

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-516225

(P2023-516225A)

(43)公表日 令和5年4月18日(2023.4.18)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 N 15/88 Z Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/62 (2017.01)	A 6 1 K 47/62	
A 6 1 K 47/66 (2017.01)	A 6 1 K 47/66	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全149頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2022-564251(P2022-564251)
 (86)(22)出願日 令和3年4月23日(2021.4.23)
 (85)翻訳文提出日 令和4年12月20日(2022.12.20)
 (86)国際出願番号 PCT/US2021/028995
 (87)国際公開番号 WO2021/217100
 (87)国際公開日 令和3年10月28日(2021.10.28)
 (31)優先権主張番号 2004126
 (32)優先日 令和2年4月24日(2020.4.24)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 フランス(FR)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く

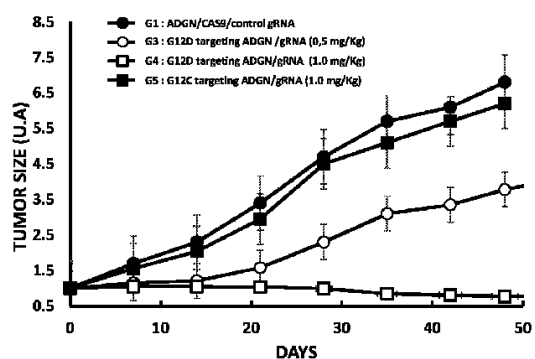
(71)出願人 514289920
 アーディジェン, エルエルシー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2
 7 2, パシフィック パリセーズ, ルナ
 ビスタ ドライブ 1 3 4 3
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 K R A S 突然変異を有するがんを処置するための組成物およびその使用

(57)【要約】

本出願は、突然変異したK R A Sを特異的に標的とするために有用なガイドRNAおよびゲノム編集複合体またはナノ粒子を提供する。例示的なゲノム編集複合体またはナノ粒子は、細胞透過性ペプチド、および必要に応じてDNAヌクレアーゼ（例えば、C a s 9）またはDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、補助的トランス活性化crRNA (t r a c r RNA) をさらに含む。一部の実施形態では、標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列は、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。

FIG. 9A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1～37、241～257 および 271 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含む、天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記ガイド RNA が、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含む、請求項 1 に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項 3】

標的配列と実質的に相補的な前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 3、19、および 34 からなる群から選択される標的配列と 100% 相補的である、請求項 3 に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項 5】

化学的に改変されている、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記ガイド RNA が、約 200 ヌクレオチド以下の長さを有する、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項 7】

a) 第 1 の細胞透過性ペプチド、および b) 突然変異した KRAS を標的とするガイド RNA を含むゲノム編集複合体であって、前記ガイド RNA が、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、ゲノム編集複合体。

【請求項 8】

DNA ヌクレアーゼまたは前記 DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 7 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 9】

前記 DNA ヌクレアーゼが、CRISPR 関連タンパク質 (Cas) ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その断片、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 8 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 10】

前記 DNA ヌクレアーゼが、Cas ポリペプチドを含む、請求項 9 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 11】

前記 Cas ポリペプチドが、Cas9 である、請求項 9 または請求項 10 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 12】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、CADDY、PEP-1 ペプチド、PEP-2 ペプチド、PEP-3 ペプチド、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、および ADGN-100 ペプチドからなる群から選択される、請求項 7 から 11 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 13】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した 1 つまたは複数の部分をさらに含み、前記 1 つまたは複数の部分が、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖、リンカー部分、および標的化部分からなる群から選択される、請

10

20

30

40

50

求項 7 から 12 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 14】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結したアセチル基を含む、請求項 13 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 15】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む、請求項 13 または請求項 14 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 16】

前記標的化ペプチドが、配列番号 196 ～ 205 および 235 ～ 240 からなる群から選択される、請求項 15 に記載のゲノム編集複合体。

10

【請求項 17】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、ポリグリシンリンカー部分、PEG 部分、Aun、Ava、および Ahx からなる群から選択されるリンカー部分を含む、請求項 7 から 16 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 18】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、N 末端から、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結した、アセチル基、標的化部分およびリンカー部分を含む、請求項 13 から 17 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 19】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、炭水化物部分をさらに含む、請求項 7 から 18 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

20

【請求項 20】

前記炭水化物部分が、GalNAc である、請求項 19 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 21】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、レトロインベルソペプチドである、請求項 7 から 20 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 22】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、配列番号 89 ～ 107、111 ～ 117、および 153 ～ 175 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 から 21 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

30

【請求項 23】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記ガイド RNA に対するモル比が、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間である、請求項 1 から 22 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 24】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 DNA ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列に対するモル比が、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間である、請求項 8 から 23 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 25】

異なるガイド配列を含む 1 つまたは複数の追加的なガイド RNA をさらに含む、請求項 7 から 24 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

40

【請求項 26】

2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、ある単一の KRAS 突然変異を標的とする、請求項 25 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 27】

前記 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、2 つまたはそれよりも多くの異なる KRAS 突然変異を標的とする、請求項 26 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 28】

前記 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、G12D、

50

G 1 2 V、および／または G 1 2 C を標的とする、請求項 2 6 または 2 7 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 2 9】

前記ゲノム編集複合体の平均直径が、約 1 0 n m から約 3 0 0 n m の間である、請求項 1 から 2 8 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 3 0】

請求項 1 から 2 9 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子。

【請求項 3 1】

請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載のガイド RNA、請求項 7 から 2 9 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体、または請求項 3 0 に記載のナノ粒子、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 2】

2 つまたはそれよりも多くのナノ粒子を含み、前記 2 つまたはそれよりも多くのナノ粒子が、異なる K R A S 突然変異を標的とする、異なるガイド RNA を含む、請求項 3 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

請求項 7 から 2 9 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を調製する方法であって、前記第 1 の細胞透過性ペプチドを前記ガイド RNA と組み合わせ、それにより、前記ゲノム編集複合体を形成するステップを含む方法。

【請求項 3 4】

細胞における突然変異した K R A S を改変する方法であって、前記細胞に請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載のガイド RNA、請求項 7 から 2 9 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体、または請求項 3 0 に記載のナノ粒子を接触させるステップを含む方法。

【請求項 3 5】

個体におけるがんを処置する方法であって、個体に請求項 3 1 または 3 2 に記載の医薬組成物を有効量で投与するステップを含む方法。

【請求項 3 6】

第 2 の薬剤を投与するステップをさらに含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願に対する相互参照

本出願は、その内容全体があらゆる目的に関して参照により組み込まれる、2 0 2 0 年 4 月 2 4 日出願の仏国特許出願番号 F R 2 0 0 4 1 2 6 号の優先権を主張するものである。

【0 0 0 2】

出願の技術分野

本出願は、突然変異した K R A S を特異的に標的とするために有用なガイド RNA およびゲノム編集複合体またはナノ粒子に関する。

【0 0 0 3】

A S C I I テキストファイルでの配列表の提出

A S C I I テキストファイルでの以下の提出の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読形態（C R F）（ファイル名：7 3 7 3 7 2 0 0 0 1 2 4 1 S E Q L I S T . T X T、記録日：2 0 2 1 年 4 月 2 3 日、サイズ：8 7 K B）。

【背景技術】

【0 0 0 4】

出願の背景

10

20

30

40

50

RASサブファミリーのメンバーであるKRASは、非常に致死性の高い肺がん、結腸がん、および膵臓がんを含むがんにおいて最も突然変異頻度の高い発癌遺伝子である (Cox et al. 2014 Nat Rev Drug Discov 13, 828)。KRASにおける活性化突然変異は、がんの開始、伝播、および維持において重大な役割を果たし、重要な治療標的となる (Cox et al. 2014)。通常のがんに関連する突然変異は、KRASのグリシンをコードするコドン12において生じる。具体的には、単一ヌクレオチドミセンス置換c. 35 G>Tおよびc. 35 G>Aによって、12位のグリシンが、それぞれ、バリン (G12V) およびアスパラギン酸 (G12D) と置き換えられる。G12VおよびG12Dの置換は、膵臓腺癌 (それぞれ、30%および51%) および結腸直腸腺癌 (それぞれ、27%および45%) において最も一般的に観察される突然変異の1つであり、予後不良に関連している (Jones, S. et al. 2008, Science 321, 1801; Wood, L. D. et al. 2007, Science 318, 1108)。

10

【0005】

今日、KRAS突然変異を標的とする強力な戦略に対して差し迫った必要性がある。RAS依存性がんを標的とするために、いくつかの試みがなされてきたが、RASタンパク質の直接的阻害は成功したことがなく、アプローチのほとんどは、突然変異したRASの下流のエフェクターに影響を及ぼすものであった。KRAS (G12C) 特異的阻害剤 (Patricelli et al. 2016 Cancer Discov 6: 316) および非突然変異選択的RAS結合ドメイン阻害剤 (Athuluri-Divakar et al. 2016, Cell 165: 643) の近年の開発により、突然変異したRAS発癌遺伝子を直接的に標的とする可能性が示された。突然変異したRAS発癌遺伝子を直接的に標的とすることは、異常なRASタンパク質とそれらの下流のエフェクター経路の両方の機能を崩壊させる可能性を有する。しかし、この化学物質を生成することはその複雑な構造によって困難であり、突然変異特異的阻害は、KRAS (G12C) よりも高い頻度で生じるKRAS (G12D) またはKRAS (G12V) に対して小分子を使用して達成されなかった。突然変異体KRAS mRNAを選択的に阻害する低分子干渉RNA (siRNA) を使用するKRASサイレンシングも報告されているが、KRAS突然変異体の継続的発現を考慮すると、完全なノックダウンを維持するために (Brummelkamp et al. 2002 Cancer Cell 2: 243)、標的RNA抑制には永続的送達が必要とされる (Zorde Khvalevsky et al. 2013 Proc Natl Acad Sci 110: 20723)。

20

30

本明細書で言及される全ての刊行物、特許、特許出願および公開特許出願の開示は、これによりそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Cox et al. 2014 Nat Rev Drug Discov 13, 828

【非特許文献2】Jones, S. et al. 2008, Science 321, 1801

【非特許文献3】Wood, L. D. et al. 2007, Science 318, 1108

【非特許文献4】Patricelli et al. 2016 Cancer Discov 6: 316

【非特許文献5】Athuluri-Divakar et al. 2016, Cell 165: 643

40

【非特許文献6】Brummelkamp et al. 2002 Cancer Cell 2: 243

【非特許文献7】Zorde Khvalevsky et al. 2013 Proc Natl Acad Sci 110: 20723

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

出願の簡単な概要

本出願は、一態様において、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドR

50

N Aを含む、天然に存在しないポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、ガイドRNAは、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含む。一部の実施形態では、標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列は、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的である。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号3、19、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的である。

【0008】

上記の天然に存在しないポリヌクレオチドのうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、化学的に改変されている。

【0009】

上記の天然に存在しないポリヌクレオチドのうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、ガイドRNAは、約200ヌクレオチド以下の長さを有する。

【0010】

本出願は、別の態様では、a) 第1の細胞透過性ペプチド、およびb) 突然変異したKRASを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体であって、ガイドRNAが、上記のポリヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む、ゲノム編集複合体を提供する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNAヌクレアーゼまたはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、CRISPR関連タンパク質(Cas)ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その断片、およびそれらの組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Casポリペプチドを含む。一部の実施形態では、Casポリペプチドは、Cas9またはCas12aである。

【0011】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。

【0012】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した1つまたは複数の部分をさらに含み、1つまたは複数の部分は、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖、リンカー部分、および標的化部分からなる群から選択される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号196～205および235～240からなる群から選択される。

【0013】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG部分、Aun、Ava、およびAhxからなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、PEG部分は、2～7個のエチレングリコール単位からなる。

【0014】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、N末端から、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した、アセチル基、標的化部分およびリンカー部分を含む。

10

20

30

40

50

【0015】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのC末端に共有結合により連結した1つまたは複数の部分をさらに含み、1つまたは複数の部分は、システアミド、システイン、チオール、アミド、必要に応じて置換されているニトリロ三酢酸、カルボキシル、必要に応じて置換されている直鎖状または分枝 (ramified) C₁~C₆アルキル、第一級または第二級アミン、オシド誘導体、脂質、リン脂質、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖、リンカー部分および標的化部分からなる群から選択される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、そのC末端に共有結合により連結したシステアミド基を含む。

10

【0016】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、炭水化物部分をさらに含む。一部の実施形態では、炭水化物部分は、GalNAcである。

【0017】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、レトロインベルソペプチドである。

【0018】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号44~195からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135~175、259~260、および267~269からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63~117、261~266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0019】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1:1から約80:1の間である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約2:1から約50:1の間である。

【0020】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1:1から約80:1の間である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約2:1から約50:1の間である。

30

【0021】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。

【0022】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。

40

【0023】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、異なるガイド配列を含む1つまたは複数の追加的なガイドRNAをさらに含む。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くのガイドRNAのうちの少なくとも2つは、ある単一のKRAS突然変異を標的とする。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くのガイドRNAのうちの少なくとも2つは、2つまたはそれよりも多くの異なるKRAS突然変異を標的とする。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くのガイドRNAのうちの少なくとも2つは、G12D、G12V、および／またはG12Cを

50

標的とする。

【0024】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、ゲノム編集複合体の平均直径は、約10nmから約300nmの間である。

【0025】

本出願は、別の態様では、上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つを含むコアを含むナノ粒子を提供する。一部の実施形態では、コアは、上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つなどの1つまたは複数の追加的なゲノム編集複合体をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の追加的なゲノム編集複合体は、異なるKRAS突然変異を標的とする少なくとも1つまたは複数のガイドRNAを含む。一部の実施形態では、コアは、第2の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、第2の細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第2の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第2の細胞透過性ペプチドは、配列番号44~175からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0026】

上記のナノ粒子のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、ナノ粒子内の第2の細胞透過性ペプチドは、連結部分によって標的化部分に共有結合により連結している。

20

【0027】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、コアは、末梢細胞透過性ペプチドを含む殻でコーティングされている。一部の実施形態では、末梢細胞透過性ペプチドは、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、末梢細胞透過性ペプチドは、配列番号44~175からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0028】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、殻内の末梢細胞透過性ペプチドは、連結部分によって標的化部分に共有結合により連結されている。

30

【0029】

上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つによる一部の実施形態では、ナノ粒子の平均直径は、約10nmから約400nmの間である。

【0030】

本出願は、別の態様では、上記のガイドRNAのうちのいずれか1つ、ゲノム編集複合体のうちのいずれか1つ、またはナノ粒子のうちのいずれか1つ、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、組成物は、2つまたはそれよりも多くのナノ粒子を含み、2つまたはそれよりも多くのナノ粒子は、異なるKRAS突然変異を標的とする異なるガイドRNAを含む。

40

【0031】

本出願は、別の態様では、上記のゲノム編集複合体のうちのいずれか1つを調製する方法であって、第1の細胞透過性ペプチドをガイドRNAと組み合わせ、それにより、ゲノム編集複合体を形成するステップを含む方法を提供する。

【0032】

本出願は、別の態様では、細胞における突然変異したKRASを改変する方法であって、細胞に上記のガイドRNAのうちのいずれか1つ、ゲノム編集複合体のうちのいずれか1つ、またはナノ粒子のうちのいずれか1つを接触させるステップを含む方法を提供する。

【0033】

50

本開示は、別の態様では、個体におけるがんを処置する方法であって、個体に上記の医薬組成物のうちのいずれか1つを有効量で投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、第2の薬剤を投与するステップをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1A～1Bは、SW403、SW480、およびHT-29細胞に対する、KRAS 35G>T突然変異体G12V KRASを標的とするgRNAの評価を示す。がん細胞を、異なるADGN/Cas9mRNA/gRNA (0.15 μg/0.2 μg) 複合体で処置した。図1Aは、T7E1法によってトランスフェクションの72時間後に評価した、異なる細胞株中の内因性標的配列におけるインデル頻度を示す。図1Bは、GlowMax上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した細胞増殖を示す。

10

【0035】

【図2】図2A～2Bは、Panc1、LS513、PK-45H、PK-1、HS-68およびHT-29細胞に対する、KRAS 35G>A突然変異体G12D KRASを標的とするgRNAの評価を示す。がん細胞を、異なるADGN/Cas9mRNA/gRNA (0.15 μg/0.2 μg) 複合体で処置した。図2Aは、T7E1法によってトランスフェクションの72時間後に評価した、異なる細胞株中の内因性標的配列におけるインデル頻度を示す。図2Bは、GlowMax上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した細胞増殖を示す。

20

【0036】

【図3】図3A～3Bは、Mia-PACA、H-23、H-358、PANC1およびHT-29細胞に対する、KRAS 35G>A突然変異体G12D KRASを標的とするgRNAの評価を示す。がん細胞を、異なるADGN/Cas9mRNA/gRNA (0.15 μg/0.2 μg) 複合体で処置した。図3Aは、T7E1法によってトランスフェクションの72時間後に評価した、異なる細胞株中の内因性標的配列におけるインデル頻度を示す。図3Bは、GlowMax上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した細胞増殖を示す。

【0037】

【図4】図4A～4Bは、異なる細胞株に対する、KRAS 35G>A、KRAS 35G>T、KRAS 34G>T突然変異体を標的とするgRNAの評価を示す。SW403、SW480、PANC1、PK-45H、PK-1、MIA-PACA、NIH-H23、H358、HT-29、PC-9、HS-68およびLS513細胞を、ADGN/Cas9mRNA/gRNA (0.4 μg) で処置した。図4Aは、T7E1法によってトランスフェクションの72時間後に評価した、異なる細胞株中の内因性標的配列におけるインデル頻度を示す。図4Bは、GlowMax上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した細胞増殖を示す。

30

【0038】

【図5】図5A～5Bは、KRASシグナル伝達経路に対する、G12DおよびG12V突然変異体を標的とするリードgRNAの影響を示す。図5Aは、PANC-1細胞に対する、KRAS 35G>A突然変異体G12D KRASを標的とするgRNAの評価を示す。図5Bは、SW403細胞に対する、KRAS 35G>T突然変異体G12V KRASを標的とするgRNAの評価を示す。ウエスタンブロット分析（上）および定量化（下）。

40

【0039】

【図6】図6は、異なるADGN-ペプチドと会合させたCAsmRNA/gRNAのin vivo 静脈内投与後の、異なる組織および腫瘍におけるELISAによるCas9タンパク質発現の定量化を示す。

【0040】

【図7】図7A～7Bは、ADGN-100 Hy3 (図7A) およびADGN-100

50

ーHy 7 (図7B) ペプチドと会合させたCAS mRNA/gRNAのin vivo IV投与後の、異なる組織および腫瘍におけるELISAによるCas9タンパク質発現の定量化を示す。

【0041】

【図8】図8A～8Bは、ADGN-Hy-3/mRNA Cas9/gRNAおよびADGN-Hy 7/mRNA Cas9:gRNA複合体で静脈内処置したマウスにおけるCas9-mRNAの血漿濃度を示す。Panc1腫瘍を有するマウスを、0.2mg/kg、0.5mg/kgおよび1.0mg/kgのADGN/mRNA Cas9/gRNAナノ粒子の単回注射で処置した。血漿中のCas9 mRNAレベルを、Quantigen bDNA法によって分析した。グラフは平均値を示す(n=4)。ピコグラムでの計算された量を、溶解物中の血漿の量およびプレートに適用された溶解物の量に対して正規化した。

10

【0042】

【図9】図9A～9Bは、膵臓腫瘍モデルにおけるADGN/Cas9/gRNA35A5のin vivoでの効力を示す。3週間の期間を処置の開始前に経過させて、PANC1腫瘍を発生させた。4つの群のマウスを同定した：未処置対照マウス(G1)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 0.5mg/kg(G3)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 1.0mg/kg(G4)およびADGN-100Hy3/mRNA/gRNA34T6 1.0mg/kg(G5)。動物(群当たり動物6匹)に、0日目および7日目に静脈内(尾部静脈)注射した。腫瘍サイズを、生物発光イメージングによって1週間に1回評価した。図9Aおよび9Bは、0日目、15日目および30日目の異なる群についての生物発光イメージング(図9B)および総発光の定量化(図9A)を示す。

20

【0043】

【図10】図10は、結腸直腸腫瘍モデルにおけるADGN/Cas9/gRNA35T3のin vivoでの効力を示す。10日間の期間を処置の開始前に経過させて、SW403腫瘍を発生させた。4つの群のマウスを同定した：未処置対照マウス(G1)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35T3 0.5mg/kg(G5)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35T3 1.0mg/kg(G7)およびADGN-100Hy3/mRNA/gRNA34T6 1.0mg/kg(G6)。動物(群当たり動物6匹)に、0日目および7日目に静脈内(尾部静脈)注射した。腫瘍サイズを、キャリパーを使用して、1週間に1回評価した。

30

【0044】

【図11】図11A～11Bは、膵臓腫瘍マウスモデルにおけるADGN/Cas9/gRNA35A5およびアブラキサンとの共処置のin vivoでの効力を示す。3週間の期間を処置の開始前に経過させて、PANC1腫瘍を発生させた。7つの群のマウスを同定した：未処置対照マウス(G1)、ADGN/mRNA Cas9/対照gRNA(G2)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 0.5mg/kg(G3)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 1.0mg/kg(G4)、アブラキサン(50μg)およびADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 0.5mg/kg(G5)、アブラキサン(50μg)およびADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 1.0mg/kg(G6)、ならびにアブラキサン(50μg)のみ(G7)。G2～G6について、動物(群当たり動物6匹)に、ADGN/Cas9:sgRNAを、0日目および7日目に静脈内(尾部静脈)注射した。G5～G7について、動物に、アブラキサン(50μg)を1週間に1回静脈内(尾部静脈)注射した。腫瘍サイズを、生物発光イメージングによって1週間に1回評価した。図11Aおよび11Bは、0日目、15日目および30日目の異なる群についての生物発光イメージングおよび総発光の定量化を示す。

40

【0045】

【図12】図12は、結腸直腸腫瘍マウスモデルにおけるADGN/Cas9/gRNA

50

35T3およびカペシタビンの共処置の *in vivo* での効力を示す。7つの群のマウスを同定した：未処置対照マウス (G1)、ADGN/mRNA Cas9/対照gRNA (G2)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35T3 0.5mg/kg (G3)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35T3 1.0mg/kg (G4)、カペシタビン (200μg) (G5)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA34T3 1.0mg/kg (G6)、ならびにカペシタビン (200μg) およびADGN-100Hy3/mRNA/gRNA34T3 0.5mg/kg (G7)。動物 (群当たり動物6匹) に、SW403腫瘍を前もって接種し、0日目および7日目のADGN/Cas9/gRNA複合体 (G2~G4、G6、およびG7) ならびに1週間に1回のカペシタビン (200μg) (G5およびG7) のIV尾部静脈注射によって処置した。腫瘍サイズを、キャリパーを使用して、1週間に1回評価した。

10

【0046】

【図13】図13A~13Bは、処置後の異なる組織および腫瘍における候補ハウスキーピング遺伝子の発現レベルを示す。動物 (群当たり動物6匹) に、PANC1腫瘍細胞 (図13A) またはSW403腫瘍細胞 (図13B) を接種し、次いで、ADGN/Cas9/gRNA複合体を、0日目および7日目に静脈内 (尾部静脈) 注射した。

【0047】

【図14】図14A~14Bは、PANC1およびSW403腫瘍に対する、KRAS 35G>AおよびKRAS 35G>T突然変異体を標的とするgRNAに関連する遺伝子編集のレベルを示す。処置の50日後に、PANC1およびSW403腫瘍中の内因性標的配列におけるインデル頻度を、ディープシーケンシングによって決定し、未処置のマウスと比較した。

20

【0048】

【図15】図15A~15Bは、PANC1 (図15A) およびSW403腫瘍 (図15B) 中のKRASシグナル伝達経路に対する、KRAS 35G>AおよびKRAS 35G>T突然変異体を標的とするADGN/Cas9/gRNAの *in vivo* 処置の影響を示す。

【0049】

【図16】図16A~16Bは、PANC1腫瘍細胞 (図16A) またはSW403腫瘍細胞 (図16B) を接種した動物における動物体重に対する、KRAS 35G>AおよびKRAS 35G>T突然変異体を標的とするADGN/Cas9/gRNAの *in vivo* 処置の影響を示す。

30

【0050】

【図17】図17A~17Dは、PANC1腫瘍細胞を接種した動物における肝臓および腎臓マーカーに対する、KRAS 35G>A突然変異体を標的とするADGN/Cas9/gRNAの *in vivo* 処置の影響を示す。4つの群のマウスを同定した：未処置対照マウス (G1)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 0.5mg/kg (G2)、ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 1.0mg/kg (G3) およびADGN-100Hy3/mRNA/gRNA34T6 1.0mg/kg (G4)。動物 (群当たり動物6匹) に、ADGN/Cas9/gRNA複合体を、0日目および7日目に静脈内 (尾部静脈) 注射した。血液試料を、D7、D15およびD30に、ヘパリン処置した管中に収集し、血中尿素窒素 (BUN) (図17D)、クレアチニン (図17C)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (図17A)、およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) (図17B) の血漿濃度について分析した。

40

【0051】

【図18】図18は、KRAS野生型またはG12D、G12V、もしくはG12C突然変異を有するKRASを標的とするsgRNAの設計のための種々の標的配列を示す。

【0052】

【図19】図19A~19Bは、DLS NanoZS (Malvern Ltd) で測

50

定したADGN／mRNA／gRNA複合体の粒子サイズと凝集のレベルとを示す。ADGN-Hy3／mRNA／gRNA粒子を、5%グルコースまたはDMEMのいずれか中に、モル比20／1／1で調製した。データを、強度によるサイズ分布（図19A）および体積によるサイズ分布（図19B）で報告する。

【0053】

【図20】図20は、異なる細胞株に対する、KRAS 35G>T突然変異体を標的とするADGN-121 gRNAの評価を示す。SW403、SW480、PANC1、LS-513、HT-29、H-441、およびH-2444細胞を、1日目に、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN-121（ADGN／mRNACas9-gRNA）複合体（0.1nM～10μM）で処置した。細胞増殖を、GlowMax（Promega）上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

10

【0054】

【図21】図21は、異なる細胞株に対する、KRAS 35G>A突然変異体を標的とするADGN-123 gRNAの評価を示す。PANC1、PK-45H、PK-1、ASPC-1、MIA-PACA、LS-513、H358、HT-29、およびH-441細胞を、1日目に、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN-123（ADGN／mRNACas9-gRNA）複合体（0.1nM～10μM）で処置した。細胞増殖を、GlowMax（Promega）上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

20

【0055】

【図22】図22は、異なる細胞株に対する、KRAS 34A>T突然変異体を標的とするADGN-122 gRNAの評価を示す。SW403、PANC1、H358、CALU-1、H-2122、H-441、MIA-PACA、およびH-1299細胞を、1日目に、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN-122（ADGN／mRNACas9-gRNA）複合体（0.1nM～10μM）で処置した。細胞増殖を、GlowMax（Promega）上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

【0056】

【図23】図23は、異なる細胞株に対する、KRAS 34A>T突然変異体を標的とするAMG-510およびADGN-122の評価を示す。H358、CALU-1、MIA-PACAおよびH-2122細胞を、1日目に、ADGN-122（ADGN／mRNACas9-gRNA）複合体およびAMG-510（0.1nM～1000nM）で処置した。細胞増殖を、GlowMax（Promega）上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

30

【0057】

【図24】図24は、突然変異体KRAS遺伝子およびまたは突然変異体p53遺伝子を持つがん細胞株を列挙する表を示す。

【0058】

【図25】図25は、がん細胞株におけるADGN-121のIC₅₀およびCC₅₀パラメータを示す。

40

【0059】

【図26】図26は、がん細胞株におけるADGN-123のIC₅₀およびCC₅₀パラメータを示す。

【0060】

【図27】図27は、がん細胞株におけるADGN-122のIC₅₀およびCC₅₀パラメータを示す。

【0061】

【図28】図28は、がん細胞株におけるADGN-122およびAMG-510のIC₅₀パラメータを示す。

50

【発明を実施するための形態】

【0062】

出願の詳細な説明

本出願は、一態様では、特定のKRAS突然変異配列（G12V、G12D、またはG12C突然変異を有するKRASなど）を標的とする新規ガイドRNAを提供する。実施例において実証されるように、例示的なガイドRNAは、KRAS野生型配列に影響を及ぼさずに、特定の突然変異（例えば、G12V、G12D、またはG12C）を有するKRAS遺伝子を特異的に標的とすることができた。

【0063】

本出願は、別の態様では、本明細書に記載のa)第1の細胞透過性ペプチド、およびb)ガイドRNAを含むゲノム編集複合体を提供する。実施例において実証されるように、本明細書に記載されている細胞透過性ペプチドおよびガイドRNAを含む例示的なゲノム編集複合体の投与によって、いずれの重大な毒性、オフターゲット効果または他のKRAS突然変異の出現も誘導することなく、KRAS突然変異を有する腫瘍を有する個体を処置するのに成功した。一部の場合には、例示的なゲノム編集複合体の1回または2回の投与によって完全な腫瘍退縮がもたらされた。

【0064】

ゲノム編集複合体を含むナノ粒子、ガイドRNA、ゲノム編集複合体またはナノ粒子を調製および使用する方法、ならびに本方法のための有用なキットおよび製造品も本発明で提供される。

I. 定義

【0065】

「ガイドRNA」という用語は、RNA編集によって細胞において標的DNAを切断するか、挿入するか、または連結させるポリヌクレオチドを指す。ガイドRNAは、一本鎖ガイドRNA（sgRNA）であってもよい。ガイドRNAは、標的ヌクレオチド配列に対して特異的なCRISPR RNA（crRNA）であってもよい。ガイドRNAは、Cas9ヌクレアーゼと相互作用するトランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含んでもよい。tracrRNAは、ループ構造を形成するポリヌクレオチドを含んでもよい。ガイドRNAは、10ヌクレオチド〜30ヌクレオチドの長さを有してもよい。ガイドRNAは、例えば、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、25ヌクレオチド、26ヌクレオチド、27ヌクレオチド、28ヌクレオチド、29ヌクレオチド、または30ヌクレオチドの長さを有してもよい。

【0066】

ガイドRNAは、RNA、DNA、PNA、またはこれらの組合せを含んでもよい。ガイドRNAは、化学的に改変されていてもよい。

【0067】

ガイドRNAは、分子はさみ（プログラム可能なヌクレアーゼ）の構成成分であってもよい。分子はさみは、ゲノム上の特異的部位を認識および切断することが可能な全ての種類のヌクレアーゼを指す。分子はさみは、例えば、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、RNA誘導型の工学的に作製されたヌクレアーゼ（RNA-guided engineered nuclease）（RGEN）、Cpf1、およびAgoホモログ（DNAにガイドされるエンドヌクレアーゼ）であってもよい。RGENは、標的DNAおよび構成成分としてのGasタンパク質に対して特異的なガイドRNAを含むヌクレアーゼを指す。ポリヌクレオチドは、例えば、RGENの構成成分であってもよい。

【0068】

本出願の態様では、「単一のガイドRNA」または「sgRNA」という用語は、ガイ

10

20

30

40

50

ド配列、*tracr*配列および*tracr*メイト配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。「ガイド配列」という用語は、標的部位を特定するガイドRNA内の約20bpの配列を指す。「*tracr*メイト配列」という用語は、「ダイレクトリピート」という用語と互換的に使用することができる。

【0069】

本明細書で使用される場合、「野生型」という用語は、当技術分野で当業者によって理解される用語であり、生物体、株、遺伝子または特徴の、突然変異体またはバリエーション形態とは区別される、天然に存在する典型的な形態を意味する。

【0070】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、天然に存在するものから逸脱するパターンを有する質を示すものと解釈されるべきである。

【0071】

「天然に存在しない」、「合成の」、または「工学的に作製された」という用語は、互換的に使用され、人間の手の関与を示す。この用語は、核酸分子またはポリペプチドについて言及する場合、その核酸分子またはポリペプチドが、自然界で天然に付随し、自然界で見いだされる少なくとも1つの他の構成成分を少なくとも実質的に含まないことを意味する。

【0072】

「ポリヌクレオチド」、または「核酸」は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくは塩基、および／もしくはそれらの類似体、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによってポリマーに組み入れることができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体などの修飾されたヌクレオチドを含み得る。「核酸」という用語は、本明細書で使用される場合、少なくとも2つのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含有する、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のポリマーを指し、DNAおよびRNAを含む。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、予め凝縮させたDNA、PCR産物、ベクター(PAC、BAC、YAC、人工染色体)、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、または誘導体およびこれらの群の組合せの形態であり得る。RNAは、siRNA、非対称干渉RNA(aiRNA)、マイクロRNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、RNA、ウイルスRNA(vRNA)、およびこれらの組合せの形態であり得る。核酸は、例えば、ロックド核酸(LNA)、アンロックド核酸(UNA)、およびジップ核酸(ZNA)を含めた、公知のヌクレオチド類似体または修飾された骨格残基または連結を含有する核酸を含み、これらは、合成核酸、天然に存在する核酸、および天然に存在しない核酸であり得、また、参照核酸と同様の結合特性を有する。そのような類似体の例としては、限定することなく、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド核酸(PNA)が挙げられる。特に限定がない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。別段の指定のない限り、特定の核酸配列はまた、保存的に改変されたそのバリエーション(例えば、縮退コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNP、および相補配列ならびに明確に示されている配列も暗黙のうちに包含する。具体的には、縮退コドン置換は、1つまたは複数の選択された(または全ての)コドンの第3の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって実現することができる(Batzner et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994))。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース(DNA)またはリボース(RNA)、塩基、およびリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を通じて連結している。「塩基」は、プリンおよびピリミジンを含み、これらは、天然化合物アデニン、チミン、グアニン、

10

20

30

40

50

シトシン、ウラシル、イノシン、および天然類似体、ならびにプリンおよびピリミジンの合成誘導体をさらに含み、これらとしては、これだけに限定されないが、例えば、これだけに限定されないが、アミン、アルコール、チオール、カルボキシラーゼ、およびハロゲン化アルキルなどの新しい反応性基が置かれる改変が挙げられる。「オリゴヌクレオチド」とは、本明細書で使用される場合、一般に、必ずではないが一般に約200ヌクレオチド未満の長さの、短い、一般に合成されたものであるポリヌクレオチドを指す。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、相互排他的ではない。ポリヌクレオチドに関する上記の説明は、オリゴヌクレオチドに同等かつ完全に適用可能である。

【0073】

一般に、「CRISPR系」は、CRISPR関連（「Cas」）ヌクレアーゼ（例えば、RNA誘導型エンドヌクレアーゼ、または「RGEN」）の活性に関与するタンパク質、転写物および他の分子を集合的に指し、Cas遺伝子産物、Cas遺伝子配列、tracr（トランス活性化CRISPR）配列（例えば、tracrRNAまたは活性部分的tracrRNA）、tracrメイト配列（内因性CRISPR系の文脈において「ダイレトリピート」およびtracrRNAプロセッシングによる部分的ダイレトリピートを含む）、ガイド配列（内因性CRISPR系の文脈において「スペーサー」とも称される）、またはCRISPR遺伝子座に由来する他の配列、転写物、および産物を含む。一部の実施形態では、CRISPR系の1つまたは複数の分子は、I型、II型、またはIII型のCRISPR系に由来する。一部の実施形態では、CRISPR系の1つまたは複数の分子は、内因性CRISPR系を含む特定の生物体、例えば、Streptococcus pyogenesに由来する。一般に、CRISPR系は、標的配列の部位でCRISPR複合体の形成を促進する分子（内因性CRISPR系の文脈においてプロトスペーサーとも称される）によって特徴付けられる。CRISPR複合体の形成の文脈において、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計された配列を指し、ここで、標的配列とガイド配列の間のハイブリダイゼーションは、CRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションをもたらし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性が存在するのであれば、完全な相補性は必ずしも必要とされるわけではない。標的配列は、DNAポリヌクレオチドまたはRNAポリヌクレオチドなどのいずれかのポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、標的配列は、細胞の核または細胞質内に存在する。一部の実施形態では、標的配列は、真核細胞のオルガネラ、例えば、ミトコンドリアまたはクロロプラスト内に存在し得る。標的配列を含む標的遺伝子座への組換えに使用され得る配列または鋳型は、「編集鋳型」、「編集ポリヌクレオチド」、「編集配列」、「ドナー配列」、または「ドナー核酸」と称される。本出願の態様では、外因性鋳型ポリヌクレオチドは、編集鋳型と称されてもよい。本出願の態様では、組換えは、相同組換えである。

【0074】

一般には、内因性CRISPR系の文脈において、CRISPR複合体（標的配列にハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質と複合体を形成したガイド配列を含む）の形成は、標的配列内またはその付近（例えば、標的配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれよりも多くの塩基対内）に一方または両方の鎖の切断をもたらす。野生型tracr配列の全てまたは一部（例えば、野生型tracr配列のうちの約20個または約20個よりも多く、約26個または約26個よりも多く、約32個または約32個よりも多く、約45個または約45個よりも多く、約48個または約48個よりも多く、約54個または約54個よりも多く、約63個または約63個よりも多く、約67個または約67個よりも多く、約85個または約85個よりも多く、またはそれよりも多くのヌクレオチド）を含み得る、またはそれからなり得るtracr配列はまた、ガイド配列に作動可能に連結したtracrメイト配列の全てまたは一部への、tracr配列の少なくとも一部分に沿ってのハイブリダイゼーションなどによって、CRISPR複合体の一部を形成し得る。一部の実施形態では、tracr配列は

10

20

30

40

50

、*tracr*メイト配列に対して、ハイブリダイズし、*CRISPR*複合体の形成に関与するのに十分な相補性を有する。標的配列と同様に、十分機能するのであれば、完全相補性は必要ないと考えられる。一部の実施形態では、*tracr*配列は、最適にアラインされた場合、*tracr*メイト配列の長さに沿って少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の配列相補性を有する。一部の実施形態では、*CRISPR*系の1つまたは複数の分子は、1つまたは複数の標的部位で*CRISPR*複合体の形成が起こり得るように、宿主細胞に導入される。例えば、*Cas*ヌクレアーゼ、*tracr*メイト配列に連結したガイド配列、および*tracr*配列をそれぞれ宿主細胞へと導入して、ガイド配列と相補的な宿主細胞内の標的配列における*CRISPR*複合体の形成を可能にすることができるであろう。

10

【0075】

「相補性」は、核酸の、別の核酸配列と従来のワトソン・クリック塩基対合または他の従来のものではない型のいずれかで水素結合（複数可）を形成する能力を指す。パーセント相補性は、核酸分子内の、第2の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン・クリック塩基対合）を形成することができる残基のパーセンテージを示す（例えば、10のうち5、6、7、8、9、10は、50%、60%、70%、80%、90%、および100%相補的である）。「完全に相補的」とは、核酸配列の連続した残基の全てが第2の核酸配列内の同じ数の連続した残基と水素結合することを意味する。「実質的に相補的」は、本明細書で使用される場合、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、もしくはそれよりも多くのヌクレオチドの領域にわたって少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%である相補性の程度を指す、または2つの核酸がストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを指す。

20

【0076】

本明細書で使用される場合、ハイブリダイゼーションに関する「ストリンジェントな条件」とは、標的配列との相補性を有する核酸が主に標的配列とハイブリダイズし、非標的配列と実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、一般に配列依存性であり、いくつかの因子に応じて変わる。一般に、配列が長いほど、配列がその標的配列と特異的にハイブリダイズする温度は高い。ストリンジェントな条件の非限定的な例は、Tijssen (1993). *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*. Elsevier, N.Y.に詳細に記載されている。

30

【0077】

「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化されている複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合、フーグスティーン結合、または任意の他の配列特異的様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2本の鎖、多重鎖複合体を形成する3本またはそれよりも多くの鎖、自己ハイブリダイズする単一の鎖、またはこれらの任意の組合せを含んでもよい。ハイブリダイゼーション反応は、より大規模なプロセスの1ステップ、例えば、*PCR*の開始、または酵素によるポリヌクレオチドの切断を構成し得る。所与の配列とハイブリダイズすることが可能な配列は、その所与の配列の「相補物」と称される。

40

【0078】

本明細書で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドが*DNA*鋳型から転写されるプロセス（例えば、*mRNA*もしくは他の*RNA*転写物に）および／または転写された*mRNA*がその後ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物およびコードされるポリペプチドは、集合的に、「遺伝子産物」と称され得

50

る。ポリヌクレオチドをゲノムDNAから引き出す場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。

【0079】

「対象」、「個体」、および「患者」という用語は、本明細書では、互換的に使用され、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。哺乳動物としては、これだけに限定されないが、マウス、サル、ヒト、農場動物、競技動物、および愛玩動物が挙げられる。in vivoで得られたまたはin vitroで培養された生物学的実体の組織、細胞およびそれらの後代も包含される。

【0080】

「治療剤」、「治療能のある薬剤 (therapeutic capable agent)」または「処置剤」という用語は、互換的に使用され、対象に投与されるといくらかの有益な効果を付与する分子または化合物を指す。有益な効果としては、診断決定の実施可能性；疾患、症状、障害、または病的状態の好転；疾患、症状、障害または状態発症の低減または防止；および一般に、疾患、症状、障害または病的状態を打ち消すことが挙げられる。

【0081】

本明細書で使用される場合、「処置 (treatment)」または「処置すること (treating)」は、これだけに限定されないが、治療的利益を含めた有益なまたは所望の結果を得るための手法を指す。治療的利益は、処置下にある1つまたは複数の疾患、状態、または症状に対するあらゆる治療に関連性のある改善または効果を意味する。

【0082】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果をもたらすために十分である薬剤の量を指す。治療有効量は、処置を受けている対象および疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などのうちの1つまたは複数に応じて変動し得、当業者が容易に決定することができる。この用語は、本明細書に記載のイメージング方法のいずれか1つによって検出するための画像がもたらされる用量にも当てはまる。特定の用量は、選択される特定の薬剤、従う投薬レジメン、他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、イメージングが行われる組織、および運ばれる物理的送達系のうちの1つまたは複数に応じて変動し得る。

【0083】

本明細書で使用される場合、単数形「1個の (a)」、「1個の (an)」および「その (the)」は、別段の指定のない限り、複数の参照対象を含む。

【0084】

「約」値またはパラメータへの言及は、本明細書では、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（および記載する）。例えば、「約X」に言及する記載は、「X」の記載を含む。

【0085】

本願の組成物および方法は、本明細書に記載の本願の必須の要素および限定、ならびに、本明細書に記載のまたは他の点で有用な任意の追加的なまたは必要に応じた成分、構成成分、または限定を含み得る、それからなり得る、またはそれから本質的になり得る。

【0086】

特に断りのない限り、技術用語は、従来の使用に従って使用されている。ガイドRNA

【0087】

一部の実施形態では、配列番号1~37、241~257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド（例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド）が提供される。一部の実施形態では、標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、ま

10

20

30

40

50

たは 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列は、配列番号 1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、ガイド RNA は、単一ガイド RNA (sgRNA) である。

【0088】

一部の実施形態では、配列番号 1 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の
10 実施形態では、配列番号 3 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態
20 では、配列番号 6 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態では、配
列番号 8 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態では、配列番号 15
30 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態では、配列番号 16 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態では、配列番号 19 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態では、配列番号 20 に記載されている
40 標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態では、配列番号 21 に記載されている標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 相補的) または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異した KRAS を標的とするためのガイド RNA を含むポリヌクレオチド (例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド) が提供される。一部の実施形態では、配列番号 23 に記載されている標的配列と実
50

20

50

50

%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。一部の実施形態では、配列番号27に記載されている標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。一部の実施形態では、配列番号28に記載されている標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。一部の実施形態では、配列番号30に記載されている標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。一部の実施形態では、配列番号32に記載されている標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。一部の実施形態では、配列番号35に記載されている標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。一部の実施形態では、配列番号36に記載されている標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。一部の実施形態では、配列番号37に記載されている標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)または100%相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA)を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含むポリヌクレオチド(例えば、天然に存在しないポリヌクレオチド)が提供される。

G12Vを標的とするガイドRNA

【0090】

一部の実施形態では、G12V突然変異を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA(例えば、単一ガイドRNA)であって、配列番号1~14からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)なヌクレオチド配列を含む、ガイドRNAが提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、および6~8からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、6、および8からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、および8からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3に記載されている。

【0091】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1、3、6、および8からなる群から選択される標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号3の標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0092】

一部の実施形態では、G12Vを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、42～44位のAGGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

10

【0093】

一部の実施形態では、G12Vを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、41～43位のTAGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

【0094】

一部の実施形態では、G12Vを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、36～38位のTGGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

20

【0095】

KRAS G12V突然変異は、種々の疾患（例えば、固形がんまたは骨髄異形成症候群などの液性がん）に存在した。例示的ながんとしては、肺がん（例えば、NSCLC、小細胞肺がん、扁平細胞肺がん）、結腸直腸がん、急性骨髄性白血病、膵臓がん、直腸がん、多発性骨髄腫、および神経膠腫が挙げられる。一部の実施形態では、がんは、悪性がんまたは進行がんである。本明細書に記載のガイドRNAは、上記疾患のいずれかを処置するために使用することができる（例えば、本明細書に記載の方法によって）。

G12Dを標的とするガイドRNA

30

【0096】

一部の実施形態では、G12D突然変異を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、ガイド配列が、配列番号15～28からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む、ガイドRNAが提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号15、16、19～21、および23からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号16、19～21、および23からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号19からなる群から選択される。

【0097】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号15、16、19～21、および23からなる群から選択される標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号19の標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。

40

【0098】

一部の実施形態では、G12Dを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、42～44位のAGGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

50

【0099】

一部の実施形態では、G12Dを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、41～43位のTAGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

【0100】

KRAS G12D突然変異は、様々な疾患（例えば、固形がんまたは骨髄異形成症候群などの液性がん）に存在した。例示的ながんとしては、肺がん（例えば、NSCLC、小細胞肺がん、扁平細胞肺がん）、結腸直腸がん、急性骨髄性白血病、膵臓がん、直腸がん、多発性骨髄腫、および神経膠腫が挙げられる。一部の実施形態では、がんは、悪性がんまたは進行がんである。本明細書に記載のガイドRNAは、上記疾患のいずれかを処置するために使用することができる（例えば、本明細書に記載の方法によって）。

10

G12Cを標的とするガイドRNA

【0101】

一部の実施形態では、G12C突然変異を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、ガイド配列が、配列番号29～37からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む、ガイドRNAが提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号34に記載されている。

20

【0102】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34の標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0103】

一部の実施形態では、G12Cを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、42～44位のAGGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

30

【0104】

一部の実施形態では、G12Cを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、41～43位のTAGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

【0105】

一部の実施形態では、G12Cを含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）であって、36～38位のTGGのPAM配列に隣接した標的配列と相補的なガイド配列を含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイド配列は、約20～24塩基対、20～22塩基対、または20～21塩基対の長さを有する。

40

【0106】

KRAS G12C突然変異は、様々な疾患（例えば、固形がんまたは骨髄異形成症候群などの液性がん）に存在した。例示的ながんとしては、肺がん（例えば、NSCLC、小細胞肺がん、扁平細胞肺がん）、結腸直腸がん、急性骨髄性白血病、膵臓がん、直腸がん、食道扁平上皮癌、消化管間質腫瘍、頭頸部扁平上皮がん、膵管腺癌、多発性骨髄腫、

50

および神経膠腫が挙げられる。一部の実施形態では、がんは、悪性がんまたは進行がんである。本明細書に記載のガイドRNAは、上記疾患のいずれかを処置するために使用することができる（例えば、本明細書に記載の方法によって）。

【0107】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、RNAの形態で存在する。

【0108】

他の実施形態では、ガイドRNAは、RNAをコードするDNA（すなわち、gDNA）の形態で存在する。一部の実施形態では、DNAは、プラスミドDNAである。一部の実施形態では、プラスミドDNAは、DNAヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするDNAをさらに含む。

【0109】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、DNAヌクレアーゼ動員配列をさらに含む。

【0110】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含む単一ガイドRNA（sgRNA）である。

【0111】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、tracrメイト配列、tracr配列、および／またはテール配列をさらに含む。一般に、以下のうちの1つまたは複数を促進するために、tracrメイト配列はtracr配列に対して十分な相補性を有する任意の配列を含む：（1）対応するtracr配列を含有する細胞におけるtracrメイト配列に挟まれたガイド配列の削除；および（2）標的配列におけるCRISPR複合体の形成、ここで、CRISPR複合体は、tracr配列とハイブリダイズしたtracrメイト配列を含む。一般に、相補性の程度は、tracrメイト配列とtracr配列の最適なアラインメントを参照し、2つの配列のうちの短い方の長さに沿ったものである。最適なアラインメントは、任意の適切なアラインメントアルゴリズムによって決定することができ、また、最適なアラインメントにより、tracr配列またはtracrメイト配列のいずれか内での自己相補性などの二次構造をさらに説明することができる。一部の実施形態では、最適にアラインメントした場合の2つのうちの短い方の長さに沿ったtracr配列とtracrメイト配列の相補性の程度は、約25%または約25%より大きい、約30%または約30%より大きい、約40%または約40%より大きい、約50%または約50%より大きい、約60%または約60%より大きい、約70%または約70%より大きい、約80%または約80%より大きい、約90%または約90%より大きい、約95%または約95%より大きい、約97.5%または約97.5%より大きい、約99%または約99%より大きい、またはそれよりも大きい。一部の実施形態では、tracr配列は、約5個または約5個よりも多く、約6個または約6個よりも多く、約7個または約7個よりも多く、約8個または約8個よりも多く、約9個または約9個よりも多く、約10個または約10個よりも多く、約11個または約11個よりも多く、約12個または約12個よりも多く、約13個または約13個よりも多く、約14個または約14個よりも多く、約15個または約15個よりも多く、約16個または約16個よりも多く、約17個または約17個よりも多く、約18個または約18個よりも多く、約19個または約19個よりも多く、約20個または約20個よりも多く、約25個または約25個よりも多く、約30個または約30個よりも多く、約40個または約40個よりも多く、約50個または約50個よりも多く、またはそれよりも多くのヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、ガイド配列、tracr配列およびtracrメイト配列は単一のRNA（本明細書では「単一ガイドRNA」または「sgRNA」と称される）内に含有され、したがって、tracr配列とtracrメイト配列のハイブリダイゼーションにより、ヘアピンなどの二次構造が生じる。ヘアピン構造への使用に好ましいループ形成配列は、4ヌクレオチドの長さであり、配列GAAAを有することが最も好ましい。しかし、より長いまたはより短いループ配列を代替配列として使用することもできる。配列は、ヌクレオチドトリプレット（例えば、AAA）および追加的なヌクレオチド（例えば、Cまた

10

20

30

40

50

はG)を含むことが好ましい。ループ形成配列の例としては、C A A AおよびA A A Gが挙げられる。一部の実施形態では、s g R N Aは、少なくとも2つまたはそれよりも多くのヘアピンを有する。一部の実施形態では、s g R N Aは、2つ、3つ、4つまたは5つのヘアピンを有する。一部の実施形態では、s g R N Aは、最大で5つのヘアピンを有する。一部の実施形態では、s g R N Aは、転写終結配列をさらに含み、これはポリT配列、例えば、6 Tヌクレオチドであることが好ましい。

【0112】

一部の実施形態では、ガイドR N Aは、プライマー結合配列および／または所望のR N A配列（例えば、ガイドR N Aの3'末端に）をさらに含むプライム編集ガイドR N A（p e g R N A）である。p e g R N Aは、プライムエディターと複合体を形成し（改変されたC a s 9タンパク質および逆転写酵素を含む融合タンパク質など）、それにより、標的配列のプライム編集が可能になる。例えば、Anzalone & Liu et al., Nature, 2019 Dec;576 (7785):149-157を参照されたい。

10

【0113】

一部の実施形態では、ガイドR N Aは、1つまたは複数の改変（例えば、化学的改変）を含む。一部の実施形態では、g R N Aは、核酸塩基の改変および／または主鎖の改変を含む、1つまたは複数の改変ヌクレオチドを有する。ガイドR N Aに対する例示的な改変としては、これだけに限定されないが、ホスホロチオエート主鎖改変、リボースにおける2'置換（例えば、2'-O-メチル置換および2'-フルオロ置換）、L N A、およびL-R N Aが挙げられる。一部の実施形態では、ガイドR N Aは、核酸塩基または主鎖に対する改変を有さない。

20

【0114】

一部の実施形態では、ガイドR N Aは、ガイド配列のアニールリングを促進する部分を含む。一部の実施形態では、部分は、合成ヌクレオチド配列を含み、合成配列は、約1~200ヌクレオチド、例えば約5~約100ヌクレオチド、例えば約8~約80ヌクレオチド、例えば約10~約50ヌクレオチド、例えば約12~約40ヌクレオチドである。

【0115】

一部の実施形態では、ガイドR N A（例えば、単一ガイドR N A）は、約200ヌクレオチド以下、例えば約5~約100ヌクレオチド、例えば約8~約80ヌクレオチド、例えば約10~約50ヌクレオチド、例えば約12~約40ヌクレオチドの長さを有する。

30

【0116】

以下のように記載された複合体、ナノ粒子および組成物を含むがこれだけに限定されない上記のガイドR N Aのいずれかを含む複合体、ナノ粒子、組成物も本発明で提供される。

【0117】

これだけに限定されないが、ウイルス、リボソーム、電気穿孔、微量注射およびコンジュゲーションを含む、多くの送達系が、本出願において記載されたガイドR N A、複合体、ナノ粒子、および組成物のいずれかを送達するために用いられ、g R N Aの宿主細胞への導入を達成することができる。従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子移入方法を使用して、核酸を哺乳動物細胞または標的組織中に導入することができる。このような方法を使用して、本発明のg R N Aをコードする核酸を、培養中、または宿主生物中の細胞に投与することができる。非ウイルスベクター送達系は、D N Aプラスミド、R N A（例えば、本明細書に記載の構築物の転写物）、ネイキッド核酸、およびリボソームなどの送達ビヒクルと複合体を形成した核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、D N AおよびR N Aウイルスを含み、これらは、宿主への送達のためのエピソームゲノムまたは統合ゲノムのいずれかを有する。

40

【0118】

核酸の非ウイルス送達の方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、微量注射、微粒子銃、ピロソーム、リボソーム、イムノリボソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、電気穿孔、ナノ粒子、エクソソーム、マイクロベシクル、または遺伝

50

子銃、ネイキッドDNAおよび人工ビリオンを含む。

【0119】

核酸の送達のためのRNAまたはDNAウイルスベースのシステムの使用は、特異的細胞にウイルスを標的化し、ウイルスペイロードを細胞の核に輸送する際に高い効率を有する。

複合体

【0120】

本出願は、a) 第1の細胞透過性ペプチド、ならびにb) 配列番号1~37、241~257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とするガイドRNAを含むポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体を提供する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNAヌクレアーゼ（例えば、Cas9）またはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、CRISPR関連タンパク質（Cas）ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その断片、およびそれらの組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む。

【0121】

一部の実施形態では、a) 第1の細胞透過性ペプチド、ならびにb) 配列番号1、3、4、および6~8からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含むKRAS G12Vを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、および8からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG部分、Aun、Ava、およびAhxからなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、炭水化物部分（例えば、GalNAc）をさらに含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135~175、259~260、および267~269からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-3ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号44~62からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63~117、261~266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118~134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1:1から約80:1の間（例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間）である。

一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1：1から約80：1の間（例えば、約5：1から約20：1の間、例えば、約2：1から約50：1の間）である。一部の実施形態では、Casポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイドRNAに対するモル比は、約1：10から約50：1の間（例えば、約1：1から約10：1の間）である。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNAヌクレアーゼ（例えば、Cas9）またはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0122】

一部の実施形態では、a) 第1の細胞透過性ペプチド、ならびにb) 配列番号15、16、19～21、および23からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含むKRAS G12Dを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号16、19～21、および23からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号19からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG部分、Aun、Ava、およびAhxからなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、炭水化物部分（例えば、GalNAc）をさらに含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135～175、259～260、および267～269からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-3ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号44～62からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63～117、261～266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118～134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1：1から約80：1の間（例えば、約5：1から約20：1の間、例えば、約2：1から約50：1の間）である。一部の実施形態では、Casポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1：1から約80：1の間（例えば、約5：1から約20：1の間、例えば、約2：1から約50：1の間）である。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNAヌクレアーゼ（例えば、Cas9）またはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0123】

一部の実施形態では、a) 第1の細胞透過性ペプチド、ならびにb) 配列番号29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少

なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)なヌクレオチド配列を含むKRAS G12Cを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号34に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA(tracrRNA)をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG部分、Aun、Ava、およびAhxからなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、炭水化物部分(例えば、GalNAc)をさらに含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135~175、259~260、および267~269からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-3ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号44~62からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63~117、261~266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118~134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1:1から約80:1の間(例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間)である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1:1から約80:1の間(例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間)である。一部の実施形態では、Casポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイドRNAに対するモル比は、約1:10から約50:1の間(例えば、約1:1から約10:1の間)である。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNAヌクレアーゼ(例えば、Cas9)またはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0124】

一部の実施形態では、a) ADGN-100ペプチドである第1の細胞透過性ペプチド、ならびにb) 配列番号1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的(例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的)なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135~175、259~260、および267~269からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、153~175からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、154、155、157、158、162、167~170、および172からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA(tracrRNA)をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1:1から約80:1の間(例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間)である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのCasポリペプチドをコードする

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列に対するモル比は、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間（例えば、約 5 : 1 から約 20 : 1 の間、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間）である。一部の実施形態では、Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイド RNA に対するモル比は、約 1 : 10 から約 50 : 1 の間（例えば、約 1 : 1 から約 10 : 1 の間）である。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNA ヌクレアーゼ（例えば、Cas 9）または DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0125】

一部の実施形態では、a) VEPEP-6 ペプチドである第 1 の細胞透過性ペプチド、ならびに b) 配列番号 1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 相補的）なヌクレオチド配列を含む突然変異した KRAS を標的とするガイド RNA を含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドは、配列番号 63~117、261~266 および 270 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドは、81、92~103、105~107、および 111~114 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドのガイド RNA に対するモル比は、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間（例えば、約 5 : 1 から約 20 : 1 の間、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間）である。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドの Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間（例えば、約 5 : 1 から約 20 : 1 の間、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間）である。一部の実施形態では、Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイド RNA に対するモル比は、約 1 : 10 から約 50 : 1 の間（例えば、約 1 : 1 から約 10 : 1 の間）である。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNA ヌクレアーゼ（例えば、Cas 9）または DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0126】

一部の実施形態では、a) VEPEP-9 ペプチドである第 1 の細胞透過性ペプチド、ならびに b) 配列番号 1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 相補的）なヌクレオチド配列を含む突然変異した KRAS を標的とするガイド RNA を含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドは、配列番号 118~134 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドのガイド RNA に対するモル比は、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間（例えば、約 5 : 1 から約 20 : 1 の間、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間）である。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドの Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間（例えば、約 5 : 1 から約 20 : 1 の間、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間）である。一部の実施形態では、Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイド RNA に対するモル比は、約 1 : 10 から約 50 : 1 の間（例えば、約 1 : 1 から約 10 : 1 の間）である。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNA ヌクレアーゼ（例えば、Cas

s 9) または DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0127】

一部の実施形態では、a) ADGN-100 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、または VEPEP-9 ペプチドである第1の細胞透過性ペプチド、b) 配列番号1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNA；ならびにc) DNA ヌクレアーゼ（例えば、CRISPR 関連エンドヌクレアーゼ）または DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、a) ADGN-100 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、または VEPEP-9 ペプチドである第1の細胞透過性ペプチド、b) 配列番号1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNA；ならびにc) DNA ヌクレアーゼ（例えば、CRISPR 関連エンドヌクレアーゼ）または DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100 ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135~175からなる群から選択されるアミノ酸配列（例えば、153~175からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば、154、155、157、158、162、167~170、および172からなる群から選択されるアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6 ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63~117、261~266 および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、81、92~103、105~107、および111~114からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9 ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118~134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、Cas9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、改変されたCas9（例えば、触媒的に損なわれたCas9）を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは融合タンパク質であり、融合タンパク質は、塩基編集またはプライム編集を可能にする第2の酵素をさらに含む。一部の実施形態では、第2の酵素は、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のガイドRNAは、G12V、G12D、およびG12Cから選択される少なくとも2つの異なるKRAS 突然変異を特異的に標的とする少なくとも2つのガイドRNAを含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1:1から約80:1の間（例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間）である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのCas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1:1から約80:1の間（例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間）である。一部の実施形態では、Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイドRNAに対するモル比は、約1:10から約50:1の間（例えば、約1:1から約10:1の間）である。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。

【0128】

一部の実施形態では、a) CADY、PEP-1 ペプチド、PEP-2 ペプチド、PEP-3 ペプチド、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、およびADGN-100 ペプチドからなる群から選択される第1の細胞透過性ペ

10

20

30

40

50

ブチド、ならびにb) 配列番号3に記載されている標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNAを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、a) CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される第1の細胞透過性ペプチド、b) 配列番号3に記載されている標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNA、ならびにc) DNAヌクレアーゼ(例えば、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Casポリペプチド、例えば、Cas9またはCas12a)またはDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチド、VEPEP-6ペプチド、またはVEPEP-9ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135~175からなる群から選択されるアミノ酸配列(例えば、153~175からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば、154、155、157、158、162、167~170、および172からなる群から選択されるアミノ酸配列)を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63~117、261~266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、81、92~103、105~107、および111~114からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118~134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA(tracrRNA)をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1:1から約80:1の間(例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間)である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1:1から約80:1の間(例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間)である。一部の実施形態では、Casポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイドRNAに対するモル比は、約1:10から約50:1の間(例えば、約1:1から約10:1の間)である。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。

10

20

30

40

50

【0129】

一部の実施形態では、a) CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される第1の細胞透過性ペプチド、ならびにb) 配列番号19に記載されている標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNAを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、a) CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される第1の細胞透過性ペプチド、b) 配列番号19に記載されている標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNA、ならびにc) DNAヌクレアーゼ(例えば、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Casポリペプチド、例えば、Cas9またはCas12a)またはDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチド、VEPEP-6ペプチド、またはVEPEP-9ペプチドである。一部の実施形態では、

、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135～175からなる群から選択されるアミノ酸配列（例えば、153～175からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば、154、155、157、158、162、167～170、および172からなる群から選択されるアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63～117、261～266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、81、92～103、105～107、および111～114からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118～134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1:1から約80:1の間（例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間）である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1:1から約80:1の間（例えば、約5:1から約20:1の間、例えば、約2:1から約50:1の間）である。一部の実施形態では、Casポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイドRNAに対するモル比は、約1:10から約50:1の間（例えば、約1:1から約10:1の間）である。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイドRNAは、第1の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。

10

20

30

40

50

【0130】

一部の実施形態では、a) CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される第1の細胞透過性ペプチド、ならびにb) 配列番号34に記載されている標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNAを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、a) CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される第1の細胞透過性ペプチド、b) 配列番号34に記載されている標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む突然変異したKRASを標的とする1つまたは複数のガイドRNA、ならびにc) DNAヌクレアーゼ（例えば、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Casポリペプチド、例えば、Cas9またはCas12a）またはDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体が提供される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチド、VEPEP-6ペプチド、またはVEPEP-9ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135～175からなる群から選択されるアミノ酸配列（例えば、153～175からなる群から選択されるアミノ酸配列、例えば、154、155、157、158、162、167～170、および172からなる群から選択されるアミノ酸配列）を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63～117、261～266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、81、92～103、105～107、および111～114からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9ペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118～134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA

(t r a c r R N A) をさらに含むガイド R N A。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドのガイド R N A に対するモル比は、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間（例えば、約 5 : 1 から約 20 : 1 の間、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間）である。一部の実施形態では、第 1 の細胞透過性ペプチドの C a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間（例えば、約 5 : 1 から約 20 : 1 の間、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間）である。一部の実施形態では、C a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイド R N A に対するモル比は、約 1 : 10 から約 50 : 1 の間（例えば、約 1 : 1 から約 10 : 1 の間）である。一部の実施形態では、ガイド R N A は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイド R N A は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。

10

細胞透過性ペプチド

【0131】

細胞透過性ペプチド (C P P) は、ウイルスによらない戦略の有望なものの 1 つである。C P P の定義は進化し続けているが、タンパク質またはキメラ配列に由来する 30 アミノ酸未満の短いペプチドと一般に説明される。C P P は、通常、両親媒性であり、正味の正電荷を有する (Langel U (2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Taylor & Francis, Boca Raton); Heitz et al. (2009) Br J Pharmacol 157, 195-206)。C P P は、種々の生体分子の細胞膜を横断して細胞質内への移動を誘発するため、およびそれらの細胞内経路設定を改善し、それにより、標的との相互作用を容易にするために、生体膜を透過させることができるものである。C P P は、2 つの主要なクラスに細分することができ、第 1 のクラスはカーゴとの化学的連結を必要とするものであり、第 2 のクラスは、安定な非共有結合性の複合体の形成を伴うものである。どちらの戦略の C P P も、カーゴの大きなパネル (プラスミド DNA、オリゴヌクレオチド、s i R N A、P N A、タンパク質、ペプチド、リポソーム、ナノ粒子、...) の多種多様な細胞型および i n v i v o モデルへの送達に有利であることが報告されている (Langel U (2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Taylor & Francis, Boca Raton); Heitz et al. (2009) Br J Pharmacol 157, 195-206; Mickan et al. (2014) Curr Pharm Biotechnol 15, 200-209; Shukla et al. (2014) Mol Pharm 11, 3395-3408)。

20

【0132】

タンパク質導入ドメイン (P T D) の概念は、最初に、いくつかのタンパク質、主に転写因子を細胞内におよび 1 つの細胞から別の細胞にシャトル輸送することができるという観察に基づいて提唱された (総説については Langel U (2007) Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Taylor & Francis, Boca Raton); Heitz et al. (2009) Br J Pharmacol 157, 195-206 を参照されたい)。最初の観察は 1988 年に Frankel および Pabo によってなされた。彼らは、H I V - 1 の転写トランス活性化 (T a t) タンパク質が細胞に進入し、核内に場所を移すことができることを示した。1991 年に、Prochiantz のグループが D r o s o p h i l a A n t e n n a p e d i a ホメオドメインを用いて同じ結論に達し、このドメインが神経細胞によって内部移行することを実証した。これらの研究は、1994 年の最初のタンパク質導入ドメイン: ペネトラチンと名付けられた、アンテナペディアのホメオドメインの第 3 のヘリックスに由来する 16 m e r ペプチドの発見の原点になった。1997 年には、Lebleu のグループにより、細胞内取り込みに必要な T a t の最小配列が同定され、Dowdy のグループにより、i n v i v o における P T D の適用に関する最初の概念実証が小さなペプチドおよび大きなタンパク質の送達に関して報告された (Gump JM, and Dowdy SF (2007) Trends Mol Med 13, 443-448.)。歴史的に、細胞透過性ペプチド (C P P) の概念は 1998 年に Langel のグループによって導入され、最初のキメラペプチド担体であるトランスポートタンが設計され、これは、スズメバチ毒液ペプチドであるマストパランと連結した神経ペプチドであるガラニンの N 末端断片に由来するものであった。トランスポートタンは元々、培養細胞および i n v

30

40

50

i v oの両方におけるPNA（ペプチド核酸）の送達を改善するためのものとして報告された（Langel U（2007）Handbook of Cell-Penetrating Peptides（CRC Taylor & Francis, Boca Raton））。1997年に、HeitzおよびDivitaのグループにより、カーゴの安定であるが非共有結合性の複合体の形成にCPPを伴う新しい戦略が提唱された（Morris et al.（1997）Nucleic Acids Res 25, 2730-2736）。この戦略は、まず、2つのドメイン：親水性（極性）ドメインおよび疎水性（無極性）ドメインからなる短いペプチド担体（MPG）に基づくものであった。核酸の送達のためにMPGが設計された。次いで、タンパク質およびペプチドの非共有結合性送達のために、第一次の両親媒性ペプチドPep-1が提唱された（Morris et al.（2001）Nat Biotechnol 19, 1173-1176）。次いで、WenderのグループおよびFutakiのグループにより、小さな分子および大きな分子を細胞内におよびin vivoで駆動するためにはポリアルギニン配列（Arg8）が十分であることが実証された（Nakase et al.（2004）Mol Ther 10, 1011-1022；Rothbard et al.（2004）J Am Chem Soc 126, 9506-9507）。その後ずっと、天然配列または天然でない配列に由来する多くのCPPが同定されており、その一覧は増え続けている。ペプチドは、単純ヘルペスウイルスのVP22タンパク質から、カルシトニンから、抗菌薬または毒素ペプチドから、細胞周期の調節に関与するタンパク質から、ならびにポリプロリンリッチペプチドから引き出されている（Heitz et al.（2009）Br J Pharmacol 157, 195-206）。つい最近、第二次の両親媒性CPPに基づく新しい非共有結合性戦略が記載されている。CADDYおよびVEPEP-ファミリーなどのこれらのペプチドは、分子の異なる側面にある親水性残基および疎水性残基を用いてヘリックス形状に自己組織化することができる。WO2014/053879にはVEPEP-3ペプチドが開示されており、WO2014/053881にはVEPEP-4ペプチドが開示されており、WO2014/053882にはVEPEP-5ペプチドが開示されており、WO2012/137150にはVEPEP-6ペプチドが開示されており、WO2014/053880にはVEPEP-9ペプチドが開示されており、WO2016/102687にはADGN-100ペプチドが開示されており、US2010/0099626にはCADDYペプチドが開示されており、米国特許第7,514,530号にはMPGペプチドが開示されている；その開示は、これによりそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0133】

本出願のゲノム編集複合体またはナノ粒子内の細胞透過性ペプチドは、ヌクレアーゼ（例えば、ZFN、TALEN、およびCRISPR関連ヌクレアーゼ（例えば、Cas9およびCpf1））、インテグラーゼ（例えば、バクテリオファージインテグラーゼ、例えば、φC31）、および核酸（例えば、ガイドRNA、ガイドDNA、およびドナー核酸）などのゲノム編集システムの種々の分子と安定な複合体およびナノ粒子を形成することができるものである。本明細書に記載の任意のゲノム編集複合体またはナノ粒子の任意の細胞透過性ペプチドは、この節に記載されている任意の細胞透過性ペプチド配列を含み得る、またはそれからなり得る。

【0134】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、CADDY、PEP-1、MPG、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-4ペプチド、VEPEP-5ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される細胞透過性ペプチドを含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ゲノム編集複体内に存在する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在するゲノム編集複体内に存在する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、DNAヌクレアーゼ（例えば、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9）と結び付いている。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、gRNAと結び付いてい

る。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイドRNAと結び付いている。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ドナー核酸と結び付いている。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ナノ粒子の中間層内に存在する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ナノ粒子の表層内に存在する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。WO2014/053879にはVEPEP-3ペプチドが開示されており、WO2014/053881にはVEPEP-4ペプチドが開示されており、WO2014/053882にはVEPEP-5ペプチドが開示されており、WO2012/137150にはVEPEP-6ペプチドが開示されており、WO2014/053880にはVEPEP-9ペプチドが開示されており、WO2016/102687にはADGN-100ペプチドが開示されており、US2010/0099626にはCADYペプチドが開示されており、米国特許第7,514,530号にはMPGペプチドが開示されている；その開示は、これによりそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

VEPEP-3ペプチド

【0135】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_2X_3X_4X_6X_7X_3X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$ （配列番号44）を含むVEPEP-3細胞透過性ペプチドを含み、ここで、 X_1 は、ベーターA（「ベーターアラニン」）またはSであり、 X_2 は、K、RまたはLであり（互いに独立に）、 X_3 は、FまたはWであり（互いに独立に）、 X_4 は、F、WまたはYであり（互いに独立に）、 X_5 は、E、RまたはSであり、 X_6 は、R、TまたはSであり、 X_7 は、E、R、またはSであり、 X_8 は、存在しないか、FまたはWであり、 X_9 は、PまたはRであり、 X_{10} は、RまたはLであり、 X_{11} は、K、WまたはRであり、 X_{12} は、RまたはFであり、 X_{13} は、RまたはKである。一部の実施形態では、VEPEP-3ペプチドは、アミノ酸配列 $X_1X_2WX_4EX_2WX_4X_6X_7X_3PRX_{11}RX_{13}$ （配列番号45）を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSであり、 X_2 は、K、RまたはLであり、 X_3 は、FまたはWであり、 X_4 は、F、WまたはYであり、 X_5 は、E、RまたはSであり、 X_6 は、R、TまたはSであり、 X_7 は、E、R、またはSであり、 X_8 は、存在しないか、FまたはWであり、 X_9 は、PまたはRであり、 X_{10} は、RまたはLであり、 X_{11} は、K、WまたはRであり、 X_{12} は、RまたはFであり、 X_{13} は、RまたはKである。一部の実施形態では、VEPEP-3ペプチドは、アミノ酸配列 $X_1KWFERWFREWPRKR$ （配列番号46）、 $X_1KWWERWWREWPRKR$ （配列番号47）、 $X_1KWWERWWREWPRKRK$ （配列番号48）、 $X_1RWWKWWTRWPRKRK$ （配列番号49）、または $X_1RWYEKWT EFP RRRR$ （配列番号50）を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSである。一部の実施形態では、VEPEP-3ペプチドは、配列番号1~7のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、ここで、細胞透過性ペプチドは、10位のアミノ酸の非天然アミノ酸による置換え、2位のアミノ酸と3位のアミノ酸の間への非天然アミノ酸の付加、および2つの非天然アミノ酸の間の炭化水素連結の付加によって改変されている。一部の実施形態では、VEPEP-3ペプチドは、アミノ酸配列 $X_1KX_{14}WWE R W W R X_{14}W P R K R K$ （配列番号51）を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSであり、 X_{14} は、非天然アミノ酸であり、また、2つの非天然アミノ酸の間に炭化水素連結が存在する。一部の実施形態では、VEPEP-3ペプチドは、アミノ酸配列 $X_1X_2X_3WX_5X_{10}X_3WX_6X_7WX_8X_9X_{10}WX_{12}R$ （配列番号52）を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSであり、 X_2 は、K、RまたはLであり、 X_3 は、FまたはWであり、 X_5 は、RまたはSであり、 X_6 は、RまたはSであり、 X_7 は、RまたはSであり、 X_8 は、FまたはWであり、 X_9 は、RまたはPであり、 X_{10} は、LまたはRであり、 X_{12} は、RまたはFである。一部の実施形態では、VEPEP-3ペプチドは、アミノ酸配列 $X_1RWWRLWWR SWFRLWRR$ （配列番号53）、 $X_1LWWR R W W$

20

30

40

50

S R W W P R W R R (配列番号 54)、 X_1 L W W S R W W R S W F R L W F R (配列番号 55)、または X_1 K F W S R F W R S W F R L W R R (配列番号 56)を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSである。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、配列番号 44 および 52 ~ 56 のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、ここで、細胞透過性ペプチドは、5位および12位のアミノ酸の非天然アミノ酸による置換え、および2つの非天然アミノ酸の間の炭化水素連結の付加によって改変されている。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、アミノ酸配列 X_1 R W W X_{14} L W W R S W X_{14} R L W R R (配列番号 57)を含み、ここで、 X_1 は、ベータアラニンまたはセリンであり、 X_{14} は、非天然アミノ酸であり、また、2つの非天然アミノ酸の間に炭化水素連結が存在する。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、アミノ酸配列ベーターA K W F E R W F R E W P R K R R (配列番号 58)を含む。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、アミノ酸配列ベーターA K W W E R W W R E W P R K R R (配列番号 59)を含む。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、アミノ酸配列A S S L N I A-A v a-K W W E R W W R E W P R K R R (配列番号 60)を含む。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、アミノ酸配列L S S R L D A-A v a-K W W E R W W R E W P R K R R (配列番号 61)を含む。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、アミノ酸配列A c-S Y T S S T M-a v a-K W W E R W W R E W P R K R R (配列番号 62)を含む。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子のコア内のゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在する。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイドRNAと結び付いている。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイドRNAと結び付いている。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイドRNAと結び付いている。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ドナー核酸と結び付いている。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子の中間層内に存在する。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、ナノ粒子の表層内に存在する。一部の実施形態では、V E P E P-3ペプチドは、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。

V E P E P-6ペプチド

【0136】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、V E P E P-6細胞透過性ペプチドを含む。一部の実施形態では、V E P E P-6ペプチドは、 X_1 L X_2 R A L W X_9 L X_3 X_9 X_4 L W X_9 L X_5 X_6 X_7 X_8 (配列番号 63)、 X_1 L X_2 L A R W X_9 L X_3 X_9 X_4 L W X_9 L X_5 X_6 X_7 X_8 (配列番号 64) および X_1 L X_2 A R L W X_9 L X_3 X_9 X_4 L W X_9 L X_5 X_6 X_7 X_8 (配列番号 65) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSであり、 X_2 は、FまたはWであり、 X_3 は、L、W、CまたはIであり、 X_4 は、S、A、NまたはTであり、 X_5 は、LまたはWであり、 X_6 は、WまたはRであり、 X_7 は、KまたはRであり、 X_8 は、Aであるかまたは存在せず、 X_9 は、RまたはSである。一部の実施形態では、V E P E P-6ペプチドは、アミノ酸配列 X_1 L X_2 R A L W R L X_3 R X_4 L W R L X_5 X_6 X_7 X_8 (配列番号 66)を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSであり、 X_2 は、FまたはWであり、 X_3 は、L、W、CまたはIであり、 X_4 は、S、A、NまたはTであり、 X_5 は、LまたはWであり、 X_6 は、WまたはRであり、 X_7 は、KまたはRであり、 X_8 は、Aであるかまたは存在しない。一部の実施形態では、V E P E P-6ペプチドは、アミノ酸配列 X_1 L X_2 R A L W R L X_3 R X_4 L W R L X_5 X_6 K X_7 (配列番号 67)を含み、ここで、 X_1 は、ベーターAまたはSであり、 X_2 は、FまたはWであり、 X_3 は、LまたはWであり、 X_4 は、S、AまたはNであり、 X_5 は、LまたはWであり、 X_6 は、WまたはRであり、 X_7 は、Aであるかまたは存在しない。一部の実施形態では、V E P E P-6ペプチドは、 X_1 L F R A L W R L L R X

$_2$ LWRL LWX $_3$ (配列番号 68)、 X_1 LWRA LWRL WRX $_2$ LWRL LWX $_3$ A (配列番号 69)、 X_1 LWRA LWRL X $_4$ RX $_2$ LWRL WRX $_3$ A (配列番号 70)、 X_1 LWRA LWRL WRX $_2$ LWRL WRX $_3$ A (配列番号 71)、 X_1 LWRA LWRL X $_5$ RA LWRL LWX $_3$ A (配列番号 72)、および X_1 LWRA LWRL X $_4$ RN LWRL LWX $_3$ A (配列番号 73) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、 X_1 は、ベーター A または S であり、 X_2 は、S または T であり、 X_3 は、K または R であり、 X_4 は、L、C または I であり、 X_5 は、L または I である。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、Ac- X_1 LFRALWRL LRS LWRL LWK-システアミド (配列番号 74)、Ac- X_1 LWRA LWRL WRS LWRL LWKA-システアミド (配列番号 75)、Ac- X_1 LWRA LWRL LRS LWRL WRKA-システアミド (配列番号 76)、Ac- X_1 LWRA LWRL WRS LWRL WRKA-システアミド (配列番号 77)、Ac- X_1 LWRA LWRL LRA LWRL LWKA-システアミド (配列番号 78)、および Ac- X_1 LWRA LWRL LRLN LWRL LWKA-システアミド (配列番号 79) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、 X_1 は、ベーター A または S である。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、配列番号 63~79 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、8 位および 12 位の 2 つの残基間に炭化水素連結をさらに含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、Ac- X_1 LFRALWR $_5$ L LRS $_5$ LWRL LWK-システアミド (配列番号 80)、Ac- X_1 LFLARWR $_5$ L LRS $_5$ LWRL LWK-システアミド (配列番号 81)、Ac- X_1 LFRALWS $_5$ L LRS $_5$ LWRL LWK-システアミド (配列番号 82)、Ac- X_1 LFLARWS $_5$ L LRS $_5$ LWRL LWK-システアミド (配列番号 83)、Ac- X_1 LFRALWRL LRS $_5$ SLWS $_5$ LLWK-システアミド (配列番号 84)、Ac- X_1 LFLARWRL LRS $_5$ SLWS $_5$ LLWK-システアミド (配列番号 85)、Ac- X_1 LFRALWRL LRS $_5$ SLWS $_5$ LLWK-システアミド (配列番号 86)、Ac- X_1 LFLARWRL LRS $_5$ SLWS $_5$ LLWK-システアミド (配列番号 87)、および Ac- X_1 LFA R $_5$ LWRL LRS $_5$ LWRL LWK-システアミド (配列番号 88) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、 X_1 は、ベーター A または S であり、また、後に下付きの「S」が続く残基は、前記炭化水素連結によって連結されている残基である。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列ベーター A LWRA LWRL WRS LWRL LWKA (配列番号 89) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、配列番号 90~117 のいずれか 1 つに記載されているアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列ベーター A LWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号 90) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、レトロインベルソアミノ酸配列 AKWL L RWL SRWL RWL ARWL R (配列番号 91) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-(PEG) 7- β ALWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号 92) または Ac-(PEG) 2- β ALWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号 93) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、配列番号 94~103 のいずれか 1 つに記載されているアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列ベーター A-Ac-YIGSR-Ava-ALWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号 96) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列ベーター A-Ac-YIGSR-Aun-ALWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号 98) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-YIGSR-Ahx-ALWRA LWRL WRS LWRL LWK-NH $_2$ (配列番号 100) または Ac-YIGSR-Ahx-ALWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号 101) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列ベーター A-Ac-GYVS-Ahx-ALWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号 102) または Ac-YIGSR- β ALWRA LWRL WRS LWRL LWKA-NH $_2$ (配列番号

10

20

30

40

50

号 103) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列ステアリル-βA-ALWRA LWRLWRS LWRL LWKA-NH₂ (配列番号 104) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、配列番号 105~107 のいずれか 1 つに記載されているアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 ALWRA (GalNac) LWRLWRS LWRL LWKA-NH₂ (配列番号 111) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-SYTSSTM-ava-βALWRA LWRLWRS LWRL LWKA-NH₂ (配列番号 112) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-THRPPNWSPVWPRALWRLWRS LWRL RWKA-NH₂ (配列番号 113) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-CKTRRV PWRALWRLWRS LWRL LWKA-NH₂ (配列番号 114) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-CKTRRV P-ava-WRALWRLWRS LWRL LWKA-NH₂ (配列番号 115) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-CARPAR-ava-WRALWRLWRS LWRL LWK-NH₂ (配列番号 116) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、アミノ酸配列 Ac-THRPPNWSPV-ava-WRALWRLWRS LWRL RWK-NH₂ (配列番号 117) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子のコア内のゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、DNA ヌクレアーゼ (例えば、CRISPR 関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9) と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、gRNA と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイド RNA と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ドナー核酸と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子の中間層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、ナノ粒子の表層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-6 ペプチドは、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。

10

20

30

VEPEP-9 ペプチド

【0137】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列 X₁X₂X₃WWX₄X₅WAX₆X₃X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂WX₁₃R (配列番号 118) を含む VEPEP-9 細胞透過性ペプチドを含み、ここで、X₁ は、ベーター A または S であり、X₂ は、L であるかまたは存在せず、X₃ は、R であるかまたは存在せず、X₄ は、L、R または G であり、X₅ は、R、W または S であり、X₆ は、S、P または T であり、X₇ は、W または P であり、X₈ は、F、A または R であり、X₉ は、S、L、P または R であり、X₁₀ は、R または S であり、X₁₁ は、W または存在せず、X₁₂ は、A であるか、R であるか、または存在せず、X₁₃ は、W または F であり、X₃ が存在しない場合、X₂、X₁₁ および X₁₂ も存在しない。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、アミノ酸配列 X₁X₂RWWLRWAX₆RWX₈X₉X₁₀WX₁₂WX₁₃R (配列番号 119) を含み、ここで、X₁ は、ベーター A または S であり、X₂ は、L であるかまたは存在せず、X₆ は、S または P であり、X₈ は、F または A であり、X₉ は、S、L または P であり、X₁₀ は、R または S であり、X₁₂ は、A または R であり、X₁₃ は、W または F である。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、X₁L RWWLRWASRWFSRWAWWR (配列番号 120)、X₁L RWWLRWASRWASRWAWFR (配列番号 121)、X₁RWWLRWASRWALSWRWWR (配列番号 122)、X₁RWWLRWASRWFLSWRWWR (配列番号 123)、X₁RWWLRWAPRWFP SWRWWR (配列番号 124)

40

50

、および X_1 RWWLRWASRWAPSWRWWR (配列番号 125) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、 X_1 は、ベーター-A または S である。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、 X_1 WW X_4 X_5 W X_6 X_7 X_8 R X_{10} WW R (配列番号 126) のアミノ酸配列を含み、ここで、 X_1 は、ベーター-A または S であり、 X_4 は、R または G であり、 X_5 は、W または S であり、 X_6 は、S、T または P であり、 X_7 は、W または P であり、 X_8 は、A または R であり、 X_{10} は、S または R である。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、 X_1 WWRWWASWARSWWR (配列番号 127)、 X_1 WWGSWATPRRRWWR (配列番号 128)、および X_1 WWRWWAPWARSWWR (配列番号 129) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、 X_1 は、ベーター-A または S である。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、アミノ酸配列ベーター-A L RWWLRWASRWFSRWAWWR (配列番号 130) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、アミノ酸配列 KSYDTY-ava-A L RWWLRWASRWFSRWAWWR (配列番号 131) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、アミノ酸配列 ac-CKRAVRWWLRWASRWFSRWAWWR (配列番号 132) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、アミノ酸配列ベーター-A-RWWLRWASRWFSRWAWWR (配列番号 133) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、アミノ酸配列 KSYDTYAAETRRWASRWFSRWAWWR (配列番号 134) を含む。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子のコア内のゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、DNA ヌクレアーゼ (例えば、CRISPR 関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9) と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、gRNA と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイド RNA と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ドナー核酸と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子の中間層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、ナノ粒子の表層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-9 ペプチドは、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。

ADGN-100 ペプチド

[0138]

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列 X_1 KWRS X_2 X_3 X_4 RWRLWR X_5 X_6 X_7 X_8 SR (配列番号 135) を含む ADGN-100 細胞透過性ペプチドを含み、ここで、 X_1 は、任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、 $X_2 \sim X_8$ は、任意のアミノ酸である。一部の実施形態では、ADGN-100 ペプチドは、アミノ酸配列 X_1 KWRS X_2 X_3 X_4 RWRLWR X_5 X_6 X_7 X_8 SR (配列番号 136) を含む、ここで、 X_1 は、 β A であるか、S であるか、または存在せず、 X_2 は、A または V であり、 X_3 は、または L であり、 X_4 は、W または Y であり、 X_5 は、V または S であり、 X_6 は、R、V、または A であり、 X_7 は、S または L であり、 X_8 は、W または Y である。一部の実施形態では、ADGN-100 ペプチドは、アミノ酸配列 KWRSAGWRWRRLWRVRSWSR (配列番号 137)、KWRSALYRWRLWRVRSWSR (配列番号 138)、KWRSALYRWRLWRSRWSR (配列番号 139)、または KWRSALYRWRLWRSALYSR (配列番号 140) を含む。一部の実施形態では、ADGN-100 ペプチドは、炭化水素連結によって連結した 3 個または 6 個の残基によって分離された 2 つの残基を含む。一部の実施形態では、ADGN-100 ペプチドは、アミノ酸配列 KWRS₅AGWR₅WRLWRVRSWSR (配列番号 141)、KWRS₅SAGWRWR₅LWRVRSWSR (配列番号 142)、KWRSAGWR₅WRLWRVRS₅WSR (配列番号 143)、

KWRS₅ALYR₅WRLWRSRSWSR（配列番号144）、KWR₅SALYR
 WR₅LWRSRSWSR（配列番号145）、KWRSALYR₅WRLWRSR₅S
 WSR（配列番号146）、KWRSALYRWRLWRS₅RSWSR（配列番号1
 47）、KWRSALYRWRLWRS₅RSWS₅R（配列番号148）、KWR₅S
 ALYRWRLWRSALYSR（配列番号149）、KWR₅SALYR₅WRLW
 RSALYSR（配列番号150）、KWRSALYRWRLWRS₅ALYSR（配
 列番号151）、またはKWRSALYRWRLWRS₅ALYS₅R（配列番号152
 ）を含み、ここで、下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結
 している。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチドは、配列番号153～171
 のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチド
 は、ベータ-AKWRSAGWRWRLWRLWRSWSR-NH₂（配列番号153）の
 アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチドは、ベータ-AK
 WRSAGWRWRLWRLWRSWSR（配列番号154）またはベータ-AKWRSAL
 YRWRLWRLWRSWSR（配列番号155）のアミノ酸配列を含む。一部の実施形
 態では、ADGN-100ペプチドは、RSWSRVRLWRLWRLWRSWSR（配列
 番号156）のレトロインベルソアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ADGN-
 100ペプチドは、Ac-(PEG)7-bA-KWRSALWRLWRLWRSWSR-NH₂（配列番号157）またはベータ-Ac-(PEG)2-βA-KWRSAL
 WRLWRLWRLWRSWSR-NH₂（配列番号158）のアミノ酸配列を含む。一部の
 実施形態では、ADGN-100ペプチドは、ステアリル-βA-KWRSALWRLWRLWRSWSR-NH₂（配列番号159）のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態
 では、ADGN-100ペプチドは、配列番号160～169のいずれか1つのアミノ酸
 配列を含む。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチドは、アミノ酸配列Ac-Y
 IGSR-Ava-KWRSALWRLWRLWRSWSR-NH₂（avaは、5-
 アミノペンタン酸である）（配列番号162）を含む。一部の実施形態では、ADGN-
 100ペプチドは、アミノ酸配列Ac-YIGSR-Ahx-KWRSALWRLWRLW
 RSVRSWSR-NH₂（配列番号167）を含む。一部の実施形態では、ADGN-1
 00ペプチドは、アミノ酸配列Ac-YIGSR-(PEG)n-βA-KWRSALW
 RRLWRLWRLWRSWSR-NH₂（n=2、4、または7）（配列番号170）を含む
 。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチドは、アミノ酸配列Ac-KWRSAL
 GALNAC）LWRLWRLWRLWRSWSR-NH₂（配列番号172）を含む。一部の
 実施形態では、ADGN-100ペプチドは、アミノ酸配列Ac-CARPARWRS
 AGWRWRLWRLWRSWSR-NH₂（配列番号173）を含む。一部の実施形態で
 は、ADGN-100ペプチドは、RWRLWRLWRSR（配列番号168）のアミノ酸配
 列を含むコアモチーフを含む。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチドは、アミ
 ノ酸配列TGNYKALHPDHNGWRSALRWRLWRLWRSR-NH₂（配列番号
 174）またはAc-TGNYKALHPDHNG-ava-WRSALRWRLWRLW
 RSVRSR-NH₂（配列番号175）を含む。一部の実施形態では、ADGN-100ペプ
 チドは、ゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、ADGN-100ペプ
 チドは、ナノ粒子のコア内のゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、ADGN
 -100ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在する。一部の実施形態では、ADGN-1
 00ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、DNAヌクレアーゼ（例えば、CRISP
 R関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9）と結び付いている。一部の実施形態では
 、ADGN-100ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、gRNAと結び付いている
 。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイ
 ドRNAと結び付いている。一部の実施形態では、ADGN-100ペプチドは、ナノ粒
 子のコア内に存在し、ドナー核酸と結び付いている。一部の実施形態では、ADGN-1
 00ペプチドは、ナノ粒子の中間層内に存在する。一部の実施形態では、ADGN-10
 0ペプチドは、ナノ粒子の表層内に存在する。一部の実施形態では、ADGN-100ペ
 プチドは、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるも

10

20

30

40

50

のである。

VEPEP-4 ペプチド

【0139】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列XWXRLLXXXXX（配列番号176）を含むVEPEP-4細胞透過性ペプチドを含み、ここで、1位のXは、ベーターAまたはSである；3位、9位および10位のXは、互いに独立に、WまたはFである；6位のXは、8位のXがSの場合にはRであり、6位のXは、8位のXがRの場合にはSである；7位のXは、Lであるかまたは存在しない；11位のXは、Rであるかまたは存在せず、および7位のXは、11位のXが存在しない場合にはLである。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、配列番号177～180のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子のコア内のゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、DNAヌクレアーゼ（例えば、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9）と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、gRNAと結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイドRNAと結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ドナー核酸と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子の中間層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、ナノ粒子の表層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-4ペプチドは、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。

VEPEP-5 ペプチド

【0140】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、アミノ酸配列RXWXRLLWXRLLR（配列番号181）を含むVEPEP-5細胞透過性ペプチドを含み、ここで、2位のXは、RまたはSであり、4位および8位のXは、互いに独立に、WまたはFである。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、配列番号182～187のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子のコア内のゲノム編集複合体内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、DNAヌクレアーゼ（例えば、CRISPR関連エンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9）と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、gRNAと結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ガイドRNAと結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子のコア内に存在し、ドナー核酸と結び付いている。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子の中間層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、ナノ粒子の表層内に存在する。一部の実施形態では、VEPEP-5ペプチドは、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。

細胞透過性ペプチドの改変

【0141】

一部の実施形態では、本明細書に記載のCPP（例えば、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、またはADGN-100ペプチド）は、CPPのN末端に連結した（例えば、共有結合により連結した）1つまたは複数の部分をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、CPPのN末端に共有結合により連結している。一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、アセチル基、ステアリル基、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核

外移行シグナル、抗体またはその抗体断片、ペプチド、多糖、リンカー部分、および標的化部分からなる群から選択される。一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、CPPのN末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。

【0142】

一部の実施形態では、本明細書に記載のCPP（例えば、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、またはADGN-100ペプチド）は、CPPのC末端に連結した（例えば、共有結合により連結した）1つまたは複数の部分をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、システアミド基、システイン、チオール、アミド、ニトリロ三酢酸、カルボキシル基、直鎖状または分枝C₁~C₆アルキル基、第一級または第二級アミン、オシド誘導体、脂質、リン脂質、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体またはその抗体断片、ペプチド、多糖、リンカー部分、および標的化部分からなる群から選択される。一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、システアミド基を含む。

10

【0143】

一部の実施形態では、本明細書に記載のCPP（例えば、PEP-1、PEP-2、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-4ペプチド、VEPEP-5ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、またはADGN-100ペプチド）がステープル留めされている。「ステープル留め」とは、本明細書で使用される場合、ペプチド内の2つの残基間の化学的連結を指す。一部の実施形態では、CPPはステープル留めされており、ペプチドの2つのアミノ酸間に化学的連結を含む。一部の実施形態では、化学的連結によって連結した2つのアミノ酸は、3個または6個のアミノ酸によって分離されている。一部の実施形態では、化学的連結によって連結した2つのアミノ酸は、3個のアミノ酸によって分離されている。一部の実施形態では、化学的連結によって連結した2つのアミノ酸は、6個のアミノ酸によって分離されている。一部の実施形態では、化学的連結によって連結した2つのアミノ酸のそれぞれは、RまたはSである。一部の実施形態では、化学的連結によって連結した2つのアミノ酸のそれぞれは、Rである。一部の実施形態では、化学的連結によって連結した2つのアミノ酸のそれぞれは、Sである。一部の実施形態では、化学的連結によって連結した2つのアミノ酸の一方はRであり、他方はSである。一部の実施形態では、化学的連結は、炭化水素連結である。

20

【0144】

一部の実施形態では、CPPは、L-アミノ酸を含むL-ペプチドである。一部の実施形態では、CPPは、レトロインベルソペプチド（例えば、逆向きの配列のD-アミノ酸で構成され、伸長させた場合、その親分子と同様の側鎖トポロジーが想定されるが、アミドペプチド結合が反転しているペプチド）である。一部の実施形態では、レトロインベルソペプチドは、配列番号91または156の配列を含む。

30

【0145】

一部の実施形態では、CPPは、N末端から、細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した、アセチル基、標的化部分およびリンカー部分を含む。

標的化部分

【0146】

一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、CPPのN末端とコンジュゲートしている。一部の実施形態では、標的化部分は、CPPのC末端とコンジュゲートしている。一部の実施形態では、第1の標的化部分は、CPPのN末端とコンジュゲートしており、第2の標的化部分は、CPPのC末端とコンジュゲートしている。

40

【0147】

一部の実施形態では、標的化部分は、1つまたは複数の臓器を標的とする標的化ペプチドを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の臓器は、筋肉、心臓、脳、脾臓、リンパ節、肝臓、肺、および腎臓からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、脳を標的とする。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、筋肉を標的とする

50

。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、心臓を標的とする。

【0148】

一部の実施形態では、標的化部分は、少なくとも約3個、4個、または5個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、約8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、または4個以下のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、約3個、4個、または5個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、GY、YV、VS、SK、GYV、YVS、VSK、GYVS、YVSK、YI、IG、GS、SR、YIG、IGS、GSR、YIGS、IGSRからなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、配列（例えば、標的化配列）は、GYVSK、GYVS、YIGS、およびYIGSRからなる群から選択される。

10

【0149】

一部の実施形態では、標的化部分は、配列番号196～205および235～240からなる群から選択される標的化配列を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列SYTSSM（配列番号196）を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列CKTRRVP（配列番号197）を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列THRPPNWSVP（配列番号198）を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列TGN YKALHPDHNG（配列番号199）を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列CARPAR（配列番号200）を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列ASSLNIA（配列番号203）を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列LSSRLDA（配列番号204）を含む。一部の実施形態では、標的化部分は、標的化配列KSYDTY（配列番号205）を含む。

20

【0150】

一部の実施形態では、標的化部分は、本明細書に記載のリンカー部分のいずれか1つなどのリンカー部分を介してCPPとコンジュゲートしている。

リンカー部分

【0151】

一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、リンカー部分を含む。

【0152】

一部の実施形態では、リンカー部分は、ポリグリシンリンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、 β -アラニンを含む。一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも約2個、3個、または4個のグリシン、必要に応じて連続したグリシンを含む。一部の実施形態では、リンカーは、セリンをさらに含む。一部の実施形態では、リンカーは、GGGGSまたはSGGGG配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、グリシン- β -アラニンモチーフを含む。

30

【0153】

一部の実施形態では、1つまたは複数の部分は、ポリマー（例えば、PEG、ポリリン、PET）を含む。一部の実施形態では、ポリマーは、CPPのN末端とコンジュゲートしている。一部の実施形態では、ポリマーは、CPPのC末端とコンジュゲートしている。一部の実施形態では、第1のポリマーがCPPのN末端とコンジュゲートしており、第2のポリマーがCPPのC末端とコンジュゲートしている。一部の実施形態では、ポリマーは、PEGである。一部の実施形態では、PEGは、直鎖状PEGである。一部の実施形態では、PEGは、分枝PEGである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約5kDa以下、10kDa以下、15kDa以下、20kDa以下、30kDa以下、または40kDa以下である。一部の実施形態では、PEGの分子量は、少なくとも約5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、30kDa、または40kDaである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約5kDa～約10kDa、約10kDa～約15kDa、約15kDa～約20kDa、約20kDa～約30kDa、または約30kDa～約40kDaである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約5kDa、10kDa、20kDa、または40kDaである。一部の実施形態では、PEGの分子量は

40

50

、5 kDa、10 kDa、20 kDaまたは40 kDaからなる群から選択される。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約5 kDaである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約10 kDaである。一部の実施形態では、PEGは、少なくとも約1個、2個、または3個のエチレングリコール単位を含む。一部の実施形態では、PEGは、約10個以下、9個以下、8個以下または7個以下のエチレングリコール単位からなる。一部の実施形態では、PEGは、約1個、2個、または3個のエチレングリコール単位からなる。一部の実施形態では、PEG部分は、約1個～8個、または約2個～7個のエチレングリコール単位からなる。

【0154】

一部の実施形態では、リンカー部分は、ベータアラニン、システイン、システアミド橋、ポリグリシン（例えば、G2またはG4）、Aun（11-アミノウンデカン酸）、Ava（5-アミノペンタン酸）、およびAhx（アミノカプロン酸）からなる群から選択される。一部の実施形態では、リンカー部分は、Aun（11-アミノウンデカン酸）を含む。一部の実施形態では、リンカー部分は、Ava（5-アミノペンタン酸）を含む。一部の実施形態では、リンカー部分は、Ahx（アミノカプロン酸）を含む。

10

炭水化物部分

【0155】

一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、炭水化物部分をさらに含む。一部の実施形態では、炭水化物部分は、GalNAcである。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ADGN-106ペプチドである。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、炭水化物部分により細胞透過性ペプチド内のアラニンが修飾されている。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号111または172に記載されている。

20

細胞透過性ペプチド混合物

【0156】

一部の実施形態では、ゲノム編集複合体内の細胞透過性ペプチドは、a) 第1の細胞透過性ペプチド（例えば、本明細書に記載の細胞透過性ペプチドのいずれか）を含む第1のペプチド、b) 第2の細胞透過性ペプチド（例えば、本明細書に記載の細胞透過性ペプチドのいずれか）を含む第2のペプチドの混合物であって、第2のペプチドが第2の細胞透過性ペプチドに共有結合により連結したポリエチレングリコール（PEG）部分を含み、かつ第1のペプチドがPEG部分を有さない、混合物である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドおよび／または第2の細胞透過性ペプチドは、PTDに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、MPGペプチド、Cadyペプチド、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、またはPEP-3ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドおよび第2の細胞透過性ペプチドは、Cady、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-4ペプチド、VEPEP-5ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドのカーゴ（例えば、必要に応じてDNAヌクレアーゼまたはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチドを含むガイドRNA）に対するモル比は、約1:1から約100:1の間（例えば、およそ約1:1から約50:1、または約2:1から約50:1の間）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体の平均直径は、約20 nmから約1000 nmの間（例えば、約20～約500 nm、約50～約400 nm、約60～約300 nm、約80～約200 nm、または約100～約160 nm）である。一部の実施形態では、PEG部分は、約1～10個（例えば、約1～8個、2～7個、1～5個、または6～10個）のエチレングリコール単位からなる。一部の実施形態では、PEG部分の分子量は、約0.05 kDa～約50 kDaである。一部の実施形態では、PEG部分の分子量は、約0.05 kDa～約0.5 kDa（例えば、約0.05～0.1 kDa、0.05～0.4 kDa、0.1～0.3 kDa、0.05～0.25 kDa、0.25～0.5 kDa）である。一部の実施形態では、

30

40

50

PEG部分は、第2の細胞透過性ペプチドのN末端またはC末端とコンジュゲートしている。一部の実施形態では、PEG部分は、第2の細胞透過性ペプチド内の部位とコンジュゲートしている。

【0157】

一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドの第2の細胞透過性ペプチドに対する比は、約20:1～約1:1（例えば、約15:1～約2:1、約10:1～約4:1）である。

【0158】

一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドおよび／または第2の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドから選択される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドおよび／または第2の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチド、およびADGN-100ペプチドから選択される。

10

【0159】

一部の実施形態では、PEG部分は、直鎖状PEGである。一部の実施形態では、PEG部分は、分枝（branched）PEGである。

カーゴ分子

【0160】

一部の実施形態では、本明細書に記載の細胞透過性ペプチドは、1つまたは複数のカーゴ分子と複合体を形成する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、1つまたは複数のカーゴ分子のうちの少なくとも1つと非共有結合により複合体を形成する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、1つまたは複数のカーゴ分子のそれぞれと非共有結合により複合体を形成する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、1つまたは複数のカーゴ分子のうちの少なくとも1つと共有結合により複合体を形成する。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、1つまたは複数のカーゴ分子のそれぞれと共有結合により複合体を形成する。

20

【0161】

上記のように、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、上記のガイドRNAを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、1つまたは複数のゲノム編集分子（例えば、DNAヌクレアーゼまたはDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド）を含む。

30

ガイドRNA

【0162】

本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、「合成ガイドRNA」の節に記載されているガイドRNAのいずれかなどの突然変異したKRASを標的とするガイドRNAを含む。一部の実施形態では、突然変異したKRASは、G12C、G12S、G12R、G12F、G12L、G12N、G12A、G12D、G12S、G12V、G13C、G13S、G13R、G13A、G13D、G13V、G13P、S17G、P34S、Q61E、Q61K、Q61L、Q61R、Q61P、Q61H、K117N、A146P、A146TおよびA146Vからなる群から選択される1つまたは複数の突然変異を含む。一部の実施形態では、突然変異したKRASは、G12D、G12C、G12V、G12A、G12S、G12R、G13DおよびG13Cからなる群から選択される1つまたは複数の突然変異を含む。

40

DNAヌクレアーゼ

【0163】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、DNAヌクレアーゼまたはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、CRISPR関連タンパク質（Cas）ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その断片、およびそれら

50

の組合せからなる群から選択される。

【0164】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子のゲノム編集系分子（例えば、RGEN）は、タンパク質またはポリペプチドである。例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、RGEN（例えば、Cas9）を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドは、約10kDaから約200kDaの間（例えば、おおよそ、10kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa、160kDa、170kDa、180kDa、190kDa、および200kDaのいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）である。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、複数のタンパク質またはポリペプチドを含み、複数のタンパク質またはポリペプチドのそれぞれが、約10kDaから約200kDaの間（例えば、おおよそ、10kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa、80kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、140kDa、150kDa、160kDa、170kDa、180kDa、190kDa、および200kDaのいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）である。

10

【0165】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、DNAヌクレアーゼをコードする核酸をさらに含む。一部の実施形態では、核酸は、約20ntから約20kbの間（例えば、おおよそ、0.02kb、0.03kb、0.04kb、0.05kb、0.06kb、0.07kb、0.08kb、0.09kb、0.1kb、0.2kb、0.3kb、0.4kb、0.5kb、0.6kb、0.7kb、0.8kb、0.9kb、1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、5kb、5.5kb、6kb、6.5kb、7kb、7.5kb、8kb、8.5kb、9kb、9.5kb、10kb、11kb、12kb、13kb、14kb、15kb、16kb、17kb、18kb、19kb、および20kbのいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）である。一部の実施形態では、核酸は、ゲノム編集系分子をコードするDNAプラスミドなどのDNAである。一部の実施形態では、DNAプラスミドは、ゲノム編集系分子を発現させるための発現カセットを含む。一部の実施形態では、DNAプラスミドは、約1kbから約20kbの間（例えば、おおよそ、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、11kb、12kb、13kb、14kb、15kb、16kb、17kb、18kb、19kb、および20kbのいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）である。一部の実施形態では、核酸は、ゲノム編集系分子をコードするmRNAなどのRNAである。一部の実施形態では、mRNAは、約100ntから約10kbの間（例えば、おおよそ、0.1kb、0.2kb、0.3kb、0.4kb、0.5kb、0.6kb、0.7kb、0.8kb、0.9kb、1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、5kb、5.5kb、6kb、6.5kb、7kb、7.5kb、8kb、8.5kb、9kb、9.5kb、および10kbのいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）である。

20

30

40

【0166】

一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、本明細書に記載の核酸のいずれかなどの複数の核酸を含む。例えば、一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、gRNAおよびゲノム編集系分子をコードする核酸（例えば、DNAヌクレアーゼをコードするDNAプラスミドまたはmRNA）を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、複数のゲノム編集系分子をコードする核酸（例えば、複数のゲノム編集系分子をコードする1つまたは複数のDNAプラスミド、または複数のゲノム編集系分子をコードする複数のmRNA）を含む。

50

【0167】

一部の実施形態では、核酸は、一本鎖オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、核酸は、二本鎖オリゴヌクレオチドである。本明細書に記載の核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi、siRNA、shRNA、iRNA、アンタゴミルの場合では必ずではないが200ヌクレオチドまで、またはプラスミドDNAの場合では1000キロ塩基までの様々な長さのいずれかであり得る。

【0168】

一部の実施形態では、核酸は、プラスミドDNAまたはDNA断片（例えば、長さが最大約1000bpのDNA断片）である。さらに、プラスミドDNAまたはDNA断片は、高度にメチル化されたものであっても低度にメチル化されたものであってもよい。一部の実施形態では、プラスミドDNAまたはDNA断片は、1つまたは複数の遺伝子をコードし、前記1つまたは複数の遺伝子の発現に必要な調節エレメントを含有し得る。一部の実施形態では、プラスミドDNAまたはDNA断片は、選択マーカーをコードする1つまたは複数の遺伝子を含み得、それにより、プラスミドDNAまたはDNA断片を妥当な宿主細胞内で維持することが可能になる。

10

CRISPR関連ヌクレアーゼ

【0169】

一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、CRISPR関連ヌクレアーゼである。一般に、SPIDR（スペーサー散在型ダイレクトリピート）としても知られるCRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）は、通常、特定の細菌種に特異的であるDNA遺伝子座のファミリーを構成する。CRISPR遺伝子座は、*E. coli*において認識された別個のクラスの散在型の短い配列リピート（SSR）（Ishino et al., J. Bacteriol., 169:5429-5433 [1987]; および Nakata et al., J. Bacteriol., 171:3553-3556 [1989])、および関連遺伝子を含む。類似の散在型SSRは、*Haloferrax mediterranei*、*Streptococcus pyogenes*、*Anabaena*、および*Mycobacterium tuberculosis*において同定されている（Groenen et al., Mol. Microbiol., 10:1057-1065 [1993]; Hoe et al., Emerg. Infect. Dis., 5:254-263 [1999]; Masepohl et al., Biochim. Biophys. Acta 1307:26-30 [1996]; および Mojica et al., Mol. Microbiol., 17:85-93 [1995]を参照されたい）。CRISPR遺伝子座は、一般には、短鎖規則的間隔リピート（short regularly spaced repeat）（SRSR）と名付けられたリピートの構造によって、他のSSRとは異なる（Janssen et al., OMICS J. Integr. Biol., 6:23-33 [2002]; および Mojica et al., Mol. Microbiol., 36:244-246 [2000]）。一般に、これらのリピートは、実質的に一定の長さの独自の介在配列によって規則的に間隔が空いたクラスターで存在する短いエレメントである（Mojica et al., [2000]、上掲）。リピート配列は系統間で高度に保存されているが、散在型リピートの数およびスペーサー領域の配列は、一般には、系統間で異なる（van Embden et al., J. Bacteriol., 182:2393-2401 [2000]）。CRISPR遺伝子座は、*Aeropyrum*、*Pyrobaculum*、*Sulfolobus*、*Archaeoglobus*、*Halocarculla*、*Methanobacterium*、*Methanococcus*、*Methanosarcina*、*Methanopyrus*、*Pyrococcus*、*Picrophilus*、*Thermoplasma*、*Corynebacterium*、*Mycobacterium*、*Streptomyces*、*Aquifex*、*Porphyromonas*、*Chlorobium*、*Thermus*、*Bacillus*、*Listeria*、*Staphylococcus*、*Clostridium*、*Thermoanaerobacter*、*Mycoplasma*、*Fusobacterium*、*Azarcus*、*Chromobacterium*、*Neisseria*、*Nitrosomonas*、*Desulfovibrio*、*Geobacter*、*Myxococcus*、*Campylobacter*、*Wolinella*、*Ac*

20

30

40

50

inetobacter, *Erwinia*, *Escherichia*, *Legionella*, *Methylococcus*, *Pasteurella*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Xanthomonas*, *Yersinia*, *Treponema*, および *Thermotoga* を含むがこれだけに限定されない 40 種を超える原核生物において同定されている（例えば、Jansen et al., Mol. Microbiol., 43:1565-1575 [2002] ; および Mojica et al., [2005] を参照されたい）。

【0170】

一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas タンパク質である。Cas タンパク質の非限定的な例としては、Cas 1、Cas 1B、Cas 2、Cas 3、Cas 4、Cas 5、Cas 6、Cas 7、Cas 8、Cas 9 (Csn1 および Csx12 としても公知)、Cas 10、Cpf1、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、そのホモログ、またはその改変バージョン、例えば、誘導性、不活化、または分割 Cas タンパク質などが挙げられる（例えば、Dominguez et al. (2015). Nature Reviews Molecular Cell Biology; Polstein, L. R., & Gersbach, C. A. (2015). Nature chemical biology, 11(3):198-200; Dow et al. (2015). Nature biotechnology, 33(4):390-394; Zetsche et al. (2015). Nature biotechnology, 33(2):139-142; Kleinstiver et al. (2015). Nature. 523:481-485; Bikard et al. (2013). Nucleic acids research, 41(15):7429-7437; Qi et al. (2013). Cell, 152(5):1173-1183 を参照されたい）。これらの酵素は、当業者に公知である；例えば、*S. pyogenes* Cas 9 タンパク質のアミノ酸配列は、SwissProt データベースにおいて受託番号 Q99ZW2 の下に見い出すことができ、*Acidaminococcus* sp. Cpf1 タンパク質のアミノ酸配列は SwissProt データベースにおいて受託番号 U2UMQ6 の下に見い出すことができる。

【0171】

一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas 9 などの、DNA 切断活性を有する改変されていない CRISPR 酵素または改変された CRISPR 酵素を含む。一部の実施形態では、CRISPR 酵素は Cas 9 であり、*S. pyogenes* または *S. pneumoniae* 由来の Cas 9 であり得る。一部の実施形態では、CRISPR 酵素は Cpf1 であり、*Acidaminococcus* または *Lachnospiraceae* 由来の Cpf1 であり得る。一部の実施形態では、CRISPR 酵素により、標的配列内および／または標的配列の相補物内などの標的配列の場所における一方または両方の鎖の切断が方向付けられる。一部の実施形態では、CRISPR 酵素により、標的配列の最初のヌクレオチドまたは最後のヌクレオチドから約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500、またはそれよりも多くの塩基対以内での一方または両方の鎖の切断が方向付けられる。一部の実施形態では、CRISPR 酵素は、対応する野生型酵素に対して突然変異したものであり、その結果、突然変異した CRISPR 酵素は、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方の鎖または両方の鎖を切断する能力を欠く。例えば、*S. pyogenes* 由来の Cas 9 の RuvC II 触媒ドメイン内のアスパラギン酸からアラニンへの置換 (D10A) により、Cas 9 が、両方の鎖を切断するヌクレアーゼからニッカーゼ（一本鎖を切断する）に変換される。Cas 9 をニッカーゼにする突然変異の他の例としては、限定することなく、H840A、N854A、および N863A が挙げられる。一部の実施形態では、Cas 9 ニッカーゼを、ガイド配列、例えば、それぞれ DNA 標的のセンス鎖およびアンチセンス鎖を標的とする 2 つのガイド配列と組み合わせて使用することができる。この組合せにより、両方の鎖にニックを入れ、NHEJ の誘導に使用することが可能になる。

【0172】

さらなる例として、Cas9の2つまたはそれよりも多くの触媒ドメイン（RuvCI、RuvC II、およびRuvC III）を突然変異させて、全てのDNA切断活性を実質的に欠く突然変異Cas9を作製することができる。一部の実施形態では、D10A突然変異を、H840A、N854A、またはN863A突然変異のうちの1つまたは複数と組み合わせて、全てのDNA切断活性を実質的に欠くCas9酵素を作製する。一部の実施形態では、CRISPR酵素は、突然変異した酵素のDNA切断活性が、その突然変異していない形態に対して約25%未満、10%未満、5%未満、1%未満、0.1%未満、0.01%未満である、またはそれよりも低い場合に、全てのDNA切断活性を実質的に欠くとみなされる。他の突然変異も有用でありうる；Cas9または他のCRISPR酵素がS. pyogenes以外の種に由来するものである場合、対応するアミノ酸の突然変異を行って同様の効果を実現することができる。

10

【0173】

一部の実施形態では、Casタンパク質（例えば、Cas9など）は、N末端Casタンパク質断片、Cas（N）、およびC末端Casタンパク質断片、Cas（C）を含む分割Casタンパク質であり、ここで、Cas（N）は第1の二量体形成ドメインと融合しており、Cas（C）は第2の二量体形成ドメインと融合しており、また、第1の二量体形成ドメインおよび第2の二量体形成ドメインにより、Cas（N）とCas（C）の二量体形成が容易になって、機能的なCasヌクレアーゼ活性を有する複合体が形成される。一部の実施形態では、第1の二量体形成ドメインと第2の二量体形成ドメインの二量体形成は、二量体形成剤に対して感受性である。例えば、一部の実施形態では、第1の二量体形成ドメインおよび第2の二量体形成ドメインは、FK506結合性タンパク質12（FKBP）およびラパマイシンの哺乳動物標的（mTOR）のFKBPラパマイシン結合性（FRB）ドメインを含み、二量体形成剤はラパマイシンである。

20

【0174】

一部の実施形態では、本明細書に記載の複合体またはナノ粒子は、特定の細胞、例えば、真核細胞での発現のためにコドン最適化されたCRISPR酵素（例えば、Cas9エンドヌクレアーゼ）をコードするヌクレオチド配列を含む。真核細胞は、これだけに限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長類を含めた哺乳動物などの特定の生物体のもまたは特定の生物体に由来するものであり得る。一般に、コドン最適化は、目的の宿主細胞における発現を増強するために、核酸配列を、ネイティブな配列の少なくとも1個のコドン（例えば、約1個または約1個よりも多く、約2個または約2個よりも多く、約3個または約3個よりも多く、約4個または約4個よりも多く、約5個または約5個よりも多く、約10個または約10個よりも多く、約15個または約15個よりも多く、約20個または約20個よりも多く、約25個または約25個よりも多く、約50個または約50個よりも多く、またはそれよりも多くのコドン）を、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって改変する一方で、ネイティブなアミノ酸配列を維持するプロセスを指す。種々の種が特定のアミノ酸に関してある特定のコドンへの特定の偏りを示す。コドンバイアス（生物体間のコドン使用の差異）は、多くの場合、メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳の効率と相関し、今度は翻訳の効率は、とりわけ、翻訳されるコドンの特性および特定の転移RNA（tRNA）分子の利用可能性に依存すると考えられる。細胞において選択されるtRNAの優勢は、一般に、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコドンを反映するものである。したがって、所与の生物体における最適な遺伝子発現のために、遺伝子をコドン最適化に基づいて調整することができる。コドン使用表は、例えば、「Codon Usage Database」で容易に入手可能であり、これらの表をいくつかのやり方で適合させることができる。Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)を参照されたい。特定の宿主細胞における発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータ

30

40

50

アルゴリズムも利用可能であり、例えば、Gene Forge (Aptagen; Jacobus, Pa.) も利用可能である。一部の実施形態では、CRISPR酵素をコードする配列における1つまたは複数のコドン（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、25個、50個、またはそれよりも多く、または全てのコドン）が特定のアミノ酸に関して最も頻繁に使用されるコドンに対応する。

【0175】

一部の実施形態では、本明細書に記載のCRISPR酵素は、1つまたは複数の核局在化配列(NLS)、例えば、約1個または約1個よりも多く、約2個または約2個よりも多く、約3個または約3個よりも多く、約4個または約4個よりも多く、約5個または約5個よりも多く、約6個または約6個よりも多く、約7個または約7個よりも多く、約8個または約8個よりも多く、約9個または約9個よりも多く、約10個または約10個よりも多く、またはそれよりも多くのNLSを含む。一部の実施形態では、CRISPR酵素は、アミノ末端またはその付近に約1個または約1個よりも多く、約2個または約2個よりも多く、約3個または約3個よりも多く、約4個または約4個よりも多く、約5個または約5個よりも多く、約6個または約6個よりも多く、約7個または約7個よりも多く、約8個または約8個よりも多く、約9個または約9個よりも多く、約10個または約10個よりも多く、またはそれよりも多くのNLSを含むか、カルボキシ末端またはその付近に約1個または約1個よりも多く、約2個または約2個よりも多く、約3個または約3個よりも多く、約4個または約4個よりも多く、約5個または約5個よりも多く、約6個または約6個よりも多く、約7個または約7個よりも多く、約8個または約8個よりも多く、約9個または約9個よりも多く、約10個または約10個よりも多く、またはそれよりも多くのNLSを含むか、またはこれらの組合せを含む（例えば、アミノ末端に1つまたは複数のNLSを含み、カルボキシ末端に1つまたは複数のNLSを含む）。1つよりも多くのNLSが存在する場合、それぞれを他のNLSとは独立に選択することができ、したがって、単一のNLSが1つよりも多くのコピー内に存在する可能性もあり、かつ／または、1つまたは複数のコピー内に存在する1つまたは複数の他のNLSと組み合わせで存在する可能性もある。一部の実施形態では、CRISPR酵素は、最大で6個のNLSを含む。一部の実施形態では、NLSは、NLSの最も近くのアミノ酸がポリペプチド鎖に沿ってN末端またはC末端から約1アミノ酸、2アミノ酸、3アミノ酸、4アミノ酸、5アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸、30アミノ酸、40アミノ酸、50アミノ酸、またはそれよりも多くのアミノ酸以内にある場合、N末端またはC末端の付近にあるとみなされる。一般には、NLSは、タンパク質表面に露出した正に荷電したリシンまたはアルギニンの1つまたは複数の短い配列からなるが、他の型のNLSも公知である。NLSの非限定的な例としては、アミノ酸配列PKKKRKV（配列番号212）を有するSV40ウイルスラージT-抗原のNLS；ヌクレオプラスミン由来のNLS（例えば、配列KRPAATKKAGQAKKKK（配列番号213）を有するヌクレオプラスミン二連NLS）；アミノ酸配列PAAKRVKLD（配列番号214）またはRQRRNELKRSP（配列番号215）を有するc-myc NLS；配列NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY（配列番号216）を有するhRNPA1 M9 NLS；インポーチン-α由来のIBBDドメインの配列RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV（配列番号217）；筋腫タンパク質の配列VSRKRPRP（配列番号218）およびPPKKAREDD（配列番号219）；ヒトp53の配列PQPKKKKPL（配列番号220）；マウスc-ab1 IVの配列SALIKKKKKMAP（配列番号221）；インフルエンザウイルスNS1の配列DRLRR（配列番号222）およびPKQKKRK（配列番号223）；肝炎ウイルスデルタ抗原の配列RKLKKKKIKKL（配列番号224）；マウスMx1タンパク質の配列REKKKKFLKRR（配列番号225）；ヒトポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼの配列KRGDEVVDGVDEVAKKKSKK（配列番号226）；ならびにステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイドの配列RKCLQAGMNLARKTKK（配列

10

20

30

40

50

番号 2 2 7) に由来する N L S 配列が挙げられる。

【 0 1 7 6 】

一部の実施形態では、C R I S P R 酵素は、1 つまたは複数の異種タンパク質ドメイン (例えば、C R I S P R 酵素に加えて、約 1 個または約 1 個よりも多く、約 2 個または約 2 個よりも多く、約 3 個または約 3 個よりも多く、約 4 個または約 4 個よりも多く、約 5 個または約 5 個よりも多く、約 6 個または約 6 個よりも多く、約 7 個または約 7 個よりも多く、約 8 個または約 8 個よりも多く、約 9 個または約 9 個よりも多く、約 1 0 個または約 1 0 個よりも多く、またはそれよりも多くのドメイン) を含む融合タンパク質の一部である。C R I S P R 酵素融合タンパク質は、任意の追加的なタンパク質配列、および必要に応じて任意の 2 つのドメイン間のリンカー配列を含み得る。C R I S P R 酵素と融合することができタンパク質ドメインの例としては、限定することなく、エプITOーブタグ、レポーター遺伝子配列、および以下の活性: メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、RNA 切断活性および核酸結合活性のうちの 1 つまたは複数を含むタンパク質ドメインが挙げられる。エプITOーブタグの非限定的な例としては、ヒスチジン (H i s) タグ、V 5 タグ、F L A G タグ、インフルエンザ赤血球凝集素 (H A) タグ、M y c タグ、V S V - G タグ、およびチオレドキシン (T r x) タグが挙げられる。レポーター遺伝子の例としては、これだけに限定されないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (G S T)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) ベータガラクトシダーゼ、ベータグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、H c R e d、D s R e d、シアン蛍光タンパク質 (C F P)、黄色蛍光タンパク質 (Y F P)、および青色蛍光タンパク質 (B F P) を含めた自己蛍光タンパク質が挙げられる。C R I S P R 酵素は、これだけに限定されないが、マルトース結合性タンパク質 (M B P)、S-タグ、L e x A D N A 結合性ドメイン (D B D) 融合、G A L 4 D N A 結合性ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス (H S V) B P 1 6 タンパク質融合物を含めた、D N A 分子に結合するまたは他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質の断片をコードする遺伝子配列と融合することができる。C R I S P R 酵素を含む融合タンパク質の一部を形成し得る追加的なドメインは、参照により本明細書に組み込まれる U S 2 0 1 1 0 0 5 9 5 0 2 に記載されている。一部の実施形態では、タグが付された C R I S P R 酵素を使用して標的配列の場所を同定する。

10

20

30

【 0 1 7 7 】

一部の実施形態では、カーゴは、塩基エディターを含む。C a s エンドヌクレアーゼをプログラム可能なヌクレオチドデアミナーゼに変換し、それによって、二本鎖切断を誘導せずに、C ~ T への突然変異 (C ~ U への脱アミノ化による) または A ~ G への突然変異 (A ~ I への脱アミノ化による) の導入を促進する塩基エディターが開発されている。塩基エディターは、核酸塩基デアミナーゼ酵素に融合した S p C a s 9 (n S p C a s 9、細胞の D N A ミスマッチ修復を刺激する) のニッカーゼ形態、およびウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (U G I) などの塩基除去修復の阻害剤を含む。Rees et al., Nature Communications Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery volume 8, Article number: 15790 (2017); Komor et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 533, 420-424 (2016) を参照されたい。

40

【 0 1 7 8 】

一部の実施形態では、カーゴは、プライムエディターを含む。プライム編集は、新たな遺伝子情報を特定の D N A 部位に直接的に書き込む多様かつ正確なゲノム編集方法である。これは、工学的に作製された逆転写酵素に融合した触媒的に損なわれた C a s 9 エンドヌクレアーゼからなる融合タンパク質、および標的部位を特定することができ、標的 D N A ヌクレオチドを置き換えるための新たな遺伝子情報を提供するプライム編集ガイド R N A (p e g R N A) を使用する。これは、二本鎖切断 (D S B) もドナー D N A 鋳型も必

50

要とせず、標的化された挿入、欠失、および塩基間変換を媒介する。Anzalone et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature volume 576, pages149-157(2019)を参照されたい。

【0179】

一部の実施形態では、カーゴは、触媒として機能しないヌクレアーゼ（例えば、触媒として機能しないCas9エンドヌクレアーゼなど）および逆転写酵素（例えば、M-MLV逆転写酵素のペンタ突然変異体など）を含む融合タンパク質を含む。例えば、Anzalone & Liu et al., Nature. 2019 Dec; 576 (7785): 149-157を参照されたい。一部の実施形態では、カーゴは、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。

10

【0180】

一部の実施形態では、カーゴは、触媒不活性化ヌクレアーゼ（例えば、触媒不活性化Cas9エンドヌクレアーゼ）と核酸塩基デアミナーゼ酵素を含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、核酸塩基デアミナーゼ酵素は、APOBEC1シチジンデアミナーゼである。一部の実施形態では、核酸塩基デアミナーゼ酵素は、シチジンデアミナーゼCDA1である。一部の実施形態では、融合タンパク質は、DNAグリコシラーゼ阻害剤をさらに含む。一部の実施形態では、DNAグリコシラーゼ阻害剤は、ウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤(UGI)である。一部の実施形態では、カーゴは、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。

20

ZFPおよびZFN; TAL、TALE、およびTALEN

【0181】

一部の実施形態では、カーゴ分子は、エンドヌクレアーゼなどのエフェクタータンパク質に融合した、1つまたは複数のジンクフィンガータンパク質(ZFP)または転写アクチベーター様タンパク質(TAL)などのDNA結合タンパク質(またはDNA結合タンパク質/エフェクタータンパク質融合体をコードする核酸)を含む。例としては、ZFN、TALE、およびTALENが挙げられる。Lloyd et al., Frontiers in Immunology, 4(221), 1-7 (2013)を参照されたい。一部の実施形態では、本明細書に記載のガイドRNAは、ZFPまたはTALを標的セットにガイドするRNAをコードするDNA(すなわち、ガイドDNA、gDNA)の形態であり得る。

30

ZFPおよびZFN

【0182】

一部の実施形態では、カーゴ分子は、配列特異的にDNAと結合する1つまたは複数のジンクフィンガータンパク質(ZFP)またはそのドメインを含む。ZFPまたはそのドメインは、亜鉛イオンの配位によってその構造が安定化される、結合ドメインの中にあるアミノ酸配列の領域である1つまたは複数のジンクフィンガーによって配列特異的にDNAに結合するタンパク質またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略されることが多い。

【0183】

ZFPの中には、個々のフィンガーのアセンブリーによって生成された、特定のDNA配列、一般には9~18ヌクレオチドの長さを標的とする人工的なZFPドメインがある。

40

【0184】

ZFPには、1個のフィンガードメインがおよそ30アミノ酸長であり、亜鉛を介して1つのベータターンの2個のシステインと配位する2個の変化しないヒスチジン残基を含有するアルファヘリックスを含有し、2個、3個、4個、5個、または6個のフィンガーを有するZFPが含まれる。一般的に、ZFPの配列特異性は、ジンクフィンガー認識ヘリックス上の4つのヘリックス位置(-1、2、3、および6)でアミノ酸置換を行うことによって変えられる可能性がある。よって、一部の実施形態では、ZFPまたはZFP含有分子は天然に存在せず、例えば、選択された標的部位と結合するように工学的に作製

50

されている。例えば、Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; 米国特許第6,453,242号; 同第6,534,261号; 同第6,599,692号; 同第6,503,717号; 同第6,689,558号; 同第7,030,215号; 同第6,794,136号; 同第7,067,317号; 同第7,262,054号; 同第7,070,934号; 同第7,361,635号; 同第7,253,273号; および米国特許公開第2005/0064474号; 同第2007/0218528号; 同第2005/0267061号を参照されたい。これらの全ては、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0185】

一部の実施形態では、カーゴ分子は、DNA切断ドメインに融合して、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を形成するジンクフィンガーDNA結合ドメインを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも1つのIIS型制限酵素に由来する切断ドメイン (または切断ハーフドメイン) および工学的に作製されていても、または工学的に作製されていなくてもよい1つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメインを含む。一部の実施形態では、切断ドメインは、IIS型制限エンドヌクレアーゼであるFokIに由来する。FokIは、一般に、一方の鎖にあるその認識部位から9ヌクレオチドおよび他方鎖にあるその認識部位から13ヌクレオチドで、DNAの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号、同第5,436,150号および同第5,487,994号、ならびにLi et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982]を参照されたい。

20

【0186】

一部の実施形態では、ZFNは、標的細胞内に存在する遺伝子を標的とする。一部の態様では、ZFNは、例えば、遺伝子のコード領域内の所定の部位で、二本鎖切断 (DSB) を効率的に生じる。標的とされる典型的な領域には、エクソン、N末端領域をコードする領域、第1のエクソン、第2のエクソン、およびプロモーターまたはエンハンサー領域が含まれる。一部の実施形態では、ZFNの一過的発現は、標的細胞の標的遺伝子の高度に効率的かつ永続的な破壊を促進する。特に、一部の実施形態では、ZFNの送達によって、50%を超える効率で遺伝子の永続的破壊がもたらされる。

30

【0187】

多くの遺伝子特異的に工学的に作製されたジンクフィンガーが市販されている。例えば、Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) と協力して、ジンクフィンガー構築に関するプラットフォーム (CompOZr) を開発し、研究者がジンクフィンガーの構築および検証を完全に回避することを可能にし、何千ものタンパク質に関して特異的に標的化されたジンクフィンガーを提供する。Gaj et al., Trends in Biotechnology, 2013, 31(7), 397-405。一部の実施形態では、市販のジンクフィンガーが使用されるか、またはカスタム仕様にされる。(例えば、Sigma-Aldrichカタログ番号CSTZFN、CSTZFN、CTI1-1KT、およびPZD0020を参照されたい)。

40

TALEおよびTALEN

【0188】

一部の実施形態では、カーゴ分子は、例えば、転写アクチベーター様タンパク質エフェクター (TALE) タンパク質におけるように、天然に存在するかまたは工学的に作製された (天然に存在しない) 転写アクチベーター様タンパク質 (TAL) DNA結合ドメインを含み、例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第2011

50

0301073号を参照されたい。

【0189】

T A L E DNA結合ドメインまたはT A L Eは、1つまたは複数のT A L Eリピートドメイン／単位を含むポリペプチドである。リピートドメインは、T A L Eのその同族の標的DNA配列への結合に関与する。単一の「リピート単位」（「リピート」とも称される）は、一般に、33～35アミノ酸長であり、天然に存在するT A L Eタンパク質内の他のT A L Eリピート配列と少なくとも一部の配列相同性を示す。各T A L Eリピート単位は、一般に、このリピートの12位および／または13位に、リピート可変二残基（Repeat Variable Diresidue）（RVD）を構成する1個または2個のDNA結合残基を含む。これらのT A L EのDNA認識に関する天然の（カノニカル）コードを、12位および13位のHD配列がシトシン（C）への結合をもたらし、N GがT、N IがAに結合し、N NがGまたはAに結合し、N GがTに結合し、非カノニカル（非典型的）RVDも公知であるように決定した。例えば、米国特許公開第20110301073号を参照されたい。一部の実施形態では、T A L Eは、標的DNA配列に対する特異性を有するT A L アレイの設計によって、いずれかの遺伝子に対して標的化され得る。標的配列は、一般に、チミジンで始まる。

10

【0190】

一部の実施形態では、カーゴ分子は、DNA結合エンドヌクレアーゼ、例えば、T A L Eヌクレアーゼ（T A L E N）を含む。一部の態様では、T A L E Nは、核酸標的配列を切断するためのT A L Eに由来するDNA結合ドメインおよびヌクレアーゼ触媒ドメインを含む融合タンパク質である。一部の実施形態では、T A L E DNA結合ドメインは、標的遺伝子内の標的配列に結合するように工学的に作製されている。

20

【0191】

一部の実施形態では、T A L E Nは、遺伝子内の標的配列を認識および切断する。一部の態様では、DNAの切断によって、二本鎖の切断がもたらされる。一部の態様では、この切断は、相同組換えまたは非相同末端結合（N H E J）の速度を刺激する。一般に、N H E Jは、DNA配列の切断部位に変化をもたらすことの多い不完全な修復プロセスである。一部の態様では、修復メカニズムは、直接的な再ライゲーション（Critchlow and Jackson, Trends Biochem Sci. 1998 Oct;23(10):394-8）による、またはいわゆるマイクロホモロジー媒介末端結合による、2つのDNA末端の残っている部分の再結合に関与する。一部の実施形態では、N H E Jによる修復は、小さな挿入または欠失をもたらし、これを使用して遺伝子を破壊し、それにより抑制することができる。一部の実施形態では、改変は、少なくとも1つのヌクレオチドの置換、欠失、または付加であり得る。一部の態様では、切断に誘導される突然変異誘発事象、すなわちN H E J事象に連続する突然変異誘発事象が起こった細胞は、当技術分野で周知の方法によって同定および／または選択することができる。

30

【0192】

一部の実施形態では、T A L Eリピートをアセンブルして、遺伝子を実験的に標的とする。（Gaj et al., Trends in Biotechnology, 2013, 31(7), 397-405）。18,740個のヒトのタンパク質コード遺伝子を標的とするT A L E Nのライブラリーを構築した（Kim et al., Nature Biotechnology. 31, 251-258 (2013)）。カスタム仕様のT A L Eアレイは、Collectis BioResearch（Paris, France）、Transposagen Biopharmaceuticals（Lexington, KY, USA）、およびLife Technologies（Grand Island, NY, USA）から市販されている。

40

【0193】

一部の実施形態では、T A L E Nは、1つまたは複数のプラスミドベクターによってコードされた導入遺伝子として導入される。一部の態様では、プラスミドベクターは、前記ベクターを受容した細胞の同定および／または選択をもたらす選択マーカ含有することができる。

50

ドナー核酸

【0194】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ドナー核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ドナー核酸は、例えばCRISPR複合体の一部としてのCRISPR酵素によってニックを入れられるまたは切断される標的配列内またはその付近での相同組換えの鑄型として機能するように設計される。ドナー核酸は、例えば、約10個または約10個よりも多く、約15個または約15個よりも多く、約20個または約20個よりも多く、約25個または約25個よりも多く、約50個または約50個よりも多く、約75個または約75個よりも多く、約100個または約100個よりも多く、約150個または約150個よりも多く、約200個または約200個よりも多く、約500個または約500個よりも多く、約1000個または約1000個よりも多く、またはそれよりも多くのヌクレオチドの長さなどの任意の適切な長さのものであってよい。一部の実施形態では、ドナー核酸は、標的配列を含むポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を含む。一部の実施形態では、ドナー核酸と標的配列を含むポリヌクレオチドを最適にアラインメントした場合、ドナー核酸は、標的配列の1つまたは複数のヌクレオチド（例えば、約1個または約1個よりも多く、約5個または約5個よりも多く、約10個または約10個よりも多く、約15個または約15個よりも多く、約20個または約20個よりも多く、約25個または約25個よりも多く、約30個または約30個よりも多く、約35個または約35個よりも多く、約40個または約40個よりも多く、約45個または約45個よりも多く、約50個または約50個よりも多く、約60個または約60個よりも多く、約70個または約70個よりも多く、約80個または約80個よりも多く、約90個または約90個よりも多く、約100個または約100個よりも多くまたはそれよりも多くのヌクレオチド）と重複する。一部の実施形態では、ドナー核酸と標的配列を含むポリヌクレオチドを最適にアラインメントした場合、相補性の領域内のドナー核酸の最も近くのヌクレオチドは、標的配列から約1ヌクレオチド以内、5ヌクレオチド以内、10ヌクレオチド以内、15ヌクレオチド以内、20ヌクレオチド以内、25ヌクレオチド以内、50ヌクレオチド以内、75ヌクレオチド以内、100ヌクレオチド以内、200ヌクレオチド以内、300ヌクレオチド以内、400ヌクレオチド以内、500ヌクレオチド以内、1000ヌクレオチド以内、5000ヌクレオチド以内、10000ヌクレオチド以内、またはそれよりも多くのヌクレオチド以内である。

KRASのRNAi標的化突然変異体

【0195】

一部の態様では、カーゴは、KRASの突然変異形態を標的とする1つまたは複数のRNAi（例えば、siRNA）をさらに含む。一部の実施形態では、KRASの突然変異形態は、KRASの異常を含み、KRASの異常は、KRASのコドン12、13、17、34および／または61に対する突然変異を含む。一部の実施形態では、KRASの異常は、KRASのコドン12、または61に対する突然変異を含む。一部の実施形態では、KRASの異常は、G12C、G12S、G12R、G12F、G12L、G12N、G12A、G12D、G12V、G13C、G13S、G13R、G13A、G13D、G13V、G13P、S17G、P34S、Q61E、Q61K、Q61L、Q61R、Q61P、Q61H、K117N、A146P、A146TおよびA146Vからなる群から選択される。一部の実施形態では、KRASの異常は、G12C、G12S、G12R、G12F、G12L、G12N、G12A、G12D、G12V、G13C、G13S、G13D、G13V、G13P、S17G、P34S、Q61K、Q61L、Q61R、およびQ61Hからなる群から選択される。一部の実施形態では、KRASの異常は、G12C、G12R、G12S、G12A、G12D、G12V、G13C、G13R、G13S、G13A、G13D、G13V、Q61K、Q61L、Q61R、Q61H、K117N、A146P、A146TおよびA146Vからなる群から選択される。一部の実施形態では、KRASの異常は、KRAS G12A、G12C、G12D、G12R、G12S、G12V、G13A、G13C、G13D、G13R、G1

3 S、G 1 3 V、Q 6 1 E、Q 6 1 H、Q 6 1 K、Q 6 1 L、Q 6 1 P、および Q 6 1 R からなる群から選択される。一部の実施形態では、K R A S の異常は、K R A S G 1 2 C、G 1 2 D、G 1 2 R、G 1 2 S、G 1 2 V および G 1 3 D からなる群から選択される。一部の実施形態では、K R A S の異常は、G 1 2 C、G 1 2 D および Q 6 1 K から選択される。

【0196】

一部の実施形態では、1 つまたは複数の R N A i（例えば、s i R N A）は、配列番号 2 2 8 ~ 2 3 4 からなる群から選択される。

改変

【0197】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているゲノム編集複合体またはナノ粒子は、標的化部分を含み、標的化部分は、細胞特異的標的化および／または核標的化の可能なリガンドである。細胞膜表面受容体および／または細胞表面マーカーは、前記リガンドに高い親和性、好ましくは高い特異性で結合することができる分子または構造である。前記細胞膜表面受容体および／または細胞表面マーカーは、好ましくは特定の細胞に対して特異的であり、すなわち、これは、一種の細胞において別の細胞種におけるよりも優勢に見いだされる（例えば、肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体を標的とするガラクトシル残基）。細胞膜表面受容体は、細胞標的化およびリガンドの標的細胞（例えば、標的化部分）および結合分子（例えば、本出願の複合体またはナノ粒子）への内在化を促進する。本出願の文脈において使用することができる多数のリガンド部分／リガンド結合パートナーは、文献において広く記載されている。このようなリガンド部分は、本出願の複合体またはナノ粒子に所与の結合パートナー分子または少なくとも1つの標的細胞の表面に局在化したあるクラスの結合パートナー分子と結合する能力を付与することができる。適切な結合パートナー分子としては、限定されないが、細胞特異的マーカー、組織特異的マーカー、細胞受容体、ウイルス抗原、抗原エピトープおよび腫瘍関連マーカーからなる群から選択されるポリペプチドが挙げられる。さらに、結合パートナー分子は、例えば、1 つまたは複数の糖、脂質、糖脂質、抗体分子もしくはその断片、またはアプタマーからなり得る、またはそれらを含み得る。本出願によれば、リガンド部分は、例えば、脂質、糖脂質、ホルモン、糖、ポリマー（例えば、P E G、ポリリシン、P E T）、オリゴヌクレオチド、ビタミン、抗原、レクチンの全てもしくはその一部、ポリペプチドの全てもしくはその一部、例えば J T S 1（W O 9 4 / 4 0 9 5 8）など、抗体もしくはその断片、またはこれらの組合せであってもよい。一部の実施形態では、本出願において使用されるリガンド部分は、最小で7アミノ酸長を有するペプチドまたはポリペプチドである。これは、ネイティブなポリペプチドまたはネイティブなポリペプチド由来のポリペプチドのいずれかである。「由来する」は、（a）ネイティブな配列に関する1つもしくは複数の改変（例えば、1 つまたは複数の残基の付加、欠失および／または置換）、（b）天然に存在しないアミノ酸を含むアミノ酸類似体、（c）置換された連結、または（d）当技術分野で公知の他の改変を含有することを意味する。リガンド部分としての役割を果たすポリペプチドは、例えば、マウス抗体の可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域を組み合わせるヒト化抗体などの種々の起源の配列を融合させることによって得られたバリエーションおよびキメラポリペプチドを包含する。さらに、このようなポリペプチドは、直鎖状または環化構造（例えば、ポリペプチドリガンドの両末端をシステイン残基で挟むことによって）を有し得る。さらに、リガンド部分として使用するポリペプチドは、化学的部分の置換または付加（例えば、グリコシル化、アルキル化、アセチル化、アミド化、リン酸化、スルフヒドリル基などの付加）によるその元の構造の改変を含み得る。本出願は、リガンド部分を検出可能にする改変をさらに企図する。このために、検出可能な部分を有する改変を予想することができる（すなわち、シンチグラフィー標識、放射性標識、または蛍光部分標識、または色素標識など）。このような検出可能な標識は、任意の従来の技法によってリガンド部分に結合することができ、診断目的で（例えば、腫瘍細胞のイメージング）使用することができる。一部の実施形態では、結合パートナー分子は、抗原（例えば、標的細胞

10

20

30

40

50

特異的抗原、疾患特異的抗原、工学的に作製された標的細胞の表面で特異的に発現される抗原)であり、リガンド部分は、免疫学のマニュアル(例えば、Immunology, third edition 1993, Roitt, Brostoff and Male, ed Gambli, Mosbyを参照されたい)に詳細に記載されたものなどの抗体、その断片または最小認識単位(例えば、抗原特異性を依然として提示する断片)である。リガンド部分は、モノクローナル抗体であってもよい。これらの抗原の多くに結合する多くのモノクローナル抗体は既に公知であり、モノクローナル抗体技術に関して当技術分野で公知の技法を使用して、ほとんどの抗原の抗体を調製することができる。リガンド部分は、抗体の一部(例えば、F a b断片)または合成抗体断片(例えば、S c F v)であってもよい。一部の実施形態では、リガンド部分は、全抗体ではなく、抗体断片の中で選択される。全抗体の有効な機能、例えば、相補的結合は除去される。S c F vおよびd A b抗体断片は、1つまたは複数の他のポリペプチドとの融合体として発現され得る。最小認識単位は、F v断片の相補性決定領域(C D R)のうちの1つまたは複数の配列に由来し得る。全抗体、およびF (a b') 2断片は、「二価」である。「二価」によって、前記抗体およびF (a b') 2断片が2つの抗原結合部位を有することが意味される。対照的に、F a b断片、F v断片、S c F v断片、d A b断片および最小認識単位は、1つの抗原結合部位のみを有する一価である。一部の実施形態では、リガンド部分は、腫瘍細胞への標的化を可能にし、腫瘍の状態に関連する分子、例えば、腫瘍特異的抗原、腫瘍細胞において差次的もしくは過剰に発現される細胞タンパク質、またはがん関連ウイルスの遺伝子産物を認識し、それに結合することができる。腫瘍特異的抗原の例としては、これだけに限定されないが、乳がんに関するM U C - 1 (Hareuven i et al., 990, Eur. J. Biochem 189, 475-486)、乳がんおよび卵巣がんに関する突然変異したB R C A 1およびB R C A 2遺伝子によってコードされている産物(Miki et al, 1994, Science 226, 66-7 1; Fuireal et al, 1994, Science 226, 120- 122; Wooster et al., 1995, Nature 378, 789-792)、結腸がんに関するA P C (Poiakis, 1995, Curr. Opin. Genet. Dev. 5, 66-71)、前立腺がんに関する前立腺特異的抗原(P S A) (Stamey et al., 1987, New England J. Med. 317, 909)、結腸がんに関する癌胎児抗原(C E A) (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748)、黒色腫に関するチロシナーゼ(Vile et al, 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864)、黒色腫細胞において高度に発現されるメラニン細胞刺激ホルモン(M S H)の受容体、乳がんおよび膵臓がんに関するE r b B - 2 (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175)、ならびに肝臓がんに関するアルファーフエトプロテイン(Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 46 1-465)が挙げられる。一部の実施形態では、リガンド部分は、M U C - 1抗原を認識し、それに結合することができる、よって、M U C - 1陽性腫瘍細胞を標的とすることができる、抗体の断片である。一部の実施形態では、リガンド部分は、M U C - 1抗原のタンデムリピート領域を認識するS M 3モノクローナル抗体のs c F v断片である(Burshell et al., 1987, Cancer Res. 47, 5476-5482; Girling et al., 1989, Int. J. Cancer 43, 1072-1076; Dokurno et al., 1998, J. Mol. Biol. 284, 713-728)。腫瘍細胞において差次的または過剰に発現される細胞タンパク質の例としては、これだけに限定されないが、一部のリンパ系腫瘍において過剰発現されるインターロイキン2(I L - 2)に関する受容体、肺癌細胞、膵臓、前立腺および胃の腫瘍において過剰発現されるG R P (ガストリン放出ペプチド) (Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660-668)、T N F (腫瘍壊死因子)受容体、上皮増殖因子受容体、F a s受容体、C D 4 0受容体、C D 3 0受容体、C D 2 7受容体、O X - 4 0、 α -vインテグリン(Brooks et al, 994, Science 264, 569)、ならびにある特定の血管新生増殖因子に関する受容体(Hanahan, 1997, Science 277, 48)が挙げられる。これらの指標に基づいて、このようなタンパク質を認識し、それに結合することができる適切なリガンド部分を定義することは、当業者の技術の範囲内である。例を挙げて説明すると、I L - 2は、T L - 2受容体と結合するのに適切なリガンド部分であ

10

20

30

40

50

る。線維症および炎症に特異的である受容体の場合には、これらは、TGFベータ受容体またはアデノシン受容体を含み、これらの受容体は、上文で確認され、本出願の組成物の適切な標的である。多発性骨髄腫の細胞表面マーカーは、これだけに限定されないが、CD56、CD40、FGFR3、CS1、CD138、IGF1R、VEGFR、およびCD38を含み、本出願の組成物にとって適切な標的である。これらの細胞表面マーカーと結合する適切なリガンド部分としては、これだけに限定されないが、抗CD56、抗CD40、PRO-001、Chir-258、HuLuc63、抗CD138-DM1、抗IGF1Rおよびベバシズマブが挙げられる。

【0198】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子は、以下のものを含むがこれだけに限定されない、1つまたは複数の遺伝子を標的とするゲノム編集系の1つまたは複数の分子（例えば、全ゲノム編集系）を含む：アデノシン受容体A2A、アデノシン受容体A2B、アデニリルシクラーゼ、Akt、ALK、ALK/Met、アングリオエチン受容体、アングリオテンシンII、APC、AR、ARK5、アレスチン、ATF1、ATF-2、B7-1、B7-h1 (pdl-1)、β-カテニン、Bcl-2、BCL2L12、Bcl6、Bcr-Ab1、BRAF、BRCA1、BRCA2、BTK、カスパーゼ-2、カスパーゼ-9、CCL2、CCN1、Ccnd2、CDK活性化キナーゼ、CEBPA、Chop、c-Jun、c-Myc、CREB、CREB1、CS1、CTGF、CTNNB1、CXCR4、サイクリンd1~2、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk1~13)、DEPTOR、DNMT3B、DPC4、EBOVポリメラーゼL、EGF、EGFR、eIF5A、Elk-1、ER、Erbb4、ERK、ESR1、Ets1、EWSR1、FAK、FGF、FGFR、FOXO1、Frizzledファミリー受容体 (FZD-1~10)、Fyn、GATA1、GATA3、GLI1、GM-CSF、GP/sGP、GSK、HBV保存配列、HDAC、HDGF、HDGFR、Her2、Her3、ヘキソキナーゼII、HGF、HGFR、HIF-1、HIF-1α、ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2、HIV TAR RNA、HIV Tat、HLA-B7/ベータ2-ミクログロブリン、HMGA2、HNF1A、HNF1B、Hsp27、HSP47、ヒトCCR5、Idh1、Idh2、IGF、IGFR、IKK、IKZF1、IL-12、IL-2、INK4、インターフェロナーガンマ、IRF1、IRF4、JAK、JNK、ケラチン16、ケラチン17、ケラチンK6A、ケラチンK6B、KGFR、KLF6、KRAS、LMO、LMO1、LMP2、LMP7、LOXL2、LPL、LYL1、MADR2、MAPK、Max、Mcl-1、MDA-7、MDM2、MDR-1、MDS1-EVI1、MECL-1、MEF2C、MEK、MEKK、MKK、MLH1、MLST8、MMP-2、MMP-9、MSFR、MSH2、MSH6、MSIN1、mTOR、MUC-1、変異型DDX3X、MYC、NCAP-D2、NCAP-D3、NCAP-G、NCAP-G2、NCAP-H、NCAP-H2、NF1、NF2、NFAT4、NF-κB、Notch1、NPC1、NR4A3、NRAS、Olig2、オステオポンチン、p53、PAI-1、PARP-1、パッチド (patched)、PAX3、PAX5、PAX7、PBX1、PDCD4、PDGF、PDGFR、PDK1、PHOX2B、PI3K、PKA、PKC、PKN3、PLK-1、PML、PR、PRAS40、PRDM16、Prdx1およびPrdx2 (パーキットリンパ腫)、Pre-gen/Pre-C、Pre-S1、Pre-S2/S、PTC、PTEN、Pyk2、Rad51、RAF、Raptor、Rb、RET、Rictor、RPN13、RRM2、RSVヌクレオカプシド、RUNX1、S6キナーゼ、Sap1a、SETBP1、Shc、SLAMF7、Smad、Smad3、Smad4、Smad7、SMC-2、SMC-4、スーズンド (smoothened)、SOX9、SPARC、Spry2、Src、β-2アドレナリン受容体 (ADRB2)、β-グロビン、STAT5B、STAT、サバイビン、Syk、Tall、TAL1、TGFR、TGF-α、TGF-β、TGFβ受容体1、TGFβ受容体2、TGFβ受容体3、TGFβ1、トロンボスポンジン、チミジンキナーゼ、TIM-1、

10

20

30

40

50

TIMP、TNF- α 、TP53、トランスサイレチン、TRPV1、ユビキチンリガーゼ、uPAR、VEGF、VEGFR、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VHL、VP24、VP30、VP35、VP40、wnt、WT1、WT2、XBP1（スプライシングされたものおよびスプライシングされていないもの）、XIAP、およびZBTB16（これらの変異型（例えば、変異型PTEN、変異型KRAS、変異型p53など）を含む）。例えば、一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、RGENに基づくゲノム編集系（例えば、CRISPR/Cas9ゲノム編集系）の1つまたは複数の分子を含み、RGENに基づくゲノム編集系は、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つを標的とするgRNAを含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ZFNに基づくゲノム編集系の1つまたは複数の分子を含み、ZFNは、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つを標的とする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、TALENに基づくゲノム編集系の1つまたは複数の分子を含み、TALENは、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つを標的とする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、ホーミングエンドヌクレアーゼに基づくゲノム編集系の1つまたは複数の分子を含み、ホーミングエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つを標的とする。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、インテグラーゼに基づくゲノム編集系の1つまたは複数の分子を含み、インテグラーゼは、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つを標的とする。

10

ナノ粒子

20

【0199】

本出願は、一態様では、上記のゲノム編集複合体のいずれか1つまたは複数を含むコアを含むナノ粒子を提供する。

【0200】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子であって、ゲノム編集送達複合体中の細胞透過性ペプチドが、カーゴと会合している、ナノ粒子が提供される。一部の実施形態では、会合は、共有結合によるものではない。一部の実施形態では、会合は、共有結合によるものである。

【0201】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、末梢細胞透過性ペプチド（すなわち、CPP）で構成される表層（例えば、殻）をさらに含み、殻によってコアがコーティングされている。一部の実施形態では、末梢CPPは、コア内のCPPと同じである。一部の実施形態では、末梢CPPは、コア内のCPPのいずれとも異なる。一部の実施形態では、末梢CPPとしては、これだけに限定されないが、PTDに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、MPGペプチド、CADDYペプチド、VEPEPペプチド（例えば、VEPEP-3、VEPEP-4、VEPEP-5、VEPEP-6、またはVEPEP-9ペプチドなど）、ADGN-100ペプチド、Pepp-1ペプチド、およびPepp-2ペプチドが挙げられる。一部の実施形態では、末梢CPPは、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、またはADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、末梢細胞透過性ペプチドは、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、表層内の末梢細胞透過性ペプチドの少なくとも一部が標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。一部の実施形態では、共有結合による連結は、化学的カップリングによるものである。一部の実施形態では、共有結合による連結は、遺伝学的方法によるものである。一部の実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子のコアと表層の間の中間層をさらに含む。一部の実施形態では、中間層は、中間CPPを含む。一部の実施形態では、中間CPPは、コア内のCPPと同じである。一部の実施形態では、中間CPPは、コア内のCPPのいずれとも異なる。一部の実施形態では、中間CPPとしては、これだけに限定されないが、PTDに基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギニンに基づくペプチド、MPGペプチ

30

40

50

ド、C A D Y ペプチド、V E P E P ペプチド（例えば、V E P E P - 3、V E P E P - 6、またはV E P E P - 9 ペプチドなど）、A D G N - 1 0 0 ペプチド、P e p - 1 ペプチド、およびP e p - 2 ペプチドが挙げられる。一部の実施形態では、中間C P P は、V E P E P - 3 ペプチド、V E P E P - 6 ペプチド、V E P E P - 9 ペプチド、またはA D G N - 1 0 0 ペプチドである。

【0202】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、本明細書に記載のガイドRNAのいずれか1つなどの2つまたはそれより多くのガイドRNAを含む。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くのガイドRNAは、2つまたはそれより多くの異なるK R A S 突然変異を標的とする。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの異なるK R A S 突然変異は、G 1 2 D、G 1 2 V、およびG 1 2 C からなる群から選択される。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くのガイドRNAは、同じゲノム編集複体内に含有される。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くのガイドRNAは、異なるゲノム編集複体内に含有される。

10

【0203】

一部の実施形態では、ナノ粒子のコアは、複数のゲノム編集複体を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子のコアは、所定の比で存在する複数のゲノム編集複体を含む。一部の実施形態では、所定の比は、以下により詳細に記載されている方法のいずれかにおいて、ナノ粒子の最も効果的な使用を可能にするように選択される。一部の実施形態では、ナノ粒子のコアは、1つもしくは複数の追加的なガイドRNA、1つもしくは複数の追加的な細胞透過性ペプチド、1つもしくは複数の追加的なゲノム編集ヌクレアーゼ、および／または1つもしくは複数の追加的なドナー核酸をさらに含む。

20

【0204】

一部の実施形態では、1つまたは複数の追加的なゲノム編集複体は、異なるK R A S 突然変異を標的とする少なくとも1つまたは複数のガイドRNAを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、a) G 1 2 D を特異的に標的とする第1のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 D を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第1のゲノム編集複体、およびb) G 1 2 V を特異的に標的とする第2のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 V を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第2のゲノム編集複体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、a) G 1 2 D を特異的に標的とする第1のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 D を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第1のゲノム編集複体、およびb) G 1 2 C を特異的に標的とする第2のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 C を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第2のゲノム編集複体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、a) G 1 2 C を特異的に標的とする第1のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 C を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第1のゲノム編集複体、およびb) G 1 2 V を特異的に標的とする第2のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 V を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第2のゲノム編集複体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、a) G 1 2 D を特異的に標的とする第1のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 D を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第1のゲノム編集複体、b) G 1 2 V を特異的に標的とする第2のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 V を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第2のゲノム編集複体、およびc) G 1 2 V を特異的に標的とする第2のガイドRNA（例えば、本明細書に記載のG 1 2 V を標的とするガイドRNAのいずれか1つ）を含む第2のゲノム編集複体を含む。

30

40

【0205】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、1つまたは複数の追加的な細胞透過性ペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の追加的な細胞透過性ペプチドとしては、これだけに限定されないが、P T D に基づくペプチド、両親媒性ペプチド、ポリアルギ

50

ニンに基づくペプチド、MPGペプチド、CADYペプチド、VEPEPペプチド（例えば、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、またはVEPEP-9ペプチド）、ADGN-100ペプチド、Pep-1ペプチド、およびPep-2ペプチドが挙げられる。一部の実施形態では、1つまたは複数の追加的な細胞透過性ペプチドの少なくとも一部は、標的化部分と連結している。一部の実施形態では、連結は、共有結合によるものである。

【0206】

本明細書に記載のナノ粒子のいずれかに従った一部の実施形態では、ナノ粒子の平均サイズ（直径）は、例えば、約50nmから約800nmまで、約75nmから約600nmまで、約100nmから約600nmまで、および約200nmから約400nmまでを含めた、約20nmから約1000nmまでである。一部の実施形態では、ナノ粒子の平均サイズ（直径）は、約1000ナノメートル（nm）以下、例えば、約900nm以下、800nm以下、700nm以下、600nm以下、500nm以下、400nm以下、300nm以下、200nm以下、または100nm以下のいずれかである。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約200nm以下である。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約150nm以下である。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約100nm以下である。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約20nm～約400nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約30nm～約400nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約40nm～約300nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約50nm～約200nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約60nm～約150nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子の標準または平均直径は、約70nm～約100nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子は、滅菌濾過可能である。

【0207】

一部の実施形態では、ナノ粒子のゼータ電位は、約-30mVから約60mVまで（例えば、おおよそ、-30mV、-25mV、-20mV、-15mV、-10mV、-5mV、0mV、5mV、10mV、15mV、20mV、25mV、30mV、35mV、40mV、45mV、50mV、55mV、および60mVのいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）である。一部の実施形態では、ナノ粒子のゼータ電位は、例えば、約-25mVから約25mVまで、約-20mVから約20mVまで、約-15mVから約15mVまで、約-10mVから約10mVまで、および約-5mVから約10mVまでを含めた、約-30mVから約30mVまでである。一部の実施形態では、ナノ粒子の多分散指数（PI）は、約0.05から約0.6まで（例えば、おおよそ、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、および0.6のいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）。一部の実施形態では、ナノ粒子は、実質的に無毒性である。

組成物

【0208】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）が提供される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子ならびに薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を含む医薬組成物である。

【0209】

一部の実施形態では、組成物は、2種またはそれよりも多くのナノ粒子の混合物を含み、ここで、この2種またはそれよりも多くのナノ粒子は、異なるKRAS突然変異を標的とする異なるガイドRNAを含む。例えば、一部の実施形態では、組成物は、a) KRAS G12Dを特異的に標的とする第1のガイドRNAを含む上記の第1のナノ粒子、およびb) KRAS G12Vを特異的に標的とする第2のガイドRNAを含む第2のナノ粒子を含む。一部の実施形態では、組成物は、a) KRAS G12Dを特異的に標的と

する第1のガイドRNAを含む上記の第1のナノ粒子、およびb) KRAS G12Cを特異的に標的とする第2のガイドRNAを含む第2のナノ粒子を含む。一部の実施形態では、組成物は、a) KRAS G12Cを特異的に標的とする第1のガイドRNAを含む上記の第1のナノ粒子、およびb) KRAS G12Vを特異的に標的とする第2のガイドRNAを含む第2のナノ粒子を含む。一部の実施形態では、組成物は、a) KRAS G12Dを特異的に標的とする第1のガイドRNAを含む上記の第1のナノ粒子、b) KRAS G12Vを特異的に標的とする第2のガイドRNAを含む第3のナノ粒子、c) KRAS G12Cを特異的に標的とする第2のガイドRNAを含む第2のナノ粒子を含む。

【0210】

一部の実施形態では、本明細書に記載のカーゴ送達複合体またはナノ粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）が提供される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載のカーゴ送達複合体またはナノ粒子ならびに薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を含む医薬組成物である。一部の実施形態では、組成物中の複合体またはナノ粒子の濃度は、例えば、約10 nMから約50 mMまで、約25 nMから約25 mMまで、約50 nMから約10 mMまで、約100 nMから約1 mMまで、約500 nMから約750 μMまで、約750 nMから約500 μMまで、約1 μMから約250 μMまで、約10 μMから約200 μMまで、および約50 μMから約150 μMまでを含めた、約1 nMから約100 mMまでである。一部の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥されたものである。

【0211】

「薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒトまたは他の脊椎動物宿主への投与に適合するありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含むものとする。一般には、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、連邦政府の規制当局、州政府、もしくは他の規制当局によって認可された、または米国薬局方もしくはヒトならびに非ヒト哺乳動物を含めた動物における使用に関して他の一般に認められている薬局方に収載されている希釈剤、賦形剤、および／または担体である。希釈剤、賦形剤、および／または「担体」という用語は、医薬組成物を共に投与する希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような医薬希釈剤、賦形剤、および／または担体は、滅菌された液体、例えば、水、および石油起源、動物起源、野菜起源または合成起源のものを含めた油などであり得る。水、生理食塩溶液および水性ブドウ糖およびグリセロール溶液を特に注射液用の液体希釈剤、賦形剤、および／または担体として使用することができる。適切な医薬希釈剤および／または賦形剤としては、凍結乾燥助剤を含め、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、イネ、穀粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望であれば、組成物は、微量の湿潤剤、増量剤、乳化剤、またはpH緩衝剤も含有し得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、持続放出製剤などの形態をとり得る。適切な医薬希釈剤、賦形剤、および／または担体の例は、

【0212】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を含む組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体をさらに含む。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、組成物中のゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集のレベルおよび／または組成物中のゲノム編集複合体もしくはナノ粒子によって媒介される細胞内送達の効率に影響を及ぼす。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体によって媒介される凝

10

20

30

40

50

集および／または送達効率に対する影響の程度および／または方向は、組成物中の薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体の相対量に依存する。

【0213】

例えば、一部の実施形態では、組成物中に薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体（例えば、塩、糖、化学緩衝剤、緩衝液、細胞培養培地、または担体タンパク質）が1つまたは複数の濃度で存在することは、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集を促進せず、かつ／もしくはそれに寄与しない、または、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子のサイズよりも多くとも約200%（例えば、多くとも、おおよそ、190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／もしくはそれに寄与する。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集を促進せず、かつ／もしくはそれに寄与しない、または、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子のサイズよりも多くとも約200%（例えば、多くとも、おおよそ、190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／もしくはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約150%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約100%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約50%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約20%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約15%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約10%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、これだけに限定することなく、NaClを含めた、塩である。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、これだけに限定することなく、スクロース、グルコース、およびマンニトールを含めた、糖である。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、これだけに限定することなく、HEPESを含めた、化学緩衝剤である。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、これだけに限定することなく、PBSを含めた、緩衝液である。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および／または担体は、これだけに限定することな

10

20

30

40

50

く、DMEMを含めた、細胞培養培地である。粒子サイズは、動的光散乱（DLS）によるものなどの、粒子サイズを測定するための当技術分野で公知の任意の手段を使用して決定することができる。例えば、一部の実施形態では、DLSによって測定されたZ-平均がゲノム編集複合体またはナノ粒子のDLSによって測定されたZ-平均よりも10%大きい凝集体は、ゲノム編集複合体またはナノ粒子よりも10%大きい。

【0214】

一部の実施形態では、組成物は、塩（例えば、NaCl）を、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集を促進せず、かつ／もしくはそれに寄与しない、または、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子のサイズよりも多くとも約100%（例えば、多くとも、おおよそ、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／もしくはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、塩（例えば、NaCl）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約75%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、塩（例えば、NaCl）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約50%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、塩（例えば、NaCl）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約20%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、塩（例えば、NaCl）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約15%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、塩（例えば、NaCl）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約10%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物中の塩の濃度は、約100mM以下（例えば、おおよそ、90mM以下、80mM以下、70mM以下、60mM以下、50mM以下、40mM以下、30mM以下、20mM以下、10mM以下、9mM以下、8mM以下、7mM以下、6mM以下、5mM以下、4mM以下、3mM以下、2mM以下、または1mM以下のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）である。一部の実施形態では、塩は、NaClである。

【0215】

一部の実施形態では、組成物は、糖（例えば、スクロース、グルコース、またはマンニトール）を、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集を促進せず、かつ／もしくはそれに寄与しない、または、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子のサイズよりも多くとも約25%（例えば、多くとも、おおよそ、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／もしくはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、糖（例えば、スクロース、グルコース、またはマンニトール）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約75%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、糖（例えば、スクロース、グルコース、またはマンニトール）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約50%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、

組成物は、糖（例えば、スクロース、グルコース、またはマンニトール）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 20 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、糖（例えば、スクロース、グルコース、またはマンニトール）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 15 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、糖（例えば、スクロース、グルコース、またはマンニトール）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 10 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物中の糖の濃度は、約 20 % 以下（例えば、おおよそ、18 % 以下、16 % 以下、14 % 以下、12 % 以下、10 % 以下、9 % 以下、8 % 以下、7 % 以下、6 % 以下、5 % 以下、4 % 以下、3 % 以下、2 % 以下、または 1 % 以下のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）である。一部の実施形態では、糖は、スクロースである。一部の実施形態では、糖は、グルコースである。一部の実施形態では、糖は、マンニトールである。

10

【0216】

一部の実施形態では、組成物は、化学緩衝剤（例えば、HEPES またはリン酸）を、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集を促進せず、かつ／もしくはそれに寄与しない、または、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 10 %（例えば、多くとも、おおよそ、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、または 1 % のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／もしくはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、化学緩衝剤（例えば、HEPES またはリン酸）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 7.5 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、化学緩衝剤（例えば、HEPES またはリン酸）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 5 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、化学緩衝剤（例えば、HEPES またはリン酸）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 3 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、化学緩衝剤（例えば、HEPES またはリン酸）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 1 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、化学緩衝剤（例えば、HEPES またはリン酸）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集の形成を促進せず、かつ／またはそれに寄与しない濃度で含む。一部の実施形態では、化学緩衝剤は、HEPES である。一部の実施形態では、HEPES を、HEPES を含む緩衝液の形態で組成物に添加する。一部の実施形態では、HEPES を含む溶液の pH は、約 5 から約 9 の間（例えば、おおよそ、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、および 9 のいずれかなどであり、これらの値の間のあらゆる範囲も含む）である。一部の実施形態では、組成物は、HEPES を、約 75 mM 以下（例えば、おおよそ、70 mM 以下、65 mM 以下、60 mM 以下、55 mM 以下、50 mM 以下、45 mM 以下、40 mM 以下、35 mM 以下、30 mM 以下、25 mM 以下、20 mM 以下、15 mM 以下、10 mM 以下またはそれ未満のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）の濃度で含む。一部の実施形態では、化学緩衝剤は、リン酸である。一部の実施形態では、リン酸を、リン酸を含む緩衝液の形態で組成物に添加する。一部の実施形態では、組成物は、PBS を含まない。

20

30

40

50

【0217】

一部の実施形態では、組成物は、細胞培養培地（例えば、DMEMまたはOpti-MEM）を、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集を促進せず、かつ／もしくはそれに寄与しない、または、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子のサイズよりも多くとも約200%（例えば、多くとも、おおよそで、190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／もしくはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、細胞培養培地（例えば、DMEMまたはOpti-MEM）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約150%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、細胞培養培地（例えば、DMEMまたはOpti-MEM）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約100%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、細胞培養培地（例えば、DMEMまたはOpti-MEM）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約50%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、細胞培養培地（例えば、DMEMまたはOpti-MEM）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約25%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、細胞培養培地（例えば、DMEMまたはOpti-MEM）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約10%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、DMEMである。一部の実施形態では、組成物は、DMEMを、約70%以下（例えば、おおよそで、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、またはそれ未満のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）の濃度で含む。

【0218】

一部の実施形態では、組成物は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）を、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集を促進せず、かつ／もしくはそれに寄与しない、または、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子のサイズよりも多くとも約200%（例えば、多くとも、おおよそで、190%、180%、170%、160%、150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%のいずれかなどであり、これらの値のいずれかの間のあらゆる範囲も含む）だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体もしくはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／もしくはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約150%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約100%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約50%だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形

10

20

30

40

50

態では、組成物は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 25 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、組成物は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）を、ゲノム編集複合体またはナノ粒子のサイズよりも多くとも約 10 % だけ大きいサイズを有するゲノム編集複合体またはナノ粒子の凝集体の形成を促進するおよび／またはそれに寄与する濃度で含む。一部の実施形態では、担体タンパク質は、アルブミンである。一部の実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。

【0219】

一部の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物を、静脈内投与、腫瘍内投与、動脈内投与、局部投与、眼内投与、点眼投与、門脈内投与、頭蓋内投与、脳内投与、脳室内投与、髄腔内投与、小胞内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、気管内投与、肺への投与、腔内投与、もしくは経口投与用、または噴霧（NB）もしくは気管内滴下注入用に製剤化する。

【0220】

例示的な投薬頻度としては、これだけに限定されないが、3日に1回以下が挙げられる。

調製方法

【0221】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を調製する方法が提供される。

【0222】

一部の実施形態では、上記のペプチドおよびカーゴ分子（例えば、ガイドRNA）を含むゲノム編集複合体を調製する方法であって、ペプチドをカーゴ分子と組み合わせ、それにより、ゲノム編集複合体を形成するステップを含む方法が提供される。

【0223】

一部の実施形態では、上記の通り第1の細胞透過性ペプチドおよび第2の細胞透過性ペプチドを含むゲノム編集複合体を調製する方法であって、a) 第1の細胞透過性ペプチドと第2の細胞透過性ペプチドとを組み合わせ、それにより、ペプチド混合物を形成するステップと、b) ペプチド混合物をカーゴと組み合わせ、それにより、ゲノム編集複合体を形成するステップとを含む方法が提供される。

【0224】

一部の実施形態では、ペプチドまたはペプチド混合物とカーゴ分子をそれぞれ約 1 : 1 から約 100 : 1 まで（例えば、およそ約 1 : 1 から約 50 : 1、例えば、約 2 : 1 から約 50 : 1 までの間）のモル比で組み合わせる。

【0225】

一部の実施形態では、方法は、カーゴ分子を含む第1の溶液をペプチドまたはペプチド混合物を含む第2の溶液と混合して第3の溶液を形成するステップを含み、ここで、第3の溶液は、i) 約 0 ~ 5 % のスクロース、ii) 約 0 ~ 5 % のグルコース、iii) 約 0 ~ 50 % の DMEM、iv) 約 0 ~ 80 mM の NaCl、または v) 約 0 ~ 20 % の PBS を含むまたはそれを含むように調整され、第3の溶液をインキュベートしてゲノム編集複合体を形成させる。一部の実施形態では、第1の溶液は、滅菌水中のカーゴを含み、かつ／または、第2の溶液は、滅菌水中のペプチドまたはペプチド混合物を含む。一部の実施形態では、第3の溶液を、インキュベートしてゲノム編集複合体を形成した後に、i) 約 0 ~ 5 % のスクロース、ii) 約 0 ~ 5 % のグルコース、iii) 約 0 ~ 50 % の DMEM、iv) 約 0 ~ 80 mM の NaCl、または v) 約 0 ~ 20 % の PBS を含むように調整する。

【0226】

一部の実施形態では、方法は、ゲノム編集複合体をポアサイズの膜を通して濾過する濾過プロセスをさらに含む。一部の実施形態では、ポアの直径は、少なくとも約 0.1 μm

10

20

30

40

50

(例えば、少なくとも約0.1 μm、0.15 μm、0.2 μm、0.25 μm、0.3 μm、0.35 μm、0.4 μm、0.45 μm、0.5 μm、0.6 μm、0.7 μm、0.8 μm、0.9 μm、1.0 μm、1.1 μmまたは1.2 μmなど)である。一部の実施形態では、ポアの直径は、約1.2 μm以下、1.0 μm以下、0.8 μm以下、0.6 μm以下、0.5 μm以下、0.45 μm以下、0.4 μm以下、0.35 μm以下、0.3 μm以下、または0.25 μm以下である。一部の実施形態では、ポートの直径は、約0.1 μm～約1.2 μm (例えば、約0.1～約0.8 μm、約0.2～約0.5 μmなど)である。

【0227】

一部の実施形態では、本出願のカーゴ分子送達複合体またはナノ粒子を含む安定な組成物に関して、複合体またはナノ粒子の平均直径は約10%よりも大きくは変化せず、また、多分散指数は約10%よりも大きくは変化しない。

【0228】

本明細書に記載の細胞透過性ペプチドを含むペプチドのいずれかの調製方法も提供される。

使用方法 (例えば、処置方法)

【0229】

本出願は、一態様では、個体における疾患 (例えば、がん) を処置する方法であって、個体に上記のガイドRNAを含むゲノム編集複合体またはナノ粒子を投与するステップを含む方法を提供する。本出願は、別の態様では、細胞における突然変異したKRASを改変する方法であって、細胞を上記のガイドRNAを含むゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含む方法を提供する。

【0230】

一部の実施形態では、個体におけるがん (例えば、膵がん、結腸直腸がんまたは肺がん) を処置する方法であって、個体に、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的) なヌクレオチド配列を含む、突然変異したKRASを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体またはナノ粒子を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的) なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、個体に静脈内に投与される。

【0231】

一部の実施形態では、細胞における突然変異したKRASを改変する方法であって、細胞を、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的) なヌクレオチド配列を含む、突然変異したKRASを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体またはナノ粒子と接触させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的) なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0232】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS G12Vを標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1、3、4、および6～8からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、および8からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。

【0233】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS G12Dを標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号15、16、19～21、および23からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号16、19～21、および23からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号19からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。

【0234】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS G12Cを標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相補的）なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号34に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。

【0235】

一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、第1の細胞透過性ペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG部分、Aun、Ava、およびAhxからなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、炭水化物部分（例えば、GalNAc）をさらに含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、ADGN-100ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号135～175、259～260、および267～269からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-3ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号44～62からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-6ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号63～117、261～266および270からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、VEPEP-9ペプチドである。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドは、配列番号118～134からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのガイドRNAに対するモル比は、約1：1から約80：1の間（例えば、約5：1から約20：1の間、例えば、約2：1から約50：1の間）である。一部の実施形態では、第1の細胞透過性ペプチドのCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するモル比は、約1：1から約80：1の間（例えば、約5：1から約20：1の間、例えば、約2：1から約50：1の間）である。一部の実施形態では、Casポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のガイドRNAに対するモル比は、約1：10から約50：1の

10

20

30

40

50

間（例えば、約 1 : 1 から約 10 : 1 の間）である。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ガイド RNA は、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、DNA ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）または DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0236】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、個体は、哺乳動物である。一部の実施形態では、個体は、ヒトである。

【0237】

一部の実施形態では、KRAS G12V 突然変異を有するがんを処置する方法であって、配列番号 1 ~ 14 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 相補的）または 100 % 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA を含むポリヌクレオチドを含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、配列番号 1、3、4、および 6 ~ 8 からなる群から選択される標的配列。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3、6、および 8 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3 に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、ガイド RNA は、シングルガイド RNA である。一部の実施形態では、組成物は、DNA ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）または DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

【0238】

一部の実施形態では、KRAS G12D 突然変異を有するがんを処置する方法であって、配列番号 15 ~ 28 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 相補的）または 100 % 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA を含むポリヌクレオチドを含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 15、16、19 ~ 21、および 23 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 16、19 ~ 21、および 23 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 19 からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、ガイド RNA は、シングルガイド RNA である。一部の実施形態では、組成物は、DNA ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）または DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

【0239】

一部の実施形態では、KRAS G12C 突然変異を有するがんを処置する方法であって、配列番号 29 ~ 37 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 相補的）または 100 % 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA を含むポリヌクレオチドを含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 34 に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、ガイド RNA は、シングルガイド RNA である。一部の実施形態では、組成物は、DNA ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）または DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、化学的に改変

されている。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

【0240】

一部の実施形態では、KRAS G12V突然変異を有するがんを処置する方法であって、a) 配列番号1～14からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含むガイドRNA、およびb) 細胞透過性ペプチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、配列番号1、3、4、および6～8からなる群から選択される標的配列。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、および8からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号196～205および235～240からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG部分、Aun、Ava、およびAhxからなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号44～195からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

10

20

【0241】

一部の実施形態では、KRAS G12D突然変異を有するがんを処置する方法であって、配列番号15～28からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含むガイドRNA、およびb) 細胞透過性ペプチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号15、16、19～21、および23からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号16、19～21、および23からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号19からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPEP-9ペプチド、およびADGN-100ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第1の細胞透過性ペプチドのN末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号196～205および235～240からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG部分、Aun、Ava、およびAhxからなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号44～195からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

30

40

【0242】

一部の実施形態では、KRAS G12C突然変異を有するがんを処置する方法であって

50

て、配列番号 29～37 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 相補的）または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA、および b) 細胞透過性ペプチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 34 に記載されている。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1 ペプチド、PEP-2 ペプチド、PEP-3 ペプチド、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、および ADGN-100 ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号 196～205 および 235～240 からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG 部分、Aun、Ava、および Ahx からなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号 44～195 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、KRAS G12V 突然変異を有するがんを処置する方法であって、a) 配列番号 1～14 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 相補的）または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA、b) 細胞透過性ペプチド、および c) DNA ヌクレアーゼまたは DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、配列番号 1、3、4、および 6～8 からなる群から選択される標的配列。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3、6、および 8 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3 に記載されている。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、Cas9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、改変された Cas9（例えば、触媒的に損なわれた Cas9）を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、融合タンパク質であり、この融合タンパク質は、塩基編集またはプライム編集を可能にする第 2 の酵素をさらに含む。一部の実施形態では、第 2 の酵素は、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1 ペプチド、PEP-2 ペプチド、PEP-3 ペプチド、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、および ADGN-100 ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号 196～205 および 235～240 からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG 部分、Aun、Ava、および Ahx からなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号 44～195 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

【0243】

一部の実施形態では、KRAS G12D 突然変異を有するがんを処置する方法であって、a) 配列番号 15～28 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例え

10

20

30

40

50

ば、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 相補的) または 100 % 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA、b) 細胞透過性ペプチド、および c) DNA ヌクレアーゼまたは DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 15、16、19～21、および 23 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 16、19～21、および 23 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 19 からなる群から選択される。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、Cas9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、改変された Cas9 (例えば、触媒的に損なわれた Cas9) を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、融合タンパク質であり、この融合タンパク質は、塩基編集またはプライム編集を可能にする第 2 の酵素をさらに含む。一部の実施形態では、第 2 の酵素は、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1 ペプチド、PEP-2 ペプチド、PEP-3 ペプチド、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、および ADGN-100 ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号 196～205 および 235～240 からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG 部分、Aun、Ava、および Ahx からなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号 44～195 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

10

20

30

40

50

【0244】

一部の実施形態では、KRAS G12C 突然変異を有するがんを処置する方法であって、a) 配列番号 29～37 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的 (例えば、少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 相補的) または 100 % 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA、b) 細胞透過性ペプチド、および c) DNA ヌクレアーゼまたは DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 34 に記載されている。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、Cas9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、改変された Cas9 (例えば、触媒的に損なわれた Cas9) を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、融合タンパク質であり、この融合タンパク質は、塩基編集またはプライム編集を可能にする第 2 の酵素をさらに含む。一部の実施形態では、第 2 の酵素は、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、CADY、PEP-1 ペプチド、PEP-2 ペプチド、PEP-3 ペプチド、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、および ADGN-100 ペプチドからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結したアセチル基を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む。一部の実施形態では、標的化ペプチドは、配列番号 196～205 および 235～240 からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ポリグリシンリンカー部分、PEG 部分、Aun、Ava、および A

h x からなる群から選択されるリンカー部分を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号 44～195 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

【0245】

一部の実施形態では、K R A S G 1 2 V 突然変異を有するがんを処置する方法であって、a) 配列番号 1、3、4、および 6～8（例えば、配列番号 3、6、および 8）からなる群から選択される標的配列と 100% 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA；b) 配列番号 89、92～103、105～107、112～114、137～138、154～155、157～158、162、167、170 および 172 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む細胞透過性ペプチド、ならびに c) DNA ヌクレアーゼまたは DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3 に記載されているアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、C a s 9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、改変された C a s 9（例えば、触媒的に損なわれた C a s 9）を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、融合タンパク質であり、この融合タンパク質は、塩基編集またはプライム編集を可能にする第 2 の酵素をさらに含む。一部の実施形態では、第 2 の酵素は、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

10

20

【0246】

一部の実施形態では、K R A S G 1 2 D 突然変異を有するがんを処置する方法であって、a) 配列番号 15、16、19～21、および 23 からなる群から選択される標的配列と 100% 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA；b) 配列番号 89、92～103、105～107、112～114、137～138、154～155、157～158、162、167、170 および 172 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む細胞透過性ペプチド、ならびに c) DNA ヌクレアーゼまたは DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 19 に記載されているアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、C a s 9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、改変された C a s 9（例えば、触媒的に損なわれた C a s 9）を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、融合タンパク質であり、この融合タンパク質は、塩基編集またはプライム編集を可能にする第 2 の酵素をさらに含む。一部の実施形態では、第 2 の酵素は、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

30

【0247】

一部の実施形態では、K R A S G 1 2 C 突然変異を有するがんを処置する方法であって、a) 配列番号 29、31、33、および 34 からなる群から選択される標的配列と 100% 相補的なヌクレオチド配列を含むガイド RNA；b) 配列番号 89、92～103、105～107、112～114、137～138、154～155、157～158、162、167、170 および 172 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む細胞透過性ペプチド、ならびに c) DNA ヌクレアーゼまたは DNA ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集複合体を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 34 に記載されているアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、C a s 9 ポリペプチドである。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、改変された C a s 9（例えば、触媒的に損なわれた C a s 9）を含む。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、融合タンパク質であり、この融合タンパク質は、塩基編集またはプライム編集を可能にする第 2 の酵素をさらに含む。一部の実施形態では、第 2 の酵素は、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ

40

50

酵素を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。

【0248】

一部の実施形態では、心臓における疾患または状態を処置する方法であって、a)細胞透過性ペプチド、ならびにb)ガイドRNAおよび／またはDNAヌクレアーゼもしくはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号114、153、154、96、100、および101のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号114のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS突然変異（例えば、G12D、G12V、またはG12C突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、19、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas9またはCas12aポリヌクレオチドである。

10

20

【0249】

一部の実施形態では、脳における疾患または状態（例えば、脳腫瘍）を処置する方法であって、a)細胞透過性ペプチド、ならびにb)ガイドRNAおよび／またはDNAヌクレアーゼもしくはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号97、112、および113のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS突然変異（例えば、G12D、G12V、またはG12C突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、19、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas9またはCas12aポリヌクレオチドである。

30

40

【0250】

一部の実施形態では、筋肉における疾患または状態を処置する方法であって、a)細胞透過性ペプチド、ならびにb)ガイドRNAおよび／またはDNAヌクレアーゼもしくはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチド

50

は、配列番号 95、98、114、100、および 101 のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイド RNA は、KRAS 突然変異（例えば、G12D、G12V、または G12C 突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 1～37、241～257 および 271 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 相補的）または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3、19、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、ガイド RNA は、シングルガイド RNA である。一部の実施形態では、ガイド RNA は、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、Cas9 または Cas12a ポリヌクレオチドである。

10

20

30

40

50

【0251】

一部の実施形態では、肺における疾患または状態（例えば、肺がん）を処置する方法であって、a) 細胞透過性ペプチド、ならびに b) ガイド RNA および／または DNA ヌクレアーゼもしくは DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号 89、90、92～94、96、98、99、100、101、105～107、113、137、138、153～155、157、158、162、164、167、および 170 のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイド RNA は、KRAS 突然変異（例えば、G12D、G12V、または G12C 突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 1～37、241～257 および 271 からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 相補的）または 100% 相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 3、19、および 34 からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化 crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイド RNA。一部の実施形態では、ガイド RNA は、シングルガイド RNA である。一部の実施形態では、ガイド RNA は、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNA ヌクレアーゼは、Cas9 または Cas12a ポリヌクレオチドである。

【0252】

一部の実施形態では、肝臓における疾患または状態（例えば、肝臓がん）を処置する方法であって、a) 細胞透過性ペプチド、ならびに b) ガイド RNA および／または DNA ヌクレアーゼもしくは DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号 89、90、95、96、98、112、137、138、153～155、157、158、172、164、153、162、167、100、および 101 のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号 89、90、95、98、112、137、138、153～155、157、158、および 172 のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入

を介して投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS突然変異（例えば、G12D、G12V、またはG12C突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、19、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas9またはCas12aポリヌクレオチドである。

10

20

30

40

50

【0253】

一部の実施形態では、腎臓における疾患または状態（例えば、腎臓がん）を処置する方法であって、a)細胞透過性ペプチド、ならびにb)ガイドRNAおよび／またはDNAヌクレアーゼもしくはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号89、90、93、96～98、137、100、101、138、154、155、および172のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号93、97、98、137、100、101、138、154、および155のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS突然変異（例えば、G12D、G12V、またはG12C突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、19、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas9またはCas12aポリヌクレオチドである。

【0254】

一部の実施形態では、脾臓における疾患または状態（例えば、脾臓がん）を処置する方法であって、a)細胞透過性ペプチド、ならびにb)ガイドRNAおよび／またはDNAヌクレアーゼもしくはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号98、99、137、138、153、154、155、および162のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号98、99、137、138、153、154、および155のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS突然変異（例えば、G12D、G12V、またはG12C突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～37、24

1～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas9またはCas12aポリヌクレオチドである。

10

【0255】

一部の実施形態では、脾臓における疾患または状態を処置する方法であって、a)細胞透過性ペプチド、ならびにb)ガイドRNAおよび／またはDNAヌクレアーゼもしくはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号93、153、154、および158のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号93および158のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS突然変異（例えば、G12D、G12V、またはG12C突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態は、標的配列は、配列番号3、19、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA（tracrRNA）をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas9またはCas12aポリヌクレオチドである。

20

30

【0256】

一部の実施形態では、腫瘍（例えば、固形腫瘍）における疾患または状態を処置する方法であって、a)細胞透過性ペプチド、ならびにb)ガイドRNAおよび／またはDNAヌクレアーゼもしくはDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むゲノム編集複合体を含む組成物を投与するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号94、96、98～101、105～107、153、154、162、164、167、および170のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、配列番号94、96、98～101、105～107、162、164、167、および170のいずれかのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体は、静脈内、筋肉内、皮下に、または噴霧もしくは気管内滴下注入を介して投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAは、KRAS突然変異（例えば、G12D、G12V、またはG12C突然変異）を標的とする。一部の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%相補的）または100%相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1、3、4、

40

50

6～8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、6、8、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号3、19、および34からなる群から選択される。一部の実施形態では、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含むガイドRNA。一部の実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。一部の実施形態では、DNAヌクレアーゼは、Cas9またはCas12aポリヌクレオチドである。

KRAS異常

【0257】

一部の実施形態では、がん組織は、KRAS異常を有する。一部の実施形態では、KRASの異常は、コドン12に対する突然変異を含む。一部の実施形態では、KRASの異常は、G12C、G12D、およびG12Vからなる群から選択される。一部の実施形態では、KRASの異常は、G12C、G12Dおよび／またはG12Vである。

【0258】

KRASの遺伝子異常は、試料、例えば、個体由来の試料および／または参照試料に基づいて評価することができる。一部の実施形態では、試料は、組織試料または組織試料から抽出された核酸である。一部の実施形態では、試料は、細胞試料（例えば、CTC試料）または細胞試料から抽出された核酸である。一部の実施形態では、試料は、腫瘍生検である。一部の実施形態では、試料は、腫瘍試料または腫瘍試料から抽出された核酸である。一部の実施形態では、試料は、生検試料または生検試料から抽出された核酸である。一部の実施形態では、試料は、ホルムアルデヒド固定パラフィン包埋（FFPE）試料またはFFPE試料から抽出された核酸である。一部の実施形態では、試料は、血液試料である。一部の実施形態では、無細胞DNAが、血液試料から単離される。一部の実施形態では、生体試料は、血漿試料または血漿試料から抽出された核酸である。

【0259】

KRASの遺伝子異常は、当技術分野で公知の任意の方法によって決定することができる。例えば、Dickson et al. Int. J. Cancer, 2013, 132(7): 1711-1717; Wagle N. Cancer Discovery, 2014, 4:546-553; およびCancer Genome Atlas Research Network. Nature 2013, 499: 43-49を参照されたい。例示的な方法としては、これだけに限定されないが、ゲノムDNA配列決定、バイサルファイト配列決定またはSanger配列決定もしくは次世代配列決定プラットフォームを使用する他のDNA配列決定に基づく方法; ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ; in situハイブリダイゼーションアッセイ; およびDNAマイクロアレイが挙げられる。個体から単離された試料由来の1つまたは複数の遺伝子のエピジェネティック特色（例えば、DNAメチル化、ヒストン結合、またはクロマチン改変）は、対照試料由来の1つまたは複数の遺伝子のエピジェネティック特色と比較され得る。試料から抽出された核酸分子は、参照配列、例えば、KRASの野生型配列と比較した遺伝子異常の存在について配列決定または分析され得る。

【0260】

一部の実施形態では、KRASの遺伝子異常は、無細胞DNA配列決定法を使用して評価される。一部の実施形態では、KRASの遺伝子異常は、次世代配列決定を使用して評価される。一部の実施形態では、血液試料から単離されたKRASの遺伝子異常は、次世代配列決定を使用して評価される。一部の実施形態では、KRASの遺伝子異常は、エクソーム配列決定を使用して評価される。一部の実施形態では、KRASの遺伝子異常は、蛍光in situハイブリダイゼーション分析を使用して評価される。一部の実施形態では、KRASの遺伝子異常は、本明細書に記載の処置方法の開始前に評価される。一部の実施形態では、KRASの遺伝子異常は、本明細書に記載の処置方法の開始後に評価される。一部の実施形態では、KRASの遺伝子異常は、本明細書に記載の処置方法の開始の前および後に評価される。KRASの異常なレベルは、異常な発現レベルまたは異常な

10

20

30

40

50

活性レベルを指し得る。

疾患（例えば、がん）

【0261】

一部の実施形態では、疾患は、がんである。一部の実施形態では、疾患は、骨髓異形成症候群である。

【0262】

一部の実施形態では、がんは、白血病またはリンパ腫である。一部の実施形態では、がんは、固形腫瘍である。

【0263】

一部の実施形態では、固形腫瘍としては、これだけに限定されないが、肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、カポジ肉腫、軟部肉腫、子宮サクロノーマ滑膜腫（uterine sacronomasynovioma）、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏枝神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫などが挙げられる。

【0264】

一部の実施形態では、疾患は、骨髓異形成症候群、肺がん（例えば、NSCLC、小細胞肺癌、扁平上皮肺癌）、結腸直腸がん、急性骨髓性白血病、膵がん、直腸がん、食道扁平上皮癌、消化管間質腫瘍、頭頸部扁平上皮がん、膵管腺癌、多発性骨髓腫、および神経膠腫からなる群から選択される。

【0265】

一部の実施形態では、がんは、膵がん（例えば、膵管腺癌）である。

【0266】

一部の実施形態では、がんは、結腸直腸がんである。

【0267】

一部の実施形態では、がんは、肺がん（例えば、NSCLC）である。

【0268】

一部の実施形態では、がんは、悪性および／または進行がんである。

併用療法

【0269】

個体における上で議論した疾患（例えば、がん）を処置するための併用療法であって、
a) 個体に本明細書に記載のゲノム編集複合体またはナノ粒子を投与するステップと、b) 個体に第2の薬剤または治療を投与するステップとを含む併用療法もまた、本明細書で提供される。本明細書に記載の第2の薬剤は、疾患を処置するために有用な任意の薬物療法または治療（例えば、疾患に対する標準的治療）であり得る。一部の実施形態では、第2の薬剤は、化学療法剤を含む。一部の実施形態では、第2の薬剤は、タキサンを含む。一部の実施形態では、第2の薬剤は、細胞毒性ヌクレオシドアナログを含む。

【0270】

一部の実施形態では、個体におけるがん（例えば、膵がん）を処置する方法であって、
a) 個体に、本明細書に記載のガイドRNAを有効量で含むゲノム編集複合体またはナノ粒子を投与するステップと、b) 個体に、ゲムシタビン、5-FU、オキサリプラチン、タキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、アルブミン結合パクリタキセル（例えば、アブラキサン））、カペシタビン（例えば、ゼローダ）、シスプラチン、イリノテカン（例えば、カンプトサル（camptosar））、EGFR阻害剤（例えば、エルロチニブ）、PARP阻害剤（例えば、オラパリブ）、NTRK阻害剤（例えば、ラトロレクチニブ、例えば、エヌトレクチニブ）、およびチェックポイント阻害剤（例えば、P

10

20

30

40

50

D-1阻害剤、例えば、ペムブロリズマブ)からなる群から選択される第2の薬剤を有効量で投与するステップとを含む方法が提供される。一部の実施形態では、第2の薬剤は、タキサン(例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、アルブミン結合パクリタキセル(例えば、アブラキサン))である。一部の実施形態では、第2の薬剤は、アブラキサンである。一部の実施形態では、アブラキサンは、1週間に約1回の頻度で投与される。一部の実施形態では、アブラキサンは、ヒトに約5~25mgの用量で投与される。一部の実施形態では、第2の薬剤は、カペシタビン(例えば、ゼローダ)である。一部の実施形態では、カペシタビンは、1週間に約1回の頻度で投与される。一部の実施形態では、カペシタビンは、ヒトに約25~100mgの用量で投与される。

【0271】

一部の実施形態では、個体におけるがん(例えば、膵がん)を処置する方法であって、a)個体に、本明細書に記載のガイドRNAを有効量で含むゲノム編集複合体またはナノ粒子を投与するステップと、b)個体に、タキサン(例えば、パクリタキセル)またはmTOR阻害剤(例えば、ラパマイシン)と担体タンパク質(例えば、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン)とを含むナノ粒子組成物を有効量で投与するステップとを含む方法が提供される。一部の実施形態では、がん組織は、KRAS G12D突然変異を有する。一部の実施形態では、タキサンは、パクリタキセルである。一部の実施形態では、他の薬剤は、nab-パクリタキセルである。一部の実施形態では、mTOR阻害剤は、ラパマイシンである。一部の実施形態では、他の薬剤は、nab-ラパマイシンである。一部の実施形態では、方法は、化学療法剤(例えば、ゲムシタビン)を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、個体は、ヒトである。一部の実施形態では、タキサン(例えば、パクリタキセル)またはmTOR阻害剤(例えば、ラパマイシン)を含むナノ粒子は、200nm以下の平均直径を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子中のタキサン(例えば、パクリタキセル)またはmTOR阻害剤(例えば、ラパマイシン)は、担体タンパク質(例えば、アルブミン)でコーティングされる。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物中の担体タンパク質(例えば、アルブミン)とタキサン(例えば、パクリタキセル)またはmTOR阻害剤(例えば、ラパマイシン)との重量比は、約9:1またはそれ未満である。一部の実施形態では、アルブミンは、ヒトアルブミンである。一部の実施形態では、個体(例えば、ヒト)における各投与のためのナノ粒子組成物中のタキサン(例えば、パクリタキセル)またはmTOR阻害剤(例えば、ラパマイシン)の用量は、約1mg/m²~約150mg/m²である。

【0272】

一部の実施形態では、個体におけるがん(例えば、結腸直腸がん)を処置する方法であって、a)個体に、本明細書に記載のガイドRNAを有効量で含むゲノム編集複合体またはナノ粒子を投与するステップと、b)個体に、5-FU、カペシタビン、イリノテカン、オキサリプラチン、トリフルリジン(trifluridine)とチピラシルとの組合せ、血管新生阻害剤(例えば、VEGFまたはVEGFRアンタゴニスト、例えば、ベバシズマブ、例えば、ラムシルマブ、例えば、アフリベルセプト)、ならびにチェックポイント阻害剤(例えば、PD-1またはCTLA-4阻害剤、例えば、ペムブロリズマブ、例えば、ニボルマブ、例えば、イピリムマブ(ipilimumab))からなる群から選択される第2の薬剤を有効量で投与するステップとを含む方法が提供される。

【0273】

一部の実施形態では、個体におけるがん(例えば、結腸直腸がん)を処置する方法であって、a)個体に、本明細書に記載のガイドRNAを有効量で含むゲノム編集複合体またはナノ粒子を投与するステップと、b)個体に、細胞毒性ヌクレオシドアナログ(例えば、カペシタビンまたはそのアナログ)を有効量で投与するステップとを含む方法が提供される。「生理的条件下で容易に加水分解可能なラジカル」を含む一連のカペシタビンアナログは、Fujira(米国特許第4,966,891号)によって特許請求されており、参照により本明細書に組み込まれる。Fujiraによって記載されたシリーズには、5'-デオキシ-5-フルオロシチジンのN4アルキルおよびアラルキルカルバメートが含

10

20

30

40

50

まれ、これらの化合物が、通常の生理的条件下での加水分解によって活性化されて、5'-デオキシ-5-フルオロシチジンを提供することが含意される。一部の実施形態では、がん組織は、KRAS G12V突然変異を有する。一部の実施形態では、個体（例えば、ヒト）における各投与のためのカペシタビンの用量は、約1mg/m²～約150mg/m²である。

【0274】

一部の実施形態では、個体（例えば、ヒト）における各投与のためのナノ粒子組成物中のタキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）の用量は、約10mg/m²～約50mg/m²である。一部の実施形態では、個体（例えば、ヒト）における各投与のためのガイドRNAの用量は、約0.001mg/kg～約10mg/kg（例えば、約0.01mg/kg～約1mg/kg、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約0.01mg/kg～約0.1mg/kg）である。一部の実施形態では、個体（例えば、ヒト）における各投与のためのガイドRNAの用量は、約0.01mg/m²～約400mg/m²（例えば、約0.1mg/m²～約100mg/m²、約1mg/m²～約50mg/m²）である。

【0275】

一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子は、DNAヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、個体（例えば、ヒト）における各投与のためのDNAヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするポリヌクレオチドの用量は、約0.001mg/kg～約10mg/kg（例えば、約0.01mg/kg～約1mg/kg、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約0.01mg/kg～約0.1mg/kg）である。一部の実施形態では、個体（例えば、ヒト）における各投与のためのDNAヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするポリヌクレオチドの用量は、約0.01mg/m²～約400mg/m²（例えば、約0.1mg/m²～約100mg/m²、約1mg/m²～約50mg/m²）である。

併用療法の投薬およびその投与方法

【0276】

一部の実施形態では、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療は、同時に投与される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療は、順次投与される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療は、同時発生的に投与される。

【0277】

ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療の投薬頻度は、投与する医師の判断に基づいて、処置の過程にわたって調整され得る。別々に投与される場合、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療は、異なる投薬頻度または間隔で投与され得る。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療の持続連続放出製剤が使用される。持続放出を達成するための種々の製剤およびデバイスは、当技術分野で公知である。本明細書に記載の投与構成の組合せもまた使用され得る。

【0278】

一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子組成物は、1週間に約2回から2週間に約1回（例えば、1週間に約1回）の頻度で個体に投与される。一部の実施形態では、ゲノム編集複合体またはナノ粒子組成物は、個体に少なくとも2回投与される。

【0279】

ゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療は、同じ投与経路または異なる投与経路を使用して投与され得る。本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体または第2の薬剤／治療は、静脈内投与、腫瘍内投与、動脈内投与、局部投与、眼内投与、点眼投与、門脈内投与、頭蓋内投与、脳内投与、脳室内投与、髄腔内投与、小胞内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、鼻

腔内投与、気管内投与、肺への投与、腔内投与、もしくは経口投与、または噴霧（NB）もしくは気管内滴下注入のいずれかによって、個体に投与される。

【0280】

一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療を、全身または局部投与のために製剤化する。一部の実施形態では、本明細書に記載のゲノム編集複合体もしくはナノ粒子組成物および／または第2の薬剤／治療を、静脈内投与、腫瘍内投与、動脈内投与、局部投与、眼内投与、点眼投与、門脈内投与、頭蓋内投与、脳内投与、脳室内投与、髄腔内投与、小胞内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、気管内投与、肺への投与、腔内投与、もしくは経口投与用、または噴霧（NB）もしくは気管内滴下注入用に製剤化する。

10

【0281】

一部の実施形態では、ヒトまたは哺乳動物対象の処置のためのカーゴ中のガイドRNAまたは総核酸（例えば、ガイドRNA、およびDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド）の投薬量は、各投与について約0.001mg/kg～約100mg/kgの範囲内である。一部の実施形態では、カーゴ中のガイドRNAまたは総核酸（例えば、ガイドRNA、およびDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド）の例示的な投薬量は、個体における各投与について、約0.005mg/kg～約0.5mg/kg（例えば、約0.01mg/kg～約0.05mg/kg、約0.02mg/kg～約0.04mg/kg）である。一部の実施形態では、個体は、ヒトである。

20

【0282】

一部の実施形態では、ヒトまたは哺乳動物対象の処置のためのカーゴ中のガイドRNAまたは総核酸（例えば、ガイドRNA、およびDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド）の投薬量は、各投与について約0.01mg/m²～約1000mg/m²の範囲内である。一部の実施形態では、カーゴ中のガイドRNAまたは総核酸（例えば、ガイドRNA、およびDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド）の例示的な投薬量は、個体における各投与について、約0.01mg/m²～約50mg/m²（例えば、約0.1mg/m²～約5mg/m²、約0.5mg/m²～約3mg/m²）である。一部の実施形態では、個体は、ヒトである。

【0283】

ナノ粒子組成物中のタキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）の例示的な有効量としては、これだけに限定されないが、各投与について、約1mg/m²～150mg/m²のタキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）が挙げられる。一部の実施形態では、タキサンまたはmTOR阻害剤を含むナノ粒子組成物の投薬頻度は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、および11回にわたって、2日に1回である。一部の実施形態では、投薬頻度は、5回にわたって、2日に1回である。一部の実施形態では、タキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）は、少なくとも10日間の期間にわたって投与され、ここで、各投与間の間隔は、約2日間以下であり、各投与におけるタキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）の用量は、約1mg/m²～約150mg/m²である。一部の実施形態では、タキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）は、28日サイクルの1日目、8日目、および15日目に投与され、各投与におけるタキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）の用量は、約1mg/m²～約150mg/m²である。一部の実施形態では、タキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）は、28日サイクルの1日目、8日目、および15日目に、30分間にわたって静脈内に投与され、各投与におけるタキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）の用量は、約1mg/m²～約150mg/m²である。一部の実施形態では、タキサンは、パクリタキセルである。一部の実施形態では、ナノ粒子組成物中のタキサン（例えば、パクリタキセル）またはmTOR阻害剤（例えば、ラパマイ

30

40

50

シン)の投薬量は、毎週のスケジュールで与えられる場合、 $5 \sim 150 \text{ mg/m}^2$ (例えば、 $80 \sim 150 \text{ mg/m}^2$ 、例えば、 $100 \sim 120 \text{ mg/m}^2$)の範囲内であり得る。ナノ粒子組成物(例えば、パクリタキセル/アルブミンナノ粒子組成物)の投与のための他の例示的な投薬スケジュールとしては、これだけに限定されないが、中断なしに毎週 100 mg/m^2 ; 4週間のうち3週間、毎週 75 mg/m^2 ; 4週間のうち3週間、毎週 100 mg/m^2 ; 4週間のうち3週間、毎週 125 mg/m^2 ; 3週間のうち2週間、毎週 125 mg/m^2 ; 中断なしに毎週 130 mg/m^2 ; および1週間に2回 $20 \sim 150 \text{ mg/m}^2$ が挙げられる。組成物の投薬頻度は、投与する医師の判断に基づいて、処置の過程にわたって調整され得る。一部の実施形態では、個体は、少なくとも約1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回の処置サイクルのいずれかにわたって処置される。ナノ粒子組成物中のタキサン(一部の実施形態では、パクリタキセル)の他の例示的な用量としては、これだけに限定されないが、約 50 mg/m^2 、 60 mg/m^2 、 75 mg/m^2 、 80 mg/m^2 、 90 mg/m^2 、 100 mg/m^2 、 120 mg/m^2 、および 150 mg/m^2 のいずれかが挙げられる。例えば、ナノ粒子組成物中のパクリタキセルの投薬量は、毎週のスケジュールで与えられる場合、約 $50 \sim 150 \text{ mg/m}^2$ の範囲内であり得る。

10

20

30

40

50

【0284】

ガイドRNAまたは第2の薬剤/治療の例示的な投薬頻度としては、これだけに限定されないが、中断なしに毎週 ; 4週間のうち3週間、毎週 ; 3週間に1回 ; 2週間に1回 ; 3週間のうち2週間、毎週が挙げられる。一部の実施形態では、ガイドRNAまたは第2の薬剤/治療は、おおよそで、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、6週間に1回、または8週間に1回投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAまたは第2の薬剤/治療は、1週間に少なくとも約1回、2回、3回、4回、5回、6回、または7回(即ち、毎日)のいずれかで投与される。一部の実施形態では、各投与間の間隔は、約6か月間未満、3か月間未満、1か月間未満、20日間未満、15、日間未満、12日間未満、10日間未満、9日間未満、8日間未満、7日間未満、6日間未満、5日間未満、4日間未満、3日間未満、2日間未満、または1日間未満のいずれかである。一部の実施形態では、各投与間の間隔は、約1か月間よりも長い、2か月間よりも長い、3か月間よりも長い、4か月間よりも長い、5か月間よりも長い、6か月間よりも長い、8か月間よりも長い、または12か月間よりも長いいずれかである。一部の実施形態では、投薬スケジュール中に中断は存在しない。一部の実施形態では、各投与間の間隔は、約1週間以下である。一部の実施形態では、個体へのガイドRNAまたは第2の薬剤/治療の投与のスケジュールは、処置全体を構成する単回投与から、毎日の投与までの範囲である。ガイドRNAまたは第2の薬剤/治療の投与は、延長された期間、例えば、約1か月間から約7年間までにわたって延長され得る。一部の実施形態では、ガイドRNAまたは第2の薬剤/治療は、少なくとも約2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間、12か月間、18か月間、24か月間、30か月間、36か月間、48か月間、60か月間、72か月間、または84か月間のいずれかの期間にわたって投与される。

【0285】

ガイドRNAまたは第2の薬剤/治療のために要求される用量は、各薬剤が単独で投与される場合に通常要求される用量よりも低くてもよい(必ずではないが)。したがって、一部の実施形態では、治療量以下の量のガイドRNAまたは第2の薬剤/治療が投与される。「治療量以下の量」または「治療量以下のレベル」は、治療量よりも少ない量、即ち、ナノ粒子組成物中の薬物および/または他の薬剤が単独で投与される場合に通常使用される量よりも少ない量を指す。低減は、所与の投与で投与される量および/または所与の期間にわたって投与される量(低減された頻度)に関して反映され得る。

【0286】

一部の実施形態では、ガイドRNAまたは第2の薬剤/治療の両方の用量は、単独で投与される場合の各々の対応する通常の用量と比較して低減される。一部の実施形態では、

ガイドRNAまたは第2の薬剤／治療は、治療量以下のレベルで、即ち、低減されたレベルで投与される。一部の実施形態では、ガイドRNAまたは第2の薬剤／治療の用量は、確立された最大毒性用量（MTD）よりも実質的に低い。例えば、ガイドRNAまたは第2の薬剤／治療の用量は、MTDの約50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、または10%未満である。

【0287】

本明細書に記載の投与構成の組合せが使用され得る。本明細書に記載の方法（本明細書に記載の併用療法方法を含む）は、単独で、または別の治療、例えば、化学療法、放射線治療、手術、ホルモン治療、遺伝子治療、免疫療法、化学免疫療法、肝動脈に基づく治療、寒冷療法、超音波治療、肝臓移植、局所的切除治療、高周波アブレーション治療、光線力学的治療などと併せて実施され得る。

10

【0288】

さらに、がん（例えば、膵がん）を発生させるリスクがより高いヒトは、疾患の発生を阻害またはおよび／または遅延させるための処置を受けてもよい。

【0289】

本明細書に記載の組成物は、約24時間よりも短い注入時間にわたる、個体への組成物の注入を可能にする。例えば、一部の実施形態では、組成物は、約24時間未満、12時間未満、8時間未満、5時間未満、3時間未満、2時間未満、1時間未満、30分間未満、20分間未満、または10分間未満のいずれかの注入期間にわたって投与される。一部の実施形態では、組成物は、約30分間の注入期間にわたって投与される。

20

キット

【0290】

本明細書に記載の方法のために有用なキット、試薬、および製造品もまた、本明細書で提供される。一部の実施形態では、キットは、1つのバイアル中に組み合わされて、または異なるバイアル中に別々に、ガイドRNA、細胞透過性ペプチド、他のゲノム編集分子および／または他の細胞透過性ペプチドを含有するバイアルを含む。患者の処置の時点で、例えば、患者試料の遺伝子発現分析またはプロテオミクスもしくは組織学的分析に基づいて、どの特定の病理を処置するかを最初に決定する。結果を得たら、細胞透過性ペプチドおよび任意の分子（例えば、改変されたCas9タンパク質または改変されたCas9をコードするmRNA）および／または細胞透過性ペプチドを、適切な1つまたは複数のガイドRNAとしかるべく組み合わせて、有効な処置のために患者に投与され得る複合体またはナノ粒子を得る。したがって、一部の実施形態では、1) CPP、2) ガイドRNA、および必要に応じて3) 1つまたは複数のDNAヌクレアーゼまたはDNAヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むキットが提供される。一部の実施形態では、キットは、他のゲノム編集分子および／または他の細胞透過性ペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、キットは、遺伝子発現プロファイルを決定するための薬剤をさらに含む。一部の実施形態では、キットは、薬学的に許容される担体をさらに含む。

30

【0291】

一部の実施形態では、本明細書に記載のキットは、a) 本明細書に記載のKRAS G12C、G12Dおよび／もしくはG12Vを標的とする1つもしくは複数のガイドRNA、b) 細胞透過性ペプチド、ならびに／またはc) CRISPR関連エンドヌクレアーゼ（例えば、改変されていないまたは改変されたCas9）をコードするmRNAを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のキットは、a) 本明細書に記載のKRAS G12C、G12Dおよび／もしくはG12Vを標的とする1つもしくは複数のガイドRNA、b) 細胞透過性ペプチド、ならびに／またはc) CRISPR関連エンドヌクレアーゼ（例えば、改変されていないまたは改変されたCas9）および第2の酵素（例えば、逆転写酵素または核酸

40

50

塩基デアミナーゼ酵素)を含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のキットは、a) 本明細書に記載のK R A S G 1 2 C、G 1 2 Dおよび／もしくはG 1 2 Vを標的とする1つもしくは複数のガイドRNA、b) 細胞透過性ペプチド、ならびに／またはc) C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼ(例えば、改変されていないまたは改変されたC a s 9)および第2の酵素(例えば、逆転写酵素または核酸塩基デアミナーゼ酵素)を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、キットは、個体におけるK R A Sの突然変異を評価するための薬剤をさらに含む。

【0292】

本明細書に記載のキットは、本主題の方法を実施するためのキットの構成成分の使用に関する指示(例えば、本明細書に記載の医薬組成物の作製および／または医薬組成物の使用に関する指示)をさらに含み得る。本主題の方法の実施に関する指示は、一般に、適切な記録媒体に記録される。例えば、指示は、紙またはプラスチックなどの基板に印刷されている場合がある。そのように、指示は、キット中に添付文書として、キットの容器のラベルに、またはその構成成分として(すなわち、パッケージングまたはサブパッケージングに付随して)などで存在し得る。一部の実施形態では、指示は、適切なコンピュータ可読記憶媒体、例えば、CD-ROM、ディスクなどには存在する電子ストレージデータファイルとして存在する。さらに他の実施形態では、実際の指示は、キット中には存在しないが、離れた供給源から、例えばインターネットを経由して指示を入手するための手段が提供される。この実施形態の例は、指示を表示することができ、かつ／または指示をダウンロードすることができるウェブアドレスを含むキットである。指示と同様に、指示を入手するためのこの手段も適切な基板に記録される。

【0293】

キットの種々の構成成分は別々の容器内に入っていてよく、容器は、単一の囲い、例えば箱内に含有されていてよい。

例示的实施形態

【0294】

実施形態1. 配列番号1~37、241~257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定C R I S P R RNA(c r RNA)を含む突然変異したK R A Sを標的とするためのガイドRNAを含む、天然に存在しないポリヌクレオチド。

【0295】

実施形態2. ガイドRNAが、補助的トランス活性化c r RNA(t r a c r RNA)をさらに含む、実施形態1に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【0296】

実施形態3. 標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列が、配列番号1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される、実施形態1または実施形態2に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【0297】

実施形態4. ヌクレオチド配列が、配列番号1、3、6、8、15、16、19~21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的である、実施形態3に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【0298】

実施形態5. ヌクレオチド配列が、配列番号3、19、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的である、実施形態4に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【0299】

実施形態6. 化学的に改変されている、実施形態1から5までのいずれか1つに記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【0300】

実施形態7. ガイドRNAが、約200ヌクレオチド以下の長さを有する、実施形態1か

10

20

30

40

50

ら 6 までのいずれか 1 つに記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【0301】

実施形態 8 . a) 第 1 の細胞透過性ペプチド、および b) 突然変異した K R A S を標的とするガイド R N A を含むゲノム編集複合体であって、ガイド R N A が、実施形態 1 から 7 までのいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドを含む、ゲノム編集複合体。

【0302】

実施形態 9 . D N A ヌクレアーゼまたは D N A ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態 8 に記載のゲノム編集複合体。

【0303】

実施形態 10 . D N A ヌクレアーゼが、C R I S P R 関連タンパク質 (C a s) ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) 、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) 、メガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その断片、およびそれらの組合せからなる群から選択される、実施形態 9 に記載のゲノム編集複合体。

10

【0304】

実施形態 11 . D N A ヌクレアーゼが、C a s ポリペプチドを含む、実施形態 10 に記載のゲノム編集複合体。

【0305】

実施形態 12 . C a s ポリペプチドが、C a s 9 である、実施形態 10 または実施形態 11 に記載のゲノム編集複合体。

【0306】

実施形態 13 . 第 1 の細胞透過性ペプチドが、C A D Y 、 P E P - 1 ペプチド、P E P - 2 ペプチド、P E P - 3 ペプチド、V E P E P - 3 ペプチド、V E P E P - 6 ペプチド、V E P E P - 9 ペプチド、および A D G N - 100 ペプチドからなる群から選択される、実施形態 8 から 12 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

20

【0307】

実施形態 14 . 第 1 の細胞透過性ペプチドが、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した 1 つまたは複数の部分をさらに含み、1 つまたは複数の部分が、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖、リンカー部分、および標的化部分からなる群から選択される、実施形態 8 から 13 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

30

【0308】

実施形態 15 . 第 1 の細胞透過性ペプチドが、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結したアセチル基を含む、実施形態 14 に記載のゲノム編集複合体。

【0309】

実施形態 16 . 第 1 の細胞透過性ペプチドが、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む、実施形態 14 または実施形態 15 に記載のゲノム編集複合体。

【0310】

実施形態 17 . 標的化ペプチドが、配列番号 196 ~ 205 および 235 ~ 240 からなる群から選択される、実施形態 16 に記載のゲノム編集複合体。

40

【0311】

実施形態 18 . 第 1 の細胞透過性ペプチドが、ポリグリシンリンカー部分、P E G 部分、A u n 、A v a 、および A h x からなる群から選択されるリンカー部分を含む、実施形態 8 から 17 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0312】

実施形態 19 . P E G 部分が 2 個 ~ 7 個のエチレングリコール単位からなる、実施形態 18 に記載のゲノム編集複合体。

【0313】

実施形態 20 . 第 1 の細胞透過性ペプチドが、N 末端から、第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した、アセチル基、標的化部分およびリンカー部分を含む、

50

実施形態 14 から 19 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0314】

実施形態 21. 第 1 の細胞透過性ペプチドが、第 1 の細胞透過性ペプチドの C 末端に共有結合により連結した 1 つまたは複数の部分をさらに含み、1 つまたは複数の部分が、システアミド、システイン、チオール、アミド、必要に応じて置換されているニトリロ三酢酸、カルボキシル、必要に応じて置換されている直鎖状または分枝 (ramified) C₁ ~ C₆ アルキル、第一級または第二級アミン、オシド誘導体、脂質、リン脂質、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖、リンカー部分および標的化部分からなる群から選択される、実施形態 8 から 20 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

10

【0315】

実施形態 22. 第 1 の細胞透過性ペプチドが、その C 末端に共有結合により連結したシステアミド基を含む、実施形態 21 に記載のゲノム編集複合体。

【0316】

実施形態 23. 第 1 の細胞透過性ペプチドが、炭水化物部分をさらに含む、実施形態 8 から 22 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0317】

実施形態 24. 炭水化物部分が、GalNAc である、実施形態 23 に記載のゲノム編集複合体。

【0318】

実施形態 25. 第 1 の細胞透過性ペプチドが、レトロインベルソペプチドである、実施形態 8 から 24 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

20

【0319】

実施形態 26. 第 1 の細胞透過性ペプチドが、配列番号 44 ~ 195 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 8 から 25 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0320】

実施形態 27. 第 1 の細胞透過性ペプチドが、配列番号 135 ~ 175、259 ~ 260 および 267 ~ 269 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 26 に記載のゲノム編集複合体。

30

【0321】

実施形態 28. 第 1 の細胞透過性ペプチドが、配列番号 63 ~ 117、261 ~ 266 および 270 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 26 に記載のゲノム編集複合体。

【0322】

実施形態 29. 第 1 の細胞透過性ペプチドのガイド RNA に対するモル比が、約 1 : 80 から約 1 : 1 の間である、実施形態 1 から 28 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0323】

実施形態 30. 第 1 の細胞透過性ペプチドのガイド RNA に対するモル比が、約 1 : 50 から約 1 : 2 の間である、実施形態 29 に記載のゲノム編集複合体。

40

【0324】

実施形態 31. 第 1 の細胞透過性ペプチドの DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に対するモル比が、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間である、実施形態 9 から 30 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0325】

実施形態 32. 第 1 の細胞透過性ペプチドの DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列に対するモル比が、約 2 : 1 から約 50 : 1 の間である、実施形態 31 に記載のゲノム編集複合体。

【0326】

50

実施形態 33. ガイド RNA が第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する、実施形態 8 から 32 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0327】

実施形態 34. DNA ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列が、第 1 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する、実施形態 9 から 33 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0328】

実施形態 35. 異なるガイド配列を含む 1 つまたは複数の追加的なガイド RNA をさらに含む、実施形態 8 から 34 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0329】

実施形態 36. 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、ある単一の KRAS 突然変異を標的とする、実施形態 35 に記載のゲノム編集複合体。

【0330】

実施形態 37. 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、2 つまたはそれよりも多くの異なる KRAS 突然変異を標的とする、実施形態 36 に記載のゲノム編集複合体。

【0331】

実施形態 38. 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、G12D、G12V、および／または G12C を標的とする、実施形態 36 または 37 に記載のゲノム編集複合体。

【0332】

実施形態 39. ゲノム編集複体の平均直径が、約 10 nm から約 300 nm の間である、実施形態 1 から 38 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体。

【0333】

実施形態 40. 実施形態 1 から 39 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子。

【0334】

実施形態 41. コアが、実施形態 1 から 40 までのいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数の追加的なゲノム編集複合体をさらに含む、実施形態 40 に記載のナノ粒子。

【0335】

実施形態 42. 1 つまたは複数の追加的なゲノム編集複合体が、異なる KRAS 突然変異を標的とする少なくとも 1 つまたは複数のガイド RNA を含む、実施形態 41 に記載のナノ粒子。

【0336】

実施形態 43. コアが、第 2 の細胞透過性ペプチドと複合体を形成する、実施形態 40 から 42 までのいずれか 1 つに記載のナノ粒子。

【0337】

実施形態 44. 第 2 の細胞透過性ペプチドが、CADDY、PEP-1 ペプチド、PEP-2 ペプチド、PEP-3 ペプチド、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、および ADGN-100 ペプチドからなる群から選択される、実施形態 43 に記載のナノ粒子。

【0338】

実施形態 45. 第 2 の細胞透過性ペプチドが、VEPEP-3 ペプチド、VEPEP-6 ペプチド、VEPEP-9 ペプチド、および ADGN-100 ペプチドからなる群から選択される、実施形態 44 に記載のナノ粒子。

【0339】

実施形態 46. 第 2 の細胞透過性ペプチドが、配列番号 44～175 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 45 に記載のナノ粒子。

【0340】

実施形態 47. ナノ粒子内の第 2 の細胞透過性ペプチドが、連結部分によって標的化部分

10

20

30

40

50

に共有結合により連結している、実施形態 4 1 から 4 6 までのいずれか 1 つに記載のナノ粒子。

【0341】

実施形態 4 8 . コアが、末梢細胞透過性ペプチドを含む殻でコーティングされている、実施形態 4 0 から 4 7 までのいずれか 1 つに記載のナノ粒子。

【0342】

実施形態 4 9 . 末梢細胞透過性ペプチドが、V E P E P - 3 ペプチド、V E P E P - 6 ペプチド、V E P E P - 9 ペプチド、および A D G N - 1 0 0 ペプチドからなる群から選択される、実施形態 4 8 に記載のナノ粒子。

【0343】

実施形態 5 0 . 末梢細胞透過性ペプチドが、配列番号 4 4 ~ 1 7 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 4 9 に記載のナノ粒子。

【0344】

実施形態 5 1 . 殻内の末梢細胞透過性ペプチドが、連結部分によって標的化部分に共有結合により連結されている、実施形態 4 0 から 5 0 までのいずれか 1 つに記載のナノ粒子。

【0345】

実施形態 5 2 . ナノ粒子の平均直径が、約 1 0 n m から約 4 0 0 n m の間である、実施形態 4 0 から 5 1 までのいずれか 1 つに記載のナノ粒子。

【0346】

実施形態 5 3 . 実施形態 1 から 7 までのいずれか 1 つに記載のガイド R N A、実施形態 8 から 3 9 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体、または実施形態 4 0 から 5 2 までのいずれか 1 つに記載のナノ粒子、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【0347】

実施形態 5 4 . 2 つまたはそれより多くのナノ粒子を含み、2 つまたはそれよりも多くのナノ粒子が、異なる K R A S 突然変異を標的とする、異なるガイド R N A を含む、実施形態 5 3 に記載の医薬組成物。

【0348】

実施形態 5 5 . 実施形態 8 から 3 9 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体を調製する方法であって、第 1 の細胞透過性ペプチドをガイド R N A と組み合わせ、それにより、ゲノム編集複合体を形成するステップを含む方法。

【0349】

実施形態 5 6 . 細胞における突然変異した K R A S を改変する方法であって、細胞に実施形態 1 から 7 までのいずれか 1 つに記載のガイド R N A、実施形態 8 から 3 9 までのいずれか 1 つに記載のゲノム編集複合体、または実施形態 4 0 から 5 2 までのいずれか 1 つに記載のナノ粒子を接触させるステップを含む方法。

【0350】

実施形態 5 7 . 個体におけるがんを処置する方法であって、個体に実施形態 5 3 に記載の医薬組成物を有効量で投与するステップを含む方法。

【0351】

実施形態 5 8 . 第 2 の薬剤を投与するステップをさらに含む、実施形態 5 7 に記載の方法。

【実施例】

【0352】

以下の実施例は、本出願の純粋な例示を意図しており、したがって、本出願を限定するとは決して解釈すべきではない。以下の実施例および詳細な説明は、例示として提供されているのであって、限定として提供されているのではない。

(実施例 1)

K R A S のコドン 1 2 に対する単一ヌクレオチド置換を標的とする s g R N A の設計

【0353】

K R A S 癌遺伝子のコドン 1 2 における特定の突然変異 (G 1 2 V、G 1 2 D および G

10

20

30

40

50

12C)を直接標的とすることによってがん細胞増殖を損なうための、新しい戦略を開発した。KRAS突然変異体の発癌性対立遺伝子を選択的に標的としそれを破壊する選択的ADGN/CRISPR/Cas9系を、*in vivo*全身投与のために設計し、がん細胞増殖および腫瘍成長の阻害をもたらした。CRISPR-Cas9系を用いて、がん細胞における突然変異体KRAS対立遺伝子を標的とするために、c.35G>T(G12V)、c.35G>A(G12D)およびc.34G>T(G12C)KRAS突然変異を標的とする特異的ガイドRNAを設計し、ADGNナノ粒子送達系を使用したときの異なるがん細胞に対するそれらの効力を検証した。次いで、突然変異体KRASの標的化が、ADGNナノ粒子を使用して静脈内に投与された場合に、腫瘍成長を*in vivo*で抑制できるかどうかを評価した。

10

【0354】

主要な発癌性突然変異は、KRASエクソン2のコドン12に対して生じる。CRISPR-Cas9系を用いて、がん細胞における突然変異体KRAS対立遺伝子を標的とするために、以下の単一ヌクレオチドミスセンス置換c.35G>T(G12V)、c.35G>A(G12D)およびc.34G>T(G12C)を標的とする特異的ガイドRNAを同定した。これらの突然変異した標的ヌクレオチドは、PAM配列に隣接する領域内に位置するので、CRISPR/Cas9によって標的とされるためにこれらを選択した。野生型KRASを標的とするsgRNA(sgRNAWT)もまた、細胞株についての陰性対照として設計した。図18を参照されたい。

表1. sgRNAは、KRAS G12V突然変異を標的とする。SgRNA c.35G>T

20

【表1-1】

配列	PAM	名称
TGG TAG TTG GAG CTG TTG GCG T (配列番号 241)	AGG	gRNA35T1
CIT GTG GTA GTT GGA GCT GT (配列番号 2)	TGG	gRNA35T2
GGT AGT TGG AGC TGT TGG CG (配列番号 3)	TAG	gRNA35T3
AGC TGT TGG CGT AGG CAA (配列番号 242)	GAG	gRNA35T4
TGT TGG CGT AGG CAA GAGT (配列番号 243)	GCC	gRNA35T5
GTT GGA GCT GTT GGC GT (配列番号 244)	AGG	gRNA35T6
TTG TGG TAG TTG GAG CTG T (配列番号 245)	TGG	gRNA35T7
GTA GTT GGA GCT GTT GGC GT (配列番号 8)	AGG	gRNA35T8
GCT GTT GGC GTA GGC AA	GAG	gRNA35T9

30

【表1-2】

配列	PAM	名称
(配列番号 246)		
TAG TTG GAG CTG TTG GCG T (配列番号 10)	AGG	gRNA35T10
TGT TGG CGT AGG CAA GAG TGC CTT G (配列番号 11)	ACG	gRNA35T11

40

表2. sgRNAは、KRAS G12D突然変異を標的とする。SgRNA 35G>A.

50

【表 2】

配列	PAM	名称
CTT GTG GTA GTT GGA GCT GA (配列番号 15)	TGG	gRNA35A1
GGT AGT TGG AGC TGA TGG CG (配列番号 247)	TAG	gRNA35A2
AGC TGA TGG CGT AGG CAA (配列番号 248)	GAG	gRNA35A3
TGA TGG CGT AGG CAA GAGT (配列番号 249)	GCC	gRNA35A4
AGT TGG AGC TGA TGG CGT (配列番号 19)	AGG	gRNA35A5
GTT GGA GCT GAT GGC GT (配列番号 250)	AGG	gRNA35A6
GTA GTT GGA GCT GAT GGC GT (配列番号 21)	AGG	gRNA35A7
TTG TGG TAG TTG GAG CTG A (配列番号 251)	TGG	gRNA35A8
GCT GAT GGC GTA GGC AA (配列番号 252)	GAG	gRNA35A9
TAG TTG GAG CTG ATG GCG T (配列番号 24)	AGG	gRNA35A10
TGA TGG CGT AGG CAA GAG TGC CTT G (配列番号 25)	ACG	gRNA35A11

10

20

表 3. sgRNAは、KRAS G12C突然変異を標的とする。SgRNA 34G>T

【表 3 - 1】

配列	PAM	名称
CTT GTG GTA GTT GGA GCT TG (配列番号 29)	TGG	gRNA34T1
AGC TTG TGG CGT AGG CAA (配列番号 253)	GAG	gRNA34T2
GTT GGA GCT TGT GGC GT (配列番号 254)	AGG	gRNA34T3
GGT AGT TGG AGC TTG TGG CG (配列番号 255)	TAG	gRNA34T4
TTG TGG TAG TTG GAG CTT G (配列番号 33)	TGG	gRNA34T5
GTA GTT GGA GCT TGT GGC GT	AGG	gRNA34T6

30

【表 3 - 2】

(配列番号 34)		
GCT TGT GGC GTA GGC AA (配列番号 256)	GAG	gRNA34T7
CTT GTG GCG TAG GCA AGAGT (配列番号 257)	GCC	gRNA34T8
CTT GTG GCG TAG GCA AGA GTG CCT TG (配列番号 37)	ACG	gRNA34T9
TTGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTG (配列番号 271)	ACG	gRNA34T10

40

(実施例 2)

A D G N ペプチド / C a s 9 m R N A / s g R N A 複合体の調製

50

【0355】

材料

【0356】

Lipofectamine 2000、RNAiMAX、TranscriptAid T7転写キット、MEGAclear転写クリーンアップキット、GeneArt Genomic Cleavage Detectionキット、およびPlatinum Green Hot Start PCRミックスは、Thermo Fisher Life Science (France) から得た。AST/ALT/BUNおよびクレアチニン活性アッセイキットは、Sigma (France) およびThermo Fisher Life Science (France) から得た。抗体：ホスホ-Akt (Ser 473) (CST、#9271、RRID: AB_329825) およびホスホ-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (CST、#4370、RRID: AB_2315112) は、CSTからである。

10

【0357】

mRNA: CleanCap (商標) Cas9 mRNA (5moU) およびCleanCap (商標) Luc mRNA (5moU) は、Trilink Biotechnology (USA) から得た。

【0358】

gRNA: ルシフェラーゼ gRNA は、Hart, T., et al. (2015). Cell, 163 (6), 1515-1526 に従って、sgRNA 発現プラスミド (Addgene #74190、プラスミド pLCKO_Luciferase_sgRNA) を使用する in vitro 転写によって得た。ルシフェラーゼ 標的 部位: ACAACTTTACCGACCGCGCC。sgRNA の生成を、in vitro で転写され得る、PCR 産物のための 鋳型として T7 プロモーターアダプター配列を含有するジェネリック sgRNA 発現 プラスミドを使用して実施した。T7 プロモーター結合部位とその後の約 20 bp の sgRNA 標的配列とを含有する直鎖状 DNA 断片を、TranscriptAid T7 高収量 転写キット (Thermo Fisher Life science, France) を製造者の指示に従って使用して、in vitro で転写した。in vitro で転 写された gRNA を、エタノールで沈殿させ、MEGAclear 転写クリーンアップキ ャット (Thermo Fisher Life Science) を使用してさらに精製

20

30

【0359】

コドン 12 における KRAS 突然変異を標的とする KRAS sgRNA は、Thermo Fisher Life science (France) および Trilink Biotechnology (USA) から得た。

【0360】

sgRNA のストック溶液を、水中に可溶化し、UV 吸光度によって定量化し、-80 °C で貯蔵した。

【0361】

ADGN ペプチド: 以下のペプチド配列を使用した。

40

表 4.

【表 4】

ADGN-100	ペータ-AKWSAGWRWRLWRVRSWSR-NH2
ADGN-100-Hydro-3	Ac-YIGSR-Ava-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
ADGN-100-Hydro-5	Ac-YIGSR-Aun-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
ADGN-100-Hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
ADGN-100-PEG2	Ac-(PEG)2-A-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
ADGN-100-HYPEG2	Ac-YIGSR-(PEG)2-βA-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
ADGN-106	ペータ-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH2
ADGN-106-Hydro-3	Ac-YIGSR-Ava-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH2
ADGN-106-Hydro-5	Ac-YIGSR-Aun-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH2
ADGN-106-Hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH2
ADGN-106-PEG2	Ac-(PEG)2-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH2
ADGN-106-HYPEG2	Ac-YIGSR-(PEG)2-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH2

10

【0362】

細胞株：全ての細胞株は、ATCCから得た。膵がん（PDAC）：KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてヘテロ接合性のPANC1、KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてホモ接合性のPK45H、KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてヘテロ接合性のPK1、KRAS p. Gly12Cys (c. 34G>T) についてホモ接合性のMIA-PACA

20

【0363】

結腸直腸がん（CRC）：KRAS p. Gly12Val (c. 35G>T) についてホモ接合性のSW480、KRAS p. Gly12Val (c. 35G>T) についてヘテロ接合性のSW403、KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてヘテロ接合性のLS513、KRASについてWTであり、TP53 p. Arg273His (c. 818G>A) についてホモ接合性のHT-29、KRASについてWTのHT-29

【0364】

肺がん（NSCLC）：KRAS p. Gly12Cys (c. 34G>T) についてヘテロ接合性のNCI H23およびH358、KRASについてWTのH1299

30

【0365】

方法：

【0366】

mRNA：gRNAとの複合体形成：ADGNペプチド／mRNA／gRNA粒子を、モル比20：1：1で調製した。ADGN／Cas9mRNA／sgRNA複合体を、0.5 μgのmRNA：1.5 μgのsgRNAおよび5%グルコースまたはDMEM（96ウェルプレートに関する例）を用いてモル比20／1／1で調製した。96ウェルのうち6ウェルのための複合体の最小体積が調製されることが示唆される。予め混合したCas9 mRNA／gRNAを室温でガラスバイアル（1～4 ml）中、滅菌水中に調製した。ADGNペプチド溶液を400 rpmでの磁気攪拌下で滴下して（毎秒1滴）、1：2の比を得、室温または37℃で30分間インキュベートした。トランスフェクションの直前に、150 μlのグルコースまたはDMEMを添加し、溶液を400 rpmでの磁気攪拌下で1分間混合した。次いで、溶液を37℃で5分間インキュベートした。次いで、複合体を細胞のトランスフェクションまたはIV投与のために準備した。IV投与の前に、複合体をスクロース5%溶液中に希釈した。

40

【0367】

トランスフェクションプロトコール。以下のプロトコールを、24／48／96ウェルプレートフォーマットでのトランスフェクションについて報告する。細胞は、トリプシン処理し、トランスフェクションの前日に播種すべきである。細胞を、2 mMのグルタミン

50

、1%抗生物質（ストレプトマイシン、10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ペニシリン、10,000 IU/mL）および10%（w/v）ウシ胎仔血清（FCS）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中、5% CO_2 を含有する加湿雰囲気中、37℃で培養した。トランスフェクションの前日に細胞50,000個を播種した96ウェルプレートに60～80%集密まで成長させ、トランスフェクションの当日時におよそ70%集密になっているように設定した。トランスフェクトする前に、細胞をDMEM（FBSおよびペニシリン／ストレプトマイシンなし）で2回洗浄する（100 μL ／ウェル）。次いで、細胞を、25 μL の複合体溶液で覆い、穏やかに混合し、37℃+5% CO_2 で10分間インキュベートした。新鮮なDMEM（FBSおよび抗生物質なし）50 μL を添加し、細胞を37℃+5% CO_2 で2時間インキュベートした（曝露時間は、細胞の感度に基づいて調整することができる）。次いで、ADGNペプチド／mRNA複合体の覆いを取り除かずに、DMEM（10% FCSおよび1%抗生物質を含有する）250 μL を添加した。次いで、細胞をインキュベーター（37℃、5% CO_2 ）に戻し、トランスフェクションの48時間～72時間後に分析した。

表5.

【表5】

プレートフォーマット	24 ウェル	48 ウェル	96 ウェル
ADGN-mRNA 複合体	225 μL	100 μL	25 μL
DMEM	450 μL	200 μL	30 μL
DMEM (+10 % FBS)	2.250 μL	1000 μL	250 μL
最終体積	2925 μL	1300 μL	305 μL

【0368】

ADGN-ペプチドがCAS9 mRNA／gRNAと安定なナノ粒子を形成する能力を分析した。粒子サイズと凝集のレベルとを、DLS Nano ZS（Malvern Ltd）で測定した。ADGN／mRNA／gRNA複合体の平均サイズおよび多分散を25℃で測定当たり3分間にわたって決定した。データが図19A～19Bに3回の別々の実験の平均として示されている。

【0369】

ADGNペプチド-mRNA：sgRNA複合体を、トランスフェクションの前に動的光散乱（DLS Malvern Nanosizer）によって特徴付けた。図19に報告されている通り、ADGNペプチドは、mRNA／gRNAと安定な高度に均一なナノ粒子を形成し、平均サイズは80～100 nmにわたり、多分散指数は0.183であった。

（実施例3）

がん細胞における突然変異体KRASのコドン12選択的かつ効率的な破壊における、KRAS突然変異を標的とする、ADGNに媒介されるCRISPR

【0370】

CRISPR-Cas9系を用いて、がん細胞における突然変異体KRAS対立遺伝子を標的とするために、我々は、c. 35 G>T（G12V）、c. 35 G>A（G12D）およびc. 34 G>T（G12C）KRAS突然変異を標的とする特異的ガイドRNAを同定し、ADGNナノ粒子送達系を使用して異なるがん細胞に対するそれらの効力を評価した。ADGN-100、ADGN-106、および異なるバリエーションが製剤化ならびにex vivoおよびin vivoの両方での評価のために使用されている。

【0371】

膵がん（PDAC）について、以下の細胞株およびKRAS標的を使用した：KRAS p. Gly12Asp（c. 35 G>A）についてヘテロ接合性のPANC1、KRAS p. Gly12Asp（c. 35 G>A）についてホモ接合性のPK45H、KRAS p. Gly12Asp（c. 35 G>A）についてヘテロ接合性のPK1、KRAS p. Gly12Cys（c. 34 G>T）についてホモ接合性のMIA-PACA

【0372】

結腸直腸がん (CRC) について、以下の細胞株およびKRAS標的を使用した：KRAS p. Gly12Val (c. 35G>T) についてホモ接合性のSW480、KRAS p. Gly12Val (c. 35G>T) についてヘテロ接合性のSW403、およびKRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてヘテロ接合性のLS513。KRASについてWTであり、TP53 p. Arg273His (c. 818G>A) についてホモ接合性のHT-29、KRASについてWTのHT-29を含む対照細胞株と結果を比較した。

【0373】

肺がん (NSCLC) について、KRAS p. Gly12Cys (c. 34G>T) 細胞株および突然変異についてヘテロ接合性のNCI H23およびH358を、対照としてのKRASについてWTのH1299と比較した。

【0374】

KRAS 35G>T突然変異体G12Vを標的とする9つの異なるgRNA (gRNA35T1、gRNA35T2、gRNA35T3、gRNA35T4、gRNA35T5、gRNA35T6、gRNA35T7、gRNA35T8およびgRNA35T9 (図18を参照されたい)) を、G12V KRAS突然変異を有するSW403およびSW480がん細胞に対して評価した。Cas9 mRNA (0.15 μg) およびgRNA (0.2 μg) を、実験手順に報告されている通り、ADGN-ペプチドと会合させた。SW403、SW480およびHT-29細胞を、48ウェルプレートフォーマットで培養し、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN-100/mRNACas9:gRNA複合体で処置した。内因性標的配列におけるインデル頻度を、トランスフェクションの72時間後に、T7E1法およびディープシーケンシングのいずれかによって評価した。細胞増殖を、GlowMax (Promega) 上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

【0375】

図1Aに報告されている通り、gRNA35T1、35T3、35T6、35T7および35T8は、がん細胞において、G12V突然変異体KRASのインデル編集および効率的な破壊を特異的に誘導したが、野生型KRAS HT29細胞では誘導しなかった。ディープシーケンシングにより、ADGNに媒介されるgRNA35T3 sgRNAの送達、35G>T突然変異についてヘテロ接合性であるSW403細胞において65%のインデル頻度を生じ、35G>T突然変異についてホモ接合性であるSW480細胞において81%のインデル頻度を生じたことが示された。35T6 sgRNAは、SW403細胞において18%のインデル頻度を生じ、SW480細胞において39%のインデル頻度を生じた。35T1 sgRNAは、SW403細胞において35%のインデル頻度を生じ、SW480細胞において57%のインデル頻度を生じた。35T8 sgRNAは、SW403細胞において40%のインデル頻度を生じ、SW480細胞において51%のインデル頻度を生じた。対照的に、gRNA35T2、35T5および35T9は、15%未満のG12V KRAS遺伝子編集を誘導した。しかし、gRNA35T4は、有意なG12V KRAS突然変異体編集を生じ (SW403において22%、SW480において41%)、このsgRNA配列は、G12V突然変異体KRASに特異的ではなく、HT29細胞においてもWT KRASの破壊を誘導した。

【0376】

我々は、突然変異体KRASの破壊ががん細胞増殖に影響を及ぼすことができるかどうかを次に決定した。図1Bに報告されている通り、gRNA35T1、35T3、35T6および35T8は、SW480およびSW403細胞の増殖または生存を特異的に阻害するが、KRAS WTを有するHT29細胞には影響を及ぼさなかった。遺伝子編集結果について報告されたように、最良の応答が、gRNA35T3>gRNA35T8>gRNA35T6/35T1で得られた。細胞増殖分析により、gRNA35T4がG12V突然変異に特異的ではなく、HT-29増殖もまた変更したという事実が確認された。

gRNA35T3は、SW403およびSW480の細胞増殖を75%遮断し、gRNA35T8およびgRNA35T6よりも1.5倍および2倍効率的である。gRNA35T3ガイドは、野生型対立遺伝子を変更することなく、35G>T(G12V)突然変異体KRASを効率的に標的とし、これをさらなる評価のために選択した。

【0377】

KRAS 35G>A突然変異体G12Dを標的とする9つの異なるgRNA(gRNA35A1、gRNA35A2、gRNA35A3、gRNA35A4、gRNA35A5、gRNA35A6；gRNA35A7、gRNA35A8、gRNA35A9)を、G12D KRAS突然変異を有するLS513、Panc1、PK-45H、およびPK1がん細胞に対して評価した。Cas9 mRNA(0.1μg)およびgRNA(0.2μg)を、モル比20/1(ペプチド/核酸)でADGN-ペプチドと会合させた。LS513、Panc1、PK-45H、PK1、HS-68およびHT-29細胞を、48ウェルプレートフォーマットで培養し、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN/mRNACas9:gRNA複合体で処置した。内因性標的配列におけるインデル頻度を、トランスフェクションの72時間後に、T7E1法またはディープシーケンシングのいずれかによって評価した。細胞増殖を、GlowMax(Promega)上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

【0378】

図2Aに報告されている通り、gRNA35A2、35A5、35A7、35A6および35A9は、がん細胞において、G12D突然変異体KRASの効率的な破壊を誘導したが、野生型KRAS細胞(HT29またはHS-68細胞)においては誘導しなかった。対照的に、gRNA35A3、35A4および35A8は、15%未満のG12D KRAS遺伝子編集を誘導し、gRNA35A1は、G12D突然変異に特異的ではなく、野生型KRAS細胞(HT-29およびHS-68)にも影響を及ぼした。

表6.

【表6】

細胞株	LS513	PANC1	HT-29	PK-45H	HS68	PK1
未処置	3±1	2±1	3±1	2±0.4	5±1	5±1
gRNA35A1	17±2	32±2	10±1	15±0.8	8±1	12±1
gRNA35A2	31±2	58±4	2±1	52±5	6±2	48±2
gRNA35A3	9±1	7±1	1±0.5	4±1	4±1	2±0.5
gRNA35A4	5±2	4±1	2±1	7±2	5±0.7	9±0.1
gRNA35A5	35±4	67±5	2±1	75±7	2±1	78±8
gRNA35A6	32±5	60±2	5±1	48±1	2±1	37±0.4
gRNA35A7	24±2	47±1	7±2	35±0.5	4±0.4	31±2
gRNA35A8	7±1	9±2	2±0.2	11±1	6±0.1	18±1
gRNA35A9	21±3	25±3	17±3	18±2	12±1	34±1

【0379】

表6に報告されている通り、ディープシーケンシングにより、gRNA35A5 sgRNAの送達、35G>A突然変異についてヘテロ接合性であるPK1細胞において78%のインデル頻度およびPK-45H細胞において75%のインデル頻度を生じ、35G>A突然変異についてホモ接合性であるPANC-1細胞において67%のインデル頻度およびLS513細胞において42%のインデル頻度を生じたことが示された。

【0380】

我々は、突然変異体KRASの破壊ががん細胞増殖に影響を及ぼすことができるかどうかを次に決定した。図2Bに報告されている通り、gRNA35A5、35A2、35A1、35A6および35A7は、PANC1、PK1、LS513およびPK-45H細胞の増殖または生存を特異的に阻害するが、KRAS WTを有するHT29細胞にもH

S-68細胞にも影響を及ぼさない。我々は、野生型対立遺伝子を変更することなく35G>A (G12D) 突然変異体KRASを効率的に標的とするgRNA35A5ガイドを選択した。gRNA35A5は、PANC1; PK1、LS513およびPK-45Hの細胞増殖を80%遮断し、gRNA35A2およびgRNA35A6よりも2倍および3倍効率的である。

(実施例4)

KRAS G12C突然変異を標的とする、ADGNに媒介されるCRISPR
【0381】

KRAS 34G>T突然変異体G12Cを標的とする8つの異なるgRNA (gRNA34T1、gRNA34T2、gRNA34T3、gRNA34T4、gRNA34T5、gRNA34T6、gRNA34T7およびgRNA34T8) を、MIA-PACA、H23、H358、H29およびPANC1細胞に対して評価した。Cas9 mRNA (0.1 μg) およびgRNA (0.2 μg) を、モル比20/1 (ペプチド/核酸) でADGNペプチドと会合させた。MIA-PACA、H23、H358、PANC1およびHT29細胞を、48ウェルプレートフォーマットで培養し、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN/mRNACas9:gRNA複合体で処置した。内因性標的配列におけるインデル頻度を、トランスフェクションの72時間後に、T7E1法またはディープシーケンシングのいずれかによって評価した。細胞増殖を、GlowMax (Promega) 上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

【0382】

図3Aに報告されている通り、gRNA34T1、34T3、34T5および34T6は、がん細胞において、G12C突然変異体KRASのインデル編集および効率的な破壊を誘導したが、HT29細胞におけるWT KRASのインデル編集および効率的な破壊もPANC1細胞におけるG12C KRAS突然変異のインデル編集および効率的な破壊も誘導しなかった。対照的に、gRNA34T2、34T4、34T7および34T8は、野生型KRASに影響を及ぼすにあたり、非効率的であるまたはあまり特異的でない。ディープシーケンシングにより、gRNA34T6 sgRNAの送達、Mia-PACA、H23およびH358細胞において、それぞれ71%、78%および67%のインデル頻度を生じたことが示された。34T5 sgRNAは、Mia-PACA、H23およびH358細胞において、それぞれ75%、68%および67%のインデル頻度を生じた。34T3 sgRNAは、Mia-PACA、H23およびH358細胞において、それぞれ51%、48%および37%のインデル頻度を生じた。34T1 sgRNAは、Mia-PACA、H23およびH358細胞において、それぞれ34%、41%および29%のインデル頻度を生じた。

【0383】

我々は、突然変異体KRASの破壊ががん細胞増殖に影響を及ぼすことができるかどうかを次に決定した。図3Bに報告されている通り、gRNA34T5、34T6、34T3および34T1は、Mia-PACA、H23およびH358細胞の増殖または生存を特異的に阻害するが、KRASがWTであるHT29細胞にもHS-68細胞にも、G12C KRAS突然変異したPANC1細胞にも影響を及ぼさない。gRNA34T6は、Mia-PACA、H23およびH358の細胞増殖を75%遮断し、gRNA34T5およびgRNA34T3よりも2倍および3倍効率的である。我々は、野生型対立遺伝子を変更することなく34G>T (G12C) 突然変異体KRASを効率的に標的とするgRNA34T6ガイドを選択した。

(実施例5)

KRAS G12D、G12VまたはG12C突然変異を標的とする、ADGNに媒介されるCRISPR

【0384】

G12V、G12CまたはG12D KRAS突然変異を標的とするsgRNAの特異

性を確認するために、G12Vを標的とするgRNA35T3、G12Cを標的とするgRNA34T6、およびG12Dを標的とするgRNA35A5を、SW403、SW480、PANC1、PK-45H、PK-1、MIA-PACA、H23、H358、HT-29、HS-68およびLS513を含む、異なるKRAS突然変異を有するがん細胞の大きいパネルに対して評価した。Cas9 mRNA (0.2 μg) およびgRNA (0.4 μg) を、モル比20/1 (ペプチド/核酸) でADGNペプチドと会合させた。細胞を、48ウェルプレートフォーマットで培養し、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN/mRNACas9:gRNA複合体で処置した。内因性標的配列におけるインデル頻度を、トランスフェクションの72時間後に、T7E1法のいずれかによって評価し、細胞増殖を、GlowMax (Promega) 上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析した。

10

【0385】

図4A~4Bに報告されている通り、gRNA35A5は、KRAS G12D突然変異したがん細胞に高度に特異的であり、PANC-1、PK-1、およびPK-45H細胞において、75%よりも高いインデル頻度をもたらし、G12VおよびG12C KRAS突然変異体細胞もWT KRAS細胞も変更しない。gRNA35T3は、KRAS G12V突然変異したがん細胞に高度に特異的であり、SW403およびSW480細胞において、65%よりも高いインデル頻度をもたらし、G12DおよびG12C KRAS突然変異体細胞もWT KRAS細胞も変更しない。gRNA34T6は、KRAS G12C突然変異したがん細胞に高度に特異的であり、Mia-PACA、H23およびH358細胞において70%よりも高いインデル頻度をもたらし、G12DおよびG12V KRAS突然変異体細胞もWT KRAS細胞も変更しない。

20

(実施例6)

KRAS G12DまたはG12V突然変異を標的とする、ADGNに媒介されるCRISPRは、PI3K/Akt経路およびMAPK経路を阻害する

【0386】

PANC-1およびSW403細胞におけるKRASシグナル伝達経路に対する、G12VおよびG12D KRAS突然変異を標的とするリードsgRNAであるgRNA35A5 G12DおよびgRNA35T3 G12Vの特異的効果を検証するために、我々は、KRASによって活性化される下流のシグナル伝達タンパク質のレベルを測定した。我々は、重要なシグナル伝達経路、例えば、KRAS活性化の主要なエフェクター経路であることが公知のミトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) またはPI3K/Aktにおける変化を特に探し求めた。Cas9 mRNA (0.2 μg) およびgRNA (0.2 μg または0.5 μg) を、モル比20/1 (ペプチド/核酸) でADGNペプチドと会合させた。PANC1およびSW403細胞を、48ウェルプレートフォーマットで培養し、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN/mRNACas9:gRNA複合体で処置した。ErkおよびAktのリン酸化のレベルを、ホスホ-Akt (Ser 473) (CST、#9271、RRID:AB_329825) およびホスホ-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (CST、#4370、RRID:AB_2315112) を使用するウェスタンブロットによって、トランスフェクションの48時間後に測定した。

30

40

【0387】

図5A~5Bに報告されている通り、ウェスタンブロット結果から、両方の場合において、KRAS突然変異体の遺伝子編集が、下流のシグナル伝達経路の特異的変更を引き起こしたことが明らかになった。gRNA35A5を使用したKRAS G12Dのノックアウトは、p-AKTのレベルを有意に低減させて、PI3K/Akt経路に影響を及ぼした (図5A)。対照的に、p-Erkのレベルは、15%低減されるだけである。gRNA35T3を使用したKRAS G12Vのノックアウトは、p-Erkのレベルに有意に影響を及ぼして、MAPK経路に影響を及ぼし、Aktリン酸化には不十分に影響を及ぼした (図5B)。我々の結果は、KRAS突然変異体間の差異が、動物由来の腫瘍におい

50

て同定されたことを示す以前の結果と一致している。K R A S G 1 2 DではなくG 1 2 Vは、R A F 1と相互作用することができ、E R Kの高いリン酸化を示し、K R A S G 1 2 Vは、P I 3 Kとのその相互作用にもかかわらずA K Tを活性化することができなかったが、一方で、K R A S G 1 2 Dは、A K Tを強く活性化した (Cespedes M, Sancho F, Guerrero S, Parrenyo M, Casanova I, Pavon M, et al. Carcinogenesis. (2006) 27:2190-200)。

(実施例 7)

A D G Nペプチドは、腫瘍におけるC R I S P R構成成分の標的送達を媒介した【0388】

A D G N-100およびA D G N-106ペプチドを、腫瘍におけるC a s 9の選択的発現を改善し、血清中でのm R N Aの半減期を増加させるために選択した。C a s 9 m R N A (10 μg) およびg R N A (10 μg) を、A D G N-106、A D G N-100、A D G N-106-H y d r o 3、A D G N-100-H y d r o 3、A D G N-100-H y d r o 5、A D G N-106-H y d r o 5、A D G N-100-H y d r o 7およびA D G N-106-H y d r o 7と会合させた。雌性ヌードマウスに、ヒト膀胱癌を皮下に注射した。腫瘍移植の10日後、マウスに、遊離C a s 9またはA D G N / m R N A C a s 9 / g R N A複合体を単回静脈内注射した。注射の24時間後に、動物を殺し、肺、肝臓、脳、腎臓、心臓、脾臓、血液、膀胱および腫瘍を含む組織を収集した。組織をホモジナイズし、C a s 9発現を、C a s 9モノクローナル抗体 (S B Iクローン 7 A 9) を使用するE L I S Aによって分析した。

表7. 腫瘍におけるC a s 9発現に使用するためのA D G Nペプチド

【表 7】

細胞透過性ペプチド	配列	配列番号
ADGN-100	ベータ-AKWSAGWRWRLWRVRSWSR-NH2	153
ADGN-100-Hydro-3	Ac-YIGSR-Ava-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2	162
ADGN-100-Hydro-5	Ac-YIGSR-Aun-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2	164
ADGN-100-Hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2	166
ADGN-106	beta-ALWRALWRLWRSWLWLLWKA-NH2	90
ADGN-106-Hydro-3:	Ac-YIGSR-Ava-ALWRALWRLWRSWLWLLWK-NH2	96 または 265
ADGN-106-Hydro-5	Ac-YIGSR-Aun-ALWRALWRLWRSWLWLLWK-NH2	98 または 266
ADGN-106 hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-ALWRALWRLWRSWLWLLWK-NH2	100

【0389】

図6に示されている通り、A D G N-100-H y 3、A D G N-100-H y 7、A D G N-106-H y 3およびA D G N-106-H y 7ペプチドは、腫瘍において高いC a s 9発現を促進する。C a s 9発現のレベルは、背景レベルの10倍のレベルで、A D G N-100およびA D G N-106ペプチドと比較して4~6倍増加する。A D G N-100-H y 3およびA D G N-100-H y 7は、試験した他の組織におけるC a s 9タンパク質発現の有意な増加を伴わずに、腫瘍を特異的に標的とする。対照的に、A D G N-106-H y 3およびA D G N-106-H y 7は、肺における大きいC a s 9発現を伴って、腫瘍および肺の両方を標的とした。この結果から、A D G N-100-H y 3およびA D G N-100-H y 7が、腫瘍におけるC R I S P R構成成分の機能的送達のi n v i v o標的送達のための強力な送達方法を構成することが実証された。

【0390】

ADGN-100-Hy3およびADGN-100-Hy7を、さらなる*in vivo*評価のために選択した。6週齢の雌性ヌードマウスに、PANC1ヒト膵癌細胞を皮下に注射した（群当たりマウス4匹）。腫瘍細胞投与の10日後および17日後に、マウスに、ADGN-100-Hy3/mRNA Cas9/gRNAおよびADGN-100-Hy7/mRNA Cas9/gRNAナノ粒子をIV注射した。異なる組織および腫瘍におけるCas9発現のレベルを、各注射（D1およびD8）の24時間後および第2の注射（D14）の4/7日後に、ELISAによって分析した。組織をホモジナイズし、Cas9発現を、タンパク質抽出物に対する、CRISPR/Cas9に対する抗体を使用するELISAによって分析した。

【0391】

図7A～Bに報告されている通り、ADGN-100-Hy3およびADGN-100-Hy7はそれぞれ、腫瘍におけるCas9 mRNAの標的化送達を媒介した。Cas9タンパク質の高い発現が、背景レベルの10倍よりも高いレベルで、腫瘍において観察された（図7A～B）。Cas9発現は、背景レベルの約2倍～3倍のレベルで、肺および肝臓においても観察された。Cas9タンパク質発現における有意な増加は、試験した他の組織では検出されなかった。組織および腫瘍におけるCas9発現は、最後の注射の4日後および7日後には、背景レベルに近い。

（実施例8）

ADGN-100 Hy3およびADGN-100 Hy7ナノ担体は、血清中でCas9 mRNAを安定化した

【0392】

我々は、血清中でのADGN-100-Hy3およびADGN-100-Hy7ナノ粒子の安定性を次に評価した。雌性ヌードマウスに、ヒト膵癌を皮下に注射した。腫瘍細胞投与の10日後に、マウスを、0.2mg/kg、0.5mg/kgおよび1.0mg/kgのADGN/mRNA Cas9/gRNA複合体で静脈内で処置した。血液中のCas9 mRNAレベルを、Quantigen bDNA法によって分析した。Cas9 mRNAレベルの定量化のための血漿試料の生物分析を、Quantigene (Affymetrix-USA)が開発したmRNA検出のためのbDNA法に従って実施した。血漿試料を、溶解緩衝液中に直接希釈した。シグナル増幅を、酵素アルカリホスファターゼに結合したオリゴヌクレオチドを用いて実施した。ピコグラムでの計算された量を、溶解物中の血漿の量およびプレートに適用された溶解物の量に対して正規化した。図8A～8Bに報告されている通り、血液中のCas9 mRNAレベルは、ADGN-100-Hy3およびADGN-100-Hy7を使用して、それぞれ4.2時間および5.0時間の中程度の半減期で、用量依存的である。両方の場合において、Cas9 mRNAレベルは、24時間で、約10ng/mlまたはそれ未満に減少した。

（実施例9）

KRAS突然変異体の、ADGNに媒介されるCRISPR遺伝子編集は、腫瘍成長を*in vivo*で遮断する。

【0393】

我々は、突然変異体KRASの標的化が、ADGN-100-Hy3ナノ粒子を使用して静脈内に投与した場合に、腫瘍成長を*in vivo*で抑制できるかどうかを評価している。6週齢の雌性ヌードマウスに、35G>A突然変異を含むヒト膵癌細胞（Panc1-Luc）または35G>T KRAS突然変異を含むヒト結腸直腸がん細胞（SW403）のいずれかを注射した（200μlのPBS中20×10⁶細胞）。動物を、12時間/12時間の明/暗サイクルを用いた22℃の一定温度の専用部屋において、（動物当たりの推奨される表面積に従って）2～4匹の動物のケージ中で、病原体なしの条件下で維持し、自由に餌と水を与えた。2週間の期間を実験の開始前に経過させて、腫瘍を発生させた。

【0394】

マウスを、2つの対照群G0およびG1（群当たり動物6匹）ならびに3つの処置群（

10

20

30

40

50

G3～G5) (群当たり動物6匹)を含む5つの群に編成した。異なる群は以下である：
【0395】

Panc1-マウスについて：

G0：未処置対照

G1：ネイキッドCas9 mRNA/gRNA35A5 1.0mg/kg

G3：ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 0.5mg/kg

G4：ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35A5 1.0mg/kg

G5：ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA34T6 1.0mg/kg

【0396】

SW-403マウスについて

G0：未処置対照

G1：ネイキッドCas9 mRNA/gRNA35T3 1.0mg/kg

G5：ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35T3 0.5mg/kg

G7：ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA35T3 1.0mg/kg

G6：ADGN-100Hy3/mRNA/gRNA34T6 1.0mg/kg

【0397】

動物に、1日目および7日目に注射した。マウスに、5%グルコース中の100μlのADGN/mRNA複合体をIV注射した。PANC-1腫瘍サイズを、生物発光イメージングによって評価した。マウスに、非侵襲性生物発光イメージング (IVIS Kinetic; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) のための150μg/gのルシフェリンをi.p.注射した。ルシフェラーゼ陽性腫瘍細胞シグナルの半定量的データを、製造者のソフトウェア (Living Image; PerkinElmer) を使用して得た。結果を光子/秒 (光子/s) として表した。生物発光イメージングを、1週間に1回実施した。次いで、結果を、0日目と比較した値として表した。50日目に、動物を殺し、腫瘍を回収した。SW403腫瘍サイズを、キャリパーを使用して、7日毎に評価した。次いで、結果を、0日目と比較した値として表した。50日目に、動物を殺し、腫瘍を回収した。

【0398】

図9A～9Bに報告されている通り、対照群では、腫瘍サイズは、48日間の期間かかって、6.1倍増加した。ADGN/Cas9/gRNA35A5のIV投与は、35G>A (G12D) 突然変異体KRASをin vivoで効率的に標的とし、0.5mg/kgにおいてPANC1腫瘍成長を65%低減させる。1mg/kgの用量では、ADGN/gRNA35A5は、PANC1腫瘍成長を無効にし、元のサイズと比較して、腫瘍サイズの50%の低減をもたらした。対照的に、34G>T (G12C) 突然変異体KRASを標的とするADGN/Cas9/gRNA34T6は、PANC1腫瘍成長に影響しない。この結果から、ADGN-100Hy3が、腫瘍における35G>A (G12D) KRAS突然変異の、効率的なCRISPRに基づく編集を媒介し、膵臓腫瘍成長を阻害したことが実証された。

【0399】

図10に報告されている通り、対照群では、SW403腫瘍サイズは、48日間の期間かかって、5.9倍増加した。ADGN/Cas9/gRNA35T3は、35G>T (G12V) 突然変異体KRASをin vivoで効率的に標的とし、0.5mg/kgにおいてSW403腫瘍成長を65%低減させる。1mg/kgの用量では、ADGN/gRNA35T3は、SW403腫瘍成長を無効にし、元のサイズと比較して、腫瘍サイズの62%の低減をもたらした。対照的に、34G>T (G12C) 突然変異体KRASを標的とするADGN/Cas9/gRNA34T6は、SW403腫瘍成長に影響しない。この結果から、ADGN-100Hy3が、腫瘍における35G>T (G12V) KRAS突然変異の、効率的なCRISPRに基づく編集を媒介し、結腸直腸腫瘍成長を阻害したことが実証された。

(実施例10)

第2の薬剤と組み合わせた、ADGNに媒介されるCRISPR遺伝子編集

【0400】

化学療法剤と組み合わせた突然変異体KRASの標的化が、ADGN-100-Hy3ナノ粒子を使用して静脈内に投与された場合に、腫瘍成長を*in vivo*で抑制できるかどうかもまた評価した。6週齢の雌性ヌードマウスに、35G>A突然変異を含むヒト膵癌細胞(Panc1-Luc)、または35G>T KRAS突然変異を含むヒト結腸直腸がん細胞(SW403)のいずれかを注射した(200 μ LのPBS中 20×10^6 細胞)。動物を、12時間/12時間の明/暗サイクルを用いた22 $^{\circ}$ Cの一定温度の専用部屋において、(動物当たりの推奨される表面積に従って)2~4匹の動物のケージ中で、病原体なしの条件下で維持し、自由に餌と水を与えた。2週間の期間を実験の開始前に経過させて、腫瘍を発生させた。

10

【0401】

PANC1腫瘍を注射したマウスについて、マウスを、2つの対照群G0およびG1(群当たり動物6匹)ならびに5つの処置群(G3~G7)(群当たり動物6匹)を含む7つの群に編成した。異なる群は以下である:

G1: 未処置対照

G2: ADGN/mRNA Cas9/対照gRNA

G3: G12D標的化ADGN/mRNACAS/gRNA用量0.5mg/kg

G4: G12D標的化ADGN/mRNACAS/gRNA用量1.0mg/kg

G5: G12D標的化ADGN/mRNACAS/gRNA/アブラキサン(50 μ g)用量0.5mg/kg

20

G6: G12D標的化ADGN/mRNACAS/gRNA/アブラキサン(50 μ g)用量1.0mg/kg

G7: アブラキサン(50 μ g)1週間に1回の用量

【0402】

SW403腫瘍を注射したマウスについて、マウスを、2つの対照群G0およびG1(群当たり動物6匹)ならびに5つの処置群(G3~G7)(群当たり動物6匹)を含む7つの群に編成した。異なる群は以下である:

G1: 対照/未処置

G2: ADGN/mRNA Cas9/対照gRNA

30

G3: G12V標的化ADGN/mRNACAS/gRNA用量0.5mg/kg

G4: G12V標的化ADGN/mRNACAS/gRNA用量1.0mg/kg

G5: カペシタビン(200 μ g)

G6: G12D標的化ADGN/mRNACAS/gRNA/用量1.0mg/kg

G7: G12V標的化ADGN/mRNACAS/gRNA/カペシタビン(200 μ g)0.5mg/kg

【0403】

動物に、1日目および7日目にADGN/mRNA複合体を注射した。マウスに、5%グルコース中の100 μ LのADGN/mRNA複合体をIV注射した。PANC-1腫瘍サイズを、生物発光イメージングによって評価した。マウスに、非侵襲性生物発光イメージング(IVIS Kinetic; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)のための150 μ g/gのルシフェリンを*i.p.*注射した。ルシフェラーゼ陽性腫瘍細胞シグナルの半定量的データを、製造者のソフトウェア(Living Image; PerkinElmer)を使用して得た。結果を光子/秒(光子/s)として表した。生物発光イメージングを、1週間に1回実施した。次いで、結果を、0日目と比較した値として表した。SW403腫瘍サイズを、キャリパーを使用して、7日毎に評価した。次いで、結果を、0日目と比較した値として表した。90日目に、動物を殺し、腫瘍を回収した。

40

【0404】

図11A~11Bに報告されている通り、対照群、およびADGN/mRNACAS

50

9 / 対照 gRNA で処置したマウスでは、腫瘍サイズは、48 日間の期間かかって、6.5 倍増加した。ADGN-100Hy3 / CAS9 / gRNA35A5 の IV 投与は、35G>A (G12D) 突然変異体 KRAS を *in vivo* で効率的に標的とし、0.5 mg/kg において PANC1 腫瘍成長を 35% 低減させる。1 mg/kg の用量では、ADGN / gRNA35A5 は、PANC1 腫瘍成長を無効にした。アブラキサン処置は、PANC1 腫瘍成長を 42% 低減させた；アブラキサンと ADGN / gRNA35A5 (0.5 mg/kg) との組合せは、PANC1 腫瘍成長を無効にした；アブラキサンと ADGN / gRNA35A5 (1.0 mg/kg) との組合せは、腫瘍成長を無効にし、初期 PANC1 腫瘍のサイズを 60% 低減させた。

【0405】

10

この結果から、Panc1 腫瘍の処置についての ADGN / CAS9 / gRNA35A5 とアブラキサンの相乗効果、および膵臓腫瘍成長の阻害の可能性が実証された。

【0406】

図 12 に報告されている通り、対照群、および ADGN / mRNA CAS9 / 対照 gRNA で処置したマウスでは、腫瘍サイズは、48 日間の期間かかって、6.5 倍増加した。

【0407】

90 日目に、ADGN-100Hy3 / mRNA / gRNA35T3 0.5 mg/kg の IV 投与は、35G>T (G12V) 突然変異体 KRAS を *in vivo* で効率的に標的とし、0.5 mg/kg において SW403 腫瘍成長を 31% 低減させる。1 mg/kg の用量では、ADGN / gRNA35T3 は、SW403 腫瘍成長を無効にした。カペシタビン処置は、SW403 腫瘍成長を 38% 低減させた。カペシタビンと ADGN / gRNA35T3 (0.5 mg/kg) との組合せは、初期 SW403 腫瘍のサイズを 60% 低減させた。この結果から、SW403 腫瘍の処置についての ADGN / CAS9 / gRNA35T3 とカペシタビンとの相乗効果、および結腸直腸腫瘍成長の阻害の可能性が実証された。

20

(実施例 11)

in vivo での KRAS 突然変異体の、ADGN に媒介される特異的 CRISPR 遺伝子編集。

【0408】

30

PANC-1 および SW403 腫瘍細胞におけるそれらの標的に対する gRNA35A5 G12D および gRNA35T3 G12V の特異性が分析されている。6 週齢の雌性ヌードマウスに、35G>A 突然変異を含むヒト膵癌細胞 (Panc1-Luc) または 35G>T KRAS 突然変異を含むヒト結腸直腸がん細胞 (SW403) のいずれかを注射した (200 μ l の PBS 中 20×10^6 細胞)。2 週間の期間を実験の開始前に経過させて、腫瘍を発生させた。

【0409】

マウスを、2 つの対照群 G0 および G1 (群当たり動物 6 匹) ならびに 3 つの処置群 (G2 ~ G4) (群当たり動物 6 匹) を含む 5 つの群に編成した。異なる群は以下である：

【0410】

40

Panc1-マウスについて

G0：未処置対照

G1：ネイキッド Cas9 mRNA / gRNA35A5 1.0 mg/kg

G2：ADGN-100Hy3 / mRNA / gRNA35A5 0.5 mg/kg

G3：ADGN-100Hy3 / mRNA / gRNA35A5 1.0 mg/kg

G4：ADGN-100Hy3 / mRNA / gRNA34T6 1.0 mg/kg

【0411】

SW-403 マウスについて

G0：未処置対照

G1：ネイキッド Cas9 mRNA / gRNA35T3 1.0 mg/kg

50

G 2 : A D G N - 1 0 0 H y 3 / m R N A / g R N A 3 5 T 3 0 . 5 m g / k g
 G 3 : A D G N - 1 0 0 H y 3 / m R N A / g R N A 3 5 T 3 1 . 0 m g / k g
 G 4 : A D G N - 1 0 0 H y 3 / m R N A / g R N A 3 4 T 6 1 . 0 m g / k g
 【 0 4 1 2 】

動物に、1日目および7日目に注射した。マウスに、5%グルコース中の100 μ lのADGN/mRNA複合体をIV注射した。50日目に、動物を殺し、組織/腫瘍を回収した。処置の50日後に、腫瘍、肝臓、脾臓および肺におけるハウスキーピング遺伝子；グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素（GAPDH）、HPRT-1およびミトコンドリアATPシンターゼ6（mATP sy 6）の発現のレベルを、PCRによって評価した。図13A～13Bに報告されている通り、処置の50日後の動物分析は、肝臓、肺、脾臓および腫瘍を含む選択された組織において、ハウスキーピング遺伝子におけるいずれの変化も明らかにしなかった。

【 0 4 1 3 】

我々は、それぞれ、PANC1（図14A）およびSW403（図14B）腫瘍において、ディープシーケンシングによってKRAS G12DまたはKRAS G12V遺伝子編集のレベルを分析した。図14A～14Bに示されている通り、ディープシーケンシングから、ADGN-Hy3/s gRNA35T3 s gRNAおよびADGN-Hy3/s gRNA35A5がそれぞれ、SW403腫瘍において72%のインデル頻度およびPANC-1腫瘍において76%のインデル頻度を生じたことが示された。下流のシグナル伝達タンパク質（pAKTおよびpERK）のレベルを、PANC1およびSW403腫瘍に対するELISAによって定量化した。図15Aから、gRNA35A5を使用したKRAS G12Dのノックアウトが、PANC1腫瘍においてp-AKTおよびp-ERKのレベルを有意に低減させたことが実証された。gRNA35T3を使用したKRAS G12Vのノックアウトは、SW403腫瘍においてp-ERKのレベルに有意に影響を及ぼしたが、p-AKTのレベルには有意には影響を及ぼさなかった（図15B）。Cas9/s gRNAを使用したKRASの標的化が、標的部位またはその近傍において種々の二次的突然変異を誘導し得ることを考慮すると、ディープシーケンシングにより、KRAS-突然変異体がん細胞（SW403/PANC-1）、または野生型KRASを含む細胞（HT29）のいずれにおいても、in vitroまたはin vivoで、同様のレベルの二次的な発癌性突然変異（G12D、G12V、G12C、G13D、G12R、G12A、およびG12S）が示された。

（実施例12）

ADGN/CRISPR/KRAS処置は、in vivoで十分に忍容性が示される
 【 0 4 1 4 】

ADGN/Cas9/gRNA35A5およびADGN/Cas9/gRNA35T3の毒性およびin vivo忍容性が評価されている。動物を、0.5mg/kgおよび1.0mg/kgのADGN/Cas9/gRNA複合体で0日目および7日目に静脈内で処置した。動物体重を、異なる時点で定量化した（図16A～16B）。血液試料を、D7、D15およびD30に、ヘパリン処置した管中に収集し、血中尿素窒素（BUN）、クレアチニン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の血漿濃度について分析した。図16A～16Bに報告されている通り、全ての処置が十分に忍容性が示され、有意な体重減少は観察されなかった。BUN、AST、ALTおよびクレアチニンに有意な変動がないことは、処置の高い忍容性と、腎および肝毒性がないことを示唆した（図17A～17D）。

（実施例13）

【 0 4 1 5 】

表8に、CRISPR分子（例えば、本明細書に記載のガイドRNA）の細胞中へのin vivoでの送達（例えば、静脈内（IV）投与、筋肉内（IM）投与、もしくは皮下（SQ）投与、または噴霧（NB）もしくは気管内滴下注入によって）に関して成功が証明された細胞透過性ペプチドの要約を列挙する。示されたように、細胞透過性ペプチド

のほとんどは、1つまたは複数の器官を特異的に標的とすることができた。

表 8.

【表 8 - 1】

CPP	配列	IN VIVO	経路	標的化器官
ADGN-100a	ペータ-AKWSAGWRWRLWRVRSWSR (配列番号 154)	マウス	IV/IM/SQ/NB	肺/肝臓/腎臓/脾臓
ADGN-100b	ペータ-AKWSALYRWRLWRVRSWSR (配列番号 155)	マウス	IV/IM/SQ	肺/肝臓/腎臓/脾臓
ADGN-100 GALNA C	Ac-KWSA(GALNAC)LWRWRLWRVRSWSR-NH2 (配列番号 172)	マウス	IV/SQ	肝臓
ADGN-100-Hydro-3	Ac-YIGSR-Ava-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 (配列番号 162)	マウス	IV/IM	腫瘍/肺
ADGN-100-Hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 (配列番号 167)	マウス	IV/IM	腫瘍/肺

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

CPP	配列	IN VIVO	経路	標的化器官
ADGN-100-PEG2	Ac-(PEG)2-ベータ-A-KWRSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 (配列番号 158または267)	マウス	IV/IM	肺/肝臓/脾臓
ADGN-100-PEG7	Ac-(PEG)7-ベータA-KWRSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 (配列番号 157または268)	マウス	IV/IM	肺/肝臓/腎臓
ADGN-100-HYPEG2	Ac-YIGSR-(PEG)2-βA-KWRSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 (配列番号 170 または269)	マウス	IV/IM	肺/腫瘍
VEPEP-6 (ADGN-106)	ベータ-ALWRALWRLWRSLWRLWKA (配列番号 89または270)	マウス/ラット	IV/IM/NB/SQ	肝臓/肺
ADGN-106-Hydro-1	Ac-YIGSR-(G)4-ALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 94)	マウス	IV/IM	肺/腫瘍
ADGN-106 hydro-2	Ac-GYVS-(G)4-ALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 95)	マウス	IV/IM	肝臓/筋肉
ADGN-106-Hydro-3:	Ac-YIGSR-Ava-ALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 96)	マウス	IV/IM	腫瘍/肺
ADGN-106 hydro-4	Ac-GYVS-Ava-ALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 97)	マウス	IV/IM	脳/腎臓
ADGN-106-Hydro-5	Ac-YIGSR-Aun-ALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 98)	マウス	IV/IM	腫瘍/肺/脾臓/肝臓
ADGN-106 hydro-6	Ac-GYVS-Aun-ALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 99)	マウス	IV/IM	腫瘍/脾臓/肺
ADGN-106 hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-ALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 100)	マウス	IV/IM	肺/腫瘍
ADGN-106-PEG7	Ac-(PEG)7-βALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 92)	マウス	IV/IM	肺
ADGN-106-PEG2	Ac-(PEG)2-βALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2 (配列番号 93)	マウス	IV/IM	肺/腎臓/脾臓

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

CPP	配列	IN VIVO	経路	標的化器官
ADGN-106-HYPEG2	Ac- YIGSR -(PEG)2- βALWRALWRLWRSLWRL WKA-NH2 (配列番号 105)	マウス	IV/IM	腫瘍/肺
ADGN-106-HYPEG4	Ac- YIGSR -(PEG)4- βALWRALWRLWRSLWRL WKA-NH2 (配列番号 106)	マウス	IV/IM	腫瘍/肺
ADGN-106-TB	Ac-SYTSSTM-ava- βALWRALWRLWRSLWRL WKA-NH2 (配列番号 112)	マウス	IV/IM	脳/肝臓
ADGN-106-TC	Ac- THRPPNWSPVWPRALWRL WRSLWRLRWKA-NH2 (配列番号 113)	マウス	IV/IM	脳/肺
ADGN-106-TD	Ac- CKTRRVPWRALWRLWRSL WRLWKA-NH2 (配列番号 114)	マウス	IV/IM	筋肉/心臓
ADGN-106-HYPEG7	Ac- YIGSR -(PEG)7- βALWRALWRLWRSLWRL WKA-NH2 (配列番号 107)	マウス	IV/IM	腫瘍/肝臓

10

20

以下の表 9 は、表 8 および図 6 に基づく、C R I S P R 分子（例えば、本明細書に記載のガイド RNA）を細胞中に *in vivo* で（例えば、静脈内（IV）投与、筋肉内（IM）投与、もしくは皮下（SQ）投与、または噴霧（NB）もしくは気管内滴下注入によって）送達することができる細胞透過性ペプチドの配列番号を示す。

表 9.

【表 9 - 1】

30

器官	心臓	脳	筋肉	肺	肝臓	腎臓	脾臓	腫瘍	脾臓
細胞透過性 ペプチド 配列番号	114, 153, 154, 96, 100, 101	97, 112, 113	95, 96, 98, 114, 100, 101	89, 90, 92, 93, 94, 96, 98, 99, 100, 101, 105, 106, 107, 113,	89, 90, 90, 92, 93, 94, 96, 98, 99, 100, 101, 105, 106, 107, 113,	89, 90, 93, 96, 97, 98, 137, 100, 101, 138, 154, 155, 157	98, 99, 137, 138, 153, 154, 155, 162	94, 96, 98, 99, 100, 101, 105, 106, 107, 153, 154, 162, 164, 167,	93, 153, 154, 158

40

50

【表 9 - 2】

器官	心臓	脳	筋肉	肺	肝臓	腎臓	膵臓	腫瘍	脾臓
				137, 138, 153, 154, 155, 157, 158, 162, 164, 167, 170	157, 96, 162, 167, 100, 101			170	

10

(実施例 14)

【0416】

がん細胞株。

【0417】

全ての細胞株はATCCから得、特徴は図24に報告されている。膵がん(PDAC): KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてヘテロ接合性のPANC1、KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてホモ接合性のPK45H、KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてヘテロ接合性のPK1、KRAS p. Gly12Cys (c. 34G>T) についてホモ接合性のMIA-PACA、ASPC-1 KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A)

20

【0418】

結腸直腸がん(CRC): KRAS p. Gly12Val (c. 35G>T) についてホモ接合性のSW480、KRAS p. Gly12Val (c. 35G>T) についてヘテロ接合性のSW403、KRAS p. Gly12Asp (c. 35G>A) についてヘテロ接合性のLS513、KRASについてWTであり、TP53 p. Arg273His (c. 818G>A) についてホモ接合性のHT-29、KRASについてWTのHT-29

30

【0419】

肺がん(NSCLC): KRAS p. Gly12Cys (c. 34G>T) についてヘテロ接合性のNCI H23、CALU-1、H-2122、H358、KRASについてWTのH1299、KRAS p. Gly12Val (c. 35G>T) についてH-2444、H-441

ADGN-121ナノ粒子を使用した、がん細胞株におけるKRAS G12V突然変異の特異的標的化

【0420】

我々は、KRAS G12V突然変異したがん細胞に高度に特異的なgRNA35T3ガイドを選択して、KRAS G12V突然変異したがん細胞において70%よりも高いインデル頻度をもたらしている。ADGN-121ナノ粒子は、モル比20/1(ペプチド/核酸)でADGNペプチド(ADGN-100-Hydro3ペプチド)と会合させたgRNA35T3 sgRNA/Cas9 mRNA(モル比1/1)に対応する。ADGN-121ナノ粒子を、がん細胞の大きいパネルに対して評価した。細胞を、98ウェルプレートフォーマットで培養し、1日目に、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN-121(ADGN/mRNACas9-gRNA)複合体(0.1~10μM)で処置した。細胞増殖を、GlowMax(Promega)上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析し、細胞毒性を、処置の72時間後に、CellTiter GlowまたはMTTアッセイキットを使用して分析した。

40

50

【0421】

図20に報告されている通り、ADGN-121 (gRNA35T3)は、全てのKRAS G12V突然変異したがん細胞の細胞増殖を特異的に阻害する。対照的に、ADGN-121は、KRAS G12D (PANC-1、LS-513)、およびKRAS G12C (H-358、CALU-1)突然変異体細胞の増殖もWT KRAS (HT-29、H-1299)細胞の増殖も変更しない。図25に報告されている通り、ADGN-121ナノ粒子は、10~50 nMのナノモル濃度範囲のIC₅₀値で、NSCLCおよびCRC細胞においてKRAS G12V編集を誘導した。ADGN-121毒性の分析により、IC₅₀よりも450~1000倍高い濃度値(7~15 μM)で毒性が生じることが示された。

10

【0422】

ADGN-100 Hydro3ペプチドをこの実験に使用した。ADGN-106-Hydro3は、同じ効率を有する。

ADGN-123ナノ粒子を使用した、がん細胞株におけるKRAS G12D突然変異の特異的標的化

【0423】

我々は、KRAS G12D突然変異したがん細胞に高度に特異的なgRNA35A5ガイドを選択して、KRAS G12D突然変異したがん細胞において70%よりも高いインデル頻度をもたらしている。ADGN-123ナノ粒子は、モル比20/1(ペプチド/核酸)でADGNペプチド(ADGN-106-Hydro3ペプチド)と会合させたgRNA35A5 sgRNA/Cas9 mRNA(モル比1/1)に対応する。ADGN-123ナノ粒子を、がん細胞の大きいパネルに対して評価した。細胞を、96ウェルプレートフォーマットで培養し、1日目に、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN-123(ADGN/mRNACas9-gRNA)複合体(0.1~10 μM)で処置した。細胞増殖を、GlowMax(Promega)上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析し、細胞毒性を、処置の72時間後に、CellTiter GlowまたはMTTアッセイキットを使用して分析した。

20

【0424】

図21に報告されている通り、ADGN-123 (gRNA35A5)は、全てのKRAS G12D突然変異したがん細胞の細胞増殖を特異的に阻害する。対照的に、ADGN-123は、KRAS G12V (H-441、SW-480、SW-403)およびKRAS G12C (H-358、MIA PACA)突然変異体細胞もWT (HT-29) KRAS細胞も変更しない。図26に報告されている通り、ADGN-123ナノ粒子は、10~25 nMのナノモル濃度範囲のIC₅₀値で、KRAS G12D突然変異を有するPDAおよびCRC細胞においてKRAS G12D編集を誘導する。ADGN-123毒性の分析により、IC₅₀よりも450~1000倍高い濃度値(7~15 μMのCC₅₀)で毒性が生じることが示された。

30

【0425】

ADGN-106 Hydro3ペプチドをこの実験に使用した。ADGN-100-Hydro3は、同じ効率を有する。

ADGN-122を用いた、がん細胞株におけるKRAS G12C突然変異の特異的標的化

40

【0426】

我々は、KRAS G12C突然変異したがん細胞に高度に特異的なgRNA34T6ガイドを選択して、KRAS G12C突然変異したがん細胞において70%よりも高いインデル頻度をもたらしている。ADGN-122ナノ粒子は、モル比20/1(ペプチド/核酸)でADGNペプチド(ADGN-100-Hydro3ペプチド)と会合させたgRNA34T6 sgRNA/Cas9 mRNA(モル比1/1)に対応する。ADGN-122ナノ粒子を、がん細胞の大きいパネルに対して評価した。細胞を、96ウ

50

エルプレートフォーマットで培養し、1日目に、遊離mRNACas9-gRNA、またはADGN-122 (ADGN/mRNACas9-gRNA) 複合体 (0.1~10 μM) で処置した。細胞増殖を、GlowMax (Promega) 上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析し、細胞毒性を、処置の72時間後に、CellTiter GlowまたはMTTアッセイキットを使用して分析した。

【0427】

図22に報告されている通り、ADGN-122 (gRNA34T6) は、全てのKRAS G12C突然変異したがん細胞の細胞増殖を特異的に阻害する。対照的に、ADGN-122は、KRAS G12V (H-441、SW-480、SW-403) および KRAS G12D (PANC-1、ASPC-1) 突然変異体細胞もWT (H-1299) KRAS細胞も変更しない。図27に報告されている通り、ADGN-122ナノ粒子は、10~16 nMのナノモル濃度範囲のIC₅₀値で、KRAS G12C突然変異を有するPDAおよびNSCL細胞においてKRAS G12C編集を誘導する。ADGN-122毒性の分析により、IC₅₀よりも800~1000倍高い濃度値 (7~15 μMのCC₅₀) で毒性が生じることが示された。

KRAS G12C突然変異体細胞株に対する、ADGN-122/AMG-510の比較

【0428】

G12C KRASを特異的に標的とするAMG510阻害剤は、非小細胞肺がん (NSCLC) の前臨床モデルにおいて有効性を示しており、免疫チェックポイント遮断に対する応答を増強することも示されている。しかし、AMG-510は、G12C突然変異に特異的であり、G12D突然変異体KRASは阻害しない。我々は、KRAS G12C突然変異を有する4つの異なるがん細胞株 (MIA PACA、H-358、CALU-1、H-2122) に対する、ADGN-122 対 AMG-510の効力を評価している。細胞を、処置の24時間前に、96ウェルプレートフォーマットでプレートした。細胞を、1日目に、ADGN-122またはAMG-510 (1~1000 nM) で処置した。細胞増殖を、GlowMax (Promega) 上でCellTiter Glowキットを使用して5日間の期間にわたって分析し、細胞毒性を、処置の72時間後に、CellTiter GlowまたはMTTアッセイキットを使用して分析した。

【0429】

ADGN-122効率は、MIA PACA細胞ではAMG-510と同様である。

【0430】

図20および図28に報告されている通り、ADGN-122およびAMG-510は共に、全てのKRAS G12C突然変異したがん細胞の増殖を特異的に阻害する。ADGN-122およびAMG-510は、PDA (MIA-PACA) 細胞において同様の有効性を有する。ADGN-122は、NSCLC細胞では、AMG-510よりも効率的である。ADGN-122は、AMG-510、H-2122、H-358およびCALU-1細胞よりも、それぞれ3.7倍、5.7倍および7.1倍強力である。

【0431】

ADGN-100 Hydro3ペプチドをこの実験に使用した。ADGN-106-Hydro3は、同じ効率を有する。

配列表

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

配列番号	説明	配列
例示的な <i>KRAS</i> G12V gRNA		
1.	G12V-gRNA35T1	GTTGGAGCTGTTGGCGTAGGC
2.	G12V-gRNA35T2	CTTGTGGTAGTTGGAGCTGT
3.	G12V-gRNA35T3	GGTAGTTGGAGCTGTTGGCG
4.	G12V gRNA35T4	AGCTGTTGGCGTAGGCAAGA
5.	G12V-gRNA35T5	TGTTGGCGTAGGCAAGAGTGCC
6.	G12V-gRNA35T6	GTTGGAGCTGTTGGCGTAGG
7.	G12V-gRNA35T7	TTGTGGTAGTTGGAGCTGTTG
8.	G12V-gRNA35T8	GTAGTTGGAGCTGTTGGCGT
9.	G12V-gRNA35T9	GCTGTTGGCGTAGGCAAGAGT
10.	G12V-gRNA35T10	TAGTTGGAGCTGTTGGCGT
11.	G12V-gRNA35T11	TGTTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTG
12.	G12V gRNA	TTGTGGTAGTTGGAGCTGTT
13.	G12V gRNA	TAGTTGGAGCTGTTGGCGTAG
14.	G12V gRNA	GCTGTTGGCGTAGGCAAGAGA
例示的な <i>KRAS</i> G12D gRNA		
15.	G12D-gRNA35A1	CTTGTGGTAGTTGGAGCTGA
16.	G12D-gRNA35A2	GGTAGTTGGAGCTGATGGC
17.	G12D-gRNA35A3	AGCTGATGGCGTAGGCAAGA

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

配列番号	説明	配列
18.	G12D-gRNA35A4	TGATGGCGTAGGCAAGAGTGCC
19.	G12D-gRNA35A5	AGTTGGAGCTGATGGCGT
20.	G12D-gRNA35A6	GTTGGAGCTGATGGCGTAGG
21.	G12D-gRNA35A7	GTAGTTGGAGCTGATGGCGT
22.	G12D-gRNA35A8	TTGTGGTAGTTGGAGCTGAT
23.	G12D-gRNA35A9	GCTGATGGCGTAGGCAAGAGA
24.	G12D-gRNA35A10	TAGTTGGAGCTGATGGCGT
25.	G12D-gRNA35A11	TGATGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTG
26.	G12D gRNA	TTGTGGTAGTTGGAGCTGAT
27.	G12D gRNA	TAGTTGGAGCTGATGGCGTAG
28.	G12D gRNA	GCTGATGGCGTAGGCAAGAGA
例示的な <i>KRAS</i> G12C gRNA		
29.	G12C-gRNA34T1	CTTGTGGTAGTTGGAGCTTG
30.	G12C-gRNA34T2	AGCTTGTGGCGTAGGCAAGA
31.	G12C-gRNA34T3	GTTGGAGCTTGTGGCGTAGGC
32.	G12C-gRNA34T4	GGTAGTTGGAGCTTGTGGC
33.	G12C-gRNA34T5	TTGTGGTAGTTGGAGCTTG
34.	G12C-gRNA34T6	GTAGTTGGAGCTTGTGGCGT
35.	G12C-gRNA34T7	GCTTGTGGCGTAGGCAAGAG
36.	G12C-gRNA34T8	CTTGTGGCGTAGGCAAGAGTGC
37.	G12C-gRNA34T9	CTTGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTG

10

20

30

40

50

【表 10 - 3】

配列番号	説明	配列
例示的な <i>KRAS</i> WT gRNA		
38.	<i>KRAS</i> WT-gRNAWT1	CTTGTGGTAGTTGGAGCTGG
39.	<i>KRAS</i> WT-gRNAWT2	TTGGATATTCTCGACACAGC
40.	<i>KRAS</i> WT-gRNAWT3	TCTCGACACAGCAGGTCAAG
41.	<i>KRAS</i> WT-gRNAWT4	GATGTACCTATGGTCCTAGT
42.	<i>KRAS</i> WT-gRNAWT5	GTCGAGAATATCCAAGAGAC
43.	<i>KRAS</i> WT-gRNAWT6	TCTCGACACAGCAGGTCAAG
例示的な細胞透過性ペプチド		
VEPEP-3 ペプチド		
44.	VEPEP-3	$X_1X_2X_3X_4X_5X_2X_3X_4X_6X_7X_3X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}$ X_1 は、ベータ-AまたはSであり、 X_2 は、K、RまたはLであり、 X_3 は、FまたはWであり、 X_4 は、F、WまたはYであり、 X_5 は、E、RまたはSであり、 X_6 は、R、TまたはSであり、 X_7 は、E、RまたはSであり、 X_8 は、存在しないか、FまたはWであり、 X_9 は、PまたはRであり、 X_{10} は、RまたはLであり、 X_{11} は、K、WまたはRであり、 X_{12} は、RまたはFであり、 X_{13} は、RまたはKである
45.	VEPEP-3 1	$X_1X_2WX_4EX_2WX_4X_6X_7X_3PRX_{11}RX_{13}$ X_1 は、ベータ-AまたはSであり、 X_2 は、RまたはKであり、 X_3 は、WまたはFであり、 X_4 は、F、WまたはYであり、 X_6 は、TまたはRであり、 X_7 は、EまたはRであり、 X_{11} は、RまたはKであり、 X_{13} は、RまたはKである
46.	VEPEP-3 1a	$X_1KWFERWFREWPRKRR$ X_1 は、ベータ-AまたはSである
47.	VEPEP-3 1b	$X_1KWWERWWREWPRKRR$ X_1 は、ベータ-AまたはSである
48.	VEPEP-3 1c	$X_1KWWERWWREWPRKRK$ X_1 は、ベータ-AまたはSである
49.	VEPEP-3 1d	$X_1RWWEKWWTRWPRKRK$ X_1 は、ベータ-AまたはSである

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

配列番号	説明	配列
50.	VEPEP-3 1c	X ₁ RWYEKWYTEFPRRRR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
51.	VEPEP-3 1S	X ₁ KX ₁₄ WVERWWRX ₁₄ WPKRK X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、X ₁₄ は、非天然のアミノ酸であり、また、2つの非天然のアミノ酸の間に炭化水素連結が存在する
52.	VEPEP-3 2	X ₁ X ₂ X ₃ WX ₅ X ₁₀ X ₃ WX ₆ X ₇ WX ₈ X ₉ X ₁₀ WX ₁₂ R X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、X ₂ は、K、RまたはLであり、X ₃ は、FまたはWであり、X ₅ は、RまたはSであり、X ₆ は、RまたはSであり、X ₇ は、RまたはSであり、X ₈ は、FまたはWであり、X ₉ は、RまたはPであり、X ₁₀ は、LまたはRであり、X ₁₂ は、RまたはFである
53.	VEPEP-3 2a	X ₁ RWWRLWWSWFRLWRR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
54.	VEPEP-3 2b	X ₁ LWWRWWWSRWPRWRR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
55.	VEPEP-3 2c	X ₁ LWWSRWWSWFRLWFR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
56.	VEPEP-3 2d	X ₁ KFWSRFWRSWFRLWRR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
57.	VEPEP-3 2S	X ₁ RWWX ₁₄ LWWSWX ₁₄ RLWRR X ₁ は、ベータ-アラニンまたはセリンであり、X ₁₄ は、非天然のアミノ酸であり、また、2つの非天然のアミノ酸の間に炭化水素連結が存在する
58.	VEPEP-3a	ベータ-AKWFERWFREWPRKRR
59.	VEPEP-3b	ベータ-AKWVERWWREWPRKRR
60.	VEPEP-3C	ASSLNIA-Ava-KWVERWWREWPRKRR
61.	VEPEP-3D	LSSRLDA-Ava-KWVERWWREWPRKRR
62.	VEPEP-3E	Ac-SYTSSTM-ava-KWVERWWREWPRKRR
VEPEP-6 ペプチド		
63.	VEPEP-6 1	X ₁ LX ₂ RALWX ₉ LX ₃ X ₉ X ₄ LWX ₉ LX ₅ X ₆ X ₇ X ₈

10

20

30

40

50

【表 10 - 5】

配列番号	説明	配列
		X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、FまたはWであり、X ₃ は、L、W、CまたはIであり、X ₄ は、S、A、NまたはTであり、X ₅ は、LまたはWであり、X ₆ は、WまたはRであり、X ₇ は、KまたはRであり、X ₈ は、Aであるかまたは存在せず、X ₉ は、RまたはSである
64.	VEPEP-6 2	X ₁ LX ₂ LARWX ₉ LX ₃ X ₉ X ₄ LWX ₉ LX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、FまたはWであり、X ₃ は、L、W、CまたはIであり、X ₄ は、S、A、NまたはTであり、X ₅ は、LまたはWであり、X ₆ は、WまたはRであり、X ₇ は、KまたはRであり、X ₈ は、Aであるかまたは存在せず、X ₉ は、RまたはSである
65.	VEPEP-6 3	X ₁ LX ₂ ARLWX ₉ LX ₃ X ₉ X ₄ LWX ₉ LX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、FまたはWであり、X ₃ は、L、W、CまたはIであり、X ₄ は、S、A、NまたはTであり、X ₅ は、LまたはWであり、X ₆ は、WまたはRであり、X ₇ は、KまたはRであり、X ₈ は、Aであるかまたは存在せず、X ₉ は、RまたはSである
66.	VEPEP-6 4	X ₁ LX ₂ RALWRLX ₃ RX ₄ LWRLX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、FまたはWであり、X ₃ は、L、W、CまたはIであり、X ₄ は、S、A、NまたはTであり、X ₅ は、LまたはWであり、X ₆ は、WまたはRであり、X ₇ は、KまたはRであり、X ₈ は、Aであるかまたは存在しない
67.	VEPEP-6 5	X ₁ LX ₂ RALWRLX ₃ RX ₄ LWRLX ₅ X ₆ KX ₇ X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、FまたはWであり、X ₃ は、LまたはWであり、X ₄ は、S、AまたはNであり、X ₅ は、LまたはWであり、X ₆ は、WまたはRであり、X ₇ は、Aであるかまたは存在しない
68.	VEPEP-6 6	X ₁ LFRALWRLRX ₂ LWRLWX ₃ X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、SまたはTであり、X ₃ は、KまたはRである
69.	VEPEP-6 7	X ₁ LWRALWRLWRX ₂ LWRLWX ₃ A X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、SまたはTであり、X ₃ は、KまたはRである
70.	VEPEP-6 8	X ₁ LWRALWRLX ₄ RX ₂ LWRLWRX ₃ A X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、SまたはTであり、X ₃ は、KまたはRであり、X ₄ は、L、CまたはIである
71.	VEPEP-6 9	X ₁ LWRALWRLWRX ₂ LWRLWRX ₃ A X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₂ は、SまたはTであり、X ₃ は、KまたはRである
72.	VEPEP-6 10	X ₁ LWRALWRLX ₅ RALWRLWX ₃ A X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₃ は、KまたはRであり、X ₅ は、LまたはIである
73.	VEPEP-6 11	X ₁ LWRALWRLX ₄ RNLWRLWX ₃ A X ₁ は、ペーター-AまたはSであり、X ₃ は、KまたはRであり、X ₄ は、L、CまたはIである
74.	VEPEP-6a	Ac-X ₁ LFRALWRLRLSLWRLWK- システアミド X ₁ は、ペーター-AまたはSである
75.	VEPEP-6b	Ac-X ₁ LWRALWRLWRLSLWRLWKA- システアミド X ₁ は、ペーター-AまたはSである

10

20

30

40

50

【表 10 - 6】

配列番号	説明	配列
76.	VEPEP-6c	Ac-X ₁ LWRALWRLRLSLWRLWRKA- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSである
77.	VEPEP-6d	Ac-X ₁ LWRALWRLWRLSLWRLWRKA- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSである
78.	VEPEP-6e	Ac-X ₁ LWRALWRLRLRALWRLWLKA- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSである
79.	VEPEP-6f	Ac-X ₁ LWRALWRLRLNLWRLWLKA- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSである
80.	ST-VEPEP-6a	Ac-X ₁ LFRALWR _s LLRS _s LWRLWLK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
81.	ST-VEPEP-6aa	Ac-X ₁ LFLARWR _s LLRS _s LWRLWLK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
82.	ST-VEPEP-6ab	Ac-X ₁ LFRALWS _s LLRS _s LWRLWLK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
83.	ST-VEPEP-6ad	Ac-X ₁ LFLARWS _s LLRS _s LWRLWLK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
84.	ST-VEPEP-6b	Ac-X ₁ LFRALWRLRLR _s SLWS _s LLWK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
85.	ST-VEPEP-6ba	Ac-X ₁ LFLARWRLRLR _s SLWS _s LLWK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
86.	ST-VEPEP-6bb	Ac-X ₁ LFRALWRLRLS _s SLWS _s LLWK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
87.	ST-VEPEP-6bd	Ac-X ₁ LFLARWRLRLS _s SLWS _s LLWK- システアミド X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
88.	ST-VEPEP-6c	Ac-X ₁ LFAR _s LWRLRLRS _s LWRLWLK- システアミド

10

20

30

40

50

【表 10 - 7】

配列番号	説明	配列
		X _i は、ペーター-AまたはSであり、後に下付きの「s」が続く残基は、炭化水素連結によって連結している
89.	VEPEP-6 (ADGN-106)	ペーター-ALWRALWRLWRSWRLWKA
90.	ADGN-106	ペーター-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
91.	ADGN-106-RI	AKWLLRWLSRWLRWLRWLR
92.	ADGN-106-PEG7	Ac-(PEG)7-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
93.	ADGN-106-PEG2	Ac-(PEG)2-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
94.	ADGN-106-Hydro-1	Ac-YIGSR-(G)4-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
95.	ADGN-106 hydro-2	Ac-GYVS-(G)4-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
96.	ADGN-106-Hydro-3:	Ac-YIGSR-Ava-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂ Avalは、5-アミノペンタン酸である
97.	ADGN-106 hydro-4	Ac-GYVS-Ava-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂ Avalは、5-アミノペンタン酸である
98.	ADGN-106-Hydro-5	Ac-YIGSR-Aun-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂ Aunは、11-アミノウンデカン酸である
99.	ADGN-106 hydro-6	Ac-GYVS-Aun-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂ Aunは、11-アミノウンデカン酸である
100.	ADGN-106 hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
101.	ADGN-106 hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
102.	ADGN-106 hydro-8	Ac-GYVS-Ahx-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
103.	ADGN-106-Hydro	Ac-YIGSR-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
104.	ADGN-106 ステアリル	ステアリル-βA-ALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
105.	ADGN-106-HYPEG2	Ac- YIGSR -(PEG)2-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
106.	ADGN-106-HYPEG4	Ac- YIGSR -(PEG)4-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
107.	ADGN-106-HYPEG7	Ac- YIGSR -(PEG)7-βALWRALWRLWRSWRLWKA-NH ₂
108.	NA	
109.	NA	

10

20

30

40

50

【表 10 - 8】

配列番号	説明	配列
110.	NA	
111.	ADGN-106 gaLnaC	ALWRA(GalNac)LWRLWRSLWRLWKA-NH2
112.	ADGN-106-TB	Ac-SYTSSTM-ava- βALWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2
113.	ADGN-106-TC	Ac-THRPPNWSPVWPRALWRLWRSLWRLWKA-NH2
114.	ADGN-106-TD	Ac-CKTRRVPWRALWRLWRSLWRLWKA-NH2
115.		Ac-CKTRRVP-ava-WRALWRLWRSLWRLWKA-NH2
116.		Ac-CARPAR-ava-WRALWRLWRSLWRLWKA-NH2
117.		Ac-THRPPNWSPV-ava-WRALWRLWRSLWRLWKA-NH2
VEPEP-9 ペプチド		
118.	VEPEP-9 1	$X_1X_2X_3WWX_4X_5WAX_6X_3X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}WX_{13}R$ X_1は、ベータ-AまたはSであり、X_2は、Lであるかまたは存在せず、X_3は、Rであるかまたは存在せず、X_4は、L、RまたはGであり、X_5は、R、WまたはSであり、X_6は、S、PまたはTであり、X_7は、WまたはPであり、X_8は、F、AまたはRであり、X_9は、S、L、PまたはRであり、X_{10}は、RまたはSであり、X_{11}は、Wであるかまたは存在せず、X_{12}は、Aであるか、Rであるか、または存在せず、X_{13}は、WまたはFであり、X_3が存在しない場合、X_2、X_{11}およびX_{12}も存在しない
119.	VEPEP-9 2	$X_1X_2RWWRWAX_6RWX_8X_9X_{10}WX_{12}WX_{13}R$ X_1は、ベータ-AまたはSであり、X_2は、Lであるかまたは存在せず、X_6は、SまたはPであり、X_8は、FまたはAであり、X_9は、S、LまたはPであり、X_{10}は、RまたはSであり、X_{12}は、AまたはRであり、X_{13}は、WまたはFである
120.	VEPEP9a1	$X_1LRWWLRWASRWFSRWAWWR$ X_1は、ベータ-AまたはSである
121.	VEPEP9a2	$X_1LRWWLRWASRWASRWAWFR$ X_1は、ベータ-AまたはSである
122.	VEPEP9b1	$X_1RWWRWASRWALSWRWWR$ X_1は、ベータ-AまたはSである
123.	VEPEP9b2	$X_1RWWRWASRWFLSWRWWR$ X_1は、ベータ-AまたはSである
124.	VEPEP9c1	$X_1RWWRWAPRWFPSRWWR$ X_1は、ベータ-AまたはSである
125.	VEPEP9c2	$X_1RWWRWASRWAPSWRWWR$

10

20

30

40

50

【表 10 - 9】

配列番号	説明	配列
		X ₁ は、ベータ-AまたはSである
126.	VEPEP-9 3	X ₁ WWX ₄ X ₅ WAX ₆ X ₇ X ₈ RX ₁₀ WWR X ₁ は、ベータ-AまたはSであり、X ₄ は、RまたはGであり、X ₅ は、WまたはSであり、X ₆ は、S、TまたはPであり、X ₇ は、WまたはPであり、X ₈ は、AまたはRであり、X ₁₀ は、SまたはRである。
127.	VEPEP9d	X ₁ WWRWWASWARSWWR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
128.	VEPEP9e	X ₁ WWGSWATPRRRWWR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
129.	VEPEP9f	X ₁ WWRWWAPWARSWWR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
130.	VEPEP-9	ベータ-ALRWLRWASRWFSRWAWWR
131.	VEPEP-9A	KSYDTY-ava-ALRWLRWASRWFSRWAWWR
132.	VEPEP-9 B	ac-CKRAVRWWLRWASRWFSRWAWWR
133.	VEPEP-9 C	beta-A-RWWLRWASRWFSRWAWWR
134.	VEPEP-9D	KSYDTYAAETRRWASRWFSRWAWWR
ADGN-100 ペプチド		
135.	ADGN-100	X ₁ KWRSX ₂ X ₃ X ₄ RWRLWRX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ SR X ₁ は、任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、X ₂ 〜X ₈ は、任意のアミノ酸である
136.	ADGN-100 1	X ₁ KWRSX ₂ X ₃ X ₄ RWRLWRX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ SR X ₁ は、βAであるか、Sであるか、または存在せず、X ₂ は、AまたはVであり、X ₃ は、GまたはLであり、X ₄ は、WまたはYであり、X ₅ は、VまたはSであり、X ₆ は、R、VまたはAであり、X ₇ は、SまたはLであり、X ₈ は、WまたはYである
137.	ADGN-100a	KWRSAGWRWRLWRVRSWSR
138.	ADGN-100b	KWRSALYRWRLWRVRSWSR
139.	ADGN-100c	KWRSALYRWRLWRSRSWSR
140.	ADGN-100d	KWRSALYRWRLWRSALYSR
141.	ADGN-100 aa	KWRS ₈ AGWR ₅ WRLWRVRSWSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している

10

20

30

40

50

【表 10 - 10】

配列番号	説明	配列
142.	ADGN-100 ab	KWR _S SAGWRWR _S LWRVRSWSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
143.	ADGN-100 ac	KWRSAGWR _S WRLWRVR _S SWSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
144.	ADGN-100 ba	KWR _S _S ALYR _S WRLWRSR _S WSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
145.	ADGN-100 bb	KWR _S SALYRWR _S LWRSR _S WSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
146.	ADGN-100 bc	KWRSALYR _S WRLWRSR _S SWSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
147.	ADGN-100 bd	KWRSALYRWR _S LWR _S _S RSWSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
148.	ADGN-100 be	KWRSALYRWRLWRS _S RSWS _S R 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
149.	ADGN-100 ca	KWR _S SALYRWR _S LWRSALYSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
150.	ADGN-100 cb	KWR _S _S ALYR _S WRLWRSALYSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
151.	ADGN-100 cc	KWRSALYRWR _S LWR _S _S ALYSR 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
152.	ADGN-100 cd	KWRSALYRWRLWRS _S ALYS _S R 下付き文字「S」で印づけられた残基は、炭化水素連結によって連結している
153.	ADGN-100	beta-AKWR _S SAGWRWRLWRVRSWSR-NH ₂

10

20

30

40

50

【表 10 - 11】

配列番号	説明	配列
154.	ADGN-100a (ADGN-100)	ヘータ-AKWSAGWRWRLWRVRSWSR
155.	ADGN-100b	ヘータ-AKWSALYRWRLWRVRSWSR
156.	ADGN-100-RI	RSWSRVRLWRWVGASRWK
157.	ADGN-100-PEG7	Ac-(PEG)7- β A-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
158.	ADGN-100-PEG2	Ac-(PEG)2- β A-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
159.	ADGN-100 ステアリル	ステアリル- β A-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
160.	ADGN-100- Hydro-1	Ac-YIGSR-(G)4-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
161.	ADGN-100 hydro- 2	Ac-GYVS-(G)4-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
162.	ADGN-100- Hydro-3	Ac-YIGSR-Ava-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 Avalは、5-アミノペンタン酸である
163.	ADGN-100 hydro- 4	Ac-GYVS-Ava -KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 Avalは、5-アミノペンタン酸である
164.	ADGN-100- Hydro-5	Ac-YIGSR-Aun-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 Aunは、11-アミノウンデカン酸である
165.	ADGN-100 hydro- 6	Ac-GYVS-Aun -KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 Aunは、11-アミノウンデカン酸である
166.	ADGN-100-Hydro	Ac-YIGSR- β A-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
167.	ADGN-100 Hydro-7	Ac-YIGSR-Ahx-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
168.	ADGN-102 コアモチーフ	RWRLWRWSR
169.	ADGN-100 Hydro-8	Ac-GYVS-Ahx -KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
170.	ADGN-100- HYPEG	Ac-YIGSR-(PEG) n - β A-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2 $N = 2, 4$, または 7
171.		Ac-SYTSTM-ava-KWSALWRWRLWRVRSWSR-NH2
172.	ADGN-100 GALNAC	Ac-KWSA(GALNAC)LWRWRLWRVRSWSR-NH2
173.	ADGN-101	Ac-CARPARWSAGWRWRLWRVRSWSR-NH2
174.	ADGN-102	TGNYKALHPDHNGWSALRWRLWRWSR-NH2
175.		Ac-TGNYKALHPDHNG-ava-WRSALRWRLWRWSR-NH2

10

20

30

40

50

【表 10 - 12】

配列番号	説明	配列
VEPEP-4 ペプチド		
176.	VEPEP-4	XWXRLXXXXXX 1位のXは、ベータ-AまたはSである;3位、9位および10位のXは、互いに独立に、WまたはFである;6位のXは、8位のXがSの場合にはRであり、6位のXは、8位のXがRの場合にはSである;7位のXは、Lであるかまたは存在しない;11位のXは、Rであるかまたは存在せず、7位のXは、11位のXが存在しない場合にはLである
177.	VEPEP-4	X ₁ WWRLSLRWW X ₁ は、ベータ-AまたはSである
178.	VEPEP-4	X ₁ WFRLSLRFWR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
179.	VEPEP-4	X ₁ WWRLRSWFR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
180.	VEPEP-4	X ₁ WFRLSLRFW X ₁ は、ベータ-AまたはSである
VEPEP-5 ペプチド		
181.	VEPEP-5	RXWXRLWXRLR 2位のXは、RまたはSである;4位および8位のXは、互いに独立に、WまたはFである
182.	VEPEP-5	X ₁ WWRLWWRLR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
183.	VEPEP-5	X ₁ WFRLWFRLR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
184.	VEPEP-5	X ₁ WFRLWWRLR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
185.	VEPEP-5	X ₁ WWRLWFRLR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
186.	VEPEP-5	X ₁ RWWRLWWRL X ₁ は、ベータ-AまたはSである
187.	VEPEP-5	X ₁ RSWFRLWFR X ₁ は、ベータ-AまたはSである
他のペプチド		
188.	PEP-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
189.	PEP-2	KETWFETWFTEWSQPKKKRKV
190.	PEP-3	KWFETWFTEWPKKKRK
191.	MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV

10

20

30

40

50

【表 10 - 13】

配列番号	説明	配列
192.	CADY	GLWRALWRLRLSLWRLWLV
193.	pANT	RQIKIWFQNRRMKWKKC
194.	TAT-HA2	CRRRQRRKKRGGDIMGEWGNEIFGAIAGFLG
195.	LAH4	KKALLALALHHLAHLALHLALALKKAC
例示的な標的化配列		
196.	標的化配列	SYTSSTM
197.	標的化配列	CKTRRVP
198.	標的化配列	THRPPNWSPV
199.	標的化配列	TGNYKALHPDHNG
200.	標的化配列	CARPAR
201.	標的化配列	YIGSR
202.	標的化配列	GYVS
203.	標的化配列	ASSLNIA
204.	標的化配列	LSSRLDA
205.	標的化配列	KSYDTY
例示的なPAM配列		
206.	PAM 配列	AGG
207.	PAM 配列	TGG
208.	PAM 配列	TAG
209.	PAM 配列	GAG
210.	PAM 配列	GCC
211.	PAM 配列	ACG

10

20

30

40

50

【表 10 - 14】

配列番号	説明	配列
例示的なNLS配列		
212.	NLS 配列	PKKKRKV
213.	NLS 配列	KRPAATKKAGQAKKKK
214.	NLS 配列	PAAKRVKLD
215.	NLS 配列	RQRRNELKRSP
216.	NLS 配列	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY
217.	NLS 配列	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRN V
218.	NLS 配列	VSRKRPRP
219.	NLS 配列	PPKKARED
220.	NLS 配列	PQPKKKPL
221.	NLS 配列	SALIKKKKKMAP
222.	NLS 配列	DRLRR
223.	NLS 配列	PKQKKRK
224.	NLS 配列	RKLKKKIKKL
225.	NLS 配列	REKKKFLKRR
226.	NLS 配列	KRKGDEV DGVDEVAKKKS
227.	NLS 配列	RKCLQAGMNLEARKTKK
KRASの突然変異体形態を標的とする例示的なsiRNA		
228.	G12C突然変異を標的とするKRAS siRNA(センス)	5'-GUUGGAGCUUGUGGCGUAGTT-3'
229.	G12C突然変異を標的とするKRAS siRNA(アンチセンス)	5'-CUACGCCACCAGCUCCAATT-3'
230.	第VIII因子siRNA(センス)	5'-GATGAGGCTATTCATGATGATT-3'

10

20

30

40

50

【表 10 - 15】

配列番号	説明	配列
231.	Q61K突然変異を標的とする <i>KRAS</i> siRNA(センス)	5'-GAAGUGCAUACACCGAGACTT-3'
232.	Q61K突然変異を標的とする <i>KRAS</i> siRNA(アンチセンス)	5'-GUCUCGGUGUAGCACUUCTT-3'
233.	G12D突然変異を標的とする <i>KRAS</i> siRNA(センス)	5'-GUUGGAGCUGUUGGCGUAGTT-3'
234.	G12D突然変異を標的とする <i>KRAS</i> siRNA(アンチセンス)	5'-CUACGCCAACAGCUCCAACCTT-3'
235.	標的化部分	YVSK
236.	標的化部分	YIGS
237.	標的化部分	IGSR
238.	標的化部分	GYVSK
239.	標的化部分	GGGGS
240.	標的化部分	SGGGG
241.	gRNA35T1	TGGTAGTTGGAGCTGTTGGCGT
242.	gRNA35T4	AGCTGTTGGCGTAGGCAA
243.	gRNA35T5	TGTTGGCGTAGGCAAGAGT
244.	gRNA35T6	GTTGGAGCTGTTGGCGT
245.	gRNA35T7	TTGTGGTAGTTGGAGCTGT
246.	gRNA35T9	GCTGTTGGCGTAGGCAA
247.	gRNA35A2	GGTAGTTGGAGCTGATGGCG
248.	gRNA35A3	AGCTGATGGCGTAGGCAA
249.	gRNA35A4	TGATGGCGTAGGCAAGAGT
250.	gRNA35A6	GTTGGAGCTGATGGCGT

10

20

30

40

50

【表 10 - 16】

配列番号	説明	配列
251.	gRNA35A8	TTGTGGTAGTTGGAGCTGA
252.	gRNA35A9	GCTGATGGCGTAGGCAA
253.	gRNA34T2	AGCTTGTGGCGTAGGCAA
254.	gRNA34T3	GTTGGAGCTTGTGGCGT
255.	gRNA34T4	GGTAGTTGGAGCTTGTGGCG
256.	gRNA34T7	GCTTGTGGCGTAGGCAA
257.	gRNA34T8	CTTGTGGCGTAGGCAAGAGT
258.	ルシフェラーゼ標的部 位	ACAACCTTTACCGACCGCGCC
259.	ADGN-100-PEG2	AKWRSALWRWRLWRVRSWSR
260.	ADGN-100- HYPEG2	YIGSR-AKWRSALWRWRLWRVRSWSR
261.	ADGN-106- Hydro-3	YIGSRXALWRALWRLWRSLWRLWK
262.	ADGN-106- Hydro-5	YIGSR-Aun-ALWRALWRLWRSLWRLWK
263.	ADGN-106-PEG2	ALWRALWRLWRSLWRLWK
264.	ADGN-106- HYPEG2	YIGSR-ALWRALWRLWRSLWRLWK
265.	ADGN-106- Hydro-3:	YIGSRXALWRALWRLWRSLWRLWK
266.	ADGN-106- Hydro-5	YIGSR-Aun-ALWRALWRLWRSLWRLWK
267.	ADGN-100-PEG2	AKWRSALWRWRLWRVRSWSR
268.	ADGN-100-PEG7	AKWRSALWRWRLWRVRSWSR
269.	ADGN-100- HYPEG2	YIGSR-AKWRSALWRWRLWRVRSWSR
270.	VEPEP-6 (ADGN-106)	ALWRALWRLWRSLWRLWKA 肺
271.	gRNA34T10	TTGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTG

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

FIG. 1A

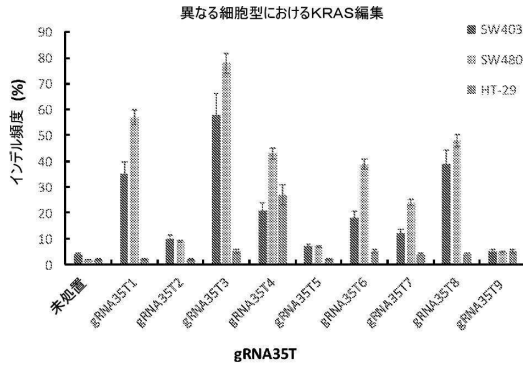
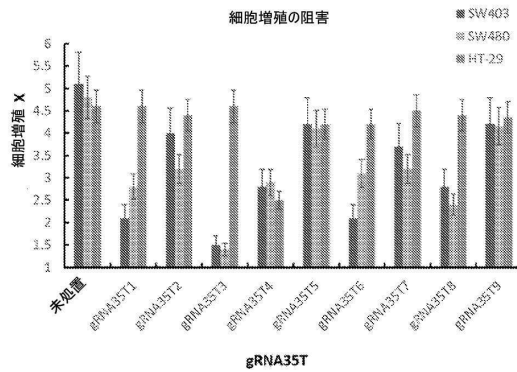


FIG. 1B



【図 2】

FIG. 2A

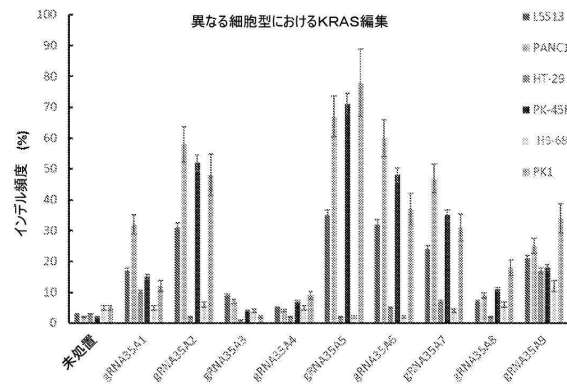
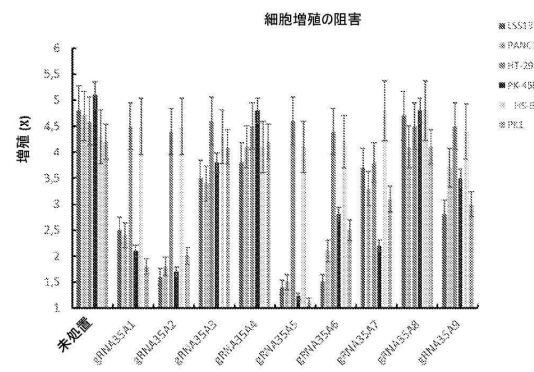


FIG. 2B



【図 3】

FIG. 3A

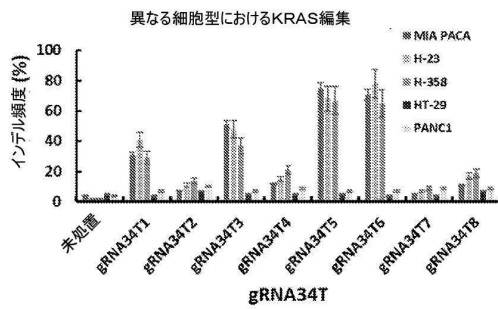
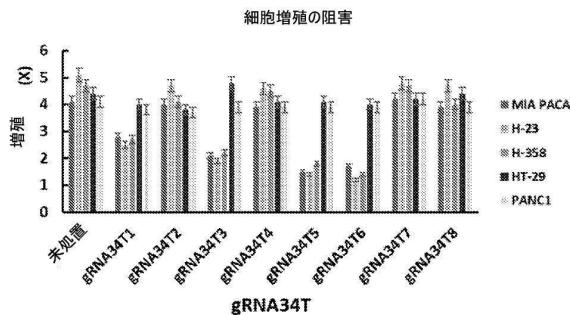


FIG. 3B



【図 4】

FIG. 4A

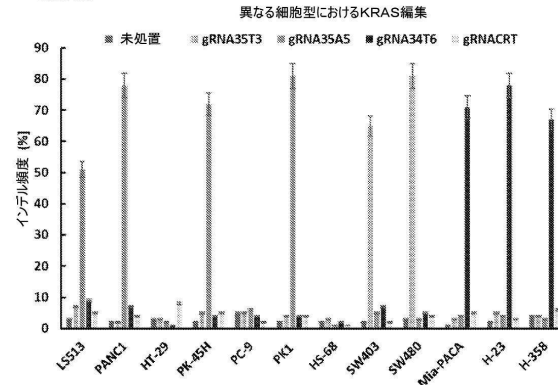
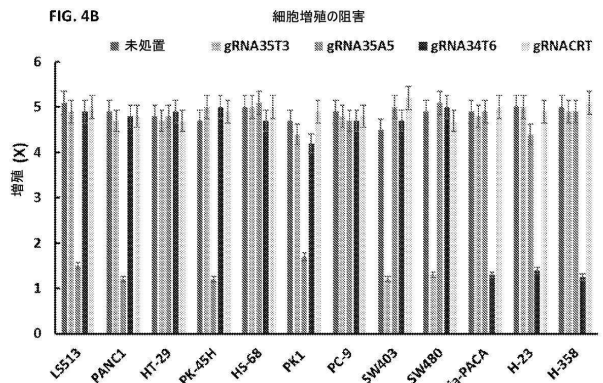


FIG. 4B



10

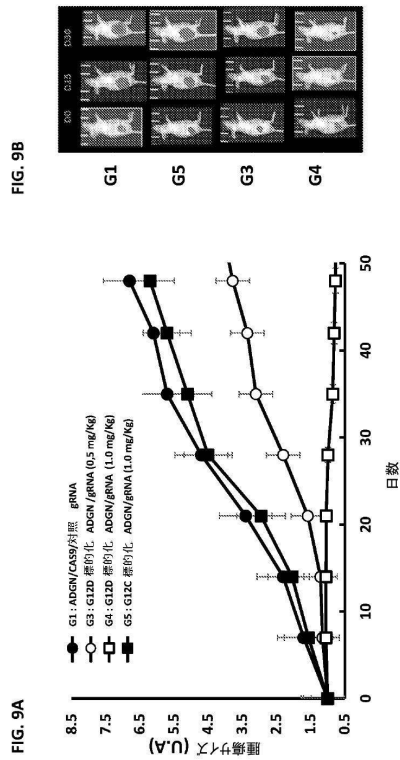
20

30

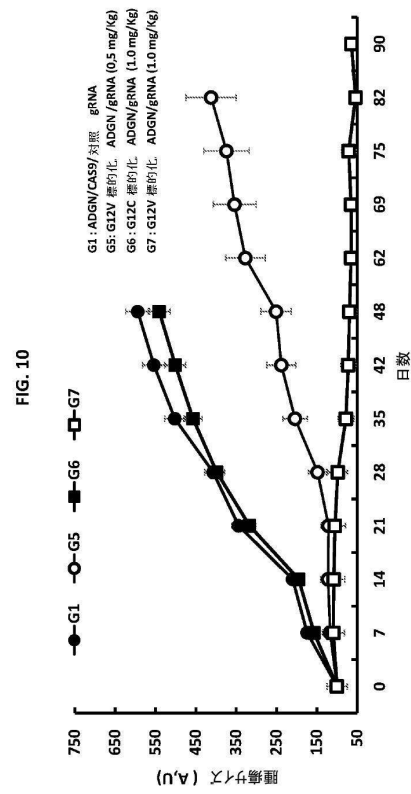
40

50

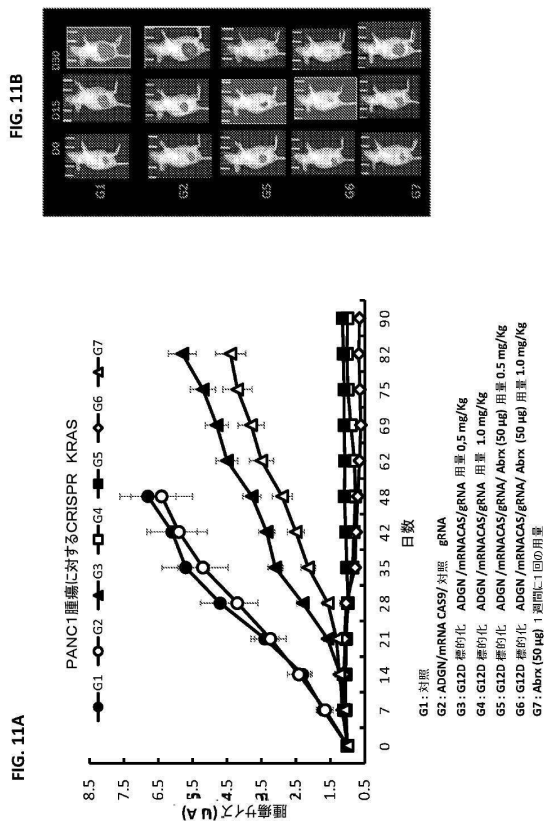
【図 9】



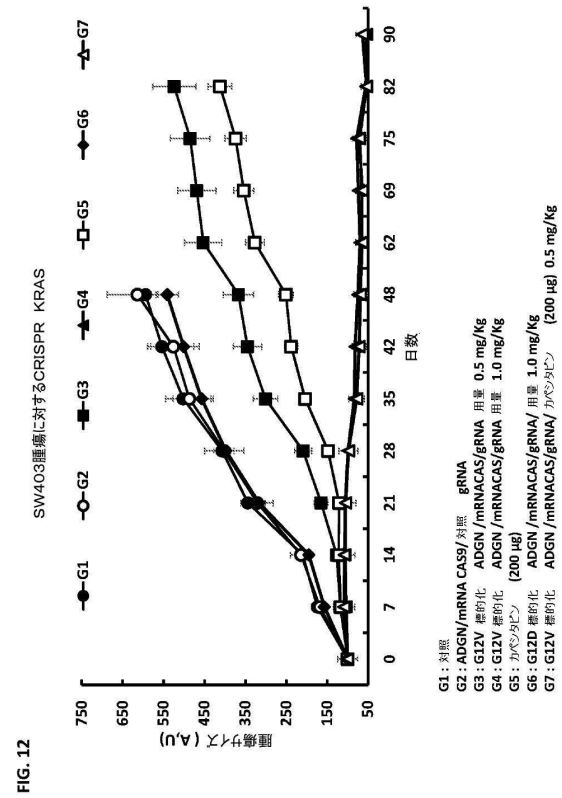
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

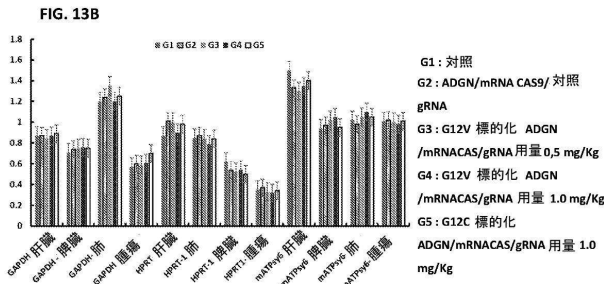
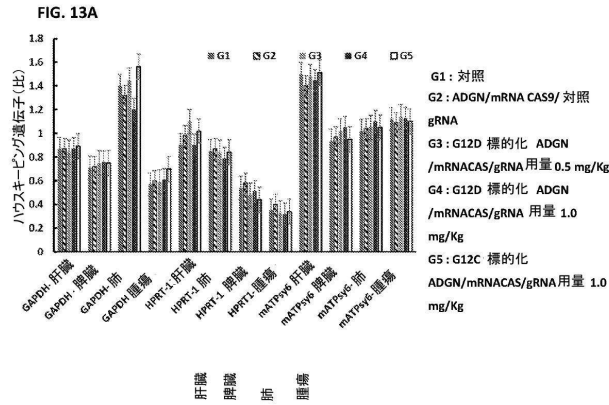
20

30

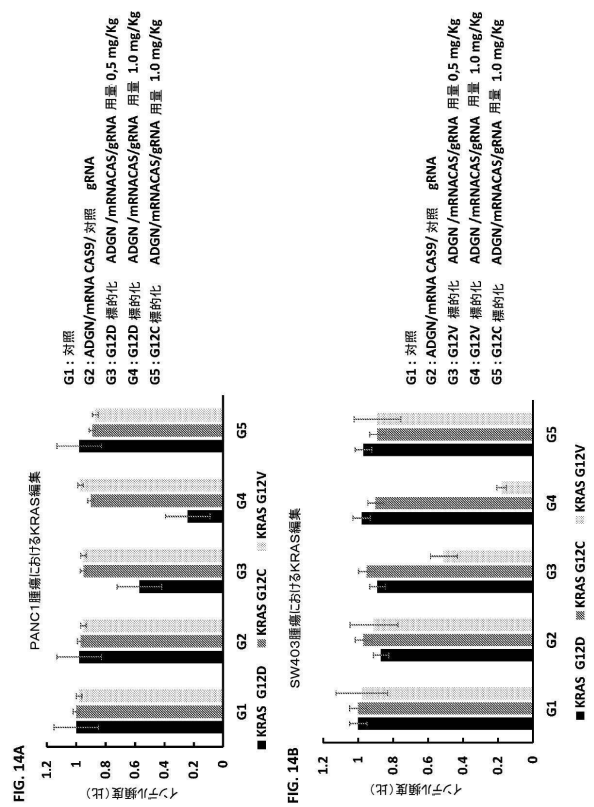
40

50

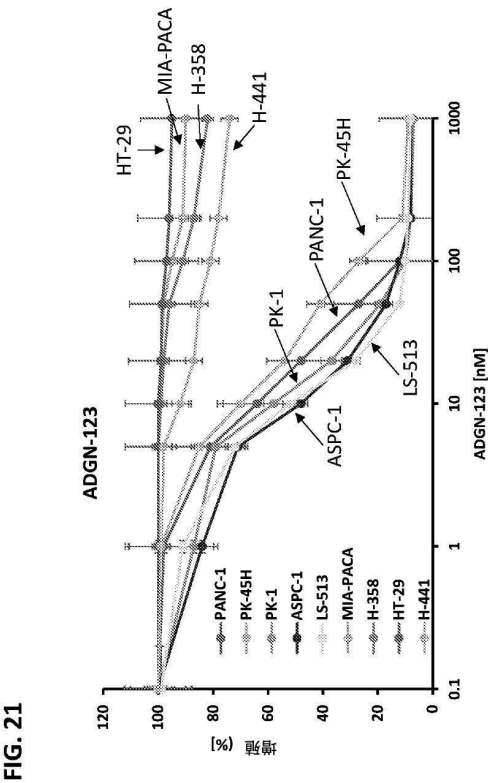
【図 13】



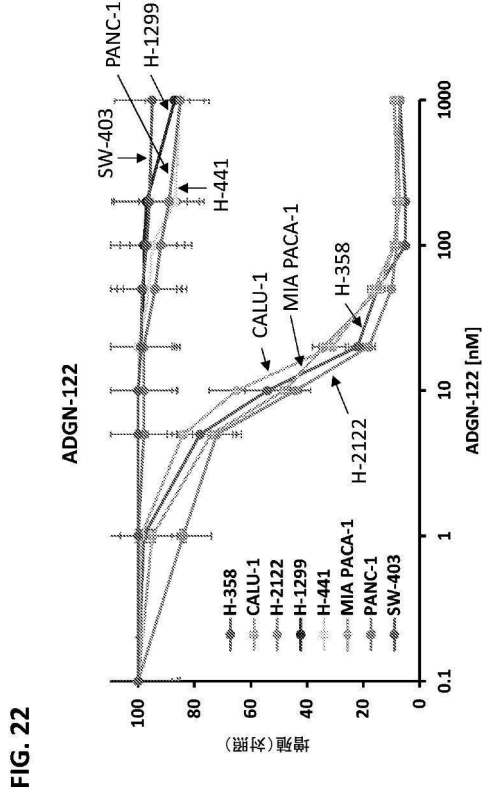
【図 14】



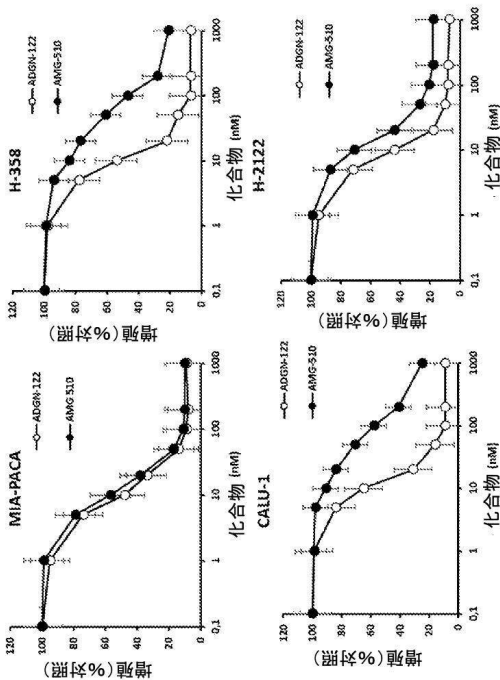
【図 2 1】



【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】

突然変異体KRAS遺伝子およびまたは突然変異体
p53遺伝子を有するがん細胞株

表示	細胞型	KRAS	P53
PDAAC 膵癌	PANC-1	G12D	R273H
	PK-45H	G12D	WT
	PK-1	G12D	M237I
CRC	MIA-PACA	G12C	R248W
	ASPC-1	G12D	C135A & 403del
	SW-480	G12V	R273H/P309S
結腸直腸癌	SW-403	G12V	Q51Ter
	LS-513	G12D	WT
	HT-29	WT	R273H
NSCLC 肺癌	NCI H-23	G12C	M246I
	NCI H-358	G12C	削除
	H-1299	WT	削除
	H-2122	G12C	Q16L/C176F
	H-2444	G12V	T236C
	H-441	G12V	R158L
	CALU-1	G12C	削除

10

20

30

40

50

【図 2 7】

FIG. 27
がん細胞株におけるADGN-122の
IC₅₀およびCC₅₀/パラメータ

細胞株	表示	KRAS	ADGN-122 IC ₅₀ (nM)	ADGN-122 CC ₅₀ (μM)
H-358	肺癌	G12C	12.8±5	9.4±0.7
CALU-1	肺癌	G12C	15.9±3	> 10
H-2122	肺癌	G12C	11.5±5	8.8±0.2
H-441	肺癌	G12V	--	> 10
H-1299	肺癌	WT	--	> 10
MIA-PACA	肺癌	G12C	11.8±2	7.4±0.5
PANC-1	肺癌	G12D	--	9.8±0.5
ASP-C-1	肺癌	G12D	--	>10
SW-480	結腸直腸癌	G12V	--	8.2±0.5
SW-403	結腸直腸癌	G12V	--	>10

【図 2 5】

FIG. 25
がん細胞株におけるADGN-121の
IC₅₀およびCC₅₀/パラメータ

細胞株	表示	KRAS	ADGN-121 IC ₅₀ (nM)	ADGN-121 CC ₅₀ (μM)
SW-480	結腸直腸癌	G12V	17.8±7	7.8±0.5
SW-403	結腸直腸癌	G12V	18.8±3	8.5±0.5
LS-513	結腸直腸癌	G12D	--	8.7±0.7
HT-29	結腸直腸癌	WT	--	7.1±0.6
PANC-1	肺癌	G12D	--	6.8±0.7
H-441	肺癌	G12V	15.6±5	> 10
H-2444	肺癌	G12V	43.5±8	> 10
H-358	肺癌	G12C	--	9.7±0.4
CALU-1	肺癌	G12C	--	>10
H-1299	肺癌	WT	--	8.5±0.5

【図 2 8】

FIG. 28
がん細胞株におけるADGN-122
およびAMG-510のIC₅₀/パラメータ

細胞株	表示	KRAS	ADGN-122 IC ₅₀ (nM)	AMG-510 IC ₅₀ (nM)
H-358	肺癌	G12C	12.8±5	7.3±2
CALU-1	肺癌	G12C	15.9±3	11.4±8
H-2122	肺癌	G12C	11.5±5	4.3±9
MIA-PACA	肺癌	G12C	11.8±2	1.2±4

【図 2 6】

FIG. 26
がん細胞株におけるADGN-123の
IC₅₀およびCC₅₀/パラメータ

細胞株	表示	KRAS	ADGN-123 IC ₅₀ (nM)	ADGN-123 CC ₅₀ (μM)
PANC-1	肺癌	G12D	22.8±2	7.7±0.5
PK-45H	肺癌	G12D	25.3±3	8.2±0.5
PK-1	肺癌	G12D	15.2±3	>10
ASP-C-1	肺癌	G12D	11.7±3	9.5±0.5
MIA-PACA	肺癌	G12C	--	7.4±0.5
HT-29	結腸直腸癌	WT	--	>10
LS-513	結腸直腸癌	G12D	9.8±2	>10
SW-480	結腸直腸癌	G12V	--	>10
SW-403	結腸直腸癌	G12V	--	9.8±0.5
H558	肺癌	G12C	--	8.8±0.5
H-441	肺癌	G12V	--	>10

【配列表】

2023516225000001.app

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和4年12月26日(2022.12.26)

【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】

配列番号1～37、241～257および271からなる群から選択される標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定CRISPR RNA (crRNA) を含む突然変異したKRASを標的とするためのガイドRNAを含む、天然に存在しないポリヌクレオチド。 10

【請求項2】

前記ガイドRNAが、補助的トランス活性化crRNA (tracrRNA) をさらに含む、請求項1に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項3】

標的配列と実質的に相補的な前記ヌクレオチド配列が、配列番号1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および34からなる群から選択される、請求項1または請求項2に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。 20

【請求項4】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号3、19、および34からなる群から選択される標的配列と100%相補的である、請求項3に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項5】

化学的に改変されている、請求項1から4までのいずれか一項に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項6】

前記ガイドRNAが、約200ヌクレオチド以下の長さを有する、請求項1から5までのいずれか一項に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

【請求項7】

a) 第1の細胞透過性ペプチド、およびb) 突然変異したKRASを標的とするガイドRNAを含むゲノム編集複合体であって、前記ガイドRNAが、請求項1から6までのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、ゲノム編集複合体。 30

【請求項8】

DNAヌクレアーゼまたは前記DNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項7に記載のゲノム編集複合体。

【請求項9】

前記DNAヌクレアーゼが、CRISPR関連タンパク質(Cas)ポリペプチド、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その断片、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項8に記載のゲノム編集複合体。 40

【請求項10】

前記DNAヌクレアーゼが、Casポリペプチドを含む、請求項9に記載のゲノム編集複合体。

【請求項11】

前記Casポリペプチドが、Cas9である、請求項9または請求項10に記載のゲノム編集複合体。

【請求項12】

前記第1の細胞透過性ペプチドが、CADDY、PEP-1ペプチド、PEP-2ペプチド、PEP-3ペプチド、VEPEP-3ペプチド、VEPEP-6ペプチド、VEPE 50

P-9 ペプチド、および A D G N-100 ペプチドからなる群から選択される、請求項 7 から 11 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 13】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した 1 つまたは複数の部分をさらに含み、前記 1 つまたは複数の部分が、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖、リンカー部分、および標的化部分からなる群から選択される、請求項 7 から 12 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 14】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結したアセチル基を含む、請求項 13 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 15】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む、請求項 13 または請求項 14 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 16】

前記標的化ペプチドが、配列番号 196～205 および 235～240 からなる群から選択される、請求項 15 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 17】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、ポリグリシンリンカー部分、PEG 部分、Aun、Ava、および Ahx からなる群から選択されるリンカー部分を含む、請求項 7 から 16 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 18】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、N 末端から、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結した、アセチル基、標的化部分およびリンカー部分を含む、請求項 13 から 17 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 19】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、炭水化物部分をさらに含む、請求項 7 から 18 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 20】

前記炭水化物部分が、GalNAc である、請求項 19 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 21】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、レトロインベルソペプチドである、請求項 7 から 20 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 22】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、配列番号 89～107、111～117、および 153～175 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 から 21 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 23】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記ガイド RNA に対するモル比が、約 1:1 から約 80:1 の間である、請求項 1 から 22 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 24】

前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 DNA ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列に対するモル比が、約 1:1 から約 80:1 の間である、請求項 8 から 23 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 25】

異なるガイド配列を含む 1 つまたは複数の追加的なガイド RNA をさらに含む、請求項 7 から 24 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 26】

2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、ある単一の KR

10

20

30

40

50

A S 突然変異を標的とする、請求項 25 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 27】

前記 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、2 つまたはそれよりも多くの異なる K R A S 突然変異を標的とする、請求項 26 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 28】

前記 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、G 1 2 D、G 1 2 V、および／または G 1 2 C を標的とする、請求項 26 または 27 に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 29】

前記ゲノム編集複合体の平均直径が、約 10 nm から約 300 nm の間である、請求項 1 から 28 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

【請求項 30】

請求項 1 から 29 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子。

【請求項 31】

請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載のガイド RNA、請求項 7 から 29 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体、または請求項 30 に記載のナノ粒子、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 32】

2 つまたはそれよりも多くのナノ粒子を含み、前記 2 つまたはそれよりも多くのナノ粒子が、異なる K R A S 突然変異を標的とする、異なるガイド RNA を含む、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

請求項 7 から 29 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を調製する方法であって、前記第 1 の細胞透過性ペプチドを前記ガイド RNA と組み合わせ、それにより、前記ゲノム編集複合体を形成するステップを含む方法。

【請求項 34】

細胞における突然変異した K R A S を改変する方法における使用のための組成物であって、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載のガイド RNA、請求項 7 から 29 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体、または請求項 30 に記載のナノ粒子を含み、前記方法が、前記細胞に前記ガイド RNA、前記ゲノム編集複合体、または前記ナノ粒子を接触させるステップを含む、組成物。

【請求項 35】

個体におけるがんを処置するための、請求項 31 または 32 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記医薬組成物が、第 2 の薬剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 35 に記載の医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

本開示は、別の態様では、個体におけるがんを処置する方法であって、個体に上記の医薬組成物のうちのいずれか 1 つを有効量で投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、第 2 の薬剤を投与するステップをさらに含む。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

配列番号 1 ～ 37、241 ～ 257 および 271 からなる群から選択される標的配列と

10

20

30

40

50

実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む特異性決定 C R I S P R R N A (c r R N A) を含む突然変異した K R A S を標的とするためのガイド R N A を含む、天然に存在しないポリヌクレオチド。

(項目 2)

前記ガイド R N A が、補助的トランス活性化 c r R N A (t r a c r R N A) をさらに含む、項目 1 に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

(項目 3)

標的配列と実質的に相補的な前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1、3、6、8、15、16、19～21、23、29、31、33、および 34 からなる群から選択される、項目 1 または項目 2 に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

(項目 4)

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 3、19、および 34 からなる群から選択される標的配列と 100% 相補的である、項目 3 に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

(項目 5)

化学的に改変されている、項目 1 から 4 までのいずれか一項に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

(項目 6)

前記ガイド R N A が、約 200 ヌクレオチド以下の長さを有する、項目 1 から 5 までのいずれか一項に記載の天然に存在しないポリヌクレオチド。

(項目 7)

a) 第 1 の細胞透過性ペプチド、および b) 突然変異した K R A S を標的とするガイド R N A を含むゲノム編集複合体であって、前記ガイド R N A が、項目 1 から 6 までのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、ゲノム編集複合体。

(項目 8)

D N A ヌクレアーゼまたは前記 D N A ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、項目 7 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 9)

前記 D N A ヌクレアーゼが、C R I S P R 関連タンパク質 (C a s) ポリペプチド、ジंकフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、メガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その断片、およびそれらの組合せからなる群から選択される、項目 8 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 10)

前記 D N A ヌクレアーゼが、C a s ポリペプチドを含む、項目 9 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 11)

前記 C a s ポリペプチドが、C a s 9 である、項目 9 または項目 10 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 12)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、C A D Y、P E P - 1 ペプチド、P E P - 2 ペプチド、P E P - 3 ペプチド、V E P E P - 3 ペプチド、V E P E P - 6 ペプチド、V E P E P - 9 ペプチド、および A D G N - 100 ペプチドからなる群から選択される、項目 7 から 11 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 13)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの N 末端に共有結合により連結した 1 つまたは複数の部分をさらに含み、前記 1 つまたは複数の部分が、アセチル、脂肪酸、コレステロール、ポリエチレングリコール、核局在化シグナル、核外移行シグナル、抗体、多糖、リンカー部分、および標的化部分からなる群から選択される、項目 7 から 12 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 14)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有

10

20

30

40

50

結合により連結したアセチル基を含む、項目 13 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 15)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結した標的化ペプチドを含む標的化部分を含む、項目 13 または項目 14 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 16)

前記標的化ペプチドが、配列番号 196 ~ 205 および 235 ~ 240 からなる群から選択される、項目 15 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 17)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、ポリグリシンリンカー部分、PEG 部分、Aun、Ava、および Ahx からなる群から選択されるリンカー部分を含む、項目 7 から 16 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 18)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、N 末端から、前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 N 末端に共有結合により連結した、アセチル基、標的化部分およびリンカー部分を含む、項目 13 から 17 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 19)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、炭水化物部分をさらに含む、項目 7 から 18 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 20)

前記炭水化物部分が、GalNAc である、項目 19 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 21)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、レトロインベルソペプチドである、項目 7 から 20 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 22)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドが、配列番号 89 ~ 107、111 ~ 117、および 153 ~ 175 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 7 から 21 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 23)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記ガイド RNA に対するモル比が、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間である、項目 1 から 22 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 24)

前記第 1 の細胞透過性ペプチドの前記 DNA ヌクレアーゼをコードする前記ヌクレオチド配列に対するモル比が、約 1 : 1 から約 80 : 1 の間である、項目 8 から 23 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 25)

異なるガイド配列を含む 1 つまたは複数の追加的なガイド RNA をさらに含む、項目 7 から 24 までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目 26)

2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、ある単一の KRAS 突然変異を標的とする、項目 25 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 27)

前記 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、2 つまたはそれよりも多くの異なる KRAS 突然変異を標的とする、項目 26 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 28)

前記 2 つまたはそれよりも多くのガイド RNA のうちの少なくとも 2 つが、G12D、G12V、および / または G12C を標的とする、項目 26 または 27 に記載のゲノム編集複合体。

(項目 29)

10

20

30

40

50

前記ゲノム編集複合体の平均直径が、約10nmから約300nmの間である、項目1から28までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体。

(項目30)

項目1から29までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を含むコアを含むナノ粒子。

(項目31)

項目1から6までのいずれか一項に記載のガイドRNA、項目7から29までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体、または項目30に記載のナノ粒子、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

(項目32)

2つまたはそれよりも多くのナノ粒子を含み、前記2つまたはそれよりも多くのナノ粒子が、異なるKRAS突然変異を標的とする、異なるガイドRNAを含む、項目31に記載の医薬組成物。

(項目33)

項目7から29までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体を調製する方法であって、前記第1の細胞透過性ペプチドを前記ガイドRNAと組み合わせ、それにより、前記ゲノム編集複合体を形成するステップを含む方法。

(項目34)

細胞における突然変異したKRASを改変する方法であって、前記細胞に項目1から6までのいずれか一項に記載のガイドRNA、項目7から29までのいずれか一項に記載のゲノム編集複合体、または項目30に記載のナノ粒子を接触させるステップを含む方法。

(項目35)

個体におけるがんを処置する方法であって、個体に項目31または32に記載の医薬組成物を有効量で投与するステップを含む方法。

(項目36)

第2の薬剤を投与するステップをさらに含む、項目35に記載の方法。

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/028995
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/11 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01) A61K 47/62 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/90 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenomeQuest and REGISTRY search for SEQ ID NO: 1-5, 15-19 and 30-34. PATENW, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS: KRAS, G12V, G12D, G12C, CRISPR, gRNA, crRNA, tracrRNA and like terms; IPC/CPC: searched within C12N2310/20; ESPACENET, GOOGLE SCHOLAR, INTERNAL DATABASES PROVIDED BY IP AUSTRALIA: Applicant and Inventor names.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 July 2021		Date of mailing of the international search report 21 July 2021
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Cara Mortimer AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832661

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2021/028995
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0255094 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 22 August 2019 Title, abstract, paragraphs [0016]-[0018], [0036]-[0037], figures 1A, 2A, 2B, 2D, SEQ ID NOs: 6 (35T9P17), 43 (35T3P20), 45 (35T3M17), 8 (35T3M17), 7 (35T3M20), 51 (35A3P20), 53 (35A8P20), 16 (35A3M17), 15 (35A3M20), 12 (35A8P17), 26 (34T9P17), 28 (34T10P17), 67 (34T9P20), 65 (34T4P20) and 69 (34T10P20). Cited sequences share between 90-100% sequence identity (over query) with SEQ ID NOs: 1-5, 15-19 or 30-34 of the instant application.	1-6, 31, 34-36
Y	Sequences cited above.	7-30, 32-33
X	WO 2018/009525 A1 (THE JOHNSON HOPKINS UNIVERSITY) 11 January 2018 Title, abstract, pages 3, 7 and 23, table on page 82, SEQ ID NOs: 2, 3, 19. Cited sequences share between 90-100% sequence identity (over query) with SEQ ID NOs: 1-5, 15-19 or 30-34 of the instant application.	1-6, 31, 34-36
Y	Sequences cited above.	7-30, 32-33
X	KR 101796036 B1 (MOOGENE MEDI CO LTD) 10 November 2017 Title, abstract, figure 8, SEQ ID NOs: 106, 108, 116 and 117. Cited sequences share between 95%-100 sequence identity (over query) with SEQ ID NOs: 1-5, 15-19 or 30-34 of the instant application.	1-4, 6, 31, 34-36
Y	Sequences cited above.	5, 7-30, 32-33
X	WO 2016/049024 A2 (THE BROAD INSTITUTE ET AL.) 31 March 2016 Title, abstract, paragraphs [0009] [0093], [0130], [0125], figure 2, SEQ ID NOs: 33, 68, 79, 94, 97-99. Cited sequences share between 89-95% sequence identity (over query) with SEQ ID NOs: 1-5, 15-19 or 30-34 of the instant application.	1-3, 5-6, 31, 34-36.
Y	Sequences cited above.	7-30, 32-33
X	Lentsch, E, et al. "CRISPR/Cas9-mediated knock-out of krasG12D mutated pancreatic cancer cell lines." <i>International journal of molecular sciences</i> 20 (2019): pages 5706. Title, abstract, section 4.2; sequences labelled Hs_KRASm_sg1-forward + reverse, and Hs_KRASm_sg2-forward + reverse. Cited sequences share between 89-100% sequence identity (over query) with SEQ ID NOs: 1-3, 15-16, 19, 31 or 33-34 of the instant application.	1-4, 6
Y	Sequences cited above.	5, 7-36
X	Lee, W, et al. "Selective targeting of KRAS oncogenic alleles by CRISPR/Cas9 inhibits proliferation of cancer cells." <i>Scientific reports</i> 8 (2018): pages 1-7. Title, abstract, figures 1-2, section 'lentiviral and plasmid construction' sequences labelled sgKRAS-G12V and sgKRAS-G12D. Cited sequences share between 93-100% sequence identity (over query) with SEQ ID NOs: 2-3, 15-19 or 32-34 of the instant application.	1-4, 6
Y	Sequences cited above.	5, 7-36
Y	WO 2017/205846 A1 (AADIGEN, LLC) 30 November 2017 Title, abstract, example 1, example 25, claims 14-16, paragraphs [0013], [0024]-[0025], [0096], [0194], [0252], [0328], [0422]-[0438], [0460], [0574]-[0575].	7-36
P,X	Divita, G, et al. "CRISPR mediated KRAS mutant gene editing in pancreatic and colorectal cancer therapy" Abstract 1826: Proceedings: AACR Annual Meeting 2020. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2020-1826 Published August 2020 Entire document	1-36
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/028995

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/028995

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

10

20

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

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

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-36 (parts relating to SEQ ID NOs: 1-5, 15-19 and 30-34)

30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2021/028995
Supplemental Box	
Continuation of: Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups: Group 1: Claims 1-36 (in part) relate to guide RNA for targeting mutated KRAS comprising a nucleotide sequence substantially complementary to a target sequence selected from SEQ ID NOs: 1-37, 241-257 and 271, wherein each guide RNA represents a separate invention. PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention. In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is the use of guide RNA for targeting mutated KRAS. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in: US 2019/0255094 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 22 August 2019 Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>. In the absence of the payment of any additional search fees, the ISA has agreed to search 15 inventions. It was noted that the guide RNAs corresponding to SEQ ID NOs 1-37, 241-257 and 271 target three different KRAS mutations. Five sequences for each mutation were searched, these comprise SEQ ID NOs: 1-5, 15-19 and 30-34.	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/US2021/028995	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2019/0255094 A1	22 August 2019	US 2019255094 A1	22 Aug 2019
		KR 20180041606 A	24 Apr 2018
		KR 101997116 B1	05 Jul 2019
		WO 2018070850 A1	19 Apr 2018
WO 2018/009525 A1	11 January 2018	WO 2018009525 A1	11 Jan 2018
		AU 2017292772 A1	21 Feb 2019
		BR 112019000107 A2	09 Apr 2019
		CA 3029908 A1	11 Jan 2018
		CL 2019000023 A1	21 Jun 2019
		CN 109963598 A	02 Jul 2019
		EA 201990214 A1	29 Nov 2019
		EP 3481431 A1	15 May 2019
		JP 2019520394 A	18 Jul 2019
		KR 20190039115 A	10 Apr 2019
		MX 2019000188 A	20 Jun 2019
		SG 11201900028V A	30 Jan 2019
		US 2020069818 A1	05 Mar 2020
KR 101796036 B1	10 November 2017	KR 101796036 B1	10 Nov 2017
		CN 110325176 A	11 Oct 2019
		WO 2018124538 A1	05 Jul 2018
WO 2016/049024 A2	31 March 2016	WO 2016049024 A2	31 Mar 2016
		US 2018010134 A1	11 Jan 2018
WO 2017/205846 A1	30 November 2017	WO 2017205846 A1	30 Nov 2017
		AU 2017268842 A1	13 Dec 2018
		CA 3025523 A1	30 Nov 2017
		CN 109689677 A	26 Apr 2019
		EP 3464323 A1	10 Apr 2019
		JP 2019521659 A	08 Aug 2019
		MX 2018014599 A	28 Feb 2019
		US 2019211317 A1	11 Jul 2019
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2021/028995
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.		
Patent Document/s Cited in Search Report Publication Number Publication Date		Patent Family Member/s Publication Number Publication Date
End of Annex		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)		

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/69	(2017.01)	A 6 1 K	47/69	
A 6 1 K	9/51	(2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	38/46	(2006.01)	A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 デサイ, ニール ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2 7 2, パシフィック パリセーズ, ルナ ビスタ ドライ
ブ 1 3 4 3

(72)発明者 ディビタ, ジル

フランス国 3 4 7 2 5 サン タンドレ ド サンゴニ, リュ スー レ ゼール 2 6 ビス

F ターム (参考)

4C076 AA65 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59
4C084 AA02 AA13 AA19 BA35 DC22 MA02 NA05 NA13 NA14 ZB26
ZC75
4C086 AA01 AA02 EA16 MA04 MA38 NA13 NA14 ZB26 ZC75