

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/127739

発行日 平成26年7月24日(2014.7.24)

(43) 国際公開日 平成24年9月27日(2012.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B024
<b>C07K 14/155 (2006.01)</b>	C07K 14/155	4C076
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C07K 14/47	4C084
<b>C07K 7/08 (2006.01)</b>	C07K 7/08	4C085
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 28 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2013-505776 (P2013-505776)	(71) 出願人	504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/077075	(74) 代理人	110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(22) 国際出願日	平成23年11月24日(2011.11.24)	(72) 発明者	大槻 高史 岡山県岡山市北区津島中三丁目1番1号 国立大学法人岡山大学 大学院自然科学研 究科内
(31) 優先権主張番号	特願2011-63953 (P2011-63953)	(72) 発明者	石躍 由佳 岡山県岡山市北区津島中三丁目1番1号 国立大学法人岡山大学 大学院自然科学研 究科内
(32) 優先日	平成23年3月23日(2011.3.23)	Fターム(参考)	4B024 AA01 CA11 DA03 FA20 GA11 HA17
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 近赤外光によりRNAを細胞質内に送達するための新規なキャリア分子ならびに方法

## (57) 【要約】

本発明では、細胞障害や発熱の問題を起こさず、生体透過性のよい(好ましくは波長700~1000nm程度の)近赤外光を利用してRNAを細胞内に導入する手段を提供することを目的とする。本発明に係るキャリア分子は、細胞膜透過性ペプチド(CPP)およびRNA結合性蛋白質(RBP)を含むキャリア蛋白質と、該キャリア蛋白質のN末端側またはC末端側に連結した、近赤外線領域の波長を有する光で機能する光増感剤(PST)とからなる構造を有することを特徴とする。該キャリア分子と該キャリア分子中のRBPに結合したRNAとからなるキャリア分子/RNA複合体を形成させ、該複合体を細胞と接触させて該細胞内のエンドソームに局在化させた後、該キャリア分子/RNA複合体中のPSTが機能する近赤外光を照射することにより、該キャリア分子/RNA複合体を細胞質中に拡散させて、導入したRNAの機能を発現させることができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞膜透過性ペプチド（CPP）およびRNA結合性蛋白質（RBP）を含むキャリア蛋白質と、該キャリア蛋白質のN末端側またはC末端側に連結した、近赤外線領域の波長を有する光で機能する光増感剤（PST）とからなる構造を有することを特徴とするキャリア分子。

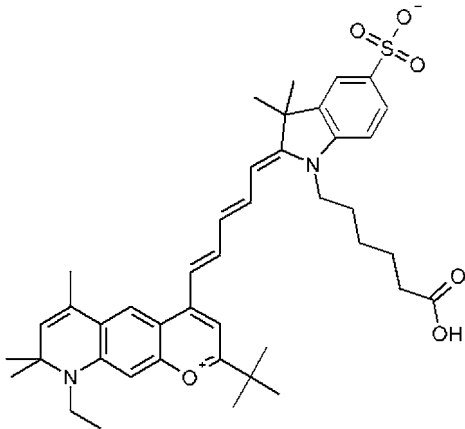
## 【請求項 2】

前記光増感剤（PST）が700nm～1000nmの波長を有する光で機能するものである、請求項1に記載のキャリア分子。

## 【請求項 3】

前記光増感剤（PST）が、下記構造式で表される化合物（DY750）、図3に示す蛍光スペクトルを有する化合物（Alexa Fluor 750）または図4に示す吸収スペクトルを有する化合物（IRDye 800CW）である、請求項1または2に記載のキャリア分子。

## 【化 1】



## 【請求項 4】

前記キャリア蛋白質が、さらにプロテアソーム分解シグナル配列タグ（PDS）および/またはHis-richタグ（HR）を含む、請求項1～3のいずれかに記載のキャリア分子。

## 【請求項 5】

前記キャリア蛋白質において、N末端側から、細胞膜透過性ペプチド（CPP）、RNA結合性蛋白質（RBP）、プロテアソーム分解シグナル配列タグ（PDS）および/またはHis-richタグ（HR）がこの順序で連結されており、かつ当該キャリア蛋白質のC末端側に前記光増感剤（PST）が連結されている、請求項1～4のいずれかに記載のキャリア分子。

## 【請求項 6】

前記CPPが、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する、ヒト免疫不全ウイルス由来Tat（trans-activator of transcription）蛋白質中の12アミノ酸からなるペプチドである、請求項1～5のいずれかに記載のキャリア分子。

YGRKKRRQRRRG

配列番号 1

## 【請求項 7】

前記RBPが、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有する、ヒト由来U1A（U1 small nuclear ribonucleoprotein A）のRNA結合ドメインである、請求項1～6のいずれかに記載のキャリア分子。

AVPETRPNHTIYINNLEKIKKDELKKSLEYAIFSQFGQIL

10

20

30

40

50

D I L V S R S L K M R G Q A F V I F K E V S S A T N A L R S M Q G F P F Y D K P  
M R I Q Y A K T D S D I I A K M K 配

列番号 4

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のキャリア分子と、該 RNA キャリア分子中の RBP に結合した RNA とからなる構造を有するキャリア分子 / RNA 複合体。

【請求項 9】

前記 RNA が、short hairpin RNA (shRNA)、small interfering RNA (siRNA) または microRNA (miRNA) である、請求項 8 に記載の RNA 複合体。

10

【請求項 10】

請求項 8 または 9 に記載のキャリア分子 / RNA 複合体を含む遺伝子治療薬。

【請求項 11】

がんまたはウイルス疾患を対象とする、請求項 10 に記載の遺伝子治療薬。

【請求項 12】

生体外において、請求項 8 または 9 に記載のキャリア分子 / RNA 複合体を細胞と接触させて当該細胞内のエンドソームに局在化させる工程、および該キャリア分子 / RNA 複合体中の PST が機能する近赤外線領域の波長を有する光を照射して該キャリア分子 / RNA 複合体を細胞質中に拡散させる工程を含むことを特徴とする、細胞質内への RNA の送達方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、所定の機能を発現しうる RNA (機能性 RNA) を細胞内に導入し、所定の波長を有する光を照射することによりその機能を発現させるための方法および当該方法に用いられるキャリア分子などに関する。

【背景技術】

【0002】

RNAi は、shRNA や siRNA の塩基配列に依存して特定遺伝子の発現が抑制される現象であり、病気の原因となる遺伝子やウイルス遺伝子の発現抑制に基づく疾患治療などに応用できるため近年非常に注目されている。このような目的のために、RNA を細胞質内に効率的に導入する手段の研究開発が進められている。

30

【0003】

特許文献 1 には、RNA 結合性タンパク質および膜透過性キャリアペプチドを含む融合タンパク質に、該 RNA 結合性タンパク質に対する認識配列および任意の配列を有する RNA を結合させ、この結合体を任意の細胞と混合することにより、該 RNA を細胞内に導入する方法が記載されている。

【0004】

非特許文献 1 および 2 には、RNA 結合性タンパク質および膜透過性キャリアペプチドに加えて可視領域の波長の光で励起する蛍光色素 (たとえば Alexa Fluor 546、励起波長 530-550nm) を含む融合タンパク質に siRNA を結合させた複合体が記載されている。そして、この結合体と細胞を接触させ、当該結合体がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれエンドソームに局在化した後、励起光を照射することにより、蛍光色素が光増感剤として作用し、siRNA がエンドソームから細胞質に放出され、所定の RNAi 効果を達成できることが記載されている (図 1 参照)。なお、非特許文献 1 および 2 には、近赤外領域の波長の光で励起する蛍光色素を用いても上記のような作用効果が奏されることは、記載も示唆もされていない。

40

【0005】

一方、特許文献 2 には、機能性分子キャリアとして金ナノロッドを用い、金ナノロッド凝集体と DNA との複合体を培養細胞に添加し、近赤外域 (波長 1064nm) のパルス

50

レーザーを照射することにより、DNAを金ナノロッドから脱離させて、当該DNAからの遺伝子を効率的に発現させる方法が記載されている（実施例参照）。しかしながら、金ナノロッドは光熱変換機能を有し、金ナノロッドを集積させた標的部周組織へのフォトサーマル治療（腫瘍細胞等を発生した熱で死滅させる）ために用いられている材料でもあるため（たとえば特許文献3参照）、そのようなことを目的としない使用における細胞毒性や安全性について懸念される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2006-280261号公報

10

【特許文献2】特開2005-255582号公報

【特許文献3】特開2010-083803号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】T. Endoh, M. Sisido and T.Ohtsuki (2008) Cellular siRNA delivery mediated by a cell permeant RNA-binding protein and photoinduced RNA interference. *Bioconjugate chemistry* 19(5), 1017-1024.

【非特許文献2】T. Endoh, M. Sisido and T.Ohtsuki (2009) Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi. *Journal of Controlled Release* 137, 241-245.

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

非特許文献1および2に記載された方法によりRNAを細胞内に導入する場合、励起光として可視光が用いられるが、可視光は生体内への透過性に劣る。そのため、生体の表層（たとえば皮膚表面）にある細胞へのRNAの導入には適用できるが、生体内の深部にある細胞へのRNAの導入には不适当である。

【0009】

本発明は、細胞障害や発熱の問題を起こさず、生体透過性のよい（好ましくは波長700～1000nm程度の）近赤外光を利用してRNAを細胞内に導入する手段を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、近赤外光を励起光とする蛍光色素のうち特定のものが、非特許文献1等に記載の複合体中の蛍光色素として用いた場合に、近赤外光の照射により光増感剤として作用し、エンドソームから細胞質にRNAを放出させる能力を有することを見いだした（図1参照）。さらに、その複合体中の融合タンパク質に特定のペプチドをさらに加えることにより、RNAの細胞質内への導入効率をさらに高めることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

40

すなわち、本発明は下記の事項を包含する。

[1] 細胞膜透過性ペプチド(CPP)およびRNA結合性蛋白質(RBP)を含むキャリア蛋白質と、該キャリア蛋白質のN末端側またはC末端側に連結した、近赤外線領域の波長を有する光で機能する光増感剤(PST)とからなる構造を有することを特徴とするキャリア分子。

【0012】

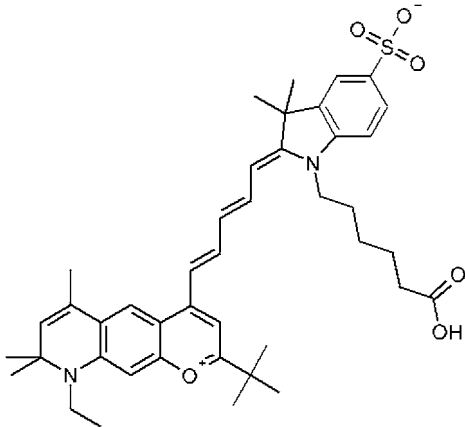
[2] 前記光増感剤(PST)が700nm～1000nmの波長を有する光で機能するものである、[1]に記載のキャリア分子。

[3] 前記光増感剤(PST)が、下記構造式で表される化合物(DY750)、図3に示す蛍光スペクトルを有する化合物(Alexa Fluor 750)または図4に示

50

す吸収スペクトルを有する化合物 ( I R D y e 8 0 0 C W ) である、 [ 1 ] または [ 2 ] に記載のキャリア分子。

【化 1】



10

【 0 0 1 3 】

[ 4 ] 前記キャリア蛋白質が、さらにプロテアソーム分解シグナル配列タグ ( P D S ) および / または H i s - r i c h タグ ( H R ) を含む、 [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかに記載のキャリア分子。

20

【 0 0 1 4 】

[ 5 ] 前記キャリア蛋白質において、N末端側から、細胞膜透過性ペプチド ( C P P ) 、 R N A 結合性蛋白質 ( R B P ) 、プロテアソーム分解シグナル配列タグ ( P D S ) および / または H i s - r i c h タグ ( H R ) がこの順序で連結されており、かつ当該キャリア蛋白質のC末端側に前記光増感剤 ( P S T ) が連結されている、 [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載のキャリア分子。

【 0 0 1 5 】

[ 6 ] 前記 C P P が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する、ヒト免疫不全ウイルス由来 T a t ( t r a n s - a c t i v a t o r o f t r a n s c r i p t i o n ) 蛋白質中の 1 2 アミノ酸からなるペプチドである、 [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれかに記載のキャリア分子。

30

Y G R K K R R Q R R R G

配列番号 1

【 0 0 1 6 】

[ 7 ] 前記 R B P が、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する、ヒト由来 U 1 A ( U 1 s m a l l n u c l e a r r i b o n u c l e o p r o t e i n A ) の R N A 結合ドメインである、 [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載のキャリア分子。

A V P E T R P N H T I Y I N N L N E K I K K D E L K K S L Y A I F S Q F G Q I L  
D I L V S R S L K M R G Q A F V I F K E V S S A T N A L R S M Q G F P F Y D K P  
M R I Q Y A K T D S D I I A K M K

40

配列番号 2

【 0 0 1 7 】

[ 8 ] [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれかに記載のキャリア分子と、該 R N A キャリア分子中の R B P に結合した R N A とからなる構造を有するキャリア分子 / R N A 複合体。

[ 9 ] 前記 R N A が、 s h o r t h a i r p i n R N A ( s h R N A ) 、 s m a l l i n t e r f e r i n g R N A ( s i R N A ) または m i c r o R N A ( m i R N A ) である、 [ 8 ] に記載の R N A 複合体。

【 0 0 1 8 】

[ 1 0 ] [ 8 ] または [ 9 ] に記載のキャリア分子 / R N A 複合体を含む遺伝子治療薬または診断薬。

50

[ 1 1 ] がんまたはウイルス疾患を対象とする、[ 1 0 ] に記載の遺伝子治療薬または診断薬。

【 0 0 1 9 】

[ 1 2 ] 生体外において、[ 8 ] または [ 9 ] に記載のキャリア分子 / R N A 複合体を細胞と接触させて当該細胞内のエンドソームに局在化させる工程、および該キャリア分子 / R N A 複合体中の P S T が機能する近赤外線領域の波長を有する光を照射して該キャリア分子 / R N A 複合体を細胞質中に拡散させる工程を含むことを特徴とする、細胞質内への R N A の送達方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 0 】

本発明による R N A キャリアは大部分を生体分子である蛋白質で合成することができるため、生分解性で細胞毒性がなく、安全な R N A キャリアとして使用することができる。また、近赤外光を照射したときのみ R N A が細胞質内に拡散するので、位置やタイミングを指定して R N A を細胞質内に送達させ、R N A i 等の R N A 機能の発現を引き起こすことができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 1 】

【 図 1 】 図 1 は、所定の波長を有する光の照射により RNA を細胞質内に送達する方法の概要。A) RNA キャリア蛋白質 (CPP-RBP) と RNA の複合体。B) エンドサイトーシスを経由する CPP-RBP/RNA 複合体の細胞質への移行。蛍光基を付加した CPP-RBP は、まず 1) CPP を介して細胞内に導入され、2) エンドサイトーシスを経由してエンドソームに取り込まれる。次に、3) 用いる蛍光色素の励起波長の光を照射することにより、エンドソーム膜が崩壊し、4) CPP-RBP/RNA 複合体が細胞質に拡散して、5) RNA の機能が発現する (導入した RNA が shRNA 等の場合は DNAi が誘導される)。

【 図 2 】 図 2 は、D Y 7 5 0 の励起スペクトル (左) および蛍光スペクトル (右) を表す。

【 図 3 】 図 3 は、A l e x a F l u o r 7 5 0 の蛍光スペクトル (右) を表す (対比のため C y 7 の蛍光スペクトル (左) も併記されている)。

【 図 4 】 図 4 は、I R D y e 8 0 0 C W の励起スペクトルを表す (蛍光スペクトルも併記されている)。

【 図 5 】 図 5 は、実施例 3 ) で行った、近赤外光照射によるキャリア/shRNA 複合体の細胞質への移行の有無を示す画像である。A l e x a F l u o r 7 5 0、D Y 7 5 0 および I R D y e 8 0 0 C W では細胞質中に R N A が見られ、特に D Y 7 5 0 について明瞭であり、これらの蛍光色素を用いると近赤外光の照射によりキャリア/shRNA 複合体を細胞質中に拡散させることができることが確認された。

【 図 6 】 図 6 は、実施例 4 ) で作製した TatU1A-DY750 を用いた近赤外光照射による RNAi 効果を示すグラフである。

【 図 7 】 図 7 は、実施例 6 ) で作製した TatU1A-His6-DY750 を用いた近赤外光照射による RNAi 効果を示すグラフである。

【 図 8 】 図 8 は、実施例 7 ) で行った、ヒト腫瘍細胞における RNAi 効果を示すグラフである。(A) フローサイトメトリーによる測定結果。(B) フローサイトメトリーの結果から算出された平均蛍光強度。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 2 】

キャリア蛋白質

本発明におけるキャリア蛋白質は、少なくとも細胞膜透過性ペプチド (CPP) と R N A 結合性蛋白質 (RBP) を必須の構成要素として含み、好ましくはさらにプロテアソーム分解シグナル配列タグ (PDS) および / または H i s - r i c h タグ (HR) を構成要素として含むペプチド (融合タンパク質) を指す。

【 0 0 2 3 】

10

20

30

40

50

C P P、R B P、P D S、H i s<sub>6</sub>の要素同士は、直接ペプチド結合を介して連結していてもよいし、リンカーとなるペプチド（通常1～20個程度のアミノ酸からなるもの）を介して連結していてもよい。また、上記所定の要素およびリンカーを含むキャリア蛋白質全体がペプチド（アミノ酸）のみで構成されることが望ましいが、リンカーとしてペプチド（アミノ酸）以外の化合物、たとえばP E G（ポリエチレングリコール）などを用いてキャリア蛋白質を構成することも可能である。

【0024】

必要に応じて、キャリア蛋白質の内部または末端に上記要素以外のペプチドが含まれていてもよい。たとえば、発現ベクターが産生した本発明のキャリア蛋白質をアフィニティ・クロマトグラフィによって精製・回収するためのH i sタグまたはG S Tタグがキャリア蛋白質のN末端付近に連結されていてもよい（キャリア蛋白質の回収後に上記H i sタグを切断しない場合は、当該H i sタグを膜透過性を高めるためのH Rとして利用することができる。そのようなH Rはキャリア蛋白質のN末端側およびC末端側の両方に連結されていてもよい。）。また、後述するような手法によりP S Tをキャリア蛋白質に連結させるために、システインを末端付近に位置させておいてもよい。

10

【0025】

・細胞膜透過性ペプチド（C P P）

C P Pは、一般的にアルギニンなどの塩基性アミノ酸に富んだアミノ酸配列を有する、細胞膜と結合し自身を細胞内に取り込ませる働きを持つポリペプチドとして知られており、膜透過性ドメイン（Protein Transduction Domain: PTD）と称されることもある。当初、C P Pは、細胞膜を透過して自発的に細胞内に侵入すると考えられたため「細胞膜透過性ペプチド」と命名されているが、現在では一般的に、主に細胞のエンドサイトーシス経路を経て細胞内に取り込まれると考えられている。そして、C P Pに連結させて細胞内に運ぼうとする積み荷の性質により、そのままエンドソームに局在化することも多い。本発明においてC P Pは、これと連結した複合体の他の要素と共にエンドソームに局在化する能力を有するペプチドを指す用語として定義される。

20

【0026】

本発明では様々なC P Pを用いることができ、目的とする細胞（通常は哺乳動物細胞）に対応するものであればよく、その種類は特に限定されるものではない。また、C P Pは、野生型のアミノ酸配列を有するものであってもよいし、細胞内に侵入する（好ましくは野生型よりも優れた）能力を有する範囲で、野生型のアミノ酸配列に対して置換、欠失、付加を施した変異型のアミノ酸配列を有するものであってもよい。

30

【0027】

たとえば、ヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-1）に由来するTrans-activator of transcription protein（T a tタンパク質）に含まれる、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、本発明におけるC P Pとして好適である。

Y G R K K R R Q R R R G

配列番号1

【0028】

また、フロックハウスウイルス（F H V）に由来する配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するC T P 5 1 2（Cytoplasmic Transduction Peptide）も、本発明における好ましいC P Pとして挙げられる。

40

R R R R N R T R R N R R R V R

配列番号3

Y G R R A R R R R R R R

配列番号4

その他、R e vペプチド、ネコヘルペスウイルスC o a tタンパク質由来ペプチド、ポリアルギニンなどもC P Pとして挙げられる。

【0029】

・RNA結合性蛋白質（R B P）

R B Pは、R N Aの塩基配列または立体構造に依存的または非依存的に結合するタンパク質として公知である。

50

## 【0030】

本発明では様々なRBPを用いることができ、その種類は特に限定されるものではないが、通常、RNAの特定の塩基配列または立体構造を認識し、特定のRNAと特異的に結合するものを用いるようにする。また、RBPは、野生型のアミノ酸配列を有するものであってもよいし、RNAと結合する（好ましくは野生型よりも優れた）能力を有する範囲で、野生型のアミノ酸配列に対して置換、欠失、付加を施した変異型のアミノ酸配列を有するものであってもよい。

## 【0031】

たとえば、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する、ヒト由来U1A (U1 small nuclear ribonucleoprotein A)のRNA結合ドメインは、本発明におけるRBPとして好適である。

A V P E T R P N H T I Y I N N L N E K I K K D E L K K S L Y A I F S Q F G Q I L  
D I L V S R S L K M R G Q A F V I F K E V S S A T N A L R S M Q G F P F Y D K P  
M R I Q Y A K T D S D I I A K M K

配列番号2

## 【0032】

また、sex-lethalタンパク質は、上記ヒト由来U1AよりもRNA運搬能にやや劣るが、本発明のRBPとして用いてもよい。その他、アミノアシルtRNA合成酵素、伸長因子Tu、RRMモチーフを構造中に有するタンパク質などの、公知のRBPを用いることもできる。

## 【0033】

・プロテアソーム分解シグナル配列タグ (PDS)

プロテアソーム分解シグナル配列は、タンパク質の末端に付加されるアミノ酸配列であって、そこにユビキチンが結合し、プロテアソームでその配列を有するタンパク質を分解しうるものとして公知であり、タンパク質分解 (シグナル) 配列、分解促進配列などと称されることもある。

## 【0034】

本発明では様々なPDSを用いることができ、その種類は特に限定されるものではない。また、PDSは、野生型のアミノ酸配列を有するものであってもよいし、プロテアソームにより分解される（好ましくは野生型よりも優れた）能力を有する範囲で、野生型のアミノ酸配列に対して置換、欠失、付加を施した変異型のアミノ酸配列を有するものであってもよい。たとえば、CL1、CL2、CL6、CL9、CL10、CL11、CL12、CL15、CL16、SL17、PESTなどの公知のPDSを用いることができる。

## 【0035】

なお、PDSを用いた場合、複合体が細胞質内に導入された後、キャリア蛋白質がプロテアソーム分解系を介して分解され、キャリアタンパク質とRNAの解離が促進されることにより、RNAの機能発現の効果が高くなるものと考えられる。

## 【0036】

・His-richタグ (HR)

HRは、典型的には6個のヒスチジン (His) からなる、複合体の細胞内への導入効率をより高めることのできるペプチドである。6個のヒスチジンからなるペプチドはアフィニティ・クロマトグラフィのために利用されているHisタグとしても知られている。本発明におけるHRは、そのようなHisタグと同じく (6個の) ヒスチジンのみからなるペプチドであってもよいし、HRを用いない場合よりも細胞内侵入性を向上させる能力を有する範囲でHis<sub>6</sub>を改変したペプチド、たとえばヒスチジンの数を7~10個程度に増加させたペプチドや、ヒスチジン以外のアミノ酸を織り交ぜたペプチドであってもよい。HRを構成するアミノ酸数は通常は6~20個程度であり、また全アミノ酸中のヒスチジンの割合は通常は50%~100%の範囲である。

## 【0037】

・作製方法



上記の要素を含むキャリア蛋白質は公知の手段により作製することができる。代表的には、1) PCR法を利用して本発明の所定の要素を含むポリペプチドに対応する塩基配列を有するDNAを作製し、2) 作製したDNAをプラスミド等のベクターに導入し、3) 部位特異的変異導入法 (Site-Directed Mutagenesis) を利用して、C末端にシステインが配置されたポリペプチドに対応する塩基配列を有するベクターを作製し、4) 得られたベクターを発現させて目的とするキャリア蛋白質を回収する、という方法が挙げられる。

**【0038】**

## キャリア分子

本発明におけるキャリア分子は、上述したキャリア蛋白質と、近赤外線領域の波長の光 (近赤外光) で機能する光増感剤とが連結した分子を指す。

10

**【0039】**

## ・光増感剤 (PST)

「近赤外線領域の波長の光 (近赤外光) で機能する」光増感剤とは、近赤外光を照射することにより、細胞内に取り込まれエンドソームに局在化していた複合体を細胞質中に拡散させ所定の機能を発揮させる状態にすることが可能である光増感剤をいう。なお、そのメカニズムとしては、近赤外光の照射により励起された光増感剤が一重項酸素を発生させ、これがエンドソーム膜を不安定化させる (破壊する) ためであると推測される。

**【0040】**

本発明において、「近赤外領域」は700nm~2500nmを指す。本発明では、そのような近赤外線領域の波長、より好ましくは700~1000nmの波長、特に好ましくは700~850nmの波長の光で機能する、換言すれば極大励起波長がこれらの領域にある光増感剤が用いられる。上記の近赤外線領域の波長が好ましい理由は、生体中のヘモグロビンや水による吸収を回避して、生体組織透過性が高い波長だからである。

20

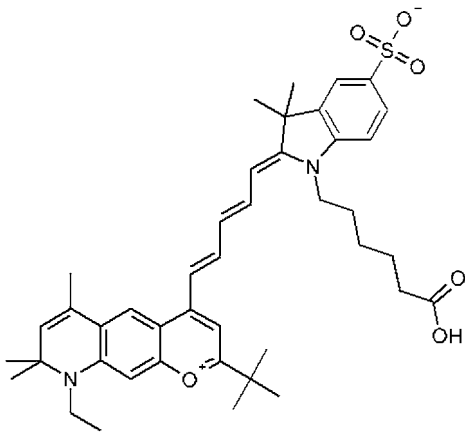
**【0041】**

本発明におけるPSTの具体例としては、DY750 (DYOMICS GmbH社製)、Alexa Fluor 750 (登録商標、Invitrogen社製)、IRDye 800CW (登録商標、LI-COR社製) が挙げられる。DY750は、下記式に示す構造式および図2に示す励起スペクトル (極大励起波長は747nm) を有する化合物である (DYOMICS GmbH社ホームページ、<http://www.dyomics.com/dy-750.html>参照)。Alexa Fluor 750は、構造式は明らかにされていないが、図3に示す蛍光スペクトルを有する化合物で極大励起波長は749nmである (Invitrogen社ホームページ、<http://www.invitrogen.jp/catalogue/molecular#probes/alexa/alexa#index.html>および<http://www.invitrogen.jp/catalogue/molecular#probes/alexa/alexafluor750/index.html>参照)。IRDye 800CWは、構造式は明らかにされていないが、図4に示す励起スペクトル (極大励起波長は774nm) を有する化合物である (LI-COR社のホームページより入手可能なカタログ、<http://biosupport.licor.com/docs/800CW#Micro#08618.pdf>参照)。

30

**【0042】**

## 【化 2】



10

## ・作製方法

キャリア分子は公知の手法によりキャリア蛋白質とPSTとを連結させて作製することができる。代表的には、キャリア蛋白質中唯一のシステインをN末端付近またはC末端付近に配置しておき、一方PSTには当該システインのチオール基と選択的に反応する(キャリア蛋白質中の他のアミノ酸残基とは反応しない)マレイミド基を導入しておき、これらの官能基を反応させてキャリア蛋白質にPSTを結合させる手法が挙げられる。このような手法は、市販の「マレイミド基の付いたPST」を用いて、末端1箇所システインを含むキャリア蛋白質と混ぜ合わせたのちに、ゲル濾過スピンカラムなどで未反応のPSTを除去することで行うことができる。

20

## 【0043】

## キャリア分子/RNA複合体

本発明におけるキャリア分子/RNA複合体(単に「複合体」と称するときもある。)は、上述したキャリア分子にRBPを介してRNAが結合した複合体を指す。ただし、RNAはRBPとの特異的な結合とともに、正電荷を多く有するCPP(たとえばTat)との静電的・非特異的な結合によってキャリア分子と複合体を形成していてもよい。

30

## 【0044】

## ・RNA

キャリア蛋白質中のRBPに結合させるRNAは、当該RBPのRNA認識部位に認識される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと、細胞質内に導入することにより所定の機能を発揮する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(以下「機能性RNA」と称する。)とを含み、これらは直接結合していても、リンカーとなるオリゴヌクレオチドを介して結合していてもよい。

## 【0045】

機能性RNAとしては様々なRNAを用いることができ、その種類は特に限定されるものではない。本発明における代表的な機能性RNAとしては、特定の遺伝子の発現を抑制するためのshRNA(short hairpin RNA)、siRNA(small interfering RNA)、miRNA(micro RNA)が挙げられる。また、細胞内で特定のタンパク質を合成するためのmRNAや、タンパク質の特定の部位に非天然アミノ酸を導入するための改変されたtRNAも本発明における機能性RNAとして用いることができる。その他、アンチセンスRNA、アプタマーRNA、リボザイムなども本発明における機能性RNAとなり得る。

40

## 【0046】

## ・形成方法

キャリア分子/RNA複合体は、あらかじめ作製したキャリア分子とRNAとを溶液中で混合することにより、容易に形成させることができる。これらの混合量(モル)の比率

50

は適宜調整することができるが、たとえば、実施例で用いているキャリア (TatU1A, TatU1A-CL1, TatU1A-His6) の場合、RNA : キャリア分子 = 1 : 5 ~ 10 とすることが好ましい。

#### 【0047】

キャリア分子 / RNA 複合体の細胞質内への送達方法

本発明によるキャリア分子 / RNA 複合体は、以下のような手順により細胞質内に送達することができる。

#### 【0048】

まず、キャリア分子 / RNA 複合体を細胞と接触させて当該細胞内のエンドソームに局在化させる。通常、細胞にキャリア分子 / RNA 複合体を含む溶液を添加すれば、一定の時間の経過の後、エンドサイトーシスにより自ずとキャリア分子 / RNA 複合体は取り込まれ、細胞内のエンドソームに局在化する。細胞は、通常は動物細胞 (ヒトの細胞を含む) であり、生体内にあるものでも、生体外にあるもの (培養細胞) でもよい。すなわち、本発明による細胞質内への RNA の送達方法は、生体内、生体外どちらにおいても適用することができる。

10

#### 【0049】

次いで、キャリア分子 / RNA 複合体中の PST が機能する近赤外線領域の波長を有する光を照射して該キャリア分子 / RNA 複合体を細胞質中に拡散させる。そのような所定の近赤外光を照射しなければ、キャリア分子 / RNA 複合体はほとんどエンドソーム中に局在したままであり、RNA の所定の機能は実質的に発現しない。

20

#### 【0050】

励起光を照射する手段は特に限定されるものではない。所定の波長の近赤外光を発するキセノンアークランプや色素ポンプレーザーを光源とし、必要に応じて適切なフィルターを用いて、RNA の機能を発現させたい所望の部位の細胞に近赤外光を照射すればよい。

#### 【0051】

このような手順によりキャリア分子 / RNA 複合体が細胞質内に送達された後は、細胞質中の各種の生体物質の作用により RNA の所定の機能が発揮される。たとえば、機能性 RNA として siRNA または shRNA を用いた場合、Dicer 酵素の作用によりリンカー配列部分および一本鎖ループ配列部分が切断・分解され、二本鎖部分が細胞固有の特定の構造体に認識されることにより、mRNA からの翻訳反応を阻害し、RNAi が達成される。

30

#### 【0052】

用途

本発明のキャリア分子は、当該キャリア分子に結合しうる任意の RNA を細胞質内に導入することができるが、その用途は特に限定されるものではない。代表的には、本発明のキャリア分子 / RNA 複合体は、たとえばがんやウイルス疾患を対象とする遺伝子治療薬として使用することができる。この場合、RNA (機能性 RNA) としては、RNAi によりがんまたはウイルス疾患の原因となっている特定の遺伝子の発現を抑制することのできる、適切な塩基配列を有するものが選択される。

#### 【実施例】

40

#### 【0053】

##### 1) キャリア蛋白質の調製

CPPとしてヒト免疫不全ウイルス由来Tat (trans-activator of transcription) 蛋白質の11アミノ酸からなる膜透過ドメインと、RBPとしてヒト由来U1A (U1 small nuclear ribonucleoprotein A) のRNA結合ドメインとを融合した、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するキャリア蛋白質TatU1Aを調製した (図1A)。下記配列番号5のアミノ酸配列中、二重下線部 (13-24位) がTat、下線部 (36-132位) がU1Aの配列である。

#### 【0054】

## 【化3】

MGSHHHHHHS SGYGRKKRRQRRRGYPYDVPDYASGAVPET  
RPNHTIYINNLNEKIKKDELKKSLEYAIFSQFGQILDILVS  
RS LKMRGQAFVIFKEVSSATNALRSMQGF PFYDKPMRIQY  
AKTDSDIIAKMKGSC 配列番号5

10

また、この蛋白質のC末端に、PDSとしてのCL1、あるいはHRとしてのHis<sub>6</sub>タグを付加した、それぞれ配列番号6および7で示されるアミノ酸配列を有するキャリア蛋白質TatU1A-CL1およびTatU1A-His<sub>6</sub>も同時に調製した。下記配列番号6のアミノ酸配列中、二重下線部(13-24位)がTat、下線部(36-132位)がU1A、一点鎖線(135-150位)がCL1の配列である。下記配列番号7のアミノ酸配列中、二重下線部(13-24位)がTat、下線部(36-132位)がU1A、二点鎖線(135-141位)がHis<sub>6</sub>の配列である。

【0055】

## 【化4】

MGSHHHHHHS SGYGRKKRRQRRRGYPYDVPDYASGAVPET  
RPNHTIYINNLNEKIKKDELKKSLEYAIFSQFGQILDILVS  
RS LKMRGQAFVIFKEVSSATNALRSMQGF PFYDKPMRIQY  
AKTDSDIIAKMKGSACKNWFSSLSHFVIHLNSC

20

配列番号6

MGSHHHHHHS SGYGRKKRRQRRRGYPYDVPDYASGAVPET  
RPNHTIYINNLNEKIKKDELKKSLEYAIFSQFGQILDILVS  
RS LKMRGQAFVIFKEVSSATNALRSMQGF PFYDKPMRIQY  
AKTDSDIIAKMKSL EHHHHHHHSGC 配列番号7

30

なお、いずれのキャリア蛋白質も、後にチオール反応性の色素(光増感剤)を付加するため、C末端はシステインにしてある。このC末端のシステインは、キャリア蛋白質の中で唯一のシステインである。

【0056】

40

## 2) キャリア蛋白質への(光増感剤としての)近赤外蛍光色素の付加

1)で調製したキャリア蛋白質に、近赤外光で励起される蛍光色素を付加した。蛍光色素として、DY750 (DYOMICS GMMBH社製)、HiLyte Fluor750 (Anaspec社製)、IRDye800CW (LI-COR社製)、Alexa Fluor 750 (Invitrogen社製)、DyLight750 (Takara社製)、DyLight800 (Takara社製)を用いた。Protein Assay Kitを用いて定量したキャリア分子の蛋白質濃度と、分光光度計を用いて吸光度測定により定量した蛍光色素濃度から、蛍光色素付加率を求めた。付加率が10~30%程度になるように、未標識のキャリア蛋白質を添加し調製した。

【0057】

## 3) 近赤外蛍光色素の付いたキャリア蛋白質によるRNAの細胞内エンドソーム内導入と近

50

### 赤外光による細胞質への拡散

種々の蛍光色素で標識したキャリア蛋白質（ここではTatU1A）について、U1Aが認識する配列を付加したshRNAの細胞質移行を試みた。shRNAとTatU1A-蛍光色素コンジュゲート（以下これをキャリアと呼ぶ）をそれぞれ最終濃度200 nMおよび2 mMとなるように混合し、遮光条件下で37℃で10分間インキュベーションすることにより、キャリア/shRNA複合体を調製した。ここでは、複合体の細胞内局在を可視化するために、FAM標識したshRNAを用いた。約70%コンフルエントになるまで培養した哺乳動物細胞（CHO細胞）に、上記キャリア/shRNA混合液を添加し、37℃で2時間、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。それぞれの蛍光色素の励起波長で光照射し、キャリア/shRNA複合体の細胞内局在を蛍光顕微鏡観察により評価した。蛍光色素（光増感剤）としてAlexa Fluor 750, DY750, IRDye800CWを用いた場合のみ、細胞内に点在（エンドソームに局在）していたshRNAが近赤外光の照射により細胞質に拡散した（図5）。すなわち、近赤外光照射特異的にキャリア/shRNA複合体を細胞質に導入できることを示した。このときHiLyte Fluor750、Alexa Fluor 750、およびDyLight750を用いた場合は750±20nmの光(epitex社製 Infrared illuminator L750-66-60)、IRDye800CWおよびDyLight800を用いた場合には780±20 nmの光(epitex社製 Infrared illuminator L780-66-60)を励起光として用いた。

10

#### 【0058】

4) 近赤外光による哺乳動物細胞の細胞質内へのRNA導入とそのRNAの機能発現（RNAi）の確認

750 nm付近に吸収をもつ蛍光色素DY750を付加したTatU1A（TatU1A-DY750）を用いて、近赤外光照射によるRNAi誘導の検討を行った。shRNAとTatU1A-DY750をそれぞれ最終濃度200 nMおよび2 mMとなるように混合し、遮光条件下で37℃で10分間インキュベーションすることにより、TatU1A-DY750/shRNA複合体を調製した。ここでは、EGFPのmRNAを標的とするため、anti-EGFP配列のshRNAを用いた。EGFPを安定発現するCHO細胞（EGFP-CHO細胞）を約70%コンフルエントになるまで培養し、上記TatU1A-DY750/shRNA混合液を添加し、さらに37℃、2時間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。DY750の励起波長で光照射し、37℃で20時間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリー法によりRNAi効果を検討した。その結果、光照射した細胞集団のEGFP平均蛍光強度は、光照射しなかったものと比較し、顕著に減少した（図6）。すなわち、光照射を行った細胞において、EGFPに対するRNAi効果が認められた。

20

30

#### 【0059】

以上の結果から、TatU1A-DY750によりshRNAを細胞内に導入し、光照射特異的に、つまり近赤外光を照射したときのみshRNAを細胞質に移行させることができ、RNAi（shRNAの機能発現）を誘導することができた。

#### 【0060】

5) RNA運搬能の高いキャリア蛋白質の選抜

上記1)で作製したTatU1Aに対して、CPP部分をFHV（フロックハウスウイルス由来のアルギニンペプチド；RRRRNRTRNRRRVR）またはCTP512（cytoplasmic transduction peptide；YGRARRRRRRR。変異導入のしやすさを考慮して、配列番号4に記載のアミノ酸配列の4位のRが欠失したものを用いた。）に変えたものを作製した。しかし、FHV-U1AやCTP-U1Aの細胞質へのRNA運搬能はTatU1Aと大差なかった。次に、CPPとしてTatを用い、RBP部分をSxl蛋白質またはバクテリオファージ $\phi$ -Nペプチドにしたものを作製した。このTatSxlはRNA運搬能を持っていたもののTatU1Aより劣っていた。Tat NはRNA運搬能が全く見られなかった。

40

#### 【0061】

次に、1)で作製したTatU1A-CL1、TatU1A-His<sub>6</sub>およびTatU1AのRNA運搬能を調べたところ、TatU1A-CL1およびTatU1A-His<sub>6</sub>はTatU1AよりもRNA運搬能が高かった。すなわち、キャリア蛋白質部分としては、TatU1A-CL1およびTatU1A-His<sub>6</sub>が、以上で検討された中で最もRNAキャリアとしての能力が高かった。

#### 【0062】

50

6) 近赤外光による哺乳動物細胞の細胞質内へのRNA導入とそのRNAの機能発現 (RNAi) の確認

4)と同様、750 nm付近に吸収をもつ蛍光色素DY750を付加したTatU1A-His<sub>6</sub> (TatU1A-His<sub>6</sub>-DY750) を用いて、近赤外光照射によるRNAi誘導の検討を行った。shRNAとTatU1A-His<sub>6</sub>-DY750をそれぞれ最終濃度200 nMおよび2 mMとなるように混合し、遮光条件下で37℃で10分間インキュベーションすることにより、TatU1A-His<sub>6</sub>-DY750/shRNA複合体を調製した。ここでは、EGFPのmRNAを標的とするため、anti-EGFP配列のshRNAを用いた。EGFPを安定発現するCHO細胞 (EGFP-CHO細胞) を約70%コンフルエントになるまで培養し、上記TatU1A-His<sub>6</sub>-DY750/shRNA 混合液を添加し、さらに37℃、2時間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。DY750の励起波長で光照射し、37℃で20時間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリー法によりRNAi効果を検討した。その結果、光照射した細胞集団のEGFP平均蛍光強度は、光照射しなかったものと比較し、顕著に減少した (図7)。すなわち、光照射を行った細胞において、EGFPに対するRNAi効果が認められた。以上の結果から、TatU1A-His<sub>6</sub>-DY750によりshRNAを細胞内に導入し、光照射特異的にshRNAを細胞質に移行させることができ、RNAi (shRNAの機能発現) を誘導することができた。

10

【0063】

7) ヒトの腫瘍細胞における近赤外光RNAi誘導

4)と同様、750 nm付近に吸収をもつ蛍光色素DY750を付加したTatU1A-CL1 (TatU1A-CL1-DY750) を用いて、近赤外光照射によるRNAi誘導の検討を行った。shRNAとTatU1A-CL1-DY750をそれぞれ最終濃度200 nMおよび2 mMとなるように混合し、遮光条件下で37℃で10分間インキュベーションすることにより、TatU1A-CL1-DY750/shRNA複合体を調製した。ここではヒト腫瘍細胞である悪性中皮腫細胞211Hを用いた。EGFPを安定発現する211H細胞を約70%コンフルエントになるまで培養し、上記TatU1A-CL1-DY750/shRNA 混合液を添加し、さらに37℃、2時間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。DY750の励起波長で光照射し、37℃で20時間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリー法によりRNAi効果を検討した。その結果、光照射した細胞集団のEGFP平均蛍光強度は、光照射しなかったものと比較し、顕著に減少した (図8)。すなわち、光照射を行った細胞において、EGFPに対するRNAi効果が認められた。

20

【配列表フリーテキスト】

【0064】

30

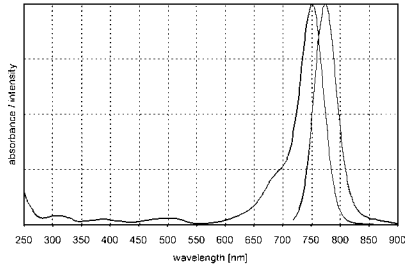
配列番号4 : CTP512

配列番号5 : TatU1A

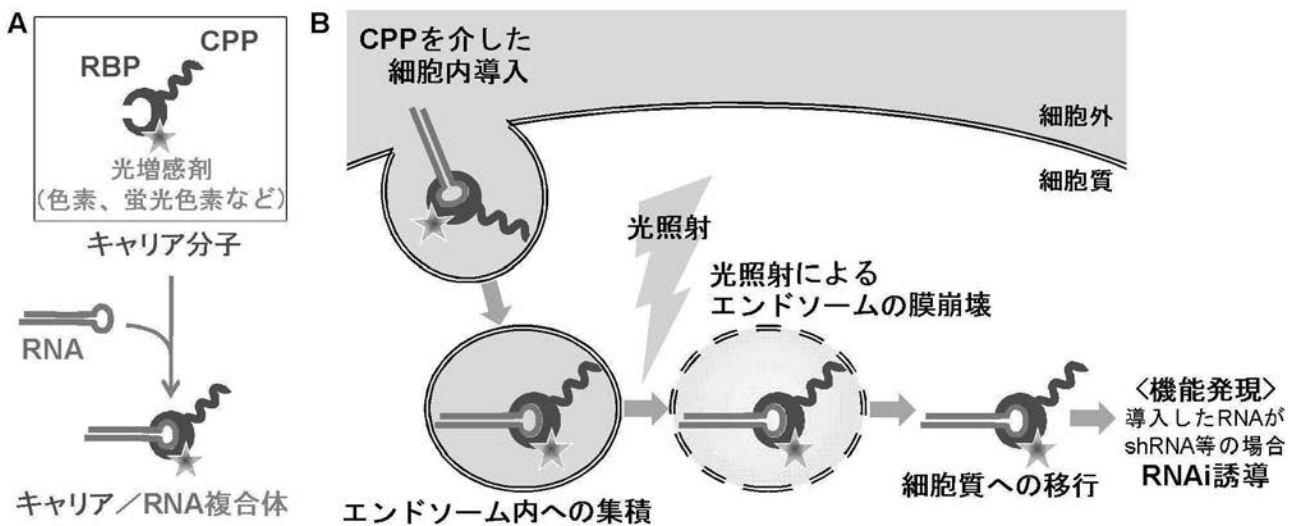
配列番号6 : TatU1A-CL1

配列番号7 : TatU1A-His6

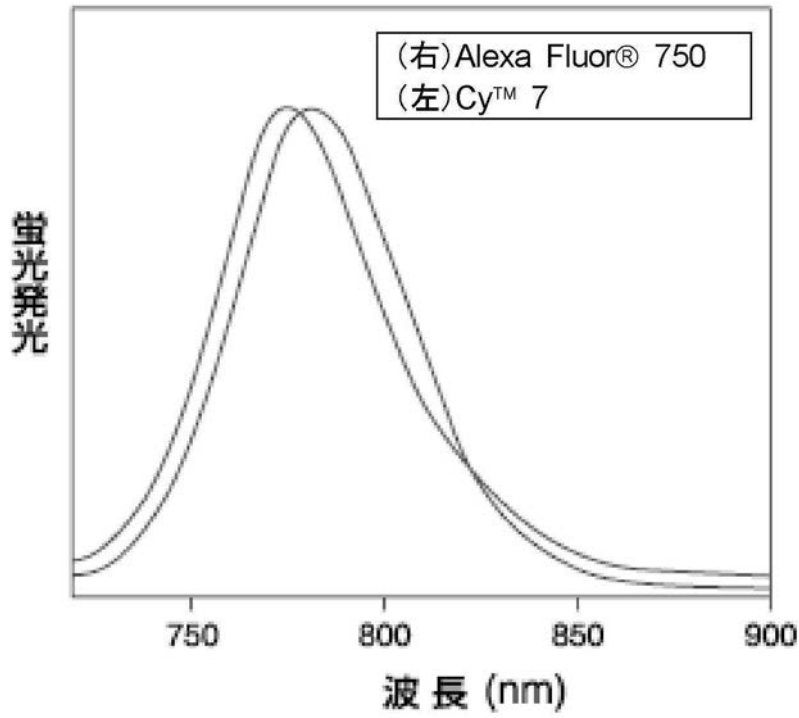
【 図 2 】



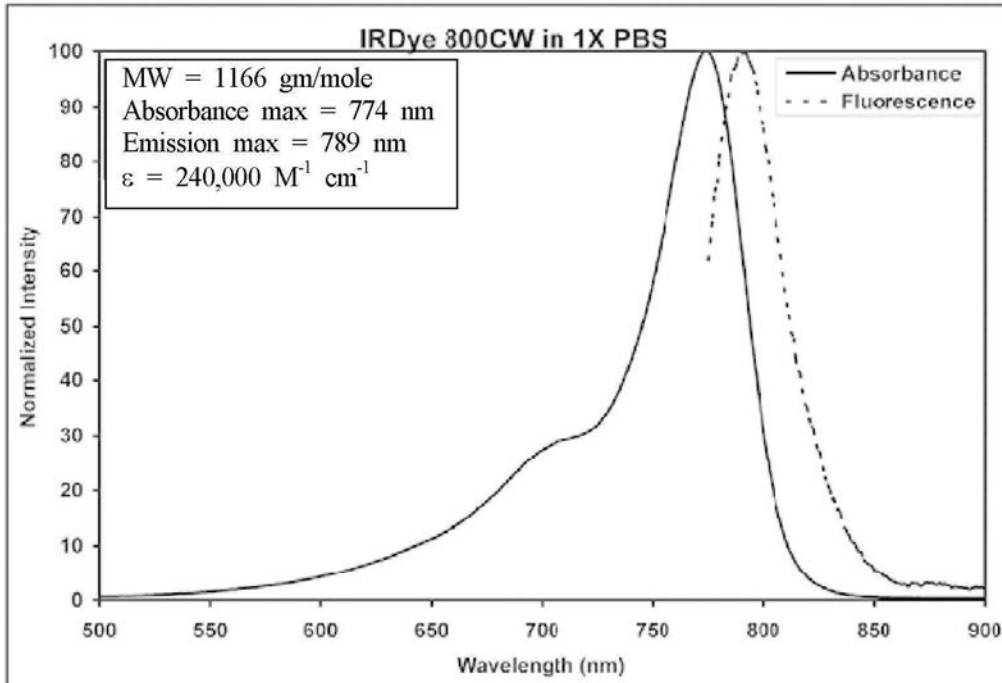
【 図 1 】



【 図 3 】

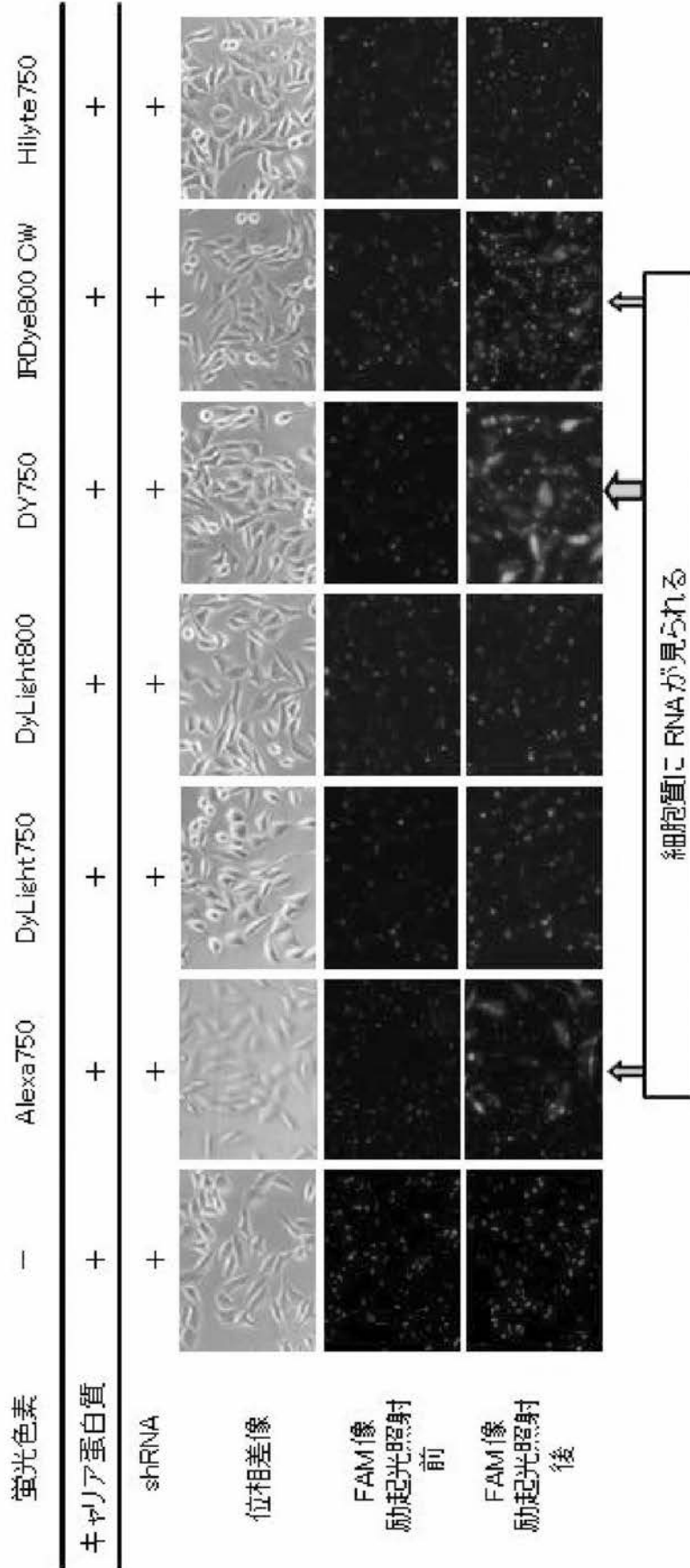


【 図 4 】

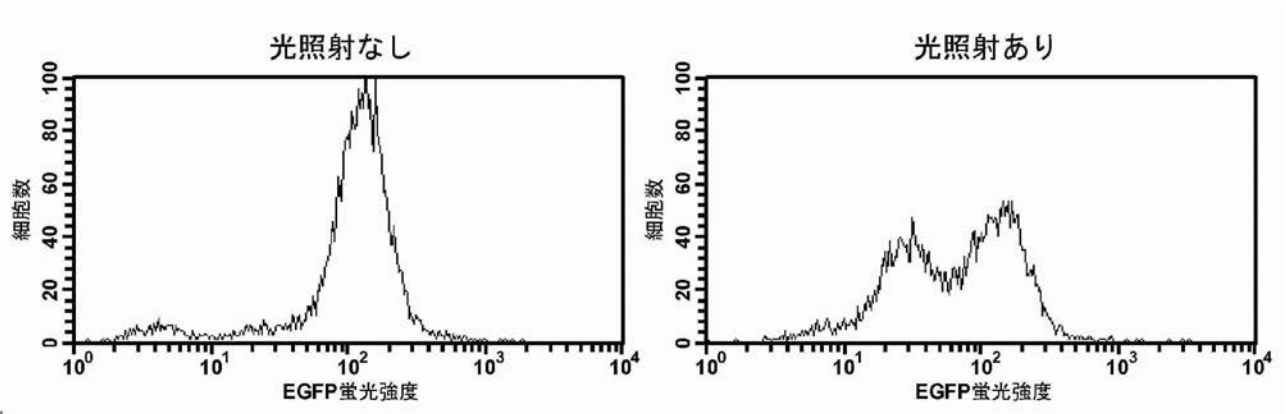




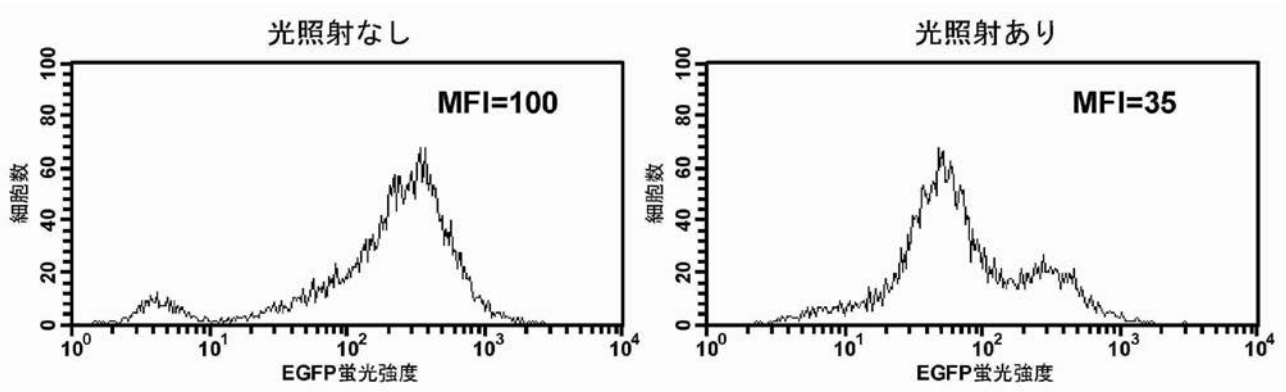
【 図 5 】



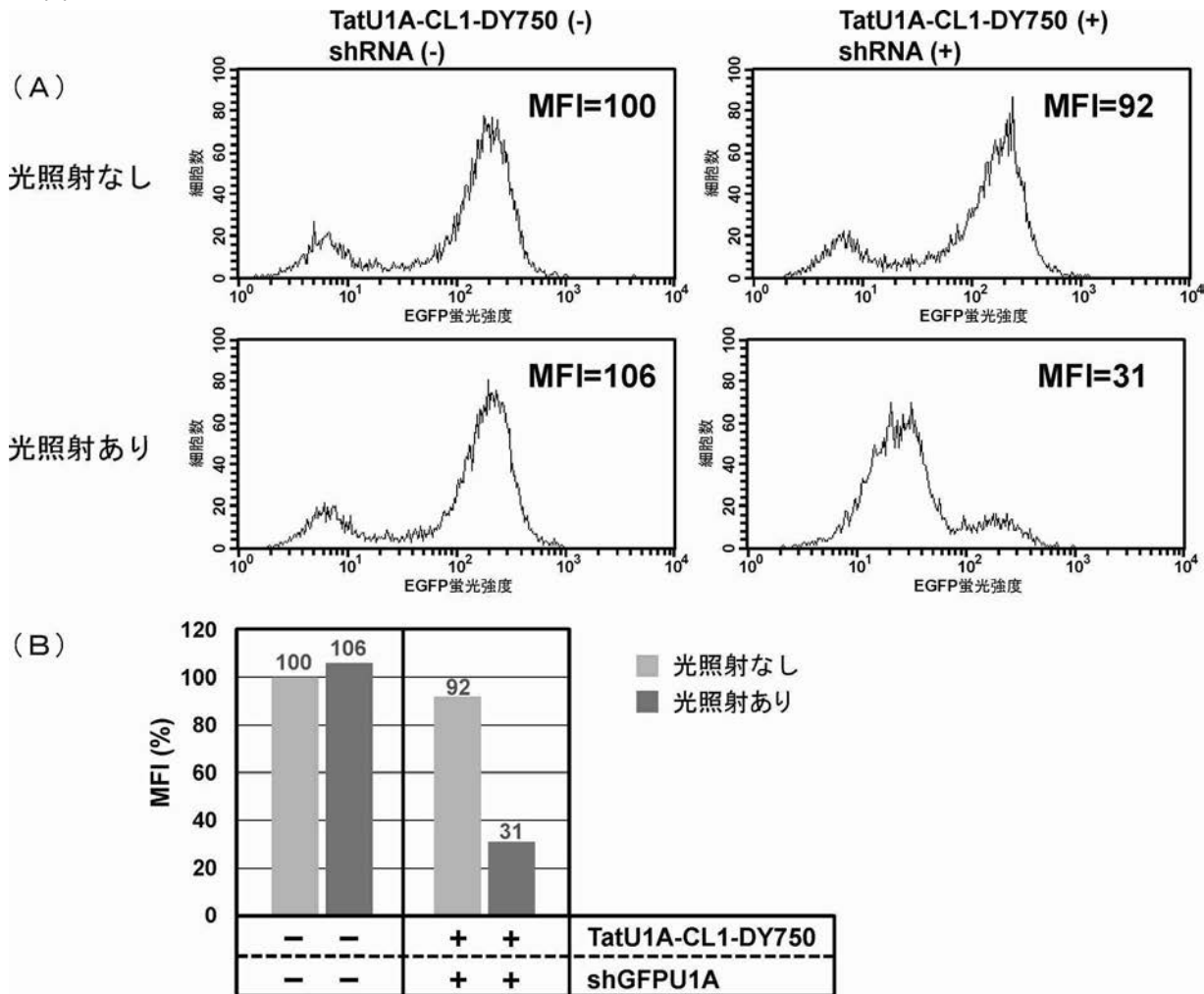
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

2012127739000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成24年4月6日 (2012.4.6)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

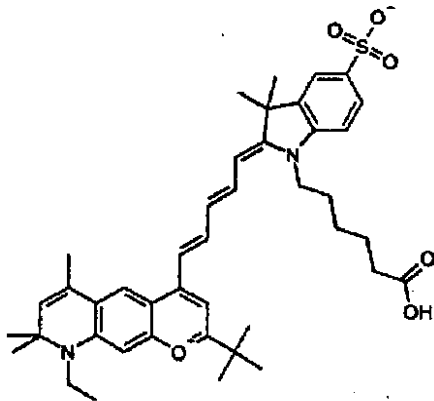
【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

細胞膜透過性ペプチド (CPP) および RNA 結合性蛋白質 (RBP) を含むキャリア蛋白質と、該キャリア蛋白質の N 末端側または C 末端側に連結した、700 nm ~ 1000 nm の波長を有する光で機能する光増感剤 (PST) とからなる構造を有するキャリア分子であって、

前記光増感剤 (PST) は、下記構造式で表される化合物 (DY750)、図 3 に示す蛍光スペクトルを有する化合物 (Alexa Fluor 750) または図 4 に示す吸収スペクトルを有する化合物 (IRDye 800CW) であることを特徴とするキャリア分子。

## 【化 1】



## 【請求項 2】

(削除)

## 【請求項 3】

(削除)

## 【請求項 4】

前記キャリア蛋白質が、さらにプロテアソーム分解シグナル配列タグ (PDS) および / または His - rich タグ (HR) を含む、請求項 1 に記載のキャリア分子。

## 【請求項 5】

前記キャリア蛋白質において、N 末端側から、細胞膜透過性ペプチド (CPP)、RNA 結合性蛋白質 (RBP)、プロテアソーム分解シグナル配列タグ (PDS) および / または His - rich タグ (HR) がこの順序で連結されており、かつ当該キャリア蛋白質の C 末端側に前記光増感剤 (PST) が連結されている、請求項 1 または 4 に記載のキャリア分子。

## 【請求項 6】

前記 CPP が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する、ヒト免疫不全ウイルス由来 Tat (trans - activator of transcription) 蛋白質中の 12 アミノ酸からなるペプチドである、請求項 1、4 または 5 のいずれかに記載のキャリア分子。

**YGRKKRRQRRRG****配列番号 1**

## 【請求項 7】

前記 RBP が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を有する、ヒト由来 U1A (U1 small nuclear ribonucleoprotein A) の RNA 結合ドメインである、請求項 1 または 4 ~ 6 のいずれかに記載のキャリア分子。

**AVPETRPNHTIYINNLNEKIKKDELKKSLEYA****IFSQFGQILDILVSRSLKMRGQAFVIFKEVS****SATNALRSMQGFPPFYDKPMRIQYAKTDSDI****AKMK****配列番号 4**

## 【請求項 8】

請求項 1 または 4 ~ 7 のいずれかに記載のキャリア分子と、該 RNA キャリア分子中の RBP に結合した RNA とからなる構造を有するキャリア分子 / RNA 複合体。

## 【請求項 9】

前記 RNA が、short hairpin RNA (shRNA)、small interfering RNA (siRNA) または microRNA (miRNA) で

ある、請求項 8 に記載の R N A 複合体。

【請求項 1 0】

請求項 8 または 9 に記載のキャリア分子 / R N A 複合体を含む遺伝子治療薬。

【請求項 1 1】

がんまたはウイルス疾患を対象とする、請求項 1 0 に記載の遺伝子治療薬。

【請求項 1 2】

生体外において、請求項 8 または 9 に記載のキャリア分子 / R N A 複合体を細胞と接触させて当該細胞内のエンドソームに局在化させる工程、および該キャリア分子 / R N A 複合体中の P S T が機能する近赤外線領域の波長を有する光を照射して該キャリア分子 / R N A 複合体を細胞質中に拡散させる工程を含むことを特徴とする、細胞質内への R N A の送達方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077075

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/00-15/90, A61K31/7105, A61K47/42, A61K47/48, A61K48/00, A61K49/00, A61P31/12, A61P35/00, C07K7/08, C07K14/155, C07K14/47, C07K19/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), G-Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ENDO, T. et.al., Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi. J. Control. Release, 2009, vol.137, no.3, pp.241-245	1-12
A	ENDO, T. et.al., Photo inducible RNA interference using cell permeable protein carrier. Nucleic Acids Symp. Ser., 2007, no.51, pp.127-128	1-12
A	ENDO, T. et.al., Cellular siRNA delivery mediated by a cell-permeant RNA-binding protein and photoinduced RNA interference. Bioconjugate Chem., 2008, vol.19, no.5, pp.1017-1024	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 19 January, 2012 (19.01.12)		Date of mailing of the international search report 31 January, 2012 (31.01.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077075

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takashi OTSUKI et al., "Cellular RNA delivery using carrier peptides", Journal of Japanese Biochemical Society, 2009, vol.81, no.2, pages 110 to 112	1-12
A	Takashi OTSUKI et al., "RNA Delivery using Cell-Permeable RNA-Binding Protein", Kobunshi, 2009, vol.58, no.3, pages 140 to 141	1-12
A	ENDO, T. et.al., Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. Adv. Drug Deliv. Rev., 2009, vol.61, no.9, pp.704-709	1-12
A	ENDO, T. et.al., Cellular siRNA delivery using TatU1A and photo-induced RNA interference. Methods Mol. Biol., 2010, vol.623, pp.271-281	1-12
A	JP 2006-280261 A (Toyobo Co., Ltd.), 19 October 2006 (19.10.2006), (Family: none)	1-12
A	MAIOLO, J.R. III et.al., Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination. J. Am. Chem. Soc., 2004, vol.126, no.47, pp.15376-15377	1-12
P,A	Yuka ISHIODORI et al., "Kashiko Shosha ni yoru RNAi no Jikukanteki Seigyoho (CLIP-RNAi-ho)", Experimental Medicine, 2011 May, vol.29, no.8, pages 1297 to 1302	1-12
P,A	MATSUSHITA-ISHIODORI, Y. et.al., Photosensitizing carrier proteins for photoinducible RNA interference. Bioconjugate Chem., 2011 Oct., vol.22, no.11, pp.2222-2226	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/077075

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

*C07K14/155(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i*

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



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 7 0 7 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C07K14/155(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i											
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))											
Int.Cl. C12N15/00-15/90, A61K31/7105, A61K47/42, A61K47/48, A61K48/00, A61K49/00, A61P31/12, A61P35/00, C07K7/08, C07K14/155, C07K14/47, C07K19/00											
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>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012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	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012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)											
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), G-Search											
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	ENDO, T. et. al., Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi. J. Control. Release, 2009, vol.137, no.3, pp.241-245	1-12									
A	ENDO, T. et.al., Photo inducible RNA interference using cell permeable protein carrier. Nucleic Acids Symp. Ser., 2007, no.51, pp.127-128	1-12									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 19.01.2012		国際調査報告の発送日 31.01.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 戸来 幸男	4 B 3964								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/077075
C (続き) . 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	ENDO, T. et.al., Cellular siRNA delivery mediated by a cell-permeant RNA-binding protein and photoinduced RNA interference. Bioconjugate Chem., 2008, vol.19, no.5, pp.1017-1024	1-12
A	大槻高史 外, キャリアペプチドによるRNAの細胞内導入法. 生化学, 2009, vol.81, no.2, pp.110-112	1-12
A	大槻高史, 細胞内侵入性RNA結合タンパク質によるRNAデリバリー. 高分子, 2009, vol.58, no.3, pp.140-141	1-12
A	ENDO, T. et.al., Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. Adv. Drug Deliv. Rev., 2009, vol.61, no.9, pp.704-709	1-12
A	ENDO, T. et.al., Cellular siRNA delivery using TatU1A and photo-induced RNA interference. Methods Mol. Biol., 2010, vol.623, pp.271-281	1-12
A	JP 2006-280261 A (東洋紡績株式会社) 2006.10.19. (ファミリーなし)	1-12
A	MAIOLO, J.R. III et.al., Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination. J. Am. Chem. Soc., 2004, vol.126, no.47, pp.15376-15377	1-12
P, A	石躍由佳 外, 可視光照射によるRNA iの時空間的制御法(CLI P-RNA i法). 実験医学, 2011 May, vol.29, no.8, pp.1297-1302	1-12
P, A	MATSUSHITA-ISHIODORI, Y. et.al., Photosensitizing carrier proteins for photoinducible RNA interference. Bioconjugate Chem., 2011 Oct., vol.22, no.11, pp.2222-2226	1-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/077075

## 第 I 欄 ニュ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、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 提出手段
- 紙形式
- 電子形式
- b. 提出時期
- 出願時の国際出願に含まれていたもの
- この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), EP(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, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(出願人による申告) 平成 2 3 年度、独立行政法人科学技術振興機構、知財活用促進ハイウェイ、産業技術力強化法第 1 9 条の適用を受ける特許出願

F ターム(参考) 4C076 CC27 CC35 CC41 DD60 EE41 FF34  
 4C084 AA13 NA13 NA14 ZB262 ZB332  
 4C085 KB92 LL18  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA05 ZB26 ZB33  
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA16 BA41 CA05 CA40 EA20 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項(実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。