(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-553010
(P2023-553010A)
(43)公表日　令和5年12月20日(2023.12.20)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/87　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/87	Ｚ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ　15/11　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｊ０２６
Ｃ１２Ｎ　15/13　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/13		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全76頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-534084(P2023-534084)
(86)(22)出願日　令和3年12月3日(2021.12.3)
(85)翻訳文提出日　令和5年8月2日(2023.8.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/061846
(87)国際公開番号　WO2022/120194
(87)国際公開日　令和4年6月9日(2022.6.9)
(31)優先権主張番号　63/121,202
(32)優先日　令和2年12月3日(2020.12.3)
(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,
最終頁に続く

(71)出願人　500415173
バテル・メモリアル・インスティテュート
ＢＡＴＴＥＬＬＥ ＭＥＭＯＲＩＡＬ ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ
アメリカ合衆国、オハイオ州、コロンバス、キング・アベニュー ５０５
５０５ Ｋｉｎｇ Ａｖｅｎｕｅ， Ｃｏｌｕｍｂｕｓ， ＯＨ ４３２０１－２６９６， Ｕ．Ｓ．Ａ．
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田 憲史
(74)代理人　100157956
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　非ウイルス性送達のためのポリマーナノ粒子およびＤＮＡナノ構造組成物ならびに方法

(57)【要約】
本発明は、非ウイルス送達のためのポリマーナノ粒子およびＤＮＡナノ構造送達組成物、ならびにそのための方法に関する。より詳細には、本発明は、可逆的付加－断片化連鎖移動（ＲＡＦＴ）ポリマー組成物などのポリマーナノ粒子送達組成物、およびＤＮＡ折り紙組成物などのＤＮＡナノ構造送達組成物であって、１つ以上のペイロードを送達するための、または３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを送達するための、ポリマーナノ粒子送達組成物、およびそのための方法に関する。

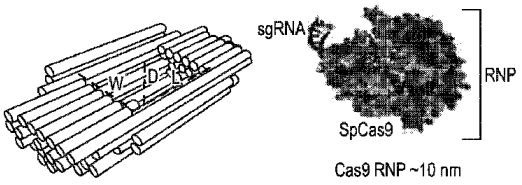


Fig. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、１つ以上のオリゴヌクレオチドがＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを含み、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含む、ＤＮＡナノ構造送達組成物。
【請求項２】
１つ以上のペイロードが核酸を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
核酸がリボ核タンパク質を含む、請求項２に記載の組成物。
【請求項５】
ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、請求項２に記載の組成物。
【請求項６】
ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項２に記載の組成物。
【請求項７】
ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項９】
標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、請求項７に記載の組成物。
【請求項１０】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１２】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１３】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合している、請求項１に記載の組成物。
【請求項１４】
ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１５】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、請求項１に記載の組成物。
【請求項１６】
３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１７】
ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１８】
核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上

、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、請求項１に記載の組成物。

【請求項１９】

ペイロードが逆転写酵素を含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項２０】

ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドが、Ｍ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項２１】

１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、請求項２に記載の組成物。

【請求項２２】

ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、請求項１に記載の組成物。

【請求項２３】

オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、請求項２１に記載の組成物。

【請求項２４】

空洞が、蓋とヒンジによって覆われており、蓋が閉じられたときにペイロードが空洞内に完全に封入されることを可能にする、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２５】

蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスカフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、請求項２４に記載の組成物。

【請求項２６】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項２７】

薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、請求項２６に記載の組成物。

【請求項２８】

ＤＮＡナノ構造が１種以上のポリマーでコーティングされている、請求項１に記載の組成物。

【請求項２９】

１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３０】

１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３１】

１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３２】

１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３３】

ＤＮＡナノ構造が、細胞にターゲティングするためのターゲティング成分をさらに含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項３４】

ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、請求項３３に記載の組成物。

【請求項３５】

標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、請求項３４に記載の組成物。

【請求項３６】
ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３７】
ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）該ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、該１つ以上のオリゴヌクレオチドが該ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを含むＤＮＡナノ構造送達組成物を患者に投与することを含む遺伝子治療のための方法であって、該組成物が、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含む、方法。
【請求項３８】
１つ以上のペイロードが核酸を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
核酸がリボ核タンパク質を含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４２】
ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４３】
ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４５】
標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４７】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４８】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４９】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合される、請求項３７に記載の方法。
【請求項５０】
ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項５１】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、請求項３７に記載の方法。
【請求項５２】
３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項５３】

ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項５４】
核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、請求項３７に記載の方法。
【請求項５５】
ペイロードが逆転写酵素を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項５６】
ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドがＭ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項５７】
１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項５８】
ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、請求項３７に記載の方法。
【請求項５９】
オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、請求項５７に記載の方法。
【請求項６０】
空洞が蓋とヒンジによって覆われ、蓋が閉じられたときにペイロードが空洞内に完全に封入されることを可能にする、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスキャフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
薬学的に許容される担体を患者に投与することをさらに含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項６３】
薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
ＤＮＡナノ構造が１つ以上のポリマーでコーティングされている、請求項３７に記載の方法。
【請求項６５】
１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６７】
１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６８】
１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６９】
ＤＮＡナノ構造が、患者の細胞に標的化するための標的化成分をさらに含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項７０】
ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオ

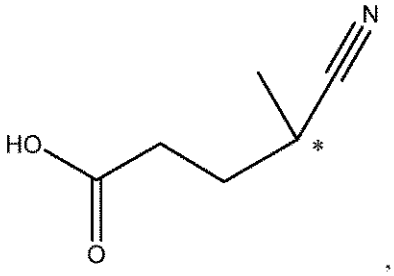
チドである、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、請求項７０に記載の方法。
【請求項７３】
患者が、癌、筋肉障害、肺障害、皮膚障害、神経疾患、神経線維腫症１、およびヘモグロビン症からなる群から選択される疾患または障害を有する、請求項３７に記載の方法。
【請求項７４】
癌が、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、子宮癌、卵巣癌、子宮内膜癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、食道の癌、内分泌系の癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、中皮腫、膀胱癌、腎臓癌、中枢神経系の新生物、脳腫瘍、および腺癌からなる群から選択される、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
皮膚障害が黄色ブドウ球菌感染症である、請求項７３に記載の方法。
【請求項７６】
筋障害が筋ジストロフィーである、請求項７３に記載の方法。
【請求項７７】
ＤＮＡナノ構造送達組成物が患者の細胞に対して細胞毒性を有さない、請求項３７に記載の方法。
【請求項７８】
ＤＮＡナノ構造送達組成物を患者の細胞に標的化する方法であって、患者に投与することを含む方法であって、該方法は、ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）該ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、該１つ以上のオリゴヌクレオチドが該ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを患者に投与することを含み、該組成物が、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含み、該ＤＮＡナノ構造が、該患者の細胞に標的化するための標的化成分を含む、方法。
【請求項７９】
１つ以上のペイロードが核酸を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
核酸がリボ核タンパク質を含む、請求項７９に記載の方法。
【請求項８２】
ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、請求項７９に記載の方法。
【請求項８３】
ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項７９に記載の方法。
【請求項８４】
ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項８６】
標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、請求項８４に記載の方法。
【請求項８７】

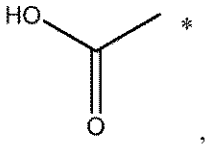
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項８８】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項８９】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項９０】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合される、請求項７８に記載の方法。
【請求項９１】
ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項９２】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、請求項７８に記載の方法。
【請求項９３】
３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項９４】
ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項９５】
核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、請求項７８に記載の方法。
【請求項９６】
ペイロードが逆転写酵素を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項９７】
ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドが、Ｍ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項９８】
１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、請求項７９に記載の方法。
【請求項９９】
ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、請求項７８に記載の方法。
【請求項１００】
オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、請求項９８に記載の方法。
【請求項１０１】
空洞が蓋とヒンジで覆われ、蓋が閉じられるとペイロードが空洞内に完全に収納される、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスキャフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０３】
ＤＮＡナノ構造が１つ以上のポリマーでコーティングされている、請求項７８に記載の方法。
【請求項１０４】

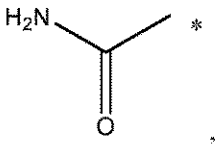
１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０６】
１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０７】
１つまたは複数のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０８】
ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、請求項７８に記載の方法。
【請求項１０９】
標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１１】
空洞が蓋とヒンジで覆われており、ＤＮＡナノ構造送達組成物が患者の細胞に関連するＤＮＡ、ＲＮＡ、または抗原と接触したときに蓋が開く、請求項１００に記載の方法。
【請求項１１２】
非ウイルス性遺伝子送達組成物の多様なセットを合成するステップであって、各非ウイルス性遺伝子送達組成物は、組成物特性のセットの少なくとも１つに関して、多様なセットの各他の非ウイルス性遺伝子送達組成物と異なる、ステップ、
多様なセットの各非ウイルス遺伝子送達組成物の１つまたは複数の品質属性を同時に試験するステップ、および
テストの結果を使用して、組成特性と品質属性とを相関させる予測モデルを作成するステップ、
を含む方法。
【請求項１１３】
組成物の特性が、分子量、分岐の程度、イオン化可能な基の数、コア対コロナ分子量比、親水性、疎水性、凝集傾向、サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、および表面電荷のうちの１つ以上を含む、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
品質属性が、細胞毒性、免疫原性、トランスフェクション効率、ゼータ電位、サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、および負荷効率のうちの１つ以上を含む、請求項１１２または請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１５】
多様なセットが数百種類の非ウイルス性遺伝子送達組成物を含む、請求項１１２～１１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１６】
多様なセットが数千の非ウイルス性遺伝子送達組成物からなる、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
多様なセットの非ウイルス遺伝子送達組成物の各々が、請求項１～３６のいずれか一項に記載のＤＮＡナノ構造送達組成物である、請求項１１２～１１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１８】
ａ．ＲＡＦＴ共重合プロセスにおける第１の連鎖移動剤から誘導される第１のキャッピ

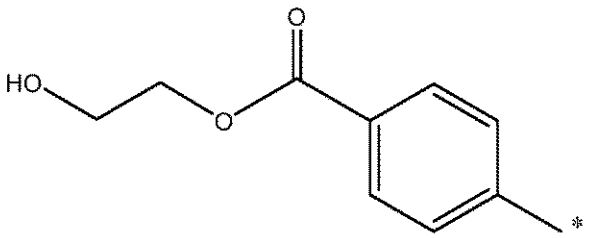
ングユニットを含む第１の末端；
ｂ．第１の反応性官能基に共有結合した１つ以上のモノマー単位から調製され、約２０ｋＤａ～約８０ｋＤａの範囲の分子量（M_n）および約２０～約４００の範囲の重合度を有する第１のブロック；
ｃ．第１のブロックに共有結合した１つ以上のモノマー単位から調製され、約５ｋＤａ～約８０ｋＤａの範囲の分子量（M_n）および約１０～約５００の範囲の重合度を有する第２のブロック；および
ｄ．第２の連鎖移動剤由来の第２のキャッピングユニットを含む第２の末端；
を含むＲＡＦＴブロックコポリマーであって、ＲＡＦＴブロックコポリマーは、約２５ｋＤａ～約１６０ｋＤａの範囲の全分子量（M_n）、約３０～約９００の範囲の全重合度、約１０～約６０ｎｍの範囲のターゲットサイズ、および約１～約４の最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）のうちの１つ以上を有する、ＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１１９】
第１のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から選択される１つ以上のモノマー単位から調製される、請求項１１８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２０】
第１のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つから調製される、請求項１１８または１１９に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２１】
第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から選択される１つまたは複数のモノマー単位から調製される、請求項１１８～１２０のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２２】
第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位から調製されるランダムコポリマーである、請求項１１８～１２１のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２３】
第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される３つの異なるモノマー単位から調製されるランダムコポリマーである、請求項１１８～１２１のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２４】
第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルから調製されるランダムコポリマーである、請求項１１８～１

２３のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２５】
各連鎖移動剤が、ビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネート、ビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネート、ビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネート、４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸、４－シアノ－４－（（フェニルカルボノチオイル）チオ）ペンタン酸、および４－シアノ－４－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］ペンタン酸からなる群から独立して選択される、請求項１１８～１２４のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２６】
第１のキャッピング単位が、式
【化１】

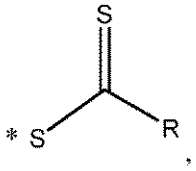


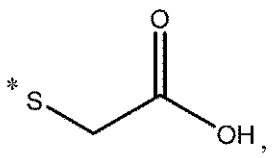
、


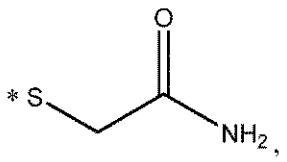
、


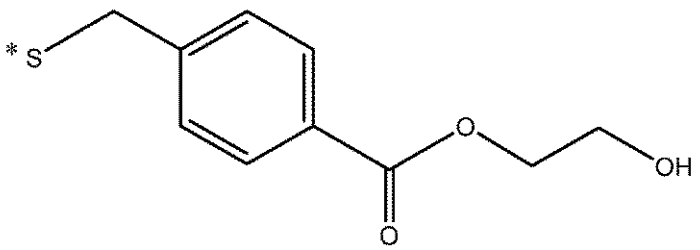
、または


［式中、＊は第一ブロックとの共有結合点を表す］、で示される、請求項１１８～１２５のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２７】
第２のキャッピング単位が、式
【化２】



、


、


、または


［式中、＊は第２ブロックへの共有結合点を表し、Ｒは－ＳＣ$_2$－Ｃ$_{12}$アルキルまたは－Ｃ$_6$Ｈ$_5$である］、で示される、請求項１１８～１２６のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
【請求項１２８】
ｉ．第１の連鎖移動剤、第１の開始剤、および１つまたは複数のモノマー単位を接触させて、第１のブロックを提供するステップ；

ｉｉ．第２の連鎖移動剤、第２の開始剤、および１つ以上のモノマー単位を接触させて、第２のブロックを提供するステップ
ｉｉｉ．第１のブロックと第２のブロックを、ブロックを結合させることができる条件下で接触させ、ＲＡＦＴブロックコポリマーを得るステップ、
を含むＲＡＦＴブロックコポリマーの調製方法。
【請求項１２９】
第１の連鎖移動剤がジアミノまたはジヒドロキシ連鎖移動剤であり、第２の連鎖移動剤がジカルボン酸連鎖移動剤である、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
第１の連鎖移動剤がビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネートまたはビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネートであり、第２の連鎖移動剤がビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネートである、請求項１２８または１２９に記載の方法。
【請求項１３１】
第１の連鎖移動剤がジカルボン酸連鎖移動剤であり、第２の連鎖移動剤がジアミノまたはジヒドロキシ連鎖移動剤である、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３２】
第１の連鎖移動剤がビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネートであり、第２の連鎖移動剤がビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネートまたはビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネートである、請求項１２８または１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
ステップ（ｉｉｉ）が、アミド化またはエステル化を促進し得る条件下で実施される、請求項１２８～１３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３４】
ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、請求項１２８～１３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３５】
ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つである、請求項１２８～１３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３６】
ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、請求項１２８～１３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３７】
ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位である、請求項１２８～１３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３８】

ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される３つの異なるモノマー単位である、請求項１２８～１３６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３９】

ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルである、請求項１２８～１３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４０】

ＲＡＦＴブロックコポリマーが、約２５ｋＤａ～約１６０ｋＤａの範囲の全分子量（Ｍｎ）、および約３０～約９００の範囲の全重合度、約１０～約６０ｎｍの範囲のターゲットサイズ、および約１～約４の最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）のうちの１つ以上を有する、請求項１２８～１３９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４１】

ｉ．マルチウェルプレート中に反応混合物のアレイを提供するステップ、ここで各ウェルは、第１の連鎖移動剤、第１の開始剤、１つ以上のモノマー単位、および任意に溶媒または溶媒混合物の混合物を含む；

ｉｉ．ＲＡＦＴ共重合を促進する条件下で各ウェルの混合物を反応させ、マルチウェルプレートのウェルに一連の第１ブロックコポリマーを供給するステップ；

ｉｉｉ．マルチウェルプレートのウェル内の反応をクエンチするステップ；

ｉｖ．マルチウェルプレートの各ウェルで第１のブロックコポリマーを精製するステップ；

ｖ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェル中の第１のブロックコポリマーを特性評価するステップ；

ｖｉ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェルで第１のブロックコポリマーを精製するステップ；

ｖｉｉ．マルチウェルプレートの各ウェルの第１のブロックコポリマーに、第２の連鎖移動剤、第２の開始剤、および１つ以上のモノマー単位、ならびに任意に溶媒または溶媒混合物を含む第２の反応混合物のアレイを接触させるステップ；

ｖｉｉｉ．ステップ（ｖｉｉ）の成分を、ＲＡＦＴ共重合を促進する条件下で反応させ、マルチウェルプレートのウェルに一連のＲＡＦＴブロックコポリマーを供給するステップ；

ｉｘ．マルチウェルプレートのウェル内の反応をクエンチするステップ；

ｘ．マルチウェルプレートの各ウェルでＲＡＦＴブロックコポリマーを精製するステップ；および

ｘｉ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェル中のＲＡＦＴブロックコポリマーを特性評価するステップ、

を含む、ＲＡＦＴブロックコポリマーのライブラリーを調製する方法。

【請求項１４２】

ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、エチルアクリル酸、プロピルアクリル酸、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、請求項１４１に記載の方法。

【請求項１４３】

ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリ

レート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つである、請求項１４１または１４２に記載の方法。

【請求項１４４】

ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、請求項１４１～１４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４５】

ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位である、請求項１４１～１４４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４６】

ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される３つの異なるモノマー単位である、請求項１４１～１４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４７】

ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルである、請求項１４１～１４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４８】

第１および第２の連鎖移動剤が同一または異なる、請求項１４１～１４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４９】

第１および第２の連鎖移動剤が同一である、請求項１４１～１４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５０】

第１および第２の連鎖移動剤が異なる、請求項１４１～１４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５１】

第１および第２の連鎖移動剤が、それぞれ独立して、ビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネート、ビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネート、ビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネート、４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸、４－シアノ－４－（（フェニルカルボノチオイル）チオ）ペンタン酸、および４－シアノ－４－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］ペンタン酸からなる群から選択される、請求項１４１～１５０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５２】

ステップ（ｉ）および（ｖｉｉ）で提供される溶媒または溶媒の混合物が、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、イソプロピルアルコール、ヘキサン、１，４－ジオ

キサン、およびテトラヒドロフランのうちの１つ以上である、請求項１４１～１５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５３】
ステップ（ｉｉ）および（ｖｉｉｉ）がそれぞれ、ステップ（ｉ）および（ｖｉｉ）の飽和溶媒の雰囲気下で実施される、請求項１４１～１５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５４】
ステップ（ｖ）および（ｘｉ）における特徴付けが、濃度またはイオン強度に対する相互作用パラメーターまたは第２のビリアル係数の変化を測定するための、マルチウェルプレート動的光散乱装置を用いた高スループットゼータ電位測定、またはポリマーの示差屈折率の高スループット測定である、請求項１４１～１５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５５】
クエンチングステップ（ｉｉｉ）および（ｉｘ）が、マルチウェルプレートを酸素に曝露することによって実施される、請求項１４１～１５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５６】
精製工程（ｉｖ）および（ｘ）が、マルチウェル形式における濾過、透析濾過または透析を介して実施される、請求項１４１～１５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５７】
請求項１１８～１２７のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または請求項１２８～１５６のいずれか一項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含む組成物。
【請求項１５８】
請求項１１８～１２７のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または請求項１２８～１５６のいずれか一項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含むＲＡＦＴブロックコポリマー結合体であって、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれる第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基を介してＲＡＦＴブロックコポリマーに共有結合的に結合した生体分子、薬物、または標識をさらに含む、ＲＡＦＴブロックコポリマー結合体。
【請求項１５９】
生体分子とＲＡＦＴブロックコポリマーとが、アミド結合またはエステル結合を介して共有結合している、請求項１５８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー結合体。
【請求項１６０】
請求項１１８～１２７のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または請求項１２８～１５６のいずれか一項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーと、生体分子、薬物、または標識とを含むＲＡＦＴブロックコポリマー結合体を調製する方法であって、ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬物、または標識とが、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれる第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基を介して共有結合している、方法。
【請求項１６１】
ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬物、または標識との間に、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれた第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基のＥＤＣ－ＮＨＳ反応を介して共有結合が形成される、請求項１６０に記載の方法。
【請求項１６２】
官能基が、ＥＤＣ－ＮＨＳ化学を介して生体分子、薬剤、または標識上の第一級アミンと反応するカルボキシレート基である、請求項１６０または１６１に記載の方法。
【請求項１６３】
ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬剤、または標識とがアミド結合を介して共有結合している、請求項１６０～１６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６４】
第１または第２の連鎖移動剤が、２－（ドデシルチオカーボンチオイルチオ）－２－メチルプロピオン酸または４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルフ

ァニルペンタン酸である、請求項１６０～１６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６５】
生体分子がタンパク質である、請求項１６０～１６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６６】
標識がアビジンまたはビオチンである、請求項１６０～１６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６７】
請求項１１８～１２７のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または請求項１２８～１５６のいずれか一項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含み、静電相互作用を介してＲＡＦＴブロックコポリマーに複合化されたペイロードをさらに含む、ＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１６８】
ペイロードが核酸を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１６９】
核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、請求項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７０】
核酸がリボ核タンパク質を含む、請求項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７１】
ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、請求項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７２】
ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７３】
ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、請求項１７２に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７４】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７５】
標的酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、請求項１７３に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７６】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７７】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７８】
ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１７９】
ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９がデアミナーゼと融合している、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８０】
ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８１】

ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８２】
ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８３】
ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８４】
ペイロードが核酸であり、核酸ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８５】
ペイロードが逆転写酵素を含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８６】
薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８７】
薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、請求項１８６に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８８】
細胞にターゲティングするためのターゲティング成分をさらに含む、請求項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
【請求項１８９】
請求項１６７～１８８のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーを患者に投与することを含む遺伝子治療方法。
【請求項１９０】
ポリマーナノ粒子組成物を患者の細胞に標的化する方法であって、患者に請求項１６７～１８８のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーを投与することを含む、方法。
【請求項１９１】
多様なセットの非ウイルス性遺伝子送達組成物の各々が、請求項１１８～１２７のいずれか一項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーである、請求項１１２～１１６のいずれか１つに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願との相互参照
【０００２】
本出願は、２０２０年１２月３日に出願された米国仮出願第６３／１２１，２０２号に対する３５ＵＳＣ§１１９（ｅ）に基づく優先権を主張し、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
開示分野
【０００４】
本発明は、非ウイルス送達のためのポリマーナノ粒子およびＤＮＡナノ構造送達組成物、ならびにそのための方法に関する。より詳細には、本発明は、ポリマーナノ粒子送達組成物、例えば可逆的付加－断片化鎖移動（ＲＡＦＴ）ポリマー組成物、およびＤＮＡナノ

構造送達組成物、例えばＤＮＡ折り紙組成物であって、例えば１つ以上のペイロードの送達のため、または３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードの送達のための、ポリマーナノ粒子送達組成物、およびそのための方法に関する。

【背景技術】

【０００５】

背景と概要

【０００６】

遺伝子治療薬（遺伝子治療、遺伝子サイレンシング、スプライシング調節因子、ヌクレアーゼベースの遺伝子エディターなど）は、ワクチン、感染症治療、抗菌治療、抗ウイルス治療、そして最も注目すべきは遺伝病治療など、革命的な治療法を生み出す態勢を整えている。しかし、遺伝子医薬の有効性や安全性を低下させる組織や細胞を避けながら、治療が必要な特定の組織や細胞にこれらの遺伝子医薬のペイロードをインビボで送達することは、重要な課題となっている。その他の課題としては、大きな遺伝子ペイロードや複数のペイロードを運搬する能力などがある。アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、遺伝子医薬のデリバリーに最も広く使われているツールであるが、ＡＡＶは大きな遺伝子ペイロードや複数のペイロード（ＣＲＩＳＰＲ（ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ）／Ｃａｓ９システムのような）をデリバリーできず、時には細胞媒介反応である抗ＡＡＶ抗体の生成など、望ましくない免疫反応を引き起こすことがある。患者におけるＡＡＶによる免疫反応の中には、致命的な免疫反応を引き起こす可能性のあるものもある。

【０００７】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムに基づく治療薬は、精密かつプログラム可能な遺伝子編集が可能であるため、多くの遺伝性疾患を治療できる特別な可能性を秘めている。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムを用いた遺伝子編集・修復には、ランダムなインデル変異を誘発することで切断部位を修復する非相同末端接合（ＮＨＥＪ）と、あらかじめ存在する鋳型に基づいて切断部位を修復する相同性指向性修復（ＨＤＲ）という２つの主要なメカニズムがある。ＨＤＲ指向性修復には、あらかじめデザインされたテンプレートを用いることができるため、このメカニズムに基づく治療法は、数多くの異なる遺伝病を治療するために調整できる。しかし、主な課題は、ＨＤＲ修復にはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、スモールガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）、ドナーＤＮＡ鎖を同時に特定の場所に送達する必要があることだ。この要件は、インビボでの応用において特に制限的となる。なぜなら、複数の大きな分子を同じ標的部位に確実に共送達することは、現在のところ実現不可能だからである。例えば、Ｃａｓ９酵素配列とガイドＲＮＡ複合体は大きすぎてＡＡＶには入らない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

したがって、遺伝子導入システムを含む、効果的な非ウイルス導入システムが必要とされている。リポソームのような現在の最先端の非ウイルス性遺伝子導入システムには、生体適合性に劣り、容易に工学的あるいは機能化できないなど、多くの欠点がある。さらに、このような非ウイルス性遺伝子導入システムは、細胞内あるいは細胞間コンパートメントを通過する際に、さまざまな酵素によって容易に分解されること、そしてこれらのシステムは、複数の大きなペイロードをパッケージ化できないことが懸念される。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明者らは、ポリマーナノ粒子（例えば、ＲＡＦＴポリマー）およびＤＮＡナノ構造送達組成物（例えば、ＤＮＡ折り紙ナノ構造）を設計した。これらの組成物は、生体適合性があり、毒性がなく、さまざまな方法でプログラムできるという利点がある。例えば、ポリマーナノ粒子およびＤＮＡナノ構造送達組成物は、早期の分解を回避することを可能にし、免疫応答を回避することを可能にし、細胞内イメージングおよび治療遺伝子の標的

化された制御された送達を可能にする機能性基を有するようにプログラムできる。したがって、これらの非ウイルス送達組成物は、免疫回避、組織指向性細胞内送達、および大きな遺伝子ペイロードまたは複数のペイロードを送達する能力を提供することにより、遺伝子医薬ペイロードの安定性、安全性、および／または有効性を高めることができる。

【００１０】

以下の条項およびその組み合わせは、本明細書で説明する本発明のさまざまな追加の例示的態様を提供する。本特許出願の「例示的実施形態の詳細な説明」と題されたセクションおよび「実施例」を含む他のセクションに記載された様々な実施形態は、以下の番号付けされた条項に記載された本発明の実施形態のいずれにも適用可能である。

１．　ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、１つ以上のオリゴヌクレオチドがＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを含み、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含む、ＤＮＡナノ構造送達組成物。

２．　１つ以上のペイロードが核酸を含む、項１に記載の組成物。

３．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項２に記載の組成物。

４．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項２に記載の組成物。

５．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、項２に記載の組成物。

６．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項２に記載の組成物。

７．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項６に記載の組成物。

８．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項１に記載の組成物。

９．　標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項７に記載の組成物。

１０．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１に記載の組成物。

１１．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項１に記載の組成物。

１２．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１に記載の組成物。

１３．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合している、項１に記載の組成物。

１４．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、項１に記載の組成物。

１５．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項１に記載の組成物。

１６．　３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項１に記載の組成物。

１７．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項１に記載の組成物。

１８．　核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項１に記載の組成物。

１９．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項１に記載の組成物。

２０．　ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドが、Ｍ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、項１に記載の組成物。

２１．　１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、項２に記載の組成物。

２２．　ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、項１に記載の組成物。

２３．　オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、項２１に記載

の組成物。
２４．　空洞が、蓋とヒンジによって覆われており、蓋が閉じられたときにペイロードが空洞内に完全に封入されることを可能にする、項２３に記載の組成物。
２５．　蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスカフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、項２４に記載の組成物。
２６．　薬学的に許容される担体をさらに含む、項１に記載の組成物。
２７．　薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、項２６に記載の組成物。
２８．　ＤＮＡナノ構造が１種以上のポリマーでコーティングされている、項１に記載の組成物。
２９．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、項２８に記載の組成物。
３０．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、項２８に記載の組成物。
３１．　１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、項２８に記載の組成物。
３２．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、項２８に記載の組成物。
３３．　ＤＮＡナノ構造が、細胞にターゲティングするためのターゲティング成分をさらに含む、項１に記載の組成物。
３４．　ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、項３３に記載の組成物。
３５．　標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、項３４に記載の組成物。
３６．　ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、項３４に記載の組成物。
３７．　ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）該ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、該１つ以上のオリゴヌクレオチドが該ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを含むＤＮＡナノ構造送達組成物を患者に投与することを含む遺伝子治療のための方法であって、該組成物が、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含む、方法。
３８．　１つ以上のペイロードが核酸を含む、項３７に記載の方法。
３９．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項３８に記載の方法。
４０．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項３８に記載の方法。
４１．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、項３８に記載の方法。
４２．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項３８に記載の方法。
４３．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項４２に記載の方法。
４４．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項３７に記載の方法。
４５．　標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項４３に記載の方法。
４６．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項３７に記載の方法。
４７．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項３７に記載の方法。
４８．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項３７に記載の方法。
４９．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合される、項３７に記載の方法。
５０．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態の

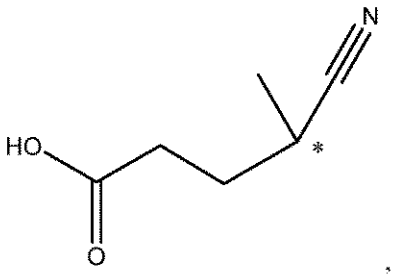
ドナーＤＮＡ鎖を含む、項３７に記載の方法。
５１．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項３７に記載の方法。
５２．　３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項３７に記載の方法。
５３．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項３７に記載の方法。
５４．　核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項３７に記載の方法。
５５．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項３７に記載の方法。
５６．　ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドがＭ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、項３７に記載の方法。
５７．　１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、項３８に記載の方法。
５８．　ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、項３７に記載の方法。
５９．　オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、項５７に記載の方法。
６０．　空洞が蓋とヒンジによって覆われ、蓋が閉じられたときにペイロードが空洞内に完全に封入されることを可能にする、項５９に記載の方法。
６１．　蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスキャフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、項６０に記載の方法。
６２．　薬学的に許容される担体を患者に投与することをさらに含む、項３７に記載の方法。
６３．　薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、項６２に記載の方法。
６４．　ＤＮＡナノ構造が１つ以上のポリマーでコーティングされている、項３７に記載の方法。
６５．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、項６４に記載の方法。
６６．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、項６４に記載の方法。
６７．　１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、項６４に記載の方法。
６８．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、項６４に記載の方法。
６９．　ＤＮＡナノ構造が、患者の細胞に標的化するための標的化成分をさらに含む、項３７に記載の方法。
７０．　ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、項６９に記載の方法。
７１．　標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、項７０に記載の方法。
７２．　ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、項７０に記載の方法。
７３．　患者が、癌、筋肉障害、肺障害、皮膚障害、神経疾患、神経線維腫症１、およびヘモグロビン症からなる群から選択される疾患または障害を有する、項３７に記載の方法。
７４　癌が、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、子宮癌、卵巣癌、子宮内膜癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、食道の癌、内分泌系の癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、中皮腫、膀胱癌、腎臓癌、中枢神経系の新生物、脳腫瘍、および腺癌からなる群から選択される、項７３に記載の方法。

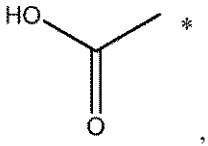
７５．　皮膚障害が黄色ブドウ球菌感染症である、項７３に記載の方法。
７６．　筋障害が筋ジストロフィーである、項７３に記載の方法。
７７．　ＤＮＡナノ構造送達組成物が患者の細胞に対して細胞毒性を有さない、項３７に記載の方法。
７８．　ＤＮＡナノ構造送達組成物を患者の細胞に標的化する方法であって、患者に投与することを含む方法であって、該方法は、ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）該ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、該１つ以上のオリゴヌクレオチドが該ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを患者に投与することを含み、該組成物が、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含み、該ＤＮＡナノ構造が、該患者の細胞に標的化するための標的化成分を含む、方法。
７９．　１つ以上のペイロードが核酸を含む、項７８に記載の方法。
８０．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項７９に記載の方法。
８１．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項７９に記載の方法。
８２．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、項７９に記載の方法。
８３．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項７９に記載の方法。
８４．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項８３に記載の方法。
８５．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項７８に記載の方法。
８６．　標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項８４に記載の方法。
８７．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項７８に記載の方法。
８８．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項７８に記載の方法。
８９．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項７８に記載の方法。
９０．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合される、項７８に記載の方法。
９１．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、項７８に記載の方法。
９２．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項７８に記載の方法。
９３．　３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項７８に記載の方法。
９４．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項７８に記載の方法。
９５．　核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項７８に記載の方法。
９６．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項７８に記載の方法。
９７．　ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドが、Ｍ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、項７８に記載の方法。
９８．　１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、項７９に記載の方法。
９９．　ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、項７８に記載の方法。
１００．　オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、項９８に記載の方法。
１０１．　空洞が蓋とヒンジで覆われ、蓋が閉じられるとペイロードが空洞内に完全に収

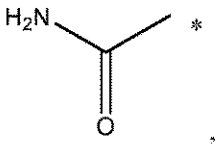
納される、項１００に記載の方法。
１０２．　蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスキャフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、項１０１に記載の方法。
１０３．　ＤＮＡナノ構造が１つ以上のポリマーでコーティングされている、項７８に記載の方法。
１０４．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、項１０３に記載の方法。
１０５．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、項１０３に記載の方法。
１０６．　１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、項１０３に記載の方法。
１０７．　１つまたは複数のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、項１０３に記載の方法。
１０８．　ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、項７８に記載の方法。
１０９．　標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、項１０８に記載の方法。
１１０．　ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、項１０８に記載の方法。
１１１．　空洞が蓋とヒンジで覆われており、ＤＮＡナノ構造送達組成物が患者の細胞に関連するＤＮＡ、ＲＮＡ、または抗原と接触したときに蓋が開く、項１００に記載の方法。
１１２．　非ウイルス性遺伝子送達組成物の多様なセットを合成するステップであって、各非ウイルス性遺伝子送達組成物は、組成物特性のセットの少なくとも１つに関して、多様なセットの各他の非ウイルス性遺伝子送達組成物と異なる、ステップ、
多様なセットの各非ウイルス性遺伝子送達組成物の１つまたは複数の品質属性を同時に試験するステップ、および
テストの結果を使用して、組成特性と品質属性とを相関させる予測モデルを作成するステップ、
を含む方法。
１１３．　組成物の特性が、分子量、分岐の程度、イオン化可能な基の数、コア対コロナ分子量比、親水性、疎水性、凝集傾向、サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、および表面電荷のうちの１つ以上を含む、項１１２に記載の方法。
１１４．　品質属性が、細胞毒性、免疫原性、トランスフェクション効率、ゼータ電位、サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、および負荷効率のうちの１つ以上を含む、項１１２または項１１３に記載の方法。
１１５．　多様なセットが数百種類の非ウイルス性遺伝子送達組成物を含む、項１１２～１１４のいずれか１項に記載の方法。
１１６．　多様なセットが数千の非ウイルス性遺伝子送達組成物からなる、項１１５に記載の方法。
１１７．　多様なセットの非ウイルス遺伝子送達組成物の各々が、項１～３６のいずれか１項に記載のＤＮＡナノ構造送達組成物である、項１１２～１１６のいずれか１項に記載の方法。
１１８．　ａ．ＲＡＦＴ共重合プロセスにおける第１の連鎖移動剤から誘導される第１のキャッピングユニットを含む第１の末端；
ｂ．第１の反応性官能基に共有結合した１つ以上のモノマー単位から調製され、約２０ｋＤａ～約４０ｋＤａの範囲の分子量（M_n）および約３００～約４００の範囲の重合度を有する第１のブロック；
ｃ．第１のブロックに共有結合した１つ以上のモノマー単位から調製され、約５ｋＤａ～約２０ｋＤａの範囲の分子量（M_n）および約４００～約５００の範囲の重合度を有する第２のブロック；および

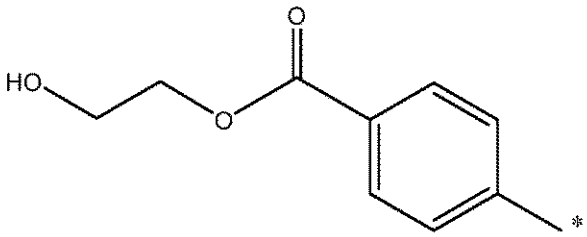
ｄ．第２の連鎖移動剤由来の第２のキャッピングユニットを含む第２の末端；
を含むＲＡＦＴブロックコポリマーであって、ＲＡＦＴブロックコポリマーは、約２５ｋＤａ～約６０ｋＤａの範囲の全分子量（M_n）、約７００～約９００の範囲の全重合度、約１０～約６０ｎｍの範囲のターゲットサイズ、および約１．５～約３．５の最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）のうちの１つ以上を有する、ＲＡＦＴブロックコポリマー。
１１９．　第１のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から選択される１つ以上のモノマー単位から調製される、項１１８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２０．　第１のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つから調製される、項１１８または１１９に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２１．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から選択される１つまたは複数のモノマー単位から調製される、項１１８～１２０のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２２．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位から調製されるランダムコポリマーである、項１１８～１２１のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２３．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される３つの異なるモノマー単位から調製されるランダムコポリマーである、項１１８～１２１のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２４．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルから調製されるランダムコポリマーである、項１１８～１２３のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２５．　各連鎖移動剤が、ビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネート、ビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネート、ビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネート、４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸、４－シアノ－４－（（フェニルカルボノチオイル）チオ）ペンタン酸、および４－シアノ－４－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］ペンタン酸からなる群から独立して選択される、項１１８～１２４のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２６．　第１のキャッピング単位が、式

【化１】



、


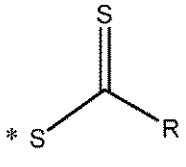
、


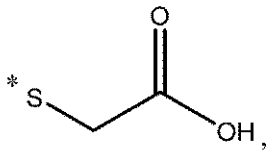
、または


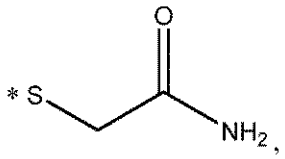
［式中、＊は第一ブロックとの共有結合点を表す］、で示される、項１１８～１２５のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。

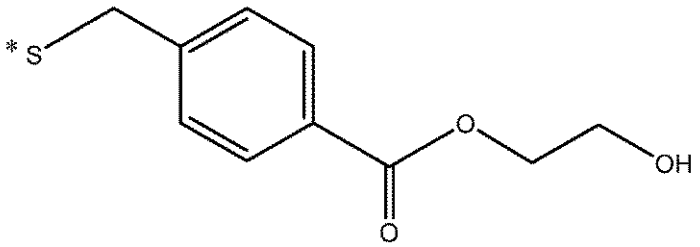
１２７．　第２のキャッピング単位が、式

【化２】



、


、


、または


［式中、＊は第２ブロックへの共有結合点を表し、Ｒは－ＳＣ$_2$－Ｃ$_{12}$アルキルまたは－Ｃ$_6$Ｈ$_5$である］、で示される、項１１８～１２６のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。

１２８．　ｉ．第１の連鎖移動剤、第１の開始剤、および１つまたは複数のモノマー単位を接触させて、第１のブロックを提供するステップ；

ｉｉ．第２の連鎖移動剤、第２の開始剤、および１つ以上のモノマー単位を接触させて、第２のブロックを提供するステップ

ｉｉｉ．第１のブロックと第２のブロックを、ブロックを結合させることができる条件下で接触させ、ＲＡＦＴブロックコポリマーを得るステップ、

を含むＲＡＦＴブロックコポリマーの調製方法。

１２９．　第１の連鎖移動剤がジアミノまたはジヒドロキシ連鎖移動剤であり、第２の連鎖移動剤がジカルボン酸連鎖移動剤である、項１２８に記載の方法。

１３０．　第１の連鎖移動剤がビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネートまたはビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネートであり、第２の連鎖移動剤がビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネートである、項１２８または１２９に記載の方法。

１３１．　第１の連鎖移動剤がジカルボン酸連鎖移動剤であり、第２の連鎖移動剤がジアミノまたはジヒドロキシ連鎖移動剤である、項１２８に記載の方法。

１３２．　第１の連鎖移動剤がビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネートであり、第２の連鎖移動剤がビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネートまたはビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネートである、項１２８または１３１に記載の方法。
１３３．　ステップ（ｉｉｉ）が、アミド化またはエステル化を促進し得る条件下で実施される、項１２８～１３２のいずれか１項に記載の方法。
１３４．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１２８～１３３のいずれか１項に記載の方法。
１３５．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つである、項１２８～１３４のいずれか１項に記載の方法。
１３６．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１２８～１３５のいずれか１項に記載の方法。
１３７．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位である、項１２８～１３６のいずれか１項に記載の方法。
１３８．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される３つの異なるモノマー単位である、項１２８～１３６のいずれか１項に記載の方法。
１３９．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルである、項１２８～１３８のいずれか１項に記載の方法。
１４０．　ＲＡＦＴブロックコポリマーが、約２５ｋＤａ～約６０ｋＤａの範囲の全分子量（M_n）、および約７００～約９００の範囲の全重合度、約１０～約６０ｎｍの範囲のターゲットサイズ、および約１．５～約３．５の最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）のうちの１つ以上を有する、項１２８～１３９のいずれか１項に記載の方法。
１４１．　ｉ．マルチウェルプレート中に反応混合物のアレイを提供するステップ、ここで各ウェルは、第１の連鎖移動剤、第１の開始剤、１つ以上のモノマー単位、および任意に溶媒または溶媒混合物の混合物を含む；
ｉｉ．　ＲＡＦＴ共重合を促進する条件下で各ウェルの混合物を反応させ、マルチウェルプレートのウェルに一連の第１ブロックコポリマーを供給するステップ；
ｉｉｉ．マルチウェルプレートのウェル内の反応をクエンチするステップ；
ｉｖ．マルチウェルプレートの各ウェルで第１のブロックコポリマーを精製するステップ；

ｖ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェル中の第１のブロックコポリマーを特性評価するステップ；
ｖｉ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェルで第１のブロックコポリマーを精製するステップ；
ｖｉｉ．マルチウェルプレートの各ウェルの第１のブロックコポリマーに、第２の連鎖移動剤、第２の開始剤、および１つ以上のモノマー単位、ならびに任意に溶媒または溶媒混合物を含む第２の反応混合物のアレイを接触させるステップ；
ｖｉｉｉ．ステップ（ｖｉｉ）の成分を、ＲＡＦＴ共重合を促進する条件下で反応させ、マルチウェルプレートのウェルに一連のＲＡＦＴブロックコポリマーを供給するステップ；
ｉｘ．マルチウェルプレートのウェル内の反応をクエンチするステップ；
ｘ．マルチウェルプレートの各ウェルでＲＡＦＴブロックコポリマーを精製するステップ；および
ｘｉ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェル中のＲＡＦＴブロックコポリマーを特性評価するステップ、
を含む、ＲＡＦＴブロックコポリマーのライブラリーを調製する方法。
１４２．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、エチルアクリル酸、プロピルアクリル酸、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１４１に記載の方法。
１４３．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つである、項１４１または１４２に記載の方法。
１４４．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１４１～１４３のいずれか１項に記載の方法。
１４５．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位である、項１４１～１４４のいずれか１項に記載の方法。
１４６．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される３つの異なるモノマー単位である、項１４１～１４５のいずれか１項に記載の方法。
１４７．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルである、項１４１～１４６のいずれか１項に記載の方法。
１４８．　第１および第２の連鎖移動剤が同一または異なる、項１４１～１４７のいずれか１項に記載の方法。

１４９．　第１および第２の連鎖移動剤が同一である、項１４１～１４８のいずれか１項に記載の方法。
１５０．　第１および第２の連鎖移動剤が異なる、項１４１～１４８のいずれか１項に記載の方法。
１５１．　第１および第２の連鎖移動剤が、それぞれ独立して、ビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネート、ビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネート、ビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネート、４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸、４－シアノ－４－（（フェニルカルボノチオイル）チオ）ペンタン酸、および４－シアノ－４－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］ペンタン酸からなる群から選択される、項１４１～１５０のいずれか１項に記載の方法。
１５２．　ステップ（ｉ）および（ｖｉｉ）で提供される溶媒または溶媒の混合物が、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、イソプロピルアルコール、ヘキサン、１，４－ジオキサン、およびテトラヒドロフランのうちの１つ以上である、項１４１～１５１のいずれか１項に記載の方法。
１５３．　ステップ（ｉｉ）および（ｖｉｉｉ）がそれぞれ、ステップ（ｉ）および（ｖｉｉ）の飽和溶媒の雰囲気下で実施される、項１４１～１５２のいずれか１項に記載の方法。
１５４．　ステップ（ｖ）および（ｘｉ）における特徴付けが、濃度またはイオン強度に対する相互作用パラメーターまたは第２のビリアル係数の変化を測定するための、マルチウェルプレート動的光散乱装置を用いた高スループットゼータ電位測定、またはポリマーの示差屈折率の高スループット測定である、項１４１～１５３のいずれか１項に記載の方法。
１５５．　クエンチングステップ（ｉｉｉ）および（ｉｘ）が、マルチウェルプレートを酸素に曝露することによって実施される、項１４１～１５４のいずれか１項に記載の方法。
１５６．　精製工程（ｉｖ）および（ｘ）が、マルチウェル形式における濾過、透析濾過または透析を介して実施される、項１４１～１５５のいずれか１項に記載の方法。
１５７．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含む組成物。
１５８．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含むＲＡＦＴブロックコポリマー結合体であって、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれる第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基を介してＲＡＦＴブロックコポリマーに共有結合的に結合した生体分子、薬物、または標識をさらに含む、ＲＡＦＴブロックコポリマー結合体。
１５９．　生体分子とＲＡＦＴブロックコポリマーとが、アミド結合またはエステル結合を介して共有結合している、項１５８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー結合体。
１６０．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーと、生体分子、薬物、または標識とを含むＲＡＦＴブロックコポリマー結合体を調製する方法であって、ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬物、または標識とが、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれる第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基を介して共有結合している、方法。
１６１．　ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬物、または標識との間に、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれた第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基のＥＤＣ－ＮＨＳ反応を介して共有結合が形成される、項１６０に記載の方法。
１６２．　官能基が、ＥＤＣ－ＮＨＳ化学を介して生体分子、薬剤、または標識上の第一級アミンと反応するカルボキシレート基である、項１６０または１６１に記載の方法。

１６３．　ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬剤、または標識とがアミド結合を介して共有結合している、項１６０～１６２のいずれか１項に記載の方法。
１６４．　第１または第２の連鎖移動剤が、２－（ドデシルチオカーボンチオイルチオ）－２－メチルプロピオン酸または４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸である、項１６０～１６３のいずれか１項に記載の方法。
１６５．生体分子がタンパク質である、項１６０～１６４のいずれか１項に記載の方法。
１６６．　標識がアビジンまたはビオチンである、項１６０～１６４のいずれか１項に記載の方法。
１６７．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含み、静電相互作用を介してＲＡＦＴブロックコポリマーに複合化されたペイロードをさらに含む、ＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１６８．　ペイロードが核酸を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１６９．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７０．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７１．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７２．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７３．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項１７２に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７４．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７５．　標的酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項１７３に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７６．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７７．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７８．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７９．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９がデアミナーゼと融合している、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８０．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８１．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８２．　ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８３．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８４．　ペイロードが核酸であり、核酸ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８５．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。

１８６．　薬学的に許容される担体をさらに含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８７．　薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、項１８６に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８８．　細胞にターゲティングするためのターゲティング成分をさらに含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８９．　項１６７～１８８のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーを患者に投与することを含む遺伝子治療方法。
１９０．　ポリマーナノ粒子組成物を患者の細胞に標的化する方法であって、患者に項１６７～１８８のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーを投与することを含む、方法。
１９１．　多様なセットの非ウイルス性遺伝子送達組成物の各々が、項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーである、項１１２～１１６のいずれか１つに記載の方法。
【００１１】
図面の簡単な説明
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１Ａ】図１Ａは、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰをカプセル化するための中心空洞を示すＤＮＡナノ構造の概略図である。図１Ｂは設計寸法を示す。図１Ｃと図１Ｄは、ＤｙｎａＰｒｏとＺｅｔａＳｉｚｅｒで測定したＤＮＡナノ構造の寸法を示す。図１Ｅは、ＤＮＡナノ構造におけるＣａｓ９　ＲＮＰの１対１カプセル化（矢印）とＨＥＫ２９３細胞への取り込みを示すＴＥＭ画像である。図１Ｆは、空のＤＮＡナノ構造体の細胞毒性を調べるためのＭＴＴアッセイの結果である。図１Ｇと図１Ｈは、ＤＮＡナノ構造の濃度依存的な取り込みと、ＥＧＦＰ　Ｃａｓ９が細胞核と共局在し、核送達を示すことを示す結果を示している。
【図１Ｂ】同上
【図１Ｃ】同上
【図１Ｄ】同上
【図１Ｅ】同上
【図１Ｆ】同上
【図１Ｇ】同上
【図１Ｈ】同上
【００１３】
【図２】図２は、ポリマーナノ粒子合成のための入力パラメーターと、高度に調整可能な出力特性の概略図である。
【００１４】
【図３】図３は、ポリマーナノ粒子組成物の細胞毒性アッセイの結果を示している。
【００１５】
【図４】図４は、ＨＥＫ－２９３細胞へのポリマーナノ粒子組成物の送達を示す。
【００１６】
【図５Ａ】図５Ａは、高さ２３．４ｎｍ、幅２６ｎｍに設計された蓋付きカプセルを有するＤＮＡナノ構造送達組成物の側面図である。図５Ｂは設計の横断面図であり、長さは６０ｎｍである。空洞は高さ１３ｎｍ、幅１５．６ｎｍの大きさで、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰを封入するように設計されている。円筒形の構造はらせんの「束」を表している。
【図５Ｂ】同上
【００１７】
【図６】図６は、本明細書に記載の方法で調製したライブラリー０００６（左端のバー）、０００７（左中央のバー）、０００９（右中央のバー）、および００１１（右端のバー）のポリマーライブラリーのサイズ（直径）データを示すチャートである。

【００１８】
【図７Ａ】図７Ａ～Ｃは、本明細書に記載のように調製し、重量平均分子量として測定した、ライブラリー０００６（図７Ａ）、０００７（図７Ｂ）、および０００８（図７Ｃ）のブロック１２のポリマーライブラリーブロック１分子量（Ｍｗ）データを示すチャートである。
【図７Ｂ】同上
【図７Ｃ】同上
【００１９】
【図８Ａ】図８Ａ～Ｂは、本明細書に記載のように調製され、重量平均分子量として測定されたライブラリー０００９（図８Ａ）および００１１（図８Ｂ）のブロック１２のポリマーライブラリーブロック１分子量（Ｍｗ）データを示すチャートである。
【図８Ｂ】同上
【００２０】
【図９Ａ】図９Ａ～Ｃは、各ウェルに、ライブラリー０００１（図９Ａ）、０００３（図９Ｂ）、０００５（図９Ｃ）の各々について分子量の異なる完成したブロック１ポリマーを有する９６ウェルプレートを示す模式図である。
【図９Ｂ】同上
【図９Ｃ】同上
【００２１】
【図１０Ａ】図１０Ａ～Ｃは、ライブラリー０００１（図１０Ａ）、０００３（図１０Ｂ）、および０００５（図１０Ｃ）のそれぞれについて、完成したブロック１ポリマーの分子量を変化させたＭＴＴアッセイ結果を示すグラフである。
【図１０Ｂ】同上
【図１０Ｃ】同上
【発明を実施するための形態】
【００２２】
例示的実施形態の詳細な説明
【００２３】
本発明は、非ウイルス送達のためのポリマーナノ粒子およびＤＮＡナノ構造送達組成物、ならびにそのための方法に関する。より詳細には、本発明は、可逆的付加－断片化鎖移動（ＲＡＦＴ）ポリマー組成物などのポリマーナノ粒子送達組成物、およびＤＮＡ折り紙組成物などのＤＮＡナノ構造送達組成物であって、１つ以上のペイロードを送達するための、または３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを送達するための、ポリマーナノ粒子送達組成物、およびそのための方法に関する。
【００２４】
以下の条項およびその組み合わせは、本明細書で説明する本発明のさまざまな追加の例示的態様を提供する。本特許出願の概要を示す「背景と概要」と題されたセクション、「実施例」および「例示的実施形態の詳細な説明」と題されたセクションを含む他のセクションに記載された様々な実施形態は、以下の番号付けされた条項に記載された本発明の実施形態のいずれにも適用可能である。
１．　ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、１つ以上のオリゴヌクレオチドがＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを含み、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含む、ＤＮＡナノ構造送達組成物。
２．　１つ以上のペイロードが核酸を含む、項１に記載の組成物。
３．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項２に記載の組成物。
４．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項２に記載の組成物。
５．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、項２に記載の組成物。

６．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項２に記載の組成物。
７．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項６に記載の組成物。
８．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項１に記載の組成物。
９．　標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項７に記載の組成物。
１０．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１に記載の組成物。
１１．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項１に記載の組成物。
１２．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１に記載の組成物。
１３．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合している、項１に記載の組成物。
１４．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、項１に記載の組成物。
１５．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項１に記載の組成物。
１６．　３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項１に記載の組成物。
１７．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項１に記載の組成物。
１８．　核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項１に記載の組成物。
１９．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項１に記載の組成物。
２０．　ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドが、Ｍ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、項１に記載の組成物。
２１．　１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、項２に記載の組成物。
２２．　ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、項１に記載の組成物。
２３．　オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、項２１に記載の組成物。
２４．　空洞が、蓋とヒンジによって覆われており、蓋が閉じられたときにペイロードが空洞内に完全に封入されることを可能にする、項２３に記載の組成物。
２５．　蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスカフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、項２４に記載の組成物。
２６．　薬学的に許容される担体をさらに含む、項１に記載の組成物。
２７．　薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、項２６に記載の組成物。
２８．　ＤＮＡナノ構造が１種以上のポリマーでコーティングされている、項１に記載の組成物。
２９．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、項２８に記載の組成物。
３０．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、項２８に記載の組成物。
３１．　１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、項２８に記載の組成物。
３２．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、項２８に記載の組成物。
３３．　ＤＮＡナノ構造が、細胞にターゲティングするためのターゲティング成分をさらに含む、項１に記載の組成物。

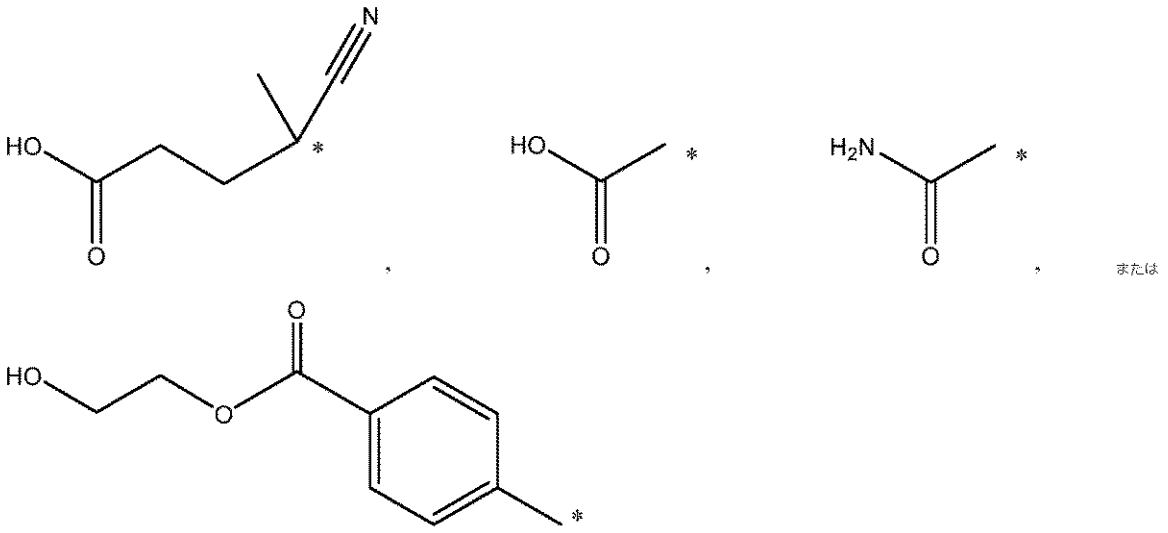
３４．　ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、項３３に記載の組成物。
３５．　標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、項３４に記載の組成物。
３６．　ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、項３４に記載の組成物。
３７．　ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）該ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、該１つ以上のオリゴヌクレオチドが該ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを含むＤＮＡナノ構造送達組成物を患者に投与することを含む遺伝子治療のための方法であって、該組成物が、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含む、方法。
３８．　１つ以上のペイロードが核酸を含む、項３７に記載の方法。
３９．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項３８に記載の方法。
４０．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項３８に記載の方法。
４１．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、項３８に記載の方法。
４２．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項３８に記載の方法。
４３．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項４２に記載の方法。
４４．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項３７に記載の方法。
４５．　標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項４３に記載の方法。
４６．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項３７に記載の方法。
４７．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項３７に記載の方法。
４８．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項３７に記載の方法。
４９．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合される、項３７に記載の方法。
５０．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、項３７に記載の方法。
５１．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項３７に記載の方法。
５２．　３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項３７に記載の方法。
５３．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項３７に記載の方法。
５４．　核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項３７に記載の方法。
５５．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項３７に記載の方法。
５６．　ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドがＭ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、項３７に記載の方法。
５７．　１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、項３８に記載の方法。
５８．　ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、項３７に記載の方法。
５９．　オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、項５７に記載の方法。
６０．　空洞が蓋とヒンジによって覆われ、蓋が閉じられたときにペイロードが空洞内に

完全に封入されることを可能にする、項５９に記載の方法。
６１．　蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスキャフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、項６０に記載の方法。
６２．　薬学的に許容される担体を患者に投与することをさらに含む、項３７に記載の方法。
６３．　薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、項６２に記載の方法。
６４．　ＤＮＡナノ構造が１つ以上のポリマーでコーティングされている、項３７に記載の方法。
６５．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、項６４に記載の方法。
６６．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、項６４に記載の方法。
６７．　１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、項６４に記載の方法。
６８．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、項６４に記載の方法。
６９．　ＤＮＡナノ構造が、患者の細胞に標的化するための標的化成分をさらに含む、項３７に記載の方法。
７０．　ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、項６９に記載の方法。
７１．　標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、項７０に記載の方法。
７２．　ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、項７０に記載の方法。
７３．　患者が、癌、筋肉障害、肺障害、皮膚障害、神経疾患、神経線維腫症１、およびヘモグロビン症からなる群から選択される疾患または障害を有する、項３７に記載の方法。
７４　癌が、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、子宮癌、卵巣癌、子宮内膜癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、食道の癌、内分泌系の癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、中皮腫、膀胱癌、腎臓癌、中枢神経系の新生物、脳腫瘍、および腺癌からなる群から選択される、項７３に記載の方法。
７５．　皮膚障害が黄色ブドウ球菌感染症である、項７３に記載の方法。
７６．　筋障害が筋ジストロフィーである、項７３に記載の方法。
７７．　ＤＮＡナノ構造送達組成物が患者の細胞に対して細胞毒性を有さない、項３７に記載の方法。
７８．　ＤＮＡナノ構造送達組成物を患者の細胞に標的化する方法であって、患者に投与することを含む方法であって、該方法は、ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールドと、ｉｉ）該ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドであって、該１つ以上のオリゴヌクレオチドが該ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる、１つ以上のオリゴヌクレオチドとを患者に投与することを含み、該組成物が、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含み、該ＤＮＡナノ構造が、該患者の細胞に標的化するための標的化成分を含む、方法。
７９．　１つ以上のペイロードが核酸を含む、項７８に記載の方法。
８０．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項７９に記載の方法。
８１．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項７９に記載の方法。
８２．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとして使用される、項７９に記載の方法。
８３．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項７９に記載の方法。

８４．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項８３に記載の方法。
８５．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項７８に記載の方法。
８６．　標的化酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項８４に記載の方法。
８７．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項７８に記載の方法。
８８．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項７８に記載の方法。
８９．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項７８に記載の方法。
９０．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９が脱アミナーゼと融合される、項７８に記載の方法。
９１．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、項７８に記載の方法。
９２．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項７８に記載の方法。
９３．　３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項７８に記載の方法。
９４．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項７８に記載の方法。
９５．　核酸構築物ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項７８に記載の方法。
９６．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項７８に記載の方法。
９７．　ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドが、Ｍ１３バクテリオファージＤＮＡを含む、項７８に記載の方法。
９８．　１つ以上のオリゴヌクレオチドが、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含む、項７９に記載の方法。
９９．　ＤＮＡスキャフォールドが約２のアスペクト比を有する、項７８に記載の方法。
１００．　オーバーハングがＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に位置する、項９８に記載の方法。
１０１．　空洞が蓋とヒンジで覆われ、蓋が閉じられるとペイロードが空洞内に完全に収納される、項１００に記載の方法。
１０２．　蓋が閉位置にあるとき、蓋がＤＮＡスキャフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖を含む、項１０１に記載の方法。
１０３．　ＤＮＡナノ構造が１つ以上のポリマーでコーティングされている、項７８に記載の方法。
１０４．　１つ以上のポリマーがポリエチレングリコールを含む、項１０３に記載の方法。
１０５．　１つ以上のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンを含む、項１０３に記載の方法。
１０６．　１つ以上のポリマーがポリエチレンイミンを含む、項１０３に記載の方法。
１０７．　１つまたは複数のポリマーが、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンを含む、項１０３に記載の方法。
１０８．　ターゲティング成分が、標的細胞レセプターに結合できる三次元構造を有するヌクレオチドである、項７８に記載の方法。
１０９．　標的細胞レセプターに結合するヌクレオチドが、ペプチドアプタマーと結合する、項１０８に記載の方法。
１１０．　ヌクレオチドが「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡである、項１０８に記載の方法。
１１１．　空洞が蓋とヒンジで覆われており、ＤＮＡナノ構造送達組成物が患者の細胞に

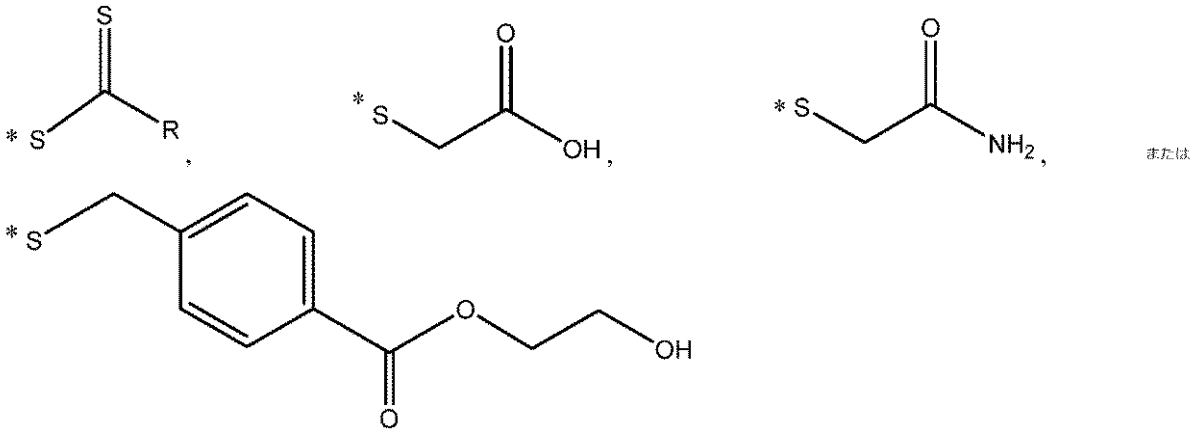
関連するＤＮＡ、ＲＮＡ、または抗原と接触したときに蓋が開く、項１００に記載の方法。
１１２．　非ウイルス性遺伝子送達組成物の多様なセットを合成するステップであって、各非ウイルス性遺伝子送達組成物は、組成物特性のセットの少なくとも１つに関して、多様なセットの各他の非ウイルス性遺伝子送達組成物と異なる、ステップ、
多様なセットの各非ウイルス性遺伝子送達組成物の１つまたは複数の品質属性を同時に試験するステップ、および
テストの結果を使用して、組成特性と品質属性とを相関させる予測モデルを作成するステップ、
を含む方法。
１１３．　組成物の特性が、分子量、分岐の程度、イオン化可能な基の数、コア対コロナ分子量比、親水性、疎水性、凝集傾向、サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、および表面電荷のうちの１つ以上を含む、項１１２に記載の方法。
１１４．　品質属性が、細胞毒性、免疫原性、トランスフェクション効率、ゼータ電位、サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、および負荷効率のうちの１つ以上を含む、項１１２または項１１３に記載の方法。
１１５．　多様なセットが数百種類の非ウイルス性遺伝子送達組成物を含む、項１１２～１１４のいずれか１項に記載の方法。
１１６．　多様なセットが数千の非ウイルス性遺伝子送達組成物からなる、項１１５に記載の方法。
１１７．　多様なセットの非ウイルス遺伝子送達組成物の各々が、項１～３６のいずれか１項に記載のＤＮＡナノ構造送達組成物である、項１１２～１１６のいずれか１項に記載の方法。
１１８．　ａ．ＲＡＦＴ共重合プロセスにおける第１の連鎖移動剤から誘導される第１のキャッピングユニットを含む第１の末端；
ｂ．第１の反応性官能基に共有結合した１つ以上のモノマー単位から調製され、約２０ｋＤａ～約８０ｋＤａの範囲の分子量（M_n）および約２０～約４００の範囲の重合度を有する第１のブロック；
ｃ．第１のブロックに共有結合した１つ以上のモノマー単位から調製され、約５ｋＤａ～約８０ｋＤａの範囲の分子量（M_n）および約１０～約５００の範囲の重合度を有する第２のブロック；および
ｄ．第２の連鎖移動剤由来の第２のキャッピングユニットを含む第２の末端；
を含むＲＡＦＴブロックコポリマーであって、ＲＡＦＴブロックコポリマーは、約２５ｋＤａ～約１６０ｋＤａの範囲の全分子量（M_n）、約３０～約９００の範囲の全重合度、約１０～約６０ｎｍの範囲のターゲットサイズ、および約１～約４の最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）のうちの１つ以上を有する、ＲＡＦＴブロックコポリマー。
１１９．　第１のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から選択される１つ以上のモノマー単位から調製される、項１１８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２０．　第１のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つから調製される、項１１８または１１９に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２１．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から選択される１つまたは複数

のモノマー単位から調製される、項１１８～１２０のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２２．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位から調製されるランダムコポリマーである、項１１８～１２１のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２３．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される３つの異なるモノマー単位から調製されるランダムコポリマーである、項１１８～１２１のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２４．　第２のブロックが、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルから調製されるランダムコポリマーである、項１１８～１２３のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２５．　各連鎖移動剤が、ビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネート、ビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネート、ビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネート、４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸、４－シアノ－４－（（フェニルカルボノチオイル）チオ）ペンタン酸、および４－シアノ－４－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］ペンタン酸からなる群から独立して選択される、項１１８～１２４のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２６．　第１のキャッピング単位が、式
【化３】



［式中、＊は第一ブロックとの共有結合点を表す］、で示される、項１１８～１２５のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。
１２７．　第２のキャッピング単位が、式

【化４】



［式中、＊は第２ブロックへの共有結合点を表し、Ｒは－ＳＣ$_2$－Ｃ$_{12}$アルキルまたは－Ｃ$_6$Ｈ$_5$である］、で示される、項１１８～１２６のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー。

１２８．　ｉ．第１の連鎖移動剤、第１の開始剤、および１つまたは複数のモノマー単位を接触させて、第１のブロックを提供するステップ；

ｉｉ．第２の連鎖移動剤、第２の開始剤、および１つ以上のモノマー単位を接触させて、第２のブロックを提供するステップ

ｉｉｉ．第１のブロックと第２のブロックを、ブロックを結合させることができる条件下で接触させ、ＲＡＦＴブロックコポリマーを得るステップ、

を含むＲＡＦＴブロックコポリマーの調製方法。

１２９．　第１の連鎖移動剤がジアミノまたはジヒドロキシ連鎖移動剤であり、第２の連鎖移動剤がジカルボン酸連鎖移動剤である、項１２８に記載の方法。

１３０．　第１の連鎖移動剤がビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネートまたはビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネートであり、第２の連鎖移動剤がビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネートである、項１２８または１２９に記載の方法。

１３１．　第１の連鎖移動剤がジカルボン酸連鎖移動剤であり、第２の連鎖移動剤がジアミノまたはジヒドロキシ連鎖移動剤である、項１２８に記載の方法。

１３２．　第１の連鎖移動剤がビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネートであり、第２の連鎖移動剤がビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネートまたはビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネートである、項１２８または１３１に記載の方法。

１３３．　ステップ（ｉｉｉ）が、アミド化またはエステル化を促進し得る条件下で実施される、項１２８～１３２のいずれか１項に記載の方法。

１３４．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１２８～１３３のいずれか１項に記載の方法。

１３５．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つである、項１２８～１３４のいずれか１項に記載の方法。

１３６．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル

酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１２８～１３５のいずれか１項に記載の方法。
１３７．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位である、項１２８～１３６のいずれか１項に記載の方法。
１３８．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される３つの異なるモノマー単位である、項１２８～１３６のいずれか１項に記載の方法。
１３９．　ステップ（ｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルである、項１２８～１３８のいずれか１項に記載の方法。
１４０．　ＲＡＦＴブロックコポリマーが、約２５ｋＤａ～約１６０ｋＤａの範囲の全分子量（M_n）、および約３０～約９００の範囲の全重合度、約１０～約６０ｎｍの範囲のターゲットサイズ、および約１～約４の最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）のうちの１つ以上を有する、項１２８～１３９のいずれか１項に記載の方法。
１４１．　ｉ．マルチウェルプレート中に反応混合物のアレイを提供するステップ、ここで各ウェルは、第１の連鎖移動剤、第１の開始剤、１つ以上のモノマー単位、および任意に溶媒または溶媒混合物の混合物を含む；
ｉｉ．　ＲＡＦＴ共重合を促進する条件下で各ウェルの混合物を反応させ、マルチウェルプレートのウェルに一連の第１ブロックコポリマーを供給するステップ；
ｉｉｉ．マルチウェルプレートのウェル内の反応をクエンチするステップ；
ｉｖ．マルチウェルプレートの各ウェルで第１のブロックコポリマーを精製するステップ；
ｖ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェル中の第１のブロックコポリマーを特性評価するステップ；
ｖｉ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェルで第１のブロックコポリマーを精製するステップ；
ｖｉｉ．マルチウェルプレートの各ウェルの第１のブロックコポリマーに、第２の連鎖移動剤、第２の開始剤、および１つ以上のモノマー単位、ならびに任意に溶媒または溶媒混合物を含む第２の反応混合物のアレイを接触させるステップ；
ｖｉｉｉ．ステップ（ｖｉｉ）の成分を、ＲＡＦＴ共重合を促進する条件下で反応させ、マルチウェルプレートのウェルに一連のＲＡＦＴブロックコポリマーを供給するステップ；
ｉｘ．マルチウェルプレートのウェル内の反応をクエンチするステップ；
ｘ．マルチウェルプレートの各ウェルでＲＡＦＴブロックコポリマーを精製するステップ；および
ｘｉ．任意に、マルチウェルプレートの各ウェル中のＲＡＦＴブロックコポリマーを特性評価するステップ、
を含む、ＲＡＦＴブロックコポリマーのライブラリーを調製する方法。
１４２．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、エチルアクリル酸、プロピルア

クリル酸、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１４１に記載の方法。
１４３．　ステップ（ｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、またはメチルメタクリレートのうちの１つである、項１４１または１４２に記載の方法。
１４４．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群より独立して選択される、項１４１～１４３のいずれか１項に記載の方法。
１４５．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される２つの異なるモノマー単位である、項１４１～１４４のいずれか１項に記載の方法。
１４６．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、アクリル酸エチル、アクリル酸プロピル、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレートからなる群から独立して選択される３つの異なるモノマー単位である、項１４１～１４５のいずれか１項に記載の方法。
１４７．　ステップ（ｖｉｉ）における１つ以上のモノマー単位が、２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸プロピル；または２－ジメチルアミノエチルアクリレートおよびブチルメタクリレート；または２－ジメチルアミノエチルアクリレート、ブチルメタクリレート、およびアクリル酸エチルである、項１４１～１４６のいずれか１項に記載の方法。
１４８．　第１および第２の連鎖移動剤が同一または異なる、項１４１～１４７のいずれか１項に記載の方法。
１４９．　第１および第２の連鎖移動剤が同一である、項１４１～１４８のいずれか１項に記載の方法。
１５０．　第１および第２の連鎖移動剤が異なる、項１４１～１４８のいずれか１項に記載の方法。
１５１．　第１および第２の連鎖移動剤が、それぞれ独立して、ビス（カルボキシメチル）トリチオカーボネート、ビス（２－アミノ－２－オキソエチル）トリチオカーボネート、ビス［４－（２－ヒドロキシエトキシカルボニル）ベンジル］トリチオカーボネート、４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸、４－シアノ－４－（（フェニルカルボノチオイル）チオ）ペンタン酸、および４－シアノ－４－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］ペンタン酸からなる群から選択される、項１４１～１５０のいずれか１項に記載の方法。
１５２．　ステップ（ｉ）および（ｖｉｉ）で提供される溶媒または溶媒の混合物が、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、イソプロピルアルコール、ヘキサン、１，４－ジオキサン、およびテトラヒドロフランのうちの１つ以上である、項１４１～１５１のいずれか１項に記載の方法。
１５３．　ステップ（ｉｉ）および（ｖｉｉｉ）がそれぞれ、ステップ（ｉ）および（ｖｉｉ）の飽和溶媒の雰囲気下で実施される、項１４１～１５２のいずれか１項に記載の方法。
１５４．　ステップ（ｖ）および（ｘｉ）における特徴付けが、濃度またはイオン強度に

対する相互作用パラメーターまたは第２のビリアル係数の変化を測定するための、マルチウェルプレート動的光散乱装置を用いた高スループットゼータ電位測定、またはポリマーの示差屈折率の高スループット測定である、項１４１～１５３のいずれか１項に記載の方法。

１５５．　クエンチングステップ（ｉｉｉ）および（ｉｘ）が、マルチウェルプレートを酸素に曝露することによって実施される、項１４１～１５４のいずれか１項に記載の方法。

１５６．　精製工程（ｉｖ）および（ｘ）が、マルチウェル形式における濾過、透析濾過または透析を介して実施される、項１４１～１５５のいずれか１項に記載の方法。

１５７．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含む組成物。

１５８．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含むＲＡＦＴブロックコポリマー結合体であって、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれる第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基を介してＲＡＦＴブロックコポリマーに共有結合的に結合した生体分子、薬物、または標識をさらに含む、ＲＡＦＴブロックコポリマー結合体。

１５９．　生体分子とＲＡＦＴブロックコポリマーとが、アミド結合またはエステル結合を介して共有結合している、項１５８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー結合体。

１６０．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーと、生体分子、薬物、または標識とを含むＲＡＦＴブロックコポリマー結合体を調製する方法であって、ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬物、または標識とが、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれる第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基を介して共有結合している、方法。

１６１．　ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬物、または標識との間に、ＲＡＦＴブロックコポリマーに組み込まれた第１または第２の連鎖移動剤の１つ上の官能基のＥＤＣ－ＮＨＳ反応を介して共有結合が形成される、項１６０に記載の方法。

１６２．　官能基が、ＥＤＣ－ＮＨＳ化学を介して生体分子、薬剤、または標識上の第一級アミンと反応するカルボキシレート基である、項１６０または１６１に記載の方法。

１６３．　ＲＡＦＴブロックコポリマーと生体分子、薬剤、または標識とがアミド結合を介して共有結合している、項１６０～１６２のいずれか１項に記載の方法。

１６４．　第１または第２の連鎖移動剤が、２－（ドデシルチオカーボンチオイルチオ）－２－メチルプロピオン酸または４－シアノ－４－（エチルスルファニルチオカルボニル）スルファニルペンタン酸である、項１６０～１６３のいずれか１項に記載の方法。

１６５．　生体分子がタンパク質である、項１６０～１６４のいずれか１項に記載の方法。

１６６．　標識がアビジンまたはビオチンである、項１６０～１６４のいずれか１項に記載の方法。

１６７．　項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー、または項１２８～１５６のいずれか１項に記載の方法に従って調製されたＲＡＦＴブロックコポリマーを含み、静電相互作用を介してＲＡＦＴブロックコポリマーに複合化されたペイロードをさらに含む、ＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。

１６８．　ペイロードが核酸を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。

１６９．　核酸がＤＮＡまたはＲＮＡを含む、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。

１７０．　核酸がリボ核タンパク質を含む、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。

１７１．　ペイロード核酸が相同性指向性修復またはトランスポーザブルエレメントとし

て使用される、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７２．　ペイロード核酸が、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６８に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７３．　ｓｇＲＮＡが、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用される、項１７２に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７４．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ関連酵素を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７５．　標的酵素がＣＲＩＳＰＲ関連酵素である、項１７３に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７６．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７７．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７８．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１７９．　ペイロードがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含み、Ｃａｓ９がデアミナーゼと融合している、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８０．　ペイロードが、Ｃａｓ９のコード配列、ｓｇＲＮＡ、およびプラスミドの形態のドナーＤＮＡ鎖を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８１．　ペイロードが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子からなる、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８２．　ペイロードがＣＡＲ－Ｔ　ＤＮＡ構築物を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８３．　ペイロードがアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８４．　ペイロードが核酸であり、核酸ペイロードが、３ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、８ｋＢ以上、および８．５ｋＢ以上からなる群より選択されるサイズである、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８５．　ペイロードが逆転写酵素を含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８６．　薬学的に許容される担体をさらに含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８７．　薬学的に許容される担体が非経口投与用または局所投与用である、項１８６に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８８．　細胞にターゲティングするためのターゲティング成分をさらに含む、項１６７に記載のＲＡＦＴブロックコポリマー複合体。
１８９．　項１６７～１８８のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーを患者に投与することを含む遺伝子治療方法。
１９０．　ポリマーナノ粒子組成物を患者の細胞に標的化する方法であって、患者に項１６７～１８８のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーを投与することを含む、方法。
１９１．　多様なセットの非ウイルス性遺伝子送達組成物の各々が、項１１８～１２７のいずれか１項に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーである、項１１２～１１６のいずれか１つに記載の方法。
【００２５】
様々な実施形態において、本明細書に記載のポリマーナノ粒子またはＤＮＡナノ構造体送達組成物は、ペイロードのインビボ送達のための任意の非ウイルス組成物を含み得る。一例として、本明細書に記載のポリマーナノ粒子またはナノ構造ＤＮＡ送達組成物は、ポリマーナノ粒子、可逆的付加－断片化連鎖移動（ＲＡＦＴ）ポリマー、ポリプレックス、

ミセル、ポリマーソーム、デンドリマー、エマルジョン、合成ウイルス様粒子、カーボンナノチューブ、エマルジョン、およびＤＮＡ折り紙構造などの任意のＤＮＡナノ構造送達組成物を含む群から選択され得る。

【００２６】

ポリマーナノ粒子組成物（例えば、ＲＡＦＴコポリマー）またはＤＮＡナノ構造送達組成物が使用される実施形態では、２つのプラットフォームは、構造および機能における高度な調整可能性、免疫系による有害反応または分解からペイロードを保護する機会、および表面電荷、粒子サイズ、または様々なアプタマーとのコンジュゲーションを介した細胞ターゲティングを有する。これらのデリバリーシステムは、コンピューター支援設計にも適しており、ウイルス製剤よりも収率が高く、精製工程が少ない、堅牢な商業規模の製造プロセスへの適切な経路を持っている。

【００２７】

一実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物が提供される。送達プラットフォームとしてのＤＮＡナノ構造送達組成物（例えば、ＤＮＡ折り紙構造）は、プログラム可能であり、精密なスケールアップと製造の機会を提供する。この実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物の生物学的および非ウイルス的性質により、有害な免疫反応の可能性が減少する。この実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物（例えば、ＤＮＡ折り紙ナノ構造）の一部を形成する各ヌクレオチドの制御により、インビボ送達およびエンドソーム脱出を可能にできる適切な化学部位を含む、構造の正確な設計および修飾が可能になる。

【００２８】

この実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物は、自己塩基対形成（すなわち、ＤＮＡ折り紙構造）を受けて、ペイロードを封入できる一本鎖ＤＮＡスキャフォールドを形成できる構造に折り畳むことができる。

【００２９】

別の実施形態において、ＤＮＡナノ構造送達組成物は、ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールド、およびｉｉ）ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドを含み得、ここで、１つ以上のオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませる。この実施形態では、１つ以上のオリゴヌクレオチドは、ペイロード核酸と相補的塩基対形成を介して結合するオーバーハングを含み得る。この実施形態では、オーバーハングはＤＮＡスキャフォールド内の空洞内に配置でき、空洞は蓋とヒンジで覆うことができ、蓋を閉めるとペイロードを空洞内に完全に封じ込めることができる。この実施形態では、蓋は、蓋が閉鎖位置にあるときにＤＮＡスキャフォールドに付着した他のオリゴヌクレオチド鎖と相補的塩基対形成を介して結合するオリゴヌクレオチド鎖をさらに含み得る。ＤＮＡナノ構造送達組成物（例えば、ＤＮＡ折り紙構造）は、米国特許第９，７６５，３４１号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

【００３０】

本明細書において、「相補的塩基対形成」という用語は、プリンおよびピリミジンヌクレオチド配列が水素結合を介して会合し、二本鎖核酸分子を形成する能力を指す。グアニンとシトシン、アデニンとチミン、アデニンとウラシルは相補的であり、２つの核酸分子が「相補的」な配列を持つ場合、水素結合によって会合し、二本鎖核酸分子を形成できる。相補配列はＤＮＡ配列でもＲＮＡ配列でもよい。相補的なＤＮＡまたはＲＮＡ配列は「相補体」と呼ばれる。

【００３１】

１つの態様において、本発明のポリマーナノ粒子組成物（例えば、ＲＡＦＴポリマー）またはＤＮＡナノ構造送達組成物は、標的細胞への送達のために１つ以上のペイロード、または標的細胞への送達のために３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含み得る。この実施形態では、３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードはＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。本明細書に記載のＤＮＡナノ構造送達組成物の実施形態のいずれかにおいて、ＤＮＡスキャフォールドおよび１つ以上のオリゴヌクレオチドは、Ｍ１３バクテリオファージＤＮＡを含

み得る。

【００３２】

例示的な一実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物は、細胞に標的化するための標的化成分をさらに含む。ある態様では、ターゲティング成分は「ステム－アンド－ループ」構造を形成するＲＮＡであるヌクレオチドであり得る。この態様では、ＤＮＡナノ構造送達組成物は、ポリヌクレオチド鎖が一連の高度に調整された「ステム－アンド－ループ」構成を介して三次元構造に折り畳まれるように設計できる。この実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物は、特定の細胞に発現するタンパク質受容体に対して高い親和性を有でき、その結果、ＤＮＡナノ構造送達組成物およびペイロードを特定の細胞に標的化できる。この実施形態では、標的細胞レセプターに結合するポリヌクレオチドは、ペプチドアプタマーと結合できる。別の態様では、ＤＮＡナノ構造送達組成物は、細胞受容体、マイクロＲＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡまたは抗原などの特定のバイオマーカーの存在下で、自己塩基対が破壊され、ＤＮＡナノ構造送達組成物が展開し、その結果、特定のバイオマーカーの存在下でのみペイロードの放出が誘発されるように折り畳むことができる。例えば、ＤＮＡナノ構造送達組成物（例：ＤＮＡ折り紙構築物）のトリガー開封のためのロック・アンド・キー機構は、以前に実証されており（Andersen, et al., Nature, Vol. 459, pages 73-76(2009)）、参照により本明細書に組み込まれる。これらの実施形態において、細胞および組織を標的とする三次元構造を作製するためにＤＮＡナノ構造送達組成物を使用することにより、ＤＮＡナノ構造送達組成物は低い免疫原性を有でき、ペイロードは、例えば、標的細胞および組織の細胞質中に存在するＲＮＡまたはペプチドバイオマーカーの存在下でのみ放出されるので、副作用が少なく、より効率的なペイロードの送達が可能になる。

【００３３】

ＤＮＡナノ構造送達組成物が使用される実施形態において、コンピューター支援設計ツールは、高度に設計されたＤＮＡナノ構造送達組成物を製造するのに必要なヌクレオチド配列を予測できる。遺伝子デリバリーの場合、これらのＤＮＡナノ構造デリバリー組成物は、構造体のサイズや形状を内容物（ｃａｒｇｏ）に合わせて調整できるため、カプセル化効率が高いという利点がある。別の態様では、核酸ペイロードをカプセル化ＤＮＡナノ構造送達組成物自体に組み込むことにより、装填効率を高めることができる。

【００３４】

遺伝子編集治療の翻訳に必要な非ウイルス送達ビヒクルは、ＧＭＰ要件を満たす再現性、汎用性、拡張性のある方法で合成できる。このような理由から、脂質ナノ粒子は、臨床試験においてほとんどの非ウイルス性核酸送達ビヒクルに使用されてきた。ポリマーナノ粒子は、臨床核酸デリバリーにはあまり使用されてこなかったが、ポリマー合成法は、脂質などの他のバイオマテリアルにはない方法で、この種のスケーラブルな製造上の利点を提供する。最近、可逆的付加フラグメント連鎖移動（ＲＡＦＴ）重合を用いたカチオン性ブロックコポリマーナノ粒子の製造方法が標準化され、商業規模のナノキャリア製造に必要な厳密性と再現性が実証された。ＲＡＦＴ共重合プロセスの頑健性、汎用性、洗練性を考えると、ＡＡＶに代わる非ウイルス送達ビヒクルを合成するための魅力的なルートである。

【００３５】

遺伝子医薬のデリバリーにおけるポリマーナノ粒子の真の可能性は、数十ナノ粒子の設計、合成、テストに数週間を要するという研究スピードの遅さのために、実現されていない。これらの素材のデザインスペースは広大だが、これまでの努力は表面的なものに過ぎなかった。しかし最近、これらのＲＡＦＴコポリマーはマルチウェルプレートでマルチプレックス、ハイスループットアレイで合成できることが実証された。本発明者らは、ＣＲＩＳＰＲツールのためのポリマー送達ビヒクルの発見を加速するために、このようなハイスループットなマルチウェル技術を使用している。一度に数十のナノ粒子を合成してテストし、与えられたＣＲＩＳＰＲペイロードと標的細胞に対して数千のオーダーでポリマーデザインをスクリーニングする機会を得ている。これは、ポリマーナノ粒子で一般的に探

索される設計空間よりも少なくとも２桁大きい。これらの方法は現在、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡ編集システムをコードするｐＤＮＡの体細胞株へのカプセル化および送達に使用されている。

【００３６】

脂質ナノ粒子の場合と同様に、ポリマーナノ粒子送達ビヒクルは、負に帯電した核酸と複合体を形成し、細胞膜の負の静止電位との相互作用を高めるカチオン性ポリマーを用いて設計される。しかし、同じ正の表面電荷も、十分な高用量では細胞毒性につながる可能性がある。本明細書に記載された方法に従って調製されたＲＡＦＴコポリマーは、本明細書に記載された実施例で提供されるように、細胞によって十分に許容されることが示されている。

【００３７】

一つの例示的な態様では、本開示にしたがってポリマーナノ粒子を送達ビヒクルとして使用できる。一実施形態では、ポリマーナノ粒子は、多様なブロックコポリマーを合成し、ペイロードと複合体を形成する能力をスクリーニングするために、ＲＡＦＴ共重合によって製造できる。ある態様では、ポリマーナノ粒子（例えば、ＲＡＦＴコポリマー）は、連鎖移動剤を用いたＲＡＦＴコポリマーへのペイロードのグラフト化など、構成ポリマーにペイロードを化学的に結合させ、その後、ポリマーを送達ビヒクルに組み立てることによって製造できる。様々な実施形態において、ペイロードは、共有結合、静電相互作用、およびリガンド親和性相互作用のいずれかまたはすべてを用いて、ポリマーナノ粒子またはＤＮＡナノ構造送達組成物と結合され得る。ある態様では、共有結合法には、ＥＤＣ／ＮＨＳを使用して、ペイロードとポリマーナノ粒子との間に安定なアミド結合を形成し、安定性（「棚上」とインビボの両方）を向上させ、分離と抽出を容易にし、高感度検出を行う方法がある。別の例示的な態様では、静電結合法は、ペイロードと静電的に複合化するカチオン性ポリマーナノ粒子またはＤＮＡナノ構造送達組成物の使用を含む。別の実施形態では、リガンド親和性結合には、ＥＤＣ／ＮＨＳ化学を介してポリマーナノ粒子またはＤＮＡナノ構造送達組成物およびペイロードに共有結合し、ペイロードとポリマーナノ粒子またはＤＮＡナノ構造送達組成物との安定な組み合わせをもたらす、アビジンおよびビオチンなどのリガンドの使用が含まれる。

【００３８】

例示的な一実施形態では、ＲＡＦＴ共重合は、上記の方法でペイロードと結合可能な末端を持つカルボキシ末端ポリマーを得るために、１つ以上の末端カルボキシル基を含む連鎖移動剤（ＣＴＡ）を使用して達成できる。この実施形態では、得られたモノまたはジカルボキシ末端ポリマーを低ｐＨ（例えば、ｐＨ６未満）の緩衝液に分散させると、ポリマーの両末端が露出し、ＥＤＣ／ＮＨＳ化学による標識に利用できる。この実施形態では、ポリマーを生理的ｐＨ（～ｐＨ７）に移すと、コアブロックが自己集合し、ペイロードを疎水性コアに封じ込め、細胞のエンドソームコンパートメントで酸性化すると遊離して露出する。

【００３９】

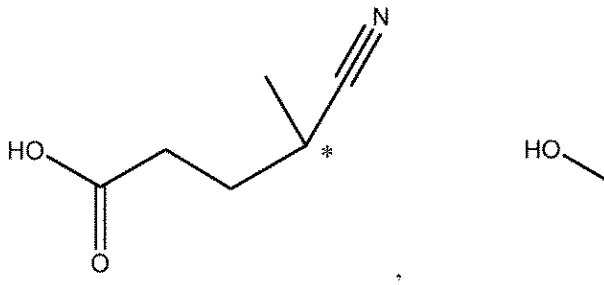
本明細書で調製するＲＡＦＴコポリマーは、以下の構造で記述できる：

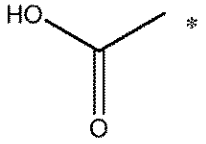
$$CTACap-[ブロック1]_m-[ブロック2]_n-CTACap$$

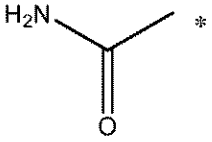
ここで、各ＣＴＡＣａｐは、ＲＡＦＴコポリマーを調製する工程で使用される連鎖移動剤由来のキャッピングユニットである。ブロック１とブロック２の準備に使用するＣＴＡは、同じでも異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、ブロック１とブロック２のそれぞれを調製するために使用されるＣＴＡは同じである（例えば、ｍａｃｒｏＣＴＡ）。いくつかの実施形態では、ブロック１とブロック２のそれぞれを調製するために使用されるＣＴＡは異なる。いくつかの実施形態では、ブロック１およびブロック２の一方または両方を調製するために使用されるＣＴＡは、ＲＡＦＴコポリマーに生体分子、薬剤、または標識を共有結合させるための官能基を含んでいる。いくつかの実施形態において、共有結合はエステル結合またはアミド結合を介できる。いくつかの実施形態において、共有結合はＥＤＣ－ＮＨＳ化学を介し得る。いくつかの実施形態において、第１のキャッピン

グユニットは、式：

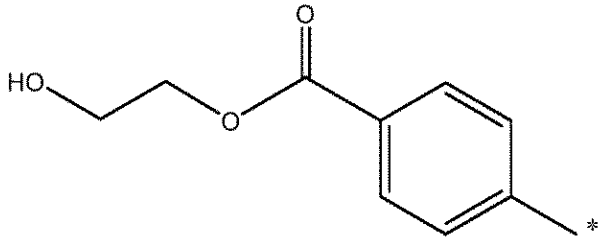
【化５】



、


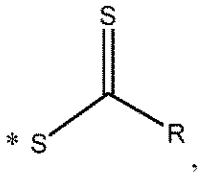
、


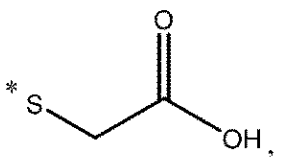
、または

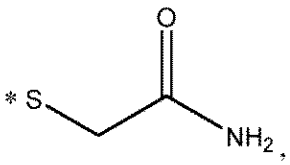


［式中、＊は第一ブロックとの共有結合点を表す］、である。いくつかの実施形態において、第２のキャッピングユニットは、式：

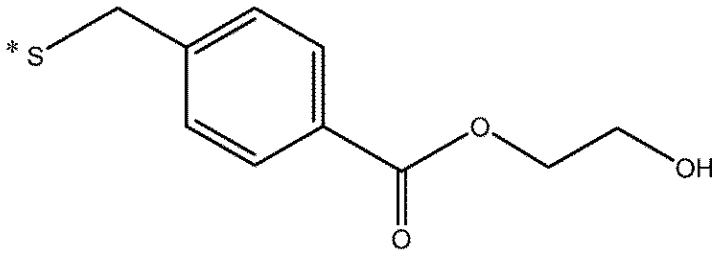
【化６】



、


、


、または



［式中、＊は第２ブロックへの共有結合点を表し、Ｒは－ＳＣ$_2$－Ｃ$_{12}$アルキルまたはＣ$_6$Ｈ$_5$である］、である。

【００４０】

いくつかの実施形態では、ＲＡＦＴコポリマーは、静電相互作用を介してＤＮＡ分子などの生体分子と複合化できる。

【００４１】

いくつかの実施形態において、ブロック１およびブロック２の各々は、ＲＡＦＴ重合プロセスを使用して重合された１つ以上のモノマー単位を含み得る。使用されるモノマー単位がＲＡＦＴ重合プロセスに適合する限り、モノマー単位の同一性は特に限定されないことが理解されよう。適切なモノマー単位としては、２－ジメチルアミノエチルアクリレート（ＤＭＡＥＭＡ）、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート（ＤＥＡＥＭＡ）、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート（ＢＭＡ）、アクリル酸エチル（ＥＡＡ）、アクリル酸プロピル（ＰＡＡ）、（ヒドロキシエチル）メタクリレート（ＨＥＭＡ）、およびメチルメタクリレート（ＭＭＡ）、アクリル酸（ＡＡ）、アミノエチルメタクリレート（ＡＥＭ）、２－（２－アミノエチルアミノ）エチルメタクリレート（ＡＥＡＥＭＡ）、Ｎ－（２－アミノエチル）メタクリルアミド（ＡＥＭ

Ａ）、３－アミノ－２－ヒドロキシプロピルメタクリレート（ＡＥＡＨＰＭＡ）、３－アミノプロピルメタクリルアミド（ＡＨＰＭＡ）、アミドアミン（ＡＭＡ）、Ｎ－（３－アミノプロピル）メタクリルアミド（ＡＰＭＡ）、５－（３－（アミノ）－プロポキシ）－２－ニトロベンジルメタクリレート（ＡＰＮＢＭＡ）、Ｎ－［Ｎ’－（２－アミノエチル）－２－アミノエチル］アスパラギン酸アミド（Ａｓｐ（ＤＥＴ））、２－アジドエチルメタクリレート（ＡｚＥＭＡ）、分岐ポリエチレンイミン（ＢＰＥＩ）、カルボキシベタインメタクリレート（ＣＢＭＡ）、ジアリルジメチルアンモニウムクロライド（ＤＡＤＭＡＣ）、２－（ジエチルアミノ）エタンチオール塩酸塩（ＤＥＡＥＴ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ－２－エチルメタクリレート）（ＤＭＡ）、Ｎ－［３－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）プロピル］－メタクリルアミド（ＤＭＡＰＭＡ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルブチルアミン（ＤＭＢＡ）、Ｎ，Ｎ’－ジメチルエタノールアミン（ＤＭＥＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ－２－エチルアクリレートまたは２－（ジメチルアミノ）エチルアクリレート（ＤＭＡＥＡ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－テトラ酢酸（ＤＯＴＡ）、１、２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＡＰ）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｙＰＥ）、Ｎ－［２－（２－ピリジルジチオ）］エチルメタクリルアミド（ＤＴＥＭＡ）、アクリル酸エチル（ＥＡＡ）、Ｎ－アセチル－Ｄ－ガラクトース（ＧａｌＮＡｃ）、Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコース（ＧｌｃＮＡｃ）、グリシジルメタクリレート（ＧＭＡ）、グリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）、２－ヒドロキシエチルメタクリレート（ＨＥＭＡ）、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）－メタクリルアミド（ＨＰＭＡ）、メタクリロキシスクシンイミド（ＭＡＳ）、メタクリルアミドトレハロース（ＭＡＴ）、２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（ＭＰＣ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）、Ｎ－（アクリロイルオキシ）スクシンイミド（ＮＨＳＡ）、Ｎ－（メタクリロイルオキシ）スクシンイミドメタクリレート（ＮＨＳＭＡ）、オリゴエチレングリコールメタクリレート（ＯＥＧＭＡ）、オリゴエチレンイミン（ＯＥＩ）、ポリ（ヨウ化Ｎ－メチル４－ビニルピリジン）（Ｐ４ＶＰＱ）、ポリ（２－アミノエチルメタクリルアミド）（ＰＡＥＭＡ）、Ｎ－（Ｎ’－｛Ｎ’’－［Ｎ’’－（２－アミノエチル）－２－アミノエチル］－２－アミノエチル｝－２－アミノエチル）－アスパラギンアミド（Ａｓｐ（ＴＥＰ））、ポリ（ε－カプロラクトン）（ＰＣＬ）、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）、ポリ（エチレングリコール）アクリレート（ＰＥＧＡ）、ポリ（エチレングリコール）メチルエーテルメタクリレート（ＰＥＧＭＥＭＡ）、ポリ（エチレングリコール）エチルエーテルメタクリレート（ＰＥＧＥＥＭＡ）、ポリ（エチレングリコール）メタクリレート（ＰＥＧＭＡ）、ペンタエチレンヘキサミン（ＰＥＨＡ）、ポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）、ペンタフルオロフェニル（ＰＦＰ）、ペンタフルオロフェニルアクリレート（ＰＦＰＡ）、ペンタフルオロフェニルメタクリレート（ＰＦＰＭＡ）、ポリ（グルタミン酸）（ＰＧＡ）、ポリ（グリコアミドアミン）（ＰＧＡＡ）、ポリ（グリシジルブチルアミン）（ＰＧＢＡ）、エタノールアミンで官能化されたポリ（グリシジルメタクリレート）（ＰＧＥＡ）、ポリ（グリシジルメタクリレート）（ＰＧＭＡ）、ポリ（Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド）（ＰＨＰＭＡ）、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）（ＰＬＧ）、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）、ポリ（Ｌ－リジン）（ＰＬＬ）、ポリ（Ｌ－乳酸）（ＰＬＬＡ）、ポリ（ラウリルメタクリレート）（ＰＬＭＡ）、ポリ（メタクリル酸）（ＰＭＡＡ）、ポリ（２－デオキシ－２－メタクリルアミドグルコピラノース）（ＰＭＡＧ）、ポリ（メチルメタクリレート）（ＰＭＭＡ）、ポリ（２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）（ＰＭＰＣ）、ポリ［Ｎ－（３－（メタクリロイルアミノ）プロピル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－（３－スルホプロピル）アンモニウムヒドロキシド］（ＰＭＰＤ）、ポリ（ｎ－ブチルアクリレート）（ＰｎＢＡ）、ポリ（ｎ－ブチルメタクリレート）（ＰｎＢＭＡ）、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミ

ド）（ＰＮＩＰＡＭ）、ポリ（オリゴエチレングリコールメタクリレート）（ＰＯＥＧＭＡ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、ポリ（プロピレンイミン）（ＰＰＩ）、ポリ（スチレン）（ＰＳ）、ポリ（４－スチレンスルホン酸ナトリウム）（ＰＳＳ）、ポリ（トリブチル－（４－ビニルベンジル）ホスホニウムクロリド）（ＰＴＢＰ）、ポリ（トリエチル－（４－ビニルベンジル）ホスホニウムクロライド）（ＰＴＥＰ）、ポリ（（２－トリメチルアミノ）エチルメタクリレートクロライド）（ＰＴＭＡＥＭＡ）、ポリ（（ビニルベンジル）トリメチルアンモニウム）（ＰＶＢＴＭＡ）、ポリ（２－ビニル－４，４－ジメチルアズラクトン）（ＰＶＤＭＡ）、ポリ（Ｎ－エチル－４－ビニルピリジニウムブロミド）（ＰＶＰ）、４級化ポリＤＭＡＥＭＡ（ＱＰＤＭＡＥＭＡ）、スルホベタインメタクリレート（ＳＢＭＡ）等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のＲＡＦＴコポリマーのブロック１および／またはブロック２を作製するために使用されるモノマー単位は、２－（ジメチルアミノ）エチルアクリレート（ＤＭＡＥＥＡ）、２－（ジエチルアミノ）エチルメタクリレート（ＤＥＡＥＥＡ）、２－（ジイソプロピルアミノ）エチルメタクリレート（ＤＩＥＡＭＡ）、ブチルメタクリレート（ＢＭＡ）、エチルアクリル酸（ＥＡＡ）、プロピルアクリル酸（ＰＡＡ）、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、およびメチルメタクリレート（ＭＭＡ）からなる群から選択される。

【００４２】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるＲＡＦＴコポリマーは、式によって記載され得る：

$$CTACap-[(B1M1)_{m-B1M2-B1M3}-(B1M2)_{-m-B1M1-B1M3}-(B1M3)_{-m-B1M1-B1M2}]_m-(B2M1)_{n-B2M2-B2M3}-(B2M2)_{-n-B2M1-B2M3}-(B2M3)_{-n-B2M1-B2M2}]_n-CTACap$$

【００４３】

例えば、２５単位のブロック１の単一モノマーおよび２０：１０：５の平均モノマー単位比を有するブロック２の３つの異なるモノマーを有し、合計ｎが３５である本明細書に記載のＲＡＦＴコポリマーは、下記の一般式で示され得る：

$$CTACap-[B1M1]_{25}-[(B2M1)_{20}-(B2M2)_{10}-(B2M3)_{5}]-CTACap$$

【００４４】

ＲＡＦＴ重合を用いて調製されるポリマーは、単位および分子量の分布を有するランダムポリマーであることがさらに理解されよう。したがって、上記の例におけるブロック２の模式図表現は、上記の比率のＢ２Ｍ１、Ｂ２Ｍ２およびＢ２Ｍ３の３５モノマー単位からなるランダムコポリマーである。

【００４５】

別の例示的な実施形態では、ポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ粒子送達組成物は、免疫反応から組成物を保護するため、あるいはエンドソームからの脱出を促進するために、１つ以上のポリマーでコーティングできる。一実施形態では、１つ以上のポリマーはポリエチレングリコールからなる。別の実施形態では、１つ以上のポリマーは、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンからなる。さらに別の実施形態では、１つ以上のポリマーはポリエチレンイミンからなる。さらなる実施形態では、１つ以上のポリマーは、ポリエチレングリコールポリ－Ｌ－リジンおよびポリエチレンイミンからなる。

【００４６】

本明細書に記載のＲＡＦＴコポリマーのパラメーターおよび特性を調整することは、本明細書に記載の組成物および方法における使用に有利であることが理解されよう。従って、本明細書に記載するＲＡＦＴコポリマーを単体またはライブラリー形式で調製する方法は、ＲＡＦＴコポリマーの特定のパラメーターおよび特性を提供することが可能である。

【００４７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のＲＡＦＴブロックコポリマーは、約２

５ｋＤａ～約１６０ｋＤａの範囲の全分子量（Ｍｎ）、および約３０～約９００の範囲の全体重合度、約１０～約６０ｎｍの範囲のサイズ、および約１～約４の最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）のうちの１つ以上を有する。いくつかの実施形態において、約３０ｋＤａ～約１２０ｋＤａ、約４０ｋＤａ～約１１０ｋＤａ、約５０ｋＤａ～約１００ｋＤａ、約６０ｋＤａ～約９０ｋＤａ、約４０ｋＤａ～約８０ｋＤａ、および約４０ｋＤａ～約６０ｋＤａの範囲の全分子量（Ｍｎ）を有する。いくつかの実施形態では、全体の重合度は、約４０～約８５０、約６０～約８００、約１００～約７００、約２００～約６００、または約３００～約５００の範囲である。いくつかの実施形態では、サイズは約１０～約５０ｎｍ、約１５～約４５ｎｍ、約２０～約４０ｎｍ、または約２５～約３５ｎｍの範囲である。いくつかの実施形態では、最大コロナ対コア比（ＣＣＲ）は、４未満、または３未満、約１～約３．８、約１．２～約３．５、約１．５～約３、約１．５～約２．５、または約１～約２である。

【００４８】

いくつかの実施形態において、第１のブロックは、１つ以上のモノマー単位から調製でき、約２０ｋＤａ～約８０ｋＤａの範囲の分子量（Ｍｎ）および約２０～約４００の範囲の重合度を有する。いくつかの実施形態において、第１のブロック分子量（Ｍｎ）は、約２５ｋＤａ～約６０ｋＤａ、または約３０ｋＤａ～約５５ｋＤａ、約３０ｋＤａ～約５０ｋＤａ、または約３０ｋＤａ～約４０ｋＤａなどの範囲にある。いくつかの実施形態において、第一ブロック重合度は、約３０～約３５０、約５０～約３００、約７０～約２５０、約８０～約２４０、約１００～約２００などの範囲である。

【００４９】

いくつかの実施形態において、第２のブロックは、１つ以上のモノマー単位から調製でき、約１ｋＤａ～約８０ｋＤａの範囲の分子量（Ｍｎ）および約３～約５００の範囲の重合度を有できる。いくつかの実施形態において、第２のブロック分子量（Ｍｎ）は、約１０ｋＤａ～約７０ｋＤａ、約１５ｋＤａ～約６５ｋＤａ、約２０ｋＤａ～約６０ｋＤａ、約２５ｋＤａ～約５５ｋＤａ、約３０ｋＤａ～約５０ｋＤａ、約３５ｋＤａ～約４５ｋＤａ、約５ｋＤａ～約１５ｋＤａなどの範囲である。いくつかの実施形態において、第二ブロック重合度は、約１０～約５００、約１２～約４５０、約２０～約４００、約２５～約３５０、約５０～約３００、約１００～約２５０、約１５０～約２００、約５～約５０、約５～約２０などの範囲である。

【００５０】

ＲＡＦＴ重合は当技術分野で一般的に知られていることは理解されよう。以前に研究されたＲＡＦＴ重合のための適切な試薬、モノマー、および条件は、本明細書に記載のコポリマー、方法、および組成物に使用でき、例えば、米国特許第９，００６，１９３号、同第９，４６４，３００号、および同第９，４７６，０６３号に記載されているものを挙げることができ、これらの各特許の開示は、参照によりその全体が組み込まれる。本明細書に記載したＲＡＦＴ重合法ステップおよび精製ステップでは、さまざまな溶媒を使用できることが理解されよう。好適な溶媒として、２－クロロエタノール、（氷）酢酸、アセトン、アセトニトリル、アセトフェノン、アニリン、ベンズアルデヒド、酢酸ベンジル、二硫化炭素、シクロヘキサン、シクロヘキサノール、ジ（エチレングリコール）、ジ（プロピレングリコール）、ジアセトンアルコール、ジエチルエーテル、ジメチルスルホキシド、エタノール、酢酸エチル、エチレングリコール、ホルムアルデヒド（３７％溶液）ホルムアミド、ギ酸、ギ酸（９６％）、ヘキサン・イソブタノール、イソプロパノール、酢酸イソプロピル、イソプロピルエーテル、ｍ－クレゾール、メタノール、酢酸メチル、メチルエチルケトン、ミネラルオイル、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、ｎ－ブタノール、ｎ－オクタン、ｎ－プロパノール、プロピレングリコール、ピリジン、ｔ－ブタノール、テトラヒドロフラン、トリフルオロ酢酸、水など、およびこれらの組み合わせなどが挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【００５１】

本明細書に記載されるポリマーナノ粒子またはナノ構造ＤＮＡ送達組成物のための例示

的なペイロードは、核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、ｐＤＮＡ、オリゴデオキシリボ核酸（ＯＤＮ）、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＤＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、メッセンジャーＲＮＡ、ガイドＲＮＡ（例えば、スモールガイドＲＮＡ）、リボヌクレオタンパク質、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムで使用されるドナーＤＮＡ鎖、および酵素、例えばＣＲＩＳＰＲ関連酵素、例えばＣａｓ９、他の遺伝子編集システムで使用される酵素、例えばＺＦＮ、カスタム設計ホーミングエンドヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮＳシステム、他の遺伝子編集エンドヌクレアーゼ、逆転写酵素などを含む群から選択される何れか一つまたは組成物の組み合わせを含み得る。

【００５２】

他の例示的なペイロードには、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）構築物などのＤＮＡ構築物が含まれる。ＣＡＲ－Ｔ細胞は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するＴ細胞である。ＣＡＲは、例えば腫瘍抗原のような特定の抗原を標的とするように設計された、遺伝子工学的に設計された受容体である。このターゲティングは、例えば、ＣＡＲを発現するＣＡＲ－Ｔ細胞が特定の腫瘍抗原を介して腫瘍をターゲティングし殺傷するように、腫瘍に対する細胞毒性をもたらすことができる。ＣＡＲは、認識領域、例えば、腫瘍によって発現される抗原を認識し結合するための抗体由来の単鎖フラグメント可変（ｓｃＦｖ）領域、活性化シグナルドメイン、例えば、Ｔ細胞のＣＤ３ζ鎖はＣＡＲにおけるＴ細胞活性化シグナルとして機能し得、そして、インビボでのＴ細胞の長時間活性化を達成するための共刺激ドメイン（例えば、ＣＤ１３７、ＣＤ２８またはＣＤ１３４）を含み得る。ある態様では、ＣＡＲは大きなＤＮＡ構築物である。

【００５３】

別の実施形態では、ペイロードは、３ｋＢ以上、３．１ｋＢ以上、３．２ｋＢ以上、３．３ｋＢ以上、３．４ｋＢ以上、３．５ｋＢ以上、３．６ｋＢ以上、３．７ｋＢ以上、３．８ｋＢ以上、３．９ｋＢ以上、４ｋＢ以上、４．１ｋＢ以上、４．２ｋＢ以上、４．３ｋＢ以上、４．４ｋＢ以上、４．５ｋＢ以上、４．６ｋＢ以上、４．７ｋＢ以上、４．８ｋＢ以上、４．９ｋＢ以上、５ｋＢ以上、５．１ｋＢ以上、５．２ｋＢ以上、５．３ｋＢ以上、５．４ｋＢ以上、５．５ｋＢ以上、５．６ｋＢ以上、５．７ｋＢ以上、５．８ｋＢ以上、５．９ｋＢ以上、６ｋＢ以上、６．１ｋＢ以上、６．２ｋＢ以上、６．３ｋＢ以上、６．４ｋＢ以上、６．５ｋＢ以上、６．６ｋＢ以上、６．７ｋＢ以上、６．８ｋＢ以上、６．９ｋＢ以上、７ｋＢ以上、７．１ｋＢ以上、７．２ｋＢ以上、７．３ｋＢ以上、７．４ｋＢ以上、７．５ｋＢ以上、７．６ｋＢ以上、７．７ｋＢ以上、７．８ｋＢ以上、７．９ｋＢ以上、８ｋＢ以上、８．１ｋＢ以上、８．２ｋＢ以上、８．３ｋＢ以上、８．４ｋＢ以上、８．５ｋＢ以上からなる群から選択されるサイズを有する核酸構築物（例えばＤＮＡまたはＲＮＡ）である。

【００５４】

様々な実施形態において、ペイロードは、ＣＲＩＳＰＲ関連酵素（例えば、Ｃａｓ９）、ショートガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）、およびドナーＤＮＡ鎖を含むＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰシステムの構成要素のいずれか１つ以上とできる。ペイロードがＣａｓ９を含む実施形態では、Ｃａｓ９はデアミナーゼに融合され得る。さらに別の実施形態では、ペイロードは、酵素を特定のゲノム配列にターゲティングするために使用されるｓｇＲＮＡを含むことができる。別の態様では、標的酵素はＣＲＩＳＰＲ関連酵素であり得る。別の例示的態様において、ペイロードは、本明細書に記載のポリマーナノ粒子またはＤＮＡナノ構造送達組成物において、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ｓｇＲＮＡ、およびドナーＤＮＡ鎖の各１分子から構成され得る。別の実施形態では、ペイロードは相同性指向性修復やトランスポーザブルエレメントとして使用される核酸であり得る。さらに別の実施形態において、ペイロードは、プラスミド構築物の形態で本明細書に記載されるペイロードのいずれかであり得る。

【００５５】

ある態様では、本明細書に記載のＤＮＡナノ構造送達組成物は、遺伝子編集に使用されるペイロードを封入できる。ある態様では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムをペイロー

ドとし、遺伝子編集に使用できる。別の実施形態では、ＺＦＮ、カスタムデザインのホーミングエンドヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮＳシステムなど、別の遺伝子編集システムをペイロードとできる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムがペイロードである実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、ＤＮＡ標的配列に二本鎖切断を導入できる。この態様において、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、ガイドポリヌクレオチド（例えば、ｓｇＲＮＡ）によって誘導され、細胞のゲノムに特定の標的部位で二本鎖切断を認識し、任意に導入する。この例示的な実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、ゲノム標的部位に近接してＤＮＡ二重鎖をほどくことができ、ガイドポリヌクレオチド（例えば、ｓｇＲＮＡ）による標的配列の認識時に両方の標的ＤＮＡ鎖を切断できるが、正しいプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）が標的の３’末端にほぼ配向している場合に限られる。この実施形態では、ドナーＤＮＡ鎖をゲノム標的部位に組み込むことができる。遺伝子編集のためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムは当技術分野でよく知られている。

【００５６】

別の例示的な実施形態では、ペイロードは、核局在化シグナルとして機能するＤＮＡセグメントを含み、エンドソーム脱出時にポリマーナノ粒子（例えば、ＲＡＦＴコポリマー）またはＤＮＡナノ構造送達組成物の核送達を強化できる。別の態様では、ペイロードは、アプタマーとしてエンドソーム受容体に結合するように設計されたヌクレオチド配列を含み、ポリマーナノ粒子（例えば、ＲＡＦＴコポリマー）またはＤＮＡナノ構造送達組成物の細胞内輸送を増強できる。

【００５７】

１つの例示的な態様において、Ｃａｓ９タンパク質、ｓｇＲＮＡおよび一本鎖ドナーＤＮＡ鎖を１つのナノ構造内に一緒にパッケージングして、すべての構成要素を同時に特定の場所に共送達することを確実にするためのＤＮＡナノ構造送達組成物（例えば、ＤＮＡ折り紙）が提供される。この実施形態では、ｓｇＲＮＡおよびドナーＤＮＡ鎖の一本鎖の性質を利用して、これらの成分をＤＮＡナノ構造送達組成物（例えば、ＤＮＡ折り紙構造）の構成部分に変換し、標的部位（例えば、標的細胞）に到達したときに、それらが一緒に送達され、ＤＮＡナノ構造送達組成物から同時に解離するようにできる。この実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物は、プラスミドまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９のリボ核タンパク質（ＲＮＰ）形態のいずれかを送達できる。

【００５８】

一実施形態では、遺伝子治療の方法が提供される。ある態様では、方法は、ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールド、およびｉｉ）ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドを含むＤＮＡナノ構造送達組成物を患者に投与することを含み、ここで、１つ以上のオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませ、そしてここで、組成物は、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含む。別の実施形態では、この方法は、ＲＡＦＴコポリマー組成物などのポリマーナノ粒子組成物を患者に投与することを含む。別の実施形態では、ＤＮＡナノ構造送達組成物を患者の細胞に標的化する方法が提供される。本方法は、ｉ）一本鎖ＤＮＡスキャフォールド、およびｉｉ）ＤＮＡスキャフォールドのセグメントと相補的塩基対形成を介して結合する１つ以上のオリゴヌクレオチドを患者に投与することを含み、ここで、１つ以上のオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡスキャフォールドを折り畳ませ、組成物は、送達のための１つ以上のペイロードまたは３ｋＢ以上の核酸構築物ペイロードを含み、ＤＮＡナノ構造は、患者の細胞に標的化するための標的化成分を含む。さらに別の実施形態では、標的化方法は、ＲＡＦＴコポリマー組成物などのポリマーナノ粒子組成物を患者に投与することを含む。

【００５９】

一実施形態では、本明細書に記載の組成物は、非経口または局所投与用の医薬組成物として処方できる。このような医薬組成物およびその製造法は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方について当技術分野で知られている。例えば、REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, (1995) A. Gennaro, et al., eds., 19th ed.,

Mack Publishing Co.を参照されたい。追加の活性成分が組成物に含まれていてもよい。

【００６０】

ある態様では、ポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造体送達組成物は、例えば、患者の血流に直接、筋肉に、内臓に投与することもできるし、局所製剤として投与することもできる。種々の実施形態において、このような非経口投与のための適切な経路としては、静脈内、動脈内、腹腔内、髄腔内、硬膜外、脳室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、腫瘍内、筋肉内および皮下送達が挙げられる。一実施形態において、非経口投与のための手段には、針（マイクロニードルを含む）注射器、無針注射器、および注入技術が含まれる。

【００６１】

一つの例示的な態様において、非経口製剤は典型的には水溶液である。塩、炭水化物、緩衝剤などの担体または賦形剤（好ましくはｐＨ３～９）を含んでもよいが、滅菌非水溶液として、または滅菌したパイロジェンフリーの水や滅菌生理食塩水などの適切なビヒクルとともに使用する乾燥形態として、より好適に製剤化できる。非経口製剤用の無菌凍結乾燥粉末を製造するための凍結乾燥による無菌条件下での調製は、当業者に周知の標準的な製薬技術を用いて容易に達成され得る。一実施形態において、非経口製剤の調製に使用される組成物の溶解性は、溶解性向上剤の組み込みなどの適切な製剤化技術の使用により増大し得る。

【００６２】

一つの例示的な実施形態では、非経口用の医薬組成物は、ａ）薬学的に活性な量のポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造送達組成物；ｂ）約ｐＨ４．５～約ｐＨ９の範囲のｐＨを提供するための薬学的に許容されるｐＨ緩衝剤；ｃ）約０～約３００ミリモルの濃度範囲のイオン強度調節剤；およびｄ）約０．２５％～約１０％の濃度範囲の水溶性粘度調節剤、またはａ）、ｂ）、ｃ）およびｄ）の任意の組み合わせを含む。

【００６３】

様々な例示的実施形態において、本明細書に記載される組成物および方法本で使用するためのｐＨ緩衝剤は、当業者に公知の薬剤であり、例えば、酢酸塩、ホウ酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、およびリン酸塩緩衝液、ならびに塩酸、水酸化ナトリウム、酸化マグネシウム、リン酸一カリウム、炭酸水素塩、アンモニア、炭酸、塩酸塩、クエン酸ナトリウム、クエン酸、酢酸、リン酸水素二ナトリウム、ホウ砂、ホウ酸、水酸化ナトリウム、バルビツール酸ジエチル、およびタンパク質、さらに様々な生物学的緩衝剤、例えばＴＡＰＳ、バイシン、トリス、トリシン、ＨＥＰＥＳ、ＴＥＳ、ＭＯＰＳ、ＰＩＰＥＳ、カコジル酸塩、ＭＥＳなどが挙げられる。

【００６４】

別の例示的な実施形態では、イオン強度調節剤は例えば、グリセリン、プロピレングリコール、マンニトール、グルコース、デキストロース、ソルビトール、塩化ナトリウム、塩化カリウム、その他の電解質などの当分野で知られた剤を含む。

【００６５】

有用な粘度調整剤としては、イオン性および非イオン性の水溶性ポリマー；架橋アクリル酸ポリマー、例えば、「カルボマー（ｃａｒｂｏｍｅｒ）」ファミリーのポリマー、例えば、Ｃａｒｂｏｐｏｌ（登録商標）で市販されているカルボキシポリアルキレン；親水性ポリマー、例えば、ポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマー、ポリビニルアルコールなどの親水性ポリマー；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースおよびエーテル化セルロースなどのセルロース系ポリマーおよびセルロース系ポリマー誘導体；トラガカントおよびキサンタンガムなどのガム類；アルギン酸ナトリウム；ゼラチン、ヒアルロン酸およびその塩、キトサン、ジェランまたはそれらの任意の組み合わせなどが挙げられるが、これらに限定されない。通常、製剤の所望のｐＨを達成しやすくする

ために、中性または塩基性薬剤などの非酸性粘度増強剤が採用される。

【００６６】

一実施形態では、非経口製剤の調製に使用される本明細書に記載の組成物の溶解度は、溶解促進剤の組み込みなどの適切な製剤技術の使用によって高めることができる。

【００６７】

他の実施形態において、本明細書に記載の組成物は、局所的に投与され得る。外用剤には、軟膏、クリーム、ゲル、ゲル軟膏、絆創膏（カタプラズム、パップ剤など）、溶液、粉末など、さまざまな剤形や基剤を適用できる。これらの製剤は、以下に記載するように、従来の薬学的に許容される担体または希釈剤を用いて、任意の従来の方法により調製できる。

【００６８】

例えば、ワセリン、高級アルコール、蜜蝋、植物油、ポリエチレングリコールなどを使用できる。クリーム製剤の調製には、油脂、ワックス、高級脂肪酸、高級アルコール、脂肪酸エステル、精製水、乳化剤などを使用できる。ゲル製剤の調製においては、ポリアクリル酸塩（ポリアクリル酸ナトリウムなど）、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、精製水、低級アルコール、多価アルコール、ポリエチレングリコールなどの従来のゲル化材料が使用される。ゲル軟膏の調製には、上記のようなゲル化物質の他に、乳化剤（好ましくは非イオン界面活性剤）、油性物質（液体パラフィン、トリグリセリドなど）等が用いられる。カタプラズムやパップ剤のような絆創膏は、上記のようなゲル製剤を支持体（布、不織布など）上に広げることによって調製できる。上記成分以外に、パラフィン、スクワラン、ラノリン、コレステロールエステル、高級脂肪酸エステルなどを任意に使用できる。さらに、ＢＨＡ、ＢＨＴ、没食子酸プロピル、ピロガロール、トコフェロールなどの酸化防止剤を配合することもできる。上述した製剤および成分に加えて、任意に、他の添加剤を配合するための従来の製剤を使用できる。

【００６９】

様々な実施形態において、ポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造送達組成物の用量は、患者の状態、または治療される疾患状態、投与経路および組織分布、ならびに他の治療処置の併用の可能性に応じて大幅に変動し得る。患者に投与される有効量は、体表面積、患者の体重または質量、および患者の状態の医師の評価に基づく。

【００７０】

ポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造体送達組成物は、癌、筋肉障害、肺障害、皮膚障害、神経疾患、神経線維腫症１（ＮＦ１）、およびヘモグロビン症からなる群から選択される疾患または障害を有する患者に投与できる。一実施形態では、癌は、肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、子宮癌、卵巣癌、子宮内膜癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、食道の癌、内分泌系の癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、中皮腫、膀胱癌、腎臓癌、中枢神経系の新生物、脳腫瘍、および腺癌からなる群から選択される。別の実施形態では、皮膚障害は黄色ブドウ球菌感染症である。さらに別の実施形態では、筋障害は筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー）である。さらに別の実施形態では、ポリマーナノ粒子組成物およびＤＮＡナノ構造送達組成物は、患者の細胞に対して細胞毒性を示さない。別の実施形態では、遺伝子治療は、患者のゲノムを変化させるのではなく、病原体（すなわち微生物）の不活性化をもたらすことがある。

【００７１】

別の実施形態において、非ウイルス性遺伝子送達組成物の多様なセットを合成することであって、各非ウイルス性遺伝子送達組成物が、組成物特性のセットの少なくとも１つに関して、多様なセットの各他の非ウイルス性遺伝子送達組成物と異なる、合成することと、多様なセットの各非ウイルス性遺伝子送達組成物の１つ以上の品質属性を同時に試験することと、試験の結果を使用して、組成物特性と品質属性とを相関させる予測モデルを作成することとを含む方法が提供される。この実施形態では、組成物の特性は、分子量、分岐の程度、イオン化可能な基の数、コア－コロナ分子量比、親水性、疎水性、凝集傾向、

サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、および表面電荷のうちの１つ以上を含むことができる。この実施形態において、品質属性は、細胞毒性、免疫原性、トランスフェクション効率、ゼータ電位、サイズ、ｐＫａ、ｌｏｇＰ、およびローディング効率のうちの１つ以上を含み得る。この実施形態では、多様なセットは、数百または数千の非ウイルス性遺伝子送達組成物から構成され得る。この実施形態において、多様なセットの非ウイルス性遺伝子送達組成物の各々は、項１～項３６もしくは項１１８～項１５４のいずれか１つのＤＮＡナノ構造送達組成物、または上記項１１８～項１２７のいずれか１つのＲＡＦＴブロックコポリマーであり得る。この方法の一実施形態では、ハイスループット試験と機械学習データ解析により、ＣＲＩＳＰＲベースの治療薬開発のための設計－構築－試験－学習（ＤＢＴＬ）サイクルを加速できる。

【００７２】

いくつかの実施形態では、ポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造送達組成物は、下流の分離を促進するために標識されることがある。例えば、これは、ポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造送達組成物を磁性ナノ粒子（例えば、超常磁性酸化鉄）、金属イオンクロマトグラフィー用のポリヒスチジンタグ、および／または蛍光補助分離（ＦＡＣＳなど）用の蛍光標識に共有結合させることを含み得る。標識は、ポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造送達組成物をインビボで追跡するために使用できる。可能な「エンドポイント」としては、投与後の様々な生理学的組織における定量的な存在、例えば蛍光による測定などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００７３】

標識が使用される実施形態において、標識は、定量的な生物学的分布の決定と並行して、多くの非ウイルスナノ粒子バリアントの迅速なインビボスクリーニング、および安定性、細胞毒性、免疫原性、および有効性に関する多くの非ウイルスナノ粒子バリアントの迅速なインビトロスクリーニングを可能にする。この実施形態により、遺伝子治療、遺伝子ワクチン、遺伝子編集、遺伝子調節因子を含む遺伝子医薬の送達ビヒクルとして使用するために引き出せる非ウイルス送達ビヒクルの大規模なライブラリーを構築できる。

【００７４】

いくつかの例示的な実施形態において、類似しているがユニークなポリマーナノ粒子組成物またはＤＮＡナノ構造送達組成物の大規模なライブラリーは、特定の標的に結合する標的化成分を同定するハイスループットスクリーニングプロセスで使用するために構築され得る。この迅速なスクリーニング・プラットフォームは、特定の細胞や組織への標的送達、あるいは病原体の中和分子として使用できる効果的な標的化分子を迅速に決定できる。

【００７５】

本明細書における「一実施形態」、「一実施形態」、「例示的実施形態」等への言及は、記載された実施形態が特定の特徴、構造、または特性を含む可能性があることを示すが、すべての実施形態がその特定の特徴、構造、または特性を含むとは限らない。さらに、このような表現は必ずしも同じ実施形態を指しているわけではない。さらに、特定の特徴、構造、または特性が実施形態に関連して記載されている場合、明示的に記載されているか否かにかかわらず、そのような特徴、構造、または特性を他の実施形態に関連して作用させることは当業者の知識の範囲内であることを提出する。さらに、「少なくとも１つのＡ、Ｂ、およびＣ」という形式のリストに含まれる項目は、（Ａ）；（Ｂ）；（Ｃ）；（ＡおよびＢ）；（ＡおよびＣ）；（ＢおよびＣ）；または（Ａ、Ｂ、およびＣ）を意味し得ることが理解されるべきである。同様に、「Ａ、Ｂ、Ｃのうち少なくとも１つ」という形で記載されている項目は、（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）、（ＡおよびＢ）、（ＡおよびＣ）、（ＢおよびＣ）、または（Ａ、Ｂ、Ｃ）を意味することがある。

【００７６】

図面では、いくつかの構造的または方法的特徴が、特定の配置および／または順序で示されている場合がある。しかし、そのような特別な手配や注文が必要ない場合もあることを理解されたい。むしろ、いくつかの実施形態では、そのような特徴は、例示的な図に示

されているのとは異なる方法および／または順序で配置されてもよい。さらに、特定の図に構造的特徴または方法的特徴を含めることは、そのような特徴がすべての実施形態において必要であることを意味するものではなく、実施形態によっては、含めなくてもよいし、他の特徴と組み合わせてもよい。

【００７７】

特定の例示的な実施形態が図面および前述の説明において詳細に記載されているが、このような例示および説明は、例示的なものとみなされ、制限的な性格を有するものではなく、例示的な実施形態のみが示され、記載されており、本開示の精神の範囲内に入るすべての変更および修正が保護されることが望まれることが理解される。本明細書に記載された装置、システム、および方法の様々な特徴から生じる、本開示の複数の利点が存在する。本開示の装置、システム、および方法の代替的な実施形態は、記載された特徴の全てを含まない可能性があるが、それでもなお、そのような特徴の利点の少なくとも一部から利益を得ることができることに留意されたい。当業者であれば、本開示の特徴の１つ以上を組み込んだ装置、システム、および方法の独自の実施態様を容易に考案できる。

【００７８】

本開示の概念は、様々な変更および代替形態の影響を受けやすいが、その具体的な実施形態は、添付の図面に例示として示されており、本明細書において詳細に説明される。しかしながら、本開示の概念を開示された特定の形態に限定する意図はなく、逆に、本開示と一致するすべての変更、等価物、および代替物を対象とする意図があることを理解されたい。

【実施例】

【００７９】

実施例１

【００８０】

ＤＮＡナノ構造送達組成物

【００８１】

ＤＮＡナノ構造送達組成物の一例では、核酸そのもの（ＤＮＡ折り紙構造）を用いてＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰコンストラクトを封入している。一本鎖ＤＮＡの足場が使用され、Ｍ１３ファージで増殖・単離され、あらかじめプログラムされたセグメントで足場と対になるオリゴヌクレオチドのステープルと組み合わされ、高度に制御・調整された三次元構造を形成する。さらに、コンピューター支援設計（ＣＡＤ）ツールは、高度に設計されたナノ構造を作り出すのに必要なオリゴヌクレオチドのステープルの配列を予測できる。遺伝子送達ビークルとして、これらのＤＮＡナノ構造体には、内容物に合わせて構造体のサイズや形状を精密に調整できるなどの大きな利点がある。これらのナノ粒子は、核酸アプタマーで機能化し、特定の細胞や組織タイプに標的結合させることができる。本発明者らは、例えばＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰの送達のためにカスタマイズされた、新規のＤＮＡ折り紙送達プラットフォームを設計した（図５）。折り紙配列にオーバーハングを戦略的に組み込んで、カプセル化ナノ構造自体にガイドＤＮＡと修復ＤＮＡコンストラクトを結合させれば、ローディング効率をさらに高めることができる。最後に、本明細書で論じるように、「ロック・アンド・キー」機構をヌクレオチド配列に組み込むことによって、高度に特異的な標的送達を達成できる。ＤＮＡスキャフォールドは、大腸菌ライブラリーの細胞密度発酵を用いて高収率で生産できる。折り紙構造の「ステープル」として使われるオリゴヌクレオチドは、合成的に製造でき、ＰＣＲ法を用いて大量にクローニングできる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムのデリバリーに対処するため、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰをカプセル化して送達するためのポリマーナノ粒子とＤＮＡ折り紙の２つの送達ビークル・プラットフォームが開発された。各プラットフォームの処理工程には、いくつかの重要な処理パラメータ（ＣＰＰ）があり、望ましい重要品質特性（ＣＱＡ）を生み出すように調整できる。例えば、いくつかの望ましいＣＱＡの成果には、送達ビヒクルの細胞毒性および免疫原性を低下させる一方で、送達ビヒクルによる取り込みとその後のトランスフェクション効率を向上させることが含まれる。これらの送達ビヒクルのサイズ、親水性、疎水性、

凝集傾向、ゼータ電位は、内容物の有無にかかわらず特徴付けることができる。その後、一連のインビトロアッセイを並行して行い、ＣＰＰの変化が送達ビヒクルの細胞毒性、免疫原性、トランスフェクション効率にどのように影響するかを同定できる。本発明者らは、大規模なデータセットを分析し、ナノキャリア設計空間の探索に適用可能なモデルを構築するための機械学習を確立した。このフレームワークは、機械学習アルゴリズムによってＣＱＡの最適化のための適合性サーフェスを構築するために設定される。このシステムは、例えばＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集ツールを効率的に細胞に送達できるナノキャリアの設計を加速する。

【００８２】

ＤＮＡナノ構造は、ＲＮＰをカプセル化するため、およびインビトロで細胞内に遊離させ、動物モデルを用いてインビボで有効性を評価するために使用できる。図５に示すデザインは、ＨＥＫ－２９３レポーター細胞に送達されるＣａｓ９／ｇＲＮＡ　ＲＮＰをインビトロでカプセル化するために使用できる。この細胞は、その前にストップコドンを持つＧＦＰレポーターで修飾できる。ｇＲＮＡは停止コドンを破壊するように標的化され、遺伝子編集が成功したことを示すＧＦＰシグナルにつながる。インビボでは、ナノ構造はＣｙ５赤色蛍光標識でタグ付けされ、ＩＶＩＳを用いて追跡され、生体内分布を決定できる。これらのＤＮＡ折り紙をベースとした送達ビヒクルは、遺伝子の精密な編集、特異性、高効率を提供する可能性がある。

【００８３】

実施例２

ＤＮＡナノ構造の作製、精製、特性評価

【００８４】

ＤＮＡナノ構造体が作製され、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９が搭載され、インビボでの分解とクリアランスから構造体を保護するためにポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－ポリ－Ｌ－リジンでコーティングされ、エンドソームからの脱出を促進するためにポリエチレンイミン（ＰＥＩ）でコーティングされた。ＤＮＡナノ構造内にＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ＲＮＰを１対１の精度で封じ込めたこと（図１Ｅ参照）は、高い予測可能性（すなわち、製作された構造物が設計通りに見える）と構造制御を持つナノ構造を作り出すＤＮＡナノ構造（例：ＤＮＡ折り紙構造）のユニークな能力を実証している。Ｃａｓ９　ＲＮＰは１つの構造体に１分子のみ封入された。これは、現在利用可能な他の送達ベクターでは不可能である。

【００８５】

閉じたＤＮＡナノ構造体を介したＣａｓ９　ＲＮＰのＨＥＫ２９３細胞への送達（図１Ｅ）も、蛍光の共局在性に基づいて実証された。さらに、ＤＮＡナノ構造体を折りたたみ、立方体状のＤＮＡナノ構造体を画像化した（図１Ｅ）。空のＤＮＡナノ構造体を用いて細胞毒性実験（ＭＴＴアッセイ）を行った結果、空のＤＮＡナノ構造体は１０ｎＭまでであっても、２４時間培養後のＨＥＫ２９３細胞に対して細胞毒性を示さなかった（図１Ｆ）。ほとんどのトランスフェクションで、細胞がＤＮＡナノ構造処理に５時間未満しかさらされなかったことを考慮すると、２０ｎＭでも細胞生存率は比較的高かった（７５％）。

【００８６】

濃度依存的な取り込みと核への共局在は、空およびＣａｓ９　ＲＮＰをロードしたＤＮＡナノ構造体をＨＥＫ２９３細胞とインキュベートすることで実証された（図１Ｇおよび１Ｈ）。ＤＮＡナノ構造はＣｙ５で標識され、カプセル化されたＣａｓ９はＥＧＦＰで標識された。このデータは、ＤＮＡナノ構造内の内容物を核に標的化して遺伝子編集作業を実行できることを示している。

【００８７】

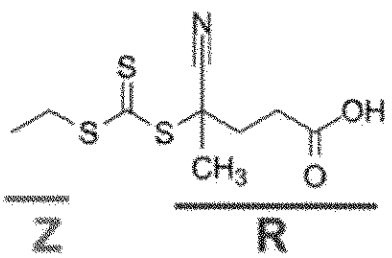
ＨＤＲを介した遺伝子編集実験では、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰに加えて、インビボ研究のためにＤＮＡナノ構造あたり２本のＨＤＲドナーＤＮＡ鎖オリゴを持つ同じＤＮＡナノ構造を使用する。ＤＮＡナノ構造はＣｙ５．５色素で標識され、生体内分布と毒性分析に使

用される。
【００８８】
実施例３
【００８９】
ＲＡＦＴコポリマー
【００９０】
遺伝子編集治療の翻訳に必要な非ウイルス送達ビヒクルは、ＧＭＰ要件を満たす再現性、汎用性、拡張性のある方法で合成できる。このような理由から、脂質ナノ粒子は、臨床試験においてほとんどの非ウイルス性核酸送達ビヒクルに使用されてきた。ポリマーナノ粒子は、臨床核酸デリバリーにはあまり使用されてこなかったが、ポリマー合成法は、脂質などの他のバイオマテリアルにはないスケーラブルな製造上の利点を提供する。最近、可逆的付加フラグメント連鎖移動（ＲＡＦＴ）重合を用いたカチオン性ブロックコポリマーナノ粒子の製造方法が標準化され、商業規模のナノキャリア製造に必要な厳密性と再現性が実証された（図２）。ＲＡＦＴ共重合プロセスは、その頑健性、多用途性、洗練性を考えると、ＡＡＶに代わる非ウイルス送達ビヒクルを合成するための魅力的なルートである。最近、これらのＲＡＦＴコポリマーがマルチウェルプレートでマルチプレックス、ハイスループットアレイで合成できることが実証された。これらの方法は、Ｃａｓ９およびｇＲＮＡ編集システムをコードするｐＤＮＡの体細胞株へのカプセル化および送達に使用されている。脂質ナノ粒子の場合と同様に、ポリマーナノ粒子送達ビヒクルは、負に帯電した核酸と複合体を形成し、細胞膜の負の静止電位との相互作用を高めるカチオン性ポリマーを用いて設計される。しかし、同じ正の表面電荷も、十分な高用量では細胞毒性につながる可能性がある。この懸念に対処するため、本発明者らは細胞毒性アッセイを実施した（図３－実施例４参照）。
【００９１】
３Ａ：ＲＡＦＴコポリマーの調製
【００９２】
ブロック１の試薬を丸底フラスコに入れ、アルゴンでパージし、加熱マントルを用いて６０℃に６時間加熱した。反応生成物は、４回の８０：２０ペンタン：エーテル沈殿洗浄と遠心分離サイクルを用いて精製し、インバキュオで乾燥させた。ブロック１の生成物をブロック２のマクロラフト剤として使用し、計算された試薬量（ブロック１の理論分子量情報に基づいて計算された）をラウンドボトムで合わせてブロック２の反応に使用した。反応混合物をアルゴンパージした後、６０℃で２４時間加熱した。反応生成物を同じ精製プロセスで精製し、インバキュオで乾燥させた。得られたポリマーを脱イオン水中で４日間透析し、１日毎に複数回水を交換した。最後に、透析物を４日間凍結乾燥し、実験用に室温で保存した。サイズはＭａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏを用いて測定した。ブロック１とブロック２の分子量を測定し、ブロック１の分子量はＤｙｎａＰｒｏ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ　ＩＩＩを用いて内部で測定した。この例では、分子量はすべて数平均分子量（M_n）として報告している。

【表１－１】

ブロック 1			
試薬	目的	ロット0001量	ロット0002量
2-ジメチルアミノエチルアクリレート(DMAEMA)	モノマー	15999. 6 mg	32000. 0 mg
(4-シアノ-4-(((エチルチオ)カルボチオイル)チオ)ペンタン酸) (ECT)	連鎖移動剤	76. 9 mg	153. 7 mg
アゾビスイソブチロニトリル AIBN	イニシエーター	9. 5 mg	19. 05 mg
ジメチルホルムアミド DMF	溶剤	24131. 1 mg	48229. 8 mg
ブロック1反応収率	収率	31. 75%	39. 55%
ブロック 2			
試薬	目的	ロット0001量	ロット0002量
2-ジメチルアミノエチルアクリレート(DMAEMA)	モノマー	713. 0 mg	2110. 6 mg
ブチルメタクリレート(BMA)	モノマー	1934. 4 mg	5727. 6 mg
アクリル酸プロピル(PAA)	モノマー	518. 2 mg	1540. 1 mg

【表１－２】

ブロック１のマクロラフト剤、つまりECT+DMAEMA。ECT末端基(RとZ)はまだその機能を果たすために存在していたが、ブロック1として合成されたp(DMAEMA)ポリマーの末端にあった。参考までに、トリチオカルボニル基の両側にあるR基とZ基を示すECTを示す。 ECT  	マクロ連鎖移動剤	1528.4 mg	4526.2 mg
アゾビスイソブチロニトリル AIBN	イニシエーター	1.7 mg	4.93 mg
ジメチルホルムアミド DMF	溶剤	7045.0 mg	20828.8 mg
ブロック２反応収率	収率	73.33%	70.99%

特性データ

【表２】

サンプル	ブロック1 GPC結果 (分子量、kDa)	ブロック1 ダイナプロ 結果 (モル質量、kDa)	ジブロックGPCの総合結果(分子量、kDa)	ゼータサイザーDLS結果 数分布 (サイズ、nm)	サイズPDI (ゴールく0.3)	ゼータ電位測定結果 (mV)
3 A-0001	22.0	19.8	29.3	44.3	0.085	20.6
3 A 0002	該当なし	27.1	該当なし	45.8	0.053	18.9

【００９３】

ＤＬＳ、ゼータ電位測定、ＴＥＭイメージングにより、２つのロットのサイズ、表面電荷、形態が類似していることが確認された。

【００９４】

ＧＰＣデータは、マルバーンのＴＤＡ－３０５　Ｔｅｔｒａ　Ｄｅｔｅｃｔｏｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して得られた。データの取得と処理はＯｍｎｉＳｅｃソフトウェアで行った。

【００９５】

データは以下の条件で得られた：

【００９６】

溶媒　０．０５ＭのＬｉＢｒを含むジメチルホルムアミド

【００９７】

流量１．０ｍＬ／分

【００９８】

注入量１００μＬ

【００９９】

カラム温度６０℃

【０１００】

濃度～２．５ｍｇ／ｍＬ

【０１０１】

カラム　Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｐｏｌａｒｇｅｌ　Ｍｉｘｅｄ　Ｍ　７．８×３００ｍｍ　８μｍ

【０１０２】

走行時間３０分

【０１０３】

オプションＡの重合度測定値：

【０１０４】

ブロック１：１４０（１４０のＤＭＡＥＭＡ）

【０１０５】

ブロック２：５２（ＤＭＡＥＭＡ８、ＰＡＡ６、ＢＭＡ３８）

【０１０６】

オプションＡのモノマー組成のおおよそのパーセンテージ（ＮＭＲを使用）：

【０１０７】

ターゲットブロック１とブロック２の分子量をそれぞれ３０．２ｋＤａと１５．１ｋＤａとして、プロトンＮＭＲスペクトルから以下のブロック組成を計算した：

【０１０８】

ブロック１＝１００％ジメチルアミノエチルメタクリレート

【０１０９】

ブロック２＝メタクリル酸ジメチルアミノエチル～１７％、メタクリル酸ブチル～７４％、アクリル酸プロピル９％。

【０１１０】

３Ｂ：ＥＤＣ－ＮＨＳ化学によるＲＡＦＴコポリマーのアビジン官能基化

少なくとも１つのカルボキシル末端基を含むＣＴＡを用いて作られたＲＡＦＴコポリマーは、アミン含有分子によるＰＮＰの官能基化の例として、さらにアビジンで官能基化された。

【０１１１】

実施例３Ａに従って調製したＲＡＦＴコポリマー（１６０ｍｇ）を５０ｍＬのコニカルチューブに移し、８ｍｇ／ｍＬのＭＥＳ緩衝液で再構成した。サンプルを３０分間超音波処理した。ＥＤＣ試薬（１０．５ｍｇ）とＳｕｌｆｏ－ＮＨＳ（２９．７ｍｇ）をポリマーに加えた。サンプルを室温で１５分間インキュベートし、反応を起こさせた。反応液をＡｍｉｃｏｎ　ｕｌｔｒａ－４遠心チューブ（ＭＷＣＯ　３０ｋＤａ）に移した。（最大３．５ｍＬ／チューブ）を加え、４，０００×ｇで１５分間遠心した。ろ液を捨て、滅菌ＰＢＳを加えて８ｍｇ／ｍＬのポリマーに再構成した。アビジン（３６．９ｍｇ）を反応液に加え、室温で１５分間インキュベートした。サンプルはａｍｉｃｏｎ　ｕｌｔｒａ－４遠心チューブに移された（ＭＷＣＯ　３０ｋＤａ）。（最大３．５ｍＬ／チューブ）を

加え、４，０００×ｇで１５分間遠心した。濾液を捨て、滅菌ＰＢＳを最終濃度８ｍｇ／ｍＬのポリマーになるように添加した。

【０１１２】

３Ｃ：アビジンローディング定量

【０１１３】

１０ｍｇのアビジンを７２０μＬのＰＢＳで再構成して２０５．８μＭのアビジン原液を作成し、３連のアビジン検量線を作成した。９６ウェルプレートのウェルＡ１～Ａ３にダルベッコスＰＢＳ（３２２μＬ）を加えた。ウェルＡ１～Ａ３に４０μＭの溶液が得られるようにストックアビジン（７８μＬ）を加えた。カラム１～３の残りのウェルにダルベッコＰＢＳ（２００μＬ）を加え、１列目のウェルから２：１の連続希釈を行った。

【０１１４】

アビジンコートポリマー（２００μＬ）を同じ９６ウェルプレートの３ウェルに添加した。ネイティブポリマー（アビジンなし）（２００μＬ）を同じ９６ウェルプレートの他の３ウェルに加えた。２８０ｎｍと２６０ｎｍの吸光度を検量線に対して読み取った。１００％ローディング効率は２７．３μＭ。

【０１１５】

３Ｄ：ＲＡＦＴコポリマーライブラリー

【０１１６】

ＲＡＦＴコポリマーは、上記の実施例３Ａで示した一般的な手順に従って、９６ウェルプレートで調製した。すべての試薬量は、実施例３Ａに記載したのと同じ方法に従って決定した。

【０１１７】

簡単に説明すると、ブロック１の試薬をポリプロピレン製９６ウェルＵ字底マイクロプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ）またはポリプロピレン製Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ微量遠心チューブ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）のウェルに入れ、ＶＷＲ　１４００Ｅ　Ｓｈｅｌｄｏｎ真空オーブンに入れた。２０ｍＬのガラスバイアルに約１０～１５ｍＬのジメチルホルムアミドを入れ、バイアルをオーブンに入れて雰囲気飽和源とした。オーブンをアルゴンで約３Ｌ／分で約４５分間パージし、６０℃～７５℃に６時間加熱した。反応終了後、ポリマーの固化を防ぐため、ウェルまたはチューブにアセトンを加え、ウェルまたはチューブを密封して室温で一晩放置した。翌日、反応生成物溶液を１．５ｍＬエッペンドルフチューブに移し（必要に応じて）、適切な精製溶媒溶液（例えば、８０：２０ペンタン：エーテル、イソプロピルアルコール、メタノールなど）を用いて４回の沈殿洗浄を行い精製し、遠心分離を繰り返し、インバキュオで乾燥させた。ブロック１の生成物をブロック２のマクロラフト剤として使用し、計算した試薬量（ブロック１の理論分子量情報に基づいて算出）をポリプロピレン製９６ウェルＵ字底マイクロプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ）またはポリプロピレン製Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ微量遠心チューブ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）のいずれかに配合してブロック２反応を行った。反応混合物をＶＷＲ１４００Ｅ　Ｓｈｅｌｄｏｎ真空オーブンに置き、約３Ｌ／分で約４５分間アルゴンパージした後、６０℃～７５℃で２４時間加熱した。反応生成物は、ブロック１のライブラリー材料に用いたのと同じ精製プロセスを用いて精製し、インバキュオで乾燥させた。得られたポリマーは、アセトンまたはクロロホルムに懸濁し、実験に必要な分量だけ分注した（これらの転移溶媒は、材料の使用前に蒸発させた）。サイズはワイアット・テクノロジー社のＤｙｎａＰｒｏ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ　ＩＩＩを用いて測定した。ブロック１の材料の分子量は、ＤｙｎａＰｒｏ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ　ＩＩＩを用いて測定した。ＤｙｎａＰｒｏ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ　ＩＩＩモル質量能力閾値を超えるナノ粒子サイズにより、これらのポリマーライブラリーのブロック２分子量の測定が妨げられた。ハイスループットポリマーライブラリーの分子量はすべて重量平均分子量（M_w）で報告されている。

【０１１８】

例示的なライブラリーは以下の表に従って調製した。

【表３－１】

ライブラリーNo.	ライブラリーの構成	ライブラリーのポリマー
0001	多様なB1+B2 p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA-co-PAA)	p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA-co-PAA)
0002	均一なB1+B2 p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA-co-PAA)	p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA-co-PAA)
0003	均一なB1+B2 p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA)	p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA)
0004	p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA)の均一なB1+B2入力	p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA)
0005	多様なB1+B2 p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA-co-EAA)	p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-co-BMA-co-EAA)
0006	多様なp(DMAEMA)-b-p(HEMA) CTA:I=1	p(DMAEMA)-b-p(HEMA)
0007	多様なp(DMAEMA)-b-p(HEMA) CTA:I=5	p(DMAEMA)-b-p(HEMA)
0008	多様なp(DMAEMA)-b-p(HEMA) CTA:I=10	p(DMAEMA)-b-p(HEMA)

【表３－２】

0009	モノマー、CTA、開始剤、およびCTA:Iを変化させたQNDをDMFを用いてプレート中で行う。	p(DMAEMA)-b-p(MMA) p(DMAEMA)-b-p(BMA) p(DPAEMA)-b-p(MMA) p(DPAEMA)-b-p(BMA) p(MMA)-b-p(DMAEMA) p(MMA)-b-p(DPAEMA) p(BMA)-b-p(DMAEMA) p(BMA)-b-p(DPAEMA)
0010	QNDモノマー、CTA、開始剤、CTA:IをDMSOを用いてプレート中で変化させた。	p(DMAEMA)-b-p(MMA) p(DMAEMA)-b-p(BMA) p(DPAEMA)-b-p(MMA) p(DPAEMA)-b-p(BMA) p(MMA)-b-p(DMAEMA) p(MMA)-b-p(DPAEMA) p(BMA)-b-p(DMAEMA) p(BMA)-b-p(DPAEMA)
0011	QNDモノマー、CTA、開始剤、およびCTA:Iを変化させたDMFを用いたチューブ内反応	p(DMAEMA)-b-p(MMA) p(DMAEMA)-b-p(BMA) p(DPAEMA)-b-p(MMA) p(DPAEMA)-b-p(BMA) p(MMA)-b-p(DMAEMA) p(MMA)-b-p(DPAEMA) p(BMA)-b-p(DMAEMA) p(BMA)-b-p(DPAEMA)

【０１１９】
ポリマーライブラリーのサイズ（直径）データは、図６にライブラリー０００６、０００７、０００９、００１１について記載されている。直径のデータは以下のように計算される：
【化７】

$$d_{num\ wtd} = \sum d_i x_i$$

式中
d_i ＝ ピークｉの直径
x_i ＝ ピークｉの数値加重寄与率

【０１２０】
ポリマーライブラリーブロック１の分子量（Ｍｗ）ライブラリー０００６、０００７、０００８、０００９、００１１（すべてブロック１のみ）の分子量データは、Ｗｙａｔｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製ＤｙｎａＰｒｏ Ｐｌａｔｅ Ｒｅａｄｅｒ ＩＩＩを用いて測定した。この例で報告されている分子量はすべて重量平均分子量（M_w）として報告されている。結果を図７Ａ－Ｃおよび図８Ａ－Ｂに示す。
【０１２１】
図９Ａ－９Ｃに示すように、ライブラリー０００１、０００３、０００５のライブラリーブロック１を９６ウェルプレートに調製した。
【０１２２】
実施例４
【０１２３】
４Ａ：細胞毒性アッセイ－ＤＮＡナノ構造
【０１２４】
標準的なメチルチアゾリルジフェニル－テトラゾリウムブロマイド（ＭＴＴアッセイ）を用いて、３日目（試験用量に暴露して～３０時間後）の細胞生存率を測定した。５ｍｇ／ｍｌの細胞培地中のＭＴＴ約２．４ｍｌを使用し、その溶液２０μｌを細胞プレートの各ウェルに加えた。プレートをホイルで包み、３時間インキュベートした。３時間後、プレートをインキュベーターから取り出し、ピペットですべての培地を吸引除去した。各ウェルに２００μｌのイソプロパノールを加え、結晶を溶解した。プレートをホイルで包み、オービタルシェーカーに～５分間置き、完全に溶解させた。その後、プレートをプレートリーダーで５６０ｎｍと６７０ｎｍで読み取った。６７０ｎｍのバックグラウンドは５６０ｎｍの吸光度から差し引いた。細胞生存率は、何も処理しなかった（すなわち、培地のみに分散させた）細胞の吸光度に対するパーセンテージとして報告されている。
【０１２５】
ＤＮＡナノ構造送達組成物の細胞毒性結果は実施例２に記載されており、結果は図１Ｆである。ポリマーナノ粒子組成の結果を図３に示す。ポリマーナノ粒子組成物は、～７３ｎＭ以下の濃度では細胞毒性を示さなかった。リポフェクタミンは、ストック溶液の０．２８ｖｏｌ％以上の濃度で細胞毒性を示した。これは１ウェルあたり０．６２５μｌに相当し、メーカーが推奨する最高用量の約２倍である。２つのネガティブコントロール（ＰＢＳとｏｐｔｉｍｕｍ）は、培地のみの場合よりもポジティブな細胞増殖（１１０％近い

細胞増殖）を示した。２つの陰性対照（９％と３３％エタノール）では、ほぼ完全な細胞死（～２％の細胞生存率）を示した。

【０１２６】

４Ｂ：細胞毒性アッセイ－ＲＡＦＴコポリマー

【０１２７】

９６ウェルプレートで細胞を培養し、少なくとも３つのウェルを空にする。対照条件では、少なくとも３つのウェルに１２時間以上培地を入れないこと。サブコンフルエント単層で増殖。実験時に１ウェルあたり１５０μＬの培地を使用。

【０１２８】

５ｍｇ／ｍＬ濃度のＭＴＴ溶液を、１サンプルあたり２５μＬ相当量の培地で調製した。２０μＬのＭＴＴ溶液を、３つのブランクウェルを含むセルプレートの各ウェルに加える。プレートを静かに振って溶液を混ぜた。蓋または９６ウェルプレートのステッカーをプレートに貼る。アルミホイルで皿を包む。プレートを７０％エタノールでスプレーダウンし、細胞培養器（３７℃、５％CO_2）に３～４時間置いた。インキュベーション後、パスツールピペットを用いてウェルから培地を吸引除去し、層流フード内で真空にした。ホルマザン（ＭＴＴ代謝産物）を２００μＬのイソプロパノールに懸濁した。結晶が溶けるまで、プレートを中速で少なくとも５分間シェーキングプレートに置いた。溶液が他のウェルに飛散しないようにする。プレートリーダーで５６０ｎｍで読み取る。６７０ｎｍでのバックグラウンドを差し引いた（ブランクウェルがバックグラウンドとなる）。

【０１２９】

ライブラリー０００１、０００３、０００５のブロック１のＭＴＴアッセイの結果を図１０Ａ－Ｃに示す。細胞生存率は最大９０％であった。

【０１３０】

実施例５

【０１３１】

ＨＥＫトランスフェクション

【０１３２】

ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を９６ウェルプレートに０．２ｍｌの培地に１ウェル当たり３０，０００個播種し、３７℃のインキュベーターに一晩放置した。翌日、ポリマーナノ粒子をＰＢＳで連続希釈した。リポフェクタミン３０００試薬は、メーカーのプロトコールに従って調製した。ｐＤＮＡをポリマーナノ粒子とリポフェクタミンの希釈液に加え、両成分の濃度を画像の１１倍とした。各ウェルに各希釈液を０．０２ｍｌずつ加え、１１倍希釈を行った。細胞を処理液とともに一晩インキュベートし、ＧＦＰフィルター・キューブ・セット（ｅｘ４７５ｎｍ，ｅｍ５０９ｎｍ）を用いて蛍光画像を撮影した。ポリマーナノ粒子の投与量（図４Ｃ）が最も蛍光を示し、ポリマーとＤＮＡの比率が～４であることに対応した。このことは、ポリマーナノ粒子プラットフォームが、治療のために遺伝子を細胞に送達するために、我々のハイスループット・プラットフォームでさらに最適化できることを示している。

【０１３３】

実施例６

【０１３４】

ＤＮＡナノ構造送達組成物設計

【０１３５】

オリゴヌクレオチドステープルは、大腸菌でクローン化されたＭ１３バクテリオファージＤＮＡから発酵を用いて産生される一本鎖ＤＮＡスキャフォールドに対して設計できる。これらのオリゴは、例えば、１３×１５ｎｍの空洞（ＲＮＰのおおよその寸法）を持つＤＮＡナノ構造体（すなわちＤＮＡ折り紙構造）を形成するように設計できる。オリゴステープルは、ＲＮＰのｇＲＮＡや相同性指向性修復ドナーＤＮＡ鎖の末端に結合する粘着性のある末端を持つオーバーハングを含むように選択できる。その結果、ＣＲＩＳＰＲＲＮＰのような複数のペイロードを標的細胞に効果的に送達するために必要なすべての機

械を１つの粒子に含むコンパクトな粒子が得られる。蛍光顕微鏡実験は、ＤＮＡナノ構造が細胞内のどこを往来しているのかを理解するのに役立つ。ＤＡＰＩ（４’，６－ジアミノ－２－フェニルインドール）青色蛍光染色を用いて細胞核を青く染め、ＲＮＰが核内でどの程度共局在しているかを調べることができる。

【０１３６】

ＤＮＡナノ構造の合成と物理的特性評価

【０１３７】

ＤＮＡナノ構造の表面は、免疫原性を低減するためにポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリリジン部分でデザインできる。また、ペプチドアプタマーの助けを借りて、あるいは借りずに、標的細胞のレセプターに結合できる３次元構造をとることができるヌクレオチドの「ステム－アンド－ループ」機能を含める可能性もある。ＤＮＡナノ構造の折りたたみは、透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）で確認できる。ＤＮＡナノ構造へのＲＮＰのロードは、蛍光標識ＲＮＰ（ＥＧＦＰ）と蛍光顕微鏡で確認できる。粒子径、表面電荷、凝集状態は、動的光散乱法によりマルチウェルプレート形式で分析できる。ゼータ電位はマルバーンのゼータサイザーで分析できる。

【０１３８】

ＤＮＡナノ構造送達組成物のハイスループット生物活性特性評価

【０１３９】

ＲＮＰを担持したＤＮＡナノ構造体は、ポリマーナノ粒子組成物と同じ９６ウェルプレートアッセイのアレイでアッセイできる。しかし、この場合、ＲＮＰシステムは、停止コドンで先行するＧＦＰレポーターで修飾されたＨＥＫ－２９３細胞株で緑色蛍光を生成するために使用できる。ＲＮＰ中のｇＲＮＡは停止コドンを標的とでき、それが破壊されると細胞は緑色の蛍光を発する。同様のテストは他の細胞でもできる。ＧＦＰレポーター系を持たない細胞の場合、ＲＮＰは単にＥＧＦＰで標識でき、細胞内のＤＮＡナノ構造の共局在は、ＤＡＰＩで染色した細胞を用いた蛍光顕微鏡で評価できる。ＥＧＦＰ蛍光が青色ＤＡＰＩで染色された核と共局在していれば、システムがＲＮＰ構築物を送達できたことがわかる。議論したように、使用した用量でのこれらの細胞に対する細胞毒性効果は、ＭＴＴ細胞生存率アッセイで調べることができる。最後に、ＴＨＰ－１細胞とＲＡＷ２６４細胞をＤＮＡナノ構造で処理し、炎症性サイトカインのＥＬＩＳＡアッセイと、亜酸化窒素生成に伴う炎症反応を迅速に評価するためのＧｒｅｉｓｓアッセイを用いて、免疫反応を定量化できる。ＴＨＰ－１細胞は強い亜酸化窒素産生を読み取れないが、ＲＡＷ２５４マウス細胞は炎症に敏感で、強い亜酸化窒素シグナルを産生する。生物活性の読み出しは、ＤＮＡナノ構造の物理的特性や設計パラメーターと関連付けることができる。これらの結果は、データベースを構築し、関心のあるデザイン空間を予測するために使用される。

【図面】

【図１Ａ】

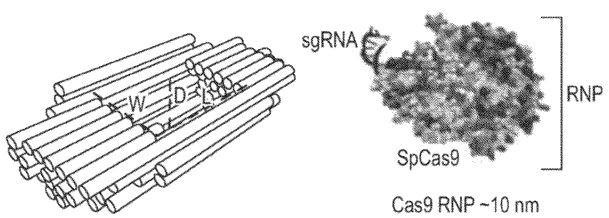


Fig. 1A

【図１Ｂ】

設計寸法	カプセル	空洞
長さ (nm)	60.0	23.1
幅 (nm)	26.0	15.6
奥行き (nm)	23.4	13.0

Fig. 1B

【図１Ｃ】

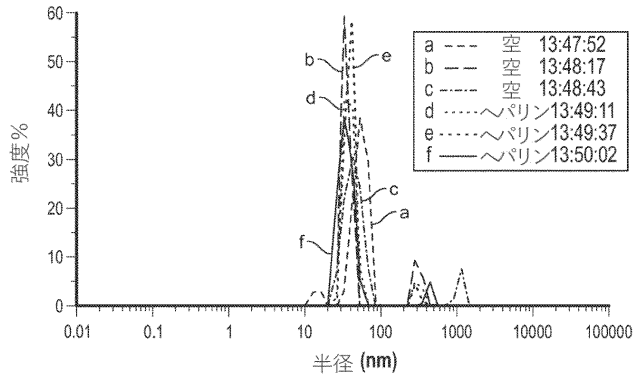


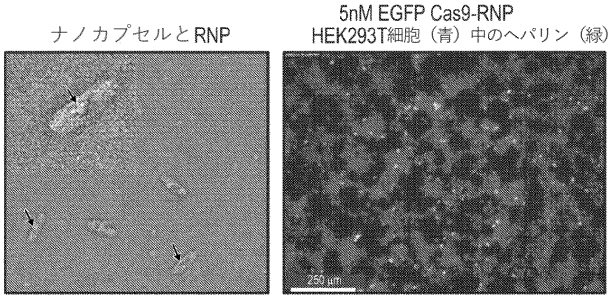
Fig. 1C

【図１Ｄ】

	サイズ (avg, nm)*	ゼータ電位 (avg, mV)**
DNAO 空	60.2 ± 1.2	-5.93 ± 4.14
DNAO と RNP および Hep	47.1 ± 0.9	-5.81 ± 4.80

Fig. 1D

【図１Ｅ】



TEM により DNA ナノカプセルへの RNP 封入を確認

蛍光の重複によりRNP送達を確認

Fig. 1E

【図１Ｆ】

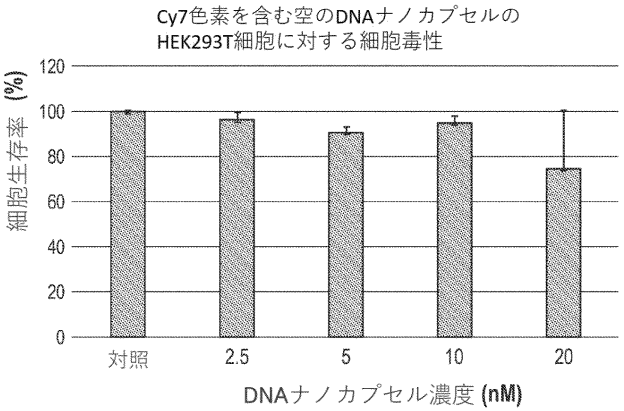


Fig. 1F

【図１Ｇ】

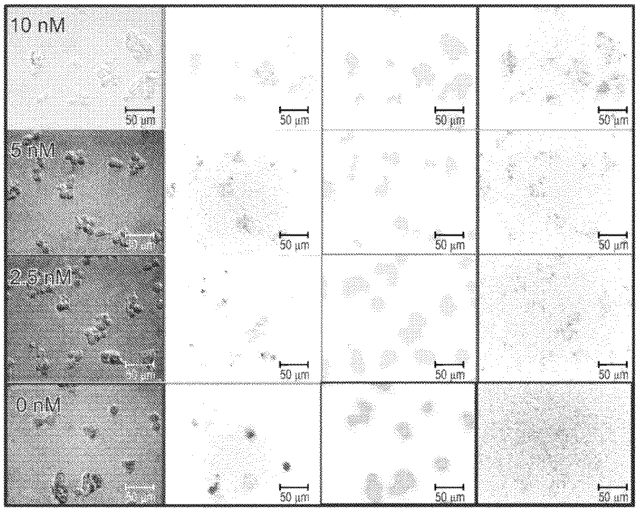


Fig. 1G

【図１Ｈ】

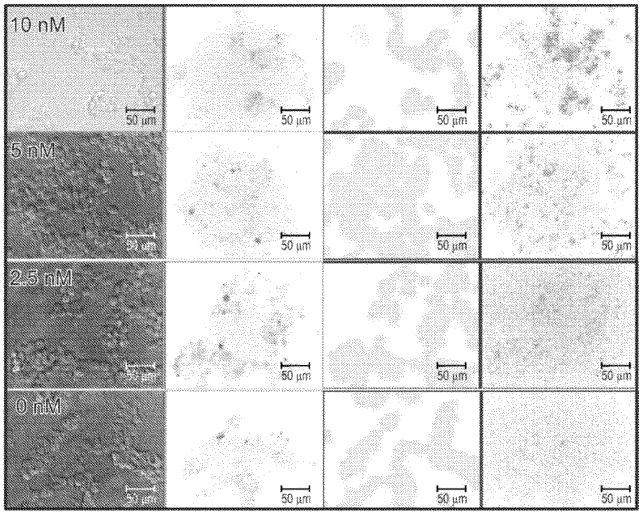


Fig. 1H

【図２】

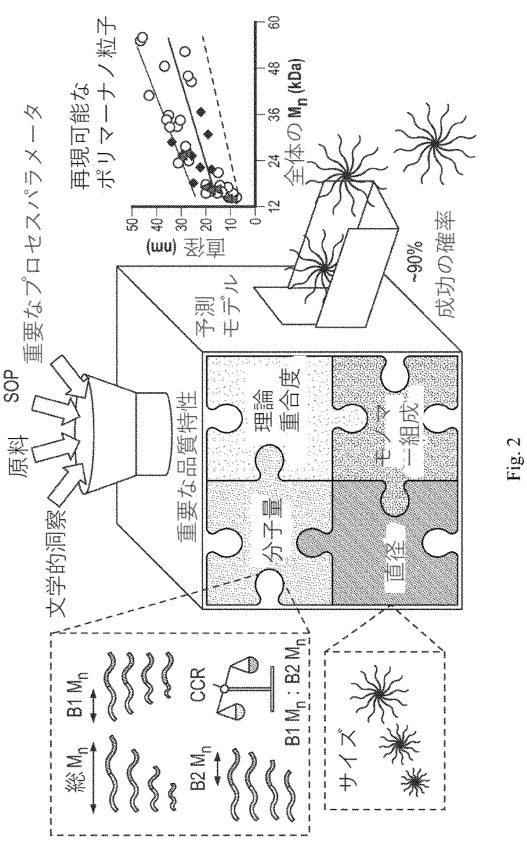


Fig. 2

【図３】

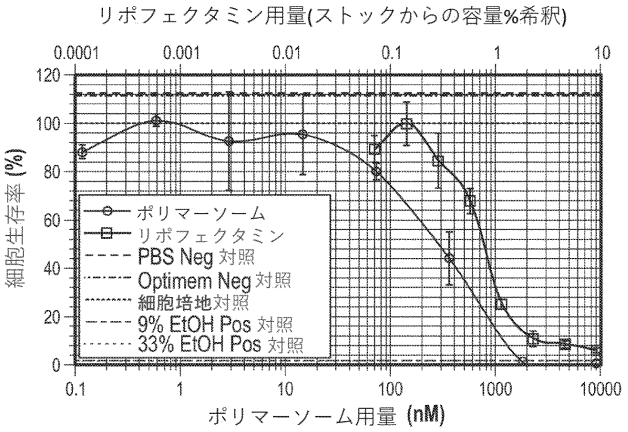


Fig. 3

【図４】

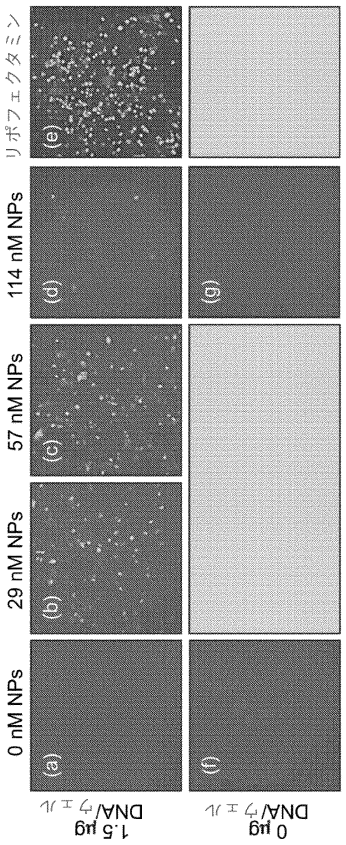


Fig. 4

【図５Ａ】

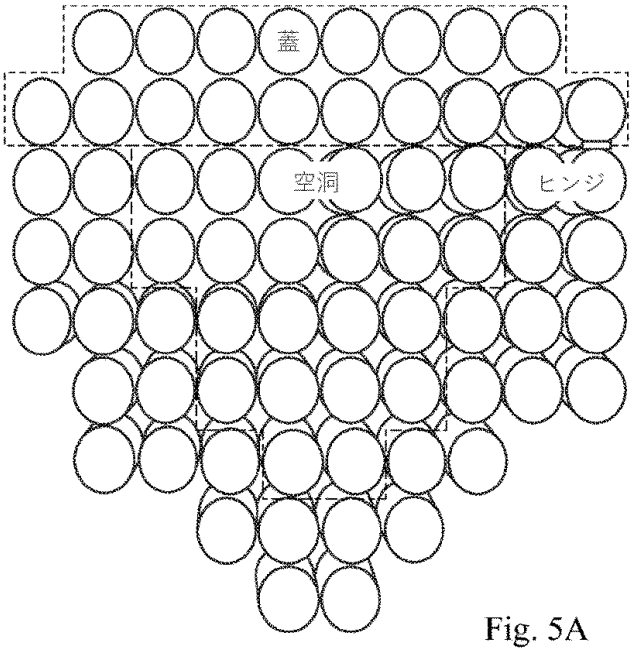


Fig. 5A

【図５Ｂ】

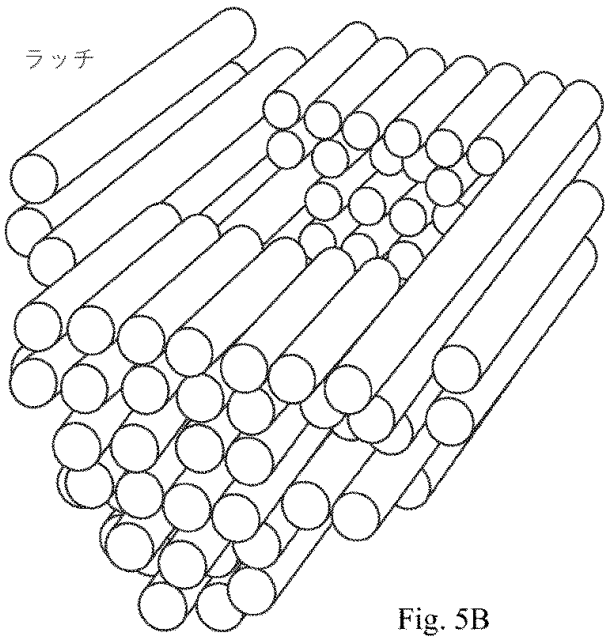


Fig. 5B

【図６】

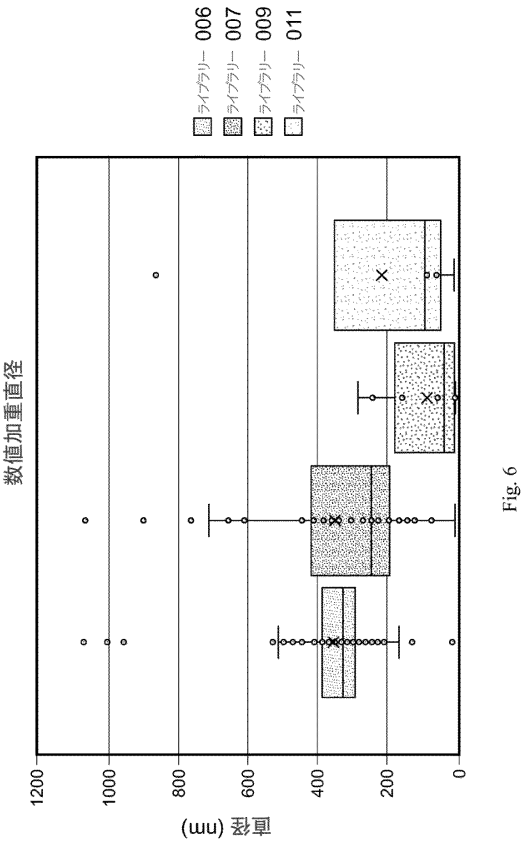


Fig. 6

【図７Ａ】

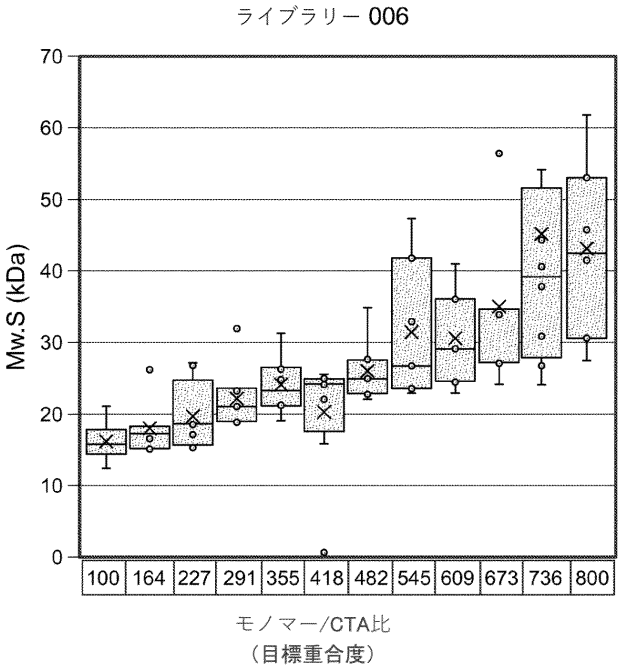


Fig. 7A

【図７Ｂ】

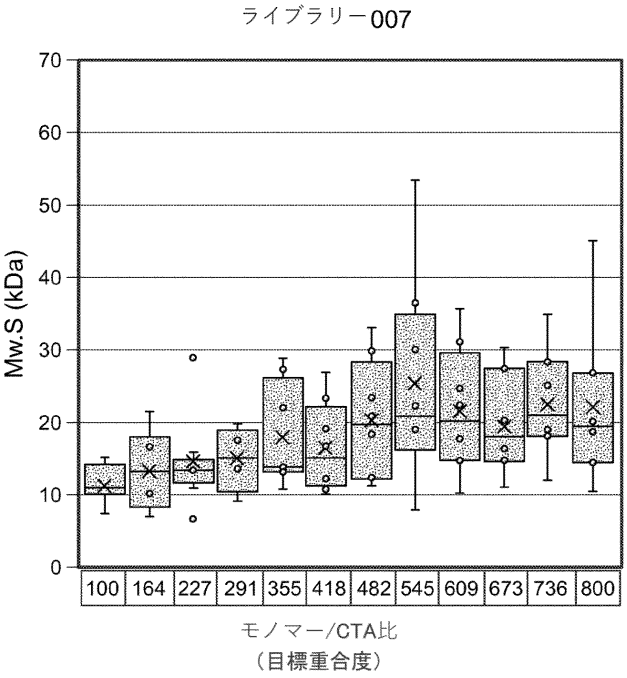


Fig. 7B

【図７Ｃ】

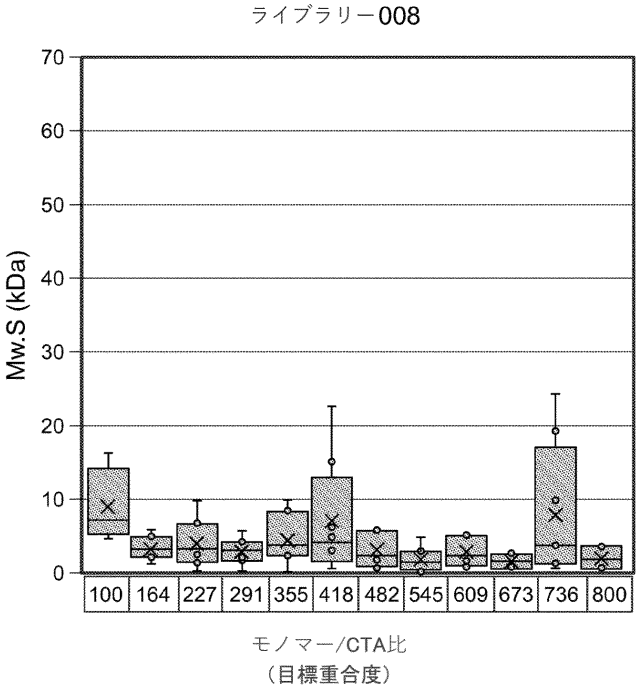


Fig. 7C

【図８Ａ】

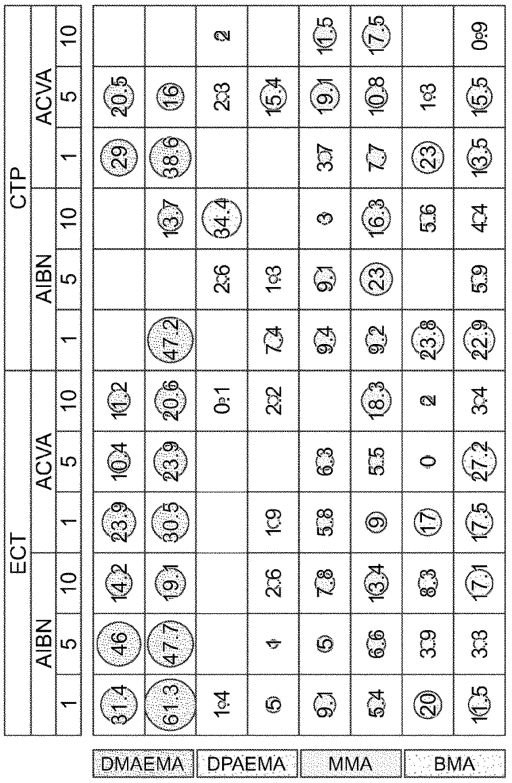


Fig. 8A

【図８Ｂ】

ライブラリー011

ECT						CTP					
AIBN		ACVA		AIBN		ACVA					
1	5	1	5	10	10	1	5	1	5	10	10
8.5	16.9	10.8			17.3						
15.6		10.7	7.2	4.6	11	8					
			0:6		5.8						
0:4			0:1				0:1				
10.5	5.1	10.5	5.9	5.9	13.2	5.3	10.8	0:7	4:1	0:6	
6.4	7.1	9.4	12.8	8.6	8	4.2		3:5	2:1	1:4	
44.6	3.2	14.3	15.5	3.6	6.6	14.2	0:9		0:3		
22.1	5	10.6	20	3.4	25.6	11.6	1:6				

Fig. 8B

【図９Ａ】

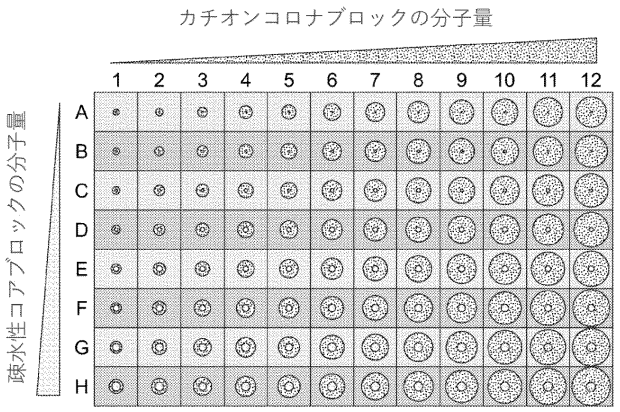


Fig. 9A

【図９Ｂ】

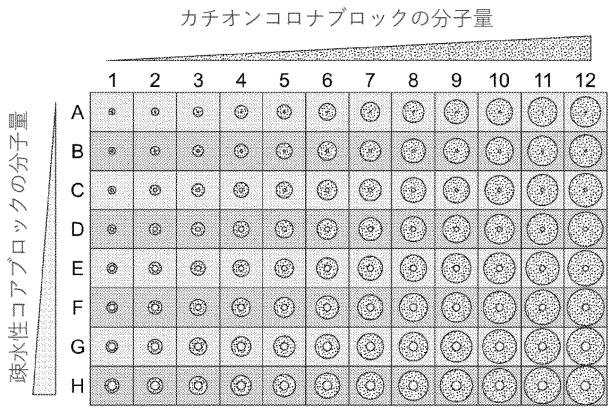


Fig. 9B

【図９Ｃ】

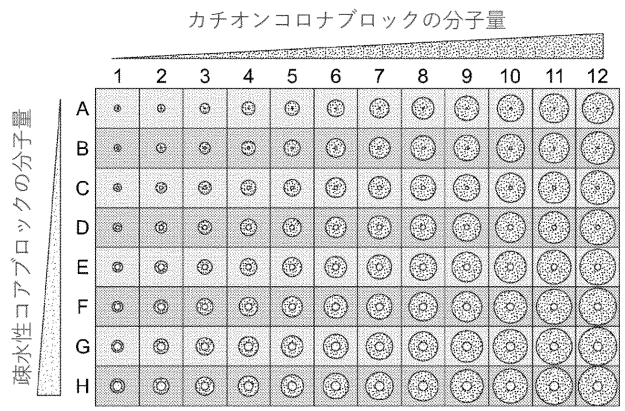


Fig. 9C

【図１０Ａ】

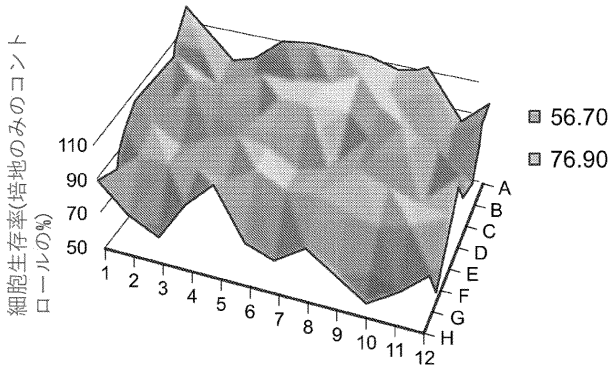


Fig. 10A

【図１０Ｂ】

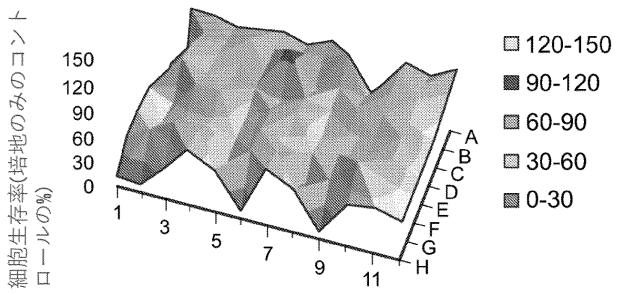


Fig. 10B

【図１０Ｃ】

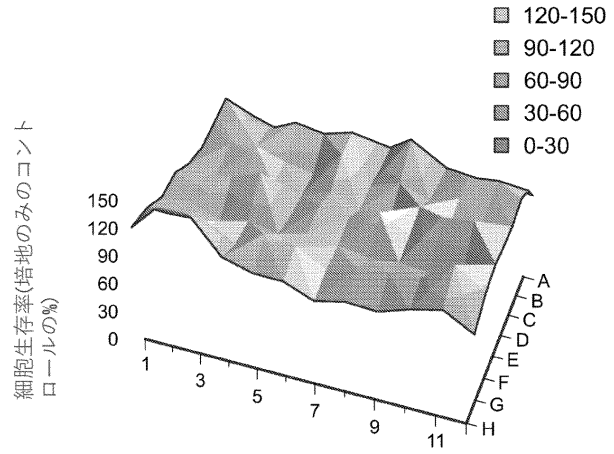


Fig. 10C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/61846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 47/58, A61K 47/32, C08F 220/36, A61K 48/00, G16B 15/10, G16B 15/00 (2022.01)
CPC - A61K 47/58, A61K 47/32, C08F 220/36, A61K 48/005, A61K 48/00, C12N 15/113, C12N 2310/20, C12N 15/102, G16B 15/10, G16B 15/00, Y10S 977/728

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2020/051507 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC.) 12 March 2020 (12.03.2020) Abstract; page 10, ln 14-33page 10, ln 14-33; page 11, ln 29-32; page 20, ln 29-33; page 21, ln 1-10; page 21, ln 11-29; page 47, ln 14-33; page 44, ln 9-15; page 58, ln 12-29; page 64, ln 32-33; page 64, ln 1-17; page 71, ln 28-33; page 72, ln 1-6; page 73, ln 13-33; page 86, ln 1-3; page 132, ln 30-33; page 133, ln 1-6; page 161, ln 25-28; page 165, ln 9-23; page 179, ln 15-25; page 192, ln 25-33; page 193, ln 30-33; page 194, ln 1-7; page 200, ln 26-33; claim 1; claim 16-18; claim 21-24;Fig. 1A; Fig. 2A; Fig. 4; Figure 6	1-15, 17, 19-36 --- 16, 18
Y	WO 2019/152957 A1 (ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY) 08 August 2019 (08.08.2019) claim 1; claim 2	16, 18
A	US 2012/0251583 A1 (ROTHEMUND) 04 October 2012 (04.10.2012), whole document	1
A	US 2015/0104408 A1 (ARROWHEAD MADISON INC.) 16 April 2015 (16.04.2015) whole document	1
A	WO 2019/126627 A1 (RENSSELAER POLYTECHNIC INSTITUTE) 27 June 2019 (27.06.2019), whole document	1

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
11 March 2022	MAR 30 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/61846

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.: 115-117, 121-127, 133-140, 144-191
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-36, directed to a DNA nanostructure delivery composition comprising a single stranded DNA scaffold and one or more oligonucleotides that bind through complementary base pairing with a segment of the DNA scaffold, wherein the one or more oligonucleotides cause the DNA scaffold to fold, and wherein the composition comprises more than one payload for delivery or a nucleic acid construct payload.

Group II: Claims 37-111, directed to a method for gene therapy comprising administering to a patient a DNA nanostructure delivery composition comprising a single stranded DNA scaffold and one or more oligonucleotides that bind through complementary base pairing with a segment of the DNA scaffold, wherein the one or more oligonucleotides cause the DNA scaffold to fold, and wherein the composition comprises more than one payload for delivery or a nucleic acid construct payload.

----------continued on supplemental 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-36

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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/61846

Box III: Observations where unity of invention is lacking:

Group III: Claims 112-114, directed to a method comprising synthesizing a diverse set of non-viral gene delivery compositions, wherein each non-viral gene delivery composition differs from each other non-viral gene delivery composition of the diverse set with respect to at least one of a set of composition characteristics.

Group IV: Claims 118-120, directed to a RAFT block copolymer comprising a first terminus comprising a first capping unit derived from a first chain transfer agent in a RAFT copolymerization process, a first block, a second block, and a second terminus comprising a second capping unit derived from a second chain transfer agent.

Group V: Claims 128-132, directed to a method of preparing a RAFT block copolymer.

Group VI: Claims 141-143, directed to a method of preparing a library of RAFT block copolymers.

The inventions listed as Groups I, II, III, IV, V and VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires a DNA nanostructure delivery composition, not required by Group II, III, IV, V & VI.

Group II requires a method for gene therapy comprising administering to a patient a DNA nanostructure delivery composition, not required by Group I, III, IV, V & VI.

Group III requires a method comprising synthesizing a diverse set of non-viral gene delivery compositions, not required by Group I, II, IV, V & VI.

Group IV requires a RAFT block copolymer, not required by Group I, II, III, V & VI.

Group V requires a method of preparing a RAFT block copolymer, not required by Group I, II, III, IV & VI.

Group VI requires a method of preparing a library of RAFT block copolymers, not required by Group I, II, III, IV & V.

Common Technical Features

The features shared by the inventions listed as Group I, II, III, IV, V and VI are a DNA nanostructure with single stranded DNA scaffold, one or more oligonucleotides that bind through complementary base pairing with a segment of the DNA scaffold, wherein the one or more oligonucleotides cause the DNA scaffold to fold, and wherein the composition comprises more than one payload for delivery or a nucleic acid construct.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2012/0251583 A1 to Rothemund (hereinafter 'Rothemund') in view of US 2015/0104408 A1 to Arrowhead Madison Inc (hereinafter 'Arrowhead').

Rothemund discloses a DNA nanostructure with single stranded DNA scaffold, one or more oligonucleotides that bind through complementary base pairing with a segment of the DNA scaffold, wherein the one or more oligonucleotides cause the DNA scaffold to fold (claim 69- "A nucleic acid nanostructure comprising: at least one unit, the unit comprising, a single scaffold polynucleotide strand scaffold; and a plurality of helper/staple strands each being designed to be at least partially complementary to the single stranded polynucleotide scaffold such that the helper/staple strands self anneal with the single strand"; para [0014]), but does not teach the composition comprises more than one payload for delivery or a nucleic acid construct.
Arrowhead teaches a structure for delivering polynucleotides (Abstract- "directed membrane active poly(acrylate) polymers and compositions for targeted delivery of RNA interference (RNAi) polynucleotides cells in vivo. RNAi polynucleotides are conjugated to the poly(acrylate) polymers and the polymers are reversibly modified to enable in vivo targeted delivery. Membrane activity of the poly(acrylate) provides for movement of the RNAi polynucleotides"). Since, Arrowhead teaches using structures for delivering polynucleotides (Abstract), and Rothemund teaches that disclosed nanostructure can be used for in vivo delivery (para [0007]- "invention also provides living organisms comprising a nanostructure of the invention either produced in vivo or delivered to the living organism") it would have been obvious to one of ordinary skill in the art, to have combined the teachings of Rothemund with Arrowhead and optimized the DNA nanostructure to deliver polynucleotides, using routine experimentation.

The features shared by the inventions listed as Group IV, V and VI are a RAFT block copolymer.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by Arrowhead.

Arrowhead teaches a RAFT block copolymer (para [0027]- " RAFT polymerization of amphipathic poly(acrylate) random copolymers").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

----------continued on next sheet----------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/61846

continuation of previous sheet:

Groups I, II, III, IV, V and VI therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)
Claims 115-117, 121-127, 133-140 and 144-191 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Note: Claim 142 is objected to for being self-dependent. For the purposes of this application, claim 142 is construed as though depending from claim 141.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62 Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113 Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/54 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/54	
Ｃ１２Ｎ	*15/115(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/115 Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｐ	*7/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/00	
Ａ６１Ｐ	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*17/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ	*21/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00	
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*31/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ａ６１Ｋ	*38/46 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/46	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ａ６１Ｋ	*31/711(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711	
Ａ６１Ｋ	*47/64 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/64	
Ａ６１Ｋ	*9/51 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51	
Ａ６１Ｋ	*47/34 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｋ	*47/32 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/32	
Ｃ０８Ｆ	*297/00 (2006.01)*	Ｃ０８Ｆ	297/00	

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,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　稲井 史生
(74)代理人　100170520
弁理士　笹倉 真奈美
(74)代理人　100221545
弁理士　白江 雄介
(72)発明者　ズオン，アンソニー ディ
アメリカ合衆国４３２０１オハイオ州コロンバス、キング・アベニュー５０５
(72)発明者　ハック，ダニエル
アメリカ合衆国４３２０１オハイオ州コロンバス、キング・アベニュー５０５
(72)発明者　シムズ，ジュニア，ケネス アール
アメリカ合衆国４３２０１オハイオ州コロンバス、キング・アベニュー５０５
(72)発明者　グプタ，チェリー
アメリカ合衆国４３２０１オハイオ州コロンバス、キング・アベニュー５０５
(72)発明者　キュート，ステファニー エム
アメリカ合衆国４３２０１オハイオ州コロンバス、キング・アベニュー５０５
(72)発明者　リリー，ジェイコブ
アメリカ合衆国４３２０１オハイオ州コロンバス、キング・アベニュー５０５
(72)発明者　コーリス，マイク
アメリカ合衆国４３２０１オハイオ州コロンバス、キング・アベニュー５０５

Ｆターム（参考）　4C076　AA64 AA65 AA95 BB11 BB21 CC09 CC14 CC18 CC27 CC32 CC41 EE13 EE23 EE26H EE59 FF70
4C084　AA13 BA01 BA08 BA22 BA44 CA04 DC22 MA02 MA55 NA13 NA14 ZA01 ZA51 ZA59 ZA94 ZB26 ZB27 ZB35

Fターム（参考）

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA03 MA04 MA55 NA13 NA14 ZA01
ZA51 ZA59 ZA94 ZB26 ZB27 ZB35
4J026 HA11 HA22 HA32 HA39 HB11 HB22 HB32 HB39 HE01