

【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、アニオン性ポリマー組成物、

(ii) 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み、カチオン性ポリマー組成物、

(iii) カチオン性ポリペプチド組成物、および

(iv) 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、アニオン性ポリマー組成物、

(ii) 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み、カチオン性ポリマー組成物、

(iii) カチオン性ポリペプチド組成物、および

(iv) 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、

(ii) 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、

(iii) カチオン性ポリペプチド組成物、および

(iv) 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、

該コアがアニオンに対するカチオンの電荷比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、

(ii) 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、

(iii) 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、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) SEQ ID NO : 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、62、88、137、181、182、183、184、185、186、187、188、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、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含み、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含み、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、RVG9R、幹細胞因子 (SCF) またはその標的指向フラグメント、CD70 またはその標的指向フラグメント、および SH2 ドメイン含有タンパク質 1A (SH2D1A) またはその標的指向フラグメント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、TAT、VP22 ドメイン、Drosophila Antennapedia 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、SEQ ID NO : 160、SEQ ID NO : 161、SEQ ID NO : 162、SEQ ID NO : 163、SEQ ID NO : 164、SEQ ID NO : 165、SEQ ID NO : 168、および SEQ ID NO : 169 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 (HTP) または核局在シグナル (NLS) 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、S E Q I D N O : 1 5 1 ~ 1 5 7 および 2 0 1 ~ 2 6 4 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 1 2 に記載のナノ粒子。

【請求項 1 4】

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 (R V G) フラグメント、A p o E - トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン (m e l a n o f e r r i t i n) 、オボトランスフェリチン (o v o t r a n s f e r r i t i n) 、L - セレクチン、E - セレクチン、P - セレクチン、P S G L - 1、E S L - 1、C D 4 4、細胞死受容体 - 3 (D R 3)、L A M P 1、L A M P 2、M a c 2 - B P、幹細胞因子 (S C F)、C D 7 0、S H 2 ドメイン含有タンパク質 1 A (S H 2 D 1 A)、エキセンディン - 4、G L P 1、5 1 を標的指向する標的指向リガンド、R G D、トランスフェリンリガンド、F G F フラグメント、コハク酸、ビスホスホネート、C D 9 0、C D 4 5 f、C D 3 4、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 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 1 5】

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 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のナノ粒子。

【請求項 1 6】

前記アンカードメインが、S E Q I D N O : 1 5 および S E Q I D N O : 1 6 から選択される、請求項 1 5 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】0 0 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 1】

【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、C a s 9 をコードするプラスミドとガイド R N A 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、P a r t i c l e M e t r i x Z e t a V i e w N T A 装置を用いて得た。ナノ粒子サイズ (ピーク) は 1 2 8 . 8 n m であり、ゼータ電位 (ピーク) は + 1 0 . 5 m V (1 0 0 %) 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、P a r t i c l e M e t r i x Z e t a V i e w N T A 装置を用いて得た。安定化されたコアは、1 1 0 . 6 n m のサイズであり、- 4 2 . 1 m V (9 5 %) のゼータ電位を有した。

【図 4】R V G 9 R 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 - A r g 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 (R V G) であり、1 1 5 . 8 n m の特徴的な粒子サイズ、- 3 . 1 m V (1 0 0 %) 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、- 5 0 m V (シリカコートされたコアへ) から 0 ~ - 1 0 m V (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 6 A】(パネル A ~ D) 核酸ペイロードとして C R I S P R / C a s 9 発現ベクターを含むナノ粒子と接触させた神経幹細胞の顕微鏡画像を示す。ナノ粒子のコアは、フルオ

ロフォア (FITC) でタグ付けされたポリ (L - アルギニン) (カチオン性ポリマー) を含んでいた。エンドソームと核はそれぞれ Lyso Tracker (赤) と Hoechst 33342 (青) を使って染色した。ナノ粒子 (および対照としてのリポフェクタミン 3000) を播種の 16 時間後に細胞に導入した。画像化の前に、細胞を Hoechst 33342 および Lyso Tracker Red を共に培養した。パネル C ~ D は、ナノ粒子コアと核およびエンドソームとの共局在を定量化する棒グラフを提示する。

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

【図 8】本発明のナノ粒子の一実施形態例の概略図を示す。

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

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

【図 11 - 1】標的指向リガンドを評価する際に考慮すべき別々のドメインを強調する、ファミリー B の GPCR の残基 170 ~ 432 (SEQ ID NO : 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、Siu, Fai Yiu, et al., Nature 499, 7459 (2013) : 444 - 449 を出典とする)。

【図 11 - 2】図 11 - 1 の説明を参照のこと。

【図 12 - 1】核酸の放出を促進および核酸の分解を制限する、親和性が維持され、標的指向リガンドが長いエンドソーム再利用経路に関与するように、標的指向リガンドの挿入および / または置換のための (例えばシステイン残基による) 内部アミノ酸位置の同定の一例を提供する。この場合、標的指向リガンドはエキセンディン - 4 であり、アミノ酸位置 10、11、および 12 は、可能な挿入および / または置換のための部位として同定された (例えば、システイン残基、例えば S11C 突然変異を有する)。図は、三次元空間で回転された、グルカゴン - GCGR (4ERS) および GLP1 - GLP1R - ECD 複合体 (PDB : 3IOL) の既知の結晶構造に対するシミュレートされたエキセンディン - 4 S11C (SEQ ID NO : 2) のアライメント、および PDB レンダリングを示す。

【図 12 - 2】図 12 - 1 の説明を参照のこと。

【図 13】三つ組みの FGF2 - FGFR1 - HEPARIN 複合体 (PDB 上の 1fq9) の一部としての tbFGF フラグメント (SEQ ID NO : 314) を示す。CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (強調された) (SEQ ID NO : 43) は、FGFR1 に対する親和性にとって重要であると決定された。

【図 14】FGF (SEQ ID NO : 315) 由来の HFKDPK (SEQ ID

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

【図 1 5】 F G F フラグメント (S E Q I D NO : 3 1 6) 由来の L E S N N Y N T (S E Q I D NO : 6) が、リガンド - 受容体オルソステリック活性および親和性に使用できるペプチドであることを決定するために使用されるアラインメントおよび P D B 3 D レンダリングを提供する。

【図 1 6】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 (N L S) の非限定的な例を提供する (例えば、N L S 含有ペプチド ; N L S 含有ペプチドの一部として / N L S 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、K o s u g i e t a l . , J B i o l C h e m . 2 0 0 9 J a n 2 ; 2 8 4 (1) : 4 7 8 - 8 5 を出典とする。[クラス 1、上から下へ (S E Q I D NO : 2 0 1 ~ 2 2 1) ; クラス 2、上から下へ (S E Q I D NO : 2 2 2 ~ 2 2 4) ; クラス 4、上から下へ (S E Q I D NO : 2 2 5 ~ 2 3 0) ; クラス 3、上から下へ (S E Q I D NO : 2 3 1 ~ 2 4 5) ; クラス 5、上から下へ (S E Q I D NO : 2 4 6 ~ 2 6 4)]。

【図 1 7 A】(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 1 7 B】図 1 7 A の説明を参照のこと。

【図 1 8 A】(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 m i R N A (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 1 8 B】図 1 8 A の説明を参照のこと。

【図 1 9】ペイロード : ペプチド核酸 (P N A) 結合部位を有する V W F - E G F P p D N A を含むナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 0 A】ペイロード : H B B g R N A と複合した N L S - C A S 9 - N L S R N P を含むナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 0 B】図 2 0 A の説明を参照のこと。

【図 2 0 C】図 2 0 A の説明を参照のこと。

【図 2 0 D】図 2 0 A の説明を参照のこと。

【図 2 1】ペイロード : H B B g R N A を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 2】ペイロード : H B B g R N A を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 3】ペイロード : H B B g R N A と複合した N L S - C A S 9 - N L S R N P を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 4】ペイロード : ペプチド核酸 (P N A) 結合部位を有する V W F - E G F P p D N A を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 5】ペイロード : ペプチド核酸 (P N A) 結合部位を有する V W F - E G F P p D N A を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 6】ペイロード : H B B g R N A を有する N L S - C A S 9 - N L S の R N P を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 7】ペイロード : ペプチド核酸 (P N A) 結合部位を有する V W F - E G F P p D N A を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 8】ペイロード : C y 5 _ E G F P m R N A を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 2 9】ペイロード : B L O C K - i T A l e x a F l u o r 5 5 5 s i R N A を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 3 0】ペイロード : H B B g R N A と複合した N L S - C a s 9 - E G F P R N P を有するナノ粒子の縮合曲線を提供する。

【図 3 1 A】ペイロードとして A l e x a 5 5 5 B l o c k - I T s i R N A 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 3 1 B】図 3 1 A の説明を参照のこと。

【図 3 1 C】図 3 1 A の説明を参照のこと。

【図 3 2 - 1】ペイロードとして N L S - C a s 9 - G F P と H B B ガイド R N A とによって形成されたりボ核タンパク質 (R N P) 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こと。

【図 3 2 - 2】図 3 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 3 2 - 3】図 3 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 3 3 - 1】ペイロードとして C y 5 E G F P m R N A 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こと。

【図 3 3 - 2】図 3 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 3 4 - 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こと： C y 5 標識されたペプチド核酸 (P N A) 結合部位を有する V W F - E G F P p D N A 。

【図 3 4 - 2】図 3 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 3 4 - 3】図 3 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 3 5】カチオン性ポリペプチド C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C を添加し、続いて P L E 1 0 0 を添加し、さらに R N P 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 S Y B R G o l d 排除アッセイのデータを提供すること。

【図 3 6】カチオン性ポリペプチド C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C を添加し、続いて P L E 1 0 0 を添加し、さらに s i R N A および S Y B R G o l d 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 S Y B R G o l d 排除アッセイのデータを提供すること。

【図 3 7】カチオン性ポリペプチドヒストンペプチド H 2 A を添加し、続いて C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C を添加し、さらに H B B g R N A および S Y B R G o l d を有する N L S - C a s 9 - E G F P の R N P に 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 S Y B R G o l d 排除アッセイのデータを提供すること。

【図 3 8】カチオン性ポリペプチドヒストンペプチド H 4 を C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C と一緒に添加し、さらに H B B g R N A および S Y B R G o l d を有する N L S - C a s 9 - E G F P の R N P に 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 S Y B R G o l d 排除アッセイのデータを提供すること。

【図 3 9】カチオン性ポリペプチド C D 4 5 _ m S i g l e c _ (4 G S) 2 _ 9 R _ C を添加し、さらに m R N A に 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 S Y B R G o l d 排除アッセイのデータを提供すること。

【図 4 0】ヒストン H 4 を添加し、さらに m R N A に C D 4 5 - m S i g l e c - (4 G S) 2 _ 9 R _ c と P L E 1 0 0 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 S Y B R G o l d 排除アッセイのデータを提供すること。

【図 4 1】ヒストン H 2 A を添加し、さらに m R N A に C D 4 5 - m S i g l e c - (4 G S) 2 _ 9 R _ c と P L E 1 0 0 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 S Y B R G o l d 排除アッセイのデータを提供すること。

【図 4 2】カチオン性ポリペプチド C D 4 5 _ m S i g l 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こと。

【図 4 3】ヒストン H 4 を添加し、続いてカチオン性ポリペプチド C D 4 5 _ m S i g l 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こと。

【図 4 4】ヒストン H 4 を添加し、続いてカチオン性ポリペプチド C D 4 5 _ m S i g l

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) ポリプレックスサイズ分布、シリカコーティングサイズおよびゼータ電位分布、ならびにリガンドコーティング / 官能化粒子サイズおよびゼータ電位分布に関するデータを提供する。

【図 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 のリボフェクタミン 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 9 0 - 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 9 0 - 2】図 9 0 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 0 - 3】図 9 0 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 0 - 4】図 9 0 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 0 - 5】図 9 0 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 1 - 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 9 1 - 2】図 9 1 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 1 - 3】図 9 1 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 1 - 4】図 9 1 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 1 - 5】図 9 1 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 2 - 1】プロジェクト C y n o B M . 0 0 2 . 7 5 に関するデータを提供する（表 5 参照）。
- 【図 9 2 - 2】図 9 2 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 2 - 3】図 9 2 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 2 - 4】図 9 2 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 3 - 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 9 3 - 2】図 9 3 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 3 - 3】図 9 3 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 3 - 4】図 9 3 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 4 - 1】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 9 4 - 2】図 9 4 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 4 - 3】図 9 4 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 4 - 4】図 9 4 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 5 - 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 9 5 - 2】図 9 5 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 5 - 3】図 9 5 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 5 - 4】図 9 5 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 6 - 1】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 9 6 - 2】図 9 6 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 6 - 3】図 9 6 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 6 - 4】図 9 6 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 7 - 1】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 9 7 - 2】図 9 7 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 7 - 3】図 9 7 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 7 - 4】図 9 7 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 8 - 1】プロジェクト C y n o B M . 0 0 2 . 8 1 に関するデータを提供する（表 5 参照）。
- 【図 9 8 - 2】図 9 8 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 8 - 3】図 9 8 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 8 - 4】図 9 8 - 1 の説明を参照のこと。
- 【図 9 9】C y n o B M . 0 0 2 R N P のみ対照の定性的画像を提供する。
- 【図 1 0 0】プロジェクト H S C . 0 0 4 のハイコンテンツ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TC E L L . 0 0 1のハイコンテンツスクリーニングに関するデータを提供する（表5参照）。

【図102】プロジェクトTC E L L . 0 0 1のリボフェクタミン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TC 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TC 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TC 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TC 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TC 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TC 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TC 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TC 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TC 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TC e l l . 0 0 1 . 10に関するデータを提供する（表5参照）。

【図112 - 2】図112 - 1の説明を参照のこと。

【図113 - 1】プロジェクトTC e l l . 0 0 1 . 11に関するデータを提供する（表5参照）。

【図113 - 2】図113 - 1の説明を参照のこと。

【図114 - 1】プロジェクトTC e l l . 0 0 1 . 12に関するデータを提供する（表5参照）。

【図114 - 2】図114 - 1の説明を参照のこと。

【図115 - 1】プロジェクトTC e l l . 0 0 1 . 13に関するデータを提供する（表5参照）。

【図115 - 2】図115 - 1の説明を参照のこと。

【図116 - 1】プロジェクトTC e l l . 0 0 1 . 14に関するデータを提供する（表5参照）。

【図116 - 2】図116 - 1の説明を参照のこと。

【図117 - 1】プロジェクトTC e l l . 0 0 1 . 15に関するデータを提供する（表5参照）。

【図117 - 2】図117 - 1の説明を参照のこと。

【図118】プロジェクトTC 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 1 1 9 - 2】図 1 1 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 1 9 - 3】図 1 1 9 - 1 の説明を参照のこと。

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

【図 1 2 1 - 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 1 2 1 - 2】図 1 2 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 2 - 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ボゾン（可能なペイロード）の電荷密度プロットを示す。

【図 1 2 2 - 2】図 1 2 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 3 - 1】（2 b）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、（2 a）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 ~ 1 0 アミノ酸、直径約 1 0 n m までの C R I S P R R N P）（1）を示す。

【図 1 2 3 - 2】図 1 2 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 4】C a s 9 R N P または任意の均質または双性イオンの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 1 2 5 - 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 1 2 5 - 2】図 1 2 5 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 6 - 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 1 2 6 - 2】図 1 2 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 7】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 1 2 8】幹細胞因子（S C F）のモデル化構造を提供する。

【図 1 2 9】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 1 3 0】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 1 3 1】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 1 3 2】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 1 3 3】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 1 3 4 - 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 1 3 4 - 2】図 1 3 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 3 4 - 3】図 1 3 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 3 4 - 4】図 1 3 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 3 4 - 5】図 1 3 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 3 4 - 6】図 1 3 4 - 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]

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

MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLA AVL

EYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLLGKVTIAQGGVLPNIQAVLL

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

H2AX

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

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

MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKKGHYAERVGAGAPVYLA AVL

EYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLGGVTIAQGGVLPNIQAVLL

PKKTSATVGPAPSGGKKATQASQEY (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]

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

MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGGKKRKR SRKESYSIYVYKVLKQVHPDTGISSK

AMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKA

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

H3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ART - K(Me3) - QTAR - K(Ac) - pS - TGGKAPRKQLA (SEQ ID NO: 90) [1-21
H3K4(Me3), K9(Ac), pS10]
ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC (SEQ ID NO: 91) [1-21 Cys]
ARTKQTAR - K(Ac) - STGGKAPRKQLATKA (SEQ ID NO: 92) [1-24 H3K9(Ac)]
ARTKQTAR - K(Me3) - STGGKAPRKQLATKA (SEQ ID NO: 93) [1-24 H3K9(Me3)]
ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAA (SEQ ID NO: 94) [1-25]
ART - K(Me3) - QTARKSTGGKAPRKQLATKAA (SEQ ID NO: 95) [1-25 H3K4(Me3)]
TKQTAR - K(Me1) - STGGKAPR (SEQ ID NO: 96) [3-17 H3K9(Me1)]
TKQTAR - K(Me2) - STGGKAPR (SEQ ID NO: 97) [3-17 H3K9(Me2)]
TKQTAR - K(Me3) - STGGKAPR (SEQ ID NO: 98) [3-17 H3K9(Me3)]
KSTGG - K(Ac) - APRKQ (SEQ ID NO: 99) [9-19 H3K14(Ac)]
QTARKSTGGKAPRKQLASK (SEQ ID NO: 100) [5-23]
APRKQLATKAARKSAPATGGVKKPH (SEQ ID NO: 101) [15-39]
ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPG (SEQ ID NO: 102) [21-44]
KAARKSAPA (SEQ ID NO: 103) [23-31]
KAARKSAPATGG (SEQ ID NO: 104) [23-34]
KAARKSAPATGGC (SEQ ID NO: 105) [23-34 Cys]
KAAR - K(Ac) - SAPATGG (SEQ ID NO: 106) [H3K27(Ac)]
KAAR - K(Me1) - SAPATGG (SEQ ID NO: 107) [H3K27(Me1)]
KAAR - K(Me2) - SAPATGG (SEQ ID NO: 108) [H3K27(Me2)]
KAAR - K(Me3) - SAPATGG (SEQ ID NO: 109) [H3K27(Me3)]
AT - K(Ac) - 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)]
GTVALREIRRYQ - K(Ac) - STELLIR (SEQ ID NO: 116) [44-63 H3K56(Ac)]
ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE (SEQ ID
NO: 117) [1-50]
TELLIRKLPFQRLVREIAQDF - K(Me1) - TDLRFQSAI (SEQ ID NO: 118)
[H3K79(Me1)]
EIAQDFKTDLR (SEQ ID NO: 119) [73-83]
EIAQDF - K(Ac) - TDLR (SEQ ID NO: 120) [73-83 H3K79(Ac)]
EIAQDF - K(Me3) - TDLR (SEQ ID NO: 121) [73-83 H3K79(Me3)]
RLVREIAQDFKTDLRFQSSAV (SEQ ID NO: 122) [69-89]

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

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

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

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

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

H4

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

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

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

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

SGRG - K(Ac) - GG - K(Ac) - GLG - K(Ac) - GGA - K(Ac) - RHRKVLDRDNGSGSK (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)]

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

MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGV
LKVFLNVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG (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

H4 ヒストンフラグメント（例えば、HTP）は、FKFL カテプシン B タンパク質分解性切断ドメイン（SEQ ID NO: 306）またはRGFFP 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、H2A、H2B、H3 および / または H4 ヒストンフラグメント（例えば、HTP）は、5R（5 アルギニン）、9R（9 アルギニン）、5K（5 リジン）、9K（9 リジン）、5H（5 ヒスチジン）、または 9H（9 ヒスチジン）カチオン性スパーサドメインによって直列に架橋され得る。いくつかの場合では、1 つ以上の H2A、H2B、H3 および / または H4 ヒストンフラグメント（例えば、HTP）は、それらの N 末端でプロタミンにジスルフィド結合している。

【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「rm」）、C = リンカー名、D = 荷電ポリペプチド名、E = B に基づくリンカー末端、および F = バージョン番号（同じ WT に由来するが AA 配列が異なる 2 つの修飾標的指向リガンドを区別するため）。

標的指向リガンド(TL)/ ペプチドカタログ名	配列	SEQ ID NO:	アンカーの 電荷	アンカーの mer/ 合計mer	リンカーの mer/ 合計mer	リガンドの mer/ 合計mer
PLR10	RRRRRRRRRR	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	RRRRRRRRRGG GGGSGGGGSVVL KYEKDAFKR	280	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	VVLKYEKDAFKRG GGGSGGGGSR RRRRRRRR	281	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	RRRRRRRRRGG GSGGGGSENLV LNE	282	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	ENLVLNEGGGGS GGGSRRRRRR RRR	283	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	RRRRRRRRRGG GSGGGGGSPTG MIRIHQM	284	9	31.03%	34.48%	34.48%
CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGGSGGGGSAA QEE	285	9	36.00%	40.00%	24.00%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GSGGGGGSSTVG KYPNTGYG	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	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGGSNPKL 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	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGGSMIAS QFLSALTLLVLLIKE SGA	291	9	22.50%	25.00%	52.50%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C	MIASQFLSALTLLV LIKESGAGGGGS GGGGSRRRRRR RRR	292	9	22.50%	25.00%	52.50%
cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG 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	TYSCHFGPLTWV CKPQGRRRRRR	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	SGRGKGKGLGK 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 AKENSGGGGSGG GGSRRRRRRRRR	301	9	19.15%	21.28%	59.57%
cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG 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 1 0

図 1 2 5 . ペプチド工学 - I L 2 R 標的指向のための新規な I L 2 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関する。IL2RとIL2の相互作用モチーフを選択することによる相補的結合の操作: ここで、配列CYS(3) - ASP(4) - ASP(5) - ASP(6) - MET(25) - LEU(26) - ASN(27) - CYS(28) - GLU(29) (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関する。アミノ酸の順序は、より大きいタンパク質によって維持されている三次構造をもち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 - アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)との複合体中のシアロアドヘシンN末端のPDBレンダリング(RCS PDB 1ODA)。レンダリングにおいてシアロアドヘシンに近いシアロアドヘシンフラグメントを、グリコシル化CD45および他の複雑な細胞表面糖タンパク質を標的指向するために利用した。TCELL.001.3のCRISPR RNP、同様に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 i t 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 + S C F 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、C y n o B M . 0 0 2 . 7 9 (約 5 % の効率) と C y n o B M . 0 0 2 . 8 5 (約 5 6 % 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 + S C F フラグメント (H S C . 0 0 4 . 7 3) は高い効率を達成するが、S C F フラグメントはそれ自体では達成せず (H S C . 0 0 4 . 7 4) 、コントラストがヒト C D 3 4 + 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 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 8 3】

図 1 2 9 : ペプチド工学 - 膜結合 S C F 標的指向のための新規 c K i t 受容体フラグメント。内皮細胞および骨髓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 i t 由来の幹細胞因子標的指向ペプチドの合理的設計 (C y n o B M . 0 0 2 . 8 0 を参照) 。折り畳みについて評価した配列 : 名称 S C F N 、配列 :

RRRRRRRRRGGGGSGGGGSEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPK (SEQ ID NO: 310)

。R o s e t t a および N A M D シミュレーションパッケージを用いて配列を評価した。R o s e t t a 結果 : a b i n i t i o 折り畳みのために短縮配列を R o s e t t a に入れた

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

。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 8 8】

青い鎖は、残基 7 1 ~ 9 4 :

SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 300)

の範囲の、K I T 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 I T 残基 7 1 ~ 9 4 の N A M D シミュレーション :

RRRRRRRRRGGGGSGGGGSSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO:311)

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 8 9】

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 7 1 ~ 9 4 については、K I T 中の他の 2 つのヘリックスと相互作用することによってヘリックスを安定化させる疎水性残基がある。疎水性残基は、赤 (下線) で示されている :

SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (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 (A i b) で置き換えて、以下の配列に到達した : K I T 7 1 9 4 _ _ A I B 1 :

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

。 A i b を含む配列を R i n k 樹脂上で合成し、遊離アミンおよびアシル化アミン (A c) 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 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 9 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 9 0】

図 1 3 2 : ペプチド工学 - c K i t 受容体フラグメント (続き)

S C F _ _ m c K i t _ _ (4 G S) 2 _ _ 9 R _ _ N および S C F _ _ m c K i t (A c) _ _ (4 G S) 2 _ _ 9 R _ _ 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 : K I T 7 1 9 4 _ _ A I B 1 の C D は、アルファヘリックスおよび A i b 単位を含むヘリックスの二次構造と一致して、2 2 2 付近でわずかに落ち込み、2 0 8 付近で大きな落ち込みを示している。下 : K I T 7 1 9 4 _ _ A I B 1 _ _ A c は、K I T 7 1 9 4 _ _ A I B 1 と同じ C D を示している。時々アシル化は折りたたみを助け得るが、それは必要ではないようである。アセチル化はまた、末端アミンが荷電よりもむしろ中性である必要があるリガンド相互作用を助け得る。完全アンカー - リンカー - K I T 7 1 9 4 _ _ A I B 1 構築物 :

RRRRRRRRRR - GGGGSGGGGS - SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

(SEQ ID NO: 312)

。

【手続補正 1 4】

【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