(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5月15日(15.05.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/100522 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/039758

(22) 国際出願日： 2024年11月8日(08.11.2024)

(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 2023-192277 2023年11月10日(10.11.2023) JP

(71) 出願人: 公立大学法人大阪 (**UNIVERSITY PUBLIC CORPORATION OSAKA**) [JP/JP]; 〒5360025 大阪府大阪市城東区森之宮一丁目６番８５号３階 (JP).

(72) 発明者: 立花 亮 (**TACHIBANA Akira**); 〒5998531 大阪府堺市中区学園町１番１号 大阪公立大学内 (JP).

(74) 代理人: 田▲崎▼ 聡, 外 (**TAZAKI Akira** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 (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, 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,

(54) **Title:** POLYPEPTIDE, FUSION PROTEIN, METHOD FOR PRODUCING FUSION PROTEIN, METHOD FOR LOCALIZING PROTEIN IN EXOSOME, EXOSOME, AND METHOD FOR PRODUCING EXOSOME

(54) 発明の名称： ポリペプチド、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、エクソソームにタンパク質を局在化させる方法、エクソソーム、及びエクソソームの製造方法

(57) **Abstract:** Provided is a polypeptide for localizing a fusion protein of a protein and the polypeptide in an exosome by being added to the C-terminus of the protein, wherein, in the polypeptide, the N-terminal amino acid sequence includes an amino acid sequence represented by formula 1 and the C-terminal amino acid sequence includes an amino acid sequence represented by formula 2. Formula 1: K-X^{11}-X^{12}-X^{13}-K, wherein X^{11} and X^{12} each independently represent any one amino acid residue selected from the group consisting of an L-lysine residue, an L-arginine residue, an L-serine residue, an L-threonine residue, and an aliphatic amino acid residue, and X^{13} represents an L-lysine residue or an L-arginine residue. Formula 2: C-X^{21}-X^{22}-X^{23}, wherein X^{21} and X^{22} each independently represent an aliphatic amino acid residue, and X^{23} represents an amino acid residue.

(57) 要約：Ｎ末端側のアミノ酸配列が式１で示されるアミノ酸配列を含み、Ｃ末端のアミノ酸配列が式２で示されるアミノ酸配列を含む、タンパク質のＣ末端に付加することにより前記タンパク質との融合タンパク質をエクソソームに局在化させるためのポリペプチド。 Ｋ－Ｘ^{11}－Ｘ^{12}－Ｘ^{13}－Ｋ ・・・式１ ただし、式１中、Ｘ^{11}及びＸ^{12}はそれぞれ独立にＬ－リシン残基、Ｌ－アルギニン残基、Ｌ－セリン残基、Ｌ－トレオニン残基、及び脂肪族アミノ酸残基からなる群から選択されるいずれか１種のアミノ酸残基であり、Ｘ^{13}はＬ－リシン残基又はＬ－アルギニン残基である。 Ｃ－Ｘ^{21}－Ｘ^{22}－Ｘ^{23} ・・・式２ ただし、式２中、Ｘ^{21}及びＸ^{22}はそれぞれ独立に脂肪族アミノ酸残基であり、Ｘ^{23}は任意のアミノ酸残基である。

WO 2025/100522 A1

［続葉有］

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 ：

ポリペプチド、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、エクソソームにタンパク質を局在化させる方法、エクソソーム、及びエクソソームの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ポリペプチド、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、エクソソーム、及びエクソソームの製造方法に関する。本願は、２０２３年１１月１０日に、日本に出願された特願２０２３－１９２２７７号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] エクソソームは細胞が産生する小胞（大きさ約１００ｎｍ）であり、さまざまな生物学的役割を担っている。エクソソームはタンパク質及び／又は核酸を含み、細胞間で情報伝達を担うことが知られている。このような特徴から、エクソソームは、バイオマーカー又はドラッグデリバリー担体としての利用が有望視されている。

[0003] 特許文献１には、「標的タンパク質を含むエクソソームであって、前記標的タンパク質の少なくとも一部が、外因性配列から発現され、前記標的タンパク質が、ＭＡＲＣＫＳ、ＭＡＲＣＫＳＬ１、ＢＡＳＰ１、またはその断片もしくは改変体を含む、前記エクソソーム。」及び「操作エクソソームの作製方法であって、ａ．（ｉ）ＭＡＲＣＫＳ、ＭＡＲＣＫＳＬ１、ＢＡＳＰ１、またはその断片もしくは改変体をコードする第１の配列、及び、（ｉｉ）カーゴペプチドをコードする第２の配列、を含む融合ポリペプチドをコードする核酸構築物を細胞に導入するステップ、ｂ．前記細胞に前記融合ポリペプチドを発現させることが可能な条件下に、前記細胞を維持するステップ、ならびにｃ．前記細胞から、前記融合ポリペプチドを含む前記操作エクソソームを得るステップ、を含む、前記方法。」が開示されている。

[0004] 特許文献２には、「足場タンパク質に連結した生物学的に活性な分子を含む単離された細胞外小胞（ＥＶ）であって、前記足場タンパク質はＮ末端ドメイン（ＮＤ）及びエフェクタードメイン（ＥＤ）を含み、前記ＮＤは前記ＥＶの内腔表面と会合し、前記ＥＤはイオン相互作用によって前記ＥＶの前記内腔表面と会合し、前記ＥＤは配列中に少なくとも２つの連続したリジン（Ｌｙｓ）を含む、前記単離された細胞外小胞（ＥＶ）。」が開示されている。

[0005] 特許文献３には、「細胞外小胞（ＥＶ）に、アンカリング部分（ＡＭ）を介して共有結合的に連結された生物学的に活性な分子（ＢＡＭ）を含む、ＥＶであって、ここで、前記アンカリング部分は、［ＡＭ］－［リンカー］ｎ－［ＢＡＭ］式（Ｉ）（式中、ｎは、任意の数である）を含む、前記ＥＶ。」が開示されている。

[0006] 非特許文献１には、ＣＤ９及びＣＤ６３などの従来知られていたタンパク質の他に、ＰＴＧＦＲＮ（プロスタグランジンＦ２受容体インヒビター）及びＢＡＳＰ１（Brain Abundant Membrane Attached Signal Protein 1）がＥＶに存在することが開示されている。また、非特許文献１には、ＰＴＧＦＲＮ又はＢＡＳＰ１と他のタンパク質との融合タンパク質がＥＶ（Extracellular Vesicle）に局在化すること、及びＢＡＳＰ１のＮ末端の８～１０個のアミノ酸配列からなるポリペプチドを任意のタンパク質のＮ末端に付加するだけでＥＶに局在化することも開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特表２０２１－５０３３００号公報

特許文献2：特表２０２２－５１３０４９号公報

特許文献3：特表２０２２－５５０２４８号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Dooley K.，他２７名、“A versatile platform for generating engineered extracellular vesicles with defined therapeutic propert

ies”、Molecular Therapy、 2021年、第29巻、第5号、ｐ．1729－1743

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 特許文献１に開示された技術では、ＢＡＳＰ１のＮ末端の８～１０個のアミノ酸配列からなるポリペプチドを目的のタンパク質のＮ末端に付加することが必須である。しかし、例えば、細胞膜タンパク質はそのＮ末端に分泌シグナルが欠かせないものであり、原理的に前記ポリペプチドを付加することが不可能である。

[0010] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、任意のタンパク質をエクソソームへ局在化させることができる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

[0011] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、特定のアミノ酸配列（以下「エクソソーム局在化配列」ともいう。）からなるポリペプチドをタンパク質のＣ末端に付加することで、前記タンパク質と前記ポリペプチドとの融合タンパク質をエクソソームに局在化させられることを知得し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の態様を含む。

[0012] ［１］ Ｎ末端側のアミノ酸配列が式１で示されるアミノ酸配列を含み、Ｃ末端のアミノ酸配列が式２で示されるアミノ酸配列を含む、タンパク質のＣ末端に付加することにより前記タンパク質との融合タンパク質をエクソソームに局在化させるためのポリペプチド。

Ｋ－X^{11}－X^{12}－X^{13}－Ｋ ・・・式１

ただし、式１中、X^{11}及びX^{12}はそれぞれ独立にＬ－リシン残基、Ｌ－アルギニン残基、Ｌ－セリン残基、Ｌ－トレオニン残基、及び脂肪族アミノ酸残基からなる群から選択されるいずれか１種のアミノ酸残基であり、X^{13}はＬ－リシン残基又はＬ－アルギニン残基である。

Ｃ－X^{21}－X^{22}－X^{23} ・・・式２

ただし、式２中、X^{21}及びX^{22}はそれぞれ独立に脂肪族アミノ酸残基であ

り、X^{23}は任意のアミノ酸残基である。

［２］　前記ポリペプチドのＮ末端側アミノ酸配列が配列番号１～１２のいずれか１つで示されるアミノ酸配列を含む、［１］に記載のポリペプチド。

［３］　式２中、X^{21}がＬ－バリンであり、X^{22}がＬ－イソロイシンであり、X^{23}がＬ－ロシイン又はメチオニンである、［２］に記載のポリペプチド。

［４］　配列番号１３～２７のいずれか１つで示されるアミノ酸配列からなる、［１］～［３］のいずれか１つに記載のポリペプチド。

［５］　少なくとも１個のシステイン残基がイソプロペニル化、ゲラニルゲラニル化、又はファルネシル化されている、［４］に記載のポリペプチド。

［６］　第一のタンパク質のＣ末端に［１］～［５］のいずれか１つに記載のポリペプチドを連結してなる融合タンパク質。

［７］　前記第一のタンパク質のＣ末端と前記ポリペプチドのＮ末端とがスペーサーを介して連結している、［６］に記載の融合タンパク質。

［８］　前記第一のタンパク質が膜貫通型タンパク質又は蛍光タンパク質である、［６］又は［７］に記載の融合タンパク質。

［９］　エクソソームに局在化する、［６］～［８］のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

［１０］　第一のタンパク質のＣ末端に第二のタンパク質を連結し、前記第二のタンパク質のＣ末端に［１］～［５］のいずれか１つに記載のポリペプチドを連結してなる融合タンパク質。

［１１］　前記第一のタンパク質のＣ末端と前記第二のタンパク質のＮ末端との間及び前記第二のタンパク質のＣ末端と前記ポリペプチドのＮ末端との間の少なくとも一方がスペーサーを介して連結している、［１０］に記載の融合タンパク質。

［１２］　前記第一のタンパク質が膜貫通型タンパク質である、［１０］又は［１１］に記載の融合タンパク質。

［１３］　前記第二のタンパク質が蛍光タンパク質である、［１０］～［１

２］のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

［１４］　エクソソームに局在化する、［１０］～［１３］のいずれか１つに記載の融合タンパク質。

［１５］　［６］～［９］のいずれか１つに記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び前記宿主細胞から前記融合タンパク質を分離し、回収する工程を含む、融合タンパク質の製造方法。

［１６］　［１０］～［１４］のいずれか１つに記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び前記宿主細胞から前記融合タンパク質を分離し、回収する工程を含む、融合タンパク質の製造方法。

［１７］　［６］～［９］のいずれか１つに記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、及び前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程を含む、エクソソームにタンパク質を局在化させる方法。

［１８］　［１０］～［１４］のいずれか１つに記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、及び前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程を含む、エクソソームにタンパク質を局在化させる方法。

［１９］　［６］～［９］のいずれか１つに記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び前記宿主細胞からエクソソームを分離し、回収する工程を含む、エクソソームの製造方法。

［２０］　［１０］～［１４］のいずれか１つに記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び前記宿主細胞から前記融合タンパク質を分離する工程を含む、エクソソームの製造方法。

発明の効果

[0013]　本発明は、非特許文献１に開示された技術のような制約がなく、任意のタンパク質をエクソソームに局在化させることができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図１は、参考例１、実施例１～２、及び比較例１～４の測定結果を示すグラフである。

[図2]図２は、参考例１及び実施例１、３～５の測定結果を示すグラフである。

[図3]図３は、比較例５～６及び実施例６の測定結果を示すグラフである。

[図4]図４は、比較例７及び実施例７の測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0015]　以下では本発明の実施形態を詳細に説明する。ただし、本発明は後述する実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない限り種々の改変が可能である。

本発明において、数値範囲を「～」を用いて表す場合、「～」の両側の数値はその数値範囲に含まれるものとする。

本発明において、アミノ酸の名称及び記号は、IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature.Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. Eur. J. Biochem. 138: 9-37 (1984).に従うものとする。

本発明において、アミノ酸の光学異性は、特に明記しない限り、Ｌ体であることが好ましい。

[0016] ［ポリペプチド］

本実施形態のポリペプチドは、Ｎ末端側のアミノ酸配列が式１で示されるアミノ酸配列を含み、Ｃ末端のアミノ酸配列が式２で示されるアミノ酸配列を含む、タンパク質のＣ末端に付加することにより前記タンパク質との融合タンパク質をエクソソームに局在化させるためのポリペプチドである。

Ｋ－X^{11}－X^{12}－X^{13}－Ｋ　・・・式１

ただし、式１中、X^{11}及びX^{12}はそれぞれ独立にＬ－リシン残基、Ｌ－アルギニン残基、Ｌ－セリン残基、Ｌ－トレオニン残基、及び脂肪族アミノ酸残基からなる群から選択されるいずれか１種のアミノ酸残基であり、X^{13}はＬ－リシン残基又はＬ－アルギニン残基である。

Ｃ－X^{21}－X^{22}－X^{23}　　・・・式２

ただし、式２中、X^{21}及びX^{22}はそれぞれ独立に脂肪族アミノ酸残基であり、X^{23}は任意のアミノ酸残基である。

[0017] 前記脂肪族アミノ酸残基は、脂肪族炭化水素基を持つアミノ酸残基であれば特に限定されないが、Ｌ－アラニン残基、Ｌ－バリン残基、Ｌ－ロイシン残基、及びＬ－イソロイシン残基からなる群から選択されるいずれか１種が好ましく、Ｌ－ロイシン残基又はＬ－イソロイシン残基がより好ましい。前記脂肪族アミノ酸残基の側鎖の脂肪族炭化水素基の水素原子の一部は、塩素原子又はフッ素原子等のハロゲン原子で置換されていてもよい。

[0018] 前記X^{21}及びX^{22}は、脂肪族炭化水素基を持つアミノ酸残基であれば特に限定されないが、Ｌ－アラニン残基、Ｌ－バリン残基、Ｌ－ロイシン残基、及びＬ－イソロイシン残基からなる群から選択されるいずれか１種が好ましく、分岐鎖状脂肪族炭化水素基を有するＬ－バリン残基又はＬ－イソロイシン残基がより好ましい。前記脂肪族炭化水素基の水素原子の一部は、塩素原子又はフッ素原子等のハロゲン原子で置換されていてもよい。

[0019] 前記X^{23}は、側鎖に疎水性官能基を有するアミノ酸残基が好ましく、Ｌ－アラニン残基、Ｌ－バリン残基、Ｌ－ロイシン残基、Ｌ－イソロイシン残基、及びＬ－メチオニン残基からなる群から選択されるいずれか１種がより好ましく、Ｌ－アラニン残基、Ｌ－ロイシン残基、及びＬ－メチオニン残基か

らなる群から選択されるいずれか１種がさらに好ましい。疎水性官能基の炭素原子に直接結合した水素原子の一部は、塩素原子又はフッ素原子等のハロゲン原子で置換されていてもよい。

[0020] 本実施形態のポリペプチドは、配列番号１～１２で示されるアミノ酸配列を含むことが好ましい。なお、下記アミノ酸配列中、式１で示すアミノ酸配列に該当する部分に下線を付けて示す。

・配列番号１：ＭＧＧＫＬＳＫＫ

・配列番号２：ＰＫＫＫＲＫＶ

・配列番号３：ＰＫＴＫＲＫＶ

・配列番号４：ＰＫＴＫＫＫＶ

・配列番号５：ＫＫＴＫＲＫＶ

・配列番号６：ＫＫＴＫＫＫＶ

・配列番号７：ＰＫＴＫＲＫＶ

・配列番号８：ＰＫＴＫＫＫＶ

・配列番号９：ＫＫＴＫＲＫＶ

・配列番号１０：ＫＫＴＫＫＫＶ

・配列番号１１：ＫＫＫＫＫ

・配列番号１２：ＫＫＲＫＫ

[0021] 本実施形態のポリペプチドは、前記ポリペプチドのＮ末端側アミノ酸配列が配列番号１～１０のいずれか１つで示されるアミノ酸配列を含むことが好ましい。ここで「前記ポリペプチドのＮ末端側アミノ酸配列」とは、当該ポリペプチドの分子鎖において、前記式２で示されるアミノ酸配列よりもＮ末端側にあるアミノ酸配列を指す。次に具体的なポリペプチドの全長配列を例示する通り、前記ポリペプチドの分子鎖において、前記式１で示されるアミノ酸配列と、前記式２で示されるアミノ酸配列との間には任意のアミノ酸配列からなるスペーサーがあってもよいし、無くてもよい。スペーサーを構成するアミノ酸残基の数は、例えば０～２０個が挙げられ、１～１５個が好ましく、１～１０個がより好ましく、１～５個がさらに好ましい。スペーサー

配列は、Ｌ－バリン残基、Ｌ－リシン残基、及びＬ－システイン残基から選択される１種以上を含むことが好ましい。

[0022] 本実施形態のポリペプチドは、配列番号１３～２７のいずれか１つで示されるアミノ酸配列からなることが好ましい。なお、下記アミノ酸配列中、式２で示すアミノ酸配列に該当する部分に下線を付けて示す。

・配列番号１３：ＭＧＧＫＬＳＫＫＣＣＶＩＬ

・配列番号１４：ＭＧＧＫＬＳＫＫＫＣＣＶＩＬ

・配列番号１５：ＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

・配列番号１６：ＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫＹＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

・配列番号１７：ＰＫＫＫＲＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号１８：ＰＫＴＫＲＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号１９：ＰＫＴＫＫＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号２０：ＫＫＴＫＲＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号２１：ＫＫＴＫＫＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号２２：ＰＫＴＫＲＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号２３：ＰＫＴＫＫＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号２４：ＫＫＴＫＲＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号２５：ＫＫＴＫＫＫＶＣＣＶＩＬ

・配列番号２６：ＫＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

・配列番号２７：ＫＫＲＫＫＣＣＶＩＬ

[0023] 配列番号１３～２７で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのＣ末端側のＬ－システイン残基の少なくとも１個は、イソプロペニル化、ゲラニルゲラニル化、又はファルネシル化されていてもよい。

本実施形態のポリペプチドは、Ｃ末端側のＬ－システイン残基にイソプロペニル基、ゲラニルゲラニル基、又はファルネシル基を導入して脂質修飾をすることで、これらの脂質がエクソソームのリン脂質二重膜に突き刺さりやすくなることから、エクソソーム膜に局在化させやすくなる。Ｌ－システイン残基は側鎖にチオール基（－ＳＨ）を有しているため、チオエーテル結合

を介して、イソプロペニル基、ゲラニルゲラニル基、又はファルネシル基を結合することが容易である。

[0024] ［融合タンパク質及び融合タンパク質の製造方法］

〈第１の態様〉

本実施形態の融合タンパク質の一態様は、第一のタンパク質のＣ末端に上述したポリペプチドを連結してなる融合タンパク質である。

[0025] 前記第一のタンパク質は、目的タンパク質、すなわちエクソソームに局在化させたいタンパク質であることが好ましい。

[0026] 前記第一のタンパク質としては、膜貫通型タンパク質又は蛍光タンパク質が好ましい。前記膜貫通型タンパク質の具体例としては、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、血管内皮増殖因子受容体（ＶＥＧＦＲ１，ＶＥＧＦＲ２）など増殖因子受容体、ＧＬＰ１受容体（ＧＬＰ１Ｒ）、アドレナリン受容体（βＡＲ）、脂肪酸受容体（例えばＧＰＲ４０）、ヒトケモカインレセプター（例えばＣＣＲ８）などのＧＰＣＲ、コネキシン２６、コネキシン４３などの細胞間接着タンパク質、インテグリンなどの細胞接着タンパク質が挙げられる。

[0027] 前記蛍光タンパク質の具体例としては、Ｓｉｒｉｕｓ及びＥＢＦＰ等の青色蛍光タンパク質；ＥＣＦＰ、ｍＴｕｒｑｕｏｉｓｅ、ＴａｇＣＦＰ、ＡｍＣｙａｎ、ｍＴＦＰ１、ＭｉｄｏｒｉｉｓｈｉＣｙａｎ及びＣＦＰ等のシアン色蛍光タンパク質；ＴｕｒｂｏＧＦＰ、ＡｃＧＦＰ、ＴａｇＧＦＰ、Ａｚａｍｉ－Ｇｒｅｅｎ、ＺｓＧｒｅｅｎ、ＥｍＧＦＰ、ＥＧＦＰ、ＧＦＰ２及びＨｙＰｅｒ等の緑色蛍光タンパク質；ＴａｇＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＦＰ、ＰｈｉＹＦＰ、ＰｈｉＹＦＰ－ｍ、ＴｕｒｂｏＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗ及びｍＢａｎａｎａ等の黄色蛍光タンパク質；ＫｕｓａｂｉｒａＯｒａｎｇｅ及びｍＯｒａｎｇｅ等の橙色蛍光タンパク質；ＴｕｒｂｏＲＦＰ、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＴａｇＲＦＰ、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＡｓＲｅｄ２及びｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ等の赤色蛍光タンパク質；並びに、ＴｕｒｂｏＦＰ６０２、ｍＲＦＰ１、ＪＲｅｄ、Ｋ

ｉｌｌｅｒＲｅｄ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ＨｃＲｅｄ、ＫｅｉｍａＲｅｄ、ｍＲａｓｂｅｒｒｙ及びｍＰＩｕｍ等の近赤外蛍光タンパク質が挙げられる。

[0028] 上述した第１の態様に係る融合タンパク質は、前記第一のタンパク質のＣ末端と前記ポリペプチドのＮ末端がスペーサーを介して連結していてもよいし、スペーサーを介さずに直接に連結してもよい。

前記スペーサーは、特に限定されないが、ポリペプチド鎖からなるスペーサーが好ましい。前記スペーサーがポリペプチド鎖からなる場合、細胞内で融合タンパク質と一体で製造できるため好ましい。前記ポリペプチドの式１で示されるアミノ酸配列のＮ末端のＬ－リシン残基と、前記第一のタンパク質のＣ末端のアミノ酸との間にスペーサーが介在する場合、そのスペーサーを構成するアミノ酸残基の数は、例えば１～２０個が挙げられ、１～１５個が好ましく、１～１０個がより好ましく、１～５個がさらに好ましい。スペーサー配列は、Ｌ－メチオニン残基、グリシン残基、Ｌ－プロリン残基、及びＬ－リシン残基から選択される１種以上を含むことが好ましい。

[0029] 上述した第１の態様に係る融合タンパク質は、エクソソームに局在化させることができる。

[0030] 〈第２の態様〉

本実施形態の融合タンパク質の別の一態様は、第一のタンパク質のＣ末端に第二のタンパク質を連結し、前記第二のタンパク質のＣ末端に上述したポリペプチドを連結してなる融合タンパク質である。

[0031] 前記第一のタンパク質は、目的タンパク質、すなわちエクソソームに局在化させたいタンパク質であることが好ましい。

[0032] 前記第一のタンパク質としては、膜貫通型タンパク質が好ましい。前記膜貫通型タンパク質の具体例としては、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、血管内皮増殖因子受容体（ＶＥＧＦＲ１，ＶＥＧＦＲ２）など増殖因子受容体、ＧＬＰ１受容体（ＧＬＰ１Ｒ）、アドレナリン受容体（βＡＲ）、脂肪酸受容体（ＧＰＲ４０）（例えばＧＰＲ４０）、ヒトケモカインレセプター（例えばＣＣＲ８）などのＧＰＣＲ、コネキシン２６、コネキシン４３などの

細胞間接着タンパク質、インテグリンなどの細胞接着タンパク質が挙げられる。

[0033] 前記第二のタンパク質としては、蛍光タンパク質が好ましい。前記蛍光タンパク質の具体例としては、Ｓｉｒｉｕｓ及びＥＢＦＰ等の青色蛍光タンパク質；ＥＣＦＰ、ｍＴｕｒｑｕｏｉｓｅ、ＴａｇＣＦＰ、ＡｍＣｙａｎ、ｍＴＦＰ１、ＭｉｄｏｒｉｉｓｈｉＣｙａｎ及びＣＦＰ等のシアン色蛍光タンパク質；ＴｕｒｂｏＧＦＰ、ＡｃＧＦＰ、ＴａｇＧＦＰ、Ａｚａｍｉ－Ｇｒｅｅｎ、ＺｓＧｒｅｅｎ、ＥｍＧＦＰ、ＥＧＦＰ、ＧＦＰ２及びＨｙＰｅｒ等の緑色蛍光タンパク質；ＴａｇＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＦＰ、ＰｈｉＹＦＰ、ＰｈｉＹＦＰ－ｍ、ＴｕｒｂｏＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗ及びｍＢａｎａｎａ等の黄色蛍光タンパク質；ＫｕｓａｂｉｒａＯｒａｎｇｅ及びｍＯｒａｎｇｅ等の橙色蛍光タンパク質；ＴｕｒｂｏＲＦＰ、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＴａｇＲＦＰ、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＡｓＲｅｄ２及びｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ等の赤色蛍光タンパク質；並びに、ＴｕｒｂｏＦＰ６０２、ｍＲＦＰ１、ＪＲｅｄ、ＫｉｌｌｅｒＲｅｄ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ＨｃＲｅｄ、ＫｅｉｍａＲｅｄ、ｍＲａｓｂｅｒｒｙ及びｍＰｌｕｍ等の近赤外蛍光タンパク質が挙げられる。

[0034] 上述した第２の態様に係る融合タンパク質は、前記第一のタンパク質のＣ末端と前記第二のタンパク質のＮ末端との間及び前記第二のタンパク質のＣ末端と前記ポリペプチドのＮ末端との間の少なくとも一方がスペーサーを介して連結していてもよい。

前記スペーサーは、特に限定されないが、ポリペプチド鎖からなるスペーサーが好ましい。前記スペーサーがポリペプチド鎖からなる場合、細胞内で融合タンパク質と一体で製造できるため好ましい。

前記第二のタンパク質のＣ末端と前記ポリペプチドのＮ末端との間のスペーサーとしては、第１の態様で例示したものと同じものが挙げられる。

[0035] 第２の態様に係る融合タンパク質は、エクソソームに局在化させることができる。

[0036] 〈融合タンパク質の製造方法〉

上述した第１の態様又は第２の態様に係る融合タンパク質は、以下の（１）～（４）の工程を含む融合タンパク質の製造方法によって製造できる。

（１）上述した第１の態様又は第２の態様に係る融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程。

（２）前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程。

（３）前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程。

（４）前記宿主細胞から前記融合タンパク質を分離し、回収する工程。

これらの工程は、定法によって実施することができる。

[0037] ［エクソソームにタンパク質を局在化させる方法］

上述した第１の態様及び第２の態様に係る融合タンパク質は、以下の（１）～（３）の工程を含む方法によってエクソソームに局在化させることができる。

（１）上述した第１の態様又は第２の態様に係る融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程。

（２）前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程。

（３）前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程。

これらの工程は、定法によって実施することができる。

[0038] ［エクソソーム及びエクソソームの製造方法］

本実施形態のエクソソームは、上述した融合タンパク質を局在化してなるエクソソームである。

本実施形態のエクソソームは、以下の（１）～（４）の工程を含む製造方法によって製造することができる。

（１）上述した融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程。

（２）前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程。

（３）前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程。

（４）前記宿主細胞からエクソソームを分離し、回収する工程。

工程（１）～（３）は、定法によって実施することができる。

[0039] 工程（４）は、亜鉛沈澱法で行うことが好ましい。亜鉛沈澱法は、エクソソーム表面のリン脂質と亜鉛の結合を利用した沈澱法である。リン酸と亜鉛は一般的に強固に結合する。リン酸亜鉛は不溶性の沈澱となる。また、ＤＮＡと亜鉛イオンでも沈澱が生成することが知られている。

[0040] 亜鉛沈澱法の具体的な方法として、例えば以下の方法が挙げられる。細胞培養上清を１０００×ｇで３分間、２０００×ｇで３０分間、１００００×ｇで３０分間の遠心分離を順次行い、細胞断片などを除去する（常法）。

その後、４００ｍＭ　$ZnCl_2$溶液を加え、$ZnCl_2$の最終濃度を８～１０ｍＭとし、直ちに遠心分離（３００００×ｇで１～３時間）を行う。

遠心分離の後、上清を捨て、沈澱にＴｒｉｓ－ＥＤＴＡ緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０），３～１０ｍＭ　ＥＤＴＡ）を加え、沈澱を懸濁する。

実施例

[0041] 以下では実施例によって本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明は後述する実施例のみに限定されるものではない。

[0042] エクソソームに局在化させたいタンパク質のＣ末端にエクソソーム局在化配列からなるポリペプチド配列を付加することによって、タンパク質をエクソソームに局在化させる。この時、コントロールとして、ｍＣｈｅｒｒｙのＮ末端にＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫ配列（ＢＡＳＰ１のＮ末端側１０残基、以下「$BASP_{10}$」とも記す。）を付加したものを使用する。この配列はすでにエクソソームへの局在化配列として知られている配列である。ただし、Ｎ末端に付加すること、２番目のグリシンがミリストイル化されるため、必須とされている（これをＡｌａに変異させるとその活性は消失することが知られている）。

[0043] 〈融合タンパク質〉

以下の融合タンパク質の発現ベクターを一般的な手法で準備した。

・参考例１（ポジティブ・コントロール）

ｍＣｈｅｒｒｙのＮ末端に配列番号２８で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号２８：ＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫ

・参考例２（ネガティブ・コントロール）

発現ベクター無し

・実施例１

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号１５で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号１５：ＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

・実施例２

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号１６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号１６：ＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫＹＭＧＧＫＬＳＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

・実施例３

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号２１で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号２１：ＫＫＴＫＫＫＶＣＣＶＩＬ

・実施例４

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号２６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号２６：ＫＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

・実施例５

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号２７で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号２７：ＫＫＲＫＫＣＣＶＩＬ

・比較例１

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号２９で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号２９：ＣＣＬＶＫＳＩＲＳＧＹＥＶＭＣＣＶＩＬ

・比較例２

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号３０で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号３０：ＣＣＡＩＲＲＮＲＥＭＶＣＣＶＩＬ

・比較例３

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号３１で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号３１：ＣＣＧＩＲＮＳＳＶＹＣＣＶＩＬ

・比較例４

ｍＣｈｅｒｒｙのＣ末端に配列番号３２で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号３２：ＣＣＫＫＥＶＱＥＴＲＲＥＲＲＲＬＭＳＭＥＭＤＣＣＶＩＬ

[0044]〈実験方法〉

ＨＥＫ２９３Ｔ（４０，０００ｃｅｌｌｓ）に対し、各発現ベクター１００ｎｇをＰＥｌｍａｘ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）でトランスフェクトし、９６ウェルプレートに播種した。

３日後、上清を回収し、亜鉛沈澱法でエクソソームを回収、蛍光を測定した。

亜鉛沈澱法はエクソソーム表面のリン脂質と亜鉛の結合を利用した沈澱法である。リン酸と亜鉛は一般的に強固に結合する。リン酸亜鉛は不溶性の沈澱となる。また、ＤＮＡと亜鉛イオンでも沈澱が生成することが知られている。

亜鉛沈澱法の具体的な方法は以下のとおりである。

細胞培養上清を１０００×ｇで３分間、２０００×ｇで３０分間、１００００×ｇで３０分間の遠心分離を順次行い、細胞断片などを除去した。

遠心分離後、４００ｍＭ塩化亜鉛（ＩＩ）水溶液を加え、最終濃度８～１０ｍＭとし、直ちに遠心分離（３００００×ｇで１～３時間）を行った。

遠心分離後、上清を捨て、沈澱にＴｒｉｓ－ＥＤＴＡ緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０），３～１０ｍＭ ＥＤＴＡ）を加え、沈澱を懸濁した。

得られた懸濁液の蛍光を測定することによって、エクソソームの蛍光値とした。

[0045] 参考例１、実施例１～２、及び比較例１～４の測定結果を図１に示す。

参考例１及び実施例１、３～５の測定結果を図２に示す。

ｍＣｈｅｒｒｙにポリペプチドを付加した融合タンパク質は全てエクソソームに局在化した。

図１から、実施例１、２は、既にエクソソームに局在化することが知られている参考例１（ポジティブ・コントロール）より多くエクソソームに局在化することがわかった。図２から、実施例３～５も、既にエクソソームに局在化することが知られている参考例１（ポジティブ・コントロール）より多くエクソソームに局在化することがわかった。

[0046] 〈考察〉

今回、顕著な局在化を示した配列はＣ末端にＣＣＶＩＬという脂質化される配列アミノ酸配列を含む。作用機序からいって、ＣＣＶＩＬに代えてＣＶＩＭ又はＣＶＩＬとしても同様の結果が得られると考えられる。

[0047] ［アミノ酸配列一覧］

[表1]

配列番号	アミノ酸配列	アミノ酸残基数
1	MGGKLSKK	8
2	PKKKRKV	7
3	PKTKRKV	7
4	PKTKKKV	7
5	KKTKRKV	7
6	KKTKKKV	7
7	PKTKRKV	7
8	PKTKKKV	7
9	KKTKRKV	7
10	KKTKKKV	7
11	KKKKK	5
12	KKRKK	5

[0048]

[表2]

配列番号	アミノ酸配列	アミノ酸残基数
13	MGGKLSKKCCVIL	13
14	MGGKLSKKKCCVIL	14
15	MGGKLSKKKKCCVIL	15
16	MGGKLSKKKKYMGGKLSKKKKCCVIL	26
17	PKKKRKVCCVIL	12
18	PKTKRKVCCVIL	12
19	PKTKKKVCCVIL	12
20	KKTKRKVCCVIL	12
21	KKTKKKVCCVIL	12
22	PKTKRKVCCVIL	12
23	PKTKKKVCCVIL	12
24	KKTKRKVCCVIL	12
25	KKTKKKVCCVIL	12
26	KKKKKCCVIL	10
27	KKRKKCCVIL	10

[0049] [表3]

配列番号	アミノ酸配列	アミノ酸残基数
28	MGGKLSKKKK	10
29	CCLVKSIRSGYEVMCCVIL	19
30	CCAIRRNREMVCCVIL	16
31	CCGIRNSSVYCCVIL	15
32	CCKKEVQETRRERRRLMSMEMDCCVIL	27

[0050] 以下の融合タンパク質の発現ベクターを一般的な手法で準備した。

・比較例５

ＧＰＣＲの１種であるヒトケモカインレセプターＣＣＲ８のＣ末端に赤色蛍

光タンパク質ｍＣｈｅｒｒｙを融合した融合タンパク質。融合タンパク質のＣ末端にさらなるポリペプチドの付加はなし。

・比較例６

比較例５の融合タンパク質のＣ末端に、配列番号３３で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号３３：ＡＡＡＡＡＣＣＶＩＬ

・実施例６

比較例５の融合タンパク質のＣ末端に、配列番号２６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号２６：ＫＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

[0051] 〈実験方法〉

ＨＥＫ２９３Ｔ（４０，０００ｃｅｌｌｓ）に対し、各発現ベクター１００ｎｇをＰＥＩｍａｘでトランスフェクトし、９６ウェルプレートに播種した。

７日後、培養上清を回収し、上述と同様の亜鉛沈澱法でエクソソーム画分を回収し、赤色蛍光を測定した。

[0052] 比較例５～６、実施例６の測定結果を図３に示す。配列番号２６で示されるポリペプチドをＣ末端に付加することにより、ＧＰＣＲを含む融合タンパク質のエクソソームへの移行量が増加することが分かった。

[0053] 以下の融合タンパク質の発現ベクターを一般的な手法で準備した。

・比較例７

Ｇａｐ Ｊｕｎｃｔｉｏｎの構成タンパク質であるコネキシン２６（Ｃｘ２６）のＣ末端に赤色蛍光タンパク質ｍＣｈｅｒｒｙを融合した融合タンパク質。融合タンパク質のＣ末端にさらなるポリペプチドの付加はなし。

・実施例７

比較例７の融合タンパク質のＣ末端に、配列番号２６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを付加した融合タンパク質。

配列番号２６：ＫＫＫＫＫＣＣＶＩＬ

[0054] 〈実験方法〉

ＨＥＫ２９３Ｔ（４０，０００ｃｅｌｌｓ）に対し、各発現ベクター１００ｎｇをＰＥｌｍａｘでトランスフェクトし、９６ウェルプレートに播種した。

４日後、培養上清を回収し、上述と同様の亜鉛沈澱法でエクソソーム画分を回収し、赤色蛍光を測定した。

[0055] 比較例７、実施例７の測定結果を図４に示す。配列番号２６で示されるポリペプチドをＣ末端に付加することにより、Ｃｘ２６を含む融合タンパク質のエクソソームへの移行量が増加することが分かった。

産業上の利用可能性

[0056] ＧＰＣＲ（Ｇタンパク質共役型受容体）などの膜タンパク質は薬剤の標的となりうるが、抗体作製は非常に難しいことが知られている。本技術によって、これら膜タンパク質又は細胞質中のタンパク質をエクソソームに局在化させることによって、抗体作製が安定的に可能となることが期待される。また、この技術を応用し、ワクチン開発へとつなげることが期待される。

請求の範囲

[請求項1] Ｎ末端側のアミノ酸配列が式１で示されるアミノ酸配列を含み、Ｃ末端のアミノ酸配列が式２で示されるアミノ酸配列を含む、タンパク質のＣ末端に付加することにより前記タンパク質との融合タンパク質をエクソソームに局在化させるためのポリペプチド。

Ｋ－X^{11}－X^{12}－X^{13}－Ｋ　・・・式１

ただし、式１中、X^{11}及びX^{12}はそれぞれ独立にＬ－リシン残基、Ｌ－アルギニン残基、Ｌ－セリン残基、Ｌ－トレオニン残基、及び脂肪族アミノ酸残基からなる群から選択されるいずれか１種のアミノ酸残基であり、X^{13}はＬ－リシン残基又はＬ－アルギニン残基である。

Ｃ－X^{21}－X^{22}－X^{23}　・・・式２

ただし、式２中、X^{21}及びX^{22}はそれぞれ独立に脂肪族アミノ酸残基であり、X^{23}は任意のアミノ酸残基である。

[請求項2] 前記ポリペプチドのＮ末端側アミノ酸配列が配列番号１～１２のいずれか１つで示されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。

[表1]

配列番号	アミノ酸配列	アミノ酸残基数
1	MGGKLSKK	8
2	PKKKRKV	7
3	PKTKRKV	7
4	PKTKKKV	7
5	KKTKRKV	7
6	KKTKKKV	7
7	PKTKRKV	7
8	PKTKKKV	7
9	KKTKRKV	7
10	KKTKKKV	7
11	KKKKK	5
12	KKRKK	5

[請求項3] 式２中、X^{21}がＬ－バリンであり、X^{22}がＬ－イソロイシンであり、X^{23}がＬ－ロシイン又はメチオニンである、請求項２に記載のポリペプチド。

[請求項4] 配列番号１３～２７のいずれか１つで示されるアミノ酸配列からなる、請求項１に記載のポリペプチド。

[表2]

配列番号	アミノ酸配列	アミノ酸残基数
13	MGGKLSKKCCVIL	13
14	MGGKLSKKKCCVIL	14
15	MGGKLSKKKKCCVIL	15
16	MGGKLSKKKKYMGGKLSKKKKCCVIL	26
17	PKKKRKVCCVIL	12
18	PKTKRKVCCVIL	12
19	PKTKKKVCCVIL	12
20	KKTKRKVCCVIL	12
21	KKTKKKVCCVIL	12
22	PKTKRKVCCVIL	12
23	PKTKKKVCCVIL	12
24	KKTKRKVCCVIL	12
25	KKTKKKVCCVIL	12
26	KKKKKCCVIL	10
27	KKRKKCCVIL	10

[請求項5] 少なくとも１個のシステイン残基がイソプロペニル化、ゲラニルゲラニル化、又はファルネシル化されている、請求項４に記載のポリペプチド。

[請求項6] 第一のタンパク質のＣ末端に請求項１～５のいずれか１項に記載のポリペプチドを連結してなる融合タンパク質。

[請求項7] 前記第一のタンパク質のＣ末端と前記ポリペプチドのＮ末端がスペーサーを介して連結している、請求項６に記載の融合タンパク質。

[請求項8] 前記第一のタンパク質が膜貫通型タンパク質又は蛍光タンパク質である、請求項６に記載の融合タンパク質。

[請求項9] 第一のタンパク質のＣ末端に第二のタンパク質を連結し、前記第二のタンパク質のＣ末端に請求項１～５のいずれか１項に記載のポリペプチドを連結してなる融合タンパク質。

[請求項10] 前記第一のタンパク質のＣ末端と前記第二のタンパク質のＮ末端との間、及び前記第二のタンパク質のＣ末端と前記ポリペプチドのＮ末

端との間の少なくとも一方がスペーサーを介して連結している、請求項９に記載の融合タンパク質。

[請求項11] 前記第一のタンパク質が膜貫通型タンパク質である、請求項９に記載の融合タンパク質。

[請求項12] 前記第二のタンパク質が蛍光タンパク質である、請求項９に記載の融合タンパク質。

[請求項13] 請求項６に記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、

前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、

前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び

前記宿主細胞から前記融合タンパク質を分離し、回収する工程

を含む、融合タンパク質の製造方法。

[請求項14] 請求項９に記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、

前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、

前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び

前記宿主細胞から前記融合タンパク質を分離し、回収する工程

を含む、融合タンパク質の製造方法。

[請求項15] 請求項６に記載の融合タンパク質を局在化してなるエクソソーム。

[請求項16] 請求項９に記載の融合タンパク質を局在化してなるエクソソーム。

[請求項17] 請求項６に記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、

前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、及び

前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程

を含む、エクソソームにタンパク質を局在化させる方法。

[請求項18] 請求項９に記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、

前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、及び

前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程

を含む、エクソソームにタンパク質を局在化させる方法。

[請求項19] 請求項６に記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、

前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、

前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び

前記宿主細胞からエクソソームを分離し、回収する工程

を含む、エクソソームの製造方法。

[請求項20] 請求項９に記載の融合タンパク質のｃＤＮＡを組み込んだ発現ベクターであるコンストラクトを準備する工程、

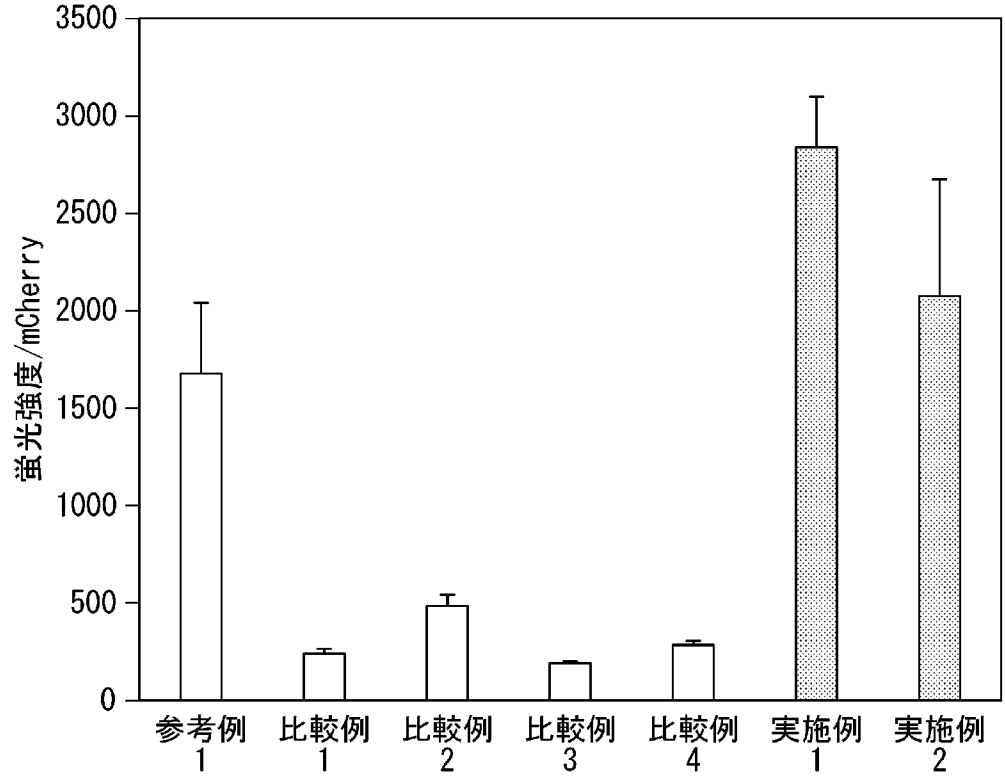
前記コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトする工程、

前記宿主細胞で前記融合タンパク質を発現させる工程、及び

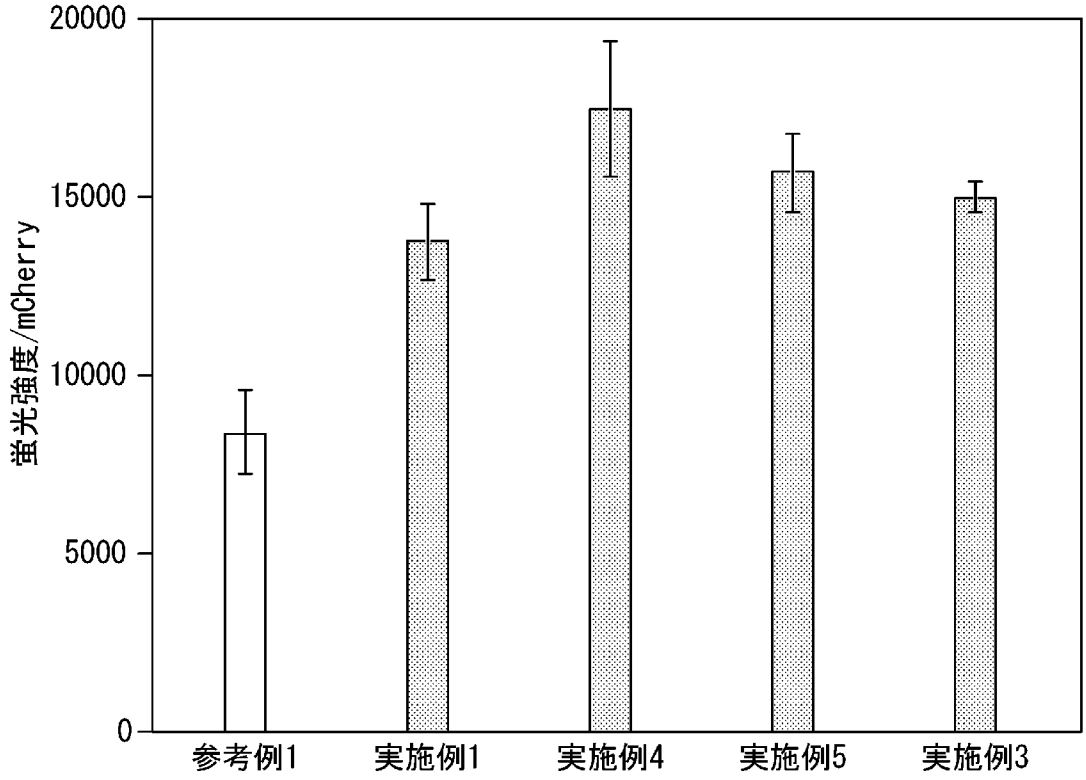
前記宿主細胞から前記融合タンパク質を分離する工程

を含む、エクソソームの製造方法。

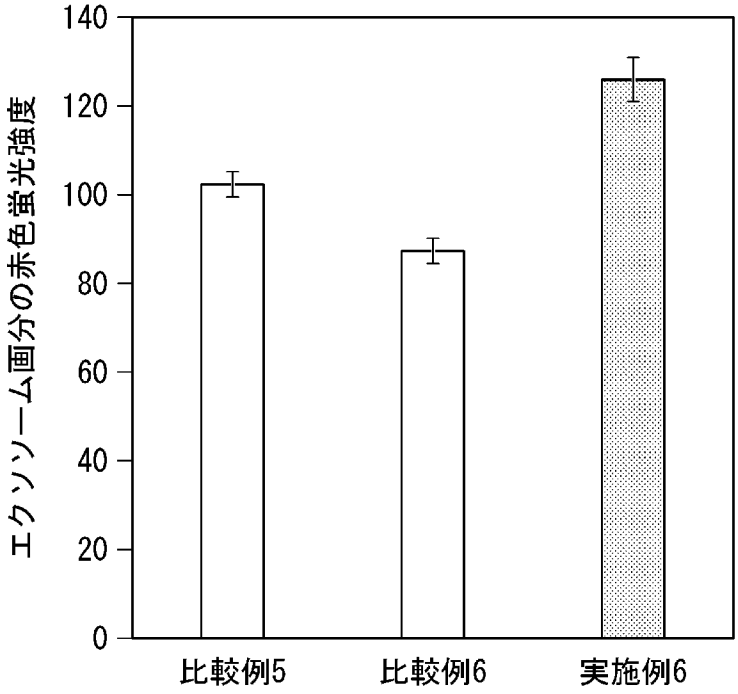
[図1]


3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
蛍光強度/mCherry
参考例1
比較例1
比較例2
比較例3
比較例4
実施例1
実施例2

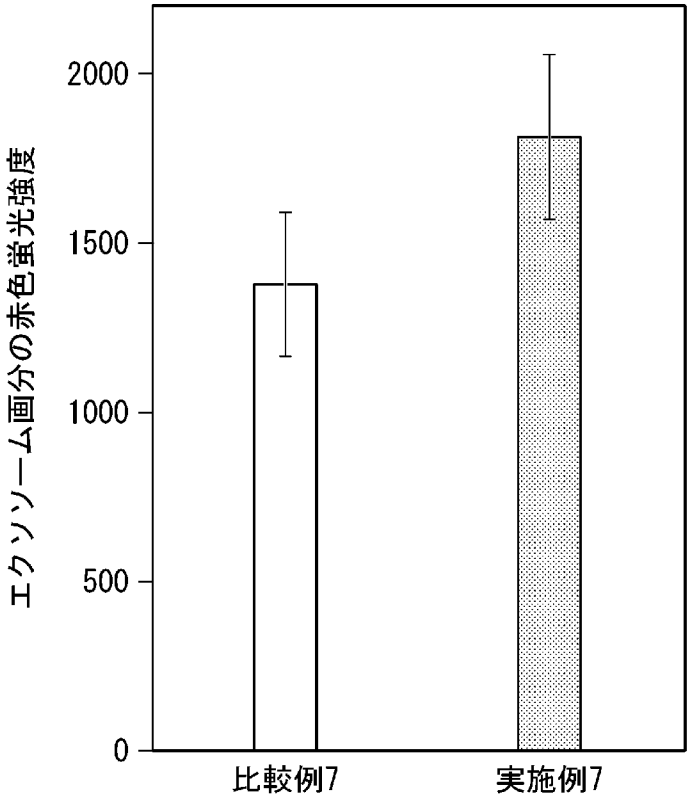
[図2]


20000
15000
10000
5000
0
蛍光強度/mCherry
参考例1
実施例1
実施例4
実施例5
実施例3

[図3]


140
120
100
80
60
40
20
0
エクソソーム画分の赤色蛍光強度
比較例5
比較例6
実施例6

[図4]


2000
1500
1000
500
0
エクソソーム画分の赤色蛍光強度
比較例7
実施例7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/039758

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; ***C07K 7/06***(2006.01)i; ***C07K 7/08***(2006.01)i; ***C07K 14/00***(2006.01)i; ***C12N 1/15***(2006.01)i; ***C12N 1/19***(2006.01)i; ***C12N 1/21***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12P 21/02***(2006.01)i
FI: C07K19/00; C07K7/08; C07K14/00; C12P21/02 C; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C07K7/06 ZNA

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; C07K7/06; C07K7/08; C07K14/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/02

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 1971-2025
Registered utility model specifications of Japan 1996-2025
Published registered utility model applications of Japan 1994-2025

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/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	JP 2023-537070 A (AMICUS THERAPEUTICS, INC.) 30 August 2023 (2023-08-30) claims 14, 15, paragraphs [0163]-[0181], [0217], [0218], [0258], examples 7, paragraph [0316], fig. 18	1-4, 6, 8, 15, 17
Y		5-20
Y	JP 2023-514975 A (MANTRA BIO INC.) 12 April 2023 (2023-04-12) claims, paragraph [0061]	5-20
A		1-4
Y	JP 2021-503300 A (CODIAK BIOSCIENCES, INC.) 12 February 2021 (2021-02-12) claims 52, 58, examples	13, 14, 19, 20
A		1-12, 15-18

☐ 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	Date of mailing of the international search report
10 January 2025	**21 January 2025**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/039758

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 13*ter*.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/JP2024/039758

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2023-537070 A	30 August 2023	WO 2022/032140 A2 claims 14, 15, paragraphs [00183]-[00201], [00237], [00238], [00258], example 7, sequence tables, fig. 18 US 2024/0043494 A1	
JP 2023-514975 A	12 April 2023	US 2023/0097907 A1 claims, paragraph [0061] WO 2021/154888 A1	
JP 2021-503300 A	12 February 2021	US 2019/0151456 A1 claims, examples WO 2019/099942 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/039758

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; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i
FI: C07K19/00; C07K7/08; C07K14/00; C12P21/02 C; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C07K7/06 ZNA

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; C07K7/06; C07K7/08; C07K14/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/02

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	１９７１－２０２５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/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	JP 2023-537070 A (アミカス セラピューティックス インコーポレイテッド) 30.08.2023 (2023-08-30) 請求項14,15,[0163]-[0181],[0217],[0218],[0258],実施例7,[0316],図18	1-4,6,8,15,17
Y		5-20
Y	JP 2023-514975 A (マントラ　バイオ，インコーポレイテッド) 12.04.2023 (2023-04-12) 特許請求の範囲,[0061]	5-20
A		1-4
Y	JP 2021-503300 A (コディアック バイオサイエンシーズ，　インコーポレイテッド) 12.02.2021 (2021-02-12) 請求項52,58,実施例	13,14,19,20
A		1-12,15-18

☐ 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、一般的技術水準を示すもの
"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
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"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	国際調査報告の発送日
10.01.2025	21.01.2025

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）
松村　真里 4I 5375

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/039758

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:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/039758

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2023-537070 A	30.08.2023	WO 2022/032140 A2 請求項14,15,[00183]-[00201],[00237],[00238],[00258],実施例7,配列表,図18 US 2024/0043494 A1	
JP 2023-514975 A	12.04.2023	US 2023/0097907 A1 特許請求の範囲,[0061] WO 2021/154888 A1	
JP 2021-503300 A	12.02.2021	US 2019/0151456 A1 請求の範囲、実施例 WO 2019/099942 A1	