

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-534830
(P2013-534830A)

(43) 公表日 平成25年9月9日(2013.9.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/133 (2006.01)	A 6 1 K 9/133	4 C 0 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-518258 (P2013-518258)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月30日 (2011. 6. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月26日 (2012. 12. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/004820
 (87) 国際公開番号 W02012/002759
 (87) 国際公開日 平成24年1月5日 (2012. 1. 5)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0065112
 (32) 優先日 平成23年6月30日 (2011. 6. 30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2010-0063527
 (32) 優先日 平成22年7月1日 (2010. 7. 1)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 512334969
 イオン メディックス インコーポレイテッド
 大韓民国 ギョンサンブク-ド 790-784、ポハン-シ、ナム-グ、ポストック 67 チュンガム-ロ、ヒョジャ-ドン、バイオテック センター
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
 (72) 発明者 コ、ヨン-スン
 大韓民国 ギョンサンブク-ド 790-751、ポハン-シ、ナム-グ、ジゴク-ドン、4-1003 ギョス アパートメント

最終頁に続く

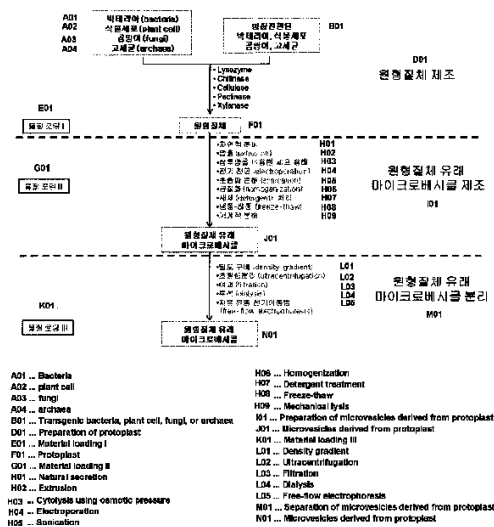
(54) 【発明の名称】 細胞の原形質体由来するマイクロベシクル及びその用途

(57) 【要約】

【課題】細菌、古細菌、カビ、植物細胞などから細胞壁を取り除いた原形質体由来するマイクロベシクルを提供すること。

【解決手段】本発明の原形質体由来マイクロベシクルは、診断、治療、ワクチン、標的誘導、標的細胞との細胞膜融合、並びに生体内外における副作用の減少及び安定性増進などの目的に必要な物質を自由にロードすることが可能であり、前記治療用物質、診断用物質、及び/又はワクチン用物質を特定の組織又は細胞に特異的に伝達することを可能とする。

【選択図】 図 1



- A01 ... Bacteria
- A02 ... plant cell
- A03 ... fungi
- A04 ... archaea
- B01 ... Transgenic bacteria, plant cell, fungi, or archaea
- D01 ... Preparation of protoplast
- E01 ... Material loading I
- F01 ... Protoplast
- G01 ... Material loading II
- H01 ... Natural secretion
- H02 ... Excretion
- H03 ... Cytolysis using osmotic pressure
- H04 ... Electroporation
- H05 ... Sonication
- H06 ... Homogenization
- H07 ... Detergent treatment
- H08 ... Freeze-thaw
- H09 ... Mechanical lysis
- H1 ... Preparation of microvesicles derived from protoplast
- J01 ... Microvesicles derived from protoplast
- K01 ... Material loading III
- L01 ... Density gradient
- L02 ... Ultracentrifugation
- L03 ... Filtration
- L04 ... Dialysis
- L05 ... Free-flow electrophoresis
- M01 ... Separation of microvesicles derived from protoplast
- N01 ... Microvesicles derived from protoplast

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む組成物。

【請求項 2】

前記細胞が、細菌細胞、古細菌細胞、カビ細胞、植物細胞及び L - f o r m 細菌よりなる群から選ばれたものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記細胞が疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現する細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記細胞が、自然に存在する細胞又は形質転換された細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記マイクロベシクルが、細胞膜融合物質が発現されるように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記マイクロベシクルが、標的細胞又は組織へ誘導されるように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記マイクロベシクルが、疾病の治療用、診断用又はワクチン物質を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記マイクロベシクルが、標的細胞又は組織へ誘導され、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記マイクロベシクルが、細胞接合分子、抗体、標的誘導タンパク質、細胞膜融合タンパク質自体、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記マイクロベシクルが、リガンドディスプレイ用タンパク質、リガンドディスプレイ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記マイクロベシクルが、リガンドトラップ用タンパク質、リガンドトラップ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記マイクロベシクルが、封入体 (inclusion body) を有するマイクロベシクルである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記マイクロベシクルが、その起源となる原形質体の細胞膜とトポロジーが同一の膜を有するマイクロベシクルである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記マイクロベシクルの膜が前記細胞の細胞膜以外の成分をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記細胞膜以外の成分がシクロデキストリン又はポリエチレングリコールである、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記マイクロベシクルの膜成分が化学的に変形したことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記化学的変形はチオール基又はアミン基を用いた化学的な方法で膜成分が変形したことであり、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

細胞の原形質体に由来し且つ疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質が、前記細胞に由来するものである、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 20】

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質が、前記細胞以外の外部から注入されたものである、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質が、抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤、ペプチド、タンパク質、毒素、核酸、ビーズ、マイクロ粒子及びナノ粒子よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

前記核酸が、DNA、RNA、アプタマー (aptamer)、LNA (locked nucleic acid)、PNA (peptide nucleic acid) 及びモルホリノ (morpholino) よりなる群から選ばれたものである、請求項 21 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 23】

前記ナノ粒子が、酸化鉄、金、炭素ナノチューブ及び磁気ビーズよりなる群から選ばれたものである、請求項 21 に記載の薬学的組成物。

【請求項 24】

前記治療用又は診断用物質が、蛍光を放出する物質である、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 25】

前記蛍光を放出する物質が蛍光タンパク質又は量子ドットである、請求項 24 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 26】

前記ワクチン用物質が、抗原、免疫補強剤及び免疫調節剤よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 27】

前記抗原が、ウイルス由来タンパク質、病原性細菌由来タンパク質、及び癌細胞由来タンパク質よりなる群から選ばれたものである、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

前記抗原が、ウイルス由来タンパク質、病原性細菌由来タンパク質、及び癌細胞由来タンパク質よりなる群から選ばれた2つ以上である、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 29】

前記免疫補強剤が、二重螺旋RNA (dsRNA)、コレラ毒素 (cholera toxin) 及びミョウバン (alum) よりなる群から選ばれたものである、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 30】

前記免疫調節剤が、インターロイキン (IL) - 2、インターロイキン (IL) - 4、インターロイキン (IL) - 6、インターロイキン (IL) - 12、インターロイキン (IL) - 17、インターフェロン (IFN) - 、血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、及び線維芽細胞成長因子 (FGF) - 2 よりなる群から選ばれたものである、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 31】

50

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質が、リガンドディスプレイ用タンパク質、リガンドディスプレイ用ペプチド、リガンドトラップ用タンパク質、リガンドトラップ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 32】

細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む、疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質伝達用組成物。

【請求項 33】

細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む、疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質伝達システム。

10

【請求項 34】

細胞の原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、
- (b) 前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び
- (c) 前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【請求項 35】

疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞に治療用、診断用又はワクチン用物質を外部からロードし、細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、
- (b) 前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び
- (c) 前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

20

【請求項 36】

疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、
- (b) 前記原形質体に治療用、診断用又はワクチン用物質を外部からロードする段階、
- (c) 前記物質がロードされた原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び
- (d) 前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

30

【請求項 37】

疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、
- (b) 前記原形質体を含む懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してマイクロベシクルを製造する段階、及び
- (c) 前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【請求項 38】

疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、
- (b) 前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、
- (c) 前記製造されたマイクロベシクル懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してマイクロベシクルにロードする段階、及び
- (d) 前記懸濁液から治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを分離する段階。

40

【請求項 39】

疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、

50

- (b) 前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、
- (c) 懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階、及び
- (d) 前記分離されたマイクロベシクルを含む懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してロードする段階。

【請求項 40】

前記マイクロベシクルが含まれた懸濁液から、前記治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを分離する段階をさらに含む、請求項 39 に記載の製造方法。

【請求項 41】

前記分離段階が、密度勾配、超遠心分離、濾過、透析及び自由流動電気移動法よりなる群から選ばれた方法を用いて行われる、請求項 34 ~ 40 に記載の製造方法。

10

【請求項 42】

前記細胞が、細菌細胞、古細菌細胞、カビ細胞、植物細胞及び L - f o r m 細菌よりなる群から選ばれたものである、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 43】

前記細胞が、自然に存在する細胞又は形質転換された細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 44】

前記細胞が、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現する細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

20

【請求項 45】

前記形質転換された細胞が、細胞膜融合物質を発現するように形質転換された細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 46】

前記形質転換された細胞が、標的細胞又は組織へ誘導されるように形質転換された細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 47】

前記形質転換された細胞が、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現するように形質転換された細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 48】

前記形質転換された細胞が、標的細胞又は組織へ誘導され、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現するように形質転換された細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

30

【請求項 49】

前記形質転換された細胞が、細胞接合分子、抗体、標的誘導タンパク質、細胞膜融合タンパク質自体、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換されたものである、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 50】

前記細胞が、リガンドディスプレイ用タンパク質、リガンドディスプレイ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

40

【請求項 51】

前記細胞が、リガンドトラップ用タンパク質、リガンドトラップ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞である、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 52】

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質が、抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤、ペプチド、タンパク質、毒素、核酸、ピーズ、マイクロ粒子及びナノ粒子よりなる群から一つ以上選ばれたものである、請求項 35 ~ 39 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 53】

50

前記核酸が、DNA、RNA、アプタマー(apptamer)、LNA(locked nucleic acid)、PNA(peptide nucleic acid)及びモルホリノ(morpholino)よりなる群から選ばれたものである、請求項52に記載の製造方法。

【請求項54】

前記ナノ粒子が酸化鉄、金、炭素ナノチューブ及び磁気ビーズよりなる群から選ばれたものである、請求項52に記載の製造方法。

【請求項55】

前記治療用又は診断用物質が、蛍光を放出する物質である、請求項35～39のいずれかに記載の製造方法。

【請求項56】

前記蛍光を放出する物質が蛍光タンパク質又は量子ドットである、請求項55に記載の製造方法。

【請求項57】

前記ワクチン用物質が、抗原、免疫補強剤及び免疫調節剤よりなる群から選ばれたものである、請求項35～39のいずれかに記載の製造方法。

【請求項58】

前記抗原が、ウイルス由来タンパク質、病原性細菌由来タンパク質、及び癌細胞由来タンパク質よりなる群から選ばれたものである、請求項57に記載の製造方法。

【請求項59】

前記抗原が、ウイルス由来タンパク質、病原性細菌由来タンパク質、及び癌細胞由来タンパク質よりなる群から選ばれた2つ以上である、請求項57に記載の製造方法。

【請求項60】

前記免疫補強剤が、二重螺旋RNA(dsRNA)、コレラ毒素(cholera toxin)及びミョウバン(alum)よりなる群から選ばれたものである、請求項57に記載の製造方法。

【請求項61】

前記免疫調節剤が、インターロイキン(IL)-2、インターロイキン(IL)-4、インターロイキン(IL)-6、インターロイキン(IL)-12、インターロイキン(IL)-17、インターフェロン(IFN)、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、及び線維芽細胞成長因子(FGF)-2よりなる群から選ばれたものである、請求項57に記載の製造方法。

【請求項62】

前記細胞の細胞膜と比較してトポロジーが変形された膜を有するマイクロベシクルを除去する段階をさらに含む、請求項34～39のいずれかに記載の製造方法。

【請求項63】

前記マイクロベシクルの膜に前記原形質体の細胞膜以外の成分をさらに添加する段階をさらに含む、請求項34～39のいずれかに記載の製造方法。

【請求項64】

前記細胞膜以外の成分がシクロデキストリン又はポリエチレングリコールである、請求項63に記載の製造方法。

【請求項65】

細胞の原形質体に由来し且つ疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを使用することを含む、疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質を標的細胞又は組織に伝達する方法。

【請求項66】

2種以上の前記治療用、診断用又はワクチン用物質を伝達することを特徴とする、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

2種以上の前記治療用、診断用又はワクチン用物質が前記マイクロベシクルに共にロードされていることを特徴とする、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

10

20

30

40

50

前記治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた2つ以上のマイクロベシクルを使用することを特徴とする、請求項65に記載の方法。

【請求項69】

前記2つ以上のマイクロベシクルを同時に投与することを特徴とする、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

1種の前記治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクル、2種以上の前記治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクル、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上のマイクロベシクルを順次投与することを特徴とする、請求項65に記載の方法。

10

【請求項71】

細胞の原形質体に由来し且つ疾病の診断用又は治療用物質がロードされたマイクロベシクルを用いて、前記物質を標的細胞又は組織に伝達することを含む、疾病の治療又は診断方法。

【請求項72】

細胞の原形質体に由来し且つワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを用いて、前記ワクチン用物質を標的細胞又は組織に伝達することを含む、疾病の予防又は治療方法。

【請求項73】

前記細胞が、細菌細胞、古細菌細胞、カビ細胞、植物細胞及びL-form細菌よりなる群から選ばれたものである、請求項71又は72に記載の方法。

20

【請求項74】

前記細胞が、自然に存在する細胞又は形質転換された細胞である、請求項71又は72に記載の方法。

【請求項75】

前記細胞が、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現する細胞である、請求項71又は72に記載の方法。

【請求項76】

前記細胞が、細胞膜融合物質が発現されるように形質転換された細胞である、請求項71又は72に記載の方法。

30

【請求項77】

前記細胞が、標的細胞又は組織へ誘導されるように形質転換された細胞である、請求項71又は72に記載の方法。

【請求項78】

前記細胞が、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現するように形質転換された細胞である、請求項71又は72に記載の方法。

【請求項79】

前記細胞が、標的細胞又は組織に誘導され、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現するように形質転換された細胞である、請求項71又は72に記載の方法。

【請求項80】

前記治療用、診断用又はワクチン用物質が、前記細胞に由来するものである、請求項71又は72に記載の方法。

40

【請求項81】

前記治療用、診断用又はワクチン用物質が前記細胞以外の外部から注入されたものである、請求項71又は72に記載の方法。

【請求項82】

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質が、リガンドディスプレイ用タンパク質、リガンドディスプレイ用ペプチド、リガントラップ用タンパク質、リガントラップ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項71又は72に記載の方法。

50

【請求項 8 3】

前記治療用又は診断用物質が、抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤、ペプチド、タンパク質、毒素、核酸、ビーズ、マイクロ粒子及びナノ粒子よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記治療用又は診断用物質が、蛍光を放出する物質である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記ワクチン用物質が、抗原、免疫補強剤及び免疫調節剤よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 6】

細胞の原形質体に由来し、且つ疾病の診断に必要なプライマー、プローブ、アンチセンス核酸又は抗体がロードされたマイクロベシクルを含む、疾病診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞壁を持っている細菌(bacteria)、古細菌(archaea)、カビ(fungi)、植物(plants)細胞などの原形質体(protoplast)に由来するマイクロベシクル及び前記マイクロベシクルを用いて治療用物質、診断用物質及び/又はワクチン用物質をロード(load)して特異の細胞及び特定の組織に伝達する方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

疾病治療のために薬物を個体に投与する場合、投与される薬物が標的位置に伝達されてその効果を発揮することに役立つために薬物伝達システム(Drug Delivery System、DDS)が使用できる。薬物が生体に吸収又は利用される速度があまり遅くて吸収されなかった薬物があまり速く体外に消失してしまう場合には、薬物の放出速度を遅らせる薬物伝達システムが使われる。副作用の激しい薬物を使用する場合には、必要な組織又は細胞にのみ薬物を伝達する必要がある。例えば、癌治療のための抗癌剤の中には癌細胞だけでなく正常細胞に対しても強い毒性を示すものが多い。このような場合、癌細胞又は癌組織にのみ抗癌剤を伝達することができれば、癌治療過程における患者の苦痛及び不便を減らすことができる。

【0003】

1960年代に初めて使用されたりポソームが薬物伝達システムとして広く研究されてきた。ポリエチレングリコール(polyethylene glycol、PEG)などのポリマーをリポソームとコンジュゲート(conjugation)して、薬物を内包したりポソームが血液から容易に除去されないようにして薬物の血液内維持時間(circulatory half-life)を増加させたステルスリポソーム(stealth liposome)が開発された。この方法で抗癌剤のドキソルビシン(doxorubicin)を伝達するドキシル(DOXIL)が商用化された。ところが、リポソームとステルスリポソームは特定の細胞を認識する能力がないため、特定の細胞又は特定の組織へ薬物を伝達する目的では使用することができない。特定の標的に結合することができるように単一標的抗体などを接合したりポソームも開発されているが、未だ臨床試験を通過して商用化されたものはない。

【0004】

人工的に合成した脂質からなるリポソームの代わりに自然的な細胞膜を用いた伝達システムが開発されている。薬物を含む培養液で生育する形質転換微生物が分泌するミニセルを薬物の伝達に利用する方法が公開されている(WO2005/079854の「Compositions and methods for targeted in vitro and in vivo drug delivery to mammalian cells via bacterially derived intact minicells」)。ところが、細菌細胞膜成分からなるミニセルには、グラム陰性菌の場合には細胞外膜に存在する内毒素(lipopolysaccharide)、グラム陽性菌の場合には細胞壁に存在するペプチドグリカン(peptidoglycan)などのように毒性をもたらす物質が含まれているため、体内に投与すると、人体において敗血

10

20

30

40

50

症などの全身性炎症反応などの副作用をもたらすおそれがある。

【0005】

原形質体は、細菌、古細菌、カビ、植物細胞などのように細胞壁を有する細胞から細胞壁が取り除かれたものをいい、細菌或いは古細菌細胞の場合にはリゾチーム(lysozyme)、カビ細胞の場合にはキチナーゼ(chitinase)、植物細胞の場合にはセルラーゼ(cellulase)、ペクチナーゼ(pectinase)、キシラナーゼ(xylanase)などの酵素を用いて細胞壁を取り除くことができる。原形質体は、巨大分子やウイルスなどの細胞内吸収などのように細胞膜の機能を研究することに利用できる。また、遺伝的に変形された生命体を作るための形質転換(DNA transformation)にも応用される。また、植物細胞に由来する原形質体は原形質体融合(protoplast fusion)技術によって植物の品種改良(breeding)のために利用されることもある。ところが、未だ原形質体に由来するマイクロベシクル及びこれを応用した事例はない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明者は、前述した従来技術の問題点を解決するために研究した結果、細菌、古細菌、カビ、植物細胞などの細胞壁を取り除いた原形質体に由来するマイクロベシクルを用いて疾病の治療及び診断のための物質或いはワクチン用物質をロードして特定の細胞又は組織などの標的に効果的に伝達することができることを見出し、本発明を完成した。

20

【0007】

このため、本発明は、細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む組成物を提供する。また、本発明は、診断、治療、ワクチン、標的誘導、標的細胞との細胞膜融合、並びに生体内外における副作用の減少及び安定性の増進などの目的に必要な物質がロードされた前記マイクロベシクルを含む薬学的組成物などを提供する。また、本発明は、細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む治療用、診断用及び/又はワクチン用物質伝達用組成物を提供する。また、本発明は、前記マイクロベシクルを用いて物質を特定の標的に伝達する方法、前記マイクロベシクルを含む物質伝達システム、及び前記マイクロベシクルを含む疾病診断用キットなどを提供する。

【0008】

ところが、本発明が解決しようとする技術的課題は上述した課題に限定されず、上述していない別の課題は以降の記載から当業者に明確に理解できるであろう。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明のある観点では、細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む組成物を提供する。本発明で使用される細胞は、自然に存在する細胞又は形質転換された細胞を含み、細菌細胞、古細菌細胞、カビ細胞及び植物細胞よりなる群から選択できる。

【0010】

本発明の他の観点では、細胞の原形質体に由来し且つ疾病の治療用又は診断用物質がロードされたマイクロベシクルを含む薬学的組成物を提供する。

40

【0011】

本発明の別の観点では、細胞の原形質体に由来し且つワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを含む薬学的組成物を提供する。

【0012】

前記本発明のマイクロベシクルを用いて疾病の治療用、診断用及び/又はワクチン用物質を特定の組織又は細胞に特異的に伝達することが可能であり、これにより特定の疾病を予防、治療及び/又は診断することに本発明のマイクロベシクルを使用することができる。前記マイクロベシクルにロードされる物質は特に限定されず、前記治療用、診断用及び/又はワクチン用物質は本発明で使用される細胞に自然に、或いは形質転換によって発現されるものであってもよく、細胞以外の外部から注入されたものであってもよい。

50

【 0 0 1 3 】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む、疾病の診断用、治療用及び/又はワクチン用物質伝達組成物を提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む、疾病の診断用、治療用及び/又はワクチン用物質伝達システムを提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法を提供する：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の別の観点は、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法を提供する：細胞に治療用、診断用又はワクチン用物質を外部からロードし、細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【 0 0 1 7 】

本発明の別の観点は、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法を提供する：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体に治療用、診断用又はワクチン用物質を外部からロードする段階、前記物質がロードされた原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離段階。

20

【 0 0 1 8 】

本発明の別の観点は、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法を提供する：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

30

【 0 0 1 9 】

本発明の別の観点は、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法を提供する：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、前記製造されたマイクロベシクル懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してマイクロベシクルにロードする段階、及び前記懸濁液から治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを分離する段階。

【 0 0 2 0 】

本発明の別の観点は、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法を提供する：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階、及び前記分離されたマイクロベシクルを含む懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してロードする段階。

40

【 0 0 2 1 】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体に由来し且つ疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを使用することを含む、疾病の診断用、治療用又はワクチン用物質を特異の細胞又は組織に伝達する方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明の別の観点は、疾病の診断用又は治療用物質がロードされた細胞原形質体由来マ

50

イクロベシクルを用いて前記物質を特異の細胞又は組織に伝達することを含む、疾病の治療及び／又は診断方法を提供する。

【0023】

本発明の別の観点は、ワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルを用いて前記ワクチン用物質を特異の細胞又は組織に伝達することを含む、疾病の予防及び／又は治療方法を提供する。

【0024】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体に由来し、前記原形質体より小さいサイズであり、且つ疾病の診断に必要なプライマー、プローブ、アンチセンス核酸又は抗体がロードされたマイクロベシクルを含む、疾病診断用キットを提供する。

【発明の効果】

【0025】

グラム陰性菌の場合には細胞外膜に存在する内毒素、細胞壁に存在するペプチドグリカン、リポタンパク質(lipoprotein)、グラム陽性菌の場合には細胞壁に存在するペプチドグリカン、リポタンパク質、古細菌の場合にはシュードペプチドグリカン(pseudopeptidoglycan)、カビと植物細胞の場合には細胞壁に存在するキチン(chitin)、セルロース(cellulose)などによって免疫反応が発生して深刻な副作用をもたらすおそれがある。本発明の原形質体由来マイクロベシクルは、細菌、古細菌、カビ及び植物細胞から細胞壁を取り除いた原形質体由来のものであって、細胞壁を取り除くことにより免疫反応による副作用がない。さらに、本発明の原形質体由来マイクロベシクルは、治療及び／又は診断用物質、或いはワクチン用物質の導入が容易であり、量産が可能であるという利点がある。

【0026】

本発明に係る治療用、診断用及び／又はワクチン用物質がロードされた、本発明の原形質体由来マイクロベシクルを使用することにより、前記物質(ら)が標的細胞又は組織にのみ伝達され、他所に伝達されることを抑制することができる。具体的に、前記本発明の原形質体由来マイクロベシクルを使用することにより、薬物などの治療用物質の副作用を減らして疾病治療過程における患者の苦痛及び不便を減らすことができ、目標の細胞又は組織にのみ診断用物質が伝達されるようにすることにより、疾病に関連した細胞又は組織を容易に診断することができ、ワクチン用物質の効能を増加させ且つ副作用を減らすことができる。

【0027】

また、前記治療用、診断用及び／又はワクチン用物質を発現する細胞の原形質体由来マイクロベシクルを使用する場合、前記物質の精製過程なしで原形質体由来マイクロベシクルに含有できるため、前記物質を精製して使用する場合より産業的、経済的に利点がある。

【0028】

また、疾病治療用及び／又は診断用物質がロードされた本発明の原形質体由来マイクロベシクル及びその製造方法は、*in vitro*及び／又は*in vivo*で治療及び／又は診断用、又は実験用として使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】原形質体由来するマイクロベシクルを作る方法に対する模式図である。

【図2】原形質体がまともに作られたことを示す図である。

【図3】グラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクルの透過電子顕微鏡写真である。

【図4】グラム陽性菌原形質体由来マイクロベシクルの透過電子顕微鏡写真である。

【図5】グラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクルの大きさを示すグラフである。

【図6】グラム陽性菌原形質体由来マイクロベシクルの大きさを示すグラフである。

【図7】グラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクルが副作用を持たないことを示すグラフである。

【図8】グラム陽性菌原形質体由来マイクロベシクルが副作用を持たないことを示すグラ

10

20

30

40

50

フである。

【図 9】グラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクルがマウスにおいて副作用を持たないことを示すグラフである。

【図 10】グラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクルがマウスにおいて I L - 6 の生成を誘導しないことを示すグラフである。

【図 11】原形質体由来マイクロベシクルにプラスミドをロードすることができることを示す図である。

【図 12】原形質体由来マイクロベシクルにロードされたプラスミドが完全な状態を維持していることを示す図である。

【図 13】原形質体由来マイクロベシクルを用いてプラスミドをバクテリアに伝達することができることを示す図である。

【図 14】抗原をロードした原形質体由来マイクロベシクルがマウスにおいて抗原特異的 I g G 抗体を誘導することができることを示すグラフである。

【図 15】抗原をロードした原形質体由来マイクロベシクルがマウスにおいて抗原特異的 I g E 抗体を誘導することができることを示すグラフである。

【図 16】抗原をロードした原形質体由来マイクロベシクルがマウスにおいて抗原特異的記憶 T 細胞の生成を誘導することができることを示すグラフである。

【図 17】原形質体由来マイクロベシクルに封入体をロードすることができることを示す図である。

【図 18】原形質体由来マイクロベシクルの内部に O m p タンパク質をロードすることができることを示す図である。

【図 19】O m p A 抗原をロードした原形質体由来マイクロベシクルがマウスにおいて O m p A 特異的 I g G 抗体を誘導することができることを示すグラフである。

【図 20】O m p 抗原がロードされたマイクロベシクルがバクテリアに対するワクチンとなったことを示すグラフである。

【図 21】黒色腫抗原「M a r t - 1」が原形質体由来マイクロベシクルにロードされたことを示す図である。

【図 22】M a r t - 1 がロードされた原形質体由来マイクロベシクルによって黒色腫に対するワクチン効果があることを示すグラフである。

【図 23】原形質体由来マイクロベシクルに E G F 融合タンパク質をロードしたことを示す図である。

【図 24】E G F 融合タンパク質が原形質体由来マイクロベシクルの表面に正しいトポロジーに維持されていることを示す図である。

【図 25】E G F 融合タンパク質をロードしたマイクロベシクルが細胞特異的に伝達されることを示すグラフである。

【図 26】E G F 融合タンパク質をロードしたマイクロベシクルが細胞に伝達される時、E G F による伝達であることを示す図である。

【図 27】E G F 融合タンパク質をロードしたマイクロベシクルが細胞に E G F シグナル伝達を誘導することができることを示す図である。

【図 28】E G F 融合タンパク質をロードしたマイクロベシクルを用いてマウスにおいて癌組織ヘドキシソルピシンを特異的に伝達することができることを示す図である。

【図 29】E G F 融合タンパク質をロードしたマイクロベシクルがマウスにおいて E G F 特異的抗体の生成を誘導することができることを示すグラフである。

【図 30】原形質体由来マイクロベシクルに E G F 受容体融合タンパク質をロードしたことを示す図である。

【図 31】E G F 受容体融合タンパク質をロードしたマイクロベシクルが E G F と結合することができることを示すグラフである。

【図 32】原形質体由来マイクロベシクルに H i s - タグ融合タンパク質をロードしたことを示す図である。

【図 33】ドキシソルピシンがロードされた原形質体由来マイクロベシクルが血管内皮細胞

10

20

30

40

50

において細胞死滅を誘導することができることを示すグラフである。

【図34】ドキシルピシンがロードされた原形質体由来マイクロベシクルがマウス大腸癌細胞において細胞死滅を誘導することができることを示すグラフである。

【図35】ドキシルピシンがロードされた原形質体由来マイクロベシクルがマウスにおいて癌組織の性状を阻害することができることを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明は、細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む組成物を提供する。

【0031】

本発明で使用される細胞は、細胞壁を有する細菌、古細菌、カビ及び植物細胞と、細胞壁のないL-form細菌(L-form細菌又はCWD(cell wall deficient)細菌)を含むが、これに限定されない。前記細菌はグラム陰性菌及びグラム陽性菌を含む。例えば、グラム陰性菌の大腸菌(*Escherichia coli*(*E.coli*))及びグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*(*S. aureus*))が使用できる。

【0032】

また、本発明で使用される細胞は、「自然に存在する細胞」又は「形質転換された細胞」を含む。

【0033】

前記「自然に存在する細胞」は、特異の細胞又は組織などへの誘導が可能な細胞や、特定の物質を発現する細胞などを含む。

【0034】

前記「形質転換された細胞」は、毒性を弱化させる或いは細胞壁の合成が阻害されるように形質転換された細胞；治療、診断、ワクチン、標的誘導物質(targeting molecule)、又は細胞膜融合物質(fusogen)を発現するように形質転換された細胞；及びこれらの2つ以上の組み合わせからなる形質転換細胞を含むが、これに限定されない。

【0035】

また、前記「形質転換された細胞」は、2回以上形質転換された細胞；特定のタンパク質の発現を抑制するように形質転換された細胞などを含む。

【0036】

前記本発明の一具現例として、前記形質転換された細胞は細胞接合分子、抗体、標的誘導タンパク質、細胞膜融合タンパク質自体、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換されたものであってもよい。

【0037】

また、前記「形質転換」に関連し、本発明に使用される細胞に物質処理、遺伝子導入、又は物理的/化学的/生物学的/電気的/機械的刺激を加えて形質転換させることができる。

【0038】

本発明において、「原形質体」とは、細胞壁を有する細菌、古細菌、カビ、植物細胞などから細胞壁を一部或いは完全に除去し、脂質二重膜に包まれた状態にした物質のことである。よって、本発明において、原形質体は、細胞壁が完全に除去された原形質体(proto-40
plast)だけでなく、細胞壁が完全に除去されていない原形質体(spheroplast)及び「L-form細菌」を含むが、これに限定されない。

【0039】

前記「L-form細菌」は、自然に存在するものと、形質転換によって生成されたものを含むが、これに限定されない。

【0040】

本発明の「原形質体由来マイクロベシクル」とは、細胞膜成分からなる脂質二重膜によって内部と外部が区分されるベシクルであって、細胞の細胞膜脂質、膜タンパク質及び細胞質成分を持っており、細胞膜成分を提供した原形質体より大きさが小さいベシクルをいう。

10

20

30

40

50

【0041】

前記「原形質体由来マイクロベシクル」は、原形質体から自然に分泌されるもの、原形質体を多様な物理的、機械的、電気的、化学的方法で処理して製造した人工的なもの、及び特定の物質又は形質転換によって原形質体から分泌が誘導されたものを含むが、これに限定されない。

【0042】

前記本発明の一具現例において、前記マイクロベシクルは、その起源となる原形質体の細胞膜とトポロジーが同一の膜を持つものであってもよいが、これに限定されない。

【0043】

前記本発明の一具現例において、前記マイクロベシクルは、封入体(inclusion body)を含むものであってもよいが、これに限定されない。

10

【0044】

本発明の別の具現例において、前記マイクロベシクルの膜が、その起源となる原形質体の細胞膜以外の成分をさらに含むことができる。

【0045】

前記細胞膜以外の成分として、標的誘導物質、細胞膜融合物質、シクロデキストリン(cyclodextrin)、ポリエチレングリコールなどを含むことができるが、これに限定されない。また、前記細胞膜以外の成分は多様な方法によって追加でき、細胞膜の化学的変形などを含む。

【0046】

前記本発明の別の具現例において、前記マイクロベシクルの膜成分を化学的に変形させるものをさらに含むことができるが、これに限定されない。例えば、前記マイクロベシクルの膜成分がチオール基(-SH)又はアミノ基(-NH₂)を用いた化学的方法で変形し、或いは前記マイクロベシクルに標的誘導物質、細胞膜融合物質、ポリエチレングリコールを化学的に結合させることにより前記マイクロベシクルの膜成分が化学的に変形したものであってもよい。

20

【0047】

本発明の別の観点は、疾病の診断、治療、ワクチン、標的誘導、標的細胞との細胞膜融合、並びに生体内外における副作用減少及び安定性増進などの目的に必要な物質がロードされた前記マイクロベシクルを含む薬学的組成物などを提供する。

30

【0048】

本発明において、原形質体由来マイクロベシクルに物質を「ロード」することは、診断、治療、ワクチン(vaccination)、標的誘導(targeting)、標的細胞との細胞膜融合(fusion)、並びに生体内外における副作用(adverse effect)減少及び安定性増進などの目的に必要な物質を単独で或いは2つ以上の組み合わせで原形質体由来マイクロベシクルの表面に露出(display)させ、或いは内部に内包(encapsulation)させることを意味するが、これに限定されない。

【0049】

前記原形質体由来マイクロベシクルにロードされる物質は、本発明のマイクロベシクルの製造に用いられる細胞(自然に存在する細胞、及び形質転換された細胞を含む)に由来しうる。すなわち、本発明に用いられる細胞は疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質などを自然に発現する細胞、及び前記物質を発現するように形質転換された細胞を含む。

40

【0050】

前記本発明の一具現例において、原形質体由来マイクロベシクルに標的誘導タンパク質をロードするために細胞接合分子、抗体、細胞膜融合タンパク質、及び標的誘導タンパク質自体又はこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞を用いることができるが、これに限定されない。前記標的誘導タンパク質は原形質体由来マイクロベシクルの表面に露出するようにしてもよく、内部に内包されるようにしてもよい。

【0051】

50

細胞の形質転換は、細胞に刺激を与えてタンパク質などの物質の発現を増加又は変化させる方法と、遺伝子導入によるタンパク質発現増加又は発現抑制させる方法によって可能である。細胞に物質処理などの特定の刺激を与えてタンパク質発現の変化を誘導することができる。また、遺伝子導入による細胞の形質転換を介して特定のタンパク質を発現或いは抑制させることができる。

【 0 0 5 2 】

特定のタンパク質の発現を増加させる方法は、プラスミド(plasmide) D N A、 R N A 又はウイルス(virus)を用いることができ、リン酸カルシウム沈殿法(calcium phosphate precipitation)、リポフェクタミン誘導(lipofectamine mediated)、エレクトロポレーション(electroporation)、微量注射法(microinjection)などの方法だけでなく、一般に知ら

10

【 0 0 5 3 】

特定のタンパク質の発現を抑制させるために、m i R N A、 s i R N A、 アンチセンス(antisense) R N A などを用いることもでき、特定の遺伝子を細胞から除去することもできる。ある細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルが2つの標的に誘導される場合、その細胞において1種又は多種の特定タンパク質の発現を抑制させて1種の標的への誘導を減少させることで物質伝達の特異性を高めることができる。2回以上形質転換された細胞の原形質体を用いることもできる。1次形質転換した細胞を2次形質転換して原形質体を作った後、マイクロベシクルを製造することができる。

20

【 0 0 5 4 】

単核球、マクロファージ、樹枝状細胞、幹細胞などが特定の組織に誘導されるとき、細胞膜に存在する多様な細胞膜タンパク質(plasma membrane protein)が関与する。例えば、単核球細胞の表面には、L F A - 1 (leukocyte function-associated antigen-1)、M a c - 1 (macrophage-1 antigen)などのインテグリン(integrin)を含む多様な細胞接合分子(cell adhesion molecule)が存在する。これらの細胞接合分子は、血管細胞の表面に存在する I C A M - 1 (intercellular adhesion molecule-1)、V C A M - 1 (vascular cell adhesion molecule-1)などの細胞接合分子と結合することができる。単核球は、L F A - 1 などの細胞接合分子を用いて、血管細胞の表面に発現した I C A M - 1 のような細胞膜タンパク質と相互作用して、血管内皮細胞を通過して炎症組織及び癌組織に誘導される。また、細胞を形質転換して癌又は組織特異的細胞膜タンパク質を細胞の表面に発現させることにより、癌組織と炎症組織を含む多様な組織に誘導することができる。例えば、乳癌組織の細胞表面には E R B B 2 細胞膜タンパク質が過剰発現される。T細胞に存在する T細胞受容体(T-cell receptor、T C R)の形質転換を介して癌細胞特異的伝達が可能である。T C Rの細胞外部部分に、E R B B 2 タンパク質を認知することが可能な抗体と、細胞内部部分に T C Rの細胞内シグナル伝達ができるように C D 3 (zeta)タンパク質とを融合した融合タンパク質(fusion protein)を発現させるように形質転換したT細胞は、乳癌組織へ誘導される。また、大腸癌、膵臓癌、肺癌などで過剰発現される癌胚芽抗原(carcinoembryonic antigen、C E A)を認知する抗体と C D 3 タンパク質とを融合した融合タンパク質を発現させるように形質転換したT細胞は、大腸癌、膵臓癌、肺癌組織へ誘導される。前述したタンパク質又は融合タンパク質を細胞に発現させて製造した原形質体由来マイクロベシクルは特定の組織に誘導することができるが、使用できる標的誘導物質はこれに限定されるものではない。

30

40

【 0 0 5 5 】

本発明の別の具現例において、前記マイクロベシクルは、サイトカイン、成長因子、細胞接合分子、抗体及び受容体の群から選ばれる一つ以上を発現する細胞又は発現するように形質転換された細胞から準備できるが、これに限定されるものではない。

【 0 0 5 6 】

50

前記細胞の原形質体由来マイクロベシクルにロードされる物質は、前記細胞に由来せず、細胞の外部から準備された物質であってもよい。また、ロードされる物質は、1種の物質であってもよく、2種以上の組み合わせ物質であってもよいが、これに限定されない。

【0057】

前記細胞に由来せず、細胞の外部から準備された物質をロードする方法は、下記の方法を含む：1)細胞に直接物質をロードする方法、2)原形質体を作った後、ロードする方法、3)マイクロベシクル製造の際にロードする方法、及び4)原形質体由来マイクロベシクルを作った後、ロードする方法。

【0058】

また、多様な物理的、化学的及び/又は生物学的方法で前記物質をロードすることができるが、これに限定されない。

【0059】

より具体的に、細胞の外部から準備された多様な物質を次の様々な方法で本発明のマイクロベシクルにロードすることができる：

一つ目、治療、診断及び/又はワクチンのための多様な物質を既にロードした細胞からマイクロベシクルを製造する。例えば、治療及び診断のための多様な物質を培養液に含ませて細胞を培養すると、前記物質がロードされた細胞を収得することもでき、或いはエレクトロポレーション法で細胞に物質をロードすることもできる。このような細胞から得た原形質体から自然に分泌される、或いは超音波分解、押出、機械的分解などの方法で製造したマイクロベシクルには、前記物質がロードされている。

【0060】

二つ目、治療、診断及び/又はワクチンのための多様な物質を既にロードした原形質体からマイクロベシクルを製造する。例えば、細胞から原形質体を製造した後、治療及び診断のための多様な物質を培養液に含ませて原形質体を培養すると、前記物質がロードされた原形質体を収得することもでき、或いはエレクトロポレーション法で原形質体に物質をロードすることもできる。このような原形質体から自然に分泌される、或いは超音波分解、押出、機械的分解などの方法で製造したマイクロベシクルには、前記物質がロードされている。

【0061】

三つ目、原形質体由来マイクロベシクルの製造過程で前記物質をロードする。例えば、原形質体が含まれた溶液に前記物質を添加した後、原形質体より大きさが小さいフィルターを通過させる押出法でマイクロベシクルを製造すると、マイクロベシクルに前記物質がロードされる。

【0062】

四つ目、原形質体由来マイクロベシクルを製造した後、前記物質をロードすることができる。例えば、多様な物質を懸濁液に含ませてマイクロベシクルと培養し、或いはエレクトロポレーション方法で既に製造したマイクロベシクルに物質をロードすることができる。

【0063】

ところが、本発明で使用できる物質を原形質体由来マイクロベシクルにロードする方法は、これらの例に限定されない。

【0064】

原形質体由来マイクロベシクルにロードすることが可能な治療用及び/又は診断用物質としては、当業界で通常使用される抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤(angiogenesis inhibitor)、ペプチド、タンパク質、核酸、ビーズ、マイクロ粒子、ナノ粒子、脂質、細胞代謝産物などの多様な種類の物質が制限なく使用できる。

【0065】

抗癌剤は癌の成長及び転移を抑制させるために使用される全ての薬剤を総称し、大部分の抗癌剤は癌細胞のDNAの複製、転写及び翻訳過程を遮断する。本発明の治療用物質と

10

20

30

40

50

して使用できる抗癌剤の種類は特に限定されない。抗癌剤は、癌細胞の種類、抗癌剤の吸収速度（治療期間と抗癌剤の投与経路）、腫瘍の位置、腫瘍のサイズなど、抗癌剤選択の際に考慮すべき一般的な原則の下で選択できる。具体的に、本発明で使用できる抗癌剤は、DNAアルキル化剤(DNA alkylating agent)としてのメクロルエタミン(mechlorethamine)、クロラムブシル(chlorambucil)、フェニルアラニン(phenylalanine)、マスタード(mustard)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、イホスファミド(ifosfamide)、カルムスチン(carmustine : BCNU)、ロムスチン(lomustine : CCNU)、ストレプトゾトシン(streptozotocin)、ブスルファン(busulfan)、チオテパ(thiotepa)、シスプラチン(cisplatin)、及びカルボプラチン(carboplatin)などが使用でき、抗癌剤として、抗癌剤(anti-cancer antibiotics)としてのダクチノマイシン(dactinomycin : アクチノマイシンD(actinomycin D))、ドキシソルピシン(doxorubicin : アドリアマイシン(adriamycin))、イダルピシン(idarubicin)、ミトキサントロン(mitoxantrone)、プリカマイシン(plicamycin)、マイトマイシン(mitomycin)、及びCブレオマイシン(C bleomycin)などが使用でき、植物アルカロイド(plant alkaloid)としてのビンクリスチン(vincristine)、ビンブラスチン(vinblastine)、パクリタキセル(paclitaxel)、ドセタキセル(docetaxel)、ダウノルピシン(daunorubicin)、タキソール(taxol)、オンコビン(oncovin)、プレドニゾン(prednisone)、シスプラチン(cisplatin)、ハーセプチン(herceptin)、リツキシマブ(rituximab)、エトポシド(etoposide)、テニポシド(teniposide)、トポテカン(topotecan)、及びイリドテカン(iridotecan)などよりなる群から選択できる。また、当業界で通常使用される放射性物質を用いることもできる。ところが、本発明で使用できる抗癌剤がこれらの例に限定されるものではない。

【0066】

また、本発明の原形質体由来マイクロベシクルにロードすることが可能な抗炎症剤は、デキサメタゾン(dexamethasone)、ソルメドロール(solumedrol)、アスピリン(aspirin)、インドメタシン(indomethacin)、イブプロフェン(ibuprofen)、プロピオン酸クロベタゾール(clobetasol propionate)、酢酸ジフロラゾン(diflorasone diacetate)、プロピオン酸ハロベタゾール(halobetasol propionate)、アムシノニド(amcinonide)、フルオシノニド(flucicnonide)、フランカルボン酸モメタゾン(mometasone furoate)、デソキシメタゾン(desoximetasone)、ジクロフェナク(diclofenac)、及びピロキシカム(piroxicam)などよりなる群から選択できるが、本発明で使用できる抗炎症剤がこれらの例に限定されない。

【0067】

本発明における「癌」とは、正常な細胞死滅バランスが壊れる場合に細胞が過剰増殖し、周辺組織に浸潤することが可能な特徴を持つ疾病群をいう。肺癌、喉頭癌、胃癌、大腸/直腸癌、肝癌、胆嚢癌、膵臓癌、乳癌、子宮頸癌、前立腺癌、腎臓癌、皮膚癌などの上皮細胞などに由来する癌腫(carcinoma)、骨肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、線維細胞肉腫などの結合組織細胞に由来する肉腫(sarcoma)、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫などの造血細胞に由来する血液癌、及び神経組織に発生する腫瘍などよりなる群から、本発明が治療しようとする標的が選択できるが、これに限定されない。

【0068】

本発明における「血管疾患」は、血管内或いは血管壁に代謝性、感染性、毒性又は免疫性の原因によって血管内或いは血管壁に障害が発生する疾患群である。動脈硬化症(或いは粥状硬化症)、狭心症、急性心筋梗塞、脳卒中、血管性痴呆、その他の虚血性血管疾患などの代謝性血管疾患、敗血症、全身性播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation)、血栓/塞栓症、血管炎、糸球体腎炎、急性呼吸不全症候群、肺気腫などの感染性、毒性又は免疫性血管疾患などよりなる群から、本発明が治療しようとする標的が選択できるが、これに限定されない。

【0069】

本発明における「炎症」は、体液が組織細胞の間に増加して現れる浮腫、血管拡張による充血、発熱物質と血管拡張による発熱、アラキドン酸代謝産物による疼痛現象などの症

状又は症候として現われ、時間によって急性、亜急性、慢性炎症に分類することができ、病態生理によって感染性、アレルギー性、自己免疫性、毒性、代謝性、外傷性炎症疾患に分類することができる。鼻炎、副鼻腔炎、中耳炎、鼻咽頭炎、喉頭炎、気管支炎、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、細気管支炎、肺炎、肺線維化症などの呼吸器系炎症疾患、口腔炎、食道炎、胃炎、消化性潰瘍、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、胆嚢炎、胆道炎、膵臓炎、肝炎などの消化器系炎症疾患、アトピー皮膚炎、乾癬などの皮膚炎症疾患、心内膜炎、心筋炎、心嚢炎、血管炎、動脈硬化症、敗血症などの心血管系炎症疾患、甲状腺炎、副甲状腺炎、糖尿病などの内分泌系炎症疾患、糸球体腎炎、腎症、癲癇性腎疾患、睾丸炎、卵巣炎、子宮内膜炎、膣炎などの泌尿生殖系炎症疾患、リウマチ性関節炎、脊椎関節病、骨関節炎、通風、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、ミオパシー(myopathy)、シェーグレン症候群、ベーチェット病、抗リン脂質症候群などの筋骨格系炎症疾患、血管性痴呆、アルツハイマー病、退行性脳疾患、鬱症、精神分裂症などの脳精神系炎症疾患などよりなる群から、本発明が治療しようとする標的が選択できるが、これに限定されない。

10

【0070】

血管新生阻害剤(angioinhibitor)は、既存の血管から新しい血管が作られる過程を抑制するために使用される全ての薬剤を総称する。大部分の血管新生阻害剤は、癌の成長及び転移を抑制し、炎症反応を抑制し、血管疾患を予防又は治療することができる。本発明の治療用物質として使用できる血管新生阻害剤の種類は特に限定されない。

20

【0071】

原形質体由来マイクロベシクルにロードすることが可能な治療及び/又は診断用物質として、タンパク質又はペプチドを使用することができる。血管内皮細胞成長因子(vascular endothelial growth factor、VEGF)、EGF(epidermal growth factor)などの成長因子、インターロイキン(interleukin、IL)-1、インターフェロン(interferon、IFN)- α 、IL-10などのサイトカイン(cytokine)類、各種抗体治療剤、多様なペプチド又はDNA分解酵素(DNase)以外に、癌の成長及び転移を抑制し且つ炎症反応を抑制することが可能な多様なタンパク質及びペプチドを制限なく使用することができる。

【0072】

前記タンパク質又はペプチドは、細胞内に発現されることも、細胞膜にディスプレイされることもでき、全体又は活性を示す部位が単独で或いは融合タンパク質の形で発現されることもできる。特に、マイクロベシクルの表面にロードされたタンパク質又はペプチドは、局所濃度(local concentration)が高いため、単独で存在する場合より活性が高いことがよく知られている。よって、マイクロベシクルの表面にロードされた細胞接合因子、成長因子、サイトカインなどのリガンド自体又はこれらの融合タンパク質はリガンドディスプレイ(ligand display)用として利用されることもでき、或いは抗体、受容体自体又はこれらの融合タンパク質はリガンドの機能を阻害するリガンドトラップ(ligand trap)用として利用されることもできるが、リガンドディスプレイ及びリガンドトラップとして利用できるタンパク質又はペプチドは上述した例に限定されるものではない。

30

【0073】

本発明に係る前記原形質体由来マイクロベシクルにロードすることが可能な治療用又は診断用物質として毒素を含ませることができる。毒素は、多様な生物体に由来するもので、体内に吸収されたときに毒性を示すものを総称し、毒素を介して細胞死滅を誘導することができる。本発明の治療用物質として使用できる毒素の種類は特に限定されない。

40

【0074】

原形質体由来マイクロベシクルにロードすることが可能な核酸は、DNA、RNA、アプタマー(aptamer)、LNA(locked nucleic acid)、PNA(peptide nucleic acid)、及びモルホリノ(morpholino)よりなる群から選択できる。具体的に、DNA、miRNA、siRNA、アンチセンスRNA、センス(sense)RNA、アプタマーを使用することができ、核酸類似体であるLNA、PNA、モルホリノなどを使用することができるが、

50

これに限定されない。このような核酸は、センス効果、アンチセンス効果、RNA干渉及びタンパク質の機能阻害などの目的で利用できる。

【0075】

蛍光タンパク質を暗号化(encode)する核酸又は多様な蛍光物質をロードした原形質体由来マイクロベシクルを診断に利用することができる。特定の細胞又は組織を標的とする原形質体由来マイクロベシクルに、蛍光タンパク質を暗号化しているプラスミド(plasmid) DNAをロードし、これを生体に注入すると、その標的細胞又は組織の存在を、蛍光タンパク質から放出される蛍光シグナルから分ることができる。また、特定の細胞又は組織を標的とする原形質体由来マイクロベシクルに蛍光放出量子ドット(quantum dot、Q-dot)を含む多様な蛍光物質を含ませて生体に注入すると、その標的細胞又は組織の存在を蛍光シグナルから分ることができる。特定の標的細胞又は組織に発生する蛍光を診断に利用することができる。細胞死滅を誘導する蛍光放出量子ドットは治療目的でも利用することができる。

10

【0076】

原形質体由来マイクロベシクルにロードすることが可能な他の治療及び/又は診断用物質の例として、蛍光物質以外に、他のマイクロ粒子又はナノ粒子を使用することができる。酸化鉄、金、炭素ナノチューブなどのマイクロ粒子又はナノ粒子を使用することができるが、これに限定されない。電磁ビーズ(magnetic bead)などのビーズをマイクロベシクルにロードして使用することもできる。酸化鉄などの磁性粒子は磁気共鳴映像(MRI)を得る造影剤として利用できる。ナノ粒子と結合した核酸や、ナノ粒子と結合したタンパク質なども使用することができ、診断に有用な放射性物質も使用することができる。

20

【0077】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体に由来し且つワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを含む薬学的組成物を提供する。

【0078】

前記本発明の原形質体由来マイクロベシクルにロードすることが可能なワクチン用物質は、当業界で通常使用される抗原、免疫補強剤、免疫調節物質などの多様な種類の物質が制限なく使用できる。

【0079】

前記抗原として、特定のウイルス又は細菌に由来するタンパク質或いは脂質/炭水化物などの非タンパク質抗原をロードすることができる。また、特定の癌細胞に由来するタンパク質抗原をロードすることができる。また、抗原を単独で或いは2つ以上組み合わせ(combination)ロードすることができる。例えば、細菌に由来する2つ以上の抗原をロードすることができ、細菌由来抗原、癌細胞に由来する抗原、ウイルスに由来する抗原を同時にロードすることができる。

30

【0080】

本発明において、前記細菌由来抗原は、エンテロバクター菌(Enterobacter aerogenes & Enterobacter cloacae)、ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、肺炎桿菌(Klebsiella pneumonia)、アシネトバクター・バウマニ(Acinetobacter baumannii)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、大便連鎖球菌(Enterococcus faecalis)に由来するものでありうるが、これに限定されない。

40

【0081】

また、本発明において、前記ウイルス由来抗原は、HIV(Human immunodeficiency virus)、HPV(Human papilloma virus)、HBV(Hepatitis B virus)、HCV(Hepatitis C virus)、インフルエンザウイルス(Influenza virus)に由来するものでありうるが、これに限定されない。

【0082】

抗原は、原形質体由来マイクロベシクルを製造する細胞又は形質転換された細胞に由来してもよく、外部から準備された物質であってもよい。例えば、外部から準備した抗原として、特定のウイルス、細菌、癌細胞又は癌組織の構成物質全体又は一部をロードするこ

50

とができる。

【0083】

免疫補強剤としては、抗体反応を増加させるか或いは特定のT細胞免疫反応を増加させるために、二重螺旋RNA(dsRNA)、コレラ毒素(cholera toxin)、ミョウバン(alum)などの免疫補強剤をロードすることができる。免疫調節物質としては、抗原特異免疫反応を亢進させる目的でIL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL-17、IFN- γ などのサイトカイン、又はVEGF、線維芽細胞成長因子(Fibroblast growth factor、FGF)-2などの成長因子をロードすることができる。

【0084】

本発明における前記薬学的組成物は、前記抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤、ペプチド、タンパク質、毒素、核酸、ビーズ、マイクロ粒子及びナノ粒子のうち少なくとも1種の有効成分以外に、薬学的に許容される担体、すなわち食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、シクロデキストリン、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール、リポソーム、及びこれらの成分のうち1種以上を混合して使用することができ、必要に応じて他の通常の添加剤、例えば抗酸化剤、緩衝液などをさらに含むことができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び/又は潤滑剤を付加的に添加して水溶液、懸濁液、乳濁液などの注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒又は錠剤に製剤化することができる。ひいては、当該技術分野の適正の方法で、或いはレミントンの文献(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)に開示されている方法を用いて各成分に応じて望ましく製剤化することができる。本発明の薬学的組成物は、剤形に特別な制限はないが、注射剤又は吸入剤に製剤化することが好ましい。

【0085】

本発明の薬学的組成物の投与方法は、特に限定されるものではないが、目的の方法に応じて静脈内、皮下、腹腔内、吸入又は局所適用などの非経口投与、又は経口投与することができる。投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄率及び疾患の重症度などによってその範囲が様々である。1日投与量は、治療を必要とする個体に投与されることにより軽減した疾病状態に対する治療に十分な本発明の治療用物質の量を意味する。治療用物質の効果的な量は特定の化合物、疾病状態及びその深刻度、治療を必要とする個体によって異なり、これは当業者によって通常決定できる。非制限的な例として、本発明に係る組成物の人体に対する投与量は、患者の年齢、体重、性別、投与形態、健康状態及び疾患の程度などによって異なる。例えば、体重70kgの成人患者を基準とするとき、一般には0.1~1000mg/日、好ましくは1~500mg/日であり、一定の時間間隔で1日1回~数回に分割して投与することもできる。

【0086】

本発明において、「個体」とは、癌、血管疾患、又は炎症性疾患の治療を必要とする対象を意味し、より具体的にはヒト、又は非ヒトである霊長類、マウス(mouse)、ラット(rat)、イヌ、猫、馬及び牛などの哺乳類を意味する。

【0087】

本発明の別の観点では、前記本発明に係る原形質体由来マイクロベシクルを含む、疾病の治療用、診断用及び/又はワクチン用物質伝達用組成物を提供する。

【0088】

本発明の別の観点では、前記本発明に係る原形質体由来マイクロベシクルを含む、疾病の治療用、診断用及び/又はワクチン用物質伝達システムを提供する。

【0089】

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質は前述したとおりである。

【0090】

本発明の別の観点では、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法を提供する。

【0091】

10

20

30

40

50

前記マイクロベシクルは、細胞から自然に分泌されるシェディング(shedding)マイクロベシクル及び人工マイクロベシクルを含む。

【0092】

原形質体由来人工マイクロベシクルは原形質体に多様な機械的、電気的、化学的方法を加えて製造できる。浸透圧を用いた細胞溶解、エレクトロポレーション(electroporation)、超音波分解(sonication)、均質化(homogenization)、洗剤(detergent)処理、冷凍-解凍(freeze-thaw)、押出(extrusion)、機械的分解、化学物質処理などの方法を使用することができるが、本発明の製造方法はこれに限定されるものでない。原形質体が入っている溶液に金属、セラミック、又は十分に硬いプラスチック玉を入れ、揺らして原形質体を機械的方法で分解することもできる。押し出してマイクロベシクルを製造する場合には、孔径の大きいフィルターから孔径の小さいフィルターへ細胞含有溶液を順次通過させることにより、細胞が適正の大きさに碎かれるようにすることができる。例えば、孔径が10 μm 5 μm 1 μmの順で小さくなるフィルター3つを順次使用してマイクロベシクルを製造することができる。

10

【0093】

前記本発明に係る製造方法の一具現例は、下記の段階を含む：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【0094】

前記本発明に係る製造方法の別の具現例は、下記の段階を含む：細胞に治療用、診断用又はワクチン用物質を外部からロードし、細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

20

【0095】

前記本発明に係る製造方法の別の具現例は、下記の段階を含む：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体に治療用、診断用又はワクチン用物質を外部からロードする段階、前記物質がロードされた原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【0096】

前記本発明に係る製造方法の別の具現例は、下記の段階を含む：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してマイクロベシクルを製造する段階、及び前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

30

【0097】

前記本発明に係る製造方法の別の具現例は、下記の段階を含む：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、前記製造されたマイクロベシクル懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してマイクロベシクルにロードする段階、及び前記懸濁液から治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを分離する段階。

【0098】

前記本発明に係る製造方法の別の具現例は、下記の段階を含む：細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階、及び前記分離されたマイクロベシクルを含む懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してロードする段階。

40

【0099】

前記製造方法は、前記マイクロベシクルの含まれた懸濁液から、前記治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを分離する段階をさらに含むことができる。

【0100】

50

前記分離段階は、超遠心分離(ultracentrifugation)、密度勾配(density gradient)、濾過(filtration)、透析(dialysis)及び自由流動電気移動法(free-flow electrophoresis)よりなる群から選ばれた方法を用いて行われてもよい。

【0101】

密度勾配は密度の異なる物質を区分するときに最も多く用いられる方法である。本発明のマイクロベシクルは、自由分子(free molecule)などと密度が区分されるため、密度勾配を介して分離することができる。この方法の具体的な例としては、フィコル(ficoll)、グリセロール(glycerol)、スクロース(sucrose)、オプティプレップ(OptiPrepTM)などの密度勾配を使用することができるが、本発明の密度選別方法がこれらに制限されない。治療及び診断のための分子がロードされたマイクロベシクルとロードされていないマイクロベシクルの密度が互いに異なるという性質を用いて、2種のマイクロベシクルを分離することができる。密度勾配は遠心分離又は電気泳動(electrophoresis)などと共に使用することができる。マイクロベシクルを選別するために、ゲル濾過(gel filtration)又は限外濾過(ultrafiltration)を使用することもできる。大きさの小さい分子を除去するために濾過の代わりに透析を使用することができる。この他にも、自由流動電気移動法を使用することもできる。

10

【0102】

目的に応じて、大きさが一定の範囲にあるマイクロベシクルを選別して使用することができる。マイクロベシクルの大きさを選別する段階は、治療用又は診断用物質をマイクロベシクルにロードする段階より先に行っても、同時に行っても、後で行ってもよい。

20

【0103】

前記原形質体由来マイクロベシクルにロードされる治療用、診断用及び/又はワクチン用物質は、特に限定されず、前述したとおりである。

【0104】

例えば、原形質体由来マイクロベシクルを製造する細胞又は形質転換された細胞に由来する物質、或いは細胞に由来せず細胞の外部から準備された物質でありうる。ロードされる物質は1種の物質であってもよく、2種以上の組み合わせ物質であってもよいが、これに限定されない。前記原形質体由来マイクロベシクルに治療油、診断用及び/又はワクチン用物質をロードすることは、原形質体由来マイクロベシクルの表面に露出させ或いは内部に内包させることを意味するが、これに限定されない。

30

【0105】

本発明の別の具現例として、前記製造方法は、細胞膜の構成成分の一部を改質する段階をさらに含むことができる。前記細胞膜構成成分の改質は多様な方法で行われ得る。例えば、別途準備した融合タンパク質と細胞の混合液からマイクロベシクルを製造し、融合タンパク質が表面に露出されたマイクロベシクルを準備することができる。マイクロベシクルの表面にポリエチレングリコールを結合させてステルス-マイクロベシクルを製造することができる。また、マイクロベシクルにシクロデキストリンを添加する場合、不特異的ターゲットを減少させることができる。シクロデキストリンは、水溶性と脂溶性を同時に持っている物質であって、マイクロベシクルの表面に付いて脂質間の不特異的結合を阻害することができる。化学的にマイクロベシクルを改質して使用することもできる。例えば、システインを含むタンパク質の部分が細胞膜の表面に露出した細胞からマイクロベシクルを製造した後、システインのチオール基に化学的な方法で様々な分子を結合させてマイクロベシクルを改質することができる。また、細胞膜タンパク質に存在するアミン基に化学的な方法で様々な分子を結合させて改質することもできる。

40

【0106】

前記本発明の製造方法は、その起源となる原形質体の細胞膜と比較してトポロジーが変形した膜を有するマイクロベシクルを除去する段階をさらに含むことができる。すなわち、マイクロベシクルを製造した後、目的に応じて元来細胞の細胞膜とトポロジーが同一のマイクロベシクルのみを選択して使用することができる。細胞膜タンパク質のうち、細胞質ドメイン(cytoplasmic domain)を認知する抗体などの物質を用いて、この細胞質ドメイ

50

ンが外部に露出されたしたマイクロベシクルを除去することができる。すると、細胞膜の内外が入れ替わったマイクロベシクルは除去され、残ったマイクロベシクルの外部には元来細胞の細胞膜の外部に露出された細胞膜タンパク質のみが存在する。

【0107】

本発明の別の観点は、前記本発明に係る原形質体由来マイクロベシクルを含む治療用、診断用及び/又はワクチン用物質を特異細胞又は組織などに伝達する方法を提供する。

【0108】

具体的に、前記治療用、診断用及び/又はワクチン用物質を特異の細胞又は組織などに伝達する方法は、原形質体由来細胞膜成分から膜が形成され、大きさが前記原形質体より小さく且つ前記物質がロードされた原形質体由来マイクロベシクルを使用することを含む。必要に応じて標的誘導物質及び/又は細胞膜融合物質がロードされた原形質体由来マイクロベシクルを用いて前記治療用、診断用及び/又はワクチン用物質を特異の細胞又は組織などに伝達することもできる。

10

【0109】

前記特異の細胞又は組織には制限がない。例えば、前記特異の細胞は内皮細胞、癌細胞、炎症細胞又は免疫細胞であってもよく、前記特異の組織は血管、癌組織又は炎症組織であってもよい。また、前記治療用、診断用又はワクチン用物質は前述したとおりである。

【0110】

前記本発明の一具現例において、2種以上の前記物質を特異の細胞又は組織に伝達することができる。

20

【0111】

前記本発明の別の具現例において、1種の前記物質がロードされたマイクロベシクル、2種以上の前記物質がロードされたマイクロベシクル、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上のマイクロベシクルを用いて前記物質を伝達することができる。例えば、前記2つ以上のマイクロベシクルを同時に投与することができる。

【0112】

前記本発明の別の具現例において、1種の前記物質がロードされたマイクロベシクル、2種以上の前記物質がロードされたマイクロベシクル、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上のマイクロベシクルを順次投与して前記物質を伝達することができる。

30

【0113】

より具体的に、2種以上の物質を同時にロードしたマイクロベシクルを用いて2種以上の物質を伝達することができる。或いは、1種又は2種以上の物質がロードされたマイクロベシクルを複数個用いて2種以上の物質を伝達することができる。例えば、3種の物質を伝達する場合、各物質を含む第1、第2、第3マイクロベシクルを製造して使用することができる。第1、第2物質を含む第4マイクロベシクルと、第3物質を含む第5マイクロベシクルを準備し、第4、第5マイクロベシクルを用いて3種の物質を伝達することができる。第1、第2、第3マイクロベシクルを同時に投与することもでき、順次投与することもできる。第4、第5マイクロベシクルを同時に投与することもでき、順次投与することもできる。

40

【0114】

必要な場合、原形質体由来マイクロベシクルを製造する過程で核酸分解酵素などを添加して、治療用、診断用及び/又はワクチン用物質の伝達に必要な核酸などをマイクロベシクルの内部から除去することもできる。

【0115】

本発明の別の観点は、疾病の診断用又は治療用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルを用いて前記物質を特異細胞又は組織に伝達することを含む、疾病の治療及び/又は診断方法を提供する。すなわち、前記マイクロベシクルを用いて疾病の診断用又は治療用物質を標的した細胞、組織又は血液に伝達することができる。

【0116】

50

原形質体から製造されるマイクロベシクルは、既存のリボソームのように多様なサイズに容易に作ることができ、伝達しようとする多様な治療用、診断用又はワクチン用物質を容易にロードさせることができるため、1種又は多種の物質を伝達することができるので、単独治療、併合治療、診断だけでなく、診断及び治療の2つの目的で使用される診断・治療(theragnosis, pharmacodiagnosis)に利用することができる。この際、伝達しようとする多様な物質は、マイクロベシクルに内包(encapsulated)されてマイクロベシクルの二重膜の内側に存在してもよく、細胞膜タンパク質のように前記物質の全部又は一部がマイクロベシクルの二重膜に埋め込まれていても組み込まれて(embedded)いてもよく、マイクロベシクルの表面に結合してもよい。

【0117】

例えば、癌の血管を介して癌組織にいずれの物質が伝達されるとき、一般に100nm以上の物質はEPR(enhanced permeability and retention)効果によって癌組織に永らく留まることができる。よって、100nmより大きいベシクルにロードされた薬物は、癌組織に留まることが可能な時間が長くて薬物の効果を極大化することができるため、診断及び治療に有用である。また、肺組織は、その構造上、サイズ1 μ m以下の粒子のみが吸入を介して肺胞まで伝達できるので、サイズ1 μ m以下のマイクロベシクルに喘息などの治療のための炎症抑制剤などの物質をロードして肺組織に効果的に薬物を伝達することができる。このようにマイクロベシクルは診断用又は治療用物質が必要な組織に応じて多様なサイズに製造できる。好ましくは、本発明の原形質体由来マイクロベシクルのサイズは10nm以上10 μ m以下である。

【0118】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体に由来し且つワクチン用物質が含まれたマイクロベシクルを用いて前記ワクチン用物質を特異の細胞又は組織に伝達することを含む、疾病の予防及び/又は治療方法を提供する。前記ワクチン用物質は前述したとおりである。

【0119】

本発明の別の観点は、細胞の原形質体に由来し、前記原形質体より小さいサイズであり、疾病の診断に必要なプライマー、プローブ、アンチセンス核酸、又は抗体がロードされたマイクロベシクルを含む疾病診断用キットを提供する。

【0120】

本発明において、前記治療用物質、診断用物質又はワクチン用物質を含んで多様な物質(ら)がロードされた原形質体由来するマイクロベシクル及びその製造方法は、特定物質の特定細胞又は組織などへの伝達のために*in vitro*及び/又は*in vivo*で治療用、診断用及び/又はワクチン用、又は実験用として使用できる。例えば、酵素、前記治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた原形質体由来マイクロベシクル及びその製造方法は、*in vitro*実験用として使用でき、また、*in vitro*実験を介して*in vivo*で治療可能な形態に細胞を変形させる用途としても使用することができるが、これに限定されるものではない。

【実施例】

【0121】

以下、本発明の理解を助けるために好適な実施例を提示する。ところが、下記の実施例は本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、本発明の内容を限定するものではない。

【0122】

[実施例1：グラム陰性菌からのリゾチーム処理による原形質体(protooplast)の製造]
図1はグラム陰性菌からリゾチーム処理によって原形質体を作った後、原形質体由来するマイクロベシクルに薬物をロードする方法を示す模式図である。

【0123】

図1に示すように、まず、グラム陰性菌から原形質体を製造した。具体的に、グラム陰性菌であるE.coli w3110 msbB細菌をLB培地でO.D₆₀₀ = 1.0となるように生育させた後、3,000 \times gで10分間遠心分離を行って細菌細胞を沈殿さ

10

20

30

40

50

せた後、細菌細胞を得た。予め作っておいたプロトプラスト用溶液(protoplasting buffer) 100 mLに懸濁(resuspension)した後、EDTAを0.01 Mとなるようにゆっくり入れ、40分間37℃で100 rpmにて振盪しながら培養(incubation)した。さらに3,000 × gで10分間遠心分離を行い、沈殿した細菌細胞を得、MgCl₂ 0.02 Mが添加されたプロトプラスト用(protoplasting)溶液100 mLに懸濁した。

【0124】

前記懸濁溶液にリゾチーム(lysozyme) 2 mg/mLを入れ、2時間37℃で100 rpmにて振盪しながら培養(incubation)し、5,000 × gで10分間遠心分離を行い、沈殿した原形質体を得、CaCl₂とMgCl₂が0.02 M添加されたTBS(Tris Buffered saline)溶液3 mLに懸濁した。また、外膜及び細胞壁が取り外された上澄み液を得た。

10

【0125】

原形質体を作られたことを確認するために、ビオチン(biotin)標識(labeling)された細菌と、ビオチン標識された細菌に由来する原形質体をそれぞれ準備した。5,000 × gで10分間遠心分離を行い、壊れていない細菌細胞を除去し、タンパク質含有上澄み液を得た。各サンプルから得たタンパク質と原形質体を作るときに取り外れた外膜及び細胞壁を含む上澄み液をそれぞれ5 × ローディング染色剤(loading dye、250 mM Tris-HCl、10% SDS、0.5% ブロモフェノールブルー(bromophenol blue)、50% グリセロール)を最終的に1 × となるように仕込み、100℃で5分間高温処理した。8% ポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide gel)を準備し、サンプルをロードした。80 Vで2時間電気泳動した後、400 mAで2時間タンパク質をPVDf(polyvinylidene fluoride)メンブレインへトランスファー(transfer)した。スキムミルクをPBSに3%となるように溶かした後、メンブレインをこの溶液で2時間ブロッキング(blocking)した。ペルオキシダーゼ(oxidase)が付いているビオチン抗体を4℃で12時間処理した。PBSで30分洗浄した後、ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham Co. No. RPN 2106)基質(substrate)で確認して図2に示した。

20

【0126】

図2に示すように、細菌の場合はビオチンに対する抗体反応が現れているが、原形質体の場合はビオチンに対する抗体反応が現れていない。また、ビオチン標識された外膜及び細胞壁のある上澄み液においてビオチンに対する抗体反応が現れた。この結果は、リゾチームを処理する場合、細菌に存在する外膜及び細胞壁が取り除かれ、外膜及び細胞壁に存在するタンパク質が取り除かれたことを意味する。前記結果より、リゾチームによって細菌の外膜及び細胞壁部分が取り除かれた原形質体が製造されたことが明白である。

30

【0127】

[実施例2：押出法によるグラム陰性菌の原形質体由来マイクロベシクルの製造]

図1に示した模式図において、押出法と密度勾配法を用いて原形質体由来マイクロベシクルを製造した。

【0128】

実施例1の方法によって得たグラム陰性菌の原形質体を、孔径10 μmのメンブレインフィルター(membrane filter)を3回通過させた後、孔径5 μmのメンブレインフィルターを3回通過させ、次いで孔径1 μmのメンブレインフィルターを3回通過させた。容量5 mLの超遠心分離チューブ(ultracentrifuge tube)にそれぞれ50% オプティブレップ1 mL、5% オプティブレップ1 mL、メンブレインフィルターを通過した原形質体懸濁液3 mLを順次入れた。その後、100,000 × gで2時間超遠心分離(ultracentrifugation)した。50% オプティブレップと5% オプティブレップとの間の層から原形質体由来マイクロベシクルを得た。

40

【0129】

[実施例3：グラム陰性菌とグラム陽性菌の原形質体に由来するマイクロベシクルの特性]

実施例1及び実施例2の方法によって、グラム陰性菌としての大腸菌(E.coli)及びグラ

50

ム陽性菌としての枯草菌(*B.subtilis*)の原形質体に由来するマイクロベシクルを製造し、それぞれの特性を分析した。

【0130】

具体的に、それぞれのマイクロベシクルをグロー放電炭素コート銅グリッド(glow-discharged carbon-coated copper grid)で3分間吸着させた。グリッドを蒸留水で洗浄した後、2%酢酸ウラニル(uranylacetate)で染色(staining)した。JEM101(Jeol、日本)電子顕微鏡で観察し、その結果を図3及び図4に示した。

【0131】

図3はグラム陰性菌としての大腸菌原形質体に由来するマイクロベシクルの透過電子顕微鏡(transmission electron microscope、TEM)写真であり、図4はグラム陽性菌としての枯草菌の透過電子顕微鏡写真である。図3及び図4の透過電子顕微鏡イメージから分かるように、細菌から押出法で製造した原形質体由来マイクロベシクルは、脂質二重層から構成されており、略球状をしているものと確認された。グラム陰性菌由来原形質体はサイズが100~200nmであり、グラム陽性菌由来原形質体はこれよりさらに小さい50~100nmであることが分かる。

10

【0132】

また、前記マイクロベシクルをそれぞれ5µg/mLの濃度でPBS1mLに希釈した。それぞれのマイクロベシクルが入っているPBS1mLをキュベット(cuvette)に仕込み、動的光散乱粒度分析器で分析してその結果を図5及び図6に示した。

【0133】

図5はグラム陰性菌としての大腸菌原形質体由来マイクロベシクルのサイズを測定したグラフであり、図6はグラム陽性菌としてのブドウ球菌原形質体由来マイクロベシクルのサイズを測定したグラフである。図5に示すように、グラム陰性菌由来原形質体はサイズが100~200nmであり、図6に示すように、グラム陽性菌由来原形質体はこれよりさらに小さい50~100nmであると確認された。

20

【0134】

[実施例4：細菌由来マイクロベシクルと細菌の原形質体由来マイクロベシクルによる*in vitro*副作用の比較]

実施例1及び実施例2の方法によって、グラム陰性菌としての大腸菌(*E.coli*)及びグラム陽性菌としてのブドウ球菌(*S.aureus*)の原形質体に由来するマイクロベシクルを製造した。また、グラム陰性菌由来マイクロベシクル[Proteomics. 2007 Sep; 7(17):3143-53.]とグラム陽性菌由来マイクロベシクル[Proteomics. 2009 Dec;9(24):5425-36.]を既存の公知の方法によって得た。

30

【0135】

免疫反応を調べるために、マクロファージに細菌由来マイクロベシクルと細菌原形質体由来マイクロベシクルをそれぞれ処理し、マクロファージが分泌する炎症関連サイトカインTNF- α の量をELISA方法で測定した。

【0136】

マウスマクロファージ(Raw264.7)にそれぞれのマイクロベシクルを1000ng/mLで16時間処理して炎症反応を誘導した。16時間後、細胞の条件培地を得、500×gで5分間遠心分離して上澄み液を得た。TNF- α 抗体がコートされた96ウェルプレートを準備し、ウェルプレートに1%BSA/PBSを100µL仕込んで1時間固定(blocking)した。得た条件培地を1/10希釈して仕込み、室温で2時間培養した後、ビオチンが付いているTNF- α に対する捕獲抗体(detection antibody)で2時間培養した。0.05%Tween-20が含まれたPBSで洗浄した後、ストレプトアビジン-POD(streptavidin-POD)で20分間培養し、BM-POD基質(substrate)を入れて発色を誘導した。

40

【0137】

図7はグラム陰性菌由来マイクロベシクルとグラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクルによるTNF- α の量を測定したグラフであり、図8はグラム陽性菌マイクロベシクル

50

とグラム陽性菌原形質体由来マイクロベシクルによるTNF- α の量を測定したグラフである。

【0138】

図7に示すように、グラム陰性菌である大腸菌に由来する外膜及び細胞壁のあるマイクロベシクルは炎症反応を誘導してTNF- α の分泌が増加するが、外膜及び細胞壁のない原形質体由来マイクロベシクルは炎症反応を誘導しないためTNF- α の分泌が対照群と類似であることを確認した。

【0139】

また、図8に示すように、グラム陽性菌である枯草菌に由来する細胞壁のあるマイクロベシクルは炎症反応を誘導してTNF- α の分泌が増加するが、細胞壁のない原形質体由来マイクロベシクルは炎症反応によるTNF- α の分泌が細菌由来マイクロベシクルより減少したことを確認した。

10

【0140】

上記結果より、細菌原形質体由来マイクロベシクルは、免疫反応による炎症反応が細菌由来マイクロベシクルより顕著に低いことを意味し、副作用を最小化することができることを意味する。

【0141】

[実施例5：細菌由来マイクロベシクルと細菌原形質体由来マイクロベシクルによるin vivo副作用の比較]

実施例1及び実施例2の方法によって、グラム陰性菌としての大腸菌(E.coli)の原形質体由来マイクロベシクルを製造した。また、グラム陰性菌由来マイクロベシクルを得た。

20

【0142】

それぞれ細菌由来マイクロベシクル25 μ gと細菌原形質体由来マイクロベシクル500 μ gをマウスの腹腔に投与した後、時間による生存率(survival)を確認して図9に示した。

【0143】

図9に示すように、細菌由来マイクロベシクルを投与する場合、48時間後に10匹のマウスのうち8匹が死んだが、細菌原形質体由来マイクロベシクルを投与したグループでは20倍高い量を投与しても何らの変化も無かった。

30

【0144】

また、細菌由来マイクロベシクル5 μ gと細菌原形質体由来マイクロベシクル5 μ gをマウスの腹腔に注射し、6時間後に血液を得て、血液内で炎症誘導サイトカインIL-6が生成されたかを確認した。前記で得た血液から血清のみを分離するために室温で30分間保管し、4 \times で1時間保管して血清を分離し、1,300 \times gで20分間遠心分離して細胞を除去し、上澄み液を得た。前記上澄み液を、IL-6抗体がコートされた96ウェルプレートに1%BSA/PBSを100 μ L入れて1時間固定(blocking)した。前記で得たマウスの血液を1/4希釈して仕込み、室温で2時間培養した後、ビオチンが付いているIL-6に対する捕獲抗体(Detection antibody)で2時間培養した。0.05%Tween-20が含まれたPBSで洗浄した後、ストレプトアビジン-PODで20分間培養し、BM-POD基質(substrate)を入れて発色を誘導した結果を図10に示した。

40

【0145】

図10に示すように、細菌由来マイクロベシクルを投与したとき、6時間後に炎症誘導サイトカインIL-6が血液内で増加したが、細菌原形質体由来マイクロベシクルを投与したグループでは何らの変化もないことを確認した。

【0146】

上記結果は、細菌由来マイクロベシクルを投与した場合に全身的な炎症反応による副作用が激しいが、原形質体由来マイクロベシクルを体内に投与する場合には高濃度でも副作用が殆どないことを意味する。

【0147】

50

[実施例 6 : 細菌由来プラスミドがロードされたマイクロベシクルの製造]

p M S C V ベクター (vector) に E G F P 遺伝子が融合された p M S C V - E G F P プラスミド (plasmid) を含む D H 5 大腸菌と、前記プラスミドを含まない大腸菌を培養して実施例 1 及び 2 と同様の方法で原形質体由来マイクロベシクルを製造した。製造された原形質体マイクロベシクルを鋳型として E G F P プライマー (primer) を用いて P C R 重合反応 (polymerase chain reaction) を行った後、D N A をアガロースゲル (T B E 緩衝溶液、1%) 電気泳動法で確認して図 1 1 に示した。使用した E G F P プライマーは次のとおりである。

【 0 1 4 8 】

前方プライマー (Forward Primer) : 5' - G G A A T T C C A T A T G G T G A G C A A G G G C G A G G A - 3'

10

【 0 1 4 9 】

後方プライマー (Reverse Primer) : 5' - A C G C G T C G A C T T A C T T G T A C A C C T C G T C C A T - 3'

【 0 1 5 0 】

図 1 1 に示すように、E G F P 遺伝子を含むプラスミドをロードしたマイクロベシクルは、E G F P プライマーによって遺伝子が増幅されてアガロースゲル上で観察された。しかし、E G F P 遺伝子がないマイクロベシクルでは観察されていない。

【 0 1 5 1 】

また、このマイクロベシクルにロードされたプラスミドが完全な形で入っているかを確認するために、Gene all miniprep kit (GENE ALL cat. # 101-102) を用いて、プラスミドがロードされたマイクロベシクルからプラスミドを抽出した。このように抽出したプラスミドをさらに大腸菌 B L 2 1 に熱衝撃によって形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に 1 m L の L B 培地を入れて 37 で 1 時間生育させた後、アンピシリン (ampicillin) の混合された L B 寒天培地プレートで 37 で 1 6 時間培養した。前記寒天培地プレートで生成された形質転換大腸菌コロニー (colony) のいずれか一つを 2 0 m L の L B 培地に入れ、アンピシリンの混合された L B 培地で 37 で $O.D_{600} = 1.0$ となるように生育させた後、さらに Gene all miniprep kit を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドに、それぞれ E G F P の前後を認識して切断する制限酵素を処理することにより、p M S C V ベクターと E G F P を分離させ、アガロースゲル (T B E 緩衝溶液、1%) 電気泳動法で確認して制限酵素マッピング (Enzyme mapping) した結果を図 1 2 に示した。

20

30

【 0 1 5 2 】

図 1 2 に示すように、E G F P をコードしている p M S C V プラスミド、及びバクテリアから抽出した p M S C V プラスミドの両方とも E G F P 遺伝子を持っており、かつ E G F P を除いた p M S C V ベクターを持っていることを確認した。

【 0 1 5 3 】

上記結果より、細菌由来プラスミドがロードされたマイクロベシクルを製造することができ、ロードされたプラスミドは既存の形態をそのまま保存していることが明白である。

【 0 1 5 4 】

[実施例 7 : 細菌由来プラスミドがロードされたマイクロベシクルの製造及び細菌へのプラスミド伝達能力]

細菌の原形質体由来マイクロベシクルが細菌にプラスミドを伝達して形質転換させることが可能な能力を有するかを確認するために、次の実験を行った。まず、緑色蛍光を帯びる細菌を作るために E G F P を発現するプラスミドを製作するために、E G F P の公知の D N A 塩基配列に基づいて特定の制限酵素を人為的に挿入して次のとおりプライマーを製作した。

【 0 1 5 5 】

前方プライマー : 5' - G G A A T T C C A T A T G G G T G A G C A A G G G C G A G G A - 3'

50

【0156】

後方プライマー：5' - A G G C G T C G A C T T A C T T G T A C A G C T C G T
C C A T - 3'

(下線は制限酵素 Nde I と Sal I の認識配列を意味する)

【0157】

前記プライマー及び GFP を発現する細胞のゲノム DNA を鋳型として PCR 重合反応を行った後、得られた PCR バンドを抽出して Quiaquick ゲル精製キット (QIAGEN、cat.#28104) で精製した。精製された生成物を制限酵素 Nde I と Sal I で 37 °C で 8 時間処理した後、さらに Quiaquick PCR 精製キットで精製し、同一酵素で処理された pHCE ベクターと連結させて挿入した。製造された組み換えベクターを「pHCE - GFP」と命名した。

10

【0158】

大腸菌 DH5 を熱衝撃形質転換によって前記 pHCE - GFP 融合ベクターで形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に 1 mL の LB 培地を入れて 37 °C で 1 時間生育させた後、アンピシリン (ampicilin) の混合された LB 寒天培地プレートで 37 °C で 16 時間培養した。前記寒天培地プレートで生成された形質転換大腸菌コロニーのうち、pHCE - GFP を含むコロニーを、コロニー - PCR と制限酵素マッピング (enzyme mapping) を介して選別して得た。

【0159】

上記で製造した pHCE - GFP ベクターを有するグラム陰性菌としての大腸菌と前記ベクターを有しない大腸菌から、それぞれ実施例 1 及び実施例 2 の方法によって pHCE - GFP プラスミドがマイクロベシクルとロードされたマイクロベシクルを製造した。

20

【0160】

pHCE ベクター内にはアンピシリン抵抗遺伝子を持っており、pHCE ベクターで形質転換された細菌はアンピシリン入りの寒天培地で生育できる。また、pHCE - GFP プラスミドは GFP 発現遺伝子を持っており、このプラスミドも形質転換された遺伝子は緑色蛍光を帯びる。

【0161】

大腸菌 DH5 を一般 LB 寒天培地プレートで 37 °C で 16 時間生育させた後、その上に、pHCE - GFP プラスミドがロードされたマイクロベシクルを 10 µg 落とした後、時間別にアンピシリン入りの寒天培地プレートにストリーキング (streaking) し、生育すること及び緑色蛍光を発現するかを確認した。

30

【0162】

図 13 に示すように、pHCE - GFP プラスミドが入っているマイクロベシクルを細菌に処理すると、細菌内にプラスミドが移されて形質転換が起こることを確認した。

【0163】

上記結果は、細菌由来マイクロベシクルがプラスミドをロードすることができるだけでなく、これを他の細菌に移して形質転換させることができることを示す。

【0164】

[実施例 8 : 細菌由来抗原タンパク質がロードされたマイクロベシクルの抗原伝達能力及び免疫反応誘導]

40

細菌原形質体由来マイクロベシクルが抗原の運搬体として使用されて抗体生成を誘導するかを調べるために、下記の実験を行った。マイクロベシクルにより抗体生成が誘導されるかを調べるために、単一タンパク質自体では抗体生成誘導を行うことができないタンパク質としての GFP タンパク質を用いて、マイクロベシクルが GFP 抗体を形成させることができるかを確認した。

【0165】

具体的に、実施例 7 の方法で製造した pHCE - GFP ベクターを有するグラム陰性菌としての大腸菌と前記ベクターを有しない大腸菌から、それぞれ実施例 1 及び実施例 2 の方法によって、GFP タンパク質がロードされているマイクロベシクルと GFP タンパク

50

質がロードされていないマイクロベシクルを製造した。

【0166】

製造したマイクロベシクルが抗体生成を誘導し免疫反応を引き起こすことができるかを確認するために、マウスにそれぞれPBS、5 μgのマイクロベシクル、5 μgのEGFPローディングマイクロベシクルに該当するEGFP2.5 μg、5 μgのEGFPローディングマイクロベシクルを7日間隔で3回腹腔に投与した。各グループ当たり5匹のマウスを使用した。投与7日後にマウスの目から血液を採取した後、室温で30分間保管し、4 で1時間保管し、1,300 × gで20分間遠心分離して細胞を除去し、上澄み液を得た。

【0167】

EGFP特異的抗体がマウスに生成されたかを確認するために、次のとおり実験を行った。EGFPタンパク質100 ngがコートされた96ウェルプレートを準備し、ウェルプレートに3%BSA/PBSを100 μL入れて1時間固定した。マウスから得た血液をそれぞれ1/1000希釈して仕込み、室温で2時間培養した後、HRPが付いている抗-マウスIgG抗体又は抗-マウスIgE抗体で1時間培養した。0.05% Tween-20の含まれたPBSで洗浄した後、BM-POD基質を入れて発色を誘導した。

【0168】

図14はIgGに対するRLU値を示し、図15はIgEに対するRLU値を示す。RLU値はEGFP特異的抗体の相対的な量を示す。図14及び図15に示すように、EGFPタンパク質をロードした大腸菌原形質体由来マイクロベシクルをマウスに投与する場合にはEGFPに対するIgGとIgE抗体が生成され、EGFP自体のみを入れた場合とEGFPのないマイクロベシクルを投与する場合にはEGFPに対する抗体が生成されないことを確認した。

【0169】

また、記憶(memory)T細胞が生成されたことを確認するために、下記の実験を行った。マイクロベシクルの最終投与3日後にマウスの脾臓(spleen)を粉砕して細胞を2.5%FBS入りのDMEM緩衝溶液に溶かした後、1,000 rpmで5分間遠心分離して上澄み液を捨て、細胞のみを集めてRBC lysis溶液(0.15M NH₄Cl、10mM KHCO₃、0.1mM Na₂EDTA、pH7.2)5mLに溶かした後、5分間培養して赤血球細胞を壊した。さらに1,000 rpmで5分間遠心分離して上澄み液を捨て、細胞のみを集めて前日予めCD3とCD28抗体を1 μg/mLで敷いた48ウェルプレートにそれぞれ1 × 10⁵の細胞を敷いた。そして、37 で12時間培養してT細胞サイトカインの発現を誘導した。培養の後、培養液を得て800 × gで10分、さらに3000 × gで20分間遠心分離して細胞を除去した後、上澄み液を得た。

【0170】

前記上澄み液を用いて、ワクチンを接種したマウスに記憶T細胞が生成されたか否かを確認するために、下記の実験を行った。T細胞サイトカインIL-4、IFN-、IL-10、IL-17がコートされた96ウェルプレートを準備し、ウェルプレートに1%BSA/PBSを100 μL入れて1時間固定(blocking)した。得た条件培地を1/10希釈して仕込み、室温で2時間培養した後、ビオチンが付いているサイトカインに対する捕獲抗体(detection antibody)で2時間培養した。0.05% Tween-20の含まれたPBSで洗浄した後、ストレプトアビジン-POD(streptavidin-POD)で20分間培養し、BM-POD基質(substrate)を入れて発色を誘導した。

【0171】

図16は発色後にRLU値を定量値に換算して得たサイトカインの量を示す。図16に示すように、EGFPタンパク質をロードした大腸菌原形質体由来マイクロベシクルをマウスに投与する場合、それぞれIL-4、IFN-、IL-10、IL-17を発現し、免疫反応を記憶することが可能な記憶T細胞が生成されることが分かった。

【0172】

10

20

30

40

50

上記結果より、細菌由来抗原タンパク質をマイクロベシクルにロードすることができ、マイクロベシクルに内包されたタンパク質（抗原）を免疫細胞に伝達することができ、マウスに抗原特異的免疫反応が生成できることが明白である。

【0173】

[実施例9：細菌由来封入体(inclusion body)がロードされたマイクロベシクルの製造]

細菌の外膜タンパク質の一つであるOmpAは、人為的に過発現させる場合、細菌内に存在する封入体(inclusion body)に存在する。そのため、人為的に過発現したOmpAタンパク質を確認する場合、マイクロベシクルに封入体がロードされたか否かを確認することができる。

【0174】

OmpAタンパク質を過発現するために、pET-30a(+)ベクターにOmpA遺伝子を挿入した。このベクターを「pET-30a(+)-OmpA-His6」と命名した。

【0175】

大腸菌BL21を熱衝撃形質転換によって前記pET-30a(+)-OmpA-His6ベクターで形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に1mLのLB培地を入れ、37で1時間生育した後、カナマイシン(Kanamycin)の混合されたLB寒天培地プレートで37で16時間培養した。前記寒天培地プレートで生成された形質転換大腸菌コロニー(colony)のうち、pET-30a(+)-OmpA-His6を含むコロニーを得た。得たコロニーのいずれか一つを20mLのLB培地に入れ、カナマイシンの混合されたLB培地で37で $OD_{600} = 0.4$ となるように生育させた後、1mM IPTG(イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド)を培養培地に添加し、混合物を37で3時間培養して融合タンパク質の発現を誘導することにより、OmpA-Hisタグが過発現された細菌を得た。

【0176】

実施例1及び実施例2の方法によって、OmpA-Hisタグがロードされたマイクロベシクルとロードされていないマイクロベシクルを製造した。製造したマイクロベシクルをそれぞれ20 μ g準備した後、5 \times ローディング染色剤を最終的に1 \times となるように仕込み、100で5分間処理した。12%ポリアクリルアミドゲルを準備し、サンプルをロードした。80Vで2時間電気泳動した後、400mAで2時間タンパク質をPVDFメンブレインにトランスファーした。スキムミルクをPBSに3%となるように溶かした後、メンブレインを該溶液で4で12時間ブロッキングした。His-タグ抗体を常温で2時間処理した。PBSで2回洗浄した後、ペルオキシダーゼが付いている二次抗体を室温で1時間処理した。PBSで30分間洗浄した後、ECL基質で確認して図17に示した。

【0177】

図17に示すように、OmpA-Hisタグが過発現された細菌の原形質体に由来するマイクロベシクルは、Hisタグ抗体によって確認されて黒色に表示されたことを確認した。これとは異なり、OmpA-Hisタグがない細菌の原形質体に由来するマイクロベシクルは確認されていない。

【0178】

上記結果より、封入体がマイクロベシクルにロードされたことが明白である。

【0179】

[実施例10：細菌外膜タンパク質がロードされたマイクロベシクルの製造]

実施例9と同様の方法でOmpA、OmpC及びOmpFが過発現された大腸菌を製造した後、各大腸菌を1:1:1の比率で混ぜた後、実施例1及び実施例2の方法でOmpA、OmpC及びOmpFがロードされた原形質体マイクロベシクルを製造した。

【0180】

製造された原形質体マイクロベシクルが実際にOmpA、OmpC及びOmpFをい

10

20

30

40

50

れも含んでおり、これがマイクロベシクルの内側に入っているかを確認するために、下記のような方法を使用した。細菌原形質体由来マイクロベシクルをトリプシン(trypsin)で処理して、細胞膜タンパク質のうちマイクロベシクルの外部に露出された領域を消化(digestion)させた。その後、高温で処理してトリプシンを変性させた後、マイクロベシクルを溶解(lysis)させて膜の内部と外部のタンパク質を全て溶液に露出させ、Omp A、Omp C、Omp Fに付いているHis 6を認知する抗体で処理した結果を図18に示した。

【0181】

トリプシンが原形質体を通過しないという事実に基づいてマイクロベシクルを溶解させた前後にトリプシンを処理してOmp A、Omp C及びOmp Fタンパク質の発現位置を確認した。もしタンパク質がマイクロベシクルの外に位置していると、トリプシン処理によって切断されて抗体に反応せず、もしタンパク質がマイクロベシクルの内側に位置していると、トリプシン処理を施しても切断されないため抗体との反応を行うことができる。

【0182】

図18に示すように、トリプシン処理を施しても抗体と反応をして黒色に表示されたもので、殆ど全てのOmp A、Omp C及びOmp Fタンパク質が原形質体マイクロベシクルの内側に位置していることを確認した。これは身体で外部として認知して炎症反応を誘導することが可能なOmp A、Omp C、Omp Fが原形質体に包まれ、身体に投与されると、炎症反応を回避し、免疫反応のみを起こして安全なワクチン効果を示しうる可能性を提示する。

【0183】

[実施例11：細菌外膜タンパク質がロードされたマイクロベシクルのワクチン作用]

細菌外膜タンパク質がロードされたマイクロベシクルのワクチン作用を調べるために、Omp A、Omp C及びOmp Fがロードされた原形質体由来マイクロベシクル40 μ gをマウスの腹腔にそれぞれPBSと共に7日間隔で3回投与した。投与7日後、Omp Aタンパク質に特異的な抗体が生成されたことを確認するために、マウスの目から血液を採取した後、室温で30分間保管し、4 で1時間保管した。1300 \times gで20分間遠心分離して細胞を除去し、上澄み液を得た。

【0184】

Omp Aタンパク質50ngがコートされた96ウェルプレートを準備し、ウェルプレートに3%BSA/PBSを100 μ L入れて2時間固定した。マウスから得た血液をそれぞれ1/10000希釈して仕込み、室温で2時間培養した後、HRPが付いている抗マウス抗体で1時間培養した。0.05%Tween-20の含まれたPBSで洗浄した後、BM-POD基質を入れて発色を誘導した。

【0185】

図19は発色後のRLU値を示す。RLU値はOmp A特異的抗体の相対的な量を示す。

【0186】

図19に示すように、Ompタンパク質をロードした原形質体由来マイクロベシクルをマウスに投与する場合、Omp Aに対する抗体が生成されたことを確認した。

【0187】

前記マイクロベシクルにより誘導された免疫反応が細菌に対するワクチン効果を有するかを確認するために、最終注射7日後0.D=1.0に生育させた大腸菌(E.coli)C4バクテリアを1/10希釈し、100 μ LのPBSを1回腹腔注射して6時間毎に死亡マウスの数を確認した。

【0188】

図20はバクテリア注射後の時間別マウスの生存曲線を示す。図20に示すように、マイクロベシクルで免疫を誘導したグループの場合は全てのマウスが生存したが、PBSグループは90%が死亡したことを確認した。上記結果は、細菌の原形質体由来マイクロベシクルを、細菌に対する抗原を運搬する運搬体として用いることができることを提示して

10

20

30

40

50

おり、このように誘導された免疫反応が細菌に浸透したときに効果的なワクチン効果を示すことを意味する。

【0189】

[実施例12：黒色腫抗原がロードされたマイクロベシクルの製造]

細菌原形質体由来マイクロベシクルを、癌細胞に対する抗原を伝達する運搬体として用いて、癌細胞に対する免疫反応を誘導し、癌ワクチンとして使用できるかを確認するために、黒色腫癌を引き起こす抗原の一つとして知られている Mart - 1 タンパク質を発現する細菌をクローニングを介して作った。

【0190】

まず、Mart - 1 を発現するプラスミドを製作するために、Mart - 1 の公知の DNA 塩基配列に基づいて特定の制限酵素を人為的に挿入すると、次のとおりプライマーを製作した。

【0191】

前方プライマー：5' - G G A A T T C C A T A T G C C C C A A G A A G A C - 3'

【0192】

後方プライマー：5' - A G G C G T C G A C T C A G G G T G A A T A A G G - 3'

(下線は制限酵素 Nde I と Sal I の認識配列を意味する)

【0193】

前記プライマー及び Mart - 1 を発現するマウス黒色腫細胞 B 1 6 B L 6 のゲノム DNA を鋳型として PCR 重合反応を行った後、得られた PCR バンドを抽出して Quiaquick ゲル精製キットで精製した。精製された生成物を制限酵素 Nde I と Sal I で 37 °C で 8 時間処理した後、さらに Quiaquick PCR 精製キットで精製し、同一酵素で処理された pET - 30a (+) ベクターと連結させて挿入した。製造された組み換えベクターを「pET - 30a (+) - Mart - 1 - His 6」と命名した。

【0194】

大腸菌 BL 2 1 を熱衝撃形質転換によって前記 pET - 30a (+) - Mart - 1 - His 6 ベクターで形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に 1 mL の LB 培地を仕込み、37 °C で 1 時間生育させた後、カナマイシン (Kanamycin) の混合された LB 寒天培地プレートで 37 °C で 16 時間培養した。前記寒天培地プレートで生成された形質転換大腸菌コロニーのうち、pET - 30a (+) - Mart - 1 - His 6 を含むコロニーを得た。得たコロニーのいずれか一つを 20 mL の LB 培地に入れ、カナマイシンの混合された LB 培地で 37 °C で $O.D_{600} = 0.4$ となるように生育させた後、1 mM IPTG を培養培地に添加し、混合物を 37 °C で 3 時間培養して、Mart - 1 を発現する細菌を得た。

【0195】

この細菌を用いて、実施例 1 及び実施例 2 の方法によって、Mart - 1 タンパク質がロードされた原形質体マイクロベシクルを製造した。

【0196】

製造されたマイクロベシクルに Mart - 1 がまともに発現されるかを確認するために、Mart - 1 を発現する B 1 6 B L 6 癌細胞株の全体タンパク質 (whole cell lysate)、Mart - 1 がロードされたマイクロベシクル、マイクロベシクルをそれぞれ 20 µg 準備した後、5 × ローディング染色剤を最終的に 1 × となるように入れ、100 °C で 5 分間処理した後、12% ポリアクリルアミドゲルを準備し、サンプルをロードした。80 V で 2 時間電気泳動した後、400 mA で 2 時間タンパク質を PVDF メンブレインにトランスファーした。スキムミルクを PBS に 3% となるように溶かした後、メンブレインを該溶液で 4 °C で 12 時間ブロッキングし、このメンブレインを Mart - 1 に特異的に結合する抗体と常温で 2 時間処理した。PBS で 2 回洗浄した後、ペルオキシダーゼが付いている二次抗体を室温で 1 時間処理した。PBS で 30 分間洗浄した後、ECL 基質で確認した結果を図 2 1 に示した。

【0197】

10

20

30

40

50

図 2 1 に示すように、M a r t - 1 がロードされたマイクロベシクルは M a r t - 1 抗体によって確認され、黒色バンドとして現れるが、M a r t - 1 がロードされていないマイクロベシクルはバンドが現れていないことを確認した。

【 0 1 9 8 】

[実施例 1 3 : 黒色腫抗原がロードされたマイクロベシクルを用いた黒色腫ワクチンの効果]

実施例 1 2 で製造した M a r t - 1 タンパク質がロードされたマイクロベシクル 2 5 μ g を 7 日間隔で 3 回マウスの腹腔に投与した。3 回目の投与 7 日後にマウス黒色腫細胞株 (B 1 6 B L 6) 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射し、2 0 日後に癌組織を分離した後、その重量を測定した。

【 0 1 9 9 】

図 2 2 に示すように、予め M a r t - 1 タンパク質がロードされたマイクロベシクルを注射したマウスの癌組織の重量が、P B S のみを注射したマウスのそれに比べて軽いことを確認した。

【 0 2 0 0 】

上記結果より、原形質体由来マイクロベシクルを用いて癌細胞に対する抗原を伝達して抗癌効果を示しうることが分かる。

【 0 2 0 1 】

[実施例 1 4 : E G F 融合タンパク質をロードした細菌の原形質体由来マイクロベシクルの製造]

原形質体の表面にヒト E G F をロードするために、バクテリア内膜タンパク質としての P r s A を暗号化する塩基配列の N 末端から 2 9 0 番目のアミノ酸のペプチド区域を暗号化する塩基配列と結合しようと思い、まず P r s A の公知の D N A 塩基配列に基づいて終止コドン (stop codon) を除いて特定の制限酵素を人為的に挿入して、次のとおりプライマーを製作した。

【 0 2 0 2 】

前方プライマー : 5 ' - C A T A T G A A G A A A A T C G C A A T A G C A G - 3 ' ,

【 0 2 0 3 】

後方プライマー : 5 ' - T C T A G A T T T A G A A T T G C T T G A A G A T G A A G - 3 ' 30

(下線は制限酵素 N d e I と X b a I の認識配列を意味する)

【 0 2 0 4 】

前記プライマー及び菌株 B . サブチリス (B . subtilis) から得たゲノム D N A を鋳型として P C R 重合反応を行った後、得られた P C R バンドを抽出して Q u i a q u i c k ゲル精製キットで精製した。精製された生成物を制限酵素 N d e I と X b a I で 3 7 ° C で 8 時間処理した後、さらに Q u i a q u i c k P C R 精製キットで精製し、同一酵素で処理された p H C E ベクターと連結させて挿入した。製造された組み換えベクターを「 p H C E - p r s A 」と命名した。

【 0 2 0 5 】

前記 p H C E - p r s A ベクターに、ヒト E G F を発現する遺伝子を融合させるために、公知のヒト E G F の D N A 塩基配列に基づいて特定の制限酵素を人為的に挿入して、プライマーを次のとおり製作した。

【 0 2 0 6 】

前方プライマー : 5 ' - G C T C T A G A A A T A C T G A C T C T G A A T G T C C C - 3 ' 40

【 0 2 0 7 】

後方プライマー : 5 ' - C A A G C T T T C A G C G C A G T T C C C A C C C A C T T C - 3 ' 50

(下線は制限酵素 X b a I と H i n d I I の認識配列を意味する)

【0208】

前記プライマー及びヒト非小細胞肺癌(human non-small cell lung cancer)のA549細胞から得たゲノムDNAを鋳型としてPCR重合反応を行った後、得られたPCRバンドを抽出してQuiaquickゲル精製キットで精製した。精製された生成物を制限酵素XbaIとHindIIIで37℃で8時間処理した後、さらにQuiaquick PCR精製キットで精製して、同一酵素で処理されたpHCE-prsAベクターと連結させて挿入した。製造された組み換え融合ベクターを「pHCE-prsA-EGF」と命名した。

【0209】

大腸菌DH5αを熱衝撃形質転換によって前記pHCE-prsA-EGF融合ベクターで形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に1mLのLB培地を入れて37℃で1時間生育させた後、アンピシリン(ampicillin)の混合されたLB寒天培地プレートで37℃で16時間培養した。前記寒天培地プレートで生成された形質転換大腸菌コロニーのうち、pHCE-prsA-EGFを含むコロニーを、コロニー-PCRと制限酵素マッピングを介して選別して得た。

10

【0210】

先立って製造したpHCE-prsA-EGFベクターを有するグラム陰性菌としての大腸菌と前記ベクターを有しない大腸菌から、それぞれ実施例1及び実施例2の方法によって、EGF融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルとEGF融合タンパク質がロードされていないマイクロベシクルを製造した。製造したマイクロベシクルをそれぞれ20μg準備した後、5xローディング染色剤を最終的に1xとなるように仕込み、100℃で5分間処理した。12%ポリアクリルアミドゲルを準備し、サンプルをロードした。80Vで2時間電気泳動した後、400mAで2時間タンパク質をPVDFメンブレインにトランスファーした。スキムミルクをPBSに3%となるように溶かした後、メンブレインを該溶液で2時間ブロッキングした。EGF抗体を4℃で12時間処理した。PBSで2回洗浄した後、ペルオキシダーゼが付いている二次抗体を室温で1時間処理した。PBSで30分間洗浄した後、ECL基質で確認して図23に示した。

20

【0211】

図23に示すように、EGF融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルはEGF抗体によって確認されて黒色に表示されていることを確認した。これとは異なり、EGFのないマイクロベシクルは確認されなかった。

30

【0212】

上記結果より、EGF融合タンパク質のロードされたマイクロベシクルがまともに作られたことが明白である。

【0213】

また、EGF融合タンパク質がマイクロベシクルの表面の外部に向かうように正しく位置するかを確認するために、トリプシンを用いて確認した。トリプシンが細菌の原形質体を通過しないということを活用して、マイクロベシクルにトリプシンを処理して細胞膜タンパク質のうちマイクロベシクルの外部に露出された領域を消化させ、EGF融合タンパク質が残っているかを確認する実験を行った。まず、トリプシンを処理した後、高温で処理してトリプシンを変性させ、しかる後に、マイクロベシクルを溶解させて膜の内部と外部のタンパク質を全て溶液に露出させ、EGFを認知する抗体を処理した結果を図24に示した。

40

【0214】

図24において、「+」で表示したものはトリプシンを処理した結果を示し、「-」で表示したものはトリプシンで処理していない結果を示す。

【0215】

図24に示すように、トリプシンを処理した場合にEGF抗体の表示が全て無くなっていることから、EGF融合タンパク質のEGF部分が全てマイクロベシクルの外部に向かっていることを推論することができる。これは、EGF融合タンパク質を有するマイクロ

50

ベシクルが、EGF受容体を有する細胞に特異的に伝達できることを意味する。

【0216】

[実施例15：EGF融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルの細胞特異的伝達の確認 (in vitro)]

EGF融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルの細胞特異的伝達をin vitroで確認するために、24ウェルプレートにヒト非小細胞肺癌のA549細胞を 2×10^4 の量だけ接種した後、24ウェルプレートで24時間培養した。A549細胞は細胞膜にEGF受容体を多量発現している細胞である。

【0217】

実施例1及び実施例2の方法によって、実施例10で製造したEGFがロードされた大腸菌の原形質体とEGFがない大腸菌の原形質体からマイクロベシクルを製造した。製造した大腸菌原形質体由来マイクロベシクルに $5 \mu\text{M}$ となるようにDiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate、Invitrogen、No. V22885) 染色剤を入れ、室温で30分間保管した。DiI染色剤は赤色の蛍光を示す。

10

【0218】

PBSで2回洗浄した後、細胞が敷いているプレートに培地 $500 \mu\text{L}$ を仕込み、DiI標識されたマイクロベシクルを $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で処理した後、20分間培養した。

【0219】

PBSで洗浄した後、血清(serum)のない培地 $500 \mu\text{L}$ を入れ、セルトラッカー溶液(CellTracker solution)を $5 \mu\text{M}$ となるように入れた後、30分間培養した。PBSで洗浄した後、血清のある培地を $500 \mu\text{L}$ 仕込み、さらに30分間培養した。カバーガラスを4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde) $500 \mu\text{L}$ に入れて室温で10分間保管した。蛍光顕微鏡を用いて、FITC波長で緑色を帯びる細胞を観察し、ローダミン(Rhodamine)波長で赤色を帯びるマイクロベシクルを観察した。細胞数とマイクロベシクルの個数を測定し、マイクロベシクルの個数を細胞数で割って1つの細胞当たりのマイクロベシクルの個数を計算した。結果を図25に示した。

20

【0220】

図25に示すように、EGFのない大腸菌原形質体由来マイクロベシクルは1つのA549細胞と結合する個数が約1.2個であり、EGFがロードされた大腸菌原形質体由来マイクロベシクルは1つのA549細胞と結合する個数が約7.9個である。

30

【0221】

上記結果は、EGFがロードされたマイクロベシクルは、A549と共に、細胞膜に存在するEGFを発現する細胞内に入ることができることを意味する。

【0222】

また、このような結合がEGF-EGF受容体間の特異的結合により生じたかを調べるために、12ウェルプレートにマウス大腸癌細胞(CT26)を 2×10^6 の量だけ接種した後、12ウェルプレートで24時間培養した。CT26は細胞膜にマウスのEGF受容体を発現している細胞であるが、ヒトEGFと結合することができる。PBSで2回洗浄した後、このウェルプレートに培地 $500 \mu\text{L}$ を入れ、EGFタンパク質を $100 \text{ng}/\text{mL}$ で処理した後、30分間培養してCT26細胞の表面にEGF受容体がそれ以上EGFと結合しないようにした。そして、PBSで洗浄して残ったEGFタンパク質を無くし、DiI標識されたマイクロベシクルを $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で処理した後、20分間培養した。

40

【0223】

PBSで洗浄した後、血清のある培地を $500 \mu\text{L}$ 仕込んでさらに30分間培養した後、4%パラホルムアルデヒド $500 \mu\text{L}$ に入れて室温で10分間保管した。蛍光顕微鏡を用いて、ローダミン波長で赤色を帯びるマイクロベシクルを観察した。

【0224】

50

図 2 6 に示すように、E G F タンパク質を予め処理して E G F 受容体を遮断した場合、E G F タンパク質を処理していないときと比較して、細胞に結合して入ったマイクロベシクルを示す赤色のシグナルが全て無くなったことを確認することができた。

【 0 2 2 5 】

上記結果は、E G F 融合タンパク質を発現しているマイクロベシクルは細胞膜に存在する E G F 受容体と結合して細胞内に入ることができることを意味する。

【 0 2 2 6 】

[実施例 1 6 : E G F 融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルの細胞内シグナル伝達の確認]

6 ウェルプレートにヒト非小細胞肺癌の A 5 4 9 細胞を 1.5×10^5 の量だけ接種した後、6 ウェルプレートで 1 6 時間培養した。P B S で 2 回洗浄した後、血清 (serum) のない培地に変えた後、1 6 時間培養した。1 6 時間後、それぞれ $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度で実施例 1 4 の方法によって製造したグラム陰性菌原形質体由来 E G F 融合タンパク質ローディングマイクロベシクルと、ロードしていないマイクロベシクルを処理した後、1 0 分間培養した。P B S で洗浄した後、ホスファターゼ阻害剤の含まれた M - P E R (P i e r c e) 溶液を $150 \mu\text{L}$ 入れ、細胞全体タンパク質 (whole cell lysate) を得た。

【 0 2 2 7 】

細胞全体タンパク質をそれぞれ $20 \mu\text{g}$ 準備した後、 $5 \times$ ローディング染色剤を最終的に $1 \times$ となるように仕込み、1 0 0 で 5 分間処理した。1 0 % ポリアクリルアミドゲルを準備し、サンプルをロードした。8 0 V で 2 時間電気泳動した後、4 0 0 m A で 2 時間タンパク質を P V D F メンブレインにトランスファーした。スキムミルクを T B S に 3 % となるように溶かした後、メンブレインを該溶液で 2 時間ブロッキングした。それぞれ E G F 受容体抗体、リン酸化 E G F 受容体抗体、E r k 抗体、リン酸化 E r k 抗体を 4 で 1 2 時間処理した。T B S で 2 回洗浄した後、ペルオキシダーゼが付いている二次抗体を室温で 1 時間処理した。T B S で 3 0 分間洗浄した後、E C L 基質で確認して図 2 7 に示した。

【 0 2 2 8 】

図 2 7 に示すように、E G F 融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルを処理する場合、E G F シグナル伝達が行われ、E G F 受容体のリン酸化が促進され、かつ E G F 受容体の下流のシグナル伝達系 (signaling cascade) の一つである E r k タンパク質のリン酸化を促進することを確認した。E G F 受容体と E r k タンパク質は対照群として用いた。

【 0 2 2 9 】

上記結果より、E G F 融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルは E G F 受容体と結合することができることが明白である。

【 0 2 3 0 】

[実施例 1 7 : 抗癌薬物がロードされた E G F 融合タンパク質ローディングマイクロベシクルの製造及び i n v i v o 特異的伝達の確認]

実施例 1 4 の方法によって E G F 融合タンパク質ローディングマイクロベシクルを製造した後、前記マイクロベシクル懸濁溶液に抗癌薬物としてのドキシソルピシンを $400 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度で添加し、よく混ぜた後、4 で 1 2 時間培養した。1 2 時間後、培養液を $100,000 \times g$ で 2 時間超遠心分離した。沈殿物を T B S で懸濁し、ドキシソルピシンがロードされたマイクロベシクルを得た。

【 0 2 3 1 】

E G F 受容体を過発現しているヒト肺癌細胞株 (A 4 3 1) 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射し、7 日間生育させた。癌細胞投与 7 日後、それぞれ P B S、 $50 \mu\text{g}$ のドキシソルピシンがロードされたマイクロベシクル、 $50 \mu\text{g}$ のドキシソルピシンがロードされた E G F 融合タンパク質ローディングマイクロベシクル、及びドキシソルピシン $80 \mu\text{g}$ をマウスの尾静脈に注射し、6 時間後にマウスから癌組織を分離した。分離した癌組織を 4 % パラホルムアルデヒドに浸して 2 4 時間固定した。固定した癌組織を 7 0 % エタノール

10

20

30

40

50

に1時間ずつ1回、95%エタノールに1時間ずつ4回、100%エタノールに1時間ずつ3回、100%キシレンに1時間ずつ3回浸して脱水反応(dehydration)を行った。その後、パラフィン(paraffin)に入れて固定した。パラフィンで固定された癌組織を4µmの厚さに切り、スライドガラスに付着させた。付着した組織を60℃で1時間保管してパラフィンを溶かした。溶かした組織を100%キシレンに1分ずつ3回、100%エタノールに1分ずつ4回、95%エタノールに1分ずつ3回、最後に流水に5分間保管して水和反応(hydration)を行った。

【0232】

水和反応が終わった組織を免疫組織化学法(immunohistochemistry)を行った。免疫組織化学法のために、組織を10mMクエン酸ナトリウム(Sodium citrate, Sigma, No. S4641)バッファに入れ、5分ずつ3回電磁レンジを用いて抗原再標識(antigen retrieval)を行った。組織を流水に入れて冷やした後、5%ウマ血清(horse serum)と0.02%トリトン X-100を入れたTBS(tris buffered saline)を仕込み、2時間ブロックした。5%ウマ血清と0.02%トリトン X-100を入れたTBSに、血管マーカーCD31を認知する抗体(Santa Cruz, No. SC1506)を1:200の比率で仕込み、4℃で12時間保管した。0.02%トリトン X-100を入れたTBSで3回洗浄した後、緑色蛍光を帯びるAlexa488が付いている二次抗体を室温で1時間処理した。0.02%トリトン X-100を入れたTBSで3回洗浄した後、ホスト染色剤を5µMとなるように仕込み、さらに10分間染色した。TBSで5回洗浄した後、カバーガラスをスライドガラスに付着させ、共焦点顕微鏡上で観察し、写真上の緑色に染色された部分の領域を測定した。

10

20

【0233】

図28は各グループ当たりの癌組織の顕微鏡写真を示す。図28に示すように、EGF融合タンパク質ローディングマイクロベシクルを投与したとき、癌組織からドキシソルピシンが観察された。これはEGF融合タンパク質によって癌細胞特異的にドキシソルピシンが伝達されたことを意味する。

【0234】

上記結果をまとめるとき、EGF融合タンパク質ローディングマイクロベシクルが、EGF受容体を発現する癌細胞に特異的な伝達を行うことができるという事実を推論することができる。

30

【0235】

[実施例18:EGF融合タンパク質ローディングマイクロベシクルの抗体誘導能力]

実施例14の方法によってEGF融合タンパク質ローディングマイクロベシクルを製造した後、マウスの腹腔にそれぞれPBSと20µgのマイクロベシクルを投与した。投与7日後、EGFタンパク質に特異的な抗体が生成されたことを確認するために、マウスの目から血液を採取した後、室温で30分間保管し、4℃で1時間保管した。1,300×gで20分間遠心分離して細胞を除去し、上澄み液を得た。

【0236】

EGFタンパク質50ngがコートされた96ウェルプレートを準備し、ウェルプレートに1%BSA/PBSを100µL入れて2時間固定した。マウスから得た血液をそれぞれ1/1000希釈して仕込み、室温で2時間培養した後、HRPが付いている抗-マウス抗体に1時間培養した。0.05%Tween-20の含まれたPBSで洗浄した後、BM-POD基質を入れて発色を誘導した。

40

【0237】

図29は発色後のRLU値を示す。RLU値はEGF特異的な抗体の相対的な量を示す。図29に示すように、EGF融合タンパク質をロードした原形質体由来マイクロベシクルをマウスに投与する場合、EGFに対する抗体が生成されることが分かる。

【0238】

上記結果は、細菌原形質体由来マイクロベシクルを用いた抗原伝達が、細胞の内側にロードされているタンパク質ではなく、細胞の表面にロードされている融合タンパク質に対

50

する抗体も形成することができることを示す。

【0239】

[実施例19：EGF受容体融合タンパク質をロードした細菌原形質体由来マイクロベシクルの製造]

原形質体の表面にヒトEGF受容体の細胞外部分をロードするために、バクテリア内膜タンパク質であるPrsAを暗号化する塩基配列のN末端から290番目のアミノ酸のペプチド領域を暗号化する塩基配列と結合しようと思い、実施例14で作られたpHCE-prsAベクターを用いた。

【0240】

前記pHCE-prsAベクターに、ヒトEGF受容体を発現する遺伝子を融合させるために、公知のヒトEGF受容体のDNA塩基配列に基づいて特定の制限酵素を人為的に挿入して、プライマーを次のとおり製作した。

【0241】

前方プライマー：5' - G C C T C T A G A C T G G A G G A A A G A A A G T T T G C - 3'

【0242】

後方プライマー：5' - C C A A G C T T C A G G A C G G G A T C T T A G G C - 3'

(下線は制限酵素XbaIとHindIIIの認識配列を意味する)

【0243】

前記プライマー及びヒト非小細胞A549から得たゲノムDNAを鋳型としてPCR融合反応を行った後、得られたPCRバンドを抽出してQuiaquickゲル精製キットで精製した。精製された生成物を制限酵素XbaIとHindIIIで37℃で8時間処理した後、さらにQuiaquickゲル精製キットで精製して、同一酵素で処理されたpHCE-prsAベクターと連結させて挿入した。製造された組み換え融合ベクターを「pHCE-prsA-EGFR」と命名した。

【0244】

大腸菌DH5αを熱衝撃形質転換によって前記pHCE-prsA-EGFR融合ベクターで形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に1mLのLB培地を入れて37℃で1時間生育させた後、アンピシリンの混合されたLB寒天培地プレートで37℃で16時間培養した。前記寒天培地プレートで生成された形質転換大腸菌コロニーのうち、pHCE-prsA-EGFRを含むコロニーを、コロニー-PCRと制限酵素マッピングを介して選別して得た。

【0245】

先立って製造したpHCE-prsA-EGFRベクターを有するグラム陰性菌としての大腸菌と前記ベクターを有しない大腸菌から、それぞれ実施例1及び実施例2の方法によって、EGF受容体融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルとEGF受容体融合タンパク質がロードされていないマイクロベシクルを製造した。製造したマイクロベシクルをそれぞれ20μg準備した後、5xローディング染色剤を最終的に1xとなるように入れ、100℃で5分間処理した。12%ポリアクリルアミドゲルを準備し、サンプルをロードした。80Vで2時間電気泳動した後、400mAで2時間タンパク質をPVDFメンブレインにトランスファーした。スキムミルクをPBSに3%となるように溶かした後、メンブレインを該溶液で2時間ブロッキングした。EGF受容体に対する抗体を4℃で12時間処理した。PBSで2回洗浄した後、ペルオキシダーゼが付いている二次抗体を室温で1時間処理した。PBSで30分間洗浄した後、ECL基質で確認して図30に示した。

【0246】

図30に示すように、EGF受容体融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルは、EGF受容体抗体によって確認されて黒色に表示されていることを確認した。これとは異なり、EGF受容体のないマイクロベシクルは確認されていない。

10

20

30

40

50

【0247】

上記結果より、EGF受容体融合タンパク質のロードされたマイクロベシクルがまともに作られたことが明白である。

【0248】

[実施例20：EGF受容体融合タンパク質をロードした細菌原形質体由来マイクロベシクルを用いたEGF結合]

実施例19で製造したEGF受容体融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルと、そのタンパク質がロードされていないマイクロベシクルを準備した。96ウェルプレートを用意し、ウェルプレートにそれぞれ0、25、100ngとなるようにそれぞれのマイクロベシクルを仕込み、常温で12時間以上保管してコートした。1%BSA/PBSを100μL入れて1時間固定した。1時間後、ビオチンが付いているEGFを10ng/mLとなるように仕込み、2時間培養した。0.05%Tween-20の含まれたPBSで洗浄した後、ストレプトアビジン-PODで20分間培養し、BM-POD基質を入れて発色を誘導した。

10

【0249】

図31は発色後のRLU値を示す。RLU値はマイクロベシクルに付いたEGFの相対的な値を示す。図31に示すように、EGF受容体融合タンパク質をロードしたマイクロベシクルは、EGFと結合(binding)して、EGF受容体融合タンパク質のないマイクロベシクルに比べて高いRLU値を示すことを確認した。

20

【0250】

上記結果より、EGF受容体融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルはEGFと結合することができることを確認した。

【0251】

[実施例21：His-タグ融合タンパク質をロードした細菌原形質体由来マイクロベシクルの製造]

原形質体の表面にHis-タグタンパク質をロードした細菌の原形質体由来マイクロベシクルを製造するために、pHCE-prsAベクターを用いた。前記pHCE-prsAベクターに制限酵素NdeIとHindIIIを用いて37℃で8時間処理した後、Quiacquickゲル精製キットで精製した。精製されたベクター挿入物を、既存のHis-タグタンパク質が融合されているpET-30a(+)ベクターに同一制限酵素を処理した後、精製して連結させて挿入した。このベクターを「pET-30a(+)-prsA-His6」と命名した。

30

【0252】

大腸菌DH5αを熱衝撃形質転換によって前記pET-30a(+)-prsA-His6融合ベクターで形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に1mLのLB培地を入れて37℃で1時間生育させた後、カナマイシンの混合されたLB寒天培地プレートで37℃で16時間培養した。前記寒天培地プレートで生成された形質転換大腸菌コロニーのうち、pET-30a(+)-prsA-His6を含むコロニーを、コロニー-PCRと制限酵素マッピングを介して選別して得た。得た形質転換菌株をさらにBL21大腸菌に熱衝撃形質転換させ、形質転換された大腸菌菌株に1mLのLB培地を入れ、37℃で1時間生育させた後、カナマイシンの混合されたLB寒天培地プレートで37℃で16時間培養した。生育したコロニーを抽出して5mLのLB培地に接種してOD₆₀₀=0.4となるように生育させた後、1mLのIPTGを培養培地に添加し、混合物を37℃で4時間培養して融合タンパク質の発現を誘導し、融合ベクターが形質転換された細菌を得た。

40

【0253】

実施例1及び実施例2の方法によってHis-タグ融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルと、その融合タンパク質がロードされていないマイクロベシクルを、グラム陰性菌としての大腸菌から製造した。製造したマイクロベシクルをそれぞれ20μg準備した後、5×ローディング染色剤を最終的に1×となるように仕込み、100℃で5分間

50

処理した。12%ポリアクリルアミドゲルを準備し、サンプルをロードした。80Vで2時間電気泳動した後、400mAで2時間タンパク質をPVDfメンブレインにトランスファーした。スキムミルクをPBSに3%となるように溶かした後、メンブレインを該溶液で4で12時間ブロッキングした。His-タグ抗体を常温で2時間処理した。PBSで2回洗浄した後、ペルオキシダーゼが付いている二次抗体を室温で1時間処理した。PBSで30分間洗浄した後、ECL基質で確認して図32に示した。

【0254】

図32に示すように、His-タグ融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルはHis-タグ抗体によって確認されて黒色に表示されていることを確認した。これとは異なり、His-タグのないマイクロベシクルは確認されていない。

10

【0255】

上記結果より、His-タグ融合タンパク質がロードされたマイクロベシクルがまともに作られたことが明白である。

【0256】

[実施例22：細菌原形質体由来マイクロベシクルを用いた*in vitro*薬物伝達及び血管内皮細胞の死滅誘導]

6ウェルプレートに0.1%ゼラチン(gelatin)がコートされたカバーガラスを仕込み、カバーガラス上にヒト血管細胞としてのHUVEC細胞を 1×10^5 の量だけ接種した後、6ウェルプレートで16時間培養した。PBSで2回洗浄した後、培地2mLを仕込み、0、0.5、1、2 μ g/mLの濃度で、実施例1及び実施例2の方法によって製造したグラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクルと実施例17の方法によって製造したドキシソルピシンローディング原形質体由来マイクロベシクルをそれぞれ処理した後、24時間培養した。PBSで洗浄し、血清のない培地2mLを入れてセルトラッカー溶液(CellTacker solution)を5 μ Mとなるように入れた後、30分間培養した。さらにPBSで洗浄した後、血清のある培地を2mL仕込み、さらに30分間培養した。カバーガラスを4%パラホルムアルデヒド2mLに入れて室温で10分間保管した。蛍光顕微鏡を用いて写真を撮り、生きている細胞の数を測定して図33に示した。

20

【0257】

図33において、縦軸の「% of control」は、マイクロベシクルを0 μ g/mLで処理した対照群の生きている細胞の数を100%、すなわち全ての細胞が生きているとしたときの各濃度での生きている細胞の数を示すものであって、% of control = {各濃度で生きている細胞の数 / (0 μ g/mLの濃度で生きている細胞の数)} * 100の計算式で求めた。

30

【0258】

マイクロベシクルを濃度別に入れたときに% of control値が高いか或いは同様であるということは、0 μ g/mL、すなわちcontrolに比べて細胞死滅が誘導されていないことを意味する。

【0259】

図33に示すように、細菌原形質体由来するマイクロベシクル自体は、血管内皮細胞(HUVEC細胞)の死滅にあまり影響がないが、ドキシソルピシンがロードされたマイクロベシクルは血管細胞の細胞死滅を誘導することを確認した。

40

【0260】

上記結果より、原形質体由来マイクロベシクルにロードされたドキシソルピシンが血管内皮細胞に伝達されて細胞死滅を誘導したことが明白である。

【0261】

[実施例23：ドキシソルピシンがロードされた細菌原形質体由来マイクロベシクルを用いた*in vitro*大腸癌細胞の死滅誘導]

24ウェルプレートに0.1%ゼラチンがコートされたカバーガラスを入れ、カバーガラス上にマウス大腸癌26細胞株(mouse colon 26)を 2×10^4 の量だけ接種した後、24ウェルプレートで16時間培養した。

50

【0262】

PBSで2回洗浄した後、培地500 μ Lを仕込み、実施例1及び実施例2の方法によって製造したグラム陽性菌原形質体由来マイクロベシクルと実施例17の方法によって製造したドキソルピシンローディンググラム陽性菌原形質体由来マイクロベシクルをそれぞれ0、1.25、2.5、5 μ g/mLの濃度で処理した後、24時間培養した。

【0263】

PBSで洗浄した後、血清のない培地500 μ Lを仕込み、セルトラッカー溶液を5 μ Mとなるように仕込んだ後、30分間培養した。PBSで洗浄した後、血清のある培地を500 μ m入れ、さらに30分間培養した。カバーガラスを4%パラホルムアルデヒド500 μ Lに入れ、室温で10分間保管した。蛍光顕微鏡を用いて写真を撮り、生きている細胞の数を測定して図34に示した。

10

【0264】

図34はそれぞれドキソルピシンがロードされていない原形質体由来マイクロベシクル、及びドキソルピシンがロードされた原形質体由来マイクロベシクルを濃度別に入れたときに生きている細胞の数を、 $\% \text{ of control} = \{ \text{各濃度で生きている細胞の数} / (0 \mu\text{g/mLの濃度で生きている細胞の数}) \} * 100$ の計算式で求めて表として示したものである。

【0265】

図34に示すように、ドキソルピシンがロードされた原形質体由来マイクロベシクルが、ドキソルピシンがロードされていない原形質体由来マイクロベシクル自体に比べて一層さらに効果的に大腸癌細胞の死滅を誘導していることが分かる。

20

【0266】

上記結果より、原形質体由来マイクロベシクルにロードされたドキソルピシンが大腸癌細胞に伝達されて細胞死滅を誘導することが明白である。

【0267】

[実施例24：ドキソルピシンがロードされた細菌原形質体由来マイクロベシクルを用いた*in vivo*癌死滅誘導]

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射し、5日間生育させた。5日後、実施例17の方法によって製造したドキソルピシンがロードされたグラム陰性菌原形質体由来マイクロベシクル0 μ g、1 μ g、5 μ gを含むPBS溶液100 μ Lを1週に2回ずつマウスの尾に注射し、癌組織の大きさを測定して図21に示した。癌組織の体積は最も長い長さ(l)とそれに垂直な長さ(s)を測定し、 $v = l s^2 / 2$ の式で計算した。

30

【0268】

図35に示すように、ドキソルピシンがロードされた原形質体由来マイクロベシクルを注射したマウスの癌組織成長が、PBSのみ注射したマウスのそれに比べて遅く、最終的に5 μ gのドキソルピシンがロードされたマイクロベシクルを注射したマウスの癌組織の大きさが最も小さいことが分かる。

【0269】

上記結果より、原形質体由来マイクロベシクルを用いて抗癌薬物のドキソルピシンを癌組織に伝達することができることが明白である。

40

【0270】

前述した本発明の説明は例示のためのものに過ぎず、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者であれば、本発明の技術的思想又は必須的な特徴を変更することなく、他の具体的な形態に容易に変形可能であることを理解することができる。よって、上述した実施例は全ての面で例示的なもので、限定的なものではないと理解すべきである。

【産業上の利用可能性】

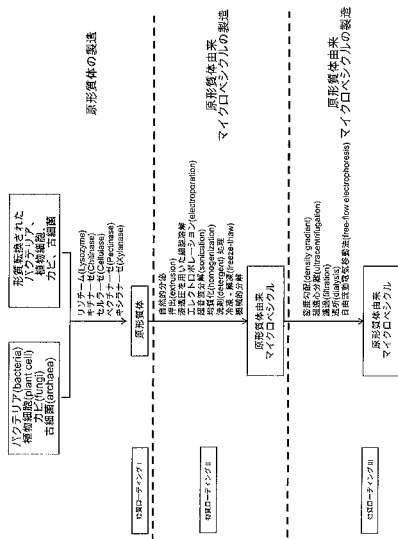
【0271】

本発明の原形質体由来マイクロベシクルは、細菌、古細菌、カビ及び植物細胞から細胞壁を取り除いた原形質体に由来するもので、細胞壁を取り除くことにより、免疫反応によ

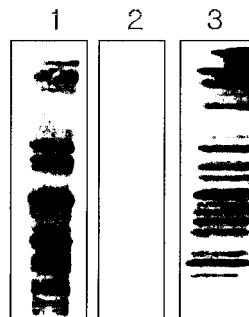
50

る副作用がない。また、本発明の原形質体由来マイクロベシクルは、治療及び/又は診断用物質、或いはワクチン用物質の導入が容易であり、量産が可能である。また、前記治療用、診断用及び/又はワクチン用物質を発現する細胞の原形質体由来マイクロベシクルを使用する場合、前記物質の精製過程なしで原形質体由来マイクロベシクルに含有できるため、前記物質を精製して使用する場合より産業的、経済的に長所がある。

【 図 1 】



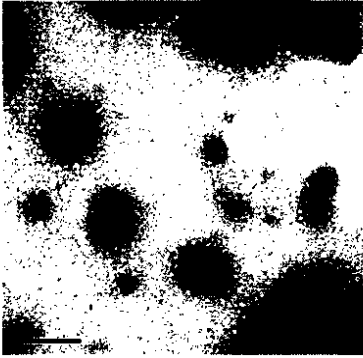
【 図 2 】



1. リゾチームで処理していないグラム陰性菌
2. リゾチーム処理後に得たグラム陰性菌由来原形質体
3. リゾチーム処理後に得た外膜及び細胞壁のある上澄み液

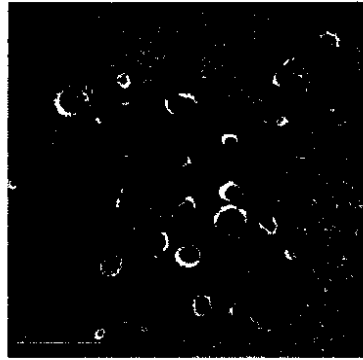
【 図 3 】

[Fig. 3]

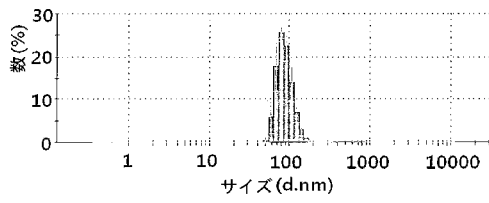


【 図 4 】

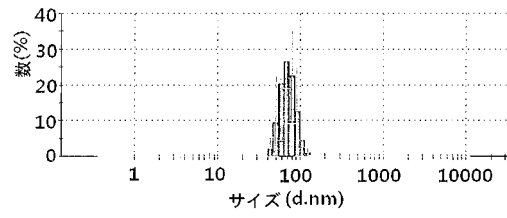
[Fig. 4]



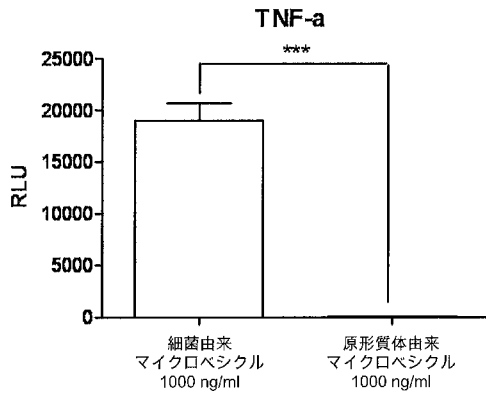
【 図 5 】



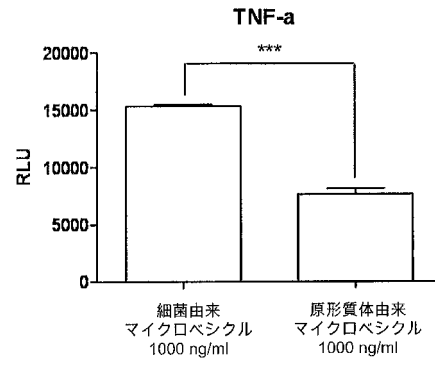
【 図 6 】



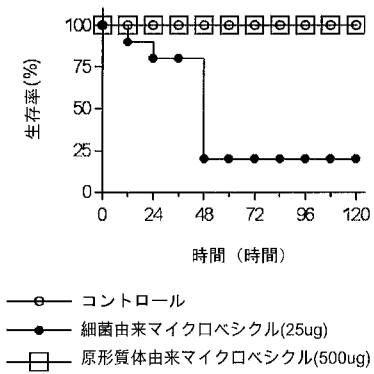
【 図 7 】



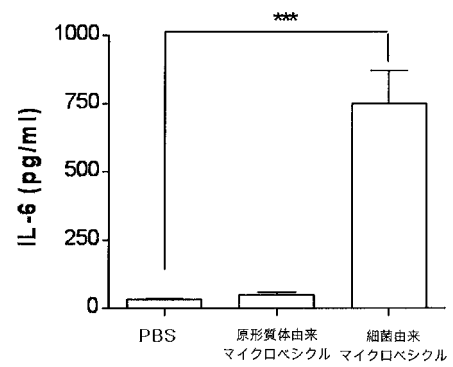
【 図 8 】



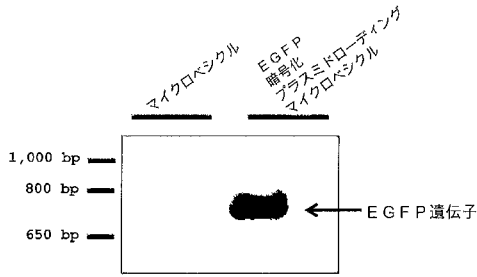
【 図 9 】



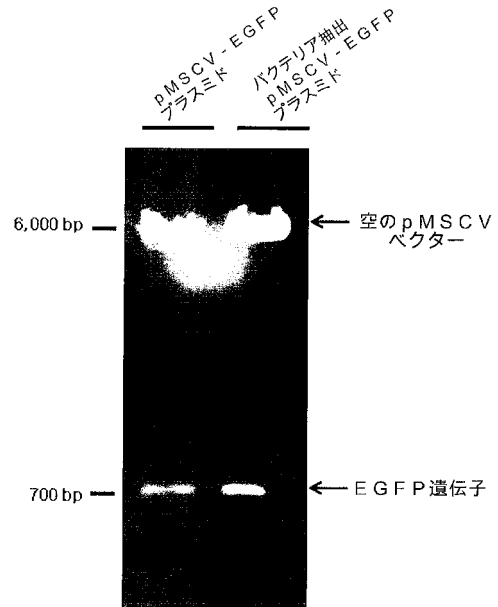
【 図 10 】



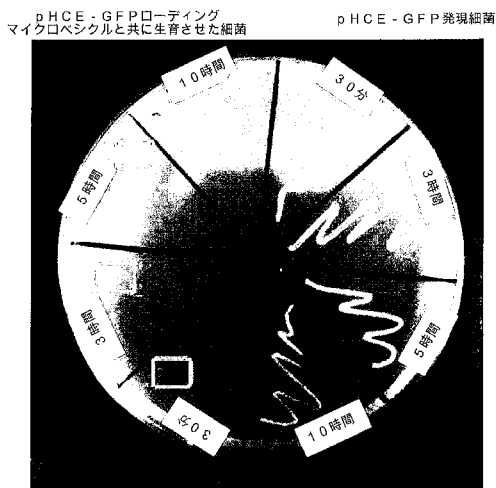
【 図 1 1 】



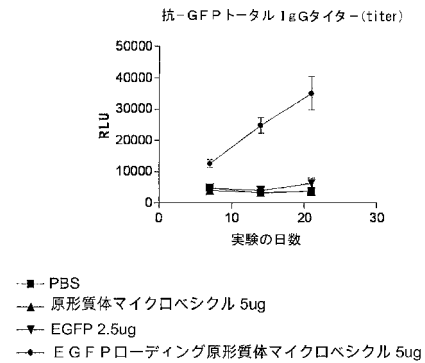
【 図 1 2 】



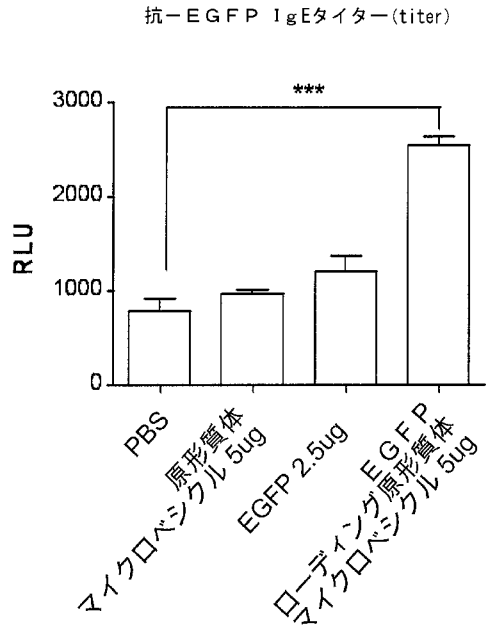
【 図 1 3 】



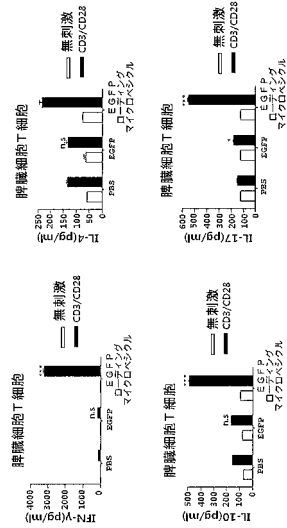
【 図 1 4 】



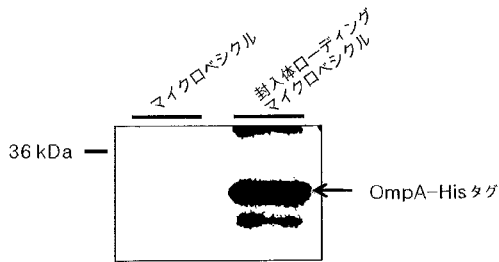
【 図 1 5 】



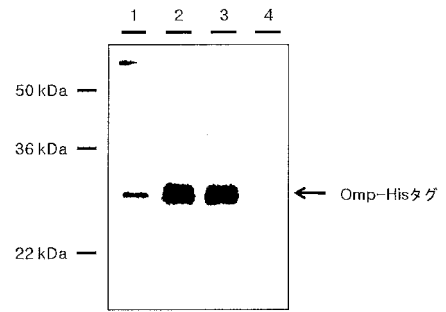
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

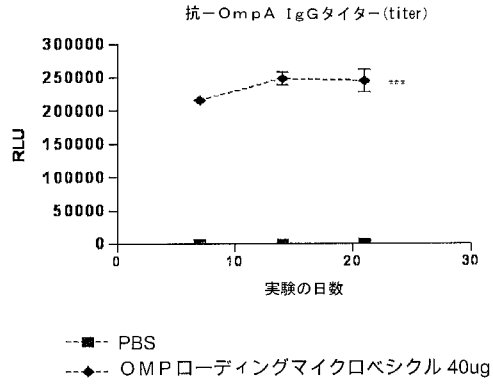


【 図 1 8 】

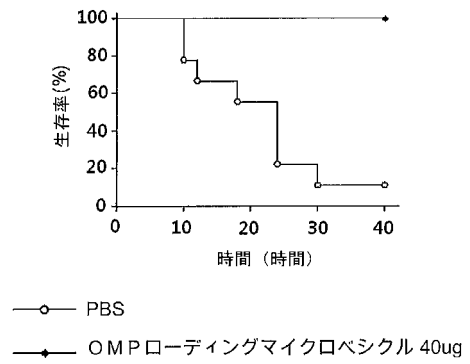


1. マイクロベシクル
2. OmpA-His タグ マイクロベシクル
3. OmpA-His タグ マイクロベシクル + トリプシン(500ug/ml)
4. (溶解したOmpA-His タグ マイクロベシクル) + トリプシン(500ug/ml)

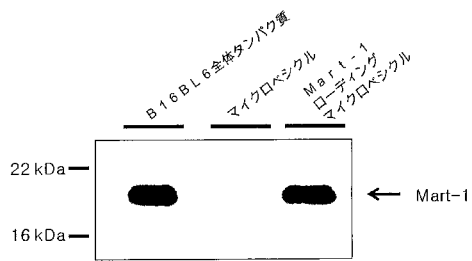
【 図 1 9 】



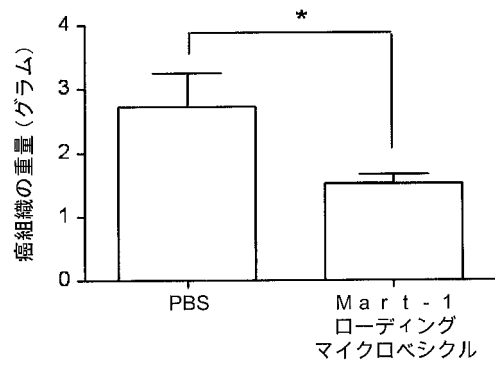
【 図 2 0 】



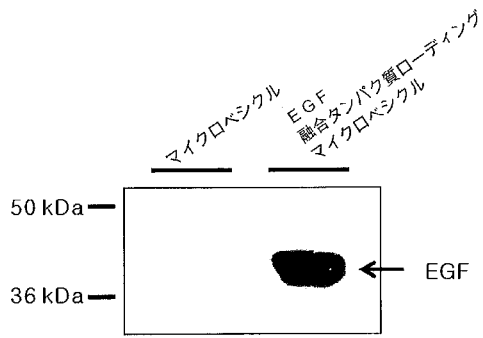
【 図 2 1 】



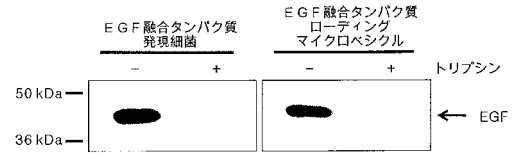
【 図 2 2 】



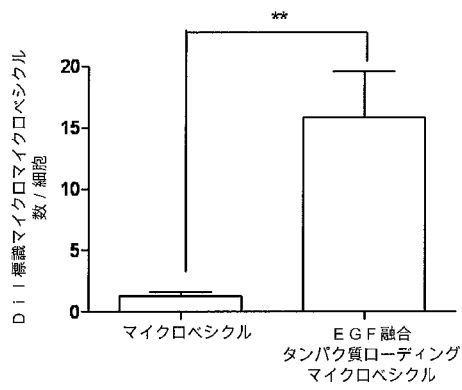
【 図 2 3 】



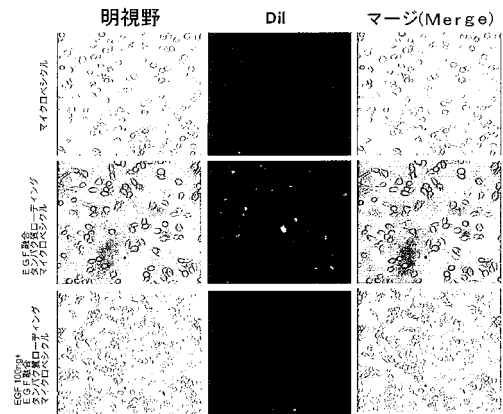
【 図 2 4 】



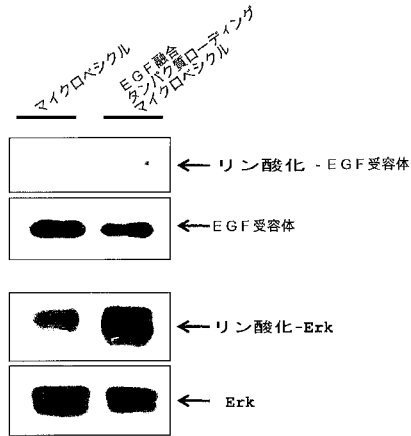
【 図 2 5 】



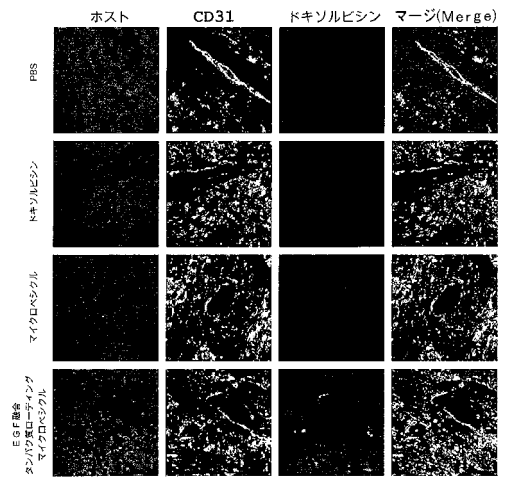
【 図 2 6 】



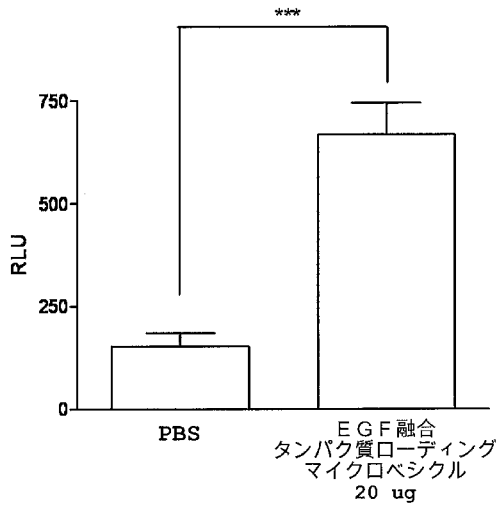
【 図 2 7 】



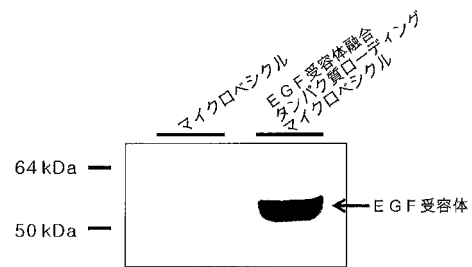
【 図 2 8 】



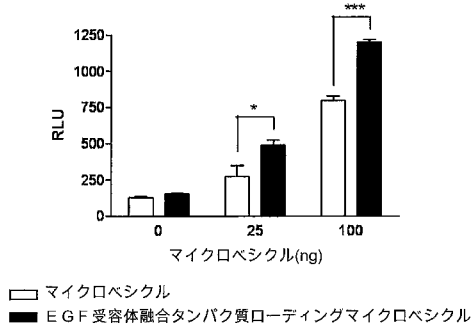
【 図 2 9 】



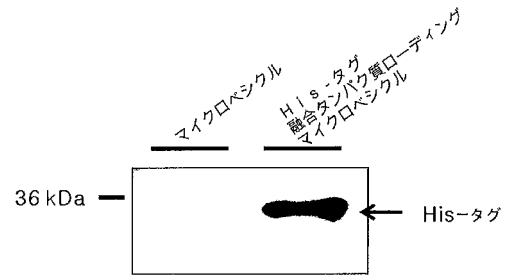
【 図 3 0 】



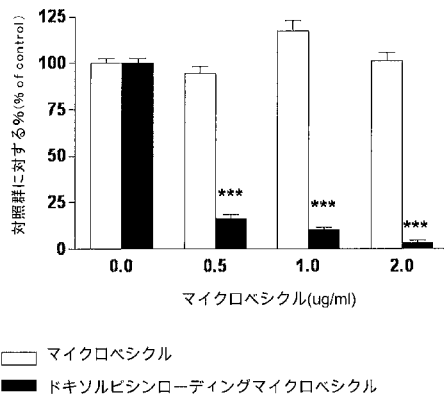
【 図 3 1 】



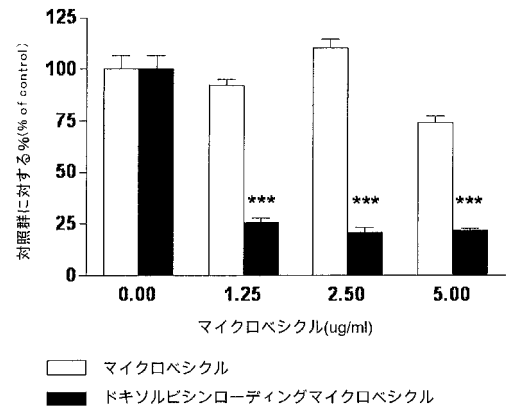
【 図 3 2 】



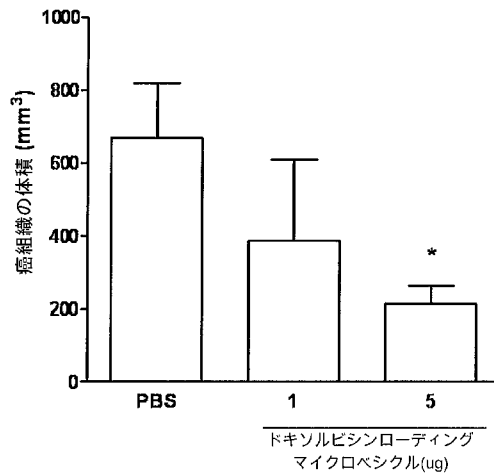
【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



【 図 3 5 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成24年12月26日 (2012.12.26)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

細胞の原形質体に由来するマイクロベシクルを含む組成物。

【 請求項 2 】

前記細胞が、細菌細胞、古細菌細胞、カビ細胞、植物細胞及び L - f o r m 細菌よりなる群から選ばれたものである、請求項 1 に記載の組成物。

【 請求項 3 】

前記細胞が疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現する細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

【 請求項 4 】

前記細胞が、自然に存在する細胞又は形質転換された細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

【 請求項 5 】

前記マイクロベシクルが、標的細胞又は組織へ誘導されるように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【 請求項 6 】

前記マイクロベシクルが、疾病の治療用、診断用又はワクチン物質を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記マイクロベシクルが、標的細胞又は組織へ誘導され、疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記マイクロベシクルが、細胞接合分子、抗体、標的誘導タンパク質、細胞膜融合タンパク質自体、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記マイクロベシクルが、リガンドディスプレイ用タンパク質、リガンドディスプレイ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記マイクロベシクルが、リガンドトラップ用タンパク質、リガンドトラップ用ペプチド、及びこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するように形質転換された細胞の原形質体に由来するものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記マイクロベシクルが、封入体(inclusion body)を有するマイクロベシクルである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

細胞の原形質体に由来し且つ疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされたマイクロベシクルを含む、薬学的組成物。

【請求項 13】

前記疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質が、抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤、ペプチド、タンパク質、毒素、核酸、ビーズ、マイクロ粒子及びナノ粒子よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

前記治療用又は診断用物質が、蛍光を放出する物質である、請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

前記ワクチン用物質が、抗原、免疫補強剤及び免疫調節剤よりなる群から選ばれる一つ以上である、請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記抗原が、ウイルス由来タンパク質、病原性細菌由来タンパク質、及び癌細胞由来タンパク質よりなる群から選ばれたものである、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

細胞の原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を取得する段階、
- (b) 前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び
- (c) 前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【請求項 18】

疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞に治療用、診断用又はワクチン用物質を外部からロードし、細胞壁を取り除いて原形質体を取得する段階、
- (b) 前記原形質体を含む懸濁液からマイクロベシクルを製造する段階、及び
- (c) 前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【請求項 19】

疾病の治療用、診断用又はワクチン用物質がロードされた細胞原形質体由来マイクロベシクルの製造方法であって、下記の段階を含む方法：

- (a) 細胞から細胞壁を取り除いて原形質体を収得する段階、
- (b) 前記原形質体を含む懸濁液に治療用、診断用又はワクチン用物質を添加してマイクロベシクルを製造する段階、及び
- (c) 前記懸濁液から製造されたマイクロベシクルを分離する段階。

【請求項 20】


細胞の原形質体に由来し、且つ疾病の診断に必要なプライマー、プローブ、アンチセンス核酸又は抗体がロードされたマイクロベシクルを含む、疾病診断用キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/004820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>A61K 9/133(2006.01)i, A61K 47/40(2006.01)i, A61K 35/74(2006.01)i, A61K 49/18(2006.01)i, A61K 49/08(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 9/133		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cell, protoplasm, microvesicle(vesicle), drug delivery, vaccine, transformation, vesicle (vesicle)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. G. MERSEY et al., "The isolation of coated vesicles from protoplasts of soybean", Planta, Vol. 163, pp. 317-327, 1985	1,2,4,34,41-43
A	See abstract and manufacturing method.	3,5-33,35-40,44-64 ,86
A	E.-Y. LEE et al., "Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles", Proteomics, Vol. 9, pp. 5425-5436, 2009 See the entire document.	1-64,86
A	E.-Y. LEE et al., "Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from Escherichia coli", Proteomics, Vol. 7, pp. 3143-3153, 2007 See the entire document.	1-64,86
A	R. VALENTI et al., "Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression", Cancer Research, Vol. 67, No. 7, pp. 2912-2915, 01 April 2007 See entire document.	1-64,86
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 FEBRUARY 2012 (20.02.2012)		Date of mailing of the international search report 21 FEBRUARY 2012 (21.02.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/004820**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **65-85**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 65-85 pertain to a method for the treatment of diseases by the administration of a therapeutic agent to the human body, or a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/004820

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	E. PAP et al., "Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer", <i>Inflammation Research</i> , Vol. 58, pp. 1-8, 2009 See the entire document.	1-64,86
A	T,SUGAHARA et al., "Preparation of cationic immunovesicles containing cationic peptide lipid for specific drug delivery to target cells", <i>Cytotechnology</i> , Vol. 47, pp. 51-57, 2004 See the entire document.	1-64,86
A	US 2004-011695 A1 (J. DOBBIE) 10 June See the entire document.	1-64,86

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/004820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2004-0110695 A1	10.06.2004	AU 2001-56461 A1	08.10.2001
		CA 2404325 A1	04.10.2001
		EP 1267924 A2	02.01.2003
		GB 0007150 D0	17.05.2000
		JP 2004-517031 A	10.06.2004
		JP 2004-517031 T	10.06.2004
		NO 20024571 A	14.10.2002
		NO 20024571 D0	24.09.2002
		NZ 522058 A	27.05.2005
		US 2008-0069866 A1	20.03.2008
		WO 2001-72277 A2	04.10.2001
		WO 2001-72277 A3	04.10.2001

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2011/004820

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))		
<i>A61K 9/133(2006.01)i, A61K 47/40(2006.01)i, A61K 35/74(2006.01)i, A61K 49/18(2006.01)i, A61K 49/08(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/133		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세포, 원형질, 마이크로베지클, 약물 전달, 백신, 형질 전환, 벡터		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	B. G. MERSEY 외 3명, "The isolation of coated vesicles from protoplasts of soybean", <i>Planta</i> , Vol. 163, pp. 317-327, 1985	1,2,4,34,41-43
A	요약 및 제조 방법 참조.	3,5-33,35-40,44-64,86
A	E.-Y. LEE 외 10명, "Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> -derived membrane vesicles", <i>Proteomics</i> , Vol. 9, pp. 5425-5436, 2009 전체 문헌 참조.	1-64,86
A	E.-Y. LEE 외 11명, "Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from <i>Escherichia coli</i> ", <i>Proteomics</i> , Vol. 7, pp. 3143-3153, 2007, 전체 문헌 참조.	1-64,86
A	R. VALENTI 외 5명, "Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression", <i>Cancer Research</i> , Vol. 67, No. 7, pp. 2912-2915, 2007.04.01, 전체 문헌 참조.	1-64,86
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2012년 02월 20일 (20.02.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 02월 21일 (21.02.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 이선화 전화번호 82-42-481-5606



국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2011/004820

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	E. PAP 외 3명, "Highlights of a new type of intercelluar communication: microvesicle-based information transfer", <i>Inflammation Research</i> , Vol. 58, pp. 1-8, 2009 전체 문헌 참조.	1-64,86
A	T. SUGAHARA 외 4명, "Preparation of cationic immunovesicles containing cationic peptide lipid for specific drug delivery to target cells", <i>Cytotechnology</i> , Vol. 47, pp. 51-57, 2005 전체 문헌 참조.	1-64,86
A	US 2004-0110695 A1 (J. DOBBIE) 2004.06.10 전체 문헌 참조.	1-64,86

국제 조사 보고서

국제출원번호

PCT/KR2011/004820

제2기재관 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 65-85
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제65항 내지 제85항은 사람에게 치료제를 투여하여 질병을 치료 또는 진단 방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재관 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2011/004820

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2004-0110695 A1	2004.06.10	AU 2001-56461 A1 CA 2404325 A1 EP 1267924 A2 GB 0007150 D0 JP 2004-517031 A JP 2004-517031 T NO 20024571 A NO 20024571 D0 NZ 522058 A US 2008-0069866 A1 WO 2001-72277 A2 WO 2001-72277 A3	2001.10.08 2001.10.04 2003.01.02 2000.05.17 2004.06.10 2004.06.10 2002.10.14 2002.09.24 2005.05.27 2008.03.20 2001.10.04 2001.10.04

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
G 0 1 N 33/544 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	D
	G 0 1 N 33/544	B

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

(72) 発明者 チャン、ス チョル
大韓民国 ギョンサンブク ド 7 5 7 9 1 3、イェチョン グン、ガンチョン ミョン、5 9 1 ヒョンネ リ

(72) 発明者 キム、ヨン グン
大韓民国 ギョンサンブク ド 7 9 0 7 5 1、ポハン シ、ナム グ、ジゴク ドン、8 1 3 0 2 ギョス アパートメント

(72) 発明者 キム、オ ヨン
大韓民国 ソウル 1 4 0 7 2 8、ヨンサン グ、イチョン 1 ドン、2 1 4 1 8 0 3 ハ ンガラム アパートメント

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 CA09 CA20 DA01 DA05 DA06 DA11 EA04 FA01
GA11 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02
4B065 AA01X AA57X AA88X AB01 BA02 CA44 CA46
4C076 AA20 AA95 CC04 CC06 CC07 CC11 CC27 CC32 CC35 DD15
DD63F EE41 FF67 FF68
4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 CA53 NA05 NA13 ZA36 ZB05 ZB07
ZB09 ZB26 ZB33 ZB35 ZC02 ZC03
4C085 AA03 AA25 AA26 AA27 AA38 BA07 BA51 BB01 BB11 CC07
CC08 CC21 DD62 EE01 FF13

4C086	AA01	AA02	EA16	MA03	MA05	MA24	NA05	NA13	ZA36	ZB05
	ZB07	ZB09	ZB26	ZB33	ZB35	ZC02	ZC03			
4C087	AA01	AA02	AA03	BC01	BC15	BC30	CA09	CA12	MA24	NA05
	NA13	ZA36	ZB05	ZB07	ZB09	ZB26	ZB33	ZB35	ZC02	ZC03