

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4662708号  
(P4662708)

(45) 発行日 平成23年3月30日 (2011.3.30)

(24) 登録日 平成23年1月14日 (2011.1.14)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 29 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-521831 (P2003-521831)	(73) 特許権者	507381983
(86) (22) 出願日	平成14年8月14日 (2002.8.14)		エクソセラ・エルエルシー
(65) 公表番号	特表2005-503791 (P2005-503791A)		EXOTHERA L. L. C.
(43) 公表日	平成17年2月10日 (2005.2.10)		アメリカ合衆国、カリフォルニア 940
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/009108		25、メンロー・パーク、オリーブ・スト
(87) 国際公開番号	W02003/016522		リート 675
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)	(74) 代理人	100078662
審査請求日	平成17年8月10日 (2005.8.10)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	60/313, 159	(74) 代理人	100113653
(32) 優先日	平成13年8月17日 (2001.8.17)		弁理士 東田 幸四郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100116919
(31) 優先権主張番号	60/343, 991		弁理士 齋藤 房幸
(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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 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、ここで前記標的化ポリペプチドは、

- 配列番号7のアミノ酸残基69~225、配列番号7のアミノ酸残基229~387若しくは配列番号7のアミノ酸残基69~387から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または

- 配列番号10のアミノ酸残基111~266、配列番号10のアミノ酸残基271~426、配列番号10のアミノ酸残基109~426若しくは配列番号10のアミノ酸残基111~426から選択されるマウ斯拉クタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウ斯拉クタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、

からなり、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エクソピポで導入し、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) 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、ここで前記標的化ポリペプチドは、

- 配列番号7のアミノ酸残基69～225、配列番号7のアミノ酸残基229～387若しくは配列番号7のアミノ酸残基69～387から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または

- 配列番号10のアミノ酸残基111～266、配列番号10のアミノ酸残基271～426、配列番号10のアミノ酸残基109～426若しくは配列番号10のアミノ酸残基111～426から選択されるマウ斯拉クタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウ斯拉クタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、  
からなり、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エクソピボで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】

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1～2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

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1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

ポリペプチドが抗原、サイトカイン、リガンド、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1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

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1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

エクソゾーム産生細胞が哺乳動物細胞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

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、

- 配列番号7のアミノ酸残基69～225、配列番号7のアミノ酸残基229～387若しくは配列番号7のアミノ酸残基69～387から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または

- 配列番号10のアミノ酸残基111～266、配列番号10のアミノ酸残基271～426、配列番号10のアミノ酸残基109～426若しくは配列番号10のアミノ酸残基111～426から選択されるマウ斯拉クタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウ斯拉クタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、  
からなること；

b) 前記構築物をエクソゾーム産生細胞内にエクソピボで導入し、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9】

10

20

30

40

50

請求項 8 に記載の方法で調製した機能化エクソゾーム。

【請求項 10】

請求項 9 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。

【請求項 11】

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、

- 配列番号 7 のアミノ酸残基 69 ~ 225、配列番号 7 のアミノ酸残基 229 ~ 387 若しくは配列番号 7 のアミノ酸残基 69 ~ 387 から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的 C1 および / 若しくは C2 ドメイン、または

- 配列番号 10 のアミノ酸残基 111 ~ 266、配列番号 10 のアミノ酸残基 271 ~ 426、配列番号 10 のアミノ酸残基 109 ~ 426 若しくは配列番号 10 のアミノ酸残基 111 ~ 426 から選択されるマウ斯拉クタドヘリンの機能的 C1 および / 若しくは C2 ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウ斯拉クタドヘリンの C1 および / 若しくは C2 ドメインと少なくとも 85% 同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、  
からなる、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エクソビポで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

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 12】

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、

- 配列番号 7 のアミノ酸残基 69 ~ 225、配列番号 7 のアミノ酸残基 229 ~ 387 若しくは配列番号 7 のアミノ酸残基 69 ~ 387 から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的 C1 および / 若しくは C2 ドメイン、または

- 配列番号 10 のアミノ酸残基 111 ~ 266、配列番号 10 のアミノ酸残基 271 ~ 426、配列番号 10 のアミノ酸残基 109 ~ 426 若しくは配列番号 10 のアミノ酸残基 111 ~ 426 から選択されるマウ斯拉クタドヘリンの機能的 C1 および / 若しくは C2 ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウ斯拉クタドヘリンの C1 および / 若しくは C2 ドメインと少なくとも 85% 同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、  
からなる、キメラ遺伝子構築物。

【請求項 13】

対象のポリペプチドが抗原、サイトカイン、リガンド、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、またはその一部分より選択される、請求項 12 に記載のキメラ遺伝子構築物。

【請求項 14】

配列番号 22 ~ 27、32 および 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、請求項 12 に記載のキメラ遺伝子構築物。

【請求項 15】

請求項 14 記載のキメラ構築物を含むベクター。

【請求項 16】

請求項 14 のキメラ構築物を含む組換え体細胞。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

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、

- 配列番号7のアミノ酸残基69～225、配列番号7のアミノ酸残基229～387若しくは配列番号7のアミノ酸残基69～387から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または

- 配列番号10のアミノ酸残基111～266、配列番号10のアミノ酸残基271～426、配列番号10のアミノ酸残基109～426若しくは配列番号10のアミノ酸残基111～426から選択されるマウスラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウスラクタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、  
からなる、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エクソビボで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18】

- 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、

i) 配列番号7のアミノ酸残基69～225、配列番号7のアミノ酸残基229～387若しくは配列番号7のアミノ酸残基69～387から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または

ii) 配列番号10のアミノ酸残基111～266、配列番号10のアミノ酸残基271～426、配列番号10のアミノ酸残基109～426若しくは配列番号10のアミノ酸残基111～426から選択されるマウスラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または、

iii) 前記ヒト若しくはマウスラクタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、

ここでC1および/若しくはC2ドメインまたはそれらの変異体は、反応性化学基により活性化されており、

を担持する脂質小胞を提供すること；

- 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エクソビボで接触させること、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19】

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18記載の方法。

#### 【請求項20】

標的化ポリペプチドと融合した特定抗原をコードする遺伝子構築物の使用であって、前記標的化ポリペプチドが、

- 配列番号7のアミノ酸残基69～225、配列番号7のアミノ酸残基229～387若しくは配列番号7のアミノ酸残基69～387から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または

- 配列番号10のアミノ酸残基111～266、配列番号10のアミノ酸残基271～426、配列番号10のアミノ酸残基109～426若しくは配列番号10のアミノ酸残基111～426から選択されるマウスラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウスラクタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、

10

20

30

40

50

からなる、特定抗原に対する免疫反応を被検体に産生するための組成物を調製するための使用。

【請求項 2 1】

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 ドメインと融合したアクセサリー分子、ここで機能的 C 1 および / 若しくは C 2 ドメインは、

- 配列番号 7 のアミノ酸残基 6 9 ~ 2 2 5、配列番号 7 のアミノ酸残基 2 2 9 ~ 3 8 7 若しくは配列番号 7 のアミノ酸残基 6 9 ~ 3 8 7 から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的 C 1 および / 若しくは C 2 ドメイン、または

- 配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 1 1 ~ 2 6 6、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 2 7 1 ~ 4 2 6、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 0 9 ~ 4 2 6 若しくは配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 1 1 ~ 4 2 6 から選択されるマウスラクタドヘリンの機能的 C 1 および / 若しくは C 2 ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウスラクタドヘリンの C 1 および / 若しくは C 2 ドメインと少なくとも 8 5 % 同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、

からなり、  
をコードする遺伝子構築物を組成物が更に含む、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

アクセサリー分子がアジュバントである、請求項 2 1 記載の使用。

【請求項 2 3】

アクセサリー分子が細胞標的化ポリペプチドである、請求項 2 1 記載の使用。

【請求項 2 4】

アジュバントが GM - C S F および I L - 2 のようなポリペプチドサイトカイン、または C D 4 0 L である、請求項 2 2 記載の使用。

【請求項 2 5】

遺伝子構築物がウイルスベクターである、請求項 2 0 記載の使用。

【請求項 2 6】

遺伝子構築物がプラスミドである、請求項 2 0 記載の使用。

【請求項 2 7】

標的化ポリペプチドと融合した特定抗原を含むキメラポリペプチドの使用であって、前記標的化ポリペプチドが、

- 配列番号 7 のアミノ酸残基 6 9 ~ 2 2 5、配列番号 7 のアミノ酸残基 2 2 9 ~ 3 8 7 若しくは配列番号 7 のアミノ酸残基 6 9 ~ 3 8 7 から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的 C 1 および / 若しくは C 2 ドメイン、または

- 配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 1 1 ~ 2 6 6、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 2 7 1 ~ 4 2 6、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 0 9 ~ 4 2 6 若しくは配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 1 1 ~ 4 2 6 から選択されるマウスラクタドヘリンの機能的 C 1 および / 若しくは C 2 ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウスラクタドヘリンの C 1 および / 若しくは C 2 ドメインと少なくとも 8 5 % 同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、

からなる、特定抗原に対する免疫反応を被検体に産生するための組成物を調製するための使用。

【請求項 2 8】

( 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、

- 配列番号 7 のアミノ酸残基 6 9 ~ 2 2 5、配列番号 7 のアミノ酸残基 2 2 9 ~ 3 8 7 若しくは配列番号 7 のアミノ酸残基 6 9 ~ 3 8 7 から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的 C 1 および / 若しくは C 2 ドメイン、または

- 配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 1 1 ~ 2 6 6、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 2 7 1 ~ 4 2 6、配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 0 9 ~ 4 2 6 若しくは配列番号 1 0 のアミノ酸残基 1 1 1 ~ 4 2 6 から選択されるマウスラクタドヘリンの機能的 C 1 および / 若しくは C

10

20

30

40

50

2ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウスラクタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、

からなる、遺伝子構築物および

(b) 標的化ポリペプチドと融合した免疫アクセサリー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(a)に記載のとおりである、遺伝子構築物、または

(c) (a)に記載の標的化ポリペプチドをコードする遺伝子構築物、

を含む組成物。

【請求項29】

(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、

- 配列番号7のアミノ酸残基69~225、配列番号7のアミノ酸残基229~387若しくは配列番号7のアミノ酸残基69~387から選択されるヒトラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または

- 配列番号10のアミノ酸残基111~266、配列番号10のアミノ酸残基271~426、配列番号10のアミノ酸残基109~426若しくは配列番号10のアミノ酸残基111~426から選択されるマウスラクタドヘリンの機能的C1および/若しくはC2ドメイン、または、

- 前記ヒト若しくはマウスラクタドヘリンのC1および/若しくはC2ドメインと少なくとも85%同一性を有し、エクソゾームに標的化できるそれらの変異体、

からなる、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(a)に記載のとおりであり、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(a)に記載のとおりである、遺伝子構築物、又は

(d) (a)に記載の標的化ポリペプチドをコードする遺伝子構築物、

を含む請求項28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。

【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

10

20

30

40

50

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WO 99 / 03 499、WO 00 / 44389およびWO 97 / 05900に記載されている。

【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WO 00 / 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リンについても起こる（図2）。我々はラクタドヘリンの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】

これらことからラクタドヘリンのC1および/またはC2ドメインの一部または全体、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リンそのものを含め

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 0 8 】

即ち本発明の目的は、

- a) ラクト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。

【 0 0 0 9 】

本発明の別の目的は、

- a) ラクト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。

【 0 0 1 0 】

発明の更なる目的は、

- a) ラクト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。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の目的は、ラクト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。

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

本発明は更にラクトドヘドリンの C 1 および / または C 2 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、イオンチャンネル、またはその一部分でも良い。この様なキメラ遺伝子の具体例は、配列番号 2 2 ~ 2 7、3 2 または 3 3 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。

【 0 0 1 4 】

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。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

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。

## 【 0 0 1 6 】

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プチドの発現を試験すること；および
  - 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。

## 【 0 0 1 7 】

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

## 【 0 0 1 8 】

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。

## 【 0 0 1 9 】

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。

## 【 0 0 2 0 】

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。

## 【 0 0 2 1 】

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

10

20

30

40

50

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】

ラクタドヘリン

ラクタドヘ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 $v_3$ および $v_5$ 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WO00/30667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US5,455,031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。

【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で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。

【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

10

20

30

40

50

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。

【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
  - (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。

10

【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C2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C1ドメインを含むその断片を包含する。

20

【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C1/C2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C2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C1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。

30

【0035】

マウスラクタドヘリンのC2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。マウスラクタドヘリンのC1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プログラムのよう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

40

50

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C1/C2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、この種の機能的変異体の具体例としてDe1-1、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C1および/またはC2ドメインを含むそれらの断片を挙げる事ができる。

【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MelanA/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。Melan/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、MelanA/MART1が実際にMelanA/MART1<sup>+</sup>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MelanA/MART1またはCD81を含むキメラタンパク質を構築し、MelanA/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；

10

20

30

40

50

- 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。

10

## 【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、MelanA/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。

20

## 【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細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。

30

## 【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。

40

## 【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】

50

後述する様に、上記連結は直接行っても、またはスパ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低い、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、
- 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。

【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】

#### 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。

【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

10

20

30

40

50

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。

【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。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

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

10

## 【 0 0 6 3 】

化学融合では、ラクタドヘリンの一部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

20

## 【 0 0 6 4 】

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。

30

## 【 0 0 6 5 】

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、pcDNA、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。

40

## 【 0 0 6 6 】

50

### 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でき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)。

10

#### 【0067】

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、ネイクド(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。

20

30

#### 【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。

#### 【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MHCII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

40

50

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。

【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。

10

【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ピトープ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、それらの表面に前記受容体またはエピトープ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プに結合する抗体を生成すること；および

30

(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。

40

【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、次にこれらを骨髄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。

50

## 【 0 0 7 7 】

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。

## 【 0 0 7 8 】

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。

## 【 0 0 7 9 】

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プは別の種のもの、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。

## 【 0 0 8 0 】

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プ）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。

## 【 0 0 8 1 】

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。

## 【 0 0 8 2 】

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。

## 【 0 0 8 3 】

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。

## 【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

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】

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】

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。

【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

10

20

30

40

50

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。

#### 【 0 0 9 1 】

本発明の更なる目的は

( a ) 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。

10

#### 【 0 0 9 2 】

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 / または C 2 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、そしてこれを前記被検体より得た樹状細胞とエクソピボで接触させること、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。

20

#### 【 0 0 9 3 】

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。

#### 【 0 0 9 4 】

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。

30

#### 【 0 0 9 5 】

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 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、CD 40 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。

40

#### 【 0 0 9 6 】

##### 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

50

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、およびこのような機能化小胞を被検体に投与することが可能である。

【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。

【0098】

この点に関し、本発明は

- 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；
  - 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。

10

【0099】

本発明の別の目的は、

- 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；
  - 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、
  - 前記機能化脂質小胞をエクソピボにて前記被検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
  - 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。

20

【0100】

本発明の別の目的は、

- 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；
  - 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
  - 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。

30

【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。

40

【0103】

別の実施態様では、本発明は、

- 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；
- 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

50

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SH基を作り出すラクタドヘリンの一部でよい。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ボ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ボソームに関する。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C1および/またはC2ドメインと融合した各種ポリペプチドを含み、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

10

20

30

40

50

はラクタドヘリンの機能的 C 1 および / または C 2 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。

【 0 1 0 9 】

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。

10

【 0 1 1 0 】

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。

【 0 1 1 1 】

この方法ではエクソゾームを介して非可溶性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 APC に抗原を移送することである (交叉プライミング) (Wolfers 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 DNA 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 APC に結合すると、APC の交叉プライミングが起こる (段階 3)。

20

【 0 1 1 2 】

具体的実施態様では、APC 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 DNA) 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 DNA) を投与することで更に高まるだろうが、それは DC 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、EGF 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 DC 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。

30

【 0 1 1 3 】

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 CD 4 0 リガンド、GM-CSF、サイトカイン等がある。

40

【 0 1 1 4 】

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 Fc 断片が挙げられる。

【 0 1 1 5 】

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

50

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 DNA でも RNA 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 DNA 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 DC 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 DC による抗原の自然な取込みおよび DC 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 DNA ワクチン接種は、癌および感染症に対する遺伝子および

DNAワクチンの改良に貢献する。

【0120】

HIVに対するDNAワクチン組成物の具体例としては、逆転写酵素、gag、env、nefおよびtat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。この様な投与を行うと、ラクタドヘリンのC1および/またはC2ドメインを持ったキメラ抗原はin vivo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C1および/若しくはC2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C1および/若しくはC2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。

【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。

【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C1および/またはC2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；  
 (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。

## 【 0 1 2 7 】

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。

## 【 0 1 2 8 】

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。

## 【 0 1 2 9 】

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。

## 【 0 1 3 0 】

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。

## 【 0 1 3 1 】

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。

## 【 0 1 3 2 】

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

10

20

30

40

50

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)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ペ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。

【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。

175cm<sup>2</sup>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%CO<sub>2</sub>雰囲気内にて完全培地(2mMのLグルタミン、100U/mlのペニシリン、0.1mg/mlのストレプトマイシン、1mM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RPMI1640)で4日間、37℃で培養した。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：

培養上清を集め、続いて200gで遠心分離し、0.2μm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、100,000gにて遠心分離し、エクソゾームを沈殿させた。沈殿を100μl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)10ml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、200gで遠心分離し沈殿した。沈殿を再懸濁し、そして50mMのリン酸ナトリウムpH8.0、300mMの塩化ナトリウム、10mMのイミダゾールおよび0.5%のTween20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)100μl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℃、1

10

20

30

40

50

0, 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。

【0138】

8  $\mu$ lのSDS-PAGEサンプル緩衝液5X (SB)を32  $\mu$ l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。

10

【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FON-T1 (レーン2) およびM10 (レーン3)、肺カルシノーマ細胞NCI-N226 (レーン4) およびNCI-H520 (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】

ミルクから部分精製されたラクタドヘ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。

20

【0141】

結果:ラクタドヘリンは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。

30

【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LTDNf15/LTDNr8およびLTDNf2/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。LTDNf15およびLTDNr13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。LTDNf2/LTDNr13を用いたラクタドヘリン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)<sub>6</sub>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 (ATC

40

50

C) 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 E L および C L を調製した (E L は P B S の代わりに L B 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, 000 g 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、200 g の遠心分離によりビーズを落とした。20 mM イミダゾールで調整した L B で 3 回洗浄した後、ビーズを 40  $\mu$ l の S B 1 X 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 S B を集め、S D S - P A G E と免疫ブロッティングにより分析した。

10

## 【0144】

C L、S および E L 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。p c D N A 6 h L a c t s f / H i s および p c D N A 6 h L a c t l f / H i s がトランスフェクションされた 293 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 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、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 293 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。

20

## 【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) バックグラウ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 51 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: 293 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リンの高い特異性を持った標的化は、ラクタドヘリンの 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リンは異なる細胞コンパートメントに見いだされる。

30

## 【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 20 (配列番号 9) および L T D N r 13 (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 20 および L T D N r 13 それぞれについて制限部位 H i n d I I I 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 I I I 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)<sub>6</sub> 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 293、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 293 細胞由来の E L は図 2 のパネル A に、ヒトラクタドヘ

40

50

リンを発現しているマウスWEHI細胞由来のEL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CHO細胞由来のEL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ELは各パネルのレーン2に示した。空のpcDNA6プラスミドをトランスフェクションされた細胞由来のEL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)。

10

【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リンのC1/C2ドメインの間に挿入することができる。

20

【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チング型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。

30

【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pcDNA6-hLacI/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pcDNA6-mLact/Hisを用いマウスラクタドヘリン由来のマッチング型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)。

40

【0155】

50

### インターロイキン - 2 - C 1 / C 2 キメラの調製

完全長の I L - 2 c D N A をヒト活性化 T 細胞 c D N A の鋳型より、プライマー I L 2 F 1 ( 配列番号 2 0 ) および I L 2 r 2 ( 配列番号 2 1 ) を用い増幅した。I L 2 f 1 はその 5 ' 末端が H i n d I I I 制限部位を含むように延長されており、一方 I L 2 r 2 はその 5 ' 末端がリン酸化されている。増幅産物を H i n d I I I で消化し、前もって H i n d I I I および A g e I 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、上記調製した各 C 1 / C 2 D N A 断片と共に連結した。I L 2 断片のリン酸化 3 ' 末端と C 1 / C 2 断片のリン酸化 5 ' 末端間を平滑連結することで I L 2 - C 1 / C 2 キメラ配列が生じた。I L 2 断片の 5 ' 末端の H i n d I I I 部位と C 1 / C 2 断片の 3 ' 末端の A g e I 部位でキメラ配列を p c D N A 6 H i s 内に挿入することができ、得られたプラスミド ( p c D N A 6 - H i s / I L 2 - C 1、I L 2 - 延長 C 1、I L 2 - C 2、I L 2 - 延長 C 2、I L 2 - C 1 / C 2 および I L 2 - 延長 C 1 / C 2 ドメイン ) は ( H i s )<sub>6</sub> タグと融合した組換え体キメラタンパク質 ( ヒト由来 C 1 / C 2 ドメインを含むキメラタンパク質については配列番号 2 2 ~ 2 7 ) をコードしていた。配列番号 2 2 ~ 2 7 では、残基 1 ~ 1 5 3 がキメラポリペプチドの h I L 2 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 ( T G H H H H H ) が H i s 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。

#### 【 0 1 5 6 】

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 2 2 ~ 2 7 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エスタンブロットにより評価した。

#### 【 0 1 5 7 】

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。

#### 【 0 1 5 8 】

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 )。

#### 【 0 1 5 9 】

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 )。

#### 【 0 1 6 0 】

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

10

20

30

40

50

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IL2を含むキメラタンパク質を産生したことから、IL2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C1/C2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。

#### 【実施例5】

##### 【0161】

###### 組換え体ヒトラクタドヘドリンの精製

(His)<sub>6</sub>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 cDNA6hLact1f/Hisを実施例2に記載の様にして調製した。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CHO、即ちハムスター卵巣細胞株(ATCC)内にトランスフェクションした。完全培地(2mMのLグルタミン、100U/mlのペニシリン、0.1mg/mlのストレプトマイシンおよび2%のウシ胎児血清(FBS)が補充されたCHO-SFN)、37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気内で1日培養した時点で、2μg/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エ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CHO-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FBSを含まない完全培地中で増殖し、ラクタドヘド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ク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100,000×g、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 NaPO<sub>4</sub> 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 NaPO<sub>4</sub> pH8/300mM NaCl/20mM イミダゾール/0.5% Tween)で、そして次に20mlのMWBII(50mM NaPO<sub>4</sub> 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 NaPO<sub>4</sub> 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-410,000MWCO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ドリン調製物の分析を示す。

##### 【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ドリンを得た。

#### 【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。

10

## 【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、950 μF、293F については 400V、200 μF) 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。

20

## 【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 AgeI 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 (pCDNA6-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 (pCDNA6-MART1/CCR7 および pCDNA6-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。

30

40

## 【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。pCDNA6-MART1/CCR7、pCDNA6-CD81E/CCR7 でトランスフェクションされた細胞、および非ト

50

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。

【 0 1 6 8 】

結果：組換え体 MelanA / MART 1 (パネル A、図 7)、CD 40 (パネル B、図 7) および CD 8 1 (パネル C、図 7) はエクソゾーム内、そして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 CD 40 L 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 CD 8 1 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 / MART 1 - CCR 7 はエクソゾーム内に検出されたが、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、CCR 7 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 CD 8 1 E / CCR 7 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)。

【 0 1 6 9 】

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、MelanA / MART 1 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 CCR 7 との融合することによりエクソゾーム上での CCR 7 の発現が誘発される。別のエクソゾームタンパク質、即ち CD 8 1 E を融合相手とした時には CCR 7 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 C 1 / C 2 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、MelanA / MART 1 の様な新規候補体が同定される。実際には CD 8 1 E / CCR 7 は検出されなかったが、それでも CD 8 1 は CCR 7 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。

【 0 1 7 0 】

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 cDNA 6 h L a c t 1 f / H i s がランスフェクションされた WEHI 細胞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 B a l b / 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 ~ 2 0 ng の組換え体ヒトラクタドヘドリンの P B S 溶液 (グループ 1)、~ 2 0 ng の組換え体ヒトラクタドヘドリンの P B S / 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 ~ 2 0 ng 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 P B S 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 P B S / 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、E L I S A 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 E L I S A では、5 0 ng のヒトラクタドヘドリンを含む P B S でマイクロタイタープレートのウエルを 1 時間、3 7 °C でコーティングした。0 . 0 5 % の T w e e n - 2 0 および 6 % の脱脂粉乳を P B S 中に含むブロッキング緩衝液をウエルに 1 時間、室温 (R T) で加え、残存する遊離の結合部位を飽和した。次にウエルをブロッキング緩衝液で 1 / 1 0 0 0 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。ウエ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 / 1 0 0 0 0 に希釈された抗マウス I g G 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。

【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)。

【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. 10  
DNA CELL BIOL 15, 281-6, 1996.
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. 20  
Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. Biochemistry 39, 6200-6., 2000
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. They, 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. They, 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., They, 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】

【 0 1 7 4 】

【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。

【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 I L - 2 のエクソゾーム内における選択的発現。

20

【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 M e l a n A / M A R T 1 ( パネル A )、C D 4 0 L ( パネル B ) および C D 8 1 ( 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

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> ANOSYS Inc.

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

<130> B0094WO

<140>

<141>

<150> US60/313,159 10

<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 20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf15

<400> 1  
tataagctta gcatgcccgcg cccccgcctg 30

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNr8

<400> 2  
ggattgycgc 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 10  
<213> Artificial Sequence

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

<400> 4  
ataaccggta cagcccagca gctccaggcg 30

<210> 5  
<211> 1164  
<212> DNA 20  
<213> Artificial Sequence

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

<400> 5  
atgccgcgcc ccgcctgct gccgcgctg tgcggcgcgc tgctctgcgc cccagcctc 60  
ctcgtcgcgc tggatatctg ttccaaaaac cctgccaca acggtggttt atgcgaggag 120  
atttcccaag aagtgcgagg agatgtcttc cctcgtaca cctgcacgtg ccttaagggc 180  
tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac 240  
attgccaaact cacagatcgc cgcctcatct gtgcgtgtga ccttcttggg tttgcagcat 300  
tgggtcccgg agctggcccg cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccagc 360  
agcaatgacg ataaccctg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt 420  
gtgggtgacgc aggggtgccag ccgcttggcc agtcatgagt acctgaaggc ctccaagggt 480  
gcctacagcc ttaatggaca cgaattcgat ttcattcatg atgttaataa aaaacacaag 540  
gagtttgtgg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcatgtca acctglttga gaccctgtrg 600  
gaggctcagt acgtgagatt gtaccccacg agctgccaca cggcctgcac tctgcgcttt 660  
gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggctgaa gaataacagc 720  
atccctgaca agcagatcac ggcctccagc agctacaaga cctggggctt gcattctctc 780  
agctggaacc cctcctatgc acgctggac aagcagggca acttcaacgc ctgggttgcg 840  
gggagctacg gtaacgatca gtggctgcag gtggacctgg gctcctcgaa ggaggtgaca 900  
ggcatcatca cccagggggc ccgtaacttt ggctctgccc agtttgtggc atcctacaag 960  
gttgccctaca glaalgacag tgcgaactgg actgagtacc aggaccccag gactggcagc 1020

```

agtaagatct tcctggcaa ctgggacaac cactcccaca agaagaactt gtttgagaag 1080
cccatcctgg ctccgtatgt gcgcacccctg cctgtagcct ggcacaaccg catcgccctg 1140
cgectggagc tgctgggctg ttag                                     1164

```

```

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

```

```

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

```

10

```

<400> 6
atgccgcgcc cccgcctgct ggccgcgctg tgcggcgcgc tgctctgcgc ccccagcctc 60
ctcgtcgcce tggatatctg ttccaaaaac ccctgccaca acggtgggtt atgcgaggag 120
atttcccaag aagtgcgagg agatgtcttc ccctcgtaca cctgcacgtg ccttaagggc 180
tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac 240
attgccaact cacagatcgc cgcctcatct gtgcgtgtga ccttcttggg ttgcagcat 300
tgggtcccgg agctggcccg cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccacgc 360
agcaatgacg ataaccctctg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggc 420
gtggtgacgc aggtgcccag ccgcttgccc agtcatgagt acctgaaggc cttcaagggtg 480
gcctacagcc ttaatggaca cgaattcgat ttcatccatg atgtaataa aaaacacaag 540
gagtttgtgg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcaltgca acctgtttga gaccctctg 600
gaggctcagt acgtgagatt gtaccccacg agctgccaca cggcctgcac tctgccttt 660
gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggcctgaa gaataacagc 720
atccctgaca agcagatcac ggccctccagc agctacaaga cctggggctt gcactcttcc 780
agctggaacc cctcctatgc acggctggac aagcagggca acctcaacgc ctgggttgcg 840
gggagctacg gtaacgatca glggctgcag atcttccctg gcaactggga caaccactcc 900
cacaagaaga acttgtttga gacgccatc ctggctcctg atgtgcgcat cctgcctgta 960
gcctggcaca accgcacgc cctgcgcctg gactgctgg gctgttag                                     1008

```

20

```

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

```

30

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: hLACTLF/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

10

20

30

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

10

20

30

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

10

20

30

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

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNF20

<400> 9  
 ataaagctta gcatgcaggt ctcccgtgtg

30

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

10

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: mLACT/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

20

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

30

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





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

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf25

<400> 14  
 ggatgcgcca atcccctgg 19

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

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNr26

<400> 15  
 gaaggaaccg gtacagccca gtagctcaaa gcg 33

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

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf30

<400> 16  
 ggatggttcta cacagctggg ca 22

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

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf31

<400> 17  
 accgaataca tctgcca 17

10

20

30

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

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf32

<400> 18  
 cctgtttcgt gccaccgagg c 21

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

10

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer LTDNf33

<400> 19  
 ggatgtctcg agccctgg 19

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

20

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

<400> 20  
 aggaggaagc ttatgtacag gatgcaactc c 31

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

30

<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-hC1

<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

10

20

30

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 hC1

<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

10

20

30

	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	

10

20

30

<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

10

20

30

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

10

20

<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

30

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





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 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

10

20

30

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

10

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

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

20

<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

30





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

10

<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

20

30

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

10

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

20

<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

30

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



<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 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

10

20

30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: MART1/CCR7

&lt;400&gt; 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 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

```

10

20

30

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

10

20

30

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

10

<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

20

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

30

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



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 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

10

20

【 1 】

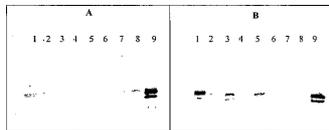


FIGURE 1

【 4 】

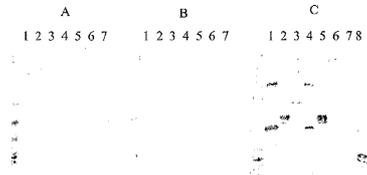


FIGURE 4

【 2 】

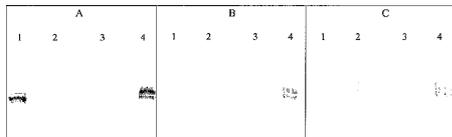


FIGURE 2

【 3 】

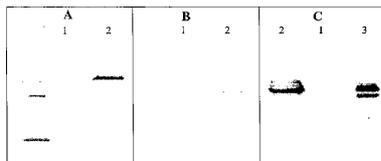


FIGURE 3

【 図 5 】  
 A            B  
 1   2   1   2

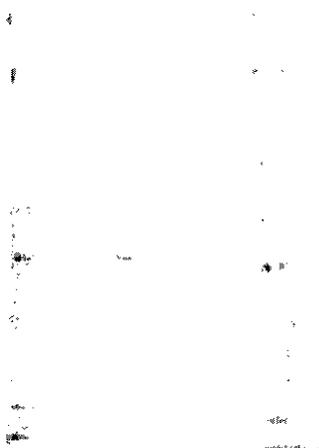
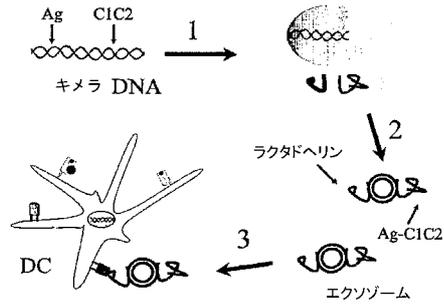


FIGURE 5

【 図 6 】



【 図 7 】

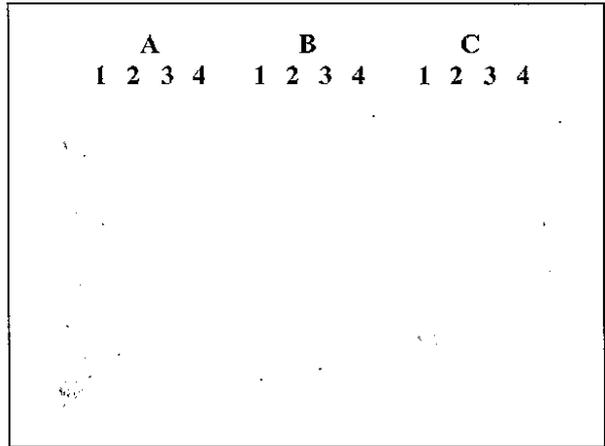


FIGURE 7

【 図 8 】

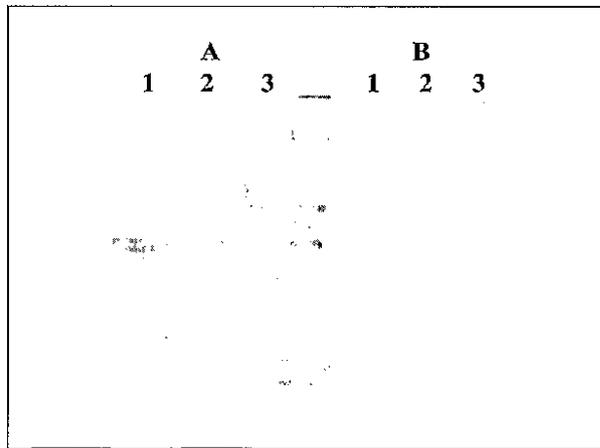
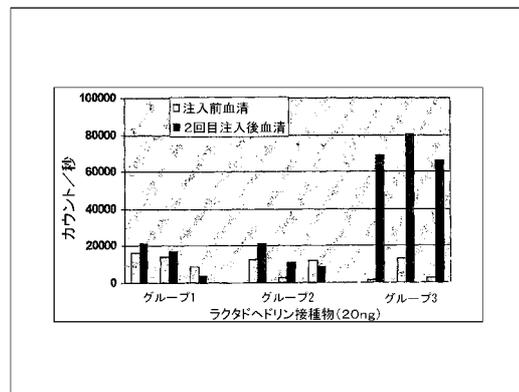


FIGURE 8

【 図 9 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 0 7 K 16/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

(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 9 5 1 2 4、サン・ノゼ、レックスフォード・アベニュー 2  
 8 1 2

(72)発明者 ル・ペック, ジャン - 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

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 国際公開第00/030667 (WO, A1)  
 J. Biol. Chem., 1998年, vol. 273, no. 32, p. 20121-20127  
 Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res., 2001年3月, vol. 42, p. 276 (#1484)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)  
 C12N 15/09  
 PubMed  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

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	<a href="#">JP4662708B2</a>	公开(公告)日	2011-03-30
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		
当前申请(专利权)人(译)	Ekusosera LLC		
[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	C12N15/09 C12N5/10 A61K38/00 A61K39/00 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/50 C07K16/00 C12Q1/02 A61K39/02 A61K39/12 A61K47/48 A61K48/00 C07K14/47 C07K14/55 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 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 C12N5/00.102 A61K37/02 A61K39/00.Z A61P35/00 A61P43/00.105 G01N33/50.Z C07K16/00 C12Q1/02		
代理人(译)	津国 肇 田畑幸四郎		
优先权	60/313159 2001-08-17 US 60/343991 2001-12-26 US		
其他公开文献	JP2005503791A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及在膜囊泡中选择性表达多肽的组合物和方法。本发明还涉及适合于产生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。更具体地，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。本发明可用于实验，研究，治疗，预防或诊断领域。

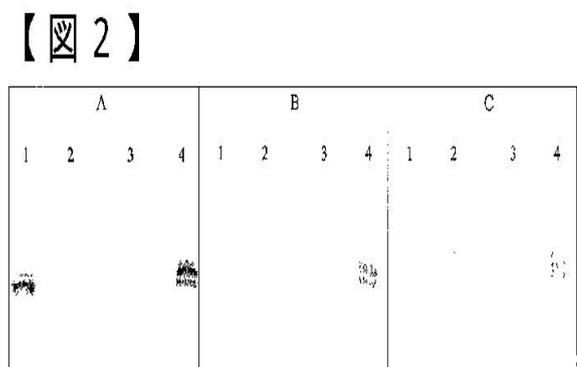


FIGURE 2