

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-512608

(P2021-512608A)

(43) 公表日 令和3年5月20日 (2021.5.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z 4 B O 6 5
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 6
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 7
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-542161 (P2020-542161)	(71) 出願人	520170759
(86) (22) 出願日	平成31年2月12日 (2019.2.12)		コディアック バイオサイエンス、
(85) 翻訳文提出日	令和2年8月3日 (2020.8.3)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/017731		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02019/157535		1 4 O, ケンブリッジ, ケンブリッジ
(87) 国際公開日	令和1年8月15日 (2019.8.15)		パーク ドライブ 35, スイート
(31) 優先権主張番号	62/629, 563		5 O O
(32) 優先日	平成30年2月12日 (2018.2.12)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 マクロファージ分極のための方法及び組成物

(57) 【要約】

遺伝子を標的とする核酸を含む細胞外小胞を含み、腫瘍関連マクロファージのマクロファージ分極をもたらす組成物及び方法が、本明細書に開示される。特定の実施形態では、がんの治療のためにマクロファージ分極を増加させるための方法及び組成物が、本明細書に開示される。本開示の態様は、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞を包含する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マクロファージとの接触の際に、前記マクロファージを M 2 表現型から M 1 表現型に選択的に再分極させる 1 つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞。

【請求項 2】

前記 1 つ以上の免疫調節成分（複数可）が少なくとも 1 つのマクロファージ標的遺伝子を阻害する、請求項 1 に記載の細胞外小胞。

【請求項 3】

前記細胞外小胞がエキソソームである、請求項 1 または 2 に記載の細胞外小胞。

【請求項 4】

前記免疫調節成分が核酸である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 5】

前記核酸が阻害性 RNA である、請求項 4 に記載の細胞外小胞。

【請求項 6】

前記阻害性 RNA が、アンチセンス RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNA または pre-miRNA である、請求項 5 に記載の細胞外小胞。

【請求項 7】

前記核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である、請求項 4 に記載の細胞外小胞。

【請求項 8】

前記免疫調節成分が、KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、p300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、CEBP/β、p3Kγ、及びPKM2 からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子を阻害する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が、STAT3、STAT6、CEBP/β、p3Kγ、KRAS、及びHIF1-α からなる群から選択される、請求項 8 に記載の細胞外小胞。

【請求項 10】

前記免疫調節成分が、配列番号 1 ～ 6 から選択される配列と少なくとも 95% 同一の配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 9 に記載の細胞外小胞。

【請求項 11】

前記免疫調節成分が、配列番号 1 ～ 6 から選択される配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 10 に記載の細胞外小胞。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が STAT3 である、請求項 9 に記載の細胞外小胞。

【請求項 13】

前記免疫調節成分が STAT3 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 12 に記載の細胞外小胞。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が KRAS である、請求項 9 に記載の細胞外小胞。

【請求項 15】

前記免疫調節成分が野生型ヒト KRAS を標的とする阻害性 RNA である、請求項 14 に記載の細胞外小胞。

【請求項 16】

前記阻害性 RNA がマウス Kras^{G12D} も標的とする、請求項 15 に記載の細胞外小胞。

【請求項 17】

前記マクロファージが腫瘍常在マクロファージである、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 18】

前記腫瘍が脾腫瘍である、請求項 17 に記載の細胞外小胞。

【請求項 19】

追加的な免疫調節成分を更に含む、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 20】

前記追加的な免疫調節成分が、小分子薬物、抗体もしくはその活性断片または治療用タンパク質もしくはその活性断片である、請求項 19 に記載の細胞外小胞。

10

【請求項 21】

前記追加的な免疫調節成分が、抗体またはその活性断片である、請求項 20 に記載の細胞外小胞。

【請求項 22】

前記抗体またはその活性断片が、CTLA-4、PD-1、またはPD-L1に結合する免疫チェックポイント阻害剤、またはCSF1-Rに結合する阻害剤である、請求項 21 に記載の細胞外小胞。

【請求項 23】

前記抗体またはその活性断片が、イピリムマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはニボルマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはセミプリマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはペムブロリズマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはアテゾリズマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはアベルマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはデュルバルマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはペキシダルチニブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはPLX7486のCDRに少なくとも95%同一であるか、またはARRY-382のCDRに少なくとも95%同一であるか、またはJNJ-40346527のCDRに少なくとも95%同一であるか、またはBLZ945のCDRに少なくとも95%同一であるか、またはエマクツズマブのCDRに少なくとも95%同一であるか、またはAMG820のCDRに少なくとも95%同一であるか、またはIMC-CS4のCDRに少なくとも95%同一であるか、またはカビラリズマブのCDRに少なくとも95%同一であるCDRを含む、請求項 22 に記載の細胞外小胞。

20

30

【請求項 24】

前記抗体またはその活性断片が、イピリムマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、IMC-CS4、及びカビラリズマブからなる群から選択される少なくとも1つの抗体である、請求項 23 に記載の細胞外小胞。

【請求項 25】

前記抗体またはその活性断片が、イピリムマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、IMC-CS4、及びカビラリズマブからなる群から選択される抗体と結合について競合する少なくとも1つの抗体である、請求項 22 に記載の細胞外小胞。

40

【請求項 26】

PTGFRNまたはその断片を更に含む、請求項 20 ～ 25 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 27】

前記抗体またはその断片がPTGFRNまたはその断片に融合される、請求項 26 に記載の細胞外小胞。

【請求項 28】

50

比較が、細胞外小胞取り込みアッセイ、標的遺伝子発現アッセイ、下流遺伝子発現アッセイ、サイトカイン放出アッセイ及びマクロファージ細胞表面タンパク質アッセイからなる群から選択されるアッセイを使用して決定される、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 29】

前記 M2 マクロファージが、M2a、M2b、及び M2c マクロファージからなる群から選択される腫瘍関連マクロファージである、上記の請求項のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 30】

前記 M1 マクロファージが、分極前の前記 M2 マクロファージと比較して、 $INF\gamma$ 、 $IL-12$ 、 $IL-23$ 、 $TNF\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1$ 、 $CCL9$ 、 $CCL10$ 及び $CCL11$ からなる群から選択される炎症性サイトカイン及びケモカインの増加した分泌を呈する、上記の請求項のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

10

【請求項 31】

前記 M1 マクロファージが、分極前の前記 M2 マクロファージと比較して、 $IL-10$ 、 $TGF\beta$ 、 $PGE2$ 、 $CCL2$ 、 $CCL17$ 、 $CCL18$ 、 $CCL22$ 及び $CCL24$ からなる群から選択される免疫抑制性サイトカイン及びケモカインの減少した分泌を呈する、上記の請求項のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 32】

前記 M1 マクロファージが、分極前の前記 M2 マクロファージと比較して、増加した腫瘍関連抗原を発現する、上記の請求項のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

20

【請求項 33】

前記 M1 マクロファージが、分極前の前記 M2 マクロファージと比較して、 $CD8^+T$ 細胞及び／またはナチュラルキラー細胞の刺激を増加させる、上記の請求項のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 34】

請求項 1～33 のいずれか一項に記載の細胞外小胞を含む、薬学的組成物。

【請求項 35】

それを必要とする患者において疾患を治療する方法であって、請求項 1～33 のいずれか一項に記載の細胞外小胞または請求項 34 に記載の薬学的組成物を前記患者に投与し、それによって前記患者における前記疾患を治療することを含む、前記方法。

30

【請求項 36】

前記疾患ががんである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記患者がヒトである、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記免疫調節成分ががん原遺伝子を標的とする阻害性 RNA である、請求項 35～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記がん原遺伝子がヒト KRS である、請求項 38 に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記がんが膀胱癌である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

少なくとも第 2 の療法で実行することを更に含む、請求項 35～40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記第 2 の療法が、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、または免疫療法を含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記投与することが、静脈内、腹腔内及び腫瘍内投与からなる群から選択される経路を

50

介する、請求項 26～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

マクロファージにおいて遺伝子発現を調節する方法であって、前記マクロファージを等モル量（複数可）の免疫調節成分単体に接触させることと比較して、前記マクロファージを、少なくとも 1 つの遺伝子を阻害し、それにより M2 表現型から M1 表現型へのマクロファージ分極を増加させる 1 つ以上の前記免疫調節成分を含む細胞外小胞と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 45】

前記接触させることがエキスピボまたはインビボである、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記接触させることがインビボである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記インビボで接触させることが対象に前記細胞外小胞を投与することを含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記投与することが、静脈内、腹腔内及び腫瘍内投与からなる群から選択される経路を介する、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

前記対象がヒトである、請求項 46～48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記対象が、がん及び繊維症から選択される状態に罹患している、請求項 46～49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記状態が膵癌である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記細胞外小胞がエキソソームである、請求項 44～51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記免疫調節成分が核酸である、請求項 44～50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

前記核酸が阻害性 RNA である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記阻害性 RNA が、アンチセンス RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNA または pre-miRNA である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が、KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、CEBP/β、Pi3Kγ、及び PKM2 からなる群から選択される、請求項 44～56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が、STAT3、STAT6、CEBP/β、Pi3Kγ、KRAS、及び HIF1-α からなる群から選択される、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記免疫調節成分が、配列番号 1～6 から選択される配列と少なくとも 95% 同一の配

10

20

30

40

50

列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記免疫調節成分が、配列番号 1～6 から選択される配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が S T A T 3 である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 62】

前記免疫調節成分が S T A T 3 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が K R A S である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 64】

前記免疫調節成分が野生型ヒト K R A S を標的とする阻害性 R N A である、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

対象における膵癌を治療する方法であって、ヒト野生型 K R A S を標的とする阻害性 R N A を含む細胞外小胞を前記対象に投与することを含み、前記治療が、M 2 表現型から M 1 表現型への腫瘍常在マクロファージの分極の割合を、ヒト K R A S ^{G 1 2 D} を標的とする阻害性 R N A で治療された患者において観察されるものよりも高いレベルに増加させる、前記方法。

【請求項 66】

前記腫瘍常在マクロファージの分極の割合が、腫瘍試料から得られた腫瘍常在マクロファージのエキスピオアッセイを使用して決定される、請求項 65 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子を標的とする核酸を保持する細胞外小胞を含み、腫瘍関連マクロファージのマクロファージ分極をもたらす組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫療法は、免疫応答を誘発、増強、または抑制することによる疾患の治療である。がん免疫療法は、通常、化学療法及び放射線療法のような従来のがん療法よりも少ない副作用を有する。1つのアプローチでは、がん免疫療法は、患者自身のマクロファージを刺激してがん細胞を攻撃するために使用されている。マクロファージは異なる表現型を示し、例えば、マクロファージはがん促進性であり得るか、またはマクロファージは抗がん活性を持つことができる。M 2 表現型、または「代替的に活性化されたマクロファージ」は、典型的には、免疫系の抑制ならびに細胞外のマトリックス及び組織リモデリング活動の産生のような、がん促進活性を呈する。M 1 表現型、または「古典的に活性化されたマクロファージ」は、典型的には、腫瘍細胞が認識及び攻撃され得るように、腫瘍細胞の食作用及び獲得免疫の刺激のような抗がん活性を呈する。マクロファージ分極（すなわち、M 1 表現型への変換）を促進する免疫調節方法及び組成物の改善が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本開示の態様は、マクロファージとの接触の際に、マクロファージを M 2 表現型から M 1 表現型に選択的に再分極させる 1 つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞を包含する。いくつかの態様では、本開示は、マクロファージとの接触の際に、マクロファージを M 2 表現型から M 1 表現型に選択的に再分極させる 1 つ以上の免疫調節成分を含むエキソソームである細胞外小胞を包含する。

【0004】

いくつかの態様では、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含み、免疫調節成分（複数可）は、核酸、例えば、阻害性RNA、例えば、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAもしくはpre-miRNA、または、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）であるか、または、例えば、免疫調節成分は、配列番号1～6から選択される配列に少なくとも95%同一の配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0005】

いくつかの態様では、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含み、免疫調節（成分）、例えば、核酸、例えば、阻害性RNA、例えば、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAもしくはpre-miRNA、または、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、または、例えば、免疫調節成分は、配列番号1～6から選択される配列に少なくとも95%同一の配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、例えば、少なくとも1つの遺伝子が、KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、p300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、CEBP/β、PI3Kγ、及びPKM2、例えば、STAT3、STAT6、CEBP/β、PI3Kγ、KRAS、及びHIF1-α、例えば、STAT3、例えば、KRASからなる群から選択される、少なくとも1つのマクロファージ標的遺伝子を阻害する。

【0006】

いくつかの態様では、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージと接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含み、免疫調節成分はSTAT3を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0007】

いくつかの態様では、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージと接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含み、免疫調節成分はKRASを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0008】

いくつかの態様では、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージと接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含み、免疫調節成分は、KRAS、例えば、野生型ヒトKRAS、または野生型ヒトKRAS及びマウスKRAS^{G12D}も標的とする阻害性RNA、例えば、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAまたはpre-miRNAである。

【0009】

上記の態様のいずれかでは、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）、例えば、核酸、阻害性RNA、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAまたはpre-miRNA、またはASOを含み、マクロファージは腫瘍（例えば、膀胱腫瘍）常在マクロファージである。

【0010】

上記の態様のいずれかでは、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ

10

20

30

40

50

以上の免疫調節成分（複数可）、例えば、核酸、阻害性RNA、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAまたはpre-miRNA、またはASOを含み、追加的な免疫調節成分、例えば、小分子薬剤、抗体もしくはその活性断片、例えば、CTLA-4、PD-1、もしくはPD-L1に結合する免疫チェックポイント阻害剤、またはCSF1-Rに結合する阻害剤、または治療用タンパク質もしくはその活性断片を更に含む。

【0011】

上記の態様のいずれかでは、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）、例えば、核酸、阻害性RNA、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAまたはpre-miRNA、またはASOを含み、追加的な免疫調節成分、例えば、抗体またはその活性断片、例えば、CTLA-4、PD-1、またはPD-L1に結合する免疫チェックポイント阻害剤またはCSF1-Rに結合する阻害剤を更に含む、抗体もしくはその活性断片は、イピリマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはニボルマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはセミプリマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはペムブロリズマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはアテゾリズマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはアベルマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはデュルバルマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはペキシダルチニブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはPLX7486のCDRに少なくとも95%同一、もしくはARRY-382のCDRに少なくとも95%同一、もしくはJNJ-40346527のCDRに少なくとも95%同一、もしくはBLZ945のCDRに少なくとも95%同一、もしくはエマクツズマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはAMG820のCDRに少なくとも95%同一、もしくはIMC-CS4のCDRに少なくとも95%同一、もしくはカビラリズマブのCDRに少なくとも95%同一であるCDRを含むか、または抗体もしくはその活性断片は、イピリマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、IMC-CS4及びカビラリズマブからなる群から選択される少なくとも1つの抗体であるか、または抗体もしくはその活性断片は、イピリマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、IMC-CS4及びカビラリズマブからなる群から選択される抗体と結合について競合する少なくとも1つの抗体である。

【0012】

細胞外小胞、例えば、エキソソームは、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）、例えば、核酸、阻害性RNA、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAまたはpre-miRNA、またはASOを含み、追加的な免疫調節成分、例えば、抗体またはその活性断片、例えば、CTLA-4、PD-1、またはPD-L1に結合する免疫チェックポイント阻害剤またはCSF1-Rに結合する阻害剤を更に含む、抗体もしくはその活性断片は、イピリマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはニボルマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはセミプリマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはペムブロリズマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはアテゾリズマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはアベルマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはデュルバルマブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはペキシダルチニブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはPLX7486のCDRに少なくとも95%同一、もしくはARRY-382のCDRに少なくとも95%同一、もしくはJNJ-40346527のCDRに少なくとも95%同一、もしくはBLZ945のCDRに少なくとも95%同一、もしくはエマクツズマ

10

20

30

40

50

ブのCDRに少なくとも95%同一、もしくはAMG820のCDRに少なくとも95%同一、もしくはIMC-CS4のCDRに少なくとも95%同一、もしくはカビラリズマブのCDRに少なくとも95%同一であるCDRを含むか、または抗体もしくはその活性断片は、イピリムマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、IMC-CS4及びカビラリズマブからなる群から選択される少なくとも1つの抗体であるか、または抗体もしくはその活性断片は、イピリムマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、IMC-CS4及びカビラリズマブからなる群から選択される抗体と結合について競合する少なくとも1つの抗体である、上記の態様のいずれかでは、それは、PTGFRNまたはその断片を更に含み、抗体またはその断片は、任意選択で、PTGFRNまたはその断片に融合され得る。

【0013】

上記の態様のいずれかでは、比較は、細胞外小胞取り込みアッセイ、標的遺伝子発現アッセイ、下流遺伝子発現アッセイ、サイトカイン放出アッセイ及びマクロファージ細胞表面タンパク質からなる群から選択されるアッセイを使用して決定される。

【0014】

上記の態様のいずれかでは、M2マクロファージは腫瘍関連マクロファージであり、M2a、M2b、及びM2cマクロファージからなる群から選択される腫瘍関連マクロファージである。

【0015】

上記の態様のいずれかでは、M1マクロファージは、分極前のM2マクロファージと比較して、INF γ 、IL-12、IL-23、TNF α 、IL-6、IL-1、CCL9、CXCL10及びCXCL11からなる群から選択される炎症性サイトカイン及びケモカインの増加した分泌を呈し、及び／または分極前のM2マクロファージと比較して、IL-10、TGF β 、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22、及びCCL24からなる群から選択される免疫抑制性サイトカイン及びケモカインの減少した分泌を呈し、及び／または分極前のM2マクロファージと比較して、増加した腫瘍関連抗原を発現し、及び／または分極前のM2マクロファージと比較して、CD8⁺T細胞及び／またはナチュラルキラー細胞の刺激を増加させる。

【0016】

態様では、本開示は、マクロファージとの接触の際に、マクロファージをM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞、例えば、エキソソームを含む薬学的組成物を包含する。

【0017】

いくつかの態様では、本開示は、それを必要とする患者（例えば、ヒト）において疾患（例えば、例えば膀胱癌のようながん）を治療する方法を包含し、上記の態様のいずれかの細胞外小胞、例えば、マクロファージとの接触の際に、マクロファージを上記の態様のいずれかのM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）（例えば、がん原遺伝子を標的とする阻害性RNA（例えば、KRAS））を含むエキソソームを投与すること（例えば、静脈内、腹腔内及び腫瘍内投与からなる群から選択される経路を介して）を含むか、または、上記の態様のいずれかの細胞外小胞、例えば、マクロファージとの接触の際に、マクロファージを上記の態様のいずれかのM2表現型からM1表現型に選択的に再分極させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含むエキソソームを含む薬学的組成物を投与することを含む。

【0018】

いくつかの態様では、本開示は、上記の治療方法を包含し、第2の療法、例えば、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、または免疫療法を更に含む。

【0019】

いくつかの態様では、本開示は、少なくとも1つの遺伝子を阻害し、それにより等モル量（複数可）の免疫調節成分単体とマクロファージを接触させることと比較して、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させる1つ以上の免疫調節成分を含む細胞外小胞とマクロファージを接触させることを含む、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する方法を包含する。

【0020】

いくつかの態様では、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する方法は、少なくとも1つの遺伝子を阻害し、それによりマクロファージを等モル量（複数可）の免疫調節成分単体と接触させることと比較して、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させる1つ以上の免疫調節成分を含む細胞外小胞とマクロファージをインビボまたはインビトロで接触させることを含む。

10

【0021】

いくつかの態様では、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する方法は、少なくとも1つの遺伝子を阻害し、それによりマクロファージを等モル量（複数可）の免疫調節成分単体と接触させることと比較して、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させる1つ以上の免疫調節成分を含む細胞外小胞とマクロファージをインビボで接触させる（例えば、静脈内、腹腔内、及び腫瘍内投与からなる群から選択される経路により、例えば、細胞外小胞を対象、例えば、ヒト対象に投与することによる）ことを含む。

【0022】

いくつかの態様では、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する上に開示された方法の対象は、がん（例えば、肺癌）及び線維症から選択される状態に罹患している。

20

【0023】

いくつかの態様では、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する上に開示された方法のいずれかにおいて使用される細胞外小胞はエクソソームであり、免疫調節成分は核酸、例えば、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAまたはpre-miRNAのような阻害性RNAである。

【0024】

いくつかの態様では、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する上に開示された方法のいずれかにおいて使用される細胞外小胞はエクソソームであり、免疫調節成分は核酸、例えば、ASOである。

30

【0025】

いくつかの態様では、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する上に開示された方法のいずれかにおいて使用される細胞外小胞はエクソソームであり、免疫調節成分は核酸、例えば、配列番号1～6から選択される配列に95%同一の配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは配列番号1～6から選択される配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、少なくとも1つの遺伝子は、KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、CEBP/β、Pi3Kγ、及びPKM2からなる群から、またはSTAT3、STAT6、CEBP/β、Pi3Kγ、KRAS、及びHIF1-αから選択されるか、またはSTAT3であるか、またはKRASであり、KRASの場合には、免疫調節成分は任意選択で野生型ヒトKRASを標的とする阻害性RNAであり得る。

40

【0026】

いくつかの態様では、本開示は、ヒト野生型KRASを標的とする阻害性RNAを含む細胞外小胞を対象に投与することを含む、対象における肺癌を治療する方法を提供し、治療は、腫瘍常在マクロファージのM2表現型からM1表現型への分極の割合を、ヒトKRAS^{G12D}を標的とする阻害性RNAで治療された患者において観察されるものよりも高いレベルに増加させる。

50

【0027】

いくつかの態様では、本開示は対象における膵癌を治療する上記の方法を提供し、腫瘍常在マクロファージの分極の割合は、腫瘍試料から得られた腫瘍常在マクロファージのエキスピボアッセイを使用して決定される。

【0028】

本明細書では、マクロファージの活性を改変できる1つ以上の免疫調節成分で選択、濃縮、または操作された細胞外小胞を含み、マクロファージのM2表現型からM1表現型へのスイッチングを促進し（マクロファージ分極）、がんと闘う患者の免疫系を高める組成物及び方法が、本明細書に提供される。

【0029】

したがって、第1の態様では、1つ以上の免疫調節成分、例えば、標的細胞において少なくとも1つの遺伝子を阻害する核酸分子を含む細胞外小胞が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態では、標的細胞はマクロファージであり、遺伝子阻害は、等モル量の免疫調節成分（複数可）単体と比較して、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させる。ある特定の実施形態では、細胞外小胞はエキソソームである。ある特定の実施形態では、核酸は阻害性RNAである。ある特定の実施形態では、阻害性RNAは、アンチセンスRNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、pri-miRNAまたはpre-miRNAである。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子は、KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、CEBP β 、PI3K γ 、及びPKM2からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、遺伝子はKRASである。ある特定の実施形態では、核酸は、野生型ヒトKRASを標的とする阻害性RNAである。ある特定の実施形態では、阻害性RNAはまた、マウスKras^{G12D}を標的とする。ある特定の実施形態では、マクロファージは腫瘍常在マクロファージである。ある特定の実施形態では、がんは膵癌である。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は追加的な免疫調節成分を更に含む。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、小分子薬物、抗体または治療用タンパク質である。ある特定の実施形態では、抗体は免疫チェックポイント阻害剤である。ある特定の態様では、上記の細胞外小胞のいずれかを含む薬学的組成物が、本明細書に提供される。

【0030】

ある特定の態様では、本明細書に記載の細胞外小胞または薬学的組成物を患者に投与し、それにより患者における疾患を治療することを含む、それを必要とする患者における疾患を治療する方法が、本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、この疾患は、がんである。ある特定の実施形態では、がんは膵癌である。いくつかの実施形態では、疾患は線維化状態である。いくつかの実施形態では、線維化状態は、肺線維症、肝線維症、または膵線維症である。ある特定の実施形態では、肝線維症は、非アルコール性脂肪性肝炎、またはNASHである。ある特定の実施形態では、患者はヒトである。ある特定の実施形態では、核酸は、がん原遺伝子を標的とする阻害性RNAである。ある特定の実施形態では、がん原遺伝子はヒトKRASである。ある特定の実施形態では、がんは膵癌である。ある特定の実施形態では、方法は、少なくとも第2の療法を実行することを更に含む。ある特定の実施形態では、第2の療法は、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、または免疫療法を含む。

【0031】

ある特定の実施形態では、M2マクロファージは、M2a、M2b、及びM2cマクロファージからなる群から選択される腫瘍関連マクロファージである。ある特定の実施形態では、M1マクロファージは、分極前のM2マクロファージと比較して、INF γ 、IL-12、IL-23、TNF α 、IL-6、IL-1、CCL9、CXCL10及びCXCL11からなる群から選択される炎症性サイトカイン及びケモカインの増加した分泌を呈する。ある特定の実施形態では、M1マクロファージは、分極前のM2マクロファ

ジと比較して、IL-10、TGF β 、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及びCCL24からなる群から選択される免疫抑制性サイトカイン及びケモカインの減少した分泌を呈する。ある特定の実施形態では、M1マクロファージは、分極前のM2マクロファージと比較して、増加した腫瘍関連抗原を発現する。ある特定の実施形態では、M1マクロファージは、分極前のM2マクロファージと比較して、CD8⁺T細胞及び／またはナチュラルキラー細胞の刺激を増加させる。

【0032】

ある特定の態様では、ヒト野生型KRASを標的とする阻害性RNAを含む細胞外小胞を対象に投与することを含む、対象における腫瘍を治療する方法が本明細書に記載され、治療は、腫瘍常在マクロファージのM2表現型からM1表現型への分極の割合を、ヒトKRAS^{G12D}を標的とする阻害性RNAで治療された患者において観察されるものよりも高いレベルに増加させる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】遺伝子の各々を標的とする増加する量のsiRNAのトランスフェクション後の、Stat3、Stat6、Cebp β -1、Pi3K γ 、CEBP β -2、及びKrasの遺伝子発現レベルを示す。

【図2】それぞれStat3、Stat6、Cebp β -1、Pi3K γ 、CEBP β -2、及びKrasを標的とする増加する量のsiRNAのトランスフェクション後のArg1発現を示す。スクランブルされたsiRNAトランスフェクトマクロファージを、対照として使用した。

【図3】6つのマクロファージ亜集団（M0、M1、M2a、M2c、M2++、及びTAM）の総細胞GFP強度により決定されたエクソソーム取り込みを示す。

【図4】総蛍光強度によって測定されたM2またはM0マクロファージによる遊離アンチセンスオリゴ（Free-ASO）及びASO負荷されたエクソソーム（Exo-ASO）の取り込みを示す。

【図5】図5Aは、ナイーブマウスにおける $1 \times 10^{1.1}$ または $1 \times 10^{1.2}$ のGFP含有エクソソームの腹腔内注射後の、インビボでのマクロファージによるエクソソーム取り込みを示す。図5Bは、B16F10担腫瘍マウスにおける単回用量のネイティブ非標識エクソソームまたはCy5標識Exo-ASOの注射後のインビボでの腫瘍細胞及びマクロファージによるネイティブエクソソーム及びExo-ASOの更新を示す。

【図6】5 μ Mの遊離コレステロールタグ付きASO、またはコレステロールタグ付きASOで負荷された 1×10^5 または 1×10^6 のエクソソームのいずれかとのインキュベーション後のM2分極マウスRAW264.7細胞におけるStat3発現を示す。STAT3を標的とする5つの異なるコレステロールタグ付きASOを、試験した。ASO4.1、二本鎖MOEケミストリー；ASO5.1及びASO5.2、一本鎖O-メチルケミストリー；ASO5.3及びASO5.4、一本鎖MOEケミストリー。未処理の分極マクロファージ及び未修飾のエクソソームとインキュベートされた分極マクロファージを、陰性対照として使用した。Stat3 siRNAトランスフェクトマクロファージを、陽性対照として使用した。

【図7】5 μ Mの遊離コレステロールタグ付きASO、またはコレステロールタグ付きASOで負荷された 1×10^5 または 1×10^6 のエクソソームのいずれかとのインキュベーション後のM2分極マウスRAW264.7細胞におけるArg1転写レベルを示す。STAT3を標的とする5つの異なるコレステロールタグ付きASOを、試験した。ASO4.1、二本鎖MOEケミストリー；ASO5.1及びASO5.2、一本鎖O-メチルケミストリー；ASO5.3及びASO5.4、一本鎖MOEケミストリー。未処理の分極マクロファージ及び未修飾のエクソソームとインキュベートされた分極マクロファージを、陰性対照として使用した。Stat3 siRNAトランスフェクトマクロファージを、陽性対照として使用した。

【図8】図8Aは、STAT3についての高（4 μ M）用量のASOまたは高（4 μ M）

10

20

30

40

50

用量及び低（ $0.4 \mu\text{M}$ ）用量の Exo-A SO とのインキュベーション後の M2 分極マウス RAW264.7 細胞における STAT3 発現を示す。図 8 B は、 KRAS についての高（ $4 \mu\text{M}$ ）用量の ASO または Exo-A SO とのインキュベーション後の M2 分極マウス RAW264.7 細胞における KRAS 発現を示す。図 8 C は、 $\text{C/EBP}\beta$ についての高（ $4 \mu\text{M}$ ）用量及び低（ $0.4 \mu\text{M}$ ）用量の ASO または Exo-A SO とのインキュベーション後の M2 分極マウス RAW264.7 細胞における $\text{C/EBP}\beta$ 発現を示す。

【図 9】図 9 A は、異なる用量の遊離 STAT3 ASO または STAT3 Exo-A SO での処理後の、3 名の別個のドナーからの初代ヒトマクロファージにおける STAT3 転写レベルを示す。各処理の IC50 及び遊離 STAT3 ASO と比較した STAT3 Exo-A SO の改善倍率が提示される。図 9 B は、異なる用量の遊離 STAT3 ASO または STAT3 Exo-A SO での処理後の、3 名の別個のドナーからの初代ヒトマクロファージにおける CD163 レベルを示す。各処理の IC50 及び遊離 STAT3 ASO と比較した STAT3 Exo-A SO の改善倍率が提示される。

【図 10】それぞれ $\text{HIF1}\alpha$ 、 $\text{Pik3K}\gamma$ 、 CEBP/β 、 STAT6 、及び STAT3 についての $4 \mu\text{M}$ の遊離 ASO または Exo-A SO での処理後のヒト M2 マクロファージにおける標的遺伝子発現を示す。未処理ヒト M2 マクロファージ及び $4 \mu\text{M}$ のスクランブルされた Exo-A SO で処理されたヒト M2 マクロファージを、対照として使用した。

【図 11】それぞれ $\text{HIF1}\alpha$ 、 $\text{Pik3K}\gamma$ 、 CEBP/β 、 STAT6 、及び STAT3 についての $4 \mu\text{M}$ の遊離 ASO または Exo-A SO での処理後のヒト M2 マクロファージにおける CD163 発現を示す。未処理ヒト M2 マクロファージ及び $4 \mu\text{M}$ のスクランブルされた Exo-A SO で処理されたヒト M2 マクロファージを、対照として使用した。

【図 12】図 12 A は、 $4 \mu\text{M}$ の遊離 STAT3 ASO 、 $4 \mu\text{M}$ の STAT3 Exo-A SO 、 $4 \mu\text{M}$ のスクランブルされた Exo-A SO 、ネイティブエキソソーム、または C188-9 、 LPS の存在下または非存在下での STAT3 の小分子阻害剤での処理後の IL-12 の誘導を示す。図 12 B は、 $4 \mu\text{M}$ の遊離 STAT3 ASO 、 $4 \mu\text{M}$ の STAT3 Exo-A SO 、 $4 \mu\text{M}$ のスクランブルされた Exo-A SO 、ネイティブエキソソーム、または C188-9 、 LPS の存在下または非存在下での STAT3 の小分子阻害剤での処理後の IL-23 の誘導を示す。

【図 13 A】図 13 A は、未修飾のエキソソーム（ EV のみ）、及び濃度一致した Stat3 遊離 ASO 及び Stat3 Exo-A SO での処理後の STAT3 転写レベルを示す。

【図 13 B】図 13 B は、未修飾のエキソソーム（ EV のみ）、及び濃度一致した Stat3 遊離 ASO 及び Stat3 Exo-A SO での処理後の CD163 転写レベルを示す。

【図 13 C】図 13 C は、未修飾のエキソソーム（ EV のみ）、及び濃度一致した Stat3 遊離 ASO 及び Stat3 Exo-A SO での処理後の $\text{TGF}\beta$ 転写レベルを示す。

【図 13 D】図 13 D は、未修飾のエキソソーム（ EV のみ）、及び濃度一致した Stat3 遊離 ASO 及び Stat3 Exo-A SO での処理後の STAT6 転写レベルを示す。

【図 14】それぞれ STAT3 （ MOE 及び LNA ケミストリーの両方）、 STAT6 （ MOE ケミストリー）、 CEBP/β （ MOE ケミストリー）に対して ASO で負荷されたエキソソームでの処理後の $\text{TGF}\beta$ 発現レベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

マクロファージ分極は、マクロファージがそれらの微小環境からの信号に応答して異なる機能プログラムを採用するプロセスである。この能力は、生物におけるそれらの複数の

10

20

30

40

50

役割に関連する。それらは、自然免疫系の強力なエフェクター細胞であるが、細胞破片の除去、胚発生及び組織修復においても重要である。

【0035】

マクロファージの表現型は大まかに2つの群、M1（古典的に活性化されたマクロファージ）及びM2（代替的に活性化されたマクロファージ）に分けられる。この大まかな分類は、培養されたマクロファージが特定の状態へスイッチングするそれらの表現型を刺激する分子で処理されたインビトロ研究に基づく。M1マクロファージは、炎症促進性であり、食作用ならびに炎症促進性サイトカイン及び殺菌分子の分泌のような、病原体に対する直接的な宿主防御において重要である。M2マクロファージは全く逆の機能、炎症の解消段階及び損傷した組織の修復の制御を有する。例えば、Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 496 (7446), 445–455、Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164 (12), 6166–6173を参照されたい。多くの固形腫瘍は、多くの場合、腫瘍関連マクロファージ（TAM）として知られるM2マクロファージの型を含む、骨髄リッチな細胞浸潤により特徴付けられる。M2マクロファージ（TAMのような）は、代謝酵素アルギナーゼ（Arg1）の発現を促進する高レベルのリン酸化STAT3及びSTAT6を発現する。TAMは、例えば、がん細胞の運動性、転移形成及び血管新生の促進のような多くの腫瘍促進活性を媒介し、TAM形成は、発生する腫瘍に存在する微小環境因子に依存する。TAMは、例えば、IL-10、TGFβ、PGE2のような免疫抑制性サイトカイン、及び非常に少量のNOまたはROI、及び低レベルの炎症性サイトカイン（IL-12、IL-1β、TNFα、IL-6）を産生する。「古典的に活性化された」M1マクロファージと比較して、TAMによる腫瘍関連抗原の提示は、T及びNK細胞の抗腫瘍機能の刺激もそうであるように、減少する。M1マクロファージとは異なり、TAMは腫瘍細胞を溶解できない。https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization_cite_note-Sica2008-31したがって、TAM及び他のM2マクロファージを標的とすることは、TAMの動員と分布を変更するか、既存のTAMを枯渇させるか、またはM2表現型からM1表現型へTAMの再教育を誘導するいずれかが薬剤の送達を通じて実証されているように、がんに対する新規の治療戦略を提供する。

【0036】

本発明のエキソソーム治療法は、これらの疾患の文脈において異常なマクロファージをM1表現型に「再分極すること」により、がん及び線維症のような疾患を治療するための組織常在微小環境を促進するためのM2マクロファージに対する選択的効果を有する。本明細書に記載のエキソソームは、ヒトの疾患を治療するためにM2マクロファージをM1表現型に再分極させる経路に関与する候補を作成するために、エキソソーム表面上またはエキソソーム内腔内で様々な生物学的活性分子を用いて精密に操作される。

【0037】

腫瘍関連M2分極マクロファージ、またはTAMは、T細胞増殖及びエフェクター機能を効果的に抑制し、腫瘍成長を促進できる。M1表現型へのTAMの復帰もまた、CSF-1受容体に配向されたマクロファージを枯渇させる抗体を使用して報告されている。これらのアプローチは、狭い治療ウィンドウ、及び意図されたよう異常なM2マクロファージだけでなく、全てのマクロファージを標的とすることによる特異性の欠如により、臨床試験において限定した成功を示している。かかるマクロファージの大量の枯渇は、増加した感染リスク及び他の安全上の懸念を生じると予想されるであろう。本発明のエキソソームは、マクロファージに対する天然のエキソソーム配向性により、M2マクロファージを

より選択的に標的とし、機能のバランスを所望のM1表現型に傾ける。これらのエクソソームは、マクロファージを再分極させ、抗腫瘍免疫応答に必要な炎症性サイトカインの所望のスペクトルの産生を生じる。以下の例に示されるように、エクソソームは、インビトロで免疫抑制性M2マクロファージをM1表現型に再プログラムした。

【0038】

腫瘍微小環境において誘導される免疫抑制に加えて、M2分極マクロファージは、線維芽細胞の蓄積を誘導してコラーゲン沈着及び組織再構築をもたらし、最終的には組織線維症を生じる、細胞シグナル伝達に關与する重要なサイトカインであるトランスフォーミング増殖因子ベータ、またはTGF β を大量に分泌する。これらのM2マクロファージを再プログラミングしてSTAT3のような主要なシグナル伝達分子を標的とすることによりTGF β 産生を低下させることは、肺線維症の前臨床モデルにおいて有益な活性を有することが、示されている。STAT3を標的とするいくつかの小分子アプローチが採用されているが、異常なM2マクロファージ内のみでの阻害の特異性の欠如は、処理に対するこのアプローチが実行可能になることを防止した。本明細書に記載されるある特定のエクソソームは、M2マクロファージにおける主要な経路を選択的に標的化し、それらが肺及び他の組織線維症症候群におけるSTAT3及び他の細胞経路を標的とすることを可能にする。

10

【0039】

免疫系のマクロファージを調節するために有用な細胞外小胞が、本明細書に開示される。これらの細胞外小胞は、等モル量（複数可）の1つ以上の免疫調節成分（複数可）単体と比較して、マクロファージとの接触の際に、少なくとも1つのマクロファージ標的遺伝子を阻害し、それによりマクロファージ分極をM2表現型からM1表現型に増加させる1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む。細胞外小胞を産生するための方法、ならびにがん及び、例えば、繊維症状態のような他の免疫系関連疾患を治療するためにこれらの細胞外小胞を使用する方法も、提供される。

20

【0040】

本発明をより詳細に記載する前に、本発明は、記載される特定の実施形態に限定されず、したがって、言うまでもなく、変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定するものとしては意図されないことも理解されたい。

30

【0041】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限値と下限値との間の各介在値、及びその表示された範囲の任意の他の表示値（stated value）または介在値（intervening value）が、文脈が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の10分の1まで、本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、より小さい範囲内に独立して含まれることができ、表示された範囲内の任意の具体的に除外された限界値を条件として、本発明内にも包含される。表示された範囲が限界値の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界値の片方または両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

40

【0042】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じの意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法及び材料は本発明の実施または試験においても使用され得るが、代表的な例示的方法及び材料が次に記載される。

【0043】

本明細書に引用された全ての刊行物及び特許は、個々の刊行物または特許が参照によって組み込まれることが具体的かつ個々に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれ、刊行物が引用されるのに関連した方法及び／または材料を開示及び記載するために、参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0044】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。同様に、用語「少なくとも1つ」は、複数の指示対象を含む（すなわち、文脈が別途明確に指示しない限り、語句「1つ以上」と同等である）。特許請求の範囲は、任意の要素を除外するように作成し得ることにさらに留意されたい。したがって、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連した「単に」、「のみ」等のような排他的な専門用語の使用のため、または否定的な制限の使用のための先行詞として役立つよう意図される。

【0045】

用語「約」は、数値を改変するために使用される際に、当業者によって容易に決定され得るように、記載された技術を実践する目的のために記載された値と機能的に同等である表示値の変動を包含することが意図される。ある特定の実施形態では、用語「約」は、表示値からの $+/-5\%$ 、 $+/-10\%$ 、 $+/-20\%$ 、 $+/-30\%$ 、 $+/-40\%$ または $+/-50\%$ の変動を含む。

【0046】

本開示を読むと当業者には明らかであるように、本明細書に記載及び例示される個々の実施形態の各々は、本発明の範囲または趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のうちのいずれかの特徴から容易に切り離され得るか、または組み合わせられ得る別個の成分及び特徴を有する。任意の列挙される方法は、列挙される事象の順で、または論理的に可能な任意の他の順序で行われ得る。

【0047】

本発明を更に説明する際に、本方法を実施する際の使用のための本系は、より詳細に議論され、その後、関連する方法の概説が後に続く。

【0048】

本明細書で使用される場合、用語「細胞外小胞」は、内部空間を封入する膜を含む細胞由来の小胞を指す。細胞外小胞は、それらが由来する細胞よりも小さい直径を有する全ての膜結合小胞を含む。一般的に、細胞外小胞は直径が 20 nm ～ 1000 nm の範囲であり、内部空間内で、細胞外小胞の外部表面に表示されて、及び／または膜をまたいで、いずれかで、様々な高分子カーゴを含むことができる。カーゴは、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、小分子、及び／またはそれらの組み合わせを含むことができる。例として、かつ限定することなく、細胞外小胞は、アポトーシス小体、細胞の断片、直接的操作または間接的操作による細胞由来の小胞（例えば、連続押出またはアルカリ溶液での処理による）、小胞化オルガネラ、及び生細胞により産生される小胞（例えば、直接原形質膜出芽または後期エンドソームの原形質膜との融合による）を含む。細胞外小胞は、生きているもしくは死んだ生物、外植された組織もしくは器官、及び／または培養された細胞に由来し得る。細胞外小胞の種は、例えば、すべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、共有の米国特許第10,195,290号に記載されるような、エキソソーム及びナノ小胞を含む。

【0049】

本明細書で使用される場合、用語「エキソソーム」は、内部空間を封入する膜を含み、直接原形質膜出芽によるか、または後期エンドソームの原形質膜との融合により細胞から生成される、細胞由来の小さい（直径 $20\sim 300\text{ nm}$ 、より好ましくは直径 $40\sim 200\text{ nm}$ ）小胞を指す。エキソソームは、細胞外小胞の一種である。エキソソームは、脂質または脂肪酸及びポリペプチドを含み、任意選択で、ペイロード（例えば、治療薬）、レシーバー（例えば、標的化部分）、ポリヌクレオチド（例えば、核酸、RNA、またはDNA）、糖（例えば、単糖、多糖類、もしくはグリカン）または他の分子を含む。エキソソームは、プロデューサー細胞に由来することができ、そのサイズ、密度、生化学的パラメータ、またはそれらの組み合わせに基づいてプロデューサー細胞から単離され得る。

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「ナノ小胞」は、内部空間を封入する膜を含み、ナノ小胞が操作なしではプロデューサー細胞によって産生されないように直接的操作または間接的操作により細胞から生成される、細胞由来の小さい（直径20～250nm、より好ましくは直径30～150nm）小胞を指す。プロデューサー細胞の適切な操作は、連続押出、アルカリ溶液での処理、超音波処理、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。ナノ小胞の産生は、いくつかの例では、プロデューサー細胞の破壊を生じ得る。好ましくは、ナノ小胞の集団は、原形質膜からの直接出芽または後期エンドソームの原形質膜との融合により、プロデューサー細胞に由来する小胞を実質的に含まない。ナノ小胞は、細胞外小胞の一種である。ナノ小胞は、脂質または脂肪酸及びポリペプチドを含み、任意選択で、ペイロード（例えば、治療薬）、レシーバー（例えば、標的化部分）、ポリヌクレオチド（例えば、核酸、RNA、またはDNA）、糖（例えば、単糖、多糖類、もしくはグリカン）または他の分子を含む。ナノ小胞は、ナノ小胞が操作に従ってプロデューサー細胞に由来すると、そのサイズ、密度、生化学的パラメータ、またはそれらの組み合わせに基づいてプロデューサー細胞から単離され得る。

【0051】

本明細書で使用される用語「M2表現型」は、1つ以上の腫瘍促進活性を呈するか、または当業者に、CD8⁺T細胞及び／またはナチュラルキラー細胞の低下した刺激または刺激の欠如；腫瘍細胞の食作用の欠如；M2関連サイトカイン（例えば、IL-10、TGFβ、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及びCCL24）の分泌及び／または発現；成長因子（例えば、VEGF-A、VEGF-C、EGF、及びTGFβ）の分泌及び／または発現；転移酵素（例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼMMP2、MMP9、システインカテプシンプロテアーゼ）の分泌及び／または発現；免疫抑制性因子（例えば、基質L-アルギニンを誘導性一酸化窒素シンターゼ（iNOS）から引き抜くアルギナーゼI（ArgI））の分泌／発現；細胞表面マーカーYM1、FIZZ1、デクチン-1、MGLの発現、M2関連miRNA（例えば、miRNA146a、miRNA146b、及びmiR-223）の発現（例えば、Moser, D. M., & Edwards, J. P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-966; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20; and Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520-5299、及び、各々が全ての目的のために参照により組み込まれる、それらに引用される参照文献を参照されたい）及び／または以下に列挙されるM1関連因子の低下した発現／分泌または低下したM1関連活性に関連すると知られるマクロファージを指し、参照試料は、M1活性マクロファージの集団を含む。インビトロでのM1活性化は、グラム陰性細菌について典型的な細菌性リポ多糖（LPS）及びグラム陽性細菌について典型的なリポテイコ酸（LTA）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）またはLPS及びインターフェロングamma（IFN-γ）の組み合わせのような、TLRリガンドでの処理により誘発される。Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000) M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173、Krausgruber, Thomas, et al. "IRF5 promotes inflammatory mac

rophage polarization and TH1-TH17 responses." *Nature immunology* 12. 3 (2011): 231-238 及び Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Fl000Prime Reports*, 6 (March), 1-13、及び、各々が全ての目的のために参照により組み込まれる、それらに引用される参考文献を参照されたい。

【0052】

本明細書で使用される用語「M1表現型」は、これらに限定されないが、CD8⁺ T細胞及び／またはナチュラルキラー細胞の刺激、腫瘍細胞の食作用、M1関連サイトカイン（例えば、INF γ 、IL-12、IL-23、TNF α 、IL-6、IL-1、CCL5、CCL9、CXCL10及びCXCL11）の分泌及び／または発現、M1関連miRNA（例えば、miRNA155、miR-33）の発現（例えば、Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8 (12), 958-96; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41 (1), 14-20; and Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10 (5), 520-5299、及び、各々が全ての目的のために参照により組み込まれる、それらに引用される参考文献を参照されたい）及び／またはM2関連因子の低下した発現／分泌、または少なくとも1つの参照試料と比較して、上に列挙される低下したM2関連活性のようなM1表現型に関連すると当業者に知られる抗腫瘍活性またはマーカーを呈するマクロファージを指し、参照試料はM2関連マクロファージの集団を含む。インビトロでのM2活性化は、IL-4及びIL-13により誘発される（例えば、全ての目的のために参照により組み込まれるLiu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014) Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10 (5), 520-529を参照されたい）。

【0053】

本明細書で使用される用語「マクロファージ分極」は、マクロファージのM2表現型からM1表現型への変化を指し、及び／または少なくとも1つの参照試料（例えば、同じ患者から試験試料または履歴データの前に採取された試料）と比較して、M1表現型を呈するマクロファージの患者で見出されるマクロファージ（例えば、腫瘍に関連するマクロファージ、または循環マクロファージ）の集団の割合の増加を指す。例えば、全ての目的のために参照により組み込まれるMills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000) M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164 (12), 6166-6173、Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8 (12), 958-969、及びXue, J., Schmidt, S. V. and Schultze, J. L. (2014), Transcriptome-Based Networ

k Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. Immunity, 40 (2) L 274-288を参照されたい。

【0054】

用語「細胞外小胞送達」または「細胞外小胞の送達」は、対象の標的組織、細胞及び／または器官への細胞外小胞の投与及び局在化を指す。いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、標的細胞の細胞質に送達され得る。他の実施形態では、免疫調節成分は、標的細胞の膜に送達される。いくつかの実施形態では、細胞外小胞の膜は、標的細胞の膜と融合する。

【0055】

本明細書で使用される場合、用語「プロデューサー細胞」は、細胞外小胞が単離され得る任意の細胞を指す。プロデューサー細胞は、細胞外小胞に対する供給源として役立つ細胞である。プロデューサー細胞は、タンパク質、脂質、糖、または核酸成分を細胞外小胞と共有できる。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞は、改変された細胞または人工細胞である。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞は、培養または単離された細胞である。ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、細胞株である。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞株は、ヒト胎児腎細胞株である。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞株は、HEK293SF細胞株である。ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、初代細胞である。いくつかの特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、例えば、Bリンパ球、Tリンパ球、樹状細胞、マスト細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、抗原提示細胞、Tヘルパー細胞、または制御性T細胞（Treg細胞）のような免疫細胞である。

【0056】

本明細書で使用される「膜」は、1つ以上の生物学的化合物、典型的には脂質、及び任意選択でポリペプチド及び／または炭水化物を含む外部空間から内部空間を分離する境界層である。いくつかの実施形態では、膜は脂質及び脂肪酸を含む。いくつかの実施形態では、膜は、リン脂質、糖脂質、脂肪酸、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、ステロール、コレステロール、及びホスファチジルセリンを含む。これらの実施形態のいくつかでは、膜は、1つ以上のポリペプチド及び／またはグリカンのような1つ以上の多糖類を更に含む。細胞外小胞は、本明細書で定義される膜を含む。

【0057】

本明細書で使用される場合、用語「免疫調節成分」は、薬剤と接触し、免疫細胞（例えばマクロファージまたは他の免疫細胞）を改変する標的（例えば、例としてこれらに限定されないが、KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-アルファ、HIF1-ベータ、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、CEBP β 、Pi3K γ 、及びPKM2を含む標的遺伝子）に作用する治療薬を指す。細胞外小胞及び／またはプロデューサー細胞中に導入され得る免疫調節成分は、阻害性核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、siRNA、miRNA、アンチセンスRNA、shRNA、lncRNA、pri-miRNA及びpre-miRNA）、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体、及び／または抗原結合断片、免疫チェックポイント阻害剤のモジュレーターまたは免疫チェックポイント阻害剤のリガンド、表面抗原及びそれらの誘導体、及び／またはサイトカイン及びそれらの誘導体のようなポリヌクレオチドのような治療薬を含むことができる。ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、阻害性核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、siRNA、miRNA、アンチセンスRNA、shRNA、lncRNA、pri-miRNA及びpre-miRNA）である。例えば、全ての目的のために参照により組み込まれるWeiss, B. (ed.) : Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA: Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Rat

10

20

30

40

50

on, FL, 1997、Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". *Nature*. 411 (6836) : 494-988、Bartel DP (January 2004) "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function". *Cell*. 116 (2) : 281-97、Paddison, PJ; Caudy, AA; Bernstein, E; Hannon, GJ; Conklin, DS (15 April 2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells". *Genes & Development*. 16 (8) : 948-58、Ma L, Bajic VB, Zhang Z (June 2013) "On the classification of long non-coding RNAs". *RNA Biology*. 10 (6) : 925-33、及び Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (March 2003). "A uniform system for microRNA annotation". *RNA*. 9 (3) : 277-9を参照されたい。

【0058】

本明細書で使用される場合、語句「阻害する核酸分子」または「阻害性核酸」は、標的遺伝子と相互作用するように細胞中に導入される際に、その標的遺伝子の発現または活性の阻害を生じる任意の核酸を指す。阻害する核酸分子、すなわち阻害性核酸は、DNAまたは阻害性RNA（例えば、siRNA、miRNA、アンチセンスRNA、shRNA、lncRNA、pre-miRNA、またはmRNA）であり得、該RNAは一本鎖であるか、二本鎖であるか、または一本鎖及び二本鎖領域の両方を含む。いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である。ASOは、一本鎖または二本鎖のDNA、RNA、またはDNA/RNAハイブリッドであり得る。例えば、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、*Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA: Novel Pharmacological and Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997を参照されたい。「EXO ASO」は、小胞膜（例えば、コレステロールまたは脂肪酸アシル誘導体化ASOと共に発生する）との相互作用を通じて、または電気穿孔のような技法を使用して小胞内腔中に負荷することによって、または、例えば、操作されたプロデューサー細胞からの細胞外小胞の単離が後に続く、所望のASOをコードする構築物をプロデューサー細胞中に導入するためのトランスフェクションまたは形質導入によるようなプロデューサー細胞の遺伝子操作を介して、例えば、エキソソームのような細胞外小胞に物理的に関連する。

【0059】

用語「レシーバー」は、細胞外小胞を標的に導き、及び／または細胞外小胞の対象の標的との相互作用を促進する分子を指す。いくつかの実施形態では、レシーバーは、本明細書で「レシーバーポリペプチド」としても時々称されるポリペプチドである。いくつかの実施形態では、レシーバーは、対象の標的組織へ導かれた輸送によるように、対象の組織中の免疫調節成分の濃度を増加させることができる。レシーバーの例は、表3に列挙される例を含むが、これらに限定されない。

【0060】

用語「標的」は、その活性が本開示の免疫調節成分（すなわち、標的遺伝子）によって調節される遺伝子を指すことができる。ある特定の実施形態では、標的遺伝子は、例えば

、阻害性ASOのような細胞外小胞に関連する（すなわち、膜表面に結合する、脂質二重層内に挿入される、または小胞の封入容積内に封入される）核酸分子によって阻害される。標的遺伝子の例は、KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、CEBP/β、Pi3Kγ、及びPKM2を含むが、これらに限定されない。「標的」はまた、本開示の細胞外小胞が導かれる細胞（すなわち、標的細胞）を指すことができる。ある特定の実施形態では、標的細胞は、免疫細胞（例えば、マクロファージ）である。ある特定の実施形態では、標的細胞は、造血幹細胞または多能性幹細胞である。ある特定の実施形態では、標的細胞は、循環マクロファージである。ある特定の実施形態では、標的細胞は、腫瘍常在マクロファージ（すなわち、腫瘍微小環境内、腫瘍組織内、または腫瘍表面近傍に位置するマクロファージ）である。追加的に、「標的」はまた、その活性が本開示の免疫調節成分との接触により調節される標的細胞上のタンパク質、または本開示の細胞外小胞に結合するためのリガンドとして作用するタンパク質（すなわち、標的タンパク質）を指し得る。したがって、ある特定の実施形態では、標的タンパク質は標的細胞上にあり、細胞外小胞と相互作用する。

10

【0061】

「治療薬」または「治療分子」は、有効量で存在する際に、それを必要とする対象に所望の治療効果、薬理的及び／または生理学的効果を生み出す化合物または分子を含む。それは、対象に投与される際に、対象に対する測定可能または伝達可能な効果を有する、例えば、それが疾患、障害または状態の症状を軽減または減少させる任意の化合物、例えば、小分子薬物、または生物製剤（例えば、ポリペプチド薬物または核酸薬物）を含む。

20

【0062】

本明細書で使用される用語「免疫チェックポイント阻害剤」または「チェックポイント阻害剤」は、免疫細胞を抑制する免疫抑制性チェックポイント経路を低下させることによって免疫細胞活性を刺激する治療薬（例えば、PD-1/PD-L1を阻害する薬剤（PD-1を標的とするニボルマブと、セミプリマブとペムブロリズマブ、及び各々PD-L1を標的とするアテゾリズマブと、アベルマブと、デュルバルマブのような）ならびにイピリムマブのようなCTLA-4/B7-1/B7-2を阻害する薬剤）を指す。例えば、Pardoll DM (March 2012) "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy". Nature Reviews. Cancer. 12 (4): 252-64を参照されたい。

30

【0063】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、天然または部分的もしくは全体的に合成的に産生されていようとなかろうと、免疫グロブリン、及びその断片を包含する。この用語はまた、免疫グロブリン結合ドメインに相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を網羅する。「抗体」は、抗原に特異的に結合し認識する免疫グロブリン遺伝子またはその断片からのフレームワーク領域を含むポリペプチドを更に含む。抗体という用語の使用は、抗体全体、ポリクローナル、モノクローナル及び組換え抗体、それらの断片を含むことを意味し、例えば、scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'、及びF(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb、及びFd断片、ダイアボディ(dibody)、及び抗体関連ポリペプチドのような、一本鎖抗体、ヒト化抗体、マウス抗体、キメラ、マウス-ヒト、マウス-霊長類、霊長類-ヒトモノクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、抗体断片を更に含む。抗体は、それらが所望の生物学的活性または機能を呈する限り、二重特異性抗体及び多重特異性抗体を含む。例示的な抗体組成物は、例えば、イピリムマブのようなCTLA-4を阻害する抗体、例えば、ニボルマブ、セミプリマブ及びペムブロリズマブのようなPD-1を阻害するもの、例えば、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブのようなPD-L1を阻害するもの、及び、例えば、ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマ

40

50

クツズマブ、AMG820、IMC-CS4及びカビラリズマブのようなCSFR1を阻害するものを含む。本明細書で使用される用語「抗原結合断片」は、無傷の免疫グロブリンの断片、及び抗原に特異的に結合する能力を有する抗原結合領域を含むポリペプチドの任意の部分を目指す。例えば、抗原結合断片は、 $F(ab')_2$ 断片、Fab'断片、Fab断片、Fv断片、またはscFv断片であり得るが、これらに限定されない。Fab断片は、1つの抗原結合部位を有し、軽鎖及び重鎖の可変領域、軽鎖の定常領域、ならびに重鎖の第1の定常領域CH1を含有する。Fab'断片は、Fab'断片が重鎖CH1領域のC末端に少なくとも1つのシステイン残基を含む重鎖のヒンジ領域を追加的に含むという点で、Fab断片とは異なる。 $F(ab')_2$ は産生され、それにより、Fab'断片のシステイン残基が、ヒンジ領域でジスルフィド結合によって結合される。Fv断片は重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のみを有する最小の抗体断片であり、Fv断片を産生するための組換え技法は当該技術分野で周知である。二本鎖Fv断片は、重鎖可変領域が非共有結合によって軽鎖可変領域に連結されている構造を有することができる。一本鎖Fv(scFv)断片は、一般に、重鎖可変領域がペプチドリンカーを介して軽鎖可変領域に共有結合されているか、または重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がそれらのC末端で互いに直接連結される二本鎖Fv断片のような二量体構造を有することができる。抗原結合断片は、プロテアーゼを使用して取得され得（例えば、抗体全体がFab断片を得るためにパパインで消化され、 $F(ab')_2$ 断片を得るためにペプシンで消化される）、遺伝子組換え技法により調製され得る。dAb断片は、VHドメインからなる。一本鎖抗体分子は、多数の個々の分子を有するポリマー、例えば、二量体、三量体または他のポリマーを含むことができる。

【0064】

語句「核酸分子」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを指す。核酸分子は、染色体DNA及び自己複製プラスミド、ベクター、mRNA、tRNA、siRNA、miRNA等を含む。核酸分子は組換え型であり得、核酸が細胞中に導入される際に、外因性ポリペプチドが発現され得る。用語は、例えば、Selvam C, Mutisya D, Prakash S, Ranganna K, Thilagavathi R. "Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends," Chem Biol Drug Des. 2017 Nov; 90(5): 665-678に記載されるもののような化学的に改変された核酸、例えば、Petersen M, Wengel J (February 2003) "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics". Trends Biotechnol. 21(2): 74-81に記載されるようなロックド核酸(LNA)、及び、例えば、Summerton, J; Weller, D (1997). "Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties". Antisense & Nucleic Acid Drug Development. 7(3): 187-195、Goodchild, J (2011). Therapeutic oligonucleotides. Methods in Molecular Biology. 764. pp. 1-15に記載されるもののような、臨床的に適切な化学的に改変された核酸を包含し、各々は全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0065】

用語「アゴニスト」は、受容体に結合し、受容体を活性化して生物学的応答を生み出す分子を指す。受容体は、内因性アゴニストまたは外因性アゴニストのいずれかによって活性化され得る。内因性アゴニストの非限定的な例は、ホルモン及び神経伝達物質を含む。外因性アゴニストの非限定的な例は、小分子、抗体、合成ペプチド等を含む様々なクラスの化合物を含む。アゴニストは、完全、部分的、または逆アゴニストであり得る。

【0066】

用語「アンタゴニスト」は、受容体に結合すると、それ自体が生物学的応答を誘発する

10

20

30

40

50

よりも、むしろアゴニスト媒介性応答を遮断または抑制する分子を指す。多くのアンタゴニストは、受容体上の構造的に定義された結合部位で内因性リガンドまたは基質と競合することにより、それらの効力を達成する。アンタゴニストの非限定的な例には、アルファ遮断薬、ベータ遮断薬、及びカルシウムチャネル遮断薬が挙げられる。アンタゴニストは、競合的、非競合的、または不競合的アンタゴニストであり得る。

【0067】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的組成物」は、例えば、薬学的に許容される担体及び賦形剤のような1つ以上の他の化学成分と混合または懸濁された細胞外小胞のような、本明細書に記載される1つ以上の化合物を指す。医薬組成物の1つの目的は、細胞外小胞の調製物の対象への投与を促進することである。用語「薬学的に許容される」及びその文法的変形例は、組成物の投与を禁止する程度に望ましくない生理学的効果を生み出すことなく、対象へのまたは対象に対する投与が可能な組成物、担体、希釈剤及び試薬を指す。用語「賦形剤」または「担体」は、化合物の投与を更に促進するために薬学的組成物に添加される不活性物質を指す。用語「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」は、ヒトを含む動物での使用について米国連邦政府の規制機関によって承認されたか、または米国薬局方に列挙されている任意の薬剤、同様に、対象に重大な刺激を引き起こさず、投与された化合物の生物学的活性及び特性を抑止しない任意の担体または希釈剤を包含する。薬学的組成物を調製するのに有用であり、一般に安全で、非毒性であり、望ましい賦形剤及び担体が、含まれる。

【0068】

本明細書で使用される場合、用語「単離する」、「単離された」、及び「単離すること」または「精製する」、「精製された」、及び「精製すること」、同様に「抽出された」及び「抽出すること」は、互換的に使用され、精製、例えば、所望の細胞外小胞調製物の選択または濃縮の1つ以上のプロセスを経た所望の細胞外小胞の調製（例えば、複数の既知または未知の量及び／または濃度）の状態を指す。いくつかの実施形態では、本明細書で使用される単離することまたは精製することは、プロデューサー細胞を含有する試料から細胞外小胞を除去、部分的に除去する（例えば、画分）プロセスである。いくつかの実施形態では、単離された細胞外小胞組成物は検出可能な望ましくない活性を有しないか、または、代替的には、望ましくない活性のレベルもしくは量は、許容されるレベルもしくは量未満である。他の実施形態では、単離された細胞外小胞組成物は、許容される量及び／または量以上の所望の細胞外小胞の量及び／または濃度を有する。他の実施形態では、単離された細胞外小胞組成物は、組成物が得られる出発材料（例えば、プロデューサー細胞調製物）と比較して濃縮される。この濃縮は、出発材料と比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%、または99.9999%超であり得る。いくつかの実施形態では、単離された細胞外小胞調製物は、残留生物学的産物を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、単離された細胞外小胞調製物は、いかなる汚染生物物質も100%含まないか、99%含まないか、98%含まないか、97%含まないか、96%含まないか、または95%含まない。残留生物学的産物は、非生物物質（化学物質を含む）または不要な核酸、タンパク質、脂質、もしくは代謝産物を含むことができる。残留生物学的産物を実質的に含まないことはまた、細胞外小胞組成物が検出可能なプロデューサー細胞を含有しないことと、細胞外小胞のみが検出可能であることを意味し得る。

【0069】

用語「投与」、「投与すること」及びそれらの変形例は、細胞外小胞または薬剤のような組成物を対象中に導入することを指し、1つ以上の追加的な組成物または薬剤の治療効果を生み出すことに一致する任意の予定通りの同時及び順次導入を含む。用量投与のタイミングは、対象内で投与された薬剤の、または突発的曝露に対する一定のレベル（例えば、血漿レベル）を達成するために、例えば、毒性を低下させるか、または脱感作を防止するために選択され得る。これらの結果を達成する方法は、例えば、Goodman &

Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Macmillan Publishing Co. 13th Ed.) に示されている既知の薬物動態原理に基づいて、当該技術分野の開業医に周知である。対象中への組成物または薬剤の導入は、経口的、肺内、鼻腔内、非経口的（静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下）、直腸内、リンパ管内、くも膜下腔内、眼周囲、腫瘍内または局所的を含む、任意の好適な経路による。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。好適な投与経路は、組成物または薬剤がその意図された機能を実行することを可能にする。例えば、好適な経路が静脈内である場合、組成物は、組成物または薬剤を対象の静脈中に導入することによって投与される。

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「調節する」、「調節すること」、「改変する」及び／または「調節因子」は、一般に、例えば、アンタゴニストまたはアゴニストとして作用するためのような、直接的または間接的に特定の濃度、レベル、発現、機能または行動を増加または減少により変更する、例えば、促進／刺激／上方制御または干渉／阻害／下方制御する能力を指す。いくつかの例では、調節因子は、対照に対して、または一般に予想されるであろう活性の平均的レベルに対して、または活性の対照レベルに対して、ある特定の濃度、レベル、活性または機能を増加及び／または減少させることができる。用語「阻害」、「抑制」、「調節」は、免疫調節成分（複数可）を伴わない状態と比較して、標的遺伝子の発現または活性の変化を説明するために本明細書で使用される。阻害は、遺伝子の発現または活性の消失または実質的な消失を指す。抑制は、遺伝子の発現または活性の低下を意味するが、完全な消失または実質的な消失を意味しない。調節は、遺伝子の発現または活性の任意の変更、上昇または下降を意味する。

【0071】

用語「十分な量」は、所望の効果を生み出すのに十分な量、例えば、対象の状態を調節するのに十分な量を意味する。

【0072】

用語「治療有効量」は、疾患の症状を改善するのに有効な量である。予防が療法と見なされ得るため、治療有効量は、「予防的有效量」であり得る。

【0073】

ヌクレオチド配列と参照配列との間の「同一性」パーセントは、必要な場合に、配列を整列させ、ギャップを導入した後、最大配列同一性パーセントを達成するための参照配列中の単一ヌクレオチドと同一であるヌクレオチド配列中の単一ヌクレオチドの割合として定義される。ヌクレオチド配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野内にある様々な手段で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMEGALIGN (DNASTAR)、CLUSTALW、CLUSTAL OMEGA、またはMUSCLEソフトウェアのような公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成され得る。当業者は、比較されている配列の完全長にわたる最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメータを決定することができる。BLASTアルゴリズムの更なる詳細については、Mount, D. W. (2004) Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9を参照されたい。

【0074】

ポリペプチド配列と参照配列との間の「同一性」パーセントは、必要な場合に、配列を整列させ、ギャップを導入した後、最大配列同一性パーセントを達成するための参照配列中のアミノ酸残基と同一であるポリペプチド配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野内にある様々な手段で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMEGALIGN (DNASTAR)、CLUSTALW、CLUSTAL OMEGA、

またはMUSCLEソフトウェアのような公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成され得る。当業者は、比較されている配列の完全長にわたる最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメータを決定することができる。BLASTアルゴリズムの更なる詳細については、Mount, D. W. (2004). Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9を参照されたい。

【0075】

本明細書で使用される場合、用語「実質的に」または「実質的な」は、例えば、特定の空間における実体の存在、レベル、もしくは濃度、別の実体に対するある実体の影響、または処理の影響を指す。例えば、実体の活性、レベル、または濃度は、増加がベースラインに対して2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍、または1000倍である場合、実質的に増加している。実体の活性、レベル、または濃度はまた、増加がベースラインに対して5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、または500%である場合、実質的に増加している。

【0076】

用語「インビボ」は、生きている生物において発生するプロセスを指す。

【0077】

本明細書で使用される用語「哺乳動物」は、ヒト及び非ヒト哺乳動物の両方を含む。

【0078】

本出願で使用される略語は以下を含む。「mRNA」はメッセンジャーRNAを指し、「miRNA」はマイクロRNAを指し、「siRNA」は低分子干渉RNAを指し、「アンチセンスRNA」は、mRNAに相補的な一本鎖RNAを指すが、これはDNAヌクレオチドを追加的に含むことができ、多くの場合アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは「ASO」と称され、「shRNA」は小さいまたは短いヘアピンRNAを指し、「lncRNA」は長い非コードRNAを指し、「dsDNA」は二本鎖DNAを指す。

【0079】

組成物

本開示の態様は、免疫系を制御できる組成物を含む。組成物は、細胞膜を含む細胞外小胞、及び細胞膜に関連するか、または膜結合封入容積内に封入された少なくとも1つの免疫調節成分を含む。膜結合容積内のエンクロージャは、電気穿孔、凍結乾燥を含む技法を使用して、または核酸（ASOをコードする）もしくはタンパク質のような免疫調節成分をコードする構築物を導入するためのプロデューサー細胞（例えば、HEK293細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、及び間葉系幹細胞（MSC）のような）を操作することを通じて、達成され得る。細胞膜との会合は、膜の内側または外側の脂質リーフレットへの結合及び脂質二重層への膜貫通挿入を包含する。いくつかの例では、膜会合は、例えば、プロスタグランジンF₂受容体ネガティブ制御因子（PTGFRN）；ベシジン；（BSG）；免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー2（IGSF2）；免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー3（IGSF3）；免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー8（IGSF8）；インテグリンベータ1（ITGB1）；インテグリンアルファ4（ITGA4）；4F2細胞表面抗原重鎖（SLC3A2）；及びATPトランスポータータンパク質のクラス（足場及び免疫調節成分を含む融合タンパク質の要素を提供できるエキソソームの表面上で高度に濃縮されることが特定されている）（ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4（共有の米国特許第10,195,290号に記載されている）のようなタンパク質（例えば、足場タンパク質またはその断片）を使用して達成される。かかる細胞外小胞及び例示的技法は、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、共有の米国特許第10,195,290号に詳細に記載される。共有の米国特許第10,195,290号に記載されるように、表面処理されたエキソ

10

20

30

40

50

ソームは、これらの足場タンパク質（及びその断片）をエキソソームまたはプロデューサー細胞中に導入するためのPEG誘導融合及び／または超音波融合のような化学的及び／または物理的方法により生成され得る。複合体は、外因性治療用タンパク質と足場タンパク質との間に生成され得る。代替的には、融合タンパク質は、前述の化学的及び／または物理的方法を使用して、足場タンパク質と、例えば、免疫調節タンパク質のような外因性治療用タンパク質とを複合体化し、表面に複合体または融合タンパク質を含有する操作されたエキソソームを産生することによって産生され得る。治療用タンパク質のネイティブな完全長または生物学的活性断片は、足場タンパク質に複合体化することにより、エキソソームの表面に輸送され得る。かかるエキソソームは、細胞のゲノムに挿入された外因性配列を含むプロデューサー細胞から得られることもできる。例えば、外因性配列は、PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2またはATPトランスポーターをコードするゲノム配列の3'または5'末端に位置するゲノム部位に挿入され得る。例えば、外因性配列は、PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2またはATPトランスポーターをコードするゲノム配列に挿入され得る。細胞膜との会合は、免疫調節成分の内部膜表面または外部膜表面への結合、脂質二重層内での免疫調節成分の固定、または脂質二重層を通じた免疫調節成分の拡大を包含する。免疫調節成分は、足場タンパク質に繫留され得るか、または共有の米国特許第10,195,290号に記載されるような足場タンパク質との融合タンパク質として発現され得る。

【0080】

細胞外小胞

様々な実施形態では、組成物は、細胞外小胞を含む。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、共有の米国特許第10,195,290号に記載されるような、内部空間を封入する膜を含む細胞由来小胞である。

【0081】

様々な実施形態では、細胞外小胞は、それが由来する細胞よりも小さな直径を有する膜結合小胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、約20~100nm、20~200nm、20~300nm、20~400nm、20~500nm、20~600nm、20~700nm、20~800nm、20~900nm、30~100nm、30~200nm、30~300nm、30~400nm、30~500nm、30~600nm、30~700nm、30~800nm、30~900nm、40~100nm、40~200nm、40~300nm、40~400nm、40~500nm、40~600nm、40~700nm、40~800nm、40~900nm、50~150nm、50~500nm、50~750nm、100~200nm、100~500nm、または500~1000nmのような、約20~1000nmの最長寸法を有する。

【0082】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、エキソソームである。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、ナノ小胞である。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、アポトーシス小体である。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、細胞の断片である。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、直接的操作または間接的操作によって細胞に由来する小胞である。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、小胞化器官である。様々な実施形態では、細胞外小胞は、生細胞によって産生される小胞である。

【0083】

いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、生きている生物に由来する。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、死んだ生物に由来する。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、外植された組織に由来する。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、外植された器官に由来する。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、培養された細胞に由来する。これらの実施形態のいくつかでは、細胞外小胞が細胞培養系において生成される際に、細胞外小胞は、更に単離される（例えば、培養細胞から細胞外小胞を分離することによって）。分離は、沈降によって達成され得る。例えば、細胞外小胞は、0.5~2.0、0.6

～1.0、0.7～1.0、0.8～1.0、0.9～1.0、1.0～1.1、1.1～1.2、1.2～1.3、1.4～1.5、1.0～1.5、1.5～2.0、及び1.0～2.0 kg/m³の比重を有することができる。分離は、アフィニティ精製によっても達成され得る。例えば、細胞外小胞は、細胞外小胞を含む集団を樹脂に結合することによって精製され得、該樹脂は、細胞外小胞の表面上の1つ以上のタンパク質に対して特異的親和性を有する複数のリガンドを含む。タンパク質は、テトラスパニン（例えば、CD63、CD81、CD9）、EWIタンパク質/免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー（例えば、PTGFRN、IGSF8、IGSF3）、インテグリン（例えば、ITGB1、ITGA4）、ATPトランスポータータンパク質（例えば、ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4）、SLC3A2、BSG、またはCD98hcであり得る。

10

【0084】

様々な実施形態では、細胞外小胞は、脂質または脂肪酸及びポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、糖を更に含む。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、ポリヌクレオチドを更に含む。

【0085】

様々な実施形態では、細胞外小胞膜は、内部表面及び外部表面を含み、内部空間を封入する。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、本明細書に記載されるような免疫調節成分のようなペイロードを更に含む。ある特定の実施形態では、ペイロードは、内部空間内に封入される。ある特定の実施形態では、ペイロードは、細胞外小胞の外部表面上に表示される。ある特定の実施形態では、ペイロードは、細胞外小胞の膜をまたぐ。様々な実施形態では、ペイロードは、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、小分子、及び/またはそれらの組み合わせを含む。ペイロードを用いて細胞外小胞を産生するための方法は、電気穿孔、凍結乾燥、及び細胞外小胞が単離され得るプロデューサー細胞の遺伝子操作を含む。例えば、共有の米国特許第10,195,290号及び上記を参照されたい。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、共有の米国特許第10,195,290号に記載されるように、レシーバー、すなわち、器官、組織、または細胞に特異的であり得る標的化部分を更に含む。標的化部分を有する融合タンパク質が、使用される。例えば、融合タンパク質は、PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2、ATPトランスポーター、またはそれらの断片もしくは変異体、及び標的化部分を含むことができる。標的化部分は、エキソソームを使用した治療のために、エキソソームを特定の器官、組織、または細胞に標的化するために使用され得る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、抗体またはその抗原結合断片である。抗体及びそれらの抗原結合断片は、抗体全体、ポリクローナル、モノクローナル及び組換え抗体、それらの断片を含み、例えば、scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'、及びF(ab')₂、F(ab)₁、Fv、dAb、及びFd断片、ダイアボディ、及び抗体関連ポリペプチドのような、一本鎖抗体、ヒト化抗体、マウス抗体、キメラ、マウスーヒト、マウスー霊長類、霊長類ーヒトモノクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、抗体断片を更に含む。抗体及びそれらの抗原結合断片は、所望の生物学的活性または機能を呈する限り、二重特異性抗体と多重特異性抗体も含む。

20

30

40

【0086】

エキソソーム

様々な実施形態では、細胞外小胞はエキソソームである。ある特定の実施形態では、エキソソームは、プロデューサー細胞によって分泌された小さな膜結合小胞である。

【0087】

いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞からのエキソソームは、約20～290 nm、20～280 nm、20～270 nm、20～260 nm、20～250 nm、20～240 nm、20～230 nm、20～220 nm、20～210 nm、20～200 nm、20～190 nm、20～180 nm、20～170 nm、20～160 nm、

50

20～150nm、20～140nm、20～130nm、20～120nm、20～110nm、20～100nm、20～90nm、20～80nm、20～70nm、20～60nm、20～50nm、20～40nm、20～30nm、30～300nm、30～290nm、30～280nm、30～270nm、30～260nm、30～250nm、30～240nm、30～230nm、30～220nm、30～210nm、30～200nm、30～190nm、30～180nm、30～170nm、30～160nm、30～150nm、30～140nm、30～130nm、30～120nm、30～110nm、30～100nm、30～90nm、30～80nm、30～70nm、30～60nm、30～50nm、30～40nm、40～300nm、40～290nm、40～280nm、40～270nm、40～260nm、40～250nm、40～240nm、40～230nm、40～220nm、40～210nm、40～200nm、40～190nm、40～180nm、40～170nm、40～160nm、40～150nm、40～140nm、40～130nm、40～120nm、40～110nm、40～100nm、40～90nm、40～80nm、40～70nm、40～60nm、40～50nm、50～300nm、50～290nm、50～280nm、50～270nm、50～260nm、50～250nm、50～240nm、50～230nm、50～220nm、50～210nm、50～200nm、50～190nm、50～180nm、50～170nm、50～160nm、50～150nm、50～140nm、50～130nm、50～120nm、50～110nm、50～100nm、50～90nm、50～80nm、50～70nm、50～60nm、60～300nm、60～290nm、60～280nm、60～270nm、60～260nm、60～250nm、60～240nm、60～230nm、60～220nm、60～210nm、60～200nm、60～190nm、60～180nm、60～170nm、60～160nm、60～150nm、60～140nm、60～130nm、60～120nm、60～110nm、60～100nm、60～90nm、60～80nm、60～70nm、70～300nm、70～290nm、70～280nm、70～270nm、70～260nm、70～250nm、70～240nm、70～230nm、70～220nm、70～210nm、70～200nm、70～190nm、70～180nm、70～170nm、70～160nm、70～150nm、70～140nm、70～130nm、70～120nm、70～110nm、70～100nm、70～90nm、70～80nm、80～300nm、80～290nm、80～280nm、80～270nm、80～260nm、80～250nm、80～240nm、80～230nm、80～220nm、80～210nm、80～200nm、80～190nm、80～180nm、80～170nm、80～160nm、80～150nm、80～140nm、80～130nm、80～120nm、80～110nm、80～100nm、80～90nm、90～300nm、90～290nm、90～280nm、90～270nm、90～260nm、90～250nm、90～240nm、90～230nm、90～220nm、90～210nm、90～200nm、90～190nm、90～180nm、90～170nm、90～160nm、90～150nm、90～140nm、90～130nm、90～120nm、90～110nm、90～100nm、100～300nm、110～290nm、120～280nm、130～270nm、140～260nm、150～250nm、160～240nm、170～230nm、180～220nm、または190～210nmのような、約20～300nmの最長寸法を有する。

【0088】

特に好ましい実施形態では、本明細書に記載されるプロデューサー細胞からのエキソソームは、約30～100nmの最長寸法を有する。別の好ましい実施形態では、プロデューサー細胞からのエキソソームは、約20～300nmの最長寸法を有する。別の好ましい実施形態では、プロデューサー細胞からのエキソソームは、約40～200nmの最長寸法を有する。別の実施形態では、本明細書に記載されるエキソソームの集団は、エキソ

ソームの90%が20~300nmの最長寸法を有する集団を含む。別の実施形態では、本明細書に記載されるエキソソームの集団は、エキソソームの95%が20~300nmの最長寸法を有する集団を含む。別の実施形態では、本明細書に記載されるエキソソームの集団は、エキソソームの99%が20~300nmの最長寸法を有する集団を含む。別の実施形態では、本明細書に記載されるエキソソームの集団は、エキソソームの90%が40~200nmの最長寸法を有する集団を含む。別の実施形態では、本明細書に記載されるエキソソームの集団は、エキソソームの95%が40~200nmの最長寸法を有する集団を含む。別の実施形態では、本明細書に記載されるエキソソームの集団は、エキソソームの99%が40~200nmの最長寸法を有する集団を含む。他の好ましい実施形態では、本明細書に記載されるエキソソームまたはエキソソームの集団のサイズは、以下に記載される方法に従って測定される。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、エキソソームは、プロデューサー細胞によって生成される。いくつかの実施形態では、エキソソーム膜は、プロデューサー細胞に由来する1つ以上の分子を含む。いくつかの実施形態では、エキソソームは、細胞培養系中で生成され、単離される（例えば、プロデューサー細胞からエキソソームを分離することによって）。分離は、沈降によって達成され得る。例えば、エキソソームは、0.5~2.0、0.6~1.0、0.7~1.0、0.8~1.0、0.9~1.0、1.0~1.1、1.1~1.2、1.2~1.3、1.4~1.5、1.0~1.5、1.5~2.0、及び1.0~2.0 kg/m³の比重を有することができる。分離は、アフィニティ精製によっても達成され得る。例えば、細胞外小胞は、細胞外小胞を含む集団を樹脂に結合することによって精製され得、該樹脂は、細胞外小胞の表面上の1つ以上のタンパク質に対して特異的親和性を有する複数のリガンドを含む。細胞外小胞の表面上の1つ以上のタンパク質は、テトラスパニン（例えば、CD63、CD81及び/またはCD9）、EWIタンパク質/免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー（例えば、PTGFRN、IGSF8及び/またはIGSF3）、インテグリン（例えば、ITGB1及び/またはITGA4）、ATPトランスポータータンパク質（例えば、ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3及び/またはATP2B4）SLC3A2、BSG、またはCD98hcであり得る。タンパク質は、任意選択で、例えば、チェックポイント阻害活性を有する抗体、抗体断片、scFv等のような、所望の薬理学的活性を有するポリペプチド部分への融合を介して、エキソソームの表面上に表示される免疫調節成分としての活性を追加的に有することができる。かかる抗体は、当該技術分野で既知であり、例えば、CTLA-4を標的とするイピリムマブ、PD-1を標的とするニボルマブ、セミプリマブ及びペムブロリズマブ、ならびに各々がPD-L1を標的とするアテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブである（例えば、参照により本明細書に組み込まれるPardoll DM (March 2012) “The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy”. Nature Reviews. Cancer. 12 (4): 252-64を参照されたい。

20

30

【0090】

いくつかの実施形態では、エキソソーム膜は、内部表面及び外部表面を含む。ある特定の実施形態では、内部表面は、エキソソームの内側コアに面する。ある特定の実施形態では、外部表面は、プロデューサー細胞または標的細胞のエンドソーム、多小胞体、または膜/細胞質と接触し得る。

40

【0091】

いくつかの実施形態では、エキソソーム膜は、脂質及び脂肪酸を含む。いくつかの実施形態では、エキソソーム膜は、リン脂質、糖脂質、脂肪酸、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、ステロール、コレステロール、及びホスファチジルセリンを含む。いくつかの実施形態では、脂質及び脂肪酸は、表1に列挙されたもののうちの1つ以上であり得る。

【0092】

50

ある特定の実施形態では、エキソソームは、内側リーフレット及び外側リーフレットから構成される脂質二重層を含む。内側及び外側リーフレットの組成物は、当該技術分野で既知のトランスバイレイヤー (transbilayer) 分布アッセイによって決定され得、例えば、Kuyper et al. Biochim Biophys Acta 1985 819:170を参照されたい。いくつかの実施形態では、外側リーフレットの組成物は、およそ70~90%のコリンリン脂質、およそ0~15%の酸性リン脂質、及びおよそ5~30%のホスファチジルエタノールアミンである。いくつかの実施形態では、内側リーフレットの組成物は、およそ15~40%のコリンリン脂質、およそ10~50%の酸性リン脂質、及びおよそ30~60%のホスファチジルエタノールアミンである。

10

【0093】

いくつかの実施形態では、エキソソーム膜は、1つ以上のポリペプチドを更に含む。ある特定の実施形態では、エキソソームは、スペクトリン、ミオシン様ポリペプチド、バンド3、SLC4A1、アクチン、アクチン様ポリペプチド、グリセルアルデヒド3-Pデヒドロゲナーゼ (G3PD)、テトラスパニン (例えば、CD63、CD81及び/またはCD9)、Alix及びTSG101、インテグリン (例えば、ITGB1及び/またはITGA4)、セレクチン、CR1、TNFRI、タンパク質分解酵素、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 結合タンパク質またはヒストン、EWIタンパク質/免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー (例えば、PTGFRN、IGSF8及び/またはIGSF3)、ATPトランスポータータンパク質 (例えば、ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3及び/またはATP2B4)、SLC3A2、BSG、またはCD98hc)を含むがこれらに限定されない、以下のリストから選択される1つ以上のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、エキソソームは、表2から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む。

20

【0094】

いくつかの実施形態では、エキソソームは、その表面にポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、エキソソームは、1つ以上のポリペプチドを含有するように改変される。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞は、1つ以上のポリペプチドを含有するように改変される。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞は1つ以上のポリペプチドを天然に含有し、そこに由来するエキソソームもポリペプチドを含有する。任意の所望の表面マーカーのレベルは、エキソソーム上で直接改変され得る (例えば、複合体を組換えにより産生されたポリペプチドと接触させて、複合体の膜への挿入または複合体化をもたらすことによって)。代替的にはまたは加えて、任意の所望の表面マーカーのレベルは、プロデューサー細胞上で直接改変され得る (例えば、複合体を組換えにより産生されたポリペプチドと接触させて、細胞の膜への挿入または複合体化をもたらすことによって)。代替的には、プロデューサー細胞は、所望の表面マーカーを発現させるためにプロデューサー細胞中に外因性核酸を形質導入することにより改変され得る。表面マーカーは、プロデューサー細胞上にすでに天然に存在でき、その場合、外因性構築物は、マーカーの過剰発現及びプロデューサー細胞内またはプロデューサー細胞上でのマーカーの増加した濃度をもたらす得る。代替的には、天然に発現された表面マーカーは、プロデューサー細胞から除去され得る (例えば、プロデューサー細胞において遺伝子サイレンシングを誘導することによって)。ポリペプチドは、エキソソームに異なる機能性を付与できる (例えば、特定の標的化能力、送達機能 (例えば、融合分子)、酵素機能、インビボでの増加または減少した半減期等)。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、CD47、CD55、CD49、CD40、CD133、CD59、グリピカン-1、CD9、CD63、CD81、インテグリン、セレクチン、レクチン、及びカドヘリンを含むが、これらに限定されない。

30

40

【0095】

特定の実施形態では、エキソソームは、その表面上に1つ以上のポリペプチドを含み、

50

該ポリペプチドは、エキソソームの表面上で濃縮されることが最近特定されたタンパク質の群から選択される（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる共有の米国特許出願第62/550,543号及びPCT/US2018/048026に詳細に記載される）。このポリペプチドの群は、プロスタグランジンF₂受容体ネガティブ制御因子（PTGFRN）、ベシジン（BSG）、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー3（IGSF3）、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー8（IGSF8）、インテグリンベータ1（ITGB1）、インテグリンアルファ4（ITGA4）、4F2細胞表面抗原重鎖（SLC3A2）、及びATPトランスポータータンパク質のクラス（ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4）を含む。

10

【0096】

様々な実施形態では、エキソソーム表面上の1つ以上のポリペプチドは、抗体または抗原結合断片を含む。抗体または抗原結合断片は、天然の供給源に由来するか、または部分的もしくは全体的に合成的に産生され得る。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、IgG抗体である。ある特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。いくつかの他の実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、抗原結合断片は、Fab、Fab'、及びF(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb、及びFd断片から選択される。ある特定の実施形態では、抗原結合断片は、scFvまたは(scFv)₂断片である。ある特定の他の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、ナノボディ（登録商標）（単一ドメイン抗体）である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、二重特異性または多重特異性抗体である。様々な実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、メソセリンに結合する。

20

【0097】

いくつかの実施形態では、エキソソームは、その表面上に、（1）PTGFRNまたはその断片及び（2）抗体またはその抗原結合断片を含む融合タンパク質を含み、抗体またはその抗原結合断片は、PD-1、PD-1L、CSF1-R、または他の免疫調節成分に結合する。

【0098】

いくつかの実施形態では、エキソソーム膜は、グリカンのような1つ以上の多糖類を更

30

【0099】

いくつかの実施形態では、エキソソームは、ペイロード（治療薬）を標的に送達する。ペイロードは、エキソソームと接触する標的（例えば、標的細胞）に作用する治療薬である。ある特定の実施形態では、ペイロードは、免疫調節成分、例えば、阻害性RNAである。接触は、インビトロで、または対象において発生できる。エキソソーム及び／またはプロデューサー細胞中に導入され得るペイロードは、ヌクレオチド（例えば、検出可能な部分もしくは毒素を含む、または転写を妨害するヌクレオチド）、核酸（例えば、酵素のようなポリペプチドをコードするDNAもしくはmRNA分子、またはmiRNA、dsDNA、lncRNA、siRNAのような制御機能を有するRNA分子）、アミノ酸（例えば、翻訳を妨害する検出可能な部分または毒素を含むアミノ酸）、ポリペプチド（例えば、酵素）、脂質、炭水化物、小分子（例えば、小分子薬物及び毒素）、ならびにそれらの組み合わせのような治療薬を含む。ある特定の実施形態では、エキソソームは、2つ以上の治療薬を送達する。ある特定の実施形態では、治療薬は、1つ以上の標的遺伝子を阻害する1つ以上の核酸である。ある特定の実施形態では、治療薬は、抗体及び核酸を含む。ある特定の実施形態では、治療薬は、核酸及び小分子を含む。ある特定の実施形態では、治療薬は、臨床候補ペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、及びIMC-CS4等のようなCSF1R阻害剤を含み、例えば、Cannarile MA, Weiss

40

50

er M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Ruttinger D (2017) "Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy". Journal for Immunotherapy of Cancer. 5 (1) : 53に記載される他のもののようなタンパク質性免疫調節成分を含む。Patel S, Player MR (2009) "Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease". Curr Top Med Chem. 9:599-610も参照されたい。モノクローナル抗体であり、転移性膵癌の初期の臨床試験にあるカビラリズマブ (cabira、FPA-008) (A phase I/II dose escalation and expansion study of cabiralizumab (cabira; FPA-008), an anti-CSF1R antibody, in tenosynovial giant cell tumor (TGCT, diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS、A Study of Cabiralzumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread、及び Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer Nov 2017を参照されたい)。ある特定の実施形態では、治療薬は、免疫チェックポイント阻害剤を含む。ある特定の実施形態では、例えば、CTLA-4を標的とするイピリムマブ、PD-1を標的とするニボルマブ、センプリマブ及びペムブロリズマブ、ならびに各々がPD-L1を標的とするアテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブのような抗体における免疫チェックポイント阻害剤。

【0100】

エキソソームは、膜融合を介して標的細胞と相互作用し、エキソソーム組成物中のペイロード (例えば、治療薬) を標的細胞の表面または細胞質に送達できる。いくつかの実施形態では、膜融合は、エキソソームと標的細胞の原形質膜との間で発生する。他の実施形態では、膜融合は、エキソソームと標的細胞のエンドソーム膜との間で発生する。

【0101】

いくつかの実施形態では、エキソソームは、レシーバーポリペプチドを含む。レシーバーポリペプチドは、合成的であり得る。いくつかの実施形態では、レシーバーポリペプチドは、プロデューサー細胞 (例えば、レシーバーポリペプチドをコードする外因性核酸はプロデューサー細胞中に導入される)、またはプロデューサー細胞の外側で作製される組換えレシーバーポリペプチド (例えば、タンパク質発現系により合成される) 中に導入される。いくつかの実施形態では、レシーバーポリペプチド (例えば、組換えにより産生されたポリペプチド) は、直接エキソソーム中に導入される (例えば、エキソソームがプロデューサー細胞から単離された後に)。いくつかの実施形態では、レシーバーポリペプチドは、エキソソームの表面上にあり得る。いくつかの実施形態では、レシーバーポリペプチドは、血液のような対象の循環系中を循環する特定の標的 (例えば、病原体、代謝産物、タンパク質、ポリペプチド複合体または非機能細胞もしくはがん細胞のような細胞のような標的)、または組織 (患部組織のような) に常在する標的にエキソソームを標的とすることができる。

【0102】

いくつかの実施形態では、エキソソームは、合成的である。つまり、エキソソームのプロデューサー細胞からの回収後、追加的な成分を添加するために改変が行われる。例えば、エキソソームは、例えば、プロデューサー細胞から回収された時にエキソソームに見出だされない治療用ポリペプチド、核酸 (DNAもしくはRNAのような) または他のポリヌクレオチド、多糖またはグリカン、脂質または脂肪酸、大きな生物学的、小分子または毒素のようなペイロードを含むことができる。いくつかの実施形態では、エキソソーム

は改変される（例えば、ペイロードを導入すること、または、他の方法では、膜のタンパク質、脂質またはグリカン含有量を変化させることによるように、複合体の含有量を改変することによって）。例えば、エキソソームは、まずプロデューサー細胞から単離され、次いで、必要に応じて改変され、それにより合成エキソソームを生成する。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞は、改変される。例えば、外因性核酸、外因性ポリペプチドまたは小分子または毒素は、プロデューサー細胞中に導入され得る。代替的にまたは加えて、プロデューサー細胞は、他の方法で改変され得る（例えば、細胞膜の脂質またはグリカン含有量を変化させることによるように、細胞または膜含有量を改変することによって）。改変されたプロデューサー細胞から生成されたエキソソームは、プロデューサー細胞の改変のうちの1つ以上を含む。このプロセスは、合成エキソソームを産生する。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞及びプロデューサー細胞から単離されたエキソソームの両方は、本明細書に記載されるように改変される。

10

【0103】

ナノ小胞

様々な実施形態では、細胞外小胞は、ナノ小胞である。ある特定の実施形態では、ナノ小胞は、内部空間を封入する膜を含み、ナノ小胞が操作なしでは細胞によって産生されないように直接的操作または間接的操作により細胞から生成される、細胞由来の小さな小胞である。細胞の適切な操作は、連続押出、アルカリ溶液による処理、超音波処理、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されず、いくつかの例では、プロデューサー細胞の破壊を生じ得る。

20

【0104】

様々な実施形態では、ナノ小胞は、約20～100nm、20～150nm、20～200nm、30～100nm、30～150nm、30～200nm、30～250nm、40～100nm、40～150nm、40～200nm、40～250nm、50～100nm、50～150nm、50～200nm、50～250nm、100～200nm、または150～250nmのような、約20～250nmの最長寸法を有する。

【0105】

様々な実施形態では、ナノ小胞は、プロデューサー細胞に由来する。ある特定の実施形態では、ナノ小胞は、直接的操作または間接的操作によってプロデューサー細胞から生成される。適切な操作は、連続押出、アルカリ溶液による処理、超音波処理、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。これらの実施形態のいくつかでは、操作は、プロデューサー細胞の破壊を生じ得る。いくつかの好ましい実施形態では、ナノ小胞の集団は、原形質膜からの直接出芽または後期エンドソームの原形質膜との融合により、プロデューサー細胞に由来する小胞を実質的に含まない。

30

【0106】

いくつかの実施形態では、ナノ小胞は、そのサイズ、密度、生化学的パラメータ、またはそれらの組み合わせに基づいてプロデューサー細胞から単離される。ある特定の実施形態では、単離は、沈降によって達成され得る。例えば、ナノ小胞は、0.5～2.0、0.6～1.0、0.7～1.0、0.8～1.0、0.9～1.0、1.0～1.1、1.1～1.2、1.2～1.3、1.4～1.5、1.0～1.5、1.5～2.0、及び1.0～2.0kg/m³の比重を有することができる。

40

【0107】

様々な実施形態では、ナノ小胞は、脂質または脂肪酸及びポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ナノ小胞は、糖を更に含む。ある特定の実施形態では、ナノ小胞は、ポリヌクレオチドを更に含む。いくつかの実施形態では、ナノ小胞は、レシーバーを更に含む。いくつかの実施形態では、ナノ小胞は、ペイロードを更に含む。これらの実施形態のいくつかでは、ペイロードは、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、小分子、及び／またはそれらの組み合わせを含む。

【0108】

免疫調節成分

50

一態様では、細胞外小胞、例えば、エキソソームは、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させる少なくとも1つの免疫調節成分を含む。一態様では、M2表現型からM1表現型への増加は、M2マクロファージの集団を含む参照試料に関して評価される。一態様では、本開示の細胞外小胞によって達成される増加は、等モル量の免疫調節成分単体によって達成されるもの以上である。ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、マクロファージ分極を増加させるポリヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、これらに限定されないが、以下の遺伝子：K R A S、H R A S、N R A S、H I F 1-α、H I F 1-β、S p 1、P 3 0 0、L K B 1、A M P K、S T A T 3、S T A T 6、n-MY C、c-MY C、H C A R 1、A 2 A B、I D O、T D O、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、C E B P / β、P i 3 K γ、及び P K M 2 を例として含む、その阻害がM2表現型からM1表現型への増加した分極を促進するがん原遺伝子及び他の型の遺伝子のような、少なくとも1つの遺伝子を阻害する核酸である。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドとタンパク質性免疫調節成分との組み合わせが企図され、例えば、P D - 1、P D - L 1、C T L A - 4 を標的とする抗体または抗体断片（例えば、C T L A - 4 を標的とするイピリムマブ、P D - 1 を標的とするニボルマブ、センプリマブ及びペムブロリズマブ、ならびに各々がP D - L 1 を標的とするアテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ）、C S F 1 R 阻害剤（例えば、臨床候補ベキシダルチニブ、P L X 7 4 8 6、A R R Y - 3 8 2、J N J - 4 0 3 4 6 5 2 7、B L Z 9 4 5、エマクツズマブ、A M G 8 2 0、及び I M C - C S 4、及び、例えば、C a n n a r i l e M A、W e i s s e r M、J a c o b W、J e g g A M、R i e s C H、R u t t i n g e r D (2017) "Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy". Journal for Immunotherapy of Cancer. 5 (1) : 53に記載される他のもののようなタンパク質性免疫調節成分、(Patel S, Player MR (2009) "Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease". Curr Top Med Chem. 9 : 599-610も参照されたい。)モノクローナル抗体であり、転移性膵癌の初期の臨床試験にあるカビラリズマブ (cabira、FPA-008) (A phase I/II dose escalation and expansion study of cabiralizumab (cabira; FPA-008), an anti-CSF1R antibody, in tenosynovial giant cell tumor (TGCT, diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS, A Study of Cabiralizumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread、及び Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer Nov 2017を参照されたく、ならびに、がん及び炎症状態の治療に有用な他の免疫調節成分を含む。

【0109】

これらの実施形態のいくつかでは、核酸は、mRNA、miRNA、siRNA、アンチセンスRNA、shRNA、lncRNA、及びdsDNAを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、核酸は、RNA（例えば、mRNA、miRNA、siRNA、アンチセンスRNA、shRNA、またはlncRNA）である。これらの実施形態のいくつかでは、ポリヌクレオチドがmRNAである際に、それは所望のポリペプチドに翻訳され得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、マイクロRNA (miRNA)、pri-miRNA、またはpre-miRNA分子である。これらの実施形態のいくつかでは、miRNA分子が標的細胞においてネイティブmRNAを発現停止できるように、miRNAは、標的細胞の細胞質に送達される。いくつかの実施形態で

は、ポリヌクレオチドは、がん遺伝子または他の制御不全ポリペプチドの発現に干渉できる低分子干渉RNA (s i RNA) または短いヘアピンRNA (s h RNA) である。これらの実施形態のいくつかでは、s i RNA 分子が標的細胞においてネイティブmRNA を発現停止できるように、s i RNA は、標的細胞の細胞質に送達される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、mRNA に相補的なアンチセンスRNA である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、遺伝子発現を制御し、疾患を調節することができる長い非コードRNA (l n c RNA) である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) である。様々な実施形態では、A S O は、一本鎖または二本鎖のDNA、RNA、またはDNA/RNA ハイブリッドである。例えば、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Ant i s e n s e O l i g o d e o x y n u c l e o t i d e s a n d A n t i s e n s e R N A : N o v e l P h a r m a c o l o g i c a l a n d T h e r a p e u t i c A g e n t s , C R C P r e s s , B o c a R a t o n , F L , 1 9 9 7 を参照されたい。

【0110】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNA に転写され得るDNA である。これらの実施形態のいくつかでは、転写されたRNA は、所望のポリペプチドに翻訳され得る。ある特定の実施形態では、核酸は、K R A S 、H R A S 、N R A S 、H I F 1 - ア ル フ ァ 、H I F 1 - ベータ、S p 1 、P 3 0 0 、L K B 1 、A M P K 、S T A T 3 、S T A T 6 、n - M Y C 、c - M Y C 、H C A R 1 、A 2 A B 、I D O 、T D O 、アルギナーゼ、C E B P / β 、P i 3 K γ 、グルタミナーゼ、及びP K M 2 からなる少なくとも1つの遺伝子を阻害する。ある特定の実施形態では、核酸は、S T A T 3 、S T A T 6 、C E B P / β 、P i 3 K γ 、K R A S 、及びH I F 1 - ア ル フ ァ からなる少なくとも1つの遺伝子を阻害する。ある特定の実施形態では、核酸は、K R A S 、H R A S 、N R A S 、H I F 1 - ア ル フ ァ 、H I F 1 - ベータ、S p 1 、P 3 0 0 、L K B 1 、A M P K 、S T A T 3 、S T A T 6 、n - M Y C 、c - M Y C 、H C A R 1 、A 2 A B 、I D O 、T D O 、アルギナーゼ、C E B P / β 、P i 3 K γ 、グルタミナーゼ、及びP K M 2 からなる少なくとも1つの遺伝子を阻害する阻害性RNA である。ある特定の実施形態では、核酸は、S T A T 3 、S T A T 6 、C E B P / β 、P i 3 K γ 、K R A S 、及びH I F 1 - ア ル フ ァ からなる少なくとも1つの遺伝子を阻害する阻害性RNA である。ある特定の実施形態では、核酸は、K R A S 、H R A S 、N R A S 、H I F 1 - ア ル フ ァ 、H I F 1 - ベータ、S p 1 、P 3 0 0 、L K B 1 、A M P K 、S T A T 3 、S T A T 6 、n - M Y C 、c - M Y C 、H C A R 1 、A 2 A B 、I D O 、T D O 、アルギナーゼ、C E B P / β 、P i 3 K γ 、グルタミナーゼ、及びP K M 2 からなる少なくとも1つの遺伝子を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) である。ある特定の実施形態では、核酸は、S T A T 3 、S T A T 6 、C E B P / β 、P i 3 K γ 、K R A S 、及びH I F 1 - ア ル フ ァ からなる少なくとも1つの遺伝子を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) である。ある特定の実施形態では、核酸は、ヒトK R A S がん原遺伝子を阻害する。ある特定の実施形態では、核酸は、ヒトK R A S がん原遺伝子を阻害する阻害性RNA である。ある特定の実施形態では、核酸は、S T A T 3 を阻害する。

【0111】

本発明のいくつかの実施形態では、核酸は、既知のアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) であり、その例は表0 に列挙される。ある特定の実施形態では、A S O は、既知のA S O 、例えば、表0 に列挙されるものに少なくとも90%~99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S O は、S T A T 3 を阻害する。様々な実施形態では、A S O は、T A A G C T G A T A A T T C A A C T C A (配列番号1) に少なくとも90%~99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S O は、配列番号1 に少なくとも90% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S O は、配列番号1 に少なくとも91% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S O は、配列番号1 に少なくとも92% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S O は、配列番号1 に少なくと

も 93% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 1 に少なくとも 94% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 1 に少なくとも 95% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 1 に少なくとも 96% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 1 に少なくとも 97% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 1 に少なくとも 98% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 1 に少なくとも 99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 1 の配列を含む。いくつかの実施形態では、ASO は、MOE、O-メチル、または LNA ケミストリーによって改変される。いくつかの実施形態では、ASO は、5' または 3' 末端でコレステロールタグを更に含む。

10

【0112】

いくつかの実施形態では、核酸は、STAT6 を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) である。様々な実施形態では、ASO は、TGAGCGAATGGACAGGCTCTT (配列番号 2) に少なくとも 90%~99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 90% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 91% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 92% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 93% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 94% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 95% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 96% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 97% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 98% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 に少なくとも 99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 2 の配列を含む。いくつかの実施形態では、ASO は、MOE、O-メチル、または LNA ケミストリーによって改変される。いくつかの実施形態では、ASO は、5' または 3' 末端でコレステロールタグを更に含む。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、核酸は、CebpB を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) である。様々な実施形態では、ASO は、TGGATTTTAAAGGCAAGCGGC (配列番号 3) に少なくとも 90%~99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 90% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 91% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 92% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 93% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 94% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 95% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 96% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 97% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 98% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 に少なくとも 99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 3 の配列を含む。いくつかの実施形態では、ASO は、MOE、O-メチル、または LNA ケミストリーによって改変される。いくつかの実施形態では、ASO は、5' または 3' 末端でコレステロールタグを更に含む。

30

40

【0114】

いくつかの実施形態では、核酸は、Pi3K γ を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) である。様々な実施形態では、ASO は、TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA (配列番号 4) に少なくとも 90%~99% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 4 に少なくとも 90% 同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、ASO は、配列番号 4 に少なくとも 91% 同一の配列を含む。ある特定の

50

実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも92%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも93%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも94%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも95%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも96%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも97%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも98%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4に少なくとも99%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号4の配列を含む。いくつかの実施形態では、A S Oは
、M O E、Oーメチル、またはL N Aケミストリーによって改変される。いくつかの実施
形態では、A S Oは、5'または3'末端でコレステロールタグを更に含む。 10

【0115】

いくつかの実施形態では、核酸は、H I F 1 α を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオ
チド (A S O) である。様々な実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも90%
~99%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も90%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も91%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も92%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も93%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も94%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も95%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も96%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も97%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も98%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくと
も99%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号5の配列を含
む。いくつかの実施形態では、A S Oは、M O E、Oーメチル、またはL N Aケミストリー
によって改変される。いくつかの実施形態では、A S Oは、5'または3'末端でコレ
ステロールタグを更に含む。 20

【0116】

いくつかの実施形態では、核酸は、H I F 1 α を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオ
チド (A S O) である。様々な実施形態では、A S Oは、G T G C A G T A T T G T A G
C C A G G C (配列番号5) に少なくとも90%~99%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも90%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも91%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも92%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも93%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも94%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも95%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも96%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも97%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも98%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5に少なくとも99%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号5の配列を含む。いくつかの実施形態では、A S Oは
、M O E、Oーメチル、またはL N Aケミストリーによって改変される。いくつかの実施
形態では、A S Oは、5'または3'末端でコレステロールタグを更に含む。 30 40

【0117】

いくつかの実施形態では、核酸は、K r a sを阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチ
ド (A S O) である。様々な実施形態では、A S Oは、G T A G C A T G T A A A T A T
A G C C C (配列番号6) に少なくとも90%~99%同一の配列を含む。ある特定の
実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも90%同一の配列を含む。ある特定の
実 50

施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも91%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも92%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも93%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも94%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも95%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも96%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも97%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも98%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6に少なくとも99%同一の配列を含む。ある特定の実施形態では、A S Oは、配列番号6の配列を含む。いくつかの実施形態では、A S Oは、M O E、Oーメチル、またはL N Aケミストリーによって改変される。いくつかの実施形態では、A S Oは、5'または3'末端でコレステロールタグを更に含む。

10

【0118】

ある特定の実施形態では、組成物は、細胞外小胞、例えば、エキソソームを含み、マクロファージ分極を促進することが知られている小分子、抗体または抗体断片である追加的な免疫調節成分を更に含む。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、コロニー刺激因子1受容体(C S F 1 R)阻害剤である。

【0119】

ある特定の実施形態では、組成物は、抗腫瘍活性を有する追加的な免疫調節成分を含む。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、自然免疫応答を制御する。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、ナチュラルキラー細胞を標的とする。いくつかの他の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、獲得免疫応答を制御する。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、細胞傷害性T細胞を標的とする。

20

【0120】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、細胞外小胞の表面上に位置する。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、細胞外小胞の内側に位置する。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、細胞外小胞の表面上及び内側の両方に位置する。

【0121】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、その完全長形態でプロデューサー細胞において発現される。他の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、エキソソーム表面タンパク質への翻訳融合タンパク質として発現され、エキソソームの表面上の免疫調節化合物の生物学的活性部分のより高いレベルの発現を生じる。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節化合物は、該可溶性タンパク質がエキソソームの表面上に保持されるように、エキソソーム表面タンパク質への翻訳融合タンパク質として発現される可溶性タンパク質である。

30

【0122】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、例えば、A 2 A R、B 7－H 3 (C D 2 7 6)、B 7－H 4 (V T C N 1)、B T L A、C T L A－4、I D O、K I R、L A G 3、N O X 2、P D－1、T I M－3、V I S T A、S I G L E C 7 (C D 3 2 8)及びS I G L E C 9 (C D 3 2 9)のようなネガティブチェックポイント制御因子に対する阻害剤である。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、例えば、P D－L 1及びP D－L 2のようなネガティブチェックポイント制御因子の結合パートナーに対する阻害剤である。

40

【0123】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (C T L A－4)の阻害剤である。これらの実施形態のいくつかでは、C T L A－4阻害剤は、C T L A－4のモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、阻害剤は、C T L A－4のモノクローナル抗体の断片である。ある特定の実施形態では、抗体

50

断片は、C T L A-4 のモノクローナル抗体の s c F v、(s c F v)₂、F a b、F a b'、及び F (a b')₂、F (a b 1)₂、F v、d A b、または F d である。ある特定の実施形態では、阻害剤は、C T L A-4 に対するナノボディ、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である。いくつかの特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、イピリムマブである。いくつかの特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、トレメリムマブである。

【0124】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、プログラム細胞死タンパク質 1 (P D-1) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、プログラム死リガンド 1 (P D-L 1) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、プログラム死リガンド 2 (P D-L 2) の阻害剤である。いくつかの実施形態では、P D-1、P D-L 1、または P D-L 2 の阻害剤は、P D-1、P D-L 1、または P D-L 2 のモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、阻害剤は、P D-1、P D-L 1、または P D-L 2 のモノクローナル抗体の断片である。ある特定の実施形態では、抗体断片は、P D-1、P D-L 1、または P D-L 2 のモノクローナル抗体の s c F v、(s c F v)₂、F a b、F a b'、及び F (a b')₂、F (a b 1)₂、F v、d A b、または F d である。ある特定の実施形態では、阻害剤は、P D-1、P D-L 1、または P D-L 2 に対するナノボディ、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である。いくつかの特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、ニボルマブである。いくつかの特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、ペムブロリズマブである。いくつかの特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、ビディリズマブである。いくつかの特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、アテゾリズマブである。いくつかの特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、アベルマブである。

【0125】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、リンパ球関連遺伝子 3 (L A G 3) の阻害剤である。これらの実施形態のいくつかでは、L A G 3 の阻害剤は、例えば、B M S-986016 のような L A G 3 のモノクローナル抗体である (C l i n i c a l T r i a l s . g o v で " S a f e t y S t u d y o f A n t i - L A G - 3 W i t h a n d W i t h o u t A n t i - P D - 1 i n t h e T r e a t m e n t o f S o l i d T u m o r s " についての臨床試験番号 N C T 0 1 9 6 8 1 0 9 を参照されたい)。

【0126】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、T 細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質 3 (T I M-3) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、B 及び T リンパ球減衰因子 (B T L A) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、I g 及び I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体 (T I G I T) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、T 細胞活性化の V ドメイン I g 抑制因子 (V I S T A) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、アデノシン A 2 a 受容体 (A 2 a R) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (K I R) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、インドールアミン 2, 3-ジオキシゲナーゼ (I D O) の阻害剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、C D 2 0、C D 3 9、または C D 7 3 の阻害剤である。

【0127】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、正の共刺激分子に対する活性化剤である。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、正の共刺激分子の結合パートナーに対する活性化剤である。

【0128】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、アゴニスト抗体または天然リガンドまたは T N F 受容体スーパーファミリーメンバーのような、T N F 受容体スーパーファ

10

20

30

40

50

ミリーメンバーの活性化剤である。ある特定の実施形態では、TNF受容体スーパーファミリーメンバーは、CD120a、CD120b、CD18、OX40、CD40、Fas受容体、M68、CD27、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、RANK、OCIF、TWEAK受容体、TACI、BAFF受容体、ATAR、CD271、CD269、GITR、TROLY、CD358、TRAMP、及びXEDARからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、TNFスーパーファミリーメンバーである。ある特定の実施形態では、TNFスーパーファミリーメンバーは、TNF α 、TNF-C、OX40L、CD40L、FasL、LIGHT、TL1A、CD27L、Siva、CD153、4-1BBリガンド、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITRリガンド、及びEDA-2からなる群から選択される。

10

【0129】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、TNF受容体スーパーファミリーメンバー4（OX40）の活性化剤である。これらの実施形態のいくつかでは、OX40の活性化剤は、OX40のアゴニスト抗体である。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、OX40の活性化剤は、OX40リガンド（OX40L）である。

【0130】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、CD27の活性化剤である。これらの実施形態のいくつかでは、CD27の活性化剤は、CD27のアゴニスト抗体である。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、CD27の活性化剤は、CD27リガンド（CD27L）である。

20

【0131】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、CD40の活性化剤である。これらの実施形態のいくつかでは、CD40の活性化剤は、CD40のアゴニスト抗体である。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、CD40の活性化剤は、CD40リガンド（CD40L）である。

【0132】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、グルコルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）の活性化剤である。これらの実施形態のいくつかでは、GITRの活性化剤は、GITRのアゴニスト抗体である。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、GITRの活性化剤は、GITRの天然リガンドである。

30

【0133】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、4-1BBの活性化剤である。これらの実施形態のいくつかでは、4-1BBの活性化剤は、4-1BBのアゴニスト抗体である。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、4-1BBの活性化剤は、4-1BBの天然リガンドである。

【0134】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、Fas受容体（Fas）である。これらの実施形態のいくつかでは、Fas受容体は、細胞外小胞の表面上に表示される。いくつかの他の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、Fasリガンド（FasL）である。これらの実施形態のいくつかでは、Fasリガンドは、細胞外小胞の表面上に表示される。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、Fas受容体の抗体である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、Fasリガンドの抗体である。

40

【0135】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、CD28スーパーファミリー共刺激分子の活性化剤である。ある特定の実施形態では、CD28スーパーファミリー共刺激分子は、ICOSまたはCD28である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、ICOSL、CD80、またはCD86である。

【0136】

50

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、誘導性T細胞共刺激因子（ICOS）の活性化剤である。これらの実施形態のいくつかでは、ICOSの活性化剤は、ICOSのアゴニスト抗体である。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、ICOSの活性化剤は、ICOSリガンド（ICOSL）である。

【0137】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、CD28の活性化剤である。これらの実施形態のいくつかでは、CD28の活性化剤は、CD28のアゴニスト抗体である。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、CD28の活性化剤は、CD28の天然リガンドである。ある特定の実施形態では、CD28のリガンドは、CD80である。

【0138】

ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、エキソソーム表面タンパク質またはその断片に翻訳によって融合されている可溶性サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-2である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-7である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-15である。

【0139】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、T細胞受容体（TCR）またはその誘導体である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、TCR α 鎖またはその誘導体である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、TCR β 鎖またはその誘導体である。いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、T細胞またはその誘導体の共受容体である。

【0140】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、腫瘍抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、アルファフェトプロテイン（AFP）、がん胎児性抗原（CEA）、上皮腫瘍抗原（ETA）、ムチン1（MUC1）、Tn-MUC1、ムチン16（MUC16）、チロシナーゼ、黒色腫関連抗原（MAGE）、腫瘍タンパク質p53（p53）、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、プログラム死リガンド1（PD-L1）、プログラム死リガンド2（PD-L2）、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、メソセリン、VEGFR、アルファ葉酸受容体、CE7R、IL-3、がん精巣抗原、MART-1 gp100、及びTNF関連アポトーシス誘導性リガンドからなる群から選択される。

【0141】

ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、がん胎児性抗原（CEA）である。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、上皮腫瘍抗原（ETA）である。

【0142】

ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、ムチンである。これらの実施形態のいくつかでは、ムチンは、分泌型ムチンである。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、ムチンは、膜貫通ムチンである。特定の実施形態では、腫瘍抗原は、ムチン1（MUC1）である。特定の実施形態では、腫瘍抗原は、Tn-MUC1である。特定の実施形態では、腫瘍抗原は、ムチン16（MUC16）である。

【0143】

ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、黒色腫関連抗原（MAGE）である。これらの実施形態のいくつかでは、MAGEは、I型MAGEである。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、MAGEは、II型MAGEである。特定の実施形態では、I型MAGEは、MAGE-A2である。特定の実施形態では、I型MAGEは、MAGE-A4である。

【0144】

ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、アルファフェトプロテイン（AFP）である。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍タンパク質p53（p53）である。ある

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、腫瘍抗原は、チロシナーゼである。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、チロシナーゼ関連タンパク質（TRP）である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、プログラム死リガンド1（PD-L1）またはプログラム死リガンド2（PD-L2）である。様々な実施形態では、腫瘍抗原は、CD4、CD8、CD45、CD80、及びCD86からなる群から選択される。

【0145】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、キメラ抗原受容体（CAR）またはその誘導体である。いくつかの実施形態では、CARは、アルファフェトプロテイン（AFP）、がん胎児性抗原（CEA）、上皮腫瘍抗原（ETA）、ムチン1（MUC1）、Tn-MUC1、ムチン16（MUC16）、チロシナーゼ、黒色腫関連抗原（MAGE）、腫瘍タンパク質p53（p53）、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、プログラム死リガンド1（PD-L1）、プログラム死リガンド2（PD-L2）、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、メソセリン、VEGFR、アルファ葉酸受容体、CE7R、IL-3、がん精巢抗原、MART-1 gp100、及びTNF関連アポトーシス誘導性リガンドのうちの1つ以上に結合する。

【0146】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、T細胞受容体または共受容体の活性化剤である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、CD3の活性化剤である。ある特定の実施形態では、活性化剤は、CD3のモノクローナル抗体の断片である。ある特定の実施形態では、抗体断片は、CD3のモノクローナル抗体のscFv、（scFv）₂、Fab、Fab'、及びF（ab'）₂、F（ab1）₂、Fv、dAb、またはFdである。ある特定の実施形態では、活性化剤は、CD3に対するナノボディ、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である。ある特定の実施形態では、追加的な免疫調節成分は、CD28の活性化剤である。ある特定の実施形態では、活性化剤は、CD28のモノクローナル抗体の断片である。ある特定の実施形態では、抗体断片は、CD28のモノクローナル抗体のscFv、（scFv）₂、Fab、Fab'、及びF（ab'）₂、F（ab1）₂、Fv、dAb、またはFdである。ある特定の実施形態では、活性化剤は、CD28に対するナノボディ、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である。

【0147】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、主要組織適合複合体（MHC）またはその誘導体である。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、MHCクラスIまたはその誘導体である。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、MHCクラスIIまたはその誘導体である。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、MHCクラスIIIまたはその誘導体である。

【0148】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、ヒト白血球抗原（HLA）またはその誘導体である。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、またはその誘導体である。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、HLA-E、HLA-F、HLA-G、またはその誘導体である。これらの実施形態のいくつかでは、追加的な免疫調節成分は、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、またはその誘導体である。

【0149】

様々な実施形態では、免疫調節成分は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、多糖、脂質、小分子、または毒素であり得る。

【0150】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、タンパク質、ペプチド、糖脂質、または糖タンパク質であり得る。

【0151】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、アゴニストである。これらの実施形態のいくつかでは、アゴニストは、ホルモンまたは神経伝達物質のような内因性アゴニストである。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、アゴニストは、薬物のような外因性アゴニストである。いくつかの実施形態では、アゴニストは、受容体に結合することなくアゴニスト応答を生み出すことができる物理的アゴニストである。いくつかの実施形態では、アゴニストは、内因性アゴニストよりも大きな最大応答を産生できるスーパーアゴニストである。ある特定の実施形態では、アゴニストは、受容体で完全な効力を有する完全アゴニストである。ある特定の他の実施形態では、アゴニストは、完全アゴニストと比較して、受容体で部分的効力のみを有する部分アゴニストである。いくつかの実施形態では、アゴニストは、受容体の恒常的活性を阻害できる逆アゴニストである。いくつかの実施形態では、アゴニストは、受容体に対する効果を産生するために他のコアゴニストと協働するコアゴニストである。ある特定の実施形態では、アゴニストは、共有結合の形成を通じて受容体に永久的に結合する不可逆的アゴニストである。ある特定の実施形態では、アゴニストは、特定の型の受容体に対する選択的アゴニストである。

10

【0152】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、アンタゴニストである。これらの実施形態のいくつかでは、アンタゴニストは、競合的アンタゴニストであり、受容体を活性化することなく内因性リガンドまたはアゴニストと同じ結合部位で受容体に可逆的に結合する。競合的アンタゴニストは、最大応答を達成するために必要なアゴニストの量に影響できる。これらの実施形態のいくつかの他のものでは、アンタゴニストは非競合的アンタゴニストであり、受容体の活性部位または受容体のアロステリック部位に結合する。非競合的アンタゴニストは、任意の量のアゴニストによって達成され得る最大応答の規模を低下できる。いくつかの他の実施形態では、アンタゴニストは、別個のアロステリック結合部位へのその結合の前にアゴニストによる受容体活性化を必要とする不競合的アンタゴニストである。

20

【0153】

様々な実施形態では、免疫調節成分は、抗体または抗原結合断片を含む。免疫調節成分は、完全長タンパク質またはその断片であり得る。抗体または抗原結合断片は、天然の供給源に由来するか、または部分的もしくは全体的に合成的に産生され得る。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、IgG抗体である。ある特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。いくつかの他の実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、抗原結合断片は、Fab、Fab'、及びF(ab')₂、F(ab)₁、Fv、dAb、及びFd断片から選択される。ある特定の実施形態では、抗原結合断片は、scFvまたは(scFv)₂断片である。ある特定の他の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、ナノボディ（登録商標）（単一ドメイン抗体）である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、二重特異性または多重特異性抗体である。

30

【0154】

様々な実施形態では、抗体または抗原結合断片は、完全にヒトである。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、ヒト化される。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、キメラである。これらの実施形態のいくつかでは、キメラ抗体は、非ヒトV領域ドメイン及びヒトC領域ドメインを有する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、マウスまたは獣医学のような非ヒトである。

40

【0155】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、タンパク質、ペプチド、糖脂質、または糖タンパク質である。

【0156】

様々な実施形態では、組成物は、原子、分子等の、混合物、融合物、組み合わせ、及び複合体を含む、2つ以上の上記の免疫調節成分を含む。ある特定の実施形態では、組成物

50

は、ポリペプチドと組み合わされた核酸を含む。ある特定の実施形態では、組成物は、互いに複合体化した2つ以上のポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、組成物は、生物学的活性分子に複合体化したタンパク質を含む。これらの実施形態のいくつかでは、生物学的活性分子は、プロドラッグである。

【0157】

薬学的組成物

薬学的組成物は、一般に、複数の細胞外小胞と、対象への投与に適した形態の薬学的に許容される賦形剤または担体と、を含む。薬学的に許容される賦形剤または担体は、部分的には、投与される特定の化合物によって、同様に組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、複数の細胞外小胞を含む薬学的組成物の多種多様な好適な製剤がある。(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005)を参照されたい)。医薬組成物は一般に滅菌して製剤化され、米国食品医薬品局の全ての適正製造基準(GMP)規制に完全に準拠する。

10

【0158】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に記載される1つ以上の治療薬及び細胞外小胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、1つ以上の別個の治療剤と同時に投与され、同時投与は、細胞外小胞の投与の前、後または同時の別個の治療剤の投与を含む。

【0159】

薬学的に許容される賦形剤は、ヒトの薬学的使用に対して同様に獣医学的使用に対して許容される賦形剤を含む、一般に安全で、非毒性で、望ましい賦形剤を含む。

20

【0160】

担体または希釈剤の例は、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。薬学的活性物質のためのかかる媒体及び化合物の使用は、当該技術分野で既知である。任意の従来培地または化合物が本明細書に記載される細胞外小胞と不適合でない限り、組成物におけるその使用が企図される。補助的な治療薬はまた、組成物中に組み込まれ得る。典型的には、薬学的組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤化される。細胞外小胞は、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、皮内、経皮、直腸内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、筋肉内経路または吸入剤によって投与され得る。ある特定の実施形態では、細胞外小胞を含む薬学的組成物は、例えば、注射によって静脈内投与される。細胞外小胞は、任意選択で、細胞外小胞が意図される疾患、障害または状態の治療に少なくとも部分的に有効である他の治療薬と組み合わせて投与され得る。

30

【0161】

溶液または懸濁液は、以下の成分、水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような滅菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗微生物化合物、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)のようなキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩のような緩衝液、及び塩化ナトリウムまたはデキストロースのような浸透圧の調整のための化合物を含むことができる。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調整され得る。調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラスもしくはプラスチックから作製された複数用量バイアルに封入され得る。

40

【0162】

注射可能な使用に好適な薬学的組成物は、滅菌水溶液(水溶性の場合)または分散液及び滅菌粉末を含む。静脈内投与については、好適な担体は、生理学的生理食塩水、静菌水、Cremophor EL(商標)(BASF, Parsippany, N. J.)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含む。組成物は一般に滅菌されており、容易な注入性(syringeability)が存在する程度に流動的である。担体は、例えば

50

、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、ならびにそれらの好適な混合物を含有する、溶媒または分散液であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌化合物及び抗真菌化合物、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。所望される場合、等張化合物、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコール、及び塩化ナトリウムは、組成物に添加され得る。注射可能な組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる化合物、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に含めることによってもたらされ得る。

10

【0163】

滅菌注射可能溶液は、細胞外小胞を、所望されるように、有効量で、かつ本明細書に列挙された成分の1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒に組み込むことによって調製され得る。一般に、分散液は、細胞外小胞を、基本的な分散媒と任意の所望の他の成分とを含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法は、活性成分と、事前に滅菌濾過されたその溶液からの任意の追加的な所望の成分との粉末をもたらし、真空乾燥及び凍結乾燥である。細胞外小胞は、細胞外小胞の持続的または拍動性放出を可能にするような様式で製剤化され得るデポー注射またはインプラント調整物の形態で投与され得る。

【0164】

細胞外小胞を含む組成物の全身投与は、経粘膜手段によることもできる。経粘膜投与のために、浸透すべき障壁に適切な浸透剤が製剤に使用される。かかる浸透剤は、一般に当該技術分野で既知であり、例えば、経粘膜投与のための、洗剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、例えば、点鼻薬の使用を通じて達成され得る。

20

【0165】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞を含む薬学的組成物は、薬学的組成物の恩恵を受けるであろう対象に静脈内投与される。ある特定の他の実施形態では、組成物は、リンパ系に、例えば、リンパ内注射によってまたは結節内注射によって（例えば、Sentinel[®] al., PNAS 105(46):17908(2008)を参照されたい）、または筋肉内注射によって、皮下注射によって、胸腺もしくは肝臓への直接注射による皮下投与によって投与される。

30

【0166】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞を含む薬学的組成物は、液体懸濁液として投与される。ある特定の実施形態では、薬学的組成物は、投与に続いてデポーを形成できる製剤として投与される。ある特定の好ましい実施形態では、デポーは、細胞外小胞を循環中に緩徐に放出するか、またはデポー形態のままである。

【0167】

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

40

【0168】

薬学的に許容される担体は、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム（gum acacia）、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシ安息香酸塩、プロピルヒドロキシ安息香酸塩、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び／または鉱油であり得るが、これらに限定されない。薬学的組成物は、潤滑剤、湿潤剤、甘味料、風味増強剤、乳化剤、懸濁剤及び／または保存料を更に含むことができる。

【0169】

50

本明細書に記載される薬学的組成物は、本明細書に記載される細胞外小胞と、任意選択で、薬学的に活性な薬剤または治療剤と、を含む。治療剤は、生物学的薬剤、小分子薬剤、または核酸薬剤であり得る。

【0170】

本明細書に記載される細胞外小胞を含む薬学的組成物を含む剤形が、提供される。いくつかの実施形態では、剤形は、静脈内注射用の液体懸濁液として製剤化される。

【0171】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞の調製物は、残留複製能のある (residual replication-competent) 核酸を損傷するために、放射線、例えば、X線、ガンマ線、ベータ粒子、アルファ粒子、中性子、陽子、元素核、紫外線に曝される。

10

【0172】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞の調製物は、1、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100超、または100kGy超の照射線量を使用するガンマ照射に曝される。

【0173】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞の調製物は、0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000超、または10000mSv超の照射線量を使用するX線照射に曝される。

20

【0174】

方法

本開示の態様はまた、細胞外小胞及び免疫調節成分を含む組成物を産生する方法を含む。いくつかの実施形態では、方法は、プロデューサー細胞から細胞外小胞を得ることによって、プロデューサー細胞が免疫調節成分を天然に含有する、得ることと、任意選択で、得られた細胞外小胞を単離することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、プロデューサー細胞を免疫調節成分で改変することと、改変されたプロデューサー細胞から細胞外小胞を得ることと、任意選択で、得られた細胞外小胞を単離することと、を含む。いくつかの他の実施形態では、方法は、プロデューサー細胞から細胞外小胞を得ることと、得られた細胞外小胞を単離することと、単離された細胞外小胞を免疫調節成分で改変することと、を含む。ある特定の実施形態では、方法は、単離された細胞外小胞を薬学的組成物に製剤化することを更に含む。

30

【0175】

細胞外小胞を産生する方法

免疫調節成分でプロデューサー細胞を改変する方法

様々な実施形態では、方法は、免疫調節成分でプロデューサー細胞を改変することを含む。

【0176】

プロデューサー細胞は、哺乳動物細胞株、植物細胞株、昆虫細胞株、真菌細胞株、または原核細胞株であり得る。ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、哺乳動物細胞株である。哺乳動物細胞株は、ヒト胎児腎 (HEK) 細胞株、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株、HT-1080細胞株、HeLa細胞株、PERC-6細胞株、CEVEC細胞株、線維芽細胞株、羊膜細胞株、上皮細胞株、及び間葉系幹細胞 (MSC) 細胞株を含むが、これらに限定されない。いくつかの好ましい実施形態では、哺乳動物細胞株は、HEK-293細胞、BJヒト包皮繊維芽細胞、fHDF線維芽細胞、AGE-HN (登録商標) 神経前駆細胞、CAP (登録商標) 羊膜細胞、脂肪性間葉系幹細胞、またはRPTC/TERT1細胞であり得る。プロデューサー細胞はまた、初代細胞であり得る。様々な実施形態では、初代細胞は、初代哺乳動物細胞、初代植物細胞、初代昆虫細胞、初代真菌細胞、または初代原核細胞であり得る。

40

50

【0177】

ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、樹状細胞、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、抗原提示細胞、マクロファージ、Tヘルパー細胞、または制御性T細胞（Treg細胞）のような免疫細胞である。

【0178】

様々な実施形態では、免疫調節成分は、プロデューサー細胞中に導入された導入遺伝子またはmRNAからのプロデューサー細胞において発現され得るが、それはトランスフェクション（例えば、Bacchetti S, Graham FL (April 1977) "Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74 (4): 1590-4、Kriegler M (1991) Transfer and Expression: A Laboratory Manual. W. H. Freeman. pp. 96-97、Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (November 1987) "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84 (21): 7413-7、Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (January 1994) "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations". The Journal of Biological Chemistry. 269 (4): 2550-61を参照されたい）、ウイルス形質導入（例えば、Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin R C, Gelbart WM (2000). "Transduction". An Introduction to Genetic Analysis (7th ed.)を参照されたい）、電気穿孔（例えば、Neumann, E; Schaefer-Ridder, M; Wang, Y; Hofschneider, PH (1982) "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields". The EMBO Journal. 1 (7): 841-5）を参照されたい）、押出（例えば、Sharei A, Zoldan J, Adamo A, Sim WY, Cho N, Jackson E, Mao S, Schneider S, Han MJ, Lytton-Jean A, Basto PA, Jhunjhunwala S, Lee J, Heller DA, Kang JW, Hartoularos GC, Kim KS, Anderson DG, Langer R, Jensen KF (February 2013) "A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110 (6): 2082-7を参照されたい）、超音波処理（例えば、Yizhi Song (2007) "Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria". Nucleic Acids Res. 35 (19): e129. を参照されたい）、細胞融合（例えば、Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roma

n R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold G M, Danielson M (November 1987) "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84 (21): 7413-を参照されたい)、または当業者に既知の他の方法による。

【0179】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、トランスフェクションによってプロデューサー細胞に導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、カチオン性脂質及びポリマーのような合成高分子を使用して好適なプロデューサー細胞中に導入され得る (Papapetrou et al., Gene Therapy 12: S118-S130 (2005))。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、電荷相互作用を通じて免疫調節成分と複合体を形成する。これらの実施形態のいくつかでは、正に荷電した複合体は、負に荷電した細胞表面に結合し、エンドサイトーシスによって細胞により取り込まれる。いくつかの他の実施形態では、カチオン性ポリマーは、プロデューサー細胞をトランスフェクトするために使用され得る。これらの実施形態のいくつかでは、カチオン性ポリマーは、ポリエチレンジアミン (PEI) である。ある特定の実施形態では、リン酸カルシウム、シクロデキストリン、またはポリブレンのような化学物質は、免疫調節成分をプロデューサー細胞に導入するために使用され得る。免疫調節成分はまた、粒子媒介性トランスフェクション、「遺伝子銃」、微粒子銃 (biolistic)、または粒子衝撃技術のような物理的方法を使用してプロデューサー細胞中に導入され得る (Papapetrou et al., Gene Therapy 12: S118-S130 (2005))。例えば、ベータガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、または緑色蛍光タンパク質のようなレポーター遺伝子は、プロデューサー細胞のトランスフェクション効率を評価するために使用され得る。

【0180】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、ウイルス形質導入によってプロデューサー細胞に導入される。モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、レンチウイルス、及びスプマウイルスを含む多くのウイルスは、遺伝子導入ビヒクルとして使用され得る。ウイルス媒介性遺伝子導入ビヒクルは、レトロウイルスと同様に、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及びヘルペスウイルスのようなDNAウイルスに基づくベクターを含む。

【0181】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、電気穿孔によってプロデューサー細胞に導入される。電気穿孔は、細胞膜に一時的な孔を作成し、細胞中への様々な分子の導入を可能にする。いくつかの実施形態では、ポリペプチド及び非ポリペプチド治療薬と同様に、DNA及びRNAは、電気穿孔によってプロデューサー細胞中に導入され得る。

【0182】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、マイクロ注射によってプロデューサー細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、ガラス製マイクロピペットは、顕微鏡レベルで免疫調節成分をプロデューサー細胞中に注射するために使用され得る。

【0183】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、押出によってプロデューサー細胞に導入される。

【0184】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、超音波処理によってプロデューサー細胞に導入される。いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞は、高強度音波に曝露され、細胞膜の一時的な破壊を引き起こして、免疫調節成分の負荷を可能にする。

【0185】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、細胞融合によってプロデューサー細胞に導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、電氣的細胞融合によってプロデューサー細胞に導入される。いくつかの他の実施形態では、ポリエチレングリコール（PEG）は、プロデューサー細胞を融合させるために使用される。いくつかの他の実施形態では、センダイウイルスは、プロデューサー細胞を融合させるために使用される。

【0186】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、低張溶解によってプロデューサー細胞に導入される。これらの実施形態のいくつかでは、プロデューサー細胞は、低イオン強度緩衝液に曝露され、それらを破裂させて免疫調節成分の負荷を可能にする。いくつかの代替的な実施形態では、低張溶液に対する制御された透析は、プロデューサー細胞を膨潤させ、プロデューサー細胞膜に孔を作成するために使用される。プロデューサー細胞は、その後、膜のリシーリング（resealing）を可能にする条件に曝露される。

10

【0187】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、洗剤処理によってプロデューサー細胞に導入される。ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、免疫調節成分の負荷を可能にする孔を作成することによってプロデューサー細胞膜を一時的に損なう穏やかな洗剤で処理される。プロデューサー細胞が負荷された後、洗剤は洗い流され、それによって膜をリシールする。

【0188】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、受容体媒介性エンドサイトーシスによってプロデューサー細胞に導入される。ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞は、免疫調節成分の結合時に受容体及び関連する免疫調節成分の内部移行を誘導する表面受容体を有する。

20

【0189】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、濾過によってプロデューサー細胞に導入される。ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞及び免疫調節成分は、プロデューサー細胞より小さい孔径のフィルターを強制的に通して、プロデューサー細胞膜の一時的な破壊を引き起こし、免疫調節成分がプロデューサー細胞に入ることを可能にする。

【0190】

いくつかの実施形態では、プロデューサー細胞は、いくつかの凍結融解サイクルに曝され、細胞膜破壊を生じ、免疫調節成分の負荷を可能にする。

30

【0191】

免疫調節成分で細胞外小胞を改変する方法

様々な代替的な実施形態では、免疫調節成分は、細胞外小胞の単離後に細胞外小胞に直接導入される。

【0192】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、トランスフェクションによって細胞外小胞に導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、カチオン性脂質及びポリマーのような合成高分子を使用して細胞外小胞中に導入され得る（Papapetrou et al., Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)）。ある特定の実施形態では、リン酸カルシウム、シクロデキストリン、またはポリブレンのような化学物質は、免疫調節成分を細胞外小胞に導入するために使用され得る。

40

【0193】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、電気穿孔によって細胞外小胞に導入される。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、細胞外小胞膜に一時的な孔を作成する電界に曝露され、免疫調節成分の負荷を可能にする。

【0194】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、マイクロ注射によって細胞外小胞に導入される。いくつかの実施形態では、ガラス製マイクロピペットは、顕微鏡レベルで免疫調節成分を細胞外小胞中に直接注射するために使用され得る。

50

【0195】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、押出によって細胞外小胞に導入される。

【0196】

ある特定の実施形態では、免疫調節成分は、超音波処理によって細胞外小胞に導入される。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、高強度音波に曝露され、細胞外小胞膜の一時的な破壊を引き起こして、免疫調節成分の負荷を可能にする。

【0197】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、細胞外小胞の表面に複合体化され得る。複合体化は、当該技術分野で既知の方法により、化学的または酵素的に達成され得る。

【0198】

いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、化学的に複合体化される免疫調節成分を含む。化学的複合体化は、リンカーを有するか有しないかに関わらず、免疫調節成分を別の分子に共有結合させることによって達成され得る。かかる複合体の形成は当該技術分野の範囲内であり、複合体化を達成するための様々な技法が既知であり、特定の技法の選択は複合体化される材料によって導かれる。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、細胞外小胞に複合体化される。ある特定の他の実施形態では、脂質、炭水化物、核酸、及び小分子のような非ポリペプチドは、細胞外小胞に複合体化される。

【0199】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、低張溶解によって細胞外小胞に導入される。これらの実施形態のいくつかでは、細胞外小胞は、低イオン強度緩衝液に曝露され、それらを破裂させて免疫調節成分の負荷を可能にする。いくつかの代替的实施形態では、低張溶液に対する制御された透析は、細胞外小胞を膨潤させ、細胞外小胞膜に孔を作成するために使用される。細胞外小胞は、その後、膜のリシーリングを可能にする条件に曝露される。

【0200】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、洗剤処理によって細胞外小胞に導入される。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、免疫調節成分の負荷を可能にする孔を作製することによって細胞外小胞膜を一時的に損なう穏やかな洗剤で処理される。細胞外小胞が負荷された後、洗剤は洗い流され、それによって膜をリシールする。

【0201】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、受容体媒介性エンドサイトーシスによって細胞外小胞に導入される。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、免疫調節成分の結合時に受容体及び関連する免疫調節成分の内部移行を誘導する表面受容体を有する。

【0202】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、機械的発射によって細胞外小胞に導入される。ある特定の実施形態では、細胞外小胞は、金マイクロキャリアのような重い粒子または荷電粒子に付着された免疫調節成分を用いて衝撃され得る。これらの実施形態のいくつかでは、粒子は、粒子が細胞外小胞膜を横断するように機械的または電氣的に加速され得る。

【0203】

いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、濾過によって細胞外小胞に導入される。ある特定の実施形態では、細胞外小胞及び免疫調節成分は、細胞外小胞より小さい孔径のフィルターを強制的に通して、細胞外小胞膜の一時的な破壊を引き起こし、免疫調節成分が細胞外小胞に入ることを可能にする。

【0204】

いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、いくつかの凍結融解サイクルに曝され、細胞外小胞膜破壊を生じ、免疫調節成分の負荷を可能にする。

【0205】

細胞外小胞を単離する方法

細胞外小胞はプロデューサー細胞から単離され得る。ある特定の実施形態では、細胞外

10

20

30

40

50

小胞は、プロデューサー細胞によって細胞培養培地中に放出される。細胞外小胞の単離の全ての既知の様式は、本明細書での使用に適すると思われることが企図される。例えば、細胞外小胞の物理的性質は、電荷（例えば、電気泳動分離）、サイズ（例えば、濾過、分子ふるい等）、密度（例えば、通常遠心分離のまたは勾配遠心分離）、Svedberg定数（例えば、外力を伴うまたは伴わない沈降等）に基づく分離を含む、培地または他の供給源材料からそれらを分離するために採用され得る。代替的にまたは追加的に、単離は、1つ以上の生物学的特性に基づくことができ、表面マーカーを採用できる方法を含む（例えば、沈殿、固相への可逆的結合、FACS分離、特異的リガンド結合、非特異的リガンド結合、アフィニティ精製等）。

【0206】

単離及び濃縮は、典型的には連続遠心分離を含む、一般的かつ非選択の様式で行われ得る。あるいは、単離及び濃縮は、細胞外小胞またはプロデューサー細胞特異的表面マーカーを使用するような、より特異的かつ選択的な様式で行われ得る。例えば、特異的表面マーカーは、免疫沈降、FACSソーティング、アフィニティ精製、及びビーズ結合リガンドを用いた磁気分離において使用され得る。

【0207】

いくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーは、細胞外小胞を単離するために使用され得る。サイズ排除クロマトグラフィー技法は、当技術分野で既知である。例示的で非限定的な技法は、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、ボイド容積画分は、単離され、目的の細胞外小胞を含む。更に、いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、当該技術分野で一般に既知のように、（1つ以上のクロマトグラフィー画分の）遠心分離技法によるクロマトグラフィー分離後に更に単離され得る。いくつかの実施形態では、例えば、密度勾配遠心分離が、細胞外小胞を更に単離するために利用され得る。ある特定の実施形態では、プロデューサー細胞由来の細胞外小胞を他の起源の細胞外小胞から更に分離することが望ましい場合がある。例えば、プロデューサー細胞由来の細胞外小胞は、プロデューサー細胞に特異的な抗原抗体を使用する免疫吸着剤捕捉により、非プロデューサー細胞由来の細胞外小胞から分離され得る。

【0208】

いくつかの実施形態では、細胞外小胞の単離は、示差遠心分離、サイズに基づく膜濾過、免疫沈降、FACSソーティング、及び磁気分離を含むがこれらに限定されない方法の組み合わせに関与できる。

【0209】

細胞外小胞のサイズを測定する方法

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞外小胞及び／または細胞外小胞の集団のサイズを測定することを含む。一般に、細胞外小胞サイズは、最も長い測定可能な寸法として測定される。一般に、細胞外小胞の最も長い測定可能な寸法はまた、その直径として参照される。

【0210】

細胞外小胞サイズは、動的光散乱（DLS）及び／または多角度光散乱（MALS）を使用して測定され得る。細胞外小胞のサイズを測定するためにDLS及び／またはMALSを使用する方法は、当業者に既知であり、ナノ粒子追跡アッセイ（NTA、例えば、Malvern NanoSight NS300ナノ粒子追跡デバイスを使用する）を含む。特定の実施形態では、細胞外小胞サイズは、Malvern NanoSight NS300を使用して決定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞は、NTAによって測定される場合（例えば、Malvern NanoSight NS300を使用する）、約20～300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞は、NTAによって測定される場合（例えば、Malvern NanoSight NS300を使用する）、約40～200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の90%は、NTAによって測定される場合（例えば、Malvern N

10

20

30

40

50

anosight NS300を使用する)、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の95%は、NTAによって測定される場合(例えば、Malvern Nanosight NS300を使用する)、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の99%は、NTAによって測定される場合(例えば、Malvern Nanosight NS300を使用する)、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の90%は、NTAによって測定される場合(例えば、Malvern Nanosight NS300を使用する)、約40~200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の95%は、NTAによって測定される場合(例えば、Malvern Nanosight NS300を使用する)、約40~200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の99%は、NTAによって測定される場合(例えば、Malvern Nanosight NS300を使用する)、約40~200nmの最長寸法を有する。

【0211】

細胞外小胞サイズは、調整可能な抵抗パルスセンシング(TRPS)を使用して測定され得る。特定の実施形態では、TRPSによって測定される細胞外小胞サイズは、iZON qNANO Goldを使用して決定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Goldを使用する)、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Gold)、約40~200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の90%は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Goldを使用する)、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の95%は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Goldを使用する)、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の99%は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Goldを使用する)、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の90%は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Goldを使用する)、約40~200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の95%は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Goldを使用する)、約40~200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の99%は、TRPSによって測定される場合(例えば、iZON qNano Goldを使用する)、約40~200nmの最長寸法を有する。

【0212】

細胞外小胞サイズは、電子顕微鏡法を使用して測定され得る。いくつかの実施形態では、細胞外小胞サイズを測定するために使用される電子顕微鏡法は、透過型電子顕微鏡法である。特定の実施形態では、細胞外小胞サイズを測定するために使用される透過型電子顕微鏡は、Tecnaï(商標)G² Spirit BioTWINである。電子顕微鏡を使用して細胞外小胞サイズを測定する方法は当業者に周知であり、任意のかかる方法は、細胞外小胞サイズを測定するために適切であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞は、走査型電子顕微鏡(例えば、Tecnaï(商標)G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡)によって測定される場合、約20~300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞は、

走査型電子顕微鏡（例えば、Tecnai（商標）G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡）によって測定される場合、約40～200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の90%は、走査型電子顕微鏡（例えば、Tecnai（商標）G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡）によって測定される場合、約20～300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の95%は、走査型電子顕微鏡（例えば、Tecnai（商標）G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡）によって測定される場合、約20～300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の99%は、走査型電子顕微鏡（例えば、Tecnai（商標）G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡）によって測定される場合、約20～300nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の90%は、走査型電子顕微鏡（例えば、Tecnai（商標）G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡）によって測定される場合、約40～200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の95%は、走査型電子顕微鏡（例えば、Tecnai（商標）G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡）によって測定される場合、約40～200nmの最長寸法を有する。他の実施形態では、本明細書に記載される細胞外小胞集団は、集団を含み、細胞外小胞の99%は、走査型電子顕微鏡（例えば、Tecnai（商標）G² Spirit BioTWIN走査型電子顕微鏡）によって測定される場合、約40～200nmの最長寸法を有する。

【0213】

マクロファージ分極を決定するための方法

マクロファージ標的遺伝子の発現を阻害する1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞を使用して、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させるための方法及び組成物が、本明細書に開示される。組成物は、マクロファージによって優先的に取り込まれ（T細胞、B細胞、マクロファージ、または樹状細胞のような他の細胞型と比較して）、等モル量の免疫調節成分単体よりもマクロファージ分極を増加させるのに同じまたはそれ以上に有効である。マクロファージのM2及びM1表現型の検出を含む、マクロファージ分極を決定するための方法は、M2及びM1表現型を決定するための当技術分野で既知の任意の方法によって実行され得る。組織切片（例えば、腫瘍生検から）、血液試料等は、M2細胞表面マーカー（例えば、YM1、FIZZ1、デクチン-1、MGL）、M2関連サイトカイン（例えば、IL-10、TGFβ、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及びCCL24）、M1関連サイトカイン（例えば、INFγ、IL-12、IL-23、TNFα、IL-6、IL-1、CCL5、CCL9、CXCL10及びCXCL11）、成長因子（例えば、VEGF-A、VEGF-C、EGF、及びTGFβ）、酵素（例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼMMP2、MMP9、システインカテプシンプロテアーゼ）、M2関連miRNA（例えば、miRNA146a、miRNA155、miRNA157b、及びmiR-223）及び／またはM1関連miRNA（例えば、miRNA155、miR-33）を含むがこれらに限定されないM2及びM1マクロファージと同様に、汎マクロファージ（pan-macrophage）のマーカーについてアッセイ（例えば、染色）され得る。例えば、Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-969; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20を参照されたい。試料内の

マクロファージ及び／またはマクロファージ成分、分泌またはマクロファージ活性（例えば、Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Randolph, G. J. (2007). Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity, *Nature Immunology* 13 (11), 1118–1128を参照されたい）は、フローサイトメトリー、免疫組織化学、イムノブロッティング、定量PCR、または生物学的試料中の細胞または細胞産物を検出するための当該技術分野で既知の任意の他の方法によって検出され得る。

10

【0214】

がんを治療する方法

また、対象におけるがんを治療する方法が、本明細書に提供される。

【0215】

様々な実施形態では、少なくとも1つの遺伝子を阻害し、それによりM2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させる1つ以上の免疫調節成分を含む細胞外小胞、例えば、エキソソームの組成物は、がんを有する対象に投与される。これらの実施形態のいくつかでは、組成物は、免疫応答を上方制御し、対象の免疫系の腫瘍標的化を増強できる。いくつかの態様では、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極の増加は、それ自体で対象の免疫応答を上方制御し、対象の免疫系の腫瘍標的化を増強する。一部の著者はIL-6及びアデノシンに対する応答としてM2dサブタイプの活性化に言及しており、これらのマクロファージは腫瘍関連マクロファージ（TAM）とも称される。例えば、Roszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–16、Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 154 (2), 186–195、及びQ. Wang, H. Ni, L. Lan, X. Wei, R. Xiang, and Y. Wang, “Fra-1 protooncogene regulates IL6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages,” *Cell Research*, vol. 20, no. 6, pp. 701–712, 2010を参照されたい。腫瘍関連マクロファージ（TAM）は、典型的には、がん細胞の運動性、転移形成及び血管新生の促進などのそれらの腫瘍誘発（protumoral）機能について典型的であり、それらの形成は、発生する腫瘍に存在する微小環境因子に依存する。TAMは、IL-10、TGFβ、PGE2などの免疫抑制性サイトカインと、非常に少量のNOまたはROIと、低レベルの炎症性サイトカイン（IL-12、IL-1β、TNFα、IL-6）と、を産生する。腫瘍関連抗原を提示するTAMの能力は、T及びNK細胞の抗腫瘍機能の刺激と同様に、低下する。また、TAMは腫瘍細胞を溶解できない。https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization-cite-note-Sica2008-31 TAMの標的化は、TAMの動員及び分布を変更するか、既存のTAMを枯渇させるか、またはM2表現型からM1表現型へTAMの再教育を誘導するかのいずれかが薬剤の送達を通じて実証されているように、がんに対する新規の治療戦略である。例えば、Lewis, Claire E., and Jeffrey W. Pollard. “Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments.” *Cancer research* 66. 2 (2006): 605–612、Sica, Antonio, et al. “Ma

20

30

40

50

cropage polarization in tumour progression. "Seminars in Cancer Biology. Vol. 18. No. 5. Academic Press, 2008、Sica, Antonio, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. J Immunol. 2000 Jan 15; 164 (2): 762-7、Cuccarese, Michael F.; Dubach, J. Matthew; Pfirschke, Christina; Engblom, Camilla; Garri, Christopher; Miller, Miles A.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2017-02-08) "Heterogeneity of macrophage infiltration and therapeutic response in lung carcinoma revealed by 3D organ imaging". Nature Communications. 8: 14293、Zeisberger, S M; Dermatt, B; Marty, C; Zehnder-Fjallman, A H M; Ballmer-Hofer, K; Schwendener, R A (2006-07-11) "Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach". British Journal of Cancer. 95 (3): 272-281、Rodell, Christopher B.; Arlauckas, Sean P.; Cuccarese, Michael F.; Garri, Christopher S.; Li, Ran; Ahmed, Maaz S.; Kohler, Rainer H.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2018-05-21) "TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy". Nature Biomedical Engineering、Guerrero, Jennifer L.; Sotayo, Alaba; Ponichtera, Holly E.; Castrillon, Jessica A.; Pourzia, Alexandra L.; Schadt, Sara; Johnson, Shawn F.; Carrasco, Ruben D.; Lazo, Suzan (March 2017). "Class IIa HDA C inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages". Nature. 543 (7645): 428-432を参照されたい。

【0216】

いくつかの実施形態では、治療されているがんは、白血球（T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、単球）の腫瘍微小環境への浸潤、またはいわゆる「熱い腫瘍（hot tumor）」もしくは「炎症性腫瘍」により特徴付けられる。いくつかの実施形態では、治療されているがんは、腫瘍微小環境への低レベルもしくは検出不可能なレベルの白血球浸潤、またはいわゆる「冷たい腫瘍（cold tumor）」もしくは「非炎症性腫瘍」により特徴付けられる。いくつかの実施形態では、組成物は、「冷たい腫瘍」を「熱い腫瘍」に変換するのに十分な量及び時間投与され、すなわち、該投与は、白血球（T細胞のような）の腫瘍微小環境への浸潤を生じる。

【0217】

いくつかの実施形態では、組成物は、細胞外小胞と、M2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を促進する成分、ならびにチェックポイント遮断阻害剤、例えば、CTLA-4を標的とするイピリムマブ、PD-1を標的とするニボルマブ、セミブリマブ及

びペムブロリズマブ、各々がPD-L1を標的とするアテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、及びペキシダルチニブ、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、エマクツズマブ、AMG820、IMC-CS4及びカビラリズマブのようなCSFR-1の阻害剤のような免疫応答を追加的に増強する成分を含む、2つ以上の免疫調節成分の組み合わせと、を含む。がんを有する対象に対する治療としてのこれらの組成物の投与は、免疫応答を更に上方制御し、免疫調節成分の組み合わせられた作用を通じて対象の免疫系の腫瘍標的化を増強できる。

【0218】

いくつかの実施形態では、追加的な免疫調節成分は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、またはCSF1-Rを標的とする抗体または活性断片である。実施形態では、抗体またはその活性断片は、イピリムマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、ニボルマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、センプリマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、ペムブロリズマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、アテゾリズマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、アベルマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、デュルバルマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、ペキシダルチニブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、PLX7486のCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、ARRY-382のCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、JNJ-40346527のCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、BLZ945のCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、エマクツズマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、AMG820のCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、IMC-CS4のCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。実施形態では、抗体またはその活性断片は、カビラリズマブのCDRに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるCDRを含む。

【0219】

いくつかの実施形態では、細胞外小胞及び免疫調節成分を含む組成物は、がんワクチンとして対象に投与される。これらの実施形態のいくつかでは、組成物は、個別化されたがんワクチンとして対象に投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、腫瘍抗原または腫瘍抗原に由来するペプチドである。好適な腫瘍抗原の例は、アルファフェトプロテイン（AFP）、がん胎児性抗原（CEA）、上皮腫瘍抗原（ETA）、ムチン1（MUC1）、Tn-MUC1、ムチン16（MUC16）、チロシナーゼ、黒色腫関連抗原（MAGE）、腫瘍タンパク質p53（p53）、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、プログラム死リガンド1（PD-L1）、プログラム死リガンド2（PD-L2）、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、メソセリン、VEGFR、アルファ葉酸受容体、CE7R、IL-3、がん精巢抗原、MART-1 gp100、及びTNF関連アポトーシス誘導性リガンドを含む。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、参照ゲノム配列に由来する。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、組成物を受容する対象のゲノム配列に由来する。

【0220】

組成物で治療され得るがんは、表5に列挙されるがんを含むが、これらに限定されない。

【0221】

マクロファージにおける遺伝子発現、転写ネットワーク及び分極を調節する方法

いくつかの実施形態は、対象に1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞を投与することを含む、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する方法を提供し、免疫調節成分は遺伝子に標的化され、調節は遺伝子に標的とされた等モル量の遊離免疫調節成分の投与により産生される調節以上である。また、対象に1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞を投与することを含む、マクロファージにおける遺伝子発現を阻害する方法が提供され、免疫調節成分は遺伝子に標的とされ、阻害は遺伝子に標的化された等モル量の遊離免疫調節成分の投与により生み出される阻害以上である。いくつかの実施形態は、対象に1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞を投与することを含む、マクロファージにおける遺伝子の下流標的を抑制する方法を提供し、免疫調節成分は遺伝子に標的とされ、抑制は遺伝子に標的化された等モル量の遊離免疫調節成分の投与により生み出される抑制以上である。いくつかの実施形態は、対象に1つ以上の免疫調節成分（複数可）を含む細胞外小胞を投与することを含む、マクロファージの集団の分極を変更する方法を提供し、免疫調節成分は遺伝子に標的とされ、分極の変更は遺伝子に標的化された等モル量の遊離免疫調節成分の投与により生み出される分極の変更以上である。いくつかの実施形態では、細胞外小胞は、エキソソームである。いくつかの実施形態では、免疫調節成分は、ASOである。いくつかの実施形態では、分極の変更は、M2表現型からM1表現型への変化である。

【0222】

線維化状態を治療する方法

また、マクロファージをM2表現型からM1表現型に再分極させる免疫調節成分を含むエキソソームを含む有効量の組成物をそれを必要とする対象に投与することを含む、対象における線維化状態を治療する方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、線維化状態は、肺線維症、肝線維症、または脾線維症である。ある特定の実施形態では、肝線維症は、非アルコール性脂肪性肝炎、またはNASHである。例えば、Mayo Clinic Staff. "Definition [of pulmonary fibrosis]". Mayo Foundation for Medical Education and Research. Archived from the original on 15 July 2014. Retrieved 26 July 2014, available from the world wide at webmayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353690, Ferri FF. Idiopathic pulmonary fibro

10

20

30

40

50

sis. In: Ferris's Clinical Advisor 2016. Philadelphia, Pa.: Mosby Elsevier; 2016. Gross TJ, Hunnigake GW (2001) "Idiopathic pulmonary fibrosis". N Engl J Med. 345 (7): 517-525. Friedman LS (2014) Current medical diagnosis and treatment 2014. [S. l.]: McGraw-Hill. pp. Chapter 16. Liver, Biliary Tract, & Pancreas Disorders. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ (January 2018). "The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases". Hepatology. 67 (1): 328-357. Xue J, Sharma V, Hsieh MH, Chawla A, Murali R, Pandol SJ, Habtezion A. Nat Commun. 2015 May 18; 6: 7158を参照されたい。

【0223】

投与の機序

いくつかの実施形態では、組成物は、対象の循環系に静脈内投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、好適な液体に注入され、対象の静脈中に投与される。

【0224】

いくつかの実施形態では、組成物は、対象の循環系に動脈内投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、好適な液体に注入され、対象の動脈中に投与される。

【0225】

いくつかの実施形態では、組成物は、くも膜下腔内投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物が脳脊髄液 (CSF) に到達するように、脊柱管またはくも膜下腔への注射を介して投与される。

【0226】

いくつかの実施形態では、組成物は、鼻腔内投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、局所投与または全身投与のいずれかの形態で、鼻を通して通気され得る。ある特定の実施形態では、組成物は、点鼻薬として投与される。

【0227】

いくつかの実施形態では、組成物は、腹腔内投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、好適な液体に注入され、対象の腹膜中に投与される。いくつかの実施形態では、該腹腔内投与は、リンパ管への組成物 (例えば、組成物中の細胞外小胞) の分布を生じる。いくつかの実施形態では、該腹腔内投与は、胸腺、脾臓、及び/または骨髄への組成物 (例えば、組成物中の細胞外小胞) の分布を生じる。いくつかの実施形態では、該腹腔内投与は、1つ以上のリンパ節への組成物 (例えば、組成物中の細胞外小胞) の分布を生じる。いくつかの実施形態では、該腹腔内投与は、頸部リンパ節、鼠径部リンパ節、縦隔リンパ節、胸骨リンパ節のうちの1つ以上への組成物 (例えば、組成物中の細胞外小胞) の分布を生じる。いくつかの実施形態では、該腹腔内投与は、脾臓への組成物 (例えば、組成物中の細胞外小胞) の分布を生じる。

【0228】

いくつかの実施形態では、組成物は、眼球周囲投与によって対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、眼球周囲組織に注射される。眼球周囲薬物投与は、結膜下、前テノン嚢下、後テノン嚢下、及び眼球後投与の経路を含む。

【0229】

いくつかの実施形態では、組成物は、複数の投与経路によって同じ対象に投与される。いくつかの実施形態では、該複数の投与経路は、静脈内投与、動脈内投与、くも膜下腔内

投与、鼻腔内投与、腹腔内投与、及び／または眼球周囲投与を含む。好ましい実施形態では、該複数の投与経路は、静脈内投与及び腹腔内投与を含む。

【0230】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞の投与量は、 $1\text{ ng} \sim 10\text{ ng}$ 、 $10\text{ ng} \sim 100\text{ ng}$ 、 $100\text{ ng} \sim 1\text{ }\mu\text{g}$ 、 $1\text{ }\mu\text{g} \sim 5\text{ }\mu\text{g}$ 、 $5\text{ }\mu\text{g} \sim 10\text{ }\mu\text{g}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g} \sim 50\text{ }\mu\text{g}$ 、 $50\text{ }\mu\text{g} \sim 75\text{ }\mu\text{g}$ 、 $75\text{ }\mu\text{g} \sim 100\text{ }\mu\text{g}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g} \sim 150\text{ }\mu\text{g}$ 、 $150\text{ }\mu\text{g} \sim 200\text{ }\mu\text{g}$ 、 $200\text{ }\mu\text{g} \sim 300\text{ }\mu\text{g}$ 、 $300\text{ }\mu\text{g} \sim 500\text{ }\mu\text{g}$ 、 $500\text{ }\mu\text{g} \sim 1\text{ mg}$ 、または $1\text{ mg} \sim 10\text{ mg}$ である。

【0231】

組成物は、対象に一度投与され得る。代替的には、複数の投与は、一定期間にわたって実施され得る。例えば、2、3、4、5、またはそれ以上の投与が、対象に与えられ得る。いくつかの実施形態では、投与は、例えば、疾患、障害または状態に関連する症状に対する限り、必要に応じて与えられ得る。いくつかの実施形態では、反復投与は、対象の生涯にわたって示され得る。治療期間は、変動でき、例えば、1年以内、6か月、3か月、2か月、1か月、2週間、1週間、3日、2日、または1日以内であり得る。

【0232】

ある特定の実施形態では、細胞外小胞の用量は、1日1回、1日おき、週1回、週2回、月1回または月2回のような間隔で投与される。

【0233】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、標的細胞または組織中の免疫調節成分の濃度を、疾患、障害または状態の症状に関連するレベルを超えて効果的に増加させるのに十分な頻度で投与される。

【0234】

いくつかの実施形態では、組成物は、疾患、障害または状態が治療されるか、またはその症状が改善されるように、治療期間にわたって少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、疾患、障害または状態が治療されるか、またはその症状が防止されるように、治療期間にわたって少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、十分な量の免疫調節成分が治療期間中に標的細胞または組織に送達されるように、治療期間にわたって十分な回数投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、疾患、障害または状態の1つ以上の症状が防止、減少、改善、または遅延されるように、十分な量の免疫調節成分が治療期間中に標的細胞または組織に送達されるように、治療期間にわたって十分な回数投与される。いくつかの実施形態では、標的細胞または組織における免疫調節成分濃度を増加させることは、ピーク濃度を増加させることを含むが、他の実施形態では、それは、平均濃度を増加させることを含む。いくつかの実施形態では、治療期間中の実質的な増加は、対象における治療前または治療後期間を比較することによって、または治療を受けている集団で行われた測定を対応する未治療の対照集団と比較することによって決定され得る。

【0235】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、標的細胞または組織における免疫調節成分の濃度が少なくとも約1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月または6ヶ月以上の間増加するように、治療期間あたり十分な回数投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、標的細胞または組織における免疫調節成分の濃度が少なくとも治療期間の間増加するように、治療期間あたり十分な回数投与される。

【0236】

いくつかの実施形態では、治療期間内の反復投与間の時間間隔は、循環中の細胞外小胞の数が、投与された薬学的組成物中に存在する細胞外小胞の数の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%未満に低下する期間以下である。

10

20

30

40

50

【0237】

いくつかの実施形態では、治療方法は、治療薬を保持する好適な治療用量の細胞外小胞の注射前に、1つまたは複数の用量の非治療用細胞外小胞を更に含む。ある特定の実施形態では、非治療用細胞外小胞は、治療用細胞外小胞とは別個に、異なる投与量で投与される。ある特定の実施形態では、非治療用細胞外小胞の投与量は、治療用細胞外小胞の投与量より大きい。ある特定の他の実施形態では、非治療用細胞外小胞の投与量は、治療用細胞外小胞の投与量よりも小さい。ある特定の実施形態では、非治療用細胞外小胞の投与量は、治療用細胞外小胞と同じである。様々な実施形態では、好適な用量の治療用細胞外小胞の注射前の非治療用細胞外小胞の方法は、肝臓、肺、及び／または脾臓における治療用細胞外小胞の更新を低下させる。全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、共有のPCT出願PCT/US2017/047794を参照されたい。

10

【0238】

有効量の組成物は、少なくとも部分的に、標的組織、標的細胞型、投与の手段、細胞外小胞の物理的特徴（例えば、サイズ、及びいくつかの場合では、送達される分子の程度）及び他の決定要因に基づいて提供される。一般に、有効量の組成物は、標的細胞の効率的な細胞応答を提供する。増加した効率は、増加した細胞トランスフェクション（すなわち、細胞外小胞成分でトランスフェクトされた細胞の割合）、増加した細胞応答、または宿主対象の低下した自然免疫応答によって実証され得る。

【0239】

細胞外小胞及びその薬学的組成物の投与の用量及び頻度は、例えば、疾患の重症度、患者の年齢、性別及び食事、任意の炎症の重症度、投与時間ならびに他の臨床的因子のような様々な因子に基づいて主治医によって決定され得る。例において、静脈内投与は最小に有効である用量で開始され、用量は正の効果が観察されるまで、予め選択された時間経過にわたって増加される。その後、用量の漸増は、現れ得るすべての有害作用を考慮しながら、効果の対応する増加を生み出すレベルに限定して行われる。

20

【0240】

追加的な実施形態

他の態様及び実施形態は、以下の付番された項目で提供される。

1. 少なくとも1つの遺伝子を阻害し、それによってM2表現型からM1表現型へのマクロファージ分極を増加させる1つ以上の核酸分子を含む細胞外小胞。
2. 細胞外小胞がエキソソームである、実施形態1に記載の細胞外小胞。
3. 核酸が阻害性RNAである、実施形態1または2に記載の細胞外小胞。
4. 阻害性RNAが、アンチセンスRNA、siRNA、shRNAを、miRNA、lncRNAまたはpre-miRNAである、実施形態1～3のいずれか1つに記載の細胞外小胞。
5. 少なくとも1つの遺伝子が以下からなる群から選択される、実施形態1～4のいずれか1つに記載の細胞外小胞：
KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、p300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、及びc-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、アルギナーゼ、グルタミナーゼ、及びPKM2。
6. 遺伝子がKRASである、実施形態5に記載の細胞外小胞。
7. 核酸が野生型ヒトKRASを標的とする阻害性RNAである、実施形態6に記載の細胞外小胞。
8. 阻害性RNAがマウスKras^{G12D}も標的とする、実施形態7に記載の細胞外小胞。
9. マクロファージが腫瘍常在マクロファージである、実施形態1～8のいずれか1つに記載の細胞外小胞。
10. 腫瘍が膵腫瘍である、実施形態9に記載の細胞外小胞。
11. 追加的な免疫調節成分を更に含む、実施形態1～10のいずれか1つに記載の細胞外小胞。

30

40

50

12. 追加的な免疫調節成分が、小分子薬物、抗体または治療用タンパク質である、実施形態11に記載の細胞外小胞。
13. 抗体が免疫チェックポイント阻害剤である、実施形態12に記載の細胞外小胞。
14. 実施形態1～13のいずれか1つに記載の細胞外小胞を含む、薬学的組成物。
15. それを必要とする患者において疾患を治療する方法であって、実施形態1～13のいずれか1つに記載の細胞外小胞または実施形態14に記載の薬学的組成物を患者に投与し、それによって患者における疾患を治療することを含む、方法。
16. 疾患ががんである、実施形態15に記載の方法。
17. 患者がヒトである、実施形態15または16に記載の方法。
18. 核酸ががん原遺伝子を標的とする阻害性RNAである、実施形態1～17のいずれか1つに記載の方法。 10
19. がん原遺伝子がヒトKRASである、実施形態18に記載の方法。
20. がんが膵癌である、実施形態19に記載の方法。
21. 少なくとも第2の療法を実行することを更に含む、実施形態15～20のいずれか1つに記載の方法。
22. 第2の療法が、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、または免疫療法を含む、実施形態21に記載の方法。
23. M2マクロファージが、M2a、M2b、及びM2cマクロファージからなる群から選択される腫瘍関連マクロファージである、上記の実施形態のいずれか1つに記載の細胞外小胞。 20
24. M1マクロファージが、分極前のM2マクロファージと比較して、 $INF\gamma$ 、 $IL-12$ 、 $IL-23$ 、 $TNF\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1$ 、 $CCL9$ 、 $CXCL10$ 及び $CXCL11$ からなる群から選択される炎症性サイトカイン及びケモカインの増加した分泌を呈する、上記の実施形態のいずれか1つに記載の細胞外小胞。
25. M1マクロファージが、分極前のM2マクロファージと比較して、 $IL-10$ 、 $TGF\beta$ 、 PGE_2 、 $CCL2$ 、 $CCL17$ 、 $CCL18$ 、 $CCL22$ 及び $CCL24$ からなる群から選択される免疫抑制性サイトカイン及びケモカインの減少した分泌を呈する、上記の実施形態のいずれか1つに記載の細胞外小胞。
26. M1マクロファージが、分極前のM2マクロファージと比較して、増加した腫瘍関連抗原を発現する、上記の実施形態のいずれか1つに記載の細胞外小胞。 30
27. M1マクロファージが、分極前のM2マクロファージと比較して、 $CD8^+$ T細胞及び／またはナチュラルキラー細胞の刺激を増加させる、上記の実施形態のいずれか1つに記載の細胞外小胞。
28. ヒト野生型KRASを標的とする阻害性RNAを含む細胞外小胞を対象に投与することを含む、対象における膵癌を治療する方法であって、治療が、腫瘍常在マクロファージのM2表現型からM1表現型への分極の割合を、ヒトKRAS^{G12D}を標的とする阻害性RNAで治療された患者において観察されるものよりも高いレベルに増加させる、方法。

【実施例】

【0241】

実施例

以下の実施例は、当業者に本発明をどのように作製および使用するかの完全なる開示および説明を提供するように提示され、本発明者が自身の発明とみなすものの範囲を限定するようには意図されておらず、以下の実験がすべてまたは唯一の実行される実験であると表すようにも意図されていない。使用される数値（例えば、量、温度等）に関する正確さを確保する努力がなされているが、いくつかの実験誤差及び偏差が考慮されるべきである。別途示されない限り、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度は、摂氏温度であり、圧力は、大気圧であるか、またはそれに近い。例えば、bp、塩基対（複数可）；kb、キロベース（複数可）；pl、ピコリットル（複数可）；sまたはsec、秒（複数可）；min、分（複数可）；hまたはhr、時間（複数可）；aa、ア

10

20

30

40

50

ミノ酸（複数可）；nt、ヌクレオチド等の、標準的な略語が使用され得る。

【0242】

本発明の実施は、別段の指示がない限り、当該技術分野内の、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技法及び薬理学の従来の方法を採用する。かかる技術は、文献において完全に説明される。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993)、A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition)、Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989)、*Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.)、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 21th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005)、Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)を参照されたい。

【0243】

実施例1：M2マクロファージにおける転写因子のノックダウン

方法：

PBMCからの単球分離：

- ・ 50mlのバフィーコートを手に入れた
- ・ 15mlのフィコールを、50mlのSTEMCELL SepMateチューブにピペットで移した
- ・ バフィーコートを、最終容量が約250mLであるようにPBS 2mM EDTAに希釈した
- ・ 希釈したバフィーコート試料を、チューブの最終容量が約45～50mlになるまでSepmateチューブ中に注いだ
- ・ ブレーキを1にして、チューブを1000gで15分間遠心した
- ・ 回転させたチューブから血漿を吸引し、バフィーコート層を50mlのコニカルチューブへのピペットエイド (pipet aid) を用いて回収した。チューブを、PBS/EDTAで満たし、細胞をペレット化するために500gで3分間遠心分離した。
- ・ 赤血球が大いに存在する場合、細胞を10mlのACK溶解緩衝液 (ThermoFisher、カタログ番号A1049201) に再懸濁させ、室温で3分間インキュベートした (製造業者のプロトコル)。チューブを、PBS/EDTAで満たし、500gで3分間遠心分離した。
- ・ チューブを400xgで5分間遠心沈殿させ、ペレットをPBS EDTAでもう一度洗浄し、再ペレット化した
- ・ ペレットをRoboSep緩衝液 (STEMCELL、カタログ番号20104) に再懸濁させ、細胞をトリプンブルー (ThermoFisher) との1:1希釈を使用して計数した (約5億のPBMCが1つのバフィーコートから得られた)
- ・ CD14+単球を、製造業者のプロトコルに従って、EasySep Human Monocyte Enrichment Kit (STEMCELL、カタログ番号19059RF) を使用して単離した (全細胞のうち約10%を単球として単離した)
- ・ 500万個の単球を、RPMI 10%FBS 1%抗抗+40ng/mlのM-CSFの1つのプレートに播種した

マクロファージ分化及び分極：

(<https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2015-0012OC>から翻案した)

- ・ 播種した細胞を、5%のCO₂、37℃で5～6日間、RPMI-1640 10%

FBS 1% 抗抗 1% PenStrep + 40 ng/ml の M-CSF (Biological) において培養した。5 ml の同じ新鮮な培地を、播種後 1 日目と 3 日目に添加した。5 日目に、極性化サイトカインを以下のように添加した (40 ng/ml の MSCF、全てのサイトカインは 20 ng/ml で添加された) :

- ・ M0 : サイトカインなし
- ・ M2a : IL-4
- ・ M2c : IL-10
- ・ M2++ : IL-4、IL-10、TGFB
- ・ M1 : IFN- γ + LPS (100 ng/ml)
- ・ TAM : 75% Panc-1 上清
- ・ 細胞をサイトカインと共に 24 時間インキュベートした
- ・ 6 日目に、培地を吸引し、細胞を PBS で洗浄し、次いで 10 ml の PBS 5 mM EDTA (氷冷) を、プレートごとに加え、4 °C で 30 分間インキュベートした。
- ・ 細胞を、穏やかにプレートからこすり落とし、計数した。
- ・ 次いで、ウェルあたり 50,000 個の細胞を、24 時間異なるマクロファージ集団 (上記を参照) に対するそれぞれのサイトカインを用いて、RPMI-1640 10% FBS 1% 抗抗 1% PenStrep + 40 ng/ml の M-CSF (Biological) の 96 ウェルプレートに播種し、その後、処理を開始した。

10

【0244】

エキソソーム精製 :

20

エキソソームを、9 日後に HEK293 SF 細胞の高密度懸濁培養物の上清から回収した。上清を、濾過し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画し、塩化ナトリウムの段階勾配で溶出した。最も高いタンパク質濃度を有するピーク画分は、エキソソーム及び汚染細胞成分が含有した。ピーク画分を、単離し、超遠心分離による Optiprep (商標) (60% イオジキサノール w/v) 密度勾配上で更に分画した。

【0245】

エキソソーム画分を、4 °C で 3 時間 133,900 x g で SW 32 Ti ローター用の 38.5 mL の Ultra-Clear (344058) チューブにおける超遠心分離により、濃縮した。ペレット化した材料を、1 mL の PBS 及び 3 mL の Optiprep (商標) に再懸濁させ、最終イオジキサノール濃度を 45% にした。Optiprep (商標) 勾配については、4 層滅菌勾配を、再懸濁された材料を含有する 4 mL の 45% イオジキサノール、3 mL の 30% イオジキサノール、2 mL の 22.5% イオジキサノール、2 mL の 17.5% イオジキサノール、及び 1 mL の PBS を、SW 41 Ti ローター用の 12 mL の Ultra-Clear (344059) チューブで調製した。Optiprep (商標) を、4 °C で 16 時間 150,000 x g で超遠心分離して、エキソソーム画分を分離した。超遠心分離は、エキソソームを含有することが知られている上層画分と、中程度の密度の細胞破片を含有する中層画分と、高密度の凝集体及び細胞破片を含有する下層画分を生じた。次いで、エキソソーム層を、チューブの上層約 3 mL から穏やかに回収した。

30

【0246】

40

エキソソーム画分を、38.5 mL の Ultra-Clear (344058) チューブにおいて約 3.2 mL の PBS に希釈し、4 °C で 3 時間 133,900 x g で超遠心分離して、精製されたエキソソームをペレット化した。次いで、ペレット化したエキソソームを、最小量の PBS (約 200 μ L) に再懸濁し、4 °C で保存した。

【0247】

多くの固形腫瘍は、代替的に活性化された、または M2 表現型を有するものとして特徴付けられる腫瘍関連マクロファージを多くの場合含む、骨髄リッチな細胞浸潤により特徴付けられる。M2 マクロファージは、代謝酵素アルギナーゼ (Arg1) の発現を促進する高レベルのリン酸化 STAT3 及び STAT6 を発現する。重要な M2 遺伝子のノックダウンがインビトロ分化したマクロファージの M2 表現型を変更することを実証するため

50

に、マウスRAW264.7マクロファージを、上記のようにM2状態に分極した。培養された分極マクロファージを、STAT3、STAT6、CEBP β -1、CEBP β -2、Pi3K γ 、またはKRAS(12.5nM、25nM、50nM、及び100nM)を標的とする増加する量のsiRNAでトランスフェクトした。遺伝子の各々は用量依存的様式で抑制され(図1)、各M2遺伝子のノックダウンによりArg1の同時低下をもたらした(図2)、M2表現型が上流の制御因子の発現を低下させることにより変更され得ることを実証した。

【0248】

実施例2：マクロファージサブタイプによる志差的エクソソーム取り込み

マクロファージサブタイプは、代謝及び他の表現型活性の変更により特徴付けられる。ある特定のマクロファージサブタイプがエクソソームを優先的に取り込むかどうかを理解するために、6つのマクロファージ亜集団(M0、M1、M2a、M2c、M2++、及びTAM)を、ルーメンGFPを発現するように操作されたHEK293SF由来の増加するレベルのエクソソームと共にインキュベートした。エクソソーム取り込みを、Incucyte(登録商標)生細胞分析システム(Essen Bioscience)において36時間にわたって全細胞GFP強度を測定することにより決定した。図3に示されるように、全てのマクロファージサブタイプがエクソソームの取り込みを示したが、M0マクロファージはエクソソームの取り込みに最も効率が悪かった一方で、M2++マクロファージは、他のマクロファージのサブタイプと比較して、エクソソームの取り込みにおいて実質的により効率的であった。

【0249】

M2マクロファージはエクソソームの取り込みに効率的であるため、ASO負荷されたエクソソームが、細胞間マクロファージ標的を標的とするのにASO単体より効率的(例えば、標的遺伝子及び遺伝子のシグナル伝達経路内の下流エフェクター分子の発現をノックダウンするのにより効率的)であろうかどうかについて調査した。STAT3を標的化し、Cy5蛍光トレーサー及び5'コレステロールリンカーを輸送する2'-メトキシエチル(MOE)一本鎖DNA/RNA ASOを、生成した。HEK293SFエクソソームをコレステロールタグ付き蛍光ASOと混合し、遊離ASOを超遠心分離及びASOを含有する上清の除去によって除去した。M2及びM0マクロファージを、同等の密度で播種し、総蛍光強度で測定される、一致した濃度の遊離ASOまたはASO負荷されたエクソソーム(Exo-ASO)と共にインキュベートした。総細胞蛍光を、48時間にわたって測定し、Incucyte(登録商標)生細胞分析システムを使用して定量した。図4に示されるように、M2マクロファージは、M0マクロファージと比較して、遊離ASO及びExo-ASOの両方をより容易に取り込んだ。興味深いことに、Exo-ASOはM0及びM2マクロファージの両方によってより効率的に取り込まれ、M2マクロファージへのASOの送達エクソソームへ負荷することによって強化され得ることを示唆している。

【0250】

エクソソームまたはExo-ASOが、インビボで他の細胞型と比較される場合、マクロファージによって示差的に取り込まれるかどうかを決定するために、ナイーブマウスに、 1×10^{11} または 1×10^{12} のいずれかのGFP含有エクソソームを腹腔内投与した。注射後1時間で、総腹膜細胞を単離し、異なる免疫細胞サブセット、すなわち、B細胞、樹状細胞、好中球、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、及びマクロファージ間のGFP陽性をフローサイトメトリーによって特徴付けた。図5Aに示されるように、両方の用量で、マクロファージは、蛍光エクソソームを取り込む主要な細胞型であった。この差異が疾患設定(disease setting)で発生したかどうかを決定するために、B16F10担腫瘍マウスに、単回用量のCy5標識Exo-ASOまたは天然の非標識エクソソームを注射した。注射された腫瘍を、単離し、解離し、フローサイトメトリーで測定した。図5Bに示されるように、マクロファージは腫瘍細胞よりもはるかに容易にExo-ASOを取り込み(全体的なCy5信号より約100倍大きい)、Exo-

A S Oの送達がいくつかの複雑な細胞混合物におけるマクロファージ集団に到達できることを示唆している。更に、マクロファージによるE x o－A S Oの優先的な取り込みは、他の試験された細胞型（B細胞、樹状細胞、好中球、ナチュラルキラー（NK）細胞及びT細胞）と比較して、E x o－A S O組成物を対象に投与することを含む、マクロファージ細胞に標的とされたA S O送達の方法を可能にし、投与された組成物は、対象に存在するマクロファージによって優先的に取り込まれる（他の免疫細胞サブセット、例えば、B細胞、樹状細胞、好中球、ナチュラルキラー（NK）細胞及びT細胞による取り込みと比較して）。E x o－A S O組成物のこの増強されたマクロファージ特異性は、標的外細胞における影響を低下することにより、投与された組成物の安全性を改善する。

【0251】

実施例3：アンチセンスオリゴのエキソソーム媒介性送達はマクロファージ転写ネットワークを強力に制御不全にして分極を変更する

以前の実験は、A S Oのエキソソーム媒介性送達がマクロファージ遺伝子発現パターンを変更する効果的な方法であり得ることを示唆する。上記の方法に従って精製されたH E K 2 9 3 S F由来のエキソソームを、S T A T 3を標的とする5つの異なるコレステロールタグ付きA S Oで負荷した（4. 1、二本鎖M O Eケミストリー；5. 1及び5. 2、一本鎖O－メチルケミストリー；5. 3及び5. 4、一本鎖M O Eケミストリー）。A S O配列は、表0に示される。M 2分極マウスR A W 2 6 4. 7細胞を、5 μ Mの遊離コレステロールタグ付きA S O、またはコレステロールタグ付きA S Oで負荷された 1×10^5 もしくは 1×10^6 エキソソームのいずれかと共にインキュベートした。S T A T 3転写産物レベルを処理後24時間で測定し、遊離A S Oと比較して、E x o－A S O処理によるS T A T 3の同等または優れたノックダウンを明らかにした。分極マクロファージと共にインキュベートされた未修飾のエキソソームは、S T A T 3発現に影響を与えなかった（図6）。S T A T 3の下流標的を検討するために、A R G 1転写産物レベルを、処理後48時間で測定した。図7に示されるように、遊離A S OまたはE x o－A S OをもちいたS T A T 3ノックダウンは、場合によっては90%以上超のA r g 1の頑健な抑制をもたらした（図7）。M 2分極R A W 2 6 4. 7細胞を、S T A T 3、K R A S、及びC / E B P β に対する高（4 μ M）及び低（0. 4 μ M）A S OまたはE x o－A S Oと共にインキュベートした。図8 A～図8 Cに示されるように、E x o－A S O試料は、全ての試験された用量で同等（S T A T 3）またはより強力（K R A S、C / E B P β ）であった（図8 A～図8 C）。A S O配列が、表0に示される。

【0252】

この結果は、E x o－A S Oが、マクロファージ発現ネットワークの強力な調節因子であり、様々な治療用途についての遊離A S Oの投与と比較して、優れた分化したモダリティを提供できることを実証する。対象にE x o－A S Oを投与することを含む、マクロファージにおける遺伝子発現を調節する1つのかかる方法であって、該A S Oは遺伝子に標的化され、調節は遺伝子に標的とされた等モル量の遊離A S Oの投与により生み出される調節以上である、方法。別の実施形態は、対象にE x o－A S Oを投与することを含む、マクロファージにおける遺伝子発現を阻害する方法を含み、該A S Oは遺伝子に標的化され、阻害は遺伝子に標的とされた等モル量の遊離A S Oの投与により産生される阻害以上である。別の実施形態は、対象にE x o－A S Oを投与することを含む、マクロファージにおける遺伝子の下流標的を抑制する方法を含み、該A S Oは遺伝子に標的化され、抑制は遺伝子に標的とされた等モル量の遊離A S Oの投与により産生される抑制以上である。更に別の実施形態は、対象にE x o－A S Oを投与することを含む、マクロファージの集団の分極を変更する方法を含み、該A S Oはマクロファージにおける遺伝子発現に標的化され、分極の変更は遺伝子に標的とされた等モル量の遊離A S Oの投与により産生される分極の変更以上である。かかる実施形態では、分極の変更は、M 2表現型からM 1表現型への変化であり得る。

【0253】

ヒト細胞におけるE x o－A S Oの役割を試験するために、初代ヒトマクロファージを

、M2表現型に分極させ、異なる用量の遊離STAT3 ASOまたはSTAT3 Exo-ASOで処理した。3人の別個のヒトドナーからのマクロファージを使用すると、Exo-ASOは、処理後24時間でのSTAT3転写産物レベルを抑制するのに一貫してより強力であった(図9A)。M2分極の下流ヒトマーカーであるCD163も、遊離ASOと比較して、Exo-ASOにより劇的に調節された(図9B)。ヒトM2マクロファージも、HIF1 α 、Pik3K γ 、CEBP β 、STAT6、及びSTAT3に対する4 μ Mの遊離ASOまたはExo-ASOを用いて処理した。図10に示されるように、全ての処理群は標的遺伝子の抑制を生じたが、全ての場合でExo-ASOは遊離ASO処理よりも強力であった。重要なことに、マクロファージ標的のいずれのExo-ASOノックダウンも、CD163発現の頑健な低下をもたらした(図11)、ASOのエキソソーム媒介性送達が必要なマクロファージシグナル伝達ネットワークを強力かつ再現可能に破壊することを実証した。

【0254】

M2マクロファージ分極の機能的結果は、腫瘍化促進性微小環境に寄与する炎症促進性サイトカインの減少である。したがって、マクロファージのM2表現型からM1表現型への変換は、増強された炎症促進性シグナル伝達を生じるはずである。M2マクロファージのM1状態への変換は、IL-12及びIL-23を含むサイトカインの誘導をもたらすLPSによって誘導される。STAT3はこのサイトカイン発現ネットワークのネガティブ制御因子であり、したがって、LPSの存在下でのSTAT3阻害が炎症促進性サイトカインの産生を更に増強できるかどうかを試験した。M2分極ヒトマクロファージを、4 μ Mの遊離STAT3 ASO、4 μ MのSTAT3 Exo-ASO、4 μ MのスクランブルExo-ASO、ネイティブエキソソーム、またはSTAT3の小分子阻害剤であるC188-9で処理した。24時間後、培地を10ng/mlのLPSを含有する培地に交換し、上清を24時間後に単離した。図12に示されるように、LPSは、IL-12及びIL-23の分泌を誘導した(LPS 10ng/ml群対LPSなし群)。遊離STAT3 ASOでなくSTAT3 Exo-ASOを用いた処理は、各サイトカインの発現を更に増強し、Exo-ASOが関連する免疫調節シグナルに応答してM1表現型の促進を更に強力にもたらし得ることを示唆している。

【0255】

STAT3、STAT6、及び他のマクロファージ調節経路の制御不全は、遺伝子発現パターンに広範な変化をもたらす。Exo-ASO処理の分化したグローバルな影響を理解するために、NanoString mRNA分析が、定常状態での、ならびに未修飾のエキソソーム(EVのみ)及び濃度一致したASOとExo-ASOとを用いた処理に応答するヒトM2マクロファージに対して、行った。nCounter(登録商標)ヒト骨髄性先天性免疫パネルを使用する正規化されたmRNA計数は、STAT3転写物が遊離ASO及びExo-ASO処理の両方の後に低下したことを実証した(図13A)。下流マーカーCD163(図13D)、TGF β (図13C)、及びSTAT6(図13D)は、ASO処理後に全て強力に下方制御された。

【0256】

TGF β (<85%)の頑健な抑制は、M2マクロファージ分極の重要な制御因子である(Yang and Zhang Journal of Hematology & Oncology(2017)10:58)。TGF β 発現に対するSTAT3、STAT6、及びCEBP β Exo-ASO処理の影響を検討した。ヒトM2分極マクロファージを、STAT3(MOE及びLNAケミストリーの両方)、STAT6(MOEケミストリー)、ならびにCEBP β (MOEケミストリー)に対してASOで負荷されたエキソソームを用いて処理した。全ての場合に、TGF β レベルは、マイクロモル未満レベルのASOでの処理後、劇的に低下した(図14)。これらの結果は、多数のマクロファージ分極制御因子に対するASOのエキソソーム媒介性送達が、多数のがんの治療に影響を与え得る細胞プログラムの頑健で安定した制御不全をもたらし得ることを実証する。重要なことに、このプロセスの制御因子としてKRASの新規認識を含むマクロファ-

ジ標的の各々は、疾患及び他の細胞プロセスにおけるそれらの役割が十分に認識されているが、安全で効果的な治療が創薬の古典的アプローチを回避している点で、「新薬開発につながらない (undruggable)」標的として特徴付けられている。

【0257】

実施例4：野生型KRASの阻害は、膵癌の同所性マウスモデルにおいて、増加したマクロファージ分極及びインビボでの低下した腫瘍サイズをもたらす。

方法：

KRASエキソソームの産生及び単離：電気穿孔方法は、エキソソームを機能的に損傷することなく、KRAS siRNA構築物をエキソソーム中に挿入するために使用される。エキソソームは、確立された超遠心分離方法を使用して、化学的に定義された培地において成長したヒト胎児腎 (HEK) 293SF懸濁細胞から単離される (Kahler et al., 2014)。エキソソームの純度及び均一性 (直径80~150nmの粒子) は、Nanosight (商標) 測定、透過型電子顕微鏡法、及びCD9イムノゴールド標識によって検証される。スクロース勾配超遠心分離及びqPCRも、KRAS siRNAの存在及び存在量を検証するために実行される。エキソソームを含有するスクランブルsiRNAも、生成される。

【0258】

RNAi戦略。マウス野生型KRASに対し標的とされたKRAS siRNA配列は、サイレンシング効率を促進するTTヌクレオチドオーバーハングを含む。RNAiはまた、その送達を追跡するために、センス鎖の3'端でAlexa Fluor (登録商標) 647フルオロフォアで標識される。

【0259】

マウス及び画像化法。4~6週齢の雌胸腺欠損nu/nuマウス (Charles River) は、21~23℃及び湿度40%~60%で12時間の明暗サイクルで個別に換気されたケージに収容される。マウスは、照射された食餌及び滅菌水への自由なアクセスが可能である。全身麻酔下で、腫瘍化ヒト膵臓PANC-1 (Kras^{aspl2} (Rejiba et al., 2007, Sun et al., 2001)) 細胞またはBXPC-3細胞 (10⁶、10µlのPBSに再懸濁された) は、27ゲージの注射器を使用して膵臓の尾部中に注射される。同所性腫瘍サイズ/体積分析については、Living Imageバージョン4.4 (Caliper Life Sciences) は、全ての腫瘍計算を定量化するために使用される。膵臓及び腫瘍の周りの円形の関心領域 (ROI) は、定義され、同じ実験群内の全ての画像を比較するための標準として設定される。加えて、全ての実験群の全ての測定について、曝露条件 (時間、開口、ステージ位置、ピンング) が同一に保たれる。次いで、その後の腫瘍測定 (p/sec/cm²/sr) は、全ての実験群について同じ条件下で得られる。マウスは、定期的に画像化され、処理のためにランダムに群に分けられる。マウスは、1日おきに100µl容積のPBSで腹腔内に2×10⁸エキソソームを投与される。エキソソームは、2µgのsiRNAで電気穿孔され、注射前にPBSで洗浄される。

【0260】

組織学、組織病理学、及び免疫組織化学。組織はホルマリンで固定され、パラフィン包埋のために処理される。5µmの厚さの組織切片は、切断され、ヘマトキシリン及びエオシン (H&E) ならびにMassonのトリクローム (MTS) (Leica) に対して染色される。組織病理学的スコア化のために、H&E染色されたスライドを、膵臓癌の形態学的段階：正常、膵臓上皮内新生物 (PanIN) 及び膵管腺癌 (PDAC) に基づいてスコア化した。各組織切片について、3つの段階 (正常、PanIN、PDAC) の各々の割合スコアは、膵臓組織学における専門家によって盲検様式で手動で得られ、次いで平均化されて各コホートについての100のうちの全体的なスコアを与える。次いで、これらの割合スコアの平均は、それぞれのコホートにおける各マウスについて取得される。腫瘍組織切片はまた、マクロファージに対して染色される (汎マクロファージマーカー (例えば、F4/80抗体及び/または腫瘍常在マクロファージの検出のためのM2及びM

1 特異的細胞マーカー)。

【0261】

マクロファージ表現型特徴付けのためのアッセイ。血液試料及び腫瘍試料は、マウスから回収される。マクロファージは、単離され、フローサイトメトリーによるM1及びM2マーカーの分析のために染色される。マクロファージは、M2表現型細胞表面マーカー（例えば、YM1、FIZZ1、デクチン-1及び／またはMGL）ならびにM1表現型細胞表面マーカーと同様に、汎マクロファージマーカーに対して染色される。次いで、M2及びM1マクロファージは、計数され、サイトカイン及び／またはM1及び／またはM2表現型のいずれかに関連するmiRNAのmiRNA発現を検出する定量PCRのような更なる分析のために選別される。

10

【0262】

異種移植実験及び同所性腫瘍体積分析からの結果は、KRAS野生型siRNAを含むエキソソームが腫瘍のサイズを効果的に低下させ、スクランブルsiRNAを保持するエキソソームと比較してM1表現型腫瘍関連マクロファージの数を増加させることを確認し、ヒト野生型KRASを標的とする阻害性RNAを含むエキソソームの投与ががんの治療に有効であることを示している。

表

【表0】

表0. アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) の配列		
標的	配列	配列番号
Stat3	TAAGCTGATAATTCAACTCA	配列番号1
Stat6	TGAGCGAATGGACAGGTCCTT	配列番号2
CebpB	TGGATTTAAAGGCAGGCGGC	配列番号3
pi3K γ	TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA	配列番号4
HIF1- α	GTGCAGTATTGTAGCCAGGC	配列番号5
Kras	GTAGCATGTAAATATAGCCC	配列番号6
全てのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオチド間にホスホロチオエート結合を有する		

20

30

【表 1 - 1】

表 1. エキソソーム脂質	
リソビスホスファチジン酸	ガングリオシド GM3 24 : 1
スフィンゴミエリン (SM)	ガングリオシド GM3 16 : 0
ガングリオシド GM3	PE 40 : 5
ホスファチジルセリン (PS)	PE 40 : 6
ホスファチジルイノシトール (PI)	PE 38 : 3
ホスファチジルコリン (PC)	PE 38 : 4
ホスファチジルエタノールアミン (PE)	PE 36 : 1
リゾホスファチジルコリン (LPC)	PE 36 : 2
コレステロール (Chol)	PE 34 : 1
ジアシルグリセロール (DG)	PE 34 : 2
PI 18 : 0 / 20 : 3	PE-エーテル 38 : 5
PI 18 : 0 / 20 : 4	PE-エーテル 38 : 6
PI 18 : 0 / 18 : 1	PE-エーテル 34 : 1
PI 18 : 1 / 18 : 1	PE-エーテル 34 : 2
PI 18 : 0 / 16 : 0	PC 34 : 1
PA 18 : 0 / 18 : 1	PC 36 : 4
PS 18 : 0 / 18 : 1	PC 34 : 3
BMP 18 : 0 / 18 : 1	PC 32 : 0
BMP 18 : 1 / 18 : 1	PC 30 : 0

10

20

【表 1 - 2】

BMP 18 : 1 / 16 : 0	SM 24 : 1
CL (18 : 1) 3 / 16 : 1	SM 16 : 0
CL (18 : 1) 2 / (16 : 1) 2	ジヒドロスフィンゴミエリン 16 : 0

30

【表 2 - 1】

表 2. エキソソームポリペプチド			
ACLY	TCP1	ACTR1A	LY75
ACTB	PRDX2	THOC4	ABCC1
ACTG1	TSPAN6	INADL	MYO1E
ALB	CCT3	CTDSPL	NACA
ALDOA	TSTA3	ZMPSTE24	NAP1L4
ALDOB	TUBA3C	DNAJA2	NCL
AKR1B1	HIST1H2AK	NDRG1	NEDD8
AMBP	HIST1H2AJ	RAPGEF3	YBX1
ANPEP	HIST1H2AB	SPON2	PA2G4
ANXA2	HIST2H2AC	UBAC1	PECAM1
ANXA3	IFITM1	N4BP2L2	PFAS
ANXA4	PDXK	CAP1	SERPINB9
ANXA5	LIN7A	VAT1	PI4KA
ANXA6	BUB3	NEBL	PLAT
ANXA7	MAP4K4	DCTN2	PLCG2
ANXA11	EDIL3	ARPC1A	PPA1
	ATP6AP2	C6orf108	PPP2CA
CAPZB	PSME3	SMC2	PRKCB
CD63	TUBB3	AHSA1	PSMA6
CD81	IFITM3	STAMPB	PSMA7
CKB	ACAA2	PMVK	PSMB8
CLU	CCT7	GIPC1	PSMB9
CLIC1	CCT4	HBS1L	PSMD7
TPP1	IFITM2	NCKAP1	PSME1
CLTC	GNA13	ALDH1L1	PTPRA
CNP	RUVBL2	FTCD	RAC2
COL6A1	PRSS23	FGL2	RPL3
CR1	ACOT7	CFHR3	RPL4
CTNND1	CCT5	MMP24	RPL5
ACE	DIP2C	COPS8	RPL11
DDT	ASCC3L1	CKAP4	RPL22
DEFA1	TNIK	C10orf116	RPL24
DEFA3	NEDD4L	SLC27A2	RPL27
DNAH8	NCSTN	MID2	RPL30
DPEP1	TSPAN15	KIF3A	RPL28

10

20

30

40

【表 2 - 2】

DPP4	PLXNB2	NUDT5	RPL31
EEF1A1	SDCBP2	TREH	RPL34
EEF2	IGKV1-5	CEP250	RPL35A
EGF	IGHV4-31	PDCD10	RPL37A
EIF5A	IGKV3-20	PADI2	RPS2
ENO1	IGKV2-24	PACSIN2	RPS3A
ENO3	MINK1	CHP	RPS5
ENPEP	IGK α	SNF8	RPS9
STOM	VPS36	DDX19B	RPS19
EPS8	DERA	SCN11A	RPS25
FABP3	GOLGA7	LYPLA2	RPS26
FGA	KRT76	PARK7	RPS28
MLANA	EIF3EIP	COBLL1	RPS29
FN1	LSR	CNKSR2	RSU1
FTL	TUBA8	ENPP4	SARS
FUS	RAB4B	RAB3GAP1	SLAMF1
GAA	SETD4	AKR7A3	SLC1A4
GAPDH	TOLLIP	SPEN	SLC2A3
GDI2	PLEKHB2	GANAB	SNRPD2
GGT1	VPS37C	MGRN1	SPINK1
GLB1	LIN7C	CUX2	SPN
GLG1	H2AFJ	DNAJC13	STK10
GNA11	CAND1	ZCCHC11	STXBP3
GNAI1	PLSCR3	PHF15	TALDO1
GNAI2	KIAA1199	KIAA0841	TNFAIP3
GNAI3	GNB4	ARHGEF12	TPM3
GNAS	MYH14	COTL1	TPM4
GNB1	TSPAN14	ANGPTL2	TYK2
GNB2	NCALD	DDAH2	VIM
GNG7	REG4	HEBP2	WARS
SFN	VPS25	CD2AP	WAS
GPI	TUBB6	PLD3	LAT2
GSTA1	TUBA1C	TMEM2	HIST1H2BL
GSTA2	TNKS1BP1	SH3BP4	STX7
GSTA3	FAM125B	BHMT2	CPNE1
GSTM3	LRSAM1	GCA	RPL14
GSTP1	HIST3H2A	MXRA5	PDCD5
GUSB	TUBA3E	AHCTF1	SYNGR2
HIST1H2AD	TUBA3D	PTPN23	RPL23
HLA-A	DCD	DAK	RAB9A

10

20

30

40

【表 2 - 3】

HLA-B	HIST4H4	ACOT11	IGSF2
HLA-DQB1	ALDH16A1	APPL1	EEF1E1
HLA-DRA	RPS4Y2	PHGDH	SCAMP2
HLA-DRB1	MYL6B	TIAM2	SCAMP3
HLA-DRB5	BRI3BP	KCNG2	DPP3
HPGD	AGR3	CYFIP2	ARPC1B
HRAS	EEF1AL3	GHITM	PDIA6
HSPA1A	KRT28	C11orf54	WASF2
HSPA1B	KRT24	DBNL	ANP32B
HSPA8	RPLP0様	ATAD2	PAICS
HSP90AA1	RPSAP15	PHPT1	AHCYL1
	RANP1	C16orf80	VAMP5
KRT1	PCSK9	OLA1	41891
KRT9	METRNL	ZDHHC1	HSPH1
KRT10	LOC284889	SNX12	SUB1
LDHA	KRT6C	PSAT1	CDC37
LDHB	KRT79	NT5C	CORO1A
TACSTD1	RAB43	EHD2	CD300A
MCAM	KRT27	TAX1BP3	TMC6
MDH1	ACTBL2	CRNN	RFTN1
MEP1A	RP11-631M21.2	NOX3	SCRIB
MSN	TUBB2B	ATP6V0A4	SERBP1
2-Sep	KRT77	ITSN2	TTLL3
PGAM1	AGRN	GEMIN4	CACYBP
PGK1	RAB15	LAP3	SIT1
PKM2	LOC388524	CRYL1	SLC43A3
PPP1CA	LOC388720	MYO15A	PILRA
	HSP90AB2P	ATP6V1D	RPL26L1
PTPRC	ACTBL3	SNX9	MPP6
RAN	LOC442497	PCYOX1	GNG2
RDX	A26C1A	ANKFY1	TMED9
SDCBP	HIST2H4B	UFC1	DOCK10
STX3	hCG_1757335	FAM49B	C3orf10
STXBP1	HLA-A29.1	CUTA	MYO1G
STXBP2	LOC653269	ATP6V1H	FLJ21438
TPI1	A26C1B	VPS24	SLC38A1

10

20

30

40

【表 2 - 4】

EZR	LOC100128 936	CMPK1	FERMT3
YWHAE	LOC100130 553	UPB1	ITFG3
TUBA1A	LOC100133 382	CLIC5	HIST1H2AH
WDR1	LOC100133 739	MUPCDH	SLAMF6
PDCD6IP	AP2A2	CLIC6	TMC8
GPA33	ALDH3B1	SIAE	LOC153364
TUBA1B	FASLG	CPVL	SVIP
TUBB2C	ATP4A	RHOF	TMEM189-U BE2V1
CAPN7	CAPS	ARL15	hCG_16001
DDAH1	COL12A1	ZNHIT6	FABP5L7
PGLS	DMBT1	GIPC2	Del(X)1Br d
SAMM50	DSP	PCDH24	ABP1
CLIC4	EGFR	VPS13C	ACTN3
CHMP2B	EPHA5	CC2D1A	AFM
ULK3	EPHB1	EPS8L1	AKT1
RNF11	FAT	C10orf18	ALDH3A2
VPS4A	HSD17B4	CHCHD3	ALOX12P2
ARFIP1	L1CAM	C2orf18	ANXA2P1
CHMP2A	LAMA5	C17orf80	KRT33B
SMPDL3B	MUC4	EPN3	MYOC
PACSIN3	NOTCH1	UACA	SERPINE1
EHD4	PPP2R1B	VPS13D	PIK3CA
EHD3	PTPRF	APPL2	NRP1
HEBP1	SORT1	ARL8B	SPRY1
VPS28	SERPINB3	DDX19A	EMILIN1
DCXR	SELP	NAGK	LRG1
RHCG	FSCN1	ITLN1	AZGP1P1
CHMP5	TGFB1	CCDC132	LOC728533
VT A1	CLTCL1	OTUB1	ALDH7A1
RAB14	CHST1	CDK5RAP2	AXL
GPRC5B	EIF3I	MBD5	CFB
CAB39	TNFSF10	SLC22A11	C1S
RAB8B	MAP7	SUSD2	CAT
TM7SF3	COPB2	SUCNR1	CD47
MXRA8	HEPH	BDH2	CD151
C11orf5		NIT2	CDH13

10

20

30

40

【表 2 - 5】

9			
MOBKL1B	CIB1	RPL23AP1 3	CFTR
UEVLD	SLC34A2	FAM20C	CEACAM8
TSNAXIP 1	SLC6A14	SLC12A9	AP1S1
GPRC5C	DIP2A	RAB25	CLTA
GNG12	TNPO3	SMURF1	CNGB1
BAIAP2L 1	FER1L3	TMEM27	COL1A1
MUC13	CNTLN	RAB22A	COL1A2
CHMP1B	TUBB4Q	NDRG3	COL2A1
SLC44A2	KIF15	ERMN	COL3A1
CPNE5	SERINC1	TAOK1	COL4A1
TMBIM1	PDIA2	KIAA1529	COL4A2
EPS8L3	EPS8L2	RNF213	COL4A3
MMRN2	PLVAP	WIZ	COL5A1
TTYH3	MYADM	ACE2	COL5A2
SLC44A4	MUC16	PLEKHA1	COL7A1
RAB1B	KRT25	SCPEP1	COMP
RAB33B	SERINC5	AASDHPPT	CPS1
RBP5	LOC440264	FIGNL1	CSF1
C5orf32	AGT	PBLD	VCAN
ABHD14B	ALPP	KIF9	SLC25A10
MOBKL1A	APOA2	LEPRE1	CTBP2
ARRDC1	APOB	RAB17	CTNNA2
	APOE	IKZF5	DCTN1
FAM125A	SERPING1	MMP25	DECR1
SNX18	C1QB	MPP5	DNASE1L1
CHMP4B	C1R	TEKT3	ENG
MITD1	C4A	ALDH8A1	STX2
S100A16	C4B	SLC13A3	ETFB
CPNE8	C4BPA	DUSP26	F2R
C1orf58	C4BPB	GGCT	F8
GLIPR2	CD5L	TMEM38A	ACSL1
TUBB	FCN1	C1orf116	FAP
ATP6V1C 2	FCN2	GDPD3	FBLN1
FTLL1	FGB	OR2A4	FBN1
PEF1	FGG	FAM65A	FBN2
SERPINA	GRIN1	NARG1L	FEN1

10

20

30

40

【表 2 - 6】

3			
ACP 2	MSH 6	CHMP 6	FLT 1
ACPP	HBA 1	DYNC 2 H 1	FUCA 2
ACTA 2	HBA 2	PRKRIP 1	GAS 6
ACTC 1	ITGA 2 B	GSTCD	GDI 1
ACTG 2	PPARG	PIP 4 K 2 C	GLDC
ACY 1	PDLIM 7	CYBRD 1	GNAL
APCS	CD 2 7 4	FUZ	GRM 2
APOD	A1BG	ARMC 9	GRM 3
APRT	ACAT 1	NAT 1 3	GRM 7
AQP 1	ACO 1	COASY	GSTM 1
AQP 2	ADCY 1	UBXN 6	GSTM 5
ARF 1	ADFP	COL 1 8 A 1	H2AFX
ARF 3	ADH 5	BHLHB 9	HBE 1
ARF 4	ADH 6	WNT 5 B	HMGCS 2
ARF 5	PARP 4	CAB 3 9 L	TNC
ARF 6	AHSG	ITM 2 C	IDH 3 B
RHOA	AK 1	LOC 8 1 6 9 1	IFRD 1
ARL 3	ALAD	AMN	ITGA 5
ASAH 1	ALCAM	SH3BGRL 3	ITGB 5
ASS 1	ALDH 2	C 9 o r f 5 8	ITPR 2
FXD 2	ALDH 9 A 1	BCL 2 L 1 2	KRT 8 4
BHMT	ALDOC	RAB 3 4	LAMB 1
BST 2	ALK	TBC 1 D 1 0 A	LCN 1
C 3	ALOX 1 2	GPR 9 8	LGALS 8
CA 2	ALPL	HDHD 2	LMNA
CA 4	ANXA 1 3	ARL 6	LOXL 2
CALB 1	AOX 1	IQCG	LTBP 2
CALR	APAF 1	C 2 o r f 1 6	MAP 1 A
CD 9	APOA 4	PARD 6 B	MAT 1 A
CD 5 9	SHROOM 2	TXNDC 1 7	MC 1 R
HSPA 5	RHOB	ABCC 1 1	MCC
HSPA 6	ARHGAP 1	FAM 4 0 A	ME 1
HSP 9 0 AB 1	ARHGDIB	SCIN	MECP 2
HSPD 1	ARSE	SCRN 2	MAP 3 K 1
IDH 1	ARSF	ZNF 4 8 6	MFAP 4
KNG 1	ASL	ACY 3	SCGB 2 A 1
KRAS	ASNA 1	C 1 1 o r f 5 2	ALDH 6 A 1
LAMP 1	ATIC	CRB 3	MOS
LGALS 3 B	ATP 6 V 1 A	C 2 0 o r f 1 1	CITED 1

10

20

30

40

【表 2 - 7】

P		4	
L R P 2	A T P 6 V 1 B 1	N A P R T 1	N E F H
M A N 1 A 1	A T P 6 V 1 B 2	R G 9 M T D 2	O P R M 1
R A B 8 A	A T P 6 V 0 C	S A T 2	O T C
M I F	A T P 6 V 1 C 1	K I F 1 2	O X T R
M M E	A T P 6 V 1 E 1	M A L 2	P A P P A
M U C 1	A T P 6 V 0 A 1	O S B P L 1 A	P C
M Y H 9	A T P 6 A P 1	V A S N	P C O L C E
N A G L U	A Z U 1	S L C 2 2 A 1 2	P D G F R B
N O N O	B C R	A C S M 1	P F K F B 3
N P M 1	B G N	T T C 1 8	P G A M 2
N R A S	B L M H	G S T O 2	S E R P I N E 2
P 2 R X 4	B L V R A	C L R N 3	P L P 2
P 4 H B	B L V R B	L R R K 2	P P P 1 C C
P E B P 1	B P I	C 1 2 o r f 5 9	S R G N
S E R P I N A 5	B T G 1	L O C 1 2 4 2 2 0	M A P 2 K 6
P F N 1	B T N 1 A 1	S L C 5 A 1 0	P S M B 7
P F N 2	T S P O	C C D C 1 0 5	P S M B 1 0
A B C B 1	C 1 Q C	C 1 o r f 9 3	P T K 7
S E R P I N A 1	C A P N 5	A R L 8 A	P T P R K
P I G R	C 5	L O C 1 2 8 1 9 2	P Z P
P I K 3 C 2 B	C 9	G A L M	R A D 2 1
P K D 1	P T T G 1 I P	L R R C 1 5	R A S A 1
P L S C R 1	C A C N A 2 D 1	L O C 1 3 1 6 9 1	R D H 5
P O D X L	C A L M L 3	H 1 F O O	R P L 1 8
C T S A	C A M K 4	E N P P 6	R P L 2 9
P P I A	C A M P	C M B L	R P S 1 0
P S A P	C A P G	M U M 1 L 1	R P S 2 4
P S M B 3	C A P N 1	C 2 0 o r f 1 1 7	S 1 0 0 A 1 3
P T B P 1	C A P N 2	S I R P A	S A A 4
P T P R J	C A P Z A 2	P L E K H A 7	A T X N 1
R A B 1 A	C D 1 4	A 2 M L 1	C L E C 1 1 A
R A B 2 A	C D 8 0	C 1 6 o r f 8 9	S D C 2
R A B 3 B	C D 3 6	T O M 1 L 2	S M A R C A 4
R A B 5 A	S C A R B 2	K I F 1 8 B	S P O C K 1
R A B 5 B	C D 4 0	C 1 9 o r f 1 8	S T A T 1

10

20

30

40

【表 2 - 8】

RAB13	CDC2	PM20D1	STC1
RAB27B	CEL	PROM2	SURF4
RAB5C	CETP	GPR155	SYT1
RAC1	CTSC	SLC36A2	TAGLN
RALB	AP2M1	VPS37D	TCN1
RAP1B	CSN1S1	SLC5A12	TERF1
RBM3	CSN2	SLC5A8	TGFB2
RNASE2	CSN3	EML5	TSPAN4
S100A6	ACSL3	TBC1D21	TSN
S100A11	FOLR1	ZNF114	TSNAX
S100P	B4GALT1	ANO6	COL14A1
SLC1A1	GNAQ	SLC5A9	WNT5A
SLC2A5	HBB	CRTC2	ZNF134
SLC12A1	HBD	C20orf106	PXDN
SLC12A3	CFH	TMEM192	SMC1A
SNCG	HLA-G	ARMC3	OFD1
SNRPD1	HP	NAPEPLD	COPS3
SOD1	HPR	C10orf30	STC2
SRI	IGHA1	ATP6V0D2	ADAM9
TF	IGJ	STXBP4	CREG1
THBS1	IGLC1	C17orf61	CDK5R2
THY1	IGLC2	TXNDC8	TNFSF18
TMPRSS2	IGLC3	LRRC57	MPZL1
TSG101	LAMC1	HSPA12A	SEMA5A
TUBB2A	LPA	MAGI3	CLDN1
UBE2N	LPL	C11orf47	RGN
UMOD	LRP1	SLC39A5	SLC16A3
UPK2	LTF	C12orf51	ARHGEF1
VTN	TACSTD2	SLC46A3	LRRFIP2
EIF4H	MBL2	VMO1	TAAR2
YWHAB	MYH8	SLC26A11	CRIP1
YWHAG	NEB	LOC284422	ENTPD4
YWHAZ	PON1	CRB2	IFT140
NPHS2	PKN2	HIST2H2AB	RNF40
RAB7A	PROS1	FAM151A	RB1CC1
PSCA	MASP1	SLC6A19	PSMD6
CUBN	RELN	PKD1L3	MRC2
BBOX1	PTX3	LOC34289	HDAC5

10

20

30

40

【表 2 - 9】

		7	
RAB11A	RARS	EGFL11	RASA4
NAPA	SILV	SERINC2	SLC25A13
PROM1	THBS2	PDDC1	PSMD14
FCGBP	TLR2	SLCO4C1	TFG
CPNE3	TTN	SFT2D2	CDIPT
MGAM	TTR	C9orf169	CRTAP
GPRC5A	TYRP1	LOC377711	UNC13B
RAB11B	VWF	OR11L1	ARL6IP5
VAMP3	CLIP2	RAB19	TGOLN2
SLC9A3R1	XDH	LOC440335	POSTN
ITM2B	APOL1	HIST2H2BF	CLPX
NAPSA	FCN3	LOC441241	TSPAN9
VPS4B	SELENBP1	KPRP	TMED10
RAB3D	SMC3	HSP90AB6P	SLC38A3
PRDX6	DDX21	LOC643751	IL1RAPL1
KIAA0174	CCPG1	LOC651536	GALNT5
PDCD6	ABCG2	LOC652968	PRR4
ARPC4	SFI1	AEBP1	ITGA11
TSPAN1	MVP	AMY1A	CLASP2
PDZK1IP1	AKAP9	AMY1B	EPB41L3
NUTF2	PRG4	AMY1C	KIAA0467
FLOT1	AKR1A1	AMY2A	DULLARD
HRSP12	ABCA7	ANGPT1	NOMO1
A2M	COLEC10	APLP2	KIAA0146
ACP1	GNB5	APP	SLC39A14
ACTA1	MMRN1	AQP5	DNPEP
ACTN4	CLASP1	AZGP1	CASP14
ACTN1	SYNE1	CEACAM1	STX12
ACTN2	NIPBL	BMP3	BRMS1
ADAM10	CHRD12	CA6	ABI3BP
AHCY	HSPB8	DDR1	PLEKHG3
ALDH1A1	ANGPTL4	CAPNS1	FBXW8

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

SLC25A4	NIN	COL6A2	GAPDHS
SLC25A5	ZNF571	COPA	GREM1
SLC25A6	LRP1B	CPD	DKK3
ANXA1	CNDP2	DLD	SRPX2
ANXA2P2	DNAH7	ETFA	IGHV3-11
APOA1	HCN3	GLUD1	IGHV3-7
ARHGDIA	EXOC4	HSD17B10	IGLV4-3
ARVCF	SNX25	IMPDH2	IGLV3-21
	TC2N	HTATIP2	IGLV1-40
	HAPLN3	MARVELD2	ST6GALNAC6
ATP1B1	CD163L1	CST4	COPS4
ATP5A1	HRNR	CST5	HERC5
ATP5B	P704P	CTSB	NUSAP1
ATP5I	CD24	DAG1	PLUNC
ATP5O	COL6A3	DSG2	PPME1
B2M	COL15A1	TOR1A	MBD3
CALM1	COMT	ECM1	SLC38A2
CALM2	CP	EIF4G1	FAM64A
CALM3	CPN2	EXT2	GTPBP2
CANX	CRABP2	FAT2	DIRAS2
CAPZA1	CRK	GPC4	DCHS2
CD2	CRYAB	FOLH1	QPCTL
CD247	CRYM	FUT2	PARP16
CD86	CSE1L	FUT3	TMEM51
CD37	CSK	FUT6	MCM10
CD44	CSTB	FUT8	CHST12
CD53	CTH	GLRX	LYAR
CDC42	CTNS	GPC1	ODZ3
CDH1	CTSD	GPX3	WDR52
CFL1	CTSG	IGHA2	ASH1L
CFL2	DDB1	IGHV α	UNC45A
COX4I1	DDC	IGL α	SLC7A10
COX5B	DDX3X	IVL	PNO1
CLDN3	DDX5	KRT12	CD248
CSPG4	CFD	LAMA4	AHRR
CSRP1	DNM2	LAMB2	ZBTB4
CST3	DPYS	LGALS7	SPTBN4
CTNNA1	DSC2	LMAN1	LGR6
CTNNB1	DSG3	LPO	RNF123
NQO1	ECE1	LTBP3	PRDM16

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

DYNC1H1	MEGF8	DNAJB9	PARVG
EEF1A2	ELA2	MEST	RMND5A
EFNB1	SERPINB1	MGAT1	FAT4
CTTN	EPHX2	MGP	FLJ13197
EPHB4	FBL	MUC5AC	TREML2
ERBB2	EVPL	MUC7	SVEP1
F5	F11	NEU1	OBFC1
FASN	FABP1	NUCB1	ZNF614
FKBP1A	ACSL4	NUCB2	FLJ22184
FLNA	FAH	FURIN	DBF4B
FLNB	EFEMP1	PAM	CD276
G6PD	FBP1	PLG	CMIP
GCNT2	FKBP4	FXD3	ADAMTS12
PDIA3	FKBP5	PLD2	SPACA1
GSN	FRK	PLTP	VANGL1
HADHA	FTH1	PON3	SPRY4
HLA-DMB	FUCA1	PPP1CB	HYI
HLA-E	GABRB2	PRELP	FAM108A1
HNRNPA2B1	GALK1	DNAJC3	TMEM47
HNRNPH2	GBE1	HTRA1	MYCBPAP
HSPA1L	GDF2	RARRES1	RAB6C
HSPA2	GFRA1	SAA1	FAM71F1
HSPA4	GK2	SAA2	ZNF503
HSPA7	GLO1	SEPP1	PARP10
HSPA9	GLUL	SFRP1	SHANK3
HSP90AA4P	GM2A	ST3GAL1	LACRT
HSP90AA2	GNG5	SLC5A5	TRIM41
HSP90AB3P	GOT1	SLC9A1	OXNAD1
HSPE1	GPD1	SLC20A2	LDHAL6B
HSPG2	GPM6A	SLPI	LOC92755
ICAM1	GPT	SRPR	CACNA2D4
ITGA6	GPX4	STAU1	ARHGAP18
ITGA2	GRB2	HSPA13	AHNAK2
ITGAV	GRID1	TGFB1	RPLP0P2
	GSR	TGM1	PGLYRP2
ITGB2	GSS	TGM3	RAB39B
ITGB4	GSTM2	YES1	GYLTL1B

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

JUP	HGD	HIST2H2A A3	KRT74
CD82	HINT1	HIST2H2B E	SLAIN1
KPNB1	HNMT	GALNT4	LOC122589
KRT2	HNRNPL	B4GALT3	NLRP8
KRT5	HPD	TNFSF13	PODN
KRT8	HPX	TNFSF12	C5orf24
KRT13	HRG	ANGPTL1	CD109
KRT14	DNAJA1	GCNT3	TRIM40
KRT15	HSPB1	TM9SF2	GPR112
KRT16	DNAJB1	DDX23	KRT72
KRT18	CFI	ADAMTS3	VTI1A
KRT19	IGF2R	GPR64	SYT9
LAMP2	IGFALS	LHFPL2	KRT80
LGALS4	IL1RN	ST3GAL6	CCDC64B
LYZ	IRF6	PRDX4	ATP8B3
	ITGA1	MAN1A2	C1orf84
MFGE8	EIF6	OS9	LOC149501
MMP7	ITGB8	MGAT4A	LOC150786
MYH10	ITIH4	TWF2	WDR49
MYL6	KHK	CLCA4	NEK10
MYO1C	KIFC3	TXNDC4	STOML3
MYO1D	KLK1	PLCB1	SASS6
NME1	LBP	CES3	DCLK2
NME2	LCN2	B3GAT3	FREM3
PRDX1	LCP1	TOR1B	C9orf91
PCBP1	LTA4H	IGHV3OR1 6-13	TREML2P
CHMP1A	BCAM	IGLV2-11	CCDC129
SERPINF 1	MAN2A1	IGLV1-44	PAN3
PHB	MDH2	IGKV3D-1 5	MAMDC2
PPIB	MFI2	IGKV4-1	RCOR2
PRKAR2A	MLLT3	C1GALT1C 1	LOC283412
PRKDC	MLLT4	RACGAP1	LOC283523
PSMA2	MNDA	EFEMP2	NOMO2
QSOX1	MPO	DUOX2	SEC14L4
PYGB	MPST	SDF4	LCN1L1
RAB6A	MYO1B	CYB5R1	LOC286444

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

RALA	MSRA	ERAP1	TAS2R60
RAP1A	MTAP	NUDT9	KRT18P19
RPL6	MTHFD1	FAM3B	LOC343184
RPL8	MYH3	FAM20A	LOC345041
RPLP1	MYO5B	FAM55D	GNAT3
RPLP2	MYO6	ANO1	POLN
RPN1	NID1	LRRC16A	LOC376693
RPS3	NKX6-1	TTC17	ARMS2
RPS7	NQO2	PDGFC	LOC387867
RPS13	NP	PCDHGB5	LOC388339
RPS14	NPC1	CCL28	FLG2
RPS15A	NPHS1	UGCGL1	LOC388707
RPS18	NRF1	SEMA3G	LOC389141
RPS20	NT5E	CORO1B	LOC390183
RPS21	PAFAH1B1	NDRG2	KRT8P9
RPS27A	PAFAH1B2	KIAA1324	LOC391777
RRAS	PCBD1	TXNDC16	LOC391833
S100A10	PCK1	ARHGAP23	LOC399942
SDC1	PDCD2	MUTED	LOC400389
SDC4	PDE8A	TINAGL1	LOC400578
SLC1A5	ENPP3	TOR3A	LOC400750
SLC2A1	SLC26A4	VWA1	LOC400963
	PDZK1	CHID1	FLJ21767
SLC12A2	PEPD	TMEM109	LOC401817
SLC16A1	PFKL	GAL3ST4	NOMO3
SPTBN1	PGD	THSD4	LOC439953
SSBP1	PGM1	UXS1	RPL12P6
SSR4	SLC25A3	TXNDC5	LOC440589
TBCA	SERPINA4	CRISPLD1	LOC440917
TCEB1	SERPINB6	LOXL4	LOC440991
TFRC	SERPINB13	GNPTG	LOC441876
TKT	PIK3C2A	SCGB3A1	LOC442308
TSPAN8	PIP	CHST14	DIPAS
TPM1	PKD2	C1QTNF1	LOC643300
HSP90B1	PKLR	C1QTNF3	LOC643358
TUBA4A	PKHD1	SLC26A9	LOC643531
TUFM	PLCD1	FAM129A	RPSAP8
TXN	PLOD1	HIST2H3C	LOC644464
UBA52	PLS1	TPRG1L	LOC644745
UBB	UBL3	TMPRSS11B	LOC645018

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

UBC	PPL	C20orf70	LOC645548
UBA1	PPP1R7	PPM1L	LOC646127
UBE2V2	PRCP	GBP6	LOC646316
UGDH	PRKCA	KRT78	LOC646359
UQCRC2	PRKCD	SLC37A2	LOC646785
VCP	PRKCH	NPNT	LOC646875
VIL1	PRKCI	KRT73	LOC646949
YWHAH	PRKCZ	HIST2H3A	LOC647000
CXCR4	PRNP	VWA2	LOC647285
SLC7A5	PRSS8	GSTK1	LOC650405
HIST1H4 I	PRTN3	SBSN	LOC650901
HIST1H4 A	PSMA1	C5orf46	LOC652493
HIST1H4 D	PSMA3	LRRC26	LOC652797
HIST1H4 F	PSMA4	C4orf40	LOC653162
HIST1H4 K	PSMA5	LOC44078 6	PPIAL3
HIST1H4 J	PSMB1	SCFV	LOC653232
HIST1H4 C	PSMB2	LGALS7B	HSPBL2
HIST1H4 H	PSMB5	HIST2H3D	LOC728002
HIST1H4 B	PSMB6	ACAT2	LOC728088
HIST1H4 E	PSMC5	ACTL6A	LOC728576
HIST1H4 L	PSMD12	ADK	LOC728590
HIST2H4 A	PSME2	ANXA8L2	LOC728791
TAGLN2	PTPN6		LOC728979
RUVBL1	PTPN13		ANG
VAMP8	PTPRO		BDNF
SNAP23	QDPR	CAV1	CALU
IQGAP1	RAB27A	CD70	CCR4
KRT75	RAP1GDS1	CS	CCR5
TJP2	RBL2	DARS	CSF2
ROCK2	RBP4	DHX9	CSF3

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

ARPC3	RENB P	DPYSL2	DCN
ACTR3	RFC1	EEF1D	EPO
LRPPRC	RHEB	EPRS	F3
TRAP1	RNH1	FDPS	GPC5
TUBB4	RNPEP	FLNC	GDF1
GNB2L1	ROBO2	XRCC6	GDF9
BAIAP2	RP2	GFPT1	GFRA3
HYOU1	RPS11	HIST1H1B	GRN
AGR2	RREB1	HIST1H2B B	CXCL2
OLFM4	RYR1	H3F3A	GZMA
CCT2	S100A4	H3F3B	HIST1H2BD
ATP5L	S100A8	HNRNPF	HGF
CCT8	S100A9	HNRNPK	IFNG
SLC12A7	SERPINB4	IARS	IGFBP3
MASP2	SCN10A	LAMA3	IGFBP4
IQGAP2	SEC13	LAMB3	IGFBP6
RAB10	SECTM1	LAMC2	IGFBP7
PRDX3	SH3BGRL	LGALS1	IL1RAP
EHD1	SHMT1	NBR1	IL3
TMED2	SHMT2	MARS	IL5
LMAN2	SLC3A1	MX1	IL6ST
YWHAQ	SLC4A1	PFKP	IL7
GCN1L1	SLC5A1	PLAU	IL8
RAB35	SLC5A2	PSMB4	IL10
DSTN	SLC6A13	PSMC2	IL11
UPK1A	SLC9A3	PSMC4	IL13
PHB2	SLC15A2	PSMD2	IL15RA
RRAS2	SLC25A1	PSMD13	INHBA
SEC31A	SLC22A2	PYGL	INHBB
CLSTN1	SLC22A5	RPL10	IPO5
PTGR1	SMO	RPL15	LIF
RAB21	SORD	STX4	LRP6
CYFIP1	SORL1	TARS	LTBP1
SLC44A1	SPAST	CLDN5	MMP1
CORO1C	SPR	TPBG	MMP2
MTCH2	SPRR3	XPO1	MMP3
QPCT	SRC	XRCC5	MMP10
PRDX5	ST13	BAT1	NBL1
SND1	STK11	HIST1H2B G	TNFRSF11B

10

20

30

40

【表 2 - 1 6】

F 1 1 R	V A M P 7	H I S T 1 H 2 B F	O S M
L I M A 1	S Y P L 1	H I S T 1 H 2 B E	P D G F A
R A B 6 B	S E R P I N A 7	H I S T 1 H 2 B I	P R K C S H
K R T 2 0	T E C T A	H I S T 1 H 2 B C	C C L 2
V P S 3 5	T G M 4	H I S T 1 H 4 G	C C L 7
T O M M 2 2	T G F B R 3	E I F 3 A	C C L 2 0
A K R 1 B 1 0	T G M 2	E I F 3 B	S F R P 4
S 1 0 0 A 1 4	T L N 1	E I F 3 C	S O D 3
D I P 2 B	D N A J C 7	S L C 5 A 6	S P A R C
R A P 2 C	U B E 2 G 1	H I S T 2 H 2 A A 4	T I M P 1
F A M 1 2 9 B	U P K 1 B	L O C 7 2 8 3 5 8	T I M P 2
	U G P 2	L O C 7 3 0 8 3 9	T I M P 3
A H N A K	U P K 3 A	L O C 1 0 0 1 2 6 5 8 3	I C A M 5
V P S 3 7 B	U T R N	A A R S	T N F R S F 1 A
T U B A 4 B	V A S P	A K 2	V E G F C
A R P C 5 L	V C L	A P E H	G D F 5
E P P K 1	V D A C 1	F A S	H I S T 3 H 3
A D S L	V D A C 3	B A X	H I S T 1 H 2 A I
A P 2 A 1	X P N P E P 2	F M N L 1	H I S T 1 H 2 A L
R H O C	B T G 2	C A S P 9	H I S T 1 H 2 A C
R H O G	G C S 1	C D 1 9	H I S T 1 H 2 A M
A S N S	B A T 2	M S 4 A 1	H I S T 1 H 2 B N
	P T P 4 A 2	C D 2 2	H I S T 1 H 2 B M
C A D	D Y S F	T N F R S F 8	H I S T 1 H 2 B H
C B R 1	E E A 1	S C A R B 1	H I S T 1 H 2 B O
C B R 3	S T K 2 4	E N T P D 1	H I S T 1 H 3 A
C C T 6 A	C U L 4 B	C D 4 8	H I S T 1 H 3 D
C D H 1 7	C U L 3	C D 5 8	H I S T 1 H 3 C
C E A C A M 5	A T R N	C D 7 4	H I S T 1 H 3 E
C O P B 1	C D C 4 2 B P A	C D 7 9 B	H I S T 1 H 3 I
C L D N 4	P P F I A 2	C D 9 7	H I S T 1 H 3 G
C L D N 7	A K R 7 A 2	4 1 8 8 9	H I S T 1 H 3 J
C R Y Z	P P A P 2 A	C R 2	H I S T 1 H 3 H
C D 5 5	A B C B 1 1	C S N K 2 B	H I S T 1 H 3 B

10

20

30

40

【表 2 - 1 7】

EEF1G	MAP2K1IP1	DBI	FADD
EPHA2	EIF3H	DHCR7	IL1RL2
EIF4A1	SLC4A4	DLG1	FGF18
EIF4A2	SNX3	DOCK2	FGF16
ENO2	MYH13	DUT	HIST1H3F
SLC29A1	NAPG	ECH1	HIST1H2AG
EPHB2	FBP2	VAPA	HIST1H2BJ
EPHB3	SCEL	H2AFY	NRG2
ESD	SUCLA2	PDIA4	GDF3
F7	GGH	EIF4A3	FGF19
FLOT2	PROZ	ACTR1B	GDF11
GARS	SQSTM1	OPTN	FST
GMD5	AP1M1	NAMPT	LASS1
GNB3	RAB7L1	MPZL2	HPSE
HIST1H2AE	WASL	STIP1	ESM1
HLA-C	PLOD3	PKP3	DKK1
HLA-H	PGLYRP1	POFUT2	IL17B
HPCAL1	KALRN	QPRT	IL19
	CLIC3	WBP2	TNFRSF12A
IGH α	BAZ1B	ERO1L	IL23A
IGHG1	SPAG9	H2AFY2	FGFRL1
IGHG2	SLC13A2	RCC2	TREM1
IGHG3	ATP6V0D1	RTN4	IL1F9
IGHG4	HGS	GLT25D1	CXCL16
IGHM	AP4M1	RNASE7	IL22RA1
IGKC	ATP6V1F	FCRLA	HIST1H2BK
ITGA3	PTER	H2AFV	HIST3H2BB
KRT3	TRIP10	MRLC2	LOC440093
KRT4	SLC9A3R2	PAGE2	PGAM4
KRT6A	SLIT2	HIST1H2BA	PC-3
KRT6B	SLC22A6	SNX33	LOC729500
KRT7	KL	PTRF	KRT18P26
KRT17	KIF3B	HIST2H2BC	S100A11P
RPSA	SLC22A8	ANXA8	LOC729679
LFNG	GRHPR	NME1-NME2	KRT17P3
LGALS3	SLC22A13	EIF2S1	RCTPI1
LRP4	TMPRSS11D	EIF2S3	LOC729903

10

20

30

40

【表 2 - 1 8】

CD 4 6	G S T O 1	E I F 4 E	R P 1 1 - 5 5 6 K 1 3 . 1
M I C A	N P E P P S	E P B 4 1 L 2	L O C 1 0 0 1 2 9 9 8 2
MYH 1 1	T M E M 5 9	E V I 2 B	L O C 1 0 0 1 3 0 1 0 0
N A R S	A T P 6 V 1 G 1	F C E R 2	L O C 1 0 0 1 3 0 4 4 6
N E D D 4	C D C 4 2 B P B	F G R	L O C 1 0 0 1 3 0 5 6 2
R P L 1 0 A	C R E B 5	F H	L O C 1 0 0 1 3 0 6 2 4
P C N A	C R O C C	G A R T	L O C 1 0 0 1 3 0 7 1 1
P L E C 1	D H X 3 4	G O T 2	L O C 1 0 0 1 3 0 8 1 9
P L X N A 1	T M E M 6 3 A	N C K A P 1 L	L O C 1 0 0 1 3 1 7 1 3
P P P 2 R 1 A	S L K	H L A - D P B 1	L O C 1 0 0 1 3 1 8 6 3
P S M C 6	R U S C 2	H L A - D Q A 1	L O C 1 0 0 1 3 2 7 9 5
P S M D 3	O X S R 1	H N R N P A 1	L O C 1 0 0 1 3 3 2 1 1
P S M D 1 1	S L C 2 3 A 1	H N R N P C	L O C 1 0 0 1 3 3 6 9 0
R A C 3	D O P E Y 2	H P R T 1	S E T
R A P 2 A	A B I 1	I C A M 3	C C T 6 B
R A P 2 B	G N P D A 1	I N S R	A C T R 3 B
R P L 1 2	T O M 1	E I F 3 E	P S M A 8
R P L P 0	A B C B 6	I T G A L	A R P 1 1
R P S 4 X	A B C C 9	I T G B 3	B C H E
R P S 4 Y 1	H U W E 1	I T G B 7	H 2 A F Z
R P S 8	A R P C 5	I T I H 2	S N R P E
R P S 1 6	A C T R 2	S T M N 1	T F P I
S P T A N 1	T S P A N 3	L C K	A D A M T S 1
V A M P 1	A R P C 2	L S P 1	G D F 1 5

10

20

30

40

【表 3－1】

表 3. ポリペプチドペイロード及びレシーバー			
一般クラス			
アンキリンリピートタンパク質		フィブロネクチン	リアーゼ
抗体	補体受容体	G P I 連結ポリペプ	ナノボディ

【表 3 - 2】

		チド	
アプタマー	環状ペプチド	HEATリピートタンパク質	核酸
ARMリピートタンパク質	DARPin	ヒドロラーゼ	ポリペプチド
炭水化物	DNAse	キナーゼ	一本鎖可変断片 (scFv)
細胞表面受容体	酵素	リポタンパク質	テトラトリコペプチドリピータンパク質
補体			
C1阻害剤	C4結合タンパク質	CR3	第I因子
C3ベータ鎖受容体	CD59	CR4	相同制限因子
C3aR	CR1	崩壊促進因子 (DAF)	膜補因子タンパク質 (MCP)
C3eR	CR2	H因子	PRELP
酵素			
トリアシルグリセロールリパーゼ	胆汁酸-COAヒドロラーゼ	フェルロイルエステラーゼ	ホスファチジン酸ホスファターゼ
(S)-メチルマロニル-COAヒドロラーゼ	ビス(2-エチルヘキシル)フタル酸エステラーゼ	ホルミル-COAヒドロラーゼ	ホスファチジルグリセロホスファターゼ
[アシル担体タンパク質] ホスホジエステラーゼ	ビスホスホグリセリン酸ホスファターゼ	フルクトース-6-リン酸ホスファターゼ	ホスファチジルイノシトールデアシラーゼ
[ホスホリラーゼ] ホスファターゼ	カルボキシルエステルヒドロラーゼ	フマリルアセトアセターゼ	ホスホジエステラーゼ I
1, 4-ラクトナーゼ	カルボキシメチレンブテノリダーゼ	フサリニン-Cオルニチンエステラーゼ	ホスホグリセリン酸ホスファターゼ
11-シス-レチニルパルミチン酸ヒドロラーゼ	セルロース-ポリスルファターゼ	ガラクトリパーゼ	ホスホグリコール酸ホスファターゼ
1-アルキル-2-アセチルグリセロホスホコリンエステラー	セファロスポリン-Cデアセチラーゼ	グルコノラクトナーゼ	ホスホイノシチドホスホリパーゼ C

10

20

30

40

【表 3 - 3】

ゼ			
2' - ヒドロキシ シビフェニル 2 - スルフィン 酸デスルフィナ ーゼ	セプロシドースル ファターゼ	グルコース - 1 - ホスファターゼ	ホスホリパーゼ A 1
2 - ピロン 4, 6 - ジカル ボン酸ラク トナーゼ	セトラキサートベン ジルエステラーゼ	グルコース - 6 - ホスファターゼ	ホスホリパーゼ A 2
3', 5' - ビ スリン酸ヌクレ オチダーゼ	クロロゲン酸ヒドロ ラーゼ	グルタチオンチオ ールエステラーゼ	ホスホリパーゼ C
3 - ヒドロキシ イソブチリル C o A ヒドロ ラーゼ	クロロフィラーゼ	グリセロール - 1 - ホスファターゼ	ホスホリパーゼ D
3' - ヌクレオ チダーゼ	コリンエステラーゼ	グリセロール - 2 - ホスファターゼ	ホスホノアセトア ルデヒドヒドロ ラーゼ
3 - オキソアジ ピン酸エノール - ラクトナーゼ	コリン - スルファタ ーゼ	グリセロホスホコ リンホスホジエス テラーゼ	ホスホノ酢酸ヒド ロロラーゼ
3 - フィターゼ	コロイル - C o A ヒド ロラーゼ	グリコシダーゼ、 すなわち、O - 及 び S - グリコシル 化合物を加水分解 する酵素	ホスホノピルビン 酸ヒドロラーゼ
4 - ヒドロキシ ベンゾイル - C o A チオエステ ラーゼ	コンドロ - 4 - スル ファターゼ	グリコスルファタ ーゼ	リントパク質ホ スファターゼ
4 - メチルオキ サロ酢酸エステ ラーゼ	コンドロ - 6 - スル ファターゼ	グリコシラーゼ	リン酸ジエステル ヒドロラーゼ
4 - フィターゼ	クエン酸塩 - リアー ゼデアセチラーゼ	ヒスチジノール ホスファターゼ	リン酸モノエステ ルヒドロラーゼ
4 - ピリドキシ ラクトナーゼ	コカインエステラー ゼ	ホルモン感受性リ パーゼ	リン酸トリエステ ルヒドロラーゼ
5' - ヌクレオ チダーゼ	クチナーゼ	加水分解する N - グリコシル化合物	ホスホセリンホス ファターゼ
6 - アセチルグ	シクラメートスルホ ヒ	加水分解する S -	ポリ (3 - ヒドロ

10

20

30

40

【表 3 - 4】

ルコースデアセチラーゼ	ドロラーゼ	グリコシル化合物	キシ酪酸) デポリメラーゼ
6-ホスホグルコノラクトナーゼ	システインエンドペプチダーゼ	ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロラーゼ	ポリ(3-ヒドロキシオクタン酸) デポリメラーゼ
a-アミノ酸エステラーゼ	システイン型カルボキシペプチダーゼ	ヒドロキシ酪酸-二量体ヒドロラーゼ	ポリノイリジーン-アルデヒドエステラーゼ
a-アミノ-アシル-ペプチドヒドロラーゼ	D-アラビノノラクトナーゼ	ヒドロキシメチルグルタルル-C o Aヒドロラーゼ	タンパク質グルタミン酸メチルエステラーゼ
アセトアセチル-C o Aヒドロラーゼ	デオキシリモネート (deoxylinonate) A環-ラクトナーゼ	イズロネート-2-スルファターゼ	クォーラム消光N-アシル-ホモセリンラクトナーゼ
アセトキシブチニルビチオフェンデアセチラーゼ	dGTPase	イノシトール-リン酸ホスファターゼ	レチニルパルミチン酸エステラーゼ
アセチルアジマリンエステラーゼ	ジヒドロクマリンヒドロラーゼ	幼若ホルモンエステラーゼ	セリンデヒドラターゼまたはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ
アセチルアルキルグリセロールアセチルヒドロラーゼ	ジペプチダーゼ	キヌレニナーゼ	セリンエンドペプチダーゼ
アセチルコリンエステラーゼ	ジペプチドヒドロラーゼ	L-アラビノノラクトナーゼ	セリン-エタノールアミンリン酸ホスホジエステラーゼ
アセチル-C o Aヒドロラーゼ	ジペプチジルペプチダーゼ及びトリペプチジルペプチダーゼ	リモニン-D環-ラクトナーゼ	セリン型カルボキシペプチダーゼ
アセチルエステラーゼ	二リン酸モノエステルヒドロラーゼ	リポタンパク質リパーゼ	S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ
アセチルピルビン酸ヒドロラーゼ	ジスルホグルコサミン-6-スルファターゼ	L-ラムノ-1, 4-ラクトナーゼ	シアル酸O-アセチルエステラーゼ
アセチルサリチ	ドデカノイル- [アシ	リゾホスホリパー	シナピンエステラ

10

20

30

40

【表 3 - 5】

ル酸デアセチラーゼ	ル担体タンパク質] ヒドロラーゼ	ゼ	ーゼ
アセチルキシランエステラーゼ	3' -ホスホモノエステルを産生するエンドデオキシリボヌクレアーゼ	マンニトール-1-ホスファターゼ	部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ：切断は配列特異的でない
酸性ホスファターゼ	5' -ホスホモノエステルを産生するエンドデオキシリボヌクレアーゼ	メタロカルボキシピプチダーゼ	変更された塩基に特異的な部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ。
酸無水物に作用して物質の膜貫通運動を触媒する	未知の触媒機構のエンドペプチダーゼ	メタロエンドペプチダーゼ	部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ：切断は配列特異的である
酸無水物に作用して細胞及び細胞内運動を促進する	3' -ホスホモノエステルを産生するエンドデオキシリボヌクレアーゼ	メチルホスホチオグリセリン酸ホスファターゼ	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ
GTPに作用して細胞及び細胞内運動を促進する	5' -ホスホモノエステルを産生するエンドデオキシリボヌクレアーゼ	メチルウンベリフェリル-酢酸デアセチラーゼ	S-スクシニルグルタチオンヒドロラーゼ
リン-窒素結合に作用する	リボ核酸またはデオキシリボ核酸のいずれかと活性であり、3' -ホスホモノエステルを産生するエンドリボヌクレアーゼ	モノテルペン-ε-ラクトンヒドロラーゼ	ステロイド-ラクトナーゼ
硫黄-窒素結合に作用する	リボ核酸またはデオキシリボ核酸のいずれかと活性であり、5' -ホスホモノエステルを産生するエンドリボヌクレアーゼ	N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ	ステロールエステラーゼ
アクチノマイシンラクトナーゼ	酸無水物に作用する酵素	N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ	ステリルスルファターゼ
アシルカルニチンヒドロラーゼ	炭素-炭素結合に作用する酵素	N-アセチルガラクトサミノグリカンデアセチラーゼ	スクシニル-CoAヒドロラーゼ
アシル-CoA	ペプチド結合以外の炭	N-アセチルグル	スクロース-リン

10

20

30

40

【表 3 - 6】

ヒドロラーゼ	素-窒素結合に作用する酵素	コサミン-6-スルファターゼ	酸ホスファターゼ	10
アシルグリセロールリパーゼ	炭素-リン結合に作用する酵素	N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ	糖-ホスファターゼ	
アシルオキシアシルヒドロラーゼ	炭素-硫黄結合に作用する酵素	オレオイル- [アシル担体タンパク質] ヒドロラーゼ	硫酸エステルヒドロラーゼ	
アセチルピルビン酸ヒドロラーゼ	エーテル結合に作用する酵素	オメガペプチダーゼ	タンナーゼ	
ADAMTS 13	ハロゲン化物結合に作用する酵素	オルセリン酸デブシドヒドロラーゼ	チオエステルヒドロラーゼ	20
アデノシンデアミナーゼ	ペプチド結合に作用する酵素 (ペプチダーゼ)	オキサロアセターゼ	チオエーテル及びトリアルキルスホニウムヒドロラーゼ	
アデニル- [グルタミン酸アンモニアリガーゼ] ヒドロラーゼ	リン-窒素結合に作用する酵素	パルミトイル [タンパク質] ヒドロラーゼ	スレオニンエンドペプチダーゼ	
ADP 依存性中鎖-アシル-CoA ヒドロラーゼ	硫黄-窒素結合に作用する酵素	パルミトイル-CoA ヒドロラーゼ	チミジンホスホリラーゼ	
ADP 依存性短鎖-アシル-CoA ヒドロラーゼ	硫黄-硫黄結合に作用する酵素	ペクチンエステラーゼ	トレハロース-ホスファターゼ	30
ADP-ホスホグリセリン酸ホスファターゼ	エーテルヒドロラーゼ。	ペプチジルペプチドヒドロラーゼ	トリアセテートラクトナーゼ	
アルカリホスファターゼ	5'-ホスホモノエステルを産生するエキソデオキシリボヌクレアーゼ	ペプチジルアミノ酸ヒドロラーゼ	三リン酸モノエステルヒドロラーゼ	
オールトランス-レチニルパルミチン酸ヒドロラーゼ	リボ核酸またはデオキシリボ核酸のいずれかと活性であり、3'-ホスホモノエステルを産生するエキソヌクレ	ペプチジルアミノ酸ヒドロラーゼまたはアシルアミノ酸ヒドロラーゼ	トリチオン酸ヒドロラーゼ	

10

20

30

40

【表 3 - 7】

	アーゼ		
アミノアシルー tRNAヒドロ ラーゼ	リボ核酸またはデオキ シリボ核酸のいずれか と活性であり、5' - ホスホモノエステルを 産生するエキソヌクレ アーゼ	ペプチジルジペプ チダーゼ	トロピンエステラ ーゼ
アミノペプチダ ーゼ	3' -ホスホモノエス テルを産生するエキソ リボヌクレアーゼ	フェニルアセチル -CoAヒドロラ ーゼ	ユビキチンチオー ルエステラーゼ
アリールエステ ラーゼ	5' -ホスホモノエス テルを産生するエキソ リボヌクレアーゼ。	フェニルアラニン アンモニアリアー ゼ	UDP-スルホキ ノボースシンター ゼ
アリールスルフ ァターゼ	第IX因子	フェニルアラニン ヒドロキシラーゼ	ウリカーゼ
アスパラギナー ゼ	第VIII因子	フェオホルビダー ゼ	ウロノラクトナー ゼ
アスパラギン酸 エンドペプチダ ーゼ	脂肪アシルエチルエス テルシンターゼ	フロレチンヒドロ ラーゼ	ワックスエステル ヒドロラーゼ
b-ジケトンヒドロラーゼ		ホルボールジエス テルヒドロラーゼ	キシロノー1, 4 -ラクトナーゼ

10

20

【表 4－1】

表 4． 標的			
標的の一般クラス			
微生物	ポリペプチド	DNA	アミノ酸
真菌	毒素	RNA	プリオン
細菌	脂質	寄生虫	サイトカイン
ウイルス	細胞	細胞破片	
感染症関連標的			
リポ多糖	細胞浸潤タンパク質	インターメジリン	分泌型エフェクタータンパク質 s p t P
Z o n a o c c l u d e n s 毒素	コレラエンテロトキシン	侵入タンパク質 s i p A	セーリゲリオリジン (s e e l i g e r i o l y s i n)
アクチン重合タンパク質 R i c k A	システインプロテアーゼ	イオタ毒素成分 I a	セリンプロテアーゼ
アクチン重合タンパク質 R i c k A	細胞致死膨張性毒素	イバノリジン	志賀毒素
アデノシンーリン	細胞溶解素	L e p B	スフィンゴミエリ

10

20

【表 4 - 2】

酸-タンパク質トランスフェラーゼ v o p S			ナーゼ	
アデニル酸シクラーゼ	細胞傷害性壊死因子	致死因子	スタフィロキナーゼ	
アデニル酸シクラーゼ E x o Y	細胞毒素	ロイコトキシン	ストレプトキナーゼ	
A D P-リボシルトランスフェラーゼ酵素成分	皮膚壊死毒素	リステリオリジン	ストレプトトリジン	10
アエロリジン	デュビキチナーゼ	微生物コラゲナーゼ	ストレプトパインゼ	
アルファトキシン	ジフテリア毒素	外膜タンパク質 I c s A オートトランスポーター	スイリジン	
アルベオリジン	エンテロヘモリジン	P a n t o n - V a l e n t i n e ロイコシジン F	スーパー抗原	20
アルベオリジン	エンテロトキシン	パーフリンゴリジン	T 3 S S 分泌型エフェクター E s p F	
アントロリシン O	表皮細胞分化阻害剤	百日咳毒素	破傷風毒素	
A r p 2 / 3 複合体活性化タンパク質 r i c k A	細胞外酵素	ホスホリパーゼ	T i r	
バイナリ A D P-リボシルトランスフェラーゼ C D T 毒素	外毒素	プラスミノゲン活性化因子	T o l C	30
ボツリヌス神経毒	G-ヌクレオチド交換因子	ニューモリシン	毒素性ショック症候群毒素	
C 2 毒素、成分 I I	グアニンヌクレオチド交換因子 s o p E	防御抗原	亜鉛-カルボキシペプチダーゼ	
C a g A	熱安定性エンテロトキシン	タンパク質キナーゼ	亜鉛-カルボキシペプチダーゼ	40
カルモジュリン感受性アデニル酸シクラーゼ	I g A 特異的セリンエンドペプチダーゼ オートトランスポーター	ピオリシン (p y o l y s i n)	亜鉛依存性ペプチダーゼ	
細胞周期阻害因子	イノシトールリン酸ホスファターゼ s o p B	R T X 毒素		

【表 4－3】

脂質&細胞標的			
循環腫瘍細胞	超低密度脂質（V L D L）	トリグリセリド	脂肪酸
転移	高密度リポタンパク質	カイロミクロン	コレステロール
真核細胞	低密度リポタンパク質	アポリポタンパク質	

【表 5 - 1】

表 5. がん			
急性リンパ芽球性白血病 (ALL)	結腸直腸癌	マクログロブリン血症、ワルデンストレーム	胸膜肺芽腫、小児
急性骨髄性白血病 (AML)	頭蓋咽頭腫、小児	男性乳癌	妊娠及び乳癌
副腎皮質癌	皮膚 T 細胞リンパ腫	骨の悪性線維性組織球腫及び骨肉腫	原発性中枢神経系 (CNS) リンパ腫
エイズ関連カポジ肉腫	非浸潤性乳管癌 (DCIS)	黒色腫	前立腺癌
エイズ関連リンパ腫	胚芽腫、小児	メルケル細胞癌	希少がん
肛門癌	子宮内膜癌	中皮腫	直腸癌
虫垂癌	上衣腫、小児	原発不明の転移性扁平上皮性頸部癌	腎細胞癌
星細胞腫、小児	上皮癌	NU T 遺伝子に関与する正中線癌	腎盂及び尿管、移行上皮癌
非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍、小児	食道癌	奇胎妊娠	網膜芽細胞腫
基底細胞癌	嗅神経芽細胞腫、小児	口腔及び中咽頭癌	横紋筋肉腫
胆管癌	ユーイング肉腫	多発性内分泌腺腫症候群、小児	唾液腺癌
膀胱癌	性腺外胚細胞腫瘍	多発性骨髄腫／形質細胞性腫瘍	肉腫
骨癌	肝外胆管癌	菌状息肉症	二次癌
腸癌	眼癌	骨髄異形成症候群	セザリー症候群
脳幹部神経膠腫、小児	胆嚢癌	骨髄異形成／骨髄増殖性新生物	皮膚癌
脳腫瘍	胃癌	骨髄増殖性疾患、慢性	皮膚癌 (非黒色腫)
乳癌	消化管カルチノイド	鼻腔及び副鼻腔癌	小細胞肺癌

10

20

30

40

【表 5 - 2】

	腫瘍		
気管支腫瘍、小児	胚細胞腫瘍	上咽頭癌	小腸癌
バーキットリンパ腫	妊娠性絨毛性腫瘍 (G T T)	神経芽細胞腫	軟部組織肉腫
原発不明のがん	神経膠腫	非ホジキンリンパ腫	扁平上皮癌
骨に進展したがん	ヘアリー細胞白血病	非小細胞肺癌	原発不明の扁平上皮性頸部癌、転移性
脳に進展したがん	頭頸部癌	食道癌	胃 (s t o m a c h) (胃 (g a s t r i c)) 癌
肝臓に進展したがん	心臓癌、小児	口腔癌	胃癌
肺に進展したがん	肝細胞 (肝臓) 癌	口腔癌	T細胞リンパ腫、皮膚ー菌状息肉症及びセザリー症候群を参照されたい
カルチノイド腫瘍	組織球症、ランゲルハンス細胞	中咽頭癌	精巣癌
原発不明の癌腫	ホジキンリンパ腫	骨肉腫 (骨癌)	咽頭癌
心臓 (c a r d i a c) (心臓 (h e a r t)) 腫瘍、小児	下咽頭癌	骨肉腫及び悪性線維性組織球腫	胸腺腫及び胸腺癌
中枢神経系非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍、小児	眼球内黒色腫	卵巣癌	甲状腺癌
中枢神経系胚芽種、小児	膵島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍	膵癌	腎盂及び尿管の移行上皮癌
中枢神経系、小児	腎癌	膵神経内分泌腫瘍 (膵島細胞腫瘍)	原発不明癌
子宮頸癌	ランゲルハンス細胞組織球症	乳頭腫症、小児	尿管及び腎盂、移行上皮癌
脊索腫、小児	喉頭癌	傍神経節腫	尿道癌
絨毛癌	白血病	副甲状腺癌	子宮癌、子宮内膜
慢性リンパ球性	口唇及び口腔癌	陰茎癌	子宮肉腫

10

20

30

40

【表 5 - 3】

白血病 (CLL)			
慢性骨髄性白血病 (CML)	肝癌	咽頭癌	腔癌
慢性骨髄増殖性疾患	非浸潤性小葉癌 (LCIS)	褐色細胞腫	外陰癌
結腸癌	低悪性度腫瘍 (low malignant potential tumour)	下垂体部腫瘍	ワルデンストレームマクログロブリン血症
リンパ腫	肺癌	形質細胞性腫瘍／多発性骨髄腫	ウィルムス腫瘍

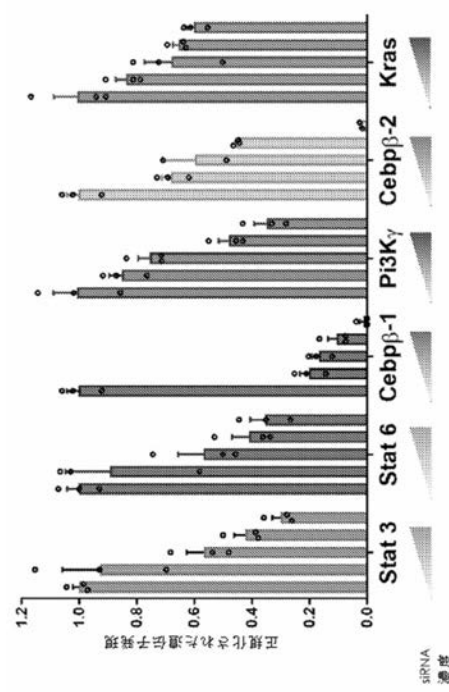
10

【0263】

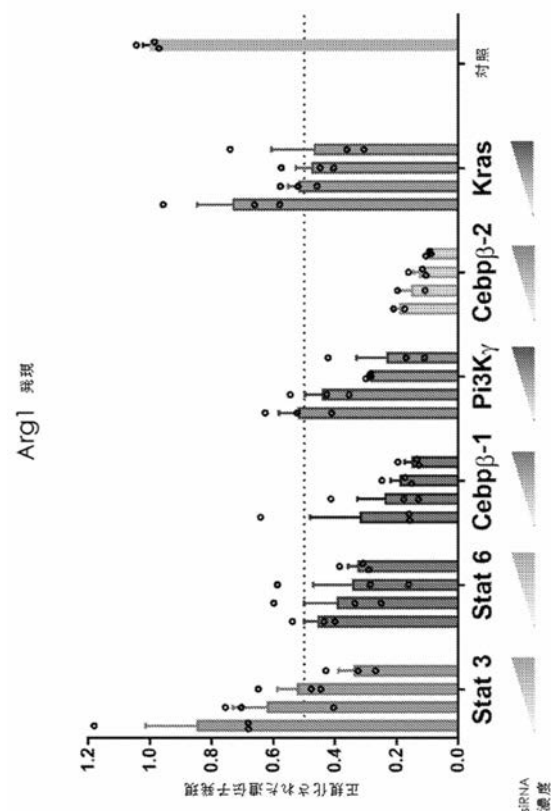
本発明は、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を限定しない例示的な実施形態と見なされる代表的な例に関して記載されている。科学刊行物、専門書、教科書、特許出願、発行済み特許を含む、刊行物への全ての参照は、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

20

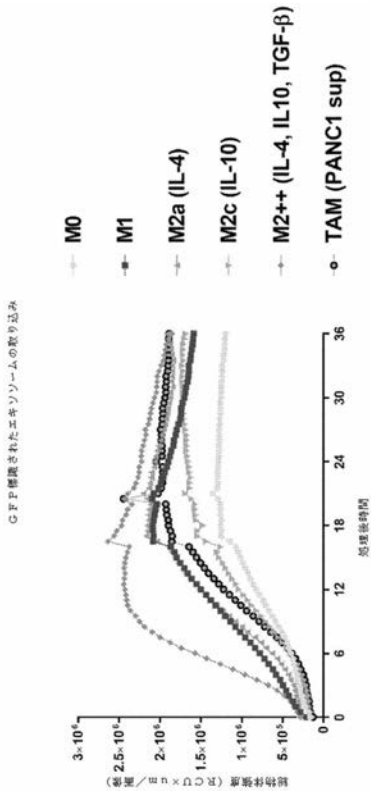
【図 1】



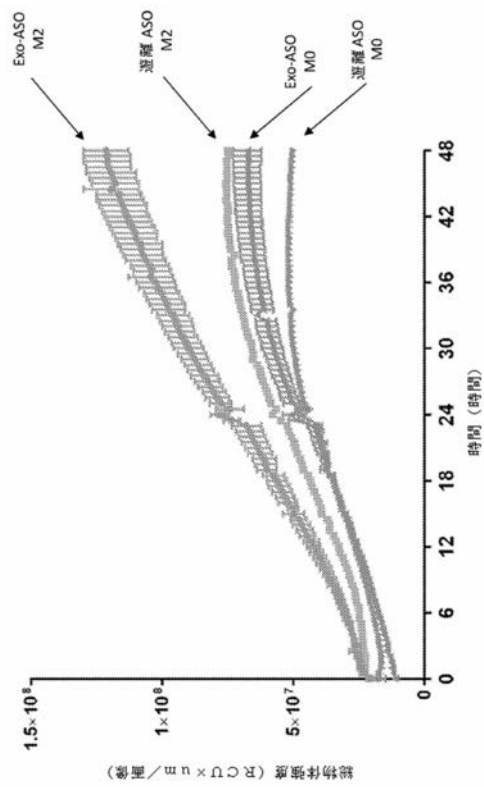
【図 2】



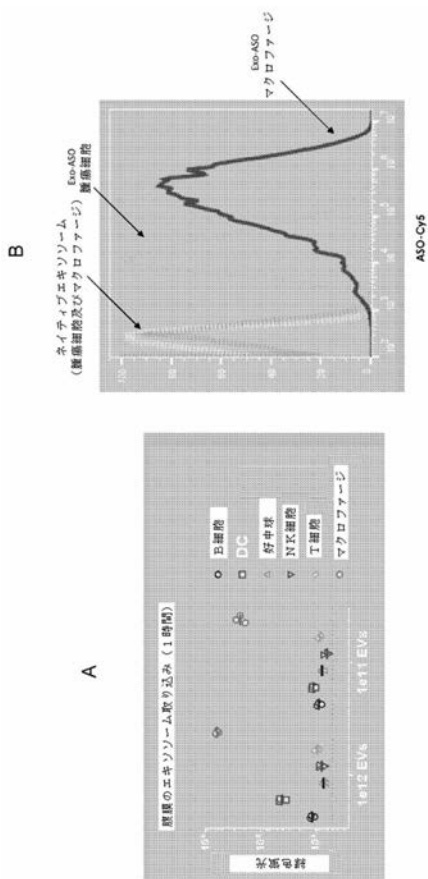
【図 3】



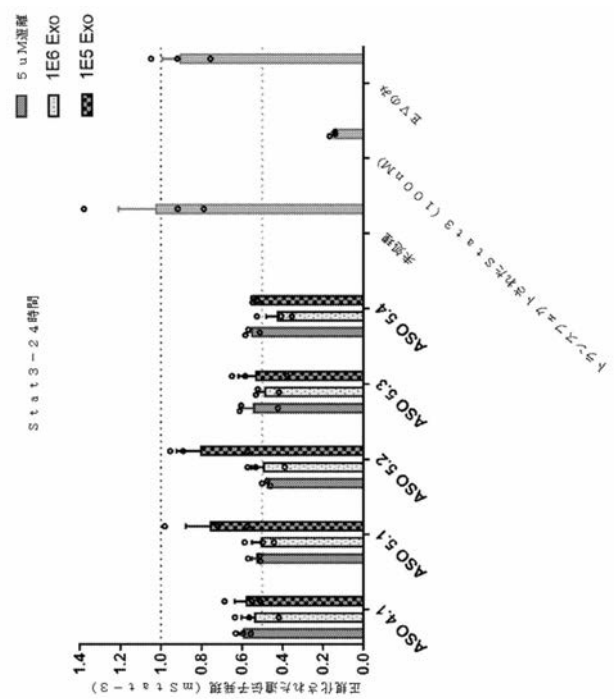
【図 4】



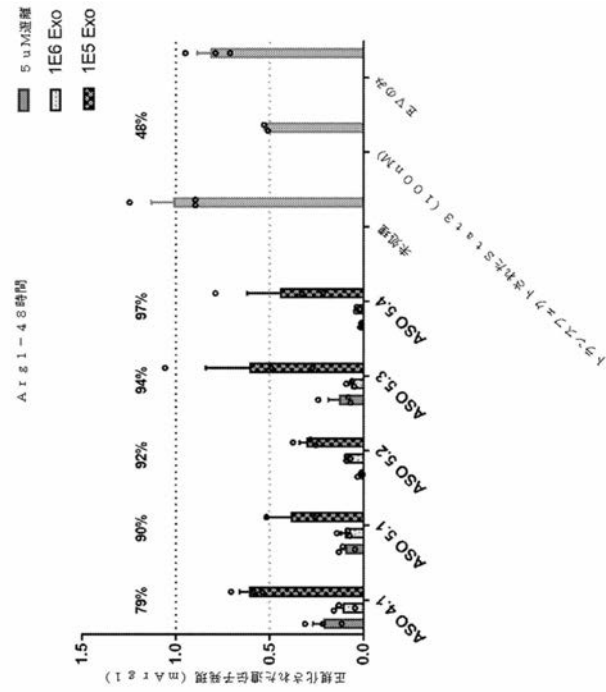
【図 5】



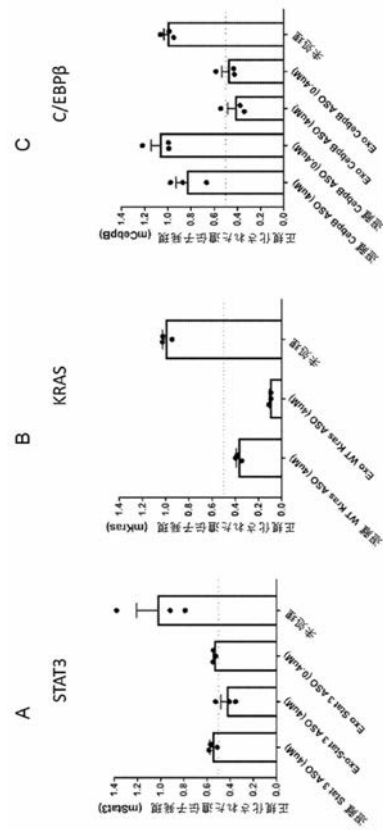
【図 6】



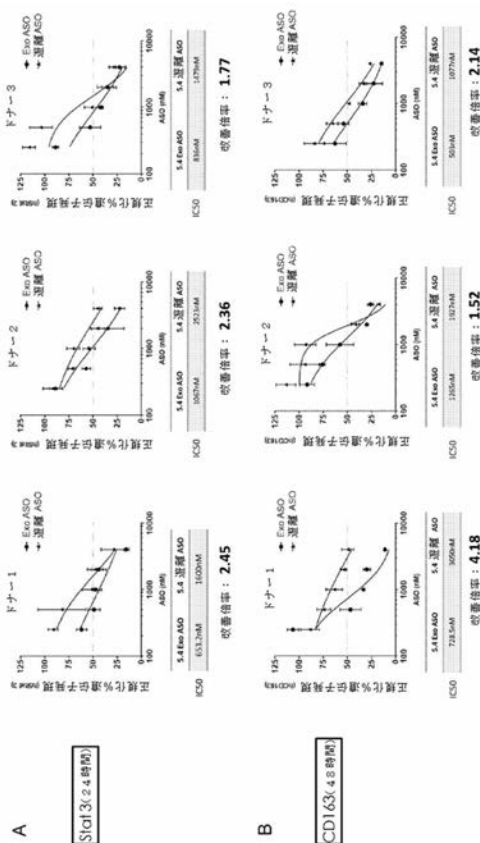
【図 7】



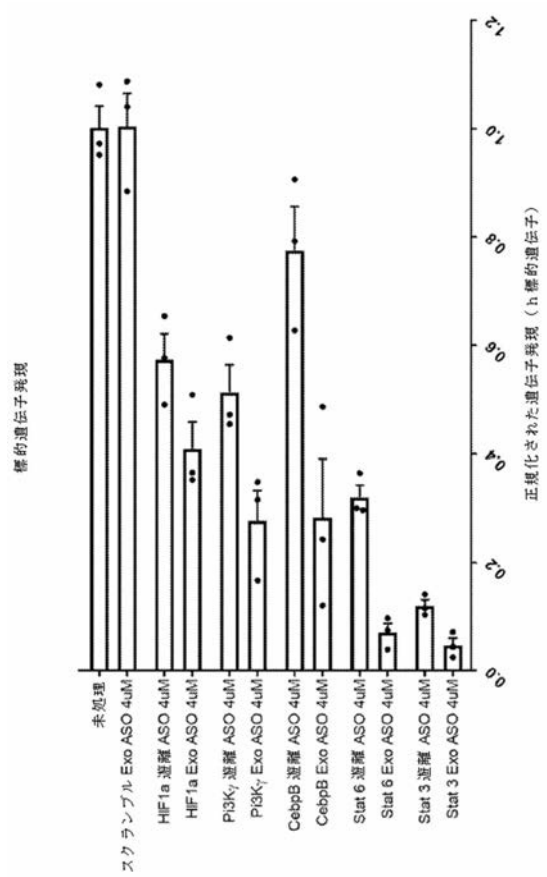
【図 8】



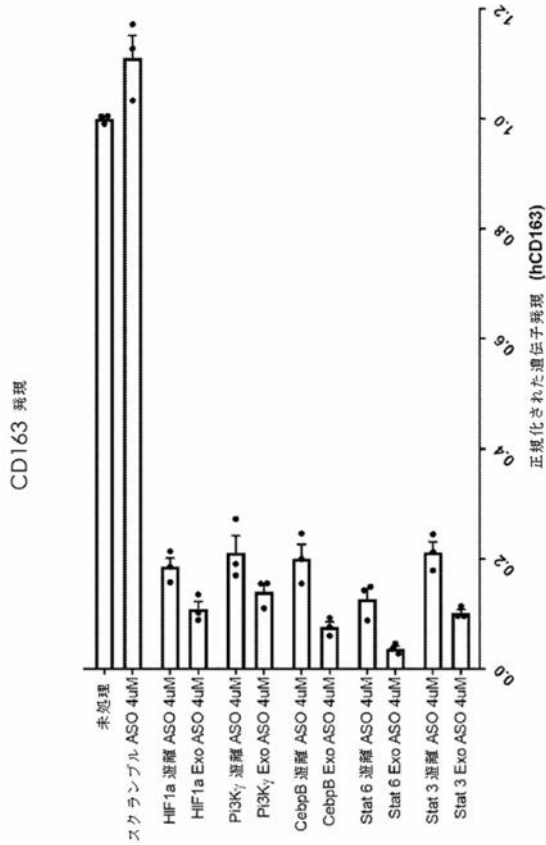
【 図 9 】



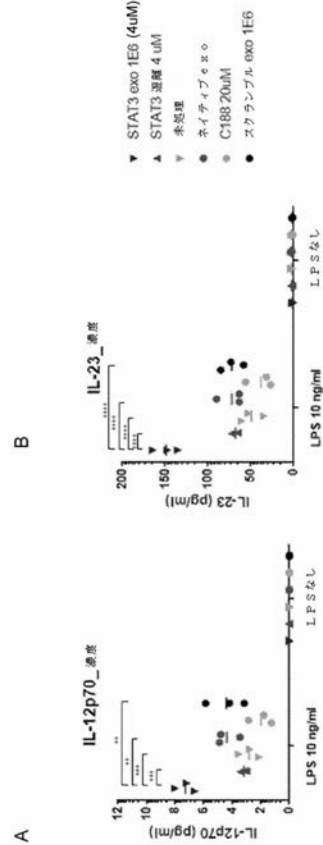
【図 10】



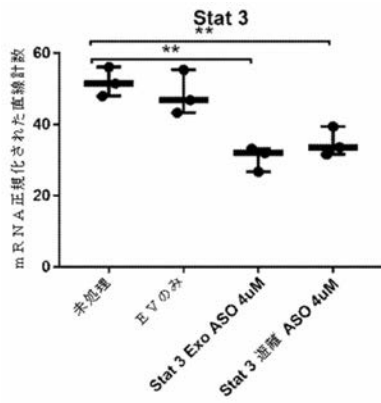
【図 1 1】



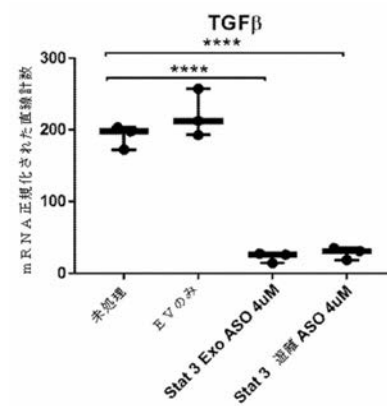
【図 1 2】



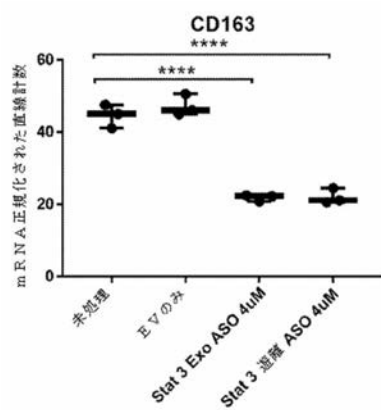
【図 1 3 A】



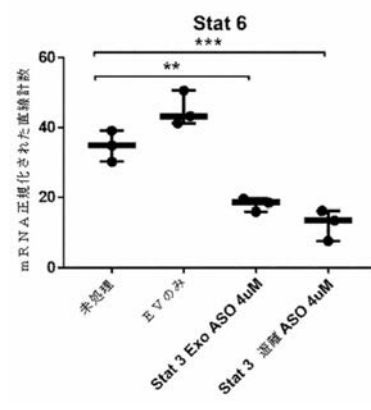
【図 1 3 C】



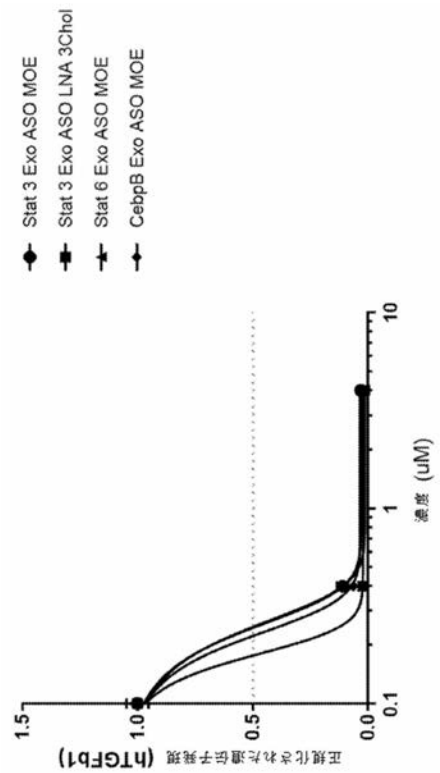
【図 1 3 B】



【図 1 3 D】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

2021512608000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/017731

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/113 A61K31/7088 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, EMBL, Sequence Search, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MEI-JU SU ET AL: "Pancreatic Cancer Cell Exosome-Mediated Macrophage Reprogramming and the Role of MicroRNAs 155 and 125b2 Transfection using Nanoparticle Delivery Systems", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 22 July 2016 (2016-07-22), XP055588271, DOI: 10.1038/srep30110 pages 2,9,10; figures 6,7 -----	1-11, 14-60, 63-66
X	W0 2016/201323 A1 (UNIV TEXAS [US]) 15 December 2016 (2016-12-15)	1-11, 14-25, 28-60, 63-66
Y	paragraphs [0087], [0088], [0103] - [0105]; claims 1,2,10,18-20,34-40; example 1 ----- -/-	26,27

☒ 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

14 May 2019

Date of mailing of the international search report

25/07/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/017731

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/161010 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 21 September 2017 (2017-09-21) claims 1,5,9,10; example 12 -----	1-9, 14-21, 28-43
A	YAQIN ZHANG ET AL: "Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155", JOURNAL OF MOLECULAR CELL BIOLOGY, vol. 8, no. 6, 25 September 2016 (2016-09-25), pages 505-517, XP055588319, ISSN: 1674-2788, DOI: 10.1093/jmcb/mjw040 page 506, left-hand column; figures 4,5,6 page 507, right-hand column - page 509, left-hand column -----	1-11, 14-60, 63-66
Y	WO 2014/082083 A1 (CARIS SCIENCE INC [US]) 30 May 2014 (2014-05-30) claims 1,14-16 -----	26,27
A	SAMARESH SAU ET AL: "Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 274, 31 January 2018 (2018-01-31), pages 24-34, XP055588512, NL ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.01.028 page 25, right-hand column - page 26, right-hand column -----	1-11, 14-60, 63-66
A	WO 2017/053722 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 30 March 2017 (2017-03-30) sequence 392 -----	1-11, 14-60, 63-66
A	FERNANDO ARANDA ET AL: "Trial Watch : Immunostimulatory monoclonal antibodies in cancer therapy", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 3, no. 2, 1 February 2014 (2014-02-01), page e27297, XP055588520, DOI: 10.4161/onci.27297 tables 1,2 ----- -/--	1-11, 14-60, 63-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/017731

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PETER STORZ: "The crosstalk between acinar cells with Kras mutations and M1-polarized macrophages leads to initiation of pancreatic precancerous lesions", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 4, no. 6, 22 May 2015 (2015-05-22), page e1008794, XP055588430, DOI: 10.1080/2162402X.2015.1008794 the whole document -----	1-11, 14-60, 63-66
A	NAKADA Y ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES SPECIFIC TO MUTATED K-RAS GENES INHIBIT INVASIVENESS OF HUMAN PANCREATIC CANCER CELL LINES", PANCREATO, KARGER, BASEL, CH, vol. 1, no. 4, 2001, pages 314-319, XP009006374, ISSN: 1424-3903, DOI: 10.1159/000055830 the whole document -----	1-11, 14-60, 63-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/017731

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

14-16, 39, 40, 63-66(completely); 1-11, 17-38, 41-60(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ US2019/ 017731

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 14-16, 39, 40, 63-66(completely); 1-11, 17-38, 41-60(partially)

An extracellular vesicle comprising one or more immunomodulating component(s) that, upon contact with a macrophage, selectively repolarizes the macrophage from an M2 to an M1 phenotype, wherein the immunomodulating component inhibits the KRAS gene (such as the oligonucleotide of SEQ ID NO: 6), related methods.

- 2-9. claims: 1-11, 17-38, 41-60(all partially)

An extracellular vesicle comprising one or more immunomodulating component(s) that, upon contact with a macrophage, selectively repolarizes the macrophage from an M2 to an M1 phenotype, wherein the immunomodulating component inhibits in each separate invention one of the genes selected from the group of HRAS, NRAS, HIF1-alpha, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1 and AMPK, related methods.

10. claims: 12, 13, 61, 62(completely); 1-11, 17-38, 41-60(partially)

An extracellular vesicle comprising one or more immunomodulating component(s) that, upon contact with a macrophage, selectively repolarizes the macrophage from an M2 to an M1 phenotype, wherein the immunomodulating component inhibits the STAT3 gene, related methods.

- 11-22. claims: 1-11, 17-38, 41-60(all partially)

An extracellular vesicle comprising one or more immunomodulating component(s) that, upon contact with a macrophage, selectively repolarizes the macrophage from an M2 to an M1 phenotype, wherein the immunomodulating component inhibits in each separate invention one of the genes selected from the group of STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginase, Glutaminase, CEBP/beta, Pi3K-gamma, and PKM2, related methods.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/017731

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016201323 A1	15-12-2016	AU 2016275046 A1	04-01-2018
		BR 112017026467 A2	11-09-2018
		CA 2988585 A1	15-12-2016
		CN 107980004 A	01-05-2018
		EA 201890006 A1	31-05-2018
		EP 3307890 A1	18-04-2018
		JP 2018520125 A	26-07-2018
		KR 20180017119 A	20-02-2018
		US 2018177727 A1	28-06-2018
		WO 2016201323 A1	15-12-2016
WO 2017161010 A1	21-09-2017	AU 2017232498 A1	18-10-2018
		BR 112018068746 A2	22-01-2019
		CA 3017586 A1	21-09-2017
		CN 109071597 A	21-12-2018
		EP 3430024 A1	23-01-2019
		JP 2019513019 A	23-05-2019
		KR 20180122433 A	12-11-2018
		SG 11201807401R A	27-09-2018
		WO 2017161010 A1	21-09-2017
WO 2014082083 A1	30-05-2014	AU 2013347838 A1	11-06-2015
		CA 2892490 A1	30-05-2014
		EP 2922861 A1	30-09-2015
		US 2015301058 A1	22-10-2015
		WO 2014082083 A1	30-05-2014
WO 2017053722 A1	30-03-2017	AR 106135 A1	13-12-2017
		AU 2016326619 A1	10-05-2018
		BR 112018004620 A2	25-09-2018
		CA 2998382 A1	30-03-2017
		CL 2018000429 A1	10-08-2018
		CN 108513588 A	07-09-2018
		CO 2018003168 A2	20-06-2018
		EP 3353328 A1	01-08-2018
		JP 2018528781 A	04-10-2018
		KR 20180051626 A	16-05-2018
		TW 201723176 A	01-07-2017
		US 2018273577 A1	27-09-2018
		WO 2017053722 A1	30-03-2017
		ZA 201802663 B	30-01-2019

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	Z N A
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 サティヤナラヤナン, スリラム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ 3 5, スイート 5 0 0, コディアック バイオサイエンシズ, インコーポレイテッド

(72)発明者 ウィリアムズ, ダグラス イー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ 3 5, スイート 5 0 0, コディアック バイオサイエンシズ, インコーポレイテッド

(72)発明者 ブジン, ダリア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ 3 5, スイート 5 0 0, コディアック バイオサイエンシズ, インコーポレイテッド

(72)発明者 プティン, アダム トーマス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ 3 5, スイート 5 0 0, コディアック バイオサイエンシズ, インコーポレイテッド

(72)発明者 カメルカル, スシュルト

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ 3 5, スイート 5 0 0, コディアック バイオサイエンシズ, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 CA44

4C084 AA13 AA19 MA02 MA56 MA65 MA66 NA06 ZB07 ZB21 ZB26
ZC75

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA56 MA65 MA66 NA06
ZB07 ZB21 ZB26 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB63 MA02 MA56 MA65 MA66 NA06 ZB07 ZB21
ZB26 ZC75

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20