

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503791

(P2005-503791A)

(43) 公表日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/02	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/12	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 140 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-521831 (P2003-521831)	(71) 出願人	501278766 アノシス・インコーポレーテッド ANOSTS, INC. アメリカ合衆国、カリフォルニア 940 25、メンロー・パーク、ハミルトン・コ ート 1014
(86) (22) 出願日	平成14年8月14日 (2002.8.14)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月17日 (2004.2.17)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/009108	(72) 発明者	デルケール, アラン アメリカ合衆国、カリフォルニア 951 24、サン・ノゼ、レックスフォード・ア ベニュー 2812
(87) 国際公開番号	W02003/016522		
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		
(31) 優先権主張番号	60/313, 159		
(32) 優先日	平成13年8月17日 (2001.8.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/343, 991		
(32) 優先日	平成13年12月26日 (2001.12.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エクソゾームにタンパク質を標的化する方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は膜小胞内にポリペプチドを選択的に発現させる組成物および方法に関する。発明はまたこの様な膜小胞の産生に好適な遺伝子構築物および組換え体細胞にも関する。本発明はまた機能化された膜小胞、並びにこれを用いた抗体産生方法、免疫反応を誘導または制御する方法、および結合相手をスクリーニングまたは同定する方法にも関する。より具体的には、発明はラクタドヘドリンまたはその一部を用いて、天然または合成起源の膜小胞内にポリペプチドを選択的に発現する。本発明は実験、研究、治療、予防または診断分野に利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分を含む標的化ポリペプチドと融合したポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；および

(ii) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内にインビボまたはエクソビボで導入し、組換え体エクソゾームを生成すること；

を含む、エクソゾームにポリペプチドを標的化する方法。

【請求項 2】

a) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分を含む標的化ポリペプチドと融合したポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること； 10

b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して組換え体エクソゾームを生成すること、および

c) 前記キメラ遺伝子構築物にコードされるポリペプチドを表面に有している、前記組換え体エクソゾームを収集すること；

を含む、エクソゾーム表面にポリペプチドを選択的に発現する方法。

【請求項 3】

ラクタドヘドリンまたはその一部分が哺乳動物ラクタドヘリンまたはその一部分である、請求項 1 または 2 記載の方法。 20

【請求項 4】

ラクタドヘドリンまたはその一部分が、

(i) ヒトラクタドヘリンまたはマウ斯拉クタドヘリン

(ii) 機能的 C 1 および／または C 2 ドメインを含むヒトラクタドヘリンまたはマウ斯拉クタドヘリンの断片、および

(iii) (i) または (ii) のポリペプチドと少なくとも 50% の一次構造同一性を含むポリペプチド；

より選択される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

ラクタドヘドリンが配列番号 7、8、10 または機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその断片を含むアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 6】

ラクタドヘリンが配列番号 7、8 または 10 の機能的 C 1 / C 2 ドメインを含むアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

ラクタドヘリンが配列番号 7 のアミノ酸残基 69～225、229～387 若しくは 69～387、または配列番号 10 のアミノ酸残基 111～266、109～266、271～426、111～426 若しくは 109～426 を含むアミノ酸配列を有する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

標的化ポリペプチドが De1-1、ニューロピリン-1、凝固第 V 因子または凝固第 VIII 因子の機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含む、請求項 1 または 2 記載の方法。 40

【請求項 9】

キメラ遺伝子構築物が、コードされたキメラポリペプチドのエクソゾーム産生細胞の小胞体内への分泌に好都合であるリーダーシグナル配列を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

ポリペプチドが標的化ポリペプチドの上流、下流または内部ドメイン部連結部のいずれかで融合する、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

ポリペプチドが抗原、サイトカイン、リガンド、受容体、免疫グロブリン、マーカーポリペプチド、酵素およびイオンチャンネル、またはそれらの一部分から選択される、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

異なるポリペプチドをコードする複数の異なるキメラ遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入する、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

エクソゾーム産生細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

エクソゾーム産生細胞がマウス細胞であり、且つラクタドヘリンがマウスラクタドヘドリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 15】

エクソゾーム標的化ポリペプチドをスクリーニング、同定または選択する方法であって、
 ー候補ポリペプチド、好ましくは候補膜貫通ポリペプチドをコードする第一遺伝子構築物を提供すること；
 ーこの第一遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、エクソゾーム内への候補ポリペプチドの発現を試験すること；
 ーエクソゾーム内で発現する候補ポリペプチドを選択し、標的にされたポリペプチドと融合した前記選択の候補ポリペプチドをコードする第二遺伝子構築物を調製すること；
 ー第二遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、エクソゾーム内への融合ポリペプチドの発現を試験すること；および
 ー標的にされたポリペプチドをエクソゾーム内に効率的に発現させる候補ポリペプチドを選択すること；
 を含む方法。

【請求項 16】

a) 標的化ポリペプチドと融合したポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物を提供することであって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘドリンまたは機能的 C 1 および／または C 2 ドメインを含むその一部、および (ii) 請求項 15 に記載の方法により同定される標的化ポリペプチドから選択されること；
 b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、表面に前記ポリペプチドを担持する機能化エクソゾームを生成すること、および
 c) 前記機能化エクソゾームを収集および／または精製すること；
 を含む機能化エクソゾームの調製方法。

【請求項 17】

選択した膜貫通ポリペプチドを発現するエクソゾームを産生する方法であって、
 ー請求項 15 に記載の方法により標的化ポリペプチドを選択すること、
 ー標的化ポリペプチドと融合した選択した膜貫通ポリペプチドをコードする遺伝子構築物を提供すること、
 ー遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に発現すること、および
 ー前記修飾した細胞からエクソゾームを産生し、そして単離すること；
 を含む方法。

【請求項 18】

GPCR または少なくとも 1 個の膜貫通ドメインを含むその一部分を発現するエクソゾームを産生する方法であって、
 ー膜貫通ドメインを含み、および／または請求項 15 に記載の方法により同定される標的化ポリペプチドと融合した GPCR またはその一部分をコードする遺伝子構築物を提供すること、
 ー遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に発現させること、および

10

20

30

40

50

ー GPCR またはその一部分を発現する前記修飾した細胞からエクソゾームを産生および単離すること；
を含む方法。

【請求項 19】

請求項 16 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法で調製した機能化エクソゾーム。

【請求項 20】

組換え体 GPCR またはその一部分を発現する機能化エクソゾーム。

【請求項 21】

請求項 19 または 20 に記載の機能化エクソゾームおよび医薬的に許容可能な賦形剤または担体を含む組成物。

10

【請求項 22】

a) 標的化ポリペプチドと融合したポリペプチドまたはそのエピトープをコードするキメラ遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C1 および／若しくは C2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 請求項 15 に記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択される、キメラ遺伝子構築物を提供すること；

b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して前記ポリペプチドまたはエピトープを表面に提示する組換え体エクソゾームを生成すること、

c) 前記組換え体エクソゾームを収集し、前記エクソゾームまたはその一部分をヒト以外の哺乳動物に注入して前記ポリペプチドまたはエピトープに結合する抗体を生成すること、および

20

d) 前記哺乳動物より抗体または抗体産生細胞を収集すること；

を含む、ポリペプチドを結合する抗体の産生方法。

【請求項 23】

a) 標的化ポリペプチドと融合した抗原をコードするキメラ遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C1 および／若しくは C2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 請求項 15 に記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択される、キメラ遺伝子構築物を提供すること；

b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して前記抗原を表面に提示する組換え体エクソゾームを生成すること、

30

c) 前記組換え体エクソゾームを収集し、前記エクソゾームまたはその一部分を被検体に注入すること；

を含む抗原を被検体に配送する方法。

【請求項 24】

抗原が腫瘍、ウイルスまたは微生物抗原である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

標的化ポリペプチドと融合した対象のポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C1 および／若しくは C2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 請求項 15 に記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択される、キメラ遺伝子構築物。

40

【請求項 26】

標的化ポリペプチドが MART1/MelanA、CD81 若しくは CD40L または膜貫通ドメインを含むそれらの断片である、請求項 25 記載のキメラ遺伝子構築物。

【請求項 27】

対象のポリペプチドが抗原、サイトカイン、リガンド、受容体、免疫グロブリン、マーカーポリペプチド、酵素およびイオンチャネル、またはその一部分より選択される、請求項 25 または 26 に記載のキメラ遺伝子構築物。

【請求項 28】

配列番号 22～27、32 及び 33、または C 末端の 8 アミノ酸残基を欠くそれらの断片より選択されたポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物。

50

【請求項 29】

請求項 28 記載のキメラ構築物を含むベクター。

【請求項 30】

請求項 28 のキメラ構築物を含む組換え体細胞。

【請求項 31】

- a) 標的化ポリペプチドと融合したポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、及び (ii) 請求項 15 に記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択される、キメラ遺伝子構築物を提供すること；
- b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して前記ポリペプチドを表面に提示する組換え体エクソゾームを生成すること、
- c) (b) の組み換え体エクソゾームを候補化合物と接触させ、前記エクソゾーム上にある前記ポリペプチドに結合する前記候補化合物の能力を決定すること；
- を含むポリペプチドのリガンドまたは結合相手を選択または同定する方法。

【請求項 32】

- a) 標的化ポリペプチドと融合した前記抗原をコードするキメラ遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、及び (ii) 請求項 15 に記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択されるキメラ遺伝子構築物を提供すること；
- b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して前記抗原を表面に担持する組換え体エクソゾームを生成すること、
- c) 組み換え体エクソゾームを収集し、そして場合により、この組換え体エクソゾームをエクソピボで被検体からの樹状細胞と接触させること、および
- d) 前記組換え体エクソゾームまたは前記の接触させた樹状細胞、または前記接触させた樹状細胞が産生するエクソゾームのようなその一部分を前記被検体に注入すること；
- を含む被検体に抗原を配送する方法。

【請求項 33】

- ーラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分を含むキメラ分子を提供すること；
- ー前記キメラ分子をホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質を含む脂質小胞と接触させ、表面に抗原を提示する機能化脂質小胞を作製すること、および
- ーヒト以外の哺乳動物をこの機能化脂質小胞で免疫し、前記抗原に結合する抗体を産生すること；
- を含む抗体産生方法。

【請求項 34】

- ーラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分と融合した抗原を含むキメラ分子を提供すること；
- ー前記キメラ分子をホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質を含む脂質小胞と接触させ、表面に前記抗原を担持する機能化脂質小胞を作製すること、および
- ー前記機能化脂質小胞をラクタドヘリン存在下にエクソピボで被検体由来の樹状細胞と接触させること、および
- ー前記接触させた樹状細胞または前記接触させた樹状細胞が産生するエクソゾームのようなその一部分を前記被検体に注入すること；
- を含む被検体に抗原を配送する方法。

【請求項 35】

- ーラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分と融合した抗原を含むキメラ分子を提供すること；
- ー前記キメラ分子をホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれる他の脂

質を含む脂質小胞と接触させ、表面に前記抗原を担持する機能化脂質小胞を作製すること、および

－前記機能化小胞またはその一部分を前記被検体にラクタドヘリン存在下に注入すること；

を含む被検体に抗原を配送する方法。

【請求項 36】

－ホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれる他の脂質を含む脂質小胞であって、前記小胞がラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分を含み、反応性化学基により活性化されている活性化ラクタドヘドリンを担持する脂質小胞を提供すること；

10

－機能化脂質小胞を産生するために、前記脂質小胞を前記反応性化学基と相互作用する化合物と接触させること、および

－場合により、前記機能化脂質小胞を精製すること；

を含む、機能化脂質小胞を産生する方法。

【請求項 37】

脂質小胞がエクソゾームまたはリポソームである、請求項 36 記載の方法。

【請求項 38】

ラクタドヘリンまたはその一部分を含むポリペプチドを産生する方法であって、

a) 前記ポリペプチドをコードする遺伝子構築物を提供すること；

b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して前記ポリペプチドを表面に提示する機能化エクソゾームを生成すること、

20

c) 場合により、前記機能化エクソゾームを収集および／または精製すること、および

d) 前記ポリペプチドまたはその断片を前記機能化エクソゾームより回収および／または精製すること；

を含む方法。

【請求項 39】

ラクタドヘドリンをコードする遺伝子をエクソゾーム産生細胞内に導入して表面にラクタドヘドリンを提示する機能化エクソゾームを生成すること、場合により前記機能化エクソゾームを収集および／または精製すること、および前記機能化エクソゾームよりラクタドヘリンを回収および／または精製することを含む、ラクタドヘドリン産生のための請求項 38 記載の方法。

30

【請求項 40】

a) 標的化ポリペプチドと融合したポリペプチドをコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／または C 2 ドメインを含むその一部分、及び (ii) 請求項 15 に記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択され、前記ポリペプチドが切断部位を含むスペーサー配列を介して前記標的化ポリペプチドと融合する遺伝子構築物を提供すること；

b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して前記ポリペプチドを表面に提示する機能化エクソゾームを生成すること、

40

c) 場合により、前記機能化エクソゾームを収集および／または精製すること、

d) 前記機能化エクソゾームを、前記切断部位を切断する作用物質で処理すること、および

e) 前記ポリペプチドを回収および／または精製すること；

を含む請求項 38 記載の方法。

【請求項 41】

被検体に標的化ポリペプチドと融合した抗原をコードする遺伝子構築物を注入することを含み、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘドリンまたは機能的 C 1 並びに／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分および (ii) 請求項 15 記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択される、被検体に抗原を配送する方法。

【請求項 42】

50

標的化ポリペプチドと融合した抗原をコードする遺伝子構築物を被検体に注入することを含み、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘドリンまたは機能的 C 1 並びに／または C 2 ドメインを含むその一部分及び (ii) 請求項 1 5 記載の方法により同定された標的化ポリペプチドから選択される、特定抗原に対する免疫反応を被検体に産生する方法。

【請求項 4 3】

遺伝子構築物が裸の DNA または RNA であり、前記遺伝子構築物が裸の形態で筋肉内への直接注入により投与される、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

ラクタドヘリン、又は、ラクタドヘリン若しくは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分と融合したアクセサリ分子をコードする遺伝子構築物を被検体に注入することを更に含む、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。 10

【請求項 4 5】

遺伝子構築物が遺伝子銃を用い裸の形態で注入される、請求項 4 2 記載の方法。

【請求項 4 6】

アクセサリ分子がアジュバントである、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 7】

アクセサリ分子が細胞標的化ポリペプチドである、請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 8】

ラクタドヘリンが配列番号 7 のアミノ酸残基 6 9 ～ 2 2 5、2 2 9 ～ 3 8 7 若しくは 6 9 ～ 3 8 7、又は配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 1 1 ～ 2 6 6、1 0 9 ～ 2 6 6、2 7 1 ～ 4 2 6、1 1 1 ～ 4 2 6 若しくは 1 0 9 ～ 4 2 6 を含むアミノ酸配列を有する、請求項 4 2 記載の方法。 20

【請求項 4 9】

アジュバントが GM-CSF および IL-2 のようなポリペプチドサイトカイン、または CD 4 0 L である、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 5 0】

標的化ポリペプチドが免疫グロブリンの F c 断片である、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 5 1】

遺伝子構築物がウイルス内に投与される、請求項 4 1 または 4 2 記載の方法。

【請求項 5 2】

遺伝子構築物がプラスミド内に投与される、請求項 4 1 または 4 2 記載の方法。 30

【請求項 5 3】

遺伝子構築物がエレクトロポレーションで投与される請求項 4 1 または 4 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

標的化ポリペプチドと融合した抗原を含むキメラポリペプチドを被検体に注入することを含み、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、及び請求項 1 5 記載の方法で同定される標的化ポリペプチドより選択される、特定抗原に対する免疫反応を被検体に産生する方法。

【請求項 5 5】

標的化ポリペプチドと融合した抗原をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 請求項 1 5 記載の方法で同定される標的化ポリペプチドより選択される遺伝子構築物、および (a) 標的化ポリペプチドと融合した免疫アクセサリ分子をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 請求項 1 5 記載の方法で同定される標的化ポリペプチドより選択される遺伝子構築物、または (b) ラクタドヘドリンをコードする遺伝子構築物、を含む組成物。 40

【請求項 5 6】

(a) 標的化ポリペプチドと融合した抗原をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメイン 50

を含むその一部分、および (ii) 請求項 15 記載の方法により同定される標的化ポリペプチドより選択される遺伝子構築物、および

(b) 標的化ポリペプチドと融合したアジュバントポリペプチドをコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C1 および／若しくは C2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 請求項 15 記載の方法により同定される標的化ポリペプチドより選択され、前記アジュバントポリペプチドが GM-CSF 若しくは IL-2 のようなサイトカインまたは CD40L である遺伝子構築物、又は

(c) 標的化ポリペプチドと融合した免疫グロブリンの Fc 断片をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C1 並びに／若しくは C2 ドメインを含むその一部分、及び (ii) 請求項 15 記載の方法により同定される標的化ポリペプチドより選択される遺伝子構築物、又は 10

(d) ラクタドヘリンをコードする遺伝子構築物、を含む請求項 55 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は膜小胞内にポリペプチドを選択的に発現させるための組成物および方法に関する。発明は、またこのような膜小胞の生成に好適な遺伝的構築物および組換え体細胞にも関する。本発明はそのように機能化された膜小胞、並びに抗体作製方法、免疫反応産生または制御方法、およびこれを用い結合相手をスクリーニングまたは同定する方法に関する。より具体的には本発明はラクタドヘリンまたはその一部を使用して膜小胞内に、天然または合成起源のポリペプチドを選択的に発現させる。本発明は実験、研究、治療、予防または診断分野に使用できる。 20

【背景技術】

【0002】

エクソゾームは後期エンドゾーム多胞体と原形質膜とが融合した後に細胞外環境内に分泌されるエンドゾーム起源の小胞である (4)。各種組織の細胞、例えば樹状細胞、Bリンパ細胞、癌細胞およびマスト細胞といった細胞がエクソゾームを分泌することが示されている。起源が異なるエクソゾームはタンパク質および脂質成分の異なるセットを提示する (5, 6)。それらは抗原提示および免疫変調に関与するタンパク質を多く含んでおり、エクソゾームが免疫反応の変調を誘導する細胞-細胞伝達に役割を果たしていることを示唆している。実際に、腫瘍抗原由来のペプチドでパルス処理した樹状細胞 (DC) 由来のエクソゾームは、適合した腫瘍を使用した動物モデルにおいて抗腫瘍反応を惹起する (7, 8)。治療目的、または研究ツールとしてエクソゾームを作製する、精製するまたは使用する方法は、例えば参照することによりここに組み込まれる国際特許 WO99/03499、WO00/44389 および WO97/05900 に記載されている。 30

【0003】

これらの免疫原のおよび治療上の特性を考えた場合、それらの特性を変えるためにエクソゾームの内容物を修飾できることは特に有用であろう。これに関しては、組換えエクソゾームが技術的に記載されているが、それは組換えタンパク質をコードするプラスミドがトランスフェクションされた細胞に由来するものである。このような組換えエクソゾームは 40 組換えタンパク質をコードするプラスミドを含む (国際特許 WO00/28001)。

【0004】

発明の概要

今回本発明は組換え体エクソゾームの新規作製方法を開示する。発明はまたエクソゾーム内にポリペプチドを選択的に発現する方法も開示する。本発明は更に新規キメラ分子および同じキメラ分子を含む組換え体細胞も記載するが、これらはこのような組換え体エクソゾームの産生に使用できる。本発明はこのような機能化膜小胞並びに抗体を作製方法、免疫反応を産生または制御する方法、および機能化膜小胞を用いて結合相手をスクリーニングするまたは同定する方法に関する。

【0005】

本発明は、ラクタドヘリンが多くのエクソゾーム産生細胞で発現されていること、およびそれら細胞内ではラクタドヘドリンの殆ど全てがエクソゾームにだけに結合して見いだされる（図1）という予想外の発見に基づいている。この高度に特異的な細胞内局在は内因性のラクタドヘドリンについて起こるが、エクソゾーム産生細胞へラクタドヘドリンをコードするプラスミドをトランスフェクションすると外因性のラクタドヘドリンについても起こる（図2）。我々はラクタドヘドリンのC1/C2ドメインの特定の短い一部分を欠失させると、ラクタドヘドリンの細胞内局在性が変わることを見いだした（図2）。これら発見は、ラクタドヘドリンのC1/C2ドメインがエクソゾーム表面に対する高度に特異的である標的化モチーフを含んでいること、そしてラクタドヘドリンのC1/C2ドメインの修飾により標的化する特異性を別の表面に向けるよう変えることができることを強く支持している。我々は、マウスおよびハムスター由来のエクソゾーム産生細胞株にヒト組換え体ラクタドヘドリンをコードするプラスミドをインビトロ（*in vitro*）でトランスフェクションした場合でも殆ど全てのヒト組換え体ラクタドヘドリンがそれぞれマウスおよびハムスターのエクソゾームにのみ結合したことから（図3）、上記現象が複数の種を越えて保存されていることを見いだした。更に、ハムスター細胞株に発現させたマウス組換え体ラクタドヘドリンもまたハムスターのエクソゾームに見いだされる（図3）。

【0006】

これらのことからラクタドヘドリンのC1および／またはC2ドメインの一部分または全体、又は機能的その等価物をタンパク質内に導入すれば、得られたキメラタンパク質をエクソゾームまたはその他脂質構造物に標的化することができると考えられる。

【0007】

発明は更に別の標的化ポリペプチドまたは遺伝子の同定を可能にする方法も開示するが、この方法を使用してエクソゾームに標的化するかまたはエクソゾーム内で発現するキメラ遺伝子またはタンパク質を構築することができる。これらキメラタンパク質を使用して、新規の望まれる機能の獲得に合わせた組換え体小胞を生成することができる。エクソゾームが固有の性質、例えば免疫原性および非毒性を有する場合、得られた組換え体エクソゾームは研究および医療分野において様々な応用に対して新規ツールになる。特にエクソゾームが持つ強い免疫反応を誘導する能力により、エクソゾームは組換え体エクソゾーム上に発現する抗原に対する抗体を調製するための理想的なツールとなる。また生物学的に活性なキメラタンパク質は、新規の治療特性の獲得に合わせた組換え体エクソゾームの生成に使用できる。ラクタドヘドリンが持つポリペプチドを標的化する能力、およびエクソゾーム内で選択的に発現されるという予想外の能力は又ラクタドヘドリンそのものを含めたこのようなポリペプチドの精製に新たな方法を提供する。

【0008】

即ち本発明の目的は、

- a) ラクタドヘドリンまたは機能的C1および／若しくはC2ドメインを含むその一部分を含む標的化ポリペプチドと融合した前記ポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；および
- b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に、インビボ（*in vivo*）またはエクソビボ（*ex vivo*）で導入して、組換え体エクソゾームを生成すること、を含むエクソゾームにポリペプチドを標的化する方法である。

【0009】

本発明の別の目的は、

- a) ラクタドヘドリンまたは機能的C1および／若しくはC2ドメインを含むその一部分と融合した前記ポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；
- b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、組換え体エクソゾームを生成すること、および
- c) 前記キメラ遺伝子構築物にコードされるポリペプチドを表面に担持する、前記組換え体エクソゾームを収集すること、

を含むエクソゾーム表面にポリペプチドを選択的に発現させる方法である。

【0010】

発明の更なる目的は、

- a) ラクタドヘドリンまたは機能的C1および／若しくはC2ドメインを含むその一部分と融合したポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；
 - b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、それらの表面に前記ポリペプチドを提示する機能化エクソゾームを生成すること、および
 - c) 前記機能化エクソゾームを収集および／または精製すること、
- を含む機能化エクソゾーム調製方法である。

【0011】

本発明の別の目的は、ラクタドヘドリンまたはその一部分を含むポリペプチドを産生する方法であって、

- a) 前記ポリペプチドをコードする遺伝子構築物を提供すること；
 - b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、それらの表面に前記ポリペプチドを提示する機能化エクソゾームを生成すること、
 - c) 前記機能化エクソゾームを収集および／または精製すること、および
 - d) 前記機能化エクソゾームから前記ポリペプチドまたはその断片を回収および／または精製すること、
- を含む方法である。

【0012】

本発明のなお更なる目的は上記方法により調製された機能化エクソゾーム並びにその種の機能化エクソゾームと医薬的に許容可能な賦形剤または担体を含む組成物である。

【0013】

本発明は更にラクタドヘドリンのC1および／またはC2ドメイン或いは以下明示するその他標的化ポリペプチドを含む標的化成分と融合した対象のポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物に関する。対象のポリペプチドは例えば抗原、サイトカイン、リガンド、受容体、免疫グロブリン、マーカーポリペプチド、酵素、イオンチャネル、またはその一部分でも良い。このようなキメラ遺伝子の具体例は、配列番号22～27、32または33より選択されるポリペプチド、或いは8個のC末端アミノ酸残基を欠くその断片をコードする。

【0014】

本発明は更に上記キメラ遺伝子構築物を含むベクター、並びに上記キメラ遺伝子構築物またはベクターを含む組換え体細胞を包含する。

【0015】

発明は更にエクソゾーム標的化ポリペプチドを同定またはスクリーニングする方法、並びに膜小胞（例えばエクソゾーム）を選択的に標的化するキメラタンパク質を生成する方法を提供する。キメラタンパク質は典型的には標的化ポリペプチドの配列、典型的にはラクタドヘドリンの配列、または機能的C1および／またはC2ドメイン、好ましくはその機能的C1／C2ドメインを含むその一部分の配列と融合したポリペプチド配列（例えば、抗原、サイトカイン、リガンド、レセプター又は免疫グロブリンのような自然に存在するタンパク質の完全又は部分配列）から構成される。

【0016】

従って本発明の更なる態様は、

- －候補ポリペプチド、好ましくは膜貫通型の候補ポリペプチドをコードする第一遺伝子構築物を提供すること；
- －この第一遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、エクソゾーム内への候補ポリペプチド発現を試験すること；
- －エクソゾーム内で発現する候補ポリペプチドを選択し、膜貫通抗原または受容体と融合した前記選択したポリペプチドをコードする第二遺伝子構築物を調製すること；
- －第二遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、エクソゾーム内への融合ポリペ

10

20

30

40

50

プチドの発現を試験すること；および一膜貫通抗原または受容体をエクソゾーム内に効率的に発現させるポリペプチドを選択すること、を含むエクソゾーム標的化ポリペプチドのスクリーニング、同定または選択方法である。

【0017】

我々の結果は、上記の方法を用いることで発現をエクソゾーム上に方向付けする特異的標的化シグナルを含む各種タンパク質またはポリペプチドを同定、選択および／または改良できることを示す。これらポリペプチドには、エクソゾーム内で発現する能力と、他分子をこのような小胞に標的化する能力の両方が求められる。これらポリペプチドは膜貫通タンパク質由来であり、その様なタンパク質の全体または一部分、典型的には少なくとも膜貫通ドメイン部分を含む。これら構築物は特に抗原、特に受容体および膜貫通タンパク質をエクソゾームに送り込むのに好適である。この方法を用いて、特異的な個々の標的化ポリペプチドを選択するか、または遺伝子構築物のライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0018】

得られた組換え体エクソゾームは、抗体産生、治療特性が向上したエクソゾームの生成、抗原の配送およびタンパク質-タンパク質相互作用の相手を同定するためのライブラリースクリーニングを含む多くの研究および治療応用に使用できる。

【0019】

本発明はまた合成脂質小胞の作製にも好都合に使用できる。実際、本発明は原形質膜二重層を含む自然にある小胞または細胞内小器官、並びにリポソームの様な脂質を含む合成小胞、或いは疎水特性を持った合成粒子の様な、エクソゾーム以外の脂質構造体に分子を標的化するのにも利用できる。この様な脂質小胞は、効率的な標的化とキメラ分子の結合を可能にするために、ホスファチジルセリンおよび／またはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質を含む（または濃縮される）様に加工されることが好ましい。

【0020】

更に本発明を利用して、人工的にラクタドヘドリンまたはその一部分に融合した選択分子を送り込むこともできる。この場合、本発明は遺伝子的融合物に限定されず、化学的融合物、即ちラクタドヘドリンと分子の化学的（共有結合）複合体も包含する。

【0021】

発明の詳細な説明

本発明は組換え体エクソゾーム産生の新規方法およびそれらの使用を開示する。より具体的には、本発明はラクタドヘドリンまたはその一部分の様な標的化ポリペプチドを使って、天然または合成起源の膜小胞内にポリペプチドを選択的に発現させるかまたは標的化する。本発明は実験、研究、治療、予防または診断分野に利用できる。

【0022】

本発明はラクタドヘドリンの新しい予想外の性質の発見に由来している。より具体的には、本発明はラクタドヘドリンがエクソゾーム内で選択的に発現されること、そしてラクタドヘドリンがこのような小胞内でのポリペプチドの選択的発現に利用可能なことを示している。

【0023】

上記の如く、本発明はエクソゾーム内にポリペプチドを標的化するまたはポリペプチドをエクソゾーム内で（選択的に）発現させる方法、エクソゾームを機能化する方法、およびポリペプチドを産生する方法を提供するが、これら方法はキメラ遺伝子またはキメラペプチドをコードする遺伝子構築物を利用する。キメラポリペプチドはラクタドヘドリンまたはその機能的ドメインに融合した対象のポリペプチドを含む。

【0024】

ラクタドヘドリン

ラクタドヘドリンは乳房組織内で最初に同定されたタンパク質である。それはミルクの成分であり、乳脂肪球の表面に複数のその他タンパク質と結合している。ラクタドヘリン

はそのN末端にインテグリンリガンド内に見いだされる配列モチーフであるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (R-G-D) を含む上皮増殖因子様 (EGF様) ドメインを含んでいる。このモチーフは $\alpha v \beta_3$ および $\alpha v \beta_5$ インテグリンへのラクタドヘリンの結合を仲介する。ラクタドヘリンのC末端はラクタドヘリンと乳脂肪球との相互作用に関係するC1/C2ドメインを含んでいる。他の細胞表面に結合する複数のその他タンパク質がC1/C2ドメインと関係している。ラクタドヘリンのC1/C2ドメインはホスファチジルセリン脂質を含む表面と優先的に結合することが示されている (参考文献1から3)。ラクタドヘリンはマウス樹状細胞が産生するエクソゾームの表面に存在することが示されている。この点に関し、国際特許WO 00/30667はラクタドヘリンまたはその変異体の使用と、樹状細胞への抗原の配送またはインビボ (in vivo) での免疫反応の仲介とを関連付けている。米国特許US 5,455,031号は長い形態のヒトラクタドヘリンのクローニングを開示している。 10

【0025】

本発明はラクタドヘリンの新たな予想外の性質、即ちポリペプチドをエクソゾーム内に選択的に発現させる、またはエクソゾームにポリペプチドを標的化するラクタドヘリンの能力の発見に由来するものである。

【0026】

本発明の文脈の中では、用語「選択的」は、他の細胞コンパートメントまたは膜内に残留物または微量のラクタドヘリンが存在することが観察されることはあっても、細胞が発現するラクタドヘリン (またはキメラポリペプチド) のほとんどがエクソゾームに限定して存在することを意味する。本発明の一部は、ラクタドヘリンが主にエクソゾーム表面に発現され、そしてこれを使用してラクタドヘリンに結合した要望分子が濃縮されたエクソゾームまたは脂質小胞を産生できるという予想外の決定に基づいている。 20

【0027】

本発明の明細書の中では、それら表面に分子を「担持する」エクソゾーム (または小胞) という用語は、それらの膜に結合したそのような分子を含んでいる小胞を意味する。分子は小胞の外側に露出している、または小胞内に含まれていてもよい (即ち膜の内側に結合している)。典型的には、本発明は小胞膜での分子の効率的な提示、即ち小胞外側へのそれらの露出を可能にする。

【0028】

本発明の実施に於いては、様々な供給源または起源のラクタドヘリンを使用することが可能である。典型的には哺乳動物のラクタドヘリンまたはその一部分を使用することが好ましい。哺乳動物のラクタドヘリンとしては、例えばヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタおよびウマラクタドヘリンがある。最も好ましいラクタドヘリンはヒトまたはマウスラクタドヘリン、或いはその断片または機能的等価物である。 30

【0029】

この点について、本発明は：

(i) ヒトラクタドヘリンまたはマウスラクタドヘリン

(ii) 機能的C1および/またはC2ドメイン、より好ましくは機能的C1/C2ドメインを含むヒトラクタドヘリンの断片またはマウスラクタドヘリンの断片、或いは 40

(iii) (i) または (ii) のポリペプチドと少なくとも50%の一次構造同一性を含むポリペプチド、
を好ましくは用いる。

【0030】

ヒトラクタドヘリンのアミノ酸配列は配列番号7 (長い形態) および8 (短い形態) に記載されている。対応する核酸分子の例は配列番号5および6にそれぞれ示している。マウスラクタドヘリンのアミノ酸配列は配列番号10に記載されている。またスタブスら (PNAS 87 (21)、1990、8417) およびジーンバンクアクセッションM38337を参照。

【0031】

本発明の具体的実施態様では、キメラ遺伝子は配列番号 7、8、10 を含むアミノ酸配列を有するラクタドヘリン、または機能的 C 2 ドメインを含むその断片を包含する。

【0032】

本発明の別の具体的実施態様では、キメラ遺伝子は配列番号 7、8、10 を含むアミノ酸配列を有するラクタドヘリン、または機能的 C 1 ドメインを含むその断片を包含する。

【0033】

本発明の更なる具体的実施態様では、キメラ遺伝子は配列番号 7、8、10 の機能的 C 1 / C 2 ドメインを含むアミノ酸配列を有するラクタドヘリンを包含する。

【0034】

ヒトラクタドヘリンの C 2 ドメインは配列番号 7 のアミノ酸残基 229 ~ 387 内に包含される。ヒトラクタドヘリンの C 1 ドメインは配列番号 7 のアミノ酸残基 69 ~ 225 内に包含される。典型例では、キメラ構築物は少なくとも配列番号 7 のアミノ酸残基 229 ~ 387 または 69 ~ 225 をコードする。更に別の具体的実施態様では、キメラ構築物は配列番号 7 の少なくともアミノ酸 69 ~ 387 をコードする。 10

【0035】

マウ斯拉クタドヘリンの C 2 ドメインは配列番号 10 のアミノ酸残基 271 ~ 426 内に包含される。マウ斯拉クタドヘリンの C 1 ドメインは配列番号 10 のアミノ酸残基 111 ~ 266 内に包含される。典型例では、キメラ構築物は配列番号 10 の少なくともアミノ酸残基 111 ~ 266 または 271 ~ 426 をコードする。更に別の具体的実施態様では、キメラ構築物は配列番号 10 の少なくともアミノ酸 111 ~ 426 をコードする。別の 20
具体的実施態様では、キメラ構築物は配列番号 10 の少なくともアミノ酸 109 ~ 426 をコードする。

【0036】

上記の如く、標的化成分は上記 (i) または (ii) のポリペプチドと少なくとも 50 % の一次構造同一性を有するポリペプチドでよい。同一性はコンピュータープログラムの様な各種公知技術により、好ましくは CLUSTAL 法により決定できるだろう。より好ましくは、標的化ポリペプチドは (i) または (ii) のポリペプチドと少なくとも 60 % の同一性、好都合には少なくとも 70 % の同一性を有する。この様なラクタドヘリンの変異体 (または機能的等価物) はポリペプチドをエクソゾームに標的化できる能力を保持していなければならない。この特性は実施例記載の如くにして実証できるが、例えばマーカーポリ 30
ペプチドと融合した前記変異体を含むキメラ遺伝子を作製し、これをエクソゾーム産生細胞内に発現させ、そしてエクソゾーム表面にマーカーポリペプチドがあることを決定することで実証できるだろう。好ましいラクタドヘリン変異体は上記 (i) または (ii) のポリペプチドと少なくとも 85 % の同一性を有する。考え得る変異体としては、アミノ酸欠失、置換、突然変異および / または付加が挙げられる。

【0037】

この様な変異体または機能的等価物の具体例としては、別の C 1 / C 2 ドメインを含むポリペプチドまたはタンパク質、或いはその断片が挙げられる。特には、この種の機能的変異体の具体例として Del-1、ニューロピリン-1、凝固 V 因子および凝固 VIII 因子、またはそれらの機能的 C 1 および / または C 2 ドメインを含むそれらの断片を挙げるこ 40
とができる。

【0038】

標的化ポリペプチドのスクリーニング

本発明はまた、追加の効率的標的化ポリペプチドが産生、スクリーニングおよび / または単離できることを開示する。具体的には、本発明はポリペプチドを、それらの持つエクソゾーム内での発現能力およびそのような小胞に他ポリペプチドを配送する能力に対して選択できることを示す。本発明は、エクソゾーム内に自然に発現するポリペプチドが効率的な標的化ポリペプチドを必ずしも代表としていないことを示す、一方、これら小胞内に自然に発現しないポリペプチドは人工的に産生され、対象のポリペプチドの効率的な配送をもたらすことができることを示す。本発明はまたエクソゾーム内に通常発現されないポリ 50

ペプチドを、組換え体DNA技術によりそのようなコンパートメント内に押し込むことができることも示す。

【0039】

エクソゾーム上にのみ見いだされるラクタドヘリンの様なエクソゾーム特異的タンパク質は、エクソゾームへのタンパク質の標的化にとって好ましいものであるが、エクソゾーム内に豊富に存在しているかまたはエクソゾームに限定されないタンパク質もまた、他のタンパク質によるエクソゾームへの標的化に関する潜在的候補物である。発明はまたこのような候補物を同定し、使用する手段も提供する。例を挙げると、我々は膜貫通分子であるMe1anA/MART1、CD40LおよびCD81をコードするプラスミドを細胞にトランスフェクションすると、これら分子の組換え体がエクソゾーム内に発現することを見いだした。これらの結果は実施例6に記載されている。Me1an/MART1は最近腫瘍細胞由来のエクソゾーム内に見いだされた腫瘍関連細胞内膜タンパク質である。この出来事は、エクソゾームが完全長の腫瘍抗原をAPCに移送できることを反映するものであることを示唆している(9)。我々の発見は、Me1anA/MART1が実際にMe1anA/MART1⁺腫瘍エクソゾームに由来するエクソゾーム内に組み込まれた構成要素であることを示している。CD40Lは免疫反応の重要な促進因子であり、そしてそれがエクソゾーム上に見いだすことができるという我々の発見は新規な発見である。これに対しCD81はエクソゾームの既知の構成要素であり、これまでにB細胞由来エクソゾーム内に豊富に存在することが示されている。我々は7回膜貫通受容体の一つであるCCR7に融合したMe1anA/MART1またはCD81を含むキメラタンパク質を構築し、Me1anA/MART1-CCR7キメラタンパク質がエクソゾーム上にほとんど局限して発現されるのに対し、単独のCCR7は細胞の表面にのみ検出されることを見いだした。これに対し、そして驚くべき事に、CD81はエクソゾームによって自然に発現されているという事実があるにもかかわらず、CCR7とのCD81キメラ構築物は検出可能なタンパク質を生じなかった(実施例6参照)。故に我々の方法は効率的なエクソゾーム標的化ポリペプチドが存在すること、および抗原、特に膜貫通抗原および受容体をエクソゾームに標的化するのに利用可能なポリペプチドを同定し、そして選択することを可能にすることを示している。

【0040】

従って本発明の別の態様は、エクソゾーム標的化ポリペプチドをスクリーニング、同定または選択する方法であって、

- 候補のポリペプチド、好ましくは膜貫通型の候補ポリペプチドをコードする第一遺伝子構築物を提供すること；
- 第一遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、エクソゾーム内への候補ポリペプチドの発現を試験すること；
- エクソゾーム内に発現している候補ポリペプチドを選び出し、この選択したポリペプチドと標的にされたポリペプチドとが融合したポリペプチドをコードする第二遺伝子構築物を調製すること；
- 第二遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、エクソゾーム内への融合ポリペプチドの発現を試験すること；および
- 標的にされたポリペプチドをエクソゾーム内に効率的に発現させるポリペプチドを選択すること、

を含む方法である。

【0041】

我々の結果は、上記の方法を用いることで発現をエクソゾーム上に方向付けする特異的標的化シグナルを含む各種タンパク質またはポリペプチドを同定、選択および／または改良できることを示している。これらポリペプチドにはエクソゾーム内に発現する能力およびこの様な小胞に他の分子を標的化する能力の両方が求められる。これらポリペプチドは膜貫通タンパク質に由来するものであり、この様なタンパク質の全体または一部分、典型的には少なくとも膜貫通ドメインを含む一部分を含む。これら構築物は抗原、特に受容体

10

20

30

40

50

および膜貫通タンパク質のエクソゾームへの配送に特に好適である。

【0042】

標的化ポリペプチドは膜貫通ドメインであるか、または膜貫通ドメインを含むことが好ましい。候補の標的化ポリペプチドはこのような膜貫通ドメイン、例えば受容体、チャンネル等を含む実際のタンパク質に由来する。このような標的化ポリペプチドの例としては、Me1anA/MART1、CD40L、CD81等、またはそれらの一部分が挙げられる。標的化ポリペプチドは膜貫通タンパク質全体を含むか、または少なくとも1つの膜貫通ドメインを含むその一部分を含む。

【0043】

候補の標的化ポリペプチドの性質から、この方法は本質的に膜貫通ポリペプチドをエクソゾームに配送、またはエクソゾーム内部にポリペプチドを配送するのに適したポリペプチドの同定に好適である。従って最も好ましい標的にされたポリペプチドは受容体、膜貫通抗原またはそれらの一部分のような膜貫通ポリペプチドである。本発明は複数の膜貫通ドメインを有する受容体（例えばGタンパク質共役受容体または「GPCR」）の様な複合分子を特定の小胞内に効率的に発現させる標的化ポリペプチドのスクリーニングを可能にすることから、特に有益である。

【0044】

候補標的化ポリペプチドまたは融合ポリペプチドのエクソゾーム内への発現は、様々な技術により試験できるが、それら技術は本明細書の記載全体を通して開示されている。好適実施態様では、遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、この修飾された細胞からエクソゾームを調製し、そして前記エクソゾーム内でのポリペプチドの発現を測定している。発現は標的化または標的にされたポリペプチドに対する特異的リガンドを使用することを包含する各種技術により測定できる。具体例では、発現は標的化成分または融合ポリペプチド内に導入されたタグ配列に対し特異的である抗体を用い測定される。

【0045】

融合ポリペプチドの調製では、標的にされた成分は標的化ポリペプチドの上流または下流、即ちC末端またはN末端のいずれに置かれてもよい。融合体の方向が標的にされたポリペプチドの発現のタイプを決定する。具体的には、標的にされたポリペプチドを標的化ポリペプチドの細胞内側部分に連結すると、標的にされたポリペプチドの発現は小胞の内側で起こるだろう（可溶性抗原向き）。一方膜貫通受容体を発現する場合は、連結タイプは構築物に合わせて当業者により、適切に折りたたまれエクソゾーム膜内に挿入できるよう調整される。

【0046】

後述する様に、上記連結は直接行っても、またはスペーサー分子を介して行っても良く、そしてエクソゾーム産生細胞は各種供給源および起源のものが利用できる。

【0047】

また異なる融合体を並行して、または同一小胞内に発現させ試験してもよい。この点に関し、この方法は特定の個々の標的化ポリペプチドを選択するのに、または遺伝子構築物のライブラリーをスクリーニングするのに利用できる。

【0048】

この方法により、エクソゾーム内への発現の効率が高い、改良型の標的化ポリペプチドおよび融合分子の産生が可能になる。

【0049】

この点に関し発明は選択された膜貫通ポリペプチドを発現するエクソゾームを産生する方法であって、

- 上記の標的化ポリペプチドを選択すること、
- 標的化ポリペプチドと融合した選択の膜貫通ポリペプチドをコードする遺伝子構築物を提供すること、
- エクソゾーム産生細胞内に遺伝子構築物を発現すること、および
- 前記の修飾した細胞よりエクソゾームを産生し、そして単離すること、

10

20

30

40

50

を含む方法にも関する。

【0050】

発明はまた GPCR または少なくとも 1 個の膜貫通ドメインを含むその一部分を発現するエクソゾームの産生方法であって、

—膜貫通ドメインを含む標的化ポリペプチドおよび／または上記の様に選択された標的化ポリペプチドと融合した GPCR またはその一部分をコードする遺伝子構築物を提供すること、

—この遺伝子構築物をエクソゾーム産生細胞内に発現させること、および

—GPCR またはその一部分を発現する前記の修飾した細胞からエクソゾームを産生し、そして単離すること、

を含む方法に関する。

10

【0051】

発明は更に組換え体 GPCR またはその一部分を発現するエクソゾームに関する。

【0052】

発明は更に MelanA/MART1、CD40L および CD81 から選択された標的化ポリペプチド、並びに標的にされたポリペプチドを含む融合ポリペプチドに関する。標的にされたポリペプチドが膜貫通ドメインを含むことがより好ましい。発明は更にこのような融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列にも関する。この様な融合体の具体的な例示を配列番号 32 および 33 として示す。

【0053】

20

対象ポリペプチド

本発明はエクソゾームまたはその他脂質構造物の中に（から）、例えば抗原、サイトカイン、リガンド、受容体、免疫グロブリン、マーカーポリペプチド（例えば緑色蛍光タンパク質の様な標識タンパク質、または酵素）、酵素、イオンチャンネル等の各種ポリペプチドまたはそれらの一部分を標的化する、選択的に発現する、或いは産生する（例えば、精製する）のに利用できる。一般的には、本発明はいずれの対象のポリペプチド、例えば生物的特性または免疫的特性を持つポリペプチドでも使用できる。更に本発明は、異なるポリペプチドをコードする複数の異なるキメラ遺伝子構築物をエクソゾーム内で同時に発現するかまたは標的化してその応用範囲を更に広げ、或いは複雑な分子を再構成することにも利用できる。

30

【0054】

ポリペプチドの好適例は、例えば腫瘍抗原、ウイルス抗原および微生物抗原の様な抗原である。腫瘍抗原の実例としては、MAGE、BAGE、前立腺癌抗原、癌遺伝子等がある。これら抗原のアミノ酸配列はそれ自体既知であり、組換え体技術または合成により生成できる。本発明で標的にされる、または提示される具体的抗原としては可溶性抗原および受容体の細胞外ドメインが挙げられる。

【0055】

対象となるポリペプチドのさらなる例としては、リンフォカイン（IL-2、IL-4、IL-13）、栄養因子（TNF、IFN、GM-CSF、C-CSF 等）、酵素、凝固因子、ホルモン、リポタンパク質等が挙げられる。

40

【0056】

対象となるその他タイプのポリペプチドは、少なくとも 1 個の膜貫通ドメイン、より好ましくは GPCR またはその一部分を有する受容体である。さらに発明は標的化ポリペプチドを用いた膜貫通ポリペプチドによる特定小胞の標的化、および特定小胞内への膜貫通ポリペプチドの発現を可能にする。小胞内に GPCR を発現させることにより、それらの精製、特性分析、リガンド（合成または天然に関わらず）スクリーニング、抗体生成等が可能となる。GPCR の具体例は、例えば CCR7 であるが、発明は他の受容体も同様に利用できる。

【0057】

その他の具体例は免疫グロブリンおよび例えば免疫グロブリンの Fc 断片の様な免疫グロ

50

ブリンの断片である。この様なFc断片は、エクソゾーム表面に発現した場合、抗原提示細胞の様なそのようなFc断片に対する受容体を発現している細胞にエクソゾームを標的化するように作用できる。このようなFc断片の発現は、単独または抗原の発現と組合せのいずれかで抗原提示細胞、特に樹状細胞によるエクソゾーム認識を促進し、増強し、これら抗原の交叉プライミングを増す。

【0058】

明らかに本発明は治療用タンパク質またはポリペプチドの配送にも適している。このようなタンパク質は、それら表面に組織特異的リガンドを場合により、担持した機能化された組換え体エクソゾームまたはリポソームを使うことにより、特定の細胞に配送できる。これにより内因性のタンパク質を欠いているかまたは非機能的な内因性タンパク質を発現することで病的状態になっている細胞の表面に、治療のためのタンパク質を発現させることができる。この観点に於ける本発明の具体的な目的は、

(a) ラクタドヘリンまたは機能的C1および／またはC2ドメインを含むその一部分、または上記方法を用いて同定された標的化ポリペプチドと融合する前記タンパク質をコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；

(b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、前記キメラタンパク質を表面に担持した組換え体エクソゾームを生成すること、

(c) 前記組換え体エクソゾームを集め、そして前記エクソゾームまたはその一部を前記患者に注入すること

を含む被験者に治療用タンパク質を配送する方法である。

【0059】

更に、本発明は分子とラクタドヘリンまたはその機能的等価物との化学的結合も可能にすることから、本発明は小分子、核酸、脂質、糖、糖脂質等の非ポリペプチド性化合物にまで広がる。

【0060】

上記の如く、いまや本発明は増加させた免疫原性を有する人工粒子を再構成できるように、ラクタドヘリンまたはその機能的等価物を利用して標的化することを介して各種分子の組合せをエクソゾーム上に発現させることができる。典型的な例は抗原、ラクタドヘリン、標的化ポリペプチド（例えばFc断片）および／またはアジュバント（例えばGM-CSFを含むサイトカイン等）の組合せである。

【0061】

融合

キメラポリペプチドまたは化合物は遺伝的または化学的融合により調製できる。

【0062】

遺伝子融合では、対象のポリペプチドをコードするキメラ遺伝子領域はラクタドヘリンまたは標的化ポリペプチドの上流、下流またはいずれの内部ドメイン結合部と融合してもよい。この点に関し、実施例はラクタドヘリンとの上流融合が機能的であると同時に、標的化ポリペプチドとのN末端およびC末端融合も機能的であることを示している。更にこのドメインを相互に直接融合してもよく、またはキメラポリペプチドの特性を変えないスペーサー領域を用いて離してもよい。この様なスペーサー領域としては、クローニングサイト、切断サイト、フレキシブルドメイン等が挙げられる。更にキメラ遺伝子構築物は、コードされたキメラポリペプチドのエクソゾーム産生細胞の小胞体内への分泌に有利なようにリーダーシグナル配列を含んでもよい。一般に、キメラ遺伝子はラクタドヘリンリーダー配列を含んでいる。しかし異種性リーダー配列を、特にラクタドヘリン部分が使用される場合には挿入することもできる。更に、キメラ遺伝子は精製またはモニタリングを容易にするために、例えばmycタグ、ポリヒスチジンタグ等のタグを更にも含む。

【0063】

化学融合では、ラクタドヘリンの一部分または全長を選択するか、または修飾してその末端にチオール、アミノ、カルボキシル基のような遊離反応基を与え、可溶性ポリペプチド、糖脂質またはいずれかの小分子と架橋してもよい。好適実施態様では、ラクタドヘリン

10

20

30

40

50

構築物は、その中にC1ドメイン（アミノ酸60～225）がエクソゾームに対し標的化モチーフを提供し、そしてシステイン230が他分子への化学的架橋のための遊離チオール残基を提供する、配列番号7の1～230のアミノ酸を少なくともコードする。SH基へのペプチド、化学物質の架橋は十分確立された方法により達成できる（G.T Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques San Diego Academic Press 785頁）。この方法の優れた点は、本発明の範囲をポリペプチド以外の化合物、例えば糖脂質、薬物および有機化合物に対する抗体の調製まで広げることである。更にこの方法は推定される新規抗原決定基を導入することなしにエクソゾームにポリペプチドや化合物を標的化する手段も提供する。選択した架橋剤は免疫学的影響を及ぼさないことが判明している（上記引用のG.T Hermanson (1996年)）。キメラ遺伝子接合部に新規の抗原決定基が発生し、特定の人への予防的および治療的応用についてキメラ遺伝子産物の使用を制限することがある。

10

【0064】

従って配列番号7の様な関連ラクタドヘリン構築物を提示するエクソゾーム（またはリポソーム）を産生し、次にそれらを結合相手となる産物と反応させることで、修飾されたエクソゾームまたは脂質小胞（例えばリポソーム）を調製できる。あるいは、この産物に架橋結合されたラクタドヘリン断片を調製し、続いて精製エクソゾームまたはリポソームに加えてもよい。

【0065】

ベクター

本発明は更に上記キメラ遺伝子構築物を含むベクター並びにキメラ遺伝子構築物、または前記ベクターを含む組換え体細胞を包含する。ベクターはプラスミド、ファージ、ウイルス、人工染色体等でよい。典型例としては、市販で入手できるプラスミド、具体的にはpUC、p cDNA、pBR等から誘導されたものの様なプラスミドが挙げられる。その他好適ベクターは複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、AAV、バキュロウイルスまたはワクシニアウイルスの様なウイルスから誘導される。ベクターの選択は、このベクターが用いられることになる組換え体宿主細胞に応じて当業者により調整される。この点に関しては、哺乳動物細胞にトランスフェクションまたは感染できるベクターを使用するのが好ましい。さらに好ましい組換え体宿主細胞は哺乳動物細胞である。これらは初代細胞または樹立細胞株でよい。実例としては繊維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞、免疫細胞等、ならびにその始原細胞または前駆細胞を挙げることができる。最も好ましい哺乳動物細胞はエクソゾーム産生哺乳動物細胞である。この種の細胞としては、例えば腫瘍細胞、樹状細胞、BおよびTリンパ細胞またはマスト細胞が挙げられる。

20

30

【0066】

エクソゾーム産生細胞

エクソゾーム産生細胞は後期エンドゾーム多胞体と原形質膜との融合によるエンドゾーム起源の膜小胞を産生しそして分泌する細胞であればいずれでも良いが、好ましくは哺乳動物起源の細胞である（4）。各種組織からの細胞、例えば樹状細胞、Bリンパ細胞、腫瘍細胞、Tリンパ細胞およびマスト細胞がエクソゾームを分泌することが示されている。治療目的または研究ツールとしてエクソゾームを産生、精製または用いる方法は例えば国際特許WO99/03499、WO00/44389、WO97/05900に記載されており、これらは参照することによりここに組み込まれる。本発明の好ましいエクソゾーム産生細胞は哺乳動物の腫瘍細胞、哺乳動物のTリンパ細胞および哺乳動物の樹状細胞であり、典型的にはマウスまたはヒト起源のものである。これに関し、細胞は不死化された樹状細胞（国際特許WO94/28113）、未成熟樹状細胞または腫瘍細胞（国際特許WO99/03499）であることが好ましい。更に、抗体産生に関しては、エクソゾーム産生細胞としてBリンパ細胞を使用することが好都合であるが、それは得られるエクソゾームが抗体産生を促進するアクセサリ機能とMHCクラスII分子の様な分子を含むからである。更にB細胞由来エクソゾームは濾胞性樹状細胞に結合することが示されているが、このことは抗体誘導にとって重要な別の特徴である（10）。

40

【0067】

50

細胞はRPMI、DMEM等の適当な培地で培養され維持されるだろう。培養はプレート、皿、チューブ、フラスコ等の好適な用具内で行われる。

【0068】

遺伝子構築物（またはベクター）は、ネイキッド（naked）DNA法、カチオン性脂質介在トランスフェクション法、ポリマー介在トランスフェクション法、ペプチド介在トランスフェクション法、ウイルス介在感染法、物理的または化学的作用物質または処理、エレクトロポレーション等のような通常の方法によりエクソゾーム産生細胞内に導入できる。この点に関して、安定細胞株を作製したりまたはトランスフェクションの条件を最適化する必要がないような、関連キメラ遺伝子の発現には一過性のトランスフェクションで十分である。この様な細胞が産生したエクソゾームは当分野周知の技術、例えば遠心分離、クロマトグラフィー等により収集および／または精製できる。好適技術は国際特許WO00/44389および米国特許US09/780,748号に記載されており、これらは参照することにより本明細書に組み込まれる。

10

【0069】

本発明の組換え体機能化エクソゾームは、抗体の産生、免疫反応の制御、生物学的活性物の配送および／または選択したポリペプチドのリガンドを選択するためのスクリーニング手段として使用することができる。

【0070】

抗体精製

具体的実施態様では、本発明は上記組換え体エクソゾームを使ったポリペプチドまたはその他抗原に特異的な抗体の産生に関する。

20

【0071】

本発明の大きな利点は、抗原が組換え体エクソゾーム上の免疫刺激成分と結合しており、これによって免疫原性が低い抗原に対する抗体の生成、および古典的方法による抗体調製が失敗する状態でも抗体の生成が可能となることである。具体的には、Bリンパ細胞より産生されたエクソゾームは抗原産生を促進するMHC II分子を含んでいる。更に、この抗体調製は抗原の大量精製を必要することなしに達成できる。実際に、それらの表面に発現する外因性抗原の性質を問わずに、1回の小規模な精製方法（米国特許US09/780,748号）でエクソゾームを単離することができる。これにより抗原調製段階を極めて迅速にでき、即ち典型的には12時間以内に終了することができる。この方法は迅速であり、そして多くのサンプルに対し並行して実行できるため、免疫感作用の複数の抗原を同時に調製できる。天然に生じる小胞内での抗原の発現と穏和な精製手順との組合せは、抗原の自然な立体構造を保つのに役立ち、これが治療応用の可能性を持った関連抗体の生成を可能にしている。更に、本発明はそれら表面に高密度のキメラ分子（例えば抗原）を含む脂質小胞を生成する。この高密度は、抗原活性を増して抗体産生を極めて有利にする重合状態と同じ意味を持つ。本発明の更なる利点は、ポリペプチドをエクソゾーム産生細胞により発現させることによって、ペプチドを自然の加工経路および翻訳後修飾（糖付加等）経路にかけることができることである。

30

【0072】

従って本発明はまたポリペプチドと結合する抗体の産生方法であって、ヒト以外の哺乳動物を前記ポリペプチドまたはそのエピトープを発現する上記機能化エクソゾームで免疫すること、および前記哺乳動物より抗体または抗体産生細胞を収集することを含む方法に関する。この方法は上記の様なラクタドヘリンに融合した抗原に対するまたは標的化ポリペプチドと融合した膜貫通受容体に対する抗体の産生に特に適している。

40

【0073】

本発明は、また

（a）ラクタドヘリンまたは機能的C1および／またはC2ドメインを含むその一部分と融合した前記ポリペプチドまたはそのエピトープをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；

（b）前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、表面に前記ポリペプチドまたはエ

50

ピトーブを提示する組換え体エクソゾームを生成すること；

(c) 前記組換え体エクソゾームを収集し、そして前記エクソゾームまたはその一部分をヒト以外の哺乳動物に注入して前記ポリペプチドまたはエピトーブに結合する抗体を生成すること；および

(d) 前記哺乳動物より抗体または抗体産生細胞を収集すること；

を含む、ポリペプチドに結合する抗体を産生する方法に関する。

【0074】

本発明はまた、

(a) 標的化ポリペプチドと融合した前記受容体またはそのエピトーブをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；

(b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、それらの表面に前記受容体またはエピトーブを提示する組換え体エクソゾームを作製すること；

(c) 前記組換え体エクソゾームを収集し、そして前記エクソゾームまたはその一部分をヒト以外の哺乳動物に注入して前記受容体またはエピトーブに結合する抗体を生成すること；および

(d) 前記哺乳動物より抗体または抗体産生細胞を収集すること；

を含む、GPCRの様な受容体と結合する抗体を産生する方法に関する。

【0075】

抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよい。マウス、齧歯類、霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、家禽類等を含む様々な動物種からポリクローナル抗体を産生する方法は、例えばヴァイツカイティスら、1971年に見いだすことができるだろう。簡単に説明すると、抗原（本発明では組換え体エクソゾーム）をアジュバント（完全または不完全アジュバント、例えばフロイントアジュバント）存在下または非存在下に動物に注入し投与するが、典型的には皮下、腹腔内、静脈内または筋肉内注射により行う。繰返し注入を行っても良い。血液サンプルを採取し、免疫グロブリンまたは血清を分離する。

【0076】

モノクローナル抗体産生法は、例えばハローら（Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988）またはケーラーら（Nature 256(1975)495）に見いだすことができるが、これらは参照することによりここに組み込まれる。簡単に説明すると、これら方法は、動物を抗原（本発明では組換え体エクソゾーム）で免疫すること、続いて脾臓またはリンパ節を取り出すこと、次にこれらを骨髓腫細胞の様な不死化細胞と融合させることを包含する。得られたハイブリドーマはモノクローナル抗体を産生し、限界希釈法により選別でき、個々のクローンに単離できる。

【0077】

具体的実施態様では、エクソゾーム産生細胞はBリンパ細胞である。

【0078】

別の具体的実施態様では、エクソゾーム産生細胞および／またはラクタドヘリンおよび／または標的化ポリペプチドは、免疫に使用した哺乳動物と同一種のものである。更にこのようなシステムでは、エクソゾームおよびラクタドヘリンは免疫原性を持たず、抗体は実質的に選択した抗原に対してのみ産生される。

【0079】

具体的実施態様では、エクソゾーム産生細胞はマウス細胞であり、ラクタドヘリンはマウスラクタドヘリンまたはC1および／またはC2ドメインを含むその一部分または変異体であり、ヒト以外の哺乳動物はマウスであり、そして抗原またはエピトーブは別の種のもので、例えばヒト起源のものである。より更に好ましくは、マウスはヒト化抗体を産生することができる、ヒト化されたマウスである。

【0080】

この目的を達成するために、タンパク質（抗原またはエピトーブ）のヌクレオチド配列をマウスラクタドヘリンのC1および／またはC2ドメインと融合させることができ、得られたキメラ配列は標準的な分子生物学的技術を用い真核生物発現ベクター内にクローニン

10

20

30

40

50

グされる。キメラタンパク質をコードするプラスミドをエクソゾーム産生細胞内にトランスフェクションし、トランスフェクト細胞を数日間培養した後、組換え体エクソゾームを採取する。次に組換え体エクソゾームをショ糖勾配（米国特許US09/780,748）の遠心分離にかけて精製する。組換え体エクソゾーム上のキメラタンパク質の存在は、モノクローナルの抗C1/C2ドメイン抗体を使ったウエスタンブロット分析で確定する。次にキメラタンパク質を持つ組換え体エクソゾームを同系マウスに注入して抗体を生成する。この場合、免疫したマウスの体内では、タンパク質配列中に含まれるキメラタンパク質生成に用いる抗原決定基のみが外来抗原となる。抗体の生成は抗原の性質に基づき設計されたスクリーニングアッセイで実証される。組換え体エクソゾームをスクリーニングアッセイに使用する場合は、同一のタンパク質抗原配列がラクタドヘリン配列の延長型C1/C2ドメインと融合している第二のキメラタンパク質を調製する。あるいは、別の種に由来するラクタドヘリンのC1/C2ドメインと融合したタンパク質抗原を発現する組換え体エクソゾームも利用できる。これら新規構築物は新しい結合配列を持つキメラタンパク質を作り出すことから、免疫に使用したキメラタンパク質の結合部に向けられた抗体の検出／選択を回避する。

10

【0081】

上記の様に、この方法は非常に利点に富んでおり、腫瘍抗原、細菌抗原またはウイルス抗原を含む、選択された抗原またはエピトープに対する様々な種における抗体の産生に利用できる。

【0082】

20

新規生物活性を示す組換え体エクソゾームの調製

本発明を用いて、選択した生物活性を示す組換え体エクソゾームを産生することができる。これらエクソゾームは上記同様にして、エクソゾーム表面に、特定の生物活性を持った一種類（または複数種類）のポリペプチドを標的化することで産生できる。

【0083】

本発明の利点は、組換え体エクソゾーム上で生物活性成分の濃度を局所的に高くすることができることであり、これによりエクソゾームに標的細胞上の受容体と交叉結合できる可能性を持った強力な新規生物活性を獲得させることができる。この様な高い局所濃度は更に運び込んだ分子の結合活性を高めることもでき、これによってエクソゾームの効能を上げることができる。また、本発明はエクソゾーム上での生物活性複合成分の再構築を可能にし、それによって組換え体エクソゾームの応用分野を古典的な方法で取り扱うことが困難な様な多連鎖タンパク質にまで広げることができる。

30

【0084】

利用可能な生物活性タンパク質の例はインターロイキン2（IL2）であり、これはT細胞を活性化し、腫瘍細胞に対するT細胞反応を促進する癌免疫治療に用いられているサイトカインである。この顕著な免疫学的に確定したアジュバントをエクソゾーム上に腫瘍抗原と同時に提示することは、エクソゾームの有効性を高める。この場合、組換え体エクソゾーム上のIL2が生物学的に活性であることを実証する機能アッセイはIL2依存性細胞株を用いるだろう。

【0085】

40

生物活性タンパク質の別の例は、DCが捕捉した抗原に対する免疫反応の開始に必要なヘルパーシグナルを誘導するCD40リガンド（CD40L）である。エクソゾーム上でのヘルパーシグナルと腫瘍抗原の同時提示はエクソゾームの有効性を高めるだろう。この場合、組換え体エクソゾーム上のCD40Lが生物学的に活性であることを検証にはDC上の活性化マーカーの誘導をモニターする機能的アッセイが用いられるだろう。

【0086】

さらなる例としては、他のリンホカイン（IL-4、IL-13）、栄養因子（TNF、IFN、GM-CSF等）、酵素、凝固因子、ホルモン、リポタンパク質などが挙げられる。

【0087】

50

その他具体例は、特定の細胞、好ましくは樹状細胞に対するエクソゾームの標的化またはこれら細胞との相互作用を促進するポリペプチドである。この様な標的化ポリペプチドとしては、例えば免疫グロブリンのFc断片が挙げられる。この様なFc断片は、エクソゾーム表面に発現した場合には、エクソゾームに作用して抗原提示細胞を標的化することができる。抗原（および場合により上記アジュバント分子）と組み合わせでこの様なFc断片を発現させれば、抗原提示細胞、特に樹状細胞によるエクソゾーム認識を促進且つ増強し、そしてこれら抗原の交叉プライミングを高める。

【0088】

この様な機能化エクソゾームを産生するために、標的化ポリペプチドをコードする配列の上流または下流のいずれかに生物活性タンパク質の全長または部分cDNA配列を融合することができ、そして得られたキメラ配列は標準的分子生物学技術を用いて真核生物発現ベクター内にクローニングする。標的化ポリペプチドは、ヒトラクタドヘリン配列またはその等価物のC1および／またはC2ドメイン、或いはMART1/MelanAまたはその断片の様な上記スクリーニング法を用い同定された標的化ポリペプチドより選択されるか、または由来する。このキメラタンパク質をコードするプラスミドをエクソゾーム産生細胞株内にトランスフェクションし、このトランスフェクションされた細胞を数日間培養した後組換え体エクソゾームを収穫する。次に組換え体エクソゾームをショ糖勾配遠心分離により精製する。組換え体エクソゾーム上のキメラタンパク質の存在は抗原特異的抗体（利用できる場合）および／または抗標的化ポリペプチド抗体を用いたウエスタンブロット分析により決定する。

10

20

【0089】

次に機能アッセイを行い、標的化ポリペプチドと融合したタンパク質の生物活性が保存されていることを実証する。次に機能化エクソゾームを、それを必要とするいずれかの哺乳動物被検体、特にヒト被検体にインビボで投与する。投与は様々な経路、例えば静脈、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、皮下注射等の全身注射等により実施できる。

【0090】

組換え体エクソゾームを使用したDCへの完全長抗原の配送

組換え体エクソゾームにより誘導された体液性または抗体反応に加えて、エクソゾーム上に発現した抗原に対しては細胞性免疫反応も生み出すことができる。腫瘍または微生物抗原をコードする完全長cDNAと標的化ポリペプチドを含むキメラ配列を上記同様に調製する。次に組換え体エクソゾームを直接使用して個体をワクチン接種するか、間接的にインビトロでDCをパルスすることができる。DCへの完全長抗原の配送は、ワクチン使用に伴うハプロタイプ制限を緩和する。DCによる抗原の取込みおよびDCへの抗原の移送に関する自然の経路を経由した配送は、効率的な抗原処理およびクラスIおよびII両方のエピトープの提示をもたらすだろう。従って、完全長の腫瘍または微生物抗原を発現している組換え体エクソゾームは、癌および感染症に対するワクチンの向上に貢献するだろう。

30

【0091】

本発明の更なる目的は

- (a) ラクタドヘリンまたは機能的C1および／またはC2ドメインを含むその一部分と融合した前記抗原をコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；
 - (b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、それらの表面に前記抗原を担持する組換え体エクソゾームを生成すること；
 - (c) 前記組換え体エクソゾームを収集し、そして前記エクソゾームまたはその一部分を被検体に注入すること；
- を含む被検体に抗原を配送する方法である。

40

【0092】

本発明の別の目的は

- (a) ラクタドヘリンまたは機能的C1および／またはC2ドメインを含むその一部分と融合した前記抗原をコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；

50

(b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入し、それらの表面に前記抗原を担持する組換え体エクソゾームを生成すること；

(c) 前記組換え体エクソゾームを収集し、そしてこれを前記被検体より得た樹状細胞とエクソビポで接触させること、および

(d) 前記接触させた樹状細胞またはその一部分を前記被検体に注入すること；
を含む、被検体に抗原を配送する方法である。

【0093】

樹状細胞の「一部分」とは、接触したDC全てを注入すること、またはその画分を注入し、必要に応じて残りをその後の注入または使用に備え保存できることを意味している。更に、用語「一部分」は細胞全体を投与しても良いが、それに由来する調製物、例えば膜抽出物またはその様な樹状細胞が産生したエクソゾームを同様に注入できることを表している。 10

【0094】

樹状細胞またはそれらの一部分は、参照することによりここに組み込まれる国際特許WO 99/03499号に例示されている様に、複数の経路、例えば静脈内、動脈内、腹腔内、腫瘍内、筋肉内等から注入できる。

【0095】

上記同様に、具体的実施態様では、エクソゾーム産生細胞をラクタドヘリンまたは機能的C1および／またはC2ドメインを含むその一部分と融合した追加（アクセサリー）分子をコードする追加のキメラ遺伝子構築物と接触させ、それら表面に抗原だけでなく前記分子も担持する組換え体エクソゾームを生成してもよい。分子はアジュバント、標的化ポリペプチド、ラクタドヘリン等である。具体例としては免疫グロブリンのFc断片、CD40リガンド、サイトカインおよびGM-CSFが挙げられる。各種遺伝子構築物が一個のベクターまたは複数の別々の構築物に含まれてもよく、これらベクターまたは構築物をエクソゾーム産生細胞と同時または連続的に接触させてもよい。 20

【0096】

機能化合成脂質小胞の作製

更に、上記同様にして、本発明を天然小胞（エクソゾームの様な）またはリポソームの様な合成小胞を包含する各種膜小胞と一緒に使用することができる。リポソームは研究および医療での応用が広い小胞である。それらは天然のリン脂質とコレステロールから作られた小型の人工小胞である。この種の小胞は現在小薬物分子、タンパク質、核酸およびプラスミドを含む極めて多様な分子を負荷する薬物キャリアとして利用されている。従ってリポソームは非常に多くの用途に使用できる。本発明では、上記キメラ分子を介してリポソームに分子（例えばポリペプチド、抗原、小分子等）を標的化すること、およびこの様な機能化小胞を被検体に投与することが可能である。 30

【0097】

典型的にはリポソームは、ラクタドヘリンキメラポリペプチドの標的化を促進するために、ホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質を含むべきであろう。 40

【0098】

この点に関し、本発明は

—ラクタドヘリンまたは機能的C1および／若しくはC2ドメインを含むその一部分と融合した抗原を含むキメラ分子を提供すること；

—前記キメラ分子をホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質と接触させ、前記抗原を表面に提示する機能化脂質小胞を作製すること、および

—ヒト以外の哺乳動物をこの様な機能化小胞で免疫し、前記抗原と結合する抗体を産生すること

を含む抗体産生方法に関する。

【0099】

本発明の別の目的は、 50

ーラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分と融合した抗原を含むキメラ分子を提供すること；
ー前記キメラ分子をホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質と接触させ、前記抗原を表面に提示する機能化脂質小胞を作製すること、
ー前記機能化脂質小胞をエクソビボにて前記被験体からの樹状細胞とラクタドヘリン存在下に接触させること、および
ー前記被検体に前記接触させた樹状細胞またはその一部分を注入すること；
を含む被検体に抗原を配送する方法である。

【0100】

本発明の別の目的は、

ーラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分と融合した抗原を含むキメラ分子を提供すること；
ー前記キメラ分子をホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質と接触させ、前記抗原をそれらの表面に提示する機能化脂質小胞を作製すること、および
ー前記機能化脂質小胞またはその一部分をラクタドヘリン存在下に前記被検体に注入すること
を含む被検体に抗原を配送する方法である。

【0101】

本発明はまた上記の機能化脂質小胞およびラクタドヘリンを含む組成物に関する。

【0102】

脂質小胞は好ましくはリポソームである。リポソームは従来技術により製造され、そしてホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に自然に含まれるその他脂質に富むことが好ましい。抗原はポリペプチド、核酸、脂質、糖、糖脂質糖の様な有機化合物である。キメラ分子は上記の様に、遺伝子的（抗原がポリペプチドの場合）または化学的のいずれかでラクタドヘリンと結合している抗原を含む。

【0103】

別の実施態様では、本発明は、

ーホスファチジルセリンまたはエクソゾーム内に天然に含まれるその他脂質を含む脂質小胞を提供することであって、前記小胞がラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／または C 2 ドメインを含み、反応性化学基により活性化されている活性化ラクタドヘリンを担持すること；
ー機能化脂質小胞を作製するために、前記脂質小胞を前記反応性化学基と相互作用する化合物と接触させること、および
ー場合により前記機能化脂質小胞を精製すること；
を含む機能化脂質小胞の産生方法に関する。

【0104】

上記の場合、活性化ラクタドヘリンはその端部の一つにシステイン残基を有し、これが反応性 S H 基を作り出すラクタドヘリンの一部分でよい。この様な活性化ラクタドヘリンは、例えば配列番号 7 のアミノ酸 1 ～ 230 を含む。あるいは活性化ラクタドヘリンはラクタドヘリン端部の一つにチオール、アミノまたはカルボキシル基の様な反応基を化学的に付加することで調製してもよい。前記活性化ラクタドヘリンを担持する脂質小胞は、エクソゾームまたは例えばリポソームの様な合成小胞である。この点に関する具体的実施態様では、発明は上記活性化ラクタドヘリンを提示するエクソゾームに関する。別の実施態様では、本発明は上記活性化ラクタドヘリンを担持するリポソームに関する。このようなエクソゾームまたは合成脂質小胞は上記の様にして産生される。化合物は例えばポリペプチド、核酸、脂質、糖脂質、糖、小分子、薬物（例えば医薬品）、毒素等の有機分子である。また上記の様に、脂質小胞は抗原、標的化成分および／またはアジュバント、並びに／或いはラクタドヘリンといった各種ポリペプチドにより機能化される。典型例としては、ラクタドヘリンまたはその機能的 C 1 および／C 2 ドメインと融合した各種ポリペプチド

10

20

30

40

50

を含み、そして前記ポリペプチドが抗原、標的化ポリペプチド（例えば免疫グロブリンのFc断片）およびアジュバント（例えばCD40リンガンド、サイトカイン、GM-CSF等）より選択される脂質小胞を挙げることができる。

【0105】

遺伝子およびDNAワクチン接種

本発明はまた、キメラ抗原分子をコードする上記遺伝子構築物を利用する、インビボでの直接的DNAまたは遺伝子ワクチン接種にも利用できる。

【0106】

抗原に対する体液性または抗体反応および細胞性免疫反応は、遺伝子およびDNA免疫によっても作り出すことができる。腫瘍または微生物抗原コードする完全長または一部分のcDNAおよび標的化ポリペプチドを含むキメラ配列を上記の様にして調製する。次にこれらキメラタンパク質はコードするウイルス性、非ウイルス性ベクターまたはDNAを直接用いて、個体または動物にワクチン接種できる。遺伝子およびDNA免疫は微生物感染に対する宿主の防御と腫瘍の退行を導く強力な免疫反応を誘導することが示されている（Hasan et al J. Immunol. Methods 229, 1-22, 1999参照）。最近の発見は、遺伝子およびDNAワクチン接種時の強力な免疫反応を誘導に於いて、抗原提示細胞（APC）の交叉プライミング、即ちDNAがトランスフェクションされた非APCによって外因性に産生された抗原のAPCによる取込みが主要メカニズムであることを示唆している（Jae Ho Cho et al. J. Immunol. 167, 5549-5557, 2001）。更に細胞と結びついた形の抗原の交叉提示が可溶性抗原の交叉提示に比べ非常に効率的であることも見いだされている（Ming Li et al J. Immunol. 166, 6099-6103, 2001）。これら所見をまとめると、最適な遺伝子およびDNAワクチン接種法のデザインにとって、DNAトランスフェクションされた非APC細胞からAPCにAgを適切にインビボで移す方法が重要であると思われる。この点に関し、本発明の遺伝子ワクチン接種法は、APCに移送されるエクソゾームに結合した抗原をインビボで産生し、この判断基準に直接答える大きな利点を提供する。

【0107】

従って本発明の更なる目的は、被検体に上記標的化ポリペプチド、特にラクタドヘリンまたはラクタドヘリンの機能的C1および／またはC2ドメインを含む標的化ポリペプチドと融合した前記抗原をコードする遺伝子構築物を注入することを含む、被検体に抗原を送り込む方法にある。

【0108】

本発明の別の目的は、特定抗原に対する免疫反応を被検体内に起こす方法であって、前記方法が前記被検体に上記の標的化ポリペプチドと融合した、特にラクタドヘリンまたはラクタドヘリンの機能的C1および／またはC2ドメインを構成成分として含むその一部分と融合した前記抗原をコードする遺伝子構築物を注入することを含む方法である。

【0109】

遺伝子ワクチン接種はワクシニア、ポックスウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス等の各種ウイルスベクター、各種脂質またはペプチド組成物と結合したDNAの様な非ウイルスベクター、或いは純粋な（例えば裸の）DNAを用いて実施できる。ワクチン接種は筋肉内、静脈内、皮下または皮内を含む様々な注入経路を通じ実行できる。ワクチン接種には、遺伝子銃またはエレクトロポレーションを含む各種配送装置または技術を使用することができる。また動物および個体はベクターと一緒にインビトロにおいてトランスフェクションされる細胞株を使って免疫してもよい。多数のエクソゾームの放出のために選ばれた細胞株が特に優れているだろう。

【0110】

具体的実施態様では、方法はキメラポリペプチドをコードする裸のDNAまたはRNAを直接注入することを含む。裸ということは、注入された組成物がトランスフェクション促進作用物質を含まないことを意味する。更に好ましい実施態様では、遺伝子構築物は裸の形で、より好ましくは遺伝子銃を用いて筋肉内注入され、投与される。

【0111】

10

20

30

40

50

この方法ではエクソゾームを介して非可溶型の抗原を交叉提示することができ、その機能は末梢にある細胞からA P Cに抗原を移送することである（交叉プライミング）（Wolfer s et al Nature Medicine 7, 297-303, 2001年）。この方法の概略図を図6に示す。ラクタドヘリンのC 1 / C 2ドメインを含むキメラタンパク質をコードするウイルス、非ウイルス、または裸のD N Aベクターを用いて免疫すると、エクソゾーム産生細胞を含む各種細胞にインビボでのキメラタンパク質の発現を誘導する（段階1）。次に組換え体タンパク質がエクソゾームに結合した形で細胞外空間に放出される（段階2）。キメラタンパク質を持つエクソゾームがA P Cに結合すると、A P Cの交叉プライミングが起こる（段階3）。

【0112】

具体的実施態様では、A P Cへの抗原の交叉提示（段階3）はキメラタンパク質をコードする遺伝子構築物（例えばD N A）と一緒にラクタドヘリンをコードする遺伝子構築物（例えばD N A）を投与することで更に高まるだろうが、それはD Cに結合するエクソゾームがラクタドヘリンを含んでいるからである。あるいは抗原配列が完全長ラクタドヘリン配列の中、E G FドメインとC 1 C 2ドメインの間に挿入される構築物を調製してもよい。これにより単一の構築物の注入によって、ラクタドヘリンのC 1 C 2ドメインを介しエクソゾームに標的化され、且つエクソゾームをD Cに特異的に配送させるラクタドヘリンの受容体結合ドメインを含む抗原が作られる。

【0113】

更に免疫反応を高めるために、抗原および場合により、ラクタドヘリンをコードする遺伝子構築物を、免疫反応を促進する因子または分子の様なアジュバントをコードする遺伝子構築物と一緒に投与してもよい。この様なアジュバントの例としてはC D 4 0リガンド、G M - C S F、サイトカイン等がある。

【0114】

更に、免疫反応を更に高めるために、抗原、ラクタドヘリンおよび／またはアジュバントをコードする遺伝子構築物を、エクソゾームを抗原提示細胞に方向付けする因子または分子の様な標的化ポリペプチドをコードする遺伝子構築物と一緒に投与してもよい。この様な標的化ポリペプチドの例としては、免疫グロブリンのF c断片が挙げられる。

【0115】

これに関し、具体的実施態様では、方法はキメラ抗原をコードする遺伝子構築物と、ラクタドヘリン或いはラクタドヘリンまたは機能的C 1および／またはC 2ドメインを含むその一部分と融合したアクセサリー分子をコードする遺伝子構築物とを被検体に注入することを含む。ラクタドヘリンまたはキメラアクセサリー分子をコードする構築物は、キメラ抗原をコードする構築物と同時に、または別々に注入してよい。別々に注入する場合、注入はほぼ同時に行ってもそうでなくてもよい。具体的には、キメラ抗原をコードする構築物を最初に注入し、次にラクタドヘリンまたはキメラアクセサリー分子をコードする構築物を注入する。しかし各種キメラタンパク質がインビボにて同時に存在し、同一エクソゾームによって発現されることが好ましい。具体的実施態様では、タンパク質はウイルスベクター（例えばワクシニアウイルス）の様な単一ベクター内に含まれる遺伝子構築物から発現される。

【0116】

これに関し、本発明はまた、標的化ポリペプチドと融合した抗原をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが（i）ラクタドヘリンまたは機能的C 1および／またはC 2ドメインを含むその一部分および（ii）上記方法により特定される標的化ポリペプチドから選択される遺伝子構築物、および（a）標的化ポリペプチドと融合した免疫アクセサリー分子（例えばアジュバントまたは細胞標的化ポリペプチド）をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが（i）ラクタドヘリンまたは機能的C 1と／またはC 2ドメインを含むその一部分、および（ii）上記方法により特定される標的化ポリペプチドから選択される遺伝的構築物、および／或いは（b）ラクタドヘリンをコードする遺伝子構築物を含む組成物も包含する。実際に、本発明は、各種分子をラクタド

10

20

30

40

50

ヘリンまたはその一部分と融合する分子を直接インビボで発現させることにより、エクソゾーム表面にそれら機能的分子が効率的に組合わさることを可能にしている。この組合せ発現は免疫反応を高めるが、それは抗原粒子または免疫複合体を模擬したものである。

【0117】

好ましい例は

(a) 標的化ポリペプチドと融合した抗原をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 上記の方法により特定される標的化ポリペプチドから選択される遺伝子構築物、

(b) 標的化ポリペプチドと融合したアジュバントポリペプチドをコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 上記の方法により特定される標的化ポリペプチドから選択され、前記アジュバントポリペプチドが GM-C S F 若しくは I L-2 の様なサイトカインまたは C D 4 0 L である遺伝子構築物、および／又は

(c) 標的化ポリペプチドと融合した免疫グロブリンの F c 断片をコードする遺伝子構築物であって、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 上記の方法により特定される標的化ポリペプチドから選択される遺伝子構築物、並びに／或いは

(d) ラクタドヘリンをコードする遺伝子構築物、
含む組成物である。

【0118】

上記の場合、遺伝子構築物は D N A でも R N A 分子でもよく、典型的にはプラスミド、ウイルスベクター、ウイルス粒子、裸の D N A または同じものを含む細胞である。各種遺伝子構築物を単一ベクターまたは複数の別々のベクター内に含ませるか、あるいは組み合わせることができる。組成物は通常更に希釈剤、緩衝剤、等張液等の医薬的に許容可能な添加物または賦形剤を含む。組成物はまた上記のトランスフェクション促進剤を含んでも良い。

【0119】

本発明による全長または部分抗原の D C への配送は、ワクチン使用に関するハプロタイプ制限を緩和する。また D C による抗原の自然な取込みおよび D C への移送に利用される生理学的経路を介した配送は、効率的な抗原処理およびクラス I および II 両エピトープの提示をもたらす。故にエクソゾームを標的とする腫瘍または微生物抗原をコードするベクターを用いた遺伝子および D N A ワクチン接種は、癌および感染症に対する遺伝子および D N A ワクチンの改良に貢献する。

【0120】

H I V に対する D N A ワクチン組成物の具体例としては、逆転写酵素、g a g、e n v、n e f および t a t ポリペプチドまたはその一部分より選択される抗原を、ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／または C 2 ドメインを含むその一部分と融合した形でコードしている遺伝子構築物を挙げることができる。

【0121】

更に、遺伝子ワクチンだけでなくタンパク質ワクチンも同様にして用いることができる。この場合、組換え体キメラ抗原は患者内への投与に適した精製形態で使用される。このような投与を行うと、ラクタドヘリンの C 1 および／または C 2 ドメインを持ったキメラ抗原は i n v i v o で患者自身の循環しているエクソゾームに負荷され、それが免疫反応を惹起することになるだろう。

【0122】

従って本発明の別の目的は、特定抗原に対する免疫反応を被検体内に起こす方法を包含するが、この方法は前記被検体に標的化ポリペプチドと融合した前記抗原を含むキメラポリペプチドを注入することを含み、そして前記標的化ポリペプチドは (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、並びに (ii) 上記

方法により特定される標的化ポリペプチドから選択される。

【0123】

本発明の別の目的は、

(a) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分に融合した前記抗原をコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；

(b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して表面に前記キメラ抗原を担持する組換え体エクソゾームを生成すること、

(c) 前記組換え体エクソゾームを収集し、前記キメラ抗原を精製すること、並びに

(d) 精製キメラ抗原を患者に注入すること；

を含む被検体に抗原を配送する方法である。

10

【0124】

タンパク質－タンパク質相互作用研究用ツールとしての組換え体エクソゾーム

ゲノム配列決定プログラムより提供された豊富な情報を利用して、遺伝子の発見とその機能解明を目的とするゲノム全体を対象としたアプローチが開発されている。組換え体エクソゾームは、タンパク質－タンパク質相互作用を研究する新規技術を構成し、そしてタンパク質－タンパク質相互作用のそれぞれの相手を特定するためのライブラリーの高処理スクリーニングを可能にする。

【0125】

この様な応用では、タンパク質は異なるタンパク質プロフィールを持つ 2 種類の組換え体エクソゾーム種内に発現される。各組換え体エクソゾーム種に由来するキメラタンパク質同士の相互作用は、組換え体エクソゾーム上の特異的マーカーを用いた標準的な ELISA の基づくアッセイで検出できる。この方法を用いて、既知のリガンドまたは受容体の相手を特定することができる。

20

【0126】

かくして具体的実施態様では、本発明は

(a) 上記の標的化ポリペプチド、特にラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／または C 2 ドメインを含むその一部分に融合した前記ポリペプチドをコードするキメラ遺伝子構築物を提供すること；

(b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して表面に前記ポリペプチドを提示する組換え体エクソゾームを生成すること；

30

(c) (b) の組換え体エクソゾームを候補化合物と接触させて、前記エクソゾーム上の前記ポリペプチドへ結合する前記候補化合物の能力を決定すること；

を含むポリペプチドのリガンドまたは結合相手を選択または同定する方法を与える。

【0127】

候補化合物は単離産物、産物の混合体、または化合物のライブラリーでよい。候補化合物の例としては、小分子（例えば有機産物）並びにそのライブラリー、DNA ライブラリー、タンパク質ライブラリー、抗体（またはその断片）のライブラリーを挙げることができるが、もとよりこれらに限定されるものではなく、それらはファージまたはその他提示システム等により表示してもよい。候補化合物は並行して試験しても、または複合混合物として試験してもよい。

40

【0128】

候補化合物の前記ポリペプチド（抗原）への結合能力を決定する方法としては、例えばエクソゾームの単離、および単離体を用いたヒト以外の哺乳動物の免疫を包含する。前記哺乳動物内で抗体が生成されるということは、候補分子がエクソゾームと複合体を形成すること、および前記分子の同定が可能であることを意味している。

【0129】

本技術は分子のリガンドに対する抗体の産生に使用できる。例えば抗体が必要とされる受容体のリガンドを、本発明に従ってリガンド小胞の表面に発現する。この様な小胞を、前記受容体を含む調製物（例えば生物サンプル）と接触させる。エクソゾームを洗浄し、精製し、ヒト以外の哺乳動物に注入する。

50

【0130】

受容体に対する抗体を前記哺乳動物から単離することができる。この手法は非常に優れており、複合分子、不安定分子に対する抗体、または単離形態で入手できない分子に対してでも抗体を得ることができる。

【0131】

精製または組換え体ポリペプチド

発明はまた上記の機能化エクソゾームからポリペプチドを産生する方法も提供する。この方法はラクタドヘリンがポリペプチドをエクソゾーム内に選択的に発現させる、またはエクソゾーム内にポリペプチドを標的化するという予想外の性質に基づくものである。故にエクソゾームはラクタドヘリンまたはラクタドヘリンの断片を含む各種キメラポリペプチドの重要な供給源を構成しており、エクソゾームよりこれらタンパク質を回収および／または精製することができる。本法の具体的利点は、エクソゾーム調製によって精製されるタンパク質がかなり濃縮されるため、小さいサンプル容積を有する大規模細胞培養よりタンパク質を精製できる迅速法を提供することである。この方法では、ラクタドヘリンまたはラクタドヘリンの機能的C1および／またはC2ドメインを含むキメラポリペプチドを産生でき、それらは例えばエクソゾームを界面活性剤または塩を用い溶解し、そしてタンパク質を脂質またはペプチドと共に特異的に放出させることを含む標準的な生化学的手段を用いることでエクソゾームから直接抽出される。あるいは、タンパク質とC1-C2ドメインの間に特異部位が挿入されていれば、キメラポリペプチドをタンパク質分解により切断することで、（未変性の）タンパク質をエクソゾームから直接放出させることもできる。この様な部位の特性は周知であり、例えばフリン、エンテロキナーゼ、第X因子等の切断部位がこれに含まれる。抽出されたタンパク質を次に陰イオンまたは疎水性クロマトグラフィー、および／またはレクチン、特異抗体、受容体またはリガンドおよびタグの相手が共有結合で結合しているカラム上のアフィニティークロマトグラフィーを含む標準的なクロマトグラフィー方法にかけて精製することができる。この技術は上記に特定される標的化ポリペプチドと融合したポリペプチドの精製にも好適である。

【0132】

従って本発明の別の目的は、

- a) 前記ポリペプチドをコードする遺伝子構築物を提供すること；
- b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して表面に前記ポリペプチドを提示する機能化エクソゾームを生成すること；
- c) 前記機能化エクソゾームを場合により収集し／または精製すること、および
- d) 前記ポリペプチドまたはその断片を前記機能化エクソゾームから回収および／若しくは精製すること；

を含む、ラクタドヘリンまたはその一部分を含むポリペプチドの産生方法にある。

【0133】

前記のポリペプチドとしては、野生型ラクタドヘリンまたはその断片の様なラクタドヘリンでもよい。これに関し、本発明は、ラクタドヘリンをコードする遺伝子をエクソゾーム産生細胞内に導入してそれら表面に前記ポリペプチドを提示する機能化エクソゾームを生成すること、前記機能化エクソゾームを場合により収集／または精製すること、および前記機能化エクソゾームよりラクタドヘリンを回収／または精製することを含む、効率的なラクタドヘリン産生（および精製）方法を提供する。

【0134】

ポリペプチドはキメラ遺伝子構築物によりコードされたキメラポリペプチドであってもよく、このキメラポリペプチドはラクタドヘリンの機能的C1および／C2ドメインと融合したポリペプチドを含む。この場合、キメラポリペプチド全体をエクソゾームから回収しても、あるいは、例えばラクタドヘリンのC1および／またはC2ドメインから分離して放出されたポリペプチドの様なその一部分のみを回収してもよい。これに関して、本発明の更なる目的は

- a) 標的化ポリペプチドと融合した前記ポリペプチドをコードする遺伝子構築物であって

、前記標的化ポリペプチドが (i) ラクタドヘリンまたは機能的 C 1 および／若しくは C 2 ドメインを含むその一部分、および (ii) 上記の方法により特定される標的化ポリペプチドより選択され、そして前記ポリペプチドが前記標的化ポリペプチドと切断部位を含むスパーサー配列により融合している遺伝子構築物を提供すること；
b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内に導入して前記ポリペプチドをそれらの表面に提示する機能化エクソゾームを生成すること；
c) 前記機能化エクソゾームを場合により収集および／または精製すること；
d) 機能化エクソゾームを前記切断部位を切断する作用物質で処理すること、および
e) 前記ポリペプチドを回収および／または精製すること；
を含むポリペプチド産生方法である。

10

【0135】

例示を目的として以下に実施例を示すが、これらにより発明が制限を受けることはない。

【実施例1】**【0136】**

腫瘍細胞株が発現するヒトラクタドヘリンはその大部分がエクソゾームにのみ見いだされる。

175 cm² のフラスコに集密度～80%で接種したヒト由来腫瘍細胞を5% CO₂ 雰囲気内にて完全培地 (2 mM の L グルタミン、100 U/ml のペニシリン、0.1 mg/ml のストレプトマイシン、1 mM のピルビン酸ナトリウムおよび10% のウシ胎児血清 (FBS) が補充された RPMI 1640) で4日間、37℃培養した。培養4日目に各培養物からエクソゾーム溶解物および細胞溶解物を次のようにして調製した：

20

培養上清を集め、続いて200 gで遠心分離し、0.2 μm のフィルターで濾過して細胞分解物を除いた。次に透明な上清を4℃で90分間、100,000 gにて遠心分離し、エクソゾームを沈殿させた。沈殿を100 μl の氷冷 PBS に懸濁し、得られた画分をエクソゾーム (E) として確保した。

【0137】

腫瘍細胞を Versene (インビトロゲン社) 10 ml 中で、室温、10分間インキュベーションした後、培養皿から剥離した。次に細胞を4℃で10分間、200 gで遠心分離し沈殿した。沈殿を再懸濁し、そして50 mM のリン酸ナトリウム pH 8.0、300 mM の塩化ナトリウム、10 mM のイミダゾールおよび0.5% の Tween 20 並びにプロテアーゼ阻害剤のカクテル (シグマ社) を含む氷冷溶解緩衝液 (LB) 100 μl に再懸濁し溶解した。溶解物を10分間、氷上でインキュベーションしてから10分間、4℃、10,000 gで遠心分離し不溶物を取り除いた。得られた上清を細胞溶解物 (CL) として確保した。

30

【0138】

8 μl の SDS-PAGE サンプル緩衝液 5X (SB) を32 μl の E および CL に加えて100℃で5分間インキュベーションしてから SDS-PAGE で分析した。半乾燥式エレクトロトランスファーを使ってゲル上のタンパク質を PVDF 膜に移し、そして1/2500 に希釈されたヒトラクタドヘリンの RGD モチーフに対するポリクローナル抗体 (セバスチャンアミゴレーナ博士より贈与) を使った免疫検出によりサンプル中のヒトラクタドヘリンの存在を決定した。ラクタドヘドリンに結合した抗体は、1/5000 に希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ標識された抗ウサギ IgG 二次抗体 (ジャクソンイムノリサーチ社) と発色基質 (CN/DAB、ピラス社) を用い検出した。

40

【0139】

CL および E サンプルはそれぞれ図1パネルAおよびパネルBで分析されている。このアッセイでは、胚腎臓細胞 293 (レーン1)、メラノーマ細胞 FORT1 (レーン2) および M10 (レーン3)、肺カルシノーマ細胞 NCIN226 (レーン4) および NCIH520 (レーン5)、メラノーマ細胞 FM3 (レーン6)、Bリンパ芽球細胞 Raji (レーン7) 由来の CL および E が試験された。

【0140】

50

ミルクから部分精製されたラクタドヘドリンを陽性コントロール（レーン9）として用い、CHO、即ちハムスター卵巣細胞株由来のEおよびCLを陰性コントロール（それぞれパネルAおよびパネルBのレーン8）として使用した。

【0141】

結果：ラクタドヘドリンは293（レーン1）、FON-T1（レーン2）、M10（レーン3）、NCI-H520（レーン5）およびFM3（レーン6）のE（パネルB）には検出されたが、一方同じ細胞株のCL（パネルA）には特異的バンドは検出されなかった。NCI-H226（レーン4）、Raji（レーン7）および陰性コントロールのCHO（レーン9）のEおよびCLにはラクタドヘリンは検出されなかった。

【0142】

結論：各種腫瘍組織由来の細胞株がラクタドヘリンを発現した。これら細胞株が発現するラクタドヘリンは主にエクソゾームに見いだされた。

【実施例2】

【0143】

組換え体ヒトラクタドヘリンはその殆どがトランスフェクションされた細胞が産生するエクソゾームだけに発現し、この高い特異性を持った標的化能はC1/C2ドメイン内に暗号化されている。

2種類の、重複部分を持つヒトラクタドヘリンcDNAを、それぞれプライマーペアLT DNf15/LTDNr8およびLT DNf2/LTDNr13（それぞれ配列番号1～4）を用いて、血液由来の全cDNAから増幅した。LT DNf15およびLT DNr13は、それらの5'末端がHindIIIおよびAgeI制限部位を含むように延長されている。LT DNf2/LTDNr13を用いたラクタドヘドリンcDNAの3'末端の増幅からは、複数の産物が生じたが、そのうち最長のものは既知ラクタドヘドリンcDNA（Lact1f、配列番号5）と一致した。より短い形の配列（Lactsf、配列番号6）は153ヌクレオチドを欠いており、その結果ラクタドヘリンのC2ドメイン内の51アミノ酸を欠損していた。cDNAの5'末端をHindIIIおよびEcoRIで消化し、Lact1fとLactsfの両cDNAをAgeIおよびEcoRIで消化した。cDNAの5'末端および3'末端の両方を前もってHindIIIおよびAgeIで切断しておいたpcDNA6A-His（インビトロゲン社）内に連結した。得られたプラスミド（pcDNA6hLact1f/HisおよびpcDNA6hLactsf/His）は（His）₆タグと融合した全長の組換え体ヒトラクタドヘリンをコードしている（それぞれ配列番号7および8）。これらを293細胞、即ちヒト胚腎臓細胞株（ATCC）内にリポフェクタミン（インビトロゲン社）を用いトランスフェクションした。完全培地（培養条件および培地の説明については実施例1を見よ）での培養4日目に、実施例1記載の様に各培養物からELおよびCLを調製した（ELはPBSの代わりにLB中にエクソゾームを再懸濁して調製した）。この実験では、エクソゾームの沈殿を目的とした100,000gの遠心分離段階後に得られた上清も確保した。Ni-NTAアガロースビーズ（キアゲン社）を全画分に加えてHisタグを含む組換え体タンパク質だけを単離した。揺動装置上で4℃、2時間のインキュベーションを行った後、4℃、200gの遠心分離によりビーズを落とした。20mMイミダゾールで調整したLBで3回洗浄した後、ビーズを40μlのSB1X中に再懸濁し、100℃で5分間インキュベーションした。実施例1記載の様にSBを集め、SDS-PAGEと免疫ブロッティングにより分析した。

【0144】

CL、SおよびELサンプルはそれぞれ図2のパネルA、BおよびCで分析されている。pcDNA6hLactsf/HisおよびpcDNA6hLact1f/Hisがトランスフェクションされた293に由来するCL、SおよびELはそれぞれ各パネルのレーン1および2に示されている。

【0145】

ミルクから部分精製されたラクタドヘドリンを陽性コントロール（レーン4）として用い

10

20

30

40

50

、空の p c D N A 6 プラスミドがトランスフェクションされた 2 9 3 細胞由来の C L、S および E L を陰性コントロール（各パネルのレーン 3）として使用した。

【0146】

結果：長い形のラクタドヘリンが E L に検出されたのに対し（パネル C のレーン 2）、同一培養物由来の S および C L では（それぞれパネル A および B のレーン 2）バックグランドレベルのみ検出された。これに対しその C 2 ドメイン内に 5 1 アミノ酸の欠損がある短い形のラクタドヘドリンは C L だけに検出され（パネル A のレーン 1）、S または E L には検出されなかった（それぞれパネル B および C のレーン 1）。

【0147】

結論：2 9 3 細胞で発現した組換え体ラクタドヘリンは大部分がエクソゾームのみに見いだされた。C 2 ドメインの欠失によりエクソゾーム標的化が無効になること、そして C 1 ドメインの立体構造にも影響が及ぼすことから、エクソゾームに対するこの組換えラクタドヘドリンの高い特異性を持った標的化は、ラクタドヘドリンの C 2 ドメインによって介在されている。実際、機能的エクソゾーム標的化シグナルを欠く短い形の組換え体ラクタドヘドリンは異なる細胞コンパートメントに見いだされる。

【実施例 3】

【0148】

ラクタドヘドリンの C 2 ドメイン内のエクソゾーム標的化シグナルは様々な哺乳動物種間で保存されている

マウスラクタドヘドリンの完全長 c D N A をマウスラクタドヘドリン c D N A 鋳型（セバスチャンアミゴレーナ博士より贈与された）から、プライマー L T D N f 2 0（配列番号 9）および L T D N r 1 3（配列番号 4）を用いて増幅した。これらプライマーは、プライマー L T D N f 2 0 および L T D N r 1 3 それぞれについて制限部位 H i n d III および A g e I を含むようにそれらの 5' 末端が延長されている。増幅産物を H i n d III および A g e I で消化し、前もって同じ酵素で切断しておいた p c D N A 6 A - H i s（インビトロゲン社）内に連結した。得られたプラスミド（p c D N A 6 m L a c / H i s）は（H i s）₆ タグと融合した組換え体マウスラクタドヘドリン（配列番号 10）をコードしている。このプラスミドおよび p c D N A 6 h L a c t l f / H i s（実施例 2 の記載に従い調製した）を 2 9 3、C H O および W E H I（マウス繊維肉腫）細胞内にトランスフェクションし、各培養物から実施例 2 の記載に正確に従って E L を調製した。サンプルを調製し、実施例 1 に従いラクタドヘドリンの発現をモニターした。マウスのラクタドヘリンを発現しているヒト 2 9 3 細胞由来の E L は図 2 のパネル A に、ヒトラクタドヘリンを発現しているマウス W E H I 細胞由来の E L は図 2 のパネル B に、そしてヒトラクタドヘリンを発現しているハムスター C H O 細胞由来の E L は図 2 のパネル C に示した。ラクタドヘリンをコードするプラスミドがトランスフェクションされた細胞由来の E L は各パネルのレーン 2 に示した。空の p c D N A 6 プラスミドをトランスフェクションされた細胞由来の E L を陰性コントロール（各パネルのレーン 1）として使用した。ミルク由来の部分精製ヒトラクタドヘリンを陽性コントロール（パネル C のレーン 3）として使用した。

【0149】

結果：マウス細胞およびハムスター細胞で発現されたヒトラクタドヘリンは、これら細胞が産生するエクソゾーム内に見いだされた（それぞれパネル B および C のレーン 2）。マウスラクタドヘリンはまた別の種に由来する細胞、即ちヒト細胞が産生したエクソゾーム内にも見いだされた（パネル A のレーン 2）。

【0150】

結論：エクソゾーム標的化シグナルは複数の哺乳動物種を跨いで保存されていた。

【実施例 4】

【0151】

キメラタンパク質の調製

キメラタンパク質はタンパク質のヌクレオチド配列とラクタドヘリンの全長または部分配

10

20

30

40

50

列のヌクレオチド配列とを融合して生成した。

【0152】

ラクタドヘドリンの完全長配列は一般にはタンパク質配列の上流に連結される。ラクタドヘドリンの部分配列はC1ドメインのみ、C2ドメインのみ、またはC1とC2ドメインの両方を含んでおり、そして一般的にはタンパク質配列の下流に連結される。実質的なリーダー配列を含まないタンパク質は、リーダー配列とラクタドヘドリンのC1/C2ドメインの間に挿入することができる。

【0153】

異なる連結部を持ったキメラタンパク質は、タンパク質のヌクレオチド配列にCドメインおよびN末端先端側に少なくとも10アミノ酸の延長を有するマッキング型Cドメインのヌクレオチド配列を融合して調製する。あるいは連結部の異なるキメラタンパク質は、ラクタドヘリンC1ドメインとC2ドメインとを用いるか、または2つの種に由来するCドメインを用いて調製する。例えばタンパク質Xと融合相手としてヒト由来C1、ヒト由来延長C1、ヒト由来C2およびマウス由来C1のいずれかを含むキメラタンパク質はそれぞれ連結部が異なっている。

10

【0154】

C1/C2断片の調製

C1、延長-C1、C2、延長-C2、C1/C2および延長-C1/C2ドメインをコードするラクタドヘリンDNA断片をp cDNA6-hLacI f/Hisを鋳型として、そしてLTDNf24（配列番号13）/LTDNr26（配列番号15）、LTDNf22（配列番号11）/LTDNr26、LTDNf25（配列番号14）/LTDNr13、LTDNf23（配列番号12）/LTDNr13、LTDNf24/LTDNr13およびLTDNf22/LTDNr13をそれぞれプライマーペアとして使用して増幅した。プライマーペアLTDNf30（配列番号16）/LTDNr26、LTDNf31（配列番号17）/LTDNr26、LTDNf33（配列番号19）/LTDNr13、LTDNf32（配列番号18）/LTDNr13、LTDNf30/LTDNr13およびLTDNf31/LTDNr13と鋳型p cDNA6-mLact/Hisを用いマウスラクタドヘリン由来のマッキング型C1/C2断片を増幅した。前方プライマー（LTDNf）は全てその5'末端がリン酸化されており、逆向きプライマー（LTDNr）は全てその5'末端がAgeI制限部位を含むように延長されている。増幅産物は、融合相手と連結する前にAgeIで消化された（以下参照）。

20

30

【0155】

インターロイキン-2-C1/C2キメラの調製

完全長のIL-2 cDNAをヒト活性化T細胞cDNAの鋳型より、プライマーIL2F1（配列番号20）およびIL2r2（配列番号21）を用い増幅した。IL2f1はその5'末端がHindIII制限部位を含むように延長されており、一方IL2r2はその5'末端がリン酸化されている。増幅産物をHindIIIで消化し、前もってHindIIIおよびAgeIで切断しておいたp cDNA6A-His（インビトロゲン社）内に、上記調製した各C1/C2 DNA断片と共に連結した。IL2断片のリン酸化3'末端とC1/C2断片のリン酸化5'末端間を平滑連結することでIL2-C1/C2キメラ配列が生じた。IL2断片の5'末端のHindIII部位とC1/C2断片の3'末端のAgeI部位でキメラ配列をp cDNA6His内に挿入することができ、得られたプラスミド（p cDNA6-His/IL2-C1、IL2-延長C1、IL2-C2、IL2-延長C2、IL2-C1/C2およびIL2-延長C1/C2ドメイン）は（His）。タグと融合した組換え体キメラタンパク質（ヒト由来C1/C2ドメインを含むキメラタンパク質については配列番号22～27）をコードしていた。配列番号22～27では、残基1～153がキメラポリペプチドのhIL2部分のアミノ酸配列に対応しており、そしてポリペプチドのC末端の最後の8個のアミノ酸（TGHHHHHH）がHisタグの配列に対応している。残りの残基はラクタドヘリン由来配列に対応する。

40

【0156】

50

エクソゾーム内での生物学的に活性な I L - 2 の発現

上記の配列番号 22 ~ 27 をコードするプラスミドを W E H I 細胞内にトランスフェクションした。画分 E L、C L および S を実施例 1 記載の様に調製した。組換え体タンパク質の発現は、この場合検出に使用した抗体がウサギ抗 I L 2 抗体であることを除き実施例 1 記載に同じであるウェスタンブロットにより評価した。

【0157】

C L、S および E L サンプルはそれぞれ図 4 のパネル A、B および C で分析された。p c D N A 6 I L 2 - 延長 C 1 / H i s、p c D N A 6 I L 2 - 延長 C 2 / H i s、p c D N A 6 I L 2 - 延長 C 1 / C 2 / H i s、p c D N A 6 I L 2 - C 1 / H i s、p c D N A 6 I L 2 - C 2 / H i s および p c D N A 6 I L 2 - C 1 / C 2 / H i s がトランスフェクションされた細胞に由来する C L、S および E L は、それぞれ各パネルのレーン 1 から 6 に示されている。

10

【0158】

組換え体 I L 2 を陽性コントロール（パネル C のレーン 8）に、そしてトランスフェクションしていない細胞の C L、S および E L を陰性コントロールとして使用した（各パネルのレーン 7）。

【0159】

結果：調製した全てのキメラ I L 2 - C 1 / C 2 遺伝子は抗 I L 2 抗体と反応する組換え体タンパク質を発現した（パネル C のレーン 1 から 6）。更に、これらタンパク質は殆どが E L のみに見いだされ、S および E L には低いかまたはバックグラウンドの発現のみが検出された（それぞれパネル A および B のレーン 1 から 6）。エクソゾーム内に検出された I L 2 - C 1 / C 2 キメラタンパク質が I L 2 活性を示すか否か決定する目的で、I L 2 依存性細胞株である C T L L - 2 を、I L 2 - C 1 / C 2 キメラタンパク質を持つ組換え体エクソゾームまたはトランスフェクションしていない細胞由来のエクソゾームとインキュベーションした。我々は組換え体エクソゾームとインキュベーションした細胞が 3 H - チミジンを取り込んだのに対し、非トランスフェクション細胞由来のエクソゾームとインキュベーションした細胞はこれを取込まなかったことを見いだした（データ未提示）。

20

【0160】

結論：I L 2 とラクタドヘドリンの C 1 / C 2 ドメインとの融合により I L 2 のエクソゾーム内での発現が起こったことから、これらドメインが抗原の発現をエクソゾームに特異的に方向付けることができることが支持された。C 1 および C 2 ドメインは共に単独でも機能する。単一の C ドメインのみを含むキメラタンパク質は、C 1 と C 2 両方を含むキメラタンパク質よりも大量に産生された。最終的に融合が生物学的に活性な I L 2 を含むキメラタンパク質を産生したことから、I L 2 が天然の立体構造を維持していることが支持された。従って、ラクタドヘドリンの C 1 / C 2 ドメインを用いたタンパク質のエクソゾームへの標的化は実際に新規の生物学的機能を持つ組換え体エクソゾームを産生する。

30

【実施例 5】

【0161】

組換え体ヒトラクタドヘドリンの精製

(H i s) ₆ タグと融合した完全長組換え体ヒトラクタドヘドリン（配列番号 7）をコードするプラスミド p c D N A 6 h L a c t 1 f / H i s を実施例 2 に記載の様に調製した。このプラスミドをリポフェクタミン（インビトロゲン社）を用いて C H O、即ちハムスター卵巣細胞株（A T C C）内にトランスフェクションした。完全培地（2 mM の L グルタミン、100 U/ml のペニシリン、0.1 mg/ml のストレプトマイシンおよび 2 % のウシ胎児血清（F B S）が補充された C H O - S F N）、37 °C、5 % C O ₂ 雰囲気内で 1 日培養した時点で、2 μg/ml のブラストジンを補充した培地を用いて安定にトランスフェクションされた細胞を選別した。4 日間培養した後に、安定クローンを限界希釈法により単離した。実施例 2 の記載に従いエクソゾーム内に発現した組換え体ラクタドヘドリンをウェスタンブロットで分析し、大量のラクタドヘドリンを産生するクローンを選別した。クローン C H O - 3.2 を 1 リットルのスピナーフラスコ内で拡大してから F B S を含

40

50

まない完全培地中で増殖し、ラクタドヘリンを大規模に産生した。7日間培養した細胞培養上清を250mlの遠心分離ボトルに移し、2000rpmで5分間、遠心分離して細胞を沈殿させた。次に上清を0.2μmのフィルターフラスコで濾過し、500Kのカットオフサイズを持つファイバーカートリッジを使って100mlに濃縮した。次に濃縮された上清を100,000xg、1時間15分間、4℃の遠心分離にかけた。エクソゾームを含む沈殿を1mlのMLBII(50mM NaPO₄ pH8 / 300mM NaCl / 10mM イミダゾール / 0.5% Tween)に再懸濁し、2mlのNi-NTAスラリー(前もって遠心分離にかけEtOHを除いた)を含むチューブに移した。シェーカー上で2~3時間、4℃でインキュベーションした後、サンプルをバイオラッド社製カラムに注ぎ込み、4℃に静置した。カラムをまず10mlのMWBI(50mM NaPO₄ pH8 / 300mM NaCl / 20mM イミダゾール / 0.5% Tween)で、そして次に20mlのMWBII(50mM NaPO₄ pH8 / 500mM NaCl / 20mM イミダゾール)で洗浄した。カラムに結合したタンパク質を8mlのMEBII(50mM NaPO₄ pH8 / 300mM NaCl / 250mM イミダゾール)で溶出した。溶出されたタンパク質をミリポアウルトラフリー-4 10,000MWCO装置を使って濃縮し、緩衝液をPBS pH7.4に交換した。タンパク質サンプルは小分けしてから-20℃に保存した。純度はSDS-PAGEをクマジー染色して分析した。図5に濃縮前と後(それぞれレーン1; 50μlおよびレーン2; 1μg)の2種類の組換え体ラクタドヘリン調製物の分析を示す。

10

【0162】

結論として、ここに記載の方法により高純度の組換え体ラクタドヘリンを得た。

20

【実施例6】

【0163】

エクソゾームに抗原を標的化するためのエクソゾームタンパク質のスクリーニング
他のタンパク質上のエクソゾーム標的化ドメインの存在、およびそれを利用した抗原をエクソゾームに標的化する手法をMelanA/MART1およびCD81を用い評価した。

【0164】

第一群の実験では、MelanA/MART1、CD40LおよびCD81をコードするcDNAをFM3細胞cDNA(MelanA/MART1)およびマウス脾臓細胞cDNA(クローンテック社; CD40L、CD81)より、特異プライマーを用い増幅した。プライマーはその5'末端側が延長され、クローニング目的の制限部位を含んでいる。増幅産物を制限酵素で消化し、適応する酵素で前もって切断しておいたpCDNA6A-His(インビトロゲン社)内に別々に連結した。得られたプラスミド(それぞれpCDNA6-MART1、pCDNA6-CD40LおよびpCDNA6-CD81)は組換え体MelanA/MART1(配列番号28)、CD40L(配列番号29)およびCD81(配列番号30)をコードしている。組換え体MelanA/MART1およびCD81はMycタグと融合し、次にベクター内に備えられているHisタグと融合する。より具体的には、配列番号28では残基1~118がMelanA/MART1に対応し、残基120~129がMycタグに対応しており、そして残基133~140はHisタグに対応する。同様に配列番号30では残基1~236がCD81に対応し、残基238~247がMycタグに対応し、そして残基251~258はHisタグに対応している。

30

40

【0165】

EL4および293F細胞をエレクトロポレーション(EL4については220V、950μF、293Fについては400V、200μF)を使って配列番号28から30をコードするプラスミドでそれぞれトランスフェクションした。画分ELおよびCLはエクソゾームと細胞の沈殿を直接SDS-PAGE用のSB1Xに再懸濁したことを除き実施例1と同じに調製した。組換え体タンパク質の発現は、ここで使用した検出用抗体がMelanA/MART1についてはマウス抗Mycタグ抗体であり、CD40Lについては抗CD40L抗体である点を除いてやはり上記実施例1の記載と同じウエスタンブロットによ

50

り評価した。MelanA/MART1、CD40LおよびCD81サンプルはそれぞれ図7のパネルA、BおよびCで解析した。トランスフェクションした、またはトランスフェクションしていない細胞のELと、トランスフェクションした、またはトランスフェクションしていない細胞のCLをそれぞれ、各パネルのレーン1から4に示す。

【0166】

第2群の実験では、7回膜貫通型受容体CCR7をコードするcDNAを、特異プライマーを使って活性化樹状細胞から増幅した。両プライマーはそれぞれの5'末端が延長されAgI制限部位を含んでいる。増幅産物をAgeIで消化してから、前もってAgeIで切断しておいた配列番号29をコードするプラスミド内に連結した。AgeI消化産物はまた、特殊プライマーを使って配列番号30として調製された端を切り取った形のCD81をコード(p cDNA6-CD81E、配列番号31)するプラスミド内にも連結した。配列番号31のCD81のC末端膜貫通領域を断端することは、細胞膜脂質二重層内のCCR7の配向を適切に維持するのに必要であった。配列番号31では、残基1~200がCD81Eに対応し、残基202~211がMycタグに対応し、そして残基215~222がHisタグに対応している。配列番号28と31をコードするプラスミド内に連結すると、受け手のプラスミドのMycタグとHisタグの間にCCR7のcDNAが挿入される。5'から3'の方向のCCR7挿入対を持つプラスミドをPCRスクリーニングにより選別した。選別されたプラスミド(p cDNA6-MART1/CCR7およびp cDNA6-CD81E/CCR7)はHisタグに融合した組換え体キメラタンパク質をコードしている(それぞれ配列番号32と33)。配列番号32では、残基1~118がMelanA/MART1に対応し、残基120~129がMycタグに対応し、残基135~488がCCR7に対応し、そして残基489~496がHisタグに対応している。配列番号33では、残基1~200がCD81Eに対応し、残基202~211がMycタグに対応し、残基217~570がCCR7に対応し、そして残基571~578がHisタグに対応している。

【0167】

EL4細胞をエレクトロポレーションにより、配列番号32および33をコードするプラスミドでトランスフェクションし、上記に従いELとCL画分を調製した。組換え体タンパク質の発現は上記に従いウエスタンブロットにより評価した。ELおよびCLサンプルはそれぞれ図8のパネルAおよびBで解析した。p cDNA6-MART1/CCR7、p cDNA6-CD81E/CCR7でトランスフェクションされた細胞、および非トランスフェクション細胞由来のサンプルはそれぞれ各パネルのレーン1から3に示している。

【0168】

結果：組換え体MelanA/MART1(パネルA、図7)、CDL40(パネルB、図7)およびCD81(パネルC、図7)はエクソゾーム内、そしてトランスフェクションされた細胞の細胞溶解物内にも検出された(それぞれ各パネルのレーン1と3)。注目すべきことに、予想される長い形(膜貫通型)のCD40LはCLに検出され(パネルBのレーン3)、一方短い形(可溶型)のものは主にエクソゾーム内に検出された(パネルBのレーン1)。細胞溶解物内でのCD81の非コントロール性タンパク質分解によると思われるより小型サイズの産物がパネルBのレーン3に検出された。組換え体キメラMelanA/MART1-CCR7はエクソゾーム内に検出されたが、トランスフェクションされた細胞の細胞溶解物には検出されなかった(それぞれ図8、パネルAおよびBのレーン1)。我々はFACS分析を用いて、CCR7のみをコードするコントロール構築物が予想通りに細胞表面に検出できるがトランスフェクションされた細胞のエクソゾーム上には検出されない組換え体受容体を生じることを実証した(データ未提示)。最後にキメラタンパク質CD81E/CCR7をコードするプラスミドは試験したいずれの画分中にも検出可能なレベルのタンパク質を産生しなかった(図8のパネルAおよびB、レーン2)。非トランスフェクション細胞由来の画分については、タンパク質は検出されなかった(図7のパネルAからCのレーン2と4、および図8のパネルAとBのレーン3)。

【0169】

結論：ラクタドヘドリンを用い明示したのと同様に、他のエクソゾームタンパク質を同定し、これを用いて抗原、特に受容体を標的化することができる。実際、Me1anA/MART1がエクソゾーム内での主要発現物として同定され、そしてそれが7回膜貫通受容体CCR7との融合することによりエクソゾーム上でのCCR7の発現が誘発される。別のエクソゾームタンパク質、即ちCD81Eを融合相手とした時にはCCR7が検出されないことから、この現象は融合相手特異的である。従って、エクソゾームに他タンパク質を標的化できる能力についてエクソゾームタンパク質をスクリーニングすれば、ラクタドヘドリンのC1/C2ドメインを利用するものと同じアプリケーションに利用可能な、Me1anA/MART1の様な新規候補体が同定される。実際にはCD81E/CCR7は10
検出されなかったが、それでもCD81はCCR7以外のその他抗原をエクソゾームに標的化するのに好適であることに注意すべきである。

【0170】

実施例7：エクソゾーム上に表示された組換え体タンパク質の免疫原性

p cDNA6hLact1f/HisがトランスフェクションされたWEHI細胞に由来するマウスエクソゾームを実施例3記載の様に調製した。精製ヒト組換え体ラクタドヘドリンを実施例5記載の様に調製した。9匹のBalb/Cマウスを3匹のマウスから成る3つの免疫グループに分けた。各マウスを～20ngの組換え体ヒトラクタドヘドリンのPBS溶液（グループ1）、～20ngの組換え体ヒトラクタドヘドリンのPBS/完全フロイントアジュバント1：1の混合液（グループ2）または～20ngのヒトラクタドヘドリンを含む組換え体WEHIエクソゾームのPBS溶液（グループ3）のいずれかで膜腔内に免疫した。動物はグループ2を除き初回注射から2週間後に同一サンプルでブーストされ、グループ2については抗原をPBS/不完全フロイントアジュバント1：1の混合液に再懸濁した。2回目の免疫後に動物から採血し、ELISAを使って抗ヒトラクタドヘドリン抗体について試験した。このELISAでは、50ngのヒトラクタドヘドリンを含むPBSでマイクロタイタープレートのウェルを1時間、37℃でコーティングした。0.05%のTween-20および6%の脱脂粉乳をPBS中に含むブロッキング緩衝液をウェルに1時間、室温（RT）で加え、残存する遊離の結合部位を飽和した。次にウェルをブロッキング緩衝液で1/1000に希釈された免疫マウス血清と1時間、室温でインキュベーションした。ウェルをブロッキング緩衝液で3回洗浄した後、結合した抗体を1/10000に希釈された抗マウスIgG西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体（ジャクソンイムノリサーチ社）と化学発光基質（アマシャム社）を用い検出した。結果を図9に示す。20
30

【0171】

結果：抗ラクタドヘドリン抗体はラクタドヘドリン含有エクソゾームで免疫されたマウスの血清中に検出されたが、ラクタドヘドリンを単独またはフロイントアジュバント中に乳剤として与えられた場合には抗体反応は生じなかった。フロイントアジュバントを用いた場合は、接種物を4回注射しても抗体は検出されなかったが、ラクタドヘドリンを持つエクソゾームを投与されたマウス血清中の抗体力価はその後の注射と共に増加した（データ未提示）。40

【0172】

結論：抗原を持つエクソゾームはアジュバントが存在しない状態で強力な免疫原として機能し、そしてフロイントアジュバントのような古典的な既知の強力なアジュバントが無効である様な極めて少量の抗原を用いた場合でも抗体反応を誘導できる。

【0173】

【表1】

参考文献

1. Couto, J. R., Taylor, M. R., Godwin, S. G., Ceriani, R. L. and Peterson, J. A.
Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain.
DNA CELL BIOL 15, 281-6, 1996. 10
2. Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T. and Petersen, T. E.
Bovine PAS-6/7 binds alpha v beta 5 integrins and anionic phospholipids through two domains. Biochemistry 36, 5441-6., 1997
3. Andersen, M. H., Graversen, H., Fedosov, S. N., Petersen, T. E. and Rasmussen, J. T.
Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. Biochemistry 39, 6200-6., 2000 20
4. Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. J Cell Biol 152, 165-80., 2001
5. Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. J Cell Biol 147, 599-610, 1999 30
6. Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. J Immunol 166, 7309-18., 2001
7. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. Nat Med 7, 297-303., 2001 40

8. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. Nat Med 4, 594-600, 1998
9. Thery C., Zitvogel L. and Amigorena S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. Nature review 2 (2002) 569
10. K. Denzer, M. van Eijk, M.J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot and H.J. Geuze.
Follicular Dendritic Cells carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. J. Immunol. 165 (2000), 1259-1265

10

【図面の簡単な説明】

【0174】

【図1】ラクタドヘドリンによるエクソゾームへの標的化。

【図2】外因性ラクタドヘドリンによるエクソゾームへの標的化。

20

【図3】ラクタドヘドリンの選択的発現は種を越え保存される。

【図4】ラクタドヘドリンと融合した生物学的に活性IL-2のエクソゾーム内における選択的発現。

【図5】組換え体ヒトラクタドヘドリンの精製。

【図6】DNAワクチン接種によるAPCの交叉プライミング

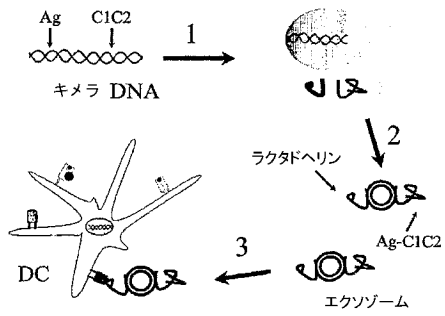
【図7】組換え体候補膜貫通ポリペプチドのエクソゾーム内への発現。組換え体Me1anA/MART1（パネルA）、CD40L（パネルB）およびCD81（パネルC）がエクソゾーム内およびトランスフェクションした細胞の細胞溶解物内にも検出された。

【図8】組換え体キメラタンパク質のエクソゾーム内への発現。

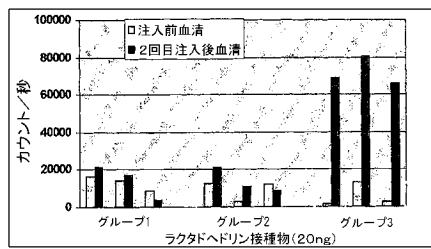
【図9】ラクタドヘドリン含有エクソゾームで免疫されたマウスの血清に於ける抗ラクタドヘドリン抗体の検出。

30

【図 6】



【図 9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016522 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/00 (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/EP02/09108
- (22) International Filing Date: 14 August 2002 (14.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/313,159 17 August 2001 (17.08.2001) US
60/343,991 26 December 2001 (26.12.2001) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): ANOSYS, INC. [US/US]; 1014 Hamilton Court, Menlo Park, CA 94025 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (*for US only*): DELCAYRE, Alain [FR/US]; 2812 Loxford Avenue, San José, CA 95124 (US).
LE PECQ, Jean-Bernard [FR/US]; 675 Olive Street, Menlo Park, CA 94025 (US).
- (74) Agents: BECKER, Philippe et al.; Becker et Associates, 35, rue des Mathurins, 1-75008 Paris (FR).
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:**
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/016522 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOUNDS FOR THE TARGETING OF PROTEIN TO EXOSOMES

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and methods for selectively expressing a polypeptide in a membrane vesicle. The invention also relates to genetic constructs and recombinant cells suitable to produce such membrane vesicles. This invention also relates to such functionalized membrane vesicles as well as to methods of making antibodies, methods of producing or regulating an immune response as well as to methods of screening or identifying binding partners using the same. The invention more particularly uses lactadherin or portions thereof to selectively express polypeptides in membrane vesicles, of natural or synthetic origin. This invention can be used in experimental, research, therapeutic, prophylactic or diagnostic areas.

METHODS AND COMPOUNDS FOR THE TARGETING OF PROTEIN TO
EXOSOMES**Introduction**

5 The present invention relates to compositions and methods for selectively expressing a polypeptide in a membrane vesicle. The invention also relates to genetic constructs and recombinant cells suitable to produce such membrane vesicles. This invention also relates to such functionalized membrane vesicles as well as to methods of making antibodies, methods of producing or regulating an immune response as well as to methods of screening or identifying binding partners using the same. The invention more particularly uses lactadherin or portions thereof to selectively express polypeptides in membrane vesicles, of natural or synthetic origin. This invention can be used in experimental, research, therapeutic, prophylactic or diagnostic areas.

Background

20 Exosomes are vesicles of endosomal origin that are secreted in the extracellular milieu following fusion of late endosomal multivesicular bodies with the plasma membrane (4). Cells from various tissue types have been shown to secrete exosomes, such as dendritic cells, B lymphocytes, tumor cells and mast cells, for instance. Exosomes from different origin exhibit discrete sets of proteins and lipid moieties (5,6). They notably contain proteins involved in antigen presentation and immuno-modulation suggesting that exosomes play a role in cell-cell communications leading to the modulation of immune responses. Indeed, exosomes from dendritic cells (DC) pulsed with peptides derived from tumor antigens elicit anti-tumor responses in animal model using the matching tumor (7,8). Methods of producing, purifying or using exosomes for therapeutic purposes or as research tools have been described for instance in WO99/03499, WO00/44389 and WO97/05900, incorporated therein by reference.

35 Considering their immunogenic and therapeutic properties, it would be particularly useful to be able to modify the content of exosomes in order to alter their properties. In this respect, recombinant exosomes have been described in the art, which derive from cells transfected with plasmids encoding recombinant proteins. Such recombinant exosomes contain the plasmid-encoded recombinant protein (WO00/28001).

CONFIRMATION COPY

Summary of the invention

5 The present invention now discloses novel methods of producing recombinant exosomes. The invention also discloses methods of selectively expressing a polypeptide in exosomes. The invention also describes novel chimeric molecules and recombinant cells containing the same, which can be used to produce such recombinant exosomes. This invention also relates to such functionalized membrane vesicles as well as to methods of making antibodies, methods of
10 producing or regulating an immune response as well as to methods of screening or identifying binding partners using the same.

The present invention is based on the unexpected findings that Lactadherin is expressed in many exosome-producing cells and that in these cells, Lactadherin is
15 almost exclusively found associated with exosomes (Figure 1). This highly specific subcellular localization occurs for endogenous Lactadherin but also for exogenous Lactadherin following transfection of exosome-producing cells with a plasmid encoding Lactadherin (Figure 2). We found that by deleting specific short portions of the C1/C2 domain of Lactadherin, the subcellular localization of
20 Lactadherin is changed (Figure 2). These findings strongly support that the C1/C2 domain of Lactadherin contains a highly specific targeting motif for exosome surfaces and that the modification of the C1/C2 domain of Lactadherin changes the specificity of targeting towards other surfaces. We found that this phenomenon is conserved across several species since *in vitro* transfection of
25 exosome-producing cell lines from mice and hamster with a plasmid encoding human recombinant Lactadherin also yields human recombinant Lactadherin almost exclusively associated to mouse and hamster exosomes, respectively (Figure 3). Moreover, mouse recombinant Lactadherin expressed in hamster cell lines is also found in hamster exosomes (Figure 3).

30 Emanating from this, the introduction into a protein of part or the entirety of the C1 and/or C2 domain of Lactadherin or a functional equivalent thereof allows the targeting of the resulting chimeric protein to exosomes and other lipidic structures.

35 The invention further discloses methods allowing the identification of additional targeting polypeptides or genes, which can be used to construct chimeric genes or proteins for targeting or expression into exosomes. These chimeric proteins can be

used to generate recombinant vesicles tailored to acquire new desirable functions. Given the intrinsic properties of exosomes, i.e. immunogenicity and non-toxicity, the resulting recombinant exosomes represent a novel tool for numerous applications in research and medical fields. Notably, the potency of exosomes to induce strong immune responses render them ideal tools to prepare antibodies against antigens expressed on recombinant exosomes. Also, biologically active chimeric proteins can be used to generate recombinant exosomes tailored to acquire new therapeutic properties. The unexpected ability of Lactadherin to target polypeptides and to be expressed selectively in exosomes also provides novel approaches to the purification of such polypeptides, including Lactadherin itself.

An object of this invention thus resides in a method of targeting polypeptides to exosomes, comprising:

- a) Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide fused to a targeting polypeptide comprising Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain; and
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells in vivo or ex vivo to generate recombinant exosomes.

An other object of this invention is a method of selectively expressing a polypeptide at the surface of exosomes, comprising:

- a) Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes, and
- c) Collecting said recombinant exosomes, wherein said exosomes carry at their surface polypeptides encoded by said chimeric genetic construct.

A further object of this invention is a method of preparing functionalized exosomes, comprising:

- a) Providing a chimeric genetic construct encoding a polypeptide fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes presenting said polypeptide at their surface, and
- c) Collecting and/or purifying said functionalized exosomes.

An other object of this invention is a method of producing a polypeptide comprising Lactadherin or a portion thereof, the method comprising:

- a) Providing a genetic construct encoding said polypeptide;
- 5 b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes presenting said polypeptide at their surface,
- c) Collecting and/or purifying said functionalized exosomes, and
- d) Recovering and/or purifying said polypeptide or a fragment thereof from said functionalized exosomes.

10

Still a further object of this invention is a functionalized exosome prepared by the above methods as well as compositions comprising such functionalized exosomes and a pharmaceutically acceptable excipient or carrier.

- 15 This invention also relates to chimeric genetic constructs encoding a polypeptide of interest fused to a targeting moiety comprising the C1 and/or C2 domain of lactadherin or an other targeting polypeptide as identified below. The polypeptide of interest may be for instance an antigen, a cytokine, a ligand, a receptor, an immunoglobulin, a marker polypeptide, an enzyme, an ionic channel, or a portion thereof. Specific examples of such chimeric genes encode a polypeptide selected from SEQ ID NO: 22-27, 32 or 33 or a fragment thereof devoid of the 8 C-terminal amino acid residues.

- 25 This invention further encompasses a vector comprising a chimeric genetic construct as described above, as well as recombinant cells comprising a chimeric genetic construct or a vector as described above.

- The invention also provides methods to identify or screen exosome-targeting polypeptides as well as methods to generate chimeric proteins that are selectively targeted to membrane vesicles (e.g., exosomes). The chimeric proteins are typically composed of a polypeptide sequence (e.g., the complete or partial sequence of naturally occurring protein such as antigens, cytokines, ligands, receptors or immunoglobulins) fused to the sequence of a targeting polypeptide, typically Lactadherin or a portion thereof including a functional C1 and/or C2 domain, preferably a functional C1/C2 domain thereof.

A further aspect of this invention thus resides in a method of screening, identification or selection of exosome-targeting polypeptides, the method comprising:

- 5 - providing a first genetic construct encoding a candidate polypeptide, preferably a candidate trans-membrane polypeptide;
- introducing the first genetic construct into exosome-producing cells and testing expression of the candidate polypeptide into exosomes;
- selecting a candidate polypeptide which is expressed in exosomes and preparing a second genetic construct encoding said selected
- 10 polypeptide fused to a trans-membrane antigen or receptor;
- introducing the second genetic construct into exosome-producing cells and testing expression of the fusion polypeptide into exosomes; and
- selecting the polypeptide which causes efficient expression of the
- 15 trans-membrane antigen or receptor into exosomes.

Our results show that different proteins or polypeptides which contain specific targeting signals directing expression on exosomes can be identified, selected and/or improved using the above methods. These polypeptides require both the

20 ability to be expressed into exosomes and to target other molecules to such vesicles. These polypeptides may be derived from transmembrane proteins, and may include all or a portion of such proteins, typically a portion comprising at least the trans-membrane domain. These constructs are particularly suited for the delivery of antigens to exosomes, particularly receptors and trans-membrane

25 proteins. The method can be used to select specific, individual targeting polypeptides, or to screen libraries of genetic constructs.

The resulting recombinant exosomes can be used for many research and therapeutic applications including raising antibodies, generating exosomes with

30 improved therapeutic properties, antigen delivery and library screening to identify counterparts of protein-protein interactions.

The present invention can also be used advantageously to create synthetic lipid vesicles. Indeed, the invention can be used to target molecules to lipid structures

35 other than exosomes such as any naturally occurring vesicle or organelle comprising a plasma membrane bilayer as well as synthetic vesicles comprising lipids such as liposomes or any synthetic particles with hydrophobic properties. Such lipid vesicles are preferably engineered to contain (or be enriched in)

phosphatidyl-serine and/or other lipids naturally contained in exosomes in order to allow efficient targeting and binding of the chimeric molecule.

Furthermore, the invention can be used to deliver any selected molecule artificially fused to lactadherin or a portion thereof. In this regard, the invention is not limited to genetic fusions but also encompasses chemical fusions, i.e., any chemical (covalent) complex of a lactadherin and a molecule.

Legend to the Figures

Figure 1: Targeting of Lactadherin to exosomes.
 Figure 2: Targeting of exogenous lactadherin to exosomes.
 Figure 3: Selective expression of Lactadherin is conserved across species.
 Figure 4 : Selective Expression in exosomes of Biologically active IL-2 fused to Lactadherin.
 Figure 5 : Purification of recombinant human lactadherin.
 Figure 6 : Cross-priming of APCs upon DNA vaccination.
 Figure 7 : Expression of recombinant candidate trans-membrane polypeptides into exosomes. Recombinant MelanA/MART1 (Panel A), CD40L (Panel B) and CD81 (Panel C) were detected in exosomes and also in cell lysates of transfected cells.
 Figure 8 : Expression of recombinant chimeric proteins into exosomes.
 Figure 9 : Detection of anti-lactadherin antibodies in the serum of mice immunized with lactadherin-containing exosomes.

Detailed Description of the Invention

The present invention discloses novel methods of producing recombinant exosomes and their uses. The invention more particularly uses a targeting polypeptide, such as lactadherin or portions thereof, to selectively express or to target polypeptides in membrane vesicles, of natural or synthetic origin. This invention can be used in experimental, research, therapeutic, prophylactic or diagnostic areas.

The present invention stems from the discovery of novel unexpected properties of lactadherin. More particularly, the invention shows that lactadherin is selectively expressed in exosomes and can be used to selectively express polypeptides in such vesicles.

As indicated above, this invention provides methods of targeting or (selectively) expressing polypeptides in exosomes, methods of functionalizing exosomes, and methods of producing polypeptides, which methods use a chimeric gene or genetic construct encoding a chimeric polypeptide. The chimeric polypeptide
5 comprises a polypeptide of interest fused to lactadherin or functional domains thereof.

Lactadherin

10 Lactadherin is a protein that was first identified in breast tissue. It is a component of milk where it associates with several other proteins at the surface of milk fat globules. Lactadherin comprises an epidermal-growth factor-like (EGF-like) domain in its N-terminal extremity that contains the sequence motif Arginine-Glycine-Aspartic acid (R-G-D) found in integrin ligands. This motif mediates the
15 binding of Lactadherin to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins. The C-terminal extremity of Lactadherin contains a C1/C2 domain that is involved in the interaction of Lactadherin with milk fat globules. Several other proteins that bind to other cell surfaces have related C1/C2 domains. The C1/C2 domain of Lactadherin has been shown to preferentially bind to surfaces containing phosphatidyl-serine lipids
20 (Ref. 1 to 3). Lactadherin has been shown to be present at the surface of exosomes produced by murine dendritic cells. In this regard, WO00/30667 relates to the use of lactadherin or variants thereof to deliver antigens to dendritic cells or to mediate an immune response in vivo. US5,455,031 discloses the cloning of the long form of human lactadherin.

25 The present invention stems from the discovery of novel unexpected properties of lactadherin, i.e., the ability of lactadherin to selectively express or target polypeptides in exosomes.

30 Within the context of this invention, the term "selectively" indicates that the lactadherin (or chimeric polypeptide) which is expressed by the cells is present almost exclusively at the surface of exosomes, although residual or minor presence in other cell compartments or membranes may be observed. The invention is partly based on the unexpected determination that lactadherin is
35 predominantly expressed at the surface of exosomes and can be used to produce exosomes or lipid vesicles enriched for desired molecules attached to lactadherin.

Within the context of this invention, the term exosomes (or vesicles) that "carry" a molecule at their surface designates vesicles that contain such molecules attached to their membrane. The molecule may be exposed outside of the vesicle, or contained within the vesicle (i.e., attached to the inner side of the membrane).
 5 Typically, the invention allows efficient presentation of the molecule at the surface of vesicles, i.e., their exposure outside of the vesicle.

In performing the present invention it is possible to use lactadherin from various sources or origins. Typically, it is preferred to use a mammalian lactadherin or a
 10 portion thereof. Mammalian lactadherin includes human, murine, rat, bovine, porcine and equine lactadherin, for instance. Most preferred lactadherin is human or murine, or fragments or functional equivalents thereof.

In this regard, the invention preferably uses:

- (i) human lactadherin or murine lactadherin,
- 15 (ii) a fragment of human lactadherin or murine lactadherin comprising a functional C1 and/or C2 domain, more preferably a functional C1/C2 domain, or
- (iii) a polypeptide comprising at least 50% primary structure identity with the polypeptides of (i) or (ii).

20 The amino acid sequence of human lactadherin is depicted SEQ ID NO: 7 (long form) and 8 (short form). Examples of corresponding nucleic acid molecules are represented in SEQ ID NO: 5 and 6, respectively. The amino acid sequence of murine lactadherin is depicted SEQ ID NO: 10. See also Stubbs et al. (PNAS
 25 87(21), 1990, 8417), as well as Genbank Accession n° M38337.

In a particular embodiment of this invention, the chimeric gene comprises a lactadherin having an amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 7, 8, 10 or a fragment thereof comprising a functional C2 domain.

30 In another particular embodiment of this invention, the chimeric gene comprises a lactadherin having an amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 7, 8, 10 or a fragment thereof comprising a functional C1 domain.

In a further particular embodiment, the chimeric gene comprises a lactadherin having an amino acid sequence comprising a functional C1/C2 domain of SEQ ID
 35 NO: 7, 8 or 10.

The C2 domain of human lactadherin is comprised in amino acid residues 229-387 of SEQ ID NO:7. The C1 domain of human lactadherin is comprised in

amino acid residues 69-225 of SEQ ID NO:7. In a typical example, the chimeric construct encodes at least amino acid residues 229-387 or 69-225 of SEQ ID NO:7. In a further particular embodiment, the chimeric construct encodes at least amino acids 69-387 of SEQ ID NO: 7.

5 The C2 domain of murine lactadherin is comprised in amino acid residues 271-426 of SEQ ID NO:10. The C1 domain of murine lactadherin is comprised in amino acid residues 111-266 of SEQ ID NO:10. In a typical example, the chimeric construct encodes at least amino acid residues 111-266 or 271-426 of
10 SEQ ID NO:10. In a further particular embodiment, the chimeric construct encodes at least amino acids 111-426 of SEQ ID NO: 10. In an other particular embodiment, the chimeric construct encodes at least amino acids 109-426 of SEQ ID NO: 10.

15 As indicated above, the targeting moiety may be a polypeptide comprising at least 50% primary structure identity with the polypeptides of (i) or (ii) above. Identity may be determined according to various known techniques, such as by computer programs, preferably be the CLUSTAL method. More preferably, the targeting polypeptide has at least 60% identity, advantageously at least 70% identity with
20 the polypeptides of (i) or (ii). Such lactadherin variant (or functional equivalent) should retain the ability to target polypeptides to exosomes. This property may be verified as described in the examples, e.g., by creating a chimeric gene comprising said variant fused to a marker polypeptide, expressing the same in an exosome-producing cell and determining the presence of the marker polypeptide
25 at the surface of the exosome. Preferred lactadherin variants have at least 85% identity with the polypeptides of (i) or (ii) above. Possible variations include amino acid deletion(s), substitution(s), mutation(s) and/or addition(s).

Specific examples of such variants or functional equivalents include other C1/C2
30 domain-containing polypeptides or proteins, or fragments thereof. In particular, specific examples of such functional variants include Del-1, Neuropilin-1, coagulation factor 5 and coagulation factor 8 or fragments thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain thereof.

35 Screening of targeting polypeptides

The present invention also discloses that additional, efficient targeting polypeptides can be produced, screened and/or isolated. In particular, this

invention shows that polypeptides can be selected for their expression in exosomes and for their capacity to deliver other polypeptides to such vesicles. The invention shows that polypeptides which are naturally expressed in exosomes do not necessarily represent efficient targeting polypeptides, while polypeptides
5 which are not naturally expressed in these vesicles can be produced artificially and cause efficient delivery of polypeptides of interest. The invention also shows that polypeptides which are not normally expressed into exosomes can be forced into such compartments, by recombinant DNA technologies.

10 Although exosome-specific proteins that are found exclusively on exosomes, such as Lactadherin, are preferred for the targeting of proteins to exosomes, proteins that are enriched in exosomes or non-exclusive to exosomes are also potential candidates for the targeting of other proteins to exosomes. The invention now provides a means to identify and use such candidates. Illustrating this, we have
15 found that recombinant MelanA/MART1, CD40L and CD81 are expressed in exosomes following transfection of cells with plasmids encoding these transmembrane molecules. These results are described in Example 6. MelanA/MART1 is a tumor associated intracellular membrane protein that was recently found in exosomes derived from tumor cells. It was suggested that this occurrence reflects
20 the ability of exosomes to transfer full-length tumor antigens to APC (9). Our findings show that MelanA/MART1 is in fact an integral component of exosomes derived from MelanA/MART1⁺ tumor exosomes. CD40L is an important stimulator of immune responses and our findings showing that it can be detected on exosomes are unprecedented. In contrast, CD81 is a known component of
25 exosomes and has previously been shown to be enriched in B cell-derived exosomes. We constructed chimeric proteins including MelanA/MART1 or CD81 fused to a seven-transmembrane receptor, CCR7, and found that MelanA/MART1-CCR7 chimeric protein is almost exclusively expressed in exosomes, whereas CCR7 alone is only detected on the cell surface. In contrast,
30 and surprisingly, the CD81 chimeric construct with CCR7 did not yield any detectable protein (See Example 6), despite the fact that CD81 is naturally expressed by exosomes. Hence our method shows that efficient exosome-targeting polypeptides exist and allows the identification and selection of such polypeptides that can be used to target antigens, and notably transmembrane
35 antigens and receptors to exosomes.

A further aspect of this invention thus resides in a method of screening, identification or selection of exosome-targeting polypeptides, the method comprising:

- 5 - providing a first genetic construct encoding a candidate polypeptide, preferably a candidate trans-membrane polypeptide;
- introducing the first genetic construct into exosome-producing cells and testing expression of the candidate polypeptide into exosomes;
- selecting a candidate polypeptide which is expressed in exosomes and preparing a second genetic construct encoding said selected
- 10 polypeptide fused to a targeted polypeptide;
- introducing the second genetic construct into exosome-producing cells and testing expression of the fusion polypeptide into exosomes; and
- selecting the polypeptide which causes efficient expression of the
- 15 targeted polypeptide into exosomes.

Our results show that different proteins or polypeptides which contain specific targeting signals directing expression on exosomes can be identified, selected and/or improved using the above methods. These polypeptides require both the

20 ability to be expressed into exosomes and to target other molecules to such vesicles. These polypeptides may be derived from transmembrane proteins, and may include all or a portion of such proteins, typically a portion comprising at least the trans-membrane domain. These constructs are particularly suited for the delivery of antigens to exosomes, particularly receptors and trans-membrane

25 proteins.

Preferably, the targeting polypeptide is or comprises a trans-membrane domain. Candidate targeting polypeptides may be derived from virtually any protein comprising such a trans-membrane domain, such as receptors, channels, etc.

30 Specific examples of such targeting polypeptides include MelanA/MART1, CD40L, CD81, etc., or a portion thereof. The targeting polypeptide may comprise an entire trans-membrane protein, or only a portion thereof comprising at least one trans-membrane domain.

35 Because of the nature of the candidate targeting polypeptide, the method is essentially suited for identification of polypeptides adapted for delivering trans-membrane polypeptides to exosomes, or for delivering polypeptides inside exosomes. Most preferred targeted polypeptides are thus trans-membrane

polypeptides, such as receptors, trans-membrane antigens, or portions thereof. The invention is particularly advantageous since it allows the screening of targeting polypeptides allowing efficient expression of complex molecules, such as receptors having several trans-membrane domains (e.g., G-Protein Coupled Receptors or "GPCR"), into particular vesicles.

Expression of the candidate targeting polypeptide or of the fusion polypeptide into exosomes can be tested according to various techniques, which are disclosed throughout the entire description of this application. In a preferred embodiment, a genetic construct is introduced into exosome-producing cells, exosomes are prepared from said modified cells, and expression of the polypeptide within said exosomes is measured. Expression can be measured by a variety of techniques, including using specific ligands of the targeting or targeted polypeptides. In a specific example, expression is measured using antibodies specific for the targeting moiety or for a tag sequence introduced within the fusion polypeptide.

In preparing the fusion polypeptide, the targeted moiety may be placed either upstream or downstream from the targeting polypeptide, i.e., either in C-ter or in N-ter. The orientation of the fusion determines the type of expression of the targeted polypeptide. In particular, coupling of the targeted polypeptide to the intracellular portion of the targeting polypeptide will cause expression of the targeted polypeptide inside of the vesicle (for soluble antigens). On the other hand, for expression of trans-membrane receptors, the type of coupling is adjusted by the skilled person depending on the construct, to allow proper folding and insertion into the exosome membrane.

As will be disclosed later, coupling can be either direct or via a spacer molecule, and the exosome-producing cells may be of various source and origin.

Also, different fusions may be expressed and tested, either in parallel or in the same vesicles. In this regard, the method can be used to select specific, individual targeting polypeptides, or to screen libraries of genetic constructs.

The method allows the production of improved targeting polypeptides and fusion molecules, which are highly efficient for expression into exosomes.

In this respect, the invention also relates to a method of producing an exosome expressing a selected trans-membrane polypeptide, the method comprising:

13

- selecting a targeting polypeptide as described above,
- providing a genetic construct encoding the selected trans-membrane polypeptide fused to the targeting polypeptide,
- expressing the genetic construct into exosome-producing cells, and
- 5 - producing and isolating exosomes from said modified cells.

The invention also relates to a method of producing an exosome expressing a GPCR or a portion thereof comprising at least one trans-membrane domain, the method comprising:

- 10 - providing a genetic construct encoding the GPCR or portion thereof fused to a targeting polypeptide comprising a trans-membrane domain and/or selected as described above,
- expressing the genetic construct into exosome-producing cells, and
- 15 - producing and isolating exosomes from said modified cells which express the GPCR or portion thereof.

The invention also relates to exosomes expressing a recombinant GPCR or a portion thereof.

- 20 The invention also relates to a fusion polypeptide comprising a targeting polypeptide selected from Melan/MART1, CD40L and CD81 and a targeted polypeptide. More preferably, the targeted polypeptide comprises a trans-membrane domain. The invention also relates to any polynucleotide sequence encoding such fusion polypeptides. Specific, illustrative examples of such fusions
- 25 are provided as SEQ ID NO: 32 and 33.

Polypeptide of interest

- The present invention can be used to target, selectively express, or produce (e.g.,
- 30 purify) various polypeptides in (from) exosomes or other lipidic structures, such as antigens, cytokines, ligands, receptors, immunoglobulins, a marker polypeptide (e.g., a label protein, such as Green Fluorescent Protein, or an enzyme, for instance), enzymes, ionic channels, etc., or a portion thereof. Generally, this invention can be used with any polypeptide of interest, e.g., any polypeptide
 - 35 having biological or immune properties. Furthermore, the invention can be used to simultaneously express or target several distinct chimeric genetic constructs encoding distinct polypeptides into exosomes, to further expand the scope of activities or reconstitute complex molecules.

Preferred examples of polypeptides are antigens, such as tumor antigens, viral antigens and microbial antigens, for instance. Illustrative examples of tumor antigens are MAGE, BAGE, Prostate tumor antigens, oncogenes, etc. The amino
5 acid sequence of these antigens are known per se and can be produced by recombinant techniques or by synthesis. Particular antigens to be targeted or presented with this invention include soluble antigens and extracellular domains of receptors.

10 Further examples of polypeptides of interest include lymphokines (IL-2, IL-4, IL-13), trophic factors (TNF, IFN, GM-CSF, G-CSF, etc.), enzymes, clotting factors, hormones, lipoproteins, etc.

An other type of polypeptides of interest is a receptor having at least one trans-
15 membrane domain, more preferably a GPCR or a portion thereof. Indeed, the invention now allows the targeting and expression of trans-membrane polypeptides into particular vesicles using targeting polypeptides. The expression of GPCRs within vesicles allows their purification, characterization, the screening for ligands (whether synthetic or natural), the production of antibodies, etc. A
20 specific example of a GPCR is, for instance, CCR7, although the invention can be used as well with other receptors.

Other particular examples are immunoglobulins and fragments thereof, such as for
instance Fc fragments of immunoglobulins. Such Fc fragments, when expressed at
25 the surface of exosomes, can act to target the exosomes to cells expressing receptors for such Fc fragments, such as antigen-presenting cells. The expression of such Fc fragments, either alone or in combination with the expression of antigens, facilitates and enhances exosome recognition by antigen-presenting cells, particularly dendritic cells, and increases cross-priming of such antigens.

30 Obviously, the invention is also adapted for the delivery of therapeutic proteins or polypeptides. Such proteins may be delivered to specific cells using functionalized recombinant exosomes or liposomes, optionally with tissue-specific ligands at their surface. Thereby, therapeutic proteins may be expressed at
35 the surface of cell lacking the endogenous protein or expressing a non-functional endogenous protein leading to pathologic conditions. In this regard, a specific object of this invention is a method of delivering a therapeutic protein to a subject comprising:

15

- (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said protein fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain, or to a targeting polypeptide identified using a method as disclosed above;
- (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes carrying said chimeric proteins at their surface,
- (c) Collecting said recombinant exosomes and injecting said exosomes or a portion thereof to said patient.

Furthermore, because the invention also allows chemical coupling of molecules to Lactadherin or functional equivalents thereof, the invention also extends to non-polypeptide compounds such as small molecules, nucleic acids, lipids, saccharides, glycolipids, etc.

As indicated, the invention now makes it possible to express on exosomes a combination of various molecules through their targeting with Lactadherin or functional equivalents thereof, so as to reconstitute artificially particles having increased immunogenicity. A typical example is a combination of antigen(s), Lactadherin, targeting polypeptide (e.g. Fc fragment) and/or adjuvant (e.g., cytokine, including GM-CSF, etc.).

Fusion

Chimeric polypeptides or compounds can be prepared by genetic or chemical fusion.

For the genetic fusion, the region of the chimeric gene coding for the polypeptide of interest may be fused upstream, downstream or at any internal domain junction of Lactadherin or a targeting polypeptide. In this regard, the examples demonstrate that upstream fusions with lactadherin are functional, as well as N-ter and C-ter fusions with targeting polypeptides. Furthermore, the domains may be directly fused to each other, or separated by spacer regions that do not alter the properties of the chimeric polypeptide. Such spacer regions include cloning sites, cleavage sites, flexible domains, etc. In addition, the chimeric genetic construct may further comprise a leader signal sequence to favor secretion of the encoded chimeric polypeptide into the endoplasmic reticulum of exosome-producing cells. Generally, the chimeric gene comprises the lactadherin leader sequence. However, it is possible to insert heterologous leader sequences, especially where portions of lactadherin are used. Moreover, the chimeric gene may further

comprise a tag to facilitate purification or monitoring, such as a myc tag, a poly-histidine tag, etc.

For the chemical fusion, the partial or full-length lactadherin sequence may be selected or modified to present at its extremity a free reactive group such as thiol, amino, carboxyl group to cross-link a soluble polypeptide, a glycolipid or any small molecule. In a preferred embodiment, the Lactadherin construct encodes at least amino acids 1-230 of SEQ ID NO: 7 in which the C1 domain (amino acids 60-225) provides the targeting motif to exosomes and Cysteine 230 provides the free thiol-residue for chemical cross-linking to other molecules. Crosslinking peptides, chemicals to SH groups can be achieved through well established methods (review G.T Hermanson (1996) Bioconjugate techniques San Diego Academic Press 785 pages). The advantage of this method is that it extends the scope of the invention to the preparation of antibodies to compounds other than polypeptides, such as glycolipids, drugs and organic chemicals. It also provides a means to target polypeptide and compounds to exosomes without introducing putative neo-antigenic determinants. Selected cross-linking reagents have been shown to be immunologically silent (G.T. Hermanson (1996) cited above). Neo-antigenic determinants sometimes occur at the junction of chimeric genes and may limit the usage of chimeric gene products for specific prophylactic and therapeutic human applications.

Modified exosomes or lipid vesicles (e.g., liposomes) can thus be prepared by producing exosomes (or liposomes) presenting the relevant lactadherin construct such as SEQ ID NO 7 and then reacting them with the product to be linked. Alternatively, the lactadherin fragment cross-linked to a product may be prepared and subsequently added to purified exosomes or liposomes.

Vectors

This invention further encompasses a vector comprising a chimeric genetic construct as described above, as well as recombinant cells comprising a chimeric genetic construct or a vector as described above. The vector may be a plasmid, a phage, a virus, an artificial chromosome, etc. Typical examples include plasmids, such as those derived from commercially available plasmids, in particular pUC, pcDNA, pBR, etc. Other preferred vectors are derived from viruses, such as replication defective retroviruses, adenoviruses, AAV, baculoviruses or vaccinia viruses. The choice of the vector may be adjusted by the skilled person depending on the recombinant host cell in which said vector should be used. In this regard, it

is preferred to use vectors that can transfect or infect mammalian cells. Indeed, preferred recombinant host cells are mammalian cells. These can be primary cells or established cell lines. Illustrative examples include fibroblasts, muscle cells, hepatocytes, immune cells, etc., as well as their progenitor or precursor cells.

- 5 Most preferred mammalian cells are exosome-producing mammalian cells. These include, for instance, tumor cells, dendritic cells, B and T lymphocytes or mastocytes.

Exosome-Producing Cells

- 10 Exosome-producing cells include any cell, preferably of mammalian origin, that produces and secretes membrane vesicles of endosomal origin by fusion of late endosomal multivesicular bodies with the plasma membrane (4). Cells from various tissue types have been shown to secrete exosomes, such as dendritic cells, 15 B lymphocytes, tumor cells, T lymphocytes and mast cells, for instance. Methods of producing, purifying or using exosomes for therapeutic purposes or as research tools have been described for instance in WO99/03499, WO00/44389, WO97/05900, incorporated therein by reference. Preferred exosome-producing cells of this invention are mammalian tumor cells, mammalian T lymphocytes and 20 mammalian dendritic cells, typically of murine or human origin. In this regard, the cells are preferably immortalized dendritic cells (WO94/28113), immature dendritic cells or tumor cells (WO99/03499). Furthermore, for the production of antibody, it may be advantageous to use B lymphocytes as exosome-producing cells, since the resulting exosomes comprise accessory functions and molecules 25 such as MHC class II molecules that facilitate antibody-production. Furthermore, it has been shown that B cells-derived exosomes are able to bind to follicular dendritic cells, which is an other important feature for antibody induction (10).

- The cells may be cultured and maintained in any appropriate medium, such as 30 RPMI, DMEM, etc. The cultures may be performed in any suitable device, such as plates, dishes, tubes, flasks, etc.

- The genetic construct (or vector) can be introduced into the exosome-producing cells by any conventional method, such as by naked DNA technique, cationic 35 lipid-mediated transfection, polymer-mediated transfection, peptide-mediated transfection, virus-mediated infection, physical or chemical agents or treatments, electroporation, etc. In this regard, it should be noted that transient transfection is sufficient to express the relevant chimeric gene so that it is not necessary to create

stable cell lines or to optimize the transfection conditions. The exosomes produced by such cells may be collected and/or purified according to techniques known in the art, such as by centrifugation, chromatography, etc. Preferred techniques have been described in WO00/44389 and in US09/780,748, incorporated therein by reference.

The recombinant, functionalized exosomes of this invention can be used to produce antibodies, to regulate an immune response, to deliver a biological activity and/or as a screening tool, to select ligands of any selected polypeptide.

Preparation of antibodies

In a particular embodiment, the present invention relates to the use of recombinant exosomes as described above to produce antibodies specific for any polypeptide or other antigen.

A considerable advantage of this invention is that antigens are associated with immuno-stimulatory components on recombinant exosomes, which allows the generation of antibodies against poorly immunogenic antigens and in situation where classical approaches to prepare antibodies failed. In particular, exosomes produced from B lymphocytes contain MHC II molecules that stimulate antibody production. Also, the preparation of antibodies can be achieved without the need to purify large amounts of antigens. In fact, a single and small scale purification method to isolate exosomes (US09/780,748) can be used regardless of the nature of the exogenous antigen expressed at their surface. Thus, the antigen preparation step can be completed very rapidly, i.e., typically within less than 12 hours. This method is rapid and can be performed on many samples in parallel allowing the simultaneous preparation of multiple antigens for immunization. The expression of antigens in a naturally occurring vesicle combined to a gentle purification procedure helps preserve the native conformation of antigens, which may enable the generation of relevant antibodies with potential therapeutic applications. Moreover, the invention generates lipid vesicles that contain a high density of chimeric molecules (e.g., antigen) at their surface. This high density can be compared to a polymeric state which highly favors antibody production by increasing antigen avidity. A further advantage of this invention is that the polypeptides can be expressed by exosome producing cells and thus subjected to natural pathways of processing and post-translational modifications (glycosylations, etc.).

The present invention thus also relates to methods of producing an antibody that binds a polypeptide, the method comprising immunizing a non-human mammal with functionalized exosomes as described above which express said polypeptide or an epitope thereof, and collecting antibodies or antibody-producing cells from said mammal. The method is particularly suited for producing antibodies to antigens fused to lactadherin, or to trans-membrane receptors fused to a targeting polypeptide, as described above.

10 The present invention also relates to methods of producing an antibody that binds a polypeptide, comprising :

- (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide or an epitope thereof fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- 15 (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes presenting said polypeptide or epitope at their surface,
- (c) Collecting said recombinant exosomes and injecting said exosomes or a portion thereof to a non-human mammal to generate antibodies that bind said polypeptide or epitope and,
- 20 (d) Collecting antibodies or antibody-producing cells from said mammal.

The present invention also relates to methods of producing an antibody that binds a receptor, such as a GPCR, comprising :

- 25 (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said receptor or an epitope thereof fused to a targeting polypeptide;
- (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes presenting said receptor or epitope at their surface,
- (c) Collecting said recombinant exosomes and injecting said exosomes or a portion thereof to a non-human mammal to generate antibodies that bind said receptor or epitope and,
- 30 (d) Collecting antibodies or antibody-producing cells from said mammal.

The antibodies may be polyclonal or monoclonal. Methods of producing polyclonal antibodies from various species, including mice, rodents, primates, horses, pigs, rabbits, poultry, etc. may be found, for instance, in Vaitukaitis et al., 1971. Briefly, the antigen (in the present invention, the recombinant exosome) is injected in the presence or absence of an adjuvant (complete or incomplete

adjuvant e.g., Freund's adjuvant) and administered to an animal, typically by sub-cutaneous, intra-peritoneal, intra-venous or intra-muscular injection. Repeated injections may be performed. Blood samples are collected and immunoglobulins or serum are separated.

5 Methods of producing monoclonal antibodies may be found, for instance, in Harlow et al (Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988) or in Kohler et al (Nature 256 (1975) 495), incorporated therein by reference. Briefly, these methods comprise immunizing an animal with the antigen (in the present invention, the recombinant exosome), followed by a recovery of spleen or lymph
10 nodes cells which are then fused with immortalized cells, such as myeloma cells. The resulting hybridomas produce the monoclonal antibodies and can be selected by limit dilutions to isolate individual clones.

In a particular embodiment, the exosome-producing cells are B lymphocytes.

15 In an other particular embodiment, the exosome-producing cells and/or the lactadherin and/or the targeting polypeptide is (are) from the same species as the mammal used for immunization. Indeed, in such a system, the exosomes and lactadherin are not immunogenic and antibodies are produced essentially only
20 against the selected antigen.

In a particular embodiment, the exosome-producing cells are murine cells, the lactadherin is a murine lactadherin or a portion or variant thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain, the non-human mammal is a mouse, and the
25 antigen or epitope is from a different species, for instance of human origin. Even more preferably, the mouse is a humanized mouse, allowing humanized antibodies to be produced.

To that effect, the nucleotide sequence of a protein (the antigen or an epitope) can be fused to the C1 and/or C2 domain of mouse Lactadherin and the resulting
30 chimeric sequence is cloned into a eukaryotic expression vector using standard molecular biology techniques. Plasmids encoding the chimeric protein are transfected into an exosome-producing mouse cell line and recombinant exosomes are harvested after several days of culture of the transfected cells. Recombinant
35 exosomes are then purified by centrifugation on a sucrose gradient (US09/780,748). The presence of chimeric proteins on recombinant exosomes is established by Western blot analysis using a monoclonal anti-C1/C2 domain antibody. Recombinant exosomes bearing chimeric proteins are then injected into

syngeneic mice to generate antibodies. In this context, only the antigenic determinants contained in the protein sequences used to generate chimeric proteins represent foreign antigens in the immunized mice. The generation of antibodies is verified in screening assays designed according to the nature of the antigen. If recombinant exosomes are used in the screening assay, a second chimeric protein is prepared where the same protein antigen sequence is fused with an extended C1/C2 domain of Lactadherin sequence. Alternatively, recombinant exosomes expressing the protein antigen fused to the C1/C2 domain of Lactadherin from a different species can also be used. These new constructions create chimeric proteins with new junction sequences, thereby, avoiding the detection/selection of antibodies directed at the junction of the chimeric protein used for immunization.

As indicated above, this methods is very advantageous and can be used to produce antibodies in various species, against any selected antigen or epitope, including tumor antigens, bacterial antigens or viral antigens.

Preparation of Recombinant exosomes that display new biological activity

The present invention can be used to produce recombinant exosomes that exhibit any selected biological activity. These can be produced by targeting one (or several) polypeptides with particular biological activity to the surface of exosomes, as described above.

An advantage of this invention is that high local concentration of biologically active components may be reached on recombinant exosomes, which enable exosomes to acquire potent new biological activity with the possibility of cross-linking receptors on target cells. Such high local concentration also allows to increase the avidity of the carried molecule, thus improving the potency of the exosome. Also, this invention allows reconstituting biologically active multi-component entities on exosomes, thereby broadening the field of applications of recombinant exosome to multi-chain proteins when classical approaches to manipulate such proteins have been difficult.

An example of biologically active protein that can be used is Interleukin-2 (IL2), a cytokine that activates T cells and is used in cancer immunotherapy to stimulate T cell responses against tumor cells. The simultaneous presentation of this immunologically defined adjuvant with tumor antigens on exosomes may improve

the efficiency of exosome. In this case, the functional assay to verify that IL2 on recombinant exosome is biologically active will use an IL2-dependent cell line.

Another example of biologically active protein is CD40 Ligand (CD40L) that induces helper signals required for DC to initiate an immune response against captured antigens. The simultaneous presentation of helper signal with tumor antigens on exosomes may improve the efficiency of exosome. In this case, a functional assay to monitor the induction of markers of activation on DC will be used to verify that CD40L on recombinant exosome is biologically active.

Further examples include other lymphokines (IL-4, IL-13), trophic factors (TNF, IFN, GM-CSF, G-CSF, etc.), enzymes, clotting factors, hormones, lipoproteins, etc.

Other particular examples are polypeptides that facilitate targeting or interaction of exosomes to or with particular cells, preferably with dendritic cells. Such targeting polypeptides include for instance Fc fragments of immunoglobulins. Such Fc fragments, when expressed at the surface of exosomes, can act to target the exosomes to antigen-presenting cells. The expression of such Fc fragments in combination with the expression of antigens (and, optionally, adjuvant molecule as disclosed above) facilitates and enhances exosome recognition by antigen-presenting cells, particularly dendritic cells, and increases cross-priming of such antigens.

To produce such functionalised exosomes, the full-length or partial cDNA sequences of biologically active proteins can be fused either upstream or downstream the sequence coding for a targeting polypeptide and the resulting chimeric sequence is cloned into a eukaryotic expression vector using standard molecular biology techniques. The targeting polypeptide may be selected or derived from C1 and/or C2 domain of human Lactadherin sequence or an equivalent thereof, and from targeting polypeptides identified using the above-disclosed screening method, such as MART1/MelanA or a fragment thereof. Plasmids encoding the chimeric protein are transfected into an exosome-producing cell line and recombinant exosomes are harvested after several days of culture of the transfected cells. Recombinant exosomes are then purified by centrifugation on a sucrose gradient. The presence of chimeric protein on recombinant exosomes is established by Western blot analysis using antigen-specific antibodies (if available) and/or anti-targeting polypeptide antibodies.

Functional assays are then performed to verify that the biological activity of the proteins fused to the targeting polypeptide is preserved. The functionalized exosomes may then be administered in vivo to any mammalian subject in need thereof, in particular human subject. Administration can be performed by various routes, such as by systemic injection, e.g., intravenous, intra-muscular, intra-peritoneal, intra-tumoral, sub-cutaneous, etc.

Delivery of full-length antigens to DC using recombinant exosomes

In addition to the humoral or antibody response induced by recombinant exosomes, cellular immune responses can also be generated against antigen expressed on exosomes. Chimeric sequences including full-length cDNA encoding tumor or microbial antigens and the targeting polypeptide are prepared as described above. Recombinant exosomes can then be used directly to vaccinate individuals or indirectly to pulse DC *in vitro*. Delivery of full-length antigens to DC alleviates haplotypes restriction for vaccine usage. Also, delivery through a natural pathway of antigen uptake by and transfer to DC will yield efficient processing of antigen and presentation of both class I and II epitopes. Hence, recombinant exosomes expressing full-length tumor or microbial antigens may contribute to improved vaccines against cancer and infectious diseases.

A further object of this invention is a method of delivering an antigen to a subject comprising:

- (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes carrying said antigen at their surface,
- (c) Collecting said recombinant exosomes and injecting said exosomes or a portion thereof to said subject.

An other object of this invention is a method of delivering an antigen to a subject comprising:

- (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes carrying said antigen at their surface,

24

- (c) Collecting said recombinant exosomes and contacting the same ex vivo with dendritic cells from said subject and,
- (d) injecting said contacted dendritic cells or a portion thereof to said subject.

5 A "portion" of dendritic cells indicates that it is possible to inject all the contacted DC or to inject a fraction thereof and keep the rest for further injection(s) or use(s), if needed. Furthermore, the term "portion" indicates that although whole cells may be administered, preparations derived therefrom may be injected as well, such as membrane extracts or exosomes produced by such dendritic cells.

10 The dendritic cells or their portion may be injected by several routes, such as by intra-venous, intra-arterial, intra-peritoneal, intra-tumoral, intra-muscular, etc., as described for instance in WO99/03499 incorporated therein by reference.

15 As indicated above, in particular embodiments, the exosome-producing cells may be contacted with additional chimeric genetic construct(s) encoding additional (accessory) molecules fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain, to generate recombinant exosomes carrying said molecules at their surface, in addition to the antigen. The molecules may be

20 adjuvant, targeting polypeptides, Lactadherin, etc. Particular examples include Fc fragment of immunoglobulin, CD40 ligand, cytokines and GM-CSF. The various genetic constructs may be comprised in one vector or in several separate constructs, which may be contacted simultaneously or sequentially with the exosome-producing cells.

25 Production of functionalised synthetic lipid vesicles

Furthermore, as indicated above, the present invention can be used with various membrane vesicles, including natural vesicles (such as exosomes) or synthetic

30 vesicles, such as liposomes. Liposomes are versatile tools in research and medicine. They are small artificial vesicles produced from natural phospholipids and cholesterol. Such vesicles are currently being used as drug carriers loaded with a great variety of molecules, including small drug molecules, proteins, nucleotides and plasmids. Hence, liposomes can be used for a large number of

35 applications. Within the present invention, it is possible to target molecules (e.g., polypeptides, antigens, small molecules, etc.) to liposomes through a chimeric molecule as described above, and to administer such a functionalized vesicle in a subject.

Typically, the liposome should contain phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, to facilitate targeting of the lactadherin chimeric polypeptide.

5

In this regard, the invention relates to a method of producing antibodies comprising:

- Providing a chimeric molecule comprising an antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- 10 - contacting said chimeric molecule with a lipid vesicle containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes to create functionalized lipid vesicle presenting said antigen at their surface, and
- immunizing a non-human mammal with such a functionalized lipid vesicle to produce antibodies that bind said antigen.

15

An other object of this invention is a method of delivering an antigen to a subject comprising:

- Providing a chimeric molecule comprising an antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- 20 - contacting said chimeric molecule with a lipid vesicle containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, to create functionalized lipid vesicle presenting said antigen at their surface, and
- contacting said functionalized lipid vesicle ex vivo with dendritic cells from said subject in the presence of lactadherin and,
- 25 - injecting said contacted dendritic cells or a portion thereof to said subject.

An other object of this invention is a method of delivering an antigen to a subject comprising:

- Providing a chimeric molecule comprising an antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- 30 - contacting said chimeric molecule with a lipid vesicle containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, to create functionalized lipid vesicles presenting said antigen at their surface, and
- injecting said functionalized lipid vesicles or a portion thereof to said subject in the presence of lactadherin.
- 35

This invention also relates to a composition comprising a functionalized lipid vesicles as described above an lactadherin.

- The lipid vesicle is preferably a liposome. The liposome may be produced according to conventional techniques, and, preferably, enriched for phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes. The antigen can be any organic compound, such as a polypeptide, a nucleic acid, a lipid, a saccharide, a glycolipid, etc. The chimeric molecule may comprise the antigen either genetically (when the antigen is a polypeptide) or chemically coupled to Lactadherin, as described above.
- 10 In an other embodiment, the invention relates to a method of producing functionalized lipid vesicles, comprising:
- Providing lipid vesicles containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, said vesicles carrying an activated Lactadherin comprising Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2
 - 15 domain, activated by a reactive chemical group ;
 - contacting said lipid vesicles with a compound that interacts with said reactive chemical group in order to produce functionalized lipid vesicles, and
 - optionally purifying said functionalized lipid vesicles.
- 20 As indicated above, the activated Lactadherin may be a portion of Lactadherin having a cysteine residue at one of its ends, thus creating reactive SH group. Such an activated Lactadherin may comprise, for instance, amino acids 1-230 of SEQ ID NO:7. Alternatively, the activated Lactadherin may be prepared by chemically adding to one of Lactadherin ends a reactive group such as a thiol, an amino or a
- 25 carboxyl group. The lipid vesicles carrying said activated Lactadherin can be an exosome or a synthetic vesicle for instance, such as a liposome. In this regard, in a particular embodiment, the invention relates to an exosome presenting an activated Lactadherin as described above. In an other embodiment, the invention relates to a liposome carrying an activated Lactadherin as described above. Such
- 30 an exosomes or synthetic lipid vesicles may be produced as described above. The compound may be any organic molecule, such as a polypeptide, nucleic acid, lipid, glycolipid, saccharide, small molecule, drug (e.g., medicament), toxin, etc. Also, as indicated above, the lipid vesicle may be functionalized with various polypeptides, such as with an antigen, a targeting moiety and/or an adjuvant
- 35 and/or Lactadherin. Typical examples include a lipid vesicle comprising various polypeptides fused to Lactadherin or a functional C1 and/or C2 domain thereof, said polypeptides being selected from an antigen, a targeting polypeptide (e.g. a

Fc fragment of an immunoglobulin) and an adjuvant (e.g., a CD40 ligand, a cytokine, GM-CSF, etc.).

Genetic and DNA vaccination

5

The present invention can also be used for direct DNA or genetic vaccination *in vivo*, using genetic constructs as disclosed above encoding chimeric antigen molecules.

10 Humoral or antibody response and cellular immune responses can also be generated against antigen upon genetic and DNA immunization. Chimeric sequences including full-length or partial cDNA encoding tumor or microbial antigens and the targeting polypeptide are prepared as described above. Viral, non viral vectors or DNA encoding these chimeric proteins can then be used directly
15 to vaccinate individuals or animals. Genetic and DNA immunization has been shown to induce potent immune responses that lead to host protection against microbial infections and tumor regression (rev. Hasan et al J. Immunol. Methods 229, 1-22, 1999). Recent findings suggest that cross-priming of antigen presenting cell (APC), i.e. the APC uptake of antigen exogenously produced by DNA-
20 transfected non-APC, is a predominant mechanism for inducing strong immune responses upon genetic and DNA vaccination (Jae Ho Cho et al. J. Immunol. 167, 5549-5557, 2001). In addition, cell-associated cross-presentation of antigens has also been found to be much more efficient than cross-presentation of soluble antigens (Ming Li et al J. Immunol. 166, 6099-6103, 2001). Emanating from these
25 findings, it is believed that an appropriate method of Ag transfer *in vivo* from DNA-transfected non-APC to APC is critical for the design of optimal genetic and DNA vaccines. In this regard, the genetic vaccination method according to the present invention offers the considerable advantage to directly address this criterion in that it leads to the production *in vivo* of antigens bound to exosomes
30 that are then transferred to APC.

A further object of this invention thus resides in a method of delivering an antigen to a subject, comprising injecting to said subject a genetic construct encoding said antigen fused to a targeting polypeptide as described above, particularly to
35 Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain of Lactadherin.

An other object of this invention is a method of producing an immune response in a subject against a specific antigen, the method comprising injecting to said subject a genetic construct encoding said antigen fused to a targeting polypeptide as described above, particularly to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain of Lactadherin.

Genetic vaccination can be performed using a variety of viral vectors, such as vaccinia, pox virus, adenovirus, adeno associated virus, etc., non-viral vectors, such as DNA associated with various lipidic or peptidic compositions, or using pure (e.g., naked) DNA. Vaccination may be performed through various routes of injections, including intra muscular, intra-venous, subcutaneous or intra-dermal. Various vector delivery devices or techniques may be used for genetic vaccination, including gene gun or electroporation. Animals and individuals may also be immunized using cell lines transfected in vitro with the vectors. Cell lines selected for release of high number of exosomes would be particularly advantageous.

In a particular embodiment, the method comprises the direct injection of a naked DNA or RNA encoding the chimeric polypeptide. Naked means that the injected composition is free of any transfection facilitating agent. In a further preferred embodiment, the genetic construct is administered by intramuscular injection in a naked form, more preferably using a gene gun.

This method allows the cross-presentation of antigens in a non-soluble form via the exosome, whose function is to transfer antigens from cells in periphery to APC (cross-priming) (Wolfers et al Nature Medicine 7, 297-303, 2001). A schematic representation of the method is shown in Figure 6. Immunization with a viral, non viral or naked DNA vector encoding chimeric proteins containing the C1/C2 domain of lactadherin leads to the expression of chimeric protein by various cells in vivo, including exosome-producing cells (step 1). The recombinant protein is then released in the extracellular milieu associated to exosomes (Step 2). Cross-priming of APC occurs when the chimeric protein-bearing exosomes binds to APC (Step 3).

In a particular embodiment, the cross-presentation of antigens to APC (step 3) may be further increased by administering, together with the chimeric protein-encoding genetic construct (e.g., DNA), a lactadherin-encoding genetic construct (e.g., DNA), since exosome binding to DC involves lactadherin. Alternatively,

constructs may be prepared in which an antigen sequence is inserted within the full-length lactadherin sequence between the EGF domain and the C1C2 domain. Thereby, injection of a single construct produces antigens targeted to exosomes via the C1C2 domain of lactadherin and containing the receptor-binding domain of lactadherin that directs the specific delivery of exosome to DC.

Furthermore, in order to further increase the immune response, the genetic construct(s) encoding the antigen(s) and, optionally, Lactadherin, may be administered together with a genetic construct encoding an adjuvant, such as a factor or molecule that facilitates an immune reaction. Examples of such adjuvants include CD40Ligand, GM-CSF, cytokines, etc.

Moreover, in order to further increase the immune response, the genetic construct(s) encoding the antigen(s), Lactadherin and/or the adjuvant may be administered together with a genetic construct encoding a targeting polypeptide, such as a factor or molecule that directs exosomes to antigen-presenting cells. Examples of such targeting polypeptides include Fc fragments of immunoglobulins.

In this regard, in a particular embodiment, the method comprises injecting to the subject a genetic construct encoding the chimeric antigen and a genetic construct encoding Lactadherin or an accessory molecule fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain. The construct encoding Lactadherin or the chimeric accessory molecule may be injected simultaneously with the construct encoding the chimeric antigen, or separately. Where separate injections are performed, they may be made at about the same time or not. In particular, the construct encoding the chimeric antigen may be injected first, and then the construct encoding Lactadherin or the chimeric accessory molecule. It is preferred however that the various chimeric proteins be present simultaneously in vivo and be expressed by the same exosomes. In a particular embodiment, the proteins are expressed from genetic constructs contained in a single vector, such as a viral vector (e.g., a vaccinia virus).

In this regard, the invention also encompasses a composition comprising a genetic construct encoding an antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by a method as described above, and (a) a genetic construct encoding an immune accessory molecule (e.g., an adjuvant or a cell targeting polypeptide) fused to a

targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by a method as described above, and/or (b) a genetic construct encoding Lactadherin. The invention indeed allows to efficiently combine various functional molecules at the surface of exosomes, upon direct in vivo expression of such molecules in fusion with Lactadherin or portions thereof. This combined expression leads to an increased immune response, which mimicks antigenic particles or immune complexes.

- 10 Preferred examples are compositions comprising:
- (a) a genetic construct encoding an antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by a method as described above,
 - 15 (b) a genetic construct encoding an adjuvant polypeptide fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by a method as described above, said adjuvant polypeptide being a cytokine, such as GM-CSF or IL-2, or CD40L, and/or
 - 20 (c) a genetic construct encoding an Fc fragment of an immunoglobulin fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by a method as described above, and/or
 - (d) a genetic construct encoding Lactadherin.

25 As indicated above, the genetic construct may be any DNA or RNA molecule, typically a plasmid, viral vector, viral particle, naked DNA or any cell comprising the same. The various genetic constructs may be comprised within a single vector or in separate vectors or in any combination(s). The composition generally further comprises a pharmaceutically acceptable excipient or vehicle, such as a diluent, buffer, isotonic solution, etc. The composition may also include transfection facilitating agents, as described above.

35 Delivery of full-length or partial antigens to DC according to the present invention alleviates haplotypes restriction for vaccine usage. Also, delivery through a natural physiological pathway of antigen uptake by and transfer to DC will yield efficient processing of antigen and presentation of both class I and II epitopes. Hence, genetic and DNA vaccination with vector encoding tumor or

microbial antigens targeted to exosomes contributes to improved genetic and DNA vaccines against cancer and infectious diseases.

5 A specific example of DNA vaccine composition against HIV includes genetic constructs encoding an antigen selected from Reverse Transcriptase, gag, env, nef and tat polypeptides or portion thereof, fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain.

10 Furthermore, in addition to genetic vaccine, protein vaccines may also be used in a similar way. In this respect, recombinant chimeric antigens may be used in a purified form for administration into the patient. Following such an administration, chimeric antigens with C1 and/or C2 domain of Lactadherin will be loaded in vivo on the patient's own circulating exosomes, thereby producing an immune response.

15 An other object of this invention thus includes a method of producing an immune response in a subject against a specific antigen, the method comprising injecting to said subject a chimeric polypeptide comprising said antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by a method as described above.

An other object of this invention is a method of delivering an antigen to a subject, comprising:

- 25 (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain;
- (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes carrying said chimeric antigen at their surface,
- 30 (c) Collecting said recombinant exosomes and purifying the said chimeric antigen, and
- (d) Injecting the purified chimeric antigens to said patient.

Recombinant Exosomes as tools for protein-protein interaction studies

35 With the wealth of information provided by genome sequencing programs, genome-wide approaches for gene discovery and function assignment are being developed. Recombinant exosomes constitute a new technology to study protein-

protein interaction and may allow high-throughput screening of libraries to identify each counterpart of a protein-protein interaction.

For such applications, proteins are expressed into two recombinant exosomes
5 species with different protein profiles. The interaction of chimeric proteins from each recombinant exosome species with each other can be detected by standard ELISA-based assays using specific markers on the recombinant exosomes. This approach can be used to identify the counterparts of a known ligand or receptor.

10 In a particular embodiment, the invention thus resides in a method of selecting or identifying a ligand or binding partner of a polypeptide comprising:

- (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide fused to a targeting polypeptide as described above, particularly to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- 15 (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes presenting said polypeptide at their surface,
- (c) Contacting recombinant exosomes of (b) with a candidate compound and determining the ability of said candidate compound to bind said polypeptide on said exosome.

20 The candidate compound may be an isolated product, a mixture of products or a library of compounds. Examples of candidate compounds include, without limitation, small molecules (e.g., organic products) as well as libraries thereof, DNA libraries, protein libraries, libraries of antibodies (or fragments thereof),
25 which may be displayed by phages or other presentation systems, etc. The candidate compounds may be tested in parallel or as complex mixtures.

Methods of determining the ability of a candidate compound to bind said polypeptide (or antigen) include, for instance, the isolation of the exosome and the
30 immunization of a non-human mammal therewith. The generation of antibodies in said mammal indicates that a candidate molecule has complexed with the exosome and allows to identify said molecule.

This technique can be used to produce antibodies against a ligand of a molecule.
35 For instance, a ligand of a receptor for which antibodies are needed is expressed according to this invention at the surface of a lipid vesicle. Such a vesicle is contacted with a preparation (e.g., a biological sample) containing said receptor. The exosomes are washed, purified and injected to a non-human-mammal.

Antibodies against the receptor can be isolated from said mammal. This strategy is very advantageous to produce antibodies against complex molecules, unstable molecules or even molecules that are not available in isolated form.

5 Purification or recombinant polypeptides

The invention also provides a method of producing a polypeptide from a functionalized exosome as described above. This method stems from the unexpected properties of lactadherin to selectively express or target polypeptides
10 in exosomes. Hence, exosomes constitute an important source of Lactadherin or various chimeric polypeptides comprising a fragment of Lactadherin, from which these proteins can be recovered and/or purified. A particular advantage of this method is that the preparation of exosomes provides a rapid means to considerably enrich and concentrate proteins to be purified and allows to perform
15 the purification of proteins from large-scale cell cultures with small sample volumes. In this method, Lactadherin or chimeric polypeptides comprising a functional C1 and/or C2 domain of Lactadherin can be produced, which are directly extracted from exosomes using standard biochemical approaches, including exosome lysis with detergent or salt and specific release of proteins
20 with lipids or peptides, for instance. Alternatively, (native) proteins can be released directly from the exosome after proteolytic cleavage of the chimeric polypeptide, when a specific site has been inserted between the protein and the C1-C2 domain. Such sites are well characterized and include for instance a cleavage site for furin, enterokinase, factor X, etc. Extracted proteins can then be
25 purified by standard chromatography approaches including anionic or hydrophobic chromatography and/or affinity chromatography on columns covalently linked to lectin, specific antibody, receptor or ligand and tag counterparts. This technique is also suited for purification of polypeptides fused to a targeting polypeptide identified as described above.

30 An other object of this invention thus resides in a method of producing a polypeptide comprising Lactadherin or a portion thereof, the method comprising:

- a) Providing a genetic construct encoding said polypeptide;
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate
35 functionalized exosomes presenting said polypeptide at their surface,
- c) Optionally collecting and/or purifying said functionalized exosomes, and
- d) Recovering and/or purifying said polypeptide or a fragment thereof from said functionalized exosomes.

As indicated the polypeptide may be Lactadherin, such as wild-type Lactadherin or a fragment thereof. In this respect, the invention provides an efficient method of producing (and purifying) Lactadherin, comprising introducing a genetic encoding Lactadherin into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes presenting said polypeptide at their surface, optionally collecting and/or purifying said functionalized exosomes, and recovering and/or purifying Lactadherin from said functionalized exosomes.

10 The polypeptide can be a chimeric polypeptide encoded by a chimeric genetic construct, which chimeric polypeptide comprises a polypeptide fused to a functional C1 and/or C2 domain of Lactadherin. In that case, the entire chimeric polypeptide may be recovered from the exosomes, or only a portion thereof, for instance the polypeptide released by separation from the C1 and/or C2 domain of Lactadherin. In this respect, a further object of this invention is a method of producing a polypeptide, comprising:

- a) Providing a genetic construct encoding said polypeptide fused to a targeting polypeptide, wherein said targeting polypeptide is selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method a method as disclosed above, and wherein said polypeptide is fused to said targeting polypeptide through a spacer sequence that comprises a cleavage site;
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes presenting said polypeptide at their surface,
- 20 c) Optionally collecting and/or purifying said functionalized exosomes,
- d) Treating said functionalized exosomes with an agent that cleaves said cleavage site, and
- e) Recovering and/or purifying said polypeptide.

30 The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

35 **Example 1 : Human Lactadherin expressed by tumor cell lines is found almost exclusively in exosomes**

Human-derived tumor cells seeded at ~80% confluency in a 175 cm²-flask were cultured in complete media (RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 1 mM Sodium Pyruvate and 10% fetal bovine serum (FBS)) for 4 days at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. At day 4
 5 of the culture, exosome lysates and cell lysates were prepared from each culture as follows:

The culture supernatants were harvested and successively spun at 200g and filtered through a 0.2 µm filter to remove cell debris. The cleared supernatants were then spun at 4°C for 90 min. under 100,000g to pellet exosomes. The pellets
 10 were resuspended into 100 µl of ice-cold PBS. and the resulting fractions were retained as the exosome (E).

Tumor cells were detached from the culture dish following incubation at room temperature for 10 min. in 10 ml of Versene (Invitrogen). Cells were then pelleted by centrifugation at 4°C for 10 min. under 200g. The pellets were
 15 resuspended and lysed into 100 µl of ice-cold Lysis Buffer (LB) consisting of 50 mM Sodium phosphate pH 8.0, 300 mM sodium chloride, 10 mM imidazole and 0.5% Tween 20 and a cocktail of protease inhibitors (Sigma). The lysates were incubated for 10 min. on ice, were then cleared of insoluble materials by centrifugation for 10 min. at 4°C under 10,000g. The resulting supernatants were
 20 retained as the cell lysates (CL).

Eight µl of SDS-PAGE Sample Buffer 5X (SB) was added to thirty-two µl of E and CL, incubated at 100°C for 5 min. then analyzed by SDS-PAGE. Proteins on the gel were transferred to PVDF membranes following semi-dry electro-transfer and the presence of human lactadherin in the samples was established by
 25 immunodetection using a 1/2500 dilution of polyclonal antibody directed to the RGD motif of human Lactadherin (a gift from Dr. Sebastian Amigorena). Antibody bound to lactadherin was detected using a 1/5000 dilution of secondary anti-rabbit IgG antibody conjugated to horse-radish peroxidase (Jackson ImmunoResearch) and a colorimetric substrate (CN/DAB, Pierce).

CL and E samples were analysed in panel A and panel B of FIGURE 1, respectively. In this assay, CL and E derived from the embryonic kidney cell 293 (lane 1), the melanoma cell FON-T1 (lane 2) and M10 (lane 3), the lung carcinoma cell NCI-N226 (lane 4) and NCI-H520 (lane 5), the melanoma cell FM3 (lane 6), the B lymphoblastoid cell Raji (lane 7) were tested.

35 Partially purified human Lactadherin from milk was used as positive control (lane 9) and E and CL from CHO, a hamster ovary cell line, were used as negative controls (lane 8 panel A and panel B, respectively).

36

Results: Lactadherin was detected in E (panel B) from 293 (lane 1), FON-T1 (lane 2), M10 (lane 3), NCI-H520 (lane 5) and FM3 (lane 6) whereas no specific band was detected in CL from the same cell lines (panel A). Lactadherin was not detected in E and CL from NCI-H226 (lane 4), Raji (lane 7) and the negative control CHO (lane 9).

Conclusion: Cell lines derived from various tumor tissues express lactadherin. The lactadherin expressed by these cell lines is found mainly in exosomes.

10

Example 2 : Recombinant human Lactadherin is expressed almost exclusively in exosomes produced by transfected cells and this highly specific targeting is encrypted in the C1/C2 domain

Two overlapping fragments of human Lactadherin cDNA were amplified from blood-derived total cDNA using primer pairs LTDNf15/LTDNr8 and LTDNf2/LTDNr13, respectively (SEQ ID Nos: 1-4, respectively). LTDNf15 and LTDNr13 were extended at their 5' end to include a Hind III and an Age I restriction site. The amplification of the 3' end of Lactadherin cDNA with LTDNf2/LTDNr13 yielded multiple products, the longest of which corresponding to the known lactadherin cDNA (Lactlf, SEQ ID No:5). The sequence of the shorter form (Lactsf, SEQ ID No:6) lacks a stretch of 153 nucleotides resulting in a deletion of 51 amino acids in the C2 domain of Lactadherin. The 5' end cDNA was digested with Hind III and EcoR I and both Lactlf and Lactsf cDNA were digested with Age I and EcoR I. The 5' end and 3' end cDNA were ligated together and into pcDNA6A-His (Invitrogen) that was pre-cut with Hind III and Age I. The resulting plasmids (pcDNA6hLactlf/His and pcDNA6hLactsf/His) encodes full-length recombinant human lactadherin fused to a (His)₆ tag (SEQ ID Nos: 7 and 8, respectively). They were transfected into 293 cells, a human embryonic kidney cell line (ATCC) using lipofectamine (Invitrogen). At day 4 of culture in complete media (see Example 1 for description of culture conditions and media), EL and CL were prepared from each culture as described in Example 1 (EL was prepared by resuspending exosomes in LB instead of PBS). In this experiment, the supernatants (S) obtained after the 100,000g spin step to pellet exosomes was also retained. Ni-NTA agarose beads (Qiagen) were added to all the fractions to isolate His Tag-containing recombinant proteins only. Following a 2-hour incubation at 4°C on a rocking platform, the beads were pelleted by centrifugation at 4°C under 200g. After three washes with LB adjusted to 20 mM

37

imidazole, the beads were resuspended in 40 µl SB IX and incubated at 100°C for 5 min. The SB was collected and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting as described in Figure 1.

CL, S and EL samples were analysed in panel A, B and panel C of FIGURE 2, respectively. CL, S and EL derived from 293 transfected with pcDNA6hLactsf/His and pcDNA6hLactlf/His are shown in lane 1 and 2 of each panel, respectively.

Partially purified human Lactadherin from milk was used as positive control (lane 4) and CL, S and EL from 293 cells transfected with an empty pcDNA6 plasmid were used as negative controls (lane 3 of each panel).

Results: The long form of Lactadherin was detected in EL (lane 2, panel C) whereas only background levels were detected in S and CL derived from the same culture (lane 2, panel A and B, respectively). In contrast, the short form of Lactadherin with a 51-amino acid deletion in its C2 domain was detected exclusively in CL (lane 1, panel A) but neither in S nor in EL (lane 1, panel B and C, respectively).

Conclusion: Recombinant lactadherin expressed in 293 cells is almost exclusively found in exosomes. This highly specific targeting of recombinant Lactadherin to exosomes can be mediated by the C2 domain of this protein since a deletion in the C2 domain abrogates exosome targeting and may also affect the conformation of the C1 domain. Indeed, the recombinant short form of Lactadherin that lacks functional exosome targeting signal is found in a different cell compartment.

Example 3 : The exosome targeting signal in the C2 domain of Lactadherin is conserved across various mammalian species

The full-length cDNA of mouse lactadherin was amplified from a mouse Lactadherin cDNA template (a gift from Dr. Sebastian Amigorena) using primers LTDNf20 (SEQ ID No: 9) and LTDNr13 (SEQ ID No: 4). These primers were extended at their 5' end to include a Hind III and an Age I restriction site for primer LTDNf20 and LTDNr13, respectively. The product of amplification was digested with Hind III and Age I and ligated into pcDNA6A-His (Invitrogen) that was pre-cut with the same enzymes. The resulting plasmid (pcDNA6mLact/His) encodes recombinant mouse lactadherin fused to a (His)₆ tag (SEQ ID No: 10).

This plasmid and pcDNA6hLactf/His (prepared as described in Example 2) were transfected into 293, CHO and WEHI (a mouse fibrosarcoma) cells and EL was prepared from each culture exactly as described in Example 2. Samples were prepared and Lactadherin expression was monitored as described in Example 1.

- 5 EL from human 293 cells expressing mouse Lactadherin is shown in panel A, EL from mouse WEHI cells expressing human Lactadherin is shown in panel B and EL from hamster CHO cells expressing human Lactadherin is shown in panel C of Figure 2. EL from cells transfected with Lactadherin-encoding plasmids are shown in lane 2 of each panel. EL from cells transfected with an empty pcDNA6
10 plasmid were used as negative controls (lane 1 of each panel). Partially purified human Lactadherin from milk was used as positive control (lane 3, panel C).

- Results:** Human Lactadherin expressed in mouse cells and hamster cells is found in exosomes produced by these cells (lane 2 of panel B and C, respectively). Mouse Lactadherin is also found in the exosomes produced by cells derived from a different species, i.e. human cells (lane 2, panel A).

- Conclusion:** The exosome targeting signal is conserved across several mammalian species.

20 **Example 4 : Preparation of chimeric proteins**

- Chimeric proteins are generated by fusing the nucleotide sequences of a protein with that of the full-length or partial sequences of Lactadherin.

- 25 The full-length sequence of Lactadherin is generally fused upstream a protein sequence. Partial sequences of Lactadherin comprise the C1 domain only, the C2 domain only or both the C1 and the C2 domains and are generally fused downstream a protein sequence. Proteins that do not contain an intrinsic leader
30 sequence can be inserted between the leader sequence and the C1/C2 domains of Lactadherin.

- Chimeric proteins with different junctions are prepared by fusing the nucleotide sequence of a protein with the nucleotide sequence of a C domain and the
35 matching C domain extended with at least 10 amino acids in its N-terminal extremity. Alternatively, chimeric proteins with different junctions are prepared using the C1 and the C2 domain of Lactadherin or using the C domains derived from two species. For instance, the chimeric proteins comprising the protein X

and either human-derived C1, human-derived extended C1, human-derived C2 and mouse-derived C1 as fusion partners have different junctions.

Preparation of C1/C2 fragments

5 The Lactadherin DNA fragments encoding C1, extended-C1, C2, extended-C2, C1/C2 and extended-C1/C2 domains were amplified using pcDNA6-hLacI/His as template and the primer pairs LTDNf24 (SEQ ID No:13)/LTDNr26 (SEQ ID No:15), LTDNf22 (SEQ ID No:11)/LTDNr26, LTDNf25 (SEQ ID No:14)/LTDNr13, LTDNf23 (SEQ ID No:12)/LTDNr13, LTDNf24/LTDNr13 and LTDNf22/LTDNr13, respectively. The primer pairs LTDNf30 (SEQ ID No:16)/LTDNr26, LTDNf31 (SEQ ID No:17)/LTDNr26, LTDNf32 (SEQ ID No:18)/LTDNr13, LTDNf30/LTDNr13 and LTDNf31/LTDNr13, and the template pcDNA6-mLact/His were used to amplify the matching C1/C2 fragments derived from mouse Lactadherin. All forward primers (LTDNf) are phosphorylated at their 5' end and all reverse primers (LTDNr) were extended at their 5' end to include an Age I restriction site. The products of amplification were digested with Age I before ligation with fusion partners (see below).

Preparation of Interleukin-2-C1/C2 chimera

Full-length IL-2 cDNA was amplified from human activated-T cell cDNA template using primers IL2f1 (SEQ ID No: 20) and IL2r2 (SEQ ID No: 21). IL2f1 was extended at its 5' end to include a Hind III restriction site whereas IL2r2 was phosphorylated at its 5' end. The product of amplification was digested with Hind III and ligated with each C1/C2 DNA fragment prepared above into pcDNA6A-His (Invitrogen) that was pre-cut with Hind III and Age I. The blunt ligation between the phosphorylated 3' end of IL2 fragment and the phosphorylated 5' end of the C1/C2 fragments yield IL2-C1/C2 chimeric sequences. The 5' end Hind III site of IL2 fragment and 3' end Age I site of the C1/C2 fragments allow the insertion of the chimeric sequence into pcDNA6His and the resulting plasmids (pcDNA6-His/IL2-C1, IL2-extended-C1, IL2-C2, IL2-extended C2, IL2-C1/C2 and IL2-extended C1/C2) encode recombinant chimeric proteins fused to a (His)₆ tag (SEQ ID Nos: 22-27 for chimeric proteins containing human derived C1/C2 domains). In SEQ ID NO: 22-27, residues 1-153 correspond to the amino acid sequence of the hIL2 portion of the chimeric polypeptide, and the last C-terminal 8 amino acid residues of the chimeric

polypeptide (TGHHHHHH) correspond to the His tag. The remaining residues correspond to lactadherin-derived sequence.

Expression of biologically active IL-2 in exosomes

5 The plasmids described above and encoding SEQ ID 22-27 were transfected into WEHI cells. Fractions EL, CL and S were prepared as described in Example 1. Expression of recombinant protein was assessed by western blot as described in Example 1 except that the detecting antibody used here was a rabbit anti-IL2

10 antibody.
CL, S and EL samples were analysed in panel A, B and panel C of FIGURE 4, respectively. CL, S and EL derived from cells transfected with pcDNA6IL2-extendedC1/His, pcDNA6IL2-extendedC2/His, pcDNA6IL2-extendedC1/C2/His, pcDNA6IL2-C1/His, pcDNA6IL2-C2/His, and pcDNA6IL2-C1/C2/His are shown in lane 1 to 6 of each panel, respectively.

15 Recombinant IL2 was used as positive control (lane 8 of panel C) and CL, S and EL from untransfected cells were used as negative controls (lane 7 of each panel).

Results: All chimeric IL2-C1/C2 genes prepared expressed recombinant proteins that react with an anti-IL2 antibody (lane 1 to 6, panel C). In addition, these proteins were almost exclusively found in EL as only low or background expression was detected in S and EL (lane 1 to 6, panel A and B, respectively). In order to determine whether the IL2-C1/C2 chimeric proteins detected in exosome display IL2 activities, CTLL-2, an IL2-dependent cell line was incubated with

25 either recombinant exosomes bearing IL2-C1/C2 chimeric proteins or exosomes from untransfected cells. We found that cells incubated with recombinant exosomes incorporated 3H-thymidine whereas cells incubated with exosomes from untransfected cells did not (data not shown).

30 **Conclusion:** The fusion of IL2 with the C1/C2 domain of Lactadherin results in the expression of IL2 in exosomes supporting that these domains are able to specifically direct expression of an antigen to exosomes. Both C1 and C2 domain are also functional individually. The chimeric proteins containing single C domains were produced in larger amounts than the chimeric proteins containing both C1 and C2. Finally, the fusion yielded a chimeric protein containing

35 biologically active IL2 supporting that IL2 is maintained in a native conformation. Therefore, targeting of proteins to exosomes using the C1/C2 domain of

Lactadherin may indeed results in the production of recombinant exosomes with new biological functions.

Example 5: Purification of recombinant human lactadherin

5 Plasmid pcDNA6hLactf/His encoding the full-length recombinant human lactadherin fused to a (His)₆ tag (SEQ ID No: 7) was prepared as described in Example 2. This plasmid was transfected into CHO cells, a hamster ovarian cell line (ATCC) using lipofectamine (Invitrogen). At day 1 of culture in complete media (CHO-SFM supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin, 10 0.1 mg/ml Streptomycin and 2% fetal bovine serum (FBS)) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, stably transfected cells were selected in media supplemented with 2 µg/ml Blasticidin. After 4 days of culture, stable clones were isolated by the limiting dilution technique. Clones producing large amounts of Lactadherin were 15 selected by western blot analysis of recombinant Lactadherin expressed in exosomes as described in example 2. The clone CHO-3.2 was expanded into 1-liter spinner flask and grown in complete media without FBS for large-scale production of Lactadherin. Seven-day cell culture supernatant was transferred into 250ml centrifuge bottles and spun 5 min at 2000 rpm to pellet cells. The 20 supernatant was then filtered through 0.2µm filter flask and concentrated to 100 ml using a fiber cartridge with a 500K size cut-off. Concentrated supernatant was then spun under 100,000xg for 1hour 15min at 4°C. The pellet containing exosome was resuspended in 1ml MLBII (50mM NaPO₄ pH 8/ 300mM NaCl/ 10mM imidazole/ 0.5%Tween) and transferred into a tube containing 2mls Ni-NTA slurry (prespun to remove EtOH). After an incubation of 2-3 hours at 4°C on a shaker, the sample was poured into a BioRad column and allowed to settle at 4°C. The column was washed with 10mls MWBI (50mM NaPO₄ pH 8/ 300mM NaCl/ 20mM imidazole/ 0.05%Tween then with 20 mls MWBII (50mM NaPO₄ pH 8/ 500mM NaCl/ 20mM imidazole). Proteins bound to the column were eluted 30 with 8mls MEBII (50mM NaPO₄ pH 8/ 300mM NaCl/ 250mM imidazole). Eluted proteins were concentrated and buffer was exchanged to PBS pH 7.4 using a Millipore Ultrafree-4 10,000 MWCO device. The protein sample was aliquoted and stored at -20°C. Purity was analyzed by Coomassie staining of an SDS-PAGE. Figure 5 shows the analysis of two preparations of recombinant 35 Lactadherin (A and B, respectively) pre- and post-concentration (lane 1; 50 µl and lane 2; 1 µg, respectively).

In conclusion, the procedure described herein yields highly purified recombinant Lactadherin.

Example 6: Screening of exosomal proteins for the targeting of antigens to exosomes

- 5 The presence of exosome targeting domains on other proteins and their usage to target antigens to exosomes was evaluated with MelanA/MART1, CD40L and CD81.

In a first set of experiments, the cDNA encoding MelanA/MART1, CD40L and CD81 were amplified from FM3 cell cDNA (MelanA/MART1) and mouse spleen cell cDNA (Clontech; CD40L, CD81), using specific primers. The primers were extended at their 5' end to include a restriction site, for cloning purposes. The products of amplification were digested with the restriction enzymes and ligated separately into pCDNA6A-His (Invitrogen) that was pre-cut with the matching enzymes. The resulting plasmids (pcDNA6-MART1, pcDNA6-CD40L and pcDNA6-CD81, respectively) encode recombinant MelanA/MART1 (SEQ ID No: 28), CD40L (SEQ ID No: 29) and CD81 (SEQ ID No: 30). Recombinant MelanA/MART1 and CD81 are fused to a Myc tag followed by a His tag that were provided in the vector. More specifically, in SEQ ID NO: 28, residues 1-118 correspond to MelanA/MART1, residues 120-129 correspond to a Myc tag and residues 133-140 correspond to a His tag. Similarly, in SEQ ID NO: 30, residues 1-236 correspond to CD81, residues 238-247 correspond to a Myc tag and residues 251-258 correspond to a His tag.

- 25 EL4 and 293F cells were transfected by electroporation (220 V, 950 μ F for EL4 and 400 V, 200 μ F for 293F) with plasmids encoding SEQ ID Nos: 28 to 30, respectively. Fractions EL and CL were prepared as in Example 1 except that exosome and cell pellets were directly resuspended in SB 1X for SDS-PAGE. Expression of recombinant protein was assessed by Western blot also as described in Example 1 except that the detecting antibody used here was a mouse anti-Myc tag antibody for MelanA/MART1 and CD81 and an anti-CD40L antibody for CD40L. MelanA/MART1, CD40L and CD81 samples were analysed in panel A, B and C of FIGURE 7, respectively. EL of transfected and untransfected cells and CL of transfected and untransfected cells are shown in lanes 1 to 4 of each panel, respectively.

In a second set of experiments, the cDNA encoding the seven-transmembrane receptor CCR7 was amplified from activated dendritic cells using specific

primers. Both primers were extended at their 5' end to include an Age I restriction site. The amplified product was digested with Age I and ligated into the plasmid encoding Seq ID No: 29 pre-cut with Age I. Age I-digested product was also ligated into a plasmid encoding a truncated form of CD81 (pcDNA6-CD81E, SEQ ID No: 31) which was prepared as SEQ ID No: 30 using a particular primer. The truncation of the C-terminal transmembrane region of CD81 in SEQ ID No: 31 was required to maintain the proper orientation of CCR7 in lipid bilayer of cellular membrane. In SEQ ID No: 31, residues 1-200 correspond to CD81E, residues 202-211 correspond to a Myc tag and residues 215-222 correspond to a His tag. Ligations in plasmids encoding SEQ ID Nos: 28 and 31 yielded the insertion of CCR7 cDNA between the Myc and His Tag of the plasmid recipient. Plasmids with the CCR7 insert in 5' to 3' orientation were selected by PCR screening. The selected plasmids (pcDNA6-MART1/CCR7 and pcDNA6-CD81E/CCR7) encode recombinant chimeric proteins fused to a His tag (SEQ ID Nos: 32 and 33, respectively). In SEQ ID No: 32, residues 1-118 correspond to MelanA/MART1, residues 120-129 correspond to a Myc tag, residues 135-488 correspond to CCR7 and residues 489-496 correspond to a His tag. In SEQ ID No: 33, residues 1-200 correspond to CD81E, residues 202-211 correspond to a Myc tag, residues 217-570 correspond to CCR7 and residues 571-578 correspond to a His tag.

EL4 cells were transfected by electroporation with plasmids encoding SEQ ID Nos: 32 and 33 and EL and CL fractions were prepared as described above. Expression of recombinant protein was assessed by Western blot also as described above. EL and CL samples were analysed in panel A and B of FIGURE 8, respectively. Samples derived from cells transfected with pcDNA6-MART1/CCR7, pcDNA6-CD81E/CCR7 and untransfected cells are shown in lane 1 to 3 of each panel, respectively.

Results: Recombinant MelanA/MART1 (Panel A, FIGURE 7), CD40L (Panel B, FIGURE 7) and CD81 (Panel C, FIGURE 7) were detected in exosomes and also in cell lysates of transfected cells (Lane 1 and 3 of each panel, respectively). Noticeably, the expected long form of CD40L (transmembrane form) was detected in CL (Lane 3 panel B) whereas mainly the short form (soluble form) was detected in exosomes (Lane 1 panel B). Smaller size products most likely due to uncontrolled proteolysis of CD81 in cell lysates were detected in Lane 3, panel B. Recombinant chimeric MelanA/MART1-CCR7 was detected in exosomes but not in cell lysates of transfected cells (Lane 1, Panel A and B,

respectively, FIGURE 8). Using FACS analysis, we verified that a control construct encoding CCR7 alone yielded as expected a recombinant receptor that could be detected on the cell surface but not on exosomes of transfected cells (data not shown). Finally, the plasmid encoding the chimeric protein CD81E/CCR7 did not yield detectable levels of protein in any of the fractions tested (Lane 2, Panel A and B, FIGURE 8). No protein was detected in the fractions derived from untransfected cells (Lane 2 and 4, Panel A to C, FIGURE 7 and Lane 3, Panel A and B, FIGURE 8).

Conclusion: As demonstrated using lactadherin, other exosomal protein can be identified and used to target antigens and notably receptors. Indeed, MelanA/MART1 was identified as being mainly expressed in exosomes and its fusion to a seven-transmembrane receptor, CCR7, triggers the expression of CCR7 on exosomes. This phenomenon is fusion-partner specific since CCR7 could not be detected when using another exosomal protein, i.e. CD81E, as fusion-partner. Therefore, the screening of exosomal proteins for their ability to target other protein to exosomes will result in the identification of novel candidates like MelanA/MART1 that can be used for the same applications using the C1C2 domain of lactadherin. It should be noted that despite the fact that no CD81E/CCR7 was detected, CD81 may still be suitable for the targeting of other antigen than CCR7 to exosomes.

Example 7: Immunogenicity of recombinant proteins displayed on exosomes

Mouse exosomes derived from WEHI cells transfected with pcDNA6hLactlf/His were prepared as described in Example 3. Purified human recombinant Lactadherin was prepared as described in Example 5. Nine Balb/C mice were arranged in three immunization groups of three mice. Each mouse was immunized intraperitoneally with either ~20 ng recombinant human lactadherin in PBS (Group 1), ~20 ng recombinant human lactadherin in a 1:1 PBS/Complete Freund's Adjuvant mix (Group 2) or recombinant WEHI exosomes containing ~20 ng human lactadherin in PBS (Group 3). Animals received a boost two weeks after the first injection with the same samples except group 2 where the antigen was resuspended in a 1:1 PBS/Incomplete Freund's Adjuvant mix. Animals were bled after the second immunization and tested for anti-human lactadherin antibody by ELISA. For the ELISA, 50 ng human Lactadherin in PBS was coated the wells of a microtitration plate for one hour at 37°C. Blocking buffer containing 0.05% Tween-20 and 6% Non-Fat Dry Milk in PBS was added.

to the wells for one hour at room temperature (RT) to saturate the remaining free binding sites. Wells were then incubated for one hour at RT with serum of immunized mice at a dilution 1/1000 in Blocking buffer. After washing the wells three times with Blocking buffer, bound antibodies were detected using a 1/10000
5 dilution of secondary anti-mouse IgG conjugated to horse-radish peroxidase (Jackson ImmunoResearch) and a chemiluminescent substrate (Amersham). The results are shown in Figure 9.

Results: Anti-lactadherin antibodies were detected in the serum of mice
10 immunized with lactadherin-containing exosomes whereas no antibody response was generated when lactadherin was given alone or as an emulsion in Freund's Adjuvant. No antibody was detected when using Freund's adjuvant even after four injections of the inoculum whereas the titer of antibody in serum of mice receiving lactadherin-bearing exosomes increased with subsequent injections
15 (data not shown).

Conclusion: Exosomes bearing antigens act as powerful immunogens in the absence of any adjuvant and can induce an antibody response using very low amounts of antigens, amounts at which a classical and already potent adjuvant
20 such as Freund's Adjuvant is inefficient.

REFERENCES

1. Couto, J. R., Taylor, M. R., Godwin, S. G., Ceriani, R. L. and Peterson, J. A.
5 Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. DNA CELL BIOL 15, 281-6, 1996.
- 10 2. Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T. and Petersen, T. E. Bovine PAS-6/7 binds alpha v beta 5 integrins and anionic phospholipids through two domains. Biochemistry 36, 5441-6., 1997
- 15 3. Andersen, M. H., Graversen, H., Fedosov, S. N., Petersen, T. E. and Rasmussen, J. T. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. Biochemistry 39, 6200-6., 2000
- 20 4. Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. J Cell Biol 152, 165-80., 2001
- 25 5. Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. J Cell Biol 147, 599-610, 1999
- 30 6. Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. J Immunol 166, 7309-18., 2001
- 35 7. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. Nat Med 7, 297-303., 2001

8. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594-600, 1998
- 5 9. Thery C., Zitvogel L. and Amigorena S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nature review* 2 (2002) 569
- 10 10. K. Denzer, M. van Eijk, M.J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot and H.J. Geuze. Follicular Dendritic Cells carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *J. Immunol.* 165 (2000), 1259-1265

Claims

We claim

- 5 1. A method of targeting polypeptides to exosomes, comprising:
 - (i) Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide fused to a targeting polypeptide comprising Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ; and
 - 10 (ii) Introducing said construct into exosome-producing cells in vivo or ex vivo, to generate recombinant exosomes.
2. A method of selectively expressing a polypeptide at the surface of exosomes, comprising:
 - 15 a) Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide fused to a targeting polypeptide comprising Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
 - b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes, and
 - 20 c) Collecting said recombinant exosomes, wherein said exosomes carry at their surface polypeptides encoded by said chimeric genetic construct.
3. The method of claim 1 or 2, wherein said lactadherin or portion thereof is a mammalian lactadherin or a portion thereof.
- 25 4. The method of claim 3, wherein the lactadherin or portion thereof is selected from:
 - (i) human lactadherin or murine lactadherin,
 - (ii) a fragment of human lactadherin or murine lactadherin comprising a functional C1 and/or C2 domain, and
 - 30 (iii) a polypeptide comprising at least 50% primary structure identity with the polypeptides of (i) or (ii).
5. The method of claim 1, wherein the lactadherin has an amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 7, 8, 10 or a fragment thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain.
- 35

6. The method of claim 1, wherein the lactadherin has an amino acid sequence comprising a functional C1/C2 domain of SEQ ID NO: 7, 8 or 10.
7. The method of claim 5, wherein the lactadherin has an amino acid sequence comprising amino acid residues 69-225, 229-387 or 69-387 of SEQ ID NO: 7 or amino acid residues 111-266, 109-266, 271-426, 111-426 or 109-426 of SEQ ID NO:10.
8. The method of claim 1 or 2, wherein said targeting polypeptide comprises a functional C1 and/or C2 domain of Del-1, Neuropilin-1, coagulation factor 5 or coagulation factor 8.
9. The method of any one of the preceding claims, wherein the chimeric genetic construct comprises a leader signal sequence to favor secretion of the encoded chimeric polypeptide into the endoplasmic reticulum of said exosome-producing cells.
10. The method of any one of the preceding claims, wherein said polypeptide is fused upstream, downstream or at any internal domain junction of the targeting polypeptide.
11. The method of any one of the preceding claims, wherein the polypeptide is selected from an antigen, a cytokine, a ligand, a receptor, an immunoglobulin, a marker polypeptide, an enzyme and an ionic channel, or a portion thereof.
12. The method of any one of the preceding claims, wherein several distinct chimeric genetic constructs encoding distinct polypeptides are introduced into said exosome-producing cells.
13. The method of any one of the preceding claims, wherein said exosome-producing cells are mammalian cells.
14. The method of claim 1 or 2, wherein the exosome-producing cells are murine cells and wherein the lactadherin is murine lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain.
15. A method of screening, identification or selection of exosome-targeting polypeptides, the method comprising:

50

- providing a first genetic construct encoding a candidate polypeptide, preferably a candidate trans-membrane polypeptide;
- introducing the first genetic construct into exosome-producing cells and testing expression of the candidate polypeptide into exosomes;
- 5 - selecting a candidate polypeptide which is expressed in exosomes and preparing a second genetic construct encoding said selected candidate polypeptide fused to a targeted polypeptide;
- introducing the second genetic construct into exosome-producing cells and testing expression of the fusion polypeptide into
- 10 exosomes; and
- selecting the candidate polypeptide which causes efficient expression of the targeted polypeptide into exosomes.

16. A method of preparing functionalized exosomes, comprising:

- 15 a) Providing a chimeric genetic construct encoding a polypeptide fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15;
- 20 b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes carrying said polypeptide at their surface, and
- c) Collecting and/or purifying said functionalized exosomes.

17. A method of producing an exosome expressing a selected trans-membrane polypeptide, the method comprising:

- 25 - selecting a targeting polypeptide according to claim 15,
- providing a genetic construct encoding the selected trans-membrane polypeptide fused to the targeting polypeptide,
- expressing the genetic construct into exosome-producing cells, and
- 30 - producing and isolating exosomes from said modified cells.

18. A method of producing an exosome expressing a GPCR or a portion thereof comprising at least one trans-membrane domain, the method comprising:

- 35 - providing a genetic construct encoding the GPCR or portion thereof fused to a targeting polypeptide comprising a trans-membrane domain and/or identified by the method of claim 15,
- expressing the genetic construct into exosome-producing cells, and

- producing and isolating exosomes from said modified cells which express the GPCR or portion thereof.

19. A functionalized exosome prepared by the method of any one of claims 16 to
5 18.

20. A functionalized exosome, wherein said exosome expresses a recombinant GPCR or a portion thereof.

10 21. A composition comprising a functionalized exosome of claim 19 or 20 and a pharmaceutically acceptable excipient or carrier.

22. A method of producing an antibody that binds a polypeptide, comprising :

- 15 a) Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide or an epitope thereof fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15 ;
- 20 b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes presenting said polypeptide or epitope at their surface,
- c) Collecting said recombinant exosomes and injecting said exosomes or a portion thereof to a non-human mammal to generate antibodies that bind said polypeptide or epitope and,
- 25 d) Collecting antibodies or antibody-producing cells from said mammal.

23. A method of delivering an antigen to a subject comprising:

- 30 a) Providing a chimeric genetic construct encoding said antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15;
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes presenting said antigen at their surface,
- 35 c) Collecting said recombinant exosomes and injecting said exosomes or a portion thereof to said subject.

24. The method of claim 23, wherein the antigen is a tumor, a viral or a microbial antigen.
25. A chimeric genetic construct, wherein said construct encodes a polypeptide of interest fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15.
26. The chimeric genetic construct of claim 25, wherein the targeting polypeptide is MART1/MelanA, CD81 or CD40L or a fragment thereof comprising a trans-membrane domain.
27. The chimeric genetic construct of claim 25 or 26, wherein the polypeptide of interest is selected from an antigen, a cytokine, a ligand, a receptor, an immunoglobulin, a marker polypeptide, an enzyme and an ionic channel, or a portion thereof.
28. A chimeric genetic construct, wherein said construct encodes a polypeptide selected from SEQ ID NO: 22-27, 32 and 33 or a fragment thereof devoid of the 8 C-terminal amino acid residues.
29. A vector comprising a chimeric genetic construct of claim 28.
30. A recombinant cell comprising a chimeric genetic construct of claim 28.
31. A method of selecting or identifying a ligand or binding partner of a polypeptide comprising:
- Providing a chimeric genetic construct encoding said polypeptide fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15;
 - Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes presenting said polypeptide at their surface,
 - Contacting recombinant exosomes of (b) with a candidate compound and determining the ability of said candidate compound to bind said polypeptide on said exosome.

32. A method of delivering an antigen to a subject comprising:

- (a) Providing a chimeric genetic construct encoding said antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15;
- (b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate recombinant exosomes carrying said antigen at their surface,
- (c) Collecting said recombinant exosomes and optionally contacting the same ex vivo with dendritic cells from said subject and,
- (d) injecting to said subject said recombinant exosomes or said contacted dendritic cells or a portion thereof such as exosomes produced by said contacted dendritic cells.

33. A method of producing antibodies comprising:

- Providing a chimeric molecule comprising an antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- contacting said chimeric molecule with lipid vesicles containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, to create functionalized lipid vesicles presenting said antigen at their surface, and
- immunizing a non-human mammal with such functionalized lipid vesicles to produce antibodies that bind said antigen.

34. A method of delivering an antigen to a subject comprising:

- Providing a chimeric molecule comprising an antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;
- contacting said chimeric molecule with lipid vesicles containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, to create functionalized lipid vesicles carrying said antigen at their surface, and
- contacting said functionalized lipid vesicles ex vivo with dendritic cells from said subject in the presence of lactadherin and,
- injecting to said subject said contacted dendritic cells or a portion thereof such as exosomes produced by said contacted dendritic cells.

35. A method of delivering an antigen to a subject comprising:

- Providing a chimeric molecule comprising an antigen fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain ;

- contacting said chimeric molecule with lipid vesicles containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, to create functionalized lipid vesicles presenting said antigen at their surface, and
- injecting said functionalized lipid vesicles or a portion thereof to said subject in the presence of lactadherin.

36. A method of producing functionalized lipid vesicles, comprising:
- Providing lipid vesicles containing phosphatidyl serine or other lipids naturally contained in exosomes, said vesicles carrying an activated Lactadherin comprising Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain, activated by a reactive chemical group ;
 - contacting said lipid vesicles with a compound that interacts with said reactive chemical group in order to produce functionalized lipid vesicles, and
 - optionally purifying said functionalized lipid vesicles.

37. The method of claim 36, wherein the lipid vesicle is an exosome or a liposome.

38. A method of producing a polypeptide comprising Lactadherin or a portion thereof, the method comprising:

- a) Providing a genetic construct encoding said polypeptide;
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes presenting said polypeptide at their surface,
- c) Optionally collecting and/or purifying said functionalized exosomes, and
- d) Recovering and/or purifying said polypeptide or a fragment thereof from said functionalized exosomes.

39. The method of claim 38 for the production of Lactadherin, comprising introducing a genetic encoding Lactadherin into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes presenting Lactadherin at their surface, optionally collecting and/or purifying said functionalized exosomes, and recovering and/or purifying Lactadherin from said functionalized exosomes.

40. The method of claim 38, comprising:

- a) Providing a genetic construct encoding said polypeptide fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim

55

- 15, wherein said polypeptide is fused to said targeting polypeptide through a spacer sequence that comprises a cleavage site;
- b) Introducing said construct into exosome-producing cells to generate functionalized exosomes presenting said polypeptide at their surface,
 - 5 c) Optionally collecting and/or purifying said functionalized exosomes,
 - d) Treating said functionalized exosomes with an agent that cleaves said cleavage site, and
 - e) Recovering and/or purifying said polypeptide.
- 10 41. A method of delivering an antigen to a subject, comprising injecting to said subject a genetic construct encoding said antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15.
- 15 42. A method of producing an immune response in a subject against a specific antigen, the method comprising injecting to said subject a genetic construct encoding said antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional
- 20 C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15.
43. The method of claim 41 or 42, wherein said genetic construct is a naked DNA or RNA and wherein said genetic construct is administered in naked form by
- 25 direct intramuscular injection.
44. The method of claim 41 or 42, further comprising injecting to the subject a genetic construct encoding Lactadherin or an accessory molecule fused to Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain.
- 30 45. The method of claim 42, wherein said genetic construct is injected in naked form with a gene gun.
46. The method of claim 44, wherein said accessory molecule is an adjuvant.
- 35 47. The method of claim 44, wherein said accessory molecule is a cell targeting polypeptide.

48. The method of claim 42, wherein the lactadherin has an amino acid sequence comprising amino acid residues 69-225, 229-387 or 69-387 of SEQ ID NO: 7 or amino acid residues 111-266, 109-266, 271-426, 111-426 or 109-426 of SEQ ID NO:10.
- 5 49. The method of claim 46, wherein the adjuvant is a polypeptide cytokine, such as GM-CSF and IL-2 or CD40L.
- 10 50. The method of claim 47, wherein the targeting polypeptide is a Fc fragment of an immunoglobulin.
51. The method of claim 41 or 42, wherein the genetic construct is administered in a virus.
- 15 52. The method of claim 41 or 42, wherein the genetic construct is administered in a plasmid.
53. The method of claim 41 or 42, wherein the genetic construct is administered by electroporation.
- 20 54. A method of producing an immune response in a subject against a specific antigen, the method comprising injecting to said subject a chimeric polypeptide comprising said antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15.
- 25 55. A composition comprising a genetic construct encoding an antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15, and (a) a genetic construct encoding an immune accessory molecule fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15, or (b) a genetic construct encoding Lactadherin.
- 30 56. A composition of claim 55, comprising:
- 35

57

- (a) a genetic construct encoding an antigen fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15, and
- 5 (b) a genetic construct encoding an adjuvant polypeptide fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15, said adjuvant polypeptide being a cytokine, such as GM-CSF or IL-2, or CD40L, or
- 10 (c) a genetic construct encoding an Fc fragment of an immunoglobulin fused to a targeting polypeptide, said targeting polypeptide being selected from (i) Lactadherin or a portion thereof comprising a functional C1 and/or C2 domain and (ii) targeting polypeptides identified by the method of claim 15, or
- (d) a genetic construct encoding Lactadherin.
- 15

1/5

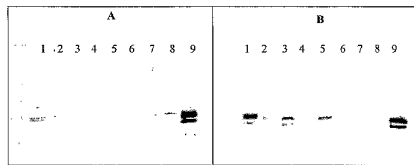


FIGURE 1

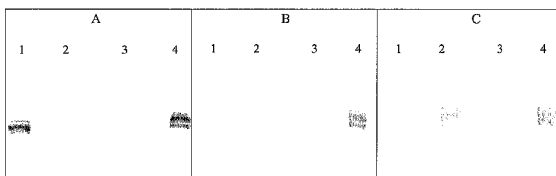
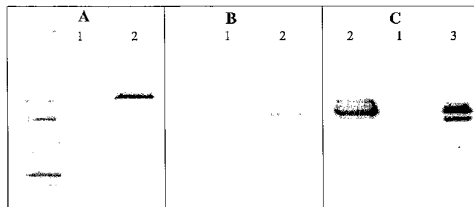
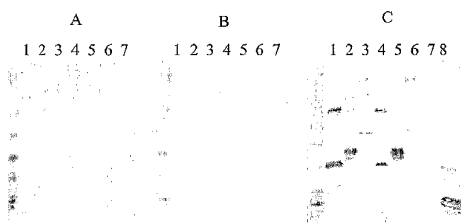
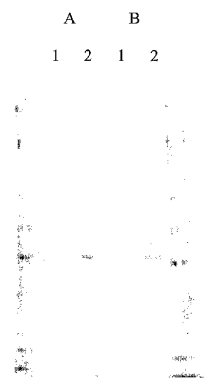
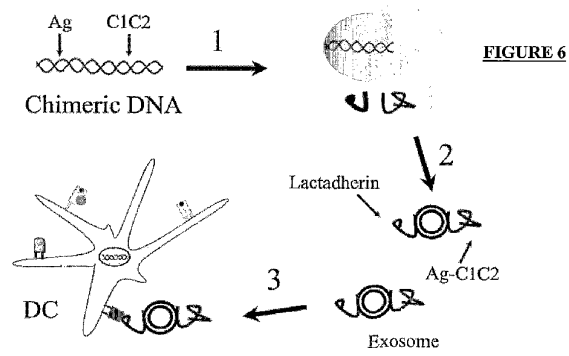


FIGURE 2

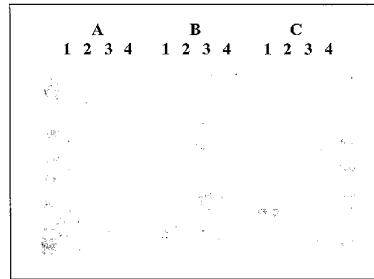
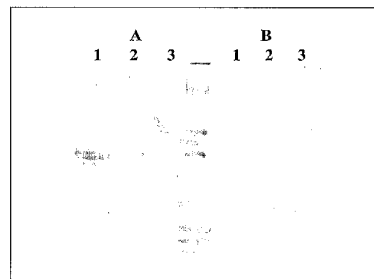
2/5

**FIGURE 3****FIGURE 4**

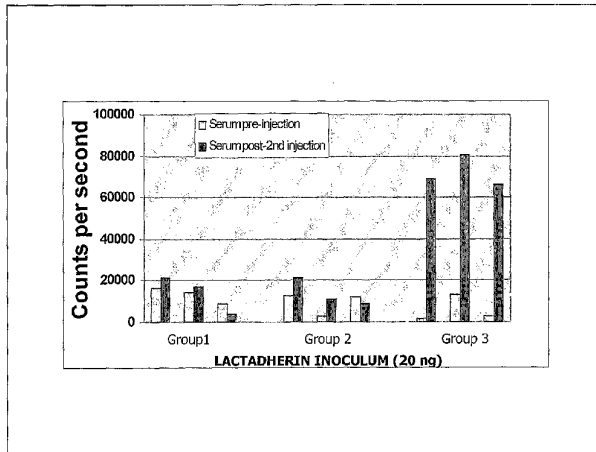
3/5

**FIGURE 5**

4/5

**FIGURE 7****FIGURE 8**

5/5

**FIGURE 9**

SEQUENCE LISTING

<110> ANOSYS Inc.

<120> Methods and compounds for the targeting of protein to
exosomes

<130> B0094WO

<140>

<141>

<150> US60/313,159

<151> 2001-08-17

<150> US60/343,991

<151> 2001-12-26

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf15

<400> 1

tataagctta gcatgcgcgc ccccgccctg 30

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNr8

<400> 2

ggattggcgc atccgttcag c 21

<210> 3

<211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf2

<400> 3
 gccctggata tctgttcc 18

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNr13

<400> 4
 ataacggta cagcccagca gctccaggcg 30

<210> 5
 <211> 1164
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Lactlf

<400> 5
 atgcgcgcgc cccgcctgct ggcgcgcgtg tgcggcgccg tgcctctgcgc ccccagcctc 60
 ctctctgcgc tggatatctg ttccaaaaac cctgcgcaca acggtggttt atgcgaggag 120
 atttcccaag aagtgcgagg agatgtcttc cctcgttaca cctgcacgtg ccttaagggc 180
 tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtccagccac tgggcacgga gaatgggaac 240
 attgcacaat cacagatcgc cgcctcatct gtgcgtgtga ccttcttggg ttgcagcat 300
 tgggtcccg agctggcccg cctgaacgcg gcaggcatgg tcaatgcctg gacacccagc 360
 agcaatgaac ataacccctg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt 420
 gtggtgaagc aggtgtccag ccgcttgccc agtcctgagt acctgaagcc cttaaggtg 480
 gcctacagcc ttaattggaca cgaattcgat ttcatccatg atgttaataa aaaacacaag 540
 gagtttgttg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcctgtca acctgtttga gacccctgtg 600
 gaggtccagt acgtgagatt gtaccccacg agctgccaca cggcctgcac tctgcgcttt 660
 gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggcctgaa gaataacagc 720
 atccctgaca agcagatcac ggcctccagc agctacaaga cctggggcctt gcctctcttc 780
 agctggaacc cctcctatgc acggttggaac aagcaggcca acttcaacgc ctgggttgcg 840
 gggagctacg gtaacgatca gtggctgcag gtggacntgg gctcctcgaa ggaggtgaca 900
 ggcatacata cccagggggc ccgttaacttt ggctctgtcc agtttgtggc atcctacaag 960
 gttgcctaca gtaatgacag tgcgaactgg actgagtacc aggaacccag gactggcagc 1020

agtaagatct tccctggcaa ctgggacaa cactccaca agaagaactt gtttgagag 1080
 cccatccctgg ctccctatgt gcgcacctcg cctgtagcct ggcacaacgg catcgccctg 1140
 cgcctggagc tgctgggctg ttag 1164

<210> 6
 <211> 1008
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Lactof

<400> 6
 atgcgcgcgc cccgcctgct ggcgcgcgtg tgcggcgcgc tgctctgcgc ccccagctc 60
 ctctgcgcgc tggatctctg ttccaaaaac cctgcgcaca acggtgggtt atgcgagag 120
 atttcccaag aagtgogag agatgtcttc cctcgctaca cctgcacgtg cottaagggc 180
 taogcgggca accactgtga gacgaatgt gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac 240
 attgccaact cacagatcgc cgcctcatct gtgcgtgtga ccttcttggg ttgcagcat 300
 tgggtcccg agctggcccg cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacacccagc 360
 agcaatgacg ataaccctg gatccaggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt 420
 gtggtgacgc aggggtgccag cgcctggcc agtcatgagt acctgaaggc ctccaaggtg 480
 gcctacagcc ttaattgaca cgaattcgat ttcatccatg atgttaataa aaaaacacag 540
 gagtttgtgg gtaactggaa caaaaacgag gtgcctgtca acctgtttga gacccctgtg 600
 gaggtcagt acgtgagatt gtaccccaag agctgccaca cggcctgcac tcgcgccttt 660
 gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggcctgaa gaataacagc 720
 atccctgaca agcagatcac ggctccagc agctacaaga cctggggctt gcabctcttc 780
 agctgggaac cctcctatgc acggctggac angcagggca acttcaacgc ctgggttgcg 840
 gggagctacg gtaacgatca gggctgcag atcttccctg gcaactggga caaccactcc 900
 cacaagaaga actgtttga gacgccatc ctggctcgtc atgtgcgcac cctgcctgta 960
 gctggcaca accgcctcgc cctgcgcctg gagctgctgg gctgttag 1008

<210> 7
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hLACTIF/His

<400> 7
 Met Pro Arg Pro Arg Leu Leu Ala Ala Leu Cys Gly Ala Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Leu Leu Val Ala Leu Asp Ile Cys Ser Lys Asn Pro Cys
 20 25 30

His Asn Gly Gly Leu Cys Glu Glu Ile Ser Gln Glu Val Arg Gly Asp
 35 40 45
 Val Phe Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn
 50 55 60
 His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val Arg Val Thr Phe Leu
 85 90 95
 Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly
 100 105 110
 Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile
 115 120 125
 Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr Gly Val Val Thr Gln
 130 135 140
 Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe Ile His Asp Val Asn
 165 170 175
 Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn Lys Asn Ala Val His
 180 185 190
 Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
 195 200 205
 Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly
 210 215 220
 Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser
 225 230 235 240
 Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly
 245 250 255
 Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln
 260 265 270
 Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp
 275 280 285

Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr
 290 295 300
 Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys
 305 310 315 320
 Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro
 325 330 335
 Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser
 340 345 350
 His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg
 355 360 365
 Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu
 370 375 380
 Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
 385 390 395

<210> 8
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hLACTSF/His

<400> 8
 Met Pro Arg Pro Arg Leu Leu Ala Ala Leu Cys Gly Ala Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Leu Leu Val Ala Leu Asp Ile Cys Ser Lys Asn Pro Cys
 20 25 30
 His Asn Gly Gly Leu Cys Glu Glu Ile Ser Gln Glu Val Arg Gly Asp
 35 40 45
 Val Phe Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn
 50 55 60
 His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val Arg Val Thr Phe Leu
 85 90 95

Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly
 100 105 110
 Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile
 115 120 125
 Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr Gly Val Val Thr Gln
 130 135 140
 Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe Ile His Asp Val Asn
 165 170 175
 Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn Lys Asn Ala Val His
 180 185 190
 Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
 195 200 205
 Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly
 210 215 220
 Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser
 225 230 235 240
 Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly
 245 250 255
 Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln
 260 265 270
 Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp
 275 280 285
 Leu Gln Ile Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn
 290 295 300
 Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val
 305 310 315 320
 Ala Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr
 325 330 335
 Gly His His His His His His
 340

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf20

 <400> 9
 ataaagctta gntgcaggt ctcccggtg 30

 <210> 10
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mIACT/His

 <400> 10
 Met Gln Val Ser Arg Val Leu Ala Ala Leu Cys Gly Met Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Leu Phe Ala Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asp Ser Ser Leu
 20 25 30
 Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Leu Thr Gly Gln Asp Asn Asp Ile Tyr
 35 40 45
 Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Thr Gly Leu Val Cys Asn Glu Thr Glu
 50 55 60
 Arg Gly Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Tyr Asn Asp Ala Lys Cys Leu
 65 70 75 80
 Val Thr Leu Asp Thr Gln Arg Gly Asp Ile Phe Thr Glu Tyr Ile Cys
 85 90 95
 Gln Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Ile His Cys Glu Thr Gly Cys Ser
 100 105 110
 Thr Gln Leu Gly Met Glu Gly Gly Ala Ile Ala Asp Ser Gln Ile Ser
 115 120 125
 Ala Ser Tyr Val Tyr Met Gly Phe Met Gly Leu Gln Arg Trp Gly Pro

```

130          135          140
Glu Leu Ala Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Ile Val Asn Ala Trp His Ala
145          150          155          160
Ser Asn Tyr Asp Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Lys
165          170          175
Met Arg Val Ser Gly Val Met Thr Gln Gly Ala Ser Arg Ala Gly Arg
180          185          190
Ala Glu Tyr Leu Lys Thr Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asp Gly Arg
195          200          205
Lys Phe Glu Phe Ile Gln Asp Glu Ser Gly Gly Asp Lys Glu Phe Leu
210          215          220
Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser Leu Lys Val Asn Met Phe Asn Pro Thr
225          230          235          240
Leu Glu Ala Gln Tyr Ile Arg Leu Tyr Pro Val Ser Cys His Arg Gly
245          250          255
Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu His Gly Cys Leu
260          265          270
Glu Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Thr Ile Pro Asp Ser Gln Met Ser
275          280          285
Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Asn Leu Arg Ala Phe Gly Trp Tyr
290          295          300
Pro His Leu Gly Arg Leu Asp Asn Gln Gly Lys Ile Asn Ala Trp Thr
305          310          315          320
Ala Gln Ser Asn Ser Ala Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Thr
325          330          335
Gln Arg Gln Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asp Phe Gly
340          345          350
His Ile Gln Tyr Val Glu Ser Tyr Lys Val Ala His Ser Asp Asp Gly
355          360          365
Val Gln Trp Thr Val Tyr Glu Glu Gln Gly Ser Ser Lys Val Phe Gln
370          375          380
Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser His Lys Lys Asn Ile Phe Glu Lys Pro

```

385 390 395 400
Phe Met Ala Arg Tyr Val Arg Val Leu Pro Val Ser Trp His Asn Arg
 405 410 415
Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His
 420 425 430
His His

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNF22

<400> 11
ccctcggtaca cctgcacgtg cc 22

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNF23

<400> 12
cccacagagct gccacacggc c 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNF24

<400> 13
aatgtgtcg agccactggg c 21

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer L/TDNF25

<400> 14
ggatgcgccca atccccctgg 19

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer L/TDNF26

<400> 15
gaaggaacgc gtacagccca gtagctcaaa gcg 33

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer L/TDNF30

<400> 16
ggatgttcta cacagctggg ca 22

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer L/TDNF31

<400> 17
accgaataca tctgccca 17

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNF32

<400> 18
ctgtttcgt gccaccggg c 21

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNF33

<400> 19
ggatgtctcg agccctgg 19

<210> 20
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer IL2f1

<400> 20
aggaggaagc ttatgtacg gatgcaactc c 31

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer IL2r2

<400> 21
agtcagtgtt gagatgatg 19

<210> 22
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: His/IL2-hCl

 <400> 22
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly
 145 150 155 160
 Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val
 165 170 175
 Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg
 180 185 190
 Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp
 195 200 205

```

Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr
210                215                220

Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu
225                230                235                240

Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe
245                250                255

Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn
260                265                270

Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln
275                280                285

Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg
290                295                300

Phe Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
305                310                315

```

<210> 23

<211> 336

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
His/IL2-extended hCl

<400> 23

```

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1          5          10          15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20        25        30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35        40        45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50        55        60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65        70        75        80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

```

```

      85              90              95
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
  100              105              110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
  115              120              125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
  130              135              140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys
  145              150              155              160
Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro
  165              170              175
Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser
  180              185              190
Ser Val Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu
  195              200              205
Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser
  210              215              220
Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp
  225              230              235              240
Val Thr Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu
  245              250              255
Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe
  260              265              270
Asp Phe Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn
  275              280              285
Trp Asn Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu
  290              295              300
Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr
  305              310              315              320
Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
  325              330              335

```

<210> 24
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: His/IL2-hC2

 <400> 24
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30

 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45

 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60

 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80

 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110

 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140

 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly
 145 150 155 160

 Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser
 165 170 175

 Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala
 180 185 190

```

Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr
 195                200                205

Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val
 210                215                220

Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe
 225                230                235                240

Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr
 245                250                255

Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn
 260                265                270

Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu
 275                280                285

Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala
 290                295                300

Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
 305                310                315                320

```

<210> 25

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

His/IL2-extended hC2

<400> 25

```

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1                5                10                15

```

```

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20                25                30

```

```

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35                40                45

```

```

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

```

```

50          55          60
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65          70          75          80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85          90          95
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100         105         110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115         120         125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130         135         140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala
145         150         155         160
Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala
165         170         175
Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr
180         185         190
Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn
195         200         205
Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val
210         215         220
Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser
225         230         235         240
Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly
245         250         255
Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser
260         265         270
Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile
275         280         285
Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu
290         295         300
Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His

```


305 310 315 320
 Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His
 325 330 335

His His His His
 340

<210> 26
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: His/IL2-hC1/C2

<400> 26
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly
 145 150 155 160

```

Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val
    165                170                175

Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg
    180                185                190

Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp
    195                200                205

Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr
    210                215                220

Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu
    225                230                235                240

Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe
    245                250                255

Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn
    260                265                270

Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln
    275                280                285

Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg
    290                295                300

Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly
    305                310                315                320

Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser
    325                330                335

Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala
    340                345                350

Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr
    355                360                365

Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val
    370                375                380

Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe
    385                390                395                400

Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr
    405                410                415

```

Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn
 420 425 430

Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu
 435 440 445

Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala
 450 455 460

Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His His His
 465 470 475 480

<210> 27
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 His/IL2-extended hC1/C2

<400> 27
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala

```

115          120          125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130          135          140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys
145          150          155          160
Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro
165          170          175
Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser
180          185          190
Ser Val Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu
195          200          205
Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser
210          215          220
Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp
225          230          235          240
Val Thr Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu
245          250          255
Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe
260          265          270
Asp Phe Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn
275          280          285
Trp Asn Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu
290          295          300
Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr
305          310          315          320
Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro
325          330          335
Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser
340          345          350
Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser
355          360          365
Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly

```

370 375 380
 Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys
 385 390 395 400
 Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val
 405 410 415
 Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn
 420 425 430
 Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro
 435 440 445
 Gly Asn Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro
 450 455 460
 Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg
 465 470 475 480
 Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Gly His His His His
 485 490 495
 His His

<210> 28

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MelanA/MART1

<400> 28

Met Pro Arg Glu Asp Ala His Phe Ile Tyr Gly Tyr Pro Lys Lys Gly
 1 5 10 15
 His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile
 20 25 30
 Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu Ile Gly Cys Trp Tyr Cys
 35 40 45
 Arg Arg Arg Asn Gly Tyr Arg Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val
 50 55 60

Gly Thr Gln Cys Ala Leu Thr Arg Arg Cys Pro Gln Glu Gly Phe Asp
 65 70 75 80
 His Arg Asp Ser Lys Val Ser Leu Gln Glu Lys Asn Cys Glu Pro Val
 85 90 95
 Val Pro Asn Ala Pro Pro Ala Tyr Glu Lys Leu Ser Ala Glu Gln Ser
 100 105 110
 Pro Pro Pro Tyr Ser Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 115 120 125
 Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His
 130 135 140

<210> 29

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CD40L

<400> 29

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45
 Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60
 Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110
 Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 30

<211> 258

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CD81

<400> 30

Met Gly Val Glu Gly Cys Thr Lys Cys Ile Lys Tyr Leu Leu Phe Val
1 5 10 15

Phe Asn Phe Val Phe Trp Leu Ala Gly Gly Val Ile Leu Gly Val Ala
20 25 30

Leu Trp Leu Arg His Asp Pro Gln Thr Thr Ser Leu Leu Tyr Leu Glu
35 40 45

Leu Gly Asn Lys Pro Ala Pro Asn Thr Phe Tyr Val Gly Ile Tyr Ile

```

      50              55              60
Leu Ile Ala Val Gly Ala Val Met Met Phe Val Gly Phe Leu Gly Cys
65              70              75              80
Tyr Gly Ala Ile Gln Glu Ser Gln Cys Leu Leu Gly Thr Phe Phe Thr
      85              90              95
Cys Leu Val Ile Leu Phe Ala Cys Glu Val Ala Ala Gly Ile Trp Gly
      100             105             110
Phe Val Asn Lys Asp Gln Ile Ala Lys Asp Val Lys Gln Phe Tyr Asp
      115             120             125
Gln Ala Leu Gln Gln Ala Val Met Asp Asp Asp Ala Asn Asn Ala Lys
      130             135             140
Ala Val Val Lys Thr Phe His Glu Thr Leu Asn Cys Cys Gly Ser Asn
      145             150             155             160
Ala Leu Thr Thr Leu Thr Thr Thr Ile Leu Arg Asn Thr Leu Cys Pro
      165             170             175
Ser Gly Gly Asn Ile Leu Thr Pro Leu Leu Gln Gln Asp Cys His Gln
      180             185             190
Lys Ile Asp Glu Leu Phe Ser Gly Lys Leu Tyr Leu Ile Gly Ile Ala
      195             200             205
Ala Ile Val Val Ala Val Ile Met Ile Phe Glu Met Ile Leu Ser Met
      210             215             220
Val Leu Cys Cys Gly Ile Arg Asn Ser Ser Val Tyr Phe Glu Gln Lys
      225             230             235             240
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Gly His His His His
      245             250             255
His His

```

```

<210> 31
<211> 222
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

```


<223> Description of Artificial Sequence: CD81E

<400> 31

Met Gly Val Glu Gly Cys Thr Lys Cys Ile Lys Tyr Leu Leu Phe Val
1 5 10 15

Phe Asn Phe Val Phe Trp Leu Ala Gly Gly Val Ile Leu Gly Val Ala
20 25 30

Leu Trp Leu Arg His Asp Pro Gln Thr Thr Ser Leu Leu Tyr Leu Glu
35 40 45

Leu Gly Asn Lys Pro Ala Pro Asn Thr Phe Tyr Val Gly Ile Tyr Ile
50 55 60

Leu Ile Ala Val Gly Ala Val Met Met Phe Val Gly Phe Leu Gly Cys
65 70 75 80

Tyr Gly Ala Ile Gln Glu Ser Gln Cys Leu Leu Gly Thr Phe Thr
85 90 95

Cys Leu Val Ile Leu Phe Ala Cys Glu Val Ala Ala Gly Ile Trp Gly
100 105 110

Phe Val Asn Lys Asp Gln Ile Ala Lys Asp Val Lys Gln Phe Tyr Asp
115 120 125

Gln Ala Leu Gln Gln Ala Val Met Asp Asp Asp Ala Asn Asn Ala Lys
130 135 140

Ala Val Val Lys Thr Phe His Glu Thr Leu Asn Cys Cys Gly Ser Asn
145 150 155 160

Ala Leu Thr Thr Leu Thr Thr Thr Ile Leu Arg Asn Thr Leu Cys Pro
165 170 175

Ser Gly Gly Asn Ile Leu Thr Pro Leu Leu Gln Gln Asp Cys His Gln
180 185 190

Lys Ile Asp Glu Leu Phe Ser Gly Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
195 200 205

Glu Asp Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His
210 215 220

<210> 32

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MART1/CCR7

<400> 32

Met Pro Arg Glu Asp Ala His Phe Ile Tyr Gly Tyr Pro Lys Lys Gly
 1 5 10 15

His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile
 20 25 30

Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Ile Gly Cys Trp Tyr Cys
 35 40 45

Arg Arg Arg Asn Gly Tyr Arg Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val
 50 55 60

Gly Thr Gln Cys Ala Leu Thr Arg Arg Cys Pro Gln Glu Gly Phe Asp
 65 70 75 80

His Arg Asp Ser Lys Val Ser Leu Gln Glu Lys Asn Cys Glu Pro Val
 85 90 95

Val Pro Asn Ala Pro Pro Ala Tyr Glu Lys Leu Ser Ala Glu Gln Ser
 100 105 110

Pro Pro Pro Tyr Ser Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 115 120 125

Leu Asn Met His Thr Gly Gln Asp Glu Val Thr Asp Asp Tyr Ile Gly
 130 135 140

Asp Asn Thr Thr Val Asp Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Leu Cys Ser Lys
 145 150 155 160

Lys Asp Val Arg Asn Phe Lys Ala Trp Phe Leu Pro Ile Met Tyr Ser
 165 170 175

Ile Ile Cys Phe Val Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Val Val Leu Thr
 180 185 190

Tyr Ile Tyr Phe Lys Arg Leu Lys Thr Met Thr Asp Thr Tyr Leu Leu
 195 200 205

Asn Leu Ala Val Ala Asp Ile Leu Phe Leu Leu Thr Leu Pro Phe Trp
 210 215 220

Ala Tyr Ser Ala Ala Lys Ser Trp Val Phe Gly Val His Phe Cys Lys
 225 230 235 240
 Leu Ile Phe Ala Ile Tyr Lys Met Ser Phe Phe Ser Gly Met Leu Leu
 245 250 255
 Leu Leu Cys Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val Gln Ala Val
 260 265 270
 Ser Ala His Arg His Arg Ala Arg Val Leu Leu Ile Ser Lys Leu Ser
 275 280 285
 Cys Val Gly Ile Trp Ile Leu Ala Thr Val Leu Ser Ile Pro Glu Leu
 290 295 300
 Leu Tyr Ser Asp Leu Gln Arg Ser Ser Ser Glu Gln Ala Met Arg Cys
 305 310 315 320
 Ser Leu Ile Thr Glu His Val Glu Ala Phe Ile Thr Ile Gln Val Ala
 325 330 335
 Gln Met Val Ile Gly Phe Leu Val Pro Leu Leu Ala Met Ser Phe Cys
 340 345 350
 Tyr Leu Val Ile Ile Arg Thr Leu Leu Gln Ala Arg Asn Phe Glu Arg
 355 360 365
 Asn Lys Ala Ile Lys Val Ile Ile Ala Val Val Val Val Phe Ile Val
 370 375 380
 Phe Gln Leu Pro Tyr Asn Gly Val Val Leu Ala Gln Thr Val Ala Asn
 385 390 395 400
 Phe Asn Ile Thr Ser Ser Thr Cys Glu Leu Ser Lys Gln Leu Asn Ile
 405 410 415
 Ala Tyr Asp Val Thr Tyr Ser Leu Ala Cys Val Arg Cys Cys Val Asn
 420 425 430
 Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Ile Gly Val Lys Phe Arg Asn Asp Leu Phe
 435 440 445
 Lys Leu Phe Lys Asp Leu Gly Cys Leu Ser Gln Glu Gln Leu Arg Gln
 450 455 460
 Trp Ser Ser Cys Arg His Ile Arg Arg Ser Ser Met Ser Val Glu Ala
 465 470 475 480

Glu Thr Thr Thr Thr Phe Ser Pro Thr Gly His His His His His His
 485 490 495

<210> 33

<211> 578

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CD81E/CCR7

<400> 33

Met Gly Val Glu Gly Cys Thr Lys Cys Ile Lys Tyr Leu Leu Phe Val
 1 5 10 15

Phe Asn Phe Val Phe Trp Leu Ala Gly Gly Val Ile Leu Gly Val Ala
 20 25 30

Leu Trp Leu Arg His Asp Pro Gln Thr Thr Ser Leu Leu Tyr Leu Glu
 35 40 45

Leu Gly Asn Lys Pro Ala Pro Asn Thr Phe Tyr Val Gly Ile Tyr Ile
 50 55 60

Leu Ile Ala Val Gly Ala Val Met Met Phe Val Gly Phe Leu Gly Cys
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Ile Gln Glu Ser Gln Cys Leu Leu Gly Thr Phe Phe Thr
 85 90 95

Cys Leu Val Ile Leu Phe Ala Cys Glu Val Ala Ala Gly Ile Trp Gly
 100 105 110

Phe Val Asn Lys Asp Gln Ile Ala Lys Asp Val Lys Gln Phe Tyr Asp
 115 120 125

Gln Ala Leu Gln Gln Ala Val Met Asp Asp Asp Ala Asn Asn Ala Lys
 130 135 140

Ala Val Val Lys Thr Phe His Glu Thr Leu Asn Cys Cys Gly Ser Asn
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Thr Leu Thr Thr Thr Ile Leu Arg Asn Thr Leu Cys Pro

```

165          170          175
Ser Gly Gly Asn Ile Leu Thr Pro Leu Leu Gln Gln Asp Cys His Gln
180          185          190
Lys Ile Asp Glu Leu Phe Ser Gly Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
195          200          205
Glu Asp Leu Asn Met His Thr Gly Gln Asp Glu Val Thr Asp Asp Tyr
210          215          220
Ile Gly Asp Asn Thr Thr Val Asp Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Leu Cys
225          230          235          240
Ser Lys Lys Asp Val Arg Asn Phe Lys Ala Trp Phe Leu Pro Ile Met
245          250          255
Tyr Ser Ile Ile Cys Phe Val Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Val Val
260          265          270
Leu Thr Tyr Ile Tyr Phe Lys Arg Leu Lys Thr Met Thr Asp Thr Tyr
275          280          285
Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Ile Leu Phe Leu Leu Thr Leu Pro
290          295          300
Phe Trp Ala Tyr Ser Ala Ala Lys Ser Trp Val Phe Gly Val His Phe
305          310          315          320
Cys Lys Leu Ile Phe Ala Ile Tyr Lys Met Ser Phe Phe Ser Gly Met
325          330          335
Leu Leu Leu Leu Cys Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val Gln
340          345          350
Ala Val Ser Ala His Arg His Arg Ala Arg Val Leu Leu Ile Ser Lys
355          360          365
Leu Ser Cys Val Gly Ile Trp Ile Leu Ala Thr Val Leu Ser Ile Pro
370          375          380
Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Leu Gln Arg Ser Ser Ser Glu Gln Ala Met
385          390          395          400
Arg Cys Ser Leu Ile Thr Glu His Val Glu Ala Phe Ile Thr Ile Gln
405          410          415
Val Ala Gln Met Val Ile Gly Phe Leu Val Pro Leu Leu Ala Met Ser

```

```

          420          425          430
Phe Cys Tyr Leu Val Ile Ile Arg Thr Leu Leu Gln Ala Arg Asn Phe
 435          440          445

Glu Arg Asn Lys Ala Ile Lys Val Ile Ile Ala Val Val Val Phe
 450          455          460

Ile Val Phe Gln Leu Pro Tyr Asn Gly Val Val Leu Ala Gln Thr Val
 465          470          475          480

Ala Asn Phe Asn Ile Thr Ser Ser Thr Cys Glu Leu Ser Lys Gln Leu
          485          490          495

Asn Ile Ala Tyr Asp Val Thr Tyr Ser Leu Ala Cys Val Arg Cys Cys
          500          505          510

Val Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Ile Gly Val Lys Phe Arg Asn Asp
          515          520          525

Leu Phe Lys Leu Phe Lys Asp Leu Gly Cys Leu Ser Gln Glu Gln Leu
          530          535          540

Arg Gln Trp Ser Ser Cys Arg His Ile Arg Arg Ser Ser Met Ser Val
          545          550          555          560

Glu Ala Glu Thr Thr Thr Thr Phe Ser Pro Thr Gly His His His His
          565          570          575

His His

```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016522 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/47,
C12N 15/62, G01N 33/543, A61K 9/127, 39/39, 47/48

(21) International Application Number: PCT/JP02/09108

(22) International Filing Date: 14 August 2002 (14.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/313,159 17 August 2001 (17.08.2001) US
60/343,991 26 December 2001 (26.12.2001) US(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): ANOSYS,
INC. [US/US]; 1014 Hamilton Court, Menlo Park, CA
94025 (US).Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): DELCAYRE, Alain
[FR/US]; 2812 Lexford Avenue, San José, CA 95124 (US),
LE PECOQ, Jean-Bernard [FR/US]; 675 Olive Street,
Menlo Park, CA 94025 (US).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
28 August 2003(74) Agents: BECKER, Philippe et al.; Becker et Associés,
35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/016522 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOUNDS FOR THE TARGETING OF PROTEIN TO EXOSOMES

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and methods for selectively expressing a polypeptide in a membrane vesicle. The invention also relates to genetic constructs and recombinant cells suitable to produce such membrane vesicles. This invention also relates to such functionalized membrane vesicles as well as to methods of making antibodies, methods of producing or regulating an immune response as well as to methods of screening or identifying binding partners using the same. The invention more particularly uses lactadherin or portions thereof to selectively express polypeptides in membrane vesicles, of natural or synthetic origin. This invention can be used in experimental, research, therapeutic, prophylactic or diagnostic areas.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09108
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/62 G01N33/543 A61K9/127 A61K39/39 A61K47/48		
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) IPC 7 C07K C12N G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPD-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 004 664 A (INST NAT SANTE RECH MED ;INST CURIE (FR)) 31 May 2000 (2000-05-31) cited in the application paragraphs '0021!', '0040!'-'0044!', '0051!', '0052!', '0058!'-' '0063!'; claims 1,6-16 --- -/-	1-7, 9-11, 13-16, 19, 21-27, 29,30, 32-35, 38,39, 41-44, 46-56
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *C* earlier document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 March 2003		Date of making of the international search report 19/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5610 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2240, Tx. 31 651 650 nl, Fax (+31-70) 340-0016		Authorized officer Renggli-Zulliger, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/09108

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 28001 A (AMIGORENA SEBASTIAN ;BENAROCHE PHILIPPE (FR); INST NAT SANTE RECH N) 18 May 2000 (2000-05-18) cited in the application examples 1-9 -----	1-56
Y	THERY C ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DENDRITIC CELL-DERIVED EXOSOMES. SELECTIVE ACCUMULATION OF THE HEAT SHOCK PROTEIN HSC73" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 147, no. 3, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 599-610, XP000918507 ISSN: 0021-9525 cited in the application abstract; figure 9; table 1 -----	1-56
P,A	OSHIMA KENJI ET AL: "Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS. GERMANY FEB 2002, vol. 269, no. 4, February 2002 (2002-02), pages 1209-1218, XP002233407 ISSN: 0014-2956 abstract -----	1-56
A	ANDERSEN M H ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF TWO CELLULAR BINDING DOMAINS OF BOVINE LACTADHERIN" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 39, no. 20, 23 May 2000 (2000-05-23), pages 6200-6206, XP000917941 ISSN: 0006-2960 cited in the application abstract; figure 1 -----	1-56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 02/09108
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. ☒ Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 23-24, 32-35, 41-54 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☐ Claims Nos.:	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. ☐ Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1. ☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/EP 02/09108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1004664 A	31-05-2000	EP 1004664 A1	31-05-2000
		AU 1653300 A	13-06-2000
		CN 1348464 T	08-05-2002
		WO 0030667 A2	02-06-2000
		EP 1133520 A2	19-09-2001
		JP 2002530348 T	17-09-2002
WO 0028001 A	18-05-2000	FR 2785543 A1	12-05-2000
		AU 1051400 A	29-05-2000
		CN 1325441 T	05-12-2001
		EP 1127110 A1	29-08-2001
		WO 0028001 A1	18-05-2000
		JP 2002529074 T	10-09-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ル・ベック, ジャンーベルナール

アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 4 0 2 5、メンロー・パーク、オリーブ・ストリート 6 7 5

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA20 BA31 BA41 BA61 CA02 CA07 DA02 DA03 EA02
 EA04 FA18 GA14 GA18 GA30 HA17 HA20
 4B063 QA01 QA18 QQ43 QQ79 QR59 QR77 QR80 QS10
 4B064 AG01 AG02 AG20 AG26 AG27 AG31 CA10 CA19 CC24 DA01
 DA13
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC16 BA02 BA03 BA30 BB40 BD15
 CA24 CA25 CA44 CA45
 4C084 AA01 AA13 BA25 NA14 ZB212 ZB262
 4C085 AA03 BA07 BA51 BB01 CC03 DD62 EE03

专利名称(译)	用于将蛋白质靶向外来体的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2005503791A	公开(公告)日	2005-02-10
申请号	JP2003521831	申请日	2002-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	ANOSYS		
申请(专利权)人(译)	Anoshisu公司		
[标]发明人	デルケールアラン ルベックジャンベルナール		
发明人	デルケール,アラン ル・ベック,ジャン-ベルナール		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/55 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N15/62 A61K47/64 A61K47/6901 C07K14/47 C07K14/55 C07K2319/00 C07K2319/01 C07K2319/41 C07K2319/75		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/02 A61K39/12 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/DB02 4B024/AA01 4B024/AA20 4B024/BA31 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA18 4B024/GA14 4B024/GA18 4B024/GA30 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS10 4B064/AG01 4B064/AG02 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC16 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA30 4B065/BB40 4B065/BD15 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4C084/AA01 4C084/AA13 4C084/BA25 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BA07 4C085/BA51 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE03		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	60/313159 2001-08-17 US 60/343991 2001-12-26 US		
其他公开文献	JP4662708B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于在膜囊泡中选择性表达多肽的组合物和方法。本发明还涉及适用于生产这种膜囊泡的基因构建体和重组细胞。本发明还涉及功能化膜囊泡，以及使用其的抗体生产方法，诱导或控制免疫应答的方法，以及筛选或鉴定结合配偶体的方法。更具体而言，本发明使用乳粘素或其部分在天然或合成来源的膜囊泡中选择性表达多肽。本发明可以用于实验，研究，治疗，预防或诊断领域。

