(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-502105
(P2021-502105A)
(43)公表日　令和3年1月28日(2021.1.28)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	5/071	(2010.01)	C12N	5/071	ZNA	4B050
C07K	14/735	(2006.01)	C07K	14/735		4B065
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C086
A61P	3/00	(2006.01)	A61P	3/00		4C087
A61P	25/28	(2006.01)	A61P	25/28		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 29 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-526180 (P2020-526180)
(86)(22)出願日　平成30年11月13日 (2018.11.13)
(85)翻訳文提出日　令和2年5月12日 (2020.5.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP2018/081122
(87)国際公開番号　WO2019/092287
(87)国際公開日　令和1年5月16日 (2019.5.16)
(31)優先権主張番号　1718681.8
(32)優先日　平成29年11月13日 (2017.11.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国 (GB)

(71)出願人　518259431
エヴォックス・セラピューティクス・リミテッド
イギリス・ＯＸ４　４ＨＧ・オックスフォード・ロバート・ロビンソン・アヴェニュー・オックスフォード・サイエンス・パーク・メダワー・センター・イースト・ビルディング・２階
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部　達彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】タンパク質操作された細胞外小胞

(57)【要約】
本発明は、リソソーム蓄積障害（ＬＳＤ）に対する新規な治療アプローチとしての細胞外小胞（ＥＶ）に関する。より具体的には、本発明は、ロードが困難なＬＳＤ関連タンパク質のロードを改善し、得られたＥＶを目的の組織および臓器に標的化するための、種々のタンパク質工学戦略の使用に関する。

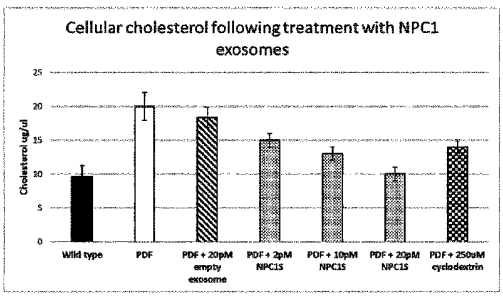


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
間葉間質細胞（ＭＳＣ）、羊膜上皮（ＡＥ）細胞または胎盤由来細胞から入手可能な細胞外小胞（ＥＶ）であって、少なくとも１つのリソソームタンパク質を含む複数のポリペプチド構築物を含む、ＥＶ。
【請求項２】
前記ポリペプチド構築物が、少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドをさらに含む、請求項１に記載のＥＶ。
【請求項３】
前記リソソームタンパク質が、アルファ－Ｄ－マンノシダーゼ、Ｎ－アスパルチル－ベーター－グルコサミニダーゼ、リソソーム酸リパーゼ、シスチノシン、リソソーム関連膜タンパク質－２、アルファガラクトシダーゼＡ、酸性セラミダーゼ、アルファフコシダーゼ、カテプシンＡ、酸性ベータグルコシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、ベータヘキソサミニダーゼＡ、ベータヘキソサミニダーゼＢ、ＧｌｃＮＡｃ－１－ホスホトランスフェラーゼ、ベータガラクトシルセラミダーゼ、リソソーム酸リパーゼ、アリールスルファターゼＡ、アルファ－Ｌ－イズロニダーゼ、イズロン酸－２－スルファターゼ、パランスルファミダーゼ、アセチルアルファ－グルコサミニダーゼ、アセチルＣｏＡ：アルファ－グルコサミニド－Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミン－６－スルファターゼ、Ｎ－アセチルガラクトサミン－６－スルファターゼ、ヒアルロニダーゼ、アセチルガラクトサミン－４－スルファターゼ、ベーター－グルクロニダーゼ、アルファ－Ｎ－アセチルノイラミニダーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミン－１－ホスホトランスフェラーゼ、ムコリピン－１、ホルミルグリシン生成酵素、パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ－１、トリペプチジルペプチダーゼＩ、システインストリングタンパク質、ＣＬＮ３ｐ、ＣＬＮ５ｐ、ＣＬＮ６ｐ、ＣＬＮ７ｐ、ＣＬＮ８ｐ、酸性スフィンゴミエリナーゼ、ＮＰＣ１、ＮＰＣ２、酸性アルファ－グルコシダーゼ、カテプシンＫ、シアリン、アルファ－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼ、ＧＭ２アクチベーター、リソソーム酸リパーゼ、およびそれらの誘導体、領域、ドメイン、および／任意の組合せからなる群から選択される、請求項１～２のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項４】
前記ＥＶ富化ポリペプチドが、ＣＤ９、ＣＤ５３、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ５４、ＣＤ５０、ＦＬＯＴ１、ＦＬＯＴ２、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ７１、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＣＤ２３５ａ、ＡＬＩＸ、シンテニン（配列番号１）、シンテニンのＮ末端部分（配列番号２）、シンテニン－２、Ｌａｍｐ２ｂ、ＴＳＰＡＮ８、ＴＳＰＡＮ１４、ＣＤ３７、ＣＤ８２、ＣＤ１５１、ＣＤ２３１、ＣＤ１０２、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ３、ＮＯＴＣＨ４、ＤＬＬ１、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、ＪＡＧ２、ＣＤ４９ｄ／ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＢ５、ＩＴＧＢ６、ＩＴＧＢ７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８／ＩＴＧＢ２、ＣＤ４１、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ５１、ＣＤ６１、ＣＤ１０４、Ｆｃ受容体、インターロイキン受容体、免疫グロブリン、ＣＤ２、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ３ゼータ、ＣＤ１３、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ３０、ＣＤ３４、ＣＤ３６、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４７、ＣＤ８６、ＣＤ１１０、ＣＤ１１１、ＣＤ１１５、ＣＤ１１７、ＣＤ１２５、ＣＤ１３５、ＣＤ１８４、ＣＤ２００、ＣＤ２７９、ＣＤ２７３、ＣＤ２７４、ＣＤ３６２、ＣＯＬ６Ａ１、ＡＧＲＮ、ＥＧＦＲ、ＧＡＰＤＨ、ＧＬＵＲ２、ＧＬＵＲ３、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＳＰＧ２、Ｈｓｐ７０、Ｌ１ＣＡＭ、ＬＡＭＢ１、ＬＡＭＣ１、ＬＦＡ－１、ＬＧＡＬＳ３ＢＰ、Ｍａｃ－１アルファ、Ｍａｃ－１ベータ、ＭＦＧＥ８、ＳＬＩＴ２、ＳＴＸ３、ＴＣＲＡ、ＴＣＲＢ、ＴＣＲＤ、ＴＣＲＧ、ＶＴＩ１Ａ、ＶＴＩ１Ｂ、それらの任意の誘導体および／またはドメイン、ならびにそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項１～３のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項５】
前記ＥＶ富化ポリペプチドが、シンテニン、シンテニンのＮ－端子部分、またはＣＤ６

３である、請求項２～４のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項６】
前記リソソームタンパク質がリソソーム膜タンパク質である、請求項１～５のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項７】
前記ＥＶが、以下のポリペプチド：ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ４４、ＳＳＥＡ４、ＣＤ１３３、ＣＤ２４、およびヒートショック７０ｋＤａタンパク質８のうちの１つ以上に対して陽性である、請求項１～６のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項８】
前記ＥＶが、少なくとも１つのヒートショックタンパク質をさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項９】
前記少なくとも１つのヒートショックタンパク質がヒートショック７０ｋＤａタンパク質８である、請求項８に記載のＥＶ。
【請求項１０】
組織標的化ペプチドおよび／またはポリペプチドをさらに含む、請求項１～９のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項１１】
前記組織標的化ペプチドおよび／またはポリペプチドが、前記ポリペプチド構築物中に含まれ、および／または別個のポリペプチド構築物として存在する、請求項１０に記載のＥＶ。
【請求項１２】
少なくとも１つのリソソームタンパク質からなる前記ポリペプチド構築物が、実質的に正しく折り込まれている、請求項１～１１のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項１３】
単一のＥＶが、
（ｉ）前記ポリペプチド構築物の少なくとも１０コピー、
（ｉｉ）前記ポリペプチド構築物の少なくとも５０コピー、および／または
（ｉｉｉ）前記ポリペプチド構築物の少なくとも１００コピー、を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載のＥＶ。
【請求項１４】
（ｉ）少なくとも１つのリソソームタンパク質を含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物をＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞に導入する工程、および（ｉｉ）少なくとも１つのリソソームタンパク質を含む複数のポリペプチド構築物を含むＥＶをＥＶ産生細胞から得る工程を含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載のＥＶの産生方法。
【請求項１５】
少なくとも１つのリソソームタンパク質を含む複数のポリペプチド構築物を含む前記ＥＶであって、少なくとも１つのリソソームタンパク質は、
（ｉ）前記リソソームタンパク質の少なくとも１０コピー、
（ｉｉ）前記リソソームタンパク質の少なくとも５０コピー、および／または
（ｉｉｉ）前記リソソームタンパク質の少なくとも１００コピー、を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
少なくとも１つのリソソームタンパク質を含む前記ポリペプチド構築物がまた、少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドを含む、請求項１４または１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
少なくとも１つのリソソームタンパク質を含む少なくとも１つのポリペプチド構築物、少なくとも１つのリソソームタンパク質をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチド

構築物、および／または少なくとも１つのリソソームタンパク質をコードするポリヌクレオチド構築物を含む少なくとも１つのベクターを含む、ＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥ、または胎盤由来細胞。

【請求項１８】

少なくとも１つのリソソームタンパク質を含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物、および／またはそのような構築物を含むベクターは、ＥＶ産生細胞に安定して挿入される、請求項１７に記載のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥ、または胎盤由来細胞。

【請求項１９】

少なくとも１つのリソソームタンパク質を含む前記ポリペプチド構築物がまた、少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドを含む、請求項１７または１８のいずれか１項に記載のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞。

【請求項２０】

細胞により産生される前記ＥＶのうちの

（ｉ）少なくとも５０％、

（ｉｉ）少なくとも７０％、および／または

（ｉｉｉ）少なくとも９０％、

は、少なくとも１つのリソソームタンパク質を含む前記ポリペプチド構築物を含む、請求項１７～１９のいずれか１項に記載のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞。

【請求項２１】

前記細胞によって産生される前記ＥＶが、

（ｉ）前記リソソームタンパク質の少なくとも１０コピー、

（ｉｉ）前記リソソームタンパク質の少なくとも５０コピー、および／または

（ｉｉｉ）前記リソソームタンパク質を含む前記ポリペプチド構築物の少なくとも１００コピー、を含む、請求項１７～２０のいずれか１項に記載のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞。

【請求項２２】

前記細胞が不死化されている、請求項１７～２１のいずれか１項に記載のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞。

【請求項２３】

前記細胞および前記細胞によって産生される前記ＥＶが、以下の天然タンパク質：ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ４４、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ１０５、ＳＳＥＡ４、ＣＤ１３３、ＣＤ２４、および／またはヒートショック７０ｋＤａタンパク質８のうちの１つ以上を含む、請求項１７～２２のいずれか１項に記載のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥ、または胎盤由来細胞。

【請求項２４】

前記細胞および前記細胞によって産生される前記ＥＶが、以下の天然タンパク質：ＣＤ６３、ＣＤ８１、およびヒートショック７０ｋＤａタンパク質８を含む、請求項１７～２３のいずれか１項に記載のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥ、または胎盤由来細胞。

【請求項２５】

請求項１～１３のいずれか１項に記載の複数のＥＶと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項２６】

ミグルスタット、アリモクロモール、ヘパリン、トレハロース、および／またはシクロデキストリンおよび／またはそれらの誘導体をさらに含む、請求項２５に記載の医薬組成物。

【請求項２７】

１つ以上のリソソーム蓄積障害の治療に使用するための、請求項１～１３のいずれか１項に記載のＥＶおよび／または請求項２５または２６に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、リソソーム蓄積障害（ＬＳＤ）に対する新規な治療アプローチとしての操作された細胞外小胞（ＥＶ）に関する。より具体的には、本発明は、ロード（ｌｏａｄ）が困難なＬＳＤ関連タンパク質のロードを改善し、得られたＥＶを目的の組織および臓器に標的化するための、種々のタンパク質工学戦略の使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

リソソーム蓄積症は、先天性代謝異常の重要なサブグループを形成する。ＬＳＤは、５０００人の生存出生毎に１人に影響を及ぼすと推定されるが、診断されていない症例および誤診された症例のために、この数字はより大きいと考えられる。全てのＬＳＤは、エンドソーム－常食性－リソソーム系の細胞小器官内の特定の高分子またはモノマー化合物の集積によって引き起こされる。基材貯蔵におけるエラーを超えて、ＬＳＤは、典型的には、神経学的障害および病変に関連し、世界中の神経変性症例の大部分を占める。過去２０年間、特に酵素補充療法の開発の結果として、ＬＳＤに対する進歩が見られてきた。しかし、現在の治療法がさらなる開発を必要とするか、またはさらに悪いことに、治療法が存在しないいくつかの疾患が依然として存在する。Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病Ｃ型は、タンパク質ＮＰＣ－１の不在または機能不全によって引き起こされる、そのようなＬＳＤの１つの例である。ＮＰＣ－１タンパク質は、コレステロールおよび糖脂質などの大きな非水溶性分子の共局在化および細胞内輸送に関与する。その結果、病気の状況下では、遊離コレステロールおよびグリコスフィンゴ脂質が多数の組織および臓器に蓄積する。Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病は、肝臓、脾臓、または肝脾腫として現れ得る広い臨床スペクトルを有する。Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病は、ＬＳＤに典型的には、進行性の神経学的病理学をもたらし、幼児期を超える全ての症例の間で早期死をもたらす。現在、Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病Ｃ型（ＮＰＣ）の治療法はなく、現在の治療レジメンは疾患管理を伴う。

【０００３】

ＮＰＣの以前の治療戦略には、抗てんかん薬、抗コリン薬または抗うつ薬などの症状を緩和する薬剤が含まれていた。その後、ミグルスタットおよびヒドロキシプロピルβ－シクロデキストリン（ＣＤ）を含む、脂質代謝経路の異なる段階を矯正することを目的とするいくつかの候補薬剤が、臨床環境において評価されているか、または現在評価されている。ミグルスタットは、グルコシルセラミドシンターゼの活性を阻害し、それによって生成するスフィンゴ糖脂質を減少させるイミノ糖である。元来、ミグルスタットはゴーシェ病の治療のために開発され、２００９年にＮＰＣ患者に使用するためにヨーロッパで承認された。ＣＤはまた、現在、くも膜下腔内または静脈内投与経路のいずれかを介して、ＮＰＣの治療のための臨床試験を受けている。ＣＤは、コレステロールと相互作用し、環流からコレステロールを除去するか、またはコレステロールの分布を変えると考えられている。いくつかの課題はＮＰＣのための全ての既存の治療に関連し、最も重要なことに、それらは根底にある疾患病理に適切に対処しない。

【０００４】

タンパク質生物製剤（そのうちの１つの重要であるが、しばしば不十分な薬物タイプが上記の酵素補充療法である）およびＲＮＡ療法のような生物製剤は、ＬＳＤを治療するためのより有効な代替手段を提供し得る。１９９０年代初頭の臨床現場へのＥＲＴの導入は、一定のＬＳＤ（例えば、ゴーシェ病）がどのように治療されるかの変化をもたらしたが、ＥＲＴは依然として重大な欠点を有し、多くのＬＳＤ患者カテゴリーへの医療サービスが依然としてかなり不十分である。多くのＥＲＴは、標的細胞内でそれらの治療効果を実行するが、これらのタンパク質ベースの薬物の内在化は、特に効率的ではない。さらに、本質的に全てのタンパク質生物製剤のサイズの大きさおよび電荷のために、ＥＲＴは血液脳関門を通過せず、したがって、中枢神経系（ＣＮＳ）に入ることが妨げられるが、いくつかのＬＳＤの神経学的徴候は非常に重篤であるため、中枢神経系に入ることはこれらの疾患の治療の鍵である。ＷＯ２０１６／０４４９４７は、ＬＳＤの治療様式としてエキソソームを利用する試みを記載しており、該出願は、治療的介入のための様々なアプローチに触れているが、設計戦略においていくつかの重大な欠点を有する。実際、ＷＯ２０１６

／０４４９４７は、（ｉ）（ｉｉ）エキソソームタンパク質に融合されたリソソーム標的化配列を含む融合タンパク質構築物を使用することによって、標的細胞のリソソームを標的化するようにエキソソームを改変することを表面的に記載しているが、この出願は、実際の治療用ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質ベースの薬剤のロードおよび生物活性送達に関する開示を顕著に欠いている。明らかに、エキソソームは、種々の型の生体分子貨物の優れたなキャリアであることが示されているが、治療タンパク質および／またはｍＲＮＡのインビボ送達のためのそれらの実際の効用は簡単ではなく、周到な小胞工学を必要とする。

【発明の概要】

【０００５】

したがって、本発明の目的は、ＬＳＤに対するタンパク質治療薬の送達のためのＥＶの操作に関連する上記の問題を克服することである。本発明は、ＬＳＤのためのＥＶベースの治療薬のいくつかの重要な態様、すなわち、複合体、タンパク質薬剤貨物のＥＶへのパッケージングおよびロード；ＥＶ自体の薬剤動態の最適化；ＥＶの再生効果の利用；および薬剤貨物（この場合、リソソームタンパク質、例えば、輸送体および酵素）のインビボでの標的細胞への生物活性送達に取り組む。

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明は、新規なＥＶ工学技術を利用して、ＬＳＤを治療するために必要とされる複雑でしばしば非常に大きなリソソームタンパク質を、生物活性状態および構成でパッケージングおよびロードすることによって、これを達成する。さらに、好適な薬物動態と再生特性との間の最適なバランスを提供する、細胞供給源からの特定の分子特性を有するＥＶの偶然の選択およびプロファイリング、ならびに種々のＬＳＤにおいて治療活性を有するさらなるタンパク質および核酸成分を含むＥＶを提供することも含む。本発明の発明者らは、（ｉ）一定の予想外の細胞源が、正確に折り畳まれ、したがって活性なリソソームタンパク質を産生するのに優れていること、（ｉｉ）そのようなリソソームタンパク質をＥＶに輸送する能力は、高度に細胞依存性であり、これは、治療用リソソームタンパク質とエキソソームタンパク質との間の融合タンパク質構築物を使用することによって改善され得ること、（ｉｉｉ）一定のＥＶタンパク質成分が、積荷タンパク質およびＥＶ自体の生物学的活性に重要であること、ならびに（ｉｖ）本明細書中のＥＶ産生細胞源に由来するＥＶが、正確な細胞内コンパートメントへの生物活性送達を可能にすることを認識した。対照的に、先行技術（例えば、ＷＯ２０１６／０４４９４７）は、リソソームタンパク質の生物活性送達のための最適な細胞供給源の選択と完全に無関係であり、そしてこの文献はまた、ＥＶ富化ポリペプチドを治療用リソソームタンパク質自体に融合することの重要性を明らかに認識していない。ＷＯ２０１６／０４４９４７は、実際に、融合タンパク質技術を利用することを提案しているが、単に標的細胞のリソソームコンパートメントを標的とするためのものである。ＷＯ２０１６／０４４９４７の溶融体は、標的細胞のリソソームに対するようなエキソソームの標的化を提供する短いペプチド配列に基づくが、該溶融タンパク質は、実際の治療用リソソームタンパク質自体のＥＶへの生物活性のロードを可能にしない。したがって、先行技術は、（１）正しい細胞内位置への標的化のための手段としての細胞源選択の重要性、（２）リソソームタンパク質が、典型的には、正しく折り畳まれておらず、かつ／または任意の所定の細胞源に操作された場合に生物活性でないという事実、および（３）治療用リソソームタンパク質のＥＶへのロードが、しばしば、ＥＶにおいて、また重要なことに標的細胞において、任意の酵素活性および／または輸送体活性を達成するために、ＥＶ富化ポリペプチド／ドメインとの融合を必要とするという事実を明らかに認識していない。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

したがって、第１の態様では、本発明は、間葉間質細胞（ＭＳＣ）、羊膜上皮（ＡＥ）細胞または胎盤由来（Ｐ）細胞から得ることができるＥＶに関し、ＥＶは、少なくとも１

つのリソソームタンパク質を含む複数のポリペプチド構築物を含む。本発明によるＡＥ－ＥＶ、ＭＳＣ－ＥＶ、およびＰ－ＥＶは、パッケージングおよびＥＶへのロードを最適化するために、ＥＶを対象の組織および／または細胞型に標的化するために、および／または異なるＬＳＤを治療するための標的区画、すなわち典型的には標的細胞のリソソーム区画へのＥＶの輸送を増強するために、様々なポリペプチド構築物を含有するように操作され得る。

【０００８】

重要なＥＶ富化戦略のいくつかは、ＥＶタンパク質およびシンテニン、シンテニンのＮ－端子部分、または非常に驚くべきことにＣＤ６３などのＥＶタンパク質の一部を、治療用リソソームタンパク質の融合パートナーとして利用することを含む。有利な実施形態では、本発明は、ＮＰＣ１タンパク質、シスチノシン、ＣＬＮタンパク質および／またはＬＡＭＰ２タンパク質などの高度に送達困難なリソソーム膜貫通タンパク質を送達するＥＶを提供する。

【０００９】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも１つのリソソームタンパク質および少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドを含むポリペプチド構築物、ならびにさらなる態様において、このようなポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物に関する。

【００１０】

より具体的には、本発明のポリペプチド構築物のリソソームタンパク質は、ＮＰＣ１、ＬＡＭＰ２、シアリン、ＣＩＣ５、ＣＬＮ３、シスチノシン、またはＧＭ２アクチベーターパク質の１つ以上であり得る。ポリペプチド構築物の少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドは、シンテニン、シンテニンのＮ末端部分、および／またはＣＤ６３であり得る。

【００１１】

さらに、本発明のポリペプチドは、少なくとも１つの標的化ペプチドおよび／またはポリペプチドをさらに含み得る。

【００１２】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド構築物を含むベクターに関し、ここで、ベクターは、プラスミド、ミニサークル、および／または任意の他の型の実質的に環状化されたポリヌクレオチド；例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、および／またはキャプシドフリーウイルスなどのウイルス；直鎖状ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリヌクレオチド；メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）；および／または改変されたｍＲＮＡである。

【００１３】

本発明はまた、さらに別の態様において、このようなポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド構築物を含む細胞に関する。このような細胞は、好ましくは、ＭＳＣ、ＡＥおよび／または胎盤由来細胞であり、これらの細胞は、好ましくは、このようなポリヌクレオチド構築物で安定にトランスフェクトおよび／または形質導入され、複数のポリペプチド構築物を内因的にロードしたＥＶの一貫した再現性のある産生を可能にする。

【００１４】

さらなる態様において、本発明はまた、本発明のような複数のＥＶ、および／または本発明のポリペプチド構築物および／または本発明のポリヌクレオチド構築物、および／または本発明の任意の型のベクターを含む医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含み得る。ＥＶおよび／またはそのような医薬組成物は、ＬＳＤの治療に特に適しているが、リソソーム機能、モルフォロジーなどが妨害される様々な疾患、例えばパーキンソン病、アルツハイマー病などの治療にも役立ち得る。

【００１５】

さらに他の態様において、本発明は、哺乳動物のリソソームおよび／または任意の他の細胞区画におけるリソソームポリペプチドの量を増加させる方法、ならびにそれを必要とする対象においてＬＳＤを治療するための種々の本発明の方法に関する。このような方法

は、ＥＶを選択し、プロファイルし、用量を決定し、最適な方法で患者に投与することができることを含む。

【００１６】

好ましい実施形態において、リソソームおよび／または哺乳動物の任意の他の細胞区画におけるリソソームポリペプチドの量を増加させる方法は、哺乳動物に、本発明によるＥＶを含む組成物、本発明による少なくとも１つのポリペプチド構築物、本発明による少なくとも１つのポリヌクレオチド、および／または本発明による少なくとも１つのベクターを投与することを含む。

【００１７】

要約すると、本発明は、ＬＳＤを治療するために必要とされる複雑でしばしば非常に大きなリソソームタンパク質を、生物活性状態および構成でパッケージングおよびロードし、適切な貨物安定化およびデリバリー能力を有する最適な再生細胞供給源を選択する、高度に発明的なＥＶ工学技術を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】図１。ＮＰＣ１羊膜由来ＥＶは、生物活性ＮＰＣ１タンパク質を細胞に大量に送達することにより、標的細胞中のコレステロールレベルを有意に低下させた。

【図２】図２。ワルトンゼリーＭＳＣ由来ＥＶ（ＷＪ－ＭＳＣ－ＥＶ、ワルトンゼリーから入手可能）を、リソソームタンパク質シスチノシンおよびＥＶ富化タンパク質ＣＤ６３を含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物を用いて遺伝子操作し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで強力なシステイン輸送効果を示した。

【図３】図３。ＣＤ４４、ＳＳＥＡ４、ＣＤ１３３、ＣＤ２４に対して陽性であり、複数のＮＰＣ１－シンテニンポリペプチド構築物を含むように操作されたＡＥ－ＥＶを、Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病のダブルノックアウトマウスモデルにおいてインビボで評価した。操作されたＡＥＥＶは、肝臓およびＣＮＳの病変の両方に対して有意な治療効果を示した。

【００１９】

生物活性ＥＶ集団の選択的設計およびプロファイリングと組み合わせた本発明のＥＶ工学技術を使用することによって、本発明は、ＬＳＤのためのＥＶベースの治療の重要な態様のいくつかに対処する。

【００２０】

便宜上および明確にするために、本明細書で使用される特定の用語を集め、以下に説明する。他に規定がない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、当業者により一般的に理解されているのと同じ意味をもつ。

【００２１】

本発明の特徴、態様、実施形態、または代替形態がマーカッシュグループに関して説明される場合、当業者は、本発明が、それによって、マーカッシュグループのメンバーの任意の個々のメンバーまたはサブグループに関しても説明されることを認識するであろう。当業者はさらに、本発明が、それによって、マーカッシュグループのメンバーの個々のメンバーまたはサブグループの任意の組合せに関しても記載されることを認識するであろう。さらに、本発明の態様および／または実施形態のうちの１つと組み合わせて説明される実施形態および特徴は、本発明の他の全ての態様および／または実施形態にも必要な変更を加えて適用されることに留意されたい。例えば、このようなリソソームタンパク質を含むＥＶと組み合わせて、本明細書中に記載されるリソソームタンパク質は、本明細書中の全ての他の態様、教示および実施形態、例えば、このようなリソソームタンパク質を含むＥＶを産生するための方法に関する態様および／または実施形態、または本明細書中のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド構築物に関する態様に、開示され、関連し、そして両立であると理解されるべきである。さらに、本明細書中で同定される全てのポリペプチドおよびタンパク質は、ポリペプチドを融合するための従来の戦略を使用して、ポリペプチド構築物において自由に組み合わされ得る。非限定的な例として、本明細書中に

記載される全てのリソソームタンパク質は、１つ以上のＥＶ富化ポリペプチドと任意の組合せで自由に組み合わされ得る。また、本明細書中の任意のおよび全てのリソソームタンパク質を、任意の他のリソソームタンパク質と組み合わせて、２つ以上のリソソームタンパク質を含む、ポリペプチド、および／または対応するポリヌクレオチド、構築物を生成し得る。さらに、任意のおよび全ての特徴（例えば、マーカッシュグループの任意のおよび全てのメンバー）は、任意のおよび全ての他の特徴（例えば、任意の他のマーカッシュグループの任意のおよび全てのメンバー）と自由に組み合わせることができる。さらに、本明細書の教示が、単数のＥＶおよび／または複数のＥＶを別個の天然ナノ粒子様小胞として言及する場合、そのような教示は全て、複数のＥＶおよびＥＶの集団に等しく関連し、それらに適用可能であることを理解されたい。一般的な注釈として、本発明に従うリソソームタンパク質、ＥＶ富化ポリペプチド、標的化ペプチドおよび／またはポリペプチド、ＥＶ産生細胞供給源、ならびに全ての他の態様、実施形態、および代替物は、本発明の範囲および要旨から逸脱することなく、任意のおよび全ての可能な組合せで自由に組み合わせられ得る。さらに、本発明の任意のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたは任意のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド配列（それぞれアミノ酸配列またはヌクレオチド配列）は、任意の所与の分子が、それに関連する所望の技術的効果を実施する能力を保持する限り、元のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび配列からかなり逸脱し得る。それらの生物学的特性が維持される限り、本願によるポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド配列は、天然配列と比較して５０％（例えば、ＢＬＡＳＴまたはＣｌｕｓｔａｌＷを使用して計算される）ほど逸脱し得るが、可能な限り高い配列同一性が好ましい（例えば、６０％、７０％、８０％、または例えば、９０％以上）。例えば、少なくとも１つのリソソームタンパク質と少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドとの組合せは、それぞれのポリペプチドの一定のセグメントが置換および／または改変され得ること、および／または配列が他のアミノ酸ストレッチの挿入によって中断され得ることを当然に意味し、これは、重要な特性（例えば、リソソームタンパク質の天然の効果、ＥＶ輸送および富化、標的化特性など）が保存される限り、天然の配列からの逸脱が相当であり得ることを意味する。したがって、同様の理由は、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列にも当然に適用される。ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質と組み合わせて本明細書中で言及される全ての受託番号および配列番号は、単に例として、そして情報のみのために見なされるべきであり、そして全てのペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、当業者が理解するように、それらの通常の意味を与えられるべきである。したがって、上記のように、当業者はまた、本発明が、本明細書中で言及される特定の配列番号および／または受託番号のみならず、その改変体および誘導体もまた包含することを理解する。本明細書中で言及される全ての受託番号は、データベースの２０１７年１１月１０日バージョンによるＵｎｉＰｒｏｔＫＢ受託番号であり、そして本明細書中で言及される全てのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、当業者によって理解されるように、それらの従来の意味にしたがって解釈されるべきである。

【００２２】

用語「細胞外小胞」または「ＥＶ」または「エキソソーム」は、本明細書中で交換可能に使用され、そして任意の形態の細胞から入手可能な任意の型の小胞（例えば、細胞の形質膜から排出される任意の小胞）、エキソソーム（例えば、エンドリソソーム経路に由来する任意の小胞）、アポトーシス体（例えば、アポトーシス細胞から入手可能である）、微粒子（例えば、血小板に由来し得る）、エクトソーム（例えば、血清中の好中球および単球に由来し得る）、前立腺腫（例えば、前立腺がん細胞から入手可能である）、または心臓腫（例えば、心臓細胞に由来し得る）などに関連すると理解されるべきである。エキソソームおよび微小胞は、特に好ましいＥＶを表す。ＥＶのサイズは、かなり変化し得るが、ＥＶは、典型的には、ナノサイズの流体力学的半径、すなわち、１０００ｎｍ未満の半径を有する。明らかに、ＥＶは、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、およびｉｎ　ｖｉｔｒｏの両方の任意の細胞型に由来し得る。しかし、本発明は、羊膜上皮（ＡＥ）細胞、

間葉間質細胞（ＭＳＣ）、および胎盤由来細胞から得ることができるＥＶに主に焦点を当てている。さらに、「ＥＶ」および／または「エキソソーム」および／または「微小胞」という語はまた、細胞外小胞模倣体、例えば、膜押し出し、音波処理、または他の技術などによって得られる細胞膜ベースの小胞に関連すると理解されるべきである。当業者には明らかなように、ＥＶの医学的および科学的な使用および用途を説明するとき、本発明は、通常、複数のＥＶ、すなわち、数千、数百万、数十億、または数兆のＥＶを含むことができるＥＶの集団に関する。以下の実験セクションから分かるように、ＥＶは、単位体積当たり（例えば、ｍｌ当たり）の10^{5}、10^{8}、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{18}、10^{25}、10^{30}ＥＶ（しばしば「粒子」と呼ばれる）、またはその間の任意の他の数のより大きい、より小さい、もしくは任意の数の濃度で存在し得る。同様に、例えば、特定のリソソームタンパク質を一定ＥＶに関連し得る「集団」という用語は、そのような集団を構成する複数の実体を包含すると理解されるべきである。換言すれば、個々のＥＶは、複数存在する場合、ＥＶ母集団を構成する。したがって、当然ながら、本発明は、当業者には明らかなように、個々のＥＶおよびＥＶを含む集団の両方に関する。インビボで適用される場合、ＥＶの投薬量は、治療されるべき疾病、投与経路、目的のリソソームタンパク質の活性および効果、ＥＶ上に存在する任意のターゲティング部分、医薬配合組成物などに依存して、当然にかなり変動し得る。

【００２３】

用語「ＥＶ富化ポリペプチド」、「ＥＶタンパク質」、「ＥＶポリペプチド」、「エキソソームポリペプチド」および「エキソソームタンパク質」は、本明細書中で交換可能にに使用され、そしてポリペプチド構築物（代表的には、ＥＶ富化タンパク質に加えて、リソソームタンパク質を含む）を適切な小胞構造、すなわち、適切なＥＶに輸送するために利用され得る任意のポリペプチドに関連すると理解されるべきである。より具体的には、これらの用語は、融合タンパク質構築物の小胞構造、例えば、ＥＶへの輸送、輸送または往復を可能にする任意のポリペプチドを含むと理解されるべきである。このようなエキソソームポリペプチドの例は、例えば、ＣＤ９、ＣＤ５３、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ５４、ＣＤ５０、ＦＬＯＴ１、ＦＬＯＴ２、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ７１（トランスフェリン受容体としても知られる）およびそのエンドソームソーティングドメイン、すなわち、トランスフェリン受容体エンドソーム選別ドメイン（配列番号３によって例示される非限定的な例として）、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８（シンデカン－１）、ＣＤ２３５ａ、ＡＬＩＸ、シンテニン（配列番号１によって例示される非限定的な例として）（シンテニン－１としても知られる）、シンテニンのＮ末端部分（配列番号２によって例示される非限定的な例として）、Ｌａｍｐ２ｂ、シンデカン－２、シンデカン－３、シンデカン－４、ＴＳＰＡＮ８、ＴＳＰＡＮ１４、ＣＤ３７、ＣＤ８２、ＣＤ１５１、ＣＤ２３１、ＣＤ１０２、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ３、ＮＯＴＣＨ４、ＤＬＬ１、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、ＪＡＧ２、ＣＤ４９ｄ／ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＢ５、ＩＴＧＢ６、ＩＴＧＢ７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８／ＩＴＧＢ２、ＣＤ４１、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ５１、ＣＤ６１、ＣＤ１０４、Ｆｃ受容体、インターロイキン受容体、免疫グロブリン、ＭＨＣ－ＩまたはＭＨＣ－ＩＩ成分、ＣＤ２、ＣＤ３、イプシロン、ＣＤ３ゼータ、ＣＤ１３、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ３０、ＴＳＧ１０１、ＣＤ３４、ＣＤ３６、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４７、ＣＤ８６、ＣＤ１１０、ＣＤ１１１、ＣＤ１１５、ＣＤ１１７、ＣＤ１２５、ＣＤ１３５、ＣＤ１８４、ＣＤ２００、ＣＤ２７９、ＣＤ２７３、ＣＤ２７４、ＣＤ３６２、ＣＯＬ６Ａ１、ＡＧＲＮ、ＥＧＦＲ、ＧＡＰＤＨ、ＧＬＵＲ２、ＧＬＵＲ３、ＡＲＲＤＣ１、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＳＰＧ２、Ｌ１ＣＡＭ、ＬＡＭＢ１、ＬＡＭＣ１、ＬＦＡ－１、ＬＧＡＬＳ３ＢＰ、Ｍａｃ－１アルファ、Ｍａｃ－１ベータ、ＭＦＧＥ８、ＳＬＩＴ２、ＳＴＸ３、ＴＣＲＡ、ＴＣＲＢ、ＴＣＲＤ、ＴＣＲＧ、ＶＴＩ１Ａ、ＶＴＩ１Ｂ、他のエキソソームポリペプチド、およびそれらの任意の組合せであるが、ポリペプチド構築物をＥＶに輸送することができる多数の他のポリペプチドは、本発明の範囲内に含まれる。典型的には、本発明の多くの実施形態において、少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドは、リソソームタ

ンパク質を含むポリペプチド構築物に含まれ、この融合ポリペプチド構築物はまた、リンカー、膜貫通ドメイン、サイトゾルドメイン、多量体化ドメイン、放出ドメインなどを含む、種々の他の成分を有利に含み得る。

【００２４】

用語「供給源細胞」もしくは「ＥＶ供給源細胞」もしくは「親細胞」もしくは「細胞供給源」もしくは「ＥＶ産生細胞」または任意の他の類似の用語は、適切な条件下で、例えば、懸濁培養、接着培養または任意の他の型の培養系において、および／またはｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、ＥＶを産生することができる任意の型の細胞に関連すると理解されるべきである。供給源細胞は、例えば、その後の翻訳のための対象へのポリヌクレオチド構築物の送達および例えば肝臓におけるＥＶのｉｎ　ｖｉｖｏ産生を介して、ｉｎ　ｖｉｖｏでエキソソームを産生する細胞も含み得る。本発明による最も有利な供給源細胞は、ＭＳＣ、ＡＥ細胞、および／または胎盤由来細胞であり、これらは全て哺乳動物、最も好ましくはヒト由来のものである。ＭＳＣは、例えば、骨髄、脂肪組織、ワルトンゼリー、周産期組織（例えば、羊膜、羊水膜、羊水、絨毛膜、胎盤、臍帯コード、ワルトンゼリー）、歯芽、臍帯コード血、皮膚組織などから得ることができる。一般に、ＥＶは、一次細胞源または不死化細胞系であっても、本質的に任意の細胞源に由来し得る。ＥＶ源細胞は、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）および任意の方法によって誘導された他の幹細胞、ならびに任意の成体細胞源を含む、任意の胚、胎児、および成体体幹細胞型であってもよい。供給源細胞は、治療される患者に対して同種異系、自己由来、または本質的に異種のいずれであってもよく、すなわち、細胞は、患者自身からのものであってもよく、または非血縁もしくは血縁の、一致もしくは不一致のドナーからのものであってもよい。特定の状況において、同種異系細胞は、特定の症状を患う患者の自己細胞から得ることができない可能性がある免疫調節効果を提供することができるので、医学的観点から好ましい場合がある。

【発明を実施するための形態】

【００２５】

第１の態様では、本発明は、ＭＳＣ、ＡＥ細胞または胎盤由来細胞から得ることができるＥＶ、いわゆるＭＳＣ－ＥＶ、ＡＥ－ＥＶ、およびＰ－ＥＶに関する。本発明によるＥＶは、さらに、種々の異なるＬＳＤにおけるそれらの治療活性を増強するために、少なくとも１つのリソソームタンパク質を含むかなりの複数のポリペプチド構築物を含むように内因的に操作される。用語「内因的に操作された」とは、ＥＶ産生ＡＥ、ＭＳＣおよび／または胎盤由来細胞が、細胞機構の助剤を借りてＥＶに組み込まれる治療用リソソームタンパク質をコードするポリヌクレオチド構築物を含むように遺伝子操作されることを意味する。ＥＶ産生細胞源の選択は、治療用リソソームタンパク質によるＥＶの集団全体にわたる高効率ロードを達成するための鍵である。対照的に、先行技術、例えばＷＯ２０１６／０４４９４７は、単に、エレクトロポレーション媒介外因性のロードを介してＧＡＡ酵素をロードされる（樹状細胞由来の）エキソソームに関する。タンパク質の外因性のローディングは、（ｉ）効率が低いこと、（２）ＥＶ集団全体にわたる分布が不均等であること、および（３）特に治療用リソソームタンパク質が高度にコンホメーション変化に感受性であるため、タンパク質ミスフォールディングのリスクが増大することを含む、いくつかの欠点を有する。

【００２６】

ＭＳＣ－ＥＶ、ＡＥ－ＥＶ、およびＰ－ＥＶの選択は、これらの細胞供給源由来のＥＶが、酵素活性もしくは輸送体活性、または該治療リソソームタンパク質が行う任意の他の活性にかかわらず、保持された治療活性を有する、正しく折り畳まれたリソソームタンパク質の多数のコピーを運ぶことができるという予想外の発見に基づく。また、本発明者らは、該細胞供給源（ＡＥ、ＭＳＣ、および胎盤由来細胞）が、リソソームタンパク質を標的細胞におけるそれらの正しい作用位置に能動的に送達する操作されたＥＶを産生することを予想外に認識した。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、これらの特性は、ＥＶ、特にエキソソームにおいて見出されるヒートショックタンパク質、特に

ヒートショック７０ｋｄａタンパク質８（遺伝子ＨＳＰＡ８によってコードされる、Ｈｓｐ７０－８としても知られる）の高含量の結果であり、これらの細胞源および該細胞が示すプロテオミクスフィンガープリントに由来すると推測される。

【００２７】

ＡＥ－ＥＶ、ＭＳＣ－ＥＶ、およびＰ－ＥＶに含まれるポリペプチド構築物は、有利な実施形態において、リソソームタンパク質のＥＶへの内在化を駆動するために、少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドをさらに含むように操作され得る。このようなＥＶ富化ポリペプチドは、本質的には、任意のＥＶポリペプチド、例えば、以下のＥＶ富化ポリペプチド：ＣＤ９、ＣＤ５３、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ５４、ＣＤ５０、ＦＬＯＴ１、ＦＬＯＴ２、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ７１、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＣＤ２３５ａ、ＡＬＩＸ、シンテニン－１、シンテニン－２、Ｌａｍｐ２ｂ、ＴＳＰＡＮ８、ＴＳＰＡＮ１４、ＣＤ３７、ＣＤ８２、ＣＤ１５１、ＣＤ２３１、ＣＤ１０２、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ３、ＮＯＴＣＨ４、ＤＬＬ１、ＤＬＬ４、ＪＡＧ１、ＪＡＧ２、ＣＤ４９ｄ／ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＢ５、ＩＴＧＢ６、ＩＴＧＢ７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８／ＩＴＧＢ２、ＣＤ４１、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ５１、ＣＤ６１、ＣＤ１０４、Ｆｃ受容体、インターロイキン受容体、免疫グロブリン、ＣＤ２、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ３ゼータ、ＣＤ１３、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ３０、ＣＤ３４、ＣＤ３６、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４７、ＣＤ８６、ＣＤ１１０、ＣＤ１１１、ＣＤ１１５、ＣＤ１１７、ＣＤ１２５、ＣＤ１３５、ＣＤ１８４、ＣＤ２００、ＣＤ２７９、ＣＤ２７３、ＣＤ２７４、ＣＤ３６２、ＣＯＬ６Ａ１、ＡＲＲＤＣ１、ＡＧＲＮ、ＥＧＦＲ、ＧＡＰＤＨ、ＧＬＵＲ２、ＧＬＵＲ３、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＳＰＧ２、Ｈｓｐ７０、Ｌ１ＣＡＭ、ＬＡＭＢ１、ＬＡＭＣ１、ＬＦＡ－１、ＬＧＡＬＳ３ＢＰ、Ｍａｃ－１アルファ、Ｍａｃ－１ベータ、ＭＦＧＥ８、ＳＬＩＴ２、ＳＴＸ３、ＴＣＲＡ、ＴＣＲＢ、ＴＣＲＤ、ＴＣＲＧ、ＶＴＩ１Ａ、ＶＴＩ１Ｂ、これらの任意の誘導体および／またはドメイン、ならびにこれらの任意の組合せ、から選択され得る。

【００２８】

本発明者らは、最も好都合なＥＶ富化ポリペプチドが、シンテニン、シンテニンの様々なＮ末端部分、およびＣＤ６３であることを認識した。これは、シンテニンが可溶性の管腔内ＥＶタンパク質であるのに対し、ＣＤ６３はＥＶ膜中に存在するテトラスパニンであるので、非常に驚くべきことである。これらの２つの異なるクラスのＥＶタンパク質が、ＥＶへの種々の型（膜貫通、可溶性など）のリソソームタンパク質のパッケージングに対してこのような顕著な効果を有するという事実は、きわめて偶然の発見であり、そしてＥＶ産生細胞供給源としてのＡＥ、ＭＳＣ、および胎盤由来細胞の賢明な選択に関連するようである。シンテニンおよびシンテニン自身のＮ末端部分は、融合ポリペプチド構築物のどこに挿入されるかにほとんど関係なく、非常に多数のリソソームタンパク質をＥＶに輸送することができるので、特に好都合なＥＶ富化ポリペプチドである。さらに、膜結合、膜貫通、および可溶性リソソームタンパク質を、生物活性を維持したままＥＶに輸送することもできる。

【００２９】

本発明のさらなる実施形態において、リソソームタンパク質は、アルファ－Ｄ－マンノシダーゼ、Ｎ－アスパルチル－ベーター－グルコサミニダーゼ、リソソーム酸リパーゼ、シスチノシン、リソソーム関連膜タンパク質－２（ＬＡＭＰ２）、アルファガラクトシダーゼＡ、酸性セラミダーゼ、アルファフコシダーゼ、カテプシンＡ、酸性ベータグルコシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、ベータヘキソサミニダーゼＡ、ベータヘキソサミニダーゼＢ、ＧｌｃＮＡｃ－１－ホスホトランスフェラーゼ、ベータガラクトシルセラミダーゼ、リソソーム酸性リパーゼ、アリールスルファターゼＡ、アルファ－Ｌ－イズロニダーゼ、イズロン酸－２－スルファターゼ、パランスルファミダーゼ、アセチルアルファ－グルコサミニダーゼ、アセチルＣｏＡ：アルファ－グルコサミニド－Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミン－６－スルファターゼ、Ｎ－アセチルガラクトサミ

ン－６－スルファターゼ、ヒアルロニダーゼ、アセチルガラクトサミン－４－スルファターゼ、ベーターグルクロニダーゼ、アルファ－Ｎ－アセチルノイラミニダーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミン－１－ホスホトランスフェラーゼ、ムコリピン－１、ホルミルグリシン生成酵素、パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ－１、トリペプチジルペプチダーゼＩ、システインストリングタンパク質、ＣＬＮ３ｐ、ＣＬＮ５ｐ、ＣＬＮ６ｐ、ＣＬＮ７ｐ、ＣＬＮ８ｐ、酸性スフィンゴミエリナーゼ、ＮＰＣ１、ＮＰＣ２、酸性アルファ－グルコシダーゼ、カテプシンＫ、シアリン、アルファ－Ｎ－アセチルガラクトサミニダーゼ、ＧＭ２アクチベーター、リソソーム酸リパーゼ、およびそれらの誘導体、領域、ドメイン、および／または任意の組合せ、を含む群から選択される。

【００３０】

特に好ましい実施形態において、リソソームタンパク質は、リソソーム膜タンパク質、好ましくはＮＰＣ１である。ＮＰＣ１は、その天然の状態でＡＥ－ＥＶ、ＭＳＣ－ＥＶおよび／またはＰ－ＥＶに操作され、ロードされ得るが、ＮＰＣ１タンパク質およびシンテニン、シンテニンのＮ末端部分、および／またはＣＤ６３のいずれか１つ以上を含む融合ポリペプチド構築物の使用を介して、該ＥＶにロードされてもよい。本発明の他の好ましい実施形態は、リソソームタンパク質ＬＡＭＰ２（例えば、Ｄａｎｏｎ病の治療のため）、シアリン（例えば、Ｓａｌｌａ病、乳児遊離シアル酸蓄積症の治療のための）、ＣＩＣ５（Ｘリンクされた高カルシウム腎結石症）、ＣＬＮ３（Ｂａｔｔｅｎ病）、シスチノシン（シスチン症）、および／またはＧＭ２アクチベータータンパク質（ＧＭ２ガングリオシド症）のいずれか１つ以上を含むポリペプチド構築物を含むＥＶを含む。

【００３１】

さらなる実施形態において、本発明のＥＶは、種々のタンパク質マーカーに対して陽性であるように選択され、これは、驚くべきことに、再生および免疫調節効果、ならびにＬＳＤの治療のための適切な薬物動態プロファイルと関連するようである。最も生物活性なＥＶは、以下のポリペプチド：ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ４４、ＳＳＥＡ４、ＣＤ１３３、ＣＤ２４のうちの１つ（しかし、しばしば少なくとも３つ）に対して陽性である。

【００３２】

なおさらなる実施形態において、本発明者らは、本明細書中のＥＶ供給源由来のＥＶが、遺伝子工学を用いなくても、種々のＬＳＤにおいて固有の効果を有することを認識した。これは、異なるＨｓｐタンパク質ファミリー、例えば、Ｈｓｐ９０、Ｈｓｐ７０（該ファミリーの最も重要なタンパク質は、ヒートショック７０ｋＤａタンパク質８（遺伝子ＨＳＰＡ８によってコードされ、Ｈｓｐ７０－８としても知られる）および／またはＨｓｐ４０である）由来の様々なヒートショックタンパク質（Ｈｓｐ）がＥＶ中に存在する結果であると推測される。しかしながら、同様の治療効果が他の細胞供給源由来のＥＶで観察されていないので、未修飾ＡＥ－ＥＶ、ＭＳＣ－ＥＶ、およびＰ－ＥＶのこの固有の活性に重要である他の因子が見かけ上存在する。

【００３３】

ヒートショックタンパク質は、タンパク質の適切なコンホメーションへの折り畳みを助けるシャペロンとして作用することが知られている。本発明者らは、特に高レベルのヒートショックタンパク質を含有するＥＶを産生する特異的細胞型を初めて記載し、これは、内因的にリソソームタンパク質を産生し、ＥＶにロードするように修飾された場合、内因的に産生されたリソソームタンパク質が適切に折り畳まれ、したがって高度に生物活性であることをもたらす。この戦略の第２の利点は、ヒートショックタンパク質が天然に豊富である、ＥＶ産生細胞自体によって生成され、ＥＶの保護された環境において標的細胞に輸送される翻訳後修飾を有する、ＥＶを用いたリソソーム蓄積障害を有する患者の治療が、患者細胞に既に存在する任意の突然変異リソソームタンパク質の折り畳みも改善すると考えられることである。これは、これらの細胞供給源からの未操作のＥＶに見られる固有の有益な効果を説明することができる。

【００３４】

先行技術、例えばＷＯ２０１６／０４４９４７とは異なり、ＥＶ産生細胞源の選択は、

正しく折り畳まれた治療用リソソームタンパク質を有するＥＶの集団全体にわたる高効率ロードを達成するための鍵である。ＷＯ２０１６／０４４９４７とは対照的に、本発明者らは、治療用リソソームタンパク質によるＥＶの内因性ロードが、正しく折り畳まれた機能的な治療用リソソームタンパク質（リソソーム酵素およびリソソーム輸送体の両方）の生物活性送達を達成するための優れた手法であることを認識した。ＷＯ２０１６／０４４９４７は、人工的に、外因的にそれらの形成後にエキソソームに添加されるシャペロン（例えば、ヒートショックタンパク質）が、治療を容易にし得ることに言及しているが、ＷＯ２０１６／０４４９４７において取られた外因性のロードアプローチから、天然のヒートショックタンパク質および他の天然のＥＶ成分の役割の理解が、正確に折り畳まれたタンパク質を有するＥＶの産生において果たされず、次いで、このタンパク質は、ヒートショックタンパク質の助けによって、リソソームタンパク質が正確な折り畳みで維持された状態で、正しい細胞内コンパートメントに局在化することが明らかである。

【００３５】

したがって、好ましい実施形態において、本発明のＥＶ産生細胞およびこれらの細胞によって産生されるＥＶの両方は、治療用リソソームタンパク質ならびに少なくとも１つのヒートショックタンパク質、好ましくは、ヒートショックタンパク質７０ｋＤａタンパク質８を含むポリペプチド構築物を含む。ＷＯ２０１６／０４４９４７とは異なり、ヒートショックタンパク質がＥＶ生産細胞に天然にに存在するということは、これらの内生ヒートショックタンパク質が生まれた時点からＥＶに存在していることを意味し、したがって、複雑で感応的な治療用リソソームタンパク質が最初から、すなわち、ＥＶに組み込まれる前、すなわちＥＶの製造時には、細胞からＥＶを分泌した後でも、また純化過程においても、ＥＶの製造時には正しく折り畳まれていることを保証するものであり、これにより製造製品の保存可能期間が長くなることが期待される。

【００３６】

さらに、ヒートショックタンパク質自体が内因性であり、したがってＥＶ産生細胞によって適切に翻訳後修飾されるという事実は、より良好なシャペロン活性をもたらし、したがってリソソームタンパク質のより良好な治療活性をもたらす可能性がある。まとめると、本発明の細胞が、内因的に産生されたリソソームタンパク質を、選択されたプロデューサー細胞型に内因的に存在するヒートショックタンパク質と組み合わせて使用するという事実は、ＥＶにロードされたリソソームタンパク質をもたらし、このリソソームタンパク質は、外因的にロードされたリソソームタンパク質よりも、有意に良好に折り畳まれ、したがって、より安定で、長寿命で、生物活性である。さらに、内因的にロードされ、内因的にシャペロン化されたリソソームタンパク質は、一旦標的細胞に送達されると、この適切に折り畳まれたコンホメーションで維持され続け、再び治療用タンパク質の生物活性を延長する。

【００３７】

したがって、正しい区画への細胞内送達、正しく折り畳まれた治療用リソソームタンパク質、および多数のリソソームタンパク質の集団全体にわたる存在に寄与するＥＶプロテオミクスフィンガープリントの組合せは、高い効力を有する治療用タンパク質の増強された細胞内送達、改善された固有の免疫調節効果、および製品コストの低減という点で、はるかに広範な意味を有する独特のアプローチを表す。

【００３８】

したがって、１つの有利な実施形態では、本発明は、ＡＥ、ＭＳＣ、および／またはＰ由来ＥＶの集団を含む組成物に関し、ＥＶの少なくとも５０％、６０％、または７０％が治療リソソームタンパク質に対して陽性であり、より好ましくは、ＥＶの少なくとも７５％が治療リソソームタンパク質に対して陽性であり、さらにより好ましくは、ＥＶの少なくとも９０％が治療リソソームタンパク質に対して陽性であり、および／またはさらにより好ましくは、ＥＶの少なくとも９５％が治療リソソームタンパク質に対して陽性である。重要なことに、本発明の治療用リソソームタンパク質は、ヒートショックタンパク質を含むＥＶへの該タンパク質の内因性ロードの結果として、正しく折り畳まれ、これは、問

題のタンパク質の正しい折り畳みを維持するのを助ける。

【００３９】

本発明によるＬＳＤの治療のための非常に強力なＥＶの非限定的な例には、以下が含まれる：

－治療用リソソームタンパク質、ならびにヒートショックタンパク質７０ｋＤａタンパク質８などの少なくとも１つの天然ヒートショックタンパク質を含むポリペプチド構築物の複数のコピーを含むＭＳＣ－ＥＶまたはＡＥ－ＥＶ。

－リソソームタンパク質シンテニン、シンテニンのリソソームタンパク質－Ｎ末端部分、またはリソソームタンパク質－ＣＤ６３を含むポリペプチド構築物を含むＡＥ－ＥＶ。特に好ましい例は、ＮＰＣ１－シンテニン、シンテニンのＮＰＣ１－Ｎ末端部分、またはＮＰＣ１－ＣＤ６３を含むポリペプチド構築物を含むＡＥ－ＥＶ。

－ＮＰＣ１－シンテニン、シンテニンのＮＰＣ１－Ｎ末端部分、またはＮＰＣ１－ＣＤ６３を含み、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ４４、ＳＳＥＡ４、ＣＤ１３３、ＣＤ２４の少なくとも１つに対して陽性であるポリペプチド構築物を含むＡＥ－ＥＶ。他のリソソームタンパク質は、他のＬＳＤのための治療を開発する場合、ＮＰＣ１タンパク質を天然に置き換え得る。

－ＡＥ－ＥＶは、上記のようなポリペプチド構築物を含み、少なくとも１つのＨｓｐ、好ましくはＨｓｐ４０、Ｈｓｐ７０（好ましくはＨｓｐ７０－８）、および／またはＨｓｐ９０またはその誘導体もしくはドメインのうちの１つ以上をさらに含む。

－複数の任意のリソソームタンパク質、好ましくはＬＡＭＰ２、シアリン、ＣＩＣ５、ＣＬＮ３、シスチノシン、ＧＭ２アクチベータータンパク質、またはＮＰＣ１などの膜貫通リソソームタンパク質を含むポリペプチド構築物を含むように操作されたＡＥ－ＥＶおよび／またはＭＳＣ－ＥＶ。

－天然ＡＥ－ＥＶおよびＭＳＣ（例えば、羊膜組織、胎盤組織、ワルトンゼリー、骨髄、または脂肪組織から入手可能）もまた、それらが少なくとも１つのＨｓｐを含む場合には、非改変形で治療のために利用され得る。

【００４０】

重要なことに、ＥＶ産生ＡＥ、ＭＳＣ、および胎盤由来細胞を最適化するための本発明の操作戦略は、ＡＥ－ＥＶ、ＭＳＣ－ＥＶ、およびＰ－ＥＶへのリソソームタンパク質の非常に効率的なローディングをもたらす。典型的には、本発明の各および全てのＥＶは、ポリペプチド構築物（したがって、リソソームタンパク質）の少なくとも５～１０コピーを含むが、より多くの場合、例えば、当該リソソームタンパク質の約２０～３０コピー、または３０～５０コピーなど１０コピーをはるかに超え、または、例えば、約７５コピーまたは約１００コピーなど、５０コピーを超える。明らかに、これは、治療効果にとって非常に重要であり、最適な操作戦略、細胞供給源、およびＥＶプロファイル、ならびにそのようなＥＶを産生および回収するための本発明の方法の意図的な選択なしには達成できない。

【００４１】

さらなる実施形態において、ＥＶは、臓器、組織または細胞標的化ペプチドおよび／またはポリペプチドをさらに含み得る。ＥＶを脳およびＣＮＳに輸送することにおいて強力であることが証明されている標的化ペプチドの例は、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）ペプチドであるが、他のペプチドおよびポリペプチドもまた、本発明の範囲内である。重要なことに、組織標的化ペプチドおよび／またはポリペプチドは、リソソームポリペプチド（および場合によりＥＶ富化ポリペプチド）も含むポリペプチド構築物中に含まれてもよく、および／またはＥＶ中に別個のポリペプチド構築物として存在してもよい。標的化ペプチドおよび／またはポリペプチドが別個のポリペプチド構築物の一部である場合、ＥＶへの効率的なロードを確実にするために、好ましくは、それはエキソソームタンパク質に融合される。

【００４２】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも１つのリソソームタンパク質および少な

くとも１つのＥＶ富化ポリペプチドを含むポリペプチド構築物に関する。上記のように、このようなポリペプチド構築物は、任意のＥＶタンパク質（すなわち、ＥＶ富化ポリペプチド）を含み得るが、特定のＥＶ富化ポリペプチド、例えば、ＣＤ６３およびシンテニンならびにシンテニンの領域が非常に好ましい。さらに、上記のように、さらなるエレメント、例えば、（ｉ）標的化ペプチドおよび／またはポリペプチド、（ｉｉ）フォールドオンドメインまたはロイシンジッパードメインなどの多量体化ドメイン、（ｉｉｉ）リンカーおよび切断または放出ドメインなどが、本発明のポリペプチド構築物に含まれ得る。有利な実施形態において、ポリペプチド構築物は、リソソームタンパク質（例えば、ＮＰＣ１、ＬＡＭＰ２、シアリン、ＣＩＣ５、ＣＬＮ３、シスチノシン、またはＧＭ２アクチベータータンパク質のうちの１つ以上）を含む。

【００４３】

さらに別の態様において、本発明は、本発明のポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物に関する。このようなポリヌクレオチド構築物は、種々のベクターを使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、および／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで天然に発現され得る。本発明のポリヌクレオチド構築物を含む好適なベクターは、さらに別の態様において、プラスミド；ミニサークル；任意の型の実質的に環状化されたポリヌクレオチド；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、および／またはカプシドフリーウイルスなどのウイルス；直鎖状ＤＮＡおよび／またはＲＮＡポリヌクレオチド；メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）；および／または修飾されたｍＲＮＡを含む。

【００４４】

なおさらなる態様において、本発明は、本明細書中に記載されるようなポリペプチド構築物、ポリヌクレオチド構築物、またはベクターの１つ以上を含む細胞に関する。当然、本発明のＥＶ産生細胞は、好ましくは、間葉間質細胞（ＭＳＣ）、羊膜上皮細胞（ＡＥ）および／または胎盤由来細胞であるが、任意の他の細胞もまた使用され得る。ＥＶ産生細胞は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、例えば細胞培養で、または任意のｅｘ　ｖｉｖｏもしくはｉｎ　ｖｉｖｏ系で存在し得る。本発明の細胞は、ＥＶの持続的な製造を可能にするために、任意に不死化されてもよい。

【００４５】

本発明の好ましい実施形態において、ＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥ、または胎盤由来細胞は、少なくとも１つの治療用リソソームタンパク質を含む少なくとも１つのポリペプチド構築物、該ポリペプチド構築物を符号化する少なくとも１つのポリヌクレオチド構築物、および／または本発明による少なくとも１つのベクターを含む。本発明の細胞は、典型的には、ポリヌクレオチド構築物（これは、例えば、プラスミド、ｍＲＮＡ、直鎖状ＤＮＡ分子、ウイルスまたはウイルスゲノムなどのようなベクターの形態で存在し得る）を含むように操作され、これは、細胞機構によって対応するポリペプチド構築物に発現され、そしてそれによって、通常、細胞によって産生されるエキソソームおよび／または微小胞である、ＥＶに組み込まれる。したがって、細胞は、通常、最初にポリヌクレオチド構築物（または該構築物を含むベクター）を含み、ポリペプチド構築物の発現および翻訳が完了すると、細胞は、ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチド構築物の両方を含み、これは、通常、ＥＶ媒介エキソサイトーシスを介して細胞から分泌され、ここで、各々およびまさにＥＶは、ポリペプチド構築物の複数のコピーを含む。

【００４６】

ポリペプチド構築物は、少なくとも１つの治療用リソソームタンパク質を含み、場合により、それは、少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチド、例えば、ＣＤ６３、シンテニン、シンデカン、Ａｌｉｘ、またはポリヌクレオチドおよびポリペプチドレベルの両方で治療用リソソームタンパク質に作動可能に連結され得る任意の他のＥＶ富化ポリペプチドと、１つのポリペプチド構築物中で組み合わされた治療用リソソームタンパク質を含む。

【００４７】

本発明のＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞は、好ましくは、（ａ）ＥＶ産生細胞に安定に挿入される少なくとも１つのリソソームタンパク質を含むポリペプチド構築物

をコードするポリヌクレオチド構築物；および／または（ｂ）少なくとも１つのリソソームタンパク質を含むポリペプチド構築物を含み得、これは、上記のように、任意に少なくとも１つのＥＶ富化ポリペプチドをさらに含み得る。安定的に（遺伝子的に）操作されたＥＶ産生細胞源の作製は、再現可能な治療効果を有し、化学、製造および制御（ＣＭＣ）の観点から再現可能な同一性を有するＥＶの一貫した高収率産生にとって重要である。安定な細胞は、通常、例えばｈＴＥＲＴ不死化、ウイルス不死化、および／または条件式不死化戦略を用いて不死化される。スケールでのＥＶ製造を可能にするために、ＥＶ製造細胞は、特定の数の集団倍加（ＰＤＬ）、好ましくは少なくとも２０ＰＤＬ、より好ましくは少なくとも５０ＰＤＬ、さらにより好ましくは少なくとも７０ＰＤＬ、さらにより好ましくは少なくとも１００またはさらに少なくとも２００ＰＤＬにわたってポリヌクレオチド構築物を（好ましくは適切なベクター中に）安定に含むことが好ましい。

【００４８】

本発明の好ましい態様において、ＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞によって産生されるＥＶの少なくとも５０％または６０％、好ましくは少なくとも７０％または８０％、さらにより好ましくは９０％または９５％以上は、少なくとも１つのリソソームタンパク質を含むポリペプチド構築物を含む。

【００４９】

本発明の別の好ましい態様において、ＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞によって産生されるＥＶは、リソソームタンパク質の少なくとも１０、２０、３０または４０コピー、好ましくは少なくとも５０コピー、より好ましくはリソソームタンパク質を含むポリペプチド構築物の少なくとも７０、８０または１００コピーを含む。ＥＶにおける治療用リソソームタンパク質の高コピー数および治療用リソソームタンパク質の集団全体にわたる存在は、本発明の細胞供給源の革新的な選択に起因するが、必要な場合、ＥＶ富化ポリペプチドの潜在的な包含、ならびに継続的なＥＶ製造のための安定に操作された細胞の作製にも起因する。

【００５０】

別の態様では、ＥＶを生成するＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞は、好適には以下の天然タンパク質、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ４４、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ１０５、ＳＳＥＡ４、ＣＤ１３３、ＣＤ２４、および／またはヒートショック７０ｋＤａタンパク質８のうちの一つまたはそれ以上で構成される。さらに好ましくは、ＥＶ産生ＭＳＣ、ＡＥまたは胎盤由来細胞は、以下の天然タンパク質、ＣＤ６３、ＣＤ８１、およびヒートショック７０ｋＤａタンパク質８を含む。両方の細胞におけるこれらの３つの天然タンパク質およびそれらの対応するＥＶ（およびより一般的には、Ｈｓｐ７０－８と組み合わされたテトラスパニン）の組合せは、高収率のＥＶ製造、治療用リソソームタンパク質の長期間にわたる正確な折り畳みおよび活性、ならびに標的細胞における正しい区画への効率的な生物活性送達と密接に関連する。

【００５１】

ヒートショックタンパク質、例えば、ヒートショック７０ｋＤａタンパク質８などのＨｓｐ７０ファミリー由来のヒートショックタンパク質の、細胞およびそれらの対応するＥＶの両方における天然の連続的な存在は、全ての治療リソソームタンパク質の折り畳みおよび活性にとって重要であるが、ＮＰＣ１、シスチノシン、シアリン、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、ＬＡＭＰ２Ａ、ＰＰＴ１、ＴＰＰ１、ＣＬＮ３、ＣＬＮ６、ＣＬＮ８、ＭＦＳＤ８、グルコシルセラミダーゼ、ＬＩＭＰ２、Ｌｇｐ８５、フロチリン－１、ＡＴＰ６Ｖ１Ｂ１、ＡＴＰ１３Ａ２、ＣＬＣＮ７、ＯＳＴＭ１、ＨＧＮＳＡＴ、ＬＭＢＲＤ１、ＴＲＰＭＬ１、ＴＲＰＭＬ３、ＤＩＲＣ２、ＳＰＰＬ２Ａ、ＤＩＲＣ２、ＤＮＡＪＣ５、および／またはＣＬＮ５などの膜貫通治療リソソームタンパク質にとって特に重要である。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、リソソーム膜貫通タンパク質の翻訳時に既に細胞中および細胞のＥＶ中に天然のヒートショックタンパク質（Ｈｓｐ７０－８など）が存在することが、タンパク質の正しい折り畳みを生成し、その後維持するための鍵であると推測される。ヒートショックタンパク質または他のシャペロン、例えば、低分

子シャペロンのその後の外因性の添加は、既に異常に折り畳まれたタンパク質を回収することができず、したがって、これは、問題の治療リソソーム膜貫通タンパク質の活性について有意なマイナスの影響を有する。したがって、本発明では、細胞および該細胞によって産生される対応するＥＶの両方において、高いレベルの天然ヒートショックタンパク質を有するＥＶ産生細胞源を選択する。

【００５２】

さらなる態様において、本発明はさらに、本明細書中に記載されるような複数のＥＶ、少なくとも１つのポリペプチド構築物、少なくとも１つのポリヌクレオチド、および／または少なくとも１つのベクター、ならびに薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物に関する。重要なことに、本明細書中の生物学的成分の全て（ＥＶ、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞など）は、有利には、単独で、または任意の組合せで一緒に、医薬組成物に含まれ得る。通常、本発明の医薬組成物は、ＥＶの集団および好適な医薬担体、添加剤、および／または賦形剤を含む。

【００５３】

別の実施形態では、医薬組成物は、有利には、ミグルスタット、アリモクロモール、ヘパリン、トレハロース、および／またはシクロデキストリン、および／またはそれらの任意の誘導体などの医薬品をさらに含むことができる。これらのタイプの組合せは、ＥＶが機能的リソソームタンパク質を送達し、次いでその効果がそのような医薬品によって増強されるので、高度に相乗的な治療効果をもたらし得る。興味深いことに、本発明者らはまた、ミグルスタット、アリモクロモール、およびシクロデキストリンをＥＶ産生細胞の培養物に添加することができ、その結果、ＥＶへの該薬剤の内因性ロードおよび増強された治療効果が得られることを認識した。これは、薬剤をＥＶに装填するための非常に容易な方法であり、本質的に、問題の薬剤の適切な濃度の存在下で、ＥＶ産生ＡＥ、ＭＳＣ、または胎盤由来細胞を培養することを含む。当然のことながら、本発明の医薬組成物は、リソソーム蓄積障害を治療するのに特に適しているが、リソソーム関与を有する他の疾患もまた、本明細書中の本発明を使用して治療され得る。このような疾患には、パーキンソン病、ＧＢＡを伴うパーキンソン病、アルツハイマー病、クローン病などが含まれる。

【００５４】

本発明によるＥＶを使用する治療のために特に興味深いＬＳＤには、以下の疾患の非限定的なリストが含まれる：アルファ－マンノシドーシス、ベータマンノシドシス、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステリルエステル貯蔵疾患、シスチノーゼ、ダノン病、ファブリー病、ファーバー病、フコシドーシス、ガラクトシアリドーシス、ゴーシェ病Ｉ型、ゴーシェ病ＩＩ型、ゴーシェ病ＩＩＩ型、ＧＭ１ガングリオシドーシスＩ型、ＧＭ１ガングリオシドーシスＩＩ型、ＧＭ１ガングリオシドーシスＩＩＩ型、ＧＭ２－サンドホフ病、ＧＭ２－テイサックス病、ＧＭ２－ガングリオシドーシス、ＡＢバリアント、ムコリピドーシスＩＩ、クラッベ病、リソソーム酸リパーゼ欠乏症、異染性白質ジストロフィー、ＭＰＳ　Ｉ－ハーラー症候群、ＭＰＳ　Ｉ－シェーイ症候群、ＭＰＳ　Ｉハーラー・シェーイ症候群、ＭＰＳ　ＩＩ－ハンター症候群、ＭＰＳ　ＩＩＩＡ－サンフィリポ症候群Ａ型、ＭＰＳ　ＩＩＩＢ－サンフィリポ症候群Ｂ型、ＭＰＳ　ＩＩＩＢ－サンフィリポ症候群Ｃ型、ＭＰＳ　ＩＩＩＢ－サンフィリポ症候群Ｄ型、ＭＰＳ　ＩＶ－モルキオＡ型、ＭＰＳ　ＩＶ－モルキオＢ型、ＭＰＳ　ＩＸ－ヒアルロニダーゼ欠損症、ＭＰＳ　ＶＩ－マロトーラミー、ＭＰＳ　ＶＩＩ－スライ症候群、ムコリピドーシスＩ－シアリドーシス、ムコリピドーシスＩＩＩＣ、ムコリピドーシスＩＶ型、多発性スルファターゼ欠損症、神経セロイドリポフスチン症Ｔ１、神経セロイドリポフスチン症Ｔ２、神経セロイドリポフスチン症Ｔ３、神経セロイドリポフスチン症Ｔ４、神経セロイドリポフスチン症Ｔ５、神経セロイドリポフスチン症Ｔ６、神経セロイドリポフスチン症Ｔ７、神経セロイドリポフスチン症Ｔ８、神経セロイドリポフスチン症Ｔ９、神経セロイドリポフスチン症Ｔ１０、ニーマンピック病Ａ型、ニーマンピック病Ｂ型、ニーマンピック病Ｃ型、ポンペ病、ピクノディスストーシス、サラー病、シンドラー病、ウォルマン病。

【００５５】

さらなる態様において、本発明は、（ｉ）ＥＶ、（ｉｉ）少なくとも１つのポリペプチド構築物、（ｉｉｉ）少なくとも１つのポリヌクレオチド構築物、および／または（ｉｖ）少なくとも１つのベクターのいずれか１つ以上を含む組成物を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物のリソソームおよび／または任意の他の細胞区画におけるリソソームタンパク質の量を増加させる方法に関する。さらに、本発明はまた、（ｉ）本発明によるＥＶの集団を含む医薬組成物を提供する工程、および（ｉｉ）体重１ｋｇ当たり少なくとも１０＾６　ＥＶの用量を患者に投与する工程を含む、それを必要とする対象におけるＬＳＤの治療方法に関する。重要なことに、上記のように、治療的介入は、あるいは、ポリペプチド構築物、ポリヌクレオチド構築物、および／またはこのようなポリヌクレオチド構築物を含むベクターのいずれかを患者に投与することを含み得る。これは、種々の送達ベクター、例えば、脂質ナノ粒子またはポリマーもしくはペプチドベースの送達ベクターを使用して実施することができる。組成物、ＥＶ、ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド構築物は、種々の投与経路、例えば、皮下投与、血管内および／または静脈内投与、経口投与、腹腔内投与、髄腔内投与、脳室内投与などを介して対象に投与され得る。

【００５６】

実験例

材料および方法

構築物設計およびクローニング：少なくとも１つのリソソームタンパク質および場合により他のポリペプチドドメイン（ＥＶ富化ポリペプチドなど）を含む様々なポリペプチド構築物が構築され、ベクターにクローニングされ、いくつかの異なるＥＶ産生細胞源、特にＡＥ細胞、ＭＳＣおよび胎盤由来細胞において産生されている。ＯＲＦは、典型的には、合成によって生成され、哺乳動物発現ベクターｐＳＦ－ＣＡＧ－Ａｍｐにクローン化された。簡単に述べると、合成したＤＮＡおよびベクタープラスミドを、製造業者の説明書（ＮＥＢ）にしたがって、酵素ＮｏｔｌおよびＳａｌｌで消化した。制限され、精製されたＤＮＡ断片を、製造業者の説明書（ＮＥＢ）にしたがってＴ４リガーゼを用いて一緒に連結した。成功したライゲーション事象を、アンピシリン補充プレート上での細菌形質転換によって選択した。トランスフェクションのためのプラスミドは、製造業者の説明書にしたがって「ｍａｘｉ－ｐｒｅｐ」によって生成した。

細胞培養およびトランスフェクション

【００５７】

実験デザインおよびアッセイに依存して、一定の場合において、非ウイルス一過性トランスフェクションおよびエキソソーム製造が、従来の２Ｄ細胞培養において実施されたが、他の場合において、ウイルス媒介形質導入が、安定な細胞株を作製するために使用され、これは、代表的には、異なる型のバイオリアクターにおいて培養された。安定に操作されたＥＶ産生細胞はまた、本発明のポリヌクレオチド構築物および／またはポリヌクレオチド構築物が含まれる適切なベクターの非ウイルストランスフェクションを使用して産生され得る。簡潔にするために、本明細書ではいくつかの例のみを挙げる。

【００５８】

リソソームタンパク質とＥＶポリペプチドの種々の組合せに対する安定な細胞系統のウイルストランスダクションおよびウイルス生成の場合、ＢＭ－ＭＳＣ、ＷＪ－ＭＳＣ、羊膜上皮細胞、羊膜間葉間質細胞、または胎盤由来細胞などの細胞源は、通常、レンチウイルス（ＬＶ）を使用してウイルストランスダクションされた。典型的には、２μＬのＬＶおよび場合によりポリブレン（またはヘキサジメトリンブロミド、ウェル上の最終濃度８μｇ／ｍＬ）を細胞培養物に添加し、形質導入後２４時間で、形質導入細胞の細胞培地を新鮮な完全培地に交換する。形質導入後７２時間で、ピューロマイシン選択（４～６μｇ／ｍｌ）を、通常７日間行い、続いて、目的のタンパク質、代表的には、リソソームタンパク質および任意に他のポリペプチド、例えば、ＥＶ富化ポリペプチド）を含むポリペプチド構築物の安定な発現の分析を行う。安定的に修飾されたＭＳＣ（例えば、骨髄、ワルトンゼリー、脂肪組織、羊膜、羊水などの羊膜組織から）、ＡＥ細胞または胎盤由来細胞もまた、例えば、化学ベースのトランスフェクションおよび／またはトランスフェクショ

ンの物理的な方法を使用して、非ウイルス方法を使用して作製した。化学的トランスフェクション方法は、例えば、カチオン性脂質および／またはリポソーム（しばしばリポフェクションと呼ばれる）、カチオン性ポリマー、デンドリマー、リン酸カルシウム、ジエチルアミノエチルデキストランおよび／またはそれらの任意の組合せなどの脂質ベースの薬剤を使用して、ポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドを含むベクターを導入することを含む。物理的方法は、エレクトロポレーション、細胞圧搾、マイクロインジェクションなど、ならびに当業者に公知の安定な細胞株を作製するための種々の他の物理的方法を包含した。安定な細胞株を作製するための物理的および化学的方法はまた、組み合わせられ得、例えば、リポフェクションまたはカチオンポリマーをエレクトロポレーションと組み合わせるか、または当業者に公知のように、安定な細胞を作製するための任意の他の型の組合せである。

【００５９】

安定な細胞を、２Ｄ培養またはバイオリアクター、代表的には、中空繊維バイオリアクターおよび／または撹拌槽バイオリアクターおよび／または振盪バイオリアクター、例えば、Ｗａｖｅ袋のいずれかにおいて培養し、次いで、馴化培地を、エキソソーム調製のために収集した。細胞を懸濁液（例えば羊膜由来細胞）中で増殖させた場合、種々の調製および純化工程を行った。通常の作業フローは、上澄み液の予備清浄、ろ過による濃縮、クロマトグラフィーベースのタンパク質汚染物質の除去、およびインビトロおよび／またはインビボアッセイのための適当な緩衝液中での得られたエキソソーム成分の任意の配合組成の工程を含む。

【００６０】

アッセイおよび分析

ウェスタンブロットは、ＥＶにおける富化ポリペプチド構築物を評価するための非常に簡便な分析方法である。簡潔には、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、製造業者の指示（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｎｏｖｅｘ　ＰＡＧＥ　４－１２％ゲル）にしたがって実施し、これにより、1×10^{10}エキソソームおよび２０μｇ細胞溶解物を、ウェルごとにロードした。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルからのタンパク質は、製造者の指示（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にしたがってＰＶＤＦ膜に移転された。膜をオディッセイブロッキング緩衝液（Ｌｉｃｏｒ）中でブロックし、供給者の指示にしたがってリソソームタンパク質および／またはエキソソームタンパク質に対する抗体でプローブした（一次抗体－Ａｂｃａｍ、二次抗体－Ｌｉｃｏｒ）。分子プローブは、６８０および８００ｎｍの波長で可視化された。ＥＶサイズ決定のために、ナノ粒子追跡分析（ＮＴＡ）を、分析ソフトウェアを備えたＮａｎｏＳｉｇｈｔ機器を用いて行った。全ての記録について、１３または１５のカメラレベルおよび自動機能を、全ての取得後設定に使用した。電子顕微鏡および蛍光顕微鏡は、細胞内の位置および放出を理解し、ＥＶを定量および分析するために頻繁に使用した。

【００６１】

種々の方法、典型的にはＴＦＦおよびＬＣ、特にビード溶離液ＬＣおよびイオン交換クロマトグラフィーなどのろ過の組合せを用いて、ＥＶを単離および精製した。典型的には、ＥＶ含有培地を収集し、３００ｇで５分間低速スピンし、続いて２０００ｇで１０分間スピンして、より大きな粒子および細胞破片を除去した。あるいは、とりわけ懸濁細胞のケースでは、上澄み液の予備清浄のために様々なフィルタを使用した。次いで、上澄み液を０．２２ｍの注射器フィルタでろ過し、様々な純化工程にかけた。１００ｋＤａカットオフフィルタを有するＶｉｖａｆｌｏｗ　５０Ｒ接線流（ＴＦＦ）装置（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）または１００または３００ｋＤａカットオフホローファイバーフィルタを有するＫＲ２ｉ　ＴＦＦシステム（ＳｐｅｃｔｒｕｍＬａｂｓ）を使用して、大容量をダイアフィルトレーションし、約２０ｍＬに濃縮した。次に、予め濃縮した培地を、ＡＫＴＡプライムプラスまたはＡＫＴＡ　Ｐｕｒｅ　２５クロマトグラフィーシステム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に接続したビード溶出液カラム（ＨｉＳｃｒｅｅｎまたはＨｉＴｒａｐ　Ｃａｐｔｏコア７００カラム、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒ

ｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に装填した。カラム平衡化、試料装填およびカラム洗浄のための流速設定を、製造業者の指示にしたがって適切に選択した。試料を紫外線吸光度クロマトグラムにしたがって集め、アミコンウルトラ－１５　１０ｋＤａ分子量カットオフスピンフィルタ（ミリポア）を用いて１００μＩの最終体積まで濃縮し、さらなるダウンストリーム解析のために－８０℃で保存した。タンパク質およびＲＮＡ溶出プロファイルを評価するために、培地を濃縮し、１００ｋＤａおよび３００ｋＤａ中空繊維フィルタを用いてＫＲ２ｉ　ＴＦＦシステムでダイアフィルトレーションし、試料をトリコーン１０／３００セファロース４高速流（Ｓ４ＦＦ）カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）で分析した。

【実施例】

【００６２】

実施例１．

分娩後胎盤から入手可能な羊膜上皮（ＡＥ）細胞を、ＮＰＣ１タンパク質およびＥＶ富化タンパク質シンテニン（ＮＰＣ１Ｓ）（配列番号２）のＮ端子部分を含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物を用いて（レンチウイルス形質導入を用いて）遺伝子操作した。ＡＥ細胞によって産生されたＡＥ－ＥＶを回収し、精製し、患者由来線維芽細胞（ＰＤＦ）におけるコレステロール輸送を増強する能力についてｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。図１に見られるように、ＮＰＣ１　ＡＥ－ＥＶは、生物活性ＮＰＣ１タンパク質を細胞に大量に送達することによって、標的細胞中のコレステロールレベルを有意に減少させた。興味深いことに、ＡＥ－ＥＶおよびＭＳＣ－ＥＶのみを使用する場合（および他の細胞源を使用しない場合）、ＥＶ富化ポリペプチドの存在なしに、ＮＰＣ１タンパク質自体を発現するようにＡＥ細胞を遺伝子操作することによって、コレステロール蓄積の用量依存的減少を達成することも可能であった（データは示さず）。ＥＶ産生細胞およびそれらの対応する生物活性ＥＶは、全て、様々なヒートショックタンパク質、重要なことにはＨｓｐ７０ファミリー、より具体的にはＨｓｐ７０－８について陽性であった。

【００６３】

実施例２．

ワルトンゼリーＭＳＣ由来ＥＶ（ＷＪ－ＭＳＣ－ＥＶ、ワルトンゼリーから入手可能）を、リソソームタンパク質シスチノシンおよびＥＶ富化タンパク質ＣＤ６３を含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチド構築物で遺伝子操作した。シスチノシン含有ＷＪ－ＭＳＣ－ＥＶ（ＣＹＳ　ＥＶ）を、ＷＪ－ＭＳＣの中空繊維バイオリアクター細胞培養物から回収し、精製し、患者由来皮膚線維芽細胞（ＰＤＳＦ）に対してｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価して、シスチン症のｉｎ　ｖｉｔｒｏモデルにおけるシスチン集積の減少を評価した。図２は、ＣＤ６３シスチノシンポリペプチド構築物を含むＷＪ－ＭＳＣ－ＥＶを適用した場合に見られるシステインの強い減少を示す。実施例１と同様に、ＷＪ－ＭＳＣおよびＷＪ－ＭＳＣ－ＥＶは、Ｈｓｐ７０タンパク質、特にＨｓｐ７０－８、ならびにテトラスパニンＣＤ６３およびＣＤ８１に対して陽性であった。

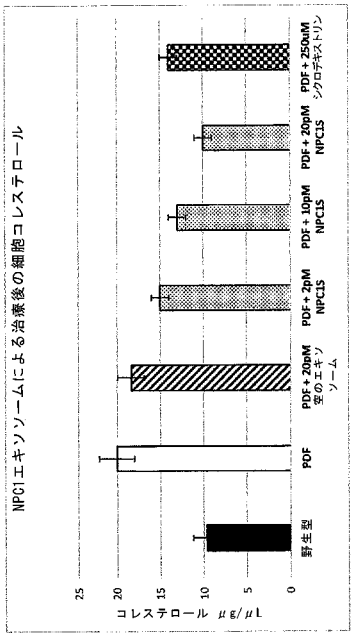
【００６４】

実施例３．

ＣＤ４４、ＳＳＥＡ４、ＣＤ１３３、ＣＤ２４、およびＨｓｐ７０－８に対して陽性であり、複数のＮＰＣ１－シンテニンポリペプチド構築物を含むように操作されたＡＥ－ＥＶを、Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病のダブルノックアウトマウスモデルにおいてインビボで評価した。操作されたＡＥ－ＥＶは肝臓病と中枢神経疾患の両方で有意な治療効果を示した（図３）。非操作ＡＥ‐ＥＶはまた、ＡＥ‐ＥＶ中の種々のヒートショックタンパク質の高含量から誘導可能な治療効力を示した。

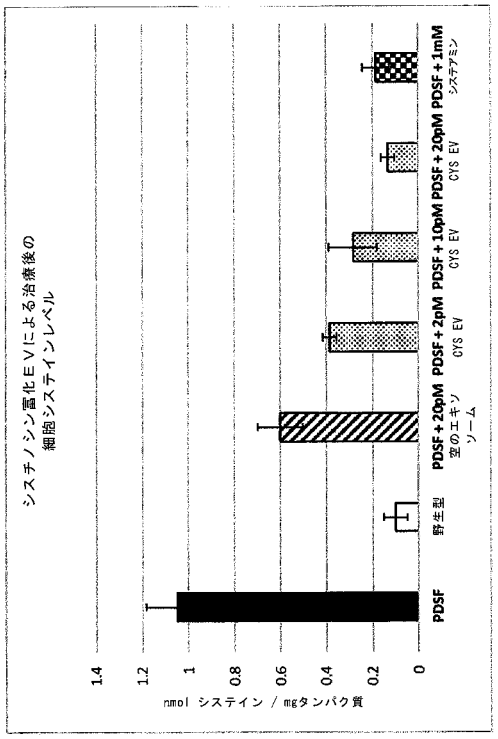
【図１】

図１



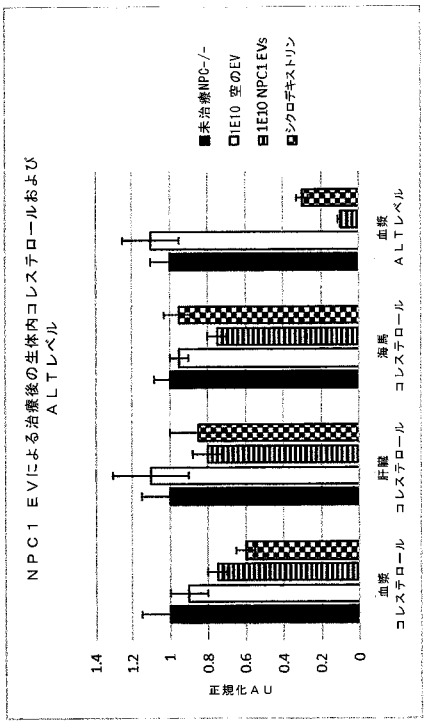
【図２】

図２



【図３】

図３



【図４】

図４

配列番号１：シンテニン（ヒト）
MSLYPSLEDLK VDKVIQAQTA FSANPANPAI LSEASAPIPH DGNLYPRLYP ELSQYMGLSL
NEEERANVA VVSGAPLQGQ LVARPSSINY MVAPVTGNDV GIRRAEIKQG TREVILCKDQ
DGKTGLRLKS IDNGIFVQLV GANSPASLVG LRFGDQVLQI NGENCAGWSS DKAHKVLKQA
FGEKITMTIR DRPFERTITM HKDSTGHVGF IFKNGKITSI VKDSSAARNG LLTEHNICEI
NGQNVGLKD SQIADILSTS GTVVTITIMP AFIFEHIKRT MAPSIMKSLM DHTIPEV
配列番号２：シンテニンのＮ末端部分（ヒト）
RSLYPSLEDLKVDKVIQAQTAFSANPANPAILSEASAPIPHDGNLYPRLYPELSQYMGLSLEGG
配列番号３：トランスフェリン受容体エンドソームソーティングドメイン（ヒト）
MDQARSAFSN LFGGEPLSYT RFSLARQVDG DNSHVEMKLA VDEEENADNN TKANVTKPK

【配列表】
2021502105000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/081122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/50 A61K38/00 A61P3/00 A61K9/50 C12N5/073
ADD.

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)
A61P A61K C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/044947 A1 (EXERKINE CORP [CA]) 31 March 2016 (2016-03-31) cited in the application abstract paragraph [0071] paragraph [0086] - paragraph [0094] claims 1-26; examples 1,4,5; table 1 -----	1-27
Y	WO 2016/197196 A1 (PRINCE HENRY'S INST OF MEDICAL RES TRADING AS THE HUDSON INST OF MEDIC) 15 December 2016 (2016-12-15) abstract paragraph [0013] - paragraph [0021]; figure 1 ----- -/--	1,3,6-9, 12-15, 17,18, 20-27

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 January 2019	12/02/2019

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mossier, Birgit

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2018/081122

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. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/081122

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/179227 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER [US]) 26 November 2015 (2015-11-26) abstract; claims 15,16; example 1; table 1	1,3,6-9, 12-15, 17,18, 20-27
Y	SHELLER SAMANTHA ET AL: "801: Isolation and characterization of amnion epithelial cell-derived exosomes", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, vol. 214, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01), - 1 January 2016 (2016-01-01), XP029370860, ISSN: 0002-9378, DOI: 10.1016/J.AJOG.2015.10.850 abstract; figure 1	1,3,6-9, 12-15, 17,18, 20-27
Y	STICKNEY ZACHARY ET AL: "Development of exosome surface display technology in living human cells", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 472, no. 1, 18 February 2016 (2016-02-18), pages 53-59, XP029445487, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2016.02.058 abstract page 57, column 2, paragraph 2 - page 58; figures 1,2	2,4,5, 10,11, 16,19
A	WO 2016/057755 A1 (ANTHROGENESIS CORP [US]) 14 April 2016 (2016-04-14) abstract paragraph [0240]; table 1	1-27
A	Lorena Urbanelli ET AL: "Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Exosome-based strategies for Diagnosis and Therapy", Recent Patents on CNS Drug Discovery, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 10-27, XP055333295, Retrieved from the Internet: URL:http://content.eurekaselect.com/download.php?param=Sk9V1Uk56BTFpMvQbkVOkL1JyQQ0A4vMdTAv8MS8xwMDiA2UEFJOoLnBfkZnwx8YrXBwdbGl8jYXDRpbB24vscGRumfHiwyNvDJluMWEcyNmlFiMrGJj0NDEf3ND3UzYuzA2qNzcw4NDaJiNfThkfNQTcVYpTcVY&key=VWlxjRWlruZEDUtQrVNEqc2RlZZkcVJQrTMyiRDMf1Rjjc1N2DV2wLTQg3MzfItM5jM1hNjQfzMj8NERs2VE abstract; figure 1; tables 1,2,9,10	1-27

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/081122

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CONLAN R STEVEN ET AL: "Exosomes as Reconfigurable Therapeutic Systems", TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB, vol. 23, no. 7, 22 June 2017 (2017-06-22), pages 636-650, XP085092668, ISSN: 1471-4914, DOI: 10.1016/J.MOLMED.2017.05.003 abstract page 642, paragraph 3 - page 643, paragraph 2; figure 1; tables 1,2 -----	1-27

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2018/081122

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016044947 A1	31-03-2016	CA 2962081 A1	31-03-2016
		WO 2016044947 A1	31-03-2016
WO 2016197196 A1	15-12-2016	AU 2016275566 A1	21-12-2017
		CA 2989172 A1	15-12-2016
		CN 108025027 A	11-05-2018
		EP 3307286 A1	18-04-2018
		JP 2018518534 A	12-07-2018
		KR 20180042217 A	25-04-2018
		PH 12017502283 A1	11-06-2018
		WO 2016197196 A1	15-12-2016
WO 2015179227 A1	26-11-2015	AU 2015264519 A1	15-12-2016
		CA 2949083 A1	26-11-2015
		CN 106714781 A	24-05-2017
		EP 3145493 A1	29-03-2017
		JP 2017517505 A	29-06-2017
		KR 20170005854 A	16-01-2017
		US 2017258840 A1	14-09-2017
		WO 2015179227 A1	26-11-2015
WO 2016057755 A1	14-04-2016	AU 2015330855 A1	27-04-2017
		CA 2964114 A1	14-04-2016
		CN 107106615 A	29-08-2017
		EP 3204022 A1	16-08-2017
		JP 2017536096 A	07-12-2017
		US 2017252379 A1	07-09-2017
		WO 2016057755 A1	14-04-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	*1/16*	*(2006.01)*	A61P	1/16		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61K	*35/28*	*(2015.01)*	A61K	35/28		
A61K	*35/50*	*(2015.01)*	A61K	35/50		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61K	*31/445*	*(2006.01)*	A61K	31/445		
A61K	*31/4545*	*(2006.01)*	A61K	31/4545		
A61K	*31/727*	*(2006.01)*	A61K	31/727		
A61K	*31/724*	*(2006.01)*	A61K	31/724		
A61K	*31/7016*	*(2006.01)*	A61K	31/7016		
C12N	*9/24*	*(2006.01)*	C12N	9/24		
C12N	*9/20*	*(2006.01)*	C12N	9/20		
C12N	*9/16*	*(2006.01)*	C12N	9/16	B	
C12N	*9/10*	*(2006.01)*	C12N	9/10		
C12N	*9/12*	*(2006.01)*	C12N	9/12		
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C12N	9/16	Z	
C07K	*14/715*	*(2006.01)*	C07K	16/00		
C07K	*14/705*	*(2006.01)*	C07K	14/715		
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C07K	14/705		
			C12N	15/12		

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

(72)発明者　ジャスティン・ヒーン
イギリス・ＯＸ２・７ＳＳ・オックスフォード・オルドリッチ・ロード・１７
(72)発明者　ペル・ルンディン
イギリス・ＯＸ３・０ＥＲ・オックスフォード・ウィリアム・ストリート・４
(72)発明者　アンドレ・グルゲンス
スウェーデン・１４１６２・フッディンゲ・ドマルヴェーゲン・１８

Ｆターム(参考)　4B050 CC07 DD07 JJ06 LL01
4B065 AA93X AA93Y AB01 BA02 CA44
4C086 AA01 AA02 BC21 EA01 EA21 EA27 GA07 GA08 MA02 MA03
MA04 NA05 NA14 ZA15 ZA75 ZB26 ZC21 ZC75
4C087 AA01 AA02 AA03 BB58 BB65 CA04 CA16 MA02 NA05 NA14
ZA15 ZA75 ZB26 ZC21 ZC75
4H045 BA10 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74