(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2020-529477
(P2020-529477A)
(43)公表日　令和2年10月8日(2020.10.8)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 35/34	(2015.01)	A61K	35/34	4C087
A61K 35/12	(2015.01)	A61K	35/12	
A61K 35/545	(2015.01)	A61K	35/545	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61K 35/56	(2015.01)	A61K	35/56	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 46 頁）

(21)出願番号　特願2020-529104 (P2020-529104)
(86)(22)出願日　平成30年8月2日(2018.8.2)
(85)翻訳文提出日　令和2年2月4日(2020.2.4)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/044956
(87)国際公開番号　WO2019/028223
(87)国際公開日　平成31年2月7日(2019.2.7)
(31)優先権主張番号　62/541,584
(32)優先日　平成29年8月4日(2017.8.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71)出願人　513268380
シーダーズ―シナイ　メディカル　センター
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９００４８，ロサンゼルス，８７００　ベバリー　ブールバード
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡　亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田　直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀　明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好　玲奈

最終頁に続く

(54)【発明の名称】がんの治療及び防止のためのカルディオスフィア由来細胞及びその細胞外小胞

(57)【要約】
本明細書では、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）及び／または細胞外小胞（ＥＶ）を用いてがんを治療することに関する方法及び組成物が説明される。一部の実施形態において、ＥＶは、心臓由来ＥＶ（例えば、カルディオスフィア由来エクソソーム、ＣＤＣ由来エクソソーム、カルディオスフィア由来微小胞、ＣＤＣ由来微小胞、またはこれらの組合せ）である。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療する方法が提供される。一部の実施形態において、ＣＤＣ及び／またはＥＶは、がんを治療するために対象に投与される。一部の実施形態において、ＣＤＣ及び／またはＥＶは、医薬製剤で提供される。
【選択図】図２－３

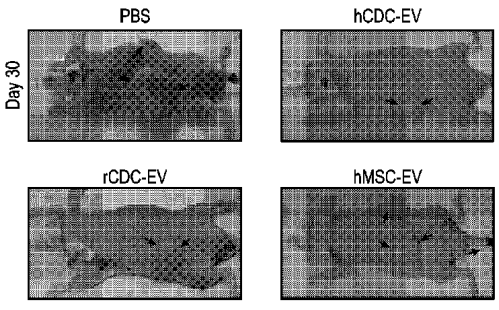


FIG. 2E

【特許請求の範囲】
【請求項１】
がんの治療を必要とする対象における前記がんを治療する方法であって、前記対象に、治療有効量のカルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）及び／または治療有効量の細胞外小胞（ＥＶ）を投与することを含む、方法。
【請求項２】
前記ＥＶが、微小胞（ＭＶ）、エクソソーム（ＸＯ）、ＣＤＣ由来細胞外小胞（ＣＤＣ－ＥＶ）、ＣＤＣ由来微小胞（ＣＤＣ－ＭＶ）、ＣＤＣ由来エクソソーム（ＣＤＣ－ＸＯ）、またはこれらの組合せの一つ以上を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＥＶが、カルディオスフィア、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株から取得される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶが前記対象に全身投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶの前記全身投与が、静脈内注射、腹腔内注射、またはこの両方によるものである、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記治療有効量のＣＤＣ及び／またはＣＤＣ－ＥＶの前記全身投与が、心臓の右室または左室への注射によるものである、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶが局所投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶが皮下投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記対象におけるがんを治療することが、腫瘍重量の低減、腫瘍血管新生の低減、腫瘍の浸潤、転移、またはこれらの組合せの低減のうちの一つ以上を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶの投与が二回以上の注射によるものである、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶの投与が単回用量によるものである、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＣＤＣ及び／またはＥＶが同種であり、前記対象がヒト対象である、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＥＶが、無血清培地で成長したＣＤＣから単離される、請求項２に記載の方法。
【請求項１４】
前記ＣＤＣまたはＥＶが、医薬的に許容される担体を含む医薬組成物として提供される、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
がんの防止、緩和、回復、または治療を必要とする対象における前記がんを防止する、緩和する、回復させる、または治療する方法であって、前記対象に予防有効量または治療有効量の細胞外小胞（ＥＶ）を投与することを含み、前記ＥＶが、カルディオスフィア、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、またはイモリＡ１細胞株から取得される、方法。
【請求項１６】

がんの治療を必要とする対象における前記がんの治療で使用するための細胞外小胞の製剤であって、前記ＥＶが、カルディオスフィア、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、またはイモリＡ１細胞株から取得される、製剤。

【請求項１７】

前記ＥＶ、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株が、再生幹細胞、例えば、胚性幹細胞、多能性幹細胞、複能性幹細胞、誘導多能性幹細胞、新生児幹細胞、成体幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、内皮幹細胞、上皮幹細胞、神経幹細胞、心臓前駆細胞を含めた心臓幹細胞、骨髄由来幹細胞、脂肪由来幹細胞、肝臓幹細胞、末梢血由来幹細胞、臍帯血由来幹細胞、または胎盤幹細胞に由来する、請求項１５または１６のいずれか一項に記載の方法または製剤。

【請求項１８】

前記細胞外小胞が、エクソソーム（ＸＯ）、微小胞（ＭＶ）、膜粒子、膜小胞、エクソソーム様小胞、エクトソーム、エクトソーム様小胞、またはエキソベシクルである、請求項１５～１７のいずれか一項に記載の方法または製剤。

【請求項１９】

前記細胞外小胞がＣＤＣから取得される、請求項１５～１８のいずれか一項に記載の方法または製剤。

【請求項２０】

前記対象が哺乳類である、請求項１５～１９のいずれか一項に記載の方法または製剤。

【請求項２１】

前記対象がヒトである、請求項１５～２０のいずれか一項に記載の方法または製剤。

【請求項２２】

前記ＥＶが、１０００ｋＤａ－１０ｋＤａプロセスを用いてＣＤＣから取得される、請求項１５～２１のいずれか一項に記載の方法または製剤。

【請求項２３】

前記１０００ｋＤａ－１０ｋＤａプロセスが、限外濾過用に１０００ｋＤａフィルターを、次いで透析濾過用に１０ｋＤａを順次使用することを含む、請求項２２に記載の方法または製剤。

【請求項２４】

がんの治療を必要とする対象における前記がんを処置する方法であって、

前記対象に、少なくとも二回の用量の治療有効量のＣＤＣまたはＥＶを投与することを含み、

前記少なくとも二回の用量が、互いに約１～２週間隔てて投与され、

前記二回の用量が、前記対象において顕著な免疫応答を誘発しないように構成される、方法。

【請求項２５】

前記用量が、全身投与、局所投与、または両方によって患者にもたらされる、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記投与が静脈内注射を含む、請求項２４または２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記ＣＤＣが同種ヒトＣＤＣであり、前記対象がヒトである、請求項２４～２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２８】

がんを治療する方法であって、

がんに罹患している対象に、治療有効量の細胞外小胞（ＥＶ）を含む組成物を投与し、前記投与により前記対象を治療することを含む、方法。

【請求項２９】

がんを防止する方法であって、

がんにかかりやすい対象に、ＥＶを含む組成物を投与することを含む、方法。

【請求項３０】
前記対象が、前記対象をがんにかかりやすくする一つ以上の遺伝子変異を有する、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記ＥＶが、カルディオスフィア、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、またはイモリＡ１細胞株から取得される、請求項２８～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
投与が全身投与である、請求項２８～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
投与が腹腔内注射によるものである、請求項２８～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
投与が局所投与である、請求項２８～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
投与が皮下注射によるものである、請求項２８～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記対象におけるがんを治療することが、腫瘍重量の低減、腫瘍血管新生の低減、腫瘍浸潤及び／または転移の低減、血清乳酸デヒドロゲナーゼの減少、またはこれらの組合せを含む、請求項２８～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
がんを治療するための、治療有効量のＣＤＣ及び／または治療有効量のＥＶを含む組成物の使用であって、前記組成物が、がんを有するかまたはがんのリスクがある対象への投与に好適であり、前記組成物の前記投与が、前記がんを治療及び／または防止する、使用。
【請求項３８】
前記ＥＶが、ＭＶ、ＸＯ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、またはこれらの組合せのうちの一つ以上を含む、請求項３７に記載の使用。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１７年８月４日に出願された米国特許仮出願第６２／５４１，５８４号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に援用される。
連邦政府の助成による研究または開発に関する記載
【０００２】
本発明は、国立衛生研究所の認可を受けた助成金番号ＨＬ１２４０７４の下、政府支援によって行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。
【０００３】
本明細書では、がんの治療及び防止のためのカルディオスフィア、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、及び細胞外小胞（ＥＶ）（以下に限定されないが、エクソソーム（ＸＯ）及び微小胞（ＭＶ）を含む）に関する方法及び組成物が説明される。
【背景技術】
【０００４】
細胞が細胞外環境に放出する多様なタイプの膜小胞には、エンドソーム起源のものと形質膜起源のものとがあり、それぞれＸＯ及びＭＶと呼ばれる。これらの細胞外小胞は、膜タンパク質、細胞質タンパク質、脂質、及びＲＮＡの細胞間移動の媒介物として働くことにより、細胞間コミュニケーションの一様式となる。
【発明の概要】
【０００５】

本明細書では、がんを治療する方法が説明される。一部の実施形態において、方法は、がんに罹患している対象に、治療有効量のＥＶ、ＣＤＣ、及び／またはカルディオスフィアを含む組成物を投与し、当該投与により対象を治療することを含む。一部の実施形態において、投与は全身投与である。一部の実施形態において、全身投与は腹腔内注射である。一部の実施形態において、投与は局所投与である。一部の実施形態において、局所投与は皮下投与である。一部の実施形態において、ＥＶは、カルディオスフィア、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、またはイモリＡ１細胞株から取得される。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍重量の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍血管新生の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍の浸潤、転移、または両方の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、血清乳酸デヒドロゲナーゼの減少を含む。

【０００６】

また、本明細書では、がんを防止する方法であって、がんにかかりやすい対象に、ＥＶ、ＣＤＣ、及び／またはカルディオスフィアを含む組成物を投与することを含む方法が説明される。一部の実施形態において、対象は一つ以上の遺伝子変異を有する。一部の実施形態において、投与は全身投与である。一部の実施形態において、全身投与は腹腔内注射である。一部の実施形態において、投与は局所投与である。一部の実施形態において、局所投与は皮下投与である。一部の実施形態において、細胞外小胞は、カルディオスフィア、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株から取得される。

【０００７】

一部の実施形態は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、対象に、治療有効量のカルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）及び／または治療有効量の細胞外小胞（ＥＶ）を投与することを含む、方法に関連する。一部の実施形態において、ＥＶは、ＭＶ、ＸＯ、ＣＤＣ由来細胞外小胞（ＣＤＣ－ＥＶ）、ＣＤＣ由来微小胞（ＣＤＣ－ＭＶ）、ＣＤＣ由来エクソソーム（ＣＤＣ－ＸＯ）、またはこれらの組合せの一つ以上を含む。

【０００８】

一部の実施形態において、治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶは対象に全身投与される。一部の実施形態において、当該治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶの全身投与は、静脈内注射によるものである。一部の実施形態において、当該治療有効量のＣＤＣ及び／またはＣＤＣ－ＥＶの全身投与は、腹腔内注射によるものである。一部の実施形態において、当該治療有効量のＣＤＣ及び／またはＣＤＣ－ＥＶの全身投与は、心臓の右室または左室への注射によるものである。

【０００９】

一部の実施形態において、投与は局所投与である。一部の実施形態において、局所投与は皮下投与である。

【００１０】

一部の実施形態において、治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶの投与は、二回以上の注射によるものである。一部の実施形態において、治療有効量のＣＤＣ及び／またはＥＶの投与は、単回投与によるものである。

【００１１】

一部の実施形態において、ＣＤＣ及び／またはＥＶは同種であり、対象はヒト対象である。一部の実施形態において、ＥＶは、無血清培地で成長したＣＤＣから単離される。一部の実施形態において、ＣＤＣまたはＥＶは、医薬的に許容される担体を含む医薬組成物として提供される。一部の実施形態において、ＥＶは、カルディオスフィア、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株から取得される。

【００１２】

一部の実施形態において、治療は、腫瘍重量の低減、腫瘍血管新生の低減、腫瘍の浸潤、転移、またはこれらの組合せの低減のうちの一つ以上を含む。

【００１３】
一部の実施形態は、がんの防止、緩和、回復、または治療を必要とする対象におけるがんを防止する、緩和する、回復させる、または治療する方法に関連する。一部の実施形態において、方法は、対象に予防有効量または治療有効量の細胞外小胞（ＥＶ）を投与することを含み、このときＥＶは、カルディオスフィア、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、またはイモリＡ１細胞株から取得される。
【００１４】
一部の実施形態は、がんの治療を必要とする対象におけるがんの治療で使用するためのＥＶの製剤であって、ＥＶが、カルディオスフィア、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株から取得される、製剤に関連する。
【００１５】
上記、または本明細書の他の箇所に記載されている任意の実施形態は、以下の特色のうちの一つ以上を含み得る。
【００１６】
一部の実施形態において、ＥＶ、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株は、再生幹細胞、例えば、胚性幹細胞、多能性幹細胞、複能性幹細胞、誘導多能性幹細胞、新生児幹細胞、成体幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、内皮幹細胞、上皮幹細胞、神経幹細胞、心臓前駆細胞を含めた心臓幹細胞、骨髄由来幹細胞、脂肪由来幹細胞、肝臓幹細胞、末梢血由来幹細胞、臍帯血由来幹細胞、または胎盤幹細胞に由来する。
【００１７】
一部の実施形態において、細胞外小胞は、ＸＯ、ＭＶ、膜粒子、膜小胞、エクソソーム様小胞、エクトソーム、エクトソーム様小胞、またはエキソベシクル（ｅｘｏｖｅｓｉｃｌｅ）である。
【００１８】
一部の実施形態において、細胞外小胞はＣＤＣから取得される。
【００１９】
一部の実施形態において、対象は哺乳類である。一部の実施形態において、対象はヒトである。
【００２０】
本明細書で提供される様々な実施形態には、以下のがんの非限定的な例の治療または防止が含まれるが、これに限定されない：急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ）、副腎皮質がん、カポジ肉腫、リンパ腫、胃腸がん、虫垂がん、中枢神経系がん、基底細胞がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳腫瘍（星細胞腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽細胞腫、上衣腫、髄芽細胞腫、髄様上皮腫を含むが、これに限定されない）、乳がん、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、子宮頸がん、結腸がん、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性骨髄増殖性障害、腺管がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、毛様細胞白血病、腎細胞がん、白血病、口腔がん、上咽頭がん、肝がん、肺がん（非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺がんを含むが、これら限定されない）、膵がん、腸がん、リンパ腫、黒色腫、眼がん、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、下垂体がん、子宮がん、ならびに膣がん。一部の実施形態において、がんは、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性骨髄性白血病、急性骨髄球性白血病、または毛様細胞白血病のうちの一つ以上から選択される。一部の実施形態において、がんは、横紋筋肉腫、血管性腫瘍、ユーイング肉腫、カポジ肉腫、骨肉腫（骨がん）、軟部組織肉腫、または子宮肉腫のうちの一つ以上から選択される。一部の実施形態において、がんは白血病の形態である。一部の実施形態において、がんは肉腫である。一部の実施形態において、方法は、白血病を患う対象を治療することを含む。一部の実施形態において、方法は、肉腫を有する対象を治療することを含む。
【００２１】

一部の実施形態において、ＥＶは、１０００ｋＤａ－１０ｋＤａプロセスを用いたＣＤＣから取得される。一部の実施形態において、１０００ｋＤａ－１０ｋＤａプロセスは、限外濾過用に１０００ｋＤａフィルターを、次いで透析濾過用に１０ｋＤａを順次使用することを含む。

【００２２】

一部の実施形態は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、対象に、少なくとも二回の用量の治療有効量のＣＤＣまたはＥＶを投与することを含む、方法に関連する。一部の実施形態において、少なくとも二回の用量は、互いに約１～２週間隔てて投与される。一部の実施形態において、二回の用量は、対象において顕著な免疫応答を誘発しないように構成される。一部の実施形態において、用量は、全身投与、局所投与、または両方によって患者にもたらされる。一部の実施形態において、投与は静脈内注射を含む。一部の実施形態において、ＣＤＣは同種のヒトＣＤＣであり、対象はヒトである。

【００２３】

一部の実施形態は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、がんにかかっている対象に治療有効量のＥＶを含む組成物を投与し、当該投与により対象を治療することを含む、方法に関連する。一部の実施形態において、投与は全身投与である。一部の実施形態において、全身投与は腹腔内注射によるものである。一部の実施形態において、投与は局所投与である。一部の実施形態において、局所投与は皮下投与である。一部の実施形態において、ＥＶは、カルディオスフィア、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株から取得される。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍重量の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍血管新生の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍の浸潤、転移、または両方の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、血清乳酸デヒドロゲナーゼの減少を含む。

【００２４】

一部の実施形態は、がんの防止を必要とする対象におけるがんを防止する方法に関連する。一部の実施形態において、方法は、がんにかかりやすい対象に、ＥＶを含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態において、対象は、対象をがんにかかりやすくする一つ以上の遺伝子変異を有する。一部の実施形態において、投与は全身投与である。一部の実施形態において、全身投与は腹腔内注射である。一部の実施形態において、投与は局所投与である。一部の実施形態において、局所投与は皮下投与である。一部の実施形態において、ＥＶは、カルディオスフィア、ＣＤＣ、またはイモリＡ１細胞株から取得される。

【００２５】

一部の実施形態は、がんを治療するための、治療有効量のＣＤＣ及び／または治療有効量のＥＶを含む組成物の使用に関連する。一部の実施形態において、組成物は、がんを有するかまたはがんのリスクがある対象への投与に好適であり、このとき組成物の投与は、当該がんを治療及び／または防止する。一部の実施形態において、ＥＶは、ＭＶ、ＸＯ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、またはこれらの組合せの一つ以上を含む。

【００２６】

上記、または本明細書の他の箇所に記載されている任意の実施形態は、以下の特色のうちの一つ以上を含み得る。

【００２７】

一部の実施形態において、ＥＶは、ＸＯ、ＭＶ、膜粒子、膜小胞、エクソソーム様小胞、エクトソーム、エクトソーム様小胞、エキソベシクル、エピジジモソーム（ｅｐｉｄｉｍｏｓｏｍｅ）、アルゴソーム、プロミニノソーム（ｐｒｏｍｉｎｉｎｏｓｏｍｅ）、プロスタソーム、デクソソーム、テクソソーム、アルケオソーム（ａｒｃｈｅｏｓｏｍｅ）、オンコソーム等である。

【００２８】

一部の実施形態において、治療のための対象は哺乳類である。一部の実施形態において、対象はヒトである。一部の実施形態において、ヒトは、がんを患う及び／またはがんを発生するリスクがある患者である。

【００２９】

一部の実施形態において、当該細胞外小胞は、無血清培地（例えば、ＩＭＤＭ）で培養し、約５％のO_2にて約１５日間インキュベートしたＣＤＣに由来し、このとき当該細胞外小胞は、細胞外小胞を含有するＣＤＣ条件培地を孔径３～１０００ｋＤａ（例えば、１０ｋＤａ）のフィルターで濾過した後に取得される。より一般的には、一部の実施形態によれば、当該細胞外小胞は、血清含有培地または無血清培地で培養し、２～２０％のO_2にて１～１５日間インキュベートしたＣＤＣに由来し、このとき当該細胞外小胞は、細胞外小胞を含有するＣＤＣ条件培地を孔径３～１０００ｋＤａ（例えば、１０ｋＤａ）のフィルターで濾過した後に取得される。代替的に、細胞外小胞は、ポリエチレングリコール（例えば、２５％　ＰＥＧ）による沈殿により取得される。

【００３０】

一部の実施形態において、ＥＶは、クリスタロイド溶液（例えば、Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ、生理食塩水）、水性溶液、ゲル、軟膏、クリーム、局所または移植可能なヒドロゲル、粉末、徐放性ポリマー（例えば、ＰＬＧＡ及びＰＬＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）含有溶液、懸濁液、乳濁液で、薬物送達デバイス、挿入物、パッチなどの一部として、製剤化される。いくつかの実施形態において、ＥＶは、使用する前に適切な緩衝液（例えば、ヒト血清アルブミンを伴うまたは伴わない無菌ＰＢＳ）に再懸濁する。一部の実施形態において、ＥＶは、将来使用するために、例えば－８０℃にて冷凍して、保管することができる。

【００３１】

一部の実施形態において、ＥＶは、ヒトまたは動物の細胞に由来する。いくつかの実施形態において、ＥＶはカルディオスフィアまたはＣＤＣから調整される。一部の実施形態において、ＥＶは、再生幹細胞、例えば、胚性幹細胞、多能性幹細胞、複能性幹細胞、誘導多能性幹細胞、新生児幹細胞、成体幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、内皮幹細胞、上皮幹細胞、神経幹細胞、心臓前駆細胞を含めた心臓幹細胞、骨髄由来幹細胞、脂肪由来幹細胞、肝臓幹細胞、末梢血由来幹細胞、臍帯血由来幹細胞、胎盤幹細胞などから調製される。

【００３２】

一部の実施形態において、ＥＶは、特異的な標的部位に向けるように（例えば、遺伝子的にまたは別の方法で）修飾される。例えば、一部の実施形態において、修飾は、所望の標的組織上の受容体との特異的な相互作用をもたらす、エクソソーム上の特異的な細胞表面マーカーの発現を誘発することを含む。一つの実施形態において、エクソソームのネイティブな内容物は除去され、所望の外来性タンパク質及び／または核酸で置き換えられるかまたはこれらが追加される。

【００３３】

一部の実施形態において、ＥＶは、ｍｉＲ－１４６ａ、ｍｉＲ－１４８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２１０、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１４０－３ｐ、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－２７ｂ、ｍｉＲ－１９ｂ、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－３７６ｃ、ｍｉＲ－１２８、ｍｉＲ－３２０ａ、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－１３０ａ、ｍｉＲ－９、ｍｉＲ－１８５、及びｍｉＲ－２３ａから選択される一つ以上のマイクロＲＮＡを含む。一部の実施形態において、ＥＶ（例えば、ＸＯ及び／またはＭＶ）は、ｍｉＲ－１４６ａ及びｍｉＲ－２１０を含む。いくつかの実施形態において、ＥＶは、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ａ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－４５１６、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１９９ａ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１９９ｂ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２２－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２４－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２９０、ｈｓａ－ｍｉＲ－３２０ｅ、ｈｓａ－ｍｉＲ－４２３－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２２－３ｐ、ｈｓ

ａ－ｍｉＲ－２２２－３ｐ（別称ｍｉＲ－２２１－３ｐ）、ｈｓａ－ｍｉＲ－１００－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３３７－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２７ｂ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１９１５－３ｐ、及びｈｓａ－ｍｉＲ－２９ｂ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２５－３ｐ（別称ｍｉＲ－９２ａ－３ｐ）から選択される一つ以上のマイクロＲＮＡを含む。

【００３４】

一部の実施形態において、ＥＶは、生物学的タンパク質、例えば、転写因子、サイトカイン、成長因子、及び標的細胞のシグナリング経路を修飾可能な類似のタンパク質を含有する。一部の実施形態において、生物学的タンパク質は、組織の再生及び／または組織の機能改善を促進可能である。一部の実施形態において、生物学的タンパク質は、Ｉｒａｋ１、Ｔｒａｆ６、トール様受容体（ＴＬＲ）シグナリング経路、ＮＯＸ－４、ＳＭＡＤ－４、及び／またはＴＧＦ－βに関する経路を修飾可能である。一部の実施形態において、生物学的タンパク質は、エクソソームの形成ならびに細胞質タンパク質（例えば、Ｈｓｐ７０、Ｈｓｐ９０、１４－３－３イプシロン、ＰＫＭ２、ＧＷ１８２、及びＡＧＯ２）のパッケージングに関する。一部の実施形態において、ＥＶ（例えば、ＸＯ及び／またはＭＶ）は、シグナリング脂質、例えば、セラミド及び誘導体を含有する。

【００３５】

一部の実施形態において、ＥＶは、テトラスパニン、例えば、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ５３、及び／またはＣＤ３７を発現する。一部の実施形態において、ＥＶ（例えば、ＸＯ及び／またはＭＶ）は、一つ以上の脂質ラフト関連タンパク質（例えば、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質及びフロチリン）、コレステロール、スフィンゴミエリン、及び／またはヘキソシルセラミドを発現する。

【００３６】

一部の実施形態において、ＥＶの直径は、例えば、約１５～２５０ｎｍ、約１５～２０５ｎｍ、約９０～２２０ｎｍ、約３０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約７０～１５０ｎｍ、または約４０～１００ｎｍである。いくつかの実施形態において、ＥＶの直径は、例えば、約１００～１０００ｎｍである。

【００３７】

一部の実施形態において、ＥＶは、不純物または所望でない化合物がＸＯから除去されるように精製される。一部の実施形態において、患者は、ＸＯから約５０％～９０％、または最大１００％の不純物が除去されるように実質的に精製されたＸＯを投与される。一部の実施形態において、エクソソーム調製物は、非エクソソーム構成成分を本質的に含まない。

【００３８】

一部の実施形態において、ＥＶは、一種以上の追加的な薬剤と組み合わせて投与される。例えば、いくつかの実施形態において、ＸＯは、エクソソームに由来する一つ以上のタンパク質または核酸と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態において、ＸＯの単離元の細胞がＸＯと共に投与される。いくつかの実施形態において、このようなアプローチは、急性及びより長期の期間のエクソソーム送達（例えば、実際のエクソソーム送達に基づいて急性、細胞送達に基づいて長期に送達し、細胞は、送達後、ＸＯの分泌を継続する）を有利にもたらす。

【００３９】

一部の実施形態において、ＥＶの用量は、約１．０×10^{5}～約１．０×10^{13}ＸＯを範囲とする。ある特定の実施形態において、エクソソームの用量は、キログラムに基づいて、例えば、約１．０×10^{5}ＸＯ／ｋｇ～約１．０×10^{9}ＸＯ／ｋｇで投与される。さらなる実施形態において、ＸＯは、標的組織の質量に基づいた量で、例えば、約１．０×10^{5}ＸＯ／標的組織１グラム～約１．０×10^{9}ＸＯ／標的組織１グラムで投与される。いくつかの実施形態において、ＸＯは、特定の標的組織中のＸＯ数：細胞数の比に基づいて投与される。ＸＯが併用療法（例えば、ＸＯを依然放出できる細胞、医薬療法、核酸療法など）と共に投与される場合、ＸＯの投与用量はそれに応じて調整され得る（例えば、所望の治療効果を達成するために必要に応じて増減する）。

【００４０】
一部の実施形態は、がんの防止または治療で使用するためのＥＶ（例えば、ＸＯ及び／またはＭＶ）を含む製剤を提供する。一部の実施形態は、がんを防止または治療するための本明細書で開示されている製剤及び組成物の使用を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００４１】
【図１－１】図１。ＣＤＣ－ＥＶは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏのヒトＨＴ１０８０線維肉腫細胞の攻撃性に負の影響を及ぼす。図１Ａ。ＣＤＣ－ＥＶによるＨＴ１０８０細胞のプライミングは、無血清培地（ＳＦ）のみでの培養（灰色のバー）と比較して、好ましくバランスの取れたがん進行関連タンパク質の修飾に結びついた。有意に修飾された（ｐ＜０．０５）タンパク質のみが示されている。黒色のバーは、ＳＦ細胞におけるタンパク質発現レベルを表す。図１Ｂ。ＳＦと対比して、ＣＤＣ－ＥＶで細胞をプライミングした後のＨＴ１０８０の代表的なウェル及び浸潤能力減少。図１Ｃ。ＳＦと対比して、ＣＤＣ－ＥＶで細胞をプライミングした後のＨＴ１０８０の代表的なウェル及び接着能力減少。図１Ｄ。ＣＤＣ－ＥＶによるＨＴ１０８０細胞のプライミングは、多くの「がん薬物標的」遺伝子の下方制御に結びついた。有意（ｐ＜０．０５）かつ二倍を上回って修飾された遺伝子のみが示されている。図１Ｅ。ＳＦ及びＣＤＣ－ＥＶプライミング細胞におけるテロメア反復増幅プロトコルに従ってＨＴ１０８０細胞の抽出物におけるテロメラーゼ活性を定量したところ、後の細胞群で著明な減少が示された。＊ｐ＜０．０５。棒グラフは平均（±ＳＥＭ）を表す。実験当たりの最小反復回数は３であった。
【図１－２】同上。
【図１－３】同上。
【図２－１】図２。ＣＤＣ－ＥＶは、マウスにおける線維肉腫成長を減少させる。図２Ａ。ヒトＣＤＣ－ＥＶ（ｈＣＤＣ－ＥＶまたはＣＤＣ－ＥＶ；ｎ＝６）の全身（腹腔内（ｉ．ｐ．））送達を、ＰＢＳ（ｎ＝９）注射及びヒトＭＳＣ－ＥＶ（ｈＭＳＣ－ＥＶまたはＭＳＣ－ＥＶ；ｎ＝８）注射と比較した試験設計。１ｘＤは単回用量を意味する。図２Ｂ。ラットＣＤＣ－ＥＶ（ｒＣＤＣ－ＥＶ；ｎ＝６）の局所（皮下、腫瘍周囲（ｓ．ｃ．））送達を、局所ＰＢＳ（ｎ＝６）注射と比較した試験設計。２ｘＤは二回用量を意味する。図２Ｃ。全身送達プロトコルにおける外部腫瘍の成長をキャリパーで測定。ＰＢＳ群と対比したｈＣＤＣ－ＥＶ群において有意な減少が示されている。図２Ｄ。局所送達プロトコルにおける外部腫瘍の成長をキャリパーで測定。ＰＢＳ群と対比したｒＣＤＣ－ＥＶ群において有意な減少が示されている。図２Ｅ。第３０日におけるマウスの代表的な画像。ヒト及びラットＣＤＣ－ＥＶで処置した動物は、他の二つの対照群（ＰＢＳ及びＭＳＣ－ＥＶ）と比較して、腫瘍が目に見えて小さくなっている（矢印で指示）。図２Ｆ。採取した腫瘍の代表的な画像。図２Ｇ。最も重い腫瘍（全てのマウスにおいて平均１．５ｇｒを上回る重量の腫瘍として定義）を有するマウスの割合を示す棒グラフ。＊ｐ＜０．０５。腫瘍成長の棒グラフは平均（±ＳＥＭ）を表す。
【図２－２】同上。
【図２－３】同上。
【図２－４】同上。
【図３－１】図３。全身送達された細胞外小胞（ＥＶ）が線維肉腫マウスの腫瘍部位にもたらす局所的効果。図３Ａ。Ｋｉ－６７及び末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼｄＵＴＰニック末端標識（ＴＵＮＥＬ）に対する免疫染色。ＰＢＳ（ｎ＝５）注射マウスと比較してＣＤＣ－ＥＶ処置（ｎ＝５）マウスにおいて著明な増殖の減少及びアポトーシスの増加が示されている。ＣＤＣ－ＥＶ処置マウスとＭＳＣ－ＥＶ（ｎ＝６）処置マウスとの間の増殖及びアポトーシスマーカーの差は著明でなかった。図３Ｂ。群間におけるＫｉ－６７（上パネル）及びＴＵＮＥＬ（下パネル）の発現の差を示すグラフ。図３Ｃ。ＰＢＳ処置マウスと対比したＣＤＣ－ＥＶ処置マウスにおける遺伝子発現を表すボルケーノプロット。有意かつ下方制御が二倍より高い遺伝子（薄い灰色）及び上方制御が二倍より高い遺伝子（濃い灰色）が参照されている。図３Ｄ。ＰＢＳ群と対比したＣＤＣ－Ｅ

Ｖ群において極めて（二倍を上回って）下方制御された遺伝子の分布を概略的に表現したものである。図３Ｅ。ＣＤＣ－ＥＶ処置マウスと対比したＭＳＣ－ＥＶ処置マウスにおける遺伝子発現を表すボルケーノプロット。有意かつ下方制御が二倍より高い遺伝子（緑色）及び上方制御が二倍より高い遺伝子（赤色）が参照されている。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。棒グラフは平均（±ＳＥＭ）を表す。
【図３－２】同上。
【図３－３】同上。
【図３－４】同上。
【図４－１】図４。線維肉腫マウスにおいて、腫瘍血管新生及び肺転移はＣＤＣ－ＥＶを用いた処置により減弱される。図４Ａ。ＰＢＳ（ｎ＝６）注射マウスにおける局所腫瘍でのがん関連タンパク質発現（黒色のバー）。色のついたバーは、ＰＢＳ注射マウスに対するＣＤＣ－ＥＶ（ｎ＝６）注射マウスにおけるタンパク質レベルの制御倍数（灰色）と、ヒトＣＤＣ－ＥＶ処置マウスに対するＭＳＣ－ＥＶ処置（ｎ＝４）マウスにおけるタンパク質レベルの制御倍数（薄い灰色、「ｘ」で指示）とを示している。群間で有意な（ｐ＜０．０５）差を伴うタンパク質のみが示されている。図４Ｂ。内皮細胞マーカーＣＤ３１に対する免疫染色により、他の対照群（ＰＢＳ、ｎ＝５及びＭＳＣ－ＥＶ、ｎ＝６）と比較してのＣＤＣ－ＥＶ処置マウス（ｎ＝５）における腫瘍血管新生の低下が示されている。上列の画像における各々の灰色の四角枠は動物一匹に対応しており、よって群当たり四匹の動物からの切片が上の写真で一緒に示されている。図４Ｃ。ＣＤＣ－ＥＶ処置マウス及び両方の対照群におけるＣＤ－３１の発現の差を示すグラフ。図４Ｄ。全マウス肺溶解物中のＨＴ１０８０線維肉腫細胞の存在を、ｑ－ＰＣＲを用いて、マウスＵ６の発現について標準化したヒトＹ－ＲＮＡ断片の発現を測定することによって分析した。結果から、ＭＳＣ‐ＥＶ処置マウス（ｎ＝６）の肺におけるがん細胞の存在は、残りの群（ＰＢＳ、ｎ＝８；ｈＣＤＣ－ＥＶ、ｎ＝５；ｒＣＤＣ－ＥＶ、ｎ＝４）と比較してより高いことが明らかになっている。図４Ｅ。血清ＬＤＨ活性の変化を第１８日及び第２５日に測定し、ＰＢＳ（ｎ＝８）群及びＭＳＣ－ＥＶ（ｎ＝５）群と比較して、ｒＣＤＣ－ＥＶ処置マウス（ｎ＝４）において有意な減少が示された。ｈＣＤＣ－ＥＶにおけるマウスの数は４匹であった。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１。棒グラフは平均（±ＳＥＭ）を表す。
【図４－２】同上。
【図４－３】同上。
【図４－４】同上。
【図５－１】図５。ＣＤＣ－ＥＶにより、老齢ラットにおける自然発症白血病の発生率が減少し、生存率が増加する。図５Ａ。ＣＤＣ－ＥＶ処置ラットの正常な脾臓及び血液塗抹標本と対比して、ＰＢＳ群のラットの著明な脾腫及び血液塗抹標本における未熟で肥大したリンパ球様細胞数の増加を示す代表的な画像。図５Ｂ。ＣＤＣ－ＥＶ（ｎ＝２４）ラット及びＰＢＳ（ｎ＝２０）ラットにおけるカプラン・マイヤー無白血病生存曲線。図５Ｃ。ＣＤＣ－ＥＶラットにおいて白血病関連死亡率の潜時が倍増した。図５Ｄ。ＥＶの投与から一週間後の白血病ＣＤＣ‐ＥＶラットにおける末梢血白血球の比例配分の変化。＊ｐ＜０．０５。棒グラフは平均（±ＳＤ）を表す。
【図５－２】同上。
【図６－１】図６。カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）により分泌されたＥＶと骨髄由来間葉幹細胞（ＭＳＣ）との間の差異。図６Ａ。ナノ粒子トラッキング分析により測定したＣＤＣ（パネルｉ）及びＭＳＣ（パネルｉｉ）により分泌されたサイズ分布及びＥＶ数。図６Ｂ。アレイで分析したヒトＣＤＣ－ＥＶ（ｈＣＤＣ－ＥＶ）、ラットＣＤＣ‐ＥＶ（ｒＣＤＣ－ＥＶ）、及びヒトＭＳＣ‐ＥＶにおける最も豊富なマイクロＲＮＡ（ｍｉＲ）の分布。図６Ｃ。ＭＳＣ‐ＥＶと対比してヒトＣＤＣ‐ＥＶにおいて差別的に発現したｍｉＲ（豊富及び非豊富）を用いたクラスターマップ。
【図６－２】同上。
【図６－３】同上。
【図７－１】図７。図７Ａ。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験で使用したプロトコル。図７Ｂ。ＮＣ

１－Ｈ２３神経芽細胞腫細胞は、ＳＦと対比して、ＣＤＣ－ＥＶにより分泌されたＥＶでプライミングした後の生存率が低かった（パネルｉ）。浸潤及び接着は有意に影響を受けなかった（それぞれパネルｉｉ及びｉｉｉ）。図７Ｃ。ＣＤＣ－ＥＶによるＨＴ１０８０線維肉腫細胞のプライミング後、ＳＦのみで培養した場合と比較して有意に修飾された遺伝子の完全なリスト。＊ｐ＜０．０５。棒グラフは平均（±ＳＥＭ）を表す。

【図７－２】同上。

【図８－１】図８。線維肉腫マウスにおける腫瘍部位の転写変化。図８Ａｉ。ＰＢＳ処置マウスと対比したラットＣＤＣ－ＥＶ処置マウスにおける遺伝子発現を表すボルケーノプロット。ＨＩＦ１は、有意かつ下方制御が二倍より高い唯一の遺伝子であった。上方制御された遺伝子は検出されなかった。図８Ａｉｉ。ＰＢＳ群と対比してラットＣＤＣ－ＥＶ群において有意に修飾された遺伝子の完全なリスト。図８Ｂ。ＰＢＳ群と対比してヒトＣＤＣ－ＥＶ群において有意に修飾された遺伝子の完全なリスト。図８Ｃ。ＣＤＣ－ＥＶ群と対比してヒトＭＳＣ－ＥＶ群において有意に修飾された遺伝子の完全なリスト。変化が境界域の有意性の遺伝子もリストに含まれる。

【図８－２】同上。

【図８－３】同上。

【図８－４】同上。

【図９】図９。ｑ－ＰＣＲを用いてヒトＹ－ＲＮＡ断片の発現を測定することにより分析した、肺組織におけるＨＴ１０８０線維肉腫細胞の存在。図９Ａ。純粋なＨＴ１０８０細胞の増加する数（10^3～10^6の範囲）を用いて標準曲線を構築した。図９Ｂ。異なるマウスの肺組織で取得されたＨＴ１０８０細胞数（Ｙ軸）とヒトＹ‐ＲＮＡ発現（Ｘ軸）のＣｔ値を相関させたプロット結果。一部の場合において、結果が標準曲線の下限Ｃｔ値から脱落した。これらはプロットの外側に示され、個別のＣｔ値が参照される。

【発明を実施するための形態】

【００４２】

本明細書では、がん及び／またはそれに関連する一つ以上の病状を治療する方法が説明される。一部の実施形態において、がん及び／またはそれに関連する一つ以上の病状を治療する方法は、当該治療を必要とする患者に、治療有効量の、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、ＣＤＣに由来する細胞外小胞（ＥＶ）（ＣＤＣ－ＥＶ）、ＣＤＣに由来するエクソソーム（ＣＤＣ－ＸＯ）、及び／またはこれらの組合せのうちの一つ以上を投与することを含む。一部の実施形態は、ＣＤＣ及び心臓由来細胞（例えば、ＣＤＣまたはカルディオスフィアのうちの一つ以上）からの細胞外小胞（ＥＶ）の抗腫瘍形成効果に関する方法及び組成物に関連する。一部の実施形態において、ＥＶはＣＤＣ－ＥＶである。一部の実施形態において、ＣＤＣ及びＣＤＣ－ＥＶはがんの治療のために使用される。

【００４３】

ＣＤＣは、カルディオスフィアを操作することにより産生される細胞集団であり、培養細胞は最初に心臓試料生検から取得され、次に外植片及び懸濁培養カルディオスフィアとして培養される。例えば、ＣＤＣは、培養容器の固体表面への細胞の接着を促す物質（例えば、フィブロネクチン、ヒドロゲル、ポリマー、ラミニン、血清、コラーゲン、ゼラチン、またはポリ－Ｄ－リジン）でコーティングされた固体表面上でカルディオスフィアを平板培養し、接着単層培養と同じように増やすことにより、産生することができる。ＣＤＣは、標準的な細胞培養法に従って、繰り返し継代（例えば、二回以上継代）させることができる。

【００４４】

ＥＶは、細胞により産生された脂質二重膜構造を含み、ＥＶには、ＸＯ（ＸＯ）、微小胞（ＭＶ）、膜粒子、膜小胞、エクソソーム様小胞、エクトソーム、エクトソーム様小胞、またはエキソベシクルが含まれる。ＸＯは、細胞の形質膜の多小胞体またはエンドソーム関連領域を伴う特異的な細胞内経路を介して形成された小胞である。それらの脂質膜は、典型的にはコレステロールに富み、スフィンゴミエリン、セラミド、脂質ラフト、及び露出したホスファチジルセリンを含有する。ＸＯは、ある特定のマーカータンパク質（例

えば、インテグリン及び細胞接着分子）を発現するが、概してリソソーム、ミトコンドリア、またはカベオラのマーカーが欠如している。一部の実施形態において、ＸＯは、細胞由来の構成成分、例えば、以下に限定されないが、タンパク質、ＤＮＡ、及びＲＮＡ（例えば、マイクロＲＮＡ及びノンコーディングＲＮＡ）を含有する。一部の実施形態において、ＥＶは、ＸＯのレシピエントに対し同種、自己由来、異種、または同系である供給源から得られた細胞から取得することができる。

【００４５】

ある特定のタイプのＲＮＡ、例えば、小胞の積荷分子の一部を構成するマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）は、ＸＯ及びＥＶによって運搬されることが知られている。ｍｉＲＮＡは、しばしば標的メッセンジャーＲＮＡ転写産物（ｍＲＮＡ）上の相補的配列との結合を通じて、転写後制御因子として機能し、翻訳抑制、標的ｍＲＮＡ分解、及び／または遺伝子サイレンシングをもたらす。例えば、ｍｉＲ１４６ａは、正常なヒト真皮線維芽細胞から単離されたＸＯと比較して、ＣＤＣにおいて２５０倍超の発現増加を示し、ｍｉＲ２１０は、およそ３０倍上方制御される。一部の実施形態において、治療用組成物は、ＣＤＣ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＸＯを含み得る一方で、他の実施形態において、治療用組成物は、ＣＤＣ及び／または小胞を含まない場合があり、代わりに組成物であって、有効量の、ＲＮＡポリヌクレオチド、またはＲＮＡポリヌクレオチドをコードするベクター、または小胞の積荷分子、を有する組成物を含む。

【００４６】

一部の実施形態において、記載されているＥＶ分子内容物は、親細胞の起源及び形成時の制御状態に基づいている。一部の実施形態において、一般的な出芽の形成及び放出の機構は、ＥＶの起源の結果としてのＥＶの分子内容物の共通セットの特色を確立する。ＥＶの起源は、例えば、エンドソーム関連タンパク質（例えば、Ｒａｂ　ＧＴＰアーゼ、ＳＮＡＲＥ、アネキシン、及びフロチリン）、形質膜またはエンドソームでミクロドメインにクラスター化することが知られているタンパク質（四回膜貫通ドメインテトラスパニン、例えば、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ５３、及びＣＤ３７）、脂質ラフト関連タンパク質（例えば、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質及びフロチリン）、コレステロール、スフィンゴミエリン、ならびにヘキソシルセラミドである。

【００４７】

本明細書で使用される場合、「及び／または」とは、関連する列挙項目の一つ以上の任意かつ全ての可能な組合せと、二者択一（「または」）で解釈される場合における組合せの欠如とを指し、これらを包含する。

【００４８】

「治療する」または「治療すること」または「治療」とは、障害、疾患、または病気にかかっている対象に対し、例えば、状態に関連する病状の顕在化の防止、対象の状態における（例えば、一つ以上の症状における、もしくは疾患における）改善、状態の進行の遅延もしくは低減、及び／または臨床パラメーター、疾患、もしくは病気における変化、病気の治癒などを含めた有益な効果であり得る、修飾効果を付与する任意のタイプの作用を指す。

【００４９】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、障害、疾患、または病気にかかっている対象に対し、例えば、対象の状態の改善（例えば、一つ以上の症状の修飾）、状態の進行の遅延もしくは低減、障害の発症の防止もしくは遅延、及び／または臨床パラメーター、疾患、もしくは病気における変化などを含めた有益な効果であり得る、修飾効果を付与する治療薬（例えば、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＥＶの積荷分子（ＸＯもしくはＭＶを含む）、及び／またはこれらの組合せ）の量を指す。例えば、一部の実施形態において、有効量は、対象における状態を、少なくとも５％、例えば、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％

、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも１００％改善する組成物、化合物、または薬剤の量を指し得る。本開示の主題の活性組成物中における活性成分及び活性薬剤の実際の薬用量レベルは、特定の対象及び／または用途における所望の応答を達成するのに有効な量の活性薬剤（一つまたは複数）を投与できるように変動させることができる。選択する薬用量レベルは、以下に限定されないが、組成物の活性、製剤、投与経路、他の薬物または治療との組合せ、治療対象となる状態の重症度、ならびに治療対象となる対象の健康状態及び過去の病歴を含めた様々な因子に依存することになる。有効用量の決定及び調整、ならびに、いつどのようにしてこのような調整を行うかについての評価は、本明細書で企図されている。「治療有効量」という用語は、がんの拡散防止または回復に十分なＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ、ＥＶ、及び／またはＥＶの積荷分子（ＸＯもしくはＭＶを含む）の量を意味し得る。

【００５０】

本明細書で開示されているように治療される「患者」または「対象」とは、一部の実施形態においてヒト患者であるが、本明細書で開示されている主題の原理は、本明細書で開示されている主題が、哺乳類を含めた全ての脊椎動物種に対し有効であることを示し、これらも「対象」及び「患者」という用語に含まれるように意図されていることを理解されたい。好適な対象は、概して哺乳類対象である。本明細書で説明される主題は、研究において有用であるだけでなく、獣医学及び医学の応用においても有用である。本明細書で使用される場合、「哺乳類」という用語には、以下に限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギ、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）、サルなどが含まれる。ヒト対象には、新生児、小児、少年、成人、及び老人対象が含まれる。

【００５１】

カルディオスフィアは、自己接着性クラスターとして成長する未分化の心臓細胞である。簡潔に述べると、心臓組織は、手術中または心臓生検中に患者から収集することができる。一部の実施形態において、心臓組織は、左室、右室、中隔、左房、右房、分界稜、右室心内膜、中隔壁もしくは心室壁、心耳、またはこれらの組合せから採取することができる。一部の実施形態において、生検は、例えば、ＵＳ／２００９／０１２４２２及びＵＳ／２０１２／００３９８５７（これらの開示内容はその全体が参照により本明細書に援用される）で説明されている経皮的バイオトームを用いて、取得することができる。一部の実施形態において、組織は直接培養することができ、または代替的に、心臓組織を凍結し、解凍し、次いで培養することができる。一部の実施形態において、組織は、プロテアーゼ酵素（例えば、コラゲナーゼ、トリプシンなど）を用いて消化することができる。一部の実施形態において、心臓組織は、外植片として培養し、外植片から線維芽細胞様細胞及びカルディオスフィア形成細胞を含めた細胞を成長させることができる。一部の実施形態において、外植片は、細胞外マトリックス（例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、エラスチン、またはその他の細胞外マトリックスタンパク質）のうちの一つ以上の構成成分でコーティングされた培養容器で培養される。一部の実施形態において、組織外植片を約１、２、３、４週間、またはそれ以上の間培養してからカルディオスフィア形成細胞を収集することができる。一部の実施形態において、線維芽細胞様細胞の層は、カルディオスフィア形成細胞が出現する外植片から成長することができる。一部の実施形態において、カルディオスフィア形成細胞は、位相差顕微鏡下では小さな円形の明位相（ｐｈａｓｅ－ｂｒｉｇｈｔ）細胞として見える。一部の実施形態において、外植片周囲のカルディオスフィア形成細胞を含む細胞は、手動の方法または酵素消化により収集することができる。一部の実施形態において、収集したカルディオスフィア形成細胞は、カルディオスフィアの形成を促進するための条件下で培養することができる。一部の実施形態において、細胞は、緩衝培地、アミノ酸、栄養素、血清または血清代替物、成長因子（ＥＧＦ及びｂＦＧＦを含むがこれに限定されない）、サイトカイン（カルディオトロフィンを含むがこれに限定されない）、及びその他のカルディオスフィア促進因子（例えば、これに

限定されないがトロンビン）を含む、カルディオスフィア成長培地中で培養される。一部の実施形態において、カルディオスフィア形成細胞は、カルディオスフィア形成に必要となる適切な密度、例えば、約２０，０００～１００，０００細胞／ｍＬで平板培養することができる。一部の実施形態において、細胞は、ポリ－Ｄ－リジンで、または細胞が皿の表面に付着するのを妨げるその他の天然もしくは合成の分子でコーティングされた無菌皿で培養することができる。一部の実施形態において、カルディオスフィアは、カルディオスフィア形成細胞を平板培養してから約２～７日またはそれ以上後に自然発生的に出現し得る。

【００５２】

ＣＤＣは、カルディオスフィアを操作することにより産生される細胞集団である。一部の実施形態において、ＣＤＣは、培養容器の固体表面への細胞の接着を促す物質（例えば、フィブロネクチン、ヒドロゲル、ポリマー、ラミニン、血清、コラーゲン、ゼラチン、またはポリ－Ｄ－リジン）でコーティングされた固体表面上でカルディオスフィアを平板培養し、接着単層培養と同じように増やすことにより、産生することができる。一部の実施形態において、ＣＤＣは、標準的な細胞培養法に従って、繰り返し継代（例えば、二回以上継代）させることができる。

【００５３】

ＸＯは、細胞の形質膜の多小胞体またはエンドソーム関連領域を伴う特異的な細胞内経路を介して形成された小胞である。ＸＯのサイズは、直径およそ２０～１５０ｎｍの範囲をとり得る。一部の実施形態において、ＸＯは、およそ１．１～１．２ｇ／ｍＬの特徴的な浮上密度と、特徴的な脂質組成とを有する。一部の実施形態において、ＸＯは、そのサイズ及び浮上性に基づいて単離することができる。ＸＯの脂質膜は、典型的にはコレステロールに富み、スフィンゴミエリン、セラミド、脂質ラフト、及び露出したホスファチジルセリンを含有する。一部の実施形態において、ＸＯは、ある特定のマーカータンパク質、例えば、インテグリン及び細胞接着分子を発現する。一部の実施形態において、ＸＯは、概して、リソソーム、ミトコンドリア、またはカベオラのマーカーが欠如している。一部の実施形態において、ＸＯは、細胞由来の構成成分、例えば、以下に限定されないが、タンパク質、ＤＮＡ、及びＲＮＡ（例えば、マイクロＲＮＡ及びノンコーディングＲＮＡ）を含有する。一部の実施形態において、ＸＯは、ＸＯの一つ以上の特色を用いて他のＥＶ及び／または細胞デブリから単離される。一部の実施形態において、ＸＯは、ＸＯのレシピエントに対し同種、自己由来、異種、または同系である供給源から得られた細胞から取得することができる。

【００５４】

ある特定のタイプのＲＮＡ（例えば、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ））は、ＸＯにより濃縮または運搬される。一部の実施形態において、ｍｉＲＮＡは、しばしば標的メッセンジャーＲＮＡ転写産物（ｍＲＮＡ）上の相補的配列との結合を通じて、転写後制御因子として機能し、翻訳抑制、標的ｍＲＮＡ分解、及び／または遺伝子サイレンシングをもたらす。一部の実施形態において、ｍｉＲ１４６ａは、正常なヒト真皮線維芽細胞から単離されたＸＯと比較して、ＣＤＣからのＸＯにおいて２５０倍超の発現増加を示し、ｍｉＲ２１０は、ＣＤＣからのＸＯにおいておよそ３０倍上方制御される。

【００５５】

ＸＯを調製するための方法は、以下のステップのうちの一つ以上を含む（または含まない）ことができる：条件培地中でカルディオスフィアまたはＣＤＣを培養すること、（例えば、連続遠心分離などにより）エクソソームを精製すること、任意選択で、密度勾配（例えば、スクロース密度勾配）でＸＯを清澄化すること。一部の実施形態において、単離及び精製されたＸＯは、非エクソソーム構成成分（例えば、カルディオスフィアまたはＣＤＣの構成成分）を実質的に含まない。一部の実施形態において、ＸＯは、０．０１～１％ヒト血清アルブミンを含有する無菌ＰＢＳ緩衝液などの緩衝液に再懸濁することができる。一部の実施形態において、ＸＯは冷凍し、将来使用するために保管することができる。

【００５６】
一部の実施形態において、ＸＯは、市販のキットを用いて、例えば、以下に限定されないが、ＥｘｏＳｐｉｎ（商標）エクソソーム精製キット、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（登録商標）全エクソソーム精製キット、ＰｕｒｅＥｘｏ（登録商標）エクソソーム単離キット、及びＥｘｏＣａｐ（商標）エクソソーム単離キットを用いて、調製することができる。一部の実施形態において、幹細胞からＸＯを単離するための方法は、ＵＳ／２０１２／００９３８８５及びＵＳ／２０１４／０００４６０１に見いだされ、これらは参照により本明細書に援用される。一部の実施形態において、収集したＸＯは、本明細書の他の箇所で開示されている方法を用いて濃縮及び／または精製することができる。一部の実施形態において、具体的な方法論としては、以下に限定されないが、超遠心分離、密度勾配、ＨＰＬＣ、親和性に基づいた基質への接着、またはサイズ排除に基づいた濾過が挙げられる。
【００５７】
一部の実施形態において、例えば、分画超遠心分離は、培養細胞の上清から分泌されたＸＯを単離する有力な技法となっている。一部の実施形態において、このアプローチは、非膜状粒子の比較的低い浮上密度を活用することにより、非膜状粒子からのＸＯの分離を可能にする。一部の実施形態において、サイズ排除は、生化学的に類似するが生物物理学的には異なるＭＶ（より大きい直径（例えば、最大１，０００ｎｍ）を有する）からの分離を可能にする。一部の実施形態において、浮遊速度の違いが、差別的なサイズのＸＯの分離をさらに可能にする。一部の実施形態において、ＸＯのサイズは、３０～２００ｎｍ（４０～１００ｎｍのサイズを含む）を範囲とする直径を有する。一部の実施形態において、精製は、特定の目的ＸＯの特異的な特性に依存し得る。一部の実施形態において、これは、外形質のまたは外向きの方向性を有する特異的な小胞を選択するために、例えば、目的タンパク質と共に免疫吸着を使用することを含む。一部の実施形態において、二つ以上の精製技法が一緒に使用され得る。
【００５８】
一部の実施形態において、分画遠心分離、不連続密度勾配、免疫親和性、限外濾過、及び高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、分画超遠心分離のうちの一つ以上がエクソソーム単離に使用され得る。一部の実施形態において、遠心分離技法は、遠心力の２０００ｘｇから１０，０００ｘｇへの増加を利用して、１００，０００ｘｇにてエクソソームペレットから中型及び大型サイズの粒子と細胞デブリとを分離する。一部の実施形態において、遠心分離は、単独で、条件培地からのＸＯの顕著な分離／収集を可能にする。一部の実施形態において、エクソソーム精製の特異性強化は、限外濾過と組み合わせた連続遠心分離、またはスクロース密度勾配における平衡密度勾配遠心分離を活用して、より高い純度のエクソソーム調製物（浮遊密度１．１～１．２ｇ／ｍＬ）、または調製における離散した糖クッションの適用をもたらすことができる。
【００５９】
一部の実施形態において、ＸＯの生物学的活性を損なうことなくＸＯを精製するために、限外濾過が使用され得る。一部の実施形態において、中性でないｐＨまたは生理的でない塩濃度の使用を回避するために、異なる孔径（例えば、小さな粒子を除去するための１００ｋＤａ分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）を有する膜及びゲル濾過）が使用されている。一部の実施形態において、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）システムはスケーラブル（１０，０００Ｌ未満まで）であり、エクソソーム画分の精製だけでなく濃縮も可能であり、このようなアプローチは、分画遠心分離よりも時間の消費が少ない。また、ＨＰＬＣも、ＸＯを均質なサイズの粒子に精製し、調製物が生理的なｐＨ及び塩濃度で維持されながらＸＯの生物学的活性を保持するために使用され得る。
【００６０】
一部の実施形態において、その他の化学的方法は、沈殿技法におけるＸＯの差別的溶解度や、体積排除ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ））への添加を活用し、場合によっては追加ラウンドの遠心分離または濾過と組み合わせる。一部の実施形態において、早急かつ迅速にＸＯ集団を沈殿させるために、例えば、沈殿試薬のＥｘｏＱｕ

ｉｃｋ（登録商標）が条件細胞培地に添加され得る。一部の実施形態において、流動場分画法（ＦＩＦＦＦ）は溶離ベースの技法であり、これは、巨大分子（例えば、タンパク質）及びナノ～マイクロサイズの粒子（例えば、細胞小器官及び細胞）を分離し特徴づけるために使用され、培地からＸＯを分画するために首尾よく適用することができる。

【００６１】

一部の実施形態において、対象を絞った技法は、特異的な目的ＸＯを単離するために適用することができる。一部の実施形態において、これは、ある特定のエクソソーム関連抗原の認識に対する抗体免疫親和性に依存することを含む。一部の実施形態において、ＸＯはさらに、膜の表面で膜結合受容体の細胞外ドメインを発現する。一部の実施形態において、これは、共有された抗原プロファイルに基づいて、親細胞の起源と関連させてＸＯを単離及び隔離するための機会が熟していることを示す。一部の実施形態において、磁気ビーズ、クロマトグラフィーマトリックス、プレート、またはマイクロ流体デバイスとの結合は、目的親細胞からの生成または関連する細胞制御状態に関し得る、特異的な目的エクソソーム集団の単離を可能にする。一部の実施形態において、その他の親和性捕捉法は、エクソソーム表面上の特異的な糖類残基に結合するレクチンを使用する。

【００６２】

心臓は、がんに対する免疫が知られている。その他の臓器とは対照的に、原発性心臓腫瘍の全体的な発生率は、米国内の検死解剖シリーズにおいてわずか０．０２％であり、悪性はその４分の１に過ぎなかった。腫瘍形成に対する心臓の耐性の主な機構として、心筋細胞の最終分化及び低いターンオーバーが提唱された。しかし、心臓が主に、非心筋細胞である線維芽細胞、内皮細胞、及び血管平滑筋細胞の増殖性集団を含有し、これらの細胞が成人の心臓の全細胞の約７０％を構成するという事実により、この前提は疑問視されている。さらに、中枢神経系も低い細胞分裂率により特徴づけられるが、中枢神経系における悪性腫瘍の発生率は、心臓における発生率よりもはるかに高い。最近、潜在的な抗がん機構として、心臓の絶え間なく効率的な酸素消費代謝が提唱されたが、これは、酸素の供給・消費バランスの変化に関する多くの心疾患（すなわち、チアノーゼ性先天性心疾患）でがんの発生率が低いことにより、妥当性が問われている。

【００６３】

原発性腫瘍の形成中、ならびに浸潤及び転移の後期段階における重要な因子として、腫瘍微小環境の概念が浮上している。一部の実施形態において、本明細書では、抗がん特性を達成するために心臓及び微小環境の抗がん特性を活用する戦略が開示される。一部の実施形態において、がんを治療する方法でＣＤＣ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＸＯが使用される。ＣＤＣは、様々な心臓病態で有効性を示しており、これまでのところ安全性関連の問題は示していない。ＣＤＣの利点は、主としてパラクラインであり、これは、ＸＯを含めたナノスケールＥＶ（これら自体が無細胞治療薬候補として使用され得る）によって媒介される。ＷＯ／２０１４／０２８４９３は、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）に由来するＸＯと、損傷または罹患した細胞または組織（例えば、損傷した心臓組織）の修復または再生に対するＸＯの治療有用性とについて説明している。ＵＳ／２０１２／０３１５２５２は、ＣＤＣと、カルディオスフィアからのＣＤＣの誘導と、哺乳類の損傷または罹患した心臓の機能を増加させるためのＣＤＣの治療有用性とについて説明している。ＷＯ／２００５／０１２５１０は、カルディオスフィアと、ヒトまたは動物の心臓組織生検試料からのカルディオスフィアの誘導と、心筋またはその他の臓器の細胞移植及び機能的修復におけるカルディオスフィアの治療有用性とについて説明している。ＷＯ／２０１４／０２８４９３、ＵＳ／２０１２／０３１５２５２、及びＷＯ／２００５／０１２５１０は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれている。

【００６４】

本明細書では、ＣＤＣ及びＣＤＣ由来ＥＶ（例えば、ＣＤＣ－ＥＶ）またはカルディオスフィア由来ＥＶの抗腫瘍形成効果に関する方法及び組成物が説明される。簡潔にするため、いくつかの実施形態は、ＣＤＣ及び／またはＣＤＣ－ＥＶに関して開示される。ただし、本明細書で開示されている治療のうちの一つ以上は、ＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、

単離されたＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、もしくはＣＤＣ－ＥＶの積荷分子、及び／またはこれらの組合せにより達成され得ることを理解されたい。したがって、一部の実施形態において、本明細書で説明されている治療の方法は、ＣＤＣ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、単離及び／もしくは精製されたＣＤＣ－ＥＶの積荷分子、単離及び／もしくは精製されたＣＤＣ－ＭＶの積荷分子、単離及び／もしくは精製されたＣＤＣ－ＸＯの積荷分子、ならびに／またはこれらの組合せのうちの一つ以上を用いて実施することができる。例えば、一部の実施形態において、ＣＤＣ－ＭＶは、ＣＤＣ－ＸＯとの治療用混合物に含まれる（このとき、ＥＶはＸＯ及びＭＶを含む）、及び／またはＭＶはＸＯから除去されない。他の実施形態において、ＸＯは、ＸＯが濃縮されるように及び／またはＭＶを実質的に含まないように、ＭＶから単離され得る。一部の実施形態において、ＣＤＣに由来しないＥＶ、ＭＶ、及びＸＯが、がんを治療する方法で使用され得る。

【００６５】

一部の実施形態において、浮遊速度の違いが、差別的なサイズのＥＶの分離をさらに可能にする。一部の実施形態において、開示されているＸＯのサイズ（例えば、直径（ｎｍ））は、約２００、１５０、１００、４０、３０、１０以下、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲である。一部の実施形態において、ＸＯの直径は、３０～２００ｎｍ（４０～１００ｎｍのサイズを含む）を範囲とする。一部の実施形態において、開示されているＭＶ及びＥＶのサイズ（例えば、直径（ｎｍ））は、約１０００、７５０、５００、４００、３００、２５０、２００以上、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲である。一部の実施形態において、本明細書で開示されている一つ以上の方法は、サイズ（例えば、直径（ｎｍ））が約１５００、１０００、７５０、５００以上、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲であるＥＶの使用を伴う。一部の実施形態において、ＸＯは、およそ１．１～１．２ｇ／ｍＬの特徴的な浮上密度と、特徴的な脂質組成とを有する。

【００６６】

一部の実施形態において、ＥＶ、ＭＶ、及び／またはＸＯの単離は、分離及び分析のための生化学的または生物物理学的な特色を用いて遂行することができる。一部の実施形態において、分画超遠心分離は、分泌されたＥＶ、ＭＶ、及び／またはＸＯを培養細胞の上清から単離する技法として使用することができる。一部の実施形態において、このアプローチは、非膜状粒子の比較的低い浮上密度を活用することにより、非膜状粒子からのＥＶ、ＭＶ、及び／またはＸＯの分離を可能にする。一部の実施形態において、浮遊速度の違いが、差別的なサイズのＸＯの分離をさらに可能にする。一部の実施形態において、サイズ排除は、生化学的に類似するが生物物理学的には異なるＭＶ（最大１，０００ｎｍのより大きい直径を有する）からの分離を可能にする。本明細書の他の箇所で開示されているように、一部の実施形態において、ＭＶはＸＯとの治療用混合物に含まれる（このとき、ＥＶはＸＯ及びＭＶの両方を包含する）、及び／またはＭＶはＸＯから除去されない。したがって、分離技法を用いてＸＯ及びＭＶの混合物をもたらすことができる。他の実施形態において、ＸＯは、ＸＯが濃縮されるように及び／またはＭＶを実質的に含まないように、ＭＶから単離され得る。

【００６７】

一部の実施形態において、ＸＯ（またはその他のＥＶ）を調製するための方法は、以下のステップを含むことができる：条件培地中でカルディオスフィアまたはＣＤＣを培養すること、（例えば、連続遠心分離により）エクソソームを精製すること、及び任意選択で、密度勾配（例えば、スクロース密度勾配）でＸＯ（またはその他のＥＶ）を清澄化すること。一部の場合において、単離及び精製されたＸＯは、非エクソソーム構成成分（例えば、カルディオスフィアまたはＣＤＣの構成成分）を実質的に含まない。一部の実施形態において、ＸＯ（またはその他のＥＶ）は、０．０１～１％ヒト血清アルブミンを含有する無菌ＰＢＳ緩衝液などの緩衝液に再懸濁することができる。ＸＯ（またはその他のＥＶ）は冷凍し、将来使用するために保管することができる。

【００６８】

一部の実施形態において、本明細書では、対象から生検標本を単離することと、生検標本を外植片として培養することと、外植片由来細胞（ＥＤＣ）を産生することと、ＥＤＣをカルディオスフィアに培養することと、ＣＤＣの形成を誘発することとを含む、方法が説明される。他の実施形態において、方法は、対象にＣＤＣを投与することを含む。他の実施形態において、方法は、ＣＤＣからＸＯを単離することと、対象にＣＤＣ由来ＥＶ（ＸＯを含む）を投与することとを含む。様々な実施形態において、生検標本を外植片として培養することは、生検標本を細かく分割することと、フィブロネクチンコーティング容器で培養することとを含む。様々な実施形態において、ＥＤＣを産生することは、外植片から細胞を単離することを含む。様々な実施形態において、外植片からの単離細胞には、緩く接着する細胞及び／またはストローマ様細胞が含まれる。様々な実施形態において、ＥＤＣをカルディオスフィアに培養することは、ＥＤＣをポリ－Ｄ－リジン皿で培養することを含む。様々な実施形態において、ＣＤＣの形成は、分離したカルディオスフィアをフィブロネクチンコーティング容器で培養することを含む。ＣＤＣ産生のさらなる例及び実施形態は、米国特許公開第２００８／０２６７９２１号（全体が参照により本明細書に援用される）で説明されている。様々な実施形態において、ＣＤＣ由来ＸＯを単離することは、本明細書で説明されている技法のいずれかの使用を含む。様々な実施形態において、ＣＤＣを対象に投与することは、本明細書で説明されている技法のいずれかの使用を含む。様々な実施形態において、ＣＤＣまたはＣＤＣ由来ＸＯを対象に投与することは、本明細書で説明されている技法のいずれかの使用を含む。様々な実施形態において、生検標本は、ＣＤＣまたはＣＤＣ由来ＸＯが投与される対象と同じ対象から単離される。様々な実施形態において、生検標本は、ＣＤＣ由来ＸＯが投与される対象とは異なる対象から単離される。

【００６９】

一部の実施形態において、本明細書の他の箇所で開示されているように、ＥＶが使用され得る。一部の実施形態において、イモリＡ１細胞株起源のＥＶは、ＣＤＣ－ＥＶ生成の場合と同様のプロセスの後に、ＥＶを含有するＡ１細胞株ＣＭを１０ＫＤａ孔径フィルターで濾過した後に取得される。イモリＥＶは、規定された無血清条件下で培養したイモリＡ１細胞株から取得される非細胞性の濾過滅菌された生成物である。分泌されたＥＶ及び濃縮されたＣＭから構成された最終生成物は、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅ　Ａで製剤化し、凍結して保管する。凍結した最終生成物は、解凍後、直接的な用途（例えば、注射）向けに使用することができる。

【００７０】

一部の実施形態において、ＸＯは、市販のキットを用いて、例えば、以下に限定されないが、ＥｘｏＳｐｉｎ（商標）エクソソーム精製キット、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（登録商標）全エクソソーム精製キット、ＰｕｒｅＥｘｏ（登録商標）エクソソーム単離キット、及びＥｘｏＣａｐ（商標）エクソソーム単離キットを用いて、調製することができる。一部の実施形態において、収集したＸＯは、例えば、超遠心分離、密度勾配、ＨＰＬＣ、親和性に基づいた基質への接着、またはサイズ排除に基づいた濾過を用いて、濃縮及び／または精製することができる。

【００７１】

一部の実施形態において、分泌されたＸＯ（及び／またはＥＶ）を培養細胞の上清から単離するために、分画超遠心分離が使用され得る。一部の実施形態において、このアプローチは、非膜状粒子の比較的低い浮上密度を活用することにより、非膜状粒子からのＸＯ（及び／またはＥＶ）の分離を可能にする。一部の実施形態において、生化学的に類似するが生物物理学的には異なるＭＶ（最大１，０００ｎｍのより大きい直径を有する）からＸＯを分離するために、サイズ排除が使用され得る。一部の実施形態において、浮遊速度の違いが、差別的なサイズのＸＯの分離をさらに可能にする。概して、本明細書の他の箇所で開示されているように、ＸＯのサイズは、３０～２００ｎｍ（４０～１００ｎｍのサイズを含む）を範囲とする直径を有する。一部の実施形態において、さらなる精製は、特定の目的ＸＯの特異的な特性に基づいて実施することができる。一部の実施形態において

、ＸＯ（及び／またはＥＶ）は、外形質のまたは外向きの方向性を有する特異的な小胞を選択するために、例えば、目的タンパク質と共に免疫吸着を使用することにより、さらに精製することができる。

【００７２】

現在存在する方法の中では、例えば、分画遠心分離、不連続密度勾配、免疫親和性、限外濾過、及び高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、分画超遠心分離が、ＸＯ（及び／またはＥＶ）の単離に使用され得る。一部の実施形態において、遠心力の増加が使用され得る。一部の実施形態において、ＸＯ（及び／またはＥＶ）ペレットから中型及び大型サイズの粒子ならびに細胞デブリを分離するために、約１００００００ｘｇ、約１００００ｘｇ、約５０００ｘｇ、約２０００ｘｇ以上、または前述の値にまたがる及び／もしくはこれらを含む範囲の遠心力が使用され得る。遠心分離は、単独で、条件培地からのＸＯ（及び／またはＥＶ）の顕著な分離／収集を可能にする。一部の実施形態において、ＸＯ（及び／またはＥＶ）精製の特異性強化は、限外濾過と組み合わせた連続遠心分離、またはスクロース密度勾配における平衡密度勾配遠心分離を用いて、より高い純度のエクソソーム調製物（浮遊密度１．１～１．２ｇ／ｍＬ）、または調製における離散した糖クッションの適用をもたらすことができる。一部の実施形態において、分離は、約２ｇ／ｍＬ、１．５ｇ／ｍＬ、１．２ｇ／ｍＬ、１．１ｇ／ｍＬ、１．０ｇ／ｍＬ、０．７５ｇ／ｍＬ以上、または前述の値にまたがる及び／もしくはこれらを含む範囲の浮遊密度を用いて実施される。

【００７３】

本明細書の他の箇所で開示されているように、一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶの生物学的活性を損なうことなくこれらを精製するために、限外濾過が使用され得る。一部の実施形態において、望ましくない粒子からＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶを分離するために、異なる孔径を有する膜、例えば、約２００ｋＤａ、１００ｋＤａ、７５ｋＤａ、５０ｋＤａ以下、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲の分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）を有する膜が使用され得る。一部の実施形態において、より小さな粒子を除去するために、ゲル濾過も、代替的にまたは共に使用され得る。一部の実施形態において、膜（例えば、透析、限外濾過など）及び／またはゲル濾過は、実質的に生理的なｐＨ及び／または実質的に生理的な塩濃度を用いて（例えば、中性でないｐＨまたは生理的でない塩濃度の使用を回避して）実施される。一部の実施形態において、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）システムが使用される。一部の実施形態において、ＴＦＦシステムはスケーラブル（１０，０００Ｌ未満まで）であり、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶ画分の精製だけでなく濃縮も可能である。一部の実施形態において、このようなアプローチは、分画遠心分離よりも時間の消費が少なく有利である。一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶを精製するためにＨＰＬＣが使用される。一部の実施形態において、ＨＰＬＣはさらに、ＸＯを均質なサイズの粒子に精製し、調製物が生理的なｐＨ及び塩濃度で維持されながらＸＯの生物学的活性を保持するために使用され得る。

【００７４】

一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶを単離するために化学的方法が使用される。一部の実施形態において、このような化学的方法には、沈殿技法における差別的溶解度による分離が含まれる。一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶを精製するために、沈殿試薬がＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶに添加される。一部の実施形態において、このような化学的方法には、体積排除ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）など）への添加による分離が含まれる。一部の実施形態において、このような化学的方法は、追加ラウンドの遠心分離または濾過などと組み合わせられ得る。一部の実施形態において、早急かつ迅速にＸＯ集団を沈殿させるために、例えば、沈殿試薬ＥｘｏＱｕｉｃｋ（登録商標）が条件細胞培地に添加される。一部の実施形態において、流動場分画法（ＦＩＦＦＦ）は溶離ベースの技法であり、これは、巨大分子（例えば、タンパク質）及びナノ～マイクロサイズの粒子（例えば、細胞小器官及び細胞）を

分離し特徴づけるために使用され、培地からＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶを分画するために首尾よく適用される。

【００７５】

一部の実施形態において、本明細書の他の箇所で開示されている技法の他に、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶの生化学的及び生物物理学的な特色に依存して、単離された特異的な目的ＸＯに対し、対象を絞った技法が適用され得る。一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶに関連した抗原を認識するために、抗体免疫親和性が使用される。一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶは、親細胞の膜の表面で膜結合受容体の細胞外ドメインを発現する。一部の実施形態において、この発現は、共有された抗原プロファイルに基づいて、親細胞の起源と関連させてＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶを単離及び隔離することを可能にする。一部の実施形態において、磁気ビーズ、クロマトグラフィーマトリックス、プレート、もしくはマイクロ流体デバイスとの結合、及び／またはこのような技法と本明細書で開示されているその他の技法との組み合わせは、（例えば、目的親細胞からの生成または関連する細胞制御状態に関し得る）特異的な目的ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶ集団の単離を可能にする。その他の親和性捕捉法は、ＥＶ（例えば、ＸＯ及びＭＶ）表面上の特異的な糖類残基に結合するレクチンを使用する。

【００７６】

本明細書では、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶ（ＣＤＣ由来のＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶ、ならびにイモリＡ１細胞株ＸＯ、ＭＶ、及び／またはＥＶなどのＸＯを含む）を用いた、がんの治療において顕著な利点をもたらす組成物及び方法が説明される。ある特定の支持的技法が、例えば、米国出願第１１／６６６，６８５号、第１２／６２２，１４３号、第１２／６２２，１０６号、第１４／４２１，３５５号、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０５４７３２号、第ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０５３８５３号、第ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０５４３０１号、第ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０３５５６１号、及び第ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０２８１８４号で説明されており、これらは各々、その全体が参照により本明細書に援用される。

【００７７】

一部の実施形態において、本明細書では、がんを治療する方法であって、がんにかかっている（またはがんを発生するリスクがある）対象に、治療有効量の、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶを含む組成物を投与し、当該投与により対象を治療することを含む方法が説明される。一部の実施形態において、投与は全身投与である。他の実施形態において、全身投与は腹腔内注射である。一部の実施形態において、投与は局所投与である。一部の実施形態において、投与は局所投与及び全身投与である。一部の実施形態において、局所投与は皮下投与である。様々な実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの投与は、治療有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの投与を含む。様々な実施形態において、これらの効果を達成するために投与されるＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの分量（例えば、粒子の数）は、1×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～1×10^{11}、1×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}以上を範囲とする。他の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの数は、細胞療法向けに臨床的に意義のある用量で使用される細胞の数に対応している。様々な実施形態において、単回用量は、二回、三回、四回、または四回以上の連続適用される用量と比較される。一部の実施形態において、本明細書の他の箇所で開示されているように、ＥＶは、カルディオスフィア、カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ）、またはイモリＡ１細胞株から取得される。一部の実施形態において、ＥＶはＸＯ（例えば、ＣＤＣ－ＸＯ）である。

【００７８】

一部の実施形態において、治療有効量の組成物は、単回用量で約1×10^{5}～約1×1

０^{8}またはそれ以上のＣＤＣを含む。別の例では、投与されるＣＤＣの数としては、エクソソーム薬用量分量における別のベースラインとして、冠状動脈当たり２，５００万ＣＤＣ（すなわち、合計７，５００万ＣＤＣ）が挙げられる。様々な実施形態において、ＣＤＣの数としては、エクソソーム薬用量分量における別のベースラインとして、単回用量で１×１０^{5}、１×１０^{6}、１×１０^{7}、１×１０^{8}、及び／または１×１０^{9}が挙げられる。一部の実施形態において、治療有効量のＣＤＣとしては、約７５×１０^{6}ＣＤＣ、１５０×１０^{6}ＣＤＣ、３００×１０^{6}ＣＤＣ、４００×１０^{6}ＣＤＣ、５００×１０^{6}ＣＤＣ、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲が挙げられる。一部の実施形態において、各用量で（単回もしくは多回用量が使用される場合）及び／または治療レジメンにわたって投与されるＥＶの分量は、１×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～１×１０^{11}、１×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}以上を範囲とする。ある特定の場合において、これは体重に対し比例配分され得る（１００，０００～１００万ＣＤＣ／ｋｇ体重の合計ＣＤＣ用量）。様々な実施形態において、投与は、反復用量で、例えば、２、３、４、または４回以上の連続適用される用量で行われ得る。

【００７９】

一部の実施形態において、用量（または投薬レジメン）において対象に送達されるＥＶの数は、細胞ベース療法において臨床的に有効な用量で使用されるであろうＣＤＣの数に基づいて決定される。例えば、一部の実施形態において、７５～５００×１０^{6}ＣＤＣががんの治療的処置向けの有効用量である場合、無細胞の処置方法では、このようなＣＤＣがｉｎ　ｖｉｖｏで放出するであろう相当量のＥＶの使用が患者に投与されると考えられる。言い換えれば、ＣＤＣ相当用量のＥＶ、ＭＶ、ＸＯ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＸＯが使用され得る。一例として、一部の実施形態において、３ｍＬ／３×１０^{8}ＣＤＣは治療利益を提供可能である。そのため、体内でＣＤＣが滞留する時間経過にわたり、その数のＣＤＣに由来すると考えられる複数のＣＤＣ－ＸＯが使用される。一部の実施形態において、患者に送達されるＥＶ、ＭＶ、ＸＯ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＸＯの量は、約７５×１０^{6}ＣＤＣ、１５０×１０^{6}ＣＤＣ、３００×１０^{6}ＣＤＣ、４００×１０^{6}ＣＤＣ、５００×１０^{6}ＣＤＣに等しいかもしくはこれ以上、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲の注射により放出されると考えられるＥＶ、ＭＶ、ＸＯ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＸＯの量である。一部の実施形態において、ＣＤＣの用量は、１，０００万から９，０００万ＣＤＣの間の範囲であり、これには、約１，０００万～約２，０００万、約２，０００万～約３，０００万、約３，０００万～約５，０００万、約５，０００万～約６，０００万、約６，０００万～約７，０００万、約７，０００万～約７，５００万、約７，５００万～約８，０００万、約８，０００万～約９，０００万、ならびに前述の値を含む及び／またはこれらにまたがる範囲が含まれる。一部の実施形態において、ＣＤＣの用量は、３，０００万から１５億ＣＤＣの間の範囲であり、これには、約３，０００万～約４，５００万、約４，０００万～約５，０００万、約５，０００万～約５，０００万、約６，０００万～約７，５００万、約７，５００万～約１０億、約９，０００万～約１１億、約１０億～１２．５億、約１２．５億～約１５億、ならびに前述の値を含む及び／またはこれらにまたがる範囲が含まれる。一部の実施形態において、患者に送達されるＣＤＣ－ＸＯまたはＣＤＣ－ＥＶの相当量は、約１週間、約２週間、約３週間、またはそれ以上の体内での所与のＣＤＣ滞留時間にわたり、開示された量のＣＤＣの投与（例えば、注射または点滴）により放出されると考えられるＣＤＣ－ＸＯまたはＣＤＣ－ＥＶの量として計算される。ある特定の場合において、薬用量は、体重に対し比例配分され得る（１００，０００～１００万ＣＤＣ／ｋｇ体重の合計ＣＤＣ用量）。一部の実施形態において、心臓内への注射向けに投与されるＣＤＣの数としては、ＸＯまたはＥＶの薬用量分量における別のベースラインとして、冠状動脈当たり２，５００万ＣＤＣ（すなわち、合計７，５００万ＣＤＣ）が挙げられる。

【００８０】

一部の実施形態において、患者に送達されるＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの分量（例えば、用量）は、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの重量（ｍｇ）により測定され得る。例えば、一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの用量は、以下におおよそ等しいかまたはそれ以上の重量（ｍｇ）を含み得る：約０．００１～約０．００５、約０．００５～約０．０１、約０．０１～約０．０５、約０．０５～約０．１、約０．１～約０．５、約０．５～約１、約１～約１０、約１０～約２５、約２５～約５０、約５０～約７５、約７５～約１００、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲。本明細書でさらに詳細に論じられるように、これらの質量は、実施形態に応じて、対象に投薬されるＣＤＣ、ＣＤＣ－ＸＯ、またはＣＤＣ－ＥＶの数を代表するものである。例えば、いくつかの実施形態において、用量におけるＣＤＣの数は、約5×10^{4}～約2×10^{9}を範囲とすることができ、これには、約5×10^{4}～約1×10^{5}、約1×10^{5}～約2.5×10^{5}、約2.5×10^{5}～約1×10^{6}、約1×10^{6}～約1×10^{7}、約1×10^{7}～約1×10^{8}、約1×10^{8}～約1×10^{9}、約1×10^{9}～約2×10^{9}、約2×10^{9}～約5×10^{9}、ならびに前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲が含まれる。同様に、実施形態に応じて、対象に投薬されるＸＯまたは粒子（例えば、小胞）の数は、約1×10^{9}～約2×10^{14}を範囲とすることができ、これには、約1×10^{9}～約2×10^{9}、約2×10^{9}～約4×10^{9}、約4×10^{9}～約1×10^{10}、約1×10^{10}～約1×10^{11}、約1×10^{11}～約1×10^{12}、約1×10^{12}～約2×10^{12}、約2×10^{12}～約2×10^{13}、約2×10^{13}～約1×10^{14}、約1×10^{14}～約2×10^{14}、ならびに前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲が含まれる。一部の実施形態において、患者に送達されるＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの分量は、タンパク質重量（ｍｇ）及び／または細胞もしくは小胞の合計重量（例えば、細胞または小胞の外側の区域から水が除去された場合）により測定され得る。一部の実施形態において、患者に送達されるＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの分量は、１～１０ｍｇ、１０～２５ｍｇ、２５～５０ｍｇ、５０～７５ｍｇ、７５～１００ｍｇ、または１００ｍｇ以上のタンパク質である。一部の実施形態において、治療有効量の組成物を投与することは、単回用量で約１～約１００ｍｇのＸＯ及び／またはＥＶタンパク質を含む。

【００８１】

一部の実施形態において、投与を必要とする対象へのＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの投与は、単回用量及び／または多回用量（例えば、２、４、６、８、１０回、またはそれ以上の用量）を含む。一部の実施形態において、多回用量が使用される場合、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの投与は、１日１回、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、月に１回、６ヵ月に１回、または１年に１回実施される。一部の実施形態において、投薬スケジュールは、例えば、２週間、１ヵ月、２ヵ月、３ヵ月、５ヵ月、６ヵ月、１年、５年、または前述の値を含む及び／もしくはこれらにまたがる範囲の期間にわたり実施される。例示として、一部の実施形態において、この間隔は、１～５ヵ月の間隔での２～１０回用量の投与を含む。一部の実施形態において、投薬スケジュールは、各用量間に約３ヵ月おいた３回用量である。一部の実施形態において、投薬スケジュールは、各用量を約１週間隔てた５回用量である。一部の実施形態において、投薬スケジュールは、第０週、第６週、及び第９週における３回投与（例えば、異なる時点での単回用量３回）である。一部の実施形態において、投薬期間と、複数の投薬期間の間にある休薬期間とが存在する、間隔スケジュールが使用される（例えば、週１回の用量が１ヵ月、その後に休薬期間が５ヵ月、その後に週１回の用量が１ヵ月、など）。一部の実施形態において、単回用量は、治療有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶを含む。一部の実施形態において、投薬期間及び／また

は間隔スケジュールは、患者の一生にわたり実施される。一部の実施形態において、各単回用量の複数回投与が対象に提供される。様々な実施形態において、本明細書の他の箇所で開示されているように、投与は、反復用量で、例えば、二回、三回、四回、または四回以上の連続適用される用量で行われ得る。

【００８２】

一部の実施形態において、薬用量レジメンにおける治療有効量の投与は、治療を行う対象に依存する。一部の実施形態において、薬用量レジメンにおける投与は、単回用量、あるいは１０、２０、３０、４０、５０、６０分、及び／または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間もしくはそれ以上、及び／または１、２、３、４、５、６、７日もしくはそれ以上にまたがる時間期間にわたる薬用量の複数回投与であり得る。さらに、投与は、製剤及び／または投与様式により実装された、時間放出または持続放出の機構を通じたものであり得る。

【００８３】

一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍重量の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍血管新生の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍の浸潤、転移、または両方の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、血清乳酸デヒドロゲナーゼの減少を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、ＥＲＢＢ２／ＥＲＢＢ３、ＭＤＭ４、ＩＧＦ１Ｒ、及び／またはＩＲＦ５の発現の減少を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、ＴＥＲＴ及び／またはテロメラーゼ酵素活性の減少を含む。

【００８４】

さらに、本明細書では、がんを防止する方法であって、がんにかかりやすい対象に、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶを含む組成物を投与することを含む方法も説明される。一部の実施形態において、対象は、一つ以上の遺伝子変異（例えば、対象をがんに罹患させやすくする遺伝子変異）を有する。一部の実施形態において、投与は全身投与である。一部の実施形態において、全身投与は腹腔内注射である。一部の実施形態において、投与は局所投与である。一部の実施形態において、局所投与は皮下投与である。一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、カルディオスフィア、ＣＤＣ、及び／またはイモリＡ１細胞株から取得される。他の実施形態において、ＥＶはＸＯ（例えば、ＣＤＣ－ＸＯ）である。

【００８５】

さらに、本明細書では、がんを治療する方法であって、がんにかかっている対象に、治療有効量の、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶを含む組成物を投与し、当該投与により対象を治療することを含む方法が説明される。一部の実施形態において、投与は全身投与である。様々な実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの投与は、治療有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの投与を含む。一部の実施形態において、組成物を投与することは、注射を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍重量の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍血管新生の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、腫瘍の浸潤、転移、または両方の低減を含む。一部の実施形態において、対象におけるがんを治療することは、血清乳酸デヒドロゲナーゼの減少を含む。

【００８６】

一部の実施形態において、治療の方法は、治療を必要とする対象を選択することを含む。一部の実施形態において、治療の方法は、対象（例えば、がんもしくはそれに関連する病状を患う対象、またはがんにかかりやすい患者）に、治療有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ

、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶを投与することを含む。一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、対象にとって自己由来または同種である（例えば、対象自身の組織、別の対象の組織、及び／または別の動物種の組織に由来する）。一部の実施形態において、治療の方法は、対象に、治療有効量の、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶからの積荷分子を投与することを含む。一部の実施形態において、ＣＤＣ－ＸＯまたはＣＤＣ－ＥＶの積荷分子は単離及び／または合成され、その積荷分子（例えば、特定の分子及び／または異なる分子の組合せ（ＲＮＡポリヌクレオチド及び／または短いノンコーディングＲＮＡを含む））は、投与を必要とする対象（例えば、がんもしくはそれに関連する病状を患う対象、またはがんにかかりやすい患者）に投与される。一部の実施形態において、治療の方法は、対象に、治療有効量の、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／もしくはＣＤＣ－ＥＶに見いだされる単離されたＲＮＡポリヌクレオチド、またはＲＮＡポリヌクレオチドをコードする（及び／もしくは含有する）ベクターを投与することを含む。

【００８７】

一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、対象に全身送達される。一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、対象に全身送達または局所送達される。一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、対象に局所送達ではなく全身送達される。一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、対象に局所送達される。一部の実施形態において、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、対象に全身送達ではなく局所送達される。一部の実施形態において、治療有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶを投与するための方法の非限定的な例としては、全身投与（例えば、静脈内、動脈内、心室内、大動脈内、及び／または腹腔内の注射及び／または点滴）が挙げられる。一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、静脈内に注射または点滴される。一部の実施形態において、治療有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、患者に、筋肉内の注射及び／または点滴により投与される。一部の実施形態において、治療有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、患者に、点滴により直接局所部位（例えば、治療が所望される腫瘍及び／または標的部位の中またはその付近）に投与される。一部の実施形態において、有効量のＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶは、注射及び／または点滴により、心臓内ではない身体の一区域に全身送達される。一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、及び／またはＣＤＣ－ＥＶの静脈内投与は、頸静脈及び／または大腿静脈の注射及び／または点滴を含む。

【００８８】

一部の実施形態において、本明細書の他の箇所で開示されているように、方法は、患者へのＥＶの積荷分子の投与を伴う。一部の実施形態において、積荷分子は、一つのＲＮＡポリヌクレオチド及び／または一つ以上のＲＮＡポリヌクレオチド、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のＲＮＡポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ＲＮＡにはノンコーディングＲＮＡが含まれる。一部の実施形態において、ノンコーディングＲＮＡには、特に、ｔＲＮＡｓ、ｙＲＮＡｓ、ｒＴＮＡｓ、ｍｉＲＮＡｓ、ｌｎｃＲＮＡｓ、ｐｉＲＮＡｓ、ｓｎＲＮＡｓ、ｓｎｏＲＮＡｓが含まれ、さらにこれらの断片も含まれる。一部の実施形態において、一つ以上のＲＮＡポリヌクレオチドはマイクロＲＮＡを含む。一部の実施形態において、マイクロＲＮＡは、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２１０、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－２２２、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－１４８ａ、ｍｉＲ－２１５、ｍｉＲ－３３ａ、ｍｉＲ

２０４、ｍｉＲ－３７６ｃ、ｍｉＲ４５３２、ｍｉＲ－４７４２、ｍｉＲ－５８２、ｍｉＲ－６２９、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－３１２５、ｍｉＲ－３６７７、ｍｉＲ－３７６ｂ、ｍｉＲ－４４４９、ｍｉＲ－４７７３、ｍｉＲ－４７８７、ｍｉＲ－４９１、ｍｉＲ－４９５、ｍｉＲ－５００ａ、ｍｉＲ－５４８ａｈ、ｍｉＲ－５５０、ｍｉＲ－５４８ａｈ、ｍｉＲ－５５０ａ、ｍｉＲ－５５１ｎ、ｍｉＲ－５５８１、及び／またはｍｉＲ－６１６からなる群から選択される。一部の実施形態において、マイクロＲＮＡは、マイクロＲＮＡ　ｍｉＲ－１４６ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２１０、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ１４８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２１０、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１４０－３ｐ、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－２７ｂ、ｍｉＲ－１９ｂ、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－３７６ｃ、ｍｉＲ－１２８、ｍｉＲ－３２０ａ、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－１３０ａ、ｍｉＲ－９、ｍｉＲ－１８５、及びｍｉＲ－２３ａからなる群から選択される。一部の実施形態において、マイクロＲＮＡにはｍｉＲ－１４８ａ－３ｐが含まれる。一部の実施形態において、マイクロＲＮＡは、ｍｉＲ－１７－９２クラスターからのものである。

【００８９】

一部の実施形態において、本明細書で開示されているマイクロＲＮＡのうちの一つ以上は、一つ以上のがん遺伝子を下方制御することにより抗がん効果をもたらす。一部の実施形態において、本明細書で開示されているがんを治療する方法は、ＨＩＦ－１α、ＩＬ－６、及び／またはＥＧＦ－Ｒを下方制御することを含む。一部の実施形態において、本明細書で開示されている方法は、がん増殖を許容するようなやり方でカテプシンＤ、ｅＮＯＳ、ＥｐＣＡＭ、及び／またはＡＮＧＰＴＬ４を顕著にまたは相当程度に上方制御することはない。

【００９０】

一部の実施形態において、有効量のＲＮＡは、０．１から２０ｍｇ／ｋｇの間、及び／または０．５から１０ｍｇ／ｋｇの間（ｋｇは患者の体重）を範囲とする。一部の実施形態において、治療有効量は単一の単位用量である。一部の実施形態において、有効量のＲＮＡは、０．１ｎＭから１０Ｍの間の範囲の濃度を含む。一部の実施形態において、ＲＮＡの濃度は、０．３から４００ｎＭの間、または１から２００ｎＭの間を範囲とする。一部の実施形態において、ＲＮＡポリヌクレオチドまたはベクターは、添加されるＲＮＡポリヌクレオチドまたはベクターの合計濃度を意味する濃度を含む。一部の実施形態において、細胞または生体にもたらされるＲＮＡポリヌクレオチドまたはベクターの量は、特定の結果のための有効量であり、これは、所望の目標（例えば、特定の細胞的特徴（一つまたは複数）の誘発）を達成するのに必要な量を意味する。一部の実施形態において、有効量のＲＮＡポリヌクレオチドには、がんを治療可能な量が含まれる。

【００９１】

一部の実施形態において、ＣＤＣ、ＣＤＣ－ＸＯ、ＣＤＣ－ＭＶ、ＣＤＣ－ＥＶ、ＣＤＣ、ＸＯ、ＭＶ、ＥＶ、ＥＶの積荷分子を含む製剤または組成物が提供される。一部の実施形態において、製剤及び／または組成物は、医薬的に許容される担体及び／または賦形剤を含む。一部の実施形態において、担体は、生理的ｐＨ及び／または等張性において水である。

【実施例】

【００９２】

実施例１

材料及び方法

細胞株

ＨＴ１０８０ヒト線維肉腫及びＮＣＩ－Ｈ２３ヒト神経芽細胞腫の細胞をＡＴＣＣから購入した。ヒト骨髄由来ＭＳＣをＬｏｎｚａから購入した。細胞を製造業者の指示に従って培養した。実施例２で説明されているようにヒトドナー及びラット心臓からのＣＤＣを導出した。

浸潤アッセイ

【００９３】
Ｃｙｔｏｓｅｌｅｃｔ　２４ウェル細胞浸潤アッセイ（比色分析）キット（Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて浸潤アッセイを行った。懸濁液のアリコートを、再構成された基底膜タンパク質（ＥＣＭａｔｒｉｘ）の均一な層でコーティングされたインサートに添加した。１０％　ＦＢＳを含有する最小必須培地を、コーティングインサートが入っている下部チャンバーに添加した。４８時間のインキュベーションにて、膜を浸潤しなかった細胞を洗い流し、浸潤細胞を細胞染色液で染色した。次いで、染色した細胞から色素を抽出し、マイクロプレートリーダーを用いてＯＤ　５６０ｎｍにおける色強度を測定した。
接着アッセイ
【００９４】
ＣｙｔｏＳｅｌｅｃｔ（商標）４８ウェル細胞接着アッセイ（ＥＣＭ　Ａｒｒａｙ、比色分析フォーマット）を用いて、細胞接着能力を試験した。各フィブリノーゲンコーティングウェルに同数の細胞を添加した。１．５時間のインキュベーション後、プレートをＰＢＳですすいで付着していない細胞を廃棄し、付着した細胞を細胞染色液で染色した。付着した細胞から色素を抽出した後、マイクロプレートリーダーを用いてＯＤ　５６０ｎｍにおける色強度を測定した。
テロメラーゼ活性アッセイ
【００９５】
ＴｅｌｏＴＡＧＧＧテロメラーゼＰＣＲ　ＥＬＩＳＡＰＬＵＳキット（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を用いて、テロメラーゼ活性を定量した。溶解試薬とＨａｌｔＴＭプロテアーゼ阻害剤（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）との混合物で細胞を溶解し、（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｑｕｉｃｋ　ＳｔａｒｔＴＭ）を用いてタンパク質濃度をチェックした。細胞抽出物を＋８５℃にて１０分間加熱して、各試料に対する陰性対照を作成した。組み合わせたプライマー伸長（テロメア反復増幅プロトコル［ＴＲＡＰ反応］）／増幅（ＰＣＲ）反応用に、各試料から全タンパク質のうちの１ｕｇを使用した。次いで、ＰＣＲ生成物を変性させ、テロメア反復に特異的なジゴキシゲニン（ＤＩＧ）標識検出プローブを用いてハイブリダイズした。次いで、ビオチン標識プライマーを使用して、得られた生成物をストレプトアビジンコーティングマイクロプレートに固定し、次いでこれを西洋ワサビペルオキシダーゼ及びＴＭＢ基質に結合した抗ジゴキシゲニン抗体で検出した。次いで、マイクロプレートリーダープレートを用いてＯＤ　４５０ｎｍにてプレートを二回読み取った。
ＲＴ－ＰＣＲアレイ
【００９６】
ＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓミニキット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてＨＴ１０８０細胞からＲＮＡを抽出し、ＲＮｅａｓｙ　ｐｌｕｓユニバーサルキット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて腫瘍組織からＲＮＡを抽出した。ＲＮＡをさらに精製するためにＲＮａｓｅ－Ｆｒｅｅ ＤＮａｓｅセット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用し、Ｎａｎｏ　ｄｒｏｐによりＲＮＡの完全性を評価した。ＲＴ２　ｆｉｒｓｔ　ｓｔｒａｎｄキットを用いて、精製したＲＮＡからｃＤＮＡを産生した。ＲＴ２　Ｐｒｏｆｉｌｅｒ　ＰＣＲ　Ａｒｒａｙヒトがん薬物標的及びＲＴ２　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてＡｐｐｌｉｅｄ　ｂｉｏ　ｓｙｓｔｅｍ　９６　ｗｅｌｌ　ｆａｓｔ　ｂｌｏｃｋ　ｃｙｃｌｅｒ上でＰＣＲを実施した。このアレイは、８４種のがんマーカー遺伝子及びデータ正規化のための五種のハウスキーピング遺伝子の発現を評価した。次いで、遺伝子発現を４０サイクルにわたって増幅し、ｄｄＣｔ法により分析した。
Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　ｐｒｏｆｉｌｅｒアッセイ
【００９７】
ＲＩＰＡ溶解抽出緩衝液とＨａｌｔＴＭプロテアーゼ阻害剤（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）との混合物を用いて腫瘍組織を溶解し、ｐｒｏｔｅｏｍｅ　ｐｒｏｆｉｌｅｒ　ｌｙｓｉｓ　ｂｕｆｆｅｒ　１７を用いて細胞を溶解した。異なる捕捉抗体及び対照抗体をスポットしたヒトホスホキナーゼアレイのニトロセルロースメン

ブレンと共に、溶解した細胞及び腫瘍組織を一晩インキュベートした。結合していないタンパク質を洗い流し、次いで、アレイをビオチン化検出抗体のカクテルと共にインキュベートした。ストレプトアビジン－ＨＲＰ及び化学発光検出試薬を適用した後、結合したリン酸化タンパク質の量に基づいて各捕捉スポットにてシグナルを生成した。各タンパク質を表す二重スポットのペアの平均シグナル（ピクセル密度）を、平均バックグラウンドシグナルを差し引いた後に定量した。

ＬＤＨアッセイ

【００９８】

ＬＤＨアッセイに使用するための血清を、処置マウス及び未処置マウスから第１８日及び第２５日に収集した血液試料から取得した。ｍａｓｔｅｒ　ｍｉｘを生物学的試料に添加した後、ＬＤＨがＮＡＤをＮＡＤＨに還元し、次いでこれが特定のプローブと相互作用して色を生成したときのＬＤＨ活性を測定した。次いで、光保護動態マイクロプレートリーダー上で３７℃にて３０分間、出力を３分ごとにＯＤ　４５０ｎｍにて測定した。

免疫染色

【００９９】

組織スライスをＰＢＳで洗浄し、４％パラホルムアルデヒドで固定し、次にブロッキング溶液（Ｄａｋｏ）を加えた。スライスを一次抗体と共に、４℃にて一晩インキュベートした。Ｋｉ－６７及びＣＤ－３１抗体をＡｂｃａｍから購入した。スライスをＰＢＳで３回洗浄し、適切な種の二次抗体及びｉｎ　ｓｉｔｕ細胞死検出キット、フルオレセイン（Ｒｏｃｈｅ）と共にインキュベートした。全てのスライドをＤＡＰＩ（Ｓｉｇｍａ）で対比染色した。スライド当たり５～１０点の画像を共焦点レーザー顕微鏡を用いて２０倍倍率でイメージングし、Ｉｍａｇｅ－Ｊソフトウェアを用いて分析した。

動物モデル

【０１００】

二つの異なる動物モデル：ヌード無胸腺Ｆｏｘｎ１ｎｕマウスにおけるヒト異種移植片線維肉腫、及び２歳齢Ｆｉｓｈｅｒ　３４４ラットにおける自然発症急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）を使用した。ＡＬＬは、大顆粒リンパ球性（ＬＧＬ）白血病としても示され、老齢のＦ３４４ラットの主な死因の一つである。白血病細胞の表現型は、ヒトＮＫ－ＬＧＬ白血病の表現型に似ている。全ての動物手順は、ＮＩＨ　Ｇｕｉｄｅ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ａｎｉｍａｌｓに概説されている人道的動物管理基準に従って実施され、Ｃｅｄａｒｓ－Ｓｉｎａｉ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより承認された。

マイクロＲＮＡアレイ分析

【０１０１】

ＣＤＣ及びＭＳＣ由来ＥＶのマイクロＲＮＡ（ｍｉＲ）積荷を特徴づけるため、ｍｉＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてｍｉＲを抽出し、合計８８種の遺伝子を伴うＭｉＳｃｒｉｐｔアレイ（Ｑｉａｇｅｎ）を製造業者の指示に従って用いて分析した。

統計的分析

【０１０２】

全ての結果は、連続変数、カテゴリー変数に対し、それぞれ平均±ＳＥＭ、パーセンテージとして提示する。差の有意性は、変数の分布が正規である複数の群の場合はスチューデントｔ検定または1方向ＡＮＯＶＡにより評価し、それ以外の場合は、マン・ホイットニー検定またはクラスカル・ウォリス検定を使用した。腫瘍体積データは、各動物内の反復測定を説明するため、混合モデル回帰を用いて処置群全体に対し検定した。多重比較のために事後検定を適合させた（チューキー）。データを分析前に対数変換し、残差を調べてデータがパラメトリック評価に必要な仮説を満たすことを確認した。生存分析については、ブレスロウ・ウィルコクソン検定を適用して無白血病生存曲線を比較した。全ての報告された確率値は両側であり、ｐ＜０．０５を有意とみなした。全ての分析に対し、ＩＢＭ　ＳＰＳＳ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ　２０及びＳＡＳ　ｖ９．４を使用した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験については、実験当たりの最小反復回数は三回であった。

実施例２
心臓細胞の単離及び培養
【０１０３】
細かく分割した心臓組織を初代培養で成長させると、単層の心臓間質細胞と外植片由来細胞（ＥＤＣ）として知られている前駆細胞とが生じる。このようなＥＤＣは、カルディオスフィア及びＣＤＣの前駆体である。ＥＤＣ及びＣＤＣを単離及び培養するための代表的方法は、米国特許出願公開第２０１２／０３１５２５２号に見いだすことができ、当該出願はその全体が参照により本明細書に援用される。簡潔に述べると、死亡した組織ドナーの健康な心臓からの心筋生検（ヒト組織用）を刻んで小さな断片にし、コラゲナーゼで消化し、フィブロネクチンコーティング皿で培養した。ＥＤＣは組織断片から自発的に成長し、２～３週間までにコンフルエンスに到達し、このときに０．２５％トリプシン（ＧＩＢＣＯ）を用いてＥＤＣを採取し、組織及び細胞デブリから精製し、再び平板培養した。ＥＤＣを２０μｇ／ｍｌのポリｄ‐リジン（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の懸濁液中で培養して、自己凝集性のカルディオスフィアを形成した。カルディオスフィアをフィブロネクチンコーティング皿に播種し２～４回継代させることにより、ＣＤＣを取得した。培養物は、２０％　ＦＢＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン、及び０．１ｍｌの２－メルカプトエタノールを追加したＩＭＤＭ基本培地（ＧＩＢＣＯ）を用いて、３７℃にて５％　ＣＯ２で維持した。全てのプロトコルは、ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　ｒｅｖｉｅｗ　ｂｏａｒｄ　ｆｏｒ　ｈｕｍａｎ　ａｎｄ　ａｎｉｍａｌ　ｓｕｂｊｅｃｔｓにより承認された。
細胞外小胞の単離及びキャラクタリゼーション
【０１０４】
第３継代のＣＤＣ及び骨髄由来間葉幹細胞（ＭＳＣ）により１５日間条件設定した無血清培地からＥＶを採取した。次いで、培地を二つの連続する遠心分離ステップ：２，０００ｘｇで２０分間及び１０，０００ｘｇで３０分間に供して、細胞デブリを除去した。得られた上清をポリエチレングリコール（ＥｘｏＱｕｉｃｋＴＣ）により沈殿させ、これにより多量の精製されたＸＯが得られ、次に４℃にて一晩インキュベートした。次いで、２，０００ｘｇで３０分間の遠心分離によりＥＶを単離し、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）に再懸濁し、ＬＭ１０－ＨＳシステム（ＮａｎｏＳｉｇｈｔ）を用いて粒子濃度及びサイズを定量化し、そしてタンパク質濃度を定量化した（ＢＱｕｉｃｋ　ＳｔａｒｔＴＭ）。
実施例３
ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験
【０１０５】
カルディオスフィア由来細胞（ＣＤＣ、心臓前駆細胞）により分泌されたＥＶを、線維肉腫ＨＴ１０８０及び神経芽細胞腫ＮＣｌ－Ｈ２３細胞でｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験した。ノイバウエル血球計算盤を用いてＨＴ１０８０細胞またはＮＣｌ－Ｈ２３細胞を手動で計数し、ＴＣ２０（商標）自動セルカウンターで再確認した。トリパンブルー染色により生存率をチェックした。同数の生細胞を６または１２ウェルプレートで平板培養し、最小必須培地、イーグル最小必須培地、及びダルベッコ変法イーグル培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）ウシ胎仔血清（１０％）追加培地中での最初の２４時間の安定化期間後、細胞をＰＢＳで洗浄し、次いで無血清培地（ＳＦ）のみまたは再懸濁したＣＤＣ－ＥＶ（１０６細胞当たり１ｍｇのＥＶタンパク質；図７Ａ）を含有する無血清培地と共にインキュベートした。
【０１０６】
９６または１２０時間後、細胞を採取し、ＰＢＳで洗浄し、様々なアッセイに使用した。ＨＴ１０８０またはＮＣｌ－Ｈ２３を、無血清培地（ＳＦ）単独または再懸濁したＣＤＣ－ＥＶ（10^6細胞当たり１ｍｇのＥＶタンパク質；図７Ａ）を含有するＳＦ中でインキュベートした。
【０１０７】
がん関連のタンパク質及び遺伝子の発現における全体的なＣＤＣ－ＥＶ誘発変化は、単

一の経路に焦点を絞るのではなく、特異的なアレイを用いて特徴づけた。ＨＴ１０８０細胞をＣＤＣ－ＥＶまたはＳＦ培地のみと共にｉｎ　ｖｉｔｒｏで９６時間インキュベートした後（図１Ａ）、分析したタンパク質８４種中１１種で有意な差が観察された（図７Ａ）。一方向ではないものの、観察された差の大部分（タンパク質の下方制御、例えば、エノラーゼ２、ｃ－Ｍｅｔ、メソテリン、ＰＤＧＦ－ＡＡ、ｅＮＯＳ、ＩＬ－６、及びＣＡ１２５の上方制御）からは、がんに関連する経路におけるＣＤＣ－ＥＶの負の影響が示唆された。負の影響は、ＣＤＣ－ＥＶ－プライムＨＴ１０８０細胞が、ＳＦ培地のみでインキュベートした細胞と比較して低い浸潤特性及び接着特性を示したこと（図１Ｂ、Ｃ）、そしてＣＤＣ－ＥＶプライミングＮＣｌ－Ｈ２３細胞が、ＳＦ培地のみでインキュベートしたＮＣｌ－Ｈ２３細胞と比較して９６時間後に生存率が低かったこと（図７Ｂ）ことにより、さらに確認された。がん薬物標的転写物（ｎ＝８４）も同様に、ＣＤＣ－ＥＶプライミングを伴うまたは伴わないＨＴ１０８０細胞において定量化した。３５種の遺伝子が有意に上方または下方制御された（図７Ｃ）。群間で少なくとも二倍の変化を伴う遺伝子を図１Ｄに示す。最も下方制御されたものは、テロメラーゼの触媒サブユニットをコードするＴＥＲＴ遺伝子であった。テロメラーゼ酵素活性の著明な減少（図１Ｅ）が同じ条件下で認められた。

実施例４：ｉｎ　ｖｉｖｏ試験

【０１０８】

ｉｎ　ｖｉｖｏモデルは、無胸腺マウスにおける異種移植片ＨＴ１０８０線維肉腫（ｎ＝３５）と、老齢ラットにおける自然発症急性リンパ性白血病（ｎ＝４４）を含むものであった。ＣＤＣ－ＥＶを二つの対照群：骨髄由来間葉幹細胞により分泌されたＥＶ（ＭＳＣ－ＥＶ）及びリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）と比較した。

無胸腺マウス試験

【０１０９】

異種移植片腫瘍を作成するため、ＰＢＳに再懸濁した10^6のＨＴ１０８０細胞をヌード無胸腺マウスの左右の側腹部に皮下注射した。次いで、ＥＶ送達法及び用量に基づいた二つの異なるプロトコルのいずれかに動物を供した。ＨＴ１０８０細胞注射から２４時間後の腹腔内（ｉ．ｐ．）投与を用いた全身送達プロトコルにおいて、マウスを、以下の三つの群にランダムに割り当てた：ヒトＣＤＣ‐ＥＶ（ｎ＝６）（宿主が指定されない限り、以下ＣＤＣ－ＥＶ）、ヒトＭＳＣ‐ＥＶ（ｎ＝８）、またはＰＢＳ単独（ｎ＝９）。ＥＶ（１ｍｇのタンパク質）を１ｍＬのＰＢＳに再懸濁するか、または１ｍＬのＰＢＳのみを使用し、２週間後に繰り返した。ＨＴ１０８０細胞注射から２４時間後の皮下（ｓ．ｃ．）投与を用いた局所送達プロトコルにおいて、マウスを以下の二つの群のいずれかにランダムに割り当てた：ラットＣＤＣ－ＥＶ（ｎ＝６）またはＰＢＳのみ（ｎ＝６）。ＥＶ（２ｍｇのタンパク質）を１ｍＬのＰＢＳに再懸濁したもの、または１ｍＬのＰＢＳのみを局所注射し、一週間ベースで繰り返した。

急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）試験

【０１１０】

自然発症急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）のラットモデルにおいて、最初の機能評価後に、合計４４匹の動物（オス及びメス）を二つの群に割り当て、同様のベースライン特性を確保した。２４匹のラットに、７μｇ－ＥＶタンパク質／体重ｇｒの用量のラットＣＤＣ－ＥＶを全身動脈内（ｉ．ａ．）注射により投与した。対照群の残りのラット（ｎ＝２０）には、４ヵ月の経過観察期間中、毎月ＰＢＳを動脈内投与した。ＡＬＬの診断は、臨床像が脾臓における典型的な組織病理学的所見及び／または末梢血検査の異常のいずれかと結びついたときに確立させた。臨床的には、罹患したラットは、運動能力の進行的低下、体重減少、蒼白な眼、及び黄疸を示した。これらのラットは常に脾腫が認められた。組織学的所見には新生物性ＬＧＬを伴う脾臓赤脾髄のびまん性浸潤が含まれ、末梢血は、異型リンパ球増加（ＬＧＬ）を伴う著明な白血球増加（＞５０×１０３／μＬ、正常上限は１１×１０３／μＬ）により特徴づけられた。再生性貧血、血小板減少、及び肝機能検査異常が一般的な所見であり、通常、最初の臨床徴候から２～３週間以内に死亡した。

試験

【０１１１】

マウス線維肉腫モデルにおける腫瘍成長を測定するため、各異種移植変腫瘍のｘ／ｙ平面における二つの最長垂直軸を、デジタルバーニアキャリパーを用いて定期的に測定した。式Ｖｏｌ＝ａ×ｂ２／２に従って腫瘍体積を計算した。カヘキシーをモニターするため、摂餌及び摂水の量ならびに体重も測定した。第１８日及び第２５日に血液試料を取得した。動物を３０日間経過観察し、安楽死させ、さらなる分析のために腫瘍及び肺を採取した。

【０１１２】

ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＤＣ－ＥＶの影響を試験した。異種移植片線維肉腫マウスにおいて、ヒトまたはラットＣＤＣ－ＥＶを用いた全身処置及び局所処置（図２Ａ、Ｂ）の両方が、ＰＢＳマウスと比較して約２．４倍の腫瘍成長減少（ヒト及びラットにおいてそれぞれｐ＜０．０１及びｐ＜０．０５）に結びついた（図２Ｃ～Ｆ）。平均腫瘍重量は１．５±０．３ｇｒであり、腫瘍重量＞１．５ｇｒのマウスの割合は、ＰＢＳ群において６２．５％であったのに対し、ラットＣＤＣ－ＥＶ処置動物では１６．６％であった（ｐ＜０．０５；図２Ｇ）。腫瘍成長の減少は、ＰＢＳマウスと対比したＣＤＣ‐ＥＶマウスにおいて、Ｋｉ６７の発現により測定した腫瘍細胞増殖の２倍の低減（ｐ＜０．００１）と、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼｄＵＴＰニックエンド標識に基づくアポトーシスの１．５倍の増加（ｐ＜０．０５）とに関連した（図３Ａ、Ｂ）。ＣＤＣ－ＥＶは、マウスにおける腫瘍細胞の増殖を減少させアポトーシスを増加させることにより、線維肉腫の成長を減少させる。

【０１１３】

ＣＤＣ‐ＥＶの注射は、ＰＢＳ群との対比で、マウスにおける線維肉腫の成長を２．５倍減少させた（ヒトＥＶ及びラットＥＶに対し、それぞれｐ＜０．０１及びｐ＜０．０５）。その効果は、ＰＢＳマウスと対比したＣＤＣ‐ＥＶマウスにおいて、腫瘍細胞増殖の２倍の減少（ｐ＜０．００１）と、アポトーシスの１．５倍の増加（ｐ＜０．０５）とに結びついた。ＣＤＣ‐ＥＶ動物において、腫瘍遺伝子及びタンパク質発現の有益な変化が観察された。ＣＤＣ‐ＥＶは、ＰＢＳ（ｐ＜０．０５）及びＭＳＣ‐ＥＶ（ｐ＜０．０１）と比較して腫瘍血管新生を低減した。さらに、ＣＤＣ‐ＥＶは、ＰＢＳと対比した老齢ラットにおいて無白血病生存期間を増加させた（ｐ＜０．０５）。ＣＤＣ－ＥＶ中で高度に濃縮されたｍｉＲ－１４６は、観察された効果の一部に関与している可能性がある。

【０１１４】

骨髄由来間葉幹細胞（ＭＳＣ）は再生医療試験で一般的に使用されているが、がんにおける安全性には議論の余地がある。この懸念を考慮して、マウスのＣＤＣ‐ＥＶ処置群に対する第二の比較対照群として、ＭＳＣ由来ＥＶ（ＭＳＣ－ＥＶ）を使用した（図２Ａ）。腫瘍体積のＣＤＣ‐ＥＶ関連減少とは異なり、ＭＳＣ‐ＥＶ処置マウスはＰＢＳと比較して外部腫瘍成長では有意差を示さず（図２Ｃ、Ｅ、Ｆ）、ＭＳＣ‐ＥＶ群の動物は、ラットＣＤＣ‐ＥＶ処置マウスと比較してより高い腫瘍重量を有した（ｐ＜０．０５；図２Ｇ）。ＭＳＣ‐ＥＶは、ＣＤＣ‐ＥＶと比較して、関連する腫瘍血管新生の増加を伴ってがん細胞の転移拡散を増加させる。

【０１１５】

ＭＳＣ‐ＥＶ処置マウスにおける腫瘍細胞増殖はＰＢＳ群より低かった（ｐ＜０．０１）ものの、ＣＤＣ‐ＥＶ処置動物よりは高かった（ｐ＜０．０５；図３Ａ、Ｂ）。アポトーシスに対する有意な効果は観察されなかった（図３Ａ、Ｂ）。遺伝子発現パターンの分析により、ＣＤＣ‐ＥＶ処置マウスと対比したＭＳＣ‐ＥＶ処置マウスでは、ＣＤＣ‐ＥＶ動物とＰＢＳ動物との間の違いと比較して、いくつかの反対方向の効果が明らかになった（図３Ｅ）。後者の場合、大部分の遺伝子は下方制御されたが、ＭＳＣ‐ＥＶマウスは、ＣＤＣ‐ＥＶ処置マウスと比較して、より高いカテプシン（ＣＴＳＳ及びＣＴＳＤ）及び成長因子（例えば、ＥＲＢＢ４、ＥＲＢＢ２、ＦＩＧＦ、ＥＧＦＲ）の発現レベルを有した（図８Ｃ）。興味深いことに、テロメラーゼ（ＴＥＲＴ）発現も、ＣＤＣ‐ＥＶ群と

対比したＭＳＣ‐ＥＶ群において１．６倍高かった（ｐ＜０．０１）。その他の差異、例えば、ＣＤＣ‐ＥＶ動物と対比したＭＳＣ‐ＥＶ動物におけるＰＴＧＳ２（３．８倍；ｐ＜０．００００１）及びＨＤＡＣ１１（３．１倍；ｐ＜０．００１）の著明に上方制御された発現は、前者の粒子のより高い炎症促進特性を反映している可能性がある。

【０１１６】

遺伝子発現と同様に、ＭＳＣ‐ＥＶ処置マウスにおける腫瘍タンパク質レベルの差は、プローブしたタンパク質のおよそ半分についてＣＤＣ‐ＥＶ注射動物で観察されたものとは逆であった（図４Ａ）。カテプシンＤ、ｅＮＯＳ、ＥｐＣＡＭ、及びＡＮＧＰＴＬ４のレベルは、ＰＢＳ群と対比したＣＤＣ‐ＥＶ群では下方制御されたのに対し、ＣＤＣ‐ＥＶ処置マウスと対比したＭＳＣ‐ＥＶ処置マウスでは上方制御された。これらは全て、血管新生の増加（ＶＥＧＦ発現もＭＳＣ‐ＥＶ群では有意に高かった）及び／または腫瘍細胞の浸潤により、腫瘍発生を促進する。ＭＳＣ－ＥＶ群における、マウスのＣＤＣ‐ＥＶ群と比較してより高い腫瘍血管新生も、ＣＤ３１染色により確認した（ｐ＜０．０１；図４Ｂ、Ｃ）。

【０１１７】

がん細胞の転移拡散を分析するために、マウス肺組織におけるヒトＹ‐ＲＮＡ断片をｑ‐ＰＣＲを用いて測定した。高～中発現（ほとんど全ての動物でＣｔ値＜３０；図９Ｂ）を伴って、ＰＢＳ群またはＣＤＣ‐ＥＶ群と対比したＭＳＣ‐ＥＶ処置マウス群の肺において、６倍高いレベルのＨＴ１０８０線維肉腫細胞が見いだされた（全ての比較に対しｐ＜０．０５；図４Ｄ）。特異的ではないが、がんの全身影響を評価する試みとして、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）の血清量の変化を試験した。高ＬＤＨレベルは、前立腺がん、肺がん、大腸がん、胃食道がん、婦人科がん、及び血液がんによる死亡リスクの増加と関連しており、処置中のＬＤＨレベルの変化も転移がん患者の全生存期間を予測する可能性がある。ラットＣＤＣ‐ＥＶ処置群で観察された著明な減少とは異なり、ＭＳＣ‐ＥＶ処置マウスでは中程度の血清ＬＤＨレベルの増加が見いだされた（ｐ＜０．０５；図４Ｅ）。

ＣＤＣ－ＥＶは老齢ラットの自然発症白血病関連死亡率を減少させる

【０１１８】

老齢ラットにおけるＣＤＣ‐ＥＶの若返り効果を試験するプロセスで、老化したラットに一般的かつ致死的であることが知られている自然発症急性白血病に対するＣＤＣ‐ＥＶの効果が認められた。ラットＣＤＣ‐ＥＶで処置した動物は、ＰＢＳラットよりも臨床的に顕性のＡＬＬを発生する頻度が低かった（黄疸、脾臓サイズの約４倍の増加、及び血球数の異常により特徴づけられる）（３０％に対し１２．５％、ｐ＝ｎ．ｓ．）（図５Ａ）。平均無白血病生存期間も、ＰＢＳ群における１０７±１１日からＣＤＣ－ＥＶで処置したラットにおける１２４±４日に増加した（ｐ＜０．０５；図５Ｂ）。進行疾患と死亡の発生に対する潜時は、ＰＢＳと対比してＣＤＣ‐ＥＶ群では二倍増加した（ｐ＜０．０５；図５Ｃ）。

【０１１９】

ＣＤＣ－ＥＶ群の２４匹のラット中３匹のみが臨床的ＡＬＬを発生した。そのラットのうちの一匹に対し、診断が血液計数により確認されたら、さらなる二倍容量のラットＣＤＣ‐ＥＶを投与してがん細胞に及ぼす効果を評価した。１週間後、白血球の合計数は、８２．６×１０３／μＬから３４．６ｘ１０３／μＬに減少し、リンパ球の絶対数は６１２４／μＬから１９７２２／μＬに減少し、１２３９０／μＬの好中球はほとんど変化せず、単球は１６５２／μＬから２７６８／μＬに増加し、血液細胞の比例配分の変化がもたらされ（図５Ｄ）、抗白血病効果が示唆された。

【０１２０】

差別的なＥＶのｍｉＲシグネチャーを、ＣＤＣ‐ＥＶの抗がん効果に対する潜在的要因として試験した。ＣＤＣ－ＥＶは、タンパク質、脂質、及び核酸を含めた多様な積荷を運搬及び移動する。ｍｉＲは、ＥＶによって安定的に輸送される小さな制御ＲＮＡ分子であり、ヒトタンパク質コード遺伝子の６０％超の発現に影響を及ぼす。ｍｉＲは、増殖シグ

ナリングの保持、成長抑制因子の回避、細胞死への抵抗、浸潤及び転移の活性化、ならびに血管新生の誘発を含めたがんの特質に影響を及ぼす。

【０１２１】

このエビデンス及びＣＤＣ‐ＥＶとＭＳＣ‐ＥＶとの間で観察された腫瘍形成性差異に基づいて、ＥＶのｍｉＲ積荷について調べた。最初に、同様の年齢のヒトドナーから取得した、同じ継代及び数の最初に平板培養した細胞が、ＥＶ生成において異なることが観察された。ＣＤＣは、ＭＳＣより約５０％多くＥＶを分泌し、粒子の平均サイズは約５０ｎｍ小さかった（図６Ａ）。これは、ＣＤＣが最小ＥＶであるＸＯをより多く分泌することに関連する可能性がある。次に、ＥＶ　ｍｉＲの比較（図６Ｂ）において、ｍｉＲ‐１４６ａがヒトＣＤＣ‐ＥＶに対し排他的であり、ｍｉＲ‐９２ａが最も豊富なｍｉＲの中でもヒト及びラットＣＤＣ‐ＥＶに対し排他的であることが観察された。全体的には（豊富なｍｉＲ及び豊富でないｍｉＲの中で）、ｍｉＲ‐１４６ａは、ヒトＣＤＣ‐ＥＶにおいて、ＭＳＣ‐ＥＶと比較すると８７倍上方制御され（ｐ＜０．０１；図６Ｃ）、ラットＣＤＣ－ＥＶと比較するとわずか６．２倍高かった。ＭＳＣ‐ＥＶと対比してＣＤＣ‐ＥＶでより豊富な他のｍｉＲには、ｍｉＲ‐１２４、ｍｉＲ‐２１０、ｍｉＲ‐９２、及びｍｉＲ‐３２０が含まれた。

実施例５

ゲノム及びプロテオームの試験

【０１２２】

観察されたＣＤＣ‐ＥＶの抗がん効果の根底にある機構をさらに探索するため、腫瘍のゲノム及びプロテオームの試験を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験と同じアレイを用いて実施した。興味深いことに、対照マウスと両方のＣＤＣ‐ＥＶ群と間の遺伝子発現の差異のパターンは類似しており（全身ヒト［図３Ｃ］及び局所ラット［図８Ａｉ］）、このことから、起源となるＥＶ種または送達方法とは無関係に、明らかなＣＤＣ‐ＥＶの負の効果が示された。がん薬物標的遺伝子の全般的な下方制御がＣＤＣ－ＥＶ群で観察され、これは、定量化した転写物の３８％において統計学的有意性に到達した（図８Ｂ）。下方制御された遺伝子のほとんどは、成長因子及びその受容体ならびに転写因子であった（図３Ｄ）。ｉｎ　ｖｉｖｏ及びｉｎ　ｖｉｔｒｏの結果を比較すると、ＥＲＢＢ２／ＥＲＢＢ３、ＭＤＭ４、ＩＧＦ１Ｒ、またはＩＲＦ５の下方制御が、ＣＤＣ－ＥＶのがん細胞に対する直接的な効果であり得る一方で、他の多く（例えば、ＨＩＦ１Ａ、ＣＴＳＬ、ＴＯＰ２Ａ、またはＰＬＫ２の発現低減）は、腫瘍成長に対する最終的な負の影響を伴った間接的な宿主細胞媒介効果であるということが観察された。

【０１２３】

腫瘍タンパク質レベルの差を測定した。分析した８４種のタンパク質のうち、３０種がＰＢＳ処置動物と比較してＣＤＣ－ＥＶ処置による有意な修飾を示した（図４Ａ）。８７％のケースにおいて、タンパク質は局所的な腫瘍進行、転移、及び／または血管新生に関する経路に属した（すなわち、カテプシンＤ、ＭＭＰ－９、ｅＮＯＳ、レプチン、ＡＮＧＰＴＬ４、オートタキシン）。内皮細胞マーカーＣＤ３１（図４Ｂ）を測定し、ＣＤＣ‐ＥＶ処置マウス腫瘍の血管新生がＰＢＳ群と比較して有意に低いことが観察された（ｐ＜０．０５；図４Ｃ）。

実施例６

考察

【０１２４】

腫瘍細胞の増殖の減少及びプログラム死の増加が、二つの異なるがんタイプ及び異なるげっ歯類種における宿主生存期間の延長と共に、ヒト及びラットＣＤＣ‐ＥＶの使用に結びつくことが示された。親ＣＤＣは、治療応用のための異なる前臨床及び臨床試験で試験されており、これまでのところ多くの好ましい効果があり、安全性の問題がないことが示されている。オンコロジーの分野において、正常細胞に対し毒性がないか最小限の、全てのがん細胞を効率的に除去するクラスの薬物はまだ利用可能ではない。そのため、ＣＤＣ及びＣＤＣ‐ＥＶが無毒性抗がん治療アプローチであるという知見の関連性は価値がある

。

【０１２５】

ＣＤＣ‐ＥＶ処置動物における腫瘍成長の低減は、ＥＶ内の生物活性成分の多様性と一致して、ゲノム及びプロテオームプロファイルの幅広い局所修飾と関連することが観察された。腫瘍進行の阻害の根底にあるのは、成長因子及びその受容体のＣＤＣ‐ＥＶ誘発性下方制御、転写因子のレベル低下、ならびに著明な抗血管新生効果であった。最後の効果は、がんの局所発生だけでなく転移がんに対しても有効であるというエビデンスをもたらす。ｉｎ　ｖｉｖｏ試験でのＣＤＣ－ＥＶ誘導抗がん効果がｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験と比較して増幅されていること（修飾される遺伝子及びタンパク質の数がより多いという点で）からは、効果の一部は、可能性としては、異なる宿主細胞の再調整を通じて、間接的に媒介されることが示唆される。腫瘍微小環境は、持続性のがん成長、浸潤、及び転移に必須であることが知られており、魅力的な治療標的として腫瘍間質細胞が提唱されている。ＣＤＣ及びＣＤＣ‐ＥＶは、線維芽細胞及びマクロファージを修飾することが示された。いずれの細胞タイプも腫瘍微小環境に関連している。また、ＣＤＣは、メタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）を放出し、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）リモデリング、ならびにＥＣＭに埋め込まれた成長因子の遊離、腫瘍成長、局所浸潤、及び血管新生をもたらす、組織筋線維芽細胞侵入を低減することが示された。活性化された腫瘍関連マクロファージは、Ｇ‐ＣＳＦ、ＩＬ‐６、及びＶＥＧＦを分泌し、血管新生を促進し、炎症性ニッチを創出する。ＣＤＣ－ＥＶ処置マウスの腫瘍では、対照と比較しての、これらのタンパク質の多くのレベルの低減が観察された。

【０１２６】

ＣＤＣ－ＥＶの試験において、抗加齢と抗がん効果との間の関係が認められた。若いドナーからのＣＤＣ－ＥＶは、局所的及び全身的な若返り特性を有する。ｍｉＲ‐１４６が線維芽細胞に及ぼす若返り効果は、老化関連分泌表現型の重要な媒介物質であるＩＬ‐６発現の阻害と関連している。一方、ｍｉＲ‐１４６は、多くの固形悪性腫瘍及び血液悪性腫瘍の腫瘍抑制因子として作用するように思われる。ｍｉＲ‐１４６により媒介される腫瘍抑制の機構は十分に特徴づけられていないものの、ＥＧＦ‐ＲはこのｍｉＲの標的として同定された。ｍｉＲ‐１４６の増加及びそれに続くＥＧＦ‐Ｒ発現の低下は、乳がん、膵臓がん、及び胃がんにおける増殖の減少ならびに腫瘍細胞の浸潤及び移動の阻害に関連する。マウスｍｉＲ‐１４６ノックアウトモデルは、骨髄リンパ球様細胞に対する腫瘍抑制因子としてのｍｉＲ‐１４６の役割を強力に支持するものである。開示されている試験では、ＩＬ‐６及びＥＧＦ‐Ｒの両方がＣＤＣ‐ＥＶにより負方向に修飾されており、ＣＤＣ‐ＥＶが、一つの考えられる抗腫瘍形成機構としてのｍｉＲ‐１４６の供給源として働き得るという考えが支持された。ヒト及びラットＣＤＣ‐ＥＶにおいて同様に豊富であり、ＭＳＣ‐ＥＶと比較して有意に高いもう一つのｍｉＲは、ｍｉＲ‐９２であった。これはｍｉＲ‐１７‐９２クラスターのメンバーであり、がん及び加齢の重要な制御因子である。ＨＩＦ‐１αはヒト及びラットＣＤＣ‐ＥＶの両方により下方制御された。エビデンスからは、ｍｉＲ‐１７‐９２に応じた細胞タイプ特異的応答が可能であることが示唆されるものの、ｍｉＲ‐９２ａの下方制御は腫瘍間質のマクロファージ侵入を特異的に誘発し、細胞移動を促進し、乳がん患者の生存期間を減少させる。

【０１２７】

ＣＤＣ‐ＥＶとは対照的に、ＭＳＣ‐ＥＶの使用はより大きな肺転移に結びついた。ＭＳＣは、免疫抑制を誘発し、血管新生を促進し、及び／または上皮から間葉への移行を刺激することにより、腫瘍形成促進効果を発揮する恐れがある。ＣＤＣ‐ＥＶ処置動物と対比したＭＳＣ‐ＥＶ処置動物における、炎症に関与する遺伝子、ならびにカテプシンＤ、ｅＮＯＳ、ＥｐＣＡＭ、及びＡＮＧＰＴＬ４などのタンパク質の有意な上方制御。これら全てのタンパク質は、異なる試験では成長、浸潤性、血管新生、及び転移の増加に結びつくものとして説明されている。さらに、開示されている試験における、ＣＤＣ‐ＥＶと対比してＭＳＣ‐ＥＶで濃縮されたｍｉＲ‐２２２／２２３は、乳がん細胞の休眠及び生存期間延長の誘発ならびに薬剤耐性の増加と関連づけられた。

【０１２８】
上記の様々な方法及び技法は、本発明を実行するための複数の方法を提供する。当然ながら、説明されている全ての目的または利点が、必ずしも本明細書に記載の任意の特定の実施形態に従って達成され得るとは限らないことを理解されたい。従って、例えば、当業者は、当該方法が、本明細書で教示または示唆される他の目的または利点を必ずしも達成することなく、本明細書に教示されるような一つの利点または一連の利点を達成または最適化するやり方で実施され得ることを認識するであろう。様々な有利な代替物及び不利な代替物が本明細書で言及されている。一部の実施形態が一つ、別の、またはいくつかの有利な特色を具体的に含み、一方他の実施形態が一つ、別の、またはいくつかの不利な特色を具体的に除外し、さらに他の実施形態が、一つ、別の、またはいくつかの有利な特色を含めることにより現在の不利な特色を具体的に軽減することを理解されたい。
【０１２９】
さらに、当業者であれば、異なる実施形態からの様々な特色の適用可能性を認識するであろう。同様に、様々な要素、特色、及びステップ、ならびにこのような要素、特色、またはステップの各々におけるその他の既知の等価物は、当業者が混合及びマッチさせて、本明細書で説明されている原理に従って方法を実施することができる。様々な要素、特色、及びステップの中でも、多様な実施形態に明確に含まれるものもあれば、明確に除外されるものもある。
【０１３０】
本明細書で開示されているように、ＣＤＣ及びＣＤＣ由来ＥＶは、ｉｎ　ｖｉｖｏがんモデルにおいて腫瘍成長を有意に低減する。腫瘍細胞と周囲細胞との間の細胞間コミュニケーションにおけるＥＶの役割が、転移及び腫瘍成長に関係するものとして強調された。
【０１３１】
本発明の実施形態において多くの変形形態及び代替的な要素が開示されている。なおさらなる変形形態及び代替的な要素も、当業者には明らかであろう。これらの変形形態に含まれるものとしては、以下に限定されないが、ＥＶ、このようなＥＶの供給源（そこで使用される技法及び組成物ならびに解決法の使用をさらに含む）、ならびに本発明の教示内容を通じて作成される生成物の特定の使用が挙げられる。本発明の様々な実施形態は、これらの変形形態または要素のいずれも明確に含むことも除外することもできる。
【０１３２】
一部の実施形態において、本発明の特定の実施形態を説明する文脈で（特に、以下の請求項の一部の文脈で）使用される「一つの（ａ）」及び「一つの（ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」ならびに同様の言及は、単数形及び複数形の両方を網羅するように解釈され得る。本明細書における値の範囲の列挙は、その範囲内に収まる別々の各値を個別に指すための簡略な方法として供するように意図されているに過ぎない。本明細書で別段の指示がない限り、各個別の値は、個別に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書で説明されている全ての方法は、本明細書で別段の指示がない限り、または別段に文脈により明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施することができる。あらゆる例、または本明細書におけるある特定の実施形態について示される例示的な言葉（例えば、「～などの（ｓｕｃｈ　ａｓ）」）の使用は、本明細書をより良好に明らかにすることを意図したものに過ぎず、別の形で特許請求されている本発明の範囲に限定をもたらすものではない。本明細書中のいかなる言葉も、本明細書の実施に不可欠な任意の特許請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。
【０１３３】
本明細書で開示されている本発明の代替的な要素または実施形態のグループ化は、限定として解釈しないものとする。各グループメンバーは、個別に、または本明細書に見いだされるグループの他のメンバーもしくはその他の要素との任意の組合せで、参照し特許請求することができる。グループの一つ以上のメンバーは、利便性及び／または特許性の理由により、グループに含めることもグループから削除することもできる。任意のこのような包含または削除が生じた場合、本明細書は、変更されたようにそのグループを含み、し

たがって、添付の請求項で使用されている全てのマーカッシュグループの書面での記載を満たすものとみなされる。

【０１３４】

本明細書で開示されている本発明の実施形態は、本発明の原理を例示するものであることを理解されたい。用いられ得る他の変更は、本発明の範囲内とすることができる。したがって、限定ではなく例として、本発明の代替的構成は、本明細書における教示に従って利用され得る。したがって、本発明の実施形態は、示され説明されているように精密にそれに限定されるわけではない。

【図１－１】

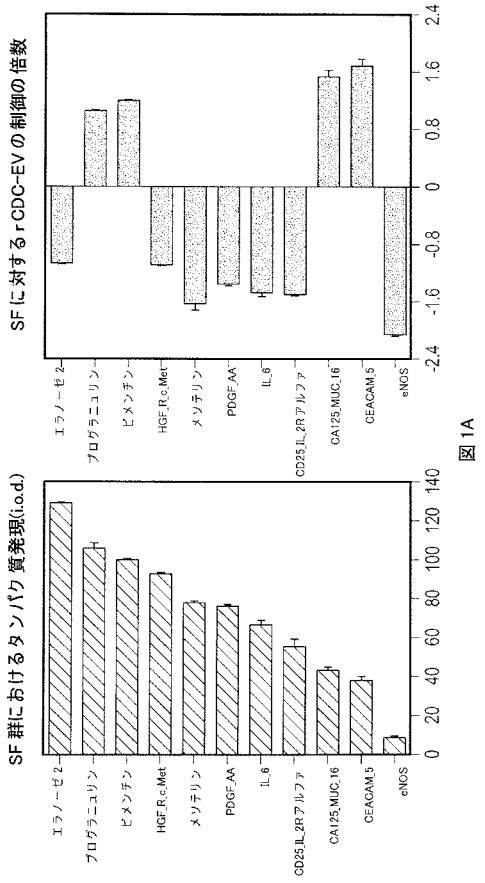


図1A

【図１－２】

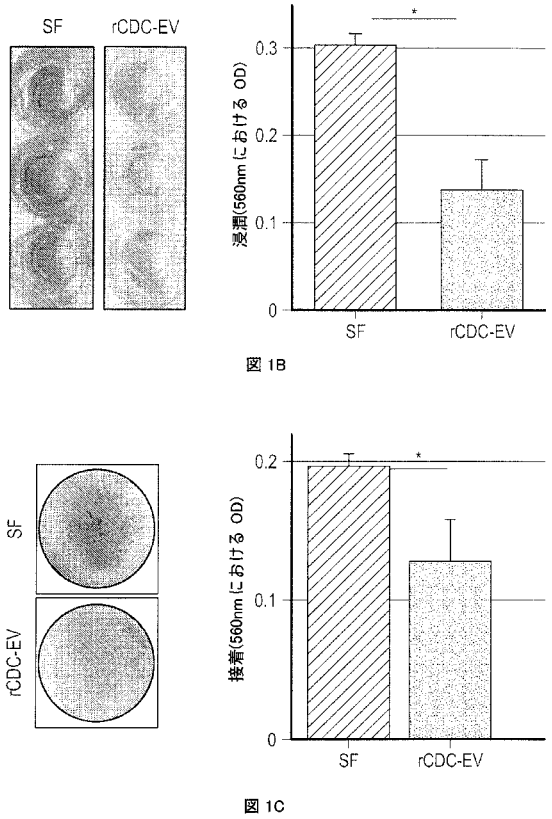


図1B

図1C

【図１－３】

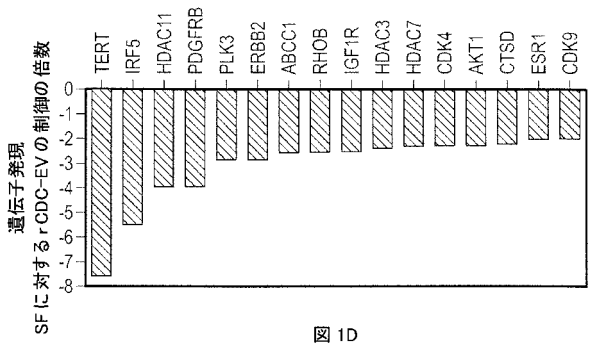


図 1D

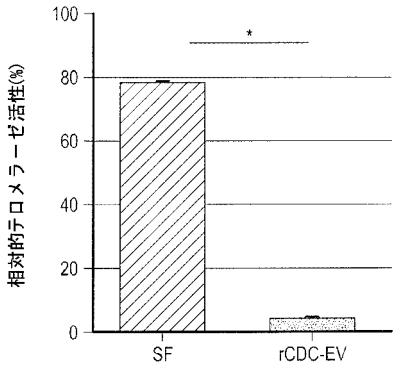


図 1E

【図２－１】

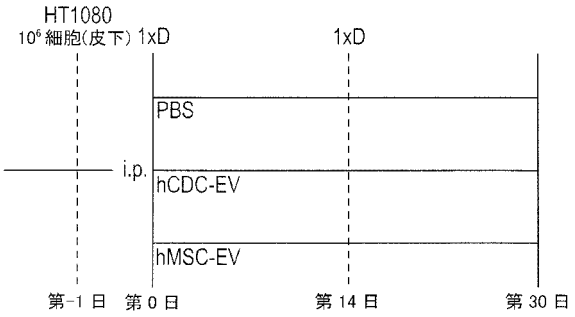


図 2A

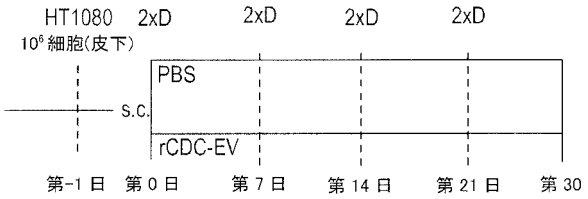


図 2B

【図２－２】

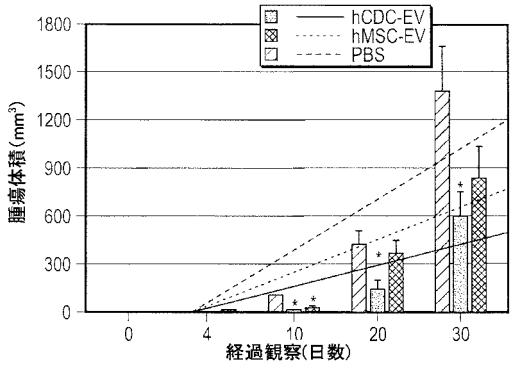


図 2C

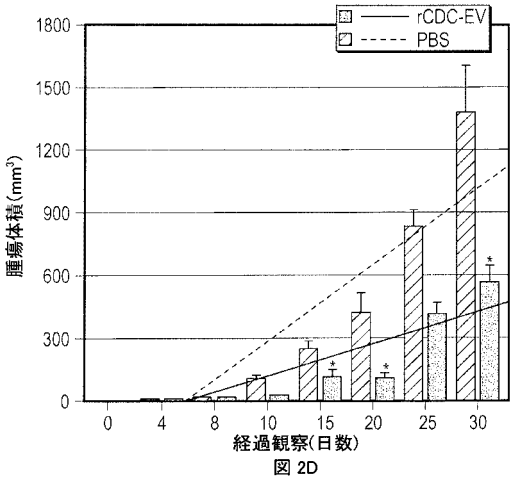


図 2D

【図２－３】

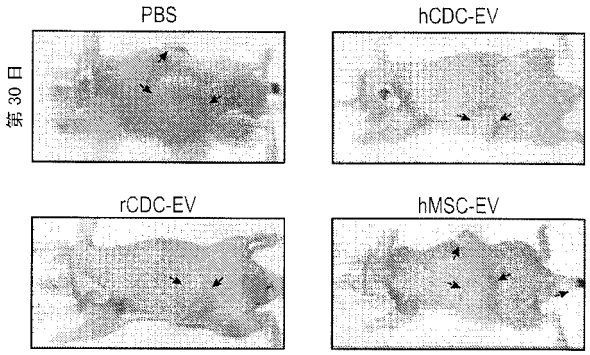


図 2E

【図２－４】

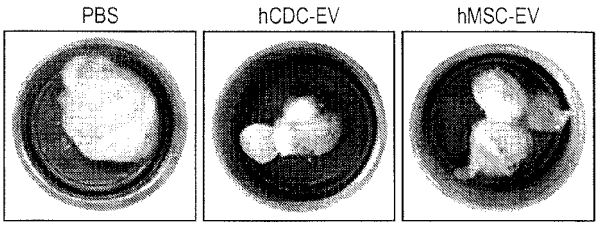


図 2F

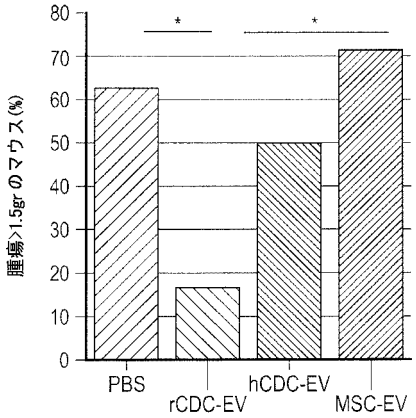


図 2G

【図３－１】

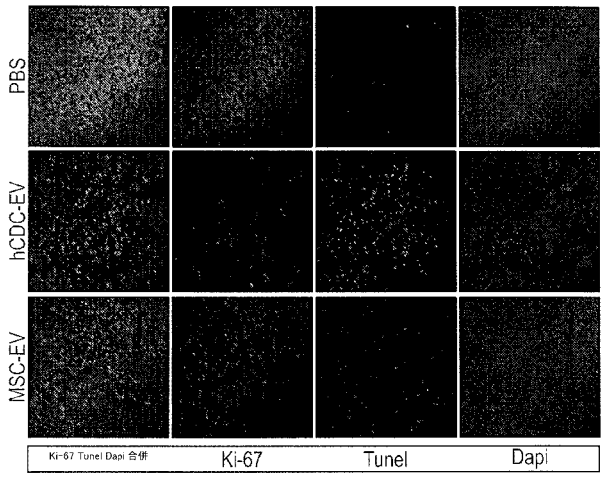
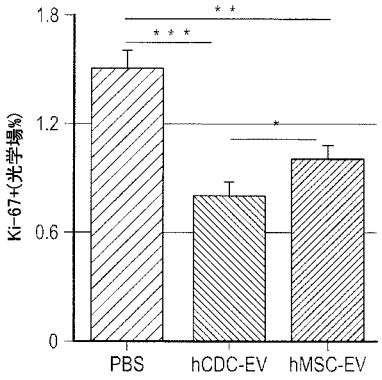


図 3A

【図３－２】



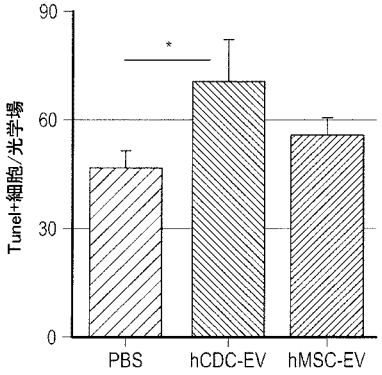


図 3B

【図３－３】

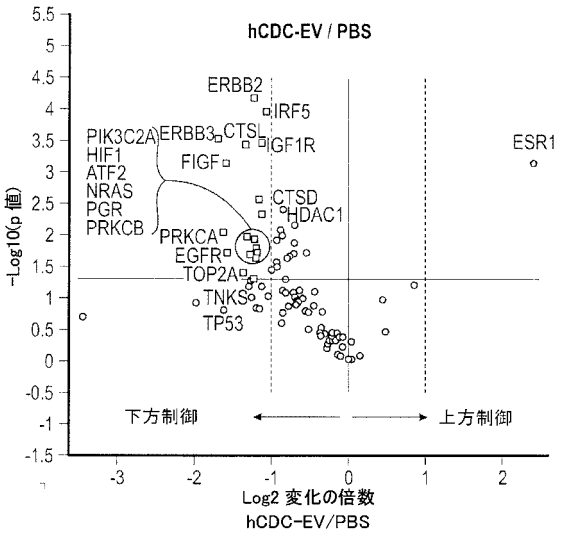


図 3C

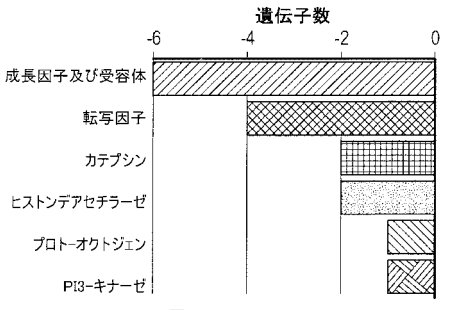


図 3D

【図３－４】

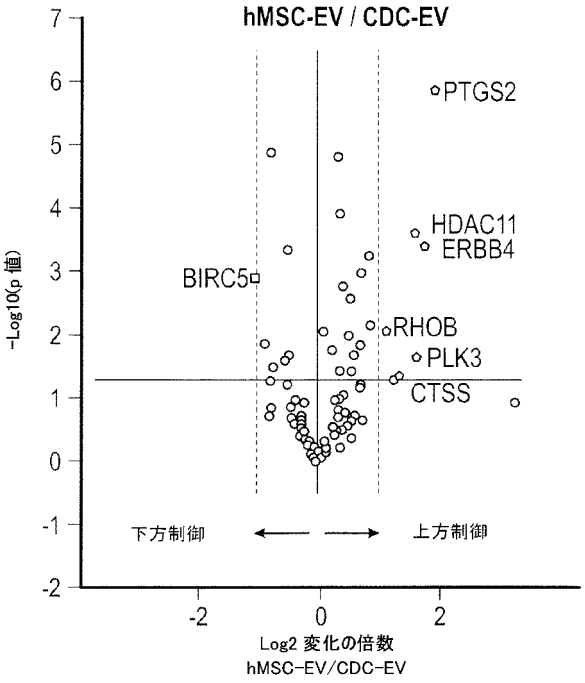


図 3E

【図４－１】

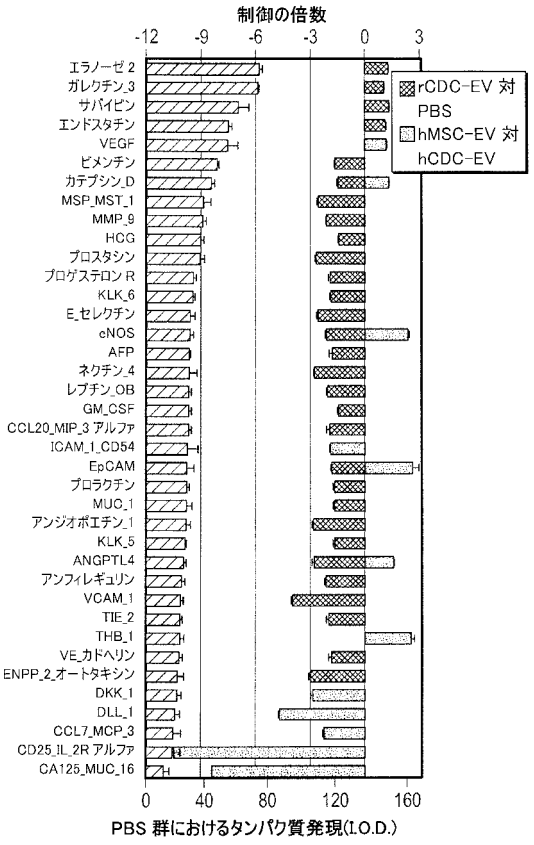


図 4A

【図４－２】

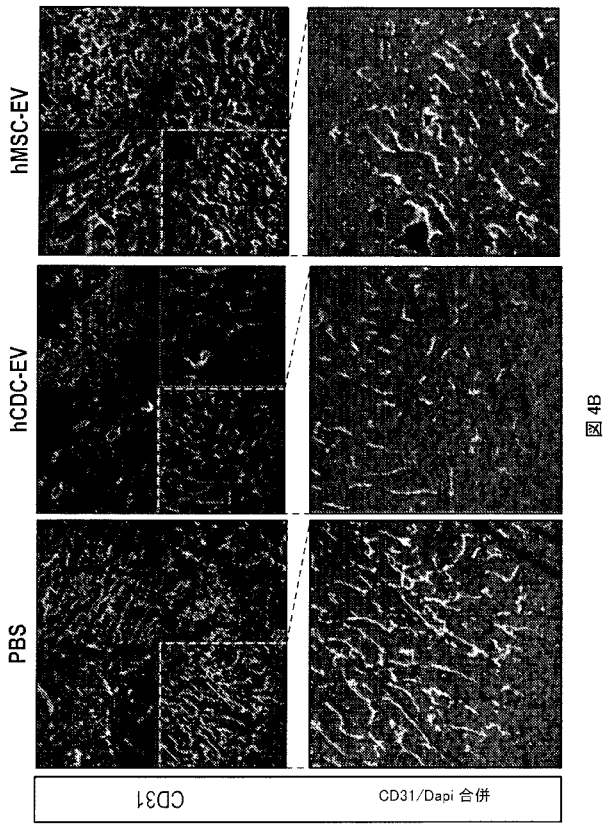


図 4B

【図４－３】

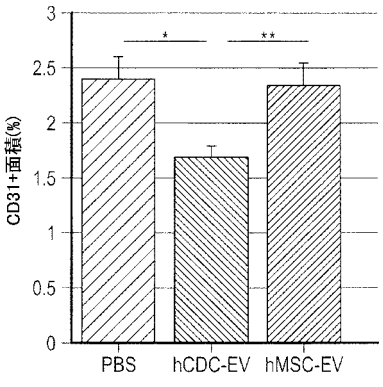


図 4C

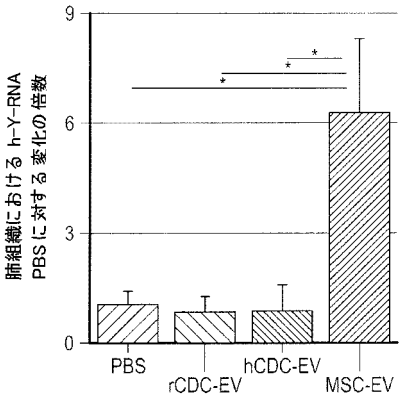


図 4D

【図４－４】

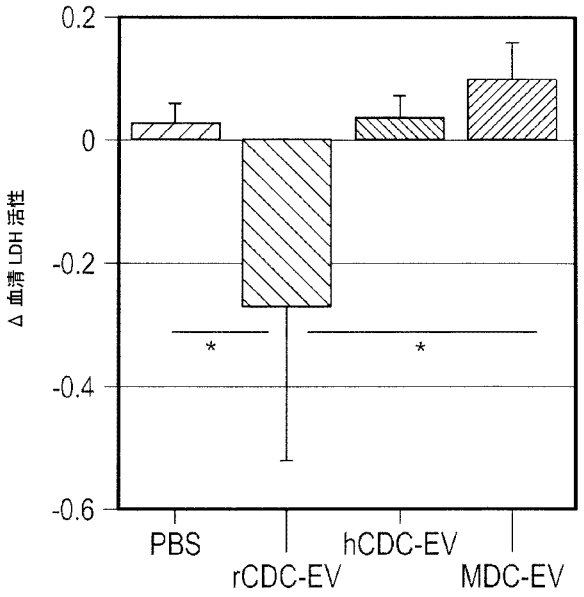


図 4E

【図５－１】

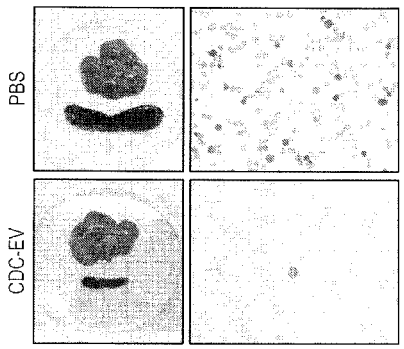


図 5A

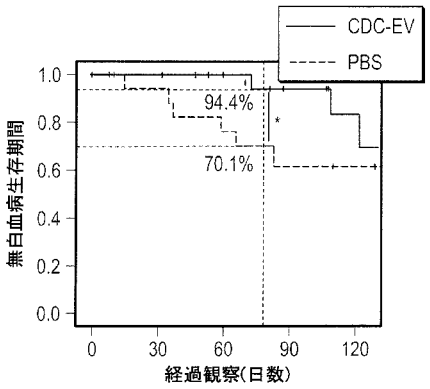


図 5B

【図５－２】

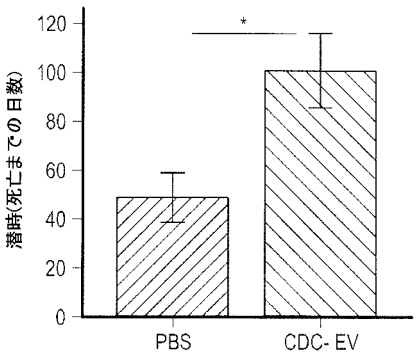


図 5C

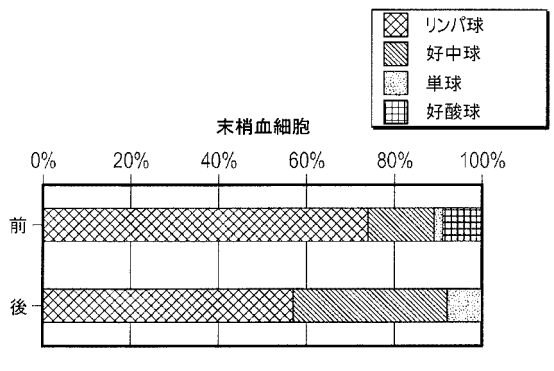
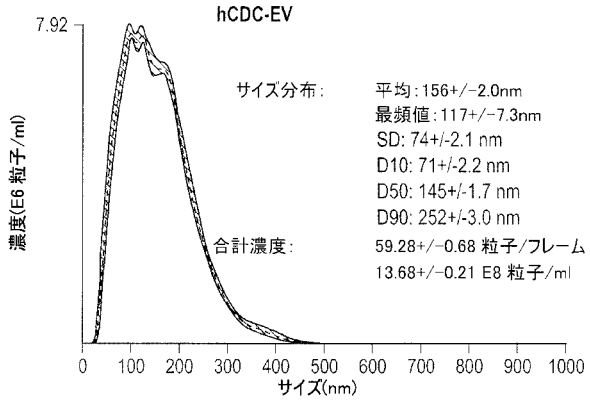


図 5D

【図６－１】



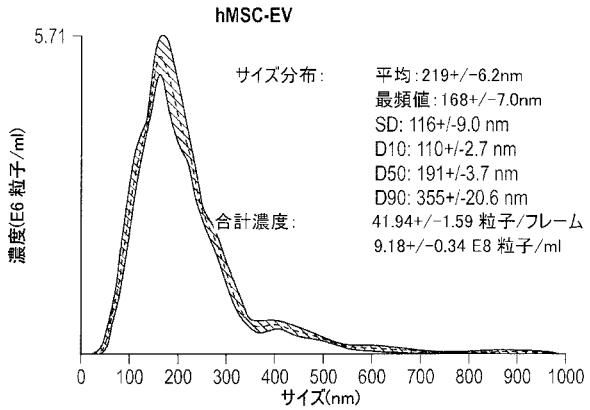


図 6A

【図６－２】

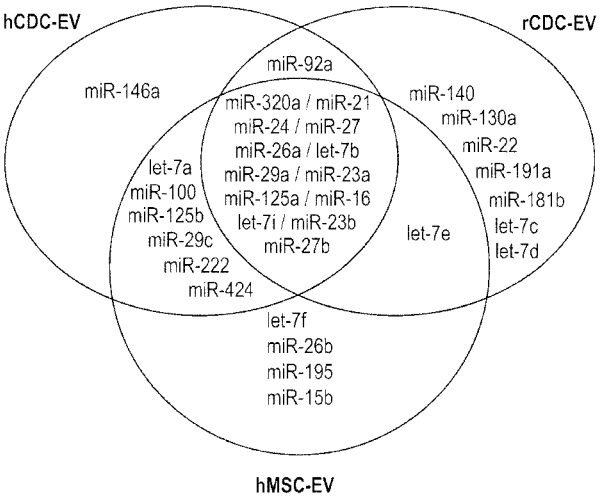


図 6B

【図６－３】

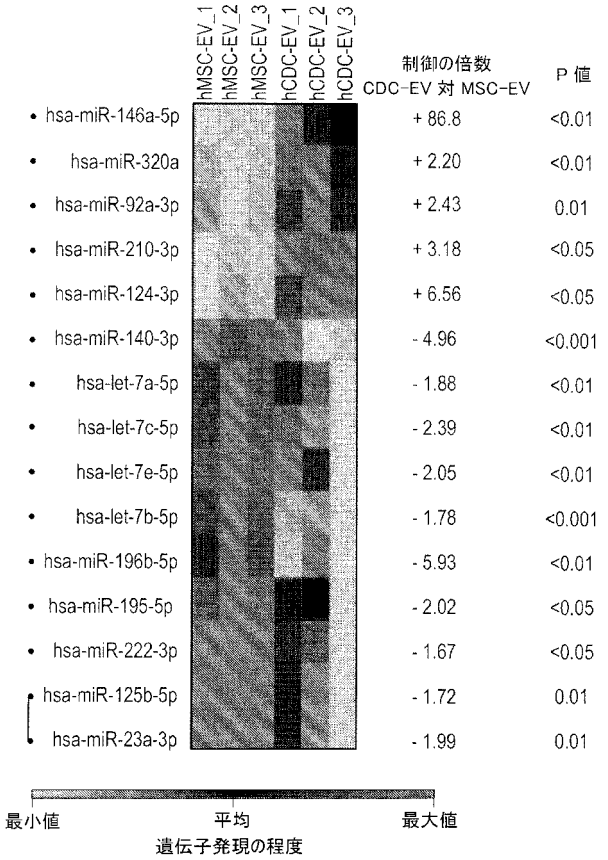


図 6C

【図７－１】

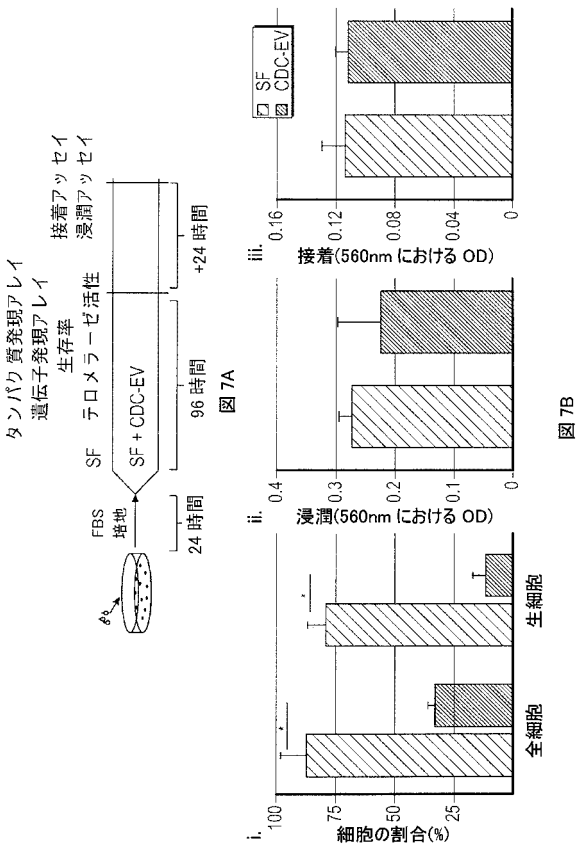


図 7A

図 7B

【図７－２】

	制御の倍数 SF に対する CDC-EV	P 値
PARP1	-1.92	0.003653
HDAC6	-1.82	0.015703
TXNRD1	-1.78	0.028951
ERBB3	-1.74	0.007890
MDM4	-1.6	0.027694
CDK5	-1.59	0.026650
AURKB	-1.55	0.021451
HDAC1	-1.54	0.026421
PLK1	-1.43	0.001768
PLK2	1.19	0.022510
PLK4	1.28	0.005505
TOP2B	1.32	0.016807
PIK3C2A	1.36	0.029868
RHOA	1.51	0.028415
HIF1A	1.52	0.007470
HSP90B1	1.53	0.022042
PGR	1.58	0.025435
PIK3C3	1.6	0.004922
PIK3CA	1.8	0.011178

図 7C

【図８－１】

i.

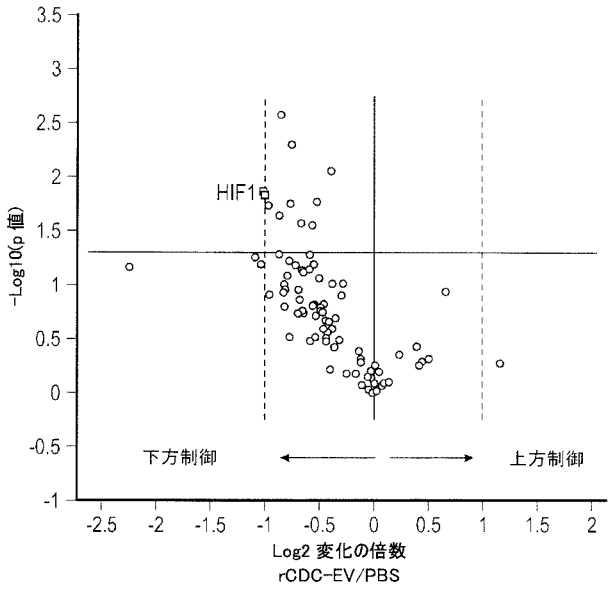


図 8A

【図８－２】

ii.

シンボル	制御の倍数	P 値
HIF1A	-2.02297	0.013793
CTSL	-1.6916	0.005007
ERBB3	-1.80793	0.002675
ESR2	-1.43972	0.017031
FIGF	-1.48242	0.027828
HDAC1	-1.47034	0.065084
HDAC11	-4.7495	0.068611
HDAC2	-1.82547	0.022834
IRF5	-1.59121	0.026775
MDM4	-1.70341	0.01771
PDGFRA	-2.12897	0.05542
PGR	-1.82667	0.052066
PIK3C2A	-1.64474	0.065696
PLK2	-1.95624	0.018533
PRKCA	-1.71303	0.059564
PRKCD	-1.50295	0.052593
TOP2A	-2.04848	0.064712

図 8A
(続き)

【図８－３】

シンボル	制御の倍数	P 値
ESR 1	5.344907	0.000703
ATF2	-2.26182	0.016032
CTSD	-2.20599	0.002652
CTSL	-2.49587	0.000362
EGFR	-2.9358	0.018862
ERBB2	-2.31896	0.000067
ERBB3	-3.18337	0.000297
FIGF	-2.97107	0.000722
HDAC1	-2.15631	0.004692
HIF1A	-2.46335	0.01053
IGF1R	-2.15186	0.000341
IRF5	-2.07154	0.000108
NRAS	-2.24988	0.01875
PGR	-2.27273	0.022818
PIK3C2A	-2.30325	0.011544
PRKCA	-3.04015	0.00897
PRKCB	-2.39305	0.019778
TNKS	-2.31325	0.047802
TOP2A	-2.53581	0.039343
TP53	-2.31146	0.049788
ABCC1	-1.6111	0.019556
AKT1	-1.60627	0.013215
AKT2	-1.73648	0.050027
CTSB	-1.60357	0.006862
GRB2	-1.96988	0.035335
HDAC2	-1.79588	0.010076
HDAC4	-1.87968	0.011918
HDAC6	-1.4407	0.019051
KRAS	-1.87504	0.030588
MDM4	-1.77688	0.003945
PLK2	-1.68516	0.021749
PLK3	-1.81691	0.008379
PRKCD	-1.72375	0.023054

図 8B

【図８－４】

シンボル	制御の倍数	P 値
PTGS2	3.840649	0.000001
ERBB4	3.409886	0.0004
PLK3	3.099962	0.022027
HDAC11	3.057121	0.000253
CTSS	2.542025	0.04584
RHOB	2.207766	0.008711
EGFR	1.835782	0.007086
ERBB2	1.800636	0.000565
TERT	1.646559	0.001055
FIGF	1.632188	0.061858
CTSD	1.619735	0.014168
IRF5	1.610349	0.069123
TP53	1.445963	0.002587
AURKC	1.436586	0.010078
MDM4	1.343562	0.001686
TNKS	1.29314	0.036987
HDAC7	1.29289	0.00012
PGR	1.265273	0.000015
MDM2	1.184841	0.017195
PRKCD	1.072644	0.008709
HRAS	-1.38729	0.000448
GSTP1	-1.39209	0.020681
KDR	-1.40814	0.061082
MTOR	-1.44672	0.0252
PRKCA	-1.51341	0.020307
CDC25A	-1.65525	0.032224
CDK5	-1.69791	0.000013
ESR2	-1.70752	0.053452
AURKB	-1.82288	0.014047
BIRC5	-2.04594	0.001261
PRKCB	-2.38835	0.051038

図 8C

【図９】

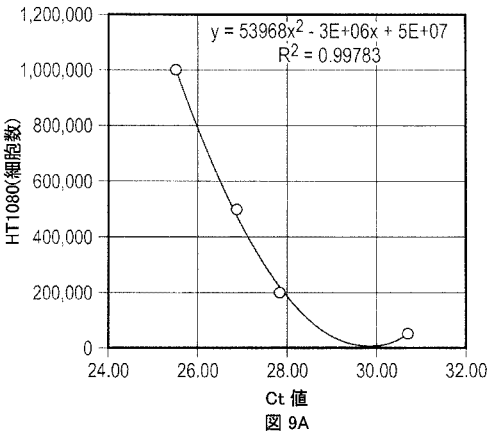

y = 53968x2 - 3E+06x + 5E+07
R2 = 0.99783
HT1080(細胞数)
1,200,000
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00
Ct 値

図 9A

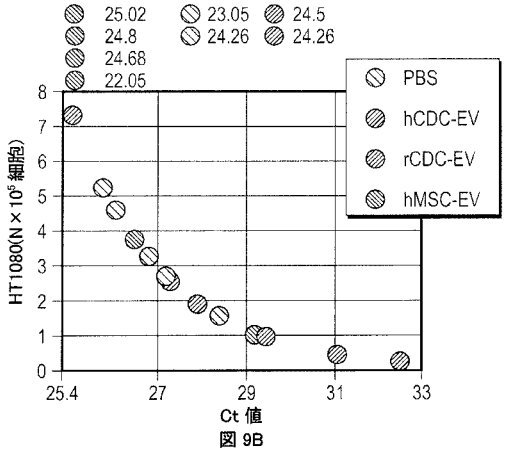

25.02
24.8
24.68
22.05
23.05
24.26
24.5
24.26
PBS
hCDC-EV
rCDC-EV
hMSC-EV
HT1080(N×10⁶細胞)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
25.4
27
29
31
33
Ct 値

図 9B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/044956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 35/12; A61K 35/34; A61K 35/545; A61K 48/00; C12N 5/095; G01N 33/574 (2018.01)
CPC - A61K 35/12; A61K 35/34; A61K 35/545; A61K 48/00; C12N 5/0657; C12N 2502/1329; G01N 33/5035; G01N 33/574 (2018.08)

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/400; 424/520; 424/93.7; 435/325; 435/366; 435/317.1 (keyword delimited)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/028493 A2 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 20 February 2014 (20.02.2014) entire document	1-8, 10-17, 24-26, 28, 29, 31, 34, 37, 38
Y		9, 30
Y	WO 2015/085096 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 11 June 2015 (11.06.2015) entire document	9, 30
P, X	GRIGORIAN-SHAMAGIAN et al. "Harnessing the heart's resistance to malignant tumors: cardiac-derived extracellular vesicles decrease fibrosarcoma growth and leukemia-related mortality in rodents," Oncotarget, 24 August 2017 (24.08.2017), Vol. 8, No. 59, Pgs. 99624-99636. entire document	1-17, 24-26, 28-31, 34, 37, 38
A	WO 2015/120150 A1 (STC.UNM) 13 August 2015 (13.08.2015) entire document	1-17, 24-26, 28-31, 34, 37, 38
P, A	MIDDLETON et al. "Newt cells secrete extracellular vesicles with therapeutic bioactivity in mammalian cardiomyocytes," J Extracell Vesicles, 15 April 2018 (15.04.2018), Vol. 7, No. 1, Pgs. 1-15. entire document	1-17, 24-26, 28-31, 34, 37, 38

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 September 2018	10 OCT 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/044956

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.: 18-23, 27, 32, 33, 35, 36
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

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

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

Remark on Protest

☐ .The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(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 100191086
弁理士 高橋 香元
(72)発明者 マーバン，エデュアルド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９００４８，ロサンゼルス，８７００ ビバリー ブールバード
(72)発明者 グリゴリアン，リリアン
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９００４８，ロサンゼルス，８７００ ビバリー ブールバード

Ｆターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BB31 BB47 BB62 BB64 CA04 MA66 NA14 ZB26