

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号
WO 2025/005142 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/023197
- (22) 国際出願日: 2024年6月26日(26.06.2024)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2023-106086 2023年6月28日(28.06.2023) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).

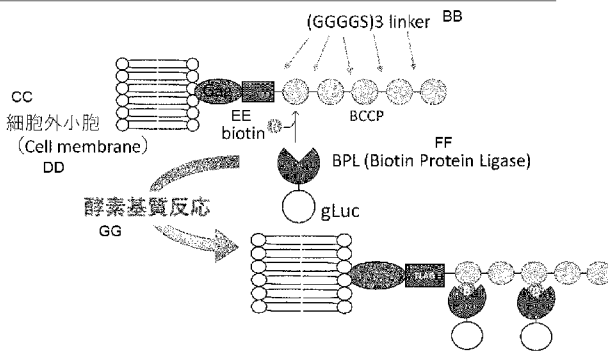
- (72) 発明者: 高橋 有己 (TAKAHASHI, Yuki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
高倉 喜信 (TAKAKURA, Yoshinobu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1 - 7 - 1 北浜コニシビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,

(54) Title: COMPLEX FOR BEING JOINED WITH EXTRACELLULAR VESICLE AND USED, AND USE OF COMPLEX

(54) 発明の名称: 細胞外小胞と連結させて使用するための複合体及びその利用

[図7]

AA
BCCP-BPL ビオチン反応を利用した細胞外小胞への有用成分の担持例



AA Example of supporting useful component on extracellular vesicle using BCCP-BPL biotin reaction
BB linker
CC Extracellular vesicle
DD Cell membrane
EE Biotin
FF Biotin Protein Ligase
GG Enzyme-substrate reaction

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide novel technology that enables more efficient joining of a useful component to an extracellular vesicle. Provided is a complex for being joined with extracellular vesicle and used, the complex: (1) containing a first binding part that joins directly or indirectly with a useful component; (2) containing a second binding part that specifically binds with the first binding part; and (3) binding together the first binding part and the second binding part.

(57) 要約: より効率よく有用成分を細胞外小胞へ連結可能な新たな技術を提供することを目的とする。以下の構成を備える、細胞外小胞と連結させて使用するための複合体: (1) 有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を含む、(2) 該第1結合部と特異的に結合する第2結合部を含む、(3) 該第1結合部と該第2結合部とが結合されている。

[続葉有]

LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

細胞外小胞と連結させて使用するための複合体及びその利用

技術分野

[0001] 細胞外小胞と連結させて使用するための複合体及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 細胞外小胞は、細胞から分泌される小胞であり、脂質二重膜構造を有し、タンパク質、糖、核酸等の物質が内包されていることが知られている。近年、細胞外小胞を利用した様々な研究が進められている。例えば、細胞外小胞は、血液、尿、唾液等の体液に含まれていることから、疾患の診断、治療等におけるバイオマーカーとしての応用が期待されている。また、細胞外小胞は、ドラッグデリバリーシステム（DDS）におけるキャリアとしての応用が期待されている（非特許文献1）。

[0003] このような研究として、例えば、エレクトロポレーション、超音波処理等の刺激を細胞外小胞に与えることで膜に細孔をあけて、該細孔から物質を細胞外小胞に導入する手法が知られている。また、例えば、CD63（Cluster Differentiation 63）タンパク質と目的タンパク質との融合タンパク質を作製し、CD63タンパク質が有する細胞外小胞への移行性を利用して、該融合タンパク質を細胞外小胞に導入する手法が知られている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：門田 幸ら、細胞外小胞・エクソソーム研究の最前線：臨床応用を目指して、日本薬理学雑誌、149(3)、119-122、2017、公益社団法人日本薬理学会

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明者らは、CD63タンパク質と目的タンパク質とを融合させる前記

技術では、CD63タンパク質1分子あたり1分子の目的タンパク質しか細胞外小胞に導入できないことに独自に着目した。本開示は、より効率よく有用成分を細胞外小胞へ連結可能な新たな技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、ビオチンを介して、有用成分と連結させたビオチンタンパク質リガーゼと、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質とを連結させた複合体を用いることにより、有用成分を効率よく細胞外小胞に連結できることを見出した。また、このように、ビオチンを介したビオチンタンパク質リガーゼとビオチンカルボキシルキャリアタンパク質との特異的結合の原理を利用することにより、有用成分を効率よく細胞外小胞に連結できたことから、ビオチンタンパク質リガーゼとビオチンカルボキシルキャリアタンパク質との組み合わせにかかわらず、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部（例えば、ビオチンタンパク質リガーゼ、SpyCatcher等）と、該第1結合部と特異的に結合する第2結合部（例えば、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質、SpyTag等）とを特異的に結合させた複合体を用いることにより、有用成分を効率よく細胞外小胞に連結できることを見出した。本発明は該知見に基づき更に検討を重ねて完成されたものであり、本開示は例えば下記に代表される発明を包含する。

項1. 以下の構成を備える、細胞外小胞と連結させて使用するための複合体：

- (1) 有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を含む、
- (2) 該第1結合部と特異的に結合する第2結合部を含む、
- (3) 該第1結合部と該第2結合部とが結合されている。

項2. 前記第1結合部、前記第2結合部及び前記特異的な結合が以下の(i)又は(ii)である、項1に記載の複合体：

(i) 前記第1結合部がビオチンタンパク質リガーゼであり、前記第2結合部がビオチンカルボキシルキャリアタンパク質であり、前記特異的な結合がビオチンを介した結合である、

(i i) 前記第 1 結合部がSpyCatcherであり、前記第 2 結合部がSpyTagであり、前記特異的な結合がイソペプチド結合である。

項 3. 有用成分が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸及び核酸からなる群より選択される少なくとも 1 種である、項 1 又は 2 に記載の複合体。

項 4. 更に、細胞外小胞指向性タンパク質を含み、細胞外小胞指向性タンパク質と前記第 2 結合部とが直接又は間接的に連結されている、項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の複合体。

項 5. 前記細胞外小胞指向性タンパク質 1 分子あたり、前記第 2 結合部を 2 分子以上含有する、項 4 に記載の複合体。

項 6. 項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載する複合体が連結された細胞外小胞。

項 7. 有用成分と直接又は間接的に連結した第 1 結合部を発現可能なベクター及び第 2 結合部を発現可能なベクターからなる群より選択される少なくとも 1 種を含む、細胞外小胞を分泌する細胞。

項 8. 前記第 2 結合部を発現可能なベクターが、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結されている第 2 結合部を発現可能なベクターである、項 7 に記載の細胞外小胞を分泌する細胞。

項 9. 次の工程 (a 1) 及び (a 2) を含む、項 4 に記載する複合体の製造方法：

(a 1) 有用成分と直接又は間接的に連結した第 1 結合部と、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第 2 結合部とを混合する、

(a 2) 前記第 1 結合部と前記第 2 結合部とを結合させて、該結合を介して、有用成分を間接的に細胞外小胞指向性タンパク質に連結させる。

項 10. 次の工程 (b 1) 及び (b 2) を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載する複合体を担持する細胞外小胞の製造方法：

(b 1) 有用成分と直接又は間接的に連結した第 1 結合部と、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第 2 結合部を担持した細胞外小胞とを混合する、

(b 2) 前記第 1 結合部と前記第 2 結合部とを結合させて、該結合を介して

、有用成分を間接的に細胞外小胞に連結させる。

発明の効果

[0007] 本開示によれば、有用成分を効率よく細胞外小胞に連結することができる。本開示の複合体を備えた細胞外小胞は、DDS等におけるキャリアとしても利用でき、疾患の診断、治療等における有用成分の送達に有用である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、BPL、BCCP及びビオチンによるビオチン化反応のモデル図を示す。

[図2]図2は、2分子以上の第2結合部（BCCP）が連結された本開示の複合体のモデル図を示す。

[図3]図3は、2分子以上の第2結合部（SpyTag）が連結された本開示の複合体のモデル図を示す。

[図4]図4は、細胞外小胞指向性タンパク質1分子あたり、7分子の第2結合部（BCCP又はSpyTag）が連結された本開示の複合体のモデル図を示す。

[図5]図5は、試験例1で用いたGag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチドを示す。

[図6]図6は、試験例1で用いたgLuc-BPLポリヌクレオチドポリヌクレオチドを示す。

[図7]図7は、BCCP-BPL ビオチン化反応を利用した細胞外小胞への有用成分の担持例を示す。

[図8]図8は、試験例1の結果を示す。図8は、本開示の複合体を用いることにより有効成分を良好に細胞外小胞に連結できたことを示す。

[図9]図9は、試験例2の結果を示す。図9は、本開示の複合体を用いることにより有効成分を良好に細胞外小胞に連結できたことを示す。

[図10]図10は、試験例2の結果を示す。図10は、本開示の複合体を用いることにより有効成分を良好に細胞外小胞に連結できたことを示す。

[図11]図11は、試験例3における有用成分（PKI）と第1結合部との結合態様、細胞外小胞指向性タンパク質（Gag）と第2結合部との結合態様、試験例3のプロトコールを示す。

[図12]図12は、試験例3の結果を示す。図12は、有効成分としてPKI阻害剤（PKI）を用いた場合も、有効成分を良好に細胞外小胞に連結できたことを示し、更に、標的対象に有用成分を良好に送達できたことを示す。

[図13]図13は、試験例3の結果を示す。図13は、有効成分としてPKIを用いた場合も、有効成分を良好に細胞外小胞に連結できたことを示し、更に、標的対象に有用成分を良好に送達できたことを示す。

[図14]図14は、試験例3の結果を示す。図14は、有効成分としてPKIを用いた場合も、有効成分を良好に細胞外小胞に連結できたことを示し、更に、標的対象に有用成分を良好に送達できたことを示す。

[図15]図15は、試験例5の結果を示す。図15は、in vivoにおいても、有効成分（PKI、STAT3i）を良好に細胞外小胞に連結できたことを示し、更に、標的対象に有用成分を良好に送達できたことを示す。

[図16]図16は、試験例5の結果を示す。図16は、in vivoにおいても、有効成分（PKI）を良好に細胞外小胞に連結できたことを示し、更に、標的対象に有用成分を良好に送達できたことを示す。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本開示に包含される実施形態について更に詳細に説明する。本開示において「含有する」、「含む」はそれぞれ、「実質的にからなる」、「からなる」という意味も包含する。

[0010] 細胞外小胞と連結させて使用するための複合体

本開示は、以下の構成を備える、細胞外小胞と連結させて使用するための複合体を包含する。

- (1) 有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を含む、
- (2) 該第1結合部と特異的に結合する第2結合部を含む、
- (3) 該第1結合部と該第2結合部とが結合されている。

[0011] 本開示において、第1結合部及び第2結合部は、これらが結合できる限り制限されないが、好ましくは第1結合部と第2結合部とが特異的に結合可能な第1結合部及び第2結合部が例示される。

[0012] 第1結合部及び第2結合部の一例として、ビオチンタンパク質リガーゼ（B P L（biotin protein ligase））及びビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（B C C P（biotin carboxyl carrier protein））が挙げられ、好ましくは第1結合部がB P Lであり、第2結合部がB C C Pである。本開示を制限するものではないが、B P LとB C C Pとは、ビオチンを介して特異的に結合可能であることが知られており、該特異的結合を介した結合はB P LとB C C Pとのビオチン化反応として知られている。

[0013] また、第1結合部及び第2結合部の一例として、SpyCatcher及びSpyTagが挙げられ、好ましくは第1結合部がSpyCatcherであり、第2結合部がSpyTagである。本開示を制限するものではないが、SpyCatcherとSpyTagとは、イソペプチド結合を介して特異的に結合可能であることが知られており、該特異的結合を介した結合はSpyCatcher/SpyTagシステムとして知られている。

[0014] 本開示を制限するものではないが、第1結合部及び第2結合部の例示として、B P L及びB C C Pを用いた場合、また、SpyCatcher及びSpyTagを用いた場合について、以下により詳細に説明する。

[0015] B P L及びB C C Pを用いた例

[0016] 第1結合部がB P Lであり、第2結合部がB C C Pである場合について説明する。本開示においてB C C Pは制限されず、B C C Pの由来として古細菌（Archaea）等が例示される。古細菌として、スルフォロバストコダイイ（*Sulfolobus tokodaii*）等のスルフォロバス属古細菌（*Sulfolobus*）等が例示される。B C C Pとして、好ましくは古細菌のB C C Pが例示され、より好ましくはスルフォロバス属のB C C P、更に好ましくはスルフォロバストコダイイのB C C P等が例示される。

[0017] 本開示を制限するものではないが、B C C Pとして、データベースUniProtのアクセッション番号F9VN46等に記載されているB C C Pが例示される。一例として、スルフォロバストコダイイのB C C Pをコードするアミノ酸配列として、配列番号1で表されるアミノ酸配列が例示される。配列番号1で表されるアミノ酸配列は、データベースUniProtのA

クセッション番号F9VN46において記載されているBCCPをコードするアミノ酸配列に対応する。このようにBCCPをコードするアミノ酸配列は、タンパク質等に関する各種データベースに基づいて容易に知ることができる。また、BCCPの分子量は7000程度（7kDa程度）であることが知られており、本開示を制限するものではないが、BCCPの分子量として好ましくは6000～8000程度（6～8kDa程度）、より好ましくは6500～7500程度（6.5～7.5kDa程度）が例示される。

[0018] BCCPをコードするアミノ酸配列は、BCCPとBPLとがビオチンを介して連結できる範囲において、前記アミノ酸配列に改変を有してもよい。

[0019] 該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号1で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上、99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が例示される。

[0020] また、該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。ここで、1又は複数個の範囲は、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1又は2個等が例示される。

[0021] 本開示においてアミノ酸配列の同一性は、2以上の対比可能なアミノ酸配列の、お互いに対するアミノ酸配列の一致の程度をいう。アミノ酸配列の同一性のレベルは、例えば、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて決定できる。また、Karlin及びAltschulによるアルゴリズムBLAST (Karlin S, Altschul SF. “Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes” Proc Natl Acad Sci USA. 87:2264—2268 1990)、Karlin S, Altschul SF. “Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences.” Proc Natl Acad Sci USA. 90:5873—7 (1993)) に基づいて決定できる。このようなBLASTのアルゴリズムに基

づいたBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている。これらの解析方法の具体的な手法は公知であり、National Center of Biotechnology Information (NCBI) のウェブサイトを (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を参照すればよい。

[0022] 改変後のアミノ酸は、天然アミノ酸及び人工アミノ酸のいずれであってもよい。アミノ酸として、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸、含硫アミノ酸等が例示される。アミノ酸として、より具体的には、例えばバリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、アルギニン、グルタミン、リシン（リジン）、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、システイン、トレオニン（スレオニン）、メチオニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン、グリシン、セリン等が挙げられる。特定のアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸を欠失、置換及び／又は付加させる技術は公知である。

[0023] また、本開示を制限するものではないが、置換として保存的置換が好ましく例示される。本開示において保存的置換とは、アミノ酸残基が類似の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されることを意味する。例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンといった塩基性側鎖を有するアミノ酸残基同士で置換されることが、保存的な置換にあたる。その他、アスパラギン酸、グルタミン酸といった酸性側鎖を有するアミノ酸残基；グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインといった非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸残基；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンといった非極性側鎖を有するアミノ酸残基；スレオニン、バリン、イソロイシンといった β -分枝側鎖を有するアミノ酸残基、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンといった芳香族側鎖を有するアミノ酸残基同士の置換も同様に、保存的な置換にあたる。

[0024] 本開示の複合体は、2分子以上のBCCPを含んでいてもよく、BCCP

は、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせで使用してもよい。

[0025] 本開示においてB P Lは制限されず、B P Lの由来として古細菌 (Archaea) 等が例示される。古細菌として、スルフォロバス トコダイイ (Sulfolobus tokodaii) 等のスルフォロバス属古細菌 (Sulfolobus) 等が例示される。B P Lとして、好ましくは古細菌のB P Lが例示され、より好ましくはスルフォロバス属のB P L、更に好ましくはスルフォロバス トコダイイのB P Lが例示される。B P Lの由来はB C C Pと同じであってもよく異なってもよく、好ましくは同じである。

[0026] 本開示を制限するものではないが、B P Lとして、データベースU n i p r o tのアクセッション番号F 9 V N G 7等に記載されているB P Lが例示される。一例として、スルフォロバス トコダイイのB P Lをコードするアミノ酸配列として、配列番号2で表されるアミノ酸配列が例示される。配列番号2で表されるアミノ酸配列は、データベースU n i p r o tのアクセッション番号F 9 V N G 7 (Mass(Da)26317) において記載されているB P Lをコードするアミノ酸配列に対応する。このようにB P Lをコードするアミノ酸配列は、タンパク質等に関する各種データベースに基づいて容易に知ることができる。B P Lの分子量は2 6 0 0 0程度 (2 6 k D a程度) であることが知られており、本開示を制限するものではないが、B P Lの分子量として好ましくは2 5 0 0 0～2 8 0 0 0程度 (2 5～2 8 k D a程度)、好ましくは2 6 0 0 0～2 7 0 0 0程度 (2 6～2 7 k D a程度) が例示される。

[0027] B P Lをコードするアミノ酸配列は、B C C PとB P Lとがビオチンを介して連結できる範囲において、前記アミノ酸配列に改変を有してもよい。

[0028] 該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列と9 0 %以上、好ましくは9 5 %以上、より好ましくは9 8 %以上、更に好ましくは9 9 %以上、9 9 . 5 %以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が例示される。

[0029] また、該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号2で表

されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。ここで、1又は複数個の範囲は、1～20個、好ましくは1～15個、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1又は2個等が例示される。

[0030] 配列同一性は前述と同様に説明される。また、改変後のアミノ酸は、天然アミノ酸及び人工アミノ酸のいずれであってもよく、アミノ酸としては前述と同様に説明される。また、本開示を制限するものではないが、置換として保存的置換が好ましく例示され、保存的置換は前述と同様に説明される。

[0031] 本開示の複合体は、2分子以上のBPLを含んでいてもよく、BPLは、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0032] ビオチンは、CAS登録番号58-85-5で示される公知の物質であり、ビタミンB群の一種としても知られている。

[0033] 本開示の複合体は、BPLと直接又は間接的に連結した有用成分を含む。有用成分として、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸等が例示される。本開示を制限するものではないが、タンパク質としてレポータータンパク質等であってもよく、ガウシアルシフェラーゼ (Gaussia Luciferase (gLuc))、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein GFP) 等の蛍光タンパク質等が例示される。ペプチドとして、PKA (protein kinase A) 阻害ペプチド、STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 阻害ペプチド等の酵素活性阻害ペプチド等が例示される。核酸として、DNA、RNA (siRNA (small interfering RNA)、miRNA (micro RNA) 等) 等が例示される。有用成分は1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。本開示の複合体は連結させる有用成分に応じてタンパク質医薬、核酸医薬等として利用できる。

[0034] 有用成分のBPLへの連結は、本分野において公知の連結手段に従い行えばよい。本開示を制限するものではないが、間接的な連結手段として、リンカーを介した連結、RNA結合タンパク質 (L7Ae等) 等の核酸結合タンパク質、

SpyCatcher/SpyTagシステム等を介した連結が例示される。

[0035] また、ビオチンを介してB C C PとB P Lとが連結できる限りにおいて、有用成分は更に直接又は間接的にB C C Pに連結していてもよい。有用成分のB C C Pへの連結は、本分野において公知の連結手段に従い行えばよく、前述と同様に説明される。

[0036] 有用成分と連結したB P Lと、B C C Pとは、ビオチンを介して連結している。従来、B C C Pを基質とし、B P Lを触媒酵素としたビオチン化反応が知られている。例えば、古細菌のB C C P及びB P Lを用いたビオチン化反応、大腸菌のB C C P及びB P Lを用いたビオチン化反応等が知られている。この観点から、本開示の複合体では、好ましくは該ビオチン化反応機構を利用して、有用成分と連結したB P Lと、B C C Pとが、ビオチンを介して連結されている。B C C Pを基質とし、B P Lを触媒酵素としたビオチン化反応のモデル図を図1に示す。また、このことから、B C C P及びB P Lにおける前述のアミノ酸配列の改変は、該ビオチン化反応機構を利用できる範囲における改変が好ましく例示され、古細菌において知られているビオチン化反応機構を利用できる範囲における改変がより好ましく例示される。また、この限りにおいて制限されないが、該ビオチン化反応機構を利用できるかどうかは、後述の試験例1に従い決定できる。試験例1に示すように、ビオチン添加条件で作成した複合体（複合体を担持する細胞外小胞体）における有用成分の担持量（搭載量）が、ビオチン無添加とする以外は同条件で作成した複合体（複合体を担持する細胞外小胞体）における有用成分の担持量（搭載量）と比較して、多い場合は該ビオチン化反応機構を利用できると判断し、同じか少ない場合は該ビオチン化反応機構を利用できないと判断する。

[0037] 本開示の複合体においてB C C Pの分子数は制限されず、該複合体は1又は複数分子のB C C Pを含む。ここで、1又は複数の範囲として1以上、好ましくは2以上が例示され、原理的には上限は制限されない。本開示の複合体は、好ましくは2分子（個）以上のB C C Pを含有し、より好ましくは2

～100個、2～80個、2～50個、2～30個、2～20個、2～10個、2～8個、2～5個等が例示される。なお、前述の通り、BCCP 1分子の分子量は7000程度である。図2に示す通り、本開示の複合体において複数のBCCPが連なっていることが好ましく例示される。

[0038] BCCP同士は、直接又は間接的に連結されており、好ましくはリンカー等を介して間接的に連結されている。リンカーとして、GSリンカー、グリシン（G）のみからなるリンカー、セリン（S）のみからなるリンカー、EAAAKリンカー等が例示される。リンカー配列の長さは、本開示の効果が得られる限り制限されず、リンカー配列のアミノ酸残基数として好ましくは2～100個、より好ましくは3～50個、更に好ましくは4～40個等が例示される。GSリンカーとして、好ましくは $(G_4S)_n$ が例示され、 n として1～6の整数が例示され、好ましくは2～5、更に好ましくは3又は4等が例示される。EAAAKリンカーとして、 $(EAAAK)_n$ が例示され、 n として1～6の整数が例示され、好ましくは2～5、更に好ましくは3又は4等が例示される（EAAAKを配列番号3に示す）。リンカーは、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0039] 該複合体においては、図2に示す通り、ビオチンを介してBCCPとBPLとが連結しており、その含有比は制限されず、BCCPの分子数あたり、有用成分と直接又は間接的に連結したBPLの分子数として0.5以上、好ましくは0.8以上、より好ましくは1が例示される。BCCPの分子数あたりの、有用成分と連結したBPLの分子数は、有用成分と直接又は間接的に連結したBPLの分子数を、BCCPの分子数で除することにより決定する。より詳細には後述の試験例1の通り決定する。なお、該複合体において全てのBPLに有用成分が連結している必要はなく、また、全てのBCCPにBPLが連結している必要はない。図2の（E）は、SpyTag及びSpyCatcherを介して有用成分がBPLに間接的に連結した例示である。BPLとSpyTagとは、直接又は間接的に連結可能であり、好ましくはリンカー等を介して間接的に連結されている。リンカー等は前述と同様にして説明される。

[0040] SpyCatcher及びSpyTagを用いた例

第1結合部がSpyCatcherであり、第2結合部がSpyTagである場合についてより詳細に説明する。SpyCatcherとSpyTagとの共有結合（具体的にはイソペプチド結合）による特異的結合は、SpyCatcher/SpyTagシステムとして従来知られている。SpyCatcher/SpyTagシステムでは、分子量1.9（1.9 kDa）の14アミノ酸残基の短いペプチドであるSpyTagと、分子量12（12 kDa）の小さなタンパク質であるSpyCatcherとを結合させる技術であり、SpyTagとSpyCatcherは混合すると結合し、両者の間には自然にイソペプチド結合が形成される。この結合反応は、幅広いpH、温度、及びバッファー条件で再現性よく起こることが知られている。このため、後述の試験例に示す培地中でも、SpyTagとSpyCatcherとを共存させることにより、イソペプチド結合によりSpyTagとSpyCatcherとが特異的に結合できる。

[0041] この限りにおいて制限されないが、SpyTagをコードするアミノ酸配列として配列番号4で表されるアミノ酸配列が例示され、SpyCatcherをコードするアミノ酸配列として配列番号5で表されるアミノ酸配列が例示される。

[0042] SpyTagをコードするアミノ酸配列は、SpyTagとSpyCatcherとがイソペプチド結合により連結できる範囲において、前記アミノ酸配列に改変を有してもよい。

[0043] 該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号4で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上、99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が例示される。

[0044] また、該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。ここで、1又は複数個の範囲は、1～5個、1～4個、1～3個、1又は2個等が例示される。

[0045] SpyCatcherをコードするアミノ酸配列は、SpyTagとSpyCatcherとがイソペプチド結合により連結できる範囲において、前記アミノ酸配列に改変を有して

もよい。

[0046] 該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号5で表されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上、99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が例示される。

[0047] また、該改変として、本開示を制限するものではないが、配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。ここで、1又は複数個の範囲は、1～20個、1～15個、1～10個、1～8個、1～5個、1～4個、1～3個、1又は2個等が例示される。

[0048] これらの配列同一性は前述と同様に説明される。また、改変後のアミノ酸は、天然アミノ酸及び人工アミノ酸のいずれであってもよく、アミノ酸としては前述と同様に説明される。また、本開示を制限するものではないが、置換として保存的置換が好ましく例示され、保存的置換は前述と同様に説明される。

[0049] 本開示の複合体は、2分子以上のSpyTagを含んでいてもよく、SpyTagは、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。また、本開示の複合体は、2分子以上のSpyCatcherを含んでいてもよく、SpyCatcherは、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0050] 本開示の複合体は、SpyCatcherと直接又は間接的に連結した有用成分を含む。有用成分は前述と同様に説明される。有用成分は1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。本開示の複合体は連結させる有用成分に応じてタンパク質医薬、核酸医薬等として利用できる。

[0051] 有用成分のSpyCatcherへの連結は、本分野において公知の連結手段に従えばよい。本開示を制限するものではないが、間接的な連結手段として、リンカーを介した連結、RNA結合タンパク質（L7Ae等）等の核酸結合タンパク質等を介した連結、前述のビオチン化反応によるBCCPとBPLとの連結

を用いた連結等が例示される。

[0052] また、SpyCatcherとSpyTagとが連結できる限りにおいて、有用成分は更にSpyTagに連結していてもよい。有用成分のSpyTagへの連結は、本分野において公知の連結手段に従い行えばよく、前述と同様に説明される。

[0053] 有用成分と連結したSpyCatcherと、SpyTagとは、イソペプチド結合を介して連結している。SpyCatcher/SpyTagシステムを用いた連結のモデル図を図3に示す。SpyTag及びSpyCatcher/における前述のアミノ酸配列の改変は、該システムを利用できる範囲における改変である。該システムを利用できるかどうかは、後述の試験例の手順に準じて決定できる。SpyCatcherとSpyTagとをリン酸緩衝生理食塩水（PBS（137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.4））中、室温（30℃）で2時間共存させて得た複合体における有用成分の担持量（搭載量）が、SpyCatcherとSpyTagとを共存させない以外は同条件で作成した複合体における有用成分の担持量（搭載量）と比較して、多い場合は、該システムを利用できると判断し、同じか少ない場合は該システムを利用できないと判断する。

[0054] 本開示の複合体においてSpyTagの分子数は制限されず、該複合体は1又は複数分子のSpyTagを含む。ここで、1又は複数の範囲として1以上、好ましくは2以上が例示され、原理的には上限は制限されない。本開示の複合体は、好ましくは2分子（個）以上のSpyTagを含有し、より好ましくは2～100個、2～80個、2～50個、2～30個、2～20個、2～10個、2～8個、2～5個等が例示される。なお、前述の通り、SpyTag1分子の分子量は1900程度である。図3に示す通り、本開示の複合体において複数のSpyTagが連なっていることが好ましく例示される。

[0055] SpyTag同士は、直接又は間接的に連結されており、好ましくはリンカー等を介して間接的に連結されている。リンカー等は前述と同様にして説明される。リンカーは、1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせで使用してもよい。

[0056] 該複合体においては、図3に示す通り、SpyTagとSpyCatcherとがイソペプ

チド結合により連結しており、その含有比は制限されず、SpyTagの分子数あたり、有用成分と直接又は間接的に連結したSpyCatcherの分子数として0.5以上、好ましくは0.8以上、より好ましくは1が例示される。SpyTagの分子数あたりの、有用成分と連結したSpyCatcherの分子数は、有用成分と連結したSpyCatcherの分子数をSpyTagの分子数で除することにより決定する。より詳細には後述の試験例1に準じて決定する。該複合体において全てのSpyCatcherに有用成分が連結している必要はなく、また、全てのSpyTagにSpyCatcherが連結している必要はない。図3の(B)は、前記ビオチン化反応によるBCCPとBPLとの連結を介して有用成分が間接的にSpyCatcherに連結した例示である。SpyCatcherとBCCPとは、直接又は間接的に連結可能であり、好ましくはリンカー等を介して間接的に連結されている。リンカー等は前述と同様にして説明される。

[0057] 第1結合部及び第2結合部を含む本開示の複合体は、更に、細胞外小胞指向性タンパク質を含んでもよい。細胞外小胞指向性タンパク質は、細胞外小胞の内側に指向性を有するタンパク質、細胞外小胞の外側に指向性を有するタンパク質等のいずれであってもよい。細胞外小胞指向性タンパク質として、Gagタンパク質、Lamp2（リボソーム関連膜タンパク質2b）、ラクトアドヘリン、ExoSignal等が例示される。本開示を制限するものではないが、Gagタンパク質として、UniProtのアクセッション番号P03332において記載されているGagタンパク質をコードするアミノ酸配列が例示される。これらは1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。本開示の複合体は、細胞外小胞と連結させて使用される。このため、本開示の複合体は、細胞外小胞指向性タンパク質を含んでいることが好ましい。

[0058] 本開示を制限するものではないが、本開示の複合体が更に細胞外小胞指向性タンパク質を含む場合、細胞外小胞指向性タンパク質は、通常、第2結合部と直接又は間接的に連結される。また、第2結合部は、細胞外小胞指向性タンパク質のN末端側又はC末端側のいずれに連結していてもよいが、好ま

しくはC末端側に連結する。間接的に連結される場合、好ましくはFLAGタグ、リンカー等を介して連結される。リンカーとして、GSリンカー、グリシン（G）のみからなるリンカー、セリン（S）のみからなるリンカー等が例示される。GSリンカーとして、好ましくは $(G_4S)_n$ が例示され、 n として1～6の整数が例示され、好ましくは2～5、更に好ましくは3又は4等が例示される。これらは1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。該連結は、本分野において公知の遺伝子工学的手法等の手順に従えばよい。また、本開示を制限するものではないが、細胞外小胞指向性タンパク質と第2結合部との間を構成するアミノ酸残基数として（すなわち、図4を例に挙げて説明すると、細胞外小胞指向性タンパク質と最も近い第2結合部（第1BCCP又は第1SpyTag）と細胞外小胞指向性タンパク質との間のアミノ酸残基数として）、好ましくは0～80個、より好ましくは0～50個、更に好ましくは0～30等が例示される。

[0059] 該複合体が細胞外小胞指向性タンパク質を含む場合、該複合体中、細胞外小胞指向性タンパク質1分子あたり、第2結合部の分子数を好ましくは1～100程度、より好ましくは2～80程度、更に好ましくは3～50程度、3～30程度、3～20程度、3～10程度、3～8程度、3～5程度等を含むことが例示される。細胞外小胞指向性タンパク質を含む場合、細胞外小胞指向性タンパク質を介して該複合体を細胞外小胞に連結できることから、細胞外小胞指向性タンパク質1分子あたりの、第2結合部を2以上の分子数とすることにより、一層効率よく有用成分を細胞外小胞に連結させることができる。本開示を制限するものではないが、細胞外小胞指向性タンパク質1分子あたり、7分子の第2結合部が連結された本開示の複合体のモデル図を図4に示す。

[0060] なお、本開示において、細胞外小胞指向性タンパク質1分子あたりの第2結合部の分子数は、細胞外小胞指向性タンパク質を含む複合体中、第2結合部の分子数を細胞外小胞指向性タンパク質の分子数で除することにより決定される。後述の試験例1は、第2結合部としてBCCPを用いており、細胞

外小胞指向性タンパク質 1 分子あたり B C C P 5 分子を含む複合体を得た例示である。

[0061] 本開示の複合体は、細胞外小胞と連結させて使用するために使用される。該複合体の細胞外小胞への連結手段は、該連結が可能である限り制限されない。好ましくは、細胞外小胞指向性タンパク質を介して、複合体と細胞外小胞とが連結することが例示される。この観点から、該複合体は好ましくは細胞外小胞指向性タンパク質を含む。細胞外小胞指向性タンパク質と細胞外小胞との連結は、公知の遺伝子工学的手法等の手順に従い行えばよい。

[0062] 細胞外小胞は、細胞から分泌される小胞であり、脂質二重膜構造を有する。細胞外小胞は、産生機構の違いから、従来は、エクソソーム（直径50～150 nm）、マイクロベシクル（直径100～1000nm）、アポトーシス小胞（直径1000～5000nm）に分類されてきた。より最近では、その大きさに応じて、small EVs (sEVs)（直径50～200nm）、medium/large EVs (m/lEVs)（直径200～1000nm）に分類される。本開示において細胞外小胞はいずれであってもよく、好ましくはエクソソーム、マイクロベシクル等が例示される。

[0063] 本開示の複合体では、前述の通り、第2結合部に、有用成分を融合させた第1結合部を連結できる。このことから、例えば図4に示すように、細胞外小胞指向性タンパク質 1 分子あたり 2 分子以上の第2結合部を連結させることにより、第1結合部に融合させた有用成分を複合体に効率よく含有させることが可能になり、ひいては、一層効率よく有用成分を細胞外小胞へ送達することが可能となる。

[0064] 本開示の複合体によれば、有用成分を効率よく細胞外小胞に搭載できる。本開示の複合体を備えた細胞外小胞は、DDS等におけるキャリアとしても利用でき、疾患の診断、治療等における有用成分の送達に有用である。

[0065] 複合体の製造方法

本開示の複合体は、前記説明に従い、本分野において公知の手順に従い製造することができる。本開示を制限するものではないが、本開示の複合体は、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部と、第2結合部とを、該

第1結合部と該第2結合部とを介して結合させることにより製造できる。

[0066] 例えば、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部、及び第2結合部は、従来公知のタンパク質発現方法等に従い製造できる。本開示を制限するものではないが、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を発現可能なベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を得て、該形質転換体を培養して有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を発現させることにより、該第1結合部を得ることができる。また、第2結合部を発現可能なベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を得て、該形質転換体を培養して第2結合部を発現させることにより、該第2結合部を得ることができる。該第1結合部を発現可能なベクターと、該第2結合部を発現可能なベクターとは、同一の宿主細胞に導入されてもよく、別々の宿主細胞に導入されてもよい。同一の宿主細胞に導入される場合、1つの細胞において、該第1結合部及び第2結合部が発現される。別々の宿主細胞に導入される場合、各細胞において該第1結合部又は第2結合部が発現される。

[0067] 第2結合部を発現可能なベクターは、好ましくは2分子以上の第2結合部が連なって第2結合部が発現可能なように構築される。本開示を制限するものではないが、ベクター中、第2結合部コードする塩基配列と第2結合部コードする塩基配列との間には、好ましくはリンカー配列等をコードする塩基配列が連結されている。リンカー等は前述の通り説明される。

[0068] 有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を発現可能なベクターは、有用物質をコードする塩基配列と第1結合部をコードする塩基配列とが少なくとも組み込まれている。これらの塩基配列は、好ましくはリンカー配列等をコードする塩基配列等を介して連結される。リンカー等は前述の通り説明される。

[0069] 該第1結合部をコードする塩基配列と該第2結合部をコードする塩基配列とは、一つのベクターに共に組み込まれてもよく、別々のベクターに組み込まれていてもよい。

[0070] 本分野の従来公知の手順に従い、目的に応じた塩基配列を有するポリヌク

レオチドを構築し、これを発現ベクターに組み込むことにより、所望の発現ベクターが得られる。

[0071] 発現ベクターとして、遺伝子工学分野において一般的に使用されている発現ベクターが例示され、その由来として大腸菌等の細菌、酵母、ウイルス、哺乳類等が例示され、また、プラスミド、ファージ、コスミド等のいずれのベクターであってもよい。また、宿主細胞も制限されず、使用する発現ベクターの種類に応じて適宜決定すればよく、哺乳類由来の細胞が好ましく例示される。発現ベクターには、必要に応じて、プロモーターが接続されていてもよく、例えば宿主細胞に適したプロモーターを選択すればよい。このほか、発現ベクターには、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、薬剤耐性遺伝子、Green Fluorescent Protein (GFP) 等のマーカー遺伝子等の塩基配列が接続されていてもよい。これらは目的に応じて発現ベクターの任意の位置に接続等される。

[0072] 構築したベクターを宿主細胞に形質転換し、これにより得た形質転換体を培養することにより、前記第1結合部と前記第2結合部が得られる。前記第1結合部と前記第2結合部とが結合可能な条件下で、前記第1結合部と前記第2結合部とを共存させることにより、前記第1結合部と前記第2結合部との結合を介して、有用成分を間接的に第2結合部に連結できる。必要に応じて、このようにして得た培養物等において集菌し、菌体を破碎後、得られた上清等から複合体等を精製してもよい。精製の手順は、従来公知のタンパク質の精製手順等に従い行えばよい。また、複合体が得られる限り、任意の処理を更に行ってもよい。

[0073] 形質転換体を培養する培地としては、宿主細胞を培養できる限り制限されず、液体培地、固体培地のいずれであってもよい。効率良く培養等する観点から、液体培地が好ましく例示される。液体培地として各種培地が公知であり、LB培地 (Luria-Bertani medium) 等が例示される。

[0074] 本開示を制限するものではないが、前記第1結合部がBPLであり、前記第2結合部がBCCPであり、前記特異的な結合がビオチンを介した結合で

ある場合、前記第1結合部と前記第2結合部との結合反応時の溶液又は培地は、これらの特異的結合が可能である限り制限されないが、好ましい培地の例としてDMEM培地（ダルベッコ改変イーグル培地）、Opti-MEM（登録商標）培地（Thermo Fisher Scientific Inc）等の液体培地が挙げられ、該溶液又は培地中、37℃程度、2～24時間程度、第1結合部と第2結合部とを接触させることが例示される。また、該結合反応時の溶液又は培地中のビオチンの含有量は前記ビオチン化反応が生じる限り制限されないが、溶液又は培地中、ビオチンの含有量として好ましくは0.1～200nM程度が例示され、より好ましくは0.1～150nM程度、更に好ましくは0.1～100 nM程度が例示される。また、溶液又は培地には、本開示の効果を妨げない範囲において、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の抗生物質、FBS（ウシ胎児血清）等の血清、血清代替物、ガラクトース、ラクトース等の任意の成分を必要に応じて配合してもよい。

[0075] 本開示を制限するものではないが、前記第1結合部がSpyCatcherであり、前記第2結合部がSpyTagである場合、前記第1結合部と前記第2結合部との結合反応時の溶液又は培地は、これらの特異的結合（イソペプチド結合）が可能である限り制限されないが、好ましい例としてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、前記培地等が挙げられ、これらにおいて30～37℃程度、2～24時間程度接触させることが例示される。溶液又は培地には、本開示の効果を妨げない範囲において、抗生物質等の任意の成分を配合してもよい。

[0076] このようにして本開示の複合体を製造することができる。

[0077] 前述の通り、本開示の複合体は更に細胞外小胞指向性タンパク質を含んでもよい。細胞外小胞指向性タンパク質を含む場合、好ましくは、第2結合部に直接又は間接的に細胞外小胞指向性タンパク質が連結している。

[0078] 第2結合部への細胞外小胞指向性タンパク質の連結も、従来公知の手順に従い行えばよい。例えば、前記第2結合部を発現可能なベクター中、細胞外小胞指向性タンパク質をコードする塩基配列を、第2結合部をコードする塩基配列の5'末端側又は3'末端側のいずれかに直接又は間接的に連結させ

ればよく、好ましくは第2結合部をコードする塩基配列の5'末端側に直接又は間接的に連結させればよい。細胞外小胞指向性タンパク質をコードする塩基配列は、第2結合部をコードする塩基配列と直接又は間接的に連結しており、好ましくは前記タグ配列等を介して連結される。該ベクターを用いることにより、細胞外小胞指向性タンパク質が直接又は間接的に連結した第2結合部が得られる。該第2結合部と前記第1結合部との連結は前述と同様に行えばよい。

[0079] 本開示の複合体は、細胞外小胞と連結させて使用される。本開示を制限するものではないが、本開示の複合体を細胞外小胞に容易に担持させる観点から、本開示の複合体は好ましくは細胞外小胞指向性タンパク質を介して細胞外小胞に連結させる。

[0080] 本開示の複合体の細胞外小胞への連結は、これらが連結できる限り制限されず、本分野で従来公知の手順に従えばよい。細胞外小胞指向性タンパク質を介した本開示の複合体の細胞外小胞への連結手順として、例えば、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部と、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部とが連結した複合体を、細胞外小胞と混合して、細胞外小胞指向性タンパク質と細胞外小胞とを連結させることにより、本開示の複合体を細胞外小胞に担持させればよい。

[0081] また、例えば、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部を、細胞外小胞と混合して、細胞外小胞指向性タンパク質と細胞外小胞とを連結させる。このようにして得た細胞外小胞指向性タンパク質を介して細胞外小胞に結合した第2結合部と、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部とを混合し、前述の通り第2結合部と第1結合部とを結合させることにより、本開示の複合体が担持された細胞外小胞を得てもよい。これらの手順において、細胞外小胞指向性タンパク質と細胞外小胞とを混合して連結させる手順自体は公知であり、従来公知の手順に従い連結させればよく、例えばPBS中、4℃程度、2時間程度混合することが例示され、また、連結が可能な限り、任意の溶液、培地を用いてもよく、その温度、時間

も適宜設定すればよい。

[0082] また、例えば、細胞外小胞存在下で細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部を発現させることにより、細胞外小胞指向性タンパク質を介して細胞外小胞に結合した第2結合部を得て、該第2結合部と、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部とを混合し、前述の通り第2結合部と第1結合部とを結合させることにより、本開示の複合体が担持された細胞外小胞を得てもよい。この観点から、前記ベクターが導入される宿主細胞は、細胞外小胞を分泌可能な細胞であることが好ましく例示される。細胞外小胞を分泌可能な宿主細胞としては、HEK293細胞、樹状細胞、B16細胞等の各種がん細胞等が例示される。これらは1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0083] このようにして、細胞外小胞指向性タンパク質を介して第2結合部及び有用成分が連結した第1結合部が担持された細胞外小胞を製造することができる。

[0084] このことから、本開示は、前記複合体が連結された細胞外小胞を提供することを包含するといえる。また、このことから、本開示は、有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を発現可能なベクター及び細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部を発現可能なベクターからなる群より選択される少なくとも1種のベクターを含む、細胞外小胞を分泌する細胞を提供することを包含するといえる。該細胞は、好ましくは細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部を発現可能なベクターを含むことが例示される。

[0085] また、このことから、本開示は、次の工程(a1)及び(a2)を含む本開示の複合体の製造方法を提供することを包含するといえる。

(a1) 有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部と、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部とを混合する、

(a2) 前記第1結合部と前記第2結合部とを結合させて、該結合を介して、有用成分を間接的に細胞外小胞指向性タンパク質に連結させる。

[0086] また、このことから、本開示は、次の工程（b 1）及び（b 2）を含む、本開示の複合体を担持する細胞外小胞の製造方法を提供することを包含するといえる。

（b 1）有用成分と直接又は間接的に連結した第 1 結合部と、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第 2 結合部を担持した細胞外小胞とを混合する、

（b 2）前記第 1 結合部と前記第 2 結合部とを結合させて、該結合を介して、有用成分を間接的に細胞外小胞に連結させる。

[0087] 本開示によれば、細胞外小胞に有用成分を担持させることができる。特に、本開示によれば、複数の第 2 結合部を連結可能であることから、有用成分を効率よく連結できる。また、本開示によれば、細胞外小胞指向性タンパク質 1 分子に対して 2 分子以上の第 2 結合部を連結させることも可能であることから、細胞外小胞指向性タンパク質を介して、細胞外小胞に該複合体を容易に連結させることができ、ひいては、細胞外小胞に有用成分を効率よく担持させることができる。また、図 2～4 に示す通り、本開示によれば、二段階以上の多段階で有用成分を連結できることから、乗算的に有用成分を細胞外小胞に担持させることが可能である。

[0088] また、本開示の複合体によれば、腫瘍マクロファージ等の標的に有用成分を送達することができることが確認された。本開示の複合体、更には該複合体が連結された細胞外小胞は、DDS 等におけるキャリアとしても有用であり、疾患の診断、治療等における有用成分の送達に有用である。また、本開示の複合体は有用成分の送達に利用できることから、医療分野以外の様々な分野においても有用である。

実施例

[0089] 以下、例を示して本開示の実施形態をより具体的に説明するが、本開示の実施形態は下記の例に限定されるものではない。

[0090] 試験例 1

1－1．細胞外小胞に担持された複合体（実施例 1 及び 2）の作製

以下の手順に従い複合体を作製した。

・ 細胞培養

市販のマウスマクロファージ様細胞株RAW264.7 (Murine macrophage cell line、RAW264.7) をATCC (American Type Culture Collection) から購入し、10%FBS (fetal bovine serum) 含有RPMI 1640 (Nissui Co.Ltd.)を用いて37℃で培養した。市販のヒト胎児腎細胞株HEK293 (Human Embryonic Kidney 293、CRL-1573) をATCCから購入し、10%FBS含有Dulbecco's modified Eagle's medium (Nissui Co. Ltd.) を用いて37℃で培養した。マウス乳がん細胞株4T1 (Mouse breast cancer cell line 4T1) をATCCから購入し、10%FBS含有RPMI 1640を用いて、37℃、5%CO₂条件で培養した。

[0091] ・ ベクターの構築

次の手順に従い、図5に示すポリヌクレオチドを構築した。該ポリヌクレオチドの配列を配列番号6に示す。一般的なtwo-step PCR手順に従い、Gagタンパク質をコードする塩基配列（図5中、下線部分）の3'末端側に、リンカー配列を介して、FLAGタグをコードする塩基配列（図5中、点線部分）を連結させた。次いで、一般的なtwo-step PCR手順に従い、該FLAGをコードする塩基配列の3'末端側に、リンカー配列（(G₄S)₃リンカー）を介して、BCCPをコードする塩基配列（図5中、二重下線部分）を5繰り返し連結させた。BCCPをコードする塩基配列同士はそれぞれ(G₄S)₃リンカーを介して連結させた。これにより、5'末端から順にGagタンパク質、FLAG及びBCCP（5回）をコードする各塩基配列が連結したポリヌクレオチド（以下、Gag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチドと記載する場合がある）を得た。

[0092] 本試験例では、細胞外小胞指向性タンパク質の一例としてGagタンパク質を使用した。Gagタンパク質をコードする前記塩基配列は、Uniprotのアクセッション番号P03332に記載されるGagタンパク質をコードする配列であって、哺乳類細胞での発現最適化のために発明者らが設計したものである。FLAGタグをコードする塩基配列は、配列番号7で表されるアミノ酸配列 (DYKDDDDK) をコードする。BCCPをコードする塩基配列は、配列番号1で表されるアミノ

酸配列をコードする。

- [0093] 別途、次の手順に従い、図6に示すポリヌクレオチドを構築した。該ポリヌクレオチドの配列を配列番号8に示す。一般的なtwo-step PCR手順に従い、gLucタンパク質を（Gaussia Luciferase）コードする塩基配列（図6中、下線部分）の3'末端側に、リンカー配列を介して、BPLをコードする塩基配列（図6中、二重下線部分）を連結させた。gLucタンパク質は、BPLに連結させる有用成分のモデルとして使用した。これにより、5'末端から順にgLucタンパク質及びBPLをコードする各塩基配列が連結したポリヌクレオチド（以下、gLuc-BPLポリヌクレオチドと記載する場合がある）を得た。BPLをコードする塩基配列は、配列番号2で表されるアミノ酸をコードする。
- [0094] 次いで、従来公知の組換え手順に従い、pcDNA3.1ベクター（Thermo Fisher Scientific, Inc.）のマルチクローニングサイトにGag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチドを挿入することにより、pCMV構築物1-1を得た。別途、pcDNA3.1ベクターのマルチクローニングサイトにgLuc-BPLポリヌクレオチドを挿入することにより、pCMV構築物1-2を得た。
- [0095] 得られたpCMV構築物1-1及びpCMV構築物1-2を、細胞外小胞（EV）産生細胞であるHEK293細胞に任意の比率にて遺伝子導入後、公知の発現、回収等の手順に従って、24時間又は48時間培養後、ビオチン存在下で更に24時間培養し、得られた培養上清から、遠心法によりEVを回収した。
- [0096] 具体的には、構築物1-1及び構築物1-2をEK293細胞に導入後24時間又は48時間培養し、次いで、培地をOpti-MEM（登録商標）培地（Thermo Fisher Scientific Inc.、0.4 μ M biotinを含有）に交換することによりビオチン存在と接触させながら更に24時間培養した。次いで、得られた各培養物を遠心し（300g、10分、2000g、20分、いずれも4℃）、更に培養上清を遠心し（10000g、30分、4℃）、沈殿画分と上清画分とに分け、該沈殿画分から細胞外小胞（medium/large EV、以下MV）を回収した。このようにして得た細胞外小胞と連結した複合体を複合体1（実施例1）とした。なお、複合体1（実施例1）のうち、前記24時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た

複合体を複合体 1-1（実施例 1-1）とし、前記48時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た複合体を複合体 1-2（実施例 1-2）とした。

[0097] また、前記上清画分を、孔径0.2 μ mのシリンジフィルターに通し、超遠心（100000g、1時間、4℃）を行うことにより得た沈殿画分から細胞外小胞（small EVs、以下sEV）を回収した。このようにして得た細胞外小胞と連結した複合体を複合体 2（実施例 2）とした。なお、複合体 2（実施例 2）のうち、前記24時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た複合体を複合体 2-1（実施例 2-1）とし、前記48時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た複合体を複合体 2-2（実施例 2-2）とした。

[0098] 参考例として、Gag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチド及びgLuc-BPLポリヌクレオチドに代えて、Gagタンパク質をコードする塩基配列とgLucタンパク質をコードする塩基配列とをFLAGタグをコードする塩基配列を介して連結させたポリヌクレオチド（以下、Gag-gLucポリヌクレオチドと記載する場合がある）を用いた以外は前述と同様にして、該ポリヌクレオチドをベクターに挿入し、参考構築物 1 を得た。前述と同様にして、参考構築物 1 をHEK293細胞に導入後、培養、遠心分離により沈殿画分と上清画分とに分け、沈殿画分及び上清画分のそれぞれから同様にして細胞外小胞（medium/large EVs、small EVs）を回収した。このようにして得た細胞外小胞と連結した複合体をそれぞれ参考複合体 1（参考例 1）、参考複合体 2（参考例 2）とした。

[0099] また、参考複合体 1（参考例 1）のうち、前記24時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た複合体を参考複合体 1-1（参考例 1-1）とし、前記48時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た複合体を参考複合体 1-2（参考例 1-2）とした。また、参考複合体 2（参考例 2）のうち、前記24時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た複合体を参考例 2-1とし、前記48時間培養後にOpti-MEM培地（ビオチン含有）に変更して得た複合体を参考例 2-2とした。

[0100] 図7は、試験例1（実施例1及び2）で用いたBCCP-BPL ビオチン化反応を利用した細胞外小胞への有用成分搭載例のモデル図である。前述のようにして得た各複合体（表1）において、細胞外小胞におけるgLucの発現量（担持量）を測定、算出した。

[0101] [表1]

実施例1 MV(沈殿画分由来)		実施例2 sEV(上清画分由来)		参考例1 MV(沈殿画分由来)		参考例2 sEV(上清画分由来)	
実施例 1-1	実施例 1-2	実施例 2-1	実施例 2-2	参考例 1-1	参考例 1-2	参考例 2-1	参考例 2-2
24hr 培養後 ビオチンと 接触	48hr 培養後 ビオチンと 接触	24hr 培養後 ビオチンと 接触	48hr 培養後 ビオチンと 接触	24hr 培養後 ビオチンと 接触	48hr 培養後 ビオチンと 接触	24hr 培養後 ビオチンと 接触	48hr 培養後 ビオチンと 接触

[0102] gLucの発現量の測定、算出について、具体的には、実施例1-1を例に挙げて説明すると、該当ベクターを遺伝子導入した細胞の培養上清中に含まれるMVを段階遠心法にて回収しPBSにて懸濁した後、ピッカジーンデュアルキット（東洋インキ、東洋ビーネット株式会社ピッカジーン（登録商標））を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。すなわち、キットの取扱説明書に従い、キット付属の溶解液にてMV膜を溶解した後、ルシフェラーゼ活性測定試薬を混合し、発光量をルミノメーターで計測した。実施例1-1以外の実施例、参考例についても同様にして測定、算出した。

[0103] 1-2. 結果

結果を図8に示す。図8に示す通り、実施例1-1及び実施例1-2の複合体（細胞外小胞MV（medium/large EV）に担持）のいずれにおいても、有用成分を細胞外小胞に効率よく担持できたことが分かった。特に、実施例1-2では、参考例1-2の約6倍量のgLucを検出することができたことから、非常に効率よく有用成分が細胞外小胞に担持されることが分かった。

[0104] また、図8には示していないが、実施例2-1及び実施例2-2の複合体（細胞小胞体sEV（small EVs）に担持）においても、有用成分が良好に細胞外小胞に担持されていることが確認できた。このことから、BCCP-BPL連結システムを用いた実施例1及び2の複合体は、有用成分を細胞外小胞に担持さ

せる手段として有用であることが分かった。

[0105] なお、本試験例において、1分子あたりBCCPの分子量は7K、BPLの分子量は27Kであり、細胞外小胞指向性タンパク質1分子あたりのBCCPの分子数は5であった。また、BCCP1分子あたりのBPLの分子数は1であった。

[0106] これらのことから、BCCPと有用成分と連結したBPLとがビオチンを介して連結された複合体を用いることにより、細胞外小胞に有用成分を効率よく担持できることが確認された。

[0107] 試験例2

2-1. 細胞外小胞に担持された複合体（実施例3～14）の作製

培養時のビオチンの接触濃度を変更する以外は試験例1と同様にして、細胞外小胞に担持された複合体を作製した。

[0108] 具体的には、試験例1と同様にして構築物をEK293細胞に導入後、24時間培養し、培地をDMEM培地（ダルベッコ改変イーグル培地、Nissui Co. Ltd.）に交換後、更に24時間培養した。次いで、ビオチン含有培地又はビオチン非含有培地に交換後、更に24時間培養した。次いで、得られた培養液を前述の通り遠心法で処理することにより、各種複合体を得た。なお、ビオチン含有培地として、Opti-MEM培地、FBS含有DMEM培地（培地中のビオチン含有量0.2 nM程度（表9中、DMEM+biotin（ビオチン存在、約0.2nM））又は培地中のビオチン含有量0.2 nM+100nM（表9中、DMEM+biotin（ビオチン存在、約0.2nM+100nM）））を使用した。FBSにはビオチンが含まれており、FBS含有DMEM培地中のビオチン含有量は、FBSの添加量とビオチン溶液の添加量とを調整して前記含有量とした。ビオチン非含有培地としてDMEM培地を使用した。

[0109] また、試験例1において、pCMV構築物1-1及びpCMV構築物1-2の導入比率を変更した以外は、前述と同様にして複合体を得た。なお、試験例1では、CMV構築物1-1及びpCMV構築物1-2の導入比率（プラスミドDNAの質量比）は1:1であり、本試験では、分子量比1:1、1:2、2:1で行った。また、本試験は、これらの構築物を細胞に導入後、24時間培養し、培地をDMEM培地に交換後24時間更に培養し、次いでFBS含有DMEM培地（培地中のビオチン濃度0.2nM程度）を

用いた条件において行った。

[0110] 2-2. 結果

結果を図9及び10に示す。図9は、構築物1-1及び構築物1-2を細胞に導入後48時間培養後にビオチンと接触させた沈殿画分由来のMVの結果（実施例3～5、比較例1）と、構築物1-1及び構築物1-2に代えてGag-gLucポリヌクレオチドを用いてビオチンと接触（使用培地はFBS含有DMEM培地）させた沈殿画分由来のMVの結果（参考例3）を示す。図9に示す通り、ビオチン無添加条件（比較例1）では有用成分がほとんど細胞外小胞に担持されず、一方で、ビオチン添加条件（実施例3～5）では有用成分が細胞外小胞に担持された。このことから、ビオチンを介したBCCP-BPL連結システムが機能していることが確認できた。

[0111] また、図9はMVの結果であるが、上清画分由来のsEVについても同様に測定、算出を行ったところ、ビオチン無添加条件（比較例2）では有用成分がほとんど細胞外小胞に担持されず、一方で、ビオチン添加条件（実施例6～8）では有用成分が細胞外小胞に担持された。このことから、ビオチンを介したBCCP-BPL連結システムが機能していることが確認できた。

[0112] また、図10に示す通り、BCCPとBPLとの比を変更した場合も、有用成分を細胞外小胞に効率よく担持できることが確認された。

[0113] 試験例3

3-1. 細胞外小胞に担持された複合体の作製

有用成分としてgLucタンパク質に代えてPKA阻害ペプチド（PKA inhibitor peptides、PKI）を用いた以外は、試験例1と同様の手順で細胞外小胞と連結した複合体を製造した。具体的には、MYCタグをコードする塩基配列の3'末端側にPKIをコードする塩基配列を5繰り返しして連結させ、更にその3'末端側にBPLをコードする塩基配列連結させた。PKIをコードする塩基配列同士はそれぞれ(G₄S)₃リンカーを介して連結させた。また、MYCタグをコードする塩基配列とPKIをコードする塩基配列、PKIをコードする塩基配列とBPLをコードする塩基配列もリンカーを介してそれぞれ連結させた。これにより、5'末端

から順にMYCタグ、PKI（5回）及びBPLの各塩基配列が連結したポリヌクレオチド（以下、Myc tag-5PKI-BPLポリヌクレオチドと記載する場合がある）を得た。本試験例で用いたMYCタグをコードする塩基配列は、配列番号9で表されるアミノ酸配列（EQKLISEEDL）をコードする。本試験例で用いたPKIをコードする塩基配列は、配列番号10で表されるアミノ酸配列（TYADFIASGRTGRRNAI）をコードする。Gag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチドは試験例1と同様にし得た。

[0114] 次いで、試験例1と同様にして、pcDNA3.1ベクターのマルチクローニングサイトにGag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチドを挿入することにより、pCMV構築物2-1を得た。同様にして、pcDNA3.1ベクターのマルチクローニングサイトにMyc tag-5PKI-BPLポリヌクレオチドを挿入することにより、pCMV構築物2-2を得た。

[0115] 得られたpCMV構築物2-1及びpCMV構築物2-2を用いて、図11に示すように試験例1と同様の手順で、遺伝子導入後48時間培養し、FBS含有DMEM培地又はOpti-MEM培地に培地を交換後、更に24時間培養し、沈殿画分から細胞外小胞MVを回収した。次いで、本分野で公知の手順に従い、ウエスタンブロッティングにて、有用成分であるPKA阻害ペプチドが、細胞外小胞MVに搭載されているかどうかを確認した。該検出には抗myc抗体及び抗ウサギIgG抗体を用いた。

[0116] 3-2. 結果

有用成分としてPKIを用いた以外は試験例1と同様にして複合体を製造した本試験例においても細胞外小胞においてPKIとGagとが共存していることが確認された。このことから、有用成分としてgLucタンパク質に代えてPKA阻害ペプチドであるPKIを用いた場合であっても細胞外小胞に有用成分を担持できることが確認された。

[0117] 従来、腫瘍微小環境に存在する腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage：TAM）ががんの進行に関与し、がんに対する免疫機構を阻害する機能を有することが知られている。そこで、本試験例では、前記複合体を用いることによってTAMの機能を阻害できるかどうかについて検討した。具体

的には、TAMによる免疫阻害作用にはPKAが関与していることが知られており、PKAの亢進が、TAMによる免疫阻害作用の一因であることが知られている。そこで、前記複合体（Opti-MEM培地使用、実施例15）を利用してPKA阻害剤として知られているPKIを有効成分として担持させた細胞小胞体をTAM様マクロファージに作用させた。

[0118] 結果を図12～14に示す。具体的には、マクロファージにがん細胞の培養上清を添加することでTAM様に分化させたのち、細胞小胞体等の各種試料を添加し、TAMのマーカ分子のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRにて測定した結果を図12に示す。同様の操作を行い、TAMとは逆のマクロファージのフェノタイプであるM1マクロファージへの分化の程度を、M1のマーカ分子のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRにて測定した結果を図13に示す。また、PKIによってPKAの経路の活性化が実際に阻害されているかどうかについてウェスタンブロッティングを用いて確認した結果を図14に示す。図中、Mφは、コントロール（試料添加なし）のマクロファージ示す。

[0119] 図12及び13に示す通り、前述の通り複合体（実施例15）を利用して作製した細胞小胞体を用いてPKIを作用させた場合（両図中、TAM+PKI-MV（1, 10, 30, 50 μg/mL））、M2マーカ値が低減し、M1マーカ値が上昇した。これは、マクロファージのM2型（免疫抑制型）の発現が低減し、M1型（免疫活性化型）の発現が上昇したことを意味し、すなわち、マクロファージの免疫阻害機能を低減できたことを意味する。このことから、前記複合体を細胞外小胞と組み合わせて用いることにより、標的対象であるマクロファージ、更にはがん細胞等に有用成分を効率よく送達できることが理解できた。

[0120] また、図14に示す通り、該細胞小胞体を用いてPKIを作用させた場合（図中、PKI-MVs）、CREBのリン酸化の割合が減少した。このことから、PKAの阻害ペプチドを担持させた細胞外小胞をTAMに添加することにより、想定されたシグナル経路が変化していることが確認された。このことから、前記複合体を細胞外小胞と組み合わせて用いることにより、標的対象であるマクロファージ等に有用成分を効率よく送達できることが確認できた。

[0121] これらのことから、本開示の複合体によれば、細胞外小胞と組み合わせて用いることにより、標的対象に有用成分を効果的に送達できることが確認できた。

[0122] 試験例 4

4-1. 細胞外小胞に担持された複合体（実施例 16）の作製

有用成分としてgLucタンパク質に代えてSTAT3阻害タンパク質（STAT3 inhibitor protein、STAT3i）を用いた以外は、試験例 3 と同様にして細胞外小胞に担持された複合体を製造した。具体的には、MYCタグをコードする塩基配列の3'末端側にSTAT3iをコードする塩基配列を5繰り返しして連結させ、更にその3'末端側にBPLをコードする塩基配列連結させた。STAT3iをコードする塩基配列同士はそれぞれ(G₄S)₃リンカーを介して連結させた。また、MYCタグをコードする塩基配列とSTAT3iをコードする塩基配列、STAT3iをコードする塩基配列とBPLをコードする塩基配列も、リンカーを介してそれぞれ連結させた。これにより、5'末端から順にMYCタグ、STAT3i（5回）及びBPLの各塩基配列が連結したポリヌクレオチド（以下、Myc tag-5STAT3i-BPLポリヌクレオチドと記載する場合がある）を得た。STAT3について、本試験例で使用した塩基配列は、配列番号 11 で表されるアミノ酸配列（VRHSALHMAVGPLSWPARVS）をコードする。Gag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチドは試験例 3 と同様にして得た。

[0123] 次に、試験例 3 と同様にして、pcDNA3.1ベクターのマルチクローニングサイトにGag-FLAG-5BCCPポリヌクレオチドを挿入することにより、pCMV構築物3-1を得た。同様にして、pcDNA3.1ベクターのマルチクローニングサイトにMyc tag-5STAT3i-BPLポリヌクレオチドを挿入することにより、pCMV構築物3-2を得た。

[0124] 試験例1と同様の手順で、遺伝子導入後48時間培養し、FBS含有DMEM培地に培地を交換後、更に24時間培養し、沈殿画分からMVを回収した。この際、pCMV構築物3-1及びpCMV構築物3-2の混合比（プラスミドDNAの質量比）は、1:1又は1:2とした。このようにビオチン化反応を利用して有効成分STAT3iを担持さ

せた細胞外小胞を実施例 16（混合比1:1）、実施例 17（混合比1:2）とした。次いで、試験例 3と同様に、ウエスタンブロッティング、リアルタイムRT-PCRにて、有用成分であるSTAT3阻害タンパク質が、細胞外小胞MVに搭載されているかどうかを確認し、また、免疫阻害機能について確認した。

[0125] 4－2．結果

その結果、試験例 3と同様に、実施例 16及び17のいずれにおいても、有用成分STAT3iを細胞外小胞に効率よく担持できたことが確認された。

[0126] また、試験例 3と同様に、実施例 16の細胞外小胞を用いてSTAT3iを作用させた場合（TAM+rS3-MV（10、50 μ g/mL））も、M2マーカー値が低減し、M1マーカー値が上昇した。実施例 17の細胞外小胞を用いた場合も同様の傾向が認められた。このことから、本試験例においても、マクロファージのM2型の発現が低減し、M1型の発現が上昇し、マクロファージの免疫阻害機能を低減できたことが理解できた。また、STAT3阻害タンパク質を担持させた細胞外小胞をTAMに添加することにより、想定されたシグナル経路が変化していることが確認された。

[0127] このことから、本開示の複合体によれば、細胞外小胞と組み合わせて用いることにより、標的対象であるマクロファージ、更にはがん細胞等に有用成分を効率よく送達できることが確認できた。

[0128] 更に、これらのことから、本開示の複合体によれば、複数のBCCPを連結して使用可能であることから、有用成分を効率よくBCCPに連結できることが確認できた。また、細胞外小胞指向性タンパク質 1分子に対して2分子以上のBCCPを連結できたことから、BCCPを介して、細胞外小胞に有用成分を効率よく担持できることが分かった。このことから、標的対象に有用成分を効率よく送達できることが確認できた。

[0129] 試験例 5

5－1．試験手順

マウスの腫瘍組織内に、試験例 3で作製した細胞外小胞（以下、PKI-MVsと記載する）又は試験例 4で作製した実施例 16の細胞外小胞（以下、STAT3i-

MVsと記載する)を投与後、腫瘍内マクロファージのM2型からM1型への変化と、腫瘍組織内T細胞数と活性化状態を評価した。また、試験例3で作製した細胞外小胞(PKI-MVs)を担がんマウスの腫瘍組織内に投与するとともに、従来の免疫チェックポイント療法(抗PD-1抗体投与)との併用等について試験を行った。

[0130] 具体的には、4T1細胞を皮内に移植することで作製した担がんマウスに対して、腫瘍組織内に前記各細胞外小胞(PKI-MVs、STAT3i-MVs)を投与した後、腫瘍組織を回収し凍結切片を作製し免疫染色にて腫瘍組織内のマクロファージの分化状態と、T細胞数とその活性化状態を評価した(後述の図15)。別途、同様に作製した担がんマウスに対して、前述の各細胞外小胞を腫瘍組織内に投与するとともに、抗PD-1抗体を腹腔内投与し、経時的に腫瘍体積を計測することで腫瘍増殖抑制効果を評価した(後述の図16)。

[0131] 5-2. 結果

結果を図15及び16に示す。図15中、腫瘍内マクロファージのM2型からM1型への変化(a)と、腫瘍組織内T細胞数と活性化状態(b)を示す。(a)において、PBSのみを投与した群ではM1型の発現よりもM2型の発現が高かったのに対して、試験例3のPKI-MVs、試験例4のSTAT3i-MVsのいずれかを投与した場合は、M2型の発現が低減し、M1型の発現が増加した。また、(b)の結果から、試験例3のPKI-MVs又は試験例4のSTAT3i-MVsを投与した場合に、T細胞数の増大が観察された。これらのことから、*in vivo*においても、有用成分と連結したBPLとBCCPとがビオチンを介して連結された複合体を細胞外小胞と組み合わせて用いることにより、有用成分を効率よく送達できることが理解できた。

[0132] また、図16に示す通り、試験例3のPKI-MVsを投与することにより、マウスの腫瘍サイズが減少した。また、腫瘍治療法の一つとして知られている抗PD-1抗体投与と試験例3のPKI-MVsを併用したところ、それぞれ単独で投与した場合よりも更に腫瘍サイズが減少した。これらのことから、本開示の複合体は有効成分の送達に有用であることが理解できた。

[0133] 前記試験例は、第1結合部としてBPLを、第2結合部としてBCCPを用いた例示であるが、BPLとBCCPとの特異的結合の原理を用いることにより前記試験例の複合体において、有用成分を細胞外小胞に良好に担持でき、また、有用成分を標的に好ましく送達できた。このことから、BPLとBCCPとの組み合わせに代えて、BPLとBCCPと同様に特異的結合を利用するSpyCatcher/SpyTagシステム等の手段を用いた場合であっても、有用成分を細胞外小胞に良好に担持でき、また、有用成分を標的に好ましく送達できることが確認できた。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の構成を備える、細胞外小胞と連結させて使用するための複合体：
- (1) 有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を含む、
 - (2) 該第1結合部と特異的に結合する第2結合部を含む、
 - (3) 該第1結合部と該第2結合部とが結合されている。
- [請求項2] 前記第1結合部、前記第2結合部及び前記特異的な結合が以下の(i)又は(ii)である、請求項1に記載の複合体：
- (i) 前記第1結合部がビオチンタンパク質リガーゼであり、前記第2結合部がビオチンカルボキシルキリヤタンパク質であり、前記特異的な結合がビオチンを介した結合である、
 - (ii) 前記第1結合部がSpyCatcherであり、前記第2結合部がSpyTagであり、前記特異的な結合がイソペプチド結合である。
- [請求項3] 有用成分が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸及び核酸からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1に記載の複合体。
- [請求項4] 更に、細胞外小胞指向性タンパク質を含み、細胞外小胞指向性タンパク質と前記第2結合部とが直接又は間接的に連結されている、請求項1に記載の複合体。
- [請求項5] 前記細胞外小胞指向性タンパク質1分子あたり、前記第2結合部を2分子以上含有する、請求項4に記載の複合体。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1項に記載する複合体が連結された細胞外小胞。
- [請求項7] 有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部を発現可能なベクター及び第2結合部を発現可能なベクターからなる群より選択される少なくとも1種を含む、細胞外小胞を分泌する細胞。
- [請求項8] 前記第2結合部を発現可能なベクターが、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結されている第2結合部を発現可能なベクターである、請求項7に記載の細胞外小胞を分泌する細胞。

[請求項9] 次の工程（a 1）及び（a 2）を含む、請求項4に記載する複合体の製造方法：

（a 1）有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部と、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部とを混合する、

（a 2）前記第1結合部と前記第2結合部とを結合させて、該結合を介して、有用成分を間接的に細胞外小胞指向性タンパク質に連結させる。

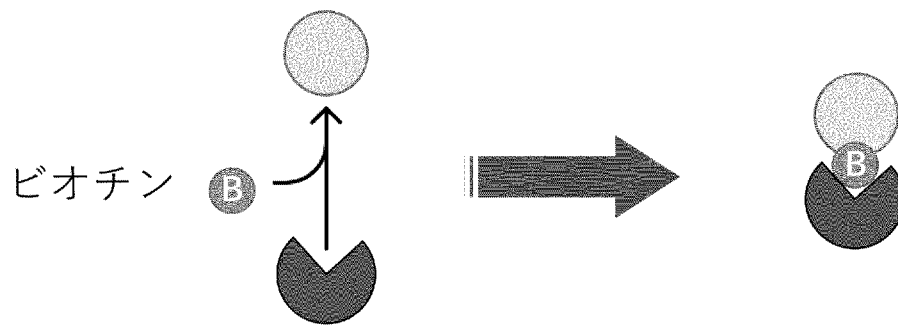
[請求項10] 次の工程（b 1）及び（b 2）を含む、請求項1に記載する複合体を担持する細胞外小胞の製造方法：

（b 1）有用成分と直接又は間接的に連結した第1結合部と、細胞外小胞指向性タンパク質と直接又は間接的に連結した第2結合部を担持した細胞外小胞とを混合する、

（b 2）前記第1結合部と前記第2結合部とを結合させて、該結合を介して、有用成分を間接的に細胞外小胞に連結させる。

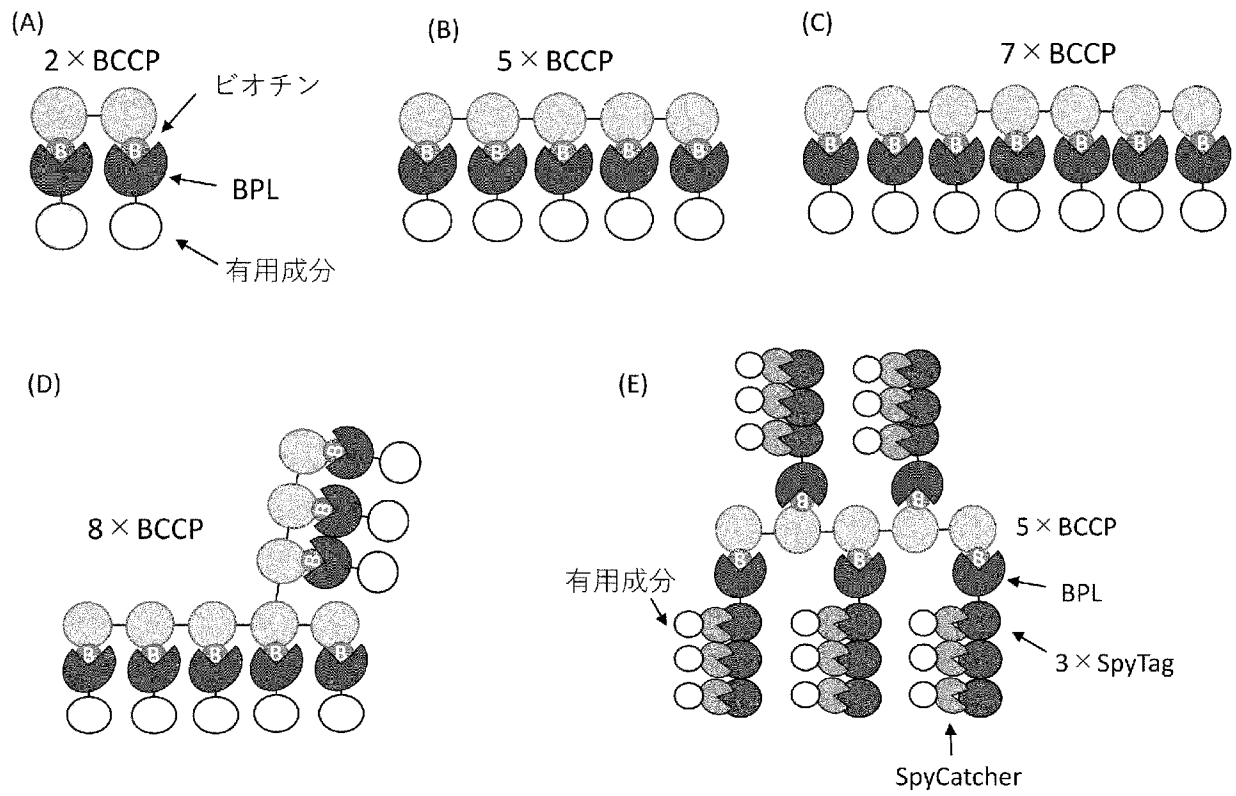
[図1]

BCCP (ビオチンカルボキシリキャリアタンパク質)

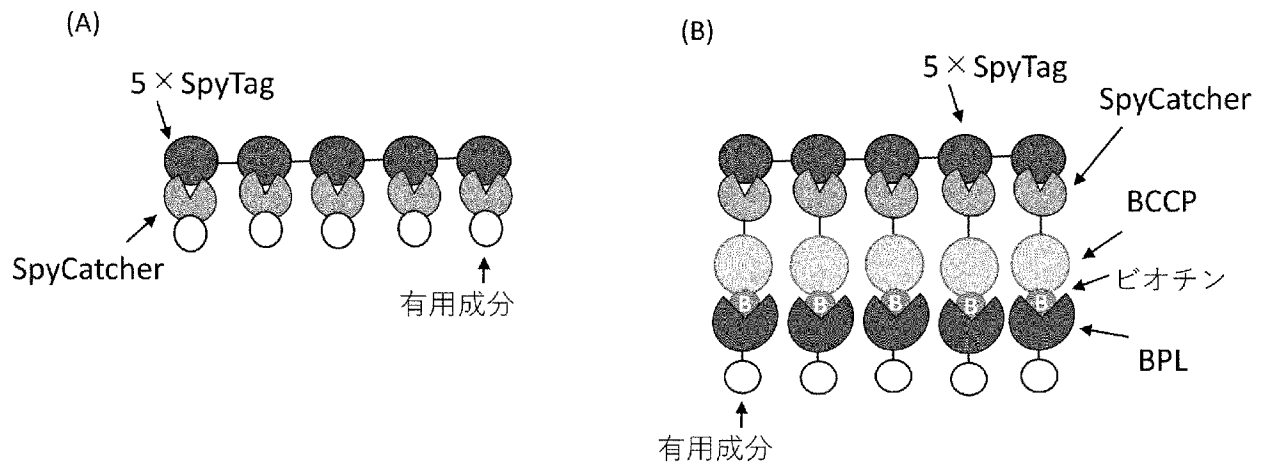


BPL (ビオチンタンパク質リガーゼ)

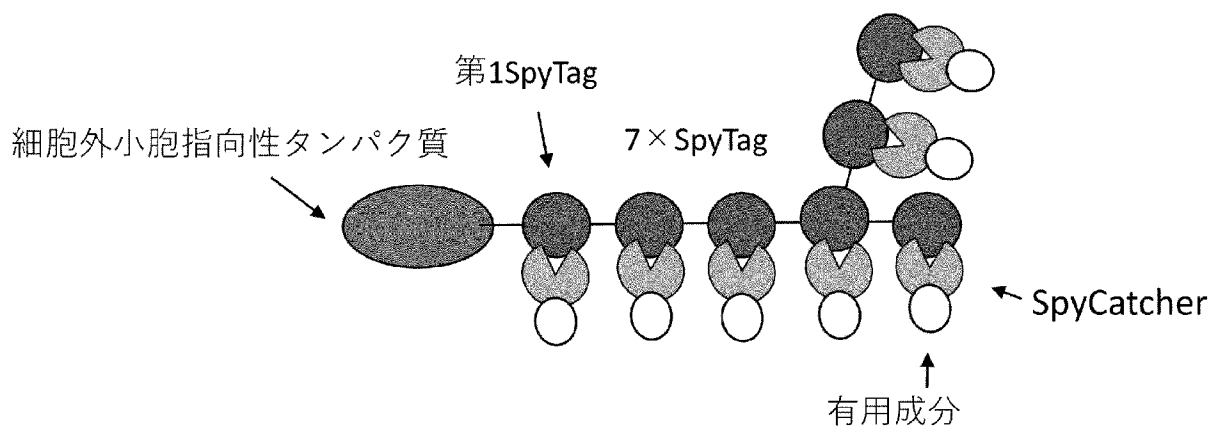
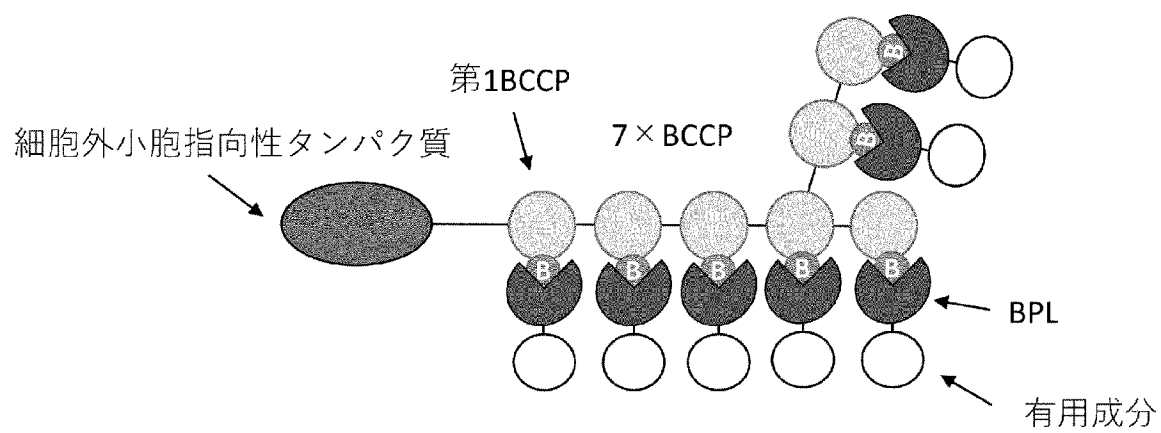
[図2]



[図3]



[図4]



[図5]

Gag-FLAG-5BCCP ポリヌクレオチド

ATGGGACAGACCGTCACAACACCCCTGAGCCTGACCCTGGGACATTGGAAAAGACGTGGAGAGGATCGCACATAA
CCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGGGTACATTCTGCAGTGCTGAGTGGCCAACTTTTAATGTGGGAT
GGCCCCGAGACGGCACTTTCAACAGGGATCTGATACCCAGGTGAAGATCAAGGTCTTTAGCCCAGGACCTCAC
GGACATCCAGACCAGGTGCCTTATATCGTCACCTGGGAGGCACTGGCCTTCGATCCCCCTCCATGGGTGAAGCC
ATTTGTCCACCCAAAACACCTCCACCACTGCCTCCAAGTGCCCTTCACTGCCACTGGAACCACCCCGGAGCA
CACCACCCCGCAGCTCCCTGTATCCTGCTCTGACTCCATCTCTGGGCGCAAAGCCAAAACACAGGTGCTGAGC
GACTCCGGAGGACCACTGATTGACCTGCTGACAGAGGACCCCCACCATACCGAGATCCTCGGCCTCCACCAAG
CGACCGCGATGGAAATGGAGGAGAGGCTACTCCTGCCGGCGAAGCCCCCTGACCCATCTCCAATGGCTAGTAGG
CTGCGCGGCAGGCGCGAGCCTCCAGTGGCAGATAGCACCATCCAGGCCTTCCCTCTGAGGGCTGGGGGAA
ATGGGCAGCTCCAGTATTGGCCATTTTCTAGTTCAGACCTGTACAACTGGAAGACAATAACCCCTCTTTCACTGA
GGACCCCGGCAAACCTGACCGCCCTGATCGAATCCGTGCTGATTACCCATCAGCCACATGGGACGATTGTCAGC
AGCTCCTGGGCACCCTGCTGACCGGAGAGGAAAAGCAGCGCGTGCTGCTGGAGGCTCGAAAGCAGTCCGAG
GGGACGATGGACGGCCACACAGCTCCCTAATGAGGTGGACGCCGCTTTTCCACTGGAAGACCCGACTGGGA
TTATACTACCCAGGCAGGGAGAAACCACTGGTCCATTACAGGCAGCTCCTGCTGGCAGGCCTGCAGAATGCCG
GGAGATCCCCACCAACCTGGCCAAGGTGAAAGGCATCACACAGGGGCCTAATGAGTCACCAAGCGCCTTTCTG
GAGAGGCTGAAGGAAGCTTACCGACGGTATACCCCATACGACCCTGAGGACCCCGACAGGAAACAAACGTCTC
CATGTCTTTCATCTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGCGGAAGCTGGAGAGACTGGAAGACCTGAAGAACAAGA
CCCTGGGCGACCTGGTGCGGGAGGCTGAAAAGATTTTCAACAAACGGGAGACACCCGAGGAAAGAGAGGAAAG
GATTAGAAGGGAACTGAGGAAAAGGAGGAACGCCGACGGACCGAGGACGAACAGAAGGAGAAAGAACGAGAT
CGGCGGCGGCACCGGGAGATGTCAAAGCTGCTGGCCACCGTGGTCAGCGGACAGAAACAGGACAGACAGGGA
GGAGAGCGACGGAGAAGCCAGCTCGACAGGGATCAGTGCGCATACTGTAAGGAAAAAGGCCATTGGGCCAAGG
ATTGCCCAAAAAGCCAAGAGGACCAAGAGGACCAAGACCACAGACATCACTGCTGACCCTGGACGACGGTGG
CGATTATAAGGACGACGATGACAAAGGGGGAGGTGGCTCAGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGGGGTTCCGG
AGAAATACTTAGCCCCATGCAGGGAAGGATTGTCCAAATTCGAGTTAAGGAAGGCGACGCGGTCAATAAAGGCC
AACCGCTTCTGAGCATCGAAGCGATGAAAAGCGAGACGGTCATTTCTGCTCCAGTAGGAGGTGTCGTACAGAAA
ATTATGGTCAAACCTGGCCAGGGCGTAAAGAAGGGCGATCTCCTGCTCATTATTAAGGGTGGAGGAGGTCTGG
TGGGGGTGGTTCCGGCGGGGGTGGGTCCGGAGAGATTCTGTACCGATGCAGGGTAGAATCGTCCAGATCCGC
GTAAAGGAAGGAGACGCTGTCAACAAAGGTCAACCTTGTCTTCAATAGAGGCAATGAAAAGCGAGACAGTTATT
AGCGCTCCTGTTGGCGGAGTCGTTAGAAAATAATGGTCAAGCCGGGCCAAGGAGTCAAAAAAGGAGACCTGCT
CCTTATTATAAAGGGGGGTGGTGGCAGCGGAGGCGGTGGGAGTGGAGGAGGGGGATCCGGGAAATACTCTCA
CCGATGCAAGGCCGCATAGTACAGATCAGGGTGAAAGAAGGCCGATGCAGTGAATAAGGGTCAACCCCTGTTGAG
TATTGAAGCGATGAAGTCTGAGACCGTGATTTCCGCCCCAGTCGGAGGAGTAGTTCAGAAAATAATGGTTAAACC
AGGGCAGGGAGTTAAAAAGGCGATCTCCTGCTTATAATTAAGGTGGCGGGGGGTGAGGAGGGGGAGGCAGC
GGAGGCGGAGGGAGTGGCGAAATCTGTCCCCGATGCAAGGGAGGATAGTGAGATTAGGGTCAAAGAGGGCG
ATGCAGTGAACAAAGGACAGCCCCTCCTCAGCATAGAGGCAATGAAGTCAGAGACGGTGATATCAGCTCCGGTC
GGGGGAGTCGTGCAAAAAATAATGGTCAAACCTGGTCAGGGGGTTAAGAAAGGGGACTTGCTCTTGATTATCAA
GGGGGGCGGTGGCAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGCGGGGGCGGGTCAGGCGAGATATTGTACCTATGCAAG
GCAGAATCGTGAGATTGAGTAAAAGAGGGTGACGCAGTGAACAAGGGCCAGCCGCTCCTCTCAATTGAAGCC
ATGAAGTCTGAAACGGTTATATCCGCTCCGGTGGGCGGGGTGGTTCAAAAGATCATGGTGAAGCCCGGCCAAGG
GGTCAAGAAGGGTGATCTCTTGCTCATAATCAAGTGA

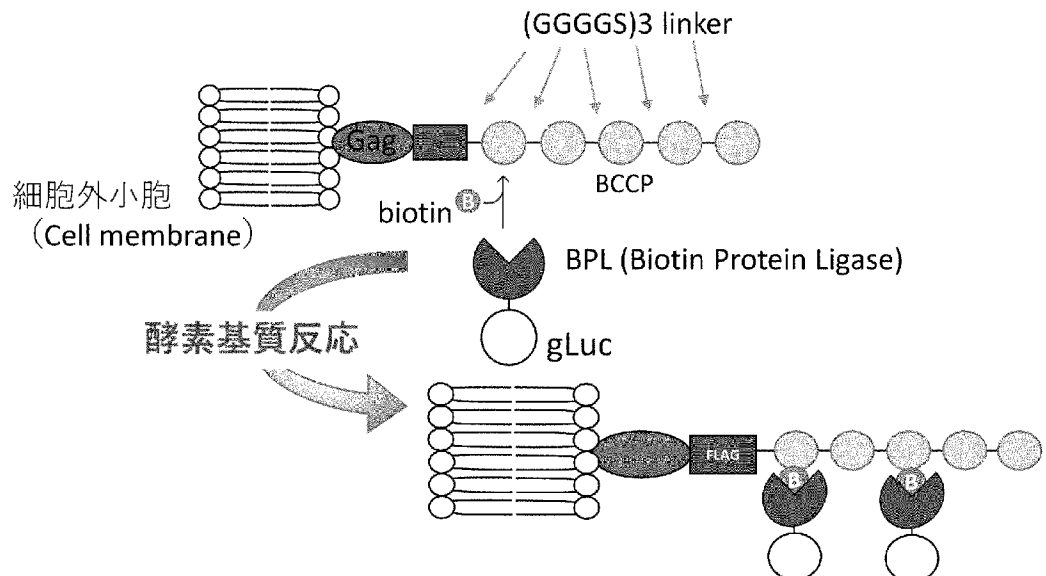
[図6]

gLuc-BPL ポリヌクレオチド

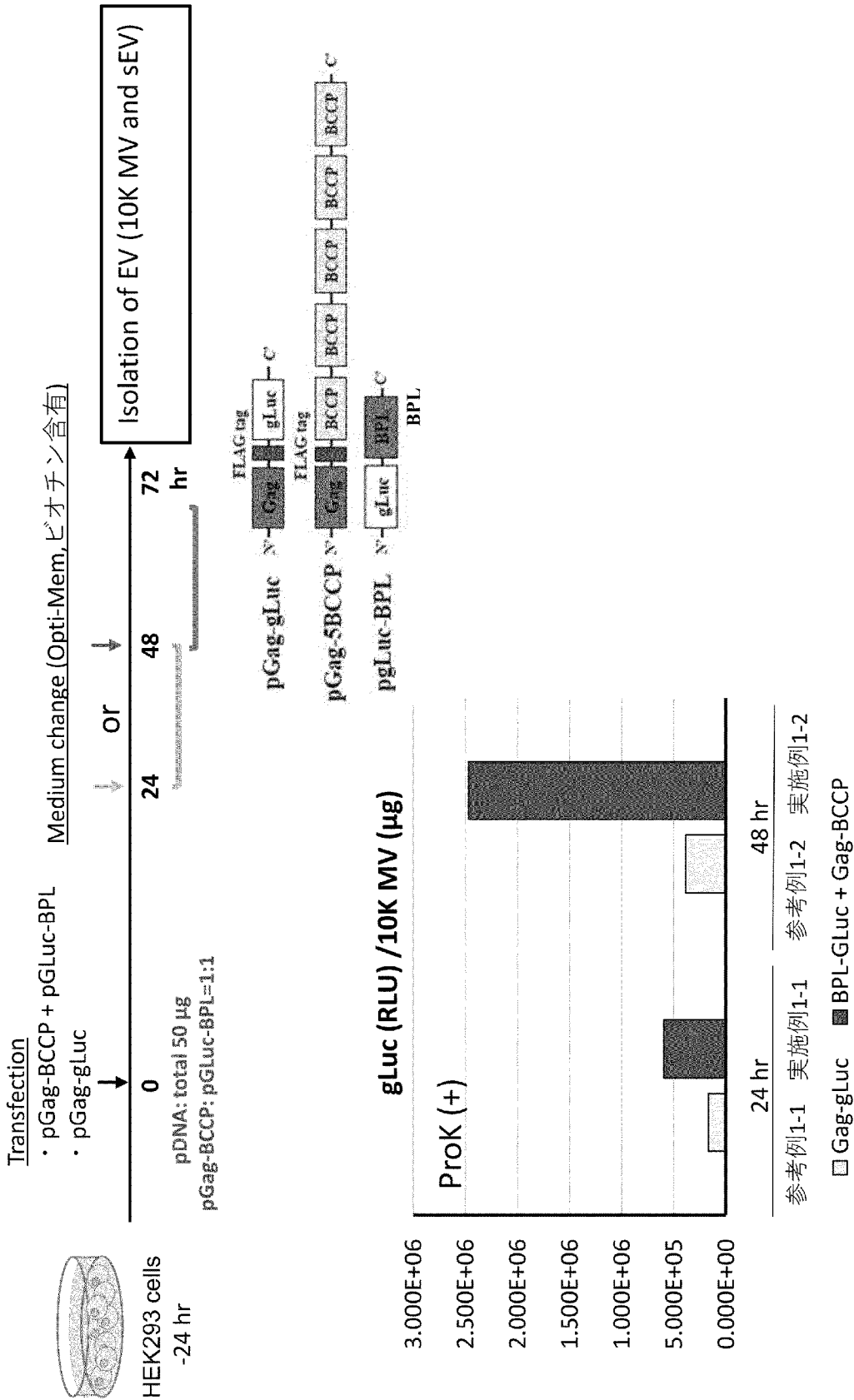
ATGAAGCCCACCGAGAACGAAGACTTCAACATCGTGGCCGTGGCCAGCAACTTCGCGACCACGGATCTCGA
 TGCTGACCGCGGGAAGTTGCCCAGCAAGAGCTGCCGCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGG
 AAAGCTGGCTGCACCAGGGGCTGTCTGATCTGCCTGTCCCACATCAAGTGCACGCCCAAGATGAAGAAGTTCAT
 CCCAGGACGCTGCCACACCTACGAAGGCGACAAAGAGTCCGCACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGATCGTCGA
 CATTCTGAGATTCTTGGGTTCAAGGACTTGGAGCCCATGGAGCAGTTCATCGCACAGGTGATCTGTGTGTGG
 ACTGCACAACCTGGCTGCCTCAAAGGGCTTGCCAACGTGCAGTGTTCTGACCTGCTCAAGAAGTGGCTGCCGCAA
 CGCTGTGCGACCTTTGCCAGCAAGATCCAGGGCCAGGTGGACAAGATCAAGGGGGCCGGTGGTGACGGTGGA
 GGAGGTTCTGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGTGGCGGCAGCATGGGAATAAGCATGCTCATATTCAAATTCCTCCA
 GCGTTACTAGCACCCAAGACCTGGCCGAGGCAATCTATCAGATTATCAATGCCGATGAATTCGTGATTGTCGCCG
 AGGAACAGACCCGCGCTAGGGGAAGATACAAGAGAGAGTGGTACTCCCCCAAAGCGGCCTGTGGTTTACATAC
 GTCATCAAAAACCTACAACGCCGAGAAAAATTCGTTTCTCACCTTCAGGTCTCCTGGCGGTGAGGAAAGTACTT
 TCCACGTTCTCTGAATGTGAAGATAAGATGGCCTAACGACATCGTCTATGGCAAGCGGAAAAATCTCAGGGATCCTG
 ATAGAAGGGATCTCTGAAGGGGCAAACTCCACCGTGTTCATCGGAATTGGGATCGATACAAACGTGAAAAGTCTC
 CCAGAGGAGCTGAGTGCTACTTCACTGTATCTGGAGCTCAATCGCGAGGTTGACAAATGACAAAATGCTGAACGAA
 ATAATTAACGAAATCAAGAATTACGAGAAGATCTCTGACAAGGAAATCATCGACGAAATCAATGAGCACCTCAGTA
 TTAAGGATAAGAAGGTAAAGTTGATTTCTAAGTCAGAAGAACGGAATTGTTTGGCTTTGTTTGTGGATTATTACGG
 GCGGCTTGTGACAGAGTGCGGGATTTTGAAGTCGAGGATATTCTTCGAGTTATTGAGGAGTAA

[図7]

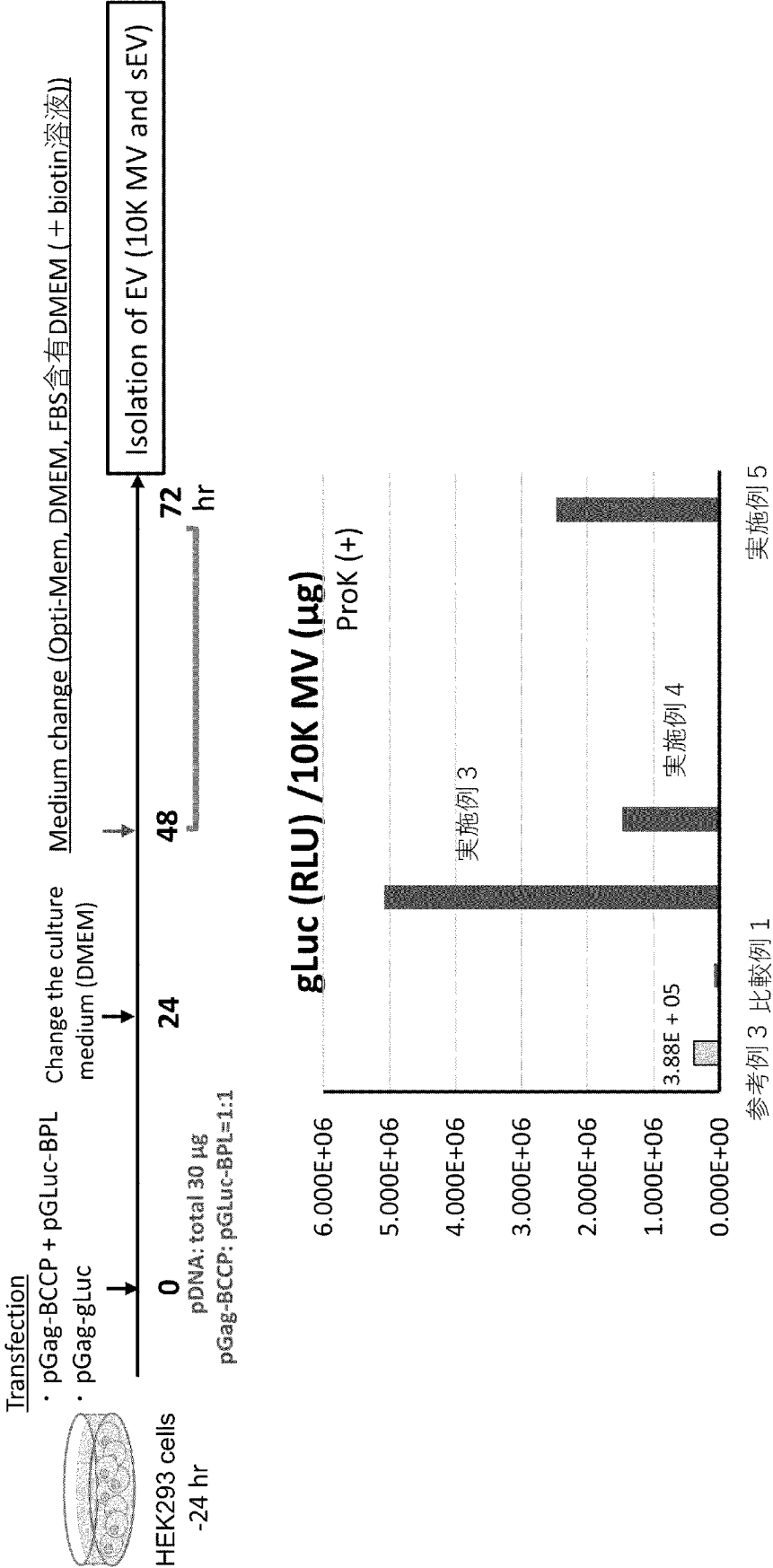
BCCP-BPL ビオチン反応を利用した細胞外小胞への有用成分の担持例



[図8]

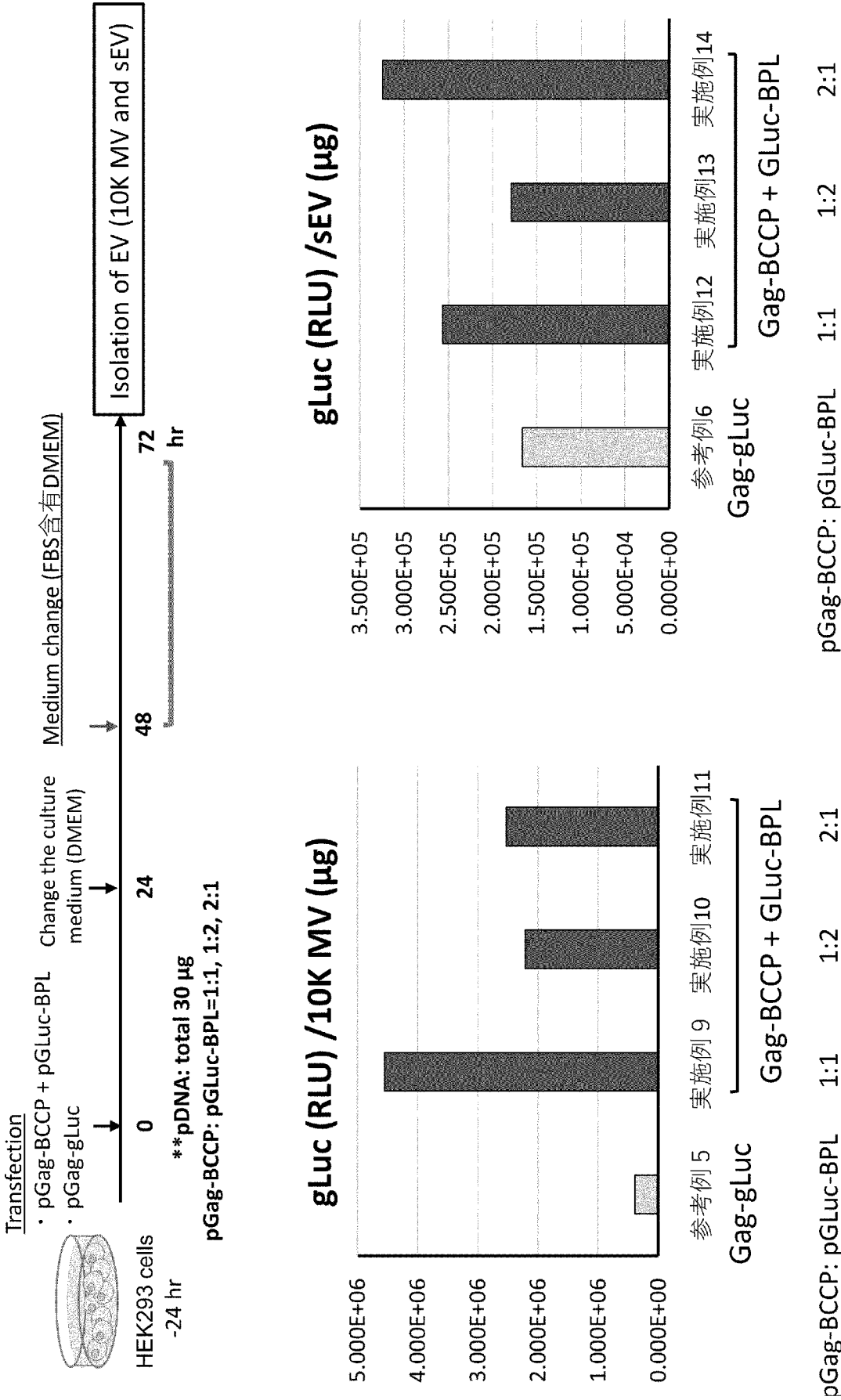


[図9]

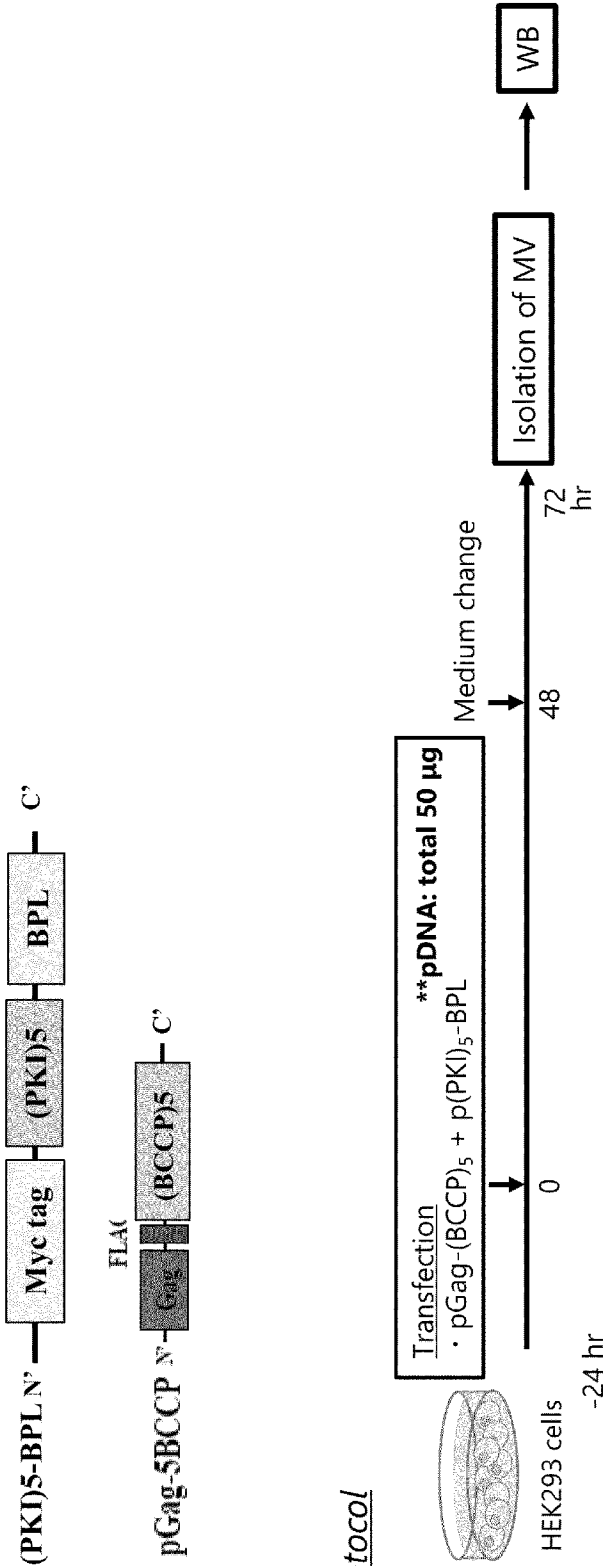


参考例 3 : pGag-gLuc / DMEM (ビオチン非存在)
比較例 1 : Gag-BCCP + GLuc-BPL / DMEM (ビオチン非存在)
実施例 3 : Gag-BCCP + GLuc-BPL / DMEM + biotin (ビオチン存在、 約0.2nM)
実施例 4 : Gag-BCCP + GLuc-BPL / DMEM + biotin (ビオチン存在、 約0.2nM + 100nM)
実施例 5 : Gag-BCCP + GLuc-BPL / Opti-MEM培地 (ビオチン存在)

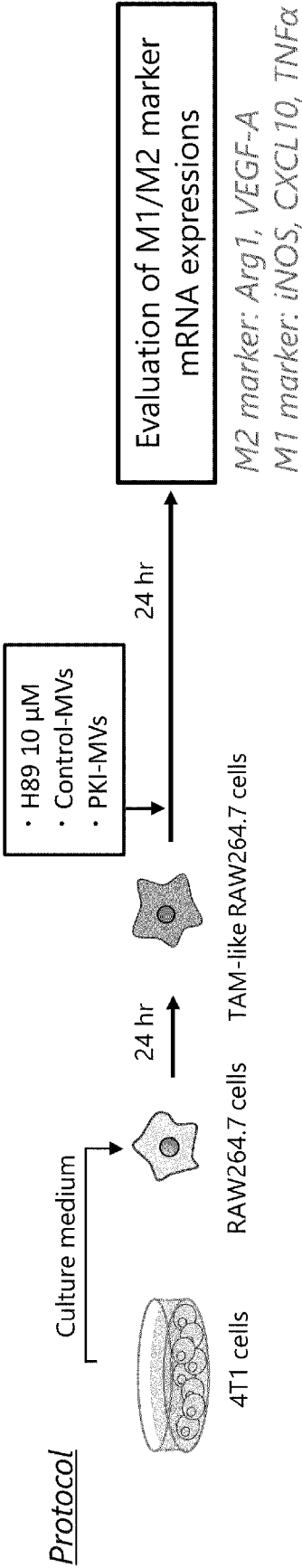
[図10]



[図11]

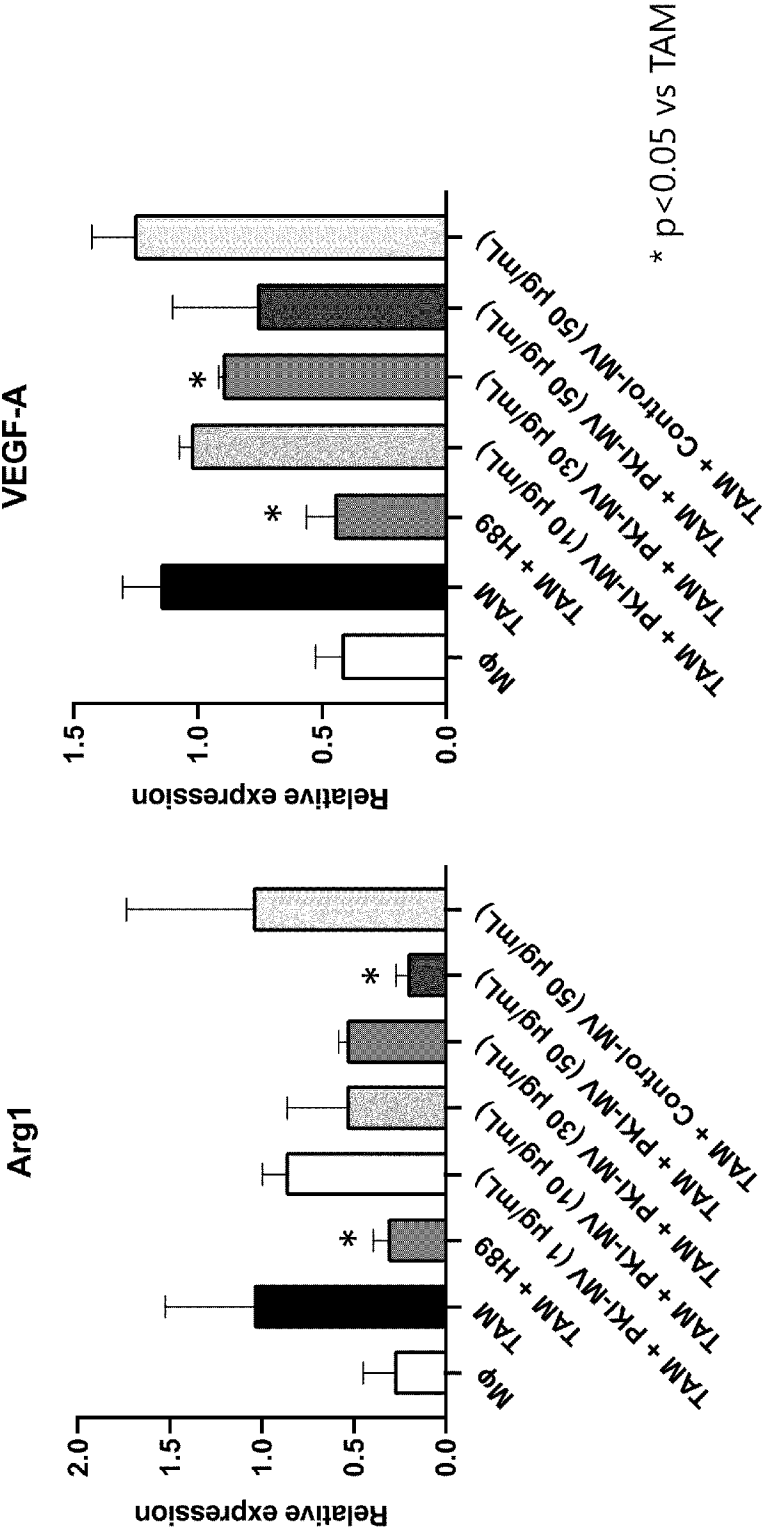


[12]

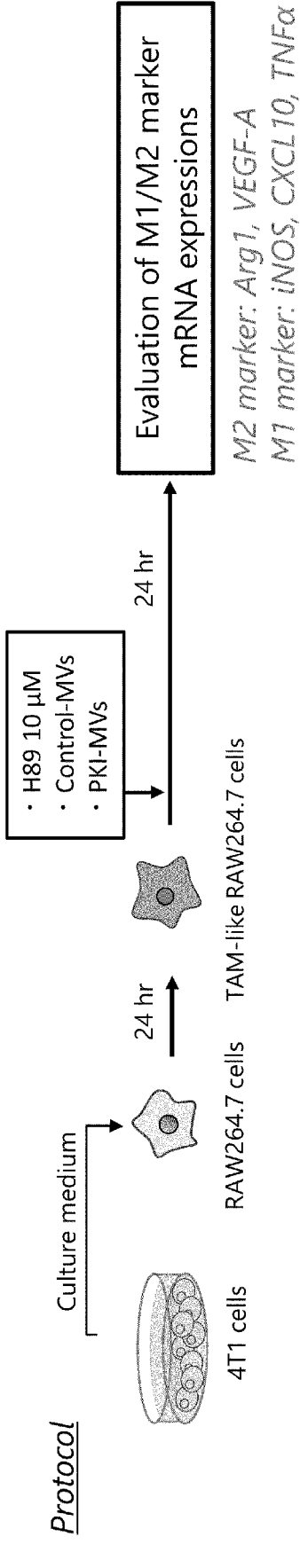


Results

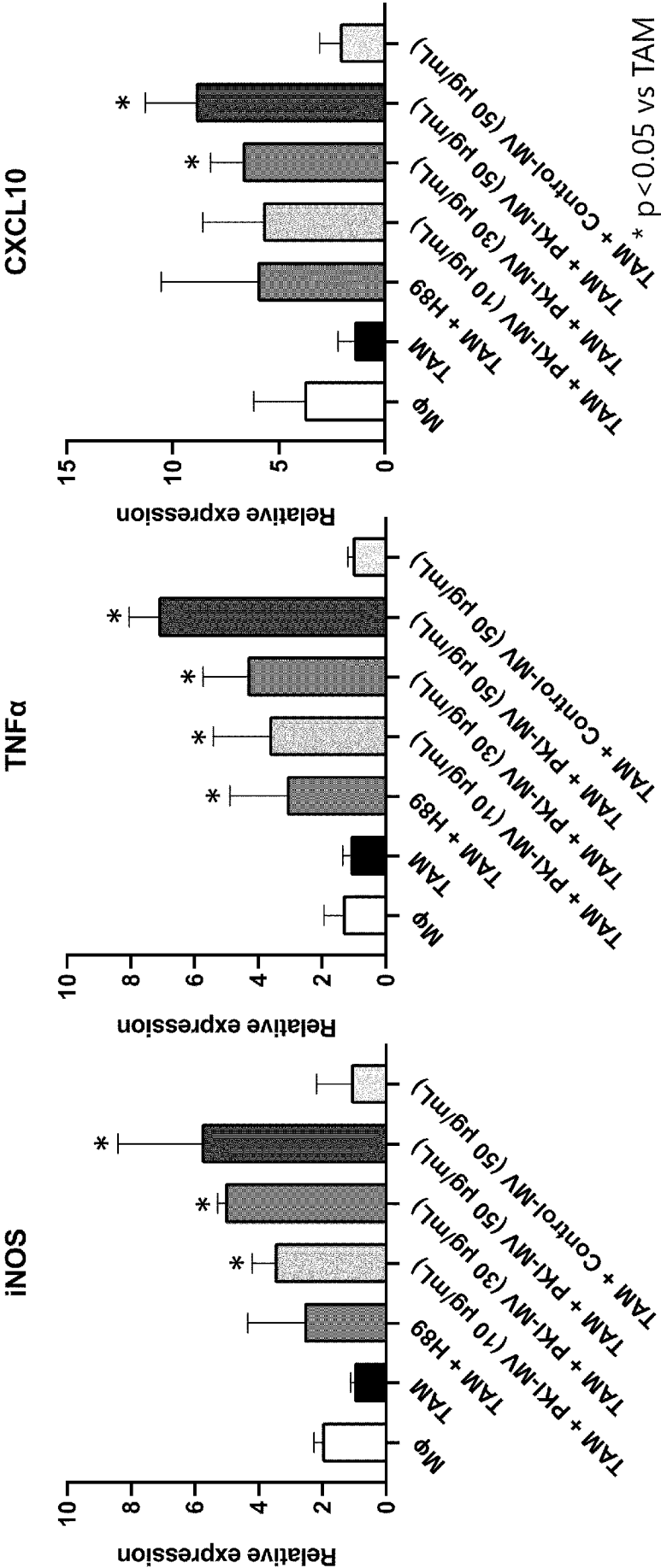
M2 marker:



[13]

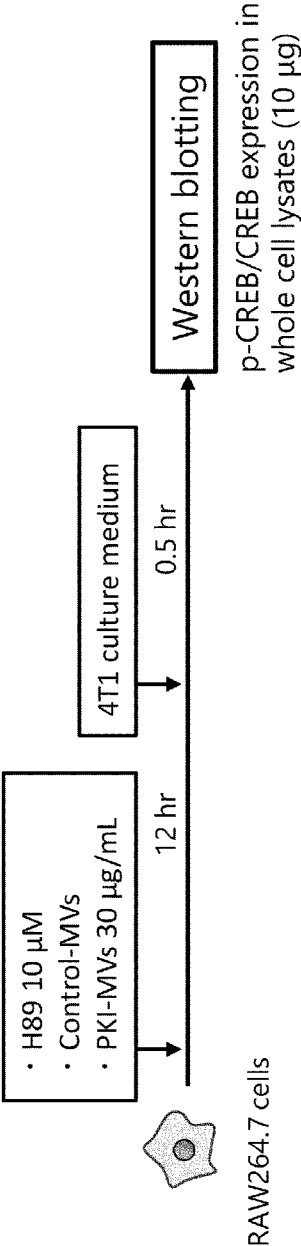


M1 marker:



[14]

Protocol

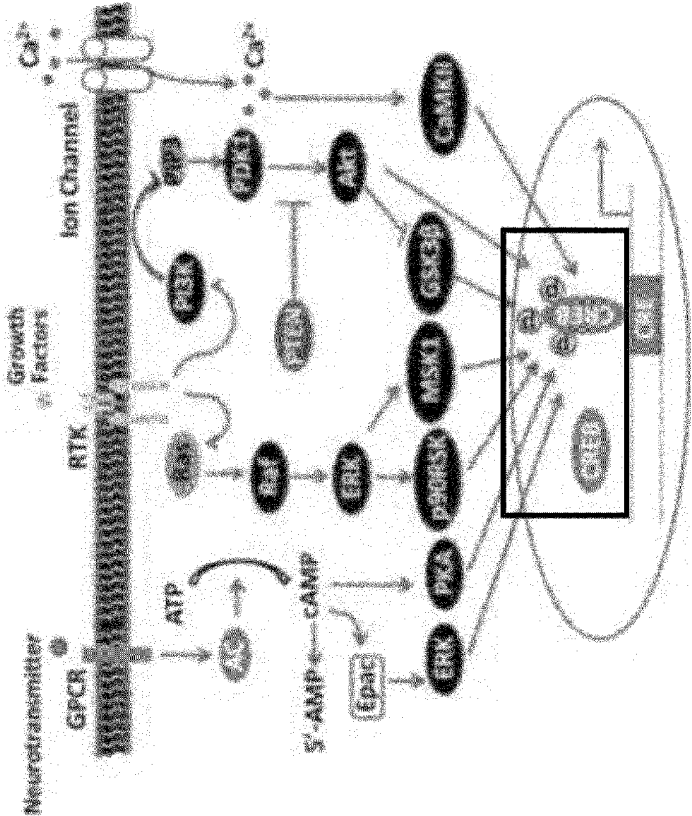
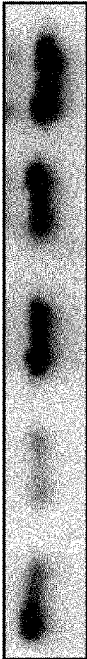
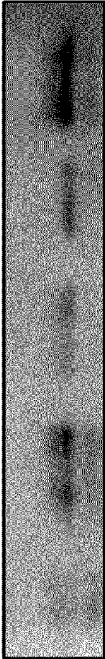


Results

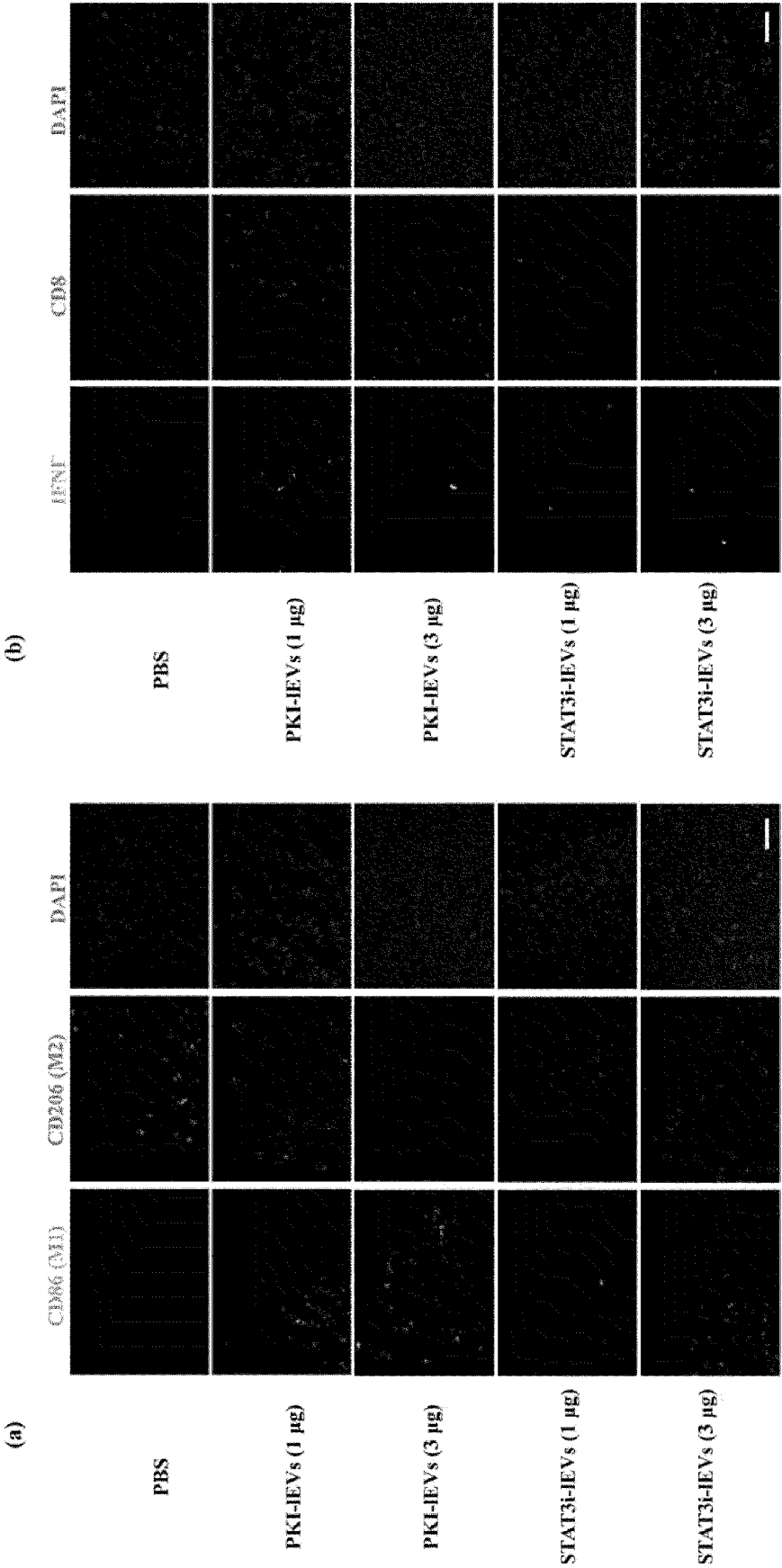
+ 4T1 medium

M0 NT H89 PKI Control

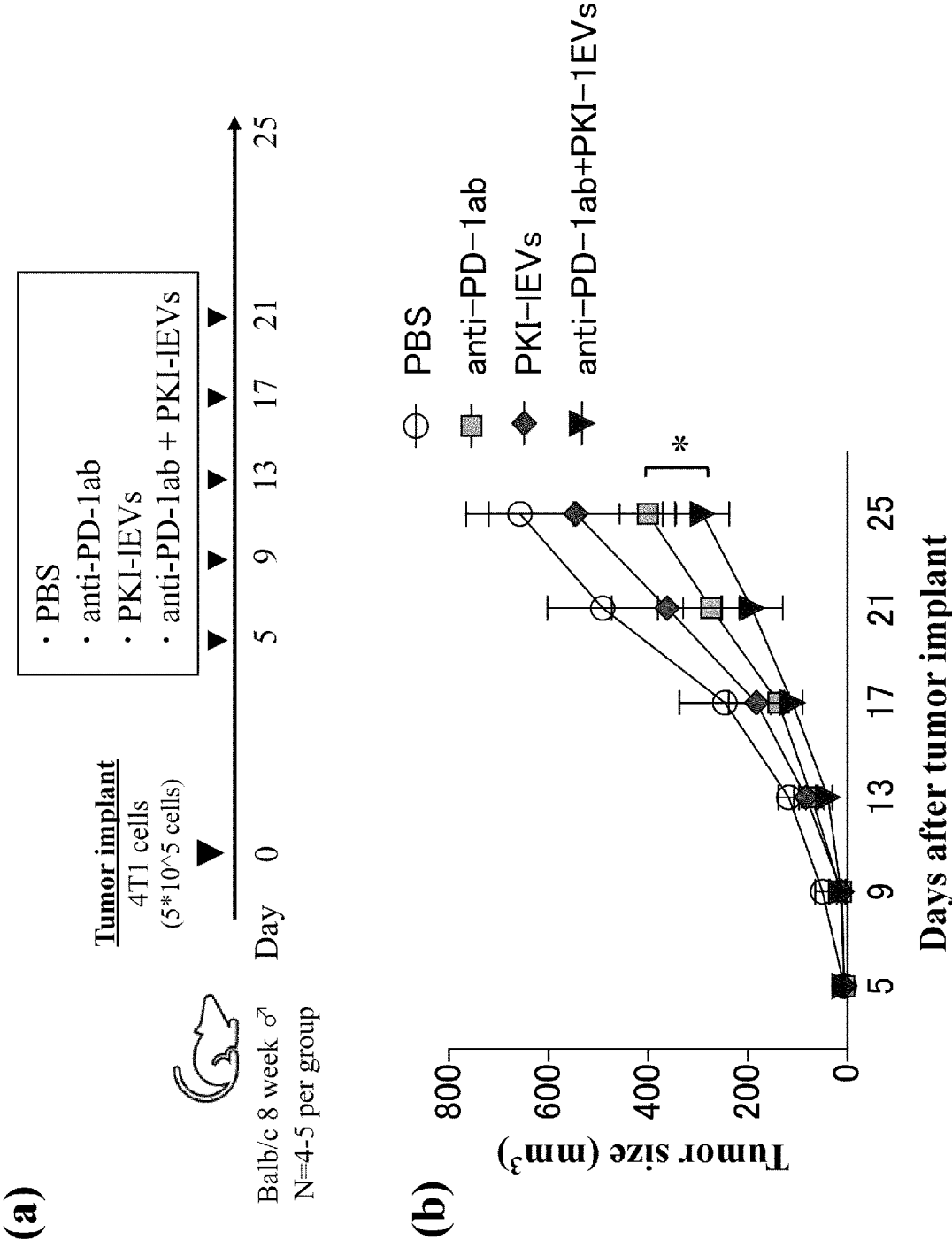
-MVs -MVs -MVs



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 19/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>C12N 9/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/63</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)n; <i>C12N 15/52</i> (2006.01)n FI: C07K19/00 ZNA; C12N5/10; C12N9/00; C12N15/63 Z; C12N5/071; C12N15/12; C12N15/52 Z According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K19/00; C12N5/10; C12N5/071; C12N9/00; C12N15/63; C12N15/12; C12N15/52 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN, J. et al. A bacterial outer membrane vesicle-based click vaccine elicits potent immune response against <i>Staphylococcus aureus</i> in mice. <i>Frontiers in Immunology</i> . 19 January 2023, vol. 14:1088501, pp. 1-10 abstract, pp. 2-3, fig. 1-3	1, 3-4, 6-10
Y	abstract, pp. 2-3, fig. 1-3	1-10
X	ALVES, N. J. et al. Bacterial Nanobioreactors-Directing Enzyme Packaging into Bacterial Outer Membrane Vesicles. <i>Applied Materials & Interfaces</i> . 2015, vol. 7, pp. 24963-24972 abstract, fig. 1	1-4, 6-10
Y	abstract, fig. 1	1-10
Y	JP 2008-237163 A (KYUSHU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 09 October 2008 (2008-10-09) paragraphs [0006]-[0007], [0013]-[0015]	1-10
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 September 2024		Date of mailing of the international search report 17 September 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUEDA, S. et al. A biotin-based protein tagging system. Analytical Biochemistry. 2009, vol. 393, pp. 189-195 abstract, fig. 1	1-10
Y	TAKENAKA, M. et al. Intercellular delivery of NF-κB inhibitor peptide utilizing small extracellular vesicles for the application of anti-inflammatory therapy. Journal of Controlled Release. 2020, vol. 328, pp. 435-443 abstract, fig. 1	1-10
A	高橋 有己, 細胞外小胞を利用したD D Sの開発, Drug Delivery System. January 2023, vol. 38-1, pp. 58-66, (TAKAHASHI, Yuki. Development of DDS using extracellular vesicles.) entire text	1-10
A	水田 涼介 他, 細胞外小胞ハイブリッド工学とD D S、医療応用, Drug Delivery System. 2021, vol. 36-2, pp. 90-99, (MIZUTA, Ryosuke et al. Extracellular vesicle hybrid engineering for DDS and medical application.) entire text	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023197

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/023197

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2008-237163	A	09 October 2008	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07K 19/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 9/00(2006.01)i;
C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)n; C12N 15/52(2006.01)n
FI: C07K19/00 ZNA; C12N5/10; C12N9/00; C12N15/63 Z; C12N5/071; C12N15/12; C12N15/52 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C07K19/00; C12N5/10; C12N5/071; C12N9/00; C12N15/63; C12N15/12; C12N15/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年
日本国公開実用新案公報1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024年

国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	SUN, J. et al., A bacterial outer membrane vesicle-based click vaccine elicits potent immune response against Staphylococcus aureus in mice, Frontiers in Immunology, 2023.01.19, Vol.14:1088501, pp.1-10 Abstract, p.2-3, Fig.1-3	1, 3-4, 6-10
Y	Abstract, p.2-3, Fig.1-3	1-10
X	ALVES, N. J. et al., Bacterial Nanobioreactors-Directing Enzyme Packaging into Bacterial Outer Membrane Vesicles, Applied Materials & Interfaces, 2015, Vol.7, pp.24963-24972 Abstract, Fig.1	1-4, 6-10
Y	Abstract, Fig.1	1-10
Y	JP 2008-237163 A (国立大学法人九州工業大学) 09.10.2008 (2008-10-09) [0006] - [0007]、[0013] - [0015]	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“I” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日03.09.2024

国際調査報告の発送日17.09.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

吉門 沙央里 41 5081

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SUEDA, S. et al., A biotin-based protein tagging system, Analytical Biochemistry, 2009, Vol.393, pp.189-195 Abstract, Fig.1	1-10
Y	TAKENAKA, M. et al., Intercellular delivery of NF- κ B inhibitor peptide utilizing small extracellular vesicles for the application of anti-inflammatory therapy, Journal of Controlled Release, 2020, Vol.328, pp.435-443 Abstract, Fig.1	1-10
A	高橋 有己, 細胞外小胞を利用したD D Sの開発, Drug Delivery System, 2023.01, Vol.38-1, p.58-66 全文	1-10
A	水田 涼介 他, 細胞外小胞ハイブリッド工学とD D S、医療応用, Drug Delivery System, 2021, Vol.36-2, pp.90-99 全文	1-10

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際出願番号
PCT/JP2024/023197

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2008-237163 A	09.10.2008	(ファミリーなし)	