(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-513311
(P2022-513311A)
(43)公表日　令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/078(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/078		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ｃ１２Ｎ	*15/55 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55		
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	

審査請求　有　予備審査請求　有　（全71頁）

(21)出願番号　特願2021-541011(P2021-541011)
(86)(22)出願日　平成30年12月6日(2018.12.6)
(85)翻訳文提出日　令和3年5月19日(2021.5.19)
(86)国際出願番号　PCT/SG2018/050596
(87)国際公開番号　WO2020/060479
(87)国際公開日　令和2年3月26日(2020.3.26)
(31)優先権主張番号　62/734,303
(32)優先日　平成30年9月21日(2018.9.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　521116532
シティー・ユニバーシティー・オブ・ホンコン
香港 ホンコン カウロン，タット・チー・アベニュー ８３
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100188374
弁理士　一宮 維幸
(72)発明者　シー，ジアハイ
香港 ホンコン カウロン，タット・チー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　カーゴ積載細胞外小胞

(57)【要約】
本出願は、赤血球に由来する細胞外小胞、特に、排他的ではないが、カーゴを含有する赤血球に由来する細胞外小胞に関する。カーゴは、小分子、タンパク質、核酸又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９遺伝子編集システムの成分を含み得る。赤血球に由来する細胞外小胞は、医学的障害、例えば遺伝的障害、炎症性疾患、がん、自己免疫障害、心血管疾患又は胃腸疾患の処置において使用され得る。電気穿孔によって赤血球に由来する細胞外小胞へとカーゴを積載する方法も提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
赤血球に由来し、外因性カーゴを含有する、細胞外小胞。
【請求項２】
カーゴが、核酸、ペプチド、タンパク質又は小分子である、請求項１に記載の細胞外小胞。
【請求項３】
カーゴが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、メッセンジャーＲＮＡ、長鎖ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｇＲＮＡ又はプラスミドからなる群から選択される核酸である、請求項１又は請求項２に記載の細胞外小胞。
【請求項４】
核酸が、１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸を含む、請求項３に記載の細胞外小胞。
【請求項５】
１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸が、２’－Ｏ－メチル類似体、３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結又は他のロックド核酸（ＬＮＡ）、ＡＲＣＡキャップ、化学修飾核酸又はヌクレオチド、又はキャッピング等の３’若しくは５’修飾から選択される、請求項４に記載の細胞外小胞。
【請求項６】
天然には生じないヌクレオチドが、２’位の糖修飾、２’－Ｏ－メチル化、２’－フルオロ修飾、２’NH_2修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモの置換、又は５－ヨード－ウラシル、又は骨格修飾から選択される、請求項５に記載の細胞外小胞。
【請求項７】
カーゴが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集システムの１つ又は複数の成分を含む、請求項１に記載の細胞外小胞。
【請求項８】
カーゴが、ヌクレアーゼ、又はヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ若しくはプラスミドである、請求項７に記載の細胞外小胞。
【請求項９】
カーゴが、ｇＲＮＡを含む、請求項７に記載の細胞外小胞。
【請求項１０】
アンチセンス核酸を含む、請求項１に記載の細胞外小胞。
【請求項１１】
請求項１～１０のいずれか一項に記載の１つ又は複数の細胞外小胞を含む組成物。
【請求項１２】
処置の方法での使用のための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の細胞外小胞又は組成物。
【請求項１３】
請求項１に記載の細胞外小胞を、処置を必要とする患者に投与するステップを含む、処置の方法。
【請求項１４】
疾患又は障害の処置のための医薬の製造における、請求項１～１１のいずれか一項に記載の細胞外小胞又は組成物の使用。
【請求項１５】
疾患又は障害の処置のための医薬の製造における、請求項１～１１のいずれか一項に記載の細胞外小胞又は組成物の使用。
【請求項１６】
処置の方法が、請求項１～９のいずれか一項に記載の細胞外小胞又は組成物の、遺伝的障害、炎症性疾患、がん、自己免疫障害、心血管疾患又は胃腸疾患を有する対象への投与を

含む、請求項１０～１２のいずれか一項に記載の使用のための細胞外小胞又は組成物、処置の方法又は使用。
【請求項１７】
対象ががんを有し、がんが任意選択で白血病、リンパ腫、骨髄腫、乳がん、肺がん、肝臓がん、結腸直腸がん、上咽頭がん、腎臓がん又は神経膠腫から選択される、請求項１３に記載の使用のための細胞外小胞又は組成物、処置の方法又は使用。
【請求項１８】
ａ．赤血球の試料を提供すること、ここで前記試料は白血球を含まない；
ｂ．赤血球の試料を小胞誘導剤と接触させること；
ｃ．赤血球から細胞外小胞を分離すること；及び
ｄ．細胞外小胞を回収すること；
ｅ．任意選択で、外因性カーゴの存在下で細胞外小胞を電気穿孔すること
を含む、方法。
【請求項１９】
外因性カーゴの存在下で赤血球に由来する細胞外小胞を電気穿孔することを含む、方法。
【請求項２０】
請求項１８又は請求項１０に記載の方法によって得られた細胞外小胞を含む組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、全ての目的のために、その内容及び要素が参照により本明細書に組み込まれる、２０１８年９月２１日に出願された米国特許仮出願第６２／７３４３０３号の優先権を主張する。
【０００２】
発明の分野
本発明は、細胞外小胞、特に、排他的ではないが、カーゴを含有する細胞外小胞に関する。
【背景技術】
【０００３】
低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、長鎖非コードＲＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ゲノム編集ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含むＲＮＡ治療は、高い特異性及び柔軟性で病的なヒトゲノムを標的とするプログラム可能な治療のための新興の治療法である。ウイルス（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス）、脂質トランスフェクション試薬、及び脂質ナノ粒子を含む、ＲＮＡ薬送達のための一般的な媒体は、通常、免疫原性及び／又は細胞傷害性である。したがって、白血病細胞及び固形腫瘍細胞を含む、ほとんどの一次組織及びがん細胞にＲＮＡ薬を送達するための安全で有効な戦略は、依然として捉えにくいままである。
【０００４】
細胞外小胞（ＥＶ）は、患者にＲＮＡを送達するために適用されてきた。ＥＶは、細胞間コミュニケーションのために体内の全ての型の細胞によって分泌される。ＥＶは、多胞体に由来する小胞（１０～１００ｎｍ）であるエキソソーム、生細胞の細胞膜に由来するマイクロベシクル（１００～１０００ｎｍ）、及びアポトーシス細胞の細胞膜に由来するアポトーシス小体（５００～５０００ｎｍ）からなる。ＥＶベースの薬物送達方法が望まれるが、ＥＶ産生には限界がある。高純度及び均質なＥＶを産生するため、厳密な精製方法、例えば、スクロース密度勾配超遠心分離又はサイズ排除クロマトグラフィーが必要であるが、それらは時間がかかり、スケーラブルではない。さらに、収率が非常に低いため、十分なＥＶを得るために１０億個の細胞が必要であり、そのような数の初代細胞は通常入手できない。初代細胞の不死化は、ＲＮＡ薬と一緒に発癌性ＤＮＡ及びレトロトランスポゾンエレメントを移行させるリスクがある。実際、全ての有核細胞は、ある程度の遺伝子

水平伝播のリスクを示し、それは、どの細胞がすでに危険なＤＮＡを持ち、どれが持たないかを先験的に予測できないためである。したがって、有害事象を減らして患者へ核酸物質を送達するための有効な手法の必要性が残っている。

【０００５】

さらに、ＥＶベースの治療をより特異的にするため、レトロウイルス又はレンチウイルスを使用してトランスフェクト又は形質導入されるプラスミドからドナー細胞においてペプチド又は抗体を発現させ、続いて抗生物質ベース又は蛍光ベースの選択により、ＥＶを操作し、特定の標的細胞に特異的に結合するペプチド又は抗体を持たせることができる。これらの方法は、高発現されたプラスミドがＥＶに組み込まれ、最終的に標的細胞へと移行されやすいため、遺伝子水平伝播の高いリスクを提起する。プラスミドの遺伝子エレメントは、発癌をもたらし得る。安定な細胞株にＥＶを産生させる場合、変異ＤＮＡ、ＲＮＡ及びタンパク質を含む豊富な発癌性因子がＥＶに詰め込まれ、腫瘍発生のリスクを標的細胞に送達する。一方、リボソームの欠如により、赤血球ではプラスミドが転写できないため、遺伝子操作方法は赤血球に適用できない。それは、トランスフェクト又は形質導入が難しい幹細胞及び初代細胞にも適用できない。

【０００６】

近年、ＥＶの表面のホスファチジルセリン（ＰＳ）に結合するラクトアドヘリンのＣ１Ｃ２ドメインに融合した抗体によってＥＶをコーティングする新しい方法がある。この方法は、いかなる遺伝的改変もなく、抗体とのＥＶのコンジュゲーションを可能にする。しかしながら、Ｃ１Ｃ２は、疎水性タンパク質であり、したがって、哺乳動物細胞では面倒な精製方法及びウシ血清アルブミンを含有する緩衝液中での保存を必要とする。さらに、Ｃ１Ｃ２融合抗体とのＥＶのコンジュゲーションは、一時的なＣ１Ｃ２とＰＳの間の親和性結合に基づく。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

したがって、治療又は診断目的のための安定なＥＶの強い必要性が残っている。本発明は、上記の検討に照らして考案された。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

細胞外小胞（ＥＶ）は、それらの天然の生物的適合性、高い送達効率、低い毒性、及び低い免疫原性特性により、新興の薬物送達媒体である。ＥＶは、通常、それらのドナー細胞の遺伝的改変によって操作されるが、遺伝子操作方法は初代細胞では非効率的であり、最終的に臨床適用に安全ではない遺伝子水平伝播のリスクを示す。小分子、タンパク質及び核酸を含む薬物のＥＶ媒介送達は、ほとんどのｉｎ　ｖｉｖｏでの送達のハードルを克服するＥＶの天然の生物的適合性のため、魅力的なプラットフォームである。ＥＶは、通常、非毒性であり、非免疫原性である。それらは多くの細胞型によって容易に取り込まれるが、それらが細網内皮系のマクロファージ及び単球による食作用を避けるのに役立つＣＤ４７などのいくつかの抗食作用マーカーを持つ。さらに、ＥＶは、内皮結合を通って、及び血液脳関門を横切ってさえも血管外遊出することができ、したがって、それらは非常に多才な薬物担体である。３　臨床的価値のうち、ＥＶによる送達は、腫瘍細胞が多くの化学化合物を除外するために使用することが多いＰ－糖タンパク質の過剰発現によって生じる多剤耐性メカニズムによって妨害されない。

【０００９】

したがって、この開示は、カーゴを含有する修飾された細胞外小胞並びにそのような積載細胞外小胞を作製及び使用する方法に関する。

最も一般的には、本開示は、本明細書では「積載細胞外小胞」と呼ばれるカーゴを含有する細胞外小胞を提供する。カーゴは、好ましくは外因性物質であり、それは天然では細胞外小胞に生じないが、細胞外小胞に導入されていることを意味する。

【００１０】

本開示は、特に赤血球に由来する細胞外小胞に関する。そのような小胞は、それらが赤血球の特徴、例えば色素沈着若しくはヘモグロビンの存在、又は赤血球の表面マーカー特徴、例えばＣＤ２３５ａを維持するため、他の細胞に由来する細胞外小胞とは異なる。小胞を囲む膜は、１つ又は複数の赤血球表面マーカー、例えばＣＤ２３５ａの存在によって特徴付けられ得る。

【００１１】

カーゴは、核酸、ペプチド、タンパク質又は小分子であり得る。例えば、カーゴは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、メッセンジャーＲＮＡ、長鎖ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｇＲＮＡ又はプラスミドからなる群から選択される核酸であり得る。いくつかの場合では、核酸は１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸を含む。１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸は、２’－Ｏ－メチル類似体、３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結又は他のロックド核酸（ＬＮＡ）、ＡＲＣＡキャップ、化学修飾核酸若しくはヌクレオチド、又はキャッピング等の３’若しくは５’修飾から選択され得る。天然には生じないヌクレオチドは、２’位の糖修飾、２’－Ｏ－メチル化、２’－フルオロ修飾、２’2N修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモの置換、又は５－ヨード－ウラシル、又は骨格修飾から選択され得る。

【００１２】

特に好ましい態様では、カーゴは、遺伝子編集システム、例えばＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集システムの１つ又は複数の成分を含む。カーゴは、ヌクレアーゼ、又はヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ若しくはプラスミドであり得る。カーゴは、ｇＲＮＡを含み得る。

【００１３】

他の好ましい態様では、カーゴは、アンチセンス核酸又はオリゴヌクレオチドを含む。カーゴは、標的細胞又は目的の細胞における核酸と相補的な配列を含み得る。例えば、ｍｉＲＮＡ又はｍＲＮＡ。いくつかの実施形態では、核酸は、発癌性ｍｉＲＮＡ、例えばｍｉＲ１２５ｂと相補的である。

【００１４】

本明細書では、カーゴを積載した１つ又は複数の細胞外小胞を含む組成物も開示する。いくつかの組成物では、積載細胞外小胞は、同じカーゴを積載される。他の組成物では、積載細胞外小胞は、２つ以上のカーゴ分子を積載される。各細胞外小胞は、１つより多くの異なるカーゴを含有し得る。いくつかの場合では、組成物中の細胞外小胞の一部の割合は１つのカーゴを含有し、組成物中の細胞外小胞の別の割合は異なるカーゴを含有する。いくつかの場合では、その割合は重複し、組成物中のいくつかの細胞外小胞は、少なくとも２つの異なるカーゴ分子を積載される。好ましくは、組成物中の細胞外小胞の少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、又は実質的に全てがカーゴを封入する。

【００１５】

組成物は、処置の方法、特に医学的処置の方法において有用であり得る。方法は、処置を必要とする個体への組成物の投与を含み得る。

疾患又は障害の処置の医薬の製造における細胞外小胞又は細胞外小胞を含む組成物の使用も記載する。

【００１６】

本明細書に記載の細胞外小胞は、遺伝的障害、炎症性疾患、がん、自己免疫障害、心血管疾患又は胃腸疾患を有する対象の処置に有用である。がんは、白血病、リンパ腫、骨髄腫、乳がん、肺がん、肝臓がん、結腸直腸がん、上咽頭がん、腎臓がん又は神経膠腫であり得る。

【００１７】

赤血球の試料を提供又は取得すること、ここで前記試料は白血球を含まない；赤血球の試料を小胞誘導剤と接触させること；赤血球から細胞外小胞を分離すること；及び細胞外小

胞を回収することを含む方法も記載する。本方法は、外因性カーゴの存在下で細胞外小胞を電気穿孔するステップを含み得る。そのようなステップは、細胞外小胞がカーゴを封入するか又は取り込むことを誘導し得る。本方法は、全血液試料、又は赤血球を含有する試料を処置し、白血球又は血小板などの赤血球ではない細胞を試料から除去するステップを含み得る。例えば、遠心分離及び／又は濾過による。

【００１８】

別の方法は、外因性カーゴの存在下で赤血球に由来する細胞外小胞を電気穿孔するステップを含む。この方法で、細胞外小胞は、カーゴを封入するか又は取り込むことを誘導され得る。

【００１９】

本開示は、本明細書に開示する方法によって得られた細胞外小胞及び積載細胞外小胞も企図する。そのような細胞外小胞は治療用途に好適である。

好ましい態様では、カーゴは、細胞外小胞が形成された後、細胞外小胞に積載される。好ましくは、カーゴは、その小胞の形成中には細胞外小胞へと積載されない。カーゴは、そこから細胞外小胞が形成された細胞に存在することができない。

【００２０】

本明細書では、医薬に使用される細胞外小胞及び細胞外小胞を含有する組成物も開示する。そのような組成物及び細胞外小胞は、処置を必要とする対象に有効量で投与され得る。対象は、遺伝的障害、炎症性疾患、がん、自己免疫障害、心血管疾患又は胃腸疾患の処置を必要とし得る又はこれらの疾患を有し得る。がんは、任意選択で、白血病、リンパ腫、骨髄腫、乳がん、肺がん、肝臓がん、結腸直腸がん、上咽頭がん、腎臓がん又は神経膠芽腫から選択される。

【００２１】

さらなる態様では、がん細胞を本発明による細胞外小胞又は組成物と接触させるステップを含む、がん細胞の成長又は増殖を阻害する方法を提供する。本明細書では、細胞を細胞外小胞と接触させるステップを含むｉｎ　ｖｉｔｒｏでの方法も開示する。

【００２２】

本明細書では、積載細胞外小胞を産生する方法、並びにそのような方法によって得られた細胞外小胞も開示する。最も一般的に、そのような方法は、細胞外小胞をカーゴと接触させるステップ及び電気穿孔し、カーゴを細胞外小胞で封入するステップを含む。積載細胞外小胞を産生する方法は、細胞外小胞を精製するステップ、単離するステップ又は洗浄するステップをさらに含み得る。細胞外小胞を精製するステップ、単離するステップ又は洗浄するステップは、細胞外小胞の分画遠心法を含み得る。分画遠心法は、スクロース勾配、又は凍結スクロースクッションでの遠心分離を含み得る。

【００２３】

本明細書に開示する方法は、細胞を積載ＲＢＣ－ＥＶと接触させるステップを含み、該方法は、接触細胞の少なくとも６０％が積荷でトランスフェクトされることをもたらす。

別の態様では、本明細書は、治療用途に好適な細胞外小胞を調製する方法であって、赤血球から細胞外小胞を単離するステップを含む方法を開示する。

【００２４】

本発明は、そのような組合せがはっきりと容認できない又は明確に避けられる以外では記載される態様と好ましい特徴の組合せを含む。

本発明の一態様では、標的細胞へのＲＮＡ送達の方法であって、ａ）赤血球（ＲＢＣ）から細胞外小胞（ＥＶ）を精製するステップ；ｂ）ＲＮＡをＥＶに電気穿孔し、ＲＮＡ積載ＥＶを形成するステップ；及びｃ）ＲＮＡ積載ＥＶを標的細胞に適用するステップを含む方法を提供する。

【００２５】

ＲＢＣからのＥＶ（マイクロベシクル及びエキソソームを含む）を使用する利点は、ＲＢＣが最も豊富にある血液細胞であり、それ故に大量のＥＶがいずれの血液バンクでも入手可能なＲＢＣユニットから取得及び精製することができることである。好ましくは、ＲＢ

ＣはヒトにＲＢＣ　ＥＶは、合成トランスフェクション試薬とは異なり、非毒性でもある。ＲＢＣ　ＥＶは、通常がん細胞又は幹細胞からのＥＶに豊富である発癌性ＤＮＡ／ＲＮＡ又は増殖因子を含有せず、それ故にＲＢＣ　ＥＶはレシピエント細胞にいずれの形質転換リスクも示さない。

【００２６】

一実施形態では、ＲＢＣは哺乳動物、好ましくはヒトに由来し、イオノフォア、特にカルシウムイオノフォアで処置される。ＥＶは、スクロースクッションの超遠心分離を使用して精製される。用語「スクロースクッション」は、遠心分離中にそれ自体で確立するスクロース勾配を指す。

【００２７】

一実施形態では、スクロース勾配は、約４０％～約７０％、約５０％～約６０％、又は約６０％のスクロースの溶液を使用することによって調製される。別の実施形態では、電気穿孔したＥＶは、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ｍＲＮＡ及びプラスミドを含む。好ましくは、ＡＳＯは、配列番号１を含む、又は配列番号１からなる。

【００２８】

さらなる実施形態では、標的細胞は、がん細胞を含む、又はがん細胞である。別の実施形態では、標的細胞は、白血病細胞、特に急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）細胞、乳がん細胞、又はＡＭＬ細胞と乳がん細胞の組合せを含む。

【００２９】

別の実施形態では、ＥＶは、上記のように標的細胞におけるｍｉＲ－１２５ｂのノックダウンのためのｍｉＲ－１２５ｂをアンタゴナイズするＡＳＯを電気穿孔した。好ましくは、ｍｉＲ－１２５ｂをアンタゴナイズするＡＳＯは、配列番号１を含む、又は配列番号１からなる。

【００３０】

別の実施形態では、標的細胞の増殖が抑制される。

さらなる実施形態では、ＥＶは、小さい化学物質、例えばデキストランを電気穿孔される。別の実施形態では、方法は、アポトーシス関連遺伝子発現を調節し、それにより標的細胞においてアポトーシスを誘導するＲＮＡ積載ＥＶを標的細胞に投与するステップを含む。本発明の第二の態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を標的細胞に送達し、遺伝子発現を抑制する方法であって、ａ）赤血球（ＲＢＣ）から細胞外小胞（ＥＶ）を精製するステップ；ｂ）ＲＮＡをＥＶに電気穿孔し、ＲＮＡ積載ＥＶを形成するステップ；及びｃ）ＲＮＡ積載ＥＶを標的細胞に適用するステップを含む方法を提供する。

【００３１】

一実施形態では、上記のように、ＲＢＣは哺乳動物、好ましくはヒトに由来し、イオノフォア、特にカルシウムイオノフォアで処置される。一実施形態では、ＲＮＡは、ｍｉＲ－１２５ｂをアンタゴナイズするＡＳＯであり、標的細胞における発癌性ｍｉＲ－１２５ｂを阻害する。好ましくは、ｍｉＲ－１２５ｂをアンタゴナイズするＡＳＯは、配列番号１を含む、又は配列番号１からなる。

【００３２】

別の実施形態では、標的細胞は、がん細胞を含む、又はがん細胞である。別の実施形態では、標的細胞は、白血病細胞、特にＡＭＬ細胞、乳がん細胞、又はＡＭＬ細胞と乳がん細胞の組合せを含む。

【００３３】

本発明の第３の態様では、ＣＲＩＳＰＲゲノム編集システムのための標的細胞へのＲＮＡ送達の方法であって、ａ）ＲＢＣが好ましくはヒトに由来し、イオノフォア、特にカルシウムイオノフォアで処置される、赤血球（ＲＢＣ）からの細胞外小胞（ＥＶ）を精製するステップ；ｂ）Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及び／又はｇＲＮＡであり得るＲＮＡをＥＶに電気穿孔し、ＲＮＡ積載ＥＶを形成するステップ；及びｃ）ＲＮＡ積載ＥＶを標的細胞に適用するステップを含む方法を提供する。ＣＲＩＳＰＲは、研究及び医薬における広範な適用のためのゲノムＤＮＡの強く正確な修飾を可能にする方法である。システムは、直接ゲノム

ＤＮＡを標的化するように設計され得る。
【００３４】
一実施形態では、ＥＶに、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを電気穿孔する。好ましくは、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、配列番号２を含む、又は配列番号２からなる。さらに、ｇＲＮＡは、配列番号３を含む、又は配列番号３からなるｅＧＦＰ　ｇＲＮＡである。
【００３５】
別の実施形態では、ＥＶに、Ｃａｓ９及びｇＲＮＡプラスミドを電気穿孔する。別の実施形態では、標的細胞は、がん細胞を含む、又はがん細胞である。
さらなる実施形態では、標的細胞は、白血病細胞を含む、又は白血病細胞である。特定の実施形態では、標的細胞は、白血病細胞、特にＡＭＬ細胞、乳がん細胞、又はＡＭＬ細胞と乳がん細胞の組合せを含む。本発明の第４の態様では、標的細胞へのＲＮＡの送達によってがんを処置する方法であって、ａ）好ましくは哺乳動物、特にヒトに由来し、イオノフォア、特にカルシウムイオノフォアで処置される、赤血球（ＲＢＣ）から細胞外小胞（ＥＶ）を精製するステップ；ｂ）ＲＮＡをＥＶに電気穿孔し、ＲＮＡ積載ＥＶを形成するステップ；及びｃ）標的細胞ががん細胞を含み、ＲＮＡ積載ＥＶを標的細胞に適用し、それにより標的細胞の増殖を阻害するステップを含む方法を提供する。
【００３６】
一実施形態では、標的細胞は、白血病細胞、乳がん細胞、又は白血病細胞と乳がん細胞の組合せを含む。別の実施形態では、標的細胞は、急性骨髄性白血病細胞を含む。
別の実施形態では、ステップｃ）は、局所又は全身投与により、標的細胞を有する対象にＲＮＡ積載ＥＶを投与するステップを含む。局所投与は、作用部位へ直接のＲＮＡ積載ＥＶの送達を指し、限定はされないが、腫瘍内投与を含む。全身投与は、循環系によるＲＮＡ積載ＥＶの送達を指し、限定はされないが、静脈内注射を含む。
【００３７】
さらなる実施形態では、標的細胞の増殖は、ステップｃ）の後に抑制される。
本発明の原理を例示する実施形態及び実験は、ここで、以下の添付の図面を参照して議論する。
【図面の簡単な説明】
【００３８】
【図１－１】ＲＢＣからのＥＶの特徴付け及び白血病細胞によるＲＢＣＥＶの取り込み。ａ）Ｎａｎｏｓｉｇｈｔナノ粒子アナライザーを使用して決定した、３人のドナーからのＲＢＣＥＶの平均濃度（１００，０００×希釈）±ＳＥＭ（グレー）及びそれらのサイズ分布。ｂ）ＲＢＣＥＶの代表的な透過型電子顕微鏡画像を示す図である。スケールバー：１００ｎｍ。ｃ）細胞溶解物及びＲＢＣからのＥＶにおけるＧＡＰＤＨ（ローディングコントロール）と比較したＥＶマーカーＡＬＩＸ及びＴＳＧ１０１；並びＲＢＣマーカーヘモグロビンＡ（ＨＢＡ）のウェスタンブロット解析。ｄ）白血病ＭＯＬＭ１３細胞、ＮＯＭＯ１細胞、ＲＢＣ、及びＲＢＣＥＶにおいて、ＧＡＰＤＨと比較した、それぞれＲＢＣＥＶ及び小胞体のマーカーとしてストマチン（ＳＴＯＭ）及びカルネキシン（ＣＡＮＸ）のウェスタンブロット解析。ｅ）未処置又は８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶと２４時間インキュベートした白血病ＭＯＬＭ１３細胞において、ＧＡＰＤＨと比較したＨＢＡのウェスタンブロット解析。ｆ）１２．４×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＥＶと２４時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３－ＧＦＰ細胞の代表的な免疫蛍光画像。スケールバー、２０μｍ。ｇ）２４時間、ヘパリンあり又はなしで１２．４×１０^{11}個の非標識又はＰＫＨ２６標識ＥＶとインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＰＫＨ２６のＦＡＣＳ解析。ＰＫＨ２６標識後の最後の洗浄の上清を使用して、バックグラウンドを決定した。ＰＫＨ２６陽性細胞のパーセンテージをゲートの上に示す。ｈ）各条件下でのＰＫＨ２６陽性細胞の平均パーセンテージ（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３回細胞継代）。Ｐ値（＊＊＊Ｐ＜０．００１）は、スチューデントの片側ｔ検定を使用して決定した。図１ｃ～ｅでは、タンパク質マーカーの分子量（ｋＤａ）を右側に示す。各実験は２～３回の細胞継代で２～３回繰り返した。

【図１－２】ＲＢＣからのＥＶの特徴付け及び白血病細胞によるＲＢＣＥＶの取り込み。ａ）Ｎａｎｏｓｉｇｈｔナノ粒子アナライザーを使用して決定した、３人のドナーからのＲＢＣＥＶの平均濃度（１００，０００×希釈）±ＳＥＭ（グレー）及びそれらのサイズ分布。ｂ）ＲＢＣＥＶの代表的な透過型電子顕微鏡画像を示す図である。スケールバー：１００ｎｍ。ｃ）細胞溶解物及びＲＢＣからのＥＶにおけるＧＡＰＤＨ（ローディングコントロール）と比較したＥＶマーカーＡＬＩＸ及びＴＳＧ１０１；並びＲＢＣマーカーヘモグロビンＡ（ＨＢＡ）のウェスタンブロット解析。ｄ）白血病ＭＯＬＭ１３細胞、ＮＯＭＯ１細胞、ＲＢＣ、及びＲＢＣＥＶにおいて、ＧＡＰＤＨと比較した、それぞれＲＢＣＥＶ及び小胞体のマーカーとしてストマチン（ＳＴＯＭ）及びカルネキシン（ＣＡＮＸ）のウェスタンブロット解析。ｅ）未処置又は８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶと２４時間インキュベートした白血病ＭＯＬＭ１３細胞において、ＧＡＰＤＨと比較したＨＢＡのウェスタンブロット解析。ｆ）１２．４×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＥＶと２４時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３－ＧＦＰ細胞の代表的な免疫蛍光画像。スケールバー、２０μｍ。ｇ）２４時間、ヘパリンあり又はなしで１２．４×１０^{11}個の非標識又はＰＫＨ２６標識ＥＶとインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＰＫＨ２６のＦＡＣＳ解析。ＰＫＨ２６標識後の最後の洗浄の上清を使用して、バックグラウンドを決定した。ＰＫＨ２６陽性細胞のパーセンテージをゲートの上に示す。ｈ）各条件下でのＰＫＨ２６陽性細胞の平均パーセンテージ（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３回細胞継代）。Ｐ値（＊＊＊Ｐ＜０．００１）は、スチューデントの片側ｔ検定を使用して決定した。図１ｃ～ｅでは、タンパク質マーカーの分子量（ｋＤａ）を右側に示す。各実験は２～３回の細胞継代で２～３回繰り返した。

【図１－３】ＲＢＣからのＥＶの特徴付け及び白血病細胞によるＲＢＣＥＶの取り込み。ａ）Ｎａｎｏｓｉｇｈｔナノ粒子アナライザーを使用して決定した、３人のドナーからのＲＢＣＥＶの平均濃度（１００，０００×希釈）±ＳＥＭ（グレー）及びそれらのサイズ分布。ｂ）ＲＢＣＥＶの代表的な透過型電子顕微鏡画像を示す図である。スケールバー：１００ｎｍ。ｃ）細胞溶解物及びＲＢＣからのＥＶにおけるＧＡＰＤＨ（ローディングコントロール）と比較したＥＶマーカーＡＬＩＸ及びＴＳＧ１０１；並びＲＢＣマーカーヘモグロビンＡ（ＨＢＡ）のウェスタンブロット解析。ｄ）白血病ＭＯＬＭ１３細胞、ＮＯＭＯ１細胞、ＲＢＣ、及びＲＢＣＥＶにおいて、ＧＡＰＤＨと比較した、それぞれＲＢＣＥＶ及び小胞体のマーカーとしてストマチン（ＳＴＯＭ）及びカルネキシン（ＣＡＮＸ）のウェスタンブロット解析。ｅ）未処置又は８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶと２４時間インキュベートした白血病ＭＯＬＭ１３細胞において、ＧＡＰＤＨと比較したＨＢＡのウェスタンブロット解析。ｆ）１２．４×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＥＶと２４時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３－ＧＦＰ細胞の代表的な免疫蛍光画像。スケールバー、２０μｍ。ｇ）２４時間、ヘパリンあり又はなしで１２．４×１０^{11}個の非標識又はＰＫＨ２６標識ＥＶとインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＰＫＨ２６のＦＡＣＳ解析。ＰＫＨ２６標識後の最後の洗浄の上清を使用して、バックグラウンドを決定した。ＰＫＨ２６陽性細胞のパーセンテージをゲートの上に示す。ｈ）各条件下でのＰＫＨ２６陽性細胞の平均パーセンテージ（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３回細胞継代）。Ｐ値（＊＊＊Ｐ＜０．００１）は、スチューデントの片側ｔ検定を使用して決定した。図１ｃ～ｅでは、タンパク質マーカーの分子量（ｋＤａ）を右側に示す。各実験は２～３回の細胞継代で２～３回繰り返した。

【図２－１】ＡＳＯのＲＢＣＥＶへの電気穿孔及び白血球細胞への送達。ａ）ＲＢＣＥＶによるＡＳＯ送達の実験スキーム。ｂ）それぞれ、ｎ＝３回繰り返して、Ｎａｎｏｓｉｇｈｔアナライザー及びＳｙｎｅｒｇｙ蛍光マイクロプレートリーダーを使用して決定した、ＥＶ（２００×希釈）の平均濃度及びＦＡＭ標識スクランブル陰性コントロールＡＳＯ（ＦＡＭ－ＮＣ－ＡＳＯ）を電気穿孔したＲＢＣＥＶのスクロース勾配分離の１２画分の非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と比較したＦＡＭ蛍光強度の平均倍率変化。ｃ　ＳＹＢＲ Ｇｏｌｄ染色（上）、及びｎ＝３回独立して反復した、電気穿孔ＲＢＣＥＶに未結合又は結合のＮＣ－ＡＳＯの平均パーセンテージ（下）を使用して可視化した、１０％未変性ゲ

ル内の未処置のＮＣ－ＡＳＯ（２００ｐｍｏｌ）と比較した、８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔又は電気穿孔ＲＢＣＥＶからの未結合のＮＣ－ＡＳＯ（未標識）の分離。ｄ）Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ３０００（Ｌｉｐｏ）、ＩＮＴＥＲＦＥＲｉｎ（登録商標）（Ｉｎｔｅ）又は１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶを使用して４００ｐｍｏｌのＦＡＭ－ＮＣ－ＡＳＯをトランスフェクトしたＭＯＬＭ１３細胞における、ＦＡＭ蛍光対前方散乱光面積（ＦＳＣ－Ａ）のＦＡＣＳ解析。ＦＡＭ陽性細胞のパーセンテージは、ゲートの上に示す。ｅ）ｎ＝３回繰り返して、図２ｄのようにＦＡＭ　ＡＳＯを含有するＲＢＣＥＶをトランスフェクトした又はそれで処置した生存ＭＯＬＭ１３細胞中のＦＡＭ＋細胞の平均パーセンテージ。ｆ）ｎ＝４回繰り返して、未標識のＮＣ　ＡＳＯを含有するＲＢＣＥＶをトランスフェクトした又はそれで処置したＭＯＬＭ１３細胞中でヨウ化プロピジウム染色によって決定した死細胞のパーセンテージ。全てのグラフは、平均±ＳＥＭを表す。スチューデントの片側ｔ検定の結果は、非電気穿孔コントロール（ｃ）又は未処置コントロール（ｅ、ｆ）と比較してｎ．ｓ．有意ではないとして示した；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１及び＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【図２－２】ＡＳＯのＲＢＣＥＶへの電気穿孔及び白血球細胞への送達。ａ）ＲＢＣＥＶによるＡＳＯ送達の実験スキーム。ｂ）それぞれ、ｎ＝３回繰り返して、Ｎａｎｏｓｉｇｈｔアナライザー及びＳｙｎｅｒｇｙ蛍光マイクロプレートリーダーを使用して決定した、ＥＶ（２００×希釈）の平均濃度及びＦＡＭ標識スクランブル陰性コントロールＡＳＯ（ＦＡＭ－ＮＣ－ＡＳＯ）を電気穿孔したＲＢＣＥＶのスクロース勾配分離の１２画分の非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と比較したＦＡＭ蛍光強度の平均倍率変化。ｃ　ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ染色（上）、及びｎ＝３回独立して反復した、電気穿孔ＲＢＣＥＶに未結合又は結合のＮＣ－ＡＳＯの平均パーセンテージ（下）を使用して可視化した、１０％未変性ゲル内の未処置のＮＣ－ＡＳＯ（２００ｐｍｏｌ）と比較した、８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔又は電気穿孔ＲＢＣＥＶからの未結合のＮＣ－ＡＳＯ（未標識）の分離。ｄ）Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ３０００（Ｌｉｐｏ）、ＩＮＴＥＲＦＥＲｉｎ（登録商標）（Ｉｎｔｅ）又は１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶを使用して４００ｐｍｏｌのＦＡＭ－ＮＣ－ＡＳＯをトランスフェクトしたＭＯＬＭ１３細胞における、ＦＡＭ蛍光対前方散乱光面積（ＦＳＣ－Ａ）のＦＡＣＳ解析。ＦＡＭ陽性細胞のパーセンテージは、ゲートの上に示す。ｅ）ｎ＝３回繰り返して、図２ｄのようにＦＡＭ　ＡＳＯを含有するＲＢＣＥＶをトランスフェクトした又はそれで処置した生存ＭＯＬＭ１３細胞中のＦＡＭ＋細胞の平均パーセンテージ。ｆ）ｎ＝４回繰り返して、未標識のＮＣ　ＡＳＯを含有するＲＢＣＥＶをトランスフェクトした又はそれで処置したＭＯＬＭ１３細胞中でヨウ化プロピジウム染色によって決定した死細胞のパーセンテージ。全てのグラフは、平均±ＳＥＭを表す。スチューデントの片側ｔ検定の結果は、非電気穿孔コントロール（ｃ）又は未処置コントロール（ｅ、ｆ）と比較してｎ．ｓ．有意ではないとして示した；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１及び＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【図２－３】ＡＳＯのＲＢＣＥＶへの電気穿孔及び白血球細胞への送達。ａ）ＲＢＣＥＶによるＡＳＯ送達の実験スキーム。ｂ）それぞれ、ｎ＝３回繰り返して、Ｎａｎｏｓｉｇｈｔアナライザー及びＳｙｎｅｒｇｙ蛍光マイクロプレートリーダーを使用して決定した、ＥＶ（２００×希釈）の平均濃度及びＦＡＭ標識スクランブル陰性コントロールＡＳＯ（ＦＡＭ－ＮＣ－ＡＳＯ）を電気穿孔したＲＢＣＥＶのスクロース勾配分離の１２画分の非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と比較したＦＡＭ蛍光強度の平均倍率変化。ｃ　ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ染色（上）、及びｎ＝３回独立して反復した、電気穿孔ＲＢＣＥＶに未結合又は結合のＮＣ－ＡＳＯの平均パーセンテージ（下）を使用して可視化した、１０％未変性ゲル内の未処置のＮＣ－ＡＳＯ（２００ｐｍｏｌ）と比較した、８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔又は電気穿孔ＲＢＣＥＶからの未結合のＮＣ－ＡＳＯ（未標識）の分離。ｄ）Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ３０００（Ｌｉｐｏ）、ＩＮＴＥＲＦＥＲｉｎ（登録商標）（Ｉｎｔｅ）又は１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶを使用して４００ｐｍｏｌのＦＡＭ－ＮＣ－ＡＳＯをトランスフェクトしたＭＯＬＭ１３細胞における、ＦＡＭ蛍光対前方散乱光面積（ＦＳＣ－Ａ）のＦＡＣＳ解析。ＦＡＭ陽性細胞のパーセンテージは、ゲー

トの上に示す。ｅ）ｎ＝３回繰り返して、図２ｄのようにＦＡＭ　ＡＳＯを含有するＲＢＣＥＶをトランスフェクトした又はそれで処置した生存ＭＯＬＭ１３細胞中のＦＡＭ＋細胞の平均パーセンテージ。ｆ）ｎ＝４回繰り返して、未標識のＮＣ　ＡＳＯを含有するＲＢＣＥＶをトランスフェクトした又はそれで処置したＭＯＬＭ１３細胞中でヨウ化プロピジウム染色によって決定した死細胞のパーセンテージ。全てのグラフは、平均±ＳＥＭを表す。スチューデントの片側ｔ検定の結果は、非電気穿孔コントロール（ｃ）又は未処置コントロール（ｅ、ｆ）と比較してｎ．ｓ．有意ではないとして示した；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１及び＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【図３－１】ＲＢＣＥＶはＡＳＯを、ｍｉＲ－１２５ｂ阻害のため白血病及び乳がん細胞に送達する。ａ）ＲＢＣＥＶを使用してがん細胞へとＡＳＯを送達する実験スキーム。ｂ）３０分間ＲＮａｓｅＩｆによって処置した後、６．２×１０^{11}個の非電気穿孔又は１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶと関連する抗ｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯ（１２５ｂ－ＡＳＯ）のパーセンテージ。ｃ）７２時間ＮＣ－ＡＳＯ又は１２５ｂ－ＡＳＯを電気穿孔していない１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）又は電気穿孔した１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶによって処置したＭＯＬＭ１３細胞における１２５ｂ－ＡＳＯのコピー数。ｄ）１２５ｂ－ＡＳＯ単独、１６．８×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）、１６．８×１０^{11}個のＮＣＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶ、又は４．２～１６．８×１０^{11}個の１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶとインキュベートした、ＭＯＬＭ１３細胞におけるｍｉＲ－１２５ｂの発現倍率変化。ｍｉＲ－１２５ｂ発現は、Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定され、Ｕ６ｂ　ＲＮＡでノーマライズし、未処置コントロールと比較した平均倍率変化として表した。ｅ）ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定し、ＧＡＰＤＨでノーマライズし、未処置コントロールと比較した平均倍率変化として表した、図３ｄのように処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるＢＡＫ１の発現倍率変化。ｆは、細胞数を使用して決定した、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔又はＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ－電気穿孔ＥＶで処置したＭＯＬＭ１３細胞の増殖。ｇは、クリスタルバイオレット染色によって決定した、図３ｆのように処置した乳がんＣＡ１ａ細胞（％）の生存率。全てのパネルでは、実験は、３又は４回の細胞継代により、３又は４回繰り返した。棒グラフは平均±ＳＥＭを示す。Ｐ値は、未処置コントロールと比較して、一元配置分散分析（ｄ、ｅ）又はスチューデントの片側ｔ検定（ｂ、ｆ、ｇ）を使用して算出した。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１。

【図３－２】ＲＢＣＥＶはＡＳＯを、ｍｉＲ－１２５ｂ阻害のため白血病及び乳がん細胞に送達する。ａ）ＲＢＣＥＶを使用してがん細胞へとＡＳＯを送達する実験スキーム。ｂ）３０分間ＲＮａｓｅＩｆによって処置した後、６．２×１０^{11}個の非電気穿孔又は１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶと関連する抗ｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯ（１２５ｂ－ＡＳＯ）のパーセンテージ。ｃ）７２時間ＮＣ－ＡＳＯ又は１２５ｂ－ＡＳＯを電気穿孔していない１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）又は電気穿孔した１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶによって処置したＭＯＬＭ１３細胞における１２５ｂ－ＡＳＯのコピー数。ｄ）１２５ｂ－ＡＳＯ単独、１６．８×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）、１６．８×１０^{11}個のＮＣＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶ、又は４．２～１６．８×１０^{11}個の１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶとインキュベートした、ＭＯＬＭ１３細胞におけるｍｉＲ－１２５ｂの発現倍率変化。ｍｉＲ－１２５ｂ発現は、Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定され、Ｕ６ｂ　ＲＮＡでノーマライズし、未処置コントロールと比較した平均倍率変化として表した。ｅ）ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定し、ＧＡＰＤＨでノーマライズし、未処置コントロールと比較した平均倍率変化として表した、図３ｄのように処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるＢＡＫ１の発現倍率変化。ｆは、細胞数を使用して決定した、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔又はＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ－電気穿孔ＥＶで処置したＭＯＬＭ１３細胞の増殖。ｇは、クリスタルバイオレット染色によって決定した、図３ｆのように処置した乳がんＣＡ１ａ細胞（％）の生存率。全てのパネルでは、実験は、３又は４回の細胞継代により、３又は４回繰り返した。棒グラフは平均±ＳＥＭを示す。Ｐ値は、未処置コントロールと比較して

、一元配置分散分析（ｄ、ｅ）又はスチューデントの片側ｔ検定（ｂ、ｆ、ｇ）を使用して算出した。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１。
【図３－３】ＲＢＣＥＶはＡＳＯを、ｍｉＲ－１２５ｂ阻害のため白血病及び乳がん細胞に送達する。ａ）ＲＢＣＥＶを使用してがん細胞へとＡＳＯを送達する実験スキーム。ｂ）３０分間ＲＮａｓｅＩｆによって処置した後、６．２×１０^{11}個の非電気穿孔又は１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶと関連する抗ｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯ（１２５ｂ－ＡＳＯ）のパーセンテージ。ｃ）７２時間ＮＣ－ＡＳＯ又は１２５ｂ－ＡＳＯを電気穿孔していない１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）又は電気穿孔した１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶによって処置したＭＯＬＭ１３細胞における１２５ｂ－ＡＳＯのコピー数。ｄ）１２５ｂ－ＡＳＯ単独、１６．８×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）、１６．８×１０^{11}個のＮＣＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶ、又は４．２～１６．８×１０^{11}個の１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶとインキュベートした、ＭＯＬＭ１３細胞におけるｍｉＲ－１２５ｂの発現倍率変化。ｍｉＲ－１２５ｂ発現は、Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定され、Ｕ６ｂ　ＲＮＡでノーマライズし、未処置コントロールと比較した平均倍率変化として表した。ｅ）ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定し、ＧＡＰＤＨでノーマライズし、未処置コントロールと比較した平均倍率変化として表した、図３ｄのように処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるＢＡＫ１の発現倍率変化。ｆは、細胞数を使用して決定した、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔又はＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ－電気穿孔ＥＶで処置したＭＯＬＭ１３細胞の増殖。ｇは、クリスタルバイオレット染色によって決定した、図３ｆのように処置した乳がんＣＡ１ａ細胞（％）の生存率。全てのパネルでは、実験は、３又は４回の細胞継代により、３又は４回繰り返した。棒グラフは平均±ＳＥＭを示す。Ｐ値は、未処置コントロールと比較して、一元配置分散分析（ｄ、ｅ）又はスチューデントの片側ｔ検定（ｂ、ｆ、ｇ）を使用して算出した。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１。
【図４－１】ＲＢＣＥＶは、ｉｎ　ｖｉｖｏで乳がん細胞によって取り込まれる。ａ）ｉｎ　ｖｉｖｏでのＥＶ取り込みアッセイのスキーム。ｂ）ｉｎ　ｖｉｖｏ画像化システム（ＩＶＩＳ）を使用して決定し、平均±ＳＥＭ（ｎ＝３匹のマウス）として表した、１６．５×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶの腫瘍内注射の２４～７２時間後の腫瘍におけるＰＫＨ２６蛍光の総発光効率。ｃ）ＩＶＩＳを使用して捕捉した、処置の７２時間後の、右脇腹に未処置の腫瘍を、左脇腹にＰＫＨ２６標識ＥＶを注射した腫瘍を担持するマウスの画像。ＰＫＨ２６はシュードカラー発光で示す。ｄ）ｃのマウスから切除した腫瘍の画像。ｅ）ＤＡＰＩ染色した核及びＥＶを取り込んだ細胞からのＰＫＨ２６シグナルによる、腫瘍切片の代表的な共焦点顕微鏡画像。スケールバーは、２０μｍである。
【図４－２】ＲＢＣＥＶは、ｉｎ　ｖｉｖｏで乳がん細胞によって取り込まれる。ａ）ｉｎ　ｖｉｖｏでのＥＶ取り込みアッセイのスキーム。ｂ）ｉｎ　ｖｉｖｏ画像化システム（ＩＶＩＳ）を使用して決定し、平均±ＳＥＭ（ｎ＝３匹のマウス）として表した、１６．５×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶの腫瘍内注射の２４～７２時間後の腫瘍におけるＰＫＨ２６蛍光の総発光効率。ｃ）ＩＶＩＳを使用して捕捉した、処置の７２時間後の、右脇腹に未処置の腫瘍を、左脇腹にＰＫＨ２６標識ＥＶを注射した腫瘍を担持するマウスの画像。ＰＫＨ２６はシュードカラー発光で示す。ｄ）ｃのマウスから切除した腫瘍の画像。ｅ）ＤＡＰＩ染色した核及びＥＶを取り込んだ細胞からのＰＫＨ２６シグナルによる、腫瘍切片の代表的な共焦点顕微鏡画像。スケールバーは、２０μｍである。
【図５－１】ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶによる処置は、ｍｉＲ－１２５ｂノックダウンによって腫瘍増殖を抑制する。ａ）乳がん異種移植片を担持するヌードマウスへのＡＳＯ送達のスキーム。ｂ）ＩＶＩＳを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、ＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯを含有する８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ、ｎ＝８匹のマウス）又は４００ｐｍｏｌのＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ（ｎ＝６匹のマウス）の腫瘍内注射で３日毎に処置した腫瘍の平均生物発光光子束。ｃ）マウスの平均重量（平均±ＳＥＭ）。ｄ）０～４２日目の代表的な画像。生物発光は、シュードカラーの発光で示す。ｅ）４４日目の腫瘍の代表的な写真。ｆ）４４日目に回収した腫瘍及び肺の代表的なＨ＆Ｅ染色画像。スケール

バー、５０μｍ。ｇ）Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、処置の４４日後の腫瘍における、Ｕ６ｂ　ＲＮＡ及びＮＣ条件と比較したｍｉＲ－１２５ｂ倍率変化。Ｐ値は片側Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定を使用して決定した、ｂ、ｇ；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１；ｎ．ｓ．有意でない。全実験は３回の独立した反復で実施した（３バッチのマウス）。

【図５－２】ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶによる処置は、ｍｉＲ－１２５ｂノックダウンによって腫瘍増殖を抑制する。ａ）乳がん異種移植片を担持するヌードマウスへのＡＳＯ送達のスキーム。ｂ）ＩＶＩＳを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、ＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯを含有する８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ、ｎ＝８匹のマウス）又は４００ｐｍｏｌのＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ（ｎ＝６匹のマウス）の腫瘍内注射で３日毎に処置した腫瘍の平均生物発光光子束。ｃ）マウスの平均重量（平均±ＳＥＭ）。ｄ）０～４２日目の代表的な画像。生物発光は、シュードカラーの発光で示す。ｅ）４４日目の腫瘍の代表的な写真。ｆ）４４日目に回収した腫瘍及び肺の代表的なＨ＆Ｅ染色画像。スケールバー、５０μｍ。ｇ）Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、処置の４４日後の腫瘍における、Ｕ６ｂ　ＲＮＡ及びＮＣ条件と比較したｍｉＲ－１２５ｂ倍率変化。Ｐ値は片側Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定を使用して決定した、ｂ、ｇ；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１；ｎ．ｓ．有意でない。全実験は３回の独立した反復で実施した（３バッチのマウス）。

【図５－３】ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶによる処置は、ｍｉＲ－１２５ｂノックダウンによって腫瘍増殖を抑制する。ａ）乳がん異種移植片を担持するヌードマウスへのＡＳＯ送達のスキーム。ｂ）ＩＶＩＳを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、ＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯを含有する８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ、ｎ＝８匹のマウス）又は４００ｐｍｏｌのＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ（ｎ＝６匹のマウス）の腫瘍内注射で３日毎に処置した腫瘍の平均生物発光光子束。ｃ）マウスの平均重量（平均±ＳＥＭ）。ｄ）０～４２日目の代表的な画像。生物発光は、シュードカラーの発光で示す。ｅ）４４日目の腫瘍の代表的な写真。ｆ）４４日目に回収した腫瘍及び肺の代表的なＨ＆Ｅ染色画像。スケールバー、５０μｍ。ｇ）Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、処置の４４日後の腫瘍における、Ｕ６ｂ　ＲＮＡ及びＮＣ条件と比較したｍｉＲ－１２５ｂ倍率変化。Ｐ値は片側Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定を使用して決定した、ｂ、ｇ；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１；ｎ．ｓ．有意でない。全実験は３回の独立した反復で実施した（３バッチのマウス）。

【図６－１】ＮＳＧマウスにおける全身投与時のＲＢＣＥＶの体内分布。ａ）ｉ．ｖ．注射後のＲＢＣＥＶ循環時間の決定のための実験スキーム。ｂ）３．３×１０^{12}個のＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶのｉ．ｖ．注射の直後（０時間）又は３、６、１２時間後のＮＳＧマウスの血液からの全ＥＶに結合したビーズのＰＫＨ２６蛍光のＦＡＣＳ解析。ＰＫＨ２６陽性ビーズのパーセンテージは、ゲートの上に示し、平均は棒グラフに示す（平均±ＳＥＭ；２回の繰り返しでｎ＝３又は４匹のマウス）。ｃ）ＮＳＧマウスにおけるＲＢＣＥＶの体内分布の決定のための実験スキーム。ｄ）３．３×１０^{12}個のＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶ又は標識ＥＶの最後の洗浄からの上清の２回のｉ．ｐ．注射（２４時間間隔）の２４時間後の臓器の代表的な画像。画像はＩＶＩＳを使用して捕捉した。ＤｉＲ蛍光は、シュードカラーの発光で示す。ｅ　ＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶを注射したマウスの臓器における平均ＤｉＲ発光（平均±ＳＥＭ；２回の繰り返しでｎ＝４匹のマウス）。ｆ）ＮＳＧマウスにおける骨髄へのｖｉｖｏｔｒａｃｋ－６８０（ＶＶＴ）標識ＲＢＣＥＶ分布の決定のための実験スキーム。ｇ）３．３×１０^{12}個のＶＶＴ標識ＲＢＣＥＶ又はＥＶ洗浄上清（Ｓｕｐ）の２回のｉ．ｐ．注射（２４時間間隔）の２４時間後のマウスからの骨髄細胞のＶＶＴ蛍光（ＡＰＣ－Ｃｙ５．５）対ＦＳＣ－ＡのＦＡＣＳ解析。ｈ）ＶＶＴ陽性細胞の平均パーセンテージ（平均±ＳＥＭ、２回の繰り返しでｎ＝４匹のマウス）。＊＊Ｐ＜０．０１、片側Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定。

【図６－２】ＮＳＧマウスにおける全身投与時のＲＢＣＥＶの体内分布。ａ）ｉ．ｖ．注射後のＲＢＣＥＶ循環時間の決定のための実験スキーム。ｂ）３．３×１０^{12}個のＰＫ

Ｈ２６標識ＲＢＣＥＶのｉ．ｖ．注射の直後（０時間）又は３、６、１２時間後のＮＳＧマウスの血液からの全ＥＶに結合したビーズのＰＫＨ２６蛍光のＦＡＣＳ解析。ＰＫＨ２６陽性ビーズのパーセンテージは、ゲートの上に示し、平均は棒グラフに示す（平均±ＳＥＭ；２回の繰り返しでｎ＝３又は４匹のマウス）。ｃ）ＮＳＧマウスにおけるＲＢＣＥＶの体内分布の決定のための実験スキーム。ｄ）３．３×１０^{12}個のＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶ又は標識ＥＶの最後の洗浄からの上清の２回のｉ．ｐ．注射（２４時間間隔）の２４時間後の臓器の代表的な画像。画像はＩＶＩＳを使用して捕捉した。ＤｉＲ蛍光は、シュードカラーの発光で示す。ｅ　ＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶを注射したマウスの臓器における平均ＤｉＲ発光（平均±ＳＥＭ；２回の繰り返しでｎ＝４匹のマウス）。ｆ）ＮＳＧマウスにおける骨髄へのｖｉｖｏｔｒａｃｋ－６８０（ＶＶＴ）標識ＲＢＣＥＶ分布の決定のための実験スキーム。ｇ）３．３×１０^{12}個のＶＶＴ標識ＲＢＣＥＶ又はＥＶ洗浄上清（Ｓｕｐ）の２回のｉ．ｐ．注射（２４時間間隔）の２４時間後のマウスからの骨髄細胞のＶＶＴ蛍光（ＡＰＣ－Ｃｙ５．５）対ＦＳＣ－ＡのＦＡＣＳ解析。ｈ）ＶＶＴ陽性細胞の平均パーセンテージ（平均±ＳＥＭ、２回の繰り返しでｎ＝４匹のマウス）。＊＊Ｐ＜０．０１、片側Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定。

【図７－１】ＲＢＣＥＶにおけるｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯの全身送達は、ＡＭＬ異種移植マウスにおける白血病の進行を抑制する。ａ）ＮＳＧマウスにおけるＡＭＬ異種移植及びＡＳＯ送達の実験スキーム。ｂ）ＩＶＩＳを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、処置開始（０日目）前のシグナルと比較したＮＣ－ＡＳＯ（ｎ＝７匹のマウス）又は１２５ｂ－ＡＳＯ（ｎ＝６匹のマウス）を含有する３．３×１０^{12}個のＲＢＣＥＶによる処置の０～９日後のマウスの全身生物発光の平均倍率変化。ｃ）ＩＶＩＳを使用して捕捉した、０日目＆９日目の白血病マウスの代表的な画像。生物発光はシュードカラーで示す。ｄ）マウスの平均体重（平均±ＳＥＭ）。ｅ）白血病マウスの骨髄におけるＧＦＰ細胞のＦＡＣＳ解析：ＧＦＰの代表的なドットプロット（ＦＩＴＣチャネル）対サイズ散乱面積（ＳＳＣ－Ａ）及びＧＦＰ陽性細胞の平均パーセンテージ（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３匹のマウス／群）。ｆ）ＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶによって処置した非移植マウス及びＡＭＬマウスからの脾臓及び肝臓の代表的なＨ＆Ｅ染色画像。矢印は、正常な細胞よりも大きな核を有する浸潤する白血病細胞のクラスターを示す。スケールバー、５０μｍ。ｇ　Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定し、脾臓においてＮＣと比較した平均倍率変化±ＳＥＭとして表す、脾臓（ｎ＝５匹のマウス）及び肝臓（ｎ＝３匹のマウス）においてＵ６Ｂ　ＲＮＡでノーマライズしたｍｉＲ－１２５ｂ発現倍率変化。片側Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定を使用して決定した＊Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．０１（ｂ、ｅ、ｇ）。全実験は、２回の独立した反復で実施した。

【図７－２】ＲＢＣＥＶにおけるｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯの全身送達は、ＡＭＬ異種移植マウスにおける白血病の進行を抑制する。ａ）ＮＳＧマウスにおけるＡＭＬ異種移植及びＡＳＯ送達の実験スキーム。ｂ）ＩＶＩＳを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、処置開始（０日目）前のシグナルと比較したＮＣ－ＡＳＯ（ｎ＝７匹のマウス）又は１２５ｂ－ＡＳＯ（ｎ＝６匹のマウス）を含有する３．３×１０^{12}個のＲＢＣＥＶによる処置の０～９日後のマウスの全身生物発光の平均倍率変化。ｃ）ＩＶＩＳを使用して捕捉した、０日目＆９日目の白血病マウスの代表的な画像。生物発光はシュードカラーで示す。ｄ）マウスの平均体重（平均±ＳＥＭ）。ｅ）白血病マウスの骨髄におけるＧＦＰ細胞のＦＡＣＳ解析：ＧＦＰの代表的なドットプロット（ＦＩＴＣチャネル）対サイズ散乱面積（ＳＳＣ－Ａ）及びＧＦＰ陽性細胞の平均パーセンテージ（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３匹のマウス／群）。ｆ）ＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶによって処置した非移植マウス及びＡＭＬマウスからの脾臓及び肝臓の代表的なＨ＆Ｅ染色画像。矢印は、正常な細胞よりも大きな核を有する浸潤する白血病細胞のクラスターを示す。スケールバー、５０μｍ。ｇ　Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定し、脾臓においてＮＣと比較した平均倍率変化±ＳＥＭとして表す、脾臓（ｎ＝５匹のマウス）及び肝臓（ｎ＝３匹のマウス）においてＵ６Ｂ　ＲＮＡでノーマライズしたｍｉＲ－１２５ｂ発現倍率変化。片側Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定を使用して決定した＊Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．０１（ｂ、ｅ、ｇ

）。全実験は、２回の独立した反復で実施した。
【図８－１】ＲＢＣＥＶは、ゲノム編集のため、白血病細胞にＣａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを送達する。ａ）Ｃａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ送達のスキーム。ｂ　非電気穿孔のＣａｓ９レベルと比較した（第２の条件）、未処置の、６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡとインキュベート又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔した、及びＲＮａｓｅＩｆで処置した、６．２×１０^{11}個のＲＢＣＥＶにおけるＣａｓ９　ｍＲＮＡの平均レベル。ｃ）３ｐｍｏｌ条件と比較して、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）又は処置の２４時間後に３、６、又は１２ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔したＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ）とインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡと比較したＣａｓ９　ｍＲＮＡのレベル。ｄ）１２．４×１０^{11}個のＵＥ－ＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔したＥＶと４８時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞の代表的な画像。ＭＯＬＭ１３細胞はまた、比較のため、６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ（Ｃａｓ９　Ｅ）を直接電気穿孔した。細胞は、ＨＡ－Ｃａｓ９タンパク質（緑）及び核ＤＮＡ（Ｈｏｅｃｈｓｔ、青）を染色した。スケールバー、２０μｍ。ｅ）ｄに示すようにＨＡ－Ｃａｓ９タンパク質が陽性に染色されたＭＯＭＬ１３細胞の平均パーセンテージ。ｆ）未処置の、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶで処置した、ＭＯＬＭ１３細胞におけるＣａｓ９及びα－チューブリン（ＴＵＢ）のウェスタンブロット解析。各バンドの下はその平均強度であり、ＩｍａｇｅＪを使用して定量した。ｇ　４８時間、１２．４×１０^{11}個のＵＥ－ＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡを積載したＥＶで処置したＭＯＬＭ１３細胞において、それぞれＵ６ｂＲＮＡ及び１８ｓ　ＲＮＡでノーマライズした、未処置の条件と比較したｍｉＲ－１２５ｂ及びＢＡＫ１発現倍率変化。ｈ）ｇのように処置したＭＯＬＭ１３細胞からのｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡの野生型（ＷＴ）ｍｉｒ－１２５ｂ（枠は成熟配列を示す）及び変異ＤＮＡ配列のアライメント。赤、挿入又は欠失。緑、ミスマッチ。ＰＡＭ、プロトスペーサー隣接モチーフ。全ての棒グラフは平均±ＳＥＭを示す（ｎ＝３又は４回の細胞継代の３又は４回反復）。＊Ｐ＜０．０５；＊＊＊Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１：片側スチューデントのｔ検定。
【図８－２】ＲＢＣＥＶは、ゲノム編集のため、白血病細胞にＣａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを送達する。ａ）Ｃａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ送達のスキーム。ｂ　非電気穿孔のＣａｓ９レベルと比較した（第２の条件）、未処置の、６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡとインキュベート又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔した、及びＲＮａｓｅＩｆで処置した、６．２×１０^{11}個のＲＢＣＥＶにおけるＣａｓ９　ｍＲＮＡの平均レベル。ｃ）３ｐｍｏｌ条件と比較して、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）又は処置の２４時間後に３、６、又は１２ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔したＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ）とインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡと比較したＣａｓ９　ｍＲＮＡのレベル。ｄ）１２．４×１０^{11}個のＵＥ－ＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔したＥＶと４８時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞の代表的な画像。ＭＯＬＭ１３細胞はまた、比較のため、６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ（Ｃａｓ９　Ｅ）を直接電気穿孔した。細胞は、ＨＡ－Ｃａｓ９タンパク質（緑）及び核ＤＮＡ（Ｈｏｅｃｈｓｔ、青）を染色した。スケールバー、２０μｍ。ｅ）ｄに示すようにＨＡ－Ｃａｓ９タンパク質が陽性に染色されたＭＯＭＬ１３細胞の平均パーセンテージ。ｆ）未処置の、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶで処置した、ＭＯＬＭ１３細胞におけるＣａｓ９及びα－チューブリン（ＴＵＢ）のウェスタンブロット解析。各バンドの下はその平均強度であり、ＩｍａｇｅＪを使用して定量した。ｇ　４８時間、１２．４×１０^{11}個のＵＥ－ＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡを積載したＥＶで処置したＭＯＬＭ１３細胞において、それぞれＵ６ｂＲＮＡ及び１８ｓ　ＲＮＡでノーマライズした、未処置の条件と比較したｍｉＲ－１２５ｂ及びＢＡＫ１発現倍率変化。ｈ）ｇのように処置したＭＯＬＭ１３細胞からのｍｉｒ－

１２５ｂ標的化ｇＲＮＡの野生型（ＷＴ）ｍｉｒ－１２５ｂ（枠は成熟配列を示す）及び変異ＤＮＡ配列のアライメント。赤、挿入又は欠失。緑、ミスマッチ。ＰＡＭ、プロトスペーサー隣接モチーフ。全ての棒グラフは平均±ＳＥＭを示す（ｎ＝３又は４回の細胞継代の３又は４回反復）。＊Ｐ＜０．０５；＊＊＊Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１：片側スチューデントのｔ検定。

【図８－３】ＲＢＣＥＶは、ゲノム編集のため、白血病細胞にＣａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを送達する。ａ）Ｃａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ送達のスキーム。ｂ　非電気穿孔のＣａｓ９レベルと比較した（第２の条件）、未処置の、６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡとインキュベート又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔した、及びＲＮａｓｅＩｆで処置した、６．２×１０^{11}個のＲＢＣＥＶにおけるＣａｓ９　ｍＲＮＡの平均レベル。ｃ）３ｐｍｏｌ条件と比較して、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）又は処置の２４時間後に３、６、又は１２ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔したＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ）とインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡと比較したＣａｓ９　ｍＲＮＡのレベル。ｄ）１２．４×１０^{11}個のＵＥ－ＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔したＥＶと４８時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞の代表的な画像。ＭＯＬＭ１３細胞はまた、比較のため、６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ（Ｃａｓ９　Ｅ）を直接電気穿孔した。細胞は、ＨＡ－Ｃａｓ９タンパク質（緑）及び核ＤＮＡ（Ｈｏｅｃｈｓｔ、青）を染色した。スケールバー、２０μｍ。ｅ）ｄに示すようにＨＡ－Ｃａｓ９タンパク質が陽性に染色されたＭＯＭＬ１３細胞の平均パーセンテージ。ｆ）未処置の、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶで処置した、ＭＯＬＭ１３細胞におけるＣａｓ９及びα－チューブリン（ＴＵＢ）のウェスタンブロット解析。各バンドの下はその平均強度であり、ＩｍａｇｅＪを使用して定量した。ｇ　４８時間、１２．４×１０^{11}個のＵＥ－ＥＶ又は６ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡを積載したＥＶで処置したＭＯＬＭ１３細胞において、それぞれＵ６ｂＲＮＡ及び１８ｓ　ＲＮＡでノーマライズした、未処置の条件と比較したｍｉＲ－１２５ｂ及びＢＡＫ１発現倍率変化。ｈ）ｇのように処置したＭＯＬＭ１３細胞からのｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡの野生型（ＷＴ）ｍｉｒ－１２５ｂ（枠は成熟配列を示す）及び変異ＤＮＡ配列のアライメント。赤、挿入又は欠失。緑、ミスマッチ。ＰＡＭ、プロトスペーサー隣接モチーフ。全ての棒グラフは平均±ＳＥＭを示す（ｎ＝３又は４回の細胞継代の３又は４回反復）。＊Ｐ＜０．０５；＊＊＊Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１：片側スチューデントのｔ検定。

【図９－１】ヒト赤血球（ＲＢＣ）からの細胞外小胞（ＥＶ）の精製及び特徴付け。ａ）精製方法：イオノフォア処置したヒト赤血球から培養上清を回収し、複数回低速遠心分離にかけ、細胞及び残渣を除去した。ＥＶを、１００，０００×ｇで１回は６０％スクロースクッションを含む３回の超遠心分離によって精製した。３人のドナーからのＲＢＣＥＶのｂ）多分散性指数及びｃ）ゼータ電位を、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）。

【図９－２】ヒト赤血球（ＲＢＣ）からの細胞外小胞（ＥＶ）の精製及び特徴付け。ａ）精製方法：イオノフォア処置したヒト赤血球から培養上清を回収し、複数回低速遠心分離にかけ、細胞及び残渣を除去した。ＥＶを、１００，０００×ｇで１回は６０％スクロースクッションを含む３回の超遠心分離によって精製した。３人のドナーからのＲＢＣＥＶのｂ）多分散性指数及びｃ）ゼータ電位を、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）。

【図１０－１】複数回の凍結融解サイクル後のＲＢＣＥＶの形態像及びサイズ分布。ａ）１～３回の凍結融解サイクル後の同じバッチからのＲＢＣＥＶの代表的な透過型電子顕微鏡画像。画像は、４２０００×（左）及び８６０００×（右）で捕捉した。スケールバー、２００ｎｍ。ｂ）３人のドナーからのＲＢＣＥＶ（１００，０００×希釈）の平均濃度±ＳＥＭ（グレー）及び１～３回の凍結融解サイクル後にＮａｎｏｓｉｇｈｔアナライザーを使用して決定したそれらのサイズ分布。

【図１０－２】複数回の凍結融解サイクル後のＲＢＣＥＶの形態像及びサイズ分布。ａ）１～３回の凍結融解サイクル後の同じバッチからのＲＢＣＥＶの代表的な透過型電子顕微鏡画像。画像は、４２０００×（左）及び８６０００×（右）で捕捉した。スケールバー、２００ｎｍ。ｂ）３人のドナーからのＲＢＣＥＶ（１００，０００×希釈）の平均濃度±ＳＥＭ（グレー）及び１～３回の凍結融解サイクル後にＮａｎｏｓｉｇｈｔアナライザーを使用して決定したそれらのサイズ分布。

【図１１】ＲＢＣＥＶは、白血病ＭＯＬＭ１３細胞によって取り込まれる。ａ）ＥＶ取り込みアッセイの概略図：ＲＢＣＥＶをＰＫＨ２６（赤い蛍光の膜色素）で標識し、超遠心分離を使用して３回洗浄し、終夜ラテックスビーズ又は２４時間ＭＯＬＭ１３細胞とインキュベートした。ｂ）１２．４×１０^{11}個の非標識又はＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶとインキュベートしたラテックスビーズのＦＡＣＳ解析。ビーズは、前方散乱面積（ＦＳＣ－Ａ）及びサイズ散乱面積（ＳＳＣ－Ａ）に基づいてゲートをかけた。ＰＫＨ２６蛍光（ＰＥチャネル）は、ＦＳＣ－Ａに対してプロットした。ＰＫＨ２６陽性ビーズのパーセンテージは、ゲートの上に示した。ｃ）１２．４×１０^{11}個の非標識又はＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶとインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞のＦＡＣＳ解析。細胞は、ＦＳＣ－Ａ対ＳＳＣ－Ａ（生存集団）及びＦＳＣ幅対ＦＳＣ高（単一細胞）に基づいてゲートをかけた。ＰＫＨ２６陽性細胞のパーセンテージはゲートの上に示す。

【図１２】異なる電圧でのデキストランのＲＢＣＥＶへの電気穿孔。ａ）ＥＶ電気穿孔の概略図：８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶを４μｇのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（ＡＦ６４７）標識デキストランと混合し、５０～２５０Ｖの異なる電圧で、ＯｐｔｉＭＥＭ中で電気穿孔した。ＥＶは、終夜ラテックスビーズとインキュベートし、ＦＡＣＳを使用して解析した。ｂ）デキストランＡＦ６４７、電気穿孔したデキストランＡＦ６４７、電気穿孔したＥＶ（Ｅ－ＥＶ）又は非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）とインキュベートしたビーズのＡＦ６４７蛍光（ＡＰＣチャネル）及びＦＳＣ－ＡのＦＡＣＳ解析。ＡＦ６４７陽性ビーズのパーセンテージは、ゲートの上に示す。

【図１３】電気穿孔したＲＢＣＥＶの特徴付け。ａ）ＲＢＣＥＶのトップダウンスクロース密度勾配分離のスキーム。ｂは、各スクロース画分（２００×希釈）の非電気穿孔（ＵＥ－ＥＶ）又はＦＡＭ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ）の濃度を、Ｎａｎｏｓｉｇｈｔアナライザーを使用して決定し、スクロースの密度を屈折計を使用して決定した。ｃ）Ｎａｎｏｓｉｇｈｔ粒子アナライザーを使用して決定した、画分６のＥＶのサイズ分布。

【図１４】電気穿孔したＲＢＣＥＶの特徴付け。ａ）１０％未変性ゲル内の、電気穿孔したＲＢＣＥＶからの非封入ＦＡＭ－ＡＳＯのＦＡＭ蛍光。ｂ）Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＴＭマイクロプレートリーダーを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）、１～７２時間、３７℃で、５０％ＦＢＳを含有するＯｐｔｉＭＥＭ中での電気穿孔あり又はなし（Ｅ又はＵＥ）のＲＢＣＥＶとインキュベートしたＦＡＭ－ＡＳＯの平均蛍光強度。Ｐ値は、スチューデントの片側ｔ検定を使用して決定した（ｎ＝３回の独立した反復）。ｃ）１２５ｂ－ＡＳＯ濃度対Ｃｔ値の標準曲線は、Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定した。

【図１５】ＲＢＣＥＶは、デキストランを白血病ＭＯＬＭ１３細胞に送達する。ａ）デキストラン送達の概略図：８．２５～１６．５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶを４μｇのデキストランＡＦ６４７と混合し、２５０Ｖで電気穿孔した。電気穿孔したＥＶを、２４時間、ＭＯＬＭ１３細胞とインキュベートした。ｂ）未処置の、又は８．２５～１６．５×１０^{11}個のデキストラン－ＡＦ６４７電気穿孔ＥＶ（Ｅ－ＥＶ）又は１６．５×１０^{11}個の非電気穿孔（ＵＥ－ＥＶ）とインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるデキストランＡＦ６４７蛍光のＦＡＣＳ解析。

【図１６－１】ＲＢＣＥＶはアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を白血病ＮＯＭＯ１細胞に送達する。ａ）未処置の、又は１２．４×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＥＶとインキュベートしたＮＯＭＯ１細胞におけるＰＫＨ２６（ＰＥチャネル）のＦＡＣＳ解析。ｂ）ＰＫＨ２６標識ＥＶで処置したＮＯＭＯ１細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像を示す図である。スケールバー、２０μｍ。ｃ）未処置の、又はＦＡＭ－ＡＳＯと、又は１２．

４×１０^{11}個の非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と、又はＦＡＭ－ＡＳＯ電気穿孔ＥＶ（Ｅ－ＥＶ）とインキュベートしたＮＯＭＯ１細胞のＦＡＭ蛍光（ＦＩＴＣチャネル）のＦＡＣＳ解析。

【図１６－２】ＲＢＣＥＶはアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を白血病ＮＯＭＯ１細胞に送達する。ａ）未処置の、又は１２．４×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＥＶとインキュベートしたＮＯＭＯ１細胞におけるＰＫＨ２６（ＰＥチャネル）のＦＡＣＳ解析。ｂ）ＰＫＨ２６標識ＥＶで処置したＮＯＭＯ１細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像を示す図である。スケールバー、２０μｍ。ｃ）未処置の、又はＦＡＭ－ＡＳＯと、又は１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と、又はＦＡＭ－ＡＳＯ電気穿孔ＥＶ（Ｅ－ＥＶ）とインキュベートしたＮＯＭＯ１細胞のＦＡＭ蛍光（ＦＩＴＣチャネル）のＦＡＣＳ解析。

【図１７】経時的な白血病細胞によるＡＳＯの取り込み。未処置の、又は４００ｐｍｏｌのＦＡＭ－ＡＳＯ単独と、又は１２×１０^{11}個のＦＡＭ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶと、５日間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＦＡＭ蛍光（ＦＩＴＣチャネル）のＦＡＣＳ解析。ＦＡＭ陽性細胞のパーセンテージをゲートの上に示す。

【図１８】ＲＢＣＥＶはデキストランのＭＯＬＭ１３細胞への送達においてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ３０００及びＩＮＴＥＲＥＲｉｎ（登録商標）よりも高い効率及び低い毒性を与える。ａ）未処置の、非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と、デキストランＡＦ６４７（Ｄｅｘ－６４７）単独と、Ｄｅｘ－６４７積載Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ３０００（Ｌｉｐｏ３０００）と、Ｄｅｘ－６４７積載ＩＮＴＥＲＦＥＲｉｎ（登録商標）と、又は１２．４×１０^{11}個のＤｅｘ－６４７電気穿孔ＲＢＣ　ＥＶ（Ｅ－ＥＶ）と２４時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＡＦ６４７蛍光のＦＡＣＳ解析。ｂ）（ａ）のように処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるヨウ化プロピジウム（ＰＩ）染色を使用して決定した死細胞のパーセンテージ。棒グラフは２～３回反復の平均±ＳＥＭを示す。

【図１９－１】白血病及び乳がん細胞におけるＥＶ送達したＡＳＯによるｍｉＲ－１２５ファミリーのノックダウン。ａ）未処置の、１６．８×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と、１６．８×１０^{11}個のＮＣ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ）又は１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶと、指定した用量で７２時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＵ６ｂ　ＲＮＡと比較したｍｉＲ－１２５ａの発現倍率変化。ｂ）指定した用量の１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶで処置したＮＯＭＯ１細胞におけるＵ６ｂ　ＲＮＡと比較したｍｉＲ－１２５ａ及び１２５ｂの発現倍率変化。ｃ）指定した用量の１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶで処置したＣＡ１ａ細胞におけるＵ６ｂ　ＲＮＡと比較したｍｉＲ－１２５ａ及び１２５ｂの発現倍率変化。全てのパネルでは、ｍｉＲ－１２５ａ、１２５ｂ及びＵ６ｂ発現は、３又は４回の細胞継代でＴａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）。一元配置分散分析結果が各グラフに示される。

【図１９－２】白血病及び乳がん細胞におけるＥＶ送達したＡＳＯによるｍｉＲ－１２５ファミリーのノックダウン。ａ）未処置の、１６．８×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と、１６．８×１０^{11}個のＮＣ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ）又は１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶと、指定した用量で７２時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＵ６ｂ　ＲＮＡと比較したｍｉＲ－１２５ａの発現倍率変化。ｂ）指定した用量の１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶで処置したＮＯＭＯ１細胞におけるＵ６ｂ　ＲＮＡと比較したｍｉＲ－１２５ａ及び１２５ｂの発現倍率変化。ｃ）指定した用量の１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶで処置したＣＡ１ａ細胞におけるＵ６ｂ　ＲＮＡと比較したｍｉＲ－１２５ａ及び１２５ｂの発現倍率変化。全てのパネルでは、ｍｉＲ－１２５ａ、１２５ｂ及びＵ６ｂ発現は、３又は４回の細胞継代でＴａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して決定した（平均±ＳＥＭ）。一元配置分散分析結果が各グラフに示される。

【図２０－１】ヌードマウスにおける全身投与によるＲＢＣＥＶの分布。ａ）実験の概略

図：小さいＣＡ１ａ腫瘍（直径７ｍｍ）を有するヌードマウスに、１６．５×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識又はＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶをｉ．ｐ．注射した。ｂ）生きたマウスの代表的な画像。ｃ）処置の２４時間後のＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶ又はＥＶ洗浄の上清を注射したヌードマウスからの臓器の代表的なｅｘ　ｖｉ。ＤｉＲ蛍光はシュードカラー発光（光子／ｓ）として示される。ｄ）ＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶを注射したヌードマウスからのＰＫＨ２６蛍光（赤）及び核のＤＡＰＩ染色（青）を有する臓器の凍結切片。スケールバー、１０μｍ。

【図２０－２】ヌードマウスにおける全身投与によるＲＢＣＥＶの分布。ａ）実験の概略図：小さいＣＡ１ａ腫瘍（直径７ｍｍ）を有するヌードマウスに、１６．５×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識又はＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶをｉ．ｐ．注射した。ｂ）生きたマウスの代表的な画像。ｃ）処置の２４時間後のＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶ又はＥＶ洗浄の上清を注射したヌードマウスからの臓器の代表的なｅｘ　ｖｉ。ＤｉＲ蛍光はシュードカラー発光（光子／ｓ）として示される。ｄ）ＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶを注射したヌードマウスからのＰＫＨ２６蛍光（赤）及び核のＤＡＰＩ染色（青）を有する臓器の凍結切片。スケールバー、１０μｍ。

【図２１】ＲＢＣＥＶ処置は臓器に影響しない。未処置の及び腹腔内にＰＫＨ２６－ＲＢＣＥＶを注射したマウス（図２０のように）からのＨ＆Ｅで染色した組織切片の代表的な写真を示す。スケールバー、１００μｍ。同じ形態が他の試料で観察された（３匹のマウス／群）。

【図２２－１】ＲＢＣＥＶはＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを送達する。ａ）ヒトゲノムのｍｉＲ－１２５遺伝子座の配列及びこれらの遺伝子座を標的化するｇＲＮＡの設計。配列は、ＤＮＡＭＡＮ配列解析ソフトウェアを使用してそれらの類似性によって色付けした（黒：全て同一；青：半分同一）。ガイド鎖は、ｍｉＲ－１２５ファミリーの成熟ｍｉＲ－１２５ａ又は１２５ｂへとプロセスされる主鎖である。ガイドＲＮＡは、変異が成熟ｍｉＲ－１２５ｓのシード配列に生じ得るように設計された（矢印の頭）。ｂ）非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）で、又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡを電気穿孔したＥＶで、４８時間処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるｍｉＲ－１２５ａの発現（平均±ＳＥＭ；ｎ＝３回の細胞継代）。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントの片側ｔ検定。ｃ）ＵＥ－ＥＶと、又はＣａｓ９プラスミド及びｅＧＦＰ標的化ｇＲＮＡプラスミドを電気穿孔したＥＶとインキュベートした２９３Ｔ－ｅＧＦＰ細胞におけるＧＦＰのＦＡＣＳ解析。ＧＦＰ陰性細胞は、矢印によって示される。ｄ）ＵＥ－ＥＶで、又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び抗ｅＧＦＰ　ｇＲＮＡを積載したＥＶで７日間処置したＮＯＭＯ１－ｅＧＦＰ細胞におけるＧＦＰ発現のＦＡＣＳ解析。

【図２２－２】ＲＢＣＥＶはＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを送達する。ａ）ヒトゲノムのｍｉＲ－１２５遺伝子座の配列及びこれらの遺伝子座を標的化するｇＲＮＡの設計。配列は、ＤＮＡＭＡＮ配列解析ソフトウェアを使用してそれらの類似性によって色付けした（黒：全て同一；青：半分同一）。ガイド鎖は、ｍｉＲ－１２５ファミリーの成熟ｍｉＲ－１２５ａ又は１２５ｂへとプロセスされる主鎖である。ガイドＲＮＡは、変異が成熟ｍｉＲ－１２５ｓのシード配列に生じ得るように設計された（矢印の頭）。ｂ）非電気穿孔ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）で、又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡを電気穿孔したＥＶで、４８時間処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるｍｉＲ－１２５ａの発現（平均±ＳＥＭ；ｎ＝３回の細胞継代）。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントの片側ｔ検定。ｃ）ＵＥ－ＥＶと、又はＣａｓ９プラスミド及びｅＧＦＰ標的化ｇＲＮＡプラスミドを電気穿孔したＥＶとインキュベートした２９３Ｔ－ｅＧＦＰ細胞におけるＧＦＰのＦＡＣＳ解析。ＧＦＰ陰性細胞は、矢印によって示される。ｄ）ＵＥ－ＥＶで、又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び抗ｅＧＦＰ　ｇＲＮＡを積載したＥＶで７日間処置したＮＯＭＯ１－ｅＧＦＰ細胞におけるＧＦＰ発現のＦＡＣＳ解析。

【図２３】追加の内部コントロールによる補足ｑＰＣＲデータ。ａ）ｍｉＲＣＵＲＹ－ＬＮＡ　ｑＲＴＰＣＲを使用して決定した、未処置の、１６．８×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣ　ＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）と、１６．８×１０^{11}個のＮＣ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣ

ＥＶ（Ｅ－ＥＶ）又は４．２～１６．８×１０^{11}個の１２５ｂ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶと７２時間インキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるｍｉＲ－１０３ａと比較したｍｉＲ－１２５ｂの発現倍率変化（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３回の細胞継代）。一元配置分散分析結果をグラフに示す。ｂ）３ｐｍｏｌ条件と比較して、処置の２４時間後に、１２．４×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（ＵＥ－ＥＶ）又は３、６、又は１２ｐｍｏｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔した１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（Ｅ－ＥＶ）とインキュベートしたＭＯＬＭ１３細胞におけるＡＣＴＢ及び１８Ｓ　ＲＮＡと比較したＣａｓ９　ｍＲＮＡのレベル（平均±ＳＥＭ；ｎ＝３回の細胞継代）。

【図２４】骨髄細胞のＦＡＣＳ解析のためのゲート戦略。図７のように１２５ｂ－ＡＳＯを含有する３．３×１０^{12}個のＲＢＣＥＶで処置したＮＳＧマウスの骨髄におけるＧＦＰ細胞のＦＡＣＳ解析を示す図である。単球はＦＳＣ－Ａ及びＳＳＣ－Ａに基づいてゲートし、残渣、死細胞及びＲＢＣ（低ＦＳＣ－Ａ）を除外した。単一細胞に、ＦＳＣ幅対ＦＳＣ高に基づいて単球からさらにゲートをかけ、ダブレット及び凝集体を除外した。生細胞は、Ｃｙｔｏｘ　ｂｌｕｅ陰性（ＰＢ４５０チャネル）に基づき、単一細胞集団からゲートをかけた。続いて、ＧＦＰ陽性細胞は、未処置の陰性コントロールにおいて無視できるＧＦＰシグナルを示す集団としてＦＩＴＣチャネルでゲートをかけた。同じゲートは同じバッチの全ての試料に適用した。

【図２５】未変性ゲル電気泳動のフル画像。ａ）非標識ＮＣ－ＡＳＯ（２２ｂｐ）の分離：２００ｐｍｏｌの非標識ＮＣ－ＡＳＯ（レーン１）、８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（レーン２）、２００ｐｍｏｌのＮＣ－ＡＳＯと８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶの混合（レーン３）、２００ｐｍｏｌのＮＣ－ＡＳＯと電気穿孔後の８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶの混合（レーン４）を１０％未変性ゲルに積載し、Ｇｅｌ　ＤｏｃＴＭ　ＥＺ　ＤｏｃｕｍｅｎｔａｔｉｏｎシステムでＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ染色を使用して可視化した。ｂ）ＦＡＭ標識ＮＣ－ＡＳＯ（２２ｂｐ）の分離：２００ｐｍｏｌのＦＡＭ　ＮＣ－ＡＳＯ（レーン１）、８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（レーン２）、２００ｐｍｏｌのＦＡＭ　ＮＣ－ＡＳＯと８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶの混合（レーン３）、２００ｐｍｏｌのＦＡＭ　ＮＣ－ＡＳＯと電気穿孔後の８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶの混合（レーン４）を１０％未変性ゲルに積載し、Ｇｅｌ　ＤｏｃＴＭ　ＥＺ　Ｄｏｃｕｍｅｎｔａｔｉｏｎシステムを使用して、ＦＡＭ蛍光によって可視化した。

【図２６－１】ウェスタンブロットのフル画像。ａ）ＲＢＣからの細胞溶解物（レーン１）及びＥＶ（レーン２）におけるＧＡＰＤＨ（ローディングコントロール）と比較したＡＬＩＸ、ＴＳＧ１０１及びＨＢＡのウェスタンブロット解析。ｂ）未処置（レーン１）の又は８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶと（レーン２）又は８．２５×１０^{11}個の電気穿孔ＲＢＣＥＶ（レーン３）と２４時間インキュベートした、ＭＯＬＭ１３細胞におけるＨＢＡ及びＧＡＰＤＨのウェスタンブロット解析。ｃ）白血病ＭＯＬＭ１３細胞（レーン１）、ＮＯＭＯ１細胞（レーン２）、ＲＢＣ（レーン３）及びＲＢＣＥＶ（レーン４）におけるストマチン（ＳＴＯＭ）、カルネキシン（ＣＡＮＸ）、及びＧＡＰＤＨのウェスタンブロット解析。ｄ）未処置の（レーン１）、非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（レーン２）又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶ（レーン３）で処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるＣａｓ９及びＴＵＢのウェスタンブロット解析。全てのパネルでは、ブロットを水平に切り取り、同時に複数の抗体とハイブリダイズさせた。タンパク質ラダー（Ｌ）を、試料の両側に積載し、分子量を決定した。

【図２６－２】ウェスタンブロットのフル画像。ａ）ＲＢＣからの細胞溶解物（レーン１）及びＥＶ（レーン２）におけるＧＡＰＤＨ（ローディングコントロール）と比較したＡＬＩＸ、ＴＳＧ１０１及びＨＢＡのウェスタンブロット解析。ｂ）未処置（レーン１）の又は８．２５×１０^{11}個の非電気穿孔ＲＢＣＥＶと（レーン２）又は８．２５×１０^{11}個の電気穿孔ＲＢＣＥＶ（レーン３）と２４時間インキュベートした、ＭＯＬＭ１３細胞におけるＨＢＡ及びＧＡＰＤＨのウェスタンブロット解析。ｃ）白血病ＭＯＬＭ１３細胞（レーン１）、ＮＯＭＯ１細胞（レーン２）、ＲＢＣ（レーン３）及びＲＢＣＥＶ（レ

ーン４）におけるストマチン（ＳＴＯＭ）、カルネキシン（ＣＡＮＸ）、及びＧＡＰＤＨのウェスタンブロット解析。ｄ）未処置の（レーン１）、非電気穿孔ＲＢＣＥＶ（レーン２）又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶ（レーン３）で処置したＭＯＬＭ１３細胞におけるＣａｓ９及びＴＵＢのウェスタンブロット解析。全てのパネルでは、ブロットを水平に切り取り、同時に複数の抗体とハイブリダイズさせた。タンパク質ラダー（Ｌ）を、試料の両側に積載し、分子量を決定した。

【図２７】ヌードマウスにおける全身投与によるＲＢＣＥＶの分布。ＲＢＣＥＶをｉ．ｖ．注射したＮＯＤ　ｓｃｉｄ　ｇａｍｍａ（ＮＳＧ）マウスからの臓器のＥｘ　ｖｉｖｏ画像。ｉ．ｖ．注射による体内分布を示す。

【図２８】リンパ腫Ｂ９５－８細胞によるＢｏｄｉｐｙ標識ＲＢＣＥＶの取り込み。ａ）Ｂ９５－８細胞＋フロースルー、及びｂ）Ｂ９５－８細胞＋Ｂｏｄｉｐｙ　ＥＶ。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

本発明の態様及び実施形態を、ここで添付の図面を参照して議論する。さらなる態様及び実施形態が、当業者には明らかであろう。この本文中で述べた全ての文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００４０】

細胞外小胞

用語「細胞外小胞」は、本明細書で使用する場合、細胞から細胞外環境へと放出された小さい粒子様構造を指す。

【００４１】

細胞外小胞（ＥＶ）は、直径が５０ｎｍと１０００ｎｍの間の細胞膜又はエンドソーム膜の実質的に球状の断片である。細胞外小胞は、病理学条件と生理学条件の両方の元で様々な細胞型から放出される。細胞外小胞は膜を有する。膜は、二重層膜であり得る（すなわち、脂質二重層）。膜は、細胞膜から生じ得る。したがって、細胞外小胞の膜は、それが由来する細胞と類似の組成を有し得る。本明細書に開示するいくつかの態様では、細胞外小胞は実質的に透明である。

【００４２】

用語、細胞外小胞は、エキソソーム、マイクロベシクル、膜微小粒子、エクトソーム、水泡及びアポトーシス小体を包含する。細胞外小胞は、外への出芽及び分裂によって産生され得る。この産生は、天然のプロセス又は化学的に誘導若しくは増強されたプロセスであり得る。本明細書に開示するいくつかの態様では、細胞外小胞は、化学誘導によって産生されたマイクロベシクルである。

【００４３】

細胞外小胞は、それらのサイズ及び形成の起源に基づいて、エキソソーム、マイクロベシクル又はアポトーシス体として分類され得る。マイクロベシクルは、本明細書に開示する本発明による細胞外小胞の特に好ましいクラスである。好ましくは、本発明の細胞外小胞は、細胞膜から放出され、エンドソーム系から生じない。

【００４４】

本明細書に開示する細胞外小胞は、様々な細胞、例えば赤血球、白血球、がん細胞、幹細胞、樹状細胞、マクロファージ等に由来し得る。好ましい例では、細胞外小胞は、赤血球に由来する。

【００４５】

マイクロベシクル又は微小粒子は、細胞膜の直接外への出芽及び分裂によって生じる。マイクロベシクルは、典型的には、エキソソームより大きく、１００～５００ｎｍの範囲の直径を有する。いくつかの場合では、マイクロベシクルの組成物は、５０～１０００ｎｍ、１０１～１０００ｎｍ、１０１～７５０ｎｍ、１０１～５００ｎｍ、又は１００～３００ｎｍ、又は１０１～３００ｎｍの範囲の直径を有するマイクロベシクルを含む。好ましくは、直径は１００～３００ｎｍである。

【００４６】

例えば、本明細書に開示する細胞外小胞組成物は、実質的にサイズが均一であり得る。それらは、平均直径約１００ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１５０ｎｍ、約１６０ｎｍ、約１７０ｎｍ、約１８０ｎｍ、約１９０ｎｍ又は約２００ｎｍの平均直径を有し得る。いくつかの場合では、平均直径は約１４０ｎｍであり、０．０５と０．０９の間、０．０６と０．０８の間、又はおよそ０．０７の多分散性指数（ＰＤＩ）である。

【００４７】

エキソソームは、およそ３０～およそ１００ｎｍの範囲である。それらは、リンパ球、樹状細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、マスト細胞、神経、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞、及び腸上皮細胞を含む、様々な培養細胞で観察される。エキソソームは、多胞体（multivesicular bodies）という、細胞質の大きな嚢内に位置する、エンドソームのネットワークから生じる。これらの嚢は、細胞外環境へと放出される前に、細胞膜へと融合する。

【００４８】

アポトーシス体又は小疱は、最大の細胞外小胞であり、１～５μｍの範囲である。有核細胞は、核クロマチンの濃縮に始まり、膜小疱形成及び最終的なアポトーシス体を含むＥＶの放出のいくつかの段階を通してアポトーシスを受ける。

【００４９】

好ましくは、細胞外小胞は、ヒト細胞、又はヒト起源の細胞に由来する。本発明の細胞外小胞は、小胞誘導剤と接触した細胞から誘導され得る。小胞誘導剤は、カルシウムイオノフォア、リゾフォスファチジン酸（ＬＰＡ）、又はフォルボール－１２－ミリスチン酸－１３－アセテート（ＰＭＡ）であり得る。

【００５０】

赤血球細胞外小胞（ＲＢＣ－ＥＶ）

本明細書に開示する特定の態様では、細胞外小胞は赤血球に由来する。赤血球は、多くの理由によりＥＶの良い供給源である。赤血球は無核であるため、ＲＢＣ－ＥＶは、他の供給源からのＥＶよりも少ない核酸を含有する。ＲＢＣ－ＥＶは、内因性ＤＮＡを含有しない。ＲＢＣ－ＥＶは、ｍｉＲＮＡ又は他のＲＮＡを含有し得る。ＲＢＣ－ＥＶは、発癌性物質、例えば発癌性ＤＮＡ又はＤＮＡ変異を含まない。

【００５１】

ＲＢＣ－ＥＶは、ヘモグロビン及び／又はストマチン及び／又はフロチリン－２を含み得る。それらの色は、赤であり得る。典型的には、ＲＢＣ－ＥＶは、透過型電子顕微鏡下でドーム状（凹んだ）表面、又は「カップ形」を示す。ＲＢＣ－ＥＶは、細胞表面ＣＤ２３５ａを持つことによって特徴付けられ得る。本発明によるＲＢＣ－ＥＶは、直径約１００～約３００ｎｍであり得る。いくつかの場合では、ＲＢＣ－ＥＶの組成物は、５０～１０００ｎｍ、５０～７５０ｎｍ、５０～５００ｎｍ、５０～３００ｎｍ、１０１～１０００ｎｍ、１０１～７５０ｎｍ、１０１～５００ｎｍ、又は１００～３００ｎｍ、又は１０１～３００ｎｍの範囲の直径を有するＲＢＣ－ＥＶを含む。好ましくは、直径は１００～３００ｎｍである。ＲＢＣ－ＥＶの集団は、異なる範囲の直径を有するＲＢＣ－ＥＶを含み、ＲＢＣ－ＥＶ試料内のＲＢＣ－ＥＶの平均直径は、５０～１０００ｎｍ、５０～７５０ｎｍ、５０～５００ｎｍ、５０～３００ｎｍ、１０１～１０００ｎｍ、１０１～７５０ｎｍ、１０１～５００ｎｍ、又は１００～３００ｎｍ、又は１０１～３００ｎｍの範囲であり得る。好ましくは、平均直径は１００～３００ｎｍの間である。

【００５２】

好ましくは、ＲＢＣ－ＥＶは、ヒト又は動物血液試料又は初代細胞に由来する赤血球又は固定化赤血球株に由来する。血液細胞は、処置される患者にマッチさせた型であってよく、したがって血液細胞は、Ａ型、Ｂ型、ＡＢ型、Ｏ型、又はＯｈ型血液であり得る。好ましくは、血液はＯ型である。血液は、Ｒｈ陽性又はＲｈ陰性であり得る。いくつかの場合では、血液はＯ型及び／又はＲｈ陰性、例えばＯ－型である。血液は、疾患又は障害がない、例えばＨＩＶ、鎌状赤血球貧血、マラリアがないことが確認され得る。しかしながら、任意の血液型が使用され得る。いくつかの場合では、ＲＢＣ－ＥＶは自己及び処置され

る患者から得られた血液試料に由来する。いくつかの場合では、ＲＢＣ－ＥＶは同種であり、処置される患者から得られた血液試料に由来しない。

【００５３】

ＲＢＣ－ＥＶは、赤血球の試料から単離され得る。赤血球からＥＶを得るためのプロトコールは当技術分野、例えば、Ｄａｎｅｓｈら、（２０１４年）Ｂｌｏｏｄ．２０１４　Ｊａｎ　３０；１２３（５）：６８７～６９６頁で公知である。ＥＶを得るために有用な方法は、赤血球を含む試料を提供する又は得るステップ、赤血球を誘導して細胞外小胞を産生するステップ、及び細胞外小胞を単離するステップを含み得る。試料は、全血液試料であり得る。好ましくは、赤血球以外の細胞は試料から除去され、試料の細胞成分は赤血球である。好ましくは、赤血球試料は完全に、又は実質的に白血球を含まない。

【００５４】

試料の赤血球は、濃縮され、又は全血液試料の他の成分、例えば白血球から分けられ得る。赤血球は、遠心分離によって濃縮され得る。試料は、白血球除去にかけられ得る。

赤血球を含む試料は、実質的に赤血球のみを含み得る。細胞外小胞は、赤血球を小胞誘導剤と接触させることによって赤血球から誘導され得る。小胞誘導剤は、カルシウムイオノフォア、リゾフォスファチジン酸（ＬＰＡ）、又はフォルボール－１２－ミリスチン酸－１３－アセテート（ＰＭＡ）であり得る。

【００５５】

ＲＢＣ－ＥＶは、遠心分離（超遠心分離あり又はなし）、沈殿、濾過プロセス、例えばタンジェント流濾過、又はサイズ排除クロマトグラフィーによって単離され得る。この方法で、ＲＢＣ－ＥＶは、ＲＢＣ及び混合物の他の成分から分離され得る。

【００５６】

細胞外小胞は：赤血球の試料を得るステップ；赤血球を小胞誘導剤と接触させるステップ；及び誘導された細胞外小胞を単離するステップを含む方法によって赤血球から得ることができる。

【００５７】

赤血球は、低速遠心分離により、及び白血球除去フィルターを使用して、白血球及び血漿を含有する全血液試料から分離され得る。いくつかの場合では、赤血球試料は、他の細胞型、例えば白血球を含有しない。言い換えると、赤血球試料は、実質的に赤血球からなる。赤血球試料は、血漿、血清、緩衝液又は他の担体をさらに含み得る。赤血球は、小胞誘導剤と接触させる前に、緩衝液、例えばＰＢＳで希釈され得る。小胞誘導剤は、カルシウムイオノフォア、リゾフォスファチジン酸（ＬＰＡ）又はフォルボール－１２－ミリスチン酸－１３－アセテート（ＰＭＡ）であり得る。小胞誘導剤は、約１０ｎＭのカルシウムイオノフォアであり得る。赤血球は、終夜、又は少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも７時間、少なくとも８時間、少なくとも９時間、少なくとも１０時間、少なくとも１１時間、少なくとも１２時間、又は１２時間以上、小胞誘導剤と接触させ得る。混合物は、低速遠心分離にかけ、ＲＢＣ、細胞残渣、又は他の非ＲＢＣ－ＥＶ物を除去することができ、及び／又は上清を約０．４５μｍシリンジフィルターに通す。ＲＢＣ－ＥＶは、超遠心分離、例えばおよそ１００，０００×ｇの遠心分離によって濃縮され得る。ＲＢＣ－ＥＶは、少なくとも１０分間、少なくとも２０分間、少なくとも３０分間、少なくとも４０分間、少なくとも５０分間、又は少なくとも１時間、超遠心分離によって濃縮され得る。濃縮されたＲＢＣ－ＥＶは、冷ＰＢＳに懸濁され得る。それらは、６０％スクロースクッションに重層され得る。スクロースクッションは、凍結した６０％スクロースを含み得る。スクロースクッションに重層したＲＢＣ－ＥＶは、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも７時間、少なくとも８時間、少なくとも９時間、少なくとも１０時間、少なくとも１１時間、少なくとも１２時間、少なくとも１３時間、少なくとも１４時間、少なくとも１５時間、少なくとも１６時間、少なくとも１７時間、少なくとも１８時間以上、１００，０００×ｇで超遠心分離にかけられ得る。好ましくは、スクロースクッションに重層し

たＲＢＣ－ＥＶは、約１６時間、１００，０００×ｇで超遠心分離にかけられ得る。次いで、スクロースクッション上の赤い層が回収され、それによりＲＢＣ－ＥＶが得られる。得られたＲＢＣ－ＥＶは、さらなるプロセシング、例えば洗浄、及び場合により積載にかけられ得る。

【００５８】

赤血球からの細胞外小胞の精製

本明細書に開示する特定の態様では、細胞外小胞は赤血球に由来する。赤血球は、多くの理由によりＥＶの良い供給源である。赤血球は無核であるため、ＲＢＣ－ＥＶは、他の供給源からのＥＶよりも少ない核酸を含有する。ＲＢＣ－ＥＶは、内因性ＤＮＡを含有しない。ＲＢＣ－ＥＶは、ｍｉＲＮＡ又は他のＲＮＡを含有し得る。ＲＢＣ－ＥＶは、発癌性物質、例えば発癌性ＤＮＡ又はＤＮＡ変異を含まない。

【００５９】

ＲＢＣ－ＥＶは、ヘモグロビン及び／又はストマチン及び／又はフロチリン－２を含み得る。それらの色は、赤であり得る。典型的には、ＲＢＣ－ＥＶは、透過型電子顕微鏡下でドーム状（凹んだ）表面、又は「カップ形」を示す。ＲＢＣ－ＥＶは、細胞表面ＣＤ２３５ａを持つことによって特徴付けられ得る。本発明によるＲＢＣ－ＥＶは、直径約１００～約３００ｎｍであり得る。いくつかの場合では、ＲＢＣ－ＥＶの組成物は、５０～１００ｎｍ、５０～７５０ｎｍ、５０～５００ｎｍ、５０～３００ｎｍ、１０１～１０００ｎｍ、１０１～７５０ｎｍ、１０１～５００ｎｍ、又は１００～３００ｎｍ、又は１０１～３００ｎｍの範囲の直径を有するＲＢＣ－ＥＶを含む。好ましくは、直径は１００～３００ｎｍである。ＲＢＣ－ＥＶの集団は、異なる範囲の直径を有するＲＢＣ－ＥＶを含み、ＲＢＣ－ＥＶ試料内のＲＢＣ－ＥＶの平均直径は、５０～１０００ｎｍ、５０～７５０ｎｍ、５０～５００ｎｍ、５０～３００ｎｍ、１０１～１０００ｎｍ、１０１～７５０ｎｍ、１０１～５００ｎｍ、又は１００～３００ｎｍ、又は１０１～３００ｎｍの範囲であり得る。好ましくは、平均直径は１００～３００ｎｍの間である。

【００６０】

好ましくは、ＲＢＣ－ＥＶは、ヒト又は動物血液試料又は初代細胞に由来する赤血球又は固定化赤血球株に由来する。血液細胞は、処置される患者にマッチさせた型であってよく、したがって血液細胞は、Ａ型、Ｂ型、ＡＢ型、Ｏ型、又はＯｈ型血液であり得る。好ましくは、血液はＯ型である。血液は、Ｒｈ陽性又はＲｈ陰性であり得る。いくつかの場合では、血液はＯ型及び／又はＲｈ陰性、例えばＯ－型である。血液は、疾患又は障害がない、例えばＨＩＶ、鎌状赤血球貧血、マラリアがないことが確認され得る。しかしながら、任意の血液型が使用され得る。いくつかの場合では、ＲＢＣ－ＥＶは自己及び処置される患者から得られた血液試料に由来する。いくつかの場合では、ＲＢＣ－ＥＶは同種であり、処置される患者から得られた血液試料に由来しない。

【００６１】

ＲＢＣ－ＥＶは、赤血球の試料から単離され得る。赤血球からＥＶを得るためのプロトコールは当技術分野、例えば、Ｄａｎｅｓｈら、（２０１４年）Ｂｌｏｏｄ．２０１４　Ｊａｎ　３０；１２３（５）：６８７～６９６頁で公知である。ＥＶを得るために有用な方法は、赤血球を含む試料を提供する又は得るステップ、赤血球を誘導して細胞外小胞を産生するステップ、及び細胞外小胞を単離するステップを含み得る。試料は、全血液試料であり得る。好ましくは、赤血球以外の細胞は試料から除去され、試料の細胞成分は赤血球である。

【００６２】

試料の赤血球は、濃縮され、又は全血液試料の他の成分、例えば白血球から分けられ得る。赤血球は、遠心分離によって濃縮され得る。試料は、白血球除去にかけられ得る。

赤血球を含む試料は、実質的に赤血球のみを含み得る。細胞外小胞は、赤血球を小胞誘導剤と接触させることによって赤血球から誘導され得る。小胞誘導剤は、カルシウムイオノフォア、リゾフォスファチジン酸（ＬＰＡ）、又はフォルボール－１２－ミリスチン酸－１３－アセテート（ＰＭＡ）であり得る。

【００６３】
ＲＢＣ－ＥＶは、遠心分離（超遠心分離あり又はなし）、沈殿、濾過プロセス、例えばタンジェント流濾過、又はサイズ排除クロマトグラフィーによって単離され得る。この方法で、ＲＢＣ－ＥＶは、ＲＢＣ及び混合物の他の成分から分離され得る。
【００６４】
細胞外小胞は：赤血球の試料を得るステップ；赤血球を小胞誘導剤と接触させるステップ；及び誘導された細胞外小胞を単離するステップを含む方法によって赤血球から得ることができる。
【００６５】
赤血球は、低速遠心分離により、及び白血球除去フィルターを使用して、白血球及び血漿を含有する全血液試料から分離され得る。いくつかの場合では、赤血球試料は、他の細胞型、例えば白血球を含有しない。言い換えると、赤血球試料は、実質的に赤血球からなる。赤血球は、小胞誘導剤と接触させる前に、緩衝液、例えばＰＢＳで希釈され得る。小胞誘導剤は、カルシウムイオノフォア、リゾフォスファチジン酸（ＬＰＡ）又はフォルボール－１２－ミリスチン酸－１３－アセテート（ＰＭＡ）であり得る。小胞誘導剤は、約１０ｎＭのカルシウムイオノフォアであり得る。赤血球は、終夜、又は少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも７時間、少なくとも８時間、少なくとも９時間、少なくとも１０時間、少なくとも１１時間、少なくとも１２時間、又は１２時間以上、小胞誘導剤と接触させ得る。混合物は、低速遠心分離にかけ、ＲＢＣ、細胞残渣、又は他の非ＲＢＣ－ＥＶ物を除去することができ、及び／又は上清を約０．４５μｍシリンジフィルターに通す。ＲＢＣ－ＥＶは、超遠心分離、例えばおよそ１００，０００×ｇの遠心分離によって濃縮され得る。ＲＢＣ－ＥＶは、少なくとも１０分間、少なくとも２０分間、少なくとも３０分間、少なくとも４０分間、少なくとも５０分間、又は少なくとも１時間、超遠心分離によって濃縮され得る。濃縮されたＲＢＣ－ＥＶは、冷ＰＢＳに懸濁され得る。それらは、６０％スクロースクッションに重層され得る。スクロースクッションは、凍結した６０％スクロースを含み得る。スクロースクッションに重層したＲＢＣ－ＥＶは、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも７時間、少なくとも８時間、少なくとも９時間、少なくとも１０時間、少なくとも１１時間、少なくとも１２時間、少なくとも１３時間、少なくとも１４時間、少なくとも１５時間、少なくとも１６時間、少なくとも１７時間、少なくとも１８時間以上、１００，０００×ｇで超遠心分離にかけられ得る。好ましくは、スクロースクッションに重層したＲＢＣ－ＥＶは、約１６時間、１００，０００×ｇで超遠心分離にかけられ得る。次いで、スクロースクッション上の赤い層が回収され、それによりＲＢＣ－ＥＶが得られる。得られたＲＢＣ－ＥＶは、さらなるプロセシング、例えば洗浄、タグ付け、及び場合により積載にかけられ得る。
【００６６】
カーゴ
本明細書に開示する細胞外小胞は、カーゴを積載、又は含有し得る。カーゴは、積み荷（ｌｏａｄ）とも呼ばれ、核酸、ペプチド、タンパク質、小分子、糖又は脂質であり得る。カーゴは、天然には生じない又は合成の分子であり得る。カーゴは、治療分子、例えば治療オリゴヌクレオチド、ペプチド、小分子、糖又は脂質であり得る。いくつかの場合では、カーゴは治療分子、例えば検出可能部分又は可視化剤でない。カーゴは、その標的細胞に送達された後に標的細胞において治療効果を発揮し得る。例えば、カーゴは、標的細胞で発現される核酸であり得る。それは、特定の遺伝子又は目的のタンパク質の発現を阻害又は増強するために作用し得る。例えば、タンパク質又は核酸を使用して、遺伝子サイレンシング又は修飾のために標的遺伝子を編集することができる。
【００６７】
好ましくは、カーゴは外因性分子であり、「非内因性物質」と呼ばれることもある。言い換えると、カーゴは、細胞外小胞、又はそれが由来する細胞で天然には生じない分子であ

る。そのようなカーゴは、好ましくは、細胞によって積載又は産生されるよりも、小胞が形成された後に細胞外小胞へと積載され、それによりそれは細胞外小胞内にも含有される。

【００６８】

いくつかの場合では、カーゴは核酸であり得る。カーゴは、ＲＮＡ又はＤＮＡであり得る。核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。カーゴは、ＲＮＡであり得る。ＲＮＡは、治療用ＲＮＡであり得る。ＲＮＡは、化学合成又はｉｎ　ｖｉｔｒｏでの転写によって産生される低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、環状ＲＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｐｉｗｉＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、又は長鎖非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）であり得る。いくつかの場合では、カーゴは、例えば内因性核酸配列、例えば転写因子、ｍｉＲＮＡ又は他の内因性ｍＲＮＡに相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【００６９】

カーゴは、目的の分子をコードし得る。例えば、カーゴは、Ｃａｓ９又は別のヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡであり得る。

細胞では、アンチセンス核酸は相当するｍＲＮＡにハイブリダイズして、二本鎖分子を形成する。細胞が二本鎖であるｍＲＮＡを翻訳しないため、アンチセンス核酸は、ｍＲＮＡの翻訳を干渉する。遺伝子のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの翻訳を阻害するアンチセンス法の使用は、当技術分野で周知である（例えば、Ｍａｒｃｕｓ－Ｓａｋｕｒａ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８８年，１７２：２８９を参照）。さらに、ＤＮＡに直接結合するアンチセンス分子が使用され得る。アンチセンス核酸は一本鎖又は二本鎖核酸であり得る。アンチセンス核酸の非限定的な例は、ｓｉＲＮＡ（それらの誘導体又は前駆体、例えばヌクレオチド類似体を含む）、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｓａＲＮＡ（小型活性化ＲＮＡ）及び小型核小体ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）又は特定のそれらの誘導体又は前駆体を含む。アンチセンス核酸分子は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を刺激し得る。

【００７０】

したがって、アンチセンス核酸カーゴは、標的遺伝子の転写を干渉し、標的ｍＲＮＡの翻訳を干渉し、及び／又は標的ｍＲＮＡの分解を促進し得る。いくつかの場合では、アンチセンス核酸は標的遺伝子の発現の減少を誘導することができる。

【００７１】

本明細書で提供する「ｓｉＲＮＡ」、「低分子干渉ＲＮＡ」、「小型ＲＮＡ」、又は「ＲＮＡｉ」は、二本鎖ＲＮＡを形成する核酸を指し、その二本鎖ＲＮＡは、遺伝子又は標的遺伝子と同じ細胞で発現される場合、遺伝子又は標的遺伝子の発現を低減又は阻害する能力を有する。ハイブリダイズして二本鎖分子を形成する核酸の相補性部分は、典型的には実質的又は完全な同一性を有する。一実施形態では、ｓｉＲＮＡ又はＲＮＡｉは、標的遺伝子と実質的又は完全な同一性を有する核酸であり、二本鎖ｓｉＲＮＡを形成する。実施形態では、ｓｉＲＮＡは、相補的な細胞のｍＲＮＡと干渉し、それにより相補的なｍＲＮＡの発現を干渉することによって遺伝子発現を阻害する。典型的には、核酸は、少なくとも約１５～５０ヌクレオチド長である（例えば、二本鎖ｓｉＲＮＡの各相補性配列は１５～５０ヌクレオチド長であり、二本鎖ｓｉＲＮＡは約１５～５０塩基対長である）。いくつかの実施形態では、長さは２０～３０塩基ヌクレオチド、好ましくは約２０～２５又は約２４～２９ヌクレオチド長、例えば２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０ヌクレオチド長である。

【００７２】

ＲＮＡｉ及びｓｉＲＮＡは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｄａｎａら、Ｉｎｔ　Ｊ　Ｂｉｏｍｅｄ　Ｓｃｉ．２０１７年；１３（２）：４８～５７頁に記載される。アンチセンス核酸分子は、標的核酸配列に相補的な二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）又は部分的二本鎖ＲＮＡ、例えばＦＨＲ－４を含有し得る。二本鎖ＲＮＡ分子は、

分子内の第１のＲＮＡ部分と第２のＲＮＡ部分の間の相補性対合によって形成される。ＲＮＡ配列（すなわち、一部）の長さは、通常３０ヌクレオチド長より短い（例えば、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０又はそれより少ないヌクレオチド）。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ配列の長さは１８～２４ヌクレオチド長である。いくつかのｓｉＲＮＡ分子では、ＲＮＡ分子の相補性の第１及び第２の部分は、ヘアピン構造の「ステム」を形成する。２つの部分は連結配列によって結合され、ヘアピン構造の「ループ」を形成し得る。連結配列は、長さが様々であってよく、例えば５、６、７、８、９、１０、１１、１２、又は１３ヌクレオチド長であり得る。好適な連結配列は、当技術分野で公知である。

【００７３】

本発明の方法での使用のための好適なｓｉＲＮＡ分子は、当技術分野で公知のスキームによって設計することができ、例えば、Ｅｌｂａｓｈｉｒｅら、Ｎａｔｕｒｅ、２００１年４１１：４９４～８頁；Ａｍａｒｚｇｕｉｏｕｉら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２００４年　３１６（４）：１０５０～８頁；及びＲｅｙｎｏｌｄｓら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２００４年、２２（３）：３２６～３０頁を参照されたい。ｓｉＲＮＡ分子を作製する詳細は、いくつかの供給業者、例えばＡｍｂｉｏｎ、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ及びＯｌｉｇｏＥｎｇｉｎｅのウェブサイトで見出すことができる。任意の可能なｓｉＲＮＡ候補の配列は、一般に、ＢＬＡＳＴアライメントプログラムを使用して、他の核酸配列又は核酸配列の多型への任意の可能なマッチを調べることができる（国立医学図書館のインターネットウェブサイトを参照）。典型的には、多くのｓｉＲＮＡが生成及びスクリーニングされ、有効な薬物候補が得られ、米国特許第７，０７８，１９６号を参照されたい。ｓｉＲＮＡは、ベクターから発現され、及び／又は化学的若しくは合成的に産生され得る。合成ＲＮＡｉは、市販の供給源、例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ、Ｃａｌｉｆ）から得ることができる。ＲＮＡｉベクターは、市販の供給源、例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからも得ることができる。

【００７４】

核酸分子は、ｍｉＲＮＡであり得る。用語「ｍｉＲＮＡ」は、その明白な通常の意味に従って使用され、転写後に遺伝子発現を制御することができる小さい非コードＲＮＡ分子を指す。一実施形態では、ｍｉＲＮＡは、標的遺伝子と実質的又は完全な同一性を有する核酸である。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡは相補的な細胞のｍＲＮＡと干渉し、それにより相補的なｍＲＮＡの発現を干渉することによって遺伝子発現を阻害する。典型的には、ｍｉＲＮＡは、少なくとも約１５～５０ヌクレオチド長である（例えば、ｍｉＲＮＡの各相補性配列は１５～５０ヌクレオチド長であり、ｍｉＲＮＡは約１５～５０塩基対長である）。いくつかの場合では、核酸は合成又は組換え体である。

【００７５】

本明細書に開示する核酸は、１つ又は複数の修飾、又は天然には生じないエレメント若しくは核酸を含み得る。好ましい態様では、核酸は、２’－Ｏ－メチル類似体を含む。いくつかの場合では、核酸は、３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結又は他のロックド核酸（ＬＮＡ）を含む。いくつかの場合では、核酸は、ＡＲＣＡキャップを含む。他の化学修飾核酸又はヌクレオチド、例えば、２’位の糖修飾、２’－Ｏ－メチル化、２’－フルオロ修飾、２’NH_2修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモの置換、又は５－ヨード－ウラシル、骨格修飾、メチル化、異常な塩基対の組合せ、例えばイソシチジン及びイソグアニジン等を使用することができる。修飾は、キャッピング等の３’及び５’修飾も含み得る。例えば、核酸は、ＰＥＧ化され得る。

【００７６】

本発明の方法で有用な核酸は、発癌性ｍｉＲＮＡ（ｏｎｃｏｍｉＲとしても公知）又は転写因子を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ又はｇＲＮ

Ａを含む。カーゴは、リボザイム又はアプタマーであり得る。いくつかの場合では、核酸はプラスミドである。

【００７７】

核酸分子は、アプタマーであり得る。本明細書で使用する場合、用語「アプタマー」は、タンパク質、ペプチド、及び小分子に（例えば、高い親和性及び特異性で）結合する、オリゴヌクレオチド（例えば、短鎖オリゴヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチド）を指す。典型的には、アプタマーは、相補性塩基対を形成するそれらの傾向により、二次又は三次構造を規定し、したがって、多様で複雑な分子構造へと折りたたむことができることが多い。三次元構造は、アプタマー結合親和性及び特異性に必須であり、特異的な三次元の相互作用はアプタマー－標的複合体の形成を駆動する。アプタマーは、指数関数的な濃縮（例えば、Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ ＡＤ、Ｓｚｏｓｔａｋ ＪＷ、Ｎａｔｕｒｅ １９９０年、３４６＊：８１８～８２２頁；Ｔｕｅｒｋ Ｃ，Ｇｏｌｄ Ｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９０年、２４９：５０５～５１０頁に記載のＳＥＬＥＸ）によるリガンドの全身進化のプロセスにより、又はＳＯＭＡｍｅｒ（ｓｌｏｗ ｏｆｆ－ｒａｔｅ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ａｐｔａｍｅｒｓ）（Ｇｏｌｄ Ｌら（２０１０年）Ａｐｔａｍｅｒ－ｂａｓｅｄ ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ ｐｒｏｔｅｏｍｉｃ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｆｏｒ ｂｉｏｍａｒｋｅｒ ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ．ＰＬｏＳ ＯＮＥ ５（１２）：ｅ１５００４）の開発により、無作為配列の非常に大きなライブラリーからｉｎ ｖｉｔｒｏで選択され得る。

【００７８】

本明細書に記載の特定の態様では、カーゴは、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ又はｍＲＮＡに相補性であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的ｍＲＮＡ配列と配列が相補性である少なくとも一部を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的配列に結合し、それにより阻害し得る。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的配列の翻訳プロセスを阻害し得る。ｍｉＲＮＡは、がんと関連するｍｉＲＮＡ（Ｏｎｃｏｍｉｒ）であり得る。ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１２５ｂであり得る。ＡＳＯは、配列５’－ＵＣＡＣＡＡＧＵＵＡＧＧＧＵＣＵＣＡＧＧＧＡ－３’を含み得る、又はからなり得る。

【００７９】

いくつかの態様では、カーゴは、遺伝子編集システムの１つ又は複数の成分である。例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集システム。例えば、カーゴは、特定の標的配列を認識する核酸を含み得る。カーゴは、ｇＲＮＡであり得る。そのようなｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集において有用であり得る。カーゴは、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ又はＣａｓ９をコードするプラスミドであり得る。他の遺伝子編集分子は、カーゴ、例えばｚｉｎｃフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）又は転写活性化因子用エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）として使用され得る。カーゴは、標的細胞において特定の核酸配列を標的化するように操作された配列を含み得る。遺伝子編集分子は、特異的にｍｉＲＮＡを標的化し得る。例えば、遺伝子編集分子は、ｍｉＲ－１２５ｂを標的化するｇＲＮＡであり得る。ｇＲＮＡは、配列５’－ＣＣＵＣＡＣＡＡＧＵＵＡＧＧＧＵＣＵＣＡ－３’を含み得る、又はからなり得る。

【００８０】

いくつかの実施形態では、方法は、部位特異的ヌクレアーゼ（ＳＳＮ）を使用する標的遺伝子編集を用いる。ＳＳＮを使用する遺伝子編集は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｅｉｄ ａｎｄ Ｍａｈｆｏｕｚ，Ｅｘｐ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．２０１６年１０月；４８（１０）：ｅ２６５に概説される。部位特異的二本鎖切断（ＤＳＢ）を創出することができる酵素は、操作され、目的の標的核酸配列にＤＳＢを導入することができる。ＤＳＢは、しばしばヌクレオチドの挿入又は欠失によって切断の２つの末端が再結合される、誤りがちな非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって修復され得る。あるいは、ＤＳＢは、切断部位に相同な末端を有するＤＮＡ鋳型がＤＳＢの部位に供給及び導入される、高度相同組換え修復（ＨＤＲ）によって修復され得る。

【００８１】
操作され、標的核酸配列特異的ＤＳＢを生成することができるＳＳＮは、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ及びクラスター化規則的間隔回文反復配列／ＣＲＩＳＰＲ関連９（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）システムを含む。
【００８２】
ＺＦＮシステムは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＵｍｏｖら、Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ．（２０１０年）１１（９）：６３６～４６頁に概説される。ＺＦＮは、プログラム化可能なＺｉｎｃ Ｆｉｎｇｅｒ ＤＮＡ結合ドメイン及びＤＮＡ切断ドメイン（例えば、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼドメイン）を含む。ＤＮＡ結合ドメインは、標的核酸配列に結合することができるＺｉｎｃ Ｆｉｎｇｅｒアレイをスクリーニングすることによって同定され得る。
【００８３】
ＴＡＬＥＮシステムは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＭａｈｆｏｕｚら、Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ．（２０１４年）１２（８）：１００６～１４頁に概説される。ＴＡＬＥＮは、プログラム化可能なＤＮＡ結合ＴＡＬＥドメイン及びＤＮＡ切断ドメイン（例えば、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼドメイン）を含む。ＴＡＬＥは、反復可変二残基（ＲＶＤ）である各反復の１２位及び１３位における２つの残基以外は同一である、３３～３９アミノ酸の反復からなる反復ドメインを含む。各ＲＶＤは、以下の関係に従って標的ＤＮＡ配列におけるヌクレオチドへの反復の結合を決定する：「ＨＤ」はＣに結合し、「ＮＩ」はＡに結合し、「ＮＧ」はＴに結合し、「ＮＮ」又は「ＮＫ」はＧに結合する（Ｍｏｓｃｏｕ ａｎｄ Ｂｏｇｄａｎｏｖｅ、Ｓｃｉｅｎｃｅ（２００９年）３２６（５９５９）：１５０１頁）。
【００８４】
ＣＲＩＳＰＲは、クラスター化規則的間隔短鎖回文反復配列（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ）の略語である。用語は、これらの配列の起源及び機能が分かっていない場合、及びそれらが原核生物起源であると考えられる場合、まず使用される。ＣＲＩＳＰＲは、回文配列リピート（ヌクレオチドの配列が両方向で同じである）において短い反復の塩基配列を含有するＤＮＡのセグメントである。各反復は、ウイルス又はプラスミドからの外来ＤＮＡの事前の挿入からのスペーサーＤＮＡの短いセグメントが続く。Ｃａｓ（ＣＲＩＳＰＲ関連）遺伝子の小さいクラスターは、ＣＲＩＳＰＲ配列の隣に位置する。スペーサー配列を持つＲＮＡは、Ｃａｓ（ＣＲＩＳＰＲ関連）タンパク質が外来病原性ＤＮＡを認識及び切断するのを助ける。他のＲＮＡガイドＣａｓタンパク質は外来ＲＮＡを切断する。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの簡単なバージョン、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９は、改変されゲノムを編集する。Ｃａｓ９ヌクレアーゼ及び全身ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を細胞に送達することにより、細胞のゲノムは所望の位置で切断され、既存の遺伝子の除去及び／又は新しい遺伝子の追加を可能にする。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは２つのクラスに分けられる。クラス１システムは、複数のＣａｓタンパク質の複合体を使用し、外来核酸を分解する。クラス２システムは、同じ目的のために単一の大きなＣａｓタンパク質を使用する。クラス１は、Ｉ型、ＩＩＩ型、及びＩＶ型に分けられる；クラス２は、ＩＩ型、Ｖ型、及びＶＩ型に分けられる。ＣＲＩＳＰＲゲノム編集はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムを使用する。
【００８５】
いくつかの態様では、ＥＶは、ＣＲＩＳＰＲ関連カーゴを積載される。言い換えると、ＥＶは、遺伝子編集、例えば治療遺伝子編集を含む方法で有用である。いくつかの場合では、ＥＶはｉｎ ｖｉｔｒｏ遺伝子編集に有用である。
【００８６】
カーゴはガイドＲＮＡであり得る。ガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含み得る。ｃｒＲＮＡは、活性型複合体を形成するｔｒａｃｒＲＮＡに結合する領域と一緒に宿主ＤＮＡの正

確な部分に位置するガイドＲＮＡを含有する。ｔｒａｃｒＲＮＡはｃｒＲＮＡに結合し、活性型複合体を形成する。ｇＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡとｃｒＲＮＡの両方を結合させ、それにより活性型複合体をコードする。ｇＲＮＡは、複数のｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含み得る。ｇＲＮＡは、目的の配列又は遺伝子に結合するように設計され得る。ｇＲＮＡは、切断のための遺伝子を標的化し得る。場合により、ＤＮＡ修復鋳型の任意選択の部分が含まれる。修復鋳型は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）又は相同修復（ＨＤＲ）のいずれかで利用され得る。

【００８７】

カーゴは、ヌクレアーゼ、例えばＣａｓ９ヌクレアーゼであり得る。ヌクレアーゼは、その活性化形態がＤＮＡを修飾することができるタンパク質である。ヌクレアーゼバリアントは、一本鎖ニック、二本鎖切断、ＤＮＡ結合又は他の異なる機能が可能である。ヌクレアーゼは、ＤＮＡ部位を認識し、部位特異的ＤＮＡ編集を可能にする。

【００８８】

ｇＲＮＡ及びヌクレアーゼは、プラスミドにコードされ得る。言い換えると、ＥＶカーゴは、ｇＲＮＡとヌクレアーゼの両方をコードするプラスミドを含み得る。いくつかの場合では、ＥＶはｇＲＮＡを含有し、別のＥＶはヌクレアーゼを含有又はコードする。いくつかの場合では、ＥＶは、ｇＲＮＡをコードするプラスミド、及びヌクレアーゼをコードするプラスミドを含有する。したがって、いくつかの態様では、組成物はＥＶを含んで提供され、ＥＶの部分はＣａｓ９などのヌクレアーゼを含み又はコードし、ＥＶの部分はｇＲＮＡを含む又はコードする。いくつかの場合では、ｇＲＮＡを含む又はコードするＥＶを含有する組成物及びヌクレアーゼをコードする又は含有するＥＶを含有する組成物は、同時投与される。いくつかの場合では、組成物はＥＶを含み、ＥＶはｇＲＮＡとヌクレアーゼの両方をコードするオリゴヌクレオチドを含有する。

【００８９】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及び関連システム、例えばＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆｌ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃ２ｃ１、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃ２ｃ２及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃ２ｃ３は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＮａｋａｄｅら、Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ（２０１７年）８（３）：２６５～２７３頁に概説される。これらのシステムは、エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１等）及び一本鎖ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）分子を含む。ｓｇＲＮＡは操作され、目的の核酸配列にエンドヌクレアーゼ活性を標的化することができる。

【００９０】

いくつかの場合では、核酸は、１つ又は複数の脱分化因子、例えば、「Ｙａｍａｎａｋａ因子」、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４及びＭｙｃをコードする１つ又は複数の核酸をコード又は標的化する。

【００９１】

いくつかの場合では、カーゴはペプチド又はタンパク質である。それは組換えペプチド又はタンパク質であり得る。好適なペプチド又はタンパク質は、酵素、例えば遺伝子編集酵素、例えばＣａｓ９、ＺＦＮ、又はＴＡＬＥＮを含む。

【００９２】

好適な小分子は、細胞傷害性試薬及びキナーゼ阻害剤を含む。小分子は、蛍光プローブ及び／又は金属を含み得る。例えば、カーゴは、超常磁性粒子、例えば酸化鉄粒子を含み得る。カーゴは、超小型超常磁性酸化鉄粒子、例えば酸化鉄ナノ粒子であり得る。

【００９３】

いくつかの場合では、カーゴは検出可能部分、例えば蛍光デキストランである。カーゴは、放射活性に標識され得る。

カーゴは、電気穿孔によって細胞外小胞に積載され得る。電気穿孔、又は電気透過（electropermeabilization）は、細胞膜の透過性を増加させるために電界が細胞に適用される微生物学技術であり、化学物質、薬物、又はＤＮＡを細胞に導入することを可能にする。言い換えると、細胞外小胞は、電気穿孔によってカーゴを封入するように誘導又は強

制され得る。したがって、本明細書に開示する方法は、カーゴ分子の存在下で細胞外小胞を電気穿孔するステップ、又は細胞外小胞及びカーゴ分子の混合物を電気穿孔するステップを含み得る。

【００９４】

本明細書に開示する他の方法では、カーゴは、超音波処理、超音波、リポフェクション、又は低張性透析によって細胞外小胞へと積載される。

積載方法

細胞外小胞へカーゴを積載するのに好適な方法は、細胞外小胞の膜の透過性の一次的又は半永久的な増加を必要とし得る。好適な方法は、電気穿孔、超音波処理、超音波、リポフェクション又は低張性透析を含む。本明細書に開示する好ましい方法では、ＲＢＣ－ＥＶはカーゴと接触され、混合物を形成し、混合物は細胞外小胞の膜の透過性を増加するように処置される。混合物は、処置の前に冷却される。それは、１つ又は複数の緩衝液、例えばＰＢＳをさらに含み得る。

【００９５】

好ましい方法では、カーゴは、電気穿孔によって細胞外小胞に積載される。電気穿孔、又は電気透過は、細胞膜の透過性を増加させるために電界が細胞に適用される微生物学技術であり、化学物質、薬物、又はＤＮＡを細胞に導入することを可能にする。言い換えると、細胞外小胞は、電気穿孔によってカーゴを封入するように誘導又は強制され得る。電気穿孔は、電気穿孔キュベット内で懸濁した細胞の１～２ミリメートルの距離に数千ボルトを通過させることによって作用する（１．０～１．５ｋＶ、２５０～７５０Ｖ／ｃｍ）。一般に、電気穿孔法は、いくつかの異なるフェーズの複数ステップのプロセスである。まず、短い電気パルスが適用される。典型的なパラメーターは、膜に３００～４００ｍＶを＜１ｍｓである。この電位の適用により、周辺溶液からのイオンの移動によって蓄電器のように、膜が荷電される。臨界場に達すると、脂質形態における脂質局在再配置が起こる。生じる構造は、それが導電性ではないため「プレ孔」であると考えられるが、導電性孔の創出を急速にもたらす。そのようなプレ孔の存在の証拠は、多くは孔の「ちらつき」から来ており、導電性と絶縁状態の間の移行を示す。これらのプレ孔は小さい（約３Å）疎水性欠陥であることが示される。この理論が正しい場合、次いで導電性状態への移行は、脂質頭が折りたたまれ、親水性界面を創出する孔の端における再配置によって説明することができる。最後に、これらの導電性孔は治すことができ、二重層再シール形成又は拡大し、場合によりそれを断裂する。生じる結末は、致命的な欠陥サイズを超えるかどうかにより、次に印加電場、局所的な機械的ストレス及び二重層端エネルギーによる。ｉｎ　ｖｉｖｏでの電気穿孔の成功は、電圧、反復、パルス、及び期間に大きく依存する。本明細書に開示する方法は、赤血球由来細胞外小胞を、約２５と３００Ｖの間で、又は約５０と２５０Ｖの間で電気穿孔にかけるステップを含み得る。

【００９６】

あるいは、カーゴは、超音波処理によって細胞外小胞へと積載され得る。超音波処理は、様々な目的、例えば植物、微細藻類及び海藻から複数の化合物の抽出のために、試料中の粒子を攪拌する音エネルギー適用の作用である。超音波周波数（＞２０ｋＨｚ）が通常使用され、超音波処理（ultrasonication）又は超音波処理（ultra-sonication）としても知られているプロセスに至る。超音波処理は、口語でソニケーターとして知られている超音波浴又は超音波プローブを使用して適用され得る。

【００９７】

別の方法では、カーゴは、超音波によって積載される。超音波は、細胞膜を破壊し、それにより細胞に分子を積載することが示されている。２０ｋＨｚ～最高数ギガヘルツの周波数の音波が、ＲＢＣ－ＥＶに適用され得る。

【００９８】

さらに別の方法では、カーゴは、リポフェクションによってＲＢＣ－ＥＶに積載され得る。リポフェクション（又はリポソームトランスフェクション）は、それらが両方ともリン脂質二重層でできているため、細胞膜と容易にマージすることができる小胞である、リポ

ソームによって細胞に遺伝物質を注入するために使用する技術である。
【００９９】
組成物
本明細書では細胞外小胞を含む組成物を開示する。
組成物は、ｍｌあたり１０^{6}～１０^{14}個の間の粒子を含み得る。組成物は、ｍｌあたり少なくとも１０^{5}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{6}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{7}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{8}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{9}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{10}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{11}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{12}個の粒子、ｍｌあたり少なくとも１０^{13}個の粒子又はｍｌあたり少なくとも１０^{14}個の粒子を含み得る。
【０１００】
組成物は、実質的に相同な大きさを有する細胞外小胞を含み得る。例えば、細胞外小胞は、１００～５００ｎｍの範囲の直径を有し得る。いくつかの場合では、マイクロベシクルの組成物は、５０～１０００ｎｍ、１０１～１０００ｎｍ、１０１～７５０ｎｍ、１０１～５００ｎｍ、又は１００～３００ｎｍ、又は１０１～３００ｎｍの範囲の直径を有するマイクロベシクルを含む。好ましくは、直径は、１００～３００ｎｍである。いくつかの組成物では、マイクロベシクルの平均直径は、１００～３００ｎｍ、好ましくは１５０～２５０ｎｍ、好ましくは約２００ｎｍである。
【０１０１】
いくつかの組成物では、細胞外小胞はカーゴを含有する。そのような組成物中でカーゴは、組成物中の実質的に全ての細胞外小胞へと封入されることが望ましいが、本明細書に開示する組成物は、細胞外小胞の少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも９７％がカーゴを含有する、細胞外小胞を含み得る。好ましくは、細胞外小胞の少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも９７％がカーゴを含有する。いくつかの場合では、組成物中の異なる細胞外小胞は異なるカーゴを含有する。いくつかの場合では、細胞外小胞は、同じ、又は実質的に同じカーゴ分子を含有する。
【０１０２】
組成物は、医薬組成物であり得る。組成物は、１つ又は複数の細胞外小胞、及び任意選択により薬学的に許容される担体を含み得る。医薬組成物は、投与の特定の経路による投与のために製剤化され得る。例えば、医薬組成物は、静脈内、腫瘍内、腹腔内、皮内、皮下、鼻腔内又は他の投与経路のために製剤化され得る。
【０１０３】
組成物は緩衝溶液を含み得る。組成物は、保存化合物を含み得る。組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。
処置の方法及び細胞外小胞の使用
本明細書に開示する細胞外小胞は、処置の方法に有用である。特に、方法は、標的遺伝子と関連する障害を患う対象を処置するために有用であり、方法は、有効量の修飾した細胞外小胞を前記対象に投与するステップを含み、修飾した細胞外小胞はその表面に結合する分子を含み、標的細胞において標的遺伝子と相互作用するための非内因性物質を封入する。非内因性物質は、前記処置のための核酸であり得る。
【０１０４】
本明細書に開示する細胞外小胞は、遺伝的障害、炎症性疾患、がん、自己免疫障害、心血管疾患又は胃腸疾患の処置のために特に有用である。いくつかの場合では、障害は、サラセミア、鎌状赤血球貧血、又は遺伝的代謝障害から選択される遺伝的障害である。いくつかの場合では、細胞外小胞は、肝臓、骨髄、肺、脾臓、脳、膵臓、胃又は腸の障害の処置に有用である。
【０１０５】

特定の態様では、細胞外小胞は、がんの処置に有用である。本明細書に開示する細胞外小胞は、がん細胞の成長又は増殖を阻害するために有用であり得る。がんは、液体又は血液のがん、例えば白血病、リンパ腫又は骨髄腫であり得る。他の場合では、がんは、固形がん、例えば乳がん、肺がん、肝臓がん、結腸直腸がん、上咽頭がん、腎臓がん又は神経膠腫であり得る。いくつかの場合では、がんは、肝臓、骨髄、肺、脾臓、脳、膵臓、胃又は腸に局在する。

【０１０６】

障害に応じて標的細胞が処置される。例えば、標的細胞は、乳がん細胞、結腸直腸がん細胞、肺がん細胞、腎臓がん細胞等であり得る。カーゴは、標的遺伝子の発現を阻害又は増強する、また特定の遺伝子をサイレンスにする遺伝子編集を実施するための核酸であり得る。

【０１０７】

本明細書に記載の細胞外小胞及び組成物は、限定はされないが、全身、腫瘍内、腹腔内、非経口、静脈内、動脈内、皮内、皮下、筋肉内、経口及び鼻腔内を含む、多くの経路によって投与、又は投与のために製剤化され得る。好ましくは、細胞外小胞は、腫瘍内、腹腔内又は静脈内から選択される経路によって投与される。医薬及び組成物は、液体又は固体形態で製剤化され得る。液体製剤は、ヒト又は動物の体の選択された領域への注射による投与のために製剤化され得る。

【０１０８】

細胞外小胞は、治療用カーゴを含み得る。治療カーゴは、標的細胞において標的遺伝子と相互作用するための非内因性物質であり得る。

投与は、好ましくは、「治療有効量」であり、これは個体に利益を示すのに十分である。投与される実際の量、並びに投与の速さ及び時間経過は、処置される疾患の性質及び重症度による。処置の処方、例えば投与量等の決定は、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、典型的には、処置される障害、個々の患者の状態、送達の部位、投与の方法及び医師には公知の他の因子を考慮する。上述の技術及びプロトコールの例は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、２０ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ、２０００年、ｐｕｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ、Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓに見出される。

【０１０９】

細胞外小胞は、単独で、又は処置される状態に応じて同時若しくは順に他の処置と組み合わせて投与され得る。

本明細書に記載のようにカーゴを積載された細胞外小胞は、カーゴを標的細胞に送達するために使用され得る。いくつかの場合では、方法は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの方法である。特に好ましいｉｎ ｖｉｔｒｏでの方法では、カーゴは標識する分子又はプラスミドである。

【０１１０】

処置される対象は、任意の動物又はヒトであり得る。対象は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。対象は、非ヒト哺乳動物であり得るが、より好ましくはヒトである。対象は男性又は女性であり得る。対象は患者であり得る。治療使用は、ヒト又は動物（家畜への使用）であり得る。

【０１１１】

タンパク質発現

細胞における本発明によるペプチド、例えばペプチド、ポリペプチド又はタンパク質カーゴを産生するために好適な分子生物学技術は、当技術分野で周知であり、例えばＳａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、１９８９年に記載されるものである。

【０１１２】

ペプチドは、ヌクレオチド配列から発現され得る。ヌクレオチド配列は、細胞に存在する

ベクター内に含有され得る、又は細胞のゲノムに組み込まれ得る。
本明細書で使用する場合、「ベクター」は、外来遺伝物質を細胞へと移行させる媒体として使用されるオリゴヌクレオチド分子（ＤＮＡ又はＲＮＡ）である。ベクターは、細胞における外来遺伝物質の発現のための発現ベクターであり得る。そのようなベクターは、発現される遺伝子配列をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結したプロモーター配列を含み得る。ベクターは、終結コドン及び発現エンハンサーも含み得る。本技術分野で公知の任意の好適なベクター、プロモーター、エンハンサー、及び終結コドンは、本発明によるベクターから植物アスパラギン酸プロテアーゼを発現させるために使用され得る。好適なベクターは、プラスミド、バイナリーベクター、ウイルスベクター及び人工染色体（例えば酵母人工染色体）を含む。

【０１１３】
この明細書では、用語「作動可能に連結した」は、選択されたヌクレオチド配列と制御ヌクレオチド配列（例えば、プロモーター及び／又はエンハンサー）が共有結合され、このような方法で制御配列の影響又は調節下でヌクレオチド配列の発現を起こす（それにより発現カセットを形成する）ような状況を含み得る。したがって、制御配列は、制御配列がヌクレオチド配列の転写に作用することができる場合、選択されたヌクレオチド配列に作動可能に連結される。適当な場合、生じる転写物は、次いで所望のタンパク質又はポリペプチドに翻訳され得る。

【０１１４】
ポリペプチドの発現に好適な任意の細胞は、本発明に従ってペプチドを産生するために使用され得る。細胞は、原核生物又は真核生物であり得る。好ましくは、細胞は、真核生物細胞、例えば、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞である。いくつかの場合では、細胞は、いくつかの原核生物細胞が真核生物と同じ翻訳後修飾が可能ではないため、原核生物細胞ではない。

【０１１５】
さらに、非常に高い発現レベルが真核生物において可能であり、タンパク質は、アポトーシスタグを使用して真核生物から容易に精製され得る。特定のプラスミドも利用され、タンパク質の培地への分泌を増強する。

【０１１６】
目的のペプチドを産生する方法は、ペプチドを発現するように改変された真核細胞の培養又は発酵を含み得る。培養又は発酵は、栄養、空気／酸素及び／又は成長因子を適切に供給したバイオリアクター内で実施され得る。分泌されたタンパク質は、細胞から培養培地／発酵ブロスを分け、タンパク質成分を抽出し、個々のタンパク質を分離して分泌されたアスパラギン酸プロテアーゼを単離することによって回収され得る。培養、発酵及び分離技術は、当業者に周知である。

【０１１７】
バイオリアクターは、細胞が培養され得る１つ又は複数のベッセルを含む。バイオリアクター内での培養は、リアクターへの反応物質の連続フロー、及びリアクターからの培養細胞の連続フローによって連続的に起こり得る。あるいは、培養はバッチで起こり得る。バイオリアクターは、最適な条件が培養される細胞に提供されるように、周辺条件、例えばｐＨ、酸素、ベッセルへの又はベッセルからの流速、及びベッセル内での攪拌をモニター及び調節する。

【０１１８】
目的のペプチドを発現する細胞の培養後、ペプチドは好ましくは単離される。当技術分野で公知の細胞培養からのタンパク質を分離するための任意の好適な方法が使用され得る。培養から目的のタンパク質を単離するため、まず、目的のタンパク質を含有する培地から培養細胞を分離する必要があり得る。目的のタンパク質が細胞から分泌される場合、遠心分離により分泌されたタンパク質を含有する培養培地から細胞が分離され得る。目的のタンパク質を細胞内、例えば細胞の液胞内で回収する場合、遠心分離の前に、例えば超音波処置、急速凍結融解又は浸透圧溶解を使用して細胞を破壊する必要がある。遠心分離は、

培養細胞、又は培養細胞の細胞残渣、並びに培養培地及び目的のタンパク質を含有する上清を含有するペレットを産生する。

【０１１９】

次いで、他のタンパク質及び非タンパク質成分を含有し得る上清又は培養培地から目的のタンパク質を単離することが望ましい。上清又は培養培地からタンパク質成分を分離する共通の手法は、沈殿による。異なる溶解性のタンパク質は、異なる濃度の沈殿剤、例えば硫酸アンモニウムで沈殿される。例えば、低濃度の沈殿剤では、水溶性タンパク質が抽出される。したがって、異なる漸増濃度の沈殿剤を添加することにより、異なる溶解性のタンパク質が区別され得る。続いて透析が使用され、分離されたタンパク質から硫酸アンモニウムが除去され得る。

【０１２０】

異なるタンパク質を区別する他の方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー及びサイズクロマトグラフィーが、当技術分野で公知である。これらは、沈殿の代替として使用することができ、又は沈殿に続いて実施することができる。

【０１２１】

目的のタンパク質が培養から単離されると、タンパク質を濃縮する必要があり得る。目的のタンパク質を濃縮する多くの方法、例えば限外濾過法又は凍結乾燥法が当技術分野で公知である。

【０１２２】

それらの特異的形態又は開示した機能を実施する手段、又は開示した結果を得るための方法若しくはプロセスの面から表された、前述の説明、又は以下の特許請求の範囲、又は添付の図面に開示した特徴は、必要に応じて、別々に又はそのような特徴の任意の組合せで、それらの多様な形態で本発明を実現するために利用され得る。

【０１２３】

本発明は上記の例示的な実施形態と併せて記載されるが、この開示を与えられた場合、多くの同等の改変及びバリエーションが当業者には明らかであろう。したがって、上に記載した本発明の例示的な実施形態は、例であり、限定ではないと考えられる。記載した実施形態への様々な変更が、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく実施され得る。

【０１２４】

いずれの疑念も避けるため、本明細書に提供する任意の理論的な説明が読み手の理解を改善する目的のために提供される。本発明者らは、これらのいずれの理論的な説明に縛られることを望まない。

【０１２５】

本明細書で使用するいずれの節の見出しも、構成目的のためだけであり、記載される主題を制限すると解釈されない。

特許請求の範囲を含む、この明細書を通して、他に文脈を必要としない限り、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」及び「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、並びにバリエーション、例えば「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、及び「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」は、言及した整数若しくはステップ、又は整数若しくはステップの群の包括を伴うが、任意の他の整数若しくはステップ又は整数若しくはステップの群の除外ではないと理解されるであろう。

【０１２６】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」は、文脈がはっきりと他に示さない限り、複数の参照を含むことに注意しなければならない。範囲は、「約」１つの特定の値から及び／又は「約」別の特定の値までとして本明細書で表され得る。そのような範囲が表される場合、別の実施形態は、１つの特定の値から及び／又は他の特定の値までを含む。同様に、先行する「約」の使用により、値がおよそとして表される場合、特定の値は別の実施形態を形成すると理解されるであろう。用語「約」は、数値に関して、任意選択であり、例えば＋／－１０％を意味する。

【実施例】
【０１２７】
実施例１：赤血球細胞外小胞を使用するＲＮＡ薬送達及びその方法
ＲＢＣＥＶの精製及び特徴付け
本発明者らは、低コストでＲＢＣからラージスケール量のＥＶを精製する新しい戦略を考案した。ＲＢＣを健康なドナーのＯ型の血液から得て、終夜カルシウムイオノフォアで処置した。ＲＢＣＥＶの精製は、６０％スクロースクッションを使用するタンパク質夾雑物の除去を含む連続遠心分離ステップによって最適化され、Ｎａｎｏｓｉｇｈｔ粒子アナライザー及びＺｅｔａｓｉｚｅｒを使用して決定した、平均直径約１４０ｎｍ及び多分散性指数約０．０７を有するＥＶの相同集団をもたらした（図１ａ及び図９ａ、ｂ）。約２００ｍｌの血液から単離された、ＲＢＣの各単位は、５～１０×１０^{13}個のＥＶをもたらした。これらのＥＶを、平均－１１．５ｍＶのＺｅｔａ電位で負にチャージした（図９ｃ）。ＥＶの形態は、小さいエキソソーム様粒子と大きいマイクロベシクル様粒子の両方の混合物により、透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）下で異種性であることが分かった（図１ｂ）。精製したＲＢＣＥＶは、ＥＶマーカー（ＡＬＩＸ及びＴＳＧ１０１）及び主要なＲＢＣタンパク質であるヘモグロビンＡが豊富である（図１ｃ）。さらに、ＲＢＣＥＶは、ＲＢＣＥＶのマーカーであるストマチン（ＳＴＯＭ）も豊富だったが、多くの細胞型で共通するがＲＢＣには存在しない小胞体マーカーであるカルネキシン（ＣＡＮＸ）を完全に欠損した（図１ｄ）。これらのデータは、ＲＢＣＥＶの同一性及び純度を説明し；他の型の血液のＥＶからの夾雑物はなかった。さらに、ＲＢＣＥＶは、複数回の凍結融解サイクル後も安定であった。ＴＥＭとＮａｎｏｓｉｇｈｔ粒子解析の両方を使用することによって決定したように１～３回の凍結融解サイクル後、凝集又はＥＶの形態、濃度、又はサイズ分布のいずれの顕著な変化もなかった（図１０ａ，ｂ）。
【０１２８】
ＲＢＣＥＶを使用する白血病細胞へのＡＳＯの送達
ＲＢＣＥＶは、観察できるほどの毒性が無く、高効率で白血病細胞によって取り込まれた。ＲＢＣＥＶとのインキュベーションの２４時間後、白血病ＭＯＬＭ１３細胞のウェスタンブロット解析は、ヘモグロビンＡの明確な取り込みを示し、それは未処置の細胞では存在しなかった（図１ｅ）。ＭＯＬＭ１３細胞は、免疫染色とＦＡＣＳの両方で観察された、蛍光標識ＥＶとのインキュベーションの２４時間後に約９９％が蛍光陽性になった（図１ｆ、ｇ及び図１１）。この取り込みは、ヘパリンがＲＢＣＥＶと一緒に細胞に添加された場合、６０～７０％まで減少し、ＲＢＣＥＶ取り込みがヘパリン硫酸プロテオグリカンに依存することを示す（図１ｇ、ｈ）。本発明者らは、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７標識デキストランによるＲＢＣＥＶの電気穿孔を最適化し、２５０Ｖの電圧で最高９３．６％の蛍光のＥＶを得た（図１２）。続いて、本発明者らは、ヌクレオチドごとに２’－Ｏ－メチル修飾を有するＦＡＭ標識スクランブル陰性コントロールＡＳＯ（ＦＡＭ－ＮＣ－ＡＳＯ）によりＲＢＣＥＶを電気穿孔した（図２ａ）。非電気穿孔ＲＢＣＥＶと電気穿孔ＲＢＣＥＶの密度を比較するため、本発明者らは、３．３×１０^{12}個のＲＢＣＥＶを１０～６０％のスクロース勾配の上に重層し、１５０，０００×ｇで１６時間、超遠心分離を使用してＥＶを分離した（図１３ａ）。非電気穿孔ＲＢＣＥＶと電気穿孔ＲＢＣＥＶの両方を、先の報告と一致する約１．１２～１．１６ｇ／ｃｍ^{3}の密度を有する２０％と４０％のスクロース層の中間層で５～７の画分に濃縮した（図１３ｂ）。画分６の非電気穿孔及び電気穿孔ＲＢＣＥＶは、同じサイズ分布を示した（図１３ｃ）。しかしながら、画分５～７では、電気穿孔ＲＢＣＥＶの濃度は非電気穿孔ＲＢＣＥＶよりも低かった（図１３ｂ）。電気穿孔ＲＢＣＥＶの勾配の底には赤いペレットが見出され（非電気穿孔では見出されなかった）、いくつかの電気穿孔ＥＶが凝集体を形成したことを示している。ＦＡＭ蛍光は、ＦＡＭ標識ＡＳＯを電気穿孔したＲＢＣＥＶの画分５～７で豊富であり、ＲＢＣＥＶがＦＡＭ　ＡＳＯをうまく積載されたことを示している（図２ｂ）。画分１の未結合のＦＡＭ　ＡＳＯは、ＥＶが豊富な画分よりも高いＦＡＭ強度を放射し、ＦＡＭ　ＡＳＯの一部のみがＲＢＣＥＶに積載されたことを示している（図２ｂ）。

【０１２９】
電気穿孔ＲＢＣＥＶへのＲＮＡ積載の推定を改善するため、本発明者らは、１０％未変性ゲルを使用して、電気穿孔ＲＢＣＥＶから未結合のＡＳＯを分離し、全部で２００ｐｍｏｌのＡＳＯと比較して、約７６％のＡＳＯが８．２５×１０^{11}個のＡＳＯを電気穿孔したＲＢＣＥＶ試料からゲルへと移動したことを見出した（図２ｃ）。したがって、約２４％のＡＳＯが電気穿孔によってＲＢＣＥＶに積載された。同様の積載効率が、ＦＡＭ　ＡＳＯによって電気穿孔したＲＢＣＥＶにおけるＦＡＭ蛍光に基づいて観察された（図１４ａ）。未結合のＡＳＯが、電気穿孔ＲＢＣＥＶを含む全ての試料中で単一のバンドとして現れ、ＦＡＭシグナルはウェル中で検出されなかったことに注目すべきである。したがって、以前に観察されたＣｙ３又はＣｙ５標識オリゴヌクレオチドの凝集とは異なり、電気穿孔はＡＳＯのいずれの凝集も起こさなかった。血清様条件下のＲＢＣＥＶ内でのＲＮＡの安定性を試験するため、本発明者らは、ＦＡＭ－ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶ又はＦＡＭＡＳＯとＲＢＣＥＶの非電気穿孔混合物を、様々なヌクレアーゼを含有する５０％ＦＢＳと３７℃で７２時間インキュベートした。電気穿孔したＦＡＭ　ＡＳＯの蛍光シグナルは、非電気穿孔のＦＡＭ　ＡＳＯよりも著しく低い率まで減退した（図１４ｂ）。このデータは、ＦＡＭ　ＡＳＯが、ＲＢＣＥＶへの組み込みの後、細胞外ヌクレアーゼ媒介分解から保護されたことを示した。

【０１３０】
本発明者らは、最適な用量である５×１０^{4}個の細胞を約１２×１０^{11}個のＲＢＣＥＶで処置した２４時間後、白血病ＭＯＬＭ１３細胞におけるＦＡＭ標識ＡＳＯ及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７標識Ｄｅｘｔｒａｎの７０～８０％の取り込みを観察した（図２ｄ及び図１５）。ＦＡＭ　ＡＳＯの取り込みは約８８％であり、別の白血病細胞株、ＮＯＭＯ１における蛍光標識ＲＢＣＥＶの約８５％の取り込みに相当する（図１６ａ～ｃ）。ＦＡＭ蛍光は、非封入（未結合）ＦＡＭ　ＡＳＯとのインキュベーションの２４時間後に約０．４％のＭＯＬＭ１３細胞及びＮＯＭＯ１細胞で観察された（図２ｄ、ｅ及び図１６ｃ）。４日間にわたり、このシグナルは、２．１％のＭＯＬＭ１３細胞に増加し、非封入ＦＡＭ　ＡＳＯが、ジムノティック送達により、ＭＯＬＭ１３細胞のとても小さい集団によってゆっくりと取り込まれたことを示している（図１７）。４日後、ＦＡＭ陽性ＭＯＬＭ１３細胞のパーセンテージは、さらなるＦＡＭ　ＡＳＯ処置によっても増加しなかった。しかしながら、同じ期間で、ＲＢＣＥＶによるＦＡＭ　ＡＳＯの送達は、インキュベーションの２日後の７５％のＦＡＭ陽性細胞から４日後の１００％まで、ＭＯＬＭ１３細胞においてずっと早い速度で起こった（図１７）。これらのデータは、白血病細胞及びほとんどの血液細胞はトランスフェクトが非常に難しい細胞型であると考えられるため、ＲＢＣＥＶが優れた送達効率を提供することを示した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ及びＩＮＴＥＲＦＥＲｉｎ（登録商標）を含む、市販のトランスフェクション試薬は、トランスフェクションの２４時間後に、ＭＯＬＭ１３細胞において約３％のデキストランの取り込み及び３３～４６％のＡＳＯの取り込みのみをもたらした（図２ｄ、ｅ及び図１８ａ）。さらに、ＲＢＣＥＶは細胞にいずれの毒性も引き起こさなかった。これは、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ３０００及びＩＮＴＥＲＦＥＲｉｎ（登録商標）によって引き起こされる細胞死の約２０～３０％の増加とは対照的である（図２ｆ及び図１８ｂ）。したがって、ＲＢＣＥＶによるＲＮＡ送達は、現在のトランスフェクション媒体と比較して、白血病細胞においてより高い効率とより低い毒性を示す。

【０１３１】
１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶを使用するｍｉＲ－１２５ｂの阻害
本発明者らは、白血病細胞、前立腺がん、及び乳がんにおいて周知の発癌性ｍｉｃｒｏＲＮＡであるｍｉＲ－１２５ｂをアンタゴナイズするＡＳＯの送達におけるＲＢＣＥＶの治療可能性をさらに調べた。特に、ｍｉＲ－１２５ｂは、難治性がん、例えば、その両方とも処置が困難である急性骨髄性白血病及び化学療法抵抗性の乳腺腫瘍のｏｎｃｏｍｉＲである。本発明者らは、ｍｉＲ－１２５ｂが、ｐ５３腫瘍抑制因子ネットワークにおいて、複数の遺伝子を抑制することによってがん細胞の生存を促進することを示した。これらの

研究は、ｍｉＲ－１２５ｂが、がん処置の潜在的薬物標的であることを示した。しかしながら、ｍｉＲ－１２５ｂを標的とする有効な治療はまだ開発されていない。ここで、本発明者らは、抗ｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯ（１２５ｂ－ＡＳＯ）をＲＢＣＥＶへと電気穿孔し、次いでＥＶにおける１２５ｂ－ＡＳＯの積載及びＭＯＬＭ１３細胞へのＡＳＯの送達を定量した（図３ａ）。ＲＮａｓｅＩｆによる６．２×１０^{11}個の電気穿孔ＲＢＣＥＶの処置は、配列特異的Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴＰＣＲを使用して定量し、未処置のＡＳＯと比較して約８０％の１２５ｂ－ＡＳＯの分解をもたらしたが、ＲＢＣＥＶとの非電気穿孔混合物中の同じ量のＡＳＯは完全に分解された（図３ｂ）。このデータは、およそ２０％のＡＳＯ（約２４×１０^{12}個のコピー）が電気穿孔によってＲＢＣＥＶへと積載され、したがって、ＲＮａｓｅから保護されたことを示す。１２５ｂ－ＡＳＯのコピー数を定量するため、本発明者らは、Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴ－ＰＣＲを使用するＡＳＯ増幅の標準曲線を作成した（図１４ｃ）。この曲線に基づき、本発明者らは、１２×１０^{11}個の１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶとのインキュベーションの７２時間後、ＭＯＭＬ１３細胞において約２１×１０^{9}コピーの１２５ｂ－ＡＳＯを見出した（図３ｃ）。

【０１３２】

１２５ｂ－ＡＳＯの取り込みにより、ｍｉＲ－１２５ｂのレベルは、Ｔａｑｍａｎ　ｑＲＴＰＣＲを使用して定量したＵ６ｂ　ＲＮＡと比較して、用量依存的な方法で、ＭＯＬＭ１３細胞において８０～９５％まで抑制された（図３ｄ）。この結果は、内部コントロールとしてｍｉＲ－１０３ａによるｍｉＲＣＵＲＹ－ＬＮＡ　ｑＲＴＰＣＲを使用して確認された（図２３ａ）。ｍｉＲ－１２５ｂの相同体である、ｍｉＲ－１２５ａも、用量依存的な方法で５０～８０％まで抑制された（図１９ａ）。同じ効果が、ＮＯＭＯ１細胞で観察された（図１９ｂ）。ｍｉＲ－１２５ファミリーの阻害は、本発明者らが以前に同定したｍｉＲ－１２５ファミリーの標的である、ＢＡＫ１の著しい増加をもたらした（図３ｅ）。ＡＳＯ単独では、ｍｉＲ－１２５ｂ又はＢＡＫ１発現にいずれの効果も持たなかった（図３ｄ、ｅ）。１２５ｂ－ＡＳＯ－積載ＲＢＣＥＶによる処置も、インキュベーションの３～４日後にＭＯＬＭ１３細胞の増殖を著しく弱めた（図３ｆ）。別のがんタイプでのｍｉＲ－１２５ｂの機能を試験するため、本発明者らは、同じ処置をヒト乳がんＭＣＦ１０ＣＡ１ａ（ＣＡ１ａ）細胞に適用した。本発明者らは、１２５ｂ－ＡＳＯ－積載ＲＢＣＥＶによる処置後、ｍｉＲ－１２５ａ／ｂの著しいノックダウン及びＣＡ１ａ細胞の生存の低下を見出した（図１９ｃ及び図３ｇ）。

【０１３３】

乳がんモデルにおけるＲＢＣＥＶのｉｎ　ｖｉｖｏ分布

本発明者らは、非常に侵襲性及び転移性であることが公知の乳がんＣＡ１細胞の異種移植モデルを使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＲＢＣＥＶの取り込み及び分布を試験した。ルシフェラーゼ発現ＣＡ１ａ細胞を、メスのヌードマウスの左右の脇腹に皮下に移植した（図４ａ）。１週間後（腫瘍が直径７ｍｍに達したとき）、本発明者らは、ＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶを左の腫瘍に注射した。ｉｎ　ｖｉｖｏ画像化システム（ＩＶＩＳ）を使用して観察し、蛍光シグナルは腫瘍で濃縮され、経時的に徐々に減退した（図４ｂ）。７２時間後、ＰＫＨ２６シグナルは腫瘍において依然として検出可能であったが、身体の他の部分では検出できなかった（図４ｃ、ｄ）。腫瘍切片の高解像度画像により、腫瘍における細胞によるＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶの内部移行を確認した（図４ｅ）。対照的に、本発明者らが、脇腹に腫瘍を担持するヌードマウスへとＰＫＨ２６又はＤｉＲ標識ＥＶを腹腔内（ｉ．ｐ．）に注射した場合、ＰＫＨ２６又はＤｉＲ蛍光は体内に広く分散した（図２０ａ、ｂ）。ＤｉＲシグナルは、肝臓、脾臓、胃、腸、腎臓、及び肺で高かった（図２０ｂ、ｃ）。ＰＫＨ２６－ＥＶをｉ．ｐ．注射したマウスからの組織の凍結切片において、本発明者らは、ｉ．ｐ．注射後に腫瘍におけるいくらかのＲＢＣＥＶ取り込みを見出したが、腫瘍内注射よりもずっと少なかった（図２０ｄ）。本発明者らは、これらの注射後、いずれの炎症も形態の変化及び肝臓及び他の臓器の細胞内含量の変化も観察しなかった（図２１）。したがって、局所注射はＲＢＣＥＶを腫瘍へとより効果的に送達するが、全身投与はヌードマウスにおいていずれの著しい細胞毒性も無く複数の臓器へとＲＢＣＥＶを分

散した。

【０１３４】

ｉｎ　ｖｉｖｏでのＲＢＣＥＶの体内分布は、ＲＢＣＥＶをｉ．ｖ．注射したＮＯＤ　ｓｃｉｄガンマ（ＮＳＧ）マウスでも試験した（図２７）。ＲＢＣＥＶの体内分布、すなわちｉ．ｐ．注射による体内分布（図２０）及びｉ．ｖ．注射による体内分布（図２７）に基づき、それらは、肝臓、骨髄、肺、脾臓、胃及び腸において疾患を処置することができる。

【０１３５】

１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶの腫瘍内注射は乳がんを抑制する

ｉｎ　ｖｉｖｏでのＲＢＣＥＶプラットフォームの潜在的有用性の評価後、本発明者らはそれを使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏでの乳腺腫瘍形成におけるその役割が試験されていないｍｉＲ－１２５ｂを標的化した。本発明者らは、３日毎に腫瘍内注射によって、１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶをルシフェラーゼ標識ＣＡ１ａ腫瘍へと送達した（図５ａ）。乳腺腫瘍増殖は、処置の３０～４２日後のＮＣ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶと比較した腫瘍の生物発光の減少から観察されるように、１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶによって著しく弱められた（図５ｂ、ｄ）。ＲＢＣＥＶ無しでの１２５ｂ－ＡＳＯの注射は、ＮＣ－ＡＳＯ処置と比較して腫瘍増殖にいずれの著しい変化ももたらさなかった。コントロールと１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶ処置マウスの間の全体的な重量の著しい違いはなく、１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶが全体的な体重の減少及び毒性を生じることなく特異的に腫瘍の縮小を誘導したことを示す（図５ｃ）。回収した場合、１２５ｂ－ＡＳＯ－積載ＲＢＣＥＶ処置した腫瘍は、コントロールより小さかった（図５ｅ）。腫瘍切片のヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色は、１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶ処置した腫瘍が侵襲性も低く、転移性も低いことが肺で観察されたことを示した（図５ｆ）。驚くべきことに、ｍｉＲ－１２５ｂは、１２５ｂ－ＡＳＯ－積載ＲＢＣＥＶ処置した腫瘍において約９５％まで減少した（図５ｇ）。これらのデータは、ＲＢＣＥＶが、ｉｎ　ｖｉｖｏで乳がん細胞によって貪欲に取り込まれ、ＲＢＣＥＶが治療ＡＳＯを送達し、ｏｎｃｏｍｉＲを効果的にアンタゴナイズし、いずれの観察できるような副反応なく腫瘍形成を抑制できることを示した。

【０１３６】

１２５ｂ－ＡＳＯ－積載ＲＢＣＥＶの全身注射は、ＡＭＬの進行を抑制した

本発明者らは、ＲＢＣＥＶが、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのｍｉＲ－１２５ｂ機能の有効な阻害のため、ＡＭＬ細胞へと１２５ｂ－ＡＳＯを容易に送達する強固な媒体であることを示した。ｉｎ　ｖｉｖｏでの１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶの機能的有効性を試験するため、本発明者らはＮＳＧマウスにおいてＡＭＬの異種移植モデルを確立することを考えた。第１に、本発明者らは、ＥＶの全身投与後のこれらのマウスの循環におけるＲＢＣＥＶの分布を決定した（図６ａ）。３．３×10^{12}個のＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶ（以降、１用量として表す）の静脈内（ｉ．ｖ．）注射直後に、本発明者らは、４０％より多くの循環するＰＫＨ２６陽性のＥＶを見出した（図６ｂ）。ＰＫＨ２６陽性ＥＶのパーセンテージは、６時間かけて低下し、１２時間後には３４．５％残った。循環するヒトＲＢＣＥＶの減少は、いくらかのＥＶが経時的にマウス組織によって取り込まれたことを示した。ＲＢＣＥＶがｉ．ｐ．注射によってＮＳＧマウスの様々な臓器に分配され得ることを確認するため、本発明者らは、２用量のＤｉＲ－標識ＲＢＣＥＶを２４時間間隔でｉ．ｐ．により投与した。２回目の投与の２４時間後、本発明者らは、蛍光ＩＶＩＳを使用して、明るいＤｉＲシグナルを肝臓、脾臓、胃、及び腸において見出した（図６ｃ～ｅ）。内部臓器へのＲＢＣＥＶの強固な送達は、ｉ．ｐ．投与したＲＢＣＥＶが、白血病が通常発生する肝臓及び脾臓において白血病細胞を効果的に処置できることを示した。高密度な骨によるＤｉＲシグナルの遮断及び長い励起／放射波長（ＤｉＲは７５０／７８０ｎｍ）の顕微鏡フィルター又はサイトメーターフィルターが利用できないことにより、本発明者らは、切除した骨又は骨髄液からＤｉＲを検出できなかった。骨髄は白血病細胞が戻る主要な区画であるため、本発明者らは、ＦＡＣＳによって検出可能な近赤外光膜色素であるＶｉｖｏ

－Ｔｒａｃｋ－６８０（ＶＶＴ）で標識したＲＢＣＥＶを使用して骨髄細胞によるＲＢＣＥＶの取り込みを決定することを試みた（図６ｆ）。実際、ＶＶＴ蛍光は、ＦＡＣＳ解析を使用して、ＶＶＴ標識ＲＢＣＥＶをｉ．ｐ．注射したＮＳＧマウスから約４０％の骨髄細胞で検出された（図６ｇ、ｈ）。したがって、ＲＢＣＥＶは骨髄細胞によって強く取り込まれ、ｉｎ　ｖｉｖｏでの白血病処置のための治療分子を送達できた。

【０１３７】

続いて、本発明者らは、ルシフェラーゼ－ＧＦＰ標識ＭＯＬＭ１３細胞を、ブスルファン条件付けＮＳＧマウスの尾静脈に注射することによってＡＭＬ異種移植を生成した（図７ａ）。１週間後、白血病性生物発光シグナルが見えるようになると、本発明者らは、マウスを１用量の１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶで１日おきに処置した。白血病は非常に急速に発生したため、本発明者らは、コントロール群が麻痺及び死滅する前の９日間のみマウスを処置できた（通常、細胞接種後１８～２０日）。９日目に、コントロール群と比較して、１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶで処置したマウスにおける白血病性生物発光は著しく減少した（図７ｂ）。コントロールマウスは非常に弱くなったが、１２５ｂ－ＡＳＯ－ＥＶ処置したマウスは依然として活動的であった。白血病性生物発光シグナルはマウスの体全体に広がり、１２５ｂ－ＡＳＯ－積載ＲＢＣＥＶ処置群と比較して、コントロールマウスの骨髄、肝臓、及び脾臓に多く蓄積した（図７ｃ）。本発明者らは、本発明者らの研究所の倫理委員会によって規定された制約により、マウスの全体的な生存への処置の効果を評価することができなかった。８日目に死亡した２匹のコントロールマウスを除き、全てのマウスが９日目に　　殺された。ＧＦＰ＋白血病細胞は、コントロールの骨髄における６３～７０％の細胞を占めるが、体重が変わらないにもかかわらず処置したマウスでは２７～４６％に減少した（図７ｄ、ｅ）。Ｈ＆Ｅ染色は、コントロール群の肝臓及び脾臓の白血病細胞の広範な浸潤を明らかにしたが、１２５ｂ－ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶ処置群では見出された白血病細胞は少なかった（図７ｆ）。さらに、ｑＰＣＲ解析は、脾臓及び肝臓においてｍｉＲ－１２５ｂの著しいノックダウンを示した（図７ｇ）。これらのデータは、ＲＢＣＥＶによって送達された１２５ｂ－ＡＳＯが白血病細胞によって取り込まれ、このモデルにおいて白血病の進行を効果的に抑制したことを示した。したがって、ＡＳＯ積載ＲＢＣＥＶの全身投与を使用するＲＮＡ阻害は、白血病処置の新しい手法を提示し得る。

Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶによって媒介されるゲノム編集

さらに、本発明者らは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によるｇＲＮＡ媒介ゲノム編集のＲＢＣＥＶプラットフォームを評価した（図８ａ）。ＲＢＣＥＶを使用するｍＲＮＡ送達の可能性を試験するため、本発明者らは、ＨＡ－タグ付けしたＣａｓ９　ｍＲＮＡ（４，５２１ヌクレオチド）をＲＢＣＥＶへと電気穿孔し、それらを使用してＭＯＬＭ１３細胞を処置した。本発明者らは、まず、ｑＰＣＲを使用してＲＢＣＥＶにおけるＣａｓ９　ｍＲＮＡの積載を定量した。電気穿孔したＣａｓ９　ｍＲＮＡは、ＲＮａｓｅＩｆ媒介分解からＲＢＣＥＶによって保護されたが、非電気穿孔のＣａｓ９　ｍＲＮＡは完全に分解された（図８ｂ）。特に、約１８％のＣａｓ９　ｍＲＮＡがＲＢＣＥＶに積載及び保護された。本発明者らは、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを電気穿孔したＲＢＣＥＶとの細胞のインキュベーションの２４時間後、ＭＯＬＭ１３細胞において豊富なＣａｓ９　ｍＲＮＡを検出したが、非電気穿孔のＲＢＣＥＶによって処置した細胞は検出可能なＣａｓ９　ｍＲＮＡを示さなかった（図８ｃ及び図２３ｂ）。Ｃａｓ９タンパク質は、処置の４８時間後に約５０％のＭＯＬＭ１３細胞の核において効果的に発現され、抗ＨＡタグ抗体による免疫染色を使用して検出された（図８ｄ、ｅ）。ウェスタンブロット解析により、抗Ｃａｓ９抗体を使用してＣａｓ９タンパク質の発現を確認した（図８ｆ）。

【０１３８】

続いて、本発明者らは、ｍｉＲＮＡのシード配列における潜在的な変異部位を有するヒトｍｉｒ－１２５ｂ－２遺伝子座を標的化するｇＲＮＡを設計した（図２２ａ）。このｇＲＮＡは、配列類似性により、ｍｉＲ－１２５ファミリーの他の遺伝子座に結合し得る。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及び１２５ｂ－ｇＲＮＡを積載したＲＢＣＥＶによるＭＯＬＭ１３細胞

の処置は、処置の２日後にｍｉＲ－１２５ｂの発現の約９８％の低下及びｍｉＲ－１２５ａの９０％の低下をもたらした（図８ｇ及び図２２ｂ）。結果として、ＢＡＫ１は、およそ３倍に上方制御された（図８ｇ）。シークエンシングデータは、各変異クローンにおけるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列から３～８ヌクレオチド離れた切断部位を確認した（図８ｈ）。成熟ｍｉＲ－１２５配列を破壊する異なるサイズの挿入及び欠失が切断部位に見出された（図８ｈ）。速く、高効率のｍｉＲ－１２５ａ／ｂの抑制は、おそらくｍｉＲ－１２５ａ／ｂの短い半減期、さらにゲノム編集による。これらのデータは、ＲＢＣＥＶが、機能性ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ゲノム編集システムを白血病細胞へと効果的に送達できることを示す。

【０１３９】

ＲＢＣＥＶがＤＮＡプラスミドも送達できるか試験するため、本発明者らは、Ｃａｓ９及びＧＦＰ　ｇＲＮＡを発現する２つのプラスミドをＲＢＣＥＶへと電気穿孔し、１週間２９３Ｔ－ｅＧＦＰ細胞を処置した。ＥＧＦＰノックアウトは、約１０％の細胞でのみ観察され（図２２ｃ）、ＤＮＡプラスミドのサイズが大きいことによるようである。ＲＢＣＥＶは、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと抗ｅＧＦＰ　ｇＲＮＡの組合せも、６：５０のモル比で電気穿孔した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶは、約３２％のＮＯＭＯ１－ｅＧＦＰ細胞におけるｅＧＦＰの完全な欠損をもたらした（図２２ｄ）。したがって、ＲＢＣＥＶを使用して、大きなＤＮＡプラスミドの低効率及びＲＮＡの高効率でも、ゲノム編集のためのＲＮＡ及びＤＮＡを送達することができる。

【０１４０】

リンパ腫の処置におけるＲＢＣＥＶ

リンパ腫Ｂ９５－８細胞によるＢｏｄｉｐｙ標識ＲＢＣＥＶの取り込みは、本発明者らによって研究され（補足図２０）、Ｂ９５－８細胞によるＢｏｄｉｐｙ標識ＲＢＣＥＶの著しい取り込みを示し、したがって、ＲＢＣＥＶはリンパ腫の処置において使用され得ることを示す。

【０１４１】

考察

まとめると、データは、短鎖ＲＮＡ、例えばＡＳＯ及びｇＲＮＡ、並びに長鎖ＲＮＡ、例えばＣａｓ９　ｍＲＮＡを含む治療用ＲＮＡの多用途送達システムとしてのＲＢＣＥＶの使用を実証する。ＡＳＯ及びＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９は、治療目的の、新薬の開発に繋がらないような標的、例えばｏｎｃｏｍｉＲ及び転写因子を含む、目的の任意の遺伝子を標的化するように設計及びプログラムされ得る。以前には、いくつかの研究グループが、ＲＮＡ送達にＥＶを使用する利点を実証したが、それらのＥＶは、全ての対象から容易に得ることができない線維芽細胞及び樹状細胞から生成された。全血漿からのＥＶはより豊富であり、得るのが簡単であるが、これらのＥＶは有核細胞を含む多くの細胞型に由来し、遺伝子水平伝播のリスクを依然として持つ。

【０１４２】

ＲＢＣＥＶプラットフォームは、臨床適用により好適ないくつかの特徴を有する。第１に、単位血液は、それぞれ同種血輸血及び自己血輸血のため、既存の血液バンクから及び患者自身の血液からさえも容易に利用可能である。多くのＲＢＣ（約１０１２個の細胞／Ｌ）が各単位血液で利用可能である。したがって、培養で細胞を増やす必要がなく、ｉｎｖｉｔｒｏでの変異のいずれの自然増加のリスクもなく、ｃＧＭＰ－条件付き培地又はサプリメントも必要ない。第２に、ラージスケール量（１０１３～１０１４個）のＥＶが、カルシウムイオノフォアによる処置後、ＲＢＣから精製され、したがってＥＶを得るためのスケーラブルな戦略を提供し得る。第３に、遺伝子水平伝播の潜在的なリスクを持つ有核細胞型からのＥＶとは違い、また予測できないものにより不均一である血漿ＥＶとは違い、除核したＲＢＣはＤＮＡを均一に欠くため、ＲＢＣＥＶは安全である。がんの同種処置のため、がん細胞及び免疫細胞が大量のがん促進ＥＶをがん患者の循環へと放出することが公知であるため、ＲＢＣＥＶは血漿ＥＶより安全である。

【０１４３】

さらに、全身のトランスフェクション試薬とは違い、ＲＢＣＥＶは非毒性である。液体及び固形がんの本発明者らのｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏデータによって示したように、ＲＮＡはＲＢＣＥＶで安定であり、レシピエント細胞で完全に機能性である。ＲＢＣＥＶは、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ナノ粒子、及びほとんどの全身のトランスフェクション試薬とは違い、血液型のマッチングにより非免疫原性であるようである。また、本発明者らは、ＲＢＣＥＶが、２つの一般に使用されるトランスフェクション試薬よりも高効率で細胞にＲＮＡを送達することも示した。本発明者らは、短鎖ＲＮＡだけでなく、ＲＢＣＥＶ中の長鎖ｍＲＮＡも送達することができる。ＲＢＣＥＶは、立体的な遮断を介してだけでなく、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ゲノム編集を介しても、特定のｏｎｃｏｍｉＲ遺伝子を標的化するためにうまく使用されたが、これまでに示されていない。Ｏ型Ｒｈ－の血液からのＲＢＣＥＶが、一般的な処置に理想的である。最後に、ＲＢＣＥＶが、それらの完全性及び有効性に影響することなく何サイクルも凍結及び融解され得るという事実は、それらが将来安定な医薬品に開発され得ることを示す。がん標的化ペプチド又は抗体でコートしたＲＢＣＥＶのさらなる開発は、治療用ＲＮＡをがん細胞に特異的に送達し、正常な組織における有害事象を減らすことができる可能性がある。

【０１４４】

本発明者らによって得られた実験データは、ＲＢＣＥＶが肝臓、骨髄、肺、脾臓、胃及び腸において疾患を処置するために使用され得ることを示す。さらに、ＲＢＣＥＶは、肺がん、肝臓がん、結腸直腸がん、上咽頭がん、神経膠腫、白血病（図１～３、７、８）、乳がん（図３ｇ、図３～５、補足図１１ｂ）、腎臓がん（２９３Ｔ細胞、図１４ｃ）、及びリンパ腫（図２８）を含む、がんの処置で使用され得る。

【０１４５】

方法

細胞培養

急性骨髄性白血病ＭＯＬＭ１３細胞及びＮＯＭＯ１細胞は、微生物細胞培養のＤＳＭＺコレクション（Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）から得た。乳がんＭＣＦ１０ＣＡ１ａ（ＣＡ１ａ）細胞は、Ｋａｒｍａｎｏｓがん研究所（Ｗａｙｎｅ　Ｓｔａｔｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、ＵＳＡ）から購入した。ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ、ＵＳＡ）から得た。ルシフェラーゼ標識を有するＭＣＦ１０ＣＡ１ａ細胞は、本発明者らの先の研究で生成した。ＡＴＣＣ　ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞から生成した２９３Ｔ－ｅＧＦＰ細胞は、Ｄｒ．Ａｌｂｅｒｔ　Ｃｈｅｎｇ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂ、ＵＳＡ）から贈られた。ｅＧＦＰを安定に発現するＭＯＬＭ１３細胞及びＮＯＭＯ１細胞は、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ２０００を使用してパッケージングプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅからのプラスミド、ＵＳＡ）をコトランスフェクトし、フローサイトメトリーを使用してソートしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞で生成したｐＣＡＧ－ｅＧＦＰレンチウイルスの感染によって生成した。白血病細胞及び乳がん細胞株は、１０％牛胎仔血清（Ｂｉｏｓｅｒａ、ＵＳＡ）及び１％ペニシリン／ストレプトマイシン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＵＳＡ）を含むそれぞれＲＰＭＩ１６４０又はＤＭＥＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で維持した。実験に使用した全ての細胞は、ＰＣＲを使用してマイコプラズマの夾雑が陰性であることを試験した。簡潔に言うと、８０～１００％コンフルエントな培養から１００μｌの上清を回収し、９５℃で５分間加熱した。マイコプラズマＤＮＡは、Ｔａｑポリメラーゼ（Ｘｉａ　ｌａｂ、Ｘｉａｍｅｎ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙからの贈り物）及びマイコプラズマ特異的プライマー混合物（以下に提供した配列）を使用して、３５サイクル：９４℃１５秒、５６℃１５秒、７２℃３０秒；で増幅し、１％アガロースゲルを使用して可視化した。平行して、マイコプラズマも、製造業者のプロトコールに従ってＭｙｃｏｆｌｕｏｒマイコプラズマ検出キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して試験した。ＭＯＬＭ１３細胞、ＮＯＭＯ１細胞、ＣＡ１ａ細胞、及び２９３Ｔ細胞は、それらの元々の業者によって確証された。本発明者らも、これらの細胞株の同一性

及びＧｕａｎｇｚｈｏｕ　ＩＧＥ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｃｈｉｎａ）による確認サービスによって提供された、ＡＴＣＣ基準に記載の１６遺伝子座の複合短鎖タンデムリピート解析を使用してそれらの蛍光／ルシフェラーゼ誘導体を確認した。

【０１４６】

ＲＢＣからのＥＶ精製

Ｏ型の血液試料は、インフォームドコンセントを行った香港の健康なドナーから、赤十字社によって得た。ヒト血液試料による全ての実験は、香港城市大学ヒト対象倫理委員会のガイドライン及び認可に従って実施した。ＲＢＣは、遠心分離及び白血球除去フィルター（Ｔｅｒｕｍｏ、Ｊａｐａｎ）を使用して血漿及び白血球から分離した。単離したＲＢＣは、ＰＢＳで希釈し、１０ｍＭのカルシウムイオノフォア（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）で終夜処置した。ＥＶを精製するため、ＲＢＣ及び細胞残渣は、６００×ｇで２０分間、１６００×ｇで１５分間、３２６０×ｇで１５分間、及び１０，０００×ｇで３０分間、４℃での遠心分離によって除去された。上清を０．４５μｍのシリンジフィルターに通した。ＥＶは、ＴＹ７０Ｔｉローター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、ＵＳＡ）を用いる、１００，０００×ｇで７０分間、４℃での超遠心分離を使用して濃縮した。ＥＶは、冷ＰＢＳに再懸濁した。標識のため、半分のＥＶを２０μＭのＰＫＨ２６（ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈ、ＵＳＡ）又は１μＭのＤｉＲ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）又は４２．６２μＭのＶｉｖｏ－Ｔｒａｃｋ－６８０（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）と混合した。標識又は非標識ＥＶを、２ｍｌの凍結６０％スクロースクッション上に重層し、ＳＷ４１Ｔｉローター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して、１００，０００×ｇで１６時間、４℃でブレーキ速度を落として遠心分離した。ＥＶの赤い層（スクロース上）を回収し、ＳＷ４１Ｔｉローター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で、１００，０００×ｇで７０分間、４℃での超遠心分離を使用して、冷ＰＢＳで１回（非標識ＥＶ）又は２回（標識ＥＶ）洗浄した。全ての超遠心分離実験は、Ｂｅｃｋｍａｎ　ＸＥ－９０超遠心（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）によって実施した。精製したＲＢＣＥＶは、－８０℃で保存した。

【０１４７】

ＥＶ特徴付け

ＥＶの濃度及びサイズ分布は、Ｎａｎｏｓｉｇｈｔ　Ｔｒａｃｋｉｎｇ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ＮＳ３００システム（Ｍａｌｖｅｍ、ＵＫ）を使用して定量した。ゼータ電位及び多分散性指数は、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ（Ｍａｌｖｅｍ、ＵＫ）を使用して決定した。ＥＶの透過型電子顕微鏡解析では、ＥＶは、等量の４％パラホルムアルデヒドを添加することによって銅グリッド（２００メッシュ、ホルムバール炭素膜でコートした）に固定した。ＰＢＳによる洗浄後、４％の酢酸ウラニルをＥＶの化学染色のために添加し、Ｔｅｃｎａｉ１２　Ｂｉｏ　ＴＶＶＩＮ透過型電子顕微鏡（ＦＥＩ／Ｐｈｉｌｉｐｓ、ＵＳＡ）を使用して画像を捕捉した。

【０１４８】

オリゴヌクレオチド配列及び修飾

抗ｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯ（５’－ＵＣＡＣＡＡＧＵＵＡＧＧＧＵＣＵＣＡＧＧＧＡ－３’）及び陰性コントロールＡＳＯ（５’－ＣＡＧＵＡＣＵＵＵＵＧＵＧＵＡＧＵＡＣＡＡ－３’）は、Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｇｅｎｅｐｈａｒｍａ（Ｓｈａｎｇｈａｉ、Ｃｈｉｎａ）により又はＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｓｉｎｇａｐｏｒｅ）により各リボヌクレオチドに２’－Ｏ－メチル修飾で合成した。抗ｍｉＲ１２５ｂｇＲＮＡ（５’－ＣＣＵＣＡＣＡＡＧＵＵＡＧＧＧＵＣＵＣＡ－Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　Ｓｃａｆｆｏｌｄ－３’）及び抗ＧＦＰ　ｇＲＮＡ：（５’－ＧＧＧＣＡＣＧＧＧＣＡＧＣＵＵＧＣＣＧＧ－Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　Ｓｃａｆｆｏｌｄ－３’）は、Ｓｙｎｔｈｅｇｏ（ＵＳＡ）によって最初の３つの５’末端及び３’末端のＲＮＡ残基における２’－Ｏ－メチル類似体及び３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結で合成した。

【０１４９】

ＥＶ電気穿孔

ＲＢＣＥＶの電気穿孔は、Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ Ｘｃｅｌｌ ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｏｒ（ＢｉｏＲａｄ）を使用して、０．４ｃｍキュベットでの、１００μＦの固定静電容量の指数プログラムを実施した。最適化のため、８．２５～１６．５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶをＯｐｔｉＭＥＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で希釈し、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（ＡＦ６４７、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）とコンジュゲートした４μｇのデキストランと混合して総容積２００μｌにした。１００μｌのＥＶ混合物のアリコットを各キュベットに添加し、氷上で１０分間インキュベートした。電気穿孔は、異なる電圧：５０～２５０Ｖで試験した。ＡＳＯ送達のため、約４～１６×１０^{11}個のＲＢＣＥＶに、４００ｐｍｏｌのスクランブル陰性コントロール（ＮＣ）又は抗ｍｉＲ１２５ｂ ＡＳＯを２５０Ｖで電気穿孔した。ゲノム編集のため、１２．４×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ（又はＭＯＬＭ１３細胞）に、６ｐｍｏｌのＣｌｅａｎＣａｐ ＴＭ Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）及び５０ｐｍｏｌの抗ＧＦＰ ｇＲＮＡ又は８０ｐｍｏｌの抗ｍｉｒ－１２５ｂ ｇＲＮＡを４００Ｖで電気穿孔した。電気穿孔中に形成されたＲＢＣＥＶの凝集は、強いピペッティングによって溶かした。電気穿孔効率を定量するため、８．２５×１０^{11}個のデキストラン－ＡＦ６４７電気穿孔ＥＶを５μｇのラテックスビーズ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と終夜インキュベートし、フローサイトメトリーを使用してＡＦ６４７を解析した。

【０１５０】

電気穿孔ＲＢＣＥＶにおけるＲＮＡ積載効率及び安定性

未結合のＡＳＯの量を定量するため、２００ｐｍｏｌの非標識又はＦＡＭ標識ＮＣＡＳＯを８．２５×１０^{11}個のＲＢＣＥＶあり又はなしで、電気穿孔あり又はなしで、１０％Ｔｒｉｓ酢酸ＥＤＴＡ（ＴＢＥ）未変性ゲルに積載し、１５０Ｖで３０分間分離し、室温で３０分間ＳＹＢＲ－Ｇｏｌｄ染色（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）又はＦＡＭ蛍光を使用して、それぞれ、Ｇｅｌ ＤｏｃＴＭ ＥＺ Ｄｏｃｕｍｅｎｔａｔｉｏｎシステム（Ｂｉｏ Ｒａｄ、ＵＳＡ）により可視化した。実験は独立して３回繰り返した。ＡＳＯのＳＹＢＲ Ｇｏｌｄバンドは、ｉｍａｇｅＪ（ＮＩＨ、ＵＳＡ）を使用して定量し、バックグラウンドでノーマライズした。ゲルのフル画像は、図２５に示す。電気穿孔ＥＶにおけるＡＳＯの安定性を決定するため、６．２×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ及び２００ｐｍｏｌのＦＡＭ ＡＳＯ非電気穿孔又は電気穿孔混合物を、３７℃で１～７２時間、ＯｐｔｉＭＥＭ中の５０％ＦＢＳとインキュベートした。混合物は、透明な底の９６ウェル黒プレート（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、ＵＳＡ）に添加し、ＳｙｎｅｒｇｙＴＭ Ｈ１マイクロプレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ、ＵＳＡ）を使用してＦＡＭ蛍光を解析した。ＡＳＯ電気穿孔の効率を定量するため、２００ｐｍｏｌの１２５ｂ－ＡＳＯを電気穿孔した６．２×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ、又は同じ量の非電気穿孔ＥＶ及び１２５ｂ－ＡＳＯを１００ユニットのＲＮａｓｅＩｆ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、ＵＳＡ）と３７℃で３０分間インキュベートした。ＲＮａｓｅは、７０℃で１０分間インキュベートすることにより熱不活性化した。Ｔｒｉｚｏｌ－ＬＳ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を各試料に添加し、抽出したＲＮＡを以下に記載のように逆転写した。同様に、１μｇのＣａｓ９ ｍＲＮＡを電気穿孔した６．２×１０^{11}個のＲＢＣＥＶ、又は同じ量の非電気穿孔Ｃａｓ９ ｍＲＮＡを２５ユニットのＲＮａｓｅＩｆと３７℃で５分間インキュベートし、ＲＮＡ抽出及びＣａｓ９ ｍＲＮＡのｑＲＴ－ＰＣＲにかけた。

【０１５１】

トップダウンスクロース密度勾配を使用するＥＶ分離

全部で３．７×１０^{12}個のＦＡＭ ＡＳＯ積載ＥＶを１ｍｌの１０％ＨＥＰＥＳ／スクロース溶液と混合した。１１ｍｌの直線勾配のスクロース（６０～１０％）を、１２．５ｍｌのオープントップＳＷ４１超遠心チューブ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）に積載した。ＥＶ懸濁液をスクロース層の上に重層し、１５０，０００×ｇで１６時間、４℃にて超遠心分離した。スクロース勾配から全部で１２画分を黒ウェルプレートに回収し、

Ｓｙｎｅｒｇｙ（商標）Ｈ１マイクロプレートリーダーを使用して解析した。各画分におけるＥＶの濃度は上記のようにＮａｎｏＳｉｇｈｔを使用して決定した。各画分のスクロースの密度は、屈折計を使用して測定した（ＶａｓｔＯｃｅａｎ、Ｃｈｉｎａ）。

【０１５２】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＲＢＣＥＶによるがん細胞の処置

本発明者らは、Ｎａｎｏｓｉｇｈｔ粒子アナライザーを使用する精製のバッチごとにＲＢＣＥＶの品質管理を実施した。異常に低濃度又は変な凝集を示す試料は廃棄した。培養中細胞は、夾雑の徴候又は形態及び増殖の変化を通常通り調べた。ＥＶ取り込みを試験するため、５０，０００個のＭＯＬＭ１３細胞、ＣＡ１ａ細胞又はＮＯＭＯ１細胞を、２００μｌの約４～１６×１０^{11}個の非電気穿孔又は電気穿孔ＥＶ及び２４ウェルのウェルにつき３００μｌの増殖培地と２４時間インキュベートした。未処置のコントロールは、２００μｌの未処置のＯｐｔｉＭＥＭと同じ培地中で保存した。長いインキュベーション時間を必要とするアッセイのため、２４時間後に培地を新しい増殖培地と置き換えた。比較のため、ＭＯＬＭ１３細胞に４μｇ　デキストラン－ＡＦ６４７又は８００ｎＭのＦＡＭ標識ＮＣ－ＡＳＯを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＴＭ３０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）又はＩＮＴＥＲＦＥＲｉｎ（登録商標）（ＰｏｌｙＰｌｕｓ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ、Ｆｒａｎｃｅ）で、製造業者のプロトコールに従ってトランスフェクトした。取り込みにおけるヘパリンの効果を試験するため、ＭＯＬＭ１３細胞を２０μｇ／ｍｌのヘパリンナトリウム塩（Ａｌａｄｄｉｎ、Ｃｈｉｎａ）で１０分間前処置し、次いで２０μｇ／ｍｌのヘパリンナトリウム塩の存在又は不在下で１２．４×１０^{11}個の非標識又はＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶと終夜インキュベートした。ＲＢＣＥＶ及びデキストラン又はＦＡＭ　ＡＳＯの取り込みは、フローサイトメトリー又は免疫染色を使用して解析した。

【０１５３】

フローサイトメトリー解析

ＦＡＣＳ緩衝液（０．５％の牛胎仔血清を含有するＰＢＳ）中のラテックスビーズ又は細胞のフローサイトメトリーは、ＣｙｔｏＦＬＥＸ－Ｓサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）又はＳＨ８００Ｚサイトメーター（Ｓｏｎｙ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ＵＳＡ）を使用して実施し、Ｆｌｏｗｊｏ　Ｖ７又はＶ１０（Ｆｌｏｗｊｏ、ＵＳＡ）を使用して解析した。ＧＦＰ陽性ＭＯＬＭ１３細胞又はＮＯＭＯ１細胞は、滅菌条件下でＳｏｎｙ　ＳＨ８００Ｚセルソーターを使用して選択した。ビーズ又は細胞は、図１１＆２４に示すように、最初にＦＳＣ－Ａ及びＳＳＣ－Ａに基づいてゲートをかけ、残渣及び死細胞（低ＦＳＣ－Ａ）を除外した。細胞は、ＦＳＣ－幅対ＦＳＣ－高さに基づいてさらにゲートをかけ、ダブレット及び凝集体を除外した。白血病ＮＳＧマウスの骨髄からのＧＦＰ＋細胞の解析では、生細胞もＣｙｔｏｘ　ｂｌｕｅ陰性（ＰＢ４５０チャネル）に基づいて単一細胞集団からゲートをかけた。続いて、図１１、２４の例によって示すように非染色／未処置の陰性コントロールでは無視できるシグナルを示す集団として、蛍光陽性ビーズ又は細胞を適切な蛍光チャネル：ＦＡＭ及びＧＦＰはＦＩＴＣ、ＰＫＨ２６及びＰＩはＰＥ、ＡＦ６４７はＡＰＣ、及びＶＶＴはＡＰＣＣｙ５．５でゲートにかけた。

【０１５４】

ウェスタンブロット解析

全細胞溶解物は、プロテアーゼインヒビター（Ｂｉｏｔｏｏｌ）を補足したＲＩＰＡ緩衝液とインキュベートすることによってＥＶ又は細胞（２４ウェルプレートの３ウェルからの細胞を各条件のために合わせた）から抽出した。全部で３０又は３５μｇのタンパク質溶解物を、１０％ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に移行させた。ＰＭ５１００　ＥｘｃｅｌＢａｎｄ（商標）３－ｃｏｌｏｒ　ｈｉｇｈ　ｒａｎｇｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｌａｄｄｅｒ（ＳｍｏＢｉｏ、Ｔａｉｗａｎ）を試料の両側に積載した。ラダーに基づいて膜を水平に２～４枚に切り、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＴＢＳＴ）を含有するＴｒｉｓ緩衝生理食塩水中５％の脱脂乳で、室温で１時間ブロックし、一次抗体と４℃で終夜インキュベートした：マウス抗Ａｌｉｘ（

クローン３Ａ９、カタログ番号ＳＣ－５３５３８、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：５００希釈）、マウス抗Ｔｓｇ１０１（クローンＣ－２、カタログ番号ＳＣ－７９６４、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：５００希釈）、ウサギ抗ヘモグロビンα（クローンＨ－８０、ＳＣ－２１００５、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：１０００希釈）、マウス抗カルネキシン（クローンＡＦ１８、ＳＣ－２３９５４、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：５００希釈）、マウス抗ストマチン（クローンＥ－５、ＳＣ－３７６８６９、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：１０００希釈）、ウサギ抗ＧＡＰＤＨ（クローンＦＬ－３３５、カタログ番号ＳＣ－２５７７８、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：１０００希釈）、マウス抗Ｃａｓ９抗体（クローン７Ａ９、カタログ番号８４４３０１、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、１：２５０希釈）、及びマウス抗チューブリン（クローンＤＭ１Ａ、カタログ番号Ａｂ７２９１、Ａｂｃａｍ、１：１０００希釈）。ブロットはＴＢＳＴで３回洗浄し、次いでＨＲＰコンジュゲート抗マウス及び抗ウサギ二次抗体（カタログ番号７１５－０３５－１５０及び７１１－０３５－１５２、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、１：１００００希釈）と室温で１時間インキュベートした。ブロットは、Ａｚｕｒｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓゲルドキュメンテーションシステムを使用して画像化した。ブロットのフル画像は図２６に示す。バンドの強度はＩｍａｇｅ　Ｊを使用して定量及びバックグラウンドを引いた。

【０１５５】

ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＲ

全ＲＮＡは、Ｔｒｉｚｏｌ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して製造業者のマニュアルに従って細胞又は組織から抽出した。ＲＮＡ試料は、Ｎａｎｏｄｒｏｐ解析（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）及び１％アガロースゲルを使用して定量及び識別した。十分な濃度（＞３０ｎｇ／μｌ）、純度（Ａ２６０／２８０＞１．７）及び完全性（明確な２８及び１８ｓ　ｒＲＮＡのバンド）を有するものは、高能力のｃＤＮＡ逆転写キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して製造業者のプロトコールに従ってｃＤＮＡに変換した。ｍｉＲ－１２５ａ及びｍｉＲ－１２５ｂのレベルは、Ｔａｑｍａｎ（登録商標）ｍｉＲＮＡアッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して定量し、Ｕ６ｂ　ｓｎＲＮＡの発現でノーマライズし、又はｍｉＲＣＵＲＹ（商標）ＬＮＡ（商標）Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ＲＴ　ｍｉｃｒｏＲＮＡ　ＰＣＲ（Ｑｉａｇｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ｍｉＲ－１０３ａの発現でノーマライズした。抗ｍｉＲ－１２５ｂ　ＡＳＯは、Ｔａｑｍａｎ（登録商標）ｍｉＲＮＡアッセイ（ＩＤ番号００７６５５＿ｍａｔ）を使用して定量し、Ｕ６ｂ　ｓｎＲＮＡの発現でノーマライズし、又はそのコピー数をＡＳＯ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ　ｃｙｃｌｅ（Ｃｔ）値対０．００１～１０００ｐＭの段階希釈のＡＳＯの濃度の標準曲線に基づいて算出した。ｍＲＮＡのｑＲＴ－ＰＣＲ解析は、ＳｓｏｆａｓｔＴＭ　Ｅｖａｇｒｅｅｎ（ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ）ｑＰＣＲマスターミックス（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して実施し、ＧＡＰＤＨ、又は１８ｓ　ｒＲＮＡ、又はＡＣＴＢの発現でノーマライズした。全てのｑＰＣＲ反応は、ＣＦＸ９６　Ｔｏｕｃｈ（商標）Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ検出システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用することによって実施した。

【０１５６】

ｍｉｒ－１２５ｂ遺伝子のシークエンシング

ｍｉｒ－１２５ｂ標的化ｇＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡ積載ＲＢＣＥＶによって生成されたゲノム編集イベントを同定するため、ＤＮＡは、Ｔｒｉｚｏｌ、続いてフェノールクロロホルム及びエタノール沈殿を使用して、ＥＶ処置したＭＯＬＭ１３細胞から抽出した。一次ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５ｂ－２配列（３８３ヌクレオチド）は、遺伝子特異的プライマー（配列は以下に示す）の対及びＱ５（登録商標）Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔハイフィデリティーマスターミックス（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、３０サイクル：９８℃１０秒、６４℃３０秒、７２℃４５秒、及び７２℃２分間の最終伸長で増幅した。ＰＣＲ産物は、シークエンシングタグを持つ同じプライマーを使用して再増幅した。ハイスループットシークエンシングは、ＨｉＳｅｑ対合末端プラットフォーム（ｉｌｌｕｍｉｎａ、ＵＳＡ）を使用してＮｏｖｏＧｅｎｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｃｏｍｐａｎｙ（Ｈｏｎｇ　Ｋｏｎｇ）によって実施された。

【０１５７】
プライマー配列
ＧＡＰＤＨフォワード：ＧＧＡＧＣＧＡＧＡＴＣＣＣＴＣＣＡＡＡＡＴ
ＧＡＰＤＨリバース：ＧＧＣＴＧＴＴＧＴＣＡＴＡＣＴＴＣＴＣＡＴＧＧ
１８ｓ　ＲＮＡフォワード：ＧＴＡＡＣＣＣＧＴＴＧＡＡＣＣＣＣＡＴＴ
１８ｓ　ＲＮＡリバース：ＣＣＡＴＣＣＡＡＴＣＧＧＴＡＧＴＡＧＣＧ
ＢＡＫ１フォワード：ＴＧＧＴＣＡＣＣＴＴＡＣＣＴＣＴＧＣＡＡ
ＢＡＫ１リバース：ＴＣＡＴＡＧＣＧＴＣＧＧＴＴＧＡＴＧＴＣ
ＳＰ－Ｃａｓ９フォワード：ＡＡＧＧＧＡＣＡＧＡＡＧＡＡＣＡＧＣＣＧ　ＳＰ－
Ｃａｓ９リバース：ＡＴＡＴＣＣＣＧＣＣＣＡＴＴＣＴＧＣＡＧ
ｍｉｒ－１２５ｂフォワード：ＡＡＴＧＧＴＣＧＴＣＧＴＧＡＴＴＡＣＴＣＡ
ｍｉｒ－１２５ｂリバース：ＴＴＴＴＧＧＧＧＡＴＧＧＧＴＣＡＴＧＧＴ
ＡＣＴＢフォワード：ＴＣＣＣＴＧＧＡＧＡＡＧＡＧＣＴＡＣＧＡ
ＡＣＴＢリバース：ＡＧＧＡＡＧＧＡＡＧＧＧＴＧＧＡＡＧＡＧ
マイコプラズマ－１フォワード：ＣＧＣＣＴＧＡＧＴＡＧＴＡＣＧＴＴＣＧＣ
マイコプラズマ－２フォワード：ＣＧＣＣＴＧＡＧＴＡＧＴＡＣＧＴＡＣＧＣ
マイコプラズマ－３フォワード：ＴＧＣＣＴＧＡＧＴＡＧＴＡＣＡＴＴＣＧＣ
マイコプラズマ－４フォワード：ＴＧＣＣＴＧＧＧＴＡＧＴＡＣＡＴＴＣＧＣ
マイコプラズマ－５フォワード：ＣＧＣＣＴＧＧＧＴＡＧＴＡＣＡＴＴＣＧＣ
マイコプラズマ－６フォワード：ＣＧＣＣＴＧＡＧＴＡＧＴＡＴＧＣＴＣＧＣ
マイコプラズマ－１リバース：ＧＣＧＧＴＧＴＧＴＡＣＡＡＧＡＣＣＣＧＡ
マイコプラズマ－２リバース：ＧＣＧＧＴＧＴＧＴＡＣＡＡＡＡＣＣＣＧＡ
マイコプラズマ－３リバース：ＧＣＧＧＴＧＴＧＴＡＣＡＡＡＣＣＣＣＧＡ
全てのプライマーは、Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｃｈｉｎａ）によって合成された。
【０１５８】
細胞生存率の定量
フローサイトメトリー解析のため、白血病細胞はヨウ化プロピジウム（ＰＩ）によって室温で１５分間染色し、ＦＡＣＳ緩衝液によって洗浄し、上記のようにＣｙｔｏＦＬＥＸ－Ｓサイトメーターを使用して解析した。プレートアッセイのため、２４ウェルプレートのウェルにつき５０，０００個のＣＡ１ａ細胞を播種し、ＡＳＯ電気穿孔ＲＢＣＥＶで処置した。３日後、細胞をＰＢＳで１回洗浄し、０．５％のクリスタルバイオレット染色溶液（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）とインキュベートした。次いで、プレートを水道水流で３回洗浄し、風乾した。その後、５００μｌの５０％酢酸を各ウェルに添加し、吸光度をＢｉｏｔｅｋマイクロプレートリーダーを使用して５７０ｎｍで測定した。
【０１５９】
動物実験
全てのマウス実験を、香港城市大学の動物倫理委員会及び香港ＳＡＲの保健省によって認可され、Ａｎｉｍａｌｓ（Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ）Ｏｒｄｉｎａｎｃｅ（Ｃａｐ．３４０）及びＰｒｅｖｅｎｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃｒｕｅｌｔｙ　ｔｏ　Ａｎｉｍａｌｓ　Ｏｒｄｉｎａｎｃｅ（Ｃａｐ．１６９）を含む政府法案に準拠する、実験プロトコールに従って実施した。ヌードマウス（ＮＵ／Ｊ００２０１９株）及びＮＳＧマウス（ＮＯＤ．ＣｇＰｒｋｄｃ＜ｓｃｉｄ＞１１２ｒｇ＜ｔｍ１　Ｗｊｌ＞／ＳｚＪ００５５５７）は、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（ＵＳＡ）から購入し、本発明者らの施設で飼育した。類似の年齢のマウスは、それらの耳タグ又は尾に油性マーカーを使用して番号を標識し、親、体重、サイズ、又は性別のいずれのバイアスもなくコントロール及び処置群に無作為化した（雌のマウスにおいてのみ実施した乳がん実験を除く）。ほとんどの画像化及び組織病理学実験は、データの回収を実施した研究者が処置を実施した者とは異なるように、盲検様式で行った。データは、それらの処置群によってではなく、マウスの数に基づいて記録した。妊娠した、又は実験中の麻酔により偶発的に死亡した

マウスは除外した。他の技術的な問題、例えば注射の失敗による擬陽性又は陰性も除外した。

【０１６０】

ｉｎ　ｖｉｖｏでのＥＶ取り込み及び体内分布の決定

５０μｌのＰＢＳ中、全部で５×１０^{6}個のＣＡ１ａ細胞を、等容積の冷Ｍａｔｒｉｇｅｌ（Ｃｏｍｉｎｇ）と混合し、６週齢の雌のヌードマウスの左右の脇腹の皮下に注射した。１週間後、腫瘍が直径７ｍｍに達すると、各マウスに１６．５×１０^{11}個のＰＫＨ２６標識ＲＢＣＥＶを左脇腹の腫瘍内に注射した。続いてマウスに、アルファルファフリーの食事（ＬａｂＤｉｅｔ、ＵＳＡ）を与え、消化器系の自己蛍光を低減させた。ＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩＩシステム（Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＵＳＡ）を使用してＰＫＨ２６蛍光を毎日測定した。３日目に、マウスを　　殺し、腫瘍を切除し、ＰＫＨ２６を画像化した。腫瘍の凍結切片をＤＡＰＩによって染色し、ＬＳＭ－８８０ＮＬＯ共焦点レーザー走査顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ、Ｇｅｒｍａｎｙ）下で観察した。同様に、ＣＡ１ａ腫瘍（７ｍｍ）担持マウスに、１６．５×１０^{11}個のＰＫＨ２６又はＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶ又はＥＶ標識後最後の洗浄の上清をｉ．ｐ．注射した。ＤｉＲ　ＥＶを注射したマウスの画像は、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩＩを使用して処置の２４時間後に捕捉した。腫瘍、肝臓、心臓、肺、脾臓、腎臓、胃、及び腸も、ＩＶＩＳ画像化及び組織病理学解析のためＤｉＲ／ＰＫＨ２６－ＥＶをｉ．ｐ．注射したマウスから得た。

【０１６１】

ＮＳＧマウスにおけるＲＢＣＥＶの体内分布を決定するため、３．３×１０^{12}個のＤｉＲ標識ＲＢＣＥＶ又は最後のＥＶ洗浄の上清を、６～８週齢のＮＳＧマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂ）に２４時間間隔で２回注射した。その後、マウスを　　殺し、ＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩＩシステムを使用するＤｉＲ蛍光画像化のため臓器を回収した。全身及び組織蛍光画像は、Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅ（登録商標）ソフトウェア（Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して獲得及び解析した。バックグラウンド及び自己蛍光は、未処置又は上清陰性コントロールを使用して決定し、Ｉｍａｇｅ－Ｍａｔｈ機能を使用して画像から引いた。

【０１６２】

骨髄における細胞によるＲＢＣＥＶの取り込みを決定するため、３．３×１０^{12}個のＶＶＴ標識ＲＢＣＥＶ又は最後のＥＶ洗浄の上清を、６～８週齢のＮＳＧマウスに２４時間間隔で２回注射した（４匹のマウス／群）。２回目の注射の２４時間後、マウスを　　殺し、シリンジ及びＧ２５針により粉砕した骨にＦＡＣＳ緩衝液を流すことによってそれらの骨髄を回収した。細胞は７０μｍストレイナーを通して濾過し、１５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、ＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁し、上記のようにＳｏｎｙ　ＳＨ８００Ｚサイトメーターを使用してＶＶＴ蛍光（ＡＰＣ－Ｃｙ５．５チャネル）を解析した。

【０１６３】

循環におけるＲＢＣＥＶの安定性

全部で３．３×１０^{12}個のＰＫＨ２６標識ＥＶを、６週齢のＮＳＧマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂ）の尾静脈へとｉ．ｖ．注射した。マウスは、注射後すぐに、又は３、６、及び１２時間後に　　殺した。血液を心臓からＥＤＴＡチューブへと回収し、８００×ｇで５分間遠心分離した。上清を１０ｍｌの冷ＰＢＳで希釈し、１０，０００×ｇで１５分間遠心分離し、０．４５μｍのフィルターを通過させて残渣を除去した。その後、ＥＶを、１００，０００×ｇで９０分間、４℃にて超遠心分離した。精製したＥＶを１７５μｌのＰＢＳ中に再懸濁し、３７℃で３０分間、２．５μｇのラテックスビーズとインキュベートし、続いて４℃で終夜インキュベートした。ＥＶ結合ラテックスビーズを１ｍｌのＦＡＣＳ緩衝液で、４０００×ｇで１０分間洗浄し、ＰＫＨ２６蛍光をＣｙｔｏＦＬＥＸ－Ｓサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ）を使用して解析した。

【０１６４】

乳腺腫瘍へのＡＳＯのｉｎ　ｖｉｖｏ送達

全部で５×１０^{5}個のルシフェラーゼ標識ＣＡ１ａ細胞を等容積のマトリゲルと混合し、

６週齢の雌のヌードマウスの脇腹に注射した。２４時間後、８．２５×１０^{12}個のＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ積載（ｎ＝８匹のマウス）又は４００ｐｍｏｌの未結合のＮＣ／１２５ｂ－ＡＳＯ（ｎ＝６匹のマウス）を各マウスの腫瘍細胞が注射された同じ部位の脇腹の皮下に注射した。ＡＳＯ電気穿孔ＥＶの腫瘍内注射は、４２日目まで３日毎に繰り返した。全身の生物発光画像を、１５０ｍｇ／ｋｇのＤ－ルシフェリン（Ｃａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）のｉ．ｐ．注射後、ＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａ ＩＩＩシステムを使用して６日毎に撮影した。全ての生物発光画像を獲得し、盲検によりＬｉｖｉｎｇ Ｉｍａｇｅ（登録商標）４．５ソフトウェアを使用して解析した（Ｃａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）。４４日目に、マウスを　　殺し、腫瘍を切除した。各腫瘍の半分を、品質管理（上記のように）に適合しなかったわずかな腫瘍からのＲＮＡ試料を除いて、ＲＮＡ抽出及びｍｉＲ－１２５ｂのｑＲＴ－ＰＣＲのためＴｒｉｚｏｌ中でホモジナイズした。腫瘍の他の半分及び肺を下記のように組織病理学解析のために固定した。

【０１６５】

白血病移植マウスへのＡＳＯのｉｎ ｖｉｖｏ送達

７～８週齢のＮＳＧマウスに、２０ｍｇ／ｋｇのブスルファン（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ）をｉ．ｐ．注射した。２４時間後、５×１０^{5}個のルシフェラーゼ及びＧＦＰ標識ＭＯＬＭ１３細胞を、ブスルファン条件付けマウスの尾静脈へと注射した。１週間後、ＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａ ＩＩＩを使用して、生体発光を測定した。白血病細胞の移植が成功したマウス（骨髄における生体発光シグナルによって示される）は、９日間１日おきに３．３×１０^{12}個のＡＳＯ積載ＥＶのｉ．ｐ．によって処置した（全部で５回投与）。全身の生物発光画像を、１５０ｍｇ／ｋｇのＤ－ルシフェリンのｉ．ｐ．注射後、盲検でＩＶＩＳ Ｌｕｍｉｎａ ＩＩＩシステムを使用して３日毎に撮影した（Ｃａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）。処置の９日後、マウスを　　殺した。骨髄を回収し、ＦＡＣＳを使用してＧＦＰ陽性細胞を解析した。簡単に言えば、シリンジ及びＧ２５針により粉砕した骨にＦＡＣＳ緩衝液を流すことによって、　　殺したマウスの大腿骨又は脛骨から細胞を回収した。細胞は７０μｍストレイナーを通して濾過し、１５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、０．５ｍｌのＲＢＣ溶解緩衝液中（$KHCO_3$で緩衝し、最終ｐＨ７．２～７．６に達した水中０．８％ NH_4Cl及び０．１ｍＭ ＥＤＴＡ）に再懸濁し、氷上で５分間インキュベートした。緩衝液は、１０％ＦＢＳを含有する５ｍｌのＤＭＥＭで中和した。細胞を再び遠心分離し、ＰＢＳで１回洗浄し、２００μｌのＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁した。０．５μｌのＣｙｔｏｘ ｂｌｕｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、死細胞の同定のために添加した。脾臓及び肝臓を、それぞれＲＮＡ抽出及び組織病理学解析のためにＴｒｉｚｏｌ又はホルマリン中に回収した。ＲＮＡ試料は、品質管理（上記のように）に適合しなかったものを除いて、ｍｉＲ－１２５ｂのｑＲＴ－ＰＣＲのために使用した。

【０１６６】

組織病理学

マウスからの腫瘍及び他の組織を、１０％緩衝ホルマリン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で終夜室温にて固定し、続いて７０、９５、及び１００％アルコール中、３７℃で脱水し、３槽のキシレン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で透徹し、それぞれ３７℃及び６２℃で各１時間及び３０分、３槽のパラフィンワックス（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で浸透させた。パラフィンブロックを、ミクロトーム（ＭＩＣＲＯＭモデル：ＨＭ３３０）を使用して５μｍで切断した。切片を、染色の前に３７℃のインキュベーターで乾燥した。切片を、２槽のキシレンで脱脂し、次いで２槽の無水アルコール及び１槽の７０％アルコールにそれぞれ１０分間浸漬した。切片を、水中で再水和し、Ｇｉｌｌ’ｓヘマトキシリン（Ｓｕｒｇｉｐａｔｈ）で１５分間染色した。水による洗浄後、染色した切片を０．３％の酸性アルコール中で識別し、水中で再び洗浄し、２％炭酸水素ナトリウム溶液中で青くした。顕微鏡試験は、きれいな細胞質及びバックグラウンドで明確な核染色を調べるために必須である。次いで切片を、０．５％のエオシンにより２分間染色した。水中で手早く洗浄して過剰

なエオシン（Ｍｅｒｃｋ）を除去した後、切片を９５％及び無水アルコール中で脱水した。次いで切片をキシレン中で透徹し、合成封入剤（Ｓｈａｎｄｏｎ）で封入した。

【０１６７】

免疫染色

ＭＯＬＭ１３細胞を４％パラホルムアルデヒド（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）で固定し、４００ｒｐｍで３分間サイトスピンを使用してガラススライドに接着させた。細胞を、５％正常ロバ血清（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）でブロックし、０．２％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で透過処理し、マウス抗ＨＡ抗体（クローンＦ－７、カタログ番号７３９２、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１：２５０希釈）と４℃で終夜インキュベートし、ＰＢＳで３回洗浄し、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ロバ抗マウス二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）と室温で１時間インキュベートした。最終的に、細胞をＨｏｅｃｈｓｔ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）で５分間室温にて染色し、ＰＢＳで３回洗浄した。ＥＶ取り込み実験では（図１ｆ）、細胞はＨｏｅｃｈｓｔでのみ染色し、いずれの抗体でも染色しなかった。画像は、Ｎｉｋｏｎ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　Ｎｉ－Ｅ正立蛍光顕微鏡を使用して捕捉した。画像は、ＩｍａｇｅＪを使用して解析した。Ｃａｓ９－ＨＡ陽性核の数を数え、同じ画像のＨｏｅｃｈｓｔ陽性核の数によってノーマライズした。Ｃａｓ９－ＨＡ陽性細胞の平均パーセンテージは、各処置の３つの試料から算出した。

【０１６８】

統計解析

Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌを使用して算出したスチューデントのｔ検定を使用して、処置した試料とコントロールの間の有意差を計算した；試験型は、片側分布及び二試料等分散性を設定した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６を使用して算出したＭａｎｎ－ｗｈｉｔｎｅｙ検定（片側）を用いて、データが正常な分布に従わない有意差を計算した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ６を使用して算出した一元配置分散分析を、複数の処置群を含むデータの解析に使用した。＜０．０５の全てのＰ値は有意差とみなされた。全てのグラフで、データは、平均±平均の標準誤差（ＳＥＭ）として表される。定量のため、各実験は通常、３人のドナーからのＲＢＣＥＶ又はこれらの細胞継代からの細胞で３回繰り返した。マウスの実験は、３～８匹のマウスの群で実施した。最小の試料サイズの３は、効果量ｄ＝５；α　ｅｒｒプローブ＝０．０５及びパワー＝０．９５の２つの独立した群の平均差を比較する片側ｔ検定のためＧ＊Ｐｏｗｅｒ解析を使用して決定した。

参考文献

本発明をより完全に記載及び開示し、本発明が関係する技術を言及するため、多くの論文を上記に引用した。これらの参考文献の完全な引用は以下に示す。これらの参考文献のそれぞれの全体が本明細書に組み込まれる

【０１６９】

【表１】

1. Pitt, J. M., Kroemer, G. & Zitvogel, L. Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions. J. Clin. Invest. 126, 1139–1143 (2016).
2. Kamerkar, S. et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. Nature 546, 498–503 (2017).
3. Syn, N. L., Wang, L., Chow, E. K.-H., Lim, C. T. & Goh, B.-C. Exosomes in Cancer Nanomedicine and Immunotherapy: Prospects and Challenges. Trends Biotechnol. (2017). doi:10.1016/j.tibtech.2017.03.004
4. Usman, W. et al. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. Nature Communications In press, (2018).
5. Vader, P., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. Trends in Molecular Medicine 20, 385–393 (2014).
6. Kooijmans, S. A. A., Gitz-Francois, J. J. J. M., Schiffelers, R. M. & Vader, P. Recombinant phosphatidylserine-binding nanobodies for targeting of extracellular vesicles to tumor cells: a plug-and-play approach. Nanoscale 10, 2413–2426 (2018).
7. Shi, J. et al. Engineered red blood cells as carriers for systemic delivery of a wide array of functional probes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 10131–10136 (2014).
8. Pishesha, N. et al. Engineered erythrocytes covalently linked to antigenic peptides can protect against autoimmune disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 3157–3162 (2017).
9. Fridy, P. C. et al. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. Nat Methods 11, 1253–1260 (2014).
10. Rodriguez, P. L. et al. Minimal 'Self' Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. Science 339, 971–975 (2013).
11. Li, Z. et al. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. FASEB J. 19, 1978–1985 (2005).
12. Yang, R. et al. Engineering a Catalytically Efficient Recombinant Protein Ligase. J. Am. Chem. Soc. 139, 5351–5358 (2017).

【０１７０】

標準的な分子生物学技術に関しては、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｒｕｓｓｅｌ，Ｄ．Ｗ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．３ｅｄ．２００１年，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【図面】

【図１－１】

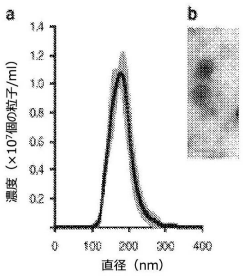


Figure 1a

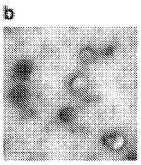


Figure 1b

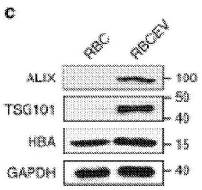


Figure 1c

【図１－２】

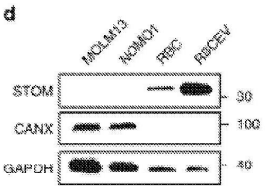


Figure 1d

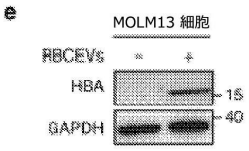


Figure 1e

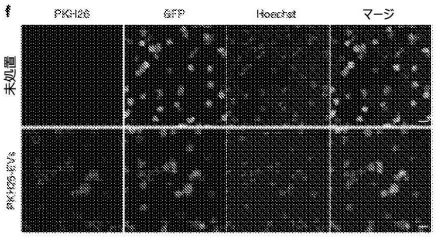


Figure 1f

【図１－３】

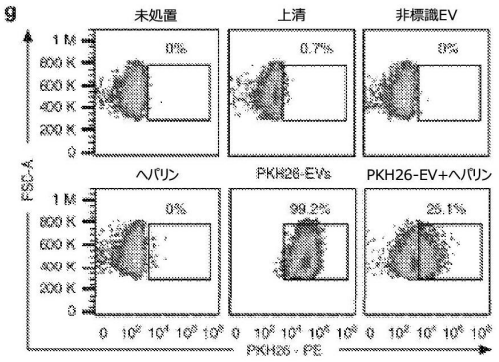


Figure 1g

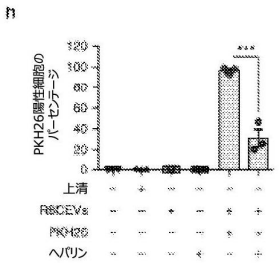


Figure 1h

【図２－１】

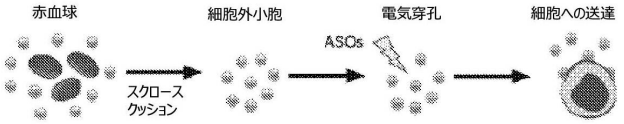


Figure 2a

【図２－２】

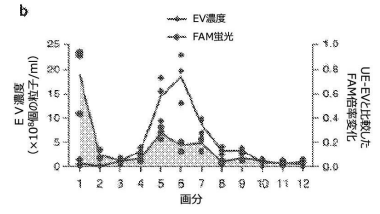


Figure 2b

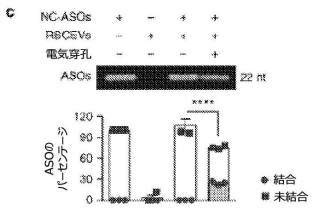


Figure 2c

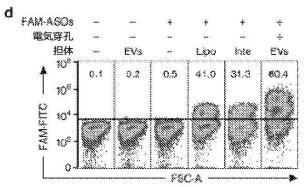


Figure 2d

【図２－３】

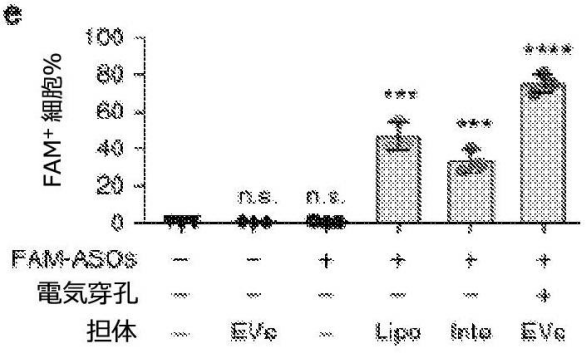


Figure 2e

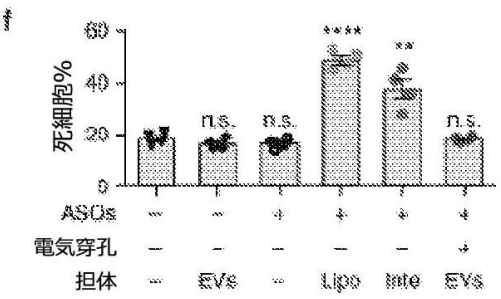


Figure 2f

【図３－１】



Figure 3a

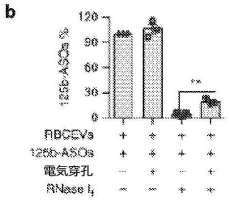


Figure 3b

【図３－２】

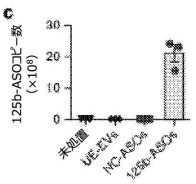


Figure 3c

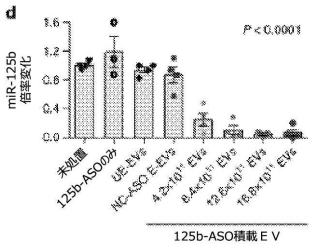


Figure 3d

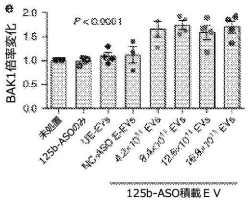


Figure 3e

【図３－３】

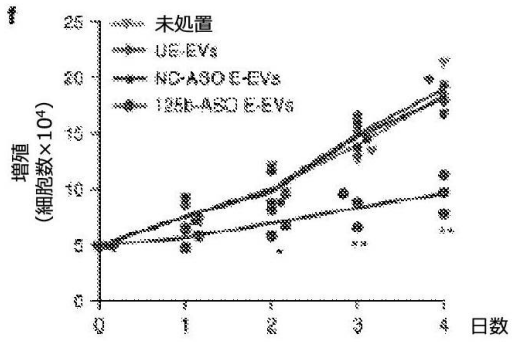


Figure 3f

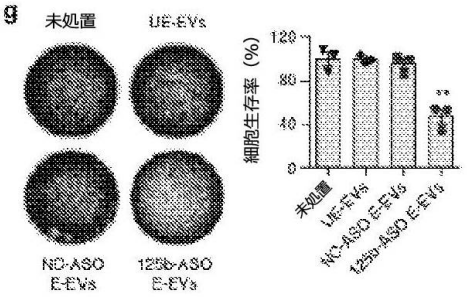


Figure 3g

【図４－１】



Figure 4a

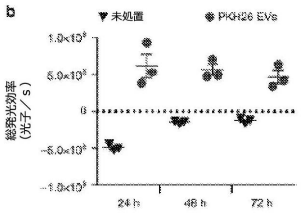


Figure 4b

【図４－２】

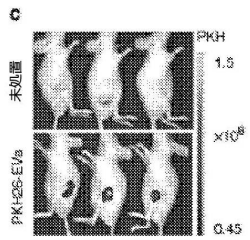


Figure 4c

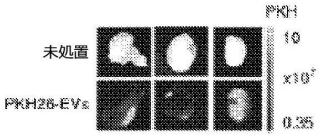


Figure 4d

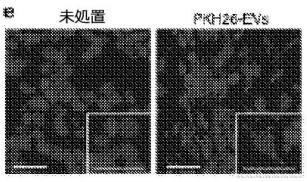


Figure 4e

【図５－１】



Figure 5a

【図５－２】

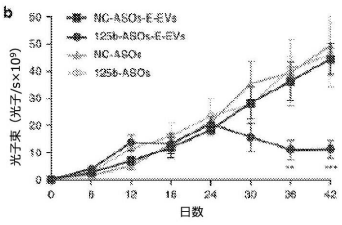


Figure 5b

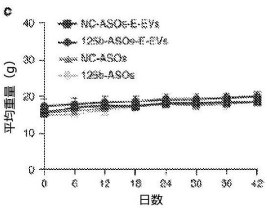


Figure 5c

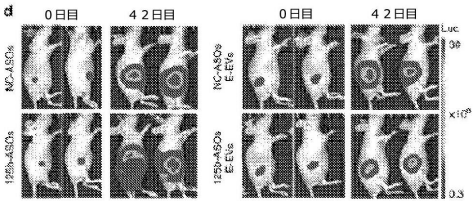


Figure 5d

【図５－３】

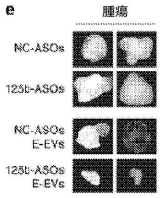


Figure 5e

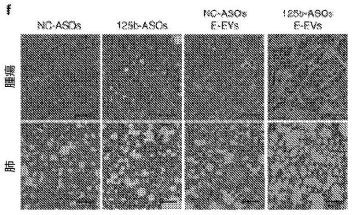


Figure 5f

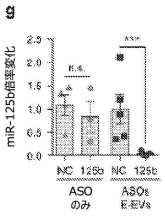


Figure 5g

【図６－１】



Figure 6a

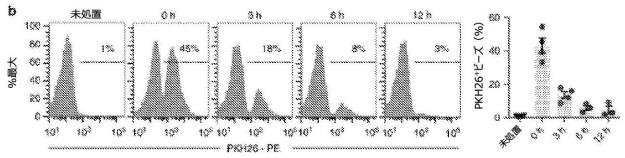


Figure 6b



Figure 6c

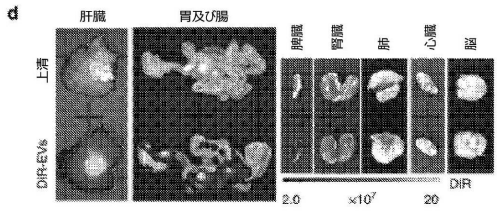


Figure 6d

【図６－２】

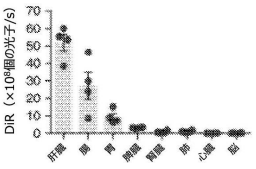


Figure 6e



Figure 6f

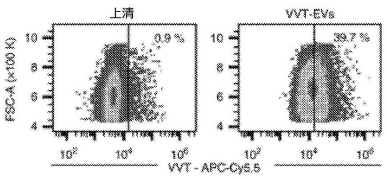


Figure 6g

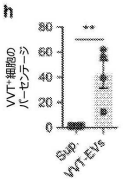


Figure 6h

【図７－１】

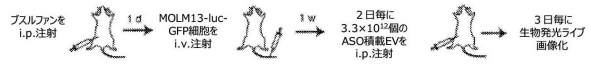


Figure 7a

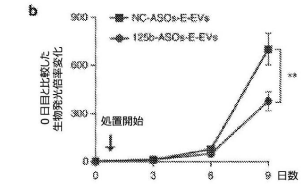


Figure 7b

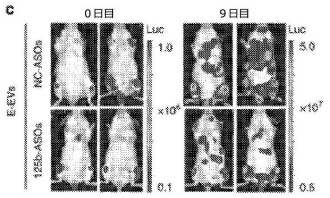


Figure 7c

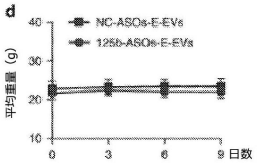


Figure 7d

【図７－２】

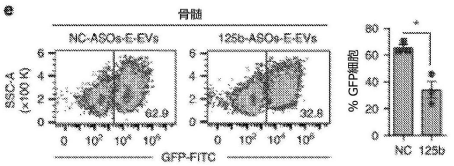


Figure 7e

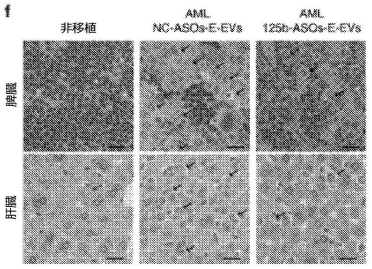


Figure 7f

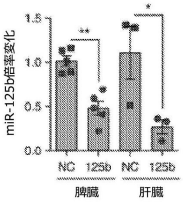


Figure 7g

【図８－１】

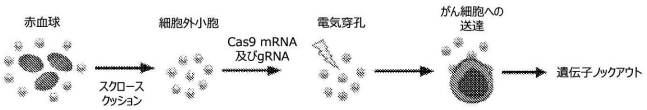


Figure 8a

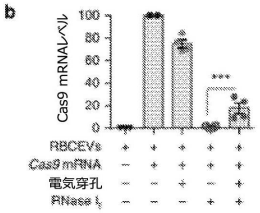


Figure 8b

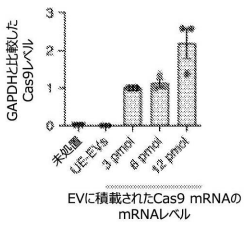


Figure 8c

【図８－２】

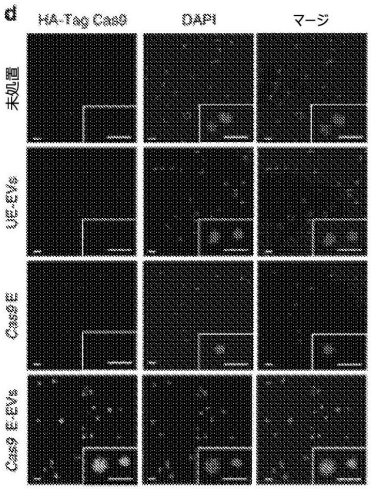


Figure 8d

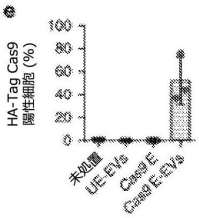


Figure 8e

【図８－３】

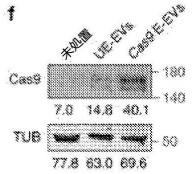


Figure 8f

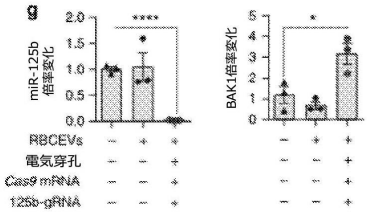


Figure 8g

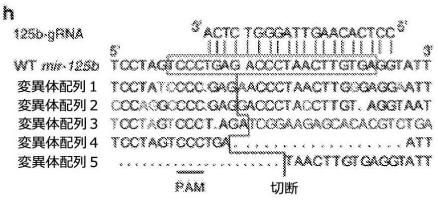


Figure 8h

【図９－１】

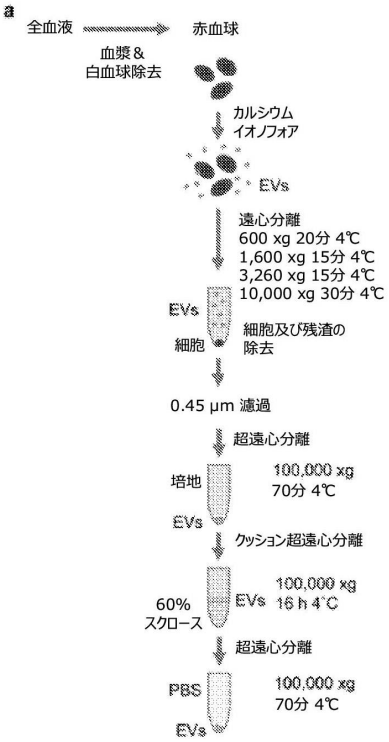


Figure 9a

【図９－２】

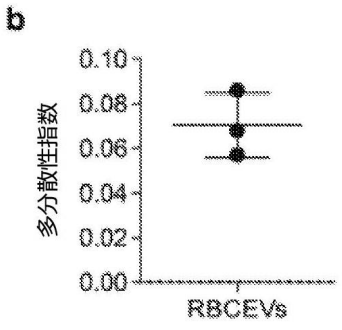


Figure 9b

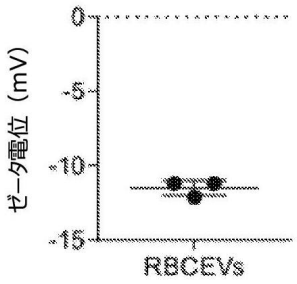


Figure 9c

【図１０－１】

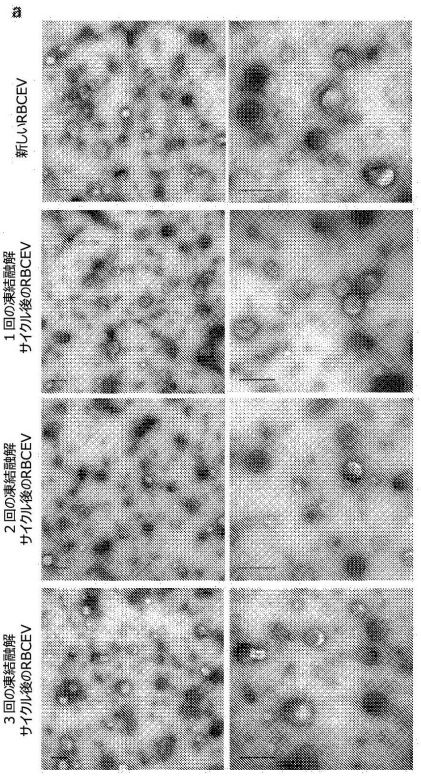


Figure 10a

【図１０－２】

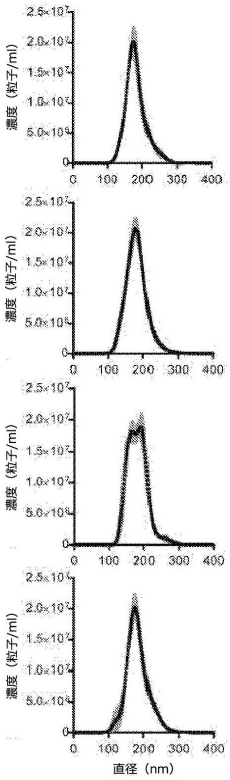


Figure 10b

【図１１】

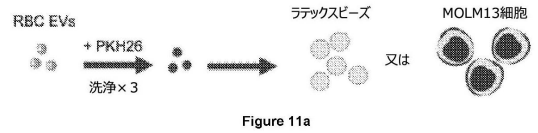


Figure 11a

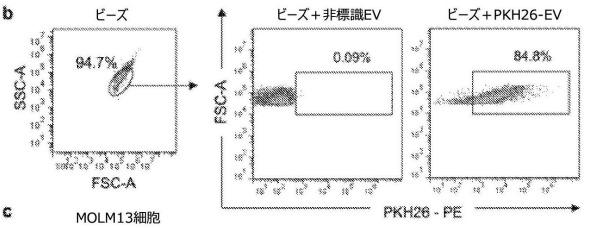


Figure 11b

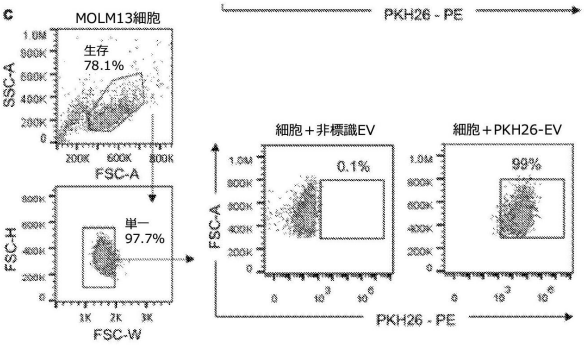


Figure 11c

【図１２】

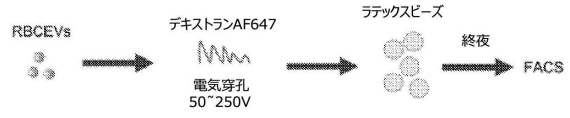


Figure 12a

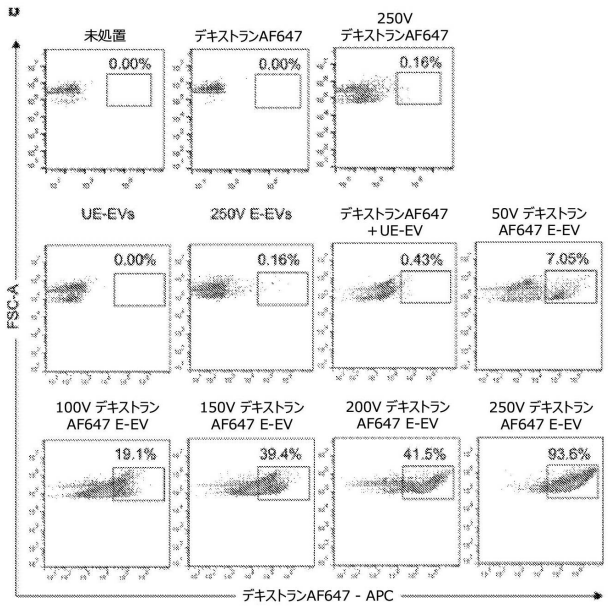


Figure 12b

【図１３】



Figure 13a

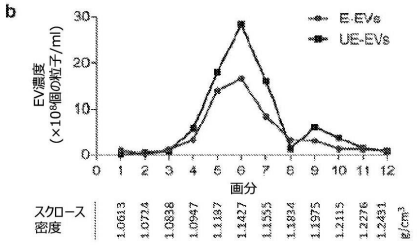


Figure 13b

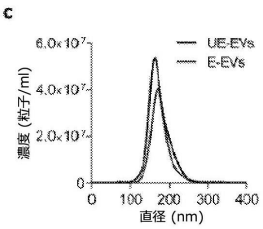


Figure 13c

【図１４】

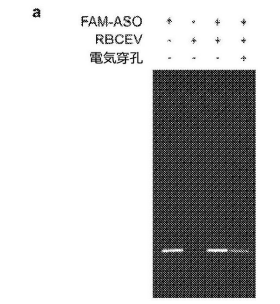


Figure 14a

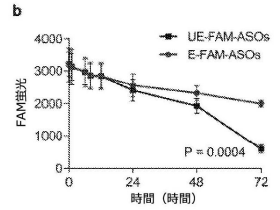


Figure 14b

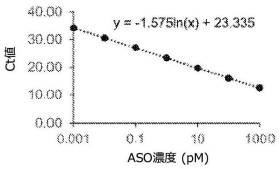


Figure 14c

【図１５】



Figure 15a

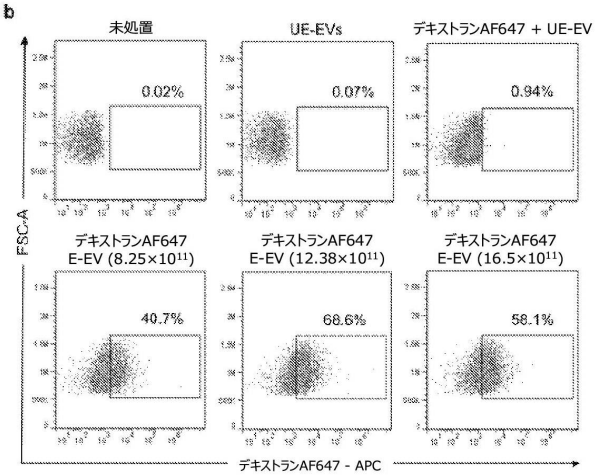


Figure 15b

【図１６－１】

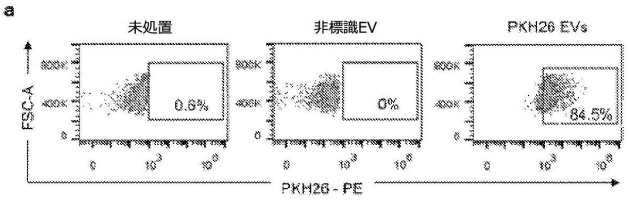


Figure 16a

【図１６－２】

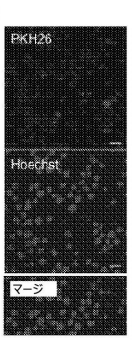


Figure 16b

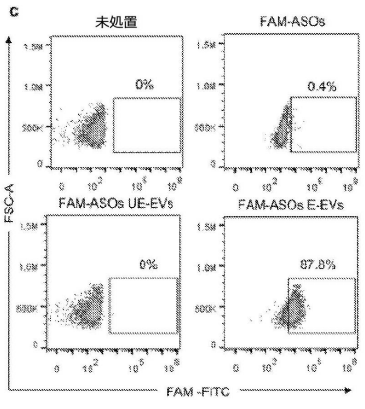


Figure 16c

【図１７】

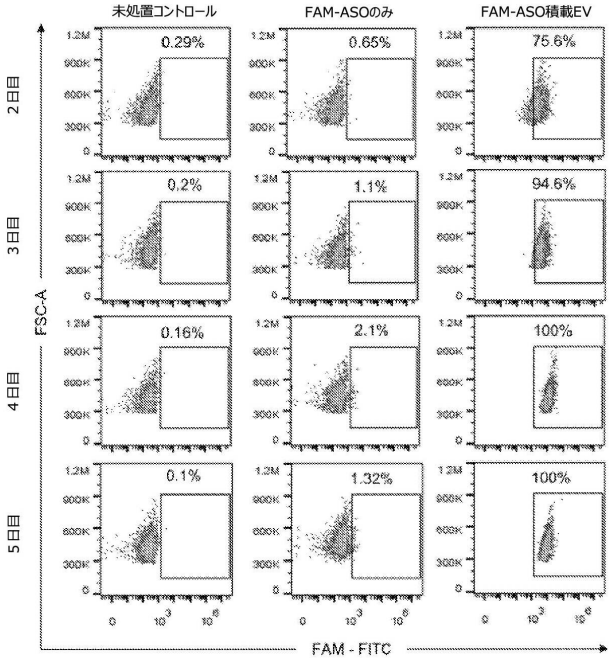


Figure 17

【図１８】

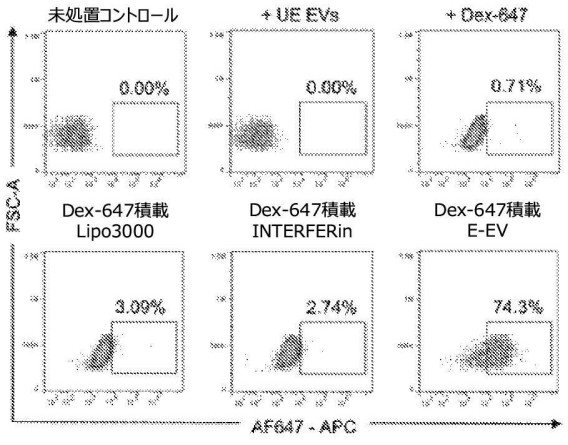


Figure 18a

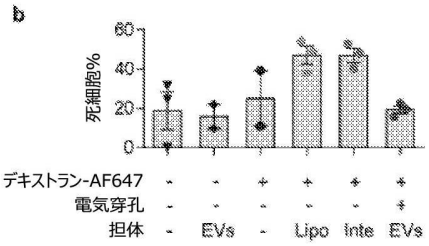


Figure 18b

【図１９－１】

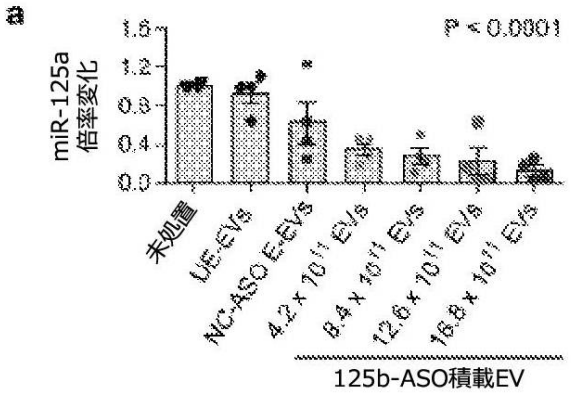


Figure 19a

【図１９－２】

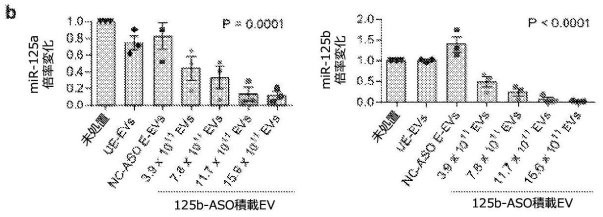


Figure 19b

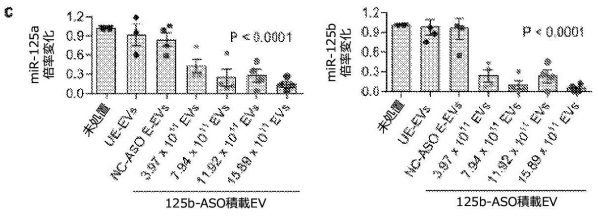


Figure 19c

【図２０－１】

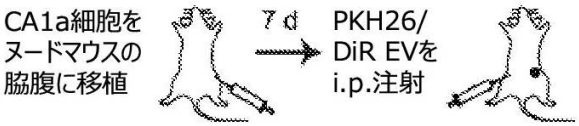


Figure 20a

【図２０－２】

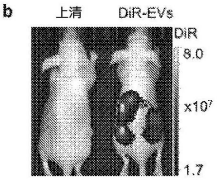


Figure 20b

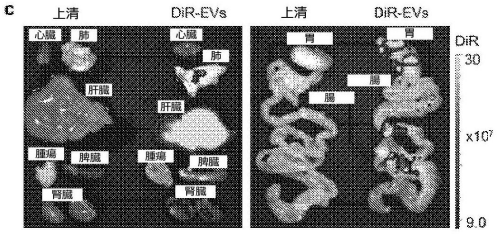


Figure 20c

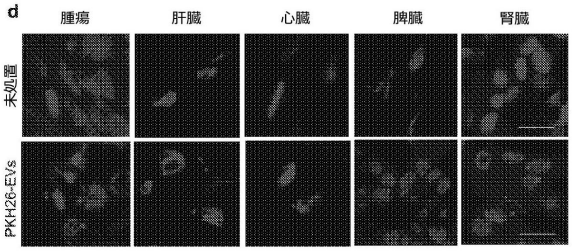


Figure 20d

【図２１】

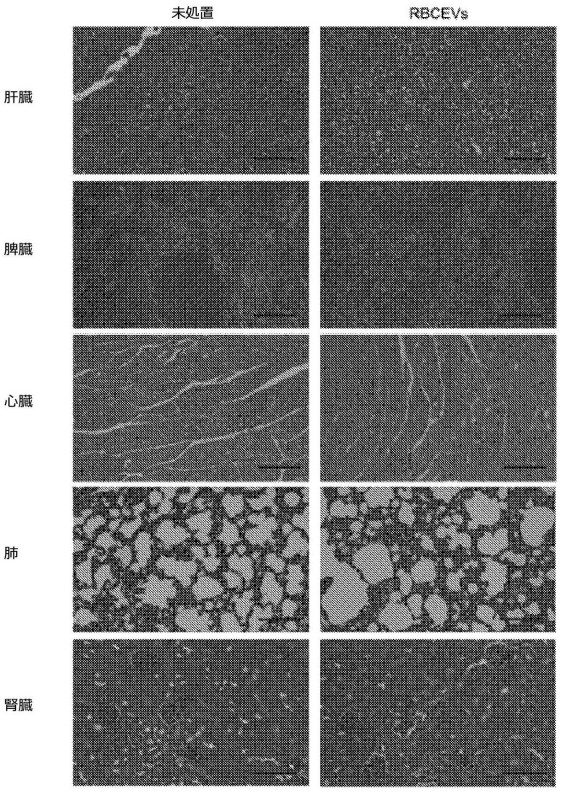


Figure 21

【図２２－１】

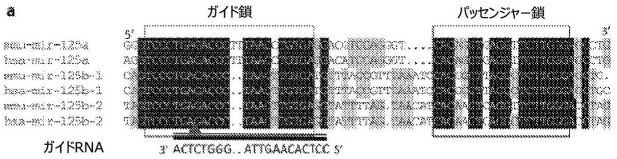


Figure 22a

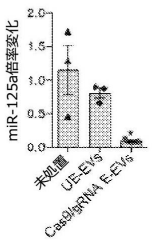


Figure 22b

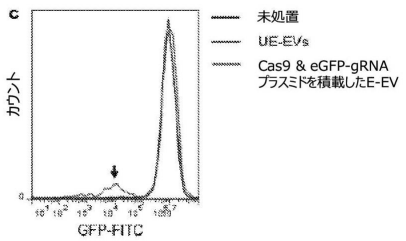


Figure 22c

【図２２－２】

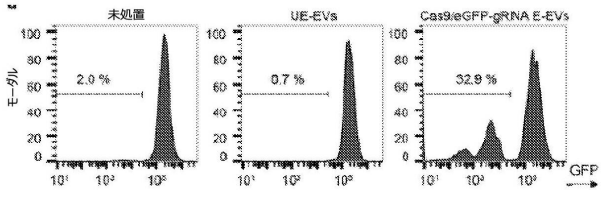


Figure 22d

【図２３】

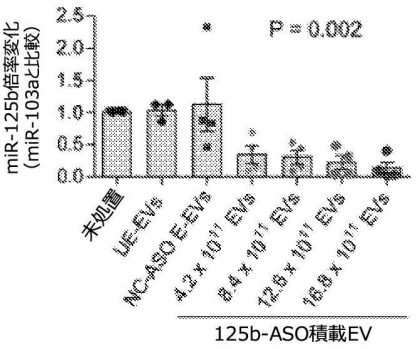


Figure 23a

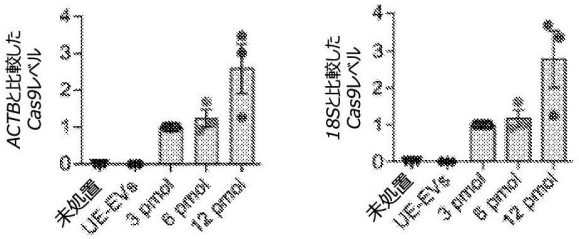


Figure 23b

【図２４】

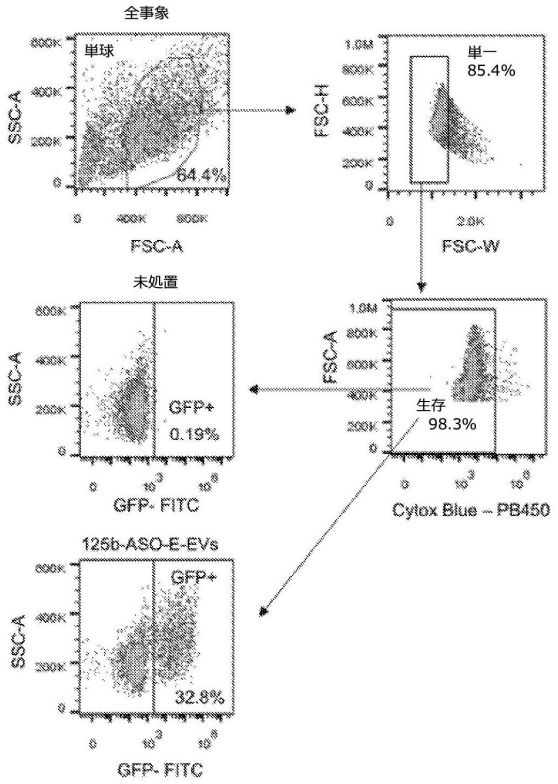


Figure 24

【図２５】

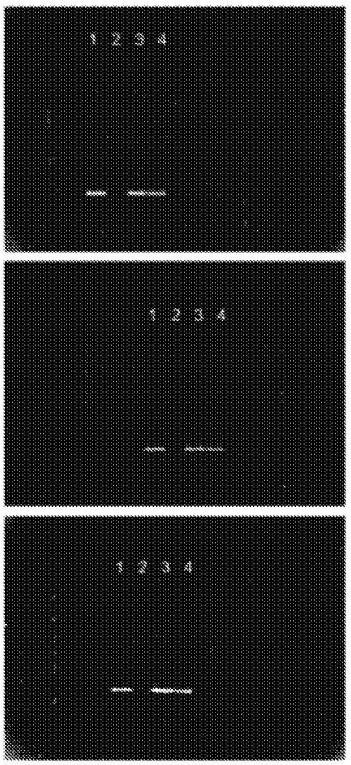


Figure 25a

【図２６－１】

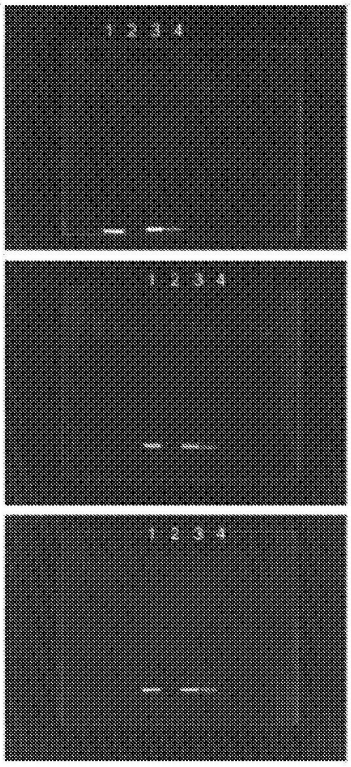


Figure 26b

【図２６－２】

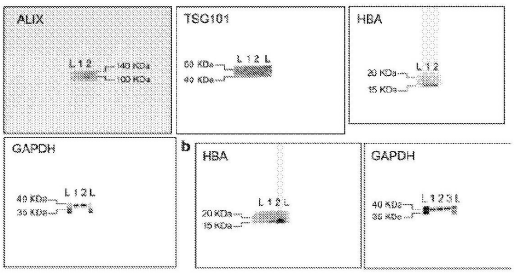


Figure 26a

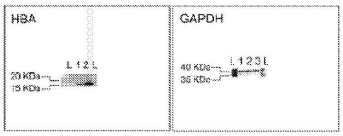


Figure 26b

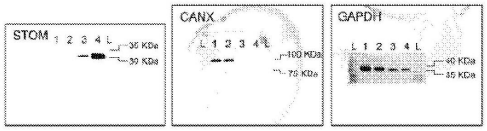


Figure 26c

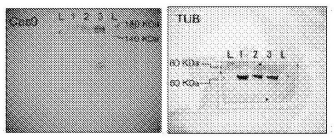


Figure 26d

【図２７】

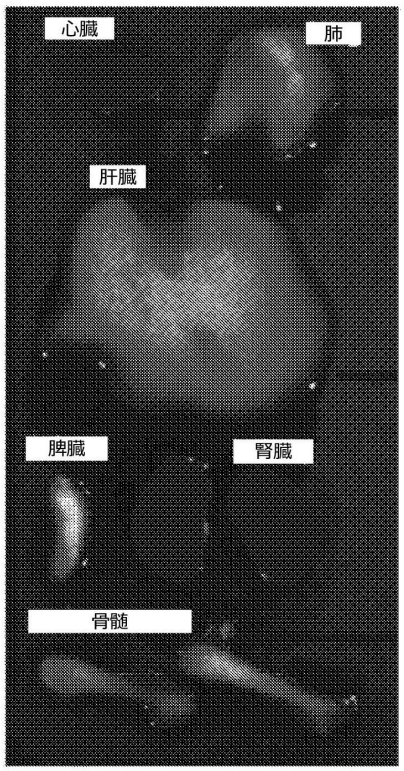


Figure 27

【図２８】

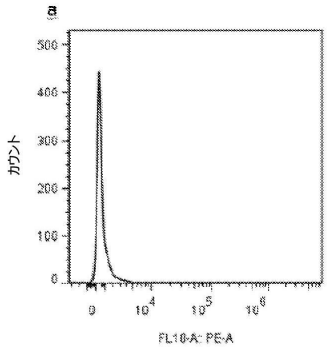


Figure 28a

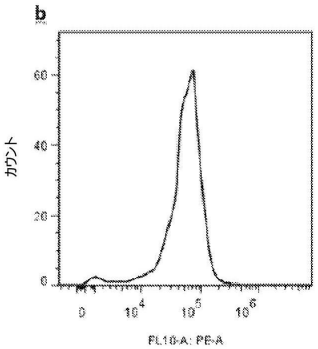


Figure 28b

【手続補正書】
【提出日】令和２年５月１４日(２０２０.５.１４)
【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】
ａ．赤血球の試料を提供すること、ここで前記試料は白血球を含まない；
ｂ．赤血球の試料を小胞誘導剤と接触させること、ここで小胞誘導剤はカルシウムイオノフォアである；
ｃ．赤血球から細胞外小胞を分離すること；
ｄ．細胞外小胞を回収すること；及び
ｅ．外因性カーゴの存在下で細胞外小胞を電気穿孔すること、ここで外因性カーゴはＲＮＡである、
を含む、方法。
【請求項２】
カーゴが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、メッセンジャーＲＮＡ、長鎖ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｇＲＮＡ又はプラスミドからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ＲＮＡが、１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸を含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸が、２’－Ｏ－メチル類似体、３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結又は他のロックド核酸（ＬＮＡ）、ＡＲＣＡキャップ、化学修飾核酸又はヌクレオチド、又はキャッピング等の３’若しくは５’修飾から選択される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
天然には生じないヌクレオチドが、２’位の糖修飾、２’－Ｏ－メチル化、２’－フルオロ修飾、２’NH_2修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモの置換、又は５－ヨード－ウラシル、又は骨格修飾から選択される、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
カーゴが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集システムの１つ又は複数の成分をコードする、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
カーゴが、ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ又はプラスミドである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
カーゴが、ｇＲＮＡを含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
カーゴが、アンチセンス核酸を含む、請求項１に記載の方法。

【手続補正書】
【提出日】令和３年１２月２日(２０２１.１２.２)
【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】
赤血球に由来し、外因性カーゴを含有する、細胞外小胞。
【請求項２】
カーゴが、核酸、ペプチド、タンパク質又は小分子である、請求項１に記載の細胞外小胞。
【請求項３】
カーゴが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、メッセンジャーＲＮＡ、長鎖ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｇＲＮＡ又はプラスミドからなる群から選択される核酸である、請求項１又は請求項２に記載の細胞外小胞。
【請求項４】
核酸が、１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸を含む、請求項３に記載の細胞外小胞。
【請求項５】
１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸が、２’－Ｏ－メチル類似体、３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結又は他のロックド核酸（ＬＮＡ）、ＡＲＣＡキャップ、化学修飾核酸又はヌクレオチド、又はキャッピング等の３’若しくは５’修飾から選択される、請求項４に記載の細胞外小胞。
【請求項６】
天然には生じないヌクレオチドが、２’位の糖修飾、２’－Ｏ－メチル化、２’－フルオロ修飾、２’NH_2修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモの置換、又は５－ヨード－ウラシル、又は骨格修飾から選択される、請求項５に記載の細胞外小胞。
【請求項７】
カーゴが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集システムの１つ又は複数の成分を含む、請求項１に記載の細胞外小胞。
【請求項８】
カーゴが、ヌクレアーゼ、又はヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ若しくはプラスミドである、請求項７に記載の細胞外小胞。
【請求項９】
カーゴが、ｇＲＮＡを含む、請求項７に記載の細胞外小胞。
【請求項１０】
アンチセンス核酸を含む、請求項１に記載の細胞外小胞。
【請求項１１】
請求項１～１０のいずれか一項に記載の１つ又は複数の細胞外小胞を含む組成物。
【請求項１２】
処置の方法での使用のための医薬組成物であって、請求項１～１０のいずれか一項に記載の細胞外小胞を含む、医薬組成物。
【請求項１３】
処置の方法が、請求項１～９のいずれか一項に記載の細胞外小胞又は組成物の、遺伝的障害、炎症性疾患、がん、自己免疫障害、心血管疾患又は胃腸疾患を有する対象への投与を含む、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】

対象ががんを有し、がんが任意選択で白血病、リンパ腫、骨髄腫、乳がん、肺がん、肝臓がん、結腸直腸がん、上咽頭がん、腎臓がん又は神経膠腫から選択される、請求項１２または１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
ａ．赤血球の試料を提供すること、ここで前記試料は白血球を含まない；
ｂ．赤血球の試料を小胞誘導剤と接触させること；
ｃ．赤血球から細胞外小胞を分離すること；及び
ｄ．細胞外小胞を回収すること；
ｅ．任意選択で、外因性カーゴの存在下で細胞外小胞を電気穿孔すること
を含む、方法。
【請求項１６】
外因性カーゴの存在下で赤血球に由来する細胞外小胞を電気穿孔することを含む、方法。
【請求項１７】
請求項１５又は請求項１６に記載の方法によって得られた細胞外小胞を含む組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７０】
標準的な分子生物学技術に関しては、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｒｕｓｓｅｌ，Ｄ．Ｗ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．３ｅｄ． ２００１年，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。
発明の態様
［態様１］赤血球に由来し、外因性カーゴを含有する、細胞外小胞。
［態様２］カーゴが、核酸、ペプチド、タンパク質又は小分子である、態様１に記載の細胞外小胞。
［態様３］カーゴが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、メッセンジャーＲＮＡ、長鎖ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｇＲＮＡ又はプラスミドからなる群から選択される核酸である、態様１又は態様２に記載の細胞外小胞。
［態様４］核酸が、１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸を含む、態様３に記載の細胞外小胞。
［態様５］１つ又は複数の修飾、天然には生じないエレメント又は天然には生じない核酸が、２’－Ｏ－メチル類似体、３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結又は他のロックド核酸（ＬＮＡ）、ＡＲＣＡキャップ、化学修飾核酸又はヌクレオチド、又はキャッピング等の３’若しくは５’修飾から選択される、態様４に記載の細胞外小胞。
［態様６］天然には生じないヌクレオチドが、２’位の糖修飾、２’－Ｏ－メチル化、２’－フルオロ修飾、２’NH_2修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンにおける修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモの置換、又は５－ヨード－ウラシル、又は骨格修飾から選択される、態様５に記載の細胞外小胞。
［態様７］カーゴが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集システムの１つ又は複数の成分を含む、態様１に記載の細胞外小胞。
［態様８］カーゴが、ヌクレアーゼ、又はヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ若しくはプラスミドである、態様７に記載の細胞外小胞。
［態様９］カーゴが、ｇＲＮＡを含む、態様７に記載の細胞外小胞。
［態様１０］アンチセンス核酸を含む、態様１に記載の細胞外小胞。
［態様１１］態様１～１０のいずれかに記載の１つ又は複数の細胞外小胞を含む組成物。
［態様１２］処置の方法での使用のための、態様１～１１のいずれかに記載の細胞外小胞又は組成物。

［態様１３］態様１に記載の細胞外小胞を、処置を必要とする患者に投与するステップを含む、処置の方法。
［態様１４］疾患又は障害の処置のための医薬の製造における、態様１～１１のいずれかに記載の細胞外小胞又は組成物の使用。
［態様１５］疾患又は障害の処置のための医薬の製造における、態様１～１１のいずれかに記載の細胞外小胞又は組成物の使用。
［態様１６］処置の方法が、態様１～９のいずれかに記載の細胞外小胞又は組成物の、遺伝的障害、炎症性疾患、がん、自己免疫障害、心血管疾患又は胃腸疾患を有する対象への投与を含む、態様１０～１２のいずれかに記載の使用のための細胞外小胞又は組成物、処置の方法又は使用。
［態様１７］対象ががんを有し、がんが任意選択で白血病、リンパ腫、骨髄腫、乳がん、肺がん、肝臓がん、結腸直腸がん、上咽頭がん、腎臓がん又は神経膠腫から選択される、態様１３に記載の使用のための細胞外小胞又は組成物、処置の方法又は使用。
［態様１８］ａ．赤血球の試料を提供すること、ここで前記試料は白血球を含まない；
ｂ．赤血球の試料を小胞誘導剤と接触させること；
ｃ．赤血球から細胞外小胞を分離すること；及び
ｄ．細胞外小胞を回収すること；
ｅ．任意選択で、外因性カーゴの存在下で細胞外小胞を電気穿孔すること
を含む、方法。
［態様１９］外因性カーゴの存在下で赤血球に由来する細胞外小胞を電気穿孔することを含む、方法。
［態様２０］態様１８又は態様１０に記載の方法によって得られた細胞外小胞を含む組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2018/050596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/88 (2006.01) ***A61K 48/00 (2006.01)*** *A61P 35/00 (2006.01)*

According to International Patent Classification (IPC)

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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

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

FAMPAT/EMBASE/BIOSIS/MEDLINE: exosome, vesicle, red blood cell, electroporation, CRISPR, nucleic acid, and related terms

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	USMAN W. M. ET AL., Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nature Communications*, 15 June 2018, Vol. 9, Article No. 2359, pages 1-15 [Retrieved on 2019-01-28] <DOI: 10.1038/S41467-018-04791-8> Pages 2, 5, 7 and 12	1-20
X Y	US 2009/0274630 A1 (HUANG D. M.) 5 November 2009 Abstract, Paragraphs [0005]-[0010], [0040], [0043], [0044], [0045], [0069] and Table 2	1-6 and 10-20 7-9
X Y	WO 2016/187717 A1 (EXERKINE CORPORATION) 1 December 2016 Examples 1-5, Paragraphs [0076] and [0083]	1, 7-9 and 11-20 7-9
X	WO 2018/062973 A1 (CELLEX LIFE SCIENCES, INCORPORATED) 5 April 2018 Experimental Example 6	1, 7-9 and 11-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

*Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28/02/2019 *(day/month/year)*	*06/03/2019* *(day/month/year)*
Name and mailing address of the ISA/SG IPOS INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF SINGAPORE **Intellectual Property Office of Singapore** 51 Bras Basah Road #01-01 Manulife Centre Singapore 189554 Email: pct@ipos.gov.sg	Authorized officer Wang Yanyao (Ms) IPOS Customer Service Tel. No.: (+65) 6339 8616

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (revised January 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2018/050596

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LUAN X. ET AL., Engineering exosomes as refined biological nanoplatforms for drug delivery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 10 April 2017, Vol. 38, No. 6, pages 754-763 [Retrieved on 2019-02-28] <DOI: 10.1038/aps.2017.12> Page 757 last paragraph	-
A	HA D. ET AL., Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B.*, 8 March 2016, Vol. 6, No. 4, pages 287–296 [Retrieved on 2019-02-28] <DOI: 10.1016/J.APSB.2016.02.001> Page 292 left column last paragraph and Page 293 Section on "Small interference RNA (siRNA)"	-
A	NGYUEN D. B. ET AL., Microvesicles Released from Human Red Blood Cells: Properties and Potential Applications. *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*, 12 July 2017, Chapter 7, pages 137-161 [Retrieved on 2019-02-28] <DOI: 10.5772/INTECHOPEN.69599> Sections 7.1, 7.3 and 7.4	-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/SG2018/050596

Note: This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in this International Search Report. This Authority is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009/0274630 A1	05/11/2009	TW 200946132 A	16/11/2009
WO 2016/187717 A1	01/12/2016	NONE	
WO 2018/062973 A1	05/04/2018	CN 108473973 A	31/08/2018
		CA 3002520 A1	05/04/2018
		EP 3356522 A1	08/08/2018
		AU 2017335084 A1	10/05/2018

フロントページの続き

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

特許法第３０条第２項適用申請有り 発行者名／ネイチャー・リサーチ（Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）刊行物名／ネイチャー・コミュニケーションズ（ＮＡＴＵＲＥ ＣＯＭＭＵＮＩＣＡＴＩＯＮＳ）、２０１８年、９：２３５９ 発行日／ 平成３０（２０１８）年６月１５日 にて発表

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

・アベニュー ８３，ケア・オブ・シティー・ユニバーシティー・オブ・ホンコン

(72)発明者 ル，ティ・グエット・ミン

香港 ホンコン カウロン，タット・チー・アベニュー ８３，ケア・オブ・シティー・ユニバーシティー・オブ・ホンコン

(72)発明者 ワカス，ムハンマド

香港 ホンコン カウロン，タット・チー・アベニュー ８３，ケア・オブ・シティー・ユニバーシティー・オブ・ホンコン

Ｆターム（参考） 4B065 AA87X AA87Y AB01 BA03 BD25 CA23 CA44