

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2023年12月28日(28.12.2023)



(10) 国際公開番号

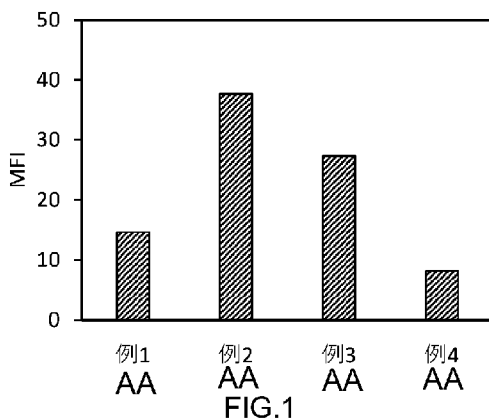
WO 2023/248846 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07K 7/08 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/021642
- (22) 国際出願日: 2023年6月12日(12.06.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2022-100033 2022年6月22日(22.06.2022) JP
- (71) 出願人: 東亜合成株式会社 (TOAGOSEI CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒1058419 東京都港区西新橋1丁目14番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: ベイリー小林 菜穂子 (BAILEYKOBAYASHI, Nahoko); 〒3002611 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社内 Ibaraki (JP). 吉田 徹彦 (YOSHIDA, Tetsuhiko); 〒3002611 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 安部 誠 (ABE, Makoto); 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目20番3号 BPRプレイス久屋大通 弁理士法人協働特許事務所 Aichi (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, 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.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: CARRIER PEPTIDE FRAGMENT AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: キャリアペプチドフラグメント及びその利用

[図1]



AA ... Example

(57) Abstract: The present disclosure provides a carrier peptide fragment which has cell membrane permeability and makes it possible to introduce a target foreign substance from outside a eukaryotic cell into at least the cytoplasm of the cell. The carrier peptide fragment disclosed herein is composed of the amino acid sequence RKKRNSKRLTRKK.

(57) 要約: 本開示により、真核細胞の外部から少なくとも該細胞の細胞質内に目的とする外来物質を導入することができ得る細胞膜透過性を有するキャリアペプチドフラグメントが提供される。ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントは、アミノ酸配列: RKKRNSKRLTRKKから成る。



WO 2023/248846 A1

DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,  
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
（規則5.2(a)）

## 明 細 書

**発明の名称**：キャリアペプチドフラグメント及びその利用

### 技術分野

[0001] 本発明は、真核細胞の外部から該細胞の内部に外来物質を導入（移送）する方法と、該方法に用いられるキャリアペプチドフラグメントに関する。なお、本出願は2022年6月22日に出願された日本国特許出願第2022-100033号に基づく優先権を主張しており、その出願の全内容は本明細書中の参照として組み入れられている。

### 背景技術

[0002] 従来から、ヒトやそれ以外の哺乳動物等の細胞（真核細胞）内にポリペプチド等の外来物質、とりわけ生理活性物質を導入し、当該細胞（さらには該細胞から成る組織や器官）の形質を転換させること或いは当該細胞の機能を改善・向上させることが行われている。

[0003] 例えば、特許文献1には、核小体局在シグナル（Nucleolar localization signal：以下「NOLS」という。）として知られるアミノ酸配列から成るキャリアペプチドフラグメントと、外来物質とを有する外来物質導入用構築物が開示されている。かかる構築物は、細胞膜透過性を有するため、目的の細胞に当該外来物質を効果的に導入することができる。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2011/013699号

### 発明の概要

[0005] ところで、医療などの観点から、目的とする外来物質を細胞質内へ導入し得る新たなキャリアペプチドフラグメントの開発が望まれている。キャリアペプチドフラグメントの細胞膜透過性は、そのキャリアペプチドフラグメントが導入される細胞種によって効率が変動し得る。そのため、新たなキャリアペプチドフラグメントの開発により、医療の幅が広がり得る。

[0006] そこで本発明は、かかる要望に対応すべく創出されたものであり、真核細胞の外部から少なくとも該細胞の細胞質内に目的とする外来物質を導入するための、細胞膜透過性を有するキャリアペプチドフラグメントを提供することを目的とする。また、本開示は、かかるキャリアペプチドフラグメントを備えた外来物質導入用構築物を提供することを他の目的とする。また、本開示は、真核細胞の外部から少なくとも該細胞の細胞質内に目的とする外来物質を導入する方法を提供することを他の目的とする。

[0007] 本発明者が鋭意検討した結果、細胞膜透過性を発揮する13アミノ酸残基から成る新規のアミノ酸配列を見出した。即ち、本開示により、アミノ酸配列：RKKRNSKRLTRKKから成るキャリアペプチドフラグメントが提供される。ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントは、真核細胞の外部から少なくとも該細胞の細胞質内に目的とする外来物質を導入するために用いることができる。

ここで、「外来物質」とは、上記キャリアペプチドフラグメントのN末端側またはC末端側に直接的または適当なリンカーを介して間接的に結合可能な無機化合物および有機化合物を包含するものであって、真核細胞内に導入可能な分子サイズ及び化学的性質を有するものをいう。

[0008] また、ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントの一態様では、上記アミノ酸配列のアルギニン残基としてD-アルギニン残基を含む。本発明者の検討によれば、かかる構成のキャリアペプチドフラグメントは、より優れた細胞膜透過性を有する。

[0009] また、ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントの一態様では、上記アミノ酸配列のリジン残基としてD-リジン残基を含む。本発明者の検討によれば、かかる構成のキャリアペプチドフラグメントは、より優れた細胞膜透過性を有する。

[0010] また、本開示により、上記目的を実現すべく、真核細胞（特に細胞壁を有しないヒトやそれ以外の哺乳動物に代表される種々の動物細胞）の外部（即ち細胞膜の外側）から少なくとも該細胞の細胞質内（好ましくはさらに核

内)に目的とする外来物質を導入する(移送する)ことができ得る人為的に作製された外来物質導入用構築物が提供される。即ち、ここで開示される構築物は、ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントと、該キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び/又はC末端側に結合した上記目的の外来物質とを有する。かかる構築物は細胞膜透過性を有するため、目的とする真核細胞に目的とする外来物質を効率よく導入することができる。

[0011] ここで開示される構築物の一態様では、上記外来物質はポリペプチド、核酸、色素および薬剤から成る群から選択される少なくとも1種の有機化合物であり得る。

ここで、「ポリペプチド」とは、複数のアミノ酸がペプチド結合により結合した構造を有するポリマーをいう。ポリペプチドは、ペプチド結合の数(即ち、アミノ酸残基数)によって限定されない。即ち、ポリペプチドは、アミノ酸残基数が10以上300未満程度の一般にペプチドと呼ばれるものと、一般にタンパク質(典型的には300以上のアミノ酸残基から成る高分子化合物)と呼ばれるものとを包含する。当該分野においては、ポリペプチドとタンパク質とは厳密に区分されていない。本明細書においては、複数のアミノ酸残基から成るポリマー(オリゴマーを包含する。)を、ポリペプチドと総称する。

また、「核酸」とは、ヌクレオチドの重合体をいい、DNAおよびRNAを包含する。「核酸」は、塩基数によって限定されない。

[0012] また、ここで開示される構築物の一態様では、上記外来物質が、上記キャリアペプチドフラグメントのC末端側に配置され得る。

[0013] また、本開示により、上記目的を実現するべく、真核細胞の外部から少なくとも該細胞の細胞質内に目的とする外来物質を導入する方法が提供される。ここで開示される方法は、(1)ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントと、上記キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び/又はC末端側に結合した上記目的の外来物質とを有する外来物質導入用構築物を用意する工程と、(2)上記構築物を、目的とする真核細胞を含む試料中に供給

する工程とを包含する。

[0014] また、ここで開示される方法の一態様では、上記外来物質が、ポリペプチド、核酸、色素および薬剤から成る群から選択される少なくとも1種の有機化合物であり得る。

[0015] また、ここで開示される方法の一態様では、上記外来物質が、上記キャリアペプチドフラグメントのC末端側に配置され得る。

[0016] また、ここで開示される方法の一態様では、上記外来物質導入用構築物を導入する対象の真核細胞がヒトまたはヒト以外の哺乳動物の細胞であり得る。

### 図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、NSC-34細胞の培養液に対し、例1~4に示す構築物（添加物）を添加して培養した後、当該細胞をフローサイトメータにより解析することで得られたMF1の値を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0018] 以下、ここで開示される技術のいくつかの実施形態について説明する。本明細書において特に言及している事項以外の事柄であって、本技術の実施に必要な事柄（例えばペプチドの化学合成法、細胞培養技法、ペプチドや核酸を成分として含む構築物の調製に関するような一般的事項）は、細胞工学、生理学、医学、薬学、有機化学、生化学、遺伝子工学、タンパク質工学、分子生物学、遺伝学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。

また、ここで開示される技術は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。なお、以下の説明では、場合によってアミノ酸をIUPAC-IUBガイドラインで示されたアミノ酸に関する命名法に準拠した1文字表記で表す。なお、本明細書において「アミノ酸残基」とは、特に言及する場合を除いて、ペプチド鎖のN末端アミノ酸及びC末端アミノ酸を包含する用語である。

[0019] また、本明細書において、「合成ペプチド」とは、そのペプチド鎖がそれ

のみ独立して自然界に安定的に存在するものではなく、人為的な化学合成あるいは生合成（即ち遺伝子工学に基づく生産）によって製造され、所定の組成物中で安定して存在し得るペプチド断片をいう。ここで「ペプチド」とは、複数のペプチド結合を有するアミノ酸ポリマーを指す用語であり、アミノ酸残基の数によって限定されない。

[0020] また、本明細書において示されるアミノ酸配列を構成するアミノ酸残基は、特に説明がない限り、L体であってもよく、D体であってもよい。即ち、ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントを構成する各アミノ酸残基は、特に説明がない限り、L体であってもよく、D体であってもよい。換言すれば、ペプチドまたはタンパク質を構成するアミノ酸配列中で、L体のアミノ酸残基とD体のアミノ酸残基とを有していてもよい。

なお、本明細書中に記載されるアミノ酸配列は、常に左側がN末端側であり右側がC末端側を表す。

[0021] 本技術の一態様において、ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントは、以下のアミノ酸配列：

R K K R N S K R L T R K K

から成る。上記アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基は、例えば、全てL体であり得る（配列番号1）。上記アミノ酸配列を含むキャリアペプチドフラグメントは、細胞膜透過性を有し得る。そのため、かかるキャリアペプチドフラグメントは、当該キャリアペプチドフラグメントを有する構築物に、細胞膜透過性を付与することができ得る。

[0022] ここで開示される「キャリアペプチドフラグメント」は、典型的には、上記アミノ酸配列と同一のアミノ酸配列であるが、細胞膜透過性を損なわない限りは、かかるアミノ酸配列の改変配列を包含する。ここで、「改変配列」とは、1個または数個（典型的には2個又は3個）のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加（挿入）されて形成されたアミノ酸配列（改変アミノ酸配列）である。そのような軽微な改変配列は、ここで開示される情報に基づいて当業者にとって容易に利用され得るため、ここで開示される技術的思想

としての「キャリアペプチドフラグメント」に包含され得る。

本明細書における改変配列の典型例としては、例えば、1個、2個または3個のアミノ酸残基が保守的に置換したいわゆる同類置換 (conservative amino acid replacement) によって生じた配列や、所定のアミノ酸配列について1個、2個または3個のアミノ酸残基が付加 (挿入) した若しくは欠失した配列等が挙げられる。同類置換の典型例としては、例えば、塩基性アミノ酸残基が別の塩基性アミノ酸残基に置換した配列 (例えばリジン残基とアルギニン残基との相互置換) や、疎水性アミノ酸残基が別の疎水性アミノ酸残基に置換した配列 (例えばロイシン残基、イソロイシン残基、およびバリン残基の相互置換) 等が挙げられる。

[0023] ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントの一態様では、配列番号1に示すアミノ酸配列のアルギニン残基としてD-アルギニン残基を含む。D-アルギニン残基の数は、例えば、1個以上4個以下、2個以上4個以下、3個以上4個以下、または4個である。本発明者の検討によれば、かかる構成により、細胞膜透過性が向上し得る。なお、D-アルギニン残基の数が4個の場合のアミノ酸配列は、配列番号2に示すアミノ酸配列である。

[0024] ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントの一態様では、配列番号1に示すアミノ酸配列のリジン残基としてD-リジン残基を含む。D-リジン残基の数は、例えば、1個以上5個以下、2個以上5個以下、3個以上5個以下、4個以上5個以下、または5個である。本発明者の検討によれば、かかる構成により、細胞膜透過性が向上し得る。なお、D-リジン残基の数が5個の場合のアミノ酸配列は、配列番号3に示すアミノ酸配列である。

[0025] ここで開示される外来物質導入用構築物 (本明細書において、単に「構築物」ともいう。) は、ここで開示されるキャリアペプチドフラグメントと、当該キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び/又はC末端側に結合した外来物質とを有する。

[0026] ここで開示される構築物は、上記キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び/又はC末端側に、所望する外来物質を直接的または適当なリンカー



を介して間接的に結合（連結）することによって、設計・構築され得る。

リンカーは、特に限定されるものではないが、ペプチド性リンカーであってもよく、非ペプチド性リンカーであってもよい。特に限定されるものではないが、ペプチド性リンカーを構成するアミノ酸配列は立体障害を生じさせず、かつ、柔軟なアミノ酸配列であることが好ましい。ペプチド性リンカーは、例えば、グリシン、アラニン、およびセリン等から選択されるアミノ酸残基を1種または2種以上含む、10個以下（より好ましくは1個以上5個以下、例えば1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸残基）のアミノ酸残基からなるリンカーであり得る。また、かかるリンカーとして、 $\beta$ アラニンを用いてもよい。非ペプチド性リンカーとしては、特に限定されるものではないが、例えばアルキルリンカー、PEG（ポリエチレングリコール）リンカー、アミノヘキサノイルスペーサ等を用いることができる。

[0027] 外来物質は、例えば、ポリペプチド、核酸、色素、薬剤等の有機化合物であり得る。

外来物質がポリペプチドである場合には、該ポリペプチドを構成するアミノ酸配列と、キャリアペプチドフラグメントを構成するアミノ酸配列とを含むようにペプチド鎖を設計し、該ペプチド鎖を生合成あるいは化学合成することによって、目的の外来物質導入用構築物を作製することができる。また、種々のDNA又はRNAのような核酸、色素（例えばFAMやFITC等の種々の蛍光色素化合物）、あるいは薬剤（例えば5-フルオロウラシル（5FU）等の核酸系抗腫瘍剤を含む抗腫瘍剤やアジドチミジン（AZT）等の抗ウイルス剤等）として機能する有機化合物を従来公知の種々の科学的手法により、上述したキャリアペプチドフラグメントのN末端側及び／又はC末端側に直接的もしくは間接的に結合させて構築物を調製することができる。

特に限定するものではないが、外来物質が有する機能は、例えば、幹細胞の分化誘導の促進（幹細胞分化誘導活性）、腫瘍細胞の増殖抑制（抗腫瘍活性）、ウイルス感染細胞の増殖抑制（抗ウイルス活性）等であり得る。

[0028] ここで開示される構築物において、キャリアペプチドフラグメントと結合する外来物質の数は特に限定されない。例えば、1のキャリアペプチドフラグメントに対して1又はそれ以上の外来物質を結合させてもよい。特に限定するものではないが、例えば、1のキャリアペプチドフラグメントのC末端側にポリペプチド、核酸、薬剤等を結合させておき、N末端側に色素を結合させてもよい。キャリアペプチドフラグメントに色素を結合させることにより、構築物の真核細胞への導入効率および細胞内における局在を評価することが容易となるため好ましい。

[0029] なお、外来物質がポリペプチドの場合、採用するポリペプチド（アミノ酸配列）は、特に限定されない。例えばアミノ酸残基数が100～1000程度のポリペプチド若しくはタンパク質のような、比較的アミノ酸残基数が多いものも外来物質として採用し得る。

典型的には、外来物質導入用構築物として作製する合成ペプチドを構成する総アミノ酸残基数は、数個乃至数十個（例えば10個）以上であって、1000以下が適当であり、好ましくは600以下であり、さらに好ましくは500以下であり、特に300以下（例えば10～300）が好適である。このような長さのポリペプチドは合成（生合成、化学合成）が容易であり、使用しやすい。

[0030] 外来物質としては、種々の細胞や組織（器官）の発生、分化、増殖、がん化、ホメオスタシス（恒常性）、代謝の調節、等の機能にかかわるポリペプチドの成熟型あるいは前駆体（プロ型、プレプロ型を包含する。）が好ましい。また、機能が従来知られていないポリペプチドを細胞内に導入して当該ポリペプチドの細胞内（生体組織内）における機能の解明のために、ここに開示される外来物質導入方法を実施することもできる。

例えば、外来物質の導入する対象となる真核細胞がヒト又はその他哺乳動物の幹細胞である場合、当該幹細胞の分化誘導に関与する種々の生理活性を有するポリペプチドの成熟型またはその前駆体の利用が好ましい。なお、「幹細胞」は、体性幹細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（Induced pluripo

tent stem cells : i P S細胞) を包含する。また、外来物質の導入する対象となる真核細胞ががん細胞 (腫瘍細胞) である場合、当該がん細胞 (腫瘍細胞) のアポトーシス誘導に関与する種々のポリペプチドの利用が好ましい。あるいは、この場合においては、がん細胞 (腫瘍細胞) が免疫監視機構の機能を抑制することを阻害し得るポリペプチドの利用が好ましい。さらに、導入の対象となる真核細胞が細菌感染細胞やウイルス感染細胞である場合、当該感染細胞のアポトーシス誘導に関与する種々のポリペプチドや、当該感染細胞において細菌もしくはウイルスが増殖することを抑制し得るポリペプチドや、当該感染細胞から細菌もしくはウイルスの感染が拡大することを抑制し得るポリペプチドの利用が好ましい。

なお、キャリアペプチドフラグメントと同様、外来物質としてのポリペプチドは、その機能を保持する限りにおいて、1個または数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加 (挿入) されて形成される改変アミノ酸配列を含んでいてもよい。

[0031] キャリアペプチドフラグメントのC末端側に外来物質が結合している構築物では、キャリアペプチドフラグメントのN末端側のアミノ酸残基の $\alpha$ -アミノ基がアセチル化されていることが好ましい。詳細なメカニズムは不明だが、真核細胞中のタンパク質の多くはN末端側のアミノ酸の $\alpha$ -アミノ基はアセチル化修飾されるため、このような構成であれば、構築物の細胞内での安定性が向上し得る。

[0032] 構築物は、C末端側のアミノ酸残基がアミド化されていることが好ましい。アミノ酸残基 (典型的にはペプチド鎖のC末端アミノ酸残基) のカルボキシル基をアミド化すると、かかる構築物の細胞質内および核小体内における構造安定性 (例えばプロテアーゼ耐性) が向上し得る。また、カルボキシル基がアミド化されることで、構築物の親水性が向上するため、かかる構築物の水系溶媒への溶解性を向上させることができる。かかる水系溶媒としては、例えば、水、種々の緩衝液、生理食塩水 (例えばPBS)、細胞培養液等が挙げられる。

例えば、キャリアペプチドフラグメントのN末端側に外来物質が結合している構築物の場合、キャリアペプチドフラグメントのC末端側のアミノ酸残基のカルボキシル基がアミド化されていることが好ましい。また、例えば外来物質がポリペプチドであり、かかるポリペプチドがキャリアペプチドフラグメントのC末端側に結合している場合は、当該ポリペプチドのC末端アミノ酸残基のカルボキシル基をアミド化することが好ましい。

[0033] 構築物のうちペプチド鎖（外来物質として構成されるポリペプチド、キャリアペプチドフラグメントおよびペプチド性リンカーを包含する）の比較的短いものは、一般的な化学合成法に準じて容易に製造することができる。例えば、従来公知の固相合成法又は液相合成法のいずれを採用してもよい。アミノ基の保護基としてBoc（t-butyloxycarbonyl）或いはFmoc（9-fluorenylmethoxycarbonyl）を適用した固相合成法が好適である。即ち、市販のペプチド合成機を用いた固相合成法により、所望するアミノ酸配列、修飾（N末端アセチル化、C末端アミド化等）部分を有する上記ペプチド鎖を合成することができる。なお、上記方法でペプチド鎖の一部のみを合成してもよく、例えば、キャリアペプチドフラグメントのみ、または、キャリアペプチドフラグメントとペプチド性リンカー部分とを含むペプチド鎖を合成し得る。

[0034] 或いは、遺伝子工学的手法に基づいてペプチド部分を生合成により作製してもよい。即ち、所望するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（ATG開始コドンを含む。）のポリヌクレオチド（典型的にはDNA）を合成する。そして、合成したポリヌクレオチド（DNA）と該アミノ酸配列を宿主細胞内で発現させるための種々の調節エレメント（プロモーター、リボゾーム結合部位、ターミネーター、エンハンサー、発現レベルを制御する種々のシスエレメントを包含する。）とから成る発現用遺伝子構築物を有する組換えベクターを、宿主細胞に応じて構築する。

一般的な技法によって、この組換えベクターを所定の宿主細胞（例えばイースト、昆虫細胞、植物細胞）に導入し、所定の条件で当該宿主細胞又は該

細胞を含む組織や個体を培養する。このことにより、目的とするペプチドを細胞内で生産させることができる。そして、宿主細胞（分泌された場合は培地中）からペプチド部分を単離し、必要に応じてリフォールディング、精製等を行うことによって、目的のペプチド部分を得ることができる。

なお、組換えベクターの構築方法及び構築した組換えベクターの宿主細胞への導入方法等は、当該分野で従来から行われている方法をそのまま採用すればよく、かかる方法自体は特に本技術を特徴付けるものではないため、詳細な説明は省略する。

[0035] 例えば、宿主細胞内で効率よく大量に生産させるために融合タンパク質発現システムを利用することができる。すなわち、目的のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子（DNA）を化学合成し、該合成遺伝子を適当な融合タンパク質発現用ベクター（例えばノバジェン社から提供されているpETシリーズおよびアマシャムバイオサイエンス社から提供されているpGEXシリーズのようなGST (Glutathione S-transferase)融合タンパク質発現用ベクター）の好適なサイトに導入する。そして該ベクターにより宿主細胞（典型的には大腸菌）を形質転換する。得られた形質転換体を培養して目的の融合タンパク質を調製する。次いで、該タンパク質を抽出及び精製する。次いで、得られた精製融合タンパク質を所定の酵素（プロテアーゼ）で切断し、遊離した目的のペプチド断片（即ち設計した人工ポリペプチド）をアフィニティークロマトグラフィー等の方法によって回収する。このような従来公知の融合タンパク質発現システム（例えばアマシャムバイオサイエンス社により提供されるGST/Hisシステムを利用し得る。）を用いることによって、目的の構築物（人工ポリペプチド）を製造することができる。

或いは、無細胞タンパク質合成システム用の鋳型DNA（即ち、構築物のペプチド部分のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む合成遺伝子断片）を構築し、ペプチド部分の合成に必要な種々の化合物（ATP、RNAポリメラーゼ、アミノ酸類等）を使用し、いわゆる無細胞タンパク質合成システムを採用して目的のポリペプチドをインビトロで合成することがで

きる。無細胞タンパク質合成システムについては、例えばShimizuらの論文(Shimizu et al., Nature Biotechnology, 19, 751-755(2001))、Madinらの論文(Madin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(2), 559-564(2000))が参考になる。これら論文に記載された技術に基づいて、本願出願時点において既に多くの企業がポリペプチドの受託生産を行っており、また、無細胞タンパク質合成用キット（例えば、日本の（株）セルフサイエンスから入手可能）が市販されている。

[0036] 構築物のペプチド部分をコードするヌクレオチド配列及び／又は該配列と相補的なヌクレオチド配列を含む一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドは、従来公知の方法によって容易に製造（合成）することができる。即ち、設計したアミノ酸配列を構成する各アミノ酸残基に対応するコドンを選択することによって、かかるアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列が容易に決定され、提供される。そして、ひとたびヌクレオチド配列が決定されれば、DNA合成機等を利用して、所望するヌクレオチド配列に対応するポリヌクレオチド（一本鎖）を容易に得ることができる。さらに得られた一本鎖DNAを鋳型として用い、種々の酵素的合成手段（典型的にはPCR）を採用して目的の二本鎖DNAを得ることができる。また、ポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもよく、RNA（mRNA等）の形態であってもよい。DNAは、二本鎖又は一本鎖で提供され得る。一本鎖で提供される場合は、コード鎖（センス鎖）であってもよく、それと相補的な配列の非コード鎖（アンチセンス鎖）であってもよい。

こうして得られるポリヌクレオチドは、上述のように、種々の宿主細胞中で又は無細胞タンパク質合成システムにて、ペプチド生産のための組換え遺伝子（発現カセット）を構築するための材料として使用することができる。

[0037] 構築物は、外来物質の機能に基づく用途の組成物の有効成分として好適に使用し得る。なお、構築物は、外来物質の機能を失わない限りにおいて塩の形態であってもよい。例えば、常法に従って通常使用されている無機酸または有機酸を付加反応させることにより得られ得る酸付加塩を使用することが

できる。従って、本明細書および請求の範囲に記載の「構築物」は、かかる塩形態のものを包含し得る。

[0038] 構築物は、使用形態に応じて医薬（薬学）上許容され得る種々の担体を含み得る組成物の有効成分として使用され得る。

上記担体としては、例えば、希釈剤、賦形剤等としてペプチド医薬において一般的に使用される担体が好ましい。かかる担体としては、外来物質導入用構築物の用途や形態に応じて適宜異なり得るが、典型的には、水、生理学的緩衝液、種々の有機溶媒が挙げられる。また、かかる担体は、適当な濃度のアルコール（エタノール等）水溶液、グリセロール、オリーブ油のような不乾性油であり得、或いはリポソームであってもよい。また、医薬用組成物に含有させ得る副次的成分としては、種々の充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、表面活性剤、色素、香料等が挙げられる。

[0039] 組成物の形態は、特に限定されない。例えば、液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル、泡沫剤、顆粒剤、粉末剤、錠剤、カプセル、軟膏などの形態が挙げられる。また、注射等に用いるため、使用直前に生理食塩水または適当な緩衝液（例えばPBS）等に溶解して薬液を調製するための凍結乾燥物、造粒物とすることもできる。

構築物（主成分）および種々の担体（副成分）を材料にして種々の形態の薬剤（組成物）を調製するプロセス自体は従来公知の方法に準じればよく、かかる製剤方法自体は本技術を特徴付けるものでもないため詳細な説明は省略する。処方に関する詳細な情報源として、例えばComprehensive Medicinal Chemistry, Corwin Hansch監修, Pergamon Press刊(1990)が挙げられる。

[0040] 本開示により、ここで開示される構築物を用いて、生体内（インビボ）、または、生体外（インビトロ）において外来物質を導入する方法が提供される。当該方法では、おおまかにいって、以下の（１）～（２）の工程：

（１）配列番号１に示されるアミノ酸配列から成るキャリアペプチドフラグメントと、該キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び／又はC末端側に結合した目的とする外来物質と、を有する外来物質導入用構築物を用意す

る工程と、

(2) 上記構築物を、目的とする真核細胞を含む試料中に供給する工程とを包含する。また、ここで開示される方法では、さらに、上記(2)の工程の後、(3)の工程として、上記構築物が供給された試料をインキュベートして、該試料中の真核細胞内にかかる構築物を導入する工程を含み得る。

[0041] 上記「真核細胞」は、インビボにおいては、例えば種々の組織、臓器、器官、血液、およびリンパ液等を包含する。上記「真核細胞」は、インビトロにおいては、例えば生体から摘出された種々の細胞塊、組織、臓器、器官、血液、およびリンパ液ならびに、セルライン等を包含する。

[0042] ここで開示される構築物を含む組成物は、インビボにおいて、その形態および目的に応じた方法や用量で使用することができる。例えば、液剤として、静脈内、筋肉内、皮下、皮内若しくは腹腔内への注射によって患者（即ち生体）の患部（例えば悪性腫瘍組織、ウイルス感染組織、炎症組織等）に所望する量だけ投与することができる。あるいは、錠剤等の固体形態のものや軟膏等のゲル状若しくは水性ゼリー状のものを、直接所定の組織（即ち、例えば腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、炎症細胞等を含む組織や器官等の患部）に投与することができる。あるいは、錠剤等の固体形態のものは経口投与することができる。経口投与の場合は、消化管内での消化酵素分解を抑止すべくカプセル化や保護（コーティング）材の適用が好ましい。

[0043] あるいは、生体外（インビトロ）において培養している真核細胞に対し、構築物の適当量を、少なくとも1回、目的とする真核細胞の培養液に供給するとよい。1回当たりの供給量および供給回数は、培養する真核細胞の種類、細胞密度（培養開始時の細胞密度）、継代数、培養条件、培地の種類、等の条件によって異なり得るため特に限定されない。例えば、培養液中のキャリアペプチドフラグメント濃度が概ね0.05  $\mu\text{M}$ 以上100  $\mu\text{M}$ 以下の範囲内、例えば0.5  $\mu\text{M}$ 以上50  $\mu\text{M}$ 以下の範囲内、また例えば1  $\mu\text{M}$ 以上20  $\mu\text{M}$ 以下の範囲内となるように1回、2回またはそれ以上の複数回添加することが好ましい。また、構築物添加後のインキュベート時間についても



、真核細胞の種類及び各種条件により異なり得るため特に限定されない。例えば、0.5時間以上、1時間以上、4時間以上、8時間以上、20時間以上であり得る。なお、インキュベートの条件についても、真核細胞の種類により異なり得るため、特に限定されるものではないが、例えば、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃下でインキュベートすることができる。

なお、インビトロにおける導入方法について、一例を後述の試験例において示している。

[0044] 構築物の導入効率を評価する方法は、特に限定されない。例えば、該構築物に色素（典型的には蛍光色素化合物）が結合している場合には、顕微鏡観察（例えば蛍光顕微鏡観察）やフローサイトメトリー等を使用して、真核細胞への導入効率を評価することができる。また、上記構築物のペプチド部分を特異的に認識する抗体を用いた免疫化学的手法（例えばウエスタンブロットや免疫細胞染色等）によっても上記構築物の導入効率を評価し得る。

[0045] 以上の通り、ここで開示される技術の具体的な態様として、以下の各項に記載のものが挙げられる。

項1：

以下のアミノ酸配列：

RKKRNSKRLTRKK

から成る、キャリアペプチドフラグメント。

項2：上記アミノ酸配列のアルギニン残基としてD-アルギニン残基を含む、項1に記載のキャリアペプチドフラグメント。

項3：上記アミノ酸配列のリジン残基としてD-リジン残基を含む、項1または2に記載のキャリアペプチドフラグメント。

項4：

項1～3のいずれか一項に記載のキャリアペプチドフラグメントと、

上記キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び／又はC末端側に結合した上記目的の外来物質と、

を有する構築物。

項5：上記外来物質が、ポリペプチド、核酸、色素および薬剤から成る群から選択される少なくとも1種の有機化合物である、項4に記載の構築物。

項6：上記外来物質が、上記キャリアペプチドフラグメントのC末端側に配置されている、項4または5に記載の構築物。

項7：真核細胞の外部から少なくとも該細胞の細胞質内に目的とする外来物質をインビトロにおいて導入する方法であって、

(1) 項1～3のいずれか一項に記載のキャリアペプチドフラグメントと、  
上記キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び／又はC末端側に結合した上記目的の外来物質と、

を有する外来物質導入用構築物を用意する工程と、

(2) 上記構築物を、目的とする真核細胞を含む試料中に供給する工程と、  
を包含する方法。

項8：上記外来物質が、ポリペプチド、核酸、色素および薬剤から成る群から選択される少なくとも1種の有機化合物である、項7に記載の方法。

項9：上記外来物質が、上記キャリアペプチドフラグメントのC末端側に配置されている、項7または8に記載の方法。

項10：上記外来物質導入用構築物を導入する対象の真核細胞がヒトまたはヒト以外の哺乳動物の細胞である、項7～9のいずれか一項に記載の方法。

[0046] 以下、ここで開示される技術に関するいくつかの試験例を説明するが、ここで開示される技術をかかると試験例に示すものに限定することを意図したものではない。

[0047] <外来物質導入用構築物の作製>

表1に示すアミノ酸配列で構成された合成ペプチドを有する構築物を用意した。ペプチド1を有する構築物をサンプル1、ペプチド2を有する構築物をサンプル2、および、ペプチド3を有する構築物をサンプル3とする。サンプル1～3は、いずれもユーロフィンジェノミクス株式会社に合成を依頼して準備した。ペプチド1は、全てL体のアミノ酸残基で構成されている。ペプチド2は、アルギニン残基がD体で構成されており、その他のアミノ酸

残基はL体である（配列番号2）。なお、配列中の「r」はD-アルギニン残基を示している。ペプチド3は、リジン残基がD体で構成されており、その他のアミノ酸残基はL体である（配列番号3）。なお、配列中の「k」はD-リジン残基を示している。

[0048] なお、構築物1～3において、ペプチド1～3のN末端側のアミノ酸残基の $\alpha$ -アミノ基はいずれもアセチル化されたものを準備した。また、ペプチド1～3のC末端側のアミノ酸残基に、外来物質として蛍光色素であるFAM ( $C_{21}H_{12}O_7 : 5(6)$ -Carboxyfluorescein、分子量376.3、励起波長495nm、蛍光波長520nm)を結合したものを準備した。そして、サンプル1～3をそれぞれジメチルスルホキシド(DMSO)で希釈し、サンプル濃度が2mMのサンプル溶液1～3をそれぞれ調製した。

[0049] [表1]

表1

ペプチドNo.	配列
1	RKKRNSKRLTRKK
2	rKKrNSKrLTrKK
3	RkkRNSkRLTRkk

[0050] <フローサイトメトリーによる細胞膜透過性評価>

真核細胞としてNSC-34細胞(mouse motor neuron-like hybrid cell line)を使用し、構築物1～3の細胞膜透過性を解析した。例1～3では、上記調製したサンプル1～3をそれぞれ用い、例4では、FAM溶液を用いた。

[0051] (例1)

NSC-34細胞を一般的な培養培地である10%FBS(fetal bovine serum)含有DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium(富士フィルム和光純薬株式会社製、Cat No. 044-29765))で培養した。

培養プレートに接着したNSC-34細胞をPBSで洗浄後、0.25%トリプシン/EDTA溶液を添加し、37℃中で3分間インキュベートを行った。該インキュベート後、上記10%FBS含有DMEMを加え、トリプシンを不活性化させた後、 $150 \times g$ で5分間の遠心分離を行い細胞を沈殿

させた。遠心分離によって生じた上清を取り除いた後、沈殿（細胞ペレット）に上記10% FBS含有DMEMを加え、凡そ $2 \times 10^5$  cells/mLの細胞懸濁液を調製した。該細胞懸濁液を市販の6穴（ウェル）プレート（AGCテクノグラス株式会社製）のウェルに1 mL加え、細胞を播種した（凡そ $2 \times 10^5$  cells/ウェル）。また、上記2 mMサンプル溶液1を上記10% FBS含有DMEMで希釈し、サンプル1の濃度が $20 \mu\text{M}$ のサンプル溶液1を準備した。そして、該ウェルに上記 $20 \mu\text{M}$ サンプル溶液1を1 mL添加した（即ち、ウェル中の培養液のサンプル1の濃度が $10 \mu\text{M}$ 、DMSO濃度が0.5%となるようにした）。その後、細胞を5% CO<sub>2</sub>条件下で、37°Cで20時間インキュベートを行った。

[0052] 20時間のインキュベート後、ウェルから培養上清を取り除き、1 mLのPBSでウェル中の細胞を2回洗浄した。次に、ウェルに200  $\mu\text{L}$ の0.25%トリプシン/EDTA溶液を添加し、37°C中で3分間インキュベートを行った。該インキュベート後、ウェルに400  $\mu\text{L}$ の上記10% FBS含有DMEMを添加することでトリプシンを不活性化した後、ウェル中の細胞懸濁液をチューブに移し、細胞を回収した。その後、さらにウェルに600  $\mu\text{L}$ のPBSを添加し、ウェルを洗浄した。そして、ウェル中のPBSを上記チューブへと移すことにより、ウェル中に残った細胞を上記チューブへと回収した。このチューブを4°C、 $210 \times g$ の条件で5分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を取り除き、沈殿（細胞ペレット）を1 mLのPBSで懸濁（洗浄）し、上記と同じ条件で遠心分離を行った。この操作を2回繰り返した後、上清を取り除き、サンプル1含有培地で培養した細胞（細胞ペレット）を得た。

[0053] 上記得られた細胞（細胞ペレット）について、フローサイトメータを用いてサンプル1の細胞膜透過性の解析を行った。フローサイトメータとして、On-Chip Flowcytometer（株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ(On-Chip Biotechnologies Co., LTD.)製）を使用した。

かかる解析のために、上記得られた細胞ペレットを100  $\mu\text{L}$ のOn-C

hip T bufferで懸濁し、解析用の細胞懸濁液を用意した。

[0054] 上記のフローサイトメータを用いて前方散乱 (forward scatter: FSC) および側方散乱 (side scatter: SSC) に基づくゲーティングを行い、解析対象とする細胞集団についてのゲートを設定し、かかるゲート内の細胞集団について、蛍光強度を測定した。なお、該細胞集団の細胞数が少なくとも10000個となるように解析を行った。蛍光強度の測定には、FAMの蛍光波長を検出可能な上記フローサイトメータの蛍光検出器FL2 (最適検出波長543nm付近) を使用した。かかる測定結果について、市販の解析ソフト「FlowJo (登録商標) (TreeStar社製) を用いて解析を行い、測定対象細胞集団の蛍光強度の中央値 (median fluorescence intensity: MFI) を得た。

[0055] (例2)

サンプル溶液1を上記調製したサンプル溶液2とした以外は例1と同様に実施した。

(例3)

サンプル溶液1を上記調製したサンプル溶液3とした以外は例1と同様に実施した。

(例4)

サンプル溶液1をDMSOで希釈したFAM溶液とした以外は例1と同様に実施した。なお、かかるFAM溶液の濃度はサンプル1溶液の濃度 (即ち、ウェル中の培養液のFAM濃度が10 $\mu$ M、DMSO濃度が0.5%) と同じになるように用いた。

[0056] 例1~4について得られた結果を表2および図1に示す。図1は、各例におけるMFIの値を示すグラフである。

[0057]

[表2]

表2

	構築物(添加物)の構成	MFI
例1	Ac-RKKRNSKRLTRKK-FAM	14.6
例2	Ac-rKKrNSKrLTrKK-FAM	37.7
例3	Ac-RkkRNSkRLTRkk-FAM	27.3
例4	FAM	8.15

[0058] 表2および図1に示すように、例1～3は、例4よりもMFIの値が顕著に高かった。即ち、外来物質であるFAMにペプチド1～3のうち少なくとも1つが結合していることで、構築物に細胞膜透過性が付与され、細胞内により多くのFAMが導入されたことがわかる。この中でも、配列番号1に示すアミノ酸配列から成る合成ペプチドのアルギニン残基としてD-アルギニン残基を含む場合に高い細胞膜透過性が実現されることがわかる。また、配列番号1に示すアミノ酸配列から成る合成ペプチドのリジン残基としてD-リジン残基を含む場合に、高い細胞膜透過性が実現されることがわかる。

なお、詳細なデータは示していないが、本発明者の検討によって、ペプチド1～3を有する構築物は、外来物質が蛍光色素のみならず、ポリペプチド、核酸、および薬剤のいずれであっても、かかる外来物質は、効率よく細胞の外部から細胞質内に導入されることが確認された。

[0059] 以上、ここで開示される技術の具体例を詳細に説明したが、これらは例示にすぎず、請求の範囲を限定するものではない。請求の範囲に記載の技術には、以上に例示した具体例を様々に変形、変更したものが含まれる。

[0060] ここで開示される技術によると、真核細胞（特に細胞壁を有しないヒトやそれ以外の哺乳動物に代表される種々の動物細胞）の外部から細胞質内に目的とする外来物質を導入するために人為的に作製されたキャリアペプチドフラグメント及び該キャリアペプチドフラグメントを有する構築物が提供される。かかる構築物を利用することにより、目的の細胞に目的の外来物質を効果的に導入させ、該外来物質が導入された細胞並びに該外来物質を含む細胞を含む器官等の生体組織を得ることができる。また、かかる構築物を利用することにより、疾患に対する治療薬を提供することができ得る。

## 請求の範囲

- [請求項1] 以下のアミノ酸配列：  
R K K R N S K R L T R K K  
から成る、キャリアペプチドフラグメント。
- [請求項2] 前記アミノ酸配列のアルギニン残基としてD-アルギニン残基を含む、請求項1に記載のキャリアペプチドフラグメント。
- [請求項3] 前記アミノ酸配列のリジン残基としてD-リジン残基を含む、請求項1に記載のキャリアペプチドフラグメント。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載のキャリアペプチドフラグメントと、  
前記キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び／又はC末端側に結合した外来物質と、  
を有する構築物。
- [請求項5] 前記外来物質が、ポリペプチド、核酸、色素および薬剤から成る群から選択される少なくとも1種の有機化合物である、請求項4に記載の構築物。
- [請求項6] 前記外来物質が、前記キャリアペプチドフラグメントのC末端側に配置されている、請求項4に記載の構築物。
- [請求項7] 真核細胞の外部から少なくとも該細胞の細胞質内に目的とする外来物質をインピトロにおいて導入する方法であって、  
(1) 請求項1～3のいずれか一項に記載のキャリアペプチドフラグメントと、  
前記キャリアペプチドフラグメントのN末端側及び／又はC末端側に結合した前記目的の外来物質と、  
を有する構築物を用意する工程と、  
(2) 前記構築物を、目的とする真核細胞を含む試料中に供給する工程と、  
を包含する方法。

- [請求項8] 前記外来物質が、ポリペプチド、核酸、色素および薬剤から成る群から選択される少なくとも1種の有機化合物である、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記外来物質が、前記キャリアペプチドフラグメントのC末端側に配置されている、請求項7に記載の方法。
- [請求項10] 前記構築物を導入する対象の真核細胞がヒトまたはヒト以外の哺乳動物の細胞である、請求項7に記載の方法。



[図1]

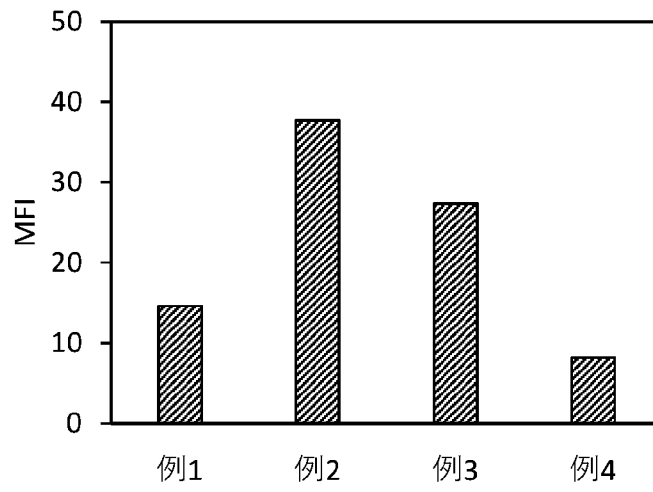


FIG.1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/021642

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><i>C07K 7/08</i>(2006.01)i; <i>C07K 19/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/85</i>(2006.01)i; <i>C12P 21/02</i>(2006.01)i  FI: C07K7/08; C07K19/00; C12P21/02 C; C12N15/85 Z ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K7/08; C07K19/00; C12N15/85; C12P21/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2022-47613 A (TOAGOSEI CO LTD) 25 March 2022 (2022-03-25) claims, paragraphs [0042]-[0054]	1-10
Y	JP 2011-529079 A (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 01 December 2011 (2011-12-01) claims 1-10, paragraph [0068]	1-10
Y	JP 2003-511071 A (UNIVERSITY OF LAUSANNE) 25 March 2003 (2003-03-25) claims, paragraphs [0012], [0022]-[0023]	1-10
Y	WO 2020/214846 A1 (AADIGEN, LLC) 22 October 2020 (2020-10-22) claims 37-39, paragraph [0033]	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>09 August 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>05 September 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**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:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/021642**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2022-47613	A	25 March 2022	US	2022/0089641	A1	
				claims, paragraphs [0082]-[0099]			
				EP	3971216	A1	
				CN	114181282	A	
JP	2011-529079	A	01 December 2011	WO	2010/011890	A2	
				claims 1-10, paragraph [0074]			
				US	2011/0076342	A1	
				EP	2328602	A1	
JP	2003-511071	A	25 March 2003	WO	2001/027268	A2	
				claims, p. 4, lines 2-5, p. 6, lines 14-25, p. 7, lines 1-8			
				US	2002/0127676	A1	
				EP	1303600	A2	
WO	2020/214846	A1	22 October 2020	JP	2022-529784	A	
				claims 37-39, paragraph [0033]			
				US	2022/0313825	A1	
				EP	3955967	A1	
				CN	114007654	A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  C07K 7/08(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i                  FI: C07K7/08; C07K19/00; C12P21/02 C; C12N15/85 Z ZNA</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  C07K7/08; C07K19/00; C12N15/85; C12P21/02</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年									
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
Y	JP 2022-47613 A (東亜合成株式会社) 25.03.2022 (2022 - 03 - 25) 特許請求の範囲、[0042]-[0054]	1-10								
Y	JP 2011-529079 A (インディアナ ユニバーシティ- リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション) 01.12.2011 (2011 - 12 - 01) 請求項1-10、[0068]	1-10								
Y	JP 2003-511071 A (ユニバーシティ オブ ローザンヌ) 25.03.2003 (2003 - 03 - 25) 特許請求の範囲、[0012]、[0022]-[0023]	1-10								
Y	WO 2020/214846 A1 (AADIGEN, LLC) 22.10.2020 (2020 - 10 - 22) Claims 37-39, [0033]	1-10								
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>										
国際調査を完了した日	09.08.2023	国際調査報告の発送日 05.09.2023								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  吉門 沙央里 4B 5081  電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式  
     紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))  
     紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2023/021642

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2022-47613	A	25.03.2022	US	2022/0089641	A1	
				Claims, [0082]-[0099]			
				EP	3971216	A1	
				CN	114181282	A	
JP	2011-529079	A	01.12.2011	WO	2010/011890	A2	
				Claims 1-10, [0074]			
				US	2011/0076342	A1	
				EP	2328602	A1	
JP	2003-511071	A	25.03.2003	WO	2001/027268	A2	
				Claims, p.4 lines 2-5, p.6 lines 14-25, p.7 lines 1-8			
				US	2002/0127676	A1	
				EP	1303600	A2	
WO	2020/214846	A1	22.10.2020	JP	2022-529784	A	
				請求項 3 7 - 3 9、[0 0 3 3]			
				US	2022/0313825	A1	
				EP	3955967	A1	
				CN	114007654	A	