(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
2021年10月7日(07.10.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/199764 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/864* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/006113

(22) 国際出願日： 2021年2月18日(18.02.2021)

(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 2020-062936 2020年3月31日(31.03.2020) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (**KANEKA CORPORATION**) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目３番１８号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 前田 博文 (**MAEDA, Hirofumi**); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 佐々木 隆英(**SASAKI, Takahide**); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 北野 光昭(**KITANO, Mitsuaki**); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 廣田 浩一, 外 (**HIROTA, Koichi** et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木１－２４－１０ ＴＳビル４階 山の手合同国際特許事務所 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, 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, 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.

(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：
— 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)）

WO 2021/199764 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PREPARING MODIFIED VECTOR AND METHOD FOR MODIFYING VECTOR

(54) 発明の名称： 修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法

(57) **Abstract:** A method for preparing a modified vector and a method for modifying a vector, characterized by including: a step for bonding, to a functional group in a vector, a functional group (A) capable of bonding with said functional group in a linker compound having the functional group (A) and a functional group (B) capable of bonding with a ligand compound; and a step for bonding, to the functional group (B), a functional group (C) capable of bonding with said functional group (B) in a ligand compound having the functional group (C).

(57) 要約：ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、を含むことを特徴とする、修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法である。

明　細　書

発明の名称 ： 修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法

技術分野

[0001] 本発明は、修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子治療には、ベクターが広く使われているが、ベクターの標的組織への移行性が十分ではないことなどが課題である。

この課題を解決する方法として、ベクターを構成するタンパク質の改変などが行われているが、薬効を示すための十分な効果が得られていない。

[0003] そこで、近年、ベクターを化学修飾し、ベクターに機能を高めるためのリガンドを導入する方法が開発されてきた（非特許文献１など）。

しかしながら、この方法では、ベクター上の官能基と結合させる部位と機能を高めるためのリガンドとが一体型の試薬が使用されているため、入手できる試薬には制限があり、有効な方法とは言い難い。

[0004] また他の方法として、２ステップで化学修飾する方法が報告されている（特許文献１など）。

しかしながら、この方法は、システイン残基を利用する方法であり、化学修飾前に還元処理でシステイン残基を遊離させる必要があるため、簡便な方法とは言い難い。またこの還元処理によって、ベクターが分解している可能性がある。

[0005] 更に他の方法としては、ベクターを改変してシステイン残基を変異導入した後に化学修飾する方法が報告されているが（非特許文献２など）、変異導入の手間がかかるため、簡便な方法とは言い難い。

[0006] したがって、ベクターを改変や前処理することなく、様々なリガンドを簡便に導入することができる、修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法は全く知られておらず、これらの提供が強く求められている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：欧州特許出願公開第３４６１８３６号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　Ｂｉｏｅｎｇ．　２００５　９２：２４－３４

非特許文献2：ｓｍａｌｌ　２０１３　９　３：４２１－４２９

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、ベクターを改変や前処理することなく、様々なリガンドを簡便に導入することができる、修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法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

[0010] 本発明者らが、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、を含む方法により、ベクターを改変や前処理することなく、様々なリガンドを簡便に導入することができる、修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法が提供できることを知見した。

[0011] 本発明は、本発明者らによる前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては以下の通りである。即ち、

＜１＞　ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物におけ

る、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、を含むことを特徴とする、修飾ベクターの作製方法である。

＜２＞　ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、を含むことを特徴とする、ベクターの修飾方法である。

発明の効果

[0012]　本発明によると、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、ベクターを改変や前処理することなく、様々なリガンドを簡便に導入することができる、修飾ベクターの作製方法、及びベクターの修飾方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、実施例１における第１の工程の後のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。

[図2]図２は、実施例１における第２の工程の後のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。

[図3]図３は、実施例２及び実施例３における第１の工程の後と第２の工程の後のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。

[図4]図４は、実施例４における第１の工程の後と第２の工程の後のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。

[図5]図５は、実施例４における第１の工程の後の陽イオン交換クロマトグラフィーの精製チャートを示す図である。

[図6]図６は、実施例４における第２の工程の後の陽イオン交換クロマトグラフィーの精製チャートを示す図である。

発明を実施するための形態

[0014]　（修飾ベクターの作製方法）

前記修飾ベクターの作製方法は、ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる第１の工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる第２の工程と、を含み、さらにその他の工程を有することができる。

[0015] 前記第１の工程と、前記第２の工程を行う順番としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、リンカー化合物に結合可能な多様なリガンドを簡便にベクターに導入することができ、リガンドの選択肢が広がる点から、前記第１の工程の後に、前記第２の工程を行うことが好ましい。

[0016] ＜第１の工程＞

前記第１の工程は、ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程である。

[0017] －ベクター－

前記ベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、人工染色体ベクター、コスミドベクター、フォスミドベクターなどが挙げられる。

これらの中でも、遺伝子治療に広く使用されている点で、ウイルスベクターが好ましい。

[0018] 前記ウイルスベクターとして用いられるウイルスとしては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、パピローマウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルスなどが挙げられる。

これらの中でも、病原性が低い点で、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）が好ましい。

[0019] 前記ウイルスベクターとして用いられるＡＡＶの血清型としてはＡＡＶ１（１型ＡＡＶ）、ＡＡＶ２（２型ＡＡＶ）、ＡＡＶ３（３型ＡＡＶ）、ＡＡＶ４（４型ＡＡＶ）、ＡＡＶ５（５型ＡＡＶ）、ＡＡＶ６（６型ＡＡＶ）、ＡＡＶ７（７型ＡＡＶ）、ＡＡＶ８（８型ＡＡＶ）、ＡＡＶ９（９型ＡＡＶ）、ＡＡＶ１０（１０型ＡＡＶ）、ＡＡＶ１１（１１型ＡＡＶ）、ＡＡＶ１２（１２型ＡＡＶ）、ＡＡＶ１３（１３型ＡＡＶ）、ＡＡＶ１４（１４型ＡＡＶ）、及びこれらの改変体などが挙げられるが、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記改変体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、標的細胞の組織特異性（感染する細胞の指向性）向上などのため、遺伝子組み換えにより（野生型ＡＡＶを）改変させたＡＡＶなどが挙げられる。

[0020] －－ベクターにおける官能基－－

前記ベクターにおける官能基としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アミノ基、グアニジノ基、水酸基、カルボキシル基、及びインドール基などが挙げられる。これらの中でも、アミノ基が好ましい。

前記ベクターにおける官能基は、リジン残基、アルギニン残基、チロシン残基、セリン残基、スレオニン残基、トリプトファン残基における官能基であってもよく、これらの中でも、リジン残基における官能基が好ましい。

前記ベクターが、前記アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）である場合は、前記ベクターにおける官能基が、前記アデノ随伴ウイルスのカプシドを構成する官能基であることが好ましい。

[0021] 前記カプシドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３などから構成される。

[0022] －リンカー化合物－

前記リンカー化合物は、前記ベクターにおける官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有し、さらに連結部（Ｄ）を有することができる。

[0023] －－ベクターにおける官能基と結合可能な官能基（Ａ）－－

前記ベクターにおける官能基と結合可能な官能基（Ａ）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、スクシンイミジル基、イソシアネート基、アミノメトキシエチル基、シクロヘキセンスルホンアミド基、カルボニル基、アルデヒド基、不飽和カルボニル基、ジアゾニウムテレフタレート、ハロゲン原子、マレイミジル基、フタルイミジル基、ジアゾベンゼン基、不飽和ニトリル基、アレニル基、脱離基、などが挙げられる。

[0024] 前記脱離基としては、ＯＳＯ２Ｒ’若しくはＯＰ（Ｏ）（ＯＲ’）$_2$（Ｒ’は炭素数１～６のアルキル基；炭素数４～１０のアリール基を表し、ここでの炭素数１～６のアルキル基としては直鎖状又は分岐状のアルキル基、中でもメチル基；エチル基；（ｎ－，ｉ－）プロピル基；（ｎ－，ｉ－，ｔ－）ブチル基が好適な例として挙げられ、また炭素数４～１０のアリール基とは、例えばフェニル基；（２－，３－，４－）トリル基；（１－，２－）ナフチル基；２－ピロリル基；２－フリル基；３－チエニル基；２－ピリジル基の５若しくは６員の単環若しくは縮合環からなる芳香族炭化水素基若しくは複素環基をいい、例えばメタンスルホニル基、トルエンスルホニル基、が挙げられる。

これらの中でも、反応性の点で、スクシンイミジル基が好ましい。

前記官能基（Ａ）は、前記リンカー化合物１分子あたり、１つであってもよく、複数であってもよい。

[0025] －－リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）－－

前記リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、カルボニル基、ホスフィン基、テトラジン基、ヒドラジン基、及びヒドロキシルアミン基などが挙げられる。

これらの中でも、反応性の点で、アルキニル基、又はアジド基が好ましく、アルキニル基がより好ましい。

前記官能基（Ｂ）は、前記リンカー化合物１分子あたり、１つであってもよく、複数であってもよい。複数の場合は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、アジド基及びアルキニル基などが挙げられる。

[0026] －－連結部（Ｄ）－－

前記連結部（Ｄ）は、前記官能基（Ａ）と前記官能基（Ｂ）とを連結することができ、前記官能基（Ａ）、前記官能基（Ｂ）、及び前記リガンド化合物と反応しない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0027] 前記連結部（Ｄ）は、直鎖構造であってもよいし、分岐構造であってもよいが、前記直鎖構造が好ましい。

前記連結部（Ｄ）は、親水性であってもよいし、疎水性であってもよいし、両親媒性であってもよいが、前記親水性が好ましい。

前記連結部（Ｄ）の長さは、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記連結部（Ｄ）を構成する炭素原子の数などによって調節することができる。

[0028] 前記連結部（Ｄ）の化学構造としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アルキレン基を有する構造、カルボニル基を有する構造、エーテル結合を有する構造、カルボン酸エステル結合を有する構造、これらの組合せなどが挙げられる。

前記エーテル結合を有する構造は、鎖状（例えばエチレングリコールなどの直鎖、例えばプロピレングリコールなどの分岐鎖）であってもよいし、環状（テトラヒドロピラン、テトラヒドロフラン、１，４－ジオキサンなどを含む構造）あってもよい。

[0029] 前記連結部（Ｄ）の具体例としては、アルキレン基、アルキレンオキシ基、ポリ（アルキレンオキシ）基、などが挙げられる。

前記アルキレン基としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、炭素数１～２０のアルキレン基が好ましく、炭素

数１～１０のアルキレン基がより好ましく、炭素数１～４のアルキレン基がさらに好ましい。

前記アルキレンオキシ基としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、炭素数１～１００のアルキレンオキシ基が好ましく、炭素数４～１００のアルキレンオキシ基がより好ましく、炭素数５～５０のアルキレンオキシ基がさらに好ましい。

前記ポリ（アルキレンオキシ）基としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、炭素数１～１００のポリ（アルキレンオキシ）基が好ましく、炭素数５～５０のポリ（アルキレンオキシ）基がより好ましく、炭素数６～４０のポリ（アルキレンオキシ）基がさらに好ましい。

前記ポリ（アルキレンオキシ）基におけるアルキレンオキサイド単位としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、エチレンオキサイド、プロピレンオキサイドが好ましく、エチレンオキサイドがより好ましい。

[0030] 前記リンカー化合物の具体例としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ＤＩＢＥＮＺ［ｂ，ｆ］ａｚｏｃｉｎｅ－５（６Ｈ）－ｈｅｘａｎｏｉｃ ａｃｉｄ， １１，１２－ｄｉｄｅｈｙｄｒｏ－ε－ｏｘｏ－，２，５－ｄｉｏｘｏ－３－ｓｕｌｆｏ－１－ｐｙｒｒｏｌｉｄｉｎｙｌ ｅｓｔｅｒ， ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ、４，７，１０，１３，１６－Ｐｅｎｔａｏｘａ－２０－ａｚａｔｒｉｃｏｓａｎｏｉｃ ａｃｉｄ， ２３－（１１，１２－ｄｉｄｅｈｙｄｒｏｄｉｂｅｎｚ［ｂ，ｆ］ａｚｏｃｉｎ－５（６Ｈ）－ｙｌ）－１９，２３－ｄｉｏｘｏ－，２，５－ｄｉｏｘｏ－１－ｐｙｒｒｏｌｉｄｉｎｙｌ ｅｓｔｅｒなどが挙げられる。

[0031] －ベクターにおける官能基への前記官能基（Ａ）の結合－

前記ベクターにおける官能基への前記官能基（Ａ）の結合としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記リンカー

化合物と前記ベクターとを含む溶液を混合し反応させる方法、前記リガンド化合物が結合した前記リンカー化合物と前記ベクターとを含む溶液を混合し反応させる方法などが挙げられる。これらの方法の後、グリシン溶液を加えて、さらに反応させる方法であってもよい。

[0032] 前記溶液の溶媒としては、水系溶媒でも有機溶媒でもよく、水系溶媒と有機溶媒との混合溶媒でもよい。

前記水系溶媒としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ＨＥＰＥＳ（４－（２－ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌ）－１－ｐｉｐｅｒａｚｉｎｅｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ ａｃｉｄ）バッファー、リン酸バッファー、蒸留水などが挙げられる。

前記ＨＥＰＥＳバッファー、又はリン酸バッファーのｐＨとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、ｐＨ４以上ｐＨ１２以下が好ましく、ｐＨ５以上ｐＨ１１以下がより好ましく、ｐＨ６以上ｐＨ１０以下がさらに好ましく、ｐＨ７以上ｐＨ９以下が特に好ましい。

前記有機溶媒としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、水と相溶性であることが好ましい。例えば、アセトニトリル等のニトリル系溶媒、メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール性溶媒、テトラヒドロフラン、１，４－ジオキサン等のエーテル系溶媒、ジメチルスルホキシド等の硫黄系溶媒、ジメチルホルムアミド等のアミド系溶媒を挙げることができる。

前記水系溶媒と前記有機溶媒の混合比としては、特に制限はなく、不溶性の成分が顕著に生じなければ良い。

[0033] 前記リンカー化合物の終濃度（グリシン溶液添加前）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、０．１μＭ以上２００ｍＭ以下が好ましく、０．５μＭ以上１００ｍＭ以下がより好ましく、５μＭ以上８０ｍＭ以下がさらに好ましく、１０μＭ以上５０ｍＭ以下が特に好ましい。

[0034] 前記ベクターの力価としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択す

ることができるが、１×１０^{4}ｖｇ／μＬ以上１×１０^{100}ｖｇ／μＬ以下が好ましく、１×１０^{5}ｖｇ／μＬ以上５×１０^{80}ｖｇ／μＬ以下がより好ましく、１×１０^{6}ｖｇ／μＬ以上１×１０^{50}ｖｇ／μＬ以下がさらに好ましい。

[0035] 前記グリシン溶液の濃度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、０．１μMM以上２０M以下が好ましく、０．５μM以上１０M以下がより好ましく、５μM以上５M以下がさらに好ましく、１０μM以上４M以下が特に好ましい。

[0036] 前記反応の温度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、０℃以上７０℃以下が好ましく、４０℃以下がより好ましい。

前記グリシン溶液添加前の反応の時間としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、５分間以上１２０時間以下が好ましく、３０分間以上９６時間以下がより好ましく、１時間以上７２時間以下がさらに好ましい。

前記グリシン溶液添加後の反応の時間としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、５分間以上１２０時間以下が好ましく、３０分間以上９６時間以下がより好ましく、１時間以上７２時間以下がさらに好ましい。

[0037] ＜第２の工程＞

前記第２の工程は、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程である。

[0038] －リガンド化合物－

前記リガンド化合物は、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）と、リガンド部を有し、さらに連結部（Ｅ）を有することができる。

前記連結部（Ｅ）は、前記官能基（Ｃ）と前記リガンド部とを連結することができ、前記リンカー化合物、及び前記官能基（Ｃ）、リガンド部と反応しない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記連結部（Ｅ）の構造、及び具体例は、前述のリンカー化合物における連結部（Ｄ）と同様である。

前記リガンド化合物におけるリガンド部とは、生物における組織や細胞やタンパク質等と親和性等を有する、あるいは親和性を利用してラベル化する物質であり、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記ラベル化とは、ベクターに膜透過性・標的細胞特異性などの機能を付加することであり、前記機能を付加するとは、修飾することを意味する。広義の意味ではリンカーの導入もその他の機能物質を導入しやすくなる足場機能を付加している点で修飾しているといえる。

[0039] 前記リガンド部としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、糖化合物、ペプチド、低分子化合物、免疫グロブリンなどが挙げられる。

これらは、前記リガンド化合物１分子あたり、１つであってもよく、複数であってもよい。複数の場合は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、糖化合物及びペプチドなどが挙げられる。

[0040] 前記糖化合物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、単糖類、オリゴ糖類、多糖類を挙げることができ、ここで言う単糖は不斉炭素が鏡像異性体であってもよく、オリゴ糖類とは２～６分子の単糖からなり、多糖類とは単糖が直鎖又は枝分かれで繋がったポリマーであり、入手性から単糖類、二糖類、三糖類が好ましい。また、前記糖化合物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アロース、アラビノース、エリスロース、フルクトース、フコース、ガラクトース、ガラクトサミン、グルコース、グルコサミン、グロース、グルクロン酸、イドース、イノシトール、リキソース、マンノース、マンノサミン、プシコース、ラムノース、リボース、シアル酸、ソルボース、タガトース、タロース、キシロース、ジサッカロイド、トリサッカロイド、テトラサッカロイド、オリゴサッカロイド、シクロデキストリン、２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ　２－ａｃｅｔａｍｉｄｏ－２－ｄｅｏｘｙ－β－Ｄ－ｇａｌａｃ

ｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ、２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ　β－Ｄ－Ｇｌｕｃｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ、非天然型糖などが挙げられ、さらに、これらにポリエチレングリコール基や保護基が付加されたものであってもよい。

[0041] 前記保護基とは、糖化合物に含まれる水酸基やアミノ基を保護する置換基であり、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、水酸基の保護基としてはアシル基やカーボネート基やカルバメート基や環状のアセタール基やエーテル基などを挙げることができる。前記アシル基としては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アセチル基、フェニルアセチル基、ハロゲン化アセチル基、メトキシアセチル基、フェノキシアセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基などを挙げることができる。前記カーボネート基としては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ｔ－ブチルカーボネート基、ベンジルカーボネート基などを挙げることができる。前記カルバメート基としては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、フェニルカルバメート基などを挙げることができる。前記環状のアセタール基としては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、メチレンアセタール基、エチリデンアセタール基、アセトナイド基、ベンジリデンアセタール基などが挙げられる。前記エーテル基としては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ベンジルエーテル基などを挙げることができる。

例えば、アミノ基の保護基としてはアシル基やカルバメート基などを挙げることができる。前記アシル基としては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アセチル基、フェニルアセチル基、ハロゲン化アセチル基、メトキシアセチル基、フェノキシアセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基などを挙げることができる。前記カルバメート基としては特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、９－フルオレニルメチルカルバメート基、フェニルカルバメート基、ｔ－ブチルカルバメート基などを挙げることができる。

これらの保護基の中で、アセチル基が低毒性や入手性から好ましい。

[0042] 前記ペプチド化合物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ＬＲＶＲＬＡＳＨＬＲＫＬＲＫＲＬＬＲＤＡＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫ（配列番号１）、ＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＫＬＲＶＲＬＡＳＨＬＲＫＬＲＫＲＬＬＲＤＡ（配列番号２）、ＬＲＶＲＬＡＳＨＬＲＫＬＲＫＲＬＬＲＤＡ（配列番号３）、ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱ（配列番号４）、ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫ（配列番号５）、ＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（配列番号６）、ＧＡＬＦＬＧＦＬＧＡＡＧＳＴＭＧＡＷＳＱＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号７）、ＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号８）、ＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号９）、ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号１０）、ＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨ（配列番号１１）、ＬＬＩＩＬＲＲＲＩＲＫＱＡＨＡＨＳＫ（配列番号１２）、ＫＬＡＬＫＬＡＬＫＡＬＫＡＡＬＫＡ（配列番号１３）、ＬＬＩＩＬＲＲＲＩＲＫＱＡＨＡＨＳＫ（配列番号１４）、ＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（配列番号１５）などが挙げられ、環状の構造を有していてもよく、さらに、各アミノ酸がＤ体でもよく、非天然アミノ酸に置換及び／又は非天然アミノ酸が挿入されていても良く、塩を含んでいても良く、これらにポリエレングリコール基が付加されたものであってもよい。

[0043] 前記低分子化合物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、生体内で薬効を示す物質で有ればよく、例えば、パクリタキセル（Ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）や低分子化抗体などを挙げることができる。生体内で物質との親和性を評価するための物質であっても良く、例えば、ビオチンや色素を挙げることができる。さらに、これらにポリエレングリコール基が付加されたものであってもよい。

前記色素としては、特に制限はなく、例えば、フルオレセイン、ＨｉＬｙｔｅ Ｆｌｕｏｒ　５５５、ＨｉＬｙｔｅ Ｆｌｕｏｒ ６４７、ＨｉＬｙｔｅ Ｆｌｕｏｒ ７５０、ＤｙＬｉｇｈｔ　３５０、ＤｙＬｉｇｈｔ　４０５、ＤｙＬｉｇｈｔ　５５０、ＤｙＬｉｇｈｔ　６３３、ＤｙＬｉｇｈｔ　７５

５、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ３５０、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ４０５、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ５３２、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ５４６、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ５５５、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ５６８、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ５９４、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ６４７、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ６８０、Ａｌｅｚａ Ｆｌｕｏｒ ７５０、Ｃｙ ５、Ｃｙ ３などを挙げることができ、さらに、これらにポリエレングリコール基が付加されたものであってもよい。

前記免疫グロブリンとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥなどが挙げられる。

[0044] 前記リガンド化合物の重量平均分子量の上限値としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、５００，０００以下が好ましく、３００，０００以下がより好ましく、２００，０００以下がさらに好ましく、１００，０００以下が特に好ましい。

前記リガンド化合物の重量平均分子量の下限値としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、２００以上が好ましい。

[0045] 前記リガンド化合物の具体例としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ ２－ａｃｅｔａｍｉｄｏ－２－ｄｅｏｘｙ－β－Ｄ－ｇａｌａｃｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ、２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ β－Ｄ－Ｇｌｕｃｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅなどが挙げられる。

[0046] －－官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）－－

前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記官能基（Ｂ）がアジド基の場合はホスフィン基、又はアルキニル基が好ましく、前記官能基（Ｂ）がアルキニル基の場合はアジド基が好ましく、前記官能基（Ｂ）がアルケニル基の場合はテトラジン基、又はアルケニル基が好ましく、前記官能基（Ｂ）がカルボニル基の場合はヒドラジン基、又はヒドロキシルアミン基が好ましく

、前記官能基（Ｂ）がホスフィン基の場合はアジド基が好ましく、前記官能基（Ｂ）がテトラジン基の場合はアルケニル基が好ましく、前記官能基（Ｂ）がヒドラジン基の場合はカルボニル基が好ましく、前記官能基（Ｂ）がヒドロキシルアミン基の場合はカルボニル基好ましい。

前記官能基（Ｃ）は、前記リガンド化合物１分子あたり、１つであってもよく、複数であってもよい。複数の場合は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アジド基及びアルキニル基などが挙げられる。

[0047] －官能基（Ｂ）への官能基（Ｃ）の結合：－

前記官能基（Ｂ）への官能基（Ｃ）の結合としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記ベクターにおける官能基への前記官能基（Ａ）の結合で得られた反応物と前記リガンド化合物とを含む溶液を混合し、反応させる方法、前記リンカー化合物と前記リガンド化合物とを含む溶液を混合し、反応させる方法などが挙げられる。

[0048] 前記溶液の溶媒としては、水系溶媒でも有機溶媒でもよく、水系溶媒と有機溶媒との混合溶媒でもよい。

前記水系溶媒としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ＨＥＰＥＳバッファー、リン酸バッファー、蒸留水などが挙げられる。

前記ＨＥＰＥＳバッファー、又はリン酸バッファーのｐＨとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、ｐＨ１以上ｐＨ１２以下が好ましく、ｐＨ２以上ｐＨ１２以下がより好ましく、ｐＨ３以上ｐＨ１１以下がさらに好ましく、ｐＨ４以上ｐＨ１０以下が特に好ましい。

前記有機溶媒としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、水と相溶性であることが好ましい。例えば、アセトニトリル等のニトリル系溶媒、メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール性溶媒、テトラヒドロフラン、１，４ジオキサン等のエーテル系溶媒、ジメチルスルホキシド等の硫黄系溶媒、ジメチルホルムアミド等のアミド系溶媒

を挙げることができる。

前記水系溶媒と前記有機溶媒の混合比としては、特に制限はなく、不溶性の成分が顕著に生じなければ良い。

[0049] 前記リガンド化合物の終濃度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、０．０１ｍＭ以上１００ｍＭ以下が好ましく、０．１ｍＭ以上８０ｍＭ以下がより好ましく、０．２ｍＭ以上５０ｍＭ以下がさらに好ましい。

[0050] 前記反応の温度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、０℃以上７０℃以下が好ましく、４０℃以下がより好ましい。

前記反応の時間としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、５分間以上１２０時間以下が好ましく、３０分間以上９６時間以下がより好ましく、１時間以上７２時間以下がさらに好ましい。

[0051] ＜その他の工程＞

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ベクターの調製工程、ベクターの精製工程、還元工程、修飾ベクターの精製工程などが挙げられる。

[0052] －ベクターの調製工程－

前記ベクターの調製工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、培養細胞などに、ベクターをコードする遺伝子をトランスフェクトし、細胞溶解液、又は細胞上清からベクターを調製する方法などが挙げられる。

[0053] －ベクターの精製工程－

前記ベクターの精製工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、市販のキットを用いて精製する方法、細胞溶解液を陽イオンクロマトグラフィー、及び陰イオンクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、フィルター、限外ろ過膜を用いて精製する方法などが挙げられる。

[0054] －還元工程－

前記還元工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記ベクターにおける官能基に、前記リンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程の後、若しくは前記官能基（Ｂ）に、前記ガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程の後の反応液に、ＤＴＴ（ジチオトレイトール）などの還元剤を加える工程、又は、精製工程後の修飾ベクターに、ＤＴＴなどの還元剤を加える工程などが挙げられる。

[0055] －修飾ベクターの精製工程－

前記修飾ベクターの精製工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、及び陰イオンクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、フィルター、限外ろ過膜を用いて精製する方法などが挙げられる。修飾反応の第１の工程と第２の工程の間で精製しても良いし、第２の工程の後で精製しても良い。

[0056] （ベクターの修飾方法）

前記ベクターの修飾方法は、ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる第１の工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる第２の工程と、を含み、さらにその他の工程を有することができる。

[0057] ベクターの修飾方法における、前記第１の工程、前記第２の工程、及びその他の工程は、前記修飾ベクターの作製方法における記載のとおりである。

実施例

[0058] 以下、本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

[0059] ＜参考例１：ＡＡＶ２の作製＞

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ社）に、ＰＥＩ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ社）の培地溶液と、蛍光タンパク質ＧＦＰのｐＡＡＶ２（ＣＥＬＬ　ＢｉｏＬＡＢｓ，Ｉｎｃ）をＶＥＮＵＳ（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＣＱ４３９５５．１）が発現するように改変したｐＡＡＶ２とｐＲＣ－ｍｉ３４２（タカラバイオ社）とｐＨｅｌｐｅｒ（タカラバイオ社）の培地溶液をトランスフェクションし、３７℃で５％CO_2下で４日間培養することでＡＡＶ２を産生させた。ＥＤＴＡ（Ｅｔｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅｔｅｔｒａａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄ）を加えて細胞を剥離した後、遠心分離して細胞ペレットと遠心上清を回収した。

[0060] ＜参考例２：ＡＡＶ２の精製＞

参考例１で得られた細胞ペレットからＡＡＶｐｒｏ（登録商標）　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＡＡＶ２）（ＴａＫａＲａ　６２３２）を用いてベクターを精製した。

得られた精製ＡＡＶ２をＲＴ－ＰＣＲ（Ｑｕａｎｔｓｔｕｄｉｏ、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ法）を用いて力価測定した結果、４×10^9ｖｇ／μＬであった。

[0061] ＜参考例３：ＡＡＶ２の精製＞

参考例１で得られた遠心上清に、４０ｗｔ％のＰＥＧ８０００（シグマ）と２．５ＭのＮａＣｌ水溶液の混合液を加えた後に４℃で１６時間静置した。遠心分離後、沈殿層を０．１ｖ／ｖ％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００含有Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－Ｂｕｆｆｅｒｅｄ　Ｓａｌｉｎｅ、１Ｍ　$MgCl_2$水溶液、更にエンドヌクレアーゼで処理した。ＥＤＴＡで反応を停止した後に遠心分離して上清を回収した。また、参考例１で得られた細胞ペレットを０．１ｖ／ｖ％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００含有Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－Ｂｕｆｆｅｒｅｄ　Ｓａｌｉｎｅ、１Ｍ　$MgCl_2$水溶液、更にエンドヌクレアーゼで処理した。ＥＤＴＡで反応を停止した後に遠心分離して上清を回収した。得られた上清を混合して、陽イオンクロマトグラフィー（Ｔｈｅｒｍｏ社、ＰＯＲＯＳ　５０ＨＳ）と陰イオン

クロマトグラフィー（Ｔｈｅｒｍｏ社、ＰＯＲＯＳ　５０ＨＱ）で精製し、濃縮後、ＡＡＶ２を得た。

[0062] ＜実施例１：ＡＡＶ２の修飾＞

参考例２で得られたＡＡＶ２溶液を用いた。

[0063] （バッファーの調製）

１ＭのＨＥＰＥＳ（ｇｉｂｃｏ社）水溶液、５ＭのＮａＣｌ（ナカライテスク社）水溶液、Ｔｗｅｅｎ２０（Ｓｉｇｍａ社）を夫々水で希釈した後に、１ＭのＮａＯＨ水溶液を加えてｐＨ８．３の５０ｍＭのＨＥＰＥＳ水溶液、１６５ｍＭのＮａＣｌ水溶液、０．１ｖ／ｖ％のＴｗｅｅｎ　２０水溶液を調製した。

[0064] （反応試薬１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１Ｄ、１Ｅ、１Ｆ、１Ｇの調製）

上記の方法で調製したＨＥＰＥＳバッファーを用いて、０．１２５ｍＭのＤＩＢＥＮＺ［ｂ，ｆ］ａｚｏｃｉｎｅ－５（６Ｈ）－ｈｅｘａｎｏｉｃ ａｃｉｄ，１１，１２－ｄｉｄｅｈｙｄｒｏ－ε－ｏｘｏ－，２，５－ｄｉｏｘｏ－３－ｓｕｌｆｏ－１－ｐｙｒｒｏｌｉｄｉｎｙｌ ｅｓｔｅｒ，ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ（Ａｌｄｒｉｃｈ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ社）溶液である反応試薬１Ａを調製した。さらに、２倍段階希釈し、反応試薬１Ｂである０．０６３ｍＭ、反応試薬１Ｃである０．０３２ｍＭ、反応試薬１Ｄである０．０１６ｍＭ、反応試薬１Ｅである０．００８ｍＭ、反応試薬１Ｆである０．００４ｍＭ、反応試薬１Ｇである０．００２ｍＭのＤＩＢＥＮＺ［ｂ，ｆ］ａｚｏｃｉｎｅ－５（６Ｈ）－ｈｅｘａｎｏｉｃ ａｃｉｄ，１１，１２－ｄｉｄｅｈｙｄｒｏ－ε－ｏｘｏ－，２，５－ｄｉｏｘｏ－３－ｓｕｌｆｏ－１－ｐｙｒｒｏｌｉｄｉｎｙｌ ｅｓｔｅｒ，ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ溶液を調製した。

[0065] （反応試薬２Ａ、２Ｂ、２Ｃ、２Ｄの調製）

上記の方法で調製したＨＥＰＥＳバッファーを用いて１６ｍＭの２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ ２－ａｃｅｔａｍｉｄｏ－２－ｄｅｏｘｙ－β－Ｄ－ｇａｌａｃｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）溶液

である反応試薬２Ａを調製した。さらに、４倍段階希釈して、反応試薬２Ｂである４ｍＭ、反応試薬２Ｃである１ｍＭ、反応試薬２Ｄである０．２５ｍＭの２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ　２－ａｃｅｔａｍｉｄｏ－２－ｄｅｏｘｙ－β－Ｄ－ｇａｌａｃｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ溶液を調製した。

[0066]　（第１の工程）

上記の方法で調製した反応試薬１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１Ｄ、１Ｅ、１Ｆ、１Ｇを９μＬと精製ＡＡＶ２溶液１μＬを混合し、３７℃のインキュベーター中で１６時間反応させた。さらに、上記バッファーで調製した２Ｍグリシン溶液（Ｗａｋｏ社）を２μＬ加えて、３７℃のインキュベーター中で５時間反応させることで、第１工程生成物１Ａ、第１工程生成物１Ｂ、第１工程生成物１Ｃ、第１工程生成物１Ｄ、第１工程生成物１Ｅ、第１工程生成物１Ｆ、第１工程生成物１Ｇを得た。反応液をＤＴＴ含有サンプルバッファーで還元した後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＡＴＴＯ社）を行い、銀染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で反応の進捗を確認した。銀染色の結果を図１に示した。反応前のＶＰ１のバンドが約８２ｋＤａで、反応後が約８８ｋＤａであり、化合物が８ｋＤａ分、付加されたことが分かった。

[0067]　図１のレーン１は第１工程生成物１Ａのサンプル、レーン２は第１工程生成物１Ｂのサンプル、レーン３は第１工程生成物１Ｃのサンプル、レーン４は第１工程生成物１Ｄのサンプル、レーン５は第１工程生成物１Ｅのサンプル、レーン６は第１工程生成物１Ｆのサンプル、レーン７は第１工程生成物１Ｇのサンプル、レーン８は未修飾のＡＡＶ２のサンプル、レーン９はマーカーである。

[0068]　（第２の工程）

上記の方法で調製した反応試薬２Ａ、２Ｂ、２Ｃ、２Ｄ（２４μＬ）と、上記の第１工程生成物１Ａの反応溶液（１２μＬ）を混合し、３７℃のインキュベーター中で１６時間反応させることで、修飾ベクター２Ａ、修飾ベクター２Ｂ、修飾ベクター２Ｃ、修飾ベクター２Ｄを得た。反応液をＤＴＴ（ＤＩＴＨＩＯＴＨＲＥＩＴＯＬ）含有サンプルバッファーで還元した後、Ｓ

ＤＳ－ＰＡＧＥ（ＡＴＴＯ社）を行い、銀染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で反応の進捗を確認した。銀染色の結果を図２に示した。反応前のＶＰ１のバンドが約８８ｋＤａで、反応後が約９２ｋＤａであり、化合物が４ｋＤａ分、付加されたことが分かった。

[0069] 図２のレーン１は修飾ベクター２Ａのサンプル、レーン２は修飾ベクター２Ｂのサンプル、レーン３は修飾ベクター２Ｃのサンプル、レーン４は修飾ベクター２Ｄのサンプル、レーン５は反応試薬２の代わりにバッファーを用いたサンプル、レーン６は未修飾のＡＡＶ２、レーン７はマーカーである。

[0070] ＜実施例２：ＡＡＶ２の修飾＞

参考例２で得られた精製ＡＡＶ２溶液を用いた。

[0071] （リン酸バッファーの調製）

２００ｍＭのリン酸二水素ナトリウム二水和物（Ｗａｋｏ社）と２００ｍＭのリン酸水素二ナトリウム・１２水和物（Ｗａｋｏ社）を混合及び希釈し、ｐＨ８．５の２０ｍＭリン酸バッファーを調製した。

[0072] （反応試薬１Ｈの調製）

上記の方法で調製したリン酸バッファーを用いて２ｍＭのＤＩＢＥＮＺ［ｂ，ｆ］ａｚｏｃｉｎｅ－５（６Ｈ）－ｈｅｘａｎｏｉｃ ａｃｉｄ，１１，１２－ｄｉｄｅｈｙｄｒｏ－ε－ｏｘｏ－，２，５－ｄｉｏｘｏ－３－ｓｕｌｆｏ－１－ｐｙｒｒｏｌｉｄｉｎｙｌ ｅｓｔｅｒ，ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ（Ａｌｄｒｉｃｈ社）溶液（反応試薬１Ｈ）を調製した。

[0073] （反応試薬３の調製）

上記の方法で調製したリン酸バッファーを用いて、１６ｍＭの２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ β－Ｄ－Ｇｌｕｃｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ（ＴＣＩ社）溶液（反応試薬３）を調製した。

[0074] （第１の工程）

上記の方法で調製した反応試薬１Ｈを９μＬと精製ＡＡＶ２溶液１μＬを混合し、３７℃のインキュベーター中で１６時間反応させた。その後、上記リン酸バッファーで調製した２Ｍグリシン溶液（Ｗａｋｏ社）を２μＬ加え

、３７℃のインキュベーター中で６時間静置することで反応を停止し、第１工程生成物１Ｈを得た。

[0075] （第２の工程）

実施例１と同様の方法で反応試薬３を反応させることで、修飾ベクター３Ａを得た。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＡＴＴＯ社　Ｅ－Ｒ７．５Ｌ）を行い、銀染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で反応の進捗を確認した。銀染色の結果を図３に示した。反応前のＶＰ３のバンドが約６０ｋＤａで、反応後が約６２ｋＤａであり、化合物が２ｋＤａ分、付加されたことが分かった。

[0076] 図３のレーン１は実施例２（反応試薬１Ｈ）の第１工程生成物１Ｈのサンプル、レーン２は実施例２（反応試薬１Ｈ）の修飾ベクター３Ａのサンプル、レーン５は未修飾のＡＡＶ２のサンプル、レーン６はマーカーである。

[0077] ＜実施例３：ＡＡＶ２の修飾＞

参考例２で得られた精製ＡＡＶ２溶液を用いた。

[0078] （反応試薬４の調製）

上記の方法で調製したリン酸バッファーを用いて２ｍＭの４，７，１０，１３，１６－Ｐｅｎｔａｏｘａ－２０－ａｚａｔｒｉｃｏｓａｎｏｉｃ ａｃｉｄ，２３－（１１，１２－ｄｉｄｅｈｙｄｒｏｄｉｂｅｎｚ［ｂ，ｆ］ａｚｏｃｉｎ－５（６Ｈ）－ｙｌ）－１９，２３－ｄｉｏｘｏ－，２，５－ｄｉｏｘｏ－１－ｐｙｒｒｏｌｉｄｉｎｙｌ ｅｓｔｅｒ（ＢＲＯＡＤＰＨＡＲＭ社）溶液（反応試薬４）を調製した。

[0079] （第１の工程）

上記の方法で調製した反応試薬４が９μＬと精製ＡＡＶ２溶液１μＬを混合し、３７℃のインキュベーター中で１６時間反応させた。その後、上記リン酸バッファーで調製した２Ｍグリシン溶液（Ｗａｋｏ社）を２μＬ加え、３７℃のインキュベーター中で６時間静置することで反応を停止し、第１工程生成物４を得た。反応液をＤＴＴ含有サンプルバッファーで還元した後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＡＴＴＯ社）を行い、銀染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で反応の進捗を確認した。銀染色の結果を図３に示した。反応前のＶＰ３

のバンドが約６０ｋＤａで、反応後が約６４ｋＤａであり、化合物が４ｋＤａ分、付加されたことが分かった。

[0080] （第２の工程）

実施例１と同様の方法で反応試薬３を反応させることで、修飾ベクター３Ｂを得た。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＡＴＴＯ社　Ｅ－Ｒ７．５Ｌ）を行い、銀染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で反応の進捗を確認した。銀染色の結果を図３に示した。反応前のＶＰ３のバンドが約６４ｋＤａで、反応後が約６８ｋＤａであり、化合物が４ｋＤａ分、付加されたことが分かった。

[0081] 図３のレーン３は実施例３（反応試薬４）の第１工程生成物４のサンプル、レーン４は実施例３（反応試薬４）の修飾ベクター３Ｂのサンプル、レーン５は未修飾のＡＡＶ２のサンプル、レーン６はマーカーである。

[0082] ＜実施例４：ＡＡＶ２の修飾＞

参考例３で得られたＡＡＶ２溶液（６．６×１０^{9}ｖｇ／μＬ、５００μＬ）を用いた。

[0083] （反応試薬１Ｉ、１Ｊ調製）

実施例１と同様のＨＥＰＥＳバッファーを用いて、１ｍＭのＤＩＢＥＮＺ［ｂ，ｆ］ａｚｏｃｉｎｅ－５（６Ｈ）－ｈｅｘａｎｏｉｃ　ａｃｉｄ，１１，１２－ｄｉｄｅｈｙｄｒｏ－ε－ｏｘｏ－，２，５－ｄｉｏｘｏ－３－ｓｕｌｆｏ－１－ｐｙｒｒｏｌｉｄｉｎｙｌ　ｅｓｔｅｒ，ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ（Ａｌｄｒｉｃｈ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ社）溶液を調製し１Ｉとした。さらに１Ｉを希釈し、０．５ｍＭの溶液１Ｊを調製した。

[0084] （反応試薬２Ｅの調製）

実施例１と同様のＨＥＰＥＳバッファーを用いて、２ｍＭの２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ　２－ａｃｅｔａｍｉｄｏ－２－ｄｅｏｘｙ－β－Ｄ－ｇａｌａｃｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ　（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）溶液を調製し２Ｅとした。

[0085] （第１の工程）

上記及び実施例１で調製した１Ｉ、１Ｊ、１Ａの反応試薬１（４．５ｍＬ

）とＡＡＶ２溶液（０．５ｍＬ）を混合し、３７℃のインキュベーター中で１６時間反応させた。そして、実施例１と同様のＨＥＰＥＳバッファーで調製した２Ｍのグリシン溶液（Ｗａｋｏ社）（１ｍＬ）を反応液に加えた後、３７℃のインキュベーター中で７時間反応させることで、第１工程生成物１Ｉ，第１工程生成物１Ｊ，第１工程生成物１Ａを得た。反応液をＤＴＴ含有サンプルバッファーで還元した後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＡＴＴＯ　Ｅ－Ｒ７．５Ｌ）を行い、銀染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　４５－１００１）で反応の進捗を確認した。銀染色の結果を図４に示した。反応前のＶＰ３のバンドが約６０ｋＤａで、反応後が約６２ｋＤａであり、化合物が２ｋＤａ分、付加されたことが分かった。

[0086] 図４のレーン１及びレーン８は未修飾のＡＡＶ２、レーン２は実施例４（反応試薬１Ａ：０．１２５ｍＭ）の第１工程生成物１Ａのサンプル、レーン４は実施例４（反応試薬１Ｊ０．５ｍＭ）の第１工程生成物１Ｊのサンプル、レーン６は実施例４（反応試薬１Ｉ：１ｍＭ）の第１工程生成物１Ｉのサンプル、レーン９はマーカーである。

[0087] （修飾ＡＡＶ２の精製）

実施例４において反応試薬１Ｉ、１Ｊ、１Ａとの反応により得た第１工程生成物１Ｉ、第１工程生成物１Ｊ、第１工程生成物１Ａを、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（担体：ＰＯＲＯＳ　５０ＨＳ、溶離液：２０ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．４）、グラジエント条件：１００～３７０ｍＭのＮａＣｌ水溶液）で精製した。結果を図５に示した。精製後にＲＴ－ＰＣＲ（Ｑｕａｎｔｓｔｕｄｉｏ、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ法）を用いて力価測定した結果、第１工程生成物１Ｉは５．８×10^{11}ｖｇ／μＬ、第１工程生成物１Ｊは１．８×10^{12}ｖｇ／μＬ、第１工程生成物１Ａは１．２×10^{12}ｖｇ／μＬ、であった。

[0088] 図５の１は未修飾のＡＡＶ２、２は実施例４（反応試薬１Ａ：０．１２５ｍＭ）の第１工程生成物１Ａのサンプル、３は実施例４（反応試薬１Ｊ：０．５ｍＭ）の第１工程生成物１Ｊのサンプル、４は実施例４（反応試薬１Ｉ

：１ｍＭ）の第１工程生成物１ｌのサンプルであり、図５の縦軸は２８０ｎｍにおける吸光度、横軸は溶出体積を示す。

[0089] （第２の工程）

上記反応後の反応液３ｍＬに、反応試薬２Ｅ、２Ｃ、２Ｄを６ｍＬずつ添加後混合した。３７℃のインキュベーター中で１６時間反応させることで、修飾ベクター２Ｅ、修飾ベクター２Ｆ、修飾ベクター２Ｇを得た。反応液をＤＴＴ含有サンプルバッファーで還元した後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＡＴＴＯ社）を行い、銀染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で反応の進捗を確認した。銀染色の結果を図４に示した。反応前のＶＰ３のバンドが約６２ｋＤａで、反応後が約６３ｋＤａであり、化合物が１ｋＤａ分、付加されたことが分かった。

[0090] 図４のレーン１及びレーン８は未修飾のＡＡＶ２、レーン３は実施例４（反応試薬１Ａ：０．１２５ｍＭ及び反応試薬２Ｄ：０．２５ｍＭ）の修飾ベクター２Ｇのサンプル、レーン５は実施例４（反応試薬１Ｊ：０．５ｍＭ及び反応試薬２Ｃ：１ｍＭ）の修飾ベクター２Ｆのサンプル、レーン７は実施例４（反応試薬１Ｉ：１ｍＭ及び反応試薬２Ｅ：２ｍＭ）の修飾ベクター２Ｅのサンプル、レーン９はマーカーである。

[0091] （修飾ベクター２Ｇと２Ｆの精製）

実施例４において反応試薬２Ｃと２Ｄとの反応により得た修飾ベクター２Ｆと修飾ベクター２Ｇを、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（担体：ＰＯＲＯＳ　５０ＨＳ、溶離液：２０ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．４）、グラジエント条件：１００～３７０ｍＭのＮａＣｌ水溶液）で精製した。結果を図６に示した。精製後にＲＴ－ＰＣＲ（Ｑｕａｎｔｓｔｕｄｉｏ、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ法）を用いて力価測定した結果、修飾ベクター２Ｆは２．６×10^{12}ｖｇ／μＬ、修飾ベクター２Ｇは２．６×10^{12}ｖｇ／μＬ、であった。

[0092] 図６の１は未修飾のＡＡＶ２、２は実施例４（反応試薬１Ａ：０．１２５ｍＭ及び反応試薬２Ｄ：０．２５ｍＭ）の修飾ベクター２Ｇのサンプル、３

は実施例４（反応試薬１Ｊ：０．５ｍＭ及び反応試薬２Ｃ：１ｍＭ）の修飾ベクター２Ｆのサンプルであり、図６の縦軸は２８０ｎｍにおける吸光度、横軸は溶出体積を示す。

[0093] （修飾ベクター２Ｅの精製）

実施例４において反応試薬２Ｅとの反応により得た修飾ＡＡＶ２においては、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製の限外ろ過膜（Ｖｉｖａｓｐｉｎ２０－１００キロ）を用いて遠心濃縮を５回繰り返し、最終的に２０ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．４、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ含有）にバッファー置換することで精製した。精製後にＲＴ－ＰＣＲ（Ｑｕａｎｔｓｔｕｄｉｏ、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ法）を用いて力価測定した結果、修飾ベクター２Ｅは１．８×１０^{12}ｖｇ／μＬであった。

[0094] 本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

＜１＞　ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、
を含むことを特徴とする、修飾ベクターの作製方法である。

＜２＞　前記ベクターにおける官能基が、アミノ基、グアニジノ基、水酸基、カルボキシル基、及びインドール基のいずれかである、前記＜１＞に記載の作製方法である。

＜３＞　前記ベクターにおける官能基が、リジン残基、アルギニン残基、チロシン残基、セリン残基、スレオニン残基、トリプトファン残基における官能基である、前記＜１＞から＜２＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜４＞　前記官能基（Ａ）が、スクシンイミジル基である、前記＜１＞から＜３＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜５＞　前記官能基（Ｂ）が、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、カルボニル基、ホスフィン基、テトラジン基、ヒドラジン基、及びヒドロキ

シルアミン基のいずれかである、前記＜１＞から＜４＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜６＞　前記リガンド化合物の重量平均分子量が１００，０００以下である、前記＜１＞から＜５＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜７＞　前記リガンド化合物が、糖化合物である、前記＜１＞から＜６＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜８＞　前記糖化合物が、ポリエチレングリコール基を有する、前記＜７＞に記載の作製方法である。

＜９＞　前記リガンド化合物が、ペプチドである、前記＜１＞から＜６＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜１０＞　前記リンカー化合物が、ポリエチレングリコール基を有する、前記＜１＞から＜９＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜１１＞　前記ベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターである、前記＜１＞から＜１０＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜１２＞　前記ベクターにおける官能基が、前記アデノ随伴ウイルスベクターのカプシドを構成する官能基である、前記＜１１＞に記載の作製方法である。

＜１３＞　前記ベクターにおける官能基がアミノ基であり、前記官能基（Ａ）がスクシンイミジル基であり、前記官能基（Ｂ）又は（Ｃ）がアジド基及び／又はアルキニル基であり、前記リガンド化合物が、糖化合物及び／又はペプチドである、前記＜１＞から＜１２＞のいずれかに記載の作製方法である。

＜１４＞　前記ベクターにおける官能基がリジン残基における官能基であり、前記官能基（Ｂ）又は（Ｃ）がアジド基及び／又はアルキニル基であり、前記リガンド化合物が、糖化合物及び／又はペプチドである、前記＜１＞から＜１２＞に記載の作製方法である。

＜１５＞　ベクターにおける官能基に、前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化

合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、前記官能基（Ｂ）に、前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、を含むことを特徴とする、ベクターの修飾方法である。

請求の範囲

[請求項1] ベクターにおける官能基に、

前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、

前記官能基（Ｂ）に、

前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、

を含むことを特徴とする、修飾ベクターの作製方法。

[請求項2] 前記ベクターにおける官能基が、アミノ基、グアニジノ基、水酸基、カルボキシル基、及びインドール基のいずれかである、請求項１に記載の作製方法。

[請求項3] 前記ベクターにおける官能基が、リジン残基、アルギニン残基、チロシン残基、セリン残基、スレオニン残基、トリプトファン残基における官能基である、請求項１から２のいずれかに記載の作製方法。

[請求項4] 前記官能基（Ａ）が、スクシンイミジル基である、請求項１から３のいずれかに記載の作製方法。

[請求項5] 前記官能基（Ｂ）が、アジド基、アルキニル基、アルケニル基、カルボニル基、ホスフィン基、テトラジン基、ヒドラジン基、及びヒドロキシルアミン基のいずれかである、請求項１から４のいずれかに記載の作製方法。

[請求項6] 前記リガンド化合物の重量平均分子量が１００，０００以下である、請求項１から５のいずれかに記載の作製方法。

[請求項7] 前記リガンド化合物が、糖化合物である、請求項１から６のいずれかに記載の作製方法。

[請求項8] 前記糖化合物が、ポリエチレングリコール基を有する、請求項７に記載の作製方法。

[請求項9] 前記リガンド化合物が、ペプチドである、請求項１から６のいずれ

かに記載の作製方法。

[請求項10] 前記リンカー化合物が、ポリエチレングリコール基を有する、請求項１から９のいずれかに記載の作製方法。

[請求項11] 前記ベクターが、アデノ随伴ウイルスベクターである、請求項１から１０のいずれかに記載の作製方法。

[請求項12] 前記ベクターにおける官能基が、前記アデノ随伴ウイルスベクターのカプシドを構成する官能基である、請求項１１に記載の作製方法。

[請求項13] 前記ベクターにおける官能基がアミノ基であり、前記官能基（Ａ）がスクシンイミジル基であり、前記官能基（Ｂ）又は（Ｃ）がアジド基及び／又はアルキニル基であり、前記リガンド化合物が、糖化合物及び／又はペプチドである、請求項１から１２のいずれかに記載の作製方法。

[請求項14] 前記ベクターにおける官能基がリジン残基における官能基であり、前記官能基（Ｂ）又は（Ｃ）がアジド基及び／又はアルキニル基であり、前記リガンド化合物が、糖化合物及び／又はペプチドである、請求項１から１２のいずれかに記載の作製方法。

[請求項15] ベクターにおける官能基に、

前記官能基と結合可能な官能基（Ａ）と、リガンド化合物と結合可能な官能基（Ｂ）と、を有するリンカー化合物における、前記官能基（Ａ）を結合させる工程と、

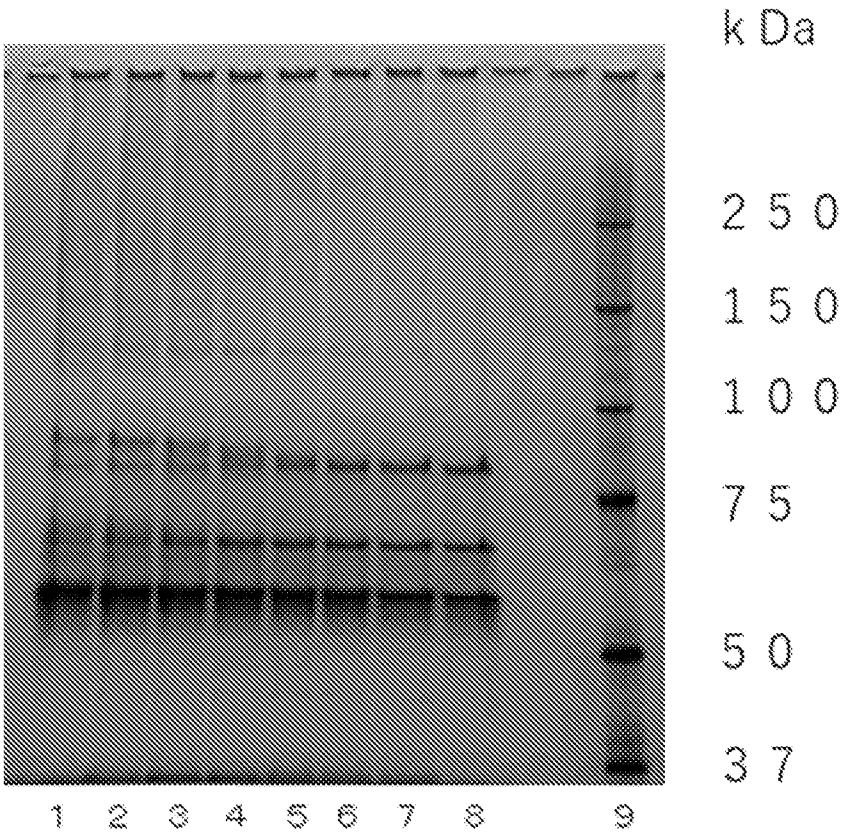
前記官能基（Ｂ）に、

前記官能基（Ｂ）と結合可能な官能基（Ｃ）を有するリガンド化合物における、前記官能基（Ｃ）を結合させる工程と、

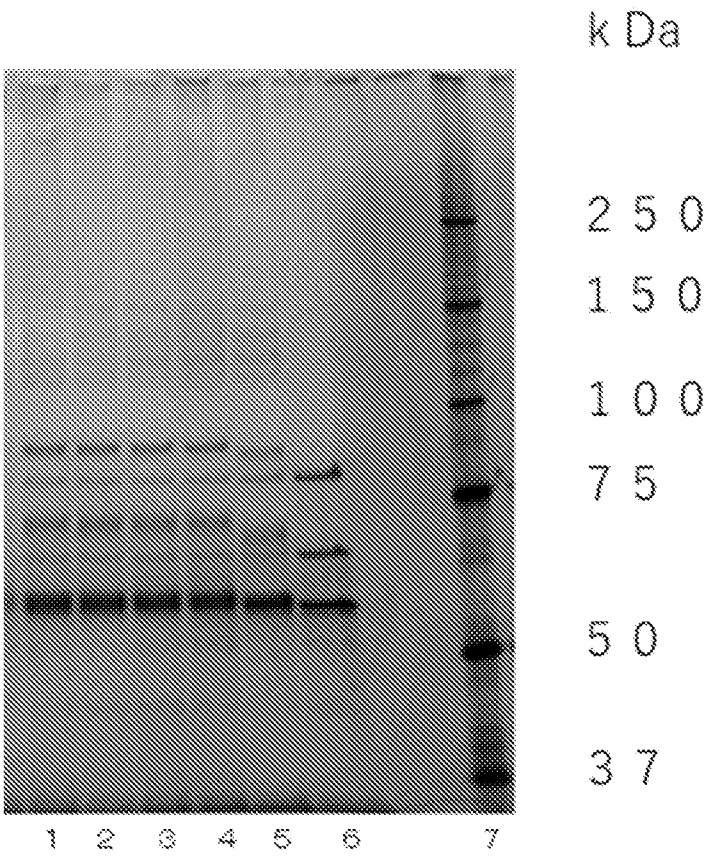
を含むことを特徴とする、ベクターの修飾方法。

WO 2021/199764 PCT/JP2021/006113

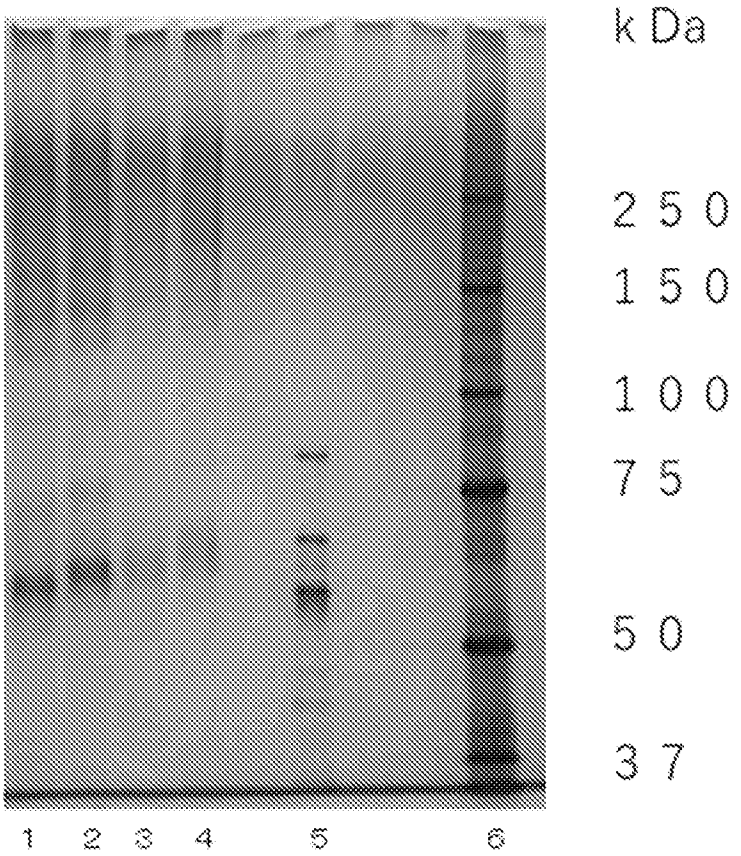
[図1]



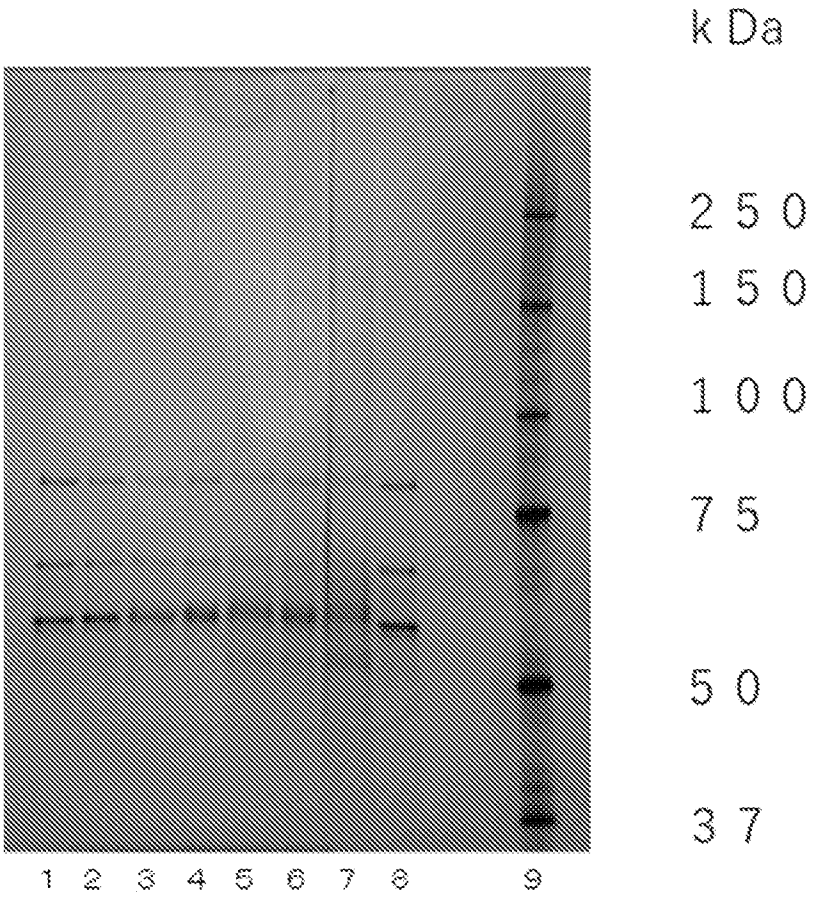
[図2]



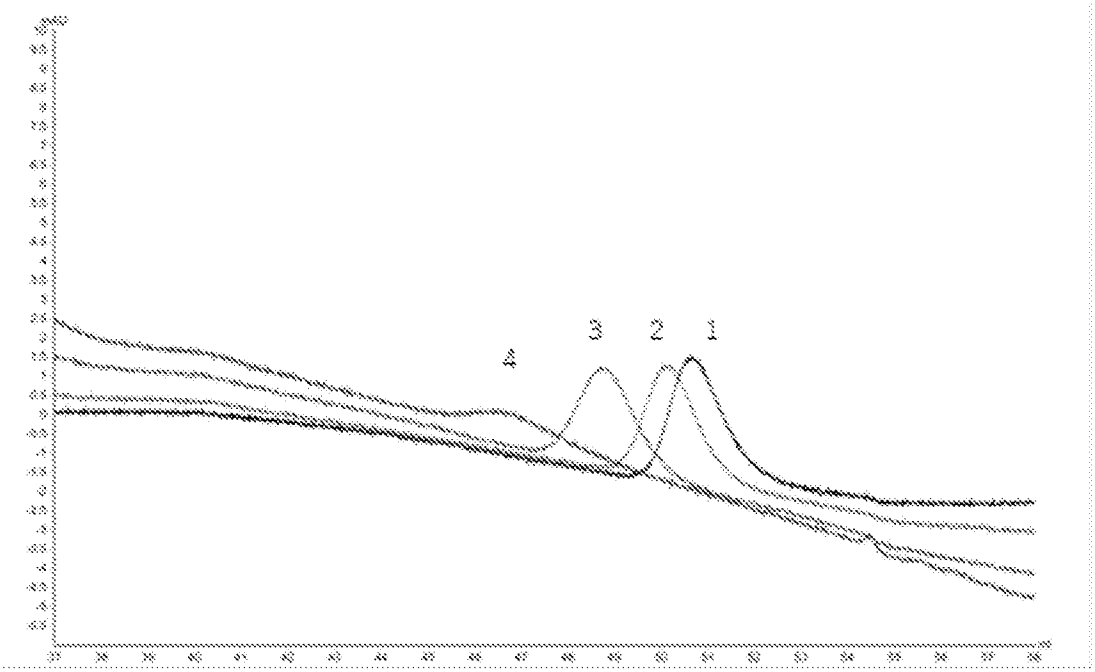
[図3]


kDa
250
150
100
75
50
37
1 2 3 4 5 6

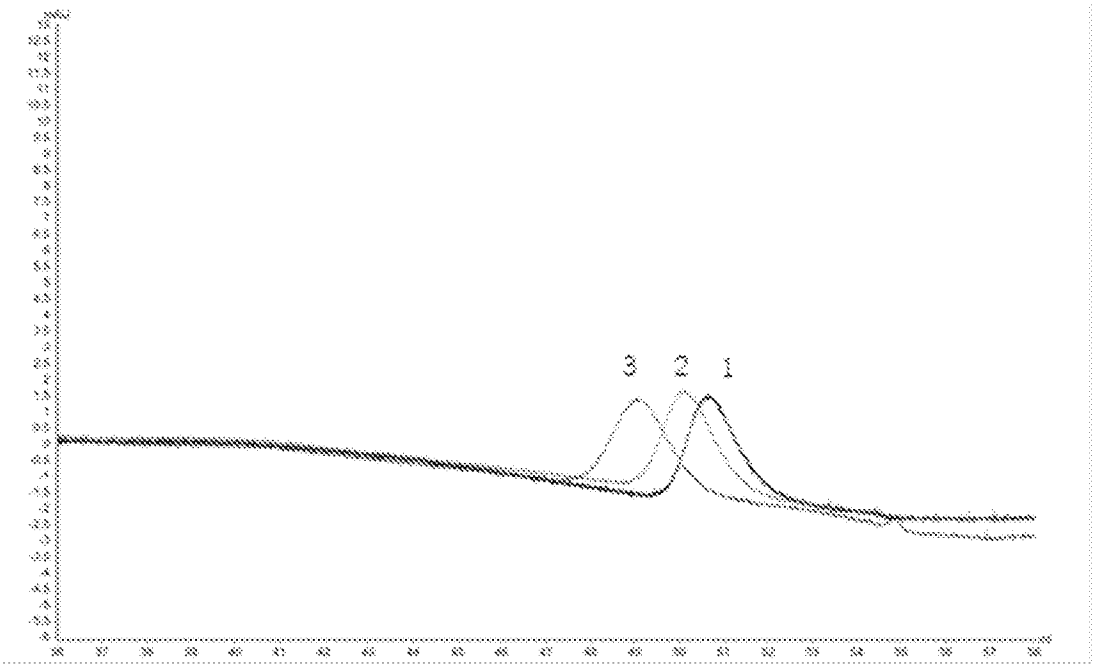
[図4]


kDa
250
150
100
75
50
37
1 2 3 4 5 6 7 8 9

[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/006113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl. C12N15/63(2006.01)i, C12N15/864(2006.01)i
FI: C12N15/63 Z ZNA, C12N15/864 100Z

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. C12N15/63, C12N15/864

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 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/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	JP 2003-523320 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 05 August 2003, claims, paragraphs [0013]-[0027], examples	1-8, 10-15
X	JP 2003-532368 A (GENZYME CORP.) 05 November 2003, claims	1, 6, 9-12, 15
A	JP 2017-522267 A (VALO THERAPEUTICS OY) 10 August 2017	1-15
A	JP 2007-514429 A (MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER) 07 June 2007	1-15
A	JP 2019-520853 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 25 July 2019	1-15

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"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
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30.04.2021	18.05.2021
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/JP2021/006113

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2003-523320 A	05.08.2003	WO 2001/023001 A2 claims, page 3, line 20 to page 9, line 2, examples US 6399385 B1	
JP 2003-532368 A	05.11.2003	US 6287857 B1 claims WO 1999/040214 A2	
JP 2017-522267 A	10.08.2017	US 2017/0080069 A1 WO 2015/177098 A2	
JP 2007-514429 A	07.06.2007	WO 2005/059129 A2	
JP 2019-520853 A	25.07.2019	US 2019/0388557 A1 WO 2017/212019 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/006113

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i
FI: C12N15/63 Z ZNA; C12N15/864 100Z

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））

C12N15/63; C12N15/864

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
X	JP 2003-523320 A (ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・ペンシルベニア) 05.08.2003 (2003-08-05) 特許請求の範囲、[0013]-[0027]、実施例	1-8, 10-15
X	JP 2003-532368 A (ジェンザイム・コーポレイション) 05.11.2003 (2003-11-05) 特許請求の範囲	1, 6, 9-12, 15
A	JP 2017-522267 A (バロ セラピューティクス オイ) 10.08.2017 (2017-08-10)	1-15
A	JP 2007-514429 A (メディツィニシェ ホッホシューレ ハノーヴァー) 07.06.2007 (2007-06-07)	1-15
A	JP 2019-520853 A (セントレ・ナショナル・デ・ラ・レシェルシェ・サイエンティフィーク) 25.07.2019 (2019-07-25)	1-15

☐ 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。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"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
"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）
"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
"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
"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
"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
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
30.04.2021	18.05.2021

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）
松田　芳子 4B 3126
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/006113

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/JP2021/006113

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2003-523320 A	05.08.2003	WO 2001/023001 A2 claims, p.3 line 20-p.9 line 2, examples US 6399385 B1	
JP 2003-532368 A	05.11.2003	US 6287857 B1 claims WO 1999/040214 A2	
JP 2017-522267 A	10.08.2017	US 2017/0080069 A1 WO 2015/177098 A2	
JP 2007-514429 A	07.06.2007	WO 2005/059129 A2	
JP 2019-520853 A	25.07.2019	US 2019/0388557 A1 WO 2017/212019 A1	