

【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 2020-502120 (P2020-502120A)

【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 2019-531743 (P2019-531743)

【国際特許分類】

A 6 1 K 47/42 (2017.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 47/64 (2017.01)

A 6 1 K 47/65 (2017.01)

A 6 1 K 31/711 (2006.01)

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 0 7 K 7/08 (2006.01)

C 0 7 K 14/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

【 F I 】

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 47/64

A 6 1 K 47/65

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 38/16

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 7/00

C 0 7 K 7/06

C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 14/00

C 1 2 N 15/113 Z N A Z

【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】

細胞表面タンパク質に特異的に結合する標的指向リガンドを含む送達分子であって、該標的指向リガンドが、

タンパク質ペイロード、核酸ペイロード、および/または荷電ポリマーポリペプチドドメインにコンジュゲートしており、かつ

該標的指向リガンドが細胞表面タンパク質に結合し、その後、該送達分子がエンドサイトーシスした時に、長いエンドソームリサイクリング経路に参与するように構成されてい

る、

送達分子。

【請求項 2】

前記細胞表面タンパク質が、受容体チロシンキナーゼ (R T K)、ファミリー B の G タンパク質共役受容体 (G P C R)、細胞表面糖タンパク質、および細胞間接着分子からなる群より選択される、請求項 1 に記載の送達分子。

【請求項 3】

前記標的指向リガンドが、E - セレクチン、L - セレクチン、P - セレクチン、線維芽細胞増殖因子 (F G F)、エキセンディン、5 1 インテグリン、トランスフェリン、およびそれらの変異体または断片からなる群より選択される、請求項 1 に記載の送達分子。

【請求項 4】

受容体チロシンキナーゼ (R T K) に特異的に結合する標的指向リガンドを含む送達分子であって、該標的指向リガンドが、

タンパク質ペイロード、核酸ペイロード、および / または荷電ポリマーポリペプチドメインにコンジュゲートしており、かつ

オルソステリック結合の間に占められる該 R T K のセグメントに結合する、送達分子。

【請求項 5】

前記 R T K が、線維芽細胞増殖因子受容体 (F G F R) である、請求項 4 に記載の送達分子。

【請求項 6】

前記標的指向リガンドが、S E Q I D N O : 3、4、5、6、7、8、9 および 10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の送達分子。

【請求項 7】

ファミリー B の G タンパク質共役受容体 (G P C R) に特異的に結合する標的指向リガンドを含む送達分子であって、該標的指向リガンドが、

タンパク質ペイロード、核酸ペイロード、および / または荷電ポリマーポリペプチドメインにコンジュゲートしており、かつ

該 G P C R のアロステリックドメインおよび該 G P C R のオルソステリックドメインの両方に結合する、

送達分子。

【請求項 8】

前記標的指向リガンドが、S E Q I D N O : 1 および 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の送達分子。

【請求項 9】

トランスフェリン受容体に特異的に結合する標的指向リガンドを含む送達分子であって、該標的指向リガンドが、

タンパク質ペイロード、核酸ペイロード、および / または荷電ポリマーポリペプチドメインにコンジュゲートしており、かつ

S E Q I D N O : 1 1 のアミノ酸配列を含む、送達分子。

【請求項 10】

5 1 インテグリンに特異的に結合する標的指向リガンドを含む送達分子であって、該標的指向リガンドが、

タンパク質ペイロード、核酸ペイロード、および / または荷電ポリマーポリペプチドメインにコンジュゲートしており、かつ

S E Q I D N O : 1 2 および R G D からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

送達分子。

【請求項 1 1】

前記標的指向リガンドが、核酸ペイロードにコンジュゲートしており、かつ該核酸ペイロードがRNAi剤であり、任意で、該RNAi剤がsiRNA分子である、請求項1～10のいずれか一項に記載の送達分子。

【請求項 1 2】

前記標的指向リガンドが、リンカーを介してタンパク質ペイロード、核酸ペイロード、および/または荷電ポリマーポリペプチドドメインにコンジュゲートしている、請求項1～10のいずれか一項に記載の送達分子。

【請求項 1 3】

前記リンカーが、SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含む、請求項12に記載の送達分子。

【請求項 1 4】

前記標的指向リガンドが、荷電ポリマーポリペプチドドメインにコンジュゲートしており、かつ該荷電ポリマーポリペプチドドメインが、核酸ペイロードと縮合している、請求項1～10のいずれか一項に記載の送達分子。

【請求項 1 5】

前記荷電ポリマーポリペプチドドメインが、ポリアルギニンおよびポリヒスチジンからなる群より選択される、請求項1～10のいずれか一項に記載の送達分子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

【図1A】（パネルA～F）主題の送達分子の例示的な構成の概略図を提供する。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、C、およびEにおける分子は、リンカーを含むが、パネルB、D、およびFの分子は含まない。（パネルA～B）ペイロードにコンジュゲートした標的指向リガンドを含む送達分子。（パネルC～D）ナノ粒子の荷電安定化層と静電的に相互作用している荷電ポリマーポリペプチド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送達分子。（パネルE～F）核酸ペイロードと縮合している荷電ポリマーポリペプチド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送達分子。

【図1B】図1Aの説明を参照のこと。

【図1C】図1Aの説明を参照のこと。

【図1D】図1Aの説明を参照のこと。

【図1E】図1Aの説明を参照のこと。

【図1F】図1Aの説明を参照のこと。

【図2A】（パネルA～D）主題の送達分子の例示的な構成の概略図を提供する。示された標的指向リガンドは、エキセンディン（S11C置換を有する）（SEQ ID NO: 2を参照）である。リンカーを伴うおよび伴わない、かつナノ粒子の荷電安定化層（「アニオン性ナノ粒子表面」）と静電的に相互作用している荷電ポリマーポリペプチドドメインへの（リンカーを介した）コンジュゲーションを伴う、異なるコンジュゲーション化学を有する例が示される。図2、パネルAは、還元的に切断可能なジスルフィド結合を用いて核酸、タンパク質またはリボ核タンパク質にコンジュゲートしたエキセンディン-4（1～39）[Cys11]（SEQ ID NO: 2）のコンジュゲーション戦略の例を提供する。図2、パネルBは、アミン反応性結合を用いて核酸、タンパク質またはリボ核タンパク質にコンジュゲートしたエキセンディン-4（1～39）[Cys11]のコンジュゲーション戦略の例を提供する。図2、パネルCは、（アミン反応性ドメインを介して）核酸、タンパク質またはリボ核タンパク質にコンジュゲートしているリンカーに、

還元的に切断可能なジスルフィド結合を介してコンジュゲートしたエキセンディン - 4 (1 ~ 3 9) [C y s 1 1] のコンジュゲーション戦略の例を提供する。図 2、パネル D は、ナノ粒子の荷電安定化層 (例えば、シリカ、ペプチド、ポリシステイン、またはリン酸カルシウムコーティング) と静電的に相互作用することによってナノ粒子表面をコーティングする荷電ポリマーポリペプチドドメイン (9 R 配列が示されている) にコンジュゲートしているリンカーに、還元的に切断可能なジスルフィド結合を介してコンジュゲートしたエキセンディン - 4 (1 ~ 3 9) [C y s 1 1] のコンジュゲーション戦略の例を提供する。

【図 2 B】図 2 A の説明を参照のこと。

【図 2 C】図 2 A の説明を参照のこと。

【図 2 D】図 2 A の説明を参照のこと。

【図 3 - 1】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に対して、標的指向リガンドを評価する際に考慮される別々のドメインを強調して、ファミリー B の G P C R の概略図を提供する。(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 3 - 2】図 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 - 1】親和性が維持され、標的指向リガンドが、核酸放出を促進し、かつ核酸分解を制限する長いエンドソームリサイクリング経路に関与するように、標的指向リガンドに対する挿入および / または置換 (例えばシステイン残基で) のための内部アミノ酸位置を同定する例を提供する。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 1 0、1 1、および 1 2 は、可能な挿入および / または置換 (例えば、システイン残基で、例えば、S 1 1 C 変異) のための部位として同定された。図は、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 1 1 C] (S E Q I D N O : 2) のアラインメント、および 3 次元空間で回転させた P D B レンダリングを示す。

【図 4 - 2】図 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5】三元 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 : 1 7 9) 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) (S E Q I D N O : 4 3) 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 6】F G F (S E Q I D N O : 1 8 0) 由来の H F K D P K (S E Q I D N O : 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され得るペプチドであると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 7】F G F フラグメント (S E Q I D N O : 1 8 1) 由来の L E S N N Y N T (S E Q I D N O : 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され得るペプチドであると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 8】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凝縮曲線を提供する。

【図 9 A】ペイロード：H B B g R N A と複合体を形成した N L S - C A S 9 - N L S R N P を有するナノ粒子の凝縮曲線を提供する。

【図 9 B】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 9 C】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 9 D】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 1 0】ペイロード：H B B g R N A を有するナノ粒子の凝縮曲線を提供する。

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

【図 1 2】ペイロード：H B B g R N A と複合体を形成した N L S - C A S 9 - N L S

RNPを有するナノ粒子の凝縮曲線を提供する。

【図13】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凝縮曲線を提供する。

【図14】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凝縮曲線を提供する。

【図15】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凝縮曲線を提供する。

【図16】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凝縮曲線を提供する。

【図17】ペイロード：Cy5-EGFP-mRNAを有するナノ粒子の凝縮曲線を提供する。

【図18】ペイロード：BLOCK-IT-Alexa-Fluor-555-siRNAを有するナノ粒子の凝縮曲線を提供する。

【図19】ペイロード：HBB-gRNAと複合体を形成したNLS-Cas9-EGFP-RNPを有するナノ粒子の凝縮曲線を提供する。

【図20A】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21-1】ペイロードとしてNLS-Cas9-GFPおよびHBBガイドRNAによって形成されたりボ核タンパク質（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21-2】図21-1の説明を参照のこと。

【図21-3】図21-1の説明を参照のこと。

【図22-1】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22-2】図21-1の説明を参照のこと。

【図23-1】ペイロード：Cy5タグ化ペプチド核酸（PNA）結合部位を有するVWF-EGFP-pDNAを有するナノ粒子を使用した場合に収集されたデータを提供する。

【図23-2】図23-1の説明を参照のこと。

【図23-3】図23-1の説明を参照のこと。

【図24】RNPに、カチオン性ポリペプチドCD45-mSinglec-(4GS)2-9R-Cを添加し、続いてPLE100を添加し、さらにカチオン性ポリペプチドを添加することによる蛍光強度の低下を示すSYBR-Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図25】siRNAおよびSYBR-Goldに、カチオン性ポリペプチドCD45-mSinglec-(4GS)2-9R-Cを添加し、続いてPLE100を添加し、さら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の変動を示すSYBR-Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図26】HBB-gRNAおよびSYBR-Goldを有するNLS-Cas9-EGFPのRNPに、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-mSinglec-(4GS)2-9R-Cを添加し、さらにPLE100を添加することによって蛍光強度の変動を示すSYBR-Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図27】HBB-gRNAおよびSYBR-Goldを有するNLS-Cas9-EGFPのRNPに、CD45-mSinglec-(4GS)2-9R-Cと一緒にカチオン性ポリペプチドヒストンペプチドH4を添加し、さらにPLE100を添加することによって蛍光強度の変動を示すSYBR-Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図28】mRNAに、カチオン性ポリペプチドCD45-mSinglec-(4GS)

2__9R__Cを添加し、さらにPLE100を添加することによって蛍光強度の変動を示すSYBR Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図29】mRNAに、ヒストンH4を添加し、さらにCD45-mSige c-(4GS)2__9R__cおよびPLE100を添加することによって蛍光強度の変動を示すSYBR Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図30】mRNAに、ヒストンH2Aを添加し、さらにCD45-mSige c-(4GS)2__9R__cおよびPLE100を添加することによって蛍光強度の変動を示すSYBR Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図31】カチオン性ポリペプチドCD45__mSige c__(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の変動を示すVWF__EGFP pDNAとのインターカレーションからのSYBR Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図32】ヒストンH4を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドCD45__mSige c__(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の変動を示すVWF__EGFP pDNAとのインターカレーションからのSYBR Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図33】ヒストンH4を添加し、続いてカチオン性ポリペプチドCD45__mSige c__(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の変動を示すVWF__EGFP pDNAとのインターカレーションからのSYBR Gold排除アッセイからのデータを提供する。

【図34A】(パネルA~C)ポリブックスサイズ分布、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34B-1】図34Aの説明を参照のこと。

【図34B-2】図34Aの説明を参照のこと。

【図34C-1】図34Aの説明を参照のこと。

【図34C-2】図34Aの説明を参照のこと。

【図35】分岐ヒストンペプチドコンジュゲートパイロット粒子に関するデータを提供する。

【図36-1】プロジェクトHSC.001.001に関するデータを提供する(表4参照)。

【図36-2】図36-1の説明を参照のこと。

【図37】プロジェクトHSC.001.002に関するデータを提供する(表4参照)。

【図38-1】プロジェクトHSC.002.01(標的指向リガンド-ESELLg__mESEL__(4GS)2__9R__N)に関するデータを提供する(表4参照)。

【図38-2】図38-1の説明を参照のこと。

【図39-1】プロジェクトHSC.002.02(標的指向リガンド-ESELLg__mESEL__(4GS)2__9R__C)に関するデータを提供する(表4参照)。

【図39-2】図39-1の説明を参照のこと。

【図40-1】プロジェクトHSC.002.03(標的指向リガンド-CD45__mSige c__(4GS)2__9R__C)に関するデータを提供する(表4参照)。

【図40-2】図40-1の説明を参照のこと。

【図41-1】プロジェクトHSC.002.04(標的指向リガンド-Cy5mRNA-SiO2-PEG)に関するデータを提供する(表4参照)。

【図41-2】図41-1の説明を参照のこと。

【図42-1】プロジェクトBLOOD.002.88(標的指向リガンド-CD45__mSige c__(4GS)2__9R__C)に関するデータを提供する(表4参照)。

【図42-2】図42-1の説明を参照のこと。

【図43-1】プロジェクトBLOOD.002.89(標的指向リガンド-CD45__

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 4 参照) 。

【図 4 3 - 2】図 4 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 4 - 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 4 参照) 。

【図 4 4 - 2】図 4 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 5 - 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 4 参照) 。

【図 4 5 - 2】図 4 5 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 6 - 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 4 参照) 。

【図 4 6 - 2】図 4 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 7 - 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 4 参
照) 。

【図 4 7 - 2】図 4 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 8 - 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 4 参
照) 。

【図 4 8 - 2】図 4 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 9 - 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 4
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 T C E L L . 0 0 1 . 1 4 に関するデータを提供する (表 4
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 T C E L L . 0 0 1 . 1 6 に関するデータを提供する (表 4
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 T C E L L . 0 0 1 . 1 8 に関するデータを提供する (表 4
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 T C E L L . 0 0 1 . 2 8 に関するデータを提供する (表 4
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 T C E L L . 0 0 1 . 2 9 に関するデータを提供する (表 4
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 T C E L L . 0 0 1 . 3 1 に関するデータを提供する (表 4
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 T C E L L . 0 0 1 . 3 3 に関するデータを提供する (表 4
参照) 。

【図 5 6 - 2】図 5 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 7】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 4 参照
) 。

【図 5 8 - 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 4
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 . 4 6 に関するデータを提供する (表 4
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 . 4 8 に関するデータを提供する (表 4

参照)。

【図60-2】図60-1の説明を参照のこと。

【図61-1】プロジェクトTCCELL.001.58に関するデータを提供する(表4参照)。

【図61-2】図61-1の説明を参照のこと。

【図62-1】プロジェクトTCCELL.001.59に関するデータを提供する(表4参照)。

【図62-2】図62-1の説明を参照のこと。

【図63-1】プロジェクトCYNOBM.002.82に関するデータを提供する(表4参照)。

【図63-2】図63-1の説明を参照のこと。

【図64-1】プロジェクトCYNOBM.002.83に関するデータを提供する(表4参照)。

【図64-2】図64-1の説明を参照のこと。

【図65-1】プロジェクトCYNOBM.002.84に関するデータを提供する(表4参照)。

【図65-2】図65-1の説明を参照のこと。

【図66-1】プロジェクトCYNOBM.002.85に関するデータを提供する(表4参照)。

【図66-2】図66-1の説明を参照のこと。

【図67-1】プロジェクトCYNOBM.002.86に関するデータを提供する(表4参照)。

【図67-2】図67-1の説明を参照のこと。

【図68-1】プロジェクトCYNOBM.002.76に関するデータを提供する(表4参照)。

【図68-2】図68-1の説明を参照のこと。

【図69】プロジェクトCYNOBM.002.77に関するデータを提供する(表4参照)。

【図70-1】プロジェクトCYNOBM.002.78に関するデータを提供する(表4参照)。

【図70-2】図70-1の説明を参照のこと。

【図71】プロジェクトCYNOBM.002.79に関するデータを提供する(表4参照)。

【図72】プロジェクトCYNOBM.002.80に関するデータを提供する(表4参照)。

【図73-1】CynoBM.002試料についてのトランスフェクションされていない対照に関するデータを提供する。

【図73-2】図73-1の説明を参照のこと。

【図73-3】図73-1の説明を参照のこと。

【図73-4】図73-1の説明を参照のこと。

【図74-1】NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNPのリボフェクタミンCRISPRMAX送達に関するデータを提供する。

【図74-2】図74-1の説明を参照のこと。

【図74-3】図74-1の説明を参照のこと。

【図74-4】図74-1の説明を参照のこと。

【図75-1】プロジェクトCynoBM.002 RNP-Only対照に関するデータを提供する(表4参照)。

【図75-2】図75-1の説明を参照のこと。

【図75-3】図75-1の説明を参照のこと。

【図76-1】プロジェクトCynoBM.002.82に関するデータを提供する(表

4 参照)。

【図 7 6 - 2】図 7 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 6 - 3】図 7 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 6 - 4】図 7 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 6 - 5】図 7 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 7 - 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 4 参照)。

【図 7 7 - 2】図 7 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 7 - 3】図 7 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 7 - 4】図 7 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 7 - 5】図 7 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 8 - 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 4 参照)。

【図 7 8 - 2】図 7 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 8 - 3】図 7 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 8 - 4】図 7 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 8 - 5】図 7 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 9 - 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 4 参照)。

【図 7 9 - 2】図 7 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 9 - 3】図 7 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 9 - 4】図 7 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 9 - 5】図 7 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 0 - 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 4 参照)。

【図 8 0 - 2】図 8 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 0 - 3】図 8 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 0 - 4】図 8 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 0 - 5】図 8 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 1 - 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 4 参照)。

【図 8 1 - 2】図 8 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 1 - 3】図 8 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 1 - 4】図 8 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 2 - 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 4 参照)。

【図 8 2 - 2】図 8 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 2 - 3】図 8 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 2 - 4】図 8 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 3 - 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 4 参照)。

【図 8 3 - 2】図 8 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 3 - 3】図 8 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 3 - 4】図 8 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 4 - 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 4 参照)。

【図 8 4 - 2】図 8 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 4 - 3】図 8 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 4 - 4】図 8 4 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 5 - 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

4 参照)。

【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 . 8 0 に関するデータを提供する (表 4 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 86 - 4】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 1 に関するデータを提供する (表 4 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 88】C y n o B M . 0 0 2 R N P - O n l y 対照の定性的画像を提供する。

【図 89】プロジェクト H S C . 0 0 4 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 4 参照)。

【図 90】プロジェクト T C E L L . 0 0 1 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 4 参照)。

【図 91】プロジェクト T C 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 4 参照)。

【図 92】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 4 参照)

。

【図 93】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 4 参照)

。

【図 94 - 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 4 参照)。

【図 94 - 2】図 94 - 1 の説明を参照のこと。

【図 95 - 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 4 参照)。

【図 95 - 2】図 95 - 1 の説明を参照のこと。

【図 96 - 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 4 参照)。

【図 96 - 2】図 96 - 1 の説明を参照のこと。

【図 97 - 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 4 参照)。

【図 97 - 2】図 97 - 1 の説明を参照のこと。

【図 98 - 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 4 参照)。

【図 98 - 2】図 98 - 1 の説明を参照のこと。

【図 99 - 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 4 参照)。

【図 99 - 2】図 99 - 1 の説明を参照のこと。

【図 100 - 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 4 参照)。

【図 100 - 2】図 100 - 1 の説明を参照のこと。

【図 101 - 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 4 参照)。

【図 101 - 2】図 101 - 1 の説明を参照のこと。

【図 102 - 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

4 参照)。

【図 102 - 2】図 102 - 1 の説明を参照のこと。

【図 103 - 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 4 参照)。

【図 103 - 2】図 103 - 1 の説明を参照のこと。

【図 104 - 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 4 参照)。

【図 104 - 2】図 104 - 1 の説明を参照のこと。

【図 105 - 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 4 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 . 1 5 に関するデータを提供する (表 4 参照)。

【図 106 - 2】図 106 - 1 の説明を参照のこと。

【図 107】プロジェクト T C e l l . 0 0 1 についての陰性対照に関するデータを提供する (表 4 参照)。

【図 108 - 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 4 参照)。

【図 108 - 2】図 108 - 1 の説明を参照のこと。

【図 108 - 3】図 108 - 1 の説明を参照のこと。

【図 109】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 4 参照)。

【図 110 - 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 110 - 2】図 110 - 1 の説明を参照のこと。

【図 111 - 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 S l e e p i n g B e a u t y T r a n s p o s o n s (可能なペイロード) の電荷密度プロットを示す。

【図 111 - 2】図 111 - 1 の説明を参照のこと。

【図 112 - 1】(2b) その後の多層化学の付加、複数の核酸また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 10 nm までの C R I S P R R N P) (1) を示す。

【図 112 - 2】図 112 - 1 の説明を参照のこと。

【図 113】C a s 9 R N P または任意の均一に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付加順序および静電マトリックス組成物の例を示す。

【図 114 - 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 114 - 2】図 114 - 1 の説明を参照のこと。

【図 115 - 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 115 - 2】図 115 - 1 の説明を参照のこと。

【図 116】N - アセチルノイラミン酸 (N e u 5 A c) と複合体を形成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 117】幹細胞因子 (S C F) のモデル化構造を提供する。

【図 118】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 119】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 2 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 2 1】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 2 2】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 2 3 - 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岐ヒストン構造の例を示す。右側のポリマーは前駆体骨格分子を表し、左側の分子は分岐構造のセグメントの一例である。

【図 1 2 3 - 2】図 1 2 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 3 - 3】図 1 2 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 3 - 4】図 1 2 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 3 - 5】図 1 2 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2 3 - 6】図 1 2 3 - 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 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 5】

主題の送達分子の一部として使用され得る標的指向リガンドの例には、表 1 に列挙されているものが含まれるが、これらに限定されない。主題の送達分子の一部として使用され得る標的指向リガンドの例には、表 2 に列挙されているものが含まれるが、これらに限定されない（表 2 に列挙される配列の多くはリンカー（例えば、G G G G S G G G S (S E Q I D N O : 1 4 6) ）を介してカチオン性ポリペプチドドメイン（例えば、9 R、6 R など）にコンジュゲートした標的指向リガンド（例えば、列 2 の S N R W L D V K (S E Q I D N O : 1 7 2) ）を含む）。標的指向リガンドに含まれ得るアミノ酸配列の例には、

NPKLTRMLTFKFY (SEQ ID NO: 173) (IL2), TSVGKYPNTGYYGD (SEQ ID NO: 174) (CD3),

SNRWLDVK (Siglec) (SEQ ID NO: 172), EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: 175) (SCF);

SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 176) (cKit), およびAc-

SNYSAibADKAibANAibADDAibAEAibAKENS (SEQ ID NO: 177) (cKit)

が含まれるが、これらに限定されない。したがって、いくつかの場合において、標的指向リガンドは、

NPKLTRMLTFKFY (SEQ ID NO: 173) (IL2), TSVGKYPNTGYYGD (SEQ ID NO: 174) (CD3),

SNRWLDVK (Siglec) (SEQ ID NO: 172), EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO: 175) (SCF);

またはSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 176) (cKit)

と 8 5 % 以上（例えば、9 0 % 以上、9 5 % 以上、9 8 % 以上、9 9 % 以上、または 1 0 0 % ）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【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 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 2】

ヒストンおよび H T P の例

例には、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]

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

MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGHYAERVGAGAPVYLA AVL

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]

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

MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGGKKRKRSRKESYSIYVYKVLKQVHPDTGISSK
AMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNNRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKA
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 ≡ 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]
 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]
 TELLIRKLFPQRLVREIAQDF - 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]
 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 (プロテイン
 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)]
 SGRGKGGKGLGKGA - K(Ac) - RHRK (SEQ ID NO: 137) [1-20 H4K16 (Ac)]
 KGLGKGGAKRHRKVLDRDNC - NH2 (SEQ ID NO: 138) [1-25 WC, アミド]
 MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGKITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGV
 LKVFLNVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG (SEQ ID NO: 139)

[1-103]

【 手続補正 5 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 7 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 7 2 】

本明細書における 1 つ以上の天然または修飾ポリペプチド配列は、末端または間欠的アルギニン、リジン、またはヒスチジン配列で修飾されてもよい。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、5 R (5 アルギニン) で修飾され得る。いくつかの実施形態において、各ポリペプチドの C 末端は、9 R (9 アルギニン) で修飾され得る。いくつかの実施形態において、各ポリペプチドの N 末端は、5 R (5 アルギニン) で修飾され得る。いくつかの実施形態において、各ポリペプチドの N 末端は、9 R (9 アルギニン) で修飾され得る。いくつかの場合において、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、HTP) は、それぞれ 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 : 1 8 2) 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 : 1 8 3) で直列に架橋されている。いくつかの場合において、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、HTP) 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) カチオン性スパーサードメインによって直列に架橋され得る。いくつかの場合において、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 6 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 9 8

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 9 8 】

いくつかの例示的な実施形態において、3 つ全ての標的指向リガンド (S C F、C D 7 0、および S H 2 D 1 A) は、主題の組成物の一部である。例えば、(1) (c - K i t 受容体を標的とする) 標的指向ポリペプチド S C F は、
XMEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLP SHCWISEM VVQLSDSLTDLLD
KFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKD
FVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAX (SEQ ID NO: 167)

を含み得、X は、例えば、いくつかの場合において、N 末端および / または C 末端に存在し得るか、またはポリペプチド配列内に埋め込まれ得る、荷電ポリマーポリペプチドドメイン (例えば、6 H などのポリヒスチジン、9 R などのポリアルギニンなど) であり、(2) (C D 2 7 を標的とする) 標的指向ポリペプチド C D 7 0 は、
XPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLN
HTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELD K GQLRIHRDGIY MVHIQVTLAICSSTTASRHHPT
TLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWV
RPX (SEQ ID NO: 168)

を含み得、X は、例えば、いくつかの場合において、N 末端および / または C 末端に存在し得るか、またはポリペプチド配列内に埋め込まれ得る、荷電ポリマーポリペプチドドメイン (例えば、6 H などのポリヒスチジン、9 R などのポリアルギニンなど) であり、(3) (C D 1 5 0 を標的とする) 標的指向ポリペプチド S H 2 D 1 A は、
XS SGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHGYIY
TYRVSQTETGWSAETAPGVHCRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPVVEKKSSARSTQGTTG
/ IREDPDVCLKAP (SEQ ID NO: 169)

を含み得、X は、例えば、いくつかの場合において、N 末端および / または C 末端に存在し得るか、またはポリペプチド配列 (例えば、
MGSSXS SGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLY
HGYIYTYRVSQTETGWSAETAPGVHCRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPVVEKKSSARST
QGTTGIREDPDVCLKAP (SEQ ID NO: 171)

など) 内に埋め込まれ得る、荷電ポリマーポリペプチドドメイン (例えば、6 H などのポリヒスチジン、9 R などのポリアルギニンなど) である。

【 手続補正 7 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 1 3 5

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 1 3 5 】

実施例 1 : ファミリー B の G P C R への標的指向された結合を提供する標的指向リガンド

図 3 は、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に対して、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して、ファミリーBのGPCRの残基170~432 (SEQ ID NO: 178) の概略図を提供する。(図は、Siu, Fai Yiu et al., Nature 499.7459 (2013): 444~449を出典とする)。そのようなドメインは、システイン置換のために標的指向リガンドエキセンディン-4内の部位を選択するときに考慮した。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0139

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0139】

(表2) 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: 受容体を標的指向しているリガンドの名前(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	147	10	100.00%	0.00%	0.00%
CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	SNRWLDVKGGGG GSGGGGSRRRR RRRRR	148	9	32.14%	35.71%	32.14%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGGSGGGGSSVL KYEKDAFKR	149	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	VVLKYEKDAFKRG GGGSGGGGSSR RRRRRRRR	150	9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSENLV LNE	151	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	ENLVLNEGGS GGGSRRRRRR RRR	152	9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSPTG MIRIHQM	153	9	31.03%	34.48%	34.48%
CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSAA QEE	154	9	36.00%	40.00%	24.00%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSTSVG KYPNTGYYGD	155	9	27.27%	30.30%	42.42%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TSVGKYPNTGYY GDGGGGSGGGG SRRRRRRRRR	156	9	27.27%	30.30%	42.42%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSNPKL TRMLTFKFY	157	9	28.13%	31.25%	40.63%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	NPKLTRMLTFKFY GGGSGGGGSR RRRRRRRR	158	9	28.13%	31.25%	40.63%
PLK10_PEG22	KKKKKKKKKK-	159	10	31.25%	68.75%	0.00%

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
	PEG22					
ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR	N/A		9	30.25%	33.61%	36.13%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSMIAS QFLSALTLLVLLIKE SGA	160	9	22.50%	25.00%	52.50%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C	MIASQFLSALTLLV LIKESGAGGGGS GGGGSRRRRRR RRR	161	9	22.50%	25.00%	52.50%
cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSEKFIL KVRPAFKAV	162	10	31.25%	68.75%	0.00%
EPOR_mEPO_6R_N	RRRRRRRTYSCHF GPLTWVCKPQGG	163	6	25.00%	0.00%	
EPOR_mEPO_6R_C	TYSCHFGPLTWV CKPQGGRRRRRR	164	6	25.00%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_N	RRRRRRTHRPPM WSPVWP	165	6	33.33%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_C	THRPPMWSPVWP RRRRRR	166	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 AKENSGGGGSGG GGSRRRRRRRRR	170	9	19.15%	21.28%	59.57%
cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSEKFIL KVRPAFKAV	162	10			

【 手続補正 9 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 8 6

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 8 6 】

実施例 5

図 1 1 4 . 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) (P D B : 1 Z 9 2)

配列 A S N (3 3) - P R O (3 4) - L Y S (3 5) - L E U (3 6) - T H R (3 7) - A R G (3 8) - M E T (3 9) - L E U (4 0) - T H R (4 1) - P H E (4 2) - L Y S (4 3) - P H E (4 4) - T Y R (4 5) (SEQ ID NO : 1 7 3)
は、I L 2 (P D B 1 Z 9 2) から選択され、I L 2 受容体 鎖への活性結合の領域と
相関する。I L 2 R と I L 2 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 C Y S (3) - A S P (4) - A S P (5) - A S P (6) - M E T (2 5) - L E U (2 6) - A S N (2 7) - C Y S (2 8) - G L U (2 9) (S E Q I D N O : 1 8 4) は、I L 2 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 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 8 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 8 7】

図 1 1 5 : ペプチド工学 - C D 3 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 T H R (3 0) - G L Y (3 1) - A S N (5 2) - P R O (5 3) - T Y R (5 4) - L Y S (5 5) - G L Y (5 6) - V A L (5 7) - S E R (5 8) - T H R (5 9) - T Y R (1 0 1) - T Y R (1 0 2) - G L Y (1 0 3) - A S P (1 0 4) (S E Q I D N O : 1 8 5) は C D 3 抗体 (P D B 1 X I W) から選択され、C D 3 イブ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: T H R (5 9) - S E R (5 8) - V A L (5 7) - G L Y (5 6) - L Y S (5 5) - T Y R (5 4) - P R O (5 3) - A S N (5 2) - T H R (3 0) - G L Y (3 1) - T Y R (1 0 1) - T Y R (1 0 2) - G L Y (1 0 3) - A S P (1 0 4) (S E Q I D N O : 1 7 4)。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 8 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 8 8】

図 1 1 6 : ペプチド工学 - C D 4 5 グリコシル化標的指向のための新規な S I G L E C 誘導体。N - アセチルノイラミン酸 (N e u 5 A c) との複合体中のシアロアドヘシン N 末端の P D B レンダリング (R C S P D B 1 O D A)。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 C D 4 5 および他の複雑な細胞表面糖タンパク質を標的とするために利用した。T C E L L . 0 0 1 . 3 の C R I S P R R N P、ならびに B L O O D . 0 0 2 . 1 ~ B L O O D . 0 0 2 . 2 の全血リンパ球ゲートの m R N A で T 細胞の標的指向に成功した。リガンドの配列は、S N R W L D V K (S E Q I D N O : 1 7 2) である。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 8 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 8 9】

図 1 1 7 : ペプチド工学 - c - K i t 標的指向のための新規な S C F 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 (R C S P D B 1 S C F) 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しない (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: 175) (mSCF/rmSCF)
である。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0290

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0290】

図118：ペプチド工学 - 膜結合SCF標的指向のための新規cKit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-KIT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：

RRRRRRRRRRGGGGSGGGGSEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPK (SEQ ID NO: 186)

。RosettaおよびNAMDSim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

(GGSEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPK)(SEQ ID NO: 186の残基17~43)

。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0295

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0295】

青い鎖は、残基71~94：

SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 176)

の範囲の、KIT中に存在するより規則的ならせんを表した。アンカーおよびリンカーを有するKIT残基71~94のNAMDSimレーション：

RRRRRRRRRRGGGGSGGGGSSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO: 187)

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0296

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0296】

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、KIT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: 176)

。疎水性残基を除去するために配列を変更し、らせん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: 177)

。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 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0297

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0297】

図121：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、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：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：

RRRRRRRRR - GGGGSGGGGS - SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

(SEQ ID NO: 188)

。

【手続補正17】

【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】

2020502120000001.app