

(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
2020年9月24日(24.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/189766 A1

(51) 国際特許分類:

A61P 43/00 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 14/31 (2006.01) *A61K 47/69* (2017.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C07K 17/02 (2006.01)

MA, MD, ME, 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.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/012364

(22) 国際出願日: 2020年3月19日(19.03.2020)

(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 2019-052427 2019年3月20日(20.03.2019) JP

(71) 出願人: プロテノバ株式会社 (**PROTENOVA CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒7692604 香川県東かがわ市西村 1 4 8 8 番地 1 Kagawa (JP).

(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, 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, 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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(72) 発明者: 真島 英司 (**MAJIMA, Eiji**); 〒7692604 香川県東かがわ市西村 1 4 8 8 番地 1 プロテノバ株式会社内 Kagawa (JP).

(74) 代理人: 田中 順也, 外 (**TANAKA, Junya et al.**); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島 6-2-40 中之島インテス 2 1 階 Osaka (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) **Title:** POLYPEPTIDE-MODIFIED LIPOSOME HAVING ANTIBODY BINDING CAPACITY, AND IMMUNOLIPOSOME

(54) 発明の名称: 抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソーム、及びイムノリポソーム

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a polypeptide-modified liposome which has excellent antibody binding capacity. In each immunoglobulin binding domain (sequence number 1-4) configuring a protein A, at least 3 amino acid residues selected from position 40, position 43, position 46, position 47, position 53 and position 54 are modified to lysine residue and/or arginine residue, and by binding the obtained polypeptide having the modified immunoglobulin binding domain to the surface of the liposome which contains an anionic lipid as a constituent lipid, it is possible to obtain a polypeptide modified liposome which has excellent antibody binding capacity.

(57) 要約: 本発明の目的は、優れた抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソームを提供することである。プロテインAを構成している各イムノグロブリン結合ドメイン(配列番号1~4)において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基をリジン残基及び/又はアルギニン残基に改変し、得られた改変イムノグロブリン結合ドメインを有するポリペプチドを構成脂質としてアニオン性脂質を含むリポソームの表面に結合させることによって、優れた抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソームが得られる。



WO 2020/189766 A1

明 細 書

発明の名称：

抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソーム、及びイムノリポソーム 技術分野

[0001] 本発明は、優れた抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソームに関する。より具体的には、プロテインAを構成している各イムノグロブリン結合ドメインの改変体を含むペプチドが表面に結合しており、優れた抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソームに関する。また、本発明は、当該ポリペプチド修飾リポソームに抗体又はそのフラグメントが結合しているイムノリポソームに関する。

背景技術

[0002] リポソームは、薬物を封入させることができることに加え、薬物の体内動態の制御、薬理効果の向上、薬物の安定性向上、副作用の低減等が期待でき、薬物送達システム（DDS）の担体として汎用されている。

[0003] また、分子標的に対する指向性を具備せたりポソームが注目されている。リポソームに分子標的に対する指向性を具備させることができれば、例えば、抗癌剤を封入したりポソームを癌細胞に選択的に送達させることが可能になり、薬物の選択送達、薬理効果の向上、副作用の低減等に大きく貢献することが期待されるためである。

[0004] 従来、リポソームに分子標的に対する指向性を具備させるために、リポソームの表面に抗体を結合させたイムノリポソームの開発が試みられている。例えば、非特許文献1には、抗体のFab'フラグメントにポリエチレングリコールをリンカーとしてリポソームの構成脂質と結合させたイムノリポソームが、細網内皮回避能及びアクティブターゲティング能の双方を備えた薬物送達キャリアとして有効であることが開示されている。また、特許文献1には、「ホスファチジルセリンを膜構成成分として含有するリポソームと、前記リポソームの外部表面を修飾するIgG結合能を有するリガンドと、前記

リポソームの膜構成成分と前記リガンドとの双方に結合する脂肪酸からなるリンカーと、を有することを特徴とするリポソーム組成物」が、病変細胞あるいは免疫細胞を選択的に認識できるとともに、長時間且つ効率的に炎症性自己免疫疾患を治療することができることが開示されている。また、特許文献2には、「カチオン性リポソーム、抗体又はそのフラグメント、及び造影剤を含むカチオン性イムノリポソーム複合体」が、癌性腫瘍を含む疾患の処置及び造影に有用であることが開示されている。

[0005] しかしながら、従来のイムノリポソームでは、抗体の結合量が少なかったり、複雑な製造工程を要したりする等の欠点がある。また、イムノリポソームに抗体結合能を具備させるためにプロテインAやプロテインGを表面に修飾させる手法も知られているが（例えば、特許文献1等）、プロテインAやプロテインGのアミノ酸配列を改変させることにより、イムノリポソームの抗体結合能を向上させる技術については報告されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ryo Suzuki et al., Drug Delivery System 19-6, 2004, p.53
9-545

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2015-137273号公報
特許文献2：特表2009-512721号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、優れた抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソーム、及び当該ポリペプチド修飾リポソームを使用したイムノリポソームを提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、前記課題を解決すべく鋭意検討を行ったところ、プロテイン

Aを構成している各イムノグロブリン結合ドメインにおいて、抗体との結合に直接寄与していない α ヘリックス部位に正電荷を付加できる所定の改変を行い、当該改変イムノグロブリン結合ドメインを有するポリペプチドを構成脂質としてアニオン性脂質を含むリポソームの表面に結合させることによって、優れた抗体結合能を有するポリペプチド修飾リポソームが得られることを見出した。更に、本発明者は、当該ポリペプチド修飾リポソームを使用することによって、抗体結合量の多いイムノリポソームを簡便に製造できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて更に検討を重ねることにより完成したものである。

[0010] 即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 構成脂質としてアニオン性脂質を含むリポソームの表面に、以下の(A1)～(A3)、(B1)～(B3)、(C1)～(C3)、(D1)～(D3)、及び(E1)～(E3)よりなる群から選択される少なくとも1種のイムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドが結合している、ポリペプチド修飾リポソーム。

(A1) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(B1) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(C1) 配列番号3に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(D1) 配列番号4に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位

、 4 7 位、 5 3 位、 及び 5 4 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(E 1) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、 4 0 位、 4 3 位、 4 6 位、 4 7 位、 5 3 位、 及び 5 4 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(A 2) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、 4 0 位、 4 3 位、 4 6 位、 4 7 位、 5 3 位、 及び 5 4 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、 1 又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である (A 1) のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

(B 2) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、 4 0 位、 4 3 位、 4 6 位、 4 7 位、 5 3 位、 及び 5 4 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、 1 又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である (B 1) のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

(C 2) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、 4 0 位、 4 3 位、 4 6 位、 4 7 位、 5 3 位、 及び 5 4 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、 1 又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（C 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（D 2）配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1 又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（D 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（E 2）配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1 又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（E 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（A 3）配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が 80 % 以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（A 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（B 3）配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位

、 47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号2に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（B1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（C3）配列番号3に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号3に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（C1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（D3）配列番号4に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号4に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（D1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（E3）配列番号5に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号5に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（E 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

項 2. 前記ポリペプチドが、配列番号 1～5 のいずれかに示すアミノ酸配列における 43 位、及び 46 位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、且つ 40 位、47 位、53 位、及び 54 位の中のいずれか少なくとも 1 つがリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている、項 1 に記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項 3. 前記ポリペプチドが、配列番号 1～5 のいずれかに示すアミノ酸配列における 43 位、46 位、及び 53 位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、40 位、及び 54 位の中の 1 又は 2 個がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている、項 1 又は 2 に記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項 4. 前記ポリペプチドが、配列番号 1～5 のいずれかに示すアミノ酸配列における 42 位、49 位、50 位、及び 56 位の内、少なくとも 1 個がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている、項 1～3 のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項 5. 前記ポリペプチドが、（A 1）～（A 3）、（B 1）～（B 3）、（C 1）～（C 3）、（D 1）～（D 3）、及び（E 1）～（E 3）よりなる群から選択される 1 種のイムノグロブリン結合ドメインを有する単ドメイン型ポリペプチドである、項 1～4 のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項 6. 前記ポリペプチドが、（A 1）～（A 3）、（B 1）～（B 3）、（C 1）～（C 3）、（D 1）～（D 3）、及び（E 1）～（E 3）よりなる群から選択される少なくとも 1 種のイムノグロブリン結合ドメインを有する複ドメイン型ポリペプチドである、項 1～5 のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項 7. 前記ポリペプチドが、（A 1）～（A 3）よりなる群から選択され

る少なくとも１種のイムノグロブリン結合ドメインを有する、項１～６のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項８． 前記アニオン性脂質が、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、及びジステロイルホスファチジルグリセロールよりなる群から選択される少なくとも１種のホスファチジルグリセロールである、項１～７のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項９． リポソームの構成脂質として、更に中性脂質を含む、項１～８のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項１０． 前記アニオン性脂質：前記中性脂質のモル比が、１：９９～９９：１である、項１～９のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

項１１． 項１～１０のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソームに抗体が結合している、イムノリポソーム。

項１２． 項１１に記載のイムノリポソームを含む、医薬組成物。

発明の効果

[0011] 本発明のポリペプチド修飾リポソームは、抗体と混合するという簡便な方法で表面に抗体を結合させることができるので、リポソームに分子標的に対する指向性を具備させたイムノリポソームを調製することが可能になる。

[0012] また、本発明のイムノリポソームは、アクティブターゲティング型リポソームとして使用でき、薬物や体内診断のDDS製剤等として有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図１]実施例８、１３、及び１４において、FITC標識IgGを添加したポリペプチド修飾リポソーム懸濁液を分画し、各フラクションの蛍光強度を測定した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、配列表以外では、アミノ酸配列における２０種類のアミノ酸残基は、一文字略記で表現することがある。即ち、グリシン（G l y）はG、アラニン（A l a）はA、バリン（V a l）は

V、ロイシン (L e u) はL、イソロイシン (I l e) はI、フェニルアラニン (P h e) はF、チロシン (T y r) はY、トリプトファン (T r p) はW、セリン (S e r) はS、トレオニン (T h r) はT、システイン (C y s) はC、メチオニン (M e t) はM、アスパラギン酸 (A s p) はD、グルタミン酸 (G l u) はE、アスパラギン (A s n) はN、グルタミン (G l n) はQ、リジン (L y s) はK、アルギニン (A r g) はR、ヒスチジン (H i s) はH、プロリン (P r o) はPである。また、本発明において、アミノ酸配列を表記する場合、左側がN末端、右側がC末端を指す。

[0015] 本明細書において、「非極性アミノ酸」には、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、フェニルアラニン、及びトリプトファンが含まれる。また、「非電荷アミノ酸」には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれる。また、「酸性アミノ酸」には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。また、「塩基性アミノ酸」には、リジン、アルギニン、及びヒスチジンが含まれる。

[0016] 1. ポリペプチド修飾リポソーム

本発明のポリペプチド修飾リポソームは、構成脂質としてアニオン性脂質を含むリポソームの表面に、特定のアミノ酸配列のイムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドが結合していることを特徴とする。以下、本発明のポリペプチド修飾リポソームについて詳述する。

[0017] [リポソーム]

本発明では、イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドを結合させるリポソームとして、構成脂質としてアニオン性脂質を含むリポソームを使用する。

[0018] 構成脂質として使用されるアニオン性脂質の種類については、特に制限されないが、例えば、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジステロイルホスファチジルグリセロール

(DSPG) 等のホスファチジルグリセロール (PG) ; ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジリンイノシトール (PI)、ホスファチジン酸 (PA)、トコフェロールコハク酸 (TS)、コレステロールコハク酸 (CS)、ジセチルリン酸等が挙げられる。これらのアニオン性脂質は、1 種単独で使用してもよく、また2 種以上を組み合わせ使用してもよい。これらのアニオン性脂質の中でも、ポリペプチドの結合効率をより一層向上させるという観点から、好ましくはホスファチジルグリセロール、より好ましくはジパルミトイルホスファチジルグリセロールが挙げられる。

[0019] リポソームの構成脂質の総量に対するアニオン性脂質の比率については、特に制限されないが、例えば、1 ~ 99 モル%、好ましくは10 ~ 90 モル%、より好ましくは30 ~ 75 モル%が挙げられる。

[0020] また、本発明で使用されるリポソームは、構成脂質として、アニオン性脂質に加えて、中性脂質が含まれていることが好ましい。中性脂質の種類については、特に制限されないが、例えば、卵黄ホスファチジルコリン (EPC)、大豆ホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、水素添加DSPC等のホスファチジルコリン (PC) ; コレステロール、コレステリルヘミスクシネート、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロール、フィトステロール、フィトステロール、スチグマステロール、チモステロール、エルゴステロール、シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロール等のステロール ; グリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリド等のグリセロ糖脂質 ; ガラクトシルセレブロシド、ガングリオシド等のスフィンゴ糖脂質 ; ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジステロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、ポリエチレングリコールホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) 等のホスファチジルエタノールアミン ; ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を有するホスファチジルエタノールアミン、セラミド、

スフィンゴミエリン、セファリン、ステロール、セレブロシド等が挙げられる。これらの中性脂質は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を組み合わせ使用してもよい。これらの中性脂質の中でも、ポリペプチドの結合効率をより一層向上させるという観点から、好ましくはホスファチジルコリン、より好ましくは卵黄ホスファチジルコリンが挙げられる。

[0021] 本発明で使用されるリポソームの構成脂質において、アニオン性脂質と中性脂質との割合については、特に制限されないが、例えば、アニオン性脂質：中性脂質のモル比で1：99～99：1、好ましくは10：90～90：10、より好ましくは30：70～75：25が挙げられる。このような割合を満たすことにより、リポソームが、イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドを結合させるのに十分な負電荷を帯びることができる。

[0022] また、リポソームの構成脂質の総量に対する中性脂質の比率については、特に制限されないが、例えば、1～99モル%、好ましくは10～90モル%、より好ましくは25～70モル%が挙げられる。

[0023] 本発明で使用されるリポソームの多分散性指数（Poly Dispersity Index；PDI）については、特に制限されないが、例えば、0.5以下、好ましくは0.01～0.3、より好ましくは0.01～0.1が挙げられる。本明細書において、リポソームの多分散性指数は、動的光散乱法にて測定される値である。

[0024] また、本発明で使用されるリポソームのゼータ電位としては、例えば、-50～-1 mV、好ましくは-50～-10 mV、より好ましくは-50～-25 mVが挙げられる。本明細書において、リポソームのゼータ電位は、リン酸緩衝液（PBS(-)）中で、レーザー・ドップラー式電気泳動法によりZeta-sizer nano Zs（Malvern Panalytical社）を用いて測定される値である。

[0025] 本発明で使用されるリポソームの粒子径については、特に制限されないが、通常は平均粒子径が30～1000 nm、好ましくは50～500 nmが挙げられる。本明細書において、リポソームの平均粒子径は、動的光散乱法によりZeta-sizer nano Zs（Malvern Panalytical社）を用いて測定されるメ

ジアン径である。

[0026] また、本発明で使用されるリポソームの構造についても、特に制限されず、MLV (multilamellar vesicles)、DRV (dehydration-rehydration vesicles)、LUV (large unilamellar vesicles)、又はSUV (small unilamellar vesicles) のいずれであってもよい。

[0027] 本発明で使用されるリポソームに内包される溶液としては、水、緩衝液、生理食塩水等の薬学的に許容される水性担体であればよい。

[0028] 本発明で使用されるリポソームには、薬物を内包させることができる。リポソームに内包される薬物は、核酸医薬（アンチセンスオリゴDNA、デコイオリゴDNA、siRNA、miRNA等）、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖類、低分子有機化合物、無機化合物等のいずれであってもよい。リポソームに内包される薬物として、具体的には、抗癌剤、免疫抑制剤、免疫調節剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、抗高血圧剤、抗低血圧剤、抗不整脈剤、抗精神病剤、鎮痛剤、解熱剤、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤、抗炎症剤、抗鬱剤、鎮静剤、催眠剤、喘息治療剤、麻酔剤、抗生物質、抗狭心症剤、気管支拡張剤、利尿剤、抗利尿剤、筋弛緩剤、抗高脂血症剤、制吐剤、抗感染症剤、副交感神経作動剤、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤等の治療薬；X線造影剤、超音波診断剤、核磁気共鳴診断用診断薬等の体内診断薬等が挙げられる。

[0029] リポソームに内包させる薬物の量については、薬物の種類、用途等に応じて適宜設定すればよい。

[0030] 本発明で使用されるリポソームは、水和法、超音波処理法、エタノール注入法、エーテル注入法、逆相蒸発法、界面活性剤法、凍結・融解法等の公知のリポソームの製造方法を用いて作製できる。また、所定のポアサイズのフィルターを通過させることにより、リポソームの粒度分布を調整することができる。また、公知の方法に従って、MLVから一枚膜リポソームへの転換、一枚膜リポソームからMLVの転換を行うこともできる。

[0031] [イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチド]

本発明で使用されるポリペプチドの一態様として、以下の（A 1）～（E 1）のいずれかに示すイムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドが挙げられる。

（A 1）配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

（B 1）配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

（C 1）配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

（D 1）配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

（E 1）配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

[0032] 配列番号 1～5 に示すアミノ酸配列は、それぞれスタフィロコッカス (*Staphylococcus aureus*) 由来のプロテイン A（配列番号 6 に示すアミノ酸配列、UniProtKB 登録番号 P02976）に含まれるムノグロブリン結合ドメインの各アミノ酸配列であり、相互に高い配列同一性を有している。具体的には、配列番号 1 に示すアミノ酸配列は、配列番号 6 において 270～327 位の領

域に存在するイムノグロブリン結合ドメインCのアミノ酸配列に該当し、配列番号2に示すアミノ酸配列は、配列番号6において35～92位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメインEのアミノ酸配列に該当し、配列番号3に示すアミノ酸配列は、配列番号6において96～153位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメインDのアミノ酸配列に該当し、配列番号4に示すアミノ酸配列は、配列番号6において154～211位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメインAのアミノ酸配列に該当し、配列番号5に示すアミノ酸配列は、配列番号6において212～269位の領域に存在するイムノグロブリン結合ドメインBのアミノ酸配列に該当する。

[0033] 配列番号1～5に示すアミノ酸配列における40～55位のアミノ酸残基は、イムノグロブリンのFc領域との結合に直接寄与していない α ヘリックス部位に該当している。本発明では、イムノグロブリン結合ドメインにおいて、リジン残基及び／又はアルギニン残基を抗体との結合に直接寄与していない部位に導入することにより、イムノグロブリン結合ドメインに正電荷が付加され、前記リポソームと結合させることが可能になる。

[0034] 配列番号1～5のいずれかに示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位のアミノ酸残基において、リジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されるアミノ酸残基の数については、3以上であればよいが、具体的には、3～6個、より好ましくは3～5個、更に好ましくは3又は4個が挙げられる。

[0035] 配列番号1～5のいずれかに示すアミノ酸配列において、リジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されるアミノ酸残基の部位は、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位の中のいずれか少なくとも3つであればよいが、前記リポソームへの結合能をより一層向上させるという観点からは、好ましくは、43位、及び46位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、且つ40位、47位、53位、及び54位の中のいずれか少なくとも1つがリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている態様；より好ましくは43位、及び46位がリジン残基及び／又はアルギニン

残基に置換され、40位、53位、及び54位の中のいずれか少なくとも1つがリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている態様；更に好ましくは43位、46位、及び53位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、40位、47位及び54位の中の0～3個がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている態様；特に好ましくは、43位、46位、及び53位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、40位、及び54位の中の1又は2個がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている態様が挙げられる。

[0036] 前記（A1）に該当するイムノグロブリン結合ドメインの具体例として、配列番号7～12及び60に示すアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメインが挙げられる。配列番号7に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、40位、43位、及び46位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号8に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位及び53位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号9に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、43位、46位及び54位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号10に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、43位、46位、53位及び54位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号11に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、43位、46位、47位及び54位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号12に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、43位、47位及び54位がアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号60に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、43位、47位及び54位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。

[0037] 前記（B1）に該当するイムノグロブリン結合ドメインの具体例として、配列番号13～18及び61に示すアミノ酸配列を有するイムノグロブリン

結合ドメインが挙げられる。配列番号 13 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、及び 46 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 14 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位及び 53 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 15 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、43 位、46 位及び 54 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 16 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、43 位、46 位、53 位及び 54 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 17 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、43 位、46 位、47 位及び 54 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 18 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、43 位、47 位及び 54 位がアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 61 に示すアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、43 位、47 位及び 54 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。

[0038] 前記 (C1) に該当するイムノグロブリン結合ドメインの具体例として、配列番号 19～24 及び 62 に示すアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメインが挙げられる。配列番号 19 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、及び 46 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 20 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位及び 53 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 21 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、43 位、46 位及び 54 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 22 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、43 位、46 位、53 位及び 54 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 23 に示すアミノ酸配列は、配列番号 3 に示すアミノ酸配

列において、４３位、４６位、４７位及び５４位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号２４に示すアミノ酸配列は、配列番号３に示すアミノ酸配列において、４３位、４７位及び５４位がアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号６２に示すアミノ酸配列は、配列番号３に示すアミノ酸配列において、４３位、４７位及び５４位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。

[0039] 前記（Ｄ１）に該当するイムノグロブリン結合ドメインの具体例として、配列番号２５～３０及び６３に示すアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメインが挙げられる。配列番号２５に示すアミノ酸配列は、配列番号４に示すアミノ酸配列において、４０位、４３位、及び４６位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号２６に示すアミノ酸配列は、配列番号４に示すアミノ酸配列において、４０位、４３位、４６位及び５３位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号２７に示すアミノ酸配列は、配列番号４に示すアミノ酸配列において、４３位、４６位及び５４位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号２８に示すアミノ酸配列は、配列番号４に示すアミノ酸配列において、４３位、４６位、５３位及び５４位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号２９に示すアミノ酸配列は、配列番号４に示すアミノ酸配列において、４３位、４６位、４７位及び５４位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号３０に示すアミノ酸配列は、配列番号４に示すアミノ酸配列において、４３位、４７位及び５４位がアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号６３に示すアミノ酸配列は、配列番号４に示すアミノ酸配列において、４３位、４７位及び５４位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。

[0040] 前記（Ｅ１）に該当するイムノグロブリン結合ドメインの具体例として、配列番号３１～３６及び６４に示すアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメインが挙げられる。配列番号３１に示すアミノ酸配列は、配列番号５に示すアミノ酸配列において、４０位、４３位、及び４６位がリジン残基

に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 3 2 に示すアミノ酸配列は、配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、4 0 位、4 3 位、4 6 位及び 5 3 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 3 3 に示すアミノ酸配列は、配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、4 3 位、4 6 位及び 5 4 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 3 4 に示すアミノ酸配列は、配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、4 3 位、4 6 位、5 3 位及び 5 4 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 3 5 に示すアミノ酸配列は、配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、4 3 位、4 6 位、4 7 位及び 5 4 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 3 6 に示すアミノ酸配列は、配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、4 3 位、4 7 位及び 5 4 位がアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列である。配列番号 6 4 に示すアミノ酸配列は、配列番号 5 に示すアミノ酸配列において、4 3 位、4 7 位及び 5 4 位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列である。

[0041] また、本発明で使用されるポリペプチドの他の態様として、以下の (A 2) ~ (E 2) 及び (A 3) ~ (E 3) のいずれかに示すイムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドが挙げられる。

(A 2) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、4 0 位、4 3 位、4 6 位、4 7 位、5 3 位、及び 5 4 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1 又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である (A 1) のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

(B 2) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、4 0 位、4 3 位、4 6 位、4 7 位、5 3 位、及び 5 4 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジ

ン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（B1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（C2）配列番号3に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（C1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（D2）配列番号4に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（D1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（E2）配列番号5に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（E1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合

能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

(A 3) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が 80 % 以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である (A 1) のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

(B 3) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が 80 % 以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である (B 1) のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

(C 3) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号 3 に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が 80 % 以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である (C 1) のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

(D 3) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、40 位、43 位、46 位、47 位、53 位、及び 54 位中の少なくとも 3 つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号 4 に示すアミノ

酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（D1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（E3）配列番号5に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号5に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（E1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

[0042] 前記（A2）及び（A3）のイムノグロブリン結合ドメインは、前記（A1）のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号1に示すアミノ酸配列においてリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換された部位以外の領域（以下、「任意改変可能領域」と表記することもある）に改変（置換、欠失、挿入又は付加）が施されたイムノグロブリン結合ドメインである。

[0043] 前記（B2）及び（B3）のイムノグロブリン結合ドメインは、前記（B1）のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号2に示すアミノ酸配列においてリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換された部位以外の領域（以下、「任意改変可能領域」と表記することもある）に改変（置換、欠失、挿入又は付加）が施されたイムノグロブリン結合ドメインである。

[0044] 前記（C2）及び（C3）のイムノグロブリン結合ドメインは、前記（C1）のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号3に示すアミノ酸配列においてリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換された部位

以外の領域（以下、「任意改変可能領域」と表記することもある）に改変（置換、欠失、挿入又は付加）が施されたイムノグロブリン結合ドメインである。

[0045] 前記（D 2）及び（D 3）のイムノグロブリン結合ドメインは、前記（D 1）のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号 4 に示すアミノ酸配列においてリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換された部位以外の領域（以下、「任意改変可能領域」と表記することもある）に改変（置換、欠失、挿入又は付加）が施されたイムノグロブリン結合ドメインである。

[0046] 前記（E 2）及び（E 3）のイムノグロブリン結合ドメインは、前記（E 1）のイムノグロブリン結合ドメインの改変体であり、配列番号 5 に示すアミノ酸配列においてリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換された部位以外の領域（以下、「任意改変可能領域」と表記することもある）に改変（置換、欠失、挿入又は付加）が施されたイムノグロブリン結合ドメインである。

[0047] 前記（A 2）、（B 2）、（C 2）、（D 2）、及び（E 2）のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変可能領域に導入されるアミノ酸残基の改変は、置換、付加、挿入、および欠失の中から 1 種類の改変（例えば置換）のみを含むものであってもよく、2 種以上の改変（例えば、置換と付加）を含んでいてもよい。

[0048] 前記（A 2）、（B 2）、（C 2）、（D 2）、及び（E 2）のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変可能領域においてアミノ酸の置換を行う場合、置換されるアミノ酸残基の数としては、1 個又は数個であればよく、具体的には 1～10 個、好ましくは 1～9 個、1～8 個、1～7 個、1～6 個、又は 1～5 個が挙げられる。

[0049] 前記（A 2）、（B 2）、（C 2）、（D 2）、及び（E 2）のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変可能領域においてアミノ酸の付加を行う場合、付加されるアミノ酸残基の数としては、1 個又は数個であれば

よく、具体的には1～10個、好ましくは1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、又は1～5個が挙げられる。

[0050] 前記(A2)、(B2)、(C2)、(D2)、及び(E2)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変可能領域においてアミノ酸の挿入を行う場合、挿入されるアミノ酸残基の数としては、1個又は数個であればよく、具体的には1～10個、好ましくは1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、又は1～5個、より好ましくは1～3個、更に好ましくは1又は2個が挙げられる。

[0051] 前記(A2)、(B2)、(C2)、(D2)、及び(E2)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変可能領域においてアミノ酸の欠失を行う場合、欠失されるアミノ酸残基の数としては、1個又は数個であればよく、具体的には1～10個、好ましくは1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、又は1～5個、より好ましくは1～3個、更に好ましくは1又は2個が挙げられる。

[0052] 前記(A3)、(B3)、(C3)、(D3)、及び(E3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～5に示す各アミノ酸配列に対する、前記置換及び／又は付加されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた部位の配列同一性は、80%以上であればよいが、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上が挙げられる。

[0053] ここで、前記(A3)、(B3)、(C3)、(D3)、及び(E3)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、配列番号1～5に示す各アミノ酸配列に対する、前記置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域(任意改変可能領域)の配列同一性とは、配列番号1～5に示す各アミノ酸配列から40位、43位、46位、47位、53位、及び54位の中でリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている部位を除いた領域を抜き出して、当該領域のみを比較して算出される配列同一性である。また、「配列同一性」とは、BLAST PACKAGE[sgi32 bit edition, Version 2.0.12

;available from National Center for Biotechnology Information(NCBI)] のbl2seq program (Tatiana A. Tatsusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol.Lett., Vol.174, p247-250, 1999) により得られるアミノ酸配列の同一性の値を示す。パラメーターは、Gap insertion Cost value:11、Gap extension Cost value:1に設定すればよい。

[0054] 前記(A2)～(E2)及び(A3)～(E3)の各イムノグロブリン結合ドメインの任意改変可能領域において導入される改変は、抗体に対する結合能を維持できる範囲で適宜設定すればよい。

[0055] 例えば、前記(A2)、(B2)、(C2)、(D2)、及び(E2)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変可能領域においてアミノ酸の置換を行う場合、ポリペプチドの結合効率をより一層向上させるという観点から、好ましくは、配列番号1～5において、43位、46位、47位、53位、及び54位を除く41～58位のアミノ酸残基の内、少なくとも1個をリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換する態様；より好ましくは、配列番号1～5において、42位、49位、50位、及び56位の内、少なくとも1個（特に、1～3個）をリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換する態様が挙げられる。

[0056] また、前記(A2)、(B2)、(C2)、(D2)、及び(E2)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、任意改変可能領域においてアミノ酸の置換を行う場合、アミノ酸置換部位としては、前記で例示する部位の他、例えば、配列番号1～5における1位、4位、7位、29位、35位、及び58位等が挙げられる。

[0057] また、例えば、前記(A2)、(B2)、(C2)、(D2)、及び(E2)のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、アミノ酸の付加を行う場合、付加されるアミノ酸残基の種類については、特に制限されないが、ポリペプチドの結合効率をより一層向上させるという観点から、好適な例として、C末端にリジン残基及び／又はアルギニン残基を1～10個、好ましくは2～5個、より好ましくは2～4個を付加していることが挙げられる。

[0058] 前記（A 2）及び（A 3）のイムノグロブリン結合ドメインにおいて、「導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（A 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、アニオン性脂質を含むリポソームに対する結合能が同等以上である」とは、アニオン性脂質を含むリポソームに対する結合能が、前述した所定の領域において導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（A 1）のイムノグロブリン結合ドメイン（即ち、任意改変可能部位に改変が導入される前のイムノグロブリン結合ドメイン）と同等以上であることを意味し、具体的には、下記測定条件で測定したポリペプチド結合率が、任意改変可能部位に改変が導入される前の（A 1）のイムノグロブリン結合ドメインを用いて同条件で測定したポリペプチド結合率（100%）を基準として、±50%の範囲内、好ましくは±30%の範囲内であることが挙げられる。なお、前記（B 2）～（E 2）及び（B 3）～（E 3）のイムノグロブリン結合ドメインでも同様である。

（測定条件）

(1)構成脂質がEPC及びDPPGからなるリポソーム（EPCとDPPGのモル比1：1）の懸濁液（EPC及びDPPGの合計濃度は30 mM）0.2 mlに、イムノグロブリン結合ドメインを30 nmol添加し、37℃で24時間インキュベートして、ポリペプチド修飾リポソームを含む懸濁液を得る。

(2)前記(1)の操作で得られたポリペプチド修飾リポソームを含む懸濁液をゲルろ過に供して、リポソームを含むフラクションと、リポソームを含まないフラクションに分画する。(3)前記(2)の操作によって得られた各フラクションをSDS-PAGEに供した後に、ゲルをクマシーブリリアントブルー（CBB）染色して染色バンドの濃さを画像解析ソフトによって測定し、各フラクションに含まれるポリペプチド量（染色バンドの濃さ）を求める。

(4)リポソームを含むフラクションのポリペプチド量の合計値を全フラクションのポリペプチド量の合計値で除して、ポリペプチド結合率（%）を算出する。

- [0059] 本発明において、リポソームの修飾に使用されるポリペプチドは、前記（A 1）～（E 1）、（A 2）～（E 2）、及び（A 3）～（E 3）のいずれかのイムノグロブリン結合ドメインを有していればよく、単ドメイン型ポリペプチド又は複ドメイン型ポリペプチドのいずれであってもよい。
- [0060] 単ドメイン型ポリペプチドの場合、前記（A 1）～（E 1）、（A 2）～（E 2）、及び（A 3）～（E 3）のいずれかのイムノグロブリン結合ドメインが1個含まれていればよい。
- [0061] 単ドメイン型ポリペプチドの場合、前記（A 1）～（E 1）、（A 2）～（E 2）、及び（A 3）～（E 3）のいずれかのイムノグロブリン結合ドメインからなるものであってもよく、またN末端及び／又はC末端にアミノ酸残基が付加されていてもよい。単ドメイン型ポリペプチドにおいて、前記イムノグロブリン結合ドメインのN末端及び／又はC末端にアミノ酸残基を付加する場合、付加されるアミノ酸残基の数については、特に制限されないが、例えば、1～100個、好ましくは1～50個、より好ましくは1～20個、更に好ましくは1～10個が挙げられる。
- [0062] また、複ドメイン型ポリペプチドの場合、イムノグロブリン結合ドメインを2個以上連結していればよく、2個以上イムノグロブリン結合ドメインの内、少なくとも1個が前記（A 1）～（E 1）、（A 2）～（E 2）、及び（A 3）～（E 3）のイムノグロブリン結合ドメインであればよい。具体的には、複ドメイン型ポリペプチドの場合には、前記（A 1）～（E 1）、（A 2）～（E 2）、及び（A 3）～（E 3）のイムノグロブリン結合ドメインの内、少なくとも1個のドメインが含まれていればよく、前記（A 1）～（E 1）、（A 2）～（E 2）、及び（A 3）～（E 3）のイムノグロブリン結合ドメインの内、2個以上のドメインからなるものであってもよく、また、前記（A 1）～（E 1）、（A 2）～（E 2）、及び（A 3）～（E 3）のイムノグロブリン結合ドメインの内、1個以上のドメインと、プロテインA、L及びGに含まれる野生型のイムノグロブリン結合ドメイン及び／又はその改変体が1個以上含まれているものであってもよい。

- [0063] 複ドメイン型ポリペプチドの場合、連結されているイムノグロブリン結合ドメインの総数については、2個以上であればよいが、好ましくは2～10個、更に好ましくは2～6個が挙げられる。
- [0064] また、複ドメイン型ポリペプチドの場合、構成する各イムノグロブリン結合ドメインは、それぞれのC末端とN末端が直接連結されていてもよく、また各イムノグロブリン結合ドメイン間が1～40個、好ましくは1～10個のアミノ酸残基を介して連結されていてもよい。
- [0065] 複ドメイン型ポリペプチドのN末端は、前記(A1)～(E1)、(A2)～(E2)、及び(A3)～(E3)のいずれかのイムノグロブリン結合ドメイン、又は他のイムノグロブリン結合ドメインのN末端であってもよいが、更にアミノ酸残基が付加されていてもよい。複ドメイン型ポリペプチドにおいて、N末端にアミノ酸残基を付加する場合、付加されるアミノ酸残基の数については、特に制限されないが、例えば、1～100個、好ましくは1～50個、より好ましくは1～20個、更に好ましくは1～10個が挙げられる。
- [0066] 複ドメイン型ポリペプチドのC末端は、前記(A1)～(E1)、(A2)～(E2)、及び(A3)～(E3)のいずれかのイムノグロブリン結合ドメイン、又は他のイムノグロブリン結合ドメインのC末端であってもよいが、更にアミノ酸残基が付加されていてもよい。複ドメイン型ポリペプチドにおいて、C末端にアミノ酸残基を付加する場合、付加されるアミノ酸残基の数については、特に制限されないが、例えば、1～100個、好ましくは1～50個、より好ましくは1～20個、更に好ましくは1～10個が挙げられる。複ドメイン型ポリペプチドにおいて、C末端にアミノ酸残基を付加する場合、付加するアミノ酸の種類については、特に制限されない。
- [0067] 前記(A1)～(E1)、(A2)～(E2)、及び(A3)～(E3)のいずれかのイムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドは、遺伝子工学的手法、化学合成法等の公知の手法によって製造することができる。
- [0068] 本発明では、前記ポリペプチドの内、1種のを単独で使用してもよく

、2種以上のものを組み合わせて使用してもよい。

[0069] [ポリペプチドによるリポソームの修飾]

本発明のポリペプチド修飾リポソームは、前記ポリペプチドが前記リポソームの表面に結合されているポリペプチドとリポソームとの複合体である。

[0070] 本発明のポリペプチド修飾リポソームでは、前記リポソームに含まれるアニオン性脂質の負電荷と、前記ポリペプチドが有するリジン残基及び／又はアルギニン残基による正電荷との静電的相互作用によって、前記リポソームの表面に前記ポリペプチドが結合した状態になっている。

[0071] 本発明のポリペプチド修飾リポソームにおいて、前記ポリペプチドの結合量については、特に制限されないが、例えば、前記リポソームの構成脂質の総量100モル当たり、前記ポリペプチドが0.001～5.0モル程度、好ましくは0.01～1.0モル程度、より好ましくは0.05～0.5モル程度が挙げられる。

[0072] 本発明のポリペプチド修飾リポソームは、前記リポソームの懸濁液と前記ポリペプチドとを混合することにより得ることができる。混合条件については、特に制限されないが、例えば、構成脂質の総濃度として0.1～100mM程度、好ましくは1～50mM程度のリポソームの懸濁液に対して、前記ポリペプチドを0.01～1mM程度、好ましくは0.05～0.5mM程度となるように添加して、4～40℃程度、好ましくは10～37℃程度で、0.01～36時間程度、好ましくは0.1～24時間程度、必要に応じて攪拌しながら保持すればよい。

[0073] 本発明のポリペプチド修飾リポソームは、後述するように抗体と結合させてイムノリポソームとして使用することができる。また、前記ポリペプチドは、イムノグロブリンの抗体のFc領域に結合するので、本発明のポリペプチド修飾リポソームは、Fc領域融合サイトカインやFc領域融合TNFR等のFc融合タンパク質と結合させて、各種用途に使用することもできる。

[0074] 2. イムノリポソーム

本発明のイムノリポソームは、前記ポリペプチド修飾リポソームに抗体が

結合してなるポリペプチド修飾リボソームと抗体との複合体である。

- [0075] 本発明のイムノリボソームで使用される抗体のアイソタイプについては、特に制限されず、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE等が挙げられる。これらの中でも、好ましくはIgGが挙げられる。
- [0076] 本発明で使用される抗体については、マウス抗体やラット抗体等の非ヒト抗体であってもよいが、本発明のイムノリボソームが医薬や体内診断薬として生体内に投与される場合であれば、ヒト体内での抗原性を低減させた抗体、具体的には、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体等であることが好ましい。
- [0077] 本発明で使用される抗体が結合する抗原については、本発明のイムノリボソームの分子標的に応じて適宜設定すればよく、例えば、本発明のイムノリボソームに抗癌剤を内包させている場合には、癌細胞に特異的に発現している抗原に対して結合できる抗体を使用すればよい。
- [0078] 本発明のイムノリボソームにおいて、抗体の結合量については、特に制限されないが、例えば、リボソームの構成脂質の総量100モル当たり、抗体が0.1～100ミリモル、好ましくは0.5～50ミリモル、より好ましくは1～10ミリモルが挙げられる。
- [0079] 本発明のイムノリボソームの多分散性指数（Poly Dispersity Index ; PDI）については、特に制限されないが、例えば、0.5以下、好ましくは0.01～0.3、より好ましくは0.01～0.2が挙げられる。本明細書において、イムノリボソームの多分散性指数は、動的光散乱法によりZeta-size r nano Zs（Malvern Panalytical社）を用いて測定される値である。
- [0080] また、本発明のイムノリボソームのゼータ電位としては、例えば、-50～-1 mV、好ましくは-50～-10 mV、より好ましくは-50～-25 mVが挙げられる。本明細書において、イムノリボソームのゼータ電位は、リン酸緩衝液（PBS(-)）中で、レーザー・ドップラー式電気泳動法にてZeta-sizer nano Zs（Malvern Panalytical社）を用いて測定される値である。
- [0081] 本発明のイムノリボソームの粒子径については、特に制限されないが、通

常は平均粒子径が30～1000nm、好ましくは50～500nmが挙げられる。本明細書において、イムノリポソームの平均粒子径は、動的光散乱法によりZeta-sizer nano Zs (Malvern Panalytical社) を用いて測定される値である。

[0082] 本発明のイムノリポソームは、アクティブターゲティング型リポソーム等として有用なDDS製剤として使用できる。従って、薬物（治療薬、体内診断薬等）を内包させた本発明のイムノリポソームを含む医薬組成物又は診断用組成物は、病変部や診断対象部に対して特異的に薬物を送達させることが可能になる。また、本発明のイムノリポソームは、細胞のある特定の受容体を介した細胞内取り込みのための研究用ツール、細胞内への薬物等の送達のための研究用ツール等としても有用である。更に、本発明のイムノリポソームにゲノム編集用材料を内包させることにより、簡便で効率的なゲノム編集が可能となる。

[0083] 本発明のイムノリポソームは、前記ポリペプチド修飾リポソームの懸濁液と、抗体とを混合することにより得ることができる。混合条件については、特に制限されないが、例えば、構成脂質の総濃度として1～100mM程度、好ましくは10～50mM程度のリポソームの懸濁液に対して、前記抗体を0.1～10 μ M程度、好ましくは0.5～5 μ M程度となるように添加して、4～40℃程度、好ましくは10～37℃程度で、0.05～36時間程度、好ましくは0.1～24時間程度、必要に応じて攪拌しながら保持すればよい。

実施例

[0084] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定して解釈されるものではない。

[0085] 1. リポソームの作製

クロロホルムに溶解した10mMの卵黄ホスファチジルコリン (EPC) 溶液1500 μ Lとクロロホルム／メタノール（クロロホルム：メタノールの容量比＝6：4）に溶解した10mMのジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)

）溶液1500 μ Lを試験管内に入れ、溶媒を揮発させ脂質薄膜（EPC：DPPGのモル比は1:1）を形成させた。次いで、リン酸緩衝液（PBS(-)）を1mL添加し、60℃で20分間静置攪拌して水和させた（脂質の最終濃度は30mM）。次いで、凍結融解を行った後に、60℃で3分間加温し、更にボルテックスによる攪拌を行った。凍結融解からボルテックスによる攪拌までの操作を合計3回行い、その後、エクストルーダーでサイズ調整を行い、リポソームの懸濁液を得た。

[0086] 得られたリポソームの懸濁液を用いて、リポソームの平均粒子径、多分散性指数（Poly Dispersity Index；PDI）、及びゼータ電位の測定を行った。なお、リポソームの平均粒子径とPDIは、動的光散乱法によってZeta-sizer nano Zs（Malvern Panalytical社）を用いて測定した。リポソームのゼータ電位は、レーザー・ドップラー式電気泳動法によってZeta-sizer nano Zs（Malvern Panalytical社）を用いて測定した。測定結果は、表1に示す通りであった。

[0087] [表1]

リポソーム懸濁液の分析結果	
平均粒子径	112.6 nm
PDI	0.059
ゼータ電位	-32.7 mV

[0088] 2. イムノグロブリン結合ドメインを有するポリペプチドの準備

2-1. 単ドメイン型ポリペプチドの準備（1）

プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインC（配列番号1）又はその改変体を1個有する単ドメイン型ポリペプチドを準備した。準備した単ドメイン型ポリペプチドのアミノ酸配列は、表2に示す通りである。なお、これらの単ドメイン型ポリペプチドは、遺伝子工学的手法を用いて作製されたものである。

[0089]

[表2]

単ドメイン型ポリペプチド

	配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して施した改変		配列番号
	40位、43位、46位、 47位、53位、及び54 位の改変	その他の改変	
C	—	—	配列番号 1
Cvar1-1	V40K	—	配列番号 37
Cvar1-2	E43K	—	配列番号 38
Cvar1-3	A46K	—	配列番号 39
Cvar1-4	D53K	—	配列番号 40
Cvar1-5	A54K	—	配列番号 41
Cvar1-6	A56K	—	配列番号 42
Cvar1-7	—	C 末端にリジン残基 3 つ (KKK) を付加	配列番号 43
Cvar1-8	V40K/E43K/A46K	—	配列番号 7
Cvar1-9	V40K/E43K/A46K/D53K	—	配列番号 8
Cvar1-10	V40K/E43K/A46K/D53K	A56K	配列番号 44
Cvar1-11	A46K/A54K	—	配列番号 45
Cvar1-12	A46K/A54K	A56K	配列番号 46
Cvar1-13	E43K/A46K/A54K	—	配列番号 9
Cvar1-14	E43K/A46K/D53K	A56K	配列番号 47
Cvar1-15	E43K/A46K/A54K	A56K	配列番号 48
Cvar1-16	V40K/E43K/A46K/D53K	K4A/K7T/K35R、及び C 末端 にリジン残基 3 つ (KKK) を 付加	配列番号 49
Cvar1-17	V40K/E43K/A46K/D53K	K4A/K7R/K35R	配列番号 50
Cvar1-18	V40K/E43K/A46K/D53K	K4A/K7T/K35R	配列番号 51
Cvar1-19	E43K/A46K/E47K/A54K	K4A/K7T/K35R/K42R/K49R	配列番号 52
Cvar1-20	E43K/E47K/A54K	—	配列番号 60

[0090] 2-2. 単ドメイン型ポリペプチドの準備 (2)

プロテイン A のイムノグロブリン結合ドメイン E (配列番号 2)、イムノグロブリン結合ドメイン B (配列番号 5)、又はその改変体を 1 個有する単ドメイン型ポリペプチドをそれぞれ準備した。準備した単ドメイン型ポリペプチドのアミノ酸配列は、表 3 に示す通りである。なお、これらの単ドメイ

ン型ポリペプチドは、遺伝子工学的手法を用いて作製されたものである。

[0091] [表3]

単ドメイン型ポリペプチド

	施した改変	配列番号
E	—	配列番号 2
Evar1-1	配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して N43K/E47K/S54K の変異を導入	配列番号 6 1
B	—	配列番号 5
Bvar1-1	配列番号 5 に示すアミノ酸配列に対して N43K/E47K/A54K の変異を導入	配列番号 6 4

[0092] 2－3．イムノグロブリン結合ドメインを2個有する複ドメイン型ポリペプチドの準備

イムノグロブリン結合ドメインを2個有する複ドメイン型ポリペプチドを準備した。準備した複ドメイン型ポリペプチドのアミノ酸配列は、表4に示す通りである。当該複ドメイン型ポリペプチド（Cvar2-1）、前記（A2）及び（A3）に該当するイムノグロブリン結合ドメインが2つ含まれている。なお、当該複ドメイン型ポリペプチドは、遺伝子工学的手法を用いて作製されたものである。

[0093] [表4]

イムノグロブリン結合ドメインを2個有する複ドメイン型ポリペプチド

	構造#	各ドメインのアミノ酸配列	配列番号
Cvar2-1	R1-R2	R1：配列番号 1 に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K/K58R）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン R2：配列番号 1 に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン	配列番号 5 3

左側がN末端、右側がC末端になるように、表示する順で各ドメイン（R1 及び R2）が連結されている。

[0094] 2－4．イムノグロブリン結合ドメインを4個有する複ドメイン型ポリペプチドの準備

イムノグロブリン結合ドメインCを4個有する複ドメイン型ポリペプチドを準備した。準備した複ドメイン型ポリペプチドのアミノ酸配列は、表5に

示す通りである。Cvar4-1及びCvar4-2の複ドメイン型ポリペプチドには、前記（A2）及び（A3）に該当するイムノグロブリン結合ドメインが2つ含まれている。Cvar4-3及びCvar4-4の複ドメイン型ポリペプチドには、前記（A2）及び（A3）に該当するイムノグロブリン結合ドメインが1つ含まれている。なお、これらの複ドメイン型ポリペプチドは、遺伝子工学的手法を用いて作製されたものである。

[0095] [表5]

イムノグロブリン結合ドメインを4個有する複ドメイン型ポリペプチド

	構造 [#]	各ドメインのアミノ酸配列	配列番号
Cvar4-1	R1-R2-R1-R3	R1：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/K58R）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン R2：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン R3：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K）が導入され、更にC末端に3つのリジン残基（KKK）が付加されているイムノグロブリン結合ドメイン	配列番号54
Cvar4-2	R1-R2-R1-R2	R1：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/K58R）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン R2：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン	配列番号55
Cvar4-3	R1-R1-R1-R2	R1：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7T/K35R/K42A/K49R/K50R/K58R）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン R2：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン	配列番号56
Cvar4-4	R1-R1-R1-R2	R1：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7T/K35R/K42A/K49R/K50R/K58R）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン R2：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/K42R/E43R/A46R/E47R/K49R/K50R/A54R）が導入され、更にC末端に2つのリジン残基（KK）が付加されているイムノグロブリン結合ドメイン	配列番号57

左側がN末端、右側がC末端になるように、表示する順で各ドメイン（R1、R2、及びR3）が連結されている。

[0096] 2-5. イムノグロブリン結合ドメインを6個有する複ドメイン型ポリペプチドの準備

イムノグロブリン結合ドメインCを6個有する複ドメイン型ポリペプチド

を準備した。準備した複ドメイン型ポリペプチドのアミノ酸配列は、表6に示す通りである。Cvar6-1及びCvar6-2の複ドメイン型ポリペプチドには、前記（A2）及び（A3）に該当するイムノグロブリン結合ドメインが1つ含まれている。なお、これらの複ドメイン型ポリペプチドは、遺伝子工学的手法を用いて作製されたものである。

[0097] [表6]

イムノグロブリン結合ドメインを6個有する複ドメイン型ポリペプチド

	構造 [#]	各ドメインのアミノ酸配列	配列番号
Cvar6-1	R1-R1-R1-R1-R1-R2	R1：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7T/K35R/K42A/K49R/K50R/K58R）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン R2：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン	配列番号58
Cvar6-2	R1-R1-R1-R1-R1-R2	R1：配列番号1に示すアミノ酸配列からなるイムノグロブリン結合ドメイン R2：配列番号1に示すアミノ酸配列において改変（K4A/K7R/K35R/V40K/E43K/A46K/D53K）が導入されているイムノグロブリン結合ドメイン	配列番号59

左側がN末端、右側がC末端になるように、表示する順で各ドメイン（R1、及びR2）が連結されている。

[0098] 2-6. プロテインAの準備

ワイルドタイプのプロテインA（wプロテインA、配列番号6の35～485位の領域、分子量45,000）及び5個の結合ドメインからなるプロテインA（rプロテインA、配列番号6の35～327位の領域、分子量33,000）を準備した。

[0099] 3. ポリペプチド修飾リポソームの作製及び評価（1）

分子間相互作用解析装置BLItz（モレキュラーデバイス社製）を用いてポリペプチドのリポソーム結合性をヒトIgGとの相互作用解析から評価した。

[0100] 先ず、ビオチン化キット（EZ-Link Biotinylation Kit、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、ヒトIgG（日本血液製剤機構製）をビオチン化した。0.1重量%BSA（ウシ血清アルブミン）含有PBSで0.1 mg/mLに調製したビオチン化IgGとストレプトアビジンセンサーチップを室温で60分間インキュベートした後に、0.1重量%BSA含有PBSで洗浄することにより、Ig

G固定化チップを作製した。別途、0.1重量%BSA含有PBSを用いて、前記で調製したリポソームの懸濁液を、脂質濃度換算で800 μ Mに希釈し、リポソーム液を調製した。得られたリポソーム液に表7に示す濃度になるように各ポリペプチドを加えて室温で1時間振とうした。その後、前記で作製したIgG固定化チップを、各ポリペプチドを加えたリポソーム液に接触させ、20秒間のシグナル変化量（nm）を測定し、リポソームの添加と未添加のときのシグナルの差分をリポソーム結合量として算出した。

[0101] 得られた結果を表7に示す。この結果から、プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインC（配列番号1）において40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている改変イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドは、アニオン性脂質を含むリポソームの表面に結合できることが確認された。とりわけ、プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインC（配列番号1）において43位、46位、及び53位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、40位、及び54位の中の1又は2個がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている改変イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドでは、アニオン性脂質を含むリポソームに対する結合能が高かった。一方、プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインC（配列番号1）において40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の1個又は2個のアミノ酸残基が置換されている改変イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドでは、アニオン性脂質を含むリポソームの表面に結合できていなかった。

[0102] 更に、プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインE（配列番号2）及びB（配列番号5）でも、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている場合は、アニオン性脂質を含むリポソームの表面に結合できることが確認された。

[0103] プロテインAの5つのイムノグロブリン結合ドメインでドメインCに対し

てドメインEが62.1%、ドメインBが91.4%の配列同一性を示す。このことを踏まえると、5個のドメインの中でもドメインCに対して最も配列同一性の低いドメインEにおいても、ドメインCと同様の改変により、アニオン性脂質を含むリポソームに対する結合能が認められたことから、ドメインCに対して配列同一性が72.4%のドメインDと79.3%のドメインAに対しても同様の改変を行うことにより、アニオン性脂質を含むリポソームに対する結合能を付与できるといえる。

[0104]

[表7]

	添加したポリペプチド		リポソーム結合量 (nm)
	種類	添加量 (nM)	
比較例 1	C	400	N. D.
比較例 2	Cvar1-1	400	N. D.
比較例 3	Cvar1-2	400	N. D.
比較例 4	Cvar1-3	400	N. D.
比較例 5	Cvar1-4	400	N. D.
比較例 6	Cvar1-5	400	N. D.
比較例 7	Cvar1-6	400	N. D.
比較例 8	Cvar1-7	400	N. D.
実施例 1	Cvar1-8	400	0. 278
実施例 2	Cvar1-9	400	0. 638
実施例 3	Cvar1-10	400	0. 736
比較例 9	Cvar1-11	400	N. D.
比較例 1 0	Cvar1-12	400	N. D.
実施例 4	Cvar1-13	400	0. 322
実施例 5	Cvar1-14	400	0. 779
実施例 6	Cvar1-15	400	0. 593
実施例 7	Cvar1-16	400	0. 693
実施例 8	Cvar1-17	400	0. 656
実施例 9	Cvar1-18	400	0. 761
実施例 1 0	Cvar1-19	400	0. 768
実施例 1 1	Cvar1-20	400	0. 569
実施例 1 2	Cvar2-1	200	0. 466
実施例 1 3	Cvar4-1	100	0. 447
実施例 1 4	Cvar4-2	100	0. 426
実施例 1 5	Cvar4-3	100	0. 401
実施例 1 6	Cvar4-4	100	0. 430
実施例 1 7	Cvar6-1	66. 7	0. 443
実施例 1 8	Cvar6-2	66. 7	0. 479
比較例 1 1	E	400	N. D.
実施例 1 9	Evar1-1	400	0. 098
比較例 1 2	B	400	N. D.
実施例 2 0	Bvar1-1	400	0. 306
比較例 1 3	r プロテイン A	80	N. D.

N. D. は、検出限界以下を示す。

[0105] 4. ポリペプチド修飾リポソームの作製及び評価 (2)

脂質濃度換算で30mMのリポソーム懸濁液0.2mL (脂質6 μ mol) に対して、表7に示す量のポリペプチドを添加して、37℃で24時間、攪拌しながらインキュベートした。その後、ポリペプチドを添加した懸濁液を、Sephacrose 4 Fast Flow (GE Healthcare社製) を充填したカラム (7×160mm) を用いたゲルろ過 (バッファー: PBS、流速0.2mL/min) に供し、10フラクション (1フラクション当たり1mL) に分画した。

[0106] 各フラクションをSDS-PAGEに供した後に、ゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色して染色バンドの濃さを (画像解析ソフトImage J (米国国立衛生研究所NIH <https://imagej.nih.gov/ij/>)) によって測定し、各フラクションに含まれるポリペプチド量を求めた。リポソームは、3番目と4番目で回収されるフラクションに溶出されることから (波長750nmでリポソーム濁度の測定により確認)、3番目と4番目のフラクションのポリペプチド量の合計値を全10個のフラクションのポリペプチド量の合計値で除して、ポリペプチド結合率 (%) を算出した。

[0107] 結果を表8に示す。この結果からも、プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインC (配列番号1) において40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている改変イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドは、構成脂質としてアニオン性脂質 (DPPG) を含むリポソームに結合できており、ポリペプチド修飾リポソームが形成されていることが確認された。一方、プロテインAでは、DPPGを含むリポソームに結合できていなかった。

[0108]

[表8]

	添加したポリペプチド		ポリペプチド結合率 (%)
	種類	量(nmol)	
実施例 7	Cvar1-16	30	25.9
実施例 8	Cvar1-17	30	21.3
実施例 1 2	Cvar2-1	20	76.3
実施例 1 3	Cvar4-1	7.5	100.0
実施例 1 4	Cvar4-2	7.5	66.4
実施例 1 5	Cvar4-3	7.5	19.8
実施例 1 7	Cvar6-1	10	15.2
比較例 1 3	r プロテインA	10	0.0
比較例 1 4	w プロテインA	10	0.0

[0109] 5. イムノリポソームの作製及び評価

前記「4. ポリペプチド修飾リポソームの作製及び評価(2)」において評価したポリペプチド修飾リポソーム(実施例7、8、12、及び13)を用いて、同懸濁液(脂質濃度換算で30mM)に表9に示す量のFITC標識IgG(製品名: IgG-FITC from human serum、SIGMA-ALDRICH社製)をそれぞれ添加し、37℃で1時間、攪拌しながらインキュベートした。

[0110] FITC標識IgGを添加した懸濁液を用いて、前記「1. リポソームの作製」の欄に示す方法で、リポソームの平均粒子径、PDI、及びゼータ電位の測定を行った。

[0111] また、FITC標識IgGを添加した懸濁液を、Sephacrose 4 Fast Flow (GE Healthcare社製)を充填したカラム(7×160mm)を用いたゲルろ過(バッファー: PBS、流速0.2mL/min)に供し、10フラクション(1フラクション当たり1mL)に分画した。得られた各フラクションの蛍光強度(Ex:488nm、Em:535nm)を測定し、各フラクションに含まれるFITC標識IgG量を求めた。リポソームは、3番目と4番目で回収されるフラクションに溶出されることから(750nmの吸光度の測定により確認)、3番目と4番目のフラクションのポリペプチド量の合計値を全10個のフラクションのポリペプチド量の合計値で除して、IgG結合率(%)を算出した。

[0112] また、比較のため、ポリペプチド修飾及びFITC標識IgGの添加を行っていないリポソームの懸濁液についても、同様に、リポソームの平均粒子径、PDI、ゼータ電位、及びIgG結合率（％）の測定を行った。

[0113] 平均粒子径、PDI、ゼータ電位、及びIgG結合率（％）の結果を表9に示し、実施例8、13、及び14について各フラクションの蛍光強度を測定した結果を図1に示す。この結果、プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインC（配列番号1）において40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている改変イムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチドで修飾されたりポソームは、IgGを結合でき、イムノリポソームを形成できることが確認された。

[0114] [表9]

	製造条件		リポソームの分析結果			
	使用したポリペプチド修飾リポソームの懸濁液	FITC 標識 IgG の添加量 (μg)	平均粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	IgG 結合率 (%)
比較例13	なし	なし	112.6	0.059	-32.7	0.0
実施例7	Cvar1-16 修飾リポソーム	62.4	138.0	0.142	-26.3	62.5
実施例8	Cvar1-17 修飾リポソーム	62.4	126.8	0.191	-22.5	82.2
実施例13	Cvar4-1 修飾リポソーム	28.0	120.3	0.148	-31.7	86.9
実施例14	Cvar4-2 修飾リポソーム	28.0	124.1	0.173	-29.4	81.2

請求の範囲

[請求項1]

構成脂質としてアニオン性脂質を含むリポソームの表面に、以下の
(A 1) ~ (A 3)、(B 1) ~ (B 3)、(C 1) ~ (C 3)、
(D 1) ~ (D 3)、及び(E 1) ~ (E 3) よりなる群から選択される
少なくとも1種のイムノグロブリン結合ドメインを含むポリペプチ
ドが結合している、ポリペプチド修飾リポソーム。

(A 1) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、40位、43位、
46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸
残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ
酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(B 1) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、40位、43位、
46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸
残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ
酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(C 1) 配列番号3に示すアミノ酸配列において、40位、43位、
46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸
残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ
酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(D 1) 配列番号4に示すアミノ酸配列において、40位、43位、
46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸
残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ
酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(E 1) 配列番号5に示すアミノ酸配列において、40位、43位、
46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸
残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されているアミノ
酸配列を有するイムノグロブリン結合ドメイン。

(A 2) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、40位、43位、
46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸

残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（A 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（B 2）配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（B 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（C 2）配列番号 3 に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（C 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（D 2）配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に

当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（D1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（E2）配列番号5に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、更に当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基以外で、1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入又は付加されてなるアミノ酸配列を有し、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（E1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（A3）配列番号1に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（A1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（B3）配列番号2に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号2に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び

／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（B1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（C3）配列番号3に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号3に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（C1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（D3）配列番号4に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号4に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（D1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

（E3）配列番号5に示すアミノ酸配列において、40位、43位、46位、47位、53位、及び54位中の少なくとも3つのアミノ酸残基がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されており、配列番号5に示すアミノ酸配列に対して、当該置換されたリジン残基及び／又はアルギニン残基を除いた領域の配列同一性が80%以上であり

、

且つ、導入されたリジン残基及び／又はアルギニン残基への置換が同一である（E 1）のイムノグロブリン結合ドメインに比べて、抗体に対する結合能が同等であるイムノグロブリン結合ドメイン。

[請求項2] 前記ポリペプチドが、配列番号1～5のいずれかに示すアミノ酸配列における43位、及び46位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、且つ40位、47位、53位、及び54位の中のいずれか少なくとも1つがリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている、請求項1に記載のポリペプチド修飾リポソーム。

[請求項3] 前記ポリペプチドが、配列番号1～5のいずれかに示すアミノ酸配列における43位、46位、及び53位がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換され、40位、及び54位の中の1又は2個がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている、請求項1又は2に記載のポリペプチド修飾リポソーム。

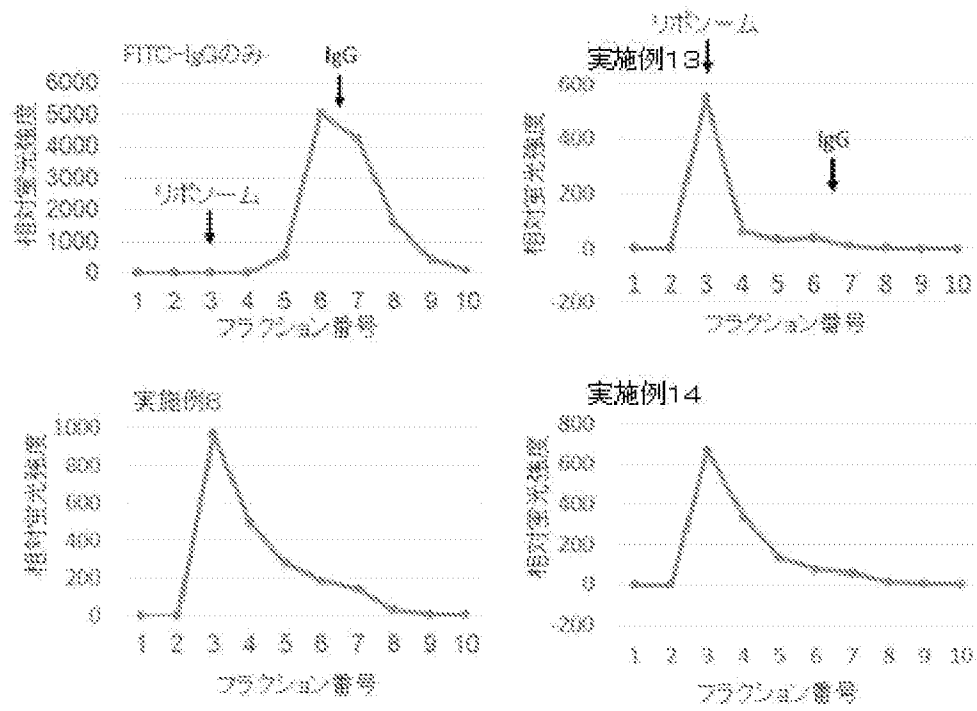
[請求項4] 前記ポリペプチドが、配列番号1～5のいずれかに示すアミノ酸配列における42位、49位、50位、及び56位の内、少なくとも1個がリジン残基及び／又はアルギニン残基に置換されている、請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

[請求項5] 前記ポリペプチドが、（A1）～（A3）、（B1）～（B3）、（C1）～（C3）、（D1）～（D3）、及び（E1）～（E3）よりなる群から選択される1種のイムノグロブリン結合ドメインを有する単ドメイン型ポリペプチドである、請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

[請求項6] 前記ポリペプチドが、（A1）～（A3）、（B1）～（B3）、（C1）～（C3）、（D1）～（D3）、及び（E1）～（E3）よりなる群から選択される少なくとも1種のイムノグロブリン結合ドメインを有する複ドメイン型ポリペプチドである、請求項1～5のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。

- [請求項7] 前記ポリペプチドが、(A1)～(A3)よりなる群から選択される少なくとも1種のイムノグロブリン結合ドメインを有する、請求項1～6のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。
- [請求項8] 前記アニオン性脂質が、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、及びジステロイルホスファチジルグリセロールよりなる群から選択される少なくとも1種のホスファチジルグリセロールである、請求項1～7のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。
- [請求項9] リポソームの構成脂質として、更に中性脂質を含む、請求項1～8のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。
- [請求項10] 前記アニオン性脂質：前記中性脂質のモル比が、1：99～99：1である、請求項1～9のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソーム。
- [請求項11] 請求項1～10のいずれかに記載のポリペプチド修飾リポソームに抗体が結合している、イムノリポソーム。
- [請求項12] 請求項11に記載のイムノリポソームを含む、医薬組成物。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/012364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61P43/00 (2006.01) i, C07K14/31 (2006.01) i, C07K16/00 (2006.01) i, C07K17/02 (2006.01) i, A61K47/68 (2017.01) i, A61K47/69 (2017.01) i, C12N15/31 (2006.01) i

FI: C12N15/31, A61K47/68, A61K47/69, A61P43/00111, C07K14/31, C07K16/00, C07K17/02ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61P43/00, C07K14/31, C07K16/00, C07K17/02, A61K47/68, A61K47/69, C12N15/31

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-252368 A (PROTENOV CO., LTD.) 04.10.2007 (2007-10-04), claims	1-12
A	JP 60-138464 A (DENKA SEIKEN CO., LTD.) 23.07.1985 (1985-07-23), claims	1-12
A	JP 2010-215509 A (KATAYAMA KAGAKU KOGYO KK) 30.09.2010 (2010-09-30), claims	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
12.05.2020

Date of mailing of the international search report
26.05.2020

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/012364

JP 2007-252368 A 04.10.2007 US 2010/0286373 A1
claims
WO 2007/097361 A1
EP 1992692 A1

JP 60-138464 A 23.07.1985 (Family: none)

JP 2010-215509 A 30.09.2010 WO 2009/008489 A1
claims

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61P 43/00(2006.01)i; C07K 14/31(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; C07K 17/02(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/69(2017.01)i; C12N 15/31(2006.01)i FI: C12N15/31; A61K47/68; A61K47/69; A61P43/00 111; C07K14/31; C07K16/00; C07K17/02 ZNA														
B. 調査を行った分野														
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61P43/00; C07K14/31; C07K16/00; C07K17/02; A61K47/68; A61K47/69; C12N15/31														
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 <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 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020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 - 2020年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年													
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)														
C. 関連すると認められる文献														
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												
A	JP 2007-252368 A（プロテノバ株式会社）04.10.2007（2007 - 10 - 04） 特許請求の範囲	1-12												
A	JP 60-138464 A（デンカ生研株式会社）23.07.1985（1985 - 07 - 23） 特許請求の範囲	1-12												
A	JP 2010-215509 A（片山化学工業株式会社）30.09.2010（2010 - 09 - 30） 特許請求の範囲	1-12												
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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	“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	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“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	
* 引用文献のカテゴリー	“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													
“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	“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													
“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	“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													
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献														
“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														
国際調査を完了した日 12.05.2020		国際調査報告の発送日 26.05.2020												
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 小金井 悟 4B 3961 電話番号 03-3581-1101 内線 3488												

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:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/012364

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2007-252368	A	04.10.2007	US 2010/0286373 A1 claims WO 2007/097361 A1 EP 1992692 A1	
JP	60-138464	A	23.07.1985	(ファミリーなし)	
JP	2010-215509	A	30.09.2010	WO 2009/008489 A1 請求の範囲	