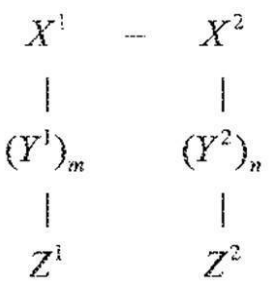
【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成29年10月19日(2017.10.19)

【公表番号】特表2016-530303(P2016-530303A)
【公表日】平成28年9月29日(2016.9.29)
【年通号数】公開・登録公報2016-057
【出願番号】特願2016-540943(P2016-540943)
【国際特許分類】
Ｃ０７Ｋ　７/08　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/42　(2017.01)
Ａ６１Ｋ　31/7088　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/00　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　５/071　(2010.01)
Ｃ０７Ｋ　７/06　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/00　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ０７Ｋ　７/08
Ａ６１Ｋ　47/42
Ａ６１Ｋ　31/7088
Ａ６１Ｋ　37/02
Ａ６１Ｋ　45/00
Ｃ１２Ｎ　５/071
Ｃ０７Ｋ　７/06
Ｃ０７Ｋ　14/00
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡ

【手続補正書】
【提出日】平成29年9月6日(2017.9.6)
【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】
式：

【化５】



（式中、
Ｘは、連結部分であり、
Ｙは、疎水性部分に共有結合したアミノ酸残基であり、
Ｚは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）部分であり、該ＣＰＰ部分は、正味の正電荷を有し、かつ５０％またはそれ超の残基がグアニジニウム基を有しているアミノ酸配列を有し、
ｍおよびｎは、独立して０または１である）
を有する化合物。
【請求項２】
前記ＣＰＰ部分が、３から３０の間のアミノ酸を含む、請求項１に記載の化合物。
【請求項３】
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示される配列に対して少なくとも８５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２に記載の化合物。
【請求項４】
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示されるアミノ酸配列を含む、請求項３に記載の化合物。
【請求項５】
ｍおよびｎの少なくとも１つが１である、請求項１に記載の化合物。
【請求項６】
前記疎水性部分が、C_6～C_{30}直鎖、分岐状、または環式基を含む、請求項５に記載の化合物。
【請求項７】
前記基が、Ｎ、Ｏ、およびＳから選択される１つまたは複数のヘテロ原子を含む、請求項６に記載の化合物。
【請求項８】
前記環式基が、単環、二環、または三環式である、請求項６に記載の化合物。
【請求項９】
前記疎水性部分がローダミン基を含む、請求項６に記載の化合物。
【請求項１０】
前記ローダミン基がテトラメチルローダミン（ＴＭＲ）である、請求項９に記載の化合物。
【請求項１１】
前記アミノ酸残基がリシン（Ｋ）である、請求項５に記載の化合物。
【請求項１２】
ｍおよびｎが０であり、Z^1および／またはZ^2が、疎水性部分に連結されたアミノ酸残基を含むＣＰＰである、請求項１に記載の化合物。
【請求項１３】
前記アミノ酸残基が、ＣＰＰアミノ酸配列中の最もＮ末端側にあるリシン（Ｋ）残基である、請求項１２に記載の化合物。
【請求項１４】
Ｘがシステイン（Ｃ）残基である、請求項１に記載の化合物。

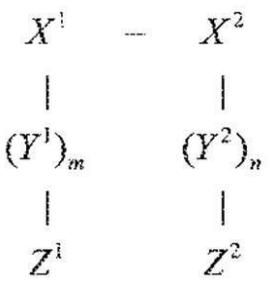
【請求項１５】
Ｘ^{1}およびＸ^{2}が、ジスルフィド結合により連結されたシステイン（Ｃ）残基である、請求項１４に記載の化合物。
【請求項１６】
Ｘ、Ｙ、および／またはＺが、アミド結合により連結される、請求項１に記載の化合物。
【請求項１７】
Ｚ^{1}のＣＰＰおよびＺ^{2}のＣＰＰが、互いに少なくとも８５％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項１に記載の化合物。
【請求項１８】
Ｘ－Ｙ－Ｚの組合せが、３０個以下のアミノ酸残基を含む、請求項１に記載の化合物。
【請求項１９】
エンドソーム溶解を容易にすることが可能である、請求項１に記載の化合物。
【請求項２０】
式：
Ｘ－Ｙ－Ｚ
（式中、
Ｘは、システイン（Ｃ）であり、
Ｙは、疎水性部分に共有結合したアミノ酸残基であり、
Ｚは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）部分であり、前記ＣＰＰ部分は、正味の正電荷を有し、かつ５０％またはそれ超の残基がグアニジニウム基を有しているアミノ酸配列を有し、
ＸおよびＹと、ＹおよびＺとは、アミド結合によって連結されている）
を有する化合物。
【請求項２１】
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示される配列に対して少なくとも８５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２０に記載の化合物。
【請求項２２】
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示される配列を持つアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の化合物。
【請求項２３】
Ｙがリシン（Ｋ）である、請求項２０に記載の化合物。
【請求項２４】
前記疎水性部分がローダミン基を含む、請求項２０に記載の化合物。
【請求項２５】
前記ローダミン基がテトラメチルローダミン（ＴＭＲ）である、請求項２４に記載の化合物。
【請求項２６】
Ｎ末端システイン（Ｃ）残基間でのジスルフィド結合の形成によって、ホモダイマーを形成することが可能である、請求項２０に記載の化合物。
【請求項２７】
細胞内のエンドソーム浸透性を高めるための、請求項１または請求項２０に記載の化合物を含む組成物であって、該組成物が、該細胞と接触させられることを特徴とする、組成物。
【請求項２８】
前記組成物が、前記細胞と、前記化合物のエンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させられることを特徴とする、請求項２７に記載の組成物。
【請求項２９】
前記組成物が、前記細胞と少なくとも１μＭの前記化合物の濃度で接触させられることを特徴とする、請求項２７に記載の組成物。

【請求項３０】
前記組成物が、前記細胞と少なくとも５μＭの前記化合物の濃度で接触させられることを特徴とする、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
前記細胞が、アルブミンを欠いている培養物中にある、請求項２７に記載の組成物。
【請求項３２】
前記組成物が、前記細胞と、細胞不浸透性分子と組み合わせて接触させられることを特徴とする、請求項２７に記載の組成物。
【請求項３３】
前記細胞が、生きている対象から得られ、前記組成物が、ｅｘ　ｖｉｖｏで前記細胞と接触させられることを特徴とする、請求項２７に記載の組成物。
【請求項３４】
前記細胞が、生きている対象内にあり、前記組成物が、前記細胞とｉｎ　ｖｉｖｏで接触させられることを特徴とする、請求項２７に記載の組成物。
【請求項３５】
前記細胞の前記エンドソーム浸透性を高めるために、前記組成物が、前記細胞とｉｎ　ｖｉｖｏで接触させられることを特徴とする、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
前記対象が哺乳動物である、請求項３３または請求項３４に記載の組成物。
【請求項３７】
細胞不浸透性分子を細胞のサイトゾルに送達するための、請求項１または請求項２０に記載の化合物および細胞不浸透性分子を含む組み合わせ物であって、該組み合わせ物が、該細胞と、エンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させられることを特徴とする、組み合わせ物。
【請求項３８】
前記組み合わせ物が、前記細胞と、少なくとも１μＭの化合物の濃度で接触させられることを特徴とする、請求項３７に記載の組み合わせ物。
【請求項３９】
前記細胞不浸透性分子が、ペプチド、ポリペプチドおよび核酸を含むポリマー、または小分子医薬品である、請求項３７に記載の組み合わせ物。
【請求項４０】
前記ポリペプチドが転写因子である、請求項３９に記載の組み合わせ物。
【請求項４１】
前記細胞不浸透性分子が、前記化合物に共有結合的に連結していない、請求項３７に記載の組み合わせ物。
【請求項４２】
前記細胞不浸透性分子が正味の正電荷を有する、請求項３７に記載の組み合わせ物。
【請求項４３】
前記細胞が、生きている対象から得られ、前記組み合わせ物が、ｅｘ　ｖｉｖｏで前記細胞と接触させられることを特徴とする、請求項３７に記載の方法。
【請求項４４】
前記細胞が、生きている対象内にあり、前記組み合わせ物が、ｉｎ　ｖｉｖｏで前記細胞と接触させられることを特徴とする、請求項３７に記載の組み合わせ物。
【請求項４５】
細胞不浸透性分子を前記細胞の前記サイトゾルに送達するために、前記組み合わせ物が、前記細胞とｉｎ　ｖｉｖｏで接触させられることを特徴とする、請求項４４に記載の組み合わせ物。
【請求項４６】
前記対象が哺乳動物である、請求項４３または請求項４４に記載の組み合わせ物。
【請求項４７】

ｅｘ　ｖｉｖｏで細胞における多能性を誘導するための、請求項１または請求項２０に記載の化合物および転写因子を含む組み合わせ物であって、該組み合わせ物が、該細胞と、エンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させられ、前記細胞が培養されて前記細胞の多能性が得られることを特徴とする、組み合わせ物。
【請求項４８】
前記細胞が、前記対象中の体細胞組織から得られる、請求項４７に記載の組み合わせ物。
【請求項４９】
前記対象が哺乳動物である、請求項４７に記載の組み合わせ物。
【請求項５０】
前記転写因子が、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃのうちの１つである、請求項４７に記載の組み合わせ物。
【請求項５１】
多能性細胞またはその子孫細胞が、前記対象に投与されることを特徴とする、請求項５０に記載の組み合わせ物。
【請求項５２】
幹細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで拡張するための、請求項１または請求項２０に記載の化合物および転写因子を含む組み合わせ物であって、該組み合わせ物が、該幹細胞と、エンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させられ、前記細胞が培養されて前記細胞の拡張が得られることを特徴とする、組み合わせ物。
【請求項５３】
前記幹細胞が造血幹細胞である、請求項５２に記載の組み合わせ物。
【請求項５４】
前記転写因子が、ＨｏｘＢ４、ＨｏｘＡ４／１０、Ｇａｔａ２、Ｇｆ１、ＡＭＬ１、ＪｕｎＢ、ＮＦ－Ｙ、Ｂｍｉ１Ｅｚｈ２、Ｄｍｎｔ３ａ、Ｃｂｘ７、ｐ１８、ｐ２１、ｐ２７、ｐ５７、ＰＴＥＮ、Ｍｙｃ、Ｆｂｘｗ７などからなる群から選択される、請求項５２に記載の組み合わせ物。

【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２６】
別の態様では、本開示は、幹細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで拡張する方法であって、幹細胞を本開示の化合物および転写因子と、エンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させること、および細胞を培養して、細胞の拡張を得ることを含む方法を提供する。一部の実施形態では、幹細胞は造血幹細胞である。一部の実施形態では、転写因子は、ＨｏｘＢ４、ＨｏｘＡ４／１０、Ｇａｔａ２、Ｇｆ１、ＡＭＬ１、ＪｕｎＢ、ＮＦ－Ｙ、Ｂｍｉ１Ｅｚｈ２、Ｄｍｎｔ３ａ、Ｃｂｘ７、ｐ１８、ｐ２１、ｐ２７、ｐ５７、ＰＴＥＮ、Ｍｙｃ、Ｆｂｘｗ７などからなる群から選択される。
本発明は、例えば、以下の項目を提供する。
（項目１）
式：

【化５】



（式中、
Ｘは、連結部分であり、
Ｙは、疎水性部分に共有結合したアミノ酸残基であり、
Ｚは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）部分であり、該ＣＰＰ部分は、正味の正電荷を有し、かつ５０％またはそれ超の残基がグアニジニウム基を有しているアミノ酸配列を有し、
ｍおよびｎは、独立して０または１である）
を有する化合物。
（項目２）
前記ＣＰＰ部分が、３から３０の間のアミノ酸を含む、項目１に記載の化合物。
（項目３）
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示される配列に対して少なくとも８５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２に記載の化合物。
（項目４）
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示されるアミノ酸配列を含む、項目３に記載の化合物。
（項目５）
ｍおよびｎの少なくとも１つが１である、項目１に記載の化合物。
（項目６）
前記疎水性部分が、C_{6}～C_{30}直鎖、分岐状、または環式基を含む、項目５に記載の化合物。
（項目７）
前記基が、Ｎ、Ｏ、およびＳから選択される１つまたは複数のヘテロ原子を含む、項目６に記載の化合物。
（項目８）
前記環式基が、単環、二環、または三環式である、項目６に記載の化合物。
（項目９）
前記疎水性部分がローダミン基を含む、項目６に記載の化合物。
（項目１０）
前記ローダミン基がテトラメチルローダミン（ＴＭＲ）である、項目９に記載の化合物。
（項目１１）
前記アミノ酸残基がリシン（Ｋ）である、項目５に記載の化合物。
（項目１２）
ｍおよびｎが０であり、Z^{1}および／またはZ^{2}が、疎水性部分に連結されたアミノ酸残基を含むＣＰＰである、項目１に記載の化合物。
（項目１３）
前記アミノ酸残基が、ＣＰＰアミノ酸配列中の最もＮ末端側にあるリシン（Ｋ）残基である、項目１２に記載の化合物。
（項目１４）

Ｘがシステイン（Ｃ）残基である、項目１に記載の化合物。
（項目１５）
Ｘ^{1}およびＸ^{2}が、ジスルフィド結合により連結されたシステイン（Ｃ）残基である、項目１４に記載の化合物。
（項目１６）
Ｘ、Ｙ、および／またはＺが、アミド結合により連結される、項目１に記載の化合物。
（項目１７）
Ｚ^{1}のＣＰＰおよびＺ^{2}のＣＰＰが、互いに少なくとも８５％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、項目１に記載の化合物。
（項目１８）
Ｘ－Ｙ－Ｚの組合せが、３０個以下のアミノ酸残基を含む、項目１に記載の化合物。
（項目１９）
エンドソーム溶解を容易にすることが可能である、項目１に記載の化合物。
（項目２０）
式：
Ｘ－Ｙ－Ｚ
（式中、
Ｘは、システイン（Ｃ）であり、
Ｙは、疎水性部分に共有結合したアミノ酸残基であり、
Ｚは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）部分であり、前記ＣＰＰ部分は、正味の正電荷を有し、かつ５０％またはそれ超の残基がグアニジニウム基を有しているアミノ酸配列を有し、
ＸおよびＹと、ＹおよびＺとは、アミド結合によって連結されている）
を有する組成物。
（項目２１）
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示される配列に対して少なくとも８５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２０に記載の組成物。
（項目２２）
前記ＣＰＰ部分が、配列番号１に示される配列を持つアミノ酸配列を含む、項目２１に記載の化合物。
（項目２３）
Ｙがリシン（Ｋ）である、項目２０に記載の化合物。
（項目２４）
前記疎水性部分がローダミン基を含む、項目２０に記載の化合物。
（項目２５）
前記ローダミン基がテトラメチルローダミン（ＴＭＲ）である、項目２４に記載の化合物。
（項目２６）
Ｎ末端システイン（Ｃ）残基間でのジスルフィド結合の形成によって、ホモダイマーを形成することが可能である、項目２０に記載の化合物。
（項目２７）
細胞内のエンドソーム浸透性を高める方法であって、細胞を項目１または項目２０に記載の化合物と接触させることを含む方法。
（項目２８）
前記細胞を、前記化合物のエンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させる、項目２７に記載の方法。
（項目２９）
前記細胞を少なくとも１μＭの濃度の前記化合物と接触させる、項目２７に記載の方法。（項目３０）
前記細胞を少なくとも５μＭの濃度の前記化合物と接触させる、項目２９に記載の方法

。
（項目３１）
前記細胞が、アルブミンを欠いている培養物中にある、項目２７に記載の方法。
（項目３２）
前記細胞を細胞不浸透性分子と接触させることをさらに含む、項目２７に記載の方法。
（項目３３）
前記細胞が、生きている対象から得られ、ｅｘ　ｖｉｖｏで前記化合物と接触させる、項目２７に記載の方法。
（項目３４）
前記細胞が、生きている対象内にあり、ｉｎ　ｖｉｖｏで接触させる、項目２７に記載の方法。
（項目３５）
前記細胞の前記エンドソーム浸透性を高めるのに有効な量の前記化合物を前記対象に投与することによって、前記細胞をｉｎ　ｖｉｖｏで接触させる、項目３４に記載の方法。
（項目３６）
前記対象が哺乳動物である、項目３３または項目３４に記載の方法。
（項目３７）
細胞不浸透性分子を細胞のサイトゾルに送達する方法であって、細胞を項目１または項目２０に記載の化合物および細胞不浸透性分子と、エンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させることを含む方法。
（項目３８）
前記細胞を少なくとも１μＭの濃度の化合物と接触させる、項目３７に記載の方法。
（項目３９）
前記細胞不浸透性分子が、ペプチド、ポリペプチドおよび核酸を含むポリマー、または小分子医薬品である、項目３７に記載の方法。
（項目４０）
前記ポリペプチドが転写因子である、項目３９に記載の方法。
（項目４１）
前記細胞不浸透性分子が、前記化合物に共有結合的に連結していない、項目３７に記載の方法。
（項目４２）
前記細胞不浸透性分子が正味の正電荷を有する、項目３７に記載の方法。
（項目４３）
前記細胞が、生きている対象から得られ、ｅｘ　ｖｉｖｏで前記化合物および細胞不浸透性分子と接触させられる、項目３７に記載の方法。
（項目４４）
前記細胞が、生きている対象内にあり、ｉｎ　ｖｉｖｏで前記化合物および細胞不浸透性分子と接触させられる、項目３７に記載の方法。
（項目４５）
細胞不浸透性分子を前記細胞の前記サイトゾルに送達するのに有効な量の前記化合物を前記対象に投与することによって、前記細胞をｉｎ　ｖｉｖｏで接触させる、項目４４に記載の方法。
（項目４６）
前記対象が哺乳動物である、項目４３または項目４４に記載の方法。
（項目４７）
ｅｘ　ｖｉｖｏで細胞における多能性を誘導する方法であって、対象から得られた細胞を項目１または項目２０に記載の化合物および転写因子と、エンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させることと、前記細胞を培養して前記細胞の多能性を得ることとを含む方法。
（項目４８）

前記細胞が、前記対象中の体細胞組織から得られる、項目４７に記載の方法。
（項目４９）
前記対象が哺乳動物である、項目４７に記載の方法。
（項目５０）
前記転写因子が、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃの１つである、項目４７に記載の方法。
（項目５１）
多能性細胞またはその子孫細胞を、前記対象に引き続き投与することをさらに含む、項目５０に記載の方法。
（項目５２）
幹細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで拡張する方法であって、幹細胞を項目１または項目２０に記載の化合物および転写因子と、エンドサイトーシスを可能にするのに十分な条件下で接触させることと、前記細胞を培養して前記細胞の拡張を得ることとを含む方法。
（項目５３）
前記幹細胞が造血幹細胞である、項目５２に記載の方法。
（項目５４）
前記転写因子が、ＨｏｘＢ４、ＨｏｘＡ４／１０、Ｇａｔａ２、Ｇｆ１、ＡＭＬ１、ＪｕｎＢ、ＮＦ－Ｙ、Ｂｍｉ１Ｅｚｈ２、Ｄｍｎｔ３ａ、Ｃｂｘ７、ｐ１８、ｐ２１、ｐ２７、ｐ５７、ＰＴＥＮ、Ｍｙｃ、Ｆｂｘｗ７などからなる群から選択される、項目５２に記載の方法。