

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和3年8月12日(2021.8.12)

【公表番号】特表2020-502124(P2020-502124A)

【公表日】令和2年1月23日(2020.1.23)

【年通号数】公開・登録公報2020-003

【出願番号】特願2019-531758(P2019-531758)

【国際特許分類】

A 6 1 K	9/51	(2006.01)
A 6 1 K	9/14	(2006.01)
A 6 1 K	47/34	(2017.01)
A 6 1 K	47/04	(2006.01)
A 6 1 K	47/02	(2006.01)
A 6 1 K	47/64	(2017.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)
A 6 1 K	45/06	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/14	(2006.01)
A 6 1 P	25/02	(2006.01)
A 6 1 P	25/16	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
A 6 1 P	7/04	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 K	38/18	(2006.01)

【F I】

A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	47/34	
A 6 1 K	47/04	
A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	45/06	
A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	38/18	

【手続補正書】

【提出日】令和3年6月28日(2021.6.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a)

(i) 1つ以上のアニオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のアニオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含み、D-異性体のポリマー対L-異性体のポリマーの比が2:1を超える、アニオニン性ポリマー組成物、

(i i) 1つ以上のカチオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のカチオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含む、カチオニン性ポリマー組成物、

(i i i) カチオニン性ポリペプチド組成物、および

(i v) 核酸および/またはタンパク質ペイロード

を含むコア、ならびに

(b) 該コアを封入している脱落可能層

を含む、ナノ粒子。

【請求項2】

(a)

(i) 1つ以上のアニオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のアニオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含み、D-異性体のポリマー対L-異性体のポリマーの比が2:1未満である、アニオニン性ポリマー組成物、

(i i) 1つ以上のカチオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のカチオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含む、カチオニン性ポリマー組成物、

(i i i) カチオニン性ポリペプチド組成物、および

(i v) 核酸および/またはタンパク質ペイロード

を含むコア、ならびに

(b) 該コアを封入している脱落可能層

を含む、ナノ粒子。

【請求項3】

(a)

(i) 1つ以上のアニオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のアニオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含む、アニオニン性ポリマー組成物、

(i i) 1つ以上のカチオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のカチオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含む、カチオニン性ポリマー組成物、

(i i i) カチオニン性ポリペプチド組成物、および

(i v) 核酸および/またはタンパク質ペイロード

を含むコア、ならびに

(b) 該コアを封入している脱落可能層

を含む、ナノ粒子であって、

該コアがアニオニンに対するカチオニンの電荷比2~5で調製される、
ナノ粒子。

【請求項4】

(a)

(i) 1つ以上のアニオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のアニオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含む、アニオニン性ポリマー組成物、

(i i) 1つ以上のカチオニン性アミノ酸のD-異性体のポリマーおよび/または1つ以上のカチオニン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含む、カチオニン性ポリマー組成物、

(i i i) カチオニン性ポリペプチド組成物、および

(i v) 核酸および / またはタンパク質ペイロード
を含むコア、ならびに

(b) 該コアを封入している脱落可能層
を含む、ナノ粒子であって、

該コアがアニオン性ポリマー組成物と該ペイロードの縮合で生成される、
ナノ粒子。

【請求項 5】

(a)

(i) 1つ以上のアニオン性アミノ酸の D - 異性体のポリマーおよび / または 1つ以
上のアニオン性アミノ酸の L - 異性体のポリマーを含む、アニオン性ポリマー組成物、

(i i) 1つ以上のカチオン性アミノ酸の D - 異性体のポリマーおよび / または 1つ以
上のカチオン性アミノ酸の L - 異性体のポリマーを含む、カチオン性ポリマー組成物、

(i i i) カチオン性ポリペプチド組成物、および

(i v) 核酸および / またはタンパク質ペイロード
を含むコア、

(b) 該コアを封入している脱落可能層、ならびに

(c) S E Q I D N O : 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12
、62、88、137、181、182、183、184、185、186、187、1
88、271、272、273、274、275、276、277、278、279、2
80、281、282、283、284、285、286、287、288、289、2
90、291、292、293、294、295、296、297、および 301 からな
る群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 85 % の同一性を有するアミノ酸配
列を含む、標的指向リガンド

を含む、ナノ粒子。

【請求項 6】

前記第 1 の標的指向リガンドが前記脱落可能層内に含まれる、請求項 5 記載のナノ粒子
。

【請求項 7】

脱落可能層を囲む表面コートをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のナノ
粒子。

【請求項 8】

第 2 の標的指向リガンドをさらに含む、請求項 6 に記載のナノ粒子。

【請求項 9】

前記第 2 の標的指向リガンドが、R V G 9 R、幹細胞因子 (S C F) またはその標的指
向フラグメント、C D 7 0 またはその標的指向フラグメント、および S H 2 ドメイン含有
タンパク質 1 A (S H 2 D 1 A) またはその標的指向フラグメントからなる群より選択さ
れる、請求項 8 に記載のナノ粒子。

【請求項 10】

前記表面コートが細胞透過性ペプチドを含む、請求項 7 に記載のナノ粒子。

【請求項 11】

前記細胞透過性ペプチドが、T A T、V P 2 2 ドメイン、D r o s o p h i l a A n
t e n n a p e d i a タンパク質導入ドメイン、欠損ヒトカルシトニンペプチド、S E Q
I D N O : 1 6 0、S E Q I D N O : 1 6 1、S E Q I D N O : 1 6 2、
S E Q I D N O : 1 6 3、S E Q I D N O : 1 6 4、S E Q I D N O : 1 6 5、S E Q I D N O : 1 6 8、および S E Q I D N O : 1 6 9 からなる群より選
択される、請求項 10 に記載のナノ粒子。

【請求項 12】

前記カチオン性ポリマー組成物が、任意でヒストンテールペプチド (H T P) または核
局在シグナル (N L S) を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 13】

前記N L Sが、SEQ ID NO: 151～157および201～264のうちのいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項12に記載のナノ粒子。

【請求項14】

少なくとも一つの標的指向リガンドが、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)フラグメント、Apoe-トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン(melanoferritin)、オボトランスフェリチン(ovotransferritin)、L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチン、PSGL-1、ESL-1、CD44、細胞死受容体-3(DR3)、LAMP1、LAMP2、Mac2-BP、幹細胞因子(SCF)、CD70、SH2ドメイン含有タンパク質1A(SHD1A)、エキセンディン-4、GLP1、5-1を標的指向する標的指向リガンド、RGD、トランスフェリンリガンド、FGFフラグメント、コハク酸、ビスホスホネート、CD90、CD45f、CD34、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン-1-ホスフェート、セラミド-1-ホスフェート、および上記のうちのいずれかの活性標的指向フラグメントからなる群から選択される、請求項1～13のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項15】

少なくとも1つの標的指向リガンドが、前記脱落可能層と相互作用するアンカードメインにコンジュゲートしている、請求項1～14のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項16】

前記アンカードメインが、SEQ ID NO: 15およびSEQ ID NO: 16から選択される、請求項15に記載のナノ粒子。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

【図1】核酸ペイロードの縮合に関する様々なパラメータ(例えば、カチオン:アニオン電荷比)を試験する蛍光アッセイの結果を示す。結果は、例えば、2の電荷比が、Cas9をコードするプラスミドとガイドRNA分子との縮合にうまく機能することを示した。

【図2】生成したナノ粒子コアの粒径とゼータ電位分布を示す。データは、Particle Matrix ZetaView NTA装置を用いて得た。ナノ粒子サイズ(ピーク)は128.8nmであり、ゼータ電位(ピーク)は+10.5mV(100%)であった。

【図3】安定化ナノ粒子コア(脱落可能層で封入されたコア)の粒子サイズとゼータ電位分布を示す。データは、Particle Matrix ZetaView NTA装置を用いて得た。安定化されたコアは、110.6nmのサイズであり、-42.1mV(95%)のゼータ電位を有した。

【図4】RVG9Rを含む外殻(外側コート)を有するナノ粒子であり、ナノ粒子は9-Argペプチド配列(カチオン性アンカードメインとして)に融合した狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)であり、115.8nmの特徴的な粒子サイズ、-3.1mV(100%)のゼータ電位を有することを示す。最適な外側コーティングは、-50mV(シリカコートされたコアへ)から0～-10mV(外殻を追加した後)の間へのゼータ電位の遷移をもたらす。

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

【図6A】(パネルA～D)核酸ペイロードとしてCRISPR/Cas9発現ベクターを含むナノ粒子と接触させた神経幹細胞の顕微鏡画像を示す。ナノ粒子のコアは、フルオ

ロフォア (F I T C) でタグ付けされたポリ (L-アルギニン) (カチオン性ポリマー) を含んでいた。エンドソームと核はそれぞれ L y s o t r a c k e r (赤) と H o e s c h t 3 3 4 2 (青) を使って染色した。ナノ粒子 (および対照としてのリポフェクタミン 3 0 0 0) を播種の 16 時間後に細胞に導入した。画像化の前に、細胞を H o e s c h t 3 3 4 2 および L y s o t r a c k e r R e d を共に培養した。パネル C ~ D は、ナノ粒子コアと核およびエンドソームとの共局在を定量化する棒グラフを提示する。

【図 6 B】図 6 A の説明を参照のこと。

【図 6 C】図 6 A の説明を参照のこと。

【図 6 D】図 6 A の説明を参照のこと。

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

【図 8】本発明のナノ粒子の一実施形態例の概略図を示す。

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

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

【図 11 - 1】標的指向リガンドを評価する際に考慮すべき別々のドメインを強調する、ファミリー B の G P C R の残基 170 ~ 432 (S E Q I D N O : 313) の概略図を提供する。例えば、アロステリック / 親和性 N 末端ドメインおよびオルソステリックエンドソームソーティング / シグナル伝達ドメインへの結合。(図は、S i u , F a i Y i u , e t a l . , N a t u r e 4 9 9 . 7 4 5 9 (2 0 1 3) : 4 4 4 - 4 4 9 を出典とする)。

【図 11 - 2】図 11 - 1 の説明を参照のこと。

【図 12 - 1】核酸の放出を促進および核酸の分解を制限する、親和性が維持され、標的指向リガンドが長いエンドソーム再利用経路に関与するように、標的指向リガンドの挿入および / または置換のための (例えばシスティン残基による) 内部アミノ酸位置の同定の一例を提供する。この場合、標的指向リガンドはエキセンディン - 4 であり、アミノ酸位置 10、11、および 12 は、可能な挿入および / または置換のための部位として同定された (例えば、システィン残基、例えば S 11 C 突然変異を有する)。図は、三次元空間で回転された、グルカゴン - G C G R (4 E R S) および G L P 1 - G L P 1 R - E C D 複合体 (P D B : 3 I O L) の既知の結晶構造に対するシミュレートされたエキセンディン - 4 S 11 C (S E Q I D N O : 2) のアライメント、および P D B レンダリングを示す。

【図 12 - 2】図 12 - 1 の説明を参照のこと。

【図 13】三つ組みの F G F 2 - F G F R 1 - H E P A R I N 複合体 (P D B 上の 1 f q 9) の一部としての t b F G F フラグメント (S E Q I D N O : 314) を示す。C K N G G F F L R I H P D G R V D G V R E K S (強調された) (S E Q I D N O : 43) は、F G F R 1 に対する親和性にとって重要であると決定された。

【図 14】F G F (S E Q I D N O : 315) 由来の H F K D P K (S E Q I D

NO:5)が、リガンド-受容体オルソステリック活性および親和性に使用できるペプチドであることを決定するために使用されるアライメントおよびPDB 3Dレンダリングを提供する。

【図15】F G F フラグメント (SEQ ID NO: 316) 由来の L E S N N Y N T (SEQ ID NO: 6)が、リガンド-受容体オルソステリック活性および親和性に使用できるペプチドであることを決定するために使用されるアライメントおよびPDB 3Dレンダリングを提供する。

【図16】本発明のナノ粒子の一部として使用することができる核局在シグナル (NLS) の非限定的な例を提供する(例えば、NLS含有ペプチド；NLS含有ペプチドの一部として/NLS含有ペプチドにコンジュゲートした、アニオン性ポリマー、カチオン性ポリマー、および/またはカチオン性ポリペプチドなど)。図は、Kosugi et al., J. Biol. Chem. 2009 Jan 2; 284(1): 478-85を出典とする。[クラス1、上から下へ(SEQ ID NO: 201~221)；クラス2、上から下へ(SEQ ID NO: 222~224)；クラス4、上から下へ(SEQ ID NO: 225~230)；クラス3、上から下へ(SEQ ID NO: 231~245)；クラス5、上から下へ(SEQ ID NO: 246~264)]。

【図17A】(パネルA～B)マウス(パネルA)およびヒト(パネルB)の造血細胞系列の概略図、かつその系列内の様々な細胞について同定されているマーカーを示す。

【図17B】図17Aの説明を参照のこと。

【図18A】(パネルA～B)細胞の分化かつ/または増殖に影響を与えるために使用することができるmiRNA(パネルA)およびタンパク質(パネルB)因子の概略図を示す。

【図18B】図18Aの説明を参照のこと。

【図19】ペイロード：ペプチド核酸(PNA)結合部位を有するVWF-EGFP-pDNAを含むナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図20A】ペイロード：HBB-gRNAと複合したNLS-CAS9-NLS-RNPを含むナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図20B】図20Aの説明を参照のこと。

【図20C】図20Aの説明を参照のこと。

【図20D】図20Aの説明を参照のこと。

【図21】ペイロード：HBB-gRNAを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図22】ペイロード：HBB-gRNAを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図23】ペイロード：HBB-gRNAと複合したNLS-CAS9-NLS-RNPを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図24】ペイロード：ペプチド核酸(PNA)結合部位を有するVWF-EGFP-pDNAを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図25】ペイロード：ペプチド核酸(PNA)結合部位を有するVWF-EGFP-pDNAを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図26】ペイロード：HBB-gRNAを有するNLS-CAS9-NLSのRNPを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図27】ペイロード：ペプチド核酸(PNA)結合部位を有するVWF-EGFP-pDNAを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図28】ペイロード：Cy5-EGFP-mRNAを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図29】ペイロード：BLOCK-it Alexa Fluor 555 siRNA有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図30】ペイロード：HBB-gRNAと複合したNLS-Cas9-EGFP-RNPを有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図31A】ペイロードとしてAlexa 555 Block-IT siRNAを有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する。

【図31B】図31Aの説明を参照のこと。

【図31C】図31Aの説明を参照のこと。

【図32-1】ペイロードとしてNLS-Cas9-EGFPとHBBガイドRNAによって形成されたリボ核タンパク質(RNP)を有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する。

【図32-2】図32-1の説明を参照のこと。

【図32-3】図32-1の説明を参照のこと。

【図33-1】ペイロードとしてCy5-EGFP-mRNAを有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する。

【図33-2】図33-1の説明を参照のこと。

【図34-1】ペイロードを有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する: Cy5標識されたペプチド核酸(PNA)結合部位を有するVWF-EGFP-pDNA。

【図34-2】図34-1の説明を参照のこと。

【図34-3】図34-1の説明を参照のこと。

【図35】カチオン性ポリペプチドCD45-mSingle-(4GS)2_9R_Cを添加し、続いてPLE100を添加し、さらにRNPにカチオン性ポリペプチドを添加することによって蛍光強度が低下することを示すSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図36】カチオン性ポリペプチドCD45-mSingle-(4GS)2_9R_Cを添加し、続いてPLE100を添加し、さらにsiRNAおよびSYBR Goldにカチオン性ポリペプチドを添加することによって蛍光強度が変動することを示すSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図37】カチオン性ポリペプチドヒストンペプチドH2Aを添加し、続いてCD45-mSingle-(4GS)2_9R_Cを添加し、さらにHBB_gRNAおよびSYBR Goldを有するNLS-Cas9-EGFPのRNPにPLE100を添加することによって蛍光強度が変動することを示すSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図38】カチオン性ポリペプチドヒストンペプチドH4をCD45-mSingle-(4GS)2_9R_Cと一緒に添加し、さらにHBB_gRNAおよびSYBR Goldを有するNLS-Cas9-EGFPのRNPにPLE100を添加することによって蛍光強度が変動することを示すSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図39】カチオン性ポリペプチドCD45-mSingle-(4GS)2_9R_Cを添加し、さらにmRNAにPLE100を添加することによって蛍光強度が変動することを示すSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図40】ヒストンH4を添加し、さらにmRNAにCD45-mSingle-(4GS)2_9R_cとPLE100とを添加することによって蛍光強度が変動することを示すSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図41】ヒストンH2Aを添加し、さらにmRNAにCD45-mSingle-(4GS)2_9R_cとPLE100とを添加することによって蛍光強度が変動することを示すSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図42】カチオン性ポリペプチドCD45-mSingle-(4GS)2_9R_Cを添加し、続いてPLE100を添加することによって蛍光強度が変動することを示すVWF_EGFP_pDNAとのインターカレーションからのSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図43】ヒストンH4を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドCD45-mSingle-(4GS)2_9R_Cを添加し、続いてPLE100を添加することによって蛍光強度が変動することを示すVWF_EGFP_pDNAとのインターカレーションからのSYBR Gold排除アッセイのデータを提供する。

【図44】ヒストンH4を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドCD45-mSingle-

e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C を添加し、続いて P L E 1 0 0 を添加することによって蛍光強度が変動することを示す V W F _ E G F P _ p D N A とのインターカレーションからの S Y B R _ G o l d 排除アッセイのデータを提供する。

【図 4 5 A】(パネル A ~ C) ポリブレックスサイズ分布、シリカコーティングサイズおよびゼータ電位分布、ならびにリガンドコーティング / 官能化粒子サイズおよびゼータ電位分布に関するデータを提供する。

【図 4 5 B - 1】図 4 5 A の説明を参照のこと。

【図 4 5 B - 2】図 4 5 A の説明を参照のこと。

【図 4 5 C - 1】図 4 5 A の説明を参照のこと。

【図 4 5 C - 2】図 4 5 A の説明を参照のこと。

【図 4 6】分枝ヒストンペプチドにコンジュゲートするパイロット粒子に関するデータを提供する。

【図 4 7 - 1】プロジェクト H S C . 0 0 1 . 0 0 1 に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 4 7 - 2】図 4 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 8】プロジェクト H S C . 0 0 1 . 0 0 2 に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 4 9 - 1】プロジェクト H S C . 0 0 2 . 0 1 (標的指向リガンド - E S E L L g _ m E S E L _ (4 G S) 2 _ 9 R _ N) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 4 9 - 2】図 4 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 0 - 1】プロジェクト H S C . 0 0 2 . 0 2 (標的指向リガンド - E S E L L g _ m E S E L _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 0 - 2】図 5 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 1 - 1】プロジェクト H S C . 0 0 2 . 0 3 (標的指向リガンド - C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 1 - 2】図 5 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 2 - 1】プロジェクト H S C . 0 0 2 . 0 4 (標的指向リガンド - C y 5 m R N A - S i O 2 - P E G) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 2 - 2】図 5 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 3 - 1】プロジェクト B L O O D . 0 0 2 . 8 8 (標的指向リガンド - C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 3 - 2】図 5 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 4 - 1】プロジェクト B L O O D . 0 0 2 . 8 9 (標的指向リガンド - C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 4 - 2】図 5 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 5 - 1】プロジェクト B L O O D . 0 0 2 . 9 0 に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 5 - 2】図 5 5 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 6 - 1】プロジェクト B L O O D . 0 0 2 . 9 1 (P L R 5 0) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 6 - 2】図 5 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 7 - 1】プロジェクト B L O O D . 0 0 2 . 9 2 (標的指向リガンド - C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C) に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 7 - 2】図 5 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 8 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 1 に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 8 - 2】図 5 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 9 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 3 に関するデータを提供する(表 5 参照)。

【図 5 9 - 2】図 5 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 0 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 1 3 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 0 - 2】図 6 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 1 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 1 4 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 1 - 2】図 6 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 2 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 1 6 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 2 - 2】図 6 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 3 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 1 8 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 3 - 2】図 6 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 4 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 2 8 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 4 - 2】図 6 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 5 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 2 9 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 5 - 2】図 6 5 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 6 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 3 1 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 6 - 2】図 6 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 7 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 3 3 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 7 - 2】図 6 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 6 8】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 4 3 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 9 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 4 4 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 6 9 - 2】図 6 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 0 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 4 6 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 7 0 - 2】図 7 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 1 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 4 8 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 7 1 - 2】図 7 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 2 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 5 8 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 7 2 - 2】図 7 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 3 - 1】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 . 5 9 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 7 3 - 2】図 7 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 4 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 8 2 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 7 4 - 2】図 7 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 5 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 8 3 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 7 5 - 2】図 7 5 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 6 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 8 4 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 7 6 - 2】図 7 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 77 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 8 5 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 77 - 2】図 77 - 1 の説明を参照のこと。

【図 78 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 8 6 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 78 - 2】図 78 - 1 の説明を参照のこと。

【図 79 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 7 6 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 79 - 2】図 79 - 1 の説明を参照のこと。

【図 80】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 7 7 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 81 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 7 8 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 81 - 2】図 81 - 1 の説明を参照のこと。

【図 82】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 7 9 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 83】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 8 0 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 84 - 1】C y n o B M . 0 0 2 試料についての非トランスフェクト対照に関するデータを提供する。

【図 84 - 2】図 84 - 1 の説明を参照のこと。

【図 84 - 3】図 84 - 1 の説明を参照のこと。

【図 84 - 4】図 84 - 1 の説明を参照のこと。

【図 85 - 1】N L S - C a s 9 - E G F P B C L 1 1 a g R N A R N P のリポフェクタミン C R I S P R M A X 送達に関するデータを提供する。

【図 85 - 2】図 85 - 1 の説明を参照のこと。

【図 85 - 3】図 85 - 1 の説明を参照のこと。

【図 85 - 4】図 85 - 1 の説明を参照のこと。

【図 86 - 1】プロジェクト C y n o B M . 0 0 2 R N P のみ対照に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 86 - 2】図 86 - 1 の説明を参照のこと。

【図 86 - 3】図 86 - 1 の説明を参照のこと。

【図 87 - 1】プロジェクト C y n o B M . 0 0 2 . 8 2 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 87 - 2】図 87 - 1 の説明を参照のこと。

【図 87 - 3】図 87 - 1 の説明を参照のこと。

【図 87 - 4】図 87 - 1 の説明を参照のこと。

【図 87 - 5】図 87 - 1 の説明を参照のこと。

【図 88 - 1】プロジェクト C y n o B M . 0 0 2 . 8 3 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 88 - 2】図 88 - 1 の説明を参照のこと。

【図 88 - 3】図 88 - 1 の説明を参照のこと。

【図 88 - 4】図 88 - 1 の説明を参照のこと。

【図 88 - 5】図 88 - 1 の説明を参照のこと。

【図 89 - 1】プロジェクト C Y N O B M . 0 0 2 . 8 4 に関するデータを提供する（表 5 参照）。

【図 89 - 2】図 89 - 1 の説明を参照のこと。

【図 89 - 3】図 89 - 1 の説明を参照のこと。

【図 89 - 4】図 89 - 1 の説明を参照のこと。

【図 89 - 5】図 89 - 1 の説明を参照のこと。

【図90-1】プロジェクトCynoBM.002.85に関するデータを提供する（表5参照）。

【図90-2】図90-1の説明を参照のこと。

【図90-3】図90-1の説明を参照のこと。

【図90-4】図90-1の説明を参照のこと。

【図90-5】図90-1の説明を参照のこと。

【図91-1】プロジェクトCynoBM.002.86に関するデータを提供する（表5参照）。

【図91-2】図91-1の説明を参照のこと。

【図91-3】図91-1の説明を参照のこと。

【図91-4】図91-1の説明を参照のこと。

【図91-5】図91-1の説明を参照のこと。

【図92-1】プロジェクトCynoBM.002.75に関するデータを提供する（表5参照）。

【図92-2】図92-1の説明を参照のこと。

【図92-3】図92-1の説明を参照のこと。

【図92-4】図92-1の説明を参照のこと。

【図93-1】プロジェクトCynoBM.002.76に関するデータを提供する（表5参照）。

【図93-2】図93-1の説明を参照のこと。

【図93-3】図93-1の説明を参照のこと。

【図93-4】図93-1の説明を参照のこと。

【図94-1】プロジェクトCynoBM.002.77に関するデータを提供する（表5参照）。

【図94-2】図94-1の説明を参照のこと。

【図94-3】図94-1の説明を参照のこと。

【図94-4】図94-1の説明を参照のこと。

【図95-1】プロジェクトCynoBM.002.78に関するデータを提供する（表5参照）。

【図95-2】図95-1の説明を参照のこと。

【図95-3】図95-1の説明を参照のこと。

【図95-4】図95-1の説明を参照のこと。

【図96-1】プロジェクトCynoBM.002.79に関するデータを提供する（表5参照）。

【図96-2】図96-1の説明を参照のこと。

【図96-3】図96-1の説明を参照のこと。

【図96-4】図96-1の説明を参照のこと。

【図97-1】プロジェクトCynoBM.002.80に関するデータを提供する（表5参照）。

【図97-2】図97-1の説明を参照のこと。

【図97-3】図97-1の説明を参照のこと。

【図97-4】図97-1の説明を参照のこと。

【図98-1】プロジェクトCynoBM.002.81に関するデータを提供する（表5参照）。

【図98-2】図98-1の説明を参照のこと。

【図98-3】図98-1の説明を参照のこと。

【図98-4】図98-1の説明を参照のこと。

【図99】CynoBM.002 RNPのみ対照の定性的画像を提供する。

【図100】プロジェクトHSC.004のハイコンテントスクリーニングに関するデータを提供する（表5参照）。

【図101】プロジェクトT C E L L . 0 0 1 のハイコンテンツクリーニングに関するデータを提供する（表5参照）。

【図102】プロジェクトT C E L L . 0 0 1 のリポフェクタミンC R I S P R M A X 対照に関するデータを提供する（表5参照）。

【図103】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 1 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図104】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 2 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図105-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 3 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図105-2】図105-1の説明を参照のこと。

【図106-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 4 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図106-2】図106-1の説明を参照のこと。

【図107-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 5 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図107-2】図107-1の説明を参照のこと。

【図108-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 6 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図108-2】図108-1の説明を参照のこと。

【図109-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 7 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図109-2】図109-1の説明を参照のこと。

【図110-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 8 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図110-2】図110-1の説明を参照のこと。

【図111-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 9 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図111-2】図111-1の説明を参照のこと。

【図112-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 1 0 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図112-2】図112-1の説明を参照のこと。

【図113-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 1 1 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図113-2】図113-1の説明を参照のこと。

【図114-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 1 2 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図114-2】図114-1の説明を参照のこと。

【図115-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 1 3 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図115-2】図115-1の説明を参照のこと。

【図116-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 1 4 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図116-2】図116-1の説明を参照のこと。

【図117-1】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 . 1 5 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図117-2】図117-1の説明を参照のこと。

【図118】プロジェクトT C e l l . 0 0 1 についてのネガティブ対照に関するデータを提供する（表5参照）。

【図119-1】プロジェクトB l o o d . 0 0 2 に関するデータを提供する（表5参照）。

)。

【図119-2】図119-1の説明を参照のこと。

【図119-3】図119-1の説明を参照のこと。

【図120】プロジェクトT C e 1 1 . 0 0 1 . 2 7 に関するデータを提供する（表5参照）。

【図121-1】タンパク質表面に安定な荷電層を形成するためにアニオン性またはカチオン性ペプチド／材料を添加すべきかどうかを決定することを可能にするC R I S P R R N P（可能なペイロード）の電荷密度プロットを示す。

【図121-2】図121-1の説明を参照のこと。

【図122-1】タンパク質表面に安定な荷電層を形成するためにアニオン性またはカチオン性ペプチド／材料を添加すべきかどうかを決定することを可能にするスリーピングビューティートランスポゾン（可能なペイロード）の電荷密度プロットを示す。

【図122-2】図122-1の説明を参照のこと。

【図123-1】(2b)その後の多層化学の付加、複数の核酸もしくは荷電治療薬の同時送達、または架橋による層安定化の有無を問わず、(2a)アンカー-リンカー-リガンドまたは独立型カチオン性アンカーのようなカチオン性アンカーの付加(2)の前にC R I S P R R N P表面上のカチオン性部位に固定する例示的なアニオン性ペプチド（長さ9～10アミノ酸、直径約10nmまでのC R I S P R R N P）(1)を示す。

【図123-2】図123-1の説明を参照のこと。

【図124】C a s 9 R N Pまたは任意の均質または双性イオン的に帯電した表面を含み得るコアテンプレートに基づく添加順序および静電マトリックス組成物の例を示す。

【図125-1】I L 2 Rに結合したI L 2のモデル化構造を提供する。

【図125-2】図125-1の説明を参照のこと。

【図126-1】一本鎖C D 3抗体フラグメントのモデル化構造を提供する。

【図126-2】図126-1の説明を参照のこと。

【図127】N-アセチルノイラミン酸（N e u 5 A c）と複合体したシアロアドヘシンのN-末端のモデル化構造を提供する。

【図128】幹細胞因子（S C F）のモデル化構造を提供する。

【図129】c K i t受容体フラグメントの合理的設計中に生成された画像の例を提供する。

【図130】c K i t受容体フラグメントの合理的設計中に生成された画像の例を提供する。

【図131】c K i t受容体フラグメントの合理的設計中に生成された画像の例を提供する。

【図132】合理的に設計されたc K i t受容体フラグメントの分析からの円二色性データを提供する。

【図133】合理的に設計されたc K i t受容体フラグメントの安定化された立体配座のモデリングを示す。

【図134-1】H T Pがカチオン性ポリマー骨格の側鎖にコンジュゲートしている分枝ヒストン構造の一例を示す。右側のポリマーは前駆体骨格分子を表し、左側の分子は分枝構造のセグメントの一例である。

【図134-2】図134-1の説明を参照のこと。

【図134-3】図134-1の説明を参照のこと。

【図134-4】図134-1の説明を参照のこと。

【図134-5】図134-1の説明を参照のこと。

【図134-6】図134-1の説明を参照のこと。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 1】

ヒストンおよびH T Pの例

例として、以下の配列が含まれるが、これらに限定されない。

H2A

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

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

MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLRKGNYAERVGAGAPVYLA AVL

EYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLLGKVTIAQGGVLPNIQAVLL

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

H2AX

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

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

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

H2B

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

[cr: クロトニル化]

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

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

MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKE~~SYSIYVYKVLKQVHPDTGISSK~~
AMGIMNSFVN~~D~~IFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEG~~T~~KA
VTKYTSSK (SEQ ID NO: 71) [1-126]

H3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ART - K(Me3) - QTAR - K(Ac) - pS - TGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 90) [1-21

H3K4(Me3), K9(Ac), pS10]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE (SEQ ID

NO: 117) [1-50]

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

[H3K79(Me1)]

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

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

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

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

RLVREIAQDFK - (Me1) - TDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 123) [69-89 H3K79 (Me1),

アミド]

RLVREIAQDFK - (Me2) - TDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 124) [69-89 H3K79 (Me2),

アミド]

RLVREIAQDFK - (Me3) - TDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 125) [69-89 H3K79 (Me3),

アミド]

KRVTIMPKDIQLARRIRGERA (SEQ ID NO: 126) [116-136]

MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARSKAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQK

STELLIRKLPFQQLMREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACESYLVGLFEDTNLCVIHAKR

VTIMPKDIQLARRIRGERA(SEQ ID NO: 127) [1-136]

H4

SGRGKGG (SEQ ID NO: 128) [1-7]

RGKGGKGLGKGA (SEQ ID NO: 129) [4-12]

SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV (SEQ ID NO: 130) [1-21]

KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC - NH2 (SEQ ID NO: 131) [8-25 WC, アミド]

SGRG - K(Ac) - GG - K(Ac) - GLG - K(Ac) - GGA - K(Ac) – RHRKVLRDNGSGSK (SEQ ID NO: 132) [1-25 H4K5,8,12,16(Ac)]

SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK - NH2 (SEQ ID NO: 133) [1-20 H4 PRMT7 (タンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ 7) 基質, M1]

SGRG - K(Ac) – GGKGLGKGGAKRHRK (SEQ ID NO: 134) [1-20 H4K5 (Ac)]

SGRGKGG – K(Ac) - GLGKGGAKRHRK (SEQ ID NO: 135) [1-20 H4K8 (Ac)]

SGRGKGGKGLG - K(Ac) - GGAKRHRK (SEQ ID NO: 136) [1-20 H4K12 (Ac)]

SGRGKGGKGLGKGG - K(Ac) - RHRK (SEQ ID NO: 137) [1-20 H4K16 (Ac)]

KGLGKGGAKRHRKVLRDNWC - NH2 (SEQ ID NO: 138) [1-25 WC, アミド]

MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGV
LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVYALKRQGRTLYGFGGG (SEQ ID NO: 139)

[1-103]

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 1】

本明細書中の1つ以上の天然のまたは修飾されたポリペプチド配列は、末端もしくは間欠性のアルギニン、リジン、またはヒスチジン配列で修飾され得る。一実施形態では、各ポリペプチドは、ナノ粒子コア内に等しいアミンモル濃度で含まれる。この実施形態では、各ポリペプチドのC末端は5R(5アルギニン)で修飾することができる。いくつかの実施形態では、各ポリペプチドのC末端は9R(9アルギニン)で修飾することができる。いくつかの実施形態では、各ポリペプチドのN末端は5R(5アルギニン)で修飾することができる。いくつかの実施形態では、各ポリペプチドのN末端は9R(9アルギニン)で修飾することができる。いくつかの場合では、H2A、H2B、H3および/または

H 4 ヒストンフラグメント（例えば、H T P）は、F K F L カテプシン B タンパク質分解性切断ドメイン（SEQ ID NO: 306）またはR G F F P カテプシン D タンパク質分解性切断ドメイン（SEQ ID NO: 307）とそれぞれ直列に架橋されている。いくつかの場合では、H 2 A、H 2 B、H 3 および／またはH 4 ヒストンフラグメント（例えば、H T P）は、5 R（5 アルギニン）、9 R（9 アルギニン）、5 K（5 リジン）、9 K（9 リジン）、5 H（5 ヒスチジン）、または9 H（9 ヒスチジン）カチオン性スペーサードメインによって直列に架橋され得る。いくつかの場合では、1つ以上のH 2 A、H 2 B、H 3 および／またはH 4 ヒストンフラグメント（例えば、H T P）は、それらのN末端でプロタミンにジスルフィド結合している。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0234

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0234】

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

標的指向リガンド(TL)/ ペプチドカタログ名	配列	SEQ ID NO:	アンカーの 電荷	アンカーの mer/ 合計mer	リンカーの mer/ 合計mer	リガンドの mer/ 合計mer
PLR10	RRRRRRRRRR	278	10	100.00%	0.00%	0.00%
CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	SNRWLDVKGGGG GSGGGGSRRRR RRRRR	279	9	32.14%	35.71%	32.14%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRG GGGSGGGGSVVL KYEKDAFKR	280	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	VVLKYEKDAFKRG GGGGSGGGGSR RRRRRRRR	281	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	RRRRRRRRRG GGSGGGSENLV LNE	282	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	ENVLVLEGGGGS GGGGSRRRRRRR RRR	283	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	RRRRRRRRRG GGSGGGGSPTG MIRIHQM	284	9	31.03%	34.48%	34.48%
CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRG GGGSGGGGSAA QEE	285	9	36.00%	40.00%	24.00%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRG GGSGGGSTSVG KYPNTGYYGD	286	9	27.27%	30.30%	42.42%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TSVGKYPNTGYY	287	9	27.27%	30.30%	42.42%

標的指向リガンド(TL)/ ペプチドカタログ名	配列	SEQ ID NO:	アンカーの 電荷	アンカーの mer/ 合計mer	リンカーの mer/ 合計mer	リガンドの mer/ 合計mer
	GDGGGGSGGGG SRRRRRRRRR					
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSNPKL TRMLTFKFY	288	9	28.13%	31.25%	40.63%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	NPKLTRMLTFKFY GGGGSGGGGSR RRRRRRRR	289	9	28.13%	31.25%	40.63%
PLK10_PEG22	KKKKKKKKKK- PEG22	290	10	31.25%	68.75%	0.00%
ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR	N/A		9	30.25%	33.61%	36.13%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSMIAS QFLSALTLLIKE SGA	291	9	22.50%	25.00%	52.50%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C	MIASQFLSALTLL LIKESGAGGGGS GGGGSRRRRRR RRR	292	9	22.50%	25.00%	52.50%
cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSEKFIL KVRPAFKAV	293	10	31.25%	68.75%	0.00%
EPOR_mEPO_6R_N	RRRRRRRTYSCHF GPLTWVCKPQGG	294	6	25.00%	0.00%	
EPOR_mEPO_6R_C	TYSCFGPLTWV CKPQGGRRRRRR	295	6	25.00%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_N	RRRRRRTHRPPM WSPVWP	296	6	33.33%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_C	THRPPMWSPVWP RRRRRR	297	6	33.33%	0.00%	
mH3_K4Me3_1	ART-K(Me3)- QTARKSTGGKAP RKQLA	88	6	100.00%	0.00%	0.00%
mH4_K16Ac_1	SGRGKGGKGLGK GGA-K(Ac)-RHRK	137	8	100.00%	0.00%	0.00%
mH2A_1	SGRGKQGGKARA KAKTRSSR	62	8	100.00%	0.00%	0.00%
SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C	Ac- SNYSAibADKAibA NAibADDAibAEAib AKENSGGGSGGG GGSRRRRRRRR	301	9	19.15%	21.28%	59.57%
cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSEKFIL KVRPAFKAV	293	10			

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 9】

実施例10

図125.ペプチド工学-IL2R標的指向のための新規なIL2模倣フラグメント。

インターロイキン2受容体(右)に結合したインターロイキン2(左)(PDB:1Z92)

配列 ASN(33) - PRO(34) - LYS(35) - LEU(36) - THR(37) - ARG(38) - MET(39) - LEU(40) - THR(41) - PHE(42) - LYS(43) - PHE(44) - TYR(45) (SEQ ID NO:303)

は、IL2(PDB 1Z92)から選択され、IL2受容体鎖への活性結合の領域と相關する。IL2RとIL2の相互作用モチーフを選択することによる相補的結合の操作:ここで、配列 CYS(3) - ASP(4) - ASP(5) - ASP(6) - MET(25) - LEU(26) - ASN(27) - CYS(28) - GLU(29) (SEQ ID NO:308)は、IL2受容体からの2つの結合モチーフについて選択される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0380

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0380】

図126:ペプチド工学-CD3を用いた新しい抗体由来の「アクティブバインディングポケット」エンジニアリング概念実証。配列 THR(30) - GLY(31) - ASN(52) - PRO(53) - TYR(54) - LYS(55) - GLY(56) - VAL(57) - SER(58) - THR(59) - TYR(101) - TYR(102) - GLY(103) - ASP(104) (SEQ ID NO:309)はCD3抗体(PDB 1XIW)から選択され、CD3イプシロンおよびデルタ鎖への活性結合の領域と相關する。アミノ酸の順序は、より大きいタンパク質によって維持されている三次構造をもはや持たない結合ポケット内のペプチドの二次元平面の結合動力学を反映するために再配列される。この寸法減少は以下の結果をもたらす: THR(59) - SER(58) - VAL(57) - GLY(56) - LYS(55) - TYR(54) - PRO(53) - ASN(52) - THR(30) - GLY(31) - TYR(101) - TYR(102) - GLY(103) - ASP(104) (SEQ ID NO:304)。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0381

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0381】

図127:ペプチド工学-CD45グリコシル化標的指向のための新規なSIGLEC誘導体。N-アセチルノイロミン酸(Neu5Ac)との複合体中のシアロアドヘシンN末端のPDBレンダリング(RCS PDB 1ODA)。レンダリングにおいてシアロアドヘシンに近いシアロアドヘシンフラグメントを、グリコシル化CD45および他の複雑な細胞表面糖タンパク質を標的指向するために利用した。TCELL.001.3のCRISPR RNP、同様にBLOOD.002.1~BLOOD.002.2の全血リンパ球ゲートのmRNAでT細胞の標的指向に成功した。リガンドの配列は、SNRWLDVK (SEQ ID NO:305)である。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0382

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0382】

図128:ペプチド工学-c-Kit標的指向のための新規なSCFフラグメント。破線の丸-幹細胞因子のシグナルペプチドドメイン(RCS PDB 1SCF)は、c-

K_it活性に必要な二量体ドメインを表す。特定のナノ粒子表面サイズ + SCFコーティング密度による細胞取り込みに対するリガンド提示の効果は、CynoBM.002.79（約5%の効率）とCynoBM.002.85（約56%の効率）との間で比較対照することができる。さらに、E-セレクチン + SCFフラグメント（HSC.004.73）は高い効率を達成するが、SCFフラグメントはそれ自体では達成せず（HSC.004.74）、コントラストがヒトCD34+造血幹細胞トランスフェクションの定性的画像と共に表示される。挙動の著しい相違は、エンドサイトーシスの合図を生じさせ、続いて核酸および/またはリボ核タンパク質材料を核内標的指向する際の二量体ペプチドの特定の役割を示唆している。リガンドの配列は、

EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: 302) (mSCF/rmSCF)

である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0383

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0383】

図129：ペプチド工学-膜結合SCF標的指向のための新規cK_it受容体フラグメント。内皮細胞および骨髄細胞上での造血幹細胞ローリング挙動の挙動を模倣し、全身的トランスフェクション効率を高めるための、c-K_it由来の幹細胞因子標的指向ペプチドの合理的設計（CynoBM.002.80を参照）。折り畳みについて評価した配列：名称SCFN、配列：

RRRRRRRRGGGGSGGGSEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPK (SEQ ID NO: 310)

。RosettaおよびNAMDシミュレーションパッケージを用いて配列を評価した。

Rosetta結果：ab initio折り畳みのために短縮配列をRosettaに入れた

(GGSEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPK)(SEQ ID NO: 310の残基17~43)

。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0388

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0388】

青い鎖は、残基71~94：

SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 300)

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

RRRRRRRRGGGGSGGGSSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 311)

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0389

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0389】

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

SNYSIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 300)

。疎水性残基を除去するために配列を変更し、螺旋状の折り畳みを誘導するのを助けるア

ミノイソ酪酸 (Aib) で置き換えて、以下の配列に到達した： KIT7194_AIB1 :

SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS (SEQ ID NO: 299)

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

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0390

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0390】

図132：ペプチド工学 - cKit 受容体フラグメント（続き）

SCF_mckit_(4GS)2_9R_N および SCF_mckit(Ac)_(4GS)2_9R_N の円二色性リガンド末端のアセチル化は、荷電ポリペプチド末端の電荷を中和するために利用され得る。上：KIT7194_AIB1 の CD は、アルファヘリックスおよび Aib 単位を含むヘリックスの二次構造と一致して、222 付近でわずかに落ち込み、208 付近で大きな落ち込みを示している。下：KIT7194_AIB1_Ac は、KIT7194_AIB1 と同じ CD を示している。時々アシル化は折りたたみを助け得るが、それは必要ではないようである。アセチル化はまた、末端アミンが荷電よりもむしろ中性である必要があるリガンド相互作用を助け得る。完全アンカー - リンカ - KIT7194_AIB1 構築物：

RRRRRRRRR - GGGSGGGGS - SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

(SEQ ID NO: 312)

。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2020502124000001.app