(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2019-521659
(P2019-521659A)
(43)公表日　令和1年8月8日(2019.8.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/11	(2006.01)	C12N	15/11	Z	4B050
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08	ZNA	4B065
C12N 9/16	(2006.01)	C12N	9/16	Z	4C076
C12N 9/10	(2006.01)	C12N	9/10		4C084
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	110	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 206 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-561967 (P2018-561967)
(86)(22)出願日　平成29年5月26日 (2017.5.26)
(85)翻訳文提出日　平成31年1月22日 (2019.1.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/034862
(87)国際公開番号　WO2017/205846
(87)国際公開日　平成29年11月30日 (2017.11.30)
(31)優先権主張番号　62/394,140
(32)優先日　平成28年9月13日 (2016.9.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/477,357
(32)優先日　平成29年3月27日 (2017.3.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

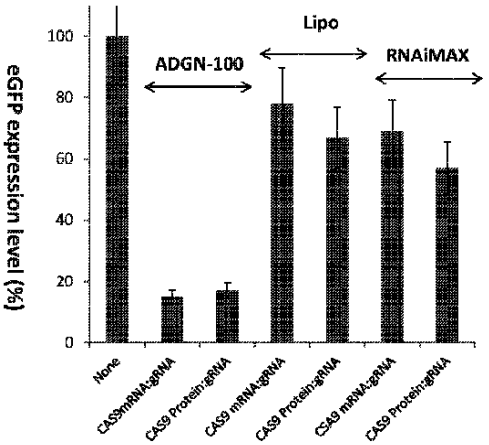
(71)出願人　514289920
アーディジェン，　エルエルシー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９０２７２，　パシフィック　パリセーズ，　ルナ　ビスタ　ドライブ　１３４３
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ゲノム編集分子の細胞内送達のためのペプチドおよびナノ粒子

(57)【要約】
本発明は、タンパク質および／または核酸、例えばＣＲＩＳＰＲタンパク質および／または核酸などの、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子の安定化および／または送達に有用である、ペプチド含有複合体／ナノ粒子に関する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）およびガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含むＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合している細胞膜透過ペプチドを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。

FIG. 19



【特許請求の範囲】
【請求項１】
標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチドと、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子とを含み、前記細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択され、前記１つまたは複数のゲノム編集システム分子が、
ａ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）、および前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）の一方または両方；
ｂ）ＤＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＤＧＥＮ）、および前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドＤＮＡ（ｇＤＮＡ）の一方または両方；
ｃ）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識するジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）；
ｄ）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識する転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）；
ｅ）前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識するホーミングエンドヌクレアーゼ；および
ｆ）前記標的ポリヌクレオチド内の組換え部位を認識するインテグラーゼ
からなる群から選択される、ゲノム編集複合体。
【請求項２】
前記細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドである、請求項１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３】
前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～１４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項２に記載のゲノム編集複合体。
【請求項４】
前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号７５または７６のアミノ酸配列を含む、請求項２に記載のゲノム編集複合体。
【請求項５】
前記細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドである、請求項１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項６】
前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号１５～４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５に記載のゲノム編集複合体。
【請求項７】
前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号７７のアミノ酸配列を含む、請求項５に記載のゲノム編集複合体。
【請求項８】
前記細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドである、請求項１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項９】
前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号４１～５２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１０】
前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号７８のアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１１】
前記細胞膜透過ペプチドが、ＡＤＧＮ－１００ペプチドである、請求項１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１２】

前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号５３～７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１３】
前記細胞膜透過ペプチドが、配列番号７９または８０のアミノ酸配列を含む、請求項１１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１４】
前記細胞膜透過ペプチドが、前記細胞膜透過ペプチドのＮ末端に共有結合によって連結している１つまたは複数の部分をさらに含み、前記１つまたは複数の部分が、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖類およびターゲティング分子からなる群から選択される、請求項１から１３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１５】
前記細胞膜透過ペプチドが、そのＮ末端に共有結合によって連結しているアセチル基を含む、請求項１４に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１６】
前記細胞膜透過ペプチドが、前記細胞膜透過ペプチドのＣ末端に共有結合によって連結している１つまたは複数の部分をさらに含み、前記１つまたは複数の部分が、システアミド、システイン、チオール、アミド、任意選択で置換されているニトリロ三酢酸、カルボキシル、任意選択で置換されている直鎖状または分枝状C_1～C_6アルキル、一級または二級アミン、オシド誘導体、脂質、リン脂質、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖類およびターゲティング分子からなる群から選択される、請求項１から１５のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１７】
前記細胞膜透過ペプチドが、そのＣ末端に共有結合によって連結しているシステアミド基を含む、請求項１６に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１８】
前記ゲノム編集複合体中の前記細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部が、連結によりターゲティング部分に連結している、請求項１から１７のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項１９】
前記連結が、共有結合である、請求項１８に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２０】
ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡの一方または両方を含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２１】
ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む、請求項２０に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２２】
前記ｇＲＮＡが、単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項２０または２１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２３】
前記ＲＧＥＮが、Ｃａｓ９である、請求項２０から２２のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２４】
ＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比が、約１：１０～約１０：１の間である、請求項２０から２３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２５】
前記細胞膜透過ペプチドと前記ＲＧＥＮのモル比が、約１：１～約８０：１の間である、請求項２０から２４のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２６】

前記細胞膜透過ペプチドと前記ＲＧＥＮのモル比が、約５：１～約２０：１の間である、請求項２５に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２７】
異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む、請求項２０から２６のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２８】
前記標的配列が、標的遺伝子内に存在し、前記１つまたは複数の追加のｇＲＮＡが、前記標的遺伝子内の配列に相補的なガイド配列を個々に含む、請求項２７に記載のゲノム編集複合体。
【請求項２９】
前記標的配列が、第１の標的遺伝子内に存在し、前記１つまたは複数の追加のｇＲＮＡが、１つまたは複数の追加の標的遺伝子内に存在する配列に相補的なガイド配列を個々に含む、請求項２７に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３０】
ＤＧＥＮおよびｇＤＮＡの一方または両方を含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３１】
ＤＧＥＮおよびｇＤＮＡを含む、請求項２０のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３２】
ＺＦＰを含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３３】
ＴＡＬＥＮを含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３４】
ホーミングヌクレアーゼを含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３５】
前記標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのドナー核酸であって、前記標的ポリヌクレオチドの前記修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含むドナー核酸をさらに含む、請求項２０から３４のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３６】
前記修飾が、前記標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である、請求項３５に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３７】
前記ドナー核酸が、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである、請求項３５または３６に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３８】
前記修飾が、前記標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入である、請求項３５に記載のゲノム編集複合体。
【請求項３９】
前記ドナー核酸が、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームに隣接した異種核酸を含む二本鎖ＤＮＡであり、前記５’ホモロジーアームおよび前記３’ホモロジーアームが、修飾される前記標的ポリヌクレオチドの領域に隣接する配列と相同である、請求項３５または３８に記載のゲノム編集複合体。
【請求項４０】
１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するための１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む、請求項３５から３９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項４１】
インテグラーゼを含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項４２】
前記標的ポリヌクレオチドへの挿入のためのドナー核酸をさらに含み、前記インテグラーゼが、前記ドナー核酸内の組換え部位を認識し、前記ドナー核酸を前記標的ポリヌクレオチドに挿入するための前記標的ポリヌクレオチド内の組換え部位と前記ドナー核酸内の組換え部位との組換えを媒介することができる、請求項４１に記載のゲノム編集複合体。
【請求項４３】
前記ゲノム編集複合体の平均直径が、約１０ｎｍ～約３００ｎｍの間である、請求項１から４２のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【請求項４４】
請求項１から４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子。
【請求項４５】
前記コアが、１つまたは複数の追加の、請求項１から４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体をさらに含む、請求項４４に記載のナノ粒子。
【請求項４６】
前記コアが、前記標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのドナー核酸であって、前記標的ポリヌクレオチドの前記修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含むドナー核酸をさらに含み、前記ドナー核酸が、第２の細胞膜透過ペプチドと複合体を形成している、請求項４４または４５に記載のナノ粒子。
【請求項４７】
前記第２の細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、請求項４６に記載のナノ粒子。
【請求項４８】
前記第２の細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項４７に記載のナノ粒子。
【請求項４９】
前記修飾が、前記標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である、請求項４６から４８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項５０】
前記ドナー核酸が、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである、請求項４９に記載のナノ粒子。
【請求項５１】
前記修飾が、前記標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入である、請求項４６から４８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項５２】
前記ドナー核酸が、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームに隣接した異種核酸を含む二本鎖ＤＮＡであり、前記５’ホモロジーアームおよび前記３’ホモロジーアームが、修飾される前記標的ポリヌクレオチドの領域に隣接する配列と相同である、請求項５１に記載のナノ粒子。
【請求項５３】
前記コアが、１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するための１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む、請求項４６から５２のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項５４】
前記ナノ粒子中の前記細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部が、連結によりターゲティング部分に連結している、請求項４４から５３のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項５５】
前記コアが、末梢細胞膜透過ペプチドを含むシェルにより被覆されている、請求項４４から５３のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項５６】
前記末梢細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、請求項５５に記載のナノ粒子。
【請求項５７】
前記末梢細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項５６に記載のナノ粒子。
【請求項５８】
前記シェル内の前記末梢細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部が、連結によりターゲティング部分に連結している、請求項５５から５７のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項５９】
前記連結が、共有結合である、請求項５４または５８に記載のナノ粒子。
【請求項６０】
前記ナノ粒子の平均直径が、約１０ｎｍ～約４００ｎｍの間である、請求項４４から５９のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項６１】
請求項１から４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体または請求項４４から６０のいずれか一項に記載のナノ粒子と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項６２】
第３の細胞膜透過ペプチドと、外来性タンパク質をコードする核酸分子とを含む発現複合体をさらに含む、請求項６１に記載の医薬組成物。
【請求項６３】
前記外来性タンパク質が、細胞の表面で発現され得る組換え受容体である、請求項６２に記載の医薬組成物。
【請求項６４】
前記組換え受容体が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である、請求項６３に記載の医薬組成物。
【請求項６５】
前記第３の細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、請求項６２から６４のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項６６】
前記第３の細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６５に記載の医薬組成物。
【請求項６７】
請求項１から１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を調製する方法であって、前記細胞膜透過ペプチドを前記１つまたは複数のゲノム編集システム分子と組み合わせるステップを含み、それによって前記ゲノム編集複合体を形成する方法。
【請求項６８】
前記１つまたは複数のゲノム編集システム分子が、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含み、前記細胞膜透過ペプチドと前記ＲＧＥＮが、それぞれ約１：１～約８０：１の比で組み合わせられ、前記ＲＧＥＮと前記ｇＲＮＡが、それぞれ約１０：１～約１：１０の比で組み合わせられる、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記細胞膜透過ペプチドと前記ＲＧＥＮが、それぞれ約５：１～約２０：１の比で組み合わせられる、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記ＲＧＥＮと前記ｇＲＮＡが、約１：１の比で組み合わせられる、請求項６８または６９に記載の方法。
【請求項７１】

ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を細胞に送達する方法であって、前記細胞を請求項１から４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体または請求項４４から６０のいずれか一項に記載のナノ粒子と接触させるステップを含み、前記ゲノム編集複合体または前記ナノ粒子が、前記１つまたは複数のゲノム編集システム分子を含む、方法。

【請求項７２】

前記細胞を前記ゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させる前記ステップが、ｉｎｖｉｖｏで行われる、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

前記細胞を前記ゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させる前記ステップが、ｅｘｖｉｖｏで行われる、請求項７１に記載の方法。

【請求項７４】

前記細胞を前記ゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させる前記ステップが、ｉｎｖｉｔｒｏで行われる、請求項７１に記載の方法。

【請求項７５】

前記細胞が、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、線維芽細胞、肝細胞、肺前駆細胞、または神経細胞である、請求項７１から７４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７６】

前記細胞がＴ細胞である、請求項７５に記載の方法。

【請求項７７】

前記ゲノム編集システムが、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＴＩＭ－１、ＣＤ２８、ＨＶＥＭ、ＧＩＴＲおよびＩＣＯＳからなる群から選択される遺伝子内の配列を標的とする、請求項７５または７６に記載の方法。

【請求項７８】

前記細胞を、第４の細胞膜透過ペプチドと外来性タンパク質をコードする核酸分子とを含む発現複合体と接触させるステップをさらに含む、請求項７１から７７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７９】

前記外来性タンパク質が、細胞の表面で発現され得る組換え受容体である、請求項７８に記載の方法。

【請求項８０】

前記組換え受容体が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である、請求項７９に記載の方法。

【請求項８１】

前記第４の細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、請求項７８から８０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８２】

前記第４の細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８１に記載の方法。

【請求項８３】

細胞内の標的ポリヌクレオチドを修飾する方法であって、前記細胞を、請求項１から４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体または請求項４４から６０のいずれか一項に記載のナノ粒子と接触させるステップを含み、前記ゲノム編集複合体または前記ナノ粒子が、前記標的ポリヌクレオチド内の配列を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、方法。

【請求項８４】

個体の疾患を処置する方法であって、前記個体に請求項６１から６６のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項８５】

前記疾患が、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼疾患、肝臓疾患、肺疾患、腎臓疾患、加齢および変性疾患、ならびにコレステロールレベル異常を特徴とする疾患からなる群から選択される、請求項８４に記載の方法。

【請求項８６】

前記疾患が、がんである、請求項８５に記載の方法。

【請求項８７】

前記がんが、固形腫瘍であり、前記医薬組成物が、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、腫瘍抑制因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子からなる群から選択される１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、請求項８６に記載の方法。

【請求項８８】

前記がんが、肝臓、肺または腎臓のがんである、請求項８７に記載の方法。

【請求項８９】

前記がんが、血液悪性腫瘍であり、前記医薬組成物が、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、腫瘍抑制因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子からなる群から選択される１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、請求項８６に記載の方法。

【請求項９０】

前記疾患が、ウイルス感染疾患であり、前記医薬組成物が、ウイルス感染性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、請求項８５に記載の方法。

【請求項９１】

前記疾患が、遺伝性疾患であり、前記医薬組成物が、前記遺伝性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、請求項８５に記載の方法。

【請求項９２】

前記疾患が、加齢または変性疾患であり、前記医薬組成物が、前記加齢または変性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、請求項８５に記載の方法。

【請求項９３】

前記疾患が、線維性または炎症性疾患であり、前記医薬組成物が、前記線維性または炎症性疾患の発症および／または進行に関与する２つまたはそれより多いタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、請求項８５に記載の方法。

【請求項９４】

前記個体がヒトである、請求項８４から９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５】

請求項１から４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体および／または請求項４４から６０のいずれか一項に記載のナノ粒子を含む組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本願は、２０１６年５月２７日に出願された米国仮出願第６２／３４２，８２３号、２０１６年９月１３日に出願された米国仮出願第６２／３９４，１４０号、および２０１７年３月２７日に出願された米国仮出願第６２／４７７，３５７号の優先権を主張し、これらすべての全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本発明は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質および核酸などの、ゲノム編集システムの１つもしくは複数の分子の安定化ならびに／または細胞への送達に有用である、ペプチド含有複合体／ナノ粒子に関する。

ＡＳＣＩＩテキストファイルでの配列表の提出

【０００３】

ＡＳＣＩＩテキストファイルでの以下の提出内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられている：コンピュータ読み取り可能な形式（ＣＲＦ）の配列表（ファイル名：７３７３７２０００８４０ＳｅｑＬｉｓｔ．ｔｘｔ、記録日：２０１７年５月２６日、サイズ：４８ＫＢ）。

【背景技術】

【０００４】

ＣＲＩＳＰＲ干渉技術には、ヒト、動物および他の生物の生殖細胞系列の変更ならびに食用作物の遺伝子の修飾を含む、非常に多くの潜在的用途がある。Ｃａｓ９またはＣｐｆ１などのＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ、および適切なガイドＲＮＡを細胞に送達することにより、生物のゲノムをほぼいずれの所望の位置でも切断することができる（Ledford、H.（２０１５年）．Nature．５２２巻（７５５４頁）；Zetscheら、（２０１５年）．Cell．１６３巻（３号）：７５９～７７１頁）。ＣＲＩＳＰＲは、多くの異なる種においてゲノム編集および遺伝子制御のために特異的エンドヌクレアーゼ酵素と連携して使用されている（Maliら、（２０１３年）．Nature Methods．１０巻（１０号）：９５７～６３頁）。ＣＲＩＳＰＲツールは、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）媒介変異導入を用いる二本鎖切断形成（Wangら、（２０１３年）．Cell．１５３巻：９１０～９１８頁）、ＮＨＥＪ媒介変異導入を用いるニック形成（Chengら．（２０１４年）．FEBS Lett．５８８巻：３９５４～３９５８頁）、相同組換え修復（ＨＤＲ）を用いるノックイン（Inuiら．（２０１４年）．Sci．Rep．４巻：５３９６頁）、およびゲノム再編成（Maddaloら．（２０１４年）Nature．５１６巻：４２３～４２７頁）を含む、様々なゲノム修飾に使用されており、遺伝子発現を抑止または活性化する方法における使用に好適である。ヌクレアーゼ欠損Ｃａｓヌクレアーゼを使用して、転写活性化因子の結合を遮断して特異的遺伝子の発現を阻止すること、転写活性化因子を送達して特定の遺伝子の発現を刺激すること、または標的配列にエピジェネティック修飾因子を送達してヒストンメチル化もしくはアセチル化を変化させることができる（Ledford，H．（２０１６年）．Nature．５３１巻：１５６～１５９頁）。

本明細書で言及するすべての刊行物、特許、特許出願および公開特許出願の開示は、それら全体が本明細書での参照により本明細書に組み入れられている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Ledford、H.（２０１５年）．Nature．５２２巻（７５５４頁）
【非特許文献２】Zetscheら、（２０１５年）．Cell．１６３巻（３号）：７５９～７７１頁
【非特許文献３】Maliら、（２０１３年）．Nature Methods．１０巻（１０号）：９５７～６３頁
【非特許文献４】Wangら、（２０１３年）．Cell．１５３巻：９１０～９１８頁
【非特許文献５】Chengら．（２０１４年）．FEBS Lett．５８８巻：３９５４～３９５８頁
【非特許文献６】Inuiら．（２０１４年）．Sci．Rep．４巻：５３９６頁

【非特許文献７】Maddaloら.（２０１４年） Nature. ５１６巻：４２３～４２７頁
【非特許文献８】Ledford, H. （２０１６年）. Nature. ５３１巻：１５６～１５９頁

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本出願は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質および核酸などの、ゲノム編集システムの１つもしくは複数の分子の安定化ならびに／または細胞への送達に有用である、細胞膜透過ペプチドを含む複合体およびナノ粒子を提供する。
【０００７】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）およびガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含むＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合している細胞膜透過ペプチドを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。
【０００８】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチドと、標的ポリヌクレオチドを標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子とを含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、ａ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）、および標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）；ｂ）ＤＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＤＧＥＮ）、および標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドＤＮＡ（ｇＤＮＡ）；ｃ）標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識するジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）；ｄ）標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識する転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）；ｅ）標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識するホーミングエンドヌクレアーゼ；およびｆ）標的ポリヌクレオチド内の組換え部位を認識するインテグラーゼからなる群から選択される。
【０００９】
一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、細胞膜透過ペプチドは、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号１～１４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号７５または７６のアミノ酸配列を含む。
【００１０】
一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号１５～４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号７７のアミノ酸配列を含む。
【００１１】
一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、細胞膜透過ペプチドは、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号４１～５２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号７８のアミノ酸配列を含む。
【００１２】
一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、細胞膜透過ペプチドは、ＡＤＧＮ－１００ペプチドである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号５３～７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号７９または８０のアミノ酸配列を含む。

【００１３】
一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、細胞膜透過ペプチドは、細胞膜透過ペプチドのＮ末端に共有結合によって連結している１つまたは複数の部分をさらに含み、１つまたは複数の部分は、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖類およびターゲティング分子からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、そのＮ末端に共有結合によって連結しているアセチル基を含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞膜透過ペプチドのＣ末端に共有結合によって連結している１つまたは複数の部分をさらに含み、１つまたは複数の部分は、システアミド、システイン、チオール、アミド、任意選択で置換されているニトリロ三酢酸、カルボキシル、任意選択で置換されている直鎖状または分枝状C_1～C_6アルキル、一級または二級アミン、オシド（osidic）誘導体、脂質、リン脂質、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖類およびターゲティング分子からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、そのＣ末端に共有結合によって連結しているシステアミド基を含む。

【００１４】
一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、ゲノム編集複合体内の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、連結によりターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。

【００１５】
一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、ｇＲＮＡは、単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している、特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。

【００１６】
一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【００１７】
一部の実施形態では、ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む上記ゲノム編集複合体のいずれかによれば、ＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１０～約１０：１の間である。

【００１８】
一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。

【００１９】
一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、標的配列は、標的遺伝子内に存在し、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡは、標的遺伝子内の配列に相補的なガイド配列を個々に含む。一部の実施形態では、標的配列は、第１の標的遺伝子内に存在し、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡは、１つまたは複数の追加の標的遺伝子内に存在する配列に相補的なガイド配列を個々に含む。

【００２０】
一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、１つまたは複数の

ゲノム編集システム分子は、ＺＦＰを含む。一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、ＴＡＬＥＮを含む。一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、ホーミングエンドヌクレアーゼを含む。

【００２１】

一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、ゲノム編集複合体は、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのドナー核酸であって、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームに隣接した異種核酸を含む二本鎖ＤＮＡであり、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、修飾される標的ポリヌクレオチドの領域に隣接する配列と相同である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するための１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のドナー核酸の各々は、１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドのうちの１つについての修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含む。

【００２２】

一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、インテグラーゼを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、標的ポリヌクレオチドへの挿入のためのドナー核酸をさらに含み、インテグラーゼは、ドナー核酸内の組換え部位を認識し、ドナー核酸を標的ポリヌクレオチドに挿入するための標的ポリヌクレオチド内の組換え部位とドナー核酸内の組換え部位との組換えを媒介することができる。

【００２３】

一部の実施形態では、上記のゲノム編集複合体のいずれかによれば、ゲノム編集複合体の直径平均値は、約１０ｎｍ～約３００ｎｍの間である。

【００２４】

一部の実施形態では、上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、コアは、１つまたは複数の追加の、上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体を含む。一部の実施形態では、コアは、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのドナー核酸であって、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含むドナー核酸をさらに含み、ドナー核酸は、第２の細胞膜透過ペプチドと複合体を形成している。一部の実施形態では、第２の細胞膜透過ペプチドは、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第２の細胞膜透過ペプチドは、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームに隣接した異種核酸を含む二本鎖ＤＮＡであり、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、修飾される標的ポリヌクレオチドの領域に隣接する配列と相同である。一部の実施形態では、コアは、１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するための１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含み、１つまたは複数の追加のドナー核酸の各々は、１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドのうちの１つについての修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、１つまたは複数の追加のドナー核酸の各々は、細胞

膜透過ペプチドと複合体を形成している。一部の実施形態では、ナノ粒子中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、連結によりターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、コアは、末梢細胞膜透過ペプチドを含むシェルにより被覆されている。一部の実施形態では、シェル中の末梢細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、連結によりターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、末梢細胞膜透過ペプチドは、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、末梢細胞膜透過ペプチドは、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値は、約１０ｎｍ～約４００ｎｍの間である。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値は、約５０ｎｍ～約３００ｎｍの間である。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値は、約８０ｎｍ～約２００ｎｍの間である。

【００２５】

一部の実施形態では、上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体または上記の実施形態のいずれかによるナノ粒子と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈内、腫瘍内、動脈内、局所、眼内、眼科的、門脈内、頭蓋内、脳内、側脳室内、髄腔内、膀胱内、皮内、皮下、筋肉内、鼻腔内、気管内、肺、空洞内または経口投与用に製剤化されている。一部の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥されている。一部の実施形態では、医薬組成物は、第３の細胞膜透過ペプチドと、外来性タンパク質をコードする核酸分子とを含む発現複合体をさらに含む。一部の実施形態では、外来性タンパク質は、細胞の表面で発現され得る組換え受容体である。一部の実施形態では、組換え受容体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。一部の実施形態では、第３の細胞膜透過ペプチドは、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第３の細胞膜透過ペプチドは、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２６】

一部の実施形態では、上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体を調製する方法であって、細胞膜透過ペプチドをＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と組み合わせるステップを含み、それによってゲノム編集複合体を形成する方法が提供される。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と約１：１～約８０：１の比で組み合わせられる。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と約５：１～約２０：１の比で組み合わせられる。

【００２７】

一部の実施形態では、上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体を調製する方法であって、細胞膜透過ペプチドを１つまたは複数のゲノム編集システム分子と組み合わせるステップを含み、それによってゲノム編集複合体を形成する方法が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集システム分子は、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含み、細胞膜透過ペプチドおよびＲＧＥＮは、それぞれ約１：１～約８０：１の比で組み合わせられ、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡは、それぞれ約１０：１～約１：１０の比で組み合わせられる。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドおよびＲＧＥＮは、それぞれ約５：１～約２０：１の比で組み合わせられる。一部の実施形態では、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡは、約１：１の比で組み合わせられる。

【００２８】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を細胞に送達する方法であって、細胞を上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体または上記の実施形態のいずれかによるナノ粒子と接触させるステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システム分子を含む、方法が提供される。一部の実施形態では、細胞をゲノム編集複合体ナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞をゲノム編集複合体ナノ粒子と接触させるステ

ップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞をゲノム編集複合体ナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、細胞は、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、線維芽細胞、または肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、Ｔ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、線維芽細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肺前駆細胞である。一部の実施形態では、細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＴＩＭ－１、ＣＤ２８、ＨＶＥＭ、ＧＩＴＲ、およびＩＣＯＳからなる群から選択される遺伝子内の配列を標的とする。一部の実施形態では、方法は、細胞を、第４の細胞膜透過ペプチドと外来性タンパク質をコードする核酸分子とを含む発現複合体と接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、外来性タンパク質は、細胞の表面で発現され得る組換え受容体である。一部の実施形態では、組換え受容体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。一部の実施形態では、第４の細胞膜透過ペプチドは、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第４の細胞膜透過ペプチドは、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２９】

一部の実施形態では、細胞内の標的ポリヌクレオチドを修飾する方法であって、細胞を、上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体または上記の実施形態のいずれかによるナノ粒子と接触させるステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、標的ポリヌクレオチド内の配列を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、方法が提供される。

【００３０】

一部の実施形態では、個体の疾患を処置する方法であって、個体に上記の実施形態のいずれかによる医薬組成物の有効量を投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、疾患は、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼疾患、肝臓疾患、肺疾患、腎臓疾患、ならびに加齢および変性疾患からなる群から選択される。一部の実施形態では、疾患はがんである。一部の実施形態では、がんは、固形腫瘍であり、医薬組成物は、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子からなる群から選択される１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、がんは、肝臓、肺または腎臓のがんである。一部の実施形態では、がんは、血液悪性腫瘍であり、医薬組成物は、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子からなる群から選択される１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。

【００３１】

一部の実施形態では、上記の疾患を治療する方法のいずれかによれば、疾患は、ウイルス感染疾患であり、医薬組成物は、ウイルス感染性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。

【００３２】

一部の実施形態では、上記の疾患を治療する方法のいずれかによれば、疾患は、遺伝子疾患であり、医薬組成物は、遺伝性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、

ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。
【００３３】
一部の実施形態では、上記の疾患を治療する方法のいずれかによれば、疾患は、加齢または変性疾患であり、医薬組成物は、加齢または変性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。
【００３４】
一部の実施形態では、上記の疾患を治療する方法のいずれかによれば、疾患は、線維性または炎症性疾患であり、医薬組成物は、線維性または炎症性疾患の発症および／または進行に関与する２つまたはそれより多いタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。
【００３５】
一部の実施形態では、上記の疾患を処置する方法のいずれかによれば、個体はヒトである。
【００３６】
一部の実施形態では、上記の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体および／または上記の実施形態のいずれかによるナノ粒子を含む組成物を含むキットが提供される。
【図面の簡単な説明】
【００３７】
【図１Ａ】図１Ａは、ＣＹ－５の蛍光によりモニターしたＣＰＰに対するＣＡＳ９の結合タイトレーション曲線を示す。ＶＥＰＥＰ－３ｂ（配列番号７６）、ＶＥＰＥＰ－６（配列番号７７）、ＶＥＰＥＰ－９（配列番号７８）、ＣＡＤＹ（配列番号８１）、およびＡＤＧＮ－１００ｂ（配列番号８０）ペプチドの濃度を増加させることによって、５ｎＭの固定濃度の蛍光標識ＣＡＳ９をタイトレーションした。解離定数は、二次方程式を使用してデータフィッティングから算出した。
【００３８】
【図１Ｂ】図１Ｂは、ＣＹ－５の蛍光によりモニターしたＣＰＰに対するＣＡＳ９：ｇＲＮＡの結合タイトレーション曲線を示す。ＶＥＰＥＰ－３ｂ（配列番号７６）、ＶＥＰＥＰ－６（配列番号７７）、ＶＥＰＥＰ－９（配列番号７８）、ＣＡＤＹ（配列番号８１）、およびＡＤＧＮ－１００ｂ（配列番号８０）ペプチドの濃度を増加させることによって、５ｎＭの固定濃度の蛍光標識ＣＡＳ９：ｇＲＮＡをタイトレーションした。解離定数は、二次方程式を使用してデータフィッティングから算出した。
【００３９】
【図２Ａ】図２Ａは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＵ２ＯＳ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：５のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００４０】
【図２Ｂ】図２Ｂは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＵ２ＯＳ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：１０のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００４１】
【図２Ｃ】図２Ｃは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＵ２ＯＳ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：２０のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。

【００４２】
【図２Ｄ】図２Ｄは、異なるペプチドを使用したＵ２ＯＳにおけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度の用量応答を示す。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸを対照として使用した。括弧内の値は、ペプチドとＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体のモル比を示した。
【００４３】
【図３Ａ】図３Ａは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＨＥＫ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：５のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００４４】
【図３Ｂ】図３Ｂは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＨＥＫ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：１０のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００４５】
【図３Ｃ】図３Ｃは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＨＥＫ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：２０のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００４６】
【図３Ｄ】図３Ｄは、異なるペプチドを使用したＨＥＫ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度の用量応答を示す。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸを対照として使用した。括弧内の値は、ペプチドとＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体のモル比を示した。
【００４７】
【図４Ａ】図４Ａは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＪＵＲＫＡＴ　Ｔ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：５０のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００４８】
【図４Ｂ】図４Ｂは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＪＵＲＫＡＴ　Ｔ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：１０のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００４９】
【図４Ｃ】図４Ｃは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＪＵＲＫＡＴ　Ｔ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：２０のモル比で異なるペプチドと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。
【００５０】
【図４Ｄ】図４Ｄは、異なるペプチドを使用したＪＵＲＫＡＴ　Ｔ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度の用量応答を示す。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸを対照として使用した。括弧内の値は、ペプチドとＣＡＳ９

：ｇＲＮＡ複合体のモル比を示した。
【００５１】
【図５Ａ】図５Ａは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＵ２ＯＳ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：２０のモル比でＶＥＰＥＰ－３およびＡＤＧＮ－１００のバリアント配列と会合させた。ＲＮＡｉＭＡＸを対照送達システムとして使用した。
【００５２】
【図５Ｂ】図５Ｂは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＪＵＲＫＡＴ　Ｔ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：２０のモル比でＶＥＰＥＰ－３およびＡＤＧＮ－１００のバリアント配列と会合させた。ＲＮＡｉＭＡＸを対照送達システムとして使用した。
【００５３】
【図６Ａ】図６Ａは、ＭＴＴアッセイにより測定したＵ２ＯＳ細胞に対するＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよびＶＥＰＥＰ－３ｂ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性評価を示す。ペプチドを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと複合体を形成したＣＡＳ９／ｇＲＮＡと比較した。括弧内の値は、ペプチドとＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体のモル比を示した。
【００５４】
【図６Ｂ】図６Ｂは、ＭＴＴアッセイにより測定したＨＥＫ細胞に対するＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよびＶＥＰＥＰ－３ｂ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性評価を示す。ペプチドをＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと比較した。括弧内の値は、ペプチドとＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体のモル比を示した。
【００５５】
【図６Ｃ】図６Ｃは、ＭＴＴアッセイにより測定したＪＵＲＫＡＴ細胞に対するＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよびＶＥＰＥＰ－３ｂ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性評価を示す。ペプチドをＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと比較した。括弧内の値は、ペプチドとＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体のモル比を示した。
【００５６】
【図７Ａ】図７Ａは、Ｕ２ＯＳ細胞におけるＥＭＸ１遺伝子編集を示す。ＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、またはＲＮＡｉＭＡＸのいずれかと会合した２５ｎＭのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを細胞にトランスフェクトした。細胞試料をＴ７ＥＩ法により解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、非切断対切断ＤＮＡの量を定量化することによって挿入欠失（indel）の結果を決定し、表３に報告した。
【００５７】
【図７Ｂ】図７Ｂは、Ｋ５６２細胞におけるＥＭＸ１遺伝子編集を示す。ＶＥＰＥＰ－ｂ３、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、またはＲＮＡｉＭＡＸのいずれかと会合した２５ｎＭのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを細胞にトランスフェクトした。細胞試料をＴ７ＥＩ法により分析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、非切断対切断ＤＮＡの量を定量化することによって挿入欠失の結果を決定し、表３に報告した。
【００５８】
【図７Ｃ】図７Ｃは、ＪＵＲＫＡＴ細胞におけるＥＭＸ１遺伝子編集を示す。ＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、またはＲＮＡｉＭＡＸのいずれかと会合した２５ｎＭのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを細胞にトランスフェクトした。細胞試料をＴ７ＥＩ法により解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、非切断対切断ＤＮＡの量を定量化することによって挿入欠失の結果を決定し、表３に報告した。
【００５９】

【図８Ａ】図８Ａは、ＥＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ細胞におけるＥＭＸ１遺伝子編集を示す。ＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、またはＲＮＡｉＭＡＸのいずれかと会合した２５ｎＭのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを細胞にトランスフェクトした。細胞試料をＴ７ＥＩ法により解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、非切断対切断ＤＮＡの量を定量化することによって挿入欠失の結果を決定し、表４に報告した。

【００６０】

【図８Ｂ】図８Ｂは、ＥＧＦＰ－ＪＵＲＫＡＴ細胞におけるＥＭＸ１遺伝子編集を示す。ＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、またはＲＮＡｉＭＡＸのいずれかと会合した２５ｎＭのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを細胞にトランスフェクトした。細胞試料をＴ７ＥＩ法により解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、非切断対切断ＤＮＡの量を定量化することによって挿入欠失の結果を決定し、表４に報告した。

【００６１】

【図８Ｃ】図８Ｃは、フローサイトメトリーにより定量化したＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡの送達からのＵ２ＯＳ細胞およびＪＵＲＫＡＴ　Ｔ細胞の両方におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。２５ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体をそれぞれ１：２０のモル比でＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａと、ならびにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸと会合させた。

【００６２】

【図９Ａ】図９Ａは、Ｕ２ＯＳ細胞におけるＥＭＸ１遺伝子中のＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｈｅＩ制限酵素部位のＨＤＲ挿入効率の解析を示す。ＨＤＲ編集のパーセントは、ＥＭＸＩ　ＰＣＲアンプリコンのＮｈｅＩ消化によるＲＦＬＰアッセイを使用して算出した。

【００６３】

【図９Ｂ】図９Ｂは、ＪＵＲＫＡＴ細胞におけるＥＭＸ１遺伝子中のＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｈｅＩ制限酵素部位のＨＤＲ挿入効率の解析を示す。ＨＤＲ編集のパーセントは、ＥＭＸＩ　ＰＣＲアンプリコンのＮｈｅＩ消化によるＲＦＬＰアッセイを使用して算出した。

【００６４】

【図１０】図１０は、ＡＤＧＮ－１００ａペプチドを使用したＣＡＳ９発現プラスミドおよびｓｇＲＮＡの共送達からのＵ２ＯＳ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。ＣＡＳ９発現プラスミドおよびｓｇＲＮＡを、ＡＤＧＮ－１００ａと、ＣＡＳ９発現プラスミドおよびｓｇＲＮＡのそれぞれのモル比１０：１または２０：１（括弧内の値によって示す）でＡＤＧＮ－１００ａと、およびｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００と会合させた。

【００６５】

【図１１】図１１は、ＡＤＧＮ－１００ａ／プラスミド複合体のトランスフェクション効率を示す。２つの濃度（２μｇおよび５μｇ）で抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするプラスミドを含有するＡＤＧＮ－１００ａ粒子を初代Ｔ細胞にトランスフェクトした。４日目に、プロテインＬのアッセイを使用してフローサイトメトリーによって抗ＣＤ１９－ＣＡＲの発現を評価した。トランスフェクトされなかった細胞に対してデータを正規化し、遊離プラスミドとインキュベートした細胞と比較した。

【００６６】

【図１２】図１２は、ＡＤＧＮ－１００ａ／プラスミド複合体によるトランスフェクション後の初代Ｔ細胞の生存能を示す。２つの濃度（２μｇおよび５μｇ）で抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするプラスミドを含有するＡＤＧＮ－１００ａ粒子を初代Ｔ細胞にトランスフェクトした。４日目に、７－ＡＡＤを使用してフローサイトメトリーによって細胞生存能を定量化した。トランスフェクトされなかった細胞に対してデータを正規化し、遊離プラスミドとインキュベートしたＴ細胞と比較した。

【００６７】

【図１３】図１３は、ペプチド／ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と組み合わせて使用したＡＤＧＮ－１００ａ／プラスミド複合体のトランスフェクション効率を示す。抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするプラスミドを含有するＡＤＧＮ－１００ａ粒子（５μｇ）およびｇＲＮＡ／ＣＡＳ９複合体を含有するペプチド粒子を初代Ｔ細胞にトランスフェクトした。６日目に、プロテインＬのアッセイを使用してフローサイトメトリーによって抗ＣＤ１９－ＣＡＲの発現を評価した。トランスフェクトされなかった細胞に対してデータを正規化し、遊離プラスミドとインキュベートした細胞と比較した。

【００６８】

【図１４】図１４は、ＭＴＴアッセイにより測定したＪＵＲＫＡＴ細胞およびＫ５６２細胞に対するＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよびＶＥＰＥＰ－３ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性評価を示す。ＲＮＡｉＭＡＸによるＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の送達を比較のために含めた。

【００６９】

【図１５】図１５は、ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体を含有するＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａ粒子によるトランスフェクション後の初代Ｔ細胞の生存能を示す。２つの濃度（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよび２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）でＣＡＳ９／ｇＲＮＡ粒子を含有するＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａ粒子をＴ細胞にトランスフェクトした。４８時間後、７－ＡＡＤを使用してフローサイトメトリーによって細胞生存能を定量化した。トランスフェクトされなかった細胞に対してデータを正規化し、遊離ＣＡＳ９／ｇＲＮＡとインキュベートしたＴ細胞と比較した。

【００７０】

【図１６】図１６Ａおよび１６Ｂは、Ｔ７Ｅ１アッセイにより定量化した、ＣＡＳ９／ｇＲＮＡにより媒介される初代ヒト線維芽細胞（図１６Ａ）または初代ヒト肝細胞（図１６Ｂ）におけるＥＭＸ１およびＨＰＲＴ内因性遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。ＡＤＧＮ－１００ａ（ペプチド対複合体について２０：１のモル比）またはＲＮＡｉＭＡＸのいずれかによってＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（１０ｎＭ、２０ｎＭ、または５０ｎＭ）を送達した。

【００７１】

【図１７】図１７Ａおよび１７Ｂは、ＭＴＴアッセイにより測定したヒト初代線維芽細胞（図１７Ａ）またはヒト初代肝細胞（図１７Ｂ）に対するＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性評価を示す。ペプチド媒介性の送達をＲＮＡｉＭＡＸによる送達と比較した。

【００７２】

【図１８】図１８は、ＡＤＧＮ－１００ａまたはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００のいずれかを使用してＣＳＡ９　ｍＲＮＡ（０．２μｇまたは０．５μｇ）をトランスフェクトしたＵ２ＯＳ細胞におけるＣＡＳ９タンパク質発現のウエスタンブロット解析および定量化を示す。

【００７３】

【図１９】図１９は、フローサイトメトリーにより定量化した、ＣＡＳ９／ｇＲＮＡまたはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡのＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の送達によるＵ２ＯＳ細胞におけるＥＧＦＰレポーター遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ（２．５μＭ／５μＭ）またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（０．５μｇ／５μｇ）複合体をペプチド媒介性の送達のために２０：１（ペプチド対複合体）のモル比でＡＤＧＮ－１００ａと会合させ、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００またはＲＮＡｉＭＡＸによる送達と比較した。

【００７４】

【図２０】図２０Ａおよび２０Ｂは、ペプチドとｍＲＮＡとの２０：１のモル比でＡＤＧＮ－１００ａペプチドと会合させたＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（１０μｇ）のｉｎ　ｖｉｖｏ投与後の異なる組織におけるウエスタンブロット（図２０Ａ）またはＥＬＩＳＡ（図２０Ｂ）によるＣＡＳ９タンパク質発現の定量化を示す。組織をホモジナイズし、ＣＲＩＳＰＲ

／Ｃａｓ９に対する抗体を使用してタンパク質抽出物に対してウエスタンブロットまたはＥＬＩＳＡによりＣＡＳ９発現を解析した。

【００７５】

【図２１】図２１は、遊離ＡＤＧＮ－１００ａペプチド（２匹の動物／群）、遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（２匹の動物／群）、またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ＡＤＧＮ－１００ａ（群あたり３匹の動物）の注射の７２時間後のルシフェラーゼ発現についての動物全体の蛍光イメージングを示す。

【００７６】

【図２２】図２２は、蛍光イメージングにより定量化した、ｍＲＮＡ　ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡのＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の送達に起因する肝臓におけるルシフェラーゼレポーター遺伝子のｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子破壊頻度を示す。遊離ＡＤＧＮ－１００ａペプチド、遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ、またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ＡＤＧＮ－１００ａの単回静脈注射をマウスに与えた。１群あたり３匹の動物（Ｍ１、Ｍ２、およびＭ３と称する）。

【００７７】

【図２３】図２３は、２０：１のペプチドとｍＲＮＡ／ｇＲＮＡのモル比でＡＤＧＮ－１００ａペプチドと会合させたＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（１０μｇ）のｉｎ　ｖｉｖｏ投与後の異なる組織におけるＣＡＳ９タンパク質発現についてのＥＬＩＳＡ解析を示す。組織をホモジナイズし、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体を使用してタンパク質抽出物に対してＥＬＩＳＡによりＣＡＳ９発現を解析した。

【００７８】

【図２４】図２４は、Ｔ細胞におけるβ２ミクログロブリン遺伝子編集のＦＡＣＳ解析を示す。ＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａのいずれかとの会合またはエレクトロポレーションによってＣＡＳ９／ｇＲＮＡ（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）をＴ細胞にトランスフェクトした。遊離ＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよび非処理条件を対照として含めた。β２ミクログロブリン発現を７２時間後にＦＡＣＳにより評価した。

【００７９】

【図２５】図２５Ａおよび２５Ｂは、Ｔ細胞に対するＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性解析を示す。ＰＢＭＣから単離したＴ細胞を、ＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ｂと会合させたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体で処理するか、またはＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体をエレクトロポレートし、４８時間後にＭＴＴアッセイによって（図２５Ａ）、および７２時間後に活性化損傷誘発細胞死（activation damage-induced cell death）（ＤＩＣＤ）をモニターすることによって（図２５Ｂ）、毒性を評価した。非処理、遊離ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ、遊離ＡＤＧＮ－１００ａ、および遊離ＶＥＰＥＰ－３ｂの条件を対照として含めた。

【００８０】

【図２６】図２６は、ＰＣＲのゲル解析により定量化した、ＣＡＳ９／ｇＲＮＡのＶＥＰＥＰ－３ｂ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の送達による未分化のおよび分化したマウス筋肉筋芽細胞（Ｃ２Ｃ１２）におけるβ－カテニン遺伝子の遺伝子破壊を示す。２０：１（ペプチド対複合体）のモル比でＣＰＰと会合させた（＋）またはさせなかった（－）ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ（２．５μＭ／５μＭ）複合体を細胞にトランスフェクトし、β－カテニン発現についてＲＮＡｉＭＡＸによる送達と比較した。β－アクチン発現をローディング対照として含めた。

【００８１】

【図２７】図２７は、ＣＡＳ９／ｇＲＮＡのＶＥＰＥＰ－３ｂ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の送達による未分化のおよび分化したマウス筋肉筋芽細胞（Ｃ２Ｃ１２）におけるＨＰＲＴ遺伝子の遺伝子破壊効率を示す。細胞試料をＴ７ＥＩ法により解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、非切断対切断ＤＮＡの量を定量化することによって挿入欠失の結果を決定した。ＲＮＡｉＭＡＸによる送達を対照として含めた。

【００８２】
【図２８】図２８Ａ～２８Ｄは、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、もしくはＶＥＰＥＰ－３ａペプチド、またはＲＮＡｉＭＡＸを使用してＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）をトランスフェクトした異なる細胞種におけるＥＬＩＳＡによるＣＡＳ９タンパク質発現の定量化を示す。図２８ＡはＵ２ＯＳ細胞についての結果を示す。図２８ＢはＨＥＰＧ２細胞についての結果を示す。図２８Ｃは初代ヒト線維芽細胞についての結果を示す。図２８ＤはＫ５６２細胞についての結果を示す。
【００８３】
【図２９】図２９Ａ～２９Ｄは、Ｔ７Ｅ１アッセイにより定量化した、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡにより媒介されるＵ２ＯＳ細胞（図２９Ａ）、ＨＥＰＧ２細胞（図２９Ｂ）、初代ヒト線維芽細胞（図２９Ｃ）、またはＫ５６２細胞（図２９Ｄ）における内因性ＥＭＸ１遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、もしくはＶＥＰＥＰ－３ａペプチド（ＣＰＰ対カーゴについて２０：１のモル比）、またはＲＮＡｉＭＡＸによってＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（０．５μｇ／２．５μｇ）を送達した。
【００８４】
【図３０】図３０は、ＭＴＴアッセイにより測定したＵ２ＯＳ、ＨＥＰＧ２、およびＫ５６２細胞株、ならびにヒト初代線維芽細胞に対するＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体の毒性評価を示す。ペプチド媒介性の送達をＲＮＡｉＭＡＸによる送達と比較した。
【００８５】
【図３１】図３１Ａ～３１Ｄは、Ｔ７Ｅ１アッセイにより定量化した、ＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡにより媒介されるＵ２ＯＳ細胞（図３１Ａ）、ＨＥＰＧ２細胞（図３１Ｂ）、初代ヒト線維芽細胞（図３１Ｃ）、またはＫ５６２細胞（図３１Ｄ）における内因性ＥＭＸ１遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）をペプチド媒介性の送達のために２０：１のＣＰＰとＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体のモル比でＣＰＰペプチドと混合し、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００またはＲＮＡｉＭＡＸによる送達と比較した。
【００８６】
【図３２】図３２Ａ～３２Ｃは、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、またはＶＥＰＥＰ－３ａペプチドを使用して、またはｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を使用してＣＡＳ９発現プラスミド（０．５μｇ）をトランスフェクトした異なる細胞種におけるＥＬＩＳＡによるＣＡＳ９タンパク質発現の定量化を示す。図３２ＡはＵ２ＯＳ細胞についての結果を示す。図３２ＢはＨＥＰＧ２細胞についての結果を示す。図３２Ｃは初代ヒト線維芽細胞についての結果を示す。
【００８７】
【図３３】図３３Ａ～３３Ｃは、Ｔ７Ｅ１アッセイにより定量化した、ＣＡＳ９発現プラスミドおよびｇＲＮＡにより媒介されるＵ２ＯＳ細胞（図３３Ａ）、ＨＥＰＧ２細胞（図３３Ｂ）、または初代ヒト線維芽細胞（図３３Ｃ）における内因性ＥＭＸ１遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。ＣＡＳ９発現プラスミド（０．５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）を２０：１のＣＰＰと核酸（プラスミド＋ｇＲＮＡ）のモル比でＣＰＰペプチドと混合した。ＣＡＳ９発現プラスミド／ｇＲＮＡのペプチド媒介性の送達をｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００またはＲＮＡｉＭＡＸによる送達と比較した。
【００８８】
【図３４】図３４は、ＣＰＰ／ｍＲＮＡ複合体のｉｎ　ｖｉｖｏ投与に関連する非特異的サイトカイン誘導の評価を示す。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ＡＤＧＮ－１００ａ、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ＶＥＰＥＰ－６、またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ＶＥＰＥＰ－９の単回静脈注射をマウスに与えた。Ｔｈｅ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　２０－Ｐｌｅｘ　Ｐａｎｅｌを使用して異なる時点において血清サイトカインレベルを評価した。対照は、ＬＰＳまたは遊離ｍＲＮＡの投与を含んだ。各時点について、バーは左から右

にそれぞれＴＮＦ－ａ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γ、ＩＬ１α、ＩＬ２、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ１０、ＩＬ１２（ｐ４０／ｐ７０）、ＩＬ１３、ＩＬ１７、ＩＬ１β、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＭＩＰ－１ａ、およびＦＧＦに対応する。

【００８９】

【図３５】図３５Ａ～３５Ｃは、２０：１のＣＰＰとｍＲＮＡのモル比でＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと会合させたＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）のｉｎ　ｖｉｖｏ投与の３日後（図３５Ａ）、６日後（図３５Ｂ）、および１０日後（図３５Ｃ）の様々な組織におけるＥＬＩＳＡによるＣＡＳ９タンパク質発現の定量化を示す。組織をホモジナイズし、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体を使用してタンパク質抽出物に対してＥＬＩＳＡによりＣＡＳ９発現を解析した。

【００９０】

【図３６】図３６は、２０：１のＣＰＰと核酸（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）のモル比でＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと会合させたＰＣＳＫ９エクソン１を標的とするＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）／ｇＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ投与後の異なる時点における血清ＰＣＳＫ９タンパク質レベルの定量化を示す。ＰＣＳＫ９の血清レベルは、Ｍｏｕｓｅ　Ｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｏｎｖｅｒｔａｓｅ　９／ＰＣＳＫ９　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ（ＭＰＣ－９００、Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ）を使用してＥＬＩＳＡによって決定した。

【００９１】

【図３７】図３７は、２０：１のＣＰＰと核酸（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）のモル比でＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと会合させたＰＣＳＫ９エクソン１を標的とするＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）／ｇＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ投与後の異なる時点における総血清コレステロールレベルの定量化を示す。総血清コレステロールレベルは、Ｉｎｆｉｎｉｔｙ　Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して測定した。

【００９２】

【図３８】図３８は、ＶＥＰＥＰ－３ａ／ＣＡＳ９タンパク質複合体のｉｎ　ｖｉｖｏ投与に関連する非特異的サイトカイン誘導の評価を示す。ＣＡＳ９／ＶＥＰＥＰ－３ａの単回静脈注射をマウスに与えた。血清サイトカインレベルは、Ｔｈｅ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　２０－Ｐｌｅｘ　Ｐａｎｅｌを使用して異なる時点において評価した。対照は、遊離ｃａｓ９タンパク質またはＬＰＳの投与を含んだ。各時点について、バーは左から右にそれぞれＴＮＦ－ａ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－γ、ＩＬ１α、ＩＬ２、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ１０、ＩＬ１２（ｐ４０／ｐ７０）、ＩＬ１３、ＩＬ１７、ＩＬ１β、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＭＩＰ－１ａ、およびＦＧＦに対応する。

【００９３】

【図３９】図３９Ａおよび図３９Ｂは、初代ヒトＴ細胞におけるＥＬＩＳＡにより決定したＣＡＳ９タンパク質発現の定量化を示す。図３９Ａは、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、もしくはＶＥＰＥＰ－３ａペプチド、またはＲＮＡｉＭＡＸを使用してＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）をトランスフェクトしたＴ細胞に対応する。図３９Ｂは、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、もしくはＶＥＰＥＰ－３ａペプチド、またはｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を使用してＣＡＳ９発現プラスミド（０．５μｇ）をトランスフェクトしたＴ細胞に対応する。

【００９４】

【図４０】図４０Ａ～４０Ｄは、Ｔ７Ｅ１アッセイにより定量化した、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡにより媒介されるヒト初代Ｔ細胞における内因性ＥＭＸ１遺伝子の遺伝子破壊頻度を示す。図４０Ａは、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、もしくはＶＥＰＥＰ－９（ＣＰＰ対カーゴについて２０：１のモル比）を使用して、またはＲＮＡｉＭＡＸによってＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（０．５μｇ／２．５μｇ）をトランスフェクトしたＴ細胞に対応する。図４０Ｂは、予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）をトランスフェクトしたＴ細胞に対応する。複合体をＡＤＧＮ－

１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、またはＶＥＰＥＰ－３ａ（ＣＰＰ対複合体について２０：１のモル比）と混合し、ＲＮＡｉＭＡＸによる送達と比較した。図４０Ｃは、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、もしくはＶＥＰＥＰ－９（ＣＰＰ対カーゴについて２０：１のモル比）を使用して、またはｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００／ＲＮＡｉＭＡＸによってＣＡＳ９発現プラスミド（０．５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をトランスフェクトしたＴ細胞に対応する。図４０Ｄは、ＭＴＴアッセイにより測定したヒト初代Ｔ細胞におけるｇＲＮＡと会合させたまたは会合させなかったＣＡＳ９　ｍＲＮＡ、ＣＡＳ９タンパク質、またはＣＡＳ９発現プラスミド（ＣＡＳ９　ｐｌｓ）との複合体におけるＣＰＰの毒性評価に対応する。ペプチド媒介性の送達をＲＮＡｉＭＡＸまたはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００による送達と比較した。

【発明を実施するための形態】

【００９５】

ゲノム編集技術（例えば、デザイナーヌクレアーゼに基づくゲノム修飾、例えばＣＲＩＳＰＲ）を治療応用可能にするために、ゲノム編集システム分子（例えば、ＣＲＩＳＰＲシステム分子）を細胞内部のそれらの標的に効率的に送達しなければならない。アデノ随伴ウイルス粒子は、遺伝子送達剤としてよく使用きたが、安全性の問題および負荷容量制限のため、ウイルス担体は、理想的な送達ビヒクルでない（Swiechら、Nat. Biotechnol.３３巻：１０２～１０６頁、２０１５年）。ゲノム編集システム分子を送達する非ウイルス手段としては、２、３例を挙げると、脂質に基づくベクター、脂質ナノ粒子、高分子ベクター、ポリエチレンイミンおよびポリ（Ｌ－リシン）が挙げられるが、ゲノム編集の（例えば、ＣＲＩＳＰＲツールを使用することによる）ｉｎ　ｖｉｖｏでの応用は、現在使用されている送達手法の制限のため、いまだ課題である（Liら（２０１５年）. Human gene therapy、２６巻（７号）：４５２～４６２頁；Wangら（２０１６年）. Proceedings of the National Academy of Sciences、１１３巻（１１号）：２８６８～２８７３頁）。したがって、ゲノム編集システム分子（例えば、ＣＲＩＳＰＲシステム分子）の単純で効率的な改善された送達方法が必要である。

【００９６】

本出願は、細胞膜透過ペプチド（ＣＰＰ）と、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子とを含む、複合体およびナノ粒子であって、ＣＰＰが、１つまたは複数のゲノム編集システム分子の安定化および／または細胞への送達に好適である、複合体およびナノ粒子を提供する。複合体およびナノ粒子は、複数のゲノム編集システム分子を含むことができ、複数のゲノム編集システム分子の一部は、ＣＰＰとの会合前に既に複合体を形成していることもある。複合体およびナノ粒子は、全ゲノム編集システムを含むことができる（例えば、複合体およびナノ粒子は、細胞に送達されたとき、ゲノム編集システムが設計される目的であるゲノムへの修飾を果すのに十分である分子を含み得る）。細胞膜透過ペプチド技術は、ウイルスベクターまたは化学的トランスフェクションより複雑でなく、毒性が低く、使用が容易である。ゲノム編集システム分子は、ゲノム編集システムの分子をコードする核酸を含むことを意図したものである。例えば、ゲノム編集システムの分子は、例えば、ａ）酵素とＲＮＡを含むこともあり、ｂ）ＲＮＡと酵素をコードする核酸とを含むこともあり、ｃ）酵素とＲＮＡをコードする核酸とを含むこともあり、またはｄ）酵素とＲＮＡの両方をコードする核酸を含むこともある。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、デザイナーヌクレアーゼ（またはデザイナーヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、ホーミングエンドヌクレアーゼ（例えば、ＡＲＣヌクレアーゼ（商標）、または核酸誘導型エンドヌクレアーゼ（ＮＧＥＮ）、例えばＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ、例えばＣａｓ９）もしくはＤＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＤＧＥＮ）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ガイド核酸（ｇＮＡ）（またはガイド核酸をコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）、例えば、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）またはガイドＤＮＡ（ｇＤＮＡ）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは

、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（clustered regularly interspaced short palindromic repeat）（ＣＲＩＳＰＲ）システム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質および／もしくは核酸、またはＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質および／もしくは核酸の１つもしくは複数をコードする核酸を含む）である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＺＦＮを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＴＡＬＥＮを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ホーミングエンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。

【００９７】

したがって、本出願は、一態様では、さらに下文でより詳細に説明される新規ゲノム編集複合体およびナノ粒子を提供する。

【００９８】

別の態様では、細胞膜透過ペプチドを使用してゲノム編集システム分子を細胞に送達する方法が提供される。

【００９９】

細胞膜透過ペプチドと、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子とを（例えば、複合体およびナノ粒子の形態で）含む医薬組成物、および疾患を処置するためのそれらの使用も提供される。

定義

【０１００】

本発明の態様では、用語「単一ガイドＲＮＡ」または「ｓｇＲＮＡ」は、ガイド配列、ｔｒａｃｒ配列およびｔｒａｃｒメイト配列を含む、ポリヌクレオチド配列を指す。用語「ガイド配列」は、標的部位を指定する、ガイドＲＮＡ内の約２０ｂｐの配列を指す。用語「ｔｒａｃｒメイト配列」は、用語「ダイレクトリピート」と同義で使用されることもある。

【０１０１】

本明細書で使用される用語「野生型」は、当業者により理解されている当技術分野の用語であり、変異体またはバリアント形態と区別される、自然界に存在する生物、株、遺伝子または特性の典型的な形態を意味する。

【０１０２】

本明細書で使用される用語「バリアント」は、自然界に存在するものから逸脱するパターンを有する質を呈することを意味すると解釈されたい。

【０１０３】

用語「天然に存在しない」または「改変された」は、同義で使用され、人手の関与を示す。核酸分子またはポリペプチドに言及するときのこれらの用語は、核酸分子またはポリペプチドには、それらが自然界で天然に会合している、自然界では見られるような、少なくとも１つの他の成分が、少なくとも実質的にないことを意味する。

【０１０４】

「相補性」は、核酸が伝統的ワトソン・クリック塩基対合または他の非伝統型のどちらかにより別の核酸配列と水素結合を形成することができることを指す。相補性パーセントは、ある核酸分子中の、もう１つの核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン－クリック塩基対合）を形成することができる残基の、パーセンテージを示す（例えば、１０のうち５、６、７、８、９、１０は、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％および１００％相補性となる）。「完全に相補的」は、核酸配列の連続する残基の全てが、別の核酸配列内の同数の連続する残基と水素結合することになることを意味する。本明細書で使用される「実質的に相補的」は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０ヌクレオチドもしくはそれより大きい領域にわたって少なくとも６０％、６５％、７０％、７５

％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％である相補性度を指すか、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする２つの核酸を指す。

【０１０５】

ハイブリダイゼーションについて本明細書で使用される「ストリンジェントな条件」は、標的配列との相補性を有する核酸が主に標的配列とハイブリダイズし、非標的配列と実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、一般に配列依存性であり、いくつかの因子によって変わる。一般に、配列が長いほど、配列がその標的配列とハイブリダイズする温度は高い。ストリンジェントな条件の非限定的な例は、Tijssen（１９９３年）、Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I、第２章「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay」. Elsevier、N.Y.に詳細に記載されている。

【０１０６】

「ハイブリダイゼーション」は、１つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化されている複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合により起こることもあり、フーグスティーン結合により起こることもあり、または任意の他の配列特異的様式で起こることもある。複合体は、二重鎖構造を形成する２本の鎖を含むこともあり、多鎖複合体を形成する３本またはそれより多い鎖を含むこともあり、自己ハイブリダイズする単一の鎖を含むこともあり、またはこれらの任意の組合せを含むこともある。ハイブリダイゼーション反応は、より大規模なプロセスの１ステップ、例えば、ＰＣＲの開始、または酵素によるポリヌクレオチドの開裂を構成することもある。所与の配列とハイブリダイズすることができる配列は、その所与の配列の「相補配列」と称される。

【０１０７】

本明細書で使用される「発現」は、ポリヌクレオチドが鋳型ＤＮＡから（例えば、ｍＲＮＡまたは他のＲＮＡ転写物に）転写されるプロセス、および／または転写されたｍＲＮＡが、その後、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物およびコードされているポリペプチドは、まとめて「遺伝子産物」と称されることもある。ポリヌクレオチドがゲノムＤＮＡに由来する場合、発現は、真核細胞におけるｍＲＮＡのスプライシングを含むことがある。

【０１０８】

用語「対象」、「個体」および「患者」は、本明細書では、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指すために同義で使用される。哺乳動物には、マウス、サル、ヒト、家畜、競技用動物、およびペットが含まれるが、これらに限定されない。ｉｎ　ｖｉｖｏで得られたまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養された生物学的実体の組織、細胞およびそれらの子孫も包含される。

【０１０９】

用語「治療剤」、「治療可能薬剤」または「処置剤」は、同義で使用され、対象への投与時に何らかの有益な効果をもたらす分子または化合物を指す。有益な効果には、診断を下すことをできるようにすること；疾患、症状、障害または病態の寛解；疾患、症状、障害または状態の発現を低減させるまたは予防すること；および疾患、症状、障害または病態を一般に抑えることが含まれる。

【０１１０】

本明細書で使用される「処置」または「処置すること」は、治療的有用性を含むがこれに限定されない有益なまたは所望の結果を得るための手法を指す。治療的有用性とは、処置中の１つもしくは複数の疾患、状態もしくは症状の、治療に関連するあらゆる改善、または処置中の１つもしくは複数の疾患、状態もしくは症状に対する、治療に関連するあらゆる効果を意味する。

【０１１１】

用語「有効量」または「治療有効量」は、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分である薬剤の量を指す。治療有効量は、処置を受ける対象および病状、対象の体重および年齢、病状の重症度、投与方法などのうちの１つまたは複数に依存して変わることがあり、当業者は治療有効量を容易に決定することができる。この用語は、本明細書に記載のイメージング方法のいずれか１つにより検出用の画像を得ることになる用量にも当てはまる。具体的な用量は、選択される特定の薬剤、従うことになる投与レジメン、他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、撮像されることになる組織、および担持される物理的送達システムのうちの１つまたは複数に依存して変わり得る。

【０１１２】

本明細書で使用される単数形「１つの（a）」、「１つの（an）」および「その（the）」は、別段の指示がない限り、複数形の言及を含む。

【０１１３】

本明細書での「約」値またはパラメーターへの言及は、その値またはパラメーター自体に関する実施形態を含む（および述べている）。例えば、「約Ｘ」に言及する記述は、「Ｘ」の記述を含む。

【０１１４】

本発明の組成物および方法は、本明細書に記載の本発明の本質的要素および制限、ならびに本明細書に記載のまたは別様に有用なあらゆる追加のまたは任意選択の構成要素、成分または制限を含むこともあり、それからなることもあり、またはそれから本質的になることもある。

【０１１５】

別段の断り書きがない限り、専門用語は、従来の用法に従って使用される。

複合体およびナノ粒子

【０１１６】

一部の態様では、本発明は、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を細胞に送達するための、細胞膜透過ペプチドを含む複合体およびナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）と複合体を形成している。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、またはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、核酸誘導型ヌクレアーゼ（例えば、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮ）であり、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ガイド配列（またはガイド配列をコードする核酸）と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）核酸誘導型ヌクレアーゼ（または核酸誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＺＦＮもしくはＴＡＬＥＮ、またはＺＦＮもしくはＴＡＬＥＮをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ、もしくはＲＧＥＮをコードする核酸と、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、もしくはｇＲＮＡをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＤＧＥＮ、もしくはＤＧＥＮをコードする核酸と、ガイドＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、もしくはｇＤＮＡをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドとゲノム編集ヌクレアーゼは、共有結合している。一部の実施形態では、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡ、またはＤＧＥＮおよびｇＤＮＡは、ゲノム編集複合体を形成するための細胞膜透過ペプチドとの会合前に既に複合体を形成している。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ゲノム編集インテグラーゼ（またはゲノム編集インテグラーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。一部の実施形態では、ゲノム編集インテグラーゼは、バクテリオファージインテグラーゼである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナ

ノ粒子を形成するために、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）ゲノム編集インテグラーゼ（またはゲノム編集インテグラーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。細胞膜透過ペプチドは、ゲノム編集システム分子（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼおよび／もしくはガイドＲＮＡ、またはＣａｓヌクレアーゼおよび／もしくはガイドＲＮＡをコードする核酸）を有する、安定した複合体およびナノ粒子を形成することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、全ゲノム編集システムを含む（例えば、ゲノム編集複合体またはナノ粒子内の分子の送達は、細胞内でゲノム編集を果すのに十分なものである）。

【０１１７】

一部の態様では、本発明は、ＺＦＰまたはＺＦＮを宿主細胞に送達するための、細胞膜透過ペプチドを含む複合体およびナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ＺＦＰまたはＺＦＮ（またはＺＦＰもしくはＺＦＮをコードする核酸）と複合体を形成している。細胞膜透過ペプチドは、ＺＦＰもしくはＺＦＮ、またはＺＦＰもしくはＺＦＮをコードする核酸を有する、安定した複合体およびナノ粒子を形成することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＺＦＰもしくはＺＦＮ、またはＺＦＰもしくはＺＦＮをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドとＺＦＰまたはＺＦＮは、共有結合している。

【０１１８】

一部の態様では、本発明は、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮを宿主細胞に送達するための、細胞膜透過ペプチドを含む複合体およびナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮ（またはＴＡＬＥもしくはＴＡＬＥＮをコードする核酸）と複合体を形成している。細胞膜透過ペプチドは、ＴＡＬＥもしくはＴＡＬＥＮ、またはＴＡＬＥもしくはＴＡＬＥＮをコードする核酸を有する、安定した複合体およびナノ粒子を形成することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＴＡＬＥもしくはＴＡＬＥＮ、またはＴＡＬＥもしくはＴＡＬＥＮをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドとＴＡＬＥまたはＴＡＬＥＮは、共有結合している。

【０１１９】

一部の態様では、本発明は、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子を宿主細胞に送達するための、細胞膜透過ペプチドを含む複合体およびナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、任意選択でガイド配列（またはガイド配列をコードする核酸）と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）、またはＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼをコードする核酸と複合体を形成している。細胞膜透過ペプチドは、ＣＲＩＳＰＲシステム分子（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼおよび／もしくはガイドＲＮＡ）、および／またはＣＲＩＳＰＲシステム分子の１つもしくは複数をコードする核酸を有する、安定した複合体およびナノ粒子を形成することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ａ）ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、もしくはＲＧＥＮをコードする核酸、および／またはｂ）ｇＲＮＡ、もしくはｇＲＮＡをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮは、共有結合している。一部の実施形態では、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡは、ゲノム編集複合体を形成するために細胞膜透過ペプチドまたはナノ粒子との会合前に既に複合体を形成している。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、全ＣＲＩＳＰＲシステムを含む。例えば、一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、またはＲＧＥＮをコードする核酸と、ｇＲＮＡ、またはｇＲＮＡをコードする核酸とを含む。

【０１２０】

一部の態様では、本発明は、Ｎａｔｒｏｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｒｅｇｏｒｙｉアルゴノート（ＮｇＡｇｏ）とガイドＤＮＡ（ｇＤＮＡ）とを含むＤＮＡ誘導型ゲノム編集システムを使用する、Gaoら、（２０１６年）．Nature biotechnologyに記載されているシステムなどの、ＤＧＥＮシステムの１つまたは複数の分子を宿主細胞に送達するための、細胞膜透過ペプチドを含む複合体およびナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ガイド配列（またはガイド配列をコードする核酸）と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）、ＤＧＥＮ（またはＤＧＥＮをコードする核酸）と複合体を形成している。細胞膜透過ペプチドは、ＤＧＥＮシステム分子（例えば、ＮｇＡｇｏヌクレアーゼおよび／もしくはガイドＤＮＡ）、および／またはＤＧＥＮシステム分子の１つもしくは複数をコードする核酸を有する、安定した複合体およびナノ粒子を形成することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＤＧＥＮ、もしくはＤＧＥＮをコードする核酸と、ｇＤＮＡ、もしくはｇＤＮＡをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドとＤＧＥＮは、共有結合している。一部の実施形態では、ＤＧＥＮおよびｇＤＮＡは、ゲノム編集複合体を形成するための細胞膜透過ペプチドとの会合前に既に複合体を形成している。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、全ＤＧＥＮシステムを含む。例えば、一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、ＤＧＥＮ、もしくはＤＧＥＮをコードする核酸と、ｇＤＮＡ、もしくはｇＤＮＡをコードする核酸とを含む。

【０１２１】

一部の態様では、本発明は、インテグラーゼを宿主細胞に送達するための、細胞膜透過ペプチドを含む複合体およびナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。細胞膜透過ペプチドは、インテグラーゼ、またはインテグラーゼをコードする核酸を有する、安定した複合体およびナノ粒子を形成することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞膜透過ペプチドと、インテグラーゼ、またはインテグラーゼをコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドとインテグラーゼは、共有結合している。一部の実施形態では、インテグラーゼおよびドナー核酸は、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するための細胞膜透過ペプチドとの会合前に既に複合体を形成している。

細胞膜透過ペプチド

【０１２２】

本発明のゲノム編集複合体またはナノ粒子中の細胞膜透過ペプチドは、ゲノム編集システムの様々な分子、例えば、ヌクレアーゼ（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、およびＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９およびＣｐｆ１））、インテグラーゼ（例えば、バクテリオファージインテグラーゼ、例えばΦＣ３１）、および核酸（例えば、ガイドＲＮＡ、ガイドＤＮＡ、およびドナー核酸）を有する、安定した複合体およびナノ粒子を形成することができる。本明細書に記載のいずれのゲノム編集複合体またはナノ粒子におけるいずれの細胞膜透過ペプチドが、このセクションに記載のいずれの細胞膜透過ペプチド配列を含んでいても、またはそれらからなってもよい。

【０１２３】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＣＡＤＹ、ＰＥＰ－１、ＭＰＧ、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－４ペプチド、ＶＥＰＥＰ－５ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、

細胞膜透過ペプチドは、ゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在するゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、ＤＧＥＮまたはインテグラーゼと会合している。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡと会合している。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体またはＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体と会合している。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ドナー核酸と会合している。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子の中間層中に存在する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ナノ粒子の表面層中に存在する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。ＷＯ２０１４／０５３８７９には、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドが開示されており、ＷＯ２０１４／０５３８８１には、ＶＥＰＥＰ－４ペプチドが開示されており、ＷＯ２０１４／０５３８８２には、ＶＥＰＥＰ－５ペプチドが開示されており、ＷＯ２０１２／１３７１５０には、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドが開示されており、ＷＯ２０１４／０５３８８０には、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドが開示されており、ＷＯ２０１６／１０２６８７には、ＡＤＧＮ－１００ペプチドが開示されており、米国特許出願公開第２０１０／００９９６２６号には、ＣＡＤＹペプチドが開示されており、および米国特許第７，５１４，５３０号には、ＭＰＧペプチドが開示されており、これらの開示は、それら全体が本明細書での参照により本明細書に組み入れられている。

【０１２４】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_2X_3X_4X_6X_7X_3X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$（配列番号１）を含むＶＥＰＥＰ－３細胞膜透過ペプチドを含み、この配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳであり、X_2は、（互いに独立して）Ｋ、ＲまたはＬであり、X_3は、（互いに独立して）ＦまたはＷであり、X_4は、（互いに独立して）Ｆ、ＷまたはＹであり、X_5は、Ｅ、ＲまたはＳであり、X_6は、Ｒ、ＴまたはＳであり、X_7は、Ｅ、ＲまたはＳであり、X_8は、存在しないか、ＦまたはＷであり、X_9は、ＰまたはＲであり、X_{10}は、ＲまたはＬであり、X_{11}は、Ｋ、ＷまたはＲであり、X_{12}は、ＲまたはＦであり、およびX_{13}は、ＲまたはＫである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、アミノ酸配列$X_1X_2WX_4EX_2WX_4X_6X_7X_3PRX_{11}RX_{13}$（配列番号２）を含み、この配列中、$X_1$は、ベーターＡまたはＳであり、$X_2$は、Ｋ、ＲまたはＬであり、$X_3$は、ＦまたはＷであり、$X_4$は、Ｆ、ＷまたはＹであり、$X_5$は、Ｅ、ＲまたはＳであり、$X_6$は、Ｒ、ＴまたはＳであり、$X_7$は、Ｅ、ＲまたはＳであり、$X_8$は、存在しないか、ＦまたはＷであり、$X_9$は、ＰまたはＲであり、$X_{10}$は、ＲまたはＬであり、$X_{11}$は、Ｋ、ＷまたはＲであり、$X_{12}$は、ＲまたはＦであり、および$X_{13}$は、ＲまたはＫである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、アミノ酸配列X_1ＫＷＦＥＲＷＦＲＥＷＰＲＫＲＲ（配列番号３）、X_1ＫＷＷＥＲＷＷＲＥＷＰＲＫＲＲ（配列番号４）、X_1ＫＷＷＥＲＷＷＲＥＷＰＲＫＲＫ（配列番号５）、X_1ＲＷＷＥＫＷＷＴＲＷＰＲＫＲＫ（配列番号６）、またはX_1ＲＷＹＥＫＷＹＴＥＦＰＲＲＲＲ（配列番号７）を含み、これらの配列中のX_1は、ベーターＡまたはＳである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、細胞膜透過ペプチドが、１０位のアミノ酸の非天然アミノ酸による置換、２位と３位のアミノ酸間への非天然アミノ酸の付加、および２つの非天然アミノ酸間への炭化水素連結の付加により修飾されている、配列番号１～７のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、アミノ酸配列$X_1KX_{14}WWERWWRX_{14}WPRKRK$（配列番号８）を含み、この配列中、$X_1$は、ベーターＡまたはＳであり、および$X_{14}$は、非天然アミノ酸であり、ならびに２つの非天然アミノ酸間に炭化水素連結がある。一部の実施形態では

、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、アミノ酸配列$X_1X_2X_3WX_5X_{10}X_3WX_6X_7WX_8X_9X_{10}WX_{12}R$（配列番号９）を含み、この配列中、$X_1$は、ベーターＡまたはＳであり、$X_2$は、Ｋ、ＲまたはＬであり、$X_3$は、ＦまたはＷであり、$X_5$は、ＲまたはＳであり、$X_6$は、ＲまたはＳであり、$X_7$は、ＲまたはＳであり、$X_8$は、ＦまたはＷであり、$X_9$は、ＲまたはＰであり、$X_{10}$は、ＬまたはＲであり、および$X_{12}$は、ＲまたはＦである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、アミノ酸配列X_1ＲＷＷＲＬＷＷＲＳＷＦＲＬＷＲＲ（配列番号１０）、X_1ＬＷＷＲＲＷＷＳＲＷＷＰＲＷＲＲ（配列番号１１）、X_1ＬＷＷＳＲＷＷＲＳＷＦＲＬＷＦＲ（配列番号１２）、またはX_1ＫＦＷＳＲＦＷＲＳＷＦＲＬＷＲＲ（配列番号１３）を含み、これらの配列中のX_1は、ベーターＡまたはＳである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、細胞膜透過ペプチドが、５位または１２位のアミノ酸の非天然アミノ酸による置換、および２つの非天然アミノ酸間への炭化水素連結の付加により修飾されている、配列番号１および９～１３のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、アミノ酸配列X_1ＲＷＷX_{14}ＬＷＷＲＳＷX_{14}ＲＬＷＲＲ（配列番号１４）を含み、この配列中、X_1は、ベーターアラニンまたはセリンであり、およびX_{14}は、非天然アミノ酸であり、ならびに２つの非天然アミノ酸間に炭化水素連結がある。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子のコア中のゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、ＤＧＥＮまたはインテグラーゼと会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡと会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体またはＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体と会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ドナー核酸と会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子の中間層中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ナノ粒子の表面層中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。

【０１２５】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＶＥＰＥＰ－６細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、$X_1LX_2RALWX_9LX_3X_9X_4LWX_9LX_5X_6X_7X_8$（配列番号１５）、$X_1LX_2LARWX_9LX_3X_9X_4LWX_9LX_5X_6X_7X_8$（配列番号１６）および$X_1LX_2ARLWX_9LX_3X_9X_4LWX_9LX_5X_6X_7X_8$（配列番号１７）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、これらの配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳであり、X_2は、ＦまたはＷであり、X_3は、Ｌ、Ｗ、ＣまたはＩであり、X_4は、Ｓ、Ａ、ＮまたはＴであり、X_5は、ＬまたはＷであり、X_6は、ＷまたはＲであり、X_7は、ＫまたはＲであり、X_8は、Ａであるか、または存在せず、およびX_9は、ＲまたはＳである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、アミノ酸配列$X_1LX_2RALWRLX_3RX_4LWRLX_5X_6X_7X_8$（配列番号１８）を含み、この配列中、$X_1$は、ベーターＡまたはＳであり、$X_2$は、ＦまたはＷであり、$X_3$は、Ｌ、Ｗ、ＣまたはＩであり、$X_4$は、Ｓ、Ａ、ＮまたはＴであり、$X_5$は、ＬまたはＷであり、$X_6$は、ＷまたはＲであり、$X_7$は、ＫまたはＲであり、および$X_8$は、Ａであるか、または存在しない。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、アミノ酸配列$X_1LX_2RALWRLX_3RX_4LWRLX_5X_6KX_7$（配列番号１９）を含み、この配列中、$X_1$は、ベーターＡまたはＳであり、$X_2$は、ＦまたはＷであり、$X_3$は、ＬまたはＷであり、$X_4$は、Ｓ、ＡまたはＮであり、$X_5$は、ＬまたはＷであり、$X_6$は、ＷまたはＲであり、$X_7$は、Ａであるか、または存在しない。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－

６ペプチドは、X_1ＬＦＲＡＬＷＲＬＬＲX_2ＬＷＲＬＬＷX_3（配列番号２０）、X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬＷＲX_2ＬＷＲＬＬＷX_3Ａ（配列番号２１）、X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬX_4ＲX_2ＬＷＲＬＷＲX_3Ａ（配列番号２２）、X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬＷＲX_2ＬＷＲＬＷＲX_3Ａ（配列番号２３）、X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬX_5ＲＡＬＷＲＬＬＷX_3Ａ（配列番号２４）、およびX_1ＬＷＲＡＬＷＲＬX_4ＲＮＬＷＲＬＬＷX_3Ａ（配列番号２５）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、これらの配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳであり、X_2は、ＳまたはＴであり、X_3は、ＫまたはＲであり、X_4は、Ｌ、ＣまたはＩであり、およびX_5は、ＬまたはＩである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、Ａｃ－X_1ＬＦＲＡＬＷＲＬＬＲＳＬＷＲＬＬＷＫ－システアミド（配列番号２６）、Ａｃ－X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬＷＲＳＬＷＲＬＬＷＫＡ－システアミド（配列番号２７）、Ａｃ－X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬＬＲＳＬＷＲＬＷＲＫＡ－システアミド（配列番号２８）、Ａｃ－X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬＷＲＳＬＷＲＬＷＲＫＡ－システアミド（配列番号２９）、Ａｃ－X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬＬＲＡＬＷＲＬＬＷＫＡ－システアミド（配列番号３０）、およびＡｃ－X_1ＬＷＲＡＬＷＲＬＬＲＮＬＷＲＬＬＷＫＡ－システアミド（配列番号３１）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、これらの配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、８位と１２位の２つの残基間に炭化水素連結をさらに含む、配列番号１５～３１のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、Ａｃ－X_1ＬＦＲＡＬＷＲ$_S$ＬＬＲＳ$_S$ＬＷＲＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３２）、Ａｃ－X_1ＬＦＬＡＲＷＲ$_S$ＬＬＲＳ$_S$ＬＷＲＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３３）、Ａｃ－X_1ＬＦＲＡＬＷＳ$_S$ＬＬＲＳ$_S$ＬＷＲＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３４）、Ａｃ－X_1ＬＦＬＡＲＷＳ$_S$ＬＬＲＳ$_S$ＬＷＲＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３５）、Ａｃ－X_1ＬＦＲＡＬＷＲＬＬＲ$_S$ＳＬＷＳ$_S$ＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３６）、Ａｃ－X_1ＬＦＬＡＲＷＲＬＬＲ$_S$ＳＬＷＳ$_S$ＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３７）、Ａｃ－X_1ＬＦＲＡＬＷＲＬＬＳ$_S$ＳＬＷＳ$_S$ＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３８）、Ａｃ－X_1ＬＦＬＡＲＷＲＬＬＳ$_S$ＳＬＷＳ$_S$ＬＬＷＫ－システアミド（配列番号３９）、およびＡｃ－X_1ＬＦＡＲ$_S$ＬＷＲＬＬＲＳ$_S$ＬＷＲＬＬＷＫ－システアミド（配列番号４０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、これらの配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳであり、下付文字「Ｓ」が後ろにある残基は、前記炭化水素連結により連結している残基である。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子のコア中のゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、ＤＧＥＮまたはインテグラーゼと会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡと会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体またはＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体と会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ドナー核酸と会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子の中間層中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ナノ粒子の表面層中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。

【０１２６】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列$X_1X_2X_3$ＷＷX_4X_5ＷＡ$X_6X_3X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}$Ｗ$X_{13}$Ｒ（配列番号４１）を含むＶＥＰＥＰ－９細胞膜透過ペプチドを含み、この配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳであり、X_2は、Ｌであるか、または存在せず、X_3は、Ｒであるか、または存在せず、X_4は、Ｌ、ＲまたはＧであり、X_5は、Ｒ、ＷまたはＳであり、X_6は、Ｓ、ＰまたはＴであり、X_7は、ＷまたはＰであり、X_8は、Ｆ、ＡまたはＲで

あり、X_9は、Ｓ、Ｌ、ＰまたはＲであり、X_{10}は、ＲまたはＳであり、X_{11}は、Ｗであるか、または存在せず、X_{12}は、Ａであるか、Ｒであるか、または存在せず、およびX_{13}は、ＷまたはＦであり、ならびにX_3が存在しない場合には、X_2、X_{11}およびX_{12}も存在しない。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、アミノ酸配列X_1X_2ＲＷＷＬＲＷＡX_6ＲＷ$X_8X_9X_{10}$ＷX_{12}ＷX_{13}Ｒ（配列番号４２）を含み、この配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳであり、X_2は、Ｌであるか、または存在せず、X_6は、ＳまたはＰであり、X_8は、ＦまたはＡであり、X_9は、Ｓ、ＬまたはＰであり、X_{10}は、ＲまたはＳであり、X_{12}は、ＡまたはＲであり、およびX_{13}は、ＷまたはＦである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、X_1ＬＲＷＷＬＲＷＡＳＲＷＦＳＲＷＡＷＷＲ（配列番号４３）、X_1ＬＲＷＷＬＲＷＡＳＲＷＡＳＲＷＡＷＦＲ（配列番号４４）、X_1ＲＷＷＬＲＷＡＳＲＷＡＬＳＷＲＷＷＲ（配列番号４５）、X_1ＲＷＷＬＲＷＡＳＲＷＦＬＳＷＲＷＷＲ（配列番号４６）、X_1ＲＷＷＬＲＷＡＰＲＷＦＰＳＷＲＷＷＲ（配列番号４７）、およびX_1ＲＷＷＬＲＷＡＳＲＷＡＰＳＷＲＷＷＲ（配列番号４８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、これらの配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、X_1ＷＷX_4X_5ＷＡ$X_6X_7X_8$ＲX_{10}ＷＷＲ（配列番号４９）のアミノ酸配列を含み、この配列中、X_1は、ベーターＡまたはＳであり、X_4は、ＲまたはＧであり、X_5は、ＷまたはＳであり、X_6は、Ｓ、ＴまたはＰであり、X_7は、ＷまたはＰであり、X_8は、ＡまたはＲであり、およびX_{10}は、ＳまたはＲである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、X_1ＷＷＲＷＷＡＳＷＡＲＳＷＷＲ（配列番号５０）、X_1ＷＷＧＳＷＡＴＰＲＲＲＷＷＲ（配列番号５１）、およびX_1ＷＷＲＷＷＡＰＷＡＲＳＷＷＲ（配列番号５２）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、これらの配列中のX_1は、ベーターＡまたはＳである。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子のコア中のゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、ＤＧＥＮまたはインテグラーゼと会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡと会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体またはＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体と会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ドナー核酸と会合している。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子の中間層中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ナノ粒子の表面層中に存在する。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。

【０１２７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列X_1ＫＷＲＳ$X_2X_3X_4$ＲＷＲＬＷＲ$X_5X_6X_7X_8$ＳＲ（配列番号５３）を含むＡＤＧＮ－１００細胞膜透過ペプチドを含み、この配列中、X_1は、任意のアミノ酸であるか、または存在せず、およびX_2～X_8は、任意のアミノ酸である。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、アミノ酸配列X_1ＫＷＲＳ$X_2X_3X_4$ＲＷＲＬＷＲ$X_5X_6X_7X_8$ＳＲ（配列番号５４）を含み、この配列中、X_1は、βＡであるか、Ｓであるか、または存在せず、X_2は、ＡまたはＶであり、X_3は、またはＬであり、X_4は、ＷまたはＹであり、X_5は、ＶまたはＳであり、X_6は、Ｒ、ＶまたはＡであり、X_7は、ＳまたはＬであり、およびX_8は、ＷまたはＹである。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、アミノ酸配列ＫＷＲＳＡＧＷＲＷＲＬＷＲＶＲＳＷＳＲ（配列番号５５）、ＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲＬＷＲＶＲＳＷＳＲ（配列番号５６）、ＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲＬＷＲＳＲＳＷＳＲ（配列番号５７）、またはＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲＬＷＲＳＡＬＹＳＲ（配列番号５８）を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは

、炭化水素連結により連結している３つまたは６つの残基により隔てられている２つの残基を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、アミノ酸配列ＫＷＲＳ$_S$ＡＧＷＲ$_S$ＷＲＬＷＲＶＲＳＷＳＲ（配列番号５９）、ＫＷＲ$_S$ＳＡＧＷＲＷＲ$_S$ＬＷＲＶＲＳＷＳＲ（配列番号６０）、ＫＷＲＳＡＧＷＲ$_S$ＷＲＬＷＲＶＲ$_S$ＳＷＳＲ（配列番号６１）、ＫＷＲＳ$_S$ＡＬＹＲ$_S$ＷＲＬＷＲＳＲＳＷＳＲ（配列番号６２）、ＫＷＲ$_S$ＳＡＬＹＲＷＲ$_S$ＬＷＲＳＲＳＷＳＲ（配列番号６３）、ＫＷＲＳＡＬＹＲ$_S$ＷＲＬＷＲＳＲ$_S$ＳＷＳＲ（配列番号６４）、ＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲ$_S$ＬＷＲＳ$_S$ＲＳＷＳＲ（配列番号６５）、ＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲＬＷＲＳ$_S$ＲＳＷＳ$_S$Ｒ（配列番号６６）、ＫＷＲ$_S$ＳＡＬＹＲＷＲ$_S$ＬＷＲＳＡＬＹＳＲ（配列番号６７）、ＫＷＲＳ$_S$ＡＬＹＲ$_S$ＷＲＬＷＲＳＡＬＹＳＲ（配列番号６８）、ＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲ$_S$ＬＷＲＳ$_S$ＡＬＹＳＲ（配列番号６９）、またはＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲＬＷＲＳ$_S$ＡＬＹＳ$_S$Ｒ（配列番号７０）を含み、これらの配列中、下付文字「Ｓ」の付いている残基は、炭化水素連結により連結している。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子のコア中のゲノム編集複合体中に存在する。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在する。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、ＤＧＥＮまたはインテグラーゼと会合している。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡと会合している。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体またはＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体と会合している。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子のコア中に存在し、ドナー核酸と会合している。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子の中間層中に存在する。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ナノ粒子の表面層中に存在する。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。

【０１２８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のＣＰＰ（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチド）は、ＣＰＰのＮ末端に連結している１つまたは複数の部分をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の部分は、ＣＰＰのＮ末端に共有結合によって連結している。一部の実施形態では、１つまたは複数の部分は、アセチル基、ステアリル基、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体またはその抗体断片、ペプチド、多糖類、およびターゲティング分子からなる群から選択される。一部の実施形態では、１つまたは複数の部分は、アセチル基および／またはステアリル基である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＮ末端に連結しているアセチル基および／またはステアリル基を含む。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＮ末端に連結しているアセチル基を含む。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＮ末端に連結しているステアリル基を含む。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＮ末端に共有結合によって連結しているアセチル基および／またはステアリル基を含む。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＮ末端に共有結合によって連結しているアセチル基を含む。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＮ末端に共有結合によって連結しているステアリル基を含む。

【０１２９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のＣＰＰ（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチド）は、ＣＰＰのＣ末端に連結している１つまたは複数の部分をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の部分は、ＣＰＰのＣ末端に共有結合によって連結している。一部の実施形態では、１つまたは複数の部分は、システアミド基、システイン、チオール、アミド、ニトリロ三酢酸、カルボキシル基、直鎖状または分枝状Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル基、一級または二級アミン、オシド誘導体、脂質、リン脂質、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレ

ングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体またはその抗体断片、ペプチド、多糖類、およびターゲティング分子からなる群から選択される。一部の実施形態では、１つまたは複数の部分は、システアミド基である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＣ末端に連結しているシステアミド基を含む。一部の実施形態では、ＣＰＰは、そのＣ末端に共有結合によって連結しているシステアミド基を含む。

【０１３０】

一部の実施形態では、本明細書に記載のＣＰＰ（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチド）は、ステープル化されている。本明細書において使用する「ステープル化」は、ペプチド中の２残基間の化学的連結を指す。一部の実施形態では、該ペプチドの２アミノ酸間に化学的連結を含むＣＰＰは、ステープル化されている。一部の実施形態では、化学的連結により連結している２つのアミノ酸は、３つまたは６つのアミノ酸により隔てられている。一部の実施形態では、化学的連結により連結している２つのアミノ酸は、３つのアミノ酸により隔てられている。一部の実施形態では、化学的連結により連結している２つのアミノ酸は、６つのアミノ酸により隔てられている。一部の実施形態では、化学的連結により連結している２つのアミノ酸の各々は、ＲまたはＳである。一部の実施形態では、化学的連結により連結している２つのアミノ酸の各々は、Ｒである。一部の実施形態では、化学的連結により連結している２つのアミノ酸の各々は、Ｓである。一部の実施形態では、化学的連結により連結している２つのアミノ酸の一方は、Ｒであり、他方は、Ｓである。一部の実施形態では、化学的連結は、炭化水素連結である。

複合体

【０１３１】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチドと、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（１つまたは複数のゲノム編集システム分子のいずれかをコードする核酸を含む）とを含むゲノム編集複合体が、提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）およびゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）、またはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含み、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡは、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体とまたはＤＧＥＮおよびｇＤＮＡを含む既成複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、細胞膜透過ペプチドおよびインテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、インテグラーゼは、バクテリオファージインテグラーゼ（例えば、ΦＣ３１）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドと、１つまたは複数のゲノム編集システム分子のうちの少なくとも１つ（例えば、１つまたは複数のゲノム編集システム分子のすべて）のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドと、１つまたは複数のゲノム編集システム分子のうちの少なくとも１つ（例えば、１つまたは複数のゲノム編集システム分子のすべて）のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１

、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡまたはｄＤＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、全ゲノム編集システムを含む。

【０１３２】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）とＺＦＮまたはＴＡＬＥＮ（またはＺＦＮもしくはＴＡＬＥＮをコードする１つもしくは複数の核酸）とを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドと、ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドと、ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、特異的修飾を標的ポリヌクレオチドに導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１３３】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）とインテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする１つもしくは複数の核酸）とを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、インテグラーゼは、バクテリオファージインテグラーゼ（例えば、ΦＣ３１）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、インテグラーゼにより認識される組換え部位

を含むドナー核酸であって、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとインテグラーゼのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとインテグラーゼのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１３４】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）およびｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）の一方または両方とを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、

ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１３５】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＤＧＥＮ（またはＤＧＥＮをコードする核酸）およびｇＤＮＡ（またはｇＤＮＡをコードする核酸）の一方または両方とを含み、ｇＤＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ＤＧＥＮおよびｇＤＮＡを含む既成複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ＤＧＥＮは、ＮｇＡｇｏである。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＤＧＥＮとｇＤＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＤＧＥＮとｇＤＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＤＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＤＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＤＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１３６】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合している細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１３７】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）、ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮ、およびドナー核酸を含み、ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列を開裂させ、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入であり、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えばプラスミドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む

５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＺＦＮまたはＴＡＬＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＺＦＮまたはＴＡＬＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ＴＡＬＥＮを含む。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なる修飾を含む１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１３８】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに外来性核酸を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、インテグラーゼと、外来性核酸を含むドナー核酸とを含み、インテグラーゼが、標的ポリヌクレオチド内の第１の組換え部位とドナー核酸内の第２の組換え部位との組換えを媒介することができる、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとインテグラーゼのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとインテグラーゼのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例え

ば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なる外来性核酸を含む１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、外来性核酸は、標的ポリヌクレオチドのコード配列に挿入される。一部の実施形態では、外来性核酸は、標的ポリヌクレオチドの非コード配列に挿入される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、外来性核酸の産物（例えば、タンパク質、例えば外来性タンパク質）を発現するように修飾される。

【０１３９】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸のうちの１つまたは複数とを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入であり、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えばプラスミドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施

形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なる修飾を含む１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１４０】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸における１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける約１～約５０個の間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５および５０個（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約２０～約１５０ヌクレオチドの間（例えば、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０および１５０ヌクレオチド（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）で

ある。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なる修飾を含む１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１４１】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸内への異種核酸の挿入である、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、長さが約５０ヌクレオチドより長い（例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子である。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５

’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約３００ヌクレオチドより長い（例えば、約３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なる修飾を含む１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１４２】

一部の実施形態では、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、および複数のｇＲＮＡ（または複数のｇＲＮＡをコードする１つもしくは複数の核酸）を含み、複数のｇＲＮＡの各々が、個々に、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのうちの１つにおける標的配列に相補的な異なるガイド配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ＲＧＥＮと複数のｇＲＮＡとを含む既成複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に

連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、複数のｇＲＮＡの各々は、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、複数のｇＲＮＡの各々は、ｇＲＮＡのガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、１つまたは複数のドナー核酸をさらに含み、１つまたは複数のドナー核酸の各々は、個々に、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのうちの１つに修飾を導入するための配列を含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。

【０１４３】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、ヌクレアーゼまたはインテグラーゼなどのゲノム編集酵素（またはゲノム編集酵素をコードする核酸）と会合している、細胞膜透過ペプチドを含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮから選択されるヌクレアーゼである。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、Ｃａｓ９である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、インテグラーゼである。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、標的ポリヌク

レオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。
【０１４４】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。
【０１４５】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、およびｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。
【０１４６】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドへの異種核酸の挿入であり、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えばプラスミドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同で

ある、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１４７】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸における１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける約１～約５０個の間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５および５０個（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約２０～約１５０ヌクレオチドの間（例えば、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０および１５０ヌクレオチド（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１４８】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸内へ

の異種核酸の挿入であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、長さが約５０ヌクレオチドより長い（例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子である。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約３００ヌクレオチドより長い（例えば、約３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１４９】

一部の実施形態では、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）、および複数のｇＲＮＡ（または複数のｇＲＮＡをコードする１つもしくは複数の核酸）を含み、複数のｇＲＮＡの各々が、個々に、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのうちの１つにおける標的配列に相補的な異なるガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ＲＧＥＮと複数のｇＲＮＡとを含む既成複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１５０】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、Ｃａｓ９とｇＲＮＡとを含む既成Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド

配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０１５１】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）、およびｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０１５２】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）Ｃａｓ９とｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドへの異種核酸の挿入であり、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えばプラスミドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１

００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。

【０１５３】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸における１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）Ｃａｓ９とｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける約１～約５０個の間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５および５０個（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約２０～約１５０ヌクレオチドの間（例えば、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０および１５０ヌクレオチド（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。

【０１５４】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）およびドナー核酸を含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸内への異種核酸の挿入であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施

形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、ａ）Ｃａｓ９とｇＲＮＡとを含む既成複合体およびｂ）ドナー核酸と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、長さが約５０ヌクレオチドより長い（例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子である。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約３００ヌクレオチドより長い（例えば、約３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）。

【０１５５】

一部の実施形態では、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチド、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）、および複数のｇＲＮＡ（または複数のｇＲＮＡをコードする１つもしくは複数の核酸）を含み、複数のｇＲＮＡの各々が、個々に、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのうちの１つにおける標的配列に相補的な異なるガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、Ｃａｓ９と複数のｇＲＮＡとを含む既成複合体と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。

【０１５６】

一部の実施形態では、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体に含有されているｇＲＮＡのガイド配列は、免疫チェックポイント制御因子、および抗原提示に関与するタンパク質を含む、免疫応答の制御に関与するタンパク質をコードする遺伝子内の標的配列に相補的である。一部の実施形態では、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるゲノム編集複合体に含有されているｇＲＮＡのガイド配列は、コレステロール輸送および／または代謝の制御に関与するタンパク質をコードする遺伝子内の標的配列に相補的である。一部の実施形態では、ガイド配列は、限定ではないが、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ－１、ＴＩＭ－３、ＴＩＭ－４、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＨＶＥＭ、ＧＩＴＲ、ＩＣＯＳ、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ６、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ｇｐ４９Ｂ、ＰＩＲ－Ｂ、ＫＩＲファミ

リー受容体、ＳＩＲＰアルファ（ＣＤ４７）、ＣＤ４８、２Ｂ４（ＣＤ２４４）、Ｂ７．１、Ｂ７．２、ＩＬＴ－２、ＩＬＴ－４、Ａ２ａＲ、Ｔｏｌｌ様受容体ＴＬＲ－２、３、４、６、７、８および９、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＴＮＦ、ＣＤ４０Ｌ、ＦＬＴ－３リガンド、サイトカイン、例えばＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１およびＩＬ－３５、ＦａｓＬ、ＴＧＦ－β、インドールアミン－２，３－ジオキシゲナーゼ（indoleamine-2,3 dioxygenase）（ＩＤＯ）、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）タンパク質（ベーター２ミクログロブリン（beta-2 microglobulin）（β２Ｍ）を含む）、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）受容体（ＬＤＬＲ）、アポリポタンパク質Ｂ（ＡｐｏＢ）、低密度リポタンパク質受容体アダプタータンパク質１（ＬＤＬＲＡＰ１）、およびプロタンパク質転換酵素サブチリシン・ケキシン９型（proprotein convertase subtilisin kexin 9）（ＰＣＳＫ９）を含む、タンパク質をコードする遺伝子内の標的配列に相補的である。

【０１５７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体のいずれかによれば、ゲノム編集複合体は、ゲノム編集システム分子以外のタンパク質、または該タンパク質をコードする核酸分子（例えば、ＤＮＡプラスミドもしくはｍＲＮＡ）をさらに含む。

【０１５８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体の平均サイズ（直径）は、約１０ｎｍ～約１０ミクロンのいずれかの間であり、これは、例えば、約３０ｎｍ～約１ミクロンの間、約５０ｎｍ～約２５０ｎｍの間、約５０ｎｍ～約１８０ｎｍの間、および約１５０ｎｍ～約２００ｎｍの間を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、約１０ｎｍ～約４００ｎｍの間である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、約２０ｎｍ～約４００ｎｍの間である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、約３０ｎｍ～約２００ｎｍの間である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、約４０ｎｍ～約２００ｎｍの間である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍの間である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、約４０ｎｍ～約１００ｎｍの間である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、実質的に非毒性である。

【０１５９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体のターゲティング部分は、該ゲノム編集複合体を組織または特異的細胞型にターゲティングする。一部の実施形態では、組織は、処置を必要とする組織である。一部の実施形態では、ターゲティング部分は、ゲノム編集システムにより処置され得る組織または細胞にゲノム編集複合体をターゲティングする。

ナノ粒子

【０１６０】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、本明細書に記載の１つまたは複数のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、複数のゲノム編集複合体を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、所定の比率で存在する複数のゲノム編集複合体を含む。一部の実施形態では、所定の比率は、より詳細に下記で説明される方法のいずれかにおけるナノ粒子の最も有効な使用を可能にするように選択される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、１つもしくは複数の追加の細胞膜透過ペプチド、１つもしくは複数の追加のゲノム編集ヌクレアーゼ、１つもしくは複数の追加のｇＲＮＡ、および／または１つもしくは複数の追加のドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加の細胞膜透過ペプチドは、１つまたは複数のゲノム編集複合体のいずれかにおいて見いだされる細胞膜透過ペプチドを含まない。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のゲノム編集ヌクレアーゼは、１つまたは複数のゲノム編集複合体のいずれかにおいて見いだされるゲノム編集ヌクレアーゼを含まない。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡは、１つまたは複数のゲノム編集複合体のいずれかにおいて見いだされるｇＲＮＡを含まない。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のドナー核酸は、１つまたは複数

のゲノム編集複合体のいずれかにおいて見いだされるドナー核酸を含まない。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。

【０１６１】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ヌクレアーゼまたはインテグラーゼなどのゲノム編集酵素（またはゲノム編集酵素をコードする核酸）とを含むコアを含むナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているゲノム編集酵素のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているゲノム編集酵素のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮから選択されるヌクレアーゼである。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、Ｃａｓ９である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、１つまたは複数のｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（または１つもしくは複数のｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする１つもしくは複数の核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、インテグラーゼである。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１６２】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（

ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、および／またはｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、および／またはｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１または第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１６３】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＤＧＥＮ（またはＤＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＤＮＡ（またはｇＤＮＡをコードする核酸）とを含むコアを含み、ｇＤＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＤＧＥＮおよびｇＤＮＡを含む既成複合体（ＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体）と会合している、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＤＧＥＮと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第１の複合体、およびｇＤＮＡと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ＤＧＥＮは、ＮｇＡｇｏである。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＤＧＥＮとｇＤＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＤＧＥＮとｇＤＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＤＧＥＮのモル比、および／またはｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＤＮＡのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＤＧＥＮのモル比、および／またはｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＤＮＡのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＤＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＤＮＡのうちの少なくとも１つは、既成ＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＤＮＡのうちの少なくとも１つは、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＤＮＡのうちの少なくとも１つは、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、既成ＤＧＥＮ／ｇＤＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１または第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００

ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。
【０１６４】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）とを含むコアを含み、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの少なくとも１つが、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合しており、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドの、該細胞膜透過ペプチドと会合している既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中とＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドの、該細胞膜透過ペプチドと会合している既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中とＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１または第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１６５】
一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第２の複合体を含む、コアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ａ）第１の複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、および／またはｂ）第２の複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ａ）第１の複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、および／またはｂ）第２の複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１または第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチ

ド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１６６】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つと、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入であり、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えばプラスミドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、ｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比、および／またはｃ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているドナー核酸のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：

１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、ｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比、および／またはｃ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているドナー核酸のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１または第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１６７】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸における１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つと、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける約１～約５０個の間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、

１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５および５０個（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約２０～約１５０ヌクレオチドの間（例えば、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０および１５０ヌクレオチド（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、ｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比、および／またはｃ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているドナー核酸のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、ｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比、および／またはｃ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているドナー核酸のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、

既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１または第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１６８】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸内への異種核酸の挿入である、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つと、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、長さが約５０ヌクレオチドより長い（例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子である。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約３００ヌクレオチドより長い（例えば、約３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なく

とも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、ｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比、および／またはｃ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているドナー核酸のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、ｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比、および／またはｃ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているドナー核酸のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つは、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１または第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１６９】

一部の実施形態では、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥ

Ｐ－６、ＶＥＰＥＰ－９またはＡＤＧＮ－１００ペプチド）と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、複数のｇＲＮＡ（または複数のｇＲＮＡをコードする１つもしくは複数の核酸）とを含むコアを含み、複数のｇＲＮＡの各々が、個々に、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのうちの１つにおける標的配列に相補的な異なるガイド配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと複数のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つとを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む。一部の実施形態では、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体は、複数のｇＲＮＡの各々を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む第１の複合体、および複数のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つと各々が会合している１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む１つまたは複数の複合体を含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の複合体は、複数のｇＲＮＡの各々を含む第２の複合体である。一部の実施形態では、ナノ粒子中の１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、複数のｇＲＮＡの各々は、補助的なトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合している特異性決定ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。一部の実施形態では、複数のｇＲＮＡの各々は、ｇＲＮＡのガイド配列と、ｔｒａｃｒメイト配列と、ｔｒａｃｒ配列と、テール配列とを含む、ｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、および／またはｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ａ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているＲＧＥＮのモル比、および／またはｂ）ナノ粒子中に存在する複合体中の細胞膜透過ペプチドと、該細胞膜透過ペプチドと会合しているｇＲＮＡのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体または１つもしくは複数の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドのうちの１つを含む追加の複合体中に存在する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、非コード配列が修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド

（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。

【０１７０】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドとゲノム編集酵素（またはゲノム編集酵素をコードする核酸）とを含むコアを含み、細胞膜透過ペプチドが、ゲノム編集酵素と会合しており、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮから選択されるヌクレアーゼである。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、Ｃａｓ９である。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集酵素は、インテグラーゼである。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。

【０１７１】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１７２】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）とを含むコアを含み、細胞膜透過ペプチドが、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合しており、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプ

チドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１７３】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１７４】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している細胞膜透過ペプチドと、ドナー核酸と会合している細胞膜透過ペプチドを含む別の複合体とを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、細胞膜透過ペプチドと、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドへの異種核酸の挿入であり、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えばプラスミドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／ま

たは３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１７５】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸における１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している細胞膜透過ペプチドと、ドナー核酸と会合している細胞膜透過ペプチドを含む別の複合体とを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、細胞膜透過ペプチドと、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける約１～約５０個の間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５および５０個（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約２０～約１５０ヌクレオチドの間（例えば、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０および１５０ヌクレオチド（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１７６】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのド

ナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸内への異種核酸の挿入であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している細胞膜透過ペプチドと、ドナー核酸と会合している細胞膜透過ペプチドを含む別の複合体とを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、細胞膜透過ペプチドと、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、長さが約５０ヌクレオチドより長い（例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子である。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約３００ヌクレオチドより長い（例えば、約３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１７７】

一部の実施形態では、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）と、複数のｇＲＮＡ（または複数のｇＲＮＡをコードする１つもしくは複数の核酸）とを含むコアを含み、複数のｇＲＮＡの各々が、個々に、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのうちの１つにおける標的配列に相補的な異なるガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つの

アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと複数のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つとを含む既成複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体は、複数のｇＲＮＡの各々を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、および複数のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つと会合している細胞膜透過ペプチドを各々が含む１つまたは複数の複合体を含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の複合体は、複数のｇＲＮＡの各々を含む第２の複合体である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮは、Ｃａｓ９である。

【０１７８】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡを含む既成複合体（Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、ＲＧＥＮと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。

【０１７９】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡを含む既成複合体（Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体）とを含むコアを含み、細胞膜透過ペプチドが、既成Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体と会合しており、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０１８０】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１

つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０１８１】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡを含む既成複合体（Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体）と会合している細胞膜透過ペプチドと、ドナー核酸と会合している細胞膜透過ペプチドを含む別の複合体とを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、細胞膜透過ペプチドと、既成Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドへの異種核酸の挿入であり、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えばプラスミドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。

【０１８２】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸における１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ

酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡを含む既成複合体（Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体）と会合している細胞膜透過ペプチドと、ドナー核酸と会合している細胞膜透過ペプチドを含む別の複合体とを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、細胞膜透過ペプチドと、既成Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、標的ポリヌクレオチドにおける約１～約５０個の間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５および５０個（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）のヌクレオチドの付加、欠失または置換である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約２０～約１５０ヌクレオチドの間（例えば、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０および１５０ヌクレオチド（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。

【０１８３】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸とを含むコアを含み、ｇＲＮＡが、標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含み、修飾が、標的核酸内への異種核酸の挿入であり、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡを含む既成複合体（Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体）と会合している細胞膜透過ペプチドと、ドナー核酸と会合している細胞膜透過ペプチドを含む別の複合体とを含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、細胞膜

透過ペプチドと、既成Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体と、ドナー核酸とを含む、三元複合体中に存在する。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、およびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む第２の複合体を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第１の複合体中に存在する。一部の実施形態では、ドナー核酸は、第２の複合体中に存在する。一部の実施形態では、修飾は、長さが約５０ヌクレオチドより長い（例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）異種核酸の挿入である。一部の実施形態では、ドナー核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子である。ドナー核酸は、標的ポリヌクレオチドの修飾の５’側に隣接する部分を含む５’標的ホモロジー領域と相同である、５’ホモロジーアームと、標的ポリヌクレオチドの修飾の３’側に隣接する部分を含む３’標的ホモロジー領域と相同である、３’ホモロジーアームとを含む。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列中の少なくとも約１個（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０個、またはそれより多数のうちのいずれか）のヌクレオチドと重複する。一部の実施形態では、５’標的ホモロジー領域および／または３’標的ホモロジー領域は、標的配列から約１０００ヌクレオチド以内（例えば、約１０００、５００、４００、３００、２００、１００、７５、５０、２５、２０、１５、１０、５または１ヌクレオチドのいずれか以内）にある。一部の実施形態では、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームは、各々個々に、長さが約３００ヌクレオチドより長い（例えば、約３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００ヌクレオチドまたはそれより多いヌクレオチド数（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれかより長い）。

【０１８４】

一部の実施形態では、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを修飾するためのナノ粒子であって、細胞膜透過ペプチドと、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と、複数のｇＲＮＡ（または複数のｇＲＮＡをコードする１つもしくは複数の核酸）とを含むコアを含み、複数のｇＲＮＡの各々が、個々に、１つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのうちの１つにおける標的配列に相補的な異なるガイド配列を含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９と複数のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つとを含む既成複合体（Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体）と会合している、細胞膜透過ペプチドを含む。一部の実施形態では、既成Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体は、複数のｇＲＮＡの各々を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子コアは、Ｃａｓ９と会合している細胞膜透過ペプチドを含む第１の複合体、および複数のｇＲＮＡのうちの少なくとも１つと会合している細胞膜透過ペプチドを各々が含む１つまたは複数の複合体を含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の複合体は、複数のｇＲＮＡの各々を含む第２の複合体である。

【０１８５】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、コアを包囲する末梢ＣＰＰを含む表面層をさらに含む。一部の実施形態では、末梢ＣＰＰは、コア中のＣＰＰと同じである。一部の実施形態では、末梢ＣＰＰは、コア中のいずれのＣＰＰとも異なる。一部の実施形態では、末梢ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（

例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、末梢ＣＰＰは、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチド、またはＡＤＧＮ－１００ペプチドである。一部の実施形態では、表面層中の末梢細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部は、ターゲティング部分に連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、該ナノ粒子のコアと表面層との間に中間層をさらに含む。一部の実施形態では、中間層は、中間ＣＰＰを含む。一部の実施形態では、中間ＣＰＰは、コア中のＣＰＰと同じである。一部の実施形態では、中間ＣＰＰは、コア中のいずれのＣＰＰとも異なる。一部の実施形態では、中間ＣＰＰは、これらに限定されないが、ＰＴＤに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、ＭＰＧペプチド、ＣＡＤＹペプチド、ＶＥＰＥＰペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－６またはＶＥＰＥＰ－９ペプチド）、ＡＤＧＮ－１００ペプチド、Ｐｅｐ－１ペプチドおよびＰｅｐ－２ペプチドを含む。一部の実施形態では、中間ＣＰＰは、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチド、またはＡＤＧＮ－１００ペプチドである。

【０１８６】

一部の実施形態では、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるナノ粒子に含有されているｇＲＮＡまたはｇＤＮＡのガイド配列は、免疫チェックポイント制御因子、および抗原提示に関与するタンパク質を含む、免疫応答の制御に関与するタンパク質をコードする遺伝子内の標的配列に相補的である。一部の実施形態では、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるナノ粒子に含有されているｇＲＮＡまたはｇＤＮＡのガイド配列は、コレステロール輸送および／または代謝の制御に関与するタンパク質をコードする遺伝子内の標的配列に相補的である。一部の実施形態では、ガイド配列は、限定ではないが、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ－１、ＴＩＭ－３、ＴＩＭ－４、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＨＶＥＭ、ＧＩＴＲ、ＩＣＯＳ、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ６、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ｇｐ４９Ｂ、ＰＩＲ－Ｂ、ＫＩＲファミリー受容体、ＳＩＲＰアルファ（ＣＤ４７）、ＣＤ４８、２Ｂ４（ＣＤ２４４）、Ｂ７．１、Ｂ７．２、ＩＬＴ－２、ＩＬＴ－４、Ａ２ａＲ、Ｔｏｌｌ様受容体ＴＬＲ－２、３、４、６、７、８および９、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＴＮＦ、ＣＤ４０Ｌ、ＦＬＴ－３リガンド、サイトカイン、例えばＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１およびＩＬ－３５、ＦａｓＬ、ＴＧＦ－β、インドールアミン－２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）タンパク質（ベータ２－ミクログロブリン（β２Ｍ）を含む）、ＬＤＬＲ、ＡｐｏＢ、ＬＤＬＲＡＰ１、ＰＣＳＫ９を含む、タンパク質をコードする遺伝子内の標的配列に相補的である。

【０１８７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子のいずれかによれば、ナノ粒子は、ゲノム編集システム分子以外のタンパク質、または該タンパク質をコードする核酸分子（例えば、ＤＮＡプラスミドもしくはｍＲＮＡ）をさらに含む。

【０１８８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子のいずれかによれば、ナノ粒子の平均サイズ（直径）は、約１０ｎｍ～約４００ｎｍであり、これは、例えば、約５０ｎｍ～約２００ｎｍ、約６０ｎｍ～約１８０ｎｍ、約８０ｎｍ～約１４０ｎｍ、および約９０ｎｍ～約１２０ｎｍを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子の平均サイズ（直径）は、約１０００ナノメートル（ｎｍ）以下、例えば、約９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００または１００ｎｍのいずれか以下である。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約２００ｎｍ以下である。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約１５０ｎｍ以下である。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約１００ｎｍ以下である。一部の実施形態

では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約１０ｎｍ～約４００ｎｍである。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約２０ｎｍ～約４００ｎｍである。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約３０ｎｍ～約２００ｎｍである。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約４０ｎｍ～約２００ｎｍである。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍである。一部の実施形態では、ナノ粒子の直径平均値または平均直径は、約４０ｎｍ～約１００ｎｍである。一部の実施形態では、ナノ粒子は、滅菌濾過可能である。

【０１８９】

一部の実施形態では、ナノ粒子のゼータ電位は、約－３０ｍＶ～約６０ｍＶ（例えば、約－３０、－２５、－２０、－１０、－５、０、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５および６０ｍＶ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子のゼータ電位は、約－３０ｍＶ～約３０ｍＶであり、これは、例えば、約－２５ｍＶ～約２５ｍＶ、約－２０ｍＶ～約２０ｍＶ、約－１５ｍＶ～約１５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約１０ｍＶ、および約－５ｍＶ～約１０ｍＶを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子の多分散指数（ＰＩ）は、約０．０５～約０．６（例えば、約０．０５、０．１、０．１５、０．２、０．２５、０．３、０．３５、０．４、０．４５、０．５、０．５５および０．６（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、実質的に非毒性である。

カーゴ

【０１９０】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子のゲノム編集システム分子（例えば、ＲＧＥＮ）は、タンパク質またはポリペプチドである。例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＲＧＥＮ（例えば、Ｃａｓ９）を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドは、約１０ｋＤａ～約２００ｋＤａの間（例えば、約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０および２００ｋＤａ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、複数のタンパク質またはポリペプチドを含み、複数のタンパク質またはポリペプチドの各々は、約１０ｋＤａ～約２００ｋＤａの間（例えば、約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０および２００ｋＤａ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。

【０１９１】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子のゲノム編集システム分子（例えば、ｇＲＮＡ）は、核酸である。一部の実施形態では、核酸は、約２０ｎｔ～約２０ｋｂの間（例えば、約０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９および２０ｋｂ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ｇＲＮＡ（例えば、Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、約２０ｎｔ～約２００ｎｔの間（例えば、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０および２００ｎｔ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、核酸は、ＤＮＡ、例えば、ゲノム編集システム分子をコードするＤＮＡプラスミドである。一部の実施形態では、ＤＮＡプラスミドは、ゲノム編集システム分子を発現するための発現カセットを含む。一部の実施形態では、ＤＮＡプラスミドは、約１ｋｂ～約２０ｋｂの間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、

８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９および２０ｋｂ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、核酸は、ＲＮＡ、例えば、ゲノム編集システム分子をコードするｍＲＮＡである。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、約１００ｎｔ～約１０ｋｂの間（例えば、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５および１０ｋｂ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、複数の核酸、例えば、本明細書に記載の核酸のいずれかを含む。例えば、一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ｇＲＮＡと、ゲノム編集システム分子をコードする核酸（例えば、ゲノム編集システム分子をコードするＤＮＡプラスミドもしくはｍＲＮＡ）とを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、複数のゲノム編集システム分子をコードする核酸（例えば、複数のゲノム編集システム分子をコードする１つもしくは複数のＤＮＡプラスミド、または複数のゲノム編集システム分子をコードする複数のｍＲＮＡ）を含む。

【０１９２】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子のゲノム編集システム分子（例えば、ＲＧＥＮまたはｇＲＮＡ）は、該ゲノム編集システム分子をコードする核酸に置き換えられる。例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＲＧＥＮをコードする核酸、および／またはｇＲＮＡをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、核酸は、ＤＮＡ、例えば、ゲノム編集システム分子をコードするＤＮＡプラスミドである。一部の実施形態では、ＤＮＡプラスミドは、ゲノム編集システム分子を発現するための発現カセットを含む。一部の実施形態では、ＤＮＡプラスミドは、約１ｋｂ～約２０ｋｂの間（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９および２０ｋｂ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、核酸は、ＲＮＡ、例えば、ゲノム編集システム分子をコードするｍＲＮＡである。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、約１００ｎｔ～約１０ｋｂの間（例えば、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５および１０ｋｂ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。

【０１９３】

本明細書で同義で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、および／またはそれらの類似体、あるいはＤＮＡまたはＲＮＡポリメラーゼによってポリマーに組み込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチド、およびそれらの類似体を含むこともある。本明細書で使用される用語「核酸」は、一本鎖形態または二本鎖形態どちらかの少なくとも２つのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含有するポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。ＤＮＡは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドＤＮＡ、予備縮合ＤＮＡ、ＰＣＲ産物、ベクター（ＰＡＣ、ＢＡＣ、ＹＡＣ、人工染色体）、発現カセット、キメラ配列、染色体ＤＮＡ、またはこれらの群の誘導体および組合せの形態であってもよい。ＲＮＡは、ｓｉＲＮＡ、非対称干渉ＲＮＡ（ａｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）、およびこれらの組合せの形態であってもよい。核酸には、例えば、ロックド核酸（ＬＮＡ）、アンロックド核酸（ＵＮＡ）およびジップ核酸（ＺＮＡ）を含む、公知のヌクレオチド類似体または修飾された主鎖残基もしくは連結を含有する核酸であって、合成であることもあり、天然に存在することもあり、天然に存在しないこともあり、基準核酸と同様の結合特異性を有する核酸が含まれる。そのような類似体の例としては、限定ではないが、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラル－メチルホスホネート、２’－Ｏ－メチ

ルリボヌクレオチド、およびペプチド核酸（ＰＮＡ）が挙げられる。特段の限定がない限り、この用語は、基準核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの公知類似体を含有する核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列は、明示されている配列ばかりでなく、その保存的に修飾されたバリアント（例えば、縮重コドン置換）、アレル、オルソログ、ＳＮＰおよび相補配列も明確に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、１つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの３番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することにより果すことができる（Batzerら、Nucleic Acid Res.、１９巻：５０８１頁（１９９１年）；Ohtsukaら、ｊ．Biol. Chern.、２６０巻：２６０５～２６０８頁（１９８５年）；Rossoliniら、Mol. Cell. Probes、８巻：９１～９８頁（１９９４年））。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（ＤＮＡ）またはリボース（ＲＮＡ）、塩基、およびリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基によって互いに連結している。「塩基」は、プリンおよびピリミジンを含み、これらは、天然化合物アデニン、チミジン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、ならびにプリンおよびピリミジンの天然類似体および合成誘導体をさらに含み、合成誘導体は、これらに限定されないがアミン、アルコール、チオール、カルボキシレートおよびハロゲン化アルキルなどの、新たな反応性基を配置する修飾を、そのような修飾に限定されないが、含む。本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」は、一般には長さが約２００ヌクレオチド未満であるが必ずしもそうでなくてもよい、短鎖の一般には合成のポリヌクレオチドを一般に指す。用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、相互排他的でない。ポリヌクレオチドについての上の説明は、オリゴヌクレオチドに同等におよび完全に当てはまる。

【０１９４】

一部の実施形態では、核酸は、一本鎖オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、核酸は、二本鎖オリゴヌクレオチドである。本明細書に記載の核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｉＲＮＡ、アンタゴｍｉｒの場合には２００ヌクレオチド以下、またはプラスミドＤＮＡの場合には１０００キロ塩基以下のいずれの長さ範囲であってもよいが、必ずしもそうでなくてもよい。

【０１９５】

一部の実施形態では、核酸は、プラスミドＤＮＡまたはＤＮＡ断片（例えば、約１０００ｂｐ以下の長さのＤＮＡ断片）である。加えて、プラスミドＤＮＡまたはＤＮＡ断片は、高メチル化されていてもよく、または低メチル化されていてもよい。一部の実施形態では、プラスミドＤＮＡまたはＤＮＡ断片は、１つまたは複数の遺伝子をコードし、前記１つまたは複数の遺伝子の発現に必要な制御要素を含有することができる。一部の実施形態では、プラスミドＤＮＡまたはＤＮＡ断片は、適切な宿主細胞におけるプラスミドＤＮＡまたはＤＮＡ断片の維持を可能にする選択可能なマーカーをコードする１つまたは複数の遺伝子を含むことができる。

修飾

【０１９６】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ターゲティング部分を含み、該ターゲティング部分は、細胞特異的ターゲティングおよび／または核ターゲティングが可能なリガンドである。細胞膜表面受容体および／または細胞表面マーカーは、前記リガンドに高い親和性でおよび好ましくは高い特異性で結合することができる、分子または構造である。前記細胞膜表面受容体および／または細胞表面マーカーは、好ましくは、特定の細胞に特異的であり、すなわち、別の細胞型でではなく、ある細胞型で主として見いだされる（例えば、肝細胞の表面のアシアロ糖タンパク質受容体を標的とするガラクトシル残基）。細胞膜表面受容体は、リガンド（例えば、ターゲティング部分）および結合分子（例えば、本発明の複合体またはナノ粒子）の細胞ターゲティングおよび標的細胞への内在化を助長する。本発明に関して使用することができる多数のリガンド部分／リガンド結合パートナーは、文献に広く記載されている。そのようなリガンド部分は、所与の結合パートナー分子とまたは少なくとも１つの標的細胞の表面に局在する結

合パートナー分子のクラスと結合する能力を、本発明の複合体またはナノ粒子に付与することができる。好適な結合パートナー分子としては、限定ではないが、細胞特異的マーカー、組織特異的マーカー、細胞受容体、ウイルス抗原、抗原性エピトープおよび腫瘍関連マーカーからなる群から選択されるポリペプチドが挙げられる。結合パートナー分子は、さらに、例えば１つまたは複数の糖、脂質、糖脂質、抗体分子もしくは抗体分子の断片、またはアプタマーからなることもあり、あるいはこれらを含むこともある。本発明によれば、リガンド部分は、例えば、脂質、糖脂質、ホルモン、糖、ポリマー（例えば、ＰＥＧ、ポリリシン、ＰＥＴ）、オリゴヌクレオチド、ビタミン、抗原、レクチンのすべてもしくは一部、例えばＪＴＳ１（ＷＯ９４／４０９５８）などのポリペプチドのすべてもしくは一部、抗体もしくはその断片、またはそれらの組合せであってもよい。一部の実施形態では、本発明で使用されるリガンド部分は、７アミノ酸の最小長を有するペプチドまたはポリペプチドである。リガンド部分は、天然ポリペプチドであるか、または天然ポリペプチドに由来するポリペプチドである。「由来する」は、（ａ）天然配列に対する１つもしくは複数の修飾（例えば、１つもしくは複数の残基の付加、欠失および／もしくは置換）、（ｂ）天然に存在しないアミノ酸を含む、アミノ酸類似体、（ｃ）置換されている連結、または（ｄ）当技術分野において公知の他の修飾を含有することを意味する。リガンド部分として役立つポリペプチドは、例えば、マウス抗体の可変領域およびヒト免疫グロブリンの定常領域を併せ持つヒト化抗体などの、様々な起源の配列を融合させることにより得られるバリアントおよびキメラポリペプチドを包含する。加えて、そのようなポリペプチドは、直鎖状または環化構造を（例えば、システイン残基をポリペプチドリガンドの両端に隣接させることにより）有し得る。加えて、リガンド部分として使用されているポリペプチドは、化学的部分の置換または付加によるその原構造の修飾（例えば、グリコシル化、アルキル化、アセチル化、アミド化、リン酸化、スルフヒドリル基の付加など）を含み得る。本発明は、リガンド部分を検出できるようにする修飾をさらに企図している。このために、検出可能な部分（すなわち、シンチグラフィック、放射性もしくは蛍光部分、または色素標識など）での修飾を、予想することができる。そのような検出可能な標識を、いずれの従来の技法によりリガンド部分に結合させてもよく、診断目的（例えば、腫瘍細胞のイメージング）に使用してもよい。一部の実施形態では、結合パートナー分子は、抗原（例えば、標的細胞特異的抗原、疾患特異的抗原、改変標的細胞の表面で特異的に発現される抗原）であり、リガンド部分は、抗体、その断片または最小認識単位（例えば、抗原特異性をなお提示する断片）、例えば、免疫学マニュアル（例えば、Immunology、第３版、１９９３年、Roitt、BrostoffおよびMale、編集Gambli、Mosbyを参照されたい）に詳細に記載されているものである。リガンド部分は、モノクローナル抗体であってもよい。これらの抗原の多くに結合する多くのモノクローナル抗体が既知であり、モノクローナル抗体技術に関して当技術分野において公知の技法を使用して、ほとんどの抗原に対する抗体を調製することができる。リガンド部分は、抗体の一部（例えば、Ｆａｂ断片）であってもよく、または合成抗体断片（例えば、ＳｃＦｖ）であってもよい。一部の実施形態では、リガンド部分は、全抗体ではなく、抗体断片の中から選択される。補体結合などの全抗体の有効な機能は除去される。ＳｃＦｖおよびｄＡｂ抗体断片は、１つまたは複数の他のポリペプチドとの融合体として発現されることもある。最小認識単位は、Ｆｖ断片の相補性決定領域（ＣＤＲ）の１つまたは複数についての配列に由来することもある。全抗体、およびＦ（ａｂ’）２断片は、「二価」である。「二価」とは、前記抗体およびＦ（ａｂ’）２断片が２つの抗原結合部位を有することを意味する。対照的に、Ｆａｂ、Ｆｖ、ＳｃＦｖ、ｄＡｂ断片および最小認識単位は一価であり、抗原結合部位を１つしか有さない。一部の実施形態では、リガンド部分は、腫瘍細胞へのターゲティングを可能にし、および腫瘍の状態に関連づけられる分子、例えば、腫瘍特異的抗原、腫瘍細胞において差次的にもしくは過剰発現される細胞タンパク質、またはがん関連ウイルス（cancer-associated vims）の遺伝子産物を認識することができ、それらと結合することができる。腫瘍特異的抗原の例としては、乳がんに関連づけられるＭＵＣ－１（Hareuven iら、９９０、Eur. J. Biochem １８９巻、４７５～４８６頁）、乳がんおよび卵巣がんに関連

づけられる変異ＢＲＣＡ１およびＢＲＣＡ２遺伝子によりコードされている産物（Mikiら、１９９４年、Science ２２６巻、６６～７１頁；Fuirealら、１９９４年、Science ２２６巻、１２０～１２２頁；Woosterら、１９９５年、Nature ３７８巻、７８９～７９２頁）、結腸がんに関連づけられるＡＰＣ（Poiakis、１９９５年、Curr. Opin. Genet. Dev. ５巻、６６～７１頁）、前立腺がんに関連づけられる前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）（Stameyら、１９８７年、New England J. Med. ３１７巻、９０９頁）、結腸がんに関連づけられる癌胎児抗原（ＣＥＡ）（Schreweら、１９９０年、Mol. Cell. Biol. １０巻、２７３８～２７４８頁）、メラノーマに関連づけられるチロシナーゼ（Vileら、１９９３年、Cancer Res. ５３巻、３８６０～３８６４頁）、メラノーマ細胞において高度に発現されるメラニン細胞刺激ホルモン（ＭＳＨ）の受容体、乳がんおよび膵臓がんに関連づけられるＥｒｂＢ－２（Harrisら、１９９４年、Gene Therapy １巻、１７０～１７５頁）、ならびに肝がんに関連づけられるアルファ－フェトプロテイン（Kanaiら、１９９７年、Cancer Res. ５７巻、４６１～４６５頁）が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、リガンド部分は、ＭＵＣ－１抗原を認識すること、およびＭＵＣ－１抗原と結合することができ、したがってＭＵＣ－１陽性腫瘍細胞を標的とすることができる、抗体の断片である。一部の実施形態では、リガンド部分は、ＭＵＣ－１抗原のタンデムリピート領域を認識するＳＭ３モノクローナル抗体のｓｃＦｖ断片である（Burshellら、１９８７年、Cancer Res.４７巻、５４７６～５４８２頁；Girlingら、１９８９年、Int. J. Cancer ４３巻、１０７２～１０７６頁；Dokurnoら、１９９８年、J. Mol. Biol. ２８４巻、７１３～７２８頁）。腫瘍細胞において差次的にまたは過剰発現される細胞タンパク質の例としては、一部のリンパ系腫瘍において過剰発現されるインターロイキン２（ＩＬ－２）の受容体、肺癌細胞、膵臓、前立腺および胃腫瘍において過剰発現されるＧＲＰ（ガストリン放出ペプチド）（Michaelら、１９９５年、Gene Therapy ２巻、６６０～６６８頁）、ＴＮＦ（腫瘍壊死因子）受容体、上皮増殖因子受容体、Ｆａｓ受容体、ＣＤ４０受容体、ＣＤ３０受容体、ＣＤ２７受容体、ＯＸ－４０、α－ｖインテグリン（Brooksら、９９４、Science ２６４巻、５６９頁）、およびある特定の血管新生増殖因子の受容体（Hanahan、１９９７年、Science ２７７巻、４８頁）が挙げられるが、これらに限定されない。これらの指標に基づいて、そのようなタンパク質を認識することおよびそのようなタンパク質と結合することができる適切なリガンド部分を定義することは、当業者の範囲内である。例を挙げて説明すると、ＩＬ－２は、ＴＬ－２受容体と結合するための好適なリガンド部分である。線維症および炎症に特異的である受容体の場合、これらは、ＴＧＦベータ受容体またはアデノシン受容体を含み、該受容体は、上文で確認され、本発明の組成物の好適な標的である。多発性骨髄腫の細胞表面マーカーは、これらに限定されないがＣＤ５６、ＣＤ４０、ＦＧＦＲ３、ＣＳ１、ＣＤ１３８、ＩＧＦ１Ｒ、ＶＥＧＦＲおよびＣＤ３８を含み、本発明の組成物の好適な標的である。これらの細胞表面マーカーと結合する好適なリガンド部分としては、抗ＣＤ５６、抗ＣＤ４０、ＰＲＯ－００１、Ｃｈｉｒ－２５８、ＨｕＬｕｃ６３、抗ＣＤ１３８－ＤＭ１、抗ＩＧＦ１Ｒおよびベバシズマブが挙げられるが、これらに限定されない。

標的

【０１９７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、以下のものを含むがそれらに限定されない、１つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む：アデノシン受容体Ａ２Ａ、アデノシン受容体Ａ２Ｂ、アデニリルシクラーゼ、Ａｋｔ、ＡＬＫ、ＡＬＫ／Ｍｅｔ、アンジオポエチン受容体、アンジオテンシンＩＩ、ＡＰＣ、ＡＲ、ＡＲＫ５、アレスチン、ＡＴＦ１、ＡＴＦ－２、Ｂ７－１、Ｂ７－ｈ１（ｐｄｌ－１）、β－カテニン、Ｂｃｌ－２、ＢＣＬ２Ｌ１２、Ｂｃｌ６、Ｂｃｒ－Ａｂｌ、ＢＲＡＦ、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＢＴＫ、カスパーゼ－２、カスパーゼ－９、ＣＣＬ２、ＣＣＮ１、Ｃｃｎｄ２、ＣＤＫ活性化キナーゼ、ＣＥＢＰＡ、Ｃｈｏｐ、ｃ－Ｊｕｎ、ｃ－Ｍｙｃ、ＣＲＥＢ、ＣＲＥＢ１、ＣＳ１、ＣＴＧＦ、ＣＴＮＮＢ１、ＣＸＣＲ４、サイクリンｄ１～２、サイ

クリン依存性キナーゼ（Ｃｄｋ１～１３）、ＤＥＰＴＯＲ、ＤＮＭＴ３Ｂ、ＤＰＣ４、ＥＢＯＶポリメラーゼＬ、ＥＧＦ、ＥＧＦＲ、ｅＩＦ５Ａ、Ｅｌｋ－１、ＥＲ、Ｅｒｂｂ４、ＥＲＫ、ＥＳＲ１、Ｅｔｓ１、ＥＷＳＲ１、ＦＡＫ、ＦＧＦ、ＦＧＦＲ、ＦＯＸＯ１、Ｆｒｉｚｚｌｅｄファミリー受容体（ＦＺＤ－１～１０）、Ｆｙｎ、ＧＡＴＡ１、ＧＡＴＡ３、ＧＬＩ１、ＧＭ－ＣＳＦ、ＧＰ／ｓＧＰ、ＧＳＫ、ＨＢＶ保存配列、ＨＤＡＣ、ＨＤＧＦ、ＨＤＧＦＲ、Ｈｅｒ２、Ｈｅｒ３、ヘキソキナーゼＩＩ、ＨＧＦ、ＨＧＦＲ、ＨＩＦ－１、ＨＩＦ－１α、ヒストンメチルトランスフェラーゼＥＺＨ２、ＨＩＶ　ＴＡＲ　ＲＮＡ、ＨＩＶ　Ｔａｔ、ＨＬＡ－Ｂ７／ベータ２－ミクログロブリン、ＨＭＧＡ２、ＨＮＦ１Ａ、ＨＮＦ１Ｂ、Ｈｓｐ２７、ＨＳＰ４７、ヒトＣＣＲ５、Ｉｄｈ１、Ｉｄｈ２、ＩＧＦ、ＩＧＦＲ、ＩＫＫ、ＩＫＺＦ１、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＮＫ４、インターフェロンガンマ、ＩＲＦ１、ＩＲＦ４、ＪＡＫ、ＪＮＫ、ケラチン１６、ケラチン１７、ケラチンＫ６Ａ、ケラチンＫ６Ｂ、ＫＧＦＲ、ＫＬＦ６、ＫＲＡＳ、ＬＭＯ、ＬＭＯ１、ＬＭＰ２、ＬＭＰ７、ＬＯＸＬ２、ＬＰＬ、ＬＹＬ１、ＭＡＤＲ２、ＭＡＰＫ、Ｍａｘ、Ｍｃｌ－１、ＭＤＡ－７、ＭＤＭ２、ＭＤＲ－１、ＭＤＳ１－ＥＶＩ１、ＭＥＣＬ－１、ＭＥＦ２Ｃ、ＭＥＫ、ＭＥＫＫ、ＭＫＫ、ＭＬＨ１、ＭＬＳＴ８、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９、ＭＳＦＲ、ＭＳＨ２、ＭＳＨ６、ＭＳＩＮ１、ｍＴＯＲ、ＭＵＣ－１、変異型ＤＤＸ３Ｘ、ＭＹＣ、ＮＣＡＰ－Ｄ２、ＮＣＡＰ－Ｄ３、ＮＣＡＰ－Ｇ、ＮＣＡＰ－Ｇ２、ＮＣＡＰ－Ｈ、ＮＣＡＰ－Ｈ２、ＮＦ１、ＮＦ２、ＮＦＡＴ４、ＮＦ－κＢ、Ｎｏｔｃｈ１、ＮＰＣ１、ＮＲ４Ａ３、ＮＲＡＳ、Ｏｌｉｇ２、オステオポンチン、ｐ５３、ＰＡＩ－１、ＰＡＲＰ－１、Ｐａｔｃｈｅｄ、ＰＡＸ３、ＰＡＸ５、ＰＡＸ７、ＰＢＸ１、ＰＤＣＤ４、ＰＤＧＦ、ＰＤＧＦＲ、ＰＤＫ１、ＰＨＯＸ２Ｂ、ＰＩ３Ｋ、ＰＫＡ、ＰＫＣ、ＰＫＮ３、ＰＬＫ－１、ＰＭＬ、ＰＲ、ＰＲＡＳ４０、ＰＲＤＭ１６、Ｐｒｄｘ１およびＰｒｄｘ２（バーキットリンパ腫）、Ｐｒｅ－ｇｅｎ／Ｐｒｅ－Ｃ、Ｐｒｅ－Ｓ１、Ｐｒｅ－Ｓ２／Ｓ、ＰＴＣ、ＰＴＥＮ、Ｐｙｋ２、Ｒａｄ５１、ＲＡＦ、ＲＡＰＴＯＲ、Ｒｂ、ＲＥＴ、ＲＩＣＴＯＲ、ＲＰＮ１３、ＲＲＭ２、ＲＳＶヌクレオカプシド、ＲＵＮＸ１、Ｓ６キナーゼ、Ｓａｐ１ａ、ＳＥＴＢＰ１、Ｓｈｃ、ＳＬＡＭＦ７、Ｓｍａｄ、Ｓｍａｄ３、Ｓｍａｄ　４、Ｓｍａｄ　７、ＳＭＣ－２、ＳＭＣ－４、スムーズンド、ＳＯＸ９、ＳＰＡＲＣ、Ｓｐｒｙ２、Ｓｒｃ、β－２アドレナリン受容体（ＡＤＲＢ２）、β－グロビン、ＳＴＡＴ５Ｂ、ＳＴＡＴ、サバイビン、Ｓｙｋ、Ｔａｌ、ＴＡＬ１、ＴＧＦＲ、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β、ＴＧＦβ受容体１、ＴＧＦβ受容体２、ＴＧＦβ受容体３、ＴＧＦβ１、トロンボスポンジン、チミジンキナーゼ、ＴＩＭ－１、ＴＩＭＰ、ＴＮＦ－α、ＴＰ５３、トランスサイレチン、ＴＲＰＶ１、ユビキチンリガーゼ、ｕＰＡＲ、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＶＨＬ、ＶＰ２４、ＶＰ３０、ＶＰ３５、ＶＰ４０、ｗｎｔ、ＷＴ１、ＷＴ２、ＸＢＰ１（スプライシングされたものおよびスプライシングされていないもの）、ＸＩＡＰ、およびＺＢＴＢ１６（これらの変異型（例えば、変異型ＰＴＥＮ、変異型ＫＲＡＳ、変異型ｐ５３など）を含む）。例えば、一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＲＧＥＮに基づくゲノム編集システム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ゲノム編集システム）の１つまたは複数の分子を含み、ＲＧＥＮに基づくゲノム編集システムは、本明細書に記載の遺伝子のうちの１つを標的とするｇＲＮＡを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＤＧＥＮに基づくゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含み、ＤＧＥＮに基づくゲノム編集システムは、本明細書に記載の遺伝子のうちの１つを標的とするｇＤＮＡを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＺＦＮに基づくゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含み、ＺＦＮは、本明細書に記載の遺伝子のうちの１つを標的とする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＴＡＬＥＮに基づくゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含み、ＴＡＬＥＮは、本明細書に記載の遺伝子のうちの１つを標的とする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ホーミングエンドヌクレアーゼに基づくゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含み、ホーミングエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載の遺伝子のうちの１つを標的とする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、

インテグラーゼに基づくゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含み、インテグラーゼは、本明細書に記載の遺伝子のうちの１つを標的とする。

核酸誘導型エンドヌクレアーゼ

【０１９８】

一部の実施形態では、核酸誘導型エンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼである。一般に、ＣＲＩＳＰＲ（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）は、ＳＰＩＤＲ（スペーサー散在型ダイレクトリピート（SPacer Interspersed Direct Repeat））としても公知であり、特定の細菌種に通常は特異的であるＤＮＡ座位のファミリーを構成する。ＣＲＩＳＰＲ座位は、Ｅ．ｃｏｌｉで認められた散在型の短い配列リピート（ＳＳＲ）の別のクラス（Ishinoら、J. Bacteriol.、１６９巻：５４２９～５４３３頁［１９８７年］；およびNakataら、J. Bacteriol.、１７１巻：３５５３～３５５６頁［１９８９年）］、および関連遺伝子を含む。類似の散在型ＳＳＲが、Ｈａｌｏｆｅｒａｘ ｍｅｄｉｔｅｒｒａｎｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ａｎａｂａｅｎａ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓにおいて同定されている（Groenenら、Mol. Microbiol.、１０巻：１０５７～１０６５頁［１９９３年］；Hoeら、Emerg. Infect. Dis.、５巻：２５４～２６３頁［１９９９年］；Masepohlら、Biochim. Biophys. Acta １３０７巻：２６～３０頁［１９９６年］；およびMojicaら、Mol. Microbiol.、１７巻：８５～９３頁［１９９５年］を参照されたい）。ＣＲＩＳＰＲ座位は、典型的に、リピートの構造が他のＳＳＲとは異なり、その構造は、短い規則的な間隔のリピート（ＳＲＳＲ）と呼ばれている（Janssenら、OMICS J. Integ. Biol.、６巻：２３～３３頁［２００２年］；およびMojicaら、Mol. Microbiol.、３６巻：２４４～２４６頁［２０００年］）。一般に、リピートは、実質的に一定の長さを有する特有の介在配列により規則的に間隔が空いているクラスター内に存在する短いエレメントである（Mojicaら、［２０００年］、上掲）。リピート配列は、系統間で高度に保存されるが、介在リピートの数およびスペーサー領域の配列は、通常は株によって異なる（van Embdenら、J. Bacteriol.、１８２巻：２３９３～２４０１頁［２０００年］）。ＣＲＩＳＰＲ座位は、これらに限定されないが、Ａｅｒｏｐｙｒｕｍ、Ｐｙｒｏｂａｃｕｌｕｍ、Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ、Ａｒｃｈａｅｏｇｌｏｂｕｓ、Ｈａｌｏｃａｒｃｕｌａ、Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ、Ｍｅｔｈａｎｏｓａｒｃｉｎａ、Ｍｅｔｈａｎｏｐｙｒｕｓ、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐｉｃｒｏｐｈｉｌｕｓ、Ｔｈｅｒｍｏｐｌａｓｍａ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ、Ａｑｕｉｆｅｘ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｃｈｌｏｒｏｂｉｕｍ、Ｔｈｅｒｍｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｔｈｅｒｍｏａｎａｅｒｏｂａｃｔｅｒ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ、Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ａｚａｒｃｕｓ、Ｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｎｉｔｒｏｓｏｍｏｎａｓ、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｇｅｏｂａｃｔｅｒ、Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｗｏｌｉｎｅｌｌａ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ｅｒｗｉｎｉａ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ｍｅｔｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ、Ｐｈｏｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ、Ｙｅｒｓｉｎｉａ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ、およびＴｈｅｒｍｏｔｏｇａを含む、４０を超える原核生物において同定されている（例えば、Jansenら、Mol. Microbiol.、４３巻：１５６５～１５７５頁［２００２年］；およびMojicaら、［２００５年］を参照されたい）。

【０１９９】

一般に、「ＣＲＩＳＰＲシステム」は、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）ヌクレアーゼ（例えば、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、または「ＲＧＥＮ」）の活性に関与するタンパク質、転写物および他の分子をまとめて指し、そのようなタンパク質、転写物および他の分子には、Ｃａｓ遺伝子産物、Ｃａｓ遺伝子配列、ｔｒａｃｒ（トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡもしくは活性な部分的ｔｒａｃｒＲＮＡ）、

ｔｒａｃｒメイト配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関しては、「ダイレクトリピート」、およびプロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡの部分的ダイレクトリピートを含む）、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関しては「スペーサー」とも称される）、またはＣＲＩＳＰＲ座位に由来する他の配列、転写物および産物が含まれる。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムの１つまたは複数の分子は、Ｉ型、ＩＩ型またはＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムに由来する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムの１つまたは複数の分子は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓなどの、内因性ＣＲＩＳＰＲシステムを有する特定の生物に由来する。一般に、ＣＲＩＳＰＲシステムは、標的配列の部位でのＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する分子（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関してはプロトスペーサーとも称される）を特徴とする。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成に関して、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計される配列であって、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する、配列を指す。ハイブリダイゼーションを引き起こし、ＣＲＩＳＰＲの形成を促進するのに十分な相補性があるのであれば、必ずしも完全相補性は必要でない。標的配列は、ＤＮＡまたはＲＮＡポリヌクレオチドなどの、任意のポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、標的配列は、細胞の核または細胞質中に存在する。一部の実施形態では、標的配列は、真核細胞の小器官、例えば、ミトコンドリアまたは葉緑体内に存在することもある。標的配列を含む標的座位への組換えに使用することができる配列または鋳型は、「編集鋳型」、「編集ポリヌクレオチド」、「編集配列」、「ドナー配列」または「ドナー核酸」と称される。本発明の態様では、外来性鋳型ポリヌクレオチドは、編集鋳型と称されることもある。本発明の態様では、組換えは、相同組換えである。

【０２００】

典型的に、内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関して、ＣＲＩＳＰＲ複合体（標的配列にハイブリダイズされ、１つまたは複数のＣａｓタンパク質と複合体を形成しているガイド配列を含む、ＣＲＩＳＰＲ複合体）の形成は、結果として、標的配列内または付近（例えば、標的配列から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、またはそれより多い塩基対以内）において一方または両方の鎖が開裂されることになる。野生型ｔｒａｃｒ配列のすべてもしくは一部分（例えば、野生型ｔｒａｃｒ配列の、約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５、もしくはそれより多いヌクレオチド、またはこれらのおよその数より多いヌクレオチド）を含むことまたはそれらからなることがあるｔｒａｃｒ配列は、ガイド配列に作動可能に連結しているｔｒａｃｒメイト配列のすべてまたは一部分への、ｔｒａｃｒ配列の少なくとも一部分に沿ってのハイブリダイゼーションなどにより、ＣＲＩＳＰＲ複合体の一部を形成することもある。一部の実施形態では、ｔｒａｃｒ配列は、ｔｒａｃｒメイト配列との相補性であって、ハイブリダイズするのにおよびＣＲＩＳＰＲ複合体の形成に関与するのに十分な相補性を有する。標的配列と同様に、十分機能するのであれば、完全相補性は必要ないと考えられる。一部の実施形態では、ｔｒａｃｒ配列は、最適にアラインされたとき、ｔｒａｃｒメイト配列の長さに沿って少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の配列相補性を有する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムの１つまたは複数の分子は、１つまたは複数の標的部位でＣＲＩＳＰＲ複合体の形成が起こり得るように、宿主細胞に導入される。例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ、ｔｒａｃｒメイト配列に連結しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列を、各々、宿主細胞に導入して、ガイド配列に相補的な宿主細胞内の標的配列におけるＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を可能にすることができるだろう。

【０２０１】

Ｃａｓタンパク質の非限定的な例としては、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（ＣｓｎおよびＣｓｘ１２としても公知）、Ｃａｓ１０、Ｃｐｆ１、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、Ｃｓａ

Ｘ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、これらのホモログ、またはこれらの修飾バージョン、例えば、誘導性、不活性化またはスプリットＣａｓタンパク質が挙げられる（例えば、Dominguezら（２０１５年）．Nature Reviews Molecular Cell Biology；Polstein，L．R．、およびGersbach，C．A．（２０１５年）．Nature chemical biology、１１巻（３号）：１９８～２００頁；Dowら（２０１５年）．Nature biotechnology、３３巻（４号）３９０～３９４頁；Zetscheら（２０１５年）．Nature biotechnology、３３巻（２号）：１３９～１４２頁；Kleinstiverら（２０１５年）．Nature．５２３巻：４８１～４８５頁；Bikardら（２０１３年）．Nucleic acids research、４１巻（１５号）７４２９～７４３７頁；Qiら（２０１３年）．Cell、１５２巻（５号）：１１７３～１１８３頁を参照されたい）。これらの酵素は、当業者に公知である。例えば、Ｓ．ｐｙｒｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質のアミノ酸配列は、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔデータベースにおいて受託番号Ｑ９９ＺＷ２で見つけることができ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．Ｃｐｆ１タンパク質のアミノ酸配列は、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔデータベースにおいて受託番号Ｕ２ＵＭＱ６で見つけることができる。一部の実施形態では、非修飾ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９は、ＤＮＡ開裂活性を有する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９であり、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓまたは Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅからのＣａｓ９であり得る。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃｐｆ１であり、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓまたは ＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅからのＣｐｆ１であり得る。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、一方または両方の鎖の、標的配列の位置での、例えば、標的配列内および／または標的配列の相補配列内での、開裂を指示する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、一方または両方の鎖の、標的配列の第１のまたは最後のヌクレオチドから約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、５０、１００、２００、５００またはそれより多い塩基対以内での、開裂を指示する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、対応する野生型酵素に対して、変異したＣＲＩＳＰＲ酵素が、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を開裂させる能力を欠くように、変異される。例えば、Ｓ．ｐｙｒｏｇｅｎｅｓからの Ｃａｓ９のＲｕｖＣ Ｉ触媒ドメインにおけるアスパラギン酸のアラニンへの置換（Ｄ１０Ａ）は、両方の鎖を開裂させるヌクレアーゼからのＣａｓ９を（単一の鎖を開裂させる）ニッカーゼに転換する。Ｃａｓ９をニッカーゼにする変異の他の例としては、限定ではないが、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、およびＮ８６３Ａが挙げられる。一部の実施形態では、Ｃａｓ９ニッカーゼを、ガイド配列、例えば、ＤＮＡ標的のセンスおよびアンチセンス鎖をそれぞれ標的とする２つのガイド配列と組み合わせて使用することができる。この組合せにより両方の鎖に切れ目を入れることができ、この組合せは、ＮＨＥＪを導入するために使用される。

【０２０２】

さらなる例としては、Ｃａｓ９の２つまたはそれより多い触媒ドメイン（ＲｕｖＣ Ｉ、ＲｕｖＣ ＩＩ、およびＲｕｖＣ ＩＩＩ）を変異させて、すべてのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠いている変異したＣａｓ９を産生することができる。一部の実施形態では、すべてのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠いているＣａｓ９酵素を産生するためにＤ１０Ａ変異がＨ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、またはＮ８６３Ａと併用される。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、変異した酵素のＤＮＡ開裂活性がその変異していない形態に対して約２５％未満、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％、またはそれ未満である場合、すべてのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠いていると見なされる。他の変異が有用であることもあり、Ｃａｓ９または他のＣＲＩＳＰＲ酵素がＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ以外の種からのものである場合、対応するアミノ酸の変異を行って同様の効果を達成することができる。

【０２０３】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、Ｎ末端Ｃａｓタンパク質断片であるＣａｓ（Ｎ）と、Ｃ末端Ｃａｓタンパク質断片であるＣａｓ（Ｃ）とを含む、スプリットＣａｓタンパク質であって、Ｃａｓ（Ｎ）が、第１の二量体化ドメインに融合しており、Ｃａｓ（Ｃ）が第２の二量体化ドメインに融合しており、第１および第２

の二量体化ドメインが、機能性Ｃａｓヌクレアーゼ活性を有する複合体を形成するためのＣａｓ（Ｎ）とＣａｓ（Ｃ）の二量体化を助長する、スプリットＣａｓタンパク質である。一部の実施形態では、第１および第２の二量体化ドメインの二量体化は、二量体化剤に対して感受性がある。例えば、一部の実施形態では、第１および第２の二量体化ドメインは、ＦＫ５０６結合タンパク質１２（ＦＫＢＰ）と、哺乳動物ラパマイシン標的タンパク質（ｍＴＯＲ）のＦＫＢＰラパマイシン結合（ＦＲＢ）ドメインとを含み、二量体化剤は、ラパマイシンである。

【０２０４】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列は、真核細胞などの特定の細胞における発現のためにコドン最適化される。真核細胞は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌまたは非ヒト霊長類を含むがこれらに限定されない哺乳動物などの、特定の生物のものであってもよく、またはそれに由来するものであってもよい。一般に、コドン最適化は、目的の宿主細胞における発現増強のために核酸配列を修飾するプロセスであって、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、もしくはそれより多いコドン、またはこれらのおよその数より多いコドン）を、天然アミノ酸配列を維持しているときのその宿主細胞の遺伝子の中でより使用頻度が高いまたは最も使用頻度が高いコドンに置き換えることによるプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンについて特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用頻度の差）は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳効率と相関することが多く、そしてまたその翻訳効率は、数ある中でも特に、翻訳されることになるコドンの特性、および特定の転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存すると考えられる。細胞内の選択されたｔＲＮＡの優位性は、一般に、ペプチド合成で最も多く使用されるコドンの影響である。したがって、遺伝子をコドン最適化に基づいて所与の生物における最適な遺伝子発現に合わせることができる。コドン使用頻度表は、例えば「Ｃｏｄｏｎ　Ｕｓａｇｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ」で容易に入手することができ、これらの表をいくつかの方法で適応させることができる。Nakamura, Y.ら、「Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000」Nucl. Acids Res. ２８巻：２９２頁（２０００年）を参照されたい。特定の宿主細胞における発現のために特定の配列をコドン最適化するコンピュータアルゴリズムも利用することができ、例えば、Ｇｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ、Ｐａ．）も利用することができる。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列内の１つまたは複数のコドン（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０もしくはそれより多い、またはすべてのコドン）は、特定のアミノ酸について最も使用頻度が高いコドンに相当する。

【０２０５】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、１つまたは複数の核内移行配列（ＮＬＳ）、例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、もしくはそれより多いＮＬＳ、またはこれらのおよその数より多いＮＬＳを含む。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、アミノ末端またはその付近に約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、もしくはそれよりも多いＮＬＳ、またはこれらのおよその数より多いＮＬＳを含むか、カルボキシ末端にまたはその付近に約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、もしくはそれより多いＮＬＳ、またはこれらのおよその数より多いＮＬＳを含むか、あるいはこれらの組合せ（例えば、アミノ末端に１つまたは複数のＮＬＳ、およびカルボキシ末端に１つまたは複数のＮＬＳ）を含む。１つより多いＮＬＳが存在する場合、各々を互いに独立して選択することができ、したがって、単一のＮＬＳが、１つより多いコピーに存在することもあり、および／または１つもしくは複数のコピーに存在する１つもしくは複数の他のＮＬＳとの組合せで存在することもある。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、最大で６つのＮＬＳを含む。一部の実施形態では、ＮＬＳは、ＮＬＳの最近接アミノ酸が、ポリペプチド鎖に沿ってＮまたはＣ末端から約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０またはそれより多いアミノ酸以内にある場合、ＮまたはＣ末端

付近にあると見なされる。典型的に、ＮＬＳは、タンパク質表面に露出している正荷電リシンまたはアルギニンの１つまたは複数の短い配列からなるが、他のタイプのＮＬＳも公知である。ＮＬＳの非限定的な例としては、次のものに由来するＮＬＳ配列が挙げられる：アミノ酸配列ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号８３）を有する、ＳＶ４０ウイルスラージＴ抗原のＮＬＳ；ヌクレオプラスミンからのＮＬＳ（例えば、配列ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号８４）を有するヌクレオプラスミン二分ＮＬＳ）；アミノ酸配列ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号８５）もしくはＲＱＲＲＮＥＬＫＲＳＰ（配列番号８６）を有するｃ－ｍｙｃ　ＮＬＳ；配列ＮＱＳＳＮＦＧＰＭＫＧＧＮＦＧＧＲＳＳＧＰＹＧＧＧＧＱＹＦＡＫＰＲＮＱＧＧＹ（配列番号８７）を有するｈＲＮＰＡ１　Ｍ９　ＮＬＳ；インポーチン－アルファからのＩＢＢドメインの配列ＲＭＲＩＺＦＫＮＫＧＫＤＴＡＥＬＲＲＲＲＶＥＶＳＶＥＬＲＫＡＫＫＤＥＱＩＬＫＲＲＮＶ（配列番号８８）；筋腫Ｔタンパク質の配列ＶＳＲＫＲＰＲＰ（配列番号８９）およびＰＰＫＫＡＲＥＤ（配列番号９０）；ヒトｐ５３の配列ＰＱＰＫＫＫＰＬ（配列番号９１）；マウスｃ－ａｂ１　ＩＶの配列ＳＡＬＩＫＫＫＫＫＭＡＰ（配列番号９２）；インフルエンザウイルスＮＳ１の配列ＤＲＬＲＲ（配列番号９３）およびＰＫＱＫＫＲＫ（配列番号９４）；肝炎ウイルスデルタ抗原の配列ＲＫＬＫＫＫＩＫＫＬ（配列番号９５）；マウスＭｘ１タンパク質の配列ＲＥＫＫＫＦＬＫＲＲ（配列番号９６）；ヒトポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼの配列ＫＲＫＧＤＥＶＤＧＶＤＥＶＡＫＫＫＳＫＫ（配列番号９７）；およびステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイドの配列ＲＫＣＬＱＡＧＭＮＬＥＡＲＫＴＫＫ（配列番号９８）。

【０２０６】

一般に、ガイド配列は、標的ポリヌクレオチド配列との、該標的配列とハイブリダイズするのに十分な、およびＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を標的配列に指向させるのに十分な、相補性を有する、任意のポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との相補性度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインされたとき、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、もしくはそれより高い、またはこれらのおよその値より高い。最適なアラインメントは、配列をアラインするための任意の好適なアルゴリズムの使用で決定することができ、そのようなアルゴリズムの非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍに基づくアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ　Ｗｈｅｅｌｅｒ　Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで入手可能）、およびＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで入手可能）が挙げられる。一部の実施形態では、ガイド配列は、長さが約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５、もしくはそれより多いヌクレオチド、またはこれらのおよその数より多いヌクレオチドである。一部の実施形態では、ガイド配列は、長さが約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２、もしくはそれより少ないヌクレオチド未満である。ＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を標的配列に指向させるガイド配列の能力を、任意の好適なアッセイにより評定することができる。例えば、試験されることになるガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するのに十分なＣＲＩＳＰＲシステムの成分を、対応する標的配列を有する宿主細胞に供給し、その後、本明細書に記載のサーベイヤーアッセイなどにより標的配列内での優先的開裂を評定することができる。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の開裂は、標的配列と、試験されることになるガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の成分と、被験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列とを供給し、標的配列への結合および標的配列における開裂率を被験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応間で比較することにより、試験管の中で評価することができる。他のアッセイも可能

であり、当業者には思い当たるであろう。

【０２０７】

任意の標的配列を標的にするためのガイド配列を選択することができる。一部の実施形態では、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。例示的な標的配列としては、標的ゲノムに特有であるものが挙げられる。一部の実施形態では、ガイド配列は、該ガイド配列内の二次構造度を低下させるように選択される。二次構造は、任意の好適なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムにより決定することができる。一部のプログラムは、最小ギブズ自由エネルギーの算出に基づく。１つのそのようなアルゴリズムの例は、ＺｕｋｅｒおよびＳｔｉｅｇｌｅｒ（Nucleic Acids Res. ９巻（１９８１年）、１３３～１４８頁）により説明されたような、ｍＦｏｌｄである。フォールディングアルゴリズムの別の例は、重心構造予測アルゴリズムを使用する、ウィーン大学の理論化学研究所（Institute for Theoretical Chemistry at the University of Vienna）で開発された、オンラインウェブサーバーＲＮＡｆｏｌｄである（例えば、A. R. Gruberら、２００８年、Cell １０６巻（１号）：２３～２４頁；ならびにP A CarrおよびG M Church、２００９年、Nature Biotechnology ２７巻（１２号）：１１５１～６２頁を参照されたい）。さらなるアルゴリズムは、参照により本明細書に組み入れられている米国特許出願第６１／８３６，０８０号において見つけることができる。

【０２０８】

一般に、ｔｒａｃｒメイト配列は、ｔｒａｃｒ配列との相補性であって、（１）対応するｔｒａｃｒ配列を含有する細胞内のｔｒａｃｒメイト配列と隣接したガイド配列の切除、および（２）標的配列での、ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされたｔｒａｃｒメイト配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の形成、のうちの１つまたは複数を促進するのに十分な相補性を有する、任意の配列を含む。一般に、相補性度は、ｔｒａｃｒメイト配列とｔｒａｃｒ配列との、これら２配列の短い方の長さに沿っての、最適なアラインメントに関するものである。最適なアラインメントは、任意の好適なアラインメントアルゴリズムにより決定することができ、ｔｒａｃｒ配列内またはｔｒａｃｒメイト配列内のどちらかでの自己相補性などの、二次構造をさらに説明することができる。一部の実施形態では、ｔｒａｃｒ配列とｔｒａｃｒメイト配列との、これら２配列の短い方の長さに沿っての、相補性度は、最適にアラインされたとき、約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、もしくはそれより高い、またはこれらのおよその値より高い。一部の実施形態では、ｔｒａｃｒ配列は、長さが約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０、もしくはそれより多いヌクレオチド、またはこれらのおよその数より多いヌクレオチドである。一部の実施形態では、ガイド配列、ｔｒａｃｒ配列およびｔｒａｃｒメイト配列は、単一のＲＮＡ内に含有され（本明細書では「単一ガイドＲＮＡ」または「ｓｇＲＮＡ」と称される）、その結果、ｔｒａｃｒ配列とｔｒａｃｒメイト配列間のハイブリダイゼーションにより、ヘアピンなどの二次構造が生成される。ヘアピン構造での使用に好ましいループ形成配列は、長さが４ヌクレオチドであり、最も好ましくは配列ＧＡＡＡを有する。しかし、より長いまたはより短いループ配列を使用することができ、代替配列を使用することもできる。配列は、好ましくは、ヌクレオチドトリプレット（例えば、ＡＡＡ）、および追加のヌクレオチド（例えば、ＣまたはＧ）を含む。ループ形成配列の例としては、ＣＡＡＡおよびＡＡＡＧが挙げられる。本発明の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、少なくとも２つまたはそれより多いヘアピンを有する。好ましい実施形態では、ｓｇＲＮＡは、２つ、３つ、４つまたは５つのヘアピンを有する。本発明のさらなる実施形態では、ｓｇＲＮＡは、最大で５つのヘアピンを有する。一部の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、転写終結配列をさらに含み、好ましくは、これは、ポリＴ配列、例えば６Ｔヌクレオチドである。

【０２０９】

一部の実施形態では、ドナー核酸も提供される。一部の実施形態では、ドナー核酸は、ＣＲＩＳＰＲ複合体の一部としてのＣＲＩＳＰＲ酵素により切り目を入れられたまたは開

裂された標的内またはその付近などでの、相同組換えにおいて鋳型として役立つように設計される。ドナー核酸は、任意の好適な長さであってよく、例えば、長さが、約１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、５００、１０００、もしくはそれより多いヌクレオチド、またはこれらのおよその数より多いヌクレオチドである。一部の実施形態では、ドナー核酸は、ポリヌクレオチドの標的配列を含む部分に相補的である配列を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸と標的配列を含むポリヌクレオチドとが最適にアラインされたとき、ドナー核酸は、標的配列の１つまたは複数のヌクレオチド（例えば、約１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、もしくはそれより多いヌクレオチド、またはこれらのおよその数より多いヌクレオチド）と重複する。一部の実施形態では、ドナー核酸と標的配列を含むポリヌクレオチドとが最適にアラインされたとき、相補性領域内のドナー核酸の最近接ヌクレオチドは、標的配列から約１、５、１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、２００、３００、４００、５００、１０００、５０００、１００００、またはそれより多いヌクレオチド以内）にある。

【０２１０】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、１つまたは複数の異種タンパク質ドメイン（例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素に加えて約１つもしくはそれより多い、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれより多いドメイン）を含む融合タンパク質の一部である。ＣＲＩＳＰＲ酵素融合タンパク質は、任意の追加のタンパク質配列と、任意選択で、任意の２ドメイン間のリンカー配列とを含むことができる。ＣＲＩＳＰＲ酵素に融合させることができるタンパク質ドメインの例としては、限定ではないが、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、および次の活性のうちの１つまたは複数を有するタンパク質ドメインが挙げられる：メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、ＲＮＡ開裂活性および核酸結合活性。エピトープタグの非限定的な例としては、ヒスチジン（Ｈｉｓ）タグ、Ｖ５タグ、ＦＬＡＧタグ、インフルエンザ赤血球凝集素（ＨＡ）タグ、Ｍｙｃタグ、ＶＳＶ－Ｇタグ、およびチオレドキシン（Ｔｒｘ）タグが挙げられる。レポーター遺伝子の例としては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ベータガラクトシダーゼ、ベータグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＨｃＲｅｄ、ＤｓＲｅｄ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、および自己蛍光タンパク質（青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。ＣＲＩＳＰＲ酵素は、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、Ｓタグ、Ｌｅｘ　Ａ　ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）融合体、ＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメイン融合体および単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）ＢＰ１６タンパク質融合体を含むがこれらに限定されない、ＤＮＡ分子に結合するまたは他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質の断片をコードする遺伝子配列に融合させることができる。ＣＲＩＳＰＲ酵素を含む融合タンパク質の一部を形成することができる追加のドメインは、参照により本明細書に組み入れられている米国特許出願公開第２０１１００５９５０２号に記載されている。一部の実施形態では、タグ付きＣＲＩＳＰＲ酵素が、標的配列の位置を同定するために使用される。

ＺＦＰおよびＺＦＮ；ＴＡＬ、ＴＡＬＥおよびＴＡＬＥＮ

【０２１１】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、エンドヌクレアーゼなどのエフェクタータンパク質に融合している、１つもしくは複数のジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）または転写活性化因子様タンパク質（ＴＡＬ）などの、ＤＮＡ結合タンパク質（またはＤＮＡ結合タンパク質／エフェクタータンパク質融合体をコードする核酸）を含む。例としては、ＺＦＮ、ＴＡＬＥおよびＴＡＬＥＮが挙げられる。Lloydら、Fronteirs in Immunology、４巻（２２１号）、１～７頁（２０１３年）を参照されたい。

ＺＦＰおよびＺＦＮ

【０２１２】
一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、配列特異的様式でＤＮＡと結合する１つまたは複数のジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）またはそのもしくはそれらのドメインを含む。ＺＦＰまたはそのドメインは、構造が亜鉛イオンの配位により安定化している結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である１つまたは複数のジンクフィンガーによって、配列特異的様式でＤＮＡに結合するタンパク質、またはより大きいタンパク質の中のドメインである。用語ジンクフィンガーＤＮＡ結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質またはＺＦＰと略記されることが多い。
【０２１３】
特異的ＤＮＡ配列を標的とする人工ＺＦＰドメインもＺＦＰのうちの１つであり、このドメインは、典型的に９～１８ヌクレオチド長であり、個々のフィンガーの集合により生成される。
【０２１４】
ＺＦＰには、単一のフィンガードメインが、おおよそ３０アミノ酸の長さであるものであって、単一ベータターンの２つのシステインが亜鉛を介して配位している２つの不変ヒスチジン残基を含有するアルファヘリックスを含有するものであり、２、３、４、５または６つのフィンガーを有するものが含まれる。一般に、ＺＦＰの配列特異性は、ジンクフィンガー認識ヘリックス上の４つのヘリックス位置（－１、２、３および６）でアミノ酸置換を行うことにより変えることができる。したがって、一部の実施形態では、ＺＦＰまたはＺＦＰ含有分子は、天然に存在せず、例えば、選ばれた標的部位と結合するように改変されている。例えば、Beerliら（２００２年）Nature Biotechnol. ２０巻：１３５～１４１頁；Paboら.（２００１年）Ann. Rev. Biochem. ７０巻：３１３～３４０頁；Isalanら（２００１年）Nature Biotechnol. １９巻：６５６～６６０頁；Segalら（２００１年）Curr. Opin. Biotechnol. １２巻：６３２～６３７頁；Chooら（２０００年）Curr. Opin. Struct. Biol. １０巻：４１１～４１６頁；米国特許第６，４５３，２４２号、同第６，５３４，２６１号、同第６，５９９，６９２号、同第６，５０３，７１７号、同第６，６８９，５５８号、同第７，０３０，２１５号、同第６，７９４，１３６号、同第７，０６７，３１７号、同第７，２６２，０５４号、同第７，０７０，９３４号、同第７，３６１，６３５号、同第７，２５３，２７３号、および米国特許出願公開第２００５／００６４４７４号、同第２００７／０２１８５２８号、同第２００５／０２６７０６１号を参照されたく、これらのすべては、それら全体が参照により本明細書に組み入れられている。
【０２１５】
一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を形成するようにＤＮＡ開裂ドメインに融合しているジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも１つのＩＩＳ型制限酵素からの開裂ドメイン（または開裂ハーフドメイン）と、１つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメインとを含み、これらは、改変されていてもよく、または改変されていなくてもよい。一部の実施形態では、開裂ドメインは、ＩＩＳ型制限エンドヌクレアーゼＦｏｋ Ｉからのものである。Ｆｏｋ Ｉは、一般に、ＤＮＡの、一方の鎖上のその認識部位から９ヌクレオチドおよび他方の鎖上のその認識部位から１３ヌクレオチドの位置での、二本鎖開裂を触媒する。例えば、米国特許第５，３５６，８０２号、同第５，４３６，１５０号および同第５，４８７，９９４号、ならびにLiら（１９９２年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ８９巻：４２７５～４２７９頁；Liら（１９９３年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９０巻：２７６４～２７６８頁；Kimら.（１９９４年ａ）Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９１巻：８８３～８８７頁；Kimら（１９９４年ｂ）J. Biol. Chem. ２６９巻：３１，９７８～３１，９８２頁を参照されたい。
【０２１６】
一部の実施形態では、ＺＦＮは、標的細胞中に存在する遺伝子を標的とする。一部の態様では、ＺＦＮは、二本鎖切断（ＤＢＳ）を、例えば、遺伝子のコード領域内の所定の位

置で、効率的に生じさせる。標的とされる典型的な領域としては、エクソン、Ｎ末端領域をコードする領域、第１エクソン、第２エクソン、およびプロモーターまたはエンハンサー領域が挙げられる。一部の実施形態では、ＺＦＮの一過性発現は、標的細胞中の標的遺伝子の高効率の永久的な破壊を促進する。特に、一部の実施形態では、ＺＦＮの送達は、５０％を超える効率で遺伝子の永久的破壊をもたらす。

【０２１７】

遺伝子特異的に改変された多くのジンクフィンガーが市販されている。例えば、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ、ＣＡ、ＵＳＡ）は、研究者がジンクフィンガーの構築および検証を完全に回避できるようにするジンクフィンガー構築用のプラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ）を、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＵＳＡ）と協力して開発し、何千ものタンパク質を特異的に標的とするジンクフィンガーを提供している。Gajら、Trends in Biotechnology、２０１３年、３１号（７巻）、３９７～４０５頁。一部の実施形態では、市販のジンクフィンガーが使用されるか、または注文設計される。（例えば、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈカタログ番号ＣＳＴＺＦＮＤ、ＣＳＴＺＦＮ、ＣＴＩ１－１ＫＴ、およびＰＺＤ００２０を参照されたい）。

ＴＡＬＥおよびＴＡＬＥＮ

【０２１８】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、天然に存在するまたは改変された（天然に存在しない）転写活性化因子様タンパク質（ＴＡＬ）ＤＮＡ結合ドメイン、例えば、転写活性化因子様タンパク質エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質中のそのようなＤＮＡ結合ドメインを含む。例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられている米国特許出願公開第２０１１０３０１０７３号を参照されたい。

【０２１９】

ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインまたはＴＡＬＥは、１つまたは複数のＴＡＬＥ反復ドメイン／単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、ＴＡＬＥのその同族標的ＤＮＡ配列への結合に関与する。単一の「反復単位」（「リピート」とも称される）は、典型的に長さが３３～３５アミノ酸であり、天然に存在するＴＡＬＥタンパク質内の他のＴＡＬＥ反復配列との少なくとも多少の配列相同性を示す。各ＴＡＬＥ反復単位は、反復可変二残基（ＲＶＤ）を構成する１または２つのＤＮＡ結合残基を、通常はリピートの１２および／または１３位に含む。これらのＴＡＬＥのＤＮＡ認識のための天然（標準）コードは、１２および１３位のＨＤ配列がシトシン（Ｃ）への結合につながり、ＮＧがＴと結合し、ＮＩがＡと結合し、ＮＮがＧまたはＡと結合し、ＮＧがＴと結合するように決められており、非標準（非定型）ＲＶＤも公知である。米国特許出願公開第２０１１０３０１０７３を参照されたい。一部の実施形態では、標的ＤＮＡ配列への特異性を有するＴＡＬアレイの設計により、ＴＡＬＥを任意の遺伝子にターゲティングすることができる。標的配列は、一般に、チミジンで始まる。

【０２２０】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＤＮＡ結合エンドヌクレアーゼ、例えば、ＴＡＬＥ－ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含む。一部の態様では、ＴＡＬＥＮは、ＴＡＬＥに由来するＤＮＡ結合ドメインと、核酸標的配列を開裂させるためのヌクレアーゼ触媒ドメインとを含む、融合タンパク質である。一部の実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインは、標的遺伝子内の標的配列に結合するように改変されている。

【０２２１】

一部の実施形態では、ＴＡＬＥＮは、遺伝子内の標的配列を認識し、開裂させる。一部の態様では、ＤＮＡの開裂は、二本鎖切断をもたらす。一部の態様では、これらの切断は、相同組換え率または非相同末端結合（ＮＨＥＪ）率を刺激する。一般に、ＮＨＥＪは、開裂部位におけるＤＮＡ配列を変化させる結果となることが多い不完全な修復プロセスである。一部の態様では、修復機序は、２つのＤＮＡ末端の維持するものについての、直接再連結（CritchlowおよびJackson、Trends Biochem Sci. １９９８年１０月；２３巻

（１０号）：３９４～８頁）による、またはいわゆるマイクロホモロジー媒介末端結合経由での、再結合を含む。一部の実施形態では、ＮＨＥＪ経由での修復は、少ない挿入または欠失をもたらすので、遺伝子を分断するためにおよびそれによって遺伝子を抑止するために使用され得る。一部の実施形態では、修飾は、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失または付加であり得る。一部の態様では、開裂誘発変異導入事象、すなわち、ＮＨＥＪ事象に続いて起こる変異導入事象、が起こった細胞を、当技術分野において周知の方法により同定および／または選択することができる。

【０２２２】

一部の実施形態では、ＴＡＬＥリピートは、遺伝子を特異的に標的とするように組み立てられる。（Gajら、Trends in Biotechnology、２０１３年、３１号（７巻）、３９７～４０５頁）。１８，７４０個のヒトタンパク質コード遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮのライブラリーが構築された（Kimら、Nature Biotechnology. ３１巻、２５１～２５８頁（２０１３年））。注文設計ＴＡＬＥアレイは、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ、Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ、ＫＹ、ＵＳＡ）、およびＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ、ＵＳＡ）を介して市販されている。

【０２２３】

一部の実施形態では、ＴＡＬＥＮは、１つまたは複数のプラスミドベクターによりコードされている導入遺伝子として導入される。一部の態様では、プラスミドベクターは、該ベクターを受け取った細胞の同定および／または選択に備える選択マーカーを含有することができる。

ホーミングエンドヌクレアーゼ

【０２２４】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ホーミングヌクレアーゼ（またはホーミングヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）を含む。ホーミングエンドヌクレアーゼは、イントロン内の独立遺伝子として、宿主タンパク質との融合体として、または自己スプライシング型インテインとしてコードされているエンドヌクレアーゼのコレクションである。ホーミングエンドヌクレアーゼは、それらを合成する細胞内のゲノムＤＮＡの加水分解を触媒するが、非常に少ない位置またはさらには単一の位置でそれを行う。ホーミングエンドヌクレアーゼは、１２～４０ｂｐにわたる非常に長い、および多くの場合、非対称の、認識配列に結合する。ホーミングエンドヌクレアーゼ認識配列は、専ら非常に低い確率（おおよそ7×10^{9}ｂｐに１回）でランダムに出現するのに足る長さであり、通常は、１ゲノムにつき１例見られるか、またはほとんど見られない。加水分解されたＤＮＡの宿主細胞による修復は、結果として、開裂部位にコピーされたホーミングエンドヌクレアーゼをコードする遺伝子をもたらすことが多く、それ故、用語「ホーミング」は、これらの遺伝子の移動を指す。

【０２２５】

ホーミングエンドヌクレアーゼは、単量体またはホモ二量体として動作するが、それらの活性を制御するために会合タンパク質を必要とすることが多く、またはリボ核タンパク質複合体を形成し、この場合はＲＮＡがその触媒装置の不可欠な成分である。現在、６つの公知構造ファミリーがある。それらの保存構造モチーフは、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧ、ＧＩＹ－ＹＩＧ、Ｈｉｓ－Ｃｙｓボックス、Ｈ－Ｎ－Ｈ、ＰＤ－（Ｄ／Ｅ）ｘＫ、およびＶｓｒ様である。

【０２２６】

一部の実施形態では、ホーミングエンドヌクレアーゼは、特異的ＤＮＡ配列を標的とするように修飾された合成酵素（例えば、完全合成酵素）である。例えば、一部の実施形態では、ホーミングエンドヌクレアーゼは、ＡＲＣヌクレアーゼ（商標）（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）である。

インテグラーゼ

【０２２７】
一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される第１の組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムによる修飾の標的となるポリヌクレオチドは、インテグラーゼにより認識される第２の組換え部位を含み、したがって、インテグラーゼは、第１の組換え部位と第２の組換え部位間の組換えを媒介することができる。
【０２２８】
多くのバクテリオファージおよび組込みプラスミドは、それらのゲノムのそれらの宿主のゲノムへの安定した組込みを可能にする部位特異的組換えシステムをコードする。これらのシステムでの組換え反応の最小必要要件は、リコンビナーゼ酵素、または組換え事象を触媒するインテグラーゼ、および２つの組換え部位である（Sadowski （１９８６年） J. Bacteriol. １６５巻：３４１～３４７頁；Sadowski （１９９３年） FASEB J. ７巻：７６０～７６７頁）。ファージ組込みシステムについては、これらは、結合（ａｔｔ）部位と称され、ファージＤＮＡからのａｔｔＰエレメント、および細菌ゲノムによりコードされているａｔｔＢエレメントがある。これら２つの結合部位は、少数の塩基対ほどの低い配列同一性しか共有することができない。リコンビナーゼタンパク質は、両方のａｔｔ部位と結合し、ＤＮＡ鎖の保存的な相互交換を触媒し、その結果、環状ファージまたはプラスミドＤＮＡが宿主ＤＮＡに組み込まれることになる。追加のファージまたは宿主因子、例えば、ＤＮＡ結合タンパク質ＩＨＦ（組込み宿主因子）が、効率的反応には必要とされ得る（Friedman （１９８８年） Cell ５５巻：５４５～５５４頁；FinkelおよびJohnson （１９９２年） Mol. Microbiol. ６巻：３２５７～３２６５頁）。逆切除反応は、ファージλのｘｉｓ遺伝子産物などの、追加のファージ因子を必要とする（WeisbergおよびLandy （１９８３年）「Site-specific recombination in phage lambda.」In Lambda II、Hendrixら編（Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY）２１１～２５０頁；Landy （１９８９年） Ann. Rev. Biochem. ５８巻：９１３～９４９頁）。
【０２２９】
リコンビナーゼは、λインテグラーゼ（Argosら（１９８６年）EMBOJ. ５巻：４３３～４４頁；Voziyanovら（１９９９年）Nucl. Acids Res. ２７巻：９３０～９４１頁）およびリゾルバーゼ／インベルターゼ（HatfullおよびGrindley （１９８８年）「Resolvases and DNA- invertases: a family of enzymes active in site-specific recombination」In Genetic Recombination、Kucherhpati, R.およびSmith, G. R.編（Am. Soc. Microbiol.、Washington DC）、３５７～３９６頁）ファミリーという２つの群に大別されている。これらは、インテグラーゼ酵素の構造、およびそれらの触媒方法の分子的詳細が異なる（Starkら （１９９２年） Trends Genetics ８巻：４３２～４３９頁）。鋳型ＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓファージΦＣ３１は、後述のクラスの６８ｋＤリコンビナーゼをコードする。ΦＣ３１組込み反応は、宿主因子を必要しない点および不可逆的であるようである点で単純であり、これは、切除に追加のファージタンパク質を必要としないためである可能性が最も高い。ファージおよび細菌ａｔｔ部位は、乗換え点で相同性の塩基対を３つしか共有しない。この相同性は、恐らくインテグラーゼタンパク質の結合部位である、逆方向リピートと隣接している。ａｔｔＢとａｔｔＰの両方についての公知最小機能サイズは、約５０ｂｐである。バクテリオファージＰＩのＣｒｅ－ｌｏｘシステム、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＦＬＰ－ＦＲＴシステムは、動物および植物における導入遺伝子および染色体改変に広く使用されている（Sauer（１９９４年）Curr. Opin. Biotechnol. ５巻：５２１～５２７頁；Ow （１９９６年）Curr. Opin. Biotechnol. ７巻：１８１～１８６頁により総説されている）。動物または植物細胞において機能する他のシステムとしては、次のものが挙げられる：１）Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｒｏｕｘｉｉからのＲ－ＲＳシステム（Onouchiら（１９９５年）Mol Gen. Genet. ２４７巻：６５３～６６０頁）、

２）バクテリオファージＭｕからのＧｉｎ－ｇｉｘシステム（MaeserおよびKahmann（１９９１年）Mol. Gen. Genet. ２３０巻：１７０～１７６頁）、および３）細菌プラスミドｐＳＭ１９０３５からのβリコンビナーゼシステム（Diazら（１９９９年）J. Biol. Chem. ２１巻Ａ：６６３４～６６４０頁）。部位特異的リコンビナーゼを使用することにより、より高い組込み頻度を得ることができる。

【０２３０】

一部の実施形態では、インテグラーゼは、原核生物リコンビナーゼ、例えば、バクテリオファージインテグラーゼである。一部の実施形態では、インテグラーゼは、２つの相補的組換え部位間の組換えを触媒することができるが、この組換えにより形成されるハイブリッド部位間の組換えを触媒することができない点で、一方向性である。一部の実施形態ではインテグラーゼは、ΦＣ３１インテグラーゼである。ΦＣ３１インテグラーゼ自体は、ａｔｔＢ×ａｔｔＰ反応のみを触媒するが、ａｔｔＢとａｔｔＰ間の組換えによって形成されるａｔｔＬおよびａｔｔＲ部位間の組換えを媒介することができない。ΦＣ３１インテグラーゼなどのリコンビナーゼは、単独では逆反応を触媒することができないため、そのようなリコンビナーゼにより形成されるａｔｔＢ×ａｔｔＰ組換えは、安定している。

【０２３１】

方法は、真核細胞中に存在する組換え部位（例えば、ａｔｔＢおよびａｔｔＰ）のペアを対応するリコンビナーゼと接触させるステップを含む。すると、リコンビナーゼは、組換え部位間での組換えを媒介する。２つの組換え部位の相対位置に依存して、いくつかの事象のうちのいずれか１つが、組換えの結果として起こり得る。例えば、２つの組換え部位が異なる核酸分子上に存在する場合、組換えは、１つの核酸分子の第２の分子への組込みをもたらすことができる。したがって、１つの組換え部位を含有するプラスミドの、対応する組換え部位を含む真核細胞染色体への組込みを達成することができる。本発明の方法に使用されるリコンビナーゼは、逆反応を触媒することができないため、組込みは安定している。このような方法は、例えば、プラスミド上に存在する導入遺伝子の真核生物染色体への安定した組込みを達成するのに有用である。２つの組換え部位が同じ核酸分子上に存在することもある。そのような場合、結果として得られる産物は、通常は、それらの部位の相対的配向に依存する。例えば、順配向である部位間の組換えは、一般に、２つの組換え部位間にあるいずれかのＤＮＡの切除をもたらすことになる。対照的に、逆配向である部位間の組換えは、介在するＤＮＡの反転をもたらすことができる。この場合もやはり、結果として得られる再配列された核酸は、リコンビナーゼが由来するバクテリオファージであって真核細胞では通常は見いだされない特定のバクテリオファージにより一般にコードされている追加の因子の非存在下では組換えが不可逆的であることから、安定している。この方法が有用である応用の一例は、２つの組換え部位間へのプロモーターの配置を含む。プロモーターが、最初に、該プロモーターにより発現されることになるコード配列に対して反対の配向であり、該プロモーターに隣接する組換え部位が、逆方向の配向である場合、これらの組換え部位を接触させることにより、結果として、プロモーターが反転されることになり、かくしてプロモーターが、コード配列の発現を駆動するのに妥当な配向に配置されることになる。同様に、プロモーターが、最初に、発現に妥当な配向であり、組換え部位が同じ配向である場合、組換え部位をプロモーターに接触させることにより、結果として、プロモーター断片を切除することができ、かくしてコード配列の発現を停止させることができる。

核酸

【０２３２】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、核酸を含む。一部の実施形態では、核酸は、ヌクレアーゼまたはインテグラーゼなどの、ゲノム編集酵素をコードする。一部の実施形態では、核酸は、ガイドＲＮＡまたはガイドＤＮＡ（またはガイドＲＮＡもしくはガイドＤＮＡをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）である。一部の実施形態では、核酸は、ドナー核酸、例えば、相同組換えによる標的ポリヌクレオチ

ドへの修飾の導入のための、または部位特異的組換えによる標的ポリヌクレオチドへの外来性核酸の挿入のための、ドナー核酸である。一部の実施形態では、核酸は、ＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡである。一部の実施形態では、核酸は、ＤＮＡ、例えば、ＤＮＡプラスミドである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムの核酸は、少なくとも１つの修飾、例えば、安定性、細胞内ターゲティング、タンパク質結合親和性、相補標的配列結合親和性、細胞分解に対する耐性、および／または細胞透過性に影響を及ぼす修飾を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの修飾は、標識である。そのような修飾、および核酸へのそれらの導入方法は、当技術分野において周知であり、本明細書に記載の核酸のいずれかとともに使用することが企図される。例えば、ＷＯ２０１１０１５３４７、ＷＯ２０１５０２６８８５、ＷＯ２０１５０２６８８７、ＷＯ２０１５０２６８８３、およびＷＯ２０１５０２６８８６を参照されたい。

【０２３３】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、５’キャップ、３’ポリアデニル化テール、リボスイッチ配列、安定性制御配列、ｄｓＲＮＡ二重鎖を形成する配列、ガイドポリヌクレオチドを細胞内位置にターゲティングする修飾または配列、トラッキングに備える修飾または配列、タンパク質の結合部位を提供する修飾または配列、ロックド核酸（ＬＮＡ）、５－メチルｄＣヌクレオチド、２，６－ジアミノプリンヌクレオチド、２’－フルオロＡヌクレオチド、２’－フルオロＵヌクレオチド、２’－Ｏ－メチルＲＮＡヌクレオチド、ホスホロチオエート結合、コレステロール分子との連結、ポリエチレングリコール分子との連結、スペーサー１８分子との連結、５’と３’の共有結合による連結、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つの修飾を含む核酸を含む。

組成物

【０２３４】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む組成物が提供される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤および／または担体とを含む、医薬組成物である。一部の実施形態では、組成物中の複合体またはナノ粒子の濃度は、約１ｎＭ～約１００ｍＭであり、これは、例えば、約１０ｎＭ～約５０ｍＭ、約２５ｎＭ～約２５ｍＭ、約５０ｎＭ～約１０ｍＭ、約１００ｎＭ～約１ｍＭ、約５００ｎＭ～約７５０μＭ、約７５０ｎＭ～約５００μＭ、約１μＭ～約２５０μＭ、約１０μＭ～約２００μＭ、および約５０μＭ～約１５０μＭを含む。

【０２３５】

本明細書で使用される用語「薬学的に許容される希釈剤、賦形剤および／または担体」は、ヒトまたは他の脊椎動物宿主への投与に適合する任意のおよびすべての溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含むことを意図したものである。典型的に、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤および／または担体は、ヒトはもちろん非ヒト哺乳動物を含む動物における使用について、連邦政府の監督機関、州政府もしくは他の監督機関によって承認された、または米国薬局方もしくは他の一般に認知されている薬局方に収載されている、希釈剤、賦形剤および／または担体である。用語希釈剤、賦形剤および／または「担体」は、医薬組成物を投与するのに用いる希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。そのような薬学的希釈剤、賦形剤および／または担体は、滅菌液、例えば、水および油（石油、動物、植物または合成由来のものを含む）であり得る。水、食塩溶液ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液を液体希釈剤、賦形剤および／または担体として、特に注射用溶液に利用することができる。好適な薬学的希釈剤および／または賦形剤には、凍結乾燥助剤を含む、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物は、必要に応じて、少量の湿潤、増量、乳化剤、またはｐＨ緩衝剤も含有することができる。これらの組

成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、徐放製剤などの形態をとることができる。好適な薬学的希釈剤、賦形剤および／または担体の例は、E.W.Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。製剤は、投与方法に適合しなければならない。適切な希釈剤、賦形剤および／または担体は、当業者には明らかであるであろうし、大部分が投与経路に依存するであろう。

【０２３６】

一部の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、静脈内、腫瘍内、動脈内、局所、眼内、眼科的、門脈内、頭蓋内、脳内、側脳室内、髄腔内、膀胱内、皮内、皮下、筋肉内、鼻腔内、気管内、肺、空洞内または経口投与用に製剤化される。

【０２３７】

一部の実施形態では、ヒトまたは哺乳動物対象の処置に好適であることが判明した本発明の医薬組成物の投薬量は、ゲノム編集複合体またはナノ粒子約０．００１ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇの範囲（例えば、約０．００１、０．０１、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５および１００ｍｇ／ｋｇ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、投薬量範囲は、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇ（例えば、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９および２０ｍｇ／ｋｇ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、投薬量範囲は、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇである。

【０２３８】

例示的な投薬頻度としては、中断なしで週１回；４週間のうちの３週間、週１回；３週間に１回；２週間に１回；３週間のうち２週間、週１回が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、医薬組成物は、約２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、６週間に１回、または８週間に１回、投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、週に少なくとも約１×、２×、３×、４×、５×、６×、または７×（すなわち毎日）のいずれか、投与される。一部の実施形態では、各投与間の間隔は、約６カ月、３カ月、１カ月、２０日、１５日、１２日、１０日、９日、８日、７日、６日、５日、４日、３日、２日または１日のいずれかより短い。一部の実施形態では、各投与間の間隔は、約１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月、８カ月または１２カ月のいずれかより長い。一部の実施形態では、投薬スケジュールに中断がない。一部の実施形態では、各投与間の間隔は、約１週間以下である。一部の実施形態では、個体への医薬組成物の投与スケジュールは、全処置に相当する単回投与から、連日投与に及ぶ。医薬組成物の投与を、約１カ月から約７年までなどの、長期間にわたって延長することができる。一部の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１８、２４、３０、３６、４８、６０、７２または８４ヶ月のいずれかの期間にわたって投与される。

【０２３９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と医薬的に許容される担体とを含む医薬組成物であって、薬学的に許容される担体が糖またはタンパク質である、医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、糖は、スクロース、グルコース、マンニトールおよびこれらの組合せからなる群から選択され、約５％～約２０％の濃度で医薬組成物中に存在する。一部の実施形態では、糖は、スクロースである。一部の実施形態では、糖は、グルコースである。一部の実施形態では、糖は、マンニトールである。一部の実施形態では、タンパク質は、アルブミンである。一部の実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。一部の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥される。

【０２４０】

一部の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、細胞膜透過ペプチド（例えば、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）と、外来性構築物をコードする核酸分子とを含む、発現複合体をさらに含む。一部の実施形態では、外来性構築物は、外来性タンパク質または核酸である。一部の実施形態では、発現複合体中の細胞膜透過ペプチドと核酸分子のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、発現複合体中の細胞膜透過ペプチドと核酸分子のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、これらに限定されないが、ＣＡＤＹ、ＰＥＰ－１、ＭＰＧ、ＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－４、ＶＥＰＥＰ－５、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９およびＡＤＧＮ－１００を含む。一部の実施形態では、発現複合体中の細胞膜透過ペプチドは、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、医薬組成物中のゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドと同じである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、医薬組成物中のゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドと同じでない。一部の実施形態では、外来性タンパク質は、治療用タンパク質である。一部の実施形態では、外来性タンパク質は、抗体もしくはその抗原結合断片であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、外来性タンパク質は、組換え受容体、例えば、細胞の表面で発現され得る組換え受容体である。一部の実施形態では、組換え受容体は、リガンド結合ドメインを含み、リガンドが結合すると、受容体は、シグナル伝達ドメインを介してシグナルを伝達することができる。一部の実施形態では、組換え受容体は、シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、シグナル伝達ドメインを含む内因性タンパク質と会合することができる。一部の実施形態では、リガンド結合ドメインは、抗体もしくはその抗原結合断片であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、抗原受容体、例えば、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。

【０２４１】

したがって、一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と本明細書に記載の発現複合体とを含む組成物、例えば医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、そのような組成物、例えば医薬組成物を使用して、細胞において遺伝子編集と遺伝子発現を同時に果すことができる。

【０２４２】

ＣＡＲをはじめとする例示的な抗原受容体、およびそのような受容体を改変する方法としては、例えば、国際特許出願公開番号ＷＯ２０００１４２５７、ＷＯ２０１３１２６７２６、ＷＯ２０１２／１２９５１４、ＷＯ２０１４０３１６８７、ＷＯ２０１３／１６６３２１、ＷＯ２０１３／０７１１５４、ＷＯ２０１３／１２３０６１、米国特許出願公開第２００２１３１９６０号、同第２０１３２８７７４８号、同第２０１３０１４９３３７号、米国特許第６，４５１，９９５号、同第７，４４６，１９０号、同第８，２５２，５９２号、同第８，３３９，６４５号、同第８，３９８，２８２号、同第７，４４６，１７９号、同第６，４１０，３１９号、同第７，０７０，９９５号、同第７，２６５，２０９号、同第７，３５４，７６２号、同第７，４４６，１９１号、同第８，３２４，３５３号、および同第８，４７９，１１８号、ならびに欧州特許出願番号ＥＰ２５３７４１６に記載されているもの、ならびに／またはSadelainら、Cancer Discov. ２０１３年４月、３巻（４号）３８８～３９８頁；Davilaら（２０１３年）PLoS ONE ８巻（４号）：ｅ６１３３８頁；Turtleら、Curr. Opin. Immunol.、２０１２年１０月、２４巻（５号）：６３３～３９頁；Wuら、Cancer、２０１２年３月、１８巻（２号）：１６０～７５頁により説明されているものが挙げられる。一部の態様では、抗原受容体は、米国特許第７，４４６，１９０号に記載されているようなＣＡＲ、および国際特許出願公開番号ＷＯ／２

０１４０５５６６８Ａ１に記載されているものを含む。ＣＡＲの例としては、ＷＯ２０１４０３１６８７、米国特許第８，３３９，６４５号、米国特許第７，４４６，１７９号、米国特許出願公開第２０１３／０１４９３３７号、米国特許第７，４４６，１９０号、米国特許第８，３８９，２８２号；Kochenderferら、２０１３年、Nature Reviews Clinical Oncology、１０巻、２６７～２７６頁（２０１３年）；Wangら（２０１２年）J. Immunother. ３５巻（９号）：６８９～７０１頁；およびBrentjensら、Sci Transl Med. ２０１３年５巻（１７７号）などの、上述の刊行物のいずれかにおいて開示されているようなＣＡＲが挙げられる。ＷＯ２０１４０３１６８７、米国特許第８，３３９，６４５号、米国特許第７，４４６，１７９号、米国特許出願公開第２０１３／０１４９３３７号、米国特許第７，４４６，１９０号および米国特許第８，３８９，２８２号も参照されたい。

【０２４３】

本明細書に記載のリガンド結合ドメインを含む組換え受容体の一部の実施形態では、リガンド結合ドメインは、疾患または状態に関連するリガンドと特異的に結合する。一部の実施形態では、リガンド結合ドメインは、がん関連抗原または病原体特異的抗原と特異的に結合する。一部の実施形態では、リガンド結合ドメインは、ウイルス抗原（例えば、ＨＩＶ、ＨＣＶ、ＨＢＶなど）、細菌抗原、および／または寄生虫抗原に特異的である。一部の実施形態では、リガンド結合ドメインは、限定ではないが次のものを含むリガンドと、特異的に結合する：オーファンチロシンキナーゼ受容体ＲＯＲｌ、ｔＥＧＦＲ、Ｈｅｒ２、Ｌｌ－ＣＡＭ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、メソセリン、ＣＥＡ、およびＢ型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４、ＥＧＦＲ、ＥＧＰ－２、ＥＧＰ－４、０ＥＰＨａ２、ＥｒｂＢ２、３または４、ＦＢＰ、胎児アセチルコリンｅ受容体、ＧＤ２、ＧＤ３、ＨＭＷ－ＭＡＡ、ＩＬ－２２Ｒ－アルファ、ＩＬ－１３Ｒ－アルファ２、ｋｄｒ、カッパ軽鎖、Ｌｅｗｉｓ　Ｙ、Ｌ１－細胞接着分子、ＭＡＧＥ－Ａ１、メソセリン、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＰＳＣＡ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００、腫瘍胎児抗原、ＲＯＲ１、ＴＡＧ７２、ＶＥＧＦ－Ｒ２、癌胎児抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的抗原、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンＢ２、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ｃ－Ｍｅｔ、ＧＤ－２、およびＭＡＧＥ　Ａ３、ＣＥ７、ウィルムス腫瘍１（ＷＴ－１）、サイクリン、例えばサイクリンＡ１（ＣＣＮＡ１）、ならびに／またはビオチン化分子、ならびに／またはＨＩＶ、ＨＣＶ、ＨＢＶもしくは他の病原体により発現される分子。

調製方法

【０２４４】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を調製する方法であって、ＣＰＰをゲノム編集システムの１つまたは複数の分子と組み合わせるステップを含み、それによってゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成する方法が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）である。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子の一部は、ＣＰＰと組み合わせる前に既に複合体を形成している。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。

【０２４５】
したがって、一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を調製する方法であって、ａ）ＣＰＰをＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）およびｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と組み合わせるステップ；またはｂ）ＣＰＰを既成ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と組み合わせるステップを含み、それによってゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成する方法が提供される。
【０２４６】
例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を調製する方法であって、ａ）水性媒体中で、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、ゲノム編集酵素、またはゲノム編集酵素をコードする核酸）を含む第１の組成物と、細胞膜透過ペプチドを含む第２の組成物とを組み合わせて、混合物を形成するステップ；およびｂ）混合物をインキュベートして、１つまたは複数のゲノム編集システム分子と会合している細胞膜透過ペプチドを含む複合体を形成するステップを含み、それによってゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成する方法が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）である。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子の一部は、ＣＰＰと組み合わせる前に既に複合体を形成している。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、水性媒体は、例えば、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ、または核タンパク質複合体を安定化するための当技術分野において公知の任意の緩衝液を含む、緩衝液である。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子を含む第１の組成物は、１つまたは複数のゲノム編集システム分子（例えば、ゲノム編集ヌクレアーゼ、ｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡ、および／またはドナー核酸）のうちの少なくとも１つを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子を含む第１の組成物は、凍結乾燥形態の１つまたは複数のゲノム編集システム分子と好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドを含む第２の組成物は、細胞膜透過ペプチドを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドを含む第２の組成物は、凍結乾燥形態の細胞膜透過ペプチドと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、溶液は、水で製剤化される。一部の実施形態では、水は、蒸留水である。一部の実施形態では、溶液は、緩衝液で製剤化される。一部の実施形態では、緩衝液は、核酸またはポリペプチドを保管するために使用される当技術分野において公知の任意の緩衝液である。一部の実施形態では、第１の組成物中のゲノム編集ヌクレアーゼとｇＲＮＡまたはｇＤＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：

１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１の組成物中のゲノム編集ヌクレアーゼとｇＲＮＡまたはｇＤＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、混合物中の細胞膜透過ペプチドと、ゲノム編集ヌクレアーゼの、またはゲノム編集ヌクレアーゼを含む複合体のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、混合物中の細胞膜透過ペプチドと、ゲノム編集ヌクレアーゼの、またはゲノム編集ヌクレアーゼを含む複合体のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、混合物は、１つまたは複数のゲノム編集システム分子と会合している細胞膜透過ペプチドを含む複合体またはナノ粒子を形成するために、例えば、約２０分、３０分、４０分および５０分間のいずれかを含む、約１０分～６０分間、例えば、約２℃～約５℃、約５℃～約１０℃、約１０℃～約１５℃、約１５℃～約２０℃、約２０℃～約２５℃、約２５℃～約３０℃、約３０℃～約３５℃、約３５℃～約４０℃、約４０℃～約４５℃、および約４５℃～約５０℃を含む、約２℃～約５０℃の温度でインキュベートされ、それによって、結果として、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液が得られる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液は、例えば、少なくとも約６週間、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月および６ヶ月間のいずれかを含む、少なくとも約３週間、４℃で、安定した状態を保つ。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液は、担体の存在下で凍結乾燥される。一部の実施形態では、担体は、例えば、スクロース、グルコース、マンニトールおよびこれらの組合せを含む、糖であり、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液中に、例えば、約７．５％～約１７．５％、約１０％～約１５％、および約１２．５％を含む、約５％～約２０％、単位体積当たりの重量、で存在する。一部の実施形態では、担体は、例えば、ヒト血清アルブミンなどのアルブミンを含む、タンパク質である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、本明細書に記載のＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号７５～８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０２４７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を調製する方法であって、ａ）水性媒体中で、ＲＧＥＮを含む組成物を、ｇＲＮＡを含む組成物と組み合わせて、第一の混合物を形成するステップ、ｂ）第１の混合物をインキュベートして、ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含むＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を形成するステップ、ｃ）水性媒体中で、ｂ）の混合物などのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を含む組成物を、細胞膜透過ペプチドを含む組成物と組み合わせて、第２の混合物を形成するステップ、ｄ）第２の混合物をインキュベートして、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合している細胞膜透過ペプチドを含む複合体を形成するステップを含み、それによってゲノム編集複合体またはナノ粒子を生成する方法が提供される。一部の実施形態では、方法のステップｃ）は、水性媒体中で、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を含む組成物を、細胞膜透過ペプチドを含む組成物、およびドナー核酸を含む組成物と組み合わせて、第２の混合物を形成するステップを含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を含む組成物、およびドナー核酸を含む組成物は、単一の組成物である。一部の実施形態では、水性媒体は、例えば、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ、または核タンパク質複合体を安定化するための当技術分野において公知の任意の緩衝液を含む、緩衝液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、ＲＧＥＮを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、

１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、凍結乾燥形態のＲＧＥＮと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、ｇＲＮＡを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、凍結乾燥形態のｇＲＮＡと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、細胞膜透過ペプチドを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、凍結乾燥形態の細胞膜透過ペプチドと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、ドナー核酸を約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、凍結乾燥形態のドナー核酸と好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、溶液は、水で製剤化される。一部の実施形態では、水は、蒸留水である。一部の実施形態では、溶液は、緩衝液で製剤化される。一部の実施形態では、緩衝液は、核酸またはポリペプチドを保管するために使用される当技術分野において公知の任意の緩衝液である。一部の実施形態では、第１の混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１の混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、第２の混合物中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第２の混合物中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１の混合物は、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を形成するために、例えば、約２０分、３０分、４０分および５０分間のいずれかを含む、約１０分～６０分間、例えば、約２℃～約５℃、約５℃～約１０℃、約１０℃～約１５℃、約１５℃～約２０℃、約２０℃～約２５℃、約２５℃～約３０℃、約３０℃～約３５℃、約３５℃～約４０℃、約４０℃～約４５℃、および約４５℃～約５０℃を含む、約２℃～約５０℃の温度でインキュベートされ、それによって、結果として、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を含む溶液が得られる。一部の実施形態では、第２の混合物は、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合している細胞膜透過ペプチドを含む複合体を形成するために、例えば、約２０分、３０分、４０分および５０分間のいずれかを含む、約１０分～６０分間、例えば、約２℃～約５℃、約５℃～約１０℃、約１０℃～約１５℃、約１５℃～約２０℃、約２０℃～約２５℃、約２５℃～約３０℃、約３０℃～約３５℃、約３５℃～約４０℃、約４０℃～約４５℃、および約４５℃～約５０℃を含む、約２℃～約５０℃の温度でインキュベートされ、

それによって、結果として、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液が得られる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液は、例えば、少なくとも約６週間、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月および６ヶ月間のいずれかを含む、少なくとも約３週間、４℃で、安定した状態を保つ。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液は、担体の存在下で凍結乾燥される。一部の実施形態では、担体は、例えば、スクロース、グルコース、マンニトールおよびこれらの組合せを含む、糖であり、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液中に、例えば、約７．５％～約１７．５％、約１０％～約１５％、および約１２．５％を含む、約５％～約２０％、単位体積当たりの重量、で存在する。一部の実施形態では、担体は、例えば、ヒト血清アルブミンなどのアルブミンを含む、タンパク質である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、本明細書に記載のＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号７５～８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０２４８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を調製する方法であって、ａ）水性媒体中で、細胞膜透過ペプチドを含む組成物と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）を含む組成物と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）を含む組成物とを組み合わせて、混合物を形成するステップ、ｂ）混合物をインキュベートして、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む複合体を形成するステップを含み、それによってゲノム編集複合体またはナノ粒子を生成する方法が提供される。一部の実施形態では、方法のステップａ）は、水性媒体中で、細胞膜透過ペプチドを含む組成物と、ＲＧＥＮを含む組成物と、ｇＲＮＡを含む組成物と、ドナー核酸を含む組成物とを組み合わせて、混合物を形成するステップを含む。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物、ｇＲＮＡを含む組成物、およびドナー核酸を含む組成物のうちの少なくとも２つは、単一の組成物（例えば、ｇＲＮＡとドナー核酸とを含む単一の組成物）である。一部の実施形態では、水性媒体は、例えば、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ、または核タンパク質複合体を安定化するための当技術分野において公知の任意の緩衝液を含む、緩衝液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、ＲＧＥＮを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、凍結乾燥形態のＲＧＥＮと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、ｇＲＮＡを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、凍結乾燥形態のｇＲＮＡと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、細胞膜透過ペプチドを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、凍結乾燥形態の細胞膜透過ペプチドと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、ドナー核酸を約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μ

Ｍ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、凍結乾燥形態のドナー核酸と好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、溶液は、水で製剤化される。一部の実施形態では、水は、蒸留水である。一部の実施形態では、溶液は、緩衝液で製剤化される。一部の実施形態では、緩衝液は、核酸またはポリペプチドを保管するために使用される当技術分野において公知の任意の緩衝液である。一部の実施形態では、混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、混合物中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、混合物中の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、混合物は、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡと会合している細胞膜透過ペプチドを含む複合体を形成するために、例えば、約２０分、３０分、４０分および５０分間のいずれかを含む、約１０分～６０分間、例えば、約２℃～約５℃、約５℃～約１０℃、約１０℃～約１５℃、約１５℃～約２０℃、約２０℃～約２５℃、約２５℃～約３０℃、約３０℃～約３５℃、約３５℃～約４０℃、約４０℃～約４５℃、および約４５℃～約５０℃を含む、約２℃～約５０℃の温度でインキュベートされ、それによって、結果として、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液が得られる。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液は、例えば、少なくとも約６週間、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月および６ヶ月間のいずれかを含む、少なくとも約３週間、４℃で、安定した状態を保つ。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液は、担体の存在下で凍結乾燥される。一部の実施形態では、担体は、例えば、スクロース、グルコース、マンニトールおよびこれらの組合せを含む、糖であり、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液中に、例えば、約７．５％～約１７．５％、約１０％～約１５％、および約１２．５％を含む、約５％～約２０％、単位体積当たりの重量、で存在する。一部の実施形態では、担体は、例えば、ヒト血清アルブミンなどのアルブミンを含む、タンパク質である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、本明細書に記載のＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドである。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、配列番号７５～８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【０２４９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のコアと少なくとも１つの追加の層とを含むナノ粒子を調製する方法であって、ａ）水性媒体中で、ＲＧＥＮを含む組成物を、ｇＲＮＡを含む組成物と組み合わせて、第一の混合物を形成するステップ、ｂ）第１の混合物をインキュベートして、ＲＧＥＮとｇＲＮＡとを含むＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を形成するステップ、ｃ）水性媒体中で、ｂ）の混合物などのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体を含む組成物を、第１の細胞膜透過ペプチドを含む組成物と組み合わせて、第２の混合物を形成するステップ、ｄ）第２の混合物をインキュベートして、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と会合している第１の細胞膜透過ペプチドを含むナノ粒子のコアを形成するステップ、ｅ）水性媒体中で、ｄ）の混合物などのナノ粒子のコアを含む組成物を、第２の細胞膜透過ペプチドを含む組成物と組み合わせて、第３の混合物を形成するステップ、およびｆ）第３の混合物をインキュベートして、コアと少なくとも１つの追加の層とを含むナノ粒子を形成するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、ｇ）水性媒体中で、コアと

少なくとも１つの追加の層とを含むナノ粒子を含む組成物を、第３の細胞膜透過ペプチドを含む組成物と組み合わせて、第４の混合物を形成するステップ、およびｈ）第４の混合物をインキュベートして、コアと少なくとも２つの追加の層とを含むナノ粒子を形成するステップをさらに含む。ますます多くの層を含むナノ粒子の形成に方法を適応させることができることは、理解されるはずである。一部の実施形態では、組み合わせるステップ（例えば、ステップａ）、ｃ）、ｅ）またはｇ））の少なくとも１つは、ドナー核酸を含む組成物と組み合わせることをさらに含む。一部の実施形態では、水性媒体は、例えば、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ、または核タンパク質複合体を安定化するための当技術分野において公知の任意の緩衝液を含む、緩衝液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、ＲＧＥＮを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、凍結乾燥形態のＲＧＥＮと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、ｇＲＮＡを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、凍結乾燥形態のｇＲＮＡと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、各々、細胞膜透過ペプチドを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、凍結乾燥形態の細胞膜透過ペプチドと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、ドナー核酸を約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、凍結乾燥形態のドナー核酸と好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、溶液は、水で製剤化される。一部の実施形態では、水は、蒸留水である。一部の実施形態では、溶液は、緩衝液で製剤化される。一部の実施形態では、緩衝液は、核酸またはポリペプチドを保管するために使用される当技術分野において公知の任意の緩衝液である。一部の実施形態では、第１の混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１の混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、第２の混合物中の第１の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第２の混合物中の第１の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：

１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の混合物は、各々、例えば、約２０分、３０分、４０分および５０分間のいずれかを含む、約１０分～６０分間、例えば、約２℃～約５℃、約５℃～約１０℃、約１０℃～約１５℃、約１５℃～約２０℃、約２０℃～約２５℃、約２５℃～約３０℃、約３０℃～約３５℃、約３５℃～約４０℃、約４０℃～約４５℃、および約４５℃～約５０℃を含む、約２℃～約５０℃の温度でインキュベートされる。一部の実施形態では、ナノ粒子を含む溶液は、例えば、少なくとも約６週間、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月および６ヶ月間のいずれかを含む、少なくとも約３週間、４℃で、安定した状態を保つ。一部の実施形態では、ナノ粒子を含む溶液は、担体の存在下で凍結乾燥される。一部の実施形態では、担体は、例えば、スクロース、グルコース、マンニトールおよびこれらの組合せを含む、糖であり、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液中に、例えば、約７．５％～約１７．５％、約１０％～約１５％、および約１２．５％を含む、約５％～約２０％、単位体積当たりの重量、で存在する。一部の実施形態では、担体は、例えば、ヒト血清アルブミンなどのアルブミンを含む、タンパク質である。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の細胞膜透過ペプチドは、各々、本明細書に記載のＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドである。一部の実施形態では、第１、第２および／第３の細胞膜透過ペプチドは、各々、配列番号７５、７６、７７、７８、７９または８０のアミノ酸配列を含む。

【０２５０】

一部の実施形態では、本明細書に記載のコアと少なくとも１つの追加の層とを含むナノ粒子を調製する方法であって、ａ）水性媒体中で、第１の細胞膜透過ペプチドを含む組成物と、ＲＧＥＮ（またはＲＧＥＮをコードする核酸）を含む組成物と、ｇＲＮＡを含む組成物とを組み合わせて、第１の混合物を形成するステップ、ｂ）第１の混合物をインキュベートして、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡと会合している第１の細胞膜透過ペプチドを含むナノ粒子のコアを形成するステップ、ｃ）水性媒体中で、ｂ）の混合物などのナノ粒子のコアを含む組成物を、第２の細胞膜透過ペプチドを含む組成物と組み合わせて、第２の混合物を形成するステップ、およびｄ）第２の混合物をインキュベートして、コアと少なくとも１つの追加の層とを含むナノ粒子を形成するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、ｅ）水性媒体中で、コアと少なくとも１つの追加の層とを含むナノ粒子を含む組成物と、第３の細胞膜透過ペプチドを含む組成物とを組み合わせて、第３の混合物を形成するステップ、およびｆ）第３の混合物をインキュベートして、コアと少なくとも２つの追加の層とを含むナノ粒子を形成するステップをさらに含む。ますます多くの層を含むナノ粒子の形成に方法を適応させることができることは、理解されるはずである。一部の実施形態では、組み合わせるステップ（例えば、ステップａ）、ｃ）またはｅ））の少なくとも１つは、ドナー核酸を含む組成物と組み合わせることをさらに含む。一部の実施形態では、水性媒体は、例えば、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ、または核タンパク質複合体を安定化するための当技術分野において公知の任意の緩衝液を含む、緩衝液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、ＲＧＥＮを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ＲＧＥＮを含む組成物は、凍結乾燥形態のＲＧＥＮと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、ｇＲＮＡを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む組成物は、凍結乾燥

形態のｇＲＮＡと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、各々、細胞膜透過ペプチドを約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の細胞膜透過ペプチドを含む組成物は、凍結乾燥形態の細胞膜透過ペプチドと好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、ドナー核酸を約１ｎＭ～約２００μＭ（例えば、約２ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、５００ｎＭ、６００ｎＭ、７００ｎＭ、８００ｎＭ、９００ｎＭ、１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０μＭ、２５μＭ、５０μＭ、１００μＭ、１５０μＭまたは２００μＭ（これらの値の間の任意の範囲を含む）のいずれか）の濃度で含む溶液である。一部の実施形態では、ドナー核酸を含む組成物は、凍結乾燥形態のドナー核酸と好適な担体とを含む固体である。一部の実施形態では、溶液は、水で製剤化される。一部の実施形態では、水は、蒸留水である。一部の実施形態では、溶液は、緩衝液で製剤化される。一部の実施形態では、緩衝液は、核酸またはポリペプチドを保管するために使用される当技術分野において公知の任意の緩衝液である。一部の実施形態では、第１の混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１０：１～約１：１０の間（例えば、約１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、および１：１０（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１の混合物中のＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比は、約１：１である。一部の実施形態では、第１の混合物中の第１の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約１：１～約８０：１の間（例えば、約１：１、５：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１の混合物中の第１の細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比は、約５：１～約２０：１の間（例えば、約５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、および２０：１（これらの比の間の任意の範囲を含む）のいずれか）である。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の混合物は、各々、例えば、約２０分、３０分、４０分および５０分間のいずれかを含む、約１０分～６０分間、例えば、約２℃～約５℃、約５℃～約１０℃、約１０℃～約１５℃、約１５℃～約２０℃、約２０℃～約２５℃、約２５℃～約３０℃、約３０℃～約３５℃、約３５℃～約４０℃、約４０℃～約４５℃、および約４５℃～約５０℃を含む、約２℃～約５０℃の温度でインキュベートされる。一部の実施形態では、ナノ粒子を含む溶液は、例えば、少なくとも約６週間、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月および６ヶ月間のいずれかを含む、少なくとも約３週間、４℃で、安定した状態を保つ。一部の実施形態では、ナノ粒子を含む溶液は、担体の存在下で凍結乾燥される。一部の実施形態では、担体は、例えば、スクロース、グルコース、マンニトールおよびこれらの組合せを含む、糖であり、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む溶液中に、例えば、約７．５％～約１７．５％、約１０％～約１５％、および約１２．５％を含む、約５％～約２０％、単位体積当たりの重量、で存在する。一部の実施形態では、担体は、例えば、ヒト血清アルブミンなどのアルブミンを含む、タンパク質である。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の細胞膜透過ペプチドは、各々、本明細書に記載のＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドである。一部の実施形態では、第１、第２および／または第３の細胞膜透過ペプチドは、各々、配列番号７５、７６、７７、７８、７９または８０のアミノ酸配列を含む。

【０２５１】

本発明のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む安定した組成物についての、一部の実

施形態では、複合体またはナノ粒子の平均直径は、約１０％より大きく変化せず、多分散指数は、約１０％より大きく変化しない。
使用方法
疾患処置方法
【０２５２】
一部の実施形態では、個体の疾患または状態を処置する方法であって、個体に、標的ポリヌクレオチドを修飾するための本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物の有効量を投与するステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、疾患または状態の処置に有用なゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、方法が提供される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含むＣＰＰを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、処置されることになる疾患または状態は、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼疾患、加齢および変性疾患、ならびにコレステロールレベル異常を特徴とする疾患を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、１つまたは複数の遺伝子の配列を修飾することができる。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、１つまたは複数の遺伝子の発現を調節することができる。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、腫瘍抑制因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子を、これらに限定されないが、含むタンパク質をコードする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、医薬組成物の個体への投与が、該個体の細胞における標的ポリヌクレオチドを修飾するのに十分なものであるような、全ゲノム編集システムを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の１つまたは複数の追加のゲノム編集複合体またはナノ粒子をさらに含み、医薬組成物中の複数のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、医薬組成物の個体への投与が、該個体の細胞における標的ポリヌクレオチドを修飾するのに十分なものであるような、全ゲノム編集システムを含む。一部の実施形態では、方法は、個体に、本明細書に記載の１つまたは複数の追加のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む１つまたは複数の追加の医薬組成物の有効量を投与するステップをさらに含み、複数の医薬組成物中の複数のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、複数の医薬組成物の個体への投与が、個体の細胞における標的ポリヌクレオチドを修飾するのに十分なものであるような、全ゲノム編集システムを含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによる発現複合体をさらに含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、

ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）と、キメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む、発現複合体をさらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患または状態に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。

【０２５３】

本明細書で使用される活性または発現の「調節」は、遺伝子もしくはｍＲＮＡの状態もしくはコピー数を制御もしくは変更すること、または産生されるタンパク質などの遺伝子産物の量を変化させることを意味する。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、標的遺伝子の発現を阻害する。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、遺伝子または遺伝子産物の発現を、少なくとも約０％、２０％、３０％、４０％、６０％、７０％、８０％、９０％または１００％のいずれか、阻害する。

【０２５４】

一部の実施形態では、個体の疾患または状態を処置する方法であって、個体に、標的ポリヌクレオチドを修飾するための本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物の有効量を投与するステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、疾患または状態の処置に有用なゲノム編集システムの１つまたは複数の分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む細胞膜透過ペプチドとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、処置されることになる疾患または状態は、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼疾患、加齢および変性疾患、ならびにコレステロールレベル異常を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、医薬組成物中のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、個体の１つまたは複数の遺伝子の配列を修飾するための、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む。一部の実施形態では、医薬組成物中のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、個体の１つまたは複数の遺伝子の発現を調節するための、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、腫瘍抑制因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子を、これらに限定されないが、含むタンパク質をコードする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、医薬組成物の個体への投与が、該個体の細胞における標的ポリヌクレオチドを修飾するのに十分なものであるような、全ゲノム編集システムを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の１つまたは複数の追加のゲノム編集複合体またはナノ粒子をさらに含み、医薬組成物中の複数のゲノム編集複

合体またはナノ粒子は、医薬組成物の個体への投与が、該個体の細胞における標的ポリヌクレオチドを修飾するのに十分なものであるような、全ゲノム編集システムを含む。一部の実施形態では、方法は、個体に、本明細書に記載の１つまたは複数の追加のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む１つまたは複数の追加の医薬組成物の有効量を投与するステップをさらに含み、複数の医薬組成物中の複数のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、複数の医薬組成物の個体への投与が、個体の細胞における標的ポリヌクレオチドを修飾するのに十分なものであるような、全ゲノム編集システムを含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を減少させること、または不活性な産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を不活性化するように修飾される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を増加させること、または活性標的遺伝子産物を発現する修飾標的遺伝子をもたらすことなどにより、標的遺伝子を活性化するように修飾される。一部の実施形態では、医薬組成物は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）と、キメラ抗原受容体をコードする核酸分子とを含む、発現複合体をさらに含む。一部の実施形態では、キメラ抗原受容体は、疾患または状態に関連する抗原と特異的に結合する。

【０２５５】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、これらに限定されないが以下のものを含む、１つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む：アデノシン受容体Ａ２Ａ、アデノシン受容体Ａ２Ｂ、アデニリルシクラーゼ、Ａｋｔ、ＡＬＫ、ＡＬＫ／Ｍｅｔ、アンジオポエチン受容体、アンジオテンシンＩＩ、ＡＰＣ、ＡＲ、ＡＲＫ５、アレスチン、ＡＴＦ１、ＡＴＦ－２、Ｂ７－１、Ｂ７－ｈ１（ｐｄｌ－１）、β－カテニン、Ｂｃｌ－２、ＢＣＬ２Ｌ１２、Ｂｃｌ６、Ｂｃｒ－Ａｂｌ、ＢＲＡＦ、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＢＴＫ、カスパーゼ－２、カスパーゼ－９、ＣＣＬ２、ＣＣＮ１、Ｃｃｎｄ２、ＣＤＫ活性化キナーゼ、ＣＥＢＰＡ、Ｃｈｏｐ、ｃ－Ｊｕｎ、ｃ－Ｍｙｃ、ＣＲＥＢ、ＣＲＥＢ１、ＣＳ１、ＣＴＧＦ、ＣＴＮＮＢ１、ＣＸＣＲ４、サイクリンｄ１～２、サイクリン依存性キナーゼ（Ｃｄｋ１～１３）、ＤＥＰＴＯＲ、ＤＮＭＴ３Ｂ、ＤＰＣ４、ＥＢＯＶポリメラーゼＬ、ＥＧＦ、ＥＧＦＲ、ｅＩＦ５Ａ、Ｅｌｋ－１、ＥＲ、Ｅｒｂｂ４、ＥＲＫ、ＥＳＲ１、Ｅｔｓ１、ＥＷＳＲ１、ＦＡＫ、ＦＧＦ、ＦＧＦＲ、ＦＯＸＯ１、Ｆｒｉｚｚｌｅｄファミリー受容体（ＦＺＤ－１～１０）、Ｆｙｎ、ＧＡＴＡ１、ＧＡＴＡ３、ＧＬＩ１、ＧＭ－ＣＳＦ、ＧＰ／ｓＧＰ、ＧＳＫ、ＨＢＶ保存配列、ＨＤＡＣ、ＨＤＧＦ、ＨＤＧＦＲ、Ｈｅｒ２、Ｈｅｒ３、ヘキソキナーゼＩＩ、ＨＧＦ、ＨＧＦＲ、ＨＩＦ－１、ＨＩＦ－１α、ヒストンメチルトランスフェラーゼＥＺＨ２、ＨＩＶ ＴＡＲ ＲＮＡ、ＨＩＶ Ｔａｔ、ＨＬＡ－Ｂ７／ベータ２－ミクログロブリン、ＨＭＧＡ２、ＨＮＦ１Ａ、ＨＮＦ１Ｂ、Ｈｓｐ２７、ＨＳＰ４７、ヒトＣＣＲ５、Ｉｄｈ１、Ｉｄｈ２、ＩＧＦ、ＩＧＦＲ、ＩＫＫ、ＩＫＺＦ１、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＮＫ４、インターフェロンガンマ、ＩＲＦ１、ＩＲＦ４、ＪＡＫ、ＪＮＫ、ケラチン１６、ケラチン１７、ケラチンＫ６Ａ、ケラチンＫ６Ｂ、ＫＧＦＲ、ＫＬＦ６、ＫＲＡＳ、ＬＭＯ、ＬＭＯ１、ＬＭＰ２、ＬＭＰ７、ＬＯＸＬ２、ＬＰＬ、ＬＹＬ１、ＭＡＤＲ２、ＭＡＰＫ、Ｍａｘ、Ｍｃｌ－１、ＭＤＡ－７、ＭＤＭ２、ＭＤＲ－１、ＭＤＳ１－ＥＶＩ１、ＭＥＣＬ－１、ＭＥＦ２Ｃ、ＭＥＫ、ＭＥＫＫ、ＭＫＫ、ＭＬＨ１、ＭＬＳＴ８、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９、ＭＳＦＲ、ＭＳＨ２、ＭＳＨ６、ＭＳＩＮ１、ｍＴＯＲ、ＭＵＣ－１、変異型ＤＤＸ３Ｘ、ＭＹＣ、ＮＣＡＰ－Ｄ２、ＮＣＡＰ－Ｄ３、ＮＣＡＰ－Ｇ、ＮＣＡＰ－Ｇ２、ＮＣＡＰ－Ｈ、ＮＣＡＰ－Ｈ２、ＮＦ１、ＮＦ２、ＮＦＡＴ４、ＮＦ－κＢ、Ｎｏｔｃｈ１、ＮＰＣ１、ＮＲ４Ａ３、ＮＲＡＳ、Ｏｌｉｇ２、オステオポンチン、ｐ５３、ＰＡＩ－１、ＰＡＲＰ－１、Ｐａｔｃｈｅｄ、ＰＡＸ３、ＰＡＸ５、ＰＡＸ７、ＰＢＸ１、ＰＤＣＤ４、ＰＤＧＦ、ＰＤＧＦＲ、ＰＤＫ１、ＰＨＯＸ２Ｂ、ＰＩ３Ｋ、ＰＫＡ、ＰＫＣ、ＰＫＮ３、ＰＬＫ－１、ＰＭＬ、ＰＲ、ＰＲＡＳ４０、ＰＲＤＭ１６、Ｐｒｄｘ１およ

びＰｒｄｘ２（バーキットリンパ腫）、Ｐｒｅ－ｇｅｎ／Ｐｒｅ－Ｃ、Ｐｒｅ－Ｓ１、Ｐｒｅ－Ｓ２／Ｓ、ＰＴＣ、ＰＴＥＮ、Ｐｙｋ２、Ｒａｄ５１、ＲＡＦ、ＲＡＰＴＯＲ、Ｒｂ、ＲＥＴ、ＲＩＣＴＯＲ、ＲＰＮ１３、ＲＲＭ２、ＲＳＶヌクレオカプシド、ＲＵＮＸ１、Ｓ６キナーゼ、Ｓａｐ１ａ、ＳＥＴＢＰ１、Ｓｈｃ、ＳＬＡＭＦ７、Ｓｍａｄ、Ｓｍａｄ　３、Ｓｍａｄ　４、Ｓｍａｄ　７、ＳＭＣ－２、ＳＭＣ－４、スムーズンド、ＳＯＸ９、ＳＰＡＲＣ、Ｓｐｒｙ２、Ｓｒｃ、β２アドレナリン受容体（ＡＤＲＢ２）、β－グロビン、ＳＴＡＴ５Ｂ、ＳＴＡＴ、サバイビン、Ｓｙｋ、Ｔａｌ、ＴＡＬ１、ＴＧＦＲ、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β、ＴＧＦβ受容体１、ＴＧＦβ受容体２、ＴＧＦβ受容体３、ＴＧＦβ１、トロンボスポンジン、チミジンキナーゼ、ＴＩＭ－１、ＴＩＭＰ、ＴＮＦ－α、ＴＰ５３、トランスサイレチン、ＴＲＰＶ１、ユビキチンリガーゼ、ｕＰＡＲ、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＶＨＬ、ＶＰ２４、ＶＰ３０、ＶＰ３５、ＶＰ４０、ｗｎｔ、ＷＴ１、ＷＴ２、ＸＢＰ１（スプライシングされたものおよびスプライシングされていないもの）、ＸＩＡＰ、およびＺＢＴＢ１６（これらの変異型（例えば、変異型ＰＴＥＮ、変異型ＫＲＡＳ、変異型ｐ５３など）を含む）。

疾患および状態

【０２５６】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、がんである。一部の実施形態では、がんは、固形腫瘍であり、医薬組成物は、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、腫瘍抑制因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子を含むがこれらに限定されないタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、増殖因子またはサイトカインには、これらに限定されないが、ＥＧＦ、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＨＧＦ、ＨＤＧＦ、ＩＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β、ＴＮＦ－αおよびｗｎｔが、これらの変異型を含めて、含まれる。一部の実施形態では、細胞表面受容体には、これらに限定されないが、ＥＲ、ＰＲ、Ｈｅｒ２、Ｈｅｒ３、アンジオポエチン受容体、ＥＧＦＲ、ＦＧＦＲ、ＨＧＦＲ、ＨＤＧＦＲ、ＩＧＦＲ、ＫＧＦＲ、ＭＳＦＲ、ＰＤＧＦＲ、ＴＧＦＲ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、Ｆｒｉｚｚｌｅｄファミリー受容体（ＦＺＤ－１～１０）、スムーズンド、ＰａｔｃｈｅｄおよびＣＸＣＲ４が、これらの変異型を含めて、含まれる。一部の実施形態では、シグナル伝達分子またはキナーゼには、これらに限定されないが、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＲＡＦ、ＭＥＫ、ＭＥＫＫ、ＭＡＰＫ、ＭＫＫ、ＥＲＫ、ＪＮＫ、ＪＡＫ、ＰＫＡ、ＰＫＣ、ＰＩ３Ｋ、Ａｋｔ、ｍＴＯＲ、Ｒａｐｔｏｒ、ＲＩＣＴＯＲ、ＭＬＳＴ８、ＰＲＡＳ４０、ＤＥＰＴＯＲ、ＭＳＩＮ１、Ｓ６キナーゼ、ＰＤＫ１、ＢＲＡＦ、ＦＡＫ、Ｓｒｃ、Ｆｙｎ、Ｓｈｃ、ＧＳＫ、ＩＫＫ、ＰＬＫ－１、サイクリン依存性キナーゼ（Ｃｄｋ１～１３）、ＣＤＫ活性化キナーゼ、ＡＬＫ／Ｍｅｔ、Ｓｙｋ、ＢＴＫ、Ｂｃｒ－Ａｂｌ、ＲＥＴ、β－カテニン、Ｍｃｌ－１およびＰＫＮ３が、これらの変異型を含めて、含まれる。一部の実施形態では、転写因子、または他の転写調節因子には、これらに限定されないが、ＡＲ、ＡＴＦ１、ＣＥＢＰＡ、ＣＲＥＢ１、ＥＳＲ１、ＥＷＳＲ１、ＦＯＸＯ１、ＧＡＴＡ１、ＧＡＴＡ３、ＨＮＦ１Ａ、ＨＮＦ１Ｂ、ＩＫＺＦ１、ＩＲＦ１、ＩＲＦ４、ＫＬＦ６、ＬＭＯ１、ＬＹＬ１、ＭＹＣ、ＮＲ４Ａ３、ＰＡＸ３、ＰＡＸ５、ＰＡＸ７、ＰＢＸ１、ＰＨＯＸ２Ｂ、ＰＭＬ、ＲＵＮＸ１、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ７、ＳＴＡＴ５Ｂ、ＴＡＬ１、ＴＰ５３、ＷＴ１、ＺＢＴＢ１６、ＡＴＦ－２、Ｃｈｏｐ、ｃ－Ｊｕｎ、ｃ－Ｍｙｃ、ＤＰＣ４、Ｅｌｋ－１、Ｅｔｓ１、Ｍａｘ、ＭＥＦ２Ｃ、ＮＦＡＴ４、Ｓａｐ１ａ、ＳＴＡＴ、Ｔａｌ、ｐ５３、ＣＲＥＢ、ＮＦ－κＢ、ＨＤＡＣ、ＨＩＦ－１αおよびＲＲＭ２が、これらの変異型を含めて、含まれる。一部の実施形態では、タンパク質発現または修飾の制御因子には、これらに限定されないが、ユビキチンリガーゼ、ＬＭＰ２、ＬＭＰ７およびＭＥＣＬ－１が、これらの変異型を含めて、含まれる。一部の実施形態では、腫瘍抑制因子には、これらに限定されないが、ＡＰＣ、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＤＰＣ４、ＩＮＫ４、ＭＡＤＲ２、ＭＬＨ１、ＭＳＨ２、

ＭＳＨ６、ＮＦ１、ＮＦ２、ｐ５３、ＰＴＣ、ＰＴＥＮ、Ｒｂ、ＶＨＬ、ＷＴ１およびＷＴ２が、これらの変異型を含めて、含まれる。一部の実施形態では、アポトーシスまたは転移の制御因子には、これらに限定されないが、ＸＩＡＰ、Ｂｃｌ－２、オステオポンチン、ＳＰＡＲＣ、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９、ｕＰＡＲが、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２５７】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、固形腫瘍である、がんであり、医薬組成物は、腫瘍の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、腫瘍の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、インターフェロン－ガンマ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｂ７－１、カスパーゼ－９、ｐ５３、ＭＵＣ－１、ＭＤＲ－１、ＨＬＡ－Ｂ７／ベータ２－ミクログロブリン、Ｈｅｒ２、Ｈｓｐ２７、チミジンキナーゼおよびＭＤＡ－７が、これらの変異型を含めて、含まれる。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。

【０２５８】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、肝がんである、がんであり、医薬組成物は、肝がんの発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、肝がんは、肝細胞癌、胆管細胞癌、肝臓の血管肉腫（angiosarcoma）、または肝臓の血管肉腫（hemangiosarcoma）である。一部の実施形態では、肝がんの発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＣＣＮＤ２、ＲＡＤ２３Ｂ、ＧＲＰ７８、ＣＥＰ１６４、ＭＤＭ２およびＡＬＤＨ２が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２５９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかによれば、がんは、肝細胞癌（ＨＣＣ）である。一部の実施形態では、ＨＣＣは、早期ＨＣＣ、非転移性ＨＣＣ、原発性ＨＣＣ、進行ＨＣＣ、局所進行ＨＣＣ、転移性ＨＣＣ、寛解期のＨＣＣ、または再発ＨＣＣである。一部の実施形態では、ＨＣＣは、限局性切除可能（すなわち、完全な外科的除去が可能である肝臓の一部分に限定される腫瘍）であるか、限局性切除不能（すなわち、極めて重要な血管構造に浸潤しているため、もしくは肝臓が障害されるため、切除不能であり得る限局性腫瘍）であるか、または切除不能である（すなわち、腫瘍が、すべての肝臓葉に浸潤している、および／または拡大して他の器官（例えば、肺、リンパ節、骨）に浸潤してしまっている。一部の実施形態では、ＨＣＣは、ＴＮＭ分類に従って、ステージＩ腫瘍（血管浸潤のない単一の腫瘍）、ステージＩＩ腫瘍（血管浸潤を伴う単一の腫瘍、または５ｃｍより大きいものがない複数の腫瘍）、ステージＩＩＩ腫瘍（いずれも５ｃｍより大きい複数の腫瘍、または門脈もしくは肝静脈の主枝に浸潤している腫瘍）、ステージＩＶ腫瘍（胆嚢以外の隣接器官への直接浸潤、または臓側腹膜穿孔を伴う、腫瘍）、Ｎ

１腫瘍（局所リンパ節転移）またはＭ１腫瘍（遠隔転移）である。一部の実施形態では、ＨＣＣは、ＡＪＣＣ（米国がん合同委員会（American Joint Commission on Cancer））ステージ分類基準に従って、ステージＴ１、Ｔ２、Ｔ３またはＴ４　ＨＣＣである。一部の実施形態では、ＨＣＣは、肝臓細胞癌、ＨＣＣの線維層板型バリアントおよび混合型肝細胞・胆管細胞癌のいずれか１つである。一部の実施形態では、個体は、肝細胞癌に関連する遺伝子、遺伝子変異または多型（例えば、ＣＣＮＤ２、ＲＡＤ２３Ｂ、ＧＲＰ７８、ＣＥＰ１６４、ＭＤＭ２および／またはＡＬＤＨ２の変異または多型）を有するヒトであってもよく、または肝細胞癌に関連する遺伝子の１つもしくは複数の余分なコピーを有するヒトであってもよい。

【０２６０】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、肺がんである、がんであり、医薬組成物は、肺がんの発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、肺がんの発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＳＡＳＨ１、ＬＡＴＳ１、ＩＧＦ２Ｒ、ＰＡＲＫ２、ＫＲＡＳ、ＰＴＥＮ、Ｋｒａｓ２、Ｋｒａｇ、Ｐａｓ１、ＥＲＣＣ１、ＸＰＤ、ＩＬ８ＲＡ、ＥＧＦＲ、Ot_1－ＡＤ、ＥＰＨＸ、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ１２、ＩＬ１β、ＲＡＳおよびＡＫＴが、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２６１】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかによれば、がんは、肺がんである。一部の実施形態では、肺がんは、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）である。ＮＳＣＬＣの例としては、大細胞癌（例えば、大細胞神経内分泌癌、混合型大細胞神経内分泌癌、類基底細胞癌、リンパ上皮腫様癌、明細胞癌、およびラブドイド表現型を有する大細胞癌）、腺癌（例えば、腺房状、乳頭状（例えば、気管支肺胞癌、非粘液性、粘液性、粘液性と非粘液性の混合型、および不確定細胞型）、ムチンを伴う固形腺癌、混合亜型を伴う腺癌、高分化型胎児型腺癌、粘液性（膠様）腺癌、粘液性嚢胞腺癌、印環細胞癌、および明細胞腺癌）、神経内分泌肺腫瘍、および扁平上皮癌（例えば、乳頭状、明細胞、小細胞、類基底のもの）が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＴＮＭ分類に従って、ステージＴ腫瘍（原発性腫瘍）、ステージＮ腫瘍（局所リンパ節）、またはステージＭ腫瘍（遠隔転移）である。一部の実施形態では、肺がんは、カルチノイド（定型または非定型）、腺扁平上皮癌、円柱腫、または唾液腺癌（例えば、腺様嚢胞癌または粘表皮癌）である。一部の実施形態では、肺がんは、多形性、肉腫様または肉腫性事象を伴う癌（例えば、紡錘および／もしくは巨細胞を伴う癌、紡錘細胞癌、巨細胞癌、癌肉腫、または肺芽腫を伴う癌）である。一部の実施形態では、がんは、小細胞肺がん（ＳＣＬＣ；燕麦細胞癌とも呼ばれる）である。小細胞肺がんは、限局型小細胞肺がんであってもよく、進展型小細胞肺がんであってもよく、または再発小細胞肺がんであってもよい。一部の実施形態では、個体は、肺がんに関連することが疑われるもしくは明らかにされた遺伝子、遺伝子変異もしくは多型（例えば、ＳＡＳＨ１、ＬＡＴＳ１、ＩＧＦ２Ｒ、ＰＡＲＫ２、ＫＲＡＳ、ＰＴＥＮ、Ｋｒａｓ２、Ｋｒａｇ、Ｐａｓ１、ＥＲＣＣ１、ＸＰＤ、ＩＬ８ＲＡ、ＥＧＦＲ、Ot_1－ＡＤ、ＥＰＨＸ、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ１２、ＩＬ１　β、ＲＡＳおよび／もしくはＡＫＴの変異もしくは多型）を有するヒトであってもよく、または肺がんに関連する遺伝子の１つもしくは複数の余分なコピーを有するヒトであってもよい。

【０２６２】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、腎細胞癌（ＲＣＣ）である、がんであり、医薬組成物は、ＲＣＣの発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体また

はナノ粒子を含む。一部の実施形態では、ＲＣＣの発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＶＨＬ、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、ＣＵＬ２、ＭＳＨ２、ＭＬＨ１、ＩＮＫ４ａ／ＡＲＦ、ＭＥＴ、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β１、ＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－ＩＲ、ＡＫＴおよびＰＴＥＮが、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２６３】

一部の実施形態では、上記に記載の方法のいずれかによれば、がんは、腎細胞癌である。一部の実施形態では、腎細胞癌は、腺癌で癌ある。一部の実施形態では、腎細胞癌は、明細胞腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌（好色素性腎細胞癌とも呼ばれる）、嫌色素性腎細胞癌、集合管腎細胞癌、顆粒細胞型腎細胞癌（granular renal cell carcinoma）、混合顆粒細胞型腎細胞癌（mixed granular renal cell carcinoma）、腎血管筋脂肪腫、または紡錘細胞型腎細胞癌（spindle renal cell carcinoma）である。一部の実施形態では、個体は、腎細胞癌に関連する遺伝子、遺伝子変異または多型（例えば、ＶＨＬ、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、ＣＵＬ２、ＭＳＨ２、ＭＬＨ１、ＩＮＫ４ａ／ＡＲＦ、ＭＥＴ、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β１、ＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－ＩＲ、ＡＫＴおよび／またはＰＴＥＮの変異または多型）を有するヒトであってもよく、または腎細胞癌に関連する遺伝子の１つもしくは複数の余分なコピーを有するヒトであってもよい。一部の実施形態では、腎細胞癌は、（１）フォンヒッペル・リンダウ（ＶＨＬ）症候群、（２）遺伝性乳頭状腎癌（ＨＰＲＣ）、（３）バート・ホッグ・デュベ症候群（ＢＨＤＳ）に関連する家族性腎オンコサイトーマ（ＦＲＯ）、または（４）遺伝性腎癌（ＨＲＣ）に、関連している。一部の実施形態では、腎細胞癌は、米国がん合同委員会（American Joint Committee on Cancer）（ＡＪＣＣ）ステージ分類基準に従って、ステージＩ、ＩＩ、ＩＩＩまたはＩＶのいずれかである。一部の実施形態では、腎細胞癌は、ステージＩＶ腎細胞癌である。

【０２６４】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、中枢神経系（ＣＮＳ）腫瘍である、がんであり、医薬組成物は、ＣＮＳ腫瘍の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、ＣＮＳ腫瘍に対する外科手術手技中または後（例えば、直後）に投与される。一部の実施形態では、外科手術手技は、ＣＮＳ腫瘍の切除である。一部の実施形態では、医薬組成物は、外科手術手技の結果として生じる術後空洞に投与される。一部の実施形態では、ＣＮＳ腫瘍の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＮＦ１、ＮＦ２、ＳＭＡＲＣＢ１、ｐＶＨＬ、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、ｐ５３、ＣＨＫ２、ＭＬＨ１、ＰＭＳ２、ＰＴＣＨ、ＳＵＦＵおよびＸＲＣＣ７が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２６５】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかによれば、がんは、ＣＮＳ腫瘍である。一部の実施形態では、ＣＮＳ腫瘍は、神経膠腫（例えば、脳幹神経膠腫および混合型神経膠腫）、神経膠芽腫（多形神経膠芽腫としても公知）、星細胞腫（例えば、高悪性度星細胞腫）、小児神経膠腫もしくは神経膠芽腫（例えば、小児高悪性度神経膠腫（ＨＧＧ）およびびまん性内在性橋神経膠腫（ＤＩＰＧ））、ＣＮＳリンパ腫、胚細胞腫、髄芽腫、シュワン腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、または脳転移である。一部の実施形態では、個体は、ＣＮＳ腫瘍に関連することが疑われるもしくは明らかにされた遺伝子、遺伝子変異または多型（例えば、ＮＦ１、ＮＦ２、ＳＭＡＲＣＢ１、ｐＶＨＬ、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、ｐ５３、ＣＨＫ２、ＭＬＨ１、ＰＭＳ２、ＰＴＣＨ、ＳＵＦＵおよびＸＲＣＣ７の変異もしくは多型）を有するヒトであってもよく、またはＣＮＳ腫瘍に関連する遺伝子の１つもしくは複数の余分なコピーを有するヒトであってもよい。

【０２６６】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、血液疾患であり、医薬組成物は、血液疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、血液疾患は、ヘモグロビン異常症、例えば、鎌状赤血球症、サラセミアもしくはメトヘモグロビン血症、貧血、例えば、巨赤芽球性貧血、溶血性貧血（例えば、遺伝性球状赤血球症、遺伝性楕円赤血球症、先天性赤血球形成異常性貧血、グルコース－６－リン酸脱水素酵素欠損症、ピルビン酸キナーゼ欠損症、免疫介在性溶血性貧血、自己免疫性溶血性貧血、温式抗体自己免疫性溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、エバンス症候群、寒冷自己免疫性溶血性貧血、寒冷凝集素症、発作性寒冷ヘモグロビン尿症、伝染性単核症、同種免疫性溶血性貧血、新生児溶血性疾患、もしくは発作性夜間ヘモグロビン尿症）、再生不良性貧血（例えば、ファンコニ貧血、ダイアモンド・ブラックファン貧血、もしくは後天性赤芽球癆）、骨髄異形成症候群、骨髄線維症、好中球減少症、顆粒球減少症、グランツマン血小板無力症、血小板減少症、骨髄増殖性障害、例えば、真正赤血球増加症、赤血球増加症、白血球増加症もしくは血小板増加症、または凝血異常、例えば、再発性血栓症、播種性血管内凝固、血友病（例えば、血友病Ａ、血友病Ｂ、もしくは血友病Ｃ）、フォン・ヴィルブランド病、プロテインＳ欠乏症、抗リン脂質抗体症候群、またはウィスコット・オルドリッチ症候群である。一部の実施形態では、血液疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＨＢＡ１、ＨＢＡ２、ＨＢＢ、ＰＲＯＣ、ＡＬＡＳ２、ＡＢＣＢ７、ＳＬＣ２５Ａ３８、ＭＴＴＰ、ＦＡＮＣＡ、ＦＡＮＣＢ、ＦＡＮＣＣ、ＦＡＮＣＤ１（ＢＲＣＡ２）、ＦＡＮＣＤ２、ＦＡＮＣＥ、ＦＡＮＣＦ、ＦＡＮＣＧ、ＦＡＮＣＩ、ＦＡＮＣＪ（ＢＲＩＰ１）、ＦＡＮＣＬ、ＦＡＮＣＭ、ＦＡＮＣＮ（ＰＡＬＢ２）、ＦＡＮＣＰ（ＳＬＸ４）、ＦＡＮＣＳ（ＢＲＣＡ１）、ＲＡＤ５１Ｃ、ＸＰＦ、ＡＮＫ１、ＳＰＴＢ、ＳＰＴＡ、ＳＬＣ４Ａ１、ＥＰＢ４２、およびＴＰＩ１が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２６７】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、器官に基づいた疾患であり、医薬組成物は、器官に基づいた疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、器官に基づいた疾患は、眼、肝臓、肺、腎臓、心臓、神経系、筋肉または皮膚の疾患である。一部の実施形態では、疾患は、心血管疾患、例えば、冠動脈心疾患、高血圧症、心房細動、末梢動脈疾患、マルファン症候群、ＱＴ延長症候群、または先天性心臓欠陥である。一部の実施形態では、疾患は、消化器系疾患、例えば、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、セリアック病、消化性潰瘍疾患、胃食道逆流症、または慢性膵炎である。一部の実施形態では、疾患は、泌尿器疾患、例えば、慢性前立腺炎、良性前立腺肥大症、または間質性膀胱炎である。一部の実施形態では、疾患は、筋骨格系疾患、例えば、変形性関節症、骨粗鬆症、骨形成不全症、または骨パジェット病である。一部の実施形態では、疾患は、皮膚疾患、例えば、湿疹、乾癬、ざ瘡、酒さ、または皮膚炎である。一部の実施形態では、疾患は、歯牙または頭蓋顔面障害、例えば、歯周病または顎関節および筋肉の障害（ＴＭＪＤ）である。

【０２６８】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、眼疾患であり、医薬組成物は、眼疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、眼疾患は、加齢黄斑変性またはこれに類するもの、未熟児網膜症、ポリープ状脈絡膜血管症、糖尿病網膜症、糖尿病黄斑浮腫、虚血性増殖

性網膜症、網膜色素変性、錐体ジストロフィー、増殖性硝子体網膜症、網膜動脈閉塞症、網膜静脈閉塞症、角膜炎、結膜炎、ぶどう膜炎、レーベル病、網膜剥離、網膜色素上皮剥離、血管新生緑内障、角膜血管新生、網膜脈絡膜血管新生である。一部の実施形態では、血液疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、Ｒｈｏ、ＰＤＥ６β、ＡＢＣＡ４、ＲＰＥ６５、ＬＲＡＴ、ＲＤＳ／ペリフェリン、ＭＥＲＴＫ、ＣＮＧＡ１、ＲＰＧＲ、ＩＭＰＤＨ１、ＣｈＲ２、ＧＵＣＹ２Ｄ、ＲＤＳ／ペリフェリン、ＡＩＰＬ１、ＡＢＣＡ４、ＲＰＧＲＩＰ１、ＩＭＰＤＨ１、ＡＩＰＬ１、ＧＵＣＹ２Ｄ、ＬＲＡＴ、ＭＥＲＴＫ、ＲＰＧＲＩＰ１、ＲＰＥ６５、ＣＥＰ２９０、ＡＢＣＡ４、ＤＦＮＢ３１、ＭＹＯ７Ａ、ＵＳＨ１Ｃ、ＣＤＨ２３、ＰＣＤＨ１５、ＵＳＨ１Ｇ、ＣＬＲＮ１、ＧＮＡＴ２、ＣＮＧＡ３、ＣＮＧＢ３、Ｒｓ１、ＯＡ１、ＭＴ－ＮＤ４、（ＯＣＡ１）、チロシナーゼ、ｐ２１　ＷＡＦ－１／ＯＣｉｐｌ、ＲＥＰ－１、ＰＤＧＦ、エンドスタチン、アンジオスタチン、ＶＥＧＦ阻害剤、オプシン、ＯＰＮ１ＬＷ、アリールスルファターゼＢおよびβ－グルクロニダーゼが、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２６９】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、肝臓疾患であり、医薬組成物は、肝臓疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、肝臓疾患は、肝炎、脂肪肝疾患（アルコール性および非アルコール性）、ヘモクロマトーシス、ウィルソン病、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症３型、遺伝性果糖不耐症、糖原病ＩＶ型、高チロシン血症Ｉ型、アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症、シトリン欠損症（ＣＴＬＮ２、ＮＩＣＣＤ）、コレステロールエステル蓄積症、嚢胞性線維症、アルストレム症候群、先天性肝線維症、アルファ１アンチトリプシン欠損症、糖原病ＩＩ型、トランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス、ジルベール症候群、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変または原発性硬化性胆管炎である。一部の実施形態では、肝臓疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＡＴＰ７Ｂ、ＡＢＣＢ４、ＡＬＤＯＢ、ＧＢＥ１、ＦＡＨ、ＡＳＬ、ＳＬＣ２５Ａ１３、ＬＩＰＡ、ＣＦＴＲ、ＡＬＭＳ１、ＨＦＥ、ＨＦＥ２、ＨＦＤＥ２Ｂ、ＨＦＥ３、ＳＬＣ１１Ａ３／ＳＬＣ４０Ａ１、セルロプラスミン、トランスフェリン、Ａ１ＡＴ、ＢＣＳ１Ｌ、Ｂ３ＧＡＴ１、Ｂ３ＧＡＴ２、Ｂ３ＧＡＴ３、ＵＧＴ１Ａ１、ＵＧＴ１Ａ３、ＵＧＴ１Ａ４、ＵＧＴ１Ａ５、ＵＧＴ１Ａ６、ＵＧＴ１Ａ７、ＵＧＴ１Ａ８、ＵＧＴ１Ａ９、ＵＧＴ１Ａ１０、ＵＧＴ２Ａ１、ＵＧＴ２Ａ２、ＵＧＴ２Ａ３、ＵＧＴ２Ｂ４、ＵＧＴ２Ｂ７、ＧＴ２Ｂ１０、ＵＧＴ２Ｂ１１、ＵＧＴ２Ｂ１５、ＵＧＴ２Ｂ１７、およびＵＧＴ２Ｂ２８が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２７０】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、肺疾患であり、医薬組成物は、肺疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、肺疾患は、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、喘息、嚢胞性線維症、原発性線毛機能不全、肺線維症、バート・ホッグ・デュベ症候群、結節性硬化症、カルタゲナー症候群、α_1－アンチトリプシン欠損症、肺毛細血管腫症（ＰＣＨ）、または遺伝性出血性毛細血管拡張症である。一部の実施形態では、肺疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＩＲＥＢ２、ＨＨＩＰ、ＦＡＭ１３Ａ、ＩＬ１ＲＬ１、ＴＳＬＰ、ＩＬ３３、ＩＬ２５、ＣＦＴＲ、ＤＮＡＩ１、ＤＮＡＨ５、ＴＸＮＤＣ３、ＤＮＡＨ１１、ＤＮＡＩ２、ＫＴＵ、ＲＳＰＨ４Ａ、ＲＳＰＨ９、ＬＲＲＣ５０、ＴＥＲＣ、ＴＥＲＴ、ＳＦＴＰＣ、ＳＦＴＰＡ２、ＦＬＣＮ、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、Ａ１Ａ

Ｔ、ＥＮＧ、ＡＣＶＲＬ１、およびＭＡＤＨ４が、これらの変異型を含めて、含まれる。
【０２７１】
本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、腎臓疾患であり、医薬組成物は、腎臓疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、腎臓疾患は、嚢胞性腎臓疾患（例えば、常染色体優性多発性嚢胞腎、常染色体劣性多発性嚢胞腎、ネフロン癆、もしくは海綿腎）、アルポート症候群、バーター症候群、先天性ネフローゼ症候群、爪膝蓋骨症候群、原発性免疫性糸球体腎炎、逆流性腎症、または溶血性尿毒症症候群である。一部の実施形態では、腎臓疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＰＫＤ１、ＰＫＤ２、ＰＫＤ３、フィブロシスチン、ＮＰＨＰ１、ＮＰＨＰ２、ＮＰＨＰ３、ＮＰＨＰ４、ＮＰＨＰ５、ＮＰＨＰ６、ＮＰＨＰ７、ＮＰＨＰ８、ＮＰＨＰ９、ＮＰＨＰ１１、ＮＰＨＰ１１、ＮＰＨＰＬ１、ＧＤＮＦ、ＣＯＬ４Ａ５、ＣＯＬ４Ａ３、ＣＯＬ４Ａ４、ＳＬＣ１２Ａ２（ＮＫＣＣ２）、ＲＯＭＫ／ＫＣＮＪ１、ＣＬＣＮＫＢ、ＢＳＮＤ、ＣＡＳＲ、ＳＬＣ１２Ａ３（ＮＣＣＴ）、およびＡＤＡＭＴＳ１３が、これらの変異型を含めて、含まれる。
【０２７２】
本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、筋肉疾患であり、医薬組成物は、筋肉疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、筋肉疾患は、ミオパチー（例えば、ミトコンドリアミオパチー）、筋ジストロフィー（例えば、デュセンヌ型、ベッカー型、エミリー・ドレイフス型、顔面肩甲上腕型、筋強直性、先天性、遠位型、肢帯型、および眼咽頭型）、脳性麻痺、進行性骨化性線維異形成症、皮膚筋炎、コンパートメント症候群、重症筋無力症、筋萎縮性側索硬化症、横紋筋融解、多発性筋炎、線維筋痛症、筋強直、筋筋膜性疼痛症候群である。一部の実施形態では、筋肉疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＤＭＤ、ＬＡＭＡ２、コラーゲンＶＩ（ＣＯＬ６Ａ１、ＣＯＬ６Ａ２、またはＣＯＬ６Ａ３）、ＰＯＭＴ１、ＰＯＭＴ２、ＦＫＴＮ、ＦＫＲＰ、ＬＡＲＧＥ１、ＰＯＭＧＮＴ１、ＩＳＰＤ、ＳＥＰＮ１、ＬＭＮＡ、ＤＹＳＦ、ＥＭＤ、ＤＵＸ４、ＤＭＰＫ、ＺＮＦ９、ＰＡＢＰＮ１、ＣＡＶ３、ＣＡＰＮ３、ＳＧＣＡ、ＳＧＣＢ、ＳＧＣＧ、ＳＧＣＤ、ＴＴＮ、ＡＮＯ５、ＤＮＡＪＢ６、ＨＮＲＮＰＤＬ、ＭＹＯＴ、ＴＣＡＰ、ＴＮＰＯ３、ＴＲＡＰＰＣ１１、およびＴＲＩＭ３２が、これらの変異型を含めて、含まれる。
【０２７３】
本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、神経系疾患（例えば、中枢神経系疾患）であり、医薬組成物は、神経系疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、神経系疾患は、副腎白質ジストロフィー、アンジェルマン症候群、毛細血管拡張症性運動失調症、シャルコー・マリー・トゥース症候群、コケイン症候群、本態性振戦、脆弱Ｘ症候群、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、レッシュ・ナイハン症候群、メープルシロップ尿症、メンケス症候群、ナルコレプシー、神経線維腫症、ニーマン・ピック病、フェニルケトン尿症、プラダー・ウィリー症候群、レフサム病、レット症候群、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳変性症、タンジール病、テイ・サックス病、結節性硬化症、フォンヒッペル・リンダウ症候群、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ツェルベーガー症候群、注意欠陥／多動性障害（ＡＤＨＤ）、自閉症、双極性障害、うつ病、てんかん、偏頭痛、多発性硬化症、脊髄症、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、またはトゥレット病であ

る。一部の実施形態では、神経系疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＡＬＤ、ＰＳ１（ＡＤ３）、ＰＳ２（ＡＤ４）、ＳＯＤ１、ＵＢＥ３Ａ、ＡＴＭ、ＰＭＰ２２、ＭＰＺ、ＬＩＴＡＦ、ＥＧＲ２、ＭＦＮ２、ＫＩＦ１Ｂ、ＲＡＢ７Ａ、ＬＭＮＡ、ＴＲＰＶ４、ＢＳＣＬ２、ＧＡＲＳ、ＮＥＦＬ、ＨＳＰＢ１、ＧＤＡＰ１、ＨＳＰＢ８、ＭＴＭＲ２、ＳＢＦ２、ＳＨ３ＴＣ２、ＮＤＲＧ１、ＰＲＸ、ＦＧＤ４、ＦＩＧ４、ＤＮＭ２、ＹＡＲＳ、ＧＪＢ１、ＰＲＰＳ１、ＣＳＡ、ＣＳＢ、Ｃｘ２６、ＥＰＭ２Ａ、ＥＴＭ１（ＦＥＴ１）、ＥＴＭ２、ＦＭＲ１、フラタキシン、ＧＢＡ、ＨＴＴ、ＨＰＲＴ１、ＢＣＫＤＨ、ＡＴＰ７Ａ、ＡＴＰ７Ｂ、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＮＦ１、ＮＦ２、ＳＭＰＤ１、ＮＰＣ１、ＮＰＣ２、ＬＲＲＫ２、ＰＡＲＫ７、ＰＩＮＫ１、ＰＲＫＮ、ＳＮＣＡ、ＵＣＨＬ１、ＰＡＨ、ＰＨＹＨ、ＰＥＸ７、ＭｅＣＰ２、ＳＭＮ１、ＡＴＸＮ遺伝子（例えば、ＡＴＸＮ１、ＡＴＸＮ２など）、ＡＢＣ１、ＨＥＸＡ、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、ＶＨＬ、ＣＬＩＰ２、ＥＬＮ、ＧＴＦ２Ｉ、ＧＴＦ２ＩＲＤ１、ＬＩＭＫ１、およびＰＸＲ１が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２７４】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、血液悪性腫瘍であるがんであり、医薬組成物は、血液悪性腫瘍の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍の発症および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＧＬＩ１、ＣＴＮＮＢ１、ｅＩＦ５Ａ、変異型ＤＤＸ３Ｘ、ヘキソキナーゼＩＩ、ヒストンメチルトランスフェラーゼＥＺＨ２、ＡＲＫ５、ＡＬＫ、ＭＵＣ１、ＨＭＧＡ２、ＩＲＦ１、ＲＰＮ１３、ＨＤＡＣ１１、Ｒａｄ５１、Ｓｐｒｙ２、ｍｉｒ－１４６ａ、ｍｉｒ－１４６ｂ、サバイビン、ＭＤＭ２、ＭＣＬ１、ＣＭＹＣ、ＸＢＰ１（スプライシングされたものおよびスプライシングされていないもの）、ＳＬＡＭＦ７、ＣＳ１、Ｅｒｂｂ４、Ｃｘｃｒ４（ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症）、Ｍｙｃ、Ｂｃｌ２、ＰｒｄｘｌおよびＰｒｄｘ２（バーキットリンパ腫）、Ｂｃｌ６、Ｉｄｈ１、Ｉｄｈ２、Ｓｍａｄ、Ｃｃｎｄ２、サイクリンｄ１～２、Ｂ７－ｈ１（ｐｄｌ－１）およびＰｙｋ２が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２７５】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、ウイルス感染性疾患であり、医薬組成物は、ウイルス感染性疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、ウイルス感染性疾患は、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ピコルナウイルス、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、インフルエンザウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス、風疹ウイルス、脳炎ウイルス、狂犬病ウイルス、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、ポリオーマウイルス、ＲＳＶ、アデノウイルス、黄熱病ウイルス、デングウイルス、パラインフルエンザウイルス、出血性ウイルス、ポックスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、パラインフルエンザウイルス、レオウイルス、オルビウイルス、ロタウイルス、パルボウイルス、アフリカブタ熱ウイルス、麻疹、ムンプスまたはノーウォークウイルスによる感染を特徴とする。一部の実施形態では、ウイルス感染性疾患は、ＣＭＶ、ＥＢＶ、ＨＢＶ、ＫＳＨＶ、ＨＰＶ、ＭＣＶ、ＨＴＬＶ－１、ＨＩＶ－１およびＨＣＶを含むがこれらに限定されない、発癌ウイルスによる感染を特徴とする。一部の実施形態では、ウイルス感染性疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ＲＳＶヌクレオカプシド、Ｐｒｅ－ｇｅｎ／Ｐｒｅ－Ｃ、Ｐｒｅ－Ｓ１、Ｐｒｅ－Ｓ２／Ｓ、Ｘ、ＨＢＶ保存配列、ＨＩＶ　Ｇａｇポリタンパク質（ｐ５５）、ＨＩＶ　Ｐｏｌポリタンパク質、ＨＩＶ

Ｇａｇ－Ｐｏｌ前駆体（ｐ１６０）、ＨＩＶマトリックスタンパク質（ＭＡ、ｐ１７）、ＨＩＶカプシドタンパク質（ＣＡ、ｐ２４）、ＨＩＶスペーサーペプチド１（ＳＰ１、ｐ２）、ＨＩＶヌクレオカプシドタンパク質（ＮＣ、ｐ９）、ＨＩＶスペーサーペプチド２（ＳＰ２、ｐ１）、ＨＩＶ　Ｐ６タンパク質、ＨＩＶ逆転写酵素（ＲＴ、ｐ５０）、ＨＩＶ　ＲＮアーゼＨ（ｐ１５）、ＨＩＶインテグラーゼ（ＩＮ、ｐ３１）、ＨＩＶプロテアーゼ（ＰＲ、ｐ１０）、ＨＩＶ　Ｅｎｖ（ｇｐ１６０）、ｇｐ１２０、ｇｐ４１、ＨＩＶトランス活性化因子（Ｔａｔ）、ＨＩＶビリオンタンパク質発現制御因子（Ｒｅｖ）、ＨＩＶレンチウイルスタンパク質Ｒ（Ｖｐｒ）、ＨＩＶ　Ｖｉｆ、ＨＩＶ陰性因子（Ｎｅｆ）、ＨＩＶウイルスタンパク質Ｕ（Ｖｐｕ）、ヒトＣＣＲ５、ｍｉＲ－１２２、ＥＢＯＶポリメラーゼＬ、ＶＰ２４、ＶＰ４０、ＧＰ／ｓＧＰ、ＶＰ３０、ＶＰ３５、ＮＰＣ１およびＴＩＭ－１をコードする遺伝子が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２７６】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患または状態は、自己免疫または炎症性疾患または状態であり、医薬組成物は、自己免疫または炎症性疾患または状態の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、自己免疫または炎症性疾患または状態は、ざ瘡、アレルギー、アナフィラキシー、喘息、セリアック病、憩質炎、糸球体腎炎、炎症性腸疾患、間質性膀胱炎、狼瘡、耳炎、骨盤内炎症性疾患、関節リウマチ、サルコイドーシス、または血管炎である。一部の実施形態では、自己免疫または炎症性疾患または状態の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、補体系の分子をコードする遺伝子（ＣＤ４６、ＣＤ５９、ＣＦＢ、ＣＦＤ、ＣＦＨ、ＣＦＨＲ１、ＣＦＨＲ２、ＣＦＨＲ３、ＣＦＨＲ４、ＣＦＨＲ５、ＣＦＩ、ＣＦＰ、ＣＲ１、ＣＲ１Ｌ、ＣＲ２、Ｃ１ＱＡ、Ｃ１ＱＢ、Ｃ１ＱＣ、Ｃ１Ｒ、Ｃ１Ｓ、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ３ＡＲ１、Ｃ４Ａ、Ｃ４Ｂ、Ｃ５、Ｃ５ＡＲ１、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８Ａ、Ｃ８Ｂ、Ｃ８Ｇ、Ｃ９、ＩＴＧＡＭ、ＩＴＧＡＸ、およびＩＴＧＢ２）が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２７７】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患または状態は、リソソーム蓄積症であり、医薬組成物は、リソソーム蓄積症の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、リソソーム蓄積症は、スフィンゴリピドーシス（例えば、ファーバー病、クラッベ病（乳児発症型、遅発型）、ガラクトシアリドーシス、ガングリオシドーシス（例えば、ファブリー病、シンドラー病、ＧＭ１ガングリオシドーシス（乳児型、若年型、成人型／慢性）、ＧＭ２ガングリオシドーシス（例えば、サンドホフ病（乳児、若年、成人発症型）、テイ・サックス））、ゴーシェ病（Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型）、リソソーム酸性リパーゼ欠損症（早期発症型、遅発型）、ニーマン・ピック病（Ａ型、Ｂ型）、スルファチドーシス（例えば、異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）、マルチプルスルファターゼ欠損症））、ムコ多糖症（例えば、ＭＰＳ　Ｉ型ハーラー症候群、ＭＰＳ　Ｉ　Ｓ型シャイエ症候群、ＭＰＳ　ＩＨ－Ｓ型ハーラー・シャイエ症候群、ＩＩ型（ハンター症候群）、ＩＩＩ型（サンフィリポ症候群）、ＩＶ型（モルキオ）、ＶＩ型（マロトー・ラミー症候群）、ＶＩＩ型（スライ症候群）、ＩＸ型（ヒアルロニダーゼ欠損症））、ムコリピドーシス（例えば、Ｉ型（シアリドーシス）、ＩＩ型（Ｉ細胞病）、ＩＩＩ型（偽性ハーラー・ポリジストロフィー／ホスホトランスフェラーゼ欠損症）、ＩＶ型（ムコリピジン（Mucolipidin）１欠損症））、リピドーシス（例えば、ニーマン・ピック病（Ｃ型、Ｄ型）、神経セロイドリポフスチン症、ウォルマン病）、アルファマンノシドーシス、ベータマンノシドーシス、アスパルチルグルコサミン尿症、フコシドーシス、リソソーム輸送障害（例えば、シスチン症

、濃化異骨症、サラ病／シアル酸蓄積症、乳児遊離シアル酸蓄積症（ＩＳＳＤ））、コレステリルエステル蓄積症である。一部の実施形態では、リソソーム蓄積症の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、セラミダーゼ、アルファガラクトシダーゼ（Ａ、Ｂ）、ベータガラクトシダーゼ、ヘキソサミニダーゼＡ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソーム酸性リパーゼ、サポシンＢ、スルファターゼ、ヒアルロニダーゼ、ホスホトランスフェラーゼ、ムコリピジン１、アスパルチルグルコサミニダーゼ、アルファ－Ｄ－マンノシダーゼ、ベータマンノシダーゼ、アルファ－Ｌ－フコシダーゼ、シスチノシン、カテプシンＫ、シアリン、ＳＬＣ１７Ａ５、酸性アルファグルコシダーゼ、ＬＡＭＰ２をコードする遺伝子が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２７８】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患または状態は、糖原病であり、医薬組成物は、糖原病の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、糖原病は、フォン・ギルーケ病、ポンペ病、コリ病もしくはフォーブス病、アンダーソン病、マッカードル病、ハース病、垂井病、ファンコニ・ビッケル症候群、または赤血球アルドラーゼ欠損症である。一部の実施形態では、糖原病の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、グリコーゲンシンターゼ、グルコース－６－ホスファターゼ、酸性アルファグルコシダーゼ、グリコーゲン脱分枝酵素、グリコーゲン分枝酵素、筋グリコーゲンホスホリラーゼ、肝グリコーゲンホスホリラーゼ、筋ホスホフルクトキナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グルコース輸送体、ＧＬＵＴ２、アルドラーゼＡおよびβ－エノラーゼをコードする遺伝子が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２７９】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患または状態は、免疫不全症であり、医薬組成物は、糖原病の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、糖原病は、フォン・ギルーケ病、ポンペ病、コリ病もしくはフォーブス病、アンダーソン病、マッカードル病、ハース病、垂井病、ファンコニ・ビッケル症候群、または赤血球アルドラーゼ欠損症である。一部の実施形態では、糖原病の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、グリコーゲンシンターゼ、グルコース－６－ホスファターゼ、酸性アルファグルコシダーゼ、グリコーゲン脱分枝酵素、グリコーゲン分枝酵素、筋グリコーゲンホスホリラーゼ、肝グリコーゲンホスホリラーゼ、筋ホスホフルクトキナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グルコース輸送体、ＧＬＵＴ２、アルドラーゼＡおよびβ－エノラーゼをコードする遺伝子が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２８０】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる状態は、異常なコレステロールレベル（例えば、異常に高いＬＤＬレベル、例えば、約１００ｍｇ／ｄＬより高いＬＤＬ、および／または異常に低いＨＤＬレベル、例えば、約４０～５０ｍｇ／ｄＬより低いＨＤＬ）を特徴とし、例えば、家族性高コレステロール血症を含み、医薬組成物は、コレステロールの輸送および／または代謝に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、コレステロールの輸送および／または代謝に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、低密度リ

ポタンパク質（ＬＤＬ）受容体（ＬＤＬＲ）、アポリポタンパク質Ｂ（ＡｐｏＢ）、低密度リポタンパク質受容体アダプタータンパク質１（ＬＤＬＲＡＰ１）、およびＰＣＳＫ９が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２８１】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＬＤＬＲ発現を活性化するために使用される。細胞のＬＤＬＲ発現を活性化するためにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ガイドＲＮＡ／ＤＮＡ配列の例示的なＬＤＬＲ特異的標的配列としては、配列番号１１０～１１２に記載のいずれかを挙げることができる。市販の試薬、例えば、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９（nuclease dead Cas9）（ｄＣａｓ９）およびｇＲＮＡベクターは、例えば、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、カタログ番号ｓｃ－４００６４５－ＡＣＴおよびｓｃ－４００６４５－ＡＣＴ－２参照）から容易に入手できる。

【０２８２】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＬＤＬＲをコードする遺伝子の変異を修正するために使用される。野生型ＬＤＬＲ配列に対応する鋳型ＤＮＡとともにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ＣＲＩＳＰＲシステムを、例えば、ＬＤＬＲ遺伝子に二本鎖ＤＮＡ切断を導入するために使用する方法は、当技術分野において公知であり、そのような方法を、例えば、ＤＮＡ相同組換え修復（ＨＤＲ）のためにドナー核酸と併用して、ＬＤＬＲ遺伝子内の変異配列を野生型配列に置き換えることができる。例えば、ガイドＲＮＡ配列の例示的な標的配列としては、配列番号１０４～１０９に記載のいずれかを挙げることができる。市販のキット、ｇＲＮＡベクター、ならびにＬＤＬＲ遺伝子に二本鎖ＤＮＡ切断を導入するためのおよびＨＤＲにより変異を修正するためのドナーベクターは、例えば、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、カタログ番号ｓｃ－４００６４５およびｓｃ－４００６４５－ＨＤＲ参照）またはＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ（例えば、カタログ番号ＨＴＮ２１０５７７、ＨＴＮ２６１６０６、ＨＴＮ２６１６０５、ＨＴＮ２６１６０８およびＨＴＮ２６１６０７参照）から、容易に入手できる。

【０２８３】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＬＤＬＲをコードする遺伝子を導入するために使用される。ＬＤＬＲをコードする遺伝子を含む鋳型ＤＮＡとともにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ＣＲＩＳＰＲシステムを、例えば、ゲノムに二本鎖ＤＮＡ切断を導入するために使用する方法は、当技術分野において公知であり、そのような方法を、例えば、ゲノムへのＬＤＬＲをコードする遺伝子のＨＤＲ媒介挿入のためにドナー核酸と併用することができる。

【０２８４】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＡｐｏＢ発現を活性化するために使用される。細胞のＡｐｏＢ発現を活性化するためにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ガイドＲＮＡ／ＤＮＡ配列の例示的なＡｐｏＢ特異的標的配列としては、配列番号１１９～１２１に記載のいずれかを挙げることができる。市販の試薬、例えば、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）およびｇＲＮＡベクターは、例えば、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、カタログ番号ｓｃ－４００７０５－ＡＣＴおよびｓｃ－４００７０５－ＡＣＴ－２参照）から容易に入手できる。

【０２８５】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＡｐｏＢをコードする遺伝子の変異を修正するために使用される。野生型ＡｐｏＢ配列に対応する鋳型ＤＮＡとともにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ＣＲＩＳＰＲシステムを、例えば、ＡｐｏＢ遺伝子に二本鎖ＤＮＡ切断を導入するために使用する方法は、当技術分野において公知であり、そのような方法を、例えば

、ＤＮＡ相同組換え修復（ＨＤＲ）のためにドナー核酸と併用して、ＡｐｏＢ遺伝子内の変異配列を野生型配列に置き換えることができる。例えば、ガイドＲＮＡ配列の例示的な標的配列としては、配列番号１１３～１１８に記載のいずれかを挙げることができる。市販のキット、ｇＲＮＡベクター、ならびにＡｐｏＢ遺伝子に二本鎖ＤＮＡ切断を導入するためのおよびＨＤＲにより変異を修正するためのドナーベクターは、例えば、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、カタログ番号ｓｃ－４００７０５－ＫＯ－２およびｓｃ－４００７０５－ＨＤＲ－２参照）またはＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ（例えば、カタログ番号ＨＴＮ２０９２１８参照）から、容易に入手できる。

【０２８６】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＡｐｏＢをコードする遺伝子を導入するために使用される。ＡｐｏＢをコードする遺伝子を含む鋳型ＤＮＡとともにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ＣＲＩＳＰＲシステムを、例えば、ゲノムに二本鎖ＤＮＡ切断を導入するために使用する方法は、当技術分野において公知であり、そのような方法を、例えば、ゲノムへのＡｐｏＢをコードする遺伝子のＨＤＲ媒介挿入のためにドナー核酸と併用することができる。

【０２８７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＬＤＬＲＡＰ１発現を活性化するために使用される。細胞のＬＤＬＲＡＰ１発現を活性化するためにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ガイドＲＮＡ／ＤＮＡ配列の例示的なＬＤＬＲＡＰ１特異的標的配列としては、配列番号１２８～１３０に記載のいずれかを挙げることができる。市販の試薬、例えば、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）およびｇＲＮＡベクターは、例えば、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、カタログ番号ｓｃ－４０６１１４－ＡＣＴおよびｓｃ－４０６１１４－ＡＣＴ－２参照）から容易に入手できる。

【０２８８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＬＤＬＲＡＰ１をコードする遺伝子の変異を修正するために使用される。野生型ＬＤＬＲＡＰ１配列に対応する鋳型ＤＮＡとともにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ＣＲＩＳＰＲシステムを、例えば、ＬＤＬＲＡＰ１遺伝子に二本鎖ＤＮＡ切断を導入するために使用する方法は、当技術分野において公知であり、そのような方法を、例えば、ＤＮＡ相同組換え修復（ＨＤＲ）のためにドナー核酸と併用して、ＬＤＬＲＡＰ１遺伝子内の変異配列を野生型配列に置き換えることができる。例えば、ガイドＲＮＡ配列の例示的な標的配列としては、配列番号１２２～１２７に記載のいずれかを挙げることができる。市販のキット、ｇＲＮＡベクター、ならびにＬＤＬＲＡＰ１遺伝子に二本鎖ＤＮＡ切断を導入するためのおよびＨＤＲにより変異を修正するためのドナーベクターは、例えば、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、カタログ番号ｓｃ－４０６１１４、ｓｃ－４０６１１４－ＫＯ－２およびｓｃ－４０６１１４－ＨＤＲ－２参照）またはＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ（例えば、カタログ番号ＨＴＮ２０７０６２参照）から、容易に入手できる。

【０２８９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＬＤＬＲＡＰ１をコードする遺伝子を導入するために使用される。ＬＤＬＲＡＰ１をコードする遺伝子を含む鋳型ＤＮＡとともにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ＣＲＩＳＰＲシステムを、例えば、ゲノムに二本鎖ＤＮＡ切断を導入するために使用する方法は、当技術分野において公知であり、そのような方法を、例えば、ＬＤＬＲＡＰ１をコードする遺伝子のゲノムへのＨＤＲ媒介挿入のためにドナー核酸と併用することができる。

【０２９０】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ＰＣＳＫ

９発現を、例えば遺伝子ノックアウトにより、抑止するために使用される。細胞のＰＣＳＫ９発現を抑止するためにそのようなシステムを使用する方法は、十分に当業者のレベルの範囲内である。ガイドＲＮＡ／ＤＮＡ配列の例示的なＰＣＳＫ９特異的標的配列としては、配列番号１３１～１３６に記載のいずれかを挙げることができる。市販のキット、ｇＲＮＡベクター、ならびにＰＣＳＫ９遺伝子に二本鎖ＤＮＡ切断を導入するためのドナーベクターは、例えば、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（例えば、カタログ番号ｓｃ－４０２４４５参照）またはＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ（例えば、カタログ番号ＨＴＮ２０６６０６参照）から、容易に入手できる。

【０２９１】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、遺伝性疾患などの遺伝子疾患であり、医薬組成物は、遺伝子疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、遺伝子疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の変異を修正する。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、２２ｑ１１．２欠失症候群、軟骨無形成症、アルファ－１アンチトリプシン欠損症、アンジェルマン症候群、常染色体優性多発性嚢胞腎、乳がん、カナバン病、シャルコー・マリー・トゥース病、結腸がん、色覚異常、嚢胞性線維症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第Ｖ因子ライデン血栓性素因、家族性地中海熱、脆弱Ｘ症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、ハンチントン病、マルファン症候群、筋強直性ジストロフィー、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、多発性嚢胞腎、ポルフィリン症、プラダー・ウィリー症候群、早老症、ＳＣＩＤ、鎌状赤血球症、脊髄性筋萎縮症、テイ・サックス病、サラセミア、トリメチルアミン、およびウィルソン病を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、遺伝子疾患の発生および／または進行に関与する遺伝子には、これらに限定されないが、ＡＡＴ、ＡＤＡ、ＡＬＡＤ、ＡＬＡＳ２、ＡＰＣ、ＡＳＰＭ、ＡＴＰ７Ｂ、ＢＤＮＦ、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＣＦＴＲ、ＣＯＬ１Ａ１、ＣＯＬ１Ａ２、ＣＯＭＴ、ＣＮＢＰ、ＣＰＯＸ、ＣＲＥＢＢＰ、ＣＲＨ、ＣＲＴＡＰ、ＣＸＣＲ４、ＤＨＦＲ、ＤＭＤ、ＤＭＰＫ、Ｆ５、ＦＢＮ１、ＦＥＣＨＦＧＦＲ３、ＦＧＲ３、ＦＩＸ、ＦＶＩＩＩ、ＦＭＯ３、ＦＭＲ１、ＧＡＲＳ、ＧＢＡ、ＨＢＢ、ＨＥＸＡ、ＨＦＥ、ＨＭＢＳ、ＨＴＴ、ＩＬ２ＲＧ、ＫＲＴ１４、ＫＲＴ５、ＬＭＮＡ、ＬＲＲＫ２、ＭＥＦＶ、ＭＬＨ１、ＭＳＨ２、ＭＳＨ６、ＰＡＨ、ＰＡＲＫ２、ＰＡＲＫ３、ＰＡＲＫ７、ＰＧＬ２、ＰＨＦ８、ＰＩＮＫ１、ＰＫＤ１、ＰＫＤ２、ＰＭＳ１、ＰＭＳ２、ＰＰＯＸ、ＲＨＯ、ＳＤＨＢ、ＳＤＨＣ、ＳＤＨＤ、ＳＭＮＩ、ＳＮＣＡ、ＳＲＹ、ＴＳＣ１、ＴＳＣ２、ＵＣＨＬ１、ＵＲＯＤ、ＵＲＯＳ、ＭＥＦＶ、ＡＰＰ、ＧＡＳＴ、ＩＮＳ、ＬＣＫ、ＬＥＰ、ＬＩＦ、ＭＣＭ６、ＭＹＨ７、ＭＹＯＤ１、ＮＰＰＢ、ＯＳＭ、ＰＫＣ、ＰＩＰ、ＳＬＣ１８Ａ２、ＴＢＸ１、トランスサイレチン、ＭＤＳ１－ＥＶＩ１、ＰＲＤＭ１６、ＳＥＴＢＰ１、β－グロビンおよびＬＰＬが、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２９２】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、加齢または変性疾患であり、医薬組成物は、加齢または変性疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、加齢または変性疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、これらに限定されないが、ケラチンＫ６Ａ、ケラチンＫ６Ｂ、ケラチン１６、ケラチン１７、ｐ５３、β－２アドレナリン受容体（ＡＤＲＢ２）、ＴＲＰＶ１、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、ＨＩＦ－１およびカスパーゼ－２が、これらの変異型を含めて、含まれる。

【０２９３】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、処置されることになる疾患は、線維性ま

たは炎症性疾患であり、医薬組成物は、線維性または炎症性疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子の配列および／または発現を修飾するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、線維性または炎症性疾患の発生および／または進行に関与するタンパク質をコードする１つまたは複数の遺伝子には、ＳＰＡＲＣ、ＣＴＧＦ、ＴＧＦβ１、ＴＧＦβ受容体１、ＴＧＦβ受容体２、ＴＧＦβ受容体３、ＶＥＧＦ、アンジオテンシンＩＩ、ＴＩＭＰ、ＨＳＰ４７、トロンボスポンジン、ＣＣＮ１、ＬＯＸＬ２、ＭＭＰ２、ＭＭＰ９、ＣＣＬ２、アデノシン受容体Ａ２Ａ、アデノシン受容体Ａ２Ｂ、アデニリルシクラーゼ、Ｓｍａｄ　３、Ｓｍａｄ　４、Ｓｍａｄ　７、ＳＯＸ９、アレスチン、ＰＤＣＤ４、ＰＡＩ－１、ＮＦ－κＢおよびＰＡＲＰ－１、これらの変異型からなる群から選択される。

【０２９４】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、医薬組成物は、疾患または状態に関与する１つまたは複数のｍｉＲＮＡの発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集システム）を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む。一部の実施形態では、疾患または状態は、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、多発性肝嚢胞および多発性嚢胞腎、がん、心血管疾患、心不全、心肥大、神経発達疾患、脆弱Ｘ症候群、レッテ症候群、ダウン症候群、アルツハイマー病、ハンチントン病、統合失調症、炎症性疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、乾癬、および骨格筋疾患を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、１つまたは複数のｍｉＲＮＡには、これらに限定されないが、ｈａｓ－ｍｉｒ－１２６＊、Ｈａｓ－ｍｉＲ－１９１、ｈａｓ－ｍｉｒ－２０５、ｈａｓ－ｍｉｒ－２１、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ－２、ｌｅｔ－７ファミリー、ｌｅｔ－７ｃ、ｌｅｔ－７ｆ－１、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１００、ｍｉＲ－１０３、ｍｉＲ－１０３－１、ｍｉＲ－１０６ｂ－２５、ｍｉＲ－１０７、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－１１２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－１２５ｂ、ｍｉＲ－１２５ｂ－２、ｍｉＲ１２５ｂ１、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１２８ａ、ｍＩＲ－１３２、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－１３３ｂ、ｍｉＲ１３５、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４１、ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ１４３、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ１４５、ｍｉＲ－１４５、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１４６ｂ、ｍｉＲ１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１５ａ、ｍｉＲ－１５ｂ、ｍｉＲ１６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１７－１９ファミリー、ｍｉＲ－１７３ｐ、ｍｉＲ１７－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１７－９２、ｍｉＲ－１８１ａ、ｍｉＲ－１８１ｂ、ｍｉＲ－１８４、ｍｉＲ－１８５、ｍｉＲ－１８９、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－１９１、ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９３ａ、ｍｉＲ－１９３ｂ、ｍｉＲ－１９４、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９６ａ、ｍｉＲ－１９８、ｍｉＲ－１９９、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－１９ｂ－１、ｍｉＲ２００ａ、ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ２００ｃ、ｍｉＲ－２００ｃ、ｍｉＲ－２０３、ｍｉＲ－２０５、ｍｉＲ－２０８、ｍｉＲ－２０ａ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２１４、ｍｉＲ－２２１、ｍｉＲ－２２２、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－２３、ｍｉＲ－２３ａ、ｍｉＲ－２３ｂ、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２６ａ、ｍｉＲ－２６ｂ、ｍｉＲ－２７ｂ、ｍｉＲ－２９、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２９９－３ｐ、ｍｉＲ－２９ｃ、ｍｉＲ－３０ａ－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｃ、ｍｉＲ－３０ｄ、ｍｉＲ－３０ｅ－５ｐ、ｍｉＲ３１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ３４２、ｍｉＲ－３８１、ｍｉＲ－３８２、ｍｉＲ－３８３、ｍｉＲ－４０９－３ｐ、ｍｉＲ－４５、ｍｉＲ－６１、ｍｉＲ－７８、ｍｉＲ－８０２、ｍｉＲ－９、ｍｉＲ－９２ａ－１、ｍｉＲ－９９ａ、ｍｉＲ－ｌｅｔ７、ｍｉＲ－ｌｅｔ７ａおよびｍｉＲ－ｌｅｔ７ｇが含まれる。

【０２９５】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、医薬組成物は、個体に、静脈内、腫瘍内、動脈内、局所、眼内、眼科的、門脈内、頭蓋内、脳内、側脳室内、髄腔内、膀胱内、皮内、皮下、筋肉内、鼻腔内、気管内、肺、空洞内または経口投与のいずれかによって投与される。

【０２９６】
本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、個体は、哺乳動物である。一部の実施形態では、個体はヒトである。
細胞送達方法
【０２９７】
一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を細胞に送達する方法であって、細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システム分子を含む、方法が提供される。一部の実施形態では、複合体またはナノ粒子は、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含む、ＣＰＰを含む。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、細胞は、不死化細胞、例えば、細胞株からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、初代細胞、例えば、個体からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞である。一部の実施形態では、細胞は、末梢血由来Ｔ細胞、セントラルメモリーＴ細胞、臍帯血由来Ｔ細胞、または造血幹細胞もしくは他の前駆細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、不死化Ｔ細胞、例えば、Ｔ細胞株からのＴ細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、初代Ｔ細胞、例えば、個体のＴ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、Ｔ細胞であり、接触させるステップは、Ｔ細胞を活性化した後に行われる。一部の実施形態では、細胞は、Ｔ細胞であり、接触させるステップは、Ｔ細胞を活性化してから少なくとも１２時間（例えば、少なくとも約１２時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、またはそれより長い時間のうちのいずれか）後に行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、抗ＣＤ３／ＣＤ２８試薬（例えば、マイクロビーズ）を使用して活性化される。一部の実施形態では、細胞は、線維芽細胞である。一部の実施形態では、線維芽細胞は、初代線維芽細胞、例えば、個体の線維芽細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、肝細胞は、初代肝細胞、例えば、個体の肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒト肺前駆細胞（ＬＰＣ）である。一部の実施形態では、細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステムである。一部の実施形態では、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（例えば、ＲＧＥＮ、例えばＣａｓ９、またはＲＧＥＮをコードする核酸）および核酸（例えば、ｇＲＮＡおよびドナー核酸）からなる群から選択される。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか（例えば、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼性疾患、ならびに加齢および変性疾患）の処置に有用である。一部の実施形態では、複合体またはナノ粒子は、追加のゲノム編集システムの１つまたは複数の分子をさらに含む。一部の実施形態では、追加のゲノム編集システムは、疾患の処置に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞を、本明細書に記載の実施形態のいずれかによる発現複合体と接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細

胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。

【０２９８】

したがって、一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を細胞に送達する方法であって、細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含むＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、細胞は、不死化細胞、例えば、細胞株からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、初代細胞、例えば、個体からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、不死化Ｔ細胞、例えば、Ｔ細胞株からのＴ細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、初代Ｔ細胞、例えば、個体のＴ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、線維芽細胞である。一部の実施形態では、線維芽細胞は、初代線維芽細胞、例えば、個体の線維芽細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、肝細胞は、初代肝細胞、例えば、個体の肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒト肺前駆細胞（ＬＰＣ）である。一部の実施形態では、細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡまたはｇＤＮＡ（またはｇＲＮＡもしくはｇＤＮＡをコードする核酸）をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、標的ポリヌクレオチドに特異的修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼ（またはインテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか（例えば、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼性疾患、ならびに加齢および変性疾患）の処置に有用である。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか（例えば、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼性疾患、ならびに加齢および変性疾患）に関与するタンパク質の調節に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合

体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＡＤＧＮ－１００ペプチドまたはＶＥＰＥＰ－３ペプチドである。

【０２９９】

一部の実施形態では、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）分子を細胞に送達する方法であって、細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択されるＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、細胞は、不死化細胞、例えば、細胞株からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、初代細胞、例えば、個体からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、不死化Ｔ細胞、例えば、Ｔ細胞株からのＴ細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、初代Ｔ細胞、例えば、個体のＴ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、線維芽細胞である。一部の実施形態では、線維芽細胞は、初代線維芽細胞、例えば、個体の線維芽細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、肝細胞は、初代肝細胞、例えば、個体の肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒト肺前駆細胞（ＬＰＣ）である。一部の実施形態では、細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか（例えば、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼性疾患、ならびに加齢および変性疾患）の処置に有用である。一部の実施形態ではＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか（例えば、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼性疾患、ならびに加齢および変性疾患）に関与するタンパク質の調節に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＡＤＧＮ－１００ペプチドまたはＶＥＰＥＰ－３ペプチドである。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステム分子は、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、任意選択で、修飾を導入するためのドナー核酸とを含む。

【０３００】

一部の実施形態では、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子を細胞に送達する方法であって、細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含むＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチド

は、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、細胞は、不死化細胞、例えば、細胞株からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、初代細胞、例えば、個体からの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、不死化Ｔ細胞、例えば、Ｔ細胞株からのＴ細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、初代Ｔ細胞、例えば、個体のＴ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、線維芽細胞である。一部の実施形態では、線維芽細胞は、初代線維芽細胞、例えば、個体の線維芽細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、肝細胞は、初代肝細胞、例えば、個体の肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒト肺前駆細胞（ＬＰＣ）である。一部の実施形態では、細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか（例えば、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼性疾患、ならびに加齢および変性疾患）の処置に有用である。一部の実施形態ではＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか（例えば、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼性疾患、ならびに加齢および変性疾患）に関与するタンパク質の調節に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＡＤＧＮ－１００ペプチドまたはＶＥＰＥＰ－３ペプチドである。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステム分子は、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９をコードする核酸）と、ｇＲＮＡ（またはｇＲＮＡをコードする核酸）と、任意選択で、修飾を導入するためのドナー核酸とを含む。

【０３０１】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子をＴ細胞に送達する方法であって、細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択されるＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、Ｔ細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、不死化Ｔ細胞、例えば、Ｔ細胞株からのＴ細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、初代Ｔ細胞、例えば、個体のＴ細胞である。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、核酸誘導型ヌクレアーゼ（例えば、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮ）であり、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ガイド配列（またはガイド配列をコードする核酸）と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）核酸誘導型ヌクレアーゼ（または核酸誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸）と複合体

を形成している。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、相同組換え修復のための鋳型としてのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸と任意選択で組み合わせた（例えば、複合体を形成している）ゲノム編集インテグラーゼ（またはゲノム編集インテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか、の処置に有用である。一部の実施形態では、複合体またはナノ粒子は、追加のゲノム編集システムの１つまたは複数の分子をさらに含む。一部の実施形態では、追加のゲノム編集システムは、疾患の処置に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。

【０３０２】

一部の実施形態では、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子をＴ細胞に送達する方法であって、細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含むＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｔ細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、不死化Ｔ細胞、例えば、Ｔ細胞株からのＴ細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、初代Ｔ細胞、例えば、個体のＴ細胞である。一部の実施形態では、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（例えば、Ｃａｓ９などの ＲＧＥＮ（ＲＧＥＮをコードする核酸を含む））および核酸（例えば、ｇＲＮＡおよびドナー核酸）からなる群から選択される。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか、の処置に有用である。一部の実施形態では、複合体またはナノ粒子は、追加ＣＲＩＳＰＲシステムの１つまたは複数の分子をさらに含む。一部の実施形態では、追加のＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患の処置に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＡＤＧＮ－１００ペプチドまたはＶＥＰＥＰ－３ペプチドである。

【０３０３】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を線維芽細胞に送達する方法であって、線維芽細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システ

ム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択されるＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、線維芽細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、線維芽細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、線維芽細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、線維芽細胞は、不死化線維芽細胞、例えば、線維芽細胞株からの線維芽細胞である。一部の実施形態では、線維芽細胞は、初代線維芽細胞、例えば、個体の線維芽細胞である。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、核酸誘導型ヌクレアーゼ（例えば、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮ）であり、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ガイド配列（またはガイド配列をコードする核酸）と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）核酸誘導型ヌクレアーゼ（または核酸誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、相同組換え修復のための鋳型としてのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸と任意選択で組み合わせた（例えば、複合体を形成している）ゲノム編集インテグラーゼ（またはゲノム編集インテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか、の処置に有用である。一部の実施形態では、複合体またはナノ粒子は、追加のゲノム編集システムの１つまたは複数の分子をさらに含む。一部の実施形態では、追加のゲノム編集システムは、疾患の処置に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。

【０３０４】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を肝細胞に送達する方法であって、肝細胞を本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含み、複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択されるＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、肝細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、肝細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、肝細胞を複合体またはナノ粒子と接触させるステップは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで行われる。一部の実施形態では、肝細胞は、不死化肝細胞、例えば、肝細胞株からの肝細胞である。一部の実施形態では、肝細胞は、初代肝細胞、例えば、個体の肝細胞である。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、核酸誘導型ヌクレアーゼ（例えば、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮ）であり、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ガイド配

列（またはガイド配列をコードする核酸）と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）核酸誘導型ヌクレアーゼ（または核酸誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、相同組換え修復のための鋳型としてのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸と任意選択で組み合わせた（例えば、複合体を形成している）ゲノム編集インテグラーゼ（またはゲノム編集インテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集システムは、疾患、例えば、本明細書に記載の処置されることになる疾患のいずれか、の処置に有用である。一部の実施形態では、複合体またはナノ粒子は、追加のゲノム編集システムの１つまたは複数の分子をさらに含む。一部の実施形態では、追加のゲノム編集システムは、疾患の処置に有用である。一部の実施形態では、方法は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）とキメラ抗原受容体などの組換え受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体と、細胞を接触させるステップを、さらに含む。一部の実施形態では、組換え受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合するキメラ抗原受容体である。

【０３０５】

一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を個体の細胞に送達する方法であって、個体に本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む組成物を投与するステップを含み、複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択されるＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、組成物は、個体に、静脈内、動脈内、腹腔内、膀胱内、皮下、髄腔内、頭蓋内、脳内、側脳室内、肺内、筋肉内、気管内、眼内、眼科的、門脈内、経皮、皮内、経口、舌下、局所または吸入経路によって投与される。一部の実施形態では、組成物は、個体に静脈内経路によって投与される。一部の実施形態では、組成物は、個体に皮下経路によって投与される。一部の実施形態では、細胞は、肺、肝臓、脳、腎臓、心臓、脾臓、血液、膵臓、筋肉、骨髄および腸を含む、器官または組織内に存在する。一部の実施形態では、細胞は、個体の肺、肝臓、腎臓または脾臓内に存在する。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、ゲノム編集ヌクレアーゼ（またはゲノム編集ヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡプラスミド）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮである。一部の実施形態では、ゲノム編集ヌクレアーゼは、核酸誘導型ヌクレアーゼ（例えば、ＲＧＥＮまたはＤＧＥＮ）であり、細胞膜透過ペプチドは、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、ガイド配列（またはガイド配列をコードする核酸）と組み合わせた（例えば、複合体を形成している）核酸誘導型ヌクレアーゼ（または核酸誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸）と複合体を形成している。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、相同組換え修復のための鋳型としてのドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、細胞に送達され得るゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成するために、インテグラーゼにより認識される組換え部位を含むドナー核酸と任意選択で組み合わせた（例えば、複合体を形成している）ゲノム編集インテグラーゼ（またはゲノム編集インテグラーゼをコードする核酸）を含む。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞である。一部の実施形態では、細胞は、線維芽細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒト肺前駆細胞（ＬＰＣ）である。一部の実施形態では、細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、個体は、疾患を有し、または疾患を発症するリスクがあり、ＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患の処置に有用である。一部の実施形態では、組成物

は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）と、キメラ抗原受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体を、さらに含む。一部の実施形態では、キメラ抗原受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合する。一部の実施形態では、組成物は、医薬組成物であり、薬学的に許容される担体をさらに含む。一部の実施形態では、個体は、哺乳動物である。一部の実施形態では、個体は、ヒトである。

【０３０６】

一部の実施形態では、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子を個体の細胞に送達する方法であって、個体に、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む組成物を投与するステップを含み、複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子と、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドまたはＡＤＧＮ－１００ペプチドのアミノ酸配列を含むＣＰＰとを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、配列番号１～１４、７５および７６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドは、配列番号１５～４０および７７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、配列番号４１～５２および７８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＡＤＧＮ－１００ペプチドは、配列番号５３～７０、７９および８０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、組成物は、個体に、静脈内、動脈内、腹腔内、膀胱内、皮下、髄腔内、頭蓋内、脳内、側脳室内、肺内、筋肉内、気管内、眼内、眼科的、門脈内、経皮、皮内、経口、舌下、局所または吸入経路によって投与される。一部の実施形態では、組成物は、個体に静脈内経路によって投与される。一部の実施形態では、組成物は、個体に皮下経路によって投与される。一部の実施形態では、１つまたは複数のＣＲＩＳＰＲシステム分子は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（例えば、Ｃａｓ９などのＲＧＥＮ（ＲＧＥＮをコードする核酸を含む））および核酸（例えば、ｇＲＮＡおよびドナー核酸）からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞である。一部の実施形態では、細胞は、線維芽細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒト肺前駆細胞（ＬＰＣ）である。一部の実施形態では、細胞は、神経細胞である。一部の実施形態では、個体は、疾患を有し、または疾患を発症するリスクがあり、ＣＲＩＳＰＲシステムは、疾患の処置に有用である。一部の実施形態では、組成物は、細胞膜透過ペプチド（例えば、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドを含む、本明細書に記載の細胞膜透過ペプチドのいずれか）と、キメラ抗原受容体をコードする核酸分子とを含む発現複合体を、さらに含む。一部の実施形態では、キメラ抗原受容体は、疾患に関連する抗原と特異的に結合する。一部の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＡＤＧＮ－１００ペプチドまたはＶＥＰＥＰ－３ペプチドである。一部の実施形態では、組成物は、医薬組成物であり、薬学的に許容される担体をさらに含む。一部の実施形態では、個体は、哺乳動物である。一部の実施形態では、個体は、ヒトである。

細胞改変方法

【０３０７】

一部の実施形態では、改変されたＴ細胞などの改変された細胞を産生する方法であって、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を細胞に送達するための本明細書に記載の方法を含む方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、エレクトロポレーションまたはウイルストランスフェクションの使用を含む方法などの、改変された細胞を産生する以前の方法に対する改善である。一部の実施形態では、改善には、限定ではないが、該方法の効率を上昇させること、該方法に付随するコストを削減すること、該方法の細胞毒性を低下させること、および／または該方法の複雑さを（例えば、ヒトにおける使用が意図された細胞にウイルス法を使用する際に必要な事前の対策の必要性をなくすことにより）

低減させることが含まれる。
ゲノム編集システム安定化方法
【０３０８】
本出願の別の態様では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、ＣＲＩＳＰＲシステム分子）を安定化する方法であって、１つまたは複数のゲノム編集システム分子を本明細書に記載のＣＰＰと組み合わせるステップを含み、それによって１つまたは複数のゲノム編集システム分子を安定化する方法が提供される。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子とＣＰＰは、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を形成する。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、核酸を含み、ＣＰＰは、核酸のスーパーコイル構造を安定化する。一部の実施形態では、１つまたは複数のゲノム編集システム分子は、（例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで血清成分またはヌクレアーゼによる）分解を受けやすく、ＣＰＰは、１つまたは複数のゲノム編集システム分子を分解されないように保護する。
【０３０９】
本明細書に記載の方法のいずれを併用してもよいことは、理解されるはずである。したがって、例えば、複数のゲノム編集システム分子を細胞に送達するために本明細書に記載の方法のいずれかを併用することにより、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子（例えば、ＣＲＩＳＰＲシステム分子）の第１のセット、およびゲノム編集システムの１つまたは複数の分子の第２のセットを送達することができる。企図される可能な併用は、本明細書に記載の方法のいずれかについての２つまたはそれより多くの併用を含む。
キット
【０３１０】
本明細書に記載の方法に有用なキット、試薬および製造品も、本明細書で提供される。そのようなキットは、ＣＰＰ、集合分子および／または他の細胞膜透過ペプチドが収容されているバイアルを、１つまたは複数のゲノム編集システム分子（例えば、ＣＲＩＳＰＲシステム分子）が収容されているバイアルとは別に含むことができる。患者処置時に、例えば、患者試料の遺伝子発現分析またはプロテオミクスもしくは組織学的分析に基づいて、処置すべき特定の病態が何であるのかが、先ず決定される。結果を得られたら、それに応じて、ＣＰＰならびに任意選択の集合分子および／または細胞膜透過ペプチドは、有効な処置のために患者に投与することができる複合体またはナノ粒子を得るために適切な１つまたは複数のゲノム編集システム分子と組み合わせられる。したがって、一部の実施形態では、１）ＣＰＰと、任意選択で２）ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子とを含む、キットが提供される。一部の実施形態では、キットは、集合分子および／または他の細胞膜透過ペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、キットは、発現複合体での使用について本明細書で説明されるように、外来性分子をコードする核酸、および任意選択で細胞膜透過ペプチドを、さらに含む。一部の実施形態では、キットは、遺伝子発現プロファイルを判定するための薬剤をさらに含む。一部の実施形態では、キットは、薬学的に許容される担体をさらに含む。
【０３１１】
本明細書に記載のキットは、対象方法を実施するためにキットの成分を使用するための説明書（例えば、本明細書に記載の医薬組成物を作製するためのおよび／または医薬組成物の使用のための説明書）をさらに含むことができる。対象方法を実施するための説明書は、一般に、好適な記録媒体に記録される。例えば、説明書は、紙またはプラスチックなどのような基材に印刷されていてもよい。したがって、説明書は、キット内に添付文書として存在することもあり、キットの容器またはキットの成分のラベルの中にある（すなわち、包装または分包に付随する）ことなどもある。一部の実施形態では、説明書は、好適なコンピュータ可読記憶媒体、例えば、ＣＤ－ＲＯＭ、ディスケットなどに存在する電子保存データファイルとして存在する。さらに他の実施形態では、実際の説明書はキット内に存在せず、リモートソースから、例えばインターネット経由で、説明書を得る手段が提供される。この実施形態の一例は、説明書を見ることができるおよび／または説明書をダ

ウンロードすることができるウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様に、説明書を得るためのこの手段は、好適な基材に記録される。

【０３１２】

キットの様々な成分は、別個の容器内に存在することもあり、それらの容器が単一のハウジング、例えば箱、の中に収容されていることもある。

例示的実施形態

【０３１３】

実施形態１．　一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドを修飾するためのゲノム編集複合体であって、細胞膜透過ペプチドと、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子とを含み、細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択され、１つまたは複数のゲノム編集システム分子が、

ａ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）、および標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）の一方または両方；

ｂ）ＤＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＤＧＥＮ）、および標的ポリヌクレオチド内の標的配列に相補的なガイド配列を含むガイドＤＮＡ（ｇＤＮＡ）の一方または両方；

ｃ）標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識するジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）；

ｄ）標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識する転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）；

ｅ）標的ポリヌクレオチド内の標的配列を認識するホーミングエンドヌクレアーゼ；および

ｆ）標的ポリヌクレオチド内の組換え部位を認識するインテグラーゼ

からなる群から選択される、ゲノム編集複合体が提供される。

【０３１４】

実施形態２．　細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチドである、実施形態１に記載のゲノム編集複合体。

【０３１５】

実施形態３．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～１４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態２に記載のゲノム編集複合体。

【０３１６】

実施形態４．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号７５または７６のアミノ酸配列を含む、実施形態２に記載のゲノム編集複合体。

【０３１７】

実施形態５．　細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドである、実施形態１に記載のゲノム編集複合体。

【０３１８】

実施形態６．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号１５～４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態５に記載のゲノム編集複合体。

【０３１９】

実施形態７．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号７７のアミノ酸配列を含む、実施形態５に記載のゲノム編集複合体。

【０３２０】

実施形態８．　細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドである、実施形態１に記載のゲノム編集複合体。

【０３２１】

実施形態９．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号４１～５２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態８に記載のゲノム編集複合体。

【０３２２】

実施形態１０．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号７８のアミノ酸配列を含む、実施形態

８に記載のゲノム編集複合体。
【０３２３】
実施形態１１．　細胞膜透過ペプチドが、ＡＤＧＮ－１００ペプチドである、実施形態１に記載のゲノム編集複合体。
【０３２４】
実施形態１２．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号５３～７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態１１に記載のゲノム編集複合体。
【０３２５】
実施形態１３．　細胞膜透過ペプチドが、配列番号７９または８０のアミノ酸配列を含む、実施形態１１に記載のゲノム編集複合体。
【０３２６】
実施形態１４．　細胞膜透過ペプチドが、細胞膜透過ペプチドのＮ末端に共有結合によって連結している１つまたは複数の部分をさらに含み、１つまたは複数の部分が、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖類およびターゲティング分子からなる群から選択される、実施形態１～１３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３２７】
実施形態１５．　細胞膜透過ペプチドが、そのＮ末端に共有結合によって連結しているアセチル基を含む、実施形態１４に記載のゲノム編集複合体。
【０３２８】
実施形態１６．　細胞膜透過ペプチドが、細胞膜透過ペプチドのＣ末端に共有結合によって連結している１つまたは複数の部分をさらに含み、１つまたは複数の部分が、システアミド、システイン、チオール、アミド、任意選択で置換されているニトリロ三酢酸、カルボキシル、任意選択で置換されている直鎖状または分枝状C_1～C_6アルキル、一級または二級アミン、オシド誘導体、脂質、リン脂質、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核内移行シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖類およびターゲティング分子からなる群から選択される、実施形態１～１５のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３２９】
実施形態１７．　細胞膜透過ペプチドが、そのＣ末端に共有結合によって連結しているシステアミド基を含む、実施形態１６に記載のゲノム編集複合体。
【０３３０】
実施形態１８．　ゲノム編集複合体中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部が、連結によりターゲティング部分に連結している、実施形態１～１７のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３３１】
実施形態１９．　連結が、共有結合である、実施形態１８に記載のゲノム編集複合体。
【０３３２】
実施形態２０．　ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡの一方または両方を含む、実施形態１～１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３３３】
実施形態２１．　ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含む、実施形態２０に記載のゲノム編集複合体。
【０３３４】
実施形態２２．　ｇＲＮＡが、単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、実施形態２０または２１に記載のゲノム編集複合体。
【０３３５】
実施形態２３．　ＲＧＥＮが、Ｃａｓ９である、実施形態２０～２２のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３３６】

実施形態２４．　ＲＧＥＮとｇＲＮＡのモル比が、約１：１０～約１０：１の間である、実施形態２０～２３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３３７】
実施形態２５．　細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比が、約１：１～約８０：１の間である、実施形態２０～２４のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３３８】
実施形態２６．　細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮのモル比が、約５：１～約２０：１の間である、実施形態２５に記載のゲノム編集複合体。
【０３３９】
実施形態２７．　異なるガイド配列を含む１つまたは複数の追加のｇＲＮＡをさらに含む、実施形態２０～２６のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３４０】
実施形態２８．　標的配列が、標的遺伝子内に存在し、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡが、標的遺伝子内の配列に相補的なガイド配列を個々に含む、実施形態２７に記載のゲノム編集複合体。
【０３４１】
実施形態２９．　標的配列が、第１の標的遺伝子内に存在し、１つまたは複数の追加のｇＲＮＡが、１つまたは複数の追加の標的遺伝子内に存在する配列に相補的なガイド配列を個々に含む、実施形態２７に記載のゲノム編集複合体。
【０３４２】
実施形態３０．　ＤＧＥＮおよびｇＤＮＡの一方または両方を含む、実施形態１～１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３４３】
実施形態３１．　ＤＧＥＮおよびｇＤＮＡを含む、実施形態２０に記載のゲノム編集複合体。
【０３４４】
実施形態３２．　ＺＦＰを含む、実施形態１～１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３４５】
実施形態３３．　ＴＡＬＥＮを含む、実施形態１～１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３４６】
実施形態３４．　ホーミングヌクレアーゼを含む、実施形態１～１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３４７】
実施形態３５．　標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのドナー核酸をさらに含み、ドナー核酸が、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含む、実施形態２０～３４のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３４８】
実施形態３６．　修飾が、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である、実施形態３５に記載のゲノム編集複合体。
【０３４９】
実施形態３７．　ドナー核酸が、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである、実施形態３５または３６に記載のゲノム編集複合体。
【０３５０】
実施形態３８．　修飾が、標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入である、実施形態３５に記載のゲノム編集複合体。
【０３５１】
実施形態３９．　ドナー核酸が、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームに隣接した異種核酸を含む二本鎖ＤＮＡであり、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジー

アームが、修飾される標的ポリヌクレオチドの領域に隣接する配列と相同である、実施形態３５または３８に記載のゲノム編集複合体。
【０３５２】
実施形態４０．　１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するための１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む、実施形態３５～３９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３５３】
実施形態４１．　インテグラーゼを含む、実施形態１～１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３５４】
実施形態４２．　標的ポリヌクレオチドへの挿入のためのドナー核酸をさらに含み、インテグラーゼが、ドナー核酸内の組換え部位を認識し、ドナー核酸を標的ポリヌクレオチドに挿入するための標的ポリヌクレオチド内の組換え部位とドナー核酸内の組換え部位との組換えを媒介することができる、実施形態４１に記載のゲノム編集複合体。
【０３５５】
実施形態４３．　ゲノム編集複合体の平均直径が、約１０ｎｍ～約３００ｎｍの間である、実施形態１～４２のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。
【０３５６】
実施形態４４．　一部の実施形態では、実施形態１～４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子が提供される。
【０３５７】
実施形態４５．　コアが、１つまたは複数の追加の、実施形態１～４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体をさらに含む、実施形態４４に記載のナノ粒子。
【０３５８】
実施形態４６．　コアが、標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するためのドナー核酸であって、標的ポリヌクレオチドの修飾を含むように修飾される部分に対応する配列を含むドナー核酸をさらに含み、ドナー核酸が、第２の細胞膜透過ペプチドと複合体を形成している、実施形態４４または４５に記載のナノ粒子。
【０３５９】
実施形態４７．　第２の細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、実施形態４６に記載のナノ粒子。
【０３６０】
実施形態４８．　第２の細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態４７に記載のナノ粒子。
【０３６１】
実施形態４９．　修飾が、標的ポリヌクレオチドにおける１つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失または置換である、実施形態４６～４８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【０３６２】
実施形態５０．　ドナー核酸が、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである、実施形態４９に記載のナノ粒子。
【０３６３】
実施形態５１．　修飾が、標的ポリヌクレオチド内への異種核酸の挿入である、実施形態４６～４８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【０３６４】
実施形態５２．　ドナー核酸が、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームに隣接した異種核酸を含む二本鎖ＤＮＡであり、５’ホモロジーアームおよび３’ホモロジーアームが、修飾される標的ポリヌクレオチドの領域に隣接する配列と相同である、実施形態５１に記載のナノ粒子。
【０３６５】

実施形態５３．　コアが、１つまたは複数の追加の標的ポリヌクレオチドに修飾を導入するための１つまたは複数の追加のドナー核酸をさらに含む、実施形態４６～５２のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【０３６６】

実施形態５４．　ナノ粒子中の細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部が、連結によりターゲティング部分に連結している、実施形態４４～５３のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【０３６７】

実施形態５５．　コアが、末梢細胞膜透過ペプチドを含むシェルにより被覆されている、実施形態４４～５３のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【０３６８】

実施形態５６．　末梢細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、実施形態５５に記載のナノ粒子。

【０３６９】

実施形態５７．　末梢細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態５６に記載のナノ粒子。

【０３７０】

実施形態５８．　シェル内の末梢細胞膜透過ペプチドの少なくとも一部が、連結によりターゲティング部分に連結している、実施形態５５～５７のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【０３７１】

実施形態５９．　連結が、共有結合である、実施形態５４または５８に記載のナノ粒子。

【０３７２】

実施形態６０．　ナノ粒子の平均直径が、約１０ｎｍ～約４００ｎｍの間である、実施形態４４～５９のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【０３７３】

実施形態６１．　一部の実施形態では、実施形態１～４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体または実施形態４４～６０のいずれか一項に記載のナノ粒子と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。

【０３７４】

実施形態６２．　第３の細胞膜透過ペプチドと外来性タンパク質をコードする核酸分子とを含む発現複合体をさらに含む、実施形態６１に記載の医薬組成物。

【０３７５】

実施形態６３．　外来性タンパク質が、細胞の表面で発現され得る組換え受容体である、実施形態６２に記載の医薬組成物。

【０３７６】

実施形態６４．　組換え受容体が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である、実施形態６３に記載の医薬組成物。

【０３７７】

実施形態６５．　第３の細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選択される、実施形態６２～６４のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【０３７８】

実施形態６６．　第３の細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態６５に記載の医薬組成物。

【０３７９】

実施形態６７．　一部の実施形態では、実施形態１～１９のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を調製する方法であって、細胞膜透過ペプチドを１つまたは複数のゲノム編集システム分子と組み合わせるステップを含み、それによってゲノム編集複合体を形成する方法が提供される。

【０３８０】
実施形態６８．　１つまたは複数のゲノム編集システム分子が、ＲＧＥＮおよびｇＲＮＡを含み、細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮが、それぞれ約１：１～約８０：１の比で組み合わせられ、ＲＧＥＮとｇＲＮＡが、それぞれ約１０：１～約１：１０の比で組み合わせられる、実施形態６７に記載の方法。
【０３８１】
実施形態６９．　細胞膜透過ペプチドとＲＧＥＮが、それぞれ約５：１～約２０：１の比で組み合わせられる、実施形態６８に記載の方法。
【０３８２】
実施形態７０．　ＲＧＥＮとｇＲＮＡが、約１：１の比で組み合わせられる、実施形態６８または６９に記載の方法。
【０３８３】
実施形態７１．　一部の実施形態では、ゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を細胞に送達する方法であって、細胞を実施形態１～４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体または実施形態４４～６０のいずれか一項に記載のナノ粒子と接触させるステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、１つまたは複数のゲノム編集システム分子を含む方法が提供される。
【０３８４】
実施形態７２．　細胞をゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップが、ｉｎｖｉｖｏで行われる、実施形態７１に記載の方法。
【０３８５】
実施形態７３．　細胞をゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップが、ｅｘｖｉｖｏで行われる、実施形態７１に記載の方法。
【０３８６】
実施形態７４．　細胞をゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップが、ｉｎｖｉｔｒｏで行われる、実施形態７１に記載の方法。
【０３８７】
実施形態７５．　細胞が、顆粒球、マスト細胞、単球、樹状細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、線維芽細胞、肝細胞、肺前駆細胞、または神経細胞である、実施形態７１～７４のいずれか一項に記載の方法。
【０３８８】
実施形態７６．　細胞がＴ細胞である、実施形態７５に記載の方法。
【０３８９】
実施形態７７．　ゲノム編集システムが、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＴＩＭ－１、ＣＤ２８、ＨＶＥＭ、ＧＩＴＲおよびＩＣＯＳからなる群から選択される遺伝子内の配列を標的とする、実施形態７５または７６に記載の方法。
【０３９０】
実施形態７８．　細胞を、第４の細胞膜透過ペプチドと外来性タンパク質をコードする核酸分子とを含む発現複合体と接触させるステップをさらに含む、実施形態７１～７７のいずれか一項に記載の方法。
【０３９１】
実施形態７９．　外来性タンパク質が、細胞の表面で発現され得る組換え受容体である、実施形態７８に記載の方法。
【０３９２】
実施形態８０．　組換え受容体が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である、実施形態７９に記載の方法。
【０３９３】
実施形態８１．　第４の細胞膜透過ペプチドが、ＶＥＰＥＰ－３ペプチド、ＶＥＰＥＰ－６ペプチド、ＶＥＰＥＰ－９ペプチドおよびＡＤＧＮ－１００ペプチドからなる群から選

択される、実施形態７８～８０のいずれか一項に記載の方法。
【０３９４】
実施形態８２．　第４の細胞膜透過ペプチドが、配列番号１～７０および７５～８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態８１に記載の方法。
【０３９５】
実施形態８３．　一部の実施形態では、細胞内の標的ポリヌクレオチドを修飾する方法であって、細胞を実施形態１～４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体または実施形態４４～６０のいずれか一項に記載のナノ粒子と接触させるステップを含み、ゲノム編集複合体またはナノ粒子が、標的ポリヌクレオチド内の配列を標的とするゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む方法が提供される。
【０３９６】
実施形態８４．　一部の実施形態では、個体の疾患を処置する方法であって、個体に実施形態６１～６６のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を投与するステップを含む方法が提供される。
【０３９７】
実施形態８５．　疾患が、がん、糖尿病、炎症性疾患、線維症、ウイルス感染性疾患、遺伝性疾患、眼疾患、肝臓疾患、肺疾患、腎臓疾患、加齢および変性疾患、ならびにコレステロールレベル異常を特徴とする疾患からなる群から選択される、実施形態８４に記載の方法。
【０３９８】
実施形態８６．　疾患が、がんである、実施形態８５に記載の方法。
【０３９９】
実施形態８７．　がんが、固形腫瘍であり、医薬組成物が、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、腫瘍抑制因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子からなる群から選択される１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、実施形態８６に記載の方法。
【０４００】
実施形態８８．　がんが、肝臓、肺または腎臓のがんである、実施形態８７に記載の方法。
【０４０１】
実施形態８９．　がんが、血液悪性腫瘍であり、医薬組成物が、増殖因子およびサイトカイン、細胞表面受容体、シグナル伝達分子およびキナーゼ、転写因子および他の転写調節因子、タンパク質発現および修飾の制御因子、腫瘍抑制因子、ならびにアポトーシスおよび転移の制御因子からなる群から選択される１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、実施形態８６に記載の方法。
【０４０２】
実施形態９０．　疾患が、ウイルス感染疾患であり、医薬組成物が、ウイルス感染性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、実施形態８５に記載の方法。
【０４０３】
実施形態９１．　疾患が、遺伝性疾患であり、医薬組成物が、遺伝性疾患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、実施形態８５に記載の方法。
【０４０４】
実施形態９２．　疾患が、加齢または変性疾患であり、医薬組成物が、加齢または変性疾

患の発症および／または進行に関与する１つまたは複数のタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、実施形態８５に記載の方法。

【０４０５】

実施形態９３．　疾患が、線維性または炎症性疾患であり、医薬組成物が、線維性または炎症性疾患の発症および／または進行に関与する２つまたはそれより多いタンパク質の発現を調節するゲノム編集システムの１つまたは複数の分子を含む、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む、実施形態８５に記載の方法。

【０４０６】

実施形態９４．　個体がヒトである、実施形態８４～９３のいずれか一項に記載の方法。

【０４０７】

実施形態９５．　一部の実施形態では、実施形態１～４３のいずれか一項に記載のゲノム編集複合体および／または実施形態４４～６０のいずれか一項に記載のナノ粒子を含む組成物を含むキットが提供される。

【実施例】

【０４０８】

本発明の範囲および精神内でいくつもの実施形態が可能であることを当業者は認識するであろう。以下の非限定的な実施例を参照することにより本発明をより詳細に説明する。以下の実施例は、本発明を例を挙げてさらに説明するものであるが、当然ながら、いかなる形でもその範囲を限定するものと解してはならない。

材料および方法

【０４０９】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００、ＲＮＡｉＭＡＸ、ＴｒａｎｓｃｒｉｐｔＡｉｄ　Ｔ７　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｋｉｔ、ＭＥＧＡｃｌｅａｒ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｃｌｅａｎ　Ｕｐ　ｋｉｔ、ＧｅｎｅＡｒｔ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　Ｃｌｅａｖａｇｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ、およびＰｌａｔｉｎｕｍ　Ｇｒｅｅｎ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＰＣＲ　ｍｉｘは、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｆｒａｎｃｅ）から入手した。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９抗体は、Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ、商品番号Ｃ１５２００２２３）およびＡＢＣＡＭ（クローン７Ａ９－　ａｂ１９１４６８）から入手した。ＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）　Ｔ７　ＡＲＣＡ　ｍＲＮＡ　Ｋｉｔは、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂから入手した。全てのオリゴヌクレオチドは、Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃ（Ｂｅｌｇｉｕｍ）から入手した。

ｇＲＮＡ

【０４１０】

ｇＲＮＡはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によって得た。ｓｇＲＮＡの生成は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで転写可能なＰＣＲ産物用の鋳型としてのＴ７プロモーターアダプター配列を含有する汎用ｓｇＲＮＡ発現プラスミドを使用して行った。Ｔ７プロモーター結合部位とそれに続く２０ｂｐのｓｇＲＮＡ標的配列を含有する線状ＤＮＡ断片をＴｒａｎｓｃｒｉｐｔＡｉｄ　Ｔ７　ｈｉｇｈ　Ｙｉｅｌｄ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ｌｉｆｅ　ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｆｒａｎｃｅ）を製造者の説明書にしたがって使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏで転写した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで転写されたｇＲＮＡをエタノールで沈殿させ、ＭＥＧＡｃｌｅａｒ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｃｌｅａｎ　ｕｐ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を使用してさらに精製した。ｓｇＲＮＡのストック溶液を水に可溶化し、ＵＶ吸光度により定量化し、－８０℃で貯蔵した。

【０４１１】

Fuら（２０１３年）、Nature　biotechnology、３１巻（９号）：８２２～８２６頁にしたがってｓｇＲＮＡ発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　４７５１１、プラスミドｐＦＹＦ１３２０　ＥＧＦＰ）を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によってＥＧＦＰ　ｇＲＮＡを得た。ＥＧＦＰ標的部位：ＧＧＧＣＡＣＧＧＧＣＡＧＣＴＴＧＣＣＧＧ（配列番号７１）

。
【０４１２】
Fuら、２０１３年（上掲）にしたがってｓｇＲＮＡ発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ＃４７５０８、プラスミドｐＦＹＦ１５４８　ＥＭＸ１）を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によってＥＭＸ１　ｇＲＮＡを得た。ＥＭＸ１標的部位：ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡ（配列番号７２）。
【０４１３】
Liaoら、（２０１５年）、Nucleic acid research、ｇｋｖ６７５にしたがってｓｇＲＮＡ発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃６９５３９、プラスミドＨＰＲＴ２ｂ－ｐＧＥＭ）を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によってＨＰＲＴ　ｇＲＮＡを得た。ＨＰＲＴ標的部位：ＧＡＣＴＧＴＡＡＧＴＧＡＡＴＴＡＣＴＴ（配列番号７３）。
【０４１４】
Maliら、（２０１３年）、Science、３３９巻（６１２１号）：８２３～８２６頁にしたがってｓｇＲＮＡ発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃４１８１８、プラスミドｇＲＮＡ＿ＡＡＶＳ１－Ｔ２）を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によってＡＡＶＳ　ｇＲＮＡを得た。ＡＡＶＳ標的部位：ＧＧＧＧＣＣＡＣＴＡＧＧＧＡＣＡＧＧＡＴ（配列番号７４）。
【０４１５】
Hart, T.ら（２０１５年）、Cell、１６３巻（６号）、１５１５～１５２６頁にしたがってｓｇＲＮＡ発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃７４１９０、プラスミドｐＬＣＫＯ＿Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ＿ｓｇＲＮＡ）を使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によってルシフェラーゼｇＲＮＡを得た。ルシフェラーゼ標的部位：ＡＣＡＡＣＴＴＴＡＣＣＧＡＣＣＧＣＧＣＣ（配列番号１０３）。
【０４１６】
Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃ（Ｂｅｌｇｉｕｍ）から入手したｓｇＲＮＡ発現プラスミドｇＲＮＡｈＰＤ１ａおよびｇＲＮＡｈＰＤ１ｂを使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によってｈＰＤ１　ｇＲＮＡを得た。ｈＰＤ１ｓｇＡ１：ＡＣＣＧＣＧＴＧＡＣＴＴＣＣＡＣＡＴＧＡＧＣＧ（配列番号９９）。ｈＰＤ１ｓｇＢ１：ＡＡＡＣＣＧＣＴＣＡＴＧＴＧＧＡＡＧＴＣＡＣＧ（配列番号１００）。ｈＰＤ１ｓｇＣ１ｆ：ＡＣＣＧＣＡＧＴＴＧＴＧＴＧＡＣＡＣＧＧＡＡＧ（配列番号１０１）。ｈＰＤ１ｓｇＤ２：ＡＡＡＣＣＴＴＣＣＧＴＧＴＣＡＣＡＣＡＡＣＴＧ（配列番号１０２）。
ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ
【０４１７】
ＤＮＡ鋳型用に線状化されたｐＣＳ２－ＣＡＳ９ベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃４７３２２）を用いてＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）　Ｔ７　ＡＲＣＡ　ｍＲＮＡ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂ）を使用してＣＡＳ９　ｍＲＮＡを調製した。合成したｍＲＮＡをＬｉＣｌ沈殿、フェノール：クロロホルム抽出、およびエタノール沈殿によって精製した。２６０ｎｍでの紫外線吸光度を測定することによってｍＲＮＡ濃度を決定し、試料を－２０℃で貯蔵した。ｉｎ　ｖｉｖｏ研究のために、ポリアデニル化され、キャップされたＣＡＳ９　ｍＲＮＡをＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから入手した。
ＣＡＳ９タンパク質の発現および精製
【０４１８】
Zurisら、２０１５年、Nature biotechnology、３３巻（１号）：７３～８０頁によって以前に記載されたように、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　ＨＩＳ－ＮＬＳ－ＣＡＳ９をＥ．ｃｏｌｉ中で発現させ、精製した。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　ＨＩＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳ　ｐＥＴ２９発現ベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃６２９３３）でＢＬ２１　ＳＴＡＲ（ＤＥ３）コンピテント細胞を形質転換した。１００ｍｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するｌｕｒｉａ　Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）培地中、３７℃で約０．５$ＯＤ_{595}$まで細胞を成長させた。次いで、細胞培養物を２０℃に冷却し、０．５ｍＭイソプロピル－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（Isopropl-1-thio-β-D-galactopyranoside）を用いてタンパク質

発現を終夜誘導した。細胞を遠心分離により回収し、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ８．０）、０．５ｍＭ ＮａＣｌ、５０ｍＭ ＫＣｌ、２０％グリセロール、および０．５ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を含有する溶解緩衝液中で超音波処理により溶解させた。ＨＩＳ－ＮＬＳ－ＣＡＳ９を含有する可溶性溶解物を２０，０００×ｇでの３０分間の遠心分離によって得、２ｍｌのＮＩ－ＮＴＡ（ニトリロ酢酸）Ａｇａｒｏｓｅ Ｒｅｓｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）と共に４℃で１時間インキュベートした。次いで、樹脂を溶解緩衝液で２回洗浄し、ＨＥＰＥＳ（ｐＨ８．０）、０．１Ｍ ＮａＣｌ、２０％グリセロール、１０ｍＭ ＴＣＥＰ、および３００ｍＭイミダゾールでＨＩＳ－ＮＬＳ－ＣＡＳ９タンパク質を溶出した。タンパク質溶液をＨＩＴｒａｐ Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）にアプライし、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ８．０）、０．１ｍＭ ＮａＣｌ、２０％グリセロール、および１０ｍＭ ＴＣＥＰを含有する緩衝液で平衡化した陽イオン交換ＨＩＴｒａｐ ＳＰ ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）でさらに精製した。５ｍｇ／ｍｌまで濃縮した線形ＮａＣｌ勾配でＨＩＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳを溶出し、－８０℃で貯蔵した。一部の研究のために、ＣＡＳ９タンパク質をＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ（ＦＲＡＮＣＥ）から入手した。

細胞膜透過ペプチド：

【０４１９】

酢酸塩形態のペプチドをＧＥＮＥＰＥＰ Ｍｏｎｔｐｅｌｌｉｅｒ（ＦＲＡＮＣＥ）から入手した。以下のペプチドを使用した：

ＶＥＰＥＰ－３ａ：βＡＫＷＦＥＲＷＦＲＥＷＰＲＫＲＲ（配列番号７５）
ＶＥＰＥＰ－３ｂ：βＡＫＷＷＥＲＷＷＲＥＷＰＲＫＲＲ（配列番号７６）
ＶＥＰＥＰ－６：βＡＬＷＲＡＬＷＲＬＷＲＳＬＷＲＬＬＷＫＡ（配列番号７７）
ＶＥＰＥＰ－９：βＡＬＲＷＷＬＲＷＡＳＲＷＦＳＲＷＡＷＷＲ（配列番号７８）
ＡＤＧＮ－１００ａ：βＡＫＷＲＳＡＧＷＲＷＲＬＷＲＶＲＳＷＳＲ（配列番号７９）
ＡＤＧＮ－１００ｂ：βＡＫＷＲＳＡＬＹＲＷＲＬＷＲＶＲＳＷＳＲ（配列番号８０）
ＣＡＤＹ：ＧＬＷＲＡＬＷＲＬＬＲＳＬＷＲＬＬＷＫＶ（配列番号８１）

【０４２０】

ペプチドのストック溶液を蒸留水または５％のＤＭＳＯ中２ｍｇ／ｍＬで調製し、水浴超音波処理装置で１０分間超音波処理した後、使用直前に希釈した。

細胞株

【０４２１】

安定なＥＧＦＰ発現細胞株（ＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ、ＥＧＦＰ－ＪＵＲＫＡＴ Ｔ、ＥＧＦＰ－ＨＥＫ）ならびにＵ２ＯＳ（ＡＴＣＣ（登録商標）ＨＴＢ－９６（商標））、初代ヒト線維芽細胞、Ｈｅｐ Ｇ２（ＡＴＣＣ（登録商標）ＨＢ－８０６５（商標））、ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ２９３）（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－１５７３（商標））、ヒト骨髄性白血病Ｋ５６２細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＣＬ２４３（商標））、Ｊｕｒｋａｔ Ｔ細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）ＴＩＢ－１５２（商標））、ヒトＥＳＣ（Ｈ９）、およびマウスＥＳＣ（ＥＳＦ １５８）を含むいくつかの細胞株を使用した。細胞はＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ［ＡＴＣＣ］から入手した。

（実施例１）

遺伝子破壊のためのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡタンパク質－ＲＮＡ複合体の細胞膜透過ペプチド媒介性の機能的送達

【０４２２】

５つの細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、ＶＥＰＥＰ－３、ＡＤＧＮ－１００、およびＣＡＤＹ）を異なる細胞株におけるＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の機能的細胞送達について評価した。ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）ＣＡＳ９およびガイドＲＮＡ、ここでｇＲＮＡは核酸配列標的に相補的なガイド配列を含む、を含むゲノム編集ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体に細胞膜透過ペプチドを会合させた。３つの安定

なＥＧＦＰ発現細胞株（Ｕ２ＯＳ、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ、およびＨＥＫ）において外来性ＥＧＦＰ遺伝子の遺伝子破壊を、ならびに／またはヒト（Ｈ９）およびマウス（ＥＳＦ－１５８）胚性幹（ＥＳ）細胞を含むマウスおよびヒト細胞株（Ｕ２ＯＳ、ＨＥＫ、およびＫ５６２）において内因性ＥＭＸ１、ＡＡＶＳ、もしくはＨＰＲＴ内因性遺伝子の遺伝子破壊をモニターすることによって、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の機能的送達を調べた。

ＣＰＰは、ＲＧＥＮ（ＣＡＳ９）およびＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ（ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡ）複合体と安定な複合体を形成する

【０４２３】

ＣＹ５蛍光標識ＣＡＳ９タンパク質を使用する蛍光分光法によってＣＰＰ／ＣＡＳ９およびＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡ複合体の形成をモニターした。マレイミド－ＣＹ５を使用してＣＡＳ９タンパク質を接近可能なシステイン残基においてＣＹ５色素で標識した。図１Ａおよび１Ｂに示すように、ＣＰＰ（ＶＥＰＥＰ－３ａ／ｂ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、ＡＤＧＮ－１００ａ／ｂ、ＣＡＤＹ）の濃度を増加させて５ｎＭの固定濃度のＣＹ５－ＣＡＳ９（図１Ａ）またはＣＹ５－ＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡ（１：１のモル比）（図１Ｂ）をタイトレーションした。曲線フィッティングにより、ＶＥＰＥＰ－３ａ／ｂ、ＡＤＧＮ－１００ａ／ｂ、およびＶＥＰＥＰ－９はＣＹ５－ＣＡＳ９およびＣＹ５－ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡ複合体の両方と相互作用するが、ＶＥＰＥＰ－６およびＣＡＤＹはＣＹ５－ＣＡＳ９：ｓｇＲＮＡ複合体のみに結合することが実証された。表１に示すように、ＶＥＰＥＰ－３ａ／ｂおよびＡＤＧＮ－１００ａ／ｂペプチドが、最も強力なペプチドとなり、低いナノモル濃度範囲においてＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体に対して非常に高い親和性を示し、ＶＥＰＥＰ－９およびＣＡＤＹは中程度のバインダーであり、ＶＥＰＥＰ－６はＣＹ５－ＣＡＳ９およびＣＹ５－ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡ複合体の両方との相互作用が乏しい。

【表１】

表1: CPP/CAS9、およびCPP/CAS9-sgRNAの結合パラメーター

	Kd (nM)	
ペプチド	Cas9	Cas9/sgRNA
ADGN-100a	54 ± 10	12 ± 5
ADGN-100b	72 ± 10	11 ± 5
VEPEP-3a	17 ± 5	11 ± 5
VEPEP-3b	15 ± 5	13 ± 5
VEPEP-6	> 100	46 ± 10
VEPEP-9	62 ± 15	28 ± 5
CADY	> 100	21 ± 5

【０４２４】

ＣＰＰ／ＣＡＳ９およびＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡ粒子をさらに特徴付けし、平均サイズ、多分散性、およびゼータ電位をＺｅｔａｓｉｚｅｒ　４装置（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｌｔｄ）を用いて測定した。２０℃の生理的条件（０．９％ＮａＣｌ）下、１０：１および２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＣＡＳ９および予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡをＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＶＥＰＥＰ－９、ＡＤＧＮ－１００ａ、およびＣＡＤＹペプチドと混合し、解析前に３７℃で３０分間インキュベートした。ＣＣＰ／ＣＡＳ９およびＣＣＰ／ＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体の平均サイズおよび多分散性は測定あたり３分間、２５℃で決定し、ゼータ電位はＺｅｔａｓｉｚｅｒ　４装置（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｌｔｄ）で測定した。３つの別々の実験の平均としてデータを表２に示す。

【０４２５】
１０：１または２０：１のモル比において、ＶＥＰＥＰ－３ｂおよびＡＤＧＮ－１００ａの両方のペプチドはＣＡＳ９およびＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体と安定なナノ粒子を形成することができた。約５０ｎｍおよび８０ｎｍの平均直径ならびに０．２５および０．３５の多分散性指数（ＰＩ）がＶＥＰＥＰ－３ｂおよびＡＤＧＮ－１００ａについてそれぞれ得られた。ゼータ電位によって得られるＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９およびＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９：ｇＲＮＡ粒子の電荷は１０：１および２０：１のモル比について類似しており、１０：１のモル比でそれぞれ６．０±０．８ｍＶおよび５．３±１．０ｍＶ、２０：１のモル比でそれぞれ７．２±１ｍＶおよび４．８±０．３ｍＶの平均値であった。ゼータ電位によって得られるＶＥＰＥＰ－３ｂ／ＣＡＳ９およびＶＥＰＥＰ－３ｂ／ＣＡＳ９：ｇＲＮＡ粒子の電荷は１０：１および２０：１のモル比について類似しており、１０：１において１７．０±０．５ｍＶ～２７．０±４ｍＶの間の範囲の平均値であった。

【０４２６】
対照的に、ＣＡＤＹはＣＡＳ９といかなる複合体も形成せず、１０：１のモル比においてＣＡＤＹもＶＥＰＥＰ－９も、予めロードしたＣＡＳ９：ｇＲＮＡ複合体と安定な粒子を形成しなかった。２０：１のモル比において、１７０±１０および３５０±２０ｎｍの粒子平均サイズならびに０．５８および０．６の多分散性指数がＶＥＰＥＰ－９およびＣＡＤＹについてそれぞれ得られた。

【表２】

表2: CPP/RGENおよびCPP/RGEN:gRNAナノ粒子の特徴付け

ペプチド(モル比)	Cas9			Cas9:gRNA		
	サイズ(nm)	PI	ゼータ(mV)	サイズ(nm)	PI	ゼータ(mV)
VEPEP-3b (10/1)	45 ± 5	0.33 ± 0.1	21.0 ± 5	38 ± 4	0.35 ± 0.1	27.0 ± 4
VEPEP-3b (20/1)	52 ± 5	0.35 ± 0.1	17.0 ± 5	51 ± 5	0.37 ± 0.1	25.3 ± 7
ADGN-100a (10/1)	82 ± 5	0.25 ± 0.1	6.0 ± 0.8	91 ± 5	0.27 ± 0.1	5.3 ± 0.7
ADGN-100a (20/1)	78 ± 7	0.21 ± 0.1	7.2 ± 1	87 ± 6	0.28 ± 0.1	4.8 ± 0.3
VEPEP-9 (20/1)	280 ± 20	0.45 ± 0.1	32 ± 5	170 ± 10	0.58 ± 0.1	39 ± 8
CADY (20/1)	-	-	-	350 ± 20	0.6 ± 0.2	45 ± 8

ＥＧＦＰレポーター遺伝子を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０４２７】
５つのＣＰＰ（ＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、ＣＡＤＹ、およびＡＤＧＮ－１００ａ）をＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の細胞送達について評価した。ＥＧＦＰを発現する３つのヒト細胞株（ＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ、ＥＧＦＰ－ＨＥＫ、ＥＧＦＰ－ＪＵＲＫＡＴ）において外来性ＥＧＦＰ遺伝子レポーターの特定部位を標的とすることによって、よく確立されたＣＡＳ９誘導性の遺伝子破壊方法（Fuら、２０１３年、上掲）を使用してＣＰＰ媒介性の送達の有効性を定量化した。

【０４２８】
両親媒性ペプチドのストック溶液を蒸留水中１ｍｇ／ｍＬで調製し、１０分間超音波処理した。ＣＡＳ９タンパク質を精製されたＥＧＦＰ　ｓｇＲＮＡと１：１のモル比で予めロードし、ペプチドとの複合体の形成前に１０分間インキュベートした。予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（１０ｎＭ、２５ｎＭ、および５０ｎＭ）を５：１、１０：１、および２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＣＰＰと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。

【０４２９】
単一の組み込まれたＥＧＦＰレポーター遺伝子を含有する細胞株（ＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ、

ＥＧＦＰ－ＨＥＫ、およびＥＧＦＰ－ＪＵＲＫＡＴ）を、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質（ストレプトマイシン１０，０００μｇ／ｍＬ、ペニシリン、１０，０００ＩＵ／ｍＬ）、および１０％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（foetal calf serum）（ＦＣＳ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、５％CO_2を含有する加湿雰囲気下３７℃で培養した。トランスフェクションの前日に３５ｍｍディッシュに播種した計１５０，０００個の細胞を５０～６０％コンフルエンスまで成長させ、２００μｌの予め形成させた複合体を重層し、３～５分間インキュベートした後、４００μｌのＤＭＥＭを添加した。３７℃での３０分間のインキュベーションの後、ＣＰＰ／ＣＡＳ９－ｇＲＮＡ複合体の重層を除去せずに、１６％のＦＣＳを含有する１ｍＬの新鮮なＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞を７２時間インキュベーターに戻した。

【０４３０】

ＥＧＦＰの発現レベルをモニターすることによって、フローサイトメトリーを使用してＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断形成を解析した。図２～５に示す遺伝子破壊頻度のデータは、３つの別々の実験からの平均として報告している。ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００およびＲＮＡｉＭＡＸの両方の送達方法を陽性対照として使用した。

【０４３１】

図２Ａ～２Ｄおよび図３Ａ～３Ｄに示すように、全てのＣＰＰは、ＥＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ細胞およびＥＧＦＰ－ＨＥＫ細胞の両方においてＣＡＳ９／ｇＲＮＡの機能的送達を促進し、ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ濃度依存的なＥＧＦＰ発現の減少を誘導した。最適な二本鎖切断形成は、２０：１のＣＰＰと予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡのモル比で形成されたＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体で得られ、１：１または１：２のモル比でそれぞれ形成された予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡを使用した際に差異は観察されなかった。

【０４３２】

Ｕ２ＯＳ細胞において、ＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、ＣＡＤＹ、およびＶＥＰＥＰ－６と会合させたＣＡＳ９：ｇＲＮＡ（５０ｎＭ）（ＣＰＰ対カーゴについて２０：１のモル比）でそれぞれ９２％、８７％、５５％、３３％、および２５％のＥＧＦＰ発現の減少が得られた。比較として、送達ベクターとしてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００またはＲＮＡｉＭＡＸを使用して、ＥＧＦＰ発現の２２％または７１％の減少がそれぞれ得られた（図２Ｃ）。

【０４３３】

ＨＥＫ細胞において、ＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、ＣＡＤＹ、およびＶＥＰＥＰ－６と会合させたＣＡＳ９：ｇＲＮＡ（５０ｎＭ）（ＣＰＰ対カーゴについて２０：１のモル比）でそれぞれ９３％、８６％、５８％、４２％、および３０％のＥＧＦＰ発現の減少が得られた。比較として、送達ベクターとしてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００またはＲＮＡｉＭＡＸを使用して、ＥＧＦＰ発現の３５％または７８％の減少がそれぞれ得られた（図３Ｃ）。

【０４３４】

両方の細胞株について、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ｂペプチドを用いて、ＥＧＦＰ陽性細胞について８５％より多くの減少に繋がる、より大きな二本鎖切断形成が得られた。用量応答の調査（図２Ｄおよび３Ｄ）は、ＣＡＳ９：ｇＲＮＡは、ＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ｂと会合させた場合に低いナノモル濃度で効率的である得ることを実証した。ＶＥＰＥＰ－３ｂまたはＡＤＧＮ－１００ａと会合させた１ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡを使用して、ＥＧＦＰ発現Ｕ２ＯＳ細胞の数はそれぞれ６８％または５７％減少した。ＶＥＰＥＰ－３ｂまたはＡＤＧＮ－１００ａと会合させた１ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡを使用して、ＥＧＦＰ発現ＨＥＫ細胞の数はそれぞれ７１％または６２％減少した。対照的に、両方の細胞株について、ＶＥＰＥＰ－６、ＣＡＤＹ、およびｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００を使用した場合に１ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡの使用はＥＧＦＰ発現の変化を生じさせず、ＲＮＡｉＭＩＸまたはＶＥＰＥＰ－９を使用して、それぞれわずかに１８％または５％のＥＧＦＰ発現の減少が得られた。したがって、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ｂは、ＣＲＩＳＰＲ複合体を送達するために、ｌｉｐ

ｏｆｅｃｔａｍｉｎｅおよびＣＡＤＹよりも７～１０倍効率的であり、ＲＮＡｉＭＡＸよりも２～４倍効率的である。

【０４３５】

図４Ａ～４Ｄならびに図５Ａおよび５Ｂに示すように、ＡＤＧＮ－１００およびＶＥＰＥＰ－３ペプチドは、ＥＧＦＰ－ＪＵＲＫＡＴ細胞においてＣＡＳ９／ｇＲＮＡの機能的送達を促進し、濃度依存的なＥＧＦＰ発現の減少を誘導した。両方のペプチドは、８０％より高い（ＡＤＧＮ－１００ａについて８１％およびＶＥＰＥＰ－３ｂについて８７％）ＥＧＦＰ陽性細胞の減少をもたらした。ＶＥＰＥＰ－９またはＣＡＤＹではＥＧＦＰ陽性細胞のそれぞれわずかに２２％または１８％の減少が得られ、ＥＧＦＰ細胞の数の有意な変化はＶＥＰＥＰ－６またはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００では観察されなかった。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ｂペプチドは、ＣＲＩＳＰＲ複合体を送達するためにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅおよびＣＡＤＹよりも１２～２０倍効率的である。用量応答の解析（図４Ｄ）は、他の細胞株について、ＪＵＲＫＡＴにおいて、ＣＡＳ９：ｇＲＮＡはＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ｂと会合させた場合に低いナノモル濃度で効率的であり得ることを実証した。ＥＧＦＰ発現細胞の数は、ＶＥＰＥＰ－３ｂまたはＡＤＧＮ－１００ａと会合させた１ｎＭのＣＡＳ９：ｇＲＮＡを使用してそれぞれ５５％または５１％減少した。対照的に、同じＣＡＳ９：ｇＲＮＡ濃度において、ＶＥＰＥＰ－６、ＣＡＤＹ、ＶＥＰＥＰ－９、またはｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００を使用してＥＧＦＰ発現の変化は観察されず、ＲＮＡｉＭＡＸを使用してわずかに１８％のＥＧＦＰ発現の減少が得られた。

ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の細胞送達は毒性を誘導しない

【０４３６】

３つの細胞株で観察されたロバストなＥＧＦＰ破壊は、細胞毒性の結果ではないことが分かった。ＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性を３つの細胞株（ＥＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ、ＥＧＦＰ－ＨＥＫ、ＥＧＦＰ－ＪＵＲＫＡＴ）で調べた。トランスフェクションの前日に２４ウェルプレートに播種した計３０，０００個の細胞を、（ＣＰＰと、予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体のモル比１０：１または２０：１で複合体を形成した）ＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡの濃度を１～２００ｎＭの範囲で増加させて、最終ＦＣＳ濃度が１０％に達するまで培地を追加する前に３０分間インキュベートした。２４時間後に比色ＭＴＴアッセイ（Ｓｉｇｍａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）によって細胞毒性応答を測定した。ＭＴＴアッセイのために、細胞培養培地を除去し、２．５ｍｇ／ｍｌのＭＴＴを含有するＰＢＳと４時間置き換えた。結果は３つの別々の実験の平均に対応する。図６Ａ～６Ｃに示すように、１００ｎＭまでの濃度について、３つの細胞株においてＶＥＰＥＰ－３ｂまたはＡＤＧＮ－１００ａペプチドについて毒性は観察されなかった。生存能の減少は、２００ｎＭにおいて１０％未満であった。対照的に、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００またはＲＮＡｉＭＡＸについて２００ｍＭにおいて、細胞株に応じて６０～７０％および２０～２５％の間の細胞死が観察された。さらに、両方の脂質方法はＪＵＲＫＡＴ細胞に対して毒性が高いらしく、７５％（ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００）または４５％（ＲＮＡｉＭＡＸ）の細胞死を誘導した。

ＥＭＸ１内因性遺伝子を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０４３７】

３つのヒト細胞株（Ｕ２ＯＳ、ＪＵＲＫＡＴ、およびＫ５６２）において内因性ＥＭＸ１遺伝子を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の細胞送達についてＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドを評価した。

【０４３８】

予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ（２５ｎＭ、５０ｎＭ）複合体を２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００よりも良好な結果を示したことが以前に報告され

たので（Zurisら、２０１５年、上掲）、ＲＮＡｉＭＡＸ送達を陽性対照として使用した。細胞株（Ｕ２ＯＳ、ＪＵＲＫＡＴおよびＫ５６２）を、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質（ストレプトマイシン１０，０００μｇ／ｍＬ、ペニシリン、１０，０００ＩＵ／ｍＬ）、および１０％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（foetal calf serum）（ＦＣＳ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、５％CO_2を含有する加湿雰囲気下３７℃で培養した。トランスフェクションの前日に３５ｍｍディッシュに播種した計１５０，０００個の細胞を５０～６０％コンフルエンスまで成長させ、２００μｌの予め形成させた複合体を重層し、３～５分間インキュベートした後、４００μｌのＤＭＥＭを添加した。３７℃での３０分間のインキュベーションの後、ＣＰＰ／ＣＡＳ９－ｇＲＮＡ複合体の重層を除去せずに、１６％のＦＣＳを含有する１ｍＬの新鮮なＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞を７２時間インキュベーターに戻した。非相同末端結合（ＮＨＥＪ）による修復が後続するＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断形成をＴ７Ｅ１アッセイまたはＧｅｎｏｍｅ Ｃｌｅａｖａｇｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＧＣＤ Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）のいずれかによって解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。標的遺伝子における挿入欠失頻度をＴ７Ｅ１アッセイを使用して定量化した。

【０４３９】

図７Ａ～７Ｃに示し、表３に要約するように、ＶＥＰＥＰ－３ｂ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、３つ全ての細胞株においてＥＭＸ－１遺伝子のロバストな編集を誘導した。３つの細胞株において、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡは、意図した標的部位においてＮＨＥＪ媒介性の挿入欠失突然変異を誘導した。２５ｎＭの濃度のＣＡＳ９－ｇＲＮＡを使用して、Ｕ２ＯＳ、Ｋ５６２、およびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＡＤＧＮ－１００ａを用いて送達した場合にそれぞれ６７％、７１％、および６５％の平均挿入欠失頻度が得られた。Ｕ２ＯＳ、Ｋ５６２、およびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＶＥＰＥＰ－３ｂを使用してそれぞれ７５％、７９％、および６９％の平均挿入欠失頻度が得られた。Ｕ２ＯＳ、Ｋ５６２、およびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＶＥＰＥＰ－９を使用してそれぞれ２７％、２９％、および２１％の平均挿入欠失頻度が得られた。同じ細胞株において３１％、３９％、および２２％の挿入欠失頻度を示したＲＮＡｉＭＡＸと比べて、ＶＥＰＥＰ－３ｂおよびＡＤＧＮ－１００ａの効率は少なくとも２倍高かった。

【表３】

表3: 異なる細胞株におけるT7E1アッセイによって測定したRGEN/gRNAの送達および生じた編集効率についての異なるペプチドとRNAiMAXとの比較

	平均挿入欠失頻度 (%) ± S.E.M					
	CAS9/sgRNA (25 nM)			CAS9/sgRNA (50 nM)		
	U2OS	K562	JURKAT	U2OS	K562	JURKAT
ADGN-100a	67 ± 5	71 ± 8	65 ± 5	72 ± 8	74 ± 4	68 ± 6
VEPEP-3b	75 ± 7	79 ± 5	69 ± 8	77 ± 5	81 ± 7	71 ± 5
VEPEP-9	27 ± 3	29 ± 7	21 ± 7	30 ± 6	25 ± 5	21 ± 5
RNAiMAX	31 ± 6	39 ± 6	22 ± 5	51 ± 7	58 ± 8	47 ± 5

（実施例２）

複数の遺伝子を編集するためのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の機能的送達ヒト細胞株

【０４４０】

次いで、ＥＧＦＰを発現する２つのヒト細胞株（ＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ、ＥＧＦＰ－ＪＵＲＫＡＴ）において内因性ＥＭＸ１および外来性ＥＧＦＰレポーター遺伝子を標的とする複数のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の細胞送達についてＶＥＰＥＰ－３、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ペプチドを評価した。２つの予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複

合体（２５ｎＭ）を２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＶＥＰＥＰ－３ｂ、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。ＲＮＡｉＭＡＸ送達を陽性対照として使用した。以前に記載したように細胞を処理し、トランスフェクションの７２時間後にＣＡＳ９誘導性のＮＨＥＪを解析した。非相同末端結合（ＮＨＥＪ）による修復が後続するＣＡＳ９誘発性の二本鎖切断形成をＴ７Ｅ１アッセイまたはＧｅｎｏｍｅ Ｃｌｅａｖａｇｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＧＣＤ Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）のいずれかによって解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。ＥＭＸ１遺伝子における欠失（挿入欠失）頻度をＴ７Ｅ１アッセイを使用して定量化し、ＥＧＦＰ発現の減少をフローサイトメトリーによってモニターした。ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異のデータを３つの別々の実験の平均として報告する。

【０４４１】

図８Ａ～８Ｃに示し、表４に要約するように、ＶＥＰＥＰ－３ｂ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、両方の細胞株においてＥＭＸ－１遺伝子およびＥＧＦＰ遺伝子の両方のロバストな編集を誘導した。２つの細胞株において、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡは、意図した標的部位においてＮＨＥＪ媒介性の挿入欠失突然変異を誘導した。

【０４４２】

２５ｎＭの濃度のＣＡＳ９－ｇＲＮＡを使用して、Ｕ２ＯＳおよびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ｂのいずれかを用いて両方の遺伝子について７０％より高い平均挿入欠失頻度が得られた。Ｕ２ＯＳおよびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＶＥＰＥＰ－９についてそれぞれ約３０％および１５％の平均挿入欠失頻度が得られた。脂質ベースのベクターＲＮＡｉＭＡＸを用いて、Ｕ２ＯＳ細胞において４０％およびＪＵＲＫＡＴ細胞において２８％の遺伝子破壊効率が得られた。Ｕ２ＯＳおよびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＶＥＰＥＰ－３ｂおよびＡＤＧＮ－１００ａペプチドはそれぞれＲＮＡｉＭＡＸよりもそれぞれ約２倍および２．８倍効率的であった。

【表４】

表4: 異なる細胞株におけるT7E1アッセイによって測定した複数のRGEN/gRNAの送達および生じた編集効率についての異なるペプチドとRNAiMAXとの比較

	平均挿入欠失頻度 (%) ± S.E.M			
	U2OS		JURKAT	
	EGFP	EMX1	EGFP	EMX1
ADGN-100a	77 ± 6	72 ± 8	78 ± 4	76 ± 7
VEPEP-3b	80 ± 5	82 ± 6	84 ± 7	79 ± 7
VEPEP-9	32 ± 4	31 ± 5	15 ± 8	10 ± 2
RNAiMAX	33 ± 7	41 ± 4	28 ± 7	27 ± 5

【０４４３】

以上を合わせると、これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－３およびＡＤＧＮ－１００の両方のペプチドは、いかなる毒性応答も誘導することなく、ＪＵＲＫＡＴなどのトランスフェクトが難しい細胞株を含む異なる細胞株において複数のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の機能的送達のための強力な方法を構成することを実証する。

胚性幹細胞

【０４４４】

次いで、Ｕ２ＯＳにおいてならびにヒト（Ｈ９）およびマウス（ＥＳＦ－１５８）胚性幹細胞においてＥＭＸ１、ＡＡＶＳ、およびＨＰＲＴの３つの内因性遺伝子を標的とする複数のＲＧＥＮ：ｇＲＮＡ複合体の細胞送達についてＶＥＰＥＰ－３およびＡＤＧＮ－１

００ペプチドを評価した。３つの予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（各２０ｎＭ）を２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＶＥＰＥＰ－３ｂおよびＡＤＧＮ－１００ａペプチドと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。ＲＮＡｉＭＡＸ送達方法を陽性対照として使用した。

【０４４５】

Ｕ２ＯＳ細胞を以前に記載したように処理した。４ｍＭ　Ｌ－グルタミンを含み、１．５ｇ／Ｌ重炭酸ナトリウムおよび４．５ｇ／Ｌグルコースを含有するように調整され、０．１ｍＭ　２－メルカプトエタノール（８５％）を補充され、かつ１５％ＥＳ－Ｃｅｌｌ　Ｑｕａｌｉｆｉｅｄウシ胎児血清（fetal bovine serum）を含むダルベッコ改変イーグル培地中でＨ９胚性幹細胞を培養した。０．１ｍＭ　２－メルカプトエタノール、１，０００Ｕ／ｍＬのマウス白血病抑制因子（ＬＩＦ）、および１５％ＥＳ－Ｃｅｌｌ　Ｑｕａｌｉｆｉｅｄ　ＦＢＳを補充したＭｏｕｓｅ　ＥＳ　Ｃｅｌｌ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ中でマウスＥＳＦ－１５８胚性幹細胞を培養した。ＮＨＥＪによる修復が後続するＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断形成をＴ７Ｅ１アッセイによってトランスフェクションの７２時間後に解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。ＥＭＸ１、ＡＡＶＳおよびＨＰＲＴ遺伝子における欠失（挿入欠失）頻度をＴ７Ｅ１アッセイを使用して定量化した。ＲＧＥＮ：ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異のデータを３つの別々の実験の平均として報告する。

【０４４６】

表５に示すように、ＶＥＰＥＰ－３ｂ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、試験した２つのＥＳ細胞株においてＥＭＸ－１、ＡＡＶＳ、およびＨＰＲＴ遺伝子のロバストな編集を誘導した。３つ全ての細胞株において、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡは、意図したオンターゲット部位においてＮＨＥＪ媒介性の挿入欠失突然変異を誘導した。対照的に、ＲＮＡｉＭＡＸ送達方法を使用して、ＥＳ細胞株において遺伝子編集は観察されなかったか、またはごくわずかであった。

【０４４７】

２０ｎＭの濃度の３つのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体を使用して、Ｕ２ＯＳおよびマウスＥＳ細胞においてＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ｂのいずれかを用いて３つの遺伝子について７０％より高い平均挿入欠失頻度が得られた。Ｈ９細胞において６０％より高い平均挿入欠失頻度が得られた。これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－３およびＡＤＧＮ－１００ペプチドが複数のＲＧＥＮ：ｇＲＮＡ複合体の送達のための強力なビヒクルであることをさらに実証した。

【表５】

表5: ES細胞における複数のRGEN:gRNAの送達についての異なるペプチドとRNAiMAXとの比較

	平均挿入欠失頻度 (%) ± S.E.M								
細胞株	U2OS			H9			ESF-158		
遺伝子	EMX1	AAVS	HPRT	EMX1	AAVS	HPRT	EMX1	AAVS	HPRT
ADGN-100a	78 ± 7	72 ± 4	78 ± 6	61 ± 6	60 ± 5	61 ± 5	75 ± 5	71 ± 5	70 ± 4
VEPEP-3b	82 ± 5	75 ± 7	84 ± 6	67 ± 6	71 ± 7	70 ± 4	84 ± 6	79 ± 5	85 ± 7
RNAiMAX	44 ± 5	47 ± 6	51 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 5	11 ± 5	7 ± 5

（実施例３）

ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の機能的送達および相同組換え修復（ＨＤＲ）による遺伝子編集

【０４４８】

精密な相同組換え修復（ＨＤＲ）を使用したゲノム操作のための三成分ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ複合体の送達についてＶＥＰＥＰ－３およびＡＤＧＮ－１００ペプチドを評価した。三成分複合体において、ＥＭＸ１遺伝子を標的とするＣＡＳ９／ｇＲＮＡを

、Ｕ２ＯＳおよびＪＵＫＡＴ細胞においてＨＤＲによって目的の遺伝子への１０～１２ヌクレオチドの挿入を可能とするｓｓＤＮＡドナーと会合させた。

【化１】

ssドナー鋳型: 5'-GGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGAC

AAGCTTGCTAGC GGTGGGCAACCACAAACCCACGAGGGCAGA-3'

(配列番号82)

【０４４９】

ｓｓＤＮＡは、１２ヌクレオチドの挿入配列（配列番号８２において太字で示した挿入）を取り囲む３０ｎｔの２つのホモロジーアームを含有する。１２ヌクレオチドの挿入は、特異的なＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｈｅＩ制限部位を含有し、ＨＤＲ効率を定量化するためにこれらを使用した。

【０４５０】

ＥＭＸ１遺伝子座でのゲノム編集実験は以下の通りに行った：２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＶＥＰＥＰ－３ｂまたはＡＤＧＮ－１００ａペプチドと会合させた５０ｎＭの濃度の予めロードしたＲＧＥＮ／ｇＲＮＡを使用して、高レベルの二本鎖切断形成のために実験を最適化した。そのような条件は、図２Ｃおよび図４Ｃに報告するように、ＪＵＲＫＡＴ　ＴおよびＵ２ＯＳの両方の細胞株に対して８０％より高い二本鎖切断効率に繋がった。表４に示すように、全ての成分を一緒に合わせて三成分複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ）を形成させるか、または別々に、１つのステップでＣＰＰをＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体と合わせ、別のステップでＣＰＰをｓｓＤＮＡドナーと合わせて２つの別々の複合体（ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ／ＣＰＰおよびｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ）を形成させるかのいずれかによって、２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比で５０ｎＭのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡおよびｓｓＤＮＡドナーの両方をＶＥＰＥＰ－３ｂまたはＡＤＧＮ－１００ａペプチドと会合させた。ＲＮＡｉＭＡＸを対照として使用した。

【０４５１】

細胞を５０～６０％コンフルエンスまで成長させ、２００μｌの予め形成させた複合体を重層し、３～５分間インキュベートした後、４００μｌのＤＭＥＭを添加した。３７℃での３０分間のインキュベーションの後、複合体の重層を除去せずに、１６％のＦＣＳを含有する１ｍＬの新鮮なＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞を７２時間インキュベーターに戻した。ＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｈｅＩ制限酵素部位のＨＤＲ挿入効率を、ＥＭＸ１　ＰＣＲアンプリコンのＮｈｅＩ消化による制限断片長多型（ＲＦＬＰ）アッセイを使用して解析した。

【０４５２】

図９Ａおよび９Ｂに示し、表６に要約するように、両方の細胞株において、シングルまたはダブルのいずれかの複合体プロトコールを使用して、ＡＤＧＮ－１００ａを用いて高いＨＤＲ効率が得られた。ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体を送達するＶＥＰＥＰ－３ｂの能力をｓｓＤＮＡを送達するＡＤＧＮ－１００ａの能力と合わせることによって、最大４７％のより高いＨＤＲ挿入が得られた。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ｂペプチドを用いる一部の構成では、ＲＮＡｉＭＡＸと比べて効率が３倍またはそれより大きく増加した。

【表６】

表6: RFLPアッセイによってモニターしたHDR挿入効率

	HDR (%)	
条件	**U2OS**	**JURKAT**
CAS9/gRNA/ssDNA/VEPEP-3b	17 ± 4	11 ± 5
CAS9/gRNA/ssDNA/ADGN-100a	32 ± 5	34 ± 7
CAS9/gRNA/VEPEP-3b + ssDNA/VEPEP-3b	2 ± 2	4 ± 4
CAS9/gRNA/ADGN-100a + ssDNA/ADGN-100a	38 ± 6	44 ± 5
CAS9/gRNA/VEPEP-3b + ssDNA/ADGN-100a	44 ± 6	47 ± 9
CAS9/gRNA/ RNAiMAX + ssDNA/RNAiMAX	12 ± 6	17 ± 5

（実施例４）

ＥＧＦＰレポーター遺伝子を標的とするＣＡＳ９発現プラスミドおよびｇＲＮＡのＡＤＧＮ－１００媒介性の送達

【０４５３】

Ｕ２ＯＳ細胞（ＥＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ）における外来性ＥＧＦＰ遺伝子レポーターの特定部位を標的とするＣＡＳ９をコードするプラスミドおよびｇＲＮＡの細胞送達についてＡＤＧＮ－１００を評価した。

【０４５４】

両親媒性ペプチドのストック溶液を蒸留水中１ｍｇ／ｍＬで調製し、１０分間超音波処理した。ＣＡＳ９発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　ＭＬＭ３６３９－Ｐｌａｓｍｉｄ＃４２２５２）およびｇＲＮＡ（５０ｎＭ）を１０：１および２０：１のＡＤＧＮ－１００ａと各プラスミドのモル比でＡＤＧＮ－１００ａと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。

【０４５５】

単一の組み込まれたＥＧＦＰレポーター遺伝子を含有するＥＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ細胞を、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質（ストレプトマイシン１０，０００μｇ／ｍＬ、ペニシリン、１０，０００ＩＵ／ｍＬ）、および１０％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（foetal calf serum）（ＦＣＳ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、５％CO_2を含有する加湿雰囲気下３７℃で培養した。トランスフェクションの前日に３５ｍｍディッシュに播種した計１５０，０００個の細胞を５０～６０％コンフルエンスまで成長させ、２００μｌの予め形成させた複合体を重層し、３～５分間インキュベートした後、４００μｌのＤＭＥＭを添加した。３７℃での３０分間のインキュベーションの後、ＣＰＰ／ＣＡＳ９－ｇＲＮＡ複合体の重層を除去せずに、１６％のＦＣＳを含有する１ｍＬの新鮮なＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞を７２時間インキュベーターに戻した。

【０４５６】

ＥＧＦＰの発現レベルをモニターすることによって、フローサイトメトリーを使用してＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断形成を解析した。図１０に報告する遺伝子破壊頻度のデータは、３つの別々の実験の平均を示す。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００送達を陽性対照として使用した。

【０４５７】

図１０に示すように、ＡＤＧＮ－１００ａは、ヒトＥＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ細胞においてＣＡＳ９発現プラスミドおよびｇＲＮＡの両方の送達を促進した。最適な二本鎖切断形成は、２０：１のＡＤＧＮ－１００ａと各核酸のモル比で形成されたＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９プラスミド／ｇＲＮＡ複合体で得られた。１０：１または２０：１のモル比でそれぞれ２３％または３８％のＥＧＦＰ発現の減少が得られた。比較として、Ｌｉｐｏｆｅｃ

ｔａｍｉｎｅ　２０００を使用して２０％のＥＧＦＰ発現の減少が得られた。

（実施例５）

ＣＰＰ媒介性のＣＡＲ　Ｔ細胞の操作

【０４５８】

ＣＡＲ－Ｔ細胞の操作のためのＡＤＧＮペプチド技術の能力を評価した。２つのヒト細胞株（ＪＵＲＫＡＴおよびＫ５６２）および異なるドナー由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）調製物から単離されたＴ細胞への、ＰＤ－１受容体を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の機能的細胞送達、および抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするＤＮＡプラスミドの送達の両方について３つの細胞膜透過ペプチド（ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－３ａ、およびＣＡＤＹ）を評価した。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａの両方のペプチドがＰＤ－１の破壊によって初代ヒトＴ細胞をリプログラミングするために効率的に使用できることを本発明者らは実証した。Ｔ細胞活性の１つの負の制御因子はリガンドＰＤ－Ｌ１であり、これは活性化Ｔ細胞上のｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ　ｄｅａｔｈ－１（ＰＤ－１）受容体の結合を通じて機能する。さらに、ＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、単独でまたはＶＥＰＥＰ－３ａとの組合せで、ＰＢＭＣから単離されたＴ細胞へのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体およびＣＡＲをコードするプラスミドの効率的な送達のための強力なトランスフェクションベクターであり、ｈＰＤ１受容体発現の効率的な下方調節を伴う安定な抗ＣＤ１９　ＣＡＲ　Ｔ細胞を産生することが分かった。

ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ／ペプチド粒子の形成のためのプロトコール

【０４５９】

ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａペプチドのストック溶液を蒸留水中２ｍｇ／ｍＬで調製し、１０分間超音波処理した。ＣＡＳ９タンパク質に精製されたｓｇＲＮＡを１：１のモル比で予めロードし、ペプチドと複合体を形成させる前に１０分間インキュベートした。予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ（２．５μｇおよび５μｇ）を２０：１のモル比（ペプチド対ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）でＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。

プラスミドＤＮＡ／ペプチド粒子の形成のためのプロトコール

【０４６０】

ＣＭＶプロモーターの制御下にあるＣＤ１９特異的キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするプラスミドは、ＣＤ２８に連結されたＣＤ１９特異的ｓｃＦｖおよびＣＤ３ζシグナル伝達部分からなった。ルシフェラーゼ（６．２Ｋｂ）をコードするプラスミドはＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓから入手し、再クローニングした。５０ｍＭトリス、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡにて１００μＭの濃度でプラスミドのストック溶液を調製した。１ｎｇまたは５ｎｇのプラスミドＤＮＡを使用して、ＡＤＧＮ－１００ａまたはＣＡＤＹペプチド（４００μＭに希釈）とプラスミド（１００μＭのストック溶液）とを２０：１のペプチドとプラスミドとの最終モル比で３７℃で３０分間混合することによってナノ粒子を調製した。次いで、複合体溶液を９０００ｒｐｍで５分間遠心分離してあらゆる沈殿物を除去し、トランスフェクション直前に５０％のＰＢＳ溶液で希釈した。

細胞株

【０４６１】

７５ｃｍ^{2}のフラスコおよび６ウェルディッシュ中、１０％の最終濃度でウシ胎児血清（ｆｅｔａｌ　ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ）（ＦＢＳ）を含有するダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中でＫ５６２およびＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞株を培養した。細胞を４日毎に継代し、トランスフェクションの２４時間前に新たに継代した。

Ｔ細胞の単離および活性化

【０４６２】

３：１（ビーズ：細胞）の比で常磁性ビーズに結合した抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８抗体（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　ＣｌｉｎＥｘＶｉｖｏ　ＣＤ３／ＣＤ２８、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してＴ細胞をＰＢＭＣ（２人の異なるドナー）から単離した。細胞およびビーズを室温で２時間共インキュベートし、Ｄｙｎａｌ　ＣｌｉｎＥｘＶＩＶＯ　ＭＰＣ　ｍａｇ

ｎｅｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してＣＤ３$^{+}$細胞の富化を行った。抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８常磁性ビーズを取り出し、洗浄し、濃縮した。１０％ウシ胎仔血清、３００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ２、および５０ｎｇ／ｍｌ　ＯＫＴ３（ＭｕｒｏｍｏｎＡＢ－ＣＤ３）を補充したＡＩＭ－Ｖ培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒｓ）を用いて、細胞１×１０^{6}個／ｍｌの濃度で２日間、ＣＤ３$^{+}$画分の細胞を活性化培地中に再懸濁した。

エレクトロポレーションのプロトコール

【０４６３】

Ａｍａｘａ　Ｈｕｍａｎ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｋｉｔ、ＶＰＡ－１００２（Ｌｏｎｚａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）と共にＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　２ｂ（Ｌｏｎｚａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してＣＤ－１９プラスミドまたはｇＲＮＡ／ＣＡＳ９（５μｇ／１０μｇ）をエレクトロポレーションすることにより細胞をトランスフェクトした。８００ｒｐｍで５分間遠心分離することによって５×１０^{6}個の細胞をＤＰＢＳで２回洗浄し、１００μｌのトランスフェクションバッファーに再懸濁した後、エレクトロポレーションキュベットに移した。Ｔ細胞に対する高トランスフェクションおよび高効率の両方について選択した最適化されたプログラムを使用した。エレクトロポレーション後、１０％ＦＢＳを含有する５００μｌの予め温めたＡＩＭ－Ｖ培地に細胞を再懸濁し、５％CO_2中、３７℃でインキュベートした。フローサイトメトリーまたはＴ７Ｅ１アッセイによって４８時間後にトランスフェクション効率を評価した。

Ｔ細胞株におけるｇＲＮＡ／ＣＡＳ９複合体のＣＰＰ媒介性の送達

【０４６４】

２つのヒトＴ細胞株（ＪＵＲＫＡＴおよびＫ５６２）において内因性ｈＰＤ１遺伝子を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の細胞送達についてＶＥＰＥＰ－３ａ、ＡＤＧＮ－１００ａ、およびＣＡＤＹペプチドを評価した。

【０４６５】

細胞株（ＪＵＲＫＡＴ、Ｋ５６２）を、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質（ストレプトマイシン１０，０００μｇ／ｍＬ、ペニシリン、１０，０００ＩＵ／ｍＬ）、および１０％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（foetal calf serum）（ＦＣＳ）を補充したＤＭＥＭ中、５％CO_2を含有する加湿雰囲気下３７℃で培養した。トランスフェクションの前日に３５ｍｍディッシュに播種した計１５０，０００個の細胞を５０～６０％コンフルエンスまで成長させた。ｈＰＤ１のエクソン２を標的とする２つの異なるｇＲＮＡを予めロードしたＣＡＳ９（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよび２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）を２０：１のモル比（ペプチド対ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）でＶＥＰＥＰ－３ａ、ＡＤＧＮ－１００ａ、またはＣＡＤＹペプチドと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。ＲＮＡｉＭＡＸ送達方法を陽性対照として使用した。細胞を再懸濁したか、または１００μｌの予め形成された複合体を重層し、３～５分間インキュベートした後、３００μｌのＤＭＥＭを添加した。３７℃での３０分間のインキュベーションの後、ＣＰＰ／ＣＡＳ９－ｇＲＮＡ複合体の重層を除去せずに、１６％のＦＣＳを含有する１ｍＬの新鮮なＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加し、細胞をインキュベーターに戻した。ＮＨＥＪによる修復が後続するＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断形成をＴ７Ｅ１アッセイによってまたはＧｅｎｏｍｅ　Ｃｌｅａｖａｇｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（ＧＣＤ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。ｈＰＤ１遺伝子における挿入欠失頻度をＴ７Ｅ１アッセイを使用して定量化した。

【０４６６】

表７に報告するように、ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、２つの細胞株においてｈＰＤ１遺伝子のロバストな編集を誘導した。両方の細胞株において、ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡは、意図したオンターゲット部位にＮＨＥＪ媒介性の挿入欠失突然変異を誘導した。５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを使用して、Ｋ５６２およびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＡＤＧＮ－１００ａを用いて送達した場合にそれぞれ７１％および７２％の平均挿入欠失頻度が得られた。Ｋ５６２お

よびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＶＥＰＥＰ－３ａを使用した場合にそれぞれ７５％および７８％の平均挿入欠失頻度が得られた。Ｋ５６２およびＪＵＲＫＡＴ細胞においてＲＮＡｉＭＡＸを使用してそれぞれ３１％および３５％の平均挿入欠失頻度が得られた。ＧＦＰを標的とする５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ陰性対照を使用して、ｈＰＤ１遺伝子において遺伝子編集は観察されなかった。比較として、５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡのエレクトロポレーション媒介性の送達を使用して、Ｋ５６２およびＪＵＲＫＡＴ細胞においてそれぞれ６５％および７２％の平均挿入欠失頻度が得られた。培養Ｔ細胞において、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａは、ＲＮＡｉＭＡＸと比べてＰＤ１ノックダウンについて少なくとも２倍効率的であり、より少ない量のＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡでエレクトロポレーションよりも最大５０％効率的であった。ＲＧＥＮ：ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異について報告するデータは３つの独立した実験の平均である。

【表７】

表７

	CAS9/sgRNA (2.5μg/5μg)		CAS9/sgRNA (5μg/10μg)	
	平均挿入欠失頻度 (%) ± s.e.m			
	K562	JURKAT	K562	JURKAT
ADGN-100a	68±2	70±5	71±5	72±2
VEPEP-3a	71±6	72±5	75±6	78±7
CADY	-	-	15±9	12±9
RNAiMAX	23±4	20±9	31±8	35±5
エレクトロポレーション	55±5	44±6	65±7	72±6

Ｔ細胞株におけるプラスミドＤＮＡのＣＰＰ媒介性の送達

【０４６７】

トランスフェクションの２４時間前に細胞株（Ｊｕｒｋａｔ、Ｋ５６２）を新たに継代した。培養培地を除去し、細胞をＰＢＳで２回洗浄した。細胞を再懸濁したか、または１００μｌのプラスミド／ペプチド溶液と５分間インキュベートした後、０．３ｍＬの無血清培地を添加した。３０分後、１．２ｍＬの完全培地を添加し、血清レベルを１０％に調整した。培養物を３７℃で４８時間インキュベートした後、ＦＡＣＳ解析によってＹＦＰをモニターし、抗ＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔの発現をプロテインＬのアッセイを使用してフローサイトメトリーによって評価した。

ヒトＴ細胞における抗ＣＤ１９　ＣＡＲをコードするプラスミドのＡＤＧＮ－１００媒介性の送達

【０４６８】

２人のドナーから単離された活性化Ｔ細胞（1×10^6）に２つの濃度（２μｇおよび５μｇ）で抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現プラスミドを含有するＡＤＧＮ－１００ａ粒子またはＣＡＤＹ粒子（２０：１のペプチドとプラスミドのモル比）を４８時間トランスフェクトした。試験した全ての条件を表８に列挙し、各実験は三連で行った。プラスミド（８．２Ｋｂ）は、ＣＭＶプロモーターの制御下にあるＣＤ１９特異的キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードし、ＣＤ２８に連結されたＣＤ１９特異的ｓｃＦｖおよびＣＤ３ζシグナル伝達部分からなった。対照として、ルシフェラーゼをコードするプラスミド（６．２Ｋｂ）を使用して類似の実験を行った。Ｔ細胞を１００μｌのプラスミド／ＡＤＧＮ－１００ａ粒子またはプラスミド／ＣＡＤＹ粒子に再懸濁し、５分間インキュベートした後、３００μｌの無血清ＲＰＭＩ－１６４０培地を添加した。３０分後、１．２ｍＬの完全培地を添

加し、血清レベルを１０％に調整した。

【０４６９】

５日目に、形質導入されたおよび形質導入されなかった細胞のレベルを解析し、細胞を新鮮なＴ細胞増殖培地に移した。Ｔ細胞増殖培地は、５％の熱不活化ヒトＡＢ血清、１％のＧｌｕｔａ－Ｍａｘ、および３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＡＩＭ　Ｖ培地を含有した。培養物を１２日目まで増殖させ、フローサイトメトリーによって生存能および抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現を解析した。Ｔ細胞における抗ＣＤ１９　ＣＡＲの発現をプロテインＬのアッセイを使用してフローサイトメトリーによって評価した。ビオチン化プロテインＬはＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃより購入し、５０ｎｇ／μｌのストック濃度で滅菌水中に再構成し、４℃で貯蔵した。７－ＡＡＤ（Ｓｉｇｍａ）を使用して生存能を決定した。

【０４７０】

図１１に示すように、ＡＤＧＮ－１００ａは、２μｇおよび５μｇのプラスミドを使用して２０：１のモル比（ペプチド対プラスミド）でＰＢＭＣから単離されたＴ細胞においてそれぞれ６２％および５５％の効率で抗ＣＤ１９　ＣＡＲプラスミドのトランスフェクションを促進した。２μｇおよび５μｇのプラスミドを使用して、それぞれ５８％および４２％の最終形質導入効率で安定な発現が６日にわたって維持された。全ての条件で得られた約８０％またはより高い平均生存能が示すように、ＡＤＧＮ－１００ａまたは形質導入に関連する細胞毒性は観察されなかった（図１２を参照）。結果は、非ウイルスベクターを用いるＡＤＧＮ－１００トランスフェクション技術は、養子細胞療法における使用など、腫瘍ターゲティングＴ細胞を操作するために効果的に使用できることを実証する。

【表８－１】

表8

プラスミド	ペプチド	比（ペプチド対プラスミド）
抗CD19 CAR 2μg	ADGN-100a	20:1
抗CD19 CAR 5μg	ADGN-100a	20:1
YFP 2μg	ADGN-100a	20:1
YFP 5μg	ADGN-100a	20:1

【表８－２】

抗CD19 CAR 2μg	CADY	20:1
抗CD19 CAR 5μg	CADY	20:1
YFP 2μg	CADY	20:1
YFP 5μg	CADY	20:1
抗CD19 CAR 2μg	-	-
抗CD19 CAR 5μg	-	-

ヒトＴ細胞におけるｈＰＤ１を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＡＤＧＮ－１００ａ／ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性の機能的送達

【０４７１】

２人の異なるドナーから単離された活性化Ｔ細胞（１×１０^{6}）に、２つの濃度（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよび２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）でｇＲＮＡ　ｈＰＤ１／ＣＡＳ９複合体を使用してＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－３ａ、またはＣＡＤＹ粒子を４８時間トランスフェクトした。試験した全ての条件を表９に列挙し、各実験は三連で行った。ｇＲＮＡ／ＣＡＳ９複合体を含有する１００μｌのＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－３ａ、またはＣＡＤＹ粒子にＴ細胞を再懸濁し、５分間イン

キュベートした後、１ｍｌの完全培地を添加し、血清レベルを１０％に調整した。対照として、ＧＦＰを標的とするｇＲＮＡをロードしたＣＡＳ９を使用した。

【０４７２】

細胞を７２時間インキュベーターに戻した。非相同末端結合（ＮＨＥＪ）による修復が後続するＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断をＴ７Ｅ１アッセイによってまたはＧｅｎｏｍｅ Ｃｌｅａｖａｇｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（ＧＣＤ Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。標的遺伝子における挿入欠失頻度をＴ７Ｅ１アッセイを使用して定量化した。培養物を増殖させ、生存能およびＰＤ１レベルを１０日毎に解析した。Ｔ細胞増殖培地は、５％の熱不活化ヒトＡＢ血清、１％のＧｌｕｔａ－Ｍａｘ、および３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＡＩＭ Ｖ培地を含有した。

【０４７３】

表１０に報告するように、ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、２人のドナーからのＴ細胞におけるｈＰＤ１遺伝子のロバストな編集を誘導した。５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを使用して、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａを用いて送達した場合にそれぞれ５８％および６６％の平均挿入欠失頻度が得られた。ＣＡＤＹペプチドまたはＲＮＡｉＭＡＸのいずれかを使用してＴ細胞におけるｈＰＤ１遺伝子の編集は得られなかった。比較として、５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを用いるエレクトロポレーション媒介性の送達を使用して、２５％の平均挿入欠失頻度が得られた。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａはＴ細胞におけるｇＲＮＡ／ＣＡＳ９複合体の送達のための非常に強力な戦略を構成することを示唆する。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａは、エレクトロポレーションと比べてＰＤ１ノックダウンについて少なくとも２倍効率的であった。ＲＧＥＮ：ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異について報告するデータは３つの独立した実験の平均である。

【表９】

表 9

CAS9/gRNA	ペプチド	比 (ペプチド対 CAS9/gRNA)
CAS9/gRNA hPD1 2.5μg	ADGN-100a	20:1
CAS9/gRNA hPD1 5μg	ADGN-100a	20:1
CAS9/gRNA GFP 5μg	ADGN-100a	20:1
CAS9/gRNA hPD1 2.5μg	VEPEP-3a	20:1
CAS9/gRNA hPD1 5μg	VEPEP-3a	20:1
CAS9/gRNA YFP 5μg	VEPEP-3a	20:1
CAS9/gRNA hPD1 2.5μg	CADY	20:1
CAS9/gRNA hPD1 5μg	CADY	20:1
CAS9/gRNA hPD1 5μg	-	-

【表１０】

表 10

	CAS9/sgRNA (2.5μg/5μg)		CAS9/sgRNA (5μg/10μg)	
	平均挿入欠失頻度 (%) ± s.e.m			
	ドナー1	ドナー2	ドナー1	ドナー2
ADGN-100a	48±6	52±5	56±4	61±8
VEPEP-3a	62±5	67±8	65±5	70±5
CADY	0	0	0	0
RNAiMAX	0	0	0	0
エレクトロポレーション	15±4	20±4	23±5	26±8

ヒトＴ細胞におけるｈＰＤ１を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体および抗ＣＤ１９ＣＡＲ発現プラスミドのＡＤＧＮ－１００／ＶＥＰＥＰ－３媒介性の同時送達

【０４７４】

抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現プラスミド（５μｇ）を含有するＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａ粒子および２つの濃度（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよび２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）でｇＲＮＡ　ｈＰＤ１／ＣＡＳ９複合体を含有するＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－３ａ、またはＣＡＤＹ粒子を２人のドナーからの活性化Ｔ細胞（１×１０^{6}）に４８時間同時にトランスフェクトした。試験した全ての条件を表１１に列挙し、各実験は三連で行った。ｇＲＮＡ　ｈＰＤ１／ＣＡＳ９複合体を含有するＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－３ａ、またはＣＡＤＹ粒子および抗ＣＤ１９ＣＡＲ発現プラスミドを含有するＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａ粒子を含有する１００μｌの無血清培地にＴ細胞を再懸濁した。細胞を５分間インキュベートした後、３００μｌの無血清ＲＰＭＩ－１６４０培地を添加した。３０分後、１．２ｍＬの完全培地を添加し、血清レベルを１０％に調整した。対照として、ＧＦＰを標的とするｇＲＮＡをロードしたＣＡＳ９を使用した。エレクトロポレーション法との比較のために、Ａｍａｘａ　Ｈｕｍａｎ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｋｉｔ、ＶＰＡ－１００２（Ｌｏｎｚａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）と共にＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　２ｂ（Ｌｏｎｚａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して細胞に抗ＣＤ－１９　ＣＡＲプラスミド（５μｇ）およびｇＲＮＡ／ＣＡＳ９（５μｇ／１０μｇ）をトランスフェクトした。

【０４７５】

５日目に、形質導入されたおよび形質導入されなかった細胞のレベルを解析し、細胞を新鮮なＴ細胞増殖培地に移した。培養物をフローサイトメトリーによって生存能および抗ＣＤ１９　ＣＡＲ発現について解析した。Ｔ細胞における抗ＣＤ１９　ＣＡＲの発現をプロテインＬのアッセイを使用してフローサイトメトリーによって評価した。ビオチン化プロテインＬはＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃより購入し、５０ｎｇ／μｌのストック濃度で滅菌水中に再構成し、４℃で貯蔵した。生存能を決定するために７－ＡＡＤ（Ｓｉｇｍａ）を使用した。ＮＨＥＪシステムによる修復が後続するＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断をＴ７Ｅ１アッセイによってまたはＧｅｎｏｍｅ　Ｃｌｅａｖａｇｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（ＧＣＤ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。標的遺伝子における挿入欠失頻度をＴ７Ｅ１アッセイを使用して定量化した。培養物を増殖させ、生存能、抗ＣＤ１９発現、およびＰＤ１レベルを１０日毎に解析した。Ｔ細胞増殖培地は、５％熱不活化ヒトＡＢ血清、１％Ｇｌｕｔａ－Ｍａｘ、および３００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を補充したＡＩＭ　Ｖ培地を含有した。

【０４７６】

図１３に示すように、ＡＤＧＮ－１００ａは、５μｇのプラスミドを使用して２０：１のモル比（ペプチド対プラスミド）でＰＢＭＣから単離されたＴ細胞において４０％～４５％の間の効率で抗ＣＤ１９　ＣＡＲプラスミドのトランスフェクションを促進する。安定な発現は少なくとも６日にわたって維持された。比較として、エレクトロポレーションによってトランスフェクトした場合に、Ｔ細胞の２０％のみが抗ＣＤ１９　ＣＡＲを発現し、ＡＤＧＮ－１００ａの遺伝子送達効率は初代Ｔ細胞においてエレクトロポレーションより少なくとも２倍高いことを示した。

【０４７７】

表１２に報告するように、ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、２人のドナーからのＴ細胞においてｈＰＤ１遺伝子のロバストな編集を誘導した。５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを使用して、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａを用いて送達した場合にそれぞれ約５０％および５７％の平均挿入欠失頻度が得られた。比較として、５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡのエレクトロポレーション媒介性の送達を使用して、１５％の平均挿入欠失頻度が得られた。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａは、エレクトロポレーションと比べてＰＤ１ノックダウンについて少なくとも３倍効率的であった。２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを使用して、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａを用いて送達した場合にそれぞれ約４２％および５０％の平均挿入欠失頻度が得られた。そのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ濃度において、有意なＰＤ１ノックダウンはエレクトロポレーションによって得られなかった。

【０４７８】

ＶＥＰＥＰ－３ａは、ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ誘導性のＰＤ１ノックダウンについてＡＤＧＮ－１００ａよりも効率的なようであった。ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異について報告するデータは３つの独立した実験の平均である。

【表１１】

表 11

プラスミド/ペプチド	比（ペプチド対プラスミド）	CAS9/gRNA/ペプチド(比)	比（ペプチド対CAS9/gRNA）
抗 CD CAR19 5μg/ ADGN-100a	20:1	CAS9/gRNA hPD1 2.5μg/ ADGN-100a	20:1
抗CD19 CAR 5μg/ ADGN-100a	20:1	CAS9/gRNA hPD1 5μg/ ADGN-100a	20:1
抗 CD19 CAR 5μg/ ADGN-100a	20:1	CSA9/gRNA hPD1 2.5μg/ VEPEP-3a	20:1
抗CD19 CAR 5μg/ ADGN-100a	20:1	CSA9/gRNA hPD1 5μg/ VEPEP-3a	20:1
抗 CD19 CAR 5μg/ ADGN-100a	20:1	CSA9/gRNA hPD1 5μg/ CADY	20:1
抗CD19 CAR 1μg	-	-	-
-	-	CSA9/gRNA hPD1 5μg	-

【表１２】

表 12

	CAS9/sgRNA (2.5μg/5μg)		CAS9/sgRNA (5μg/10μg)	
	平均挿入欠失頻度 (%) ± s.e.m			
	ドナー1	ドナー2	ドナー1	ドナー2
ADGN-100a	44±5	42±3	50±3	51±8
VEPEP-3a	51±5	53±5	57±2	58±8
エレクトロポレーション	5±5	5±5	16±2	15±6

ＣＡＳ９／ｓｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の送達はＴ細胞において毒性を誘導しない

【０４７９】

２つの細胞株およびＰＢＭＣから単離された初代Ｔ細胞において観察されたロバストなｈＰＤ１の破壊には、細胞毒性が付随しなかった。ＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性を２つの細胞株（ＪＵＲＫＡＴおよびＫ５６２）およびＰＢＭＣから単離されたＴ細胞において調べた。ＭＴＴアッセイまたは７－ＡＡＤのいずれかを使用して細胞生存能を決定した。

【０４８０】

トランスフェクションの前日に２４ウェルプレートに播種した計３０，０００個のＪＵＲＫＡＴまたはＫ５６２細胞を、２０：１のモル比（ＣＰＰ対ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）で複合体を形成したＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡの濃度を１ｎＭ～２００ｎＭの範囲で増加させて、ＦＣＳの最終濃度が１０％に達するまで培地を追加する前に３０分間インキュベートした。２４時間後に比色ＭＴＴアッセイ（Ｓｉｇｍａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）によって細胞毒性応答を測定した。ＭＴＴアッセイのために、細胞培養培地を除去し、２．５ｍｇ／ｍｌのＭＴＴを含有するＰＢＳと４時間置き換えた。結果は３つの別々の実験の平均に対応する。図１４に示すように、１００ｎＭまでの濃度について、２つの細胞株においてＶＥＰＥＰ－３ａまたはＡＤＧＮ－１００ａペプチドのいずれについても毒性は観察されず、生存能の減少は、２００ｎＭにおいて１０％未満であった。対照的に、ＲＮＡｉＭＡＸでは２００ｍＭにおいて、細胞株に応じて４０～４５％の間の細胞死が観察された。

【０４８１】

２人の異なるドナーからの初代Ｔ細胞に、２つの濃度（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡおよび２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）でＣＡＳ９／ｇＲＮＡを含有するＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａ粒子を４８時間トランスフェクトした後、７－ＡＡＤを使用してフローサイトメトリーによって細胞生存能を１２日間にわたって定量化した。トランスフェクトされなかった細胞に対してデータを正規化し、遊離ＣＡＳ９／ｇＲＮＡとインキュベートしたＴ細胞と比較した。図１５に示すように、全ての条件における約８０％またはより高い平均生存能が示すように、ＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａのいずれを用いても細胞毒性は観察されなかった。

【０４８２】

Ｔ細胞におけるＣＡＳ９／ｇＲＮＡのペプチドベースの送達とのエレクトロポレーションの比較

【０４８３】

初代Ｔ細胞においてベータ２ミクログロブリン（β２Ｍ）をコードする遺伝子を標的とするガイド配列を含有するｇＲＮＡと共にＣＡＳ９を使用するβ２Ｍのノックダウンを、エレクトロポレーション媒介性の送達を使用して試験し、ペプチドＶＥＰＥＰ３またはＡＤＧＮ１００とのＣＡＳ９／ｇＲＮＡの複合体形成によって媒介される送達と比較する。２人のドナーからのＴ細胞を使用し、例えば、エレクトロポレーションについてはそれぞ

れ５μｇ／１０μｇの比、ペプチドについてはそれぞれ５μｇ／１０μｇおよび２．５μｇ／５μｇの比のＣＡＳ９／ｇＲＮＡを用いる。各場合において、例えば５×１０^{6}個のＴ細胞を処理する。例えば５％の血清中または無血清培地中で、ペプチドでのトランスフェクションを行う。２４時間での細胞生存能、３日でのノックダウン効率、および増殖相の最後での細胞数を評価する。

Ｔ細胞におけるプラスミドＤＮＡのペプチドベースの送達とのエレクトロポレーションの比較

【０４８４】

初代Ｔ細胞においてプラスミドｐＴＲＰＥ　ＧＦＰ（１０Ｋｂ）からのＧＦＰの発現をプラスミドのエレクトロポレーション媒介性の送達を使用して試験し、ペプチドＡＤＧＮ１００またはＶＥＰＥＰ９とのプラスミドの複合体形成によって媒介される送達と比較する。２人のドナーからのＴ細胞を使用し、例えば、エレクトロポレーションについては３μｇのプラスミド、ペプチドについては２μｇおよび５μｇのプラスミドを用いる。各場合において、例えば５×１０^{6}個のＴ細胞を処理する。例えば５％の血清中または無血清培地中で、ペプチドでのトランスフェクションを行う。２４時間での細胞生存能、３日でのノックダウン効率、および増殖相の最後での細胞数を評価する。

（実施例６）

初代ヒト心臓線維芽細胞および初代ヒト肝細胞におけるＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＡＤＧＮ－１００媒介性の機能的送達

【０４８５】

初代ヒト心臓線維芽細胞および初代ヒト肝細胞において内因性ＥＭＸ１遺伝子およびＨＰＲＴ遺伝子を標的とする複数のＲＧＥＮ：ｇＲＮＡ複合体の細胞送達についてもＡＤＧＮ－１００ペプチドの評価を行った。ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体は、ＣＡＳ９タンパク質またはＣＡＳ９タンパク質をコードするｍＲＮＡのいずれかおよびＥＭＸ１またはＨＰＲＴのいずれかを標的とするｇＲＮＡを含有した。ヒト初代心臓線維芽細胞およびヒト初代肝細胞を新たに得、ゼラチンベースのコーティング溶液を予めコーティングしたフラスコ中で成長させ、増殖および処理の前に３日間Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｍｅｄｉｕｍ中でインキュベートした。次いで、細胞を異なる濃度のＡＤＧＮ－１００ａ：ＣＡＳ９タンパク質：ｇＲＮＡ複合体またはＡＤＧＮ－１００ａ：ＣＡＳ９ｍＲＮＡ：ｇＲＮＡ複合体のいずれかで処理した。Ｔ７Ｅ１アッセイによってトランスフェクションの７２時間後に非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を解析し、ＲＮＡｉＭＡＸ脂質方法を使用する送達と比較した。ＭＴＴアッセイを使用して全ての条件について毒性を解析した。

【０４８６】

ＣＡＳ９　ｍＲＮＡはＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）Ｔ７　ＡＲＣＡ　ｍＲＮＡ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂ）を使用して得た。線状化されたプラスミドＤＮＡを使用してｍＲＮＡを合成し、フェノール：クロロホルム抽出によって精製した。合成したｍＲＮＡをＬｉＣｌ沈殿、フェノール：クロロホルム抽出、それに続くエタノール沈殿によって精製した後、ＵＶ　Ｌｉｇｈｔ　Ａｂｓｏｒｂａｎｃｅによって定量化した。２６０ｎｍでの紫外線吸光度を測定することによってＲＮＡ濃度を決定した。１μｇのＤＮＡ鋳型を使用して１８μｇのキャップされたｍＲＮＡを得、－２０℃で貯蔵した。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　ＨＩＳ－ＮＬＳ－ＣＡＳ９は、Ｅ．ｃｏｌｉ中で発現させ、ＨＩＳ－ＣＡＳ９－ＮＬＳ　ｐＥＴ２９発現ベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃６２９３３）を使用してZurisら、２０１５年によって以前に記載されたように精製するか、またはＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅから入手した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００、ＲＮＡｉＭＡＸ、ＴｒａｎｓｃｒｉｐｔＡｉｄ　Ｔ７　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｋｉｔ、ＭＥＧＡｃｌｅａｒ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｃｌｅａｎ　Ｕｐ　ｋｉｔ、およびＧｅｎｅＡｒｔ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　Ｃｌｅａｖａｇｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ、ならびにＰｌａｔｉｎｉｕｍ　Ｇｒｅｅｎ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＰＣＲ　ｍｉｘはＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅから入手した。

全てのオリゴヌクレオチドはＥｕｒｏｇｅｎｔｅｃから入手した。

【０４８７】

ＡＤＧＮ－１００ａペプチドのストック溶液を蒸留水中１ｍｇ／ｍＬで調製し、１０分間超音波処理した。ＣＡＳ９タンパク質に精製されたｇＲＮＡ－ＧＦＰを１：１のモル比で予めロードし、ＡＤＧＮペプチドと複合体を形成させる前に１０分間インキュベートした。予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ（１０ｎＭ、２０ｎＭ、５０ｎＭ）を２０：１のモル比（ペプチド対複合体）でＡＤＧＮ－１００ａと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。

【０４８８】

両方の細胞種について以下のプロトコールを使用した。トランスフェクションの時点で約７０％のコンフルエンスまで細胞を培養した。１０％の血清を含む高グルコースＤＭＥＭ培地中で細胞を維持した。トランスフェクションの前に細胞をＤＭＥＭで２回洗浄し、０．２ｍｌの複合体溶液（１６μｌの複合体＋１８４μｌのＯＰＴｉＭＥＭ）に再懸濁して穏やかに混合し、３７℃で１０分間インキュベートした。０．８ｍＬの新鮮なＯＰＴｉＭＥＭ（高グルコース）を添加し、細胞を３７℃で２０分間インキュベートした。ＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の重層を除去せずに、１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するように１１．４％のＦＣＳを含有する２ｍＬの完全ＯＰＴｉＭＥＭ（高グルコース）を添加した。細胞を３７℃のインキュベーターに戻し、トランスフェクションの７２時間後にアッセイを行った。

【０４８９】

陽性対照として、ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して複合体を送達した。非相同末端結合（ＮＨＥＪ）システムを通じての修復が後続するＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断形成をＴ７Ｅ１アッセイによって７２時間時に解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。ＥＭＸ１遺伝子およびＨＰＲＴ遺伝子について報告する挿入欠失頻度は３つの別々の実験の平均である。ＭＴＴアッセイを使用して細胞毒性を解析した。

【０４９０】

２つの初代細胞種についてＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性を調べた。トランスフェクションの前日に３５ウェルプレートに播種した計３０，０００個の細胞を、２０：１のモル比（ペプチド対複合体）のＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（１０ｎＭ、２０ｎＭ、および５０ｎＭ）の濃度を増加させて、ＦＣＳの最終濃度が１０％に達するまで培地を追加する前に３０分間インキュベートした。２４時間後に比色ＭＴＴアッセイ（Ｓｉｇｍａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）によって細胞毒性応答を測定した。ＭＴＴアッセイのために、細胞培養培地を除去し、２．５ｍｇ／ｍｌのＭＴＴを含有するＰＢＳと４時間置き換えた。

【０４９１】

データを初代線維芽細胞について図１６Ａに、初代肝細胞について図１６Ｂに、そして表１３に報告する。報告するように、ＡＤＧＮ－１００媒介性のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、２つの初代細胞種においてＥＭＸ－１遺伝子およびＨＰＲＴ遺伝子の両方のロバストな編集を誘導する。２０ｎＭの濃度のＣＡＳ９－ｇＲＮＡを使用して、初代線維芽細胞および初代肝細胞において両方の遺伝子についてそれぞれ６０％および５５％より高い平均挿入欠失頻度が得られた。５０ｎＭのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡを使用して、ＲＮＡｉＭＡＸを用いて初代ヒト線維芽細胞において約３０％、初代ヒト肝細胞において２０％の平均挿入欠失頻度が得られた。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ペプチドはＲＮＡｉＭＡＸよりも少なくとも３～４倍強力であることを実証した。

【表１３】

表13: 初代ヒト線維芽細胞および初代ヒト肝細胞におけるT7E1アッセイによって測定したRGEN:gRNAの送達および生じた編集効率についてのADGN-100aとRNAiMAXとの比較

送達方法	平均挿入欠失頻度 (%) ± S.E.M					
	CAS9/sgRNA (10 nM)		CAS9/sgRNA (20 nM)		CAS9/sgRNA (50 nM)	
	線維芽細胞	肝細胞	線維芽細胞	肝細胞	線維芽細胞	肝細胞
ADGN-100a						
EMX1	61 ± 5	55 ± 6	65 ± 4	58 ± 5	67 ± 5	61 ± 5
HPR	62 ± 5	54 ± 6	68 ± 4	56 ± 5	70 ± 5	57 ± 5
RNAiMAX						
EMX1	16 ± 4	15 ± 6	22 ± 5	21 ± 4	28 ± 7	23 ± 6
HPRT	18 ± 7	16 ± 6	22 ± 5	19 ± 5	25 ± 6	21 ± 8

【０４９２】

２つの初代細胞種において観察されたロバストなＥＭＸ１遺伝子およびＨＰＲＴ遺伝子の破壊には、細胞毒性が付随しなかった。図１７Ａおよび１７Ｂに示すように、両方の初代細胞種についてＡＤＧＮ－１００ａペプチドを使用して１０％未満の毒性が観察された。対照的に、ＲＮＡｉＭＡＸを用いて、初代ヒト肝細胞において６０～６５％の間の細胞死、および初代ヒト線維芽細胞において３５～４０％の間の細胞死が観察された。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａは、初代ヒト細胞における、ＣＲＩＳＰＲなどによるゲノム編集に有用な強力な非毒性の送達技術であることを実証する。

（実施例７）

培養Ｕ２ＯＳ細胞におけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡのＡＤＧＮ－１００媒介性のｉｎ　ｖｉｔｒｏ送達

【０４９３】

この実験では、Ｕ２ＯＳ細胞においてＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよびＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡの細胞送達についてＡＤＧＮ－１００ａペプチドを評価した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡは、ＤＮＡ鋳型として線状ｐＣＳ２－ＣＡＳ９ベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃４７３２２）を使用し、ＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）Ｔ７　ＡＲＣＡ　ｍＲＮＡ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂを使用して得た。

【０４９４】

ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．２μｇおよび０．５μｇ）を２０：１のモル比（ペプチド対ｍＲＮＡ）でＡＤＧＮ－１００ａと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。U_2ＯＳ細胞を、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質（ストレプトマイシン１０，０００μｇ／ｍＬ、ペニシリン、１０，０００ＩＵ／ｍＬ）、および１０％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（foetal calf serum）（ＦＣＳ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、５％CO_2を含有する加湿雰囲気下３７℃で培養した。トランスフェクションの前日に３５ｍｍディッシュに播種した計１５０，０００個の細胞を５０～６０％コンフルエンスまで成長させ、２００μｌの予め形成させたＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ複合体を重層し、５分間インキュベートした後、４００μｌのＤＭＥＭを添加した。３７℃での２０分間のインキュベーションの後、複合体の重層を除去せずに、１６％のＦＣＳを含有する１ｍＬの新鮮なＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞を７２時間インキュベーターに戻した。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ、商品番号Ｃ１５２００２２３）を使用してタンパク質抽出物に対するウエスタンブロットによってＣＡＳ９発現レベルを定量化した。

【０４９５】

図１８に示すように、ウエスタンブロット解析は、トランスフェクトされたＵ２ＯＳ細胞におけるＣＡＳ９タンパク質の用量依存的な発現を明らかにした。これらの結果は、Ａ

ＤＧＮ－１００ａは、ＣＡＳ９タンパク質発現が後続するＣＡＳ９　ｍＲＮＡの機能的送達を促進することを示唆する。比較として、ＣＡＳ９発現レベルは、ｍＲＮＡ送達ベクターとしてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００またはＲＮＡｉＭＡＸを使用して約１０倍低かった。

（実施例８）

ＣＡＳ９タンパク質またはＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡと複合体を形成したＡＤＧＮ－１００を使用するｅＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ遺伝子編集

【０４９６】

ｅＧＦＰ－Ｕ２ＯＳ細胞株において外来性ｅＧＦＰ遺伝子レポーターの特定部位を標的とすることによって、ＣＡＳ９タンパク質またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡのいずれかを使用し、ＡＤＧＮ－１００ａを使用する遺伝子編集を評価した。予め混合したＣＡＳ９／ｇＲＮＡ（２．５μＭ／５μＭ）またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（０．５μｇ／５μｇ）を２０：１のモル比（ペプチド対複合体）でＡＤＧＮ－１００ａと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸの両方による送達方法を対照として含めた。ｅＧＦＰ－Ｕ$_2$ＯＳ細胞を、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質（ストレプトマイシン１０，０００μｇ／ｍＬ、ペニシリン、１０，０００ＩＵ／ｍＬ）、および１０％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（foetal　calf　serum）（ＦＣＳ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、５％ＣＯ$_2$を含有する加湿雰囲気下３７℃で培養した。トランスフェクションの前日に３５ｍｍディッシュに播種した計１５０，０００個の細胞を５０～６０％コンフルエンスまで成長させ、２００μｌの予め形成させた複合体を重層し、５分間インキュベートした後、４００μｌのＤＭＥＭを添加した。３７℃での２０分間のインキュベーションの後、複合体の重層を除去せずに、１６％のＦＣＳを含有する１ｍＬの新鮮なＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞を７２時間インキュベーターに戻した。

【０４９７】

図１９に示すように、７２時間後のｅＧＦＰ発現レベルをモニターすることによって、フローサイトメトリーを使用してＣＡＳ９誘導性の二本鎖切断形成を解析した。ＡＤＧＮ－１００ａと会合させたＣＡＳ９／ｇＲＮＡまたはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（２０：１のモル比、ペプチド対複合体）を用いてそれぞれ８７％または８５％のｅＧＦＰ発現の減少が得られた。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａは、機能的なＣＡＳ９タンパク質およびＣＡＳ９　ｍＲＮＡの両方を送達し、類似の遺伝子編集効率に繋がることを実証する。比較として、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡのための送達ベクターとしてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００またはＲＮＡｉＭＡＸを使用してｅＧＦＰ発現のそれぞれ２２％または３１％の減少が得られた。ＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡのための送達ベクターとしてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００またはＲＮＡｉＭＡＸを使用してｅＧＦＰ発現のそれぞれ３５％または４５％の減少が得られた。

（実施例９）

マウスにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡのＡＤＧＮ－１００媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達

【０４９８】

スイスマウスにおいてＣＡＳ９　ｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ送達についてＡＤＧＮ－１００ａペプチドを評価した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（１０μｇ）を２０：１のペプチドとｍＲＮＡとの比でＡＤＧＮ－１００ａペプチドと会合させた。遊離ＡＤＧＮ－１００ａペプチド（２匹の動物／群）、遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（２匹の動物／群）、またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ＡＤＧＮ－１００ａ（群あたり３匹の動物）の単回静脈注射をマウスに与えた。注射の７２時間後、動物を屠殺し、肺、肝臓、脳、腎臓、心臓、脾臓、血液、および膵臓を含む組織を収集した。組織をホモジナイズし、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ、商品番号Ｃ１５２００２２３）を使用してタンパク質抽出物に対するウエスタンブロットによって、またはＣａｓ９モノクローナル抗体（ＳＢＩクローン７Ａ９）を使用するＥＬＩＳＡによって、ＣＡＳ９発現を解析した。図２０Ａおよび２

０Ｂに示すように、ＣＡＳ９タンパク質の高発現が肝臓において観察され、バックグラウンドの１５倍より高いレベルであった。ＣＡＳ９発現は肺および腎臓においても観察され、バックグラウンドの約２～３倍のレベルであった。調べた他の組織ではＣＡＳ９タンパク質発現の有意な増加は検出されなかった。

（実施例１０）

肝臓でルシフェラーゼを発現するマウスにおけるルシフェラーゼを標的とするＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡのＡＤＧＮ－１００媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達

【０４９９】

肝臓でルシフェラーゼを発現するスイスマウスにおけるＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ送達についてＡＤＧＮ－１００ａペプチドを評価した。ルシフェラーゼを標的とするＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡ（１０μｇ）を２０：１のモル比（ペプチド対核酸）でＡＤＧＮ－１００ａペプチドと会合させた。遊離ＡＤＧＮペプチド（３匹の動物／群）、遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（３匹の動物／群）、またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ＡＤＧＮ－１００ａ（群あたり３匹の動物）の単回静脈注射をマウスに与えた。図２１に示すように、注射の直後および注射の７２時間後に動物全体の蛍光イメージングによってルシフェラーゼレベルを定量化した。

【０５００】

注射の７２時間後に動物を屠殺し、以下の組織を収集した：肝臓、肺、腎臓、脾臓、および血液。肝臓における蛍光によってルシフェラーゼを定量化した。組織をホモジナイズし、Ｃａｓ９モノクローナル抗体（ＳＢＩクローン７Ａ９）を使用するＥＬＩＳＡによってＣＡＳ９発現を解析した。

【０５０１】

図２１および２２に示すように、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡのＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の送達は、肝臓においてルシフェラーゼ発現の６０％～６５％の間のノックダウンを誘導した。対照的に、遊離ＡＤＧＮ－１００ａまたは遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡのいずれかを用いたルシフェラーゼ発現の変化は観察されなかった。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡの送達についての以前の結果と合致して、図２３に示すように、ＡＤＧＮ－１００ａは、主に肝臓において（バックグラウンドレベルの約２０倍）ならびにより低いレベルで肺および腎臓において（バックグラウンドレベルの約２倍）ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡの送達を媒介した。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡを含むＣＲＩＳＰＲ成分のｉｎ　ｖｉｖｏでの機能的送達のための強力な方法を構成することを実証する。

（実施例１１）

ヒト初代Ｔ細胞におけるβ２－ミクログロブリンを標的とするＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体のＡＤＧＮ－１００ａ媒介性およびＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性の機能的送達：遺伝子編集効率および毒性の評価

【０５０２】

β２－ミクログロブリンを標的とするＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）と会合させたＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－３ａを使用して１人のドナーから単離されたＴ細胞（5×10^{6}）へのトランスフェクトを行った。簡潔に述べれば、ＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ粒子を含有する１００μｌの溶液にＴ細胞を再懸濁し、５分間インキュベートした後、１ｍｌの完全培地を添加し、血清レベルを１０％に調整した。対照として、5×10^{6}個の細胞にエレクトロポレーションによってＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体をトランスフェクトし、遊離ＣＡＳ９／ｇＲＮＡで処理し、または未処理のままとした。細胞を７２時間インキュベーターに戻した。次いで、β２－ミクログロブリンのレベルをＦＡＣＳ解析によって定量化した。

【０５０３】

図２４に示すように、ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、Ｔ細胞においてβ２－ミクログロブリン遺伝子のロバストな編集を誘導し、それぞれ７１％および７８％の効率であった。対照的に、５μｇ／１０

μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡを用いるエレクトロポレーション媒介性の送達は３２％の効率を生じさせた。遊離複合体を使用してＴ細胞においてβ２－ミクログロブリン遺伝子の編集は観察されなかった。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａは、Ｔ細胞において非常に強力なＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の送達を媒介できることを示唆する。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－３ａは、エレクトロポレーションと比べてβ２－ミクログロブリンのノックダウンについて少なくとも２倍効率的であった。ＲＧＥＮ：ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異について報告するデータは３つの独立した実験の平均である。

【０５０４】

４８時間後にＭＴＴアッセイを使用し、かつ７２時間後に活性化損傷誘発細胞死（ＤＩＣＤ）をモニターすることによってＰＢＭＣから単離されたＴ細胞においてＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体の毒性を調べた。図２５Ａおよび２５Ｂに示すように、初代Ｔ細胞において観察されたロバストなβ２－ミクログロブリンのノックダウンには、細胞毒性は付随しなかった。ＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体または遊離ペプチドに関連する毒性はＭＴＴアッセイによって観察されなかった。さらに、Ｔ細胞活性化の遅延または活性化損傷誘発細胞死は、ＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体またはＣＰＰペプチドで観察されなかった。対照的に、エレクトロポレーション後に、Ｔ細胞活性化の７０％より高い減少およびＤＩＣＤ活性化と共に５５％の毒性が観察された。

（実施例１２）Ｃ２Ｃ１２細胞におけるβ－カテニン（ベーター－カテニン）またはＨＰＲＴを標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体のＡＤＧＮ－１００ａ媒介性およびＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性の機能的送達

【０５０５】

未分化のおよび分化したマウスの筋肉筋芽細胞（Ｃ２Ｃ１２）において内因性のＨＰＲＴ遺伝子およびβ－カテニン遺伝子を標的とするＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の機能的細胞送達についてＶＥＰＥＰ－３ａおよびＡＤＧＮ－１００ａペプチドを評価した。心筋において、ベーター－カテニンは、隣接する心筋細胞間の電気的および機械的なカップリングにとって決定的に重要である介在板構造における接着結合に局在する。予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（５μｇ／１０μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）を２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＶＥＰＥＰ－３ａおよびＡＤＧＮ－１００ａペプチドと混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。ＲＮＡｉＭＡＸによる送達を陽性対照として含めた。

【０５０６】

ＰＣＲ（図２６）およびＴ７Ｅ１アッセイ（図２７）によってトランスフェクションの７２時間後にＣＡＳ９誘導性のＮＨＥＪを解析した。Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、非切断対切断ＤＮＡの量を定量化することによってＴ７Ｅ１アッセイを使用してＨＰＲＴ遺伝子における欠失（挿入欠失）頻度を定量化した。ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異のデータは、３つの別々の実験の平均として報告する。

【０５０７】

Ｃ２Ｃ１２マウス接着筋芽細胞を、熱不活化１０％ウシ胎児血清（fetal bovine serum）、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質、０．５％抗マイコプラズム（antimycoplasm）および２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓを添加したｐＨ７．５のダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で成長させた。細胞株を３７℃、５％CO_2に維持し、細胞生存能をＴｒｙｐａｎ　Ｂｌｕｅ排除試験によって評価した。筋原性分化を誘導するために、約８０％の細胞コンフルエンスにおいて１０％のウシ胎仔血清を含有する培地を１％のウシ胎仔血清を含有する培地に置換した。未分化段階でまたは分化の７日後に細胞へのトランスフェクトを行った。

【０５０８】

図２６および２７に示すように、ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、未分化および分化したＣ２Ｃ１２細胞株の両方

においてβ－カテニンおよびＨＰＲＴ遺伝子のロバストな編集を誘導した。

【０５０９】

未分化および分化したＣ２Ｃ１２細胞株においてそれぞれ８１％および７３％の平均挿入欠失頻度がＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性の送達によって得られた。未分化および分化したＣ２Ｃ１２細胞株においてそれぞれ７９％および４７％の平均挿入欠失頻度がＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の送達によって得られた。対照的に、ＲＮＡｉＭＡＸ媒介性の送達は、未分化および分化したＣ２Ｃ１２細胞株においてそれぞれ４６％および１８％の挿入欠失頻度を生じさせた。これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－３およびＡＤＧＮ－１００ペプチドは、分化した筋肉筋芽細胞における複数のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ複合体の送達のための強力なビヒクルであることをさらに実証する。

（実施例１３ａ）

複数の接着および懸濁細胞株におけるＣＰＰ媒介性のＣＡＳ９　ｍＲＮＡの送達

【０５１０】

複数の接着（Ｕ２ＯＳおよび初代ヒト線維芽細胞）および懸濁（ＨＥＰＧ２およびＫ５６２）細胞株においてＣＡＳ９　ｍＲＮＡの細胞送達について細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、ＶＥＰＥＰ－３ａ、およびＡＤＧＮ－１００ａ）を評価した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡは、ＤＮＡ鋳型のための線状化されたｐＣＳ２－ＣＡＳ９ベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃４７３２２）と共にＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）Ｔ７　ＡＲＣＡ　ｍＲＮＡ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂ）を使用して調製し、フェノール：クロロホルム抽出によって精製した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰ：ＣＡＳ９　ｍＲＮＡのモル比で混合し、細胞トランスフェクション前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ複合体を形成した。接着または懸濁細胞株のいずれかのために最適化されたプロトコールにしたがって細胞へのトランスフェクトを行った。

接着細胞へのトランスフェクション

【０５１１】

ヒト初代線維芽細胞を新たに得、ゼラチンベースのコーティング溶液を予めコーティングしたフラスコ中で成長させ、増殖および処理の前に３日間Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｍｅｄｉｕｍ中でインキュベートした。Ｕ２ＯＳ細胞を、２ｍＭグルタミン、１％抗生物質（ストレプトマイシン１０，０００μｇ／ｍＬ、ペニシリン、１０，０００ＩＵ／ｍＬ）、および１０％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（foetal calf serum）（ＦＣＳ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、５％CO_2を含有する加湿雰囲気下３７℃で培養した。トランスフェクションの前日に１５０，０００個の細胞を播種した３５ｍｍディッシュを５０～６０％コンフルエンスまで成長させ、トランスフェクション時に約７０％コンフルエンスになるように設定した。トランスフェクションの前に細胞をＤＭＥＭ（２×）、その後ＰＢＳ（１×）で洗浄した。次いで、細胞に０．２ｍｌの複合体溶液（１６μｌの水中のＣＰＰ／カーゴ複合体＋１８４μｌの抗生物質を含まないＯＰＴｉＭＥＭ）を重層し、穏やかに混合し、３７℃で１０分間インキュベートした。次いで、０．８ｍＬの新鮮なＯＰＴｉＭＥＭまたはＤＭＥＭを添加し、細胞を３７℃で２０分間インキュベートした。次いで、ＣＰＰ／カーゴ複合体の重層を除去せずに、１１．４％ＦＣＳを含有する２ｍＬの完全ＯＰＴｉＭＥＭ（高グルコース）またはＤＭＥＭを１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞をインキュベーター（３７℃、５％CO_2）に戻し、トランスフェクションの７２時間後にアッセイを行った。

懸濁細胞のトランスフェクション

【０５１２】

Ｋ５６２およびＨＥｐＧ２細胞をトランスフェクション時に約７０％コンフルエンスになるように設定した。細胞を１０％の血清を含む高グルコースＤＭＥＭ培地中で維持した。トランスフェクションの前に細胞を遠心分離によって回収した後、ＤＭＥＭ（２×）、その後ＰＢＳ（１×）で洗浄した。次いで、細胞を０．２ｍｌの複合体溶液（１６μｌの水中のＣＰＰ／カーゴ複合体＋１８４μｌの抗生物質を含まないＯＰＴｉＭＥＭ）に再懸

濁し、穏やかに混合し、３７℃で１０分間インキュベートした。次いで、０．８ｍＬの新鮮なＯＰＴｉＭＥＭを添加し、細胞を３７℃で２０分間インキュベートした。次いで、ＣＰＰ／カーゴ複合体の重層を除去せずに、１１．４％のＦＣＳを含有する２ｍＬの完全ＯＰＴｉＭＥＭ（高グルコース）を１０％の最終ＦＣＳ濃度に達するまで添加した。細胞をインキュベーター（３７℃、５％CO_2）に戻し、トランスフェクションの７２時間後にアッセイを行った。

【０５１３】

ＲＮＡｉＭＡＸ脂質ベースの送達（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｆｒａｎｃｅ）を対照として使用し、製造者の説明書にしたがってトランスフェクションを行った。Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ、商品番号Ｃ１５２００２２３）およびＡＢＣＡＭ（クローン７Ａ９－　ａｂ１９１４６８）から入手したＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体を使用してタンパク質抽出物に対するＥＬＩＳＡによる決定で、１０日の期間にわたって複数の時点においてＣＡＳ９発現レベルを解析した。ＣＡＳ９タンパク質発現の結果を図２８Ａ～２８Ｄに示し、３つの別々の実験からの平均として報告する。

【０５１４】

図２８Ａ～２８Ｄに示すように、ＶＥＰＥＰ－６およびＡＤＧＮ－１００ａ　ＣＰＰは、試験した細胞種のそれぞれにおけるロバストなＣＡＳ９タンパク質発現に繋がるｍＲＮＡの効率的な送達を促進した。Ｕ２ＯＳ、Ｋ５６２、およびＨｅｐＧ２細胞において、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－６を使用して、３日目のＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルはバックグラウンドレベル（０日目のシグナル）のそれぞれ約２５および３０倍に増加した。初代ヒト線維芽細胞において、ＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－６のいずれかを使用して、３日目のＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルはバックグラウンドの約２０倍に増加した。ＣＡＳ９タンパク質発現はトランスフェクションの３日後に最適であり、１０日目までにこれらのレベルの約５０％に減少した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡの送達のためにＶＥＰＥＰ－９を使用して、３日目のＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルについてバックグラウンドの約５～１０倍への増加が得られた。対照的に、ＶＥＰＥＰ－３ａペプチドでは３日目にＣＡＳ９タンパク質発現の増加はほとんどまたは全く観察されなかった。比較として、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡの送達のためにＲＮＡｉＭＡＸ脂質製剤を使用して、３日目のＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルはＵ２ＯＳ細胞においてバックグラウンドの約５～１０倍に増加し、他の細胞種（Ｋ５６２、ＨｅｐＧ２、および初代ヒト線維芽細胞）ではＣＡＳ９発現の増加はほとんどまたは全く観察されなかった。これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－６およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、トランスフェクトが困難な細胞種におけるｍＲＮＡの送達のための強力なビヒクルであることを実証する。

（実施例１３ｂ）

複数の接着および懸濁細胞種におけるＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよびＥＭＸ１ターゲティングｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０５１５】

複数の接着（Ｕ２ＯＳおよび初代ヒト線維芽細胞）および懸濁（ＨＥＰＧ２、Ｋ５６２）細胞種においてＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよび内因性ＥＭＸ１遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含有する核タンパク質複合体の機能的な細胞内送達について細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａ）を評価した。

【０５１６】

ＥＭＸ１ターゲティングｇＲＮＡおよびＣＡＳ９　ｍＲＮＡは上記のように調製した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰ：カーゴのモル比で混合することによってＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体を形成し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートした。実施例１３ａに記載のプロトコールにしたがって懸濁および接着細胞へのトランスフェクトを行った。ＲＮＡｉＭＡＸ媒介性の送達（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓ

ｈｅｒ　Ｆｒａｎｃｅ）を対照として使用した。Ｔ７Ｅ１アッセイによって3日目および６日目にＥＭＸ１遺伝子編集を解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。

【０５１７】

ＥＭＸ１遺伝子における挿入欠失頻度の結果を図２９Ａ～２９Ｄ（３つの別々の実験の平均）に示す。ＶＥＰＥＰ－６媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性のＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡの送達は、試験した細胞種のそれぞれにおいてＥＭＸ－１遺伝子のロバストな編集を誘導した。両方のペプチドについて、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡを含有する複合体の効率的な機能的細胞内送達が７２時間後に観察された。Ｕ２ＯＳおよびＨｅｐＧ２細胞において約７０～８０％、ならびに初代ヒト線維芽細胞およびＫ５２６細胞において約６０％の平均挿入欠失頻度が得られた。

【０５１８】

送達のためにＶＥＰＥＰ－９を使用して、Ｕ２ＯＳおよびＨｅｐＧ２細胞において約４０～５０％、ならびに初代ヒト線維芽細胞およびＫ５６２細胞において約１０％の平均挿入欠失頻度が得られた。比較として、送達のためにＲＮＡｉＭＡＸを使用して、Ｕ２ＯＳおよびＨｅｐＧ２細胞において約４０～５０％、ならびに初代ヒト線維芽細胞およびＫ５６２細胞において約１０～１５％の平均挿入欠失頻度が得られた。これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－６およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡの機能的送達について、細胞種に応じてＲＮＡｉＭＡＸの約３～５倍強力であることを実証する。

【０５１９】

４つの細胞種において観察されたロバストなＣＰＰ媒介性のＥＭＸ１遺伝子破壊には、細胞毒性は付随しなかった。図３０に示すように、ＡＤＧＮ－１００ａまたはＶＥＰＥＰ－６ペプチドのいずれかを使用して１０％未満の毒性が観察された。対照的に、ＲＮＡｉＭＡＸでは初代ヒト線維芽細胞およびＫ５６２細胞において４０～５０％の間の細胞死、ならびにＵ２ＯＳおよびＨｅｐＧ２細胞において３５～４０％の間の細胞死が観察された。これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－６およびＡＤＧＮ－１００ａの両方は、複数のヒト細胞種においてｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ送達に有用な強力な非毒性の細胞膜透過ペプチドであることを実証する。

（実施例１３ｃ）複数の接着および懸濁細胞種におけるＣＡＳ９タンパク質／ＥＭＸ１ターゲティングｇＲＮＡ複合体のＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０５２０】

次いで、複数の接着（Ｕ２ＯＳおよび初代ヒト線維芽細胞）および懸濁（ＨＥＰＧ２およびＫ５６２）細胞種において内因性ＥＭＸ１遺伝子を標的とするＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡ複合体の細胞送達についてＣＰＰ（ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－３ａ）を評価した。

【０５２１】

ＨＩＳ－ＮＬＳ－ＣＡＳ９タンパク質およびＥＭＸ１ターゲティングｇＲＮＡは上記のように調製した。予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）をＣＰＰペプチドと２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体を調製した。実施例１３ａに記載のプロトコールにしたがって細胞へのトランスフェクトを行い、ＲＮＡｉＭＡＸ媒介性の送達（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｆｒａｎｃｅ）を対照として使用した。Ｔ７Ｅ１アッセイによって3日目および6日目にＥＭＸ１遺伝子編集を解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。

【０５２２】

ＲＧＥＮ／ｇＲＮＡによって誘導されたオンターゲット突然変異のデータを図３１Ａ～３１Ｄ（３つの別々の実験の平均）に示す。ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性の両方のＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ送達は、試験した細胞種のそれぞれにおいてＥ

ＭＸ１遺伝子のロバストな編集を誘導した。ＶＥＰＥＰ－３ａおよびＡＤＧＮ－１００ａによる送達を用いてそれぞれ約７５～７０％および約６０～６５％の平均挿入欠失頻度が得られた。ＶＥＰＥＰ－９を使用して３５～４０％の平均挿入欠失頻度が得られた。対照的に、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドでは有意なＥＭＸ１遺伝子編集は観察されなかった。比較のために、ＲＮＡｉＭＡＸ送達は、Ｕ２ＯＳおよびＫ５６２細胞において４０％、ならびにＨＥＰＧ２細胞および初代ヒト線維芽細胞において２５～３０％の挿入欠失頻度を生じさせた。

（実施例１３ｄ）

複数の接着および懸濁細胞種におけるＣＰＰ媒介性のＣＡＳ９発現プラスミドの送達

【０５２３】

Ｕ２ＯＳおよびＨＥＰＧ２細胞株ならびに初代ヒト線維芽細胞においてＣＡＳ９タンパク質をコードするプラスミドの細胞送達についてＣＰＰ（ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－９、ＶＥＰＥＰ－３ａ、およびＶＥＰＥＰ－６）を評価した。

【０５２４】

０．５μｇのＣＡＳ９発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　ＭＬＭ３６３９－Ｐｌａｓｍｉｄ　＃４２２５２）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰ：カーゴのモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／プラスミド複合体を調製した。実施例１３ａに記載の接着および懸濁細胞のためのプロトコールにしたがって細胞へのトランスフェクトを行った。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を脂質ベースの送達の対照として使用した。Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ、商品番号Ｃ１５２００２２３）およびＡＢＣＡＭ（クローン７Ａ９－ａｂ１９１４６８）から入手したＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体を使用してタンパク質抽出物に対するＥＬＩＳＡによる決定で、１０日の期間にわたって複数の時点においてＣＡＳ９タンパク質発現レベルを解析した。

【０５２５】

ＣＡＳ９タンパク質発現の結果を図３２Ａ～３２Ｃ（３つの別々の実験からの平均）に示す。試験した細胞種のそれぞれにおけるロバストなＣＡＳ９タンパク質発現が示すように、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９　ＣＰＰは、ＣＡＳ９発現プラスミドの効率的な送達を促進した。両方のペプチドについて、タンパク質発現はトランスフェクションの６日後に最適であり、１０日目までに約５０％減少した。ＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルは、６日目にＵ２ＯＳおよびＨＥＰＧ２細胞ならびに初代ヒト線維芽細胞においてＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９を使用してバックグラウンドの約９～１０倍に、Ｕ２ＯＳおよびＨＥＰＧ２細胞においてＶＥＰＥＰ－６を使用してバックグラウンドの約４倍に、初代ヒト線維芽細胞においてＶＥＰＥＰ－６を使用してバックグラウンドの約２倍に増加した。対照的に、ＶＥＰＥＰ－３ａペプチドではＣＡＳ９発現の増加はほとんどまたは全く観察されなかった。比較として、ＣＡＳ９発現プラスミド送達のためにｌｉｐｏｆｅｃｔｉｍｅ　２０００を使用して、６日目のＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルは、Ｕ２ＯＳ細胞においてバックグラウンドの約４倍に増加し、ＨｅｐＧ２細胞および初代ヒト線維芽細胞において有意なＣＡＳ９タンパク質発現は観察されなかった（バックグラウンドの２倍より低い）。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、トランスフェクトが困難な細胞種におけるＣＡＳ９発現プラスミドの送達のための強力なビヒクルであることを実証する。

（実施例１３ｅ）

複数の接着および懸濁細胞種におけるＣＡＳ９発現プラスミド／ＥＭＸ１ターゲティングｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０５２６】

複数の接着（Ｕ２ＯＳおよび初代ヒト線維芽細胞）および懸濁（ＨＥＰＧ２）細胞種においてＣＡＳ９をコードするプラスミドおよび内因性ＥＭＸ１遺伝子を標的とするｇＲＮＡの機能的な細胞内送達について細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａ）を評価した。

【０５２７】
ＥＭＸ１ターゲティングｇＲＮＡは上記のように調製した。０．５μｇのＣＡＳ９発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　ＭＬＭ３６３９－Ｐｌａｓｍｉｄ　＃４２２５２）および５μｇのｇＲＮＡをＣＰＰと２０：１のＣＰＰと核酸（プラスミド＋ｇＲＮＡ）のモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／プラスミド／ｇＲＮＡ複合体を調製した。実施例１３ａに記載のプロトコールにしたがって懸濁および接着細胞へのトランスフェクトを行った。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００媒介性およびＲＮＡｉＭＡＸ媒介性の送達方法（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｆｒａｎｃｅ）を対照として使用した。Ｔ７Ｅ１アッセイによって3日目および6日目にＥＭＸ１遺伝子編集を解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。

【０５２８】
ＥＭＸ１遺伝子における挿入欠失頻度を図３３Ａ～３３Ｃ（３つの別々の実験の平均）に示す。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９は、ＣＡＳ９発現プラスミドおよびｇＲＮＡの両方の送達を促進し、３つの細胞種のそれぞれにおいてＥＭＸ－１遺伝子のロバストな編集を誘導した。最適な二本鎖切断形成は、ＡＤＧＮ－１００ａペプチドを使用して得られた。両方のペプチドについて、ＣＡＳ９発現プラスミドおよびｇＲＮＡの効率的な機能的細胞内送達は3日目に観察された。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９を使用して3つの細胞種においてそれぞれ約４５～５０％および約３５～４０％の平均挿入欠失頻度が得られた。

【０５２９】
比較として、送達のためにｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００およびＲＮＡｉＭＡＸを使用して、Ｕ２ＯＳ細胞において約２０％、ならびにＨｅｐＧ２細胞および初代ヒト線維芽細胞において１０％未満の平均挿入欠失頻度が得られた。これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－９およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、プラスミドおよびｇＲＮＡの両方を送達するために、細胞種に応じてＲＮＡｉＭＡＸの約２～５倍強力であることを実証する。

（実施例１４）
マウスにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡのＣＰＰ媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達

【０５３０】
スイスマウスにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ送達についてＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９を含むＣＰＰを評価した。ポリアデニル化（polyadenylatyed）およびキャップされたＣＡＳ９　ｍＲＮＡはＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから入手した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）をＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと２０：１のＣＰＰとｍＲＮＡとの比で混合することによってＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ複合体を調製した。生理緩衝液中のＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ＡＤＧＮ－１００ａ（６匹の動物／群）、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ＶＥＰＥＰ－６（群あたり6匹の動物）、またはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ＶＥＰＥＰ－９（群あたり6匹の動物）複合体の単回静脈注射（１００μｌ）をマウスに与えた。生理緩衝液中の遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡを対照として注射した。

【０５３１】
ＣＰＰ／ｍＲＮＡ送達に関連するｉｎ　ｖｉｖｏサイトカイン誘導を評価するために、複数の時点（１２時間、２４時間、４８時間、および７２時間）において伏在静脈の出血によって血液試料を収集し、収集は週あたり１００μｌ以下または全血液量の１０％以下であった。ＩｎｖｒｉｔｒｏｇｅｎのＴｈｅ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　２０－Ｐｌｅｘ　Ｐａｎｅｌ（ＬＭＣ　０００６Ｍ）を使用して血清サイトカインレベルを測定した。血清、血漿、および組織培養上清中のマウスのサイトカイン、ケモカイン、および増殖因子を定量化するためにＬｕｍｉｎｅｘ（商標）プラットフォーム用のＴｈｅ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　２０－Ｐｌｅｘ　Ｐａｎｅｌを特別に設計する。２０－ｐｌｅｘ　ｐａｎｅｌは、血清または組織培養上清中のマウスのＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮ－ｇ、ＩＬ１ａ、Ｉｌ１ｂ、Ｉｌ２、ＩＬ４、Ｉｌ５、Ｉ

１６、Ｉｌ１０、Ｉｌ１２（ｐ４０／ｐ７０）、ＩＬ１３、ＩＬ１７、ＴＮＦ－ａ、ＩＰ－１０、ＫＣ、ＭＣＰ－１、ＭＩＧ、ＭＩＰ－１ａ、塩基性ＦＧＦ、およびＶＥＧＦの同時の定量化を可能とした。リポ多糖（ＬＰＳ）の投与を対照として含めて、結果を図３４に報告する。ＬＰＳの投与とは対照的に、異なる時点において非特異的サイトカイン誘導に対する異なるＣＰＰの影響はほとんどまたは全く観察されなかった。

【０５３２】

注射の３日、６日、および１０日後に動物を屠殺し、肺、肝臓、脳、腎臓、心臓、脾臓、血液、膵臓、筋肉、骨髄、および腸を含む組織を収集した。組織をホモジナイズし、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体（ＳＢＩクローン７Ａ９）を使用してＥＬＩＳＡによってタンパク質抽出物中のＣＡＳ９タンパク質レベルを解析した。図３５Ａ（３日目）および３５Ｂ（６日目）に示すように、３つのＣＰＰ（ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９）を使用して肝臓におけるＣＡＳ９タンパク質のロバストな発現が観察され、ＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルはバックグラウンドのそれぞれ２０倍、１５倍、および８倍より大きかった。

【０５３３】

送達のためにＡＤＧＮ－１００ａを使用して、ＣＡＳ９発現は肺および腎臓においても観察され、バックグラウンドの約２～３倍のレベルであった。調べた他の組織ではＣＡＳ９タンパク質発現の増加はほとんどまたは全く検出されなかった。

【０５３４】

送達のためにＶＥＰＥＰ－６を使用しても、肺（バックグラウンドの約８倍）、ならびに腎臓、心臓、脳、および骨髄（バックグラウンドの約３～４倍）においてロバストなＣＡＳ９発現が観察された。調べた他の組織ではＣＡＳ９タンパク質発現の増加はほとんどまたは全く検出されなかった。

【０５３５】

送達のためにＶＥＰＥＰ－９を使用しても、脾臓、脳、およびリンパ節（バックグラウンドの約４～５倍）においてロバストなＣＡＳ９発現が観察された。調べた他の組織ではＣＡＳ９タンパク質発現の増加はほとんどまたは全く検出されなかった。

【０５３６】

３つ全てのＣＰＰについて、異なる組織におけるＣＡＳ９発現レベルは３日目および６日目において類似しており、ＣＡＳ９タンパク質発現の長期間の持続を示唆した。図３５Ｃに示すように、ＣＡＳ９タンパク質の発現は注射の１０日後に維持された。１０日目に、３つのＣＰＰ（ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９）で肝臓において、ＶＥＰＥＰ－６およびＶＥＰＥＰ－９で脳において、ＶＥＰＥＰ－６で肺において、ならびにＶＥＰＥＰ－９でリンパ節においてＣＡＳ９発現が観察された。

（実施例１５）

マウスにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびＰＣＳＫ９を標的とするｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達

【０５３７】

ＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ　ｃｏｎｖｅｒｔａｓｅ　ｓｕｂｔｉｌｉｓｉｎ／ｋｅｘｉｎ　ｔｙｐｅ　９（ＰＣＳＫ９）（コレステロールホメオスタシスに関与する治療関連遺伝子）を標的とするｇＲＮＡのスイスマウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ送達についてＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９を含むＣＰＰを評価した。ＰＣＳＫ９の減少は心血管疾患のリスクの減少およびより低いレベルの低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）コレステロールに関連するため、ヒト転換酵素ＰＣＳＫ９の阻害剤が、見込みのある新規クラスの心臓保護薬として現れてきた。

【０５３８】

ポリアデニル化およびキャップされたＣＡＳ９　ｍＲＮＡはＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから入手し、ＰＣＳＫ９エクソン１を標的とするｇＲＮＡ（５μｇ）はＥｕｒｏｇｅｎｔｅｃから入手した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと２０：１のＣＰＰと核酸

（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）との比で混合し、投与の前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体を調製した。生理緩衝液中のＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（４匹の動物／群）、ＶＥＰＥＰ－６／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（群あたり４匹の動物）、またはＶＥＰＥＰ－９／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（群あたり４匹の動物）複合体の単回静脈注射（１００μｌ）をスイスマウスに与えた。遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡを対照として注射した。

【０５３９】

複数の時点（３日目、６日目、１０日目、および２１日目）において伏在静脈の出血によって血液試料を収集し、収集は週あたり１００μｌ以下または全血液量の１０％以下であった。Ｍｏｕｓｅ　Ｐｒｏｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｏｎｖｅｒｔａｓｅ　９／ＰＣＳＫ９　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ（ＭＰＣ－９００、Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ）を使用してＥＬＩＳＡによってＰＣＳＫ９の血清レベルを決定した。Ｉｎｆｉｎｉｔｙ　Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して血清中の総コレステロールレベルを測定した。

【０５４０】

図３６に示すように、送達のためにＡＤＧＮ－１００ａを使用してＰＳＣＫ９の血清レベルは１日目、３日目、６日目、１０日目、１４日目、および２０日目にそれぞれ５１％、６２％、６９％、６５％、６５％、および６０％減少した。送達のためにＶＥＰＥＰ－６を使用してＰＳＣＫ９の血清レベルは１日目、３日目、６日目、１０日目、１４日目、および２０日目にそれぞれ６４％、７３％、７５％、７３％、７１％、および７０％減少した。最後に、送達のためにＶＥＰＥＰ－９を使用してＰＳＣＫ９の血清レベルは１日目、３日目、６日目、１０日目、１４日目、および２０日目にそれぞれ１３％、２９％、３１％、２７％、２５％、および２４％のみ減少した。図３７に示すように、全ての条件について、ＰＣＳＫ９レベルの減少には血清コレステロールレベルの減少が付随した。送達のためにＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－６ペプチドを使用して３日目、６日目、１０日目、１４日目、および２０日目にコレステロールレベルは約３５％～４２％減少した。

【０５４１】

これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－６の両方のペプチドは、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡを含むＣＲＩＳＰＲ成分のｉｎ　ｖｉｖｏでの機能的送達のための強力な担体を構成し、治療応用における使用のためのそれらの好適性を示唆することを実証する。

（実施例１６）

ＣＡＳ９タンパク質のＶＥＰＥＰ－３媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達はマウスにおいてサイトカイン活性化を誘導しない

【０５４２】

スイスマウスにおいてＣＡＳ９タンパク質のｉｎ　ｖｉｖｏ送達についてＶＥＰＥＰ－３ａを評価した。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　ＨＩＳ－ＮＬＳ－ＣＡＳ９は上記のように調製した。ＣＡＳ９タンパク質（５μｇ）をＶＥＰＥＰ－３ａと２０：１のＣＰＰとＣＡＳ９タンパク質との比で混合することによってＣＰＰ／ＣＡＳ９タンパク質複合体を調製した。生理緩衝液中のＣＡＳ９／ＶＥＰＥＰ－３ａ（６匹の動物／群）複合体の単回静脈注射（１００μｌ）をマウスに与えた。生理緩衝液中の遊離Ｃａｓ９タンパク質を陰性対照として注射し、ＬＰＳの投与をサイトカイン活性化のための陽性対照として使用した。ＶＥＰＥＰ－３ａ／ＣＡＳ９送達に関連するｉｎ　ｖｉｖｏサイトカイン誘導を評価するために、複数の時点（１２時間、２４時間、４８時間、および７２時間）において伏在静脈の出血によって血液試料を収集し、収集は週あたり１００μｌ以下または全血液量の１０％以下であった。ＩｎｖｒｉｔｒｏｇｅｎのＴｈｅ　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　２０－Ｐｌｅｘ　Ｐａｎｅｌ（ＬＭＣ　０００６Ｍ）を使用して血清サイトカインレベルを測定した。図３８に示すように、ＬＰＳの投与とは対照的に、非特異的サイトカイン誘導に対するＶＥＰＥＰ－３ａの影響は異なる時点においてほとんどまたは

全く観察されなかった。

（実施例１７）

初代ヒトＴ細胞におけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびプラスミドのＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０５４３】

３：１（ビーズ：細胞）の比で常磁性ビーズに結合した抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８抗体（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ ＣｌｉｎＥｘＶｉｖｏ ＣＤ３／ＣＤ２８、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してＴ細胞をＰＢＭＣから単離した。細胞およびビーズを室温で２時間共インキュベートし、Ｄｙｎａｌ ＣｌｉｎＥｘＶＩＶＯ ＭＰＣ ｍａｇｎｅｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してＣＤ３$^{+}$細胞の富化を行った。抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８常磁性ビーズを取り出し、洗浄し、濃縮した。１０％のウシ胎仔血清、３００ＩＵ／ｍｌのＩＬ２、および５０ｎｇ／ｍｌのＯＫＴ３（ＭｕｒｏｍｏｎＡＢ－ＣＤ３）を補充したＡＩＭ－Ｖ培地（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒｓ）を用いて、１×１０^{6}個の細胞／ｍｌの濃度で２日間、ＣＤ３$^{+}$画分の細胞を活性化培地中に再懸濁した。

【０５４４】

１人のドナーから単離されたＴ細胞（５×１０^{6}）においてＣＡＳ９ ｍＲＮＡまたはＣＡＳ９発現プラスミドのいずれかの細胞送達について細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、ＶＥＰＥＰ－３ａ、およびＡＤＧＮ－１００ａ）を評価した。ＣＡＳ９ ｍＲＮＡは上記のように調製した。ＣＡＳ９ ｍＲＮＡ（０．５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰ：ＣＡＳ９ ｍＲＮＡのモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９複合体を形成した。ＣＡＳ９発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ ＭＬＭ３６３９－Ｐｌａｓｍｉｄ ＃４２２５２）（０．５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰ：プラスミドのモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９発現プラスミド複合体を形成した。

【０５４５】

実施例１３ａに記載の懸濁細胞についてのプロトコールにしたがって細胞へのトランスフェクトを行った。ＲＮＡｉＭＡＸおよびｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００の脂質ベースの送達方法（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｆｒａｎｃｅ）を対照として使用し、トランスフェクションを製造者の説明書にしたがって行った。Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ、商品番号Ｃ１５２００２２３）およびＡＢＣＡＭ（クローン７Ａ９－ａｂ１９１４６８）から入手したＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９に対する抗体を使用してタンパク質抽出物に対するＥＬＩＳＡによる決定で、１０日の期間にわたって複数の時点においてＣＡＳ９タンパク質発現レベルを解析した。

【０５４６】

ＣＡＳ９タンパク質発現の結果を図３９Ａおよび３９Ｂ（３つの別々の実験からの平均）に示す。初代ヒトＴ細胞におけるロバストなＣＡＳ９タンパク質発現が示すように、ＶＥＰＥＰ－６およびＡＤＧＮ－１００ａ ＣＰＰは、ＣＡＳ９ ｍＲＮＡの効率的な送達を促進した（図３９Ａ）。ＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルは３日目に、ＣＡＳ９ ｍＲＮＡ送達のためにＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－６を使用してバックグラウンドのそれぞれ約１５倍および１７倍に、ＶＥＰＥＰ－９を使用してバックグラウンドの約４倍に増加した。全ての条件において、高レベルのＣＡＳ９タンパク質発現が６日目に維持され、これは１０日目に約５０％減少した。対照的に、ＶＥＰＥＰ－３ａペプチドまたはＲＮＡｉＭＡＸではＣＡＳ９発現はほとんどまたは全く観察されなかった。これらの結果は、ＶＥＰＥＰ－６およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、トランスフェクトが困難な細胞種におけるｍＲＮＡの送達のための強力なビヒクルであることを実証する。

【０５４７】

図３９Ｂに示すように、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９のＣＰＰは、初代ヒトＴ細胞におけるロバストなＣＡＳ９タンパク質発現が示すように、ＣＡＳ９発現プラス

ミドの効率的な送達を媒介した。３日目におけるＣＡＳ９タンパク質発現のＥＬＩＳＡシグナルは、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９を使用してバックグラウンドの約４倍に増加した。全ての条件において、高レベルのＣＡＳ９タンパク質発現が６日目に維持され、これは１０日目に約５０％減少した。対照的に、ＶＥＰＥＰ－３ａもしくはＶＥＰＥＰ－６ペプチド、またはｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００ではＣＡＳ９発現はほとんどまたは全く観察されなかった。これらの結果は、ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９ペプチドは、トランスフェクトが困難な細胞種におけるＣＡＳ９発現プラスミドの送達のための強力なビヒクルであることを実証する。

（実施例１８）

ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ、ＣＡＳ９タンパク質、またはＣＡＳ９発現プラスミドを使用する初代ヒトＴ細胞におけるＥＭＸ１ターゲティングＲＧＥＮ／ｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０５４８】

初代ヒトＴ細胞においてＣＡＳ９　ｍＲＮＡ、ＣＡＳ９タンパク質、またはＣＡＳ９発現プラスミドを用いて内因性ＥＭＸ１遺伝子を標的とするｇＲＮＡの機能的な細胞内送達について細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、ＡＤＧＮ－１００ａ、およびＶＥＰＥＰ－３ａ）を評価した。

【０５４９】

ＥＭＸ１ターゲティングｇＲＮＡおよびＣＡＳ９　ｍＲＮＡは上記のように調製した。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰと核酸（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）のモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体を形成させた。ＣＡＳ９発現プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　ＭＬＭ３６３９－Ｐｌａｓｍｉｄ　＃４２２５２）（０．５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰと核酸（プラスミド＋ｇＲＮＡ）のモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／プラスミド／ｇＲＮＡ複合体を形成させた。予めロードしたＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体（２．５μｇ／５μｇのＣＡＳ９／ｇＲＮＡ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰと複合体のモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９／ｇＲＮＡ複合体を形成させた。

【０５５０】

実施例１３ａに記載の懸濁細胞についてのプロトコールにしたがってＴ細胞へのトランスフェクトを行った。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００媒介性およびＲＮＡｉＭＡＸ媒介性の送達方法（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｆｒａｎｃｅ）を対照として含めた。３日目、６日目、および１０日目にＴ７Ｅ１アッセイによってＥＭＸ１遺伝子編集を解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化した。

【０５５１】

ＥＭＸ１遺伝子における挿入欠失頻度を図４０Ａ～４０Ｃに示す。ＶＥＰＥＰ－６およびＡＤＧＮ－１００ａはＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡの送達を媒介し、初代ヒトＴ細胞においてＥＭＸ－１遺伝子のロバストな編集を誘導した（図４０Ａ）。両方のペプチドについて、ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡの効率的な機能的細胞内送達が７２時間後に観察された。約６０～６５％の平均挿入欠失頻度が得られた。比較として、ＶＥＰＥＰ－９またはＲＮＡｉＭＡＸを使用して約１０～１５％の平均挿入欠失頻度が得られた。ＶＥＰＥＰ－３ａ媒介性およびＡＤＧＮ－１００ａ媒介性のＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡの送達は、初代Ｔ細胞においてＥＭＸ１遺伝子のロバストな編集を誘導した（図４０Ｂ）。両方のペプチドで約６０～６５％の平均挿入欠失頻度が得られた。ＶＥＰＥＰ－９を使用して約２０％の平均挿入欠失頻度が得られた。対照的に、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドまたはＲＮＡｉＭＡＸではＥＭＸ１遺伝子編集はほとんどまたは全く観察されなかった。ＡＤＧＮ－１００ａおよびＶＥＰＥＰ－９は、ＣＡＳ９発現プラスミドおよびｇＲＮＡの送達を促進

し、初代Ｔ細胞においてＥＭＸ１遺伝子のロバストな編集を誘導した（図４０Ｃ）。両方のペプチドについて、ＣＡＳ９発現プラスミドおよびｇＲＮＡの効率的な機能的細胞内送達が３日目に観察され、約３０％の平均挿入欠失頻度であった。比較として、ＶＥＰＥＰ－６ペプチドまたはＲＮＡｉＭＡＸではＥＭＸ１遺伝子編集はほとんどまたは全く観察されなかった。

【０５５２】

初代ヒトＴ細胞において観察されたロバストなＥＭＸ１遺伝子破壊には、細胞毒性は付随しなかった。図４０Ｄに示すように、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、およびＶＥＰＥＰ－３ａカーゴ複合体を使用して１０％未満の毒性が観察された。対照的に、ＲＮＡｉＭＡＸおよびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００では４０～５０％の間の細胞死が観察された。これらの結果は、ＣＰＰは、初代ヒトＴ細胞においてＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ、ＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡ、およびＣＡＳ９プラスミド／ｇＲＮＡを含む様々な種類のカーゴの送達に有用な強力な非毒性の担体であることを実証する。

（実施例１９）

異なるカーゴを用いるペプチドベースの粒子の粒径測定およびゼータ電位

【０５５３】

ＣＰＰ／ＣＡＳ９タンパク質、ＣＰＰ／ＣＡＳ９タンパク質／ｓｇＲＮＡ、ＣＰＰ／ＣＡＳ９－ｍＲＮＡ、ＣＰＰ／ＣＡＳ－ｍＲＮＡ／ｓｇＲＮＡ粒子を特徴付け、平均サイズ、多分散性、およびゼータ電位をＺｅｔａｓｉｚｅｒ　ＮＡＮＯ　ＺＳ　Ｐ装置（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｌｔｄ）を用いて測定した。２０℃の生理的条件（０．９％　ＮａＣｌ）下、２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＣＡＳ９タンパク質（２．５μｇ）および予めロードしたＣＡＳ９タンパク質（２．５μｇ）／ｇＲＮＡ（５μｇ）をＶＥＰＥＰ－３ａ、ＶＥＰＥＰ－９、ＡＤＧＮ－１００ａ、およびＶＥＰＥＰ－６ペプチドと混合し、解析前に３７℃で３０分間インキュベートした。

【０５５４】

２０℃の生理的条件（０．９％　ＮａＣｌ）下、２０：１のＣＰＰとカーゴのモル比でＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）およびＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）／ｇＲＮＡ（５μｇ）をＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａと混合し、解析前に３７℃で３０分間インキュベートした。

【０５５５】

ＣＣＰ／カーゴ複合体の平均サイズおよび多分散性を２５℃で測定あたり５分間で決定し、ゼータ電位をＺｅｔａｓｉｚｅｒ　ＮＡＮＯ　ＺＳ　Ｐ装置（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｌｔｄ）を用いて測定した。データを３つの別々の実験の平均について表１４に示す。

【０５５６】

２０：１のモル比において、ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、ＣＡＳ９－ｍＲＮＡおよびＣＡＳ９－ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体と安定なナノ粒子を形成することができた。ＡＤＧＮ－１００、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９について約７５ｎｍ、１００ｎｍ、および１２０ｎｍの平均直径、ならびに０．２５、０．２、および０．１５の多分散性指数（ＰＩ）がそれぞれ得られた。

【０５５７】

ゼータ電位によって得られるＡＤＧＮ－１００ａ／ｍＲＮＡおよびＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９－ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ粒子の電荷は、それぞれ－４．５±０．５ｍＶおよび－５．８±０．６ｍＶであった。

【０５５８】

ゼータ電位によって得られるＶＥＰＥＰ－６／ｍＲＮＡおよびＶＥＰＥＰ－６／ＣＡＳ９－ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ粒子の電荷は、それぞれ－１１．０±２ｍＶおよび－１２．７±２．０ｍＶであった。

【０５５９】

ゼータ電位によって得られるＶＥＰＥＰ－９／ｍＲＮＡおよびＶＥＰＥＰ－９／ＣＡＳ

９－ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ粒子の電荷は、それぞれ１５．４±４．０ｍＶおよび１１．１±２．０ｍＶであった。

【０５６０】

２０：１のモル比において、ＶＥＰＥＰ－３ａおよびＡＤＧＮ－１００ａペプチドは、ＣＡＳ９タンパク質およびＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡ複合体と安定なナノ粒子を形成することができた。ＶＥＰＥＰ－３ａおよびＡＤＧＮ－１００ａについて約６０ｎｍおよび約１００ｎｍの平均直径、ならびに約０．２５および０．３の多分散性指数（ＰＩ）がそれぞれ得られた。

【０５６１】

ゼータ電位によって得られるＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９タンパク質およびＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡ粒子の電荷は、それぞれ３．６±０．５ｍＶおよび８．３±１．５ｍＶであった。

【０５６２】

ゼータ電位によって得られるＶＥＰＥＰ－３ａ／ＣＡＳ９タンパク質およびＶＥＰＥＰ－３ａ／ＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡ粒子の電荷は、それぞれ１６．６±５ｍＶおよび１８．０±５ｍＶであった。

【０５６３】

対照的に、ＶＥＰＥＰ－９は、予めロードしたＣＡＳ９タンパク質／ｇＲＮＡ複合体とより大きい粒子を形成した。２０：１のモル比において、２１０±２０の平均粒径および０．５１の多分散性指数が得られた。

【表１４】

表14: CPP/RGENおよびCPP/RGEN:gRNAナノ粒子の特徴付け

粒子	サイズ (nm)	ゼータ電位 (mV)	PI
ADGN 100/CAS9-mRNA	75 ± 5	-4.5 ± 0.5	0.27 ± 0.1
ADGN 100/CAS9-mRNA/gRNA	71 ± 5	-5.8 ± 0.6	0.308 ± 0.1
ADGN 100/CAS9タンパク質	96 ± 7	3.6 ± 0.5	0.28 ± 0.1
ADGN 100/CAS9タンパク質/gRNA	98 ± 6	8.3 ± 1.5	0.21 ± 0.1
VEPEP 6/CAS9-mRNA	102 ± 6	-11 ± 2	0.18 ± 0.1
VEPEP 6/CAS9-mRNA/gRNA	97 ± 5	-12.7 ± 2	0.21 ± 0.1
VEPEP 9/CAS9-mRNA	121 ± 7	15.4 ± 4	0.12 ± 0.1
VEPEP 9/CAS9-mRNA/gRNA	113 ± 6	11.1 ± 2	0.15 ± 0.1
VEPEP 9/CAS9タンパク質	210 ± 20	25.3 ± 5	0.46 ± 0.1
VEPEP 9/CAS9タンパク質/gRNA	189 ± 12	22.4 ± 5	0.51 ± 0.1
VEPEP 3/CAS9タンパク質	68 ± 5	16.6 ± 5	0.29 ± 0.1
VEPEP 3/CAS9タンパク質/gRNA	54 ± 5	18.0 ± 5	0.33 ± 0.1

（実施例２０）

膠芽腫または膵臓がん細胞株におけるＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよびＯｌｉｇ２、ＨＩＦ１－アルファ、ＢＣＬ２Ｌ２、突然変異体ＰＴＥＮ、または突然変異体ＫＲＡＳを標的とするｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性の機能的送達

【０５６４】

膠芽腫または膵臓がん細胞株においてＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよびＯｌｉｇ２、ＨＩＦ１－アルファ、ＢＣＬ２Ｌ２、突然変異体ＰＴＥＮ、または突然変異体ＫＲＡＳを標的とす

ｇＲＮＡを含有する核タンパク質複合体の機能的な細胞内送達について細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａ）を評価する。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰ：カーゴのモル比で混合し、細胞トランスフェクションの前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体を形成させる。実施例１３ａに記載のプロトコールにしたがって細胞へのトランスフェクトを行う。ＲＮＡｉＭＡＸ媒介性の送達（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｆｒａｎｃｅ）を対照として使用する。Ｔ７Ｅ１アッセイによって３日目および６日目に遺伝子編集を解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化する。標準技術を使用して細胞増殖および細胞死を測定する。

（実施例２１）

膠芽腫または膵臓がん細胞株におけるＣＡＳ９　ｍＲＮＡおよび突然変異体ＰＴＥＮまたは突然変異体ＫＲＡＳを標的とするｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性の機能的送達ならびに相同組換え修復（ＨＤＲ）による遺伝子編集

【０５６５】

膠芽腫または膵臓がん細胞株において精密な相同組換え修復（ＨＤＲ）を使用したゲノム操作のためのＲＧＥＮ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡの機能的な細胞内送達について細胞膜透過ペプチド（ＶＥＰＥＰ－６、ＶＥＰＥＰ－９、およびＡＤＧＮ－１００ａ）を評価する。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ、突然変異体ＰＴＥＮまたは突然変異体ＫＲＡＳを標的とするｇＲＮＡ、およびｓｓＤＮＡドナー鋳型を含有する１つまたは複数の複合体の送達は、ＨＤＲによる突然変異遺伝子の訂正を可能とする。

【０５６６】

ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（０．５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＣＰＰと２０：１のＣＰＰ：カーゴのモル比で混合することによって形成されたＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体を使用して、高レベルの二本鎖切断形成のためにゲノム編集実験を最適化する。５０ｎＭのＲＥＧＮ／ｇＲＮＡおよびｓｓＤＮＡドナーの両方を２０：１のモル比で同じ粒子（ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ三成分複合体）中または２つの異なる粒子（ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ＣＰＰおよびｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ）中でＶＥＰＥＰ－６またはＡＤＧＮ－１００ａペプチドと会合させる。

【０５６７】

実施例１３ａに記載のプロトコールにしたがって細胞へのトランスフェクトを行う。ＲＮＡｉＭＡＸ媒介性の送達（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｆｒａｎｃｅ）を対照として使用する。Ｔ７Ｅ１アッセイによって３日目および６日目に遺伝子編集を解析し、Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して定量化する。標準技術を使用して細胞増殖および細胞死を測定する。標的とする遺伝子のＨＤＲの訂正効率を制限断片長多型（ＲＦＬＰ）アッセイおよびゲノムシークエンシングを使用して解析する。

（実施例２２）

膠芽腫モデルにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびＯｌｉｇ２、ＨＩＦ１－アルファ、ＢＣＬ２Ｌ２、または突然変異体ＰＴＥＮを標的とするｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達

【０５６８】

ペプチドベースの遺伝子編集複合体の抗腫瘍活性について同所性膠芽腫異種移植腫瘍（例えば、Ｕ８７）を持つヌードマウスを評価する。ＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびＯｌｉｇ２、ＨＩＦ１－アルファ、ＢＣＬ２Ｌ２、または突然変異体ＰＴＥＮを標的とするｇＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ送達について、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９を含むＣＰＰを評価する。

【０５６９】

ポリアデニル化およびキャップされたＣＡＳ９　ｍＲＮＡはＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから入手し、上記標的を標的とするｇＲＮＡは市販されているものを入手する。ＣＡＳ９

ｍＲＮＡ（５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと２０：１のＣＰＰと核酸（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）との比で混合し、投与の前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体を調製する。生理緩衝液中のＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（４匹の動物／群）、ＶＥＰＥＰ－６／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（群あたり４匹の動物）、またはＶＥＰＥＰ－９／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（群あたり４匹の動物）複合体の単回の静脈内または頭蓋内／腫瘍内注射（１００μｌ）をヌードマウスに与える。遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡを対照として注射する。動物を週毎に１×または２×処理し、腫瘍サイズを６週にわたって測定する。

（実施例２３）

膵臓がんモデルにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよび突然変異体ＫＲＡＳを標的とするｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達

【０５７０】

ペプチドベースの遺伝子編集複合体の抗腫瘍活性について膵臓異種移植腫瘍を持つヌードマウスを評価する。ＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよびＯｌｉｇ２、ＨＩＦ１－アルファ、ＢＣＬ２Ｌ２、または突然変異体ＫＲＡＳを標的とするｇＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏ送達について、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９を含むＣＰＰを評価する。

【０５７１】

ポリアデニル化およびキャップされたＣＡＳ９　ｍＲＮＡはＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから入手し、上記標的を標的とするｇＲＮＡは市販されているものを入手する。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）およびｇＲＮＡ（５μｇ）をＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと２０：１のＣＰＰと核酸（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）との比で混合し、投与の前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ複合体を調製する。生理緩衝液中のＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（４匹の動物／群）、ＶＥＰＥＰ－６／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（群あたり４匹の動物）、またはＶＥＰＥＰ－９／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ（群あたり４匹の動物）複合体の単回静脈注射（１００μｌ）をヌードマウスに与える。遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡを対照として注射する。動物を週毎に１×または２×処理し、腫瘍サイズを６週にわたって測定する。

（実施例２４）

膠芽腫モデルにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよび突然変異体ＰＴＥＮを標的とするｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達ならびに相同組換え修復（ＨＤＲ）による遺伝子編集

【０５７２】

ペプチドベースの遺伝子編集複合体の抗腫瘍活性について同所性膠芽腫異種移植腫瘍（例えば、Ｕ８７）を持つヌードマウスを評価する。ＣＡＳ９発現ｍＲＮＡ、突然変異体ＰＴＥＮを標的とするｇＲＮＡ、およびＨＤＲによる突然変異体ＰＴＥＮ遺伝子の訂正を可能とするｓｓＤＮＡドナー鋳型のｉｎ　ｖｉｖｏ送達について、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９を含むＣＰＰを評価する。

【０５７３】

ポリアデニル化およびキャップされたＣＡＳ９　ｍＲＮＡはＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから入手し、上記標的を標的とするｇＲＮＡは市販されているものを入手する。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）、ｇＲＮＡ（５μｇ）、およびｓｓＤＮＡ（１０μｇ）をＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと２０：１のＣＰＰと核酸（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）との比で同じ粒子（ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ三成分複合体）中または２つの異なる粒子（ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ＣＰＰおよびｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ）中で混合し、投与の前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ複合体を調製する。生理緩衝液中のＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ（４匹の動物／群）、ＶＥ

ＰＥＰ－６／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ（群あたり４匹の動物）、またはＶＥＰＥＰ－９／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ（群あたり４匹の動物）複合体の単回静脈注射（１００μｌ）をヌードマウスに与える。遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡを対照として注射する。動物を週毎に１×または２×処理し、腫瘍サイズを６週にわたって測定する。目的の遺伝子ＰＴＥＮのＨＤＲの訂正効率を６週目にゲノムシークエンシングによって解析する。

（実施例２５）

膵臓がんモデルにおけるＣＡＳ９発現ｍＲＮＡおよび突然変異体ＫＲＡＳを標的とするｇＲＮＡのＣＰＰ媒介性のｉｎ　ｖｉｖｏ送達ならびに相同組換え修復（ＨＤＲ）による遺伝子編集

【０５７４】

ペプチドベースの遺伝子編集複合体の抗腫瘍活性について膵臓異種移植腫瘍を持つヌードマウスを評価する。ＣＡＳ９発現ｍＲＮＡ、突然変異体ＫＲＡＳを標的とするｇＲＮＡ、およびＨＤＲによる突然変異体ＫＲＡＳ遺伝子の訂正を可能とするｓｓＤＮＡドナー鋳型のｉｎ　ｖｉｖｏ送達について、ＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、およびＶＥＰＥＰ－９を含むＣＰＰを評価する。

【０５７５】

ポリアデニル化およびキャップされたＣＡＳ９　ｍＲＮＡはＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから入手し、上記標的を標的とするｇＲＮＡは市販されているものを入手する。ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ（５μｇ）、ｇＲＮＡ（５μｇ）、およびｓｓＤＮＡ（１０μｇ）をＡＤＧＮ－１００ａ、ＶＥＰＥＰ－６、またはＶＥＰＥＰ－９ペプチドと２０：１のＣＰＰと核酸（ｍＲＮＡ＋ｇＲＮＡ）との比で同じ粒子（ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ三成分複合体）中または２つの異なる粒子（ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ＣＰＰおよびｓｓＤＮＡ／ＣＰＰ）中で混合し、投与の前に３７℃で３０分間インキュベートすることによってＣＰＰ／ＣＡＳ９ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ複合体を調製する。生理緩衝液中のＡＤＧＮ－１００ａ／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ（４匹の動物／群）、ＶＥＰＥＰ－６／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ（群あたり４匹の動物）、またはＶＥＰＥＰ－９／ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡ（群あたり４匹の動物）複合体の単回静脈注射（１００μｌ）をヌードマウスに与える。遊離ＣＡＳ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ／ｓｓＤＮＡを対照として注射する。動物を週毎に１×または２×処理し、腫瘍サイズを６週にわたって測定する。目的の遺伝子のＨＤＲの訂正効率を６週目にゲノムシークエンシングによって解析する。

【表１５－１】

配列表

配列番号	配列	注釈
1	$X_1X_2X_3X_4X_5X_2X_3X_4X_6X_7X_3X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$ X_1はベータ-A またはSであり、X_2はK、Rまたは Lであり、X_3はFまたはWであり、X_4はF、Wまたは Yであり、X_5はE、Rまたは Sであり、X_6はR、Tまたは Sであり、X_7はE、R、または Sであり、X_8はなし、Fまたは Wであり、X_9はPまたは Rであり、X_{10}はRまたは Lであり、X_{11}はK、Wまたは Rであり、X_{12}はRまたは Fであり、X_{13}はRまたは Kである。	VEPEP-3
2	$X_1X_2WX_4EX_2WX_4X_6X_7X_3PRX_{11}RX_{13}$ X_1はベータ-A またはSであり、X_2はRまたは Kであり、X_3はWまたは Fであり、X_4はF、W、または Yであり、X_6はTまたは Rであり、X_7はEまたは Rであり、X_{11}はRまたは Kであり、X_{13}はRまたは Kである。	VEPEP-3 1
3	X_1KWFERWFREWPRKRR X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 1a
4	X_1KWWERWWREWPRKRR X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 1b
5	X_1KWWERWWREWPRKRK X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 1c
6	X_1RWWEKWWTRWPRKRK X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 1d
7	X_1RWYEKWYTEFPRRRR X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 1e
8	X_1KX_{14}WWERWWRX_{14}WPRKRK X_1はベータ-A またはSであり、X_{14}は非天然アミノ酸であり、2つの非天然アミノ酸の間に炭化水素連結が存在する。	VEPEP-3 1S

【表１５－２】

9	$X_1X_2X_3WX_5X_{10}X_3WX_6X_7WX_8X_9X_{10}WX_{12}R$ X_1はベータ-A またはSであり、X_2はK、Rまたは L であり、X_3はFまたはWであり、X_5はRまたはSであり、X_6はRまたはSであり、X_7はRまたはSであり、X_8はFまたはWであり、X_9はRまたはPであり、X_{10}はLまたはRであり、X_{12}はRまたはFである。	VEPEP-3 2
10	X_1RWWRLWWRSWFRLWRR X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 2a
11	X_1LWWRRWWSRWWPRWRR X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 2b
12	X_1LWWSRWWRSWFRLWFR X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 2c
13	X_1KFWSRFWRSWFRLWRR X_1はベータ-A またはSである。	VEPEP-3 2d
14	X_1RWWX_{14}LWWRSWX_{14}RLWRR X_1はベータ-アラニンまたはセリンであり、X_{14}は非天然アミノ酸であり、2つの非天然アミノ酸の間に炭化水素連結が存在する。	VEPEP-3 2S
15	$X_1LX_2RALWX_9LX_3X_9X_4LWX_9LX_5X_6X_7X_8$ X_1はベータ-A またはSであり、X_2はFまたはWであり、X_3はL、W、CまたはIであり、X_4はS、A、NまたはTであり、X_5はLまたはWであり、X_6はWまたはRであり、X_7はKまたはRであり、X_8はAまたはなしであり、X_9はRまたはSである。	VEPEP-6 1
16	$X_1LX_2LARWX_9LX_3X_9X_4LWX_9LX_5X_6X_7X_8$ X_1はベータ-A またはSであり、X_2はFまたはWであり、X_3はL、W、CまたはIであり、X_4はS、A、NまたはTであり、X_5はLまたはWであり、X_6はWまたはRであり、X_7はKまたはRであり、X_8はAまたはなしであり、X_9はRまたはSである。	VEPEP-6 2

【表１５－３】

17	$X_1LX_2ARLWX_9LX_3X_9X_4LWX_9LX_5X_6X_7X_8$ X_1 はベータ-A または S であり、X_2 は F または W であり、X_3 は L、W、C または I であり、X_4 は S、A、N または T であり、X_5 は L または W であり、X_6 は W または R であり、X_7 は K または R であり、X_8 は A またはなしであり、X_9 は R または S である。	VEPEP-6 3
18	$X_1LX_2RALWRLX_3RX_4LWRLX_5X_6X_7X_8$ X_1 はベータ-A または S であり、X_2 は F または W であり、X_3 は L、W、C または I であり、X_4 は S、A、N または T であり、X_5 は L または W であり、X_6 は W または R であり、X_7 は K または R であり、X_8 は A またはなしである。	VEPEP-6 4
19	$X_1LX_2RALWRLX_3RX_4LWRLX_5X_6KX_7$ X_1 はベータ-A または S であり、X_2 は F または W であり、X_3 は L または W であり、X_4 は S、A または N であり、X_5 は L または W であり、X_6 は W または R であり、X_7 は A またはなしである。	VEPEP-6 5
20	$X_1LFRALWRLLRX_2LWRLLWX_3$ X_1 はベータ-A または S であり、X_2 は S または T であり、X_3 は K または R である。	VEPEP-6 6
21	$X_1LWRALWRLWRX_2LWRLLWX_3A$ X_1 はベータ-A または S であり、X_2 は S または T であり、X_3 は K または R である。	VEPEP-6 7
22	$X_1LWRALWRLX_4RX_2LWRLWRX_3A$ X_1 はベータ-A または S であり、X_2 は S または T であり、X_3 は K または R であり、X_4 は L、C または I である。	VEPEP-6 8
23	$X_1LWRALWRLWRX_2LWRLWRX_3A$ X_1 はベータ-A または S であり、X_2 は S または T であり、X_3 は K または R である。	VEPEP-6 9

【表１５－４】

24	X_1LWRALWRLX_5RALWRLLWX_3A X_1はベータ-Aまたは S であり、X_3は K または R であり、X_5は L または I である。	VEPEP-6 10
25	X_1LWRALWRLX_4RNLWRLLWX_3A X_1はベータ-Aまたは S であり、X_3は K または R であり、X_4は L、C または I である。	VEPEP-6 11
26	Ac-X_1LFRALWRLLRSLWRLLWK-システアミド X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP-6a
27	Ac-X_1LWRALWRLWRSLWRLLWKA-システアミド X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP-6b
28	Ac-X_1LWRALWRLLRSLWRLWRKA-システアミド X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP-6c
29	Ac-X_1LWRALWRLWRSLWRLWRKA-システアミド X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP-6d
30	Ac-X_1LWRALWRLLRALWRLLWKA-システアミド X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP-6e
31	Ac-X_1LWRALWRLLRNLWRLLWKA-システアミド X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP-6f
32	Ac-X_1LFRALWR$_s$LLRS$_s$LWRLLWK-システアミド X_1はベータ-Aまたは S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6a
33	Ac-X_1LFLARWR$_s$LLRS$_s$LWRLLWK-システアミド X_1はベータ-Aまたは S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6aa

【表１５－５】

34	Ac-X_1LFRALWS$_s$LLRS$_s$LWRLLWK-システアミド X_1はベータ-A または S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6ab
35	Ac-X_1LFLARWS$_s$LLRS$_s$LWRLLWK-システアミド X_1はベータ-A または S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6ad
36	Ac-X_1LFRALWRLLR$_s$SLWS$_s$LLWK-システアミド X_1はベータ-A または S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6b
37	Ac-X_1LFLARWRLLR$_s$SLWS$_s$LLWK-システアミド X_1はベータ-A または S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6ba
38	Ac-X_1LFRALWRLLS$_s$SLWS$_s$LLWK-システアミド X_1はベータ-A または S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6bb
39	Ac-X_1LFLARWRLLS$_s$SLWS$_s$LLWK-システアミド X_1はベータ-A または S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6bd
40	Ac-X_1LFAR$_s$LWRLLRS$_s$LWRLLWK-システアミド X_1はベータ-A または S であり、下付きの「s」が後に続く残基は炭化水素連結によって連結されている。	ST-VEPEP-6c

【表１５－６】

41	$X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_3X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ X_1はベータ-Aまたは S であり、X_2は Lまたはなしであり、X_3は Rまたはなしであり、X_4は L、Rまたは G であり、X_5は R、Wまたは S であり、X_6は S、Pまたは T であり、X_7は Wまたは P であり、X_8は F、Aまたは R であり、X_9は S、L、Pまたは R であり、X_{10}は Rまたは S であり、X_{11}は Wまたはなしであり、X_{12}は A、Rまたはなしであり、X_{13}は Wまたは F であり、X_3がなしの場合には、X_2、X_{11}およびX_{12}もなしである。	VEPEP-9 1
42	$X_1X_2RWWLRWAX_6RWX_8X_9X_{10}WX_{12}WX_{13}R$ X_1はベータ-Aまたは S であり、X_2は Lまたはなしであり、X_6は Sまたは P であり、X_8は Fまたは A であり、X_9は S、Lまたは P であり、X_{10}は Rまたは S であり、X_{12}は Aまたは R であり、X_{13}は Wまたは F である。	VEPEP-9 2
43	X_1LRWWLRWASRWFSRWAWWR X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP9a1
44	X_1LRWWLRWASRWASRWAWFR X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP9a2
45	X_1RWWLRWASRWALSWRWWR X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP9b1
46	X_1RWWLRWASRWFLSWRWWR X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP9b2
47	X_1RWWLRWAPRWFPSWRWWR X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP9c1
48	X_1RWWLRWASRWAPSWRWWR X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP9c2
49	$X_1WWX_4X_5WAX_6X_7X_8RX_{10}WWR$ X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP-9 3
50	X_1WWRWWASWARSWWR X_1はベータ-Aまたは S である。	VEPEP9d

【表１５－７】

51	X_1WWGSWATPRRRWWR X_1 はベータ-A または S である。	VEPEP9e
52	X_1WWRWWAPWARSWWR X_1 はベータ-A または S である。	VEPEP9f
53	X_1KWRS$X_2X_3X_4$RWRLWR$X_5X_6X_7X_8$SR X_1 は任意のアミノ酸またはなしであり、X_2～X_8 は任意のアミノ酸である。	ADGN-100
54	X_1KWRS$X_2X_3X_4$RWRLWR$X_5X_6X_7X_8$SR X_1 は βA、S、またはなしであり、X_2 は A または V であり、X_3 は G または L であり、X_4 は W または Y であり、X_5 は V または S であり、X_6 は R、V、または A であり、X_7 は S または L であり、X_8 は W または Y である。	ADGN-100 1
55	KWRSAGWRWRLWRVRSWSR	ADGN-100a
56	KWRSALYRWRLWRVRSWSR	ADGN-100b
57	KWRSALYRWRLWRSRSWSR	ADGN-100c
58	KWRSALYRWRLWRSALYSR	ADGN-100d
59	KWR$_S$AGWR$_S$WRLWRVRSWSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 aa
60	KWR$_S$SAGWRWR$_S$LWRVRSWSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 ab
61	KWRSAGWR$_S$WRLWRVR$_S$SWSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 ac
62	KWRS$_S$ALYR$_S$WRLWRSRSWSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 ba
63	KWR$_S$SALYRWR$_S$LWRSRSWSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 bb

【表１５－８】

64	KWRSALYR$_S$WRLWRSR$_S$SWSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 bc
65	KWRSALYRWR$_S$LWRS$_S$RSWSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 bd
66	KWRSALYRWRLWRS$_S$RSWS$_S$R 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 be
67	KWR$_S$SALYRWR$_S$LWRSALYSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 ca
68	KWRS$_S$ALYR$_S$WRLWRSALYSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 cb
69	KWRSALYRWR$_S$LWRS$_S$ALYSR 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 cc
70	KWRSALYRWRLWRS$_S$ALYS$_S$R 下付きの「S]を付した残基は炭化水素連結によって連結されている。	ADGN-100 cd
71	GGGCACGGGCAGCTTGCCGG	EGFP 標的部位
72	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	EMX1 標的部位
73	GACTGTAAGTGAATTACTT	HPRT 標的部位
74	GGGGCCACTAGGGACAGGAT	AAVS 標的部位
75	ベータ-AKWFERWFREWPRKRR	VEPEP-3a
76	ベータ-AKWWERWWREWPRKRR	VEPEP-3b
77	ベータ-ALWRALWRLWRSLWRLLWKA	VEPEP-6
78	ベータ-ALRWWLRWASRWFSRWAWWR	VEPEP-9
79	ベータ-AKWRSAGWRWRLWRVRSWSR	ADGN-100a
80	ベータ-AKWRSALYRWRLWRVRSWSR	ADGN-100b
81	GLWRALWRLLRSLWRLLWKV	CADY
82	GGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAAT GAC AAGCTTGCTAGC GGTGGGCAACCACAAACCCACGAGGGC AGA	ss ドナー鋳型
83	PKKKRKV	SV40 NLS
84	KRPAATKKAGQAKKKK	ヌクレオプラスミン NLS
85	PAAKRVKLD	c-myc NLS 1
86	RQRRNELKRSP	c-myc NLS 2
87	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGG QYFAKPRNQGGY	hRNPA1 M9 NLS
88	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRK AKKDEQILKRRNV	インポーチン-アルファ由来の IBB ドメイン

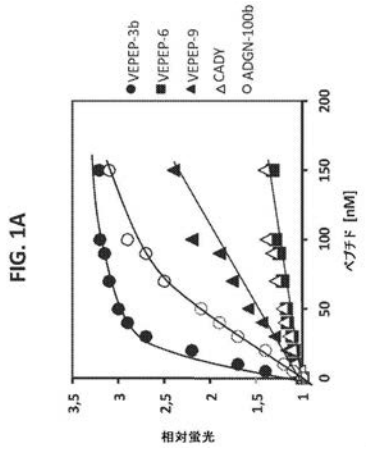
【表１５－９】

89	VSRKRPRP	筋腫 T タンパク質 NLS 1
90	PPKKARED	筋腫 T タンパク質 NLS 2
91	PQPKKKPL	p53 NLS
92	SALIKKKKKMAP	マウス c-ab1 IV NLS
93	DRLRR	インフルエンザウイルス NS1 NLS1
94	PKQKKRK	インフルエンザウイルス NS1 NLS2
95	RKLKKKIKKL	肝炎ウイルスデルタ抗原 NLS
96	REKKKFLKRR	マウス Mx1 NLS
97	KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK	ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ NLS
98	RKCLQAGMNLEARKTKK	ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイド NLS
99	ACCGCGTGACTTCCACATGAGCG	hPD1sgA1 標的部位
100	AAACCGCTCATGTGGAAGTCACG	hPD1sgB1 標的部位
101	ACCGCAGTTGTGTGACACGGAAG	hPD1sgC1f 標的部位
102	AAACCTTCCGTGTCACACAACTG	hPD1sgD2 標的部位
103	ACAACTTTACCGACCGCGCC	ルシフェラーゼ標的部位
104	GGCACTCGTAGCCGATCTTA	LDLR 標的部位 1
105	GTGGCCCAGCGAAGATGCGA	LDLR 標的部位 2
106	TCCAGATATCGATGAGTGTC	LDLR 標的部位 3
107	AGACTCACCGCACTCTTTGA	LDLR 標的部位 4
108	CCAGCTGGACCCCCACACGA	LDLR 標的部位 5
109	CCATGTTGCAGACTTTGTCC	LDLR 標的部位 6
110	AAACATCGAGAAATTTCAGG	LDLR SAM 標的部位 1
111	ACAAATCAAGTCGCCTGCCC	LDLR SAM 標的部位 2
112	AGGGGGCGTCAGCTCTTCAC	LDLR SAM 標的部位 3
113	CGACCCGATTCAAGCACCTC	ApoB 標的部位 1
114	CTGATTCAAGAAGTGCCACC	ApoB 標的部位 2
115	AGCTGGCGATGGACCCGCCG	ApoB 標的部位 3
116	ATGCCTTACTTGGACAGACC	ApoB 標的部位 4
117	CGCCAGCAGCGCCAGCAGCG	ApoB 標的部位 5
118	TCTTACAGAAGAGGAAATGC	ApoB 標的部位 6
119	CTTTGAGCCTTGAAGAGCCT	ApoB SAM 標的部位 1
120	GCAAACAGGTCAGGCCCGGG	ApoB SAM 標的部位 2
121	GCTGCGGCTGCATCCCAGGT	ApoB SAM 標的部位 3
122	CGCCGACTTGAGCGCGTCCA	LDLRAP1 標的部位 1
123	TGTAGCCACGATCCTCTTGA	LDLRAP1 標的部位 2
124	GCTCCACTAGCGTCATGCCC	LDLRAP1 標的部位 3
125	TCTGTCAGGATAATTCCCCG	LDLRAP1 標的部位 4
126	GGCCATGGACGCGCTCAAGT	LDLRAP1 標的部位 5
127	TGGACACGTTCTCAATGAGC	LDLRAP1 標的部位 6
128	AAACTCTTGGTGCCTGGACC	LDLRAP1 SAM 標的部位 1
129	CTGGCGCCTTCGGGCGGCCT	LDLRAP1 SAM 標的部位 2
130	GAGGAAAGCGGGGGCGTCTA	LDLRAP1 SAM 標的部位 3
131	GGTGCTAGCCTTGCGTTCCG	PCSK9 標的部位 1
132	CTGGCCGAAGCACCCGAGCA	PCSK9 標的部位 2
133	ACTGTATGGTCAGCACACTC	PCSK9 標的部位 3
134	GTCGTGCTGGTCACCGCTGC	PCSK9 標的部位 4
135	CGCCCGCTGCGCCCCAGATG	PCSK9 標的部位 5

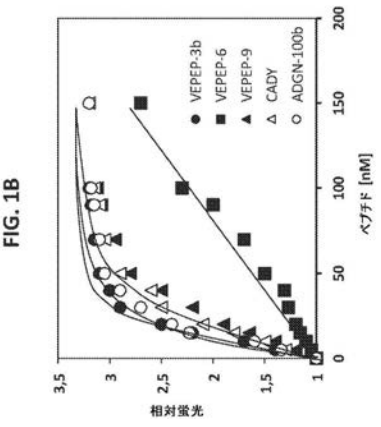
【表１５－１０】

136	AGTAGAGGCAGGCATCGTCC	PCSK9 標的部位 6

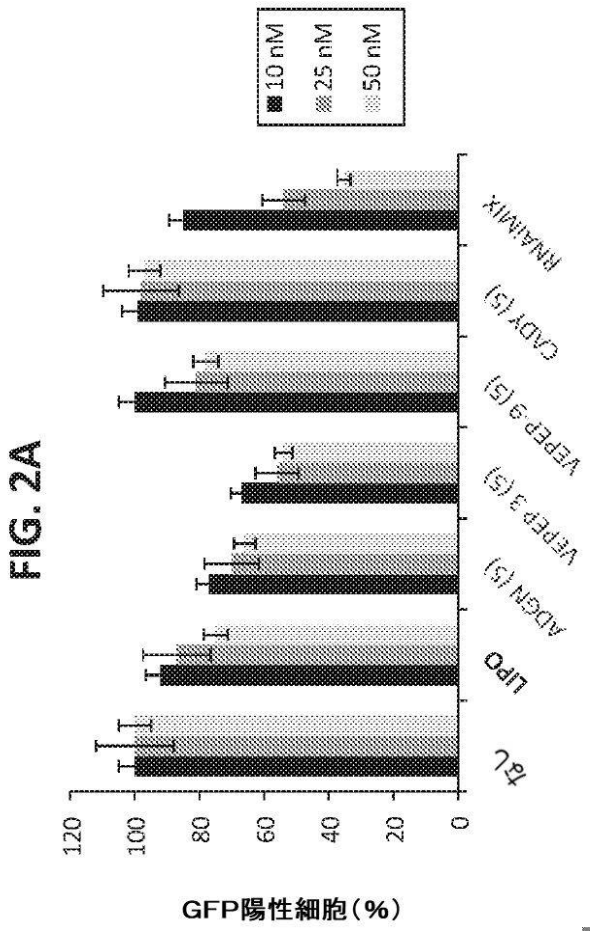
【図１Ａ】



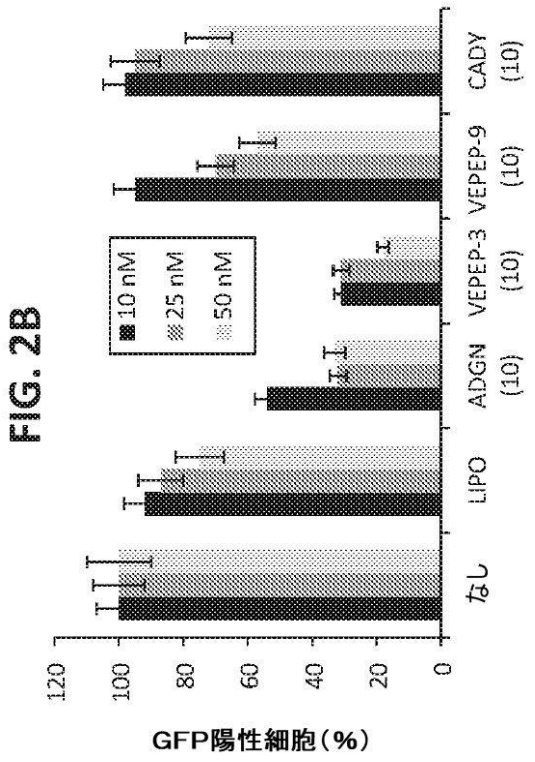
【図１Ｂ】



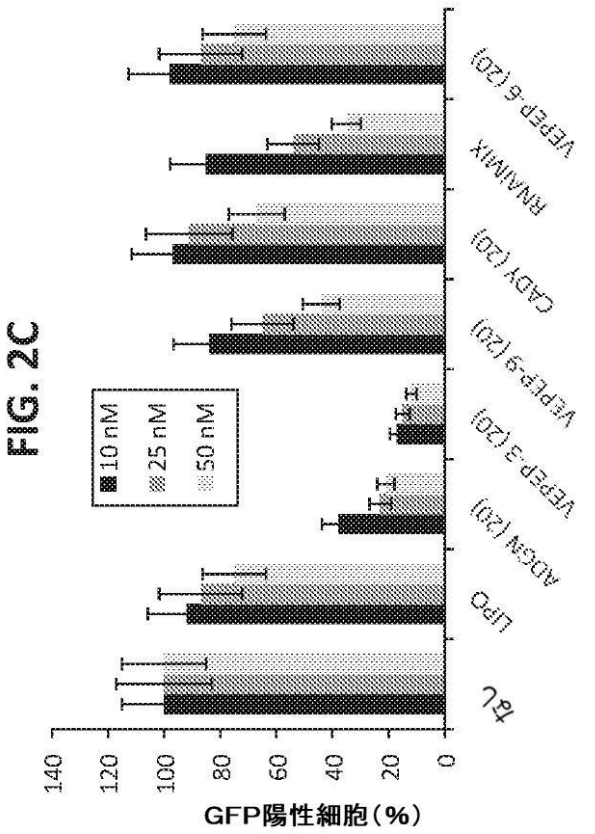
【図２Ａ】



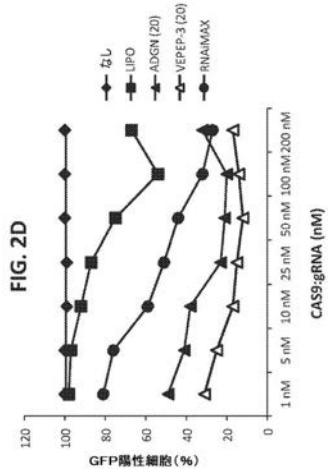
【図２Ｂ】



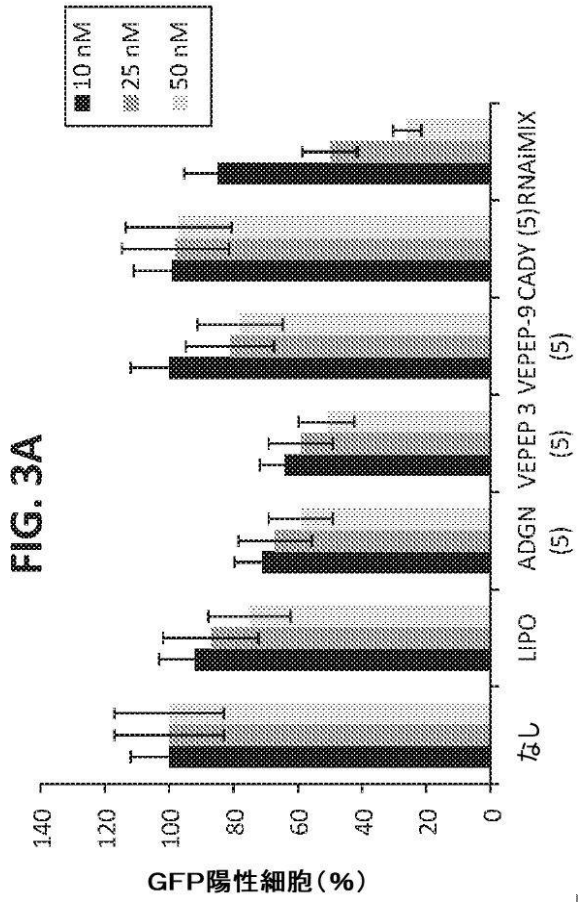
【図２Ｃ】



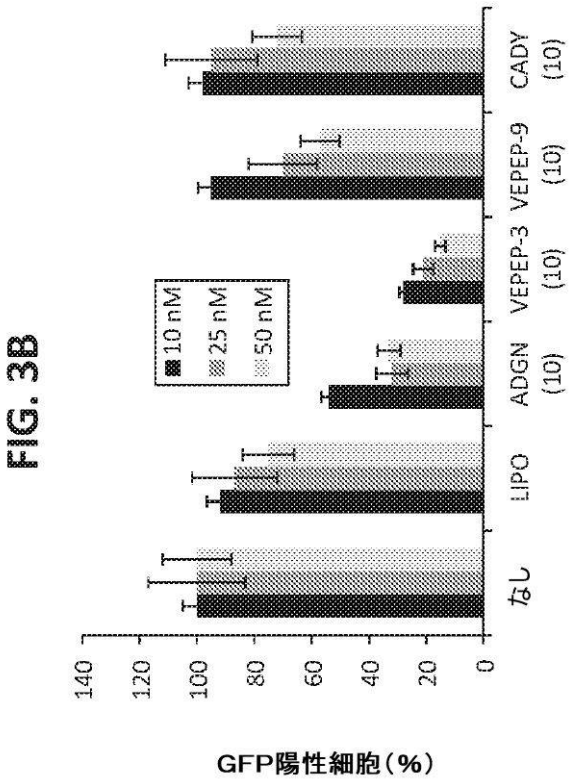
【図２Ｄ】



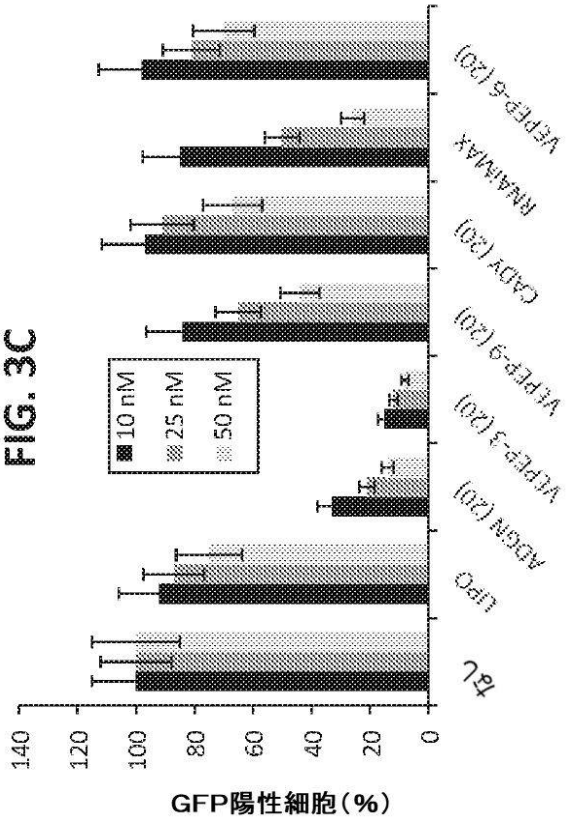
【図３Ａ】



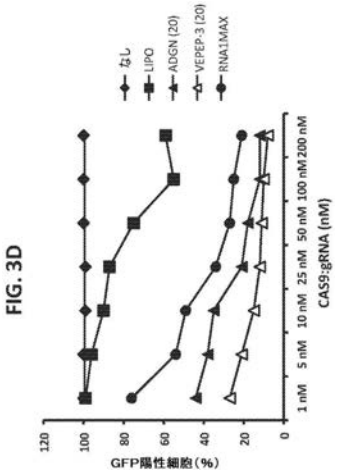
【図３Ｂ】



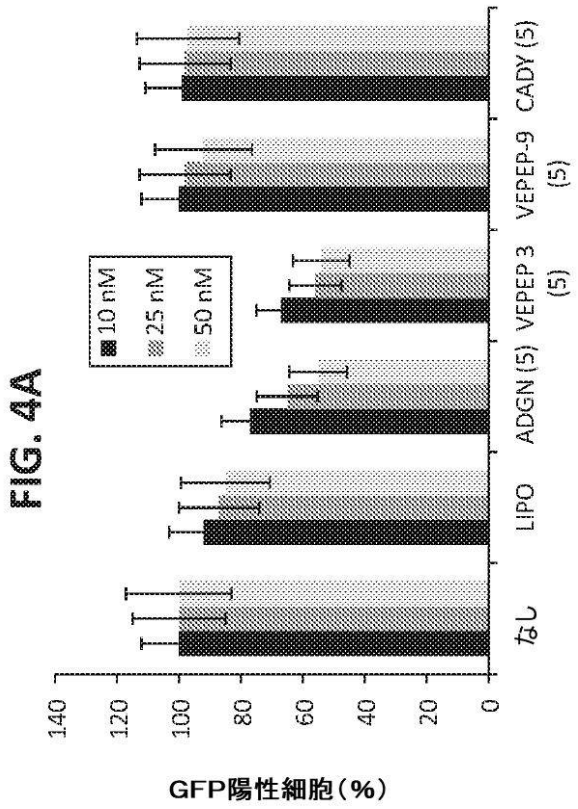
【図３Ｃ】



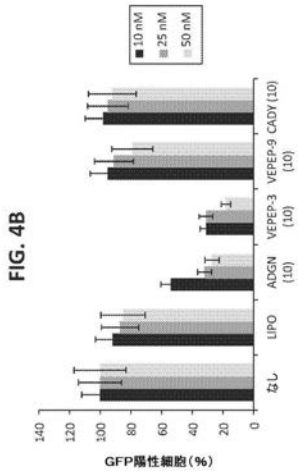
【図３Ｄ】



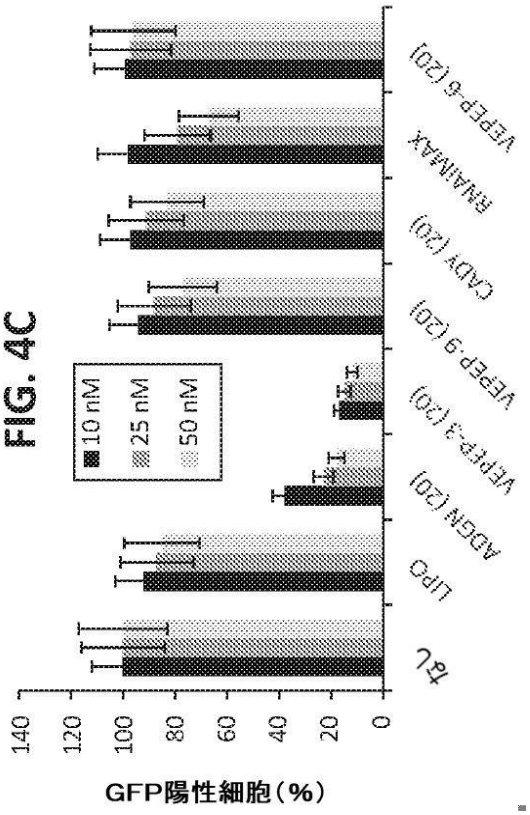
【図４Ａ】



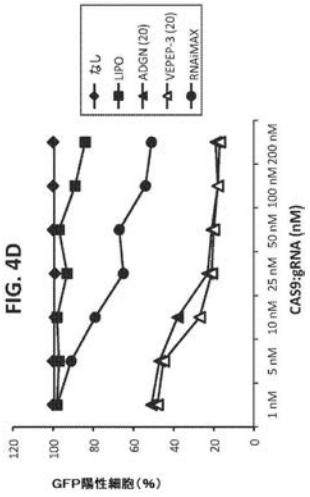
【図４Ｂ】



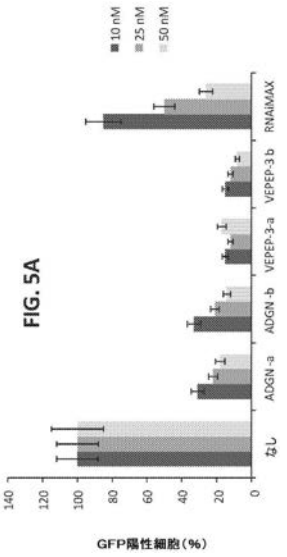
【図４Ｃ】



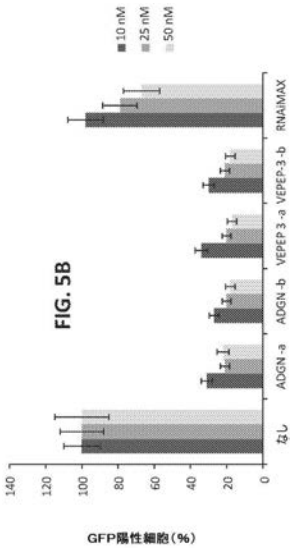
【図４Ｄ】



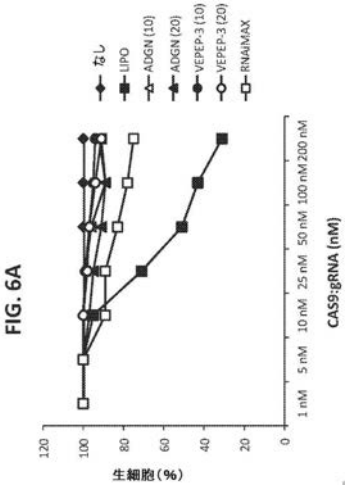
【図５Ａ】



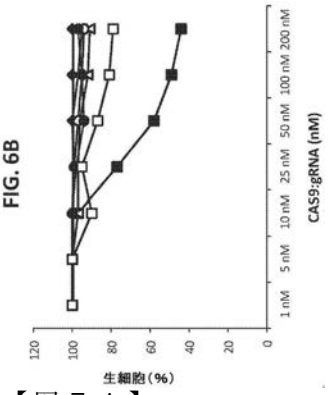
【図５Ｂ】



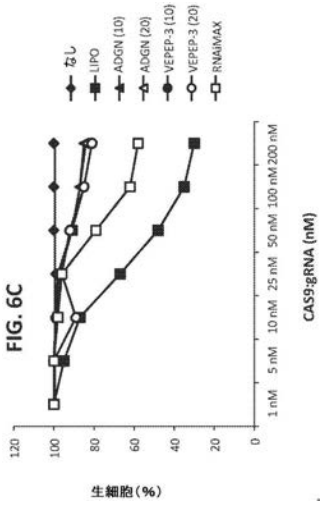
【図６Ａ】



【図６Ｂ】



【図６Ｃ】



【図７Ａ】

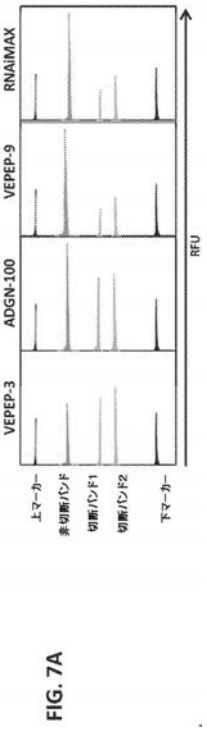


FIG. 7A

【図７Ｂ】

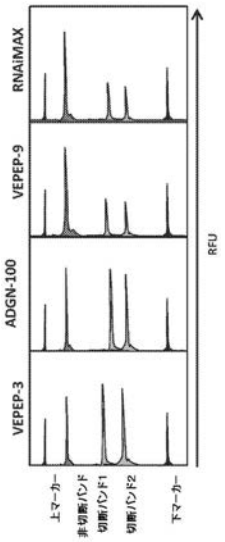


FIG. 7B

【図７Ｃ】

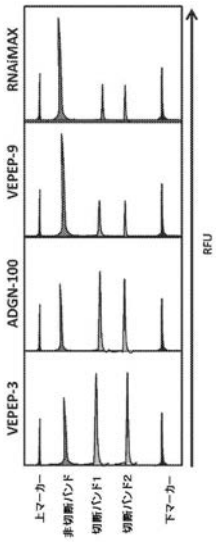


FIG. 7C

【図８Ａ】

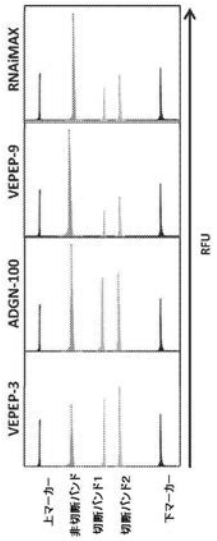


FIG. 8A

【図８Ｂ】

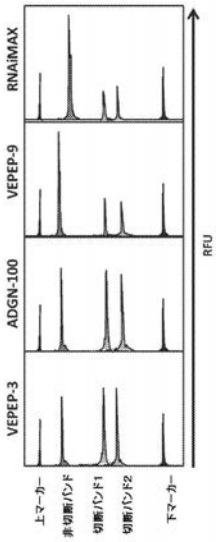


FIG. 8B

【図８Ｃ】

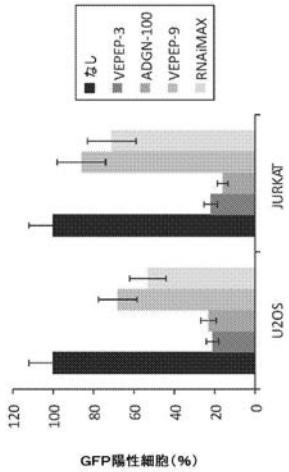
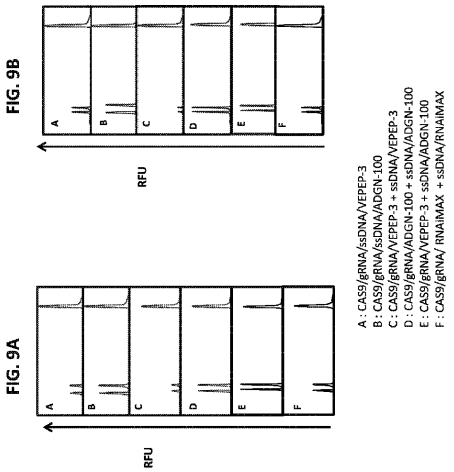


FIG. 8C

【図９Ａ－９Ｂ】



【図１０】

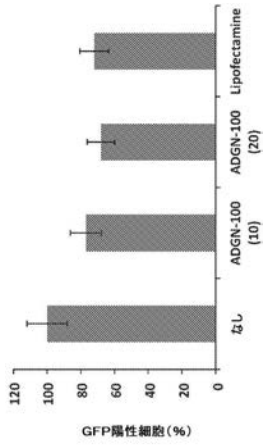


FIG. 10

【図１１】

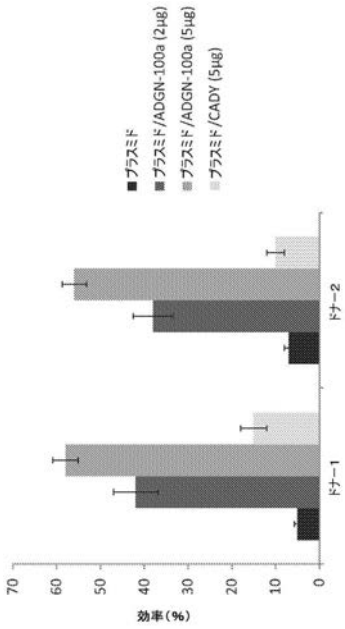


FIG. 11

【図１２】

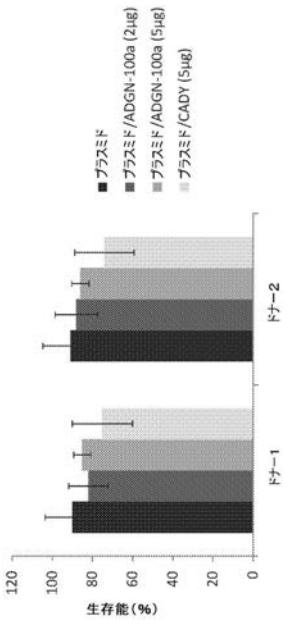


FIG. 12

【図１３】

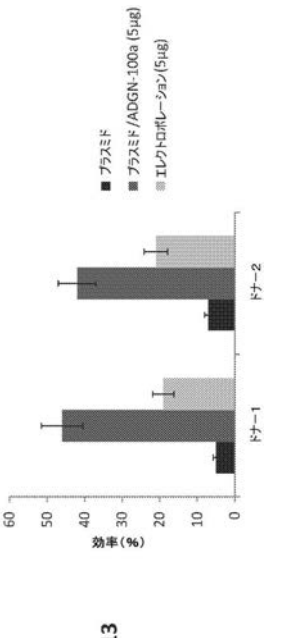


FIG. 13

【図１４】

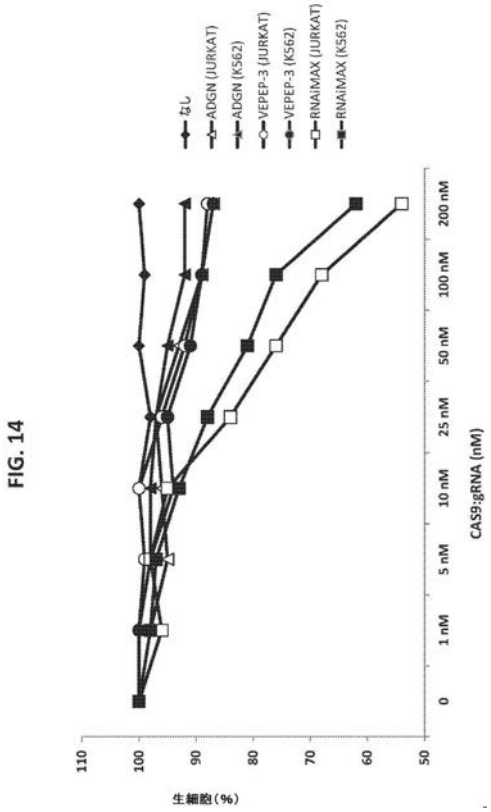


FIG. 14

【図１５】

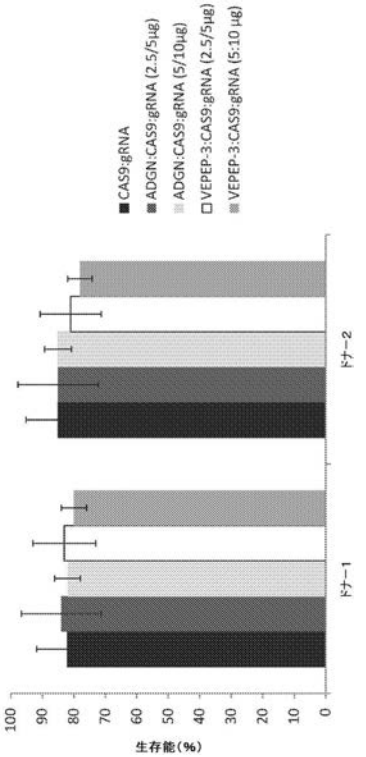
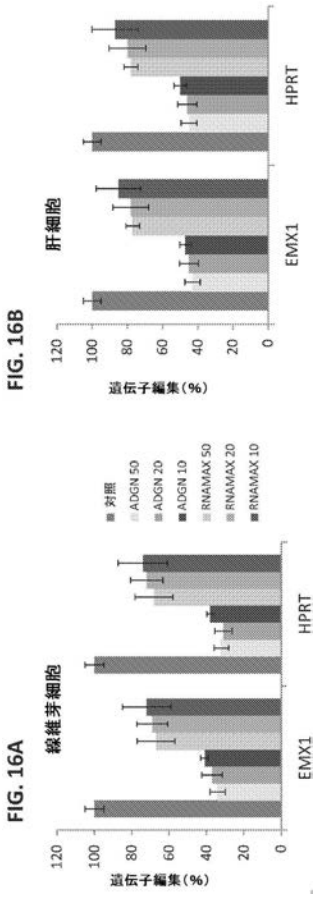
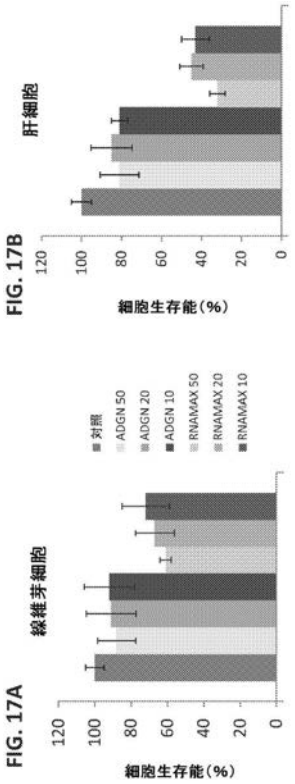


FIG. 15

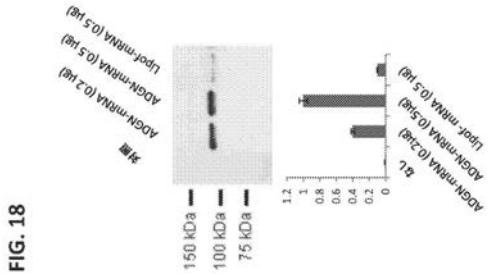
【図１６】



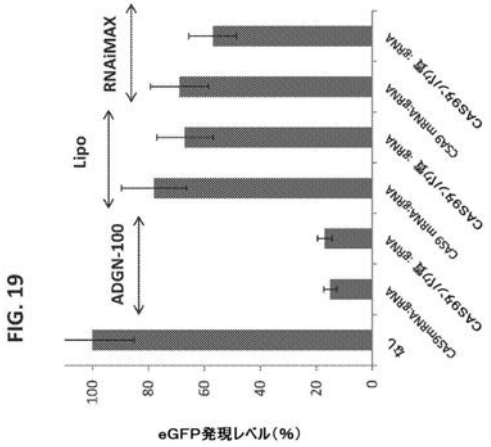
【図１７】



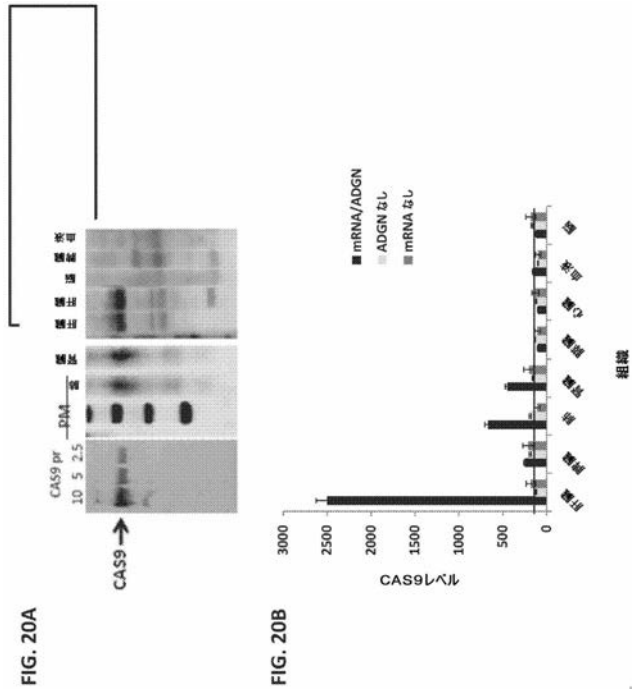
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【図２１】

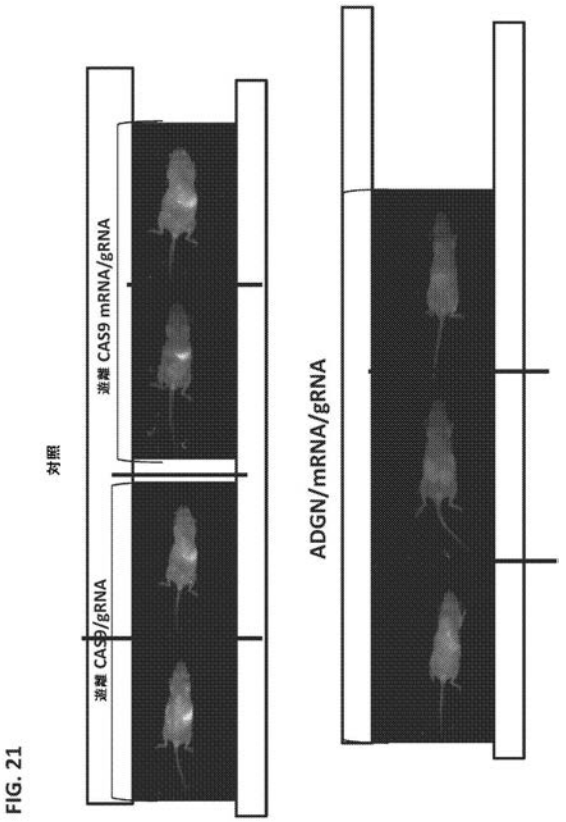


FIG. 21

【図２２】

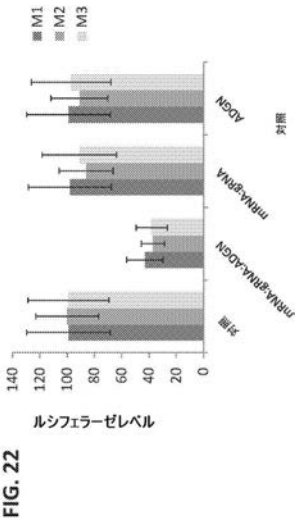


FIG. 22

【図２３】

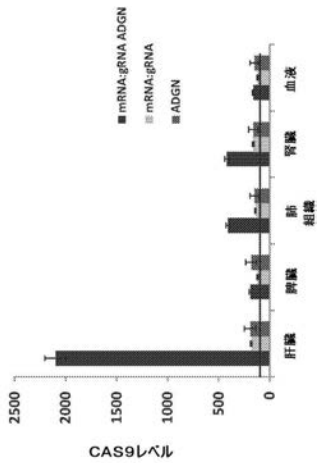


FIG. 23

【図２４】

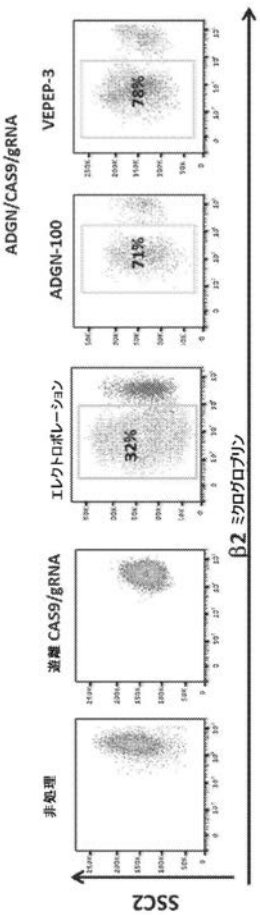
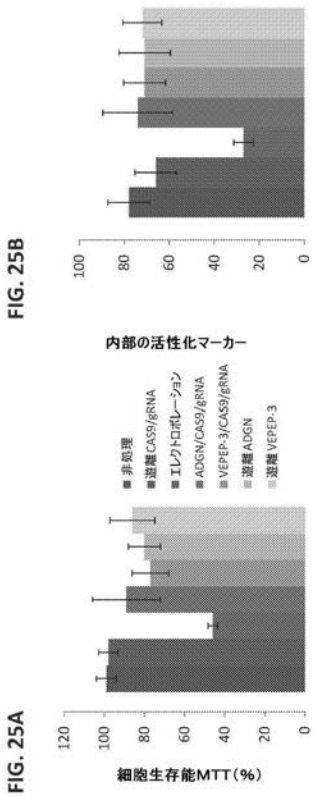
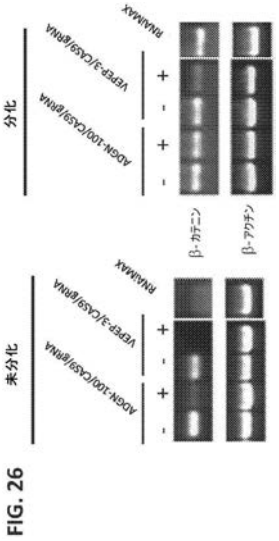


FIG. 24

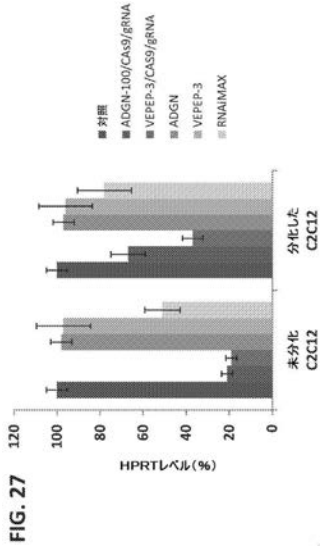
【図２５】



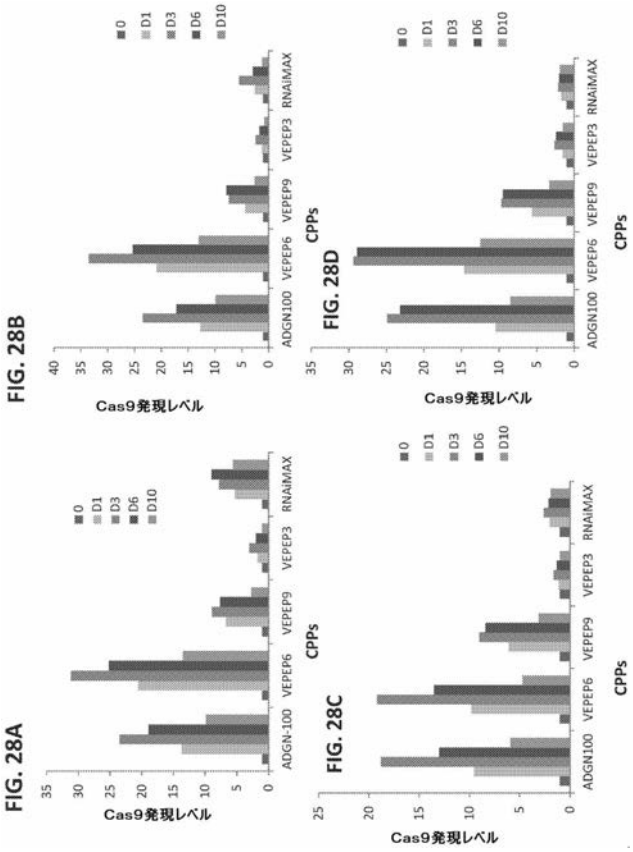
【図２６】



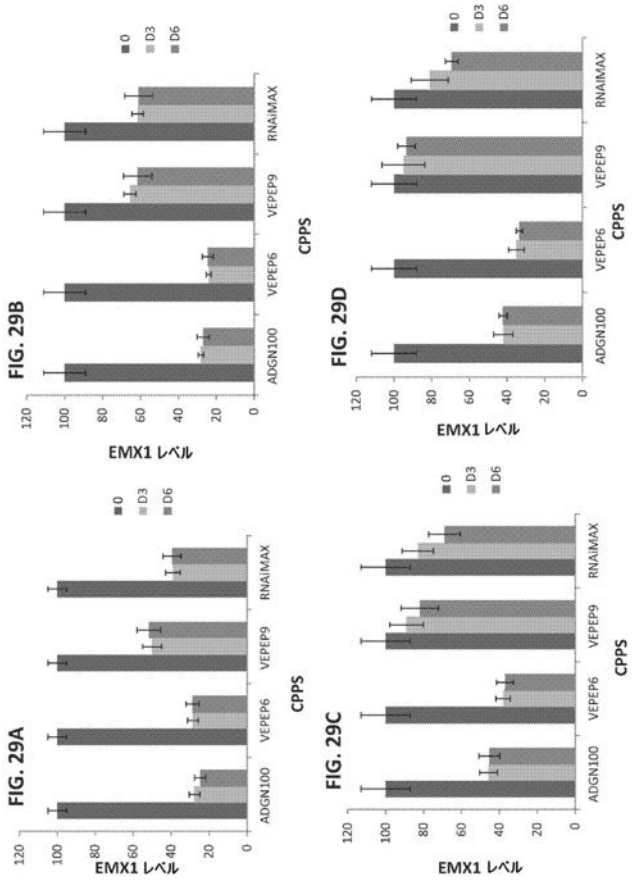
【図２７】



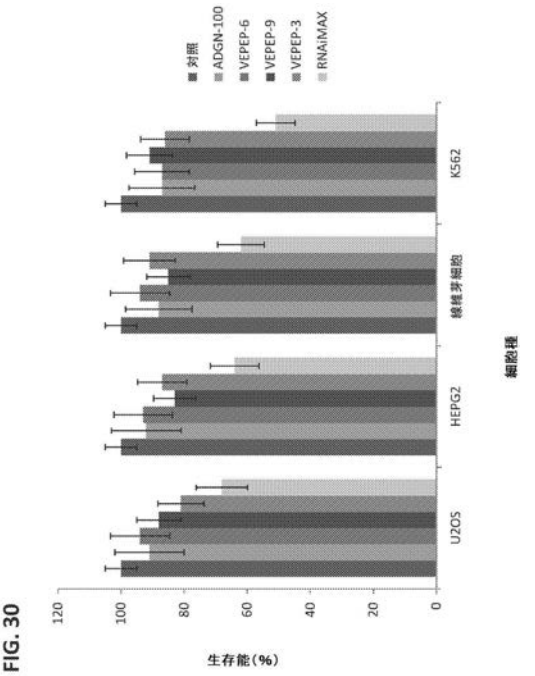
【図２８】



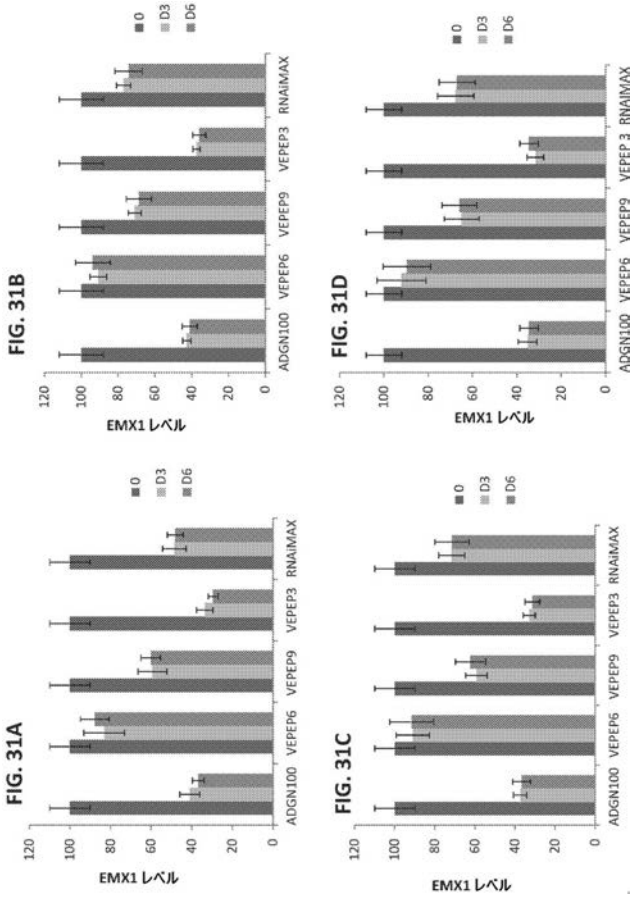
【図２９】



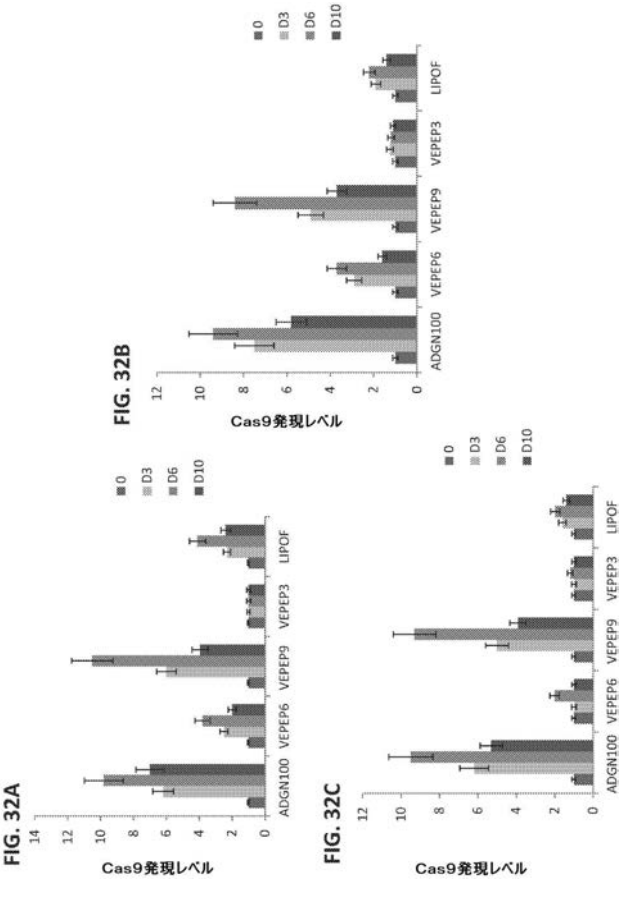
【図３０】



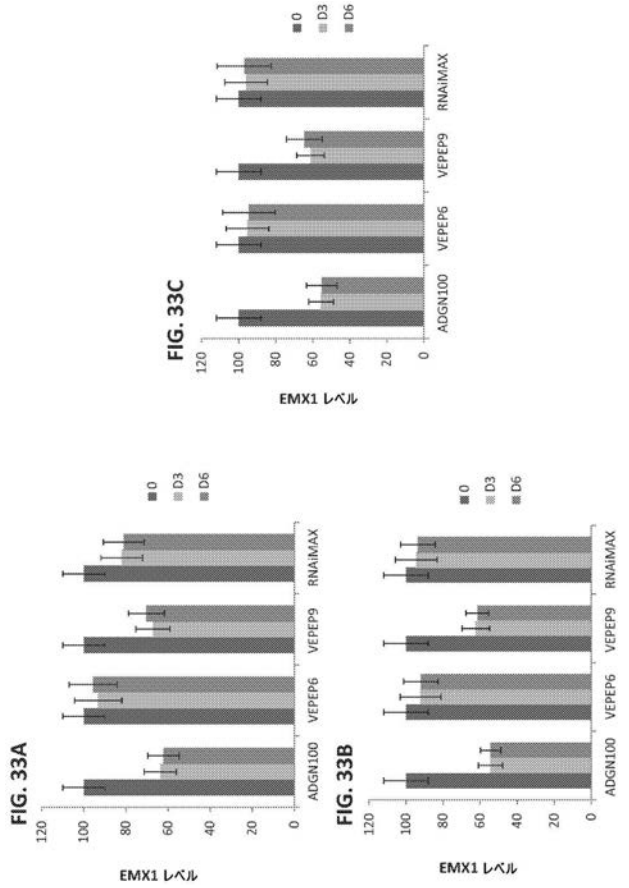
【図３１】



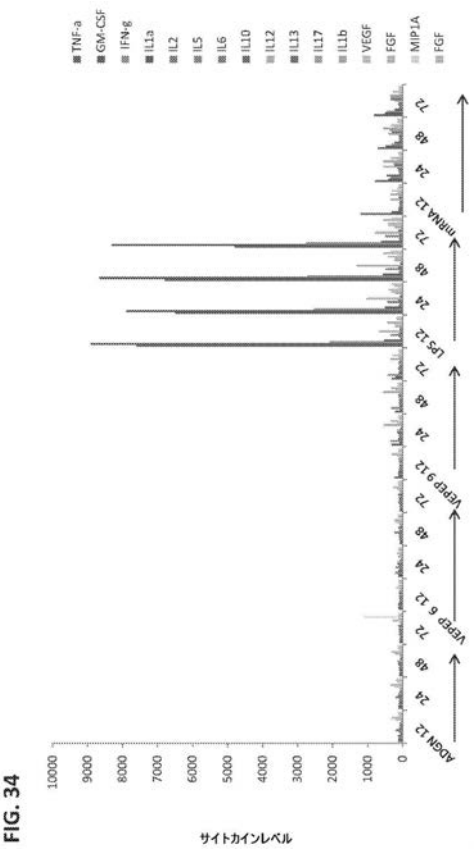
【図３２】



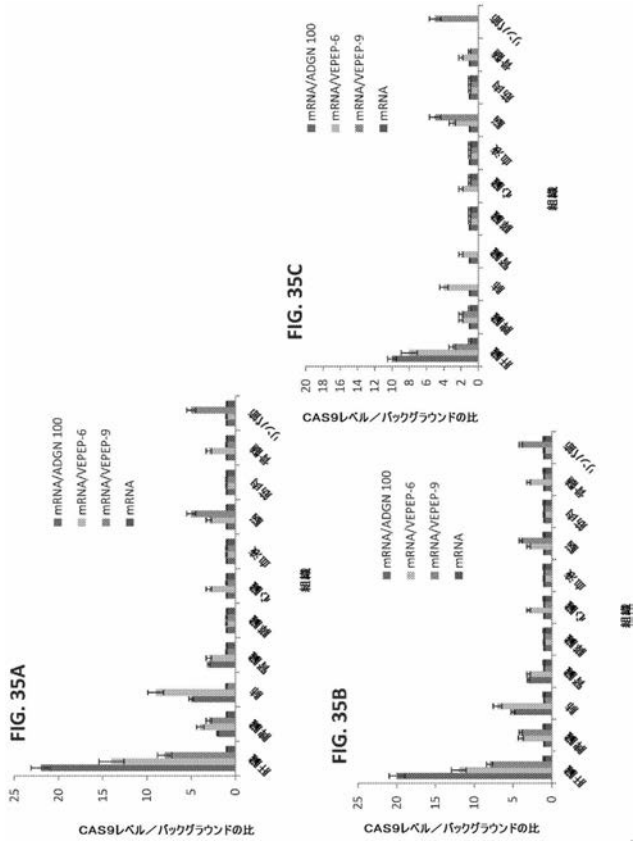
【図３３】



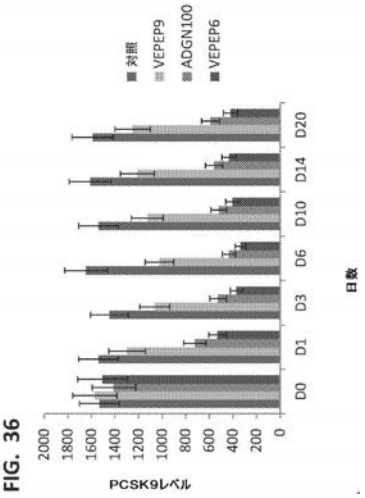
【図３４】



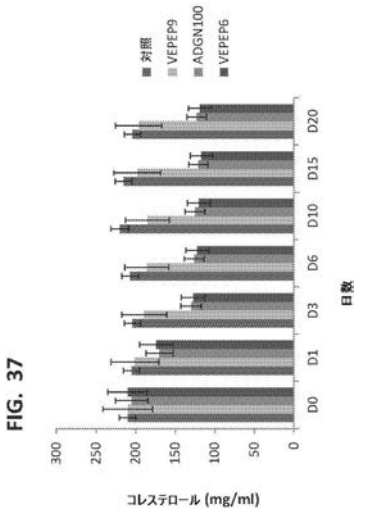
【図３５】



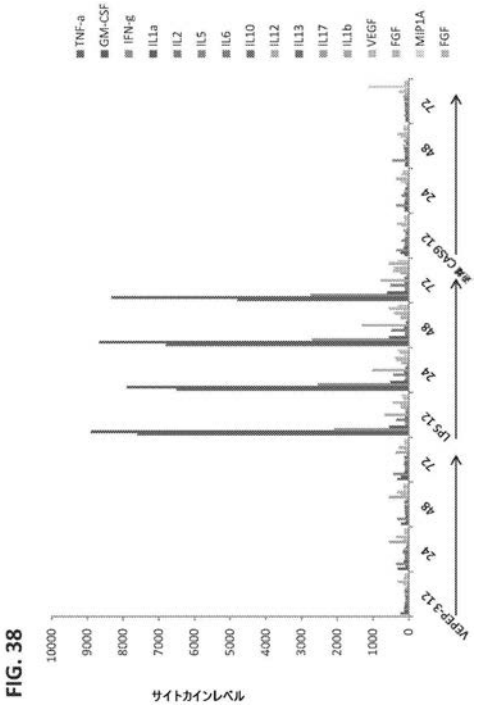
【図３６】



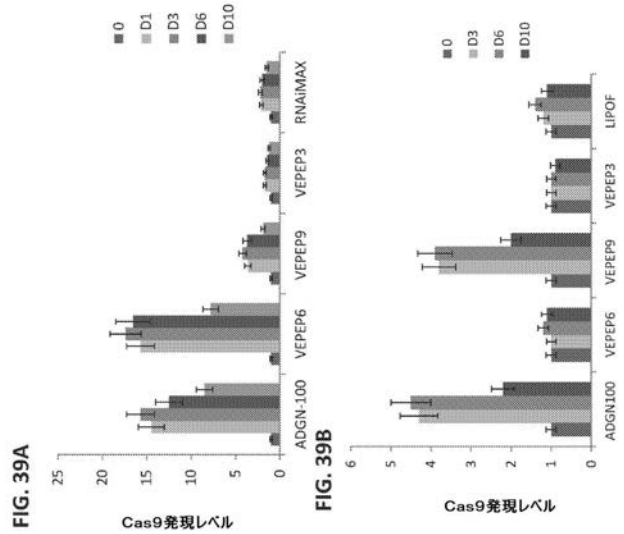
【図３７】



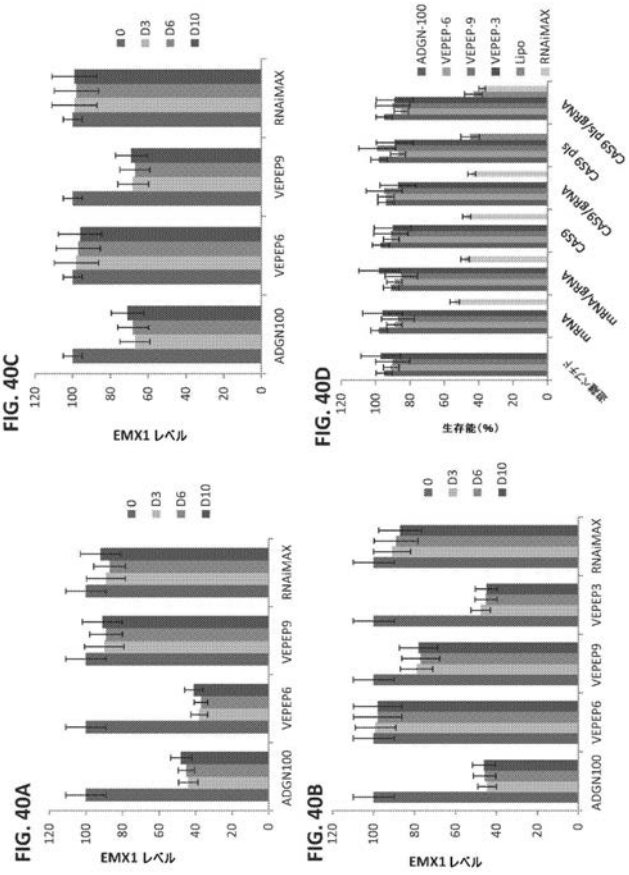
【図３８】



【図３９】



【図４０】



【配列表】
2019521659000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/034862

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K7/08 C12N15/113 C12N15/63 C12N9/22
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2014/053622 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 10 April 2014 (2014-04-10) page 5, line 17 - line 28; claims 1-29; examples 1-5	1-4, 14-95 11-13
Y A	WO 2016/073433 A1 (DU PONT [US]) 12 May 2016 (2016-05-12) page 56 - page 64; claims 1-19; examples 1-11; table 1	1-4, 14-95 11-13

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
24 October 2017	07/11/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schmidt-Yodlee, H

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/034862

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JIA LIU ET AL: "Cell-Penetrating Peptide-Mediated Delivery of TALEN Proteins via Bioconjugation for Genome Engineering", PLOS ONE, vol. 9, no. 1, 20 January 2014 (2014-01-20), page e85755, XP055396351, DOI: 10.1371/journal.pone.0085755	1-4, 14-95
A	the whole document	11-13
Y	S. RAMAKRISHNA ET AL: "Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA", GENOME RESEARCH, vol. 24, no. 6, 2 April 2014 (2014-04-02), pages 1020-1027, XP55128944, ISSN: 1088-9051, DOI: 10.1101/gr.171264.113	1-4, 14-95
A	the whole document	11-13
Y	WO 2015/086795 A1 (CELLECTIS [FR]) 18 June 2015 (2015-06-18)	1-4, 14-95
A	page 15 - page 16; claims 1-22	11-13
Y	WO 2013/176772 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; UNIV VIENNA [AT]; DOUDNA JENNIFER A [US]; JINEK) 28 November 2013 (2013-11-28)	1-4, 14-95
A	paragraphs [0123], [0211], [0254] - [0256], [0265], [0289]	11-13
Y	WO 2014/065596 A1 (TOOLGEN INC [KR]) 1 May 2014 (2014-05-01)	1-4, 14-95
A	claims 1-23; example 5	11-13
X,P	WO 2016/102687 A1 (AADIGEN LLC [US]; DIVITA GILLES [FR]; DESAI NEIL [US]) 30 June 2016 (2016-06-30) cited in the application paragraph [0005] - paragraph [0033]; claims 1-101	1,11-95

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/034862

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

2-4, 11-13(completely); 1, 14-95(partially)

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.

International Application No. PCT/US2017/034862

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2-4(completely); 1, 14-95(partially)

genome-editing complex comprising a cell-penetrating peptide (CPP), nanoparticle comprising the genome-editing complex, pharmaceutical composition comprising the genome-editing complex or nanoparticle, and its methods and kit, wherein the CPP is a VEPEP-3 peptide

---

2. claims: 5-7(completely); 1, 14-95(partially)

genome-editing complex comprising a cell-penetrating peptide (CPP), nanoparticle comprising the genome-editing complex, pharmaceutical composition comprising the genome-editing complex or nanoparticle, and its methods and kit, wherein the CPP is a VEPEP-6 peptide

---

3. claims: 8-10(completely); 1, 14-95(partially)

genome-editing complex comprising a cell-penetrating peptide (CPP), nanoparticle comprising the genome-editing complex, pharmaceutical composition comprising the genome-editing complex or nanoparticle, and its methods and kit, wherein the CPP is a VEPEP-9 peptide

---

4. claims: 11-13(completely); 1, 14-95(partially)

genome-editing complex comprising a cell-penetrating peptide (CPP), nanoparticle comprising the genome-editing complex, pharmaceutical composition comprising the genome-editing complex or nanoparticle, and its methods and kit, wherein the CPP is an ADGN-100 peptide

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/034862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014053622 A1	10-04-2014	EP 2951196 A1	09-12-2015
		ES 2627822 T3	31-07-2017
		US 2016089447 A1	31-03-2016
		US 2017258928 A1	14-09-2017
		WO 2014053622 A1	10-04-2014
		WO 2014053879 A1	10-04-2014
WO 2016073433 A1	12-05-2016	AU 2015343307 A1	25-05-2017
		CA 2966731 A1	12-05-2016
		EP 3215611 A1	13-09-2017
		KR 20170077238 A	05-07-2017
		WO 2016073433 A1	12-05-2016
WO 2015086795 A1	18-06-2015	AU 2014363476 A1	23-06-2016
		CA 2933134 A1	18-06-2015
		EP 3080256 A1	19-10-2016
		JP 2016539653 A	22-12-2016
		US 2016304893 A1	20-10-2016
		WO 2015086795 A1	18-06-2015
WO 2013176772 A1	28-11-2013	AU 2013266968 A1	20-11-2014
		AU 2017225060 A1	28-09-2017
		CA 2872241 A1	28-11-2013
		CL 2014003208 A1	19-06-2015
		CN 104854241 A	19-08-2015
		DE 202013012240 U1	02-02-2016
		DE 202013012241 U1	18-01-2016
		DE 202013012242 U1	02-02-2016
		DK 2800811 T3	17-07-2017
		EA 201401319 A1	29-05-2015
		EP 2800811 A1	12-11-2014
		EP 3241902 A1	08-11-2017
		ES 2636902 T3	10-10-2017
		GB 2518764 A	01-04-2015
		GB 2537000 A	05-10-2016
		HK 1204003 A1	06-11-2015
		HK 1207107 A1	22-01-2016
		HK 1211978 A1	03-06-2016
		HR P20171163 T1	06-10-2017
		JP 2015523856 A	20-08-2015
		KR 20150016588 A	12-02-2015
		LT 2800811 T	11-09-2017
		PE 03362015 A1	25-03-2015
		PH 12014502574 A1	21-01-2015
		PT 2800811 T	17-08-2017
		SG 10201701800Y A	27-04-2017
		SG 11201407702X A	30-12-2014
		TN 2014000493 A1	30-03-2016
		US 2014068797 A1	06-03-2014
		US 2016046961 A1	18-02-2016
		US 2016060653 A1	03-03-2016
		US 2016060654 A1	03-03-2016
		US 2016068864 A1	10-03-2016
		US 2016130608 A1	12-05-2016
		US 2016130609 A1	12-05-2016
		US 2016138008 A1	19-05-2016
		US 2017051310 A1	23-02-2017
		US 2017051312 A1	23-02-2017

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/034862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2017166893 A1	15-06-2017
		WO 2013176772 A1	28-11-2013
WO 2014065596 A1	01-05-2014	AU 2013335451 A1	07-05-2015
		AU 2015218519 A1	17-09-2015
		CA 2888190 A1	01-05-2014
		CN 104968784 A	07-10-2015
		CN 105441440 A	30-03-2016
		EP 2912175 A1	02-09-2015
		HK 1212732 A1	17-06-2016
		HK 1223125 A1	21-07-2017
		JP 2016027807 A	25-02-2016
		JP 2016500003 A	07-01-2016
		KR 20150101446 A	03-09-2015
		KR 20150101476 A	03-09-2015
		KR 20150101477 A	03-09-2015
		KR 20150101478 A	03-09-2015
		SG 11201503059X A	29-06-2015
		US 2015284727 A1	08-10-2015
		US 2015322457 A1	12-11-2015
		US 2015344912 A1	03-12-2015
		WO 2014065596 A1	01-05-2014
WO 2016102687 A1	30-06-2016	AU 2015370926 A1	13-07-2017
		CA 2971643 A1	30-06-2016
		EP 3237436 A1	01-11-2017
		WO 2016102687 A1	30-06-2016

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５
Ａ６１Ｐ	*31/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12	
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*3/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｋ	*9/51*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/06	
Ａ６１Ｋ	*9/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51	
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/16	
Ａ６１Ｋ	*38/03*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ｂ８２Ｙ	*5/00*	*(2011.01)*	Ａ６１Ｋ	38/03	
Ｂ８２Ｙ	*40/00*	*(2011.01)*	Ｂ８２Ｙ	5/00	
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｂ８２Ｙ	40/00	
Ｃ１２Ｎ	*5/0787*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	
Ｃ１２Ｎ	*5/0786*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0787	
Ｃ１２Ｎ	*5/0784*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0786	
Ｃ１２Ｎ	*5/0781*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0784	
Ｃ１２Ｎ	*5/0783*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0781	
Ｃ１２Ｎ	*5/0793*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	
Ｃ１２Ｎ	*5/074*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0793	
			Ｃ１２Ｎ	5/074	

(31)優先権主張番号 62/342,823
(32)優先日 平成28年5月27日(2016.5.27)
(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,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,TZ

(72)発明者 ディビタ, ジル
フランス国 ３４７２５ サン－タンドレ－ド－サンゴニ, リュ スー レ ゼール ２６ ビス
(72)発明者 デサイ, ニール
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９０２７２, パシフィック パリセーズ, ルナ ビスタ ドライブ １３４３

Ｆターム(参考) 4B050 CC07 KK13 KK18 LL01
4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AA94X AA94Y BD35 BD44 CA24 CA44

4C076 AA31 AA65 CC04 CC10 CC15 CC16 CC17 CC21 CC26 CC27
CC29 CC35
4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA02 BA08 BA18 BA23 MA41 MA52
MA56 MA58 MA63 MA66 NA14 ZA331 ZA332 ZA591 ZA592 ZA751
ZA752 ZA811 ZA812 ZB111 ZB112 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZB331
ZB332 ZC021 ZC022 ZC331 ZC332 ZC351 ZC352 ZC521 ZC522
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA16 BA17 EA20