

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7538795号
(P7538795)

(45)発行日 令和6年8月22日(2024.8.22)

(24)登録日 令和6年8月14日(2024.8.14)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	47/66 (2017.01)	A 6 1 K	47/66
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/00
請求項の数 22 (全124頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-526563(P2021-526563)	(73)特許権者	522228126
(86)(22)出願日	令和1年5月22日(2019.5.22)		ロンザ セールス アーゲー
(65)公表番号	特表2022-513049(P2022-513049 A)		L O N Z A S A L E S A G
(43)公表日	令和4年2月7日(2022.2.7)		スイス連邦, 4 0 5 2 バーゼル, ミ
(86)国際出願番号	PCT/US2019/033629	(74)代理人	100078282
(87)国際公開番号	WO2020/101740		弁理士 山本 秀策
(87)国際公開日	令和2年5月22日(2020.5.22)	(74)代理人	100113413
審査請求日	令和4年5月23日(2022.5.23)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	62/835,430	(74)代理人	100181674
(32)優先日	平成31年4月17日(2019.4.17)		弁理士 飯田 貴敏
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641
(31)優先権主張番号	PCT/US2018/061679		弁理士 石川 大輔
(32)優先日	平成30年11月16日(2018.11.16)	(74)代理人	230113332
	最終頁に続く		弁理士 山本 健策
			最終頁に続く
(54)【発明の名称】 操作された細胞外小胞及びその使用			

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

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（E V）であって、

前記足場タンパク質はN末端ドメイン（N D）及びエフェクタードメイン（E D）を含み、

前記N Dは前記E Vの内腔表面と会合し、前記E Dはイオン相互作用によって前記E Vの前記内腔表面と会合し、

前記N Dは、G G K L S K（配列番号2 0 3）のアミノ酸配列を含むが、N末端にメチオニン（M e t）を含まず、

前記E Dは、前記N Dの配列番号2 0 3のC末端のリジンに直接連結したリジン（L y s）をそのN末端に含み、

前記アミノ酸配列G G K L S Kは、前記足場タンパク質のN末端に位置し、

前記生物学的に活性な分子は、前記足場タンパク質のC末端に融合した1つ以上の異種タンパク質を含む、

前記単離された細胞外小胞（E V）。

【請求項2】

前記E Dが、K K、K K K、K K K K（配列番号1 5 1）、K K K K K（配列番号1 5 2）、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項1に記載のE V。

【請求項3】

前記ND及び前記EDが、ペプチド結合によって直接連結される、請求項1または請求項2に記載のEV。

【請求項4】

前記足場タンパク質が、GGKLSKK（配列番号157）のアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のEV。

【請求項5】

前記足場タンパク質が、GGKLSKKK（配列番号161）のアミノ酸配列を含む、請求項4に記載のEV。

【請求項6】

前記足場タンパク質が、少なくとも8アミノ酸長である、請求項1～5のいずれか1項に記載のEV。

【請求項7】

前記足場タンパク質の前記N末端における前記アミノ酸残基が、Gly、アリルグリシン、ブチルグリシン、またはプロパルギルグリシンである、請求項1～6のいずれかに記載のEV。

【請求項8】

前記生物学的に活性な分子が、前記EVの前記内腔表面上または内腔中にある、請求項1～7のいずれか一項に記載のEV。

【請求項9】

前記足場タンパク質が、リンカーによって前記生物学的に活性な分子に連結される、請求項1～8のいずれか一項に記載のEV。

【請求項10】

前記リンカーが、切断可能なリンカーを含む、請求項9に記載のEV。

【請求項11】

前記生物学的に活性な分子が、

- (a) タンパク質、
- (b) ポリペプチド；
- (c) ペプチド；
- (d) ポリヌクレオチド（DNA及び／またはRNA）；
- (e) 化学化合物；
- (f) ウイルス；
- (g) イオノフォア；
- (h) イオノフォア用担体；
- (i) チャネルもしくは細孔を形成する部分；または
- (j) それらの任意の組み合わせ

を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のEV。

【請求項12】

前記タンパク質が、

(i) 組換えペプチド、天然ペプチド、合成ペプチド、抗体、融合タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせ

(ii) 酵素、サイトカイン、リガンド、受容体、転写因子、またはそれらの組み合わせ；

(iii) T細胞受容体（TCR）、T細胞共受容体、主要組織適合性複合体（MHC）、ヒト白血球抗原（HLA）、またはそれらの誘導体；

(iv) 腫瘍抗原であって、アルファフエトプロテイン（AFP）、がん胎児性抗原（CEA）、上皮腫瘍抗原（ETA）、ムチン1（MUC1）、Tn-MUC1、ムチン16（MUC16）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（MAGE）、腫瘍タンパク質p53（p53）、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、プログラム死リガンド1（PD-L1）、プログラム死リガンド2（PD-L2）、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、メソテリン、VEGF

10

20

30

40

50

R、アルファー葉酸受容体、CE7R、IL-3、がん-精巢抗原、MART-1 gp100、及びTNF関連アポトーシス誘導リガンドからなる群から選択される腫瘍抗原；あるいは

(iv) (i) ~ (iv) のいずれかの組み合わせを含む、請求項11に記載のEV。

【請求項13】

前記生物学的に活性な分子が、

(a) 負のチェックポイント調節因子であり、ここで、前記負のチェックポイント調節因子は、

- (i) 細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、
- (ii) プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、
- (iii) リンパ球活性化遺伝子3 (LAG-3)、
- (iv) T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3 (TIM-3)、
- (v) B及びTリンパ球減衰因子 (BTLA)、
- (vi) Ig及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体 (TIGIT)、
- (vii) T細胞活性化のVドメインIg抑制因子 (VISTA)、
- (viii) アデノシンA2a受容体 (A2aR)、
- (ix) キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、
- (x) インドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、
- (xi) CD20、
- (xii) CD39、および
- (xiii) CD73

からなる群から選択される；

(b) 免疫原性タンパク質である；

(c) 毒素、トキソイド、または毒素の非毒性変異体であり、ここで、

(i) 前記毒素はジフテリア毒素である、または

(ii) 前記トキソイドは破傷風トキソイドである；あるいは

(d) 正の共刺激分子または前記正の共刺激分子の活性化剤であり、ここで、前記正の共刺激分子は、

(i) TNF受容体スーパーファミリーメンバーであって、CD120a、CD120b、CD18、OX40、CD40、Fas受容体、M68、CD27、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、RANK、OCIF、TWEAK受容体、TACI、BAFF受容体、ATAR、CD271、CD269、AITR、TROY、CD358、TRAMP、及びXEDARからなる群から選択され、ここで、正の共刺激分子の前記活性化剤は、TNFスーパーファミリーメンバーであり、TNF α 、TNF γ 、OX40L、CD40L、FasL、LIGHT、TL1A、CD27L、Siva、CD153、4-1BBリガンド、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITRリガンド、及びEDA-2からなる群から選択される、TNF受容体スーパーファミリーメンバー；ならびに

(ii) CD28スーパーファミリー共刺激分子であって、ICOS及びCD28から選択され、ここで、正の共刺激分子の前記活性化剤は、ICOSL、CD80、またはCD86である、CD28スーパーファミリー共刺激分子からなる群から選択される、

請求項1~12のいずれか1項に記載のEV。

【請求項14】

前記EVがエクソソームである、請求項1~13のいずれか一項に記載のEV。

【請求項15】

請求項1~14のいずれか一項に記載のEV及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 1～14 のいずれか一項に記載の EV を産生する細胞であって、HEK293、HT1080、K562、MDA-MB-231、CHO および Raji 細胞からなる群から選択される、前記細胞。

【請求項 17】

1 つ以上のベクターを含む細胞であって、前記ベクターが、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の EV における前記足場タンパク質及び前記生物学的に活性な分子をコードする核酸配列を含み、HEK293、HT1080、K562、MDA-MB-231、CHO および Raji 細胞からなる群から選択される、前記細胞。

【請求項 18】

前記核酸配列が、プロモーターに作用可能に結合している、請求項 17 に記載の細胞。

【請求項 19】

請求項 1～14 のいずれか一項に記載の EV を使用するためのキットであって、前記 EV 及び前記 EV を使用するための説明書を含む、キット。

【請求項 20】

好適な条件下で請求項 16～18 のいずれか一項に記載の細胞を培養し、前記 EV を得ることを含む、EV の作製方法。

【請求項 21】

請求項 1～14 のいずれか一項に記載の EV における前記生物学的に活性な分子を請求項 1～14 のいずれか一項に記載の EV における前記足場タンパク質に連結することを含む、生物学的に活性な分子を細胞外小胞に固定する方法。

【請求項 22】

疾患の予防または治療を必要とする対象において前記疾患を予防または治療するための、請求項 1～14 のいずれかに記載の EV を含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

EFS-WEB を介して電子的に提出された配列表の参照

本出願において提出された電子的に提出された配列表の内容（名前：4000__041PC01__SL__ST25.txt、サイズ：116,344 バイト、及び作成日：2019 年 5 月 22 日）は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、がん及び他の疾患の予防または治療のための薬剤として有用であり得る、細胞外小胞の内腔表面と会合された足場タンパク質が富化された細胞外小胞、例えば、エクソソームを提供する。

【背景技術】

【0003】

エクソソームは、細胞間コミュニケーションの重要な媒介物質である。これらはまた、がんなどの多くの疾患の診断及び予後における重要なバイオマーカーである。薬物送達ビヒクルとして、エクソソームは、多くの治療領域において、新たな治療モダリティとして、従来の薬物送達方法を超えて多くの利益を提供する。

【0004】

エクソソームの中心的特徴は、それらの内部空間、または内腔内に生物学的に活性なペイロードを含む能力である。エクソソームは、mRNA、miRNA、DNA、タンパク質、炭水化物、及び脂質を含む内因性ペイロードを含むことは周知であるが、所望の治療的ペイロードの特異的担持を導く能力は、現在限定される。エクソソームは、産生細胞において所望の治療的ペイロードを過剰発現することによって担持され得るが、この担持は、細胞エクソソーム処理センターへのペイロードの確率論的な局在化に起因して、効率が限定されていることが多い。あるいは、精製されたエクソソームは、例えば、エレクトロポレーションによってエキスポで担持され得る。これらの方法は、低効率に苦しみ得る

10

20

30

40

50

か、または s i R N A のような小さなペイロードに限定され得る。したがって、エクソソームベースの技術の治療的使用及び他の用途をより良く可能にするために、非常に効率的で明確に定義された担持エクソソームを生成するための好適な方法が必要とされる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示の態様は、細胞外小胞（E V）、例えば、治療的使用のためのエクソソームを担持する新規な方法に関する。具体的には、方法は、エクソソームの内腔表面から新たに識別されるタンパク質マーカーを使用する。特に、タンパク質の群（例えば、ミリストイル化アラニンリッチプロテインキナーゼ C 基質（M A R C K S）、ミリストイル化アラニンリッチプロテインキナーゼ C 基質様 1（M A R C K S L 1）及び脳酸可溶性タンパク質 1（B A S P 1））は、エクソソームの内腔表面上で非常に豊富であることが特定された。さらに、B A S P 1 のアミノ末端の短い配列、例えば、少なくとも 7 つのアミノ酸は、蛍光タンパク質分子の高効率担持を全長 B A S P 1 タンパク質と同じ程度に導くのに十分であることが示された。少なくとも 7 個のアミノ酸及び 10 個未満のアミノ酸であるこの断片は、操作された E V 担持の分野において有意な進歩を提示し、エクスピボ操作の追加のステップを伴わず、E V、例えば、エクソソームの内腔への任意の生物学的に活性な分子、例えば、治療的タンパク質ペイロードの効率的で再現可能な担持を可能にする。本明細書に記載される融合タンパク質を使用した E V、例えば、エクソソームの担持は、これまでに記載された任意の他の遺伝子工学的な方法と比較して著しく高いペイロードレベルを有する操作された E V、例えば、操作されたエクソソームを産生する。

【0006】

エクソソームから新たに同定されたタンパク質及びペプチド配列は、本開示の様々な実施形態で使用される。例えば、いくつかの実施形態は、E V、例えば、エクソソームタンパク質またはタンパク質断片（すなわち、足場タンパク質）と生物学的に活性な分子（例えば、治療的に関連するタンパク質）とをコンジュゲートすることによって融合タンパク質を生成し、E V の内腔表面上に融合タンパク質を含む E V、例えば、エクソソームを産生することに関する。生物学的に活性な分子の天然の完全長タンパク質または生物学的に活性な断片（例えば、治療的に関連するタンパク質）は、エクソソームが富化されたタンパク質またはタンパク質断片にコンジュゲートされることによって、E V、例えば、エクソソームの内腔表面に輸送され得る。

【0007】

本開示は、さらに、より効率的な担持、または E V、例えば、エクソソームの内腔中の生物学的に活性な分子（例えば、治療的に関連するタンパク質）の担持のために設計された内腔操作された E V、例えば、内腔操作されたエクソソームの生成または使用に関する。例えば、E V の内腔表面は、より高い濃度の天然全長 E V、例えば、エクソソームタンパク質及び／または内腔表面上の天然 E V の断片もしくは改変されたタンパク質、例えば、エクソソームタンパク質を含むように改変され得る。

【0008】

本開示のいくつかの実施形態は、産生細胞、またはそのような内腔操作された E V を産生するための産生細胞の生成方法に関する。外因性ポリヌクレオチドは、産生細胞中に一過性または安定的に導入され、産生細胞から内腔操作された E V、例えば、内腔操作されたエクソソームを生成し得る。

【0009】

したがって、一態様において、本開示は、足場タンパク質を含む E V、例えば、エクソソームを提供し、足場タンパク質の少なくとも一部は外因性配列から発現され、足場タンパク質は、M A R C K S、M A R C K S L 1、B A S P 1、またはそれらの断片、変異体、誘導体、もしくは改変を含む。

【0010】

いくつかの態様において、足場タンパク質は、E V、例えば、エクソソーム中に、異な

10

20

30

40

50

るEV、例えば、エクソソーム中の異なる足場タンパク質よりも高い密度で存在し、異なる足場タンパク質は、従来のEV、例えば、エクソソームタンパク質またはその変異体を含む。いくつかの実施形態において、従来のEV、例えば、エクソソームタンパク質は、CD9、CD63、CD81、PDGFR、GPIアンカータンパク質、ラクタドヘリン、LAMP2、LAMP2B、及びそれらの断片からなる群から選択される。

【0011】

いくつかの実施形態において、EV、例えば、エクソソームは、外因性配列を含むよう遺伝子改変された細胞から産生され、任意に、細胞は、HEK293細胞である。

【0012】

いくつかの実施形態において、細胞は、外因性配列を含むプラスミドを含む。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、外因性配列は、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1をコードするゲノム配列に対して3'または5'に位置するゲノム部位に挿入される。いくつかの実施形態において、外因性配列は、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1をコードするゲノム配列に挿入される。

【0014】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはその断片、及び治療的ペプチドを含む融合タンパク質である。

【0015】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、または治療的化合物へのリンカーからなる群から選択される治療的ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子（例えば、治療的化合物）は、ヌクレオチド、アミノ酸、脂質、炭水化物、及び小分子からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、抗体またはその断片もしくは改変である。いくつかの実施形態において、治療的ペプチドは、酵素、リガンド、受容体、転写因子、またはその断片もしくは改変である。いくつかの実施形態において、治療的ペプチドは、抗菌ペプチドまたはその断片もしくは改変である。

20

【0016】

いくつかの実施形態において、EV、例えば、エクソソームは、第2の足場タンパク質をさらに含み、第2の足場タンパク質は、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはそれらの断片を含む。いくつかの実施形態において、EV、例えば、エクソソームは、第2の足場タンパク質をさらに含み、第2の足場タンパク質は、PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2、ATPトランスポーター、またはそれらの断片を含む。

30

【0017】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、パターン(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)(配列番号118)またはN末端(M)を有しない該パターンに対応するペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、(M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+)のペプチド、またはN末端(M)を有しないペプチドを含み、各括弧位置は、アミノ酸を表し、 π は、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xは、任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は、(+)ではなく、6位は、(+)でも(AspまたはGlu)でもない。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、配列(M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+)のペプチド、またはN末端(M)を有しないペプチドを含み、各括弧位置は、アミノ酸を表し、 π は、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 ξ は、(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu)

40

50

u、Lys、His、Arg) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Φは、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は、(+)ではなく、6位は、(+)でも(AspまたはGlu)でもない。アミノ酸の命名法についてはR. Aasland et al., F E B S L e t t e r s 5 1 3 (2 0 0 2) : 1 4 1 - 1 4 4を参照されたい。

【0018】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、配列番号4～110のいずれか1つのペプチドを含む。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、MGXKLKKK (配列番号116) のペプチド、またはN末端Mを有しないペプチドを含み、Xは、任意のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、配列番号110のペプチド、またはN末端Mを有しない対応するペプチドを含む。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、配列番号13のペプチド、またはN末端(M)を有しない対応するペプチドを含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、ペイロード、例えば、ペプチドをさらに含む。

【0020】

別の実施形態において、本開示は、本開示のEV、例えば、エクソソーム、及び賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0021】

いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、巨大分子を実質的に含まず、巨大分子は、核酸、外因性タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、及びそれらの組み合わせから選択される。

【0022】

さらに別の実施形態において、本開示は、本明細書で提供されるEV、例えば、エクソソームを産生するための細胞集団を提供する。

【0023】

いくつかの実施形態において、細胞集団は、MARCKS、MARCKSL1、BASP1またはそれらの断片もしくは改変を含む足場タンパク質をコードする外因性配列を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団は、第2の足場タンパク質をコードする第2の外因性配列をさらに含み、第2の足場タンパク質は、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはそれらの断片もしくは改変を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団は、第2の足場タンパク質をコードする第2の外因性配列をさらに含み、第2の足場タンパク質は、PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2、ATPトランスポーター、またはそれらの断片を含む。

【0024】

いくつかの実施形態において、外因性配列は、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1をコードするゲノム配列に挿入され、外因性配列及びゲノム配列は、足場タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、外因性配列は、プラスミド中にある。

【0025】

いくつかの実施形態において、外因性配列は、生物学的に活性な分子(例えば、治療的ペプチド)をコードする。いくつかの実施形態において、治療的ペプチドは、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、または治療的化合物へのリンカーからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、治療的化合物は、ヌクレオチド、アミノ酸、脂質、炭水化物、及び低分子からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、治療的ペプチドは、抗体またはその断片もしくは改変である。特定の実施形態において、抗体は、ナノボディである。当業者は、本開示のEVにおいて使用される抗体は、例えば、

10

20

30

40

50

代替抗体フォーマット、抗原－薬物コンジュゲート（ADC）または免疫毒素などを含む、当該技術分野で既知の任意の抗原結合分子であり得ることを理解するであろう。

【0026】

いくつかの実施形態において、治療的ペプチドは、酵素、リガンド、受容体、転写因子、またはその断片もしくは改変である。いくつかの実施形態において、治療的ペプチドは、抗菌ペプチドまたはそれらの断片もしくは改変である。

【0027】

いくつかの実施形態において、外因性配列は、標的指向性部分をコードする。いくつかの実施形態において、標的指向性部分は、器官、組織、または細胞に特異的である。

【0028】

いくつかの実施形態において、第2の足場タンパク質は、標的指向性部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、標的指向性部分は、器官、組織、または細胞に特異的である。

【0029】

一実施形態において、本開示は、EV、例えば、エクソソームを改変するためのポリペプチドを提供し、以下の配列、

(i) (M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号118)、またはN末端(M)を有しない対応する配列、

(ii) (M) (G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+)、またはN末端(M)を有しない対応する配列であって、各括弧位置はアミノ酸を表し、 π は、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xは、任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は、(+)ではなく、6位は、(+)でも(AspまたはGlu)でもない、配列、または

(iii) (M) (G) (π) (ξ) (Φ/π) (S/A/G/N) (+) (+)、またはN末端(M)を有しない対応する配列であって、各括弧位置がアミノ酸を表し、 π は、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 ξ は、(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、Arg)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は、(+)ではなく、6位は、(+)でも(AspまたはGlu)でもない、配列、を含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、足場のポリペプチドは、配列番号4～110のいずれかの配列、またはN末端Mを有しない対応する配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、配列番号13の配列、またはN末端Mを有しない対応する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、配列番号110の配列、またはN末端Mを有しない対応する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、MGXKLSKKK(配列番号116)の配列であって、Xは、任意のアミノ酸である配列、またはN末端Mを有しない対応する配列を含む。

【0031】

一態様において、本開示は、本明細書に提供されるポリペプチドをコードするコード配列を含むポリヌクレオチド構築物を提供する。いくつかの実施形態において、コード配列は、コドン最適化される。

【0032】

別の態様において、本開示は、操作されたEV、例えば、エクソソームを作製する方法を提供し、以下の工程、

a.

10

20

30

40

50

(i) MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはそれらの断片もしくは改変をコードする第1の配列、及び

(ii) ペイロード、例えば治療的ペプチドなどの生物学的に活性な分子をコードする第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工程と、
b. 細胞に融合ポリペプチドを発現させる条件下で細胞を維持する工程と、
c. 該細胞から融合ポリペプチドを含む操作されたエクソソームを得る工程と、を含む。

【0033】

いくつかの実施形態において、第1の配列は、以下の配列

(i) (M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号118)、またはN末端(M)を有しない対応する配列、

(ii) (M) (G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+)、またはN末端(M)を有しない対応する配列であって、各括弧位置はアミノ酸を表し、 π は、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xは、任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は(+)ではなく、6位は(+)でも(AspまたはGlu)でもない、配列、または

(iii) (M) (G) (π) (ξ) (Φ/π) (S/A/G/N) (+) (+)、またはN末端(M)を有しない対応する配列であって、各括弧位置がアミノ酸を表し、 π が(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 ξ は、(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、Arg)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は、(+)ではなく、6位は、(+)でも(AspまたはGlu)でもない、配列、を含む。

【0034】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号4～110のいずれかの配列、またはN末端Mを有しない対応する配列のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号13の配列、またはN末端Mを有しない対応する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号110の配列、またはN末端Mを有しない対応する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、MGXKLSKKK(配列番号116)の配列、またはN末端Mを有しない対応する配列を含み、Xは、任意のアミノ酸である。

【0035】

いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、異なるEV、例えば、エクソソームにおける異なる足場タンパク質よりも高い密度で、操作されたEV、例えば、操作されたエクソソームの内腔表面上に存在し、異なる足場タンパク質は、従来のEV、例えば、エクソソームタンパク質またはその変異体を含む。いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、異なるEV、例えば、エクソソームにおける異なる足場タンパク質よりも2倍超高い密度で存在する。

【0036】

いくつかの実施形態において、融合ポリペプチドは、異なるEV、例えば、エクソソームにおける異なる足場タンパク質よりも4倍超、16倍超、100倍超、または10,000倍超高い密度で存在する。

【0037】

本開示は、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)を対象とし、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、ND及びEDはイオン相互作用によってEVの内腔表面と会合し、EDは、配列において少なくとも2つの連続したリジン(Lys)を含む。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態において、NDは、ミリストイル化を介して、EVの内腔表面と会合される。他の実施形態において、NDは、N末端にGlyを有する。

【0038】

いくつかの実施形態において、EDは、少なくとも3つのLys、少なくとも4つのLys、少なくとも5つのLys、少なくとも6つのLys、または少なくとも7つのLysを含む。他の実施形態において、EDは、ペプチド結合によってNDに連結される。いくつかの実施形態において、EDは、(Lys)_nを含み、nは、1～10の整数である。他の実施形態において、EDは、KK、KKK、KKKK（配列番号151）、KKKKK（配列番号152）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0039】

他の実施形態において、NDは、G:X2:X3:X4:X5:X6に記載のアミノ酸配列を含み、Gは、Glyとして表されるグリシンであり、「:」は、ペプチド結合を表し、X2～X6のそれぞれは、独立して、アミノ酸であり、X6は、塩基性アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、X6は、Lys、Arg、及びHisからなる群から選択される。

【0040】

他の実施形態において、本開示は、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）であり、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、NDは、G:X2:X3:X4:X5:X6に記載のアミノ酸配列を含み、Gは、Glyによって表されるグリシンであり、「:」はペプチド結合を表し、X2～X6のそれぞれは、独立してアミノ酸であり、X6は塩基性アミノ酸を含み、EDは、ペプチド結合によってX6に連結され、EDのN末端に少なくとも1つのリジンを含む。いくつかの実施形態において、EDは、ウイルスの膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインを含まない。いくつかの実施形態において、X2は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択される。他の実施形態において、X4は、Pro、Gly、Ala、Ser、Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Gln、及びMetからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、X5は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択される。

【0041】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質のNDは、G:X2:X3:X4:X5:X6のアミノ酸配列を含み、

Gは、Glyを表し、

「:」は、ペプチド結合を表し、

X2は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X3は、アミノ酸であり、

X4は、Pro、Gly、Ala、Ser、Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Gln、及びMetからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X5は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X6は、Lys、Arg、及びHisからなる群から選択されるアミノ酸である。

【0042】

いくつかの実施形態において、X3は、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、及びArgからなる群から選択される。

【0043】

いくつかの実施形態において、ND及びEDは、リンカーによって接合される。いくつかの実施形態において、リンカーは、1つ以上のアミノ酸を含む。

【0044】

いくつかの実施形態において、本開示は、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）を対象とし、足場タンパク質は、ND-EDを

10

20

30

40

50

含み、

NDは、G : X 2 : X 3 : X 4 : X 5 : X 6を含み、

Gは、G l yを表し、

「:」は、ペプチド結合を表し、

X 2は、P r o、G l y、A l a、及びS e rからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X 3は、アミノ酸であり、

X 4は、P r o、G l y、A l a、S e r、V a l、I l e、L e u、P h e、T r p、T y r、G l u、及びM e tからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X 5は、P r o、G l y、A l a、及びS e rからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X 6は、L y s、A r g、及びH i sからなる群から選択されるアミノ酸であり、

「-」は、1つ以上のアミノ酸を含む任意のリンカーであり、

EDは、(i) ペプチド結合もしくは1つ以上のアミノ酸によってX 6に連結される少なくとも2つの連続するリジン (L y s)、または (i i) ペプチド結合によってX 6に直接連結される少なくとも1つのリジンを含むエフェクタードメインである。

【0045】

他の実施形態において、X 2は、G l y及びA l aからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、X 3は、L y sである。いくつかの実施形態において、X 4は、L e uまたはG l uである。いくつかの実施形態において、X 5は、S e r及びA l aからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、X 6は、L y sである。他の実施形態において、X 2は、G l y、A l a、またはS e rであり、X 3は、L y sまたはG l uであり、X 4は、L e u、P h e、S e r、及びG l uであり、X 5は、S e rまたはA l aであり、X 6は、L y sである。

【0046】

いくつかの実施形態において、ND及びEDは、1つ以上のアミノ酸を含むリンカーによって連結される。いくつかの実施形態において、EDは、L y s (K)、K K、K K K、K K K K (配列番号151)、K K K K K (配列番号152)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0047】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、(i) G G K L S K K (配列番号157)、(i i) G A K L S K K (配列番号158)、(i i i) G G K Q S K K (配列番号159)、(i v) G G K L A K K (配列番号160)、または(v) それらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、(i) G G K L S K K K (配列番号161)、(i i) G G K L S K K S (配列番号162)、(i i i) G A K L S K K K (配列番号163)、(i v) G A K L S K K S (配列番号164)、(v) G G K Q S K K K (配列番号165)、(v i) G G K Q S K K S (配列番号166)、(v i i) G G K L A K K K (配列番号167)、(v i i i) G G K L A K K S (配列番号168)、及び(i x) それらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、少なくとも約21、少なくとも約22、少なくとも約23、少なくとも約24、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約55、少なくとも約60、少なくとも約65、少なくとも約70、少なくとも約75、少なくとも約80、少なくとも約85、少なくとも約90、少なくとも約95、少なくとも約100、少なくとも約105、少なくとも約110、少なくとも約120、少なくとも約130、少なくとも約140、少なくとも約150、少なくとも約160、少なくとも約170、少なくとも約180、少な

10

20

30

40

50

くとも約190、または少なくとも約200アミノ酸長である。

【0048】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、(i) GGKLSKKKKGYNVN (配列番号169)、(ii) GAKLSKKKKGYNVN (配列番号170)、(iii) GGKQSKKKKKGYNVN (配列番号171)、(iv) GGKLAKKKKGYNVN (配列番号172)、(v) GGKLSKKKKKGYSGG (配列番号173)、(vi) GGKLSKKKKKSGSGS (配列番号174)、(vii) GGKLSKKKKSGSGSG (配列番号175)、(viii) GGKLSKKKKSGSGSGS (配列番号176)、(ix) GGKLSKKSGSGSGS (配列番号177)、(x) GGKLSKSGSGSGSV (配列番号178)、または(xi) GAKKSKKRFSFKKS (配列番号179)を含む。

10

【0049】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、N末端にMetを含まない。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、足場タンパク質のN末端にミリストイル化アミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、足場タンパク質のN末端のアミノ酸残基は、Glyである。いくつかの実施形態において、足場タンパク質のN末端のアミノ酸残基は、合成である。いくつかの実施形態において、足場タンパク質のN末端におけるアミノ酸残基は、グリシン類似体である。

【0050】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、配列番号1(MARKS)、配列番号2(MARKSL1)、または配列番号3(BASP1)に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0051】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、EVの内腔表面上にある。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、膜貫通ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、足場タンパク質のEDドメインと、生物学的に活性な分子との間にある。いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、小胞外ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、小胞外ドメインに連結される。

30

【0052】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質は、リンカーによって生物学的に活性な分子に連結される。いくつかの実施形態において、NDドメインは、リンカーによってEDドメインに連結される。いくつかの実施形態において、リンカーは、1つ以上のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、柔軟なリンカーを含む。

【0053】

他の実施形態において、生物学的に活性な分子は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド(DNA及び／またはRNA)、化学化合物、ウイルス、イオノフォア、イオノフォア用担体、チャネルもしくはポアを形成する部分、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質は、組換えペプチド、天然ペプチド、合成ペプチド、抗体、融合タンパク質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質は、酵素、サイトカイン、リガンド、受容体、転写因子、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、ウイルスは、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

40

【0054】

他の実施形態において、EVは、第2の足場タンパク質をさらに含む。いくつかの実施形態において、第2の足場タンパク質は、PTGFRNポリペプチド、BSGポリペプチ

50

ド、IGSF2ポリペプチド、IGSF3ポリペプチド、IGSF8ポリペプチド、ITGB1ポリペプチド、ITGA4ポリペプチド、SLC3A2ポリペプチド、ATPトランスポーターポリペプチド、アミノペプチダーゼN (ANPEP) ポリペプチド、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼファミリーメンバー1 (ENPP1) ポリペプチド、ネプリライシン (MME) ポリペプチド、ニューロピリン-1 (NRP1) ポリペプチド、またはそれらの断片を含む。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、負のチェックポイント調節因子の阻害剤または負のチェックポイント調節因子の結合パートナーの阻害剤である。いくつかの実施形態において、負のチェックポイント調節因子は、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG-3)、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3 (TIM-3)、B及びTリンパ球減衰因子 (BTLA)、Ig及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体 (TIGIT)、T細胞活性化のVドメインIg抑制因子 (VISTA)、アデノシンA2a受容体 (A2aR)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、CD20、CD39、ならびにCD73からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、免疫原性タンパク質である。

【0055】

他の実施形態において、生物学的に活性な分子は、毒素、トキシイド、または毒素の非毒性変異体である。いくつかの実施形態において、毒素は、ジフテリア毒素である。いくつかの実施形態において、トキシイドは、破傷風トキシイドである。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、ジフテリア毒素の非毒性変異体である。

【0056】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、正の共刺激分子の活性化剤または正の共刺激分子の結合パートナーの活性化剤である。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子は、TNF受容体スーパーファミリーメンバーである。いくつかの実施形態において、TNF受容体スーパーファミリーメンバーは、CD120a、CD120b、CD18、OX40、CD40、Fas受容体、M68、CD27、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、RANK、OCIF、TWEAK受容体、TACI、BAFF受容体、ATAR、CD271、CD269、AITR、TROY、CD358、TRAMP、及びXEDARからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子の活性化剤は、TNFスーパーファミリーメンバーである。いくつかの実施形態において、TNFスーパーファミリーメンバーは、TNF α 、TNF-C、OX40L、CD40L、FasL、LIGHT、TL1A、CD27L、Siva、CD153、4-1BBリガンド、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITRリガンド、及びEDA-2からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子は、CD28スーパーファミリー共刺激分子である。いくつかの実施形態において、CD28スーパーファミリー共刺激分子は、ICOSまたはCD28である。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子の活性化剤は、ICOSL、CD80、またはCD86である。

【0057】

他の実施形態において、サイトカインは、IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、及びIL-15からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、タンパク質は、T細胞受容体 (TCR)、T細胞共受容体、主要組織適合性複合体 (MHC)、ヒト白血球抗原 (HLA)、またはそれらの誘導体を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質は、腫瘍抗原を含む。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は、アルファフェトプロテイン (AFP)、がん胎児性抗原 (CEA)、上皮腫瘍抗原 (ETA)、ムチン1 (MUC1)、Tn-MUC1、ムチン16 (MUC16)、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原 (MAGE)、腫瘍タンパク質p53 (p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、プログラム死リガンド1 (PD-L1)、プログラム死リガ

10

20

30

40

50

ンド2 (PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、メソテリン、VEGFR、アルファー葉酸受容体、CE7R、IL-3、がん-精巣抗原、MART-1 gp100、及びTNF関連アポトーシス誘導リガンドからなる群から選択される。

【0058】

他の実施形態において、EVは、エクソソームである。

【0059】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のEV及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を対象とする。いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のEVを生成する細胞を対象とする。いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のEV及び使用説明書を含むキットを対象とする。

10

【0060】

他の実施形態において、本開示は、好適な条件下で本開示の細胞を培養し、EVを得ることを含む、EVの作製方法を対象とする。いくつかの実施形態において、本開示は、生物学的に活性な分子を明細書に開示される足場タンパク質に連結することを含む、生物学的に活性な分子を細胞外小胞に固定する方法を対象とする。

【0061】

他の実施形態において、本開示は、本開示のEVを投与することを含む、それを必要とする対象における疾患を予防または治療する方法を対象とし、疾患は、抗原と関連付けられる。いくつかの実施形態において、EVは、非経口、経口、静脈内、筋肉内、腫瘍内、鼻腔内、皮下、または腹腔内投与される。

20

【0062】

実施形態

E1. 足場タンパク質を含むEV、例えば、エクソソームであって、足場タンパク質の少なくとも一部は外因性配列から発現され、足場タンパク質は、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはそれらの断片もしくは改変を含む。

【0063】

E2. 足場タンパク質が、EV、例えば、エクソソームにおいて、異なるEV、例えば、エクソソームにおける異なる足場タンパク質よりも高い密度で存在し、異なる足場タンパク質が、従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質またはその変異体を含む、実施形態E1に記載のEV、例えば、エクソソーム。

30

【0064】

E3. 従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質が、CD9、CD63、CD81、PDGFR、GPIアンカータンパク質、ラクタドヘリン、LAMP2、LAMP2B、及びそれらの断片からなる群から選択される、実施形態E2に記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0065】

E4. EV、例えば、エクソソームが、外因性配列を含むように遺伝子改変された細胞から産生され、任意で、細胞がHEK293細胞である、実施形態E1～E3のいずれかに記載のEV、例えば、エクソソーム。

40

【0066】

E5. 細胞が、外因性配列を含むプラスミドを含む、実施形態E1～E4に記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0067】

E6. 細胞が、細胞のゲノムに挿入された外因性配列を含む、実施形態E1～E5に記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0068】

E7. 外因性配列が、MARCKS、MARCKSL1またはBASP1をコードするゲノム配列に対して3'または5'に位置するゲノム部位に挿入される、実施形態E1～E6に記載のEV、例えば、エクソソーム。

50

【0069】

E 8. 外因性配列が、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1をコードするゲノム配列に挿入される、実施形態E1～E7に記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0070】

E 9. 足場タンパク質が、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはそれらの断片、及び治療的ペプチドを含む融合タンパク質である、実施形態E1～E8のいずれか一つに記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0071】

E 10. 治療的ペプチドが、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、または治療的化合物へのリンカーからなる群から選択される、実施形態E9に記載のEV、例えば、エクソソーム。

10

【0072】

E 11. 治療化合物が、ヌクレオチド、アミノ酸、脂質、炭水化物、及び小分子からなる群から選択される、実施形態E9に記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0073】

E 12. 治療的ペプチドが、抗体またはその断片もしくは改変である、実施形態E9に記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0074】

E 13. 治療的ペプチドが、酵素、リガンド、受容体、転写因子、またはそれらの断片もしくは改変である、実施形態E9に記載のEV、例えば、エクソソーム。

20

【0075】

E 14. 治療的ペプチドが、抗菌ペプチドまたはその断片もしくは改変である、実施形態E9に記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0076】

E 15. 第2の足場タンパク質をさらに含み、第2の足場タンパク質が、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはそれらの断片を含む、実施形態E1～E14のいずれに記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0077】

E 16. 第2の足場タンパク質をさらに含み、第2の足場タンパク質が、PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2、ATPトランスポーター、またはそれらの断片を含む、実施形態E1～E14のいずれかに記載のEV、例えば、エクソソーム。

30

【0078】

E 17. 足場タンパク質が、配列(M)(G)(G/A/S)(K/Q)(L/F/S/Q)(S/A)(K)(K)(配列番号118)のペプチド、またはN末端(M)を有しない対応する配列を含む、実施形態E1～E16のいずれかに記載のEV、例えば、エクソソーム。

【0079】

E 18. 足場タンパク質が、配列(M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+)(+)、またはN末端(M)を有しない対応する配列のペプチドを含み、各括弧位置が、アミノ酸を表し、 π が、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xが、任意のアミノ酸であり、 Φ が、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)が、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位が、(+)でなく、6位が、(+)でも(AspまたはGlu)でもない、実施形態E1～E17のいずれかに記載のEV、例えば、エクソソーム。

40

【0080】

E 19. 足場タンパク質が、配列(M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+)のペプチド、またはN末端(M)を有しない対応する配列を含み、各括弧位置がアミノ酸を表し、 π が、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選

50

択される任意のアミノ酸であり、ξが、(A s n、G l n、S e r、T h r、A s p、G l u、L y s、H i s、A r g) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、φが、(V a l、I l e、L e u、P h e、T r p、T y r、M e t) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)が、(L y s、A r g、H i s) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位が、(+)でなく、6位が、(+)でも(A s pまたはG l u)でもない、実施形態E 1～E 18のいずれかに記載のE V、例えば、エクソソーム。

【0081】

E 20. 足場タンパク質が配列番号4～110のいずれか1つのペプチド、またはN末端Mを有しない対応する配列のいずれかを含む、実施形態E 18またはE 19のいずれかに記載のE V、例えば、エクソソーム。

10

【0082】

E 21. 足場タンパク質が、M G X K L S K K K (配列番号116) のペプチド、またはN末端Mを有しない対応する配列を含み、Xが任意のアミノ酸である、実施形態E 18またはE 19のいずれかに記載のE V、例えば、エクソソーム。

【0083】

E 22. 足場タンパク質が、配列番号110のペプチド、またはN末端Mを有しない対応する配列を含む、実施形態E 20に記載のE V、例えば、エクソソーム。

【0084】

E 23. 足場タンパク質が、配列番号13のペプチド、またはN末端Mを有しない対応する配列を含む、実施形態E 20に記載のE V、例えば、エクソソーム。

20

【0085】

E 24. 足場タンパク質が、ペイロード、例えば、ペプチドなどの生物学的に活性な分子をさらに含む、実施形態E 1～E 24のいずれかに記載のE V、例えば、エクソソーム。

【0086】

E 25. 実施形態E 1～E 24のいずれかに記載のE V、例えば、エクソソーム、及び賦形剤を含む、薬学的組成物。

【0087】

E 26. 巨大分子が、核酸、外因性タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、及びそれらの組み合わせから選択される、実施形態E 25に記載の薬学的組成物。

30

【0088】

E 27. 実施形態E 1～E 24のいずれかのE V、例えば、エクソソームを産生するための細胞集団。

【0089】

E 28. M A R C K S、M A R C K S L 1、B A S P 1、またはそれらの断片もしくは改変を含む、足場タンパク質をコードする外因性配列を含む、実施形態E 27に記載の細胞集団。

【0090】

E 29. 第2の足場タンパク質をコードする第2の外因性配列をさらに含み、第2の足場タンパク質が、M A R C K S、M A R C K S L 1、B A S P 1またはそれらの断片もしくは改変を含む、実施形態E 28に記載の細胞集団。

40

【0091】

E 30. 第2の足場タンパク質をコードする第2の外因性配列をさらに含み、第2の足場タンパク質が、P T G F R N、B S G、I G S F 2、I G S F 3、I G S F 8、I T G B 1、I T G A 4、S L C 3 A 2、A T P トランスポーター、またはそれらの断片を含む、実施形態E 28に記載の細胞集団。

【0092】

E 31. 外因性配列が、M A R C K S、M A R C K S L 1またはB A S P 1をコードするゲノム配列に挿入され、外因性配列及びゲノム配列が、足場タンパク質をコードする、実施形態E 27～E 30のいずれかに記載の細胞集団。

50

【0093】

E 32. 外因性配列が、プラスミド中にある、実施形態 E 27 ~ E 30 のいずれかに記載の細胞集団。

【0094】

E 33. 外因性配列が、生物学的に活性な分子、例えば、治療的ペプチドをコードする、実施形態 E 27 ~ E 32 のいずれかに記載の細胞集団。

【0095】

E 34. 治療的ペプチドが、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、または治療的化合物へのリンカーからなる群から選択される、実施形態 E 33 に記載の細胞集団。

【0096】

E 35. 治療的化合物が、ヌクレオチド、アミノ酸、脂質、炭水化物、及び小分子からなる群から選択される、実施形態 E 33 に記載の細胞集団。

【0097】

E 36. 治療的ペプチドが、抗体またはその断片もしくは改変である、実施形態 E 33 に記載の細胞集団。

【0098】

E 37. 治療的ペプチドが、酵素、リガンド、受容体、転写因子、またはそれらの断片もしくは改変である、実施形態 E 33 に記載の細胞集団。

【0099】

E 38. 治療的ペプチドが、抗菌ペプチドまたはその断片もしくは改変である、実施形態 E 33 に記載の細胞集団。

【0100】

E 39. 外因性配列が、標的指向性部分をコードする、実施形態 E 28 に記載の細胞集団。

【0101】

E 40. 標的指向性部分が、器官、組織、または細胞に特異的である、実施形態 E 39 に記載の細胞集団。

【0102】

E 41. 第2の足場タンパク質が、標的指向性部分をさらに含む、実施形態 E 29 または E 30 に記載の細胞集団。

【0103】

E 42. 標的指向性部分が、器官、組織、または細胞に特異的である、実施形態 E 41 に記載の細胞集団。

【0104】

E 43. E V、例えば、エクソソームを改変するためのポリペプチドであって、以下の配列、

(i) (M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号 118)、または N 末端 (M) を有しない対応する配列、

(ii) (M) (G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+)、または N 末端 (M) を有しない対応する配列であって、各括弧位置が、アミノ酸を表し、 π が、(Pro、Gly、Ala、Ser) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、X が、任意のアミノ酸であり、 Φ が、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+) が、(Lys、Arg、His) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5 位が、(+) ではなく、6 位が、(+) でも (Asp または Glu) でもない、配列、または

(iii) (M) (G) (π) (ξ) (Φ/π) (S/A/G/N) (+) (+)、または N 末端 (M) を有しない対応する配列であって、各括弧位置が、アミノ酸を表し、 π が、(Pro、Gly、Ala、Ser) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 ξ が、(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、Arg) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 Φ が、(Val、Ile、Leu

10

20

30

40

50

、P h e、T r p、T y r、M e t) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+) が、(L y s、A r g、H i s) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5 位が、(+) ではなく、6 位が、(+) でも (A s p または G l u) でもない任意のアミノ酸である、配列、を含む。

【0105】

E 4 4 . 配列番号 4 ~ 1 1 0 のいずれかの配列、または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかを含む、実施形態 E 4 3 に記載のポリペプチド。

【0106】

E 4 5 . 配列番号 1 3 の配列、または N 末端 M を有しない対応する配列を含む、実施形態 E 4 3 に記載のポリペプチド。

【0107】

E 4 6 . 配列番号 1 1 0 の配列、または N 末端 M を有しない対応する配列を含む、実施形態 E 4 3 に記載のポリペプチド。

【0108】

E 4 7 . M G X K L S K K K (配列番号 1 1 6) の配列、または N 末端 M を有しない対応する配列を含み、X が、任意のアミノ酸である、実施形態 E 4 3 に記載のポリペプチド。

【0109】

E 4 8 . ポリペプチドが、ペイロード、例えば、ペプチドなどの生物学的に活性な分子に融合される、実施形態 E 4 3 ~ E 4 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

【0110】

E 4 9 . ポリペプチドが、ペプチドの N 末端に融合される、実施形態 E 4 8 に記載のポリペプチド。

【0111】

E 5 0 . 実施形態 E 4 3 ~ E 4 9 のいずれかに記載のポリペプチドをコードするコード配列を含むポリヌクレオチド構築物。

【0112】

E 5 1 . コード配列がコドン最適化される、実施形態 E 5 0 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0113】

E 5 2 . 操作された E V、例えば、エクソソームを作製する方法であって、以下の工程、

a . (i) M A R C K S、M A R C K S L 1、B A S P 1 またはそれらの断片もしくは改変をコードする第 1 の配列、及び (i i) ペイロード、例えばペプチドなどの生物学的に活性な分子をコードする第 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工程と、

b . 細胞に融合ポリペプチドを発現させる条件下で細胞を維持する工程と、

c . 該細胞から融合ポリペプチドを含む操作された E V、例えば、エクソソームを得る工程と、を含む。

【0114】

E 5 3 . 第 1 の配列が、以下の配列、

(i) (M) (G) (G / A / S) (K / Q) (L / F / S / Q) (S / A) (K) (K) (配列番号 1 1 8)、または N 末端 (M) を有しない対応する配列、

(i i) (M) (G) (π) (X) (Φ / π) (π) (+) (+)、または N 末端 (M) を有しない対応する配列であって、各括弧位置が、アミノ酸を表し、 π が、(P r o、G l y、A l a、S e r) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、X が、任意のアミノ酸であり、 Φ が、(V a l、I l e、L e u、P h e、T r p、T y r、M e t) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+) が、(L y s、A r g、H i s) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5 位が、(+) ではなく、6 位が、(+) でも (A s p または G l u) でもない、配列、または

(i i i) (M) (G) (π) (ξ) (Φ / π) (S / A / G / N) (+) (+)、または N 末端 (M) を有しない対応する配列であって、各括弧位置が、アミノ酸を表し、 π

10

20

30

40

50

が (Pro、Gly、Ala、Ser) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、ξが、(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、Arg) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、φが、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)が、(Lys、Arg、His) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位が、(+)ではなく、6位が、(+)でも (Asp または Glu) でもない、配列、を含む、実施形態 E 5 2 に記載の方法。

【0115】

E 5 4. 第 1 の配列が、配列番号 4 ~ 1 1 0 のいずれか、または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかを含む、実施形態 E 5 2 または E 5 3 のいずれかに記載の方法。

【0116】

E 5 5. 第 1 の配列が、配列番号 1 3、または N 末端 M を有しない対応する配列を含む、実施形態 E 5 4 に記載の方法。

【0117】

E 5 6. 第 1 の配列が、配列番号 1 1 0、または N 末端 M を有しない対応する配列を含む、実施形態 E 5 5 に記載の方法。

【0118】

E 5 7. 第 1 の配列が M G X K L S K K K (配列番号 1 1 6)、または N 末端 M を有しない対応する配列を含み、X が、任意のアミノ酸である、実施形態 E 5 3 に記載の方法。

【0119】

E 5 8. 融合ポリペプチドが、操作された E V、例えば、エクソソームの内腔表面上に、異なる E V、例えば、エクソソームにおける異なる足場タンパク質よりも高い密度で存在し、異なる足場タンパク質が、従来の E V、例えば、エクソソームタンパク質またはその変異体を含む、実施形態 E 5 2 ~ E 5 7 のいずれかに記載の方法。

【0120】

E 5 9. 融合ポリペプチドが、異なる E V、例えば、エクソソームにおける異なる足場タンパク質より 2 倍超の密度で存在する、実施形態 E 5 8 に記載の方法。

【0121】

E 6 0. 融合ポリペプチドが、異なる E V、例えば、エクソソームにおける異なる足場タンパク質より 4 倍超、1 6 倍超、1 0 0 倍超、または 1 0, 0 0 0 倍超高い密度で存在する、実施形態 E 5 9 に記載の方法。

【0122】

図面は、例示のみを目的として本開示の様々な態様を示す。当業者は、本明細書に例示される構造及び方法の代替的な態様が、本明細書に記載される本開示の原理から逸脱することなく用いられ得ることを以下の考察から容易に認識するであろう。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

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 (E V) であって、前記足場タンパク質は N 末端ドメイン (N D) 及びエフェクタードメイン (E D) を含み、前記 N D は前記 E V の内腔表面と会合し、前記 E D はイオン相互作用によって前記 E V の前記内腔表面と会合し、前記 E D は配列中に少なくとも 2 つの連続したリジン (L y s) を含む、前記単離された細胞外小胞 (E V)。

(項目 2)

前記 N D が、ミリストイル化を介して前記 E V の前記内腔表面と会合する、項目 1 に記載の E V。

(項目 3)

前記 N D が、N 末端に G l y を有する、項目 2 に記載の E V。

(項目 4)

前記 E D が、少なくとも 3 つの L y s、少なくとも 4 つの L y s、少なくとも 5 つの L y s、少なくとも 6 つの L y s、または少なくとも 7 つの L y s を含む、項目 1 ~ 3 のい

10

20

30

40

50

ずれか一項に記載の E V。

(項目 5)

前記 E D が、ペプチド結合によって前記 N D に連結される、項目 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 6)

前記 E D が、(L y s) n を含み、n が 1 ～ 10 の整数である、項目 4 または 5 に記載の E V。

(項目 7)

前記 E D が、K K、K K K、K K K K (配列番号 1 5 1)、K K K K K (配列番号 1 5 2)、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 8)

前記 N D が、G : X 2 : X 3 : X 4 : X 5 : X 6 に記載されるアミノ酸配列を含み、G が G l y として表されるグリシンであり、「:」がペプチド結合を表し、前記 X 2 ～前記 X 6 のそれぞれが独立してアミノ酸であり、前記 X 6 が塩基性アミノ酸を含む、項目 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 9)

前記 X 6 が、L y s、A r g、及び H i s からなる群から選択される、項目 8 に記載の E V。

(項目 10)

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 (E V) であって、前記足場タンパク質は N 末端ドメイン (N D) 及びエフェクタードメイン (E D) を含み、前記 N D は G : X 2 : X 3 : X 4 : X 5 : X 6 に記載のアミノ酸配列を含み、G は G l y によって表されるグリシンであり、「:」はペプチド結合を表し、前記 X 2 ～前記 X 6 のそれぞれは独立してアミノ酸であり、前記 X 6 は塩基性アミノ酸を含み、前記 E D はペプチド結合によって X 6 に連結され、前記 E D の N 末端に少なくとも 1 つのリジンを含む、前記単離された細胞外小胞 (E V) 。

(項目 11)

前記 E D が、ウイルスの膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインを含まない、項目 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 12)

前記 X 2 が、P r o、G l y、A l a、及び S e r からなる群から選択される、項目 8 ～ 11 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 13)

前記 X 4 が、P r o、G l y、A l a、S e r、V a l、I l e、L e u、P h e、T r p、T y r、G l n、及び M e t からなる群から選択される、項目 8 ～ 12 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 14)

前記 X 5 が、P r o、G l y、A l a、及び S e r からなる群から選択される、項目 8 ～ 13 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 15)

前記足場タンパク質の前記 N D が、G : X 2 : X 3 : X 4 : X 5 : X 6 のアミノ酸配列を含み、

(i) G が、G l y を表し、

(i i) 「:」が、ペプチド結合を表し、

(i i i) 前記 X 2 が、P r o、G l y、A l a、及び S e r からなる群から選択されるアミノ酸であり、

(i v) 前記 X 3 が、アミノ酸であり、

(v) 前記 X 4 が、P r o、G l y、A l a、S e r、V a l、I l e、L e u、P h e、T r p、T y r、G l n、及び M e t からなる群から選択されるアミノ酸であり、

(v i) 前記 X 5 が、P r o、G l y、A l a、及び S e r からなる群から選択される

10

20

30

40

50

アミノ酸であり、

(vii) 前記X6が、Lys、Arg、及びHisからなる群から選択されるアミノ酸である、項目1～14のいずれか一項に記載のEV。

(項目16)

前記X3が、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、及びArgからなる群から選択される、項目8～15のいずれか一項に記載のEV。

(項目17)

前記ND及び前記EDが、リンカーによって接合される、項目1～9及び11～16のいずれか一項に記載のEV。

(項目18)

前記リンカーが、ペプチド結合または1つ以上のアミノ酸を含む、項目17に記載のEV。

(項目19)

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ND-EDを含み、

a. NDはG:X2:X3:X4:X5:X6を含み、

i. GはGlyを表し、

ii. 「:」はペプチド結合を表し、

iii. 前記X2はPro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択されるアミノ酸であり、

iv. 前記X3はアミノ酸であり、

v. 前記X4はPro、Gly、Ala、Ser、Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Glu、及びMetからなる群から選択されるアミノ酸であり、

vi. 前記X5はPro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択されるアミノ酸であり、

vii. 前記X6はLys、Arg、及びHisからなる群から選択されるアミノ酸であり、

b. 「-」は1つ以上のアミノ酸を含む任意のリンカーであり、

c. EDは(i) ペプチド結合もしくは1つ以上のアミノ酸によって前記X6に連結される少なくとも2つの連続するリジン (Lys)、または(ii) ペプチド結合によって前記X6に直接連結される少なくとも1つのリジンを含むエフェクタードメインである、前記単離された細胞外小胞 (EV)。

(項目20)

前記X2が、Gly及びAlaからなる群から選択される、項目8～19のいずれか一項に記載のEV。

(項目21)

前記X3が、Lysである、項目8～20のいずれか一項に記載のEV。

(項目22)

前記X4が、LeuまたはGluである、項目8～21のいずれか一項に記載のEV。

(項目23)

前記X5が、Ser及びAlaからなる群から選択される、項目8～22のいずれか一項に記載のEV。

(項目24)

前記X6がLysである、項目8～23のいずれか一項に記載のEV。

(項目25)

前記X2が、Gly、Ala、またはSerであり、前記X3が、LysまたはGluであり、前記X4が、Leu、Phe、Ser、及びGluであり、前記X5が、SerまたはAlaであり、前記X6が、Lysである、項目8～24のいずれか一項に記載のEV。

(項目26)

10

20

30

40

50

前記ND及び前記EDが、1つ以上のアミノ酸を含むリンカーによって連結される、項目19～25のいずれか一項に記載のEV。

(項目27)

前記EDが、Lys(K)、KK、KKK、KKKK(配列番号151)、KKKKK(配列番号152)、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目19～26のいずれか一項に記載のEV。

(項目28)

前記足場タンパク質が、(i)GGKLSKK(配列番号157)、(ii)GAKLSKK(配列番号158)、(iii)GGKQSKK(配列番号159)、(iv)GGKLAKK(配列番号160)、または(v)それらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目1～27のいずれか一項に記載のEV。

(項目29)

前記足場タンパク質が、(i)GGKLSKKK(配列番号161)、(ii)GGKLSKKKS(配列番号162)、(iii)GAKLSKKK(配列番号163)、(iv)GAKLSKKKS(配列番号164)、(v)GGKQSKKK(配列番号165)、(vi)GGKQSKKS(配列番号166)、(vii)GGKLAKKK(配列番号167)、(viii)GGKLAKKS(配列番号168)、及び(ix)それらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目28に記載のEV。

(項目30)

前記足場タンパク質が、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、少なくとも約21、少なくとも約22、少なくとも約23、少なくとも約24、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約55、少なくとも約60、少なくとも約65、少なくとも約70、少なくとも約75、少なくとも約80、少なくとも約85、少なくとも約90、少なくとも約95、少なくとも約100、少なくとも約105、少なくとも約110、少なくとも約120、少なくとも約130、少なくとも約140、少なくとも約150、少なくとも約160、少なくとも約170、少なくとも約180、少なくとも約190、または少なくとも約200アミノ酸長である、項目1～29のいずれか1項に記載のEV。

(項目31)

前記足場タンパク質が、(i)GGKLSKKKKGYNVN(配列番号169)、(ii)GAKLSKKKKGYNVN(配列番号170)、(iii)GGKQSKKKKGYNVN(配列番号171)、(iv)GGKLAKKKKKGYNVN(配列番号172)、(v)GGKLSKKKKKGYSGG(配列番号173)、(vi)GGKLSKKKKKSGGS(配列番号174)、(vii)GGKLSKKKKKSGSGG(配列番号175)、(viii)GGKLSKKKSGSGSGG(配列番号176)、(ix)GGKLSKKSGSGSGG(配列番号177)、(x)GGKLSKSGSGSGGSV(配列番号178)、または(xi)GAKKSKKRFSFKKS(配列番号179)を含む、項目1～30のいずれか一項に記載のEV。

(項目32)

前記足場タンパク質が、N末端にMetを含まない、項目1～31のいずれか一項に記載のEV。

(項目33)

前記足場タンパク質が、前記足場タンパク質の前記N末端にミリストイル化アミノ酸残基を含む、項目1～32のいずれか一項に記載のEV。

(項目34)

前記足場タンパク質の前記N末端における前記アミノ酸残基が、Glyである、項目33に記載のEV。

(項目 3 5)

前記足場タンパク質の前記N末端における前記アミノ酸残基が、合成物質である、項目 3 3 または 3 4 に記載の E V。

(項目 3 6)

前記足場タンパク質の前記N末端における前記アミノ酸残基が、グリシン類似体である、項目 3 3 または 3 5 に記載の E V。

(項目 3 7)

前記足場タンパク質が、配列番号 1 (MARKS)、配列番号 2 (MARCKSL1)、または配列番号 3 (BASP1) と少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または約 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の E V。

10

(項目 3 8)

前記生物学的に活性な分子が、前記 E V の前記内腔表面または内腔上にある、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 3 9)

前記足場タンパク質が、膜貫通ドメインをさらに含む、項目 1 及び 8 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 4 0)

前記膜貫通ドメインが、前記足場タンパク質の E D ドメインと前記生物学的に活性な分子との間にある、項目 3 9 に記載の E V。

20

(項目 4 1)

前記足場タンパク質が、小胞外ドメインをさらに含む、項目 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 4 2)

前記生物学的に活性な分子が、前記小胞外ドメインに連結される、項目 4 1 に記載の E V。

(項目 4 3)

前記足場タンパク質が、リンカーによって前記生物学的に活性な分子に連結される、項目 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の E V。

30

(項目 4 4)

N D ドメインが、リンカーによって E D ドメインに連結される、項目 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 4 5)

前記リンカーが、ペプチド結合または 1 つ以上のアミノ酸を含む、項目 4 3 または 4 4 に記載の E V。

(項目 4 6)

前記リンカーが、切断可能なリンカーを含む、項目 1 7 ~ 1 9、2 6、及び 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の E V。

40

(項目 4 7)

前記リンカーが、柔軟なリンカーを含む、項目 1 7 ~ 1 9、2 6、及び 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 4 8)

前記生物学的に活性な分子が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド (DNA 及び / または RNA)、化学化合物、ウイルス、イオノフォア、イオノフォア用担体、チャネルもしくは細孔を形成する部分、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 4 9)

前記タンパク質が、組換えペプチド、天然ペプチド、合成ペプチド、抗体、融合タンパ

50

ク質、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目 4 8 に記載の E V。

(項目 5 0)

前記タンパク質が、酵素、サイトカイン、リガンド、受容体、転写因子、またはそれらの組み合わせを含む、項目 4 8 に記載の E V。

(項目 5 1)

前記ウイルスが、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目 4 8 に記載の E V。

(項目 5 2)

前記 E V が、第 2 の足場タンパク質をさらに含む、項目 1 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 5 3)

前記第 2 の足場タンパク質が、P T G F R N ポリペプチド、B S G ポリペプチド、I G S F 2 ポリペプチド、I G S F 3 ポリペプチド、I G S F 8 ポリペプチド、I T G B 1 ポリペプチド、I T G A 4 ポリペプチド、S L C 3 A 2 ポリペプチド、A T P トランスポーターポリペプチド、アミノペプチダーゼ N (A N P E P) ポリペプチド、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼファミリーメンバー 1 (E N P P 1) ポリペプチド、ネプリライシン (M M E) ポリペプチド、ニューロピリン-1 (N R P 1) ポリペプチド、またはそれらの断片を含む、項目 5 2 に記載の E V。

(項目 5 4)

前記生物学的に活性な分子が、負のチェックポイント調節因子の阻害剤または負のチェックポイント調節因子の結合パートナーの阻害剤である、項目 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の E V。

(項目 5 5)

前記負のチェックポイント調節因子が、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4)、プログラム細胞死タンパク質 1 (P D - 1)、リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G - 3)、T 細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質 3 (T I M - 3)、B 及び T リンパ球減衰因子 (B T L A)、I g 及び I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体 (T I G I T)、T 細胞活性化の V ドメイン I g 抑制因子 (V I S T A)、アデノシン A 2 a 受容体 (A 2 a R)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (K I R)、インドールアミン 2, 3 - ジオキシゲナーゼ (I D O)、C D 2 0、C D 3 9、ならびに C D 7 3 からなる群から選択される、項目 5 4 に記載の E V。

(項目 5 6)

前記生物学的に活性な分子が、免疫原性タンパク質である、項目 1 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 5 7)

前記生物学的に活性な分子が、毒素、トキシイド、または毒素の非毒性変異体である、項目 1 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の E V。

(項目 5 8)

前記毒素が、ジフテリア毒素である、項目 5 7 に記載の E V。

(項目 5 9)

前記トキシイドが、破傷風トキシイドである、項目 5 7 に記載の E V。

(項目 6 0)

前記生物学的に活性な分子が、ジフテリア毒素の非毒性変異体である、項目 5 7 に記載の E V。

(項目 6 1)

前記生物学的に活性な分子が、正の共刺激分子の活性化剤または正の共刺激分子の結合パートナーの活性化剤である、項目 1 ～ 6 0 のいずれか 1 項に記載の E V。

(項目 6 2)

前記正の共刺激分子が、T N F 受容体スーパーファミリーメンバーである、項目 6 1 に記載の E V。

10

20

30

40

50

(項目 6 3)

前記 TNF 受容体スーパーファミリーメンバーが、CD120a、CD120b、CD18、OX40、CD40、Fas 受容体、M68、CD27、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、RANK、OCIF、TWEAK 受容体、TACI、BAFF 受容体、ATAR、CD271、CD269、AITR、TROY、CD358、TRAMP、及び XEDAR からなる群から選択される、項目 6 2 に記載の EV。

(項目 6 4)

正の共刺激分子の前記活性化剤が、TNF スーパーファミリーメンバーである、項目 6 3 に記載の EV。

10

(項目 6 5)

前記 TNF スーパーファミリーメンバーが、TNF α 、TNF-C、OX40L、CD40L、FasL、LIGHT、TL1A、CD27L、Siva、CD153、4-1BB リガンド、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITR リガンド、及び EDA-2 からなる群から選択される、項目 6 4 に記載の EV。

(項目 6 6)

前記正の共刺激分子が、CD28-スーパーファミリー共刺激分子である、項目 6 1 に記載の EV。

(項目 6 7)

前記 CD28-スーパーファミリー共刺激分子が、ICOS または CD28 である、項目 6 6 に記載の EV。

20

(項目 6 8)

正の共刺激分子の前記活性化剤が、ICOSL、CD80、または CD86 である、項目 6 7 に記載の EV。

(項目 6 9)

前記サイトカインが、IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、及び IL-15 からなる群から選択される、項目 5 0 に記載の EV。

(項目 7 0)

前記タンパク質が、T 細胞受容体 (TCR)、T 細胞共受容体、主要組織適合性複合体 (MHC)、ヒト白血球抗原 (HLA)、またはそれらの誘導体を含む、項目 4 8 に記載の EV。

30

(項目 7 1)

前記タンパク質が、腫瘍抗原を含む、項目 4 8 に記載の EV。

(項目 7 2)

前記腫瘍抗原が、アルファ-フェトプロテイン (AFP)、がん胎児性抗原 (CEA)、上皮腫瘍抗原 (ETA)、ムチン 1 (MUC1)、Tn-MUC1、ムチン 16 (MUC16)、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原 (MAGE)、腫瘍タンパク質 p53 (p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、プログラム死リガンド 1 (PD-L1)、プログラム死リガンド 2 (PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、メソテリン、VEGFR、アルファ-葉酸受容体、CE7R、IL-3、がん-精巢抗原、MART-1 gp100、及び TNF 関連アポトーシス誘導リガンドからなる群から選択される、項目 7 1 に記載の EV。

40

(項目 7 3)

前記 EV がエクソソームである、項目 1 ~ 7 2 のいずれか一項に記載の EV。

(項目 7 4)

項目 1 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の EV 及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

(項目 7 5)

項目 1 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の EV を産生する細胞。

50

(項目 7 6)

1 つ以上のベクターを含む細胞であって、前記ベクターが、前記足場タンパク質及び項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の生物学的に活性な分子をコードする核酸配列を含む、前記細胞。

(項目 7 7)

前記核酸配列が、プロモーターに作用可能に結合している、項目 7 6 に記載の細胞。

(項目 7 8)

項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の E V 及び使用説明書を含む、キット。

(項目 7 9)

好適な条件下で項目 7 5 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の細胞を培養し、前記 E V を得ることを含む、E V の作製方法。

(項目 8 0)

項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の生物学的に活性な分子を項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の足場タンパク質に連結することを含む、生物学的に活性な分子を細胞外小胞に固定する方法。

(項目 8 1)

疾患の予防または治療を必要とする対象において前記疾患を予防または治療する方法であって、項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の E V を投与することを含み、前記疾患は前記抗原と関連付けられる、前記方法。

(項目 8 2)

前記 E V が、非経口、経口、静脈内、筋肉内、腫瘍内、鼻腔内、皮下、または腹腔内で投与される、項目 8 1 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0 1 2 3】

【図 1】図 1 A は、F L A G (登録商標) タグ及び G F P に融合した B A S P 1 断片を含む融合タンパク質の配列 (それぞれ、出現順に配列番号 1 3 5 ～ 1 4 2) を示す。図 1 B は、図 1 A の融合タンパク質の 1 つを安定して発現する細胞から精製されたエクソソームについての抗 F L A G (登録商標) ウエスタンブロットの結果を示す。図 1 A 及び 1 B の両方について、アミノ酸位置、例えば、B A S P 1、1 ～ 3 0 は、遺伝子構築物によって最初にコードされる B A S P - 1 断片を指す。最初の M e t は、処理中に切断される。

【図 2 A】図 2 A は、B A S P 1 断片 (1 ～ 3 0) (配列番号 4) 由来の配列、ならびに F L A G (登録商標) タグ及び G F P に融合したその改変 (1 - 3 0 - S 6 D、1 - 3 0 - S 6 A、及び 1 - 3 0 - L 5 Q) (それぞれ、出現順に配列番号 1 4 3 ～ 1 4 5) を示す。図 2 B は、図 2 A の融合タンパク質の 1 つを安定的に発現する細胞から精製されたエクソソームについての抗 F L A G (登録商標) ウエスタンブロットの結果を示す。図 2 A 及び 2 B の両方について、アミノ酸位置、例えば、B A S P 1、1 ～ 3 0 は、遺伝子構築物によって最初にコードされる B A S P - 1 断片を指す。最初の M e t は、処理中に切断される。

【図 2 B】図 2 A は、B A S P 1 断片 (1 ～ 3 0) (配列番号 4) 由来の配列、ならびに F L A G (登録商標) タグ及び G F P に融合したその改変 (1 - 3 0 - S 6 D、1 - 3 0 - S 6 A、及び 1 - 3 0 - L 5 Q) (それぞれ、出現順に配列番号 1 4 3 ～ 1 4 5) を示す。図 2 B は、図 2 A の融合タンパク質の 1 つを安定的に発現する細胞から精製されたエクソソームについての抗 F L A G (登録商標) ウエスタンブロットの結果を示す。図 2 A 及び 2 B の両方について、アミノ酸位置、例えば、B A S P 1、1 ～ 3 0 は、遺伝子構築物によって最初にコードされる B A S P - 1 断片を指す。最初の M e t は、処理中に切断される。

【図 3】すべて F L A G (登録商標) - G F P に融合させた、全長 M A R C K S L 1、B A S P 1、または M A R C K S、M A R C K S L 1、もしくは B A S P 1 のアミノ酸 1 ～ 3 0 を安定的に発現する細胞から精製したエクソソーム試料での C o o m m a s s i e (登録商標) 染色タンパク質ゲルの画像を示す。画像上の白い矢印は、融合タンパク質に対

10

20

30

40

50

応するバンドを示す。図3について、アミノ酸位置、例えば、BASP1、1～30は、遺伝子構築物によって最初にコードされるBASP-1断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【図4】BASP1の最初の28個のアミノ酸（保存領域1）、アミノ酸1～7、MARCKSの152～173（保存領域2）、ならびにMARCKSL1のアミノ酸1～7及び87～110（保存領域3）の間のタンパク質配列アライメントを示す。

【図5A】BASP1のアミノ酸1～30の配列（「BASP1-30」）（配列番号4）、及びMARCKSのアミノ酸1～3を含む融合タンパク質、またはMARCKSのPSDドメインに融合されたその改変もしくはその改変（「MARCKS-MG-PSD」、「MARCKS-MA-PSD」、「MARCKS-MG-PSD-K6S」及び「MARCKS-MG-PSD-K6A」）（それぞれ、出現順で、配列番号146～149）を示す。MARCKS配列に導入された変異点は太字である。アミノ酸位置、例えば、BASP1のaa1～30またはMARCKSのaa1～3は、最初に遺伝子構築物によってコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

10

【図5B】図5A及びFLAG（登録商標）のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を安定的に発現する細胞からの精製されたエクソソームの抗FLAG（登録商標）ウエスタンブロットの結果を示す。

【図6】MARCKS、MARCKSL1、及びBASP1の機能研究、ならびに内腔表面への結合を介してペイロードをエクソソームの内腔に担持するための配列のそれぞれのアミノ酸要件に由来する3つの異なるコンセンサス配列（3つの配列全てが配列番号118によって表される）を示す。

20

【図7A】BASP1のアミノ酸1～10または1～30に融合したCas9を安定的に発現し、及び組換えCas9の量を減少させた細胞から精製された天然エクソソームまたはエクソソームの総タンパク質（上部）及び抗Cas9ウエスタンブロット（下部）を示す。アミノ酸位置、例えば、BASPのaa1～10またはBASP1のaa1～30は、最初に遺伝子構築物によってコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【図7B】上部パネルは、図7Aのウエスタンブロットの結果のCas9濃度測定に由来する標準曲線を示す。底面パネルは、標準曲線に基づいて推定された、BASP1の1～30のアミノ酸または1～10のアミノ酸断片（処理後のBASP1の2～30個のアミノ酸または2～10個のアミノ酸断片（すなわち、最初のMetが切断される））にコンジュゲートされた融合タンパク質として、各精製されたエクソソームあたりに担持されるCas9の量をさらに提供する。

30

【図8A】オボアルブミンへのBASP1N末端（アミノ酸1～10）融合（「BASP1（1～10）-OVA」）を発現する構築物を安定にトランスフェクションした細胞、または一方はオボアルブミンへのBASP1N末端（アミノ酸1～10）融合を発現し、他方は膜貫通タンパク質PTGFRNに融合したCD40Lを発現する（「BASP1（1～10）-OVA；3×CD40L-PTGFRN」）2つの構築物を安定にトランスフェクションした細胞から精製したエクソソームのタンパク質ゲル画像を示す。図8Aは、組換えOVAの量を減少させて充填したタンパク質ゲル画像をさらに示す。アミノ酸番号付け、例えば、アミノ酸1～10は、遺伝子構築物によって最初にコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

40

【図8B】図8Aからの試料の抗オボアルブミンウエスタンブロット結果を示す。

【図8C】組換えovaを、exoTOPEに融合したovaと比較したウエスタンブロットの結果を示す。

【図8D】（i）エクソソームの内腔側におけるオボアルブミンに連結したexoTOPE、及び（ii）エクソソームの内腔における免疫刺激物質を含むエクソソームの図を示す。

【図9A】図9Aは、BASP1のアミノ酸1～10及びFLAG（登録商標）タグに融合したGFPに対して指向されるラクダ科ナノボディの配列（配列番号150）を示す。

50

アミノ酸番号付け、例えば、BASP1のアミノ酸1～10は、最初に遺伝子構築物によってコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。図9Bは、図10Aの融合タンパク質（「BASP1（1-10）-ナノボディ」）またはBASP1配列を欠くタンパク質（「ナノボディ」）を安定して発現する細胞由来の精製されたエクソソームのタンパク質ゲル及び抗FLAG（登録商標）ウエスタンブロットの結果を示す。アミノ酸番号付け、例えば、BASP1（1-10）-ナノボディは、遺伝子構築物によって最初にコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【図9B】図9Aは、BASP1のアミノ酸1～10及びFLAG（登録商標）タグに融合したGFPに対して指向されるラクダ科ナノボディの配列（配列番号150）を示す。アミノ酸番号付け、例えば、BASP1のアミノ酸1～10は、最初に遺伝子構築物によってコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。図9Bは、図10Aの融合タンパク質（「BASP1（1-10）-ナノボディ」）またはBASP1配列を欠くタンパク質（「ナノボディ」）を安定して発現する細胞由来の精製されたエクソソームのタンパク質ゲル及び抗FLAG（登録商標）ウエスタンブロットの結果を示す。アミノ酸番号付け、例えば、BASP1（1-10）-ナノボディは、遺伝子構築物によって最初にコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【図10】（i）FLAG（登録商標）及び単量体または二量体MCP変異体（1×MCP（V29I）（「815」、配列番号111）、1×MCP（V29I/N55K）（「817」、配列番号112）、2×MCP（V29I）（「819」、配列番号113）または2×MCP（V29I/N55K）（「821」、配列番号114））に融合されたBASP1（1～30）、ならびに（ii）3×MS2ヘアピンループ（「ルシフェラーゼ-MS2 mRNA」または「811」、配列番号115）を含むルシフェラーゼmRNAを含むエクソソームmRNA担持システムの概略図を示す。アミノ酸番号付け、例えば、BASP1（1-30）は、最初に遺伝子構築物によってコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【図11A】図11Aは、図10に記載のmRNA担持構築物、様々なBASP1融合タンパク質（815、817、または819）と組み合わせたルシフェラーゼmRNA（811）を含むエクソソームのタンパク質ゲルを示す。図11Bは、図11Aにおける試料の抗FLAG（登録商標）ウエスタンブロットを示す。

【図11B】図11Aは、図10に記載のmRNA担持構築物、様々なBASP1融合タンパク質（815、817、または819）と組み合わせたルシフェラーゼmRNA（811）を含むエクソソームのタンパク質ゲルを示す。図11Bは、図11Aにおける試料の抗FLAG（登録商標）ウエスタンブロットを示す。

【図12A】図10に示すmRNA担持構築物を含む細胞（上部）またはエクソソーム（下部）におけるルシフェラーゼmRNAの量についてのRT-qPCRの結果を示す。

【図12B】ルシフェラーゼmRNAの確率的担持からの富化倍率を含む、図12Aの試料由来の精製されたエクソソームにおけるルシフェラーゼmRNAの量を定量する表を示す。

【図13】エクソソームの内腔表面に固定された膜貫通タンパク質の外部表面表示を可能にするために、MARCKS、MARCKSL1、及びBASP1のN末端断片に融合されたCD40Lトリマーの概略図を示す。アミノ酸番号付け、例えば、MARCKS1-30、MARCKSL1 1-30、BASP1 1-30、BASP1 1-10 ExoTOPEは、遺伝子構築物によって最初にコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【図14A】MARCKS、MARCKSL1、及びBASP1のN末端断片に融合したCD40L表面発現エクソソームでインキュベートされた培養物におけるマウスB細胞活性化の結果を示す。

【図14B】MARCKS、MARCKSL1、及びBASP1のN末端断片に融合されたCD40L表面発現エクソソームでインキュベートされた培養物におけるヒトB細胞活性化の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図14C】MARCKS、MARCKSL1、BASP1、または全長PTGFRNのN末端配列に融合した場合の異なるCD40L表面表示エクソソームの相対的な効力のチャートを示す。アミノ酸番号付け、例えば、BASP1 1-30は、遺伝子構築物によって最初にコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【図15】異なる起源の様々な細胞株（HEK293SF、腎臓、HT1080、結合組織、K562、骨髄、MDA-MB-231、乳房、Raji、リンパ芽球、間葉系幹細胞（MSC）、骨髄）から精製されたエクソソームにおける内腔タンパク質（MARCKS、MARCKSL1、及びBASP1）及び従来のEV、例えば、エクソソームタンパク質（CD81及びCD9）のペプチドスペクトルマッチ（PSM）の数を示す。

【図16】チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞由来エクソソーム単独、またはFLAG（登録商標）-GFPに融合したBASP1もしくはBASP1N末端断片（1-30もしくは1-8）を過剰発現する細胞由来のタンパク質ゲル（左）及び抗FLAG（登録商標）ウエスタンブロット（右）を示す。アミノ酸番号付け、例えば、BASP1（1-30）は、遺伝子構築物によって最初にコードされる断片を指す。最初のMetは、処理中に切断される。

【発明を実施するための形態】

【0124】

本開示は、足場タンパク質を介してEV、例えば、エクソソームに連結した少なくとも1つの生物学的に活性な分子を含む、細胞外小胞（EV）、例えば、エクソソームを対象とし、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、ND及び／またはEDは、EVの内腔表面、例えば、エクソソームと会合し、EDは、（i）EDにおけるリジン反復、または（ii）ND、例えば、NDにおけるC末端のK及びEDにおけるN末端のKと組み合わせるときのリジン反復を含み、ND及びEDは、直接、すなわち、ペプチド結合によって、連結される。本開示はまた、EV、例えば、エクソソームの内腔表面にペイロード、例えば、生物学的に活性な分子を固定することができる最小のアミノ酸の数、例えば、7-15、7-14、7-13、7-12、7-11、7-10、7-9、または7-8個のアミノ酸断片を提供する。NDは、ミリスチル化を介してEV、例えば、エクソソームの内腔表面と会合し得、一方、EDは、イオン相互作用、例えば、誘引静電相互作用を介してEV、例えば、エクソソームの内腔表面と会合し得る。様々な態様の非限定的な例は、本開示に示される。

【0125】

本開示がより詳細に説明される前に、本開示は、説明される特定の組成物またはプロセス工程に限定されず、もちろん、変化し得ることを理解されたい。本開示を読む当業者には明らかであるように、本明細書に説明及び例示される個々の態様の各々は、本開示の範囲または趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの態様のいずれかの特徴から容易に切り離され得るか、または組み合わせられ得る別個の成分及び特徴を有する。任意の記載された方法は、記載された事象の順序、または論理的に可能な任意の他の順序で行われ得る。

【0126】

本明細書で提供される見出しは、本開示の様々な態様の制限ではなく、本明細書全体を参照することによって定義され得る。本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書で使用される専門用語は、特定の態様のみを説明するためのものであり、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0127】

したがって、以下に定義される用語は、本明細書全体を参照することによってより完全に定義される。

【0128】

I. 定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示の属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Mole

10

20

30

40

50

cular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press, The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press、及びthe Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressは、本開示で使用する用語の多くの一般的な辞書を当業者に提供する。本明細書で使用する際、以下の用語は、以下に帰する意味を有する。

【0129】

用語「a」または「an」実体は、その実体のうちの1つ以上を指すことに留意されたい。例えば、「ヌクレオチド配列 (a nucleotide sequence)」は、1つ以上のヌクレオチド配列を表すと理解される。したがって、用語「a」（または「an」）、「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」は、本明細書で同義に使用され得る。特許請求の範囲は、いずれかの任意的要素を除外するように起草され得ることを、さらに留意されたい。したがって、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連する「単に」、「のみ」などのような排他的な専門用語の使用のため、または否定的な制限の使用のための先行詞として役立つよう意図される。

【0130】

さらに、本明細書で 사용되는場合、「及び／または」は、他の有無にかかわらず、2つの指定された特徴または構成要素のそれぞれの特定の開示とみなされるべきである。したがって、本明細書における「A及び／またはB」などの語句で使用する用語「及び／または」は、「A及びB」、「AまたはB」、「A」（単独）、及び「B」（単独）を含むことが意図される。同様に、「A、B、及び／またはC」などの語句で使用する用語「及び／または」は、以下の態様、A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；及びC（単独）のそれぞれを包含することが意図される。

【0131】

本明細書において、態様が言語「含む」で説明される場合は常に、さもなければ「からなる」及び／または「から本質的になる」に関して説明される類似の態様もまた提供されることが理解される。

【0132】

単位、接頭辞、及び記号は、そのSystème International de Unités (SI) 承認の形式で表される。

【0133】

数値範囲は、範囲を定義する数値を含む。値の範囲が記載される場合、その範囲の記載された上限値及び下限値との間の各介在整数値、及びその各端数も、そのような値間の各下位範囲と共に特に開示されていることを理解されるべきである。任意の範囲の上限値及び下限値は、独立して範囲内に含まれるか、または範囲から除外され得、いずれかの限界値を含む、いずれの限界値も含まない、または両方の限界値を含む各範囲も、本開示内に包含される。

【0134】

したがって、本明細書に記載される範囲は、記載されるエンドポイントを含んだ範囲内のすべての値の略語であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、及び50からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、または下位範囲を含むと理解される。

【0135】

別途示されない限り、1つ以上の立体中心を有する化合物への言及は、各立体異性体、及びそれらの立体異性体の全ての組み合わせを意図する。

【0136】

値が明示的に記載される場合、記載される値とほぼ同じ量 (quantity) または量 (amount) である値も、本開示の範囲内であることを理解されたい。組み合わせが開示される場合、その組み合わせの要素の各下位組み合わせもまた特に開示され、本開示の範囲内である。逆に、異なる要素または要素の群が個別に開示される場合、それらの組み合わせも開示される。開示の任意の要素が複数の代替物を有するものとして開示される場合、各代替物が単独でまたは他の代替物と任意の組み合わせで除外されるその開示の例も、本明細書によって開示され、開示の2つ以上の要素は、そのような除外を有し得、そのような除外を有する要素のすべての組み合わせが、本明細書に開示される。

【0137】

ヌクレオチドは、それらの一般に許容される単一文字コードによって参照される。別途示されない限り、ヌクレオチド配列は、5' から3' 方向で左から右に書かれる。ヌクレオチドは、IUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨される、それらの一般的に知られている一文字記号によって本明細書で言及される。したがって、Aはアデニンを表し、Cはシトシンを表し、Gはグアニンを表し、Tはチミンを表し、Uはウラシルを表す。

【0138】

アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ方向で左から右に書かれる。アミノ酸は、本明細書において、それらの一般に知られている三文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨される一文字記号のいずれかによって参照される。

【0139】

用語「約 (about)」は、およそ (approximately)、おおよそ (roughly)、おおよそ (around)、またはその領域を意味するために本明細書で使用される。用語「約」が数値範囲と組み合わせで使用される場合、それは記載された数値の上下の境界を拡張することによってその範囲を修正する。一般に、用語「約」は、上または下に (より高いまたはより低い) 例えば、10%の相違によって、記載された値を上回る及び下回る数値を修正することができる。

【0140】

本明細書で使用される際、用語「およそ (approximately)」は、1つ以上の関心のある値に適用される場合、記載された基準値に類似する値を指す。ある特定の態様において、用語「およそ (approximately)」は、別途記載されない限り、または文脈から別途明らかでない限り (そのような数が可能な値の100%を超える場合を除き)、記載された基準値のいずれかの方向 (より大きいまたはより小さい) において10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満に該当する値の範囲を指す。

【0141】

用語「投与」、「投与すること」ならびにそれらの文法変異形は、本開示のEV (例えば、エクソソーム) のような組成物を薬学的に許容される経路を介して対象へと導入することを指す。本開示のEV (例えば、エクソソーム) などの組成物の対象への導入は、腫瘍内、経口、肺、鼻腔内、非経口 (静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、もしくは皮下)、直腸、リンパ内、髄腔内、眼周または局所を含む任意の好適な経路による。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。好適な投与経路は、組成物または薬剤がその意図された機能を実行することを可能にする。例えば、好適な経路が静脈内である場合、組成物は、組成物または薬剤を対象の静脈へと導入することによって投与される。

【0142】

本明細書で使用する場合、用語「アゴニスト」は、受容体に結合し、受容体を活性化して生物学的応答を産生する分子を指す。受容体は、内因性または外因性アゴニストのいずれかによって活性化され得る。内因性アゴニストの非限定的な例は、ホルモン、神経伝達物質、及び環状ジヌクレオチドを含む。外因性アゴニストの非限定的な例は、薬物、小分子、及び環状ジヌクレオチドを含む。アゴニストは、完全アゴニスト、部分アゴニスト、または逆アゴニストであり得る。

10

20

30

40

50

【0143】

本明細書で使用される場合、用語「アンタゴニスト」は、受容体に結合すると生物学的応答そのものを誘発するよりも、むしろアゴニスト媒介性応答を遮断または抑制する分子を指す。多くのアンタゴニストは、受容体上の構造的に定義された結合部位で内因性リガンドまたは基質と競合することにより、それらの効力を達成する。アンタゴニストの非限定的な例は、アルファ遮断薬、ベータ遮断薬、及びカルシウムチャネル遮断薬を含む。アンタゴニストは、競合的、非競合的、または不競合的アンタゴニストであり得る。

【0144】

本明細書で使用される際、用語「細胞外小胞」または「EV」は、内部空間（内腔）を封入する膜を含む細胞由来小胞を指す。細胞外小胞は、それらが由来する細胞よりも小さい直径を有する全ての膜結合小胞を含む。概して、細胞外小胞は、直径が20nm～1000nmの範囲であり、内部空間（すなわち、内腔）内、外部表面もしくは細胞外小胞の内腔表面上に表示されて、及び／または膜にまたがって、のいずれかで、様々なペイロードを含み得る。ペイロードは、例えば、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、低分子、及び／またはそれらの組み合わせを含み得る。例として、及び限定することなく、細胞外小胞は、アポトーシス小体、細胞の断片、直接的または間接的操作による細胞由来の小胞（例えば、連続押出またはアルカリ溶液での処理による）、小胞化オルガネラ、及び生細胞により産生される小胞（例えば、直接原形質膜出芽または後期エンドソームの原形質膜との融合による）を含む。細胞外小胞は、生きているもしくは死んだ生物、外植された組織もしくは器官、及び／または培養された細胞に由来し得る。いくつかの態様において、EVは、本明細書に開示される足場タンパク質を含む。

【0145】

本明細書で使用される際、用語「エクソソーム」は、内部空間（内腔）を封入する膜を含む細胞由来の小さい（直径20～300nmの間、より好ましくは直径40～200nm）細胞外小胞（EV）を指し、いくつかの態様において、例えば直接原形質膜出芽によるか、または後期エンドソームの原形質膜との融合によって、細胞（例えば、産生細胞）から生成される。エクソソームは、細胞外小胞（EV）の一種である。いくつかの態様において、エクソソームは、脂質または脂肪酸及びポリペプチドを含み、任意に、ペイロード（例えば、治療薬などの生物学的に活性な分子）、レシーバー（例えば、標的指向性部分）、ポリヌクレオチド（例えば、核酸、RNA、もしくはDNA）、糖（例えば、単糖、多糖類、もしくはグリカン）、または他の分子を含む。エクソソームは、産生細胞に由来し得、そのサイズ、密度、生化学的パラメータ、またはそれらの組み合わせに基づいて産生細胞から単離され得る。いくつかの態様において、エクソソームは、本開示の足場タンパク質を含む。いくつかの態様において、本開示のエクソソームは、1つ以上の導入遺伝子産物を発現する細胞によって産生される。

【0146】

本明細書で使用される場合、「エクソソーム内腔タンパク質」という用語は、足場タンパク質、すなわち、EV、例えば、エクソソームの内腔表面に取り付けたまたは会合したタンパク質、例えば、MARCKS、MARKSL1、BASP1、またはそれらの任意の機能的断片、それらの任意の変異体、それらの任意の誘導體、またはそれらの任意の組み合わせを指し、EV、例えば、エクソソームの内腔表面にペイロード、例えば、生物学的に活性な分子（例えば、治療的タンパク質）を標的とするための足場としての使用に好適である。

【0147】

本明細書で使用される際、用語「ナノ小胞」は、内部空間を封入する膜を含む細胞由来の小さい（直径20～250nmの間、例えば直径30～150nm）小胞を指し、ナノ小胞がそのような操作なしに産生細胞によって産生されないように、直接的または間接的操作によって細胞（例えば産生細胞）から生成される。ナノ小胞を産生する産生細胞の適切な操作は、これらに限定されないが、連続押出、アルカリ溶液での処理、超音波処理、またはそれらの組み合わせを含む。ナノ小胞の産生は、いくつかの例では、産生細胞の破

壊を生じ得る。いくつかの態様において、本明細書に記載のナノ小胞の集団は、原形質膜からの直接出芽または後期エンドソームの原形質膜との融合による産生細胞に由来する小胞を実質的に含まない。いくつかの態様において、ナノ小胞は、脂質または脂肪酸及びポリペプチドを含み、任意に、ペイロード（例えば、治療薬）、レシーバー（例えば、標的指向性部分）、ポリヌクレオチド（例えば、核酸、RNA、DNA）、糖（例えば、単糖、多糖類、もしくはグリカン）または他の分子を含む。ナノ小胞は、ナノ小胞が操作に従って産生細胞に由来するため、そのサイズ、密度、生化学的パラメータ、またはそれらの組み合わせに基づいて産生細胞から単離され得る。いくつかの態様において、ナノ小胞は、本明細書に開示される足場タンパク質を含み得る。

【0148】

本明細書で使用される場合、用語「内腔操作されたEV」は、操作されたEV、例えば、エクソソームの内腔表面または内腔が、改変前のEV、例えば、エクソソーム、または天然に存在するEV、例えば、エクソソームの内腔表面または内腔と異なるように、その組成において改変されたEV、例えば、エクソソームの膜の内腔表面または内腔を有するEV、例えば、エクソソームを指す。

【0149】

操作は、EVの内腔及び／または内腔表面、例えば、エクソソームが変更されるように、EV（例えば、エクソソーム）の内腔（すなわち、EV内の空隙）または膜、特にEVの内腔表面内に直接であり得る。例えば、膜は、EV、例えば、エクソソームの内腔表面が改変されるように、タンパク質、脂質、低分子、炭水化物などのその組成において改変される。同様に、内腔の内容物は改変され得る。組成は、化学的、物理的、もしくは生物学的的方法によって、または化学的、物理的、もしくは生物学的的方法によって以前に改変された細胞から産生されることによって変更され得る。具体的には、組成は、遺伝子工学によって、または遺伝子工学によって以前に改変された細胞から産生されることによって変更され得る。いくつかの態様において、内腔操作されたEV、例えば、内腔操作されたエクソソームは、EV、例えば、エクソソームの内腔表面または内腔において曝露され得る、またはEV、例えば、エクソソームの内層で曝露される部分のための固定ポイント（取り付け）であり得る外因性タンパク質（すなわち、EV、例えば、エクソソームが天然に発現しないタンパク質）またはその断片もしくは変異体を含む。他の態様において、内腔操作されたEV、例えば、内腔操作されたエクソソームは、EV、例えば、エクソソームの内腔に曝露され得る、またはEV、例えば、エクソソームの内腔表面に曝露された部分のための固定ポイント（取り付け）であり得る、天然EV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、足場タンパク質）またはその断片もしくは変異体のより高い発現を含む。

【0150】

本明細書で使用される際、用語「表面操作されたEV」は、操作されたEVの外部表面が改変前のEVの外部表面または天然に存在するEVの外部表面と異なるように、その組成において改変されたEVの外部表面を有するEVを指す。

【0151】

本明細書で使用される場合、用語「表面操作されたエクソソーム」は、操作されたエクソソームの外部表面が、改変前のエクソソームの外部表面または天然に存在するエクソソームの外部表面と異なるように、その組成において改変されたエクソソームの外部表面を有するエクソソームを指す。

【0152】

本明細書に記載のEV、例えば、エクソソームの文脈で使用される用語「改変された」は、改変されたEV、例えば、エクソソームが天然に存在するEV、例えば、エクソソームと異なるように、EV、例えば、エクソソーム及び／またはその産生細胞の変更または操作を指す。いくつかの態様において、本明細書に記載の改変されたEV、例えば、エクソソームは、天然に存在するEV、例えば、エクソソームの膜と比較してタンパク質、脂質、小分子、炭水化物などの組成が異なる膜を含む。例えば、膜は、より高い密度または数の天然EV、例えば、エクソソーム、タンパク質を含み、及び／または膜は、EV、例

例えば、エクソソームに天然に見られないタンパク質を含む。ある特定の態様において、膜へのそのような改変は、E V、例えば、エクソソーム（例えば、本明細書に記載の表面操作されたE V及びエクソソーム）の外部表面を変化させる。ある特定の態様において、膜へのそのような改変は、E V、例えば、エクソソーム（例えば、本明細書に記載の内腔操作されたE V及びエクソソーム）の内腔表面を変化させる。

【0153】

例えば、内腔は、タンパク質、脂質、低分子、炭水化物などのその組成において改変される。組成物は、化学的、物理的、もしくは生物学的方法によって、または化学的、物理的、もしくは生物学的方法によって以前に改変された細胞から産生されることによって変更することができる。具体的には、組成は、遺伝子工学によって、または遺伝子工学によって以前に改変された細胞から産生されることによって変更され得る。

10

【0154】

本明細書で使用される際、タンパク質の「改変」という用語、例えば、「改変されたタンパク質」もしくは「タンパク質改変」またはその文法変異形で使用される際、タンパク質の非変異アミノ酸配列と少なくとも15%の同一性を有するタンパク質を指す。タンパク質の改変は、タンパク質の断片または変異体を含む。タンパク質の改変は、タンパク質の断片または変異体に対する化学的または物理的改変をさらに含み得る。いくつかの態様において、改変されたタンパク質は、改変されていないタンパク質の少なくとも1つの生理学的機能を保持する。

【0155】

本明細書で使用される際、タンパク質（例えば、治療的タンパク質などの生物学的に活性な分子、または本明細書で開示される足場タンパク質）の「断片」という用語は、天然に存在する配列よりも短い、例えば、天然に存在するタンパク質と比較してN末端及び／またはC末端を欠失したタンパク質を指す。

20

【0156】

本明細書で使用される際、用語「機能的断片」は、タンパク質機能を保持するタンパク質断片を指す。したがって、いくつかの態様において、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの本明細書に開示される足場タンパク質の機能的断片は、E V、例えば、エクソソームの内腔表面上に生物学的に活性な分子を固定する能力を保持する。

【0157】

断片がその意味で機能的断片であるかどうかは、ウエスタンブロット、FACS分析、及び例えばGFPのような自己蛍光タンパク質との断片の融合物を含む、E V、例えば、エクソソームのタンパク質含有量を決定する任意の技術分野で既知の方法によって評価され得る。特定の態様において、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1の断片は、E V、例えば、エクソソームの内腔上または外部表面上にペイロード、例えば、生物学的に活性な分子を固定するための天然に存在するMARCKS、MARCKSL1、またはBASP1の能力の例えば少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%を保持する。特定の態様において、MARCKS、MARCKSL1、BASP1の変異体の能力、またはMARCKS、MARCKSL1、もしくはBASP1の断片の能力は、E V、例えば、エクソソームの内腔上または外部表面上にペイロード、例えば、生物学的に活性な分子を固定するためのMARCKS、MARCKSL1、及びBASP1それぞれの能力の少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%である。この能力は、実験セクションに記載されているアッセイにおいて、例えば、蛍光標識変異体によって評価され得る。

30

40

【0158】

本明細書で使用される用語「誘導体」は、化学的もしくは酵素的に改変された、E V、

50

例えば、エクソソーム、成分（例えば、タンパク質もしくは脂質）、本開示の足場タンパク質、またはペイロード、例えば、生物学的に活性な分子（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、抗体もしくはその断片）を指す。

【0159】

本明細書で使用される際、タンパク質の「変異体」という用語は、当該技術分野で既知の方法による比較（例えば、配列アライメントによる）時に、ある特定の構造的（例えば、アミノ酸配列同一性）及び機能的な同一性を別のタンパク質と共有するタンパク質を指す。例えば、タンパク質の変異体は、別のタンパク質における置換、挿入、欠失、フレームシフトまたは再配列を含み得る。いくつかの態様において、タンパク質の変異体は、非変異体タンパク質の少なくとも1つの生理学的機能を保持する。

10

【0160】

具体的な態様において、変異体は、完全長、成熟MARCKS、MARCKSL1、BASP1、またはMARCKS、MARCKSL1、もしくはBASP1の断片と少なくとも70%の同一性を有する変異体タンパク質である。

【0161】

いくつかの態様において、MARCKSの変異体またはMARCKSの断片の変異体は、例えば、Needleman-Wunschアルゴリズムを使用する対アライメントによって決定されるように、配列番号1によるMARCKSまたはその機能的断片と、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の配列同一性を共有する。

20

【0162】

いくつかの態様において、MARCKSL1の変異体またはMARCKSL1の断片の変異体は、例えば、Needleman-Wunschアルゴリズムを使用する対アライメントによって決定されるように、配列番号2によるMARCKSL1またはその機能的断片と、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の配列同一性を共有する。

【0163】

いくつかの態様において、BASP1の変異体またはBASP1の断片の変異体は、例えば、Needleman-Wunschアルゴリズムを使用する対アライメントによって決定されるように、配列番号3によるBASP1またはその機能的断片と、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の配列同一性を共有する。

30

【0164】

いくつかの態様において、足場タンパク質（例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1）の変異体、足場タンパク質の機能的断片、または足場タンパク質の機能的断片の変異体は、誘導体である。

【0165】

上記の各々の場合において、足場タンパク質の変異体または足場タンパク質の断片の変異体（例えば、MARCKS、MARCKSL1、BASP1の変異体、またはMARCKS、MARCKSL1、もしくはBASP1の断片）は、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子を、EV、例えば、エクソソームの内腔上または外部表面上に固定する能力を保持する。

40

【0166】

本明細書で提供する任意のタンパク質の記載は、タンパク質の機能的変異体を包含する。タンパク質の「機能的変異体」という用語は、EVの内腔または外部表面、例えば、エクソソーム上に生物学的に活性な分子を固定する能力を保持するタンパク質の変異体を指す。特定の態様において、MARCKS、MARCKSL1、BASP1の機能的変異体、またはMARCKS、MARCKSL1、もしくはBASP1の断片の機能的変異体の

50

能力は、E V、例えば、エクソソームの内腔上または外部表面上にペイロード、例えば、生物学的に活性な分子を固定するためのMARCKS、MARCKSL1、BASP1それぞれの能力の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または少なくとも約99%である。

【0167】

天然に存在する変異体は、「対立遺伝子変異体」と呼ばれ、生物の染色体上の所与の遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの代替形態のうちの1つを指す(Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985))。これらの対立遺伝子変異体は、ポリヌクレオチド及び／またはポリペプチドレベルのいずれかで変化し得、本開示に含まれる。代替的には、非天然の変異体は、突然変異誘発技術によって、または直接合成によって産生され得る。

【0168】

タンパク質工学及び組換えDNA技術の既知の方法を使用して、変異体が生成され、ポリペプチドの特徴を改善または変更することができる。例えば、1つ以上のアミノ酸は、生物学的機能の実質的な喪失なしに、分泌タンパク質のN末端またはC末端から欠失され得る。その全体が参照により本明細書に組み込まれるRon et al., J. Biol. Chem. 268:2984-2988 (1993)は、3、8、または27個のアミノ末端アミノ酸残基を欠失した後であっても、ヘパリン結合活性を有する変異型KGFタンパク質を報告した。同様に、インターフェロンガンマは、このタンパク質のカルボキシ末端から8~10個のアミノ酸残基を欠失させた後、最大10倍の活性を示した。(Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988)、その全体が参照により組み込まれる)

【0169】

さらに、十分な証拠は、変異体がしばしば天然に存在するタンパク質と同様の生物学的な活性を保持することを実証する。例えば、Gayleと同僚(J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993)、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)は、ヒトサイトカインIL-1aの広範な変異分析を行った。彼らは、ランダム変異誘発を使用して、分子の全長にわたって変異体あたり2.5アミノ酸変化に平均化した、3,500個を超える個々のIL-1a変異体を生成した。可能なすべてのアミノ酸位置で複数の変異が検査された。研究者らは、「分子のほとんどが結合または生物学的な活性のいずれにもほとんど影響を与えずに変更され得ること」を発見した。(要約を参照) 実際、試験した3,500個を超えるヌクレオチド配列のうち、23個の独自のアミノ酸配列のみが、野生型と活性が著しく異なるタンパク質を産生した。

【0170】

上述のように、変異体または誘導体は、例えば、改変ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖タンパク質の変異体または誘導体は、化学改変及び／または内因性改変の結果である。いくつかの態様において、変異体または誘導体は、インビボ改変の結果である。いくつかの態様において、変異体または誘導体は、インビトロ改変の結果である。さらに他の態様において、変異体または誘導体は、産生細胞における細胞内改変の結果である。

【0171】

変異体及び誘導体において存在する改変は、例えば、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合性の取り付け、ヘム部分の共有結合性の取り付け、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合性の取り付け、脂質または脂質誘導体の共有結合性の取り付け、ホスホチジリノシートの共有結合性の取り付け、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化(Mei et al., Blood 116:270-79 (2010)その全体が参照により本明細書に組み込まれる)、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセ

ミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、及びユビキチン化を含む。

【0172】

用語「アミノ酸置換」は、親または参照配列（例えば、野生型配列）に存在するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基で置き換えることを指す。アミノ酸は、例えば、化学ペプチド合成または当該技術分野で既知の組換え方法を介して、親または参照配列（例えば、野生型ポリペプチド配列）で置換されることができる。したがって、「X位での置換」への言及は、X位に存在するアミノ酸と代替アミノ酸残基との置換を指す。いくつかの態様において、置換パターンは、スキーマA_nYに従って説明され得、Aは、n位に天然に、または元々存在するアミノ酸に対応する一文字コードであり、Yは、置換アミノ酸残基である。他の態様において、置換パターンは、スキーマA_n(YZ)に従って説明され得、Aは、n位に天然にまたは元々存在するアミノ酸を置換するアミノ酸残基に対応する単一文字コードであり、Y及びZは、Aを置換することができる代替的なアミノ酸残基である。

【0173】

本明細書で使用される際、用語「抗体」は、天然の、または部分的もしくは完全に合成的に産生される免疫グロブリン、及びその断片を包含する。本用語はまた、免疫グロブリン結合ドメインと相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を包含する。「抗体」は、抗原に特異的に結合し認識する、免疫グロブリン遺伝子またはその断片からのフレームワーク領域を含むポリペプチドをさらに含む。用語抗体の使用は、全抗体、ポリクローナル、モノクローナル及び組換え抗体、その断片を含むことを意味し、一本鎖抗体、ヒト化抗体、マウス抗体、キメラ、マウスーヒト、マウスー霊長類、霊長類ーヒトモノクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、例えば、scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'、及びF(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb、及びFd断片などの抗体断片、ダイアボディ、ならびに抗体関連ポリペプチドをさらに含む。抗体は、それらが所望の生物学的な活性または機能を呈する限り、二重特異性抗体及び多重特異性抗体を含む。本開示のいくつかの態様において、ペイロードは、抗体またはその抗原結合断片を含む生物学的に活性な分子である。いくつかの態様において、抗体（例えば、本開示の生物学的に活性な分子）は、ナノボディである。

【0174】

用語「抗体ー薬物コンジュゲート」及び「ADC」は互換的に使用され、治療薬（本明細書では薬剤、薬物、または活性薬学的成分として時々称される）または薬剤に共有結合した抗体を指す。本開示のいくつかの態様において、ペイロードは、抗体ー薬物コンジュゲートを含む生物学的に活性な分子である。

【0175】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されており、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、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）、β分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。したがって、ポリペプチド内のアミノ酸が同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸に置き換えられた場合、置換は保存的であると見なされる。別の態様において、アミノ酸のストリングは、側鎖ファミリーメンバーの順序及び／または組成が異なる構造的に類似するストリングで保存的に置き換えることができる。

【0176】

本明細書で使用される場合、用語「保存された」は、それぞれ、比較される2つ以上の配列の同じ位置において変化なしに生じるものであるポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のヌクレオチドまたはアミノ酸残基を指す。比較的保存されているヌクレオチ

ドまたはアミノ酸は、配列の他の場所に現れるヌクレオチドまたはアミノ酸よりもより関連性の高い配列の間で保存されているものである。

【0177】

いくつかの態様において、2つ以上の配列は、互いに100%同一である場合、「完全に保存された」または「同一である」と言われる。いくつかの態様において、2つ以上の配列は、互いに少なくとも70%同一である、少なくとも80%同一である、少なくとも90%同一である、または少なくとも95%同一である場合、「高度に保存された」と言われる。

【0178】

いくつかの態様において、2つ以上の配列は、互いに約70%同一である、約80%同一である、約90%同一である、約95%、約98%、または約99%同一である場合、「高度に保存された」と言われる。いくつかの態様において、2つ以上の配列は、互いに少なくとも30%同一、少なくとも40%同一、少なくとも50%同一、少なくとも60%同一、少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%同一である場合、「保存された」と言われる。いくつかの態様において、2つ以上の配列は、互いに約30%同一、約40%同一、約50%同一、約60%同一、約70%同一、約80%同一、約90%同一、約95%同一、約98%同一、または約99%同一である場合、「保存された」と言われる。配列の保存は、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの全長に適用され得るか、またはそれらの一部、領域もしくは特徴に適用し得る。

【0179】

本明細書で使用される際、用語「相同性」は、高分子間、例えば、核酸分子間（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。一般に、用語「相同性」は、2つの分子間の進化関係を意味する。したがって、相同である2つの分子は、共通の進化先祖を有するであろう。本開示の文脈において、用語相同性は、同一性及び類似性の両方を包含する。

【0180】

いくつかの態様において、ポリマー分子は、分子におけるモノマーの少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%が同一（完全に同じモノマー）であるか、または類似（保存的置換）である場合、互いに「相同」とであると見なされる。用語「相同」は、必然的に、少なくとも2つの配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列）間の比較を指す。

【0181】

本開示の文脈において、置換（それらがアミノ酸置換と称される場合でも）は、核酸レベルで行われ、すなわち、アミノ酸残基を代替アミノ酸残基で置換することは、第1のアミノ酸をコードするコドンで第2のアミノ酸をコードするコドンで置換することによって行われる。

【0182】

本明細書で使用される場合、用語「同一性」は、ポリマー分子間、例えば、ポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）間の全体的なモノマー保存を指す。任意の追加の修飾子のない用語「同一」、例えば、タンパク質Aは、タンパク質Bと同一である、とは、配列が100%同一であることを暗示する（100%配列同一性）。例えば、「70%同一である」として2つの配列を記述することは、例えば、「70%の配列同一性」を有するとしてそれらを記述することに等しい。

【0183】

2つのポリペプチド配列の同一性の割合の計算は、例えば、最適な比較目的のために2つの配列をアライメントさせることによって実行され得る（例えば、ギャップは、最適なアライメントのために第1及び第2のポリペプチド配列の一方または両方に導入され得、同一でない配列は、比較目的のために無視され得る）。ある特定の態様において、比較目

10

20

30

40

50

的のためにアライメントされた配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%である。次に、対応するアミノ酸位置におけるアミノ酸を比較する。

【0184】

第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸によって占有される場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性の割合は、2つの配列の最適アライメントのために導入される必要があるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れて、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。配列の比較及び2つの配列間の同一性の割合の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

【0185】

比較のための配列のアライメントの方法は、当該技術分野において周知である。様々なプログラム及びアライメントアルゴリズムは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)、Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443 (1970)、Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24:307-31 (1988)、Higgins and Sharp, Gene 73:15 237-44 (1988)、Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3 (1989) Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90 (1988)、Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65 (1992)、及びPearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31 (1994)において説明される。NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Altschul 20 et al., J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990)]は、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastn及びtblastxに関連して使用するために、National Center for Biological Information (NCBI, Bethesda, Md.) 及びインターネット上を含むいくつかの供給源から入手可能である。BLAST、及びプログラムを使用して配列同定を決定する方法の説明は、NIH (National Institute of Health) のもとのNCBI (National Center for Biotechnology Information) の公式ウェブサイトでアクセスされ得る。

【0186】

他の好適なプログラムは、例えば、Needle、Stretcher、Water、またはMatcher、バイオインフォマティクスプログラムのEMBOSS suiteの一部であり、www.ebi.ac.uk/Tools/psaでEuropean Bioinformatics Institute (EBI) から入手可能である。配列アライメントは、MAFFT、Clustal (ClustalW、Clustal XまたはClustal Omega)、MUSCLEなどの当該技術分野で既知の方法を使用して実施され得る。

【0187】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列とアライメントする単一のポリヌクレオチドまたはポリペプチド標的配列内の異なる領域は、それぞれ独自の配列同一性の割合を有し得る。配列同一性の割合の値は、最も近い10分の1に四捨五入されることに留意されたい。例えば、80.11、80.12、80.13、及び80.14は、80.1まで切り捨てられ、80.15、80.16、80.17、80.18、及び80.19は、80.2まで切り上げられる。また、長さの値は常に整数であることに留意されたい。

【0188】

ある特定の態様において、第2のアミノ酸配列（または核酸配列）に対する第1のアミノ酸配列（または核酸配列）の同一性の割合（%ID）または第1のアミノ酸配列（また

10

20

30

40

50

は核酸配列)は、 $\%ID = 100 \times (Y/Z)$ として計算され、Yは、(目視検査または特定の配列アライメントプログラムによってアライメントされるように)第1及び第2の配列のアライメントにおいて同一の一致としてスコア化されたアミノ酸残基(または核酸塩基)の数であり、Zは、第2の配列中の残基の総数である。第1の配列の長さが第2の配列よりも長い場合、第2の配列に対する第1の配列の同一性の割合は、第1の配列に対する第2の配列の同一性の割合よりも高い。

【0189】

当業者は、配列同一性の割合の計算のための配列アライメントの生成が、一次配列データによって排他的に駆動される二値配列比較に限定されないことを理解するであろう。また、配列アライメントは、構造データ(例えば、結晶タンパク質構造)、機能データ(例えば、変異の位置)、または系統発生データ等の異種情報源からのデータと配列データを統合することによって生成され得ることも理解されるであろう。多重配列アライメントを生成するために不均一なデータを統合する好適なプログラムは、T-Coffeeであり、www.tcoffee.orgで入手可能であり、代替的に、例えば、EBIから入手可能である。また、配列同一性の割合を計算するために使用される最終アライメントは、自動的にまたは手動のいずれかでキュレートされ得ることも理解されるであろう。

【0190】

本明細書で使用される場合、用語「類似性」は、ポリマー分子間、例えば、ポリヌクレオチド分子間(例えば、DNA分子及び／またはRNA分子)及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。ポリマー分子の互いに類似性の割合の計算は、同一性の割合の計算と同じ方法で実行され得るが、類似性パーセントの計算は、当該技術分野で理解されるように保存的置換を考慮に入れることを除いてはならない。類似性の割合は、使用される比較尺度、すなわち、アミノ酸が、例えば、それらの進化近接度、電荷、体積、柔軟性、極性、疎水性、芳香族性、等電点、抗原性、またはそれらの組み合わせに従って比較されるかどうかによって不随することが理解される。

【0191】

本明細書で使用される際、用語「産生細胞」は、EV、例えば、エクソソームを生成するために使用される細胞を指す。産生細胞は、インビトロで培養された細胞、またはインビボ細胞であり得る。産生細胞は、これらに限定されないが、EVの生成に有効であることが知られている細胞、例えば、HEK293細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、及び間葉系幹細胞(MSCs)、BJヒト包皮線維芽細胞、fHDF線維芽細胞、AGE-HN(登録商標)神経前駆細胞、CAP(登録商標)羊水細胞、脂肪間葉系幹細胞、RPTEC/TERT1細胞を含む。ある特定の態様において、産生細胞は、抗原提示細胞ではない。いくつかの態様において、産生細胞は、樹状細胞、B細胞、マスト細胞、マクロファージ、好中球、Kupffer-Browicz細胞、これらの細胞のいずれかに由来する細胞、またはそれらの任意の組み合わせではない。

【0192】

本明細書で使用される場合、用語「単離する」、「単離された」、及び「単離すること」、または「精製する」、「精製された」、及び「精製すること」、同様に「抽出された」及び「抽出すること」、及びその文法変異形は互換的に使用され、所望のEV、例えば、エクソソーム、調製物の精製、例えば、選択または富化の1つ以上のプロセスを経た所望のEV、例えば、エクソソーム、調製物の調製の状態(例えば、複数の既知または未知の量及び／または濃度)を指す。いくつかの実施形態において、本明細書で使用される単離することまたは精製することは、産生細胞を含む試料からEV、例えば、エクソソームを除去、部分的に除去する(例えば、画分)プロセスである。いくつかの実施形態において、単離されたEV、例えば、エクソソーム、組成物は望ましくない活性を検出可能でない、または代替的に、望ましくない活性のレベルもしくは量が、許容されるレベルもしくは量、またはそれ未満である。

【0193】

他の実施形態において、単離されたEV、例えば、エクソソーム、組成物は、許容され

10

20

30

40

50

る量及び／または濃度、またはそれより上である、所望のEV、例えば、エクソソームの量及び／または濃度を有する。他の態様において、単離されたEV、例えば、エクソソーム、組成物は、組成物が得られる出発材料（例えば、産生細胞調製物）と比較して富化される。この富化は、出発物質と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.9%、少なくとも約99.99%、少なくとも約99.999%、少なくとも約99.9999%、または約99.9999%超までであり得る。

10

【0194】

いくつかの態様において、単離されたEV、例えば、エクソソーム、調製物は、残留の生物学的な産物（例えば、汚染物質）を実質的に含まない。いくつかの態様において、単離されたEV、例えば、エクソソーム、調製物は、任意の汚染生物学的物質を、約100%含まない、少なくとも約99%含まない、少なくとも約98%含まない、少なくとも約97%含まない、少なくとも約96%含まない、少なくとも約95%含まない、少なくとも約94%含まない、少なくとも約93%含まない、少なくとも約92%含まない、少なくとも約91%含まない、または少なくとも約90%含まない。残留の生物学的な産物は、非生物物質（化学物質を含む）または不要な核酸、タンパク質、脂質、もしくは代謝産物を含み得ない。ある特定の態様において、単離されたEV、例えば、エクソソーム、調製物は、任意の巨大分子、例えば、任意の核酸、タンパク質、脂質、及び／または炭水化物を、約100%含まない、少なくとも約99%含まない、少なくとも約98%含まない、少なくとも約97%含まない、少なくとも約96%含まない、少なくとも約95%含まない、少なくとも約94%含まない、少なくとも約93%含まない、少なくとも約92%含まない、少なくとも約91%含まない、または少なくとも約90%含まない。残留の生物学的な産物を実質的に含まないことは、EV、例えば、エクソソーム、組成物が検出可能な産生細胞を含まず、EV、例えば、エクソソームのみが検出可能であることを意味し得る。

20

【0195】

用語「賦形剤」または「担体」は、化合物の投与をさらに促進するために薬学的組成物に添加される不活性物質を指す。用語「薬学的に許容される担体」、「薬学的に許容される賦形剤」、及びその文法変異形は、米国連邦政府の規制機関によって承認されたか、またはヒトを含む動物での使用について米国薬局方に列挙されている薬剤のいずれか、同様に対象に重大な刺激を与えず、投与された化合物の生物学的活性及び特性を抑制しない任意の担体もしくは希釈剤を包含する。医薬組成物を調製する際に有用であり、概して安全であり、無毒であり、及び望ましい、賦形剤ならびに担体が含まれる。

30

【0196】

本明細書で使用される場合、用語「ペイロード」は、本開示の足場に取り付けられ、その後、本開示のEV、例えば、エクソソームの膜に固定され得る任意の分子を指す。いくつかの実施形態において、ペイロードは、EV、例えば、エクソソーム、膜の内腔表面に取り付けられる。ペイロードという用語は、生物学的に活性な分子、例えば、治療及び／または予防効果を有し得る分子だけでなく診断分子を包含する。したがって、ペイロードという用語は、検出可能な部分、例えば、リガンドまたはタグによって認識され得る放射性核種、蛍光分子、造影剤、タグ、または分子実体などの検出可能な部分も包含する。

40

【0197】

本明細書で使用される場合、用語ペイロードは、用語「カーゴ (c a r g o)」と同等であり、交換可能である。したがって、「カーゴタンパク質」または「カーゴペプチド」は、本開示の足場に結合した特定のタイプのペイロード分子（それぞれタンパク質及びペプチド）を指す。

50

【0198】

本明細書で使用される「生物学的に活性な分子」という用語は、本開示の足場を介してEV、例えば、エクソソームに取り付けられ得る任意の分子を指し、その分子は、それを必要とする対象において治療もしくは予防効果を有し得る、または対象における細胞もしくは組織の恒常性に影響を及ぼし得る。EV、例えば、エクソソーム、及び／または産生細胞に導入され得る生物学的に活性な分子の非限定的な例は、例えば、ヌクレオチド（例えば、検出可能な部分もしくは毒素を含むか、または転写を中断させるヌクレオチド）、核酸（例えば、酵素のようなポリペプチドをコードするDNAもしくはmRNA分子、またはmiRNA、dsDNA、lncRNA、及びsiRNAのような制御機能を有するRNA分子）、アミノ酸（例えば、検出可能な部分もしくは毒素を含むか、または翻訳を中断させるアミノ酸）、ポリペプチド（例えば、酵素もしくは抗体）、脂質、炭水化物、ウイルス及びウイルス粒子（例えば、アデノ随伴ウイルス及びウイルス粒子、レトロウイルス、アデノウイルスなど）、ならびにML-RR S2及び3'-3'cAIMPdFSHのような環状ジヌクレオチドを含む小分子STINGアゴニストを含む低分子（例えば、低分子薬物及び毒素）などの治療薬を含む。ある特定の態様において、ペイロードは、抗原を含む。ある特定の態様において、生物学的に活性な分子、例えば、治療薬、例えば、ヒトに対する治療薬は、本明細書に開示される足場タンパク質と融合したときに、生物学的機能、例えば、治療的機能を保持する。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも5個のアミノ酸、少なくとも6個のアミノ酸、少なくとも7個のアミノ酸、少なくとも8個のアミノ酸、少なくとも9個のアミノ酸、少なくとも10個のアミノ酸、少なくとも15個のアミノ酸、少なくとも20個のアミノ酸、少なくとも25個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも35個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも45個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも55個のアミノ酸、少なくとも60個のアミノ酸、少なくとも65個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも75個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、少なくとも150個のアミノ酸、少なくとも200個のアミノ酸、少なくとも250個のアミノ酸、少なくとも300個のアミノ酸、少なくとも350個のアミノ酸、少なくとも400個のアミノ酸、または少なくとも500個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも5個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも10個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも50個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも100個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも5個のアミノ酸、例えば、5～500個、5～450個、5～400個、5～350個、5～300個、5～250個、5～200個、5～150個、5～100個、5～90個、5～80個、5～70個、5～60個、5～50個、5～40個、5～30個、5～20個、5～15個、または5～10個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも10個のアミノ酸、例えば、10～500個、10～450個、10～400個、10～350個、10～300個、10～250個、10～200個、10～150個、10～100個、10～90個、10～80個、10～70個、10～60個、10～50個、10～40個、10～30個、10～20個、または10～15個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも50個のアミノ酸、例えば、50～500個、50～450個、50～400個、50～350個、50～300個、50～250個、50～200個、50～150個、50～100個、50～90個、50～80個、50～50個、または50～60個のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも100個のアミノ酸、例えば、100～500個、100～450個、100～400個、100～350個、100～300個、100～250個、100～200個、または100～150個のアミノ酸を有し得る。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも

10

20

30

40

50

7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも110個、少なくとも120個、少なくとも130個、少なくとも140個、少なくとも150個、少なくとも160個、少なくとも170個、少なくとも180個、少なくとも190個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個、または少なくとも500個のヌクレオチドを有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも2個のヌクレオチド、例えば、2～1000個、2～900個、2～500個、2～300個、または2～50個を有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも10個のヌクレオチド、例えば、10～1000個、10～900個、10～500個、10～300個、または10～50個を有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも15個のヌクレオチド、例えば、15～1000個、15～900個、15～500個、15～300個、または15～50個を有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも20個のヌクレオチド、例えば、20～1000個、20～900個、20～500個、20～300個、または20～50個を有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも50個のヌクレオチド、例えば、50～1000個、50～900個、50～500個、50～300個、または50～100個を有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも100個のヌクレオチド、例えば、100～10000個、100～9000個、100～5005個、100～3000個、または100～500個を有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも200個のヌクレオチド、例えば、200～10000個、200～9000個、200～5000個、200～3000個、または200～500個を有する。他の態様において、生物学的に活性な分子は、少なくとも500個のヌクレオチド、例えば、500～10000個、500～9000個、500～5000個、または500～3000個を有する。本明細書で使用される場合、用語「抗原」は、対象に導入される際に、それ自体に対する免疫応答（細胞性または体液性）を引き起こす任意の薬剤を指す。いくつかの態様において、ペイロード分子は、EV、例えば、エクソソームに共有結合で連結される。他の態様において、ペイロードは、アジュバントを含む。

【0199】

「組換え」ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術を介して産生されるポリペプチドまたはタンパク質を指す。操作された宿主細胞において発現される組換え産生ポリペプチド及びタンパク質は、任意の好適な技術によって分離、分画、または部分的もしくは実質的に精製された天然または組換えポリペプチドと同様に、本開示の目的のために単離されていると見なされる。本明細書に開示されるポリペプチドは、当該技術分野で既知の方法を使用して組換え技術で産生され得る。あるいは、本明細書に開示されるタンパク質及びペプチドは、化学的に合成され得る。本開示のいくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームに存在する足場タンパク質は、EV、例えば、エクソソームにおける足場タンパク質のレベルが、そのような足場タンパク質を過剰発現しない産生細胞のEV、例えば、エクソソームに存在する足場タンパク質のレベルに関して有意に増加するよう、産生細胞における足場タンパク質を過剰発現することによって組換え技術で産生される。

【0200】

本明細書で使用される場合、足場タンパク質を介して本開示のEV（例えば、エクソソーム）の内腔表面または外部表面上に生物学的に活性な分子を「固定」または「固定する」という用語は、それぞれ、EV（例えば、エクソソーム）の内腔表面または外部表面上に位置する足場分子の部分に生物学的に活性な分子を共有結合で取り付けることを指す。

【0201】

用語「会合した」、「会合」、及びその文法変異形は、互換的に使用され、それぞれ、

10

20

30

40

50

第2の部分、例えば、第2のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に共有結合でまたは非共有結合で接合した第1の部分、例えば、第1のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を指す。第1の部分は、第2の部分に直接接合または並置され得る、あるいは、介在する部分は、第1の部分を第2の部分に共有結合で接合させ得る。いくつかの実施形態において、用語「会合した」は、ミリストイル化、イオン相互作用、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0202】

本明細書で使用される用語「連結された」または「融合された」は、ペプチド結合によって、または1つ以上のアミノ酸のリンカーによって、C末端またはN末端で第1の部分が第2の部分に融合されることを指す。用語「連結された」または「融合された」はまた、第2の部分（またはそれぞれ第1の部分）における任意の2つの点、例えばアミノ酸中への第1の部分全体（または第2の部分）の挿入を含む。一態様において、第1の部分は、ペプチド結合またはリンカーによって第2の部分に連結される。第1の部分は、ホスホジエステル結合またはリンカーによって第2の部分に連結され得る。リンカーは、ペプチドもしくはポリペプチド（ポリペプチド鎖の場合）、またはヌクレオチドもしくはヌクレオチド鎖（ヌクレオチド鎖の場合）、または任意の化学部分（ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド鎖、または任意の化学分子の場合）であり得る。用語「連結された」はまた、ハイフン（-）によって示され得る。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソーム上の足場タンパク質は、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子に連結または融合され得る。

【0203】

本明細書で使用される場合、「哺乳類対象」は、これらに限定されず、ヒト、飼育動物（例えば、イヌ、ネコなど）、農場動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）及び実験動物（例えば、サル、ラット、マウス、ウサギ、モルモットなど）を含む全ての哺乳類を含む。

【0204】

用語「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」、ならびにそれらの変異形は、本明細書で互換的に使用され、診断、治療、または治療が所望される任意の哺乳動物対象、特にヒトを指す。本明細書に記載の方法は、ヒト療法及び獣医学的用途の両方に適用可能である。いくつかの態様において、対象は哺乳動物であり、他の態様において、対象はヒトである。

【0205】

本明細書で使用される場合、「実質的に含んでいない（substantially free）」という用語は、EV、例えば、エクソソームを含む試料が、質量／体積（m／v）%濃度で、10%未満の巨大分子、例えば汚染物質を含むことを意味する。いくつかの画分は、約0.001%未満、約0.01%未満、約0.05%未満、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.3%未満、約0.4%未満、約0.5%未満、約0.6%未満、約0.7%未満、約0.8%未満、約0.9%未満、約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、約5%未満、約6%未満、約7%未満、約8%未満、約9%未満、または約10%（m／v）未満の巨大分子を含み得る。

【0206】

本明細書で使用される場合、用語「巨大分子」は、核酸、外因性タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物（例えば、ポリマー代謝産物）、またはそれらの組み合わせを意味する。

【0207】

本明細書で使用される場合、用語「従来のEVタンパク質」は、以前にEVが豊富であることが知られているタンパク質を意味する。

【0208】

本明細書で使用される場合、用語「従来のEV、例えば、エクソソームタンパク質」は、これらに限定されないが、CD9、CD63、CD81、PDGFR、GPIアンカータンパク質、ラクタドヘリンLAMP2、及びLAMP2B、それらの断片、またはそれ

らに結合するペプチドを含む、エクソソームが豊富であることが既知のタンパク質を意味する。疑いを避けるために、PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2、ATPトランスポーター、またはそれらの断片もしくは変異体は、従来のEV、例えば、エクソソームタンパク質ではない。

【0209】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的組成物」は、例えば、薬学的に許容される担体及び賦形剤などの1つ以上の他の化学成分と混合もしくは混ぜ合わされ、または懸濁された本開示のエクソソームなどのEVなどの本明細書に記載の化合物のうちの1つ以上を指す。医薬組成物の1つの目的は、EV、例えば、エクソソームの調製物の対象への投与を促進することである。

【0210】

本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、それらの類似体、またはそれらの混合物を含む任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指す。この用語は、分子の一次構造を指す。したがって、この用語は、三本鎖、二本鎖及び一本鎖デオキシリボ核酸（「DNA」）、同様に三本鎖、二本鎖及び一本鎖リボ核酸（「RNA」）を含む。また、改変された、例えば、アルキル化によって、及び／またはキャッピングによって、ならびに未改変の形態のポリヌクレオチドも含む。より具体的には、用語「ポリヌクレオチド」は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含む）、スプライシングされているか非スプライシングにかかわらず、tRNA、rRNA、hRNA、siRNA及びmRNAを含むポリリボヌクレオチド（D-リボースを含む）、プリンまたはピリミジン塩基のN-またはC-グリコシドである任意の他のタイプのポリヌクレオチド、ならびに、非ヌクレオチド骨格、例えば、ポリアミド（例えば、ペプチド核酸「PNA」）及びポリモルホリノポリマーを含む他のポリマー、ならびにポリマーがDNA及びRNAに見られるような塩基対形成及び塩基スタッキングを可能にする構成で核酸塩基を含むことを提供する他の合成配列特異的核酸ポリマーを含む。特定の態様において、ポリヌクレオチドは、mRNAを含む。他の態様において、mRNAは、合成mRNAである。いくつかの態様において、合成mRNAは、少なくとも1つの非天然核酸塩基を含む。いくつかの態様において、ある特定のクラスの全ての核酸塩基は、非天然核酸塩基で置き換えられている（例えば、本明細書に開示されるポリヌクレオチドにおける全てのウリジンは、非天然核酸塩基、例えば、5-メトキシウリジンで置き換えられ得る）。本開示のいくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、ポリヌクレオチドである。

【0211】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書で互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、改変アミノ酸を含み得る。この用語はまた、天然にまたは介入によって改変されたアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作もしくは改変も包含する。定義の中には、例えば、アミノ酸の1つ以上の類似体（例えば、ホモシステイン、オルニチン、p-アセチルフェニルアラニン、D-アミノ酸、及びクレアチンなどの非天然アミノ酸を含む）だけでなく当該技術分野で既知の他の改変を含むポリペプチドも含まれる。本開示のいくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームに結合したペイロード、例えば、生物学的に活性な分子は、ポリペプチド、例えば、ADC、PROTAC、毒素、融合タンパク質、または酵素等の抗体またはその誘導体である。

【0212】

本明細書で使用される用語「ポリペプチド」は、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを指す。ポリペプチドは、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、ホモログ、オーソログ、パラログ、断片、ならびに前述の他の等価物、変異体、及び類似体が挙げられる。ポリペプチドは、単一のポリペプチドであり得るか、または二量体、三量体、または四量体などの多分子複合体であり

得る。それらはまた、一本鎖または多鎖ポリペプチドを含み得る。最も一般的に、ジスルフィド結合は、多鎖ポリペプチドに見られる。用語ポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用し得る。いくつかの態様において、「ペプチド」は、50アミノ酸長以下、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸長であり得る。いくつかの態様において、「ペプチド」は、少なくとも約2～約50、少なくとも約3～約50、少なくとも約4～約50、少なくとも約5～約50、少なくとも約10～約50、少なくとも約15～約50、少なくとも約20～約50、少なくとも約25～約50、少なくとも約30～約50、少なくとも約35～約50、少なくとも約40～約50、または少なくとも約45～約50アミノ酸長であり得る。

10

【0213】

本明細書で使用される場合、用語「本開示の足場タンパク質」、または文法変異形は、以下、

(i) MARCKS、MARKSL1、またはBASP1などの、EV、例えば、エクソソームの内腔表面に位置するタンパク質（天然発現、化学的もしくは酵素的に合成、または組換え技術で産生される）、

(ii) (i)の任意の機能的断片、

(iii) (i)～(ii)の任意の機能的変異体、

(iv) (i)～(iii)の任意の誘導体、

(v) EV、例えば、エクソソームの内腔表面に結合し得る(i)におけるタンパク質に由来するドメインもしくはそれらの組み合わせに対応する任意のペプチド、またはそのようなペプチドを含む分子、

20

(vi) EV、例えば、エクソソームの内腔表面に結合し得る(i)におけるタンパク質に由来するモチーフに由来する任意のペプチド、またはそのようなペプチドを含む分子、

(vii) 少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む(i)～(vi)の分子、

(viii) またはそれらの任意の組み合わせ、

それは、ペイロード、例えば生物学的に活性な分子（例えば治療用タンパク質）をEV、例えば、エクソソームの内腔表面に標的化（取り付け）するための足場としての使用に好適である、を指す。

【0214】

30

本明細書で使用される場合、用語「本開示のEV、例えば、エクソソーム」または文法変異形は、本開示の少なくとも1つの足場タンパク質を含むEV、例えば、エクソソームを指す。

【0215】

本明細書で使用される場合、用語「本開示の産生細胞」、または文法変異形は、本開示のEV、例えば、エクソソームを産生し得る細胞を指す。

【0216】

II. 細胞外小胞タンパク質、例えば、エクソソームタンパク質

本開示のいくつかの態様は、EV、例えば、エクソソーム、内腔表面において高度に富化されたEV、例えば、エクソソームタンパク質（足場タンパク質）の同定、使用、及び改変に関する。そのようなEVタンパク質またはエクソソームタンパク質（足場タンパク質）は、質量分析または当該技術分野で既知の他の方法で高度に精製されたEV、例えば、エクソソームを分析することによって同定され得る。

40

【0217】

本開示の足場タンパク質は、EV、例えば、エクソソーム膜上で豊富な、膜貫通タンパク質（すなわち、1つ以上の膜貫通ヘリックスを介してEV膜にまたがるタンパク質）、一体型タンパク質、及び末梢タンパク質（すなわち、静電相互作用及び／またはアンカー部分を介して表面と相互作用する内腔表面上のタンパク質）などの様々な内腔タンパク質または膜タンパク質を含む。具体的には、本開示の足場タンパク質は、これらに限定されないが、以下、

50

- (1) ミリスチル化アラニンリッチタンパク質キナーゼC基質 (MARCKS)、
(2) ミリスチル化アラニンリッチタンパク質キナーゼC基質様1 (MARCKSL1)、及び
(3) 脳酸可溶性タンパク質1 (BASP1)、を含む。

【0218】

本明細書で特定される1つ以上のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）は、産生細胞、産生条件、精製方法、またはエクソソームの意図される適用に応じて選択的に使用され得る。

【0219】

特定のサイズ範囲、標的指向性部分、電荷密度、ペイロードなどを有する特定のEV、例えば、エクソソームの内腔（例えば、EV膜の内腔表面上）で富化されたEV、例えば、エクソソーム、タンパク質は、本開示のいくつかの態様で同定され、使用され得る。

【0220】

いくつかの態様において、本明細書に開示される2つ以上のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、MARCKS、MARKSL1、BASP1、それらの任意の機能的断片、変異体、もしくは誘導体、またはそれらの任意の組み合わせなどの足場タンパク質）は、本開示の治療用EV、例えば、エクソソームの生成及び単離のために同時にまたはその後使用され得る。

【0221】

III. 内腔操作されたEV、例えば、エクソソーム

細胞外小胞（EV）、例えば、エクソソームは、典型的には、直径20nm～1000nmである。小細胞外小胞であるエクソソームは、典型的には、直径100～200nmである。EV、例えば、エクソソームは、限定脂質二重層ならびに多様な一式のタンパク質及び核酸から構成される (Maas, S. L. N., et al., Trends. Cell Biol. 27 (3): 172-188 (2017))。EV、例えば、エクソソームは、別個の細胞型及び組織において優先的な取り込みを示し、それらの向性は、標的細胞の表面上の受容体と相互作用するタンパク質をそれらの表面に付加することによって指向され得る (Alvarez-Erviti, L., et al., Nat. Biotechnol. 29 (4): 341-345 (2011))。

【0222】

抗体とは異なり、EV、例えば、エクソソームは、EV、例えば、エクソソームあたり数千～数万オーダーの分子で、それらの表面に取り付けられた多数の分子を収容し得る。したがって、EV、例えば、エクソソーム、及びペイロード、例えば、生物学的に活性な分子（例えば、治療的分子）を含むコンジュゲートまたは複合体は、高濃度の治療的または診断的化合物を個別の細胞型に送達し、同時に、化合物への全体的な全身曝露を制限するプラットフォームを表し、これは、オフターゲット毒性を低減させる。さらに、EV、例えば、エクソソームは、異なる区画に複数のペイロード、例えば、生物学的に活性な分子を収容する可能性を提供する。例えば、EV、例えば、エクソソームは、例えば、特定の標的細胞（例えば、がん細胞）または標的組織（例えば、肝臓または脳）にEVを導くであろうEVの外部表面に取り付けられた標的指向性部分、1つ以上の治療学部分（例えば、薬物）、及び／または1つ以上の検出可能な部分（例えば、造影剤または放射性核種）を含み得る。

【0223】

EV、例えば、エクソソームはまた、異なるペイロード、例えば、EVの内腔表面に取り付けられた治療学部分（例えば、薬物）及び／または検出可能部分（例えば、造影剤または放射性核種）を含み得る。加えて、EV、例えば、エクソソームはまた、EV、例えば、エクソソームの内腔に1つ以上のペイロード、例えば、生物学的に活性な分子（例えば、治療薬、診断試薬、アジュバントなど）を含み得る。

【0224】

したがって、EV、例えば、エクソソームは、複数のペイロード、例えば、生物学的に

10

20

30

40

50

【 0 2 2 5 】

50

0 nm、170～230 nm、180～220 nm、または190～210 nmの間の直径を有する。本明細書に記載されるEV、例えば、エクソソームのサイズは、以下に記載される方法に従って測定され得る。

【0226】

いくつかの態様において、本開示のEV、例えば、エクソソームは、内部表面及び外部表面を含む二脂質膜（「EV、例えば、エクソソーム、膜」）を含む。ある特定の形態において、内部表面は、EV、例えば、エクソソームの内側コア（すなわち、内腔）に面する。ある特定の態様において、外部表面は、産生細胞または標的細胞のエンドソーム、多小胞体、または膜／細胞質と接触し得る。

【0227】

いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、脂質及び脂肪酸を含む。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソーム、膜は、リン脂質、糖脂質、脂肪酸、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、ステロール、コレステロール、及びホスファチジルセリンを含む。

【0228】

いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソーム、膜は、内側リーフレット及び外側リーフレットを含む。内側及び外側リーフレットの組成は、当該技術分野で既知のトランスバイレイヤー（transbilayer）分布アッセイによって決定され得、例えば、Kuypers et al. Biochim, Biophys Acta 1985 819:170を参照されたい。いくつかの態様において、外側リーフレットの組成物は、およそ70～90%の間のコリンリン脂質、およそ0～15%の間の酸性リン脂質、及びおよそ5～30%の間のホスファチジルエタノールアミンである。いくつかの態様において、内側リーフレットの組成物は、およそ15～40%の間のコリンリン脂質、およそ10～50%の間の酸性リン脂質、及びおよそ30～60%の間のホスファチジルエタノールアミンである。

【0229】

一態様において、本開示は、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームの生成及び使用に関する。内腔操作されたエクソソームは、その組成において改変された、例えば、天然に見出されるエクソソームの組成に関して改変された内部空間（EVの内腔表面）を有する。例えば、内腔表面の組成は、EV、例えば、エクソソームの内腔側の構成要素のタンパク質、脂質またはグリカン含有量を変化させることによって改変され得る。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームの内腔表面は、EV、例えば、エクソソームに天然ではない1つ以上の組換え発現タンパク質、例えば、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質を含み得る。したがって、本開示は、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をEV、例えば、エクソソームに固定することを可能にする組成物を提供し、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子を本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質に連結することを含む。本開示はまた、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をEV、例えば、エクソソームに固定する方法を提供し、生物学的に活性な分子を本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質に連結することを含む方法も提供する。

【0230】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、脂質化を介してEV、例えば、エクソソームの内腔表面に取り付けられる。いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質は脂肪アシル化される。いくつかの態様において、足場タンパク質は、ミリスティル化される。

【0231】

ミリスティル化は、ミリスチン酸に由来するミリスティル基が、アミド結合によってN末端グリシンの α -アミノ基に共有結合で取り付けられる脂質化改変である。ミリスチン酸は、n-テトラデカン酸の系統名を有する14炭素飽和脂肪酸（14:4）である。この改変は、共翻訳的または翻訳後のいずれかで付加され得る。ミリスティル基の共翻訳付

10

20

30

40

50

加中、N末端グリシンは、新たに形成された成長ポリペプチドにおけるN末端メチオニン残基の切断後に改変される。これは、ミリスチル化タンパク質のおよそ80%で発生する。翻訳後のミリスチル化は、典型的には、内部グリシン残基の曝露をもたらすカスパーゼ切断事象の後に生じ、次いで、ミリスチン酸添加に利用可能であろう。共翻訳または翻訳後のミリスチル化（インビボまたはインビトロのいずれか、例えば酵素的に実施）に加えて、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質のミリスチル化は、化学合成を介して、例えば、合成ステップとして、化学合成中に足場タンパク質にミリスチン酸を付加することによっても生じ得る。

【0232】

いくつかの実施形態において、生物学的膜への脂質固定は、パルミトイル化ではない（すなわち、パルミチン酸、一般的にはシステインへ、及びより少ない頻度でセリンまたはトレオニンへの取り付け）。他の実施形態において、生物学的膜への脂質定着は、プレニル化（プレニル基の結合）またはグリコシルホスファチジルイノシトール連結（GPI連結）である。プレニル化タンパク質は、タンパク質のシステイン残基で共有結合により結合した疎水性イソプレンポリマー（すなわち、分枝状5炭化水素）を有するタンパク質である。GPI結合タンパク質は、タンパク質のC末端カルボキシル基へのアミド結合を介してGPI複合体分子基に取り付けられる。GPIの取り付けは、GPIートランスアミダーゼ複合体の作用を通じて生じる。ホスファチジルイノシトールの脂肪酸鎖は、膜に挿入され、したがって、タンパク質を膜に固定するものである。

【0233】

いくつかの実施形態において、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、PEG誘導融合及び／または超音波融合のような化学的及び／または物理的方法により生成される。

【0234】

他の実施形態において、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、遺伝子操作によって生成される。遺伝子改変産生細胞または遺伝子改変細胞の子孫から産生されるエクソソームは、改変内腔組成物を含み得る。いくつかの実施形態において、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、より高い密度またはより低い密度でEV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、足場タンパク質、例えば、MARCKS、MARKSL1、BASP1、またはそれらの組み合わせなどのエクソソーム内腔タンパク質）を有するか、またはEV、例えば、エクソソーム、タンパク質の改変もしくは断片（例えば、任意の機能的断片、変異体、もしくはそれらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせ）を含む。

【0235】

例えば、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、EV、例えば、エクソソーム、タンパク質、またはEV、例えば、エクソソーム、タンパク質の改変もしくは断片（例えば、足場タンパク質、例えば、MARCKS、MARKSL1、BASP1、それらの任意の機能的断片、変異体、もしくは誘導体、またはそれらの任意の組み合わせなどのエクソソーム内腔タンパク質）をコードする外因性配列で形質転換された細胞から産生され得る。外因性配列から発現されるタンパク質を含むEV、例えば、エクソソームは、改変内腔表面タンパク質（足場タンパク質）組成物を含み得る。

【0236】

EVタンパク質、例えば、エクソソームタンパク質（例えば、足場タンパク質、例えば、MARCKS、MARKSL1、BASP1、それらの任意の機能的断片、変異体、もしくは誘導体、またはそれらの任意の組み合わせなどのエクソソーム内腔タンパク質）の様々な改変または断片は、本開示の実施形態に使用され得る。例えば、EV、例えば、エクソソーム、内腔表面をより効果的に標的化されるように改変されたタンパク質が使用され得る。EV、例えば、エクソソーム、内腔表面を特異的かつ効果的に標的にする必要な最小断片を含むように改変されたタンパク質もまた、使用され得る。

【0237】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、MARCKSタンパク質、またはその断片、変異体、もしくは誘導体を含む。MARCKSタンパク質(Uniprot受託番号P29966)は、プロテインキナーゼC基質、80kDaタンパク質、軽鎖としても知られている。全長ヒトMARCKSタンパク質は、332アミノ酸長であり、アミノ酸残基152~176にカルモジュリン結合ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質は、成熟MARCKSタンパク質(すなわち、N末端メチオニンを含まない)を含む。いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質は、成熟MARCKSタンパク質に由来し、すなわち、それは、成熟MARCKSタンパク質の断片、変異体、または誘導体であり、したがって、非成熟タンパク質において存在するN末端メチオニンを欠く。

10

【0238】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、MARCKS様タンパク質1、及びマクロファージミリスチル化アラニンリッチCキナーゼ基質としても知られる、MARCKSL1タンパク質(Uniprot受託番号P49006)を含む。全長ヒトMARCKSL1タンパク質は、195アミノ酸長である。MARCKSL1タンパク質は、アミノ酸残基87~110における脂質結合及びカルモジュリン結合に関与するエフェクタードメインを有する。いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質は、成熟MARCKSL1タンパク質(すなわち、N末端メチオニンを含まない)を含む。いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質は、成熟MARCKSL1タンパク質に由来し、すなわち、それは、成熟MARCKSL1タンパク質の断片、変異体、または誘導体であり、したがって、非成熟タンパク質において存在するN末端メチオニンを欠く。

20

【0239】

いくつかの態様において、本開示の足場は、22kDaニューロン組織が豊富な酸性タンパク質またはニューロン軸索膜タンパク質NAP-22としても知られるBASP1タンパク質(Uniprot受託番号P80723)を含む。全長ヒトBASP1タンパク質配列(異性体1)は、227アミノ酸長である。選択的スプライシングによって産生される異性体は、異性体1からアミノ酸88~141が欠損している。いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、成熟BASP1タンパク質(すなわち、N末端メチオニンを含まない)を含む。いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質は、成熟BASP1タンパク質に由来し、すなわち、それは、成熟BASP1タンパク質の断片、変異体、または誘導体であり、したがって、非成熟タンパク質において存在するN末端メチオニンを欠く。

30

【0240】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、「N末端ドメイン」(ND)及び「エフェクタードメイン」を含み、ND及び/またはEDは、EVの内腔表面、例えば、エクソソームと会合する。本明細書で使用される場合、用語「会合」は、膜成分への共有結合を伴わない、本開示の足場タンパク質とEV、例えば、エクソソームの内腔表面との間の相互作用を指す。例えば、本開示の足場は、例えば、脂質アンカー(例えば、ミリスチン酸)、及び/または膜リン脂質の負荷電ヘッドと静電的に相互作用する多塩基性ドメインを介して、EVの内腔表面と会合し得る。他の態様において、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、NDは、EVの内腔表面と会合し、EDは、イオン相互作用によってEVの内腔表面と会合し、EDは、配列において少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つの連続したリジン(Lys)を含む。

40

【0241】

他の態様において、EDは、1つ以上の低複雑性領域、例えば、PESTモチーフをさらに含む。PEST配列は、プロリン(P)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、及びトレオニン(T)が豊富なペプチド配列である。いくつかの態様において、EDは、負荷

50

電残基（例えば、G l u）ならびに一過性リン酸化を受ける多くのS e r及びT h rをさらに含む（したがって、両方ともE D外の領域に負荷電を付加する）。

【0242】

いくつかの態様において、N Dは、E V、例えば、エクソソームの内腔表面と、脂質化を介して、例えば、ミリスチル化を介して会合する。いくつかの実施形態において、N Dは、N末端にG l yを有する。いくつかの実施形態において、N末端G l yは、ミリスチル化される。いくつかの態様において、N DはN末端にM e tを含まない。他の実施形態において、N Dは、ミリスチル化されたG l yを含み、N末端にM e tを含まない。

【0243】

いくつかの態様において、E Dは、イオン相互作用によってE V、例えば、エクソソームの内腔表面と会合する。いくつかの実施形態において、E Dは、静電相互作用、特に、魅力的な静電相互作用によって、E V、例えば、エクソソームの内腔表面に会合する。

【0244】

いくつかの態様において、E Dは、(i) 塩基性アミノ酸（例えば、リジン）、または(ii) ポリペプチド配列において互いに隣接する2つ以上の塩基性アミノ酸（例えば、リジン）を含む。いくつかの態様において、塩基性アミノ酸は、リジン（L y s、K）、アルギニン（A r g、R）、またはヒスチジン（H i s、H）である。いくつかの実施形態において、塩基性アミノ酸は、(L y s) nであり、nは、1～10の整数である。

【0245】

他の態様において、E Dは、少なくともリジンを含み、E DのN末端がN DのC末端でリジンに直接連結されている場合、N DはC末端でリジンを含み、すなわち、リジンはE DのN末端にあり、N DのC末端でリジンに融合される。他の実施形態において、E DのN末端がリンカー、例えば、1つ以上のアミノ酸によってN DのC末端に連結されている場合、E Dは、少なくとも2つのリジン、少なくとも3つのリジン、少なくとも4つのリジン、少なくとも5つのリジン、少なくとも6つのリジン、または少なくとも7つのリジンを含む。

【0246】

いくつかの態様において、E Dは、K、K K、K K K、K K K K（配列番号151）、K K K K K（配列番号152）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。本開示はまた、いくつかの態様において、リジン反復はアルギニンで置き換えられ得ることも提供する。他の態様において、E Dまたは足場タンパク質におけるアルギニン反復は、リジン有効性と比較して低い担持有効性を提供する。

【0247】

いくつかの態様において、本開示について有用な足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、E DまたはN Dと共にするE Dにおける配列において反復する少なくとも2つのリジンまたは少なくとも3つのリジン、すなわち、N DのC末端におけるリジン及びE DのN末端におけるKを必要とする。いくつかの実施形態において、E Dは、K、K K、K K K、K K K K（配列番号151）、K K K K K（配列番号152）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、N Dは、G：X 2：X 3：X 4：X 5：X 6に記載されるアミノ酸配列を含み、Gは、G l yを表し、「：」は、ペプチド結合を表し、X 2～X 6のそれぞれは、独立して、アミノ酸を表し、X 6は塩基性アミノ酸を表す。いくつかの態様において、X 6アミノ酸は、L y s、A r g、及びH i sからなる群から選択される。いくつかの態様において、X 5アミノ酸は、P r o、G l y、A l a、及びS e rからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、X 2アミノ酸は、P r o、G l y、A l a、及びS e rからなる群から選択される。いくつかの態様において、X 4は、P r o、G l y、A l a、S e r、V a l、I l e、L e u、P h e、T r p、T y r、G l n、及びM e tからなる群から選択される。いくつかの態様において、足場タンパク質は、N末端に、例えば、ミリスチル化されたM e tを含まない。

【0248】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、ND及びEDを含み、NDは、G：X2：X3：X4：X5：X6に記載のアミノ酸配列を含み、Gは、Glyを表し、「：」は、ペプチド結合を表し、X2～X6のそれぞれは、独立して、アミノ酸を表し、X6は、塩基性アミノ酸を表し、X5アミノ酸は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択され、X4は、Pro、Gly、Ala、Ser、Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Gln、及びMetからなる群から選択され、X3は、アミノ酸を表し、X2アミノ酸は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択され、EDは、少なくとも1つのアミノ酸、例えば、少なくとも1つのLysを含み、足場タンパク質は、(i)配列番号4～114、116～118、122～150、もしくは180～190を含むアミノ酸配列、または(ii)配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列ではない。
【0249】

10

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、N末端ドメイン(ND)及びエフェクタードメイン(ED)を含み、NDは、G：X2：X3：X4：X5：X6に記載されるアミノ酸配列を含み、Gは、Glyとして表されるグリシンであり、「：」は、ペプチド結合を表し、X2～X6のそれぞれは、独立して、アミノ酸であり、X6は、塩基性アミノ酸を含み、EDは、ペプチド結合によってX6に連結され、EDのN末端に少なくとも1つのリジンを含む。いくつかの態様において、足場タンパク質は、N末端に、例えば、ミリスチル化されたMetを含まない。他の態様において、足場タンパク質は、(i)配列番号4～114、116～118、122～150、もしくは180～190を含むアミノ酸配列、または(ii)配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列を含まない、またはそれらからならない。

20

【0250】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質のNDは、G：X2：X3：X4：X5：X6のアミノ酸配列を含み、

- a. Gは、Glyを表し、
- b. 「：」は、ペプチド結合を表し、
- c. X2は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択されるアミノ酸を表し、
- d. X3は、任意のアミノ酸を表し、
- e. X4は、Pro、Gly、Ala、Ser、Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Gln、及びMetからなる群から選択されるアミノ酸を表し、
- f. X5は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択されるアミノ酸を表し、
- g. X6は、Lys、Arg、及びHisからなる群から選択されるアミノ酸を表す。

30

【0251】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、N末端に、例えば、ミリスチル化されたMetを含まない。他の態様において、足場タンパク質は、(i)配列番号4～114、116～118、122～150もしくは180～190を含むアミノ酸配列、または(ii)配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列を含まない、またはそれらからならない。いくつかの態様において、X3アミノ酸は、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、及びArgからなる群から選択される。

40

【0252】

いくつかの態様において、ND及びEDは、リンカーによって接合される。いくつかの実施形態において、リンカーは、1つ以上のアミノ酸を含む。いくつかの態様において、用語「リンカー」は、ペプチドもしくはポリペプチド配列(例えば、合成ペプチドもしくはポリペプチド配列)、または非ポリペプチド、例えば、アルキル鎖を指す。いくつかの態様において、2つ以上のリンカーは、直列に連結し得る。概して、リンカーは、柔軟さ

50

を提供する、または立体障害を予防／改善する。リンカーは、典型的には切断されないが、ある特定の態様において、そのような切断が望ましい場合がある。したがって、いくつかの実施形態において、リンカーは、1つ以上のプロテアーゼ切断可能部位を含み得、それはリンカーの配列内に位置し得るか、リンカー配列のいずれかの末端でリンカーに隣接し得る。ND及びEDがリンカーによって接合されるとき、EDは、少なくとも2つのリジン、少なくとも3つのリジン、少なくとも4つのリジン、少なくとも5つのリジン、少なくとも6つのリジン、または少なくとも7つのリジンを含む。

【0253】

いくつかの態様において、リンカーはペプチドリンカーである。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、少なくとも約2個、少なくとも約3個、少なくとも約4個、少なくとも約5個、少なくとも約10個、少なくとも約15個、少なくとも約20個、少なくとも約25個、少なくとも約30個、少なくとも約35個、少なくとも約40個、少なくとも約45個、少なくとも約50個、少なくとも約55個、少なくとも約60個、少なくとも約65個、少なくとも約70個、少なくとも約75個、少なくとも約80個、少なくとも約85個、少なくとも約90個、少なくとも約95個、または少なくとも約100個のアミノ酸を含み得る。

【0254】

いくつかの態様において、リンカーは、グリシン／セリンリンカーである。いくつかの実施形態において、ペプチドリンカーは、式 $[(Gly)_n - Ser]_m$ によるグリシン／セリンリンカーであり、式中、 n は、1～100の任意の整数であり、 m は、1～100の任意の整数である。他の態様において、グリシン／セリンリンカーは、式 $[(Gly)_x - Ser_y]_z$ によるものであり、式中、 x は1～4の整数であり、 y は0または1であり、 z は1～50の整数である。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは配列 G_n を含み、 n は1～100の整数であり得る。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、配列 $(GlyAla)_n$ を含み得、式中、 n は1～100の整数である。他の態様において、ペプチドリンカーは、配列 $(GlyGlySer)_n$ を含み得、式中、 n は1～100の整数である。

【0255】

いくつかの態様において、ペプチドリンカーは合成、すなわち、非天然に存在する。一実施形態において、ペプチドリンカーは、アミノ酸の第1の直鎖配列を、天然に連結されていないか、または天然に遺伝子融合されていないアミノ酸の第2の直鎖配列に連結するか、または遺伝子融合するアミノ酸配列を含むペプチド（またはポリペプチド）（例えば、天然に存在するまたは天然に存在しないペプチド）を含む。例えば、一態様において、ペプチドリンカーは、天然に存在するポリペプチドの改変形態である（例えば、付加、置換、または欠失などの変異を含む）天然に存在しないポリペプチドを含み得る。

【0256】

他の態様において、ペプチドリンカーは、天然に存在しないアミノ酸を含み得る。さらに他の態様において、ペプチドリンカーは、天然に存在しない直鎖配列における存在する天然に存在するアミノ酸を含み得る。さらに他の態様において、ペプチドリンカーは、天然に存在するポリペプチド配列を含み得る。

【0257】

本開示はまた、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質に結合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）、例えば、エクソソームも提供し、足場タンパク質は、ND-EDを含み、

a. NDは $G : X_2 : X_3 : X_4 : X_5 : X_6$ を含み、

i. G は、 Gly を表し、

ii. 「:」 は、ペプチド結合を表し、

iii. X_2 は、 Pro 、 Gly 、 Ala 、及び Ser からなる群から選択されるアミノ酸を表し、

iv. X_3 は、任意のアミノ酸を表し、

10

20

30

40

50

v. X4は、Pro、Gly、Ala、Ser、Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Glu、及びMetからなる群から選択されるアミノ酸を表し、

vi. X5は、Pro、Gly、Ala、及びSerからなる群から選択されるアミノ酸を表し、

vii. X6は、Lys、Arg、及びHisからなる群から選択されるアミノ酸を表し、

b. 「-」は、任意のリンカーを表し、

c. EDは、(i) 少なくとも2つの連続するリジン(Lys)、ペプチド結合もしくは1つ以上のアミノ酸によってX6に連結したN末端リジン、または(ii) ペプチド結合によってX6に直接連結された少なくとも1つのリジンを含むエフェクタードメインである。いくつかの態様において、足場タンパク質は、N末端に、例えば、ミリスチル化されたMetを含まない。他の態様において、足場タンパク質は、(i) 配列番号4～114、116～118、122～150もしくは180～190を含むアミノ酸配列、または(ii) 配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列を含まない、またはそれらからならない。

【0258】

いくつかの態様において、X2アミノ酸は、Gly及びAlaからなる群から選択される。いくつかの態様において、X3アミノ酸はLysである。いくつかの態様において、X4アミノ酸はLeuまたはGluである。いくつかの態様において、X5アミノ酸は、Ser及びAlaからなる群から選択される。いくつかの態様において、X6アミノ酸はLysである。いくつかの態様において、X2アミノ酸はGly、Ala、またはSerであり、X3アミノ酸はLysまたはGluであり、X4アミノ酸はLeu、Phe、Ser、またはGluであり、X5アミノ酸はSerまたはAlaであり、X6アミノ酸はLysである。いくつかの態様において、-リンカーは、ペプチド結合または1つ以上のアミノ酸を含む。

【0259】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質におけるEDは、Lys(K)、KK、KKK、KKKK(配列番号151)、KKKKK(配列番号152)、Arg(R)、RR、RRR、RRRR(配列番号153)、RRRRR(配列番号154)、KR、RK、KKR、K RK、RKK、KRR、RRK、(K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(配列番号155)、(K/R)(K/R)(K/R)(K/R)(配列番号156)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0260】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、(i) GGKLSKK(配列番号157)、(ii) GAKLSKK(配列番号158)、(iii) GGKQSKK(配列番号159)、(iv) GGKLAKK(配列番号160)、または(v) それらの任意の組み合わせに記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i)～(v)の配列のN末端にMetを有するアミノ酸配列を含まない。他の態様において、足場タンパク質は、(i) 配列番号4～114、116～118、もしくは122～150を含むアミノ酸配列、または(ii) 配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列を含まないか、またはそれらからならない。

【0261】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質中のNDは、(i) GGKLSK(配列番号203)、(ii) GAKLSK(配列番号204)、(iii) GGKQSK(配列番号205)、(iv) GGKLAK(配列番号206)、または(v) それらの任意の組み合わせのアミノ酸配列を含み、足場タンパク質中のEDは、a) K、(b) KK、(c) KKK、(d) KKKK(配列番号207)、(e) KKKGY(配列番号208)、(f) KKKGYN(配列番号209)、(g)

KKKGYNV (配列番号210)、(h) KKKGYNVN (配列番号211)、(i) KKKGYS (配列番号212)、(k) KKKGYG (配列番号213)、(l) KKKGYGG (配列番号214)、(m) KKKGS (配列番号215)、(n) KKKGS (配列番号216)、(o) KKKGS (配列番号217)、(p) KKKGS (配列番号218)、(q) KKKS (配列番号219)、(r) KKKSG (配列番号220)、(s) KKKSGG (配列番号221)、(t) KKKSGGS (配列番号222)、(u) KKKSGGS (配列番号223)、(v) KKS GGS (配列番号224)、(w) KKS GGS (配列番号225)、(x) KRFSFKKS (配列番号226)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i) ~ (v) の配列のN末端にMetを有するアミノ酸配列を含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i) 配列番号4~114、116~118、122~150もしくは180~190を含むアミノ酸配列、または(ii) 配列番号115もしくは118~121によってコードされるアミノ酸配列を含まないか、またはそれらからならない。

10

【0262】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質のポリペプチド配列は、(i) GGKLSKK (配列番号157)、(ii) GAKLSKK (配列番号158)、(iii) GGKQSKK (配列番号159)、(iv) GGKLAKK (配列番号160)、または(v) それらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

20

【0263】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、(i) GGKLSKKK (配列番号161)、(ii) GGKLSKKKS (配列番号162)、(iii) GAKLSKKK (配列番号163)、(iv) GAKLSKKKS (配列番号164)、(v) GGKQSKKK (配列番号165)、(vi) GGKQSKKS (配列番号166)、(vii) GGKLAKKK (配列番号167)、(viii) GGKLAKKS (配列番号168)、または(ix) それらの任意の組み合わせのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i) ~ (ix) の配列のN末端にMetを有するアミノ酸配列を含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i) 配列番号4~114、116~118、122~150もしくは180~190を含むアミノ酸配列、または(ii) 配列番号115もしくは118~121によってコードされるアミノ酸配列を含まない、またはそれらからならない。

30

【0264】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質のポリペプチド配列は、(i) GGKLSKKK (配列番号161)、(ii) GGKLSKKKS (配列番号162)、(iii) GAKLSKKK (配列番号163)、(iv) GAKLSKKKS (配列番号164)、(v) GGKQSKKK (配列番号165)、(vi) GGKQSKKS (配列番号166)、(vii) GGKLAKKK (配列番号167)、(viii) GGKLAKKS (配列番号168)、及び(ix) それらの任意の組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

40

【0265】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、少なくとも約21、少なくとも約22、少なくとも約23、少なくとも約24、少なくとも約25、少なくとも約26、少なくとも約27、少なくとも約28、少なくとも約29、少なくとも約30、少なくとも約31、少なくとも約32、少なくとも約33、少なくとも約34、少なくとも約35、少なくとも約36、少なくとも約37、少なくとも約38、少なくとも約39、少なくとも約39、少なくとも約40、少なくとも約41、少なくとも約42

50

、少なくとも約43、少なくとも約44、少なくとも約50、少なくとも約46、少なくとも約47、少なくとも約48、少なくとも約49、少なくとも約50、少なくとも約55、少なくとも約60、少なくとも約65、少なくとも約70、少なくとも約75、少なくとも約80、少なくとも約85、少なくとも約90、少なくとも約95、少なくとも約100、少なくとも約105、少なくとも約110、少なくとも約115、少なくとも約120、少なくとも約125、少なくとも約130、少なくとも約135、少なくとも約140、少なくとも約145、少なくとも約150、少なくとも約155、少なくとも約160、少なくとも約165、少なくとも約170、少なくとも約175、少なくとも約180、少なくとも約185、少なくとも約190、少なくとも約195、少なくとも約200、少なくとも約205、少なくとも約210、少なくとも約215、少なくとも約220、少なくとも約225、少なくとも約230、少なくとも約235、少なくとも約240、少なくとも約245、少なくとも約250、少なくとも約255、少なくとも約260、少なくとも約265、少なくとも約270、少なくとも約275、少なくとも約280、少なくとも約285、少なくとも約290、少なくとも約295、少なくとも約300、少なくとも約305、少なくとも約310、少なくとも約315、少なくとも約320、少なくとも約325、少なくとも約330、少なくとも約335、少なくとも約340、少なくとも約345、または少なくとも約350アミノ酸長である。

【0266】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、約5～約10、約10～約20、約20～約30、約30～約40、約40～約50、約50～約60、約60～約70、約70～約80、約80～約90、約90～約100、約100～約110、約110～約120、約120～約130、約130～約140、約140～約150、約150～約160、約160～約170、約170～約180、約180～約190、約190～約200、約200～約210、約210～約220、約220～約230、約230～約240、約240～約250、約250～約260、約260～約270、約270～約280、約280～約290、約290～約300、約300～約310、約310～約320、約320～約330、約330～約340、または約340～約250アミノ酸長である。

【0267】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、(i) GGKLSKKKKGYNVN (配列番号169)、(ii) GAKLSKKKKGYNVN (配列番号170)、(iii) GGKQSKKKKKGYNVN (配列番号171)、(iv) GGKLAKKKKKGYNVN (配列番号172)、(v) GGKLSKKKKKGYSGG (配列番号173)、(vi) GGKLSKKKKKGS GGS (配列番号174)、(vii) GGKLSKKKKKSG GSG (配列番号175)、(viii) GGKLSKKKSG GSGG (配列番号176)、(ix) GGKLSKKSGGS GGS (配列番号177)、(x) GGKLSKSGGS GGSV (配列番号178)、または(xi) GAKKSKKRFSFKKS (配列番号179)を含む。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i)～(xi)の配列のN末端にMetを有するアミノ酸配列を含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i)配列番号4～114、116～118、122～150もしくは180～190を含むアミノ酸配列、または(ii)配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列を含まないか、またはそれらからならない。

【0268】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質のポリペプチド配列は、(i) GGKLSKKKKKKGYNVN (配列番号169)、(ii) GAKLSKKKKKKGYNVN (配列番号170)、(iii) GGKQSKKKKKGYNVN (配列番号171)、(iv) GGKLAKKKKKGYNVN (配列番号172)、(v) GGKLSKKKKKGYSGG (配列番号173)、(vi) GGKLSKKKKKGS GGS (配列番号174)、(vii) GGKLSKKKKKSG GSG (

配列番号175)、(v i i i) G G K L S K K K S G G S G G (配列番号176)、(i x) G G K L S K K S G G S G G S (配列番号177)、(x) G G K L S K S G G S G G S V (配列番号178)、または(x i) G A K K S K K R F S F K K S (配列番号179)からなる。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i)～(x i)の配列のN末端にMe tを有するアミノ酸配列を含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(i)配列番号4～114、116～118、122～150もしくは180～190を含むアミノ酸配列、または(i i)配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列を含まないか、またはそれらからなる。

【0269】

他の態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、本明細書に開示される配列のいずれか1つを含むが、N末端にMe tを有する対応する配列、例えば、配列番号4～109を含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、表1の配列のいずれか1つを含むが、(i)配列番号4～114、116～118、122～150または180～190を含むアミノ酸配列、または(i i)配列番号115または118～121によってコードされるアミノ酸配列を含まないか、またはそれらからならない。

【0270】

本開示について有用な足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質の非限定的な例を以下に列挙する。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1.

配列番号	足場タンパク質: GX2X3X4X5X6-ED
227	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD KKAEGAA
228	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD KKAEGA
229	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD KKAEG
230	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD KKA E
231	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD KKA
232	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD K K
233	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD K
234	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD
235	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEK
236	GGKLSKKKKGYNVNDEKAKE
237	GGKLSKKKKGYNVNDEKAK
238	GGKLSKKKKGYNVNDEKA
239	GGKLSKKKKGYNVNDEK
240	GGKLSKKKKGYNVNDE
241	GGKLSKKKKGYNVND
169	GGKLSKKKKGYNVN
242	GGKLSKKKKGYNV
243	GGKLSKKKKGYN
244	GGKLSKKKKGY
245	GGKLSKKKKG
246	GGKLSKKKK
161	GGKLSKKK
157	GGKLSKK
247	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
248	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
249	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
250	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
251	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

252	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
253	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFK
254	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSF
255	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGFS
256	GAKKSKKRFSFKKSFKLSGF
257	GAKKSKKRFSFKKSFKLSG
258	GAKKSKKRFSFKKSFKLS
259	GAKKSKKRFSFKKSFKL
260	GAKKSKKRFSFKKSFK
261	GAKKSKKRFSFKKSF
179	GAKKSKKRFSFKKS
262	GAKKSKKRFSFKK
263	GAKKSKKRFSFK
264	GAKKSKKRFSF
265	GAKKSKKRFS
266	GAKKSKKRF
267	GAKKSKKR
268	GAKKSKK
269	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKEA
270	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKKE
271	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
272	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK
273	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKKN
274	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
275	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSFK
276	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFSF
277	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGFS
278	GAKKAKKRFSFKKSFKLSGF
279	GAKKAKKRFSFKKSFKLSG
280	GAKKAKKRFSFKKSFKLS
281	GAKKAKKRFSFKKSFKL
282	GAKKAKKRFSFKKSFK
283	GAKKAKKRFSFKKSF
284	GAKKAKKRFSFKKS
285	GAKKAKKRFSFKK
286	GAKKAKKRFSFK
287	GAKKAKKRFSF
288	GAKKAKKRFS
289	GAKKAKKRF

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

290	GAKKAKKR
291	GAKKAKK
292	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKK
293	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFK
294	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFSF
295	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGFS
396	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSGF
297	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLSG
298	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKLS
299	GAQESKKKKKKRFSFKKSFKL
300	GAQESKKKKKKRFSFKKSFK
301	GAQESKKKKKKRFSFKKSF
302	GAQESKKKKKKRFSFKKS
303	GAQESKKKKKKRFSFKK
304	GAQESKKKKKKRFSFK
305	GAQESKKKKKKRFSF
306	GAQESKKKKKKRFS
307	GAQESKKKKKKRF
308	GAQESKKKKKKR
309	GAQESKKKKKK
310	GAQESKKKKK
311	GAQESKKKK
312	GAQESKKK
313	GAQESKK
314	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNRK
315	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRNR
316	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKRN
317	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFKR
318	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSFK
319	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLSF
320	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGLS
321	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSGL
322	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLSG
323	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKLS
324	GSQSSKKKKKKFSFKKPFKL
325	GSQSSKKKKKKFSFKKPFK
326	GSQSSKKKKKKFSFKKPF
327	GSQSSKKKKKKFSFKKP
328	GSQSSKKKKKKFSFKK

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

329	GSQSSKKKKKKFSFK
330	GSQSSKKKKKKFSF
331	GSQSSKKKKKKFS
332	GSQSSKKKKKKF
333	GSQSSKKKKKK
334	GSQSSKKKKK
335	GSQSSKKKK
336	GSQSSKKK
337	GSQSSKK

10

【0271】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、本開示の配列のいずれかからなる、またはそれらから本質的になる。いくつかの態様において、本開示の足場は、表 1 に開示される配列からなる。いくつかの態様において、本開示の足場は、本明細書に開示される配列、例えば、膜アンカー（例えば、ミリスチン酸）に共有結合で取り付けられた表 1 に開示される配列からなる。いくつかの態様において、膜固定は、脂質化を介して実施し得る。いくつかの実施形態において、脂質化は、例えば、脂肪アシル化であり得る。いくつかの態様において、脂肪アセチル化は、例えば、ミリストイル化であり得る。いくつかの態様において、膜アンカーは、本明細書に開示される配列、例えば、表 1 に開示される配列の N 末端アミノ酸に共有結合で取り付けられる。いくつかの態様において、膜アンカーは、本明細書に開示される配列、例えば、表 1 に開示される配列の N 末端グリシンに共有結合で取り付けられる。したがって、いくつかの態様において、本開示の足場は、N-ミリストイル化された開示された配列、例えば、表 1 に開示された配列からなる。

20

【0272】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、N 末端 Met を含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、足場タンパク質の N 末端に脂質アンカーとして機能する脂質化アミノ酸、例えば、ミリストイル化アミノ酸を含む。いくつかの態様において、Gly における足場タンパク質の N 末端におけるアミノ酸残基。N 末端 Gly の存在は、N-ミリストイル化の要件である。いくつかの態様において、足場タンパク質の N 末端におけるアミノ酸残基は、合成である。いくつかの態様において、足場タンパク質の N 末端におけるアミノ酸残基は、グリシン類似体、例えば、アシルグリシン、ブチルグリシン、またはプロパルギルグリシンである。

30

【0273】

いくつかの態様において、脂質アンカーは、化学合成によって、または本開示の足場タンパク質の任意の N 末端アミノ酸に酵素的に取り付けられ得る。

【0274】

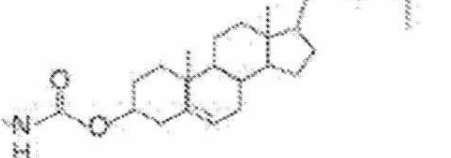
他の態様において、脂質アンカーは、当該技術分野で既知の任意の脂質アンカー、例えば、パルミチン酸またはグリコシルホスファチジルイノシトールであり得る。まれな状況下では、例えば、ミリスチン酸が制限されている培養培地を使用することによって、短鎖及び不飽和を含むいくつかの他の脂肪酸が、N 末端グリシンに取り付けられ得る。例えば、BK チャネルにおいて、ミリスチン酸塩は、ヒドロキエステル結合を介して内部セリン／トレオニンまたはチロシン残基に翻訳後に取り付けられることが報告されている。当該技術分野で既知の膜アンカーは、以下の表に提示される。

40

50

【表 2】

表 2

改変	改変基
S-パルミトイル化	
N-パルミトイル化	
N-ミリストイル化	
〇-アシル化	
ファルネシル化	
ゲラニルゲラニル化	
コレステロール	

【0275】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、配列番号1（MARCKS）、配列番号2（MARCKSL1）、または配列番号3（BASP1）の成熟形態、すなわち、配列番号1、配列番号2、または配列番号3に存在するN末端メチオニンアミノ酸なしと、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0276】

いくつかの実施形態において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、配列番号1（MARCKS）、配列番号2（MARCKSL1）、または配列番号3（BASP1）の成熟形態、すなわち、配列番号1、配列番号2、または配列番号3に存在するN末端メチオニンアミノ酸なしの機能的断片と、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0277】

いくつかの態様において、本開示の足場タンパク質に取り付けた生物学的に活性な分子は、EV（例えば、エクソソーム）の内腔側にある。

【0278】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、膜貫通ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、EV（例えば、エクソソーム）の内腔側に位置する足場タンパク質のEDドメインと、ペイロード、

例えば、生物学的に活性な分子との間に挿入される。したがって、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子は、E V（例えば、エクソソーム）の外部表面に固定される。

【0279】

いくつかの態様において、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、小胞外ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態において、小胞外ドメインは、膜貫通ドメインと生物学的に活性な分子との間に挿入される。

【0280】

いくつかの態様において、足場タンパク質は、少なくとも1つのリンカー、例えばペプチドリンカーを介して生物学的に活性な分子に連結される。いくつかの態様において、N Dは、両方のドメイン間に直接挿入されたリンカーによってE Dに連結される。いくつかの態様において、リンカーは、例えば、ペプチド結合または1つ以上のアミノ酸を含む。いくつかの態様において、リンカーは切断可能なリンカーを含む。いくつかの態様において、リンカーは柔軟なリンカーを含む。いくつかの態様において、リンカーは、自己崩壊性リンカーを含む。

【0281】

本開示の足場タンパク質と生物学的に活性な分子（例えば、治療活性を有する分子）との間の融合もまた使用され得る。例えば、融合タンパク質は、M A R C K S、M A R C K S L 1、B A S P 1などの足場タンパク質、またはそれらの改変、特にそれらの断片もしくは変異体、及びペイロード、例えば、生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）を含み得る。いくつかの態様において、融合タンパク質は、B A S P 1のアミノ末端の断片を含む足場タンパク質を含む。いくつかの態様において、生物学的に活性な分子は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド（DNA及び／またはRNA）、化学化合物、ウイルス、イオノフォア、イオノフォア用担体、チャネルもしくは細孔を形成する部分、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0282】

生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、融合タンパク質、または治療的化合物へのリンカーからなる群から選択され得る。生物学的に活性な分子（例えば、治療的化合物）はまた、ヌクレオチド、アミノ酸、脂質、炭水化物、または低分子であり得る。生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、抗体、酵素、リガンド、抗原（例えば、腫瘍抗原、または細菌、ウイルス、真菌、もしくは原生動物などの感染性薬剤由来の抗原）、受容体、抗菌ペプチド、転写因子、またはそれらの断片もしくは改変であり得る。

【0283】

ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子に融合またはコンジュゲートされた本開示の足場を含む融合タンパク質は、E V、例えば、エクソソームの内腔表面に取り付けられ得、例えば、E V、例えば、エクソソームに治療的活性を提供する。

【0284】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、ゲノム編集複合体の成分である。いくつかの実施形態において、該ゲノム編集複合体は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L -エフェクターヌクレアーゼまたはT A L E N）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、リコンビナーゼ、C R I S P R / C a s 9複合体、C R I S P R / C p f 1複合体、C R I S P R / C 2 c 1、C 2 c 2もしくはC 2 c 3複合体、C R I S P R / C a s YもしくはC a s X複合体、または当該技術分野で既知の任意の他の適切なC R I S P R複合体、または当該技術分野で既知の任意の他の適切なゲノム編集複合体またはそれらの任意の組み合わせである。

【0285】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、膜貫通ペプチドである。本明細書に記載の膜貫通ペプチドは、本明細書に記載の配列のいずれか、またはその任意の断片もしくは変異体への融合タンパク質として発現され得る。いくつかの実施形態において、膜貫通タンパク質は、E V例えば、エクソソームの内腔に

10

20

30

40

50

おける内腔配列に融合された第1の端部、及びEV、例えば、エクソソームの表面上に発現される第2の端部を有する。

【0286】

いくつかの実施形態において、例えば、本開示のEVは、第2の足場タンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、第2の足場タンパク質は、PTGFRNポリペプチド、BSGポリペプチド、IGSF2ポリペプチド、IGSF3ポリペプチド、IGSF8ポリペプチド、ITGB1ポリペプチド、ITGA4ポリペプチド、SLC3A2ポリペプチド、ATPトランスポーターポリペプチド、アミノペプチダーゼN (ANPEP) ポリペプチド、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼファミリー1 (ENPP1) ポリペプチド、ネプリリシン (MME) ポリペプチド、ニューロピリン-1 (NRP1) ポリペプチド、またはそれらの断片、変異体、もしくは誘導体を含む膜貫通タンパク質を含む。第2の足場タンパク質の非限定的な例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第10,195,290号及びPCT公開第WO2019/040920号に見出され得る。

10

【0287】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、核酸結合タンパク質である。いくつかの実施形態において、核酸結合タンパク質は、Dicer、Argonauteタンパク質、TRBP、MS2バクテリオファージコートタンパク質である。いくつかの実施形態において、核酸結合タンパク質は、1つ以上のRNAまたはDNA分子をさらに含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAは、miRNA、siRNA、ガイドRNA、lincRNA、mRNA、アンチセンスRNA、dsRNA、またはそれらの組み合わせである。

20

【0288】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、タンパク質-タンパク質相互作用系の一部である。いくつかの実施形態において、タンパク質間相互作用システムは、FRB-FKBP相互作用システム、例えば、Banaszynski et al., J Am Chem Soc. 2005 Apr 6; 127 (13): 4715-21に記載されるようなFRB-FKBP相互作用システムを含む。

【0289】

融合タンパク質は、EV、例えば、エクソソームの内腔表面を標的化され得、EV、例えば、エクソソームに治療的活性を提供し得る。

30

【0290】

いくつかの実施形態において、標的指向性部分を有する融合タンパク質が、使用される。例えば、融合タンパク質は、(i) MARCKS、MARCKSL1、BASP1などの足場タンパク質、またはそれらの断片、変異体、もしくは改変、及び(ii) 標的指向性部を含み得る。標的指向性部は、EV、例えば、エクソソームを使用した治療のために、EV、例えば、エクソソームを標的化するために使用され得る。いくつかの実施形態において、標的指向性部は、抗体またはその抗原結合断片である。

【0291】

抗体及びそれらの抗原結合断片は、抗体全体、ポリクローナル、モノクローナル及び組換え抗体、それらの断片を含み、一本鎖抗体、ヒト化抗体、マウス抗体、マウス-ヒト、マウス-霊長類、霊長類-ヒトモノクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、例えば、scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'、及びF(ab')₂、F(ab)₁、Fv、dAb及びFd断片などの抗体断片、ダイアボディ、ミニボディ、ラクダ抗体、ならびに抗体関連ポリペプチドをさらに含む。

40

【0292】

抗体及びそれらの抗原結合断片は、所望の生物学的活性または機能を呈する限り、二重特異性抗体及び多重特異性抗体も含む。抗体のモジュラーアーキテクチャは、60を超える異なる二重特異性抗体フォーマットを作製するために利用されている。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Spiess et al. (2015) Molecu

50

ar Immunology 67:95-106を参照されたい。したがって、いくつかの実施形態において、二重特異性抗体フォーマットは、crossMab、DAF（二重作用Fab）（2イン1）、DAF（4イン1）、DutaMab、DT-IgG、ノブインホール共通LC、ノブインホールアセンブリ、チャージペア、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ（Triomab）、LUZ-Y（2つのHCのヘテロ二本化を誘導する白血球ジッパーを備えた二重特異性抗体）、Fcab、Kλ-body、直交Fab、DVD-IgG（二重可変ドメインIgG）、IgG（H）-scFv、scFv-（H）IgG、IgG（L）-scFv、scFv-（L）IgG、IgG（L，H）-Fv、IgG（H）-V、V（H）-IgG、IgG（L）-V、V（L）-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody、DVI-IgG（4イン1）、ナノボディ、ナノボディーHSA、BiTE（二重特異性T細胞誘導体）、ダイアボディ、DART（二重親和性再標的化）、TandAb（タンデム抗体）、scダイアボディ、scダイアボディーCH3、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH3KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F（ab'）₂、F（ab'）₂-ScFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価HCAb、scダイアボディーFc、ダイアボディーFc、タンデムscFv-Fc、イントラボディ、Dock及びLock、ImmTAC、HSAbody、scダイアボディーHSA、タンデムscFv-トキシン、IgG-IgG、Cov-X-Body、ならびにscFv1-PEG-scFv₂から選択される。二重特異性抗体は、軽鎖または重鎖のいずれかのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかを追加の抗原結合単位で付加することによって、二重特異性のために操作された単一特異性抗体であり得る。これらの追加の抗原結合単位の代替としては、単一ドメイン抗体（対合されていないVLまたはVH）、対合抗体可変ドメイン（例えば、FvまたはscFv）、または操作されたタンパク質足場が挙げられる。二重特異性抗体定常ドメインの一部または全てを欠く多数の二重特異性断片形態は、当該技術分野で既知である。

【0293】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子（例えば、治療的ペプチド）は、本開示の足場タンパク質及びウイルスタンパク質を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態において、ウイルスタンパク質は、ウイルスキャプシド、エンベロープタンパク質、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、EV、例えば、エクソソームの内腔表面上に保持される完全なままのウイルスの集合を可能にする。

【0294】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、負のチェックポイント調節因子の阻害剤または負のチェックポイント調節因子の結合パートナーの阻害剤である。いくつかの実施形態において、負のチェックポイント調節因子は、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンチン含有タンパク質3（TIM-3）、B及びTリンパ球減衰因子（BTLA）、Ig及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIg抑制因子（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2，3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、ならびにCD73からなる群から選択される。

【0295】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、免疫原性タンパク質である。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、毒素、トキソイド、または毒素の非毒性変異体である。いくつかの実施形態において、毒素は、ジフテリア毒素である。いくつかの実施形態において、トキソイドは、破傷風トキソイドである。いくつかの実施形態において、ジフテリア毒素は、ジフテリア毒素の非毒性変異体である。

【0296】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、正の共刺激分子の活性化剤または正の共刺激分子の結合パートナーの活性化剤である。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子は、CD120a、CD120b、CD18、OX40、CD40、Fas受容体、M68、CD27、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、RANK、OCIF、TWEAK受容体、TACI、BAFF受容体、ATAR、CD271、CD269、AITR、TROY、CD358、TRAMP、及びXEDARからなる群から選択されるTNF受容体スーパーファミリーメンバーである。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子の活性化剤は、TNF α 、TNF-C、OX40L、CD40L、FasL、LIGHT、TL1A、CD27L、Siva、CD153、4-1BBリガンド、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITRリガンド、及びEDA-2からなる群から選択されるTNFスーパーファミリーメンバーである。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子は、CD28スーパーファミリー共刺激分子である。いくつかの実施形態において、CD28スーパーファミリー共刺激分子は、ICOSまたはCD28である。いくつかの実施形態において、正の共刺激分子の活性化剤は、ICOSL、CD80、またはCD86である。

10

【0297】

いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、以下からなる群から選択されるサイトカインである：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、及びIL-15。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、T細胞受容体（TCR）、T細胞共受容体、主要組織適合性複合体（MHC）、ヒト白血球抗原（HLA）、またはそれらの誘導体を含むタンパク質である。いくつかの実施形態において、生物学的に活性な分子は、腫瘍抗原を含むタンパク質である。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原は、アルファフェトプロテイン（AFP）、がん胎児性抗原（CEA）、上皮腫瘍抗原（ETA）、ムチン1（MUC1）、Tn-MUC1、ムチン16（MUC16）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（MAGE）、腫瘍タンパク質p53（p53）、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、プログラム死リガンド1（PD-L1）、プログラム死リガンド2（PD-L2）、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、メソテリン、VEGFR、アルファ葉酸受容体、CE7R、IL-3、がん精巣抗原、MART-1 gp100、及びTNF関連アポトーシス誘導リガンドからなる群から選択される。

20

30

【0298】

いくつかの態様において、本開示の生物学的に活性な分子及び足場タンパク質（例えば、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、配列番号4～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、または本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）、またはその改変、特にその断片もしくは変異体）を含む融合タンパク質は、足場タンパク質を欠く生物学的に活性な分子の発現と比較して、EV、例えば、エクソソームにおける生物学的に活性な分子の富化をもたらす。いくつかの態様において、本開示の生物学的に活性な分子及び足場タンパク質（例えば、N末端Mを有しないMARCKS、MARCKSL1、BASP1、N末端Mを有しない配列番号4～114、116～118、122～150もしくは180～190のアミノ酸配列、配列番号115もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1））を含む融合タンパク質は、足場タンパク質を欠く生物学的に活性な分子の発現と比較して、EV、例えば、エクソソームにおける生物学的に活性な分子の富化をもたらす。

40

【0299】

いくつかの実施形態において、本開示について有用な足場タンパク質は、配列番号4～109のうちのいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、または表1に開示される任意の配列を含む。いくつかの態様において、本開示について有用な足場タンパク質は、配

50

列番号4～109のいずれかを含み、足場タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、表1に開示される配列を含み、足場タンパク質はN末端Metを含まない。いくつかの態様において、本開示について有用な足場タンパク質は、N末端Mを有しないMARCKS、MARCKSL1、BASP1、N末端Mを有しない配列番号4～114、116～118、122～150、もしくは180～190のアミノ酸配列、配列番号115、もしくは118～121によってコードされるアミノ酸配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む。いくつかの態様において、本開示について有用な足場タンパク質は、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1を含み、足場タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、配列番号4～114、116～118、122～150、または180～190のアミノ酸配列を含み、足場タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、配列番号115または118～121によってコードされるアミノ酸配列を含み、足場タンパク質は、N末端Metを含まない。他の実施形態において、本開示について有用な足場タンパク質は、本明細書に開示される任意の配列を含むが、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない表1に開示される任意の配列のうちのいずれか1つではない。他の実施形態において、本開示について有用な足場タンパク質は、本明細書に開示される任意の配列を含むが、配列番号4～109のうちのいずれか1つを含まない。

【0300】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列MGXKLSKKKを有し、Xがアラニンまたは任意の他のアミノ酸であるペプチド（配列番号117）、または（M）（G）（ π ）（ ξ ）（ Φ/π ）（S/A/G/N）（+）（+）の配列を有するペプチドを含む足場タンパク質を含み、得られる融合タンパク質が、生物学的に活性な分子に接合したGXKLSKKK（配列番号425）または（G）（ π ）（ ξ ）（ Φ/π ）（S/A/G/N）（+）（+）を含むように、N末端Mが切断され、各括弧位置はアミノ酸を表し、 π は（Pro、Gly、Ala、Ser）からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 ξ は（Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、Arg）からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 Φ は（Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met）からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、（+）は（Lys、Arg、His）からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は（+）ではなく、6位は（+）でも（AspまたはGlu）でもない。いくつかの実施形態において、本開示について有用な足場タンパク質は、MGXKLSKKKではなく、Xはアラニンまたは任意の他のアミノ酸（配列番号117）であり、または（M）（G）（ π ）（ ξ ）（ Φ/π ）（S/A/G/N）（+）（+）の配列を有するペプチドではない。いくつかの実施形態において、本開示に有用な足場タンパク質は、MGXKLSKKKを含まず、Xはアラニンまたは任意の他のアミノ酸（配列番号117）であり、または（M）（G）（ π ）（ ξ ）（ Φ/π ）（S/A/G/N）（+）（+）の配列を有するペプチドを含まない。

【0301】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、（M）（G）（ π ）（X）（ Φ/π ）（ π ）（+）（+）または（G）（ π ）（X）（ Φ/π ）（ π ）（+）（+）の配列を有するペプチドを含む足場タンパク質を含み、各括弧位置は、アミノ酸を表し、 π は、（Pro、Gly、Ala、Ser）からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xは任意のアミノ酸であり、 Φ は（Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met）からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、（+）は（Lys、Arg、His）からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は（+）ではなく、6位は（+）でも（AspまたはGlu）でもない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、（G）（ π ）（X）（ Φ/π ）（ π ）（+）（+）の配列を有するペプチドを含む足場タンパク質を含み、足場タンパク質は、N末端M（例えば、N末端メチオニン）を

含まない。

【0302】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、(G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+) の配列を有するペプチドを含む足場タンパク質を含み、各括弧位置は、アミノ酸を表し、πは、(Pro、Gly、Ala、Ser) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xは任意のアミノ酸であり、Φは (Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+) は (Lys、Arg、His) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は (+) ではなく、6位は (+) でも (Asp または Glu) でもなく、配列は (M) (G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+) ではない。いくつかの態様において、足場タンパク質は、(G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+) の配列を有するペプチドを含み、足場タンパク質はN末端Metを含まない。

10

【0303】

いくつかの実施形態において、従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質は、CD9、CD63、CD81、PDGFR、GPIアンカータンパク質、LAMP2、LAMP2B、及びそれらの断片、変異体、または誘導体からなるリストから選択される。

【0304】

いくつかの実施形態において、エクソソームにおけるMARCKS、MARCKSL1、BASP1、または配列番号4～109のいずれかを含む融合タンパク質の富化は、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、配列番号4～109のいずれかを欠く融合タンパク質よりも、または従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質を含む融合タンパク質と比較して>2倍、>4倍、>8倍、>16倍、>25倍、>50倍、>100倍、>200倍、>500倍、>750倍、>1,000倍、>2,000倍、>5,000倍、>7,500倍、>10,000倍高い。いくつかの態様において、エクソソームにおけるN末端Mを有しないMARCKS、MARCKSL1、BASP1、N末端Mを有しない配列番号4～109のいずれか、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の配列、例えば、表1を含む融合タンパク質の富化は、N末端Mを有しないMARCKS、MARCKSL1、BASP1、N末端Mを有しない配列番号4～109のいずれか、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の配列、例えば、表1を欠く融合タンパク質よりも、または従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質を含む融合タンパク質と比較して、>2倍、>4倍、>8倍、>16倍、>25倍、>50倍、>100倍、>200倍、>500倍、>750倍、>1,000倍、>2,000倍、>5,000倍、>7,500倍、>10,000倍高い。

20

30

【0305】

いくつかの実施形態において、エクソソームにおけるMARCKS、MARCKSL1、BASP1、配列番号4～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質の富化は、MARCKS、MARCKSL1、BASP1、配列番号4～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を欠く融合タンパク質よりも、または従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質を含む融合タンパク質と比較して、少なくとも約2倍、少なくとも約4倍、少なくとも約6倍、少なくとも約8倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約14倍、少なくとも約16倍、少なくとも約18倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約35倍、少なくとも約40倍、少なくとも約45倍、少なくとも約50倍、少なくとも約60倍、少なくとも約70倍、少なくとも約80倍、少なくとも約90倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約750倍、少なくとも約1,000倍、少なくとも約1,500倍、少なくとも約2,000倍、少なくとも約2,500倍、少なくとも約3,000倍、少なくとも約3,500倍、少なくとも約4,000倍、少な

40

50

くとも約4,500倍、少なくとも約5,000倍、少なくとも約5,500倍、少なくとも約6,000倍、少なくとも約6,500倍、少なくとも約7,000倍、少なくとも約7,500倍、少なくとも約8,000倍、少なくとも約8,500倍、少なくとも約9,000倍、少なくとも約9,500倍、または少なくとも約10,000倍高い。

【0306】

いくつかの実施形態において、配列番号1~109のいずれかのタンパク質配列、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）は、融合タンパク質でEV、例えば、エクソソームを担持するのに十分である。

【0307】

いくつかの実施形態において、本明細書で新たに特定された外因性配列（例えば、生物学的に活性な分子）及びEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）を含む融合タンパク質を含む内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、当該技術分野で既知の従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、CD9、CD63、CD81、PDGFR、GPIアンカータンパク質、ラクタドヘリン、LAMP2、及びLAMP2B、それらの断片、またはそれらに結合するペプチド）にコンジュゲートされた外因性配列を含む、同様に操作されたEV、例えば、エクソソームよりも高い密度の融合タンパク質を有する。

【0308】

いくつかの実施形態において、本明細書で新たに特定されたEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）を含む融合タンパク質は、EV、例えば、エクソソーム、内腔表面において、従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質を使用して同様に改変された他のEV、例えば、エクソソーム、内腔表面における融合タンパク質よりも、2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0309】

いくつかの実施形態において、本明細書で新たに特定されたEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）を含む融合タンパク質は、EV、例えば、エクソソーム、内腔表面において、従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質を使用して同様に改変された他のEV、例えば、エクソソーム、内腔表面における融合タンパク質よりも、2~4倍、4~8倍、8~16倍、16~32倍、32~64倍、64~100倍、100~200倍、200~400倍、400~800倍、800~1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0310】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD9を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0311】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD63を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0312】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD81を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、8

10

20

30

40

50

00倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

【0313】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、PDGFRを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームにおいて、2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

【0314】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、GPIアンカータンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

10

【0315】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、ラクタドヘリンを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

【0316】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、LAMP2を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

20

【0317】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、LAMP2Bを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

30

【0318】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、従来のタンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

【0319】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKS、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質の変異体を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

40

【0320】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD9を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1、000倍またはより高い密度で存在する。

50

【0321】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD63を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0322】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD81を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

10

【0323】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、PDGFRを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0324】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、GPIアンカータンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

20

【0325】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、ラクタドヘリンを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

30

【0326】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、LAMP2を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0327】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、LAMP2Bを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

40

【0328】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、従来のタンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0329】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タ

50

ンパク質（例えば、MARCKSL1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質の変異体を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0330】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD9を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

10

【0331】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD63を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0332】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、CD81を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

20

【0333】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、PDGFRを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0334】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、GPIアンカータンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

30

【0335】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、ラクタドヘリンを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

40

【0336】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、LAMP2を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0337】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む

50

融合タンパク質は、LAMP2Bを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0338】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、従来のタンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームにおいて、2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0339】

いくつかの実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（例えば、BASP1、変異体、断片、断片の変異体、またはその改変）を含む融合タンパク質は、従来のEV、例えば、エクソソームタンパク質の変異体を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームタンパク質よりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0340】

いくつかの実施形態において、配列番号1~109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、CD9を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1~109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、CD9を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0341】

いくつかの実施形態において、配列番号1~109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、CD63を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1~109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、CD63を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0342】

いくつかの実施形態において、配列番号1~109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、CD81を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1~109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、CD81を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0343】

いくつかの実施形態において、配列番号1～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、PDGFRを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1～109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、PDGFRを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

10

【0344】

いくつかの実施形態において、配列番号1～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、GPIアンカータンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1～109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、GPIアンカータンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

20

【0345】

いくつかの実施形態において、配列番号1～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、ラクタドヘリンを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1～109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、ラクタドヘリンを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

30

【0346】

いくつかの実施形態において、配列番号1～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、LAMP2を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1～109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、LAMP2を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

40

【0347】

いくつかの実施形態において、配列番号1～109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、LAMP2Bを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1～109のいずれかを含

50

む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、LAMP2Btを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0348】

いくつかの実施形態において、配列番号1~109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、従来のタンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1~109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、従来のプロティエンを使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームよりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0349】

いくつかの実施形態において、配列番号1~109のいずれか、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列（例えば、表1）を含む融合タンパク質は、従来のEVタンパク質、例えば、エクソソームタンパク質の変異体を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームタンパク質よりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの態様において、EV、例えば、エクソソームは、配列番号1~109のいずれかを含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まず、融合タンパク質は、従来のEVタンパク質、例えば、エクソソームタンパク質を使用して同様に改変されたEV、例えば、エクソソームタンパク質よりも2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0350】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、当該技術分野で既知の内腔操作されたEV、例えば、エクソソームと比較して優れた特徴を示す。例えば、本明細書で提供される新たに特定されたEV、例えば、エクソソームタンパク質を使用することによって産生される内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、従来技術におけるEV、例えば、エクソソーム、例えば、従来のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質を使用して産生されるものと比較して、それらの内腔表面上でより多く富化された改変タンパク質を含む。

【0351】

さらに、本開示の内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、当該技術分野で既知の内腔操作されたEV、例えば、エクソソームと比較して、より素晴らしく、より特異的に、またはより制御された生物学的活性を有し得る。例えば、本明細書に記載のEV、例えば、エクソソーム、タンパク質またはその断片（例えば、BASP1またはその断片、変異体、もしくは誘導体などの本開示の足場）に融合したペイロード、例えば、治療的または生物学的に関連する外因性配列を含む内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、当該技術分野で既知の足場への融合よりも所望の操作された特徴のうちのより多くを有し得る。

【0352】

当該技術分野で既知の足場タンパク質としては、テトラスパニン分子（例えば、CD63、CD81、CD9など）、リソソーム関連膜タンパク質2（LAMP2及びLAMP2B）、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）、GPIアンカータンパク質、ラクタドヘリン及びそれらの断片、ならびにそれらのタンパク質またはその断片のいずれかに親和性を有するペプチドが挙げられる。疑いを避けるために、PTGFRN、BSG、IG

S F 2、I G S F 3、I G S F 8、I T G B 1、I T G A 4、S L C 3 A 2、A T P トランスポーター、またはそれらの断片もしくは変異体は、従来の E V、例えば、エクソソーム、タンパク質ではない。以前、外因性タンパク質の過剰発現は、内腔操作されたエクソソームを産生するために、外因性タンパク質のエクソソームへの確率的またはランダムな配置に依存した。これは、エクソソームにおける外因性タンパク質の低レベルで予測不可能な密度をもたらした。したがって、本明細書に記載の E V、例えば、エクソソームタンパク質及びその断片は、新規の E V、例えば、エクソソーム組成物及びその作製方法における重要な進歩を提供する。

【0353】

本明細書で提供する融合タンパク質は、本開示の足場タンパク質、例えば、M A R C K S、M A R C K S L 1、B A S P 1、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、及び追加のペプチドを含み得る。追加のペプチドは、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）またはその断片、変異体、または誘導体の N 末端または C 末端のいずれかに取り付けられ得る。

10

【0354】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供する融合タンパク質は、M A R C K S、M A R C K S L 1、B A S P 1、またはその断片、変異体、もしくは誘導体、及び 2 つの追加のペプチドなどの本開示の足場タンパク質を含む。2 つの追加のペプチドの両方は、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）、またはその断片、変異体、もしくは誘導体の N 末端または C 末端のいずれかに取り付けられ得る。いくつかの実施形態において、2 つの追加のペプチドの一方は、N 末端に取り付けられ、2 つの追加のペプチドの他方は、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）またはその断片、変異体、または誘導体の C 末端に取り付けられる。

20

【0355】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の内腔操作された細胞外小胞を生成する組成物及び方法は、ナノ小胞を含む。

【0356】

I V、内腔操作された E V、例えば、エクソソームの産生のための産生細胞

本開示の E V、例えば、エクソソームは、インビトロまたは対象の体液で成長した細胞から産生され得る。E V、例えば、エクソソームがインビトロ細胞培養から産生されるとき、様々な産生細胞、例えば、H E K 2 9 3 細胞は、本開示のために使用され得る。本明細書に記載される内腔操作された E V、例えば、エクソソームの産生に使用し得る追加の細胞型としては、間葉系幹細胞、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、及びがん細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0357】

したがって、本開示は、本開示の E V、例えば、エクソソームを産生する細胞を提供する。いくつかの実施形態において、1 つ以上のベクターを含み、ベクターは、足場タンパク質及びペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸配列は、足場タンパク質をコードし、第 2 の核酸配列は、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をコードする。いくつかの実施形態において、足場タンパク質をコードする核酸配列及びペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をコードする核酸配列は、単一のオープンリーディングフレーム内にあり、したがって、発現産物は、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子に融合された足場タンパク質を含む融合タンパク質であろう。いくつかの実施形態において、核酸配列は、プロモーターに作用可能に連結される。

40

【0358】

産生細胞は、内腔操作された E V、例えば、エクソソームを産生するための 1 つ以上の外因性配列を含むように遺伝子改変され得る。遺伝子改変産生細胞は、一過性または安定な形質転換によって外因性配列を含み得る。外因性配列は、プラスミドとして形質転換され得る。外因性配列は、標的部位またはランダム部位で、産生細胞のゲノム配列に安定的

50

に組み込まれ得る。いくつかの実施形態において、安定した細胞株は、内腔操作された E V、例えば、エクソソームの産生のために生成される。

【0359】

外因性配列は、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質をコードする内因性配列の内部、上流（5'末端）または下流（3'末端）に位置する、産生細胞のゲノム配列に挿入され得る。当該技術分野で既知の様々な方法は、産生細胞への外因性配列の導入のために使用され得る。例えば、様々な遺伝子編集方法（例えば、相同組換え、トランスポゾン媒介系、LoxP-Cre系、CRISPR/Cas9またはTALENを使用する方法）を使用して改変された細胞は、本開示の範囲内である。

【0360】

外因性配列は、本開示の足場タンパク質（例えば、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質、またはE V、例えば、エクソソーム、タンパク質の改変もしくは断片）をコードする配列を含み得る。足場タンパク質（例えば、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質）をコードする配列の追加のコピーはより高い密度のE V、例えば、エクソソーム、タンパク質を有する内腔操作されたE V、例えば、エクソソームを産生するために導入され得る。E V、例えば、エクソソーム、タンパク質の改変または断片をコードする外因性配列は、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質の改変または断片を含む内腔操作されたE V、例えば、エクソソームを産生するために導入され得る。親和性タグをコードする外因性配列は、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質に取り付けた親和性タグを含む融合タンパク質を含む内腔操作されたE V、例えば、エクソソームを産生するために導入され得る。

【0361】

いくつかの実施形態において、内腔操作されたE V、例えば、エクソソームは、同じまたは類似の産生細胞型から単離された天然E V、例えば、エクソソームよりも高い密度のE V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）を有する。いくつかの実施形態において、該E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）は、該内腔操作されたE V、例えば、エクソソーム上に、天然E V<、例えば、エクソソームよりも、2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、100倍、200倍、400倍、800倍、1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの実施形態において、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）は、内腔操作されたE V、例えば、エクソソーム上に、天然E V、例えば、エクソソームよりも、2~4倍、4~8倍、8~16倍、16~32倍、32~64倍、64~100倍、100~200倍、200~400倍、400~800倍、800~1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの実施形態において、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）を含む融合タンパク質は、該内腔操作されたE V、例えば、エクソソーム上に、天然E V、例えば、エクソソーム上の未改変E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）よりも、2~4倍、4~8倍、8~16倍、16~32倍、32~64倍、64~100倍、100~200倍、200~400倍、400~800倍、800~1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの実施形態において、E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）の断片または変異体は、内腔操作されたE V、例えば、エクソソーム上に、天然E V、例えば、エクソソーム上の未改変E V、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）よりも、2~4倍、4~8倍、8~16倍、16~32倍、32~64倍、64~100倍、100~200倍、200~400倍、400~800倍、800~1,000倍またはより高い密度で存在する。

【0362】

特定の実施形態において、MARCKS、MARCKSの断片もしくは変異体、またはそれらの改変は、該内腔操作されたE V、例えば、エクソソーム上に、該天然E V、例えば、エクソソーム上の未改変MARCKSよりも、2~4倍、4~8倍、8~16倍、16~32倍、32~64倍、64~100倍、100~200倍、200~400倍、400~800倍、800~1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態において、MARCKSL1、MARCKSL1の断片もしくは変異体、またはそれらの改変は、該内腔操作されたEV、例えば、エクソソーム上に、該天然EV、例えば、エクソソーム上の未改変MARCKSL1よりも、2～4倍、4～8倍、8～16倍、16～32倍、32～64倍、64～100倍、100～200倍、200～400倍、400～800倍、800～1,000倍またはより高い密度で存在する。いくつかの実施形態において、BASP1、BASP1の断片もしくは変異体、またはそれらの改変は、該内腔操作されたEV、例えば、エクソソーム上に、天然EV、例えば、エクソソーム上の未改変BASP1よりも、2～4倍、4～8倍、8～16倍、16～32倍、32～64倍、64～100倍、100～200倍、200～400倍、400～800倍、800～1,000倍またはより高い密度で存在する。

10

【0363】

いくつかの実施形態において、産生細胞は、追加の外因性配列を含むために、さらに改変される。例えば、追加の外因性配列は、内因性遺伝子発現を調節するか、またはペイロードとしてある特定のポリペプチドを含むエクソソームを産生するために含まれ得る。いくつかの実施形態において、産生細胞は、2つの外因性配列を含むように改変され、1つは、EV、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）、またはEV、例えば、エクソソーム、タンパク質（足場タンパク質）の改変もしくは断片をコードし、他方は、ペイロードをコードする。

【0364】

より具体的には、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、これらに限定されないが（1）ミリスチル化アラニンリッチプロテインキナーゼC基質（MARCKS）、（2）ミリスチル化アラニンリッチプロテインキナーゼC基質1（MARCKSL1）、及び（3）脳酸可溶性タンパク質1（BASP1）を含む1つ以上のエクソソーム内腔タンパク質（足場タンパク質）をコードする配列で形質転換された細胞から産生され得る。本明細書に記載される1つ以上のEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）のいずれかは、プラスミド、ゲノムに挿入された外因性配列、または合成メッセンジャーRNA（mRNA）などの他の外因性核酸から発現され得る。

20

【0365】

いくつかの実施形態において、1つ以上のEV、例えば、エクソソーム内腔タンパク質（足場タンパク質）は、その完全長の内因性形態をコードする外因性配列で形質転換された細胞で発現される。いくつかの実施形態において、そのような外因性配列は、配列番号1のMARCKSタンパク質、またはN末端Mを有しない対応する配列をコードする。ある特定の態様において、そのような外因性配列は、配列番号1のMARCKSタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、そのような外因性配列は、配列番号1のMARCKSタンパク質をコードし、外因性配列によってコードされるMARCKSタンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、そのような外因性配列は、配列番号2のMARCKSL1タンパク質、またはN末端Mを有しない対応する配列をコードする。ある特定の態様において、そのような外因性配列は、配列番号2のMARCKSL1タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、そのような外因性配列は、配列番号2のMARCKSL1タンパク質をコードし、外因性配列によってコードされるMARCKSL1タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、そのような外因性配列は、配列番号3のBASP1タンパク質またはN末端Mを有しない対応する配列をコードする。ある特定の態様において、そのような外因性配列は、配列番号3のBASP1タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、そのような外因性配列は、配列番号3のBASP1タンパク質をコードし、外因性配列によってコードされるBASP1タンパク質は、N末端Metを含まない。

30

40

【0366】

内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、これらに限定されないが（1）ミリスチル化アラニンリッチプロテインキナーゼC基質（MARCKS）、（2）ミリスチル化アラニンリッチプロテインキナーゼC基質1（MARCKSL1）、及び（3）脳酸

50

可溶性タンパク質1 (BASP1) を含む1つ以上のEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質 (足場タンパク質) の断片をコードするポリヌクレオチド配列で形質転換された細胞から産生され得る。

【0367】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、天然タンパク質のN末端から少なくとも5個、10個、50個、100個、200個、または300個のアミノ酸を欠くEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質 (例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの足場タンパク質) の断片をコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、天然タンパク質のC末端から少なくとも5個、10個、50個、100個、200個、または300個のアミノ酸を欠くEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質 (例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの足場タンパク質) の断片をコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、天然タンパク質のN末端及びC末端の両方から少なくとも5個、10個、50個、100個、200個、または300個のアミノ酸を欠くEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質 (例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの足場タンパク質) の断片をコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、天然タンパク質の1つ以上の機能的または構造的ドメインを欠くEV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質 (例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの足場タンパク質) の断片をコードする。

【0368】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号4~109のペプチド、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列 (例えば、表1) を含む。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号4~109のペプチド、または本明細書に開示される任意の足場タンパク質配列 (例えば、表1) を含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号13のペプチドを含む。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号13のペプチドを含み、融合タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列MGXKLSKKK (配列番号117) またはGXKLSKKK (配列番号425) を有するペプチドを含む足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質を含み、Xはアラニンまたは任意の他のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列GXKLSKKK (配列番号425) を有するペプチドを含む足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質を含み、Xはアラニンまたは任意の他のアミノ酸であり、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列GXKLSKKK (配列番号425) を有するペプチドを含む足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質を含み、Xはアラニンまたは任意の他のアミノ酸であり、融合タンパク質は、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、GXKLSKKK (配列番号425) のアミノ酸配列を含む足場タンパク質を含み、Xは、アラニンまたは任意の他のアミノ酸であり、足場タンパク質は、例えば、MGXKLSKKK (配列番号117) を含むアミノ酸配列のN末端にMetを有しない。他の実施形態において、融合タンパク質は、GXKLSKKK (配列番号425) のアミノ酸配列を含む足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質を含み、融合タンパク質は、MGXKLSKKKを含まない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、(M) (G) (π) (ξ) (Φ/π) (S/A/G/N) (+) (+) または (G) (π) (ξ) (Φ/π) (S/A/G/N) (+) (+) の配列を有するペプチドを含む足場タンパク質を含み、各括弧位置は、アミノ酸を表し、 π は、(Pro、Gly、Ala、Ser) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 ξ は、(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、His、Arg) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met) からなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れる任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は(+)ではなく、6位は(+)でも(AspまたはGlu)でもない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質、(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+)のアミノ酸配列を含み、融合タンパク質は、(M)(G)(π)(ξ)(Φ/π)(S/A/G/N)(+)(+)を含まない。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、((M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+)または((G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+)の配列を有するペプチドを含む足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質を含み、各括弧位置は、アミノ酸を表し、 π は、(Pro、Gly、Ala、Ser)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xは、任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val、Ile、Leu、Phe、Trp、Tyr、Met)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+)は、(Lys、Arg、His)からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は、(+)ではなく、6位は、(+)でも(AspまたはGlu)でもない。他の実施形態において、融合タンパク質は、(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+)のアミノ酸配列を含む足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質を含み、融合タンパク質は、(M)(G)(π)(X)(Φ/π)(π)(+)(+)を含まない。

【0369】

いくつかの実施形態において、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、EV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、足場タンパク質、例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などのエクソソーム内腔タンパク質）または1つ以上の異種タンパク質に融合したその断片もしくは改変をコードする配列で形質転換された細胞から産生され得る。いくつかの実施形態において、1つ以上の異種タンパク質は、EV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの足場タンパク質）またはその改変、特にその断片もしくは変異体のN末端に融合される。いくつかの実施形態において、1つ以上の異種タンパク質は、EV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの足場タンパク質）またはその改変、特にその断片もしくは変異体のC末端に融合される。いくつかの実施形態において、1つ以上の異種タンパク質は、EV、例えば、エクソソーム、タンパク質（例えば、MARCKS、MARCKSL1、またはBASP1などの足場タンパク質）またはその改変、特にその断片もしくは変異体のN末端及びC末端に融合される。いくつかの実施形態において、1つ以上の異種タンパク質は、哺乳類タンパク質である。いくつかの実施形態において、1つ以上の異種タンパク質は、ヒトタンパク質である。

【0370】

いくつかの実施形態において、内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、これらに限定されないが、

(1) ミリストイル化アラニンリッチプロテインキナーゼC基質(MARCKS)、

(2) ミリストイル化アラニンリッチプロテインキナーゼC基質1(基質(MARCKSL1)及び

(3) 脂酸可溶性タンパク質1(BASP1)を含む、天然EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質(足場タンパク質)の全長または断片と同一または類似の配列のポリペプチドをコードする配列で形質転換された細胞から産生される。

【0371】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質(足場タンパク質)の全長または断片に少なくとも約50%同一であり、例えば、配列番号1~3またはN末端Mを有しない対応する配列のいずれかに50%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質(足場タンパク質)の全長または断片に少なくとも約55%同一であり、例えば、配列番号1~3またはN末端Mを有しない対応する配列のいずれかに少なくと

10

20

30

40

50

も約 55% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 60% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 60% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 65% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 65% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 70% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 70% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 75% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 75% 同一である。いくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 80% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 80% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 85% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 85% 同一である。いくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 90% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 90% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 95% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 95% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、天然 EV、例えば、エクソソーム、内腔タンパク質（足場タンパク質）の全長または断片に少なくとも約 99% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 99.9% 同一であり、例えば、配列番号 1～3 または N 末端 M を有しない対応する配列のいずれかに少なくとも約 99.9% 同一である。

【0372】

いくつかの実施形態において、細胞から産生される内腔操作された EV、例えば、エクソソームは、脳酸可溶性タンパク質 1（BASP1）の断片と同一または類似の配列のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、BASP1 の全長または断片に少なくとも約 50% 同一であり、例えば、配列番号 4～109、N 末端 M を有しない対応する配列、または N 末端 M を有しない本明細書に記載の任意の BASP1 配列、例えば、表 1 に少なくとも約 50% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、BASP1 の全長または断片に少なくとも約 55% 同一であり、例えば、配列番号 4～109、N 末端 M を有しない対応する配列、または N 末端 M を有しない本明細書に記載の任意の BASP1 配列、例えば、表 1 に少なくとも約 50% 同一である。いくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、BASP1 の全長または断片に少なくとも約 60% 同一であり、例えば、配列番号 4～109、N 末端 M を有しない対応する配列、または N 末端 M を有しない本明細書に記載の任意の BASP1 配列、例えば、表 1 に少なくとも約 60% 同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、BASP1 の全長または断片に少なくとも約 65% 同一であり、例えば、配列番号 4～109、N 末端 M を有しない対応する配列、または N 末端 M を有しない本明細書に記載の任意の BASP1 配列、例えば、表 1 に少なくとも約 65% 同一である。いくつかの実施形態において、

ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約70%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約70%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約75%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約75%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約80%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約80%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約85%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約85%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約90%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約90%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約95%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約95%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約99%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約99%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約99.9%同一であり、例えば、配列番号4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約99.9%同一である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の断片に約100%同一であり、例えば、4～109、N末端Mを有しない対応する配列、またはN末端Mを有しない本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に約100%同一である。

【0373】

いくつかの実施形態において、細胞から産生される内腔操作されたEV、例えば、エクソソームは、脳酸可溶性タンパク質1（B A S P 1）の断片に同一または類似の配列のポリペプチドを含み、ポリペプチドは、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約50%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約50%同一であり、ポリペプチドは、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約55%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約50%同一であり、ポリペプチドは、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、該ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約60%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約60%同一であり、ポリペプチドは、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約65%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約65%同一であり、ポリペプチドは、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約70%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約70%同一であり、ポリペプチドは、N末端Metを含まない。いくつかの実施形態に

において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約75%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約75%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約80%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載される任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約80%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約85%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約85%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約90%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約90%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約95%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約95%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約99%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に少なくとも約99%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の全長または断片に少なくとも約99.9%同一であり、例えば、配列番号4～109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列（例えば、表1）に少なくとも約99.9%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、B A S P 1の断片に約100%同一であり、例えば、4-109または本明細書に記載の任意のB A S P 1配列、例えば、表1に約100%同一であり、ポリペプチドは、N末端M e tを含まない。

【0374】

V I . 作製方法

本開示のE V（例えば、エクソソーム）は、化学合成、組換えD N A技術、より大きな分子の生化学的または酵素的断片化、前述の組み合わせ、または任意の他の方法によって産生され得る。一実施形態において、本開示は、生物学的に活性な分子をE V（例えば、エクソソーム）にコンジュゲートする方法を提供する。方法は、生物学的に活性な分子を、上述のE V（例えば、エクソソーム）に連結することを含む。

【0375】

本開示のいくつかの実施形態において、E V、例えば、本開示のエクソソームは、上述の産生細胞を使用して製造され得る。したがって、本開示は、好適な条件下で本明細書に開示される産生細胞を培養し、本開示のE V、例えば、エクソソームを得ることを含む、E V、例えば、エクソソームの作製方法を提供する。

【0376】

他の実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、組換え技術で産生され得、その後、本開示のE V、例えば、エクソソームに組み込まれ得る。他の実施形態において、足場タンパク質のポリペプチド部分のみが、組換え技術で産生される。いくつかの実施形態において、組換え技術で産生された足場タンパク質のポリペプチド部分は、その後、膜アンカー（例えば、N末端ミリスチン酸）を組み込むために、例えば、化学的または酵素的に改変される。いくつかの実施形態において、半組換え技術で産生される足場タンパク質（すなわち、ポリペプチド部分の組換え産物を続く化学的または酵素的改変と組み合わせる）は、その後、本開示のE V、例えば、エクソソームに組み込まれる。

【0377】

他の実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク

質は、例えば、固相ペプチド合成を使用して化学的に産生され得、その後、本開示のEV、例えば、エクソソームに組み込まれ得る。他の実施形態において、足場タンパク質のポリペプチド部分のみが合成的に産生される。いくつかの実施形態において、合成的に産生された足場タンパク質のポリペプチド部分は、その後、膜アンカー（例えば、N末端ミリスチン酸）を組み込むために、例えば、化学的または酵素的に改変される。いくつかの実施形態において、半合成的に産生される足場タンパク質（すなわち、ポリペプチド部分の合成産物を続く化学的または酵素的改変と組み合わせる）は、その後、本開示のEV、例えば、エクソソーム中に組み込まれる。

【0378】

他の実施形態において、本開示の足場タンパク質、例えば、エクソソーム内腔タンパク質は、例えば、網膜細胞系などの無細胞発現を使用して、インビトロで産生され得、その後、本開示のEV、例えば、エクソソームに組み込まれ得る。他の実施形態において、足場タンパク質のポリペプチド部分のみが、インビトロで、例えば、無細胞系で産生される。いくつかの実施形態において、インビトロで、例えば、無細胞系で産生された足場タンパク質のポリペプチド部分は、その後、膜アンカー（例えば、N末端ミリスチン酸）を組み込むために、例えば、化学的または酵素的に改変される。いくつかの実施形態において、半インビトロで産生される足場タンパク質（すなわち、ポリペプチド部分のインビトロ産物を続く化学的または酵素的改変と組み合わせる）は、その後、本開示のEV、例えば、エクソソーム中に組み込まれる。

【0379】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、それらの産生及び精製の間に各収集された画分に含まれるEV、例えば、エクソソームを特徴付ける工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、EV、例えば、エクソソームの内容物は、研究及び特徴付けのために抽出され得る。いくつかの実施形態において、EV、例えば、エクソソームは、単離され、これらに限定されないが、サイズ、形状、形態、または核酸、タンパク質、代謝産物、及び脂質などの分子組成を含む測定基準によって特徴付けられる。

【0380】

VII. 医薬組成物及び投与方法

本開示は、対象への投与に適した、本明細書に記載のEV（例えば、エクソソーム）を含む薬学的組成物も提供する。医薬組成物は、概して、対象への投与に適した形態で、複数のEV（例えば、エクソソーム）に共有結合でまたは非共有結合で連結した、少なくとも1つのペイロード、例えば、生物学的に活性な分子と、薬学的に許容される賦形剤または担体と、を含む、複数のEV（例えば、エクソソーム）を含む。

【0381】

薬学的に許容される賦形剤または担体は、部分的に、投与される特定の化合物、同様に組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、複数のEV（例えば、エクソソーム）を含む医薬組成物の多種多様な好適な製剤が存在する。（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18th ed. (1990) 参照）。医薬組成物は、概して滅菌されて製剤化され、かつ米国食品医薬品局の全ての適正製造基準（GMP）規制に完全に準拠する。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、例えば、本明細書に記載のEV（例えば、エクソソーム）に共有結合で連結した小分子などの1つ以上の化学化合物を含む。

【0382】

いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、1つ以上の治療薬または診断薬及び本明細書に記載のEV（例えば、エクソソーム）を含む。ある特定の実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、薬学的に許容される担体において、1つ以上の追加の治療薬または診断薬と共投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）を含む薬学的組成物は、追加の治療薬または診断薬の投与の前に投与される。他の実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）を含む医薬組成物は、追加の治療薬

10

20

30

40

50

または診断薬の投与後に投与される。さらなる実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）を含む医薬組成物は、追加の治療薬または診断薬と同時に投与される。

【0383】

所望の純度を有する本開示のEV（例えば、エクソソーム）と、対象への投与に適した形態の薬学的に許容される担体または賦形剤と、を含む薬学的組成物が、本明細書に提供される。薬学的に許容される賦形剤または担体は、部分的には、投与される特定の化合物、同様に組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定され得る。したがって、複数の細胞外小胞を含む医薬組成物の多種多様な好適な製剤が存在する。（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005) 参照）。医薬組成物は、概して滅菌されて製剤化され、かつ米国食品医薬品局の全ての適正製造基準（GMP）規制に完全に準拠する。

【0384】

いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、1つ以上の治療薬または診断薬及び本明細書に記載のEV（例えば、エクソソーム）を含む。ある特定の実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、薬学的に許容される担体中で、1つ以上の追加の治療薬または診断薬と共に投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）を含む薬学的組成物は、追加の治療薬または診断薬の投与の前に投与される。他の実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）を含む医薬組成物は、追加の治療薬または診断薬の投与後に投与される。さらなる実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）を含む医薬組成物は、追加の治療薬または診断薬と同時に投与される。

【0385】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量及び濃度でレシピエント（例えば、動物またはヒト）に対して無毒であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤、防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム塩化物、ヘキサメトニウム塩化物、ベンザルコニウム塩化物、ベンゼトニウム塩化物、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール、メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール及びm-クレゾールなど）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸、単糖、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、ショ糖、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）、及び／またはTWEEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。

【0386】

担体または希釈剤の例は、これらに限定されないが、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンを含む。そのような媒体及び化合物の薬学的活性物質への使用は、当該技術分野において周知である。任意の従来の媒体または化合物が本明細書に記載の細胞外小胞と互換性がない場合を除き、その組成物中における使用が企図される。補充治療薬は、組成物中へと組み込まれることもできる。典型的には、医薬組成物は、その意図された投与経路と適合性があるように製剤化される。本開示のEV（例えば、エクソソーム）は、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、皮膚内、経皮、直腸、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、腫瘍内、筋肉内経路、または吸入剤として投与され得る。ある特定の実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）を含む薬学的組成物は、例えば、注射によって静脈内投与される。EV（例えば、エクソソーム）は、任意で、EV（例えば、エクソソーム）が意図された疾患、障害または状態を治療することに少なくとも部分的に有効である他の治療薬と組み合わせて投与され得る。

【0387】

溶液または懸濁液は、以下の成分、水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの滅菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌化合物、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などキレート化合物、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤、及び塩化ナトリウムまたはデキストロースのような張度調整のための化合物を含み得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調整され得る。調製物は、アンプル、ディスポーザブルシリンジ、またはガラスもしくはプラスチック製の複数の用量バイアルに封入し得る。

【0388】

注射可能な使用に好適な医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液及び滅菌粉末を含む。静脈内投与については、好適な担体は、生理学的生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N. J.）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。組成物は、概して滅菌され、容易に注射可能である程度の流体である。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含む、溶媒または分散液であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用、分散液の場合における必要な粒子サイズの維持、及び界面活性剤の使用によって維持し得る。微生物の作用の予防は、様々な抗菌及び抗真菌化合物、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。所望の場合、等張化合物、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、及び塩化ナトリウムは、組成物に添加され得る。注射用組成物の長期間の吸収は、吸収を遅らせる化合物、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされ得る。

【0389】

滅菌注射用溶液は、所望されるように、本明細書に列挙された成分の1つまたは組み合わせを有する有効量で適切な溶媒に本開示のEV（例えば、エクソソーム）を組み込むことによって調製され得る。概して、分散液は、EV（例えば、エクソソーム）を、基本的な分散媒及び任意の所望の他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法は、活性成分と、前もって滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分との粉末を生じる真空乾燥及び凍結乾燥である。EV（例えば、エクソソーム）は、EV（例えば、エクソソーム）の持続的または拍動性放出を可能にするような様式で製剤化され得る、デポー注射またはインプラント調製物の形態で投与され得る。

【0390】

本開示のEV（例えば、エクソソーム）を含む組成物の全身投与はまた、経粘膜手段によるものであり得る。経粘膜投与のために、バリアに浸透するのに適した浸透剤が、製剤に使用される。そのような浸透剤は、当該技術分野で一般に知られており、例えば、経粘膜投与用の、洗浄剤、胆汁塩、及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、例えば、鼻腔スプレーの使用を通じて達成されることができる。

【0391】

ある特定の実施形態において、本開示のEV（例えば、エクソソーム）を含む医薬組成物は、医薬組成物の恩恵を受けるであろう対象へと静脈内投与される。特定の他の実施形態において、組成物は、例えば、リンパ内注射もしくはリンパ節内注射（例えば、Sentietal., PNAS 105 (46) : 17908 (2008) 参照）、または筋肉内注射、皮下注射、腫瘍内注射、胸腺もしくは肝臓への直接注射によってリンパ系に投与される。

【0392】

ある特定の実施形態において、本開示のEV（例えば、エクソソーム）を含む薬学的組成物は、液体懸濁液として投与される。ある特定の実施形態において、医薬組成物は、投

10

20

30

40

50

与後にデポーを形成し得る製剤として投与される。ある特定の好ましい実施形態において、デポーは、EV（例えば、エクソソーム）を血液循環にゆっくり放出するか、またはデポー形態のままである。

【0393】

典型的には、薬学的に許容される組成物は、汚染物質を含まないように高度に精製され、生体適合性があり、毒性がなく、対象への投与に適している。水が担体の構成要素である場合、水は、汚染物質、例えば、エンドトキシンを含まないように高度に精製及び加工される。

【0394】

薬学的に許容される担体は、乳糖、デキストロース、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシ安息香酸塩、プロピルヒドロキシ安息香酸塩、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び／または鉱物油であり得るが、これらに限定されない。薬学的組成物は、潤滑剤、湿潤剤、甘味料、風味増強剤、乳化剤、懸濁剤及び／または保存料をさらに含み得る。

【0395】

本明細書に記載される医薬組成物は、本明細書に記載されるEV（例えば、エクソソーム）と、任意選択で、薬学的活性剤または治療薬、及び／または診断薬と、を含む。治療薬は、生物学的薬、小分子薬、または核酸薬であり得る。診断薬は、例えば、造影試薬で

【0396】

本明細書に記載されるEV（例えば、エクソソーム）を含む薬学的組成物が、提供される。いくつかの実施形態において、剤形は、静脈内注射用の液体懸濁液として製剤化される。いくつかの実施形態において、剤形は、腫瘍内注射用の液体懸濁液として製剤化される。

【0397】

ある特定の実施形態において、本開示のEV（例えば、エクソソーム）の調製物は、残留複製能のある核酸を破壊するために、例えば、X線、ガンマ線、ベータ粒子、アルファ粒子、中性子、陽子、元素核、紫外線のような放射線照射に供する。

【0398】

ある特定の実施形態において、本開示のEV（例えば、エクソソーム）の調製物は、1 kGy超、5 kGy超、10 kGy超、15 kGy超、20 kGy超、25 kGy超、30 kGy超、35 kGy超、40 kGy超、50 kGy超、60 kGy超、70 kGy超、80 kGy超、90 kGy超、100 kGy超、または100 kGy超の線量を使用するガンマ照射に供される。

【0399】

ある特定の実施形態において、本開示のEV（例えば、エクソソーム）の調製物は、0.1超、0.5超、1超、5超、10超、15超、20超、25超、30超、35超、40超、50超、60超、70超、80超、90超、100超、200超、300超、400超、500超、600超、700超、800超、900超、1000超、2000超、3000超、4000超、5000超、6000超、7000超、8000超、9000超、10000超または、の線量を使用するX線照射に供される。

【0400】

本開示のEV（例えば、エクソソーム）は、他の薬物と同時に使用され得る。具体的には、本開示のEV（例えば、エクソソーム）は、ホルモン治療薬、化学療法剤、免疫療法剤、細胞成長因子または細胞成長因子受容体の作用を阻害する薬剤などの薬剤と共に使用され得る。

【0401】

VIII. 治療用途

本開示は、本開示のEV（例えば、エクソソーム）を含む組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における疾患または状態を治療する方法を提供する。本開示はまた、本開示のEV（例えば、エクソソーム）を含む組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における疾患または状態の症状を予防または改善する方法を提供する。本開示のEV（例えば、エクソソーム）を含む組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象において疾患または状態を診断する方法も提供される。療法に使用するための、薬剤として使用するための、それを必要とする対象における疾患もしくは状態の治療に使用するための、それを必要とする対象における疾患もしくは状態の症状を予防もしくは改善するための、またはそれを必要とする対象における疾患もしくは状態を診断するための、本開示のEV（例えば、エクソソーム）も提供される。

10

【0402】

一実施形態において、疾患または障害は、がん、炎症性疾患、神経変性障害、中枢神経疾患、または代謝疾患である。

【0403】

本開示はまた、本明細書に開示されるEV（例えば、エクソソーム）を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における疾患または障害の予防及び／または治療方法を提供する。いくつかの実施形態において、本方法で治療され得る疾患または障害は、がん、移植片対宿主疾患（GVHD）、自己免疫疾患、感染疾患、または線維性疾患を含む。いくつかの実施形態において、治療は、予防的である。他の実施形態において、本開示のEV（例えば、エクソソーム）は、免疫応答を誘導するために使用される。他の実施形態において、本開示のEV（例えば、エクソソーム）は、対象にワクチン接種するために使用される。いくつかの実施形態において、疾患または障害は、がんである。

20

【0404】

いくつかの実施形態において、疾患または障害は、感染性疾患である。ある特定の実施形態において、疾患または障害は、発がん性ウイルスである。いくつかの実施形態において、本開示で治療され得る感染症は、これらに限定されないが、ヒトガンマヘルペスウイルス4（エプスタインバーウイルス）、インフルエンザAウイルス、インフルエンザBウイルス、サイトメガロウイルス、黄色ブドウ球菌、結核マイコバクテリウム、クラミジアトラコマチス、HIV-1、HIV-2、コロナウイルス（例えば、MERS-CoV及びSARS-CoV）、フィロウイルス（例えば、マールブルグ及びエボラ）、連鎖球菌、肺炎連鎖球菌、プラスモジア属（例えば、ピバクス及びファルシパルム）、チンガウイルス、ヒトパピローマウイルス（HPV）、B型肝炎、C型肝炎、ヒトヘルペスウイルス8、単純ヘルペスウイルス2（HSV2）、クレブシエラ属、緑膿菌、エンテロコッカス属、プロテウス属、エンテロバクター属、アクチノバクター属、コアグラエゼ陰性ブドウ球菌（CONS）、マイコプラズマ属、またはこれらの組み合わせを含む。

30

【0405】

いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、対象の循環系に静脈内投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、好適な液体に注入され、対象の静脈へと投与される。

【0406】

いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、対象の循環系に動脈内投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、好適な液体に注入され、対象の動脈へと投与される。

40

【0407】

いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、髄腔内投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、EVが脳脊髄液（CSF）に到達するように、脊柱管またはくも膜下腔への注射を介して投与される。

【0408】

いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、対象の1つ以上の腫

50

瘍へと腫瘍内投与される。

【0409】

いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、鼻腔内投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、局所投与または全身投与のいずれかの形態で、鼻を通して吸送され得る。ある特定の実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、鼻腔スプレーとして投与される。

【0410】

いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、腹腔内投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、好適な液体に注入され、対象の腹膜へと注射される。いくつかの実施形態において、腹腔内投与は、リンパ管へのEV（例えば、エクソソーム）の分布をもたらす。いくつかの実施形態において、該腹腔内投与は、胸腺、脾臓、及び／または骨髄へのEV（例えば、エクソソーム）の分布を生じる。いくつかの実施形態において、腹腔内投与は、1つ以上のリンパ節へのEV（例えば、エクソソーム）の分布をもたらす。いくつかの実施形態において、腹腔内投与は、頸部リンパ節、鼠径部リンパ節、縦隔リンパ節、または胸骨リンパ節のうちの1つ以上へのEV（例えば、エクソソーム）の分布をもたらす。いくつかの実施形態において、腹腔内投与は、膵臓へのEV（例えば、エクソソーム）の分布をもたらす。

10

【0411】

いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、眼周囲投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態において、EV（例えば、エクソソーム）は、眼周囲組織へと注射される。眼周囲薬物投与は、結膜下、前側テノン嚢下、後側テノン嚢下、及び球後投与の経路が含まれる。

20

【0412】

IX. キット

本開示はまた、本開示の1つ以上のEV（例えば、エクソソーム）及び任意で使用説明書を含むキットまたは製品を提供する。いくつかの実施形態において、キットまたは製造産物は、本開示の少なくとも1つのEV（例えば、エクソソーム）を含む本明細書に記載の薬学的組成物及び使用説明書を含む。

【0413】

いくつかの実施形態において、キットまたは製造産物は、1つ以上の容器中に本開示の少なくとも1つのEV（例えば、エクソソーム）またはEV（例えば、エクソソーム）を含む薬学的組成物を含む。当業者は、本開示のEV（例えば、エクソソーム）、本開示のEV（例えば、エクソソーム）を含む医薬組成物、またはそれらの組み合わせが、当該技術分野で周知の確立されたキット形式のうちの1つに容易に組み込まれ得ることを容易に認識するであろう。

30

【0414】

いくつかの実施形態において、キットまたは製造産物は、(i) EV（例えば、エクソソーム）、(ii) 1つ以上のペイロード、例えば、生物学的に活性な分子、(iii) 1つ以上のペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をEV（例えば、エクソソーム）に共有結合で取り付けするための試薬、または(iv) それらの任意の組み合わせ、及び1つ以上のペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をEV（例えば、エクソソーム）に共有結合で取り付けするための反応を行うための説明書を含む。

40

【0415】

いくつかの実施形態において、キットは、ペイロード、例えば、生物学的に活性な分子をEV（例えば、エクソソーム）にコンジュゲートするための試薬、及びコンジュゲーションを実施するための説明書を含む。

【0416】

本開示の実施は、別途示されない限り、当該技術分野内の、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来の技術を採用する。そのような技術は、文献で十分に説明されている。例えば、Sambro

50

ok et al., ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, NY)、D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II、Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis、Mullis et al. U. S. Pat. No. 4, 683, 195、Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization、Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription and Translation、Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.)、Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press) (1986)、Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning、The treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.)、Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory)、Wu et al., eds., Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155、Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London)、Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV、Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1986))、Crooke, Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2nd Ed. CRC Press (2007) and in Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) を参照されたい。

10

20

30

40

50

【表 A - 1】

配列		
配列番号	解説	配列
1		MGAQFSKTAACKGEAAAERPGEAAVA SSPSKANGQENGHVKVNGDASPA ESGAKEELQANGSAPAADKEEPAAA GSGAASPSAAEKGEPAAAAAPEAGA SPVEKEAPAEGEAAEPGSPTAAEGE AASAASSTSSPKAEDGATPSPSNET PKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNK KEAGEGGEAEAPAAEGGKDEAAGGA AAAAAEAGAASGEQAAAPGEEAAAG EEGAAGGDPQEAKPQEA AVAPEKPP ASDETKAAE EPSKVEEKKAEEAGAS AAACEAPSAAGPGAPPEQEAPAE PAAAAASSACAAPSQEAQPECSPEA PPAEAAE
2		MGSQSSKAPRGDVTAEAAAGASPAK ANGQENGHVKSNGDLS PKGEGESPP VNGTDEAAGATGDAIEPAPPSQGAE AKGEVPPKETPKKKKKFSFKKPKFL SGLSFKRNRKEGGGDSSASSPTEEE QEQGEIGACSDGTAQEGKAAATPE SQEPQAKGAEEASAASEEEAGPQATE PSTPSGPESGPTPASAEQNE
3		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAATEEEGTPKESEPQAAAEPAE AKEGKEKPDQDAEGKAEKEGEGKDA AAAKEEAPKAEPEKTEGAEEAKAEP PKAPEQEQAAPGPAAGGEAPKAAEA AAPAESAAPAAGEEPSKEEGEPKK TEAPAAPAAQETKSDGAPASDSKPG SSEAAPSSKETPAATEAPSSTPKAQ GPAASAE E PKPVEAPAANS DQTVTV KE
4		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAA
5		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AE
6		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDK
7		MGGKLSKKKKGYNVNDEKAKE
8		MGGKLSKKKKGYNVNDEK

10

20

30

40

50

【表 A - 2】

配列番号	解説	配列
9		MGGKLSKKKKGYNVN
10		MGGKLSKKKKGY
11		MGGKLSKKKKG
12		MGGKLSKKKK
13		MGGKLSKKK
14		MGGKLSKK
15		MGGKLSK
16		MGGKLAKK
17		MGGKFSKK
18		MGGKFAKK
19		MGGKSSKK
20		MGGKSAKK
21		MGGKQSKK
22		MGGKQAKK
23		MGGQLSKK
24		MGGQLAKK
25		MGGQFSKK
26		MGGQFAKK
27		MGGQSSKK
28		MGGQSAKK
29		MGGQQSKK
30		MGGQQAKK
31		MGAKLSKK
32		MGAKLAKK
33		MGAKFSKK
34		MGAKFAKK
35		MGAKSSKK
36		MGAKSAKK
37		MGAKQSKK
38		MGAKQAKK
39		MGAQLSKK
40		MGAQLAKK
41		MGAQFSKK
42		MGAQFAKK
43		MGAQSSKK
44		MGAQSAKK
45		MGAQQSKK
46		MGAQQAKK

10

20

30

40

50

【表 A - 3】

配列番号	解説	配列
4 7		M G S K L S K K
4 8		M G S K L A K K
4 9		M G S K F S K K
5 0		M G S K F A K K
5 1		M G S K S S K K
5 2		M G S K S A K K
5 3		M G S K Q S K K
5 4		M G S K Q A K K
5 5		M G S Q L S K K
5 6		M G S Q L A K K
5 7		M G S Q F S K K
5 8		M G S Q F A K K
5 9		M G S Q S S K K
6 0		M G S Q S A K K
6 1		M G S Q Q S K K
6 2		M G S Q Q A K K
6 3		M G G K L A K
6 4		M G G K F S K
6 5		M G G K F A K
6 6		M G G K S S K
6 7		M G G K S A K
6 8		M G G K Q S K
6 9		M G G K Q A K
7 0		M G G Q L S K
7 1		M G G Q L A K
7 2		M G G Q F S K
7 3		M G G Q F A K
7 4		M G G Q S S K
7 5		M G G Q S A K
7 6		M G G Q Q S K
7 7		M G G Q Q A K
7 8		M G A K L S K
7 9		M G A K L A K
8 0		M G A K F S K
8 1		M G A K F A K
8 2		M G A K S S K
8 3		M G A K S A K
8 4		M G A K Q S K

10

20

30

40

50

【表 A - 4】

配列番号	解説	配列
8 5		M G A K Q A K
8 6		M G A Q L S K
8 7		M G A Q L A K
8 8		M G A Q F S K
8 9		M G A Q F A K
9 0		M G A Q S S K
9 1		M G A Q S A K
9 2		M G A Q Q S K
9 3		M G A Q Q A K
9 4		M G S K L S K
9 5		M G S K L A K
9 6		M G S K F S K
9 7		M G S K F A K
9 8		M G S K S S K
9 9		M G S K S A K
1 0 0		M G S K Q S K
1 0 1		M G S K Q A K
1 0 2		M G S Q L S K
1 0 3		M G S Q L A K
1 0 4		M G S Q F S K
1 0 5		M G S Q F A K
1 0 6		M G S Q S S K
1 0 7		M G S Q S A K
1 0 8		M G S Q Q S K
1 0 9		M G S Q Q A K
1 1 0		M G A K L S K K K
1 1 1		M G G K L S K K K K G Y N V N D E K A K E K D K K A E G A A S G G S G G S D Y K D D D D K G G G S G M A S N F T Q F V L V D N G G T G D V T V A P S N F A N G I A E W I S S N S R S Q A Y K V T C S V R Q S S A Q N R K Y T I K V E V P K G A W R S Y L N M E L T I P I F A T N S D C E L I V K A M Q G L L K D G N P I P S A I A A N S G I Y

10

20

30

40

50

【表 A - 5】

配列番号	解説	配列
1 1 2		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASGGSGGSDYKDDDDKGGGSG MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSN FANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVR QSSAQKRKYTIKVEVPKGAWRSYLN MELTIPIFATNSDCELI VKAMQGLL KDGNPIPSAIAANSGLY
1 1 3		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASGGSGGSDYKDDDDKGGGSG MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSN FANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVR QSSAQNRKYTIKVEVPKGAWRSYLN MELTIPIFATNSDCELI VKAMQGLL KDGNPIPSAIAANSGLYGGSGSGGS GGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTV APSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVT CSVRQSSAQNRKYTIKVEVPKGAWR SYLNMELTIPIFATNSDCELI VKAM QGLLKDGNPIPSAIAANSGLY
1 1 4		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASGGSGGSDYKDDDDKGGGSG MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSN FANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVR QSSAQKRKYTIKVEVPKGAWRSYLN MELTIPIFATNSDCELI VKAMQGLL KDGNPIPSAIAANSGLYGGSGSGGS GGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTV APSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVT CSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKGAWR SYLNMELTIPIFATNSDCELI VKAM QGLLKDGNPIPSAIAANSGLY

10

20

30

40

50

【表 A - 6】

配列番号	解説	配列
1 1 5		a u g a a g c c c a c c g a g a a c a a c g a a g a c u u c a a c a u c g u g g c c g u g g c c a g c a a c u u c g c g a c c a c g g a u c u c g a u g c u g a c c g c g g g a a g u u g c c c g g c a a g a a g c u g c c g c u g g a g g u g c u c a a a g a g u u g g a a g c c a a u g c c c g g a a a g c u g g c u g c a c c a g g g c u g u c u g a u c u g c c u g u c c c a c a u c a a g u g c a c g c c c a a g a u g a a g a a g u u c a u c c c a g g a c g c u g c c a c a c c u a c g a a g g c g a c a a a g a g u c c g c a c a g g g c g g c a u a g g c g a g g c g a u c g u c g a c a u u c c u g a g a u u c c u g g g u u c a a g g a c u u g g a g c c c u u g g a g c a g u u c a u c g c a c a g g u c g a u c u g u g u g u g g a c u g c a c a a c u g g c u g c c u c a a a g g g c u u g c c a a c g u g c a g u g u u c u g a c c u g c u c a a g a a g u g g c u g c c g c a a c g c u g u g c g a c c u u u g c c a g c a a g a u c c a g g g c c a g g u g g a c a a g a u c a a g g g g g c c g g u g g u g a c u a a g g a u c c a u c g a u a a g c u u c a u c g a a a c a u g a g g a u c a c c c a u a u c u g c a g u c g a c a u c g a a a c a u g a g g a u c a c c c a u g u c u g c a g u c g a c a u c g a a a c a u g a g g a u c a c c c a u g u c u g c a g u c g a c a u c g a a a c a u g a g g a u c a c c c a u g u c u g c a g u c g a c a u c g a a a
1 1 6	Xは任意のアミノ酸である	MGXKL SKKK
1 1 7	Xはアラニンまたは任意の他のアミノ酸である	MGXKL SKKK
1 1 8	X1 = (G/A/S)、X2 = (K/Q)、X3 = (L/F/S/Q)、X4 = (S/A)	MGX1X2X3X4KK

10

20

30

40

50

【表 A - 7】

配列番号	解説	配列
1 1 9		t g g a g g t g c t c a a a g a g t t g
1 2 0		t t g g g c g t g c a c t t g a t
1 2 1		g g g c a t t g g c t t c
1 2 2		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGS VSKGEELFTG
1 2 3		MAGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGS VSKGEELFTG
1 2 4		MGAKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGS VSKGEELFTG
1 2 5		MAAKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGS VSKGEELFTG
1 2 6		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AESAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSK GEELFTG
1 2 7		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKS AGGGGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEE LFTG
1 2 8		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKESAGG GGSDYKDDDDKGGGGSVSKGEELFT G
1 2 9		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKSAGGGGS DYKDDDDKGGGGSVSKGEELFTG
1 3 0		MGGKLSKKKKKGYNVNSAGGGGSDYK DDDDKGGGGSVSKGEELFTG
1 3 1		MGGKLSKKKKKGYSAGGGGSDYKDDD DKGGGGSVSKGEELFTG
1 3 2		MGGKLSKKKSAGGGGSDYKDDDDKG GGGSVSKGEELFTG
1 3 3		MGGKLSAGGGGSDYKDDDDKGGGG SVSKGEELFTG
1 3 4		MGGSAGGGGSDYKDDDDKGGGGSVS KGEELFTG
1 3 5		MGGKLSKKKKKGYNVNDEKAKEKDKK AEGAASAGGGGSDYKDDDDKGGGGS VSKG

10

20

30

40

50

【表 A - 8】

配列番号	解説	配列
1 3 6		MGGKLSKKKKGYSSAGGGGSDYKDDD DKGGGGSVSKG
1 3 7		MGGKLSKKKKGSAGGGGSDYKDDDD KGGGGSVSKG
1 3 8		MGGKLSKKKKSAGGGGSDYKDDDDK GGGGSVSKG
1 3 9		MGGKLSKKKSAGGGGSDYKDDDDK GGGGSVSKG
1 4 0		MGGKLSKKSAGGGGSDYKDDDDKGG GGSVSKG
1 4 1		MGGKLSKSAGGGGSDYKDDDDKGGG GSVSKG
1 4 2		MGGKLSSAGGGGSDYKDDDDKGGGG SVSKG
1 4 3		MGGKLDKKKKGYNVNDEKAKEKD KKAEGAA
1 4 4		MGGKLAKKKKGYNVNDEKAKEKD KKAEGAA
1 4 5		MGGKQSKKKKGYNVNDEKAKEKD KKAEGAA
1 4 6		MGAKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFK KNKKEA
1 4 7		MAAKKKKKRFSFKKSFKLSGFSFK KNKKEA
1 4 8		MGAKKSKKRFSFKKSFKLSGFSFK KNKKEA
1 4 9		MGAKKAKKRFSFKKPFKLSGFSFK KNKKEA
1 5 0		MGGKLSKKKKSAGGSGGSTSGSDY KDDDDKGS GFEMDQVQLVESGGALV QPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWY RQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYED SVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSLK PEDTAVYYC NVNVGF EYWGQGTQVT VSS
1 5 1		KKKK
1 5 2		KKKKK
1 5 3		RRRR
1 5 4		RRRRR

10

20

30

40

50

【表 A - 9】

配列番号	解説	配列
1 5 5		(K/R) (K/R) (K/R) (K/R)
1 5 6		(K/R) (K/R) (K/R) (K/R) (K/R)
1 5 7		G G K L S K K
1 5 8		G A K L S K K
1 5 9		G G K Q S K K
1 6 0		G G K L A K K
1 6 1		G G K L S K K K
1 6 2		G G K L S K K S
1 6 3		G A K L S K K K
1 6 4		G A K L S K K S
1 6 5		G G K Q S K K K
1 6 6		G G K Q S K K S
1 6 7		G G K L A K K K
1 6 8		G G K L A K K S
1 6 9		G G K L S K K K K G Y N V N
1 7 0		G A K L S K K K K G Y N V N
1 7 1		G G K Q S K K K K G Y N V N
1 7 2		G G K L A K K K K G Y N V N
1 7 3		G G K L S K K K K G Y S G G
1 7 4		G G K L S K K K K G S G G S
1 7 5		G G K L S K K K K S G G S G
1 7 6		G G K L S K K K S G G S G G
1 7 7		G G K L S K K S G G S G G S
1 7 8		G G K L S K S G G S G G S V
1 7 9		G A K K S K K R F S F K K S
1 8 0		(M) (G) (G) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
1 8 1		(M) (G) (A) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
1 8 2		(M) (G) (S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
1 8 3		(M) (G) (G/A/S) (K) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
1 8 4		(M) (G) (G/A/S) (Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
1 8 5		(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L) (S/A) (K) (K)

10

20

30

40

50

【表 A - 10】

配列番号	解説	配列
186		(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (F) (S/A) (K) (K)
187		(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (S) (S/A) (K) (K)
188		(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (Q) (S/A) (K) (K)
189		(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S) (K) (K)
190		(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (A) (K) (K)
191		(G) (G) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
192		(G) (A) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
193		(G) (S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
194		(G) (G/A/S) (K) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
195		(G) (G/A/S) (Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
196		(G) (G/A/S) (K/Q) (L) (S/A) (K) (K)
197		(G) (G/A/S) (K/Q) (F) (S/A) (K) (K)
198		(G) (G/A/S) (K/Q) (S) (S/A) (K) (K)
199		(G) (G/A/S) (K/Q) (Q) (S/A) (K) (K)
200		(G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S) (K) (K)
201		(G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (A) (K) (K)
202		(G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K)
203		G G K L S K
204		G A K L S K
205		G G K Q S K
206		G G K L A K

10

20

30

40

50

【表 A - 1 1】

配列番号	解説	配列
2 0 7		KKKG
2 0 8		KKKGY
2 0 9		KKKGYN
2 1 0		KKKGYNV
2 1 1		KKKGYNVN
2 1 2		KKKGYS
2 1 3		KKKGYG
2 1 4		KKKG YGG
2 1 5		KKKGS
2 1 6		KKKGS S
2 1 7		KKKGS G
2 1 8		KKKGS GS
2 1 9		KKKS
2 2 0		KKKS G
2 2 1		KKKS GG
2 2 2		KKKS GGS
2 2 3		KKKS GGS G
2 2 4		KKSGGS GG
2 2 5		KKSGGS GGS
2 2 6		KRFSFKKS
2 2 7		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA EGAA
2 2 8		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA EGA
2 2 9		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA EG
2 3 0		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA E
2 3 1		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKKA
2 3 2		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDKK
2 3 3		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKDK
2 3 4		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEKD
2 3 5		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKEK
2 3 6		GGKLSKKKKGYNVNDEKAKE
2 3 7		GGKLSKKKKGYNVNDEKAK
2 3 8		GGKLSKKKKGYNVNDEKA
2 3 9		GGKLSKKKKGYNVNDEK
2 4 0		GGKLSKKKKGYNVNDE

10

20

30

40

50

【表 A - 1 2】

配列番号	解説	配列
2 4 1		G G K L S K K K K G Y N V N D
2 4 2		G G K L S K K K K G Y N V
2 4 3		G G K L S K K K K G Y N
2 4 4		G G K L S K K K K G Y
2 4 5		G G K L S K K K K G
2 4 6		G G K L S K K K K
2 4 7		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N K K E A
2 4 8		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N K K E
2 4 9		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N K K
2 5 0		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N K
2 5 1		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N
2 5 2		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F K K
2 5 3		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F K
2 5 4		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S F
2 5 5		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F S
2 5 6		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G F
2 5 7		G A K K S K K R F S F K K S F K L S G
2 5 8		G A K K S K K R F S F K K S F K L S
2 5 9		G A K K S K K R F S F K K S F K L
2 6 0		G A K K S K K R F S F K K S F K
2 6 1		G A K K S K K R F S F K K S F
2 6 2		G A K K S K K R F S F K K
2 6 3		G A K K S K K R F S F K
2 6 4		G A K K S K K R F S F
2 6 5		G A K K S K K R F S
2 6 6		G A K K S K K R F
2 6 7		G A K K S K K R
2 6 8		G A K K S K K
2 6 9		G A K K A K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N K K E A
2 7 0		G A K K A K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N K K E
2 7 1		G A K K A K K R F S F K K S F K L S G F S F K K N K K

10

20

30

40

50

【表 A - 1 3】

配列番号	解説	配列
2 7 2		GAKKAKKRFSFKKSGFSFKKN K
2 7 3		GAKKAKKRFSFKKSGFSFKKN
2 7 4		GAKKAKKRFSFKKSGFSFKK
2 7 5		GAKKAKKRFSFKKSGFSFK
2 7 6		GAKKAKKRFSFKKSGFSF
2 7 7		GAKKAKKRFSFKKSGFS
2 7 8		GAKKAKKRFSFKKSGF
2 7 9		GAKKAKKRFSFKKSG
2 8 0		GAKKAKKRFSFKKSL
2 8 1		GAKKAKKRFSFKKL
2 8 2		GAKKAKKRFSFKKSF
2 8 3		GAKKAKKRFSFKKS
2 8 4		GAKKAKKRFSFKKS
2 8 5		GAKKAKKRFSFKK
2 8 6		GAKKAKKRFSFK
2 8 7		GAKKAKKRFSF
2 8 8		GAKKAKKRFS
2 8 9		GAKKAKKRF
2 9 0		GAKKAKKR
2 9 1		GAKKAKK
2 9 2		GAQESKKKKKKRFSFKKSGFS FKK
2 9 3		GAQESKKKKKKRFSFKKSGFS FK
2 9 4		GAQESKKKKKKRFSFKKSGFS F
2 9 5		GAQESKKKKKKRFSFKKSGFS
2 9 6		GAQESKKKKKKRFSFKKSGF
2 9 7		GAQESKKKKKKRFSFKKSG
2 9 8		GAQESKKKKKKRFSFKKSL
2 9 9		GAQESKKKKKKRFSFKKL
3 0 0		GAQESKKKKKKRFSFKKSF
3 0 1		GAQESKKKKKKRFSFKKS
3 0 2		GAQESKKKKKKRFSFKKS
3 0 3		GAQESKKKKKKRFSFKK
3 0 4		GAQESKKKKKKRFSFK
3 0 5		GAQESKKKKKKRFSF

10

20

30

40

50

【表 A - 1 4】

配列番号	解説	配列
306		GAQESKKKKKKRFS
307		GAQESKKKKKKRF
308		GAQESKKKKKKR
309		GAQESKKKKKK
310		GAQESKKKKK
311		GAQESKKKK
312		GAQESKKK
313		GAQESKK
314		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGLSF KRNRK
315		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGLSF KRNR
316		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGLSF KRN
317		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGLSF KR
318		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGLSF K
319		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGLSF
320		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGLS
321		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSGL
322		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLSG
323		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFLS
324		GSQSSKKKKKKKFSFKKPKFL
325		GSQSSKKKKKKKFSFKKPK
326		GSQSSKKKKKKKFSFKKPF
327		GSQSSKKKKKKKFSFKKP
328		GSQSSKKKKKKKFSFKK
329		GSQSSKKKKKKKFSFK
330		GSQSSKKKKKKKFSF
331		GSQSSKKKKKKKFS
332		GSQSSKKKKKKF
333		GSQSSKKKKKK
334		GSQSSKKKKK
335		GSQSSKKKK
336		GSQSSKKK
337		GSQSSKK
338		GKFSKK

10

20

30

40

50

【表 A - 15】

配列番号	解説	配列
3 3 9		G G K F A K K
3 4 0		G G K S S K K
3 4 1		G G K S A K K
3 4 2		G G K Q A K K
3 4 3		G G Q L S K K
3 4 4		G G Q L A K K
3 4 5		G G Q F S K K
3 4 6		G G Q F A K K
3 4 7		G G Q S S K K
3 4 8		G G Q S A K K
3 4 9		G G Q Q S K K
3 5 0		G G Q Q A K K
3 5 1		G A K L A K K
3 5 2		G A K F S K K
3 5 3		G A K F A K K
3 5 4		G A K S S K K
3 5 5		G A K S A K K
3 5 6		G A K Q S K K
3 5 7		G A K Q A K K
3 5 8		G A Q L S K K
3 5 9		G A Q L A K K
3 6 0		G A Q F S K K
3 6 1		G A Q F A K K
3 6 2		G A Q S S K K
3 6 3		G A Q S A K K
3 6 4		G A Q Q S K K
3 6 5		G A Q Q A K K
3 6 6		G S K L S K K
3 6 7		G S K L A K K
3 6 8		G S K F S K K
3 6 9		G S K F A K K
3 7 0		G S K S S K K
3 7 1		G S K S A K K
3 7 2		G S K Q S K K
3 7 3		G S K Q A K K
3 7 4		G S Q L S K K
3 7 5		G S Q L A K K
3 7 6		G S Q F S K K

10

20

30

40

50

【表 A - 1 6】

配列番号	解説	配列
3 7 7		G S Q F A K K
3 7 8		G S Q S A K K
3 7 9		G S Q Q S K K
3 8 0		G S Q Q A K K
3 8 1		G G K F S K
3 8 2		G G K F A K
3 8 3		G G K S S K
3 8 4		G G K S A K
3 8 5		G G K Q A K
3 8 6		G G Q L S K
3 8 7		G G Q L A K
3 8 8		G G Q F S K
3 8 9		G G Q F A K
3 9 0		G G Q S S K
3 9 1		G G Q S A K
3 9 2		G G Q Q S K
3 9 3		G G Q Q A K
3 9 4		G A K L A K
3 9 5		G A K F S K
3 9 6		G A K F A K
3 9 7		G A K S S K
3 9 8		G A K S A K
3 9 9		G A K Q S K
4 0 0		G A K Q A K
4 0 1		G A Q L S K
4 0 2		G A Q L A K
4 0 3		G A Q F S K
4 0 4		G A Q F A K
4 0 5		G A Q S S K
4 0 6		G A Q S A K
4 0 7		G A Q Q S K
4 0 8		G A Q Q A K
4 0 9		G S K L S K
4 1 0		G S K L A K
4 1 1		G S K F S K
4 1 2		G S K F A K
4 1 3		G S K S S K
4 1 4		G S K S A K

10

20

30

40

50

【表 A - 17】

配列番号	解説	配列
4 1 5		G S K Q S K
4 1 6		G S K Q A K
4 1 7		G S Q L S K
4 1 8		G S Q L A K
4 1 9		G S Q F S K
4 2 0		G S Q F A K
4 2 1		G S Q S S K
4 2 2		G S Q S A K
4 2 3		G S Q Q S K
4 2 4		G S Q Q A K
4 2 5		G X K L S K K K

10

【実施例】

【0 4 1 7】

以下の実施例は、当業者に本開示を作成する及び使用する方法の完全なる開示ならびに説明を提供するように提案され、発明者がその開示と見なす範囲を限定することが意図されるものではなく、または、以下の実験が実行された全てもしくは唯一の実験であることを表すことが意図されるものではない。使用される数（例えば、量、温度など）に関しての正確性を確実にするために努力がなされてきたが、いくつかの実験誤差や偏差は説明されるべきである。

20

【0 4 1 8】

別途示されない限り、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は、摂氏温度であり、圧力は、大気圧であるか、または大気圧に近い。標準的な略語、例えば、b p、塩基対（複数可）；k b、キロベース（複数可）；p l、ピコリットル（複数可）；sまたはs e c、秒（複数可）；m i n、分（複数可）；hまたはh r、時間（複数可）；a a、アミノ酸（複数可）；n t、ヌクレオチド（複数可）などが使用され得る。

30

【0 4 1 9】

本開示の実施は、別途示されない限り、当技術分野の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技術、及び薬理学の従来の方法を採用する。そのような技術は、文献で十分に説明されている。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993)、A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition)、Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989)、Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.)、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 21th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005)、Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)を参照されたい。

40

【0 4 2 0】

実施例 1

内腔エクソソームペイロードを担持するために十分な最小タンパク質配列の同定

上述のように、担持を容易にした12個のアミノ酸切断及び、担持を容易にすることが

50

できなかった6個のアミノ酸切断の間の最小限のBASP1アミノ酸配列を同定するために、FLAG（登録商標）タグ及びGFPに融合したBASP1のN末端の個々の切断変異体が生成され、HEK293SF細胞内で安定して発現された（図1A）。エクソソームを上記の安定細胞培養物から精製した。7～12個のアミノ酸のBASP1配列は、エクソソーム中にGFPを高密度で担持することができたが、最初の6個のアミノ酸は担持しなかった（図1B）。これらのデータは、位置6の後の少なくとも1つのリジン残基が、BASP1のN末端を有するエクソソームの内腔担持、すなわち、エクソソームの内腔表面への取り付けのために必要であることを実証する。

【0421】

BASP1の6位のセリンは、種間ならびにMARCKS及びMARCKSL1において高度に保存されている。このアミノ酸がエクソソームへのペイロード担持に必要であったかどうかを判断するために、HEK293SF細胞は、BASP1 1-30-FLAG（登録商標）-GFPまたは点変異、セリン6をアスパラギン酸で（S6D；極性荷電置換）またはアラニン（S6A；小さな非極性置換）で置換していることを含むBASP1 1-30-FLAG（登録商標）-GFPをコードする発現プラスミドで安定にトランスフェクションされた。加えて、5位のリジンをグルタミン酸（L5Q）に変異させて、いくつかの膜関連タンパク質のミリスチル化、パルミトイル化、及び他の膜機能の調節におけるこの位置の潜在的な役割を試験した（Gottlieb-Abraham et al. Mol. Biol. Cell. 2016 Dec 1; 27(24): 3926-3936）（図2A）。BASP1 S6Dは、GFPのエクソソームへの担持を完全に廃止したが、S6Aは担持を変更しなかった。BASP1 L5Qも内腔担持に影響を与えず、6位の負の電荷が担持を中断する一方で、5位の極性アミノ酸置換が十分に許容されることを示した（図2B）。

【0422】

BASP1の最初の30個のアミノ酸は、上で同定されたN末端リーダー配列を含み、続いて、アミノ酸のリジン豊富な伸長を含む。MARCKS及びMARCKSL1N末端がBASP1と同様にエクソソームを担持し得るかどうかを理解するために、HEK293SF細胞は、MARCKS及びMARCKSL1全長タンパク質またはFLAG（登録商標）-GFPに融合したアミノ酸1～30で安定にトランスフェクションされた。精製されたエクソソームはSDSページ及びCOOMASSIE（登録商標）染色によって分析され、担持の程度を決定した。全長MARCKS及びMARCKSL1は、エクソソームにGFPを担持することができたが、アミノ酸1～30は全長タンパク質よりも劣っており、担持に必要なMARCKS及びMARCKSL1タンパク質の末梢領域に追加の構造的または配列特徴が存在することを示唆している（図3）。MARCKS及びMARCKSL1の配列分析は、BASP1のN末端に対する潜在的な配列相同性を有する領域を明らかにした。

【0423】

MARCKSのアミノ酸152～173及びMARCKSL1のアミノ酸87～110は、散在したフェニルアラニン及びセリン残基を有するリジンリッチであり、リン酸化部位ドメイン（PSD）またはエフェクタードメイン（ED）であると予測される（図4）。HEK293SF細胞は、MARCKSのアミノ酸1～3をPSDドメインに融合するプラスミド構築物（MG-PSD）で安定にトランスフェクションされた。個々の点変異は、予測されるミリスチル化部位（MA-PSD）及び6位（K6S及びK6A）で生成され、エクソソームの担持におけるこれらの残基の役割を判断した（図5A）。精製されたエクソソームのウエスタンブロットは、BASP1 1-30の陽性対照と比較して、MG-PSDもMA-PSDもエクソソームを効率的に担持することができなかったことを実証した。興味深いことに、K6A及びK6S変異は、担持の改善をもたらし、6位の正電荷がエクソソームペイロードの担持を防止し、MARCKSのPSDが内因性N末端配列に対して機能的に相補的であり得ることを示唆している（図5B）。合わせて、これらの研究は、ペイロードをエクソソームに担持するのに十分ないくつかのモチーフの同

10

20

30

40

50

定を可能にした（図6）。

【0424】

最も狭いモチーフ、モチーフ1は、(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号118) または第1のMetを有しない (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号202) のタンパク質配列を可能にし、各括弧文字または文字群はアミノ酸位置であり、さらに、5位は正荷電アミノ酸 (K/R/H) ではなく、6位は負荷電アミノ酸 (D/E) ではない。

【0425】

モチーフ1のサブモチーフとしては、限定するものではないが、タンパク質配列：

(M) (G) (G) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号180)

(G) (G) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号191)

(M) (G) (A) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号181)

(G) (A) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号192)

(M) (G) (S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号182)

(G) (S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号193)

(M) (G) (G/A/S) (K) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号183)

(G) (G/A/S) (K) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号194)

(M) (G) (G/A/S) (Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号184)

(G) (G/A/S) (Q) (L/F/S/Q) (S/A) (K) (K) (配列番号195)

(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L) (S/A) (K) (K) (配列番号185)

(G) (G/A/S) (K/Q) (L) (S/A) (K) (K) (配列番号196)

(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (F) (S/A) (K) (K) (配列番号186)

(G) (G/A/S) (K/Q) (F) (S/A) (K) (K) (配列番号197)

(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (S) (S/A) (K) (K) (配列番号187)

(G) (G/A/S) (K/Q) (S) (S/A) (K) (K) (配列番号198)

(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (Q) (S/A) (K) (K) (配列番号188)

(G) (G/A/S) (K/Q) (Q) (S/A) (K) (K) (配列番号199)

(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S) (K) (K) (配列番号189)

(G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (S) (K) (K) (配列番号200)

(M) (G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (A) (K) (K) (配列番号190) 及び

(G) (G/A/S) (K/Q) (L/F/S/Q) (A) (K) (K) (配列番号201)

5位は正荷電アミノ酸 (K/R/H) ではなく、6位は負荷電アミノ酸 (D/E) ではない。

【0426】

10

20

30

40

50

より広範なモチーフであるモチーフ2は、(M) (G) (π) (ξ) (Φ/π) (S/A/G/N) (+) (+) または、第1のMetを有しない (G) (π) (ξ) (Φ/π) (S/A/G/N) (+) (+) として表現され得、各括弧位置はアミノ酸を表し、 π は (Pro, Gly, Ala, Ser) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 ξ は、(Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、 Φ は、(Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+) は、(Lys, Arg, His) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、位置5は(+)ではなく、6は(+)でも (Asp または Glu) でもない。アミノ酸の命名法については、R. Aasland et al., FEBS Letters 513 (2002): 141-144を参照されたい。

10

【0427】

最も広いモチーフであるモチーフ3は、第1のMetなしで (M) (G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+) または第1のMetなしで (G) (π) (X) (Φ/π) (π) (+) (+) として表現され得、各括弧位置はアミノ酸を表し、 π は (Pro, Gly, Ala, Ser) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、Xは任意のアミノ酸であり、 Φ は (Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、(+) は (Lys, Arg, His) からなる群から選択される任意のアミノ酸であり、5位は(+)ではなく、6位は(+)でも (Asp または Glu) でもない。モチーフ1~3の全ての場合において、配列は、1つのアミノ酸によって切断されて、7個の総アミノ酸長 (すなわち、モチーフ1~3に示される順序でアミノ酸1~7からなる) とし得る。モチーフ1、2、または3のいずれかに由来する配列 (またはアミノ酸7を欠くこれらのモチーフ) のいずれかは、BASP1の全長BASP1またはBASP1の天然切断配列と同じ程度または同等にペイロードをエクソソームに担持するために使用され得る。アミノ酸配列-構造-機能のこの深い分析は、産生細胞によって生物学的に発現されたペイロードをエクソソームに導くための要件についての新たな洞察を提供する。

20

【0428】

実施例2

BASP1のN末端は、多様なクラスのタンパク質を担持するのに十分である

30

実施例1における結果は、BASP1のN末端が、産生細胞から直接内腔に担持されたエクソソームを生成するための足場を操作するのに有益であり得ることを示唆する。この仮説を試験するために、BASP1のアミノ酸1~30または1~10に融合したコドン最適化を有する全長Cas9タンパク質を発現するための安定したHEK293SF細胞を生成した (Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nat Biotechnol. 2015 Feb; 33 (2): 139-42に記載されている)。エクソソームは、上述の細胞培養物から精製され、抗Cas9抗体 (Abcam; Catalog # ab191468、クローン7A9-3A3) を使用してSDS-PAGE及びウエスタンブロットによって分析された。図7Aに示されるように、BASP1 1-30及び1-10の両方は、エクソソームにおいてCas9を担持するのに十分であった。組換えCas9タンパク質を、ウエスタンブロットの陽性対照として使用した。ウエスタンブロット実験からの様々な量の組換えCas9及びBASP1-Cas9エクソソームレーンの密度計量及び比較は、エクソソームがエクソソームあたり4~5個のCas9分子で担持されたことが明らかになった (図7B)。質量で約160kDaであるこのCas9酵素は、上記に示されるGFP実験と比較して、ペイロードサイズの著しい増加を表す。

40

【0429】

BASP1のN末端への融合物として担持され得るペイロードタンパク質の多様性の追

50

加の検証として、オボアルブミンが、HEK293SF細胞内で、BASP1のアミノ酸1～10への融合物（「BASP1（1～10）-OVA」）として安定に発現された。別個の細胞株は、同じプラスミド及び第2の選択マーカーを使用して、エクソソーム特異的表面糖タンパク質PTGFRNに融合した3量体CD40L（「3×CD40L-PTGFRN」）をコードする第2のプラスミドで共トランスフェクションされた。エクソソームは、2つのトランスフェクションした細胞培養物から精製され、SDS-PAGE（図8A）及び抗オボアルブミンウエスタンブロット（Abcam；カタログ番号ab17293、クローン6C8）によって分析された（図8B）。対照として、組換えオボアルブミン（InvivoGen；カタログ番号vac-pova）が別個のゲル中で滴定された。オボアルブミンは、単一構築物としてBASP1のアミノ酸1～10に融合したとき、または追加の過剰発現プラスミド（3×CD40L-PTGFRN）と組み合わせるときに、エクソソームに強力に担持された。この結果は、エクソソームが、内腔ペイロード及び別個の転写産物からの同時表面ペイロード（例えば、PTGFRN）の両方で組み合わせて操作され得ることを実証する。

【0430】

治療的エクソソームの文脈において有用であり得る別のクラスのタンパク質は、抗体及び抗体断片である。GFPを標的とする一本鎖ラクダナノボディ（Caussinus E, Kanca O, Affolter M. *Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody*. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Dec 11; 19 (1): 117-21 に記載されている）は、HEK293SF細胞において、BASP1のアミノ酸1～10及びFLAG（登録商標）タグ（「BASP1（1-10）-ナノボディ」）またはFLAG（登録商標）タグ単独（「ナノボディ」）への融合タンパク質として安定に発現された（図9A）。精製されたエクソソームは、SDS-PAGE及び抗FLAG（登録商標）ウエスタンブロットによって分析され、ナノボディがBASP1のN末端に融合されたときに、等量的全担持タンパク質でナノボディの実質的な富化があったことを実証した（図9B）。これらの結果は、多様なクラスのタンパク質ペイロードが、BASP1のN末端に由来する非常に短いタンパク質配列、すなわち足場を使用して、産生細胞によって発現され、エクソソームにパッケージ化され得ることを実証する。

【0431】

実施例3

BASP1のN末端は、エクソソームの内腔において核酸を担持するために使用され得る核酸、及び特にRNA（例えば、mRNA、siRNA、miRNA）は、治療的エクソソームの内腔に担持される治療的ペイロードの魅力的なクラスである。RNAのエクソソーム担持は、細胞外環境中の分解からRNAを保護し得、担持されたエクソソームは、さらなるレベルのエクソソーム操作、例えば、標的指向性構築物の表面発現を通じて、特定の細胞及び／または組織に向けられ得る。上記で同定されたEV、例えば、エクソソームタンパク質（またはタンパク質断片）が、mRNA担持エクソソームを生成するために使用され得るかどうかを理解するために、組み合わせ操作されたエクソソームが生成された。図10に示されるように、BASP1のアミノ酸1～30は、FLAG（登録商標）及びファージタンパク質MCPの変異体への融合物として発現された。MCPは、MS2と呼ばれるmRNAステムループを認識して、結合し、mRNA及び他のRNAへの転写融合物として発現され得、したがって、目的のMCP融合タンパク質及びMS2融合RNAの間の物理的会合を促進する。変異分析は、MCPにおけるMS2に対する親和性を増加させる2つの位置、すなわち、29位でのイソロイシンのバリンへの置換（V29I；Lim&Peabody, *RNA. Nucleic Acids Res*. 1994 Sep 11; 22 (18): 3748-52）、及び55位でのアスパラギンのリジンへの置換（N55K, Lim et al., *J Biol Chem*. 1994 Mar 25; 269 (12): 9006-10）を以前に特定した。BASP1 1-30は単量体または二量体MCP変異体に融合され、各MCPはV29Iまたは二重変異V29I/N5

5 Kのいずれかであった。ルシフェラーゼレポーター構築物は、別個のプラスミドからの3つのMS2ステムループとの融合物として、発現された。ルシフェラーゼ-MS2単独(#811)またはBASP1-MCP変異体の各々と組み合わせ(#815、817、819、または821)のいずれかの5つの安定したHEK293SF細胞株が生成された(図10)。追加の対照として、HEK293SF細胞はFLAGタグ付きBASP11-27で安定にトランスフェクションされた。エクソソームは単離され、ベンゾナーゼ(登録商標)で処理され、任意の外部関連mRNAを除去し、上記の方法に従って精製した。精製されたエクソソームはSDS-PAGE(図11A)及び抗FLAG(登録商標)ウエスタンブロット(図11B)によって分析され、各エクソソーム調製物中の等量の総タンパク質及び同等レベルのBASP1-FLAG(登録商標)融合物を実証した。重要なことに、BASP1-MCP融合物は、MCPタンパク質を欠くBASP11-27FLAG融合物として同等レベルに発現し、MCPモノマーまたは二量体の添加がエクソソームにおけるタンパク質のBASP1媒介担持を破壊しないことを実証した。

【0432】

BASP1-MCP及びルシフェラーゼ-MS2mRNAを安定して発現する細胞が単離され、総ルシフェラーゼmRNAはRT-qPCR(FWDプライマー:5'-TGGA GGTGCTCAAAGAGTTG-3'(配列番号119)、REVプライマー:5'-TTGGGCGTGCACTTGAT-3'(配列番号120)、プローブ:5'-/56-FAM/CAGCTTTCC/ZEN/GGGCAATTGGCTTC/3IABkFQ-/3'(配列番号121))によって定量化した。未トランスフェクション細胞は、ルシフェラーゼの同等レベルを発現した811発現細胞の全てよりも低いレベルのルシフェラーゼを発現した(図12A、上部)。安定した細胞株の各々からの精製されたエクソソームも、RT-qPCRによって分析された。天然エクソソームは、検出可能なレベルのルシフェラーゼMS2を有さず、一方、811単独を発現する細胞は、検出可能であるが、非常に低いレベルのルシフェラーゼMS2を有した。重要なことに、BASP1-MCP融合タンパク質の各々は、より多くの量のルシフェラーゼ-MS2mRNAを含み、mRNAのエクソソームへの担持を容易にするためのMCP及びMS2の間の結合の重要性を実証した(図12A、下部)。群間の相対mRNAの定量化は、811単独に対して全てのBASP1-MCP融合物について約30~60倍の富化を示した(図12B)。二量体MCP V29I/N55Kを含んだBASP1-MCP構築物821は、MS2mRNAに対して最大の親和性を有すると予測され、実際には、この実験において最大量のルシフェラーゼ-MS2を含んだ。これらの結果は、BASP1断片が、核酸を含む多様なペイロードをエクソソームの内腔に担持するための堅牢で多目的な足場タンパク質であることを実証する。

【0433】

実施例4

BASP1、MARCKS、及びMARCKSL1は、表面装飾エクソソームを生成するために使用され得る

以前の実験の結果は、MARCKS、MARCKSL1、及びBASP1の全長及びN末端領域が、内腔担持エクソソームを生成するために使用され得ることを実証する。エクソソーム操作のためのこれらのタンパク質の可能性をさらに探索するために、MARCKS、MARCKSL1及びBASP1のアミノ酸1~30、またはBASP1のアミノ酸1~10は、ホモトリマーとして発現するCD40Lの内因性膜貫通領域に融合された。リガンドが他の種の同族受容体と交差反応しないため、CD40Lのヒト及びマウス配列の両方について構築物が調製された(図13)。エクソソームは、CD40L発現構築物の1つで安定にトランスフェクションされたHEK293SF細胞から精製され、マウスまたはヒトB細胞のいずれかでインキュベートされた。エクソソーム上の入力CD40Lの量は、CD40L ELISA(ヒトCD40Lの測定について、R&D Systems、カタログ番号DCDL40、ロット番号P168248、及び、マウスCD40Lの測定について、Abcam、カタログ番号ab119517、ロット番号GR32188

10

20

30

40

50

50-2が使用された)によって定量化され、B細胞はB細胞マーカーを使用して定量化され、CD19、及びB細胞活性化は、CD69に対して陽性のゲート細胞の割合によって測定された。種適合培養物中のマウス(図14A)またはヒト(図14B)エクソソームCD40Lの用量滴定曲線は、粒子間ベース構築物間で(左のグラフ及び下の表)または互いに及びCD40Lモルベースで等量の組換えタンパク質と比較して、同等の活性を示した(右のグラフ及び下の表)。CD40L構築物が同様にモノマーとして発現された場合、同等の活性が観察され、高密度エクソソーム表示足場であるPTGFRNのN末端に発現する3量体CD40Lよりもわずかに強力ではなかった。(例えば、国際特許出願第PCT/US2018/048026号参照)(図14C)。これらの結果は、MARCKS、MARCKSL1、及びBASP1が、ヒト及び動物用途での使用のための様々なクラスの操作されたエクソソームの生成に有用な多様で堅牢な足場であることを実証する。

【0434】

実施例5

多様な細胞型は、BASP1、MARCKS、及び/またはMARCKSL1を発現する異なる起源組織(HEK293、腎臓、HT1080、結合組織、K562、骨髄、MDA-MB-231、乳房、Raji、リンパ芽細胞)由来の細胞株が、対数増殖期にまで増殖させ、化学的に定義された培地で増殖させたHEK293細胞を除き、約6日間エクソソーム欠失血清を補充した培地に移した。骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を3Dマイクロキャリア上で5日間増殖させ、無血清培地中で3日間補充させた。各細胞株培養物から上清が単離され、上記のOptiprep(商標)密度勾配超遠心分離方法を使用して、エクソソームが精製された。精製されたエクソソーム調製物の各々は、上記のLC-MS/MSによって分析され、BASP1、MARCKS、及びMARCKSL1、ならびに広く研究された2つのEV、例えば、エクソソームタンパク質(CD81及びCD9)についてペプチドスペクトルマッチ(PSM)の数が定量された。テトラスパニンCD81及びCD9は、ほとんどの精製されたエクソソーム集団において検出可能であったが、場合によっては、内腔EV、例えば、エクソソーム、タンパク質(例えば、CD9をBASP1またはMARCKSL1と比較すると同等以下であった(図15)。この発見は、新たに同定された内腔エクソソームマーカーが、異なる組織に由来するいくつかの無関係な細胞株から操作されたエクソソームを生成するための好適な融合タンパク質であり得ることを示す。

【0435】

実施例6

BASP1を過剰発現する非ヒト細胞は、内腔操作されたエクソソームを産生する実施例5における結果は、多数のヒト由来細胞がBASP1及び他の新規EVを自然に発現することを実証する。BASP1がユニバーサルエクソソーム足場タンパク質として使用され得るかどうかを決定するために、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、FLAG(登録商標)タグ及びGFPに融合した全長BASP1を発現するプラスミド(「BASP1-GFP-FLAG」)、FLAG(登録商標)タグ及びGFPに融合したBASP1のアミノ酸1~30を発現するプラスミド(「BASP1(1-30)-GFP-FLAG」)、またはFLAG(登録商標)タグ及びGFPに融合したBASP1のアミノ酸1~8を発現するプラスミド(「BASP1(1-8)-GFP-FLAG」)のいずれかで安定にトランスフェクションされた。エクソソームは、野生型CHO細胞から精製され、3つのBASP1プラスミドのうちの1つでトランスフェクションされたCHO細胞を精製した。図16A~図16Bに示されるように、BASP1及びBASP1断片融合タンパク質は、CHO細胞において過剰発現に成功し、無染色PAGE(図16A)及びFLAG(登録商標)に対する抗体を用いたウェスタンブロットによって検出されるようにエクソソームに担持された(図16B)。この結果は、CHO細胞などの非ヒト細胞が、ヒトBASP1断片を過剰発現するエクソソームを産生することができ、この過剰発現が、高密度でエクソソームの内腔にペイロードタンパク質を駆動し得ることを

実証する。この結果は、B A S P 1 が、多くの異なる細胞型及び種から操作されたエクソソームを生成するための普遍的足場タンパク質であることを示す。

【0436】

詳細説明セクションが、概要及び要約セクションではなく、特許請求の範囲を解釈するために使用されることが意図されることを理解されたい。概要及び要約セクションは、発明者（複数可）によって企図される本開示の全てではないが1つ以上の例示的な実施形態を記載し得、したがって、本開示及び添付の特許請求の範囲をいかなる方法でも限定することを意図するものではない。

【0437】

本開示は、特定の機能の実装及びその関係を例示する機能的構築ブロックを用いて上述されている。これらの機能的構築ブロックの境界は、説明の便宜のために本明細書で任意に定義されている。代替の境界は、特定の機能及びそれらの関係が適切に実行される限り、定義され得る。

【0438】

参照による組み込み

本出願に引用された全ての刊行物、特許、特許出願、及び他の文書は、個々の刊行物、特許、特許出願、または他の文書が全ての目的のために参照により組み込まれることが個々に示されている場合と同様に、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0439】

等価物

本開示は、とりわけ、E V、例えば、エクソソームにおける外因性タンパク質の富化に使用するための改変された外因性タンパク質及びペプチドを含むE V、例えば、エクソソームの組成物を提供する。本開示はまた、富化されたE V、例えば、エクソソームを産生する方法（method）及び方法（methods）を提供する。様々な特定の実施形態が例示され、説明されているが、上記の仕様は、限定的ではない。本開示の幅及び範囲は、上記の例示的な実施形態のいずれかによって限定されるべきではなく、以下の特許請求の範囲及びそれらの等価物に従ってのみ定義されるべきである。本開示（複数可）の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変更がなされ得ることが理解されるであろう。本明細書を再検討すると、多くの変形形態が当業者に明らかになるであろう。

【0440】

本出願は、2018年11月16日に出願された国際出願第PCT/US2018/061679号、及び2019年4月17日に出願された米国仮出願第62/835,430号の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

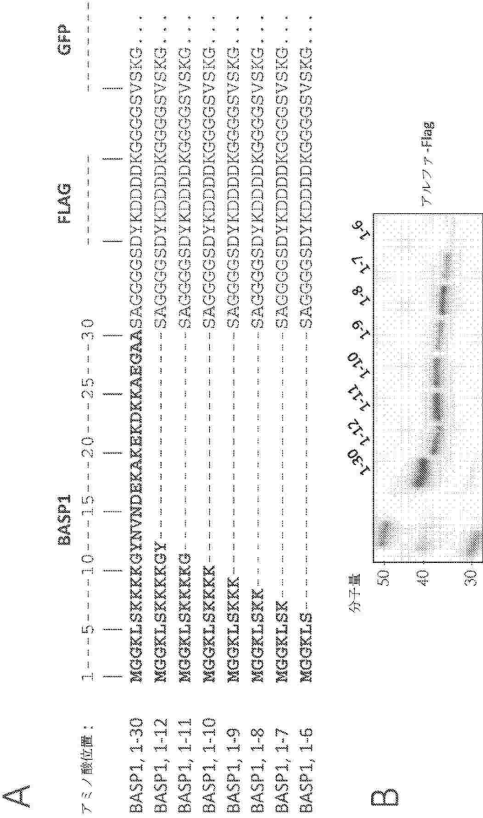
20

30

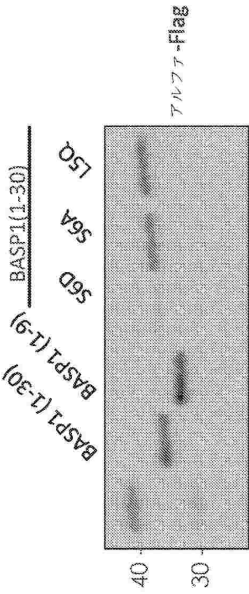
40

50

【図面】
【図 1】



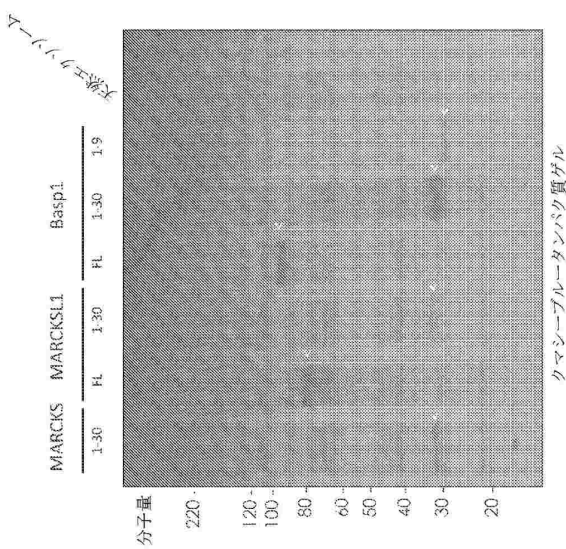
【図 2 B】



【図 2 A】



【図 3】



10

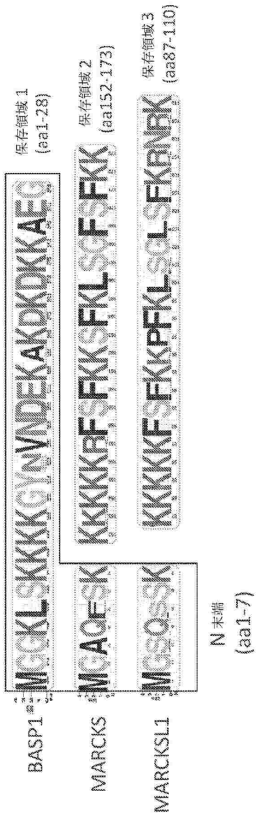
20

30

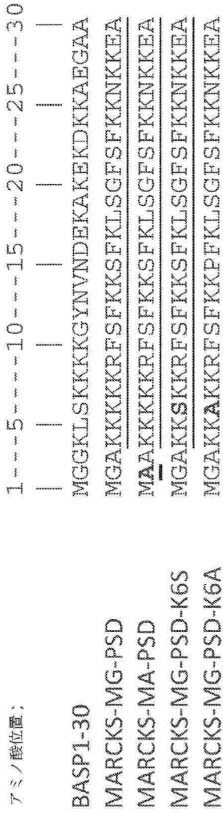
40

50

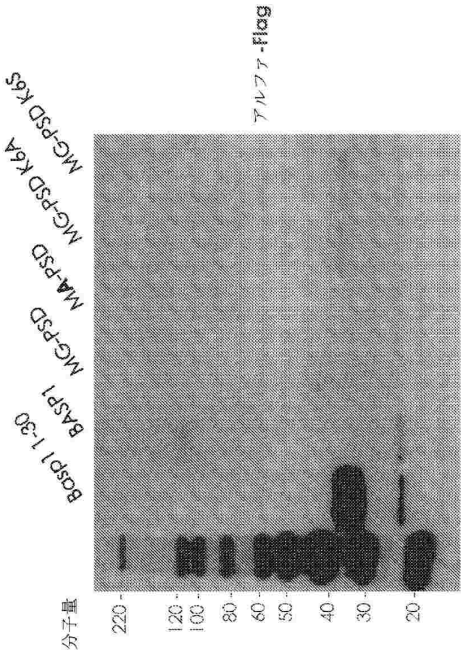
【図 4】



【図 5 A】



【図 5 B】



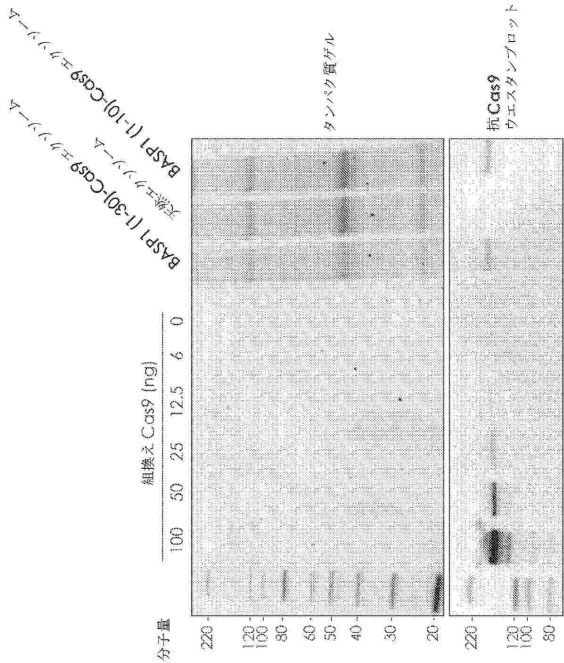
【図 6】

位置	1	2	3	4	5*	6*	7	8
モチーフ 1	M	G	GAS	KQ	LFSQ	SA	K	K
モチーフ 2	M	G	π	ζ	$\Phi\pi$	SAGN	[+]	[+]
モチーフ 3	M	G	π	κ	$\Phi\pi$	π	[+]	[+]

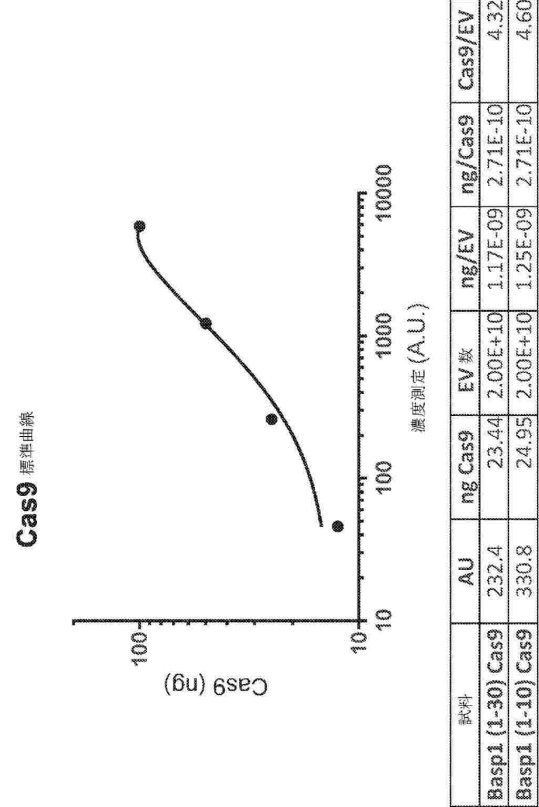
略語:
 π - Pro, Gly, Ala, Ser
 ζ - Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, His, Arg
 Φ - Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr, Met
[+] - Lys, Arg, His
[-] - Asp, Glu

* 5 位は [+] を含めない
* 6 位は [-] を含めない

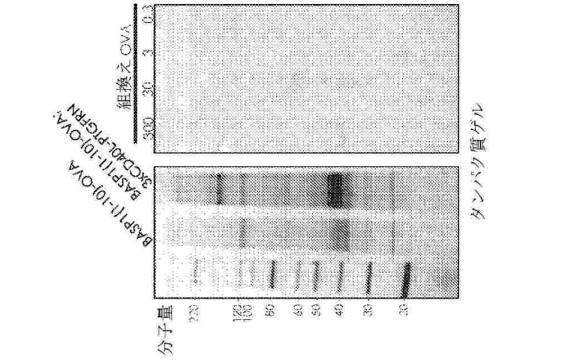
【図 7 A】



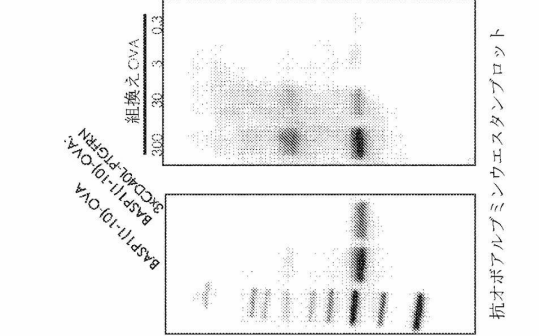
【図 7 B】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

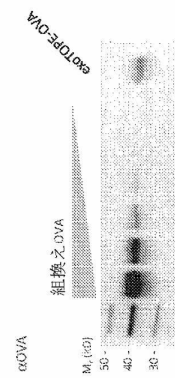
20

30

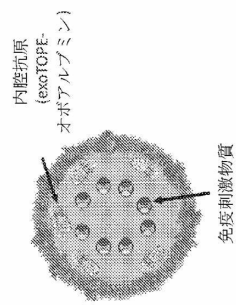
40

50

【図 8 C】



【図 8 D】



【図 9 A】

BASP1(1-10) FLAG

MGGKLSKKK SAGSGGSTS GSGDYKDDDD

KSGFEMDQV QLVESGALV QPGSLRLSC

AAGFVNRY SMRWYQAPG KEREWAGMS

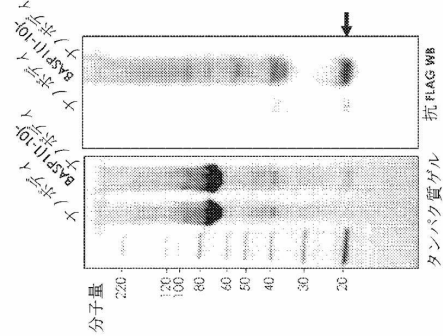
SAGDESSYED SVKGRPTISR DDARNTVYLQ

MNSLXPEDTA VYICNVNVGF EYWGQGTQVT

VSS

17 kDa の予測分子量

【図 9 B】



10

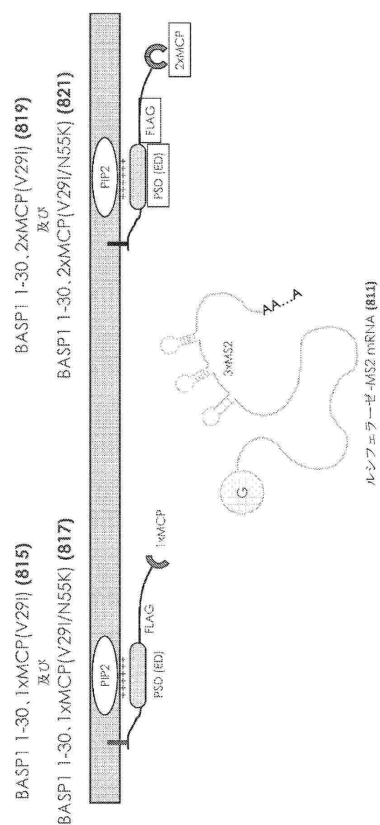
20

30

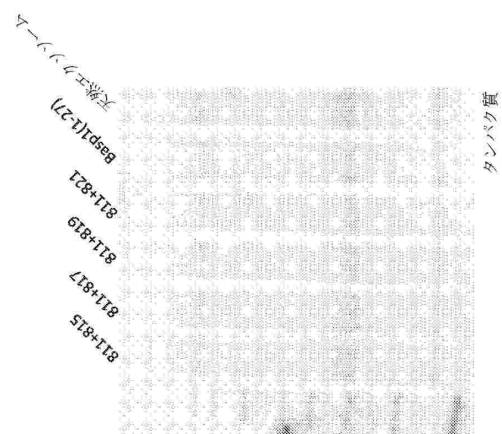
40

50

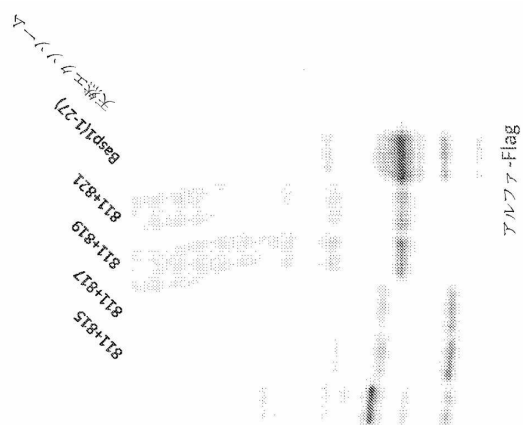
【図 10】



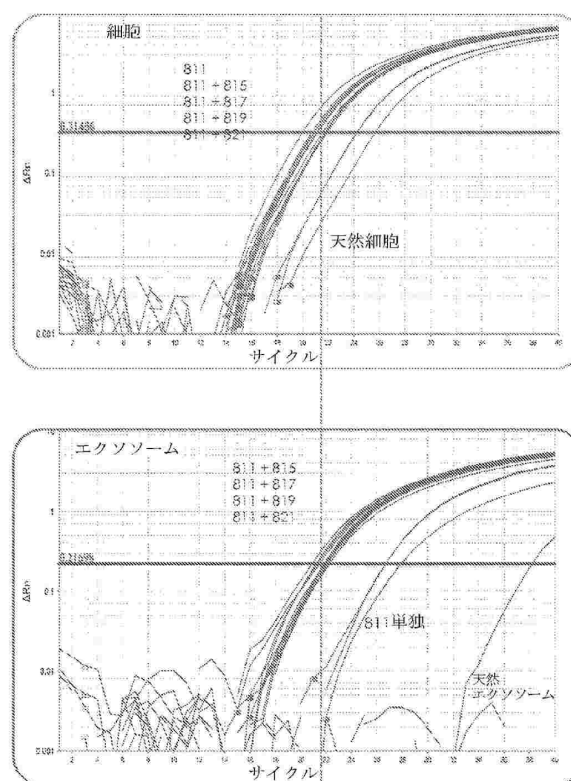
【図 1 1 A】



【図 1 1 B】



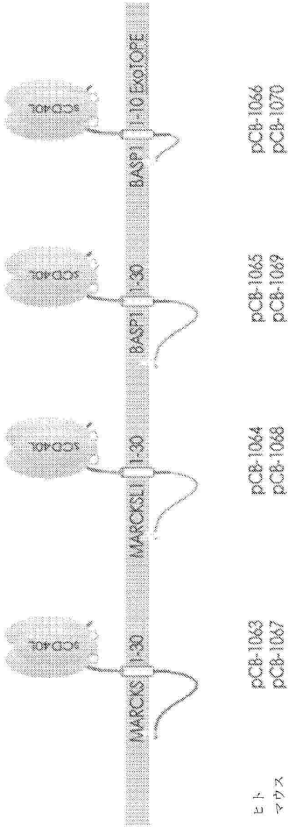
【図 12 A】



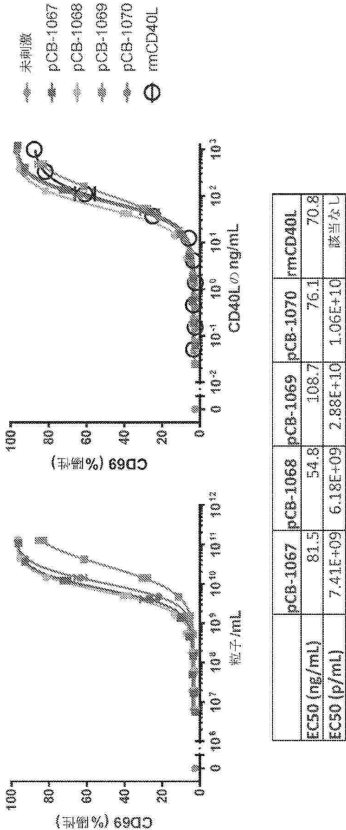
【図 1 2 B】

構築物	C _t 細胞	C _t FV	811 単独に対するエクソソームの倍増
天然HEK	24.6	38.2	4.2×10 ⁻⁴
811 (mRNA 単独)	21.3	27.0	1
811 + 815	20.6	21.7	39.4
811 + 817	21.8	22.1	29.9
811 + 819	21.2	21.9	34.3
811 + 821	20.9	21.1	59.7

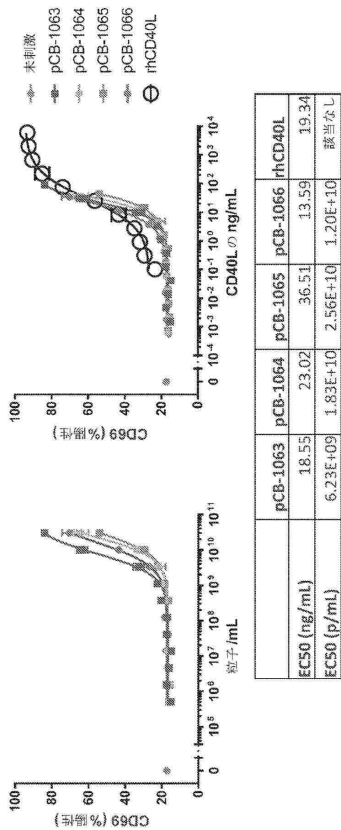
【図 1 3】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



10

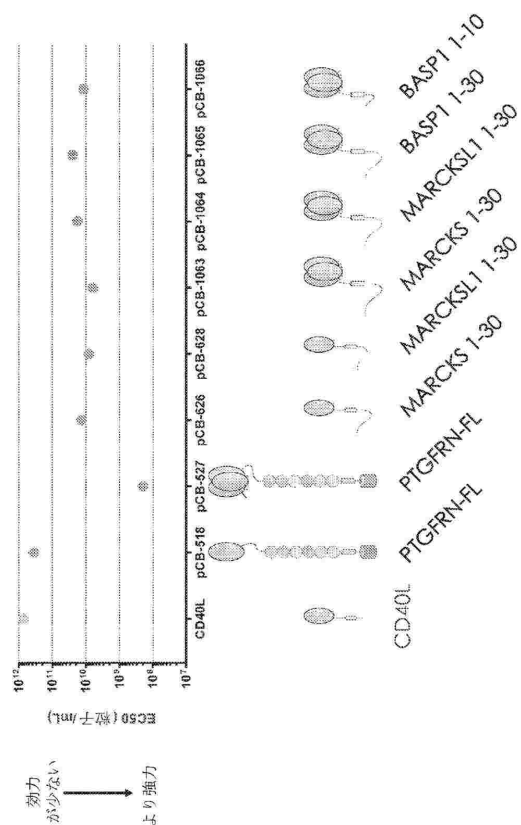
20

30

40

50

【図 14 C】



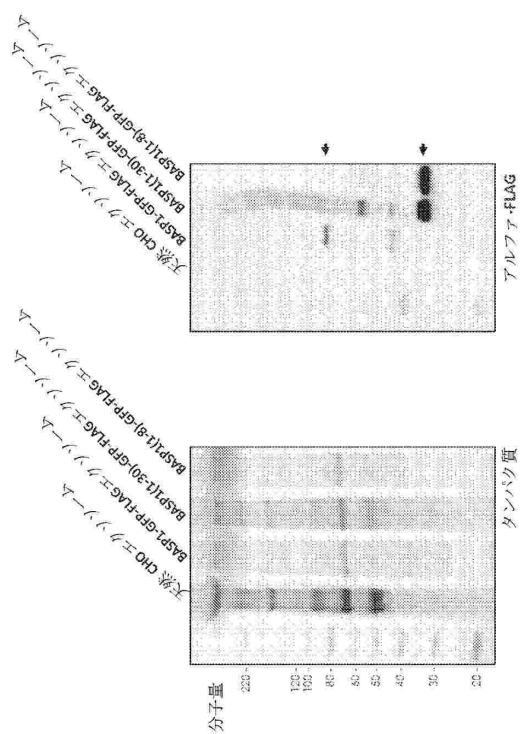
【図 15】

遺伝子名	HEK293	HT1080	K562	MB231	Raji	MSC*
BASP1	122	79	0	74	103	96
MARCKS	101	0	0	14	0	82
MARCKSL1	114	53	97	23	193	23
CD81	34	21	2	9	9	48
CD9	21	6	0	31	0	41

*別の実験で実行

*別の実験で実行

【図 16】



【配列表】

0007538795000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K	38/43	
A 6 1 K	38/08	(2019.01)	A 6 1 K	38/08	
A 6 1 K	38/44	(2006.01)	A 6 1 K	38/44	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	H
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(72)発明者 ドゥーリー, ケビン ピー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 ハリソン, レーン エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 シュー, ケ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 ハウデ, ダミアン ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 ハウプト, ソーニャ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 クルマン, ジョン ディー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 ウィリアムズ, ダグラス イー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 マコーネル, ラッセル イー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

(72)発明者 ユーニス, マデリーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
3 5, スイート 5 0 0, 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

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 9 0 4 3 0 (US, A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 1 1 7 5 8 5 (WO, A 1)

BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2005年, Vol.72, p.1452-1465, DOI 10.1095/biolreprod
.104.036426

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1999年, Vol.274, No.17, p.11848-11853

PNAS, 2009年04月07日, vol.106, no.14, p.5604-5609, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073
/pnas.0812101106

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C12N 5/071

C12N 5/10

A61K 47/66

A61K 35/12

A61K 38/00

A61K 38/19

A61K 38/43

A61K 38/08

A61K 38/44

A61K 39/00

A61K 9/127

A61P 35/00

A61P 43/00

C07K 1/00-19/00

C12N 15/00-15/90

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)