

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和1年5月16日(2019.5.16)

【公表番号】特表2018-512891(P2018-512891A)

【公表日】平成30年5月24日(2018.5.24)

【年通号数】公開・登録公報2018-019

【出願番号】特願2018-503698(P2018-503698)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/11	(2006.01)
C 0 7 K	14/195	(2006.01)
C 0 7 K	14/21	(2006.01)
C 0 7 K	14/47	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/10	Z N A
C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/11	
C 0 7 K	14/195	
C 0 7 K	14/21	
C 0 7 K	14/47	
C 1 2 N	15/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成31年4月5日(2019.4.5)

【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】

標的真核細胞のサイトゾルへの独立ポリペプチドカーゴの形質導入効率を増大させるための、細胞透過性ドメイン(CPD)と作動可能に連結されたエンドソーム漏出ドメイン(ELD)、又はヒスチジンリッチドメイン及びCPDと作動可能に連結されたELDを含むポリペプチドベースのシャトル剤を含む組成物であって、

標的真核細胞のサイトゾルへの独立ポリペプチドカーゴの形質導入効率を増大させるのに十分な濃度でポリペプチドベースのシャトル剤を含む、組成物。

【請求項2】

前記ポリペプチドベースのシャトル剤が、

(a)20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸残基の最小の長さ及び35、40、45、50、55、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145又は150アミノ酸残基の最大の長さを含む、

(b)生理学的pHで、少なくとも+6、+7、+8、+9、+10、+11、+12、+13、+14又は+15の予測される正味電荷を有する、

(c)水溶液に可溶性である、又は

(d)(a)～(c)のいずれかの組合せである、

請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

(a)前記ELDが、エンドソーム溶解性ペプチド、抗菌性ペプチド(AMP)、直鎖状カチオン性ヘリックス抗菌性ペプチド、セクロピン-A/メリチンハイブリッド(CMシリーズ)ペプチド、pH依存性膜活性ペプチド(PAMP)、ペプチド両親媒性物質、インフルエンザ血球凝集素(HA)のHA2サブユニットのN末端に由来するペプチド、CM18、ジフテリア毒素Tドメイン(DT)、GALA、PEA、INF-7、LAH4、HGP、H5WYG、HA2、EB1、VSVG、シードモナス毒素、メリチン、KALA、JST-1、C(LLKK)₃C、G(LLKK)₃G又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれに由来する。

(b)前記CPDが、細胞透過性ペプチド又は細胞透過性ペプチド由来のタンパク質形質導入ドメイン、TAT、PTD4、ペネトラチン(アンテナペディア)、pVEC、M918、Pep-1、Pep-2、キセントリー(Xentry)、アルギニンストレッチ、トランスポータン、SynB1、SynB3又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれに由来する。

(c)前記ヒスチジンリッチドメインが、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%若しくは少なくとも90%のヒスチジン残基を含む、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5又は少なくとも6個のアミノ酸のストレッチである、及び/又は少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8若しくは少なくとも9個の連続するヒスチジン残基を含む、或いは

(d)(a)～(c)の任意の組合せである。

請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

前記ポリペプチドベースのシャトル剤が、

(a)配列番号1～15、63若しくは64のいずれか1つのアミノ酸配列を含むELD又はエンドソーム溶解性活性を有するその変異体若しくは断片、

(b)配列番号16～27若しくは65のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCPD又は細胞透過性活性を有するその変異体若しくは断片、

(c)少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5若しくは少なくとも6個の連続するヒスチジン残基を有するヒスチジンリッチドメイン、又は

(d)(a)～(c)の任意の組合せ

を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

前記ドメインが、1つ又は複数のリンクードメインと作動可能に連結している、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記ポリペプチドベースのシャトル剤が、少なくとも2つの異なる種類のCPD及び/又はELDを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

前記ポリペプチドベースのシャトル剤が、

(a)配列番号1、14若しくは63のアミノ酸配列を有するCM18、KALA若しくはC(LLKK)₃Cである、又は配列番号1、14若しくは63に対して少なくとも85%、90%若しくは95%の同一性を有し、エンドソーム溶解性活性を有するその変異体であるELD、

(b)配列番号17若しくは65のアミノ酸配列を有するTAT若しくはPTD4である、又は配列番号17若しくは65に対して少なくとも85%、90%若しくは95%の同一性を有し、細胞透過性活性を有するその変異体、或いは配列番号18のアミノ酸配列を有するペネトラチン、又は配列番号18に対して少なくとも85%、90%若しくは95%の同一性を有し、細胞透過性活性を有するその変異体であるCPD、

(c)少なくとも6個の連続するヒスチジン残基を含むヒスチジンリッチドメイン、又は

(d)(a)～(c)の任意の組合せ

を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記ポリペプチドベースのシャトル剤が、配列番号57～59、66～72若しくは82～102のいずれか1つのアミノ酸配列又は配列番号57～59、66～72若しくは82～102のいずれか1つに対して少なくとも85%、90%若しくは95%の同一性を有するその機能的変異体を含む若しくはからなる、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記ポリペプチドベースのシャトル剤が、非毒性であり、及び/又は代謝可能である、請求項1から8のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

標的真核細胞のサイトゾルへの独立ポリペプチドカーゴの形質導入効率を増大させるための、

(a)請求項1から9のいずれか一項に規定されたポリペプチドベースのシャトル剤並びにヒスチジンリッチドメイン及びCPDを含むさらなる独立合成ペプチド、並びに/又は

(b)請求項1から9のいずれか一項に規定された少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4若しくは少なくとも5種の異なる種類のポリペプチドベースのシャトル剤のカクテルを含む組成物であって、

標的真核細胞のサイトゾルへの独立ポリペプチドカーゴの形質導入効率を増大させるのに十分な濃度のポリペプチドベースのシャトル剤を含む、組成物。

【請求項11】

ポリペプチドカーゴの標的真核細胞のサイトゾルへの形質導入効率を増大させるためのキットであって、

請求項1から9のいずれか一項に規定されたポリペプチドベースのシャトル剤又は請求項10に規定された組成物及び適した容器を含み、

標的真核細胞のサイトゾルへの独立ポリペプチドカーゴの形質導入効率を増大させるのに十分な濃度でポリペプチドベースのシャトル剤を含む、キット。

【請求項12】

血清の存在下で、ポリペプチドカーゴの標的真核細胞のサイトゾルへの形質導入効率を増大させるための、請求項1から10のいずれか一項に記載の組成物、又は、請求項11に記載のキット。

【請求項13】

前記ポリペプチドカーゴが、

(a)請求項3(b)若しくは4(b)に規定されたCPD若しくはCPDを含む又は欠く、

(b)組換えタンパク質である、

(c)細胞内ターゲッティングドメインを含む、

(d)DNA及び/若しくはRNA分子と複合体形成される、又は

(e)(a)～(d)の任意の組合せである、

請求項1から10及び12のいずれか一項に記載の組成物、又は、請求項11もしくは12に記載のキット。

【請求項14】

前記細胞内ターゲッティングドメインが、

(a)核局在シグナル(NLS)、

(b)核小体シグナル配列、

(c)ミトコンドリアシグナル配列、又は

(d)ペルオキシソームシグナル配列

である、請求項13に記載の組成物、又は、キット。

【請求項15】

(a)前記NLSが、E1a、T-Ag、c-myc、T-Ag、op-T-NLS、Vp3、ヌクレオプラスミン、ヒストン2B、アフリカツメガエル(*Xenopus*)N1、PARP、PDX-1、QKI-5、HCDA、H2B、v-Rel、アミダ(Amida)、RanBP3、Pho4p、LEF-1、TCF-1、BDV-P、TR2、SOX9若しくはMaxに由来する、

(b)前記核小体シグナル配列が、BIRC5若しくはRECQL4に由来する、

(c) 前記ミトコンドリアシグナル配列が、Tim9若しくは酵母チトクロームCオキシダーゼサブユニットIVに由来する、又は

(d) 前記ペルオキソソームシグナル配列が、PTS1に由来する、
請求項14に記載の組成物、又は、キット。

【請求項16】

前記ポリペプチドカーゴが、転写因子、ヌクレアーゼ、サイトカイン、ホルモン、増殖因子又は抗体である、請求項1から10及び12から15のいずれか一項に記載の組成物、又は、請求項11から15のいずれか一項に記載のキット。

【請求項17】

(a) 前記転写因子が、HOXB4、NUP98-HOXA9、Oct3/4、Sox2、Sox9、Klf4、c-Myc、MyoD、Pdx1、Ngn3、MafA、Blimp-1、Eomes、T-bet、FOXO3A、NF-YA、SALL4、ISL1、FoxA1、Nanog、Esrrb、Lin28、HIF1- α 、Hif、Runx1t1、Pbx1、Lmo2、Zfp37、Prdm5、Bcl-6若しくはそれらのいずれかの組合せであり、及び/又は

(b) 前記ヌクレアーゼが、RNAによってガイドされるエンドヌクレアーゼ、CRISPRエンドヌクレアーゼ、I型CRISPRエンドヌクレアーゼ、II型CRISPRエンドヌクレアーゼ、III型CRISPRエンドヌクレアーゼ、IV型CRISPRエンドヌクレアーゼ、V型CRISPRエンドヌクレアーゼ、VI型CRISPRエンドヌクレアーゼ、CRISPR関連タンパク質9(Cas9)、Cpf1、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)、ホーミングエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ又はそれらの任意の組合せである、
請求項16に記載の組成物、又は、キット。

【請求項18】

細胞治療、ゲノム編集、養子細胞移入、及び/又は再生医学において使用するためのものである、請求項1から10及び12から17のいずれか一項に記載の組成物、又は、請求項11から17のいずれか一項に記載のキット。

【請求項19】

前記標的真核細胞が、幹細胞、初代細胞、免疫細胞、T細胞又は樹状細胞である、請求項1から10及び12から18のいずれか一項に記載の組成物、又は、請求項11から18のいずれか一項に記載のキット。

【請求項20】

請求項1から9のいずれか一項に規定されたポリペプチドベースのシャトル剤又は請求項10に記載の組成物を含む真核細胞。

【請求項21】

前記ポリペプチドベースのシャトル剤によって細胞内に送達された独立ポリペプチドカーゴを更に含む、請求項20に記載の真核細胞。

【請求項22】

細胞外間隙から標的真核細胞のサイトゾルへの独立ポリペプチドカーゴの形質導入効率を増大させるためのin vitro方法であって、前記標的真核細胞を、標的真核細胞のサイトゾルへの独立ポリペプチドカーゴの形質導入効率を増大させるのに十分な濃度の、請求項1から9のいずれか一項に規定されたポリペプチドベースのシャトル剤又は請求項10に記載の組成物、及び前記ポリペプチドベースのシャトル剤によって細胞内に送達されるべき独立ポリペプチドカーゴと接触させるステップを含むin vitro方法。

【請求項23】

前記独立ポリペプチドカーゴが、請求項13から17のいずれか一項に規定されたとおりである、請求項20若しくは21に記載の真核細胞又は請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記真核細胞が、動物細胞、哺乳動物細胞、ヒト細胞、幹細胞、初代細胞、免疫細胞、T細胞又は樹状細胞である、請求項20、21若しくは23に記載の真核細胞又は請求項22若しくは23に記載の方法。

【請求項25】

細胞透過性ドメイン(CPD)と作動可能に連結されたエンドソーム漏出ドメイン(ELD)、又

はヒスチジンリッヂメイン及びCPDと作動可能に連結されたELDを含む合成ペプチド。

【請求項 2 6】

請求項2から9のいずれか一項に規定されたポリペプチドベースのシャトル剤である、請求項25に記載の合成ペプチド。