

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和3年9月9日(2021.9.9)

【公表番号】特表2020-534261(P2020-534261A)

【公表日】令和2年11月26日(2020.11.26)

【年通号数】公開・登録公報2020-048

【出願番号】特願2020-514212(P2020-514212)

【国際特許分類】

A 6 1 K	38/02	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/31	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/57	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
A 6 1 K	47/62	(2017.01)
A 6 1 K	47/54	(2017.01)
A 6 1 K	47/60	(2017.01)
A 6 1 K	35/12	(2015.01)
A 6 1 K	35/28	(2015.01)
A 6 1 K	47/46	(2006.01)
A 6 1 K	38/48	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	9/127	(2006.01)
C 0 7 K	14/315	(2006.01)
C 0 7 K	14/195	(2006.01)
C 1 2 N	9/74	(2006.01)

【F I】

A 6 1 K	38/02	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/57	
C 1 2 N	15/62	Z
A 6 1 K	47/62	
A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	35/28	
A 6 1 K	47/46	
A 6 1 K	38/48	1 0 0
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	38/16	1 0 0
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	

A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	9/127	
C 0 7 K	14/315	Z N A
C 0 7 K	14/195	
C 1 2 N	9/74	

【手続補正書】**【提出日】**令和3年7月27日(2021.7.27)**【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】**

アンカータンパク質を含む少なくとも1つの包埋タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートを含む二重層又はミセルであるリン脂質組成物であって、前記アンカータンパク質は、カチオン化タンパク質又はアニオン化タンパク質であるとともに、

- a) 酵素である、又は、
- b) アミノ酸側鎖に共有結合する $- \text{CH}_2 \text{C}(\text{O})\text{NCH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{H}^+$ リンカーを含まないタンパク質である、組成物。

【請求項2】

前記リン脂質二重層は、細胞、任意的に間葉系幹細胞又は心筋細胞の表面膜を形成する、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記アンカータンパク質は、アミノ酸側鎖に共有結合する $- \text{CH}_2 \text{C}(\text{O})\text{NCH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{H}^+$ リンカーを含まないタンパク質であり、前記アンカータンパク質は、CsHAである又は配列番号19を含むCsHAの機能的変異体若しくは部分である2次分子に結合する、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載のリン脂質組成物を含み、薬学的に許容される担体、希釈剤、又はビヒクリルをさらに含む、医薬又は外科用組成物。

【請求項5】

請求項1～4のいずれかに記載の組成物を作製する方法であって、

- a) タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートを提供するステップ、及び、
- b) 前記コンジュゲートにリン脂質二重層又はミセルを接触させるステップを含み、前記タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートは、カチオン化タンパク質又はアニオン化タンパク質であるとともに、(i)酵素である、及び/又は、(ii)アミノ酸側鎖に共有結合する $- \text{CH}_2 \text{C}(\text{O})\text{NCH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{H}^+$ リンカーを含まないタンパク質であるアンカータンパク質を含む、方法。

【請求項6】

前記リン脂質二重層は細胞であり、ステップ(b)は、前記細胞を前記コンジュゲートに接触させることと、低くとも約10の温度で少なくとも約2分の時間インキュベートすることと、任意的に、その後前記細胞を洗浄することとを含む、及び/又は、

ステップ(a)は、カチオン化タンパク質又はアニオン化タンパク質であるアンカータンパク質と界面活性剤との静電的コンジュゲーションを可能にする条件下で、前記アンカータンパク質を前記界面活性剤に接触させることを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

ステップ(a)は、カチオン化タンパク質又はアニオン化タンパク質であるアンカータ

ンパク質と界面活性剤との静電的コンジュゲーションを可能にする条件下で、前記アンカータンパク質を前記界面活性剤に接触させることを含み、

前記アンカータンパク質は、

i) アンカー前駆体タンパク質の溶液をN , N ' - ジメチル - 1 , 3 - プロパンジアミン (D M P A) 又はその類似体のp H中和溶液と混合するステップ、及び任意的に、混合物をp H 5 ~ 7 に調節するステップ、

i i) その後又は同時に、N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N ' - エチルカルボジイミドハイドロクロライド (E D C)などのカルボジイミドを添加するステップ、及び前記混合物をp H 4 ~ 7 に調節するステップ、

i i i) (i i) の前記混合物をp H 4 ~ 7 において0 ~ 2 5 の温度で1 ~ 3 0 時間かく拌するステップ、

i v) 水又はバッファーに対して(i i i) の前記混合物内の前記タンパク質をp H 6 . 5 ~ 8 . 5 において少なくとも4 時間透析するステップ、

v) 必要であれば、(i v) の前記混合物のp Hをp H 6 . 5 ~ 8 . 5 に調節するステップ、を含む方法によって得られ、

前記アンカー前駆体タンパク質は酵素であり、さらに、

- ステップ(i i i)は約120 分以下継続され、及び / 又は、

- 前記方法は、ステップ(i v)、若しくは存在する場合はステップ(v)の前記混合物にサイズ排除クロマトグラフィーを行うステップ(v i)をさらに含む、請求項5 に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(a)は、カチオン化タンパク質又はアニオン化タンパク質であるアンカータンパク質と界面活性剤との静電的コンジュゲーションを可能にする条件下で、前記アンカータンパク質を前記界面活性剤に接触させることを含み、

前記アンカータンパク質は、スーパーチャージタンパク質をコードする組換えD N A配列の発現を含む方法によって得られ、

任意に、前記組換えD N A配列は、前記スーパーチャージタンパク質と2次分子とを含む融合タンパク質をコードし、

任意に、前記2次分子は、C s h A、配列番号19を含むC s h Aの機能的変異体若しくは部分、O p d A (配列番号10若しくは配列番号39)、トロンビン、プロトロンビン、P I G F - 2 (配列番号22)、若しくは配列番号21を含むP I G F - 2 の機能的変異体若しくは部分、スパイキヤッチャーポリペプチド (配列番号23)、若しくはスパイタグポリペプチド (配列番号24)の1つ以上を含む、又は非変異体配列に対して少なくとも約60 % の配列同一性を有するこれらのいずれかの機能的変異体を含み、

前記組換えD N A配列は配列番号4 ~ 7 の配列を有する、請求項5 に記載の方法。

【請求項9】

タンパク質標識で細胞を標識する方法であって、請求項5 ~ 8 のいずれかに記載の方法を含み、前記リン脂質二重層が前記細胞の外膜を形成し、前記タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートが前記タンパク質標識を含む、方法。

【請求項10】

請求項1 ~ 3 のいずれかに記載のリン脂質組成物を含む組織工学用足場であって、

任意に、前記リン脂質組成物は、そのアンカー前駆体タンパク質形態において組織の成長及び / 若しくは治癒を促進することが知られているアンカータンパク質を含む、並びに / 又は、前記リン脂質組成物は、組織の成長及び / 若しくは治癒を促進することが知られている2次分子を含み、

任意に、前記アンカータンパク質は、カチオン化若しくはスーパーチャージのトロンビン、若しくはトロンビンのカチオン化若しくはスーパーチャージの機能的変異体、若しくはプロトロンビンのカチオン化若しくはスーパーチャージの機能的変異体である、並びに / 又は、前記2次分子は、トロンビン、プロトロンビン、P I G F - 2 (配列番号22)、若しくは配列番号21を含むP I G F - 2 の機能的変異体若しくは部分である、組織工

学用足場。**【請求項 1 1】**

請求項1 0に記載の組織工学用足場を形成するインビトロ又はエクスピボ方法であって、前記リン脂質組成物はアンカータンパク質を含み、

前記方法は、前記タンパク質がカチオン化若しくはスーパーチャージのトロンビン若しくはプロトロンビン、若しくは、トロンビン若しくはプロトロンビンのカチオン化若しくはスーパーチャージの機能的変異体である、又は、前記タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートがトロンビン若しくはプロトロンビン、若しくはトロンビン若しくはプロトロンビンの機能的変異体である2次分子を含む請求項2に記載の細胞を、フィブリノゲン含有ゲル又は構造などのフィブリノゲン組成物に接触させるステップを含む、方法。

【請求項 1 2】

組織の成長及び／又は治癒を促進するインビトロ又はエクスピボ方法であって、前記アンカータンパク質が前記組織の成長及び／若しくは治癒を促進することで知られている、又は、前記タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートが前記組織の成長及び／若しくは治癒を促進することで知られている2次分子を含む請求項2に記載のリン脂質組成物である細胞を、前記組織の成長及び／又は治癒が求められる部位に導入することによって、該細胞を使用するステップを含み、

任意に、前記細胞は間葉系幹細胞であり、前記タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートは、P I G F - 2 (配列番号 2 2) 又は配列番号 2 1 を含むその機能的変異体若しくは部分である2次分子を含み、

請求項4に記載の組成物又は請求項1 0に記載の組織工学用足場を使用するステップを含む、方法。

【請求項 1 3】

細胞を組織にターゲティングするインビトロ又はエクスピボ方法であって、請求項2に記載のリン脂質組成物である細胞を使用するステップを含み、前記リン脂質二重層が前記細胞の外膜を形成し、前記タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートが前記組織に特異的なタンパク質を含み、

任意に、前記組織に特異的な前記タンパク質は、前記アンカータンパク質又は2次分子であり、

任意に、前記2次分子は、カチオン化若しくはスーパーチャージの抗体、レクチン、インテグリン、又は接着分子、任意的に C s h A (配列番号 2 0) 又は配列番号 1 9 を含むその部分若しくは機能的変異体であり、

任意に、請求項4に記載の組成物又は請求項1 0に記載の組織工学用足場を使用するステップを含む、方法。

【請求項 1 4】

タンパク質を細胞内部に送達するインビトロ又はエクスピボ方法であって、請求項2に記載のリン脂質組成物である細胞を得るため請求項5 ~ 8のいずれかに記載の方法を使用するステップを含み、前記リン脂質二重層が前記細胞の外膜を形成し、さらに前記タンパク質 - ポリマー界面活性剤コンジュゲートがエンドサイトーシスのスピード／速度を促進又は抑制する分子を含む、方法。

【請求項 1 5】

治療における使用のための、請求項1 ~ 3のいずれかに記載のリン脂質組成物、又は請求項4に記載の組成物又は請求項1 0に記載の組織工学用足場であって、

任意に、前記組成物は組織の成長及び／又は治癒を促進することが知られているタンパク質を含み、前記使用は前記組織の成長及び／又は治癒の促進における使用、例えば心筋梗塞、心筋症、及び／又は心筋炎の処置の方法における使用であり、

任意に、前記リン脂質組成物は、(a) 毒物を中和可能な酵素であるアンカータンパク質を含み、又は(b) 毒物に結合若しくは毒物を中和可能な2次分子に結合するアンカータンパク質を含み、前記使用は前記毒物に接触した被毒ヒト又は動物の処置における使用であり、

酵素である前記アンカータンパク質は、任意に、カチオン化若しくはスーパーチャージのO p d A、若しくは、有機リン化合物を分解することができるそのカチオン化若しくはスーパーチャージの機能的変異体若しくは部分である、又は、前記アンカータンパク質に結合する前記2次分子は、O p d A（配列番号10若しくは配列番号39）、若しくは有機リン化合物を分解することができるその機能的変異体若しくは部分である、リン脂質組成物、組成物又は組織工学用足場。

【請求項16】

配列番号11、40若しくはそれらの非変異体配列と少なくとも約97%の配列同一性を有する機能的変異体、又は配列番号13～16のいずれか、若しくはそれらの非変異体配列と少なくとも約60%の配列同一性を有するそれらのいずれかの機能的変異体を含む、又は、

スーパーチャージGFP及び配列番号10、若しくは19～39のいずれか、若しくはスーパーチャージGFP及び非変異体配列と少なくとも60%の配列同一性を有する配列番号10、若しくは19～39のいずれかの機能的変異体の融合タンパク質を含む、ポリペプチド。