｖ）では、軽鎖および重鎖が二本鎖Ｆｖ種のものと類似した「二量体」構造で会合することができるように、１つの重鎖可変ドメインおよび１つの軽鎖可変ドメインが柔軟なペプチドリンカーによって共有結合され得る。ｓｃＦｖの概説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照。

【０１２１】

いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ウイルス糖タンパク質を含み、これは、いくつかの場合では、ヘパリン硫酸プロテオグリカンなどの遍在する表面マーカーに結合し、いくつかの細胞集団において膜ラッフリング関連プロセスを介して微飲作用を誘導し得る。ポリ（Ｌ－アルギニン）は、ヘパリン硫酸プロテオグリカンなどの表面マーカーへの結合にも使用することができる別の例示的な標的指向リガンドである。

【０１２２】

いくつかの場合では、標的指向リガンドは、システイン残基を付加する変異を含み得、これはリンカーおよび／またはアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）へのコンジュゲーションを促進し得る。例えば、システインは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）および／またはアミン反応性化学的性質を介した架橋（コンジュゲーション）に使用することができる。

【０１２３】

いくつかの場合では、標的指向リガンドは、内部システイン残基を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、Ｎ末端および／またはＣ末端にシステイン残基を含む。いくつかの場合では、システイン残基を含めるために、標的指向リガンドは、例えば、対応する野生型配列に対して変異している（例えば、挿入または置換）。したがって、本明細書に記載される標的指向リガンドのいずれも、システイン残基における挿入および／または置換（例えば、システイン残基の内部、Ｎ末端、Ｃ末端の挿入またはシステイン残基での置換）によって修飾され得る。

【０１２４】

「対応する」野生型配列とは、主題の配列が由来したまたは由来した可能性がある野生型配列（例えば、目的の配列に対して高い配列同一性を有する野生型タンパク質配列）を意味する。例えば、１つ以上の変異（例えば、置換、挿入）を有するがそれ以外は野生型配列と非常に類似している標的指向リガンドについては、それが最も類似しているアミノ酸配列は、対応する野生型アミノ酸配列であると考えられ得る。

【０１２５】

対応する野生型タンパク質／配列は、１００％同一である必要はない（例えば、８５％以上同一、９０％以上同一、９５％以上同一、９８％以上同一、９９％以上同一など）（修飾された位置（複数可）の外側で）が、標的指向リガンドおよび対応する野生型タンパク質（例えば、野生タンパク質のフラグメント）は意図された細胞表面タンパク質に結合し得、かつ、これが相同であるとみなされ得るのに十分な配列同一性（修飾された領域の外側で）を保持し得る。「対応する」野生型タンパク質配列のアミノ酸配列は、任意の好都合な方法を使用して（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＭＵＳＣＬＥ、Ｔ－ＣＯＦＦＥＥなどの任意の好都合な配列比較／アラインメントソフトウェアを使用して）同定／評価され得る。

【０１２６】

表面コートの一部として（例えば、表面コートの送達分子の一部として）使用され得る標的指向リガンドの例には、表１に列挙されているものが含まれるが、これらに限定されない。主題の送達分子の一部として使用され得る標的指向リガンドの例には、表３に列挙されているものが含まれるが、これらに限定されない（表３に列挙される配列の多くはリンカー（例えば、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ）を介してカチオン性ポリペプチドドメイン（例えば、９Ｒ、６Ｒなど）にコンジュゲートした標的指向リガンド（例えば、列２のＳＮＲ

ＷＬＤＶＫ）を含む）。標的指向リガンドに含まれ得るアミノ酸配列の例には、NPKLTRMLTFKFY (SEQ ID
NO: xx) (IL2), TSVGKYPNTGYYGD (SEQ ID NO: xx) (CD3), SNRWLDVK (Siglec),
EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: xx) (SCF); EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: xx) (SCF),
EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: xx) (SCF), SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO:
xx) (cKit), および Ac-SNYSAibADKAibANAibADDAibAEAibAKENS (SEQ ID NO: xx) (cKit)

が含まれるが、これらに限定されない。したがって、標的指向リガンドは、NPKLTRMLTFKFY (SEQ ID NO: xx) (IL2), TSVGKYPNTGYYGD (SEQ ID NO: xx) (CD3),
SNRWLDVK (Siglec), EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: xx) (SCF); EKFILKVRPAFKAV (SEQ
ID NO: xx) (SCF), EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: xx) (SCF), または
SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: xx) (cKit)

と８５％以上（例えば、９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１２７】

（表１）標的指向リガンドの例

細胞表面タンパク質	標的指向リガンド	配列	SEQ ID NO:
ファミリーB GPCR	エキセンディン	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSG APPPS	1
	エキセンディン (S11C)	HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSG APPPS	2
FGF 受容体	FGF フラグメント	KRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQL QAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVT DECFFFERLESNNYNTY	3
	FGF フラグメント	KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS	4
	FGF フラグメント	HFKDPK	5
	FGF フラグメント	LESNNYNT	6
	E-セレクチン	MIASQFLSALTLVLLIKESGA	7
	L-セレクチン	MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLLCCDFLIHH GTHC	8
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAH HGTDC	9
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC	10
P-セレクチン	PSGL-1 (SELPLG)	MAVGASGLEGDKMAGAMPLQLLLLLILLGPGNSL QLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDY DFLPETEPPEMLRNSTDTTPLTGPGTPESTTVEPA ARRSTGLDAGGAVTELTTELANMGNLSTDSAAME IQTTQPAATEAQTTQPVPTEAQTTPLAATEAQTTR LTATEAQTTPLAATEAQTTPPAATEAQTTQPTGLE AQTTAPAAMEAQTTAPAAMEAQTTPPAAMEAQTT QTTAMEAQTTAPEATEAQTTQPTATEAQTTPLAA MEALSTEPSATEALSMEPTTKRGLFIPFSVSSVTH KGIPMAASNLSVNYPVGAPDHISVKQCLLAILILAL VATIFFVCTVVLAVRLSRKGHMYPVRNYSPTEMV CISSLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTPEPR EDREGDDLTLHSFLP	271
E-セレクチン	ESL-1 (GLG1)	MAACGRVRRMFRLSAALHLLLLFAAGAEKLPGQG VHSQGQGPGANFVSFVGQAGGGGPAGQQLPQL PQSSQLQQQQQQQQQQQPQPPQPPFPAGGPP ARRGGAGAGGGWKLAEEESCREDVTRVCPKHT WSNNLAVLECLQDVREPENEISSDCNHLLWNYKL NLTTDPKFESVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGY MVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIIFSDYRLIC GFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSCL EKGLVKEAEEREPKIQVSELCKKAILRVAELSSDD FHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLF NHKFEESMSEKCREALTTRQKLIAQDYKVSYSLAK SCKSDLKKYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLESA VHRGRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSLSPEIIL SCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVRGEKGNL GMNCQQALQTLIQETDPGADYRIDRALNEACESVI QTACKHIRSGDPMILSCLMEHLYTEKMVEDCEHR LLELQYFISRDWKLDPVLYRKCQGDASRLCHTHG WNETSEFMPQGAVFSCLYRHAYRTEEQGRRLSR ECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDLGKW CSEKTETGQELECLQDHLDDLVVECRDIVGNLTEL ESEDIQIEALLMRACEPIIQNFCHDVADNQIDSGDL MECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRF SYKFKMACKEDVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRN DTLQEAKEHRVSLKCRRQLRVEELEMTEDIRLEP DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIIECLKENKKQL STRCHQKVFKLQETEMMDPELDYTLMRVCKQMIK RFCPEADSKTMLQCLKQNKNSELMDPKCKQMITK RQITQNTDYRLNPMLRKACKADIPKFCHGILTKAK	272

細胞表面タンパク質	標的指向リガンド	配列	SEQ ID NO:
		DDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCEDQIRIIIQE SALDYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTG QVEECLKVNLLKIKTELCKKEVLNMLKESKADIFVD PVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALE DKRVRLQPECKKRLNDRIEMWSYAAKVAPADGFS DLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRIT KRVTRELKDRLQYRSETMAYKGLVWSQDVTGSP A	
	PSGL-1 (SELPLG)	上記参照	271
	CD44	MDKFWWHAAWGLCLVPLSLAQIDLNITCRFAGVF HVEKNGRYSISRTEAADLCKAFNSTLPTMAQMEK ALSIGFETCRYGFIEGHVVIPRIHPNSICAANNTGV YILTSNTSQYDTYCFNASAPPEEDCTSVTDLPNAF DGPITITIVNRDGTRYVQKGEYRTNPEDIYPSNPTD DDVSSGSSSERSSTSGGYIFYTFSTVHPIPDEDSP WITDSTDRIPATTLMSTSATATETATKRQETWDW FSWLFLPSESKNHLHTTTQMAGTSSNTISAGWEP NEENEDERDRHLSFSGSGIDDDEDFISSTISTTPR AFDHTKQNQDWTQWNPSHSNPEVLLQTTTRMTD VDRNGTTAYEGNWNPEAHPPLIHHEHHEEEETPH STSTIQATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYR QTPKEDSHSTTGTAAASAHTSHPMQGRTTPSPE DSSWTDFFNPISHPMGRGHQAGRRMDMDSSHSI TLQPTANPNTGLVEDLDRTGPLSMTTQQSNSQSF STSHEGLEEDKDHPTTSTLTSSNRNDVTGGRRDP NHSEGSTTLLEGYTSHYPHTKESRTFIPVTSAKTG SFGVTAVTVGDSNSNVNRSLSGDQDTFHPSGGS HTTHGSESDGHSHGSQEGGANTTSGPIRTPQIPE WLIILASLLALALILAVCIAVNSRRRCGQKKKLVINS GNGAVEDRKPSGLNGEASKSQEMVHLVNKESSE TPDQFMTADETRNLQNVDMKIGV	273
	DR3 (TNFRSF25)	MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTRSPRC DCAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGN STCLVCPQDTFLAWENHHNSECARCQACDEQAS QVALENCSAVADTRCGCKPGWFVECQVSQCVSS SPFYCQPCLDCGALHRHTRLLCSRRDTDCGTCLP GFYEHGDGCVSCPTPPPSLAGAPWGAVQSAVPL SVAGGRVGVFWVQVLLAGLVVPLLLGATLTYTYR HCWPHKPLVTADEAGMEALTPPPATHLSPLDSAH TLLAPPDSSEKICTVQLVGNSWTPGYPETQEALC PQVTWSWDQLPSRALGPAAAPTLSPESPAGSPA MMLQPGPQLYDVMDAVPARRWKEFVRTLGLREA EIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGA VYAALERMGLDGCVEDLRSRLQRGP	274
	LAMP1	MAAPGSARRPLLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVK NGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTFDLP SDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLN FTRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKT VESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHDA TIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAPPS PSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNGTCLLASMGLQLN LTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTL ELHSEGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILP DARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEHV RVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLD ENSMLIPIAVGGALAGLVLIVLIAYLVGRKRSHAGY	275

細胞表面タンパク質	標的指向リガンド	配列	SEQ ID NO:
		QTI	
	LAMP2	MVCFRLFPVPGSGLVLVCLVLGAVRSYALELNLTD SENATCLYAKWQMNFTVRYETTNKTYKTVTISDH GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFSWIANFT KAASTYSIDSVSFSYNTGDNTTFPDAEDKGILTVD ELLAIRIPLNDLFRCNSLSTLEKNDVVQHYWDVLV QAFVQNGTVSTNEFLCDKDKTSTVAPTIHTTVPSP TTTPTPKEKPEAGTYSVNNGNDTCLLATMGLQLNI TQDKVASVININPNTTHSTGSCRSHTALLRLNSSTI KYLDFVFAVKNENRFYLKEVNISMYLVNGSVFSIA NNNLSYWDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTF DLRVQPFNVTQGKYSTAQDCSADDDNFLVPIAVG AALAGVLILVLLAYFIGLKHHHAGYEQF	276
	Mac2-BP (ガレクチン3 結合タンパク質) (LGALS3BP)	MTPPRLFWVWLLVAGTQGVNDGDMRLADGGAT NQGRVEIFYRGQWGTVCDNLWDLTDASVVCRAL GFENATQALGRAAFGQGSGPIMLDEVQCTGTEAS LADCKSLGWLKSNCRHERDAGVVCTNETRSTHTL DLSRELSEALGQIFDSQRGCDLSISVNVQGEDALG FCGHTVILTANLEAQALWKEPGSNVTMSVDAECV PMVRDLLRYFYSRRIDITLSSVKCFHKLASAYGAR QLQGYCASLFAILLPQDPSFQMPLDLYAYAVATGD ALLEKLCLQFLAWNFEALTQAEAWPSVPTDLLQLL LPRSDLAVPSELALLKAVDTWSWGERASHEEVEG LVEKIRFPMMLPEELFELQFNLSLYWSHEALFQKK TLQALEFHTVPFQLLARYKGLNLTEDTYKPRIYTSP TWSAFVTDSSWSARKSQLVYQSRRGPLVKYSSD YFQAPSDYRYYPYQSFQTPQHPSFLFQDKRVSW SLVYLPTIQSCWNYGFSCSSDELPVLGLTKSGGS DRTIAYENKALMLCEGLFVADVTDFEGWKAAIPSA LDTNSSKSTSSFPCPAGHFNGFRTVIRPFYLTNSS GVD	277
トランスフェリン受容体	トランスフェリンリガンド	THRPPMWSPVWP	11
α5β1インテグリン	α5β1リガンド	RRETAWA	12
		RGD	
		RGDGW	181
インテグリン	インテグリン結合ペプチド	(Ac)-GCGYGRGDSPG-(NH2)	188
		GCGYGRGDSPG	182
α5β3インテグリン	α5β3リガンド	DGARYCRGDCFDG	187
	狂犬病ウイルス糖タンパク質 (RVG)	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGG	183
c-Kit 受容体 (CD117)	幹細胞因子 (SCF)	EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPG MDVLPSHCWISEMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGL SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPE PRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVSS TLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA	184
CD27	CD70	PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLV VCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQ QDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRD GIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPAS RSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTG TLLPSRNTDETFFGVQWVRP	185
CD150	SH2ドメイン-含有タンパク質 1A (SH2D1A)	SSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATG LDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHGYIYTYRVSQT ETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGI VIPLQYPVEKKSSARSTQGTTGIREDPDVCLKAP	186

【０１２８】

標的指向リガンド（例えば、送達分子の）は、アミノ酸配列ＲＧＤおよび／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤおよび／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、システイン（内部、Ｃ末端、またはＮ末端）を含み得、またアミノ酸配列ＲＧＤおよび／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含み得る。

【０１２９】

標的指向リガンド（例えば、送達分子の）は、アミノ酸配列ＲＧＤならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２および１８１～１８７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２および１８１～１８７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、システイン（内部、Ｃ末端、またはＮ末端）を含み得、またアミノ酸配列ＲＧＤならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２および１８１～１８７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含み得る。

【０１３０】

標的指向リガンド（例えば、送達分子の）は、アミノ酸配列ＲＧＤならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２、１８１～１８７、および２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２、１８１～１８７、および２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、システイン（内部、Ｃ末端、またはＮ末端）を含み得、またアミノ酸配列ＲＧＤならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～１２、１８１～１８７、および２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含み得る。

【０１３１】

いくつかの場合では、標的指向リガンド（例えば、送達分子の）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８１～１８７および２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８１～１８７および２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、システイン（内部、Ｃ末端、またはＮ末端）を含み得、またＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８１～１８７および２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含み得る。

【０１３２】

いくつかの場合では、標的指向リガンド（例えば、送達分子の）は、ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎ

Ｏ：１８１～１８７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８１～１８７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、システイン（内部、Ｃ末端、またはＮ末端）を含み得、またＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８１～１８７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含み得る。

【０１３３】

いくつかの場合では、標的指向リガンド（例えば、送達分子の）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、システイン（内部、Ｃ末端、またはＮ末端）を含み得、またＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７１～２７７のいずれか１つに記載のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含み得る。

【０１３４】

用語「標的」および「標的指向された結合」は、特異的結合を指すために本明細書中で使用される。「特異的結合」、「特異的に結合する」などの用語は、溶液または反応混合物中の他の分子または実体と比較して、分子への優先的な非共有結合または共有結合を指す（例えば、抗体は、他の利用可能なポリペプチドと比較して特定のポリペプチドまたはエピトープに特異的に結合し、リガンドは、他の利用可能な受容体と比較して特定の受容体に特異的に結合する）。いくつかの実施形態では、それが特異的に結合する別の分子に対する１つの分子の親和性は、10^{-5}Ｍ以下（例えば、10^{-6}Ｍ以下、10^{-7}Ｍ以下、10^{-8}Ｍ以下、10^{-9}Ｍ以下、10^{-10}Ｍ以下、10^{-11}Ｍ以下、10^{-12}Ｍ以下、10^{-13}Ｍ以下、10^{-14}Ｍ以下、10^{-15}Ｍ以下、または10^{-16}Ｍ以下）のK_d（解離定数）によって特徴付けられる。「親和性」とは、結合の強度を指し、結合親和性の増加は、より低いK_dと相関する。

【０１３５】

いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ファミリーＢのＧ－タンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、細胞表面糖タンパク質、および細胞間接着分子から選択される細胞表面タンパク質への標的指向された結合を提供する。受容体ドッキングの際のリガンドの空間配置の考慮を使用して、例えばリガンドと標的との間の構造機能関係がペイロードまたはアンカードメイン（カチオン性アンカードメイン）への標的指向リガンドのコンジュゲーションにより妨害されないような、所望の機能選択性およびエンドソームソーティングバイアスを達成することができる。例えば、核酸、タンパク質、リボ核タンパク質、またはアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）へのコンジュゲーションは、妨害溝（複数可）に干渉する可能性がある。

【０１３６】

したがって、いくつかの場合では、そのリガンドに結合した所望の標的（細胞表面タンパク質）の結晶構造が利用可能な場合（またはそのような構造が関連タンパク質に対して利用可能な場合）、リガンドと標的との間の相互作用部位を可視化するために３Ｄ構造モデリングおよびシーケンススレッディングを使用することができる。これは、例えば、（例えば、システイン残基の）置換および／または挿入の配置のための内部部位の選択を容易にし得る。

【０１３７】

一例として、いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ファミリーＢのＧタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）（「セクレチンファミリー」としても知られる）への結合を提供する。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ファミリーＢのＧＰＣＲのアロステリック親和性ドメインおよびオルソステリックドメインの両方への結合を提供して、それぞれ標的指向された結合および長いエンドソームリサイクリング経路の関与を提供する（例えば、下記の実施例の節ならびに図１１および図１２を参照）。

【０１３８】

Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）は、それらがＧタンパク質（ヘテロ三量体ＧＴＰアーゼ）と相互作用してサイクリックＡＭＰ、イノシトールリン酸、ジアシルグリセロールおよびカルシウムイオンなどの細胞内セカンドメッセンジャーの合成を調節するという点で共通の分子構造（７つの推定膜貫通セグメントを有する）および共通のシグナル伝達機構を共有する。ＧＰＣＲのファミリーＢ（セクレチン受容体ファミリーまたは「ファミリー２」）は、細胞膜における細胞内相互作用を媒介すると考えられるポリペプチドおよび分子の受容体を含む、小さいが構造的および機能的に多様な、タンパク質群である（例えば、Ｈａｒｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．２００１；２（１２）：ＲＥＶＩＥＷＳ３０１３を参照）。結合したリガンドの有無にかかわらず、それらのＮ末端のいくつかの結晶構造の発表（この発表は、リガンド結合の理解を拡大し、構造ベースのリガンド設計の有用なプラットフォームを提供した）を含め、セクレチン受容体ファミリーのメンバーに関して構造生物学において重要な発展が遂げられている（例えば、Ｐｏｙｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ　Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１２　Ｍａｙ；１６６（１）：１－３）。

【０１３９】

例えば、エキセンディン－４リガンドまたはその誘導体（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に提示されるものなどのシステイン置換エキセンディン－４標的指向リガンド）を使用して膵臓細胞表面タンパク質ＧＬＰ１Ｒを標的指向するために（例えば、β島を標的指向するために）主題の送達分子を使用することが望ましい場合がある。ＧＬＰ１Ｒは脳および膵臓内で豊富であるため、ＧＬＰ１Ｒへの標的指向結合を提供する標的指向リガンドを使用して、脳および膵臓を標的指向することができる。したがって、ＧＬＰ１Ｒを標的指向することにより、ハンチントン病（ＣＡＧ反復増殖変異）、パーキンソン病（ＬＲＲＫ２変異）、ＡＬＳ（ＳＯＤ１変異）、および他のＣＮＳ疾患などの疾患の治療（例えば、１つ以上の遺伝子編集ツールの送達を介した）に焦点を当てた方法（例えば、治療方法）が容易になる。ＧＬＰ１Ｒの標的指向はまた、Ｉ型糖尿病、ＩＩ型糖尿病、および膵臓癌などの疾患の治療（例えば、１つ以上の遺伝子編集ツールの送達を介した）のための膵臓β島へのペイロードの送達に焦点を当てた方法（例えば、治療方法）も容易にし得る。

【０１４０】

エキセンディン－４の修飾バージョンを使用してＧＬＰ１Ｒを標的指向する場合、

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO. 1)

であるエキセンディン－４アミノ酸配列を、２つの結合溝を妨害させないために架橋複合体が向いていなければならない方向を予想するために３Ｄ空間で回転させることができるＰＤＢ　３次元レンダリングを使用して、グルカゴン－ＧＣＧＲ（４ＥＲＳ）およびＧＬＰ１－ＧＬＰ１Ｒ－ＥＣＤ複合体（ＰＤＢ：３ＩＯＬ）の結晶構造に対して整列させることによって、システインの置換および／または挿入のための（例えば、核酸ペイロードへのコンジュゲーションのための）アミノ酸を同定することができる（例えば、以下の実施例の節ならびに図１１および図１２を参照）。標的指向リガンド（ファミリーＢ　ＧＰＣＲを標的とする）の望ましい架橋部位（例えば、システイン残基の置換／挿入のための部位）が、対応する受容体の２つの結合溝と十分に直交している場合に、高親和性結合、ならびに付随する長いエンドソームリサイクリング経路の隔離（例えば、最適なペイロード放出のための）が生じ得る。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸位置１０、１１、および／または１２におけるシステイン置換は、Ｇｓバイアスシグナルカスケードの二峰性結合および特異的開始、βアレスチンの係合、ならびにアクチン細胞骨格からの解離を付与す

る。いくつかの場合では、この標的指向リガンドは、付随するオルソステリック部位係合を伴わないＧＰＣＲのＮ末端ドメインへの単なる結合（親和性ストランドエキセンディン－４［３１－３９］の単なる結合の場合と同様に）を介して係合しない機構である、受容体に媒介されるエンドサイトーシスの内部移行を引き起こす。

【０１４１】

いくつかの場合では、主題の標的指向リガンドは、エキセンディン－４アミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）に対して、８５％以上（例えば、９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％）の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載のアミノ酸配列のＬ１０、Ｓ１１、およびＫ１２に対応する位置の１つ以上にシステイン置換または挿入を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載のアミノ酸配列のＳ１１に対応する位置でのシステイン置換または挿入を含む。いくつかの場合では、主題の標的指向リガンドは、エキセンディン－４アミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドをアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）に（リンカーを用いてまたは用いずに）コンジュゲートさせる。

【０１４２】

別の例として、いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）受容体（ＦＧＦＲ）などの受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）への結合を提供する。したがって、いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＦＧＦのフラグメントである（すなわち、ＦＧＦのアミノ酸配列を含む）。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、オルソステリック結合の間に占められるＲＴＫのセグメントに結合する（例えば、下記の実施例の節を参照）。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＲＴＫのヘパリン親和性ドメインに結合する。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＦＧＦ受容体への標的指向された結合を提供し、アミノ酸配列

KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (SEQ ID NO: 4)

と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＦＧＦ受容体への標的指向された結合を提供し、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４として記載されるアミノ酸配列を含む。

【０１４３】

いくつかの場合では、ＲＴＫのオルソステリック部位を占める小ドメイン（例えば、５～４０アミノ酸長）を使用して、天然の増殖因子リガンドに固有であり得る細胞増殖性および癌原性のシグナル伝達カスケードの関与なしに、ＲＴＫ（例えば、ＦＧＦＲ）の核選別に関係するエンドサイトーシス経路に関与し得る。例えば、切断型ｂＦＧＦ（ｔｂＦＧＦ）ペプチド（ａ.ａ３０～１１５）は、ｂＦＧＦ受容体結合部位およびヘパリン結合部位の一部を含有し、このペプチドは細胞増殖を刺激することなく細胞表面のＦＧＦＲに効果的に結合し得る。ｔｂＦＧＦの配列は、

KRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLL

ASKCVTDECFFFERLESNNYNTY (SEQ ID NO: 13)

である（例えば、Ｃａｉ　ｅｔ　ａｌ.，Ｉｎｔ　Ｊ　Ｐｈａｒｍ．２０１１　Ａｐｒ　１５；４０８（１－２）：１７３－８２を参照）。

【０１４４】

いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＦＧＦ受容体への標的指向された結合を提供し、アミノ酸配列ＨＦＫＤＰＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）を含む（例えば、下記の実施例の節を参照）。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＦＧＦ受容体への標的指向された結合を提供し、アミノ酸配列ＬＥＳＮＮＹＮＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）を含む（例えば、以下の実施例の節を参照）。

【０１４５】

いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、細胞表面糖タンパク質への標的指向された結合を提供する。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、細胞間接着分子への標的指向された結合を提供する。例えば、いくつかの場合では、標的指向リガンドは、細胞間接着因子として機能する細胞表面糖タンパク質であり、（例えば、骨髄の）造血幹細胞上に見られるタンパク質であるＣＤ３４への標的指向された結合を提供する。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、Ｅ－セレクチン、Ｌ－セレクチン、またはＰ－セレクチンなどのセレクチンのフラグメント（例えば、セレクチンの最初の４０アミノ酸に見られるシグナルペプチド）である。いくつかの場合では、主題の標的指向リガンドは、セレクチンのスシドメイン（例えば、Ｅ－セレクチン、Ｌ－セレクチン、Ｐ－セレクチン）を含む。

【０１４６】

いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列

MIASQFLSALTLVLLIKESGA (SEQ ID NO: 7)

と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７として記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列

MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLLCCDFLIHHGTHC (SEQ ID NO: 8)

と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８として記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列

MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAHHGTDC (SEQ ID NO: 9)

と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９として記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列

MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC (SEQ ID NO: 10)

と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０として記載されるアミノ酸配列を含む。

【０１４７】

主題の標的指向リガンドとして使用され得るセレクチンのフラグメント（例えば、セレクチンの最初の４０アミノ酸に見られるシグナルペプチド）は、いくつかの場合では、特異的に修飾されたシアロムチンへの強い結合を達成し得、例えば、様々なＳｉａｌｙｌ　Ｌｅｗｉｓ^{x}修飾／細胞外ＣＤ３４のＯ－シアリル化は、Ｐ－セレクチン、Ｌ－セレクチンおよびＥ－セレクチンの骨髄、リンパ液、脾臓および扁桃腺区画に対する異なる親和性をもたらし得る。逆に、いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＣＤ３４の細胞外部分であり得る。いくつかのそのような場合では、リガンドのシアリル化の修飾を利用して、標的指向リガンドを様々なセレクチンに差次的に標的指向させ得る。

【０１４８】

いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、Ｅ－セレクチンへの標的指向された結合を提供する。Ｅ－セレクチンは、内皮細胞への腫瘍細胞の接着を媒介し得、Ｅ－セレクチンのリガンドは、腫瘍転移において役割を果たし得る。一例として、Ｐ－セレクチン糖タンパク質－１（ＰＳＧＬ－１）（例えば、ヒト好中球に由来する）は、Ｅ－セレクチンの高効率なリガンド（例えば、内皮によって発現される）として機能し得、したがって、主題の標的指向リガンドは、いくつかの場合では、ＰＳＧＬ－１アミノ酸配列（またはＥ－セレクチンに結合するそのフラグメント）を含む。別の例として、Ｅ－セレクチンリガンド－１（ＥＳＬ－１）は、Ｅ－セレクチンに結合することができ、したがって

、主題の標的指向リガンドは、いくつかの場合では、ＥＳＬ－１アミノ酸配列（またはＥ－セレクチンに結合するそのフラグメント）を含む。いくつかの場合では、ＰＳＧＬ－１および／またはＥＳＬ－１アミノ酸配列を有する標的指向リガンド（またはＥ－セレクチンに結合するそのフラグメント）は、Ｅ－セレクチンに結合するために１つ以上のシアリルＬｅｗｉｓ修飾を持っている。別の例として、いくつかの場合では、ＣＤ４４、細胞死受容体－３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、およびＭａｃ２－ＢＰは、Ｅ－セレクチンに結合することができ、したがって、主題の標的指向リガンドは、いくつかの場合では、ＣＤ４４、細胞死受容体－３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、およびＭａｃ２－ＢＰのうちのいずれか１つのアミノ酸配列（またはＥ－セレクチンに結合するそのフラグメント）を含む。

【０１４９】

いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、Ｐ－セレクチンへの標的指向された結合を提供する。いくつかの場合では、ＰＳＧＬ－１はそのような標的指向された結合を提供することができる。いくつかの場合では、したがって、主題の標的指向リガンドは、いくつかの場合では、ＰＳＧＬ－１アミノ酸配列（またはＰ－セレクチンに結合するそのフラグメント）を含む。いくつかの場合では、ＰＳＧＬ－１アミノ酸配列を有する標的指向リガンド（またはＰ－セレクチンに結合するそのフラグメント）は、Ｐ－セレクチンに結合するために１つ以上のシアリルＬｅｗｉｓ修飾を持っている。

【０１５０】

いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、トランスフェリン受容体への標的指向された結合を提供する。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列

THRPPMWSPVWP (SEQ ID NO: 11)

と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１として記載されるアミノ酸配列を含む。

【０１５１】

いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、インテグリン（例えば、α５β１インテグリン）への標的指向された結合を提供する。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列ＲＲＥＴＡＷＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２として記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤＧＷ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８１）と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８１として記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤを含む。

【０１５２】

いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、インテグリンへの標的指向された結合を提供する。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列

GCGYGRGDSPG (SEQ ID NO: 182)

と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８２として記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、そのような標的指向リガンドは、Ｎ末端でアセチル化され、かつ／またはＣ末端でアミド化（ＮＨ２）されている。

【０１５３】
いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、インテグリン（例えば、α５β３インテグリン）への標的指向された結合を提供する。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、アミノ酸配列
DGARYCRGDCFDG (SEQ ID NO: 187)
と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８７として記載されるアミノ酸配列を含む。
【０１５４】
いくつかの実施形態では、脳を標的指向するために使用される標的指向リガンドは、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）由来のアミノ酸配列（例えば、
YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGG (SEQ ID NO: 183)
）を含む。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８３として記載されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。（本明細書の他の場所に記載される）標的指向リガンドのいずれにおいても、ＲＶＧは、アンカードメイン（例えば、９Ｒペプチド配列）にコンジュゲートおよび／または融合され得る。例えば、主題のナノ粒子の表面コートの一部として使用される主題の送達分子は、配列
YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 180)
を含み得る。
【０１５５】
いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、ｃ－Ｋｉｔ受容体への標的指向された結合を提供する。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８４として記載されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８４として記載されるアミノ酸配列を含む。
【０１５６】
いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、ＣＤ２７への標的指向された結合を提供する。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８５として記載されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８５として記載されるアミノ酸配列を含む。
【０１５７】
いくつかの場合では、本開示による標的指向リガンドは、ＣＤ１５０への標的指向された結合を提供する。いくつかのそのような場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８６として記載されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例えば、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８６として記載されるアミノ酸配列を含む。
【０１５８】
いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、ＫＬＳ　ＣＤ２７＋／ＩＬ－７Ｒａ－／ＣＤ１５０＋／ＣＤ３４－造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＰＣ）への標的指向された結合を提供する。例えば、ＢＣＬ１１ａ転写因子の発現を破壊し、その結果として胎児ヘモグロビンを生成するために、（本明細書の他の場所に記載の）遺伝子編集ツール（複数可）が導入され得る。別の例として、ベータグロビン（ＨＢＢ）遺伝子は、対応する相同性指向修復ドナーテンプレートを用いて変化したＥ７Ｖ置換を修正するために直接標的指向さ

れ得る。一つの実例として、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、ＨＢＢ遺伝子中の遺伝子座に結合し、ゲノム中に二本鎖または一本鎖の切断を生成し、ゲノム修復を開始するような適切なガイドＲＮＡで送達され得る。いくつかの場合では、ＤＮＡドナーテンプレート（一本鎖または二本鎖）は、（ペイロードの一部として）導入され、１４～３０日間放出される一方、ガイドＲＮＡ／ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質複合体（リボ核タンパク質複合体が）は、１～７日間の期間にわたって放出され得る。いくつかの場合では、ペイロードは、例えば、相同指向修復（ＨＤＲ）を促進し、インデル形成を制限するために使用され得る、ｋｕ７０またはｋｕ８０に対するｓｉＲＮＡを含み得る。いくつかの場合では、ヌクレアーゼ媒介部位特異的切断後のドナー鎖のＨＤＲ駆動挿入を促進するために、ＳＩＲＴ６に対するｍＲＮＡが１４～３０日間にわたって放出される。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、Ｔ細胞受容体を修飾するために、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞、造血前駆細胞（ＨＳＰＣ）、または末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）への標的指向された結合を提供する。例えば、（本明細書の他の場所に記載の）遺伝子編集ツール（複数可）は、Ｔ細胞受容体を修飾するために導入され得る。Ｔ細胞受容体は、直接標的指向され得、新規のＴ細胞受容体のための対応する相同性指向修復ドナーテンプレートで置換され得る。一例として、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、ＴＣＲ遺伝子中の遺伝子座に結合し、ゲノム中に二本鎖または一本鎖の切断を生成し、ゲノム修復を開始するような適切なガイドＲＮＡで送達され得る。いくつかの場合では、ＤＮＡドナーテンプレート（一本鎖または二本鎖）は、ＨＤＲのために（ペイロードの一部として）導入される。βグロビン、ＣＣＲ５、Ｔ細胞受容体、もしくは任意の他の目的の遺伝子を標的指向する他のＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡおよびＨＤＲドナー配列、ならびに／または他の発現ベクターが、本開示に従って使用され得ることは当業者には明らかであろう。

【０１６０】

標的指向リガンドを一緒に構成する２つの異なるペプチド配列を有する送達分子も提供される。例えば、いくつかの場合では、標的指向リガンドは、二価（例えば、ヘテロ二価）である。いくつかの場合では、細胞透過性ペプチドおよび／またはヘパリン硫酸プロテオグリカン結合リガンドは、本開示の任意の標的指向リガンドと共に、ヘテロ二価エンドサイトーシストリガーとして使用される。ヘテロ二価標的指向リガンドは、標的指向リガンドのうちの１つからの親和性配列および異なる標的指向リガンドからのオルソステリック結合配列（例えば、所望のエンドサイトーシス輸送経路に関与することが知られているもの）を含み得る。

【０１６１】

アンカードメイン

いくつかの実施形態では、表面コートは、アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）にコンジュゲートされた標的指向リガンドを含む送達分子を含む（例えば、図１０、パネルＡ～Ｂを参照）。いくつかの場合では、標的指向リガンドは、例えば、活性を保存するために、標的指向リガンドの活性領域に対して遠位においてアンカードメインに（またはリンカーに）コンジュゲートされている。アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）は、反復カチオン性残基（例えば、アルギニン、リジン、ヒスチジン）を含み得る。いくつかの場合では、カチオン性アンカードメインは、３～３０アミノ酸（例えば、３～２８、３～２５、３～２４、３～２０、４～３０、４～２８、４～２５、４～２４、または４～２０アミノ酸）の範囲の長さを有する。いくつかの場合では、カチオン性アンカードメインは、４～２４アミノ酸の範囲の長さを有する。アンカードメイン（カチオン性アンカードメイン）の適切な例には、
RRRRRRRRR (9R)(SEQ ID NO: 15)およびHHHHHH (6H)(SEQ ID NO: 16)
が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６２】

いくつかの場合では、例えば標的指向リガンドがナノ粒子を所望の細胞／細胞表面タンパク質に標的指向するために使用されるように、主題の送達分子のアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）は、ナノ粒子の表面を送達分子でコーティングするためのアンカーとして使用される（例えば、図８、図９、および図１０を参照）。したがって、いくつかの場合では、アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）は、ナノ粒子の荷電脱落可能層と静電的に相互作用する。いくつかの場合では、安定化層は負電荷を有し、したがって正に荷電したアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）は安定化層と相互作用することができ、送達分子をナノ粒子に効果的に固定し、ナノ粒子表面を主題の標的指向リガンドでコーティングする（例えば、図８、図９、および図１０を参照）。

【０１６３】

標的指向リガンドのアンカードメインへのコンジュゲーションは、任意の便利な技術によって達成され得、多くの異なるコンジュゲーション化学が当業者に知られているであろう。いくつかの場合では、コンジュゲーションは、スルフヒドリル化学（例えば、ジスルフィド結合）を介する。いくつかの場合では、コンジュゲーションは、アミン反応性化学的性質（例えば、アンカードメイン中のアミノ酸残基からの側鎖上に存在するアミン）を使用して達成される。上記のように、標的指向リガンドは、システイン残基を含み得、これはコンジュゲーションを促進し得る。同様に、アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）は、システイン残基を含み得、これはコンジュゲーションを促進し得る。いくつかの場合では、標的指向リガンドおよびアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）は、同じポリペプチドの一部であることによってコンジュゲートされる。

【０１６４】

リンカー

いくつかの実施形態では、本開示による標的指向リガンドは、介在リンカーを介してアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）にコンジュゲートされている（例えば、図１０を参照）。リンカーは、タンパク質リンカーまたは非タンパク質リンカーであり得る。リンカーは、いくつかの場合では、安定化を補助し、補体活性化を防止し、かつ／またはアンカードメインに対する柔軟性をリガンドに提供する。

【０１６５】

標的指向リガンドのリンカーへのコンジュゲーションまたはリンカーの標的指向リガンドへのコンジュゲーションは、多数の異なる方法で達成され得る。いくつかの場合では、コンジュゲーションは、スルフヒドリル化学（例えば、２つのシステイン残基間のジスルフィド結合、例えば、図１０を参照）を介する。いくつかの場合では、コンジュゲーションは、アミン反応性化学的性質を使用して達成される。いくつかの場合では、標的指向リガンドがシステイン残基を含み、システイン残基を介してリンカーにコンジュゲートされ、かつ／またはアンカードメインがシステイン残基を含み、システイン残基を介してリンカーにコンジュゲートされている。いくつかの場合では、リンカーはペプチドリンカーであり、システイン残基を含む。いくつかの場合では、標的指向リガンドおよびペプチドリンカーは、同じポリペプチドの一部であることによってコンジュゲートされ、かつ／またはアンカードメインおよびペプチドリンカーは、同じポリペプチドの一部であることによってコンジュゲートされている。

【０１６６】

いくつかの場合では、主題のリンカーは、ポリペプチドであり、ポリペプチドリンカーと呼ばれ得る。ポリペプチドリンカーが企図される一方、いくつかの場合では非ポリペプチドリンカー（化学的リンカー）が使用されることが理解されるべきである。例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。適切なタンパク質リンカーには、４アミノ酸～６０アミノ酸長さ（例えば、４～５０、４～４０、４～３０、４～２５、４～２０、４～１５、４～１０、６～６０、６～５０、６～４０、６～３０、６～２５、６～２０、６～１５、６～１０、８～６０、８～５０、

８～４０、８～３０、８～２５、８～２０、または８～１５アミノ酸長）のポリペプチドが含まれる。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、主題のリンカーは剛性である（例えば、１つ以上のプロリン残基を含むリンカー）。剛性リンカーの１つの非限定的な例は、ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７）である。いくつかの場合では、ポリペプチドリンカーは、Ｎ末端またはＣ末端にＣ残基を含む。したがって、いくつかの場合では、剛性リンカーは、
GAPGAPGAPC (SEQ ID NO: 18) および CGAPGAPGAP (SEQ ID NO: 19)
から選択される。

【０１６８】

ある程度の柔軟性を有するペプチドリンカーを使用することができる。したがって、いくつかの場合では、主題のリンカーは、柔軟性がある。柔軟なリンカーは、一般に柔軟なペプチドをもたらす配列を有することを念頭に置いて、連結ペプチドは実質的に任意のアミノ酸配列を有し得る。グリシンおよびアラニンなどの小さなアミノ酸の使用は、柔軟なペプチドを作製するのに有用である。そのような配列の作製は、当業者には日常的である。多種多様なリンカーが市販されており、使用に適していると考えられる。リンカーポリペプチドの例には、グリシンポリマー（Ｇ）$_n$、グリシン－セリンポリマー（例えば、
$(GS)_n$, $GSGGS_n$ (SEQ ID NO: 20), $GGSGGS_n$ (SEQ ID NO: 21), および $GGGS_n$ (SEQ ID NO: 22)
を含み、ここで、ｎは少なくとも１の整数である）、グリシン－アラニンポリマー、アラニン－セリンポリマーが含まれる。例示的なリンカーには、
GGSG (SEQ ID NO: 23), GGSGG
(SEQ ID NO: 24), GSGSG (SEQ ID NO: 25), GSGGG (SEQ ID NO: 26), GGGSG (SEQ ID NO: 27), GSSSG (SEQ ID NO: 28)
等を含むがこれらに限定されないアミノ酸配列が含まれ得る。当業者は、上記の任意の要素にコンジュゲートしたペプチドの設計が、全体的または部分的に柔軟なリンカーを含み得、その結果リンカーが柔軟なリンカーならびに柔軟性の低い構造を付与する１つ以上の部分を含み得ることを認識するであろう。柔軟なリンカーのさらなる例には、
GGGGGSGGGGG (SEQ ID NO: 29) および GGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30)
が含まれるが、これらに限定されない。上記のように、いくつかの場合では、ポリペプチドリンカーは、Ｎ末端またはＣ末端にＣ残基を含む。したがって、いくつかの場合では、柔軟なリンカーは、
GGGGGSGGGGGC (SEQ ID NO: 31), CGGGGGSGGGGG (SEQ ID NO: 32),
GGGGGSGGGGSC (SEQ ID NO: 33), および CGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34)
から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１６９】

いくつかの場合では、主題のポリペプチドリンカーは、エンドソーム分解性である。エンドソーム分解性ポリペプチドリンカーには、ＫＡＬＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）およびＧＡＬＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６）が含まれるが、これらに限定されない。上記のように、いくつかの場合では、ポリペプチドリンカーは、Ｎ末端またはＣ末端にＣ残基を含む。したがって、いくつかの場合では、主題のリンカーは、
CKALA (SEQ ID NO: 37), KALAC (SEQ ID NO: 38), CGALA (SEQ ID NO: 39),
および GALAC (SEQ ID NO: 40)
から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１７０】

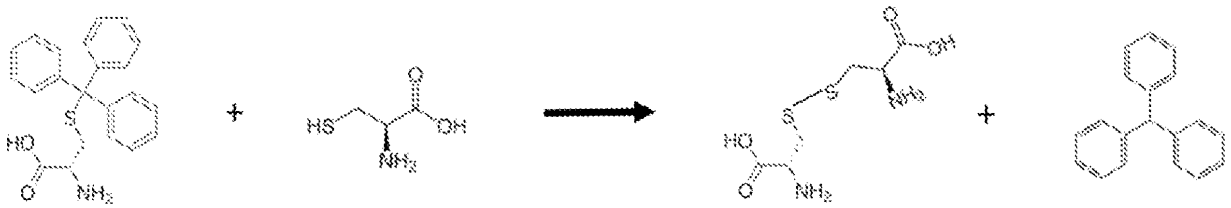
スルフヒドリルカップリング反応の実例
（例えば、スルフヒドリル化学による、例えばシステイン残基を使用した、コンジュゲーションのための）

（例えば、標的指向リガンドリンカーにコンジュゲートする、標的指向リガンドをアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）にコンジュゲートする、リンカーをアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）にコンジュゲートするなどのための）

【０１７１】

ジスルフィド結合

遊離スルフヒドリル基を含有する還元状態のシステイン残基は、典型的なジスルフィド交換反応において保護チオールと容易にジスルフィド結合を形成する。

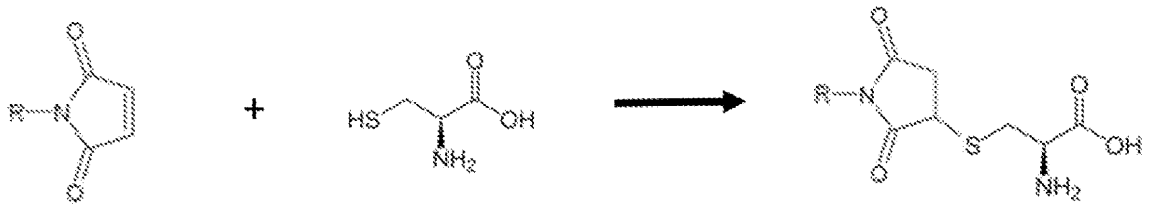


【０１７２】

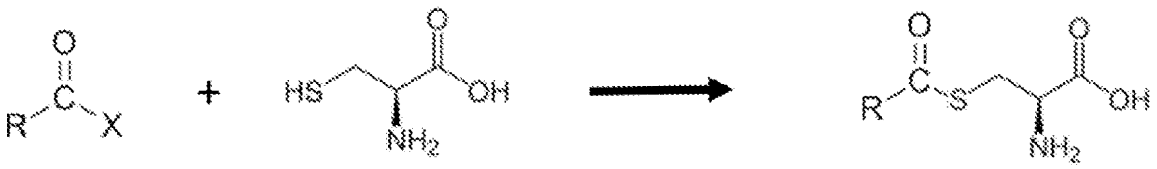
チオエーテル／チオエステル結合

システインのスルフヒドリル基は、マレイミドおよびハロゲン化アシル基と反応して、それぞれ安定なチオエーテルおよびチオエステル結合を形成する。

マレイミド



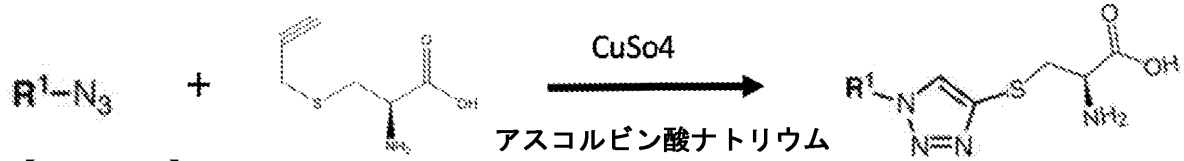
ハロゲン化アシル



【０１７３】

アジド－アルキン環状付加

このコンジュゲーションは、アルキン結合を含有するようにシステイン残基を化学的に修飾することによって、または合成ペプチド調製においてＬ－プロパルギルシステイン（以下に示す）を使用することによって容易になる。次いで、カップリングは、Ｃｕ促進クリックケミストリーによって達成される。



【０１７４】

標的指向リガンドの例

標的指向リガンド例としては、以下のアミノ酸配列が含まれるが、これらに限定されない。

ＳＣＦ（ｃ－Ｋｉｔ受容体を標的とする／に結合する）

EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSHCWISEMVVQLSDSLTDLLDKFS
NISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVV
ASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA (SEQ ID NO: 184)

；
ＣＤ７０（ＣＤ２７を標的とする／に結合する）
PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNH
TGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTT
LAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWV
RP (SEQ ID NO: 185)
；および
ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）（ＣＤ１５０を標的とする／に結合する）
SSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHGYIYT
YRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSSARSTQGTTGI
REDPDVCLKAP (SEQ ID NO: 186)

したがって、（単独で、または他の標的指向リガンドと組み合わせて使用され得る）標的指向リガンドの非限定的な例としては、以下が含まれる：

9R-SCF

RRRRRRRRR*M*EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSHCWISEMVVQL
SDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIF
NRSIDAFKDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA (SEQ ID NO: 189)

9R-CD70

RRRRRRRRRPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLG
WDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICS
STTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNT
DETFFGVQWVRP (SEQ ID NO: 190)

CD70-9R

PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNH
TGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTT
LAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWV
RP**RRRRRRRRR** (SEQ ID NO: 191)

6H-SH2D1A

*MGSS***HHHHHH***SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYC
LCVLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSS
ARSTQGTTGIREDPDVCLKAP (SEQ ID NO: 192)

6H-SH2D1A

RRRRRRRRR*SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCL
CVLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSS
ARSTQGTTGIREDPDVCLKAP (SEQ ID NO: 193)

【０１７５】
送達分子および構成要素の実例
（０ａ）システインコンジュゲーションアンカー１（ＣＣＡ１）
［アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－システイン］
RRRRRRRRR GAPGAPGAP C (SEQ ID NO: 41)
（０ｂ）システインコンジュゲーションアンカー２（ＣＣＡ２）
［システイン－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）］
C GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 42)
（１ａ）α５β１リガンド
［アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－標的指向リガンド］
RRRRRRRRR GAPGAPGAP RRETAWA (SEQ ID NO: 45)
（１ｂ）α５β１リガンド
［標的指向リガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）］
RRETAWA GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 46)
（１ｃ）α５β１リガンド－Ｃｙｓ左
CGAPGAPGAP (SEQ ID NO: 19)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（１ｄ）α５β１リガンド－Ｃｙｓ右
GAPGAPGAPC (SEQ ID NO: 18)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ２（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（２ａ）ＲＧＤ　α５β１リガンド
［アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－標的指向リガンド］
RRRRRRRRR GAPGAPGAP RGD (SEQ ID NO: 47)
（２ｂ）ＲＧＤ　ａ５ｂ１リガンド
［標的指向リガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）］
RGD GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 48)
（２ｃ）ＲＧＤリガンド－Ｃｙｓ左
　ＣＲＧＤ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）
　注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（２ｄ）ＲＧＤリガンド－Ｃｙｓ右
　ＲＧＤＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５０）
　注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ２（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（３ａ）トランスフェリンリガンド
［アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－標的指向リガンド］
RRRRRRRRR GAPGAPGAP THRPPMWSPVWP (SEQ ID NO: 51)
（３ｂ）トランスフェリンリガンド
［標的指向リガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）］
THRPPMWSPVWP GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 52)

（３ｃ）トランスフェリンリガンド－Ｃｙｓ左
CTHRPPMWSPVWP (SEQ ID NO: 53)

CPTHRPPMWSPVWP (SEQ ID NO: 54)

注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（３ｄ）トランスフェリンリガンド－Ｃｙｓ右
THRPPMWSPVWPC (SEQ ID NO: 55)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ２（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（４ａ）Ｅ－セレクチンリガンド［１～２１］
［アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－標的指向リガンド］
RRRRRRRRR GAPGAPGAP MIASQFLSALTLVLLIKESGA (SEQ ID NO: 56)
（４ｂ）Ｅ－セレクチンリガンド［１～２１］
［標的指向リガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）］
MIASQFLSALTLVLLIKESGA GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 57)
（４ｃ）Ｅ－セレクチンリガンド［１～２１］－Ｃｙｓ左
CMIASQFLSALTLVLLIKESGA (SEQ ID NO: 58)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（４ｄ）Ｅ－セレクチンリガンド［１～２１］－Ｃｙｓ右
MIASQFLSALTLVLLIKESGAC (SEQ ID NO: 59)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ２（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（５ａ）ＦＧＦフラグメント［２６～４７］
［アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－標的指向リガンド］
RRRRRRRRR GAPGAPGAP KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (SEQ ID NO: 60)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（５ｂ）ＦＧＦフラグメント［２６～４７］
［標的指向リガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）］
KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 61)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（５ｃ）ＦＧＦフラグメント［２５～４７］－左のＣｙｓは天然
CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (SEQ ID NO: 43)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（５ｄ）ＦＧＦフラグメント［２６～４７］－Ｃｙｓ右
KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSC (SEQ ID NO: 44)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ２（上記を参照）にコンジュゲートし得る。
（６ａ）エキセンディン（Ｓ１１Ｃ）［１～３９］
HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2)
注：これは、スルフヒドリル化学的性質（例えば、ジスルフィド結合）またはアミン反応性化学的性質のいずれかを介して、ＣＣＡ１（上記を参照）にコンジュゲートし得る。

【０１７６】
多価表面コート
いくつかの場合では、表面コートは、（任意の所望の組み合わせで）、（ｉ）上記のポリマーのいずれか１つ以上、（ｉｉ）１つ以上の標的指向リガンド、１つ以上のＣＰＰ、および１つ以上のヘプタペプチドのうちのいずれか１つ以上を含む。例えば、いくつかの場合では、表面コートは、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上）の標的指向リガンドを含み得るが、上記のカチオン性ポリマーのうちの１つ以上もまた含み得る。いくつかの場合では、表面コートは、１つ以上（例えば、２つ以上、３つ以上）の標的指向リガンドを含み得るが、１つ以上のＣＰＰもまた含み得る。
【０１７７】
いくつかの場合では、表面コートは、ＣＤ３４およびヘパリン硫酸プロテオグリカンへの標的指向された結合を提供する標的指向リガンドの組み合わせを含む。例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン）を表面コートの一部として使用して、ヘパリン硫酸プロテオグリカンへの標的指向された結合を提供することができる。したがって、いくつかの場合では、ナノ粒子をカチオン性ポリマー（例えば、ポリ（Ｌ－アルギニン））で表面コーティングした後に、コーティングされたナノ粒子はヒアルロン酸とともにインキュベートされ、それによって双性イオン性多価表面を形成する。
【０１７８】
いくつかの実施形態では、表面コートは、多価である。多価表面コートは、２つ以上の標的指向リガンド（例えば、異なるリガンドを含む２つ以上の送達分子）を含むものである。多量体（この場合は三量体）の表面コート（外殻）の例は、（これはＣＤ１１７としても知られるｃ－Ｋｉｔ受容体を標的とする）標的指向リガンド幹細胞因子（ＳＣＦ）、（ＣＤ２７を標的とする）ＣＤ７０、および（ＣＤ１５０を標的とする）ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）を含むものである。例えば、いくつかの場合では、造血幹細胞（ＨＳＣ）［ＫＬＳ（ｃ－Ｋｉｔ$^{+}$Ｌｉｎ$^{-}$Ｓｃａ－１$^{+}$）およびＣＤ２７$^{+}$／ＩＬ－７Ｒａ$^{-}$／ＣＤ１５０$^{+}$／ＣＤ３４$^{-}$］を標的指向するために、主題のナノ粒子は、それぞれｃ－Ｋｉｔ、ＣＤ２７、およびＣＤ１５０を標的指向する標的指向リガンドＳＣＦ、ＣＤ７０、およびＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）の組み合わせを含む表面コートを含む（例えば、表１を参照）。いくつかの場合では、そのような表面コートは、他のリンパ球および骨髄前駆細胞よりも、ＨＳＰＣおよび長期ＨＳＣ（ｃ－Ｋｉｔ＋／Ｌｉｎ－／Ｓｃａ－１＋／ＣＤ２７＋／ＩＬ－７Ｒａ－／ＣＤ１５０＋／ＣＤ３４－）を選択的に標的指向することができる。
【０１７９】
いくつかの例示的な実施形態では、３つ全ての標的指向リガンド（ＳＣＦ、ＣＤ７０、およびＳＨ２Ｄ１Ａ）は、カチオン性アンカードメイン（例えば、６Ｈなどのポリ－ヒスチジン、９Ｒなどのポリ－アルギニンなど）への融合によってナノ粒子に固定されている。例えば、（１）標的指向ポリペプチドＳＣＦ（ｃ－Ｋｉｔ受容体を標的とする）は、

X*M*EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSHCWISEMVVQLSDSLTDLLD
KFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKD
FVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA**X** (SEQ ID NO: 194)

（Ｘは、例えば、いくつかの場合では、Ｎ末端および／またはＣ末端に存在し得るか、またはポリペプチド配列に埋め込まれ得る、カチオン性アンカードメイン（例えば、６Ｈなどのポリ－ヒスチジン、９Ｒなどのポリ－アルギニンなど）である）を含み得、（２）標的指向ポリペプチドＣＤ７０（ＣＤ２７を標的とする）は、

XPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLN
HTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPT
TLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWV
RP**X** (SEQ ID NO: 195)

（Ｘは、例えば、いくつかの場合では、Ｎ末端および／またはＣ末端に存在し得るか、またはポリペプチド配列に埋め込まれ得る、カチオン性アンカードメイン（例えば、６Ｈなどのポリ－ヒスチジン、９Ｒなどのポリ－アルギニンなど）である）を含み得、かつ（３）標的指向ポリペプチドＳＨ２Ｄ１Ａ（ＣＤ１５０を標的とする）は、

X*SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHGYIY

TYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSS*ARSTQGTTG*

IREDPDVCLKAP (SEQ ID NO: 196)

（Ｘは、例えば、いくつかの場合ではＮ末端および／もしくはＣ末端に存在し得るか、またはポリペプチド配列に埋め込まれ得る（例えば、

*MGSS***X***SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLY

HGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSSARST

QGTTGIREDPDVCLKAP (SEQ ID NO: 197)

など）、カチオン性アンカードメイン（例えば、６Ｈなどのポリ－ヒスチジン、９Ｒなどのポリ－アルギニン）である）を含み得る。

【０１８０】

上記のように、本開示のナノ粒子は、所望の細胞型を標的指向するために、または細胞型の所望の組み合わせを標的指向するために、複数の標的指向リガンド（表面コートの一部として）を含み得る。マウスおよびヒト造血細胞内の目的の細胞の例は、それらの細胞について同定されたマーカーと共に図１７（パネルＡ～Ｂ）に示されている。例えば、目的の細胞表面マーカーの様々な組み合わせの例としては、［マウス］（ｉ）ＣＤ１５０；（ｉｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０；（ｉｉｉ）ＣＤ１５０およびＣＤ４９ｂ；（ｉｖ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０、およびＣＤ４９ｂ；（ｖ）ＣＤ１５０およびＦｌｔ３；（ｖｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０、およびＦｌｔ３；（ｖｉｉ）Ｆｌｔ３およびＣＤ３４；（ｖｉｉｉ）Ｆｌｔ３、ＣＤ３４、Ｓｃａ１、およびｃＫｉｔ；（ｉｘ）Ｆｌｔ３およびＣＤ１２７；（ｘ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ３、およびＣＤ１２７；（ｘｉ）ＣＤ３４；（ｘｉｉ）ｃＫｉｔおよびＣＤ３４；（ｘｉｉｉ）ＣＤ１６／３２およびＣＤ３４；（ｘｉｖ）ｃＫｉｔ、ＣＤ１６／３２、およびＣＤ３４；（ｘｖ）ｃＫｉｔ；ならびに［ヒト］（ｉ）ＣＤ９０およびＣＤ４９ｆ；（ｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ９０、およびＣＤ４９ｆ；（ｉｉｉ）ＣＤ３４、（ｉｖ）ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ１０；（ｖ）ＣＤ３４、ＣＤ４５ＲＡ、およびＣＤ１０；（ｖｉ）ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ１３５；（ｖｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４５ＲＡ、およびＣＤ１３５；（ｖｉｉｉ）ＣＤ１３５；（ｉｘ）ＣＤ３４、ＣＤ３８、およびＣＤ１３５；（ｘ）ＣＤ３４およびＣＤ３８が含まれるが、これらに限定されない。したがって、いくつかの場合では、表面コートは、［マウス］（ｉ）ＣＤ１５０；（ｉｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０；（ｉｉｉ）ＣＤ１５０およびＣＤ４９ｂ；（ｉｖ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０、およびＣＤ４９ｂ；（ｖ）ＣＤ１５０およびＦｌｔ３；（ｖｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０、およびＦｌｔ３；（ｖｉｉ）Ｆｌｔ３およびＣＤ３４；（ｖｉｉｉ）Ｆｌｔ３、ＣＤ３４、Ｓｃａ１、およびｃＫｉｔ；（ｉｘ）Ｆｌｔ３およびＣＤ１２７；（ｘ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ３、およびＣＤ１２７；（ｘｉ）ＣＤ３４；（ｘｉｉ）ｃＫｉｔおよびＣＤ３４；（ｘｉｉｉ）ＣＤ１６／３２およびＣＤ３４；（ｘｉｖ）ｃＫｉｔ、ＣＤ１６／３２、およびＣＤ３４；ならびに（ｘｖ）ｃＫｉｔ；ならびに［ヒト］（ｉ）ＣＤ９０およびＣＤ４９ｆ；（ｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ９０、およびＣＤ４９ｆ；（ｉｉｉ）ＣＤ３４、（ｉｖ）ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ１０；（ｖ）ＣＤ３４、ＣＤ４５ＲＡ、およびＣＤ１０；（ｖｉ）ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ１３５；（ｖｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４５ＲＡ、およびＣＤ１３５；（ｖｉｉｉ）ＣＤ１３５；（ｉｘ）ＣＤ３４、ＣＤ３８、およびＣＤ１３５；ならびに（ｘ）ＣＤ３４およびＣＤ３８から選択される表面タンパク質または表面タンパク質の組み合わせへの標的指向された結合を提供する１つ以上の標的指向リガンドを含む。主題のナノ粒子は１つ超の標的指向リガンドを含むことができるため、

かついくつかの細胞は重複するマーカーを含むため、表面コートの組み合わせを使用して複数の異なる細胞型を標的指向することができ、例えば、いくつかの場合では、表面コートは、１つの特定の細胞型を標的指向し得る一方、他の場合では、表面コートは、１つ超の特定の細胞型（例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上の細胞型）を標的指向し得る。例えば、造血細胞系内の細胞の任意の組み合わせを標的指向することができる。実例として、（ＣＤ３４への標的指向された結合を提供する標的指向リガンドを使用して）ＣＤ３４を標的指向することは、造血系統内のいくつかの異なる細胞へのペイロードのナノ粒子送達をもたらし得る（例えば、図１７、パネルＡおよびＢを参照）。

【０１８１】

ｉｖ．送達

核酸、タンパク質、またはリボ核タンパク質ペイロードを細胞に送達する方法が提供される。上記のように、いくつかの場合では、ペイロードは遺伝子編集ツールを含む。したがって、いくつかの場合では、主題の方法は、いくつかの場合ではドナーＤＮＡテンプレートの存在下で実施された場合に相同性指向修復をもたらす、部位特異的ゲノム編集を実施するために使用される。

【０１８２】

そのような方法は、細胞を主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）と接触させる工程を含む。主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）は、ペイロードを任意の所望の真核生物標的細胞に送達するために使用され得る。いくつかの場合では、標的細胞は、哺乳動物細胞（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、有蹄動物、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ラクダ、ウサギ、イヌ（犬）、ネコ（猫）、霊長類、非ヒト霊長類、またはヒトの細胞）である。任意の細胞型が標的指向され得、いくつかの場合では、特定の細胞の特定の標的指向は、例えば、表面コートの一部としての標的指向リガンドの存在に依存し、標的指向リガンドは、特定の細胞型への標的指向結合を提供する。例えば、標的指向され得る細胞には、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、長期ＨＳＣ、短期ＨＳＣ、造血前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞（例えば、ＨＵＤＥＰ細胞）、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵臓細胞、膵臓β島細胞、筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、および胃の細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【０１８３】

様々な用途の例（例えば、ニューロン、膵臓の細胞、造血幹細胞および多分化能前駆体などを標的指向するためのもの）は、例えば、標的指向リガンドの文脈において上記されている。例えば、造血幹細胞および多分化能前駆体は、インビボでの遺伝子編集（例えば、挿入）のために標的指向され得る。インビボでの１％の骨髄細胞（約１５０億個の細胞）の編集でさえ、エクスビボでの治療（約１００億個の細胞）よりも多くの細胞を標的指向する。別の例として、膵臓細胞（例えば、β島細胞）は、例えば、膵臓癌を治療するため、糖尿病などを治療するために標的指向され得る。別の例として、（例えば、ハンチントン病、パーキンソン病（例えば、ＬＲＲＫ２変異）、およびＡＬＳ（例えば、ＳＯＤ１変異）などの適応症を治療するために）ニューロンなどの脳内の体細胞が標的指向され得る。いくつかの場合では、これは直接の頭蓋内注射によって達成され得る。

【０１８４】

別の例として、内皮細胞および造血系の細胞（例えば、巨核球および／または巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多分化能前駆体（ＭＰＰ）などの巨核球の上流の任意の前駆細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、例えば、図１７を参照）は、フォンヴ

ィレブランド病を治療するための主題のナノ粒子（または対照のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）で標的指向され得る。例えば、フォンヴィレブランド因子（ＶＷＦ）をコードする遺伝子における変異を有する細胞（例えば、内皮細胞、巨核球ならびに／またはＭＥＰ、ＣＭＰ、ＭＰＰ、ＨＳＣ、例えば、ＳＴ－ＨＳＣ、ＩＴ－ＨＳＣ、および／もしくはＬＴ－ＨＳＣなどの巨核球の上流の任意の前駆細胞）を標的指向して（インビトロ、エクスビボ、インビボ）、活性タンパク質を導入し（例えば、機能的ＶＷＦタンパク質および／または機能的ＶＷＦタンパク質をコードする核酸の送達を介して）、かつ／または例えば置換配列を導入する（例えば、遺伝子編集ツールの送達およびＤＮＡドナーテンプレートの送達を介して）ことによって変異遺伝子を編集することができる。上記の場合のいくつかでは（例えば、フォンヴィレブランド病の治療に関する場合、ＶＷＦをコードする遺伝子における変異を有する細胞の標的指向に関する場合）、主題の標的指向リガンドは、Ｅ－セレクチンへの標的指向された結合を提供する。

【０１８５】

別の例として、幹細胞系統の細胞（例えば、造血系統の幹細胞および／または前駆細胞、例えば、ＧＭＰ、ＭＥＰ、ＣＭＰ、ＭＬＰ、ＭＰＰ、および／またはＨＳＣ）は、細胞内で幹細胞因子（ＳＣＦ）の発現を増加させるために主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）で標的指向され得、それにより標的細胞の増殖を促進することができる。例えば、主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）は、ＳＣＦおよび／またはＳＣＦをコードする核酸（ＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）を標的細胞に送達するために使用され得る。

【０１８６】

本開示の方法および組成物は、既知の原因となる変異、例えばゲノム中の変異に関連する任意の疾患を含む、任意の数の疾患を治療するために使用され得る。例えば、本開示の方法および組成物は、鎌状赤血球症、βサラセミア、ＨＩＶ、骨髄異形成症候群、ＪＡＫ２媒介性真性赤血球増加症、ＪＡＫ２媒介性原発性骨髄線維症、ＪＡＫ２媒介性白血病、および様々な血液障害を治療するために使用され得る。さらなる非限定的な例として、本開示の方法および組成物はまた、Ｂ細胞抗体生成、免疫療法（例えば、チェックポイント遮断試薬の送達）、および幹細胞分化適用のために使用され得る。

【０１８７】

上記のように、いくつかの実施形態において、標的指向リガンドは、ＫＬＳ　ＣＤ２７＋／ＩＬ－７Ｒａ－／ＣＤ１５０＋／ＣＤ３４－造血前駆細胞（ＨＳＰＣ）への標的指向された結合を提供する。例えば、ＢＣＬ１１ａ転写因子の発現を破壊し、その結果として胎児ヘモグロビンを生成するために、（本明細書の他の場所に記載の）遺伝子編集ツール（複数可）が導入され得る。別の例として、ベータグロビン（ＨＢＢ）遺伝子は、対応する相同性指向修復ドナーテンプレートを用いて変化したＥ７Ｖ置換を修正するために直接標的指向され得る。一つの実例として、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、ＨＢＢ遺伝子中の遺伝子座に結合し、ゲノム中に二本鎖または一本鎖の切断を生成し、ゲノム修復を開始するような適切なガイドＲＮＡで送達され得る。いくつかの場合では、ＤＮＡドナーテンプレート（一本鎖または二本鎖）は、（ペイロードの一部として）導入され、１４～３０日間放出される一方、ガイドＲＮＡ／ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質複合体（リボ核タンパク質複合体が）は、１～７日間の期間にわたって放出され得る。いくつかの場合では、ペイロードは、例えば、相同指向修復（ＨＤＲ）を促進し、インデル形成を制限するために使用され得る、ｋｕ７０またはｋｕ８０に対するｓｉＲＮＡを含み得る。いくつかの場合では、ヌクレアーゼ媒介部位特異的切断後のドナー鎖のＨＤＲ駆動挿入を促進するために、ＳＩＲＴ６に対するｍＲＮＡが１４～３０日間にわたって放出される。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、標的指向リガンドは、Ｔ細胞受容体を修飾するために、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞、造血前駆細胞（ＨＳＰＣ）、または末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）への標的指向された結合を提供する。例えば、（本明細書の他の場所に記載の）遺伝

子編集ツール（複数可）は、Ｔ細胞受容体を修飾するために導入され得る。Ｔ細胞受容体は、直接標的指向され得、新規のＴ細胞受容体のための対応する相同性指向修復ドナーテンプレートで置換され得る。一例として、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド（例えば、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、ＴＣＲ遺伝子中の遺伝子座に結合し、ゲノム中に二本鎖または一本鎖の切断を生成し、ゲノム修復を開始するような適切なガイドＲＮＡで送達され得る。いくつかの場合では、ＤＮＡドナーテンプレート（一本鎖または二本鎖）は、ＨＤＲのために（ペイロードの一部として）導入される。βグロビン、ＣＣＲ５、Ｔ細胞受容体、もしくは任意の他の目的の遺伝子を標的指向する他のＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡおよびＨＤＲドナー配列、ならびに／または他の発現ベクターが、本開示に従って使用され得ることは当業者には明らかであろう。

【０１８９】

いくつかの場合では、細胞を主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）と接触させる場合、接触は、インビトロであり（例えば、細胞は培養中である）、例えば、細胞は、確立された組織培養細胞株の細胞であり得る。いくつかの場合では、接触は、エクスビボである（例えば、細胞は、個体、例えば患者から単離された初代細胞（または最近の子孫）である）。いくつかの場合では、細胞は、インビボであり、したがって生物（の一部）の内部にある。インビボ接触の例として、いくつかの場合では、接触工程は、個体への主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）の投与を含む。

【０１９０】

主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）は、以下の経路：全身的、局所的、非経口的、皮下（ｓｃ）、静脈内（ｉｖ）、頭蓋内（ｉｃ）、脊髄内、眼内、皮内（ｉｄ）、筋肉内（ｉｍ）、リンパ内（ｉｌ）、または脊髄液中のいずれかを介して対象に導入され得る（すなわち、個体に投与され得る）。主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）は、注射（例えば、全身注射、直接局所注射、腫瘍内および／または腫瘍切除部位への局所注射など）、カテーテルなどによって導入され得る。局所送達（例えば、腫瘍および／または癌部位への送達）のための方法の例には、例えば、関節、腫瘍、もしくは臓器、または関節、腫瘍、もしくは臓器の近くへの注射器によるボーラス注射、例えば、対流を伴う、例えばカニューレ挿入による連続注入が含まれる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第２００７／０２５４８４２号を参照）。

【０１９１】

対象への治療の投与回数は異なり得る。主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）を個体に導入することは、一度限りの事象であり得るが、特定の状況では、そのような治療は限られた期間の間改善を引き出し得、継続的な一連の繰り返しの治療を必要とする。他の状況では、効果が観察される前に、主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）の複数回投与が必要とされ得る。当業者には容易に理解されるように、正確なプロトコルは、疾患または状態、疾患の段階および治療されている個体のパラメータに依存する。

【０１９２】

「治療有効用量」または「治療用量」は、所望の臨床結果をもたらす（すなわち、治療有効性を達成する）のに十分な量である。治療有効用量は、１回以上の投与で投与され得る。本開示の目的のために、主題のナノ粒子（または主題のウイルスもしくは非ウイルス送達ビヒクル）の治療有効用量は、個体に投与された場合に、病状／疾患の進行を緩和、改善、安定化、逆転、予防、遅延または遅らせるのに十分な量である。

【０１９３】

例示的な治療的介入は、宿主ゲノムに組み込まれている任意のレトロウイルスＤＮＡを除去することに加えて、ＨＩＶ感染に対する耐性を生み出すものである。Ｔ細胞は、ＨＩＶによって直接影響を受けるので、二重誘導ヌクレアーゼを送達するためにＣＤ３４＋およびＣＤ４５＋細胞のためのハイブリッド血液標的指向戦略が探求され得る。ＨＳＣおよ

びＴ細胞を同時に標的指向し、複数の誘導型ヌクレアーゼ（例えば、単一粒子内）を介してＣＣＲ５－Δ３２およびｇａｇ／ｒｅｖ／ｐｏｌ遺伝子にアブレーションを送達することによって、普遍的なＨＩＶ治療法を、患者の生涯を通じて持続的に作り出すことができる。

【０１９４】

ｖ．共送達（必ずしも本開示のナノ粒子ではない）

上記のように、同じパッケージの一部として複数のペイロードを送達することの１つの利点は、各ペイロードの効率が希薄されないことである。そのため、いくつかの実施形態では、ゲノム編集効率を高めるタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）ならびに／または非コードＲＮＡと組み合わせて（例えば、同じパッケージ／送達ビヒクルの一部として（この送達ビヒクルは本開示のナノ粒子である必要はない）の一部として）、１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、上記のような）が送達される。いくつかの実施形態では、細胞分裂および／または分化を制御するタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）ならびに／または非コードＲＮＡと組み合わせて（例えば、同じパッケージ／送達ビヒクルの一部として（この送達ビヒクルは本開示のナノ粒子である必要はない）の一部として）、１つ以上の遺伝子編集ツールが送達される。例えば、いくつかの場合では、細胞分裂を制御するタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）ならびに／または非コードＲＮＡと組み合わせて（例えば、同じパッケージ／送達ビヒクルの一部として（この送達ビヒクルは本開示のナノ粒子である必要はない）の一部として）、１つ以上の遺伝子編集ツールが送達される。いくつかの場合では、分化を制御するタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）ならびに／または非コードＲＮＡと組み合わせて（例えば、同じパッケージ／送達ビヒクルの一部として（この送達ビヒクルは本開示のナノ粒子である必要はない）の一部として）、１つ以上の遺伝子編集ツールが送達される。いくつかの場合では、細胞ＤＮＡ修復機構を非相同末端結合（ＮＨＥＪ）もしくは相同性指向修復（ＨＤＲ）に偏らせるタンパク質（および／またはそれをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）ならびに／または非コードＲＮＡと組み合わせて（例えば、同じパッケージ／送達ビヒクルの一部として（この送達ビヒクルは本開示のナノ粒子である必要はない）の一部として）、１つ以上の遺伝子編集ツールが送達される。

【０１９５】

上記のように、いくつかの場合では、送達ビヒクルは本開示のナノ粒子である必要はない。例えば、いくつかの場合では、送達ビヒクルはウイルス性であり、いくつかの場合では、送達ビヒクルは非ウイルス性である。非ウイルス送達系の例としては、複数の核酸ペイロード、またはタンパク質および核酸ペイロードの組み合わせを共縮合するために使用され得る材料が含まれる。例としては、（１）双性またはカチオン性脂質などの脂質系粒子、およびエキソソームまたはエキソソーム由来の小胞、（２）核酸および／またはタンパク質ペイロードと共縮合したイオン性複合体、ならびにＣａ、Ｍｇ、Ｓｉ、Ｆｅのカチオン性イオン状態、およびO^{2-}、ＯＨ、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}などの生理学的アニオンから縮合され得る複合体を含むものなどの無機／ハイブリッド複合体粒子、（３）シクロデキストリンおよび／またはアルギネートなどの炭水化物送達ビヒクル、（４）ポリ（アミノ酸）系静電的複合体、ポリ（アミド－アミン）、およびカチオン性ポリ（Ｂ－アミノエステル）などの重合および／または共重合錯体、ならびに（５）Ｌｉ２０１６人工ウイルスなどのウイルス様粒子（例えば、タンパク質および核酸系）が含まれるが、これらに限定されない。ウイルス送達系の例としては、ＡＡＶ、アデノウイルス、レトロウイルス、およびレンチウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

【０１９６】

共送達のためのペイロードの例

いくつかの実施形態では、１つ以上の遺伝子編集ツールは、ＳＣＦ（および／またはＳＣＦをコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ＨｏｘＢ４（および／またはＨｏｘＢ４をコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ＢＣＬ－ＸＬ（および／またはＢＣＬ－ＸＬをコ

ードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ＳＩＲＴ６（および／またはＳＩＲＴ６をコードするＤＮＡもしくはｍＲＮＡ）、ｍｉＲ－１５５を抑制する核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡおよび／またはＬＮＡ）、ｋｕ７０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、およびｋｕ８０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ）のうちの１つ以上と組み合わせて（例えば、同じパッケージ／送達ビヒクル（この送達ビヒクルは本開示のナノ粒子である必要はない）の一部として）送達され得る。

【０１９７】

一緒に送達され得るマイクロＲＮＡ（ＲＮＡまたはＲＮＡをコードするＤＮＡとして送達される）の例については、図１８Ａを参照。例えば、以下のマイクロＲＮＡを以下の目的に使用することができる：多能性幹細胞の外胚葉系への分化を阻止：ｍｉＲ－４３０／４２７／３０２；多能性幹細胞の内胚葉系への分化を阻止：ｍｉＲ－１０９および／またはｍｉＲ－２４；多能性幹細胞の内胚葉系への分化を促進：ｍｉＲ－１２２および／またはｍｉＲ－１９２；外胚葉前駆細胞のケラチノサイト運命への分化を促進：ｍｉＲ－２０３；神経堤幹細胞の平滑筋運命への分化を促進：ｍｉＲ－１４５；神経幹細胞のグリア細胞運命へおよび／またはニューロン運命への分化を促進：ｍｉＲ－９および／またはｍｉＲ－１２４ａ；中胚葉前駆細胞の軟骨細胞運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１９９ａ；中胚葉前駆細胞の骨芽細胞運命への分化を促進：ｍｉＲ－２９６および／またはｍｉＲ－２８６１；中胚葉前駆細胞の心筋運命への分化を促進：ｍｉＲ－１；中胚葉前駆細胞の心筋運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１３３；中胚葉前駆細胞の骨格筋運命への分化を促進：ｍｉＲ－２１４、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－１、および／またはｍｉＲ－２６ａ；中胚葉前駆細胞の骨格筋運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－２２１、および／またはｍｉＲ－２２２；造血前駆細胞の分化を促進：ｍｉＲ－２２３；造血前駆細胞の分化を阻止：ｍｉＲ－１２８ａおよび／またはｍｉＲ－１８１ａ；造血前駆細胞のリンパ球前駆細胞への分化を促進：ｍｉＲ－１８１；造血前駆細胞のリンパ球前駆細胞への分化を阻止：ｍｉＲ－１４６；造血前駆細胞の骨髄前駆細胞への分化を阻止：ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２４ａ、および／またはｍｉＲ－１７；リンパ球前駆細胞のＴ細胞運命への分化を促進：ｍｉＲ－１５０；骨髄前駆細胞の顆粒球運命への分化を阻止：ｍｉＲ－２２３；骨髄前駆細胞の単球運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－２０ａ、および／またはｍｉＲ－１０６ａ；骨髄前駆細胞の赤血球運命への分化を阻止：ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２２１、および／またはｍｉＲ－２２２；ならびに、骨髄前駆細胞の赤血球運命への分化を促進：ｍｉＲ－４５１および／またはｍｉＲ－１６。

【０１９８】

１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、本明細書の他の場所に記載される）と一緒に送達され得るシグナル伝達タンパク質（例えば、細胞外シグナル伝達タンパク質）の例については、図１８Ｂを参照。例えば、以下のシグナル伝達タンパク質（例えば、細胞外シグナル伝達タンパク質）（例えば、タンパク質として、またはタンパク質をコードするＤＮＡもしくはＲＮＡなどの核酸として送達される）を以下の目的に使用することができる：造血幹細胞のリンパ球共通前駆細胞系への分化を促進：ＩＬ－７；造血幹細胞の骨髄共通前駆細胞系への分化を促進：ＩＬ－３、ＧＭ－ＣＳＦ、および／またはＭ－ＣＳＦ；リンパ球共通前駆細胞のＢ細胞運命への分化を促進：ＩＬ－３、ＩＬ－４、および／またはＩＬ－７；リンパ球共通前駆細胞のナチュラルキラー細胞運命への分化を促進：ＩＬ－１５；リンパ球共通前駆細胞のＴ細胞運命への分化を促進：ＩＬ－２、ＩＬ－７、および／またはＮｏｔｃｈ；リンパ球共通前駆細胞の樹状細胞運命への分化を促進：Ｆｌｔ－３リガンド；骨髄共通前駆細胞の樹状細胞運命への分化を促進：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ、および／またはＴＮＦ－アルファ；骨髄共通前駆細胞の顆粒球－マクロファージ前駆細胞系への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦ；骨髄共通前駆細胞の巨核球－赤血球前駆細胞系への分化を促進：ＩＬ－３、ＳＣＦ、および／またはＴｐｏ；巨核球－赤血球前駆細胞の巨核球運命への分化を促進：ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＳＣＦ、および／またはＴｐｏ；巨核球－赤血球前駆細胞の赤血球運命への分化を促進：エリスロポエチン；巨核球の血小板運

命への分化を促進：ＩＬ－１１および／またはＴｐｏ；顆粒球－マクロファージ前駆細胞の単球への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦおよび／またはＭ－ＣＳＦ；顆粒球－マクロファージ前駆細胞の骨髄芽球系への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦ；単球の単球由来樹状細胞運命への分化を促進：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－アルファ、および／またはＩＬ－４；単球のマクロファージ運命への分化を促進：ＩＦＮ－ガンマ、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、および／またはＭ－ＣＳＦ；骨髄芽球の好中球運命への分化を促進：Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－６、および／またはＳＣＦ；骨髄芽球の好酸球運命への分化を促進：ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３、および／またはＩＬ－５；ならびに骨髄芽球の好塩基性運命への分化を促進：Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、および／またはＩＬ－３。

【０１９９】

１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、本明細書の他の場所に記載される）と一緒に送達することができるタンパク質（例えば、タンパク質をコードするＤＮＡもしくはＲＮＡのようなタンパク質および／または核酸として）の例には、ＳＯＸ１７、ＨＥＸ、ＯＳＫＭ（Ｏｃｔ４／Ｓｏｘ２／Ｋｌｆ４／ｃ－ｍｙｃ）、および／またはｂＦＧＦ（例えば、幹細胞系への分化を促進する）；ＨＮＦ４ａ（例えば、肝細胞運命への分化を促進）；ポリ（Ｉ：Ｃ）、ＢＭＰ－４、ｂＦＧＦ、および／または８－Ｂｒ－ｃＡＭＰ（例えば、内皮幹細胞／前駆細胞系への分化を促進）；ＶＥＧＦ（例えば、動脈内皮細胞運命への分化を促進）；Ｓｏｘ－２、Ｂｒｎ４、Ｍｙｔ１ｌ、Ｎｅｕｒｏｄ２、Ａｓｃｌ１（例えば、神経幹細胞／前駆細胞系への分化を促進）；ならびにＢＤＮＦ、ＦＣＳ、Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ、および／またはＳＨＨ（例えば、ニューロン、アストロサイト、および／またはオリゴデンドロサイト運命への分化を促進）が含まれるがこれらに限定されない。

【０２００】

１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、本明細書の他の場所に記載される）と一緒に（例えば、タンパク質をコードするＤＮＡもしくはＲＮＡのようなタンパク質および／または核酸として）送達することができるシグナル伝達タンパク質（例えば、細胞外シグナル伝達タンパク質）の例には、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２および／またはＩＬ－１５、例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞を活性化するため）；Ｎｏｔｃｈ、Ｗｎｔ、および／もしくはＳｍａｄシグナル伝達経路の１つ以上を調節するリガンドおよびまたはシグナル伝達タンパク質；ＳＣＦ；幹細胞分化因子（例えば、Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃなど）；ならびにその後の単離／精製／濃縮のための一時的表面マーカー「タグ」および／または蛍光レポーターが含まれるがこれらに限定されない。例えば、線維芽細胞は、Ｓｏｘ２の送達を介して神経幹細胞に変換され得る一方、それは、Ｏｃｔ３／４および小分子「エピジェネティックリセット因子」の存在下で心筋細胞に変わるであろう。ハンチントン病またはＣＸＣＲ４突然変異を有する患者では、これらの線維芽細胞はニューロンおよび心臓細胞に関連する罹患表現型形質をそれぞれコードし得る。遺伝子編集の修正とこれらの要素とを単一のパッケージで提供することによって、１つ以上しかしすべてではない要素／ペイロードに起因する有害な影響のリスクが導入されることを大幅に減らすことができる。

【０２０１】

用途には、遺伝子編集が成功しないことが細胞死のきっかけとなり得、かつ細胞分化／増殖／活性化が組織／器官特異的プロモーターおよび／または外因性因子に結び付けられるインビボアプローチが含まれる。遺伝子編集を受ける罹患細胞は活性化および増殖し得るが、別のプロモーター駆動発現カセット（例えば、ｐ２１またはｐ５３のような腫瘍抑制因子の不在に関連する）の存在によって、それらの細胞はその後排除される。一方、所望の特性を発現する細胞は、所望の下流系統へとさらに分化するように誘発され得る。

【０２０２】

ｖｉ．キット

キットもまた本開示の範囲内である。例えば、いくつかの場合では、主題のキットは、（ｉ）標的指向リガンド、（ｉｉ）リンカー、（ｉｉｉ）リンカーにコンジュゲートした標的指向リガンド、（ｉｖ）アンカードメインにコンジュゲートした標的指向リガンド（

例えば、リンカーを有するまたはリンカーを有さない）、（ｖ）脱落可能層として使用するための薬剤（例えば、シリカ）、（ｖｉ）ペイロード、例えば、ｓｉＲＮＡ、またはｓｉＲＮＡもしくはｓｈＲＮＡの転写テンプレート、遺伝子編集ツールなど、（ｖｉｉ）カチオン性ポリマーとして使用することができるポリマー、（ｖｉｉｉ）アニオン性ポリマーとして使用することができるポリマー、（ｉｘ）カチオン性ポリペプチドとして使用することができるポリペプチド、例えば１つ以上のＨＴＰ、および（ｘ）主題のウイルス性または非ウイルス性送達ビヒクルのうちの１つ以上（任意の組み合わせで）を含むことができる。いくつかの場合では、主題のキットは使用説明書を含むことができる。キットは、典型的には、キットの内容物の意図された用途を示すラベルを含む。ラベルという用語は、キットの上またはキットと共に供給されるか、そうでなければキットに付随するあらゆる筆記または記録された資料を含む。

【０２０３】

本開示の例示的で非限定的な態様

上記の本主題の実施形態を含む態様は、単独で、または１つ以上の他の態様または実施形態と組み合わせて有益であり得る。前述の説明を限定することなく、本開示の特定の非限定的な態様は、セットＡ（番号１～７４）、セットＢ（番号１～３３）、およびセットＣ（番号１～１１）で以下に提供された。本開示を読むと当業者には明らかとなるように、個々に番号付けされた態様のそれぞれは、前述のまたは後に続く個々に番号付けされた態様のいずれかと一緒に使用または組み合わせてもよい。これは、そのような態様の全ての組み合わせに対するサポートを提供することを意図しており、以下に明示的に提供される態様の組み合わせに限定されない。

【０２０４】

態様（セットＡ）

１．コアと、コアを封入している脱落可能層とを含むナノ粒子であって、コアが、

（ｉ）アニオン性ポリマー組成物と、

（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物と、

（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物と、

（ｉｖ）核酸および／またはタンパク質ペイロードと

を含み、

（ａ）該アニオン性ポリマー組成物が、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、ならびに／または

（ｂ）該カチオン性ポリマー組成物が、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含む、ナノ粒子。

２．該アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される第１のアニオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択される第２のアニオン性ポリマーを含む、１に記載のナノ粒子。

３．該カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択される第１のカチオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択される第２のカチオン性ポリマーを含む、１または２に記載のナノ粒子。

４．該アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーが、該アニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する、１～３のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。

５．該カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーが、該カチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する、１～４のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。

６．コアと、コアを封入している脱落可能層とを含むナノ粒子であって、コアが、

（ａ）アニオン性ポリマー組成物と、

（ｂ）カチオン性ポリマー組成物と、
（ｃ）カチオン性ポリペプチド組成物と、
（ｄ）核酸および／またはタンパク質のペイロードと
を含み、
（ａ）および（ｂ）の一方はアミノ酸のＤ－異性体ポリマーを含み、（ａ）および（ｂ）の他方はアミノ酸のＬ－異性体ポリマーを含み、Ｄ－異性体ポリマー対Ｌ－異性体ポリマーの比は、１０：１～１．５：１、または１：１．５～１：１０の範囲内である、ナノ粒子。
７．該アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択されるアニオン性ポリマーを含む、６に記載のナノ粒子。
８．該カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含む、７に記載のナノ粒子。
９．該カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含む、６に記載のナノ粒子。
１０．該アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択されるアニオン性ポリマーを含む、９に記載のナノ粒子。
１１．脱落可能層がアニオン性コートである、１～１０のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
１２．脱落可能層がｐＨおよび／またはグルタチオン感受性である、１～１１のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
１３．脱落可能層が、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンガン、リン酸マンガン、硫酸マンガン、マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、鉄、リン酸鉄、硫酸鉄、リチウム、リン酸リチウム、および硫酸リチウムのうちの１つ以上を含む、１～１２のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
１４．脱落可能層がシリカコートである、８に記載のナノ粒子。
１５．脱落可能層を囲む表面コートをさらに含む、１～１４のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
１６．表面コートが、脱落可能層と静電的に相互作用するカチオン性成分を含む、１５に記載のナノ粒子。
１７．表面コートが、カチオン性アミノ酸のポリマー、ポリ（アルギニン）、アンカードメイン、カチオン性アンカードメイン、細胞透過性ペプチド、ウイルス糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、および標的指向リガンドのうちの１つ以上を含む、１５または１６に記載のナノ粒子。
１８．表面コートが双性イオン性および多価である、１５～１７のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
１９．表面コートが、１つ以上の標的指向リガンドを含む、１５～１８のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
２０．１つ以上の標的指向リガンドのうちの少なくとも１つが、脱落可能層と相互作用するアンカードメインにコンジュゲートしている、１９に記載のナノ粒子。
２１．アンカードメインが、
RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 15) および HHHHHH (SEQ ID NO: 16)
から選択されるカチオン性アンカードメインである、２１に記載のナノ粒子。
２２．アンカードメインが、リンカーを介して１つ以上の標的指向リガンドのうちの少なくとも１つにコンジュゲートしている、２１または２１に記載のナノ粒子。
２３．リンカーがポリペプチドでない、２２に記載のナノ粒子。

２４．リンカーがポリペプチドである、２２に記載のナノ粒子。
２５．リンカーが、スルフヒドリル化学的性質もしくはアミン反応性化学的性質を介して標的指向リガンドにコンジュゲートし、かつ／またはリンカーが、スルフヒドリル化学的性質もしくはアミン反応性化学的性質を介してアンカードメインにコンジュゲートしている、２２～２４のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
２６．該１つ以上の標的指向リガンドのうちの少なくとも１つがシステイン残基を含み、システイン残基を介してリンカーにコンジュゲートしている、２２～２５のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
２７．該１つ以上の標的指向リガンドが、ファミリーＢのＧタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）への標的指向された結合を提供する、１９～２６のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
２８．該標的指向リガンドが、対応する野生型アミノ酸配列に対して１つ以上の内部アミノ酸位置にシステイン置換を含む、２７に記載のナノ粒子。
２９．該標的指向リガンドが、アミノ酸配列
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1)
に対して８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、２７または２８に記載のナノ粒子。
３０．該標的指向リガンドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載のアミノ酸配列の位置Ｌ１０、Ｓ１１、およびＫ１２のうちの１つ以上にシステイン置換を含む、２９に記載のナノ粒子。
３１．該標的指向リガンドが、アミノ酸配列
HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2)
を含む、３０に記載のナノ粒子。
３２．表面コートが、ｃ－Ｋｉｔ、ＣＤ２７、およびＣＤ１５０から選択される細胞表面タンパク質への標的指向された結合を提供する１つ以上の標的指向リガンドを含む、１９～３１のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
３３．表面コートが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）フラグメント、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン（ｍｅｌａｎｏｆｅｒｒｉｔｉｎ）、オボトランスフェリチン（ｏｖｏｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｔｉｎ）、Ｌ－セレクチン、Ｅ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、細胞死受容体－３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン－４、ＧＬＰ１、α５β１を標的指向する標的指向リガンド、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦフラグメント、コハク酸、ビスホスホネート、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン－１－ホスフェート、セラミド－１－ホスフェート、および上記のうちのいずれかの活性標的指向フラグメントからなる群から選択される１つ以上の標的指向リガンドを含む、１９～３２のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
３４．表面コートが、幹細胞因子（ＳＣＦ）またはその標的指向フラグメント、ＣＤ７０またはその標的指向フラグメント、およびＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）またはその標的指向フラグメントを含む、１９～３３のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
３５．表面コートが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択

される標的細胞への標的指向された結合を提供する１つ以上の標的指向リガンドを含む、１９～３４のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
３６．表面コートが、２つ以上の標的指向リガンドを含み、それらの組み合わせが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞（例えば、ＨＵＤＥＰ細胞）、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される細胞への標的指向された結合を提供する、１９～３４のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
３７．カチオン性ポリペプチド組成物が、核局在シグナル（ＮＬＳ）を含むポリペプチドを含む、１～３６のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
３８．ＮＬＳが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５１～１５７および２０１～２６４のうちのいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む、３７に記載のナノ粒子。
３９．カチオン性ポリペプチド組成物が、ヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）を含む、１～３８のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
４０．ＨＴＰが、カチオン性アミノ酸ポリマーにコンジュゲートしている、３９に記載のナノ粒子。
４１．ＨＴＰがシステイン残基を介してカチオン性アミノ酸ポリマーにコンジュゲートしている、４０に記載のナノ粒子。
４２．カチオン性アミノ酸ポリマーがポリ（リジン）を含む、４０または４１に記載のナノ粒子。
４３．該カチオン性ポリペプチド組成物が、分枝構造を有するヒストンペプチドを含む、３８～４２のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
４４．ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）をコードする核酸分子、（ｖｉｉ）ＺＦＰ、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質をコードする核酸分子、（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質、および（ｘ）ＤＮＡドナーテンプレートのうちの１つ以上を含む、１～４３のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
４５．ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡおよび／または前記ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ならびに（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドおよび／または前記ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、１～４４のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
４６．ペイロードが、ＤＮＡドナーテンプレートをさらに含む、４５に記載のナノ粒子。
４７．ＳＣＦ、ＳＣＦをコードする核酸、ＨｏｘＢ４、ＨｏｘＢ４をコードする核酸、ＢＣＬ－ＸＬ、ＢＣＬ－ＸＬをコードする核酸、ＳＩＲＴ６、ＳＩＲＴ６をコードする核酸、ｍｉＲ－１５５を抑制する核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＬＮＡ）、ｋｕ７０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）、およびｋｕ８０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）のうちの１つ以上をさらに含む、１～４６のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子。
４８．（ａ）１～４７のうちのいずれか１つに記載の第１のナノ粒子であって、
ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃ

ａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）をコードする核酸分子、（ｖｉｉ）ＺＦＰ、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質をコードする核酸分子、および（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質のうちの１つ以上を含む、第１のナノ粒子と、

（ｂ）ＤＮＡドナーテンプレートを含む核酸ペイロードを含む第２のナノ粒子と

を含む、ナノ粒子製剤。

４９．（ａ）ＤＮＡドナーテンプレートを含むペイロードを含む内部コアと、

（ｂ）内部コアを囲む第１の脱落可能層と、

（ｃ）第１の脱落可能層を囲む中間コアであって、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）、（ｖｉｉ）ＺＦＰをコードするＤＮＡ分子、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質、および（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質をコードするＤＮＡ分子のうちの１つ以上を含む、中間コアと、

（ｄ）中間コアを囲む第２の脱落可能層と

を含む、多層ナノ粒子。

５０．第１および／または第２の脱落可能層が、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンガン、リン酸マンガン、硫酸マンガン、マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、鉄、リン酸鉄、硫酸鉄、リチウム、リン酸リチウム、および硫酸リチウムのうちの１つ以上を含む、４９に記載の多層ナノ粒子。

５１．第２の脱落可能層を囲む表面コートを含む、４９または５０に記載の多層ナノ粒子。

５２．表面コートが、第２の脱落可能層と静電的に相互作用するカチオン性成分を含む、５１に記載の多層ナノ粒子。

５３．表面コートが、カチオン性アミノ酸のポリマー、ポリ（アルギニン）、細胞透過性ペプチド、ウイルス性糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、および標的指向リガンドのうちの１つ以上を含む、５１または５２に記載の多層ナノ粒子。

５４．表面コートが双性イオン性および多価である、４９～５３のうちのいずれか１つに記載の多層ナノ粒子。

５５．表面コートが、１つ以上の標的指向リガンドを含む、４９～５４のうちのいずれか１つに記載の多層ナノ粒子。

５６．核酸および／またはタンパク質ペイロードを標的細胞に送達する方法であって、真核生物の標的細胞と、１～４７のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子、４８に記載のナノ粒子製剤、および／または４９～５５のうちのいずれか１つに記載のナノ粒子とを接触させる工程を含む、方法。

５７．ペイロードが、遺伝子編集ツールを含む、５６に記載の方法。

５８．ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする核酸分子、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮ、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮをコードする核酸分子、ＤＮＡドナーテンプレート、部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸分子（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＫＤリコンビナーゼ、Ｂ２リコンビナーゼ、Ｂ３リコンビナーゼ、Ｒリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ

、ＰｈｉＣ３１インテグラーゼ、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ラムダインテグラーゼ、ＨＫ０２２インテグラーゼ、ＨＰ１インテグラーゼ）、部位特異的リコンビナーゼ、レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼをコードする核酸分子（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼ（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、トランスポゾンおよび／またはトランスポゾン由来のＤＮＡ（例えば、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１６８１のような細菌トランスポゾン、Ｔｃ１／ｍａｒｉｎｅｒスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃスーパーファミリートランスポゾン、ｈＡＴスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ、Ｆｒｏｇ Ｐｒｉｎｃｅ、Ｍｉｎｏｓ、Ｈｉｍａｒ１、ｍａｒｉｎｅｒのような真核生物トランスポゾン）、ならびにトランスポザーゼのうちの１つ以上を含む、５６または５７に記載の方法。

５９．標的細胞が哺乳動物細胞である、５６～５８のうちのいずれか１つに記載の方法。

６０．標的細胞がヒト細胞である、５６～５９のうちのいずれか１つに記載の方法。

６１．標的細胞がインビトロで培養下にある、５６～６０のうちのいずれか１つに記載の方法。

６２．標的細胞がインビボである、５６～６０のうちのいずれか１つに記載の方法。

６３．該接触させる工程が、ナノ粒子を個体に投与することを含む、６２に記載の方法。

６４．個体が、ハンチントン病、ＡＬＳ、パーキンソン病、膵臓癌、糖尿病、またはフォンヴィレブランド病を有する、６３に記載の方法。

６５．ナノ粒子が、標的指向リガンドを含む表面コートを含む、５６～６４のうちのいずれか１つに記載の方法。

６６．標的指向リガンドが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞（例えば、ＨＵＤＥＰ細胞）、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される細胞への標的結合を提供する、６５に記載の方法。

６７．標的細胞が、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される、５６～６６のうちのいずれか１つに記載の方法。

６８．標的細胞が幹細胞および／または前駆細胞であり、ペイロードが幹細胞因子（ＳＣＦ）および／またはＳＣＦをコードする核酸を含む、５６～６７のうちのいずれか１つに記載の方法。

６９．（ｉ）標的細胞がフォンヴィレブランド病を有する個体に由来し、および／または標的細胞が、細胞が正常以下のレベルの機能的ＶＷＦを産生するようにＶＷＦをコードする遺伝子にゲノム突然変異を含み、（ｉｉ）標的細胞が、巨核球、内皮細胞、ＭＥＰ、ＣＭＰ、ＭＰＰ、ＨＳＣ、ＳＴ－ＨＳＣ、およびＬＴ－ＨＳＣのうちのいずれかであり、ならびに（ｉｉｉ）ペイロードが、機能的ＶＷＦタンパク質および／または機能的ＶＷＦをコードする核酸を含む、５６～６７のうちのいずれか１つに記載の方法。

７０．カチオン性ポリマーの側鎖に結合した１つ以上のヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）を含む、分枝ヒストン分子。
７１．カチオン性ポリマーが、ポリ（アルギニン）またはポリ（リジン）を含む、７０に記載の分枝ヒストン分子。
７２．カチオン性ポリマーの側鎖の最大４０％が、前記１つ以上のＨＴＰにコンジュゲートしている、７０または７１に記載の分枝ヒストン分子。
７３．分枝ヒストン分子が、ブラシポリマー、ウェブ（例えば、スパイダーウェブ）、グラフトポリマー、星形ポリマー、くし形ポリマー、ポリマー網目、およびデンドリマーから選択される構造を形成するように互いにコンジュゲートしている１つ以上のヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）を含む、分枝ヒストン分子。
７４．分枝ヒストン分子がウェブ構造を形成する、７３に記載の分枝ヒストン分子。
【０２０５】
態様（セットＢ）
１．脂質と、コアとを含むタンパク質および／または核酸ペイロードを送達するための脂質製剤であって、コアが、
（ｉ）アニオン性ポリマー組成物と、
（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物と、
（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物と、
（ｉｖ）核酸および／またはタンパク質ペイロードと
を含み、
（ａ）該アニオン性ポリマー組成物が、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含み、ならびに／または
（ｂ）該カチオン性ポリマー組成物が、カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびカチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを含む、脂質製剤。
２．該アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される第１のアニオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択される第２のアニオン性ポリマーを含む、１に記載の脂質製剤。
３．該カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択される第１のカチオン性ポリマーを含み、かつポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択される第２のカチオン性ポリマーを含む、１または２に記載の脂質製剤。
４．該アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーが、該アニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する、１～３のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤。
５．該カチオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーが、該カチオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーに対して１０：１～１：１０の範囲の比で存在する、１～４のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤。
６．脂質と、コアとを含むタンパク質および／または核酸ペイロードを送達するための脂質製剤であって、コアが、
（ａ）アニオン性ポリマー組成物と、
（ｂ）カチオン性ポリマー組成物と、
（ｃ）カチオン性ポリペプチド組成物と、
（ｄ）核酸および／またはタンパク質のペイロードと
を含み、
（ａ）および（ｂ）の一方はアミノ酸のＤ－異性体ポリマーを含み、（ａ）および（ｂ）の他方はアミノ酸のＬ－異性体ポリマーを含む、脂質製剤。
７．Ｄ－異性体ポリマー対Ｌ－異性体ポリマーの比は、１０：１～１．５：１、または１：１．５～１：１０の範囲内である、６に記載の脂質製剤。

８．該アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）およびポリ（Ｄ－アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択されるアニオン性ポリマーを含む、７に記載の脂質製剤。
９．該カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｌ－アルギニン）、ポリ（Ｌ－リジン）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）、ポリ（Ｌ－オルニチン）、およびポリ（Ｌ－シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含む、８に記載の脂質製剤。
１０．該カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ポリ（Ｄ－リジン）、ポリ（Ｄ－ヒスチジン）、ポリ（Ｄ－オルニチン）、およびポリ（Ｄ－シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含む、７に記載の脂質製剤。
１１．該アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）およびポリ（Ｌ－アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択されるアニオン性ポリマーを含む、１０に記載の脂質製剤。
１２．カチオン性ポリペプチド組成物が、核局在シグナル（ＮＬＳ）を含むポリペプチドを含む、１～１１のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤。
１３．ＮＬＳが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５１～１５７および２０１～２６４のうちのいずれか１つに記載のアミノ酸配列を含む、１２に記載の脂質製剤。
１４．カチオン性ポリペプチド組成物が、ヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）を含む、１～１３のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤。
１５．ＨＴＰが、カチオン性アミノ酸ポリマーにコンジュゲートしている、１４に記載の脂質製剤。
１６．ＨＴＰがシステイン残基を介してカチオン性アミノ酸ポリマーにコンジュゲートしている、１５に記載の脂質製剤。
１７．カチオン性アミノ酸ポリマーがポリ（リジン）を含む、１４または１５に記載の脂質製剤。
１８．該カチオン性ポリペプチド組成物が、分枝構造を有するヒストンペプチドを含む、１～１７のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤。
１９．ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）をコードする核酸分子、（ｖｉｉ）ＺＦＰ、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質をコードする核酸分子、（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質、（ｘ）ＤＮＡドナーテンプレート、（ｘｉ）部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸分子（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＫＤリコンビナーゼ、Ｂ２リコンビナーゼ、Ｂ３リコンビナーゼ、Ｒリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＰｈｉＣ３１インテグラーゼ、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ラムダインテグラーゼ、ＨＫ０２２インテグラーゼ、ＨＰ１インテグラーゼ）、（ｘｉｉ）部位特異的リコンビナーゼ、（ｘｉｉｉ）レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼをコードする核酸分子（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、（ｘｉｖ）レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼ（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、（ｘｖ）トランスポゾンおよび／またはトランスポゾン由来のＤＮＡ（例えば、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１６８１のような細菌トランスポゾン、Ｔｃ１／ｍａｒｉｎｅｒスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃスーパーファミリートランスポゾン、ｈＡＴスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ、Ｆｒｏｇ　Ｐｒｉｎｃｅ、Ｍｉｎｏｓ、Ｈｉｍａｒ１、ｍａｒｉｎｅｒのような真核生物トランスポゾン）、ならびに（ｘｖｉ）トランスポザーゼのうちの１つ以上を含む、１～１８のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤。
２０．ペイロードが、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡおよび／または該ＣＲＩ

ＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ならびに（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドおよび／または該ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、１～１９のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤。

２１．ペイロードが、ＤＮＡドナーテンプレートをさらに含む、２０に記載の脂質製剤。

２２．核酸および／またはタンパク質ペイロードを標的細胞に送達する方法であって、真核生物の標的細胞と、１～２１のうちのいずれか１つに記載の脂質製剤とを接触させる工程を含む、方法。

２３．ペイロードが、遺伝子編集ツールを含む、２２に記載の方法。

２４．ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする核酸分子、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮ、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮをコードする核酸分子、ＤＮＡドナーテンプレート、部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸分子（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＫＤリコンビナーゼ、Ｂ２リコンビナーゼ、Ｂ３リコンビナーゼ、Ｒリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＰｈｉＣ３１インテグラーゼ、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ラムダインテグラーゼ、ＨＫ０２２インテグラーゼ、ＨＰ１インテグラーゼ）、部位特異的リコンビナーゼ、レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼをコードする核酸分子（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼ（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、トランスポゾンおよび／またはトランスポゾン由来のＤＮＡ（例えば、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１６８１のような細菌トランスポゾン、Ｔｃ１／ｍａｒｉｎｅｒスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃスーパーファミリートランスポゾン、ｈＡＴスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ、Ｆｒｏｇ　Ｐｒｉｎｃｅ、Ｍｉｎｏｓ、Ｈｉｍａｒ１、ｍａｒｉｎｅｒのような真核生物トランスポゾン）、ならびにトランスポザーゼのうちの１つ以上を含む、２２または２３に記載の方法。

２５．標的細胞が哺乳動物細胞である、２２～２４のうちのいずれか１つに記載の方法。

２６．標的細胞がヒト細胞である、２２～２５のうちのいずれか１つに記載の方法。

２７．標的細胞がインビトロで培養下にある、２２～２６のうちのいずれか１つに記載の方法。

２８．標的細胞がインビボである、２２～２６のうちのいずれか１つに記載の方法。

２９．該接触させる工程が、脂質製剤を個体に投与することを含む、２８に記載の方法。

３０．個体が、ハンチントン病、ＡＬＳ、パーキンソン病、膵臓癌、糖尿病、またはフォンヴィレブランド病を有する、２９に記載の方法。

３１．標的細胞が、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹細胞および前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄前駆細胞、リンパ球前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球前駆細胞、巨核球－赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄共通前駆細胞（ＣＭＰ）、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、アストロサイト、膵臓細胞、膵臓β島細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸の細胞、ならびに胃の細胞から選択される、２２～３０のうちのいずれか１つに記載の方法。

３２．標的細胞が幹細胞および／または前駆細胞であり、ペイロードが幹細胞因子（ＳＣＦ）および／またはＳＣＦをコードする核酸を含む、２２～３１のうちのいずれか１つに記載の方法。

３３．（ｉ）標的細胞がフォンヴィレブランド病を有する個体の細胞に由来し、および／

または標的細胞が、細胞が正常以下のレベルの機能的ＶＷＦを産生するようにＶＷＦをコードする遺伝子にゲノム突然変異を含み、（ｉｉ）標的細胞が、巨核球、内皮細胞、ＭＥＰ、ＣＭＰ、ＭＰＰ、ＨＳＣ、ＳＴ－ＨＳＣ、およびＬＴ－ＨＳＣのうちのいずれかであり、ならびに（ｉｉｉ）ペイロードが、機能的ＶＷＦタンパク質および／または機能的ＶＷＦをコードする核酸を含む、２２～３１のうちのいずれか１つに記載の方法。

【０２０６】

態様（セットＣ）

１．真核生物標的細胞をウイルス性または非ウイルス性送達ビヒクルと接触させる工程を含む、核酸および／またはタンパク質ペイロードを標的細胞に送達する方法であって、

（ａ）遺伝子編集ツールと、

（ｂ）標的細胞の増殖を誘導するかつ／または標的細胞の分化を偏らせる核酸剤もしくはタンパク質剤と

を含む方法。

２．（ａ）が、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドをコードする核酸分子、（ｉｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチド、（ｖ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導ポリペプチドと複合したＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｖｉ）ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）をコードする核酸分子、（ｖｉｉ）ＺＦＰ、（ｖｉｉｉ）転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質をコードする核酸分子、（ｉｘ）ＴＡＬＥタンパク質、（ｘ）ＤＮＡドナーテンプレート、（ｘｉ）部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸分子（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、ＫＤリコンビナーゼ、Ｂ２リコンビナーゼ、Ｂ３リコンビナーゼ、Ｒリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＰｈｉＣ３１インテグラーゼ、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、Ｒ４インテグラーゼ、ラムダインテグラーゼ、ＨＫ０２２インテグラーゼ、ＨＰ１インテグラーゼ）、（ｘｉｉ）部位特異的リコンビナーゼ、（ｘｉｉｉ）レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼをコードする核酸分子（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、（ｘｉｖ）レゾルバーゼおよび／またはインベルターゼ（例えば、Ｇｉｎ、Ｈｉｎ、γδ３、Ｔｎ３、Ｓｉｎ、ベータ）、（ｘｖ）トランスポゾンおよび／またはトランスポゾン由来のＤＮＡ（例えば、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１６８１のような細菌トランスポゾン、Ｔｃ１／ｍａｒｉｎｅｒスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃスーパーファミリートランスポゾン、ｈＡＴスーパーファミリートランスポゾン、ＰｉｇｇｙＢａｃ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ、Ｆｒｏｇ　Ｐｒｉｎｃｅ、Ｍｉｎｏｓ、Ｈｉｍａｒ１、ｍａｒｉｎｅｒのような真核生物トランスポゾン）、ならびに（ｘｖｉ）トランスポザーゼのうちの１つ以上を含む、１に記載の方法。

３．（ｂ）が、標的細胞の増殖を誘導する核酸またはタンパク質剤を含む、１または２に記載の方法。

４．（ｂ）が、標的細胞の分化を偏らせる核酸またはタンパク質剤を含む、１～３のうちのいずれか１つに記載の方法。

５．（ｂ）が、ＳＣＦ、ＳＣＦをコードする核酸、ＨｏｘＢ４、ＨｏｘＢ４をコードする核酸、ＢＣＬ－ＸＬ、ＢＣＬ－ＸＬをコードする核酸、ＳＩＲＴ６、ＳＩＲＴ６をコードする核酸、ｍｉＲ－１５５を抑制する核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＬＮＡ）、ｋｕ７０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）、およびｋｕ８０発現を減少させる核酸分子（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）のうちの１つ以上を含む、１～４のうちのいずれか１つに記載の方法。

６．（ｂ）が、標的細胞の分化を阻止または促進するためのマイクロＲＮＡを含む、１～５のうちのいずれか１つに記載の方法。

７．（ｂ）が、標的細胞の分化のためのシグナル伝達タンパク質を含む、１～６のうちのいずれか１つに記載の方法。

８．送達ビヒクルが、非ウイルス性である、１～７のうちのいずれか１つに記載の方法。
９．送達ビヒクルが、ウイルス性である、１～７のうちのいずれか１つに記載の方法。
１０．送達ビヒクルが、ナノ粒子でない、１～９のうちのいずれか１つに記載の方法。
１１．送達ビヒクルが、ナノ粒子、例えば、本明細書に記載のナノ粒子である、１～９のうちのいずれか１つに記載の方法。

【０２０７】

本発明の精神または範囲から逸脱することなく様々な変更および修正を行うことができることは当業者には明らかであろう。

【実施例】

【０２０８】

実験

以下の実施例は、当業者に本発明の製造方法および使用方法の完全な開示および説明を提供するように記載されており、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、また以下の実験が実施された全てまたは唯一の実験であることを表すことを意図するものでもない。使用された数字（例えば、量、温度など）に関する精度を確保する努力を行ったが、ある程度の実験誤差および偏差が考慮されるべきである。別段の指示がない限り、部分は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧か、またはそれに近い。

【０２０９】

本明細書で引用した全ての刊行物および特許出願は、あたかもそれぞれの個々の刊行物または特許出願が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されているかのように参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１０】

本発明は、本発明の実施のための好ましい様式を含むことが見出されるか、または提案された特定の実施形態に関して説明された。本開示に照らして、例示された特定の実施形態において本発明の意図された範囲から逸脱することなく多数の修正および変更を行うことができることは当業者には理解されるであろう。例えば、コドンの重複性により、タンパク質配列に影響を与えることなく基礎となるＤＮＡ配列に変更を加えることができる。さらに、生物学的機能等価性の考慮により、生物学的作用の種類または量に影響を与えることなくタンパク質構造に変更を加えることができる。全てのそのような修正は、添付の請求項の範囲内に含まれることが意図されている。

【０２１１】

実施例１

コア製剤パラメータを決定するために、蛍光分光法を使用して核酸の縮合をモニターした（二本鎖ＤＮＡペイロードについて）。インターカレートしているエチジウムブロマイド（ＥｔＢｒ）の発光スペクトルは、増加する電荷比での縮合剤の添加後に測定された。ポリマー誘導性核酸縮合によって引き起こされるエチジウムブロマイドの脱挿入は、蛍光シグナルの低下をもたらす。その理由は、エチジウムブロマイドは、非結合状態よりもＤＮＡ結合状態ではるかに高い量子蛍光収率を示すためである。結果を図１に示す。

【０２１２】

図１は、核酸ペイロードの縮合に関する様々なパラメータ（例えば、カチオン：アニオン電荷比）を試験する蛍光アッセイの結果を示す。結果は、例えば、２の電荷比が、Ｃａｓ９をコードするプラスミドとガイドＲＮＡ分子との縮合にうまく機能することを示した。１００μｌのアニオン性溶液は各ウェルに添加された：１００ｎｇ／μｌのＤＮＡ、８０ｎｇ／μｌのポリ（Ｄ－グルタミン酸）（ＰＤＥ）、０．５ｎｇ／μｌのエチジウムブロマイド。縮合種は、各データ点について１２．５μｌで滴定された。溶液中の縮合剤の総濃度（ｍ／ｖ）は０．４μｇ／μｌであり、括弧内の質量分率でヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）［Ｈ３Ｋ４（ｍｅ３）］およびポリ（Ｌ－アルギニン）（ＰＬＲ）の異なる組成を有する。各滴定の後、プレートは２５０ｎｍと６０５ｎｍの励起で読み取られた。試験した各電荷比について、対照は（ｉ）「ＤＮＡのみ」、ＥｔＢｒを有さないＤＮＡ（

ｉｉ）「ＤＮＡ」、ＰＤＥ、ＰＬＲ、またはＨＴＰが存在しないＤＮＡとＥｔＢｒ、および（ｉｉｉ）「ＤＮＡ＋ＰＤＥ」、ＰＬＲまたはＨＴＰが存在しないＤＮＡとＥｔＢｒとＰＤＥを含む。

【０２１３】

実施例２：合成方法の一例

手順は、無菌の無塵環境（ＢＳＬ－ＩＩフード）内で行われた。気密シリンジは、濾過したヌクレアーゼフリー水で３回すすぐ前に７０％エタノールで滅菌され、そして使用前に４℃で保存された。表面は、使用前にＲＮＡｓｅ阻害剤で処理された。

【０２１４】

ナノ粒子コア

第１の溶液（アニオン性溶液）は、適切な量のポリ（Ｄ－グルタミン酸）とポリ（Ｌ－グルタミン酸）との水性混合物（「アニオン性ポリマー組成物」）を有するペイロード（この場合、プラスミドＤＮＡ（ＥＧＦＰ－Ｎ１プラスミド））を組み合わせることによって調整された。この溶液は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）で適切な容量に希釈された。第２の溶液（カチオン性溶液）は、「カチオン性ポリマー組成物」および「カチオン性ポリペプチド組成物」の組み合わせであり、適切な容量のｐＨ５．５の６０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを用いて適量の縮合剤を含有する濃縮溶液を希釈することによって調整された。この場合では、「カチオン性ポリマー組成物」はポリ（Ｌ－アルギニン）であり、「カチオン性ポリペプチド組成物」は１６μｇのＨ３Ｋ４（ｍｅ３）（ヒストンＨ３のテール、Ｋ４上でトリメチル化）であった。

【０２１５】

２００μｌ未満のバッチでのナノ粒子コアの沈殿は、ガラスバイアルまたは低タンパク質結合遠心管中のペイロード溶液への縮合溶液の滴下添加、続いて４℃で３０分間のインキュベーションによって実施することができる。２００μｌを超えるバッチでは、２つの溶液を標準的な混合チップ（例えばＤｏｌｏｍｉｔｅ　Ｍｉｃｒｏｍｉｘｅｒ）または流体力学的集束チップを使用してマイクロ流体形式で組み合わせることができる。それぞれの場合において、最適な投入流量は、得られたナノ粒子コアの懸濁液が単分散し、１００ｎｍ未満の平均粒径を示すように決定することができる。

【０２１６】

この場合では、上記からの２つの等容量の溶液（１つはカチオン性縮合剤および１つはアニオン性縮合剤）を混合のために調製された。カチオン性縮合剤の溶液については、ポリマー／ペプチド溶液を１本のタンパク質低結合チューブ（エッペンドルフ）に添加し、次いで６０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ５．５）で１００μｌの総容量に希釈された（上記のように）。アニオン性溶液を調製する間、この溶液は室温に保たれた。アニオン性縮合剤の溶液については、アニオン性溶液は最小限の露光で氷上で冷却された。水溶液中の１０μｇの核酸（約１μｇ／μｌ）および７μｇの水性ポリ（Ｄ－グルタミン酸）［０．１％］は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　８．５）で１００μｌの総容量に希釈された（上記のように）。

【０２１７】

２つの溶液の各々は、０．２ミクロンのシリンジフィルターを用いて濾過され、それ自身のハミルトン１ｍｌガスタイトシリンジ（Ｈａｍｉｌｔｏｎ　１ｍｌ　Ｇａｓｔｉｇｈｔ　Ｓｙｒｉｎｇｅ）に移された（ガラス、（製品番号を挿入）。各シリンジは、ハーバードポンプ１１エリートデュアルシリンジポンプ（Ｈａｒｖａｒｄ　Ｐｕｍｐ　１１　Ｅｌｉｔｅ　Ｄｕａｌ　Ｓｙｒｉｎｇｅ　Ｐｕｍｐ）に入れた。シリンジは、チューブを使用してＤｏｌｏｍｉｔｅ　Ｍｉｃｒｏ　Ｍｉｘｅｒチップの適切なはめ込みに接続され、シリンジポンプは、１００μｌの総容量に対して１２０μｌ／分で実行された。得られた溶液は、コア組成物（これは核酸ペイロード、アニオン性成分、およびカチオン性成分を含んでいた）を含んでいた。ナノ粒子サイズ（ピーク）は１２８．８ｎｍであり、ゼータ電位（ピーク）は＋１０．５ｍＶ（１００％）であった（例えば、図２を参照）。

【０２１８】

コア安定化（脱落可能層の追加）

脱落可能層を有するコアをコートするために、得られたナノ粒子コアの懸濁液は、１０ｍＭトリスＨＣｌ（ｐＨ８．５、１０～５００ｍＭ）中のケイ酸ナトリウムの希溶液または１０ｍＭ　ＰＢＳ（ｐＨ８．５、１０～５００ｍＭ）中の塩化カルシウムの希溶液と組み合わされ、室温で１～２時間インキュベートした。この場合では、コア組成物は、希ケイ酸ナトリウム溶液に加えられ、ポリマーシリカの酸不安定コーティングを有するコアでコートする（脱落可能層の例）。そうするために、１０μｌのストックケイ酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ）は、最初に１．９９ｍｌのトリス緩衝液（１０ｍＭトリスｐＨ＝８．５、１：２００希釈）に溶解され、十分に混合された。ケイ酸塩溶液は、滅菌０．１ミクロンシリンジフィルターを用いて濾過され、シリンジポンプに取り付けた滅菌ハミルトンガスタイトシリンジに移された。上記のコア組成物もまた、シリンジポンプに取り付けられた滅菌ハミルトンガスタイトシリンジに移された。シリンジは、ＰＴＦＥチューブを使用してＤｏｌｏｍｉｔｅ　Ｍｉｃｒｏ　Ｍｉｘｅｒチップの適切なはめ込みに接続され、そしてシリンジポンプを１２０μｌ／分で実行された。

【０２１９】

安定化された（コートされた）コアは、標準的な遠心濾過装置（１００ｋＤａ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）または高分子量遮断膜を使用する３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）中での透析を使用して精製することができる。この場合では、安定化された（コートされた）コアは、遠心濾過装置を用いて精製された。回収したコートされたナノ粒子（ナノ粒子溶液）は、希ＰＢＳ（１：８００）またはＨＥＰＥＳで洗浄され、再度濾過された（溶液は、５００μｌの滅菌分散緩衝液またはヌクレアーゼフリーの水に再懸濁して保存することができる）。効果的なシリカコーティングは、実証された。安定化コアは、１１０．６　ｎｍのサイズ、－４２．１　ｍＶ（９５％）のゼータ電位を有した（図３）。

【０２２０】

表面コート（外殻）

表面コート（外殻とも呼ばれる）の追加は、時に「表面官能化」と呼ばれ、安定化された（この場合ではシリカコートされた）ナノ粒子の負に帯電した表面に配位子種を静電的に接合する（この場合では、狂犬病ウイルス糖タンパク質は、カチオン性アンカードメインとして９－Ａｒｇペプチド配列に融合した－「ＲＶＧ９Ｒ」）ことによって達成された。最初に、シリカコートされたナノ粒子は、濾過され、分散緩衝液または水に再懸濁され、各ナノ粒子分散液の最終体積を決定し、プロトン化アミン基の最終濃度が少なくとも７５μＭとなるように添加するポリマーまたはペプチドの所望量であった。所望の表面成分は、追加され、溶液は、１時間インキュベートする前に、２０～３０秒間超音波処理された。遠心濾過は、３００ｋＤａで実行され（最終生成物は標準的な遠心濾過装置を用いて精製することができ、例えば、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅからの３００～５００ｋＤａ、または透析、例えば、高分子量遮断膜を使用した３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）内）、最終再懸濁は、細胞培養培地または分散緩衝液のいずれか内である。いくつかの場合では、好適な外殻添加は、５０～１５０ｎｍの平均粒径および０～－１０ｍＶのゼータ電位を有する粒子の単分散懸濁液を生じる。この場合では、外殻を持つナノ粒子は、１１５．８　ｎｍのサイズ、－３．１　ｍＶ（１００％）のゼータ電位を有した（図４）。

【０２２１】

実施例３：ナノ粒子の取り込み

これらの研究において（例えば、図５参照）、種々の表面化学および電荷比を有するナノ粒子が試験された。製剤は（電荷比はナノ粒子コアを指す）、

ＨＴＴ０１８Ｂ：電荷比（カチオン／アニオン）が２、表面コートがポリ（Ｌ－アルギニン）、

ＨＴＴ０１９Ｂ：電荷比が５、表面コートがポリ（Ｌ－アルギニン）、

ＨＴＴ０２０Ｂ：電荷比が２、表面コートがＮ－アセチルＳｅｍａｘ、

ＨＴＴ０２１Ｂ：電荷比が５、表面コートがＮ－アセチルＳｅｍａｘ、
ＨＴＴ０２２Ｂ：電荷比が２、表面コートがＮ－アセチルＳｅｌａｎｋ、
ＨＴＴ０２３Ｂ：電荷比が５、表面コートがＮ－アセチルＳｅｌａｎｋ、
Ｌ３０００ＧＦＰ：ＧＦＰをコードする核酸（ＧＦＰをコードするプラスミド）のリポフェクタミン（非ナノ粒子）送達、
Ｌ３０００ＣＲＩＳＰＲ：ＧＦＰまたは蛍光タグのないＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ成分のリポフェクタミン（非ナノ粒子）送達、であった。

【０２２２】

ナノ粒子が生成された。ＨＴＴ０１８Ｂ－０２３Ｂについて、コア成分は、取り込みが蛍光顕微鏡法によって評価され得るように、フルオロフォア（ＦＩＴＣ）でタグ付けされた核酸ペイロード（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓコード核酸：Ｃａｓ９ガイドＲＮＡをコードするプラスミドとＣａｓ９タンパク質をコードする第２のプラスミド）およびポリ（Ｌ－アルギニン）（カチオン性ポリマー組成物）を含んだ。Ｌ３０００ＧＦＰ（陽性対照）については、ナノ粒子は使用されず、送達された核酸はＧＦＰをコードするプラスミドであった。Ｌ３０００ＣＲＩＳＰＲ（陰性対照）については、ナノ粒子は使用されず、送達された核酸は、ＣＲＩＳＰＲ成分をコードするプラスミドであったが、使用されたプラスミドはＧＦＰをコードせず、ＦＩＴＣでタグ付けされたものはなかった。

【０２２３】

神経幹細胞は、１ウェルあたり10^5細胞（９６ウェルプレート）の密度で播種され、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）を補充したＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地（１：１０００）中で成長させた。ナノ粒子およびリポフェクタミン３０００（０．７５μＬ試薬／μｇＤＮＡ）は、播種２４時間後に、ウェルあたり４００ｎｇのＤＮＡペイロードをトランスフェクトして細胞に導入された。ナノ粒子試料は、培養中の神経幹細胞に適用され、４～２４時間インキュベートした後、ＰＢＳで最大３回洗浄し、すべての内在していない粒子を除去した。取り込みは、適切なレーザー励起およびフィルター選択を用いた画像化によって決定された。細胞は、２０倍対物レンズを使用してＺｅｉｓｓ　ＬＳＭ７８０で画像化された。代替的または追加的に、定量的取り込みデータは、ハイコンテントイメージングおよびフローサイトメトリーを用いて得ることができる。３行は３つの異なる複製を表す。

【０２２４】

上記のように、試料ＨＴＴ１８Ｂ、ＨＴＴ２０Ｂ、およびＨＴＴ２２Ｂは電荷比２で調製されたが、試料ＨＴＴ１９Ｂ、ＨＴＴ２１Ｂ、およびＨＴＴ２３Ｂは電荷比５で調製された。データは、２の電荷比（コアの縮合のために）が５の電荷比よりも高い内部移行をもたらすことを示す。さらに、ヘプタペプチド適応因子ＳｅｌａｎｋおよびＳｅｍａｘの表面コーティング（外殻）は、細胞透過性ペプチドポリ（Ｌ－アルギニン）［９．７ｋＤａ］を含む表面コーティングよりも高度の内部移行を促進した。

【０２２５】

実施例４：ナノ粒子内部移行挙動および細胞内輸送の特徴付け

神経幹細胞は、核酸ペイロードとしてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドを含むナノ粒子と接触させた。ナノ粒子コアは、取り込みが蛍光顕微鏡によって評価され得るように、フルオロフォア（ＦＩＴＣ）でタグ付けされたポリ（Ｌ－アルギニン）（カチオン性ポリマー組成物）を含んでいた。エンドソームと核はそれぞれＬｙｓｏｔｒａｃｋｅｒ（赤）とＨｏｅｓｃｈｔ　３３４２（青）を使って染色された。ナノ粒子およびＬｉｐｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（０．７５μｌ試薬／μｇＤＮＡ）は、播種１６時間後に、ウェルあたり４００ｎｇのＤＮＡペイロードをトランスフェクトして細胞に導入された。画像化の前に、細胞をＨｏｅｓｃｈｔ　３３４２およびＬｙｓｏｔｒａｃｋｅｒ　Ｒｅｄを共に培養した。細胞は、１０倍対物レンズを使用して、トランスフェクションの２．５時間後および５時間後にＣｅｌｌｏｍｉｃｓ　ＣＸ５で画像化された（図６、パネルＡ～Ｂ）。ナノ粒子の蛍光シグナルと染色されたエンドソームのシグナルとの共局在、および核は定量的に測定され、共局在の程度を得られたピアソンの積率モーメント係数によって表した（図６、パネルＣ～Ｄ）。

【０２２６】
表２に列挙されるすべてのナノ粒子について（図６参照）、コアは（ｉ）表に示すカチオン性ポリペプチド組成物、（ｉｉ）核酸ペイロード、（ｉｉｉ）ポリ（Ｌ－アルギニン）［カチオン性アミノ酸ポリマー］および（ｉｖ）ポリ（Ｌ－グルタミン酸）［アニオン性アミノ酸ポリマー］を含んでいた。脱落可能層はシリカコートであり、表面コートは表２に示す通りであった。
【０２２７】
（表２）

試料名	コアのカチオン性ポリペプチド組成	表面コート
CAS9005	ヒストンテールペプチド（HTP）＝H3K4（me3） [ヒストンH3のテール、K4上でトリメチル化]	ポリ（L-アルギニン)(PLR)
CAS9007	同上	「RVG」：9-Argペプチド 配列に融合した狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)(カチオン性アンカードメインとして）
CAS9009	同上	TAT (細胞透過性ペプチド)
HTT024	同上	N-アセチルSelank
CAS9006	SV40 NLS	9-Argペプチド配列に融合したRVG
CAS9008	SV40 NLS	TAT (細胞透過性ペプチド)

【０２２８】
図６、パネルＣは、ナノ粒子ポリマー（ＦＩＴＣタグ付きコアポリマー）とＨｏｅｓｃｈ　ＤＮＡ染色との間、またはナノ粒子ポリマー（ＦＩＴＣタグ付きコアポリマー）とＬｙｏｔｒａｃｋｅｒとの間のピアソンの積率相関係数を示す。相関係数は、パネルＡおよびＢの画像を生成しながら計算された。すべての値は、陰性対照（Ｃａｓ９リポフェクタミン３０００）の値に対して正規化された。２．５時間と５時間の時点の間のＨｏｅｓｃｈｔとＦＩＴＣとの間のピアソン相関の低下は、ナノ粒子ポリマーの分解、放出、または経時的に核以外の区画への拡散を示した。図６、パネルＤは、ナノ粒子ポリマーとエンドソームとの間のピアソンの積率相関係数を示す（Ｌｙｓｏｔｒａｃｋｅｒ　Ｒｅｄ）。相関係数は、パネルＡおよびＢの画像を生成しながら計算された。すべての値は、陰性対照（Ｃａｓ９リポフェクタミン３０００）の値に対して正規化された。２．５時間と５時間の時点を比較すると、経時的なエンドソーム逃避が示された。
【０２２９】
実施例５：持続放出
図７は、核酸ペイロードがＧＦＰをコードするｍＲＮＡである、ナノ粒子をトランスフェクトした末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の顕微鏡画像を示す。画像は、ｍＲＮＡ発現が、定義された比率で、アニオン性アミノ酸のＤ－異性体のポリマーおよびアニオン性アミノ酸のＬ－異性体のポリマーを有するコアを含むナノ粒子を用いて１６日まで延長されたことを実証する。この場合、２：１の比のポリ（Ｄ－グルタミン酸）対ポリ（Ｌ－グルタミン酸）を有するナノ粒子コアの使用は、１６日で最大発現であった（パネルＡ＝４日；パネルＢ＝１６日）。ナノ粒子コアは、（ｉ）アニオン性ポリマー組成物：合計７μｇのポリ（グルタミン酸）（すなわち、Ｄ－異性体とＬ－異性体とを合わせて７μｇ）、（ｉｉ

）カチオン性ポリマー組成物：ポリ（Ｌ－アルギニン）、（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物：Ｈ３Ｋ４（ｍｅ３）［すなわち、ヒストンＨ３のテール、Ｋ４上でトリメチル化］、および（ｉｖ）核酸ペイロード：ＧＦＰをコードするｍＲＮＡを含んでいた。ナノ粒子コアはシリカコート（脱落可能層）によって封入され、表面コートはポリ（Ｌ－アルギニン）（ＰＬＲ）であった。

【０２３０】

実施例６：ファミリーＢのＧＰＣＲへの標的指向された結合を提供する標的指向リガンド

図１１は、例えば、アロステリック／親和性Ｎ末端ドメインおよびオルソステリックエンドソームソーティング／シグナル伝達ドメインへの結合に対して、標的指向リガンドを評価する際に考慮すべき別々のドメインを強調して、ファミリーＢのＧＰＣＲの概略図を提供する。（図は、Ｓｉｕ，Ｆａｉ　Ｙｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４９９．７４５９（２０１３）：４４４～４４９を出典とする）。そのようなドメインは、システイン置換のために標的指向リガンドエキセンディン－４内の部位を選択するときに考慮した。

【０２３１】

図１２において、システイン１１置換（Ｓ１１Ｃ）は、親和性を維持し、また核酸の放出を促進し、核酸の分解を制限する長いエンドソームリサイクリング経路に関与するような、エキセンディン－４をアンカードメイン（例えば、カチオン性アンカードメイン）にコンジュゲートするための１つの可能なアミノ酸修飾として同定された。模擬エキセンディン－４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）のグルカゴン－ＧＣＧＲ（４ＥＲＳ）およびＧＬＰ１－ＧＬＰ１Ｒ－ＥＣＤ複合体（ＰＤＢ：３ＩＯＬ）の既知の結晶構造へのアラインメント後、２つの結合溝を妨害しないようにするために、架橋複合体が向いていなければならない方向を予想するために、ＰＤＢレンダリングを３次元空間で回転させた。セクレチンファミリーリガンドの架橋部位が、対応するセクレチンファミリー受容体の２つの結合溝と十分直交している場合に、最適なペイロード放出のための付随する長いエンドソームリサイクリング経路の隔離と同様に、高親和性結合が起こり得ることが決定された。この技術を使用して、エキセンディン－４のアミノ酸位置１０、１１、および１２は、システイン残基の挿入または置換のための位置として同定された。

【０２３２】

実施例７：ＲＴＫへの標的指向された結合を提供する標的指向リガンド

図１３は、三元ＦＧＦ２－ＦＧＦＲ１－ＨＥＰＡＲＩＮ複合体（ＰＤＢ上の１ｆｑ９）の一部としてのｔｂＦＧＦフラグメントを示す。ＣＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳ（強調された）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４）は、ＦＧＦＲ１に対する親和性にとって重要であると決定された。図１４は、ＨＦＫＤＰＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）がリガンド－受容体オルソステリック活性および親和性に使用するためのペプチドとして決定されたことを示す。図１５は、ＬＥＳＮＮＹＮＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）もまたリガンド－受容体オルソステリック活性および親和性に使用するためのペプチドとして決定されたことを示す。

【０２３３】

実施例８

表３～表５は、以下の実験に使用される構成要素（例えば、縮合データ、生理化学的データ、ならびにフローサイトメトリーおよび画像化データ）のためのガイドを提供する。

【０２３４】

（表３）以下の実験で使用される送達分子の特徴。標的指向リガンド名／命名形式：Ａ＿Ｂ＿Ｃ＿Ｄ＿Ｅ＿Ｆ、ここで、Ａ＝受容体名：リガンドが標的指向している受容体の名前、Ｂ＝標的指向リガンド供給源：受容体を標的指向するリガンドの名前（リガンドが野生型でない場合は修飾の接頭辞「ｍ」または「ｒｍ」）、Ｃ＝リンカー名、Ｄ＝荷電ポリペプチド名、Ｅ＝Ｂに基づくリンカー末端、およびＦ＝バージョン番号（同じＷＴに由来するがＡＡ配列が異なる２つの修飾標的指向リガンドを区別するため）。

標的指向リガンド(TL)/ ペプチドカタログ名	配列	SEQ ID NO:	アンカーの電荷	アンカーのmer/ 合計mer	リンカーのmer/ 合計mer	リガンドのmer/ 合計mer
PLR10	RRRRRRRRRR		10	100.00%	0.00%	0.00%
CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	SNRWLDVKGGGGGSGGGGSRRRRRRRRR		9	32.14%	35.71%	32.14%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGGSGGGGSVVLKYEKDAFKR		9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	VVLKYEKDAFKRGGGGGSGGGGSRRRRRRRRR		9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSENLVLNE		9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	ENLVLNEGGGGSGGGGSRRRRRRRRR		9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSPTGMIRIHQM		9	31.03%	34.48%	34.48%
CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSAAQEE		9	36.00%	40.00%	24.00%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSTSVGKYPNTGYYGD		9	27.27%	30.30%	42.42%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TSVGKYPNTGYY		9	27.27%	30.30%	42.42%

標的指向リガンド(TL)/ペプチドカタログ名	配列	SEQ ID NO:	アンカーの電荷	アンカーのmer/合計mer	リンカーのmer/合計mer	リガンドのmer/合計mer
	GDGGGGSGGGGSRRRRRRRRR					
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSNPKLTRMLTFKFY		9	28.13%	31.25%	40.63%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	NPKLTRMLTFKFYGGGGSGGGGSRRRRRRRRR		9	28.13%	31.25%	40.63%
PLK10_PEG22	KKKKKKKKKK-PEG22		10	31.25%	68.75%	0.00%
ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR	N/A		9	30.25%	33.61%	36.13%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSMIASQFLSALTLVLLIKESGA		9	22.50%	25.00%	52.50%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C	MIASQFLSALTLVLLIKESGAGGGGSGGGGSRRRRRRRRR		9	22.50%	25.00%	52.50%
cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSEKFILKVRPAFKAV		10	31.25%	68.75%	0.00%
EPOR_mEPO_6R_N	RRRRRRTYSCHFGPLTWVCKPQGG		6	25.00%	0.00%	
EPOR_mEPO_6R_C	TYSCHFGPLTWVCKPQGGRRRRRR		6	25.00%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_N	RRRRRRTHRPPMWSPVWP		6	33.33%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_C	THRPPMWSPVWPRRRRRR		6	33.33%	0.00%	
mH3_K4Me3_1	ART-K(Me3)-QTARKSTGGKAPRKQLA		6	100.00%	0.00%	0.00%
mH4_K16Ac_1	SGRGKGGKGLGKGGA-K(Ac)-RHRK		8	100.00%	0.00%	0.00%
mH2A_1	SGRGKQGGKARAKAKTRSSR		8	100.00%	0.00%	0.00%
SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C	Ac-SNYSAibADKAibANAibADDAibAEAibAKENSGGGGSGGGGGSRRRRRRRRR		9	19.15%	21.28%	59.57%
cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGGGGSGGGGSEKFILKVRPAFKAV		10			

【０２３５】

（表４）以下の実験で使用されたペイロード

ペイロード	ヌクレオチド	一本鎖または二本鎖？	タンパク質分子量
BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA	20	2	N/A
NLS-Cas9-EGFP + gRNA	98	1	186229.4531
Cy5 EGFP mRNA	998	1	N/A
VWF-GFP pDNA + Cy5 PNA	13000	2	N/A

【０２３６】

（表５）以下の実験で使用される構成要素のためのガイドキー。キー：Ｎ＝「ナノ粒子」、ｃａｔ．＝「カチオン」、ａｎ．＝「アニオン」、ｓｐｅｃ．＝「種」、ｃ：ｐ＝「カルボキシル：ホスフェート」

プロジェクトコード	N	ペイロード (PI)	標的指向リガンド (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 比	+/- 比
TCell.001	1	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLR10	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	2	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLK10_PEG22	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	3	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	4	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	5	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	6	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	7	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	8	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	9	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	10	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	11	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	12	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	13	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	14	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	15	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	16	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR10	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	17	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1

プロジェクトコード	N	ペイロード (PI)	標的指向リガンド (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 比	+/- 比
TCell.001	18	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	19	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	20	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	21	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	22	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	23	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	24	Cy5_EGFP_mRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	25	Cy5_EGFP_mRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	26	Cy5_EGFP_mRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	27	Cy5_EGFP_mRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	28	Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	29	Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	30	Cy5_EGFP_mRNA	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100: pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	31	VWF_GFP_Cy5_pDNA	N/A	PLR10	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	32	VWF_GFP_Cy5_pDNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	33	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	34	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	35	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	36	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	37	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	38	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	39	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	40	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	41	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	42	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	43	VWF_GFP_Cy5_pDNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	44	VWF_GFP_Cy5_pDNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	45	VWF_GFP_Cy5_pDNA	ALL_LIGANDS_E	TL	pLE100:	2:1	2:1

プロジェクトコード	N	ペイロード (PI)	標的指向リガンド (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 比	+/- 比
			QUIMOLAR (C7-C18)		pDE100		
TCell.001	46	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	N/A	PLR10	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	47	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	48	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	49	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	50	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	51	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	52	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	53	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	54	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	55	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	56	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	57	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	58	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	59	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.001	60	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	61	NLS_Cas9_gRNA_RNP	N/A	PLR10	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	62	NLS_Cas9_gRNA_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	63	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	64	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	65	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	66	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	67	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_3 + CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
TCell.002	68	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1

プロジェクトコード	N	ペイロード (PI)	標的指向リガンド (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 比	+/- 比
			GS)2_9R_N_3 + CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C + IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N				
HSC.004	69	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR10	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	70	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	71	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	72	Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	73	Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	74	Cy5_EGFP_mRNA	cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
CynoBM.002	75	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLR10	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	76	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	mH4_K16Ac_1 : mH2A_1	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	77	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	78	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	79	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	SCF_mcKit_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	80	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	d	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	81	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N + ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	82	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	83	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	84	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	85	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	86	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N + ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100: pDE100	2:1	2:1

プロジェクトコード	N	ペイロード (PI)	標的指向リガンド (TL)	Cat. Spec.	An. Spec.	C:P 比	+/- 比
Blood.001	87	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	88	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	89	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	90	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK30_PEG113	pLE100		
Blood.002	91	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE100		
Blood.002	92	ビヒクル	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	N/A	1.93:1

＊ナノ粒子製剤に使用される細胞内輸送ペプチドは、特定のペイロードにコンジュゲートした核局在シグナルペプチドであった（例えば、「ＮＬＳ＿Ｃａｓ９…」）。
＊ナノ粒子製剤に使用されるカチオン種は、アミノ酸長９（９Ｒ）のポリ（アルギニン）鎖として標的指向リガンド（ＴＬ）にコンジュゲートした。標的指向リガンドを含まないナノ粒子は、長さ１０の非コンジュゲートカチオン種ポリ（アルギニン）ＡＡ鎖（ＰＬＲ１０）または１０のＡＡ鎖長を有するＰＥＧ化ポリ（リジン）を含有した。表中の全てのカチオン種は、１：０のＬ：Ｄ異性体比を有する。
＊ＨＳＣ＝造血幹細胞、ＢＭ＝骨髄細胞、Ｔｃｅｌｌ＝Ｔ細胞、ｂｌｏｏｄ＝全血、ｃｙｎｏＢＭ＝カニクイザル骨髄

【０２３７】

材料および方法

リガンド合成

大部分の標的指向リガンド配列は、社内で設計されており、第三者の商業的提供者によって特注製造されている。ペプチドリガンドは、天然のポリペプチド配列に由来し、いくつかの場合では、結合親和性を改善するために変異させた。結合速度論の計算分析および最適な変異の決定は、Ｒｏｓｅｔｔａソフトウェアの使用を通して達成された。標的指向リガンドが社内で製造される場合、方法および材料は以下の通りであった：

標準的なＦｍｏｃベースの固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）を使用してペプチドを合成した。Ｒｉｎｋ－アミドＡＭ樹脂上でペプチドを合成した。アミノ酸カップリングは、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中のＯ－（１Ｈ－６－クロロベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＣＴＵ）カップリング剤およびＮ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）を用いて行った。ペプチドの脱保護および開裂は、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、トリイソプロピルシラン（ＴＩＰＳ）、および水を用いて行った。粗ペプチド混合物を、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）によって精製した。純粋なペプチド画分を、凍結および凍結乾燥して精製ペプチドを得た。

【０２３８】

ナノ粒子合成

ナノ粒子を、カチオン性成分とアニオン性成分との間で、室温、３７Ｃまたは３７Ｃと室温との差で合成した。カチオン性成分とアニオン性成分の混合中に自然静電相互作用を利用して、水溶液を水性緩衝液中で調製した。開始時に、アニオン性成分をトリス緩衝液（３０ｍＭ～６０ｍＭ；ｐＨ＝７．４～９）またはＨＥＰＥＳ緩衝液（３０ｍＭ、ｐＨ＝５．５）に溶解し、一方でカチオン性成分をＨＥＰＥＳ緩衝液（３０ｍＭ～６０ｍＭ、ｐＨ＝５～６．５）に溶解した。

【０２３９】

具体的には、ペイロード（例えば、遺伝物質（ＲＮＡまたはＤＮＡ）、遺伝物質－タンパク質－核局在シグナルポリペプチド複合体（リボ核タンパク質）、またはポリペプチド）を、塩基性、中性または酸性緩衝液中で再構成した。分析目的のために、ペイロードは、発蛍光団で共有結合的にタグ付けされるか、またはそれを遺伝的にコードするように製

造された。ｐＤＮＡペイロードと共に、ＴＡＴＡＴＡタンデムリピートに特異的なＣｙ５タグ化ペプチド核酸（ＰＮＡ）を使用して、蛍光レポーターベクターおよび蛍光レポーター治療用遺伝子ベクターを蛍光標識した。負に帯電した縮合種（例えば、ポリ（グルタミン酸））としても機能し得る持続放出成分もまた、塩基性、中性または酸性緩衝液中で再構成した。リンカー－アンカー配列にコンジュゲートした野生型由来または野生型変異型標的指向ペプチドを有する標的指向リガンドを酸性緩衝液中で再構成した。追加の縮合種または核局在シグナルペプチドがナノ粒子に含まれていた場合、これらもまた緩衝液中でカチオン種については０．０３％ｗ／ｖの作業溶液として、アニオン種については０．０１５％ｗ／ｖとして再構成した。実験もまた、カチオン種については０．１％ｗ／ｖの作業溶液、アニオン種については０．１％ｗ／ｖで行った。遺伝物質と複合体を形成するものを除く全てのポリペプチドを、可溶化を改善するために１０分間超音波処理した。

【０２４０】

次いで、ナノ粒子のそれぞれ別々に再構成された成分を、調査された添加の順序で混合した。調査された添加の異なる順序は、以下を含む。

１）ペイロード＜カチオン種

２）ペイロード＜カチオン種（アンカー）＜カチオン種（アンカー－リンカー－リガンド）

３）ペイロード＜アニオン種＜カチオン種

４）ペイロード＜カチオン種＜アニオン種

５）ペイロード＜カチオン種（アンカー）＜カチオン種（アンカー－リンカー－リガンド）＜アニオン種

６）ペイロード＜アニオン種＜カチオン種（アンカー）＋カチオン種（アンカー－リンカー－リガンド）

７）ペイロード＋アニオン種＜カチオン種（アンカー）＋カチオン種（アンカー－リンカー－リガンド）

８）ペイロード１（リボ核タンパク質または他の遺伝的／タンパク質材料）＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳまたはリンカー－リガンドを含まない荷電ポリペプチドアンカー）＜アニオン種

９）ペイロード１（リボ核タンパク質または他の遺伝的／タンパク質材料）＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳまたはリンカー－リガンドを含まない荷電ポリペプチドアンカー）＜アニオン種＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳ、またはリンカー－リガンドを含むまたは含まない荷電ポリペプチドアンカー）

１０）ペイロード１（リボ核タンパク質または他の遺伝的／タンパク質材料）＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳまたはリンカー－リガンドを含まない荷電ポリペプチドアンカー）＜ペイロード２／３／４（１つ以上のペイロード）＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳ、またはリンカー－リガンドを含むまたは含まない荷電ポリペプチドアンカー）

１１）ペイロード１（リボ核タンパク質または他の遺伝的／タンパク質材料）＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳまたはリンカー－リガンドを含まない荷電ポリペプチドアンカー）＜ペイロード２／３／４（１つ以上のペイロード）＋アニオン種＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳ、またはリンカー－リガンドを含むまたは含まない荷電ポリペプチドアンカー）

１２）ペイロード１／２／３／４（１つ以上のリボ核タンパク質、タンパク質または核酸ペイロード）＋アニオン種＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳ、またはリンカー－リガンドを含むまたは含まない荷電ポリペプチドアンカー）

１３）ペイロード１／２／３／４（１つ以上のリボ核タンパク質、タンパク質または核酸ペイロード）＜カチオン種（ヒストンフラグメント、ＮＬＳ、またはリンカー－リガンドを含むまたは含まない荷電ポリペプチドアンカー）

【０２４１】

細胞培養

Ｔ細胞

トランスフェクションの２４時間前に、２０Ｍヒト初代Ｐａｎ－Ｔ細胞（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ＃７００２４）を含有するクライオバイアルを解凍し、４×９６ウェルプレートの４×６６ウェルに２００μｌおよび７５，０００細胞／ウェル（１．５Ｅ６細胞／ｍｌ）で播種した。細胞を、１０％ＦＢＳおよびＬ－グルタミンを補充した抗生物質を含まないＲＰＭＩ　１６４０培地（サーモフィッシャー＃１１８７５１１９）中で培養し、２日毎に培地を交換することによって維持した。

【０２４２】

造血幹細胞（ＨＳＣ）

トランスフェクションの２４時間前に、５００ｋのヒト初代ＣＤ３４＋細胞（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ＃７０００２）を含有するクライオバイアルを解凍し、９６ウェルプレートの４８ウェルに２００μｌおよび１０～１２ｋ細胞／ウェルで播種した。培地は、１０％ＦＢＳ、２５ｎｇ／ｍｌ　ＴＰＯ、５０ｎｇ／ｍｌ　Ｆｌｔ－３リガンド、および５０ｎｇ／ｍｌ　ＳＣＦを補充したＳｔｅｍｓｐａｎ　ＳＦＥＭ　ＩＩ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ＃０９６０５）からなり、細胞は、２日毎に培地を交換することによって維持した。

【０２４３】

カニクイザル骨髄（ＨＳＣ）

トランスフェクションの４８時間前に、１．２５Ｍカニクイザル骨髄細胞（ＩＱ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ＃ＩＱＢ－ＭｎＢＭ１）を含有するクライオバイアルを解凍し、丸底９６ウェルプレートの４８ウェルに２００μｌおよび～３０ｋ細胞／ウェルで播種した。細胞を、１２％ＦＢＳを補充した抗生物質を含まないＲＰＭＩ　１６４０培地中で培養し、２日毎に培地を交換することによって維持する。

【０２４４】

ヒトの全血

５ｍＬの全血を静脈穿刺により採取した。１ｍＬを１４ｍＬのＰＢＳと混合した。ナノ粒子を１５ｍＬチューブに直接トランスフェクトするか、またはナノ粒子トランスフェクションの前に１００μｌの血液を９６ウェルプレートの各ウェルに滴定した。

【０２４５】

トランスフェクション

ナノ粒子のストック溶液を形成した後、９６ウェルプレートの１ウェルあたり１０μｌのナノ粒子を添加し、細胞培養条件の変更または培地の補充をせずにインキュベートした（表６を参照）。生細胞イメージング中、ＢｉｏＴｅｋ　Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５により、ＣＯ２および温度制御環境下で９６ウェルプレートを維持した。

【０２４６】

（表６）

ペイロード	1ウェルあたりの投与量 (96ウェルプレート)	ナノ粒子懸濁物の体積
mRNA	100ng mRNA	10ul
CRISPR RNP	100ng sgRNA,	10ul
pDNA	200ng pDNA	10ul
siRNA	50ng	10ul

【０２４７】

分析
縮合曲線および包含曲線
０．００４４ｕｇ／μｌのヘモグロビンサブユニットベータ（ＨＢＢ）ｇＲＮＡまたはフォンヴィレブランド因子（ＶＷＦ）－ＥＧＦＰ－ｐＤＮＡを含有する５０μｌの溶液を、ｐＤＮＡ結合部位またはｍＲＮＡまたはｓｉＲＮＡと、３０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ＝　７．４～８．５）に懸濁した１μｌのＳＹＢＲ０．４ｘとを混合することによって縮合曲線を作成した。ＨＢＢ　ｇＲＮＡは、ＲＮＰ中に複合体として存在していた。インターカレートされたＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄからの蛍光発光を、ＰＬＥ２０、ＰＬＥ３５、ＰＬＥ１００、またはＰＬＥ１００：ＰＤＥ１００（１：１のＤ：Ｌ比）の単回添加の前後でモニターし、カルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は１～１５０の範囲であった。その後、所望のアミン対ホスフェート（Ｎ：Ｐ）またはアミン対ホスフェート＋カルボキシレート［Ｎ：（Ｐ＋Ｃ）］の比率に達するようにカチオン種を添加した。代表的なカチオン種には、ＰＬＲ１０、ＰＬＲ５０、ＰＬＲ１５０、アンカー－リンカーペプチド、荷電ポリ（アルギニン）鎖にコンジュゲートしたＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：ｘｘ）リンカーにコンジュゲートした種々の変異標的指向リガンド（すなわち内部名：ＳＣＦ＿ｍｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）、Ｈｉｓｔｏｎｅ＿Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）ペプチド［１～２２］（ｍＨ３＿Ｋ４Ｍｅ３＿１）、Ｈｉｓｔｏｎｅ＿Ｈ４Ｋ１６（Ａｃ）ペプチド［１～２０］（ｍＨ４＿Ｋ１６Ａｃ＿１）、Ｈｉｓｔｏｎｅ＿Ｈ２Ａペプチド［１～２０］（ｍＨ２Ａ＿１）が含まれ、正電荷と負電荷の比率（ＣＲ）が異なる。いくつかの実験では、上記の指示に従って、カチオン種はアニオン種の前に添加された。
【０２４８】
異なるナノ粒子製剤中に封入された既知量（１００～６００ｎｇ）のＶＷＦ－ＥＧＦＰ－ｐＤＮＡ、ｇＲＮＡ　ＨＢＢ、Ａｌｅｘａ５５５　Ｂｌｏｃｋ－ＩＴ－ｓｉＲＮＡを含有する６０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ＝５．５）溶液に懸濁したナノ粒子に、３０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ＝７．４）で希釈したＳＹＢＲ　ＧＯＬＤ　０．２ｘを複数回添加した後、包含曲線を得た。
【０２４９】
ＧＦＰチャンネル中のインターカレートされたＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄからの蛍光発光を、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２ハイブリッドマルチモードリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ，ＵＳＡ）またはＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅリーダー（ＢＭＧ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して平底半領域９６ウェルプレートで記録した。
【０２５０】
ナノ粒子追跡分析（ゼータ）
ナノ粒子製剤の流体力学的直径およびゼータ電位は、ＺｅｔａＶｉｅｗ機器（Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｍｅｔｒｉｘ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してナノ粒子追跡分析によって調べた。機器に注入する前に、試料をＰＢＳ（１：１２）で１：１００に希釈する。測定値を得るために、分析前にカメラ設定を最適な感度および粒子／フレーム（約１００～１５０）に調整する。
【０２５１】
蛍光顕微鏡－ＢｉｏＴｅｋ　Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５
フローサイトメトリーによる評価の前に、Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５ハイコンテントスクリーニング生細胞イメージング顕微鏡（ＢｉｏＴｅｋ、ＵＳＡ）を利用して、トランスフェクション効率をイメージングした。簡単に説明すると、ＧＦＰおよび／またはＣｙ５チャンネルならびに１０倍対物レンズ下で明視野を利用して、トランスフェクションの前に、トランスフェクション後４時間で１５分ずつ、その後１２時間で２時間ずつ細胞をイメージングした。続いて、画像を、連続的な動態または離散的な１～１８、２４、３６、もしくは４８時間の時点の代表として集めた。
【０２５２】
フローサイトメトリー

洗浄工程を行って細胞培地を除去し、続いて細胞を、ＰＢＳに溶解したＺｏｍｂｉｅＮＩＲ生存率キット染色および／またはＣｅｌｌＥｖｅｎｔ（商標）Ｃａｓｐａｓｅ－３／７　Ｇｒｅｅｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＳＡ）と共に室温で３０分間インキュベートする、細胞標識実験を行った。生存率標識混合物の総容量は、ウェルあたり２５μｌであった。次いで、蛍光一次抗体のパネルを混合物に添加し（ウェルあたり各抗体０．２５μｌ）、１５分間インキュベートしたままにした。ＵｌｔｒａＣｏｍｐ　ｅＢｅａｄｓ　Ｃｏｍｐｅｎｓａｔｉｏｎ　ＢｅａｄｓおよびＮｅｇａｔｉｖｅ　Ｂｅａｄｓまたは生細胞のＣｙ５核染色を利用して、陽性対照および陰性シングルチャンネル対照を作製した。全てのインキュベーション工程は、ロータリーシェーカー上および暗所で行った。異なるチャンネル間で適切な補正を適用した後、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，ＵＳＡ）を使用して、生細胞に対してＡｔｔｕｎｅマルチパラメトリックフローサイトメトリー測定を行った。代表的な細胞集団は、前方および側方散乱強度の適切なゲートの選択によって選択された。細胞蛍光の検出は、少なくとも１００００の事象が収集されるまで続けた。

【０２５３】

結果／データ

図１９～図４４：縮合データ

図１９．（ａ）最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートしたｐ　ＮＡペイロードを有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。

【０２５４】

カチオン性ＰＬＲ１５０を段階的に添加することによってＣＲを増加させた。観察された蛍光の減少は、ＰＬＲ１５０の添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なｃ：ｐ比にわたって一貫したままである。空の溶液には、ペイロードがない場合はＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄが含まれる。（ｂ）ＰＬＥ１００なしのナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動。

【０２５５】

図２０．最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートしたｎｌｓ－ＣＡＳ９－ｎｌｓ　ＲＮＰとｗ／ＨＢＢ　ｇＲＮＡペイロードの複合体を含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ＊）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。さらに、ＣＲ＊の決定は、ｃａｓ９との複合体形成によって遮蔽されたｇＲＮＡの負に帯電した部分を含まない。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。

【０２５６】

カチオン性ＰＬＲ１５０を段階的に添加することによってＣＲを増加させた。空の溶液には、ペイロードがない場合はＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄが含まれる。観察された蛍光の減少は、ＰＬＲ１５０の添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なｃ：ｐ比にわたって一貫したままである。

【０２５７】

図２１．最初にＳＹＢＲ　ＧｏｌｄとインターカレートしたｇＲＮＡ　ＨＢＢペイロードを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。

【０２５８】
ＰＬＲ１５０を段階的に添加することによってＣＲを増加させた。空の溶液には、ペイロードがない場合はＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄが含まれる。観察された蛍光の減少は、ＰＬＲ１５０の添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、ＣＲに関する縮合は、様々なＣ：Ｐ比にわたって一貫したままである。
【０２５９】
（表７）いくつかの製剤についての流体力学的直径およびゼータ電位を縮合終点で測定し、以下の表に報告する。

ペイロード	C:P	流体力学的直径 [nm]	ゼータ電位 [mV]
pDNA	0	120 ± 49	-
HBB gRNA	0	99 ± 32	6.7 ± 0.6
RNP (NLS-Cas9-NLS およびHBB gRNA)	0	90 ± 36	-0.6 ± 0.9
RNP (NLS-Cas9-NLS およびHBB gRNA	15	110 ± 49	26.7 ± 1
pDNA	15	88 ± 49	11.7 ± 0.6

【０２６０】
図２２～図２４：カチオン性物質としてのペプチドＳＣＦ＿ｒｍＡｃ－ｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの縮合曲線
図２２．（ａ）（ｂ）最初にＳＹＢＲ　ＧｏｌｄとインターカレートしたｈＢＢ　ｇＲＮＡペイロードを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。
【０２６１】
ＣＲは、正に荷電したポリ（アルギニン）にコンジュゲートした（ＧＧＧＳ）２リンカーにコンジュゲートしたカチオン性変異ｃＫｉｔ標的指向リガンド（内部リガンド名：ＳＣＦ＿ｒｍＡｃ－ｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）の段階的添加により増加した。観察された蛍光の減少は、ＳＣＦ＿ｒｍＡｃ－ｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なｃ：ｐ比にわたって一貫したままである。空の溶液には、ペイロードがない場合はＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄが含まれる。
【０２６２】
図２３．（ａ）（ｂ）最初にＳＹＢＲ　ＧｏｌｄとインターカレートしたｎＬＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳ　ＲＮＰとｗ／　ＨＢＢ　ｇＲＮＡペイロードの複合体を含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。
【０２６３】
ＣＲは、正に荷電したポリ（アルギニン）にコンジュゲートした（ＧＧＧＳ）２リンカーにコンジュゲートしたカチオン性変異ｃＫｉｔ標的指向リガンド（内部リガンド名：ＳＣＦ＿ｒｍＡｃ－ｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）の段階的添加により増加した。観察された蛍光の減少は、ＳＣＦ＿ｒｍＡｃ－ｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの添加に

よってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なｃ：ｐ比にわたって一貫したままである。空の溶液には、ペイロードがない場合はＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄが含まれる。

【０２６４】

図２４．（ａ）（ｂ）最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートしたｐ ＮＡペイロードを有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。

【０２６５】

ＣＲは、正に荷電したポリ（アルギニン）にコンジュゲートした（ＧＧＧＳ）２リンカーにコンジュゲートしたカチオン性変異ｃＫｉｔ標的指向リガンド（内部リガンド名：ＳＣＦ＿ｒｍＡｃ－ｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）の段階的添加により増加した。観察された蛍光の減少は、ＳＣＦ＿ｒｍＡｃ－ｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なｃ：ｐ比にわたって一貫したままである。空の溶液には、ペイロードがない場合はＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄが含まれる。

【０２６６】

図２５～図２６：カチオン性物質としてのヒストンＨ３Ｋ４Ｍｅの縮合曲線

図２５．最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートしたｐ ＮＡペイロードを有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。カチオン性変異ヒストン＿Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）ペプチド［１～２２］（内部ペプチド名ｍＨ３＿Ｋ４Ｍｅ３＿１）の段階的添加により、ＣＲを増加させた。観察された蛍光変化は、ＰＬＥ１００の存在下でｍＨ３＿Ｋ４Ｍｅ３＿１を添加することによってＣＲを増加させることが、ＳＹＢＲをペイロードから十分に置き換えることができないことを示す。空の溶液には、ペイロードがない場合はＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄが含まれる。

【０２６７】

図２６．（ａ）最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートしたｐ ＮＬＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳ　ＲＮＰとｗ／ＨＢＢ　ｇＲＮＡペイロードの複合体を含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。カチオン性変異ヒストン＿Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）ペプチド［１～２２］（内部ペプチド名ｍＨ３＿Ｋ４Ｍｅ３＿１）の段階的添加により、ＣＲを増加させた。観察された蛍光変化は、ＰＬＥ１００の存在下でｍＨ３＿Ｋ４Ｍｅ３＿１を添加することによってＣＲを増加させることが、一貫してＳＹＢＲをペイロードから置き換えることができないことを示す。しかしながら、ヒストン＿Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）は、アニオン性ポリペプチドの不在下で、ＣＲ≦８：１で有効な縮合剤であることが示されている。

【０２６８】

図２７～図３０：カチオン性物質としてのペプチドＣＤ４５＿ａＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの縮合曲線

図２７．最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートしたｐ ＮＡペイロードを有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に

対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。

【０２６９】

ＣＲは、正に荷電したポリ（アルギニン）にコンジュゲートした（ＧＧＧＳ）２リンカーにコンジュゲートしたカチオン性変異ＣＤ４５受容体標的指向リガンド（内部リガンド名：ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）の段階的添加により増加した。空のシンボルは、ペイロードがない場合のＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄを含有する空の溶液を表す。

【０２７０】

観察された蛍光の減少は、ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なＣ：Ｐ比にわたって一貫したままである。

【０２７１】

図２８．最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートした Ｃｙ５－ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡペイロードを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。

【０２７２】

ＣＲは、正に荷電したポリ（アルギニン）にコンジュゲートした（ＧＧＧＳ）２リンカーにコンジュゲートしたカチオン性変異ＣＤ４５受容体標的指向リガンド（内部リガンド名：ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）の段階的添加により増加した。観察された蛍光の減少は、ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なｃ：ｐ比にわたって一貫したままである。

【０２７３】

図２９．最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートした ＢＬＯＣＫ－ｉＴ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５５５　ｓｉＲＮＡペイロードを含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。ＣＲは、正に荷電したポリ（アルギニン）にコンジュゲートした（ＧＧＧＳ）２リンカーにコンジュゲートしたカチオン性変異ＣＤ４５受容体標的指向リガンド（内部リガンド名：ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）の段階的添加により増加した。観察された蛍光の減少は、ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なＣ：Ｐ比にわたって一貫したままである。

【０２７４】

図３０．（ａ）最初にＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄとインターカレートした ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＲＮＰとＨＢＢ　ｇＲＮＡペイロードの複合体を含有するナノ粒子における正電荷対負電荷比（ＣＲ）の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。凡例に示されているカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）の比は、ペイロードの遺伝物質上のリン酸基に対するアニオン性ポリペプチド種（ＰＬＥ１００）上のカルボン酸基のナノ粒子の比率に基づいている。

【０２７５】

ＣＲは、正に荷電したポリ（アルギニン）にコンジュゲートした（ＧＧＧＳ）２リンカーにコンジュゲートしたカチオン性変異ＣＤ４５受容体標的指向リガンド（内部リガンド名：ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ）の段階的添加により増加した。塗りつぶしのシンボルは、ペイロードがない場合のＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄを含有する空の

溶液を表す。

【０２７６】

観察された蛍光の減少は、ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃの添加によってＣＲを増加させると、粒子が縮合するにつれてＳＹＢＲがペイロードから置き換えられることを示す。さらに、縮合は、様々なｃ：ｐ比にわたって一貫したままである。（ｂ）ＰＬＥを含まず、電荷比＝２２を有するナノ粒子の流体力学的直径分布の代表的な画像。平均直径は、＜ｄ＞＝１３４ｎｍ±６５である。

【０２７７】

（表８）いくつかの製剤についての流体力学的直径およびゼータ電位を縮合終点で測定し、以下の表に報告する。

ペイロード	C:P	カチオン性ペプチド	流体力学的直径 [nm]	ゼータ電位 [mV]
RNP (NLS-Cas9-EGFP およびgRNA)	0	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	134±65	13±1
RNP (NLS-Cas9-EGFP およびgRNA	10	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	166 ±75	19.2±1
RNP (NLS-Cas9-EGFP およびgRNA	20	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	179±92	21± 1

【０２７８】

図３１～図３４：包含曲線

図３１．１５０ｎｇのＢＬＯＣＫ－ｉＴ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５５５　ｓｉＲＮＡペイロードを全て含有する異なるナノ粒子製剤への段階的なＳＹＢＲ添加の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ包含アッセイ。０μｌ～５０μｌのＳＹＢＲの蛍光のデルタ変化は、ナノ粒子製剤の安定性を示す。製剤の安定性が低いほど、ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄは遺伝子ペイロードとインターカレートする可能性が高くなる。リポフェクタミンＲＮＡｉＭＡＸを、ここで陽性対照として使用する。表２～４。

【０２７９】

図３２．３００ｎｇのＨＢＢ　ｇＲＮＡペイロードを全て含有する異なるナノ粒子製剤への段階的なＳＹＢＲ添加の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ包含アッセイ。０μｌ～５０μｌのＳＹＢＲの蛍光のデルタ変化は、ナノ粒子製剤の安定性を示す。製剤の安定性が低いほど、ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄは遺伝子ペイロードとインターカレートする可能性が高くなる。リポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸを、ここで陽性対照として使用する。表２～４。

【０２８０】

図３３．Ｃｙ５　ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡペイロードを全て含有する異なるナノ粒子製剤への段階的なＳＹＢＲ添加の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ包含アッセイ。０μｌ～５０μｌのＳＹＢＲの蛍光のデルタ変化は、ナノ粒子製剤の安定性を示す。製剤の安定性が低いほど、ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄは遺伝子ペイロードとインターカレートする可能性が高くなる。リポフェクタミンＭｅｓｓｅｎｇｅｒ　ＭＡＸを、ここで陽性対照として使用する。表２～４。

【０２８１】

図３４．６００ｎｇのＣｙ５タグ化ペプチド核酸（ＰＮＡ）結合部位を有するＶＷＦ－ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡペイロードを全て含有する異なるナノ粒子製剤への段階的なＳＹＢＲ添加の関数としての蛍光強度変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ包含アッセイ。０μｌ～５０μｌのＳＹＢＲの蛍光のデルタ変化は、ナノ粒子製剤の安定性を示す。製剤の安定性が低いほど、ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄは遺伝子ペイロードとインターカレートする可能性が高くなる。リポフェクタミン３０００を、ここで陽性対照として使用する。表２～４。

【０２８２】

図３５～図４４：ＴＣ．００１に関するＳＹＢＲ排除／縮合アッセイ（表２～４を参照）
これらのデータは、実験ＴＣ．００１において使用された製剤が安定であることを示し、さらにそれらは、Ｈ３とは異なり、Ｈ２ＡおよびＨ４ヒストンテールペプチドが全ての列挙されたペイロードに対してそれ自体有効な縮合剤であることを示す。それはまた、Ｈ２ＡおよびＨ４が、アンカー－リンカー－リガンドとさらに組み合わされ得ることを示す。最後に、アニオン性ポリマーに添加する前の核酸またはリボ核タンパク質ペイロードにコンジュゲートした様々なアンカー－リンカー－リガンドペプチドに関するサイズおよびゼータ電位測定を通して実証されるように、その後のアニオン性ポリマー（この実施形態では、ＰＬＥ１００）の添加は粒子安定性に影響を及ぼさないか、または安定性を高めるという証拠が提示される。

【０２８３】
図３５．ＲＮＰに、カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加し、さらにカチオン性ポリペプチドを添加することによる蛍光強度の低下を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。蛍光バックグラウンドシグナルは、ＲＮＰからのＧＦＰ蛍光によるものである。

【０２８４】
図３６．ｓｉＲＮＡおよびＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄに、カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加し、さらにカチオン性ポリペプチドを添加することによって蛍光強度の変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。

【０２８５】
図３７．ＨＢＢ　ｇＲＮＡおよびＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄを有するＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰのＲＮＰに、カチオン性ポリペプチドヒストンペプチドＨ２Ａを添加し、続いてＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、さらにＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。

【０２８６】
図３８．ＨＢＢ　ｇＲＮＡおよびＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄを有するＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰのＲＮＰに、ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃと一緒にカチオン性ポリペプチドヒストンペプチドＨ４を添加し、さらにＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。

【０２８７】
図３９．ｍＲＮＡに、カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、さらにＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。

【０２８８】
図４０．ｍＲＮＡに、ヒストンＨ４を添加し、さらにＣＤ４５－ｍＳｉｇｌｅｃ－（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿ｃおよびＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。

【０２８９】
図４１．ｍＲＮＡに、ヒストンＨ２Ａを添加し、さらにＣＤ４５－ｍＳｉｇｌｅｃ－（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿ｃおよびＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。

【０２９０】
図４２．カチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＶＷＦ＿ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡとのインターカレーションからのＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。

【０２９１】
図４３．ヒストンＨ４を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＶＷＦ＿ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡとのインターカレーションからのＳＹＢ

Ｒ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。
【０２９２】
図４４．ヒストンＨ４を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃを添加し、続いてＰＬＥ１００を添加することによって蛍光強度の変動を示すＶＷＦ＿ＥＧＦＰ　ｐＤＮＡとのインターカレーションからのＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ排除アッセイ。
【０２９３】
図４５～図８３：理化学的データ
粒子サイズおよびゼータ電位は、コロイド状ナノ材料のキャラクタリゼーションに使用される日常的な測定値である。これらの測定値は、主に、ＤＬＳ（動的光散乱）などの光散乱技術を通して得られる。ナノ粒子追跡分析（ＮＴＡ）は、レーザー散乱顕微鏡法および画像分析を利用して、高解像度で粒子サイズおよびゼータ電位の測定値を得る。
【０２９４】
分析
分散性は、試料の不均一性の尺度であり、分布によって決定され、ここで、低い標準偏差および単一ピークは、粒子の均一性を示す。
【０２９５】
リガンド、（ＧＧＧＧＳ）２リンカー、および静電アンカードメインを有するポリペプチドからなる標的指向リガンドを固相ペプチド合成によって合成し、ｐＥＧＦＰ－Ｎ１プラスミドＤＮＡペイロードを担持する粒子のシリカ表面（脱落可能層）を官能化するために使用した。得られた粒子サイズおよびゼータ電位分布は、ＺｅｔａＶＩＥＷ装置（Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｍｅｔｒｉｘ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してナノ粒子追跡分析によって得られた。
【０２９６】
図４５．（Ａ）Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）およびポリ（Ｌ－アルギニン）と複合体化したｐＥＧＦＰ－Ｎ１プラスミド（２９ｋＤ、ｎ＝１５０）からなるコアポリプレックスサイズ分布。（Ｂ）特徴的な負のゼータ電位および１２４ｎｍの平均粒径を示すシリカ脱落可能層を有する図４５Ａのポリプレックス。（Ｃ）図４５Ｂに示される粒子上にコーティングされたＮ末端アンカーおよびグリシン－セリンリンカー（（ＧＧＧＧＳ）２）を有するＥセレクチンリガンド。
【０２９７】
図４６．分枝ヒストンペプチドコンジュゲートパイロット粒子Ｃ末端システインを有するヒストンＨ３ペプチドを、１０％の側鎖チオール置換を有する４８ｋＤのポリ（Ｌ－リジン）にコンジュゲートさせた。遠心ろ過および分子量排除により精製した最終生成物を使用して、プラスミドＤＮＡ（ｐＥＧＦＰ－Ｎ１）を複合体化した。図４６に示す測定結果は、狭いサイズ分布を示している。プラスミドＤＮＡ（ｐＥＧＦＰ－Ｎ１）と複合体を形成しているＨ３－ポリ（Ｌ－リジン）コンジュゲートのサイズ分布
【０２９８】
図４７～８３では、データは実験番号（プロジェクトコード）によって索引付けされている。多くの場合、これは表５のプロジェクトコードと相互参照され得る（ＨＳＣ＝造血幹細胞、ＢＭ＝骨髄細胞、Ｔｃｅｌｌ＝Ｔ細胞、ｂｌｏｏｄ＝全血、ｃｙｎｏＢＭ＝カニクイザル骨髄）。
【０２９９】
図４７は、プロジェクトＨＳＣ．００１．００１に関するデータを提供する。
【０３００】
図４８は、ＰＮＡタグ付きｐＤＮＡおよびＥ－セレクチン標的指向ペプチド（ＥＳＥＬＬｇ＿ｍＥＳＥＬ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｎ）と複合体を形成したＨ３－ポリ（Ｌ－リジン）コンジュゲートを使用したプロジェクトＨＳＣ．００１．００２に関するデータを提供する。
【０３０１】

図４９～図５２は、シリカコーティング粒子およびシリカコーティングナノダイヤモンド上に種々の標的指向リガンドまたはステルス分子をコーティングした実験のデータを提供する（蛍光増感用途の診断のため）。サイズおよびゼータ電位分布は、関連する統計と共に提示される。標的指向リガンドは、それぞれＥＳＥＬＬｇ＿ｍＥＳＥＬ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｎ、ＥＳＥＬＬｇ＿ｍＥＳＥＬ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ、ＣＤ４５＿ｍＳｉｇｌｅｃ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｃ、およびＣｙ５ｍＲＮＡ－ＳｉＯ２－ＰＥＧであった。

【０３０２】

ナノ製剤および標的指向リガンドの性能は全てのデータにおいて有意に改善され、シリカ層を除去し、荷電アニオン性脱落可能ポリペプチドマトリックスと交換すると、さまざまなペイロードおよびリガンド標的指向アプローチを用いた、全ての製剤にわたってナノ粒子のトランスフェクション効率が大幅に向上した。しかしながら、上記のデータで使用された多層化技術、ならびに分枝ヒストン複合体との増強された縮合およびそれに続くペプチドマトリックス工学（実施例は、Ｔｃｅｌｌ．００１、ＨＳＣ．００４、ＣＹＮＯＢＭ．００２、およびＢｌｏｏｄ．００２に提示される）は、技術（例えば多層化）およびコア生体材料（例えば、開示全体およびその後の実験を参照）の柔軟性を実証する。本明細書に記載されるすべての技術は、診断用または治療用、自己組織化材料にも同様に任意の粒子コアに適用され得る。例えば、分枝ヒストンは、リンカー－リガンドドメインにコンジュゲートされ得るか、または複数の実施形態およびその使用と共縮合され得る。

【０３０３】

図５３～図５７は、脱落可能ポリ（グルタミン酸）表面マトリックスおよびＣＤ４５リガンドと複合体を形成したＣｙ５－ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡペイロードを担持する粒子を示す。この配合を使用して製造されたナノ粒子は、粒子サイズおよびゼータ電位において非常に均一であった。ＳＩＧＬＥＣ由来のペプチドとｍＲＮＡとの会合後にポリグルタミン酸を添加した粒子は、ＳＩＧＬＥＣ由来のｍＲＮＡおよびポリ（グルタミン酸）との会合前にポリ（グルタミン酸）を添加した粒子よりも安定で単分散であり（ＢＬＯＯＤ．００２．８８）、これは特定の添加順序がより安定な粒子を形成するのに役立ち得ることを示す。さらに、リン酸含有核酸なしでＳＩＧＬＥＣ由来ペプチドと複合体を形成したポリ（グルタミン酸）から形成された粒子は、高度にアニオン性の単分散であった（ＢＬＯＯＤ．００２．９２）。ｍＲＮＡとのＰＬＲ会合後にＰＬＥ１００を添加してＰＬＲ５０から形成された粒子は、非常に安定で、単分散でカチオン性であった（ＢＬＯＯＤ．００２．９１）。対照的に、ＰＬＥ１００添加前のｍＲＮＡとのＰＬＫ－ＰＥＧの会合は、不均一電荷分布を有する非常に小さい粒子をもたらした。これらの添加順序およびＳＩＧＬＥＣ誘導体ペプタイドの有効性は、ＰＥＧ化対照と同様のトランスフェクション効率にもかかわらず、リガンドに標的指向されたＳＩＧＬＥＣ誘導体粒子が全血球においてほぼ２桁大きいＣｙ５強度をもたらすフローサイトメトリーデータによって実証された。

【０３０４】

図５３は、ＢＬＯＯＤ．００２．８８からのデータを提供する。ナノ粒子は、－３．３２±０．２９ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１８０ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによると、全血において５８．６％の効率的なＣｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした。狭くて一様なピークは、優れた電荷分布の例であり、ＴＣＥＬＬ．００１．１８において正味のアニオン性粒子を形成するのに再現性があった。これは、全身送達のためのＳＩＧＬＥＣ由来標的指向ペプチドの広範な適用性を実証する（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。

【０３０５】

図５４は、ＢＬＯＯＤ．００２．８９からのデータを提供する。ナノ粒子は－０．２５±０．１２ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１７６ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによると、全血においてそれぞれ５８．６％の効率的なＣｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした。これは、全身送達の

ためのＳｉｇｌｅｃ由来標的指向ペプチドの広範な適用性を実証する（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。

【０３０６】

図５５は、ＢＬＯＯＤ．００２．９０からのデータを提供する。ナノ粒子は、２．５４±０．０３ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が９９ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによると、全血においてそれぞれ７９．９％の効率的なＣｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。

【０３０７】

図５６は、ＢＬＯＯＤ．００２．９１からのデータを提供する。ナノ粒子は、２７．１０　ＦＷＨＭ　１８．４０ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１３０ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによると、全血においてそれぞれ９６．７％の効率的なＣｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。強く正に帯電したゼータ電位は、全血球上での高い効率および強度のＣｙ５＋シグナルをもたらした。簡潔には、この実施形態では、より高用量のＰＬＲ５０（１５μｌのＰＬＲ５０　０．１％ｗ／ｖ溶液）を、２．５μｇのＣｙ５　ｍＲＮＡを含む１００μｌのｐＨ５．５　３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ＴｒｉＬｉｎｋ）に添加した。３７℃で５分後、１．５μｌの０．１％ＰＬＥ１００を溶液に添加した。対照的に、他の実験では、より大きな相対容量（全溶液容量の５～２０％）のＰＬＥ１００を、あらかじめ形成されたカチオン性ポリマー＋アニオン性材料コアに添加することが含まれた。

【０３０８】

図５７は、ＢＬＯＯＤ．００２．９２からのデータを提供する。ナノ粒子は、－２２．１６　ＦＷＨＭ　１８．４０ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１３０ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、それらがフルオロフォアで標識されなかったため、フローサイトメトリーデータによれば、全血における検出可能なＣｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらさなかった（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。ペイロード（ビヒクル）なしでこれらのナノ粒子を効果的に縮合させることは、荷電ポリマーの小分子または化学療法剤へのコンジュゲーションなど、非遺伝物質ペイロード送達にも影響を与える。

【０３０９】

図５８～図７３は、ＣＲＩＳＰＲリボ核タンパク質（ＲＮＰ）（ＴＣＥＬＬ．００１．０１～ＴＣＥＬＬ．００１．１５）、ｍＲＮＡ（ＴＣＥＬＬ．００１．１６～ＴＣＥＬＬ．００１．３０）、プラスミドＤＮＡ（ＴＣＥＬＬ．００１．３１～ＴＣＥＬＬ００１．４５）およびｓｉＲＮＡ（ＴＣＥＬＬ．００１．４６～ＴＣＥＬＬ．００１．６０）を含有し、対応する群の同一のリガンドでパターン化された代表的な粒子を特徴付けるために行われた実験からの結果を示す。

【０３１０】

図５８は、ＢＬＯＯＤ．００１．１からのデータを提供する。ナノ粒子は、－３．２４±０．３２ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が７７ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋ｐａｎＴ細胞において、それぞれ９９．１６％および９８．４７％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの取り込みをもたらした（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。これらの製剤はまた、全てのＣＹＮＯＢＭ．００２．７５の理化学的性質、ならびにその後のＣＹＮＯＢＭ．００２．８２～ＣＹＮＯＢＭ．００２．８５の層状化のための基材として働くコアを反映しており、ここで、ＰＬＲ１０コーティング粒子は、１つ以上のアニオン性ポリペプチド、核酸、および／またはＤ：Ｌ比、分子量、および組成の範囲の荷電高分子のアニオン性脱落可能コートと複合体を形成した。ＣＹＮＯＢＭ．００２．８２－ＣＹＮＯＢＭ．００２．８５の荷電ポリマーまたは荷電アンカー－リンカー－リガンドの添加前に、ＴＣＥＬＬ．００１．１はＰＬＥ１００＋ｍＲＮＡで続

いてコーティングされた。

【０３１１】

図５９は、ＴＣＥＬＬ．００１．３からのデータを提供する。ナノ粒子は、－０．９８±０．０８ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が６５ｎｍ未満の直径を有していた。理想的なサイズ範囲にもかかわらず、フローサイトメトリーデータによれば、これらのナノ粒子は、同じ細胞集団で約９９％の効率を達成したＴＣＥＬＬ．００１．１における強いアニオン性の同じサイズの粒子とは対照的に、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋ｐａｎＴ細胞においてそれぞれ１１．６％および１３．２％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの取り込みをもたらした。粒子サイズと安定な負のゼータ電位との関係およびその方法および使用は、本明細書に記載の実験を通じて予測可能な制約であることが示されている。理想的なナノ粒子は、＜－５ｍＶのゼータ電位を有する＜７０ｎｍの粒子の大部分を有し、本明細書に記載のアニオン性脱落可能コーティング方法およびＣＹＮＯＢＭ．００２に記載の同時送達のための多段階積層脱落可能マトリックスは、ヒトおよびカニクイザルの血液、骨髄、ならびに上記の範囲内の特定の細胞からの敏感な一次細胞の安定かつ極めて効率的なトランスフェクションを達成する。ＴＣＥＬＬ．００１．３の効率の低下は、同じリガンドがこの特定のＣＲＩＳＰＲ製剤に使用されるものよりも変更されたアミン対ホスフェート対カルボキシレート比でｍＲＮＡの安定な縮合を達成したＴＣＥＬＬ０１．２７の結果とは著しく対照的である（例えば、下記のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。

【０３１２】

図６０は、ＴＣＥＬＬ．００１．１３からのデータを提供する。ナノ粒子は、２．１９±０．０８ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１０１ｎｍ未満の直径を有していた。生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋ｐａｎ　Ｔ細胞におけるＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの取り込みの効率については、以下のフローサイトメトリー／画像データを参照。

【０３１３】

図６１は、ＴＣＥＬＬ．００１．１４からのデータを提供する。ナノ粒子は、－９．３７±０．１６ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１１１ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋ｐａｎＴ細胞において、それぞれ２５．７％および２８．６％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの取り込みをもたらした。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。

【０３１４】

図６２は、ＴＣＥＬＬ．００１．１６からのデータを提供する。

【０３１５】

図６３は、ＴＣＥＬＬ．００１．１８からのデータを提供する。これらの粒子のサイズおよびゼータ電位は、－２０．２６±０．１５ｍＶのゼータ電位で、９０％の粒子が３９．２～１２９．８ｎｍの直径を有する、８０．９ｎｍの平均粒径を示し、１．３５のカルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）および０．８５のアミン対ホスフェート比で強い粒子安定性を示し、ここでカチオン性アンカー－リンカー－リガンドを含有させた後にポリ（グルタミン酸）を添加した。追加の一般的なパターン、工学的な制約、観察、および高効率初代細胞トランスフェクションの達成に関連する経験的測定についてのＴＣＥＬＬ．００１．２、ＴＣＥＬＬ．００１．１８、およびＣＹＮＯＢＭ．００２のゼータ電位、サイズ、フローサイトメトリーおよび顕微鏡データをすべて参照（例えば、表５ならびに下記のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。

【０３１６】

図６４は、ＴＣＥＬＬ．００１．２８からのデータを提供する。図６５は、ＴＣＥＬＬ．００１．２９からのデータを提供する。図６６は、ＴＣＥＬＬ．００１．３１からのデータを提供する。図６７は、ＴＣＥＬＬ．００１．３３からのデータを提供する。図６８は、ＴＣＥＬＬ．００１．４３からのデータを提供する。図６９は、ＴＣＥＬＬ．００１．４４からのデータを提供する。図７０は、ＴＣＥＬＬ．００１．４６からのデータを提

供する。図７１は、ＴＣＥＬＬ．００１．４８からのデータを提供する。図７２は、ＴＣＥＬＬ．００１．５８からのデータを提供する。図７３は、ＴＣＥＬＬ．００１．５９からのデータを提供する。

【０３１７】

図７４～図８３は、カニクイザル骨髄細胞に使用された製剤を特徴付ける結果を示す。

【０３１８】

図７４は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８２からのデータを提供する。３％の生細胞における胎児ヘモグロビンタンパク質発現によって証明されるように、粒子は、全骨髄赤血球前駆細胞におけるＢＣＬ１１ａ赤血球エンハンサーを首尾よく削除した。ＣＹＮＯＢＭ．００２．８２ナノ粒子は、２．９６±０．１４ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１３２ｎｍ未満の直径を有し、粒子の５０％が３０ｎｍ未満の直径を有する。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、わずか１１．４％の全骨髄生存サブ集団標的指向にもかかわらず、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄亜集団における、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰおよびＣｙ５　ｍＲＮＡの、それぞれ、約４８％、約５３％、および約９７％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡ共局在的取り込みをもたらした。

【０３１９】

対照的に、ＰＬＲ１０、ＰＬＥ１００、ＰＤＥ１００、およびＣａｓ９　ＲＮＰからなる同一のコアテンプレートを有するが、ｍＲＮＡ共送達成分またはＰＬＲ５０のさらなる層を含まないＣＹＮＯＢＭ．００２．７５は、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄亜集団において、それぞれ、約２０％、約１４％、および約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの取り込み、およびフローサイトメトリーデータによる１８．０％の全骨髄生存サブ集団標的指向を示した。

【０３２０】

これらのデータを用いて、混合骨髄一次集団内での全体的なトランスフェクション効率においてわずかな増強が見られた場合でさえ、より大きな粒子は選択的標的指向にあまり適していない可能性があると推論することができる。一次細胞培養トランスフェクションに対する粒子の二峰性分布の影響は決定されていないままである。以前の研究では、骨芽細胞は、１５０～２００ｎｍの粒子を高効率でエンドサイトーシスすることが見出された。驚くべきことに、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８２を有する粒子の集団の大部分は、ＴＣＥＬＬ．００１．１と同様に８５ｎｍピークを下回っていたが、ＰＬＥ、ＰＤＥ、ｍＲＮＡおよびＣａｓ９　ＲＮＰの基礎となるポリペプチド－リボ核タンパク質－ｍＲＮＡ－タンパク質マトリックスを取り囲むＰＬＲ５０の正電荷陽性マトリックスを有した。

【０３２１】

さらに、全生存細胞の３．０％が胎児ヘモグロビン陽性であり、これらの細胞はいずれもＣＤ３４＋ではなく、ＣＤ３４－赤血球前駆細胞内のＢＣＬ１１ａ赤血球前駆細胞ノックアウト集団のクローン増殖が成功したことを示唆している。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。結果はまた、内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および骨髄の他の細胞における標的指向の成功を意味し得る。

【０３２２】

図７５は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８３からのデータを提供する。これらの細胞のいずれもＣＤ３４＋ではない１．９％の生細胞における胎児ヘモグロビンタンパク質発現によって証明されるように、粒子は、全骨髄赤血球前駆細胞におけるＢＣＬ１１ａ赤血球エンハンサーを首尾よく削除した。ナノ粒子は、－２．４７±０．３３ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が２０６ｎｍ未満の直径を有し、同じＩＬ２－模倣ペプチドコーティングでのＣＹＮＯＢＭ．００２．０３に対して改善したトランスフェクション効率をもたらした。約－５０ｍＶおよび＋２５ｍＶのテールを有する大きな電荷分布は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８３と同様に、また他のＣＲＩＳＰＲ＋ｍＲＮＡ共送達粒子群（ＣＹＮＯＢＭ．００２．８２～ＣＹＮＯＢＭ．００２．８５）と比較して、安定なアニオン性単一ピークゼータ電位－１８ｍＶおよび対応する細胞生存率の増加を有するＣＹＮＯＢＭ．００２．８４

とは対照的に、粒子安定性の分散を有する多分散粒子集団を示していた。全体的なカニクイザル骨髄同時送達に関して次善のナノ粒子群は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８６であり、－２０ｍＶの同様の高い正味負電荷ゼータ電位、ならびに対応する高効率のトランスフェクション、ＣＤ３４クローン拡大、およびＢＣＬ１１ａ赤血球エンハンサーノックアウトからの胎児ヘモグロビン産生が実証された。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、混合細胞集団、ならびに８．１％の全骨髄生存亜集団内で、生存ＣＤ３４＋骨髄細胞において、約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした。フローサイトメトリーデータは、カニクイザル骨髄細胞における選択的ＣＤ３４＋増殖の誘導を示し、ＣＤ３４－赤血球前駆細胞内のＢＣＬ１１ａ赤血球前駆細胞ノックアウト集団の成功したクローン拡大を示唆している。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。結果はまた、内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および／または骨髄の他の細胞における標的指向の成功を意味する。

【０３２３】

図７６は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８４からのデータを提供する。各選択的亜集団におけるＣｙ５－ｍＲＮＡ＋およびＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋ゲートにより測定された中等度のトランスフェクション効率にもかかわらず、ＣＤ３４＋、ＣＤ４５またはＣＤ３＋亜集団における９．５％の生全骨髄細胞における胎児ヘモグロビンタンパク質発現および陽性ではない胎児ヘモグロビン測定によって証明されるように、粒子は、全骨髄赤血球前駆細胞におけるＢＣＬ１１ａ赤血球エンハンサーを首尾よく削除した。ＣＹＮＯＢＭ．００２．８４ナノ粒子は、－１８．０７＋／－０．７１ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が２０５ｎｍ未満の直径を有していた。高い正味負電荷は、安定した粒子形成を示す。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞において、それぞれ７６．５％、７１％、および約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込み、ならびに２５．５％の全骨髄生存亜集団をもたらした。さらに、全生存細胞の９．５％が胎児ヘモグロビン陽性であり、これらの細胞はいずれもＣＤ３４＋ではなく、ＣＤ３４－赤血球前駆細胞内のＢＣＬ１１ａ赤血球前駆細胞ノックアウト集団のクローン増殖が成功したことを示唆している。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。結果はまた、内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および／または骨髄の他の細胞における標的指向の成功を意味する。

【０３２４】

図７７は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８５からのデータを提供する。ナノ粒子は、－１２．５４±０．２５ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１８６ｎｍ未満の直径を有していた。フローサイトメトリーデータによれば、これらのナノ粒子は、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞において、それぞれ約３３％、約２３％、および約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。結果は、内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および骨髄の他の細胞における標的指向の成功を意味し得る。粒子サイズおよび電荷分布は、その後のＣＹＮＯＢＭ．００２グループおよびカニクイザル骨髄ＣＲＩＳＰＲおよび／またはｍＲＮＡ送達におけるそれらの予想される生物学的性能と一致していた。

【０３２５】

図７８は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８６からのデータを提供する。ナノ粒子は、－２０．０２±０．１０ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１２０ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによると、それぞれ約６８％、７０％、および約９７％の効率のＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋の標的指向で、生存カニクイザル骨髄におけるＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの２０．１％の効率的共送達をもたらした。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。結果は、内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および骨髄の他の細

胞における標的指向の成功を意味し得る。非常に負に帯電したゼータ電位および粒子数の９０％が＜２００ｎｍであることは、高い効率を予測する。

【０３２６】

図７９は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．７６からのデータを提供する。ナノ粒子は、－１２．０２±０．５９ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１３５ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞において、それぞれ１８．４％、１０．３％、および約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの取り込みをもたらした（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。さらに、約５００ｎｍに大きな体積ピークを追加することで、同様のゼータ電位分布およびサイズを示す、ＣＹＮＯＢＭ．００２．７８に見られるように、大きな凝集体のない、非常に負のゼータ電位１０～５０パーセンタイル粒径２５．８～８０．６ｎｍのヒストン様粒子から予想されるように、粒子の毒性は限られている。

【０３２７】

図８０は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．７７からのデータを提供する。ナノ粒子は、９０％が２５４ｎｍ未満の直径であり、大部分は１７１～２５４ｎｍの範囲であった。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。さらに、数による１０～５０パーセンタイル粒子は７０～１７２ｎｍであり、この集団内での合理的なサイズ分布を示している。＞２００ｎｍの多数の粒子が溶液中に存在する、かつ／または大きな分布ゼータ電位および／もしくは非アニオン性ゼータ電位を有する他の研究と一致して、これらの粒子は著しい細胞死をもたらす。これらのナノ粒子は全体として高い取り込み率をもたらしたが、多数の細胞（＞９０％）が死滅した。最終的に、粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞におけるＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの検出限界でのごくわずかな取り込み、および全骨髄生存サブ集団内の３．８％のＣＲＩＳＰＲ取り込みをもたらした。対照的に、同じ表面コーティングを有するＣＹＮＯＢＭ．００２．８３（ＣＲＩＳＰＲ＆ｍＲＮＡ共送達変異体）粒子の９０％は、２００ｎｍ未満であり、数平均は１２１ｎｍであった。同様の処方でＴＣＥＬＬ．００１．０１～ＴＣＥＬＬ．００１．１５の粒子とは異なる方法で製造されたＣＹＮＯＢＭ．００２．７５～ＣＹＮＯＢＭ．００２．８１の他の粒子は、より好ましいサイズおよびゼータ電位分布を有し、生存ヒトＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋Ｔ細胞において高いトランスフェクション効率（最大９９％）をもたらした。

【０３２８】

図８１は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．７８からのデータを提供する。ナノ粒子は、－１１．７２±０．７９ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が２２３ｎｍ未満の直径を有していた。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。ＣＹＮＯＢＭ．００２．８４のゼータ電位は有意により負であるが（－１８．０７ｍＶ対－１１．７２ｍＶ）、同じ表面コーティングを有するＣＹＮＯＢＭ．００２．８４（ＣＲＩＳＰＲ＆ｍＲＮＡ共送達変異体）粒子の９０％は２００ｎｍ未満であり、数平均は１２５ｎｍであり、これは、ＰＬＲ１０によるＣａｓ９　ＲＮＰ電荷の均質化およびそれに続くリガンドまたは場合によっては分子量をずらしたポリマーまたはポリペプチドでのコーティングの中間のアニオン性脱落可能中間層工程による安定性の向上を示す。これらの単一送達ナノ粒子対共送達ナノ粒子（または中間層対ＲＮＰへのリガンドの直接的コンジュゲーション）の異なる物理化学的性質およびそれらのそれぞれのサイズ範囲はトランスフェクション効率および毒性と強く相関している。

【０３２９】

図８２は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．７９からのデータを提供する。ナノ粒子は、２００ｎｍ未満の直径を有していた。これらのナノ粒子は、骨髄全体で非常に低い（３．７％）ＧＦＰ－ＲＮＰ取り込みをもたらしたが、細胞は、培養物中で非常に優れた生存率（陰性対照について７０．０％対７１．６％）を保持した。全体的な取り込みが非常に低いにもかかわらず、フローサイトメトリーデータによれば、粒子は、約９．０％の生存ＣＤ３＋

細胞、４．４％の生存ＣＤ４５＋細胞、および約１００％の生存ＣＤ３４＋細胞について選択的取り込みを示し、これはＣＤ３４＋サブ集団の細胞数の検出限界にある。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。結果は、混合細胞集団内のＣＤ３４＋造血幹細胞の特異的標的指向を意味する。

【０３３０】

図８３は、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８０からのデータを提供する。ナノ粒子は、１．３６±１．６９ｍＶのゼータ電位を有していた。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、生存ＣＤ３４＋骨髄細胞において８％のトランスフェクション効率および約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ取り込みをもたらし、これは細胞数の検出限界にある。（例えば、以下のフローサイトメトリーおよび画像データを参照）。結果は、内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および骨髄の他の細胞における標的指向の成功を意味し得る。広い表面を有する約０ｍＶでの均一なピークは、双性イオン性粒子表面を示している。高度な細胞生存率は、粒子がこのサイズで十分に許容されたこと、およびｃ－Ｋｉｔ受容体由来の粒子表面が細胞間相互作用の間に骨髄内の天然幹細胞集団表面マーカーの提示を模倣する可能性が高いことを示す。

【０３３１】

図８４～図１２０：フローサイトメトリーおよび画像データ

図８４．カニクイザル骨髄におけるＣｙｎｏＢＭ．００２試料のための非トランスフェクト対照。

顕微鏡画像－上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。フローサイトメトリーデーター生存率、ＣＤ３４、ＣＤ３、およびＣＤ４５染色。

【０３３２】

図８５．ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰのリポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸ送達は、生存細胞において２．５％のトランスフェクション効率を達成し、カニクイザル骨髄における陰性対照と比較してＣＤ４５およびＣＤ３相対亜集団の割合が有意に低下して有意な毒性を引き起こす。リポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸは、残りのＣＤ３＋細胞ならびに無視できる残りのＣＤ４５＋およびＣＤ３４＋細胞集団の７．４％の効率的標的指向によって例示されるように、細胞選択性を示さない。顕微鏡画像－上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。

【０３３３】

図８６．ＣｙｎｏＢＭ．００２　ＲＮＰのみ対照は、デリバリーベクターなしでカニクイザル骨髄において無視できるトランスフェクション効率を達成するが、両方のペイロードがトランスフェクションの前に組み合わされた、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰを示す。送達ベクターがなく、最小限の事象にもかかわらず高度の共局在は、リボ核タンパク質複合体とｍＲＮＡとの会合、およびＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰのアニオン性官能化の例示を示す。（この例では、ｍＲＮＡは、ＲＮＰ用の緩やかに会合した脱落可能コートとして作用し、さらにカチオン性材料を上に重ねることができる）。共局在係数の計算

Ｘ：生細胞におけるＣＲＩＳＰＲの取り込み％

Ｙ：生細胞におけるｍＲＮＡの取り込み％

Ｃ：ＣＲＩＳＰＲおよびｍＲＮＡのある細胞の割合（％）

Ｚ：ＸまたはＹのいずれか大きい方の値

共局在係数＝Ｃ／Ｚ

Ｃａｓ９－ｍＲＮＡ共局在係数：９２．２％

【０３３４】

図８７．ＣｙｎｏＢＭ．００２．８２は、非特異的に標的指向されたＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰが、カニクイザル骨髄への１１．３％の効率的ｍＲＮＡ送達および１１．４％の効率的なＣＲＩＳＰＲ送達を９８．９％の共局在係数で達成することを実証した。細胞内局在は、非特異的に標的指向されたＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰがＣｙ５　ｍＲＮＡと共局在し、高いトランスフェクション効率を達成する

ことを実証した。高度の共局在により、離散粒子に両方のペイロードがロードされていることがわかる。さらに、Ｃａｓ９は、ｍＲＮＡとは別の区画にきちんと局在していることがわかり、ここでｍＲＮＡは核関連Ｃａｓ９の周囲に環状構造を形成している。これは、２つのペイロードの細胞質ゾル（ｍＲＮＡ）対核（ＣＲＩＳＰＲ）局在を示す。顕微鏡画像－上：デジタル位相差、中央：Ｃｙ５　ｍＲＮＡ、下：マージ、および上：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰ、下：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰと共局在したＣｙ５　ｍＲＮＡ。

【０３３５】

物理化学的パラメータおよび追加の観察については上記のデータを参照。ＣＹＮＯＢＭ．００２．８２は、２．９６±０．１４ｍＶのゼータ電位を有し、９０％が１３２ｎｍ未満の直径を有し、粒子の５０％が３０ｎｍ未満の直径を有する。これらのナノ粒子は、わずか１１．４％の全骨髄生存サブ集団標的指向にもかかわらず、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄亜集団において、それぞれ４５．５％、５６．０％、および９７．３％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした。Ｃａｓ９－ｍＲＮＡ共局在係数：９４．８％。生存ＣＤ３４＋およびＣＲＩＳＰＲ＋：９７．２％の生存ＣＤ３４＋。胎児ヘモグロビン陽性：３．０２２％の生存細胞。

【０３３６】

図８８．ＣｙｎｏＢＭ．００２．８３は、カニクイザル骨髄への８．１％の効率的なｍＲＮＡ送達および８．１％の効率的なＣＲＩＳＰＲ送達を９３．０％の共局在係数で達成する。細胞内局在は、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰと会合したホモ標的指向されたＩＬ２由来ペプチドがＣｙ５　ｍＲＮＡと共局在し、高いトランスフェクション効率を達成することを実証した。高度の共局在により、離散粒子に両方のペイロードがロードされていることがわかる。さらに、Ｃａｓ９は、ｍＲＮＡとは別の区画にきちんと局在していることがわかり、ここでｍＲＮＡは核関連Ｃａｓ９の周囲に環状構造を形成している。これは、２つのペイロードの細胞質ゾル（ｍＲＮＡ）対核（ＣＲＩＳＰＲ）局在を示す。顕微鏡画像－上：デジタル位相差、中央：Ｃｙ５　ｍＲＮＡ、下：マージ、および上：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰ、下：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰと共局在したＣｙ５　ｍＲＮＡ。

【０３３７】

物理化学的パラメータおよび追加の観察については上記のデータを参照。これらのナノ粒子は、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞において、それぞれ約２７％、４１％、および約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした。Ｃａｓ９－ｍＲＮＡ共局在係数：９３．０％。胎児ヘモグロビン陽性：１．９％の生存細胞。

【０３３８】

図８９．各選択的亜集団におけるＣｙ５－ｍＲＮＡ＋およびＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋ゲートにより測定された中等度のトランスフェクション効率にもかかわらず、ＣＤ３４＋、ＣＤ４５またはＣＤ３＋亜集団における９．５％の生全骨髄細胞における胎児ヘモグロビンタンパク質発現および陽性ではない胎児ヘモグロビン測定によって証明されるように、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８４粒子は、全骨髄赤血球前駆細胞におけるＢＣＬ１１ａ赤血球エンハンサーを首尾よく削除する。細胞内局在は、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰと会合したホモ標的指向されたＥ－セレクチン由来ペプチドがＣｙ５　ｍＲＮＡと共局在し、高いトランスフェクション効率を達成することを実証した。高度の共局在により、離散粒子に両方のペイロードがロードされていることがわかる。さらに、Ｃａｓ９は、ｍＲＮＡとは別の区画にきちんと局在していることがわかり、ここでｍＲＮＡは核関連Ｃａｓ９の周囲に環状構造を形成している。これは、２つのペイロードの細胞質ゾル（ｍＲＮＡ）対核（ＣＲＩＳＰＲ）局在を示す。顕微鏡画像－上：デジタル位相差、中央：Ｃｙ５　ｍＲＮＡ、下：マージ、および上：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰ、下：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰと共局在したＣｙ５　ｍＲＮＡ。

【０３３９】

物理化学的パラメータおよび追加の観察については上記のデータを参照。これらのナノ粒子は、フローサイトメトリーデータによれば、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞において、それぞれ７６．５％、７１％、および約１００％の効率的な共局在したＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込み、ならびに約２５．５％の全骨髄生存亜集団をもたらした。さらに、全生存細胞の９．５％が胎児ヘモグロビン陽性であり、これらの細胞はいずれもＣＤ３４＋、ＣＤ３＋、またはＣＤ４５＋ではなく、ＣＤ３４－赤血球前駆細胞内のＢＣＬ１１ａ赤血球前駆細胞ノックアウト集団のクローン増殖が成功したことを示唆している。Ｃａｓ９－ｍＲＮＡ共局在係数：９７．１％。胎児ヘモグロビン（ＨｂＦ）陽性：９．５％の生存細胞。１４％のＣＤ３４＋細胞；０％共局在ＣＤ３４＋およびＨｂＦ＋。

【０３４０】

図９０．ＣｙｎｏＢＭ．００２．８５は、カニクイザル骨髄への５．２％の効率的なｍＲＮＡ送達および５．３％の効率的なＣＲＩＳＰＲ送達を８７．２％の共局在係数で達成した。生存細胞への５．３％の効率的なＣＲＩＳＰＲ送達にもかかわらず、ＣｙｎｏＢＭ．００２．８５は、他の共送達実施形態において見られるように、胎児ヘモグロビン陽性細胞において付随する増加をもたらさなかった。細胞内局在は、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰと会合したホモ標的指向されたＳＣＦ由来ペプチドがＣｙ５　ｍＲＮＡと共局在し、高いトランスフェクション効率を達成することを実証した。高度の共局在により、離散粒子に両方のペイロードがロードされていることがわかった。さらに、Ｃａｓ９は、ｍＲＮＡとは別の区画にきちんと局在していることがわかり、ここでｍＲＮＡは核関連Ｃａｓ９の周囲に環状構造を形成している。これは、２つのペイロードの細胞質ゾル（ｍＲＮＡ）対核（ＣＲＩＳＰＲ）局在を示す。顕微鏡画像－上：デジタル位相差、中央：Ｃｙ５　ｍＲＮＡ、下：マージ、および上：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰ、下：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰと共局在したＣｙ５　ｍＲＮＡ。

【０３４１】

追加の物理化学的特性については上記のデータを参照。これらのナノ粒子は、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞において、それぞれ約３３％、約２３％、および約１００％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰ＋Ｃｙ５＿ＥＧＦＰ＿ｍＲＮＡの取り込みをもたらした。Ｃａｓ９－ｍＲＮＡ共局在係数：８７．２％。胎児ヘモグロビン陽性：０．９％の生存細胞。

【０３４２】

図９１．ＣｙｎｏＢＭ．００２．８６は、カニクイザル骨髄への２０．１％の効率的なｍＲＮＡ送達および２１．８％の効率的なＣＲＩＳＰＲ送達を９８．６％の共局在係数で達成した。細胞内局在は、ヘテロ三価標的指向されたＩＬ２－、Ｅ－セレクチンおよびＳＣＦ由来ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰがＣｙ５　ｍＲＮＡと共局在し、高いトランスフェクション効率を達成することを実証した。高度の共局在により、離散粒子に両方のペイロードがロードされていることがわかった。さらに、Ｃａｓ９は、ｍＲＮＡとは別の区画にきちんと局在していることがわかり、ここでｍＲＮＡは核関連Ｃａｓ９の周囲に環状構造を形成している。これは、２つのペイロードの細胞質ゾル（ｍＲＮＡ）対核（ＣＲＩＳＰＲ）局在を示す。顕微鏡画像－上：デジタル位相差、中央：Ｃｙ５　ｍＲＮＡ、下：マージ、および上：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰ、下：Ｃａｓ９－ＧＦＰ　ＲＮＰと共局在したＣｙ５　ｍＲＮＡ。

【０３４３】

追加の物理化学的特性については上記のデータを参照。Ｃａｓ９－ｍＲＮＡ共局在係数：９１．３％。胎児ヘモグロビン陽性：７．６％の生存細胞。

【０３４４】

図９２．ＣｙｎｏＢＭ．００２．７５は、脱落可能アニオン性ポリペプチドコートを有する非特異的に標的指向されたＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、生存カニクイザル骨髄において１８．０％のトランスフェクション効率を達成することを実証した。全体として、本明細書中の混合集団カニクイザル骨髄培養モデルで

は、生存ＣＤ３＋Ｔ細胞の２０％がＣＲＩＳＰＲ＋であったのに対して、ヒト初代ＰａｎＴ細胞中の生存ＣＤ４およびＣＤ８ａＴ細胞の９７～９９％がＴＣＥＬＬ．００１においてＣＲＩＳＰＲ＋であった。同一処方の粒径は、手ではなく流体ハンドリングロボットを介して合成されたＴＣＥＬＬ１においてより小さく、より均一であった。追加の定性的および定量的解説およびデータ比較については上記のデータを参照。上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。

【０３４５】

図９３．ＣｙｎｏＢＭ．００２．７６は、カニクイザル骨髄において、二重ヒストンフラグメントに会合しかつ非特異的に標的指向されたＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰが１３．１％のトランスフェクション効率および限定的な毒性対陰性対照を達成することを実証した。ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋の生存可能亜集団の１８％、１０％、および０％がＣＲＩＳＰＲ＋であった。追加の物理化学的特性および観察については上記のデータを参照。上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。

【０３４６】

図９４．ＣｙｎｏＢＭ．００２．７７は、カニクイザル骨髄において、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰと結合したホモ標的指向されたＩＬ２由来ペプチドが、３．８％のトランスフェクション効率および陰性対照を超える生存率の向上を達成することを実証した。トランスフェクトした細胞の約９０％が死滅した。最終的に、粒子は、生存ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋骨髄細胞においてＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰ－ＲＮＰの検出限界でのごくわずかな取り込みをもたらし、これは生ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の残りの３．８％がそれらの亜集団由来ではないことを示している。サイズデータは、大きな粒子の多分散性および約９９９ｎｍの９０容量パーセンタイル粒子サイズにおける毒性の原因となる役割を裏付けている。追加の物理化学的性質については上記のデータを参照。上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。

【０３４７】

図９５．ＣｙｎｏＢＭ．００２．７８は、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰと結合したホモ標的指向されたＥ－セレクチン由来ペプチドが全体で（死細胞を含む）約７１％のトランスフェクション効率を達成することを示し、カニクイザル骨髄中のトランスフェクトされたままの生細胞はわずか４．５％であった。これは、粒子毒性の指標であり、数による粒子の５０％が３３．１～１１３．１ｎｍであるにもかかわらず大きいサイズ分布と相関し得る。溶液中の粒子の質量と体積の大部分を占める＞２５０ｎｍの粒子は、おそらくこの実験の生存率の低下をもたらした。この実施形態においても、ＣＤ４５＋およびＣＤ３＋亜集団密度は、多大に減少した。同じトランスフェクションからのナノ粒子群を比較したより詳細な物理化学的特性および定性的観察については上記のデータを参照。

上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。

【０３４８】

図９６．ＣｙｎｏＢＭ．００２．７９は、カニクイザル骨髄において、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰと結合したホモ標的指向されたＳＣＦ由来ペプチドが、３．７％のトランスフェクション効率および陰性対照を超える優れた生存率を達成することを実証した。

これらのナノ粒子は、骨髄全体で非常に低い（３．７％）ＧＦＰ－ＲＮＰ取り込みをもたらしたが、細胞は、培養物中で非常に優れた生存率（陰性対照について６９．０％対７１．６％）を保持した。全体的な取り込みが非常に低いにもかかわらず、粒子は、約５％の生存ＣＤ３＋細胞、約４％の生存ＣＤ４５＋細胞、および約１００％の生存ＣＤ３４＋細胞（後者は検出限界にあった）に対して選択的取り込みを示した。強力な負のゼータ電位および他の群よりも有意に多くのＣＤ４５＋細胞と相まって、高度な細胞生存率は、幹細胞ニッチ標的指向および増殖および／または生存技術の確立におけるＳＣＦ模倣粒子表面の多因子的役割に関与している。追加の物理化学的パラメータについては上記のデータを

参照。
上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。
【０３４９】
図９７．ＣｙｎｏＢＭ．００２．８０は、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰと会合したホモ標的指向されたｃ－Ｋｉｔ－（ＣＤ１１７）由来ペプチドが８．０９７％のトランスフェクション効率を達成することを実証した。トランスフェクション効率は、ＣＤ３＋、ＣＤ４５＋、およびＣＤ３４＋の生存可能亜集団について、それぞれ３．３％、２．４％、および検出限界であり、これはＣＤ３＋およびＣＤ４５＋細胞についての低い選択性を示している。より定量的および定性的なデータについては上記のデータを参照。
上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。（続き）：フローサイトメトリーデータ。
【０３５０】
図９８．ＣｙｎｏＢＭ．００２．８１は、細胞のわずか０．４８％がＣＤ３４＋であるにもかかわらず、カニクイザル骨髄において、ヘテロ三価標的指向されたＩＬ２、Ｅ－セレクチン、およびＳＣＦ由来のＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰが５％のトランスフェクション効率を達成し、トランスフェクションされた細胞の約１０％が生ＣＤ３４＋細胞であることを実証した。これは、ＣＤ３４＋細胞のほぼ１００％の効率的な選択的トランスフェクションを示している。上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。
【０３５１】
図９９．ＣｙｎｏＢＭ．００２　ＲＮＰのみ対照の定性的画像は、ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＢＣＬ１１ａ　ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、送達ベクターなしでカニクイザル骨髄において軽度の陽性シグナルを達成していることを示す。上：デジタル位相差、中央：ＧＦＰ、下：マージ。
【０３５２】
図１００．ＨＳＣ．００４（ナノ粒子６９～７４、表５参照）ハイコンテントスクリーニング。初代ヒトＣＤ３４＋造血幹細胞におけるトランスフェクションの１２～１５時間後のＨＳＣ．００４　Ｃｙ５　ｍＲＮＡ送達の蛍光顕微鏡画像（Ｃｙ５　ｍＲＮＡ）。ｍＲＮＡ製剤のこの特定の実施形態では、ＳＣＦペプチドおよびＥ－セレクチンによるヘテロ二価標的指向、ならびにＳＣＦペプチドではないＥ－セレクチンによるホモ標的指向は、リポフェクタミンＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸよりも高いトランスフェクション効率を達成する。ＨＳＣ．００１．６９：Ａ１～Ａ６、ＨＳＣ．００１．７０：Ｂ１～Ｂ６、ＨＳＣ．００１．７１：Ｃ１～Ｃ６、ＨＳＣ．００１．７２：Ｄ１～Ｄ６、ＨＳＣ．００１．７３：Ｅ１～Ｅ６、ＨＳＣ．００１．７４：Ｆ１～Ｆ６、ＨＳＣ．００４リポフェクタミンＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ投与１：Ｇ１～Ｇ２およびＧ４～Ｇ５、ＴＣ．００１リポフェクタミンＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ投与２：Ｈ１～Ｈ２およびＨ４～Ｈ５、ＴＣ．００１陰性：Ｇ３、Ｇ６、Ｈ３、Ｈ６。
【０３５３】
図１０１．ＴＣＥＬＬ．００１（ナノ粒子１～１５、表５参照）ハイコンテントスクリーニング。４つのペイロード（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰ、ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡおよびｐＤＮＡ）にわたる１５のリガンドに相当する、ＴＣ．００１．１～ＴＣ．００１．６０についてロボット製剤を実施した。Ｔ細胞ＣＲＩＳＰＲ送達および定性的トランスフェクション効率－初代ヒトＰａｎ　Ｔ細胞へのＴＣＥＬＬ．００１　ＣＲＩＳＰＲ－ＥＧＦＰ　ＲＮＰ送達の１２～１５時間後のトランスフェクション複合顕微鏡のサムネイル画像の実施形態が示される。
プレートレイアウト：ＴＣ．００１．１：Ａ１～Ｃ１、ＴＣ．００１．３：Ｄ１～Ｆ１、ＴＣ．００１．４：Ａ２～Ｃ２、ＴＣ．００１．５：Ｄ２～Ｆ２、ＴＣ．００１．６：Ａ３～Ｃ３、ＴＣ．００１．７：Ｄ３～Ｆ３、ＴＣ．００１．８：Ａ４～Ｃ４、ＴＣ．００１．９：Ｄ４～Ｆ４、ＴＣ．００１．１０：Ａ５～Ｃ５、ＴＣ．００１．１１：Ｄ５～Ｆ

５、ＴＣ．００１．１２：Ａ６～Ｃ６、ＴＣ．００１．１３：Ｄ６～Ｆ６、ＴＣ．００１．１４：Ａ７～Ａ９、ＴＣ．００１．１５：Ｂ７～Ｂ９、ＴＣ．００１．２：Ａ１０～Ａ１２、ＴＣ．００１リポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸ投与１：Ｂ１０～Ｂ１２、ＴＣ．００１リポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸ投与２：Ｃ７～Ｃ９、ＴＣ．００１　ＲＮＰのみ：Ｃ１０～Ｃ１２、ＴＣ．００１陰性：Ｄ７～Ｅ１２。

【０３５４】

図１０２．ＴＣＥＬＬ．００１リポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸ。リポフェクタミンＣＲＩＳＰＲＭＡＸは、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代ＰａｎＴ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ４．７％および４．８％の効率的なＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＲＮＰの送達を達成した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の１２．５％および全体の細胞の６５．９％が生存していた。

【０３５５】

図１０３：ＴＣｅｌｌ．００１．１は、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ９９．１６３％および９８．４４７％の効率的な非特異的に標的指向されたＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質の取り込みを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の６０．２％および全体の細胞の５７．２％が生存していた。

【０３５６】

図１０４．ＴＣｅｌｌ．００１．２、非特異に的標的指向されたＰＥＧ化対照は、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ５．５％および６．９％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質の取り込みを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の５．６％および全体の細胞の４０．５％が生存していた。

【０３５７】

図１０５．ＴＣｅｌｌ．００１．３は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたシアロアドヘシン由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ１１．６％および１３．２％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の４０．０％および全体の細胞の７９．２％が生存していた。

【０３５８】

図１０６．ＴＣｅｌｌ．００１．４は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＣＤ８０由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ６．８％および８．８％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の１２．９％および全体の細胞の６０．２％が生存していた。

【０３５９】

図１０７．ＴＣｅｌｌ．００１．５は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＣＤ８０由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ１０．３％および１０．９％の効率的なＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質の取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の４８．３％および全体の細胞の８５．１％が生存していた。陰性対照（ＴＣＥＬＬ．００１フローサイトメトリーについてｎ＝３ネガティブ）の９ウェルにわたって、生存率は８１．４％、８４．７％、および８２．５％であったことに留意されたく、これはＣ末端に固定されたＣＤ８０由来のＣＤ２８標的指向ペプチドが培養液中の非トランスフェクト細胞に対して軽度の生存促進効果を及ぼし得ることを実証した。対照的に、ＴＣｅｌｌ００１．４、同一のＮ末端に固定されたペプチドは、ＣＤ２８膜貫通受容体に対して異なるアロステリズムを有するＣＤ８０由来のフラグメントでもある、ＴＣ．００１．６およびＴＣ．００１．７と同様に著しい毒性を示した。

【０３６０】
図１０８．ＴＣｅｌｌ．００１．６は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＣＤ８６由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ１．７％および２．９％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の６．８％および全体の細胞の６９．１％が生存していた。
【０３６１】
図１０９．ＴＣｅｌｌ．００１．７は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＣＤ８６由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ１．６％および２．１％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の１０．３％および全体の細胞の７６．４％が生存していた。
【０３６２】
図１１０．ＴＣｅｌｌ．００１．８は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＣＤ８６由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ１４．５％および１６．０％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の３９．１％および全体の細胞の７６．３％が生存していた。
【０３６３】
図１１１．ＴＣｅｌｌ．００１．９は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向された４－１ＢＢ由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ３．６％および３．２％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の２７．５％および全体の細胞の８７．８％が生存していた。陰性対照（ＴＣＥＬＬ．００１フローサイトメトリーについてｎ＝３ネガティブ）の９ウェルにわたって、生存率は８１．４％、８４．７％、および８２．５％であったことに留意されたく、これはＣ末端に固定された、Ｔ細胞との生来の生存シグナル伝達を有する、４－１ＢＢ由来のＣＤ１３７標的指向ペプチドが培養液中の非トランスフェクト細胞に対して軽度の生存促進効果を及ぼすことを実証した。
【０３６４】
図１１２．ＴＣｅｌｌ．００１．９は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向された４－１ＢＢ由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ５．８％および５．４％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の３０．８％および全体の細胞の８４．２％が生存していた。陰性対照（ＴＣＥＬＬ．００１フローサイトメトリーについてｎ＝３ネガティブ）の９ウェルにわたって、生存率は８１．４％、８４．７％、および８２．５％であったことに留意されたく、これはＣ末端に固定された、Ｔ細胞との生来の生存シグナル伝達を有する、４－１ＢＢ由来のＣＤ１３７標的指向ペプチドが培養液中で全体的な毒性を示さないことを実証した。
【０３６５】
図１１３．ＴＣｅｌｌ．００１．１１は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＣＤ３－Ａｂ由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ１２．９％および１２．４％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の５０．０％および全体の細胞の７７．６％が生存していた。
【０３６６】
図１１４．ＴＣｅｌｌ．００１．１２は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＣＤ３－Ａｂ由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、そ

れぞれ９．０％および９．５％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の３８．９％および全体の細胞の８０．７％が生存していた。

【０３６７】

図１１５．ＴＣｅｌｌ．００１．１３は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＩＬ２由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ２５．７％および２８．６％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の４０．３％および全体の細胞の６８．１％が生存していた。

【０３６８】

図１１６．ＴＣｅｌｌ．００１．１４は、ＣＲＩＳＰＲ－ＧＦＰリボ核タンパク質に結合したホモ標的指向されたＩＬ２由来ペプチドが、トランスフェクションの２４時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の、生存ＣＤ４＋およびＣＤ８ａ＋亜集団において、それぞれ２４．９％および２５．８％の効率的な取り込みを生じることを実証した。全体として、ＣＲＩＳＰＲ＋細胞の４５．９％および全体の細胞の７０．１％が生存していた。

【０３６９】

図１１７．十二価に標的指向された１２リガンド変異体であるＴＣｅｌｌ．００１．１５は、エンドサイトーシスによる取り込みまたはＣＲＩＳＰＲ送達をもたらさない。全体として、全細胞の５９．８％が生存していた。

【０３７０】

図１１８．ＴＣＥＬＬ．００１陰性対照。陰性（トランスフェクトされていない）対照の９ウェルのうちの１つからの代表的な結果。全体として、全細胞の８１．４％、８４．７％、および８２．５％が、細胞播種の５２時間後（トランスフェクションの２４時間後）に生存していた。

【０３７１】

図１１９．Ｂｌｏｏｄ．００２は、グリコシル化された細胞表面マーカーの標的指向にＳＩＧＬＥＣ誘導体を利用することにより、全ヒト血液のリンパ球ゲートにおいて６０％～９７％のｍＲＮＡ送達効率を達成する；示されているのは、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーターによってアッセイされたＣｙ５タグ付きＥＧＦＰ　ｍＲＮＡである。リガンド標的指向は、PEG化対照に対して細胞シグナルの有意な増強剤である。ナノ粒子の挙動を予測する追加の物理化学的性質については上記のデータを参照。Ｂｌｏｏｄ．００２対照：非トランスフェクト。Ｂｌｏｏｄ．００２．８８：ＣＤ４５－およびＮｅｕ５Ａｃ－標的指向ＳＩＧＬＥＣ誘導体（アニオン性ポリマーの前に添加されるカチオン性アンカー－リンカー－リガンドペプチド）。Ｂｌｏｏｄ．００２．８９：ＣＤ４５－およびＮｅｕ５Ａｃ－標的指向ＳＩＧＬＥＣ誘導体（アニオン性ポリマーの後に添加されるカチオン性アンカー－リンカー－リガンドペプチド）。Ｂｌｏｏｄ．００２．９０：ＰＥＧ化対照（アニオン性ポリマーの前に添加されるカチオン性アンカー－ＰＥＧ）。Ｂｌｏｏｄ．００２．９１：非特異的標的指向変異体。Ｂｌｏｏｄ．００２．９２：ペイロードを含まないＣＤ４５－およびＮｅｕ５Ａｃ－標的指向ＳＩＧＬＥＣ誘導体（アンカー－リンカー－リガンドはアニオン性ポリマーに直接コンジュゲートしている、陰性蛍光対照）。

【０３７２】

図１２０．ＴＣｅｌｌ．００１．２７は、フローサイトメトリーで測定したところ、トランスフェクションの５時間後に、ヒト初代Ｐａｎ　Ｔ細胞の生存ＣＤ８ａ＋およびＣＤ４＋亜集団において、ホモ標的指向されたＳＩＧＬＥＣ由来ペプチドが４５％の効率的なＣｙ５　ｍＲＮＡ取り込みを指示することを実証した。これらの粒子のサイズおよびゼータ電位は、－２５．５±０．１５ｍＶのゼータ電位で１７１ｎｍの平均粒径を示し、これは１．３５カルボキシレート対ホスフェート（Ｃ：Ｐ）および０．８５アミン対ホスフェートの比で強い粒子安定性を示しており、ここでポリ（グルタミン酸）は、カチオン性アンカー－リンカー－リガンドを含めた後に添加される。ゼータ電位およびサイズデータ、ＴＣｅｌｌ．００１．２およびＴＣｅｌｌ．００１．１８については上記のデータを参照。追加の定量的詳細については上記のデータを参照。右上：明視野、右中央：Ｃｙ５　ｍ

ＲＮＡ、右下：マージ、上：陰性対照の明視野、下：陰性対照のＣｙ５チャンネル。
【０３７３】
実施例９
図１２１．リボ核タンパク質およびタンパク質送達の根拠ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰの電荷密度プロットは、タンパク質表面に安定な荷電層を形成するためにアニオン性またはカチオン性ペプチド／材料を添加すべきかどうかを決定することを可能にする。一実施形態では、露出した核酸（アニオン性）およびアニオン性電荷ポケットは、荷電アニオンを付加する前の荷電カチオンのための強力な静電固定部位として、またはそれら自身のリガンド－リンカーアニオン性アンカーとして役立つ。スケールバー：電荷。
【０３７４】
図１２２．リボ核タンパク質およびタンパク質送達の根拠スリーピングビューティートランスポゾンの電荷密度プロットは、タンパク質表面に安定な荷電層を形成するためにアニオン性またはカチオン性ペプチド／材料を添加すべきかどうかを決定することを可能にする。別の実施形態では、カチオン性電荷ポケットは、それら自身のリガンド－リンカーアニオン性アンカードメインとして、または荷電カチオンの付加前に、荷電アニオンのための強力な静電固定部位として機能する。スケールバー：電荷。
【０３７５】
図１２３．（２ｂ）その後の多層化学の付加、複数の核酸または荷電治療薬の同時送達、または架橋による層安定化の有無を問わず、（２ａ）アンカー－リンカー－リガンドまたは独立型カチオン性アンカーのようなカチオン性アンカーの付加（２）の前にＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰ表面上のカチオン性部位に固定する例示的なアニオン性ペプチド（長さ９～１０アミノ酸、直径約１０ｎｍまでのＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰ）（１）。
【０３７６】
テキストを左から右へ描画する際の手書き文字：「カチオン性アンカー」。「スペーサー」。「リガンド」。「および／または」。「２ｄ」。「カチオン性ポリマーおよび／またはポリペプチド」。「２ｂ、続いて層間化学」。
【０３７７】
図１２４．荷電タンパク質コアテンプレートを用いたペイロード共送達の根拠。Ｃａｓ９　ＲＮＰまたは任意の均一にまたは双性イオン的に帯電した表面を含み得るコアテンプレートに基づく付加順序および静電マトリックス組成物の例。様々なポリマーを利用して双性イオン性表面の電荷を均質化する方法が示されている。ｇＲＮＡに結合したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９　ＲＮＰからなる約１０ｎｍのコア粒子は、双性イオン性ドメインで示されている。手短に言えば、カチオン性ポリマーまたはアニオン性ポリマーを添加して、反対に荷電したポリマーを添加する前に表面電荷を均質化することができる。アニオン性成分の分子量をずらすことで、ＣＹＮＯＢＭ．００２．８２～ＣＹＮＯＢＭ．００２－８６対ＣＹＮＯＢＭ．００２．７５～ＣＹＮＯＢＭ．００２．８１の単一ペイロード送達変異体において、ＲＮＰコアを有する粒子およびさまざまな表面コーティングを有するｍＲＮＡ－ＰＬＥ中間層を有する粒子のトランスフェクション効率および遺伝子編集効率が向上することが実証されている。荷電コアテンプレートの実施形態は、荷電デンドリマーまたはオリゴ糖－デンドリマー、組換えまたは合成ヒストン二量体／三量体／四量体／八量体、ナノダイヤモンド、金ナノ粒子、量子ドット、ＭＲＩ造影剤、またはこれらと上記の組合せを含む任意の荷電表面を包含する。
【０３７８】
テキストを左から右へ描画する際の手書き文字：「負に帯電したコーティングは、カチオン性ポリマーまたはアンカー－リンカー－リガンドを上に重ねられ得、アンカーは、カチオン性である」。「アミノ糖」。「荷電グリコサミノグリカン」。「ｐＤＮＡ」。「共送達」。「露出したｇＲＮＡ」。「正味の陰性脱落可能ポリマーコート」。「グリカン」「ｃａｓ９上のカチオン性タンパク質ドメイン」。「約１０ｎｍのｃａｓ９　ＲＮＰ」。「ｃａｓ９上のカチオン性タンパク質ドメイン」。「ＰＬＲ」。「ＰＤＥ（５～１００）」。「ＰＬＥ（５～１００）」。「ｃａｓ９上のアニオン性タンパク質ドメイン」。「ｍ

ＲＮＡ」。「糖ペプチド上の分枝カチオン性ポリマー」。「ヒストン」。「ｓｉＲＮＡ」。負に帯電したコーティングはまた、アニオン性アンカーリンカーリガンドのドメインまたは独立型アニオン性マトリックス組成物であり得る。一貫したポリマーの互い違いの分子量は、コロイド安定性および遺伝子編集効率を高める。

【０３７９】

実施例１０

図１２５．ペプチド工学－ＩＬ２Ｒ標的指向のための新規なＩＬ２模倣フラグメント。インターロイキン２受容体（右）に結合したインターロイキン２（左）（ＰＤＢ：１Ｚ９２）

配列ＡＳＮ（３３）－ＰＲＯ（３４）－ＬＹＳ（３５）－ＬＥＵ（３６）－ＴＨＲ（３７）－ＡＲＧ（３８）－ＭＥＴ（３９）－ＬＥＵ（４０）－ＴＨＲ（４１）－ＰＨＥ（４２）－ＬＹＳ（４３）－ＰＨＥ（４４）－ＴＹＲ（４５）は、ＩＬ２（ＰＤＢ　１Ｚ９２）から選択され、ＩＬ２受容体α鎖への活性結合の領域と相関する。ＩＬ２ＲとＩＬ２の相互作用モチーフを選択することによる相補的結合の操作：ここで、配列ＣＹＳ（３）－ＡＳＰ（４）－ＡＳＰ（５）－ＡＳＰ（６）－ＭＥＴ（２５）－ＬＥＵ（２６）－ＡＳＮ（２７）－ＣＹＳ（２８）－ＧＬＵ（２９）は、ＩＬ２受容体からの２つの結合モチーフについて選択される。

【０３８０】

図１２６：ペプチド工学－ＣＤ３を用いた新しい抗体由来の「アクティブバインディングポケット」エンジニアリング概念実証。配列ＴＨＲ（３０）－ＧＬＹ（３１）－ＡＳＮ（５２）－ＰＲＯ（５３）－ＴＹＲ（５４）－ＬＹＳ（５５）－ＧＬＹ（５６）－ＶＡＬ（５７）－ＳＥＲ（５８）－ＴＨＲ（５９）－ＴＹＲ（１０１）－ＴＹＲ（１０２）－ＧＬＹ（１０３）－ＡＳＰ（１０４）はＣＤ３抗体（ＰＤＢ　１ＸＩＷ）から選択され、ＣＤ３イプシロンおよびデルタ鎖への活性結合の領域と相関する。アミノ酸の順序は、より大きいタンパク質によって維持されている三次構造をもはや持たない結合ポケット内のペプチドの二次元平面の結合動力学を反映するために再配列される。この寸法減少は以下の結果をもたらす：ＴＨＲ（５９）－ＳＥＲ（５８）－ＶＡＬ（５７）－ＧＬＹ（５６）－ＬＹＳ（５５）－ＴＹＲ（５４）－ＰＲＯ（５３）－ＡＳＮ（５２）－ＴＨＲ（３０）－ＧＬＹ（３１）－ＴＹＲ（１０１）－ＴＹＲ（１０２）－ＧＬＹ（１０３）－ＡＳＰ（１０４）。

【０３８１】

図１２７：ペプチド工学－ＣＤ４５グリコシル化標的指向のための新規なＳＩＧＬＥＣ誘導体。Ｎ－アセチルノイラミン酸（Ｎｅｕ５Ａｃ）との複合体中のシアロアドヘシンＮ末端のＰＤＢレンダリング（ＲＣＳ　ＰＤＢ　１ＯＤＡ）。レンダリングにおいてシアロアドヘシンに近いシアロアドヘシンフラグメントを、グリコシル化ＣＤ４５および他の複雑な細胞表面糖タンパク質を標的指向するために利用した。ＴＣＥＬＬ．００１．３のＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰ、同様ににＢＬＯＯＤ．００２．１～ＢＬＯＯＤ．００２．２の全血リンパ球ゲートのｍＲＮＡでＴ細胞の標的指向に成功した。リガンドの配列は、ＳＮＲＷＬＤＶＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：ｘｘ）である。

【０３８２】

図１２８：ペプチド工学－ｃ－Ｋｉｔ標的指向のための新規なＳＣＦフラグメント。破線の丸－幹細胞因子のシグナルペプチドドメイン（ＲＣＳ　ＰＤＢ　１ＳＣＦ）は、ｃ－Ｋｉｔ活性に必要な二量体ドメインを表す。特定のナノ粒子表面サイズ＋ＳＣＦコーティング密度による細胞取り込みに対するリガンド提示の効果は、ＣｙｎｏＢＭ．００２．７９（約５％の効率）とＣｙｎｏＢＭ．００２．８５（約５６％の効率）との間で比較対照することができる。さらに、Ｅ－セレクチン＋ＳＣＦフラグメント（ＨＳＣ．００４．７３）は高い効率を達成するが、ＳＣＦフラグメントはそれ自体では達成せず（ＨＳＣ．００４．７４）、コントラストがヒトＣＤ３４＋造血幹細胞トランスフェクションの定性的画像と共に表示される。挙動の著しい相違は、エンドサイトーシスの合図を生じさせ、続いて核酸および／またはリボ核タンパク質材料を核内標的指向する際の二量体ペプチドの

特定の役割を示唆している。リガンドの配列は、
EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: xx) (mSCF); およびEKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: xx) (rmSCF)
である。

【０３８３】

図１２９：ペプチド工学－膜結合ＳＣＦ標的指向のための新規ｃＫｉｔ受容体フラグメント。内皮細胞および骨髄細胞上での造血幹細胞ローリング挙動の挙動を模倣し、全身的トランスフェクション効率を高めるための、ｃ－Ｋｉｔ由来の幹細胞因子標的指向ペプチドの合理的設計（ＣｙｎｏＢＭ．００２．８０を参照）。折り畳みについて評価した配列：名称ＳＣＦＮ、配列：
RRRRRRRRRGGGGSGGGGSEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPK (SEQ ID NO: xx)
。ＲｏｓｅｔｔａおよびＮＡＭＤシミュレーションパッケージを用いて配列を評価した。Ｒｏｓｅｔｔａ結果：ａｂ　ｉｎｉｔｉｏ折り畳みのために短縮配列をＲｏｓｅｔｔａに入れた
(GGSEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPK)(SEQ ID NO: xx)
。

【０３８４】

図１３０：ペプチド工学－ｃＫｉｔ受容体フラグメント（続き）。ナノ粒子表面に提示されるであろうエントロピー的に好ましい立体配座をシミュレートすることを可能にするために適所に保持されたアンカー－リンカー－リガンドのアンカーセグメントを有する分子動力学シミュレーション。各結果には同じスコア係数が含まれているため、これらの構造のいずれかが優先されるかどうかを判断するのは困難である。Ｒｏｓｅｔｔａも折り畳み動力学をしないので、これらの配列がらせん状構造に折り畳まれない可能性が高い。

【０３８５】

ＮＡＭＤの結果：Ｒｏｓｅｔｔａは折り畳みの動力学をしていないので、完全な配列が素早く二次構造に折り畳まれるかどうかをチェックした。３００～５００Ｋの間の１６個または３２個のレプリカに対してレプリカ交換分子動力学（ＲＥＭＤ）を用いてＮＡＭＤでシミュレーションを行い、各レプリカについて１０ｎｓまでシミュレーションした。アンカー部分（ポリ－Ｒ）は、粒子に結合したタンパク質をシミュレートするために線形として固定された。最低エネルギーのスナップショットが表示される。

【０３８６】

ＫＩＴから派生した配列のさらなる分析は、それはおそらく多くの固有の順序を有さないということを示した。オレンジ色の漫画セクションは、最初にＫＩＴから選択された配列に属する。

【０３８７】

図１３１：ペプチド工学－ｃＫｉｔ受容体フラグメント（続き）。アミノイソ酪酸による重要な疎水性ドメインの修飾による効果的なリガンド提示のための安定な螺旋状ペプチドへの強いリガンド－リンカー自己折畳みを有するランダムコイル状ペプチドの安定化。

【０３８８】

青い鎖は、残基７１～９４：
SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS
の範囲の、ＫＩＴ中に存在するより規則的な螺旋を表した。アンカーおよびリンカーを有するＫＩＴ残基７１～９４のＮＡＭＤシミュレーション：
RRRRRRRRRGGGGSGGGGSSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS

【０３８９】

鎖がリンカー残基と強く相互作用する構造に収束した。残基７１～９４については、ＫＩＴ中の他の２つのヘリックスと相互作用することによってヘリックスを安定化させる疎水性残基がある。疎水性残基は、赤（下線）で示されている：
SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS

。疎水性残基を除去するために配列を変更し、螺旋状の折り畳みを誘導するのを助けるアミノイソ酪酸（Ａｉｂ）で置き換えて、以下の配列に到達した：ＫＩＴ７１９４＿ＡＩＢ１：

SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

。Ａｉｂを含む配列をＲｉｎｋ樹脂上で合成し、遊離アミンおよびアシル化アミン（Ａｃ）で単離した。二次構造は円二色性によって調べた。

【０３９０】

図１３２：ペプチド工学－ｃＫｉｔ受容体フラグメント（続き）

ＳＣＦ＿ｍｃＫｉｔ＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿ＮおよびＳＣＦ＿ｍｃＫｉｔ（Ａｃ）＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｎの円二色性リガンド末端のアセチル化は、荷電ポリペプチド末端の電荷を中和するために利用され得る。上：ＫＩＴ７１９４＿ＡＩＢ１のＣＤは、アルファヘリックスおよびＡｉｂ単位を含むヘリックスの二次構造と一致して、２２２付近でわずかに落ち込み、２０８付近で大きな落ち込みを示している。下：ＫＩＴ７１９４＿ＡＩＢ１＿Ａｃは、ＫＩＴ７１９４＿ＡＩＢ１と同じＣＤを示している。時々アシル化は折りたたみを助け得るが、それは必要ではないようである。アセチル化はまた、末端アミンが荷電よりもむしろ中性である必要があるリガンド相互作用を助け得る。完全アンカー－リンカー－ＫＩＴ７１９４＿ＡＩＢ１構築物：

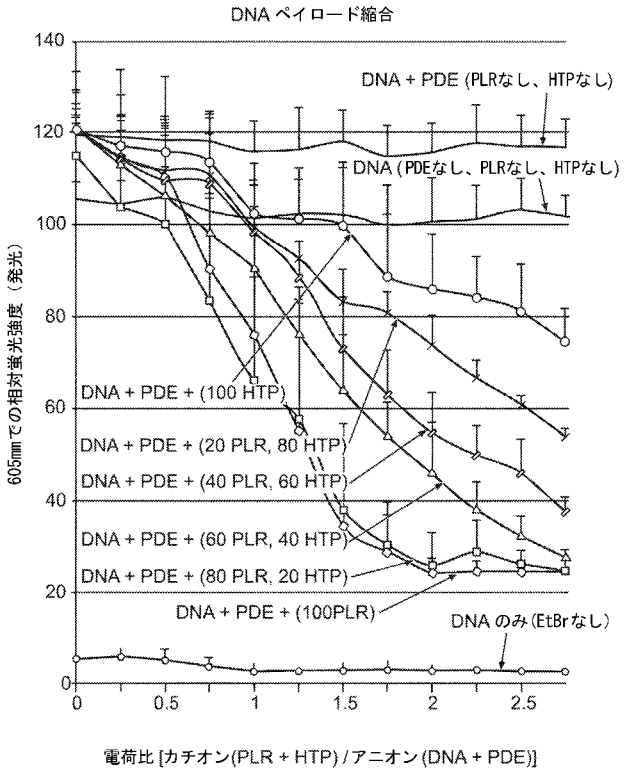
RRRRRRRRR - GGGGSGGGGS - SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

。

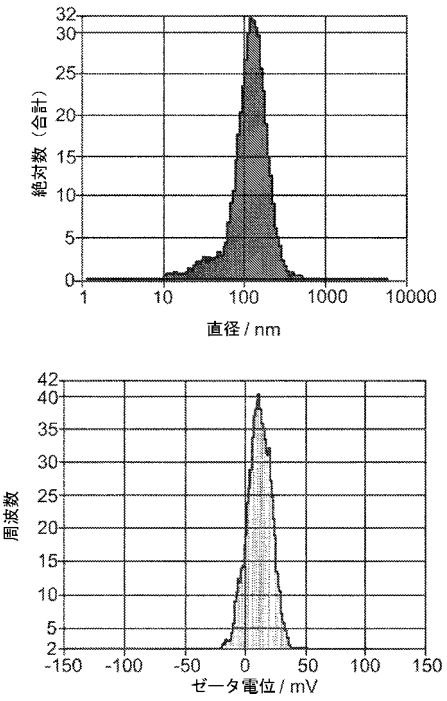
【０３９１】

図１３３：ペプチド工学－ｃＫｉｔ受容体フラグメント（続き）アミノイソ酪酸による重要な疎水性残基の修飾後のＳＣＦ＿ｍｃＫｉｔ（Ａｃ）＿（４ＧＳ）２＿９Ｒ＿Ｎの安定な立体配座。

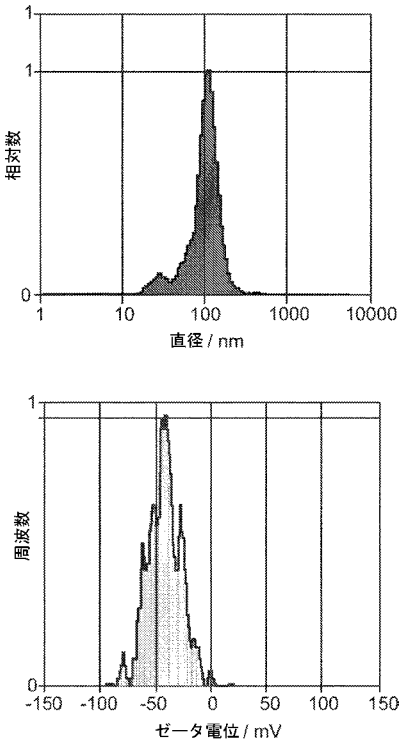
【図１】



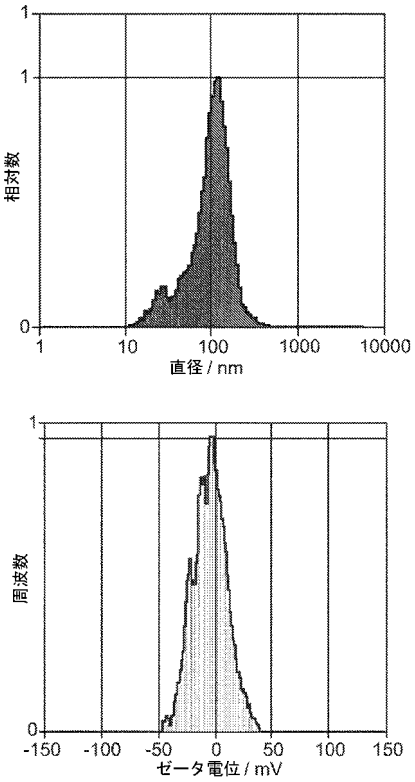
【図２】



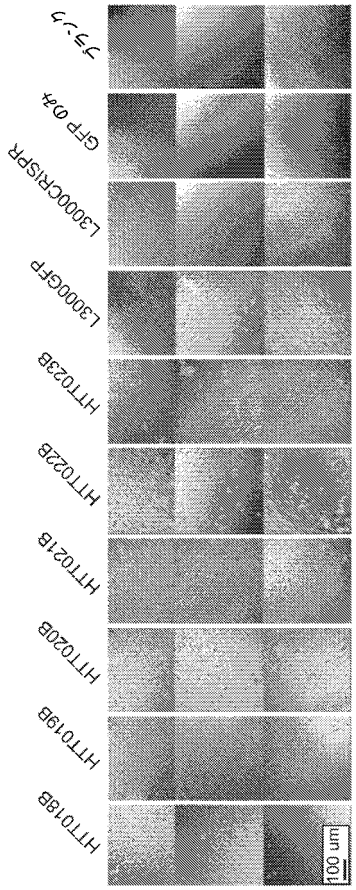
【図３】



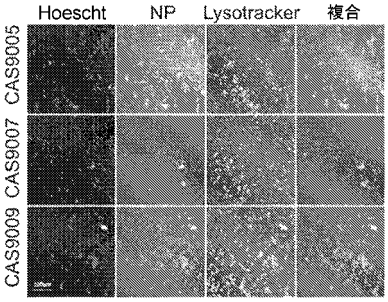
【図４】



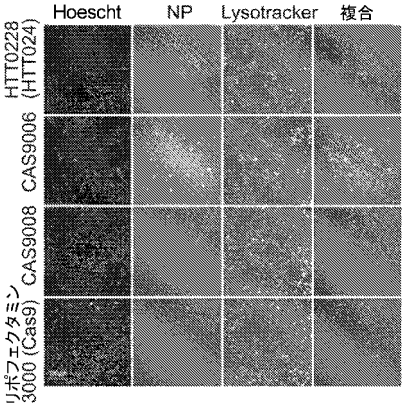
【図５】



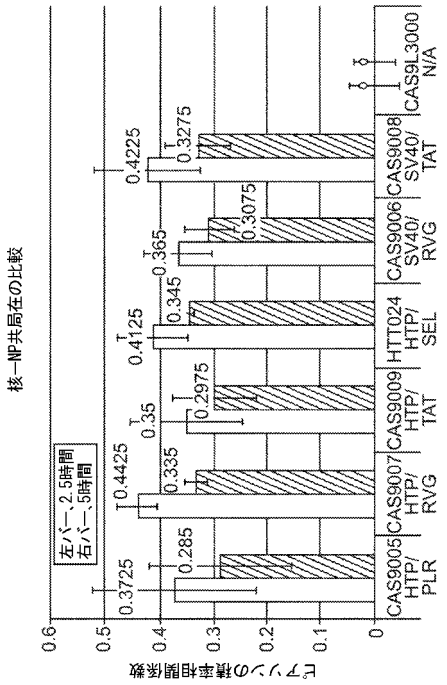
【図６Ａ】



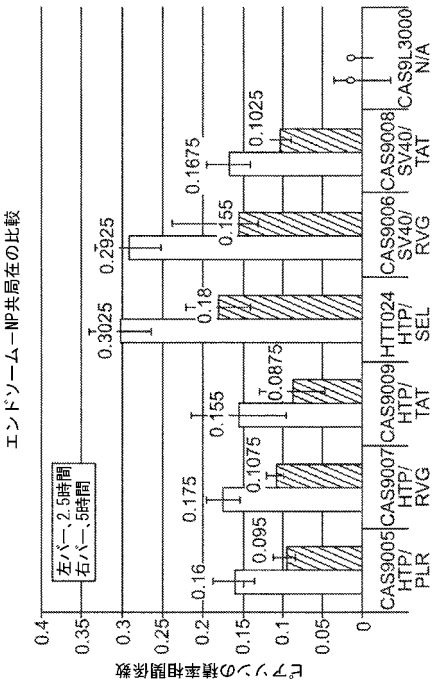
【図６Ｂ】



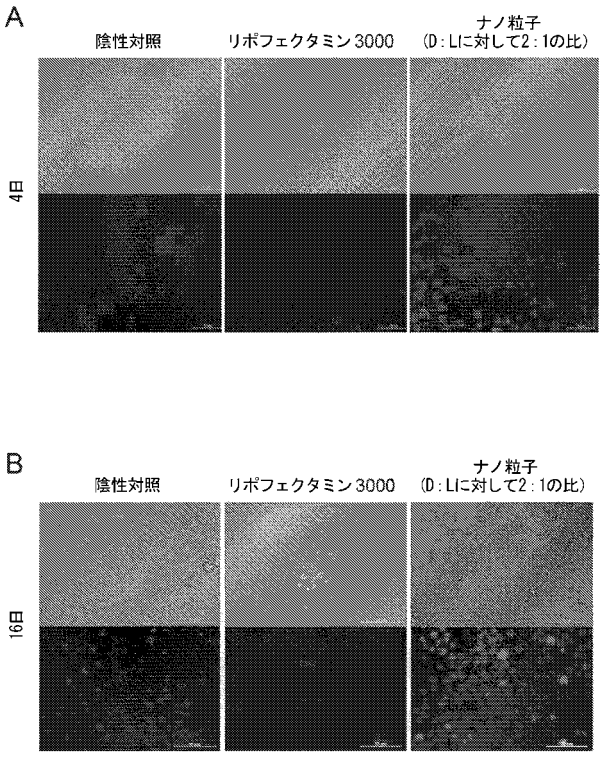
【図６Ｃ】


核－NP共局在の比較
ピアソンの積率相関係数
左バー、2.5時間
右バー、5時間
CAS9005 HTP/ PLR
CAS9007 HTP/ RVG
CAS9009 HTP/ TAT
HTT024 HTP/ SEL
CAS9006 SV40/ RVG
CAS9008 SV40/ TAT
CAS9L3000 N/A
0.3725
0.285
0.4425
0.335
0.35
0.2975
0.4125
0.345
0.365
0.3075
0.4225
0.3275

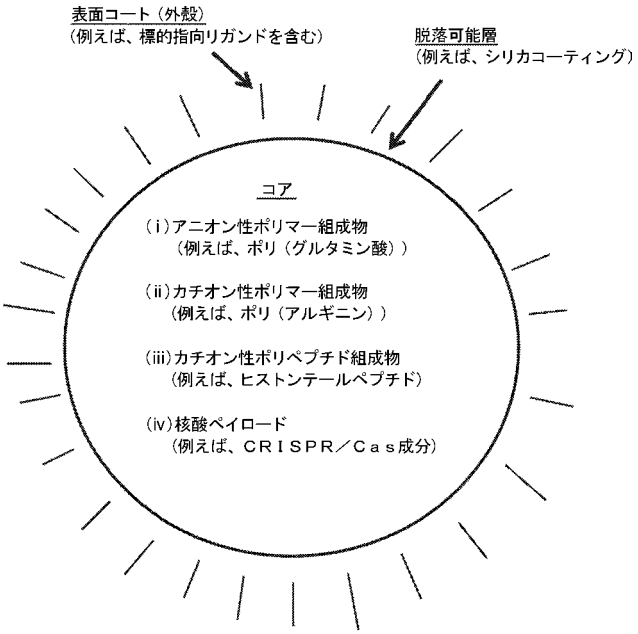
【図６Ｄ】


エンドソーム－NP共局在の比較
ピアソンの積率相関係数
左バー、2.5時間
右バー、5時間
CAS9005 HTP/ PLR
CAS9007 HTP/ RVG
CAS9009 HTP/ TAT
HTT024 HTP/ SEL
CAS9006 SV40/ RVG
CAS9008 SV40/ TAT
CAS9L3000 N/A
0.16
0.095
0.175
0.1075
0.155
0.0875
0.3025
0.18
0.2925
0.155
0.1675
0.1025

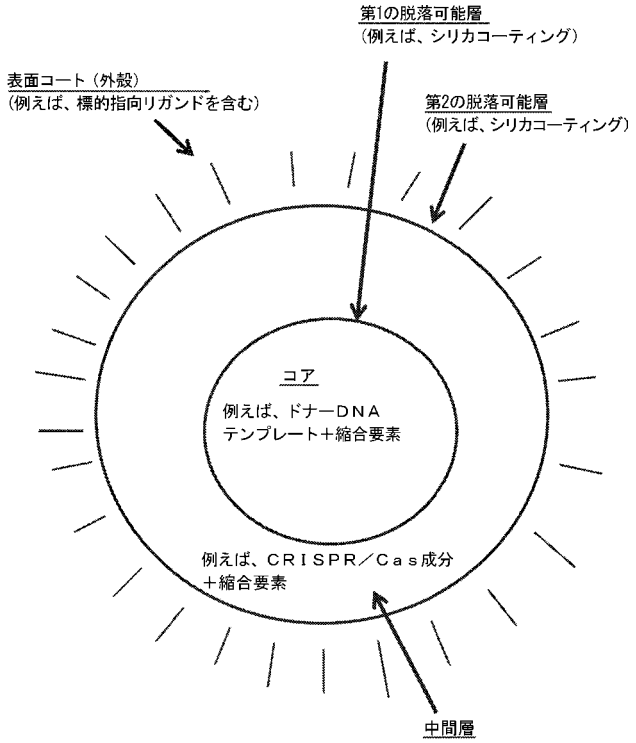
【図７】


A
陰性対照
リポフェクタミン3000
ナノ粒子
(D:Lに対して2:1の比)
4日
B
陰性対照
リポフェクタミン3000
ナノ粒子
(D:Lに対して2:1の比)
16日

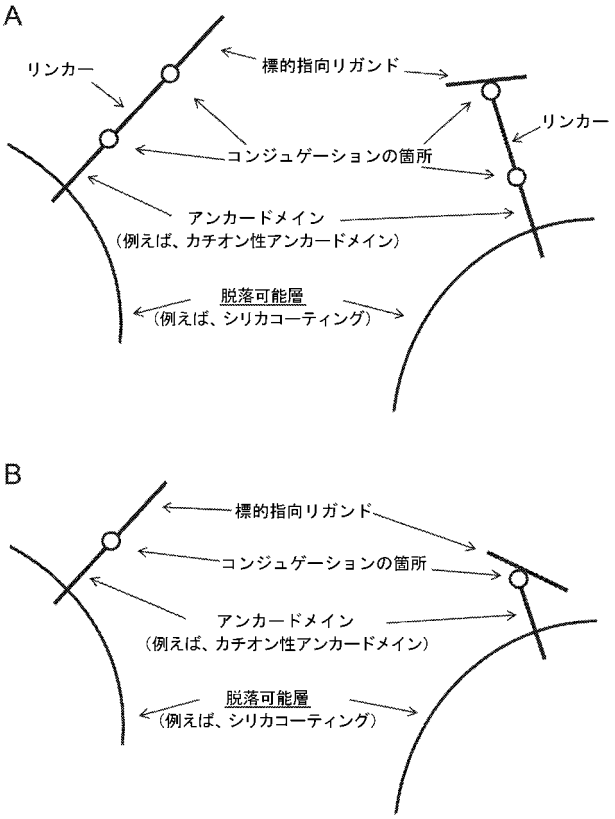
【図８】


表面コート（外殻）
（例えば、標的指向リガンドを含む）
脱落可能層
（例えば、シリカコーティング）
コア
（ｉ）アニオン性ポリマー組成物
（例えば、ポリ（グルタミン酸））
（ii）カチオン性ポリマー組成物
（例えば、ポリ（アルギニン））
（iii）カチオン性ポリペプチド組成物
（例えば、ヒストンテールペプチド）
（iv）核酸ペイロード
（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ成分）

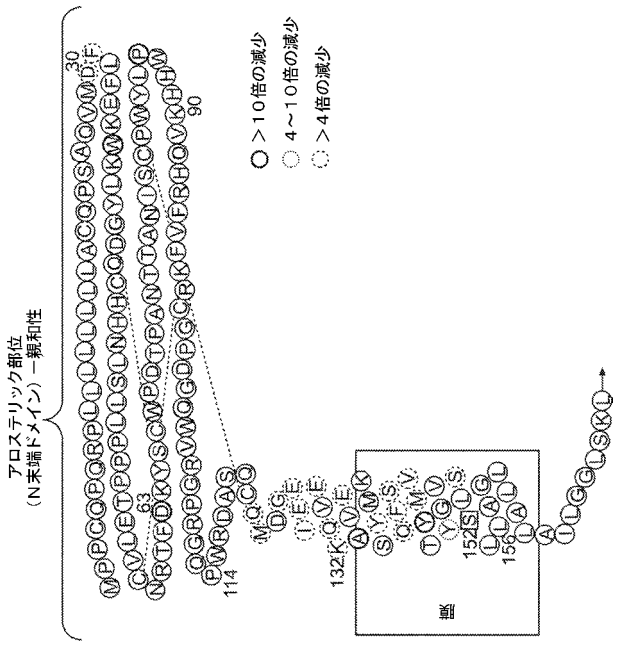
【図９】



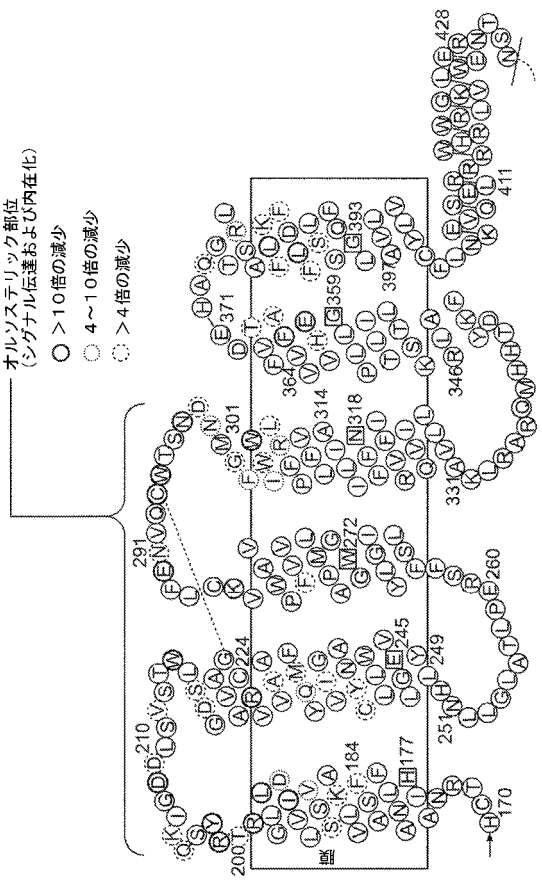
【図１０】



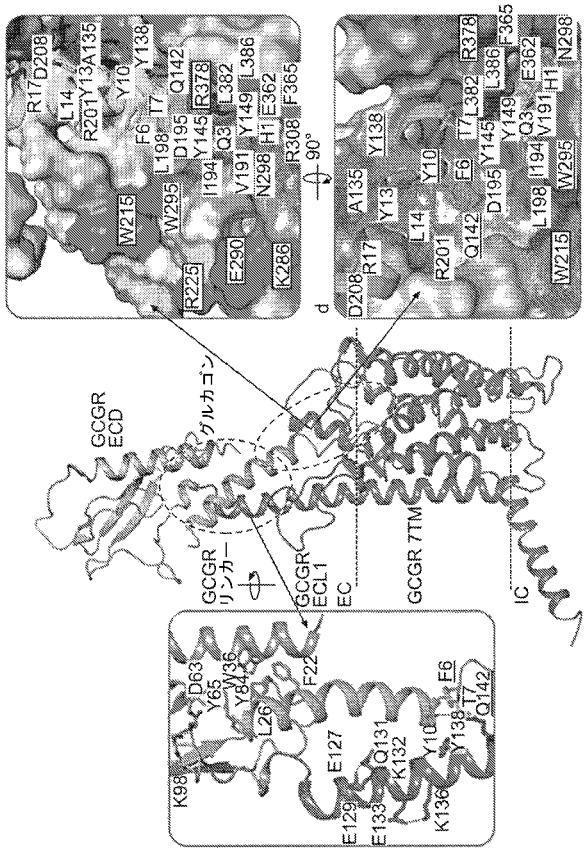
【図１１－１】



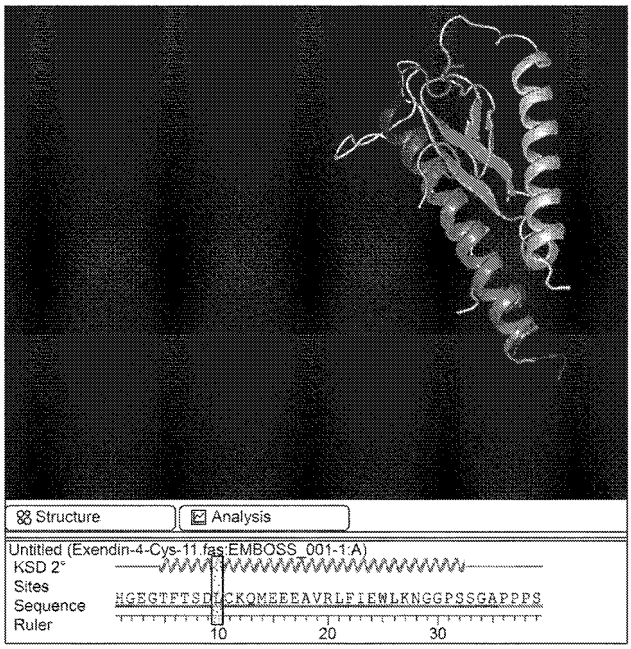
【図１１－２】



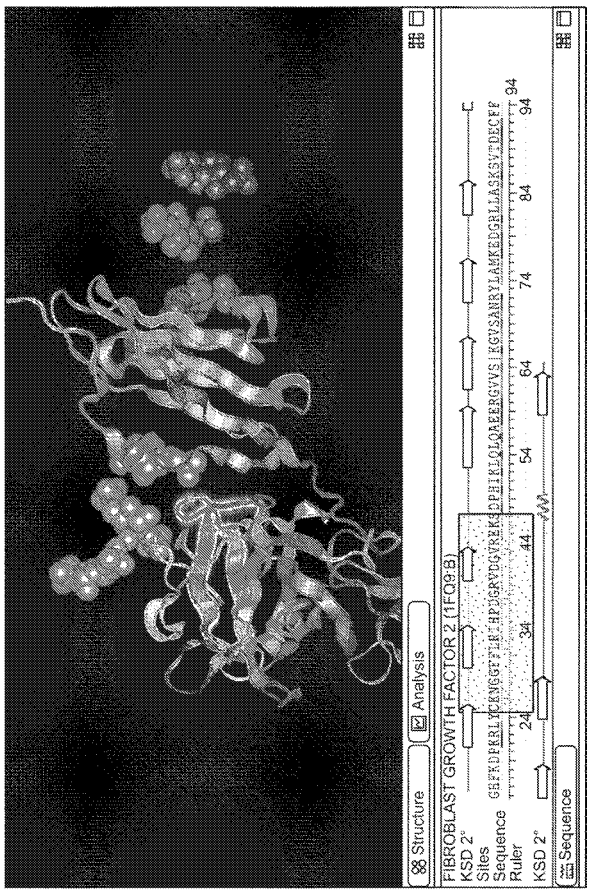
【図１２－１】



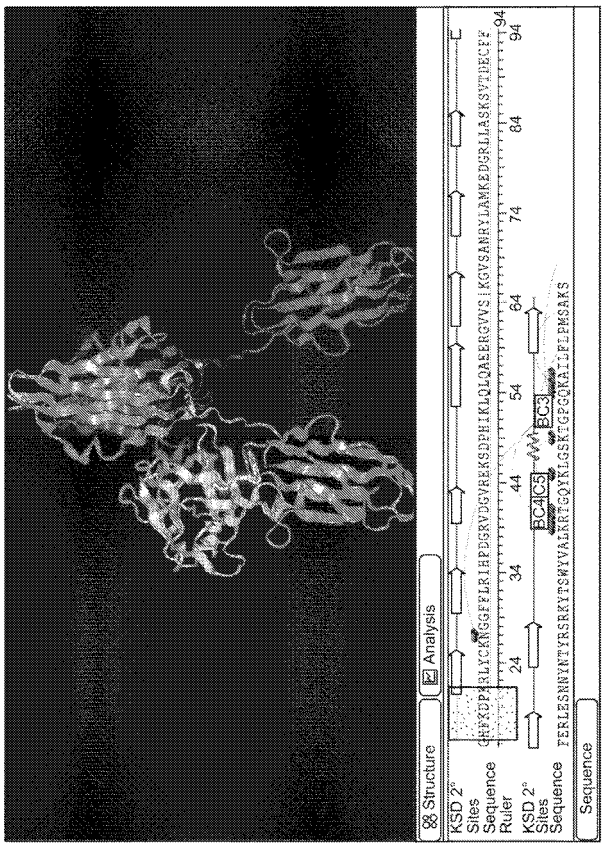
【図１２－２】



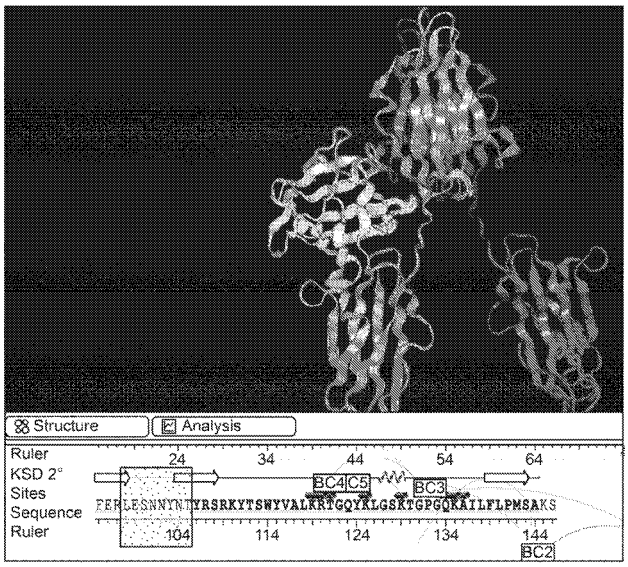
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【図１６】

クラス１

LPKKRKFSEISS
KRKRWENDIP
KRKRWENNIP
TGGVMKRKRGSV
PILPLKRRRGSP
TYSGVKRKRNVV
THIGYKRKRDSV
LSGTKRKRAYFI
QRRLLKRKRGSL
QIGKKRKRDYLD
KRGKRKRLVRPW
KKGKRKRLVRPW
PSRKRKRESDHI
PSRKRKRDHYAV
ISRKRKRDLEFV
ITRKRKRDLVFT
EPNPRKRKRSEL
TSPSRKRKWDQV
TLERKRKLAVLY
RRRKRRREWEDF
HRYCGKRRRRTR

クラス２

SVLGKRSRTWE
YGRVSKRPRYQF
RKRGRKRFRSV

クラス４

KRKYAVFLESQN
KRKYSIYLGSQS
KRKWMAFVMGDP
KRKCAVFLEGQN
IPRKRSFAELYD
RLTPRKRAFSEV

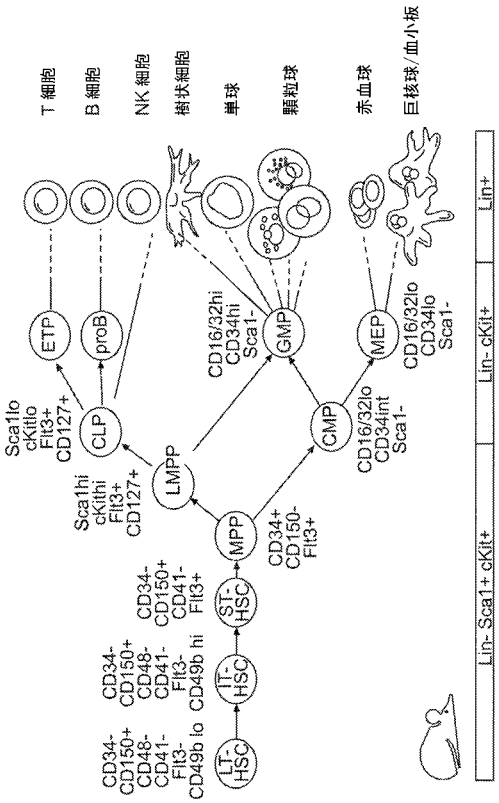
クラス３

KRSWSMAFC
KRTWAQAFTE
KRPYSIAFPLGQ
RRRSVLKRSWSVAF
KRRYSDAFRLPV
KRKYSDAFGLPV
IGRKRGYSVAFG
IGRKRVWAVAFY
WAGRKRTWRDAF
SSHRKRKFSDAF
PSHRKRKFSDAF
TAHRKRKFSDAF
RVQRKRKWSEAF
RLTRKRKYDCAF
LVNRKRRYWEAF

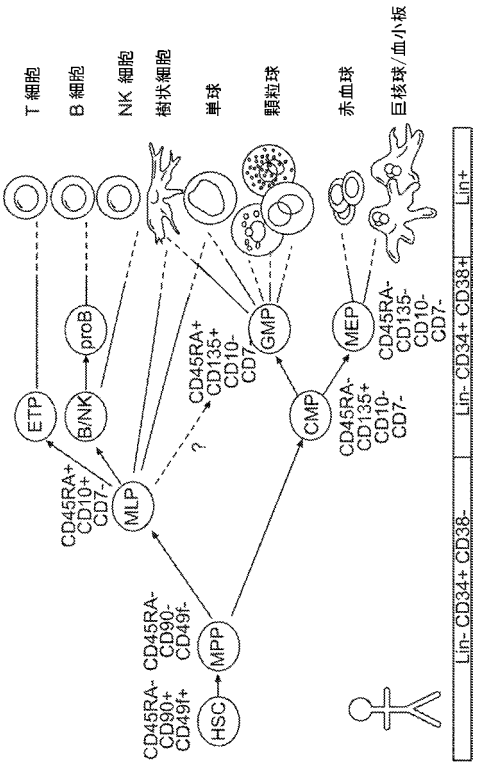
クラス５

LGKRYDRDWDYK
RSSGILGKRKFE
VHKTVLGKRKYW
SILGKRKNRDPS
QSVLGKRKSRPF
TVHLGKRRLRPW
RVLGKRKTGRSP
VLGKRKRDDCW
HGRQVLGKRKR
SVLGKRKRHPKV
SVLGKRKRHHLD
PVLGKRKRSLSS
RVLGKRKREDRP
ILGKRKRSHHFY
PILGKRKRHLFL
LLGKRKRPSIEH
SMLGKRKRCIIS
TLGKRKRISCVT
DTRLGKRKRRPW

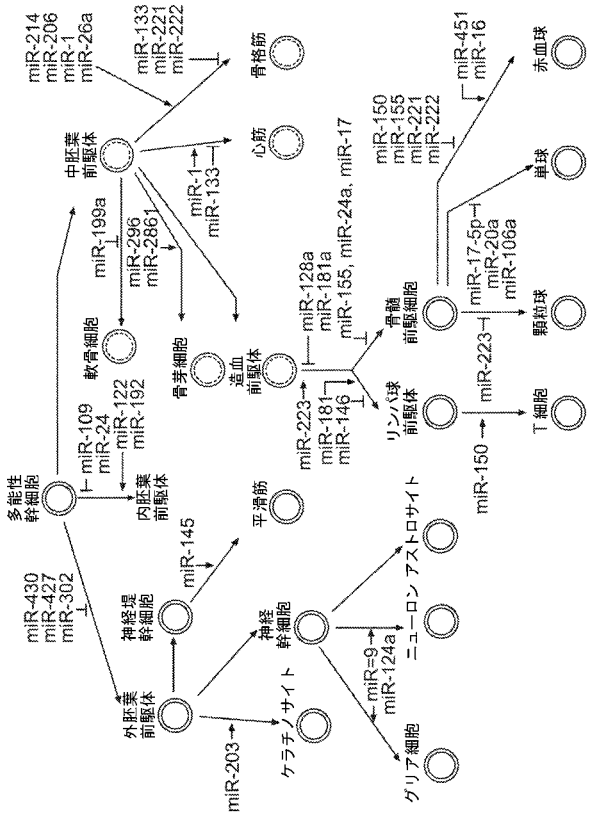
【図１７Ａ】



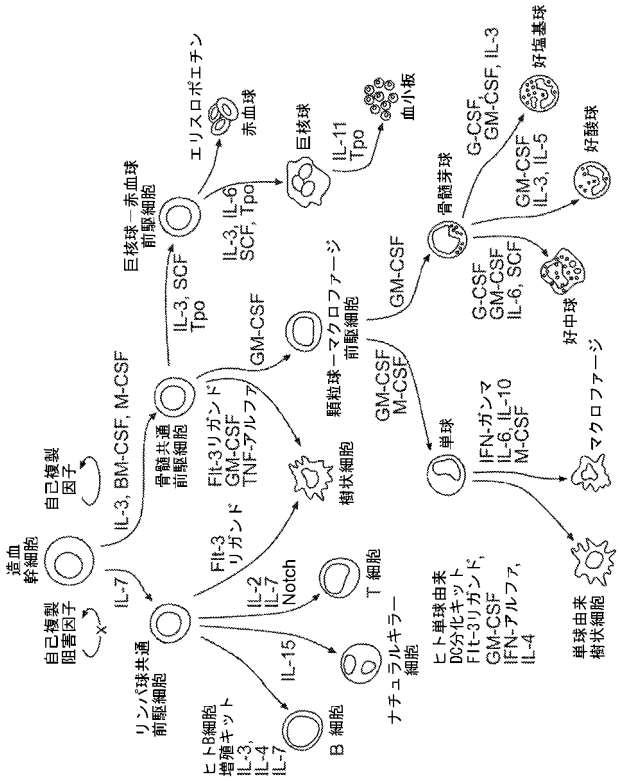
【図１７Ｂ】



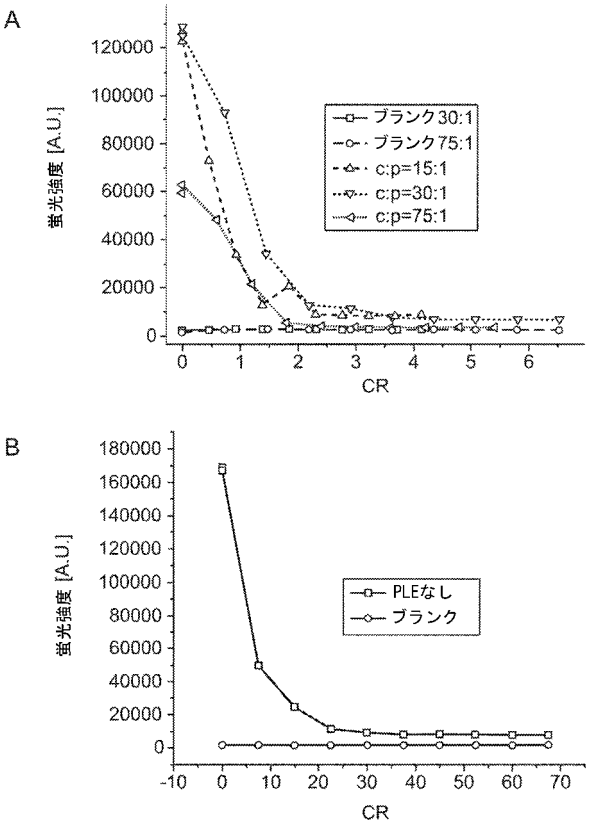
【図１８Ａ】



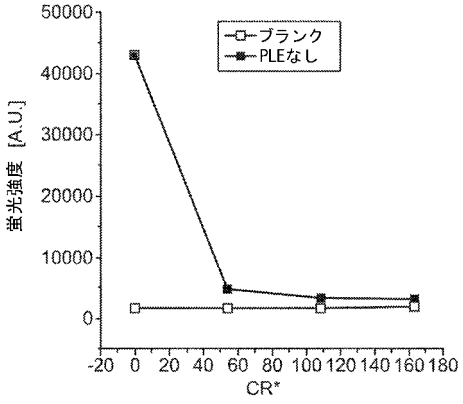
【図１８Ｂ】



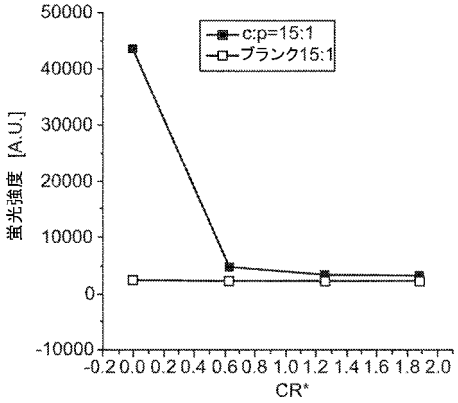
【図１９】



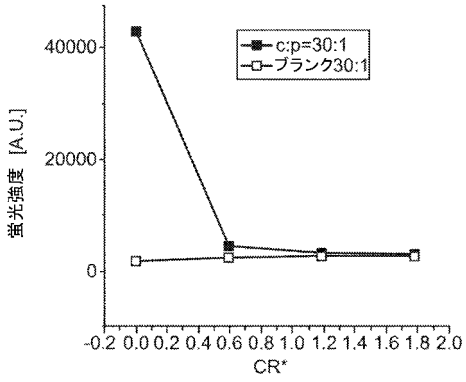
【図２０Ａ】



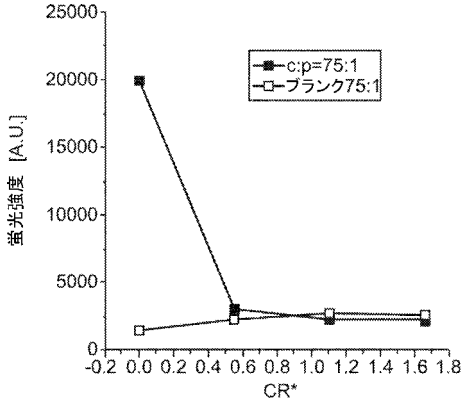
【図２０Ｂ】



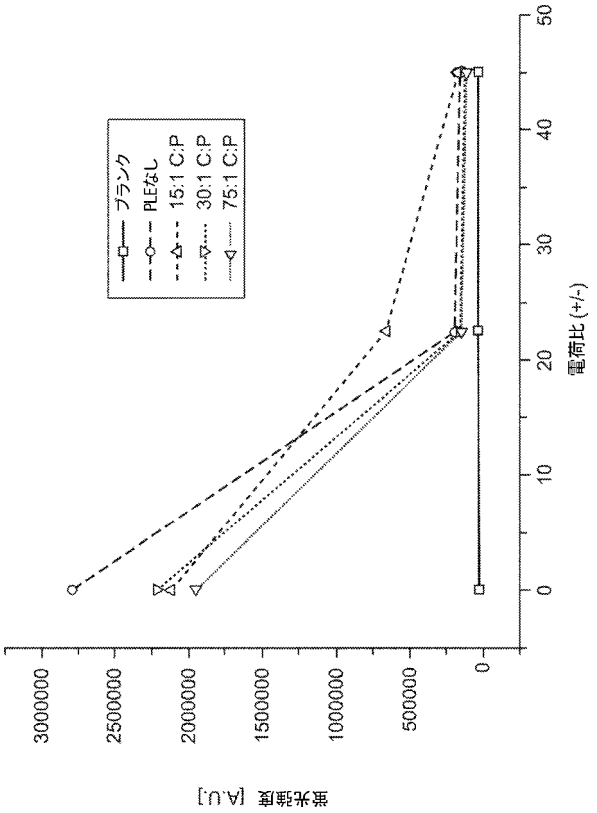
【図２０Ｃ】



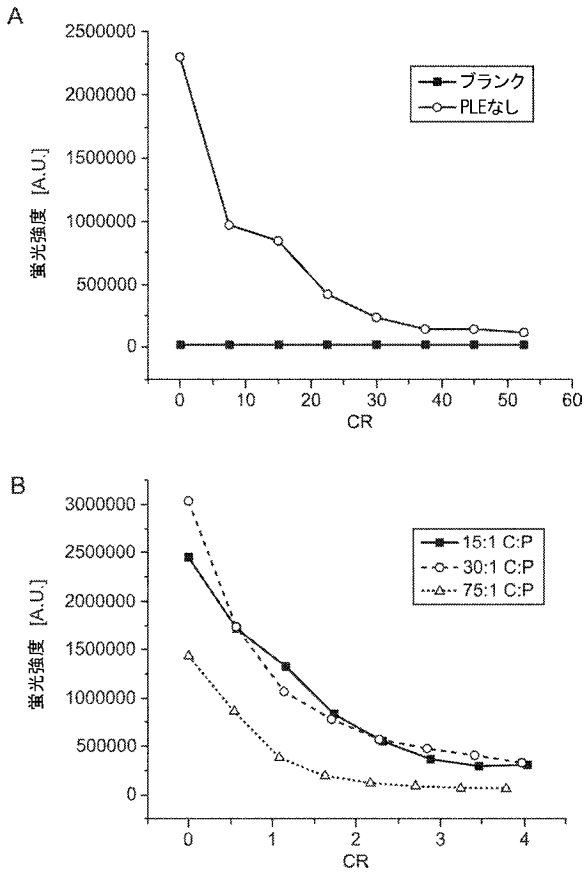
【図２０Ｄ】



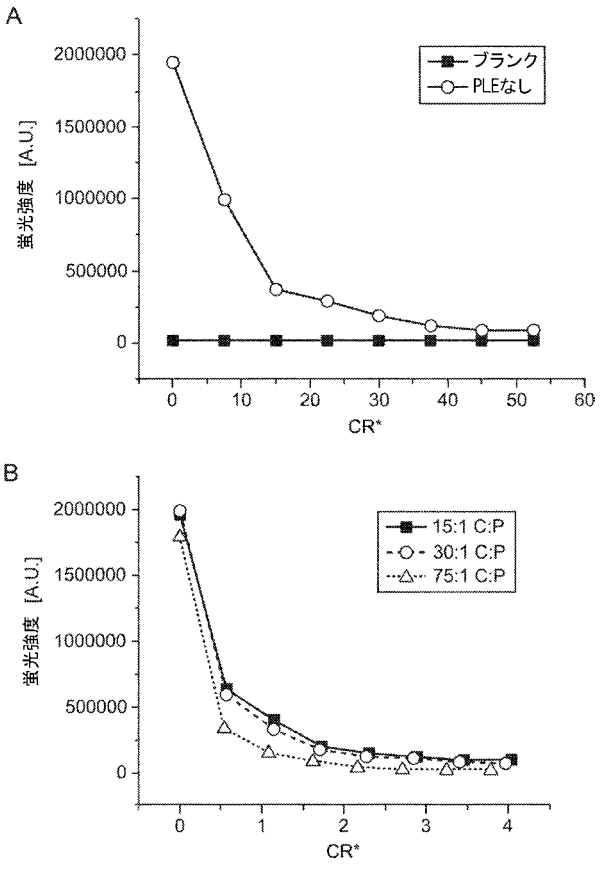
【図２１】



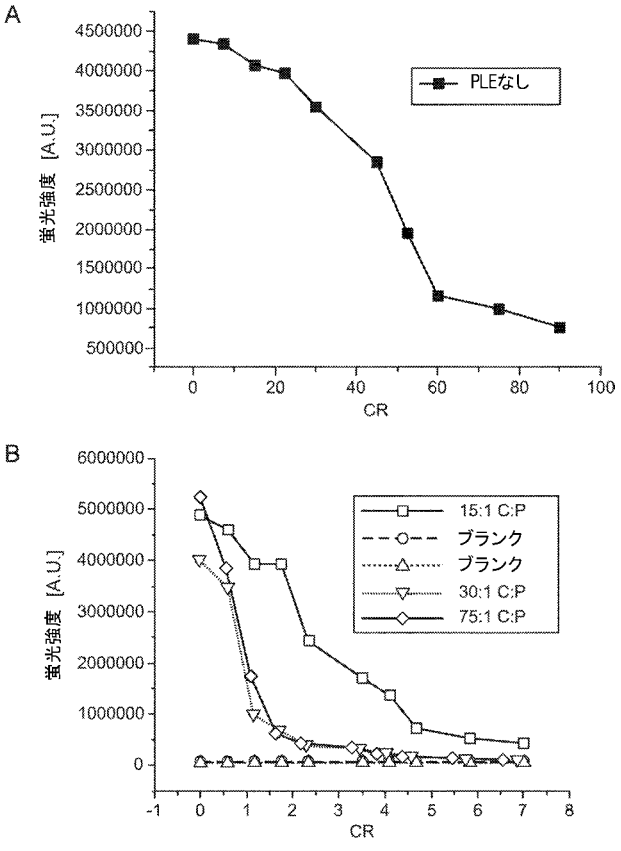
【図２２】



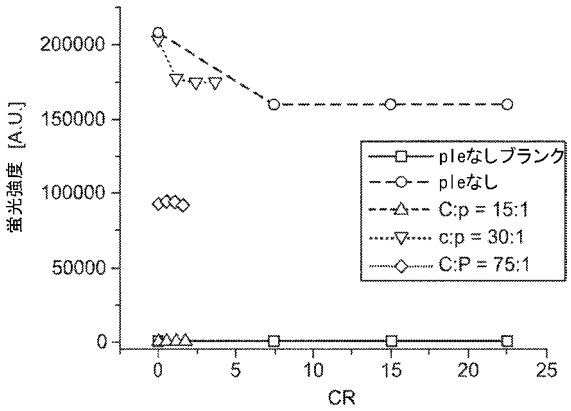
【図２３】



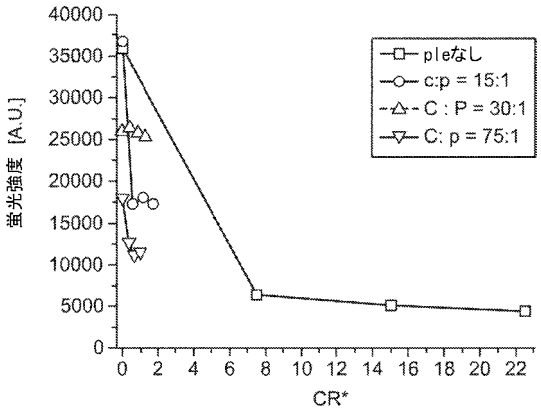
【図２４】



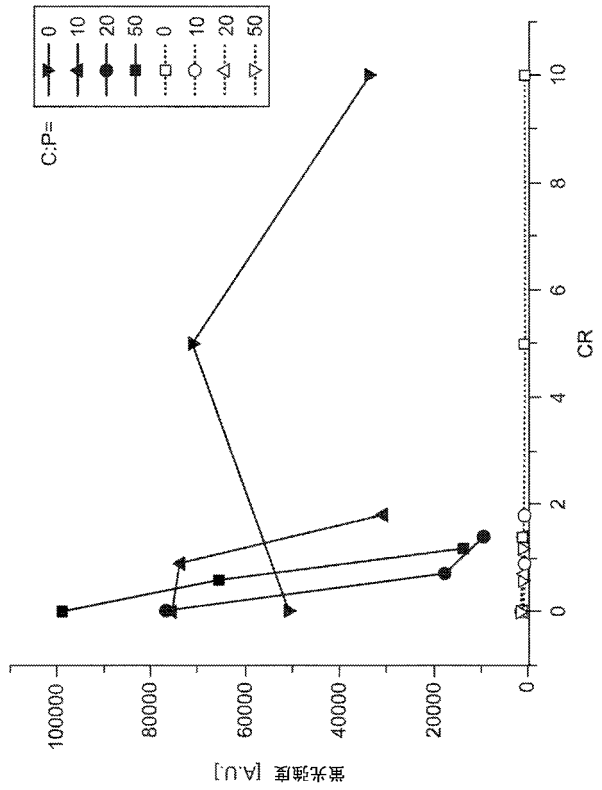
【図２５】



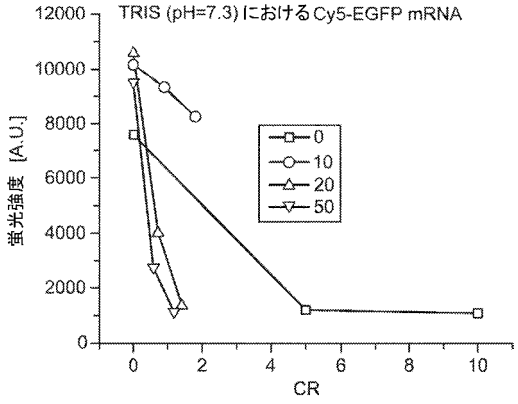
【図２６】



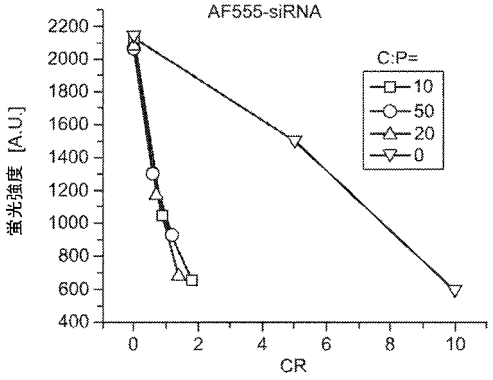
【図２７】



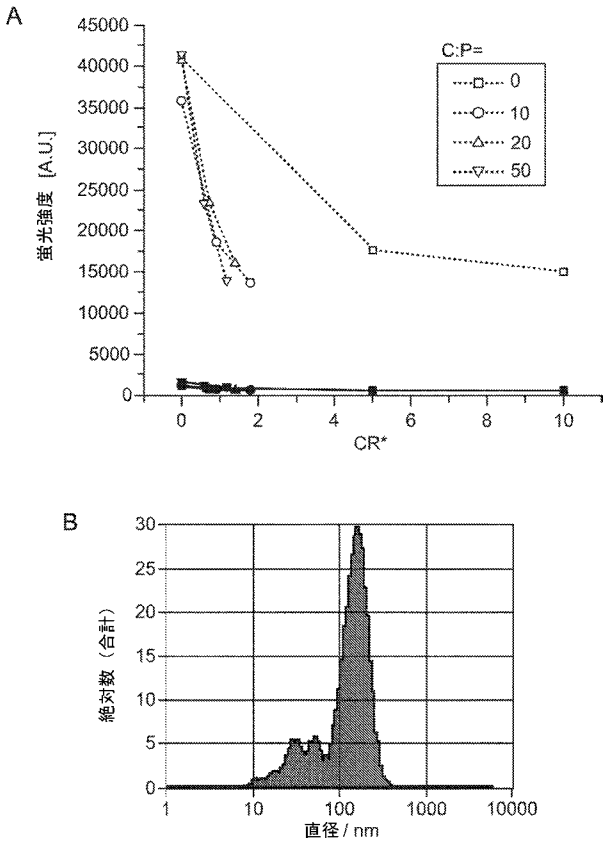
【図２８】



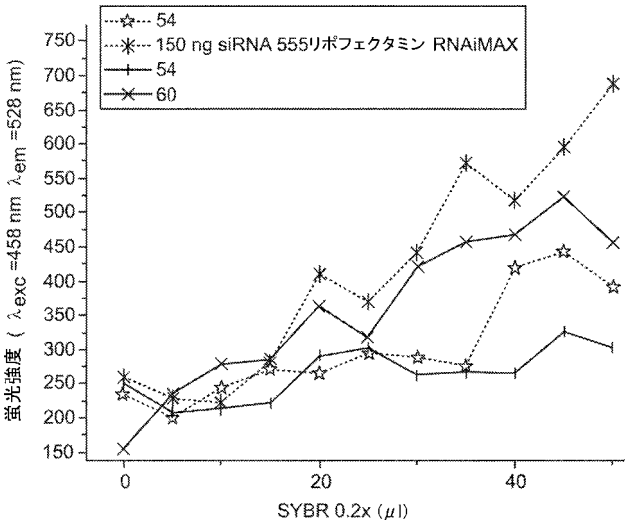
【図２９】



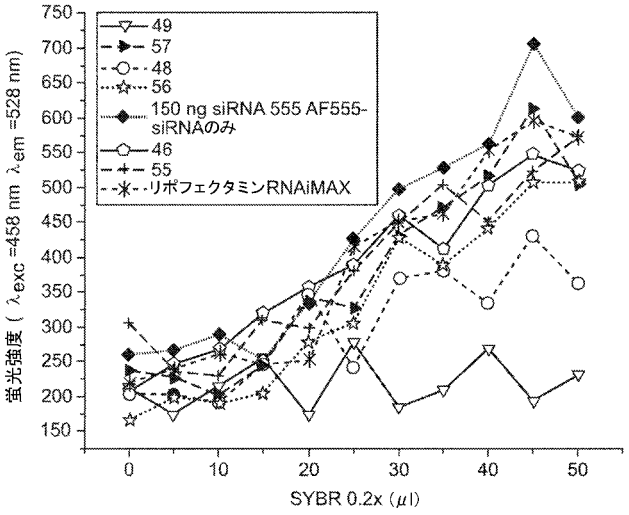
【図３０】



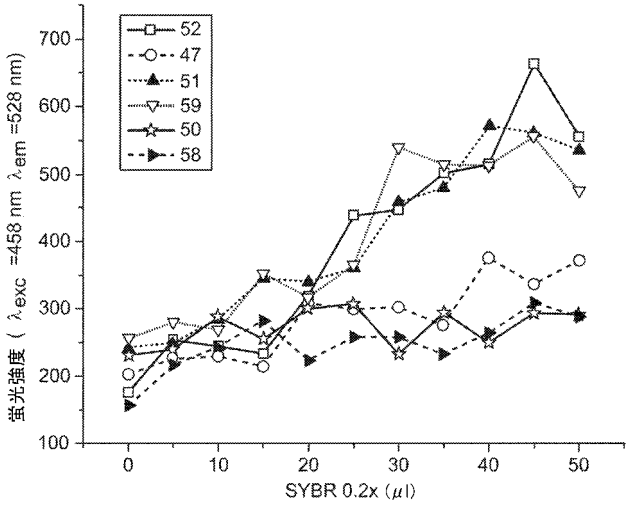
【図３１Ａ】



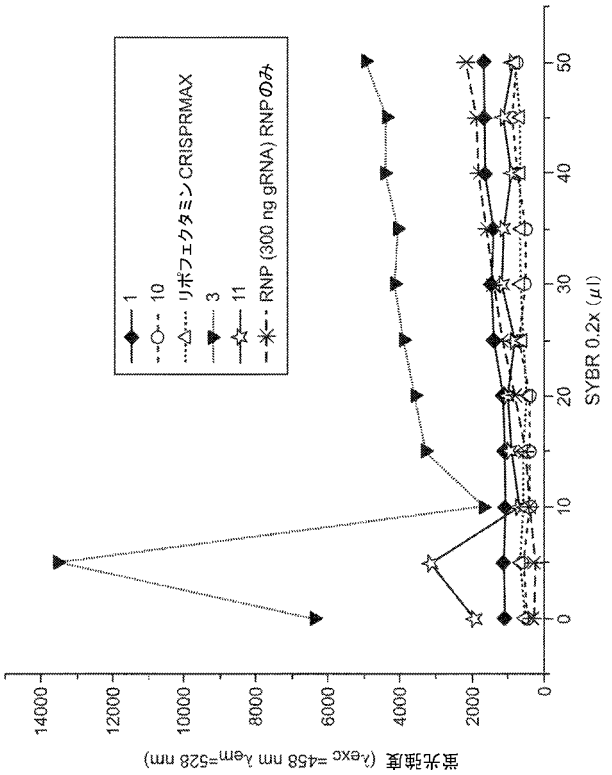
【図３１Ｂ】



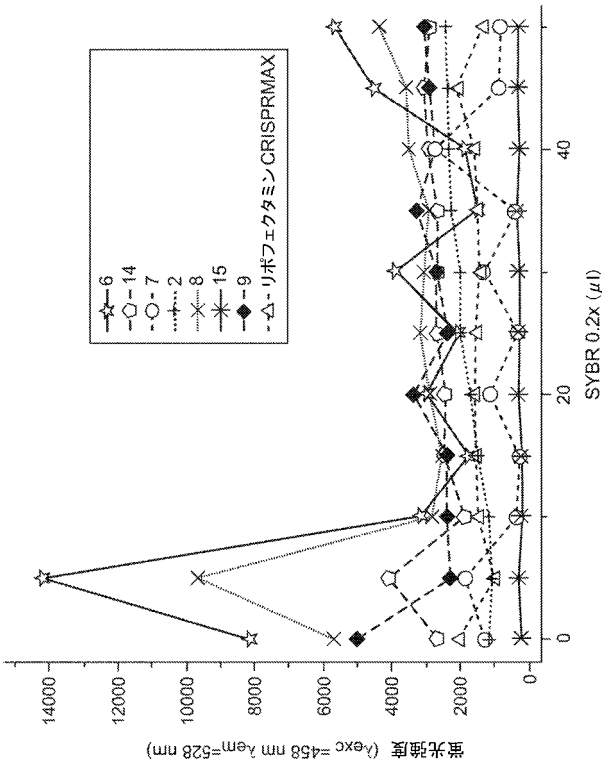
【図３１Ｃ】



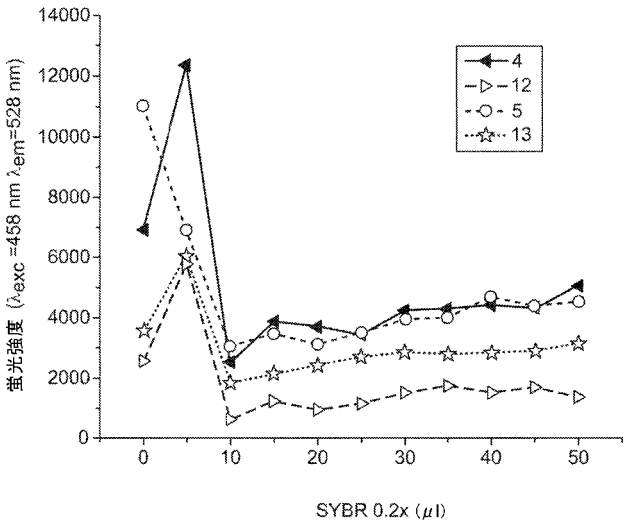
【図３２－１】



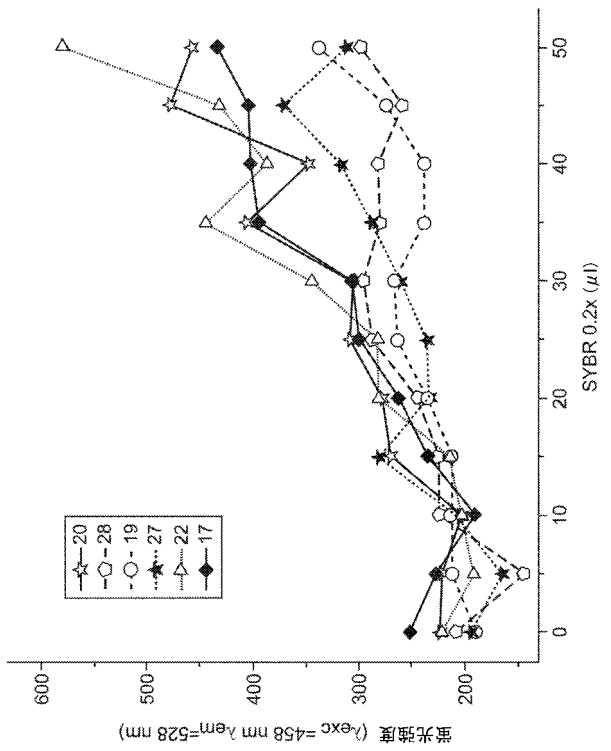
【図３２－２】



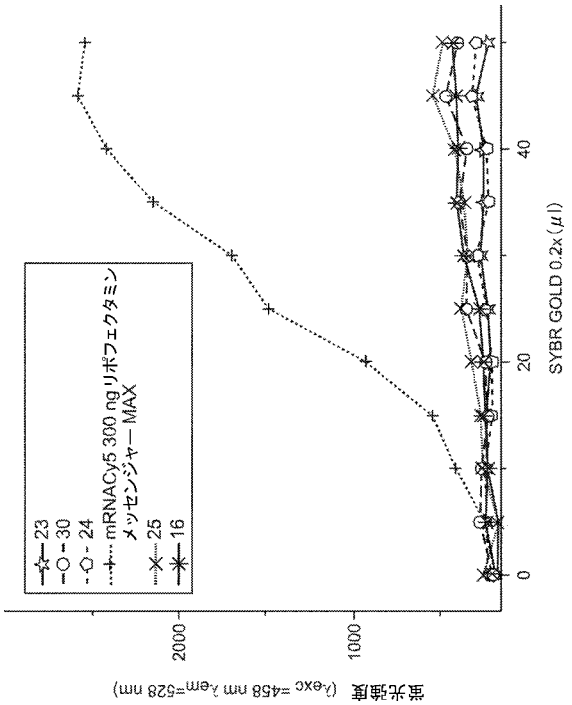
【図３２－３】



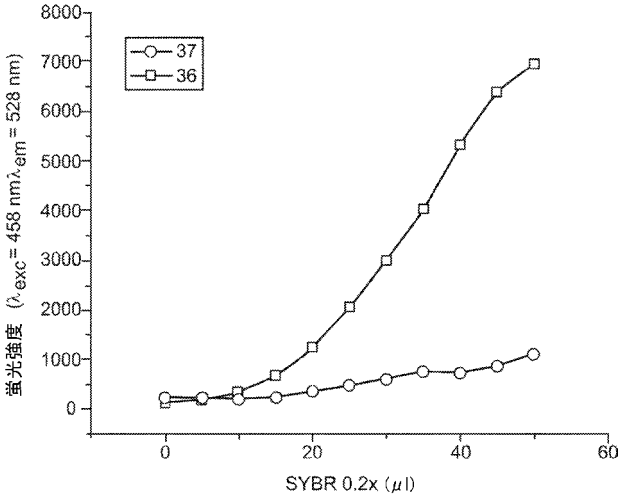
【図３３－１】



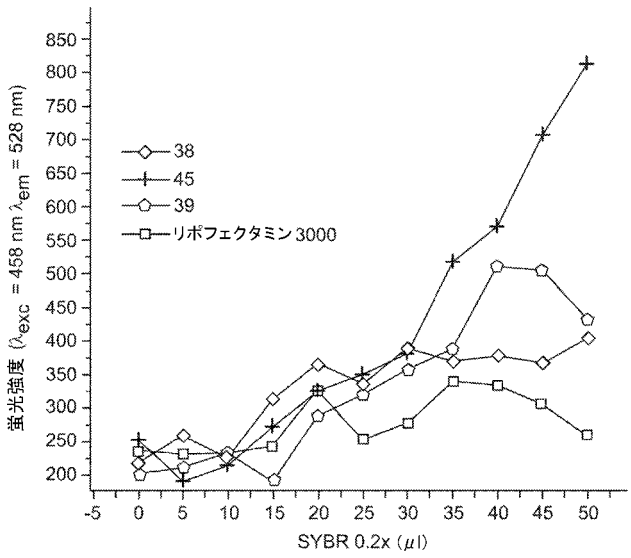
【図３３－２】



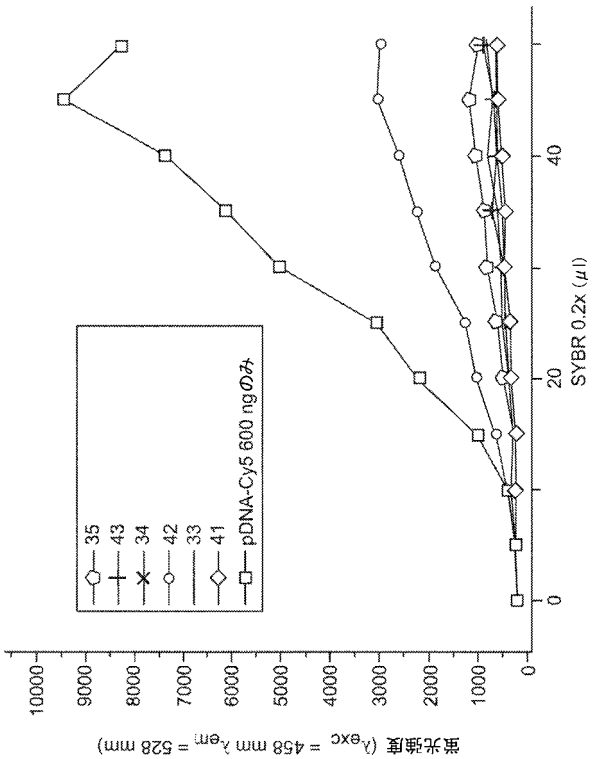
【図３４－１】



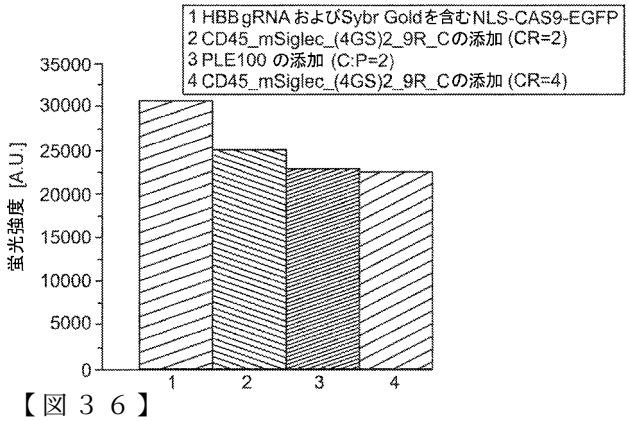
【図３４－２】



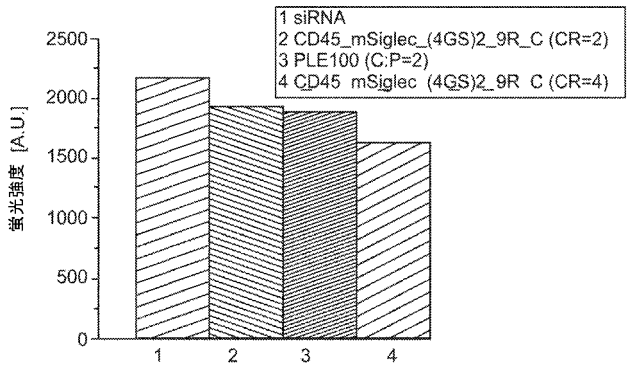
【図３４－３】



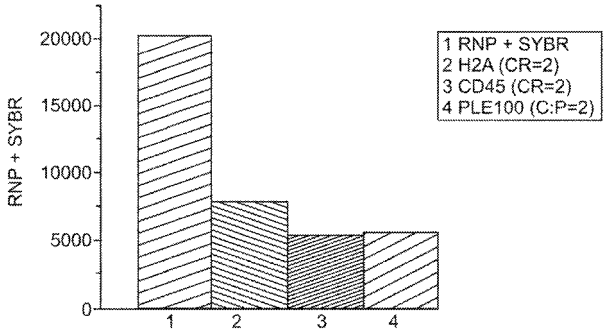
【図３５】



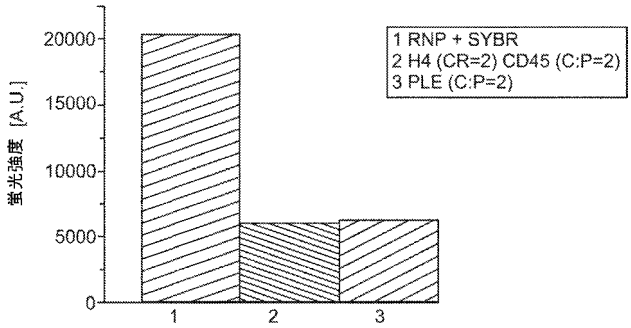
【図３６】



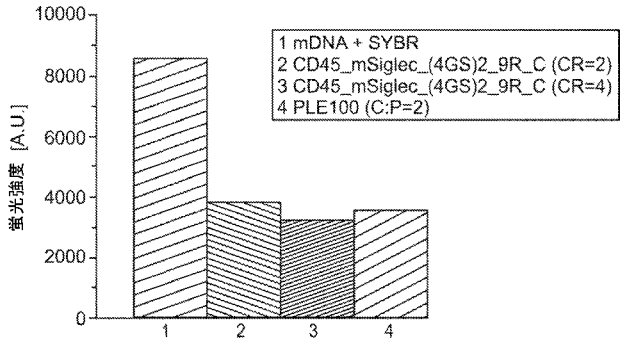
【図３７】



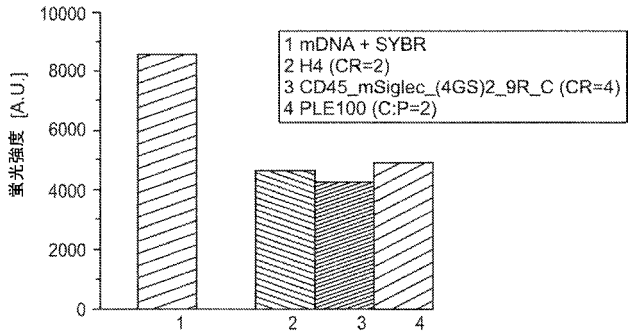
【図３８】



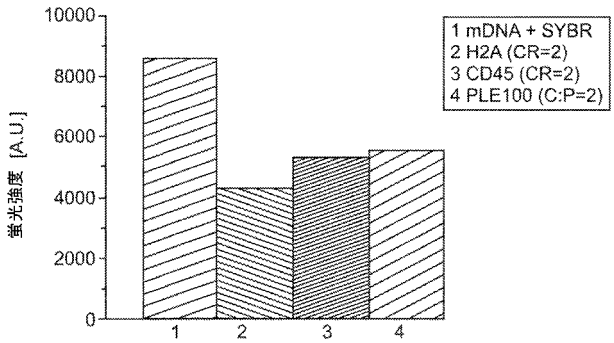
【図３９】



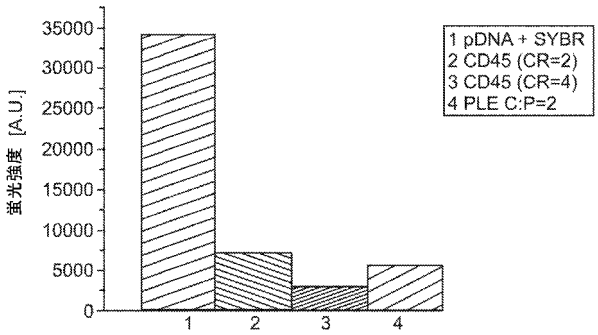
【図４０】



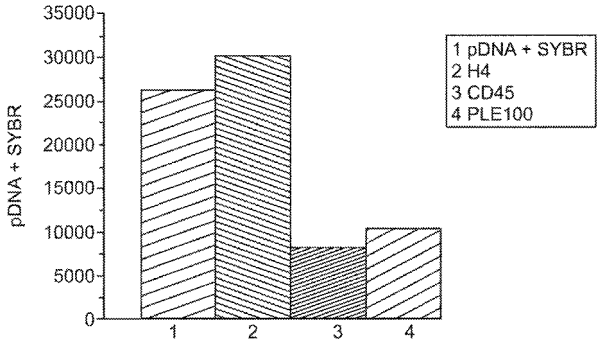
【図４１】



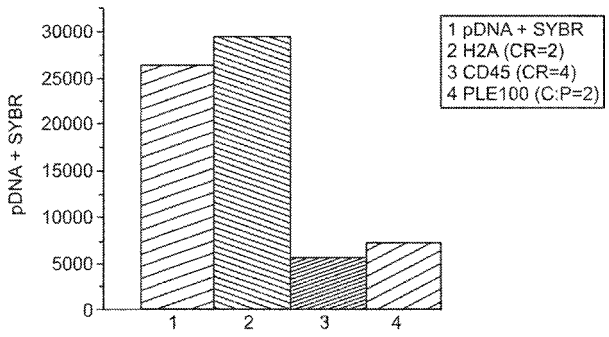
【図４２】



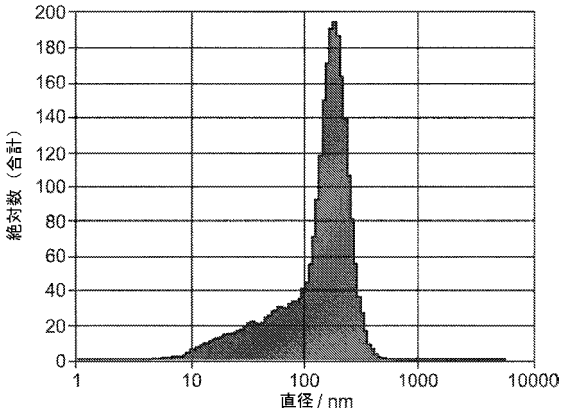
【図４３】



【図４４】



【図４５Ａ】



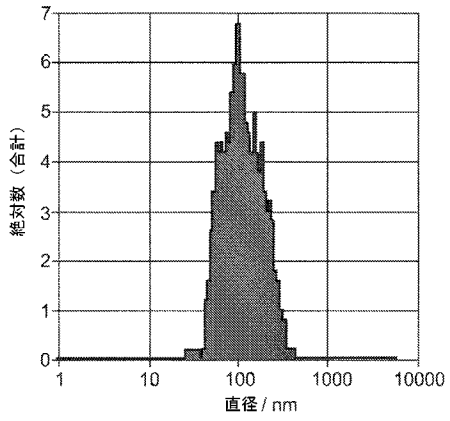
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
181.0	194.4	116.0	100.0

X 値

	数	濃度	体積
X10	34.7	34.7	152.3
X50	155.8	155.8	214.4
X90	232.1	232.1	314.7
スパン	1.3	1.3	0.8
平均	151.5	151.5	233.4
標準偏差	76.2	76.2	70.6

【図４５Ｂ－１】



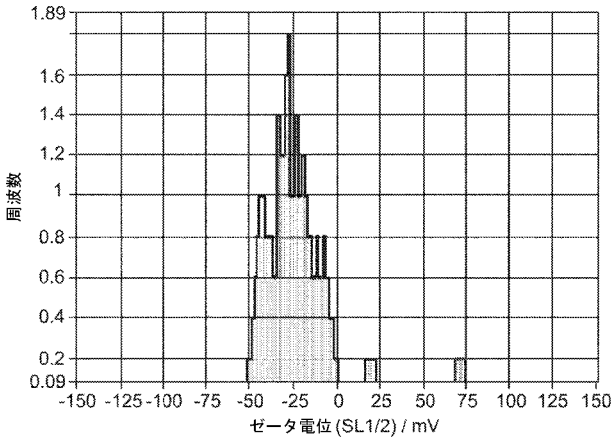
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
100.0	6.6	143.6	100.0

X 値

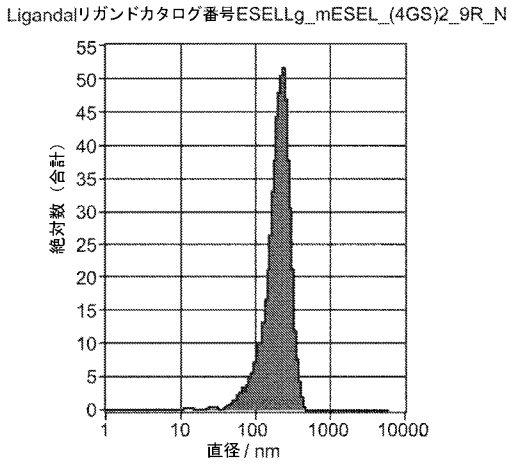
	数	濃度	体積
X10	54.9	54.9	115.8
X50	102.0	102.0	209.3
X90	207.8	207.8	343.7
スパン	1.5	1.5	1.1
平均	124.5	124.5	226.6
標準偏差	65.7	65.7	78.0

【図４５Ｂ－２】



移動度 : -1.72 ± 0.04 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.72 µm/sec/V/cm
ZPファクター : 12.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -21.98 ± 0.51 mV
ゼータ電位分布 : -21.98 mV FWHM 16.96 (SL1/2)

【図４５Ｃ－１】



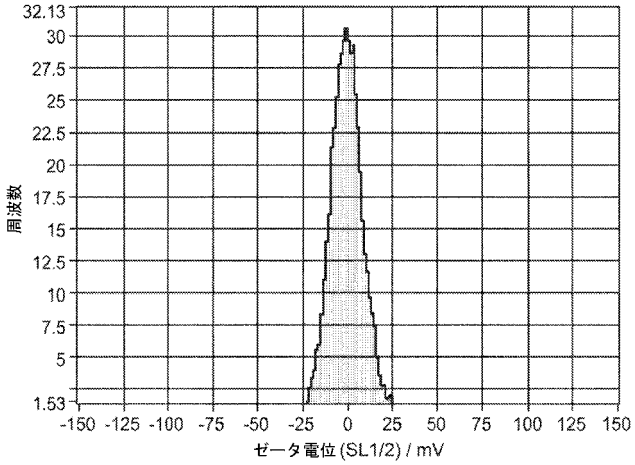
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
224.4	50.2	149.2	100.0

X 値

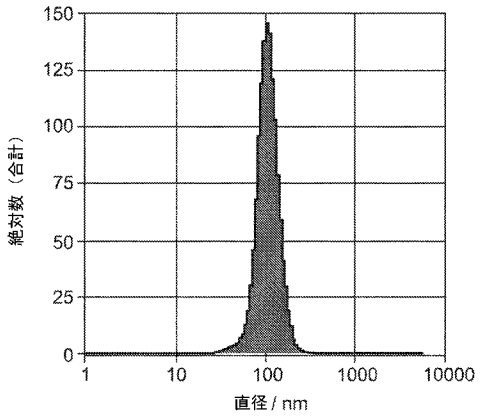
	数	濃度	体積
X10	110.9	110.9	182.7
X50	205.8	205.8	253.2
X90	279.9	279.9	333.5
スパン	0.8	0.8	0.6
平均	209.3	209.3	263.1
標準偏差	68.2	68.2	58.4

【図４５Ｃ－２】



移動度：-0.03 ± 0.07 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.03 µm/sec/V/cm
ZPファクター：13.7 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -0.36 ± 0.96 mV
ゼータ電位分布：-0.36 mV FWHM 21.36 (SL1/2)

【図４６】



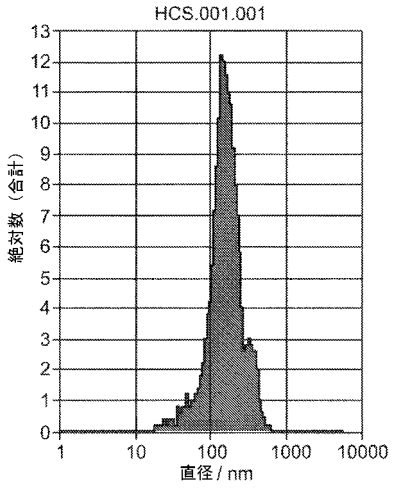
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
107.0	145.4	61.0	100.0

X 値

	数	濃度	体積
X10	75.9	75.9	91.9
X50	103.2	103.2	124.5
X90	143.6	143.6	180.8
スパン	0.7	0.7	0.7
平均	110.3	110.3	137.0
標準偏差	29.6	29.6	40.4

【図４７－１】



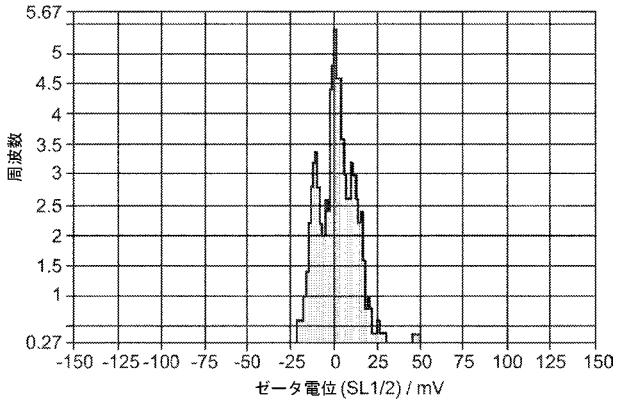
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
156.6	11.7	129.3	100.0

X 値

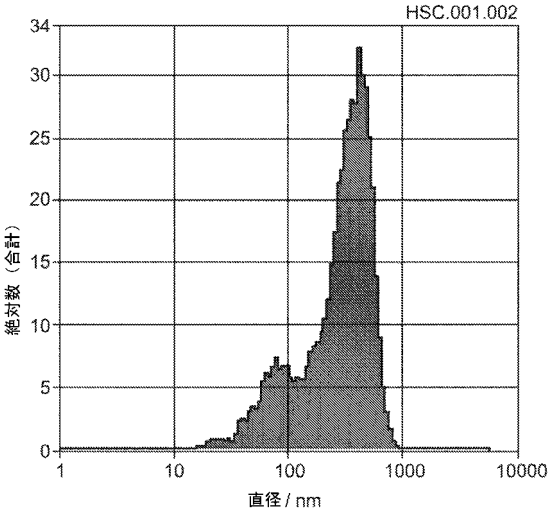
	数	濃度	体積
X10	82.2	82.2	153.2
X50	150.9	150.9	319.1
X90	277.0	277.0	440.7
スパン	1.3	1.3	0.9
平均	173.5	173.5	308.2
標準偏差	85.6	85.6	112.7

【図４７－２】

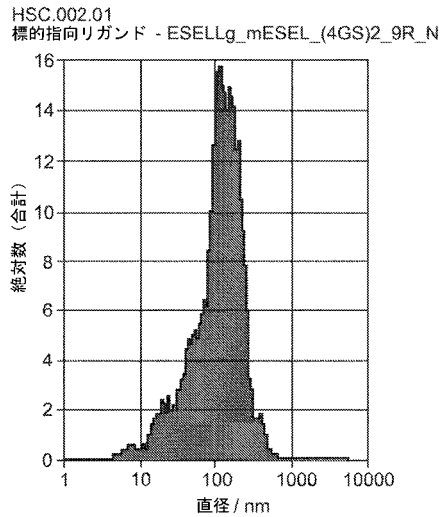


移動度: 0.31 ± 0.07 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.33 µm/sec/V/cm
ZPファクター : 13.6 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 4.18 ± 0.93 mV
ゼータ電位分布 : 4.18 mV FWHM 10.97 (SL1/2)

【図４８】



【図４９－１】



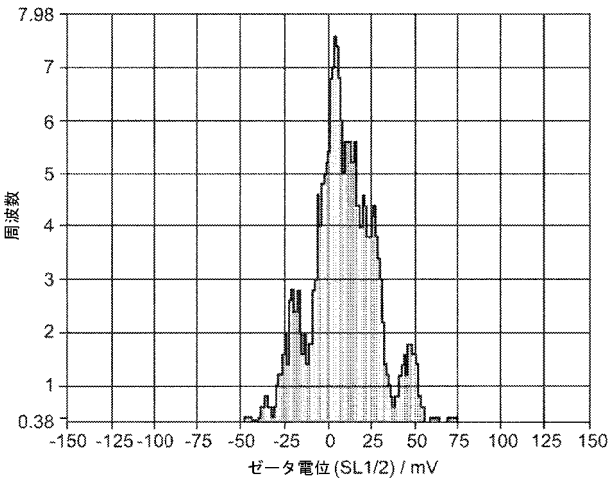
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
127.3	14.9	161.8	100.0

X 値

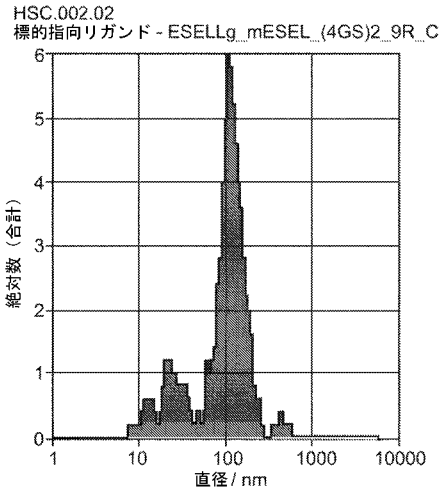
	数	濃度	体積
X10	31.3	31.3	137.3
X50	109.8	109.8	245.7
X90	217.7	217.7	448.7
スパン	1.7	1.7	1.3
平均	126.7	126.7	288.4
標準偏差	81.3	81.3	130.0

【図４９－２】



移動度 : 0.88 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.85 µm/sec/V/cm
ZPファクター : 12.5 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 10.90 ± 0.58 mV
ゼータ電位分布 : 10.90 mV FWHM 22.10 (SL1/2)

【図５０－１】

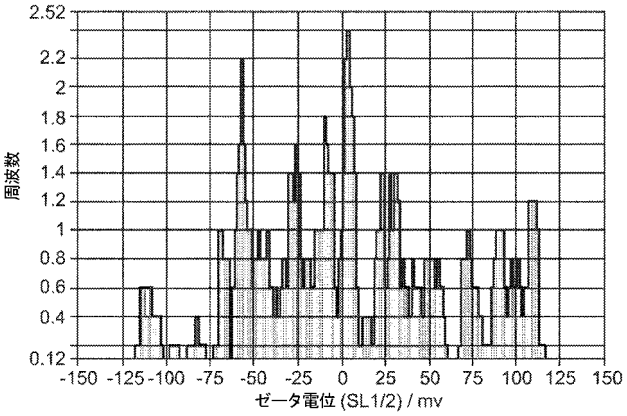


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
114.6	5.7	70.3	80.0
23.9	1.1	19.3	20.0

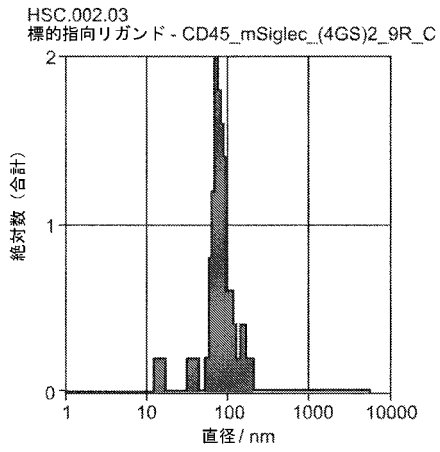
X 値	数	濃度	体積
X10	21.4	21.4	114.4
X50	102.0	102.0	373.5
X90	166.0	166.0	473.5
スパン	1.4	1.4	1.0
平均	108.9	108.9	319.5
標準偏差	74.5	74.5	153.6

【図５０－２】



ゼータ電位 @ 25° C: -7.10 ± 0.30 mV
ゼータ電位分布：-7.10 mV FWHM 6.49 (SL1/2)
濃度：6.7E+7 粒子 / mL
希釈係数 ：1
当初濃度： 6.7E+7 粒子 / cm^3

【図５１－１】

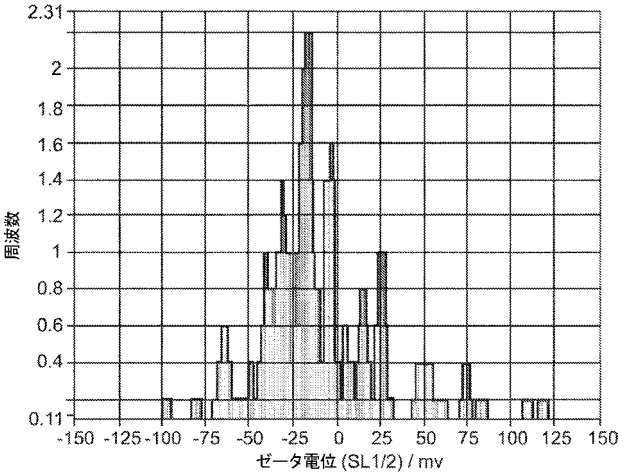


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
78.2	1.8	32.3	100.0

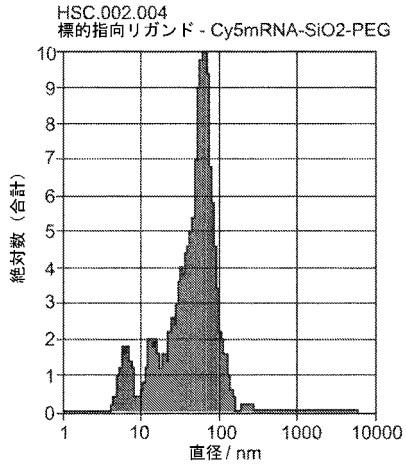
X 値	数	濃度	体積
X10	36.7	36.7	70.9
X50	75.4	75.4	130.6
X90	132.6	132.6	167.8
スパン	1.3	1.3	0.7
平均	82.6	82.6	124.1
標準偏差	35.3	35.3	42.6

【図５１－２】



移動度：-0.33 ± 0.03 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.32 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：12.5 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -4.11 ± 0.38 mV
ゼータ電位分布：-4.11 mV FWHM 6.33 (SL1/2)

【図５２－１】

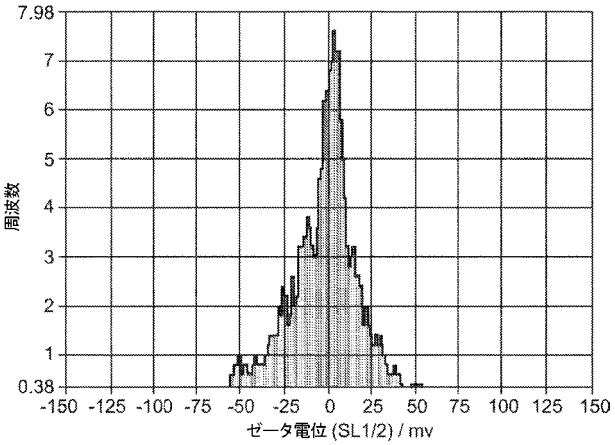


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
60.8	9.8	40.9	83.8
15.2	2.0	5.9	8.7
6.3	1.6	2.9	7.5

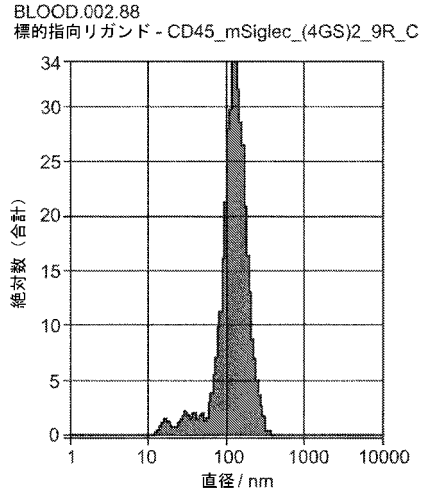
X値	数	濃度	体積
X10	12.2	12.2	54.9
X50	50.5	50.5	90.0
X90	79.6	79.6	219.1
スパン	1.3	1.3	1.8
平均	51.1	51.1	117.2
標準偏差	31.0	31.0	64.8

【図５２－２】



移動度 : -0.15 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.15 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 12.4 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -1.86 ± 0.58 mV
ゼータ電位分布 : -1.86 mV FWHM 15.86 (SL1/2)

【図５３－１】

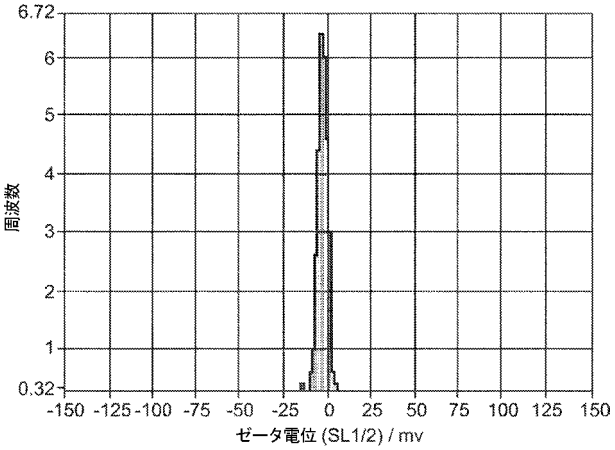


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
129.1	34.0	88.1	100.0

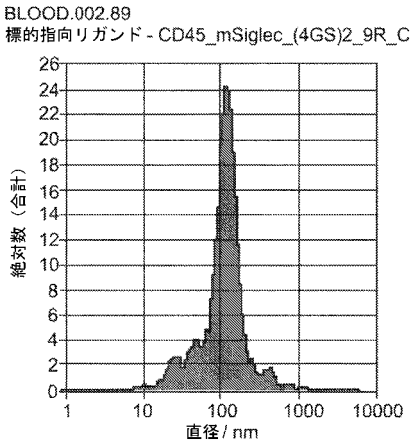
X値	数	濃度	体積
X10	69.0	69.0	111.6
X50	120.1	120.1	164.4
X90	179.8	179.8	246.4
スパン	0.9	0.9	0.8
平均	128.4	128.4	177.9
標準偏差	48.5	48.5	53.0

【図５３－２】



移動度 : -0.26 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.26 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 12.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -3.32 ± 0.29 mV
ゼータ電位分布 : -3.32 mV FWHM 7.13 (SL1/2)

【図５４－１】

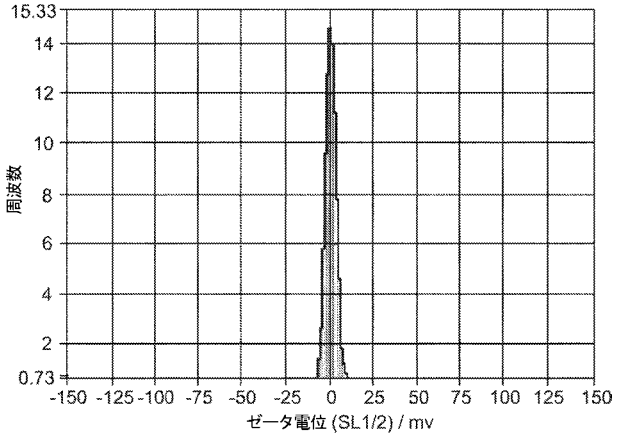


ピーク解析（絶対数）

直径 /nm	絶対数	FWHM/nm	パーセンテージ
117.1	24.1	72.3	100.0

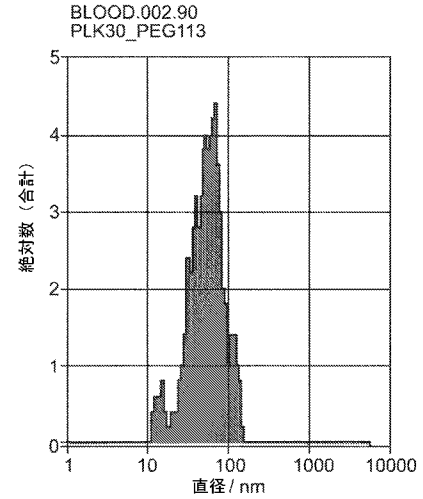
X値	数	濃度	体積
X10	40.1	40.1	156.8
X50	108.4	108.4	705.8
X90	175.4	175.4	1086.1
スパン	1.2	1.2	1.3
平均	126.0	126.0	710.0
標準偏差	103.9	103.9	363.6

【図５４－２】



移動度：-0.02 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.02 µm/sec/V/cm
ZPファクター：12.9 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -0.25 ± 0.12 mV
ゼータ電位分布：-0.25 mV FWHM 7.51 (SL1/2)

【図５５－１】

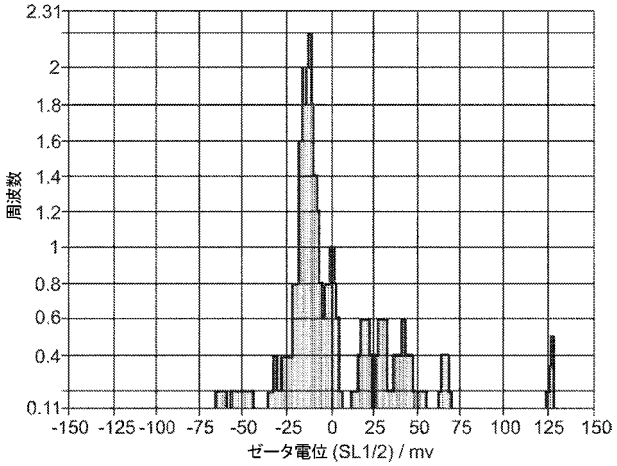


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
60.1	4.0	49.7	94.8
14.4	0.6	4.8	5.2

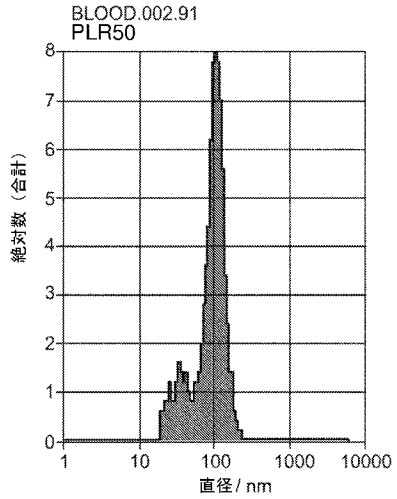
X値	数	濃度	体積
X10	27.4	27.4	54.0
X50	53.4	53.4	89.3
X90	98.8	98.8	121.0
スパン	1.3	1.3	0.8
平均	58.1	58.1	92.6
標準偏差	27.3	27.3	29.1

【図５５－２】



移動度：0.20 ± 0.03 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.20 µm/sec/V/cm
ZPファクター：12.9 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 2.54 ± 0.34 mV
ゼータ電位分布：2.54 mV FWHM 11.52 (SL1/2)

【図５６－１】

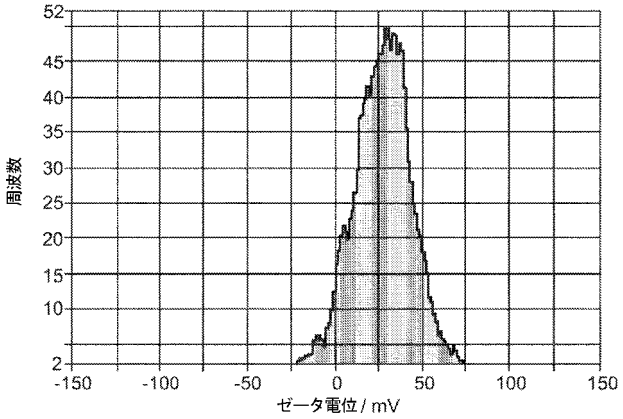


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
106.7	8.0	53.7	83.1
37.9	1.4	18.9	16.9

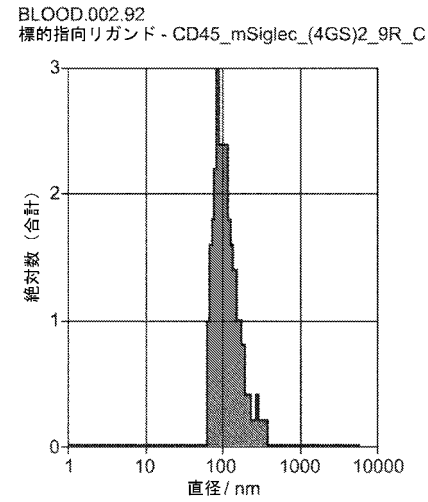
X 値	数	濃度	体積
X10	36.1	36.1	88.5
X50	98.5	98.5	115.5
X90	129.1	129.1	165.2
スパン	0.9	0.9	0.7
平均	94.6	94.6	126.4
標準偏差	36.7	36.7	31.6

【図５６－２】



移動度 : 2.09 FWHM 2.69 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 2.12 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 12.9 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 27.10 FWHM 18.40 mV
濃度 : 3.6E+7 粒子 / mL

【図５７－１】

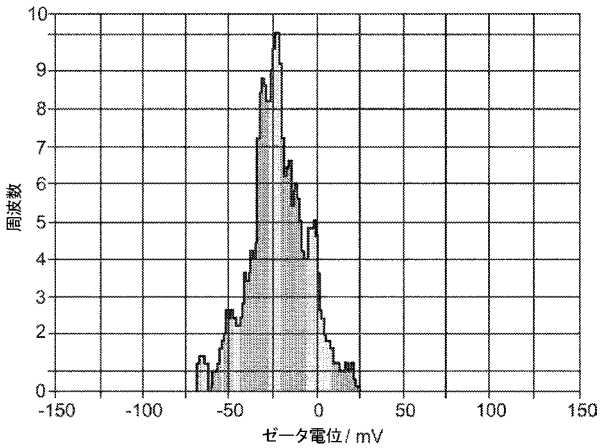


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
95.8	2.4	65.5	100.0

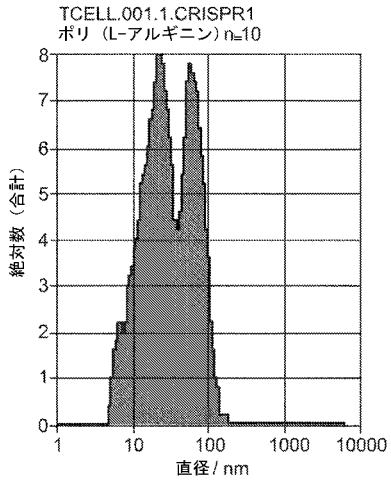
X 値	数	濃度	体積
X10	72.8	72.8	98.4
X50	100.3	100.3	194.2
X90	170.0	170.0	312.4
スパン	1.0	1.0	1.1
平均	120.8	120.8	215.5
標準偏差	54.0	54.0	86.4

【図５７－２】



移動度 : -1.73 FWHM 1.98 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.73 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 12.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -22.16 FWHM 19.85 mV
濃度 : 5.2E+6 粒子 / mL

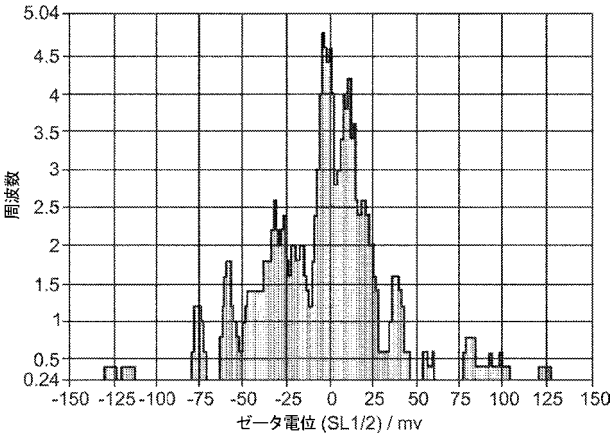
【図５８－１】



ピーク解析（絶対数）

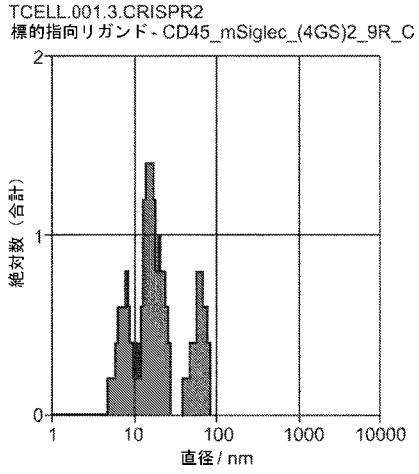
直径 /nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
22.7		8.0	25.9	60.4
61.5		7.6	55.1	39.6
X値	数		濃度	体積
X10	9.9		9.9	50.3
X50	27.4		27.4	81.1
X90	76.9		76.9	112.3
スパン	2.4		2.4	0.8
平均	38.6		38.6	85.9
標準偏差	27.6		27.6	29.9

【図５８－２】



移動度 : -0.22 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.25 µm/sec/V/cm
ZP ファクター: 14.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -3.24 ± 0.32 mV
ゼータ電位分布 : -3.24 mV FWHM 26.36 (SL1/2)
濃度 : 4.1E+7 粒子 / mL

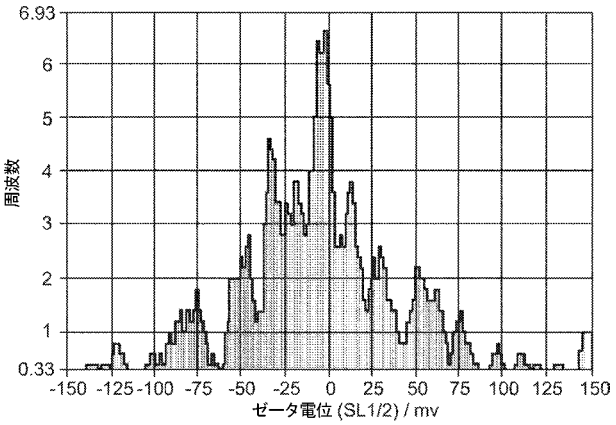
【図５９－１】



ピーク解析（絶対数）

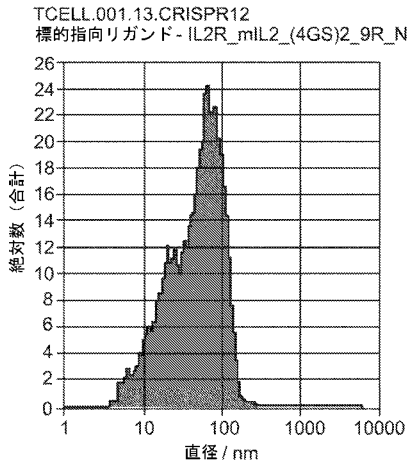
直径 / nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
16.3		1.4	11.4	56.4
62.9		0.8	23.4	22.7
7.7		0.6	3.2	20.9
X値	数		濃度	体積
X10	7.2		7.2	44.8
X50	15.3		15.3	65.2
X90	64.2		64.2	68.8
スパン	3.7		3.7	0.4
平均	25.2		25.2	62.3
標準偏差	21.2		21.2	NaN

【図５９－２】



移動度 : -0.07 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.08 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 14.7 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -0.98 ± 0.08 mV
ゼータ電位分布 : -.98 mV FWHM 11.33 (SL1/2)
濃度 : 7.2E+7 粒子 / mL

【図６０－１】



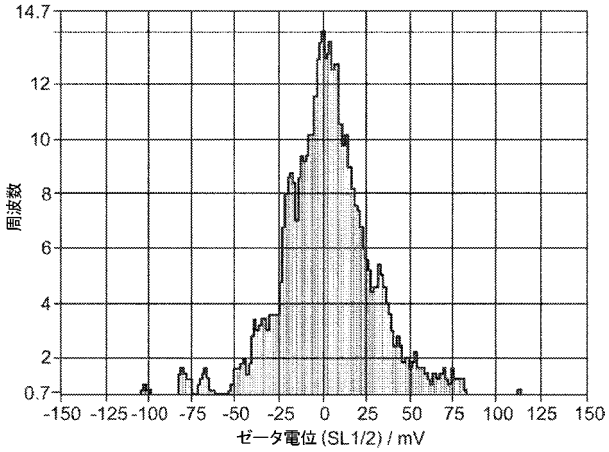
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
69.6	22.2	83.8	100.0

X 値

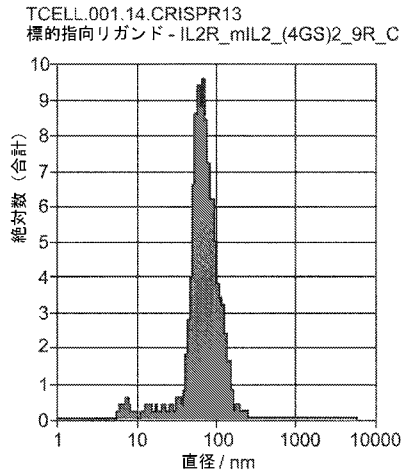
	数	濃度	体積
X10	13.0	13.0	62.5
X50	49.7	49.7	102.0
X90	100.7	100.7	156.9
スパン	1.8	1.8	0.9
平均	55.1	55.1	112.2
標準偏差	35.6	35.6	43.8

【図６０－２】



移動度：0.15 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.17 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：14.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 2.19 ± 0.08 mV
ゼータ電位分布：2.19 mV FWHM 42.28 (SL1/2)
濃度：6.5E+7 粒子 / mL

【図６１－１】



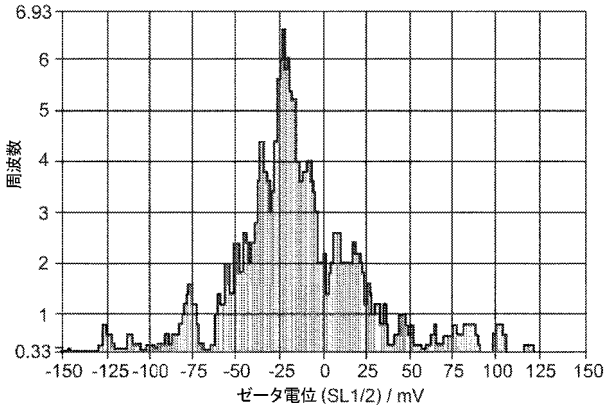
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm
67.6	9.2	49.2

X 値

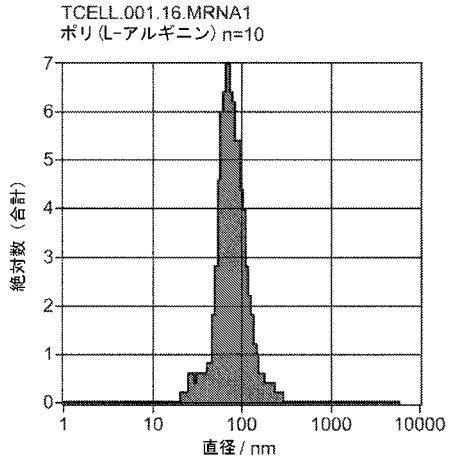
	数	濃度	体積
X10	45.0	45.0	62.8
X50	65.9	65.9	106.8
X90	110.6	110.6	199.2
スパン	1.0	1.0	1.3
平均	74.4	74.4	118.3
標準偏差	32.0	32.0	46.5

【図６１－２】



移動度：-0.63 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.73 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：14.9 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -9.37 ± 0.16 mV
ゼータ電位分布：-9.37 mV FWHM 27.63 (SL1/2)
濃度：3.5E+7 粒子 / mL

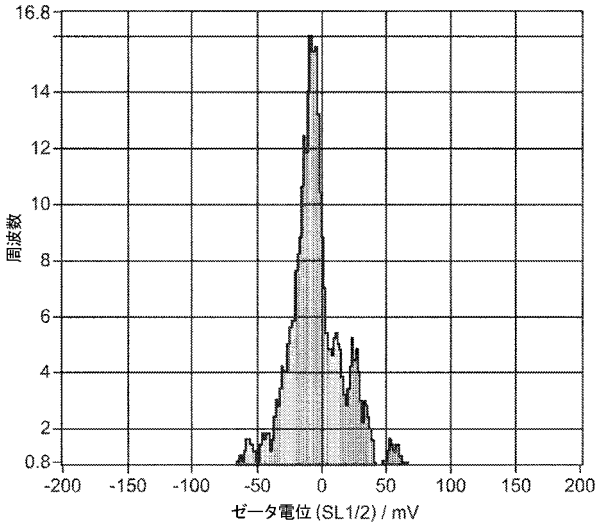
【図６２－１】



ピーク解析（絶対数）

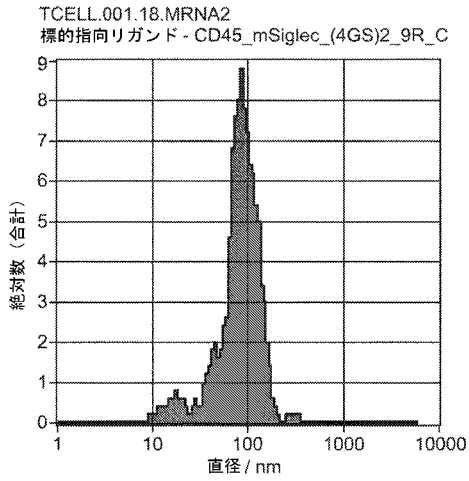
直径 / nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
	74.0	6.5	54.3	100.0
X 値		数	濃度	体積
	X10	52.5	52.5	68.4
	X50	73.9	73.9	120.7
	X90	117.5	117.5	233.2
	スパン	0.9	0.9	1.4
	平均	83.0	83.0	142.0
	標準偏差	34.8	34.8	62.2

【図６２－２】



移動度 : -0.13 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.15 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 15.3 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -1.96 ± 0.30 mV
ゼータ電位分布 : -1.96 mV FWHM 21.84 (SL1/2)
濃度 : 3.5E+7 粒子 / mL

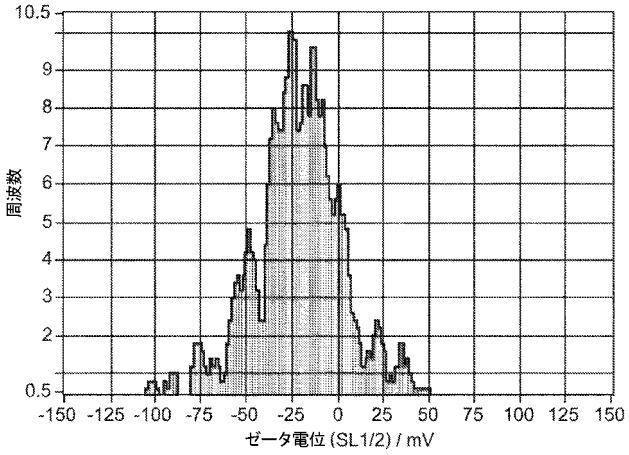
【図６３－１】



ピーク解析（絶対数）

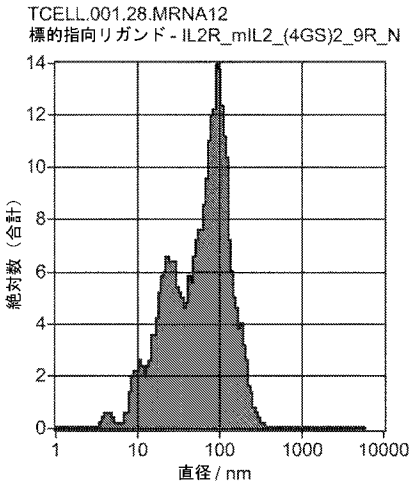
直径 / nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
	88.0	8.4	68.7	100.0
X 値		数	濃度	体積
	X10	39.2	39.2	78.6
	X50	80.9	80.9	127.5
	X90	129.8	129.8	287.4
	スパン	1.1	1.1	1.6
	平均	88.6	88.6	156.1
	標準偏差	40.6	40.6	76.4

【図６３－２】



移動度 : -1.36 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.58 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 14.9 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -20.26 ± 0.15 mV
ゼータ電位分布 : -20.26 mV FWHM 20.45 (SL1/2)
濃度 : 2.0E+7 粒子 / mL

【図６４－１】



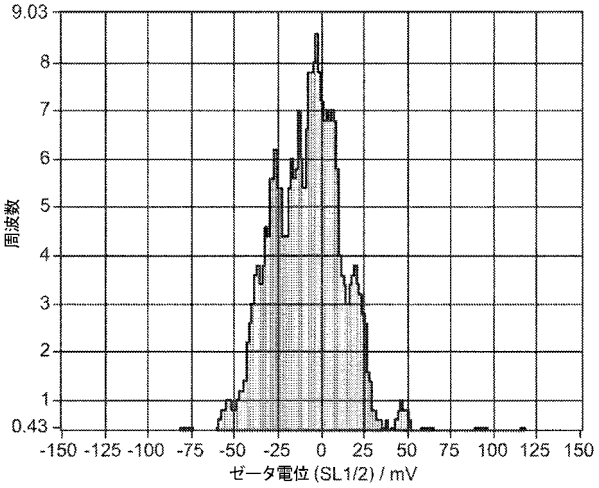
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
92.3	14.0	79.7	70.3
24.9	6.4	17.7	29.7

X 値

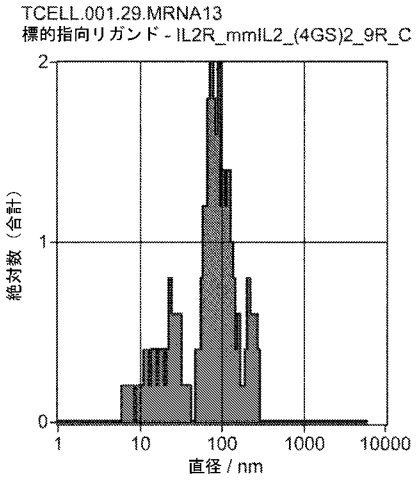
	数	濃度	体積
X10	16.4	16.4	86.1
X50	63.9	63.9	160.6
X90	133.4	133.4	251.4
スパン	1.8	1.8	1.0
平均	73.1	73.1	168.2
標準偏差	51.9	51.9	64.7

【図６４－２】



移動度：-0.29 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.34 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：14.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -4.30 ± 0.23 mV
ゼータ電位分布：-4.30 mV FWHM 35.23 (SL1/2)
濃度：4.6E+7 粒子 / mL

【図６５－１】



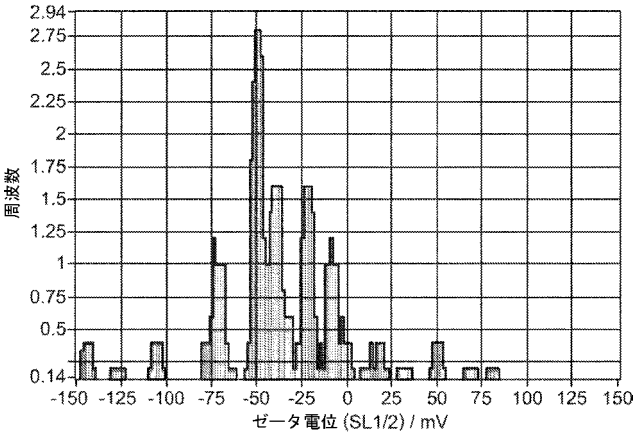
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
81.6	1.7	71.1	62.9
218.1	0.7	81.1	11.2
25.6	0.6	9.0	17.1
14.7	0.4	2.5	8.8

X 値

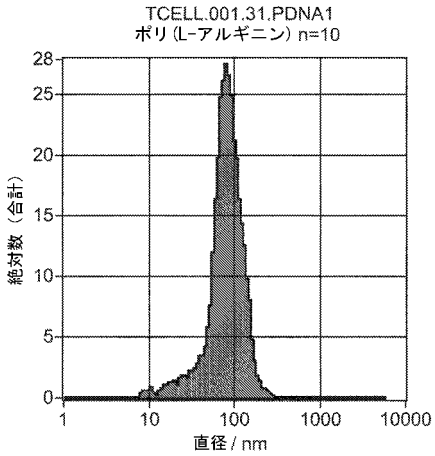
	数	濃度	体積
X10	15.7	15.7	97.8
X50	76.9	76.9	219.9
X90	178.5	178.5	238.0
スパン	2.1	2.1	0.6
平均	87.6	87.6	194.2
標準偏差	62.8	62.8	59.8

【図６５－２】



移動度：-2.47 ± 0.04 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -2.86 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：14.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -36.64 ± 0.64 mV
ゼータ電位分布：-36.64 mV FWHM 8.84 (SL1/2)

【図６６－１】

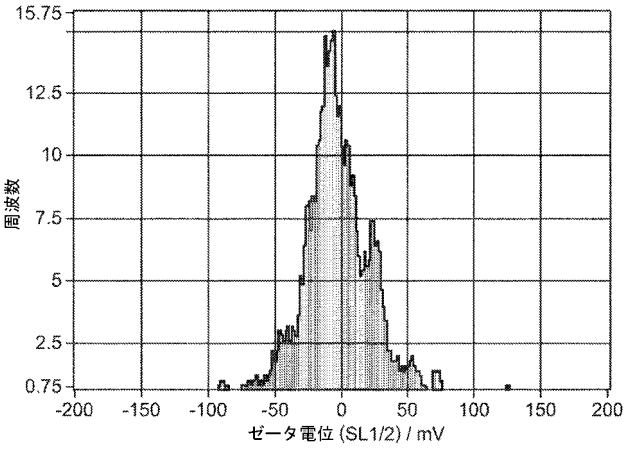


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
82.0	27.3	65.7	100.0

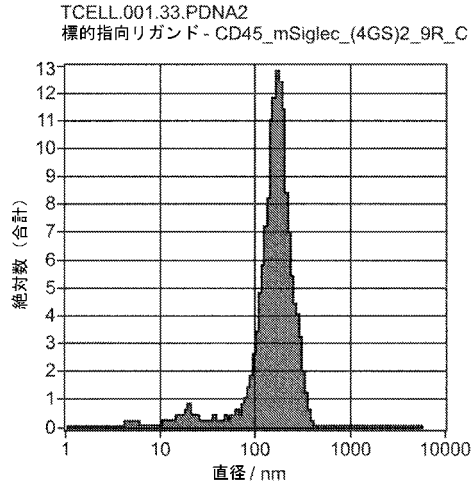
X 値	数	濃度	体積
X10	42.8	42.8	74.8
X50	78.5	78.5	118.4
X90	126.2	126.2	198.6
スパン	1.1	1.1	1.0
平均	85.5	85.5	128.7
標準偏差	35.0	35.0	46.3

【図６６－２】



移動度 : -0.21 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.25 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 15.5 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -3.22 ± 0.73 mV
ゼータ電位分布 : -3.22 mV FWHM 40.03 (SL1/2)
濃度 : 4.0E+7 粒子 / mL

【図６７－１】

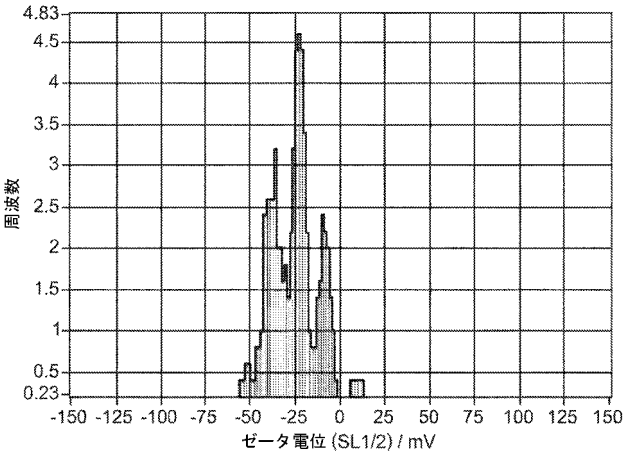


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
171.2	12.8	106.8	100.0

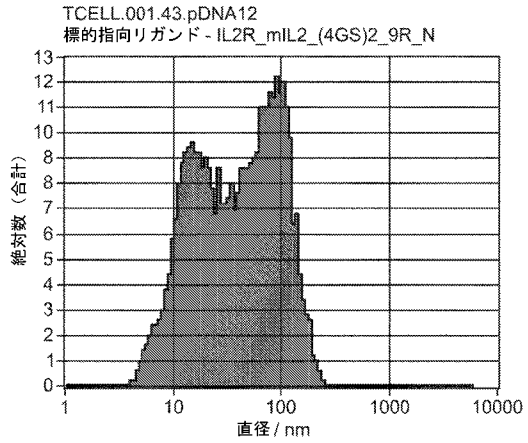
X 値	数	濃度	体積
X10	89.8	89.8	149.0
X50	163.5	163.5	212.2
X90	246.7	246.7	299.9
スパン	1.0	1.0	0.7
平均	167.6	167.6	227.0
標準偏差	64.5	64.5	59.5

【図６７－２】



移動度 : -1.73 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.99 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 14.7 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -25.51 ± 0.16 mV
ゼータ電位分布 : -25.51 mV FWHM 8.59 (SL1/2)
濃度 : 9.0E+6 粒子 / mL

【図６８】



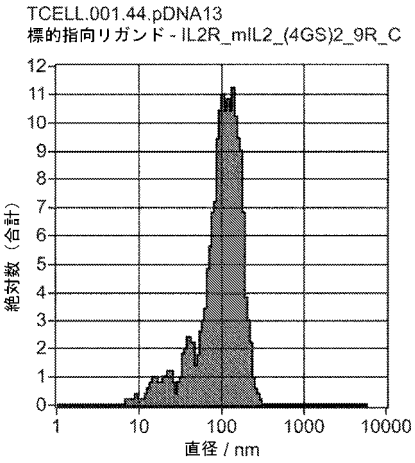
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
88.5	11.8	109.4	57.6
15.9	9.4	20.8	42.4

X 値

	数	濃度	体積
X10	11.0	11.0	73.3
X50	40.4	40.4	121.0
X90	113.7	113.7	186.2
スパン	2.5	2.5	0.9
平均	54.4	54.4	130.3
標準偏差	43.2	43.2	42.5

【図６９－１】

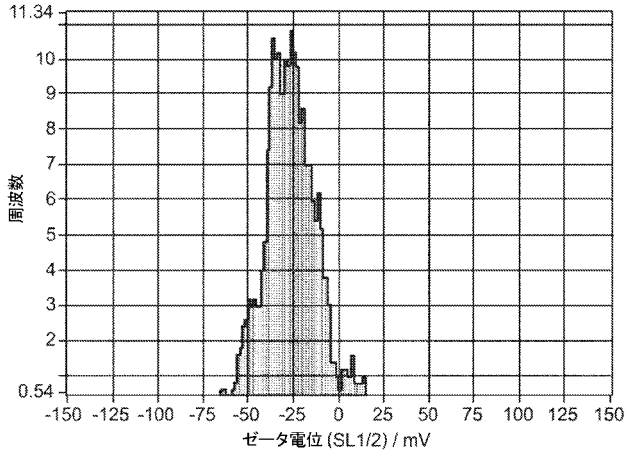


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
122.3	10.7	113.9	93.2
20.1	1.0	13.2	6.8

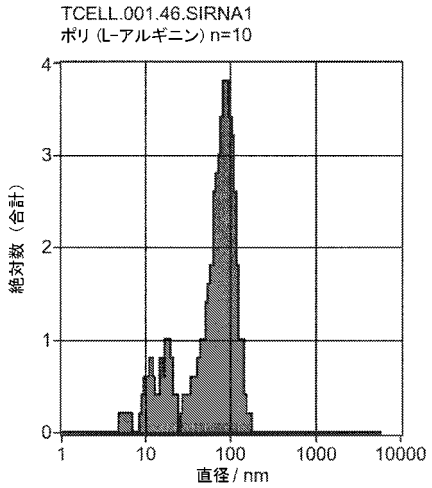
X 値	数	濃度	体積
X10	37.6	37.6	102.4
X50	104.6	104.6	154.1
X90	166.1	166.1	215.1
スパン	1.2	1.2	0.7
平均	109.6	109.6	162.5
標準偏差	50.6	50.6	44.1

【図６９－２】



移動度 : -1.76 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -2.02 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 14.8 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -25.91 ± 0.14 mV
ゼータ電位分布 : -25.91 mV FWHM 31.89 (SL1/2)
濃度 : 4.3E+7 粒子 / mL
希釈係数 : 1
当初濃度 : 4.3E+7 粒子 / cm^3

【図７０－１】



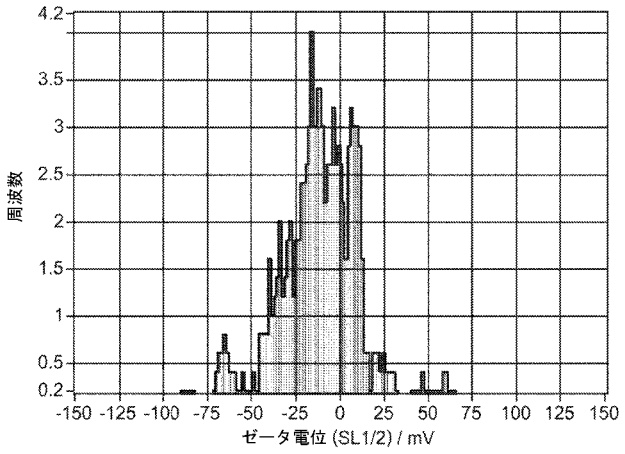
ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
87.1	3.8	58.9	81.5
17.2	0.9	6.7	18.5

X 値

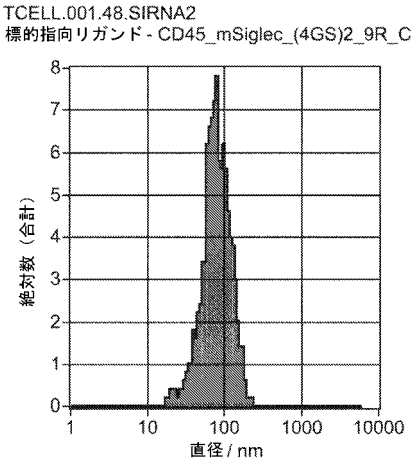
	数	濃度	体積
X10	15.7	15.7	70.9
X50	71.7	71.7	99.4
X90	105.0	105.0	139.5
スパン	1.2	1.2	0.7
平均	69.5	69.5	103.9
標準偏差	35.8	35.8	25.2

【図７０－２】



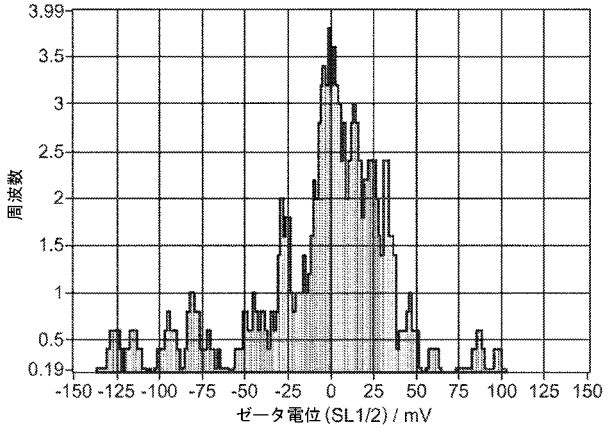
移動度：-0.75 ± 0.13 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.87 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：15.0 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -11.17 ± 1.97 mV
ゼータ電位分布：-11.17 mV FWHM 25.31 (SL1/2)
濃度：6.7E+6 粒子 / mL

【図７１－１】



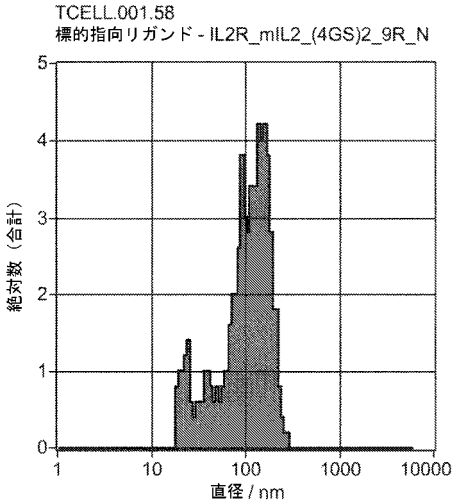
ピーク解析（絶対数）				
直径 / nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
	78.8	7.7	68.1	100.0
X 値				
		数	濃度	体積
X10		44.2	44.2	69.5
X50		74.7	74.7	115.0
X90		124.1	124.1	157.9
スパン		1.1	1.1	0.8
平均		84.4	84.4	121.6
標準偏差		33.1	33.1	37.1

【図７１－２】



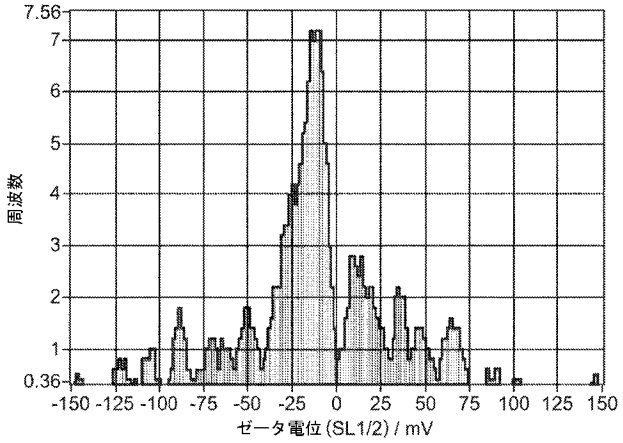
移動度：-1.04 ± 0.00 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.19 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：14.7 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -15.25 ± 0.06 mV
ゼータ電位分布：-15.25 mV FWHM 32.55 (SL1/2)
濃度：3.8E+7 粒子 / mL

【図７２－１】



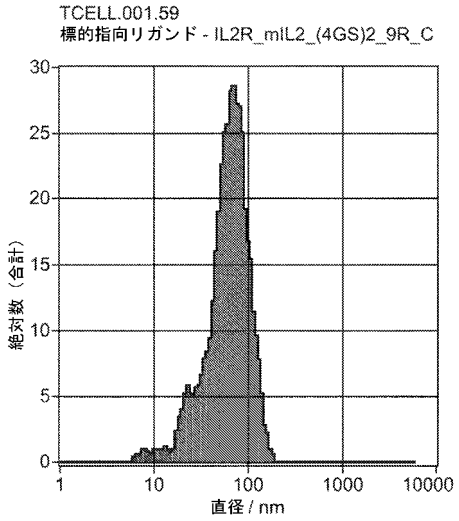
ピーク解析（絶対数）				
直径 / nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
	139.8	4.2	111.6	90.6
	23.6	1.3	7.7	9.4
X 値				
		数	濃度	体積
X10		28.0	28.0	103.5
X50		103.2	103.2	157.6
X90		176.5	176.5	208.2
スパン		1.4	1.4	0.7
平均		110.4	110.4	165.5
標準偏差		54.1	54.1	40.8

【図７２－２】



移動度 : -0.68 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.79 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 14.9 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -10.09 ± 0.12 mV
ゼータ電位分布 : -10.09 mV FWHM 21.02 (SL1/2)
濃度 : 1.6E+7 粒子 / mL

【図７３－１】

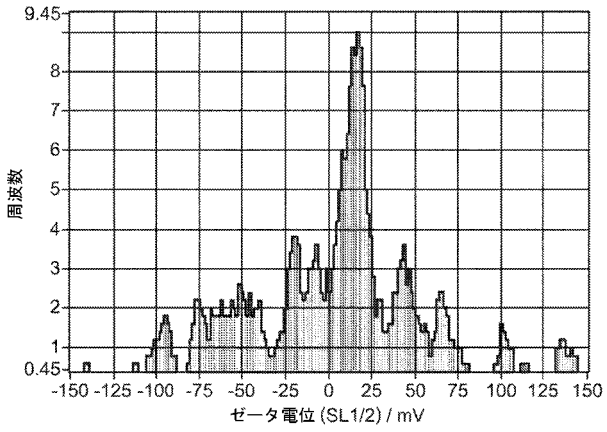


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
68.7	28.5	62.9	100.0

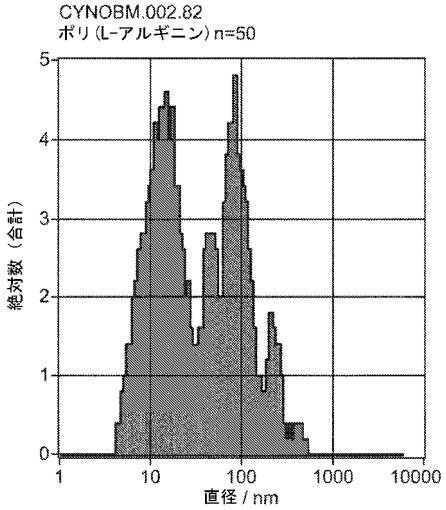
X 値	数	濃度	体積
X10	26.3	26.3	60.5
X50	62.4	62.4	95.6
X90	104.5	104.5	137.9
スパン	1.3	1.3	0.8
平均	66.6	66.6	100.8
標準偏差	29.7	29.7	30.1

【図７３－２】



移動度 : 0.26 ± 0.23 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.31 µm/sec/V/cm
ZP ファクター : 14.9 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 3.95 ± 3.43 mV
ゼータ電位分布 : 3.95 mV FWHM 16.95 (SL1/2)
濃度 : 4.2E+7 粒子 / mL

【図７４－１】

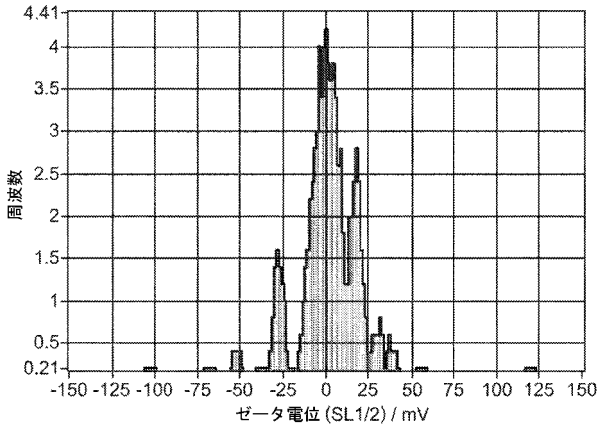


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
85.1	4.7	53.1	41.8
14.2	4.4	16.7	49.9
220.3	1.7	94.2	8.3

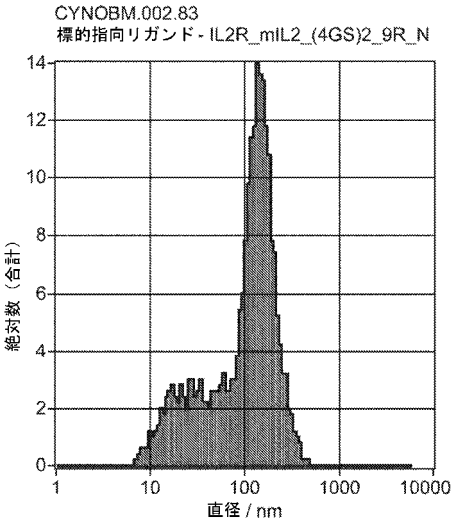
X 値	数	濃度	体積
X10	8.3	8.3	123.5
X50	30.1	30.1	285.3
X90	132.2	132.2	439.2
スパン	4.1	4.1	1.1
平均	61.4	61.4	307.4
標準偏差	73.3	73.3	121.3

【図７４－２】



移動度：0.22 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.23 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：13.6 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 2.96 ± 0.14 mV
ゼータ電位分布：2.96 mV FWHM 19.98 (SL1/2)
濃度：7.8E+6 粒子 / mL

【図７５－１】

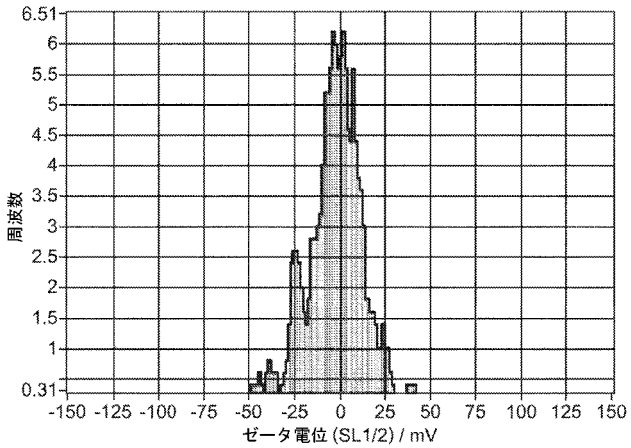


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
145.8	13.7	110.9	79.1
29.8	2.6	27.6	20.9

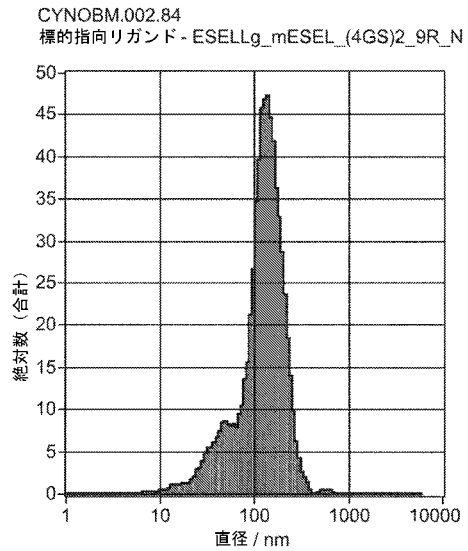
X 値	数	濃度	体積
X10	19.7	19.7	131.8
X50	120.6	120.6	214.2
X90	205.8	205.8	336.7
スパン	1.5	1.5	1.0
平均	121.8	121.8	236.6
標準偏差	77.0	77.0	86.7

【図７５－２】



移動度：-0.18 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.19 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：13.6 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -2.47 ± 0.33 mV
ゼータ電位分布：-2.47 mV FWHM 24.95 (SL1/2)
濃度：1.3E+7 粒子 / mL

【図７６－１】

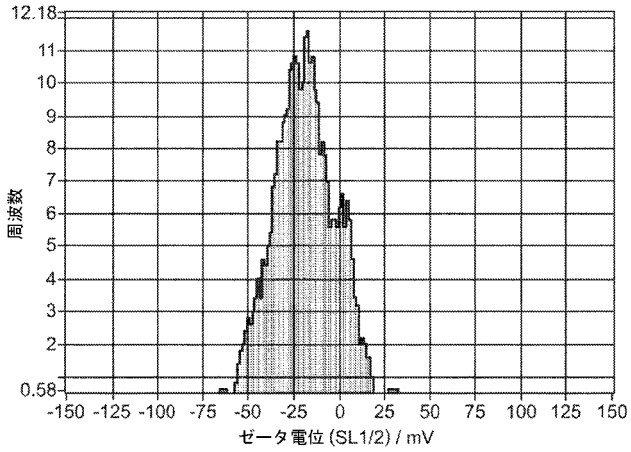


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
137.3	47.1	115.7	100.0

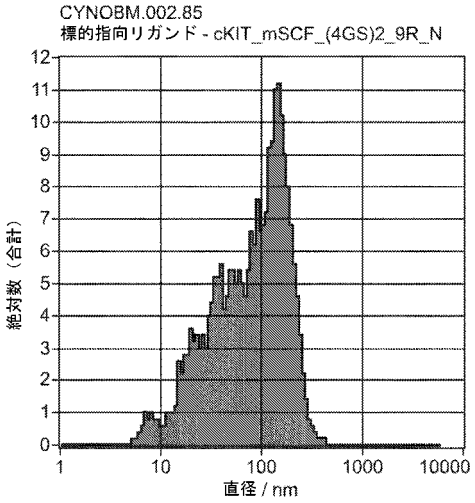
X 値	数	濃度	体積
X10	46.9	46.9	124.0
X50	124.8	124.8	201.2
X90	204.3	204.3	534.7
スパン	1.3	1.3	2.0
平均	132.8	132.8	249.1
標準偏差	64.5	64.5	138.2

【図７６－２】



移動度：-1.33 ± 0.05 µm/sec/V/cm, @ 25ºC: -1.41 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：13.6 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25ºC: -18.07 ± 0.71 mV
ゼータ電位分布：-18.07 mV FWHM 33.89 (SL1/2)
濃度：3.2E+7 粒子/ mL

【図７７－１】

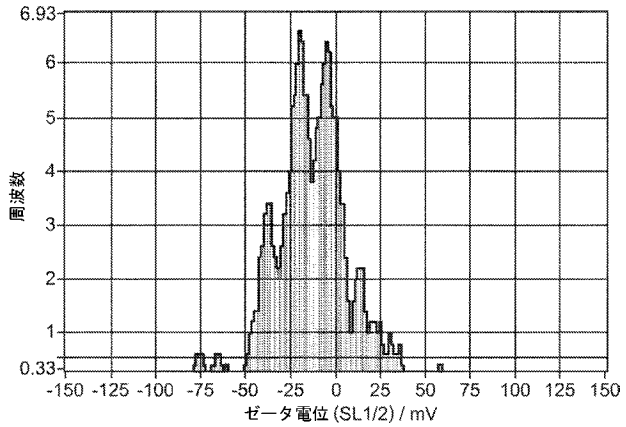


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
145.1	11.1	135.0	69.8
46.5	4.7	27.3	30.2

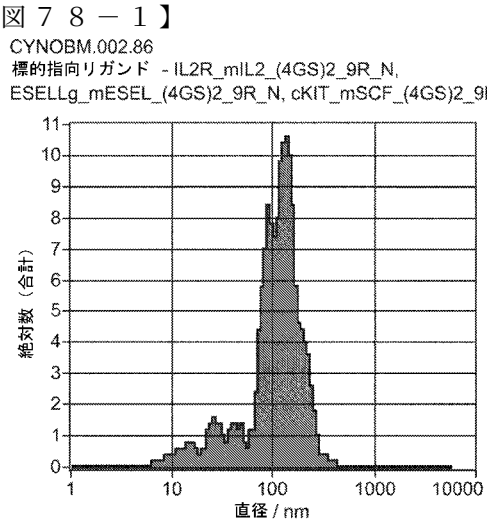
X 値	数	濃度	体積
X10	19.9	19.9	122.4
X50	85.8	85.8	189.5
X90	186.0	186.0	287.1
スパン	1.9	1.9	0.9
平均	99.0	99.0	203.3
標準偏差	67.7	67.7	70.4

【図７７－２】



移動度：-0.93 ± 0.02 µm/sec/V/cm, @ 25ºC: -0.98 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：13.6 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25ºC: -12.54 ± 0.25 mV
ゼータ電位分布：-12.54 mV FWHM 11.66 (SL1/2)
濃度：1.2E+7 粒子/ mL

【図７８－１】

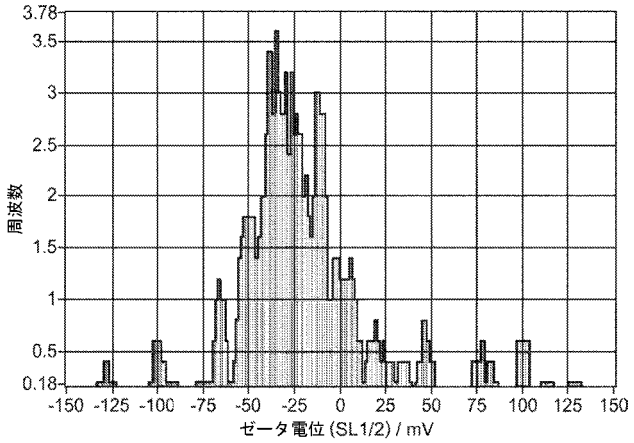


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
126.5	10.2	98.1	84.7
30.4	1.4	12.9	15.3

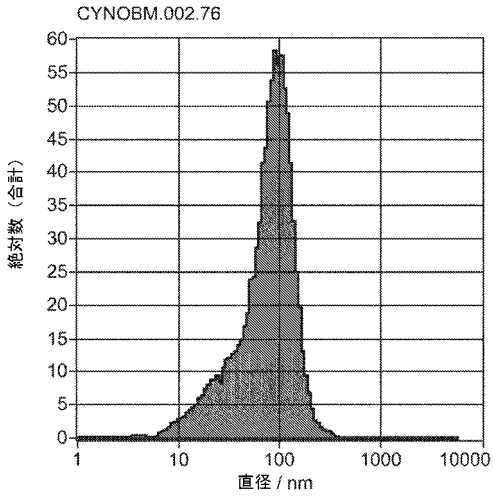
X 値	数	濃度	体積
X10	30.0	30.0	117.0
X50	115.1	115.1	189.6
X90	194.4	194.4	297.0
スパン	1.4	1.4	0.9
平均	118.8	118.8	202.2
標準偏差	61.2	61.2	75.1

【図７８－２】



移動度：-1.47 ± 0.01 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1.56 µm/sec/V/cm
ZP ファクター: 13.6 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -20.02 ± 0.10 mV
ゼータ電位分布：-20.02 mV FWHM 26.45 (SL1/2)
濃度：3.7E+7 粒子 / mL

【図７９－１】

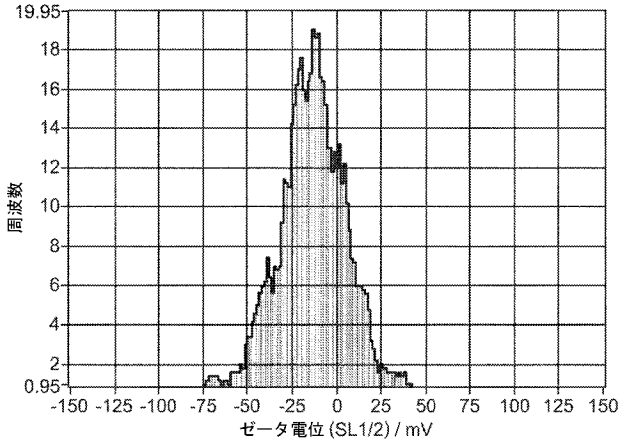


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
96.7	56.8	82.4	100.0

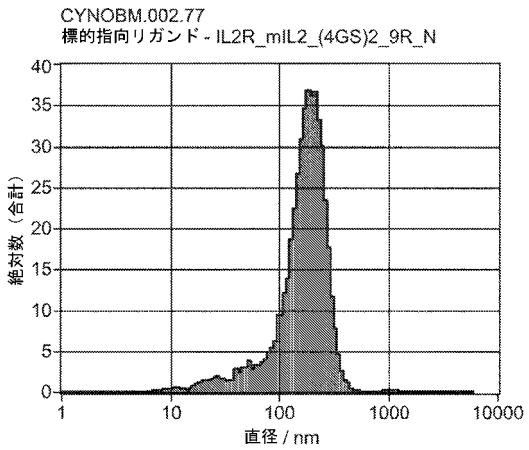
X 値	数	濃度	体積
X10	25.8	25.8	84.3
X50	80.6	80.6	132.8
X90	134.9	134.9	263.9
スパン	1.4	1.4	1.4
平均	85.6	85.6	153.4
標準偏差	44.9	44.9	64.4

【図７９－２】



移動度：-0.89 ± 0.04 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.94 µm/sec/V/cm
ZP ファクター: 13.5 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -12.02 ± 0.59 mV
ゼータ電位分布：-12.02 mV FWHM 39.15 (SL1/2)
濃度：5.1E+7 粒子 / mL

【図８０】

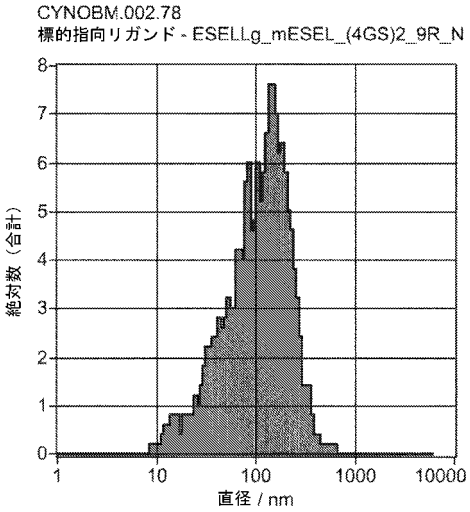


ピーク解析（絶対数）

直径 / nm	絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
193.2	36.4	145.6	100.0

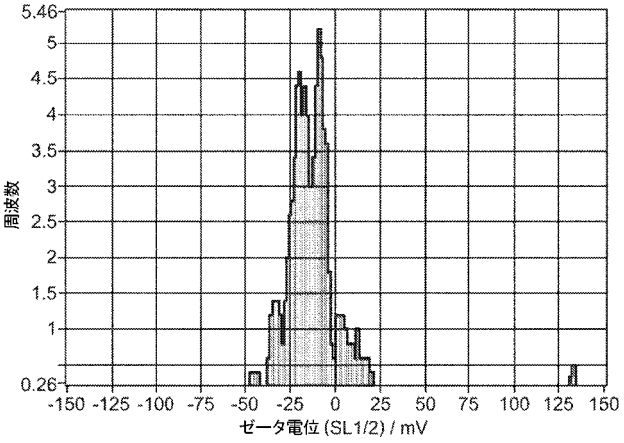
X 値	数	濃度	体積
X10	70.1	70.1	166.5
X50	171.6	171.6	250.9
X90	253.6	253.6	999.6
スパン	1.1	1.1	3.3
平均	176.1	176.1	415.4
標準偏差	82.1	82.1	330.0

【図８１－１】



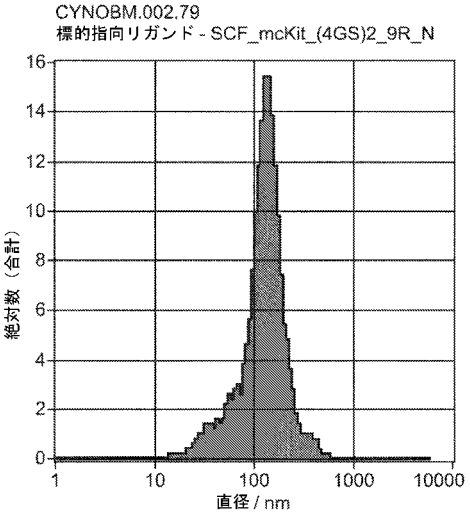
ピーク解析（絶対数）				
直径 / nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
152.0		7.4	178.1	100.0
X 値		数	濃度	体積
	X10	33.1	33.1	141.5
	X50	113.1	113.1	254.4
	X90	222.1	222.1	534.3
	スパン	1.7	1.7	1.5
	平均	126.4	126.4	302.3
	標準偏差	83.9	83.9	142.8

【図８１－２】



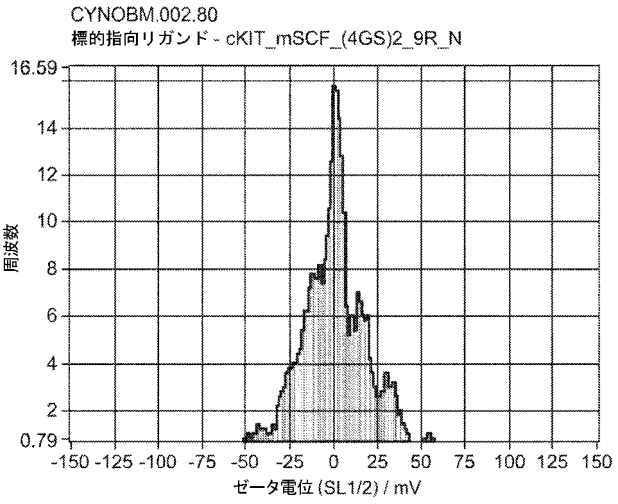
移動度：-0.87 ± 0.06 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -0.91 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：13.5 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: -11.72 ± 0.79 mV
ゼータ電位分布：-11.72 mV FWHM 10.76 (SL1/2)
濃度：7.1E+6 粒子 / mL

【図８２】



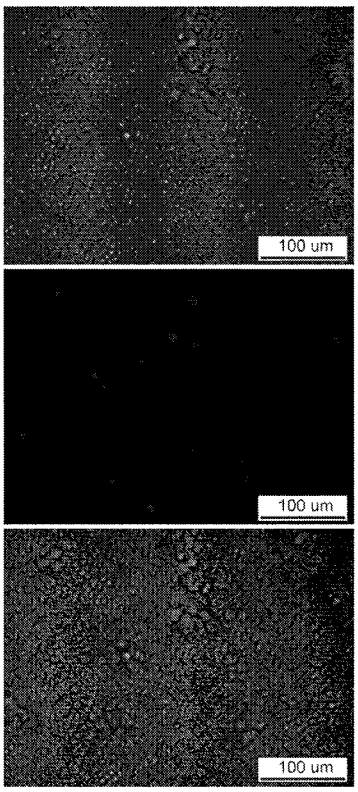
ピーク解析（絶対数）				
直径 / nm		絶対数	FWHM / nm	パーセンテージ
134.2		15.4	83.1	100.0
X 値		数	濃度	体積
	X10	56.3	56.3	124.8
	X50	125.0	125.0	221.3
	X90	199.9	199.9	456.5
	スパン	1.1	1.1	1.5
	平均	135.2	135.2	263.1
	標準偏差	67.6	67.6	120.8

【図８３】

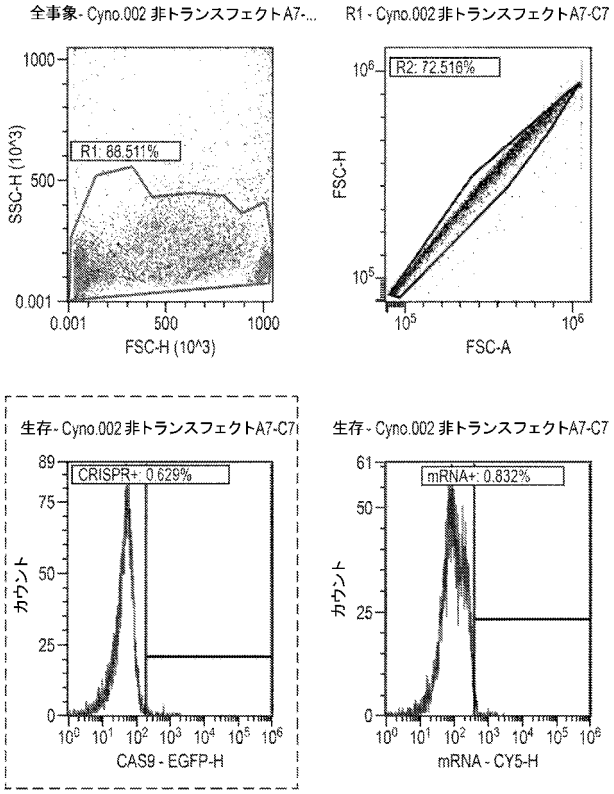


移動度：0.10 ± 0.12 µm/sec/V/cm, @ 25°C: 0.11 µm/sec/V/cm
ZP ファクター：13.5 (Smoluchowski)
ゼータ電位 @ 25°C: 1.36 ± 1.69 mV
ゼータ電位分布：1.36 mV FWHM 12.99 (SL1/2)
濃度：2.5E+7 粒子 / mL

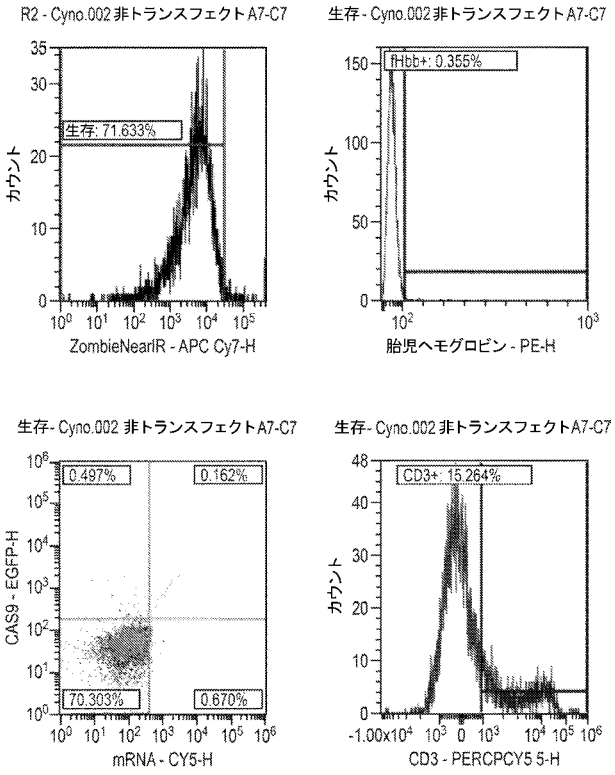
【図８４－１】



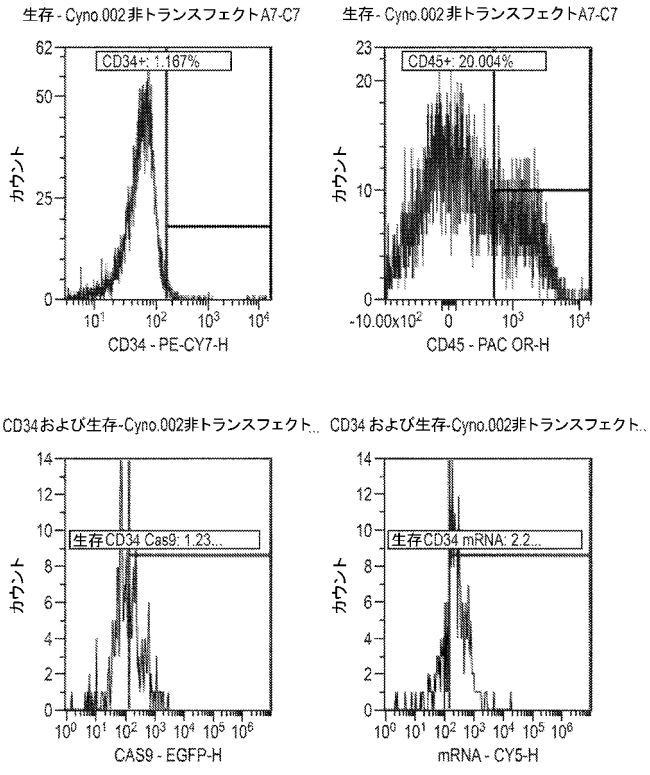
【図８４－２】



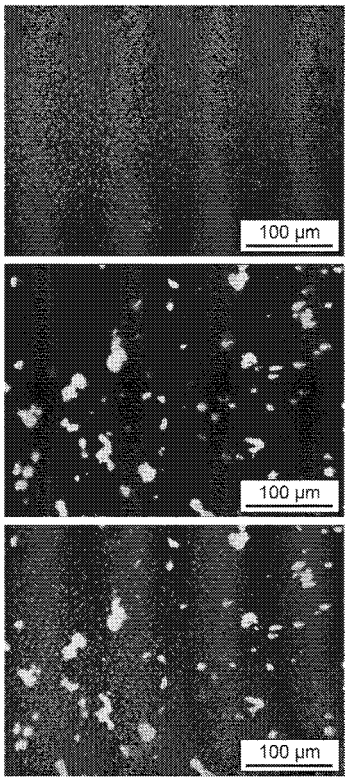
【図８４－３】



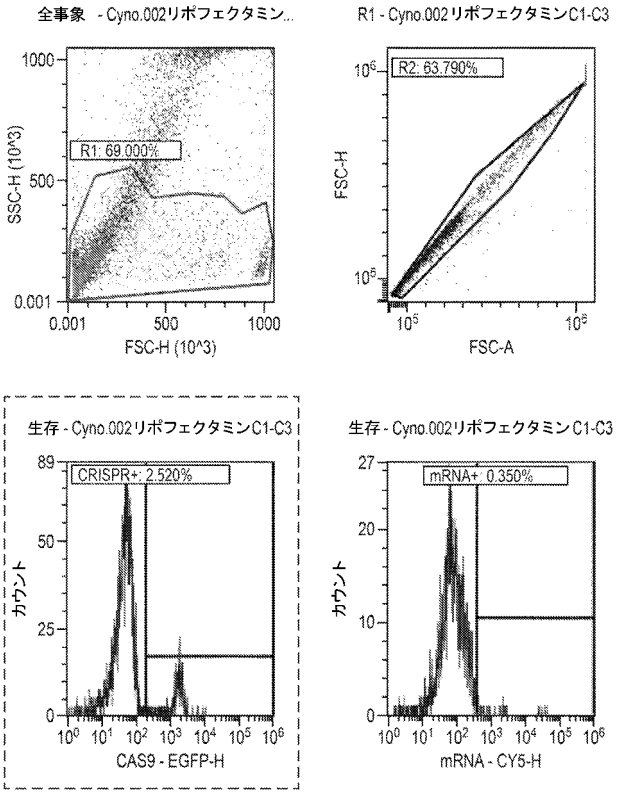
【図８４－４】



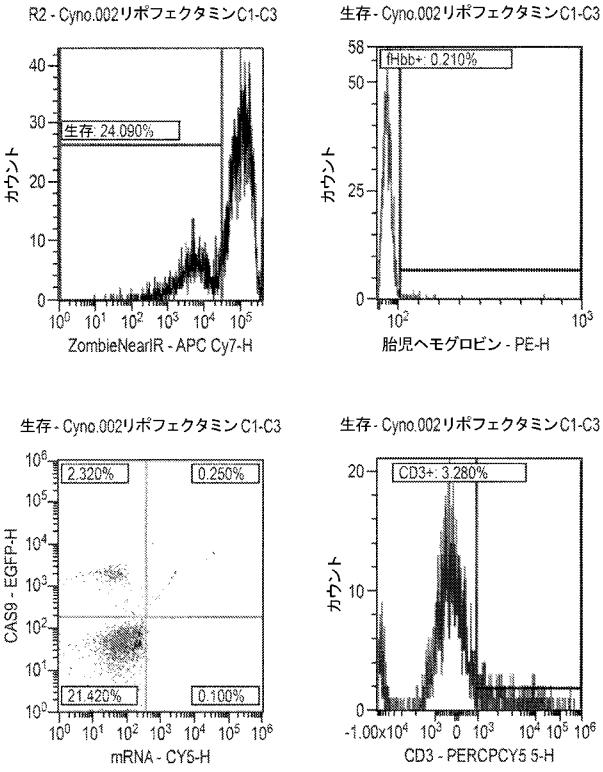
【図８５－１】



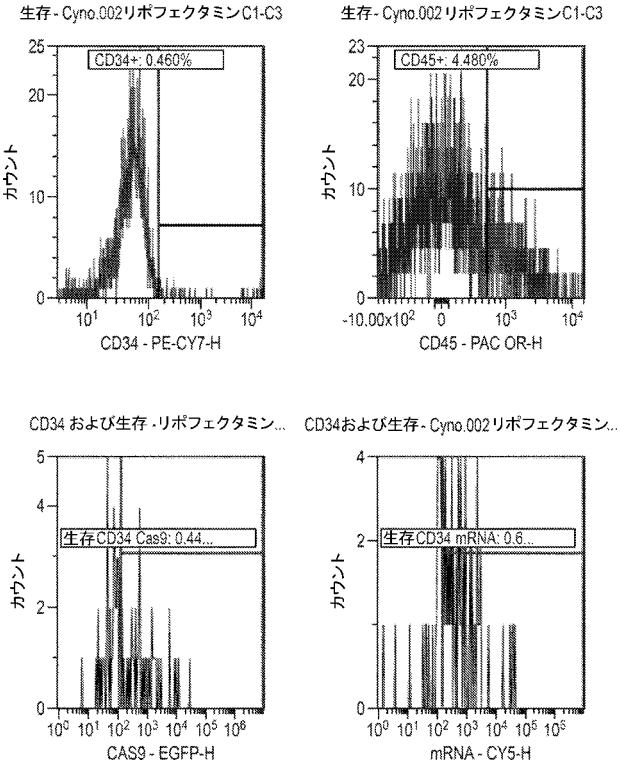
【図８５－２】



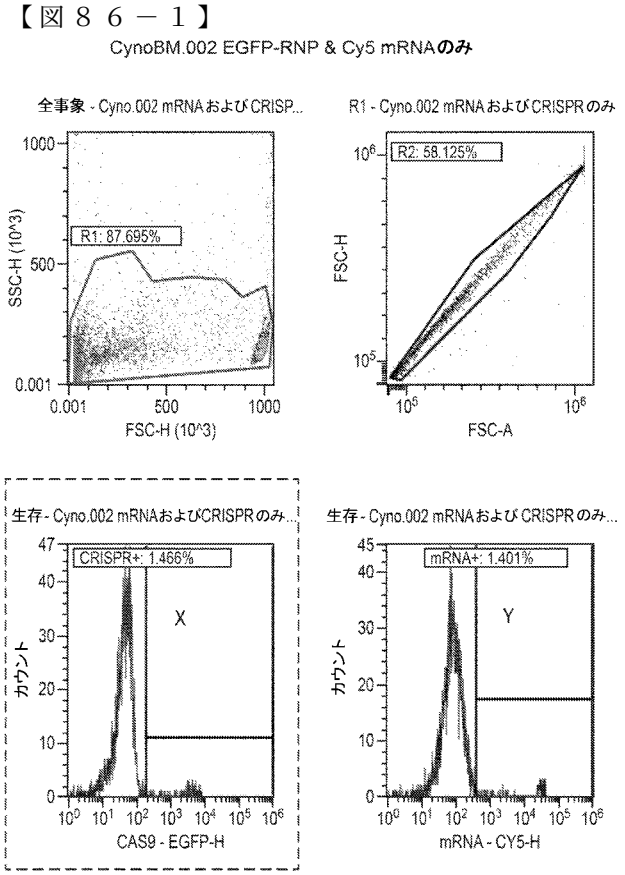
【図８５－３】



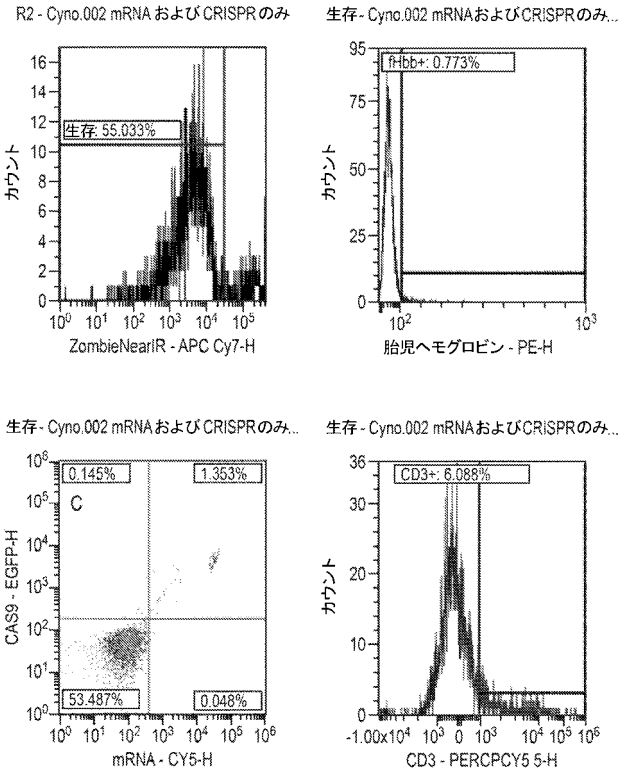
【図８５－４】



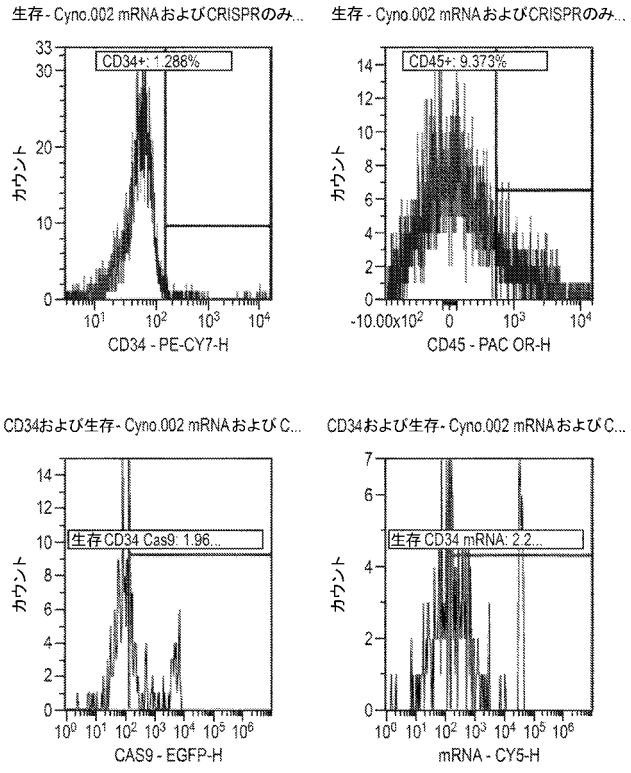
【図８６－１】



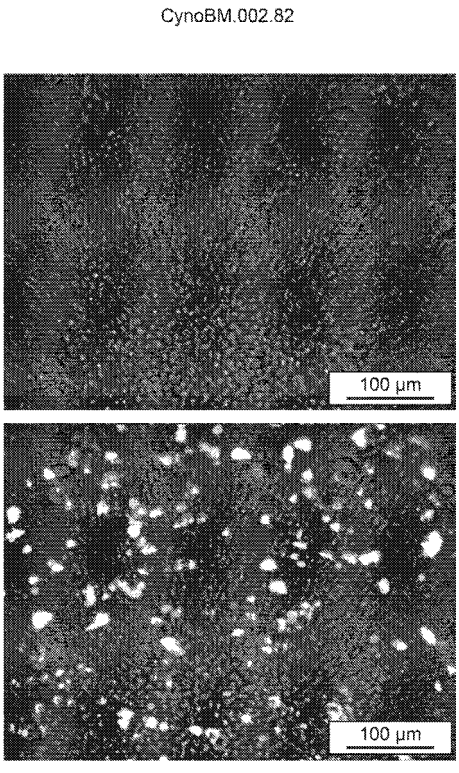
【図８６－２】



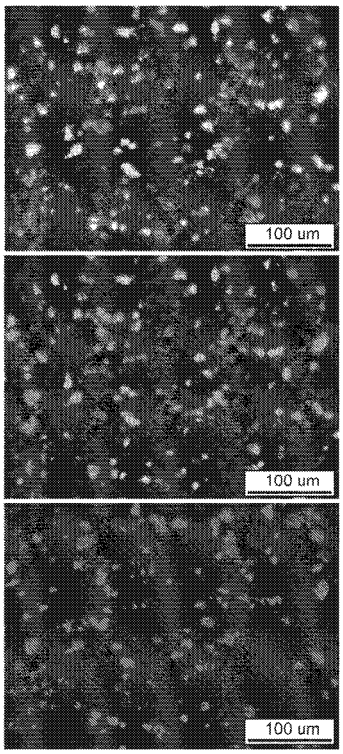
【図８６－３】



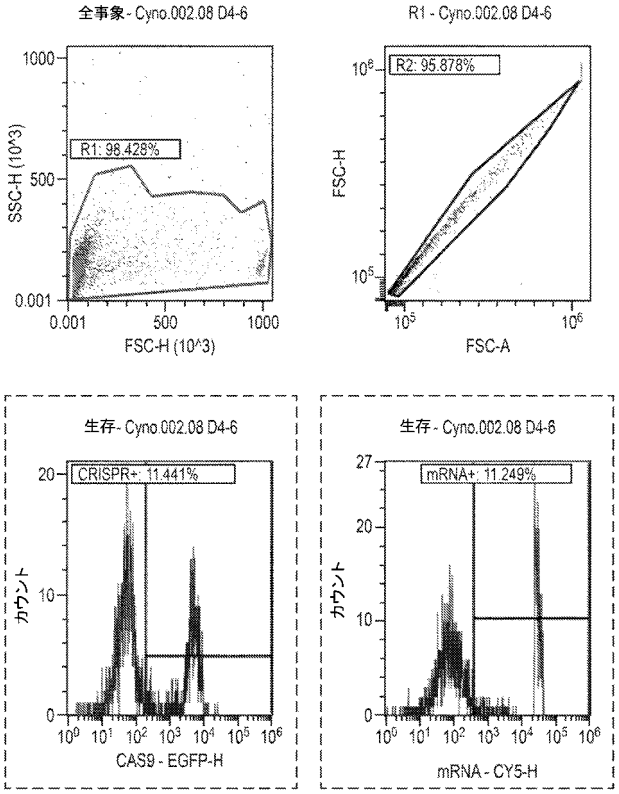
【図８７－１】



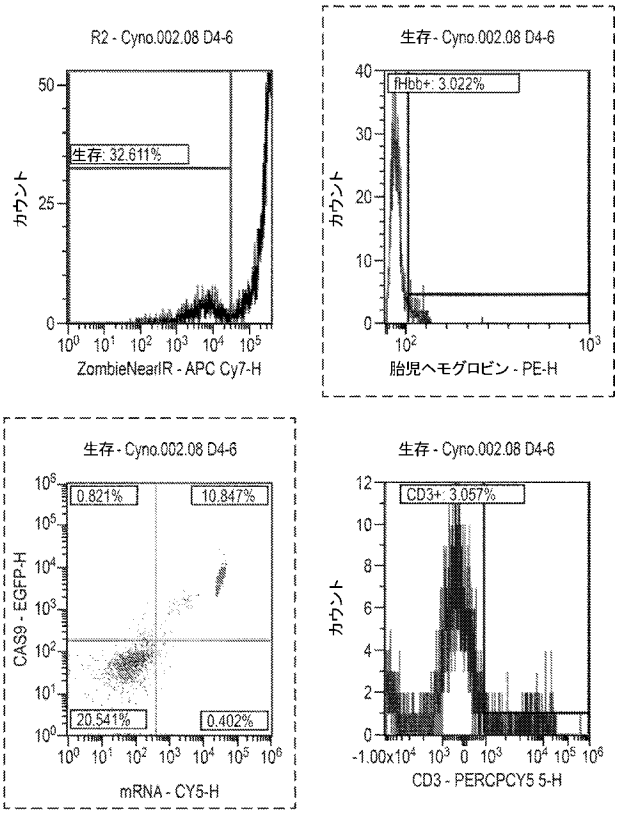
【図８７－２】



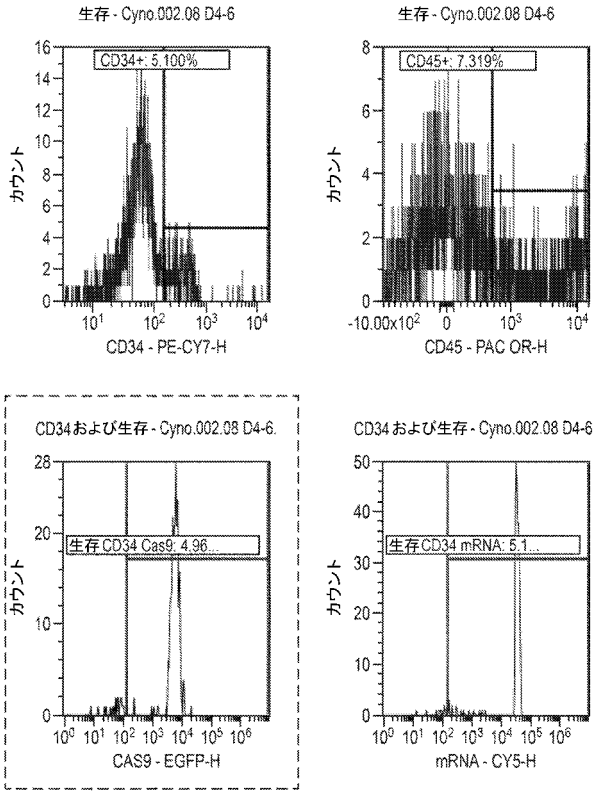
【図８７－３】



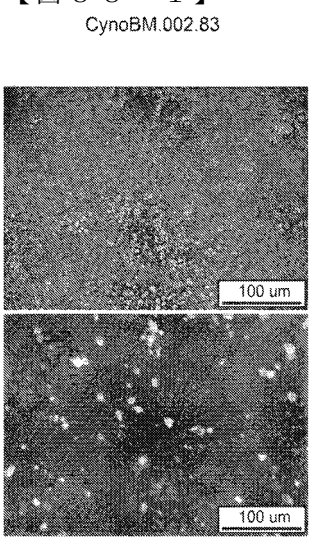
【図８７－４】



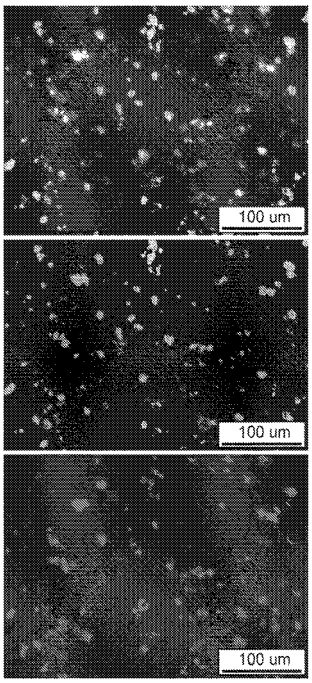
【図８７－５】



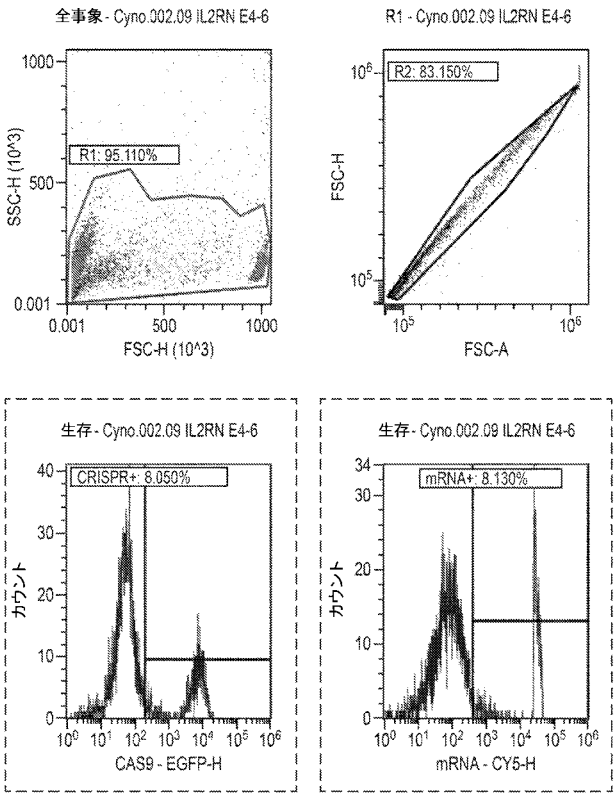
【図８８－１】



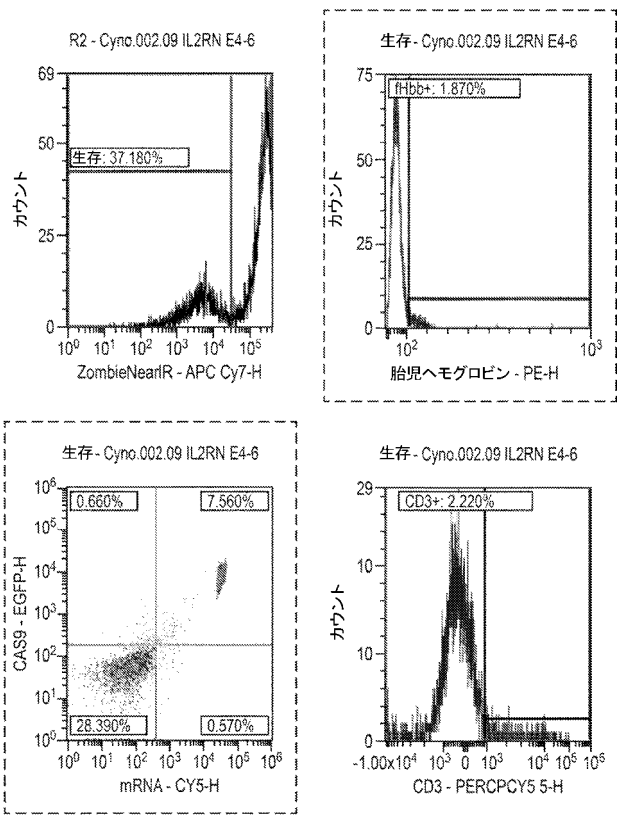
【図８８－２】



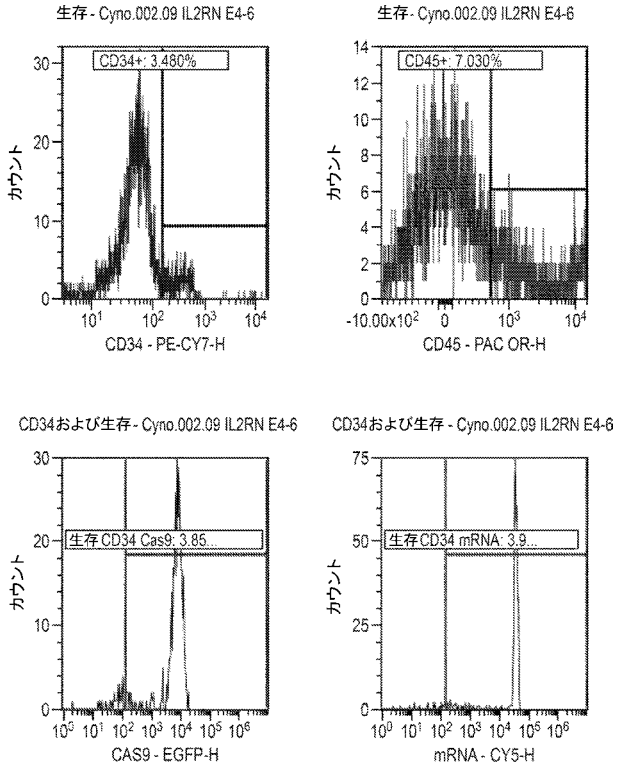
【図８８－３】



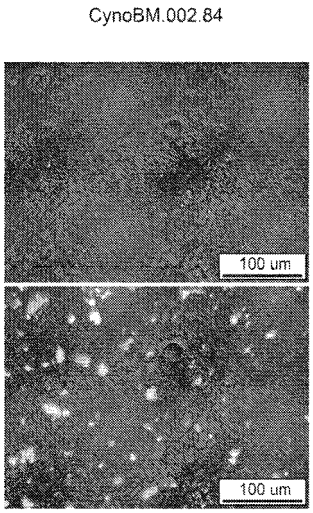
【図８８－４】



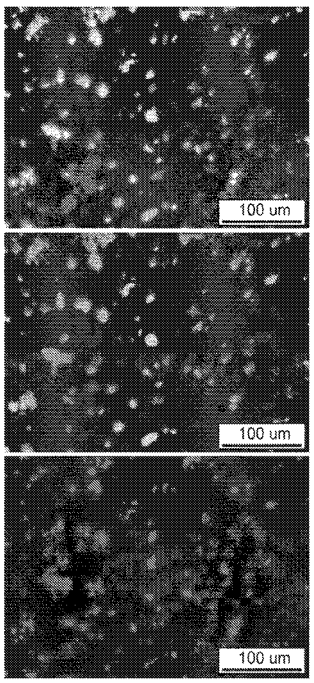
【図８８－５】



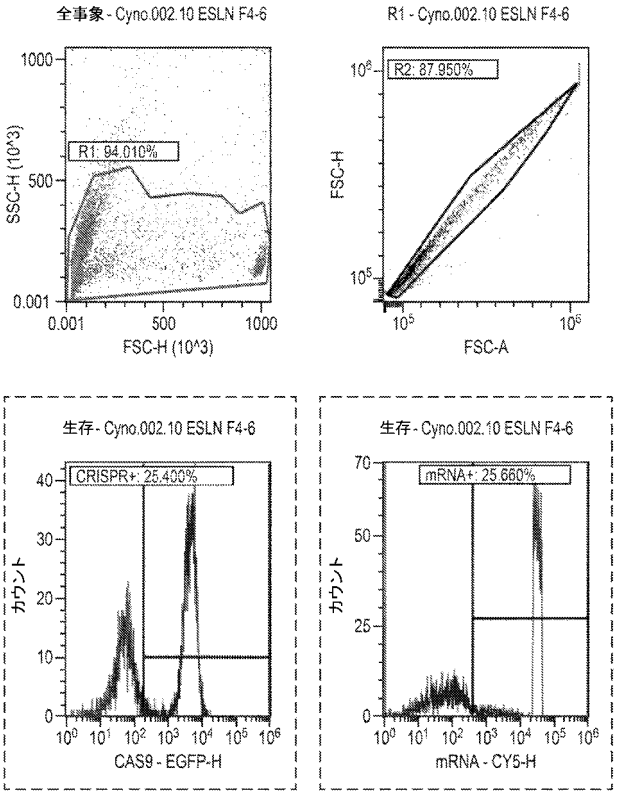
【図８９－１】



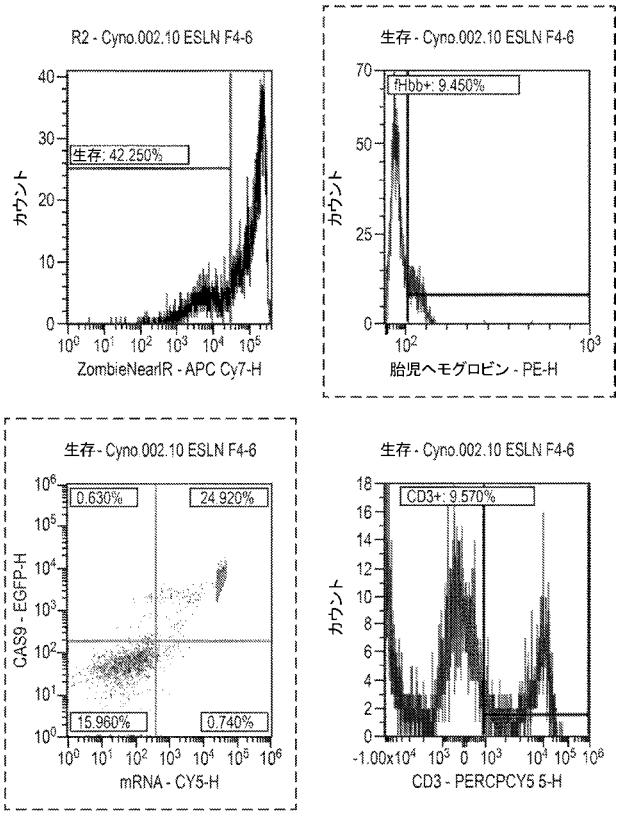
【図８９－２】



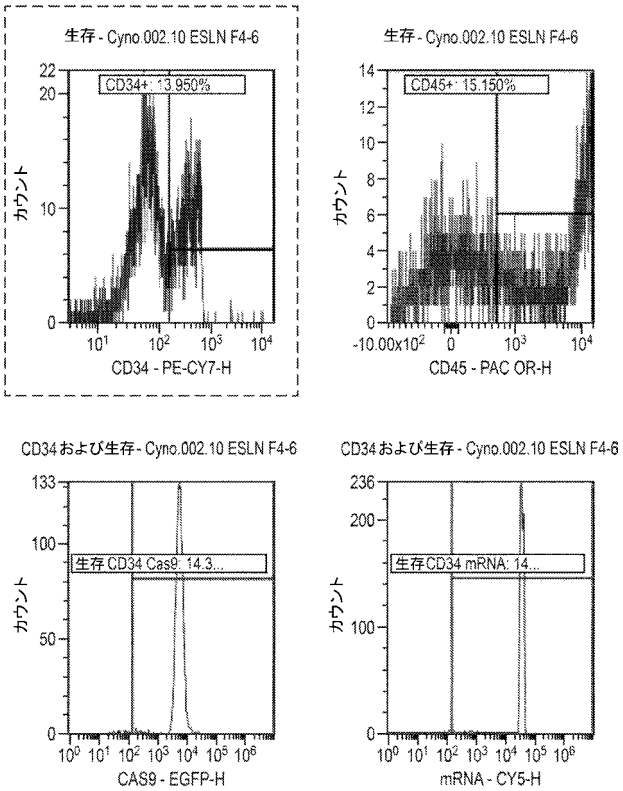
【図８９－３】



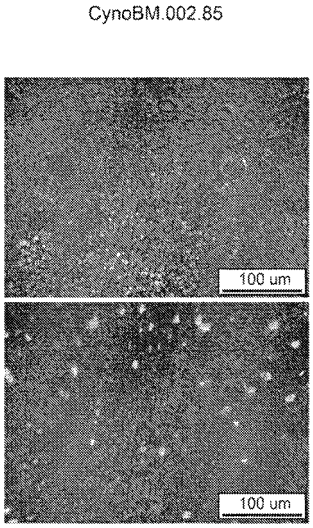
【図８９－４】



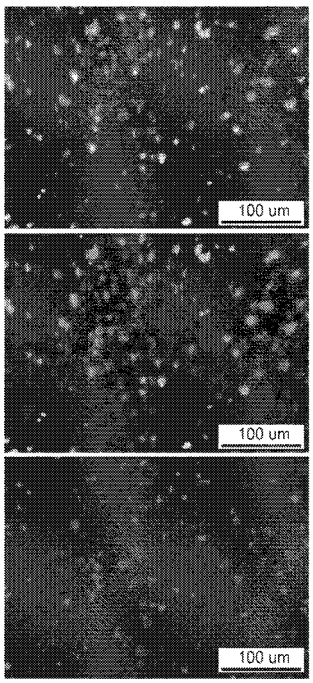
【図８９－５】



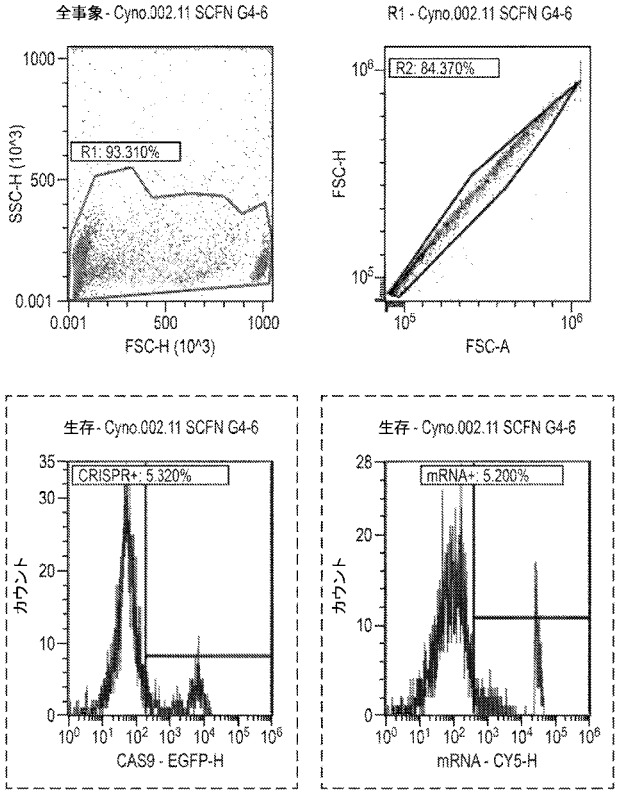
【図９０－１】



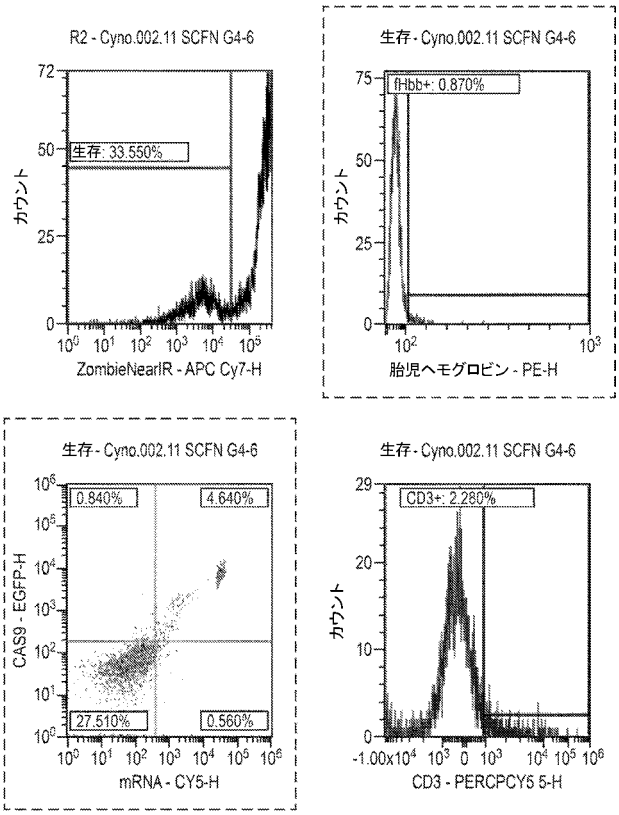
【図９０－２】



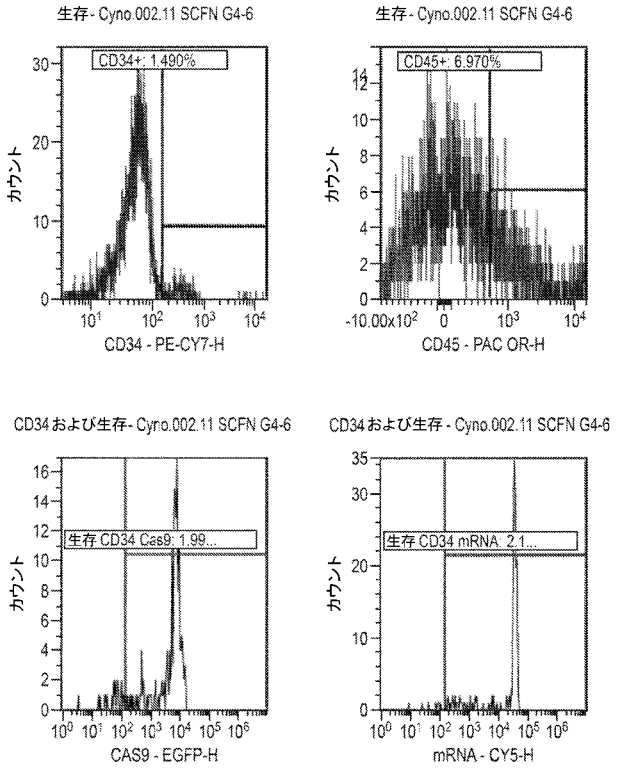
【図９０－３】



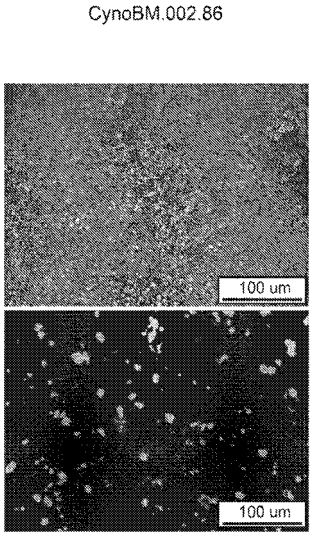
【図９０－４】



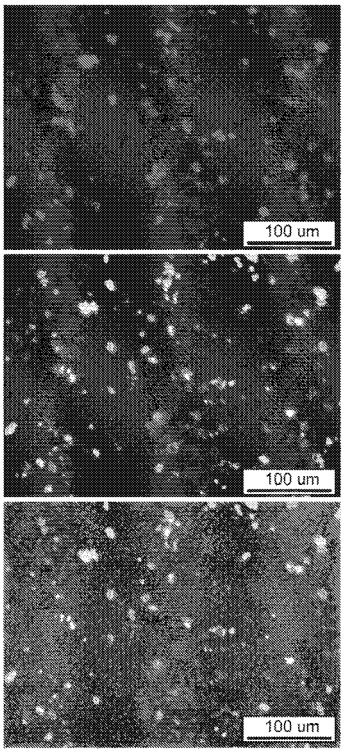
【図９０－５】



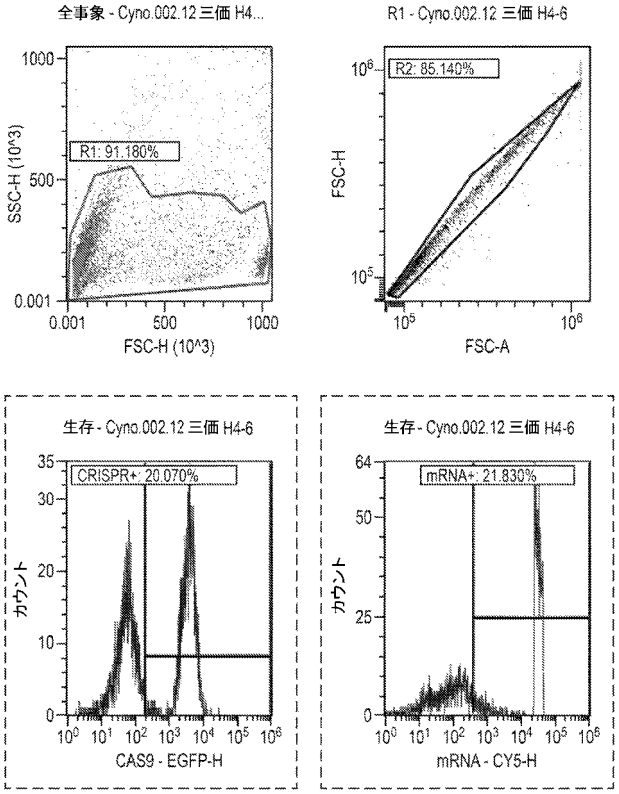
【図９１－１】



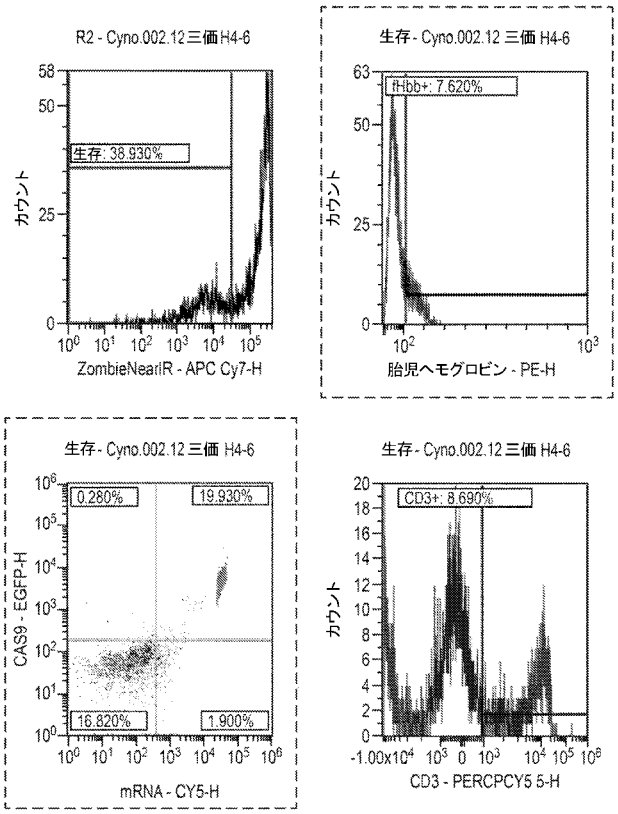
【図９１－２】



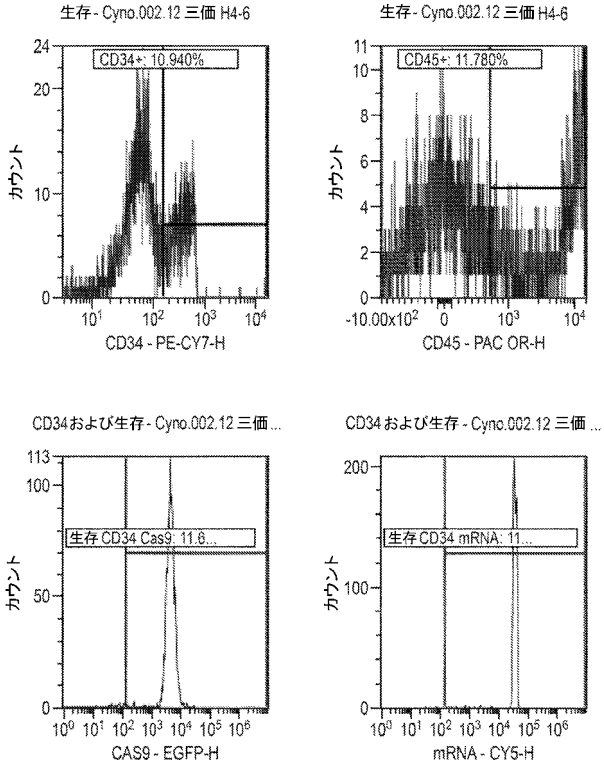
【図９１－３】



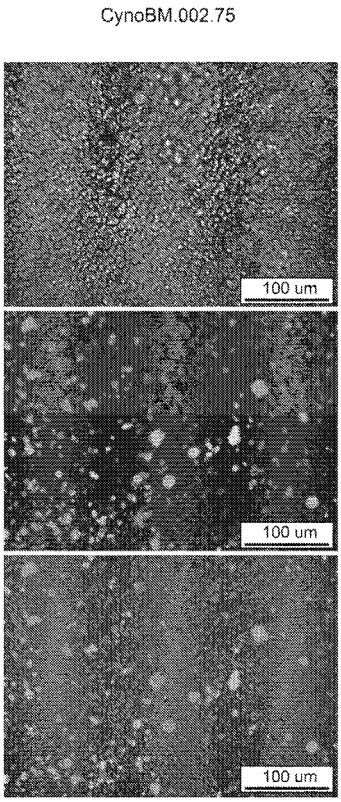
【図９１－４】



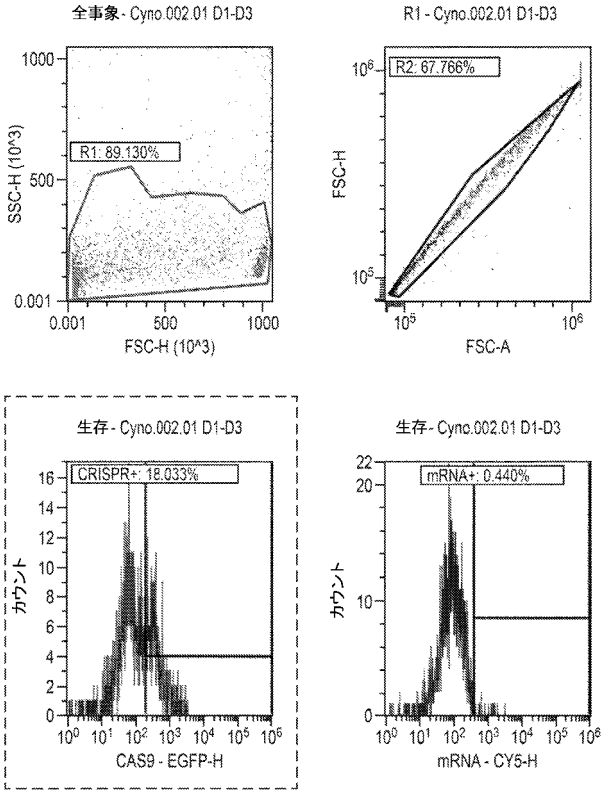
【図９１－５】



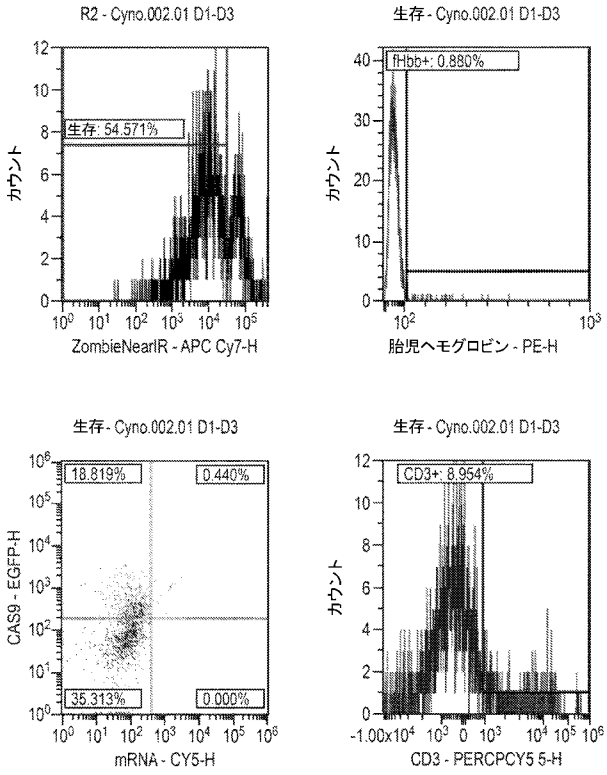
【図９２－１】



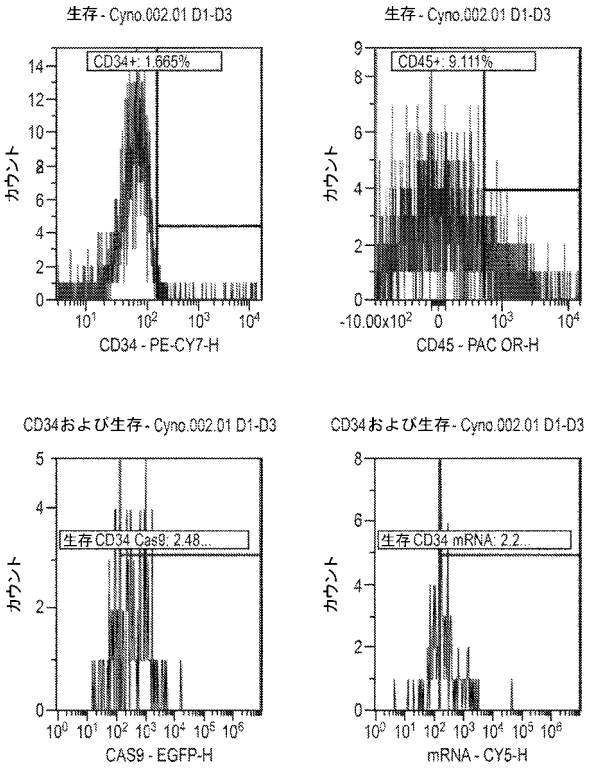
【図９２－２】



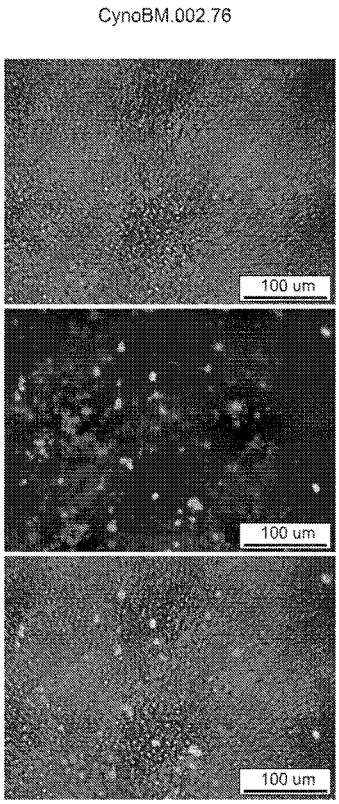
【図９２－３】



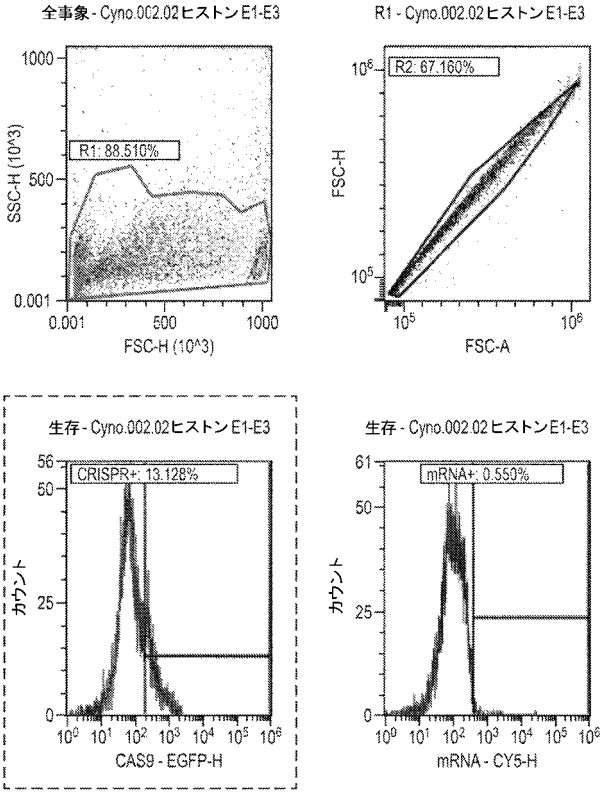
【図９２－４】



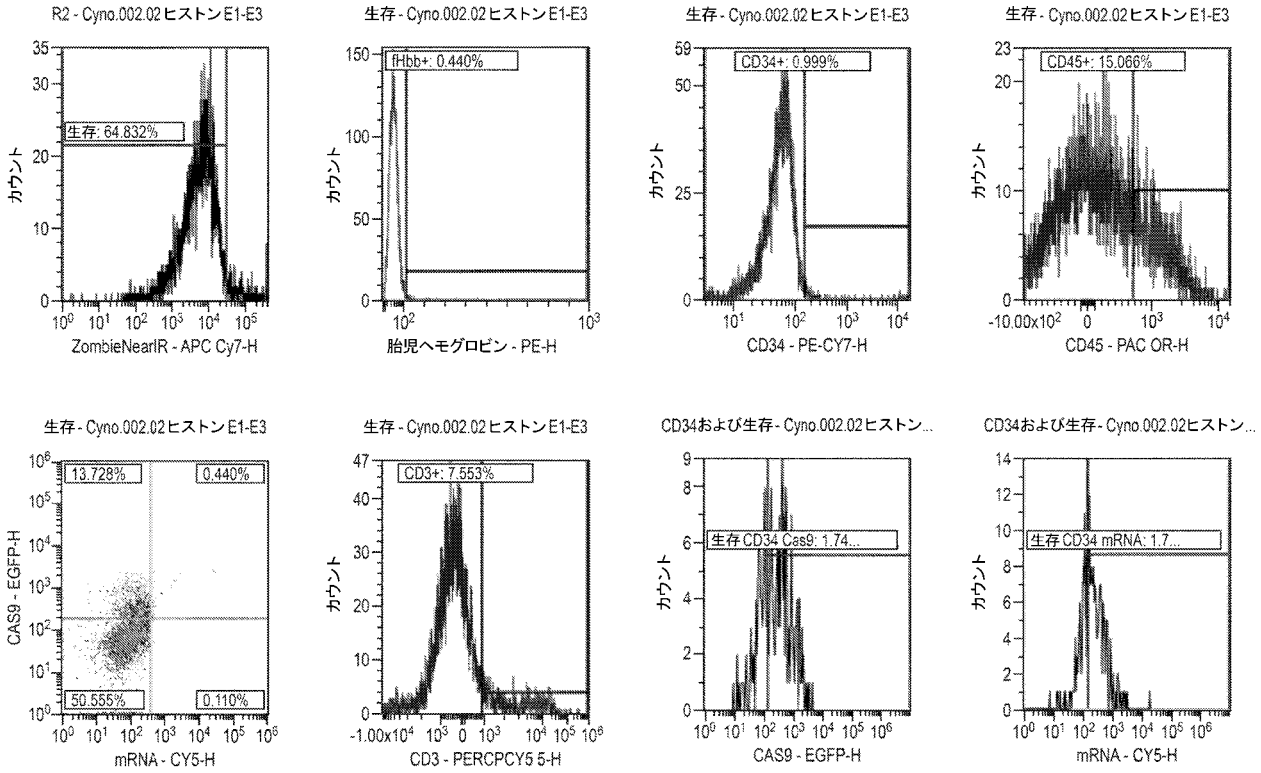
【図９３－１】



【図９３－２】

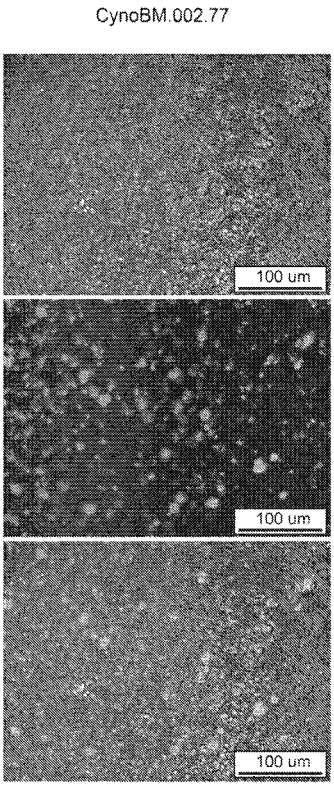


【図９３－３】

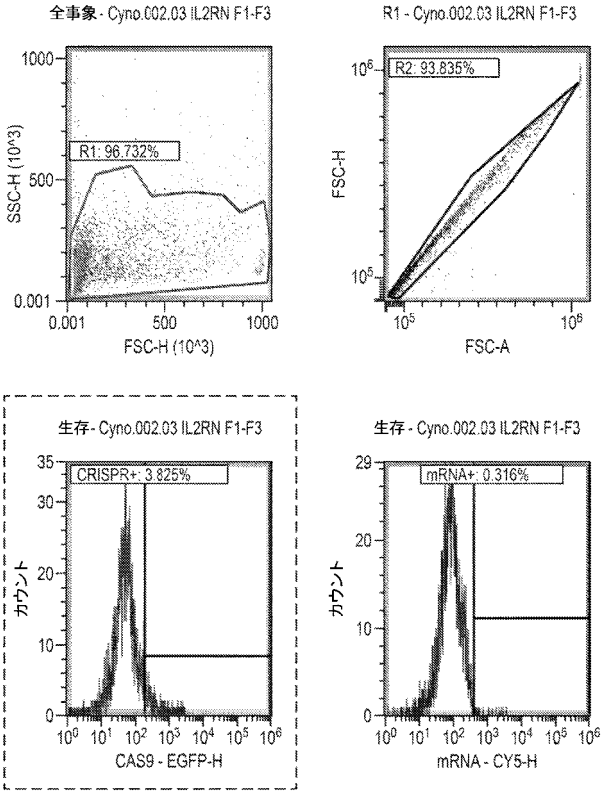


【図９３－４】

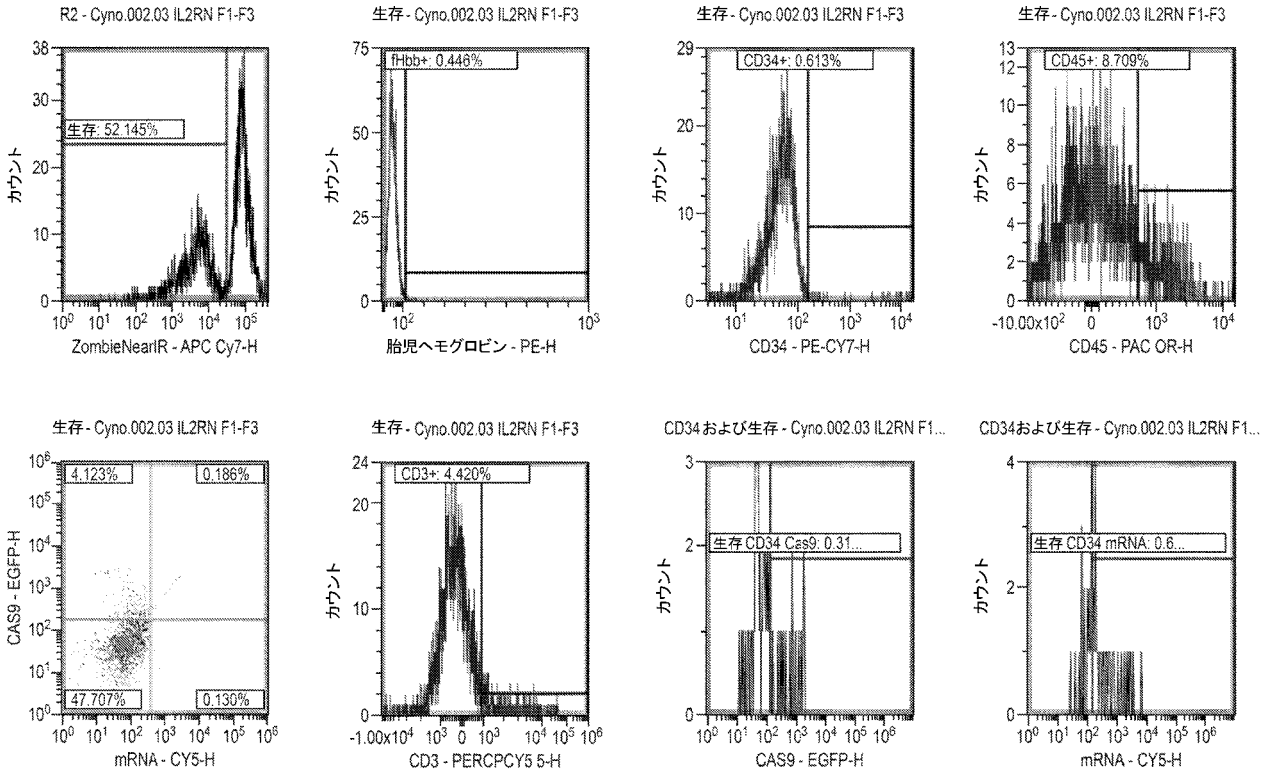
【図９４－１】



【図９４－２】

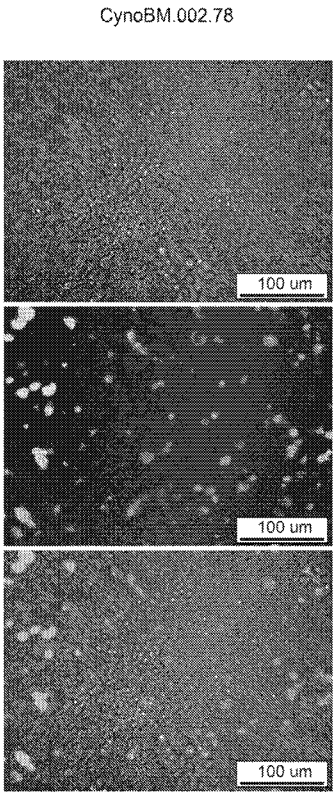


【図９４－３】

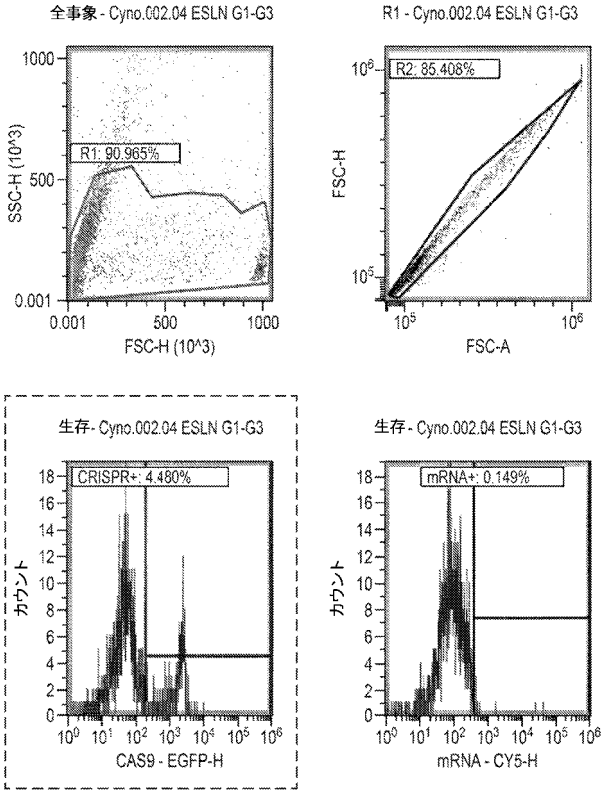


【図９４－４】

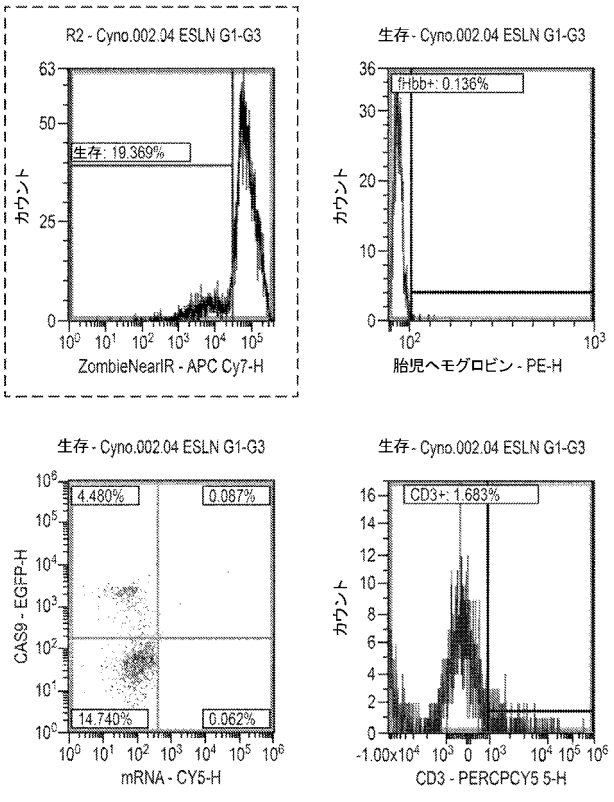
【図９５－１】



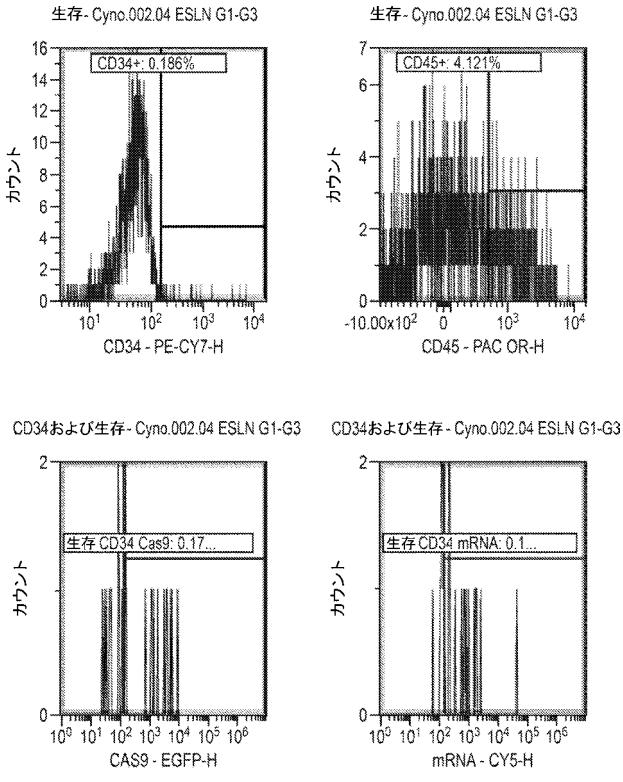
【図９５－２】



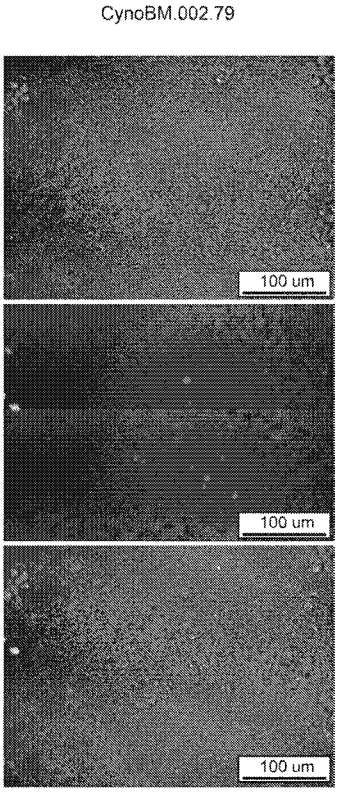
【図９５－３】



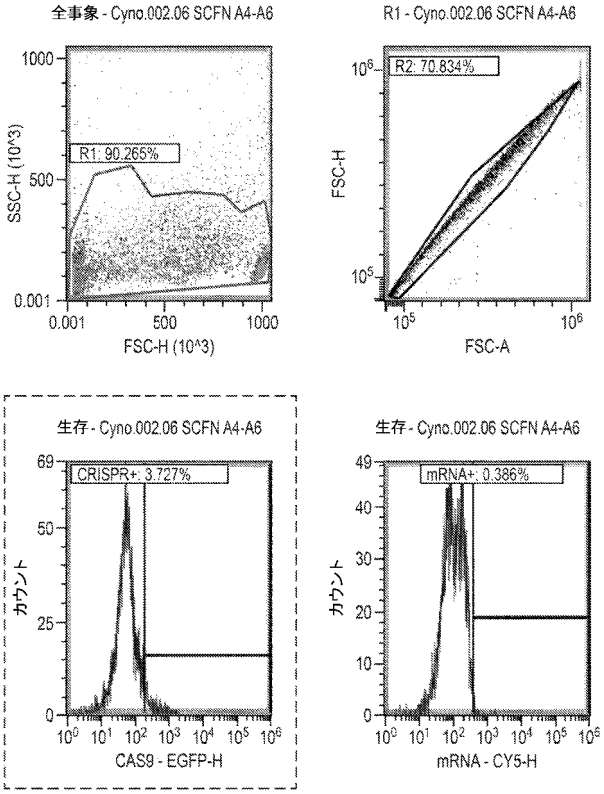
【図９５－４】



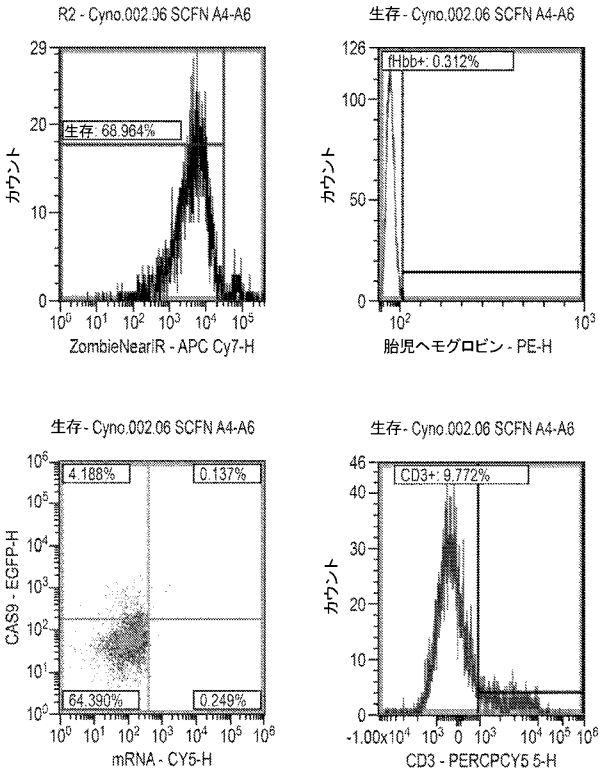
【図９６－１】



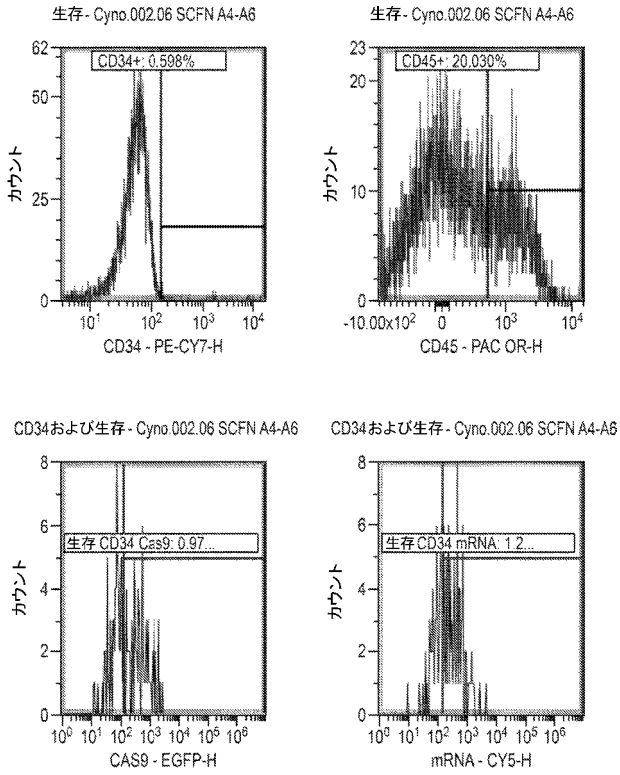
【図９６－２】



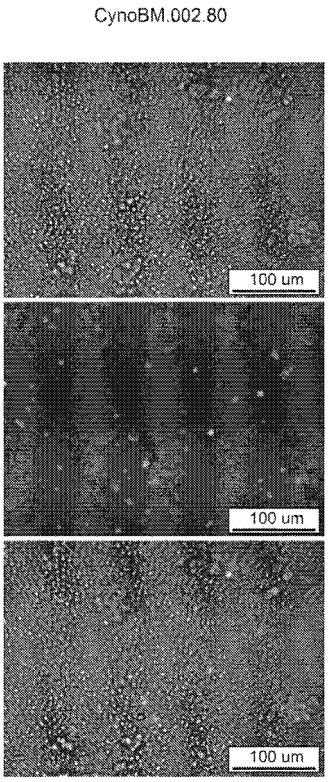
【図９６－３】



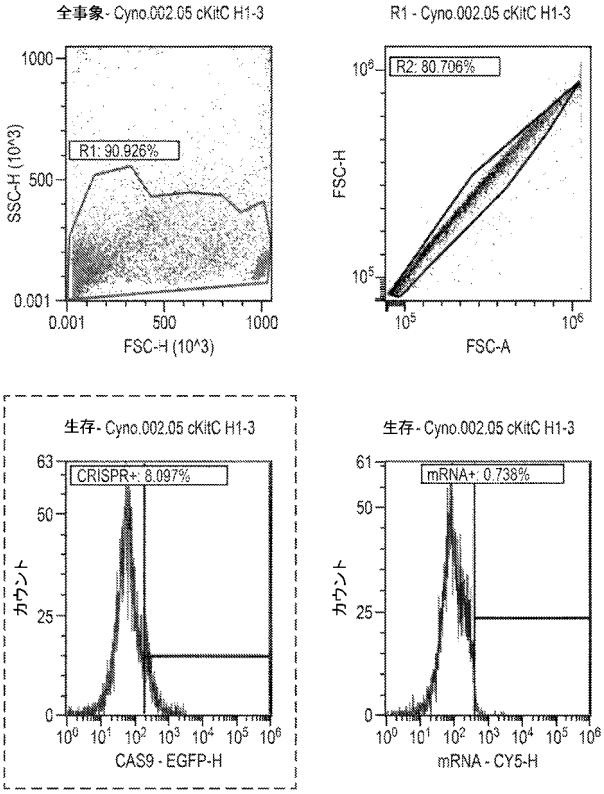
【図９６－４】



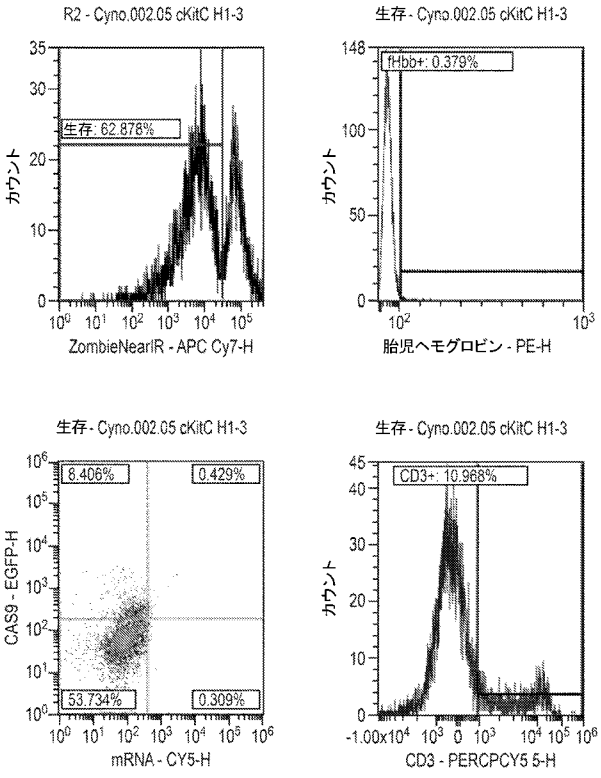
【図９７－１】



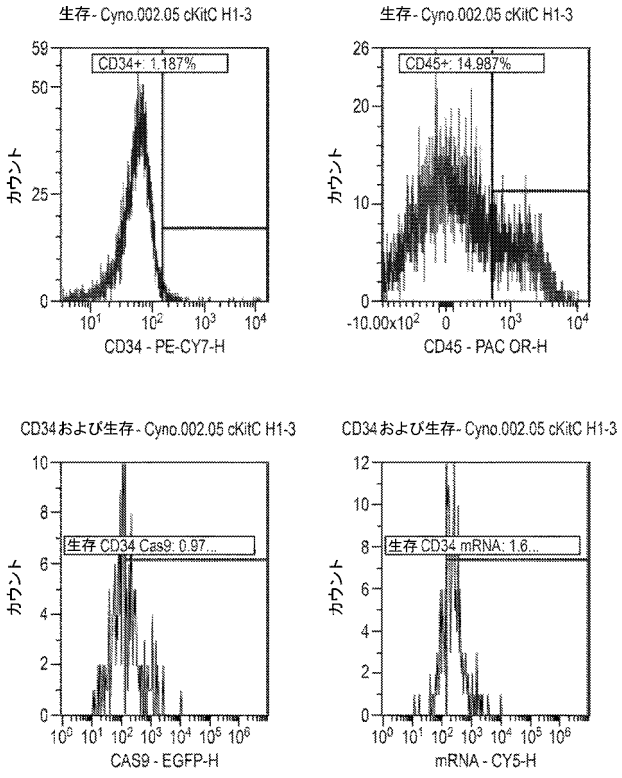
【図９７－２】



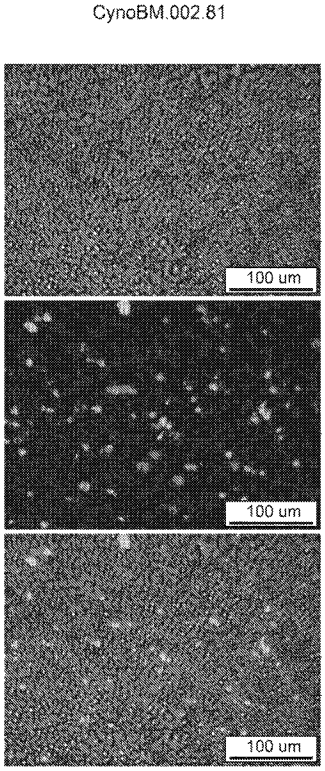
【図９７－３】



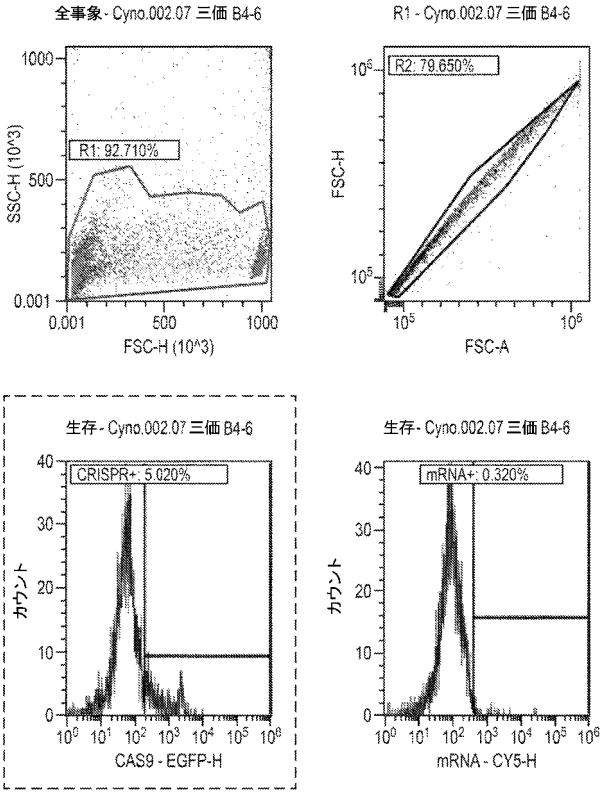
【図９７－４】



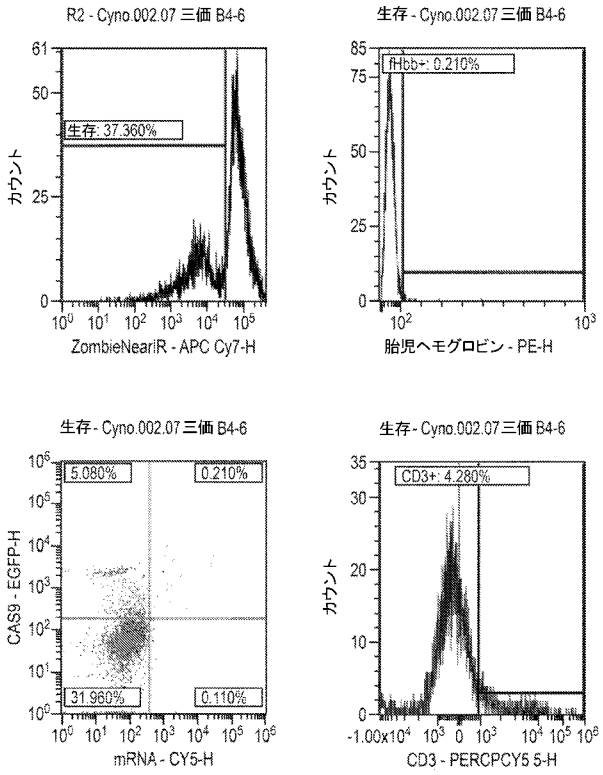
【図９８－１】



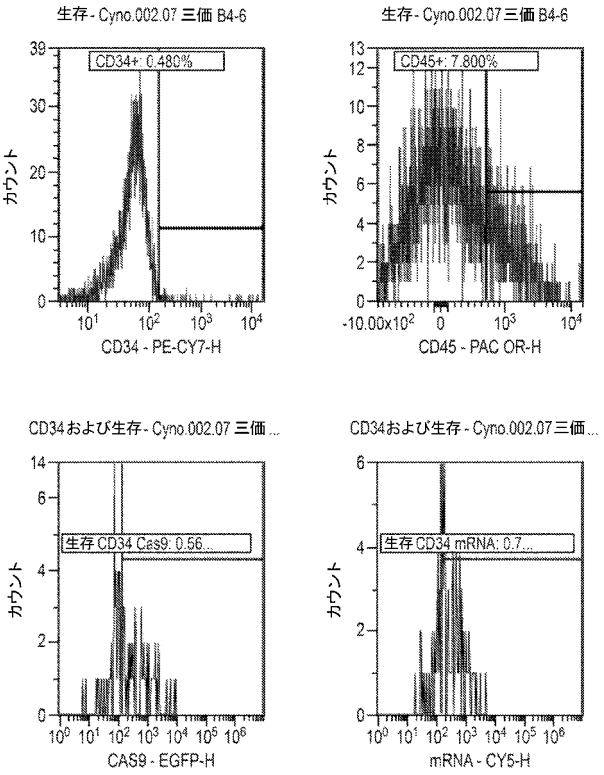
【図９８－２】



【図９８－３】

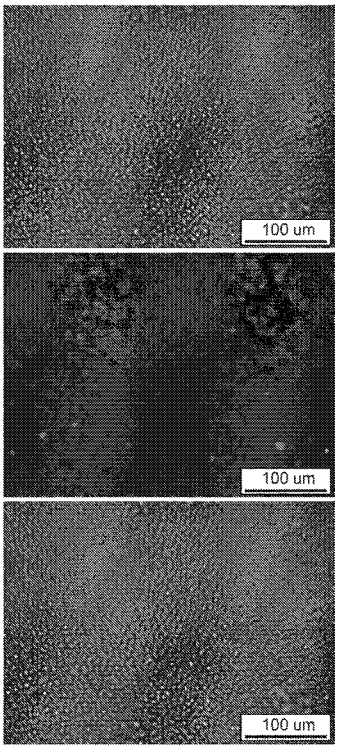


【図９８－４】



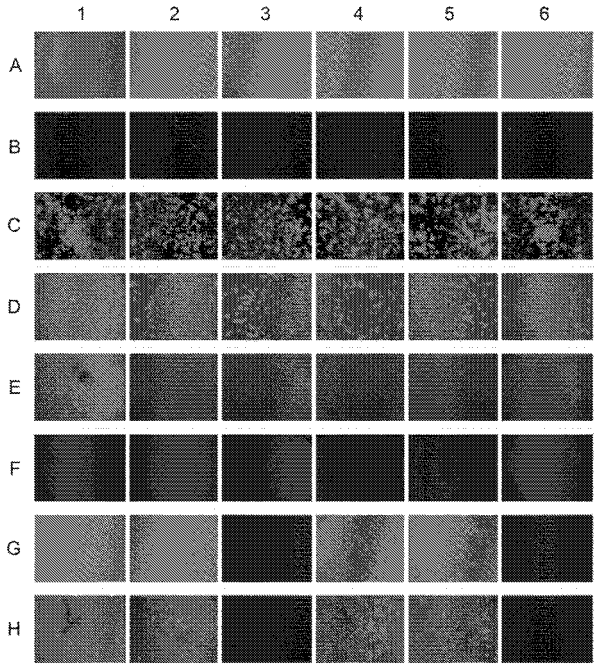
【図９９】

CynoBM.002 EGFP-RNPのみ

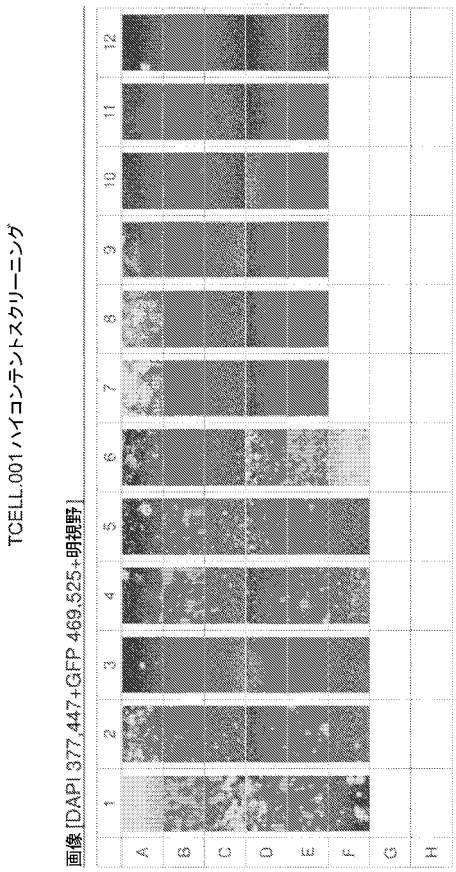


【図１００】

HSC.004 ハイコンテントスクリーニング

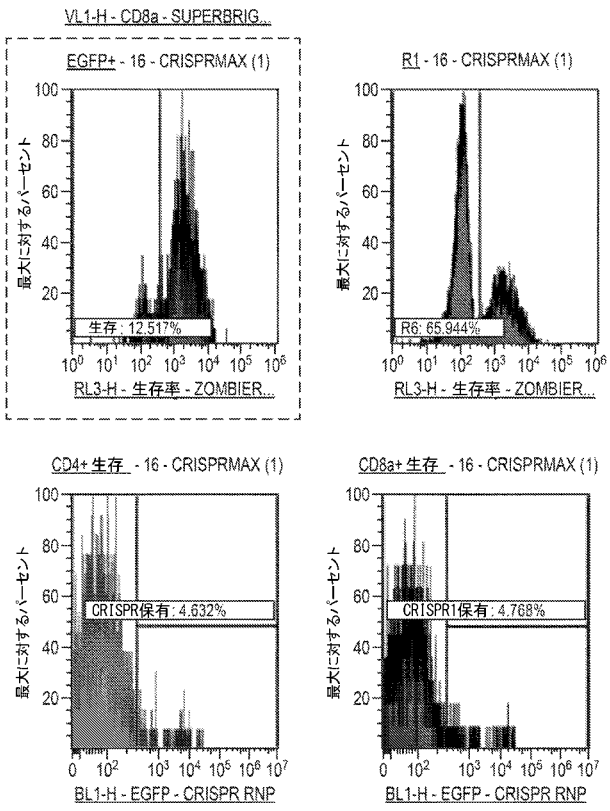


【図１０１】

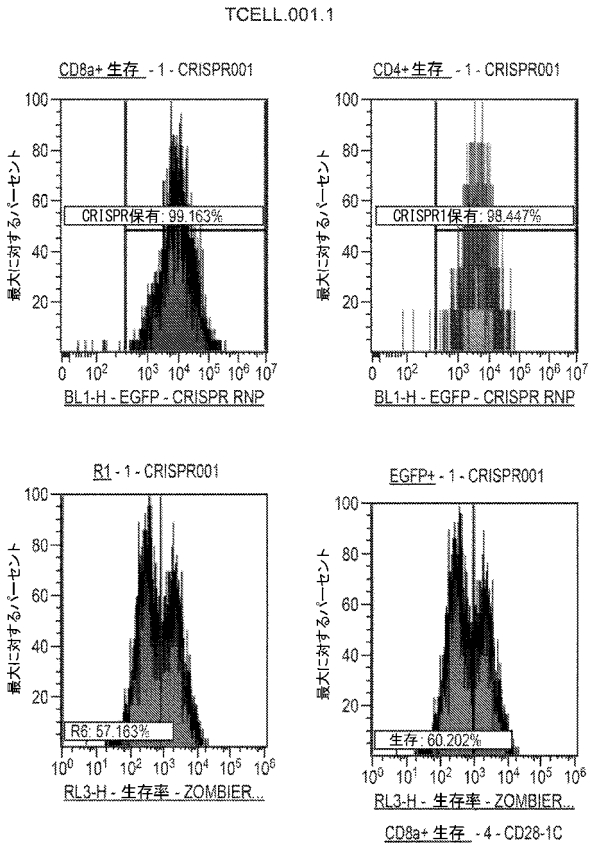


【図１０２】

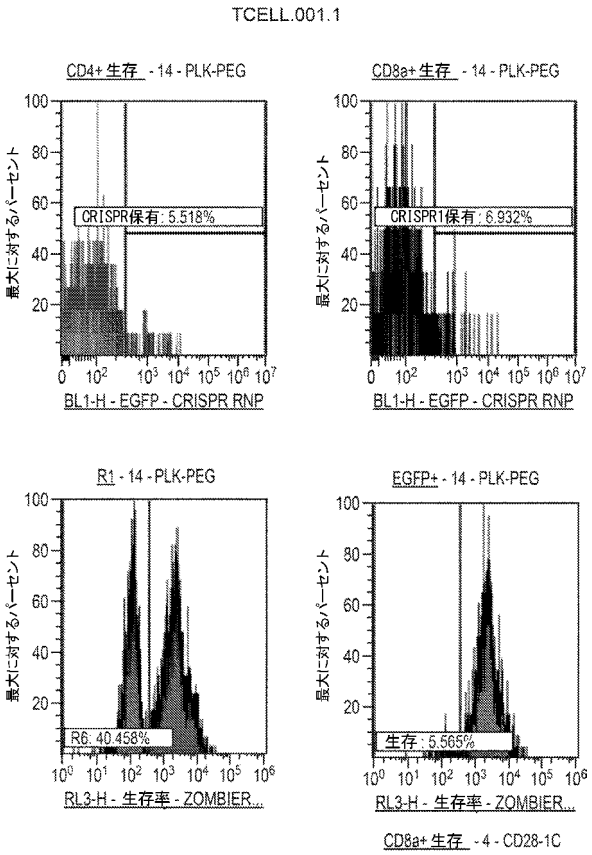
TCELL.001リポフェクタミンCRISPRMAX



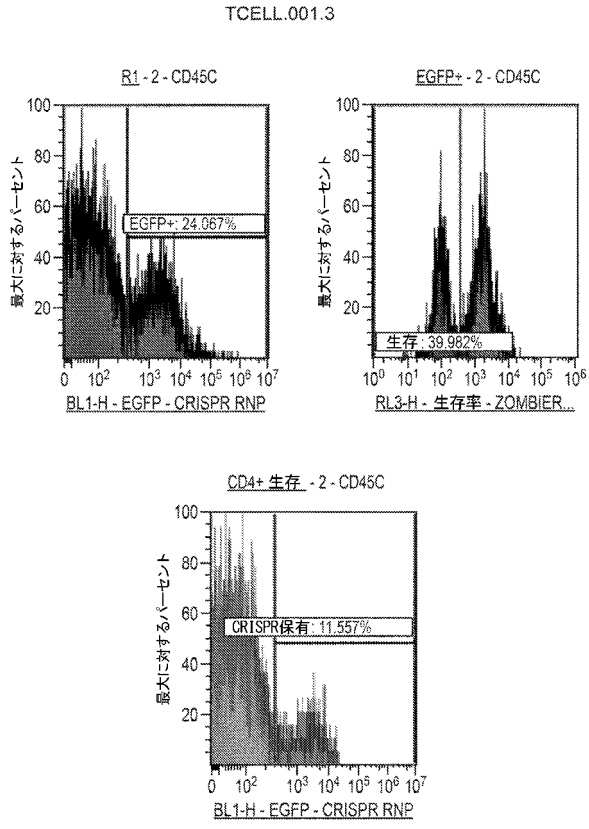
【図１０３】



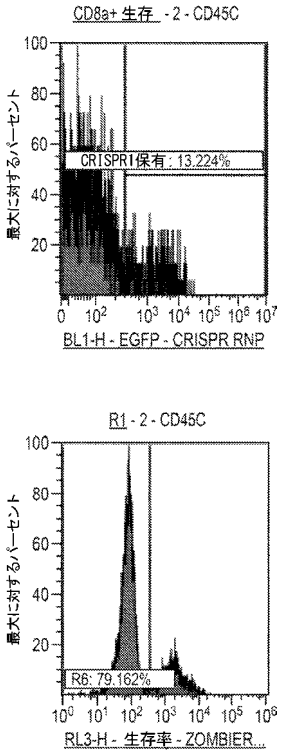
【図１０４】



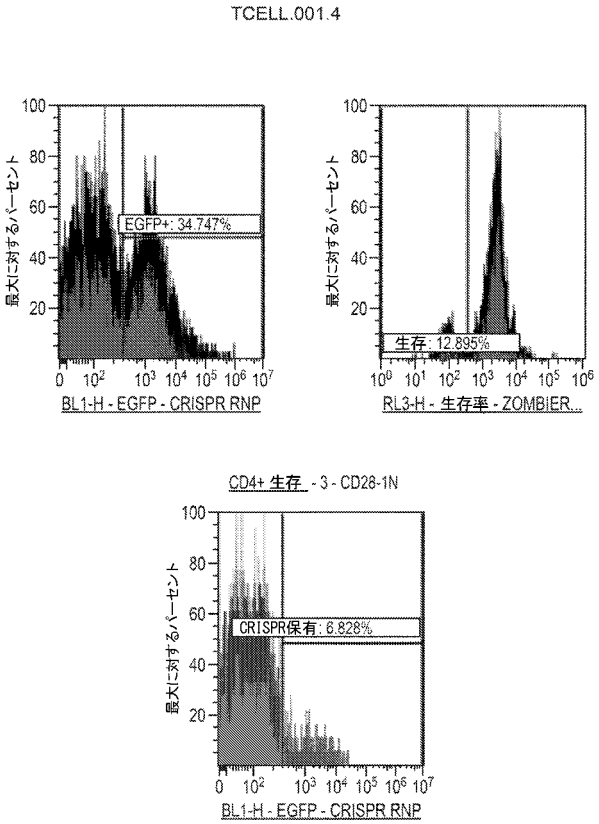
【図１０５－１】



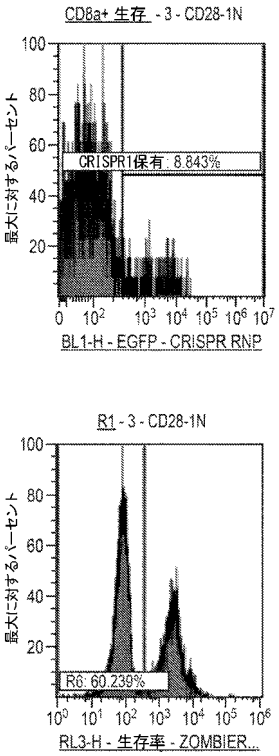
【図１０５－２】



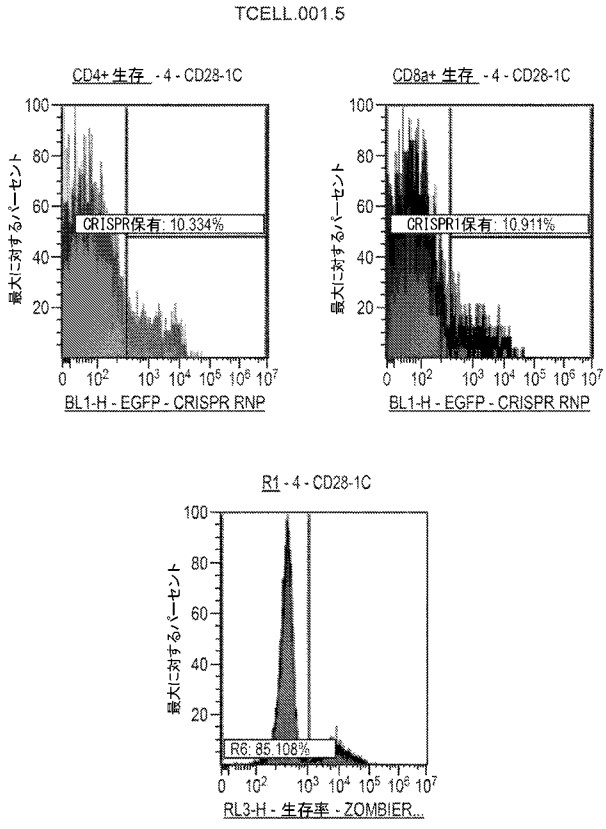
【図１０６－１】



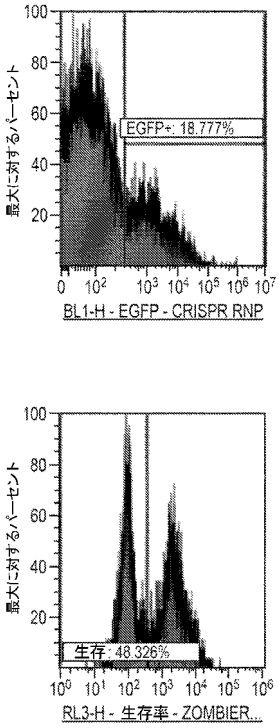
【図１０６－２】



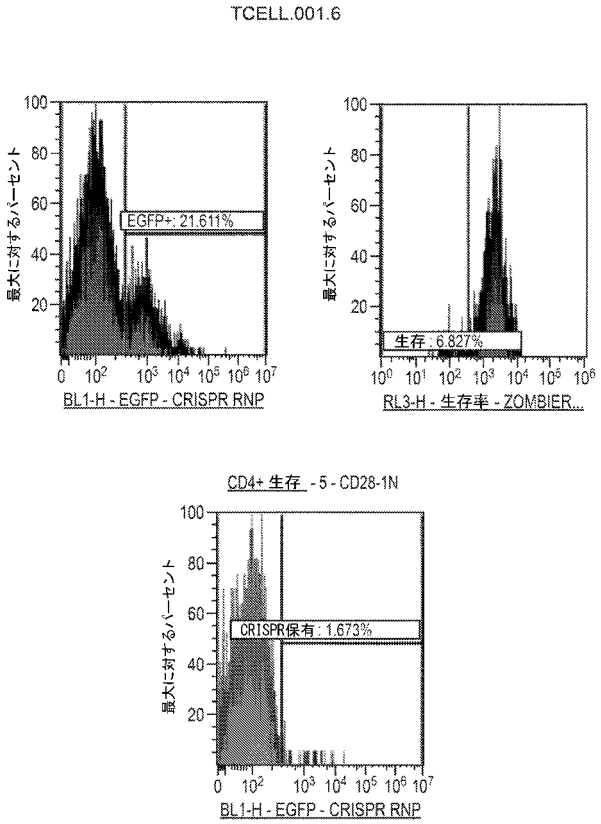
【図１０７－１】



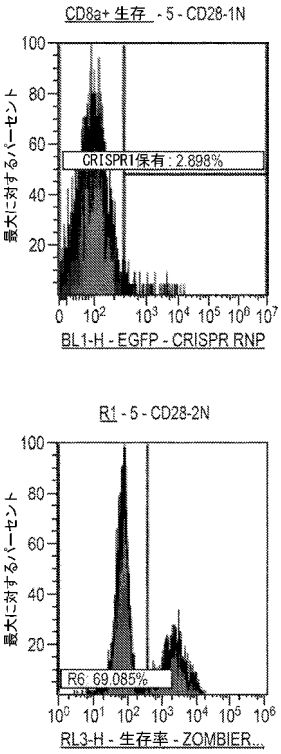
【図１０７－２】



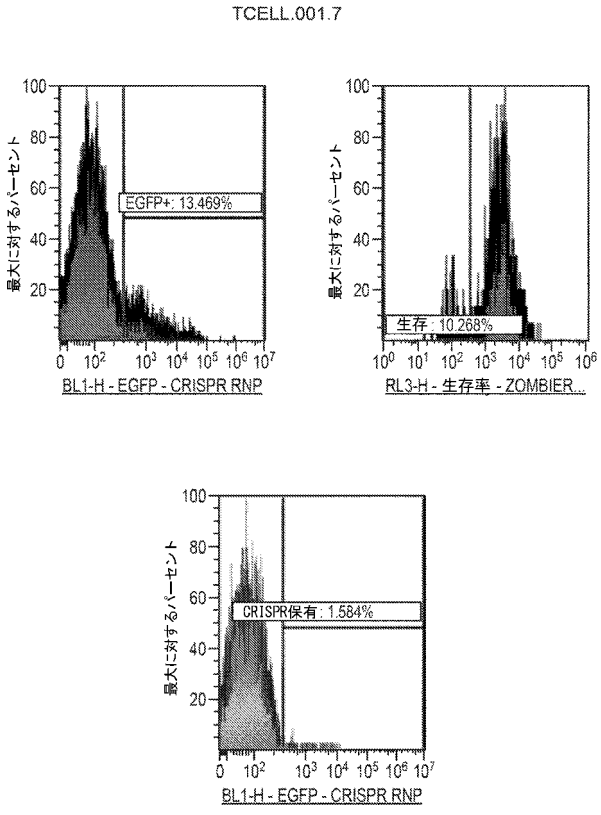
【図１０８－１】



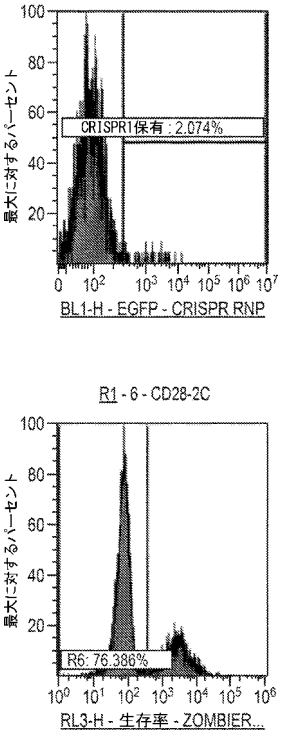
【図１０８－２】



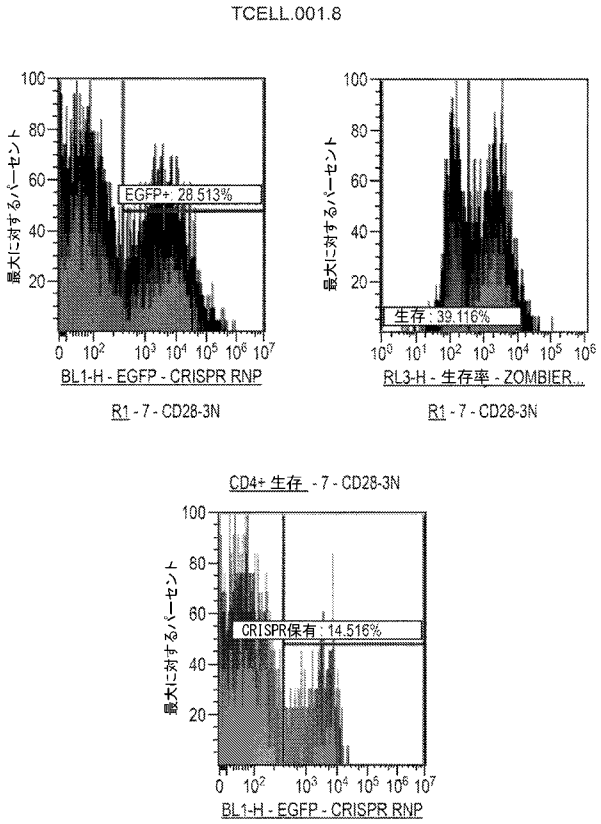
【図１０９－１】



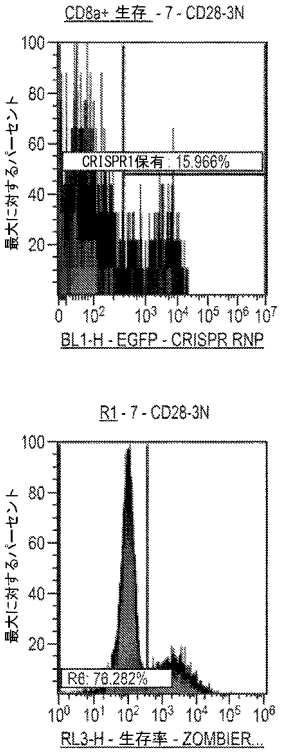
【図１０９－２】



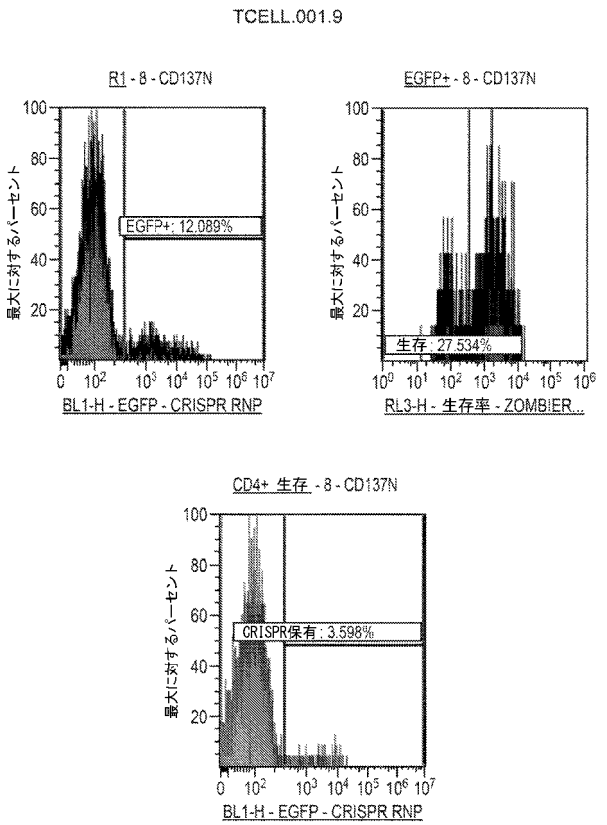
【図１１０－１】



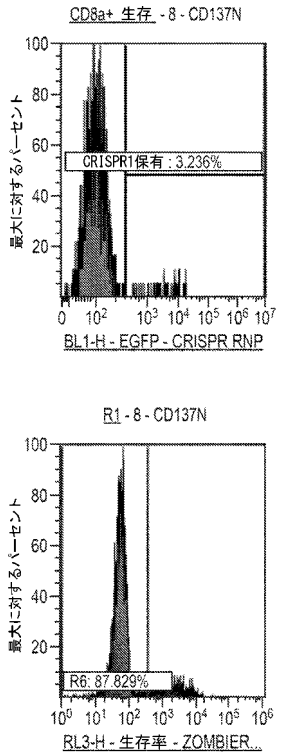
【図１１０－２】



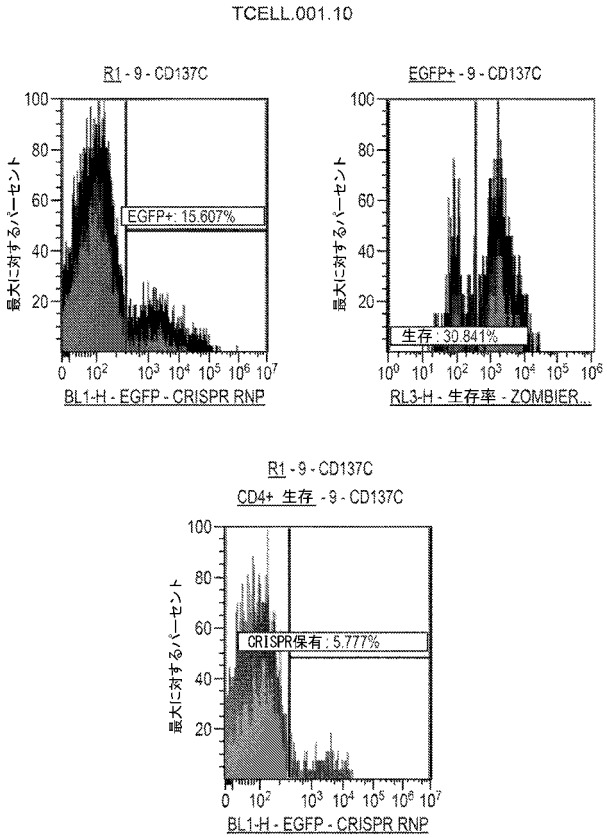
【図１１１－１】



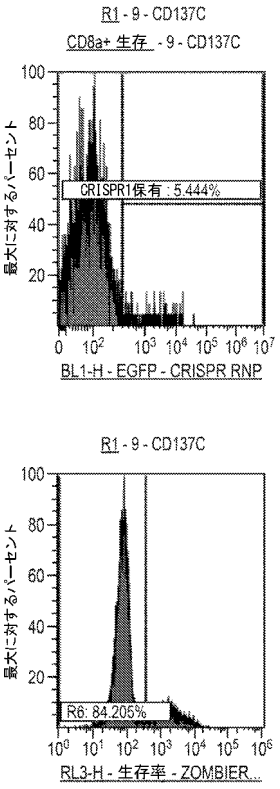
【図１１１－２】



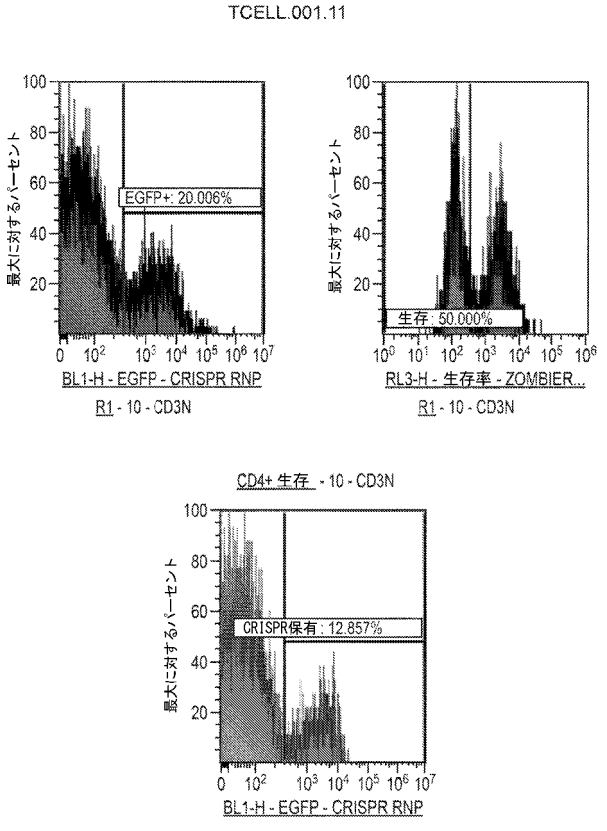
【図１１２－１】



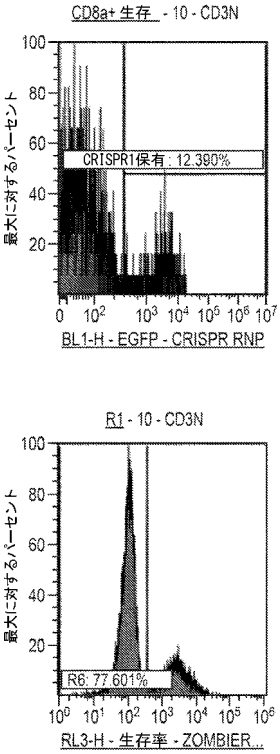
【図１１２－２】



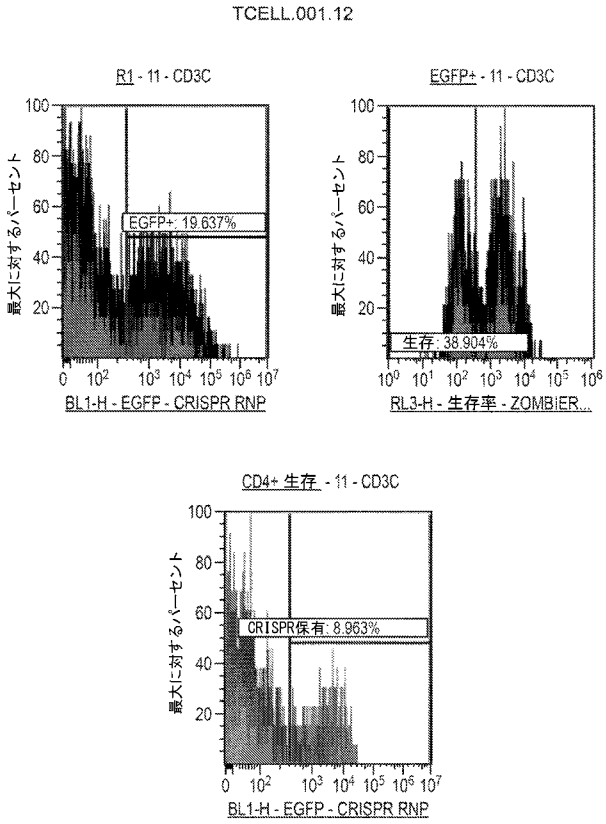
【図１１３－１】



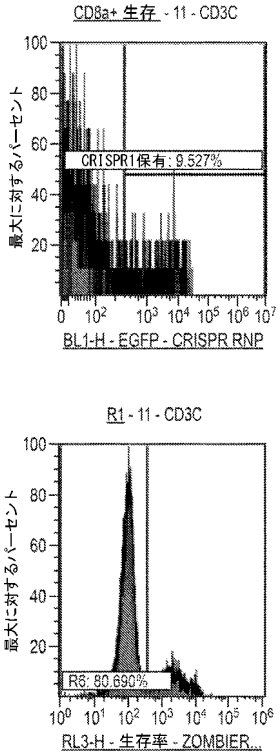
【図１１３－２】



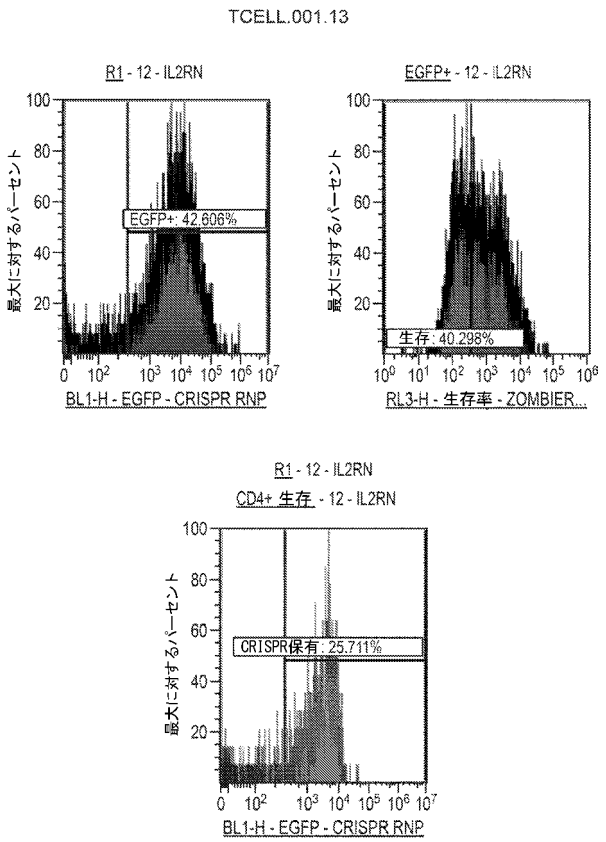
【図１１４－１】



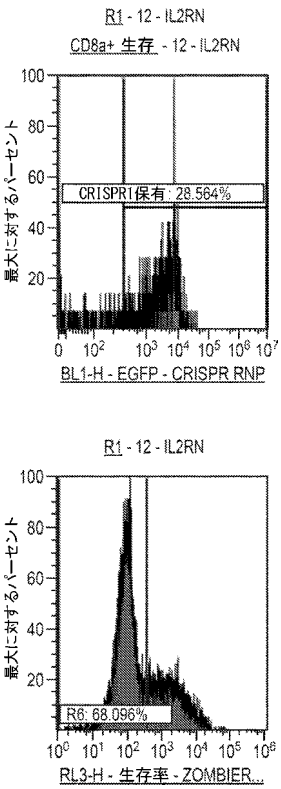
【図１１４－２】



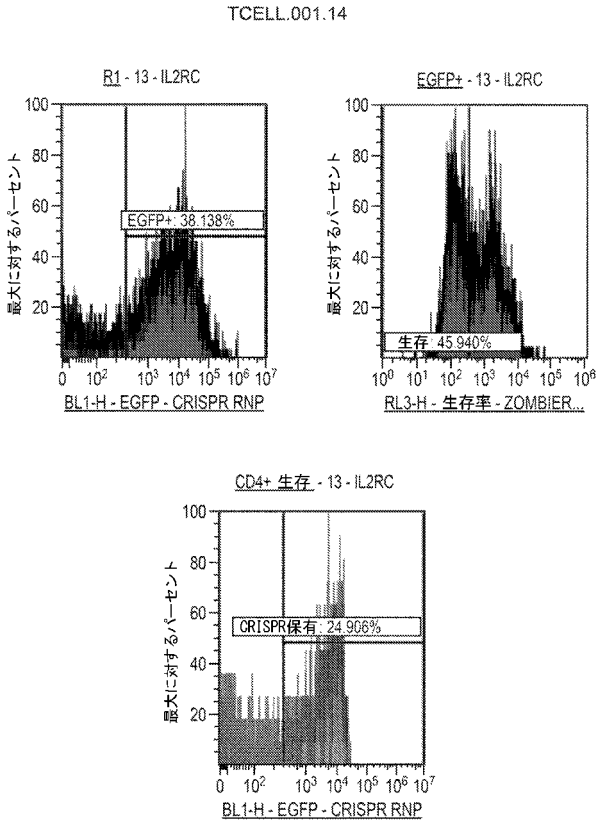
【図１１５－１】



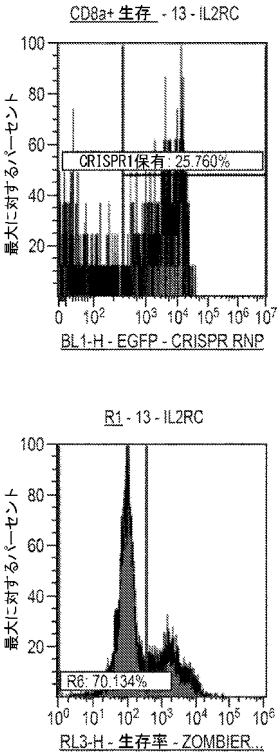
【図１１５－２】



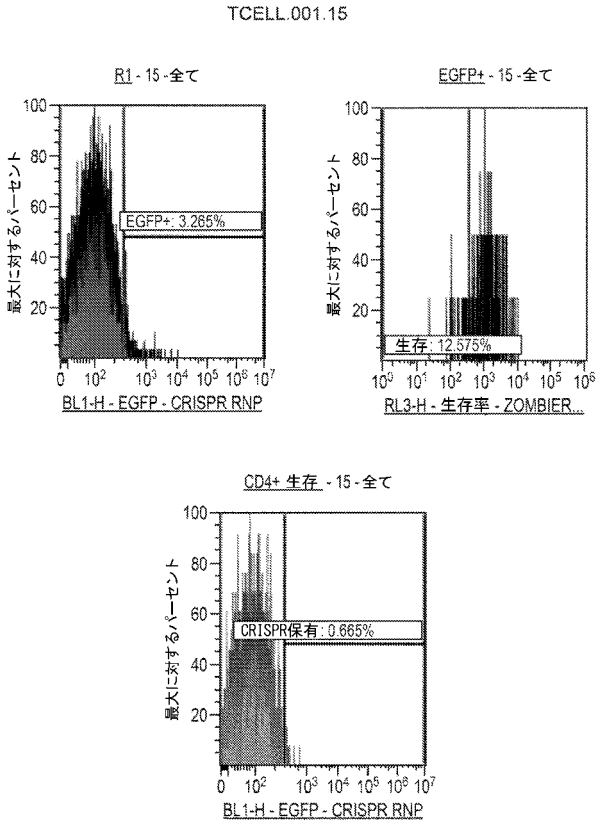
【図１１６－１】



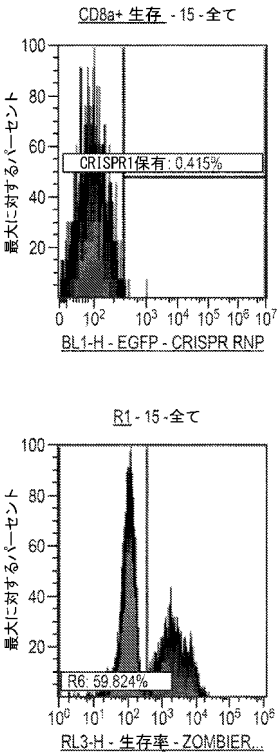
【図１１６－２】



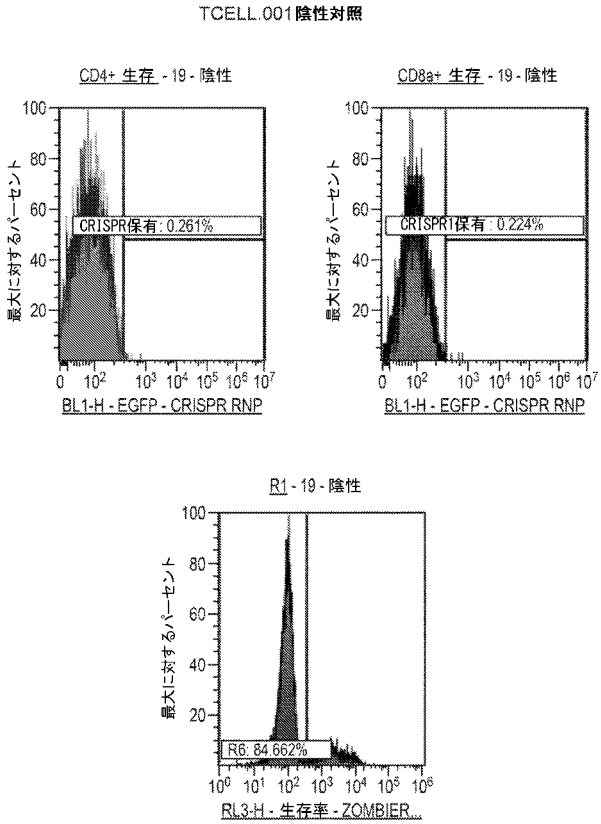
【図１１７－１】



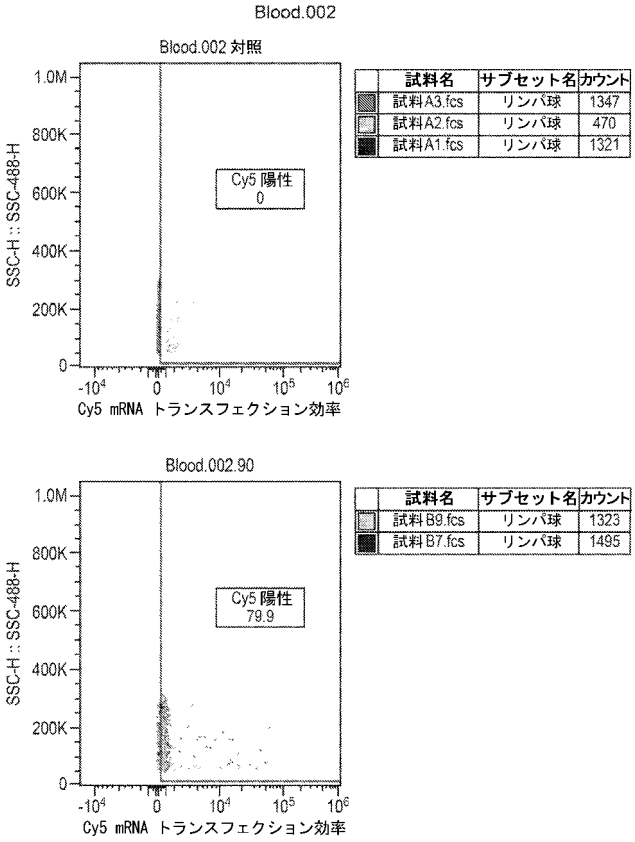
【図１１７－２】



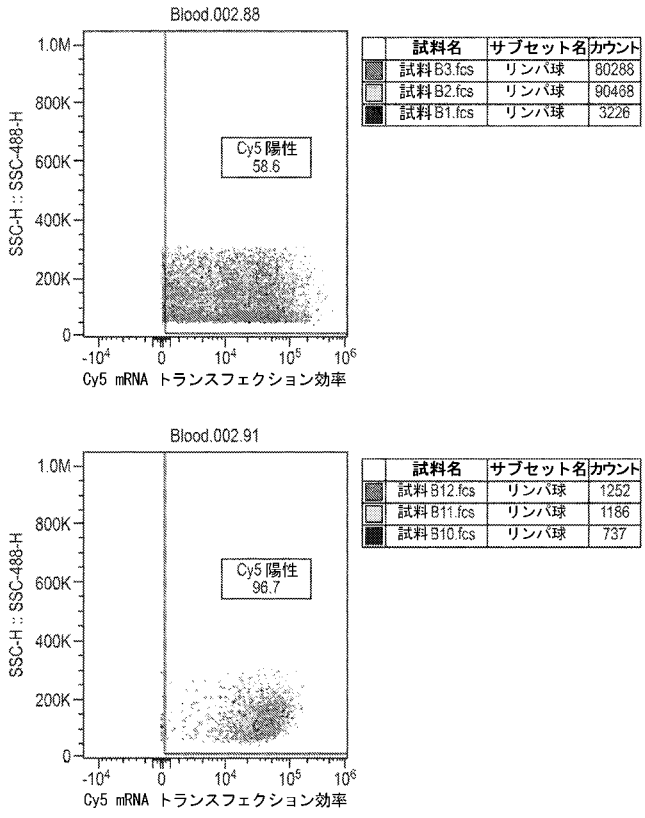
【図１１８】



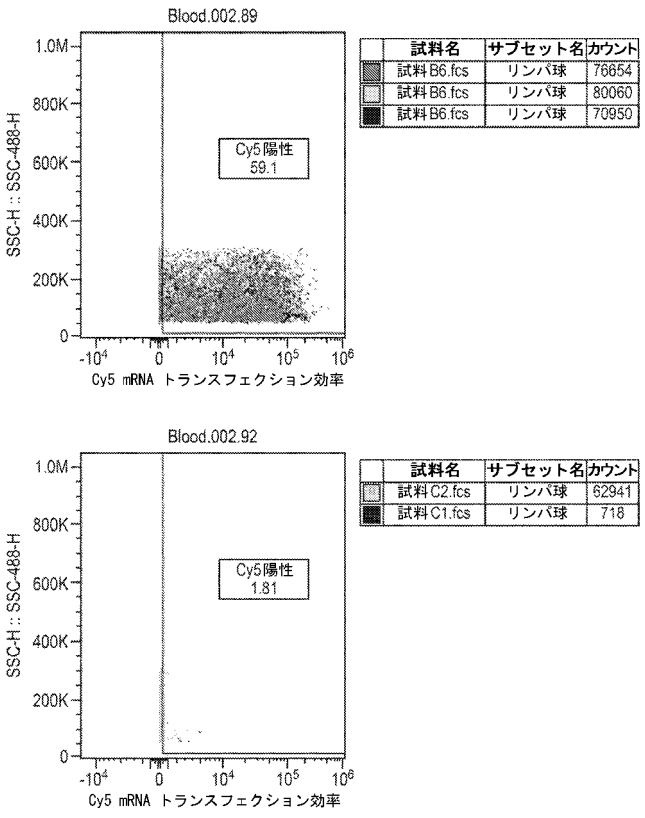
【図１１９－１】



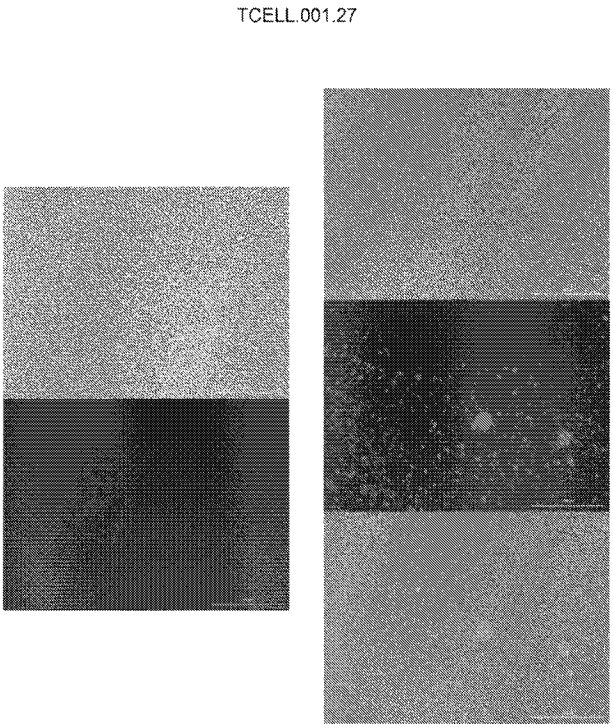
【図１１９－２】



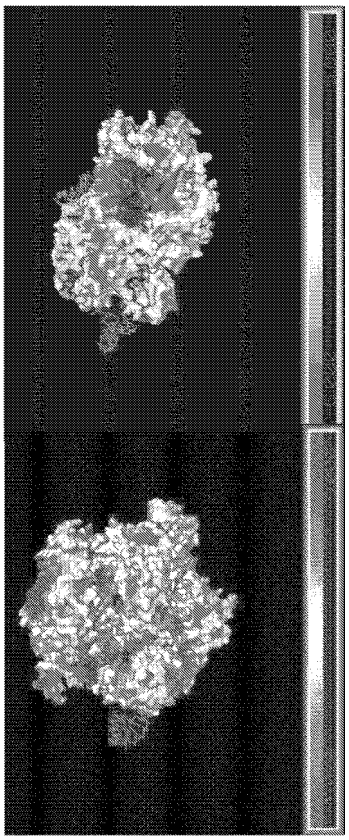
【図１１９－３】



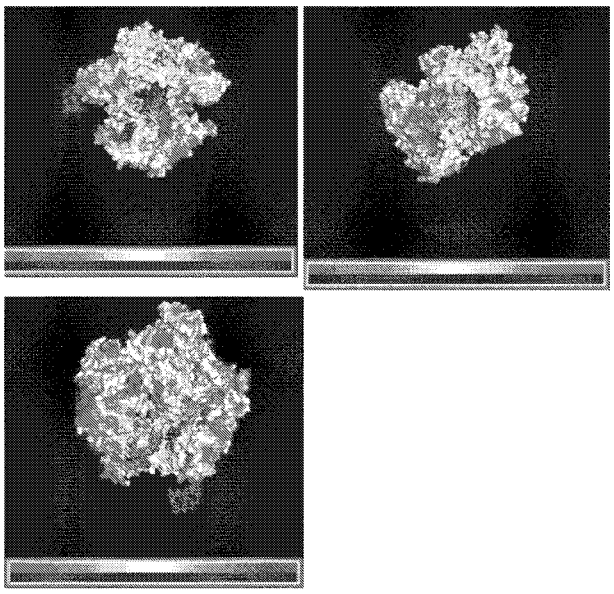
【図１２０】



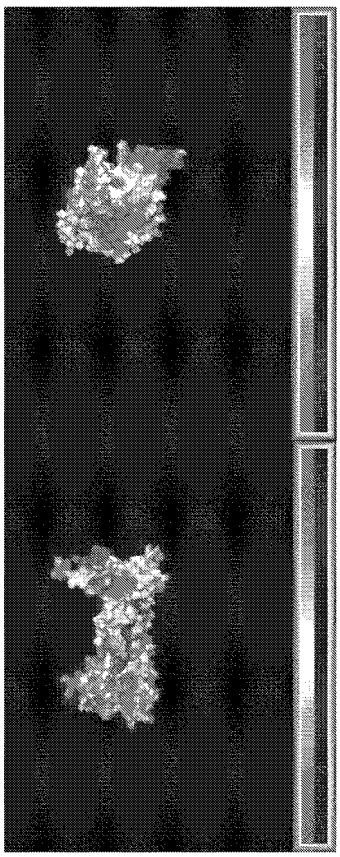
【図１２１－１】



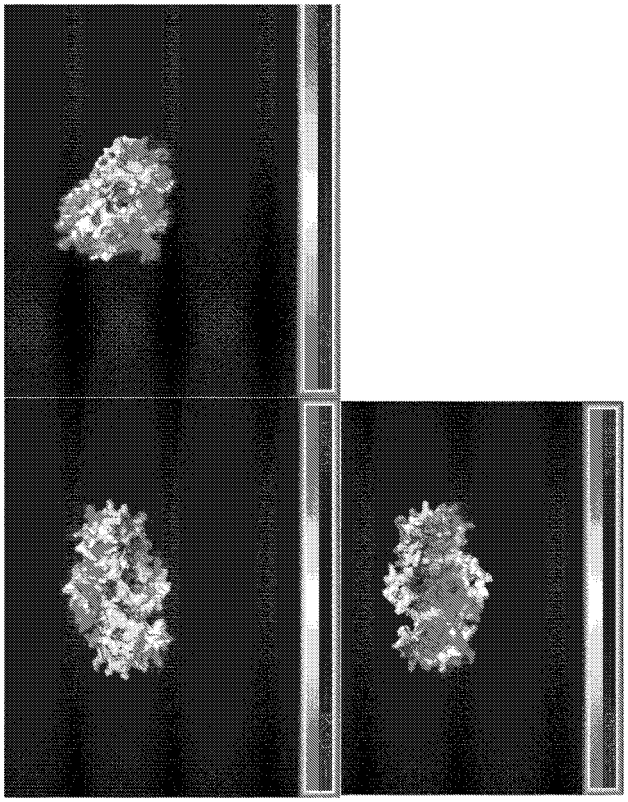
【図１２１－２】



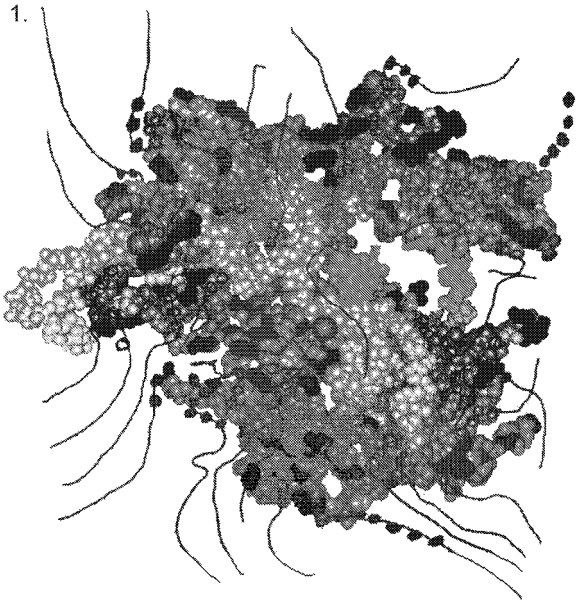
【図１２２－１】



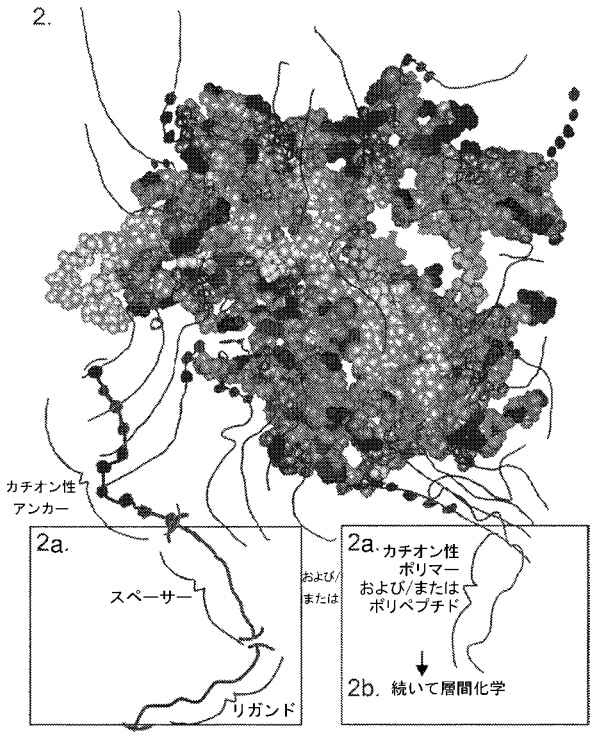
【図１２２－２】



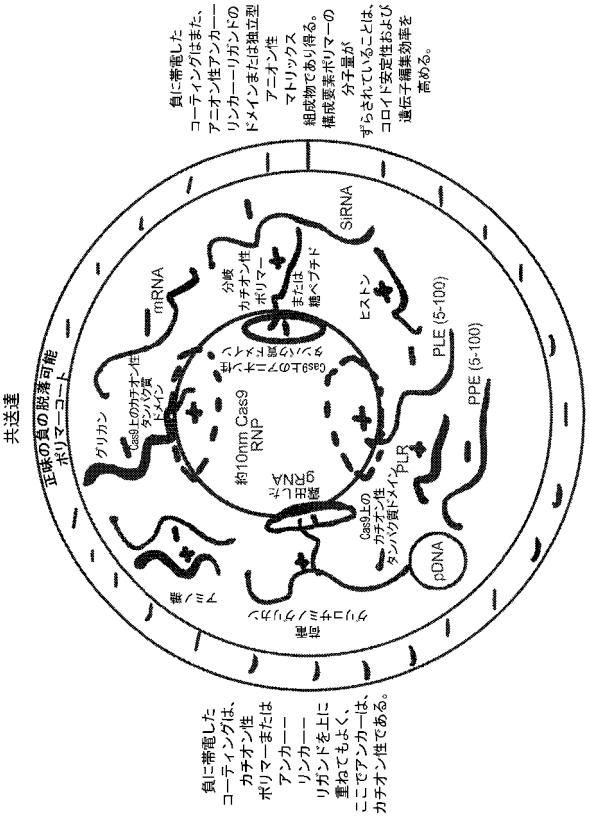
【図１２３－１】



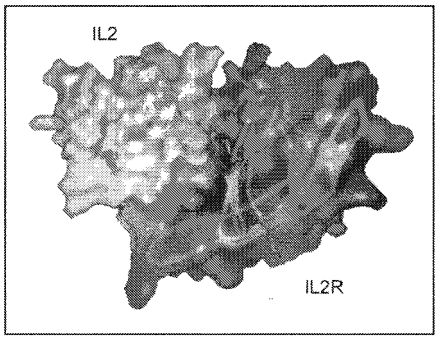
【図１２３－２】



【図１２４】



【図１２５－１】

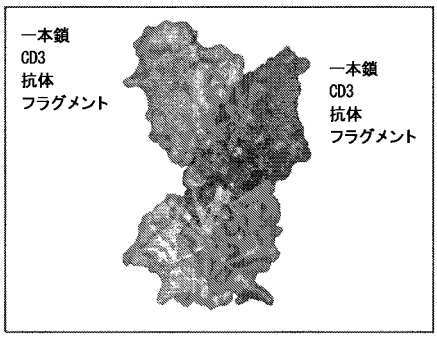


- A 20 ASP
- A 21 LEU
- A 22 GLN
- A 23 MET
- A 24 ILE
- A 25 LEU
- A 26 ASN
- A 27 GLY
- A 28 ILE
- A 29 ASN
- A 30 ASN
- A 31 TYR
- A 32 LYS
- **A 33 ASN**
- A 132 LEU
- A 135 THR
- **鎖B：インターロイキン2受容体α鎖**
- B - 1 ASP
- B 0 PRO
- B 1 GLU
- B 2 LEU
- **B 3 CYS**
- **B 4 ASP**
- **B 5 ASP**
- **B 6 ASP**
- B 7 PRO
- B 8 PRO
- B 9 GLU

【図１２５－２】

- **A 34 PRO**
- **A 35 LYS**
- **A 36 LEU**
- **A 37 THR**
- **A 38 ARG**
- **A 39 MET**
- **A 40 LEU**
- **A 41 THR**
- **A 42 PHE**
- **A 43 LYS**
- **A 44 PHE**
- **A 45 TYR**
- A 46 MET
- A 47 PRO
- A 48 LYS
- A 49 LYS
- A 50 ALA
- A 51 THR
- A 52 GLU
- A 53 LEU
- B 10 ILE
- B 11 PRO
- B 12 HIS
- B 13 ALA
- B 14 THR
- B 15 PHE
- B 16 LYS
- B 17 ALA
- B 18 MET
- B 19 ALA
- B 20 TYR
- B 21 LYS
- B 22 GLU
- B 23 GLY
- B 24 THR
- **B 25 MET**
- **B 26 LEU**
- **B 27 ASN**
- **B 28 CYS**
- **B 29 GLU**

【図１２６－１】

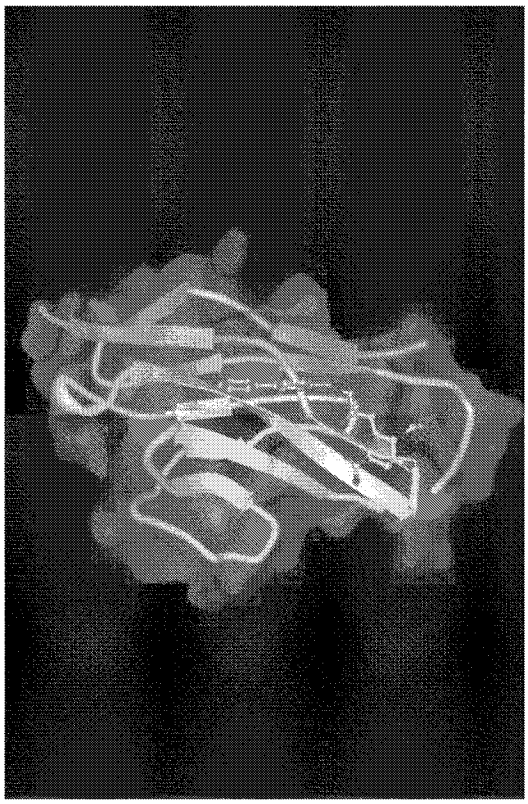


- D 2 VAL
- D 3 GLN
- D 4 LEU
- D 5 GLN
- D 6 GLN
- D 7 SER
- D 8 GLY
- D 9 PRO
- D 10 GLU
- D 11 LEU
- D 12 VAL
- D 13 LYS
- D 14 PRO
- D 15 CLY
- D 40 SER
- D 41 HIS
- D 42 GLY
- D 43 LYS
- D 44 ASN
- D 45 LEU
- D 46 GLU
- D 47 TRP
- D 48 MET
- D 49 GLY
- D 50 LEU
- D 51 ILE
- **D 52 ASN**
- **D 53 PRO**
- D 91 SER
- D 92 ALA
- D 93 VAL
- D 94 TYR
- D 95 TYR
- D 96 CYS
- D 97 ALA
- D 98 ARG
- D 99 SER
- D 100 GLY
- **D 101 TYR**
- **D 102 TYR**
- **D 103 GLY**
- **D 104 ASP**

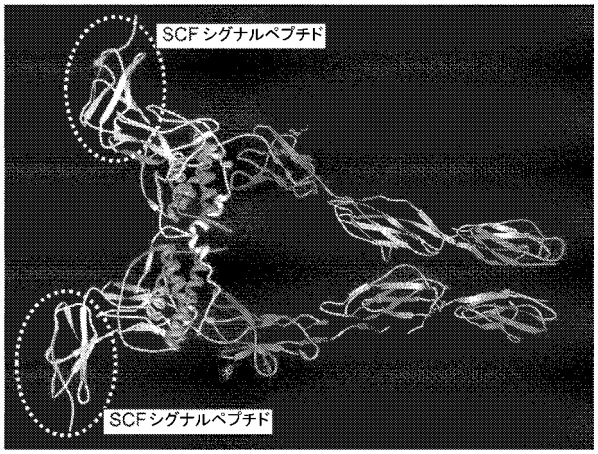
【図１２６－２】

- D 16 ALA
- D 17 SER
- D 18 MET
- D 19 LYS
- D 20 ILE
- D 21 SER
- D 22 CYS
- D 23 LYS
- D 24 ALA
- D 25 SER
- D 26 GLY
- D 27 TRY
- D 28SER
- D 29 PHE
- **D 30 THR**
- **D 31 GLY**
- D 32 TYR
- D 33 THR
- D 34 MET
- D 35 ASN
- **D 54 TYR**
- **D 55 LYS**
- **D 56 GLY**
- **D 57 VAL**
- **D 58 SER**
- **D 59 THR**
- D 60 TYR
- D 61 ASN
- D 62 GLN
- D 63 LYS
- D 64 PHE
- D 65 LYS
- D 66 ASP
- D 67 LYS
- D 68 ALA
- D 69 THR
- D 70 LEU
- D 71 THR
- D 72 VAL
- D 73 ASP
- D 105 SER
- D 106 ASP
- D 107 TRP
- D 108 TYR
- D 109 PHE
- D 110 ASP
- D 111 VAL
- D 112 TRP
- D 113 GLY
- D 114 GLN
- D 115 GLY
- D 116 THR
- D 117 THR
- D 118 LEU
- D 119 THR
- D 120 VAL
- D 121 PHE
- D 122 SER
- 水分子

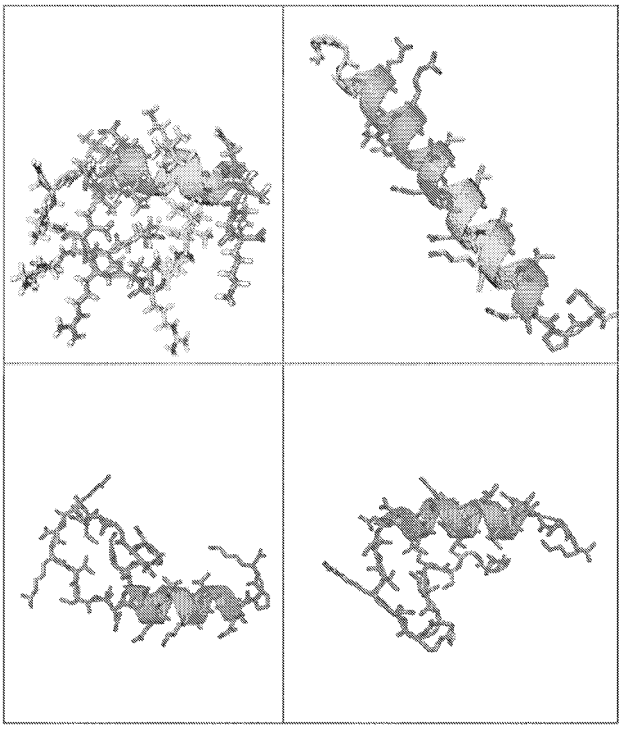
【図１２７】



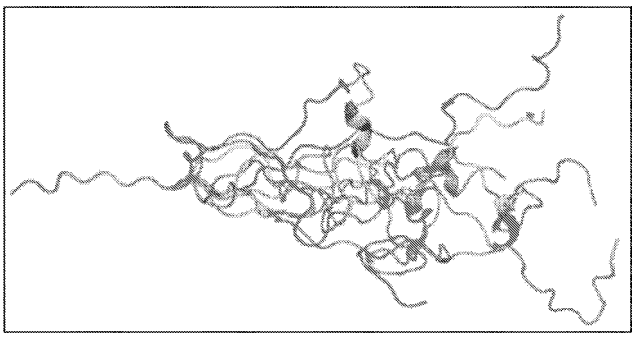
【図１２８】

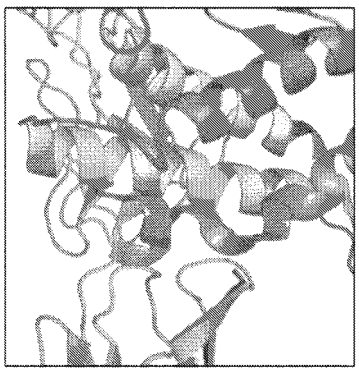


【図１２９】

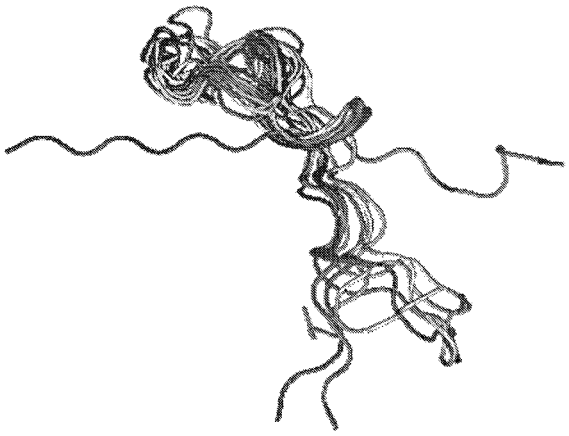


【図１３０】





【図１３１】



鎖がリンカー残基と強く相互作用する構造に収束した。

残基７１～９４については、ＫＩＴ中の他の２つのヘリックスと
相互作用することによってヘリックスを安定化させる疎水性残基がある。
疎水性残基は、赤で表示されている（太字の下線）。

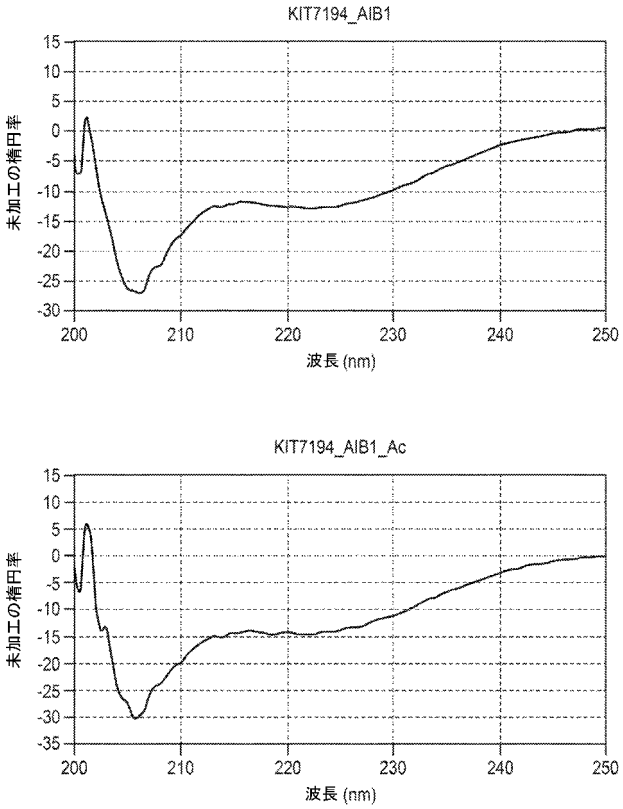
SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS

疎水性残基を除去するために配列を変更し、らせん状の折り畳みを
誘導するのを助けるアミノイソ酪酸（Ａｉｂ）で置き換えた。

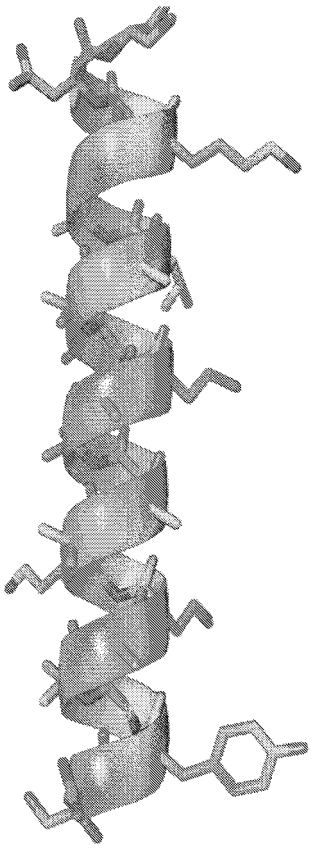
SNYS IIDK LVNIV DD LVECVKENS

KIT7194_AIB1: SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

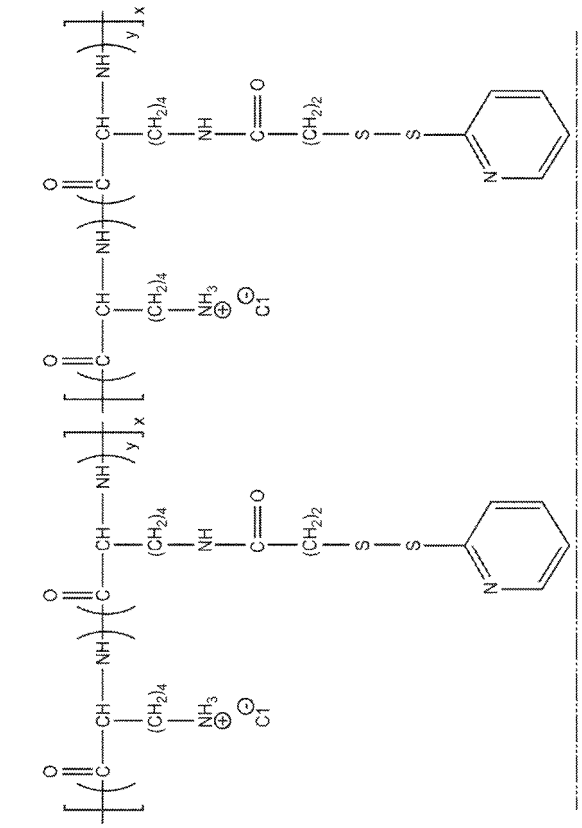
【図１３２】



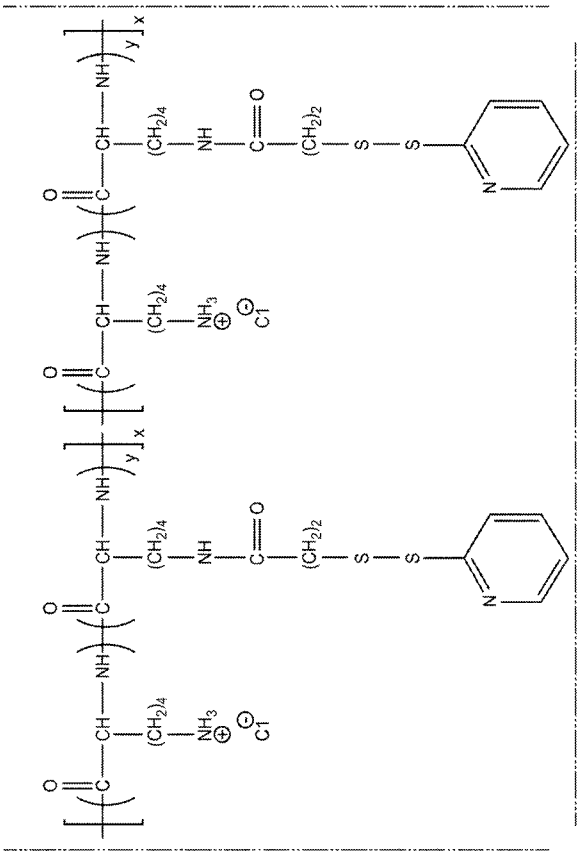
【図１３３】



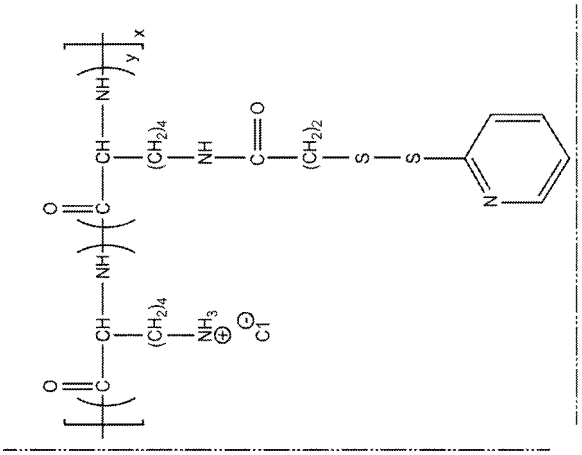
【図１３４－１】



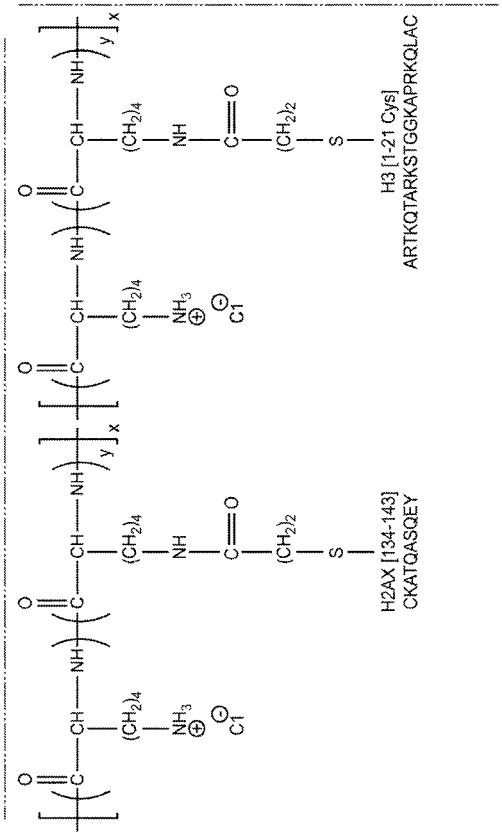
【図１３４－２】



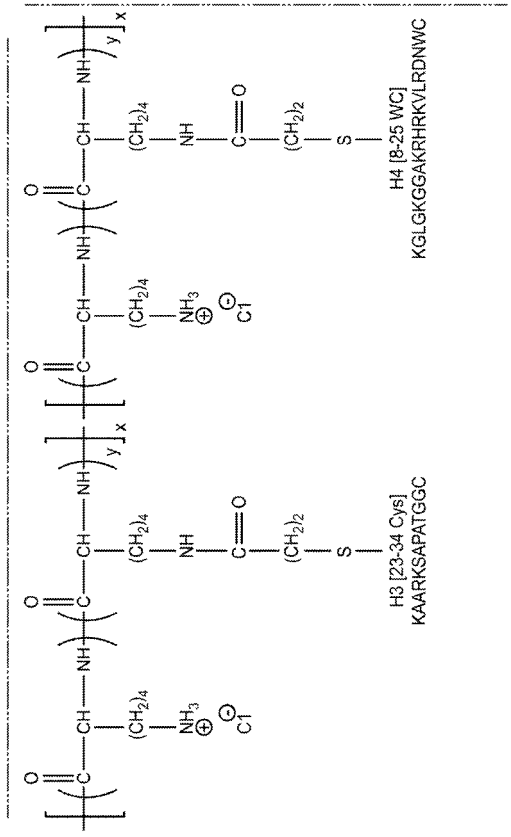
【図１３４－３】



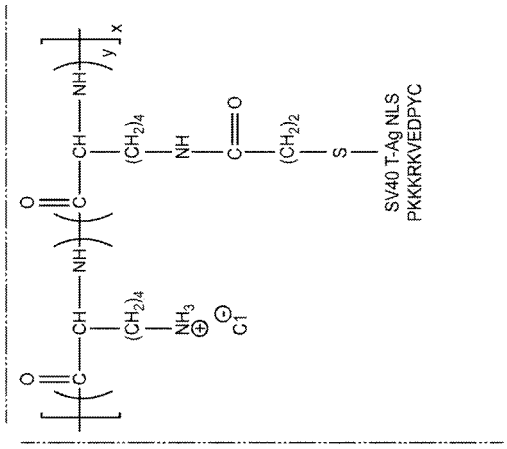
【図１３４－４】



【図１３４－５】



【図１３４－６】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/66545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 47/64; C12N 15/85, 15/88 (2018.01)
CPC - A61K 47/64, 47/6455, 47/6923, 47/6929, 48/0041; C12N 9/22, 15/85, 15/88

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)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2016/0230189 A1 (RENSSELAER POLYTECHNIC INSTITUTE) August 11, 2016; abstract; paragraphs [0032], [0042], [0056]; claim 1	1, 3/1 --- 2, 3/2, 46-44, 45/43-44, 46/45/43-44, 62-64
Y	US 2013/0296285 A1 (ALFERIEV, et al.) November 7, 2013; abstract; paragraph [0038]; claim 22	2, 3/2
Y	US 2014/0093575 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) April 3, 2014; abstract; paragraphs [0003], [0017], [0089], [0092], [0096]; claim 1	43-44, 45/43-44, 46/45/43-44
Y	US 2009/0233359 A1 (KWON) September 17, 2009; abstract; claim 1	62-64

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 February 2018 (09.02.2018)	26 FEB 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/66545

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-42, 47-61
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
A61K 47/64	*(2017.01)*	A61K	47/64	
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00	
A61K 38/16	*(2006.01)*	A61K	38/16	
A61K 45/06	*(2006.01)*	A61K	45/06	
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P	43/00	121
A61P 25/14	*(2006.01)*	A61P	25/14	
A61P 25/02	*(2006.01)*	A61P	25/02	
A61P 25/16	*(2006.01)*	A61P	25/16	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P	3/10	
A61P 7/04	*(2006.01)*	A61P	7/04	
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61P	43/00	111
A61K 38/18	*(2006.01)*	A61K	31/7088	
		A61K	38/18	

(31)優先権主張番号 62/443,567
(32)優先日 平成29年1月6日(2017.1.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/517,346
(32)優先日 平成29年6月9日(2017.6.9)
(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,IR,IS,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ワトソン アンドレ ロナルド

アメリカ合衆国　９４１０７　カリフォルニア州　サンフランシスコ　イリノイ　ストリート　７００　ユニット　２０４
(72)発明者　フォスター　クリスチャン
アメリカ合衆国　９４６０７　カリフォルニア州　オークランド　キャンベル　ストリート　１１２３

Ｆターム(参考)　4C076 AA31 AA65 CC01 CC14 CC21 CC27 DD21 DD24 DD26 DD29 EE26 EE59
4C084 AA20 BA01 BA08 BA19 BA23 DB52 MA02 MA37 MA41 NA13 ZA02 ZA20 ZA53 ZB26 ZC35 ZC75
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA37 MA41 NA13 ZA02 ZA20 ZA53 ZB26 ZC35 ZC75