

(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5月25日(25.05.2023)

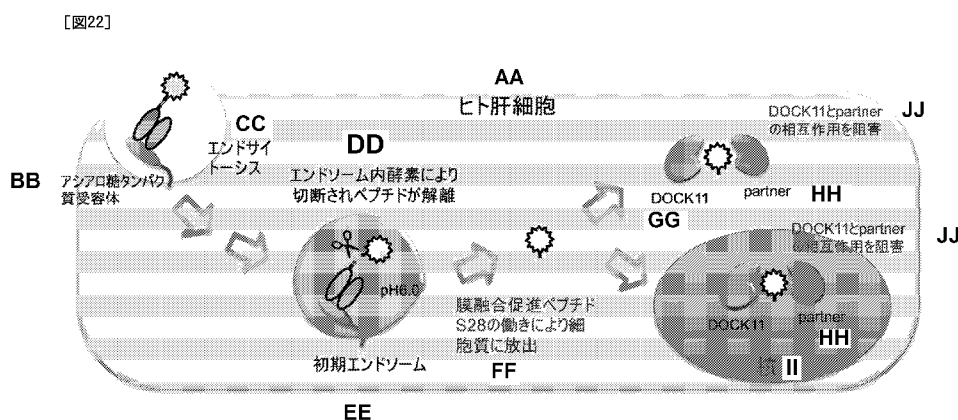


(10) 国際公開番号
WO 2023/090381 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/042642
- (22) 国際出願日: 2022年11月17日(17.11.2022)
- (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 2021-187544 2021年11月18日(18.11.2021) JP
- (71) 出願人: ピューロテックバイオ株式会社
(PUROTECH BIO, INC.) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-1-27 株式会社池田理化鶴見支店内 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 柳川 弘志 (YANAGAWA, Hiroshi); 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-1-27 株式会社池田理化鶴見支店内ピューロテックバイオ株式会社内 Kanagawa (JP). 田島 典子 (TABATA, Noriko); 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-1-27 株式会社池田理化鶴見支店内ピューロテックバイオ株式会社内 Kanagawa (JP). 井手 真由子 (IDE, Mayuko); 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-1-27 株式会社池田理化鶴見支店内ピューロテックバイオ株式会

(54) Title: ANTI-HEPATITIS B VIRUS AGENT TARGETING HOST FACTOR DOCK11

(54) 発明の名称: 宿主因子DOCK11をターゲットとした抗B型肝炎ウイルス剤



- AA Human liver cell
BB Asialoglycoprotein receptor
CC Endocytosis
DD Cleaved by an intralysosomal enzyme and peptide is separated
EE Early endosome
FF Released into cytoplasm by the action of membrane fusion-promoting peptide S28
GG DOCK11
HH partner
II Nucleus
JJ Blocking the interaction between DOCK11 and partner

(57) Abstract: Disclosed is a new anti-HBV agent targeting host factor DOCK11. This anti-HBV agent contains, as an active ingredient, a substance which binds to DOCK11 and inhibits the function of DOCK11. In one embodiment, the anti-HBV according to the present invention contains, as an active ingredient, a DOCK11-binding peptide constituted by a specific amino acid sequence. The DOCK11-binding peptide may be a carrier molecule (for example, antibody, antibody fragment, or single-chain antibody binding to asialoglycoprotein receptor) for delivery into cells, a cell membrane

WO 2023/090381 A1

社内 Kanagawa (JP). 米村 裕子(YONEMURA, Yuko); 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-1-27 株式会社池田理化鶴見支店内ピューロテックバイオ株式会社内 Kanagawa (JP). 伊藤 哲(ITO, Satoru); 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-1-27 株式会社池田理化鶴見支店内ピューロテックバイオ株式会社内 Kanagawa (JP). 金子 周一(KANEKO, Shuichi); 〒9201164 石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内 Ishikawa (JP). 本多 政夫(HONDA, Masao); 〒9201164 石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内 Ishikawa (JP). 村居 和寿(MURAI, Kazuhisa); 〒9201164 石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内 Ishikawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号山京別館801 Tokyo (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, 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, 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, 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))

permeation-promoting molecule, or in a form connected to a nuclear localization signal.

(57) 要約: 宿主因子DOCK11をターゲットとした新規な抗HBV薬が開示されている。本発明の抗HBV剤は、DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する物質を有効成分として含む。1つの態様において、本発明の抗HBV剤は、特定のアミノ酸配列で構成されるDOCK11結合ペプチドを有効成分とする。DOCK11結合ペ

プチドは、細胞内への送達のための担体分子（例えば、アシアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体、抗体断片又は一本鎖抗体）や、細胞膜透過促進分子、核移行シグナルと連結した形態であってよい。

明 細 書

発明の名称：

宿主因子DOCK11をターゲットとした抗B型肝炎ウイルス剤

技術分野

[0001] 本発明は、宿主因子であるDOCK11をターゲットとした抗B型肝炎ウイルス剤に関する。また、本発明は、肝細胞内への薬物の送達用担体として優れたアシアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体、抗体断片又は一本鎖抗体に関する。

背景技術

[0002] 慢性肝疾患の主な原因であるB型肝炎ウイルス（HBV）の慢性キャリアは、世界で3億5000万人と推定されている。毎年、78万人以上の人々が、肝硬変や肝がんなどのB型肝炎感染の合併症により亡くなっている（非特許文献1）。HBVキャリアは、非感染者に比べて肝臓がんを発症する可能性が非常に高いと言われている。HBVは、不完全二重鎖DNA（relaxed-circular DNA；rcDNA）として核内に存在している。HBVが肝細胞に感染すると、rcDNAは、核内で共有結合で閉じた環状DNA（cccDNA）に変換される（非特許文献2）。HBVがrcDNAからcccDNAを合成する際には宿主のDNA修復機構、特にATRシグナル伝達経路を利用することが知られている（非特許文献3）。HBVは、細胞内では、安定的に不活性化されたcccDNAとして潜伏状態を維持することができる。しかし、化学療法や造血幹細胞移植によって免疫系が障害されると、HBVの再活性化が引き起こされる。さらに、宿主の免疫系とウイルスの間の相互作用は、進行した肝細胞癌（HCC）の発症に影響を与える。ウイルスのレプリカを減らすことに成功した治療は、進行した肝疾患や肝細胞癌の発生を遅らせることができる。しかし、潜伏しているHBVを排除するためには、cccDNAを標的とすることが必要である。

[0003] HBVに感染した肝細胞からHCC細胞に形質転換された細胞は、細胞内に減少した量のHBVのタンパク質とmRNAを発現している。宿主ゲノムに組み込まれた

HBV DNAを含む細胞を除いて、HCCから樹立された細胞株は通常、HBV転写産物を発現しない。HBVの転写産物を発現し続ける細胞株は、HBVの維持に必要な宿主遺伝子の同定に非常に有用である。そこで、橋本らは、HBV感染が非常に少ない割合（3000個に1個程度）で維持されるHC1細胞株を樹立し、シングルセルトランスクリプトーム解析（Nx1-Seq）を行うことで、HBV感染細胞で高発現するLIPG、DOCK11、DENND2A、HECW2の4つの宿主遺伝子を同定した（非特許文献4）。そのうちのひとつであるDOCK11(dedicator of cytokinesis 11、NCBI Gene ID: 139818)は、Zizimin2とも呼ばれ、DOCK-Dサブファミリーのメンバーで、分子サイズは大きい（～240 kDa）。細胞はアクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格を使ってその形態を変化させたり維持したりしている。細胞骨格は外界からの刺激によって引き起こされる細胞内のシグナル伝達によって厳密にコントロールされており、そのシグナル伝達に重要な役割を担っているのがRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質(Gタンパク質)である。RhoファミリーGタンパク質は、GTPが結合することにより活性状態になり、GDPが結合することにより不活性状態になることで、細胞内シグナル伝達の分子スイッチとして働いている。また、RhoファミリーGタンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor、GEF)の働きによってGDP-GTP交換反応が引き起こされ活性化される。RhoファミリーGタンパク質を活性化するGEFは、Dblホモロジドメイン(DHドメイン)を共通にもつグループと、DOCKファミリーと呼ばれる独自の活性化領域をもつグループの二つに大きく分類される（非特許文献5）。両グループを含めて哺乳類ではこれまでに約80種類のGEFが報告されている。1996年にDOCK 180が最初に報告されて以来、現在では11種類のDOCKファミリータンパク質が哺乳類で確認されており、その構造の類似性から大きく4つのグループ、DOCK-A、DOCK-B、DOCK-C、DOCK-Dに分けられる（非特許文献6）。DOCK11はDOCK-Dファミリーに属する。DOCKファミリータンパク質にはファミリー間でアミノ酸配列がよく保存されている二つの領域、Dock homology region 1(DHR1)とDHR2が存在し、このうちDHR2を介してそれぞれ特異的なRhoファミリーGタンパク質を

活性化することが知られている(非特許文献6)。DOCK11はG蛋白であるCDC42と会合し、細胞骨格及び物質輸送に係る分子である。

[0004] また、DOCK11は、HBV遺伝子を宿主細胞内で維持するために機能している分子の1つとしても報告されている(特許文献1)。特許文献1には、siRNA、及びレンチshRNAによってDOCK11の発現を抑制することにより、HBVの複製が低下することが開示されている。しかしながら、HBV感染患者に適用し得るDOCK11阻害剤は未だ開発されていない。

[0005] 医薬分野において、薬物を標的部位に効率よく送達するためのドラッグデリバリーシステム(DDS)が従来より種々検討、開発されており、肝細胞内に送達すべき薬物の場合には、肝実質細胞に豊富に存在するアジア糖タンパク質受容体やApoE受容体に着目したDDSが知られている(非特許文献7)。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1: WO 2017/082202 A1

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Lozano, R. et al., Lancet, 380:2095-2128, 2012

非特許文献2: Yang, H.C., Kao, J.H., Emerg. Microbes Infect. 3:e64, 2014

非特許文献3: Luo, J. et al. mBio, 11, e03423-19, 2020

非特許文献4: Hashimoto, S. et al., PLoS One, 16:e0246313, 2021

非特許文献5: Schmidt, A., Hall, A., Genes Dev., 16:1587-1609, 2002

非特許文献6: Cote, J.F., Vuori, K., J. Cell Sci., 15:4901-4913, 2002

非特許文献7: 伊藤 裕子、STI Horizon, 2019, Vol.5, No.4, pp.21-25

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本願発明は、DOCK11をターゲットとした新規な抗HBV薬を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本願発明者らは、鋭意検討の結果、DOCK11への結合活性が強いペプチドを同定し、それらのペプチドが宿主細胞内のHBV DNA、cccDNAを低減する活性を有することを明らかにした。また、DOCK11結合ペプチドの肝細胞選択的送達法を確立するため、肝細胞表面に存在するアジアロ糖タンパク質受容体 (ASGR) に結合する一本鎖抗体を鋭意作製し、ASGRを強く認識できる一本鎖抗体の確立に成功した。さらに、確立した抗ASGR結合一本鎖抗体を利用し、DOCK11結合ペプチドに細胞膜透過を促進するペプチドや核移行シグナル等を付加したコンストラクトを作製し、PXBマウス由来のPXB細胞及びPXBマウス体内で抗HBV活性を発揮できることを確認した。さらに、DOCK11結合ペプチドが、DOCK11とAck1の結合の阻害によるAck1活性化の阻害、DOCK11のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 活性の阻害、DOCK11によるATRシグナル伝達経路の活性化の阻害などの作用を有し、これらの作用により、rcDNAからcccDNAへの修復過程を阻害するとともに、EGFRのエンドサイトーシスの阻害等によるHBV粒子の細胞内への再侵入を阻害し、抗HBV効果を発揮することを見いだした。以上の鋭意研究の結果から、本願発明を完成した。
- [0010] すなわち、本発明は、DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する物質を有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤 (抗HBV剤) を提供する。
- [0011] 1つの態様において、有効成分とする物質は、DOCK11の第1516番～第2073番残基の領域に結合する。
- [0012] 1つの態様において、DOCK11の機能の阻害は、DOCK11とAck1の結合の阻害によるAck1活性化の阻害、DOCK11のグアニンヌクレオチド交換因子活性の阻害、及びDOCK11によるATRシグナル伝達経路の活性化の阻害から選択される少なくとも1種である。
- [0013] 1つの態様において、有効成分とする物質は、下記(1)～(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドである。
- (1) IITPGTEVLNSDLQAS (配列番号1) の配列のポリペプチド。
 - (2) HNVLSVYNPAWGKYFH (配列番号2) の配列のポリペプチド。

- (3) NFPPNPMHNTDSCICA (配列番号3) の配列のポリペプチド。
- (4) TEKRRLMKPVLLTYNP (配列番号4) の配列のポリペプチド。
- (5) IICPGAEVLNGDLVAS (配列番号5) の配列のポリペプチド。
- (6) TEYRRCVTPVLLTYNN (配列番号6) の配列のポリペプチド。
- (7) TEEHRGLLPVLMYTNV (配列番号7) の配列のポリペプチド。
- (8) TEFRCRWTWPVLCTYNA (配列番号8) の配列のポリペプチド。
- (9) TEQARPTPPPVLDTYNL (配列番号9) の配列のポリペプチド。
- (10) PEQARPPPPLEDNLFL (配列番号10) の配列のポリペプチド。
- (11) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の配列のポリペプチド。
- (12) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の配列のポリペプチド。
- (13) PEQARPPPPLEDNLFL (配列番号10) の領域を含むAck1の部分ポリペプチド。
- (14) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の領域を含むラディキシンの部分ポリペプチド。
- (15) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の領域を含む β -セントラクチンの部分ポリペプチド。
- (16) (1)~(15)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。

[0014] 1つの態様において、該ポリペプチドは、肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態にある。担体分子は、例えば、アジアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体、抗体断片又は一本鎖抗体であり得る。

[0015] 1つの態様において、該ポリペプチドは、細胞膜透過促進分子と連結した形態にある。細胞膜透過促進分子は、例えば、配列番号38又は39に示すアミノ酸配列のポリペプチドであり得る。

[0016] 1つの態様において、該ポリペプチドは、核移行シグナルと連結した形態にある。

[0017] また、本発明は、上記(1)~(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドの、DOCK11結合ペプチドとしての使用、及び、上記(1)~

(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドからなる、DOCK11結合ペプチドを提供する。

[0018] また、本発明は、

配列番号13、19、25若しくは31に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1と、

配列番号14、20、26若しくは32に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2と、

配列番号15、21、27若しくは33に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3と、

配列番号16、22、28若しくは34に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1と、

配列番号17、23、29若しくは35に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2と、

配列番号18、24、30若しくは36に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3と

を有する、アシアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体、抗体断片又は一本鎖抗体を提供する。

[0019] さらに、本発明は、上記本発明の抗体、抗体断片又は一本鎖抗体を含む、肝細胞内に薬物を送達するための薬物送達用担体を提供する。

[0020] さらに、本発明は、上記本発明の薬物送達用担体と肝細胞内に送達すべき薬物との複合体を含む、医薬組成物を提供する。

発明の効果

[0021] 本発明により、DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する作用を有する抗HBV剤が初めて提供される。本発明の抗HBV剤によれば、細胞内のHBV DNA及びcccDNAを低減するとともに、HBV粒子の細胞内への再侵入も阻害できるので、B型肝炎の根治も期待される。また、本発明が提供する特定のCDR配列ないしはその改変配列を有する抗ASGR抗体、抗体断片又は一本鎖抗体は、肝細胞内への薬物の送達用担体として非常に優れており、抗HBV剤のみならず、肝臓内で作用させるべき様々な薬物の送達用担体として有用である。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]IVVスクリーニングのためのDNAライブラリーのデザイン。

[図2]ヒトDOCK180 superfamilyの構造。

[図3]ビオチン化全長DOCK11の構築手順の説明図。

[図4]IVV法によるDOCK11と結合するペプチドの選択実験の説明図。

[図5]DOCK11結合ペプチドによるDHR2領域を含むC末端DOCK11に対するプルダウンアッセイ（1）

[図6]DOCK11結合ペプチドによるDHR2領域を含むC末端DOCK11に対するプルダウンアッセイ（2）

[図7]HepG2-NTCP-C4細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性（1）

[図8]HepG2-NTCP-C4細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性（2）

[図9]HepG2-NTCP-C4細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性（長期投与）。Day 1:10 cm Dishに細胞を播種。Day 2:HBVを感染（12時間後にmedium change）。Day 17:12 well plateにHBV感染細胞を播種。Day 18:Peptideを発現するPlasmidをトランスフェクション（Lipofectamine 3000で1 μ g）。Day 20:HBV-DNA, cccDNAを測定。

[図10]HepG2-NTCP-C4細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性（短期投与）。Day 1:12 well plateに細胞を播種。Day 2:Peptideを発現するPlasmidをトランスフェクション（Lipofectamine 3000で1 μ g）。Day 3:HBVを感染（12時間後にmedium change）。Day 5:HBV-DNAとcccDNAを測定。

[図11]HepG2-NTCP-C4細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性（長期投

与)。A:HBVの感染とサンプル投与のスケジュール。B:(左図)HBV-DNAのコピー数の定量図、(右図)HBV-cccDNAのコピー数の定量図。

[図12]ビオチン化アシアロ糖タンパク質受容体のデザイン。

[図13]ASGR1とASGR2のそれぞれの細胞外ドメインのクローニング配列。

[図14]ビオチン化アシアロ糖タンパク質受容体のコンストラクト。

[図15]抗体の構造。(左)IgG抗体の基本構造。S-S結合により結合した2本のH鎖と2本のL鎖から構成され、抗原結合部位である可変領域(VH、VL)と、それ以外の定常領域(CH、CL)にわかれている。定常領域のFc領域は、Fcレセプター結合部位である。(右)可変領域に存在する相補性決定領域(Complementarity determining region: CDR)。それ以外の領域はフレームワーク領域である。

[図16]一本鎖抗体(scFv)の構造。VH鎖のC末端とVL鎖のN末端がペプチドリンカーを介して結合している。

[図17]マウス一本鎖抗体のcDNAライブラリーの作成のスキーム。

[図18]ヒト一本鎖抗体のcDNAライブラリーの作成のスキーム。

[図19]IVV法によるASGRと結合する一本鎖抗体の選択実験の説明図。

[図20]ASGR結合一本鎖抗体によるプルダウンアッセイ(1)

[図21]ASGR結合一本鎖抗体によるプルダウンアッセイ(2)

[図22]DOCK11結合ペプチドとアシアロ糖タンパク質受容体との融合体の細胞内での機構。

[図23]DOCK11結合ペプチドとアシアロ糖タンパク質受容体との融合体のデザイン。A:DOCK11結合ペプチドの有無による機能の検証に使用した融合体。B:膜融合促進ペプチドの機能の検証に使用した融合体。C:核移行シグナルの機能の検証に使用した融合体。D:PXB細胞を使って抗HBV効果を調べる、あるいはキメラマウスを用いたin vivoでの評価に使用した融合体。

[図24]DOCK11結合ペプチドの有無による融合体の機能の検証。A:実験の手順。B:初期エンドソーム、ペプチド(GGP)、アクチン、核について共焦点顕微鏡で観察した。

[図25A]膜融合促進ペプチドの機能の検証。A:実験の手順。B:初期エンドソーム、ペプチド (GGP)、アクチン、核について共焦点顕微鏡で観察した。

[図25B]膜融合促進ペプチドS28とS39の機能検証:S28とS39によるペプチドの核内取り込み量の比較

[図26]核移行シグナルの機能の検証。A:実験の手順。B:ペプチド (GGP)、アクチン、核について共焦点顕微鏡で観察した。

[図27A]PXB細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性(1)。(上):アッセイのタイムスケジュール。(下左):DOCK11結合ペプチドのHBV-DNAのcopy数に対する影響。(下右):DOCK11結合ペプチドのcccDNAのcopy数に対する影響。

[図27B]PXB細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性(2)。(上):アッセイのタイムスケジュール。(下左):DOCK11結合ペプチドのHBV-DNAのcopy数に対する影響。(下右):DOCK11結合ペプチドのcccDNAのcopy数に対する影響。

[図28] (A) HEK293T細胞にHisBioFLAG-DOCK11あるいはHisBioFLAGとともにT7-Ack1-Hisを発現して24時間後、100 nM N-10M-D42TNで24時間処理し、IP Lysis bufferで可溶化した。この細胞可溶化液を用いて共免疫沈降実験を行い、検出には抗FLAGタグ抗体あるいは抗Ack1抗体を用いた。ImageLabを用いて、各条件において共免疫沈降されたAck1の量を比較した。(B) HEK293T細胞で発現させたHisBioFLAG-DOCK11およびT7-Ack1-HisをHisタグ精製し、HisBioFLAG-DOCK11をストレプトアビジンビーズに結合させた後、T7-Ack1-Hisを加え、0-100nM GST-Cdc42 WTあるいは100 nM DCS8-42TN存在下でプルダウンアッセイを行った。このビーズから、抗FLAGタグ抗体および抗T7タグ抗体を用いてWestern Blottingを行った。(C) HEK293T細胞で発現させたHisBioFLAG-DOCK11およびT7-Ack1-HisをHisタグ精製し、HisBioFLAG-DOCK11をストレプトアビジンビーズに結合させた後、T7-Ack1-Hisを加え、100nM GST-Cdc42 Q61Lあるいは100nM GST-Cdc42 T17N, 100 nM DCS8-42TN存在下でプルダウンアッセイを行った。このビーズから、抗FLAGタグ抗体および抗T7タグ抗体を用いてW

estern Blottingを行った。

[図29] ストレプトアビジンコートされた96wellプレートに、DHR2ドメインを含むDOCK1516-2073-Bio-Hisを加えて4℃で一晩固定し、0-1.0 molのDCS8-42TNを室温で1時間反応後、GEFアッセイを行った。

[図30] (A) HepG2細胞にLipofectamine 3000を用いてDOCK11 siRNA #1~3をトランスフェクションし、72時間後にリアルタイムRT-PCRを行った。GAPDH mRNA量を用いてDOCK11 mRNA量を標準化した。(B) HepG2細胞にLipofectamine 3000を用いてDOCK11あるいはAck1 siRNA #1~3をトランスフェクションした。72時間後に細胞可溶化液を調製し、抗Ack1抗体を用いてWestern Blottingを行った。(C) HepG2細胞にLipofectamine 3000を用いてDOCK11あるいはAck1 siRNA #1~3をトランスフェクションした。72時間後に細胞を固定・透過し、蛍光ファロイジンでアクチンフィラメントを染色後、DAPIを用いて核染色した。

[図31] (A) HepG2細胞を100 nM N-10M-D42TNで0-48時間処理後、洗浄し、さらに24-72時間培養した。その後、細胞を固定・透過し、蛍光ファロイジンでアクチンフィラメントを染色後、DAPIを用いて核染色した。(B) 蛍光顕微鏡LSM800を用いて細胞質におけるアクチンフィラメントの長さを測定し、N-10M-D42TNで0時間処理した細胞における平均長をコントロールとして標準化した。(C) HepG2細胞にEYFP-NLS-Actinをトランスフェクションし、48時間後100 nMのN-10M-D42TNで20時間処理した。細胞を固定・透過し、DAPIで核染色後、EYFPおよびGFPの蛍光を観察した。

[図32] (A) EGFRのエンドサイトーシスに関するN-10M-D42TN作用機序の模式図。EGF刺激によって活性化されると、EGFRはリン酸化およびユビキチン化を受ける。Ack1はDOCK11によって活性化されたCdc42と結合して活性化し、EGFRと結合してリン酸化される。その結果、EGFR-Ack1複合体はともにエンドサイトーシスされて分解されるが、N-10M-D42TNがDOCK11の機能を阻害することで、リン酸化されたEGFRは分解されず、Ack1のリン酸化およびAck1によってリン酸化されるWASPのリン酸化も阻害される。(B) Huh7細胞を100 nM N-10M-D

42TNで24時間処理後、10 ng/ml EGFで0-10分間処理し、この細胞可溶化液を用いてWestern Blottingを行った。1次抗体としてAck1, pAck1, EGFR, pEGFR(Tyr845), pEGFR(Tyr1068), pEGFR(Tyr1045), WASP, pWASP, GAPDH抗体を用いた。

[図33](A) HepG2細胞を100 nM N-10M-D42TNで24時間処理後、100 ng/ml EGFで1時間処理した。CellLight Early Endosomes-RFPを用いて初期エンドソームを染色し、抗Ack1抗体を用いて免疫染色を行い、DAPIで核染色した。白矢印でAck1が局在する初期エンドソームを、黒矢印でAck1が局在しない初期エンドソームを示す。(B) 図Aで示した細胞における初期エンドソームをあらゆる全ピクセルと、そのうちAck1と共局在しているピクセルの比 (Colocalization coefficients) を示す。

[図34] (A) HepG2細胞にLipofectamine 3000を用いてDOCK11 siRNA #1~3をトランスフェクションし、72時間後にUV照射によってDNA損傷を誘導した。この細胞からRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRによってDOCK11 mRNA量を測定した。GAPDH mRNAも同様に測定し標準化した。(B) HepG2細胞にLipofectamine 3000を用いてDOCK11 siRNA #1~3をトランスフェクションし、72時間後にUV照射によってDNA損傷を誘導した。この細胞可溶化液を調製し、1次抗体として抗Chk1, pChk1抗体を用いてWestern Blottingを行った。(C) 図BにおいてImageLabを用いてpChk1とChk1の発現量比を算出し、各細胞におけるChk1のリン酸化量を算出した。コントロールとして、siEmptyをトランスフェクション後UV照射しなかった細胞でのリン酸化量を用いた。(D) HepG2細胞を100 nM N-10M-D42TNで24時間処理後、UV照射によってDNA損傷を誘導した。この細胞可溶化液を調製し、1次抗体として抗Chk1, pChk1抗体を用いてWestern Blottingを行った。(E) 図DにおいてImageLabを用いてpChk1とChk1の発現量比を算出し、各細胞におけるChk1のリン酸化量を算出した。コントロールとして、N-10M-D42TN処理およびUV照射処理しなかった細胞でのリン酸化量を用いた。

[図35]UV照射によってPXB細胞にDNA損傷を誘導後、抗pChk1抗体を用いて免疫

染色を行い、DAPIで核染色した。(A) UV照射前にEmptyあるいはDOCK11を標的としたsiRNAをトランスフェクションし、72時間培養した。(B) UV照射前に0 nMあるいは100 nM N-10M-D42TNで24時間処理した。

[図36] (A) PXB細胞を100 nM N-10M-D42TNで24時間処理後、UV照射によってDNA損傷を誘導した。抗DOCK11抗体を用いて免疫染色を行い、DAPIで核染色した。(B) 核内部において閾値以上を示したDOCK11の蛍光強度を算出し、DAPIの蛍光強度を用いて標準化した。

[図37] (A) DOCK11を標的としたsiRNAをトランスフェクションしたPXB細胞および100 nM N-10M-D42TNで24時間処理したPXB細胞に対して、UV照射によりDNA損傷を誘導し、抗DOCK11抗体および抗 γ H2AX抗体を用いて免疫染色した。白矢印は γ H2AXと共局在しているDOCK11、黒矢印は γ H2AXと共局在しないDOCK11を示す。(B, E-G) 図37Aの矢印で示した点を含む5.0 μ mの直線上における、DOCK11および γ H2AXの蛍光強度の変化を示す。(B) Emptyを標的としたsiRNAをトランスフェクションし、UV照射した細胞。(E) DOCK11を標的としたsiRNAをトランスフェクションし、UV照射した細胞。(F) 100 nM N-10M-D42TNで0時間処理し、UV照射した細胞。(G) 100 nM N-10M-D42TNで24時間処理し、UV照射した細胞。(C, D) 図37Aの各細胞におけるDOCK11(C)および γ H2AX(D)の蛍光強度を示す。いずれもDAPIの蛍光強度との比を示し、siEmptyをトランスフェクションしUVしなかった細胞での結果をコントロールとした。* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

[図38] 実施例 1 6 におけるサンプルの投与スケジュール。

[図39] 実施例 1 6 におけるHBsAgの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)の比較。

[図40] 実施例 1 6 におけるHBeAgの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)の比較。

[図41] 実施例 1 6 におけるHBcrAgの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)の比較。

[図42] 実施例 1 6 における血中HBV DNAの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)

の比較。

[図43]実施例16におけるh-Albの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)の比較。

[図44]実施例16におけるALTの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)の比較。

[図45]実施例16における肝臓中HBV DNAの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)の比較。

[図46]実施例16における肝臓中HBV DNAの測定。N-10M-D42TNとcontrol (PBS)の比較。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明において、「抗B型肝炎ウイルス（抗HBV）」という語には、HBV感染の治療、HBV感染の予防、HBVの増殖抑制、B型肝炎の治療、及びB型肝炎の予防が包含される。本発明の抗HBV剤は、B型肝炎患者に投与することで、該患者体内（肝臓内）でのHBVの増殖を抑制し、B型肝炎を治療することができる。また、抗HBV剤をB型肝炎発症前のHBVキャリアに投与することで、該キャリアにおけるHBVの増殖を防止し、B型肝炎の発症を防止することができる（B型肝炎の予防）。

[0024] 本発明の抗HBV剤は、DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する物質を有効成分として含む。ヒトDOCK11は図2に示した構造を有するタンパク質であり、DOCKファミリー間でアミノ酸配列がよく保存されているドメインであるDock homology region 1(DHR1)及びDHR2を有する。N末側に存在するDHR1は、ホスファチジルイノシトール3-リン酸と結合する。C末側に存在するDHR2は、それぞれ特異的なRhoファミリーGタンパク質を活性化するドメインであり、DOCK11のDHR2は低分子量Gタンパク質Cdc42を活性化する。配列表の配列番号41、42に示した配列は、NCBIのGenBankにNM_144658.4で登録されているヒトDOCK11 mRNAのコード領域の塩基配列及びこれにコードされるDOCK11のアミノ酸配列であり、第1609番～第2036番残基の領域がDHR2ドメインである。本発明の抗HBV剤の有効成分として用いる物質は、DOCK11の第1516番～第2073番残基の領域（C末領域）、例えばDHR2ドメインに結合する物質であってよい。

[0025] DOCK11については、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) としてCdc42を非活性型 (GDP結合型) から活性型 (GTP結合型) へと置換すること、他のGEFタンパク質と異なり活性型Cdc42にも結合してさらに活性化し、ポジティブフィードバックをもたらすことが知られている (Lin, Q. et al. J. Biol. Chem., 281, 35253-35262, 2006; Nishikimi, A. et al. Exp Cell Res 319, 2343-2349, 2013)。また、活性型Cdc42結合タンパク質であるAck1 (activated CDC42 kinase 1) が、GTP結合型Cdc42と特異的に結合して活性化されることが知られている (Prieto-Echague, V., Miller, J., Signal Transduct, 1-9, 2011)。下記実施例において、DOCK11とAck1が細胞内で結合すること、Cdc42とAck1は競合的にDOCK11に結合することが、本願発明者らによって示された。

[0026] DOCK11の機能の阻害は、例えば、DOCK11とAck1の結合の阻害によるAck1活性化の阻害、DOCK11のGEF活性の阻害、及びDOCK11によるATRシグナル伝達経路の活性化の阻害から選択される少なくとも1種であってよい。下記実施例には、抗HBV活性を有するDOCK11結合ペプチドが、DOCK11とAck1の結合を阻害してAck1活性化を阻害すること、DOCK11のGEF活性を阻害すること、DOCK11によるATRシグナル伝達経路の活性化を阻害すること、これらの作用により、宿主のDNA修復機構 (特にATR (ataxia telangiectasia and Rad-3 related) シグナル伝達経路) を利用したrcDNAからcccDNAの合成過程を阻害するとともに、EGFRのエンドサイトーシスの阻害等によるHBV粒子の細胞内への再侵入を阻害し、抗HBV効果を発揮することが示されている。

[0027] DOCK11の第1516番～第2073番残基の領域 (C末領域)、又はDHR2ドメインに結合し、DOCK11の機能を阻害する物質としては、例えば、該C末領域又はDHR2ドメインを認識して結合する抗体、抗体断片若しくは一本鎖抗体又はアプタマー、該C末領域又はDHR2ドメインに選択的に結合するポリペプチド等を挙げることができる。本発明において、抗体断片という語は、抗体の抗原結合性断片という語と同義であり、Fab、Fab'、F(ab')₂等が包含される。抗原との結合性を維持した抗体断片であれば特に限定されない。

[0028] 本発明の抗HBV剤は、例えば、下記(1)～(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドを有効成分として含むものであってよい。[]内は、下記実施例において使用した各ポリペプチドの名称である。以下、これらのポリペプチドを「DOCK11結合ペプチド」ということがある。

- (1) IITPGTEVLNSDLQAS (配列番号1) の配列のポリペプチド。[DCS3-1]
- (2) HNVLSVYNPAWGKYFH (配列番号2) の配列のポリペプチド。[DCS5-4]
- (3) NFPPNPMHNTDSCICA (配列番号3) の配列のポリペプチド。[DCS5-5]
- (4) TEKRRLMKPVLLTYNP (配列番号4) の配列のポリペプチド。[DCS5-15]
- (5) IICPGAEVNLGDLVAS (配列番号5) の配列のポリペプチド。[DCS8-6]
- (6) TEYRRCVTPVLLTYNN (配列番号6) の配列のポリペプチド。[DCS8-29]
- (7) TEEHRGLLPVLMTYNV (配列番号7) の配列のポリペプチド。[DCS8-59]
- (8) TEFRCRWTWPVLCTYNA (配列番号8) の配列のポリペプチド。[DCS8-72]
- (9) TEQARPTPPPVLDTYNL (配列番号9) の配列のポリペプチド。[DCS8-42]
- (10) PEQARPPPPLEDNLFL (配列番号10) の配列のポリペプチド。[DCS8-42TN]
- (11) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の配列のポリペプチド。[DCS8-59R]
- (12) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の配列のポリペプチド。[DCS8-59C]
- (13) PEQARPPPPLEDNLFL (配列番号10) の領域を含むAck1の部分ポリペプチド。
- (14) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の領域を含むラディキシンの部分ポリペプチド。
- (15) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の領域を含む β -セントラクチンの部分ポリペプチド。
- (16) (1)～(15)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。

[0029] (1)～(9)のポリペプチドは、下記実施例において、ピアコアを使ったDOCK11と結合するペプチドの選択実験によりIVVライブラリーから選択され、プルダウンアッセイ等により抗HBV活性を確認したポリペプチドである。(10)～(1

2)は、(7)及び(9)の配列のホモロジー検索結果に基づいて設計され、プルダウンアッセイ等により抗HBV活性を確認したポリペプチドである。下記実施例では、(10)のDCS8-42TNを用いて調製した被検物質をin vivo投与実験に使用して抗HBV活性を確認しているが、上記したポリペプチドの具体例は、DCS8-42TN以外のものもDCS8-42TNと同様に抗HBV剤として有用である。

[0030] (13)の部分ポリペプチドとは、Ack1 (NP_001374642.1、配列番号50)の部分領域であって、DOCK11結合ペプチドDCS8-42と高いホモロジーを有する領域であるPEQARPPPPLEDNLFL (配列番号10; 配列番号50に示すAck1のアミノ酸配列中の第674番～第689番アミノ酸の領域)を含む部分領域で構成されるポリペプチドである。配列番号50のアミノ酸配列をコードする塩基配列 (NM_001387713.1のコード領域の塩基配列)を配列番号49に示す。(14)の部分ポリペプチドとは、ラディキシン (NP_001247421.1、配列番号92)の部分領域であって、DOCK11結合ペプチドDCS8-59と高いホモロジーを有する領域であるHEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11; 配列番号92に示すラディキシンのアミノ酸配列中の第176番～第193番アミノ酸の領域)を含む部分領域で構成されるポリペプチドである。配列番号92のアミノ酸配列をコードする塩基配列 (NM_001260492.2のコード領域の塩基配列)を配列番号91に示す。(15)の部分ポリペプチドとは、 β -セントラクチン (NP_005726.1、配列番号94)の部分領域であって、DOCK11結合ペプチドDCS8-59と高いホモロジーを有する領域であるAEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12; 配列番号94に示す β -セントラクチンのアミノ酸配列中の第62番～第77番アミノ酸の領域)を含む部分領域で構成されるポリペプチドである。配列番号94のアミノ酸配列をコードする塩基配列 (NM_005735.4のコード領域の塩基配列)を配列番号93に示す。配列番号10の配列のポリペプチドであるDCS8-42TN、配列番号11の配列のポリペプチドであるDCS8-59R、及び配列番号12の配列のポリペプチドであるDCS8-59Cが抗HBV活性を有することは下記実施例において確認されているので、これらの領域を含む各タンパク質の部分領域で構成されるポリペプチドも同様に抗HBV活性を有し、抗HBV剤として有用である。(13)～(15)のポリペプチドの鎖長は特に限定されない

が、合成や肝細胞内への送達などの便宜から、例えば100残基以内、80残基以内、70残基以内、60残基以内、50残基以内、40残基以内、30残基以内、25残基以内、又は20残基以内のサイズとしてもよい。

[0031] (16)のポリペプチドは、(1)～(15)のいずれかのポリペプチドにおいて残基の一部を改変した、もとのポリペプチドと80%以上の配列同一性を有するポリペプチドである。ごく少数の残基を改変しても、ポリペプチドの活性が同等以上に維持されることは、この分野において周知である。従って、(1)～(15)のポリペプチドの少数の残基（例えば1～4残基、1～3残基、1若しくは2残基、又は1残基）を改変した、もとの配列との同一性が80%以上、例えば85%以上、又は90%以上であるポリペプチドも、もとのポリペプチドと同様に抗HBV活性を発揮でき、抗HBV剤として有用である。ここでいう残基の改変は、置換、欠失、挿入又は付加であり、典型的には置換である。

[0032] ここで、アミノ酸配列の同一性とは、比較すべき2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基ができるだけ多く一致するように両アミノ酸配列を整列させ、一致したアミノ酸残基数を全アミノ酸残基数で除したものを百分率で表したものである。上記整列の際には、必要に応じ、比較する2つの配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このような配列の整列化は、例えばBLAST、FASTA、CLUSTAL W等の周知のプログラムを用いて行なうことができる。ギャップが挿入される場合、上記全アミノ酸残基数は、1つのギャップを1つのアミノ酸残基として数えた残基数となる。このようにして数えた全アミノ酸残基数が、比較する2つの配列間で異なる場合には、同一性(%)は、長い方の配列の全アミノ酸残基数で、一致したアミノ酸残基数を除いて算出される。

[0033] 保存的置換、すなわち、化学的性質が類似するアミノ酸への置換であれば、タンパク質の性質・活性を損なわない蓋然性が高い。側鎖が類似するアミノ酸は、化学的性質が類似する。側鎖の類似性でアミノ酸をグループ分けすると、例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン）、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ

酸の群（セリン、トレオニン）、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群（アスパラギン、グルタミン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群（アルギニン、リジン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸の群（アスパラギン酸、グルタミン酸）、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群（システイン、メチオニン）、などに分類することができる。同じ群に属する別のアミノ酸への置換が保存的置換である。

[0034] ペプチド製剤の分野では、ペプチドの生体内での安定性を向上させ、血中半減期を高めるなどの目的で、ポリエチレングリコール（PEG）鎖を付加する（*Clin Nephrol.* 2006 Mar;65(3):180-90.や*Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Sep 6;102(36):12962-7.など）、主としてN末端又はC末端に糖鎖を付加する（*J Am Chem Soc.* 2004 Nov 3;126(43):14013-22や*Angew Chem Int Ed Engl.* 2004 Mar 12;43(12):1516-20など）、アミノ酸残基の少なくとも一部をD体とする（*J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jun;309(3):1190-7や*J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jun;309(3):1183-9.など）、抗体のFc領域を適宜改変して付加する（例えば、*J. Immunol.*, 154 (10), 5590-5600 (1995)、*Nature*, 332, 563-564 (1998)、*Nature*, 332, 738-740 (1998)、*BioDrugs.* 2008;22:11-26など）、C末端をアミド化する、N末端をアセチル化する等の技術が用いられている。本発明の抗HBV剤に有効成分として用いるポリペプチドは、そのような技術を適用したものであってもよい。

[0035] 本発明において、「配列番号Xの配列のポリペプチド」、「配列番号Xで表されるポリペプチド」、「配列番号Xで構成されるポリペプチド」（配列番号Xはアミノ酸残基数Nのアミノ酸配列とする）という語は、配列番号Xに示されるアミノ酸配列を有し、全長がN残基であるポリペプチド（このようなポリペプチドを便宜的にポリペプチドXと呼ぶ）に、Fc領域や肝臓へのデリバリーを高める効果を有するポリペプチドのような他の機能性分子を付加ないし連結した構造を有するポリペプチドを包含する。「配列番号Xの配列のポリペプチド」、「配列番号Xで表されるポリペプチド」又は「配列番号Xで構成される

ポリペプチド」を有効成分として含む」という語は、全長がN残基であるポリペプチドXを有効成分として含むという態様の他、ポリペプチドXに他の機能性分子を付加した構造を有するポリペプチドを有効成分として含む態様を包含する。ポリペプチドの抗HBV活性を損なわない限り、いかなる機能性分子が連結されていてもよい。

[0036] (1)～(12)のポリペプチド、及び(16)のポリペプチドのうちで(1)～(12)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチドは、鎖長が短いので、常法の化学合成により容易に調製できる。(13)～(15)のポリペプチド、及び(16)のポリペプチドのうちで(13)～(15)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチドは、鎖長が短いものは化学合成により容易に調製でき、化学合成による調製が難しい鎖長のものは遺伝子工学的的手法により製造することができる。他の機能性分子が連結された構造を有するポリペプチドも、機能性分子がサイズの短いポリペプチドである場合は化学合成により、機能性分子がサイズの長いポリペプチドである場合は遺伝子工学的的手法により製造することができる。

[0037] 化学合成法の具体例としては、例えばFmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等を挙げることができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。

[0038] 遺伝子工学的的手法による製造方法も周知である。簡潔に記載すると、サイズの長いDOCK11結合ペプチドの全長、又は機能性分子に連結されたDOCK11結合ペプチドの全長をコードするcDNAを調製し、該cDNAを適当な発現ベクターに組み込んで適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞内でポリペプチドを生産させて抽出、精製することにより、目的とするポリペプチドを得ることができる。

[0039] また、DOCK11結合ペプチドは、精製や検出の便宜のためにFlagタグやHisタグ等のタグ配列を付加したものであってもよい。このようなタグ配列も、機能性分子の1つの例として捉えることができる。例えば、下記実施例で調製

したN-10M-D42TNのうちの「切断配列+DCS8-42TNペプチド+S28+核移行シグナル」部分（配列番号90）では、DOCK11結合ペプチドDCS8-42TNのC末にFlagタグとHisタグが付加されている。もっとも、このようなタグ配列の付加は任意であり、タグ配列を付加しないDOCK11結合ペプチドにて本発明の抗HBV剤を調製することも可能である。

[0040] 機能性分子の1つの例として、肝細胞内への送達のための担体分子を挙げることができる。すなわち、DOCK11結合ペプチドは、肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態にあってよい。肝細胞内に送達すべき薬物のための担体分子としては、肝実質細胞に豊富に存在するアジアロ糖タンパク質受容体（ASGR）やApoE受容体を利用したDDSが知られている（非特許文献7）。本発明においても、ASGRやApoE受容体を利用して肝細胞内に薬物を送達する担体分子を用いることができる。

[0041] ASGRを利用した薬物送達用担体の例として、ASGRに結合する特異結合分子（抗体、抗体断片若しくは一本鎖抗体、又はアプタマーなど）、特にASGRに結合する抗体、抗体断片又は一本鎖抗体（scFv）を挙げることができる。アジアロ糖タンパク質受容体（ASGR）は、図12に示すように、N末端を細胞内、C末端の糖認識部位（CRDs）を細胞外に向けたII型の1回膜貫通タンパク質である。ヒトの肝細胞においては、ASGR1とASGR2のヘテロオリゴマーにより受容体が形成されている。薬物送達用担体として用いるASGR特異結合分子は、ASGRの細胞外ドメインと結合するものであればよい。ASGR1とASGR2の両方に結合できる特異結合分子を特に好ましく用いることができるが、いずれか一方にのみ結合する特異結合分子であっても薬物送達用担体として利用可能である。いずれか一方にのみ結合する特異結合分子の場合、単独で薬物送達用担体として利用してもよいし、一方に結合する特異結合分子と他方に結合する特異結合分子を組み合わせ利用してもよい。組み合わせる場合、ASGR1特異結合分子を連結したDOCK11結合ペプチドと、ASGR2特異結合分子を連結したDOCK11結合ペプチドを調製し、両者を混合して抗HBV剤として利用すればよい。

[0042] GenBankにNM_001671.5で登録されているヒトASGR1 mRNAのコード領域の塩

基配列及びこれにコードされるASGR1のアミノ酸配列を配列番号43、44に、NM_001181.4で登録されているヒトASGR2 mRNAのコード領域の塩基配列及びこれにコードされるASGR2のアミノ酸配列を配列番号45、46に、それぞれ示す。配列番号44 (ASGR1) の第41番～第61番アミノ酸、配列番号46 (ASGR2) の第59番～第79番アミノ酸が膜貫通ドメインであり、そのN末側が細胞内ドメイン、C末側が細胞外ドメインである。抗ASGR抗体、抗体断片又は一本鎖抗体の調製においては、ASGR1の第62番～第291番アミノ酸の領域と、ASGR2の第80番～第331番アミノ酸の領域を抗原ないし免疫原として利用すればよいが、これらの細胞外ドメインをヘテロオリゴマー化して用いることがより好ましい。以下、本明細書において、「ASGR細胞外ドメイン」という語には、ヘテロオリゴマー化した細胞外ドメインが包含される。「ヘテロオリゴマー」といった場合には、ヘテロオリゴマー化したASGR細胞外ドメインを意味する。

[0043] 抗ASGRポリクローナル抗体は、ASGR細胞外ドメインを免疫原として非ヒト動物を免役し、血液を採取して血清を分離し、血清からASGR細胞外ドメインに結合する抗体を回収・精製することで得ることができる。抗ASGRモノクローナル抗体は、ASGR細胞外ドメインで免役した非ヒト動物から脾細胞やリンパ球などの抗体産生細胞を採取し、これをミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを調製し、ASGR細胞外ドメインと結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、これを増殖させて培養上清から抗ASGRモノクローナル抗体を得ることができる。

[0044] 抗ASGR抗体断片は、抗ASGR抗体をパパインやペプシンのようなタンパク分解酵素で処理することにより得ることができる。抗体断片の定義は上記した通りであり、Fab、Fab'、F(ab')₂等の、抗原 (ASGR細胞外ドメイン) との結合性を維持した抗体断片が包含される。

[0045] 抗ASGR scFvは、例えば、上記の通りに作製したハイブリドーマのmRNAを抽出してcDNAを調製し、免疫グロブリンH鎖及びL鎖に特異的なプライマーを用いてPCRを行ない免疫グロブリンH鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を増幅し、これらをリンカーで連結し、適切な制限酵素部位を付与してプラスミドベクターに導

入し、該ベクターで大腸菌を形質転換してscFvを発現させ、これを大腸菌から回収することにより得ることができる。

[0046] また、抗ASGR scFvは、ファージディスプレイ法やIVV法等の技術により、scFvライブラリーから取得することができる。

[0047] ファージディスプレイ法では、scFvライブラリーとして、ファージ表面にscFvが提示されたファージのライブラリーを調製する。例えば次のような手順で、ナイーブscFvファージライブラリーを調製すればよい。健常なヒト又は非ヒト動物から採取された脾細胞やリンパ球などの抗体産生細胞からmRNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成し、重鎖可変領域（VH）を含む領域をコードするcDNA（VH cDNA）及び軽鎖可変領域（VL）を含む領域をコードするcDNA（VL cDNA）をPCRにより網羅的に増幅する。次いで、増幅したVH cDNA及びVL cDNAを、常法のアセンブリPCRないしはFusion PCRにより、適当なリンカー（例えば、GGGSユニットを3回繰り返したリンカー等）を介してランダムに連結し、scFvをコードするcDNA（scFv cDNA）を調製する。scFv cDNAをファージ用プラスミドベクターに組み込んでベクターのライブラリーを調製した後、ファージディスプレイ法により各scFvを表面に提示するファージのライブラリーを作製する。ファージ用プラスミドベクターとしては、ファージ粒子を形成するために必要なファージ遺伝子が全て含まれ、単独でファージ粒子形成が可能なファージベクターと、g3p遺伝子を含むが他のファージタンパク質遺伝子を含まず、ファージ粒子形成のためにヘルパーファージを必要とするファージミドベクターの2種類があるが、ファージミドベクターを好ましく用いることができる。ファージミドベクターを用いて作製したscFv cDNAライブラリーを大腸菌に導入し、大腸菌にヘルパーファージを重感染させることにより、scFv cDNAライブラリーの個々のベクターがパッケージングされ、該ベクターが発現するscFvを表面に提示するファージのライブラリーを作製できる。調製したVH cDNA及びVL cDNAあるいはscFv cDNAにランダムに突然変異を導入し、変異scFvのファージライブラリーを作製してもよい。

[0048] 作製したライブラリーより、ASGR細胞外ドメインに結合するscFvを提示し

たファージを選別する（パニング）。このパニング工程は、ASGR細胞外ドメインを固定化した固相担体（チップ、プレート、磁気ビーズ等）を使用して実施することができ、ヘテロオリゴマーを固定化した担体を特に好ましく使用できる。ASGR1の細胞外ドメイン（ASGR1ex）及びASGR2の細胞外ドメイン（ASGR2ex）をビオチン化し、アビジン類がコートされた担体とビオチン化ASGR1ex及びASGR2exを接触させることで、担体表面上でASGR1ex及びASGR2exをヘテロオリゴマー化させることができる。ファージライブラリーをASGR細胞外ドメイン固定化担体と接触させ、洗浄後、担体上に結合したファージを回収する。回収したファージを溶解し、パッケージングされていたベクターを回収して再度大腸菌に導入し、ヘルパーファージを重感染させてファージ粒子を再度形成させる。これらのファージ粒子を再度、ASGR細胞外ドメイン固定化担体と接触させる。この操作を複数回実施することで、ASGR細胞外ドメインに特異的なscFvを提示したファージクローンを濃縮できる。

[0049] 複数ラウンドのパニングを経て濃縮したファージを抗ASGR scFv候補のクローンとして取得できるが、候補をさらに絞り込むためにクローンの選定を行ってもよい。濃縮後のファージよりscFv発現ベクターを回収し、大腸菌等の適当な宿主細胞に導入してscFvを発現する宿主細胞クローンを調製し、これらのクローンについて、ASGR細胞外ドメインへの反応性及び可変領域の配列を調べ、ASGR細胞外ドメインへの特異的結合性が高いクローンを選定する。反応性の確認は、ASGR細胞外ドメイン、好ましくはヘテロオリゴマーを抗原としたELISA等のイムノアッセイにより行なえばよい。可変領域の配列が同一ないし非常に類似したクローンが複数存在している可能性があるため、VH及びVLの塩基配列によりクローンの重複を確認してクローンのグルーピングを行ってもよい。これらのクローン選定作業により、ASGR細胞外ドメインへの特異的結合性が高いクローンを選定し、候補をさらに絞り込むことができる。

[0050] 候補クローンよりscFv発現ベクターを回収し、scFv発現ベクターからscFvcDNAを増幅し、適当なプラスミド発現ベクターに組み込んで適当な宿主細胞

内でscFvを発現させ、これを回収、精製する。精製後のscFvについて、ASGR1ex及びASGR2exとの反応性又はヘテロオリゴマーとの反応性を最終確認し、ASGR細胞外ドメインに特異的に結合するscFvを得ることができる。

[0051] IVV法 (Nemoto, N. et al., FEBS Lett., 414:405-408, 1997; Miyamoto-Sato, E. et al., Nucleic Acids Res., 28:1176-1182, 2000; WO 03/106675 A1) は、本願発明者の一人である柳川及びその共同研究者らが開発した技術である。IVV法では、mRNAの3'末端にPEG (ポリエチレングリコール) スペーサーを介して抗生物質の一種のピューロマイシンを結合させ、それを鋳型として無細胞翻訳反応を行うことにより、タンパク質分子とこれをコードするmRNA分子とがピューロマイシンを介して共有結合したmRNA-タンパク質連結分子 (in vitro virus; IVV) が形成される。こうして構築されたIVVライブラリーの中からベイト (タンパク質、ペプチド、抗原など) と結合するタンパク質を含むIVVをin vitroで釣り上げた後、そこに連結している遺伝子 (mRNA) を逆転写PCRで増幅し、DNAシーケンサーで塩基配列を解読することによって、相互作用するタンパク質やペプチドや抗体を容易に同定することができる。ベイトに結合したIVVを溶出・回収する方法は、フリーのベイトで競合溶出する方法が一般的であるが、競合溶出できない場合は、光開裂が可能な2-nitrobenzylリンカーを導入したPEGスペーサーを用い、365nmのUVを照射してスペーサーを切断してmRNA部を溶出・回収することができる (Doi, N. et al., J. Biotechnol., 131:231-239, 2007)。

[0052] IVV法による抗ASGR scFvの作製方法の詳細は下記実施例に記載の通りである。以下、簡単に説明する。

[0053] 上記のようにしてscFv cDNAライブラリーを調製した後、cDNAライブラリーから逆転写反応にてmRNAを合成し、PEGスペーサーを介してmRNAの3'末端にピューロマイシンを結合させ、scFv mRNA-ピューロマイシンのライブラリーとする。これを鋳型として無細胞翻訳反応を行ない、scFv分子とこれをコードするmRNA分子がピューロマイシンを介して共有結合したmRNA-scFv連結分子 (IVV) のライブラリーを構築する。

- [0054] scFv IVVライブラリーの中から、ASGR細胞外ドメインに結合するscFvを選択する。この選択工程も、ファージディスプレイ法と同様に、ASGR細胞外ドメイン、好ましくはヘテロオリゴマーをベイトとして固定化した固相担体（チップ、プレート、磁気ビーズ等）を使用して実施できる。scFv IVVライブラリーとASGR細胞外ドメイン固定化担体を接触させ、洗浄後、担体上に結合したIVVを溶出・回収する。ASGR1ex若しくはASGR2exを用いた競合溶出によりIVVを溶出・回収できる。PEGスペーサーとして2-nitrobenzylリンカーを導入したPEGスペーサーを使用した場合には、UV照射によりスペーサーを切断してIVVのmRNA部を溶出・回収することも可能である。
- [0055] 回収したIVV又はmRNA部を鋳型として逆転写PCRを行ない、1stラウンド選択後のscFv cDNAライブラリーを調製する。このcDNAライブラリーから再度IVVライブラリーを調製し、2ndラウンドの選択を実施することができる。選択圧（IVVライブラリーとベイトの接触時間、担体へのベイトの固定量等）を順次上げながら複数ラウンドの選択を実施することが好ましい。
- [0056] 数回目以降のラウンドで得られた各scFv cDNAライブラリーからscFvコード領域を増幅し、適当なプラスミドベクターにクローニングして、選択後のscFv cDNAを組み込んだベクターのライブラリーを調製する。このベクターを大腸菌等の適当な宿主細胞に導入し、選択後のscFvのクローンのライブラリーを得る。得られたクローンライブラリーについて、ファージディスプレイ法のクローン選定と同様に、ASGR細胞外ドメインへの反応性の評価と可変領域配列の解析、グルーピングを行ない、選定されたクローンよりベクターを回収してscFvを調製し、ASGR1ex及びASGR2exとの反応性又はヘテロオリゴマーとの反応性を最終確認することで、ASGR細胞外ドメインへの特異的結合性が高いscFvを得ることができる。
- [0057] 抗ASGR抗体、抗体断片又はscFvの特に好ましい例として、
配列番号13、19、25若しくは31に示すアミノ酸配列を含む重鎖CDR1と、
配列番号14、20、26若しくは32に示すアミノ酸配列を含む重鎖CDR

2と、

配列番号15、21、27若しくは33に示すアミノ酸配列を含む重鎖CDR

3と、

配列番号16、22、28若しくは34に示すアミノ酸配列を含む軽鎖CDR

1と、

配列番号17、23、29若しくは35に示すアミノ酸配列を含む軽鎖CDR

2と、

配列番号18、24、30若しくは36に示すアミノ酸配列を含む軽鎖CDR

3と

を有する抗体、抗体断片又はscFvを挙げることができる。これらのCDR配列は、下記実施例で取得された抗ASGR scFvのCDR配列に基づいている。下記実施例では、配列番号13～15に示すアミノ酸配列の重鎖CDR1～3及び配列番号16～18に示すアミノ酸配列の軽鎖CDR1～3を有する抗ASGR scFv、配列番号19～21に示すアミノ酸配列の重鎖CDR1～3及び配列番号22～24に示すアミノ酸配列の軽鎖CDR1～3を有する抗ASGR scFv、配列番号25～27に示すアミノ酸配列の重鎖CDR1～3及び配列番号28～30に示す軽鎖CDR1～3を有する抗ASGR scFv、並びに配列番号31～33に示す重鎖CDR1～3及び配列番号34～36に示す軽鎖CDR1～3を有する抗ASGR scFvが得られている。

[0058] また、CDR配列は上記した特定のアミノ酸配列のものに限定されず、上記アミノ酸配列において一部の塩基が置換され、もとのアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むCDRを有した抗体等であってもよい。例えば、重鎖及び軽鎖CDR1は、1個の残基の置換が許容され、重鎖及び軽鎖CDR2は、1～3個、1～2個又は1個の残基の置換が許容され、重鎖及び軽鎖CDR3は、1～2個又は1個の残基の置換が許容される。このような改変型CDRを有する抗体、抗体断片又はscFvも、ASGRに特異的に結合する抗体、抗体断片又はscFvとして利用できる。

[0059] 所定の配列のCDRを有する抗体等は、例えば、クローニングされた任意の抗体のVH遺伝子及びVL遺伝子あるいは任意のscFvをコードするscFv遺伝子のCDR

領域に変異を導入して上記のアミノ酸配列をコードするように改変することにより容易に調製できる。上記のCDR配列を導入するベースとなる任意の抗体及び任意のscFvは、上記とは異なる配列のCDRを有する抗ASGR抗体及び抗ASGR scFvであってもよいし、他の抗原に対する抗体及びscFvであってもよい。

[0060] 上記した特定のアミノ酸配列を含むCDR又は改変型CDRを有する抗ASGR抗体、抗体断片又はscFvは、本発明の抗HVB剤の送達用担体としてのみならず、肝細胞内に送達すべき様々な薬物のための送達用担体として非常に優れている。この抗ASGR抗体、抗体断片又はscFvを肝細胞内への薬物送達用担体とし、肝細胞内に送達すべき薬物を医薬分野で公知の技術により該担体と複合体化して医薬組成物として利用できる。当該抗ASGR抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、ヒト-非ヒト動物間のキメラ抗体、非ヒト動物抗体のいずれであってもよいが、ヒト用医薬の送達用担体として利用する場合にはヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体、特にヒト抗体又はヒト化抗体、とりわけヒト抗体が好ましい。抗ASGR scFv抗体も同様に、ヒト抗体、ヒト化抗体、ヒト-非ヒト動物間のキメラ抗体、非ヒト動物抗体のいずれに由来するものであってもよいが、ヒト用医薬の送達用担体として利用する場合にはヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体に由来するもの、特にヒト抗体又はヒト化抗体に由来するもの、とりわけヒト抗体に由来するものが好ましい。

[0061] DOCK11結合ペプチドに抗ASGR抗体等の肝細胞内送達用担体分子を連結する場合、DOCK11結合ペプチドのどちらの末端に連結してもよい。1種以上の他の機能性分子も使用する場合には、それら他の機能性分子と併せて適切に機能するよう、DOCK11結合ペプチドに連結すればよい。肝細胞内送達用担体分子は、本発明の抗HBV剤の投与を受ける患者の細胞内に存在する内因性酵素によって切断される切断配列を介してDOCK11結合ペプチドと連結することが好ましい。切断配列の一例として、Furinが認識して切断する配列RVRR（配列番号37）を挙げることができるが、切断配列はこれに限定されない。

[0062] 機能性分子の他の例として、細胞膜透過促進分子を挙げることができる。すなわち、DOCK11結合ペプチドは、細胞膜透過促進分子と連結した形態にあ

ってよい。細胞膜透過促進分子とは、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたDOCK11結合ペプチドが、エンドソーム内から膜を透過して細胞質内に放出するのを促進する作用を有する分子である。細胞膜透過促進分子の具体例として、土居らが開発した、ヒト胎盤形成における細胞融合に関与するシンチン1というタンパク質の部分ペプチドであるS19 (Sudo, K. et al., J. Control. Release, 255:1-11, 2017、Sudo, K. et al., J. Control. Release, 255:1-11, 2017、WO 2016/199674 A1) や、その後の検討により、膜透過促進ペプチドとしてS19よりもさらに効率的に機能しうるペプチドとして開発された、28残基のシンチン1部分ペプチドS28 (PFVIGAGVLGALGTGIGGITSTQFYK、配列番号38) 及び39残基のシンチン1部分ペプチドS39 (PFVIGAGVLGALGTGIGGITSTQFYKLSQELNGDMER、配列番号39) を挙げることができる。これらのペプチド、特にS28及びS39は、本発明において好ましく使用できる細胞膜透過促進分子であるが、使用可能な細胞膜透過促進分子はこれらに限定されない。

[0063] 細胞膜透過促進分子は、DOCK11結合ペプチドのいずれの末端に連結してもよいが、肝細胞内送達用担体分子及び切断配列をDOCK11結合ペプチドに連結する場合には、切断配列よりもDOCK11結合ペプチド側に、あるいは担体分子とは逆の末端に連結する。

[0064] 機能性分子のさらなる例として、核移行シグナルを挙げることができる。すなわち、DOCK11結合ペプチドは、核移行シグナルと連結した形態であってよい。核移行シグナルも種々のものが公知であり、いずれを用いてもよい。下記実施例では核移行シグナルとしてPAAKRVKLD (配列番号40) を利用しているが、この具体例に限定されない。核移行シグナルは、DOCK11結合ペプチドのいずれの末端に連結してもよいが、肝細胞内送達用担体分子及び切断配列をDOCK11結合ペプチドに連結する場合には、切断配列よりもDOCK11結合ペプチド側に、あるいは担体分子とは逆の末端に連結する。細胞膜透過促進分子と核移行シグナルをDOCK11結合ペプチドに連結する場合には、両末端にそれぞれ連結してもよいし、一方の末端に両方を連結してもよい。後者の場合、

どちらを最末端に配置してもよい。送達用担体+切断配列、細胞膜透過促進分子及び核移行シグナルをDOCK11結合ペプチドに連結する場合は、送達用担体+切断配列を一方の末端に、細胞膜透過促進分子及び核移行シグナルを他方の末端に連結する。

[0065] 本発明の抗HBV剤の投与する主たる対象はHBV感染患者であり、B型肝炎患者、及びB型肝炎を発症していないHBV感染患者（HBVキャリア）が包含される。患者は典型的には哺乳動物、特にヒトであるが、これに限定されない。

[0066] 本発明の抗HBV剤の投与量は、投与対象の患者において抗HBV効果が得られる量であればよい。有効量は、患者の症状、ウイルス量、年齢、体重等に応じて適宜選択されうる。特に限定されないが、本発明の抗HBV剤の投与量は、対象に対し1日当たりの有効成分量として、体重1kg当たり1 μ g~10000mg程度、例えば100 μ g~1000mg程度としてよい。なお、ここでいう有効成分量とは、DOCK11結合ペプチドの場合には該ペプチド部分のみの量であり、DOCK11結合ペプチドに1種以上の他の機能性分子を連結したものを有効成分として用いる場合には、当該1種以上の他の機能性分子の量は上記の有効成分量には含まれていない。また、複数種類の物質を有効成分として用いる場合、有効成分量はその合計量である。1日の投与は1回でもよいし、数回に分けて投与してもよい。投与は毎日でもよいし、数日おきでもよい。

[0067] 本発明の抗HBV剤の投与経路は、経口投与でも非経口投与でもよいが、一般には筋肉内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与等の非経口投与が好ましい。

[0068] 本発明の抗HBV剤の有効成分は、各投与経路に適した、薬剂的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、甘味剤、懸濁化剤、乳化剤、着色剤、矯味剤、安定剤等の添加剤と適宜混合して製剤することができる。製剤形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口剤や、吸入剤、注射剤、座剤、液剤などの非経口剤などを挙げることができる。製剤方法及び使用可能な添加剤は、医薬製剤の分野において周知であり、いずれの方法及び添加剤をも用いることができる。

[0069] 2種以上の物質を有効成分として含む抗HBV剤は、2種以上の有効成分の全てを同一の製剤中に含む配合剤であってもよいし、各有効成分をそれぞれ単独で含有する単剤の組み合わせを含むものであってもよい。単剤の組み合わせを含む態様では、通常、単剤を同時に又は順次に投与するが、適当な間隔を置いて各単剤を投与しても差し支えない。

実施例

[0070] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0071] [実施例1]: DNAライブラリーの作成

(1-1) DNAライブラリーデザイン

IVVスクリーニングのためのDNAライブラリーのデザインを図1に示した。

In vitro virus (IVV)法 (Nemoto, N. et al., FEBS Lett., 414:405-408, 1997; Miyamoto-Sato, E. et al., Nucleic Acids Res., 28:1176-1182, 2000; WO 03/106675 A1) は、本願発明者の一人である柳川及びその共同研究者らが提案し、その構築に世界に先がけて成功した手法である。IVV法では、mRNAの3'末端にPEG (ポリエチレングリコール) スペーサーを介して抗生物質の一種のピューロマイシンを結合させ、それを鋳型として無細胞翻訳反応を行うことにより、タンパク質とmRNAがピューロマイシンを介して共有結合した単純なmRNA-タンパク質連結分子であるIVVが形成される (Miyamoto-Sato, E. et al., Nucleic Acids Res., 31: e78, 2003)。こうして構築されたIVVライブラリーの中からベイト (タンパク質、ペプチド、抗原など) と結合するタンパク質を含むIVVをin vitroで釣り上げた後、そこに連結している遺伝子 (mRNA) を逆転写・PCRで増幅し、DNAシーケンサーで塩基配列を解読することによって、相互作用するタンパク質やペプチドや抗体を容易に同定することができる。ベイトに結合したIVVを溶出・回収する方法は、フリーのベイトで競合溶出する方法が一般的であるが、競合溶出できない場合は、光開裂が可能な2-nitrobenzylリンカーを導入したPEGスペーサーを用い、365nmのUVを照射してスペーサーを切断することでmRNA部を溶出・回収できる (Doi, N. et al

., J. Biotechnol., 131:231-239, 2007)。

[0072] (1-2) DNAライブラリーの合成

緑色蛍光タンパク質GFP配列を有するDNA溶液 1 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 10 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 10 μ l、25mM MgSO₄ 4 μ l、forwardプライマー : GSP6-GFP-F (10 pmol/ μ l) 3 μ l、reverseプライマー : GFP-R (10 pmol/ μ l) 3 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 2 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を100 μ lとし、これを1チューブに入れ、合計300 μ l (チューブ3本) をPCR反応した。PCRは、94 $^{\circ}$ C5分間反応後、94 $^{\circ}$ C30秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C2分間を16サイクル行った後、68 $^{\circ}$ C5分間反応を行った。DNAはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し、50 μ lのGSP6-GFP-DNA溶液として回収した。

[0073] Atail配列を有するDNA溶液 1 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 10 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 10 μ l、25mM MgSO₄ 4 μ l、forwardプライマー : Flag-His-F (10 pmol/ μ l) 3 μ l、reverseプライマー : Atail (R) (10 pmol/ μ l) 3 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 2 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を100 μ lとし、これを1チューブに入れ、合計300 μ l (チューブ3本) をPCR反応した。PCRは、94 $^{\circ}$ C5分間反応後、94 $^{\circ}$ C30秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C2分間を16サイクル行った後、68 $^{\circ}$ C5分間反応を行った。DNAはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し50 μ lのFlag-His Atail-DNA溶液として回収した。

[0074] Flag-His Atail-DNA溶液 1 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 10 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 10 μ l、25mM MgSO₄ 4 μ l、forwardプライマー : 16NNS-Fあるいは9NNS-F (10 pmol/ μ l) 3 μ l、reverseプライマー : Atail (R) (10 pmol/ μ l) 3 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 2 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を100 μ lとし、これを1チューブに入れ、合計300 μ l (チューブ3本) をPCR反応した。PCRは、94 $^{\circ}$ C5分間反応後、94 $^{\circ}$ C30秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C2分間を12サイクル行った後、68 $^{\circ}$ C5分間反応を行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し50 μ lの16NNS At

ail-DNA溶液あるいは9NNS Atail-DNA溶液として回収した。

[0075] GSP6-GFP-DNA溶液1 μ l、16NNS Atail-DNA溶液あるいは9NNS Atail-DNA溶液1 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 10 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 10 μ l、25 mM MgSO₄ 4 μ l、forwardプライマー：GSP6-GFP-F (10 pmol/ μ l) 3 μ l、reverseプライマー：Atail (R) (10 pmol/ μ l) 3 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 2 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を100 μ lとし、これを1チューブに入れ、合計300 μ l (チューブ3本) をオーバーラップPCR反応した。PCRは、94 $^{\circ}$ C5分間反応後、94 $^{\circ}$ C30秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C2分間を12サイクル行った後68 $^{\circ}$ C5分間反応を行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し50 μ lのcDNAライブラリー16NNSLibならびに9NNSLibとして回収した。

[0076] [表1]

表1. プライマー配列(1)

名前	配列(5'→3')	配列番号
GSP6-GFP-F	GGAAGATCTATTTAGGTGACACTATAGAACAACAACAACAACAACAACAACAAAA TGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAG	51
GFP-R	TTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG	52
Flag-His-F	GACTATAAGGACGACGACGACAAGCACCATC	53
Atail (R)	TTTTTTTTCTTGTACTAGAACTGGGTGCTGGTTCGTAATCCCGCCAATGCC	54
16NNS-F	GGATGAACTATACAAANNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSGACTATAAGGACGACGACG	55
9NNS-F	CATGGCATGGATGAACTATACAAANNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSGACTA TAAGGACGACGACG	56

[0077] [実施例2]: IVVライブラリーの調製

(2-1) ライブラリーの転写

cDNAライブラリー16NNSLib ならびに9NNSLib をそれぞれ2pmol、5 \times SP6緩衝液 8 μ l、ATP (100mM) 2 μ l、CTP (100mM) 2 μ l、UTP (100mM) 2 μ l、GTP (10mM) 4 μ l、キャップアナログ(m7G(5')PPP(5')G) (Thermo Fisher Scientific) (40mM) 5 μ l、エンザイムミックスSP6RNA ポリメラーゼ (Promega) 4 μ l、RNase-Free水を添加し全体量を 40 μ lとし、37 $^{\circ}$ C、3時間反応後、RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 10 μ lを添加し、さらに37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた

。

[0078] RNAはRNeasy Mini kit (Qiagen)により精製した。すなわち転写反応液に、RNase-Free水を添加し全体量を100 μ lとし、RLT緩衝液(Qiagen) 350 μ l、2-メルカプトエタノール 3.5 μ l、(100%) エタノール 250 μ l、を加えRNeasy ミニスピニングカラムに供し、25 $^{\circ}$ C、12000 rpm、15秒間遠心後排出された溶液を除去し、RPE緩衝液(Qiagen)500 μ lを同カラムに加え、25 $^{\circ}$ C、12000 rpm、15秒間遠心後排出された溶液を除去し、さらにRPE緩衝液(Qiagen)500 μ lを同カラムに加え、25 $^{\circ}$ C、12000 rpm、2分間遠心後排出された溶液を除去し、同カラムを新しいチューブに差し替え、25 $^{\circ}$ C、12000 rpm、1分間遠心分離し、再び同カラムを新しいチューブに差し替え同カラムに、RNase-Free水を33 μ l添加し、10分間室温で放置後25 $^{\circ}$ C、13200 rpm、1分間遠心しRNA溶液として回収した。

[0079] (2-2) PEGスパーサーとのライゲーション

RNA溶液 32 μ l、T4 ligation 10 \times 緩衝液 5 μ l、0.1 M DTT 1 μ l、40 mM ATP 0.5 μ l、100% DMSO 5 μ l、0.1% BSA 1 μ l、RNase inhibitor(TOYOBO) 1 μ l、ピューロマイシン付きポリエチレングリコール光切断リンカー分子 (10 nmol) 0.5 μ l、ポリエチレングリコール (PEG) 2000 (日本油脂) (30 nmol) 1 μ l、T4 RNA リガーゼ (Takara)(40 U/ μ l) 3 μ lを混合し、遮光条件下15 $^{\circ}$ C、15時間反応させた。得られたスパーサー分子が結合したPEG-RNAはRNeasy Mini kit (Qiagen)により精製した。

[0080] (2-3) IVVライブラリーの調製

PEG-RNA 10 pmol、小麦胚芽抽出液 (ZoeGene) 20 μ l、クレアチンキナーゼ (40 μ g/ μ l) (ZoeGene) 2 μ l、RNase inhibitor(TOYOBO) 3.2 μ l、及び5 \times 翻訳緩衝液(ZoeGene) 20 μ lにRNase-Free水を添加し全体量を100 μ lとし、遮光条件下26 $^{\circ}$ C、1時間反応させ翻訳を行い、IVVライブラリーを調製した。

[0081] [実施例3]: ビオチン化DOCK11の調製

DOCK11のヒトDOCK180 superfamilyの構造を図2に示した。構造の類似性が

ら大きく四つのグループに分けられる。DOCKファミリータンパク質にはファミリー間で、アミノ酸配列がよく保存されている二つの領域、Dock homology region 1(DHR1)とDHR2が存在し、DHR1は、ホスファチジルイノシトール3-リン酸と結合する。DHR2ドメインは、それぞれ特異的なRhoファミリーGタンパク質を活性化する。DOCK11はDOCK-Dグループに属し、N末端領域にPHドメインを有している。DOCK11は低分子量Gタンパク質Cdc42を活性化し、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)としてはたらく。DOCK11結合ペプチドのIVVスクリーニングにおいて、全長のDOCK11(aa1-2073、配列番号42)のアミノ酸配列のC末端にビオチン化配列、Flag-tag及びHis-tagを付加した。またDHR2ドメインを含むDOCK11のC末側領域のペプチド(配列番号42のうちのaa1516-2073)のアミノ酸配列のC末端にビオチン化配列、Flag-tag及びHis-tagを付加した。

[0082] (3-1) ビオチン化全長DOCK11の発現ベクター構築

図3に示したように、初めに全長のDOCK11遺伝子(配列番号41)にビオチン化配列、Flag-tag、His-tag配列を付加したpcDNA3.3 TOPO KDOCK11-BioFLAGHisベクターを作成した。

[0083] BioEase™ plasmidよりF-Bioプライマー、R-Bioプライマーを用いてPCRにて調製した*Klebsiella pneumoniae*のオキサロ酢酸脱炭酸酵素 α サブユニットの遺伝子(72アミノ酸分)からなるBio-tag(Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 8, page e64)に、Flag-tagとHis-tagを付加させた。Bio-tag 2.37 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 40 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 40 μ l、25mM MgSO₄ 16 μ l、KstartBio-F (10 pmol/ μ l) 12 μ l、Bio-Flag-Histag A stop (10 pmol/ μ l) 12 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 8 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を200 μ lとし、PCR反応させた。PCRは、94 $^{\circ}$ C5分間反応後、94 $^{\circ}$ C30秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C2分間を20あるいは25サイクル行った後68 $^{\circ}$ C5分間反応を行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動でDNAのバンドを確認後、Wizard SV Gel PCR Clean-Up System(Promega)で精製し50 μ lのDNA溶液として回収しKstartBio-Flag-Hisを得た。

- [0084] KstartBio-Flag-HisのpcDNA 3.3ベクターへの導入はTOP0 クローニングキット (Invitrogen) で手順に従って行った。得られたクローンが正しい配列であることを確認し、コロニーを植菌し37°C、16時間培養した。菌体ペレットからPureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega)でプラスミドpcDNA3.3 TOP0 KBioFlagHisを精製した。
- [0085] DOCK11ベクター pF1KE2360 (Kazusa DNA Res.Inst.) (1 ng/μl) 0.5 μl、KAPA HiFi HS RM 12.5 μl、10 μM TOP0KstartDOCK11-IF-F 0.75 μl、及び10 μM DOCK11Bio-IF-R 0.75 μlにRNase-Free水を添加して全体量を25 μlとし、PCR反応を行った。PCRは、95°C5分間反応後、98°C20秒間、60°C15秒間、72°C1分間を25サイクル行った後72°C1分間反応を行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動でDNAのバンドを確認後、Wizard SV Gel PCR Clean-Up System(Promega)で精製し30 μlのDNA溶液として回収しKstart-DOCK11-IFを得た。
- [0086] pcDNA3.3 TOP0 KBioFlagHis 0.5 μl、KAPA HiFi HS RM 10 μl、10 μM F-Bio 0.6 μl、10 μM TOP0KstartINV-R 0.6 μlにRNase-Free水を添加して全体量を20 μlとし、PCR反応させた。PCRは、95°C3分間反応後、98°C20秒間、60°C15秒間、72°C3分間を25サイクル行った後、72°C1分間反応を行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で確認後、Wizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega)で精製し30 μlのDNA溶液として回収しTOP0 KBioFlagHisINVを得た。
- [0087] Kstart-DOCK11-IF 1.0 μl、TOP0 KBioFlagHisINV 1.0 μl、5x in fusion HD Enzyme premix 1.0 μl (Takara) にRNase-Free水を添加して全体量を5 μlとし、50°C、15分間反応させた。2.5 μlをOne Shot TOP10 competent cellにトランスフォーメーションし37°C 1晩培養し、クローンを得た。クローンの配列解析の結果、プラスミドpcDNA3.3 TOP0 KDOCK11-BioFLAGHisであることを確認した。
- [0088] (3-2) ビオチン化C末側領域DOCK11の発現ベクター構築
次にC末側領域のDOCK11遺伝子にビオチン化配列、Flag-tag、His-tag配列を付加したpcDNA3.3 TOP0 KDOCK11(1516-2073)-BioFLAGHisベクターを作成し

た。

[0089] DHR2ドメインを含むDOCK11のC末側領域のペプチド(aa1516-2073)にビオチン化配列、Flag-tag、His-tag配列を付加したDOCK11(1516-2073)-BioFLAGHis-pcDNAベクターを作成するためにKOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) でInverse PCRを行なった。pcDNA3.3 TOPO KDOCK11-BioFLAGHis プラスミド0.14 μ l、10 \times buffer for iPCR 5 μ l、2 mM dNTPs 5 μ l、forwardプライマー：DOCK11-1516-F(10 pmol/ μ l) 1.5 μ l、reverseプライマー：Kstart-R (10 pmol/ μ l) 1.5 μ l、KOD plus ポリメラーゼ1 μ lにRNase-Free水を添加し全体量を50 μ lとしてPCR反応させた。PCRは94 $^{\circ}$ C、2分間反応後98 $^{\circ}$ C、10秒間、68 $^{\circ}$ C 10分間を6サイクル行った。続いてPCR product 50 μ lに制限酵素Dpn I 12 μ lを加え37 $^{\circ}$ C、1時間反応させ鋳型 Plasmid DNAを分解した。Dpn I処理済みproduct 2 μ l、Ligation high 5 μ l、T4 Polynucleotide Kinase 1 μ l を加え16 $^{\circ}$ C、1時間反応させPCR 産物を自己環状化させた。Ligation product5 μ lをOne Shot TOP10 competent cellにトランスフォーメーションし37 $^{\circ}$ C 1晩培養し、クローンを得た。クローンの配列解析の結果、プラスミドpcDNA3.3 TOPO KDOCK11(1516-2073)-BioFLAGHisであることを確認した。

[0090] [表2]

表2. プライマー配列(2)

名前	配列(5'→3')	配列番号
F-Bio	GGCGCCGGCACCCCGGTGAC	57
R-Bio	CGCCAGGGTCATCAGGGTGT	58
KstartBio-F	GCCACCATGGGCGCCGGCACCCCGGTG	59
Bio-Flag-Histag A stop	CTAATGGTGATGGTGGTGATGGTGCTTGTCTGTCGTCGTCTTGT AGTCCGCCAGGGTCATCAGGGTGT	60
TOPOKstartDOCK11-IF-F	ACCCTTGCCACCATGGCCGAAGTGCGCAAATTCAC	61
DOCK11Bio-IF-R	CGGGGTGCCGGCGCCCACTTCAGCGTATCTTGGGG	62
TOPOKstartINV-R	CATGGTGGCAAGGGTTCGATC	63
DOCK11-1516-F	ACCAAAAGGAAAACCTTTTTGAGG	64
Kstart-R	CATGGTGGCAAGGGTTCGATC	65

[0091] (3-3) ビオチン化全長DOCK11あるいはビオチン化C末側領域DOCK11の発現と精製

ヒト胎児腎細胞293T細胞は10%FCS(ニチレイ)、DMEM(1.0g/l Glucose) with

L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (ナカライ)培地で培養した。トランスフェクションの24時間前に6cmシャーレに(1:2)の割合でプレATINGした。1枚のシャーレに対しプラスミドpcDNA3.3 TOP0 KDOCK11-BioFLAGHisあるいはpcDNA3.3 TOP0 KDOCK11(1516-2073)-BioFLAGHisをOpti-MEM I 500 μ lに入れたものに、Lipofectamine 2000 20 μ lをOpti-MEM I 500 μ lに入れ室温で5分間置いたものを穏やかに加えた。混和物は室温で20分間放置後293T細胞のシャーレに加え37°C、5% CO₂条件下1日培養した。

[0092] シャーレの培地を除去後、冷PBS 2mlで細胞を洗った。RIPA buffer (25 mM Tris·HCl、150 mM NaCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、pH 7.6) 800 μ l、プロテアーゼ阻害剤、動物細胞抽出物用(Cat#25955-11) x50 (フッ化4-(2-アミノエチル)、ベンゼンスルホニル塩酸塩(AEBSF)、アプロチニン、E-64、ロイペプチンヘミ硫酸塩一水和物、ベスタチン、ペプスタチン A) を16 μ l、0.1M PMSF 8 μ lを細胞に加え15分間氷上で放置した。セルスクレーパーで細胞を剥がしチューブに集め21Gの注射針でホモジネート後60分間氷上で放置した。12,300 rpm、30分間 4°Cで遠心分離し、上清を新しいチューブに移し細胞画分とした。それぞれ全部で6cmシャーレ4枚をトランスフェクションし細胞画分を得た。これらを使って固定用のビオチン化全長DOCK11あるいはビオチン化C末側領域DOCK11を精製した。TALON magnetic beads (Clontech) 500 μ l(50%スラリー)をTBS buffer (ナカライ) 5.0 mlで3回洗浄したものに上記のそれぞれの細胞画分を加え、4°Cで1晩ミニディスクローター (Bio craft) で回転攪拌した。ビーズをTBS buffer 5.0 mlで3回洗浄した。500mM imidazoleを含むTBS 500 μ lを加え4°Cで1時間ミニディスクローターで回転攪拌した後上清を集めた(溶出画分 E1)。残ったビーズに500mM imidazoleを含むTBS 250 μ lを加え、同様の操作で溶出画分 E2を回収した。溶出画分 E1 15 μ lにサンプル緩衝液LDS(4x)、0.2mM DTT 6.8 μ lを加え70°C、10分間加熱後SDS-PAGEに供した。SDS-PAGEは4-12% Bis-Tris NuPAGE ゲル、MES電気泳動緩衝液 (Invitrogen)で200V、400mA、35分間電気泳動後、Mini Format、0.2 μ m PVDF、Single application (BIORAD) Trans-Blot Turboで転写し

た。膜はBlocking One Buffer : TBST (1 : 9) でブロッキングし、Blocking One Buffer : TBST(1 : 9)で2:3000に希釈したanti-Flag-HRP (Sigma: A8592)を反応させた。検出はECL(Enhanced ChemiLuminescence)を用い、ChemiDoc(BIO RAD)で行った。ビオチン化全長DOCK11は分子量246,762 Daあるいはビオチン化C末側領域DOCK11は分子量73,404 Daのバンドとして確認することができた。

[0093] [実施例4]: DOCK11と結合するペプチドの選択

DOCK11と結合するペプチドの選択実験を図4に示すような手順で行った。

(4-1) DOCK11の固定化

ピアコアはピアコア3000システムを用い、センサーチップSAにビオチン化C末側領域DOCK11の固定化を行った。フローは緩衝液HBS-P(10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20) で10 μ l/minで行った。フローセル1~4への50mM NaOH, 1M NaClを含む溶液10 μ lのインジェクトを3回繰り返していき、固定化の前処理を行った。ビオチン化C末側領域DOCK11 (1nM) を用いて、フローセル1~4に固定化した。フローは緩衝液HBS-P、20 μ l/minで行った。23 μ lをマニュアルインジェクションしたところフローセル1~4に1267.4 RU (平均) 結合した。センサーチップを洗浄する目的で緩衝液HBS-Pで10 μ l/min, 50% Isopropanol, 50mM NaOH, 1M NaClを用いてextra washを行った。

[0094] (4-2) DOCK11と結合するペプチドの選択

調製したIVVライブラリー100 μ lにfinal 20mMとなるように0.5M EDTA 4 μ lを加え、20分間室温で回転攪拌した。HBS-Pで膨潤ならびに平衡化させたSep hadex G200 (Amersham Biosciences)ゲル1 mlをカラム (バイオラッド) に充填したものにIVVライブラリー溶液100 μ lを供し、2滴ずつ96穴プレートに集め1 wellから10wellまでを回収した。Multi-detection Microplate Reader POWERSCAN HTで励起波長485nm、蛍光波長528nmで蛍光を検出し、3well目から7 well目あたりに溶出したIVV画分を集めた。Strep Magne Sphae Paramagnetic Part (9013-20-1) 100 μ lをHBS-P 500 μ lで3回洗浄したものにIVV画分約200

μl を加え、20分間室温で回転攪拌し、その上清をビアコアにインジェクトした(図4)。ビアコアでのセレクションは緩衝液HBS-Pで $40\mu\text{l}/\text{min}$ で行い、160秒結合、5000秒解離させた。その後、センサーチップを機械より抜き取った。センサーチップの金膜の上にRNase-Free水 $55\mu\text{l}$ を静かに加え、20分間、365nmのUVを照射してスパーサーを切断してmRNA部を溶出・回収した。

[0095] (4-3) RT-PCRによるcDNAライブラリーの回収

上記(4-2)の選択実験で回収した溶液 $55\mu\text{l}$ 、 $5\times\text{RT}$ 緩衝液(TOYOBO) $20\mu\text{l}$ 、(10 mM) dNTPs(TOYOBO) $10\mu\text{l}$ 、及びreverseプライマー: Atail (R) ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$) $5\mu\text{l}$ にRNase-Free水を添加し全体量を $90\mu\text{l}$ として混和させ、 65°C で9分間反応後直ちに氷上に冷却し、2分間放置した後、ReverTra Ace(TOYOBO) $5\mu\text{l}$ 及びRNase inhibitor(TOYOBO) $5\mu\text{l}$ を加え、 50°C 30分間、 99°C 、5分間逆転写反応させた。逆転写反応させた反応溶液 $100\mu\text{l}$ 、 $10\times\text{KOD plus}$ 緩衝液(TOYOBO) $100\mu\text{l}$ 、2 mM dNTPs(TOYOBO) $100\mu\text{l}$ 、25mM MgSO_4 $40\mu\text{l}$ 、forwardプライマー: GSP6-GFP-F ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$) $30\mu\text{l}$ 、reverseプライマー: Atail (R) ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$) $30\mu\text{l}$ 、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) $20\mu\text{l}$ にRNase-Free水を添加して全体量を $1000\mu\text{l}$ としチューブ1本につき $100\mu\text{l}$ 入れ合計10本をPCR反応させた。PCRは、 94°C 5分間反応後、 94°C 30秒間、 58°C 30秒間、 68°C 2分間を20から40サイクル行った後、 68°C で5分間反応を行った。

[0096] ビアコアを使った選択実験の選択圧は表3に示すように段階的にラウンドごとに選択圧を順次上げた。

[0097]

[表3]

表3 DOCK11のスクリーニング実験における選択圧

	1st ラウンド	2nd ラウンド	3rd ラウンド	4th ラウンド
ペイトの固定量	1267.4 RU	856.7 RU	340.8 RU	357.8 RU
IVV結合時間	240s	120s	96s	96s
ピアコアでの洗浄流速	40 μ l/min	80 μ l/min	100 μ l/min	100 μ l/min
ピアコアでの洗浄時間	5000秒	8000秒	72000秒	18時間

	5th ラウンド	6th ラウンド	7th ラウンド	8th ラウンド
ペイトの固定量	334.3 RU	536.9 RU	546.9 RU	529.1 RU
IVV結合時間	96s	96s	96s	96s
ピアコアでの洗浄流速	100 μ l/min	100 μ l/min	100 μ l/min	100 μ l/min
ピアコアでの洗浄時間	20.8時間	21.0時間	23.0時間	21.0時間

[0098] [実施例5]: クローニングと塩基配列の決定

(5-1) クローニングと塩基配列

DOCK11と結合するペプチドライブラリーから in-fusionクローニングライブラリーのinsert作成

8ラウンドの選択実験を行ったライブラリー 1 μ l、10×KOD plus緩衝液(TOYOBO) 100 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 100 μ l、25mM MgSO₄ 40 μ l、GFP-F in (10 pmol/ μ l) 30 μ l、His-S28-R in (10 pmol/ μ l) 30 μ l、及びKOD plusポリメラーゼ(TOYOBO) 20 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を1000 μ lとし、PCR反応させた。PCRは、94°C5分間反応後、94°C30秒間、58°C30秒間、68°C2分間を8サイクル行った後、68°C5分間反応を行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し、50 μ lのDNA溶液として回収しGFP-DC-S8 inを得た。

[0099] kozak-GFP配列とFlagHisS28配列とstopコドンを含む pcDNA 3.3ベクター8 μ l、10×KOD plus緩衝液(TOYOBO) 80 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 80 μ l、25mM MgSO₄ 32 μ l、S28-F iv (10 pmol/ μ l) 24 μ l、3.3K-GFP-Riv (10 pmol/ μ l) 24 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 16 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を800 μ lとし、PCR反応させた。PCRは、94°C2分間反応後、98°C10秒間、68°C5分11秒間を25サイクル行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel

PCR Clean-Up System (Promega) で精製し、40 μ lのDNA溶液として回収しKGF P-S28 3.3 vectorを得た。

[0100] GFP-DC-S8 in 0.08 μ l、KGFP-S28 3.3 vector 0.14 μ l、5x in fusion HD Enzyme premix 1.0 μ l (Takara) を混ぜ、RNase-Free水を添加し全体量を5 μ lとし50°C、15分間反応させた。反応後の溶液2.5 μ lをOne Shot TOP10 competent cellにトランスフォーメーションし37°C 1晩培養し、KGFP-DCS8クローンを得た。得られたクローンの配列解析はユーロフィンDNAシーケンス受託サービス、ValueReadプレミックスにより行った。

[0101] GFP配列の上流に核移行シグナル配列遺伝子CCTGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGAC (配列番号47) を導入し、stopコドンを含む pcDNA 3.3ベクター8 μ l、10×KOD plus緩衝液(TOYOBO) 80 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 80 μ l、25mM MgSO₄ 32 μ l、S28iv-25F (10 pmol/ μ l) 24 μ l、GFPiv-71R (10 pmol/ μ l) 24 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 16 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を800 μ lとし、PCR反応させた。PCRは、94°C2分間反応後、98°C10秒間、68°C5分11秒間を25サイクル行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し、40 μ lのDNA溶液として回収しNLS-GFP-S28 3.3 vectorを得た。

[0102] KGFP-DCS8クローンDNA 1 μ l、10×KOD plus緩衝液(TOYOBO) 100 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 100 μ l、25mM MgSO₄ 40 μ l、GFPin-92F (10 pmol/ μ l) 30 μ l、S28in-7R (10 pmol/ μ l) 30 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 20 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を1000 μ lとし、PCR反応させた。PCRは、94°C5分間反応後、94°C30秒間、58°C30秒間、68°C2分間を8サイクル行った後、68°C5分間反応を行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し、50 μ lのDNA溶液として回収しNLS-GFP-DC-S8 inを得た。

[0103] NLS-GFP-DC-S8 in 0.08 μ l、NLS-GFP-S28 3.3 vector 0.14 μ l、5x in fusion HD Enzyme premix 1.0 μ l (Takara) を混ぜ、RNase-Free水を添加し全体量を5 μ lとし50°C、15分間反応させた。反応後の溶液2.5 μ lをOne Shot TOP1

0 competent cellにトランスフォーメーションし37°C 1晩培養し、NLS-GFP-D CS8クローンを得た。得られたクローンの配列解析はユーロフィンDNAシーケンス受託サービス、ValueReadプレミックスにより行った。

[0104] [表4]

表4. プライマー配列(3)

名前	配列(5'→3')	配列番号
GFP-F in	ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAG	66
His-S28-R in	ACCGATCACAAACGGATGGTGGTGGTGGTG	67
S28-F iv	CCGTTTGTGATCGGTGCCGGTGTCTGGGC	68
3.3K-GFP-Riv	TTCTCCTTTACTCATGGTGGCATCTCTAG	69
S28iv-25F	CTGGGCGCGTTAGGCACTGGCATTTGGCGGGATTAC	70
GFPiv-71R	CACCTTCACCCCTCTCCACTGACAGAGAACTTGTGGC	71
S28in-7R	GCCTAACGCGCCCAGAACACCGGCACCGATCAC	72
GFPin-92F	GAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACC	73

[0105] (5-2) ライブラリーの配列解析

ライブラリーの配列解析の結果、表5に示すように3ラウンド、5ラウンド、8ラウンドからそれぞれDOCK11結合ペプチドのクローンが得られた。なお、表5中のDCS8-42TN、DCS8-59R、DCS8-59Cは、後述するとおり、DCS8-42及びDCS8-59のホモロジー検索の結果に基づいて設計したペプチドである。

[0106] [表5]

表5. IVVスクリーニングされたDOCK11結合ペプチドのアミノ酸配列と誘導体の配列

クローン名	アミノ酸残基数	ランダムペプチド部分のアミノ酸配列	配列番号
DCS3-1	16	IITPGTEVLNSDLQAS	配列番号1
DCS5-4	16	HNVLVYNPAWGKYFH	配列番号2
DCS5-5	16	NFPPNPMHNTDSCICA	配列番号3
DCS5-15	16	TEKRRLMKPVLLTYNP	配列番号4
DCS8-6	16	IICPGAELVNGDLVAS	配列番号5
DCS8-29	16	TEYRRCVTPVLLTYNN	配列番号6
DCS8-59	16	TEEHRGLLPVLMTYNV	配列番号7
DCS8-72	16	TEFCRWTPVLCITYNA	配列番号8
DCS8-42	17	TEQARPTPPPVLDTYNL	配列番号9
DCS8-42TN	16	PEQARPPPLEDNLFL	配列番号10
DCS8-59R	18	HEEHRGMLREDSMMEYLK	配列番号11
DCS8-59C	16	AEEHRGLLTI RYPMEH	配列番号12

[0107] [実施例6]: DOCK11結合ペプチドのクローンの活性評価

(6-1) 蛋白質の調製

インフレイムのクローンはカルベニシリン $20\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地にマスタープレートよりコロニーを植菌し 37°C 、16時間培養した。菌体ペレットからPureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (インビトロジェン)でプラスミドを精製した。

[0108] (6-2) 蛋白質の調製

ヒト胎児腎細胞293T細胞は10%FCS(ニチレイ)、DMEM(1.0g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (ナカライ)培地で培養した。トランスフェクションの24時間前に6cm シャーレに(1:2)の割合でプレーティングした。6cm シャーレに対しプラスミドDNA $8\mu\text{g}$ をOpti-MEM I $500\mu\text{l}$ に入れたものに、Lipofectamine 2000 $20\mu\text{l}$ あるいはPEI-MAX $20\mu\text{l}$ をOpti-MEM I $500\mu\text{l}$ に入れ室温で5分間置いたものを穏やかに加えた。混和物は室温で20分間放置後293T細胞の6cm シャーレに加え 37°C 、5% CO_2 条件下4日～6日培養した。

[0109] (6-3) プルダウン実験

レジン(Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles)(Promega)の洗浄はMagneSphere Technology Magnetic Separation Stand (twelve-position)を使って行った。レジン $40\mu\text{l}$ を1.5 mlチューブに取り、溶液を除去した後PBS 1 mlで3回洗浄を行った。新しいチューブにレジンを移し、ビオチン化全長DOCK11あるいはビオチン化C末側領域DOCK11 あるいはベイトなしは等量のPBSを加え、ミニディスクローター (Bio craft) で回転攪拌し 4°C で1時間結合させた。溶液を除去後TBST (Tween20 0.05%) 1 mlで3回洗浄を行った。

新しいチューブにレジンを移し、ELISA BSA緩衝液(ナカライテスク株式会社

TBS, 0.05%, Tween 20, 1% BSA) 1 mlで 4°C 1時間ブロッキングを行い、ELISA BSA緩衝液1 mlで3回洗浄を行った。新しいチューブにレジンを移し、DCS3 あるいは DCS5あるいはDCS8を発現させた培養上清を $1000\mu\text{l}$ ずつ、ビオチン化全長DOCK11あるいはビオチン化C末側領域DOCK11あるいはベイトなしで処理したレジン $40\mu\text{l}$ に混和させ、ミニディスクローター (Bio craft) で回転攪

拌し、4°Cで1時間30分結合させた。溶液を除去後TBST (Tween20 0.1%) 500 μ lで3回洗浄を行い、回収レジンをウエスタンブロットした。

[0110] 各レジんに水とサンプル緩衝液LDS(4x)、0.2mM DTTを加え、70°C、10分間加熱後SDS-PAGEに供した。SDS-PAGEは4-12% Bis-Tris Gel、NuPAGE MES SDS電気泳動緩衝液 (Invitrogen)で200V, 400mA, 35分間電気泳動後、Mini Format, 0.2 μ m PVDF, Single application (BIORAD) Trans-Blot Turboで転写した。膜はBlocking One Buffer : TBST (1 : 9) でブロッキングし、Blocking One Buffer : TBST(1 : 9)で2:3000に希釈したanti-Flag-HRP (Sigma: A8592)を反応させた。検出はECL(Enhanced ChemiLuminescence)を用い、ChemiDoc(BIORAD)で行った。

[0111] DOCK11結合ペプチドによるDHR2領域を含むC末端DOCK11に対するプルダウンアッセイ (図5) を行った。3ラウンドの選択実験を行なったクローンの内3個を評価した結果、DCS3-1 (配列番号1)、DCS3-2、DCS3-3がポジティブだった。

[0112] 3ラウンド、5ラウンド、8ラウンドのクローンの内4つのクローンDCS3-1 (配列番号1)、DCS5-15 (配列番号4)、DCS8-42 (配列番号9) 並びにDCS8-42TN (配列番号10) についてDOCK11結合ペプチドによるDHR2領域を含むC末端DOCK11に対するプルダウンアッセイを行なった (図6)。ポジティブだったDCS3-1 (配列番号1) とシグナル強度を比較した結果、8ラウンドから得られたDCS8-42 (配列番号9) 並びにDCS8-42TN (配列番号10) は強くDOCK11に結合していることがわかった。

[0113] [実施例7]: スクリーニングしたDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性

(7-1) HepG2-NTCP-C4細胞におけるDOCK11G結合ペプチドの抗HBV活性

DHR2領域を含むC末端DOCK11に対するプルダウン実験でポジティブだったクローンについて、HepG2-NTCP-C4細胞 (HBVの受容体であるNTCPを過剰発現させたHepG2細胞、Iwamoto, M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 443: 808-813, 2014) におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性を評価した (図7)。ペプチドを含むプラスミドには細胞内に発現するもの(DCS3-1)と、核移

行シグナルPAAKRVKLD（配列番号40）を付加したもの(N-DCS3-1)を調整した。HBVは、HBV core上流に存在するpackaging signal (ϵ) を欠損させたヘルパープラスミドをHepG2細胞に安定発現させた細胞であるHepG2.2.15に由来するHBVを用いた。HepG2-NTCP-C4細胞にHepG2.2.15由来HBVを感染させた後、種々のペプチドをコードしたプラスミドをLipofectamine 3000でそれぞれトランスフェクションした。トランスフェクションから3-5日後にサンプルを回収し、HBV-DNA、cccDNAを評価した。

- [0114] プルダウン実験でポジティブだった2つのクローンDCS3-2、DCS3-3はコントロールと比較してHBV DNAのコピー数とcccDNAのコピー数を減少させることはなかったが、DCS3-1はコントロールと比較してHBV DNAのコピー数を減少させた。また、cccDNAのコピー数についても減少していた。
- [0115] 5ラウンドの選択実験を行なったクローン6個についても同様にDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性を評価した（図8）。DCS5-1、DCS5-4（配列番号2）、DCS5-5（配列番号3）、DCS5-15（配列番号4）、DCS5-7、DCS5-33のうち、DCS5-1、DCS5-7、DCS5-33はコントロールと比較してHBV DNAのコピー数とcccDNAのコピー数を減少させることはなかったが、DCS5-4（配列番号2）、DCS5-5（配列番号3）、DCS5-15（配列番号4）はコントロールと比較してHBV DNAのコピー数を減少させた。また、cccDNAのコピー数についても減少していた。
- [0116] さらに強い抗HBV活性を有するDOCK11結合ペプチドを選択するために、強力な選択圧をかけてIVV選択実験を行なった。8ラウンドの選択実験を行ない5個のクローンを得た。そのうち2つのクローンDCS8-42とDCS8-59はBLASTPにおいてホモロジー検索を行った結果、DCS8-42はTNK2 (Ack1) と高いホモロジーを示し、DCS8-59はradixin、 β -Contractinと高いホモロジーを示した。DCS8-42と相同配列を有するDCS8-42TN (DCS8-42と高いホモロジーを示したTNK2 (Ack1) の部分領域からなるペプチド、配列番号10)、並びに、DCS8-59と相同配列を有するDCS8-59R (DCS8-59と高いホモロジーを示したradixinの部分領域からなるペプチド、配列番号11)、DCS8-59C (DCS8-59と高いホモロジーを示した β -Contractinの部分領域からなるペプチド、配列番号12) を調製し、

他の3つのクローンと合わせて抗HBV活性を検討した。20日間HBVをHepG2-NTCP-C4細胞に感染させて評価したところ、DCS8-6（配列番号5）、DCS8-29（配列番号6）、DCS8-59（配列番号7）、DCS8-72（配列番号8）、DCS8-42TN（配列番号10）のいずれもHBV DNAのコピー数とcccDNAのコピー数についても減少させた（図9）。

[0117] DOCK11は細胞質だけでなく核画分にも局在することから、核移行シグナル（N-と表記する）をC末端につけたペプチドについて、検討した。5日間HBVをHepG2-NTCP-C4細胞に感染させて評価したところ、N-DCS8-6、N-DCS8-29、N-DCS8-59、N-DCS8-72、N-DCS8-42TNのいずれもHBV DNAのコピー数とcccDNAのコピー数についても減少させた（図10）。19日間HBVをHepG2-NTCP-C4細胞に感染させて評価したところN-DCS8-59、N-DCS8-59C、N-DCS8-59R、N-DCS8-42TNのいずれもHBV DNAのコピー数とcccDNAのコピー数についても減少させた（図11）。

[0118] 血中のタンパク質の多くはシアル酸が付加された糖タンパク質であるが、劣化してくるとアシアロ糖タンパク質となり、主として肝臓で分解される。そのために肝臓には、血中のアシアロ糖タンパク質を特異的に認識し、取り込むためのアシアロ糖タンパク質受容体が存在する。抗アシアロ糖タンパク質受容体抗体も同様に受容体に結合した後肝臓細胞内に取り込まれると考えられる。これを利用した抗アシアロ糖タンパク質受容体抗体を用いたDOCK11結合ペプチドの肝細胞選択的送達法を確立するためにアシアロ糖タンパク質受容体に結合する一本鎖抗体の選択実験をIVV法を用いて行なった。

[0119] [実施例8]: ビオチン化ASGRの調製

初めに抗原となるビオチン化アシアロ糖タンパク質受容体を作成した。図12に示すようにアシアロ糖タンパク質受容体（ASGR）はN末端を細胞内、糖認識部位（CRDs）を細胞外に向けたII型の1回膜貫通タンパク質である。これをピアコアのセンサーチップ上に提示するために膜貫通ドメインを除き、ビオチン化配列等を付加したコンストラクトを作成した。ヒトの肝細胞には受容体ASGR1とASGR2が存在し、ヘテロオリゴマーを形成していることからそれ

それぞれの細胞外ドメインにビオチンを付加した、ビオチン化ASGR1exとビオチン化ASGR2exを作成した。

[0120] (8-1) ビオチンASGRの発現ベクター構築

ASGRの細胞外ドメインにHis-tag、ビオチン化配列、Flag-tag、配列を付加したpcDNA3.3 TOPO HisBioFLAG-ASGR1exベクターとpcDNA3.3 TOPO HisBioFLAG-ASGR2exベクターを作成した。

[0121] 図13に示すようにASGR1とASGR2のそれぞれの細胞外ドメインをクローニングした。

cDNA Library, Human Liver (1 ng/ μ l) (タカラバイオ) 1 μ l、KAPA HiFi HS RM 10 μ l、10 μ M ASGR1-ex-if-F1 0.6 μ lあるいはASGR2-ex-if-F1 0.6 μ l、及び10 μ M ASGR1-if-R2 0.6 μ lあるいはASGR2-if-R2 0.6 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を20 μ lとし、PCR反応を行った。PCRは、95 $^{\circ}$ C5分間反応後、98 $^{\circ}$ C20秒間、60 $^{\circ}$ C15秒間、72 $^{\circ}$ C1分間を25サイクル行った後72 $^{\circ}$ C1分間反応を行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動でDNAのバンドを確認後、Wizard SV Gel PCR Clean-Up System(Promega)で精製し30 μ lのDNA溶液として回収しASGR1-ifあるいはASGR2-ifを得た。

[0122] 図14に示すようなコンストラクトの発現プラスミドを作成するために、kozak配列-Hisタグ配列-ビオチン化配列-Flagタグ配列を含むベクターpcDNA3.3 TOPO KHisBioFlagを使ってASGR1-ifあるいはASGR2-ifをインフュージョンクローニングした。pcDNA3.3 TOPO KHisBioFlagINV 1.0 μ l、ASGR1-if 1.0 μ lあるいはASGR2-if 1.0 μ l、5x in fusion HD Enzyme premix 1.0 μ l (Takara)にRNase-Free水を添加して全体量を5 μ lとし、50 $^{\circ}$ C、15分間反応させた。2.5 μ lをOne Shot TOP10 competent cellにトランスフォーメーションし37 $^{\circ}$ C 1晩培養し、クローンを得た。クローンの配列解析の結果、プラスミドpcDNA3.3 TOPO KHisBioFlag-ASGR1exあるいはpcDNA3.3 TOPO KHisBioFlag-ASGR2exであることを確認した。

[0123]

[表6]

表6. プライマー配列(4)

名前	配列(5'→3')	配列番号
ASGR1-ex-if-F1	GACGACGACGACAAGCAAAACTCCCAGCTGCAGGA	74
ASGR2-ex-if-F1	GACGACGACGACAAGCAAAAGTGAGGGTCACAGGGG	75
ASGR1-if-R2	CTAACCGGTAGGGATTTAAAGGAGAGGTGGCTCCT	76
ASGR2-if-R2	CTAACCGGTAGGGATTCAGGCCACCTCGCCGGTGG	77

[0124] (8-2) ビオチン化細胞外ドメインASGR1exあるいはビオチン化細胞外ドメインASGR2exの発現と精製

ヒト胎児腎細胞293T細胞を用いてプラスミドpcDNA3.3 TOP0 KHisBioFlag-ASGR1exあるいはpcDNA3.3 TOP0 KHisBioFlag-ASGR2exをトランスフェクションした。37°C 5% CO₂ 48時間培養後得られた細胞をCell lysis buffer (Tris-HCl pH 7.4 25 mM、NaCl 137 mM、KCl 2.68 mM、Triton X-100 1%)で抽出した。得られた細胞抽出液に、TBSで洗浄したM2アガロースビーズ(ANTI-FLAG (登録商標) M2 Affinity Gel, Sigma, A2220)を加え、4°C 16時間混合した。TBST(10x TBS-t 1%Tween-20, ナカライ, 12749-21)で3回洗浄した後、TBSで希釈した150 µg/mL 3x FLAG peptide(Sigma, F4799)で競合溶出した。

[0125] SAビーズ(Streptavidin MagneSphere(登録商標) Paramagnetic Particles, Promega)20 µLをTBST(10x TBS-T 1%Tween-20, ナカライ) 200 µLで3回洗浄し、FLAG精製済みタンパク質を以加えた。1時間室温で回転させて混合した後TBST 200 µLで3回洗浄した。ビーズをTBS 10 µLに懸濁させて70°C 10 min処理し、SDS-PAGEとFlag抗体を用いてウエスタンブロットで検出したところ。K HisBioFlag-ASGR1exは分子量35,597Da、KHisBioFlag-ASGR2exは分子量35,708 Daのバンドとして確認することができた。

[0126] 同様の方法で得たHisBioFLAG-ASGR1exの細胞抽出液をSAビーズに結合し、洗浄した後EKMax buffer (500 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 1% Tween-20)に交換した。EKMax™ Enterokinase (Thermo Fisher Scientific)を加え37°C 0/N (16.5h) 回転させEKMax digestionを行ない、マグネットスタンドでSAビーズを吸着させて上清回収した。回収した上清に前処理したEK Away

resin を加え、室温15min 回転させEKMaxを除去した。遠心して上清を回収 (5000rcf 2min x2) しSDS-PAGEとFlag抗体を用いてウエスタンブロットで検出したところASGR1ex 分子量26394 Daバンドとして確認することができた。

[0127] [実施例9]: 一本鎖抗体cDNAライブラリーの作成

(9-1) DNAライブラリーデザイン

抗体の抗原認識はH鎖、L鎖のN末端側のドメインが担っており、可変領域 (Variable region) と呼ばれる。一方、その他のドメインはクラスごとに一定で、定常領域 (Constant region) と呼ばれる (図15左)。V_H鎖、V_L鎖はともに3つのCDR (Complementarity-determining regions) と4つのFR (Framework regions) から構成されている (図15右)。CDRは抗体ごとに多様なアミノ酸配列からなり、様々な抗原との結合を可能にしている。人工的な抗体断片としては、V_H鎖とV_L鎖をペプチドリンカーで連結させた一本鎖抗体 (Single-chain antibody : scFv) がある (図16)。V_H鎖、V_L鎖を15アミノ酸からなるペプチドリンカーがドメイン間の会合を妨げないよう、二次構造が強制されない配列としてグリシンと親水性のセリンを含むGGGGユニットを3回繰り返したリンカー (配列番号48) が多く利用されている。

[0128] [実施例10]: マウス由来一本鎖抗体cDNAライブラリーの作成

マウス由来一本鎖抗体cDNAライブラリーの作成は図17に示すようにマウス脾臓Poly A+ RNAを出発原料に行った。H鎖DNA溶液の調製、L鎖DNA溶液の調製、H鎖とL鎖の一本化PCRを行なった。(Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 8 e64)。

[0129] (10-1) H鎖DNA溶液の調製

一本鎖抗体cDNAライブラリーの作成は、始めにH鎖DNA溶液の調製を行った。マウス脾臓Poly A+ RNA (5 μg/μl) (DEPC-処理水) (CLONTECH社)をRNase-Free水で100倍に希釈したものを 11 μl、5×RT緩衝液(TOYOBO) 22 μl、(10 mM) dNTPs(TOYOBO) 11 μl、forwardプライマー MulgG1/2 (1pmol/μl) 27.5 μl、forwardプライマー MulgG3 (1pmol/μl) 27.5 μl、を混和させ65°C 9分間反応後直ちに4°Cに冷却し4°C 2分間放置した後、ReverTra Ace(TOYOBO) 5.

5 μ l、RNase inhibitor(TOYOBO) 5.5 μ lを加え50°C 30分間、99°C、5分間反応させcDNA-Hを合成した。cDNA-H溶液 5 μ lに、HBプライマーに示した各HBプライマー (1pmol/ μ l) 各2.5 μ l、10×PCR緩衝液(TOYOBO) 2.5 μ l、forwardプライマー MulgG1/2 (1pmol/ μ l) 1.25 μ l、forwardプライマー MulgG3 (1pmol/ μ l) 1.25 μ l、KOD DASH ポリメラーゼ(TOYOBO) 0.25 μ l、とRNase-Free水を添加し全体量を 25 μ l、としてそれぞれPCR反応させた。PCRは96°C、5分間反応後96°C、30秒間、50°C 30秒間、72°C 1分間を25サイクル行った後72°C 5分間反応を行った。増幅した遺伝子は2%アガロースゲル電気泳動によりそれぞれ500-900bpのバンドを確認し、フェノール/クロロホルム処理を行った。すなわち同量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) を加えよく混和し4°Cで13,200rpm、5分間遠心し、水層部のみを新しいチューブに移しもう一度同量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) を加えよく混和し4°Cで13,200rpm、5分間遠心し、水層部のみを新しいチューブに移した。得られた溶液についてエタノール沈殿を行った。約15分間遠心乾燥した後、各DNA(19種)をRNase-free水20 μ lに溶解した。合成した各DNA溶液(19種) 各1 μ lに、HBプライマーに示した対応する各HBプライマー (10pmol/ μ l) 各2 μ l、10×PCR緩衝液(TOYOBO) 10 μ l、(2 mM) dNTPs (TOYOBO) 10 μ l、HFプライマーに示したVH forwardプライマー HF1:HF2:HF3:HF4(1:1:1:1)混合液 (10pmol/ μ l) 2 μ l、KOD DASH ポリメラーゼ(TOYOBO) 0.5 μ l、とRNase-Free水を添加し全体量を 100 μ l、としてそれぞれPCR反応させた。PCRは96°C、5分間反応後96°C、30秒間、50°C 30秒間、72°C 1分間を20サイクル行った後72°C 5分間反応を行った。増幅した遺伝子は2%アガロースゲル電気泳動によりそれぞれ500-900bpのバンドを確認し、フェノール/クロロホルム処理及びエタノール沈殿を行った。その後、約15分間遠心乾燥した後、各DNA(19種)をRNase-free水10 μ lに溶解した。得られた19種のDNAを2%低融点アガロースゲル(Sigma)電気泳動しそれぞれのバンドを切り出した。各DNA(19種)はRNase-free水10 μ lに溶解した。各DNA溶液について260nmの吸収を測定しHB1:HB2:HB3:HB4:HB5: HB6:HB7:HB8:HB9:HB10:HB11:HB12:HB13: HB14:

HB15:HB16:HB17:HB18:HB19(8:9:4:4:12:4:1:4:12:4:4:2:2:4:4:8:6:1:1)の比率で混和させ合計0.5pmolのH鎖DNA溶液とした。

[0130] (10-2) L鎖DNA溶液の調製

マウス脾臓Poly A+ RNA (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (DEPC-処理水) (CLONTECH社)をRNase-Free水で100倍に希釈したものを 10 μl 、5 \times RT緩衝液(TOYOBO) 20 μl 、(10 mM) dNTPs(TOYOBO) 10 μl 、forwardプライマー MuCK (1pmol/ μl) 50 μl 、を混和させ65 $^{\circ}\text{C}$ 9分間反応後直ちに4 $^{\circ}\text{C}$ に冷却し4 $^{\circ}\text{C}$ 2分間放置した後、ReverTra Ace(TOYOBO) 5 μl 、RNase inhibitor(TOYOBO) 5 μl 、を加え50 $^{\circ}\text{C}$ 30分間、99 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間反応させcDNA-Lを合成した。cDNA-L溶液 5 μl に、LBプライマーに示した各LBプライマー (1pmol/ μl) 各2.5 μl 、10 \times PCR緩衝液(TOYOBO) 2.5 μl 、forwardプライマー MuCK (1pmol/ μl) 2.5 μl 、KOD DASH ポリメラーゼ(TOYOBO) 0.25 μl 、とRNase-Free水を添加し全体量を 25 μl としてそれぞれPCR反応させた。PCRは96 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間反応後96 $^{\circ}\text{C}$ 、30秒間、48 $^{\circ}\text{C}$ 30秒間、72 $^{\circ}\text{C}$ 1分間を25サイクル行った後72 $^{\circ}\text{C}$ 5分間反応を行った。増幅した遺伝子は2%アガロースゲル電気泳動によりそれぞれ500-900bpのバンドを確認し、フェノール/クロロホルム処理を行った。得られた溶液についてエタノール沈殿を行った。その後、約15分間遠心乾燥した後、各DNA(18種)をRNase-free水20 μl に溶解した。合成した各DNA溶液(18種) 各1 μl に、LBプライマーに示した対応する各LBプライマー (10pmol/ μl) 各2 μl 、10 \times PCR緩衝液(TOYOBO) 10 μl 、(2 mM) dNTPs(TOYOBO) 10 μl 、LFプライマーに示したLH forwardプライマー LF1:LF2:LF3:LF4:LF λ (1:1:1:1)混合液 (10pmol/ μl) 2 μl 、KOD DASH ポリメラーゼ(TOYOBO) 0.5 μl 、とRNase-Free水を添加し全体量を 100 μl 、としてそれぞれPCR反応させた。PCRは96 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間反応後96 $^{\circ}\text{C}$ 、30秒間、48 $^{\circ}\text{C}$ 30秒間、72 $^{\circ}\text{C}$ 1分間を20サイクル行った後72 $^{\circ}\text{C}$ 5分間反応を行った。増幅した遺伝子は2%アガロースゲル電気泳動によりそれぞれ500-900bpのバンドを確認し、フェノール/クロロホルム処理及びエタノール沈殿を行った。その後、約15分間遠心乾燥した後、各DNA(18種)をRNase-free水10 μl に溶解した。得られた18種のDNAを2%低融点アガロースゲル(Sigma)電気泳動しそれぞれのバン

ドを切り出した。各DNA(18種)はRNase-free水10 μ lに溶解した。各DNA溶液について260nmの吸収を測定しLB1:LB2:LB3:LB4:LB5:LB6:LB7:LB8: LB9:LB10:LB11: LB12:LB13:LB14:LB15:LB16:LB17:LB18 (2:4:8:8:8:16:12:4:4:8:16:16:12:4:4:2:2:1)の比率で混和させ合計0.5pmolのL鎖DNA溶液とした。

[0131] (10-3) H鎖とL鎖を一本化するためのPCR

合成したH鎖DNA溶液 0.5pmol、L鎖DNA溶液 0.5pmol、5' UTR (1pmol/ μ l) 0.5 μ l、McD-Linker+ (1pmol/ μ l) 0.5 μ l、McD 3' UTR (His Tag) (1pmol/ μ l) 0.5 μ l、10 \times PCR緩衝液(TOYOBO) 5 μ l、(2 mM) dNTPs(TOYOBO) 5 μ l、KOD DASH ポリメラーゼ(TOYOBO) 0.25 μ l、とRNase-Free水を添加し全体量を 45.75 μ l、としてPCR反応させた。PCRは96 $^{\circ}$ C、5分間反応後96 $^{\circ}$ C、30秒間続いて5分間のスロープで58 $^{\circ}$ Cとし58 $^{\circ}$ C30秒間、72 $^{\circ}$ C1分間を10サイクル行った後72 $^{\circ}$ C 5分間反応を行った。続いて、PCR反応溶液 45.75 μ l、McD-F (1pmol/ μ l) 2 μ l、McD-R (His Tag) (1pmol/ μ l) 2 μ l、KOD DASH ポリメラーゼ(TOYOBO) 0.25 μ l、を加えさらにPCR反応させた。PCRは96 $^{\circ}$ C、5分間反応後96 $^{\circ}$ C、30秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、72 $^{\circ}$ C 1分間を15サイクル行った後72 $^{\circ}$ C 5分間反応を行った。得られたDNAを1%低融点アガロースゲル(Sigma)電気泳動しそれぞれのバンドを切り出した。DNAはRNase-free水10 μ lに溶解し、マウス由来一本鎖抗体ライブラリーDNAを得た。

[0132] [実施例11]: ヒト由来一本鎖抗体cDNAライブラリーの作成

ヒト骨髄由来のリンパ球からの一本鎖抗体cDNAライブラリーの作成は図18に示すようにヒト骨髄由来Poly A+ RNAを出発原料に行った。マウスの場合と同様に複数の特異的プライマーを用いてH鎖DNA溶液の調製、L鎖DNA溶液の調製、H鎖とL鎖の一本化PCRを行うことでIVV選択実験用のヒト一本鎖抗体cDNAライブラリーを作成した。(J. Mol. Biol. 1991, 222, 581-597、Nature Biotechnology, 2005, 23, 344-348、Antibody Engineering, Springer Lab. Manual (2001) 93-108)。

[0133] さらに図17に示すように調製したマウスH鎖DNAならびにマウスL鎖DNAあるいはヒトH鎖DNAならびにヒトL鎖DNAをそれぞれMutazyme IIを使ってError-pr

one PCRによりランダムな突然変異導入させた。マウス変異H鎖DNAならびにマウス変異L鎖DNAをH鎖とL鎖を一本化PCRによりマウス変異一本鎖抗体のcDNAライブラリーを作成した。ヒト変異H鎖DNAならびにヒト変異L鎖DNAをH鎖とL鎖の一本化PCRによりヒト変異一本鎖抗体のcDNAライブラリーを作成した。

[0134] [実施例12]: ASGRと結合する一本鎖抗体の選択

ASGRと結合する一本鎖抗体の選択実験を図19に示すような手順で行った。

[0135] (12-1) 一本鎖抗体IVVライブラリーの調製

(12-1-1) 一本鎖抗体ライブラリーの転写

各一本鎖抗体ライブラリーDNA 2pmol、5×SP6緩衝液 8 μ l、ATP (100mM) 2 μ l、CTP (100mM) 2 μ l、UTP (100mM) 2 μ l、GTP (10mM) 4 μ l、キャップアナログ(m7G(5')PPP(5')G) (Invitrogen) (40mM) 5 μ l、エンザイムミックスS P6RNAポリメラーゼ (Promega) 4 μ l、RNase-Free水を添加し全体量を 40 μ l、37 $^{\circ}$ C、3時間反応後、RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 10 μ l、を添加しさらに37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。

得られたRNAはRNeasy Mini kit (Qiagen)により精製した。すなわち転写反応液に、RNase-Free水を添加し全体量を 100 μ lとし、RLT緩衝液(Qiagen) 350 μ l、2-メルカプトエタノール 5 μ l、(100%) エタノール 250 μ l、を加えRNeasy ミニスピナラムに供し、4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm、15秒間遠心後排出された溶液を除去し、RPE緩衝液(Qiagen)500 μ lを同カラムに加え、4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm、15秒間遠心後排出された溶液を除去し、さらにRPE緩衝液(Qiagen)500 μ lを同カラムに加え、4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm、2分間遠心後排出された溶液を除去し、同カラムを新しいチューブに差し替え、4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm、1分間遠心し、再び同カラムを新しいチューブに差し替え同カラムに、RNase-Free水を33 μ l添加し、10分間氷上で放置後、4 $^{\circ}$ C、14000 rpm、1分間遠心しRNA溶液として回収した。

[0136] (12-1-2) PEGスペーサーとのライゲーション

精製した各RNA溶液 32 μ l、T4 ligation 10×緩衝液 5 μ l、(0.1 M) DTT 1 μ l、(40 mM) ATP 0.5 μ l、(100%) DMSO 5 μ l、(0.1%) BSA 1 μ l、RNase inh

ibitor(TOYOB0) 1 μ l、ピューロマイシン付きPEGスパーサー (特開2002-176987) (10 nmol) 0.5 μ l、ポリエチレングリコール (PEG) 2000 (日本油脂) (30 nmol) 1 μ l、T4 RNA リガーゼ (Takara)(250 U/ μ l) 3 μ l、遮光条件下15 $^{\circ}$ C、15時間反応させた。得られたスパーサー分子が結合したRNAはRNeasy Mini kit (Qiagen)により精製した。

[0137] (12-1-3) IVVライブラリーの調製

ヒト一本鎖抗体PEG-RNAライブラリー、ヒト変異一本鎖抗体PEG-RNAライブラリー、マウス一本鎖抗体PEG-RNAライブラリー、マウス変異一本鎖抗体PEG-RNAライブラリーを1:1:1:1の比で混合したPEG-RNA 10 pmol、小麦胚芽抽出液 (Promega) 20 μ l、クレアチンキナーゼ (40 μ g/ μ l) (Roche) 2 μ l、RNase inhibitor(TOYOB0) 1.6 μ l、5 \times 翻訳緩衝液(Promega) 20 μ l、RNase-Free水を添加し全体量を 100 μ lとし、遮光条件下26 $^{\circ}$ C、1時間30分反応させ翻訳を行いIVVライブラリーを調製した。

[0138] (12-2) ASGRの固定化

ビアコアはビアコア3000システムを用い、センサーチップSAに固定化を行った。フローは緩衝液HBS-P(10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20) で10 μ l/minで行った。フローセル1~4への50mM NaOH, 1M NaClを含む溶液10 μ lのインジェクトを3回繰り返し行い、固定化の前処理を行った。初めにビオチン化細胞外ドメインASGR1exを用いて、フローセル1~4にベイトを固定化した。フローは緩衝液HBS-P、20 μ l/minで行った。ベイトの固定量は表7に示した。続いてビオチン化細胞外ドメインASGR2exを用いて、フローセル3~4に固定化した。フローは緩衝液HBS-P、20 μ l/minで行った。ベイトの固定量は表7に示した。センサーチップを洗浄する目的で緩衝液HBS-Pで10 μ l/min, 50% Isopropanol, 50mM NaOH, 1M NaClを用いてextra washを行った。

[0139] (12-3) ASGRと結合する一本鎖抗体の選択

調製した一本鎖抗体IVVライブラリー100 μ lにfinal 20mMとなるように0.5 M EDTA 4 μ lを加え、20分間室温で回転攪拌した。HBS-Pで膨潤ならびに平衡

化させたSephadex G200 (Amersham Biosciences)ゲル1 mlをカラム (バイオラッド) に充填したものにIVVライブラリー溶液100 μ lを供し、2滴ずつ96穴プレートに集め1wellから10wellまでを回収した。Multi-detection Microplate Reader POWERSCAN HTで励起波長485nm、蛍光波長528nmで蛍光を検出し、3well目から7well目あたりに溶出したIVV画分を集めた。Strep Magne Sphae Paramagnetic Part (9013-20-1) 100 μ lをHBS-P 500 μ lで3回洗浄したものにIVV画分約200 μ lを加え、20分間室温で回転攪拌し、その上清をピアコアにインジェクトした。ピアコアでのセレクション条件は表7に示した。図20に示すように1ラウンドから3ラウンドの選択実験では洗浄工程の終了後、センサーチップを機械より抜き取り、センサーチップの金膜の上にRNase-Free水55 μ lを静かに加え、20分間、365nmのUVを照射してスパーサーを切断してmRNA部を溶出・回収した。また4ラウンドから5ラウンドの選択実験では洗浄工程の終了後、ASGR1exを用いて競合溶出を行ないIVV画分を回収した。

[0140] (12-4) RT-PCRによるcDNAライブラリーの回収

選択実験で回収した溶液55 μ l、5 \times RT緩衝液(TOYOBO) 20 μ l、(10 mM) dNTPs(TOYOBO) 10 μ l、及びreverseプライマー: Flag His tag A02 (10pmol/ μ l) 5 μ lにRNase-Free水を添加し全体量を90 μ lとして混和させ、65 $^{\circ}$ Cで9分間反応後直ちに氷上に冷却し、2分間放置した後、ReverTra Ace(TOYOBO) 5 μ l及びRNase inhibitor(TOYOBO) 5 μ lを加え、50 $^{\circ}$ C30分間、99 $^{\circ}$ C、5分間逆転写反応させた。逆転写反応させた反応溶液100 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 100 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 100 μ l、25mM MgSO₄ 40 μ l、forwardプライマー: SP6 Omega (10 pmol/ μ l) 30 μ l、reverseプライマー: Flag His tag A02 (10 pmol/ μ l) 30 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 20 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を1000 μ lとしチューブ1本につき100 μ l入れ合計10本をPCR反応させた。PCRは、94 $^{\circ}$ C5分間反応後、94 $^{\circ}$ C30秒間、58 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C2分間を20から40サイクル行った後、68 $^{\circ}$ Cで5分間反応を行った。

[0141] ピアコアを使って選択実験の選択圧は表7に示すように段階的にラウンドごとに選択圧を順次上げた。

[0142] [表7]

表7

	1stラウンド	2ndラウンド	3rdラウンド
ペイトの固定量His-Bio-Flang-ASGR1ex	654.7 RU	403.5 RU	353.4 RU
ペイトの固定量His-Bio-Flang-ASGR2ex	191.4 RU	147.8 RU	96 RU
ASGR1ex:ASGR2ex	3.4 : 1.0	2.7 : 1.0	3.7 : 1.0
IVV結合時間	240s	240s	120s
ピアコアでの洗浄流速	40 μ l/min	40 μ l/min	80 μ l/min
ピアコアでの洗浄時間	11367秒	59064秒	68342秒

	4thラウンド	5thラウンド
ペイトの固定量His-Bio-Flang-ASGR1ex	538.9 RU	504.5 RU
ペイトの固定量His-Bio-Flang-ASGR2ex	171.7 RU	75.1 RU
ASGR1ex:ASGR2ex	3.1 : 1.0	6.7 : 1.0
IVV結合時間	96s	96s
ピアコアでの洗浄流速	100 μ l/min	100 μ l/min
ピアコアでの洗浄時間	64800秒	68400秒

[0143] [実施例13]: クローニングと塩基配列の決定

(13-1) クローニングと塩基配列

ASGRと結合する一本鎖抗体ライブラリーから in-fusionクローニング

ライブラリーのinsert作成を行なった。3ラウンドの選択実験を行ったライブラリー1 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 100 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 100 μ l、25mM MgSO₄ 40 μ l、T7-long-F in (10 pmol/ μ l) 30 μ l、Flag(Histag) in R (10 pmol/ μ l) 30 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 20 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を1000 μ lとし、PCR反応させた。PCRは、94 $^{\circ}$ C 5分間反応後、94 $^{\circ}$ C 30秒間、58 $^{\circ}$ C 30秒間、68 $^{\circ}$ C 2分間を8サイクル行った後、68 $^{\circ}$ C 5分間反応を行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し、50 μ lのDNA溶液として回収しT7-ASGR3を得た。

[0144] kozak-Igk-T7tag配列とHis配列とstopコドンを含む pcDNA 3.3ベクター8 μ l、10 \times KOD plus緩衝液(TOYOBO) 80 μ l、2 mM dNTPs(TOYOBO) 80 μ l、25mM MgSO₄ 32 μ l、His-stop-topo F (10 pmol/ μ l) 24 μ l、Igk-T7-R (10 pmol/ μ l) 24 μ l、及びKOD plus ポリメラーゼ(TOYOBO) 16 μ lにRNase-Free水を添加して全体量を800 μ lとし、PCR反応させた。PCRは、94 $^{\circ}$ C 2分間反応後、98 $^{\circ}$ C 10

秒間、68°C5分11秒間を25サイクル行った。cDNAライブラリーはWizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) で精製し、40 μ lのDNA溶液として回収しK Igk-stop 3.3 vectorを得た。

[0145] T7-ASGR3 0.08 μ l、KIgk-stop 3.3 vector 0.14 μ l、5x in fusion HD Enzyme premix 1.0 μ l (Takara) を混ぜ、RNase-Free水を添加し全体量を5 μ lとし50°C、15分間反応させた。反応後の溶液2.5 μ lをOne Shot TOP10 competent cellにトランスフォーメーションし37°C 1晩培養し、KIgk-ASGR3クローンを得た。得られたクローンの配列解析はユーロフィンDNAシーケンス受託サービス、ValueReadプレミックスにより行った。

[0146] [表8]

表8. プライマー配列(5)

名前	配列(5'→3')	配列番号
Flag His tag A02	TTTTTTTTTATGGTGATGGTGGTGATGGTGCTTGTCGTCGTCGTC	78
SP6 Omega	ATTTAGGTGACACTATAGAACAACAACAACAACAACAACAAAATGGCTA GCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT	79
T7-long-F	ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT	80
Flag(Histag) in R	ATGGTGATGGTGGTGATGGTGCTTGTCGTCGTCGTC	81
His-stop-topo F	CACCACCATCACCATTAGAAGGGTTTCGATC	82
Igk-T7-R	AGTCATGCTAGCCATGTCACCAGTGAACC	83

[0147] (13-2) ライブラリーの配列解析

ライブラリーの配列解析の結果、表9に示すように3ラウンド4ラウンド5ラウンドからそれぞれASGR結合一本鎖抗体のクローンが得られた。

[0148]

[表9]

表9. IVVスクリーニングされたASGR結合一本鎖抗体のCDR部分のアミノ酸配列

クローン名	CDR	アミノ酸配列	配列番号
ASGR3-10M	HCDR1	SSYWIE	配列番号13
ASGR3-10M	HCDR2	EILPGSGSTNYNEKFKG	配列番号14
ASGR3-10M	HCDR3	YGNVDAMDY	配列番号15
ASGR3-10M	LCDR1	RASQSVSSSYLA	配列番号16
ASGR3-10M	LCDR2	YASSRAT	配列番号17
ASGR3-10M	LCDR3	QQSSSTPFT	配列番号18
ASGR3-39D	HCDR1	SNYGMA	配列番号19
ASGR3-39D	HCDR2	TISYDGSFTYYRDSVKG	配列番号20
ASGR3-39D	HCDR3	KGRQADTEEDF	配列番号21
ASGR3-39D	LCDR1	RASQSVSISSHDLMQ	配列番号22
ASGR3-39D	LCDR2	DAFNLAS	配列番号23
ASGR3-39D	LCDR3	QQSKDYPYT	配列番号24
ASGR4-70D	HCDR1	SNYGMA	配列番号25
ASGR4-70D	HCDR2	TISYDGSITYYRDSVKG	配列番号26
ASGR4-70D	HCDR3	AHHRNTKSDF	配列番号27
ASGR4-70D	LCDR1	RASQSVSISSHDLMQ	配列番号28
ASGR4-70D	LCDR2	DAFNLAS	配列番号29
ASGR4-70D	LCDR3	QQSKDDPYT	配列番号30
ASGR5-24M	HCDR1	SSFQMH	配列番号31
ASGR5-24M	HCDR2	YISSGSSTIYYANTVKG	配列番号32
ASGR5-24M	HCDR3	LGPTVVATPFAY	配列番号33
ASGR5-24M	LCDR1	KASQDVSTAVA	配列番号34
ASGR5-24M	LCDR2	SASYRYS	配列番号35
ASGR5-24M	LCDR3	QQYNNYPLT	配列番号36

[0149] [実施例14]: ASGR結合一本鎖抗体のクローンの活性評価

(14-1) タンパク質の調製

クローンはカルベニシリン20 µg/mlを含むLB培地にマスタープレートよりコロニーを植菌し37°C、16時間培養した。菌体ペレットからPureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (インビトロジェン)でプラスミドを精製した。

[0150] (14-2) タンパク質の調製

ヒト胎児腎細胞293T細胞は10%FCS(ニチレイ)、DMEM(1.0g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (ナカライ)培地で培養した。トランスフェクションの24時間前に6cm シャーレに(1:2)の割合でプレATINGした。6cm シャーレに対しプラスミドDNA 8 µgをOpti-MEM I 500 µlに入れたもの

に、Lipofectamine 2000 20 μ lあるいはPEI-MAX 20 μ lをOpti-MEM I 500 μ lに入れ室温で5分間置いたものを穏やかに加えた。混和物は室温で20分間放置後293T細胞の6cm シャーレに加え37°C、5% CO₂条件下4日～6日培養した。

[0151] (14-3) プルダウン実験

レジン(Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles)(Promega) の洗浄はMagneSphere Technology Magnetic Separation Stand (twelve-position)を使って行った。レジン40 μ lを1.5 mlチューブに取り、溶液を除去した後PBS 1 mlで3回洗浄を行った。新しいチューブにレジンを移し、ビオチン化細胞外ドメインASGR1exあるいはビオチン化細胞外ドメインASGR2ex あるいはベイトなしは等量のPBSを加え、ミニディスクローター (Bio craft) で回転攪拌し4°Cで1時間結合させた。溶液を除去後TBST (Tween20 0.05%) 1 mlで3回洗浄を行った。新しいチューブにレジンを移し、ELISA BSA緩衝液(ナカライテスク株式会社 TBS, 0.05%, Tween 20, 1% BSA) 1 mlで4°C1時間ブロッキングを行い、ELISA BSA緩衝液1 mlで3回洗浄を行った。新しいチューブにレジンを移し、ASGR3-10M、ASGR3-39D、ASGR4-70DあるいはASGR5-24Mを発現させた培養上清を1000 μ lずつ、ビオチン化細胞外ドメインASGR1exあるいはビオチン化細胞外ドメインASGR2exあるいはベイトなしで処理したレジン40 μ lに混和させ、ミニディスクローター (Bio craft) で回転攪拌し、4°Cで1時間30分結合させた。溶液を除去後TBST (Tween20 0.1%) 500 μ lで3回洗浄を行い、回収レジンをウエスタンブロットした。

[0152] 各レジンに水とサンプル緩衝液LDS(4x)、0.2mM DTTを加え、70°C、10分間加熱後SDS-PAGEに供した。SDS-PAGEは4-12% Bis-Tris Gel、NuPAGE MES SDS電気泳動緩衝液 (Invitrogen)で200V, 400mA, 35分間電気泳動後、Mini Format, 0.2 μ m PVDF, Single application (BIORAD) Trans-Blot Turboで転写した。膜はBlocking One Buffer : TBST (1 : 9) でブロッキングし、Blocking One Buffer : TBST(1 : 9)で2:3000に希釈したanti-Flag-HRP (Sigma: A8592)を反応させた。検出はECL(Enhanced ChemiLuminescence)を用い、ChemiDoc(BIORAD)で行った。

[0153] ASGR結合一本鎖抗体によるプルダウンアッセイ（図20、21）を行った。3ラウンドの選択実験を行なったクローン、ASGR3-10M、ASGR3-39Dは、コントロールと比べて抗原を強く認識した。ASGR3-10Mは両方の抗原を認識し、ASGR3-39Dの方はASGR1抗原を特に強く認識した。4ラウンドと5ラウンドの選択実験を行なったクローン、ASGR4-70D、ASGR5-24Mは、コントロールと比べて抗原を認識した。ASGR4-70D、ASGR5-24MはASGR1抗原を特に強く認識した。

[0154] 図22に、抗ASGR一本鎖抗体を肝細胞内送達用担体として用いたDOCK11結合ペプチドの肝細胞選択的送達法の概要図を示した。抗ASGR抗体を連結したDOCK11結合ペプチドは、受容体に結合後、エンドサイトーシスにより初期エンドソームに内包される。DOCK11結合ペプチドの上流にはエンドソーム内の酵素により切断を受ける切断配列を組み込んでおくことでそれが切断を受けペプチドが解離する。DOCK11結合ペプチドの下流には膜透過促進ペプチドを付加し、それにより細胞質にペプチドが放出される。標的であるDOCK11は、細胞内あるいは核画分に局在するタンパク質であることから、核に送達させる場合は核移行シグナルを付加させる。

[0155] IVV法による選択実験の結果、DOCK11結合ペプチドとASGR結合一本鎖抗体はそれぞれ複数個得られた。まずは図23に示すように抗アジアロ糖タンパク質受容体一本鎖抗体はASGR3-10M、DOCK11結合ペプチドはDCS8-42TNを使って融合体を作成した。それぞれ発現ベクターに組み込まれた遺伝子に対し必要な機能性ペプチドをインフュージョンクローニングで各コンストラクトを作成した。本実施例では、切断配列として内因性プロテアーゼFurinが認識する配列を、膜透過促進ペプチドとして膜融合促進ペプチドS28又はS39を、核移行シグナルとしてPAAKRVKLD（配列番号40）を利用した。

[0156]

[表10]

表10. 抗アジアロ糖タンパク質受容体一本鎖抗体とDOCK11結合ペプチドの肝細胞選択的送達法に用いた機能性ペプチドのアミノ酸配列

機能性ペプチド名	アミノ酸配列	配列番号
切断配列	RVRR	配列番号37
膜融合促進ペプチドS28	PFVIGAGVLGALGTGIGGITTTSTQFYK	配列番号38
膜融合促進ペプチドS39	PFVIGAGVLGALGTGIGGITTTSTQFYKLSQELNGDMER	配列番号39
核移行シグナル	PAARKVKLD	配列番号40

[0157] DOCK11結合ペプチドDCS8-42TNは、トランスフェクション法でプラスミドを細胞内に導入しタンパク質を発現させた場合、アクチンの形態変化を生じる。図23Aに示すコンストラクトの融合体をHepG2細胞へ直接細胞外より取り込ませた場合にも同様にアクチンの形態変化を生じるかどうかを検証した。また、Furinにより切断配列が切断され機能しているかについても同時に検証した。図23Bのコンストラクトを使用し、膜融合促進ペプチドが機能しているかどうかを検証した。図23Cのコンストラクト使用し、核移行シグナルが機能しているかどうかを検証した。これらはDOCK11結合ペプチドDCS8-42TNの上流に付加したGFPの蛍光を利用し、共焦点顕微鏡を観察することにより明らかにした。図23Dのコンストラクトは、PXB細胞を使った抗HBV効果の評価、あるいはPXBマウスを用いたin vivoでの評価に用いた。またこのコンストラクトはN-10M-D42TNと呼称した。N-10M-D42TNのうち、切断配列+DCS8-42TNペプチド+S28+核移行シグナルの部分のアミノ酸配列を配列番号90に示す。配列番号90のアミノ酸配列中、第21番～第28番アミノ酸はFlagタグ、第29番～第35番アミノ酸はHisタグである。

[0158] DCS8-42TNペプチド有り、無しのコンストラクトで一本鎖抗体-ペプチド融合体をHepG2細胞に加えた。図24Aに示す手順で処理し共焦点顕微鏡で観察したところ、ペプチド有りをかけた細胞はアクチンの断片化が起きていたのに対し、ペプチド無しはアクチンの断片化は見られなかった。またペプチドの局在を示すGFPのシグナルは細胞質に見られ、Furinにより切断配列が切断され機能し、また膜融合促進ペプチドが機能していることがわかった。

[0159] 図25Aに示すように膜融合促進ペプチドが機能しているかどうかを検証した

。エンドソームはインキュベーション時間に伴い大きくなっていった。また同じ位置にGFP（ペプチド）が観察された。それに対し細胞質中にGFPはほとんど観察出来ないだけでなくアクチンの断片化も見られなかった。膜融合促進ペプチドS28が無いと、ペプチドは細胞質に放出されずエンドソームに蓄積しているようだった。

[0160] 図25Bに示すように膜融合促進ペプチドの種類に応じて機能に違いがあるかどうかを検証した。HepG2細胞に取り込ませた抗体-ペプチド融合体より核画分を抽出し、anti-FLAG M2 magnetic beadsでプルダウンさせ比較した。その結果、膜融合促進ペプチドS28よりも膜融合促進ペプチドS39のバンド強度が濃かったことから膜融合促進ペプチドS39の方がエンドソームからの離脱の効率がよいことがわかった。

[0161] 図26に示すように核移行シグナルが機能しているかどうかを検証した。抗体-ペプチド融合体を加えないコントロール(PBS)の場合は核内アクチンは網目状に見え、断片化は起こっていなかった。これに対し、核移行シグナル有り-ペプチド融合体をかけた細胞ではペプチド(GFP)が核内に局在し核内アクチンの断片化が起きていた。ペプチド(GFP)は核内アクチンに沿って点々と見られた。アクチンに重なっているか、あるいは近接しているようだった。

[0162] [実施例15]: PXB細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性

PXBマウス（ヒト肝細胞キメラマウス）から分離された新鮮ヒト肝細胞であるPXB細胞は、ヒト型の肝機能が強く維持されたヒト肝細胞であり、B型肝炎ウイルス（HBV）が持続感染する。そこで、PXB細胞を使用してDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性を評価した。DOCK11結合ペプチドは細胞の外から加えるため抗ASGR一本鎖抗体-ペプチド融合体N-10M-D42TNとし、PXB細胞でのHBVアッセイに供した。

[0163] 図27A、図27BにPXB細胞におけるDOCK11結合ペプチドの抗HBV活性を示した。N-10M-D42TNはHBV-DNAおよびcccDNAのコピー数を顕著に減少させ、濃度依存的に高い抗HBV活性を示した。非常に高い抗HBV活性を示すことが明らかになった。また図27Bに示すように再現性の良い結果が得られた。

- [0164] DOCK11結合ペプチドDCS8-42TNは非受容体型チロシンキナーゼAck1 (NM_001387713.1、配列番号49、50) の674-689残基の配列である。そのため、DOCK11とAck1が細胞内で相互作用するかどうかを共免疫沈降実験により調べた。細胞に投与するにあたり、ペプチドDCS8-42TNを抗ASGR一本鎖抗体と融合させ、細胞内に取り込まれるようにした。以下、DCS8-42TNと一本鎖抗体の融合体をN-10M-D42TNと呼ぶ。293T細胞内でHisBioFLAG-DOCK11およびT7-Ack1-Hisを共発現させ、一本鎖抗体-DOCK11結合ペプチド融合体N-10M-42TNで24時間処理したところ、HisBioFLAG-DOCK11およびT7-Ack1-Hisは細胞内で結合し、この結合はN-10M-D42TNにより阻害された (図28A)。
- [0165] DOCK11はDOCK-Dサブファミリーのひとつであり、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) としてCdc42を非活性型 (GDP結合型) から活性型 (GTP結合型) へと置換することが知られているが、他のGEFタンパク質と異なり活性型Cdc42にも結合してさらに活性化し、ポジティブフィードバックをもたらすことがわかっている (Lin, Q. et al. J. Biol. Chem., 281, 35253-35262, 2006; Nishikimi, A. et al. Exp Cell Res 319, 2343-2349, 2013)。また、Ack1は活性型Cdc42結合タンパク質であり、GTP結合型Cdc42と特異的に結合して活性化される (Prieto-Echague, V., Miller, J., Signal Transduct, 1-9, 2011)。
- [0166] Hisタグ精製したHisBioFLAG-DOCK11およびT7-Ack1-Hisを用いて、DCS8-42TNおよびCdc42存在下でプルダウンアッセイを行ったところ、共免疫沈降実験の結果と同様に、T7-Ack1-HisはHisBioFLAG-DOCK11に結合し、この結合はDCS8-42TNにより阻害された。同様に、この結合は、野生型のGST-Cdc42濃度依存的 (図28B)、あるいは活性型 (Q61L) および非活性型 (T17N) GST-Cdc42によっても阻害された (図28C)。以上の結果から、Cdc42とAck1は競合的にDOCK11に結合することが示唆される。
- [0167] 次いで、DCS8-42TNがDOCK11のGEF活性に与える影響について調べた。DOCK11はN末端のDHR2ドメインでCdc42と相互作用すると予測されていることから (Lin, Q. et al., J. Biol. Chem., 281, 35253-35262, 2006)、固定したDOCK11

1のDHR2ドメインにDCS8-42TNおよびGDP結合型Cdc42を反応させた後、Mant-GTPを加えたところ、DCS8-42TN濃度依存的にGDPからGTPへの置換が阻害された(図29)。この結果から、DCS8-42TNは濃度依存的にDOCK11のGEF活性を阻害することが示唆される。

[0168] Ack1はWASPをリン酸化し、アクチン重合を促進することが知られている(Yokoyama, N., Loughheed, J., and Miller, W.T. (2005). Phosphorylation of WASP by the Cdc42-associated Kinase ACK1. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42219-42226.)。DOCK11およびAck1を標的としたsiRNAをHepG2細胞にトランスフェクションし、蛍光ファロイジンでアクチンフィラメントを染色したところ、細胞質におけるアクチンフィラメントの断片化および微小突起の増加が見られた(図30A-C)。同様に、HepG2細胞をN-10M-D42TNで24-48時間処理すると、処理時間依存的に細胞質のアクチンフィラメントが断片化した(図31A, B)。24時間処理後に洗浄し、さらに24-72時間培養したところ、アクチンフィラメントは処理前と同様の長さに回復したことから、N-10M-D42TNによるアクチンフィラメントへの影響には可塑性があることがわかった。また、HepG2細胞にEYFP-NLS-Actinをトランスフェクションして核内のアクチンフィラメントへの影響も調べたところ、GFPタグ付きのN-10M-D42TN(N-10M-GFP-D42TN)で処理した細胞では核内アクチンの断片化が起きた(図30C)。ペプチドは核内に局在し、核内アクチンに沿って点々と見られた。これに対しペプチドで処理しない場合は核内アクチンは網目状に見え、断片化は起こらなかった。以上の結果から、N-10M-D42TNは細胞質および核内においてアクチンフィラメントを断片化することがわかった。

[0169] HBVは細胞膜上で受容体NTCPと結合した後、上皮成長因子受容体EGFRと共にエンドサイトーシスによって細胞内へ侵入することがわかっている(Iwamoto, M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 116, 8487-8492, 2019)。Cdc42により活性化されたAck1はEGF刺激に応じてEGFRと相互作用し、EGFRのエンドサイトーシスに寄与することから(Shen, F. et al., *Mol. Biol. Cell*, 18, 732-742, 2007; Lin, Q. et al., *J. Biol. Chem.* 281, 35253-35262, 2010)、

D42TNペプチドがEGFRのエンドサイトーシスを阻害することでHBVの侵入を阻害している可能性が示唆される。図32Aにこの機序の模式図を示す。すなわち、EGF刺激によってEGFRが活性化されると、リン酸化およびユビキチン化を受ける。Ack1はDOCK11によって活性化されたCdc42と結合して活性化し、EGFRと結合してリン酸化される。その結果、EGFR-Ack1複合体はともにエンドサイトーシスされて分解される。一方で、N-10M-D42TNがDOCK11の機能を阻害すると、Ack1の活性化が阻害されるため、Ack1とリン酸化EGFRはエンドサイトーシスされず分解されない。また、Ack1によってリン酸化されるWASPのリン酸化も阻害されると考えられる。Huh7細胞をN-10M-D42TNで処理後にEGF刺激したところ、EGF刺激によるAck1のリン酸化が抑制されるとともに、EGFRの分解が抑制された（図32B）。このときEGFRのリン酸化は阻害されなかったことから、EGFRはエンドサイトーシスの段階で阻害されたことが示唆され、N-10M-D42TNによってAck1の活性化が阻害されたためと考えられる。また、N-10M-D42TN処理によってWASPのリン酸化も阻害されたことから、アクチンフィラメントの断片化はWASPの阻害によることが示唆される。また、HepG2細胞をEGF処理すると初期エンドソームにおけるAck1の局在が増加するが、N-10M-D42TN処理によってこの局在変化が抑制された（図33A, B）。以上の結果から、N-10M-D42TNはEGFRのリン酸化には影響せず、Ack1の活性化を阻害することで、Ack1およびEGFRのエンドサイトーシスを阻害することが示唆される。

[0170] HBVがrcDNAからcccDNAを合成する際には宿主のDNA修復機構、特にATRシグナル伝達経路を利用することが知られている(Luo, J. et al. *mBio*, 11, e03423-19, 2020)。ATRはDNA損傷部位へのアクチン集積に応じてリクルートされることから(Wang, Y-H. et al. *Nat Commun*, 8, 2118-2133, 2017)、DOCK11がアクチン重合を通じてATRシグナル伝達経路に影響し、cccDNA合成に寄与している可能性が考えられる。HepG2細胞にUV照射したところDOCK11のmRNAが増加したことから（図34A）、DOCK11がDNA修復機構に寄与することが示唆された。また、DOCK11のノックダウンによってDNA修復時のChk1の活性化が抑制されたことから（図34B, C）、DOCK11はATRシグナル伝達経路の活性化に必要で

あることがわかった。

[0171] DOCK11のノックダウンと同様に、N-10M-D42TNは処理時間依存的にChk1のリン酸化を抑制したことから（図34D,E）、DOCK11の機能を阻害することでATRシグナル伝達経路を阻害することが示唆された。抗pChk1抗体を用いたHepG2細胞の免疫染色によって、DOCK11のノックダウンによって核内のChk1のリン酸化が抑制された（図35A）。また、N-10M-D42TN処理においても同様に、核内でのChk1のリン酸化が抑制された（図35B）。これらの結果からも、DOCK11が核内でのATRシグナル伝達経路の活性化に必須であり、N-10M-D42TNがそれを阻害することが示唆される。次いで、抗DOCK11抗体を用いてヒト肝細胞PXB細胞を免疫染色し、DNA修復時のDOCK11の局在を調べた（図36A,B）。その結果、DOCK11はUV照射によって核内で凝集して点状の局在を示し、N-10M-D42TNでの処理はそれを阻害することがわかった。抗 γ H2AX抗体を用いた免疫染色によって、DNA修復時のDOCK11の局在は γ H2AXと一致することがわかった（図37A,B）。さらに、DOCK11を標的としたsiRNAのトランスフェクションによってDOCK11の発現が減少すると（図37C）、 γ H2AXの発現も同様に減少し（図37D）、わずかに発現したDOCK11と γ H2AXの局在は一致した（図37E）。 γ H2AXはリン酸化されたヒストンH2AXであり、DNA損傷部位のマーカーであることから、DOCK11がDNA損傷部位に蓄積し、ATRシグナル伝達経路を活性化することが示唆される。N-10M-D42TNはDOCK11のノックダウンと同様に γ H2AXの発現を減少させたが（図37D）、このとき γ H2AXはDOCK11と共局在しなかった（図37F,G; Wang, Y-H. et al. Nat Commun, 8, 2118, 2017）。このことから、N-10M-D42TNはDNA損傷部位におけるDOCK11のATRシグナル伝達経路活性化を阻害していることが示唆される。すなわち、N-10M-D42TNで処理した細胞ではHBVがrcDNAからcccDNAを合成する際にDNA修復機構を利用できず、感染が抑制されると考えられる。

[0172] 以上の結果から、DOCK11結合ペプチドN-10M-D42TNはDOCK11とAck1の結合を阻害し、DOCK11のGEF活性を阻害することがわかった。またAck1の活性化を阻害してアクチン重合を阻害するとともに、EGFRのエンドサイトーシスを阻害

してHBVの細胞内侵入を阻害する可能性も示唆された。また、アクチンフィラメントがエンドサイトーシスに寄与することが知られているので(Toshima, J Y. et al., eLife 5, e10276, 2016)、N-10M-D42TNはアクチン重合を阻害することによりHBVの侵入を阻害している可能性もある。また、核内においても、DOCK11結合ペプチドN-10M-D42TNはDNA損傷部位に集合・蓄積したDOCK11によるATRシグナル伝達経路の活性化を阻害し、rcDNAからcccDNAへの修復過程を阻害する可能性が考えられる。すなわち、DOCK11結合ペプチドN-10M-D42TNは、EGFRのエンドサイトーシスおよびrcDNAからcccDNAへの修復過程を阻害することで、HBV感染を抑制すると考えられる。

[0173] [実施例16]: HBV感染PXBマウスを用いた薬効試験

PXBマウスにHBVを感染させ、被験物質 (N-10M-D42TN) 投与による薬効を確認することを目的として下記の実験を行なった。

[0174] (16-1) 被験物質、溶媒および調製方法

薬剤 D : N-10M-D42TN

性状 : PBSに溶解

量 : 21.6mL (1800 μ L x 12本)

保存 : 冷蔵

調製方法 : 初回投与 (Day 0) 及び2回目投与 (Day 3) は、1倍希釈で300 μ L/匹に投与した。3回目投与 (Day 5) 以降は、900 μ Lを分取し、PBS 900 μ Lと混合 (2倍希釈) し、300 μ L/匹に投与した。

溶媒

名称 : PBS

入手先 : Thermo Fisher Scientific (Life) 10010049 PBS pH 7.4

保存 : 冷蔵

[0175] (16-2) 使用ウイルス

使用ウイルスは株式会社フェニックスバイオら分与されたHBVを用いた。

ウイルス名 : Hepatitis B Virus

株名 : PBB004 (Genotype C)

BSL : 2

ウイルス力価 : 1.1E+09 copies/mL (10 μ L/tubeを2本)

保存 : 超低温冷凍庫で保存

調製方法 : 凍結保存したウイルス液1本を解凍し、生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場) を用いて1.0E+06 copies/mLに調製する。

[0176] (16-3) 使用動物

動物種 : マウス

系統 : PXBマウス (cDNA-uPAwild+/SCIDマウスにヒト肝細胞を導入したなかで、マウス血中h-Alb濃度に基づいて計算したヒト肝細胞予想置換率が70%以上のマウス)

入手先 : 株式会社フェニックスバイオ

性別 : 雄

週齢 : 12週齢以上 (入荷時)

ヒト肝細胞移植後 ; 9週以上

使用匹数 : 10匹

動物種選択理由 : HBV感染モデルとして一般的に使用されている。

[0177] (16-4) 動物管理条件

16-4.1 飼育条件 (SOP/環境/504)

室温24 \pm 3 $^{\circ}$ C、湿度50 \pm 20 %、換気 (10~25回/1時間)、照明12時間 (8:00~20:00)

[0178] 16-4.2 飼料 (SOP/飼育/206、SOP/飼育/512)

MF (オリエンタル酵母工業株式会社) にPS-A (オリエンタル酵母工業株式会社) を2:1で混合した飼料を自由摂取。

[0179] 16-4.3 飲料水 (SOP/飼育/206、SOP/飼育/512)

オートクレーブ滅菌した市水に次亜塩素酸ナトリウム (終濃度 : 14.4 ppm) を添加した飲水を自由摂取。

[0180] 16-4.4 ケージ (SOP/動物/301)

オートクレーブ滅菌したケージを使用。1~5匹/ケージ飼育とする。

ケージ交換、給餌（補充）および給水瓶交換は、微生物的汚染のリスク低減のために同時期に実施する。

[0181] 16-4.5 検疫および馴化（SOP/動物/301）

動物入荷後から検疫および馴化終了日まで、一般状態を毎日観察する。また、入荷日ならびに検疫および馴化終了日に体重を測定する。

[0182] 16-4.6 群分け（SOP/試験/002）

ウイルス接種6週間目に採血を実施し、その血中HBV DNA量をもとにウイルス接種8週目（被験物質初回投与日）に各群にマウスを振り分ける。

[0183] 16-4.7 動物の識別（SOP/試験/001）

背側尾部へ油性インクを用いて個体識別を行う。ケージに試験番号、動物番号、試験期間、試験群、試験責任者名等を記載したラベルを付ける。

[0184] （16-5）試験群構成および投与スケジュール

下記表11の通り。

[0185] [表11]

表11. 試験群構成および投与スケジュール

群	投与物質	投与量 (/body)	投与経路	投与期間 ^{※1}	標本採取日 ^{※2}	動物番号 (匹数)
4	薬剤D	300 μ L	ip	Day 0 ~ 27	Day 28	41-45 (5)
6	溶媒	300 μ L	ip	Day 0 ~ 27	Day 28	61-65 (5)

※1 Day 0:被験物質初回投与日(ウイルス接種8週間目)

※2 投与期間のうち2~3日(月、水、金)に1回実施

[0186] ウイルス接種

HBVを $1.0E+05$ copies/100 μ L/bodyでマウス尾静脈より接種する。

[0187] 被験物質の投与

ウイルス接種8週間目（Day 0）から標本採取前日（Day 27）まで300 μ L/bodyで2~3日（月、水、金）に1回、マウスに腹腔内投与する。

[0188] 採血

ウイルス接種6週目（初回投与2週間前）および初回投与前（Day 0：ウイル

ス接種8週目) からDay 21まで1週間に1回、鎖骨下静脈から約70 μ Lの血液を採取した。剖検時 (Day 28) にはイソフルラン吸入麻酔下で、腹大静脈もしくは心臓より採取可能全量 (400 μ L以上) の血液を採取した。採血終了後に血中h-Alb濃度測定として2 μ Lの血液を200 μ Lの生理食塩液と混合し、390 \times g、室温、10分間の遠心分離を行った後、1.5mLチューブ (INA・OPTIKA, RC-0150) に上清を入れて、送付するまで凍結保存 (-60 $^{\circ}$ C以下) した。残りの血液は6000 rpm、15分間、4 $^{\circ}$ C遠心分離を行い、血清 (経時採血時 (HBV関連因子測定用) : 30 μ L (5 μ L \times 2本、20 μ L \times 1本)、剖検時 : 160 μ L以上 (5 μ L \times 2本、20 μ L \times 1本、残余1本) を分離し、下記に送付するまで凍結保存 (-60 $^{\circ}$ C以下) した。

[0189] 剖検

Day28に安楽死後、肝臓を採取し、重量を測定する。肝臓はHBV DNAおよびcccDNAのために、一部を凍結保存し残りを病理組織学的検査用にホルマリン固定する。また肺、脾臓および腎臓はホルマリン固定する。

[0190] HBsAg、HBeAgおよびHBcrAgの測定

血清中HBsAg濃度測定は、株式会社エスアールエル (東京) によって実施された。測定には、化学発光酵素免疫測定法 (ChemiLuminescence Enzyme ImmunoAssay, CLEIA) を利用するLumipulse(登録商標) Presto II (富士レビオ株式会社, 東京) を用いた。測定範囲は0.005 から 150 IU/mLであった。当試験での被測定試料の希釈倍率は30倍とし、同希釈倍率での測定範囲は0.15 から 4500 IU/mLとした。血清中HBsAg濃度測定は、株式会社エスアールエル (東京) によって実施された。測定には、化学発光酵素免疫測定法 (ChemiLuminescence Enzyme ImmunoAssay, CLEIA) を利用するLumipulse(登録商標) Presto II (富士レビオ株式会社, 東京) を用いた。測定範囲は0.1から1590 C.O.I.であった。当試験での被測定試料の希釈倍率は30倍とし、同希釈倍率での測定範囲は3から47700 C.O.I.とした。血清中HBc-rAg濃度測定は、株式会社エスアールエル (東京) によって実施された。測定には、化学発光酵素免疫測定法 (ChemiLuminescence Enzyme ImmunoAssay, CLEIA) を利用するLUMIPU

LSE HBcrAg, LUMIPULSE F (富士レピオ株式会社, 東京) を用いた。測定下限は $3.0 \log \text{ U/mL}$ であった。当試験での被測定試料の希釈倍率は300倍とし、同希釈倍率での測定下限は $5.5 \log \text{ U/mL}$ とした。

[0191] h-Albの測定

株式会社フェニックスバイオにて以下の操作を実施した。

2 μL の血液を200 μL の生理食塩液で希釈し、 $390 \times g$, 室温の条件で10分間の遠心分離を行った。血中h-Alb濃度は、ラテックス凝集免疫比濁法 (LZテスト ‘栄研’ U-ALB, 栄研化学株式会社, 東京) を用いて、自動分析装置BioMajesty™ (JCA-BM6050, JEOL, 東京) で測定した。

[0192] ALTの測定

剖検時の血清を用いてフェニックスバイオにて測定した。

血漿中ALT活性は、採取した血漿10 μL を利用して測定した。測定対象はジアリールイミダゾールロイコ色素 (ピルビン酸オキシダーゼにより発生する過酸化水素とペルオキシダーゼによりジアリールイミダゾールロイコ色素を青色に発色) であり、測定にはドライケム7000/NX500sVを利用した。

[0193] 肝臓中HBV DNAの測定

RNA later 浸漬肝臓試料からDNeasy (登録商標) Blood & Tissue Kits (株式会社キアゲン, 東京) を用いてDNA抽出を行い、DNAをNuclease-free waterに溶解した。DNA濃度をBioPhotometer (登録商標) 6131 (エッペンドルフ株式会社) で測定した後、Nuclease-free waterを用いて最終濃度を20 $\text{ ng}/\mu\text{L}$ に調製した。PCR反応液は、溶解したDNA原液もしくは希釈したDNAを5 μL とTaqMan (登録商標) Fast Advanced Master Mixを用いて調製した。また、PCR反応と解析にはCFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systemを用いた。PCR反応は、 50°C 2分 $\rightarrow 95^\circ\text{C}$ 20秒 $\rightarrow (95^\circ\text{C}$ 3秒 $\rightarrow 60^\circ\text{C}$ 32秒) $\times 53$ サイクルで行った。肝臓中HBV DNA濃度は、2ウエルの平均で算出した。使用したプライマーおよびプローブの配列は、以下の表12に記した。なお、当定量方法による検出下限は、50 copies/100ng DNAである。HBV DNAスタンダードにはHBV感染PXBマウスから得られた血清を使用した。この血清中に含まれるHBV DNA濃度はデ

デジタルPCRにより定量した。

[0194] [表12]

表12

識別情報	想定される 標的的位置	配列情報			配列 番号
		標識	5' 核酸配列 3'	標識	
Forward primer	166-186	n/a	CACATCAGGATTCCTAGGACC	n/a	84
Reverse primer	344-325	n/a	AGGTTGGTGACTGATTGGAG	n/a	85
TaqMan probe	242-267	6-FAM	CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC	TAMRA	86

n/a: Not applicable

[0195] cccDNAの測定

肝臓中HBV DNAの測定時に精製したDNA原液もしくは希釈したDNAを5 μ LとTaqMan(登録商標 Fast Advanced Master Mixを用いて調製した。また、PCR反応と解析にはCFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systemを用いた。PCR反応は、50°C 2分→95°C 20秒→(95°C 3秒→60°C 32秒)×55サイクルで行った。肝臓中HBV cccDNA濃度は、2ウエルの平均で算出した。使用したプライマー(タカラバイオ株式会社, 滋賀)及びプローブ(タカラバイオ株式会社)の配列は、以下の表13の通りである。なお、当定量方法による検出下限は、 1.0×10^2 copies/100 ng DNAであった。また、HBV cccDNAスタンダードにはHBVの全ゲノム配列を含むプラスミドを利用した。

[0196] [表13]

表13

識別情報	想定される 標的的位置	配列情報			配列 番号
		標識	5' 核酸配列 3'	標識	
Forward primer	1545-1563	n/a	CTCCCCGTCIGTGCCCTTCT	n/a	87
Reverse primer	1900-1883	n/a	GCCCCAAAGCCACCCAAG	n/a	88
TaqMan probe	1602-1628	6-FAM	CGTCGCATGGARACCACCGTGAACGCC	TAMRA	89

n/a: Not applicable

[0197] 病理組織学的検査 (HBsAg免疫染色、HBcAg免疫染色)

肝臓組織は、10%中性緩衝ホルマリン液固定後に70%エタノールに置換し、

これらの試料を奈良病理研究所（奈良）に依頼して常法によりパラフィン包埋ブロックを作製し、その後薄切標本を得た。

パラフィン切片を脱パラフィン処理した後にマイクロウェーブにより抗原賦活化を施した。一次抗体（HBsAg (anti-HBsAg antibody, Code: 0BT0990, Bio-Rad AbD Serotec Limited, Oxford, UK)もしくはHBcAg (anti-HBcAg antibody, Code: PAB14506, Abnova, Taipei City, Taiwan))を4°Cで一晩反応させた。一次抗体をビオチン-アビジン-ペルオキシダーゼ複合体と反応させた後、DABにより発色させた。細胞核をヘマトキシリンにて染色した後、これらの切片を脱水・透徹し、封入した。その後、ハムリー株式会社で光学顕微鏡を用いて鏡検を実施した。

[0198] (16-6) 観察・測定項目

サンプルの投与は、図38に示すスケジュールに従った。HBsAg (図39)、HBeAg (図40) およびHBcAg (図41) に関してN-10M-D42TNとcontrol (PBS)を比較した結果、いずれの場合もN-10M-D42TNが抑制的に働いていた。血中HBV DNA (図42) についてもN-10M-D42TNが抑制的に働いていた。h-Albの測定 (図43) の結果、キメラマウスにおいて十分なヒトアルブミン量が得られた。本アッセイはヒト肝臓細胞での評価として優れていた。ALT (図44) の測定の結果、N-10M-D42TNはcontrol (PBS)と比較して、肝炎を悪化させることはなかった。剖検して得た肝臓より肝臓中のHBV-DNA (図45) の量を測定した結果、N-10M-D42TNはコントロール投与群と比較し、HBV DNAのコピー数を減少させていた。同様に肝臓中のcccDNA (図46) のコピー数を測定した結果、N-10M-D42TNはコントロール投与群と比較し、HBV DNAのコピー数を減少させた。

[0199] 以上の結果から、DOCK11結合ペプチド(N-10M-D42TN)はHBVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いた動物実験において、肝臓中のHBV-DNAおよびcccDNAを減少させ、明確な抗HBV作用を有することが証明された。また、in vitroおよびin vivoアッセイ系において、HBVを十分に感染させた後にDOCK11結合ペプチド(N-10M-D42TN)を投与しているため、DOCK11結合ペプチド(N-10M-D42TN)はHBV粒子が細胞の外に一度分泌された後、再度細胞内に侵入する再感

染の過程を阻止している可能性が高い。

[0200] 実施例15の結果と併せると、DOCK11結合ペプチドは、rcDNAからcccDNAへの修復過程の阻害、並びにEGFRのエンドサイトーシスの阻害等によるHBV粒子の細胞内への再侵入の阻害により、抗HBV効果を発揮することが示唆される。

請求の範囲

- [請求項1] DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する物質を有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。
- [請求項2] 前記物質は、DOCK11の第1516番～第2073番残基の領域に結合する、請求項1記載の抗B型肝炎ウイルス剤。
- [請求項3] DOCK11の機能の阻害が、DOCK11とAck1の結合の阻害によるAck1活性化の阻害、DOCK11のグアニンヌクレオチド交換因子活性の阻害、及びDOCK11によるATRシグナル伝達経路の活性化の阻害から選択される少なくとも1種である、請求項1又は2記載の抗B型肝炎ウイルス剤。
- [請求項4] 前記物質が、下記(1)～(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドである、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗B型肝炎ウイルス剤。
- (1) IITPGTEVLNSDLQAS (配列番号1) の配列のポリペプチド。
 - (2) HNVLSVYNPAWGKYFH (配列番号2) の配列のポリペプチド。
 - (3) NFPPNPMHNTDSCICA (配列番号3) の配列のポリペプチド。
 - (4) TEKRRLMKPVLLTYNP (配列番号4) の配列のポリペプチド。
 - (5) IICPGAEVLNGLDVLAS (配列番号5) の配列のポリペプチド。
 - (6) TEYRRCVTPVLLTYNN (配列番号6) の配列のポリペプチド。
 - (7) TEEHRGLLPVLMTYNV (配列番号7) の配列のポリペプチド。
 - (8) TEF CRWTWPVLCTYNA (配列番号8) の配列のポリペプチド。
 - (9) TEQARPTPPPVLDTYNL (配列番号9) の配列のポリペプチド。
 - (10) PEQARPPPLEDNLFL (配列番号10) の配列のポリペプチド。
 - (11) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の配列のポリペプチド。
 - (12) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の配列のポリペプチド。
 - (13) PEQARPPPLEDNLFL (配列番号10) の領域を含むAck1の部分ポリペプチド。
 - (14) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の領域を含むラディキシンの部分ポリペプチド。

(15) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の領域を含む β -セントラクチンの部分ポリペプチド。

(16) (1)~(15)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。

[請求項5] 前記ポリペプチドは、肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態にある、請求項4記載の抗B型肝炎ウイルス剤。

[請求項6] 前記担体分子が、アシアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である、請求項5記載の抗B型肝炎ウイルス剤。

[請求項7] 前記抗体、抗体断片又は一本鎖抗体が、
配列番号13、19、25若しくは31に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1と、
配列番号14、20、26若しくは32に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2と、
配列番号15、21、27若しくは33に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3と、
配列番号16、22、28若しくは34に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1と、
配列番号17、23、29若しくは35に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2と、
配列番号18、24、30若しくは36に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3と

を有する、請求項6記載の抗B型肝炎ウイルス剤。

[請求項8] 前記抗体、抗体断片又は一本鎖抗体が、内因性酵素により切断される切断配列を介して前記ポリペプチドと連結する、請求項6又は7記載の抗B型肝炎ウイルス剤。

[請求項9] 前記ポリペプチドは、細胞膜透過促進分子と連結した形態にある、請求項4～8のいずれか1項に記載の抗B型肝炎ウイルス剤。

[請求項10] 細胞膜透過促進分子が、配列番号38又は39に示すアミノ酸配列のポリペプチドである、請求項9記載の抗B型肝炎ウイルス剤。

[請求項11] 前記ポリペプチドは、核移行シグナルと連結した形態にある、請求項4～10のいずれか1項に記載の抗B型肝炎ウイルス剤。

[請求項12] 下記(1)～(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドの、DOCK11結合ペプチドとしての使用。

(1) IITPGTEVLNSDLQAS (配列番号1) の配列のポリペプチド。

(2) HNVLSVYNPAWGKYFH (配列番号2) の配列のポリペプチド。

(3) NFPPNPMHNTDSCICA (配列番号3) の配列のポリペプチド。

(4) TEKRRLMKPVLLTYNP (配列番号4) の配列のポリペプチド。

(5) IICPGAEVINGDLVAS (配列番号5) の配列のポリペプチド。

(6) TEYRRCVTPVLLTYNN (配列番号6) の配列のポリペプチド。

(7) TEEHRGLLPVLMTYNV (配列番号7) の配列のポリペプチド。

(8) TEFCRWTWPVLCTYNA (配列番号8) の配列のポリペプチド。

(9) TEQARPTPPPVLDTYNL (配列番号9) の配列のポリペプチド。

(10) PEQARPPPLEDNFL (配列番号10) の配列のポリペプチド。

(11) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の配列のポリペプチド。

(12) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の配列のポリペプチド。

(13) PEQARPPPLEDNFL (配列番号10) の領域を含むAck1の部分ポリペプチド。

(14) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の領域を含むラディキシンの部分ポリペプチド。

(15) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の領域を含む β -セントラクチンの部分ポリペプチド。

(16) (1)~(15)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。

[請求項13] 下記(1)~(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドからなる、DOCK11結合ペプチド。

(1) IITPGTEVLNSDLQAS (配列番号1) の配列のポリペプチド。

(2) HNVLSVYNPAWGKYFH (配列番号2) の配列のポリペプチド。

(3) NFPPNPMHNTDSCICA (配列番号3) の配列のポリペプチド。

(4) TEKRRLMKPVLLTYNP (配列番号4) の配列のポリペプチド。

(5) IICPGAEVINGDLVAS (配列番号5) の配列のポリペプチド。

(6) TEYRRCVTPVLLTYNN (配列番号6) の配列のポリペプチド。

(7) TEEHRGLLPVLMTYNV (配列番号7) の配列のポリペプチド。

(8) TEFRCRWTWPVLCTYNA (配列番号8) の配列のポリペプチド。

(9) TEQARPTPPPVLDTYNL (配列番号9) の配列のポリペプチド。

(10) PEQARPPPLEDNLFL (配列番号10) の配列のポリペプチド。

(11) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の配列のポリペプチド。

(12) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の配列のポリペプチド。

(13) PEQARPPPLEDNLFL (配列番号10) の領域を含むAck1の部分ポリペプチド。

(14) HEEHRGMLREDSMMEYLK (配列番号11) の領域を含むラディキシンの部分ポリペプチド。

(15) AEEHRGLLTIRYPMEH (配列番号12) の領域を含む β -セントラクチンの部分ポリペプチド。

(16) (1)~(15)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。

[請求項14] 配列番号13、19、25若しくは31に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と8

0%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR1と、

配列番号14、20、26若しくは32に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR2と、

配列番号15、21、27若しくは33に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖CDR3と、

配列番号16、22、28若しくは34に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1と、

配列番号17、23、29若しくは35に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2と、

配列番号18、24、30若しくは36に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において一部の残基が置換され、該アミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3と

を有する、アシアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体、抗体断片又は一本鎖抗体。

[請求項15] 請求項14記載の抗体、抗体断片又は一本鎖抗体を含む、肝細胞内に薬物を送達するための薬物送達用担体。

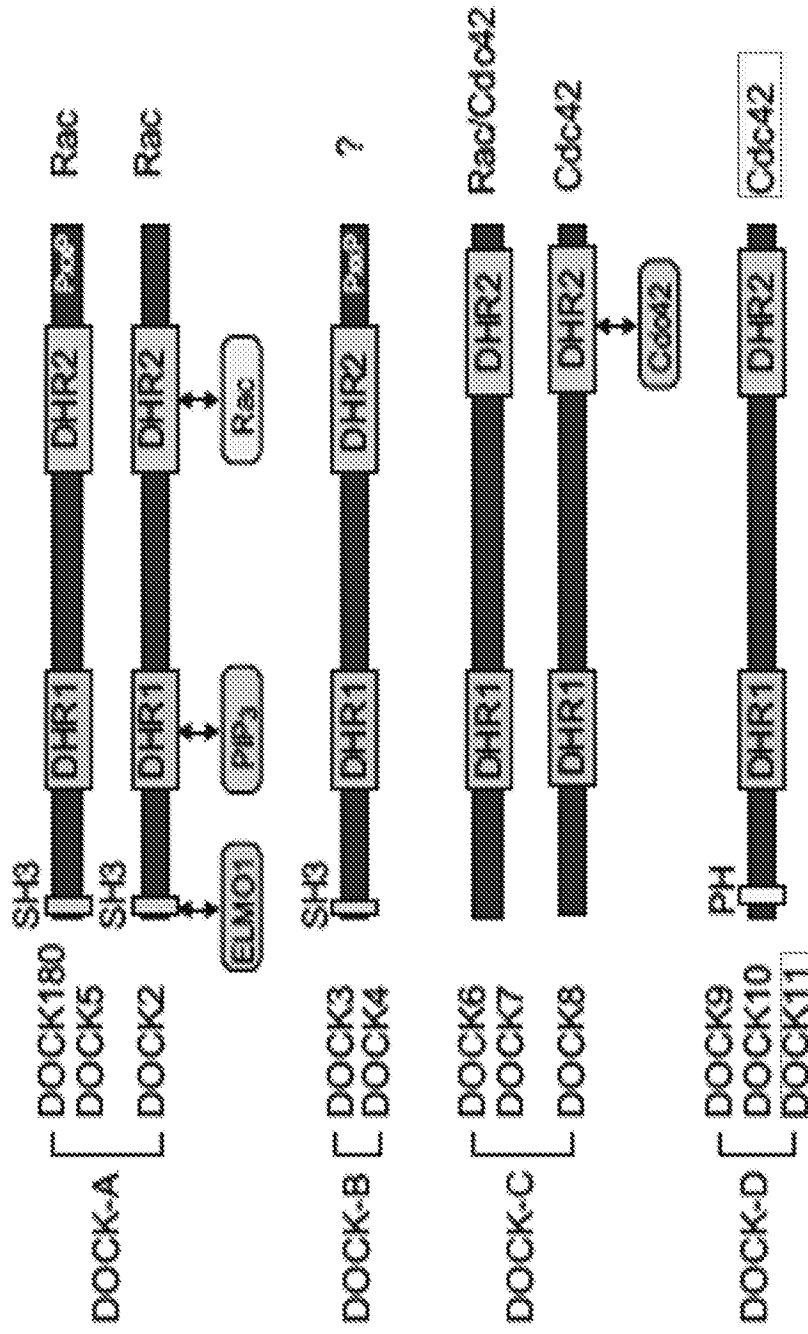
[請求項16] 請求項15記載の薬物送達用担体と肝細胞内に送達すべき薬物との複合体を含む、医薬組成物。

[1]



[図2]

ヒトDOCK 180 superfamilyの構造



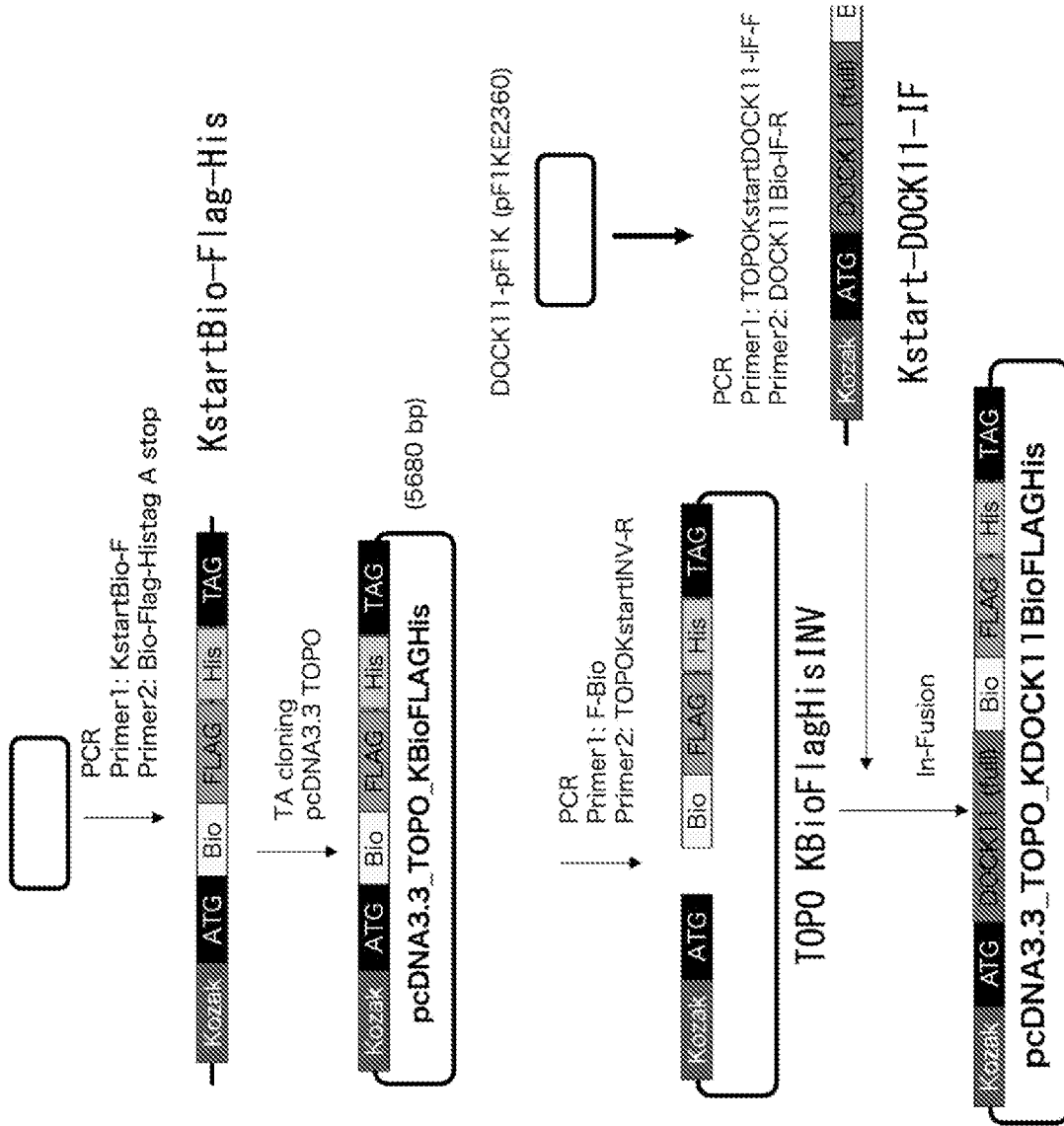
SH3: Src homology 3 domain

DHR: Dock homology region

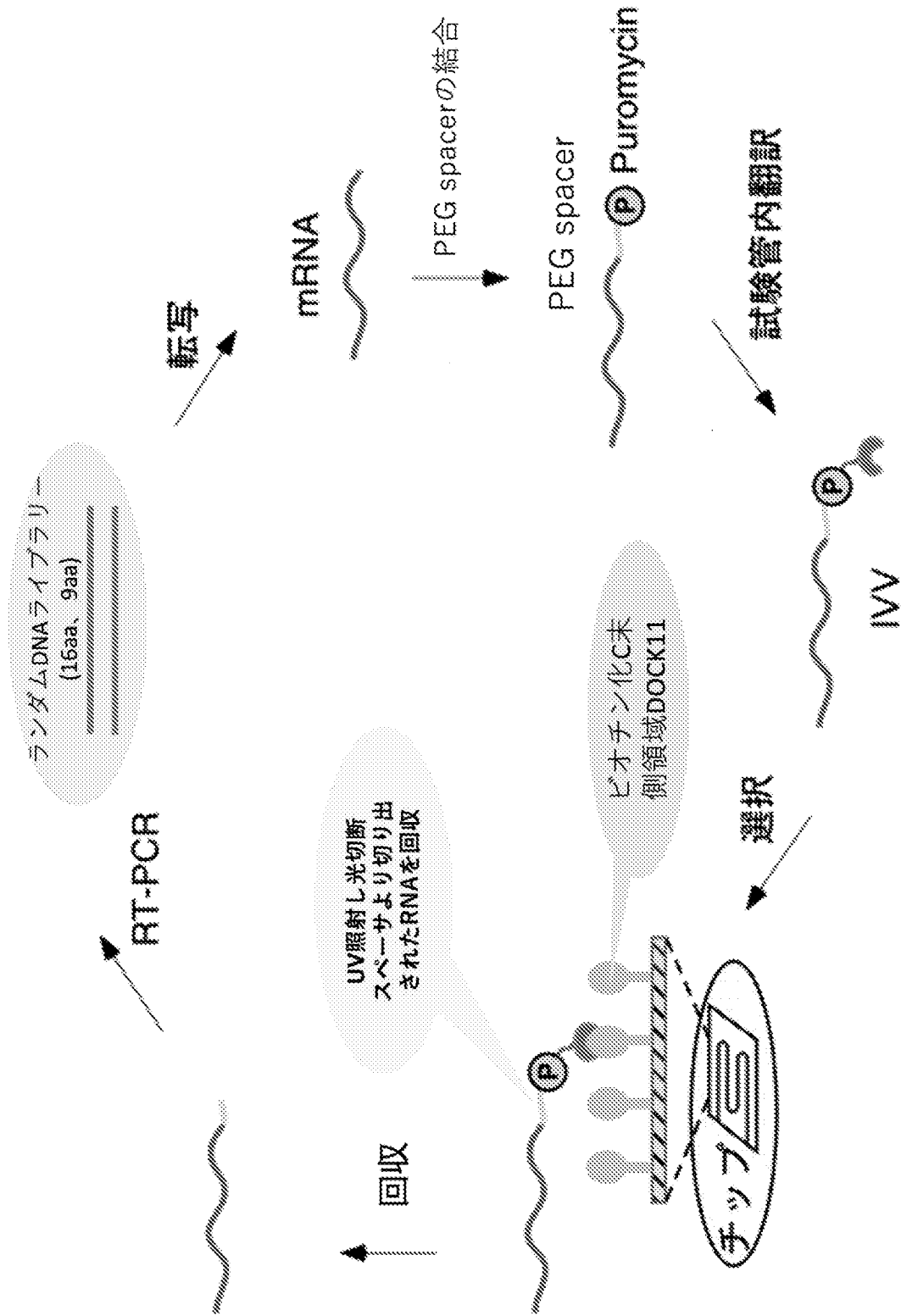
PH: Pleckstrin homology domain

Nishikimi, A. et al., Exp.Cell Res., 319, 2343 (2013)

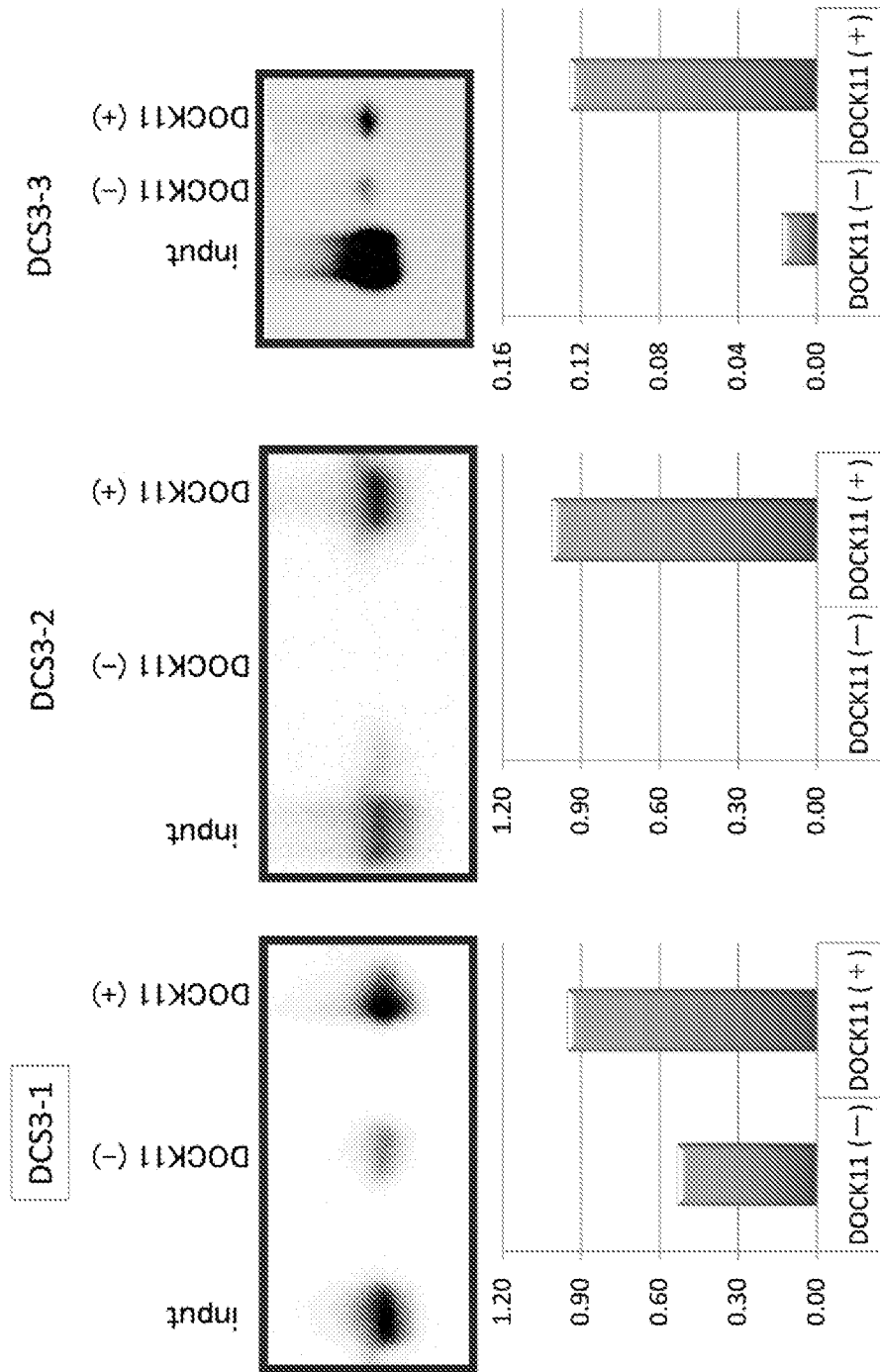
[3]



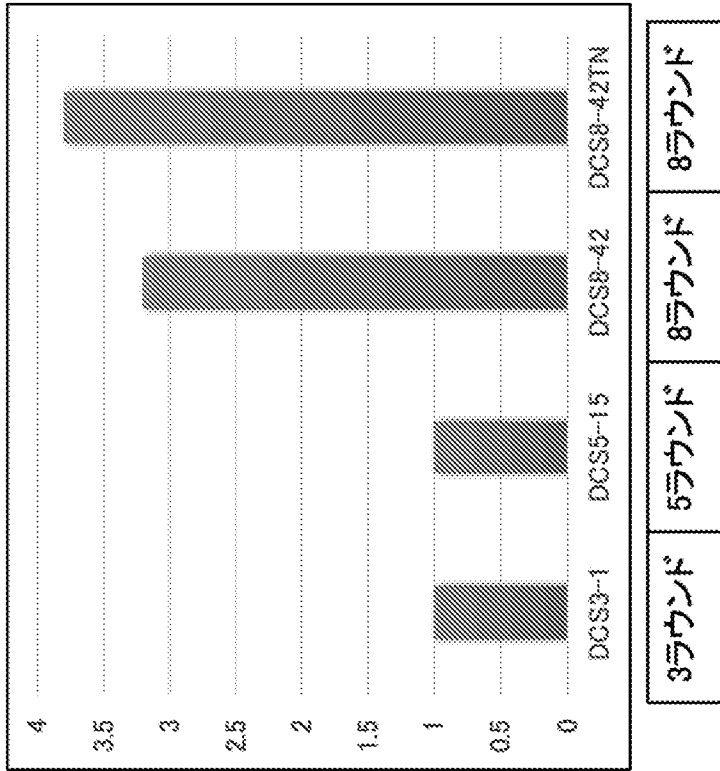
[図4]



[5]

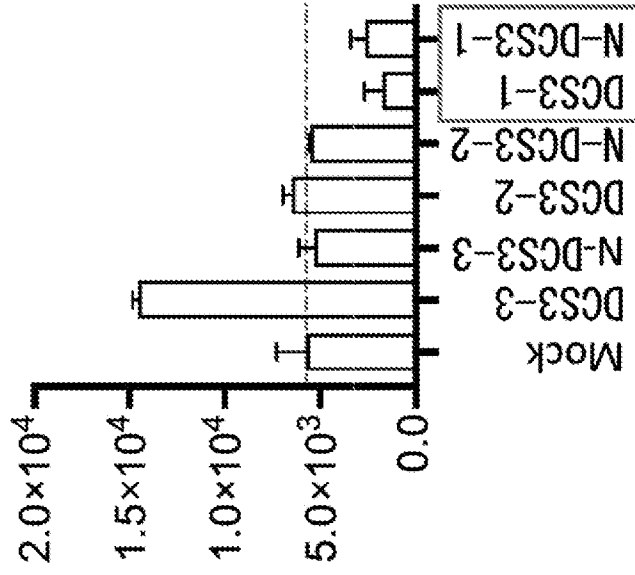


[図6]

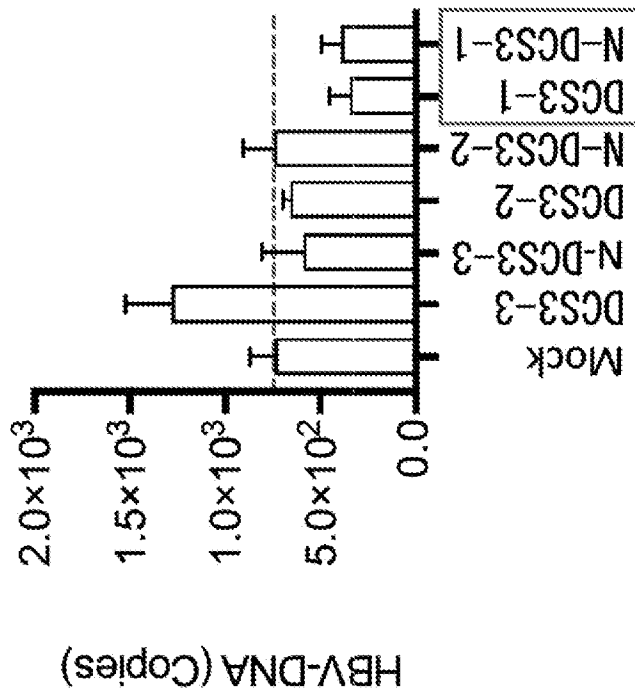


[7]

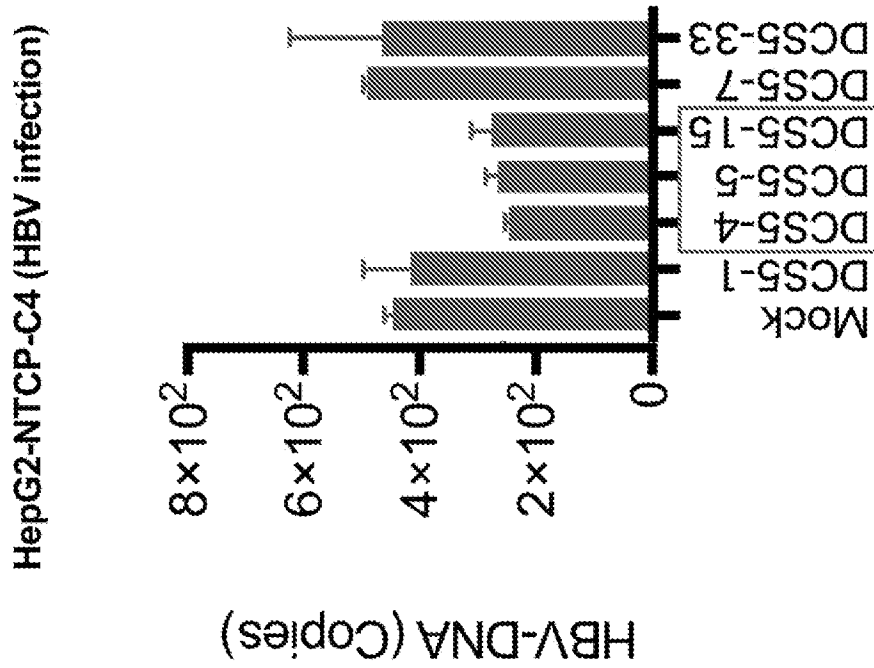
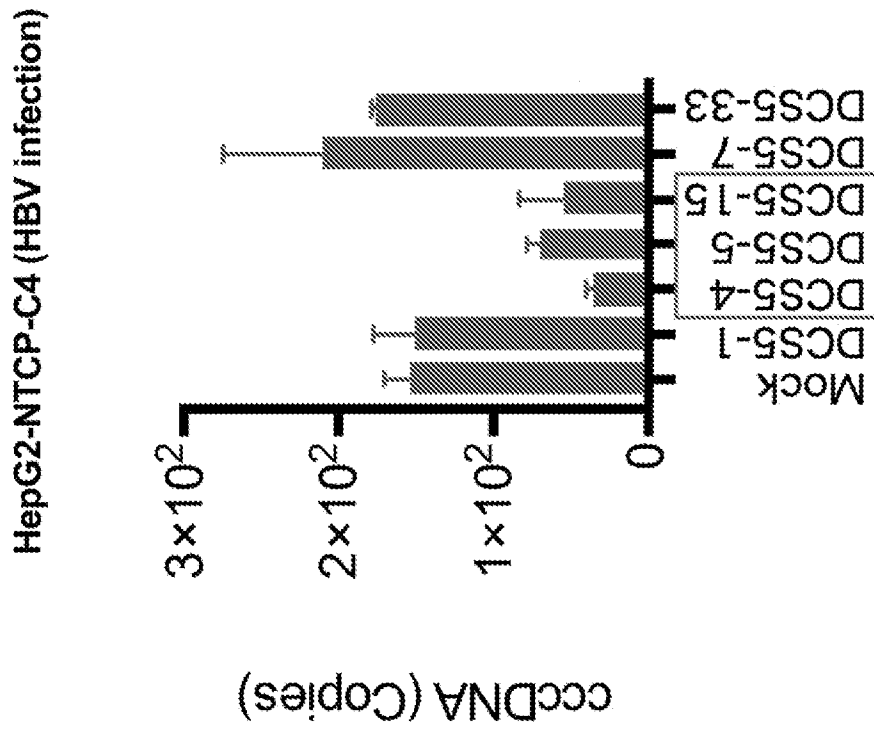
HepG2-NTCP-C4 (HBV infection)



HepG2-NTCP-C4 (HBV infection)

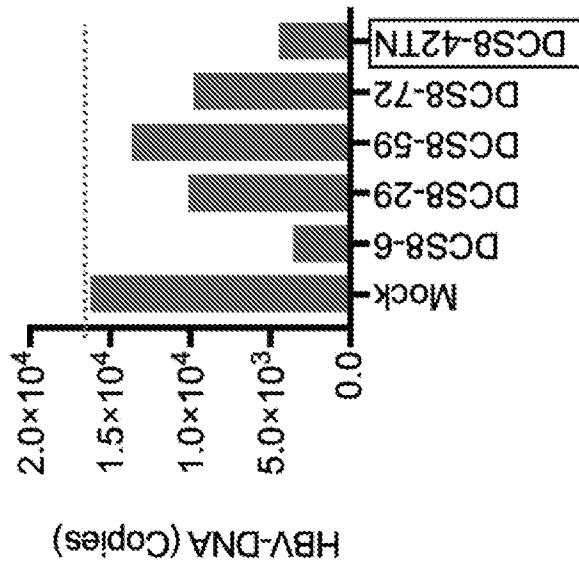
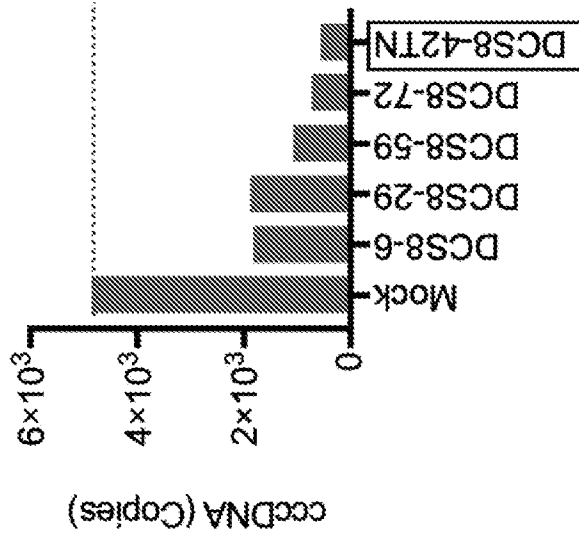


[8]



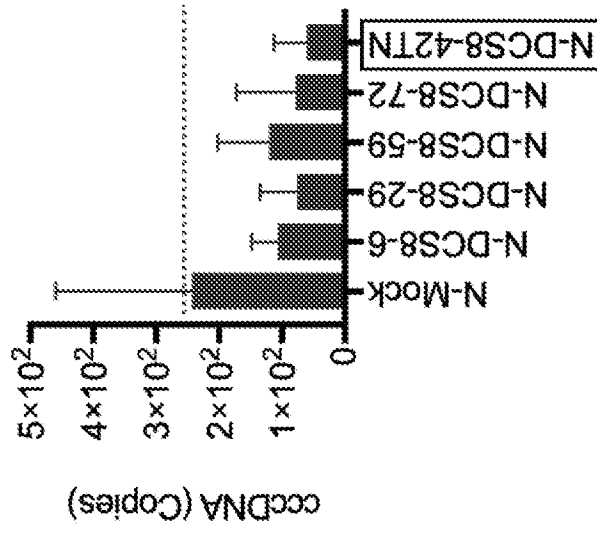
[9]

HepG2-NTCP-C4-DOX-DOCK11 (HBV infection) HepG2-NTCP-C4-DOX-DOCK11 (HBV infection)

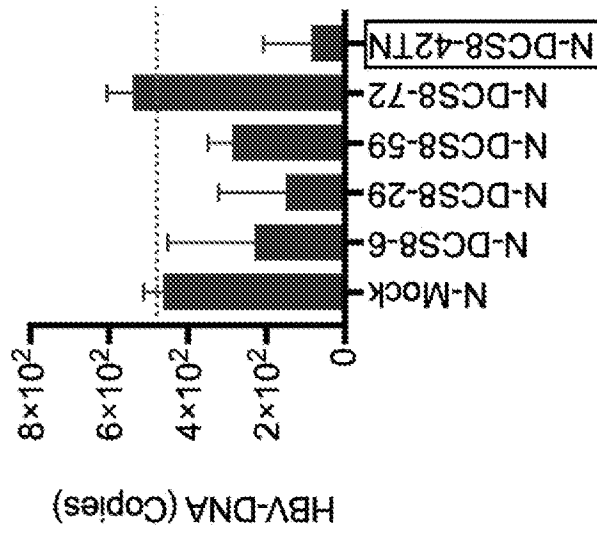


[010]

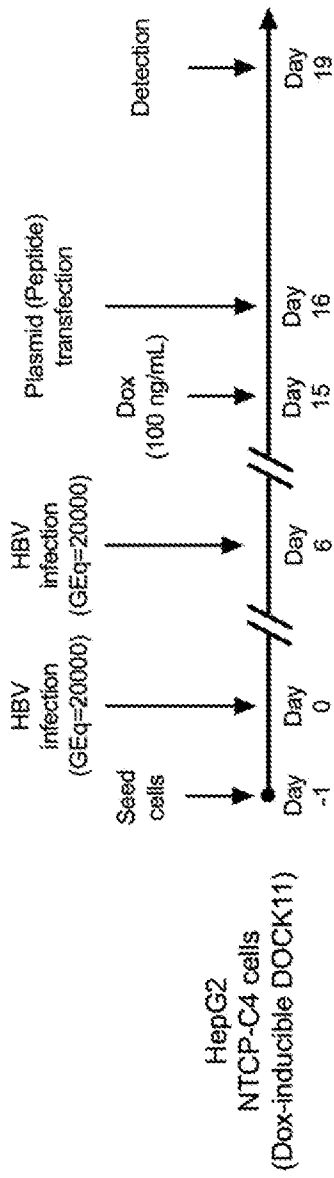
HepG2-NTCP-C4-DOX-DOCK11 (HBV infection)



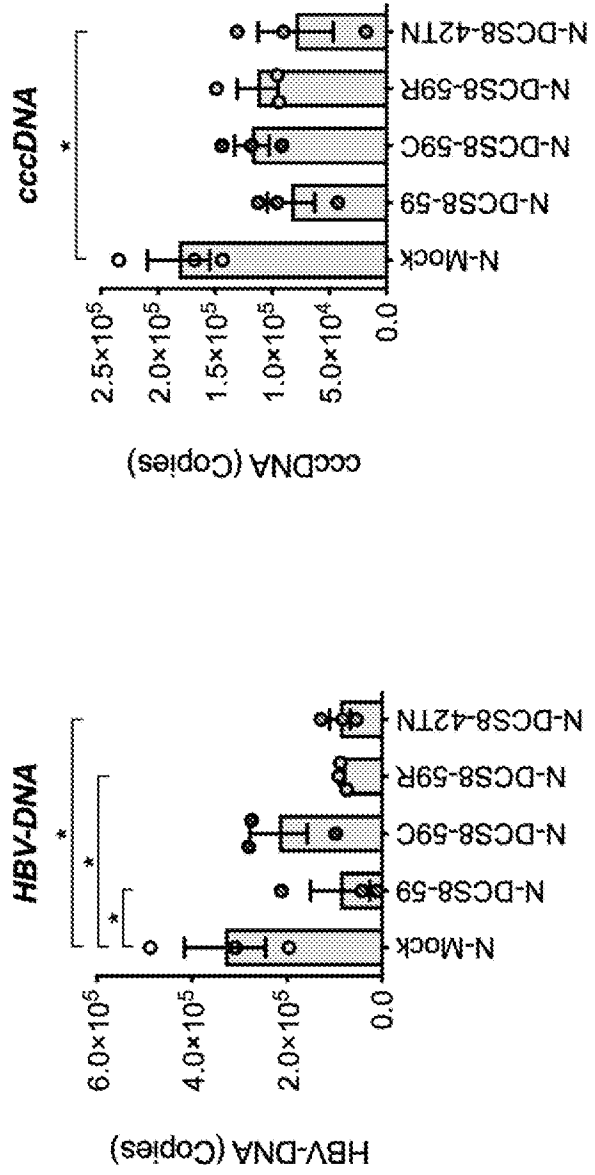
HepG2-NTCP-C4-DOX-DOCK11 (HBV infection)



[11]

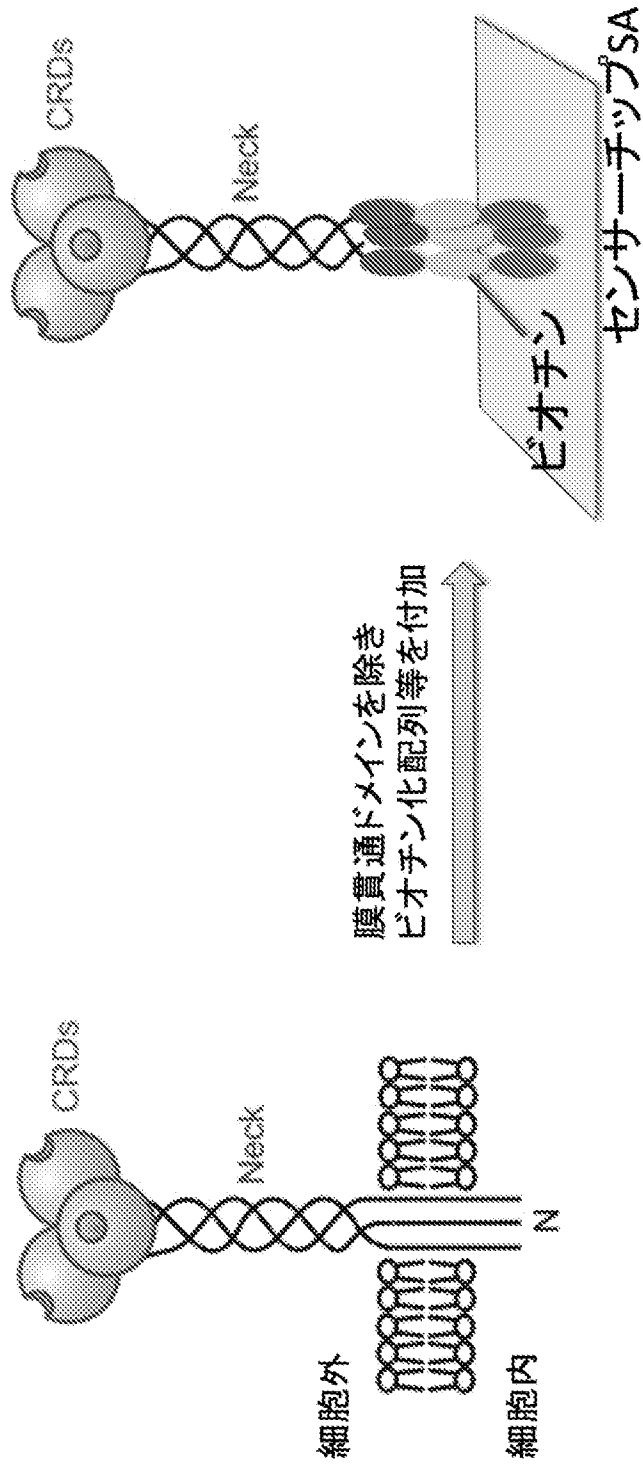


A



B

[図12]



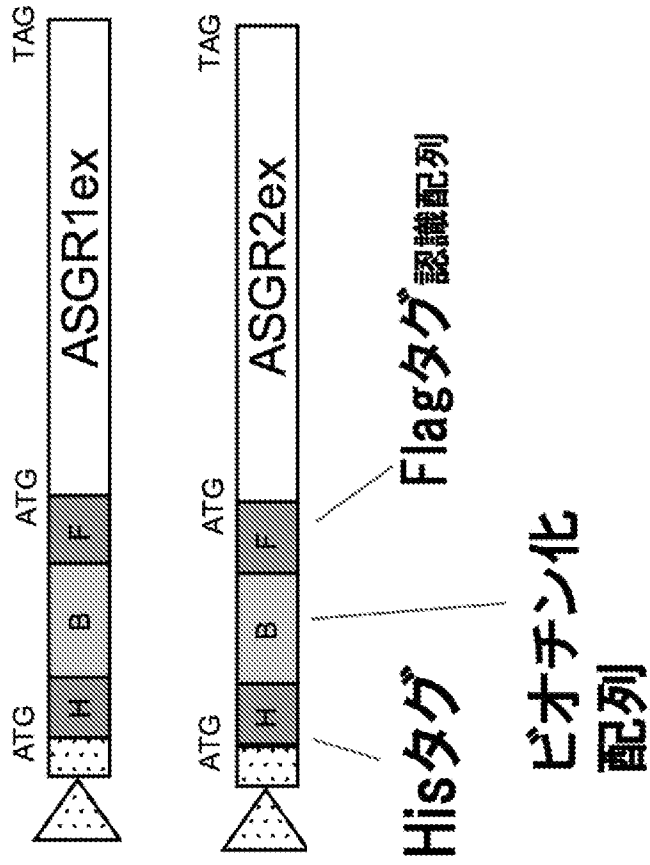
[図13]

ASGR1_HUMAN.seq	1	MITKE YDILQHLDNEESDH--HQ-----LRKGGPPPQPLLQRLCSGPRLL	42
ASGR2_HUMAN.seq	1	MAKDFDIIQQLSSEENDHPFHQEGEGTRRLNPRRGNPFLKGGPPAQLAQRLCSMVCFS	60
ASGR1_HUMAN.seq	43	LLSLGLSLILLVWCVIGSN-----SQLQEEELRGLREITFSNFTASTEAQVKGLSTDGGN	97
ASGR2_HUMAN.seq	61	LLALSFNTILLVVICVITGSSQSEHGGAQLQAE LRS LKEAF SNFSSSTLTENQAISTHGGG	120
ASGR1_HUMAN.seq	98	VGRKMKSLÉSQLEKQKDLSEDHSSLLLVKQFVSDLRSLSCQMAALQGGNGSERTCCPVN	157
ASGR2_HUMAN.seq	121	VGDKITSLGAKLEKQQDILKADHDALLFHLKHPVDLRFVACQMELLHSNGSQRCCPVN	180
ASGR1_HUMAN.seq	158	WVEHERSCYWF SRS GKAWADADNYCRLEDAHLVVA TSWEEQK FVQHILGPNVTWIMGLHDQ	217
ASGR2_HUMAN.seq	181	WVEHQSCYWF SHS GKAWAEAEKYCQLENAHLVWINSWEEQKFTVQITNPTNTWIGLIDS	240
ASGR1_HUMAN.seq	218	NGPWKWDGTDYETGFKNWRPEQDDMYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCCQRPYRWVC	277
ASGR2_HUMAN.seq	241	DGSWKWVDGTDYRHNYKNWAVTQPDNWHIGHELGGSEDCVEVQPDGRWNDDVCLQVYRWVC	300
ASGR1_HUMAN.seq	278	EITELDKASQEPPLL	291
ASGR2_HUMAN.seq	301	EKRRNATGE---VA	311

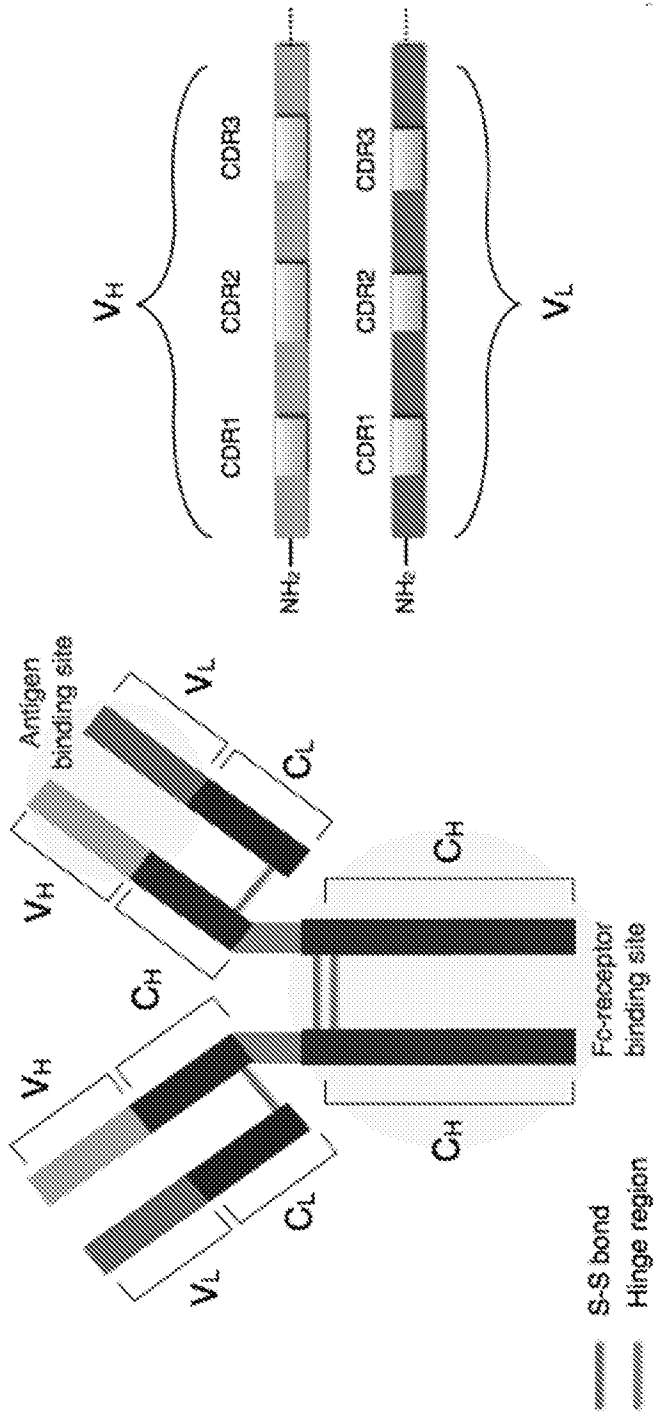
↑ クロニンゲルした領域


=====: 膜貫通ドメイン

[図14]



[15]

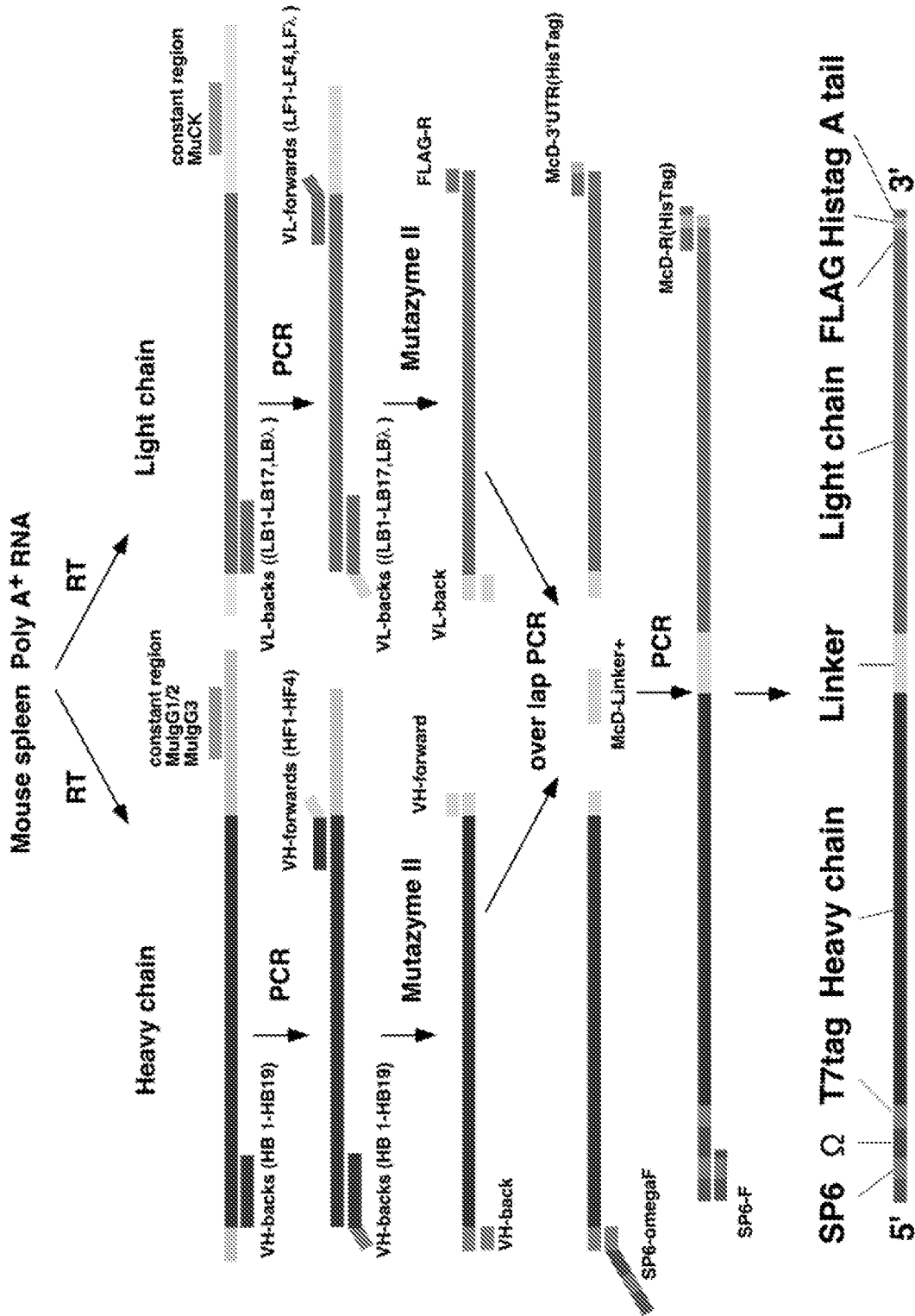


[16]

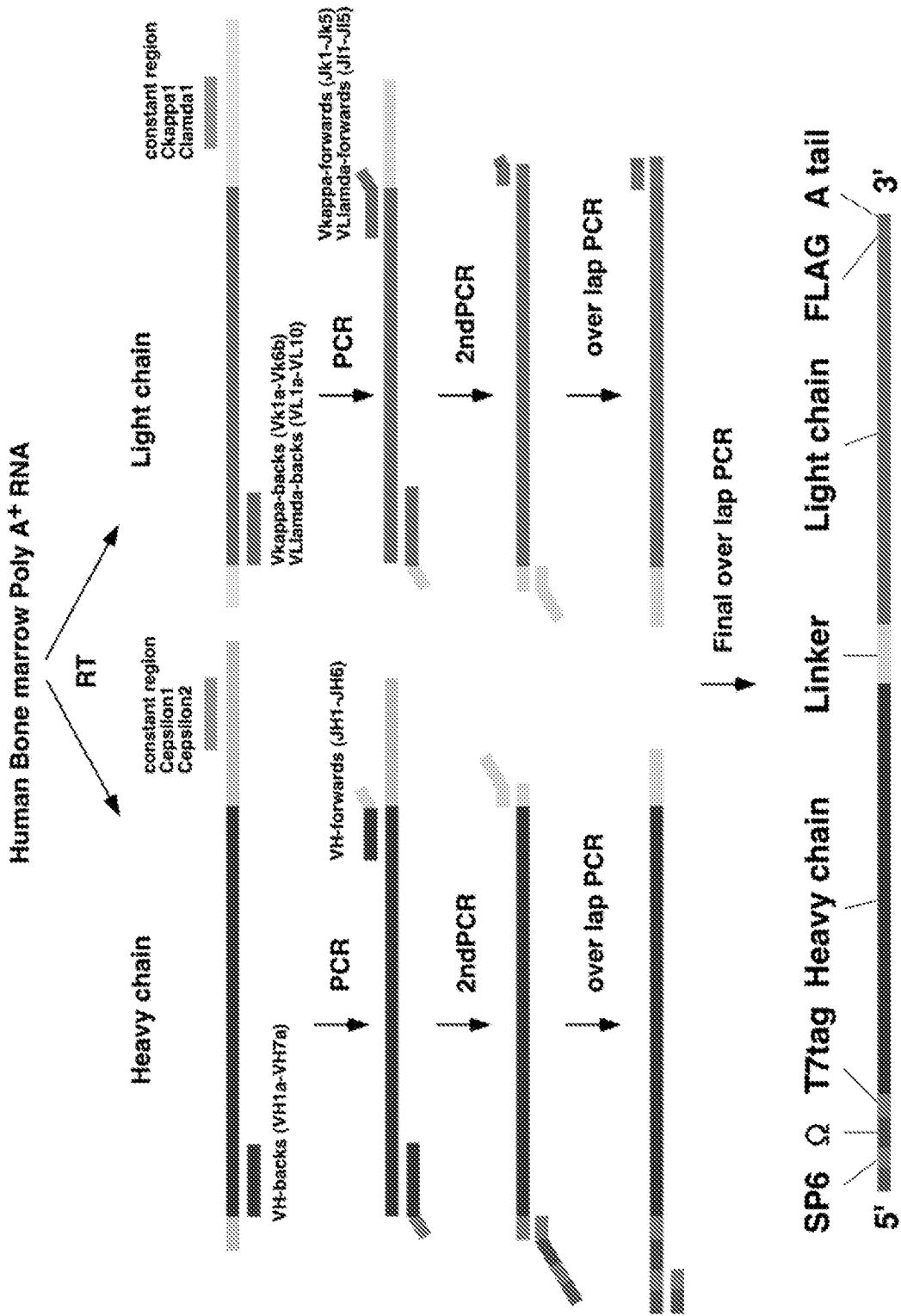


scFv
(30 kDa)

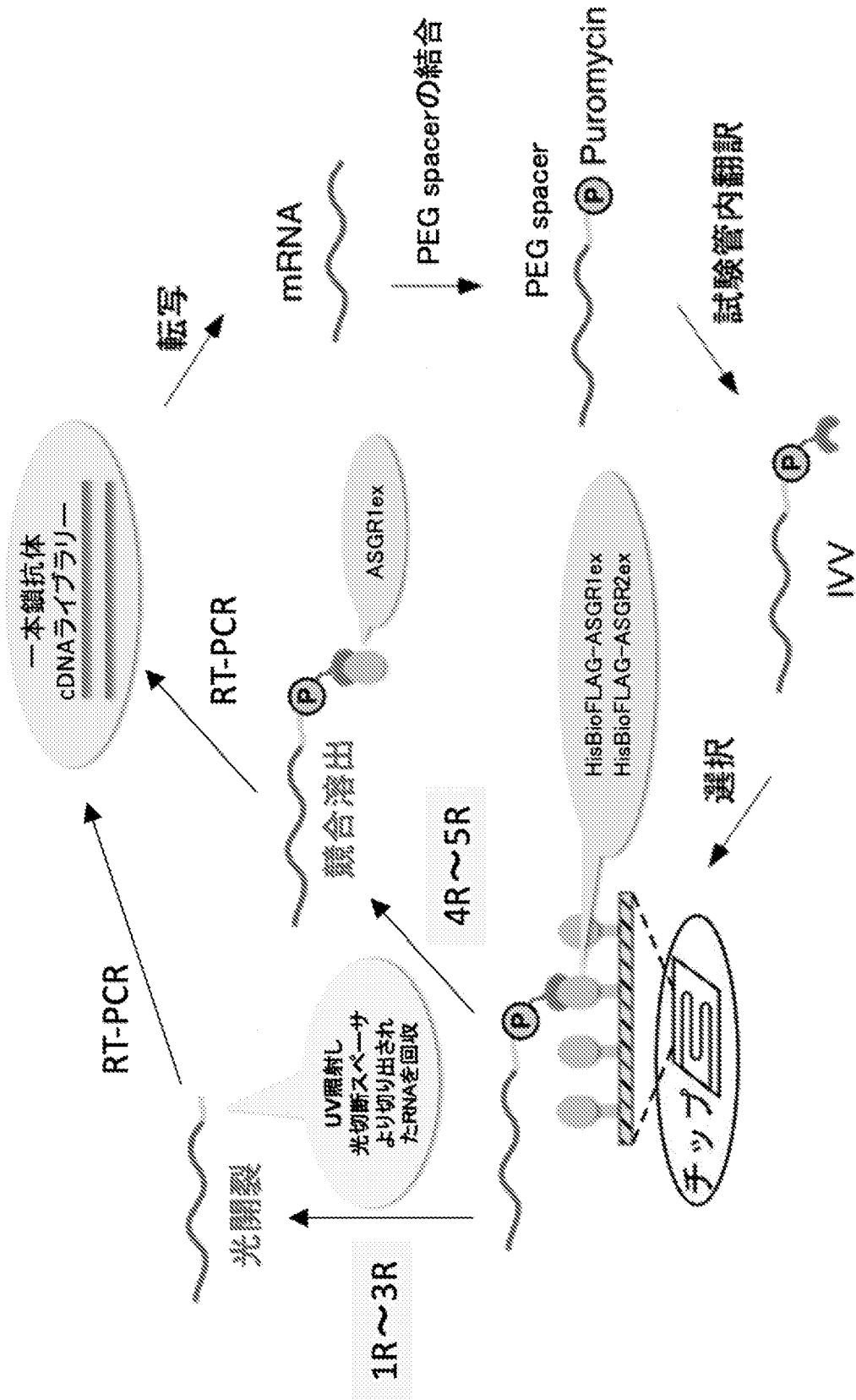
[17]



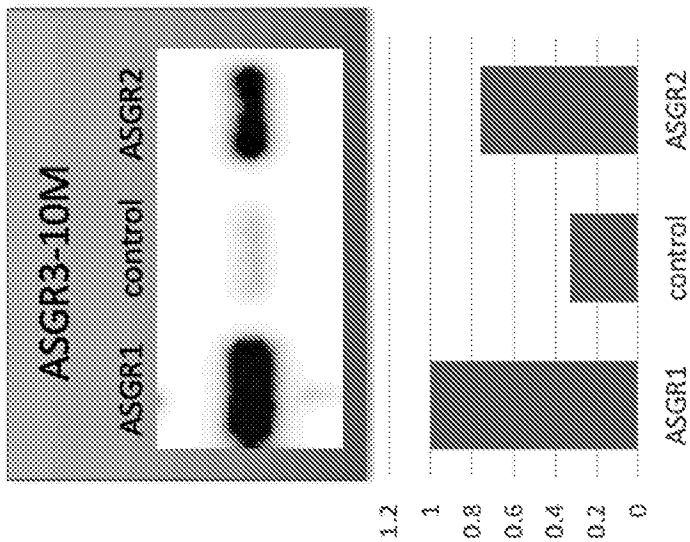
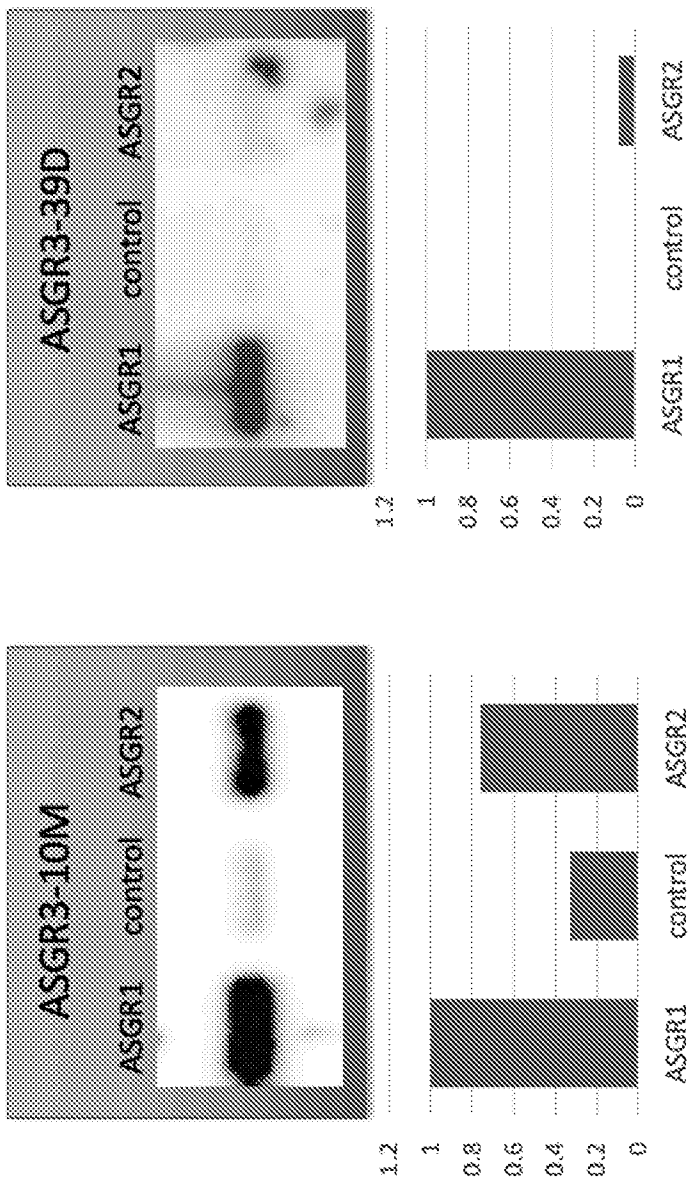
[18]



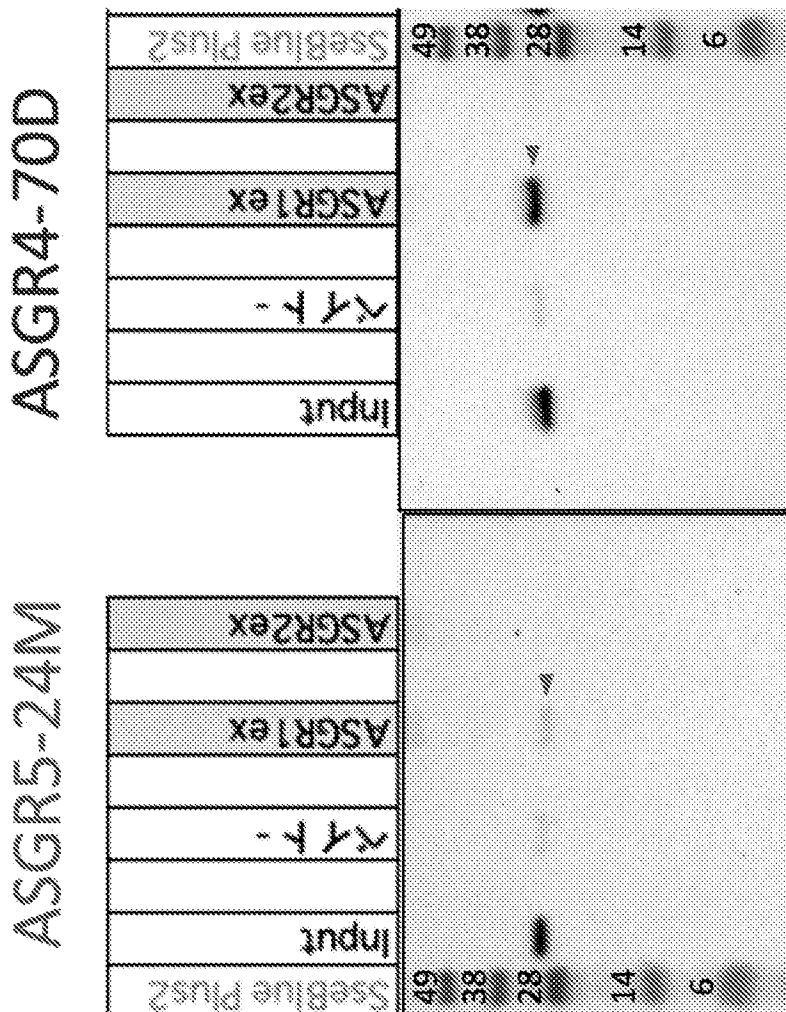
[図19]



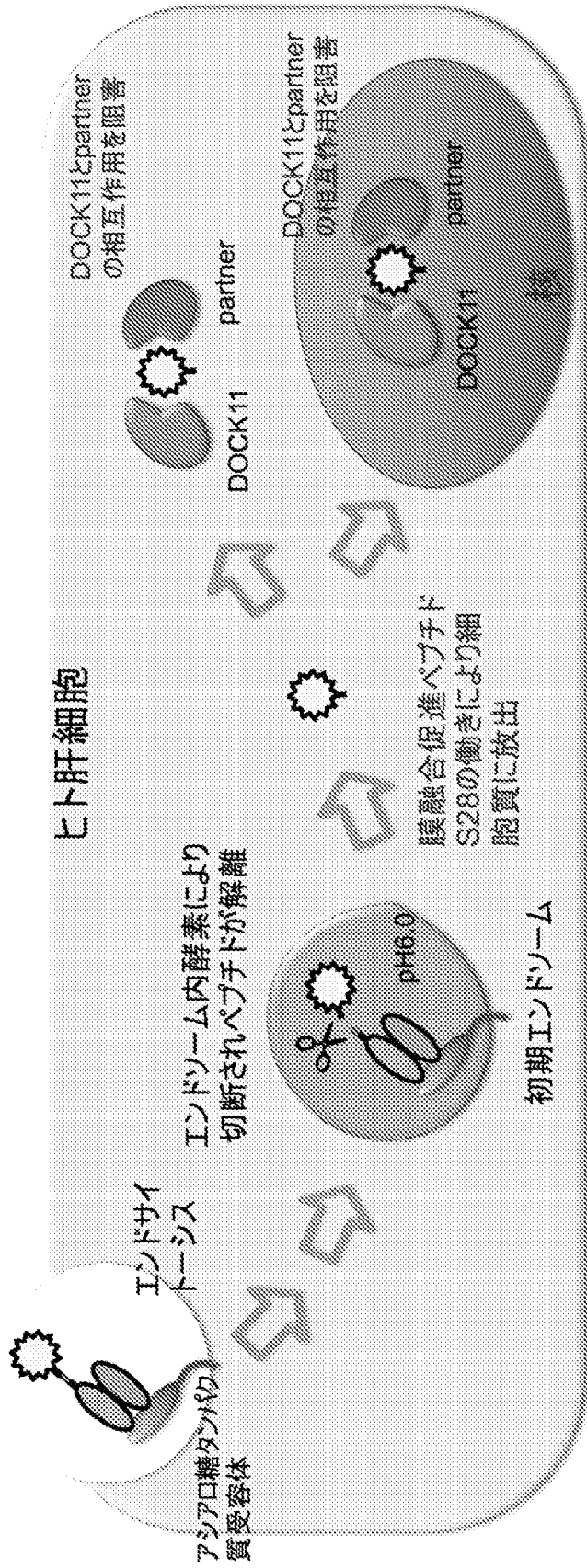
[20]



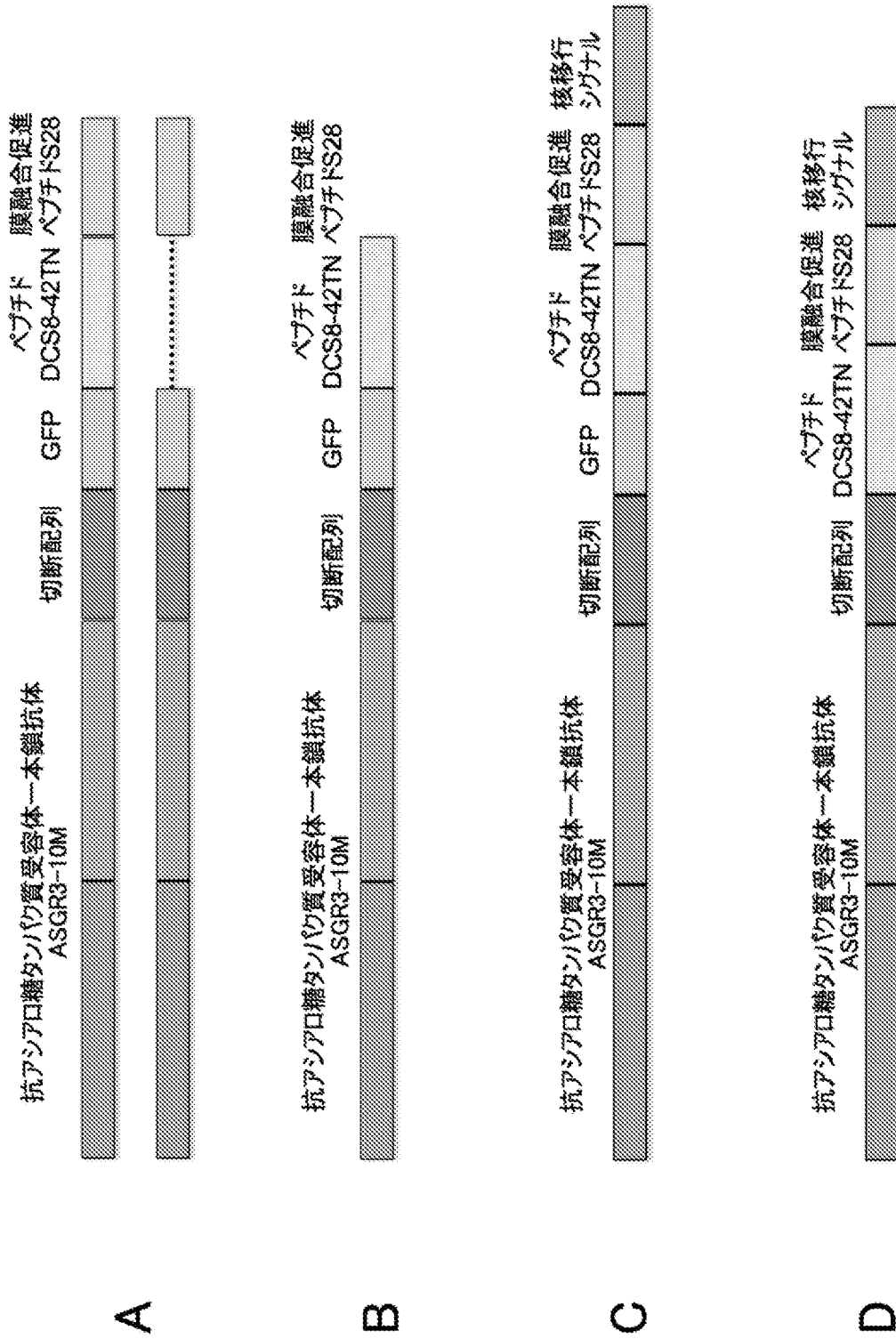
[21]



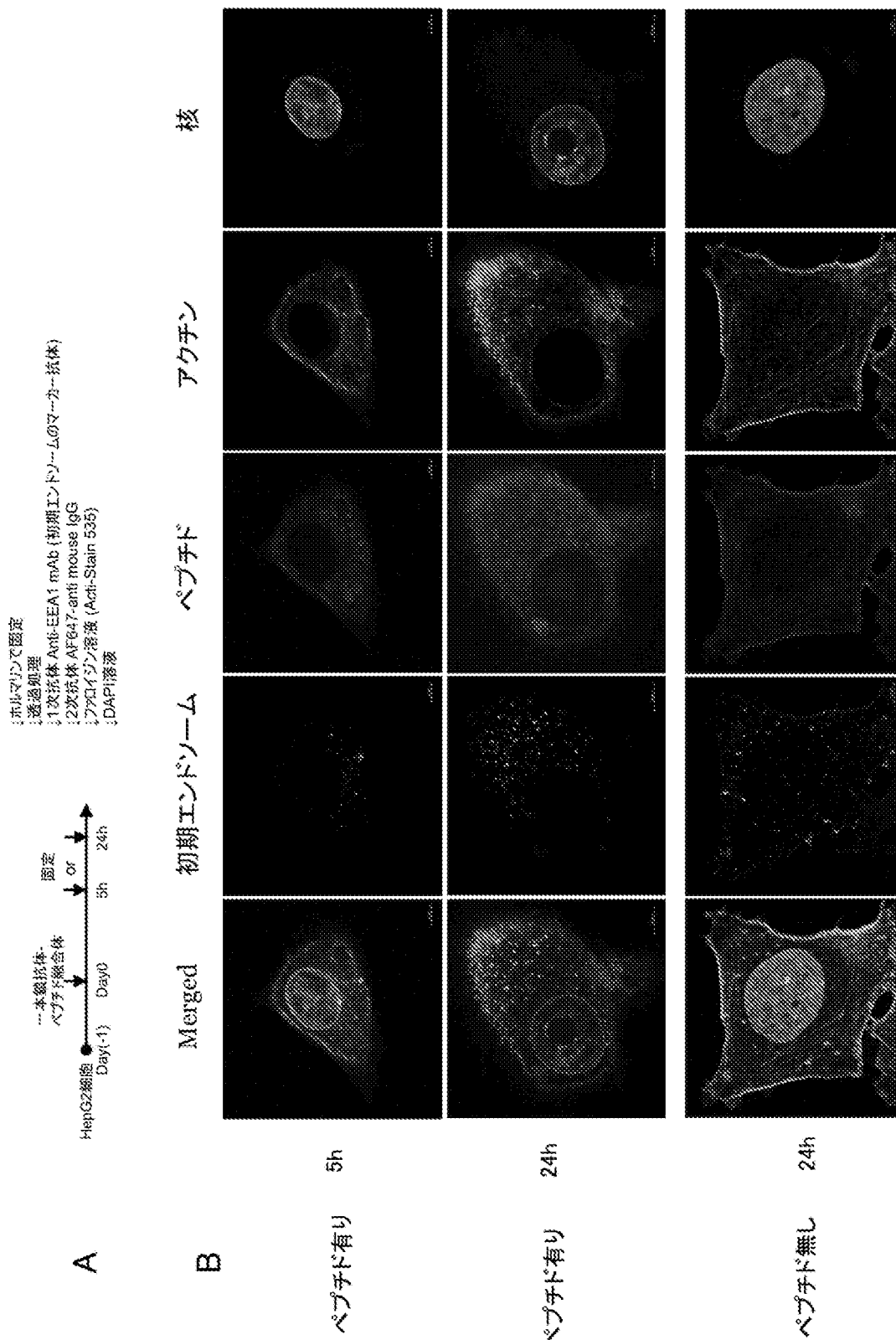
[図22]



[図23]



[図24]

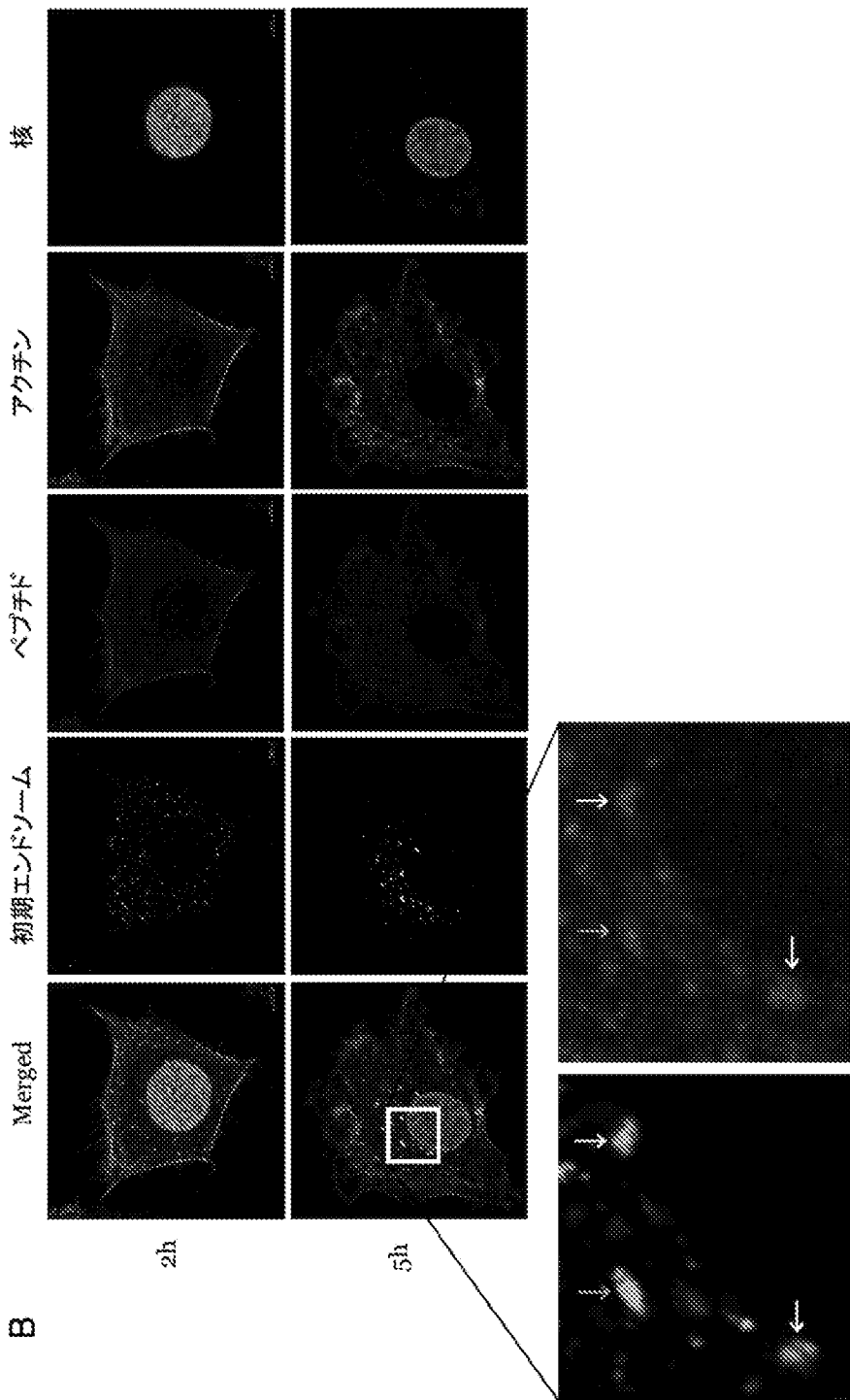


[図25A]

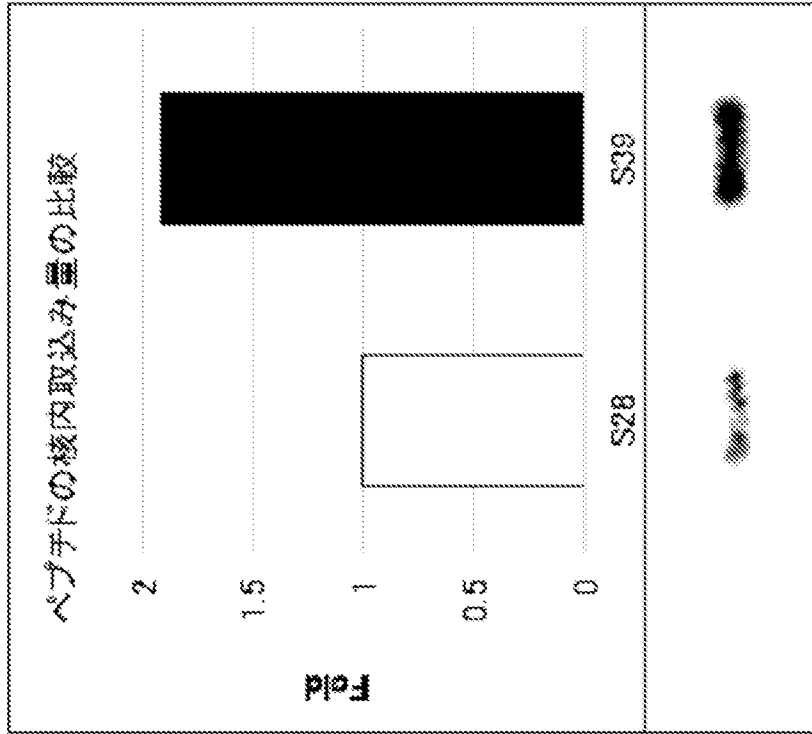
●: 本抗原抗体
 ○: ペプチド融合体
 Day(-1) HepG2細胞
 Day0
 2h
 5h
 固定
 OR
 免疫
 免疫検出
 1次抗体 Anti-EEA1 mAb (初期エンドソームのマーカー抗体)
 2次抗体 AF647-anti mouse IgG
 3. DAPI染色

A

B



[図25B]

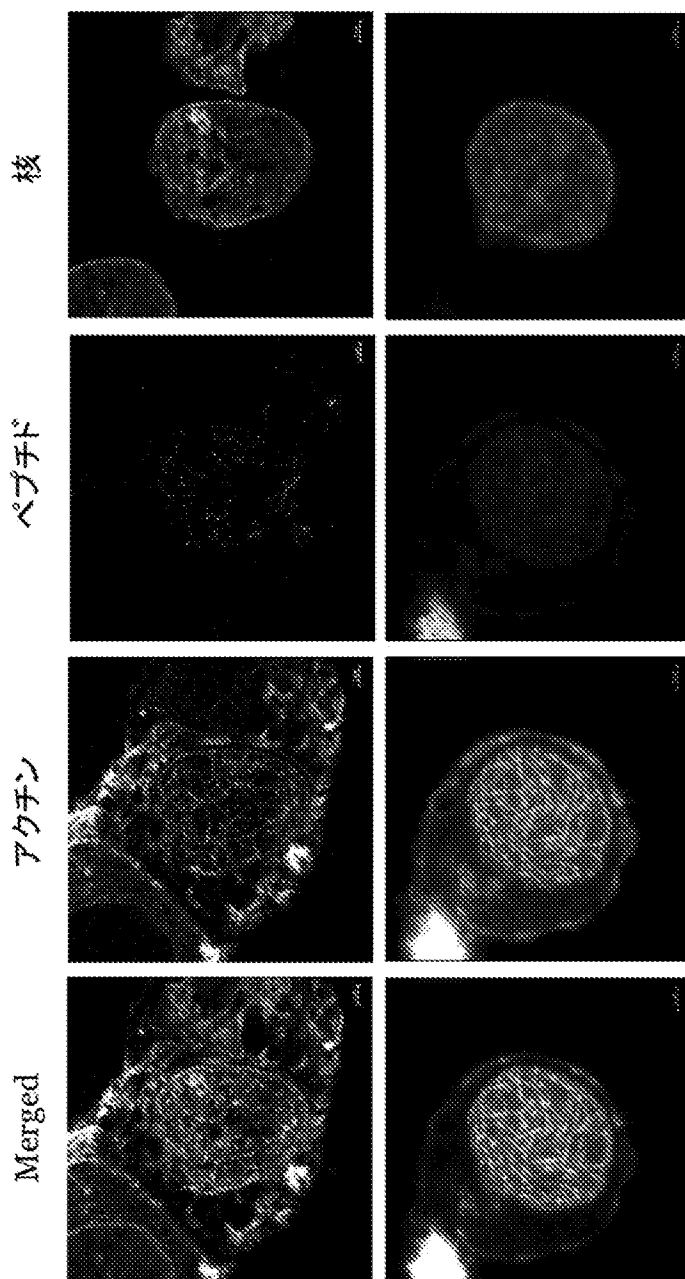


[図26]



A

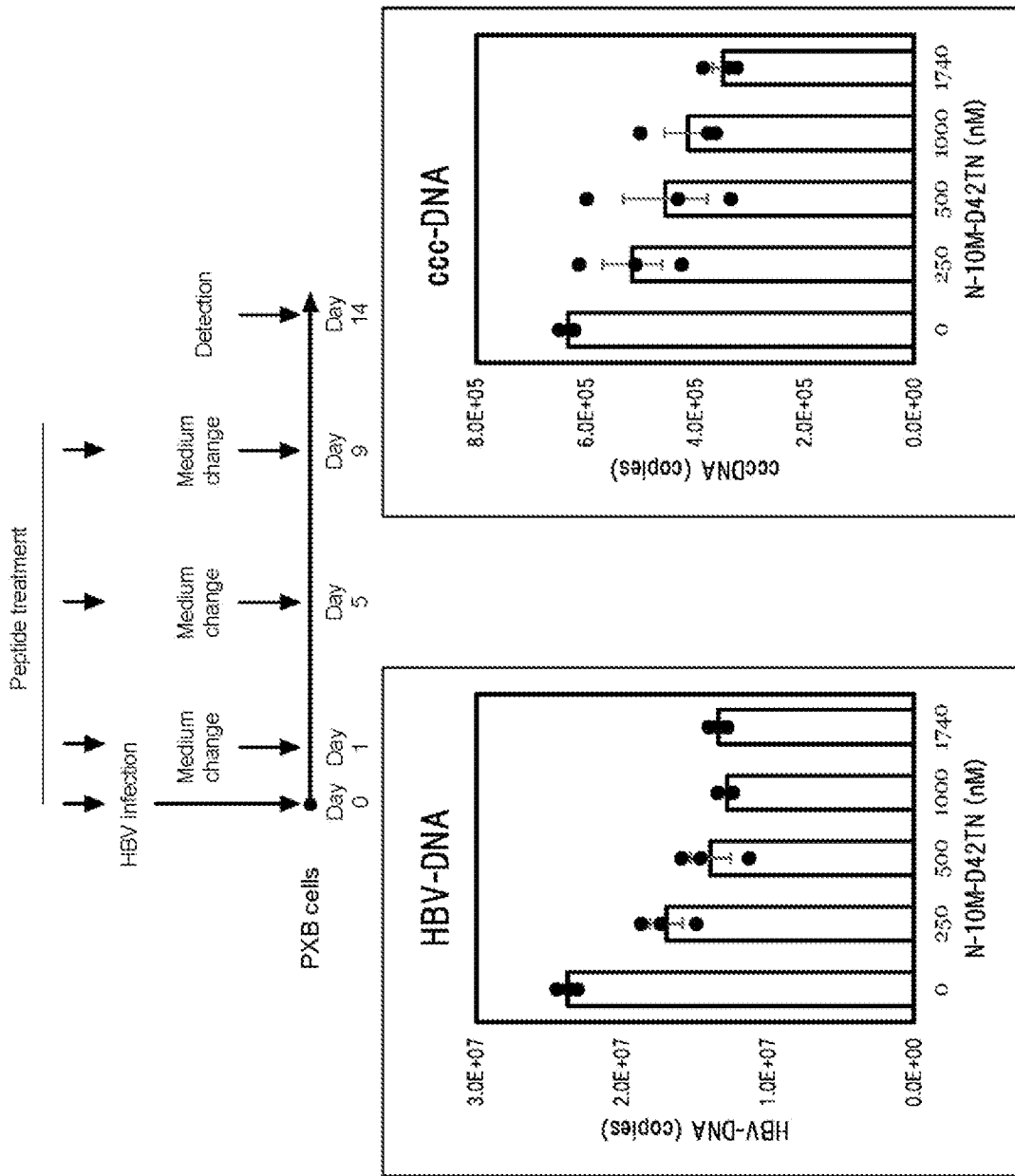
B



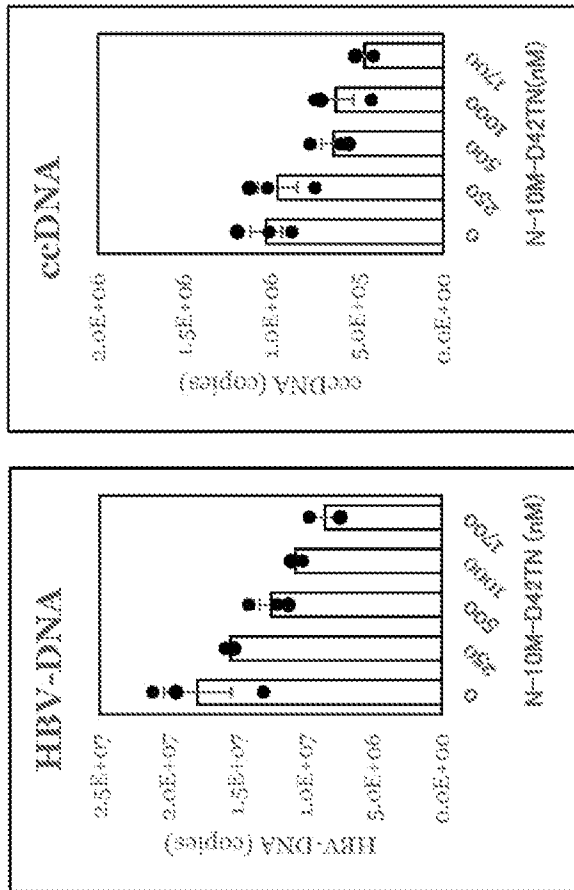
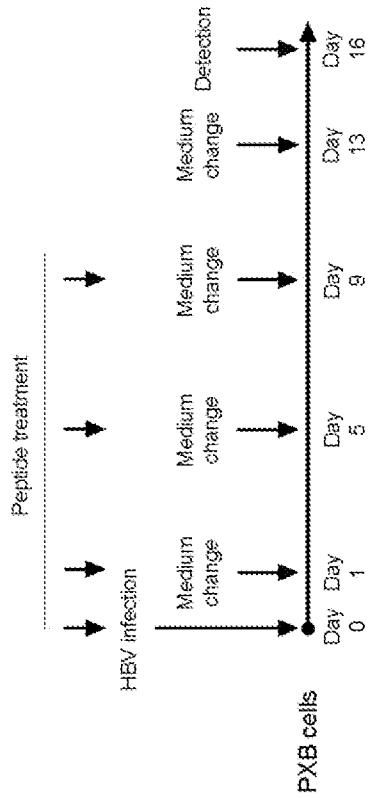
核移行シ
グナル有り

コント
ロール

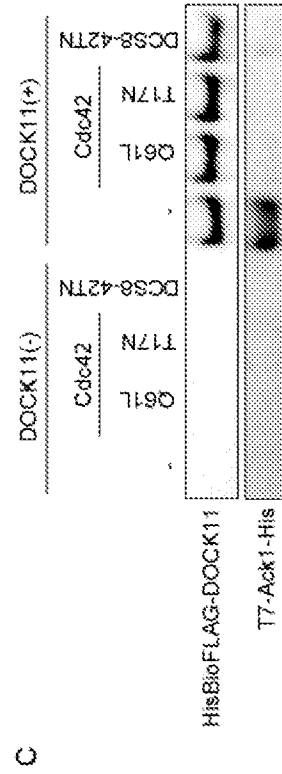
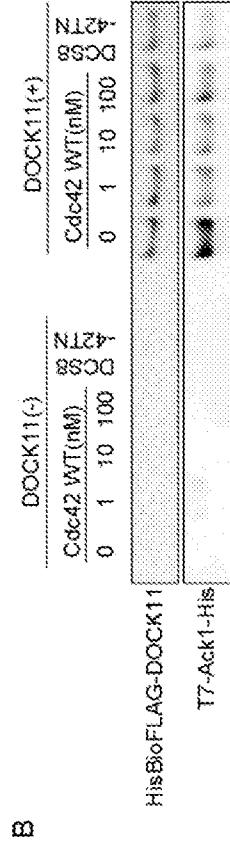
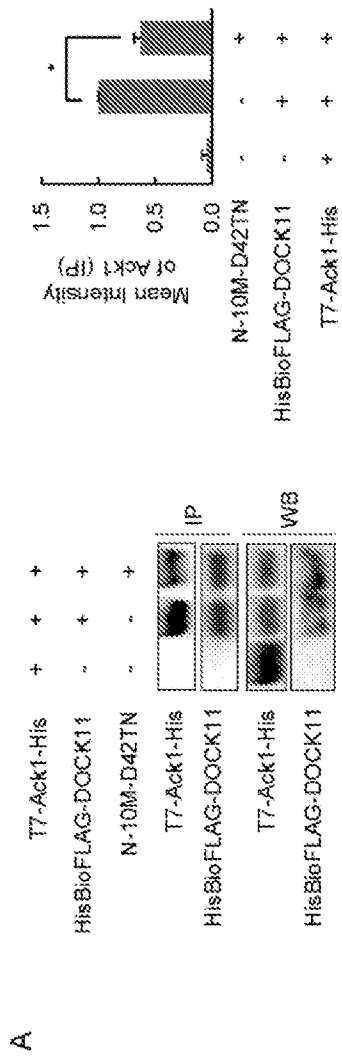
[27A]



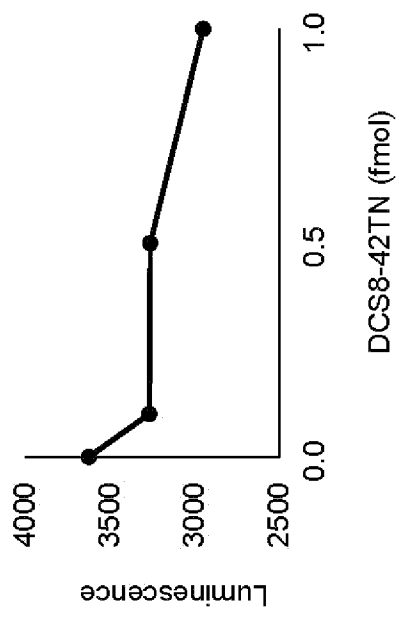
[27B]



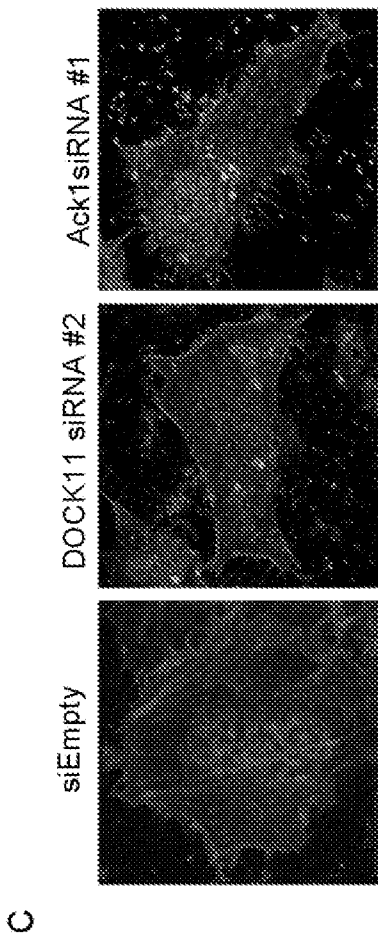
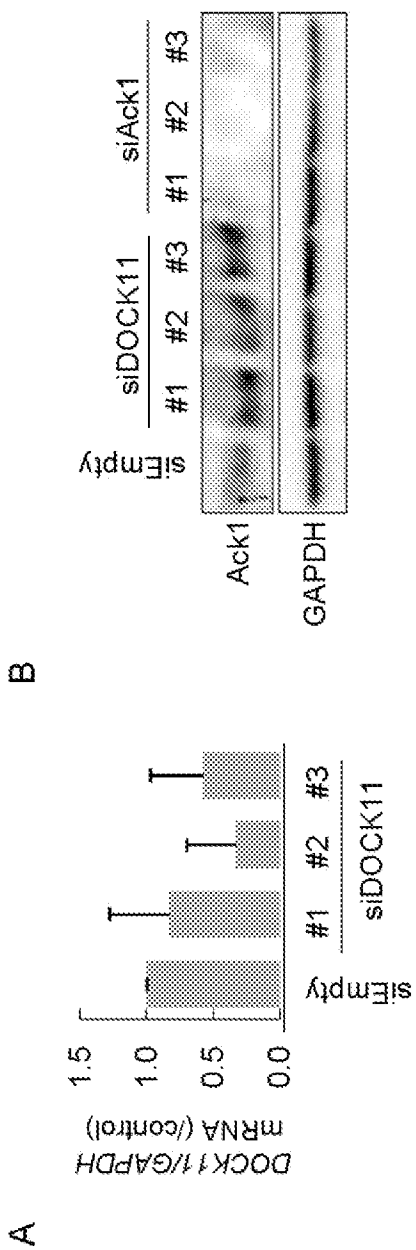
[28]



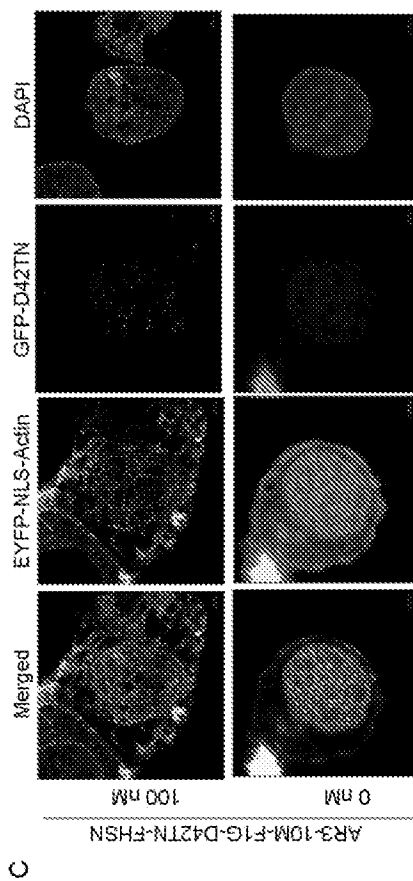
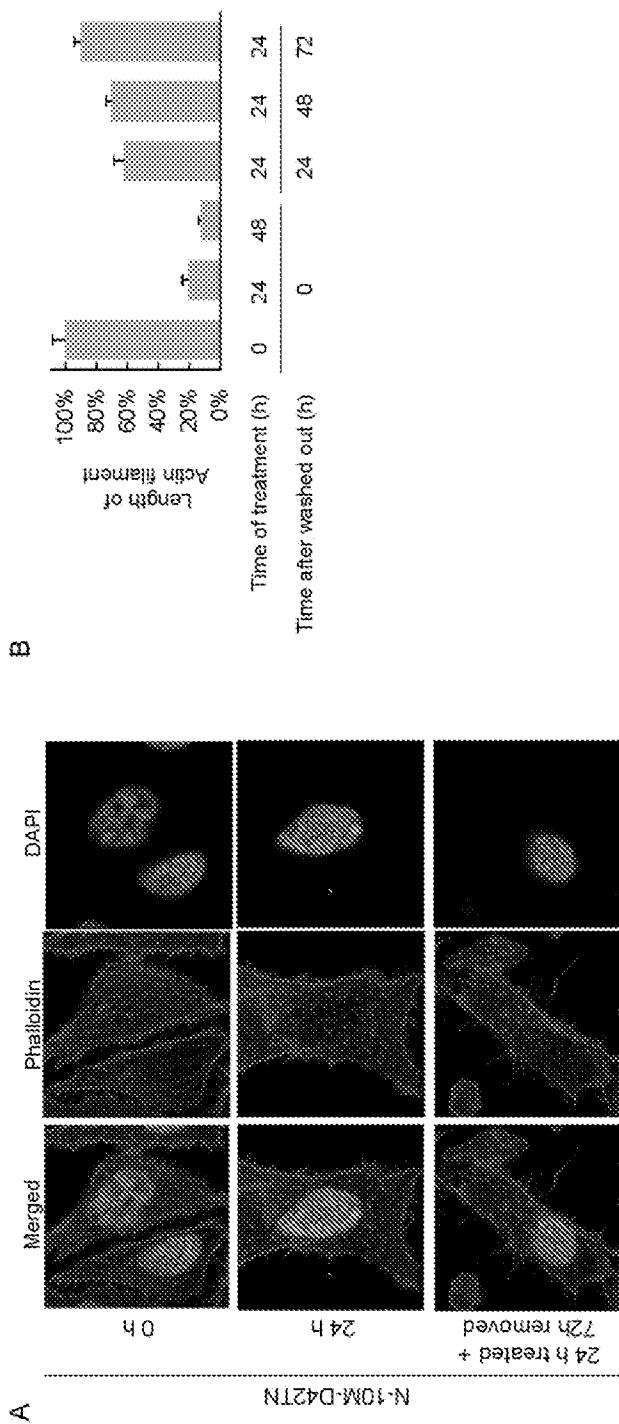
[図29]



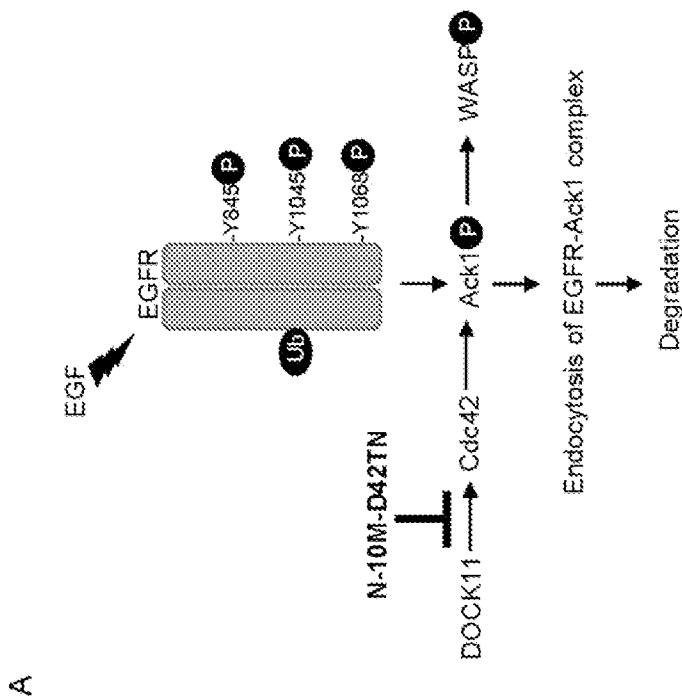
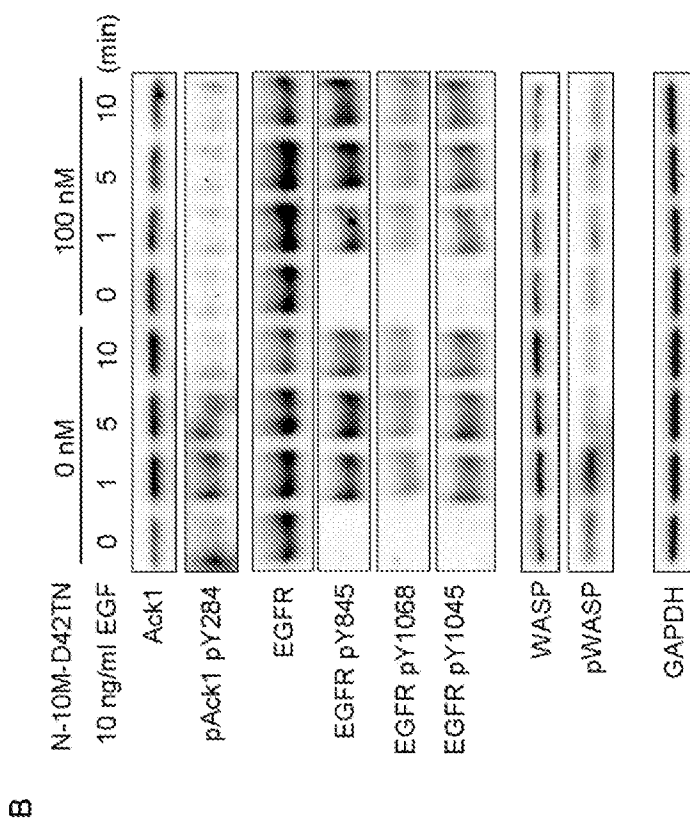
[30]



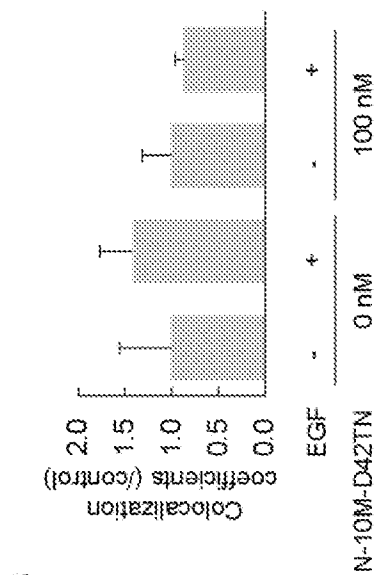
[31]



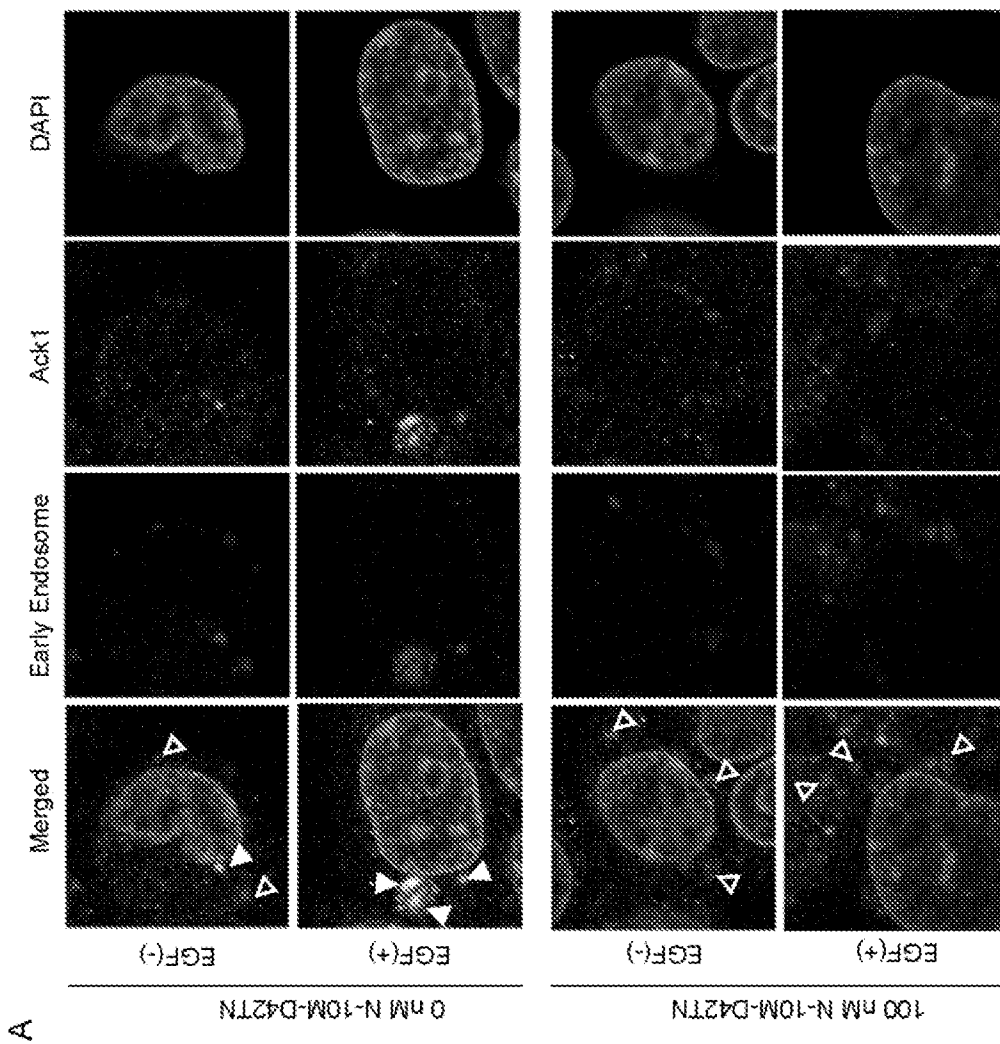
[32]



[33]

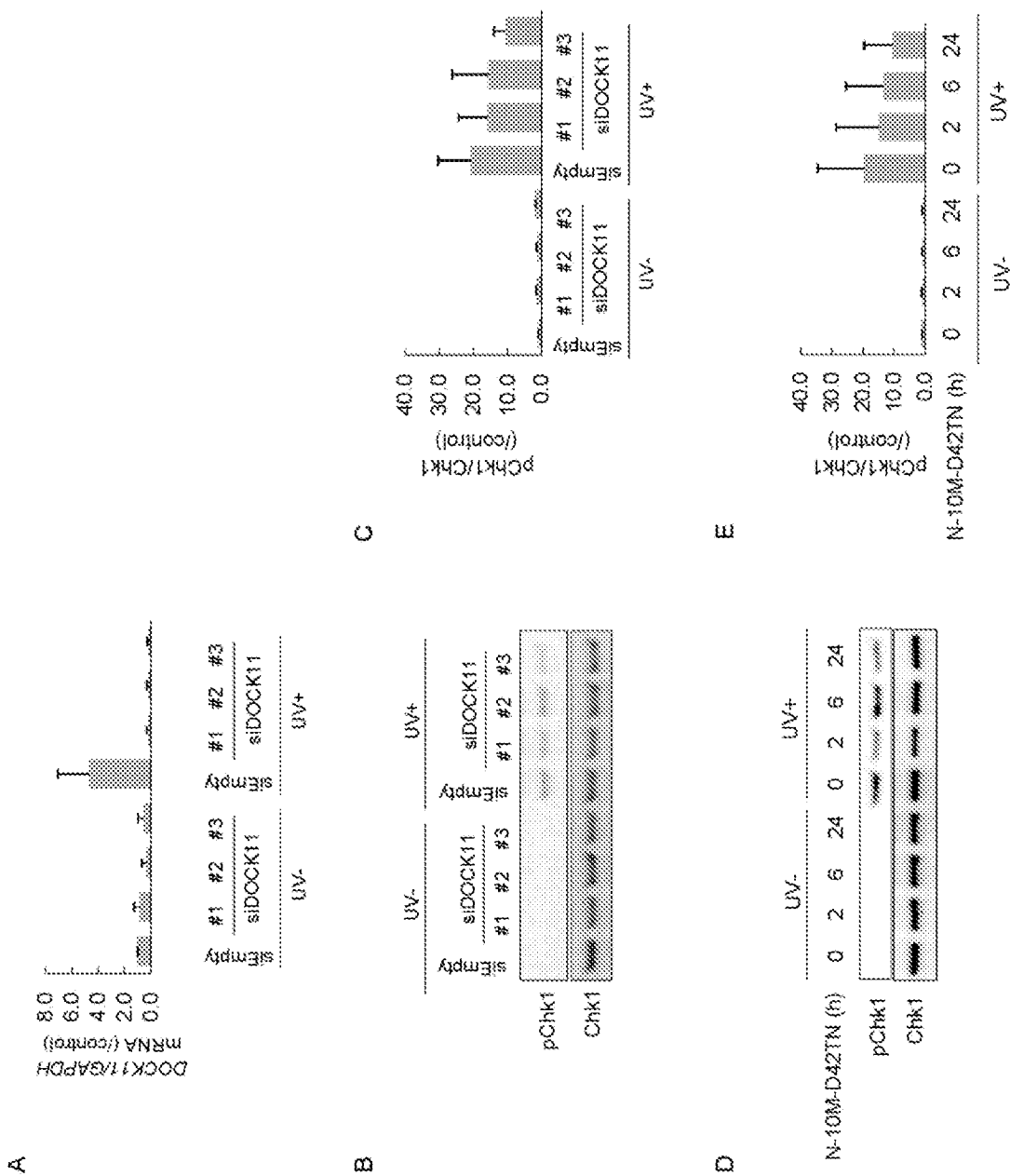


B

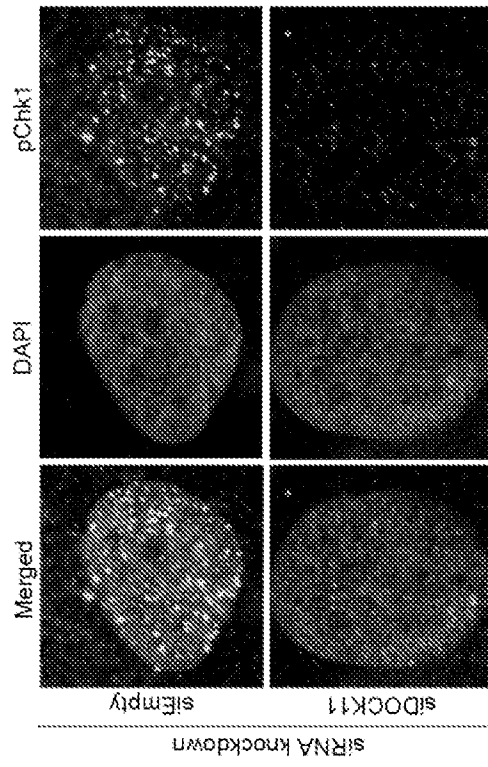


A

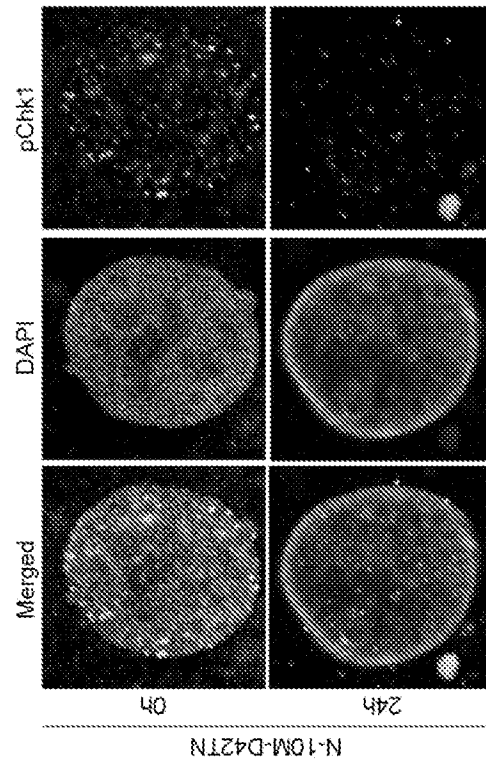
[34]



[35]

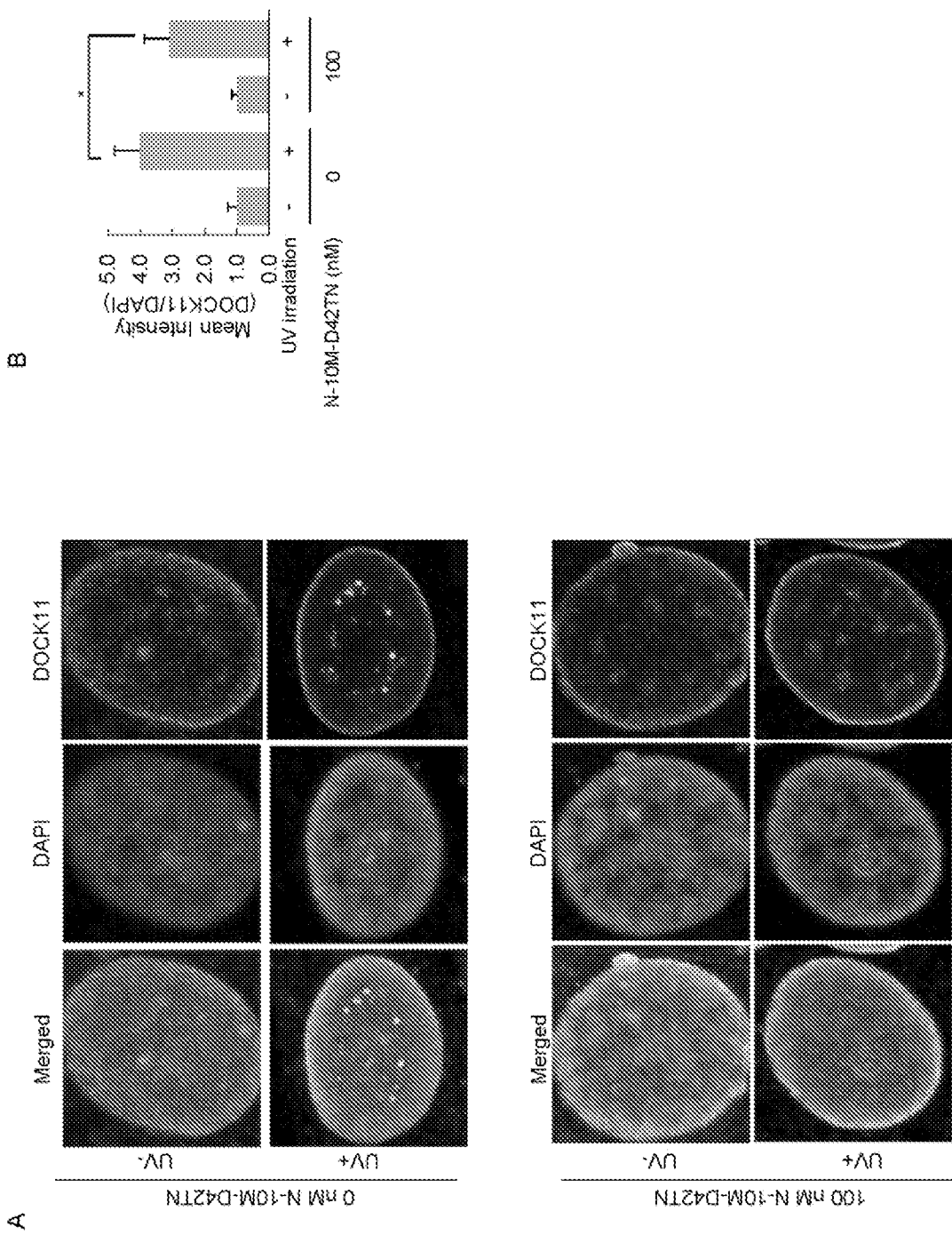


A

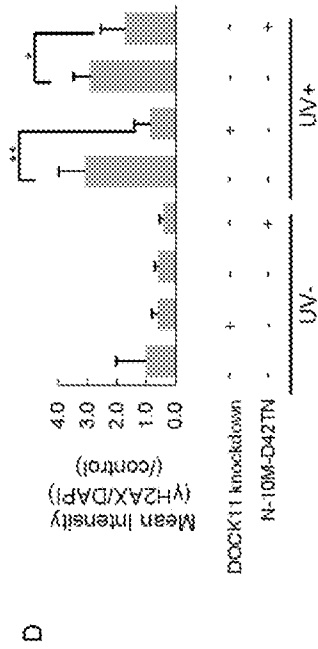
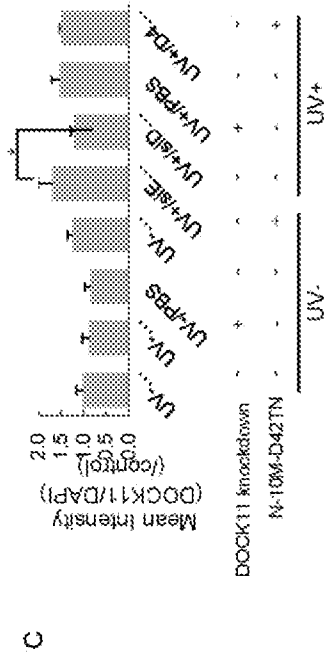
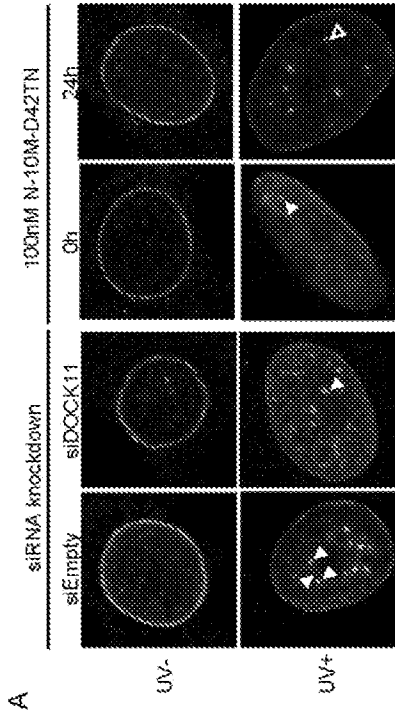
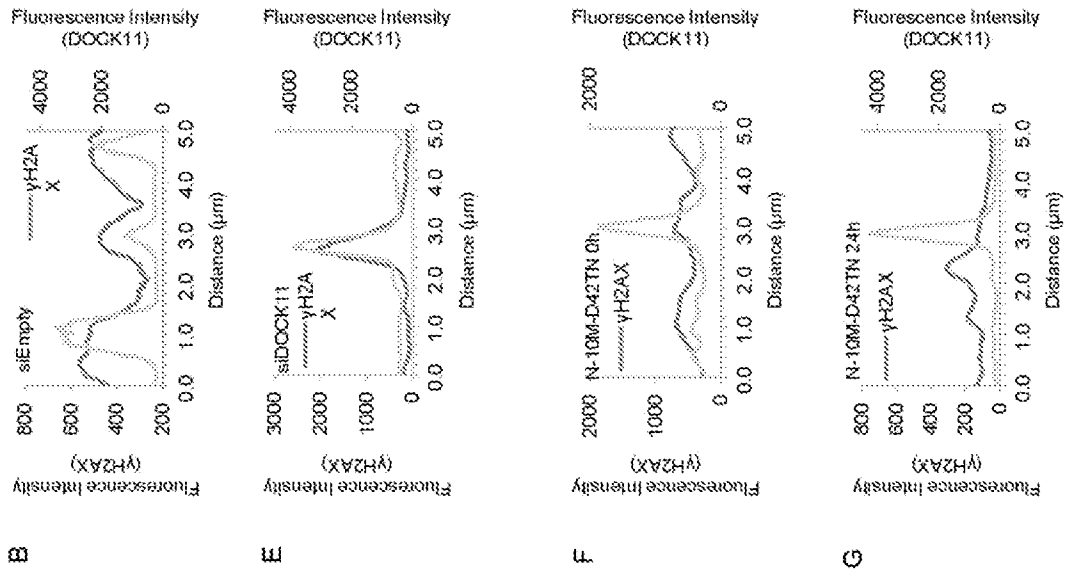


B

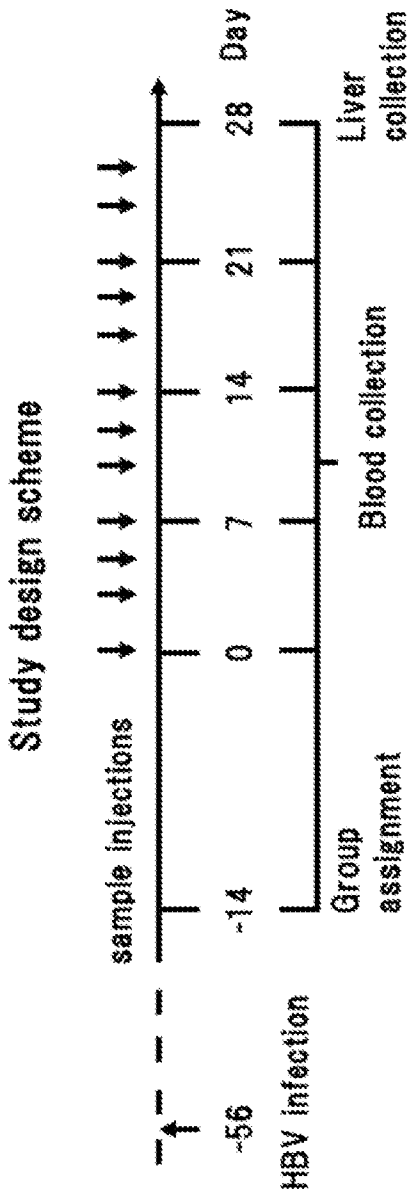
[36]



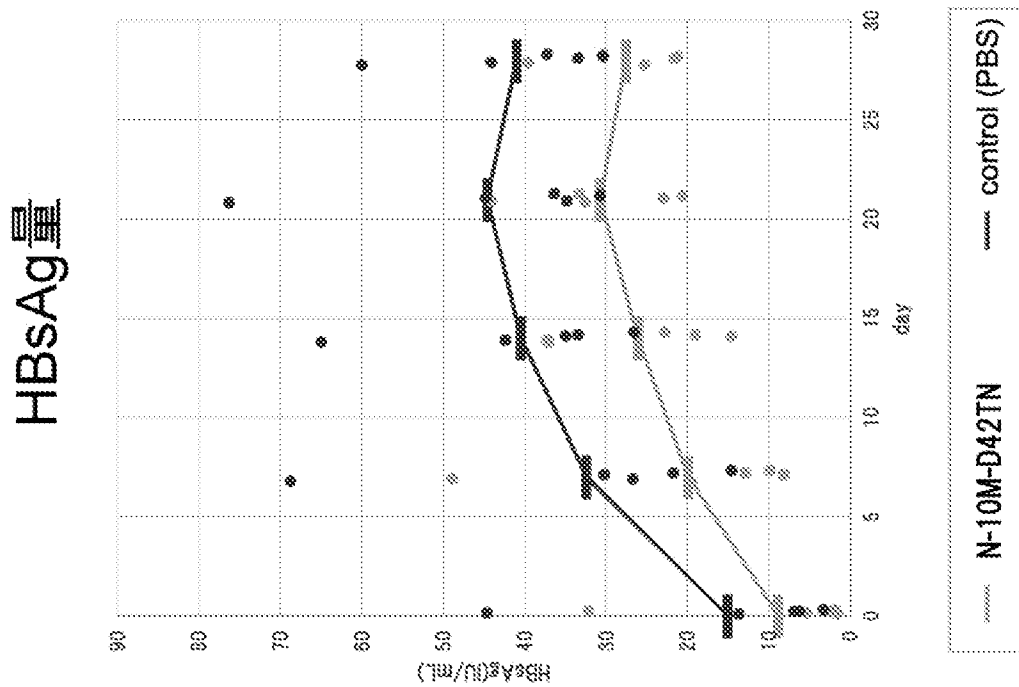
[37]



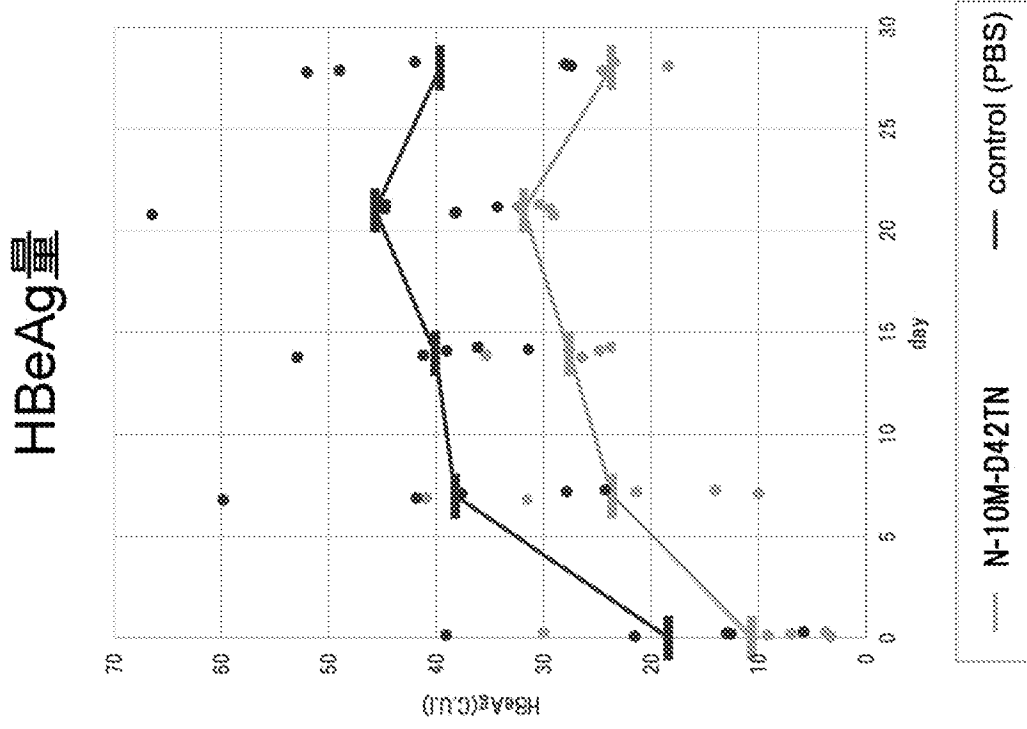
[図38]



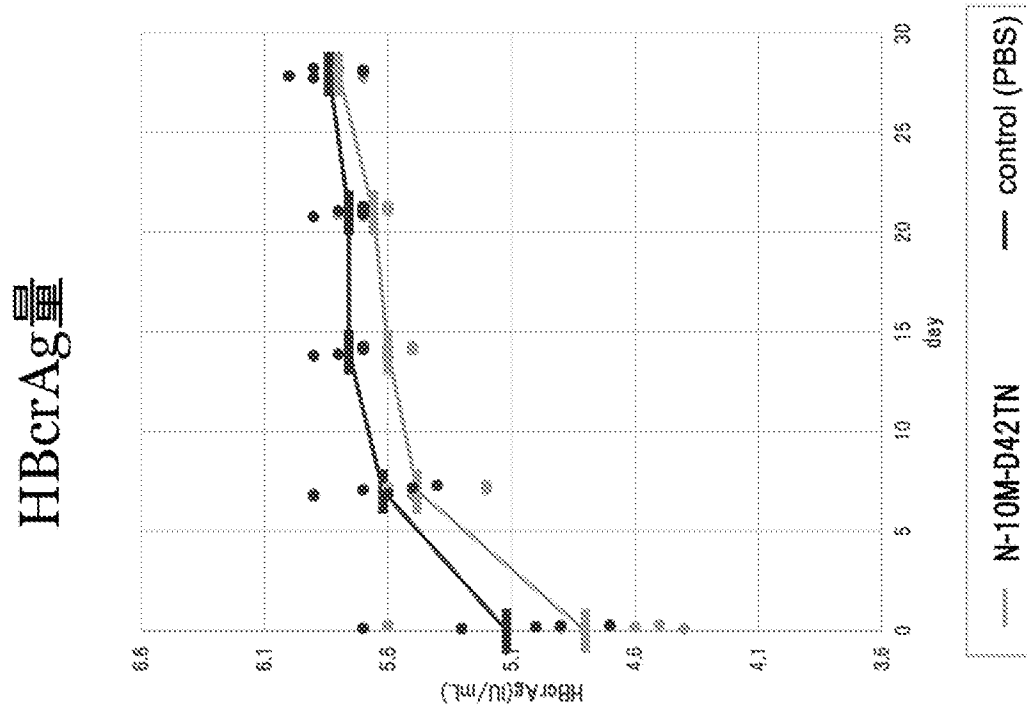
[図39]



[図40]

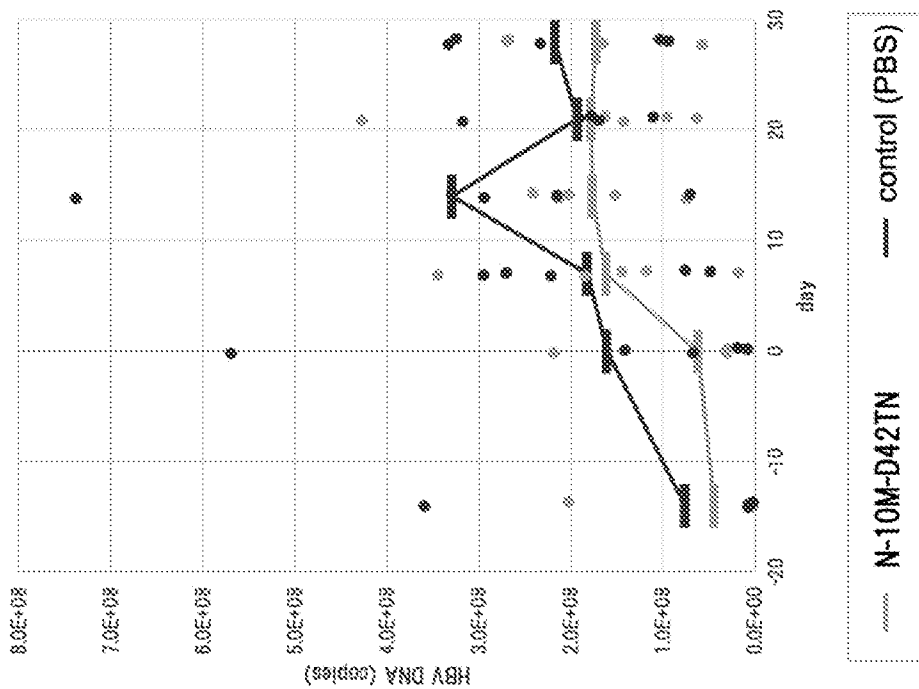


[図41]



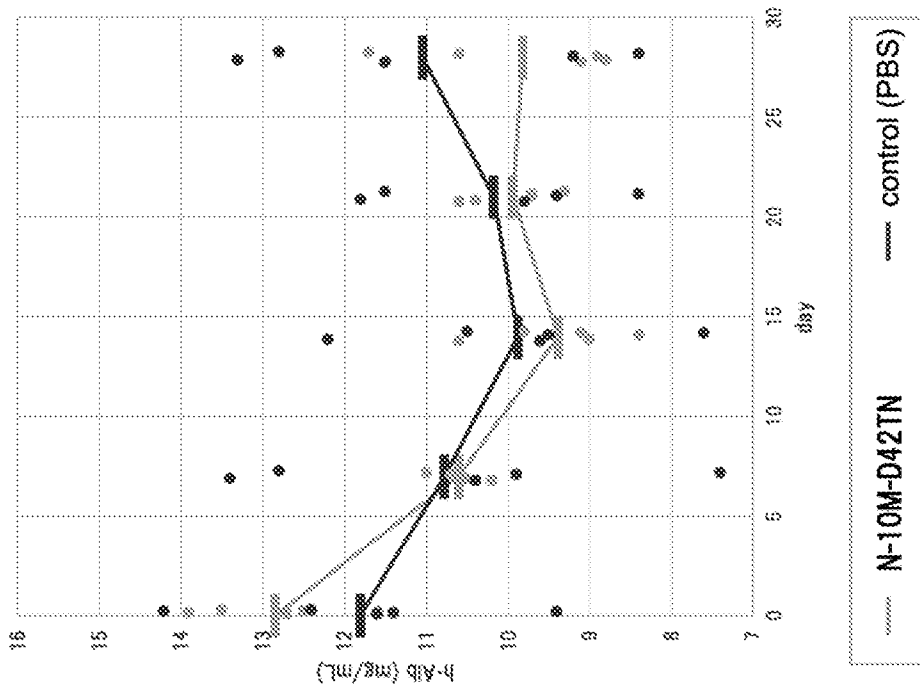
[図42]

血中HBV DNA量

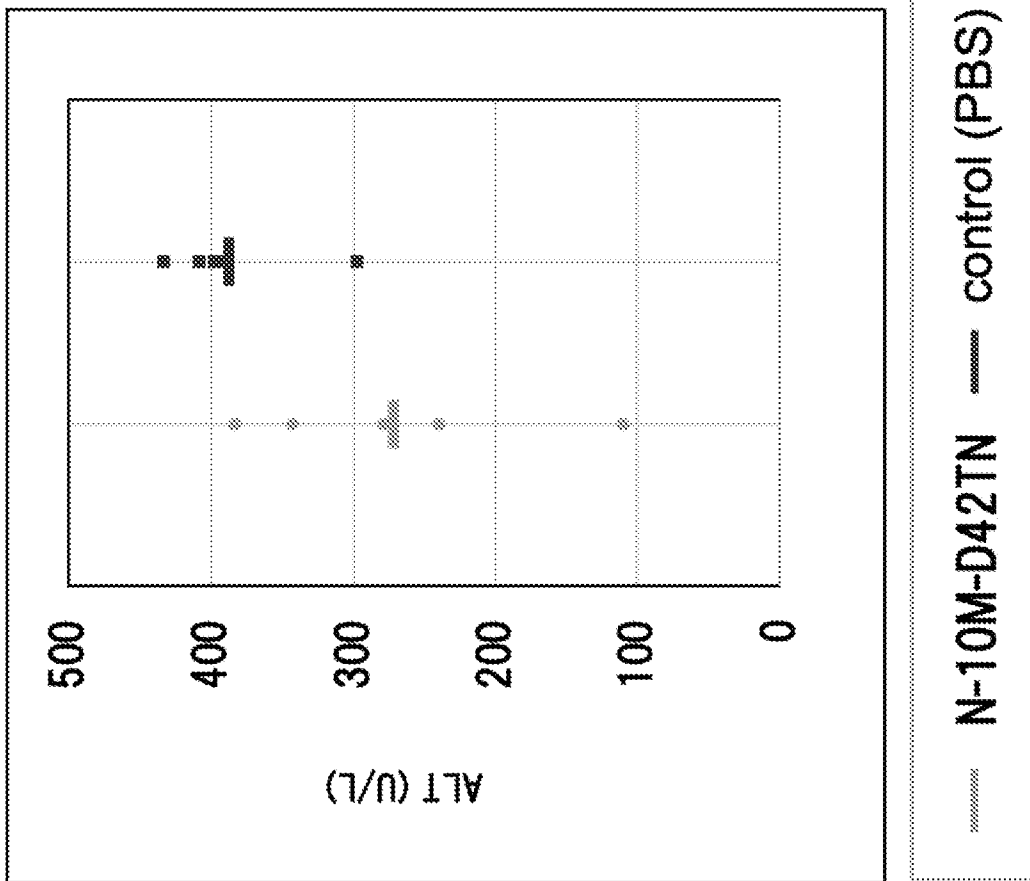


[図43]

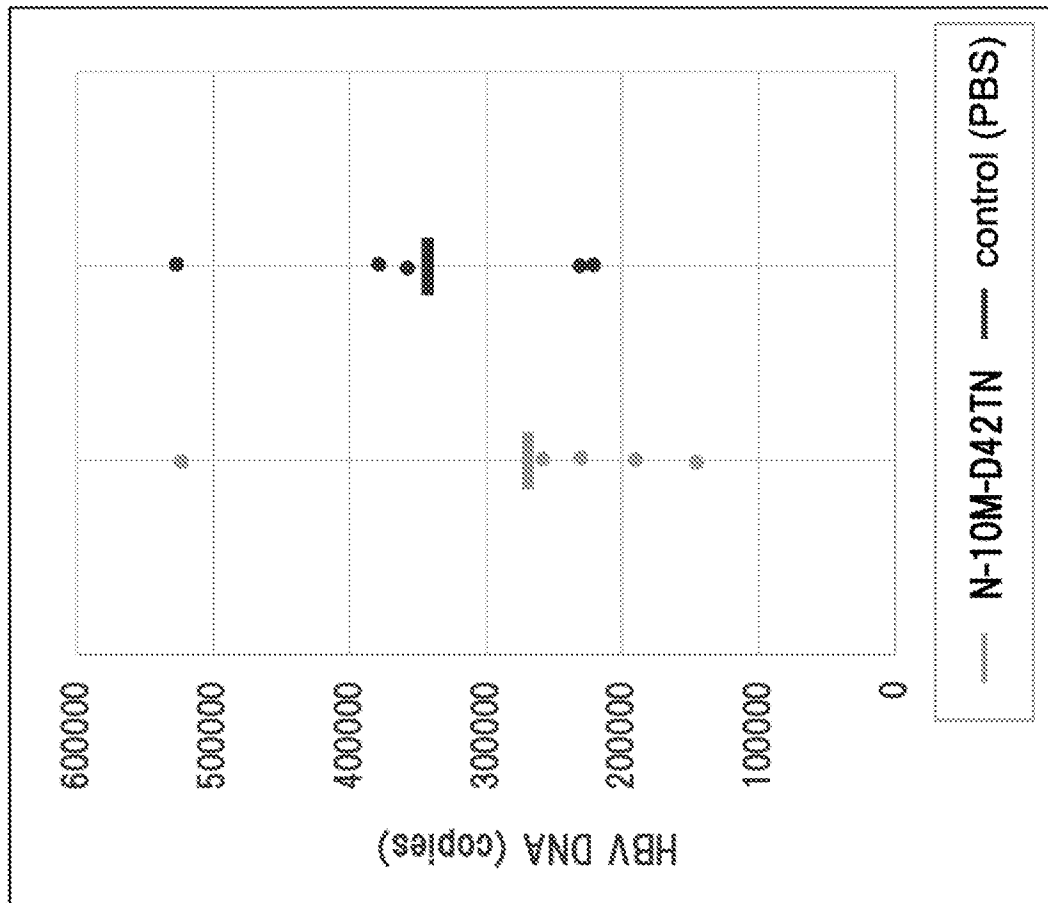
h-Alb



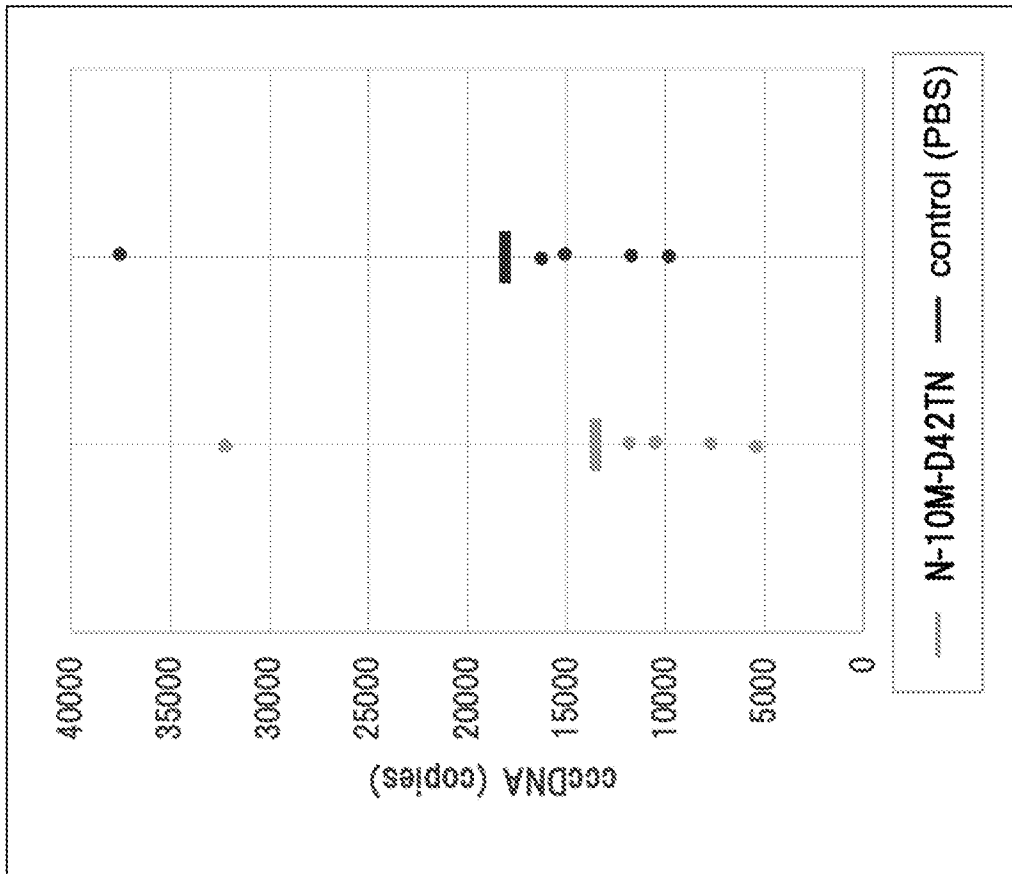
[図44]



[図45]



[図46]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/042642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 45/00(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i</p> <p>FI: A61K45/00 ZNA; A61K38/10; A61K47/68; A61P1/16; A61P31/20; A61P43/00 111; C07K7/08; C07K16/28; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K45/00; A61K38/10; A61K47/68; A61P1/16; A61P31/20; A61P43/00; C07K7/08; C07K16/28; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2023</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2023</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2020-0101075 A (KOREA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) 27 August 2020 (2020-08-27) particularly, claims, paragraph [0024]	1-4
X	WO 2017/082202 A1 (IDAC THERANOSTICS, INC.) 18 May 2017 (2017-05-18) claims, paragraphs [0024], [0050]-[0054], examples	1
P, X	IDE, Mayuko et al. Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits hepatitis B virus infection and replication. J. Biol. Chem. 02 June 2022, vol. 298, no. 7, 102097, pp. 1-17 particularly, abstract	1-4
<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>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 January 2023		14 February 2023
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
<p>Japan Patent Office (ISA/JP)</p> <p>3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915</p> <p>Japan</p>		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:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26".

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:

(Invention 1) Parts of claims 1-4 pertaining to (10), (13) and (16)

Document 1 (KR 10-2020-0101075 A) discloses a "pharmaceutical composition for prophylaxis or therapy of hepatitis B, comprising, as an active component, a deletion variant (corresponding to "(13) a partial polypeptide of Ack1 containing the region of PEQARPPPPLEDNLFL (SEQ ID NO: 10)" in claim 4 of the present application) of ACK1 protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1" (particularly, see the claims and paragraph [0024]). The inventions in claims 1-3 lack novelty in light of document 1, and thus do not have a special technical feature. However, the part of claim 4 which is dependent on claim 3 pertaining to "(10) a polypeptide of the sequence PEQARPPPPLEDNLFL (SEQ ID NO: 10)" has the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (10) a polypeptide of the sequence PEQARPPPPLEDNLFL (SEQ ID NO: 10)".

Therefore, the parts of claims 1-4 pertaining to the "(10) polypeptide of the sequence PEQARPPPPLEDNLFL (SEQ ID NO: 10)" are classified as invention 1.

The parts of claim 4 pertaining to "(13) a partial polypeptide of Ack1 containing the region of PEQARPPPPLEDNLFL (SEQ ID NO: 10)" and "(16) a polypeptide having a sequence identity of 80% or more and less than 100% to either (10) or (13)" also pertain to SEQ ID NO: 10 and are inventively linked, and thus are classified as invention 1.

It should be noted that the "(10) polypeptide of the sequence PEQARPPPPLEDNLFL (SEQ ID NO: 10)" is used most frequently in the examples of the present application, and is the only peptide of which pharmaceutical efficacy is demonstrated in vivo, and thus is recognized as the main invention.

(Invention 2) Parts of claims 1-4 pertaining to (1) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(1) a polypeptide of the sequence IITPGTEVLNSDLQAS (SEQ ID NO: 1)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (1)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NO: 10 in claim 4 classified as invention 1.

The parts of claim 4 pertaining to (1) and (16) are not dependent on the part of claim 4 pertaining to SEQ ID NO: 10 classified as invention 1.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (1) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1. Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (1) and (16) cannot be classified as invention 1.

The parts of claims 1-4 pertaining to (1) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (1) a polypeptide of the sequence IITPGTEVLNSDLQAS (SEQ ID NO: 1)", and thus are classified as invention 2.

(Invention 3) Parts of claims 1-4 pertaining to (2) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(2) a polypeptide of the sequence HNVLSVYNPAWGKYFH (SEQ ID NO: 2)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (2)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1 and 10 in claim 4 classified as inventions 1 and 2.

The parts of claim 4 pertaining to (2) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1 and 10 classified as inventions 1 and 2.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (2) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (2) and (16) cannot be classified as invention 1 or 2.

The parts of claims 1-4 pertaining to (2) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (2) a polypeptide of the sequence HNVLSVYNPAWGKYFH (SEQ ID NO: 2)", and thus are classified as invention 3.

(Invention 4) Parts of claims 1-4 pertaining to (3) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(3) a polypeptide of the sequence NFPPNPMHNTDSCICA (SEQ ID NO: 3)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (3)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1, 2 and 10 in claim 4 classified as inventions 1-3.

The parts of claim 4 pertaining to (3) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1, 2 and 10 classified as inventions 1-3.

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

Further, the parts of claim 4 pertaining to (3) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-3.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (3) and (16) cannot be classified as inventions 1-3.

The parts of claims 1-4 pertaining to (3) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (3) a polypeptide of the sequence NFPPNPMHNTDSCICA (SEQ ID NO: 3)", and thus are classified as invention 4.

(Invention 5) Parts of claims 1-4 pertaining to (4) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(4) a polypeptide of the sequence TEKRRLMKPVLLTYNP (SEQ ID NO: 4)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (4)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-3 and 10 in claim 4 classified as inventions 1-4.

The parts of claim 4 pertaining to (4) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-3 and 10 classified as inventions 1-4.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (4) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-4.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (4) and (16) cannot be classified as inventions 1-4.

The parts of claims 1-4 pertaining to (4) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (4) a polypeptide of the sequence TEKRRLMKPVLLTYNP (SEQ ID NO: 4)", and thus are classified as invention 5.

(Invention 6) Parts of claims 1-4 pertaining to (5) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(5) a polypeptide of the sequence IICPGAEVINGDLVAS (SEQ ID NO: 5)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (5)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-4 and 10 in claim 4 classified as inventions 1-5.

The parts of claim 4 pertaining to (5) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-4 and 10 classified as inventions 1-5.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (5) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-5.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (5) and (16) cannot be classified as inventions 1-5.

The parts of claims 1-4 pertaining to (5) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (5) a polypeptide of the sequence IICPGAEVINGDLVAS (SEQ ID NO: 5)", and thus are classified as invention 6.

(Invention 7) Parts of claims 1-4 pertaining to (6) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(6) a polypeptide of the sequence TEYRRCVTPVLLTYNN (SEQ ID NO: 6)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (6)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-5 and 10 in claim 4 classified as inventions 1-6.

The parts of claim 4 pertaining to (6) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-5 and 10 classified as inventions 1-6.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (6) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-6.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (6) and (16) cannot be classified as inventions 1-6.

The parts of claims 1-4 pertaining to (6) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (6) a polypeptide of the sequence TEYRRCVTPVLLTYNN (SEQ ID NO: 6)", and thus are classified as invention 7.

(Invention 8) Parts of claims 1-4 pertaining to (7) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(7) a polypeptide of the sequence TEEHRGLLPVLMYTNV (SEQ ID NO: 7)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (7)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-6 and 10 in claim 4 classified as inventions 1-7.

The parts of claim 4 pertaining to (7) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-6 and 10 classified as inventions 1-7.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (7) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-7.

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

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (7) and (16) cannot be classified as inventions 1-7.

The parts of claims 1-4 pertaining to (7) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (7) a polypeptide of the sequence TEEHRGLLPVLMYTNV (SEQ ID NO: 7)", and thus are classified as invention 8.

(Invention 9) Parts of claims 1-4 pertaining to (8) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(8) a polypeptide of the sequence TEFCRWTWPVLCTYNA (SEQ ID NO: 8)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (8)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-7 and 10 in claim 4 classified as inventions 1-8.

The parts of claim 4 pertaining to (8) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-7 and 10 classified as inventions 1-8.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (8) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-8.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (8) and (16) cannot be classified as inventions 1-8.

The parts of claims 1-4 pertaining to (8) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (8) a polypeptide of the sequence TEFCRWTWPVLCTYNA (SEQ ID NO: 8)", and thus are classified as invention 9.

(Invention 10) Parts of claims 1-4 pertaining to (9) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(9) a polypeptide of the sequence TEQARPTPPPVLDTYNL (SEQ ID NO: 9)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (9)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-8 and 10 in claim 4 classified as inventions 1-9.

The parts of claim 4 pertaining to (9) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-8 and 10 classified as inventions 1-9.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (9) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-9.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (9) and (16) cannot be classified as inventions 1-9.

The parts of claims 1-4 pertaining to (9) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (9) a polypeptide of the sequence TEQARPTPPPVLDTYNL (SEQ ID NO: 9)", and thus are classified as invention 10.

(Invention 11) Parts of claims 1-4 pertaining to (11), (14) and (16) The parts of claim 4 pertaining to "(11) a polypeptide of the sequence HEEHRGMLREDSMMEYLK (SEQ ID NO: 11)", "(14) a partial polypeptide of radixin containing the region of HEEHRGMLREDSMMEYLK (SEQ ID NO: 11)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (11) or (14)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-10 in claim 4 classified as inventions 1-10.

The parts of claim 4 pertaining to (11), (14) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-10 classified as inventions 1-10.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (11), (14) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-10.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (11), (14) and (16) cannot be classified as inventions 1-10.

The parts of claims 1-4 pertaining to (11), (14) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (11) a polypeptide of the sequence HEEHRGMLREDSMMEYLK (SEQ ID NO: 11)", and thus are classified as invention 11.

(Invention 12) Parts of claims 1-4 pertaining to (12), (15) and (16)

The parts of claim 4 pertaining to "(12) a polypeptide of the sequence AEEHRGLLTIRYPMEH (SEQ ID NO: 12)", "(15) a partial polypeptide of β -contractin containing the region of AEEHRGLLTIRYPMEH (SEQ ID NO: 12)" and "(16) a polypeptide having a sequence identify of 80% or more and less than 100% to (12) or (15)" cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-11 in claim 4 classified as inventions 1-11.

The parts of claim 4 pertaining to (12), (15) and (16) are not dependent on the parts of claim 4 pertaining to SEQ ID NOs: 1-11 classified as inventions 1-11.

Further, the parts of claim 4 pertaining to (12), (15) and (16) are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-11.

Accordingly, the parts of claims 1-4 pertaining to (12), (15) and (16) cannot be classified as inventions 1-11.

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

The parts of claims 1-4 pertaining to (12), (15) and (16) have the special technical feature of an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, (12) a polypeptide of the sequence AEEHRGLLTIRYPMEH (SEQ ID NO: 12)", and thus are classified as invention 12.

(Invention 13) Claims 5-8 and 14-16

Claims 5-8 and 14-16 pertain to an "antibody capable of binding to an asialoglycoprotein receptor" specified by amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 13-36 in an "embodiment of being linked to a carrier molecule for delivery to hepatocytes", and cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-12 in claim 4 classified as inventions 1-12.

While claims 5-8 are dependent on claim 1 classified as invention 1, the technical feature added to claim 1, namely configuring an "antibody capable of binding to an asialoglycoprotein receptor" to be in an "embodiment of being linked to a carrier molecule for delivery to hepatocytes" has less technical relationship with the technical feature of claim 1, namely an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, a substance capable of binding to DOCK11 and inhibiting DOCK 11 function". Because of this, it is not considered that claims 5-8 are inventively linked to claim 1. In addition, claims 14-16 are not dependent on any of claims 1-4.

Further, claims 5-8 and 14-16 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-12.

Accordingly, claims 5-8 and 14-16 cannot be classified as inventions 1-12.

Claims 5-8 and 14-16 have the special technical feature of an "antibody capable of binding to an asialoglycoprotein receptor" specified by amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 13-36 in an "embodiment of being linked to a carrier molecule for delivery to hepatocytes", and thus are classified as invention 13.

(Invention 14) Claims 9 and 10

Claims 9 and 10 pertain to an embodiment of being linked to a cell membrane permeability promoting molecule specified by an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 38 or 39, and cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-12 in claim 4 classified as inventions 1-12 or the "embodiment of being linked to a carrier molecule for delivery to hepatocytes" in claims 5-8 and 14-16 classified as invention 13.

While claims 9 and 10 are dependent on claim 1 classified as invention 1, the technical feature added to claim 1, namely configuring an "embodiment of being linked to a cell membrane permeability promoting molecule" has less technical relationship with the technical feature of claim 1, namely an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, a substance capable of binding to DOCK11 and inhibiting DOCK 11 function". Because of this, it is not considered that claims 9 and 10 are inventively linked to claim 1.

Further, claims 9 and 10 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-13.

Accordingly, claims 9 and 10 cannot be classified as inventions 1-13.

Claims 9 and 10 have the special technical feature of an "embodiment of being linked to a cell membrane permeability promoting molecule", and thus are classified as invention 14.

(Invention 15) Claim 11

Claim 11 pertains to an "embodiment of being linked to a nuclear localization signal", and cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with SEQ ID NOs: 1-12 in claim 4 classified as inventions 1-12, the "embodiment of being linked to a carrier molecule for delivery to hepatocytes" in claims 5-8 and 14-16 classified as invention 13, or the "embodiment of being linked to a cell membrane permeability promoting molecule" in claims 9 and 10 classified as invention 14.

While claim 11 is dependent on claim 1 classified as invention 1, the technical feature added to claim 1, namely configuring an "embodiment of being linked to a nuclear localization signal" has less technical relationship with the technical feature of claim 1, namely an "anti-hepatitis B virus agent, comprising, as an active component, a substance capable of binding to DOCK11 and inhibiting DOCK 11 function". Because of this, it is not considered that claim 11 is inventively linked to claim 1.

Further, claim 11 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-14.

Accordingly, claim 11 cannot be classified as inventions 1-14.

Claim 11 has the special technical feature of an "embodiment of being linked to a nuclear localization signal", and thus is classified as invention 15.

(Invention 16) Claims 12 and 13

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

Claims 12 and 13 are different from any of the claims classified as inventions 1-15 in terms of pertaining to "use as a DOCK11-binding peptide", and thus cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with any of the claims classified as inventions 1-15.

In addition, claims 12 and 13 are not dependent on any of claims 1-11.

Further, claims 12 and 13 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1-15.

Accordingly, claims 12 and 13 cannot be classified as any of inventions 1-15.

Claims 12 and 13 have the special technical feature of "use of at least one polypeptide selected from polypeptides (1)-(16) indicated below as a DOCK11-binding peptide", and thus are classified as invention 16.

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.: **Parts of claims 1-4 pertaining to (10), (13) and (16)**

- 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/042642

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2020-0101075 A	27 August 2020	(Family: none)	
WO 2017/082202 A1	18 May 2017	US 2019/0022126 A1 claims, paragraphs [0069], [0099]-[0104], examples EP 3395363 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/00(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i</p> <p>FI: A61K45/00 ZNA; A61K38/10; A61K47/68; A61P1/16; A61P31/20; A61P43/00 111; C07K7/08; C07K16/28; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62 Z</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））</p> <p>A61K45/00; A61K38/10; A61K47/68; A61P1/16; A61P31/20; A61P43/00; C07K7/08; C07K16/28; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62</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> <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）</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			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>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2020-0101075 A (KOREA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) 27.08.2020 (2020 - 08 - 27) 特に、特許請求の範囲及び段落0024</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2017/082202 A1 (IDACセラノステイクス株式会社) 18.05.2017 (2017 - 05 - 18) 特許請求の範囲、段落0024、0050-0054、実施例</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>IDE, Mayuko et al., Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits hepatitis B virus infection and replication, J. Biol. Chem., 2022.06.02, Vol. 298, No. 7, 102097, pp. 1-17 特に、Abstract</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			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	X	KR 10-2020-0101075 A (KOREA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) 27.08.2020 (2020 - 08 - 27) 特に、特許請求の範囲及び段落0024	1-4	X	WO 2017/082202 A1 (IDACセラノステイクス株式会社) 18.05.2017 (2017 - 05 - 18) 特許請求の範囲、段落0024、0050-0054、実施例	1	P, X	IDE, Mayuko et al., Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits hepatitis B virus infection and replication, J. Biol. Chem., 2022.06.02, Vol. 298, No. 7, 102097, pp. 1-17 特に、Abstract	1-4
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												
X	KR 10-2020-0101075 A (KOREA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) 27.08.2020 (2020 - 08 - 27) 特に、特許請求の範囲及び段落0024	1-4												
X	WO 2017/082202 A1 (IDACセラノステイクス株式会社) 18.05.2017 (2017 - 05 - 18) 特許請求の範囲、段落0024、0050-0054、実施例	1												
P, X	IDE, Mayuko et al., Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits hepatitis B virus infection and replication, J. Biol. Chem., 2022.06.02, Vol. 298, No. 7, 102097, pp. 1-17 特に、Abstract	1-4												
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><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>“&” 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>27.01.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>14.02.2023</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)</p> <p>〒100-8915</p> <p>日本国</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>菊池 美香 4U 3954</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>													

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。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明1）請求項1-4において(10), (13), (16)に関する部分

文献1（KR 10-2020-0101075 A）には「配列番号1のアミノ酸配列から構成されるACK1タンパク質の欠失体（本願請求項4における「(13) PEQARPPPPLEDNLFL（配列番号10）の領域を含むAck1の部分ポリペプチド」に相当）を有効成分として含有するB型肝炎の予防または治療用薬学的組成物」が記載されており（特に、特許請求の範囲及び段落0024を参照）、請求項1-3に係る発明は、文献1により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項3の従属請求項である請求項4において「(10) PEQARPPPPLEDNLFL（配列番号10）の配列のポリペプチド。」に関する部分は、「(10) PEQARPPPPLEDNLFL（配列番号10）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有している。

したがって、請求項1-4において「(10) PEQARPPPPLEDNLFL（配列番号10）の配列のポリペプチド。」に関する部分を発明1に区分する。

また、請求項4において「(13) PEQARPPPPLEDNLFL（配列番号10）の領域を含むAck1の部分ポリペプチド。」及び「(16) (10), (13)のいずれかと80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、同じく配列番号10に関するものであり、発明の連関を有しているため、発明1に区分する。

なお、「(10) PEQARPPPPLEDNLFL（配列番号10）の配列のポリペプチド。」は、最も多くの本願実施例において使用されているペプチド配列であり、かつ、in vivoで薬効を確認した唯一のペプチドであるため、主発明として認定した。

（発明2）請求項1-4において(1), (16)に関する部分

請求項4において「(1) IITPGTEVLNSDLQAS（配列番号1）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(1)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1に区分された請求項4における配列番号10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(1), (16)に関する部分は、発明1に区分された請求項4において配列番号10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(1), (16)に関する部分は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項1-4において(1), (16)に関する部分は発明1に区分できない。

そして、請求項1-4において(1), (16)に関する部分は、「(1) IITPGTEVLNSDLQAS（配列番号1）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤」という特別な技術的特徴を有しているため、発明2に区分する。

（発明3）請求項1-4において(2), (16)に関する部分

請求項4において「(2) HNVLSVYNPAWGKYFH（配列番号2）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(2)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1または2に区分された請求項4における配列番号1, 10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(2), (16)に関する部分は、発明1、2に区分された請求項4において配列番号1, 10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(2), (16)に関する部分は、発明1、2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(2), (16)に関する部分は発明1-2に区分できない。

そして、請求項1-4において(2), (16)に関する部分は、「(2) HNVLSVYNPAWGKYFH（配列番号2）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているため、発明3に区分する。

（発明4）請求項1-4において(3), (16)に関する部分

請求項4において「(3) NFPPNPMHNTDSCICA（配列番号3）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(3)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-3に区分された請求項4における配列番号1, 2, 10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(3), (16)に関する部分は、発明1-3に区分された請求項4において配列番号1, 2, 10に関する部分の従属請求項ではない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

さらに、請求項4において(3)、(16)に関する部分は、発明1-3に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(3)、(16)に関する部分は発明1-3に区分できない。

そして、請求項1-4において(3)、(16)に関する部分は、「(3) NFPPNPMHNTDSCICA（配列番号3）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明4に区分する。

（発明5）請求項1-4において(4)、(16)に関する部分

請求項4において「(4) TEKRRLMKPVLLTYNP（配列番号4）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(4)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-4に区分された請求項4における配列番号1-3,10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(4)、(16)に関する部分は、発明1-4に区分された請求項4において配列番号1-3,10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(4)、(16)に関する部分は、発明1-4に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(4)、(16)に関する部分は発明1-4に区分できない。

そして、請求項1-4において(4)、(16)に関する部分は、「(4) TEKRRLMKPVLLTYNP（配列番号4）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明5に区分する。

（発明6）請求項1-4において(5)、(16)に関する部分

請求項4において「(5) IICPGAEVNLGDLVAS（配列番号5）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(5)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-5に区分された請求項4における配列番号1-4,10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(5)、(16)に関する部分は、発明1-5に区分された請求項4において配列番号1-4,10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(5)、(16)に関する部分は、発明1-5に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(5)、(16)に関する部分は発明1-5に区分できない。

そして、請求項1-4において(5)、(16)に関する部分は、「(5) IICPGAEVNLGDLVAS（配列番号5）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明6に区分する。

（発明7）請求項1-4において(6)、(16)に関する部分

請求項4において「(6) TEYRRCVTPVLLTYNN（配列番号6）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(6)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-6に区分された請求項4における配列番号1-5,10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(6)、(16)に関する部分は、発明1-6に区分された請求項4において配列番号1-5,10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(6)、(16)に関する部分は、発明1-6に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(6)、(16)に関する部分は発明1-6に区分できない。

そして、請求項1-4において(6)、(16)に関する部分は、「(6) TEYRRCVTPVLLTYNN（配列番号6）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明7に区分する。

（発明8）請求項1-4において(7)、(16)に関する部分

請求項4において「(7) TEEHRGLLPVLMYNTV（配列番号7）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(7)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-7に区分された請求項4における配列番号1-6,10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(7)、(16)に関する部分は、発明1-7に区分された請求項4において配列番号1-6,10に関する部分の従属請求項ではない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

さらに、請求項4において(7)、(16)に関する部分は、発明1-7に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(7)、(16)に関する部分は発明1-7に区分できない。

そして、請求項1-4において(7)、(16)に関する部分は、「(7) TEEHRGLLPVLMYTNV（配列番号7）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明8に区分する。

（発明9）請求項1-4において(8)、(16)に関する部分

請求項4において「(8) TEFRCRWTWPVLCTYNA（配列番号8）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(8)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-8に区分された請求項4における配列番号1-7,10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(8)、(16)に関する部分は、発明1-8に区分された請求項4において配列番号1-7,10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(8)、(16)に関する部分は、発明1-8に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(8)、(16)に関する部分は発明1-8に区分できない。

そして、請求項1-4において(8)、(16)に関する部分は、「(8) TEFRCRWTWPVLCTYNA（配列番号8）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明9に区分する。

（発明10）請求項1-4において(9)、(16)に関する部分

請求項4において「(9) TEQARPTPPVLDTYNL（配列番号9）の配列のポリペプチド。」および「(16)

(9)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-9に区分された請求項4における配列番号1-8,10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(9)、(16)に関する部分は、発明1-9に区分された請求項4において配列番号1-8,10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(9)、(16)に関する部分は、発明1-9に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(9)、(16)に関する部分は発明1-9に区分できない。

そして、請求項1-4において(9)、(16)に関する部分は、「(9) TEQARPTPPVLDTYNL（配列番号9）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明10に区分する。

（発明11）請求項1-4において(11)、(14)、(16)に関する部分 請求項4において「(11)

HEEHRGMLREDSMMEYLK（配列番号11）の配列のポリペプチド。」、「(14) HEEHRGMLREDSMMEYLK（配列番号11）の領域を含むラディキシンの部分ポリペプチド。」および「(16) (11)、(14)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-10に区分された請求項4における配列番号1-10と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(11)、(14)、(16)に関する部分は、発明1-10に区分された請求項4において配列番号1-10に関する部分の従属請求項ではない。

さらに、請求項4において(11)、(14)、(16)に関する部分は、発明1-10に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(11)、(14)、(16)に関する部分は発明1-10に区分できない。

そして、請求項1-4において(11)、(14)、(16)に関する部分は、「(11) HEEHRGMLREDSMMEYLK（配列番号11）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明11に区分する。

（発明12）請求項1-4において(12)、(15)、(16)に関する部分

請求項4において「(12) AEEHRGLLTIRYPMEH（配列番号12）の配列のポリペプチド。」、「(15)

AEEHRGLLTIRYPMEH（配列番号12）の領域を含むβ-セントラクチンの部分ポリペプチド。」および「(16) (12)、(15)と80%以上100%未満の配列同一性を有するポリペプチド。」に関する部分は、発明1-11に区分された請求項4における配列番号1-11と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4において(12)、(15)、(16)に関する部分は、発明1-11に区分された請求項4において配列番号1-11に関する部分の従属請求項ではない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

さらに、請求項4において(12)、(15)、(16)に関する部分は、発明1-11に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1-4において(12)、(15)、(16)に関する部分は発明1-11に区分できない。

そして、請求項1-4において(12)、(15)、(16)に関する部分は、「(12) AEEHRGLLTIRYPMEH（配列番号12）の配列のポリペプチドを有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」という特別な技術的特徴を有しているため、発明12に区分する。

（発明13）請求項5-8、14-16

請求項5-8、14-16は、配列番号13-36に示すアミノ酸配列等により特定される「アジアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体」等の「肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態」に関するものであり、発明1-12に区分された請求項4における配列番号1-12と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項5-8は、発明1に区分された請求項1の従属請求項であるが、請求項1に対して追加された技術的特徴である「アジアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体」等の「肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態」とすることは、請求項1の技術的特徴である「DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する物質を有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」と、技術的関連性が低い。このため、請求項5-8が請求項1に対して発明の連関を有しているとは認められない。また、請求項14-16は、請求項1-4のいずれの従属請求項でもない。

さらに、請求項5-8、14-16は、発明1-12に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項5-8、14-16は発明1-12に区分できない。

そして、請求項5-8、14-16は、配列番号13-36に示すアミノ酸配列等により特定される「アジアロ糖タンパク質受容体に結合する抗体」等の「肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態」という特別な技術的特徴を有しているため、発明13に区分する。

（発明14）請求項9、10

請求項9、10は、配列番号38または39に示すアミノ酸配列等により特定される細胞膜透過促進分子と連結した形態に関するものであり、発明1-12に区分された請求項4における配列番号1-12、または、発明13に区分された5-8、14-16における「肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態」と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項9、10は、発明1に区分された請求項1の従属請求項であるが、請求項1に対して追加された技術的特徴である「細胞膜透過促進分子と連結した形態」とすることは、請求項1の技術的特徴である「DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する物質を有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」と、技術的関連性が低い。このため、請求項9、10が請求項1に対して発明の連関を有しているとは認められない。

さらに、請求項9、10は、発明1-13に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項9、10は発明1-13に区分できない。

そして、請求項9、10は、「細胞膜透過促進分子と連結した形態」という特別な技術的特徴を有しているため、発明14に区分する。

（発明15）請求項11

請求項11は、「核移行シグナルと連結した形態」に関するものであり、発明1-12に区分された請求項4における配列番号1-12、発明13に区分された5-8、14-16における「肝細胞内への送達のための担体分子と連結した形態」、および、発明14に区分された請求項9、10の「細胞膜透過促進分子と連結した形態」と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項11は、発明1に区分された請求項1の従属請求項であるが、請求項1に対して追加された技術的特徴である「核移行シグナルと連結した形態」とすることは、請求項1の技術的特徴である「DOCK11に結合し、DOCK11の機能を阻害する物質を有効成分として含む、抗B型肝炎ウイルス剤。」と、技術的関連性が低い。このため、請求項11が請求項1に対して発明の連関を有しているとは認められない。

さらに、請求項11は、発明1-14に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項11は発明1-14に区分できない。

そして、請求項11は、「核移行シグナルと連結した形態」という特別な技術的特徴を有しているため、発明15に区分する。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

（発明16）請求項12, 13

請求項12, 13は、「DOCK11結合ペプチドとしての使用」に関するものである点において、発明1-15に区分されたいずれの請求項に対しても異なるから、両者が同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項12, 13は請求項1-11のいずれの従属請求項でもない。

さらに、請求項12, 13は、発明1-15に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項12, 13は発明1-15のいずれにも区分できない。

そして、請求項12, 13は、「下記(1)-(16)のポリペプチドから選択される少なくとも1種のポリペプチドの、DOCK11結合ペプチドとしての使用。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明16に区分する。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。 請求項1-4において(10), (13), (16)に関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
特許ファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/042642

引用文献	公表日	特許ファミリー文献	公表日
KR 10-2020-0101075 A	27.08.2020	(ファミリーなし)	
WO 2017/082202 A1	18.05.2017	US 2019/0022126 A1 Claims, [0069], [0099]- [0104], Examples EP 3395363 A1	