(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-508832
(P2024-508832A)
(43)公表日　令和6年2月28日(2024.2.28)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｂ０３３
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*37/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*25/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		４Ｃ０８６

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2023-552064(P2023-552064)
(86)(22)出願日　令和4年2月25日(2022.2.25)
(85)翻訳文提出日　令和5年10月17日(2023.10.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/017984
(87)国際公開番号　WO2022/183043
(87)国際公開日　令和4年9月1日(2022.9.1)
(31)優先権主張番号　63/154,530
(32)優先日　令和3年2月26日(2021.2.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/273,086
(32)優先日　令和3年10月28日(2021.10.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/290,522
最終頁に続く

(71)出願人　500041019
ノースウェスタン ユニバーシティ
アメリカ合衆国 イリノイ ６０２０８，
エヴァンストン， クラーク ストリート
６３３
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺 陽一
(74)代理人　100141977
弁理士　中島 勝
(74)代理人　100138210
弁理士　池田 達則
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ゲノム編集球状核酸（ＳＮＡ）を開発するための戦略

(57)【要約】
球状核酸（ＳＮＡ）は、その化学的に調整可能な構造、生体適合性、及びトランスフェクション試薬なしで細胞に迅速に侵入する能力により、治療的送達のための魅力的なプラットフォームである。本開示は、遺伝子編集タンパク質を細胞に送達するためのＳＮＡ及び戦略を提供する。送達された遺伝子編集タンパク質は、酵素活性のままであり、哺乳類細胞に迅速に侵入する。
【選択図】図１

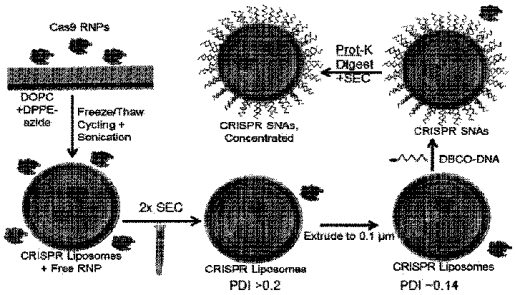


FIGURE 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
タンパク質－コア球状核酸（ＰｒｏＳＮＡ）であって、
（ａ）遺伝子編集タンパク質を含むタンパク質コアと、
（ｂ）前記タンパク質コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェルと、を含む、タンパク質－コア球状核酸。
【請求項２】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドが、前記タンパク質コアに共有結合している、請求項１に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項３】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質コアに結合している、請求項２に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項４】
前記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、無痕跡型リンカー、又はそれらの組み合わせである、請求項３に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項５】
前記リンカーが、カルバミン酸アルキレンジチオレートリンカーである、請求項３又は４に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項６】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－$Ｃ_{2-5}$アルキレン－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－オリゴヌクレオチド、又はタンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－$ＣＨ_{2}$－Ａｒ－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含み、Ａｒが、メタ又はパラ置換フェニルを含む、請求項５に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項７】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－Ｃ（ＺＡ）（ＺＢ）$Ｃ_{1-4}$アルキレン－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－Ｓ－Ｓ－Ｃ（ＹＡ）（ＹＢ）$Ｃ_{1-6}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含み、ＺＡ、ＺＢ、ＸＡ、ＸＢ、ＹＡ、及びＹＢが、それぞれ独立して、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである、請求項５に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項８】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－Ａｒ－Ｓ－Ｓ－Ｃ（ＹＡ）（ＹＢ）$Ｃ_{2-6}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含み、ＸＡ、ＸＢ、ＹＡ、及びＹＢが、それぞれ独立して、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである、請求項５に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項９】
前記リンカーが、アミドアルキレンジチオレートリンカーである、請求項３に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項１０】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{2-5}$アルキレン－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含む、請求項９に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項１１】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{1-4}$アルキレン－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－Ｓ－Ｓ－Ｃ（ＹＡ）（ＹＢ）$Ｃ_{1-6}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含み、ＸＡ、ＸＢ、ＹＡ、及びＹＢが、それぞれ独立して、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである、請求項９に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項１２】

前記リンカーが、アミドアルキレンチオエーテルリンカーである、請求項３に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項１３】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{2-4}$アルキレン－Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－$Ｃ_{2-6}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含む、請求項１２に記載のＰｒｏＳＮＡ。
【請求項１４】
球状核酸（ＳＮＡ）であって、
（ａ）ナノ粒子コアと、
（ｂ）前記ナノ粒子コアの外側表面に結合したオリゴヌクレオチドのシェルと、
（ｃ）遺伝子編集タンパク質と、を含む、球状核酸。
【請求項１５】
前記ナノ粒子コアが、リポソームコア又は脂質ナノ粒子コアである、請求項１４に記載のＳＮＡ。
【請求項１６】
前記脂質ナノ粒子コアが、イオン化可能な脂質、リン脂質、ステロール、及び脂質－ポリエチレングリコール（脂質－ＰＥＧ）コンジュゲートを含む、請求項１５に記載のＳＮＡ。
【請求項１７】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドが、前記脂質－ＰＥＧコンジュゲートを介して前記脂質ナノ粒子コアの外部に共有結合している、請求項１６に記載のＳＮＡ。
【請求項１８】
前記遺伝子編集タンパク質が、前記脂質ナノ粒子コアに封入されている、請求項１５～１７のいずれか一項に記載のＳＮＡ。
【請求項１９】
請求項１～１３のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡが、前記脂質ナノ粒子コアに封入されている、請求項１５～１８のいずれか一項に記載のＳＮＡ。
【請求項２０】
リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体が、前記脂質ナノ粒子コアに封入され、前記ＲＮＰが、前記遺伝子編集タンパク質、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む、請求項１５～１８のいずれか一項に記載のＳＮＡ。
【請求項２１】
前記リポソームコアが、複数の脂質基を含む、請求項１５に記載のＳＮＡ。
【請求項２２】
前記遺伝子編集タンパク質が、前記リポソームコアに封入されている、請求項１５又は２１に記載のＳＮＡ。
【請求項２３】
請求項１～１３のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡが、リポソームナノ粒子コアに封入されている、請求項２２に記載のＳＮＡ。
【請求項２４】
リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体が、前記脂質ナノ粒子コアに封入され、前記ＲＮＰが、前記遺伝子編集タンパク質、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む、請求項１５又は２１に記載のＳＮＡ。
【請求項２５】
前記複数の脂質基が、脂質のホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、及びホスファチジルエタノールアミンファミリーからなる群から選択される脂質を含む、請求項２１～２４のいずれか一項に記載のＳＮＡ。
【請求項２６】

前記脂質が、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－ホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－ホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＳＰＧ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＯＰＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、及び１，２－ジヘキサデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）からなる群から選択される、請求項２５に記載のＳＮＡ。

【請求項２７】

前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、脂質アンカー基を介して前記リポソーム又は前記脂質ナノ粒子コアの前記外部に結合している、請求項１４～２６のいずれか一項に記載のＳＮＡ。

【請求項２８】

前記脂質アンカー基が、前記少なくとも１個のオリゴヌクレオチドの５’終端又は３’終端に結合している、請求項２７に記載のＳＮＡ。

【請求項２９】

前記脂質アンカー基が、トコフェロール又はコレステロールである、請求項２７又は２８に記載のＳＮＡ。

【請求項３０】

前記遺伝子編集タンパク質が、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（Ｃａｓ）である、請求項１～１３のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又は請求項１４～２９のいずれか一項に記載のＳＮＡ。

【請求項３１】

前記Ｃａｓが、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１３、又はそれらの組み合わせである、請求項３０に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。

【請求項３２】

前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、その５’終端及び／又は３’終端でジベンゾシクロオクチル（ＤＢＣＯ）で修飾される、請求項１～３１のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。

【請求項３３】

前記オリゴヌクレオチドのシェルが、一本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む、請求項１～３２のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。

【請求項３４】

前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、修飾オリゴヌクレオチドである、請求項１～３３のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。

【請求項３５】

前記オリゴヌクレオチドのシェルが、約２～約１００個のオリゴヌクレオチドを含む、請求項１～３４のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。

【請求項３６】

前記オリゴヌクレオチドのシェルが、約１０～約８０個のオリゴヌクレオチドを含む、請求項３５に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。

【請求項３７】

前記オリゴヌクレオチドのシェルが、約５～約５０個のオリゴヌクレオチドを含む、請求項３５に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。

【請求項３８】

前記オリゴヌクレオチドのシェルが、約５～約２０個のオリゴヌクレオチドを含む、請

求項３５に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項３９】
前記オリゴヌクレオチドのシェルが、約１４個のオリゴヌクレオチドを含む、請求項３５に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４０】
前記オリゴヌクレオチドのシェルが、約１５個のオリゴヌクレオチドを含む、請求項３５に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４１】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドが、約５～約１００ヌクレオチド長である、請求項１～４０のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４２】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドが、約１０～約５０ヌクレオチド長である、請求項４１に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４３】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の１個以上のオリゴヌクレオチドが、$(GGX)_n$ヌクレオチド配列を含み、配列中、ｎは２～２０であり、Ｘは核酸塩基（Ａ、Ｃ、Ｔ、Ｇ、又はＵ）である、請求項１～４２のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４４】
前記$(GGX)_n$ヌクレオチド配列が、前記１個以上のオリゴヌクレオチドの５’終端にある、請求項４３に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４５】
前記$(GGX)_n$ヌクレオチド配列が、前記１個以上のオリゴヌクレオチドの３’終端にある、請求項４３に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４６】
前記$(GGX)_n$ヌクレオチド配列が、$(GGT)_n$ヌクレオチド配列である、請求項４３～４５のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４７】
前記ＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡの直径が、約１ナノメートル（ｎｍ）～約５００ｎｍである、請求項１～４６のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項４８】
前記ＳＮＡの直径が、約５０ナノメートル以下である、請求項１４～４７のいずれか一項に記載のＳＮＡ。
【請求項４９】
前記オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドが、標的化オリゴヌクレオチドである、請求項１～４７のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ若しくはＳＮＡ、又は請求項４８に記載のＳＮＡ。
【請求項５０】
前記オリゴヌクレオチドのシェルが、阻害性オリゴヌクレオチド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、遺伝子編集因子基質ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む、請求項１～４７のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ若しくはＳＮＡ、又は請求項４８に記載のＳＮＡ。
【請求項５１】
前記阻害性オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、アプタマー、短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、ＤＮＡザイム、又はアプタザイムである、請求項５０に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項５２】
前記免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、ＣｐＧモチーフ含有オリゴヌクレオチド、二本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド、又は一本鎖ＲＮＡオリゴヌクレオチドである、請求項５０に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項５３】

前記免疫刺激性オリゴヌクレオチドのそれぞれが、ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）アゴニストである、請求項５０に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項５４】
前記ＴＬＲが、ｔｏｌｌ様受容体１（ＴＬＲ１）、ｔｏｌｌ様受容体２（ＴＬＲ２）、ｔｏｌｌ様受容体３（ＴＬＲ３）、ｔｏｌｌ様受容体４（ＴＬＲ４）、ｔｏｌｌ様受容体５（ＴＬＲ５）、ｔｏｌｌ様受容体６（ＴＬＲ６）、ｔｏｌｌ様受容体７（ＴＬＲ７）、ｔｏｌｌ様受容体８（ＴＬＲ８）、ｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ９）、ｔｏｌｌ様受容体１０（ＴＬＲ１０）、ｔｏｌｌ様受容体１１（ＴＬＲ１１）、ｔｏｌｌ様受容体１２（ＴＬＲ１２）、及びｔｏｌｌ様受容体１３（ＴＬＲ１３）からなる群から選択される、請求項５３に記載のＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡ。
【請求項５５】
請求項１～１３、３０～４７、又は４９～５４のいずれか一項に記載の複数のタンパク質－コア球状核酸（ＰｒｏＳＮＡ）を含む、組成物。
【請求項５６】
ガイドＲＮＡを更に含む、請求項５５に記載の組成物。
【請求項５７】
前記ＰｒｏＳＮＡのうちの少なくとも２つが、異なるタンパク質コアを含む、請求項５５又は５６に記載の組成物。
【請求項５８】
請求項１４～５４のいずれか一項に記載の複数の球状核酸（ＳＮＡ）を含む、組成物。
【請求項５９】
前記ＳＮＡのうちの少なくとも２つが、異なるナノ粒子コアを含む、請求項５７に記載の組成物。
【請求項６０】
遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項１～１３、３０～４７、又は４９～５４のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡと接触させることを含む、方法。
【請求項６１】
遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項５５～５７のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含む、方法。
【請求項６２】
遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項１４～５４のいずれか一項に記載のＳＮＡと接触させることを含む、方法。
【請求項６３】
遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項５８又は５９に記載の組成物と接触させることを含む、方法。
【請求項６４】
対象において障害を治療、改善、及び／又は予防する方法であって、前記対象に、有効量の（ｉ）請求項１～１３、３０～４７、若しくは４９～５４のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ、（ｉｉ）請求項１４～５４のいずれか一項に記載のＳＮＡ、（ｉｉｉ）請求項５５～５９に記載の組成物、又は（ｉｖ）それらの組み合わせを投与することを含む、方法。
【請求項６５】
前記障害が、がん、感染性疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、遺伝性疾患、心血管疾患、又はそれらの組み合わせである、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
以下のように、Ｎ末端からＣ末端に配置された、以下：
（ｉ）１つ以上のＧＡＬＡペプチド、
（ｉｉ）遺伝子編集タンパク質、及び
（ｉｉｉ）核局在化シグナル（ＮＬＳ）、を含む、融合タンパク質。

【請求項６７】
前記１つ以上のＧＡＬＡペプチドが、３つの連続したＧＡＬＡペプチドを含む、請求項６６に記載の融合タンパク質。
【請求項６８】
前記１つ以上のＧＡＬＡペプチドのそれぞれが、配列番号２２に記載のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項６６又は６７に記載の融合タンパク質。
【請求項６９】
前記１つ以上のＧＡＬＡペプチドが、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項６６～６８のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項７０】
前記遺伝子編集タンパク質が、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（Ｃａｓ）である、請求項６６～６９のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項７１】
前記Ｃａｓが、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１３、又はそれらの組み合わせである、請求項７０に記載の融合タンパク質。
【請求項７２】
前記Ｃａｓ９が、配列番号１又は配列番号２５に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項７１に記載の融合タンパク質。
【請求項７３】
前記Ｃａｓ１２が、配列番号２７に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項７１又は７２に記載の融合タンパク質。
【請求項７４】
前記Ｃａｓ１３が、配列番号２９に記載の前記アミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項７１～７３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項７５】
前記ＮＬＳが、配列番号２３又は配列番号２８に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項６６～７４のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項７６】
請求項６６～７５のいずれか一項に記載の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。
【請求項７７】
前記遺伝子編集タンパク質が、請求項６６～７５のいずれか一項に記載の融合タンパク質である、請求項１～１３、３０～４７、若しくは４９～５４のいずれか一項に記載のＰｒｏＳＮＡ、又は請求項５５～５７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７８】
前記遺伝子編集タンパク質が、請求項６６～７５のいずれか一項に記載の融合タンパク質である、請求項１４～５４のいずれか一項に記載のＳＮＡ、又は請求項５８若しくは５９に記載の組成物。
【請求項７９】
遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項６６～７５のいずれか一項に記載の融合タンパク質と接触させることを含む、方法。
【請求項８０】
遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項７６に記載の組成物と接触させることを含む、方法。
【請求項８１】

対象において障害を治療、改善、及び／又は予防する方法であって、前記対象に、有効量の（ｉ）請求項６６～７５のいずれか一項に記載の融合タンパク質、（ｉｉ）請求項７６に記載の組成物、又は（ｉｉｉ）それらの組み合わせを投与することを含む、方法。

【請求項８２】

前記障害が、がん、感染性疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、遺伝性疾患、心血管疾患、又はそれらの組み合わせである、請求項８１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２０２１年２月２６日に出願された米国仮特許出願第６３／１５４，５３０号、２０２１年１０月２８日に出願された米国仮特許出願第６３／２７３，０８６号、及び２０２１年１２月１６日に出願された米国仮特許出願第６３／２９０，５２２号の米国特許法第１１９条（ｅ）下の優先権の利益を主張し、それらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０００２】

政府の利益に関する声明

本発明は、Ｆｅｄｅｒａｌ Ｂｕｒｅａｕ ｏｆ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ（ＦＢＩ）によって授与された認可番号ＤＪＦ－１５－１２００－Ｋ－０００１７３０の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【０００３】

電子的に提出された資料の参照による組み込み

この出願には、本開示の別の部分として、参照によりその全体が組み込まれ、次のように識別される、コンピュータ読み取り可能な形式の配列表が含まれる：ファイル名：２０２１－０４３Ｒ＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ；サイズ：６１，１２９バイト；作成日：２０２２年２月２５日。

【背景技術】

【０００４】

ゲノム編集とは、特定のＤＮＡ配列の除去又は挿入を指す。ゲノム編集タンパク質のメンバーの中で、その特異性及び汎用性のために、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート、及びＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９）タンパク質は、臨床翻訳のためのゲノムを編集及び調節するための効率的なゲノム編集ツールとして利用されている［Ｐ．Ｈｏｒｖａｔｈ，Ｒ．Ｂａｒｒａｎｇｏｕ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１０，３２７，１６７－１７０］。Ｃａｓ９酵素のかなりの成果がなされているが、Ｃａｓ９単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）複合体の低減されたオフターゲット効果及び効率的かつ直接的な形質導入は、依然として非常に望ましい［Ｌ．Ｙ．Ｃｈｏｕ，Ｋ．Ｍｉｎｇ，Ｗ．Ｃ．Ｃｈａｎ，Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．２０１１，４０，２３３－２４５、Ｖ．Ｂｉｊｕ，Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．２０１４，４３，７４４－７６４、Ｙ．Ｌｕ，Ａ．Ａ．Ａｉｍｅｔｔｉ，Ｒ．Ｌａｎｇｅｒ，Ｚ．Ｇｕ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍａｔｅｒ．２０１７，２，１６０７５］。

【０００５】

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）／ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）などの迅速にプログラム可能なヌクレアーゼは、広範囲の遺伝性疾患を治療する可能性を有する［Ｇｕｐｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２４（１０）：４１５４－４１６１（２０１４）、Ｈｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １５７（６）：１２６２－１２７８（２０１４）］が、哺乳類細胞への効率的な送達は依然として課題である。

【発明の概要】

【０００６】

遺伝子編集タンパク質のオフターゲット効果及び効率的な形質導入を含むゲノム編集による現在の制限に対処しようとするために、カチオン性リポソーム、カチオン性ポリマー、及び無機ナノ粒子などの様々な非ウイルス送達系が、Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体の送達を安定化及び増強するために設計及び用いられている［Ｙ．Ｆｕ，Ｊ．Ａ．Ｆｏｄｅｎ，Ｃ．Ｋｈａｙｔｅｒ，Ｍ．Ｌ．Ｍａｅｄｅｒ，Ｄ．Ｒｅｙｏｎ，Ｊ．Ｋ．Ｊｏｕｎｇ，Ｊ．Ｄ．Ｓａｎｄｅｒ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３，３１，８２２－８２６、Ｊ．Ｇ．Ｄｏｅｎｃｈ，Ｎ．Ｆｕｓｉ，Ｍ．Ｓｕｌｌｅｎｄｅｒ，Ｍ．Ｈｅｇｄｅ，Ｅ．Ｗ．Ｖａｉｍｂｅｒｇ，Ｋ．Ｆ．Ｄｏｎｏｖａｎ，Ｉ．Ｓｍｉｔｈ，Ｚ．Ｔｏｔｈｏｖａ，Ｃ．Ｗｉｌｅｎ，Ｒ．Ｏｒｃｈａｒｄ，Ｈ．Ｗ．Ｖｉｒｇｉｎ，Ｊ．Ｌｉｓｔｇａｒｔｅｎ，Ｄ．Ｅ．Ｒｏｏｔ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６，３４，１８４－１９１、Ｂ．Ｐ．Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ，Ｖ．Ｐａｔｔａｎａｙａｋ，Ｍ．Ｓ．Ｐｒｅｗ，Ｓ．Ｑ．Ｔｓａｉ，Ｎ．Ｔ．Ｎｇｕｙｅｎ，Ｚ．Ｚｈｅｎｇ，Ｊ．Ｋ．Ｊｏｕｎｇ，Ｎａｔｕｒｅ ２０１６，５２９，４９０－４９５、Ｉ．Ｍ．Ｓｌａｙｍａｋｅｒ，Ｌ．Ｇａｏ，Ｂ．Ｚｅｔｓｃｈｅ，Ｄ．Ａ．Ｓｃｏｔｔ，Ｗ．Ｘ．Ｙａｎ，Ｆ．Ｚｈａｎｇ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１６，３５１，８４－８８］。しかしながら、これらの担体の複雑な設計、放出効率、並びに潜在的な毒性及び免疫原性の副作用は、それらの迅速な臨床的採用を妨げる。ウイルス系は、インビボで細胞を形質導入するための第一の手段として使用されている。これらの系は、パッケージングの制約、免疫原性、及びオフターゲット事象を好むＣａｓ発現の寿命に関連する問題に悩まされている。したがって、ウイルスベクターは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓの直接インビボ送達のための最良の選択ではない。本開示は、ナノ粒子コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェルを含む球状核酸、及び遺伝子編集タンパク質の送達におけるそれらの使用に関する。

【０００７】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、（ａ）遺伝子編集タンパク質を含むタンパク質コアと、（ｂ）タンパク質コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェルと、を含む、タンパク質－コア球状核酸（ＰｒｏＳＮＡ）を提供する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドは、タンパク質コアに共有結合している。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質コアに結合している。更なる実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、無痕跡型リンカー、又はそれらの組み合わせである。なお更なる実施形態では、リンカーは、カルバミン酸アルキレンジチオレートリンカーである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－$Ｃ_{2-5}$アルキレン－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－オリゴヌクレオチド、又はタンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－$ＣＨ_{2}$－Ａｒ－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含み、Ａｒは、メタ又はパラ置換フェニルを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－Ｃ（ＺＡ）（ＺＢ）$Ｃ_{1-4}$アルキレン－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－Ｓ－Ｓ－Ｃ（ＹＡ）（ＹＢ）$Ｃ_{1-6}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含み、ＺＡ、ＺＢ、ＸＡ、ＸＢ、ＹＡ、及びＹＢは、それぞれ独立して、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－Ａｒ－Ｓ－Ｓ－Ｃ（ＹＡ）（ＹＢ）$Ｃ_{2-6}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含み、ＸＡ、ＸＢ、ＹＡ、及びＹＢは、それぞれ独立して、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミドアルキレンジチオレートリンカーである。更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{2-5}$アルキレン－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{1-4}$アルキレン－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－Ｓ－Ｓ－Ｃ（ＹＡ）（ＹＢ）$Ｃ_{1-6}$アルキレン－オ

リゴヌクレオチドを含み、ＸＡ、ＸＢ、ＹＡ、及びＹＢは、それぞれ独立して、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミドアルキレンチオエーテルリンカーである。更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、タンパク質－コア－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－C_{2-4}アルキレン－Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－C_{2-6}アルキレン－オリゴヌクレオチドを含む。

【０００８】

いくつかの態様では、本開示は、（ａ）ナノ粒子コア、（ｂ）ナノ粒子コアの外側表面に結合したオリゴヌクレオチドのシェル、及び（ｃ）遺伝子編集タンパク質を含む、球状核酸（ＳＮＡ）を提供する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子コアは、リポソームコア又は脂質ナノ粒子コアである。更なる実施形態では、脂質ナノ粒子コアは、イオン化可能な脂質、リン脂質、ステロール、及び脂質－ポリエチレングリコール（脂質－ＰＥＧ）コンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドは、脂質－ＰＥＧコンジュゲートを介して脂質ナノ粒子コアの外部に共有結合している。いくつかの実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、脂質ナノ粒子コアに封入されている。いくつかの実施形態では、本開示のＰｒｏＳＮＡは、脂質ナノ粒子コアに封入されている。いくつかの実施形態では、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体は、脂質ナノ粒子コアに封入され、ＲＮＰは、遺伝子編集タンパク質、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、リポソームコアは、複数の脂質基を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、リポソームコアに封入されている。いくつかの実施形態では、本開示のＰｒｏＳＮＡは、リポソームナノ粒子コアに封入されている。いくつかの実施形態では、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体は、脂質ナノ粒子コアに封入され、ＲＮＰは、遺伝子編集タンパク質、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、複数の脂質基は、脂質のホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、及びホスファチジルエタノールアミンのファミリーからなる群から選択される脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質は、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－ホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－ホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＳＰＧ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＯＰＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、及び１，２－ジヘキサデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、脂質アンカー基を介してリポソーム又は脂質ナノ粒子コアの外部に結合している。いくつかの実施形態では、脂質アンカー基は、少なくとも１個のオリゴヌクレオチドの５’終端又は３’終端に結合している。更なる実施形態では、脂質アンカー基は、トコフェロール又はコレステロールである。いくつかの実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（Ｃａｓ）である。更なる実施形態では、Ｃａｓは、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１３、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、その５’終端及び／又は３’終端でジベンゾシクロオクチル（ＤＢＣＯ）で修飾される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、一本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、約２～約１００個のオリゴヌクレオチドを含む。更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは

、約１０～約８０個のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、約５～約５０個のオリゴヌクレオチドを含む。更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、約５～約２０個のオリゴヌクレオチドを含む。なお更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、約１４個のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、約１５個のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドは、約５～約１００ヌクレオチド長である。更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の各オリゴヌクレオチドは、約１０～約５０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の１個以上のオリゴヌクレオチドは、$(GGX)_n$ヌクレオチド配列を含み、配列中、ｎは２～２０であり、Ｘは核酸塩基（Ａ、Ｃ、Ｔ、Ｇ、又はＵ）である。いくつかの実施形態では、$(GGX)_n$ヌクレオチド配列は、１個以上のオリゴヌクレオチドの５’終端にある。いくつかの実施形態では、$(GGX)_n$ヌクレオチド配列は、１個以上のオリゴヌクレオチドの３’終端にある。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の１個以上のオリゴヌクレオチドは、$(GGT)_n$ヌクレオチド配列を含み、配列中、ｎは２～２０である。いくつかの実施形態では、$(GGT)_n$ヌクレオチド配列は、１個以上のオリゴヌクレオチドの５’終端にある。いくつかの実施形態では、$(GGT)_n$ヌクレオチド配列は、１個以上のオリゴヌクレオチドの３’終端にある。いくつかの実施形態では、ＰｒｏＳＮＡ又はＳＮＡの直径は、約１ナノメートル（ｎｍ）～約５００ｎｍである。いくつかの実施形態では、ＳＮＡの直径は、約５０ナノメートル以下である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、標的化オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、阻害性オリゴヌクレオチド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、遺伝子編集因子基質ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。更なる実施形態では、阻害性オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、アプタマー、短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、ＤＮＡザイム、又はアプタザイムである。いくつかの実施形態では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、ＣｐＧモチーフ含有オリゴヌクレオチド、二本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド、又は一本鎖ＲＮＡオリゴヌクレオチドである。更なる実施形態では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドのそれぞれは、ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）アゴニストである。なお更なる実施形態では、ＴＬＲは、ｔｏｌｌ様受容体１（ＴＬＲ１）、ｔｏｌｌ様受容体２（ＴＬＲ２）、ｔｏｌｌ様受容体３（ＴＬＲ３）、ｔｏｌｌ様受容体４（ＴＬＲ４）、ｔｏｌｌ様受容体５（ＴＬＲ５）、ｔｏｌｌ様受容体６（ＴＬＲ６）、ｔｏｌｌ様受容体７（ＴＬＲ７）、ｔｏｌｌ様受容体８（ＴＬＲ８）、ｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ９）、ｔｏｌｌ様受容体１０（ＴＬＲ１０）、ｔｏｌｌ様受容体１１（ＴＬＲ１１）、ｔｏｌｌ様受容体１２（ＴＬＲ１２）、及びｔｏｌｌ様受容体１３（ＴＬＲ１３）からなる群から選択される。

【０００９】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される複数のタンパク質－コア球状核酸（ＰｒｏＳＮＡ）を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、ガイドＲＮＡを更に含む。いくつかの実施形態では、少なくとも２つのＰｒｏＳＮＡは、異なるタンパク質コアを含む。

【００１０】

いくつかの態様では、本開示は、本開示の複数の球状核酸（ＳＮＡ）を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、ＳＮＡの少なくとも２つは、異なるナノ粒子コアを含む。

【００１１】

いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、細胞を本開示のＰｒｏＳＮＡと接触させることを含む、方法を提供する。

【００１２】

いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって

、細胞を本開示の組成物と接触させることを含む、方法を提供する。
【００１３】
いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、細胞を本開示のＳＮＡと接触させることを含む、方法を提供する。
【００１４】
いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、細胞を本開示の組成物と接触させることを含む、方法を提供する。
【００１５】
いくつかの態様では、本開示は、対象において障害を治療、改善、及び／又は予防する方法であって、対象に、有効量の（ｉ）本開示のＰｒｏＳＮＡ、（ｉｉ）本開示のＳＮＡ、（ｉｉｉ）本開示の組成物、又は（ｉｖ）それらの組み合わせを投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、障害は、がん、感染性疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、遺伝性疾患、心血管疾患、又はそれらの組み合わせである。
【００１６】
いくつかの態様では、本開示は、以下のように、Ｎ末端からＣ末端に配置された、以下：（ｉ）１つ以上のＧＡＬＡペプチド、（ｉｉ）遺伝子編集タンパク質、及び（ｉｉｉ）核局在化シグナル（ＮＬＳ）、を含む、融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、１つ以上のＧＡＬＡペプチドは、３つの連続したＧＡＬＡペプチドを含む。様々な実施形態では、１つ以上のＧＡＬＡペプチドのそれぞれは、配列番号２２に記載のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、１つ以上のＧＡＬＡペプチドは、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（Ｃａｓ）である。更なる実施形態では、Ｃａｓは、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１３、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９は、配列番号１又は配列番号２５に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２は、配列番号２７に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３は、配列番号２９に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。様々な実施形態では、ＮＬＳは、配列番号２３又は配列番号２８に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。
【００１７】
いくつかの態様では、本開示は、本開示の融合タンパク質と、生理学的に許容される担体と、を含む、組成物を提供する。
【００１８】
更なる態様では、本開示は、本明細書に記載されるＰｒｏＳＮＡであって、遺伝子編集タンパク質が本開示の融合タンパク質である、ＰｒｏＳＮＡを提供する。
【００１９】
いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるＳＮＡであって、遺伝子編集タンパク質が本開示の融合タンパク質である、ＳＮＡを提供する。
【００２０】
更なる態様では、本開示は、遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、細胞を本明細書に記載の融合タンパク質と接触させることを含む、方法を提供する。
【００２１】
いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集タンパク質を細胞に送達する方法であって、細胞を融合タンパク質を含む本開示の組成物と接触させることを含む、方法を提供する。
【００２２】
更なる態様では、本開示は、対象において障害を治療、改善、及び／又は予防する方法であって、対象に、有効量の（ｉ）本開示の融合タンパク質、（ｉｉ）融合タンパク質を

含む本開示の組成物、又は（ｉｉｉ）それらの組み合わせを投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、障害は、がん、感染性疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、遺伝性疾患、心血管疾患、又はそれらの組み合わせである。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】ＣＲＩＳＰＲ－ＳＮＡの合成の概略図である。濃縮されたＣａｓ９　ＲＮＰは、リポソーム中に封入され、ほとんどの封入されていないＲＮＰは、ＳＥＣを介して除去され、リポソームは、多分散性を低減するために押し出され、ＤＢＣＯ－ＤＮＡは、ＤＮＡを有するリポソームを官能化するために添加され、リポソームは、プロテイナーゼＫとともにインキュベートされて、残りの封入されていないＣａｓ９を消化し、最終的に消化されたＣａｓ９は、ＳＥＣを介して除去される。

【図２】以下を示す。（Ａ）ＤＮＡの官能化及びクリーニング後のＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡのＤＬＳ。（Ｂ）ＳＮＡ試料（半分に希釈）を用いたＣｙ３－ＤＮＡ蛍光の標準曲線。（Ｃ）標準曲線（青）、ＳＮＡ試料（赤）、及びＢで得られたＤＮＡ濃度について補正した後のＳＮＡ試料を含む、ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡ試料中のリン（及びしたがってリン脂質）濃度のＩＣＰ－ＯＥＳ定量化。ＳＮＡ濃度は、式１を使用して計算される。（Ｄ）線形適合でプロットされたＳＮＡ試料（青）を用いた、Ａｌｅｘａ６４７－ＲＮＰ蛍光の標準曲線。

【図３】ＲＮＰがＳＮＡ合成手順を通して活性を維持することを示す。（Ａ）インビトロＣａｓ９活性試験の概略図。（Ｂ）新鮮なＣａｓ９　ＲＮＰ（Ｂ１）、Ａｌｅｘａ色素で修飾し（Ｂ２）、次いでＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋフィルターで濃縮し（Ｂ３）、次いで７サイクルの凍結／解凍／超音波処理に供し（Ｂ４）、次いでＳｅｐｈａｒｏｓｅ　６ｂ　ＳＥＣカラムに通し（Ｂ５）、次いで３回、０．２μＭ及び０．１μＭのＰＥＳ膜を通して押し出した（Ｂ６）、Ｃａｓ９　ＲＮＰの活性試験。

【図４】ＣＲＩＳＰＲ－ＳＮＡがプロテイナーゼから活性ＲＮＰを保護し、封入を示すことを実証する。（Ａ）プロテイナーゼＫを空のＳＮＡ及びＡｌｅｘａ－ＲＮＰ（上）又はＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡと封入されたＡｌｅｘａ－ＲＮＰ（下）との混合物とともにインキュベートした後に、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００カラムから収集されたサイズ排除画分。Ｃｙ３（ＤＮＡ）蛍光は赤で示され、Ａｌｅｘａ６４７（Ｃａｓ９）蛍光は青で示され、Ｃｙ３及びＣａｓ９蛍光の共局在化はピンクで示される。（Ｂ）インビトロＣａｓ９活性試験は、Ｃａｓ９なし（１）；プロテイナーゼＫを含まない（２）及びプロテイナーゼＫを含む（３）新鮮なＣａｓ９；プロテイナーゼＫを含まない（４）及びプロテイナーゼＫを含む（５）Ａｌｅｘａ修飾Ｃａｓ９；プロテイナーゼＫを含まない（６）、プロテイナーゼＫを含む（７）、及びＴｗｅｅｎ２０でリポソームを破壊した後にプロテイナーゼＫを添加した（８）ＣＲＩＳＰＲリポソーム；並びに最後にプロテイナーゼＫを含まない（９）、プロテイナーゼＫを含む（１０）、及びＴｗｅｅｎ２０でリポソームを破壊した後にプロテイナーゼＫを添加した（１１）ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡを用いて実行した。

【図５】ＣＲＩＳＰＲ－ＳＮＡが哺乳類細胞に能動的に取り込まれることを示す。各試料の５ピコモル当量のＡｌｅｘａ　ＲＮＰをＣ１６６－ＧＦＰ細胞とともに１６時間インキュベートした後、Ａｌｅｘａ　６４７蛍光を、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）励起及び発光フィルターで測定した。未処理細胞（赤、空のリポソーム球状核酸（ＬＳＮＡ）と重複、空のＣｙ３修飾ＬＳＮＡ（明るい緑）、リポソームに封入されたＲＮＰ（オレンジ）、ＲＮＡｉＭａｘでトランスフェクトされたＡｌｅｘａ－ＲＮＰ、及び最後にＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡ（濃い緑）のＡｌｅｘａ－ＲＮＰ蛍光のヒストグラム。

【図６】ＰｒｏＳＮＡ（破線赤のトレース）Ｃａｓ９の構造特性評価を示す。（Ａ）Ｃａｓ９　ＳＮＡのＴＥＭ特性評価。（Ｂ）及び（Ｃ）未修飾のＣａｓ９、Ｃａｓ９　ＡＦ６４７、Ｃａｓ９アジド、及びＣａｓ９　ＳＮＡの変性ゲル電気泳動及びゼータ電位。（Ｄ）ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７及びＤＮＡによるＣａｓ９の官能化を定量化するために使用されるＵＶ－ｖｉｓ吸光度スペクトル。

【図７】生体適合性及び細胞取り込みを実証する細胞実験からの結果を示す。（ａ）Ｃａ

ｓ９　ＳＮＡで４８時間処理された、ＨａＣａｔ、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｈＭＳＣ、又はＲａｗ２６４．７細胞の細胞生存率、（ｂ）フローサイトメトリーによって決定される、Ｃａｓ９（白）及びＣａｓ９　ＳＮＡ（黒）の細胞取り込み。

【図８】Ｃａｓ９　ＳＮＡのＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ細胞ゲノム編集を示す。（ａ）ＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位、（ｂ）ＧＲＩＮ２Ｂ、及び（ｃ）ＥＧＦＰのＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイ。ｄ）Ｃａｓ９　ＳＮＡで処理されたＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ細胞のフローサイトメトリー。

【図９】Ｎ末端でＧＡＬＡエンドソームペプチドと融合させた、ＧｅｏＣａｓ９工学の概略設計を示す。

【図１０】（ａ）２６０ｎｍ及び（ｂ）２８０ｎｍにおけるＧｅｏＣａｓ９の定量的モル吸光係数を示す。モル吸光係数を、Ｐｉｅｒｃｅビシンコニン酸アッセイによって決定し、ＧｅｏＣａｓ９及びＣａｓ９　ＳＮＡの濃度を定量化するために使用した。

【図１１】Ｃａｓ９－ＡＦ６４７を調製するために使用されるＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７　ＮＨＳエステル（ＡＦ６４７）の構造を示す。

【図１２】ＡＦ－６４７フルオロフォア修飾Ｃａｓ９のＵＶ－Ｖｉｓスペクトルを示す。分光法を、Ｃａｒｙ５０００分光光度計で周囲温度で決定した。タンパク質及びＡＦ６４７の濃度を、それぞれ６５０ｎｍ及び２８０ｎｍでの吸光度から計算した。ＡＦ６４７フルオロフォアを使用して、ＤＮＡ修飾後のタンパク質の濃度を計算し、フローサイトメトリー及び共焦点画像化実験の両方でタンパク質取り込みを追跡した。挿入図：Ｃａｓ９当たりのフルオロフォアの計算の詳細。

【図１３】アジド末端Ｃａｓ９（Ｃａｓ９－ＡＦ６４７－アジド）を調製するために使用されるＮＨＳ－ＰＥＧ$_4$－アジドリンカーの構造を示す。

【図１４】未修飾のＣａｓ９－ＡＦ６４７（青）及びＣａｓ９－ＡＦ６４７－アジド（赤）のＭＡＬＤＩ－ＭＳスペクトルを示す。タンパク質当たりのＮＨＳ－ＰＥＧ$_4$－アジドの数を計算するために、ＭＡＬＤＩ－ＭＳを使用して、未修飾タンパク質とアジド修飾タンパク質との間の質量差を決定した。各リンカーコンジュゲーションは、２７５ｍ／ｚの質量増加をもたらす。

【図１５】ＵＶ－Ｖｉｓスペクトルを用いた、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ上のＤＮＡ鎖の数の決定を示す。スペクトルは、Ｃａｒｙ５０００分光光度計で決定した。タンパク質及びＤＮＡ濃度を、それぞれ６５０ｎｍ及び２６０ｎｍでの吸光度から計算した。挿入図：Ｃａｓ９当たりのＤＮＡの計算の詳細。

【図１６】（ａ）Ｃａｓ９　ＳＮＡ（ｂ）及びＣａｓ９－ＡＦ６４７－アジドのＦＰＬＣサイズ排除クロマトグラム（ＳＥＣ）分析を示す。実線は、６５０ｎｍでの吸光に対応し、破線は２６０ｎｍでの吸光に対応する。４℃で１ｍＬ／分の流量でＳＥＣ６５０カラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で、全ての試料を実行した。

【図１７】トリプシン（プロテイナーゼ）とともにインキュベートした（ａ）Ｃａｓ９及び（ｂ）Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル生体安定性分析を示し、Ｃａｓ９は１時間にわたって分解したが（Ｃａｓ９タンパク質バンドの消失によって証明されるように）、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡは残ったことを示す。

【図１８】ＨａＣａｔ細胞中のＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの生死分析による細胞生存率測定を示す。生細胞をカルシウムＡＭで染色し、死細胞をヨウ化プロピジウム（ＰＩ）で染色した。蛍光顕微鏡法によって決定されたように、Ｃａｓ９タンパク質の処理後に顕著な細胞毒性は観察されなかった。スケールバー：３００μｍ。

【図１９】ＨａＣａｔ細胞におけるＡＦ６４７修飾Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ及び天然Ｃａｓ９の細胞取り込みを示すフローヒストグラムを示す。フローサイトメトリーを使用して、２０ｎＭのタンパク質で４時間処理した後の、ＨａＣａｔ細胞中のＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又は天然タンパク質の取り込みを測定した。

【図２０】異なる時点でＣａｓ９－ＡＦ６４７及びＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡで処理されたＨａＣａｔ細胞の核輸送効率の結果を示し、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの核輸入の増強を示す。

【図２１】二本鎖切断誘導微小挿入及び欠失の検出のためのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイを示す。Ｃａｓ９媒介切断効率を決定するために使用されるＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの概略図。最初に、ゲノムＰＣＲ（ｇＰＣＲ）を使用して、修飾及び未修飾の細胞の不均一な集団からＣａｓ９標的領域を増幅し、ｇＰＣＲ産物をゆっくりと再ハイブリダイズして、ヘテロ二本鎖を生成する。再アニーリングされたヘテロ二重鎖は、Ｔ７ＥＩヌクレアーゼによって切断されるが、ホモ二重鎖はそのままにされる。Ｃａｓ９媒介切断効率（インデル％）は、切断されたＤＮＡの割合に基づいて計算される。
【図２２】ゲノム編集分析を示す。Ｃａｓ９タンパク質又はＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡで処理されたＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ細胞のフローサイトメトリーヒストグラム結果。
【図２３】表面反応性リジン化学が、Ｃａｓ９へのＤＮＡコンジュゲーションを可能にすることを示す。
【図２４】ＤＮＡの官能化後にＣａｓ９の構造が保持されたことを示す。
【図２５】Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡが、プロテイナーゼ分解に対する増強された安定性を実証したことを示す。
【図２６】Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡとともにインキュベートした細胞が、ＨａＣａＴ、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｈＭＳＣ、及びＲＡＷ２６４．７細胞を含む複数の細胞型において高い細胞生存率を実証することを示す。
【図２７】ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７蛍光によって観察されるように、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡで処理された細胞による細胞取り込みが増強されたことを示す。
【図２８】本開示のタンパク質（例えば、融合タンパク質）を含むＳＮＡによって提供される、遺伝子編集タンパク質の細胞送達に対する障壁及び利点を示す。
【図２９】ＧＡＬＡ及びＮＬＳと融合したＣａｓ９　ＳＮＡが、顕著なエンドソーム脱出及び核輸送効率を実証したことを示す。
【図３０】Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡが、ＨａＣａＴ及びｈＭＳＣ細胞における対照Ｃａｓ９タンパク質と比較して、挿入及び欠失の両方について高い遺伝子編集効率を達成したことを示す。
【図３１】マクロファージ様ＲＡＷ２６４．７細胞におけるＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの編集効率を実証する。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡは、対照Ｃａｓ９タンパク質及び市販のトランスフェクション剤と比較して、遺伝子編集活性を増加したことを実証した。
【図３２】ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの遺伝子サイレンシング活性を実証する。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡは、対照Ｃａｓ９タンパク質と比較して、ＧＦＰのノックダウンの増加を実証した。
【発明を実施するための形態】
【００２４】
球状核酸（ＳＮＡ）は、交換可能なナノ粒子コアを取り囲むオリゴヌクレオチドの高密度層で官能化されたナノ粒子のクラスである。この核酸シェルは、いくつかの機能を付与する：オリゴヌクレオチドコーティングは、ナノ粒子表面上のエンドヌクレアーゼ活性を低下させ、細胞表面タンパク質と相互作用し、実質的に全ての細胞株において高い細胞取り込みをもたらす、高濃度の塩雲を形成する。これらの固有の特性の組み合わせにより、ＳＮＡは容易に調整可能な単一体の薬剤として動作することができる。
【００２５】
用語
「～から」、「～まで」、「最大」、「少なくとも」、「～より大きい」、「～より小さい」などの全ての言語は、列挙された数を含み、その後部分的な範囲に分解することができる範囲を指す。
【００２６】
範囲には、各個々のメンバーが含まれる。したがって、例えば、１～３つのメンバーを有する群は、１つ、２つ、又は３つのメンバーを有する群を指す。同様に、６つのメンバーを有する群は、１つ、２つ、３つ、４つ、又は６つのメンバーを有する群を指す。
【００２７】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、冠詞「ａ」及び「ａｎ」は、冠詞の文法的対象のうちの１つ又は２つ以上（例えば、少なくとも１つ）を指す。

【００２８】

「約」及び「およそ」とは、一般に、測定の性質又は精度を考慮して測定された量について許容される誤差の程度を意味するものとする。例示的な誤差の程度は、２０～２５パーセント（％）以内、例えば、記載された値又は値の範囲の２０パーセント以内、１０パーセント以内、５パーセント以内、４パーセント以内、３パーセント以内、２パーセント以内、又は１パーセント以内である。

【００２９】

「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用される場合には交換可能である。

【００３０】

本明細書で使用される場合、「リンカー」は、本明細書に記載されるタンパク質－コア球状核酸（ＰｒｏＳＮＡ）のタンパク質コアにオリゴヌクレオチドを結合する部分である。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、無痕跡型リンカー、又はそれらの組み合わせである。

【００３１】

「対象」は、脊椎動物生物である。対象は、非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、又は非ヒト霊長類）であり得るか、又は対象は、ヒト対象であり得る。

【００３２】

本明細書で使用される場合、「投与すること」、「投与する」、「投与」などの用語は、治療剤を、そのような薬剤による治療を必要とする対象に移送、送達、導入、又は輸送する任意のモードを指す。そのようなモードには、経口、局所、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、鼻腔内、及び皮下投与が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３３】

本明細書で使用される場合、「治療すること」及び「治療」は、異常な瘢痕に関連する症状の重症度及び／又は発症の任意の低減を指す。したがって、「治療すること」及び「治療」には、治療的及び予防的手段が含まれる。当業者は、異常な瘢痕からの任意の程度の保護又は改善が、ヒト患者などの対象に有益であることを理解するであろう。患者の生活の質は、対象における症状の重症度を任意の程度まで低減し、かつ／又は症状の出現を遅らせることによって向上させる。

【００３４】

本明細書で使用される場合、「標的化オリゴヌクレオチド」は、ＳＮＡを特定の組織及び／又は特定の細胞型に指向するオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、標的化オリゴヌクレオチドはアプタマーである。したがって、いくつかの実施形態では、本開示のＳＮＡは、ナノ粒子コアの外部に結合したアプタマーを含み、アプタマーは、特定の細胞型の表面上の１つ以上の受容体に結合するように設計されている。

【００３５】

本明細書で使用される場合、「免疫刺激性オリゴヌクレオチド」は、免疫応答を刺激（例えば、誘導又は増強）することができるオリゴヌクレオチドである。免疫刺激性オリゴヌクレオチドの典型的な例は、ＣｐＧモチーフ含有オリゴヌクレオチド、一本鎖ＲＮＡオリゴヌクレオチド、二本鎖ＲＮＡオリゴヌクレオチド、及び二本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドである。「ＣｐＧモチーフ」は、シトシン－グアニンジヌクレオチド配列である。一本鎖ＲＮＡ配列は、ｔｏｌｌ様受容体８及び９によって認識することができ、二本鎖ＲＮＡ配列は、ｔｏｌｌ様受容体３によって認識することができ、二本鎖ＤＮＡは、ｔｏｌｌ様受容体３及び環状ＧＭＰ－ＡＭＰ合成酵素（ｃＧＡＳ）によって認識することができる。

【００３６】

「阻害性オリゴヌクレオチド」という用語は、例えば、ｍＲＮＡをリボソーム内のタン

パク質に翻訳することを妨げることによって、又は１つ以上の標的遺伝子若しくはｍＲＮＡに特異的に結合（ハイブリダイズ）し、それによって標的タンパク質の発現又は生物学的活性を低減する、標的タンパク質のうちの１つ以上をコードする遺伝子又はｍＲＮＡのいずれかに十分に相補的である、タンパク質の産生又は発現を低減するオリゴヌクレオチドを指す。阻害性オリゴヌクレオチドには、単離又は合成の短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ又はＤＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡ、キメラアンチセンスＤＮＡ又はＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ模倣物、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、先天性免疫受容体のＤＮＡ又はＲＮＡ阻害剤、アプタマー、ＤＮＡザイム、又はアプタザイムが含まれるが、これらに限定されない。

【００３７】

本明細書に開示される全ての参考文献、特許、及び特許出願は、それぞれが引用される主題に関して参照により組み込まれ、場合によっては、本明細書の全体を包含し得る。

【００３８】

遺伝子編集タンパク質

本開示のＳＮＡは、１つ以上の遺伝子編集タンパク質を含む。本開示によって企図される遺伝子編集タンパク質には、転写活性化因子様エフェクターベースのヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、メガヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、Ｃａｓ９、ｘＣａｓ９、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、Ｃａｓ１３、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１４、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、クラス１のＣａｓタンパク質、クラス２のＣａｓタンパク質、ＭＡＤ７、又はそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。本開示の任意の態様又は実施形態では、ゲノム編集は、標的遺伝子の産生を阻害又は低減するために使用される。特定の実施形態では、遺伝子発現及びその後の生物学的活性タンパク質発現の低減は、非相同終端結合（ＮＨＥＪ）を介したヌクレオチドの挿入／欠失、又は早期停止コドン及び非機能性タンパク質の発現につながる相同性指向修復（ＨＤＲ）を介した適切なドナーカセットの挿入、又はヌクレオチドの挿入によって達成することができる。

【００３９】

図２８に示されるように、遺伝子編集タンパク質の細胞への侵入には障壁がある。これらの障壁には、遺伝子編集タンパク質の内在化（膜障壁及び大型の遺伝子編集タンパク質による）、遺伝子編集タンパク質の核取り込みを達成する方法、及び遺伝子編集タンパク質がエンドソームを脱出できる方法が含まれる。したがって、本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、遺伝子編集タンパク質は、「融合した」タンパク質の一部である。この意味での「融合した」という用語は、様々な態様では、Ｎ末端からＣ末端の順に一緒に融合した以下の要素：（ｉ）１つ以上のＧＡＬＡペプチド、（ｉｉ）遺伝子編集タンパク質、及び（ｉｉｉ）核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含むか、又はそれらからなるタンパク質を指す。いくつかの態様では、融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端の順に一緒に融合した以下の要素：（ｉ）遺伝子編集タンパク質及び（ｉｉ）核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含むか、又はそれらからなる。融合タンパク質の遺伝子編集部分は、当技術分野で知られている及び／又は本明細書に記載の任意の遺伝子編集タンパク質、例えば、及び限定されないが、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（Ｃａｓ）であり得る。様々な実施形態では、Ｃａｓは、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１３、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９は、Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ，Ｌ．Ｂ．，Ｐａｅｚ－Ｅｓｐｉｎｏ，Ｄ．，Ｓｔａａｈｌ，Ｂ．Ｔ．ｅｔ ａｌ．Ａ ｔｈｅｒｍｏｓｔａｂｌｅ Ｃａｓ９ ｗｉｔｈ ｉｎｃｒｅａｓｅｄ ｌｉｆｅｔｉｍｅ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｐｌａｓｍａ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ８，１４２４（２０１７）．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１４６７－０１７－０１４０８－４（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている通りである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９は、配列番号１又は配列番号２５に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２は、配列番号２７に記載のｉアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又

はそれからなる（Ｓｔｒｅｃｋｅｒ Ｊ，Ｊｏｎｅｓ Ｓ，Ｋｏｏｐａｌ Ｂ，Ｓｃｈｍｉｄ－Ｂｕｒｇｋ Ｊ，Ｚｅｔｓｃｈｅ Ｂ，Ｇａｏ Ｌ，Ｍａｋａｒｏｖａ ＫＳ，Ｋｏｏｎｉｎ ＥＶ，Ｚｈａｎｇ Ｆ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．２０１９ Ｊａｎ ２２；１０（１）：２１２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１４６７－０１８－０８２２４－４．１０．１０３８／ｓ４１４６７－０１８－０８２２４－４ ＰｕｂＭｅｄ ３０６７０７０２）。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３は、配列番号２９に記載のアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる（Ｓｍａｒｇｏｎ ＡＡ，Ｃｏｘ ＤＢ，Ｐｙｚｏｃｈａ ＮＫ，Ｚｈｅｎｇ Ｋ，Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ＩＭ，Ｇｏｏｔｅｎｂｅｒｇ ＪＳ，Ａｂｕｄａｙｙｅｈ ＯＡ，Ｅｓｓｌｅｔｚｂｉｃｈｌｅｒ Ｐ，Ｓｈｍａｋｏｖ Ｓ，Ｍａｋａｒｏｖａ ＫＳ，Ｋｏｏｎｉｎ ＥＶ，Ｚｈａｎｇ Ｆ．Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２０１７ Ｆｅｂ １６；６５（４）：６１８－６３０．ｅ７．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１６．１２．０２３．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｊａｎ ５．１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１６．１２．０２３ ＰｕｂＭｅｄ ２８０６５５９８）。ＧＡＬＡは、当技術分野で知られており（例えば、Ｓｃｈａｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１５，１３７，３８，１２１９９－１２２０２（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）、本明細書に記載されている。本開示は、様々な実施形態では、融合タンパク質が、タンデムで１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つのＧＡＬＡペプチドを含むか、又はそれらからなることを企図する。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質のＮ末端は、タンデムで３つのＧＡＬＡペプチドを含むか、又はそれらからなる。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質のＮ末端は、タンデムで３つのＧＡＬＡペプチドを含むか、又はそれらからなり、各ＧＡＬＡペプチドは、配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、本明細書に記載される融合タンパク質のＣ末端は、ＮＬＳ配列を含むか、又はそれからなる。ＮＬＳ配列は、当技術分野で知られている（例えば、Ｃｕｔｒｏｎａ，Ｇ．，Ｃａｒｐａｎｅｔｏ，Ｅ．，Ｕｌｉｖｉ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｅｆｆｅｃｔｓ ｉｎ ｌｉｖｅ ｃｅｌｌｓ ｏｆ ａ ｃ－ｍｙｃ ａｎｔｉ－ｇｅｎｅ ＰＮＡ ｌｉｎｋｅｄ ｔｏ ａ ｎｕｃｌｅａｒ ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ ｓｉｇｎａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １８，３００－３０３（２０００）．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／７３７４５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。いくつかの実施形態では、ＮＬＳ配列は、ＳＶ４０ウイルス大型Ｔ抗原のＮＬＳに由来し、アミノ酸配列ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号２３）を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、アミノ酸配列ＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号２８）を含むか、又はそれからなる。本開示はまた、本明細書に記載される融合タンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を提供する。本開示によって提供される融合タンパク質は、本明細書に記載のＰｒｏＳＮＡ、ＳＮＡ、組成物、及び／又は方法のいずれかで使用され得る。したがって、いくつかの態様では、本開示のＰｒｏＳＮＡは、（ａ）融合タンパク質を含むタンパク質コアと、（ｂ）タンパク質コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェルと、を含む。更なる態様では、本開示は、（ａ）ナノ粒子コア、（ｂ）ナノ粒子コアの外側表面に結合したオリゴヌクレオチドのシェル、及び（ｃ）融合タンパク質を含む、ＳＮＡを提供する。

【００４０】

Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用したインビトロ研究を通じて、効率的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ媒介標的ＤＮＡ又はゲノム修飾に必要な唯一の構成要素は、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ）、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）であることが示されている。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ媒介ＤＮＡ切断の野生型機構は、いくつかのステップを介して起こる。遭遇した（又は標的）ＤＮＡの小断片（２０～３０塩基対）を含有するＣＲＩＳＰＲアレイの、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡの直接リピートを介したｔｒａｃｒＲＮＡとのハイブリダイゼーションを通して成熟する、ｐｒｅ－ｃｒＲＮ

Ａへの転写。ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ又はｓｇＲＮＡ）として知られるｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡのハイブリダイゼーションは、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡの成熟ｃｒＲＮＡへの変換を媒介するリボ核タンパク質複合体を形成するＣａｓヌクレアーゼと会合する。成熟ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖は、ｃｒＲＮＡのスペーサー領域と宿主ゲノム上のプロトスペーサーＤＮＡとの間のヘテロ二本鎖形成を介して、プロトスペーサー及び必要なプロトスペーサー隣接モチーフ（ＣＲＩＳＰＲ／ｃａｓプロトスペーサー隣接モチーフ；ＰＡＭ）からなるＤＮＡ標的にＣａｓ９を指向する。Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、ＰＡＭの上流の標的ＤＮＡの切断を媒介して、プロトスペーサー内に二本鎖切断を生じさせるか、又は変異したＣａｓ９ヌクレアーゼを使用して鎖特異的ニックを生じさせ、それによって１つのＤＮＡ鎖特異的切断モチーフを変異させる。

【００４１】

したがって、遺伝子編集を伴う様々な態様では、本開示のＳＮＡ（例えば、ＰｒｏＳＮＡ、ＬＮＰ－ＳＮＡ、ＬＳＮＡ）は、遺伝子編集タンパク質に加えて、ＤＮＡ又はＲＮＡ遺伝子編集因子基質（例えば、ガイドＲＮＡ）を含み、ＤＮＡ又はＲＮＡ遺伝子編集因子基質は、様々な実施形態では、ＳＮＡの表面に結合されるか、又はＳＮＡ内に封入される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集タンパク質を含むＳＮＡは、ＤＮＡ又はＲＮＡ遺伝子編集因子基質とは別個に送達される。

【００４２】

プログラム可能な核酸切断にも適合されている関連ＣＲＩＳＰＲ系からの他のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとしては、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９（ＳａＣａｓ９）、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ又はＦｒａｎｃｉｓｃｅｌｌａ ＩからのＣＲＩＳＰＲ（ＣｐｆＩ）、Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ Ｃａｓ９（ＧｅｏＣａｓ９）、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９（ＣｊＣａｓ９）、メタゲノム由来のＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓＸ及びＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓＹ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ３、並びにＲＮＡを切断するＣＲＩＳＰＲ－Ｃ２ｃ２が挙げられる。

【００４３】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、遺伝子ノックアウト及び編集以外のいくつかの機能を実行するように修飾されており、そのうちの３つの例を以下に記載する。触媒的に不活性化されたＣａｓ９（ｄＣａｓ９）は、転写活性化及び抑制ドメインに融合されており、それによって、遺伝子発現のプログラム可能な制御を可能にしている［Ｇｉｌｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １５４，４４２－４５１（２０１３）、Ｚａｌａｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １６０３３９－３５０（２０１５）］。ｄＣａｓ９転写活性化因子は特に、ｓｉＲＮＡ又はＣＲＩＳＰＲノックアウトライブラリーに類似するが、遺伝子が過剰発現している新規スクリーニングを可能にする［Ｇｉｌｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １５９，６４７－６１（２０１４）］。蛍光タンパク質に融合されたｄＣａｓ９は、ゲノム内の特定の部位の顕微鏡的追跡及び配列特異的核組織の研究を可能にする［Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １５５，１４７９－９１（２０１３）］。最後に、活性Ｃａｓ９を標的にして、接合体内の様々な非機能性ゲノム領域を切断することができ、成熟生物の各細胞における変異の頻度及び配列を使用して、胚発生中の細胞分化の系譜を追跡することができる［Ｍｃｋｅｎｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ４２，２３７－２４１（２０１６）］。

【００４４】

本明細書で使用される場合、ＴＡＬＥＮという用語は広範であり、別のＴＡＬＥＮからの支援なしに二本鎖ＤＮＡを切断することができる単量体ＴＡＬＥＮを含む。ＴＡＬＥＮという用語は、同じ部位でＤＮＡを切断するように一緒に機能するように操作された一対のＴＡＬＥＮのうちの１つ又は両方のメンバーを指すためにも使用される。一緒に機能するＴＡＬＥＮは、ＤＮＡの利き手又はＴＡＬＥＮ対に言及する、左ＴＡＬＥＮ及び右ＴＡＬＥＮと称され得る。

【００４５】

ＴＡＬＥＮという用語は、転写活性化因子様（ＴＡＬ）エフェクター結合ドメイン及び

ヌクレアーゼドメインを含むタンパク質を意味し、それ自体が機能的である単量体ＴＡＬＥＮ、及び別の単量体ＴＡＬＥＮによる二量体化を必要とする他のものを含む。二量体化は、両方の単量体ＴＡＬＥＮが同一である場合にホモ二量体ＴＡＬＥＮをもたらすことができるか、又は単量体ＴＡＬＥＮが異なる場合にヘテロ二量体ＴＡＬＥＮをもたらすことができる。ＴＡＬＥＮは、２つの主要な真核生物ＤＮＡ修復経路、非相同終端結合（ＮＨＥＪ）、及び相同性指向修復によって、不死化ヒト細胞において遺伝子修飾を誘導することが示されている。ＴＡＬＥＮは、しばしば対で使用されるが、単量体ＴＡＬＥＮは、知られている。ＴＡＬＥＮ（及び他の遺伝子ツール）による治療のための細胞としては、培養細胞、不死化細胞、一次細胞、一次体細胞、接合体、生殖細胞、原始生殖細胞、胚盤胞、又は幹細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬエフェクターを使用して、他のタンパク質ドメイン（例えば、非ヌクレアーゼタンパク質ドメイン）を特定のヌクレオチド配列に標的化することができる。例えば、ＴＡＬエフェクターは、限定されないが、ＤＮＡ相互作用酵素（例えば、メチラーゼ、トポイソメラーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、又はリガーゼ）、転写活性化因子若しくは抑制因子、又はヒストンなどの他のタンパク質と相互作用するか、若しくはそれを修飾するタンパク質からのタンパク質ドメインに結合され得る。そのようなＴＡＬエフェクター融合物の用途には、例えば、エピジェネティック調節エレメントを創出又は修飾すること、ＤＮＡにおける部位特異的挿入、欠失、又は修復を行うこと、遺伝子発現を制御すること、及びクロマチン構造を修飾することが含まれる。

【００４６】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集タンパク質の送達に使用するためのＳＮＡ（例えば、ＰｒｏＳＮＡ、ＬＳＮＡ、ＬＮＰ－ＳＮＡ）を提供する。様々な実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体中にある。様々な実施形態では、ＳＮＡに封入されたリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９）（配列番号１又は配列番号２５）、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、及び／又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含む。いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び方法で利用されるＣａｓ９は、ＥｎＧｅｎ（登録商標）Ｃａｓ９ ＮＬＳ、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓカタログ番号Ｍ０６４６Ｔ）である。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、本開示のヌクレオチド又はアミノ酸配列は、参照又は野生型配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、又は１００％同一である配列を含むか、又はそれからなる。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、遺伝子編集タンパク質は、参照又は野生型配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。様々な実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、参照又は野生型Ｃａｓ９配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるＣａｓ９タンパク質である。したがって、様々な実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、配列番号１又は配列番号２５と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるＣａｓ９タンパク質である。更なる実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、配列番号２７と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるＣａｓ１２タンパク質である。更なる実施形態では、遺伝子編集タンパク質は、配列番号２９と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるＣａｓ１３タンパク質である。

【００４７】

球状核酸（ＳＮＡＳ）

本明細書に記載されるように、球状核酸（ＳＮＡ）は、高度に配向されたオリゴヌクレオチドシェルで官能化された球状ナノ粒子コアを含むナノ材料の固有のクラスである。オリゴヌクレオチドシェルは、ナノ粒子コアの外側表面に結合した１個以上のオリゴヌクレオチドを含む。様々な実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、阻害性オリゴヌクレオチド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、遺伝子編集因子基質ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、標的化オリゴヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを含む。ナノ粒子コアは、有機（例えば、リポソーム）、無機（例えば、金、銀、又は白金）、ポリマーベース（例えば、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）粒子）、又は中空（例えば、シリカベース）のいずれかであり得る。本開示の様々な実施形態では、ナノ粒子コアは、タンパク質（タンパク質－コアＳＮＡ（ＰｒｏＳＮＡ））、リポソーム（リポソームＳＮＡ（ＬＳＮＡ））、又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ－ＳＮＡ）である。

【００４８】

ポリヌクレオチドシェルの球状アーキテクチャは、トランスフェクション剤とは無関係なほぼ全ての細胞中への侵入及びヌクレアーゼ分解に対する耐性を含む、伝統的な核酸送達方法を上回る特有の利点を与える。更に、ＳＮＡは、血液脳関門（例えば、米国特許出願公開第２０１５／００３１７４５号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）及び血液腫瘍関門並びに表皮（例えば、米国特許出願公開第２０１０／０２３３２７０号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）を含む、生物学的関門を貫通し得る。

【００４９】

タンパク質－コア球状核酸（ＰｒｏＳＮＡ）

最近、タンパク質コアに結合した（例えば、共有結合した）オリゴヌクレオチドの高密度シェルを含むタンパク質球状核酸（ＰｒｏＳＮＡ）が、タンパク質送達、組み立て、及び細胞内検出における多様な生物学的用途を有する刺激的な新しいアーキテクチャとして浮上している［Ｂｒｏｄｉｎ，Ｊ．Ｄ．；Ｓｐｒａｎｇｅｒｓ，Ａ．Ｊ．；ＭｃＭｉｌｌａｎ，Ｊ．Ｒ．；Ｍｉｒｋｉｎ，Ｃ．Ａ．ＤＮＡ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｅｎｚｙｍｅｓ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１５，１３７（４７），１４８３８－１４８４１、Ｋｕｓｍｉｅｒｚ，Ｃ．Ｄ．；Ｂｕｊｏｌｄ，Ｋ．Ｅ．；Ｃａｌｌｍａｎｎ，Ｃ．Ｅ．；Ｍｉｒｋｉｎ，Ｃ．Ａ．Ｄｅｆｉｎｉｎｇ ｔｈｅ Ｄｅｓｉｇｎ Ｐａｒａｍｅｔｅｒｓ ｆｏｒ ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｅｎｚｙｍｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｔｈｒｏｕｇｈ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｐｈｅｒｉｃａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．ＡＣＳ Ｃｅｎｔ．Ｓｃｉ．２０２０，６（５），８１５－８２２］。オリゴヌクレオチドの高密度シェルは、それらの個々の構成要素に対するタンパク質の細胞取り込み、生理学的安定性、及び生体適合性を促進する［Ｇｉｌｊｏｈａｎｎ，Ｄ．Ａ．；Ｓｅｆｅｒｏｓ，Ｄ．Ｓ．；Ｐａｔｅｌ，Ｐ．Ｃ．；Ｍｉｌｌｓｔｏｎｅ，Ｊ．Ｅ．；Ｒｏｓｉ，Ｎ．Ｌ．；Ｍｉｒｋｉｎ，Ｃ．Ａ．Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｌｏａｄｉｎｇ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｅｓ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｕｐｔａｋｅ ｏｆ ＤＮＡ－Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｇｏｌｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ．Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２００７，７（１２），３８１８－３８２１］。ＳＮＡのこの増強された細胞内在化は、コンジュゲートの３次元アーキテクチャ、及びほとんどの細胞の表面上のスカベンジャー受容体と係合するその能力に由来する。重要なことに、ＳＮＡの好ましい生物学的特性は、それらのタンパク質コアとは無関係であり、したがって、タンパク質送達ゲノム編集用途のために選択することができる。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「タンパク質－コア」は、遺伝子編集タンパク質を含む。したがって、本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、本開示の遺伝子編集タンパク質は、一般に、タンパク質－コアＳＮＡ（ＳＮＡ）の「コア」として機能する。タンパク質は、アミノ酸の１つ以上のポリマーを含む分子である。本開示の様々な実施形態では、タンパク質－コアは、単一のタンパク質（すなわち、アミノ酸の単一のポリマー）、多量体タンパク質、ペプチド（例えば、約２～５０アミノ酸長のアミノ酸のポリマー）、又は２

つ以上のタンパク質の合成融合タンパク質を含むか、若しくはそれらからなる。合成融合タンパク質には、発現された融合タンパク質（単一の遺伝子から発現される）及びタンパク質が化学的に一緒にコンジュゲートされる発現後融合物が含まれるが、これらに限定されない。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、タンパク質－コアは、遺伝子編集タンパク質を含むか、又はそれからなる。タンパク質は、当技術分野で理解されており、天然に存在するか又は天然に存在しないかのいずれかであり得る。

【００５１】

タンパク質－コアＳＮＡ合成。本開示は、１個以上のオリゴヌクレオチドが、リンカーを介してタンパク質－コアＳＮＡの表面に会合し、かつ／又は結合している組成物及び方法を提供する。様々な実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、無痕跡型リンカー、又はそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、還元剤（例えば、グルタチオン（ＧＳＨ）、ジチオスレイトール（ＤＴＴ））又は還元環境（例えば、細胞内）に感受性である（かつそれに応答して切断される）。様々な実施形態では、切断可能なリンカーは、例えば、酸性度（例えば、低ｐＨ）、酵素（例えば、ペプチダーゼ）、光（例えば、ＮＩＲレーザー）、及び／又は加水分解などの様々な化学刺激に感受性である（かつそれに応答して切断される）。

【００５２】

リンカーは、タンパク質－コアを、開示されたタンパク質－コアＳＮＡ内のオリゴヌクレオチド（すなわち、タンパク質－コア－ＬＩＮＫＥＲ－オリゴヌクレオチド）に結合する。様々な実施形態では、単一のオリゴヌクレオチドがリンカーに結合している。更なる実施形態では、２個以上のオリゴヌクレオチド（例えば、２個、３個、又はそれ以上）が単一のリンカーに結合している。一般に、本開示によって企図されるリンカーには、本開示のＰｒｏＳＮＡにおいて単独で又は組み合わせて使用され得る以下が含まれる：アミド、チオエーテル、トリアゾール、オキシム、尿素、及びチオ尿素。いくつかの具体的に企図されるリンカーとしては、カルバメートアルキレン、カルバメートアルキレンアリールジチオレートリンカー、アミドアルキレンジチオレートリンカー、アミドアルキレンアリールジチオレートリンカー、及びアミドアルキレンスクシンイミジルリンカーが挙げられる。場合によっては、リンカーは、－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－$Ｃ_{2-5}$アルキレン－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－又は－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{2-5}$アルキレン－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－を含む。－Ｓ－Ｓ－部分に対する炭素アルファは、分岐状、例えば、－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－Ｓ－Ｓ－若しくは－Ｓ－Ｓ－Ｃ（ＹＡ）（ＹＢ）－又はそれらの組み合わせであり得、式中、ＸＡ、ＸＢ、ＹＡ、及びＹＢは、独立して、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである。タンパク質に対する炭素アルファは、分岐状、例えば、－Ｃ（ＸＡ）（ＸＢ）－$Ｃ_{2-4}$アルキレン－Ｓ－Ｓ－であり得、式中、ＸＡ及びＸＢは、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、又はｉＰｒである。場合によっては、リンカーは、－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－$ＣＨ_{2}$－Ａｒ－Ｓ－Ｓ－$Ｃ_{2-7}$アルキレン－であり、Ａｒは、メタ又はパラ置換フェニルである。場合によっては、リンカーは、－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{2-4}$アルキレン－Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－$Ｃ_{2-6}$アルキレン－である。

【００５３】

本開示によって企図される追加のリンカーとしては、国際特許公開第２０１８／２１３５８５号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、ＳＨリンカー、ＳＭリンカー、ＳＥリンカー、又はＳＩリンカーである。本開示は、タンパク質－コア上のオリゴヌクレオチドの複数の結合点を企図する。

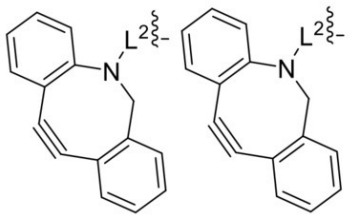
【００５４】

本開示のオリゴヌクレオチドは、タンパク質コアへの結合のために、５’末端又は３’末端のいずれかで修飾され得る。

【００５５】

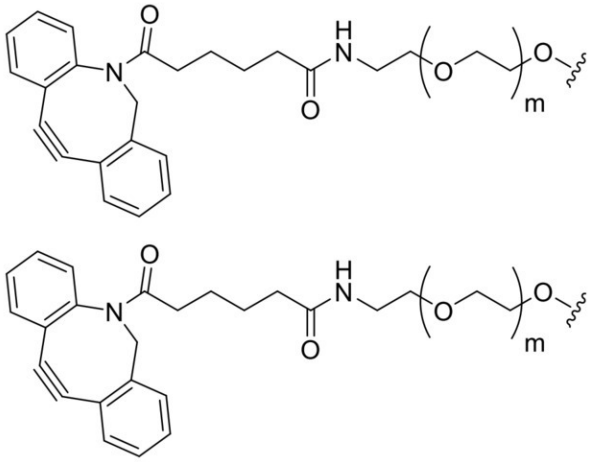
本開示のオリゴヌクレオチドは、アルキン部分、例えば、タンパク質表面のアジドと反応するためのＤＢＣＯ型部分：

【化１】



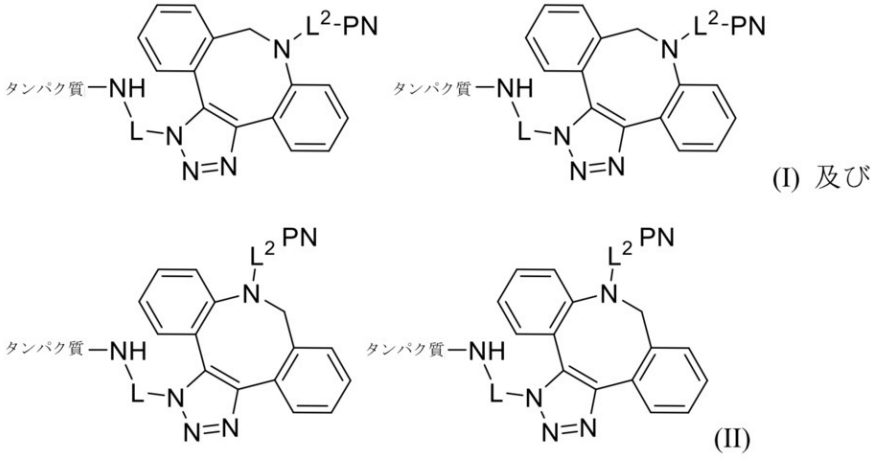
を有する末端で修飾することができ、式中、Ｌは、ポリヌクレオチドの末端へのリンカーである。Ｌ^{2}は、Ｃ$_{1-10}$アルキレン、－Ｃ（Ｏ）－Ｃ$_{1-10}$アルキレン－Ｙ－、及び－Ｃ（Ｏ）－Ｃ$_{1-10}$アルキレン－Ｙ－Ｃ$_{1-10}$アルキレン－（ＯＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$）$_{m}$－Ｙ－であり得、式中、各Ｙは、独立して、結合、Ｃ（Ｏ）、Ｏ、ＮＨ、Ｃ（Ｏ）ＮＨ、及びＮＨＣ（Ｏ）からなる群から選択され、ｍは、０、１、２、３、４、又は５である。例えば、ＤＢＣＯ官能基は、

【化２】



の構造を有するリンカーを介して結合され得、末端「Ｏ」はポリヌクレオチド上の末端ヌクレオチドからである。このＤＢＣＯ型部分の使用は、表面アミンが修飾される場合に、ポリヌクレオチドとタンパク質との間に、

【化３】



の構造をもたらし、式中、Ｌ及びＬ^{2}は、それぞれ独立して、Ｃ$_{1-10}$アルキレン、－Ｃ（Ｏ）－Ｃ$_{1-10}$アルキレン－Ｙ－、及び－Ｃ（Ｏ）－Ｃ$_{1-10}$アルキレン－Ｙ－Ｃ$_{1-10}$アルキレン－（ＯＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$）$_{m}$－Ｙ－から選択され、各Ｙは、独立して、結合、Ｃ（Ｏ）、Ｏ、ＮＨ、Ｃ（Ｏ）ＮＨ、及びＮＨＣ（Ｏ）からなる群から選択され、ｍは、０、１、２、３、４、又は５であり、ＰＮは、ポリヌクレオチドである。タンパク質

の表面チオール又は表面カルボキシレートが修飾される同様の構造は、同等の結合構造をもたらすように同様の方法で作製することができる。

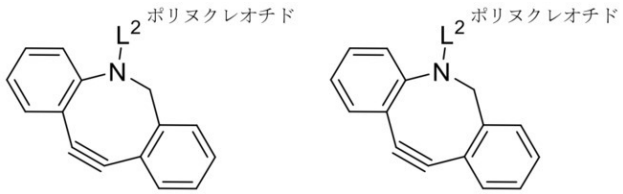
【００５６】

タンパク質は、アジド官能基で終結するリンカーを用いて、表面官能基（例えば、表面アミン、表面カルボキシレート、表面チオール）で修飾することができる：タンパク質－Ｘ－Ｌ－$Ｎ_3$（Ｘは、タンパク質上の表面アミノ基（例えば、－ＮＨ－）、カルボキシ基（例えば、－Ｃ（Ｏ）－若しくは－Ｃ（Ｏ）Ｏ－）、又はチオール基（例えば、－Ｓ－）からであり、Ｌは、$Ｃ_{1-10}$アルキレン、－Ｙ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{1-10}$アルキレン－Ｙ－、及び－Ｙ－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{1-10}$アルキレン－Ｙ－$Ｃ_{1-10}$アルキレン－（$ＯＣＨ_2ＣＨ_2$）$_m$－Ｙ－から選択され、各Ｙは、独立して、結合、Ｃ（Ｏ）、Ｏ、ＮＨ、Ｃ（Ｏ）ＮＨ、及びＮＨＣ（Ｏ）からなる群から選択され、ｍは、０、１、２、３、４、又は５である）。タンパク質の表面部分への「Ｌ－$Ｎ_3$」官能基の導入は、周知の技術を使用して達成することができる。例えば、タンパク質の表面アミンは、末端$Ｎ_3$を有するリンカーの活性化エステルと反応させて、タンパク質のアミンとリンカー試薬の活性化エステルのカルボキシレートとの間にアミド結合を形成することができる。

【００５７】

オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの末端にアルキン官能基を含むように修飾することができる：オリゴヌクレオチド－$Ｌ_2$－Ｘ－≡－Ｒ（$Ｌ^2$は、$Ｃ_{1-10}$アルキレン、
－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{1-10}$アルキレン－Ｙ－、及び－Ｃ（Ｏ）－$Ｃ_{1-10}$アルキレン－Ｙ－$Ｃ_{1-10}$アルキレン－（$ＯＣＨ_2ＣＨ_2$）$_m$－Ｙ－から選択され、各Ｙは、独立して、結合、Ｃ（Ｏ）、Ｏ、ＮＨ、Ｃ（Ｏ）ＮＨ、及びＮＨＣ（Ｏ）からなる群から選択され、ｍは、０、１、２、３、４、又は５であり、Ｘは、結合であり、Ｒは、Ｈ若しくは$Ｃ_{1-10}$アルキルであるか、又はＸ及びＲは、それらが結合している炭素と一緒に、８～１０員炭素環式基若しくは８～１０員複素環式基を形成する）。場合によっては、ポリヌクレオチドは、構造

【化４】



を有する。

【００５８】

表面修飾アジドを有するタンパク質、及びアルキンを含むように修飾された末端を有するポリヌクレオチドを一緒に反応させて、銅（ＩＩ）塩及び還元剤の存在下でトリアゾール環を形成して、インサイチュで銅（Ｉ）塩を生成することができる。場合によっては、銅（Ｉ）塩を直接添加する。企図される還元剤には、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩、水素化ホウ素ナトリウム、２－メルカプトエタノール、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、ヒドラジン、水素化アルミニウムリチウム、水素化ジイソブチルアルミニウム、シュウ酸、リンドラー触媒、亜硫酸化合物、スズ化合物、鉄化合物、アマルガムナトリウム、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン、ヒドロキノン、及びそれらの混合物が含まれる。

【００５９】

タンパク質の表面官能基は、他の結合化学を使用してオリゴヌクレオチドに結合することができる。例えば、表面アミンは、オリゴヌクレオチドの末端でカルボキシレート又は活性化エステルに直接コンジュゲートされて、アミド結合を形成することができる。表面カルボキシレートは、オリゴヌクレオチドの末端上のアミンにコンジュゲートされて、アミド結合を形成することができる。あるいは、表面カルボキシレートをジアミンと反応さ

せて、表面カルボキシレートでアミド結合を形成し、他の末端でアミンを形成することができる。次いで、この末端アミンは、タンパク質の表面アミンの場合と同様の方法で修飾することができる。表面チオールは、ポリヌクレオチド上のチオール部分とコンジュゲートされて、ジスルフィド結合を形成することができる。あるいは、チオールは、ポリヌクレオチドの末端上の活性化エステルとコンジュゲートされて、チオカルボキシレートを形成することができる。あるいは、チオールは、ポリヌクレオチドの末端上のマイケルアクセプター（例えば、スクシンイミド）とコンジュゲートされて、チオエーテルを形成することができる。

【００６０】

一般に、タンパク質－コアＳＮＡ（ＰｒｏＳＮＡ）を合成するための代表的な手順は、所望の量のオリゴヌクレオチドをタンパク質の表面に結合させることを含む。結合は、２段階のプロセスを繰り返すことによって行われる：（１）タンパク質の表面へのリンカーの結合及び精製、（２）タンパク質コンジュゲートリンカーへのオリゴヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ）の結合及び精製。所望の量のオリゴヌクレオチドがタンパク質に結合するまで、これらの２つのステップを繰り返す。前述の手順は、本質的に例示的であることが理解されるであろう。

【００６１】

脂質ナノ粒子球状核酸（ＬＮＰ－ＳＮＡ）

脂質ナノ粒子球状核酸（ＬＮＰ－ＳＮＡ）は、オリゴヌクレオチドで装飾された脂質ナノ粒子コアから構成される。脂質ナノ粒子コアは、遺伝子編集タンパク質、イオン化可能な脂質、リン脂質、ステロール、及び脂質－ポリエチレングリコール（脂質－ＰＥＧ）コンジュゲートを含む。オリゴヌクレオチドシェルは、脂質ナノ粒子コアの外側表面に結合した１個以上のオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドシェルの球状アーキテクチャは、トランスフェクション剤とは独立したほぼ全ての細胞への侵入、ヌクレアーゼ分解に対する耐性、配列に基づく機能、標的化、及び診断を含む、従来の核酸送達方法よりも独自の利点を与える。

【００６２】

したがって、様々な態様では、本開示は、（ａ）脂質ナノ粒子コア、（ｂ）脂質ナノ粒子コアの外側表面に結合したオリゴヌクレオチドのシェル、及び（ｃ）遺伝子編集タンパク質を含む脂質ナノ粒子球状核酸（ＬＮＰ－ＳＮＡ）を提供する。したがって、ＬＮＰ－ＳＮＡは、遺伝子編集タンパク質、イオン化可能な脂質、リン脂質、ステロール、及び脂質－ポリエチレングリコール（脂質－ＰＥＧ）コンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、ジリノレイルメチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、Ｃ１２－２００、１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＤＡＰ）、同様の脂質／リピドイド構造、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジヘキサデカノイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、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）、又はそれらの組み合わせである。更なる実施形態では、ステロールは、３β－ヒドロキシコレスト－５－エン（コレステロール）、９，１０－セココレスタ－５，７，１０（１９）－トリエン－３β－オール（ビタミンＤ３）、９，１０－セコエルゴスタ－５，７，１０（１９），２２－テトラエン－３β－オール（ビタミンＤ２）、カルシポトリオール、２４－エチル－５，２２－コレスタジエン－３β－オール（スチグマステロール）、２２，２３－ジヒドロスチグマステロール（β－シトステロール）、３，２８－ジヒドロキシ－ルペオール（ベツリン）、ルペオール、ウルゾール酸、オレアノール酸、２４α－メチルコレステロール（カンペステロール）、２４－エチルコレスタ－５，２４（２８）Ｅ－ジエン－３β－オール（フコステロール）、２４－メチルコレスタ－５，２２－ジエン－３β－オール（ブラシカステロール）、２４－メチルコレ

スター５，７，２２－トリエン－３β－オール（エルゴステロール）、９，１１－デヒドロエルゴステロール、ダウコステロール、又は１つ以上のアミノ酸で修飾された前述のステロールのうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、脂質－ポリエチレングリコール（脂質－ＰＥＧ）コンジュゲートは、２０００ダルトン（Ｄａ）のポリエチレングリコールを含む。更なる実施形態では、脂質－ポリエチレングリコール（脂質－ＰＥＧ）コンジュゲートは、脂質－ＰＥＧ－マレイミドである。なお更なる実施形態では、脂質－ＰＥＧ－マレイミドは、２０００Ｄａのポリエチレングリコールマレイミドにコンジュゲートされた１，２－ジパルミトリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、２０００Ｄａのポリエチレングリコールマレイミドにコンジュゲートされた１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、又はそれらの組み合わせである。

【００６３】

本開示による使用が企図されるオリゴヌクレオチドには、任意の手段（例えば、共有結合又は非共有結合）を通してナノ粒子コアに結合したものが含まれる。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの脂質－ポリエチレングリコール（脂質－ＰＥＧ）コンジュゲートへの共有結合を介して、脂質ナノ粒子コアの外部に結合している。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドの１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％は、脂質－ＰＥＧコンジュゲートを介して脂質ナノ粒子コアの外部に共有結合している。様々な実施形態では、オリゴヌクレオチドシェル内の１個以上のオリゴヌクレオチドは、脂質アンカー基を介して脂質ナノ粒子コアの外部に結合している。脂質アンカー基は、様々な実施形態では、オリゴヌクレオチドの５’又は３’終端に結合している。様々な実施形態では、脂質アンカー基は、コレステロール又はトコフェロールである。

【００６４】

本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、ＬＮＰ－ＳＮＡは、遺伝子編集タンパク質が脂質ナノ粒子コアに封入され、オリゴヌクレオチドのシェルが脂質ナノ粒子コアの外部に結合するように合成される。一般に、かつ一例として、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、脂質及びステロールをエタノール中で希釈することによって製剤化されてもよい。

【００６５】

リポソーム球状核酸（ＬＳＮＡ）

リポソームは、親水性コアを有する１つ又はいくつかの疎水性脂質二重層を含む様々なサイズ範囲の球状の自己閉鎖構造である。これらの脂質ベースの担体の直径は、０．１５～１マイクロメートルの範囲であり、これは、２０～１００ナノメートルの有効な治療範囲よりも顕著に大きい。小さな単層小胞（ＳＵＶ）と呼ばれるリポソームは、２０～５０ナノメートルのサイズの範囲で合成することができるが、粒子間融合につながる不安定性及び凝集などの課題に直面する。この粒子間融合は、治療剤におけるＳＵＶの使用を制限する。

【００６６】

リポソーム球状核酸（ＬＳＮＡ）は、その化学的に調整可能な構造、生体適合性、及びトランスフェクション試薬なしで細胞に迅速に侵入する能力により、治療的送達のための魅力的なプラットフォームである。本開示は、遺伝子編集タンパク質をＬＳＮＡに封入することによって、それらを細胞に送達するための方法を提供する。封入された遺伝子編集酵素は、酵素活性のままであり、哺乳類細胞に迅速に侵入する。これらの特性は、この新しい形態のＬＳＮＡを、遺伝子編集治療剤のための送達ビヒクルにする。

【００６７】

以前のＳＮＡ媒介タンパク質送達戦略は、タンパク質上のアミノ酸の化学修飾を必要とし、これは、タンパク質機能を阻害し得る。ＬＳＮＡに封入されたタンパク質は、任意の化学修飾なしに細胞内に送達することができる。更に、タンパク質送達のためのカチオン性脂質媒介戦略は、アニオン性タンパク質複合体を必要とする。しかしながら、ＳＮＡ媒

介送達は、中性リン脂質を使用し、アニオン性タンパク質を必要としてはならない。したがって、この方法は、ＴＡＬＥＮなどの正に帯電したタンパク質の送達にも適している。

【００６８】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集方法における、遺伝子編集酵素（例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９）（Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ．８１６－８２１、Ｚｕｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５ Ｊａｎ；３３（１）：７３－８０（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ））及び表面官能化オリゴヌクレオチドを含む、本明細書に開示されるＬＳＮＡの使用を企図する。

【００６９】

したがって、本開示は、遺伝子編集タンパク質の（例えば、細胞への）インビトロ又はインビボ送達を含むが、これらに限定されない方法で使用するためのＬＳＮＡを提供する。リポソーム粒子（例えば、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６８４２９号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる、特にリポソーム粒子の考察に関して）に開示されるような）もまた、本開示によって企図される。本開示のリポソーム粒子は、少なくとも実質的に球状の形状、内側及び外側を有し、脂質二重層を含む。したがって、様々な態様では、本開示は、（ａ）リポソームコア、（ｂ）リポソームコアの外側表面に結合したオリゴヌクレオチドのシェル、及び（ｃ）遺伝子編集タンパク質を含む、球状核酸（ＳＮＡ）を提供する。脂質二重層は、様々な実施形態では、脂質のホスホコリンファミリー又は脂質のホスホエタノールアミンファミリーからの脂質を含む複数の脂質基を含む。本開示によって企図される脂質としては、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－ホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－ホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＳＰＧ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＯＰＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジヘキサデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＯＰＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホスホエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、カルジオリピン、脂質Ａ、それらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。様々な実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内の少なくとも１個のオリゴヌクレオチドは、脂質アンカー基を介してリポソームコアの外部に結合している。更なる実施形態では、脂質アンカー基は、少なくとも１個のオリゴヌクレオチドの５’終端又は３’終端に結合している。なお更なる実施形態では、脂質アンカー基は、トコフェロール又はコレステロールである。したがって、様々な実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドの少なくとも１個（又は全て）は、脂質アンカー基を含有するオリゴヌクレオチド－脂質コンジュゲートであり、該脂質アンカー基は、脂質二重層に吸着される。脂質アンカー基は、様々な実施形態では、トコフェロール、パルミトイル、ジパルミトイル、ステアリル、ジステアリル、又はコレステロールを含む。更なる態様では、本開示は、実質的に球状の形状を有し、複数の脂質基を含む脂質二重層と、リポソーム粒子に封入されたリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体であって、ＲＮＰが、遺伝子編集タンパク質（例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９））及びガイドＲＮＡを含む、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体と、ＬＳＮＡの表面上の１個以上のオリゴヌクレオチドと、を含む、ＬＳＮＡを提供する。

【００７０】

本開示のＬＳＮＡの表面上のオリゴヌクレオチドの表面密度に関して、本明細書に記載されるＬＳＮＡが、その表面上に約１～約４００個のオリゴヌクレオチドを含むことが企図される。様々な実施形態では、ＬＳＮＡは、その表面上に、約１０～約１００、又は１０～約９０、又は約１０～約８０、又は約１０～約７０、又は約１０～約６０、又は約１０～約５０、又は約１０～約４０、又は約１０～約３０、又は約１０～約２０、又は約５０～約１００、又は約６０～約１００、又は約７０～約１００、又は約８０～約１００、又は約９０～約１００個のオリゴヌクレオチドを含む。更なる実施形態では、ＬＳＮＡは、その表面上に少なくとも約５個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、６０個、７０個、８０個、９０個、１００個、１５０個、２００個、２５０個、３００個、３５０個、又は４００個のオリゴヌクレオチドを含むか、又はそれらからなる。いくつかの実施形態では、ＬＳＮＡは、その表面上に７０個のオリゴヌクレオチドを含むか、又はそれらからなる。ＳＮＡの追加の表面密度は、本明細書において以下に記載される。

【００７１】

いくつかの態様では、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを含むアーキテクチャが開示される。様々な実施形態では、トコフェロールは、オリゴヌクレオチド又はその修飾形態の５’終端又は３’終端にあることが企図される。トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドは、親油性終端及び非親油性終端を含む。親油性終端はトコフェロールを含み、及びトコフェロール誘導体、アルファ－トコフェロール、ベータ－トコフェロール、ガンマ－トコフェロール、及びデルタ－トコフェロールからなる群から選択され得る。更なる実施形態では、親油性終端は、パルミトイル、ジパルミトイル、ステアリル、コレステロール、又はジステアリルを含む。

【００７２】

更なる態様では、本開示は、コレステロール又はリン脂質が、トコフェロールの代わりに使用されることを企図する。コレステロールは固相オリゴヌクレオチド合成で結合され、調製されたリポソームと混合されてＳＮＡを形成する。いくつかの実施形態では、９５％の１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３ホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）及び５％の１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（６－アジドヘキサノイル）（ＤＰＰＥ－アジド）から構成されるリポソームを以下に記載するように調製する。次いで、アジド脂質と反応して表面を官能化するＤＢＣＯ修飾オリゴヌクレオチドが付加される。

【００７３】

なお更なる態様では、リン脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、以下のように調製される。まず、ＤＯＰＥなどのホスファチジルエタノールアミン脂質を、クロロホルム中に２５ｍｇ／ｍＬの脂質、１当量のＳＭＰＢ、及び１当量のＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミンを混合することによって、スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ＳＭＰＢ）と反応させる。混合物を一晩反応させる。次に、産物をシリカカラム（溶媒Ａ：ジクロロメタン、溶媒Ｂ：メタノール）を使用したフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。チオール修飾オリゴヌクレオチド（修飾された３’又は５’終端）を、４０℃で２時間、０．２ＭのＤＴＴ及び０．１Ｍのリン酸緩衝液（ｐＨ８）で還元する。次いで、オリゴヌクレオチドを、水を使用してサイズ排除カラムで精製する。ホスファチジルエタノールアミン－ＳＭＰＢ脂質を窒素ガス上で乾燥させ、オリゴヌクレオチドと同じ体積でエタノールに溶解させる。次いで、オリゴヌクレオチドを、反応が５０：５０の水及びエタノールであるように脂質と混合する。この混合物を一晩反応させ、過剰な脂質を、反応混合物をクロロホルムで３回洗浄することによって抽出する。次に、水相及び界面を乾燥させ、水に溶解させる。本明細書に開示される全ての脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、ＬＳＮＡの調製において互換的に使用されることが企図される。トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドの非親油性終端は、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドである。

【００７４】

脂質アンカーを含むオリゴヌクレオチドを作製する方法が、本明細書に開示される。例

えば、最初に、オリゴヌクレオチド及びホスホラミダイト修飾トコフェロールが提供される。次いで、オリゴヌクレオチドをホスホラミダイト修飾トコフェロールに曝露して、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを作製する。限定することを意図するものではないが、当業者に既知の任意の化学を使用して、アミド結合又はクリックケミストリーを含む、トコフェロール（又は任意の脂質アンカー）をオリゴヌクレオチドに結合させることができる。

【００７５】

本開示はまた、ＬＳＮＡを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、リン脂質、溶媒、及びトコフェロール修飾オリゴヌクレオチドが提供される。次いで、リン脂質を溶媒に添加して、リポソームを含む第１の混合物を形成する。第１の混合物中のリポソームのサイズは、約１００ナノメートル～約１５０ナノメートルである。次に、リポソームを破壊して、リポソーム及び小さな単層小胞（ＳＵＶ）を含む第２の混合物を作製する。第２の混合物中のリポソーム及びＳＵＶのサイズは、約２０ナノメートル～約１５０ナノメートルである。次に、約２０ナノメートル～約５０ナノメートルの粒子サイズを有するＳＵＶを第２の混合物から単離する。最後に、トコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを、単離されたＳＵＶに添加して、リポソーム粒子を作製する。様々な実施形態では、本開示の方法によって作製されるＬＳＮＡの直径は、約５０ナノメートル以下である。いくつかの実施形態では、複数のＬＳＮＡが産生され、複数の中の粒子は、約５０ナノメートル以下（例えば、約５ナノメートル～約５０ナノメートル、又は約５ナノメートル～約４０ナノメートル、又は約５ナノメートル～約３０ナノメートル、又は約５ナノメートル～約２０ナノメートル、又は約１０ナノメートル～約５０ナノメートル、又は約１０ナノメートル～約４０ナノメートル、又は約１０ナノメートル～約３０ナノメートル、又は約１０ナノメートル～約２０ナノメートル）の平均直径を有する。更なる実施形態では、本開示の方法によって作製される複数のＬＳＮＡ内の粒子は、約２０ナノメートル以下、又は約２５ナノメートル以下、又は約３０ナノメートル以下、又は約３５ナノメートル以下、又は約４０ナノメートル以下、又は約４５ナノメートル以下の平均直径を有する。

【００７６】

いくつかの態様では、方法は、（１）１×ＰＢＳを添加して、脂質を１～２５ｍｇ／ｍＬの最終濃度まで乾燥させる（したがって、様々な実施形態では、最終濃度は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、又は２５ｍｇ／ｍｌである）、（２）３回、液体窒素中で急速に凍結させ、バスソニケーターで解凍させる、（３）２００、１００、８０、５０、及び３０ｎｍフィルターを通して押し出す。二重フィルターが使用され、典型的には各フィルターに２～１０回通過させる。いくつかの実施形態では、プロセスは５０ｎｍで停止されるが、３０ｎｍの構造が所望される場合、３０ｎｍのフィルターが更に追加される。更なる態様では、３０ｎｍのリポソームが所望される場合、１つのプローブが、ステップ（２）の後に超音波処理される。次に、リポソームを２１０００×ｇで１０分間遠心分離して、超音波処理で剥がれる金属切粉を除去し、混合物を、ステップ（３）に記載されるように、３０ｎｍのフィルターを通して押し出す。

【００７７】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、リン脂質を溶媒に添加して第１の混合物を形成することであって、該第１の混合物が複数のリポソームを含む、形成することと、該複数のリポソームを破壊して第２の混合物を作製することであって、該第２の混合物が、リポソーム及び小さな単層小胞（ＳＵＶ）を含む、作製することと、該ＳＵＶを該第２の混合物から単離することであって、該ＳＵＶが、約２０ナノメートル～５０ナノメートルの粒子サイズを有する、単離することと、オリゴヌクレオチド又は複数のオリゴヌクレオチドを単離したＳＵＶに添加して、ＬＳＮＡを作製することと、を含む、ＬＳＮＡを作製する方法を提供する。

【００７８】

オリゴヌクレオチド

本開示は、ナノ粒子コアと、ナノ粒子コアの外部に結合したオリゴヌクレオチドのシェルと、を含む、球状核酸（例えば、ＰｒｏＳＮＡ、ＬＳＮＡＳ、ＬＮＰ－ＳＮＡ）を提供する。様々な実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェルは、阻害性オリゴヌクレオチド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、標的化オリゴヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを含む。本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、ナノ粒子コアは、封入された遺伝子編集タンパク質を含む。様々な実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドには、ＤＮＡオリゴヌクレオチド、ＲＮＡオリゴヌクレオチド、それらの修飾形態、又はそれらの組み合わせが含まれる。本明細書に記載の任意の態様又は実施形態では、オリゴヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖である。本開示の任意の態様又は実施形態では、オリゴヌクレオチドは、検出可能なマーカーを含む。

【００７９】

本明細書に記載されるように、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド間結合を有するものを含む、オリゴヌクレオチドの修飾形態もまた、本開示によって企図される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、全て又は部分的にペプチド核酸である。他の修飾ヌクレオシド間結合は、少なくとも１つのホスホロチオエート結合を含む。更に他の修飾オリゴヌクレオチドとしては、１つ以上のユニバーサル塩基を含むものが挙げられる。「ユニバーサル塩基」とは、著しい構造不安定化を伴わずに水素結合を形成することによって、核酸中のＡ、Ｃ、Ｇ、Ｔ及びＵのうちのいずれか１つへの結合を置き換えることができる分子を指す。ユニバーサル塩基類似体と組み込まれたオリゴヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーションにおけるプローブとして機能することができる。ユニバーサル塩基の例には、５’－ニトロインドール－２’－デオキシリボシド、３－ニトロピロール、イノシン、及びヒポキサンチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８０】

本明細書で使用される「ヌクレオチド」という用語又はその複数形は、本明細書で論じられ、それ以外は当技術分野で知られている変形形態と交換可能である。本明細書で使用される「核酸塩基」という用語又はその複数形は、本明細書で論じられ、それ以外は当技術分野で知られている変形形態と交換可能である。ヌクレオチド又は核酸塩基は、天然に存在する核酸塩基Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、及びＵを含む。天然に存在しない核酸塩基には、例えば、限定されないが、キサンチン、ジアミノプリン、８－オキソ－Ｎ６－メチルアデニン、７－デアザキサンチン、７－デアザグアニン、Ｎ４，Ｎ４－エタノシトシン、Ｎ’，Ｎ’－エタノ－２，６－ジアミノプリン、５－メチルシトシン（ｍＣ）、５－（Ｃ３－Ｃ６）－アルキニル－シトシン、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、プソイドイソシトシン、２－ヒドロキシ－５－メチル－４－トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシン、並びにＢｅｎｎｅｒ ｅｔ ａｌ．、米国特許第５，４３２，２７２号及びＳｕｓａｎ Ｍ．Ｆｒｅｉｅｒ ａｎｄ Ｋａｒｌ－Ｈｅｉｎｚ Ａｌｔｍａｎｎ，１９９７，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ｖｏｌ．２５：ｐｐ４４２９－４４４３に記載の「天然に存在しない」核酸塩基が挙げられる。「核酸塩基」という用語には、既知のプリン及びピリミジン複素環だけでなく、その複素環類似体及び互変異性体も含まれる。更に、天然に存在する及び天然に存在しない核酸塩基には、米国特許第３，６８７，８０８号（Ｍｅｒｉｇａｎ， ｅｔ ａｌ．）、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｅｄ．Ｓ．Ｔ．Ｃｒｏｏｋｅ ａｎｄ Ｂ．Ｌｅｂｌｅｕ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，１９９３、Ｅｎｇｌｉｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ，３０：６１３－７２２におけるＳａｎｇｈｖｉによる第１５章において、開示されているものが挙げられる（特に頁６２２及び６２３、かつＣｏｎｃｉｓｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｊ．Ｉ．Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ Ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，１９９０，ｐａｇｅｓ ８５８－８５９、Ｃｏｏｋ，Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ １９９１，６，５８５－６０７において参照されたく、これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。様々な態様では、オリゴ

ヌクレオチドは、最も古典的な意味でのヌクレオシド塩基ではないが、ヌクレオシド塩基として機能する、特定の「ユニバーサル塩基」を含む核酸塩基のように機能し得る複素環式化合物などの化合物を含む天然に存在しないヌクレオチドのカテゴリーである１つ以上の「ヌクレオシド塩基」又は「塩基単位」も含む。ユニバーサル塩基には、３－ニトロピロール、任意選択で置換されたインドール（例えば、５－ニトロインドール）、及び任意選択で置換されたヒポキサンチンが含まれる。他の望ましいユニバーサル塩基には、当該技術分野において既知のユニバーサル塩基を含む、ピロール、ジアゾール、又はトリアゾール誘導体が挙げられる。

【００８１】

オリゴヌクレオチドの例には、修飾された骨格又は非天然ヌクレオシド間結合を含有するものが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドには、骨格にリン原子を有するもの及び骨格にリン原子を有さないものが含まれる。ヌクレオシド間骨格にリン原子を有していない修飾オリゴヌクレオチドは、「オリゴヌクレオチド」の意味の範囲内であるとみなされる。

【００８２】

リン原子を含む修飾オリゴヌクレオチド骨格には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホトリエステル、３’－アルキレンホスホネート、５’－アルキレンホネート及びキラルホスホネートを含むメチル及び他のアルキルホスネート、ホスフィネート、３’－アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、及び正常な３’－５’結合を有するボラノホスフェート、これらの２’－５’結合類似体、並びに１つ以上のヌクレオチド間結合が３’－３’、５’－５’又は２’－２’結合である逆向きの極性を有するものが挙げられる。最も３’側のヌクレオチド間結合にあるただ１つの３’－３’結合を含む、すなわち、塩基がない（ヌクレオチドがない、若しくはその場所に水酸基を有する）場合があるただ１つの逆向きのヌクレオシド残基を有するオリゴヌクレオチドも企図される。塩、混合塩、及び遊離酸形態も企図される。上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第３，６８７，８０８号、同第４，４６９，８６３号、同第４，４７６，３０１号、同第５，０２３，２４３号、同第５，１７７，１９６号、同第５，１８８，８９７号、同第５，２６４，４２３号、同第５，２７６，０１９号、同第５，２７８，３０２号、同第５，２８６，７１７号、同第５，３２１，１３１号、同第５，３９９，６７６号、同第５，４０５，９３９号、同第５，４５３，４９６号、同第５，４５５，２３３号、同第５，４６６，６７７号、同第５，４７６，９２５号、同第５，５１９，１２６号、同第５，５３６，８２１号、同第５，５４１，３０６号、同第５，５５０，１１１号、同第５，５６３，２５３号、同第５，５７１，７９９号、同第５，５８７，３６１号、同第５，１９４，５９９号、同第５，５６５，５５５号、同第５，５２７，８９９号、同第５，７２１，２１８号、同第５，６７２，６９７号及び同第５，６２５，０５０号が挙げられ、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００８３】

その中にリン原子を含まない修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、ヘテロ原子とアルキル若しくはシクロアルキルとが混合されたヌクレオシド間結合、又は１つ以上の短鎖のヘテロ原子若しくは複素環のヌクレオシド間結合により形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合を有する骨格；シロキサン骨格；スルフィド、スルフォキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びメチレンチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファミン酸骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホン酸及びスルホンアミド骨格；アミド骨格；並びにＮ、Ｏ、Ｓ及びCH_2構成要素部分が混在するその他の骨格がある。例えば、米国特許第５，０３４，５０６号、同第５，１６６，３１５号、同第５，１８５，４４４号、同第５，２１

４，１３４号、同第５，２１６，１４１号、同第５，２３５，０３３号、同第５，２６４，５６２号、同第５，２６４，５６４号、同第５，４０５，９３８号、同第５，４３４，２５７号、同第５，４６６，６７７号、同第５，４７０，９６７号、同第５，４８９，６７７号、同第５，５４１，３０７号、同第５，５６１，２２５号、同第５，５９６，０８６号、同第５，６０２，２４０号、同第５，６１０，２８９号、同第５，６０２，２４０号、同第５，６０８，０４６号、同第５，６１０，２８９号、同第５，６１８，７０４号、同第５，６２３，０７０号、同第５，６６３，３１２号、同第５，６３３，３６０号、同第５，６７７，４３７号、同第５，７９２，６０８号、同第５，６４６，２６９号及び同第５，６７７，４３９号を参照されたく、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【００８４】

なお更なる実施形態では、１つ以上の糖及び／又はヌクレオチド単位の１つ以上のヌクレオチド間結合の両方が「天然に存在しない」基で置き換えられている、オリゴヌクレオチド模倣物がある。オリゴヌクレオチドの塩基は、ハイブリダイゼーションのために維持される。いくつかの態様では、この実施形態は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）を企図する。ＰＮＡ化合物において、オリゴヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格で置き換えられる。例えば、米国特許第５，５３９，０８２号、同第５，７１４，３３１号、及び同第５，７１９，２６２号、並びにＮｉｅｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９１，２５４，１４９７－１５００を参照されたく、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００８５】

なお更なる実施形態では、ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチド及びヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシドが提供され、米国特許第５，４８９，６７７号及び同第５，６０２，２４０号に記載の－ＣＨ$_2$－ＮＨ－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｏ－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＨ$_2$－、及び－Ｏ－Ｎ（ＣＨ$_3$）－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－を含む。米国特許第５，０３４，５０６号に記載のモルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチドも企図される。

【００８６】

様々な形態では、オリゴヌクレオチド中の２つの連続する単量体間の結合は、－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^H－、＞Ｃ＝Ｏ、＞Ｃ＝ＮＲ^H、＞Ｃ＝Ｓ、－Ｓｉ（Ｒ’’）$_2$－、－ＳＯ－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、－Ｐ（Ｏ）$_2$－、－ＰＯ（ＢＨ$_3$）－、－Ｐ（Ｏ，Ｓ）－、－Ｐ（Ｓ）$_2$－、－ＰＯ（Ｒ’’）－、－ＰＯ（ＯＣＨ$_3$）－、及び－ＰＯ（ＮＨＲ^H）から選択される２～４個の、望ましくは３個の基／原子からなり、式中、Ｒ^{H}は、水素及びＣ$_{1-4}$－アルキルから選択され、Ｒ’’は、Ｃ$_{1-6}$－アルキル及びフェニルから選択される。そのような結合の例示的な例は、－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－ＣＯ－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－ＣＨＯＨ－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｏ－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝（後続単量体への結合として使用される場合、Ｒ^{5}を含む）、－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ－、－ＮＲ^H－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－、－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－ＣＨ$_2$－－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－、－ＮＲ^H－ＣＯ－Ｏ－、－ＮＲ^H－ＣＯ－ＮＲ^H－、－ＮＲ^H－ＣＳ－ＮＲ^H－、－ＮＲ^H－Ｃ（＝ＮＲ^H）－ＮＲ^H－、－ＮＲ^H－ＣＯ－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－Ｏ－ＣＯ－Ｏ－、－Ｏ－ＣＯ－ＣＨ$_2$－Ｏ－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－ＣＯ－ＮＲ^H－、－Ｏ－ＣＯ－ＮＲ^H－、－ＮＲ^H－ＣＯ－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＯ－ＮＲ^H－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－、－ＣＨ＝Ｎ－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｎ＝（後続単量体への結合として使用される場合、Ｒ^{5}を含む）、－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＮＲ^H－、－ＣＯ－ＮＲ^H－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－ＣＯ－、－Ｏ－ＮＲ^H－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－ＮＲ^H、－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｓ－、－Ｓ－ＣＨ$_2$－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｓ－、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｓ－、－Ｓ－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝（後続単量体への結合として使用される場合、Ｒ^{5}を含む）、－Ｓ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｓ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－

－Ｏ－、－Ｓ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｓ－、－ＣＨ$_2$－Ｓ－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－ＳＯ－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$－ＳＯ$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－ＳＯ－Ｏ－、－Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$－Ｏ－、－Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$－ＮＲ^H－、－ＮＲ^H－Ｓ（Ｏ）$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｓ（Ｏ）$_2$－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ、Ｓ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）$_2$－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ、Ｓ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）$_2$－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ、Ｓ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）$_2$－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ、Ｓ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）$_2$－Ｓ－、－Ｏ－ＰＯ（Ｒ’’）－Ｏ－、－Ｏ－ＰＯ（ＯＣ$_3$Ｈ）－Ｏ－、－Ｏ－ＰＯ（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）－Ｏ－、－Ｏ－ＰＯ（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｓ－Ｒ）－Ｏ－、－Ｏ－ＰＯ（ＢＨ$_3$）－Ｏ－、－Ｏ－ＰＯ（ＮＨＲ^N）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）$_2$－ＮＲ^{H}Ｈ－、－ＮＲ^H－Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ、ＮＲ^H）－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）$_2$－ＣＨ$_2$－、及び－Ｏ－Ｓｉ（Ｒ’’）$_2$－Ｏ－であり、その中でも、－ＣＨ$_2$－ＣＯ－ＮＲ^H－、－ＣＨ$_2$－ＮＲ^H－Ｏ－、－Ｓ－ＣＨ$_2$－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｏ－Ｏ－Ｐ（－Ｏ、Ｓ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）$_2$－Ｏ－、－ＮＲ^{H}Ｐ（Ｏ）$_2$－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ、ＮＲ^H）－Ｏ－、－Ｏ－ＰＯ（Ｒ’’）－Ｏ－、－Ｏ－ＰＯ（ＣＨ$_3$）－Ｏ－、及び－Ｏ－ＰＯ（ＮＨＲ^N）－Ｏ－であり、式中、Ｒ^{H}は、水素及びＣ$_{1-4}$－アルキルから選択され、Ｒ’’は、Ｃ$_{1-6}$－アルキル及びフェニルから選択される。更なる例示は、Ｍｅｓｍａｅｋｅｒ ｅｔ．ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ １９９５，５，３４３－３５５及びＳｕｓａｎ Ｍ．Ｆｒｅｉｅｒ ａｎｄ Ｋａｒｌ－Ｈｅｉｎｚ Ａｌｔｍａｎｎ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９７，ｖｏｌ ２５，ｐｐ ４４２９－４４４３に提供されている。

【００８７】

オリゴヌクレオチドのなお他の修飾形態は、米国特許出願第２００４／０２１９５６５号に詳細に記載されており、その開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００８８】

修飾オリゴヌクレオチドはまた、１つ以上の置換糖部分を含有してもよい。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、以下のうちの１つを２’位に含み：ＯＨ；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－、若しくはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－、若しくはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－、若しくはＮ－アルキニル；又はＯ－アルキル－Ｏ－アルキル、ここで、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換又は非置換のＣ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキル又はＣ$_2$～Ｃ$_{10}$アルケニル及びアルキニルであり得る。他の実施形態には、Ｏ［（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ］$_m$ＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＯＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ$_2$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＯＮＨ$_2$、及びＯ（ＣＨ$_2$）$_n$ＯＮ［（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ$_3$］$_2$が含まれ、式中、ｎ及びｍは、１～約１０である。他のオリゴヌクレオチドは、２’位に以下のうちの１つを含む：Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、Ｏ－アルカリル又はＯ－アラルキル、ＳＨ、ＳＣＨ$_3$、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、ＣＦ$_3$、ＯＣＦ$_3$、ＳＯＣＨ$_3$、ＳＯ$_2$ＣＨ$_3$、ＯＮＯ$_2$、ＮＯ$_2$、Ｎ$_3$、ＮＨ２、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、又はＲＮＡ切断基。一態様では、修飾には、２’－メトキシエトキシ（２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）又は２’－ＭＯＥとしても知られる、２’－Ｏ－Ｃ$_2$ＨＣＨ$_2$ＯＣＨ$_3$）（Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｈｅｌｖ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ１９９５７８４８６－５０４）、すなわち、アルコキシアルコキシ基が挙げられる。他の修飾には、２’－ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、２’－ＤＭＡＯＥとしても知られるＯ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＮ（ＣＨ$_3$）$_2$基、及び２’－ジメチルアミノエトキシエトキシ（当該技術分野において、２’－Ｏ－ジメチル－アミノ－エトキシ－エチル又は２’－ＤＭＡＥＯＥとしても知られる）、すなわち、２’－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）$_2$が挙げられる。

【００８９】

更に他の修飾には、２’－メトキシ（２’－Ｏ－ＣＨ$_3$）、２’－アミノプロポキシ（２’

－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$）、２’－アリル（２’－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、２’－Ｏ－アリル（２’－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、及び２’－フルオロ（２’－Ｆ）が挙げられる。２’修飾は、アラビノ（上）位又はリボ（下）位にあってもよい。一態様では、２’－アラビノ修飾は２’－Ｆである。同様の修飾はまた、オリゴヌクレオチドの他の位置、例えば、３’末端ヌクレオチド上の糖の３’位、又は２’－５’結合オリゴヌクレオチド中、及び５’末端ヌクレオチドの５’位で行ってもよい。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣物を有していてもよい。例えば、米国特許第４，９８１，９５７号、同第５，１１８，８００号、同第５，３１９，０８０号、同第５，３５９，０４４号、同第５，３９３，８７８号、同第５，４４６，１３７号、同第５，４６６，７８６号、同第５，５１４，７８５号、同第５，５１９，１３４号、同第５，５６７，８１１号、同第５，５７６，４２７号、同第５，５９１，７２２号、同第５，５９７，９０９号、同第５，６１０，３００号、同第５，６２７，０５３号、同第５，６３９，８７３号、同第５，６４６，２６５号、同第５，６５８，８７３号、同第５，６７０，６３３号、同第５，７９２，７４７号、及び同第５，７００，９２０号を参照されたく、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００９０】

いくつかの態様では、糖の修飾には、２’－ヒドロキシル基が糖環の３’又は４’炭素原子に結合し、それにより、二環式糖部分を形成する、ロックド核酸（ＬＮＡ）が含まれる。特定の態様では、結合は、２’酸素原子と４’炭素原子とを架橋するメチレン（－ＣＨ$_2$－）$_n$であり、式中、ｎは１又は２である。ＬＮＡ及びその調製は、ＷＯ９８／３９３５２及びＷＯ９９／１４２２６に記載されている。

【００９１】

修飾ヌクレオチドは、ＥＰ１０７２６７９及びＷＯ９７／１２８９６に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。修飾核酸塩基には、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、６－メチル並びにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、２－プロピル並びにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、及び２－チオシトシン、５－ハロウラシル及びシトシン、５－プロピニルウラシル及びシトシン、並びにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシン及びチミン、５－ウラシル（シュードウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシル並びに他の８－置換アデニン及びグアニン、５－ハロ、特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチル並びに他の５－置換ウラシル及びシトシン、７－メチルグアニン及び７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン及び８－アザアデニン、７－デアザグアニン及び７－デアザアデニン、並びに３－デアザグアニン及び３－デアザアデニンが挙げられるが、これらに限定されない。更なる修飾塩基には、三環系のピリミジン、例えばフェノキサジンシチジン（１Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド［５，４‐ｂ］［１，４］ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、置換フェノキサジンシチジン（例えば９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾキサジン‐２（３Ｈ）－オン）のようなＧ－クランプ（Ｇ‐ｃｌａｍｐ）、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド［３’，２’：４，５］ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン‐２‐オン）が挙げられる。修飾塩基には、プリン又はピリミジン塩基が他の複素環、例えば、７－デアザ－アデニン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、及び２－ピリドンで置き換えられたものも含まれ得る。追加の核酸塩基には、米国特許第３，６８７，８０８号に開示されているもの、Ｔｈｅ Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ Ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｐａｇｅｓ ８５８－８５９，Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ，Ｊ．Ｉ．，ｅｄ．Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ１９９０に開示されているもの、Ｅｎｇｌｉｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９１Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅ

ｍｉｅ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，３０：６１３に開示されているもの、及びＳａｎｇｈｖｉ，Ｙ．Ｓ．，Ｃｈａｐｔｅｒ　１５，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐａｇｅｓ　２８９－３０２，Ｃｒｏｏｋｅ，Ｓ．Ｔ．ａｎｄ　Ｌｅｂｌｅｕ，Ｂ．，ｅｄ．，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，１９９３に開示されているものが含まれる。これらの塩基のいくつかは、結合親和性を高めるのに有用であり、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、並びにＮ－２、Ｎ－６、及びＯ－６置換プリンを含み、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシル、及び５－プロピニルシトシンが含まれる。５－メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を０．６～１．２℃上昇させることが示されており、特定の態様では、２’－Ｏ－メトキシエチル糖修飾と組み合わされる。米国特許第３，６８７，８０８号、米国特許第４，８４５，２０５号、同第５，１３０，３０２号、同第５，１３４，０６６号、同第５，１７５，２７３号、同第５，３６７，０６６号、同第５，４３２，２７２号、同第５，４５７，１８７号、同第５，４５９，２５５号、同第５，４８４，９０８号、同第５，５０２，１７７号、同第５，５２５，７１１号、同第５，５５２，５４０号、同第５，５８７，４６９号、同第５，５９４，１２１号、同第５，５９６，０９１号、同第５，６１４，６１７号、同第５，６４５，９８５号、同第５，８３０，６５３号、同第５，７６３，５８８号、同第６，００５，０９６号、同第５，７５０，６９２号及び同第５，６８１，９４１号を参照されたく、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９２】

所定の配列のポリヌクレオチドを作製する方法は周知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ　ｅｄ．１９８９）及びＦ．Ｅｃｋｓｔｅｉｎ（ｅｄ．）Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ａｎａｌｏｇｕｅｓ，１ｓｔ　Ｅｄ．（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９９１）を参照されたい。固相合成法は、ポリリボヌクレオチド及びポリデオキシリボヌクレオチドの両方に適している（ＤＮＡ合成の周知の方法は、ＲＮＡ合成にも有用である）。ポリリボヌクレオチドは酵素的に調製することもできる。天然に存在しない核酸塩基もポリヌクレオチドに組み込むことができる。例えば、米国特許第７，２２３，８３３号、Ｋａｔｚ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，７４：２２３８（１９５１）、Ｙａｍａｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８３：２５９９（１９６１）、Ｋｏｓｔｕｒｋｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：３９４９（１９７４）、Ｔｈｏｍａｓ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，７６：６０３２（１９５４）、Ｚｈａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２７：７４－７５（２００５）、及びＺｉｍｍｅｒｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２４：１３６８４－１３６８５（２００２）を参照されたい。

【００９３】

様々な態様では、本開示のオリゴヌクレオチド又はその修飾形態は、一般に、約５ヌクレオチド長～約１００ヌクレオチド長である。より具体的には、本開示のオリゴヌクレオチドは、約５～約９０ヌクレオチド長、約５～約８０ヌクレオチド長、約５～約７０ヌクレオチド長、約５～約６０ヌクレオチド長、約５～約５０ヌクレオチド長約５～約４５ヌクレオチド長、約５～約４０ヌクレオチド長、約５～約３５ヌクレオチド長、約５～約３０ヌクレオチド長、約５～約２５ヌクレオチド長、約５～約２０ヌクレオチド長、約５～約１５ヌクレオチド長、約５～約１０ヌクレオチド長、約１０～約１００ヌクレオチド長、約１０～約９０ヌクレオチド長、約１０～約８０ヌクレオチド長、約１０～約７０ヌクレオチド長、約１０～約６０ヌクレオチド長、約１０～約５０ヌクレオチド長約１０～約４５ヌクレオチド長、約１０～約４０ヌクレオチド長、約１０～約３５ヌクレオチド長、約１０～約３０ヌクレオチド長、約１０～約２５ヌクレオチド長、約１０～約２０ヌクレオチド長、約１０～約１５ヌクレオチド長、約１８～約２８ヌクレオチド長、約１５～約２６ヌクレオチド長、及びオリゴヌクレオチドが所望の結果を達成できる程度に、具体的に開示されたサイズの中間にある全てのオリゴヌクレオチド長である。更なる実施形態で

は、本開示のオリゴヌクレオチドは、約５～約１００ヌクレオチド長、約５～約９０ヌクレオチド長、約５～約８０ヌクレオチド長、約５～約７０ヌクレオチド長、約５～約６０ヌクレオチド長、約５～約５０ヌクレオチド長、約５～約４０ヌクレオチド長、約５～約３０ヌクレオチド長、約５～約２０ヌクレオチド長、約５～約１０ヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチドが所望の結果を達成できる程度に具体的に開示されたサイズの中間にある全てのオリゴヌクレオチド長である。したがって、様々な実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のヌクレオチド長であるか、又は少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上のヌクレオチド長である。更なる実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００以上少ないヌクレオチド長である。様々な実施形態では、ＳＮＡのナノ粒子コアの外部に結合したオリゴヌクレオチドのシェルは、全てが同じ長さ／配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含み、いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、複数の中の少なくとも１個の他のオリゴヌクレオチドに対して異なる長さ及び／又は配列を有する１個以上のオリゴヌクレオチドを含む。様々な実施形態では、ナノ粒子コアは、その中に封入された１個以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【００９４】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドは、アプタマーである。したがって、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの全ての特徴及び態様（例えば、長さ、タイプ（ＤＮＡ、ＲＮＡ、それらの修飾形態）、スペーサーの任意の存在）は、アプタマーにも適用される。アプタマーは、目的の様々な標的分析物に結合するように進化させることができるオリゴヌクレオチド配列である。アプタマーは、一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖であってもよい。

【００９５】

本明細書に記載の検出可能なマーカー（例えば、フルオロフォア、放射性標識）及び治療剤（例えば、抗体）をオリゴヌクレオチドに結合させる方法は、当技術分野において既知である。

【００９６】

スペーサー。いくつかの態様及び実施形態では、ＳＮＡのナノ粒子コアに結合するオリゴヌクレオチドのシェル内の１個以上のオリゴヌクレオチドは、スペーサーを含む。本明細書で使用される場合、「スペーサー」は、ナノ粒子コアとオリゴヌクレオチドとの間の

距離を増加させる、又は複数のコピーでナノ粒子コアに結合したときに個々のオリゴヌクレオチド間の距離を増加させる、又はＳＮＡの合成を向上させる役割を果たす部分を意味する。したがって、スペーサーは、オリゴヌクレオチドとナノ粒子コアとの間に位置することが企図される。

【００９７】

いくつかの態様では、スペーサーは、存在する場合、有機部分である。いくつかの態様では、スペーサーは、水溶性ポリマー、核酸、ポリペプチド、オリゴ糖、炭水化物、脂質、エチルグリコール、又はそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されないポリマーである。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、スペーサーは、オリゴ（エチレングリコール）ベースのスペーサーである。様々な実施形態では、オリゴヌクレオチドは、１、２、３、４、５、又はそれ以上のスペーサー（例えば、スペーサー－１８（ヘキサエチレングリコール））部分を含む。更なる実施形態では、スペーサーはアルカン系スペーサー（例えば、Ｃ１２）である。いくつかの実施形態では、スペーサーはオリゴヌクレオチドスペーサー（例えば、Ｔ５）である。オリゴヌクレオチドスペーサーは、ナノ粒子コア又は標的に結合するようになるオリゴヌクレオチドの能力を妨害しない任意の配列を有し得る。特定の態様では、オリゴヌクレオチドスペーサーの塩基は、全てのアデニル酸、全てのチミジル酸、全てのシチジル酸、全てのグアニル酸、全てのウリジル酸、又は全ての他のいくつかの修飾塩基である。

【００９８】

様々な実施形態では、スペーサーの長さは、少なくとも約２ヌクレオチド、少なくとも約３ヌクレオチド、少なくとも約４ヌクレオチド、少なくとも約５ヌクレオチド、５～１０ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１０～３０ヌクレオチド、又は更には３０ヌクレオチド超であるか、又はそれらに等しい。

【００９９】

ＳＮＡ表面密度。一般に、少なくとも約２ｐモル／ｃｍ^{2}のオリゴヌクレオチド表面密度が、安定なＳＮＡを提供するのに適当である。いくつかの態様では、本開示のＳＮＡ（例えば、ＰｒｏＳＮＡ、ＬＳＮＡ、ＬＮＰ－ＳＮＡ）の表面密度は、少なくとも１５ｐモル／ｃｍ^{2}である。また、オリゴヌクレオチドが、約２ｐｍｏｌ／ｃｍ^2～約２００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、又は約１０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2～約１００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}の表面密度でＳＮＡのナノ粒子コアに結合される方法も提供される。更なる実施形態では、表面密度は、少なくとも約２ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも３ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも４ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも６ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも７ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも８ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも９ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも１０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約１５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約１９ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約２０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約２５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約３０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約３５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約４０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約４５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約５５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約６０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約６５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約７０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約７５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約８０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約８５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約９０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約９５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約１００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約１２５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約１５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約１７５ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約２００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約２５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約３００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約３５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約４００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約４５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約５００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約５５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約６００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約６５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約７００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約７５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約８００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約８５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約９００ｐｍｏｌ／ｃｍ^2、少なくとも約９５０ｐｍｏｌ／ｃ

ｍ^2、少なくとも約１０００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}以上である。更なる実施形態では、表面密度は、約２ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約３ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約４ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約６ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約７ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約８ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約９ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約１０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約１５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約１９ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約２０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約２５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約３０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約３５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約４０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約４５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約５５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約６０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約６５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約７０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約７５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約８０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約８５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約９０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約９５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約１００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約１２５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約１５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約１７５ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約２００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約２５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約３００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約３５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約４００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約４５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約５００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約５５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約６００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約６５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約７００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約７５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約８００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約８５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約９００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、約９５０ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満、又は約１０００ｐｍｏｌ／ｃｍ^{2}未満である。

【０１００】

あるいは、ＳＮＡに結合したオリゴヌクレオチドの密度を、ＳＮＡに結合したオリゴヌクレオチドの数によって測定する。本開示のＳＮＡに結合したオリゴヌクレオチドの表面密度に関して、本明細書に記載されるＳＮＡが、その表面上に約１～約２，５００個又は約１～約５００個のオリゴヌクレオチドを含むことが企図される。様々な実施形態では、ＳＮＡは、ナノ粒子コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェル内に、約１０～約５００個、又は約１０～約３００個、又は約１０～約２００個、又は約１０～約１９０個、又は約１０～約１８０個、又は約１０～約１７０個、又は約１０～約１６０個、又は約１０～約１５０個、又は約１０～約１４０個、又は約１０～約１３０個、又は約１０～約１２０個、又は約１０～約１１０個、又は約１０～約１００個、又は１０～約９０個、又は約１０～約８０個、又は約１０～約７０個、又は約１０～約６０個、又は約１０～約５０個、又は約１０～約４０個、又は約１０～約３０個、又は約１０～約２０個のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＳＮＡは、ナノ粒子コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェル内に、約８０～約１４０個のオリゴヌクレオチドを含む。更なる実施形態では、ＳＮＡは、ナノ粒子コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェル内に、少なくとも約５、１０、２０、３０、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、又は２００個のオリゴヌクレオチドを含む。更なる実施形態では、ＳＮＡは、ナノ粒子コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェル内の５、１０、２０、３０、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、又は２００個のオリゴヌクレオチドからなる。なお更なる実施形態では、ＳＮＡのナノ粒子コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェルは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＳＮＡのナノ粒子コアに結合したオリゴヌクレオチドのシェルは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個以上のオリゴヌクレオチドからなる。

【０１０１】

組成物

本開示はまた、本開示のＳＮＡ、又はその複数を含む組成物を提供する。本開示の態様又は実施形態のいずれかでは、組成物は、ガイドＲＮＡを更に含む。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。「担体」という用語は、本明細書に記載されるＳＮＡが対象に投与されるビヒクルを指す。本開示によるＳＮＡと互換性のある任意の従来の媒体又は薬剤を使用することができる。担体という用語は、希釈剤、賦形剤、補助剤、及びそれらの組み合わせを包含する。薬学的に許容される担体は、当技術分野でよく知られている（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｂｙ　Ｍａｒｔｉｎ，１９７５（その全体の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

【０１０２】

例示的な「希釈剤」には、注射用水、生理食塩水、Ｔｒｉｓ、酢酸塩、クエン酸塩、若しくはリン酸塩などの緩衝液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒が含まれる。例示的な「賦形剤」には、アミノ酸及びアミノ酸誘導体、ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコール誘導体、ポリオール、酸、アミン、多糖又は多糖誘導体、塩、及び界面活性剤などの安定剤、並びにｐＨ調整剤が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明で提供されるＳＮＡは、アジュバントとして免疫刺激性オリゴヌクレオチド（例えば、及び限定されないが、ＣｐＧオリゴヌクレオチド）を含む。当技術分野で知られている他のアジュバントも、本開示の組成物に使用することができる。例えば、アジュバントは、アルミニウム又はその塩、鉱物油、フロイントアジュバント、植物油、油中水型エマルション、鉱物塩、小分子（例えば、イミキモド、レシキモド）、細菌構成要素（例えば、フラゲリン、モノホスホリル脂質Ａ）、又はそれらの組み合わせであり得る。

【０１０３】

遺伝子調節におけるＳＮＡの使用

本開示のいくつかの態様では、ＳＮＡ（例えば、ＰｒｏＳＮＡ、ＬＮＰ－ＳＮＡ、ＬＳＮＡ）に関連するオリゴヌクレオチドは、遺伝子の発現を阻害する。遺伝子産物の発現を阻害する方法には、標的遺伝子産物の発現が、ＳＮＡの不在下での遺伝子産物の発現と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、又は１００％阻害されるものが含まれる。言い換えれば、提供される方法は、本質的に標的遺伝子産物の発現のあらゆる程度の阻害をもたらすものを包含する。

【０１０４】

阻害の程度は、体液試料若しくは生検試料から、又は当技術分野において周知の画像化技術により、インビボで決定される。あるいは、阻害の程度は、一般に、特定の種類のＳＮＡ及び特定のオリゴヌクレオチドの使用から生じるインビボで予想され得る阻害の程度の予測可能な尺度として、細胞培養アッセイにおいて決定される。

【０１０５】

本開示のいくつかの態様では、ＳＮＡが、遺伝子阻害機能及び薬剤送達機能の両方を果たすことが企図される。そのような態様では、薬剤（例えば、治療剤）は、ＳＮＡと会合し、粒子は、標的遺伝子発現の阻害をもたらすように設計された１個以上のオリゴヌクレオチドで追加的に官能化される。

【０１０６】

様々な態様では、方法は、標的オリゴヌクレオチドに１００％相補的である、すなわち完全に一致するが、他の態様では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さにわたってポリヌクレオチドに少なくとも（以上を意味する）約９５％相補的、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子産物の所望の阻害を達成できる程度にオリゴヌクレオチドの長さに

わたってポリヌクレオチドに少なくとも約９０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８０％、少なくとも約７５％、少なくとも約７０％、少なくとも約６５％、少なくとも約６０％、少なくとも約５５％、少なくとも約５０％、少なくとも約４５％、少なくとも約４０％、少なくとも約３５％、少なくとも約３０％、少なくとも約２５％、少なくとも約２０％相補的である、オリゴヌクレオチドの使用を含む。

【０１０７】

当技術分野では、特異的にハイブリダイズ可能であるために、アンチセンス化合物の配列は、その標的核酸の配列と１００％相補的である必要はないことが理解される。更に、オリゴヌクレオチドは、介在又は隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないように、１つ以上のセグメント上でハイブリダイズし得る（例えば、ループ構造又はヘアピン構造）。相補性パーセントは、オリゴヌクレオチドの長さにわたって決定される。例えば、アンチセンス化合物の２０ヌクレオチドのうち１８ヌクレオチドが全長１００ヌクレオチドの標的オリゴヌクレオチドの２０ヌクレオチド領域に相補的であるアンチセンス化合物を考えると、オリゴヌクレオチドは９０パーセント相補的であろう。この例では、残りの非相補的ヌクレオチドは、クラスター化されるか又は相補的ヌクレオチドが散在していてもよく、互いに又は相補的核酸塩基に隣接する必要はない。アンチセンス化合物の標的核酸の領域との相補性パーセントは、当技術分野で知られているＢＬＡＳＴプログラム（基本的なローカルアライメント検索ツール）及びＰｏｗｅｒＢＬＡＳＴプログラム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９９０２１５，４０３－４１０、Ｚｈａｎｇ ａｎｄ Ｍａｄｄｅｎ，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．，１９９７，７，６４９－６５６）を使用して日常的に決定することができる。

【０１０８】

そのような方法で利用されるオリゴヌクレオチドは、ＲＮＡ又はＤＮＡのいずれかである。ＲＮＡは、調節機能を果たす阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）などの阻害性オリゴヌクレオチドであってもよく、様々な実施形態では、小阻害性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）、及びリボザイムからなる群から選択される。あるいは、ＲＮＡは、調節機能を果たすマイクロＲＮＡである。ＤＮＡは、いくつかの実施形態では、アンチセンス－ＤＮＡである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡはｐｉｗｉ相互作用ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）である。

【０１０９】

免疫調節におけるＳＮＡの使用

Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）は、センチネル細胞で発現されるタンパク質のクラスであり、自然免疫系の調節に重要な役割を果たす。哺乳類の免疫系は、感染性疾患と戦うために２つの一般的な戦略を使用する。病原体への曝露は、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、及び多反応性ＩｇＭ抗体の産生によって特徴付けられる自然免疫応答を急速に引き起こす。自然免疫系は、多様な感染性微生物群によって発現される病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰ）への曝露によって活性化される。ＰＡＭＰの認識は、受容体のＴｏｌｌ様ファミリーのメンバーによって媒介される。特定のオリゴヌクレオチドに応答するＴＬＲ４、ＴＬＲ８、及びＴＬＲ９などのＴＬＲ受容体は、エンドソームと呼ばれる特別な細胞内区画内に存在する。ＴＬＲ４、ＴＬＲ８、及びＴＬＲ９受容体の調節機構は、例えば、限定されないが、ＤＮＡ－タンパク質相互作用に基づいている。

【０１１０】

本明細書に記載されるように、細菌ＤＮＡに見られるものと同様のＣｐＧモチーフを含有する合成免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、ＴＬＲ受容体の同様の応答を刺激する。したがって、本開示のＣｐＧオリゴヌクレオチドは、ＴＬＲアゴニストとして機能する能力を有する。本開示によって企図される他のＴＬＲアゴニストには、一本鎖ＲＮＡ及び小分子（例えば、Ｒ８４８（レシキモド））が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、免疫調節（例えば、免疫刺激性）オリゴヌクレオチドには、免疫不全及びがんの治療を含む、様々な有望な治療用途がある。したがって、いくつかの実施形態では、本開示のＳＮＡは、ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の活性を調節する方法で使用される。

【０１１１】
いくつかの実施形態では、本開示のＳＮＡ（例えば、ＰｒｏＳＮＡ、ＬＳＮＡ、ＬＮＰ－ＳＮＡ）は、ＴＬＲアンタゴニストであるオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＴＬＲアンタゴニストは一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）である。
【０１１２】
いくつかの実施形態では、免疫系の下方調節は、Ｔｏｌｌ様受容体の発現に関与する遺伝子のノックダウンを伴う。このアンチセンスアプローチは、任意のｔｏｌｌ様タンパク質の発現を阻害するための本開示のＳＮＡの使用を伴う。
【０１１３】
したがって、いくつかの実施形態では、ｔｏｌｌ様受容体を調節するために本明細書に記載されるＳＮＡを利用する方法が開示される。本方法は、それぞれ、ＴＬＲアゴニスト又はＴＬＲアンタゴニストを使用して、Ｔｏｌｌ様受容体活性を上方調節又は下方調節するかのいずれかである。方法は、ｔｏｌｌ様受容体を有する細胞を本開示のＳＮＡと接触させ、それによってｔｏｌｌ様受容体の活性及び／又は発現を調節することを含む。調節されるｔｏｌｌ様受容体には、ｔｏｌｌ様受容体１、ｔｏｌｌ様受容体２、ｔｏｌｌ様受容体３、ｔｏｌｌ様受容体４、ｔｏｌｌ様受容体５、ｔｏｌｌ様受容体６、ｔｏｌｌ様受容体７、ｔｏｌｌ様受容体８、ｔｏｌｌ様受容体９、ｔｏｌｌ様受容体１０、ｔｏｌｌ様受容体１１、ｔｏｌｌ様受容体１２、及び／又はｔｏｌｌ様受容体１３のうちの１つ以上が含まれる。
【０１１４】
障害を治療するためのＳＮＡの使用
いくつかの実施形態では、本開示のＳＮＡ（例えば、ＰｒｏＳＮＡ、ＬＳＮＡ、ＬＮＰ－ＳＮＡ）は、障害を治療するために使用される。したがって、いくつかの態様では、本開示は、障害を治療する方法であって、有効量の本開示のＳＮＡを、それを必要とする対象（例えば、ヒト対象）に投与することを含み、投与することにより、障害を治療する、方法を提供する。様々な実施形態では、障害は、がん、感染性疾患、肺疾患、胃腸疾患、血液疾患、ウイルス疾患、炎症疾患、自己免疫疾患、神経変性疾患、遺伝性疾患、心血管疾患、又はそれらの組み合わせである。ＳＮＡの「有効量」は、例えば、遺伝子編集に影響を及ぼし、障害を治療するのに十分な量である。ＳＮＡの有効量はまた、例えば、遺伝子発現を阻害するか、自然免疫応答を活性化するか、又はそれらを組み合わせて、障害を治療する量である。したがって、自然免疫応答を活性化する方法も本明細書で企図され、そのような方法は、本開示のＳＮＡを、対象における自然免疫応答を活性化するのに有効な量で、それを必要とする対象に投与することを含む。
【０１１５】
本開示のＳＮＡは、非経口投与、筋肉内注射、皮下注射、皮内投与、及び／又は経口若しくは鼻腔内などの粘膜投与などの任意の好適な経路を介して投与することができる。追加の投与経路には、静脈内、腹腔内、鼻腔内投与、膣内、直腸内、及び経口投与が挙げられるが、これらに限定されない。異なる投与経路の別々又は同時の組み合わせも、本開示によって企図される。
【０１１６】
治療剤
本明細書で提供するＳＮＡは、任意選択で、治療剤又はその複数を更に含む。治療剤は、様々な実施形態では、ＳＮＡのナノ粒子コアの外部に結合したオリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドに単純に会合しており、かつ／又は治療剤はＳＮＡのナノ粒子コアに会合しており、かつ／又は治療剤はＳＮＡに封入されている。いくつかの実施形態では、治療剤は、ナノ粒子コアに結合していないオリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドの終端に会合している（例えば、オリゴヌクレオチドがその３’終端を介してナノ粒子コアに結合している場合、治療剤はオリゴヌクレオチドの５’終端に会合している）。あるいは、いくつかの実施形態では、治療剤は、ナノ粒子コアに結合しているオリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドの終端に会合している（例えば、オ

リゴヌクレオチドがその３’終端を介してナノ粒子コアに結合している場合、治療剤はオリゴヌクレオチドの３’終端に会合している）。いくつかの実施形態では、治療剤は、ＳＮＡのナノ粒子コアの外部に結合しているオリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドに共有結合的に会合している。いくつかの実施形態では、治療剤は、ＳＮＡのナノ粒子コアの外部に結合しているオリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドに非共有結合的に会合している。しかしながら、本開示は、１つ以上の治療剤が、ＳＮＡのナノ粒子コアの外部に結合しているオリゴヌクレオチドのシェル内のオリゴヌクレオチドに共有結合的及び非共有結合的の両方で会合しているＳＮＡを提供することを理解されたい。また、非共有結合的な会合には、ハイブリダイゼーション、タンパク質結合、及び／又は疎水性相互作用が含まれることも理解されるであろう。いくつかの実施形態では、治療剤は、本開示のＳＮＡとは別個に投与される。したがって、いくつかの実施形態では、治療剤は、障害を治療するために、本開示のＳＮＡの前、後、又は同時に投与される。

【０１１７】

本開示によって企図される治療剤には、タンパク質（例えば、治療用タンパク質）、成長因子、ホルモン、インターフェロン、インターロイキン、抗体又は抗体断片、小分子、ペプチド、抗生物質、抗真菌剤、抗ウイルス剤、化学療法剤、又はそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１８】

本明細書で使用される「小分子」という用語は、化学化合物若しくは薬物、又は天然若しくは合成のいずれかの任意の他の低分子量有機化合物を指す。「低分子量」とは、１５００ダルトン未満、典型的には１００～７００ダルトンの分子量を有する化合物を意味する。

【実施例】

【０１１９】

以下の実施例に関して、「ＣＲＩＳＰＲ－ＳＮＡ」の使用への言及は、任意のＧＡＬＡペプチド配列を含まないＣａｓ９タンパク質の利用を示し得る。また、以下の実施例に関して、「Ｃａｓ９　ＳＮＡ」の使用への言及は、Ｎ末端からＣ末端の順に以下の構造：（ｉ）１つ以上のＧＡＬＡペプチド、（ｉｉ）遺伝子編集タンパク質、及び（ｉｉｉ）核局在化シグナル（ＮＬＳ）、を含む、本明細書に記載される「融合」Ｃａｓ９タンパク質の利用を示し得る。

【０１２０】

実施例１

遺伝子編集におけるＬＳＮＡの使用

本開示は、球状核酸を使用して遺伝子編集タンパク質を哺乳類細胞に送達するための方法を提供する。ｔｒａｃｒＲＮＡ及びｃｒＲＮＡを有するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９の酵素活性リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を合成し、次いで、ＲＮＰを、９５％の１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３ホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）及び５％の１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（６－アジドヘキサノイル）（ＤＰＰＥ－アジド）から作製したリポソームに封入する。次いで、リポソームを５’ＤＢＣＯ修飾ＤＮＡで官能化して、ＬＳＮＡを生成する。これらの粒子は、酵素活性Ｃａｓ９を含有し、哺乳類細胞によって効率的に取り込まれる。

【０１２１】

方法

特に明記しない限り、全ての試薬は商業的供給源から購入し、受け取ったままで使用した。オリゴヌクレオチド、ｃｒＲＮＡ、及びｔｒａｃｒＲＮＡ合成について、全てのホスホラミダイト及び試薬をＧｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｃｏ．（Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，ＶＡ，ＵＳＡ）から購入した。全ての脂質は、乾燥粉末形態又はクロロホルムのいずれかでＡｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ（Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ，ＵＳＡ）から購入し、更に精製することなく使用した。ＥｎＧｅｎ（登録商標）Ｃａｓ９　ＮＬＳ（Ｃａｓ

９）、プロテイナーゼＫ、及びＰｈｕｓｉｏｎ　ＰＣＲキットをＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ，ＵＳＡ）から購入した。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７　ＮＨＳエステル色素（Ａｌｅｘａ６４７）をＬｕｍｉｐｒｏｂｅ　Ｃｏｒｐ．（Ｃｏｃｋｎｅｙｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ，ＵＳＡ）から購入した。プラスミドをＡｄｄＧｅｎｅ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ，ＵＳＡから購入した。ＧｅｌＲｅｄ色素をＢｉｏｔｉｕｍ　Ｉｎｃ．（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ，ＵＳＡ）から購入した。他の全ての試薬をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）から購入した。Ｃ１６６－ＧＦＰ細胞をＡＴＣＣ（Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡ）から購入し、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭをＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）から購入した。

【０１２２】

Ｃａｓ９の標識化及び定量化

Ｃａｓ９を追跡及び定量化するために、２ナノモルのＣａｓ９を、１０ナノモルのＡｌｅｘａ６４７　ＮＨＳエステルとともに、１×ＨＢＳ中で４℃で一晩インキュベートし、Ａｌｅｘａ－Ｃａｓ９を生成した。未反応の色素を除去するために、Ａｌｅｘａ－Ｃａｓ９を、１×ＨＢＳ中で平衡化したＮＡＰ５カラムに通し、１ｍＬの１×ＨＢＳ中で溶出した。２ナノモルの未修飾Ｃａｓ９を、ＮＡＰ５カラムを使用して１×ＨＢＳに交換し、Ａｌｅｘａ　Ｃａｓ９と組み合わせた。Ｃａｓ９及びＡｌｅｘａ色素の濃度を、それぞれ２８０ｎｍ及び６５０ｎｍの吸光度を使用して計算し、Ａｌｅｘａ色素のＣａｓ９に対するモル比を計算した。次いで、Ａｌｅｘａ－Ｃａｓ９を１μＭに希釈した。活性及び濃度アッセイのために２０μＬのアリコートを確保した。

【０１２３】

Ｃａｓ９リボ核タンパク質の合成及び濃度

１０ナノモルのｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを、１０μＭのｃｒＲＮＡを１０μＭのｔｒａｃｒＲＮＡとともに１×ＨＢＳ中で９５℃で５分間インキュベートすることによって生成し、１０分間室温に冷却させた。次いで、１０ナノモルのｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体を４ナノモルの１μＭのＡｌｅｘａ－Ｃａｓ９と混合し、室温で１０分間放置して、Ｃａｓ９リボ核タンパク質（ＲＮＰ）を形成する。次いで、ＲＮＰをＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋスピンフィルターで５分間濃縮し、次いで、保持された液体体積が５００μＬ以下に達するまで再懸濁した。Ｃａｓ９濃度を再び、Ａｌｅｘａ６４７色素の吸光度を使用して定量化した。活性及び濃度測定のために２０μＬを確保した。

【０１２４】

ＳＮＡの合成及び精製

Ｃａｓ９　ＲＮＰを封入するリポソームを合成するために、クロロホルム中の３ｍｇのＤＯＰＣ及び０．１５ｍｇのＤＰＰＥ－アジドの混合物を凍結乾燥させることによって、脱水リン脂質フィルムを生成した。次いで、脂質フィルムを、５～８μＭの濃度で、１×ＨＢＳ中の４００μＬのＡｌｅｘａ６４７標識リボ核タンパク質複合体（Ａｌｅｘａ－ＲＮＰ）で再水和した。次いで、この溶液を、液体窒素及び室温のバスソニケーターを使用した７回の凍結／解凍サイクルに供して、単一の単層小胞（ＳＵＶ）を生成した。ＳＵＶを、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　６Ｂで満たされたカラムに通し、１×ＨＢＳ中で平衡化して、それらを封入されていないＲＮＰから分離した。多分散性を低減するために、ＳＵＶを２００ｎｍ、次いで１００ｎｍの膜フィルターを通して２回押し出した。残りの封入されていないＲＮＰを除去するために、ＳＵＶを、プロテイナーゼＫ（１０Ｕ、５００μＬの１×ＮＥＢ緩衝液２＋１×ＨＢＳ中）とともに室温で１時間インキュベートした。ＳＵＶを、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００で充填したカラムを使用して、消化されたＲＮＰから分離し、１×ＨＢＳ中で平衡化した。次いで、ＳＮＡを生成するために、ＳＵＶを、５’終端でＤＢＣＯで官能化したオリゴヌクレオチド、及び内部的にＣｙ３（２０個のリン脂質当たりおよそ１個のＤＮＡ）とともに一晩インキュベートした。次いで、ＳＮＡを、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００で充填したカラムを使用して、遊離オリゴヌクレオチドから分離し、１×ＨＢＳ中で平衡化した。図１を参照されたい。

【０１２５】

Ｃａｓ９の定量化及びＤＮＡローディング

ＳＵＶ濃度を測定するために、誘導結合プラズマ発光分光法（ＩＣＰ－ＯＥＳ）及びリン標準を使用して、リン脂質濃度を計算した。リポソームの直径を、動的光散乱（ＤＬＳ）を介して測定し、リポソーム当たりのリン脂質の数を、以下の式１を使用して計算した。ＳＵＶ濃度は、リン脂質濃度をＳＵＶ当たりのリン脂質の数で割ることによって計算した。

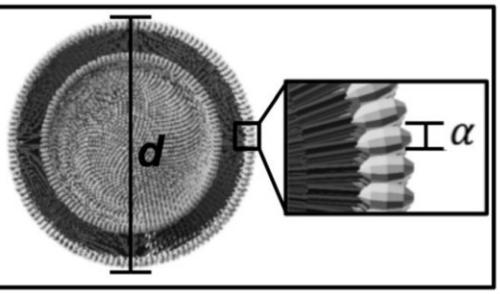
【化５】

式１．Ｄは、リポソームの直径 (Z 平均) (又は SNA の Z 平均、DNA シェルについては-5 nm) である。アルファ(α)は、脂質頭部のフットプリントであり、DOPC =0.72nm^2 である。

$$C_{リポソーム} = C_{DOPC}\frac{4\pi\left(\frac{d}{2}\right)^2 + 4\pi\left(\frac{d}{2}-h\right)^2}{\alpha}$$

$$C_{DOPC} = DOPC\text{の濃度 (μM)}$$

$$= ICP_{OES}\,(ppm) * \frac{32.2\mu M\ DOPC}{ppm}$$



【０１２６】

ＳＮＡを合成した後（図１）、ＳＮＡ試料を０．１％のＴｗｅｅｎ　２０洗剤で処理し（リポソームを破壊し、オリゴヌクレオチドを分散させる）、ＳＮＡ試料中のＣｙ３蛍光を、遊離ＤＢＣＯ及びＣｙ３標識オリゴヌクレオチドから生成された標準曲線と比較することによって、プレートリーダーでオリゴヌクレオチドの濃度を測定した。リポソームの濃度は、オリゴヌクレオチドの濃度及びオリゴヌクレオチド当たりのリン原子の数に基づいて補正されたリン濃度を用いて、上記のようにＩＣＰ－ＯＥＳで決定した。

【０１２７】

ＲＮＰの濃度を計算するために、取っておいたＡｌｅｘａ－ＲＮＰアリコートから標準曲線を生成した。ＲＮＰの濃度を、リポソーム試料からのＡｌｅｘａ６４７の蛍光を測定することによって決定し、次いで、それをプレートリーダーにおけるＡｌｅｘａ－ＲＮＰ標準曲線の線形回帰上にプロットした。

【０１２８】

代表的な合成では、粒子当たりおよそ４５０のＤＮＡ鎖で１１５ｎｍのＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡを生成し、リポソーム当たりおよそ３つのＲＮＰを封入した（図２）。

【０１２９】

インビトロＣａｓ９　ＤＮＡ切断アッセイ

Ｃａｓ９酵素活性を測定するために、ＥＧＦＰ遺伝子を標的とするＲＮＰを合成し、ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡを作製するために使用した。精製したプラスミドｐｃＤＮＡ３－ＥＧＦＰを、制限酵素ＳｍａＩで消化することによって線状化した。線状化したプラスミドとともにインキュベートした活性ＲＮＰを２ｋｂ及び４ｋｂの断片に切断し、これは、ＴＢＥ緩衝液中で３０分間実行された１％アガロース電気泳動ゲル上で見ることができる。ＲＮＰが、ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡの合成中に分解しない又は活性を失わないことを検証するために、２００ナノグラムの線状化したプラスミドを、それらを作製した直後、凍結／解凍サイクル後、サイズ排除後、及び押し出し後に、１ｐｍｏｌ及び０．１ｐｍｏｌのＡｌｅｘａ　ＲＮＰとともにインキュベートした。ＲＮＰは、これらのステップで活性を失わなかった（図３）。

【０１３０】

ＲＮＰは、ＳＮＡ合成手順を通して活性を維持する－プロテイナーゼ安定性研究

ＲＮＰがＳＮＡ内に封入されていることを検証するために、クリーンなＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡを、ＮＥＢの制限酵素緩衝液２中のプロテイナーゼＫとともに１時間室温でインキュベートした。対照として、Ａｌｅｘａ－ＲＮＰを空のＳＮＡと混合し、プロテイナーゼ

Ｋとともにインキュベートした。次いで、インキュベートした試料を、１×ＨＢＳ中で平衡化したＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００サイズの除外カラムを通して２００μＬの画分で溶出した。次いで、これらの画分を、Ｃｙ３及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７蛍光の蛍光ゲルスキャナで画像化した。封入されたＲＮＰは、プロテイナーゼＫ消化後にＳＮＡと共溶出したが、空のＳＮＡとともにインキュベートしたＲＮＰは消化され、したがって、ＲＮＰ関連Ａｌｅｘａ蛍光は、ＳＮＡ関連Ｃｙ３蛍光よりもはるかに遅く溶出した。

【０１３１】

封入されたＲＮＰが依然として活性であることを検証するために、インビトロＣａｓ９ＤＮＡ切断アッセイをいくつかの試料で実行した。ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡ中のリポソームを、それらを上記のようにプロテイナーゼＫとともにインキュベートする前又はインキュベートした後のいずれかで、０．１％のＴｗｅｅｎ　２０洗剤で破壊した。インビトロＤＮＡ切断活性アッセイを、１ｍＭのフェニルメチルスルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）でプロテイナーゼＫを不活性化した後に行った。対照ＲＮＰについて、Ｔｗｅｅｎは活性に影響を及ぼさなかったが、プロテイナーゼＫインキュベーションは活性を消失させた。しかしながら、ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡは、ＴｗｅｅｎがプロテイナーゼＫインキュベーションの後に添加された場合、その活性を維持したが、ＴｗｅｅｎがプロテイナーゼＫインキュベーションの前に添加された場合、活性を示さなかった（図４）。これは、ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡ中のＲＮＰが封入され（プロテイナーゼ消化から保護され）、酵素活性の両方であることを示した。

【０１３２】

細胞取り込み研究

ＳＮＡがＲＮＰを細胞に送達することができるかどうかを決定するために、Ｃ１６６－ＧＦＰ細胞を、ＣＲＩＳＰＲ　ＳＮＡ、空のＳＮＡ、裸のリポソームに封入されたＲＮＰ、及びＲＮＡｉＭＡＸトランスフェクション試薬と複合体化されたＲＮＰとともに、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ還元血清培地中で１６時間インキュベートした。次いで、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７で標識されたＲＮＰの取り込みをフローサイトメトリーを介して測定した。ＣＲＩＳＰＲ－ＳＮＡで処理された細胞は、裸のリポソームに封入されたＲＮＰ／ＲＮＡｉＭＡＸ混合物又はＲＮＰで処理された細胞よりも蛍光中央値が高く、高蛍光（蛍光＞１０００ＡＵ）細胞の割合が高かったが、未処理の細胞はほとんど蛍光を示さなかった（図５）。このデータは、リポソームＳＮＡに封入された遺伝子編集酵素が、哺乳類細胞に能動的に取り込まれることを示した。

【０１３３】

実施例２

この実施例は、Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体の効率的なゲノム編集送達プラットフォームとしてのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの合成を詳述する。本明細書に記載されるように、Ｃａｓ９は、ＰｒｏＳＮＡのナノ粒子コアとして機能する。表面リジンアミンを、反対側の末端で、アジド及びアミン反応性Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド部分を有する小さなポリエチレングリコールポリマーと反応させた。次いで、共有結合したアジドを、５’末端に歪んだシクロオクチン、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）を含有するＤＮＡ鎖と反応させた。本明細書で使用される配列（ｄＧＧＴ）$_{10}$は、ポリｄＴシェルに対して、Ｇ豊富シェルを含むＳＮＡの細胞取り込みの増強を示した以前の研究に基づいて選択された。三次元オリゴヌクレオチドシェルは、立体及び静電障壁を創出してＣａｓ９タンパク質を安定化し、細胞侵入に関してそれらに機能性を付与する。この戦略は、優れた生体適合性及び細胞取り込み性能、並びにヒト細胞株においておよそ４２．５％の優れたゲノム編集活性を有するゲノム編集ツールの容易な生成を可能にする。我々の知見は、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡが、ゲノム編集及び遺伝子サイレンシングにおいて魅力的な展望を有することを実証する。

【０１３４】

材料

寒天を含むＬＢブロス（カタログ番号Ｌ２８９７－２５０Ｇ）及びＬＢブロスをＳｉｇ

ｍａから購入した。イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（カタログ番号ＤＳＩ５６００）をドットサイエンティフィックインク（ｄｏｔ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ｉｎｃ）から購入した。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．４）をＧｉｂｃｏ　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入した。ＳＡ　ＭＡＬＤＩマトリックス（カタログ番号９００３２）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７（カタログ番号Ａ３７５７３）、及びＮＨＳ－ＰＥＧ４－アジド（カタログ番号２６１３０）を、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから購入した。Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ（Ｍ０２５１Ｓ）は、ＮＥＢから購入した。超純水（１８．２５ＭΩ．ｃｍ、２５℃）を使用して、全ての溶液を調製した。

【０１３５】

オリゴヌクレオチドの設計、合成、及び精製

Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈから入手した試薬及び標準プロトコルを使用して、オリゴヌクレオチドを固体支持体上で合成した。産物を、室温で一晩、３０％のNH_4OHを使用して固体支持体から切断し、４５分にわたって酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液中０～７５％のアセトニトリルの勾配で逆相ＨＰＬＣを使用して精製した。ＨＰＬＣ精製後、最終ジメトキシトリチル基を２０％酢酸中で２時間除去し、続いて酢酸エチルで抽出した。３－ヒドロキシピコリン酸をマトリックスとして使用するマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析を使用して、オリゴヌクレオチドの質量を確認した。ｓｇＲＮＡを、マニュアルに従ってＮＥＢ　Ｔ７　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔを用いて合成した。

【０１３６】

【表１】

$T_4(GGT)_{10}$	DBCO-dT-TTT$(TGG)_{10}$ (配列番号 5)
DNase I-sgRNA	CATCAAGCTGACTAGATAATCTAGCTGATCGTGGACCGATCATACGT ATAATGCCGTAAGATCACGGGTCGCAGCACAGCTCGCGGTCCAGTA GTGATCGACACTGCTCGATCCGCTCGCACCGCTAGCTAATACGACTC ACTATAGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC AAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC GAGTCGGTGCTTTTAAAAAGCTTGGATCGACGA (配列番号 2)
GRIN2B-sgRNA	CATCAAGCTGACTAGATAATCTAGCTGATCGTGGACCGATCATACGT ATAATGCCGTAAGATCACGGGTCGCAGCACAGCTCGCGGTCCAGTA GTGATCGACACTGCTCGATCCGCTCGCACCGCTAGCGAAATTAATAC GACTCACTATAGGTCAACTCGTCGACTCCCTGCAGTCATAGTTCCCC TGAGAAATCAGGGTTACTATGATAAGGGCTTTCTGCCTAAGGCAGAC TGACCCGCGGCGTTGGGGATCGCCTGTCGCCCGCTTTTGGCGGGCA TTCCCCATCCTT (配列番号 3)
GFP-sgRNA	CATCAAGCTGACTAGATAATCTAGCTGATCGTGGACCGATCATACGT ATAATGCCGTAAGATCACGGGTCGCAGCACAGCTCGCGGTCCAGTA GTGATCGACACTGCTCGATCCGCTCGCACCGCTAGCGAAATTAATAC GACTCACTATAGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGGTCATAGTTCCCC TGAGAAATCAGGGTTACTATGATAAGGGCTTTCTGCCTAAGGCAGAC TGACCCGCGGCGTTGGGGATCGCCTGTCGCCCGCTTTTGGCGGGCA TTCCCCATCCTT (配列番号 4)

【０１３７】

Ｃａｓ９　ＳＮＡの合成及び特性評価

Ｃａｓ９の発現及び精製。Ｃａｓ９プラスミド（番号８７７０３）を電気ショックによ

りＯｎｅ　Ｓｈｏｔ（登録商標）ＢＬ２１（ＤＥ３）Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｅ．ｃｏｌｉ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）に形質転換し、細胞を１００μｇ／ｍＬアンピシリンを有するＬＢ寒天プレート上で一晩増殖させた。単一のコロニーを選び、７ｍＬの培養物をＬＢブロス中で、３７℃で一晩成長させた。これらの培養物を７５０ｍＬの２×ＹＢＴブロス及び１００μｇ／ｍＬのアンピシリンに添加し、細胞を３７℃で光学密度０．６～０．９まで成長させ、次いで１ｍＭのイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシドとともに１７℃で一晩誘導した。細胞を沈降させ（６０００ｇ、１５分間）、１００ｍＬの１×ＰＢＳに再懸濁し、次いで、高圧ホモジナイザーを使用して溶解した。細胞溶解物を３００００ｇで３０分間遠心分離することにより清澄化し、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ（商標）Ｍｉｎｉ　Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ（商標）ＩＭＡＣカートリッジ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に充填した。カラムを１００ｍＬの１×ＰＢＳで洗浄し、次いで、２５０ｍＭのイミダゾールを含む同じ緩衝液で溶出した。溶出した画分を透析によって更に精製した。

【０１３８】

表面アクセス可能なシステインとＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７（ＡＦ６４７）との反応。Ｃａｓ９タンパク質を１×リン酸緩衝生理食塩水（１×ＰＢＳ；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に溶解した。次いで、ＤＭＳＯに溶解した１０当量のＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７－Ｃ２－マレイミド（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、１５００μＬの１×ＰＢＳ中およそ１０μＭのＣａｓ９に添加し、反応物を一晩振盪した（９００ｒｐｍ）。非コンジュゲートＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７を、１００ｋＤａフィルターを使用して遠心分離を繰り返すことによって、濾液がＵＶ－Ｖｉｓによって６５０ｎｍで検出可能な吸光度を有さないまで除去した。タンパク質当たりのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７修飾の数をＵＶ－Ｖｉｓ分光法に基づいて計算した。

【０１３９】

表面アクセス可能なリジンとＮＨＳ－ＰＥＧ４－アジドとの反応。１００ｍＭの濃度で無水ＤＭＳＯに溶解した５０当量のＮＨＳ－ＰＥＧ$_4$－アジド架橋剤（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、５５０μＬの１×ＰＢＳ中およそ４５μＭのＣａｓ９－ＡＦ６４７に添加した。反応物を２５℃で一晩振盪した（９００ｒｐｍ）。非コンジュゲートリンカーを、１００ｋＤａフィルターを使用して１０回遠心分離することによって除去した。アジド修飾の数を、Ｂｒｕｋｅｒ　ＡｕｔｏＦｌｅｘ－ＩＩＩにおいてマトリックスとしてシナピン酸（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、ＭＡＬＤＩ－ＭＳによって評価した。

【０１４０】

ＤＮＡコンジュゲーション。ＤＮＡコンジュゲーションは、精製直後に行った。３５０当量のＤＢＣＯ－ｄＴ末端ＤＮＡ鎖を最初に凍結乾燥し、次いで、４５０μＬの１×ＰＢＳ中１０μＭのＣａｓ９－ＡＦ６４７－アジドを添加してＤＮＡを再水和した。この溶液を、振盪（９００ｒｐｍ）しながら２５℃で７２時間インキュベートした。未反応のＤＮＡ鎖を、１００ｋＤａフィルターで連続した遠心分離によって濾液が２６０ｎｍで検出可能な吸光度を有さないまで除去した。典型的には、ＤＮＡの完全な除去は、３０～４０の洗浄ステップを必要とする。タンパク質当たりのＤＮＡ鎖の数は、ＵＶ－Ｖｉｓ分光法及びＭＡＬＤＩ－ＭＳに基づいて計算した。

【０１４１】

Ｃａｓ９　ＳＮＡ－ｓｇＲＮＡ複合体の結合及び切断活性。Ｃａｓ９　ＳＮＡ－ｓｇＲＮＡ複合体を組み立てるために、ヒトゲノム内の非コード領域を標的とする精製したＣａｓ９　ＳＮＡ及びｓｇＲＮＡを、それぞれ３０ｎＭ及び６０ｎＭの濃度で、３７℃で３０分間、１×ＮＥＢｕｆｆｅｒ　４．１中でインキュベートした。その後、標的配列を有するＣｙ５標識ＤＮＡを添加して１５０ｎＭの濃度を得、混合物を同じ条件下で３０分間更にインキュベートした。６％のｎａｔｉｖｅ　ＰＡＧＥゲルを使用した分析の前に、１０μＬの反応物を２μＬの６×天然ローディング緩衝液と混合して、切断活性を調べた。

【０１４２】
Ｃａｓ９　ＳＮＡに関するインビトロ調査。細胞株ＨａＣａＴ（ヒトケラチノサイト細胞株）、ＥＧＦＰ発現ＨＥＫ２９３（ヒト胚性腎細胞、ＨＥＫ２９３／ＥＧＦＰ）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから購入した。細胞を、加湿した５％CO_2雰囲気で、３７℃で、１０％のウシ胎仔血清及び１％のペニシリン－ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）培地中で培養した。
【０１４３】
ＨａＣａｔ細胞における細胞取り込み。ＨａＣａＴ細胞をフローサイトメトリーチューブ（０．７×10^5、０．５ｍＬ）に播種し、１０％のＦＢＳを含むＤＭＥＭ中で一晩培養した。その後、培養培地を４５０μＬのＯＰＴＩ－ＭＥＭに交換し、５０μＬのＣａｓ９　ＳＮＡを添加して混合し、異なる時間間隔（０．５時間、１時間、２時間、４時間、６時間、８時間）の２０ｎＭの最終濃度を得た。後処理として、細胞を１×ＰＢＳ、３００μＬ（トリプシン処理）（Ｇｉｂｃｏ）で洗浄し、３００μＬの１×ＰＢＳを添加して、３００Ｇで５分間洗浄し、次いで、細胞を１ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁した。細胞を計数し、密度をＰＢＳで１ｍＬの体積中１×10^6個の細胞に調整した。１μＬの生死色素を１ｍＬの細胞懸濁液に添加し、よく混合した。０．５時間生死染色し、室温で３０分間インキュベートし、光から保護した。細胞を１回、０．５ｍＬのＰＢＳで洗浄し、次いで、１５０μＬの４％のパラホルムアルデヒド（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で１５分間固定した。次いで、４５０μＬの１×ＰＢＳを添加し、３分間洗浄し、その後、２００μＬのＰＢＳを添加し、次いで、試料当たり少なくとも３００００の単一細胞事象の蛍光（励起６４０ｎｍ、発光６５５～６８５ｎｍ）を測定するＢＤ　ＬＳＲＦｏｒｔｅｓｓａを使用して、フローサイトメトリーによって分析した。生のＦＣＳファイルは、前方及び側方の散乱強度に基づいてゲートされ、ＦｌｏｗＪｏで分析された。
【０１４４】
細胞生存率。細胞生存率を評価するために、Ｓｔａｎｄａｒｄ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（ＣＣＫ－８）アッセイを利用した。簡単に説明すると、細胞を９６ウェルプレート（ウェル当たり１×10^4）に播種し、１％のＦＢＳの２００μＬのＤＭＥＭ培地中で一晩培養した。次いで、異なる濃度（５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、３００ｎＭ、４００ｎＭ、及び５００ｎＭ）のＣａｓ９　ＳＮＡを含有する２％のＦＢＳの２００μＬのＯＰＴＩ－ＭＥＭ培地を添加し、続いて２４時間インキュベートした。その後、培地を２００μＬのＰＢＳ中１０％のＣＣＫ－８に交換した。３７℃で０．５時間の連続的なインキュベーション後、１５０μＬの培地を使用して、マイクロプレートリーダーを使用して４５０ｎｍでの吸光度を測定した。細胞生存率も、カルセイン－ＡＭ／ＰＩ染色によって評価した。
【０１４５】
インビトロ遺伝子サイレンシング。ＥＧＦＰを絶えず発現するＨＥＫ２９３細胞（ＨＥＫ２９３／ＥＧＦＰ）を用いて、Ｃａｓ９　ＳＮＡの遺伝子サイレンシング効果を評価した。ＨＥＫ２９３／ＥＧＦＰ細胞を２４ウェルプレート（２４ウェルプレート、ウェル当たり１．３×10^5、０．５ｍＬ）に播種し、３７℃で一晩培養した。培地をＯＰＴＩ－ＭＵＭ中２％のＦＢＳに５時間変更した。ＰＯＴＩ－ＭＵＭ中のＣａｓ９　ＳＮＡとともに６時間インキュベートした後、ＥＧＦＰのコード領域を２４時間標的化し、細胞を新鮮な培地に交換し、５日間培養した。次いで、細胞をトリプシン－ＥＤＴＡ溶液で消化し、フローサイトメトリーのために０．３ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁した。
【０１４６】
Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイ。ＨＥＫ２９３／ＥＧＦＰ細胞を２４ウェルプレート（ウェル当たり５×10^4細胞）に播種し、３７℃で一晩培養した。組み立てられたＣａｓ９　ＳＮＡ（１００ｎＭ、ヒトＤＮａｓｅ　Ｉ高活性部位、ヒトＧＲＩＮ２Ｂ部位、及びＥＧＦＰ部位を２４時間標的化する）とのインキュベーション後、細胞を新鮮な培地に交換し

、更に４日間培養した。次いで、ゲノムＤＮＡ抽出キットを使用して、ゲノムＤＮＡ抽出のために細胞を採取した。２５０ｎｇのＤＮＡ抽出物を、１９μＬの総体積で、２μＬのＮＥＢｕｆｆｅｒ２（ＮＥＢ）と組み合わせて変性させ、次いで、９５℃で５分間、２℃／秒で９５～８５℃、０．２℃／秒で８５～２０℃の熱循環で再アニーリングした。再アニーリングしたＤＮＡを、１μＬのＴ７エンドヌクレアーゼＩ（１０Ｕ／μＬ、ＮＥＢ）とともに、３７℃で１５分間インキュベートした。１０μＬの５０％のグリセロールをＴ７エンドヌクレアーゼ反応に添加し、２００Ｖで３０分間電気泳動したＰＡＧＥゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で１２μＬを分析し、次いで、１×ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で３０分間染色した。Ｃａｓ９誘導切断バンド及び切断されていないバンドを使用して、ＩｍａｇｅＪを使用してゲノム編集効率を計算した。標的ゲノム修飾も、Ｓａｎｇｅｒシーケンシングによって検出した。

【０１４７】

結果

組換えＣａｓ９タンパク質をＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）から精製し、Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体の結合／切断活性を溶液中で確認した。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡは、以前に開発された方法によって合成された。具体的には、Ｃａｓ９タンパク質をＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７（ＡＦ６４７）でタグ付けして、インビトロでの追跡を容易にし、Ｃａｓ９　ＳＮＡの濃度を計算した。次いで、表面リジンアミンを、反対側の末端で、アジド及びアミン反応性Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド部分を有する小さなポリエチレングリコールポリマーと反応させた。次いで、共有結合したアジドを、銅不含クリックケミストリーを介して、５’末端に歪んだシクロオクチン、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）を含有するＤＮＡ鎖と反応させた。合成に成功したＣａｓ９　ＳＮＡを、平均サイズ１０ｎｍの透過電子顕微鏡法（ＴＥＭ）で特性評価した（図６ａ）。合成したタンパク質の純度は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを使用して確認した（図６ｂ）。ゲル画像は、各合成ステップ後に明らかな分子量変化を示し、その表面との非特異的会合ではなく、オリゴヌクレオチドの共有結合を実証する。ＤＮＡで官能化した後、平均ゼータ電位を－１５．８ｍＶに変更した（図６ｃ）。これにより、より多くの負電荷で溶液安定性が増強した。ＤＮＡ修飾のレベルを、ＡＦ　Ｃａｓ９とＰｒｏＳＮＡ　Ｃａｓ９との間の２６０ｎｍでの吸光度の差を比較することによって決定した（図６ｄ）。これらの結果は、Ｃａｓ９のＤＮＡ官能化の成功を明確に示した。

【０１４８】

良好な生体適合性は、生物学的応用の前提条件であるため、いくつかの細胞株の生存率を評価した。Ｃａｓ９　ＳＮＡの細胞傷害性を、モデルとしてＨａＣａｔ、ＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ、ｈＭＳＣ、及びＲａｗ２６４．７細胞株を使用して調査した（図７ａ）。標準的なＣＣＫ－８を使用して、細胞生存率を決定した。Ｃａｓ９　ＳＮＡの濃度は、インビトロ実験で使用される典型的な濃度を超えたが、細胞毒性は観察されなかった。Ｃａｓ９　ＳＮＡの細胞質送達を、モデルとしてＨａＣａｔ細胞株を使用して調査した。細胞を２０ｎＭのタンパク質で０～８時間インキュベートし、それらの取り込み性能をフローサイトメトリーによって決定した（図７ｂ）。Ｃａｓ９でインキュベートした細胞と比較して、Ｃａｓ９　ＳＮＡは、細胞取り込みが約１０倍増加したことを示した。Ｃａｓ９　ＳＮＡの増強された細胞取り込みは、細胞表面スカベンジャー受容体の関与、続いて小窩媒介エンドサイトーシスに起因した。

【０１４９】

次に、ゲノム編集におけるＣａｓ９　ＳＮＡの能力を評価した。ヒトゲノム内のＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位を標的とするＣａｓ９　ＳＮＡ、すなわち、比較的安全であり、ゲノム編集にアクセス可能であるＣａｓ９　ＳＮＡを、ＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ細胞に送達した。Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイは、３９．２％のインデル頻度を明らかにした（図８ａ）。その後、まれな神経発達障害に関連する遺伝子ＧＲＩＮ２Ｂ内の部位（すなわち、ＧＲＩＮ２Ｂ）を標的とするＣａｓ９　ＳＮＡも決定し、４２．５％のインデル頻度をもたらした（図８ｂ）。増強された緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）のコード領域を標的と

するｓｇＲＮＡを使用して、遺伝子サイレンシングにおけるＣａｓ９　ＳＮＡの能力も評価した。対応するインデル及びＥＧＦＰサイレンシング効率は、３５．５％であった（図８ｃ）。遺伝子サイレンシング性能は、フローサイトメトリーによるＥＧＦＰ蛍光変化によっても確認され、効率は１７．８％であった。これらの結果は、Ｃａｓ９　ＳＮＡが非常に高い編集効率を達成したことを実証した。

【０１５０】

結論として、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ＳＮＡは、効率的なゲノム編集及び遺伝子サイレンシングのために確立された。Ｃａｓ９　ＳＮＡは、スカベンジャー受容体経路によって効果的に細胞に侵入した。更に、インビトロ研究は、Ｃａｓ９　ＳＮＡが、良好な生体適合性を有する効率的なゲノム編集及び遺伝子サイレンシングをもたらしたことを実証した。この単純で汎用性のある細胞質送達アプローチは、遺伝子療法の生物医学的用途に拡張することができ、その優れた生体適合性は、遺伝子療法及び個別化医療における新しい道を開く。

【０１５１】

実施例３

この実施例は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡを使用した追加の実験を記載する。

【０１５２】

Ｃａｓ９の設計、発現、及び精製

Ｃａｓ９発現ベクターの構築。ｐＥＴ－ＭＢＰ－ＮＬＳ－Ｇｅｏ＿ｓｔ発現ベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　Ｐｌａｓｍｉｄ番号８７７０３（Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ．２０１７　Ｎｏｖ　１０；８（１）：１４２４．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１４６７－０１７－０１４０８－４））を、Ｇｅｏ　Ｃａｓ９のＮ末端に３つの連続したＧＡＬＡペプチド（３ＧＡＬＡ）を挿入することによって更に操作した（図９）。使用される全ての配列を、表１に列挙する。ＧＡＬＡ遺伝子配列をＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入し、Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリ（ＧＧ）を使用してクローニングした。ｐＥＴ－ＭＢＰ－ＮＬＳ－Ｇｅｏ＿ｓｔベクターを最初にＰＣＲサーモサイクラー（ＡＢＩ）で増幅し、続いてＤｐｎＩ消化及びゲル精製によって元のプラスミド鋳型を除去した。続いて、３ＧＡＬＡ遺伝子配列をＧＧ－アセンブリによって増幅したベクターにサブクローニングした。構築したベクターを、エレクトロポレーションによってＯｎｅ　Ｓｈｏｔ（登録商標）ＢＬ２１（ＤＥ３）に形質転換し、従来のＳａｎｇｅｒシーケンシングで確認し、３ＧＡＬＡ　Ｃａｓ９ベクターを得た。Ｃａｓ９のＣ末端は、核局在化シグナルを含有したことに留意されたい。融合タンパク質（配列番号２４）のアミノ酸配列を以下に示す。

【０１５３】

【表２】

配列表１

MKSSHHHHHHHHHHGSSMKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEE
KFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIA
VEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYEN
GKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDT
SKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGA
VALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQ
TNSSSNNNNNNNNNNLGIEENLYFQSM**WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAWEAA**
LAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAWEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAASGGSS
GGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSMRYKIGLDIGITSVGWAVMNLDIPRIEDLGVRIFDRA
ENPQTGESLALPRRLARSARRRLRRRKHRLERIRRLVIREGILTKEELDKLFEEKHEIDVWQLRV
EALDRKLNNDELARVLLHLAKRRGFKSNRKSERSNKENSTMLKHIEENRAILSSYRTVGEMIVK
DPKFALHKRNKGENYTNTIARDDLEREIRLIFSKQREFGNMSCTEEFENEYITIWASQRPVASKD
DIEKKVGFCTFEPKEKRAPKATYTFQSFIAWEHINKLRLISPSGARGLTDEERRLLYEQAFQKNK
ITYHDIRTLLHLPDDTYFKGIVYDRGESRKQNENIRFLELDAYHQIRKAVDKVYGKGKSSSFLPID
FDTFGYALTLFKDDADIHSYLRNEYEQNGKRMPNLANKVYDNELIEELLNLSFTKFGHLSLKALR
SILPYMEQGEVYSSACERAGYTFTGPKKKQKTMLLPNIPPIANPVVMRALTQARKVVNAIIKKYG
SPVSIHIELARDLSQTFDERRKTKKEQDENRKKNETAIRQLMEYGLTLNPTGHDIVKFKLWSEQ
NGRCAYSLQPIEIERLLEPGYVEVDHVIPYSRSLDDSYTNKVLVLTRENREKGNRIPAEYLGVGT
ERWQQFETFVLTNKQFSKKKRDRLLRLHYDENEETEFKNRNLNDTRYISRFFANFIREHLKFAE
SDDKQKVYTVNGRVTAHLRSRWEFNKNREESDLHHAVDAVIVACTTPSDIAKVTAFYQRREQN
KELAKKTEPHFPQPWPHFADELRARLSKHPKESIKALNLGNYDDQKLESLQPVFVSRMPKRSV
TGAAHQETLRRYVGIDERSGKIQTVVKTKLSEIKLDASGHFPMYGKESDPRTYEAIRQRLLEHN
NDPKKAFQEPLYKPKKNGEPGPVIRTVKIIDTKNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYC
VPVYTMDIMKGILPNKAIEPNKPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIELPREKTVKTAAGEEINV
KDVFVYYKTIDSANGGLELISHDHRFSLRGVGSRTLKRFEKYQVDVLGNIYKVRGEKRVGLASS
AHSKPGKTIRPLQSTRD***PKKKRKV*** (配列番号 24)

【０１５４】

太字の配列（ＷＥＡＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＨＬＡＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＡＷＥＡ
ＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＨＬＡＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＡＷＥＡＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬ
ＡＥＨＬＡＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＡ（配列番号２６））は、３ＧＡＬＡペプチドである
下線付きの配列（ＭＲＹＫＩＧＬＤＩＧＩＴＳＶＧＷＡＶＭＮＬＤＩＰＲＩＥＤＬＧＶＲ
ＩＦＤＲＡＥＮＰＱＴＧＥＳＬＡＬＰＲＲＬＡＲＳＡＲＲＲＬＲＲＲＫＨＲＬＥＲＩＲＲ
ＬＶＩＲＥＧＩＬＴＫＥＥＬＤＫＬＦＥＥＫＨＥＩＤＶＷＱＬＲＶＥＡＬＤＲＫＬＮＮＤ
ＥＬＡＲＶＬＬＨＬＡＫＲＲＧＦＫＳＮＲＫＳＥＲＳＮＫＥＮＳＴＭＬＫＨＩＥＥＮＲＡ
ＩＬＳＳＹＲＴＶＧＥＭＩＶＫＤＰＫＦＡＬＨＫＲＮＫＧＥＮＹＴＮＴＩＡＲＤＤＬＥＲ
ＥＩＲＬＩＦＳＫＱＲＥＦＧＮＭＳＣＴＥＥＦＥＮＥＹＩＴＩＷＡＳＱＲＰＶＡＳＫＤＤ
ＩＥＫＫＶＧＦＣＴＦＥＰＫＥＫＲＡＰＫＡＴＹＴＦＱＳＦＩＡＷＥＨＩＮＫＬＲＬＩＳ
ＰＳＧＡＲＧＬＴＤＥＥＲＲＬＬＹＥＱＡＦＱＫＮＫＩＴＹＨＤＩＲＴＬＬＨＬＰＤＤＴ
ＹＦＫＧＩＶＹＤＲＧＥＳＲＫＱＮＥＮＩＲＦＬＥＬＤＡＹＨＱＩＲＫＡＶＤＫＶＹＧＫ
ＧＫＳＳＳＦＬＰＩＤＦＤＴＦＧＹＡＬＴＬＦＫＤＤＡＤＩＨＳＹＬＲＮＥＹＥＱＮＧＫ
ＲＭＰＮＬＡＮＫＶＹＤＮＥＬＩＥＥＬＬＮＬＳＦＴＫＦＧＨＬＳＬＫＡＬＲＳＩＬＰＹ
ＭＥＱＧＥＶＹＳＳＡＣＥＲＡＧＹＴＦＴＧＰＫＫＫＱＫＴＭＬＬＰＮＩＰＰＩＡＮＰＶ
ＶＭＲＡＬＴＱＡＲＫＶＶＮＡＩＩＫＫＹＧＳＰＶＳＩＨＩＥＬＡＲＤＬＳＱＴＦＤＥＲ
ＲＫＴＫＫＥＱＤＥＮＲＫＫＮＥＴＡＩＲＱＬＭＥＹＧＬＴＬＮＰＴＧＨＤＩＶＫＦＫＬ
ＷＳＥＱＮＧＲＣＡＹＳＬＱＰＩＥＥＩＥＲＬＬＥＰＧＹＶＥＶＤＨＶＩＰＹＳＲＳＬＤＤ
ＳＹＴＮＫＶＬＶＬＴＲＥＮＲＥＫＧＮＲＩＰＡＥＹＬＧＶＧＴＥＲＷＱＱＦＥＴＦＶＬ
ＴＮＫＱＦＳＫＫＫＲＤＲＬＬＲＬＨＹＤＥＮＥＥＴＥＦＫＮＲＮＬＮＤＴＲＹＩＳＲＦ
ＦＡＮＦＩＲＥＨＬＫＦＡＥＳＤＤＫＱＫＶＹＴＶＮＧＲＶＴＡＨＬＲＳＲＷＥＦＮＫＮ
ＲＥＥＳＤＬＨＨＡＶＤＡＶＩＶＡＣＴＴＰＳＤＩＡＫＶＴＡＦＹＱＲＲＥＱＮＫＥＬＡ
ＫＫＴＥＰＨＦＰＱＰＷＰＨＦＡＤＥＬＲＡＲＬＳＫＨＰＫＥＳＩＫＡＬＮＬＧＮＹＤＤ
ＱＫＬＥＳＬＱＰＶＦＶＳＲＭＰＫＲＳＶＴＧＡＡＨＱＥＴＬＲＲＹＶＧＩＤＥＲＳＧＫ
ＩＱＴＶＶＫＴＫＬＳＥＩＫＬＤＡＳＧＨＦＰＭＹＧＫＥＳＤＰＲＴＹＥＡＩＲＱＲＬＬ

ＥＨＮＮＤＰＫＫＡＦＱＥＰＬＹＫＰＫＫＮＧＥＰＧＰＶＩＲＴＶＫＩＩＤＴＫＮＱＶＩ
ＰＬＮＤＧＫＴＶＡＹＮＳＮＩＶＲＶＤＶＦＥＫＤＧＫＹＹＣＶＰＶＹＴＭＤＩＭＫＧＩ
ＬＰＮＫＡＩＥＰＮＫＰＹＳＥＷＫＥＭＴＥＤＹＴＦＲＦＳＬＹＰＮＤＬＩＲＩＥＬＰＲ
ＥＫＴＶＫＴＡＡＧＥＥＩＮＶＫＤＶＦＶＹＹＫＴＩＤＳＡＮＧＧＬＥＬＩＳＨＤＨＲＦ
ＳＬＲＧＶＧＳＲＴＬＫＲＦＥＫＹＱＶＤＶＬＧＮＩＹＫＶＲＧＥＫＲＶＧＬＡＳＳＡＨ
ＳＫＰＧＫＴＩＲＰＬＱＳＴＲＤ（配列番号２５）は、Ｃａｓ９である。
太字で斜体の配列（ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号２３））は、ＮＬＳである。

【０１５５】

【表３】

表１．プライマーの設計及びGALA断片。

3GALA-For	5’-ATGCGTTATAAGATTGGCC-3’ (配列番号 6)
3GALA-Rev	5’-CATGGATTGGAAGTACAGG-3’ (配列番号 7)
3GALA	5’-cctgtacttccaatccatgtgggaagctgccctggctgaagcactggctgaag cgctggccgaacatctggcagaagcgctggcggaagcactggaagcactggcagcgtgggaagctgccctg gctgaagcactggctgaagcgctggccgaacatctggcagaagcgctggcggaagcactggaagcactggc agcgtctggaggatctagcggaggatcctctggcagcgagacaccaggaacaagcgagtcagcaacaccag agagcagtggcggcagcagcggcggcagcatgcgttataagattggcc-3’ (配列番号 8)

【０１５６】

Ｃａｓ９の産生及び精製。Ｎ末端３ＧＡＬＡペプチドを有する組換えＣａｓ９過剰発現ベクターを、電気ショックによりＯｎｅ　Ｓｈｏｔ（登録商標）ＢＬ２１（ＤＥ３）に形質転換し、ＬＢ－アンピシリン寒天プレート（１００μｇ／ｍＬアンピシリン）上で一晩成長させた。得られた発現コロニーを、７ｍＬ（ＬＢ、１００μｇ／ｍＬアンピシリン）スターター培養物に接種し、これを３７℃で一晩激しく振盪した。翌日、スターター培養物を７５０ｍＬの２×ＹＢＴブロス（１００μｇ／ｍＬアンピシリン）に接種し、３７℃で０．８の光学密度まで成長させ、その後、１ｍＭのイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシドで遺伝子発現を誘導し、続いて１７℃で一晩インキュベートした。細胞を採取し（６０００ｇ、１５分間）、１００ｍＬの溶解緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５ＲＴ、０．５ｍＭのＴＣＥＰ、５００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＰＭＳＦ）に再懸濁し、次いで、高圧ホモジナイザーによって溶解した。溶解物画分を３００００ｇで３０分間遠心分離することにより清澄化し、結合緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５　ＲＴ、５００ｍＭのＮａＣｌ）中で予備平衡化した５ｍＬのＢｉｏ－Ｓｃａｌｅ（商標）Ｍｉｎｉ　Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ（商標）ＩＭＡＣカートリッジ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に充填した。結合したタンパク質を洗浄緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、５００ｍＭのＮａＣｌ、２５０ｍＭのイミダゾール）によって溶出した。マルトース結合タンパク質を一晩ＴＥＶプロテイナーゼによって溶出したタンパク質から切断し、第２のＭＢＰ親和性ステップによって捕捉した。得られたタンパク質をヘパリンカラムに充填し、３００～１２５０ｍＭのＮａＣｌの勾配で溶出した。Ｃａｓ９を含有する溶出液の画分を、貯蔵緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、５％のグリセロール、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＴＣＥＰ）中で予備平衡化したＢｉｏ－Ｓｃａｌｅ（商標）Ｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｇｅｌ（登録商標）Ｐ－６脱塩カートリッジによって精製し、濃度をＮａｎｏＤｒｏｐ　８０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって測定した（図１０）。タンパク質を、４℃の一定温度で精製し、液体窒素中で瞬間凍結し、－２０℃で保存した。

【０１５７】

オリゴヌクレオチド及びｓｇＲＮＡの合成

オリゴヌクレオチドの合成及び精製。全てのホスホラミダイト及びＤＮＡ合成試薬をＧｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈから入手した。この研究で使用される配列を表２に列挙する。

ＤＮＡ合成を、ＭｅｒＭａｄｅ１２オリゴヌクレオチド合成装置（ＭＭ１２，Ｂｉｏ　Ａｕｔｏｍａｔｉｏｎ　Ｉｎｃ．、Ｔｅｘａｓ，ＵＳＡ）又はＡＢＩ３９４合成装置によって、１０μｍｏｌのスケールで、制御された細孔ガラス（ＣＰＧ）ビーズ上で行った。全てのオリゴヌクレオチドを、３０％のＮＨ$_4$ＯＨを使用して室温で一晩ＣＰＧビーズから脱保護した。次いで、Ｏｒｇａｎｏｍａｔｉｏｎ（登録商標）Ｍｕｌｔｉｖａｐ（登録商標）Ｎｉｔｒｏｇｅｎ　Ｅｖａｐｏｒａｔｏｒを使用して、窒素流下でアンモニアを除去した。残りの溶液を０．２μＭのフィルターを通して濾過して、ＣＰＧビーズを除去した。濾液の画分を逆相高性能液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ、Ｖａｒｉａｎ　ＰｒｏＳｔａｒ　２１０，Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）によって精製して、産物を単離した。Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｄｙｎａｍａｘ　Ｍｉｃｒｏｓｏｒｂ　Ｃ４カラム及び４５分にわたる０～７５％Ｂの勾配（Ａ＝酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液、Ｂ＝アセトニトリル）を使用した。収集した画分を凍結乾燥し、２０％の酢酸に２時間再溶解し、切断したジメトキシトリチル基を酢酸エチル抽出によって除去した。マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ；ＲａｐｉＦｌｅｘ，Ｂｒｕｋｅｒ）を使用して、２’，６’－ジヒドロキシアセトフェノン及びクエン酸水素ジアンモニウムをマトリックスとして使用して、オリゴヌクレオチドの質量を確認した。ＩＤＴ　Ｏｌｉｇｏ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｔｏｏｌから得られたオリゴヌクレオチドの吸光係数を使用して、ＵＶ－ｖｉｓ分光法Ｃａｒｙ　５０００　ＵＶ－ｖｉｓ分光光度計、Ｖａｒｉａｎ）を使用してλ＝２６０ｎｍで溶液吸光度を測定することによって、ＤＮＡ濃度を決定した。

【０１５８】

ｓｇＲＮＡの設計及び合成。コンセンサス５’Ｔ７プロモーター結合部位に続いて２０ｂｐのｓｇＲＮＡ標的配列を有するｓｇＲＮＡの合成ｄｓＤＮＡ鋳型を、ＭＥＧＡｓｃｒｉｐｔ（商標）Ｔ７転写キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用してインビトロで転写した。転写を、２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、３０ｍＭのＭｇＣｌ２、１０ｍＭのＤＴＴ、各５ｍＭのＮＴＰ、１００μｇ／ｍＬのＴ７ポリメラーゼ、ＲＮａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、及び１００ｎｇのＤＮＡ鋳型を含有する緩衝液中で行った。反応物を３７℃でおよそ１８時間インキュベートした。インビトロで転写されたＲＮＡをエタノールで沈殿させ、水に再溶解し、ｓｇＲＮＡ濃度を最終的にＮａｎｏ　Ｄｒｏｐ８０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって定量化し、液体窒素中で瞬間凍結し、－２０℃で保存した。配列を表２に列挙する。ＤＮａｓｅ　Ｉ－ｓｇＲＮＡ、ＧＲＩＮ２Ｂ－ｓｇＲＮＡ、Ｇｒｉｎ２ｂ－ｓｇＲＮＡ、及びＥＧＦＰ－ｓｇＲＮＡを使用して、ＤＮａｓｅ　Ｉ、ＧＲＩＮ２Ｂ、Ｇｒｉｎ２ｂ、及びＥＧＦＰ部位におけるゲノム編集又は遺伝子サイレンシングのためのｓｇＲＮＡを生成した。

【０１５９】

【表４】

表２．本実施例で使用されたDNA配列。

	DNA配列
$T_4(GGT)_{10}$	5'-DBCO-dT-TTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTG GTGG-3' (配列番号5)
DNase I-For	5'-Cy3-CTTGTAGCTACGCCTGTGATGGGCT-3' (配列番号9)
DNase I-Rev	5'-Cy3-TGAGGCTGGCCCCTTCCAGG-3' (配列番号10)
GRIN2B-For	5'-Cy3-TGAAATCGAGGATCTGGGCGATGGC-3' (配列番号11)
GRIN2B-Rev	5'-Cy3-CAGGAGGGCCAGGAGATTTGTGTATGC-3' (配列番号12)
Grin2b-For	5'-Cy3-CCTTTTTACCTTATCTGCCATTATC-3' (配列番号13)
Grin2b-Rev	5'-Cy3-CAGACACTTCAAGGATGCGTTCC-3' (配列番号14)
GFP-For	5'-Cy3-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3' (配列番号15)
GFP-Rev	5'-Cy3-TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG-3' (配列番号16)
DNase I-sgRNA	5'-catcaagctgactagataatctagctgatcgtggaccgatcatacgtataatgc cgtaagatcacgggtcgcagcacagctcgcggtcCagtagtgatcgacactgctcgatccgctcgcaccgctagctaatacga ctcactataggcccagactgagcacgtgagttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaa agtggcaccgagtcggtgcttttaaaaagcttggatcgacga-3' (配列番号2)
GRIN2B-sgRNA	5'-catcaagctgactagataatctagctgatcgtggaccgatcatacgtataatgc cgtaagatcacgggtcgcagcacagctcgcggtccagtagtgatcgacactgctcgatccgctcgcaccgctagcgaaattaat acgactcactataggtcaactcgtcgactccctgcagtcatagttcccctgagaaatcagggttactatgataagggctttctgcct aaggcagactgacccgcggcgttggggatcgcctgtcgcccgcttttggcgggcattccccatcctt-3' (配列番号3)
Grin2b-sgRNA	5'-catcaagctgactagataatctagctgatcgtggaccgatcatacgtataatgc cgtaagatcacgggtcgcagcacagctcgcggtccagtagtgatcgacactgctcgatccgctcgcaccgctagcgaaattaat acgactcactataggatggcttcctggtccgtgtcagtcatagttcccctgagaaatcagggttactatgataagggctttctgccta aggcagactgacccgcggcgttggggatcgcctgtcgcccgcttttggcgggcattccccatcctt-3' (配列番号17)
EGFP-sgRNA	5'-catcaagctgactagataatctagctgatcgtggaccgatcatacgtataatgc cgtaagatcacgggtcgcagcacagctcgcggtccagtagtgatcgacactgctcgatccgctcgcaccgctagcgaaattaat acgactcactataggtatggctagcatgactggtgggtcatagttcccctgagaaatcagggttactatgataagggctttctgcct aaggcagactgacccgcggcgttggggatcgcctgtcgcccgcttttggcgggcattccccatcctt-3' (配列番号4)

DBCO: 5'-ジメトキシトリチル-5-[(6-オキソ-6-(ジベンゾ[b,f]アザシクロオクタ-4-イン-1-イル)-カプラミド-N-ヘキサ-6-イル)-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン,3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(5'-DBCO-dT-CE ホスホラミダイト)

Cy3: 1-[3-(4-モノメトキシトリチルオキシ)プロピル]-1'-[3-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)ホスホラミジル]プロピル]-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニンクロリド(シアニン3ホスホラミダイト)

【０１６０】

Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの合成及び特性評価

Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７（ＡＦ６４７）との反応。Ｃａｓ９タンパク質を、アミノ活性Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７　ＮＨＳエステル（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で最初に修飾した（図１１）。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７　ＮＨＳエステルをＤＭＳＯに溶解して、ＵＶ－可視吸光度分光法（ε６４７＝２７０，０００Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）によって決定されるように、１０ｍＭのストック溶液を得た。５当量過剰のＡＦ－６４７をＣａｓ９タンパク質の溶液に添加し、反応物を９００ｒｐｍで一晩振盪した。過剰なＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７を６５０ｎｍで監視

し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＦＰＬＣでサイズ排除クロマトグラフィーによって除去した。タンパク質当たりのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７修飾の数を、Ｃａｒｙ－５００　ＵＶ－ｖｉｓ分光光度計、及びそれらのそれぞれの吸光係数（εＣａｓ９＝２８０ｎｍで２０４，４７０$M^{-1}cm^{-1}$、２６０ｎｍで３２４，６１０$M^{-1}cm^{-1}$、εＡＦ－６４７＝６５０ｎｍで２７０，０００）で収集した（図１２）。

【０１６１】

表面アクセス可能なリジンとＮＨＳ－ＰＥＧ$_4$－アジドとの反応。表面アミンを、反対側の末端で、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル及びアジド部分を含有するテトラエチレングリコールリンカーと反応させることによってアジドに変換した（ＮＨＳ－ＰＥＧ$_4$－Ｎ$_3$、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）（図１３）。Ｃａｓ９－ＡＦ６４７の溶液に、６００当量のＮＨＳ－ＰＥＧ$_4$－アジド架橋剤を添加した。反応物を４℃で一晩振盪した（９００ｒｐｍ）。２時間後、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＦＰＬＣでサイズ排除クロマトグラフィーによって非コンジュゲートアジドリンカーを除去した。アジドリンカー修飾の数を、Ｂｒｕｋｅｒ　ＡｕｔｏＦｌｅｘ－ＩＩＩにおいてマトリックスとしてシナピン酸（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、ＭＡＬＤＩ－ＭＳによって特定した。各リンカーコンジュゲーションは、２７５ｍ／ｚの質量増加をもたらす（図１４）。

【０１６２】

ＤＮＡコンジュゲーション。ＤＮＡコンジュゲーションは、アジド官能化Ｃａｓ９精製直後に行った。３００倍過剰のＤＢＣＯ末端ＤＮＡは、クリック反応によって反応したＣａｓ９－アジドであった。この反応溶液を、９００ｒｐｍで振盪しながら４℃で７２時間インキュベートした。３日後、未反応のＤＮＡ鎖を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＦＰＬＣでサイズ排除クロマトグラフィー６５０によって除去した。タンパク質当たりのＤＮＡの数は、コンジュゲートされたＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ色素の吸光度に基づいて、ＵＶ－可視吸光度分光法によって決定された（図１５）。吸光度が２６０ｎｍで重複するため、ＡＦ－６４７フルオロフォアを使用して、タンパク質の濃度を計算した。タンパク質吸光度を差し引いた後、ＤＮＡの濃度を、オンラインＩＤＴ　ｏｌｉｇｏ　ａｎａｌｙｚｅｒ（ε２６０＝２７６，０００$M^{-1}cm^{-1}$）を使用して計算された吸光係数に基づいて決定した（図１６）。

【０１６３】

Ｃａｓ９　ＳＮＡの生体安定性分析。ＤＮＡの表面コンジュゲーションがプロテイナーゼ分解からタンパク質を保護できるかどうかを実証するために、天然Ｃａｓ９タンパク質及びＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの両方をトリプシン（プロテイナーゼ）とともにインキュベートし、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを行った。反応溶液をＮＥＢ緩衝液２中で３７℃で１時間にわたってインキュベートした。トリプシンとともにインキュベートした天然タンパク質バンドは、１０分後に顕著に減少したことが観察された。しかしながら、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの分解は観察されず、ＤＮＡシェルがトリプシンによる実質的な分解からタンパク質を保護することができたことを示唆している（図１７）。

【０１６４】

Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡのインビトロ調査

細胞生存率。細胞生存率は、標準のＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（ＣＣＫ－８）アッセイで決定した。ＣＣＫ－８試薬は、生細胞に自由に侵入することができるＷＳＴ－８（２－（２－メトキシ－４－ニトロフェニル）－３－（４－ニトロフェニル）－５－（２，４－ジスルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム、一ナトリウム塩）を含有する。細胞に侵入すると、ＷＳＴ－８（弱蛍光化合物）は、細胞デヒドロゲナーゼによってオレンジ色のホルマザン色素に還元される。具体的には、細胞を１０％のＦＢＳのＤＭＥＭ培地中で一晩、９６ウェル細胞培養プレート（ウェル当たり1×10^4）に播種した。次に、細胞培養培地を、異なる濃度のＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡを含有する２００μＬの培地に交換し、続いて更に２４時間インキュベートした。その後、細胞を１×ＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ中１０％のＣＣＫ－８に交換した。細胞を更に３０分間インキュベートした。

最後に、４５０ｎｍでのＣＣＫの吸光度をＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ４　Ｈｙｂｒｉｄ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒによって測定した。実験は３つ組で行った。細胞生存率も、カルセイン－ＡＭ／ＰＩ染色によって評価した。簡単に説明すると、細胞を２４ウェルプレート（ウェル当たり５×１０^4）に播種し、一晩培養し、続いてＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡを含有する培地で２４時間インキュベートした。その後、細胞を、２μｇ／ｍＬのカルセイン－ＡＭ及び３μｇ／ｍＬのＰＩを含有する５００μＬのＰＢＳで一緒に処理した。生細胞又は死細胞を、カルシン－ＡＭについては４８８ｎｍ、ＰＩについては５３５ｎｍの励起で、Ｂｉｏｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ４　Ｈｙｂｒｉｄ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒによって観察した（図１８）。

【０１６５】

フローサイトメトリーによるＨａＣａｔ細胞における細胞取り込み。ＨａＣａＴ細胞を４８ウェルプレート（ウェル当たり６０，０００）に播種し、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ）及び１％のペニシリンストレプトマイシンを含むＤＭＥＭ中で一晩培養した。その後、培養培地をＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９　ＡＦ６４７を含有するＯＰＴＩ－ＭＥＭに交換して、異なる時間間隔（０．５時間、１時間、２時間、４時間、６時間、８時間）の２０ｎＭの最終濃度を得た。各処理の終了時に、細胞を、１×ＰＢＳ、３００ｕＬ（トリプシン処理）（Ｇｉｂｃｏ）、３００ｕＬの１×ＰＢＳで洗浄し、３００Ｇで５分間遠心分離した後、１ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁した。１μＬの生死色素を細胞懸濁液に添加した。３０分後、細胞を遠心分離によって収集し、４％のパラホルムアルデヒド（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に固定した。次いで、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＬＳＲ　ＩＩを使用してフローサイトメトリーを行い、試料当たり１０，０００の単一細胞事象の蛍光（励起６４０ｎｍ、発光６５５～６８５ｎｍ）を測定した。生のＦＣＳファイルは、前方及び側方の散乱強度に基づいてゲートされ、ＦｌｏｗＪｏで分析された（図１９）。

【０１６６】

細胞内共焦点顕微鏡法。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの細胞内送達を共焦点レーザー走査顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　８１０顕微鏡）によって評価した。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９　ＡＦ６４７のエンドソーム脱出を調査するために、ＨａＣａｔ細胞（ウェル当たり１×１０^4）をホウケイ酸８チャンバーカバーガラススライド（Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）に播種した。８時間後、細胞を３７℃でリソソーム色素（ＣｅｌｌＬｉｇｈｔ（商標）リソソーム－ＧＦＰ、ＢａｃＭａｍ　２．０）とともにインキュベートし、異なる時間間隔でＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９　ＡＦ６４７（２０ｎＭ）を含有する５００μＬのＯｐｔｉＭＥＭとともにインキュベートし、続いてＰＢＳで洗浄し、核色素（Ｈｏｅｃｈｓｔ、１μｇ／ｍＬ）で１０分間室温で染色した後、４％のＰＦＡで１０分間細胞を固定した。その後、生細胞を、それぞれ、Ｈｏｅｃｈｓｔについては４０５ｎｍ、Ｌｙｓｏｓｏｍｅｓ－ＧＦＰについては４８８ｎｍ、ＡＦ６４７標識Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９　ＡＦ６４７については５６１ｎｍで、蛍光顕微鏡によって画像化した。核輸送効率は、共焦点顕微鏡法によって、ＡＦ６４７によって重複した核の割合として決定され、各試料について約１００個の細胞を分析した（ｎ＝３）（図２０）。

【０１６７】

Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイ（図２１）。ＨａＣａｔ、ｈＢＭＳＣ、ＲＡＷ２６４．７、及びＡ５４９／ＥＧＦＰ細胞を４８ウェルプレート（ウェル当たり５×１０^{4}細胞）に播種し、３７℃で一晩培養した。組み立てられたＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ（５０ｎＭ、ヒトＤＮａｓｅ　Ｉ高活性部位：

【０１６８】

【表５】

配列表２

AGTGCTGGAGAATGGGTCACAgtggCAAA (配列番号 18)、

【０１６９】
ヒトＧＲＩＮ２Ｂ部位：
【０１７０】
【表６】

配列表３
AGTCATTGGCAGCTACAGGCAgagaCAAA (配列番号 19)、

【０１７１】
相同性マウスＧｒｉｎ２ｂ部位：
【０１７２】
【表７】

配列表４
ATGGCTTCCTGGTCCGTGTCAtccgCGAA (配列番号 20)、

【０１７３】
及びＥＧＦＰ部位：
【０１７４】
【表８】

配列表５
ACGACTTCTTCAAGTCCGCCAtgccCGAA (配列番号 21)

【０１７５】
（下線はゲノム編集標的を示す）を標的とする）と、ＯＰＴＩＭＥＭ中で４時間インキュベートした後、細胞を新鮮な培地に交換し、更に３日間培養した。次いで、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を使用してゲノムＤＮＡ抽出のために細胞を採取し、続いてＰＣＲによって増幅した。ｉｄｌｅアッセイのために、２５０ｎｇのＤＮＡ抽出物を、１９μＬの総体積で、２μＬのＮＥＢｕｆｆｅｒ２（ＮＥＢ）と組み合わせて変性させ、次いで、９５℃で５分間、２℃／秒で９５～８５℃、０．２℃／秒で８５～２０℃の熱循環で再アニーリングした。再アニーリングしたＤＮＡを、１μＬのＴ７エンドヌクレアーゼＩ（１０Ｕ／μＬ、ＮＥＢ）とともに、３７℃で１５分間インキュベートした。１０μＬの５０％のグリセロールをＴ７エンドヌクレアーゼ反応に添加し、２００Ｖで３０分間電気泳動したＰＡＧＥゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で１２μＬを分析した。Ｃａｓ９誘導切断バンド及び切断されていないバンドを使用して、ＩｍａｇｅＪを使用してゲノム編集効率を計算した。
【０１７６】
Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ Ｃａｓ９トランスフェクション。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＣＲＩＳＰＲＭＡＸトランスフェクション試薬を、提供されたトランスフェクションプロトコルに従って、Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体を細胞にトランスフェクションするために用いた。簡単に説明すると、１μＬのＣａｓ９ Ｐｌｕｓ試薬を、Ｃａｓ９タンパク質（５００ｎＭ）及びｓｇＲＮＡ（１μＭ）を含有する２５μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地に添加し、続いて室温で５分間インキュベートした（チューブ１）。更に、１．５μＬのｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ試薬を２５μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地に添加し、更に室温で５分間インキュベートした（チューブ２）。その後、チューブ１からのＣａｓ９－ｓｇＲＮＡ Ｐｌｕｓ混合物をチューブ２からのｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ溶液と混合し、続いて室温で１０分間インキュベーションした。その後、５０μＬの調製したＣａｓ９－ｓｇＲＮＡトランスフェクション複合体を各ウェルに滴下した（４８ウェルプレート、ウェル当たり５×１

０^{4}）。

【０１７７】

インビトロ遺伝子サイレンシング。ＥＧＦＰを絶えず発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ）を用いて、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの遺伝子サイレンシング効果を評価した。ＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ細胞を４８ウェルプレート（ウェル当たり５×１０^{4}、０．５ｍＬ）に播種し、３７℃で一晩培養した。次いで、培地をＯＰＴＩ－ＭＵＭ中２％のＦＢＳに５時間変更する。ＰＯＴＩ－ＭＵＭ中のＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡとともに６時間インキュベートした後、ＥＧＦＰのコード領域を２４時間標的化し、細胞を新鮮な培地に交換し、３日間培養した。次いで、細胞をトリプシン－ＥＤＴＡ溶液で消化し、フローサイトメトリー（ＢＤ　ＦＡＣＳＣＡＮＴＯ　ＩＩ、ＥＧＦＰのチャネル）のために０．３ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁した。全てのデータを、ＦＣＳ　Ｅｘｐｒｅｓｓフローサイトメトリーデータ分析を使用して分析した（図２２）。

【０１７８】

この実施例は、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡが細胞内在化を最大およそ４５倍向上させたことを示した。更に、ｄ（ＧＧＴ）$_{10}$配列を用いることにより、およそ４５．４％の優れた生体適合性、プロテイナーゼ生体安定性、及び優れたゲノム編集インデル効率を有するゲノム編集ツールの容易な生成が可能となった。これらの観察は、細胞機能が特異的かつ一過性に操作され得るように、普遍的に使用され得る核酸官能化（生体）巨大分子カーゴの設計につながる。

【０１７９】

実施例４

この実施例は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡを使用した追加の実験を記載する。

【０１８０】

Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７の官能化。Ｃａｓ９タンパク質を、アミノ活性Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７　ＮＨＳエステル（ＡＦ６４７、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で修飾した。ＡＦ６４７をＤＭＳＯに溶解して、ＵＶ－可視分光光度法（ε_{647}＝２７０，０００Ｍ－１ｃｍ－１）によって決定されるように、１０ｍＭのストック溶液を得た。５過剰当量のＡＦ６４７をＣａｓ９タンパク質の溶液に添加し、反応物を９００ｒｐｍで一晩振盪した。過剰なＡＦ６４７を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＦＰＬＣでサイズ排除クロマトグラフィーによって除去した。ＡＦ６４７修飾タンパク質のスペクトルをＣａｒｙ－５００　ＵＶ－可視分光光度計（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｉｎｃ、ＵＳＡ）で収集し、修飾の数をそれぞれの吸光係数を使用して計算した（Ｃａｓ９：２８０ｎｍでε_{280}＝２０４，４７０Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$及び２６０ｎｍでε_{260}＝３２４，６１０Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$、ＡＦ６４７：６５０ｎｍでε_{650}＝２７０，０００）。（図２３）

【０１８１】

ＡＦ６４７フルオロフォア修飾Ｃａｓ９のＵＶ－可視スペクトル。スペクトルは、Ｃａｒｙ５０００分光光度計で周囲温度で得た。タンパク質及びＡＦ６４７の濃度を、それぞれ２８０ｎｍ及び６５０ｎｍでの吸光度から計算した。ＡＦ６４７フルオロフォアを使用して、ＤＮＡコンジュゲーション後のタンパク質の濃度を計算し、フローサイトメトリー及び共焦点画像化実験の両方で細胞取り込みを追跡した。（図２３）

【０１８２】

表面アクセス可能なリジンとＮＨＳ－ＰＥＧ$_{4}$－アジドとの反応。表面リジンを、反対側の末端で、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル及びアジド部分を含有するテトラエチレングリコールリンカーと反応させることによってアジドに変換した（ＮＨＳ－ＰＥＧ$_{4}$－Ｎ$_{3}$、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。Ｃａｓ９－ＡＦ６４７の溶液に、６００当量のＮＨＳ－ＰＥＧ$_{4}$－アジドリンカーを添加した。２時間後、非コンジュゲートリンカーを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＦＰＬＣでサイズ排除クロマトグラフィーによって除去した。アジド修飾の数を、マトリックスとしてシナピン酸（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉ

ｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、ＭＡＬＤＩ－ＭＳによって特定した。各リンカーコンジュゲーションは、２７５ｍ／ｚの質量増加をもたらした。（図２３）

【０１８３】

ＤＮＡコンジュゲーション。ＤＮＡコンジュゲーション反応は、アジド修飾Ｃａｓ９の精製直後に行った。３００倍過剰のＤＢＣＯ末端ＤＮＡを、クリック反応によってＣａｓ９－ＡＦ６４７－アジドと反応させた。この反応溶液を４℃で３日間インキュベートした。３日後、未反応のＤＮＡ鎖をＢｉｏ－Ｒａｄ　ＦＰＬＣでサイズ排除クロマトグラフィー（ＥＮｒｉｃｈ（商標）ＳＥＣ６５０カラム、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｉｎｃ．、ＵＳＡ）によって除去した。タンパク質当たりのＤＮＡ修飾の数は、ＵＶ－可視分光光度法によって決定された。両方の吸光度が２６０ｎｍで重複するため、ＡＦ６４７フルオロフォアを使用して、ＤＮＡコンジュゲーション後のタンパク質の濃度を計算した。タンパク質吸光度を差し引いた後、ＤＮＡの濃度を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　ｏｌｉｇｏ　ａｎａｌｙｚｅｒ（ε_{260}＝２７６，０００$M^{-1}cm^{-1}$）から得られた吸光係数に基づいて決定した。（図２３）

【０１８４】

ＵＶ－可視分光光度法によるＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ上のＤＮＡ鎖の数の決定。スペクトルをＣａｒｙ５０００分光光度計で収集した。タンパク質及びＤＮＡ濃度を、それぞれ６５０ｎｍ及び２６０ｎｍでの吸光度から計算した。（図２３）

【０１８５】

円二色性分光法。円二色性（ＣＤ）を使用して、ＤＮＡ官能化後の無傷のＣａｓ９タンパク質構造を特性評価した。全ての試料をＰＢＳで緩衝液交換し、ＣＤスペクトルをＪａｓｃｏ　Ｊ－１７００分光光度計で室温で収集した。Ｃａｓ９及びＤＮＡ試料を、それぞれ５００ｎＭ及び７．１３μＭの濃度で調製した。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの理論スペクトルは、Ｃａｓ９－ＡＦ６４７及び遊離ＤＮＡのスペクトルを合計することによって計算した。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの収集されたスペクトルは、計算されたスペクトルと一致した。（図２４）

【０１８６】

Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの生体安定性分析。ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を使用して、ＤＮＡの表面コンジュゲーションが、Ｃａｓ９タンパク質をトリプシン分解から保護することができるかどうかを調査した。天然Ｃａｓ９タンパク質及びＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの両方を３７℃でトリプシンとともにインキュベートし、異なる時点にわたる分析のために３０μＬのタンパク質を充填した。Ｃａｓ９タンパク質に対応するバンドは、トリプシンとともに１０分間ほどインキュベートすると顕著に減少したことが観察された。しかしながら、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡは、ＤＮＡコンジュゲーションにより、この研究の時間経過においてほとんど分解を示さなかった。（図２５）

【０１８７】

細胞生存率。細胞生存率は、標準のＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（ＣＣＫ－８）アッセイで決定した。ＣＣＫ－８試薬は、生細胞に自由に侵入することができる２－（２－メトキシ－４－ニトロフェニル）－３－（４－ニトロフェニル）－５－（２，４－ジスルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム（ＷＳＴ－８）を含有した。細胞に侵入すると、ＷＳＴ－８は、細胞デヒドロゲナーゼによってオレンジ色のホルマザン色素に還元された（４６０ｎｍでの吸光度）。具体的には、細胞を１０％のＦＢＳを含むＤＭＥＭ培地中で一晩、９６ウェル細胞培養プレート（ウェル当たり10^4）に播種した。次に、細胞培養培地を、異なる濃度のＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡを含有する新鮮な培地に交換し、更に２４時間インキュベートした。次に、細胞をＰＢＳで洗浄し、１０％のＣＣＫ－８に交換した。細胞を更に３０分間インキュベートし、４６０ｎｍの吸光度値をＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ４　Ｈｙｂｒｉｄ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒによって測定した。全ての実験は、独立した３つ組で行った。細胞生存率も、生／死染色によって評価した。簡単に説明すると、細胞を２４ウェルプレート（ウェル当たり5×10^4）に播種し、一晩

培養し、続いてＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡを含有する細胞培地中で２４時間インキュベートした。その後、細胞をカルセインアセトキシメチル（２μｇ／ｍＬ）及びヨウ化プロピジウム（３μｇ／ｍＬ）で一緒に処理した。生細胞又は死細胞を、カルシン－ＡＭについては４８８ｎｍ、ヨウ化プロピジウムについては５３５ｎｍの励起で、Ｂｉｏｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ４　Ｈｙｂｒｉｄ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（ＢｉｏＲａｄ、ＵＳＡ）によって観察した。（図２６）

【０１８８】

フローサイトメトリーによるＨａＣａｔ細胞における細胞取り込み。ＨａＣａＴ細胞を４８ウェルプレート（ウェル当たり６０，０００）に播種し、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ）並びに１％のペニシリン及びストレプトマイシンを含むＤＭＥＭ中で培養した。その後、細胞培養培地を、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９－ＡＦ６４７を含有するＯｐｔｉ－ＭＥＭに交換し、異なる時間間隔（０．５時間、１時間、２時間、４時間、６時間、及び８時間）の２０ｎＭの最終濃度を得た。各処理の終了時に、細胞をＰＢＳ（トリプシン処理）（Ｇｉｂｃｏ）で洗浄し、８００×ｇで５分間遠心分離し、固定緩衝液（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）で固定した。次いで、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＬＳＲ　ＩＩを使用してフローサイトメトリーを行い、試料当たり少なくとも１０，０００の単一細胞事象の蛍光（励起６４０ｎｍ、発光６５５～６８５ｎｍ）を測定した。全ての実験は３つ組で行った。（図２７）

【０１８９】

共焦点顕微鏡法による細胞内送達分析。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの細胞内送達を共焦点レーザー走査顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　８１０、ドイツ製）によって評価した。Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９　ＡＦ６４７のエンドソーム脱出を調査するために、ＨａＣａｔ細胞（ウェル当たり10^4）をホウケイ酸８チャンバーカバーガラススライド（Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）に播種した。８時間後、異なる時間間隔にわたってＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９　ＡＦ６４７（２０ｎＭ）を含有するエンドソーム染色（ＣｅｌｌＬｉｇｈｔ（商標）Ｌａｔｅ　Ｅｎｄｏｓｏｍｅｓ－ＧＦＰ，ＢａｃＭａｍ　２．０）とともに細胞をインキュベートした。過剰なタンパク質をＰＢＳで洗浄し、核をＨｏｅｃｈｓｔ（１μｇ／ｍＬ）で１分間染色した後、４％のパラホルムアルデヒド（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で１５分間細胞を固定した。その後、細胞を、Ｈｏｅｃｈｓｔについては４０５ｎｍ、Ｌｙｓｏｓｏｍｅｓ－ＧＦＰについては４８８ｎｍ、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ又はＣａｓ９　ＡＦ６４７については５６１ｎｍで、共焦点蛍光顕微鏡によって同時に画像化した。核輸送効率は、ＡＦ６４７と重複する核を計数する共焦点顕微鏡画像から決定され、各試料について約１００個の細胞を分析した。（図２９）

【０１９０】

ゲノム編集インデル効率を検出するＳｕｒｖｅｙｏｒ　アッセイ。ＨａＣａｔ、ｈＢＭＳＣ、ＲＡＷ２６４．７、及びＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ細胞を４８ウェルプレート（ウェル当たり５×10^4細胞）に播種し、一晩培養した。Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ中の組み立てられたＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ－ｓｇＲＮＡ複合体（５０ｎＭ）で４時間トランスフェクションした後、細胞を新鮮な培地に交換し、更に３日間培養した。次に、ゲノムＤＮＡ抽出キット（Ｑｕｉｃｋ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ、Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を使用して、製造業者のプロトコルに従って、細胞からゲノムＤＮＡを抽出した。簡単に説明すると、細胞をＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液中に再懸濁し、６５℃で１５分間及び９８℃で６分間インキュベートした。次いで、５μＬの抽出溶液を、標的領域プライマーとのＰＣＲ反応によって増幅した。ｉｄｌｅ形成アッセイのために、５μＬのＰＣＲ産物のアリコートを、１９μＬの総体積でＴ７エンドヌクレアーゼＩ（Ｔ７ＥＩ）緩衝液と混合し変性させ、次いで、熱循環で再アニーリングして、ヘテロ二重鎖形成（９５℃で１０分間、－２℃／秒の勾配で９５～８５℃、－０．２℃／秒の勾配で８５～２０℃）を可能にした。再アニーリング産物を１μＬのＴ７ＥＩ（１０Ｕ／μＬ、ＮＥＢ）とともに１５分間インキュベートし、４～１５％のポリアクリルアミドゲル（ＢｉｏＲａｄ）で分析し

た。Ｃａｓ９誘導切断バンド及び切断されていないバンドをＧｅｌ　Ｄｏｃゲル画像化システム（ＢｉｏＲａｄ）で視覚化し、ＩｍａｇｅＪデンシトメトリー分析を使用して定量化した。図２１に示されるように、ゲノム編集効率スキームを決定した。結果を図３０に示す。

【０１９１】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ　Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体トランスフェクション。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ（商標）トランスフェクション試薬を使用して、製造のトランスフェクションプロトコルに従って、Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体をＲＡＷ　２６４．７細胞にトランスフェクトした。簡単に説明すると、Ｃａｓ９　Ｐｌｕｓ試薬を、Ｃａｓ９タンパク質及びｓｇＲＮＡを含有する培地に添加し、続いて、室温で５分間インキュベートして、Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体を形成した。次いで、ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ試薬をＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地と混合し、更に５分間インキュベートした。その後、Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ混合物をｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ溶液と混合し、続いて、１０分間インキュベートした。その後、５０μＬの調製したＣａｓ９－ｓｇＲＮＡトランスフェクション複合体（５０ｎＭの最終濃度）を添加し、細胞培地に４時間混合した。Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体の処理後、細胞を対応する培地中で３日間培養した。次いで、後続のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイのために細胞を採取した。結果を図３１に示す。

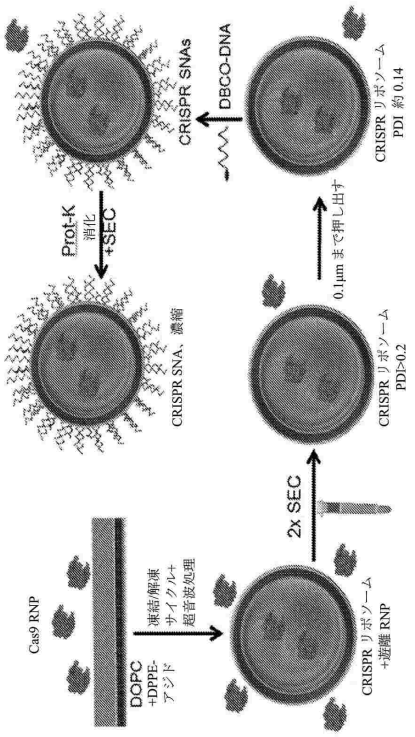
【０１９２】

インビトロ遺伝子サイレンシング。ＥＧＦＰ遺伝子を含有するＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ）を用いて、Ｃａｓ９　ＰｒｏＳＮＡの遺伝子サイレンシング効果を評価した。ＨＥＫ２９３Ｔ／ＥＧＦＰ細胞を４８ウェルプレート（ウェル当たり５×10^4）に播種し、一晩培養した。Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ中のＥＧＦＰのコード領域を標的とするＣａｓ９　ＰｒｏＳＮＡ（５０ｎＭ）と４時間インキュベートした後、細胞を新鮮な培地に交換し、更に３日間培養した。次いで、細胞をトリプシン－ＥＤＴＡ溶液で消化し、生死細胞懸濁液中に再懸濁した。３０分後、細胞をＰＢＳで洗浄し、フローサイトメトリー（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＬＳＲ　ＩＩ、ＥＧＦＰのチャネル）のために固定した。全ての実験は、独立した３つ組で行った。結果を図３２に示す。

【図面】

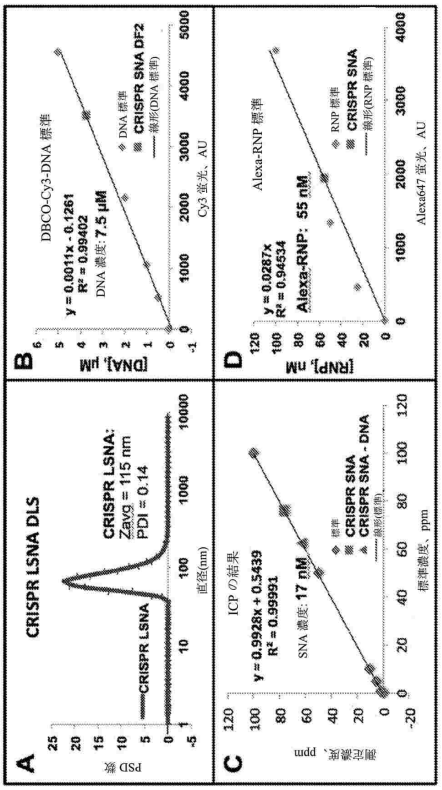
【図１】

図１



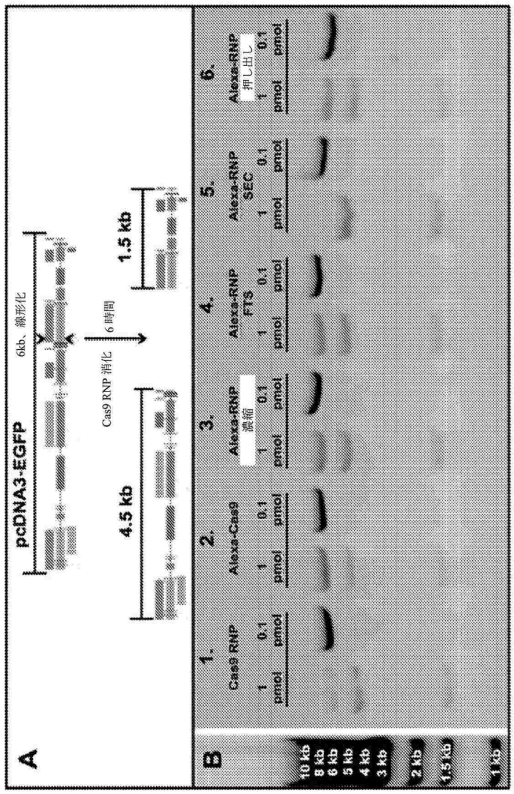
【図２】

図２



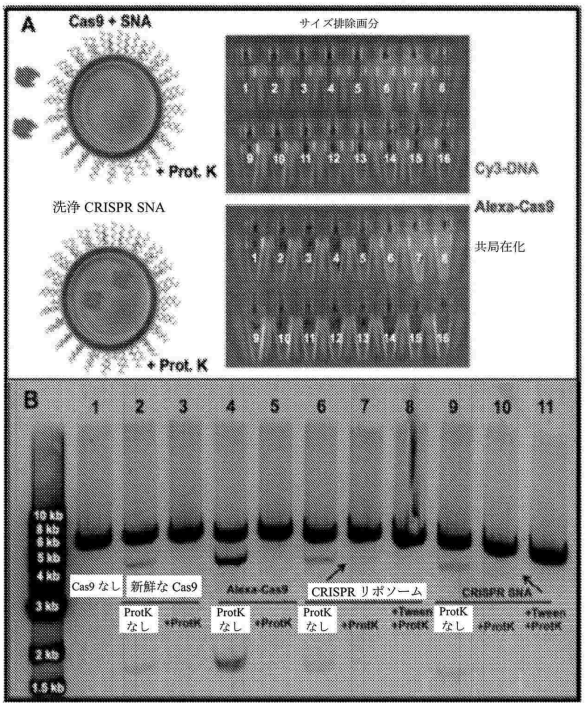
【図３】

図３



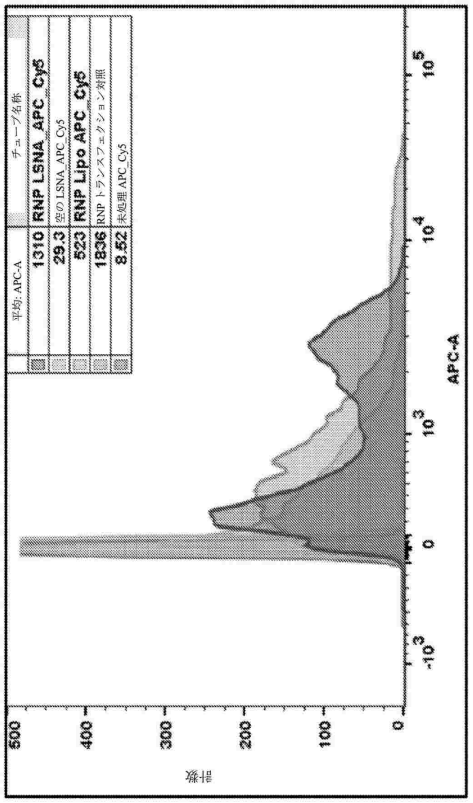
【図４】

図４



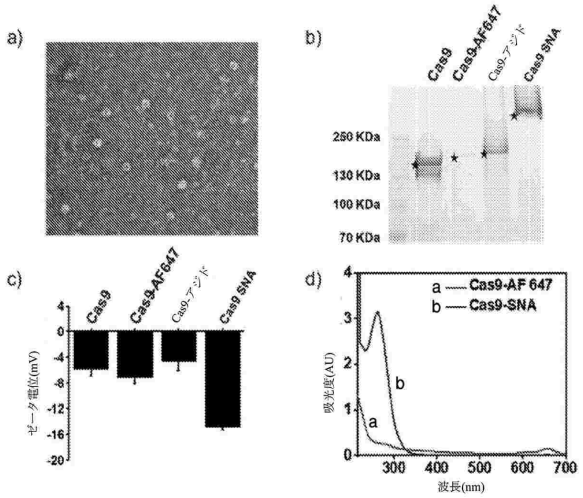
【図５】

図５



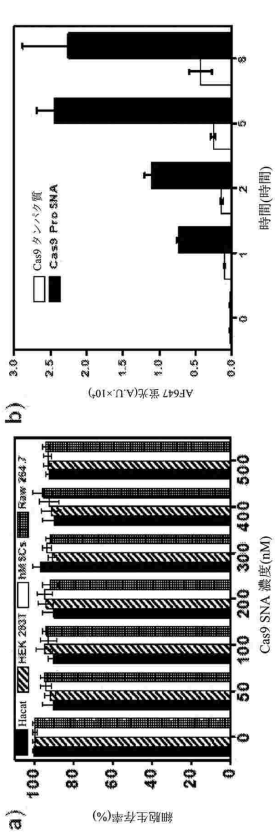
【図６】

図６



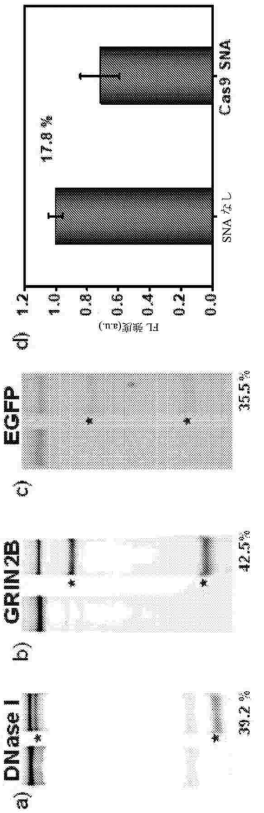
【図７】

図７



【図８】

図８



【図９】

図９

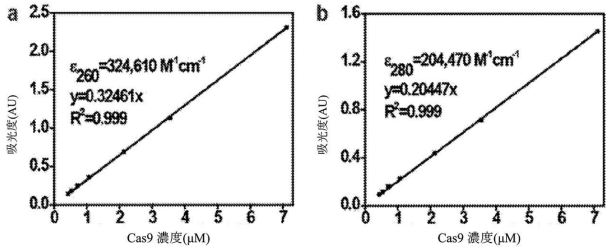


GALA: WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA

[配列番号 22]

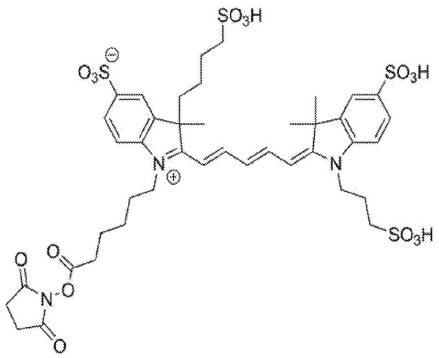
【図１０】

図１０



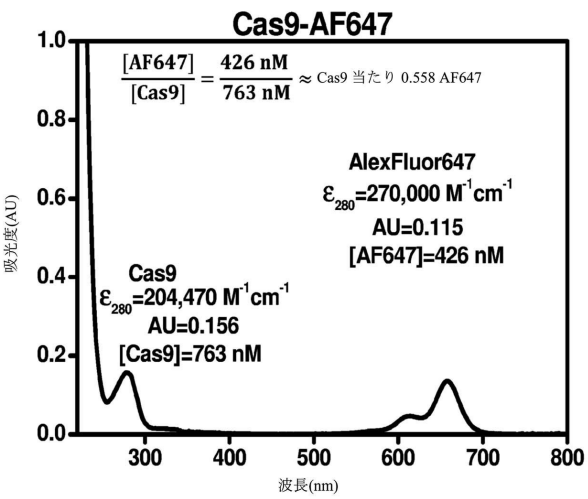
【図１１】

図１１



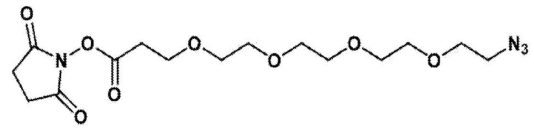
【図１２】

図１２



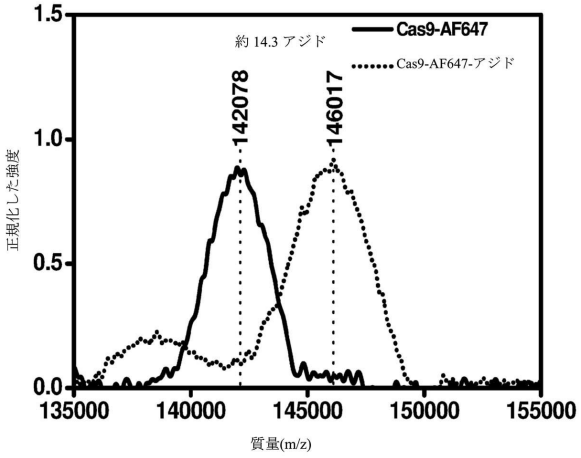
【図１３】

図１３



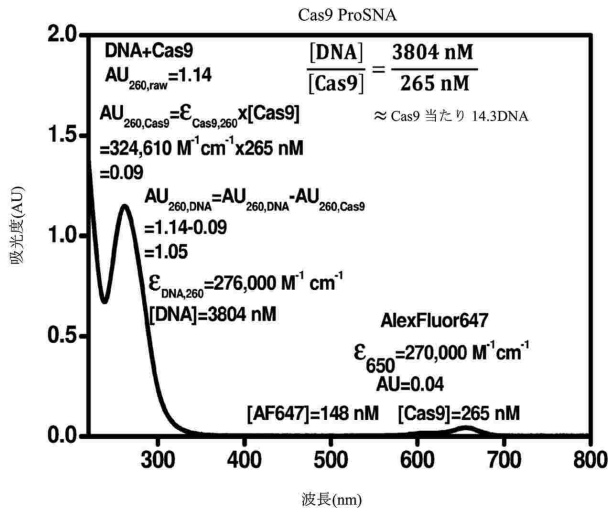
【図１４】

図１４



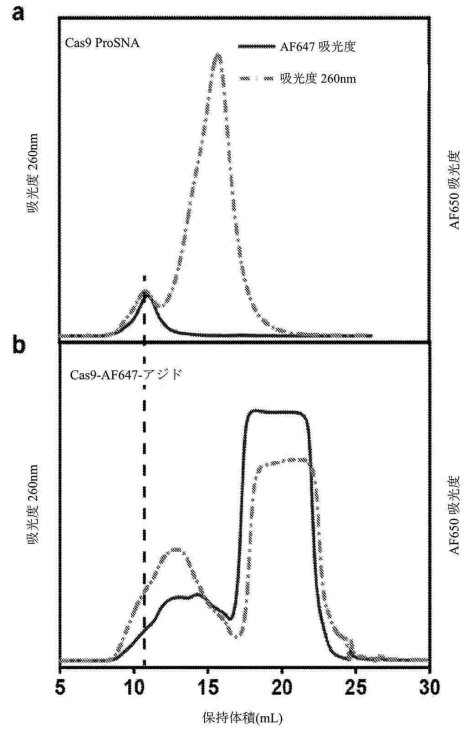
【図１５】

図１５



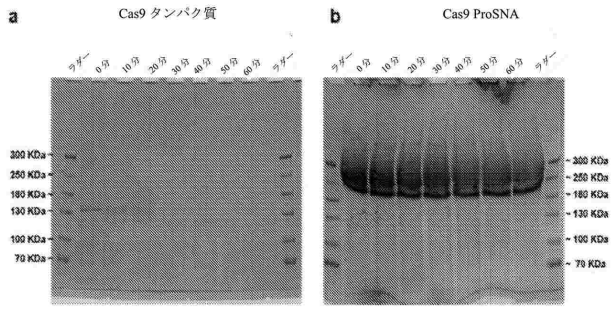
【図１６】

図１６



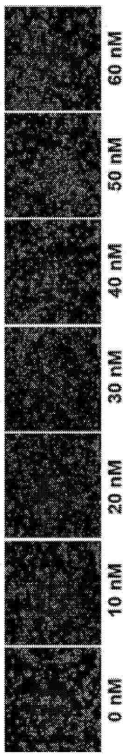
【図１７】

図１７



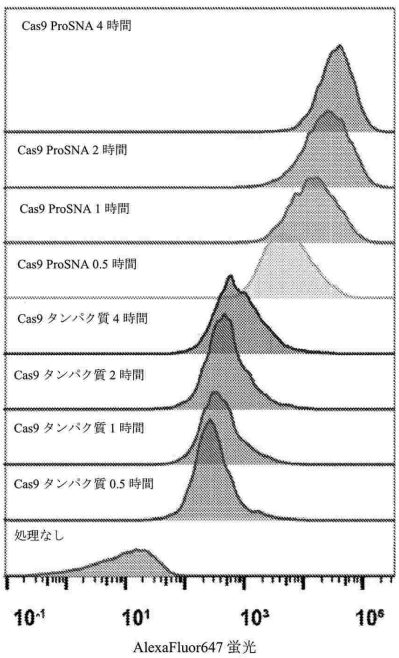
【図１８】

図１８



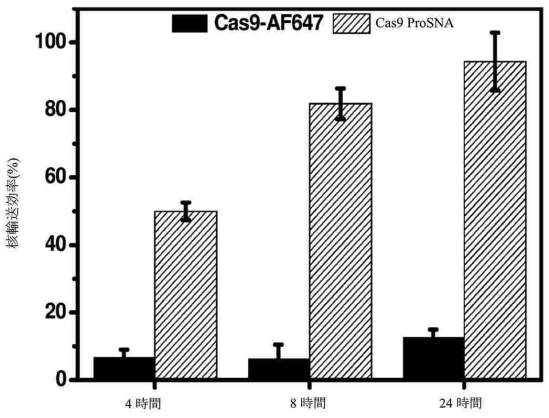
【図１９】

図１９



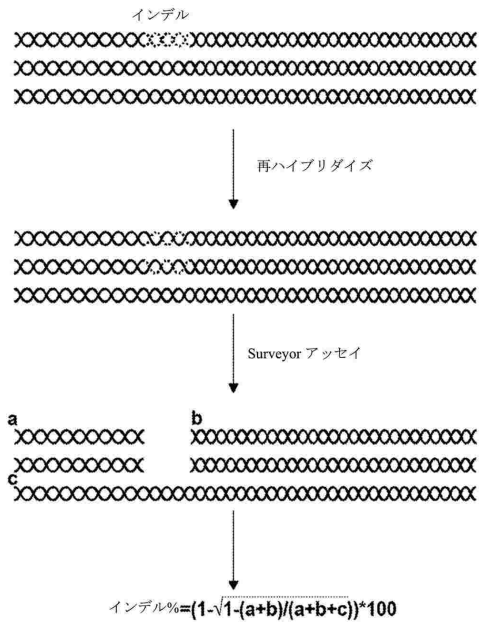
【図２０】

図２０



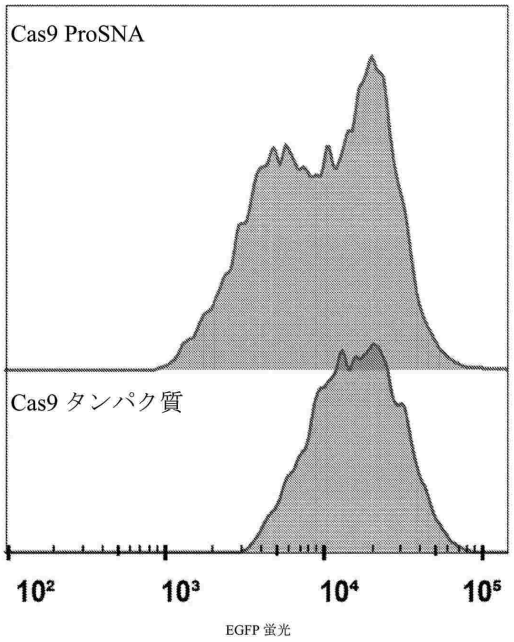
【図２１】

図２１



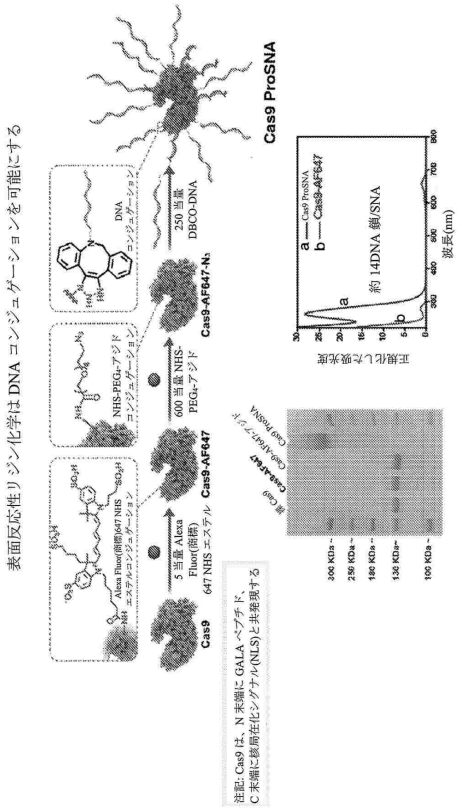
【図２２】

図２２



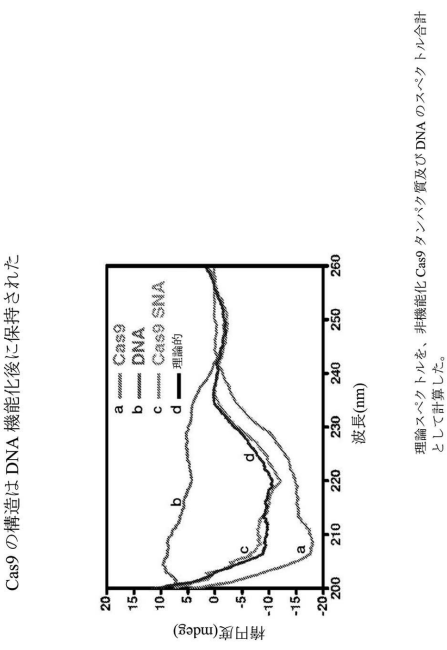
【図２３】

図２３



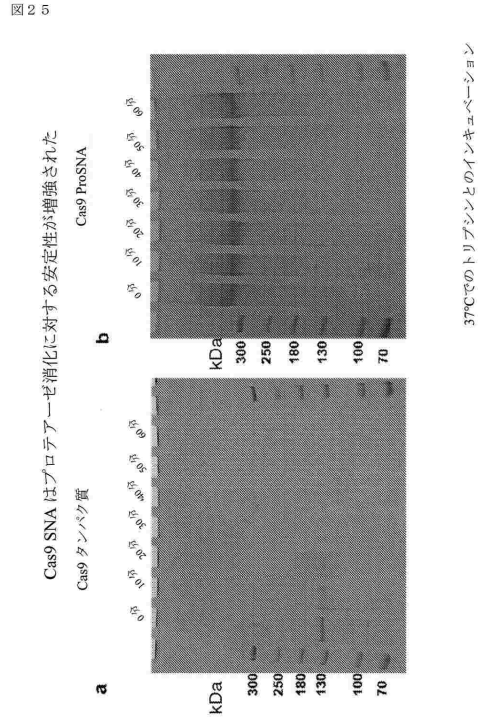
【図２４】

図２４



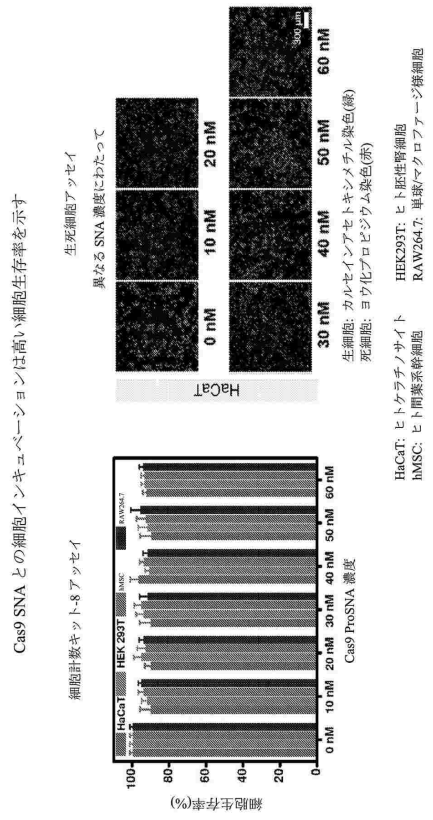
【図２５】

図２５



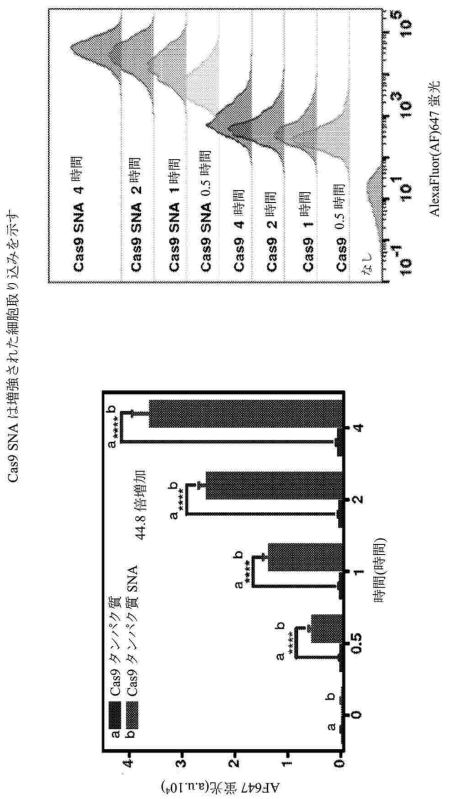
【図２６】

図２６



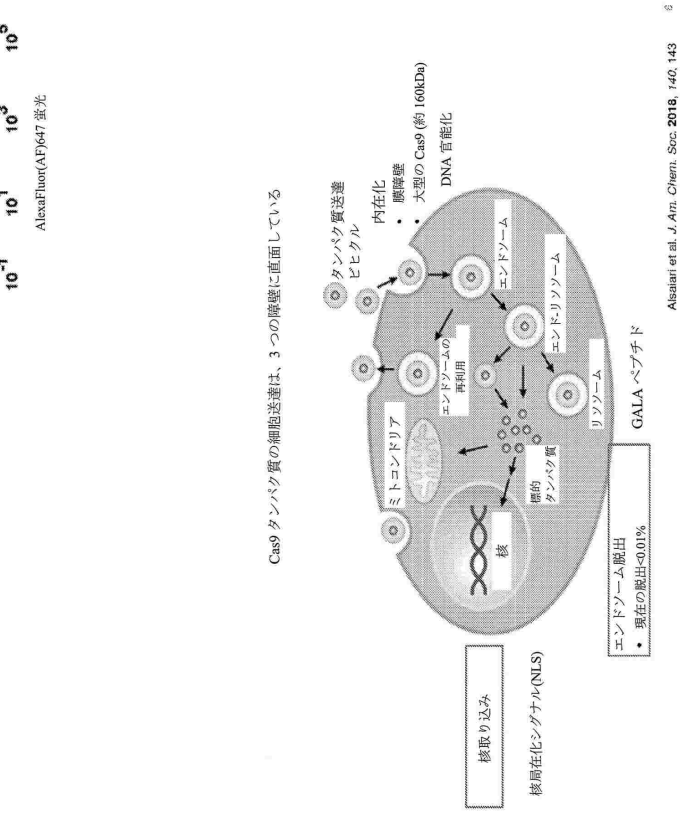
【図２７】

図２７



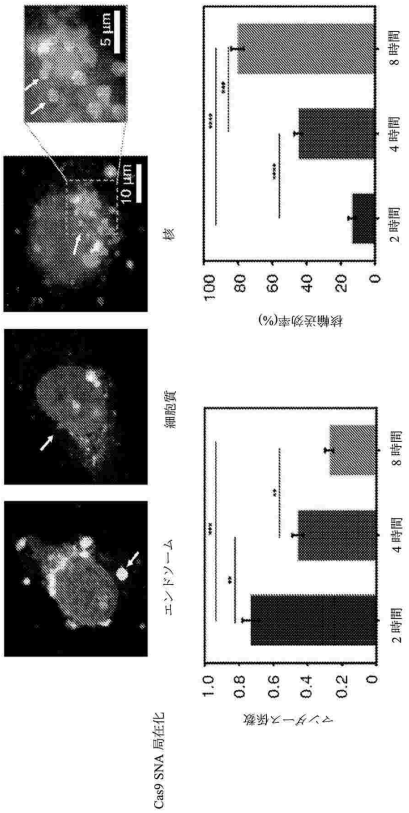
【図２８】

図２８



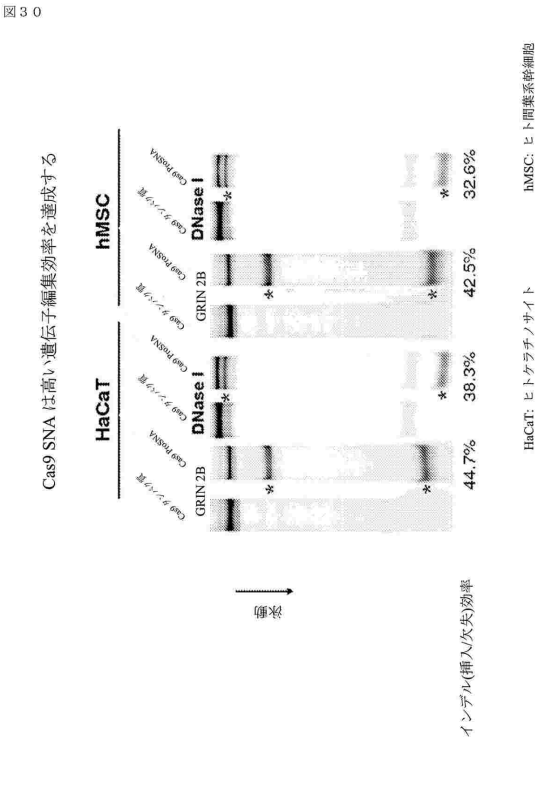
【図２９】

図２９



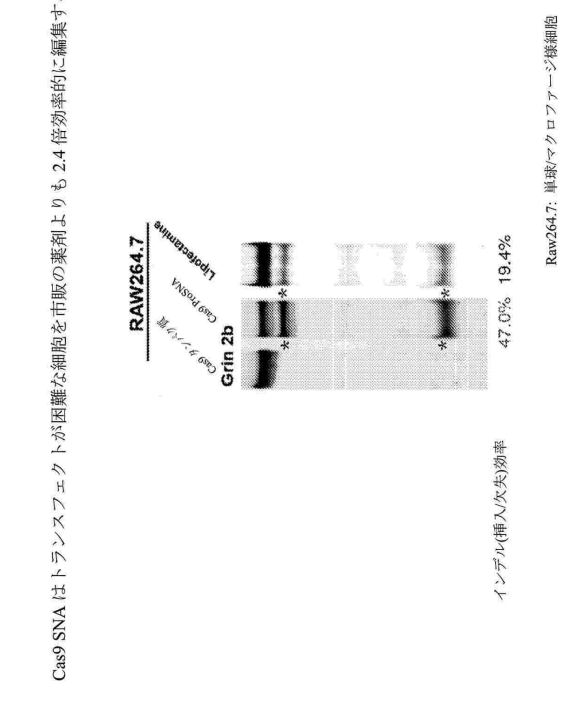
【図３０】

図３０



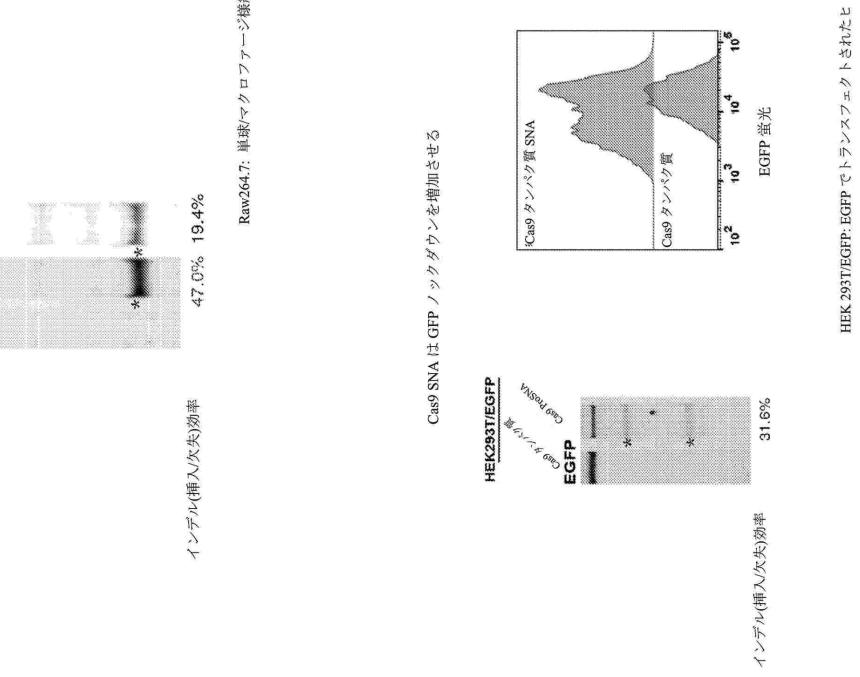
【図３１】

図３１



【図３２】

図３２



【配列表】
20245088320000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.:
PCT/US2022/017984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 9/127; A61K 9/14; B82Y 5/00; C12N 9/22; C12N 15/11 (2022.01)
CPC - A61K 9/14; B82Y 5/00; C12N 9/22; C12N 15/11; C12N 2310/20; C12N 2310/3513 (2022.05)

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.
Y	US 2020/0291394 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 17 September 2020 (17.09.2020) entire document	1-6
Y	US 2019/0136231 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC.) 09 May 2019 (09.05.2019) entire document	1-6
A	US 2020/0208177 A1 (LIGANDAL INC.) 02 July 2020 (02.07.2020) entire document	1-6
A	US 2017/0232109 A1 (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 17 August 2017 (17.08.2017) entire document	1-6

☐ 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
23 June 2022	JUL 14 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/017984

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NO: 22 was searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/017984

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.: 19, 20, 23, 25-65, 69-82
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See extra sheet(s).

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.:
1-6

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/US2022/017984

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

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 examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-18, 21, 22, and 24 are drawn to protein-core spherical nucleic acids (ProSNA) comprising: (a) a protein core that comprises a gene editing protein; and (b) a shell of oligonucleotides attached to the protein core.

Group II: claims 66-68 are drawn to a fused protein comprising the following, arranged from N-terminus to C-terminus as follows: (i) one or more GALA peptides; (ii) a gene editing protein, and (iii) a nuclear localization signal (NLS).

The first invention of Group I+ is restricted to a protein-core spherical nucleic acid (ProSNA) comprising a cleavable linker; wherein the at least one protein core-linker-oligonucleotide in the protein-core spherical nucleic acid comprises: protein core-NH-C(O)-O-C2alkylene-S-S-C2alkylene-oligonucleotide. It is believed that claims 1-6 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above embodiment.

Applicant is invited to elect additional core-protein-linker-oligonucleotide(s) for each additional embodiment to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. Each additional elected embodiment requires the selection of a single definition for each core-protein-linker-oligonucleotide(s). An exemplary election would be wherein the protein-core spherical nucleic acid comprises: protein core-NH-C(O)-O-C3alkylene-S-S-C3alkylene-oligonucleotide. Additional embodiment(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ and II 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:

The special technical features of Group I+, a protein core, are not present in Group II; the special technical features of Group II, a nuclear localization sequence, are not present in Group I+.

The Groups I+ formulae do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for spherical, nucleic-acid comprising particles, and accordingly these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of: a protein-core spherical nucleic acid (ProSNA) comprising: (a) a nanoparticle protein core that comprises a gene editing protein; and (b) a shell of oligonucleotides attached to the protein core, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art, as disclosed by US 2020/0208177 to Ligandal Inc. (hereinafter, "Ligandal").

Specifically, Ligandal discloses a protein-core spherical nucleic acid (ProSNA) (nanoparticles, Para. [0007]; comprising a core comprising a cationic polymer, Para. [0007]; with a targeting ligand conjugated to a charged polymer polypeptide domain, Para. [0007]; wherein the targeting ligand is an aptamer, Para. [0216]; Figure 3, wherein the particle is illustrated as spherical) comprising: (a) a nanoparticle protein core (a nanoparticle comprising a cationic polymer core, Para. [0007]) that comprises a gene editing protein (donor DNA bound to one or more sequence specific nucleases, Para. [0006]); and (b) a shell of oligonucleotides attached to the protein core (with a targeting ligand conjugated to a charged polymer polypeptide domain, Para. [0007]; wherein the targeting ligand is an aptamer, Para. [0216]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

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）
Ａ６１Ｐ	*9/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*47/69 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/69		
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127		
Ａ６１Ｋ	*9/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/14		
Ａ６１Ｋ	*9/51 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51		
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ａ６１Ｋ	*31/713(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713		
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28		
Ａ６１Ｋ	*47/22 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22		
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/117(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/117	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/115(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/115	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ０７Ｋ	*17/04 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	17/04		
Ｃ１２Ｎ	*11/04 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	11/04		
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/55 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55		

(32)優先日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人　100203828
弁理士　喜多村 久美
(72)発明者　チャド エー．マーキン
アメリカ合衆国，イリノイ ６００９１，ウィルメット，ウエスト ブラックホーク ロード ２７３７
(72)発明者　アイザック ラーキン
アメリカ合衆国，イリノイ ６０６１１，シカゴ，イースト デラウェア プレイス ２５３，アパートメント １２エー
(72)発明者　チー ホアン
アメリカ合衆国，イリノイ ６０２０１，エバンストン，シャーマン アベニュ １８００，スイート ５０４

Ｆターム（参考）　4B033　NA26 NB32 NB62 ND05 ND12
4B065　AB01 BA05 CA44 CA46
4C076　AA22 AA30 AA65 AA95 BB01 BB11 CC07 CC11 CC27 CC41 DD59 DD63 DD70 EE59
4C084　AA13 MA24 MA38 MA41 MA52 MA55 NA13 NA14 ZA361 ZA362 ZB081 ZB082 ZB261 ZB262 ZB321 ZB322
4C086　AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA24 MA38 MA41 MA52 MA55

Fターム（参考） NA13 NA14 ZA36 ZB08 ZB26 ZB32
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 BA54 BA60 CA11 DA89 EA20 EA50
FA74 FA84