

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7395355号
(P7395355)

(45)発行日 令和5年12月11日(2023.12.11)

(24)登録日 令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/46 (2006.01)	A 6 1 K	47/46
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
請求項の数 29 (全299頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2019-562632(P2019-562632)	(73)特許権者	519397987
(86)(22)出願日	平成30年5月8日(2018.5.8)		フラッグシップ パイオニアリング イノ
(65)公表番号	特表2020-519648(P2020-519648		ベーションズ ブイ, インコーポレイテ
	A)		ッド
(43)公表日	令和2年7月2日(2020.7.2)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(86)国際出願番号	PCT/US2018/031515		1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ
(87)国際公開番号	WO2018/208728		パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ
(87)国際公開日	平成30年11月15日(2018.11.15)		フロア
審査請求日	令和3年5月7日(2021.5.7)	(74)代理人	100078282
(31)優先権主張番号	62/502,998		弁理士 山本 秀策
(32)優先日	平成29年5月8日(2017.5.8)	(74)代理人	100113413
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	62/595,862	(74)代理人	100181674
(32)優先日	平成29年12月7日(2017.12.7)		弁理士 飯田 貴敏
	最終頁に続く	(74)代理人	100181641
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 膜融合を促進するための組成物およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、前記複数のフソソームが、

- (a) 脂質二重層と、
 - (b) サイトゾルを含む内腔であって、前記脂質二重層によって囲まれている、内腔と、
 - (c) 前記脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現したフソゲンであって、前記フソゲンが、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質またはFおよびHタンパク質またはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはそれらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む、フソゲンと、
 - (d) カーゴと、
 - (e) 標的化部分と、を含み、
- 前記標的化部分が、標的細胞上の細胞表面マーカーに特異的であり、前記標的化部分が前記フソゲンに含まれ、
- 前記フソソームが、核を含まず、

前記フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量が、総タンパク質の1%未満であり、

前記複数のフソソームが、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接触した場合、および、前記エンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、前記参照標的細胞集団と比較して、前記標的細胞集団に少なくとも30%多くの前記カーゴを送達し、

前記複数のフソソームが、標的細胞集団と接触した場合、エンドソームまたはリソソーム以外の標的細胞位置にカーゴを送達する、フソソーム組成物。

【請求項2】

カーゴが、ダイナミン非依存性経路、リソソーム酸性化非依存性経路、マクロピノサイトーシス非依存性経路、またはアクチン非依存性経路を通して前記標的細胞集団の前記細胞に入る、請求項1に記載のフソソーム組成物。

【請求項3】

供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、前記複数のフソソームが、

(a) 脂質二重層と、

(b) サイトゾルを含む内腔であって、前記内腔が前記脂質二重層によって囲まれている、内腔と、

(c) 前記脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現した再標的化フソゲンであって、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質またはFおよびHタンパク質またはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはそれらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む、再標的化フソゲンと、

(d) カーゴと、を含み、

前記再標的化フソゲンは、天然に存在するフソゲンの一部ではない配列を有する標的化部分を含み、前記標的化部分が、標的細胞上の細胞表面マーカーに特異的であり、

前記フソソームが、核を含まず、

前記フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量が、前記フソソーム組成物中の総タンパク質の1%未満であり、

前記複数のフソソームが、標的細胞集団と接触した場合、エンドソームまたはリソソーム以外の標的細胞位置にカーゴを送達し、

(i) 前記複数のフソソームが、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団または参照細胞を含む細胞集団と接触する場合、前記カーゴが、非標的細胞もしくは参照細胞よりも少なくとも10倍多くの標的細胞中に存在するか、または

(ii) 前記複数のフソソームが、非標的細胞または参照細胞よりも少なくとも50%高い割合で標的細胞と融合する、フソソーム組成物。

【請求項4】

前記細胞表面マーカーが、皮膚細胞、心筋細胞、肝細胞、腸細胞（例えば、小腸の細胞）、膵臓細胞、脳細胞、前立腺細胞、肺細胞、結腸細胞、または骨髄細胞の細胞表面マーカーである、請求項1～3のいずれか1項に記載のフソソーム組成物。

【請求項5】

標的細胞集団と接触した場合、前記サイトゾルである標的細胞位置にカーゴを送達する、請求項1～4のいずれか1項に記載のフソソーム組成物。

【請求項6】

前記カーゴの50%、40%、30%、20%、または10%未満が、エンドソームまたはリソソームに送達される、請求項4または請求項5に記載のフソソーム組成物。

【請求項 7】

前記複数のフソソームが、エキソソーム、微小胞、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 8】

前記複数のフソソームのうちの前記フソソームは、直径が、少なくとも 50 nm、100 nm、200 nm、500 nm、1000 nm、1200 nm、1400 nm、または 1500 nm の平均サイズを有する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 9】

前記複数のフソソームのうちの前記フソソームは、直径が、100 nm、80 nm、60 nm、40 nm、または 30 nm 未満の平均サイズを有する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

10

【請求項 10】

前記供給源細胞が、好中球、HEK293 細胞、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 11】

前記複数のフソソームが、部分的または完全な核の不活化を有する細胞を含む、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

20

【請求項 12】

前記複数のフソソームが、除核細胞を含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 13】

前記フソゲンが、4～5、5～6、6～7、7～8、8～9、または 9～10 の pH で活性である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 14】

前記フソゲンが、1 フソソーム当たり少なくとも 10 コピーのコピー数で存在する、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 15】

30

前記カーゴが、外因性タンパク質または外因性核酸を含む、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 16】

前記カーゴが、細胞質タンパク質または膜タンパク質を含むか、またはそれをコードする、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 17】

前記カーゴが、治療剤を含む、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 18】

前記カーゴが、1 フソソーム当たり少なくとも 1、2、5、10、20、50、100、または 200 コピーのコピー数で存在する、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

40

【請求項 19】

前記フソゲンのコピー数と前記カーゴのコピー数の比が、1000:1～1:1、500:1～1:1、250:1～1:1、150:1～1:1、100:1～1:1、75:1～1:1、50:1～1:1、25:1～1:1、20:1～1:1、15:1～1:1、10:1～1:1、5:1～1:1、2:1～1:1、または 1:1～1:2 である、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

【請求項 20】

a) 前記フソソーム組成物が、例えば、質量分析アッセイによって、約 100～10,

50

000、500～5,000、1000～5000、2000～4000、2500～3500、2900～2930、2910～2915、もしくは2912.0のフソゲンとCD63の比率を有するか、または

b) 前記フソソーム組成物が、約5～35、10～30、15～25、16～19、18～19、もしくは18.6のタンパク質カーゴとCD63の比率であるか、または

c) 前記フソソーム中の前記タンパク質の15%、20%、もしくは25%未満が、エキソソームタンパク質である、のうちの1つ以上である、請求項1～19のいずれか1項に記載のフソソーム組成物。

【請求項21】

a) 前記フソゲンが、フソソーム中の総タンパク質の約1～30%、5～20%、10～15%、12～15%、13～14%、または13.6%を含む、

b) フソゲンが、約20～120、40～100、50～90、60～80、65～75、68～70、または69のGAPDHに対する比率を有する、

c) フソゲンが、約200～900、300～800、400～700、500～600、520～590、530～580、540～570、550～560、または558.4のCNXに対する比率を有する、

d) 前記フソソーム中の前記タンパク質の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%が、リボソームタンパク質であるか、または前記フソソーム中の前記タンパク質の約1%～20%、3%～15%、5%～12.5%、7.5%～11%、8.5%～10.5%、または9%～10%が、リボソームタンパク質である、のうちの1つ以上である、請求項1～20のいずれか1項に記載のフソソーム組成物。

【請求項22】

請求項1～21のいずれかに記載のフソソーム組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項23】

前記カーゴが、治療剤を含む、請求項22に記載の薬学的組成物。

【請求項24】

対象に治療剤を送達するための医薬の製造における、請求項23に記載の薬学的組成物の使用であって、前記薬学的組成物が、前記治療剤が送達されるような量および／または時間で使用するためのものである、使用。

【請求項25】

対象に治療剤を送達することにおける使用のための請求項23に記載の薬学的組成物であって、前記薬学的組成物が、前記治療剤が送達されるような量および／または時間で使用するためのものである、薬学的組成物。

【請求項26】

供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、前記複数のフソソームが、

(a) 脂質二重層と、

(b) 前記脂質二重層によって囲まれている内腔と、

(c) 外因性または過剰発現したフソゲンであって、前記フソゲンが、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質またはFおよびHタンパク質またはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはそれらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含み、かつ、前記フソゲンが前記脂質二重層内に配置されている、フソゲンと、

(d) カーゴと、

(e) 標的化部分と、を含み、

前記フソソーム組成物が、標的細胞集団と接触した場合、エンドソームまたはリソソーム以外の標的細胞位置にカーゴを送達し、

前記標的化部分が、標的細胞上の細胞表面マーカーに特異的であり、

前記フソソームが、核を含まず、

v i i i) 前記フソゲンが、少なくとも1,000コピーのコピー数で存在する、

i x) 前記フソソームが、少なくとも1,000コピーのコピー数で治療剤を含む、

x) 前記フソソームが、CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGのうちの1つ以上が前記供給源細胞中の前記対応する脂質レベルの75%以内である脂質を含む、

x i) 前記フソソームが、供給源細胞のプロテオーム組成物と同様のプロテオーム組成物を含む、

x i i) 前記フソソームが、シグナル伝達を可能にする、

x i i i) 前記フソソームが、対象に投与される場合、組織を標的とするか、または

x i v) 前記供給源細胞が、好中球、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、のうちの1つ以上である、フソソーム組成物。

【請求項27】

ウイルスカプシドタンパク質またはDNA組み込みポリペプチドを含む、請求項26に記載のフソソーム組成物。

【請求項28】

前記カーゴが、ウイルスゲノムを含む、請求項26に記載のフソソーム組成物。

【請求項29】

核酸を標的細胞に送達することができる、請求項26に記載のフソソーム組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2017年5月8日に出願された米国特許出願第62/502,998号、2017年10月20日に出願された米国特許出願第62/575,147号、および2017年12月7日出願された米国特許出願第62/595,862号の優先権を主張し、これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

複合生物学的製剤は、様々な疾患に有望な治療の候補である。しかしながら、細胞膜が、細胞と細胞外空間との間の障壁として機能するため、大きな生物学的薬剤を細胞に送達することは困難である。当該技術分野において、対象における細胞に複雑な生物学的製剤を送達する新しい方法が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

膜融合は、受精、発達、免疫応答、および腫瘍形成などの多様な生物学的プロセスに必要である。本開示は、複合生物学的カーゴを細胞に送達する融合ベースの方法を提供する。

【0004】

したがって、本開示は、いくつかの態様では、脂質二重層、脂質二重層に囲まれた内腔、およびフソゲンを含むフソソームを提供する。フソソームは、例えば、標的細胞への内腔または脂質二重層内のカーゴの送達のために使用することができる。カーゴには、例えば、治療用タンパク質、核酸、および小分子が含まれる。

【0005】

本開示は、いくつかの態様では、

10

20

30

40

50

- (a) 脂質二重層と、
 - (b) 脂質二重層によって囲まれている内腔（例えば、サイトゾルを含む）と、
 - (c) 外因性または過剰発現したフソゲンであって、例えば、フソゲンが、脂質二重層内に配置されている、フソゲンと、を含む、フソソームを提供し、
- フソソームは、供給源細胞に由来し、
- フソソームは、部分的または完全な核の不活性化（例えば、核の除去）を有する。

【0006】

いくつかの実施形態において、以下のもののうちの1つ以上が、以下を示す：

- i) フソソームは、細胞生物学的製剤を含むか、または細胞生物学的製剤に含まれる、
- ii) フソソームは、除核細胞を含む、
- iii) フソソームは、不活性化された核を含む、

10

iv) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、非標的細胞よりも、例えば、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で標的細胞と融合する、

v) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、他のフソソームよりも、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で標的細胞と融合する、

vi) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、フソソーム中の薬剤が、24、48、または72時間後、標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%に送達されるような割合で標的細胞と融合する、

20

vii) フソゲンは、例えば、実施例29のアッセイによって測定されるように、少なくとも10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、もしくは1,000,000,000コピー、またはそれ以下のコピー数で存在する、

viii) フソソームは、例えば、実施例43または156のアッセイによって測定されるように、少なくとも10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、もしくは1,000,000,000コピー、またはそれ以下のコピー数の治療剤を含む、

30

ix) フソゲンのコピー数と治療剤のコピー数の比は、1,000,000:1~100,000:1、100,000:1~10,000:1、10,000:1~1,000:1、1,000:1~100:1、100:1~50:1、50:1~20:1、20:1~10:1、10:1~5:1、5:1~2:1、2:1~1:1、1:1~1:2、1:2~1:5、1:5~1:10、1:10~1:20、1:20~1:50、1:50~1:100、1:100~1:1,000、1:1,000~1:10,000、1:10,000~1:100,000、または1:100,000~1:1,000,000である、

40

x) フソソームは、供給源細胞中の脂質組成と実質的に同様の脂質組成物を含むか、またはCL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGのうちの1つ以上は、供給源細胞中の対応する脂質レベルの10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%以内である、

xi) フソソームは、例えば、実施例42または155のアッセイを使用して、供給源

50

細胞のプロテオーム組成物と同様のプロテオーム組成物を含む、

x i i) フソソームは、例えば、実施例 49 のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の 10 %、20 %、30 %、40 %、または 50 % 以内である脂質とタンパク質の比率を含む、

x i i i) フソソームは、例えば、実施例 50 のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の 10 %、20 %、30 %、40 %、または 50 % 以内であるタンパク質と核酸（例えば DNA）の比率を含む、

x i v) フソソームは、例えば、実施例 51 または 159 のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の 10 %、20 %、30 %、40 %、または 50 % 以内である脂質対核酸（例えば DNA）の比率を含む、

x v) フソソームは、例えば、実施例 75 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞の半減期の 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 % 以内である、対象、例えば、マウスにおける半減期を有する、

x v i) フソソームは、例えば、実施例 64 のアッセイを使用して測定されるように、膜を介してグルコース（例えば、標識グルコース、例えば、2-NBDG）を、例えば、陰性対照、例えば、グルコースの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 % 多く（例えば、約 11.6 % 多く）輸送する、

x v i i) フソソームは、例えば、実施例 66 のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、供給源細胞またはマウス胚線維芽細胞におけるエステラーゼ活性のエステラーゼ活性の 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 100 % 以内である内腔中のエステラーゼ活性を含む、

x v i i i) フソソームは、例えば、実施例 68 に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中のクエン酸シンターゼ活性の 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 100 % 以内である代謝活性レベルを含む、

x i x) フソソームは、例えば、実施例 69 に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中の呼吸レベルの 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 100 % 以内である呼吸レベル（例えば、酸素消費速度）を含む、

x x) フソソームは、例えば、実施例 70 のアッセイを使用して、最大で 18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000、または 10,000 の MFI のアネキシン-V 染色レベルを含むか、またはフソソームは、例えば、実施例 70 のアッセイにおいてメナジオンで処理された他の同様のフソソームのアネキシン-V 染色レベルよりも少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、または 50 % 低いアネキシン-V 染色レベルを含むか、またはフソソームは、実施例 70 のアッセイにおいてメナジオンで処理されたマクロファージのアネキシン-V 染色レベルよりも少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、または 50 % 低いアネキシン-V 染色レベルを含む、

x x i) フソソームは、例えば、実施例 39 のアッセイによって、供給源細胞の m i R N A 含有レベルよりも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、またはそれよりも大きい m i R N A 含有レベルを有する、

x x i i) フソソームは、例えば、実施例 47 のアッセイによって、供給源細胞の比率よりも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、またはそれ以上、例えば、供給源細胞の比率の 1 % ~ 2 %、2 % ~ 3 %、3 % ~ 4 %、4 % ~ 5 %、5 % ~ 10 %、10 % ~ 20 %、20 % ~ 30 %、30 % ~ 40 %、40 % ~ 50 %、50 % ~ 60 %、60 % ~ 70 %、70 % ~ 80 %、または 80 % ~ 90 % 以内である、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比を有す

10

20

30

40

50

る、

x x i i i) フソソームは、例えば、質量分析により測定されるように、例えば、実施例 48 のアッセイによって、供給源細胞の L P S 含量の 5 %、1 %、0 . 5 %、0 . 0 1 %、0 . 0 0 5 %、0 . 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 1 % 未満またはそれより少ない L P S レベルを有する、

x x i v) フソソームは、例えば、実施例 63 のアッセイを使用して、シグナル伝達、例えば、細胞外シグナル、例えば、インスリンに応答する A K T リン酸化反応、またはインスリンに応答するグルコース（例えば、標識グルコース、例えば 2 - N B D G）の取り込みを、例えば、陰性対照、例えば、インスリンの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 % 多く輸送することを可能にする、

10

x x v) フソソームは、組織、例えば、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、胃腸管、腎臓、精巣、卵巣、脳、生殖器官、中枢神経系、末梢神経系、骨格筋、内皮、内耳、または眼を標的とし、対象、例えば、マウスに投与される場合、投与されたフソソームの集団中のフソソームの少なくとも 0 . 1 %、0 . 5 %、1 %、1 . 5 %、2 %、2 . 5 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % は、例えば、実施例 87 または 1 0 0 のアッセイによって、24、48、または 72 時間後、標的組織中に存在する、

x x v i) フソソームは、例えば、実施例 71 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞または骨髄間質細胞（B M S C）により誘発されるジャクスタクリンシグナル伝達のレベルよりも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 1 0 0 % 多くジャクスタクリンシグナル伝達レベルを有する、

20

x x v i i) フソソームは、例えば、実施例 72 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはマクロファージにより誘発されるパラクリンシグナル伝達レベルよりも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 % 多いパラクリンシグナル伝達のレベルを有する、

x x v i i i) フソソームは、例えば、実施例 73 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞または C 2 C 1 2 細胞中の重合アクチンのレベルと比較して、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 1 0 0 % 以内のレベルでアクチンを重合する、

30

x x i x) フソソームは、例えば、実施例 74 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞または C 2 C 1 2 細胞中の膜電位の約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 % 以内の膜電位を有するか、またはフソソームは、約 - 2 0 ~ - 1 5 0 m V、- 2 0 ~ - 5 0 m V、- 5 0 ~ - 1 0 0 m V、または - 1 0 0 ~ - 1 5 0 m V の膜電位を有する、

x x x) フソソームは、例えば、実施例 57 のアッセイによって、供給源細胞または供給源細胞と同じタイプの細胞の溢出率の少なくとも 1 %、2 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % の割合で血管から溢出することができ、例えば、供給源細胞は、好中球、リンパ球、B 細胞、マクロファージ、または N K 細胞である、

40

x x x i) フソソームは、細胞膜、例えば、内皮細胞膜または血液脳関門を通過することができる、

x x x i i) フソソームは、例えば、実施例 62 のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、マウス胎児線維芽細胞よりも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 1 0 0 % より多い割合でタンパク質を分泌することができる、

x x x i i i) フソソームは、医薬品または適正製造基準（G M P）の基準を満たしている、

50

x x x i v) フソソームは、適正製造基準 (GMP) に従って作製された、

x x x v) フソソームは、所定の基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、実質的に病原体を含まない、

x x x v i) フソソームは、所定の基準値を下回る汚染物質レベルを有する、例えば、実質的に汚染物質を含まない、

x x x v i i) フソソームは、例えば、本明細書に記載されるように、低い免疫原性を有する、

x x x v i i i) 供給源細胞は、好中球、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、あるいは

x x x i x) 供給源細胞は、293細胞、HEK細胞、ヒト内皮細胞、またはヒト上皮細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、または幹細胞以外である。

【0007】

本開示はまた、いくつかの態様では、

a) フソソームが供給源細胞に由来する、脂質二重層、および水溶液、例えば水と混和性である内腔と、

b) 脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現したフソゲンと、

c) 内腔内に配置されたオルガネラ、例えば治療上有効な数のオルガネラと、を含む、フソソームも提供する。

【0008】

いくつかの実施形態において、以下のもののうちの1つ以上は、以下を示す：

i) 供給源細胞は、内皮細胞、マクロファージ、好中球、顆粒球、白血球、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞）、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、

i i) オルガネラは、ゴルジ装置、リソソーム、小胞体、ミトコンドリア、液胞、エンドソーム、アクロソーム、オートファゴソーム、中心小体、グリコソーム、グリオキシソーム、ヒドロゲノソーム、メラノソーム、マイトソーム、刺胞、ペルオキシソーム、プロテアソーム、小胞、およびストレス顆粒から選択される、

i i i) フソソームは、5 μ m、10 μ m、20 μ m、50 μ m、または100 μ mより大きいサイズを有する、

i) フソソーム、または複数のフソソームを含む組成物もしくは調製物は、例えば、実施例33のアッセイによって測定されるように、1.08 g/ml ~ 1.12 g/ml以外の密度を有し、例えば、フソソームは、1.25 g/ml + / - 0.05の密度を有する、

i v) フソソームは、循環中のスカベンジャーシステムまたは肝臓洞のクッパー細胞によって捕捉されない、

v) 供給源細胞は、293細胞以外である、

v i) 供給源細胞は、形質転換または不死化されていない、

v i i) 供給源細胞は、アデノウイルス媒介による不死化以外の方法を使用して形質転換または不死化される、例えば、自然突然変異またはテロメラーゼ発現による不死化によって不死化される、

v i i i) フソゲンは、VSVG、SNAREタンパク質、または分泌顆粒タンパク質以外である、

i x) フソソームは、CreまたはGFP、例えば、EGFPを含まない、

x) フソソームは、CreまたはGFP以外の外因性タンパク質、例えば、EGFPをさらに含む、

x i) フソソームは、例えば、内腔内に外因性核酸（例えば、RNA、例えばmRNA、miRNA、もしくはsiRNA）または外因性タンパク質（例えば、抗体、例えば抗体）をさらに含む、

x i i) フソソームは、ミトコンドリアを含まない。

10

20

30

40

50

【0009】

本開示はまた、いくつかの態様では、

- (a) 脂質二重層と、
 - (b) 脂質二重層によって囲まれている内腔（例えば、サイトゾルを含む）と、
 - (c) 外因性または過剰発現したフソゲンであって、例えば、脂質二重層内に配置されている、フソゲンと、
 - (d) 機能的核と、を含む、フソソームも提供し、
- フソソームは、供給源細胞に由来する。

【0010】

いくつかの実施形態において、以下のもののうちの1つ以上は、以下を示す：

- i) 供給源細胞は、樹枝状細胞または腫瘍細胞以外であり、例えば、内皮細胞、マクロファージ、好中球、顆粒球、白血球、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞）、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、
- ii) フソゲンは、フソゲン糖タンパク質以外である、
- iii) フソゲンは、フェルチリン-ベータ以外の哺乳動物タンパク質であり、
- iv) フソソームは、例えば、本明細書に記載されるように、低い免疫原性を有する、
- v) フソソームは、医薬品または適正製造基準（GMP）の基準を満たしている、
- vi) フソソームは、適正製造基準（GMP）に従って作製された、
- vii) フソソームは、所定の基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、実質的に病原体を含まない、
- viii) フソソームは、所定の基準値を下回る汚染物質レベルを有する、例えば、実質的に汚染物質を含まない。

【0011】

本開示はまた、いくつかの態様では、複数のフソソームを含む精製されたフソソーム組成物を提供し、少なくとも1つのフソソームは、

- a) 脂質二重層および水性内腔であって、フソソームは、供給源細胞に由来する、脂質二重層および水性内腔と、
 - b) 脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現したフソゲンと、を含み、
- フソソームは、4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80、または-160℃未満の温度である。

【0012】

本開示はまた、いくつかの態様では、複数のフソソームを含む精製されたフソソーム組成物も提供し、少なくとも1つのフソソームは、

- a) 脂質二重層および水性内腔と、
 - b) 脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現したタンパク質フソゲンと、を含み、
- フソソームは、4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80、または-160℃未満の温度である。

【0013】

本開示はまた、いくつかの態様では、本明細書に記載の複数のフソソームを含むフソソーム組成物も提供する。

【0014】

本開示はまた、いくつかの態様では、供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物も提供し、複数のフソソームは、

- (a) 脂質二重層と、
 - (b) サイトゾルを含む内腔であって、脂質二重層に囲まれている、内腔と、
 - (c) 脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現したフソゲンと、
 - (d) カーゴと、を含み、
- フソソームは、核を含まず、

フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量は、総タンパク質の1%未満であり、

複数のフソソームは、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接触した場合、およびエンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団中の少なくとも30%の数の細胞にカーゴを送達する。

【0015】

本開示はまた、いくつかの態様では、供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物も提供し、複数のフソソームは、

- (a) 脂質二重層と、
- (b) サイトゾルを含む内腔であって、脂質二重層によって囲まれている、内腔と、
- (c) 脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現した再標的化フソゲンと、
- (d) カーゴと、を含み、

フソソームは、核を含まず、

フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量は、総タンパク質の1%未満であり、

(i) 複数のフソソームは、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団と接触する場合、カーゴは、非標的細胞よりも標的細胞中に少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍多く存在するか、あるいは

(ii) 複数のフソソームは、非標的細胞よりも少なくとも50%高い割合で標的細胞と融合する。

【0016】

本開示はまた、いくつかの態様では、供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物も提供し、複数のフソソームは、

- (a) 脂質二重層と、
- (b) 脂質二重層によって囲まれている内腔と、
- (c) 外因性または過剰発現したフソゲンであって、脂質二重層内に配置されている、フソゲンと、

- (d) カーゴと、を含み、

フソソームは、核を含まず、

i) フソゲンは、少なくとも1,000コピーのコピー数で存在する、

ii) フソソームは、少なくとも1,000コピーのコピー数で治療剤を含む、

iii) フソソームは、CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGのうちの1つ以上が供給源細胞中の対応する脂質レベルの75%以内である脂質を含む、

iv) フソソームは、供給源細胞のプロテオーム組成物と同様のプロテオーム組成物を含む、

v) フソソームは、シグナル伝達、例えば、細胞外シグナルを送信すること、例えば、インスリンに応答するAKTリン酸化反応、または例えば、陰性対照、例えばインスリンの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも10%多い、インスリンに応答するグルコース（例えば、標識グルコース、例えば2-NBDG）の取り込みを可能にする、

vi) フソソームは、組織、例えば、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、胃腸管、腎臓、精巣、卵巣、脳、生殖器官、中枢神経系、末梢神経系、骨格筋、内皮、内耳、または眼を標的とし、対象、例えば、マウスに投与される場合、投与されたフソソームの集団中のフソソームの少なくとも0.1%または10%が、24時間後に標的組織中に存在するか、あるいは

供給源細胞は、好中球、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、のうちの1つ以上（例えば、少なくとも2、3つ、4つ、または5つ）である。

【0017】

本開示はまた、いくつかの態様では、本明細書に記載のフソソーム組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物も提供する。

【0018】

本開示は、ある特定の態様では、フソソーム組成物を、対象（例えば、ヒト対象）、標的組織、または細胞に投与する方法であって、対象に投与すること、または標的組織もしくは細胞を、本明細書に記載の複数のフソソーム、本明細書に記載のフソソーム組成物、もしくは本明細書に記載の薬学的組成物と接触させ、それによって、フソソーム組成物を対象に投与することを含む、方法も提供する。

【0019】

本開示はまた、ある特定の態様では、治療剤（例えば、ポリペプチド、核酸、代謝産物、オルガネラ、または細胞下構造）を、対象、標的組織、または細胞に送達する方法であって、対象に投与すること、または標的組織もしくは細胞を、本明細書に記載の複数のフソソーム、本明細書に記載の複数のフソソームを含むフソソーム組成物、本明細書に記載のフソソーム組成物、もしくは本明細書に記載の薬学的組成物と接触させることを含む、方法も提供し、フソソーム組成物は、治療剤が送達されるような量および／または時間で投与される。

【0020】

本開示はまた、ある特定の態様では、ある機能を、対象、標的組織、または細胞に送達する方法であって、対象に投与すること、または標的組織もしくは細胞を、本明細書に記載の複数のフソソーム、本明細書に記載の複数のフソソームを含むフソソーム組成物、本明細書に記載のフソソーム組成物、もしくは本明細書に記載の薬学的組成物と接触させることを含む、方法も提供し、フソソーム組成物は、ある機能（function）が送達されるような量および／または時間で投与される。

【0021】

本開示はまた、ある特定の態様では、ある機能を、対象、標的組織、または細胞に標的化する方法であって、対象に投与すること、または標的組織もしくは細胞を、本明細書に記載の複数のフソソーム、本明細書に記載の複数のフソソームを含むフソソーム組成物、本明細書に記載のフソソーム組成物、もしくは本明細書に記載の薬学的組成物と接触させることを含む、方法も提供し、フソソーム組成物は、ある機能が標的化されるような量および／または時間で投与される。

【0022】

本開示はまた、ある特定の態様では、対象、標的組織、または細胞における生物学的機能を調節する、例えば、増強する方法であって、対象に投与すること、または標的組織もしくは細胞を、本明細書に記載の複数のフソソーム、本明細書に記載の複数のフソソームを含むフソソーム組成物、本明細書に記載のフソソーム組成物、もしくは本明細書に記載の薬学的組成物と接触させ、それによって、対象における生物学的機能を調節することを含む、方法も提供する。

【0023】

本開示はまた、ある特定の態様では、機能を対象に送達または標的化する方法であって、対象に、機能を含む本明細書に記載の複数のフソソームを含むフソソーム組成物、本明細書に記載のフソソーム組成物、または本明細書に記載の薬学的組成物を投与することを含み、フソソーム組成物は、対象の機能が送達または標的化されるような量および／または時間で投与される、方法も提供する。実施形態において、対象は、がん、炎症性障害、自己免疫疾患、慢性疾患、炎症、損傷した臓器機能、感染症、変性疾患、遺伝病、または傷害を有する。

【0024】

本開示はまた、いくつかの態様では、フソソーム組成物を製造する方法であって、

- a) フソゲンを含む、例えば、それを発現する供給源細胞を提供することと、
- b) 供給源細胞から、脂質二重層、内腔、およびフソゲンを含むフソソームを生成し、

それによってフソソームを作製することと、

c) フソソームを、例えば、対象への投与に適した薬学的組成物として製剤化することと、を含む、方法も提供する。

【0025】

実施形態において、以下のもののうちの1つ以上は、以下を示す：

i) 供給源細胞は、293細胞、HEK細胞、ヒト内皮細胞、またはヒト上皮細胞以外である、

ii) フソゲンは、ウイルスタンパク質以外である、

iii) フソソーム、または複数のフソソームを含む組成物もしくは調製物は、例えば、 $1.08\text{ g/ml} \sim 1.12\text{ g/ml}$ 以外の密度を有する、

iv) フソソームは、例えば、実施例33のアッセイによって測定されるように、 $1.25\text{ g/ml} + / - 0.05$ の密度を有する、

v) フソソームは、循環中のスカベンジャーシステムまたは肝臓洞のクッパー細胞によって捕捉されない、

vi) フソソームは、例えば、実施例76のアッセイによって、対象における細網内皮系 (RES) によって捕捉されない、

vii) 複数のフソソームが対象に投与される場合、複数の1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%未満は、例えば、実施例76のアッセイによって、24、48、または72時間後、RESによって捕捉されるかまたは捕捉されない、

viii) フソソームは、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $6\text{ }\mu\text{m}$ 、 $7\text{ }\mu\text{m}$ 、 $8\text{ }\mu\text{m}$ 、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 、 $50\text{ }\mu\text{m}$ 、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 、 $150\text{ }\mu\text{m}$ 、または $200\text{ }\mu\text{m}$ より大きい直径を有する、

ix) フソソームは、細胞生物学的物質を含む、

x) フソソームは、除核細胞を含むか、あるいは

xi) フソソームは、不活性化された核を含む。

【0026】

いくつかの態様では、本開示は、フソソーム組成物を製造する方法であって、

a) 本明細書に記載の複数のフソソーム、本明細書に記載のフソソーム組成物、または本明細書に記載の薬学的組成物を提供することと、

b) フソソームを、例えば、対象への投与に適した薬学的組成物として製剤化することと、を含む、方法を提供する。

【0027】

いくつかの態様では、本開示は、フソソーム組成物を製造する方法であって、

a) 本明細書に記載の複数のフソソームまたは本明細書に記載のフソソーム組成物を提供する、例えば、生成することと、

b) 1つ以上 (例えば、2つ、3つ、またはそれ以上) の基準が満たされているかどうかを判定するために、複数からの1つ以上のフソソームをアッセイすることと、を含む、方法を提供する。実施形態において、基準 (複数可) は、以下から選択される：

i) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、非標的細胞よりも、例えば、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で標的細胞と融合する、

ii) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、他のフソソームよりも、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%高い割合で標的細胞と融合する、

iii) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、フソソーム中の薬剤が、24、48、または72時間後、標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%に送達されるような割合で標的細胞と融合する、

iv) フソゲンは、例えば、実施例29のアッセイによって測定されるように、少なく

10

20

30

40

50

とも10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、もしくは1,000,000,000コピー、またはそれ以下のコピー数で存在する、

v) フソソームは、例えば、実施例43または156のアッセイによって測定されるように、少なくとも10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、もしくは1,000,000,000コピー、またはそれ以下のコピー数の治療剤を含む、

10

vi) フソゲンのコピー数と治療剤のコピー数の比は、1,000,000:1、100,000:1、10,000:1、1,000:1、100:1~50:1、1,000,000:1~100,000:1、100,000:1~10,000:1、10,000:1~1,000:1、1,000:1~100:1、100:1~50:1、50:1~20:1、20:1~10:1、10:1~5:1、5:1~2:1、1:1~2:1、2:1~1:1、1:1~1:2、1:2~1:5、1:5~1:10、1:10~1:20、1:20~1:50、1:50~1:100、1:100~1:1,000、1:1,000~1:10,000、1:10,000~1:100,000、または1:100,000~1:1,000,000、または1:20~1:50、1:100、1,000:1、10,000:1、100,000:1、および1,000,000:1である、

20

vii) フソソームは、供給源細胞の脂質組成物と実質的に同様の脂質組成物を含むか、またはCL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGのうちの1つ以上は、供給源細胞中の対応する脂質レベルの10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、または75%以内である、

viii) フソソームは、例えば、実施例42または155のアッセイを使用して、供給源細胞のプロテオーム組成物と同様のプロテオーム組成物を含む、

ix) フソソームは、例えば、実施例49のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内である脂質とタンパク質の比率を含む、

30

x) フソソームは、例えば、実施例50のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるタンパク質と核酸（例えばDNA）の比率を含む、

xi) フソソームは、例えば、実施例51または159のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内である脂質と核酸（例えばDNA）の比率を含む、

xii) フソソームは、例えば、実施例75のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞の半減期の1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内である、対象、例えば、マウスにおける半減期を有する、

40

xiii) フソソームは、例えば、実施例64のアッセイを使用して測定されるように、膜を介してグルコース（例えば、標識グルコース、例えば、2-NBDG）を、例えば、陰性対照、例えば、グルコースの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%多く輸送する、

xiv) フソソームは、例えば、実施例66のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、供給源細胞またはマウス胚線維芽細胞におけるエステラーゼ活性のエステラーゼ活性の1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、7

50

0 %、80 %、90 %、または100 %以内である内腔中のエステラーゼ活性を含む、

x v) フソソームは、例えば、実施例 68 に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中の代謝活性（例えば、クエン酸シンターゼ活性）の1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または100 %以内である代謝活性レベルを含む、

x v i) フソソームは、例えば、実施例 69 に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中の呼吸レベルの1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または100 %以内である呼吸レベル（例えば、酸素消費速度）を含む、

x v i i) フソソームは、例えば、実施例 70 のアッセイを使用して、最大で18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000、または10,000のMFIのアネキシン-V染色レベルを含むか、またはフソソームは、例えば、実施例 70 のアッセイにおいてメナジオンで処理された他の同様のフソソームのアネキシン-V染色レベルよりも少なくとも5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、または50 %低いアネキシン-V染色レベルを含むか、またはフソソームは、実施例 70 のアッセイにおいてメナジオンで処理されたマクロファージのアネキシン-V染色レベルよりも少なくとも5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、または50 %低いアネキシン-V染色レベルを含む、

x v i i i) フソソームは、例えば、実施例 39 のアッセイによって、供給源細胞のmiRNA含有レベルよりも少なくとも1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、またはそれよりも高いmiRNA含有レベルを有する、

x i x) フソソームは、例えば、実施例 47 のアッセイによって、供給源細胞の比率よりも1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、またはそれ以上、例えば、供給源細胞の比率の1 %~2 %、2 %~3 %、3 %~4 %、4 %~5 %、5 %~10 %、10 %~20 %、20 %~30 %、30 %~40 %、40 %~50 %、50 %~60 %、60 %~70 %、70 %~80 %、または80 %~90 %以内である、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比率を有する、

x x) フソソームは、例えば、質量分析によって測定されるように、例えば、実施例 48 のアッセイによって、供給源細胞のLPS含量またはフソソームの脂質含量の5 %、1 %、0.5 %、0.01 %、0.005 %、0.0001 %、0.00001 %未満またはそれより低いLPSレベルを有する、

x x i) フソソームは、例えば、実施例 63 のアッセイを使用して、シグナル伝達、例えば、細胞外シグナル、例えば、インスリンに応答するAKTリン酸化反応、またはインスリンに応答するグルコース（例えば、標識グルコース、例えば2-NBDG）の取り込みを、例えば、陰性対照、例えば、インスリンの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %多く輸送することを可能にする、

x x i i) フソソームは、例えば、実施例 71 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞または骨髄間質細胞（BMSC）により誘発されるジャクスタクリンシグナル伝達のレベルよりも少なくとも1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または100 %より高いジャクスタクリンシグナル伝達レベルを有する、

x x i i i) フソソームは、例えば、実施例 72 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはマクロファージにより誘発されるパラクリンシグナル伝達レベルよりも少なくとも1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %より高いパラクリンシグナル伝達のレベルを有する、

x x i v) フソソームは、例えば、実施例 73 のアッセイによって、参照細胞、例えば

10

20

30

40

50

、供給源細胞またはC2C12細胞中の重合アクチンのレベルと比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%以内のレベルでアクチンを重合する、

xxv) フソソームは、例えば、実施例74のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはC2C12細胞中の膜電位の約1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内の膜電位を有するか、またはフソソームは、約-20~-150mV、-20~-50mV、-50~-100mV、または-100~-150mVの膜電位を有する、

xxvi) フソソームは、例えば、実施例62のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、マウス胎児線維芽細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%高い割合でタンパク質を分泌することができる、あるいは

xxvii) フソソームは、例えば、本明細書に記載されるように、低い免疫原性を有する、ならびに

c) (任意に) 基準のうちの1つ以上が満たされた場合、複数のフソソームまたはフソソーム組成物の放出を承認する。

【0028】

本開示はまた、いくつかの態様では、フソソーム組成物を製造する方法であって、

a) 本明細書に記載の複数のフソソームまたは本明細書に記載のフソソーム組成物を提供する、例えば、生成することと、

b)

i) 例えば、本明細書に記載されるように、免疫原性分子、例えば、免疫原性タンパク質、

ii) 病原体、例えば、細菌もしくはウイルス、または

iii) 汚染物質、の因子のうちの1つ以上の存在またはレベルを決定するために、複数からの1つ以上のフソソームをアッセイすることと、

c) (任意に) 因子のうちの1つ以上が、基準値を下回っている場合、複数のフソソームまたはフソソーム組成物の放出を承認することと、を含む、方法も提供する。

【0029】

本開示はまた、いくつかの態様では、ヒト対象にフソソーム組成物を投与する方法であって、

a) 対象における1つ以上の標的細胞中の第1のフソゲンの配置を可能にする条件下で、対象に第1のフソゲンを投与することと、

i) 第1のフソゲンの投与は、1つ以上の標的細胞中の第1のフソゲンの発現を可能にする条件下で、第1のフソゲンをコードする核酸を投与することを含むか、または

ii) 第1のフソゲンは、コイルドコイルモチーフを含まない、のうちの1つ以上であり、

b) ヒト対象に、第2のフソゲンを含む複数のフソソームを含むフソソーム組成物を投与することであって、ここで、第2のフソゲンは第1のフソゲンと適合性である、投与することと、

それによって、フソソーム組成物を対象に投与することと、を含む、方法も提供する。

【0030】

本開示はまた、いくつかの態様では、治療剤を対象に送達する方法であって、

a) 対象における1つ以上の標的細胞中の第1のフソゲンの配置を可能にする条件下で、対象に第1のフソゲンを投与することであって、

i) 第1のフソゲンの投与は、1つ以上の標的細胞中の第1のフソゲンの発現を可能にする条件下で、第1のフソゲンをコードする核酸を投与することを含むか、または

ii) 第1のフソゲンは、コイルドコイルモチーフを含まない、のうちの1つ以上である、投与することと、

b) ヒト対象に、第2のフソゲンを含む複数のフソソームを含むフソソーム組成物およ

10

20

30

40

50

び治療剤を投与することであって、ここで、第2のフソゲンは第1のフソゲンと適合性である、投与することと、

それによって、治療剤を対象に送達することと、を含む、方法も提供する。

【0031】

本開示はまた、いくつかの態様では、対象における生物学的機能を調節する、例えば、増強する方法であって、

a) 対象における1つ以上の標的細胞中の第1のフソゲンの配置を可能にする条件下で、対象に第1のフソゲンを投与することであって、

i) 第1のフソゲンの投与は、1つ以上の標的細胞中の第1のフソゲンの発現を可能にする条件下で、第1のフソゲンをコードする核酸を投与することを含むか、または

ii) 第1のフソゲンは、コイルドコイルモチーフを含まない、のうちの1つ以上である、投与することと、

b) ヒト対象に、第2のフソゲンを含む複数のフソソームを含むフソソーム組成物を投与することであって、ここで、第2のフソゲンは第1のフソゲンと適合性である、投与することと、

それによって、対象における生物学的機能を調節することと、を含む、方法も提供する。

【0032】

一態様では、本発明は、コンドリソームおよびフソゲンを含むフソソームを含む。

【0033】

一態様では、本発明は、複数のフソソームを含む組成物を含み、少なくとも1つのフソソームは、コンドリソームおよびフソゲンを含む。

【0034】

本開示はまた、いくつかの態様では、対象における標的細胞のフソソーム含有量（例えば、標的細胞へのフソソーム融合）を評価する方法であって、フソソーム組成物（例えば、本明細書に記載のフソソーム組成物）を受容している対象からの生物学的試料を提供することと、本明細書に記載のフソソームと生物学的試料中の標的細胞の融合から生じる生物学的試料の1つ以上の特性を決定するために、アッセイを実施することと、を含む、方法も提供する。いくつかの態様では、本開示は、例えば、実施例54または124に記載されるように、標的細胞との融合を測定する方法を提供する。いくつかの実施形態において、生物学的試料の1つ以上の特性を決定することは、フソゲンの存在、またはカーゴもしくはペイロードのレベル、またはカーゴもしくはペイロードに関連する活性を決定することを含む。

【0035】

いくつかの態様では、本開示は、対象における標的細胞のフソソーム含有量（例えば、標的細胞へのフソソーム融合）を評価する方法であって、例えば、本明細書に記載されるように、フソソーム組成物を受容している対象からの生物学的試料を提供することと、フソゲン、例えば、本明細書に記載のフソゲンの存在について生物学的試料を試験することと、を含む、方法を提供する。場合によっては、検出されるフソゲンのレベルは、フソソーム組成物を受容していない対象からの対応する生物学的試料中で観察されたものよりも高い（例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%、3000%、4000%、5000%、10,000%、50,000%、または100,000%高い）。いくつかの実施形態において、対象は、フソソーム組成物の投与前の同じ対象であり、いくつかの実施形態において、対象は、異なる対象である。

【0036】

いくつかの態様では、本開示は、対象における標的細胞のフソソーム含有量（例えば、標的細胞へのフソソーム融合）を評価する方法であって、例えば、本明細書に記載されるように、フソソーム組成物を受容している対象からの生物学的試料を提供することと、フソゲン、例えば、本明細書に記載のフソゲンの存在について生物学的試料を試験すること

と、を含む、方法を提供する。場合によっては、検出されるカーゴまたはペイロードのレベルは、フソソーム組成物を受容していない対象からの対応する生物学的試料中で観察されたものよりも高い（例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%、3000%、4000%、5000%、10,000%、50,000%、または100,000%高い）。いくつかの実施形態において、対象は、フソソーム組成物の投与前の同じ対象であり、いくつかの実施形態において、対象は、異なる対象である。

【0037】

いくつかの態様では、本開示は、標的細胞のフソソーム含有量（例えば、対象における標的細胞へのフソソーム融合）を評価する方法であって、例えば、本明細書に記載されるように、フソソーム組成物を受容している対象からの生物学的試料を提供することと、フソソーム組成物に関連する活性、例えば、フソソーム組成物によって送達されたカーゴまたはペイロードに関連する活性の変化について生物学的試料を試験することと、を含む、方法を提供する。場合によっては、検出された活性のレベルは、フソソーム組成物を受容していない対象（例えば、フソソーム組成物の投与前の同じ対象）からの対応する生物学的試料のものと比較して、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%、3000%、4000%、5000%、10,000%、50,000%、または100,000%増加する。場合によっては、検出された活性のレベルは、フソソーム組成物を受容していない対象からの対応する生物学的試料のものと比較して、例えば、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%、3000%、4000%、5000%、10,000%、50,000%、または100,000%減少する。いくつかの実施形態において、対象は、フソソーム組成物の投与前の同じ対象であり、いくつかの実施形態において、対象は、異なる対象である。

【0038】

一態様では、本開示は、対象における標的細胞へのフソソーム融合を評価する方法であって、例えば、本明細書に記載されるように、フソソーム組成物を受容している対象からの生物学的試料を提供することと、生物学的試料中の未融合フソソームのレベルを評価することと、を含む、方法を提供する。

【0039】

本明細書の態様のいずれか、例えば、上記のフソソーム、フソソーム組成物、および方法は、本明細書の実施形態、例えば、以下の実施形態のうちの1つ以上と組み合わせることができる。

【0040】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞のサイトゾルに薬剤、例えば、タンパク質、核酸（例えばmRNA）、オルガネラ、または代謝産物を送達（例えば送達）することができる。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的細胞のサイトゾルに薬剤を送達することを含む。いくつかの実施形態において、薬剤は、標的細胞内に存在しないか、変異体であるか、または野生型より低いレベルであるタンパク質（またはタンパク質をコードする核酸、例えば、タンパク質をコードするmRNA）である。いくつかの実施形態において、標的細胞は、遺伝的疾患、例えば、単一遺伝子疾患、例えば、単一遺伝子細胞内タンパク質疾患を有する対象からのものである。いくつかの実施形態において、薬剤は、転写因子、例えば、外因性転写因子または内因性転写因子を含む。いくつかの態様では、フソソームは、1つ以上（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、10、20、または50）の追加の転写因子、例えば、外因性転写因子、内因性転写因子、またはそれらの組み合わせをさらに含むか、またはそれらを送達すること

10

20

30

40

50

をさらに含む。

【0041】

いくつかの実施形態において、フソソームは、複数の薬剤（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、10、20、または50の薬剤）を含み（例えば、標的細胞に送達することができる）、複数の各薬剤は、標的細胞内の経路のステップに作用し、例えば、経路は、生合成経路、異化経路、またはシグナル伝達カスケードである。実施形態において、複数の各薬剤は、経路を上方調節するか、経路を下方調節する。いくつかの実施形態において、フソソームは、経路のステップに作用しない、例えば、第2の経路のステップに作用する1つ以上のさらなる薬剤（例えば、第2の複数の薬剤を含む）をさらに含むか、または本方法は、それらを送達することをさらに含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、複数の薬剤（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、10、20、または50の薬剤）を含み（例えば、標的細胞に送達することができる）、複数の各薬剤は、単一経路の一部であり、例えば、その経路は、生合成経路、異化経路、またはシグナル伝達カスケードである。いくつかの実施形態において、フソソームは、単一経路の一部ではない、例えば第2の経路の一部である、1つ以上のさらなる薬剤（例えば、複数の第2の薬剤を含む）をさらに含むか、または本方法は、それらを送達することをさらに含む。

10

【0042】

いくつかの実施形態において、標的細胞は、凝集したまたはミスフォールドしたタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞内の凝集したまたはミスフォールドしたタンパク質のレベルを減少させることができる（例えば、レベルを減少させる）か、または本明細書の方法は、標的細胞内の凝集したまたはミスフォールドしたタンパク質のレベルを減少させることを含む。

20

【0043】

いくつかの実施形態において、薬剤は、転写因子、酵素（例えば、核酵素もしくはサイトゾル酵素）、DNAへの配列特異的修飾を媒介する試薬（例えば、Cas9、ZFN、もしくはTALEN）、mRNA（例えば、細胞内タンパク質をコードするmRNA）、オルガネラ、または代謝産物から選択される。

【0044】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞の細胞膜に薬剤、例えばタンパク質を送達することができる（例えば送達する）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的細胞の細胞膜に薬剤を送達することを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質の送達は、標的細胞がタンパク質を生成し、それを膜に局在化するように、タンパク質をコードする核酸（例えばmRNA）を標的細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、タンパク質を含み、または本方法は、タンパク質を送達することをさらに含む、フソソームと標的細胞との融合は、タンパク質を標的細胞の細胞膜に移す。いくつかの実施形態において、薬剤は、細胞表面受容体に結合する細胞表面リガンドまたは抗体を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞表面受容体に結合する第2の細胞表面リガンドまたは抗体を含むか、またはそれをコードする第2の薬剤をさらに含むか、または本方法は、それらを送達することをさらに含む、任意に、細胞表面受容体に結合する1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、10、20、50、またはそれ以上）の追加の細胞表面リガンドまたは抗体をさらに含むか、またはそれらをコードする。いくつかの実施形態において、第1の薬剤および第2の薬剤は、複合体を形成し、任意に、複合体は、1つ以上の追加の細胞表面リガンドをさらに含む。いくつかの実施形態において、薬剤は、細胞表面受容体、例えば、外因性細胞表面受容体を含むか、またはそれをコードする。いくつかの実施形態において、フソソームは、第2の細胞表面受容体を含むか、またはそれをコードし、任意に、1つ以上の追加の細胞表面受容体（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、10、20、50、またはそれ以上の細胞表面受容体）をさらに含むか、またはそれらをコードする。

30

40

【0045】

いくつかの実施形態において、第1の薬剤および第2の薬剤は、複合体を形成し、任意

50

に、複合体は、1つ以上の追加の細胞表面受容体をさらに含む。いくつかの実施形態において、薬剤は、抗原または抗原提示タンパク質を含むか、またはそれをコードする。

【0046】

いくつかの態様では、フソソームは、例えば、標的細胞がタンパク質を産生および分泌することを可能にする条件下で、タンパク質をコードする核酸（例えばmRNA）を標的細胞に送達することによって、分泌された薬剤、例えば、分泌タンパク質を標的部位（例えば細胞外領域）に送達することができる（例えば送達する）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、本明細書に記載の分泌剤を送達することを含む。実施形態において、分泌タンパク質は、内因性または外因性である。実施形態において、分泌タンパク質は、治療用タンパク質、例えば、抗体分子、サイトカイン、または酵素を含む。実施形態において、分泌タンパク質は、オートクリンシグナル伝達分子またはパラクリンシグナル伝達分子を含む。実施形態において、分泌された薬剤は、分泌顆粒を含む。

10

【0047】

いくつかの態様では、フソソームは、例えば、転写因子またはmRNA、または複数の当該薬剤から選択される薬剤を送達することによって、標的細胞（例えば免疫細胞）を再プログラミングすることができる（例えば再プログラミングする）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的細胞を再プログラミングすることを含む。実施形態において、再プログラミングは、ドーパミン作動性ニューロンの1つ以上の特性を呈するように非ドーパミン作動性ニューロンを誘導することによって、または消耗していないT細胞、例えば、キラーT細胞の1つ以上の特性を呈するように消耗したT細胞を誘導することによって、膵臓ベータ細胞の1つ以上の特性を呈するように膵臓内分泌細胞を誘導することを含む。いくつかの実施形態において、薬剤は、抗原を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、抗原を含む第1の薬剤、および抗原提示タンパク質を含む第2の薬剤を含む。

20

【0048】

いくつかの態様では、フソソームは、1つ以上の細胞表面受容体を標的細胞（例えば免疫細胞）に提供することができる（例えば提供する）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、1つ以上の細胞表面受容体を提供することを含む。

【0049】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的腫瘍細胞を改変することができる、例えば、改変する。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的腫瘍細胞を改変することを含む。実施形態において、フソソームは、免疫刺激リガンド、抗原提示タンパク質、腫瘍抑制タンパク質、またはプロアポトーシスタンパク質をコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、免疫抑制リガンド、細胞増殖シグナル、または成長因子の標的細胞のレベルを減少させることができるmiRNAを含む。

30

【0050】

いくつかの実施形態において、フソソームは、免疫調節性、例えば免疫刺激性である薬剤を含む。

【0051】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞に抗原を提示させることができる（例えば提示させる）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的細胞上に抗原を提示することを含む。

40

【0052】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的組織の再生を促進する。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的組織の再生を促進することを含む。実施形態において、標的細胞は、心臓細胞、例えば、心筋細胞（例えば静止心筋細胞）、肝芽細胞（例えば胆管肝芽細胞）、上皮細胞、ナイーブT細胞、マクロファージ（例えば腫瘍湿潤マクロファージ）、または線維芽細胞（例えば心臓線維芽細胞）である。実施形態において、供給源細胞は、T細胞（例えばTreg）、マクロファージ、または心筋細胞

50

である。

【0053】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、遺伝子療法のために、例えば、標的細胞のゲノムを安定に改変するために、核酸を標的細胞に送達することができる（例えば、送達する）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、核酸を標的細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態において、標的細胞は、酵素欠乏を有し、例えば、酵素の活性の減少（例えば、活性なし）をもたらす酵素の変異を含む。

【0054】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞内のDNA（例えば、Cas9、ZFN、またはTALEN）への配列特異的修飾を媒介する試薬を送達することができる（例えば送達する）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、試薬を標的細胞に送達することを含む。実施形態において、標的細胞は、筋肉細胞（例えば骨格筋細胞）、腎臓細胞、または肝臓細胞である。

【0055】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、標的細胞における遺伝子発現を一時的に改変するために、核酸を標的細胞に送達することができる（例えば送達する）。

【0056】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、タンパク質欠乏を一時的に救助するために、タンパク質を標的細胞に送達することができる（例えば送達する）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、タンパク質を標的細胞に送達することを含む。実施形態において、タンパク質は、膜タンパク質（例えば膜輸送体タンパク質）、細胞質タンパク質（例えば酵素）、または分泌タンパク質（例えば免疫抑制タンパク質）である。

【0057】

いくつかの実施形態において、フソソームは、オルガネラを標的細胞に送達することができ（例えば送達し）、例えば、標的細胞は、欠陥オルガネラネットワークを有する。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、オルガネラを標的細胞に送達することを含む。実施形態において、供給源細胞は、肝細胞、骨格筋細胞、またはニューロンである。

【0058】

いくつかの実施形態において、フソソームは、核を標的細胞に送達することができ（例えば送達し）、例えば、標的細胞は、遺伝子変異を有する。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、核を標的細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態において、核は、自己であり、標的細胞に関連する1つ以上の遺伝的変化を含み、例えば、核は、DNAに対する配列特異的改変（例えば、Cas9、ZFN、もしくはTALEN）、または人工染色体、ゲノムに組み込まれた追加の遺伝子配列、欠失、またはそれらの任意の組み合わせを含む。実施形態において、自己核の供給源は、幹細胞、例えば造血幹細胞である。実施形態において、標的細胞は、筋肉細胞（例えば、骨格筋細胞もしくは心筋細胞）、肝細胞、またはニューロンである。

【0059】

いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞内分子送達を可能にし、例えば、タンパク質薬剤を標的細胞に送達する。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、分子を標的細胞の細胞内領域に送達することを含む。実施形態において、タンパク質薬剤は、阻害剤である。実施形態において、タンパク質薬剤は、ナノボディ、scFv、ラクダ科抗体、ペプチド、マクロサイクル、または小分子を含む。

【0060】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞にタンパク質、例えば治療用タンパク質を分泌させることができる（例えば分泌させる）。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的細胞にタンパク質を分泌させることを含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、フソソームは、薬剤、例えばタンパク質を分泌することができる（例えば分泌する）。いくつかの実施形態において、薬剤、例えば分泌された薬剤は、対象において標的部位に送達される。いくつかの実施形態において、薬剤は、組換え的に作製することができないか、組換え的に作製することが困難なタンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質を分泌するフソソームは、MSCまたは軟骨細胞から選択される供給源細胞からのものである。

【0062】

いくつかの実施形態において、フソソームは、その膜上に1つ以上の細胞表面リガンド（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、10、20、50、またはそれ以上の細胞表面リガンド）を含む。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的細胞に1つ以上の細胞表面リガンドを提示することを含む。いくつかの実施形態において、細胞表面リガンドを有するフソソームは、好中球（例えば、標的細胞は腫瘍浸潤リンパ球である）、樹状細胞（例えば、標的細胞はナイーブT細胞である）、または好中球（例えば、標的は腫瘍細胞もしくはウイルス感染細胞である）から選択される供給源細胞からのものである。いくつかの実施形態において、フソソームは、膜複合体、例えば、少なくとも2、3つ、4つ、または5つのタンパク質を含む複合体、例えば、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ四量体、またはヘテロ四量体を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、抗体、例えば毒性抗体を含み、例えば、フソソームは、例えば標的部位にホーミングすることによって、抗体を標的部位に送達することができる。いくつかの実施形態において、供給源細胞は、NK細胞または好中球である。

【0063】

いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、標的細胞からのタンパク質の分泌または標的細胞の表面上のリガンド提示を引き起こすことを含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞の細胞死を引き起こすことができる。いくつかの実施形態において、フソソームは、NK供給源細胞からのものである。

【0064】

いくつかの実施形態において、フソソームまたは標的細胞は、（例えば、病原体の）食作用が可能である。同様に、いくつかの実施形態において、本明細書の方法は、食作用を引き起こすことを含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、フソソームは、その局所環境を感知し、それに反応する。いくつかの実施形態において、フソソームは、代謝産物、インターロイキン、または抗原のレベルを感知することができる。

【0066】

実施形態において、フソソームは、走化性、溢出、または1つ以上の代謝活性が可能である。実施形態において、代謝活性は、キヌリニン、糖新生、プロスタグランジン脂肪酸酸化、アデノシン代謝、尿素サイクル、および発熱呼吸から選択される。いくつかの実施形態において、供給源細胞は、好中球であり、フソソームは、損傷部位にホーミングすることができる。いくつかの実施形態において、供給源細胞は、マクロファージであり、フソソームは、食作用が可能である。いくつかの実施形態において、供給源細胞は、褐色脂肪組織細胞であり、フソソームは、脂肪分解が可能である。

【0067】

いくつかの実施形態において、フソソームは、複数の薬剤（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、10、20、または50の薬剤）を含む（例えば、標的細胞に送達することができる）。実施形態において、フソソームは、阻害性核酸（例えば、siRNAまたはmiRNA）およびmRNAを含む。

【0068】

いくつかの実施形態において、フソソームは、膜タンパク質または膜タンパク質をコードする核酸を含む（例えば、標的細胞に送達することができる）。実施形態において、フソソームは、標的細胞を再プログラミングまたは分化形質転換させることができ、例えば

、フソソームは、標的細胞の再プログラミングまたは分化形質転換を誘導する1つ以上の薬剤を含む。

【0069】

いくつかの実施形態において、対象は、再生を必要としている。いくつかの実施形態において、対象は、がん、自己免疫疾患、感染症、代謝性疾患、神経変性疾患、または遺伝病（例えば、酵素欠乏症）に罹患している。

【0070】

いくつかの実施形態（例えば、カーゴの非エンドサイトーシス送達をアッセイするための実施形態）において、カーゴ送達は、（a）30,000個のHEK-293T標的細胞を100nMのバフィロマイシンA1を含む96ウェルプレートの第1のウェルに配置し、同様の数の同様の細胞をバフィロマイシンA1を欠く96ウェルプレートの第2のウェルに配置するステップ、（b）37℃および5%CO₂でDMEM培地中で標的細胞を4時間培養するステップ、（c）カーゴを含む10ugのフソソームと標的細胞を接触させるステップ、（d）37℃および5%CO₂で標的細胞とフソソームを24時間インキュベートするステップ、ならびに（e）カーゴを含む第1のウェルおよび第2のウェル中の細胞の割合を決定するステップ、のうちの1つ以上（例えば、すべて）を使用してアッセイする。ステップ（e）は、顕微鏡検査を使用して、例えば免疫蛍光を使用してカーゴを検出することを含み得る。ステップ（e）は、カーゴを間接的に検出すること、例えば、レポータータンパク質の存在などのカーゴの下流効果を検出することを含み得る。いくつかの実施形態において、上記のステップ（a）～（e）のうちの1つ以上は、実施例135に記載されるように実施される。

【0071】

いくつかの実施形態において、エンドサイトーシスの阻害剤（例えば、クロロキンまたはバフィロマイシンA1）は、エンドソームの酸性化を阻害する。いくつかの実施形態において、カーゴ送達は、リソソーム酸性化と無関係である。いくつかの実施形態において、エンドサイトーシスの阻害剤（例えば、ダイナソーレ）は、ダイナミンを阻害する。いくつかの実施形態において、カーゴ送達は、ダイナミン活性と無関係である。

【0072】

いくつかの実施形態（例えば、標的細胞対非標的細胞へのカーゴの特異的送達のための実施形態）において、カーゴ送達は、（a）CD8aおよびCD8bを過剰発現する30,000個のHEK-293T標的細胞を96ウェルプレートの第1のウェルに配置し、CD8aおよびCD8bを過剰発現しない30,000個のHEK-293T非標的細胞を96ウェルプレートの第2のウェルに配置するステップ、（b）37℃および5%CO₂でDMEM培地中で標的細胞を4時間培養するステップ、（c）カーゴを含む10ugのフソソームと標的細胞を接触させるステップ、（d）37℃および5%CO₂で標的細胞とフソソームを24時間インキュベートするステップ、ならびに（e）カーゴを含む第1のウェルおよび第2のウェル中の細胞の割合を決定するステップ、のうちの1つ以上（例えば、すべて）を使用してアッセイする。ステップ（e）は、顕微鏡検査を使用して、例えば免疫蛍光を使用して、カーゴを検出することを含み得る。ステップ（e）は、カーゴを間接的に検出すること、例えば、レポータータンパク質の存在などのカーゴの下流効果を検出することを含み得る。いくつかの実施形態において、上記のステップ（a）～（e）のうちの1つ以上は、実施例124に記載されるように実施される。

【0073】

いくつかの実施形態において、

i i) 供給源細胞は、293細胞、HEK細胞、ヒト内皮細胞、またはヒト上皮細胞以外である、

i i i) フソゲンは、ウイルスタンパク質以外である、

i v) フソソーム、または複数のフソソームを含む組成物もしくは調製物は、例えば、1.08g/ml～1.12g/ml以外の密度を有する、

v) フソソームは、例えば、実施例33のアッセイによって測定されるように、1.2

10

20

30

40

50

5 g / m l + / - 0 . 0 5 の密度を有する、

v i) フソソームは、循環中のスカベンジャーシステムまたは肝臓洞のクッパー細胞によって捕捉されない、

v i i) フソソームは、例えば、実施例 7 6 のアッセイによって、対象における細網内皮系 (R E S) によって捕捉されない、

v i i i) 複数のフソソームが対象に投与される場合、複数の 1 % 未満、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % は、例えば、実施例 7 6 のアッセイによって、2 4、4 8、または 7 2 時間後、R E S によって捕捉される、

i x) フソソームは、5 u m、6 u m、7 u m、8 u m、1 0 u m、2 0 u m、5 0 u m、1 0 0 u m、1 5 0 u m、または 2 0 0 u m より大きい直径を有する。

10

【0074】

いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞生物学的製剤を含むか、または細胞生物学的製剤に含まれる。いくつかの実施形態において、フソソームは、除核細胞を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、不活性化された核を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、機能的核を含まない。

【0075】

いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、本明細書の特性、例えば以下の特性のうちの 1 つ以上（例えば、少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つ）を有する、または有すると特定される。

20

【0076】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 5 4 のアッセイにおいて、非標的細胞よりも、例えば、少なくとも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、5 0 倍、または 1 0 0 倍高い割合で標的細胞と融合する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 5 4 のアッセイにおいて、他のフソソームよりも、例えば、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 高い割合で標的細胞と融合する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 5 4 のアッセイにおいて、フソソーム中の薬剤が、2 4、4 8、または 7 2 時間後、標的細胞の少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % に送達されるような割合で標的細胞と融合する。実施形態において、標的化融合の量は、例えば、実施例 5 4 のアッセイにおいて、約 3 0 % ~ 7 0 %、3 5 % ~ 6 5 %、4 0 % ~ 6 0 %、4 5 % ~ 5 5 %、または 4 5 % ~ 5 0 %、例えば約 4 8 . 8 % である。実施形態において、標的化融合の量は、例えば、実施例 5 5 のアッセイにおいて、約 2 0 % ~ 4 0 %、2 5 % ~ 3 5 %、または 3 0 % ~ 3 5 %、例えば約 3 2 . 2 % である。

30

【0077】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、例えば、実施例 2 9 のアッセイによって測定されるように、少なくとも 1 0、5 0、1 0 0、5 0 0、1、0 0 0、2、0 0 0、5、0 0 0、1 0、0 0 0、2 0、0 0 0、5 0、0 0 0、1 0 0、0 0 0、2 0 0、0 0 0、5 0 0、0 0 0、1、0 0 0、0 0 0、5、0 0 0、0 0 0、1 0、0 0 0、0 0 0、5 0、0 0 0、0 0 0、1 0 0、0 0 0、0 0 0、5 0 0、0 0 0、0 0 0、もしくは 1、0 0 0、0 0 0、0 0 0 コピー、またはそれ以下のコピー数で存在する。いくつかの実施形態において、フソソームに含まれるフソゲンの少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % は、細胞膜に配置される。実施形態において、フソソームはまた、内部に、例えば細胞質またはオルガネラにフソゲンも含む。いくつかの実施形態において、フソゲンは、例えば、実施例 1 6 2 に記載の方法に従っておよび／または質量分析アッセイによって決定されるように、フソソーム中の総タンパク質の約 0 . 1 %、0 . 2 %、0 . 3 %、0 . 4 %、0 . 5 %、0 . 6 %、0 . 7 %、0 . 8 %、0 . 9 %、1 %、5 %、1 0

40

50

20

30

50

20

30

50

0、5、000、10、000、20、000、50、000、100、000、200、000、500、000、1、000、000、5、000、000、10、000、000、50、000、000、100、000、000、500、000、000、または1、000、000、000コピーを標的細胞に送達する。

【0080】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞に、フソソームに含まれるカーゴ（例えば、治療剤、例えば、内因性治療剤または外因性治療剤）の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%送達する。いくつかの実施形態において、標的細胞（複数可）と融合するフソソームは、標的細胞に、標的細胞（複数可）と融合するフソソームに含まれるカーゴ（例えば、治療剤、例えば、内因性治療剤または外因性治療剤）の平均少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%送達する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、標的組織に、フソソームに含まれるカーゴ（例えば、治療剤、例えば、内因性治療剤または外因性治療剤）の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%送達する。

【0081】

いくつかの実施形態において、フソソームは、フソソーム中の総タンパク質1mg当たり1mgのフソゲンの0.00000001mgのフソゲン、例えば、フソソーム中の総タンパク質1mg当たり0.00000001~0.0000001、0.0000001~0.000001、0.000001~0.0001、0.0001~0.01、0.01~0.1、または0.1~1mgのフソゲンを含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、フソソーム中の脂質1mg当たり0.00000001mg~5mgのフソゲン、例えば、フソソーム中の脂質1mg当たり0.00000001~0.0000001、0.0000001~0.000001、0.000001~0.0001、0.0001~0.001、0.001~0.01、0.01~0.1、0.1~1、または1~5mgのフソゲンを含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、カーゴは、タンパク質カーゴである。実施形態において、カーゴは、内因性または合成タンパク質カーゴである。いくつかの実施形態において、フソソームは、1フソソーム当たり少なくとも1、2、3、4、5、10、20、50、100、またはそれ以上のタンパク質カーゴ分子を有する（または有すると特定される）。一実施形態において、フソソームは、例えば、実施例156に記載の方法に従って定量化されるように、1フソソーム当たり約100、110、120、130、140、150、160、166、170、180、190、または200個のタンパク質薬剤分子を有する（または有すると特定される）。いくつかの実施形態において、内因性または合成タンパク質カーゴは、フソソーム中の総タンパク質の約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%またはそれ以上を含む（または含むと特定される）。一実施形態において、合成タンパク質カーゴは、フソソーム中の総タンパク質の約13.6%を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、合成タンパク質カーゴは、約 4×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 6×10^{-3} （例えば、 6.37×10^{-3} ）、 7×10^{-3} 、または 8×10^{-3} のVSV-Gに対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、合成タンパク質カーゴは、約10、15、16、17、18（例えば、18.6）、19、20、25、もしくは30、または約10~30、15~25、16~19、18~19、または18.6のCD63に対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、合成タンパク質カーゴは、約2、3、4（例えば、4.24）、5、6、または7のARRDC1に対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、合成タ

10

20

30

40

50

ンパク質カーゴは、約 0.1、0.2、0.3、0.4（例えば、0.44）、0.5、0.6、または 0.7 の GAPDH に対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、合成タンパク質カーゴは、約 1、2、3（例えば、3.56）、4、5、または 6 の CNX に対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、合成タンパク質カーゴは、約 10、15、16、17、18、19（例えば、19.52）、20、21、22、23、24、25、または 30 の TSG101 に対する比率を有する（または有すると特定される）。

【0083】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、例えば、質量分析アッセイによって、フソソーム中の総タンパク質の少なくとも 0.5%、1%、5%、10%、またはそれ以上含む（または含むと特定される）。一実施形態において、フソゲンは、例えば、質量分析アッセイによって、フソソーム中の総タンパク質の約 1~30%、5~20%、10~15%、12~15%、13~14%、または 13.6% 含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソゲンは、対象となる他のタンパク質よりも豊富である。実施形態において、フソゲンは、例えば、質量分析アッセイによって、約 145~170、150~165、155~160、156.9 のペイロードタンパク質、例えば EGFP に対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、フソゲンは、例えば、質量分析アッセイによって、約 1000~5000、2000~4000、2500~3500、2900~2930、2910~2915、または 2912.0 の CD63 に対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、フソゲンは、例えば、質量分析アッセイによって、約 300~1000、400~900、500~800、600~700、640~690、650~680、660~670、または 664.9 の ARRDC1 に対する比率を有する。実施形態において、フソゲンは、例えば、質量分析アッセイによって、約 20~120、40~100、50~90、60~80、65~75、68~70、または 69.0 の GAPDH に対する比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、フソゲンは、例えば、質量分析アッセイによって、約 200~900、300~800、400~700、500~600、520~590、530~580、540~570、550~560、または 558.4 の CNX に対する比率を有する。実施形態において、質量分析エッセイは、実施例 162 のアッセイである。

【0084】

いくつかの実施形態において、フソソームおよび供給源細胞の両方に存在する（例えば、共有される）脂質種数は、例えば、質量分析アッセイを使用して、少なくとも 300、400、500、550、560、または 569 である（またはそれであると特定される）か、または 500~700、550~600、または 560~580 である。実施形態において、供給源細胞中の対応する脂質レベルの少なくとも 25% のレベルでフソソーム中に存在する（両方とも試料内の総脂質レベルに対して正規化されている）脂質種数は、例えば、質量分析アッセイを使用して、少なくとも 300、400、500、530、540、または 548 である（またはそれであると特定されている）か、または 400~700、500~600、520~570、530~560、または 540~550 である。いくつかの実施形態において、供給源細胞中の総脂質種に対するフソソームおよび供給源細胞の両方に存在する（例えば、共有される）脂質種の割合は、例えば、質量分析アッセイを使用して、約 0.4~1.0、0.5~0.9、0.6~0.8、または 0.7 である（またはそれであると特定される）か、または少なくとも 0.4、0.5、0.6、または 0.7 である。いくつかの実施形態において、質量分析アッセイは、実施例 154 のアッセイである。

【0085】

いくつかの実施形態において、フソソームおよび供給源細胞の両方に存在する（例えば、共有される）タンパク質種数は、例えば、質量分析アッセイを使用して、少なくとも 500、1000、1100、1200、1300、1400、1487、1500、ま

たは1600である（またはそれであると特定される）か、または1200～1700、1300～1600、1400～1500、1450～1500、または1480～1490である（またはそれであると特定される）。実施形態において、供給源細胞中の対応するタンパク質レベルの少なくとも25%のレベルでフソソーム中に存在する（両方とも試料内の総タンパク質レベルに対して正規化されている）タンパク質種数は、例えば、質量分析アッセイを使用して、少なくとも500、600、700、800、900、950、957、1000、または1200である（または特定されている）。いくつかの実施形態において、供給源細胞中の総タンパク質種に対するフソソームおよび供給源細胞の両方に存在する（例えば、共有される）タンパク質種の割合は、例えば、質量分析アッセイを使用して、約0.1～0.6、0.2～0.5、0.3～0.4、もしくは0.333、または少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.333、もしくは0.4である（またはそれであると特定される）。実施形態において、質量分析アッセイは、実施例155のアッセイである。

10

【0086】

いくつかの実施形態において、CD63は、例えば、質量分析アッセイ、例えば、実施例157のアッセイによって、フソソーム中の総タンパク質の量の0.048%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、または10%未満の量で存在する（または存在すると特定される）。

【0087】

いくつかの実施形態において、フソソームは、フィルター、例えば、約1～10、2～8、3～7、4～6、または5 μmのフィルターを通した押出によって生成される。いくつかの実施形態において、フソソームは、約1～5、2～5、3～5、4～5、または5 μmの平均直径を有する（または有すると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、少なくとも1、2、3、4、または5 μmの平均直径を有する（または有すると特定される）。

20

【0088】

いくつかの実施形態において、フソソームは、供給源細胞：コレステリルエステル、遊離コレステロール、エーテル結合リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルセリン、ホスファチジン酸塩、エーテル結合ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、およびスフィンゴミエリンと比較して、以下の脂質のうちの1つ以上（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、またはすべて）が濃縮されている（または濃縮されていると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、供給源細胞：セラミド、カルジオリピン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルイノシトール、エーテル結合ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、およびトリアシルグリセロールと比較して、以下の脂質のうちの1つ以上（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、またはすべて）が枯渇している（または枯渇していると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、前述の濃縮脂質のうちの1つ以上が濃縮され（または濃縮されていると特定される）、かつ前述の枯渇脂質のうちの1つ以上が枯渇している。いくつかの実施形態において、フソソームは、総脂質の割合として濃縮脂質を、供給源細胞中の対応するレベルよりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、5倍、または10倍多く含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、総脂質の割合として枯渇脂質を、供給源細胞中の対応するレベルの90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、または10%未満含む（または含むと特定される）。実施形態において、脂質濃縮は、質量分析アッセイ、例えば、実施例164のアッセイによって測定される。

30

40

【0089】

いくつかの実施形態において、CE脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソーム中よりもフソソーム中で約2倍高く、および／または親細胞中よりもフソソーム

50

中で約5、6、7、8、9、もしくは10倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、セラミド脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりも親細胞中で約2、3、4、または5倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、コレステロールレベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2倍高く、および／または親細胞中よりもフソソーム中で約2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、CL脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりも親細胞中で少なくとも約5、10、20、30、または40倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、DAG脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約2もしくは3倍高く、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約1.5もしくは2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PC脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームの間でほぼ等しく（またはほぼ等しいと特定される）、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、もしくは1.8倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PC-O脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PE脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソーム中よりもフソソーム中で約1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、もしくは1.8倍高く、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、もしくは1.8倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PE-O脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームとの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PG脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PI脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約3、4、5、6、もしくは7倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PS脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）、および／または親細胞中よりもフソソーム中で約2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、SM脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）、および／または親細胞中よりもフソソーム中で約2、2.5、または3倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、TAG脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソームとフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍、またはそれ以上高い（または高いと特定される）。

【0090】

いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソーム：コレステリルエステル、セラミド、ジアシルグリセロール、リゾホスファチデート、およびホスファチジルエタノールアミン、およびトリアシルグリセロールと比較して、以下の脂質のうちの1つ以上（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、またはすべて）が濃縮されている（または濃縮されていると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソームと比較して（例えば、試料中の総脂質と比較して）、脂質：遊離コレステロール、ヘキソシルセラミド、リゾホスファチジルコリン、エーテル結合リゾホスファチジルコリン

10

20

30

40

50

、リゾホスファチジルエタノールアミン、エーテル結合リゾホスファチジルエタノールアミン、およびリゾホスファチジルセリンのうちの1つ以上（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、またはすべて）が枯渇している（または枯渇していると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、前述の濃縮脂質のうちの1つ以上が濃縮され（または濃縮されていると特定され）、かつ前述の枯渇脂質のうちの1つ以上が枯渇している。いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソーム中の対応するレベルよりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、5倍、または10倍多い総脂質の割合として濃縮脂質を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソーム中の対応するレベルの90%、80%、70%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、または10%より少ないレベルで総脂質の割合として枯渇脂質を含む（または含むと特定される）。実施形態において、脂質濃縮は、質量分析アッセイ、例えば、実施例164のアッセイによって測定される。

【0091】

いくつかの実施形態において、セラミド脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソーム中よりもフソソーム中で約2倍高く、および／またはフソソーム中よりもエキソソーム中で約2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、HexCer脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2倍高く（または高いと特定される）、および／または親細胞中およびフソソーム中でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）。いくつかの実施形態において、LPA脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソーム中よりもフソソーム中で約3もしくは4倍高く（または高いと特定される）、および／または親細胞中よりもフソソーム中で約1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、もしくは1.8倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、LPC脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約2倍高く、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、LPC O-脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約3もしくは4倍高く、および／または親細胞とフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）。いくつかの実施形態において、LPE脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2倍高く、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、LPE O-脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約2倍もしくは3倍高く（または高いと特定される）、および／または親細胞とフソソームの間でほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）。いくつかの実施形態において、LPS脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソーム中よりもエキソソーム中で約3倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PA脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）エキソソーム中よりもフソソーム中で約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2倍高く、および／または親細胞中よりもフソソーム中で約2倍高い（または高いと特定される）。いくつかの実施形態において、PG脂質レベルは、（試料中の総脂質と比較して）フソソームとエキソソームの間でほぼ等しく（またはほぼ等しいと特定される）、および／またはフソソーム中よりも親細胞中で約10、11、12、13、14、もしくは15倍高い（または高いと特定される）。

【0092】

いくつかの実施形態において、フソソームは、供給源細胞の脂質組成物と実質的に同様の脂質組成物を含むか、またはCL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGのうちの1つ以上は、供給源細胞中の対応する脂質レベルの10%、15%

10

20

30

40

50

、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%以内である。実施形態において、フソソームの脂質組成物は、それらが由来する細胞に同様である。実施形態において、フソソームおよび親細胞は、例えば、実施例154に従って決定されるように、親細胞の任意の複製試料で特定される脂質種の約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、または90%以上が、フソソームの任意の複製試料中に存在する（または存在すると特定される）場合、同様の脂質組成物を有する（または有すると特定される）。特定された脂質の実施形態において、フソソーム中の平均レベルは、（試料中の総脂質と比較して）親細胞中の対応する平均脂質種レベルの約10%、15%、20%、25%、30%、35%、または40%高い。一実施形態において、フソソームの脂質組成物は、（試料中の総脂質と比較して）親細胞と比較して特異的脂質が濃縮される、および／または枯渇している。

10

【0093】

いくつかの実施形態において、フソソームの脂質組成物は、例えば、実施例164に記載の方法に従って決定されるように、親細胞と比較して特異的な脂質が濃縮され、および／または枯渇している（あるいは濃縮され、および／または枯渇していると特定される）。

【0094】

いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞の比率よりも大きいホスファチジルセリンと総脂質の比率を有する（または有すると特定される）。実施形態において、フソソームは、親細胞の比率と比較して、約110%、115%、120%、121%、122%、123%、124%、125%、130%、135%、140%、またはそれ以上のホスファチジルセリンと総脂質の比率を有する（または有すると同定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して、コレステリルエステル、遊離コレステロール、エーテル結合リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルセリン、ホスファチジン酸塩、エーテル結合ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、および／またはスフィンゴミエリンが濃縮される（または濃縮されると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して、セラミド、カルジオリピン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルイノシトール、エーテル結合ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、および／またはトリアシルグリセロールが枯渇している（または枯渇していると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソームと比較して、コレステリルエステル、セラミド、ジアシルグリセロール、リゾホスファチジン酸塩、ホスファチジルエタノールアミン、および／またはトリアシルグリセロールが濃縮される（または濃縮されると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソームと比較して、遊離コレステロール、ヘキサシルセラミド、リゾホスファチジルコリン、エーテル結合リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、エーテル結合リゾホスファチジルエタノールアミン、および／またはリゾホスファチジルが枯渇している（または枯渇していると特定される）。

20

30

【0095】

いくつかの実施形態において、フソソームは、供給細胞中のカルジオリピン：セラミドの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるカルジオリピン：セラミドの比率を有するか、または供給細胞中のカルジオリピンのカルジオリピン：ジアシルグリセロールの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるカルジオリピン：ジアシルグリセロールの比率を有するか、または供給細胞中のカルジオリピン：ヘキサシルセラミドの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるカルジオリピン：ヘキサシルセラミドの比率を有するか、または供給細胞中のカルジオリピン：リゾホスファチジン酸塩の比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるカルジオリピン：リゾホスファチジン酸塩の比率を有するか、または供給細胞中のカルジオリピン：リゾホスファチジルコリンの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるカルジオリピン：リゾホスファチジルコリンの比率を有

40

50

50

50

50

50

50

チジルエタノールアミンの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：リゾホスファチジルエタノールアミンの比率を有するか、または供給源細胞中のコレステロールエステル：リゾホスファチジルグリセロールの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：リゾホスファチジルグリセロールの比率を有するか、または供給源細胞中のコレステロールエステル：リゾホスファチジリンの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：リゾホスファチジルセリンの比率を有するか、または供給源細胞中のコレステロールエステル：リゾホスファチジルセリンの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：リゾホスファチジルセリンの比率を有するか、または供給源細胞中のコレステロールエステル：ホスファチジン酸塩の比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：ホスファチジン酸塩の比率を有するか、または供給源細胞中のコレステロールエステル：ホスファチジルグリセロールの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：ホスファチジルグリセロールの比率を有するか、または供給源細胞中のコレステロールエステル：ホスファチジリンの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：ホスファチジリンの比率を有するか、または供給源細胞中のコレステロールエステル：トリアシルグリセロールの比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内であるコレステロールエステル：トリアシルグリセロールの比率を有する。

【0096】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例42または155のアッセイを使用して、供給源細胞のプロテオーム組成物と同様のプロテオーム組成物を含む。いくつかの実施形態において、フソソームのタンパク質組成物は、それらが由来する親細胞に同様である。いくつかの実施形態において、タンパク質の複数のカテゴリーの各々の分画含有量は、例えば、実施例155に記載されるように、試料中のすべての特定されたタンパク質の強度シグナルの合計で割った各カテゴリーからの強度シグナルの合計として決定される。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例165に記載の方法に従って決定されるように、親細胞および／またはエキソソームと比較して様々な量のコンパートメント特異的タンパク質を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞およびエキソソームと比較して、小胞体タンパク質が枯渇している（または枯渇していると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソームと比較して、エキソソームタンパク質が枯渇している（または枯渇していると特定される）。いくつかの態様では、フソソームは、エキソソームタンパク質であるとしてフソソーム中のタンパク質の15%、20%、または25%未満を有する（または有すると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して、ミトコンドリアタンパク質が枯渇している（または枯渇していると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して、核タンパク質が濃縮される（または濃縮されると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞およびエキソソームと比較して、リボソームタンパク質が濃縮される（または濃縮されると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソーム中のタンパク質の少なくとも0.025%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%は、リボソームタンパク質であるか、またはフソソーム中のタンパク質の約0.025~0.2%、0.05~0.15%、0.06~1.4%、0.07%~1.3%、0.08%~1.2%、0.09%~1.1%、1%~20%、3%~15%、5%~12.5%、7.5%~11%、8.5%~10.5%、または9%~10%は、リボソームタンパク質である。

10

20

30

40

50

【0097】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例49のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内である脂質とタンパク質の比率を含む。実施形態において、フソソームは、有核細胞における脂質量対タンパク質の比率にほぼ等しい脂質量とタンパク質の比率を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、親細胞よりも大きい脂質：タンパク質の比率を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、親細胞の脂質：タンパク質の比率の約110%、115%、120%、125%、130%、131%、132%、132.5%、133%、134%、135%、140%、145%、または150%の脂質：タンパク質の比率を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、実施例150のアッセイにおいて、約100~180、110~170、120~160、130~150、135~145、140~142、または141 $\mu\text{mol/g}$ のリン脂質：タンパク質の比率を有する（または有すると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、実施例150のアッセイにおいて、供給源細胞中の対応する比率の約60~90%、70~80%、または75%であるリン脂質：タンパク質の比率を有する（または有すると特定される）。

10

【0098】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例50のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内にあるタンパク質と核酸（例えばDNAまたはRNA）の比率を含む。実施形態において、フソソームは、親細胞の比率と同様のタンパク質量とDNA質量の比率を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、親細胞の約85%、90%、95%、96%、97%、98%、98.2%、99%、100%、101%、102%、103%、104%、105%、または110%であるタンパク質：DNAの比率を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例50のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率より大きい、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%大きいタンパク質とDNAの比率を含む。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、実施例151のアッセイによって、約20~35、25~30、26~29、27~28、または27.8 g/g であるタンパク質：DNAの比率を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、実施例151のアッセイによって、供給源細胞中の対応する比率の約1%、2%、5%、10%、または20%以内であるタンパク質：DNAの比率を含む（または含むと特定される）。

20

30

【0099】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例51または159のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率の10%、20%、30%、40%、または50%以内である脂質と核酸（例えばDNA）の比率を含む。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、実施例152のアッセイによって、約2.0~6.0、3.0~5.0、3.5~4.5、3.8~4.0、または3.92 $\mu\text{mol/mg}$ である、脂質：DNAの比率を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例51または159のアッセイを使用して測定されるように、供給源細胞中の対応する比率より大きい、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%高い脂質と核酸（例えばDNA）の比率を含む。実施形態において、フソソームは、親細胞よりも大きい脂質：DNAの比を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して、約105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、またはそれ以上の脂質：DNAの比を含む。

40

50

【0100】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、例えば、実施例75のアッセイによって、参照細胞組成物、例えば、供給源細胞の半減期の1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内である、対象、例えば、マウスにおける半減期を有する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、例えば、実施例75のアッセイによって、例えば、ヒト対象またはマウスにおいて、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、または24時間である、対象、例えば、マウスにおける半減期を有する。実施形態において、フソソーム組成物は、例えば、実施例134のアッセイにおいて、対象における少なくとも1、2、4、6、12、または24時間の半減期を有する。いくつかの実施形態において、治療剤は、フソソーム組成物の半減期よりも、例えば、少なくとも10%、20%、50%、2倍、5倍、または10倍長い、対象における半減期を有する。例えば、フソソームは、治療剤を標的細胞に送達してもよく、治療剤は、フソソームがもはや存在しないか、または検出できなくなった後に存在してもよい。

【0101】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例64のアッセイを使用して測定されるように、膜を介してグルコース（例えば、標識グルコース、例えば、2-NBDG）を、例えば、陰性対照、例えば、グルコースの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%輸送する、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以上輸送する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例126のアッセイにおいて、フロレチンで処理された他の同様のフソソームよりも高いレベルで膜を介してグルコース（例えば、標識グルコース、例えば、2-NBDG）を輸送する（または輸送すると特定される）。実施形態において、フロレチンで処理されていないフソソームは、例えば、実施例126のアッセイにおいて、フロレチンで処理された他の同様のフソソームよりも少なくとも1%、2%、3%、5%、または10%高い（および任意に最大15%高い）レベルでグルコースを輸送する（または輸送しないと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例66のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、供給源細胞またはマウス胚線維芽細胞におけるエステラーゼ活性のエステラーゼ活性の1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%以内である内腔中のエステラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例127のアッセイによって、非染色対照よりも少なくとも10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、または5000倍高い内腔中のエステラーゼ活性を含む（または含むと同定される）。いくつかの態様では、フソソームは、例えば、実施例127のアッセイによって、供給源細胞のエステラーゼ活性よりも約10~100倍低い内腔中のエステラーゼ活性を含む（または含むと同定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例128のアッセイによって、約1E5~1E6、6E5~8E5、6.5E5~7E5、または6.83E5のエキソソーム等価物のアセチルコリンエステラーゼ活性を含む（または含むと特定される）。いくつかの態様では、フソソームは、例えば、実施例68に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中の代謝活性レベルの1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%以内である代謝活性レベル（例えば、クエン酸シンターゼ活性）を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例68に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中の代謝活性レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%である代謝活性レベル（例えば、クエン酸シンターゼ活性）を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例129のアッセイによって、約1E-2~2E-2、1.3E-2~1.8E-2、1.4E-2~1.7E-2、1.5E-2~1.6E-2、または1.57E-2 $\mu\text{mol} / \mu\text{g}$ フソ

10

20

30

40

50

ソーム／分であるクエン酸シンターゼ活性を含む（または含むと特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 69 に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中の呼吸レベルの 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 100 % 以内である呼吸レベル（例えば、酸素消費速度）、例えば、基礎呼吸レベル、非結合呼吸レベル、または最大呼吸レベルを含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 69 に記載されるように、参照細胞、例えば、供給源細胞中の呼吸レベルの少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 100 % である呼吸レベル（例えば、酸素消費速度）、例えば、基礎呼吸レベル、非結合呼吸レベル、または最大呼吸レベルを含む。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 130 のアッセイによって、約 8 ~ 15、9 ~ 14、10 ~ 13、11 ~ 12、または 11.3 pmol / 分 / 20 µg フソソームの基礎呼吸速度を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 130 のアッセイによって、約 8 ~ 13、9 ~ 12、10 ~ 11、10 ~ 10.2、または 10.1 pmol / 分 / 20 µg フソソームの非結合呼吸速度を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 130 のアッセイによって、約 15 ~ 25、16 ~ 24、17 ~ 23、18 ~ 22、19 ~ 21、または 20 pmol / 分 / 20 µg フソソームの最大呼吸速度を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 130 のアッセイによって、非結合呼吸速度よりも約 1 %、2 %、5 %、または 10 %、例えば最大約 15 % 高い基礎呼吸速度を有する（または有すると特定される）。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 130 のアッセイによって、基礎呼吸速度よりも、例えば、約 1 %、2 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 高い最大呼吸速度を有する（または有すると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 70 のアッセイを使用して、最大で 18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000、または 10,000 の MFI のアネキシン-V 染色レベルを含むか、またはフソソームは、例えば、実施例 70 のアッセイにおいてメナジオンで処理された他の同様のフソソームのアネキシン-V 染色レベルよりも少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 低いアネキシン-V 染色レベルを含むか、またはフソソームは、実施例 70 のアッセイにおいてメナジオンで処理されたマクロファージのアネキシン-V 染色レベルよりも少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 低いアネキシン-V 染色レベルを含む。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 131 のアッセイにおいて、アンチマイシン A で処理された他の同様のフソソームのアネキシン V 染色レベルよりも少なくとも約 1 %、2 %、5 %、または 10 % 低いアネキシン V 染色レベルを含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 131 のアッセイにおいて、アンチマイシン A で処理された他の同様のフソソームのアネキシン V 染色レベルの約 1 %、2 %、5 %、または 10 % 以内であるアネキシン V 染色レベルを含む（または含むと特定される）。

【0102】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 39 のアッセイによって、供給源細胞の miRNA 含有レベルよりも少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、またはそれよりも大きい miRNA 含有レベルを有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 39 のアッセイによって、供給源細胞の miRNA 含有レベルの少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、またはそれ以上（例えば、供給源細胞の miRNA 含有量レベルの最大 100 %）の miRNA 含有レベルを有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 108 のアッセイによって測定されるよう

に、供給源細胞の総RNA含有レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上（例えば、供給源細胞の総RNA含有量レベルの最大100%）の総RNA含有レベルを有する。

【0103】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例47のアッセイによって、供給源細胞の比率よりも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上、例えば、供給源細胞の比率の1%~2%、2%~3%、3%~4%、4%~5%、5%~10%、10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、または80%~90%以内である可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比率を有する。実施形態において、フソソームは、例えば、実施例47のアッセイによって、約0.3~0.8、0.4~0.7、または0.5~0.6、例えば約0.563の可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比率を有する。いくつかの実施形態において、フソソームの集団は、約0.1、0.2、0.3、0.4、または0.5よりも約0.3~0.8、0.4~0.7、0.5~0.6、または0.563、もしくはそれ以上の可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の質量比を有する（または有すると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームの集団は、例えば、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、または20倍高い、供給源細胞の質量比より大きい可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の質量比を有する（または有すると同定される）。実施形態において、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の質量比は、実施例123のアッセイによって決定される。実施形態において、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の質量比は、親細胞よりもフソソーム集団において低い（または低いと特定される）。実施形態において、フソソームと親細胞の比率は、約3%、4%、5%、6%、7%、または8%である（またはそれであると特定される）場合、フソソームの集団の可溶性：不溶性の比率は、親細胞の可溶性：不溶性の比率にほぼ等しい（またはほぼ等しいと特定される）。

【0104】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、質量分析により測定されるように、例えば、実施例48のアッセイによって、供給源細胞のLPS含量の5%未満、1%、0.5%、0.01%、0.005%、0.0001%、0.00001%以下のLPSレベルを有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例63のアッセイを使用して、シグナル伝達、例えば、細胞外シグナル、例えば、インスリンに応答するAKTリン酸化反応、またはインスリンに応答するグルコース（例えば、標識グルコース、例えば2-NBDG）の取り込みを、例えば、陰性対照、例えば、インスリンの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以上輸送することを可能にする。いくつかの実施形態において、フソソームは、組織、例えば、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、胃腸管、腎臓、精巣、卵巣、脳、生殖器官、中枢神経系、末梢神経系、骨格筋、内皮、内耳、または眼を標的とし、対象、例えば、マウスに投与される場合、投与されたフソソームの集団中のフソソームの少なくとも0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%は、例えば、実施例87または100のアッセイによって、24、48、または72時間後に標的組織中に存在する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例71のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞または骨髄間質細胞（BMSC）により誘発されるジャクスタクリンシグナル伝達のレベルよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%高いジャクスタクリンシグナル伝達レベルを有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例71のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞または骨髄間質細胞（BMSC）により誘発されるジャクスタクリンシ

グナル伝達のレベルよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%（例えば、最大100%）のジャスタクリンシグナル伝達レベルを有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例72のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはマクロファージにより誘発されるパラクリンシグナル伝達のレベルよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%より大きいパラクリンシグナル伝達のレベルを有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例72のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはマクロファージにより誘発されるパラクリンシグナル伝達のレベルよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%（例えば、最大100%）のパラクリンシグナル伝達レベルを有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例73のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはC2C12細胞中の重合アクチンのレベルと比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%以内のレベルでアクチンを重合する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例147のアッセイによって、経時的に、例えば、少なくとも3、5、または24時間にわたって一定であるレベルでアクチンを重合する（またはアクチンを重合すると特定される）。実施形態において、アクチン重合のレベルは、例えば、実施例147のアッセイによって、5時間にわたって1%、2%、5%、10%、または20%未満変化する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例74のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはC2C12細胞の膜電位の約1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内の膜電位を有するか、またはフソソームは、約-20~-150mV、-20~-50mV、-50~-100mV、または-100~-150mVの膜電位を有するか、またはフソソームは、-1mV、-5mV、-10mV、-20mV、-30mV、-40mV、-50mV、-60mV、-70mV、-80mV、-90mV、-100mV未満の膜電位を有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例132のアッセイにおいて、約-25~-35、-27~-32、-28~-31、-29~-30、または-29.6ミリボルトの膜電位を有する（または有すると特定される）。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例57のアッセイを使用して、供給源細胞の溢出率の少なくとも1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の割合で血管から溢すことができ、例えば、供給源細胞は、好中球、リンパ球、B細胞、マクロファージ、またはNK細胞である。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例58のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、マクロファージと比較して、例えば、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%（例えば、最大100%）の走化性を可能にする。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例60のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、マクロファージと比較して、例えば、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%（例えば、最大100%）の食作用を可能にする。いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞膜、例えば、内皮細胞膜または血液脳関門を通過することができる。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例62のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、マウス胎児線維芽細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%より大きい割合でタンパク質を分泌することができる。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例62のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、マウス胎児線維芽細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%（例えば、最大1

10

20

30

40

50

00%)の割合でタンパク質を分泌することができる。

【0105】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例19のアッセイを使用して、参照細胞、例えば供給源細胞を転写することができないか、または参照細胞、例えば供給源細胞の転写活性の転写の1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%未満の転写活性を有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例20のアッセイを使用して、参照細胞、例えば供給源細胞の核のDNA複製ができないか、または参照細胞、例えば供給源細胞の核のDNA複製の1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%未満の核のDNA複製を有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、クロマチンを欠いているか、または例えば、実施例37のアッセイを使用して、参照細胞、例えば供給源細胞のクロマチン含量の1%、2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%未満のクロマチン含量を有する。

10

【0106】

いくつかの実施形態において、フソソームの特徴は、参照細胞との比較によって記載されている。実施形態において、参照細胞は、供給源細胞である。実施形態において、参照細胞は、HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR90、IMR91、PER.C6、HT-1080、またはBJ細胞である。いくつかの実施形態において、フソソームの集団の特徴は、参照細胞の集団、例えば、供給源細胞の集団、またはHeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR90、IMR91、PER.C6、HT-1080、またはBJ細胞の集団と比較することによって記載されている。

20

【0107】

いくつかの実施形態において、フソソームは、医薬品または適正製造基準(GMP)の基準を満たしている。いくつかの実施形態において、フソソームは、適正製造基準(GMP)に従って作製された。いくつかの実施形態において、フソソームは、所定の基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、実質的に病原体を含まない。いくつかの実施形態において、フソソームは、所定の基準値を下回る汚染物質レベルを有する、例えば、実質的に汚染物質を含まない。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、本明細書に記載されるように、低い免疫原性を有する。

30

【0108】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物の免疫原性は、血清不活化アッセイ(例えば、抗体媒介性中和または補体媒介性分解を検出するアッセイ)によってアッセイされる。いくつかの実施形態において、フソソームは、血清によって不活性化されないか、または所定の値を下回るレベルで不活性化される。いくつかの実施形態において、フソソームナイーブ対象(例えば、ヒトまたはマウス)の血清を、試験フソソーム組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、フソソームの1回以上の投与を施した、例えば、フソソームの少なくとも2回の投与を施した対象の血清を、試験フソソーム組成物と接触させる。次いで、実施形態において、血清に曝露されたフソソームを、カーゴを標的細胞に送達する能力について試験する。いくつかの実施形態において、血清をインキュベートしたフソソームでの処理後にカーゴを検出可能に含む細胞の割合は、血清と接触していない陽性対照フソソームによる処理後にカーゴを検出可能に含む細胞の割合の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または95%である。いくつかの実施形態において、血清の不活性化は、実施例168のアッセイを使用して測定される。

40

【0109】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物の免疫原性は、フソソームに応答した補体活性化を検出することによってアッセイされる。いくつかの実施形態において、フソソームは、補体を活性化しないか、または所定の値を下回るレベルで補体を活性化する。いくつかの実施形態において、フソソームナイーブ対象(例えば、ヒトまたはマウス)の

50

血清を、試験フソソーム組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、フソソームの1回以上の投与を施した、例えば、フソソームの少なくとも2回の投与を施した対象の血清を、試験フソソーム組成物と接触させる。次いで、実施形態において、血清およびフソソームを含む組成物は、例えばELISAによって、活性化補体因子（例えば、C3a）について試験される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の改変を含むフソソーム（例えば、参照細胞と比較して、補体調節タンパク質のレベルが高い）は、改変を欠いている他の同様のフソソームと比較して、補体活性化が低下し、例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%低下する。いくつかの実施形態において、補体活性化は、実施例169のアッセイを使用して測定される。

10

【0110】

いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム集団は、血清によって実質的に不活性化されないだろう。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム集団は、例えば、実施例167または168に記載の方法に従って定量化されるように、血清不活化に耐性を示す。実施形態において、フソソームまたはフソソーム集団は、例えば、本明細書に記載の方法に従って、対象へのフソソームまたはフソソーム集団の複数回投与後、血清によって実質的に不活性化されないか、または血清不活化に耐性を示す。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例167または168に記載の方法に従って定量化されるように、改変フソソームの複数回投与後、例えば、対応する非改変フソソームと比較して、血清不活化が低下するように改変される。

20

【0111】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例169に記載の方法に従って測定されるように、補体活性を実質的に誘導しない。いくつかの実施形態において、フソソームは、対応する非修飾フソソームと比較して、低下した補体活性を誘導するように改変される。実施形態において、補体活性は、細胞中の、補体タンパク質（例えば、DAF、崩壊促進因子（DAF、CD55）に結合するタンパク質、例えば、因子H（FH）様タンパク質-1（FHL-1）、C4b結合タンパク質（C4BP）、補体受容体1（CD35）、膜補因子タンパク質（MCP、CD46）、プロフェクチン（CD59）、古典的および代替補体経路CD/C5変換酵素を阻害するタンパク質、またはMACアセンブリを調節するタンパク質）の発現または活性を決定することによって測定される。

30

【0112】

いくつかの実施形態において、供給源細胞は、内皮細胞、線維芽細胞、血液細胞（例えば、マクロファージ、好中球、顆粒球、白血球）、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、骨髄幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞、例えば、対象の細胞に由来する人工多能性幹細胞）、胚性幹細胞（例えば、胚性卵黄嚢、胎盤、臍帯、胎児の皮膚、思春期の皮膚、血液、骨髄、脂肪組織、赤血球生成組織、造血組織からの幹細胞）、筋芽細胞、実質細胞（例えば肝細胞）、肺胞細胞、ニューロン（例えば、網膜神経細胞）前駆細胞（例えば、網膜前駆細胞、骨髄芽球、骨髄前駆細胞、胸腺細胞、減数細胞、巨核芽細胞、前巨核芽球、メラニン芽細胞、リンパ芽球、骨髄前駆細胞、正常細胞、または血管芽細胞）、前駆細胞（例えば、心臓前駆細胞、衛星細胞、放射線ギアル細胞、骨髄間質細胞、脾臓前駆細胞、内皮前駆細胞、芽球細胞）、または不死化細胞（例えば、HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR90、IMR91、PER.C6、HT-1080、またはBJ細胞）である。いくつかの実施形態において、供給源細胞は、293細胞、HEK細胞、ヒト内皮細胞、またはヒト上皮細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、または幹細胞以外である。

40

【0113】

いくつかの実施形態において、供給源細胞は、ARRDC1またはその活性断片またはバリエーションを発現する（例えば、過剰発現する）。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、質量分析アッセイによって、約1~3、1~10、1~100、3~10、4~9、5~8、6~7、15~100、60~200、8

50

0～180、100～160、120～140、3～100、4～100、5～100、6～100、15～100、80～100、3～200、4～200、5～200、6～200、15～200、80～200、100～200、120～200、300～1000、400～900、500～800、600～700、640～690、650～680、660～670、100～10,000、または約664.9のフソゲンとARRDC1の比率を有する。いくつかの実施形態において、例えば、質量分析によって、例えば、実施例166に記載の方法に従って測定されるように、総タンパク質含有量の割合としてARRDC1のレベルは、少なくとも約0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%であるか、または、総タンパク質含有量の割合としてARRDC1のレベルは、約0.05～1.5%、0.1%～0.3%、0.05～0.2%、0.1～0.2%、0.25～7.5%、0.5%～1.5%、0.25～1%、0.5～1%、0.05～1.5%、10%～30%、5～20%、または10～20%である。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、質量分析アッセイ、例えば、実施例162のアッセイを使用して、約100～1,000、100～400、100～500、200～400、200～500、200～1,000、300～400、1,000～10,000、2,000～5,000、3,000～4,000、3,050～3,100、3,060～3,070、または約3,064、10,000～100,000、10,000～200,000、10,000～500,000、20,000～500,000、30,000～400,000のフソゲンとTSG101の比率を有する。いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、例えば、質量分析アッセイ、例えば、実施例163のアッセイを使用して、約1～3、1～30、1～20、1～25、1.5～30、10～30、15～25、18～21、19～20、10～300、10～200、15～300、15～200、100～300、100～200、150～300、または約19.5のカーゴとtsg101の比率を有する。いくつかの実施形態において、例えば、質量分析、例えば、実施例166に記載の方法に従って測定されるように、総タンパク質含有量の割合としてTSG101のレベルは、少なくとも約0.0001%、0.0002%、0.0003%、0.0004%、0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%であるか、または総タンパク質含有量の割合としてTSG101のレベルは、約0.0001～0.001、0.0001～0.002、0.0001～0.01、0.0001～0.1、0.001～0.01、0.002～0.006、0.003～0.005、0.001～0.1、0.01～0.1、0.02～0.06、0.03～0.05、または0.004である。

【0114】

いくつかの実施形態において、フソソームは、カーゴ、例えば治療剤、例えば、内因性治療剤または外因性治療剤を含む。いくつかの実施形態において、治療剤は、タンパク質、例えば、酵素、膜貫通タンパク質、受容体、抗体、核酸、例えば、DNA、染色体（例えば、ヒト人工染色体）、RNA、mRNA、siRNA、miRNA、または小分子のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態において、治療剤は、ミトコンドリア以外のオルガネラ、例えば、核、ゴルジ装置、リソソーム、小胞体、液胞、エンドソーム、アクロソーム、オートファゴソーム、中心小体、グリコソーム、グリオキシソーム、ヒドロゲノソーム、メラノソーム、マイトソーム、刺胞、ペルオキシソーム、プロテアソーム、小胞、およびストレス顆粒から選択されるオルガネラである。いくつかの実施形態において、オルガネラは、ミトコンドリアである。

【0115】

いくつかの実施形態において、フソソームは、エンドサイトーシスによって標的細胞に入り、例えば、エンドサイトーシス経路を介して送達される治療剤のレベルは、例えば、

10

20

30

40

50

実施例 91 のアッセイによって、0.01~0.6、0.01~0.1、0.1~0.3、または0.3~0.6であるか、または同様のフソソームと接触されたクロロキンで処理した参照細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、標的細胞に入るフソソーム組成物中のフソソームの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%は、非エンドサイトーシス経路を介して入る、例えば、フソソームは、細胞表面との融合を介して標的細胞に入る。いくつかの実施形態において、所定のフソソームにおける非エンドサイトーシス経路を介して送達される治療剤のレベルは、

例えば、実施例 90 のアッセイを使用して、0.1~0.95、0.1~0.2、0.2~0.3、0.3~0.4、0.4~0.5、0.5~0.6、0.6~0.7、0.7~0.8、0.8~0.9、0.9~0.95であるか、またはクロロキンで処理した参照細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、標的細胞に進入するフソソーム組成物中のフソソームの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%は、細胞質に入る（例えば、エンドソームまたはリソソームに入らない）。いくつかの実施形態において、標的細胞に入るフソソーム組成物中のフソソームの90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満は、エンドソームまたはリソソームに入る。いくつかの実施形態において、フソソームは、非エンドサイトーシス経路によって標的細胞に入り、例えば、送達される治療剤のレベルは、例えば、実施例 91 のアッセイを使用して、クロロキンで処理した参照細胞のレベルの少なくとも90%、95%、98%、または99%である。一実施形態において、フソソームは、ダイナミン媒介性経路を介して標的細胞に薬剤を送達する。一実施形態において、ダイナミン媒介経路を介して送達される薬剤のレベルは、0.01~0.6の範囲であるか、または例えば、実施例 92 のアッセイで測定されるように、同様のフソソームと接触したDynasoreで処理した標的細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。一実施形態において、フソソームは、マクロピノサイトーシスを介して標的細胞に薬剤を送達する。一実施形態において、マクロピノサイトーシスを介して送達される薬剤のレベルは、0.01~0.6の範囲であるか、または例えば、実施例 92 のアッセイで測定されるように、同様のフソソームと接触したEIPAで処理した標的細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。

【0116】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、実施例 33 のアッセイによって、1未満、1~1.1、1.05~1.15、1.1~1.2、1.15~1.25、1.2~1.3、1.25~1.35、または1.35 g/ml 超の密度を有する。

【0117】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、タンパク質質量によって0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、または10%未満の供給源細胞を含むか、または細胞の0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、または10%未満は、機能核を有する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物中のフソソ

ームの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%は、オルガネラ、例えば、ミトコンドリアを含む。

【0118】

いくつかの実施形態において、フソソームは、外因性治療剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、外因性治療剤は、タンパク質、例えば、酵素、膜貫通タンパク質、受容体、抗体、核酸、例えば、DNA、染色体（例えば、ヒト人工染色体）、RNA、mRNA、siRNA、miRNA、または小分子のうちの1つ以上から選択される。

【0119】

実施形態において、フソソームは、エンドサイトーシスまたは非エンドサイトーシス経路によって細胞に入る。

【0120】

いくつかの実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、冷蔵または冷凍されている。実施形態において、フソソームは、機能核を含まないか、またはフソソーム組成物は、機能核を有しないフソソームを含む。実施形態において、フソソーム組成物は、タンパク質量によって0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、または10%未満の供給源細胞を含むか、または細胞の0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、または10%未満は、機能核を有する。実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも1、2、3、6、または12時間、1、2、3、4、5、または6日間、1、2、3、または4週間、1、2、3、または6カ月間、または1、2、3、4、または5年間、当該温度で維持されている。実施形態において、フソソーム組成物は、当該温度での維持前に、集団の活性の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の活性を有し、例えば、

i) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、非標的細胞よりも、例えば、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で標的細胞と融合する、

ii) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、他のフソソームよりも、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%高い割合で標的細胞と融合する、

iii) フソソームは、例えば、実施例54のアッセイにおいて、フソソーム中の薬剤が、24、48、または72時間後、標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%に送達されるような割合で標的細胞と融合するか、または

iv) フソゲンは、例えば、実施例29のアッセイによって測定されるように、少なくとも10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、1,000,000コピー、またはそれ以下のコピー数で存在する、のうちの1つ以上である。

【0121】

実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも1、2、3、6、または12時間、1、2、3、4、5、または6日間、1、2、3、または4週間、1、2、3、または6カ月間、または1、2、3、4、または5年間、4℃未満の温度で安定している。実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも1、2、3、6、または12時間、1、2、3、4、5、または6日間、1、2、3、または4週間、1、2、3、または6カ月間、または1、2、3、4、または5年間、-20℃未満の温度で安定している。実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも1、2、3、6、または12時間、1、2、3、4、5、または6日間、1、2、3、または4週間、1、2、3、または6カ月間、または1、2、3、4、または5年間、-80℃未満の温度で安定している。

【0122】

実施形態において、

i) 供給源細胞は、293細胞以外である、

ii) 供給源細胞は、形質転換または不死化されていない、

iii) 供給源細胞は、アデノウイルス媒介による不死化以外の方法を使用して形質転換または不死化される、例えば、自然突然変異またはテロメラーゼ発現による不死化によって不死化される、

iv) フソゲンは、VSVG、SNAREタンパク質、または分泌顆粒タンパク質以外である、

v) 治療剤は、CreまたはEGFP以外である、

vi) 治療剤は、例えば、内腔内に外因性核酸（例えば、RNA、例えば、mRNA、miRNA、もしくはsiRNA）または外因性タンパク質（例えば、抗体、例えば、抗体）をさらに含む、

vii) フソソームは、ミトコンドリアを含まない、のうちの1つ以上である。

【0123】

実施形態において、

i) 供給源細胞は、293またはHEK細胞以外である、

ii) 供給源細胞は、形質転換または不死化されていない、

iii) 供給源細胞は、アデノウイルス媒介による不死化以外の方法を使用して形質転換または不死化される、例えば、自然突然変異またはテロメラーゼ発現による不死化によって不死化される、

iv) フソゲンは、ウイルスフソゲンではない、または

v) フソソームは、40~150nm以外、例えば、150nm、200nm、300nm、400nm、または500nmより大きいサイズを有する、のうちの1つ以上である。

【0124】

実施形態において、

i) 治療剤は、供給源細胞によって発現される可溶性タンパク質である、

ii) フソゲンは、TAT、TAT-HA2、HA-2、gp41、アルツハイマー病のベータアミロイドペプチド、センダイウイルスタンパク質、または両親媒性の正味の負ペプチド(WAE 11)以外である、

iii) フソゲンは、哺乳動物フソゲンである、

iv) フソソームは、酵素、抗体、または抗ウイルス性ポリペプチドから選択されるポリペプチドをその内腔中に含む、

v) フソソームは、外因性治療的膜貫通タンパク質を含まないか、または

vi) フソソームは、CD63またはGLUT4を含まないか、またはフソソームは、例えば、実施例157に記載の方法に従って決定されるように、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、または10%以下（例えば、約0.048%以下）のCD63を含む、のうちの1つ以上である。

【0125】

実施形態において、フソソームは、

i) ウイルスを含まない、感染性がない、または宿主細胞中で増殖しない、

ii) ウイルスベクターではない、

iii) VLP（ウイルス様粒子）ではない、

iv) ウイルス構造タンパク質、例えば、gag由来のタンパク質、例えば、ウイルスカプシドタンパク質、例えば、ウイルスカプセルタンパク質、例えばウイルスヌクレオカプシドタンパク質を含まないか、またはウイルスカプシドタンパク質の量は、例えば、質量分析によって、例えば、実施例53または161のアッセイを使用して、総タンパク質の10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、または0.1%未満である、

v) ウイルスマトリックスタンパク質を含まない、

v i) ウイルスの非構造タンパク質、例えば、p o l またはその断片もしくはバリエーション、ウイルス逆転写酵素タンパク質、ウイルスインテグラーゼタンパク質、またはウイルスプロテアーゼタンパク質を含まない、

v i i) ウイルス核酸、例えば、ウイルスRNAまたはウイルスDNAを含まない、

v i i i) ウイルス構造タンパク質の1小胞当たり10、50、100、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、1,000,000,000、または1,000,000,000未満のコピーを含むか、あるいは

i x) フソソームは、ウイルスソームではない。

【0126】

いくつかの態様では、フソソームは、約0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%未満のウイルスカプシドタンパク質（例えば、約0.05%のウイルスカプシドタンパク質）を含む（または含むと特定される）。実施形態において、ウイルスカプシドタンパク質は、ウサギ内因性レンチウイルス（RELIK）カプシドとシクロフィリンAとの複合体である。実施形態において、ウイルスカプシドタンパク質：総タンパク質の比率は、約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、または0.1である（またはそうであると特定される）。

【0127】

いくつかの実施形態において、フソソームは、g a g タンパク質またはその断片もしくはバリエーションを含まない（または含まないと特定される）か、またはg a g タンパク質またはその断片もしくはバリエーションの量は、例えば、実施例53または161のアッセイによって、総タンパク質の10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、または0.1%未満である。

【0128】

実施形態において、フソソームのコピー数とフソソーム上のウイルス構造タンパク質のコピー数の比は、少なくとも1,000,000:1、100,000:1、10,000:1、1,000:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、または1:1であるか、または100:1~50:1、50:1~20:1、20:1~10:1、10:1~5:1または1:1である。実施形態において、フソソームのコピー数とフソソーム上のウイルスマトリックスタンパク質のコピー数の比は、少なくとも1,000,000:1、100,000:1、10,000:1、1,000:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、または1:1である。

【0129】

実施形態において、

i) フソソームは、水不混和性の液滴を含まない、

i i) フソソームは、水性内腔および親水性外部を含む、

i i i) フソゲンは、タンパク質フソゲンであるか、または

i v) オルガネラは、ミトコンドリア、ゴルジ装置、リソソーム、小胞体、液胞、エンドソーム、アクロソーム、オートファゴソーム、中心小体、グリコソーム、グリオキシソーム、ヒドロゲノソーム、メラノソーム、マイトソーム、刺胞、ペルオキシソーム、プロテアソーム、小胞、およびストレス顆粒から選択される、のうちの1つ以上である。

【0130】

実施形態において、

i) フソゲンは、哺乳動物フソゲンまたはウイルスフソゲンである、

i i) フソソームは、治療物質または診断物質でフソソームを充填させることによって作製されなかった、

i i i) 供給源細胞は、治療物質または診断物質で充填されなかった、

10

20

30

40

50

v) フソソームは、1つ以上の翻訳後修飾、例えば、グリコシル化を有する外因性治療剤をさらに含む、うちの1つ以上である。

実施形態において、フソソームは、単層または多層である。

10

50

～90%以内のサイズを有するか、あるいはフソソームの集団は、供給源細胞のサイズの約0.01%～0.05%、0.05%～0.1%、0.1%～0.5%、0.5%～1%、1%～2%、2%～3%、3%～4%、4%～5%、5%～10%、10%～20%、20%～30%、30%～40%、40%～50%、50%～60%、60%～70%、70%～80%、または80%～90%以内の平均サイズを有する。実施形態において、例えば、実施例119、120、または121のアッセイによって測定されるように、フソソームは、直径を有するか、またはフソソームの集団は、約500nm未満（例えば、約10、50、100、150、200、250、300、350、400、または450nm未満）の平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例119、120、または121のアッセイによって測定されるように、フソソームは、約80～180、90～170、100～160、110～150、120～140、または130nmの直径を有するか、あるいはフソソームの集団は、約80～180、90～170、100～160、110～150、120～140、または130nmの平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例119、120、または121のアッセイによって測定されるように、フソソームは、約11,000nm～21,000nmの直径を有するか、あるいはフソソームの集団は、約11,000nm～21,000nmの平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例119、120、または121のアッセイによって測定されるように、フソソームは、約10～22,000、12～20,000、14～18,720nm、20～16,000nmの直径を有するか、あるいはフソソームの集団は、約10～22,000、12～20,000、14～18,720nm、20～16,000nmの平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例119、120、または121のアッセイによって測定されるように、フソソームは、約0.01～0.1 μm^3 、0.02～1 μm^3 、0.03～1 μm^3 、0.04～1 μm^3 、0.05～0.09 μm^3 、0.06～0.08 μm^3 、0.07 μm^3 の体積を有するか、またはフソソームの集団は、約0.01～0.1 μm^3 、0.02～1 μm^3 、0.03～1 μm^3 、0.04～1 μm^3 、0.05～0.09 μm^3 、0.06～0.08 μm^3 、0.07 μm^3 平均体積を有する。実施形態において、例えば、実施例32のアッセイによって測定されるように、フソソームは、少なくとも約10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、または250nmの直径を有するか、あるいはフソソームの集団は、少なくとも約10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、または250nmの平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例32のアッセイによって測定されるように、フソソームは、約10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、または250nm（例えば、 $\pm 20\%$ ）の直径を有するか、あるいはフソソームの集団は、約10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、または250nm（例えば、 $\pm 20\%$ ）の平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例32のアッセイによって測定されるように、フソソームは、少なくとも約500nm、750nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm、3,000nm、5,000nm、10,000nm、または20,000nmの直径を有するか、あるいはフソソームの集団は、少なくとも約500nm、750nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm、3,000nm、5,000nm、10,000nm、または20,000nmの平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例32のアッセイによって測定されるように、フソソームは、約500nm、750nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm、3,000nm、5,000nm、10,000nm、または20,000nm（例えば、 $\pm 20\%$ ）の直径を有するか、あるいはフソソームの集団は、約500nm、750nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm、3,000nm、5,000nm、10,000nm、また

10

20

30

40

50

は20,000nm（例えば、±20%）の平均直径を有する。実施形態において、例えば、実施例120のアッセイによって、フソソームの集団は、約40～90nm、45～60nm、50～55nm、または53nmの10%の四分位直径、約70～100nm、80～95nm、85～90nm、または88nmの25%の四分位直径、約200～250nm、210～240nm、220～230nm、または226nmの75%の四分位直径、または約4000～5000nm、4300～4600nm、4400～4500nm、4450nmの90%の四分位直径、のうちの1つ以上を有する（または有すると特定される）。

【0133】

実施形態において、フソソーム組成物は、例えば、実施例149のアッセイにおいて、約35～40、36～39、37～38、または37.2ng/mLのGAPDH濃度を含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソーム組成物のGAPDH濃度は、例えば、実施例149のアッセイにおいて、供給源細胞のGAPDH濃度の約1%、2%、5%、10%、または20%以内である（またはそうであると特定される）。実施形態において、フソソーム組成物のGAPDH濃度は、例えば、実施例149のアッセイにおいて、供給源細胞のGAPDH濃度よりも少なくとも1%、2%、5%、10%、または20%低い（または低いと特定される）。実施形態において、フソソーム組成物は、総タンパク質1グラム当たり約30、35、40、45、46、47、48、49、50、55、60、65、または70μg未満のGAPDHを含む（または含むと特定される）。実施形態において、フソソーム組成物は、総タンパク質1グラム当たり約500、250、100、または50μg未満のGAPDHを含む（または含むと特定される）。実施形態において、親細胞は、フソソーム組成物よりも総タンパク質当たり少なくとも1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、30%、50%、またはそれ以上のGAPDHを含む（または含むと特定される）。

【0134】

実施形態において、

i) フソソームは、エキソソームではない、

ii) フソソームは、微小胞である、

iii) フソソームは、非哺乳動物フソゲンを含む、

iv) フソソームは、フソゲンを組み込むように操作されている、

v) フソソームは、外因性フソゲンを含む、

vi) フソソームは、少なくとも80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm、または1500nmのサイズを有するか、あるいはフソソーム集団は、少なくとも80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm、または1500nmの平均サイズを有する、

vii) フソソームは、1つ以上のオルガネラ、例えば、ミトコンドリア、ゴルジ装置、リソソーム、小胞体、液胞、エンドソーム、アクロソーム、オートファゴソーム、中心小体、グリコソーム、グリオキシソーム、ヒドロゲノソーム、メラノソーム、マイトソーム、刺胞、ペルオキシソーム、プロテアソーム、小胞、およびストレス顆粒を含む、

viii) フソソームは、細胞骨格またはその成分、例えば、アクチン、Arp2/3、ホルミン、コロニン、ジストロフィン、ケラチン、ミオシン、またはチューブリンを含む、

ix) フソソーム、または複数のフソソームを含む組成物もしくは調製物は、例えば、蔗糖勾配遠心アッセイにおいて、例えば、Thery et al., "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22に記載されるように、1.08～1.22g/mLの浮選密度を有しないか、または少なくとも1.18～1.25g/mL、または1.05～1.12g/mLの密度を有する、

x) 脂質二重層は、供給源細胞と比較して、セラミドもしくはスフィンゴミエリンまたはそれらの組み合わせが濃縮されているか、あるいは脂質二重層は、供給源細胞と比較して、糖脂質、遊離脂肪酸、もしくはホスファチジルセリン、またはそれらの組み合わせが濃縮されていない（例えば、枯渇している）、

x i) フソソームは、例えば、実施例 5 2 または 1 6 0 のアッセイにおいて測定した場合、ホスファチジルセリン (P S) もしくは C D 4 0 リガンドまたは P S および C D 4 0 リガンドの両方を含む、

x i i) フソソームは、供給源細胞と比較して、P S が濃縮されており、例えば、少なくとも 5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % のフソソーム集団において、例えば、Kanada M, et al. (2015) *Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA* 112:E1433-E1442 のアッセイによって、P S が陽性である、

x i i i) フソソームは、例えば、実施例 6 7 のアッセイによって、アセチルコリンエステラーゼ (A C h E) を実質的に含まないか、または 0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、または 1000 未満の A C h E 活性単位 / u g タンパク質を含む、

x i v) フソソームは、テトラスパニンファミリータンパク質（例えば、C D 6 3、C D 9、もしくは C D 8 1）、E S C R T 関連タンパク質（例えば、T S G 1 0 1、C H M P 4 A - B、もしくは V P S 4 B）、A l i x、T S G 1 0 1、M H C I、M H C I I、G P 9 6、アクチニン-4、ミトフィリン、シンテニン-1、T S G 1 0 1、A D A M 1 0、E H D 4、シンテニン-1、T S G 1 0 1、E H D 1、フロチリン-1、熱ショック 7 0 k D a タンパク質 (H S C 7 0 / H S P 7 3、H S P 7 0 / H S P 7 2)、またはそれらの任意の組み合わせを実質的に含まないか、あるいは例えば、実施例 4 4 または 1 5 7 のアッセイによって、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、5%、または 10% 未満の任意の個々のエキソソームマーカータンパク質、および / または 0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、または 25% 未満の当該タンパク質のいずれかの総エキソソームマーカータンパク質を含むか、あるいは供給源細胞と比較して、これらのタンパク質のうちの任意の 1 つ以上が、脱濃縮されているか、あるいはこれらのタンパク質のうちの任意の 1 つ以上が、濃縮されていない、

x v) フソソームは、例えば、実施例 4 5 のアッセイを使用して、500、250、100、50、20、10、5、または 1 n g の G A P D H / u g 総タンパク質を下回る、または供給源細胞中の G A P D H レベルを下回る、例えば、供給源細胞中の総タンパク質当たりの G A P D H のレベル (n g / u g) よりも 1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または 90% 未満より少ない、グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H) レベルを含む、

x v i) フソソームは、1 つ以上の小胞体タンパク質（例えば、カルネキシン）、1 つ以上のプロテアソームタンパク質、もしくは 1 つ以上のミトコンドリアタンパク質、またはそれらの任意の組み合わせが濃縮されているか、またはカルネキシンの量は、500、250、100、50、20、10、5、または 1 n g のカルネキシン / u g 総タンパク質未満である、またはフソソームは、例えば、実施例 4 6 または 1 5 8 のアッセイを使用して、供給源細胞と比較して、総タンパク質当たり 1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または 90% 少ないカルネキシン (n g / u g) を含むか、またはフソソーム中のカルネキシンの平均画分含量は、約 1×10^{-4} 、 1.5×10^{-4} 、 2×10^{-4} 、 2.1×10^{-4} 、 2.2×10^{-4} 、 2.3×10^{-4} 、 2.4×10^{-4} 、 2.43×10^{-4} 、 2.5×10^{-4} 、 2.6×10^{-4} 、 2.7×10^{-4} 、 2.8×10^{-4} 、 2.9×10^{-4} 、 3×10^{-4}

10

20

30

40

50

、 3.5×10^{-4} 、または 4×10^{-4} 未満であるか、またはフソソームは、親細胞のカルネキシンの量よりも総タンパク質当たり約70%、75%、80%、85%、88%、90%、95%、99%またはそれ以上低いカルネキシンの量を含む、

xvii) フソソームは、例えば、実施例39または40のアッセイを使用して測定されるように、外因性薬剤（例えば、外因性タンパク質、mRNA、またはsiRNA）を含むか、あるいは

xviii) フソソームは、例えば、Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442のアッセイによって、少なくとも30分間の原子間力顕微鏡法によって、雲母表面上に固定化することができる、のうちの1つ以上である。

【0135】

実施形態において、

i) フソソームは、エキソソームである、

ii) フソソームは、微小胞ではない、

iii) フソソームは、80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm、または1500nm未満のサイズを有するか、あるいはフソソーム集団は、80nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm、または1500nm未満の平均サイズを有する、

iv) フソソームは、オルガネラを含まない、

v) フソソームは、細胞骨格またはその成分、例えば、アクチン、Arp2/3、ホルミン、コロニン、ジストロフィン、ケラチン、ミオシン、またはチューブリンを含まない、

vi) フソソーム、または複数のフソソームを含む組成物もしくは調製物は、例えば、蔗糖勾配遠心アッセイにおいて、例えば、Thery et al., "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22に記載されるように、 $1.08 \sim 1.22 \text{ g/ml}$ の浮選密度を有する、

vii) 脂質二重層は、供給源細胞と比較して、セラミドまたはスフィンゴミエリンまたはそれらの組み合わせが濃縮されていないか、あるいは脂質二重層は、供給源細胞と比較して、糖脂質、遊離脂肪酸、またはホスファチジルセリン、またはそれらの組み合わせが濃縮されている、

viii) フソソームは、例えば、実施例52または160のアッセイにおいて測定した場合、供給源細胞、ホスファチジルセリン(PS)またはCD40リガンド、またはPSおよびCD40リガンドの両方を含まないか、あるいはそれらが枯渇している、

ix) フソソームは、供給源細胞と比較して、PSが濃縮されておらず（枯渇しており）、例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%未満のフソソーム集団において、例えば、Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442のアッセイによって、PSが陽性である、

x) フソソームは、例えば、実施例67のアッセイによって、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)、例えば、少なくとも0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、または1000のAChE活性単位/ μg タンパク質を含む、

xi) フソソームは、テトラスパニンファミリータンパク質（例えば、CD63、CD9、もしくはCD81）、ESCRT関連タンパク質（例えば、TSG101、CHMP

10

20

30

40

50

4A-B、もしくはVPS4B)、Alix、TSG101、MHC I、MHC II、GP96、アクチニン-4、ミトフィリン、シンテニン-1、TSG101、ADAM10、EHD4、シンテニン-1、TSG101、EHD1、フロチリン-1、熱ショック70kDaタンパク質(HSC70/HSP73、HSP70/HSP72)、またはそれらの任意の組み合わせを含む、例えば、例えば、実施例44または157のアッセイによって、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、5%、または10%未満の任意の個々のエキソソームマーカータンパク質、および/または0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、または25%未満の当該タンパク質のいずれかの総エキソソームマーカータンパク質を含むか、あるいは供給源細胞と比較して、これらのタンパク質のうちの任意の1つ以上は、濃縮されている、

10

xii) フソソームは、例えば、実施例45のアッセイを使用して、500、250、100、50、20、10、5、または1ngのGAPDH/ug総タンパク質を上回る、または供給源細胞中のGAPDHレベルを下回る、例えば、供給源細胞中の総タンパク質当たりのGAPDHのレベル(ng/ug)よりも少なくとも1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%より多い、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)レベルを含む、

xiii) フソソームは、1つ以上の小胞体タンパク質(例えば、カルネキシン)、1つ以上のプロテアソームタンパク質、もしくは1つ以上のミトコンドリアタンパク質、またはそれらの任意の組み合わせが濃縮されておらず(例えば、枯渇しており)、例えば、カルネキシンの量は、500、250、100、50、20、10、5、または1ngのカルネキシン/ug総タンパク質未満であるか、またはフソソームは、例えば、実施例46または158のアッセイを使用して、供給源細胞と比較して、総タンパク質当たり1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%少ないカルネキシン(ng/ug)を含むか、あるいはフソソーム中のカルネキシンの平均画分含量は、約 1×10^{-4} 、 1.5×10^{-4} 、 2×10^{-4} 、 2.1×10^{-4} 、 2.2×10^{-4} 、 2.3×10^{-4} 、 2.4×10^{-4} 、 2.43×10^{-4} 、 2.5×10^{-4} 、 2.6×10^{-4} 、 2.7×10^{-4} 、 2.8×10^{-4} 、 2.9×10^{-4} 、 3×10^{-4} 、 3.5×10^{-4} 、または 4×10^{-4} 未満であるか、またはフソソームは、親細胞のカルネキシンの量よりも総タンパク質当たり約70%、75%、80%、85%、88%、90%、95%、99%またはそれ以上低いカルネキシンの量を含むか、あるいは

20

30

xiv) フソソームは、例えば、Kanada M, et al. (2015) Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 112:E1433-E1442のアッセイによって、少なくとも30分間の原子間力顕微鏡法によって、雲母表面上に固定化することができない、のうちの1つ以上である。

【0136】

40

実施形態において、フソソーム中のカルネキシンの平均画分含量は、約 1×10^{-4} 、 1.5×10^{-4} 、 2×10^{-4} 、 2.1×10^{-4} 、 2.2×10^{-4} 、 2.3×10^{-4} 、 2.4×10^{-4} 、 2.43×10^{-4} 、 2.5×10^{-4} 、 2.6×10^{-4} 、 2.7×10^{-4} 、 2.8×10^{-4} 、 2.9×10^{-4} 、 3×10^{-4} 、 3.5×10^{-4} 、または 4×10^{-4} 未満である(またはあると同定される)。実施形態において、フソソームは、親細胞のカルネキシンの量よりも総タンパク質当たり約70%、75%、80%、85%、88%、90%、95%、99%以上低いカルネキシンの量を含む。

【0137】

実施形態において、

i) フソソームは、VLPを含まない、

50

- i i) フソソームは、ウイルスを含まない、
- i i i) フソソームは、複製可能なウイルスを含まない、
- i v) フソソームは、ウイルスタンパク質、例えば、ウイルス構造タンパク質、例えば、カプシドタンパク質またはウイルスマトリックスタンパク質を含まない、
- v) フソソームは、エンベロープウイルスのカプシドタンパク質を含まない、
- v i) フソソームは、ヌクレオカプシドタンパク質を含まない、または
- v i i) フソゲンは、ウイルスフソゲンではない、のうちの1つ以上である。

【0138】

実施形態において、フソソームは、サイトゾルを含む。

【0139】

実施形態において、

i) フソソームまたは供給源細胞は、例えば、実施例102のアッセイによって、対象に移植したときに奇形腫を形成しない、

i i) フソソームは、例えば、実施例58のアッセイを使用して、参照細胞、例えば、マクロファージよりも、例えば、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内、またはそれより大きい走化性を可能にする、

i i i) フソソームは、例えば、損傷部位でホーミングすることができ、フソソームまたは細胞生物学は、例えば、実施例59のアッセイを使用して、例えば、供給源細胞は好中球である、ヒト細胞からのものであるか、または

i v) フソソームは、食作用が可能であり、例えば、フソソームによる食作用は、例えば、供給源細胞がマクロファージである、実施例60のアッセイを使用して、0.5、1、2、3、4、5、または6時間以内に検出可能である、のうちの1つ以上である。

【0140】

実施形態において、フソソームまたはフソソーム組成物は、対象、例えばヒト対象への投与後、5日以下、例えば、4日以下、3日以下、2日以下、1日以下、例えば、約12〜72時間、特性のいずれかの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上保持する。

【0141】

実施形態において、フソソームは、以下の特徴のうちの1つ以上を有する：

a) 供給源細胞からの1つ以上の内因性タンパク質、例えば、膜タンパク質またはサイトゾルタンパク質を含む、

b) 少なくとも10、20、50、100、200、500、1000、2000、または5000個の異なるタンパク質を含む、

c) 少なくとも1、2、5、10、20、50、または100個の異なる糖タンパク質を含む、

d) フソソーム中のタンパク質の質量で少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%は、天然に存在するタンパク質である、

e) 少なくとも10、20、50、100、200、500、1000、2000、または5000個の異なるRNAを含むか、あるいは

f) 例えば、CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGから選択される少なくとも2、3、4、5、10、または20個の異なる脂質を含む。

【0142】

実施形態において、フソソームは、以下の特性のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上を有するように操作されているか、またはフソソームが天然に存在する細胞ではなく、または核は、以下の特性のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上天然に有しない：

a) 核の部分的な不活性化は、核機能の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%以上の減少、例えば、転写またはDNA複製、またはその両方の減少をもたらし、転写は、実施例19のアッセイによって測定され、DNA複製は、実施例20のアッセイ

10

20

30

40

50

によって測定される、

b) フソソームは、例えば、実施例 19 のアッセイを使用して、参照細胞、例えば供給源細胞を転写することができないか、または参照細胞、例えば供給源細胞の転写活性の転写の 1 %、2.5 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 未満の転写活性を有する、

c) フソソームは、例えば、実施例 20 のアッセイを使用して、参照細胞、例えば供給源細胞の核の DNA 複製ができないか、または参照細胞、例えば供給源細胞の核の DNA 複製の 1 %、2.5 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 未満の核の DNA 複製を有する、

d) フソソームは、クロマチンを欠いているか、または例えば、実施例 37 のアッセイを使用して、参照細胞、例えば供給源細胞のクロマチン含量の 1 %、2.5 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 未満のクロマチン含量を有する、

10

e) フソソームは、核膜を欠いているか、または例えば、実施例 36 のアッセイによって、参照細胞、例えば、供給源細胞またはジャーカット細胞の核膜の量の 50 %、40 %、30 %、20 %、10 %、5 %、4 %、3 %、2 %、または 1 % 未満有する、

f) フソソームは、機能的な核膜孔複合体を欠いているか、または例えば、実施例 36 のアッセイによって、核の輸入または輸出活性が、例えば、少なくとも 50 %、40 %、30 %、20 %、10 %、5 %、4 %、3 %、2 %、または 1 % 低下しているか、またはフソソームは、核膜孔タンパク質、例えば、NUP98 またはインポーチン 7 の 1 つ以上欠いている、

20

g) フソソームは、ヒストンを含まないか、または例えば、実施例 37 のアッセイによって、供給源細胞のヒストンレベルの（例えば、H1、H2a、H2b、H3、または H4 の）1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 未満のヒストンレベルを有する、

h) フソソームは、20、10、5、4、3、2、または 1 未満の染色体を含む、

i) 核機能は、排除される、

j) フソソームは、除核された哺乳動物細胞である、

k) 核は、除去または不活性化され、例えば、機械的力、放射線、または化学的アブレーションによって押し出されるか、あるいは

30

l) フソソームは、例えば、中間期または有糸分裂中に完全にまたは部分的に除去された DNA を有する哺乳動物細胞からのものである。

【0143】

実施形態において、フソソームは、mtDNA またはベクター DNA を含む。実施形態において、フソソームは、DNA を含まない。

【0144】

実施形態において、供給源細胞は、初代細胞、不死化細胞、または細胞株（例えば、骨髓芽球細胞株、例えば、C2C12）である。実施形態において、フソソームは、（例えば MHC タンパク質または MHC 複合体を除去するために、例えば、ゲノム編集によって）免疫原性の低下を有する、改変ゲノムを有する供給源細胞からのものである。実施形態において、供給源細胞は、抗炎症シグナルで処理された細胞培養物からのものである。実施形態において、供給源細胞は、免疫抑制剤で処理された細胞培養物からのものである。実施形態において、供給源細胞は、例えば、本明細書に記載のアッセイを使用して、実質的に非免疫原性である。実施形態において、供給源細胞は、外因性薬剤、例えば治療剤を含む。実施形態において、供給源細胞は、組換え細胞である。

40

【0145】

実施形態において、フソソームは、外因性薬剤、例えば治療剤、例えば、タンパク質または核酸（例えば、DNA、染色体（例えばヒト人工染色体）、RNA、例えば、mRNA または miRNA）をさらに含む。実施形態において、外因性薬剤は、例えば、フソソームに含まれる、少なくとも 10、20、50、100、200、500、1,000、

50

2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、または1,000,000,000コピー、またはそれ以下で存在するか、または1フソソーム当たり少なくとも10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、または1,000,000コピー、またはそれ以下の平均レベルで存在する。実施形態において、フソソームは、例えば、哺乳動物細胞をs iRNAまたは遺伝子編集酵素で処理することにより、1つ以上の内因性分子、例えば、タンパク質または核酸のレベルを変化、例えば、増加または減少させる。実施形態において、内因性分子は、例えば、少なくとも10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、または1,000,000,000コピー（例えば、フソソームに含まれるコピー）、またはそれ以下で存在するか、または1フソソーム当たり少なくとも10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、または1,000,000,000コピー、またはそれ以下の平均レベルで存在する。実施形態において、内因性分子（例えば、RNAまたはタンパク質）は、供給源細胞中のその濃度よりも少なくとも1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 、または 1.0×10^8 高い濃度で存在する。

【0146】

実施形態において、活性剤は、タンパク質、タンパク質複合体（例えば、少なくとも2、3、4、5、10、20、または50個のタンパク質、例えば、少なくとも少なくとも2、3、4、5、10、20、または50個の異なるタンパク質を含む）ポリペプチド、核酸（例えば、DNA、染色体、またはRNA、例えば、mRNA、s iRNA、もしくはmiRNA）、または小分子から選択される。実施形態において、外因性薬剤は、部位特異的ヌクレアーゼ、例えば、Cas9分子、TALEN、またはZFNを含む。

【0147】

実施形態において、フソゲンは、ウイルス性フソゲン、例えば、HA、HIV-1 ENV、HHV-4、gp120、またはVSV-Gである。実施形態において、フソゲンは、哺乳動物フソゲン、例えば、SNARE、シンシチン、ミオメーカー、ミオミキサー、ミオマージャー、またはFGFRL1である。実施形態において、フソゲンは、4～5、5～6、6～7、7～8、8～9、または9～10のpHで活性である。実施形態において、フソゲンは、4～5、5～6、6～7、7～8、8～9、または9～10のpHで活性ではない。実施形態において、フソソームは、標的細胞の表面で標的細胞に融合する。実施形態において、フソゲンは、リソソーム非依存的な様式で融合を促進する。実施形態において、フソゲンは、タンパク質フソゲンである。実施形態において、フソゲンは、脂質フソゲン、例えば、オレイン酸、モノオレイン酸グリセロール、グリセリド、ジアシルグリセロール、または改質不飽和脂肪酸である。実施形態において、フソゲンは、化学的フソゲン、例えばPEGである。実施形態において、フソゲンは、小分子フソゲン、例えば、ハロタン、NSAID、例えば、メロキシカム、ピロキシカム、テノキシカム、およびクロルプロマジンである。実施形態において、フソゲンは、組み換えである。実施形態において、フソゲンは、生化学的に組み込まれ、例えば、フソゲンは、精製タンパク質として提供され、フソゲンと脂質二重層との結合を可能にする条件下で脂質二重層と接触される。実施形態において、フソゲンは、生合成的に組み込まれ、例えば、フソゲンが脂質二重層と結合することを可能にする条件下で供給源細胞に発現される。

【0148】

実施形態において、フソソームは、標的細胞に結合する。実施形態において、標的細胞は、HeLa細胞以外であるか、標的細胞は、形質転換または不死化されていない。

【0149】

フソソーム組成物を含むいくつかの実施形態において、複数のフソソームは、同じである。いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、異なる。いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、1つ以上の供給源細胞からのものである。いくつかの実施形態において、複数のフソソームの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%は、フソソーム組成物中のフソソームの平均直径の10%、20%、30%、40%、または50%以内の直径を有する。いくつかの実施形態において、複数のフソソームの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%は、フソソーム組成物中のフソソームの平均体積の10%、20%、30%、40%、または50%以内の体積を有する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、約90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%未満のサイズ分布の変動、例えば、実施例31に基づいて、供給源細胞集団の10%、50%、または90%以内のサイズ分布の変動を有する。いくつかの実施形態において、複数のフソソームの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%は、フソソーム組成物中のフソソームの平均フソゲンコピー数の10%、20%、30%、40%、または50%、60%、70%、80%、または90%以内のフソゲンのコピー数を有する。いくつかの実施形態において、複数のフソソームの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%は、フソソーム組成物中のフソソームの平均治療剤のコピー数の10%、20%、30%、40%、または50%、60%、70%、80%、または90%以内のフソゲンのコピー数を有する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、または 10^{15} 個以上のフソソームを含む。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも1 μ l、2 μ l、5 μ l、10 μ l、20 μ l、50 μ l、100 μ l、200 μ l、500 μ l、1 ml、2 ml、5 ml、または10 mlの体積内である。

【0150】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団中の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の数の細胞にカーゴを送達する。

【0151】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照標的細胞集団または非標識細胞集団と比較して、標的細胞集団に少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%のカーゴを送達する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照標的細胞集団または非標識細胞集団と比較して、標的細胞集団に少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%多くのカーゴを送達する。

【0152】

いくつかの実施形態において、カーゴの10%未満は、エンドサイトーシスによって細胞に入る。

【0153】

いくつかの実施形態において、エンドサイトーシスの阻害剤は、リソソーム酸性化の阻害剤、例えばバフィロマイシンA1である。いくつかの実施形態において、エンドサイトーシスの阻害剤は、ダイナミン阻害剤、例えばダイナソーレである。

【0154】

いくつかの実施形態において、標的細胞集団は、生理学的pH（例えば、7.3~7.5、例えば7.38~7.42）である。

【0155】

いくつかの実施形態において、送達されるカーゴは、エンドサイトーシス阻害アッセイ、例えば、実施例90、92、または135のアッセイを使用して決定される。

【0156】

いくつかの実施形態において、カーゴは、ダイナミン非依存性経路またはリソソーム酸性化非依存性経路、マクロピノサイトーシス非依存性経路を通して細胞に入る（例えば、エンドサイトーシスの阻害剤は、例えば25 μ Mの濃度で、マクロピノサイトーシスの阻害剤、例えば5-（N-エチル-N-イソプロピル）アミロライド（EIPA）である）、またはアクチン非依存性経路（例えば、エンドサイトーシスの阻害剤は、アクチン重合の阻害剤である場合、例えば6 μ Mの濃度で、ラトランキュリンBである）。

10

【0157】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、標的化部分をさらに含む。実施形態において、標的化部分は、フソゲンに含まれるか、または別個の分子に含まれる。

【0158】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団と接触した場合、カーゴは、非標的細胞よりも少なくとも10倍多くの標的細胞中に存在する。

【0159】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団と接触した場合、カーゴは、非標的細胞よりも少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、または50倍多くの標的細胞中に存在する、および／またはカーゴは、参照細胞よりも少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、または50倍多くの標的細胞中に存在する。

20

【0160】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、非標的細胞よりも標的細胞と少なくとも50%高い割合で融合する。

【0161】

いくつかの実施形態において、カーゴの存在は、例えば、実施例124のアッセイを使用して、顕微鏡検査によって測定される。いくつかの実施形態において、融合は、例えば、実施例54のアッセイを使用して、顕微鏡検査によって測定される。

30

【0162】

いくつかの実施形態において、標的化部分は、標的細胞上の細胞表面マーカーに特異的である。実施形態において、細胞表面マーカーは、皮膚細胞、心筋細胞、肝細胞、腸細胞（例えば、小腸の細胞）、膵臓細胞、脳細胞、前立腺細胞、肺細胞、結腸細胞、または骨髓細胞の細胞表面マーカーである。

【0163】

いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、ラウドウイルス科フソゲン（例えば、VSV-G）、フィロウイルス科フソゲン、アレナウイルス科フソゲン、トガウイルス科フソゲン、フラビウイルス科フソゲン、ブニヤウイルス科フソゲン、またはヘパドナウイルス科フソゲン（例えば、Hep B）、またはそれらの誘導体を含む。

40

【0164】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接触した場合、およびエンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団中の少なくとも30%の数の細胞にカーゴを送達する。

【0165】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接触した場合、およびエンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団中の

50

少なくとも30%のカーゴを送達する。

【0166】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞集団と接触した場合、エンドソームまたはリソソーム以外の標的細胞位置、例えばサイトゾルにカーゴを送達する。実施形態において、カーゴの50%、40%、30%、20%、または10%未満は、エンドソームまたはリソソームに送達される。

【0167】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量は、質量分析を使用して、例えば、実施例53または161のアッセイを使用して決定される。

10

【0168】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、エキソソーム、微小胞、またはそれらの組み合わせを含む。

【0169】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、少なくとも50nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm、または1500nmの平均サイズを有する。他の実施形態において、複数のフソソームは、100nm、80nm、60nm、40nm、または30nm未満の平均サイズを有する。

【0170】

いくつかの実施形態において、供給源細胞は、好中球、HEK293細胞、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される。

20

【0171】

いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、細胞生物学的製剤を含む。いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、除核細胞を含む。

【0172】

いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、哺乳動物フソゲンを含む。いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、ウイルス性フソゲンを含む。いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、タンパク質フソゲンである。いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、ニパウイルスタンパク質F、麻疹ウイルスFタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFタンパク質、パラミクソウイルスFタンパク質、ヘンドラウイルスFタンパク質、ヘニパウイルスFタンパク質、モルビリウイルスFタンパク質、レスピロウイルスFタンパク質、センダイウイルスFタンパク質、ルブラウイルスFタンパク質、またはアブラウイルスFタンパク質、またはそれらの誘導体を含む。

30

【0173】

いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、または9~10のpHで活性である。いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、または9~10のpHで活性ではない。

40

【0174】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、1フソソーム当たり少なくとも1、2、5、または10コピーのコピー数で存在する。

【0175】

いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、ニパウイルスタンパク質G、麻疹タンパク質H、ツパイアパラミクソウイルスHタンパク質、パラミクソウイルスGタンパク質、パラミクソウイルスHタンパク質、パラミクソウイルスHNタンパク質、モルビリウイルスHタンパク質、レスピロウイルスHNタンパク質、センダイHNタンパク質、ルブラウイルスHNタンパク質、アブラウイルスHNタンパク

50

質、またはそれらの誘導体を含む。いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）は、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質またはFおよびHタンパク質またはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはそれらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む。

【0176】

いくつかの実施形態において、カーゴは、外因性タンパク質または外因性核酸を含む。いくつかの実施形態において、カーゴは、細胞質タンパク質を含むか、またはそれをコードする。いくつかの実施形態において、カーゴは、膜タンパク質を含むか、またはそれをコードする。いくつかの実施形態において、カーゴは、治療剤を含む。いくつかの実施形態において、カーゴは、1フソソーム当たり少なくとも1、2、5、10、20、50、100、または200コピー（例えば、1フソソーム当たり最大約1,000コピー）のコピー数で存在する。いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）のコピー数とカーゴのコピー数の比は、1000:1~1:1、または500:1~1:1、または250:1~1:1、または150:1~1:1、または100:1~1:1、または75:1~1:1、または50:1~1:1、または25:1~1:1、または20:1~1:1、または15:1~1:1、または10:1~1:1、または5:1~1:1、または2:1~1:1、または1:1~1:2である。

【0177】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、
a) 医薬品または適正製造基準（GMP）の基準を満たしている、
b) 適正製造基準（GMP）に従って作製された、
c) 所定の基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、実質的に病原体を含まない、または
d) 所定の基準値を下回る汚染物質レベルを有する、例えば、実質的に汚染物質を含まない。

【0178】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80、または-160℃未満の温度である。

【0179】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、ウイルスカプシドタンパク質またはDNA組み込みポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、カーゴは、ウイルスゲノムを含む。

【0180】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、例えば、遺伝子療法のために、例えば、標的細胞のゲノムを安定に改変するために、核酸を標的細胞に送達することができる。

【0181】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、ウイルスヌクレオカプシドタンパク質を含まないか、またはウイルスヌクレオカプシドタンパク質の量は、例えば、質量分析によって、例えば、実施例53または161のアッセイを使用して、総タンパク質の10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、または0.1%未満である。

【0182】

実施形態において、本明細書に記載される薬学的組成物は、以下の特徴のうちの1つ以上を有する：

a) 薬学的組成物は、医薬品または適正製造基準（GMP）の基準を満たしている、

- b) 薬学的組成物は、適正製造基準（GMP）に従って作製された、
- c) 薬学的組成物は、所定の基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、実質的に病原体を含まない、
- d) 薬学的組成物は、所定の基準値を下回る汚染物質レベルを有する、例えば、実質的に汚染物質を含まない、あるいは
- e) 薬学的組成物は、例えば、本明細書に記載されるように、低い免疫原性を有する。

【0183】

実施形態において、薬学的組成物のカーゴは、治療剤を含む。

【0184】

実施形態において、生物学的機能は、

- a) 酵素を調節する、例えば、阻害または刺激すること、
- b) 例えば、因子の合成を阻害もしくは刺激することによって、または分解を阻害もしくは刺激することによって、対象における分子（例えば、タンパク質、核酸、または代謝産物、薬物、または毒素）のレベルを調節する、例えば増加または減少させること、
- c) 標的細胞または組織の生存率を調節する、例えば増加または減少させること、あるいは
- d) タンパク質の状態を調節する、例えば、タンパク質のリン酸化の増加または減少させること、またはタンパク質の立体構造を調節すること、
- e) 傷害の治療を促進すること、
- f) 2つの細胞間の相互作用を調節する、例えば増加または減少させること、
- g) 細胞分化を調節する、例えば、促進または阻害させること、
- h) 対象における因子（例えば、タンパク質、核酸、代謝産物、薬物、または毒素）の分布を変化させること、
- i) 免疫応答を調節する、例えば、増加または減少させること、あるいは
- j) 標的組織への細胞の動員を調節する、例えば、増加または減少させること、から選択される。

【0185】

本明細書の治療方法のいくつかの実施形態において、複数のフソソームは、局所効果を有する。いくつかの実施形態において、複数のフソソームは、遠位効果を有する。

【0186】

いくつかの実施形態において、対象は、がん、炎症性障害、自己免疫疾患、慢性疾患、炎症、損傷した臓器機能、感染症、代謝性疾患、変性障害、遺伝性疾患（例えば、遺伝的欠損、劣性遺伝性障害、もしくは優性遺伝障害）、または傷害を有する。いくつかの実施形態において、対象は、感染症を有し、フソソームは、感染症の抗原を含む。いくつかの実施形態において、対象は、遺伝的欠損を有し、フソソームは、対象が欠損しているタンパク質、またはタンパク質をコードする核酸（例えばmRNA）、またはタンパク質をコードするDNA、またはタンパク質をコードする染色体、またはタンパク質をコードする核酸を含む核を含む。いくつかの実施形態において、対象は、優性遺伝障害を有し、フソソームは、優性突然変異対立遺伝子の核酸阻害剤（例えば、siRNAまたはmiRNA）を含む。いくつかの実施形態において、対象は、優性遺伝障害を有し、および／またはフソソームは、優性変異対立遺伝子の核酸阻害剤（例えば、siRNAまたはmiRNA）を含み、および／またはフソソームは、核酸阻害剤によって標的化されない変異遺伝子の非変異対立遺伝子をコードするmRNAも含む。いくつかの実施形態において、対象は、ワクチン接種を必要としている。いくつかの実施形態において、対象は、例えば、損傷した部位の再生を必要としている。

【0187】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、対象に、少なくとも1、2、3、4、または5回投与される。

【0188】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、対象に、全身的（例えば、経口、

10

20

30

40

50

非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内)または局所的に投与される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物が、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、胃腸管、腎臓、精巣、卵巣、脳、生殖器官、中枢神経系、末梢神経系、骨格筋、内皮、内耳、または眼から選択される標的組織に到達するように、フソソーム組成物は、対象に投与される。いくつかの実施形態(例えば、対象が自己免疫疾患を有する場合)において、フソソーム組成物は、免疫抑制剤、例えば、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、抗体、またはイムノフィリン調節剤と同時投与される。いくつかの実施形態(例えば、対象ががんまたは感染症を有する場合)において、フソソーム組成物は、免疫賦活剤、例えば、アジュバント、インターロイキン、サイトカイン、またはケモカインと同時投与される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物の投与は、対象における標的細胞中の遺伝子の上方調節または下方調節をもたらす、例えば、フソソームは、転写活性化因子もしくは抑制因子、翻訳活性化因子もしくは抑制因子、または後成的活性化因子もしくは抑制因子を含む。

10

【0189】

本明細書の作製方法のいくつかの実施形態において、フソゲンを発現する供給源細胞を提供することは、供給源細胞中で外因性フソゲンを発現すること、または供給源細胞中で内因性フソゲンの発現を上方調節することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、供給源細胞の核を不活性化することを含む。

【0190】

実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、または 10^{15} 個のフソソームを含む。実施形態において、フソソーム組成物は、少なくとも10ml、20ml、50ml、100ml、200ml、500ml、1L、2L、5L、10L、20L、または50L含む。実施形態において、本方法は、例えば、化学的除核、機械的力の使用、例えば、フィルターもしくは遠心分離機の使用、細胞骨格の少なくとも部分的な破壊、またはそれらの組み合わせによって、哺乳動物細胞を除核することを含む。実施形態において、本方法は、供給源細胞中にフソゲンまたは他の膜タンパク質を発現させることを含む。実施形態において、本方法は、小胞形成、低張処理、押出、または遠心分離のうちの1つ以上を含む。実施形態において、本方法は、細胞中に外因性因子を遺伝的に発現させること、または細胞もしくはフソソームに外因性因子を負荷することを含む。実施形態において、本方法は、例えば、核を不活性化する前に、細胞(例えば供給源細胞)を除核することを含む。実施形態において、本方法は、例えば、核を不活性化する、例えば、細胞を除核する前または後に、細胞を、ポリペプチド剤をコードするRNAと接触させることを含む。実施形態において、本方法は、例えば、エレクトロポレーションによって、治療剤(例えば、核酸またはタンパク質)をフソソームに導入することを含む。

20

30

【0191】

実施形態において、フソソームは、例えば、免疫原性を低下させるために(例えば、ゲノム編集によって、例えば、MHCタンパク質またはMHC複合体を除去するために)改変ゲノムを有する哺乳動物細胞からのものである。実施形態において、供給源細胞は、抗炎症シグナルで処理された細胞培養物からのものである。実施形態において、本方法は、例えば、核を不活性化する、例えば、細胞を除核する前または後に、ステップa)の供給源細胞を、免疫抑制剤または抗炎症シグナルと接触させることをさらに含む。

40

【0192】

いくつかの実施形態において、検出可能なレベル、例えば基準値を超える値が決定される場合、複数のフソソームまたはフソソーム組成物を含む試料は、廃棄される。

【0193】

いくつかの実施形態において、第1のフソゲンは、リポペプチドではない。

【0194】

対象におけるレシピエント細胞の形成をもたらす標的細胞のフソソーム含有量(例えば、標的細胞へのフソソームの融合)を評価する方法のいくつかの実施形態において、本方

50

法は、対象から生物学的試料を収集することをさらに含む。実施形態において、生物学的試料は、1つ以上のレシピエント細胞を含む。

【0195】

対象における標的細胞のフソソーム含有量（例えば、標的細胞へのフソソームの融合）を評価する方法のいくつかの実施形態において、本方法は、例えば、遠心分離機によって、生物学的試料中のレシピエント細胞を生物学的試料中の融合されていないフソソームから分離することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、例えば、遠心分離機によって、生物学的試料中の融合されていないフソソームと比較して、レシピエント細胞を濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態において、本方法は、例えばFACSによって、生物学的試料中の非標的細胞と比較して、標的細胞を濃縮することをさらに含む。

10

【0196】

対象における標的細胞のフソソーム含有量（例えば、標的細胞へのフソソームの融合）を評価する方法のいくつかの実施形態において、フソソーム組成物に関する活性は、代謝産物の存在またはレベル、バイオマーカーの存在またはレベル（例えば、タンパク質レベルまたは翻訳後修飾、例えば、リン酸化または切断）から選択される。

【0197】

対象における標的細胞のフソソーム含有量（例えば、標的細胞へのフソソームの融合）を評価する方法のいくつかの実施形態において、フソソーム組成物に関連する活性は、免疫原性である。実施形態において、標的細胞は、CD3+細胞であり、生物学的試料は、対象から採取された血液試料である。実施形態において、血液細胞は、例えば緩衝塩化アンモニウム溶液を使用して、血液試料から濃縮される。実施形態において、濃縮された血液細胞は、抗CD3抗体（例えば、マウス抗CD3-FITC抗体）でインキュベートされ、CD3+細胞は、例えば、蛍光活性化細胞選別によって選択される。実施形態において、細胞、例えば選別された細胞、例えばCD3+細胞は、例えば、抗IgM抗体で染色することによって、細胞表面上の抗体の存在について分析される。いくつかの実施形態において、抗体が基準レベルを超えるレベルで存在する場合、対象は、レシピエント細胞に対する免疫応答を有すると特定される。

20

【0198】

実施形態において、免疫原性は、細胞溶解アッセイによってアッセイされる。実施形態において、生物学的試料からのレシピエント細胞は、他の細胞を溶解することができる免疫エフェクター細胞とインキュベートされる。実施形態において、免疫エフェクター細胞は、対象、またはフソソーム組成物を投与されていない対象からのものである。例えば、実施形態において、免疫原性は、PBMC細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、生物学的試料からのレシピエント細胞は、対象からの末梢血単核細胞（PBMC）、またはフソソーム組成物を投与されていない対象からの対照PBMCとインキュベートされ、次いで、PBMCによるレシピエント細胞の溶解について評価される。実施形態において、免疫原性は、ナチュラルキラー（NK）細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、対象からのNK細胞、またはフソソーム組成物を投与されていない対象からの対照NK細胞と共インキュベートされ、次いで、NK細胞によるレシピエント細胞の溶解について評価される。実施形態において、免疫原性は、CD8+T細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、対象からのCD8+T細胞、またはフソソーム組成物を投与されていない対象からの対照CD8+T細胞と共インキュベートされ、次いで、CD8+T細胞による標的細胞の溶解について評価される。いくつかの実施形態において、細胞溶解が基準レベルを超えるレベルで起こる場合、対象は、レシピエント細胞に対する免疫応答を有すると特定される。

30

40

【0199】

いくつかの実施形態において、免疫原性は、レシピエント細胞、例えばマクロファージの食作用によってアッセイされる。実施形態において、レシピエント細胞は、食作用のた

50

めにマクロファージによって標的化されない。実施形態において、生物学的試料は、対象から採取された血液試料である。実施形態において、血液細胞は、例えば緩衝塩化アンモニウム溶液を使用して、血液試料から濃縮される。実施形態において、濃縮された血液細胞は、抗CD3抗体（例えば、マウス抗CD3-FITC抗体）でインキュベートされ、CD3+細胞は、例えば、蛍光活性化細胞選別によって選択される。実施形態において、蛍光標識されたCD3+細胞は、マクロファージとインキュベートされ、次いで、例えばフローサイトメトリーによって、マクロファージ内の細胞内蛍光について試験される。いくつかの実施形態において、マクロファージの食作用が基準レベルを超えるレベルで起こる場合、対象は、レシピエント細胞に対する免疫応答を有すると特定される。

【0200】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、例えば、実施例54または124に記載されるように、標的細胞のフソソーム含有量、例えば、標的細胞によるフソソームの融合を測定または判定すること（例えば、融合が起こったかどうかを判定すること）を含む。実施形態において、検出可能なマーカーは、（例えば、フソソーム中のカーゴまたはペイロード分子にコンジュゲートされた）フソソーム中に存在し得る。カーゴまたはペイロードがタンパク質を含む実施形態において、カーゴまたはペイロードは、例えば、結合部分（例えば、抗体またはその抗原結合断片）を使用して直接検出され得る。ある特定の実施形態において、タンパク質ペイロードは、検出可能な部分、例えば、抗体分子によって特異的に結合され得る部分と関連付けられる（例えば、コンジュゲートされる）。カーゴまたはペイロードが核酸（例えば、DNAまたはmRNA）を含む実施形態において、カーゴまたはペイロードは、核酸にハイブリダイズすることができる核酸プローブを使用して、または核酸によってコードされるポリペプチドに特異的に結合することができる結合部分（例えば、抗体またはその抗原結合断片）を使用して検出され得る。実施形態において、標的細胞へのフソソームの融合は、検出可能なマーカーを検出することによって判定される。実施形態において、標的細胞へのフソソームの融合は、カーゴまたはペイロード（例えば、核酸カーゴまたはペイロードによってコードされるポリペプチドまたは非コードRNA）の発現を測定することによって判定される。実施形態において、標的細胞へのフソソームの融合は、カーゴまたはペイロード活性の下流マーカーを測定することによって判定される。いくつかの実施形態において、標的細胞またはレシピエント細胞は、標的細胞またはレシピエント細胞のフソゲン含有量、例えば、標的細胞によるフソソームの融合を測定または判定する前に、対象から単離される。実施形態において、標的細胞またはレシピエント細胞はまた、エンドソームまたはリソソーム色素または抗体で染色して、ペイロードがエンドソームまたはリソソーム中に存在するかどうかを判定される。いくつかの実施形態において、ペイロードは、エンドソームまたはリソソームと共局在しないか、またはペイロードの50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、または1%未満は、エンドソームまたはリソソームと共局在化する。実施形態において、レシピエント細胞はまた、細胞質、核、ミトコンドリア、または原形質膜の色素または抗体で染色して、ペイロードが、標的コンパートメント、例えば、細胞質、核、ミトコンドリア、または原形質膜と共局在化するかどうかを判定し、そのような実施形態において、ペイロードは、核、ミトコンドリア、または原形質膜と局在化し得る。

【0201】

実施形態において、本明細書のフソソームを製造する方法は、供給源細胞中でARRDC1またはその活性断片もしくはバリエーションを発現（例えば、過剰発現）させることを含む。実施形態において、本方法は、フソソームを、ARRDC1を発現する供給源細胞から分離することをさらに含む。実施形態において、本方法は、1mL当たり少なくとも 1.2×10^{11} 、 1.4×10^{11} 、 1.6×10^{11} 、 1.8×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 2.2×10^{11} 、 2.4×10^{11} 、 2.6×10^{11} 、または 2.8×10^{11} 個の粒子、例えば、1mL当たり最大約 3×10^{11} 個の粒子を得る。いくつかの実施形態において、本方法は、ARRDC1またはその活性断片またはバリエーションを発現しない、または過剰発現しない、他の同様の供給源細胞で実施される同じ方法よりも、1mL当

たり約 1.2、1.4、1.6、1.8、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 倍多く粒子を得る。いくつかの実施形態において、供給源細胞から生成されるフソソームは、標的細胞と接触した場合、ARRDC1 またはその活性断片またはバリエントを発現させること（例えば、過剰発現させること）を含み、例えば、顕微鏡アッセイ、例えば、実施例 170 のアッセイを使用して、ARRDC1 またはその活性断片またはバリエントを発現しない、または過剰発現しない、賢明な同様の供給源細胞から生成されるフソソームに少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、または 20 倍多い細胞で検出可能なカーゴ送達を生成する。

【0202】

列挙実施形態

1. 供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、複数のフソソームが、

- (a) 脂質二重層と、
- (b) サイトゾルを含む内腔であって、脂質二重層に囲まれている、内腔と、
- (c) 脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現したフソゲンと、
- (d) カーゴと、を含み、

フソソームは、核を含まず、

フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量は、総タンパク質の 1% 未満であり、

複数のフソソームは、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接触した場合、およびエンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団中の少なくとも 30% の数の細胞にカーゴを送達する。

【0203】

2. 参照標的細胞集団もしくは非標的細胞集団と比較して、標的細胞集団中の少なくとも 40%、50%、60%、70%、または 80% の数の細胞にカーゴを送達するか、または参照標的細胞集団もしくは非標的細胞集団と比較して、標的細胞集団に少なくとも 40%、50%、60%、70%、または 80% のカーゴを送達する、実施形態 1 に記載のフソソーム組成物。

【0204】

3. カーゴの 10% 未満がエンドサイトーシスによって細胞に入る、実施形態 1 または 2 に記載のフソソーム組成物。

【0205】

4. エンドサイトーシスの阻害剤が、リソソーム酸性化の阻害剤、例えばバフィロマイシン A1 である、実施形態 1～3 のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0206】

5. 送達されるカーゴが、エンドサイトーシス阻害アッセイ、例えば、実施例 90 または 135 のアッセイを使用して決定される、実施形態 1～4 のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0207】

6. カーゴが、ダイナミン非依存性経路またはリソソーム酸性化非依存性経路、マクロピノサイトーシス非依存性経路を通して細胞に入る（例えば、エンドサイトーシスの阻害剤は、例えば 25 μ M の濃度で、マクロピノサイトーシスの阻害剤、例えば 5-（N-エチル-N-イソプロピル）アミロライド（EIPA）である）、またはアクチン非依存性経路（例えば、エンドサイトーシスの阻害剤は、アクチン重合の阻害剤である場合、例えば 6 μ M の濃度で、ラトランキュリン B である）、実施形態 1～5 のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0208】

7. 複数のフソソームが標的化部分をさらに含む、実施形態 1～6 のいずれかに記載のフソソーム組成物。

10

20

30

40

50

【0209】

8. 標的化部分が、フソゲンに含まれるか、または別個の分子に含まれる、実施形態7に記載のフソソーム組成物。

【0210】

9. 複数のフソソームが、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団と接触する場合、
(i) カーゴが、非標的細胞よりも少なくとも10倍多くの標的細胞中に存在するか、または

(ii) カーゴが、非標的細胞および／または参照細胞よりも少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、または50倍多くの標的細胞中に存在する、実施形態1～8のいずれかに記載のフソソーム組成物。

10

【0211】

10. 複数のフソソームが、非標的細胞よりも少なくとも50%高い割合で標的細胞と融合する、実施形態1～9のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0212】

11. 供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、複数のフソソームが、

(a) 脂質二重層と、

(b) サイトゾルを含む内腔であって、脂質二重層によって囲まれている、内腔と、

(c) 脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現した再標的化フソゲンと、

(d) カーゴと、を含み、

20

フソソームは、核を含まず、

フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量は、総タンパク質の1%未満であり、

(i) 複数のフソソームが、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団と接触する場合、カーゴが、非標的細胞よりも少なくとも10倍多くの標的細胞中に存在するか、または少なくとも10倍多くのカーゴが、参照細胞集団よりも細胞集団に送達されるか、あるいは

(ii) 複数のフソソームが、非標的細胞よりも少なくとも50%高い割合で標的細胞と融合するか、または少なくとも50%多くのカーゴが、参照細胞集団と比較して、細胞集団に送達される、フソソーム組成物。

【0213】

30

12. カーゴの存在が、例えば、実施例124のアッセイを使用して、顕微鏡検査によって測定される、実施形態11に記載のフソソーム組成物。

【0214】

13. 融合が、例えば、実施例54のアッセイを使用して、顕微鏡検査によって測定される、実施形態11に記載のフソソーム組成物。

【0215】

14. 標的化部分が、標的細胞上の細胞表面マーカーに特異的である、実施形態7～13のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0216】

15. 細胞表面マーカーが、皮膚細胞、心筋細胞、肝細胞、腸細胞（例えば、小腸の細胞）、膵臓細胞、脳細胞、前立腺細胞、肺細胞、結腸細胞、または骨髄細胞の細胞表面マーカーである、実施形態14に記載のフソソーム組成物。

40

【0217】

16. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ラウドウイルス科フソゲン（例えば、VSV-G）、フィロウイルス科フソゲン、アレナウイルス科フソゲン、トガウイルス科フソゲン、フラビウイルス科フソゲン、ブニヤウイルス科フソゲン、またはヘパドナウイルス科フソゲン（例えば、Hep B）、またはそれらの誘導体を含む、実施形態11～15のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0218】

17. 複数のフソソームが、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接

50

触した場合、およびエンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、

(i) 参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団中の少なくとも30%数の細胞にカーゴを送達する、

(ii) 参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団に少なくとも30%のカーゴを送達する、または

(iii) 参照標的細胞集団と比較して、標的細胞集団に少なくとも30%多くのカーゴを送達する、実施形態7～16のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0219】

18. 標的細胞集団と接触した場合、エンドソームまたはリソソーム以外の標的細胞位置、例えば、サイトゾルにカーゴを送達する、実施形態1～17のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0220】

19. カーゴの50%、40%、30%、20%、または10%未満が、エンドソームまたはリソソームに送達される、実施形態18に記載のフソソーム組成物。

【0221】

20. フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量が、質量分析を使用して、例えば、実施例53または161のアッセイを使用して決定される、および／または

フソソーム組成物は、ウイルスマクロカプシドタンパク質を含まないか、またはウイルスマクロカプシドタンパク質の量は、例えば、質量分析によって、例えば、実施例53または161のアッセイを使用して、総タンパク質の10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、または0.1%未満である、実施形態1～19のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0222】

21. 複数のフソソームが、エキソソーム、微小胞、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態1～20のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0223】

22. 複数のフソソームが、少なくとも50nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1200nm、1400nm、または1500nmの平均サイズを有する、実施形態1～21のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0224】

23. 複数のフソソームが、100nm、80nm、60nm、40nm、または30nm未満の平均サイズを有する、実施形態1～21のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0225】

24. 供給源細胞が、好中球、HEK293細胞、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、実施形態1～23のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0226】

25. 複数のフソソームが、細胞生物学的製剤を含む、実施形態1～24のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0227】

26. 複数のフソソームが、除核細胞を含む、実施形態1～25のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0228】

27. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、哺乳動物フソゲンを含む、実施形態1～26のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0229】

28. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ウイルス性フソゲンを含む、実施形態1～27のいずれかに記載のフソソーム組成物。

10

20

30

40

50

【0230】

29. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、4～5、5～6、6～7、7～8、8～9、または9～10のpHで活性である、実施形態1～28のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0231】

30. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、4～5、5～6、6～7、7～8、8～9、または9～10のpHで活性ではない、実施形態1～29のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0232】

31. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、タンパク質フソゲンである、実施形態1～30のいずれかに記載のフソソーム組成物。

10

【0233】

32. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ニパウイルスタンパク質F、麻疹ウイルスFタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFタンパク質、パラミクソウイルスFタンパク質、ヘンドラウイルスFタンパク質、ヘニパウイルスFタンパク質、モルビリウイルスFタンパク質、レスピロウイルスFタンパク質、センダイウイルスFタンパク質、ルブラウイルスFタンパク質、またはアブラウイルスFタンパク質、またはそれらの誘導体を含む、実施形態1～31のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0234】

33. フソゲンが、1フソソーム当たり少なくとも2、5、または10コピーのコピー数で存在する、実施形態1～32のいずれかに記載のフソソーム組成物。

20

【0235】

34. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ニパウイルスタンパク質G、麻疹タンパク質H、ツパイアパラミクソウイルスHタンパク質、パラミクソウイルスGタンパク質、パラミクソウイルスHタンパク質、パラミクソウイルスHNタンパク質、モルビリウイルスHタンパク質、レスピロウイルスHNタンパク質、センダイHNタンパク質、ルブラウイルスHNタンパク質、アブラウイルスHNタンパク質、またはそれらの誘導体を含む、実施形態1～33のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0236】

35. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質またはFおよびHタンパク質またはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはそれらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む、実施形態1～34のいずれかに記載のフソソーム組成物。

30

【0237】

36. カーゴが、外因性タンパク質または外因性核酸を含む、実施形態1～35のいずれかに記載のフソソーム組成物。

40

【0238】

37. カーゴが、細胞質タンパク質または膜タンパク質を含むか、またはそれをコードする、実施形態1～36のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0239】

38. カーゴが、治療剤を含む、実施形態1～37のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0240】

39. カーゴが、1フソソーム当たり少なくとも1、2、5、10、20、50、100、または200コピー（例えば、1フソソーム当たり最大約1,000コピー）のコピ

50

一数で存在する、実施形態1～38のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0241】

40. フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）のコピー数とカーゴのコピー数の比が、1000:1～1:1、500:1～1:1、250:1～1:1、150:1～1:1、100:1～1:1、75:1～1:1、50:1～1:1、25:1～1:1、20:1～1:1、15:1～1:1、10:1～1:1、5:1～1:1、2:1～1:1、または1:1～1:2である、実施形態1～39のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0242】

41.

a) フソソーム組成物が、例えば、質量分析アッセイによって、約100～10,000、500～5,000、1000～5000、2000～4000、2500～3500、2900～2930、2910～2915、もしくは2912.0のフソゲンとCD63の比率を有するか、または

b) フソソーム組成物が、約5～35、10～30、15～25、16～19、18～19、もしくは18.6のタンパク質カーゴとCD63の比率であるか、または

c) フソソーム中のタンパク質の15%、20%、または25%未満が、エキソソームタンパク質である、のうちの1つ以上である、実施形態1～40のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0243】

42.

a) フソゲンが、例えば、質量分析アッセイによって、フソソーム中の総タンパク質の約1～30%、5～20%、10～15%、12～15%、13～14%、または13.6%を含む、

b) フソゲンが、例えば、質量分析アッセイによって、約20～120、40～100、50～90、60～80、65～75、68～70、または69のGAPDHに対する比率を有する、

c) フソゲンが、例えば、質量分析アッセイによって、約200～900、300～800、400～700、500～600、520～590、530～580、540～570、550～560、または558.4のCNXに対する比率を有する、

d) フソソーム中のタンパク質の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%が、リボソームタンパク質であるか、またはフソソーム中のタンパク質の約1%～20%、3%～15%、5%～12.5%、7.5%～11%、8.5%～10.5%、または9%～10%が、リボソームタンパク質である、のうちの1つ以上である、実施形態1～41のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0244】

43. 供給源細胞が、ARRDC1またはその活性断片またはバリエーションを発現する（例えば、過剰発現する）、実施形態1～42のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0245】

44. 例えば、質量分析アッセイによって、約1～3、1～10、1～100、3～100、4～9、5～8、6～7、15～100、60～200、80～180、100～160、120～140、3～100、4～100、5～100、6～100、15～100、80～100、3～200、4～200、5～200、6～200、15～200、80～200、100～200、120～200、300～1000、400～900、500～800、600～700、640～690、650～680、660～670、100～10,000、または約664.9のフソゲンとARRDC1の比率を有する、実施形態1～43のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0246】

45. 総タンパク質含有量の割合としてARRDC1のレベルは、少なくとも約0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、

10

20

30

40

50

5 %、10 %、15 %、20 %、または25 %であるか、または、総タンパク質含有量の割合としてARRDC1のレベルは、約0.01～25 %、0.5～20 %、2～15 %、または5～10 %である、実施形態1～44のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0247】

46. 例えば、質量分析アッセイ、例えば、実施例162のアッセイを使用して、約1,000～10,000、2,000～5,000、3,000～4,000、3,050～3,100、3,060～3,070、または約3,064のフソゲンとts g 101の比率を有する、実施形態1～45のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0248】

47. 例えば、質量分析アッセイ、例えば、実施例163のアッセイを使用して、約10～30、15～25、18～21、19～20、または19.5のフソゲンとts g 101の比率を有する、実施形態1～46のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0249】

48. 総タンパク質含有量の割合としてTSG101のレベルは、少なくとも約0.001 %、0.002 %、0.003 %、0.004 %、0.005 %、0.006 %、または0.007 %であるか、または総タンパク質含有量の割合としてTSG101のレベルは、約0.001～0.01、0.002～0.006、0.003～0.005、または0.004である、実施形態1～47のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0250】

49.

- e) 医薬品または適正製造基準 (GMP) の基準を満たしている、
- f) 適正製造基準 (GMP) に従って作製された、
- g) 所定の基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、実質的に病原体を含まない、あるいは
- h) 所定の基準値を下回る汚染物質レベルを有する、例えば、実質的に汚染物質を含まない、実施形態1～48のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0251】

50. 4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80、または-160℃未満の温度である、実施形態1～49のいずれかに記載のフソソーム組成物。

【0252】

51. 先行する実施形態のいずれかのフソソーム組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【0253】

52. カーゴが、治療剤を含む、実施形態51に記載の薬学的組成物。

【0254】

53. 対象に治療剤を送達する方法であって、対象に、実施形態52に記載の薬学的組成物を投与することを含み、フソソーム組成物が、治療剤が送達されるような量および／または時間で投与される、方法。

【0255】

54. フソソーム組成物を製造する方法であって、

- a) 実施形態1～50のいずれかに記載のフソソーム組成物を提供することと、
- b) 対象への投与に適した薬学的組成物としてフソソームを製剤化することと、を含む、方法。

【0256】

55. フソソーム組成物を製造する方法であって、

- a) 実施形態1～50のいずれかに記載のフソソーム組成物を提供することと、
- b) (i) 免疫原性分子、(ii) 病原体、または (iii) 汚染物質、の因子のうちの1つ以上の存在またはレベルを決定するために、複数からの1つ以上のフソソームをアッセイすることと、
- c) 因子のうちの1つ以上が、基準値を下回っている場合、複数のフソソームまたはフ

10

20

30

40

50

ソソーム組成物の放出を承認することと、を含む、方法。

【0257】

56. 供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、複数のフソソームが、

(a) 脂質二重層と、

(b) 脂質二重層によって囲まれている内腔と、

(c) 外因性または過剰発現したフソゲンであって、脂質二重層内に配置されている、フソゲンと、

(d) カーゴと、を含み、

フソソームが、核を含まず、

i) フソゲンが、少なくとも1,000コピーのコピー数で存在する、

ii) フソソームが、少なくとも1,000コピーのコピー数の治療剤を含む、

iii) フソソームが、CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGのうちの1つ以上が供給源細胞中の対応する脂質レベルの75%以内である脂質を含む、

iv) フソソームが、供給源細胞のプロテオーム組成物と同様のプロテオーム組成物を含む、

v) フソソームが、シグナル伝達、例えば、細胞外シグナルを送信すること、例えば、インスリンに応答するAKTリン酸化反応、または例えば、陰性対照、例えばインスリンの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも10%多い、インスリンに応答するグルコース（例えば、標識グルコース、例えば2-NBDG）の取り込みを可能にする、

vi) フソソームが、組織、例えば、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、胃腸管、腎臓、精巣、卵巣、脳、生殖器官、中枢神経系、末梢神経系、骨格筋、内皮、内耳、または眼を標的とし、対象、例えば、マウスに投与される場合、投与されたフソソームの集団中のフソソームの少なくとも0.1%または10%が、24時間後に標的組織中に存在するか、または

vii) 供給源細胞は、好中球、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、のうちの1つ以上（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つ）である。

【0258】

57. ウイルスカプシドタンパク質またはDNA組み込みポリペプチドを含む、実施形態56に記載のフソソーム組成物。

【0259】

58. カーゴが、ウイルスゲノムを含む、実施形態56に記載のフソソーム組成物。

【0260】

59. 例えば、遺伝子療法のために、例えば、標的細胞のゲノムを安定的に修飾するために、核酸を標的細胞に送達することができる、実施形態56に記載のフソソーム組成物。

【0261】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0262】

特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を持つ。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。例えば、本明細書で、例えば、本明細書の任意の表内において言及されるすべてのGenBank、UniGene、およびEntrez配列は、参照により組み込まれる。特に明記しない限り、本明細書の任意の表内を含む本明細書に特定した配列受入番号は、2017年5月8日現在のデータベースエントリを指す。1つの遺

10

20

30

40

50

伝子またはタンパク質が複数の配列受入番号を参照する場合、配列バリエーションのすべてが包含される。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであり、限定することを意図しない。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、前記複数のフソソームが、

(a) 脂質二重層と、

(b) サイトソルを含む内腔であって、前記脂質二重層によって囲まれている、内腔と、

(c) 前記脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現したフソゲンと、

(d) カーゴと、を含み、

前記フソソームが、核を含まず、

前記フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量が、総タンパク質の 1 % 未満であり、

前記複数のフソソームが、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接触した場合、および前記エンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、前記参照標的細胞集団と比較して、前記標的細胞集団中の少なくとも 30 % の数の細胞に前記カーゴを送達するか、または前記参照標的細胞集団と比較して、前記標的細胞集団に少なくとも 30 % 多くの前記カーゴを送達する、フソソーム組成物。

(項目 2)

前記参照標的細胞集団と比較して、前記標的細胞集団中の少なくとも 40 %、50 %、60 %、70 %、または 80 % の数の細胞に前記カーゴを送達するか、または前記参照標的細胞集団と比較して、前記標的細胞集団に少なくとも 40 %、50 %、60 %、70 %、または 80 % 多くの前記カーゴを送達する、項目 1 に記載のフソソーム組成物。

(項目 3)

カーゴの 10 % 未満がエンドサイトーシスによって前記細胞に入る、項目 1 または 2 に記載のフソソーム組成物。

(項目 4)

前記エンドサイトーシスの阻害剤が、リソソーム酸性化の阻害剤、例えばバフィロマイシン A1 である、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 5)

送達されるカーゴが、エンドサイトーシス阻害アッセイ、例えば、実施例 135 のアッセイを使用して決定される、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 6)

カーゴが、ダイナミン非依存性経路またはリソソーム酸性化非依存性経路、マクロピノサイトーシス非依存性経路、またはアクチン非依存性経路を通して前記細胞に入る、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 7)

前記複数のフソソームが標的化部分をさらに含む、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 8)

前記標的化部分が、フソゲンに含まれるか、または別個の分子に含まれる、項目 7 に記載のフソソーム組成物。

(項目 9)

前記複数のフソソームが、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団と接触した場合、前記カーゴが、非標的細胞よりも少なくとも 10 倍多くの標的細胞中に存在するか、または少なくとも 10 倍多くの前記カーゴが、前記参照標的細胞集団と比較して、前記標的細胞集団中に存在する、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 10)

前記複数のフソソームが、非標的細胞または参照細胞よりも少なくとも 50 % 高い割合

10

20

30

40

50

で標的細胞と融合する、項目 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 1)

供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、前記複数のフソソームが、

(a) 脂質二重層と、

(b) サイトゾルを含む内腔であって、前記内腔が脂質二重層によって囲まれている、内腔と、

(c) 前記脂質二重層内に配置された外因性または過剰発現した再標的化フソゲンと、

(d) カーゴと、を含み、

前記フソソームが、核を含まず、

前記フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量が、総タンパク質の 1 % 未満であり、

(i) 前記複数のフソソームが、標的細胞および非標的細胞を含む細胞集団と接触する場合、前記カーゴが、非標的細胞もしくは参照細胞よりも少なくとも 10 倍多くの標的細胞中に存在するか、または

(i i) 前記複数のフソソームが、非標的細胞または参照細胞よりも少なくとも 50 % 高い割合で標的細胞と融合する、フソソーム組成物。

(項目 1 2)

カーゴの存在が、例えば、実施例 1 2 4 のアッセイを使用して、顕微鏡検査によって測定される、項目 1 1 に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 3)

融合が、例えば、実施例 5 4 のアッセイを使用して、顕微鏡検査によって測定される、項目 1 1 に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 4)

前記標的化部分が、前記標的細胞上の細胞表面マーカーに特異的である、項目 7 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 5)

前記細胞表面マーカーが、皮膚細胞、心筋細胞、肝細胞、腸細胞（例えば、小腸の細胞）、膵臓細胞、脳細胞、前立腺細胞、肺細胞、結腸細胞、または骨髄細胞の細胞表面マーカーである、項目 1 4 に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 6)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ラブドウイルス科フソゲン（例えば、V S V - G）、フィロウイルス科フソゲン、アレナウイルス科フソゲン、トガウイルス科フソゲン、フラビウイルス科フソゲン、ブニヤウイルス科フソゲン、またはヘパドナウイルス科フソゲン（例えば、H e p B）、またはそれらの誘導体を含む、項目 1 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 7)

前記複数のフソソームが、エンドサイトーシスの阻害剤の存在下で標的細胞集団と接触した場合、および前記エンドサイトーシスの阻害剤で処理されていない参照標的細胞集団と接触した場合、前記参照標的細胞集団と比較して、前記標的細胞集団中の少なくとも 30 % の数の細胞に前記カーゴを送達する、項目 7 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 8)

標的細胞集団と接触した場合、エンドソームまたはリソソーム以外の標的細胞位置、例えば、前記サイトゾルにカーゴを送達する、項目 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 1 9)

前記カーゴの 50 %、40 %、30 %、20 %、または 10 % 未満が、エンドソームまたはリソソームに送達される、項目 1 8 に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 0)

前記フソソーム組成物中のウイルスカプシドタンパク質の量が、質量分析を使用して、例えば、実施例 5 3 のアッセイを使用して決定される、項目 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 1)

複数のフソソームが、エキソソーム、微小胞、またはそれらの組み合わせを含む、項目 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 2)

前記複数のフソソームが、少なくとも 5 0 n m、1 0 0 n m、2 0 0 n m、5 0 0 n m、1 0 0 0 n m、1 2 0 0 n m、1 4 0 0 n m、または 1 5 0 0 n m の平均サイズを有する、項目 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 3)

前記複数のフソソームが、1 0 0 n m、8 0 n m、6 0 n m、4 0 n m、または 3 0 n m 未満の平均サイズを有する、項目 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 4)

前記供給源細胞が、好中球、H E K 2 9 3 細胞、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、項目 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 5)

前記複数のフソソームが、細胞生物学的製剤を含む、項目 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 6)

前記複数のフソソームが、除核細胞を含む、項目 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 7)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、哺乳動物フソゲンを含む、項目 1 ～ 2 6 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 8)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ウイルスフソゲンを含む、項目 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 2 9)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、4 ～ 5、5 ～ 6、6 ～ 7、7 ～ 8、8 ～ 9、または 9 ～ 1 0 の p H で活性である、項目 1 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 0)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、4 ～ 5、5 ～ 6、6 ～ 7、7 ～ 8、8 ～ 9、または 9 ～ 1 0 の p H で活性ではない、項目 1 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 1)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、タンパク質フソゲンである、項目 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 2)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ニパウイルスタンパク質 F、麻疹ウイルス F タンパク質、ツパイアパラミクソウイルス F タンパク質、パラミクソウイルス F タンパク質、ヘンドラウイルス F タンパク質、ヘニパウイルス F タンパク質、モルビリウイルス F タンパク質、レスピロウイルス F タンパク質、センダイウイルス F タンパク質、ルブラウイルス F タンパク質、またはアブラウイルス F タンパク質、またはそれらの誘導体を含む、項目 1 ～ 3 1 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 3)

前記フソゲンが、1 フソソーム当たり少なくとも 1 0 コピーのコピー数で存在する、項

10

20

30

40

50

目 1 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 4)

前記複数のフソソームが、ニパウイルスタンパク質 G、麻疹タンパク質 H、ツパイアパラミクソウイルス H タンパク質、パラミクソウイルス G タンパク質、パラミクソウイルス H タンパク質、パラミクソウイルス H N タンパク質、モルビリウイルス H タンパク質、レスピロウイルス H N タンパク質、センダイ H N タンパク質、ルブラウイルス H N タンパク質、アブラウイルス H N タンパク質、またはそれらの誘導体をさらに含む、項目 1 ～ 3 3 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 5)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）が、ニパウイルス F および G タンパク質、麻疹ウイルス F および H タンパク質、ツパイアパラミクソウイルス F および H タンパク質、パラミクソウイルス F および G タンパク質または F および H タンパク質または F および H N タンパク質、ヘンドラウイルス F および G タンパク質、ヘニパウイルス F および G タンパク質、モルビリウイルス F および H タンパク質、レスピロウイルス F および H N タンパク質、センダイウイルス F および H N タンパク質、ルブラウイルス F および H N タンパク質、またはアブラウイルス F および H N タンパク質、またはそれらの誘導体、またはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む、項目 1 ～ 3 4 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 6)

前記カーゴが、外因性タンパク質または外因性核酸を含む、項目 1 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 7)

前記カーゴが、細胞質タンパク質または膜タンパク質を含むか、またはそれをコードする、項目 1 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 8)

前記カーゴが、治療剤を含む、項目 1 ～ 3 7 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 3 9)

前記カーゴが、1 フソソーム当たり少なくとも 1、2、5、10、20、50、100、または 200 コピー（例えば、1 フソソーム当たり最大約 1,000 コピー）のコピー数で存在する、項目 1 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 4 0)

前記フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）のコピー数と前記カーゴのコピー数の比が、1000:1～1:1、500:1～1:1、250:1～1:1、150:1～1:1、100:1～1:1、75:1～1:1、50:1～1:1、25:1～1:1、20:1～1:1、15:1～1:1、10:1～1:1、5:1～1:1、2:1～1:1、または 1:1～1:2 である、項目 1 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 4 1)

a) 前記フソソーム組成物が、例えば、質量分析アッセイによって、約 100～10,000、500～5,000、1000～5000、2000～4000、2500～3500、2900～2930、2910～2915、もしくは 2912.0 のフソゲンと CD63 の比率を有するか、または

b) 前記フソソーム組成物が、約 5～35、10～30、15～25、16～19、18～19、もしくは 18.6 のタンパク質カーゴと CD63 の比率であるか、または

c) 前記フソソーム中の前記タンパク質の 15%、20%、もしくは 25% 未満が、エキソソームタンパク質である、のうちの 1 つ以上である、項目 1 ～ 4 0 のいずれか 1 項に記載のフソソーム組成物。

(項目 4 2)

a) 前記フソゲンが、例えば、質量分析アッセイによって、フソソーム中の総タンパク質の約 1～30%、5～20%、10～15%、12～15%、13～14%、または 1

10

20

30

40

50

3. 6%を含む、

b) フソゲンが、例えば、質量分析アッセイによって、約20~120、40~100、50~90、60~80、65~75、68~70、または69のGAPDHに対する比率を有する、

c) フソゲンが、例えば、質量分析アッセイによって、約200~900、300~800、400~700、500~600、520~590、530~580、540~570、550~560、または558.4のCNXに対する比率を有する、

d) 前記フソソーム中の前記タンパク質の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%が、リボソームタンパク質であるか、または前記フソソーム中の前記タンパク質の約1%~20%、3%~15%、5%~12.5%、7.5%~11%、8.5%~10.5%、または9%~10%が、リボソームタンパク質である、うちの1つ以上である、項目1~41のいずれか1項に記載のフソソーム組成物。

10

(項目43)

a) 医薬品または適正製造基準(GMP)の基準を満たしている、

b) 適正製造基準(GMP)に従って作製された、

c) 所定の基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、実質的に病原体を含まない、あるいは

d) 所定の基準値を下回る汚染物質レベルを有する、例えば、実質的に汚染物質を含まない、項目1~42のいずれか1項に記載のフソソーム組成物。

(項目44)

20

4、0、-4、-10、-12、-16、-20、-80、または-160℃未満の温度である、項目1~43のいずれか1項に記載のフソソーム組成物。

(項目45)

先行する項目のいずれかに記載のフソソーム組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

(項目46)

前記カーゴが、治療剤を含む、項目45に記載の薬学的組成物。

(項目47)

対象に治療剤を送達する方法であって、前記対象に、項目46に記載の薬学的組成物を投与することを含み、前記フソソーム組成物が、前記治療剤が送達されるような量および/または時間で投与される、方法。

30

(項目48)

フソソーム組成物を製造する方法であって、

a) 項目1~44のいずれか1項に記載のフソソーム組成物を提供することと、

b) 対象への投与に適した薬学的組成物として前記フソソームを製剤化することと、を含む、方法。

(項目49)

フソソーム組成物を製造する方法であって、

a) 項目1~44のいずれか1項に記載のフソソーム組成物を提供することと、

b) (i) 免疫原性分子、(ii) 病原体、または(iii) 汚染物質、の因子のうちの1つ以上の存在またはレベルを決定するために、前記複数からの1つ以上のフソソームをアッセイすることと、

40

c) 前記因子のうちの1つ以上が、基準値を下回っている場合、前記複数のフソソームまたはフソソーム組成物の放出を承認することと、を含む、方法。

(項目50)

供給源細胞に由来する複数のフソソームを含むフソソーム組成物であって、前記複数のフソソームが、

(a) 脂質二重層と、

(b) 前記脂質二重層によって囲まれている内腔と、

(c) 外因性または過剰発現したフソゲンであって、前記脂質二重層内に配置されてい

50

る、フソゲンと、

(d) カーゴと、を含み、

前記フソソームが、核を含まず、

v i i i) 前記フソゲンが、少なくとも1, 000コピーのコピー数で存在する、

i x) 前記フソソームが、少なくとも1, 000コピーのコピー数で治療剤を含む、

x) 前記フソソームが、CL、Cer、DAG、HexCer、LPA、LPC、LPE、LPG、LPI、LPS、PA、PC、PE、PG、PI、PS、CE、SM、およびTAGのうちの1つ以上が前記供給源細胞中の前記対応する脂質レベルの75%以内である脂質を含む、

x i) 前記フソソームが、供給源細胞のプロテオーム組成物と同様のプロテオーム組成物を含む、

x i i) 前記フソソームが、シグナル伝達、例えば、細胞外シグナルを送信すること、例えば、インスリンに応答するAKTリン酸化反応、または例えば、陰性対照、例えばインスリンの非存在下で他の同様のフソソームよりも少なくとも10%多い、インスリンに応答するグルコース（例えば、標識グルコース、例えば2-NBDG）の取り込みを可能にする、

x i i i) 前記フソソームが、組織、例えば、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、胃腸管、腎臓、精巣、卵巣、脳、生殖器官、中枢神経系、末梢神経系、骨格筋、内皮、内耳、または眼を標的とし、対象、例えば、マウスに投与される場合、投与されたフソソームの集団中の前記フソソームの少なくとも0.1%または10%が、24時間後に前記標的組織中に存在するか、または

x i v) 前記供給源細胞が、好中球、顆粒球、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、誘導多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄芽球、筋芽細胞、肝細胞、またはニューロン、例えば、網膜神経細胞から選択される、のうちの1つ以上（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つ）である、フソソーム組成物。

(項目51)

ウイルスカプシドタンパク質またはDNA組み込みポリペプチドを含む、項目50に記載のフソソーム組成物。

(項目52)

前記カーゴが、ウイルスゲノムを含む、項目50に記載のフソソーム組成物。

(項目53)

例えば、遺伝子療法のために、例えば、前記標的細胞の前記ゲノムを安定的に修飾するために、核酸を標的細胞に送達することができる、項目50に記載のフソソーム組成物。

【図面の簡単な説明】

【0263】

本発明の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むとよりよく理解されるであろう。本発明を例示する目的で、本明細書に記載の図面には、現在例示されている特定の実施形態が示されている。しかしながら、本発明は、図面に示される実施形態の正確な配置および手段に限定されないことが、理解されるべきである。

【0264】

【図1】小胞体用色素によるフソソームの染色を定量化する。

【図2】ミトコンドリア用色素によるフソソームの染色を定量化する。

【図3】リソソーム用色素によるフソソームの染色を定量化する。

【図4】F-アクチン用色素によるフソソームの染色を定量化する。

【図5】CreおよびGFPを発現するフソゲンと接触した細胞の光退色後のGFP蛍光の回復を示すグラフである。

【図6】フソソームまたは陰性対照との接触後にRFPを発現する標的細胞の割合を示すグラフである。

【図7】ドナーHeLa細胞とレシピエントHeLa細胞との間での融合を介した陽性オルガネラ送達の画像である。白で示された細胞内領域は、ドナーのミトコンドリアとレシ

10

20

30

40

50

ピエントのミトコンドリアとの間での重複を示す。灰色の細胞内領域は、ドナーおよびレシピエントのオルガネラが重複しない場所を示す。

【図 8】ドナー H e L a 細胞とレシピエント H e L a 細胞との間での融合を介した陽性オルガネラ送達の画像である。白で示された細胞内領域は、ドナーのミトコンドリアとレシピエントのミトコンドリアとの間での重複を示す。灰色の細胞内領域は、ドナーおよびレシピエントのオルガネラが重複しない場所を示す。

【図 9】フソソームを注射したマウスから指示された組織の顕微鏡画像を示す。白は、R F P 蛍光細胞を表し、インビボでの細胞へのタンパク質カーゴの送達を示す。

【図 10】指示された投与経路によりインビボでのマウス組織へのフソソームの成功した送達を示す一連の画像であり、標的化細胞によるルシフェラーゼの発現をもたらす。

10

【図 11】マウス筋肉組織の t d T o m a t o 蛍光の顕微鏡画像を示し、細胞生物学による筋肉細胞へのタンパク質カーゴの送達を示す。

【図 12】タンパク質が増強し、除核された V S V - G H e L a 細胞を使用して、レシピエント H e L a R h o O 細胞にミトコンドリアの送達を示すグラフである。

【図 13】巨大原形質膜フソソームの生成および単離を示す一連の画像である。

【図 14 A】示されているように、C r e リコンビナーゼを担持するフソソームでインキュベートし、様々なサイズの細孔を有する膜を通して押し出すことにより生成された H E K 2 9 3 T 細胞における R F P の発現を示すグラフである。

【図 14 B】親細胞およびフソソームの A F 4 8 8 の E u : 4 8 8 陽性事象（左パネル）および中央値蛍光強度（M F I ; 右パネル）を示す一連のグラフである。

20

【図 14 C】親細胞およびフソソームの A F 6 4 7 の E d u : 6 4 7 陽性事象および中央値蛍光強度を示す一連のグラフである。

【図 14 D】3、5、および 24 時間にわたるポリメラーゼアクチンに対するフソソームおよび親細胞の能力を示すグラフである。

【図 15】脂質二重層構造を有するフソソームを示す電子顕微鏡画像である。

【図 16】ウエスタンブロットによる V S V - G 発現の検出を示す図である。「+対照」は、V S V - G でトランスフェクトした 2 9 3 T 細胞を表す。「-対照」は、トランスフェクトされていない 2 9 3 T 細胞を表す。

【図 17 A】サブミクロンのフソソームの測定パラメーターおよび設定を示す表である。

【図 17 B】超ミクロンのフソソームの測定パラメーターおよび設定を示す表である。

30

【図 17 C】N T A および顕微鏡によって測定されるように、フソソームおよび親細胞のサイズ分布を示す一連のグラフである。

【図 17 D】N T A および顕微鏡によって測定されるように、フソソームおよび親細胞の平均直径を示す表である。

【図 18】N T A および顕微鏡によって測定されるように、フソソームおよび親細胞のサイズ分布統計を示す表である。

【図 19】フソソームおよび親細胞の平均サイズおよび体積を示す表である。

【図 20】フソソーム内のオルガネラの検出を示す一連のグラフである。（A）小胞体、（B）ミトコンドリア、（C）リソソーム。

【図 21】フソソームまたは細胞調製において観察された可溶性：不溶性の比を示す一連の図である。

40

【図 22】標的細胞または非標的細胞への M v H (C D 8) + F フソソーム融合、および標的融合の絶対量を示す一連の図である。

【図 23】フソソームで処置した P C 3 細胞での h O x 4 0 L の発現を示す図である。

【図 24】V S V - G フソソームの 2 - N B D G 平均蛍光強度を示す図である。

【図 25】V S V - G フソソームのサイトゾルのエステラーゼ活性を示す図である。

【図 26 A】フソソームを注射したマウスの組織におけるホタルルシフェラーゼシグナルの持続性を示す一連の図である。（A）F V B マウスのフソソームで処置した（右脚）と P B S で処置した（左脚）の腹部画像および発光シグナル。左側は、画像および発光シグナルのオーバーレイであり、右側は、発光シグナルのみである。（B）フソソームで処置

50

したTA（黒四角）、PBSで処置したTA（白丸）、マウスバックグラウンド（黒六角形）、およびステージバックグラウンド（白六角形）の全磁束シグナル。yスケールは、 $\log 10$ スケールである。フソソームで処置した脚は、処置から1時間後（ $p < 0.0001$ ）、6時間後（ $p < 0.01$ ）、および12時間後（ $p < 0.01$ ）、著しく大きなシグナルを有した。

【図26B】同上。

【図27A】マウスにおける生物発光画像によって検出されるように、フソソームによるCreリコンビナーゼの送達を示す一連の図である。（A）IVフソソームで処置したマウスの露出肝臓および脾臓の腹側画像および発光シグナルオーバーレイ（1倍および3倍の濃度）。下部は発光シグナルのみである。（B）フソソームを標的とした脾臓および肝臓の全磁束シグナル；yスケールは、 $\log 10$ スケールである。3倍濃度のフソソームで処置したマウスは、処置から72時間後のバックグラウンドよりも脾臓において著しく大きなシグナルを有した（ $p = 0.0004$ ）。

【図27B】同上。

【図28A】生物発光画像によって検出されるフソソームによるマウス肝臓および脾臓へのCreリコンビナーゼを示す一連の図である。（A）左から右へ；殺処分から5分以内に収集および画像化された、切除された肝臓、心臓、肺、腎臓、小腸、脾臓、および脾臓の背側画像および発光シグナルのオーバーレイ。下部は発光シグナルのみである。（B）フソソームを標的とした脾臓および肝臓および他の組織の全フラックスシグナル；yスケールは、 $\log 10$ スケールである。3倍濃度のフソソーム処理で処置したマウスは、最も低いシグナルを有する組織（心臓）と比較して、脾臓でのシグナルが有意に大きかった（ $p < 0.0001$ ）。

【図28B】同上。

【図29】非エンドサイトーシス経路を介したNivG+FフソソームによるCreカーゴの送達を示す表である。

【図30】エンドサイトーシス経路を介したVSV-GフソソームによるCreカーゴの送達を示す一連の画像である。

【図31】Syn1 HeLa細胞フソソームを使用して、レシピエントHeLa Rhodamine細胞への機能的ミトコンドリアの送達を示すグラフである。

【図32】フソソームを介したレシピエント細胞へのDNAのインビトロ送達を示す一連の画像である。

【図33】フソソームを介したレシピエント細胞へのmRNAのインビトロ送達を示す一連の画像である。

【図34A】フソソームを使用して、マウスの組織への蛍ルシフェラーゼをコードするmRNAのインビボ送達を示す一連の図である。（A）FVBマウスのフソソームで処置した（右脚）とPBSで処置した（左脚）の腹部画像および発光シグナル。左側は、画像および発光シグナルのオーバーレイであり、右側は、発光シグナルのみである。（B）フソソームで処置したTA（黒四角）、PBSで処置したTA（白丸）、マウスバックグラウンド（黒六角形）、およびステージバックグラウンド（白六角形）の全磁束シグナル。yスケールは、 $\log 10$ スケールである。フソソームで処置した脚は、処置から1時間後（ $p < 0.0001$ ）、6時間後（ $p < 0.01$ ）、および12時間後（ $p < 0.01$ ）、著しく大きなシグナルを有した。

【図34B】同上。

【図35】フソソームを介したレシピエント細胞へのタンパク質のインビトロ送達を示す一連の画像である。

【図36A】フソソームを使用して、マウスの組織へのCreリコンビナーゼタンパク質のインビボ送達を示す一連の図である。（A）左から右へ；腹部に露出した処置済みTAの発光シグナルおよびマウスの画像、および発光シグナルのみ。（B）処置済みの脚対未治療の脚、バックグラウンド（マウス胸部）、およびステージバックグラウンドの合計フラックス；yスケールは、 $\log 10$ スケールである。

【図36B】同上。

【図37】超音波処理によりロードされたフソソームを介したレシピエント細胞へのm i R F P 6 7 0 DNAの送達を示す一連の図である。

【図38】超音波処理によりロードされたフソソームを介したレシピエント細胞へのB S A - A F 6 4 7 タンパク質の送達を示す一連の図である。

【図39】フソソームゴーストのサイズ分布および濃度を示すヒストグラムである。

【図40】親細胞およびフソソームのE d u : 6 4 7 陽性事象およびA F 6 4 7 の中央値蛍光強度を示す一連のグラフである。

【図41】フソソームおよび親細胞においてビシンコニン酸アッセイにより測定されたG A P D H : 総タンパク質の比率を示すグラフである。

【図42】フソソームおよび親細胞においてビシンコニン酸アッセイにより測定された脂質 : タンパク質の比率を示すグラフである。

【図43】フソソームおよび親細胞においてビシンコニン酸アッセイにより測定されたタンパク質 : DNAの比率を示すグラフである。

【図44】フソソームおよび親細胞においてビシンコニン酸アッセイにより測定された脂質 : DNAの比率を示すグラフである。

【図45】ダイナミン阻害剤D y n a s o r e の存在下または非存在下でのV S V - G フソソームによる細胞内へのC r e の送達を示す一連の画像である。

【図46】エキソソームおよびフソソームにおけるエキソソームマーカーC D 6 3 のタンパク質レベルを示すグラフである。

【図47】フソソームおよび親細胞で検出されたカルネキシンシグナルの強度を示すグラフである。

【図48】フソソームおよび親細胞について決定された脂質 : DNAの比率を示すグラフである。

【図49A】親細胞、エキソソーム、およびフソソームにおける総脂質の割合として脂質種の比率を示す一連のグラフである。

【図49B】同上。

【図50】示されているように、特定のコンパートメントに関連するタンパク質に関する親細胞、エキソソーム、およびフソソームのタンパク質含有量を示す一連のグラフである。

【図51】親細胞、エキソソーム、およびフソソームにおける総タンパク質含有量の割合としてA R R D C 1 (左パネル) またはT S G 1 0 1 (右パネル) のレベルを示す一連のグラフである。

【図52A】アレスチンドメイン含有タンパク質1 (A R R D C 1) を、C r e を内包するフソソームの生成物に組み込む効果を示す一連のグラフである。(A) A R R D C 1 の存在下または非存在下で生成されたフソソームとのインキュベーション後に検出されたR F P 陽性細胞の割合。(B) A R R D C 1 の存在下または非存在下で生成されたフソソームに対してナノ粒子追跡分析 (f N T A) を使用して検出された1 m L 当たりの粒子数。

【図52B】同上。

【発明を実施するための形態】

【0265】

本発明は、フソゲンを含む天然由来または設計された二脂質膜を記載している。

【0266】

定義

本明細書で使用される、「細胞膜」は、細胞、例えば、供給源細胞または標的細胞に由来する膜を指す。

【0267】

本明細書で使用される、「コンドリソーム」は、天然の細胞または組織起源のミトコンドリアネットワークから由来および単離または精製された細胞内装置である。「コンドリソーム調製物」は、生物活性(細胞または組織と相互作用するか、または細胞もしくは組織に影響を与えることができる)および/または薬学的活性を有する。

10

20

30

40

50

【0268】

本明細書で使用される、「細胞生物学的製剤」とは、内腔および細胞膜を含む細胞の一部、または部分的もしくは完全な核不活性化を有する細胞を指す。いくつかの実施形態において、細胞生物学的製剤は、細胞骨格成分、オルガネラ、およびリボソームのうちの1つ以上を含む。実施形態において、細胞生物学的製剤は、除核細胞、微小胞、または細胞ゴーストである。

【0269】

本明細書で使用される、「サイトゾル」は、細胞の細胞質の水性成分を指す。サイトゾルは、タンパク質、RNA、代謝産物、およびイオンを含んでもよい。

【0270】

本明細書で使用される、「外因性薬剤」とは、i) 内在性タンパク質と比較して（例えば、挿入、欠失、または置換によって）変更された配列を有するタンパク質など、天然には存在しない、または、ii) 外因性物質が配置されているフソソームの天然に存在する供給源細胞には天然に存在しない、薬剤を指す。

【0271】

本明細書で使用される、「融合」とは、2つの膜で囲まれた内腔の間に相互作用を作り出すこと、例えば、2つの膜の融合を促進すること、または2つの内腔の間に接続、例えば孔を作り出すことを指す。

【0272】

本明細書で使用される、「フソゲン」とは、2つの膜で囲まれた内腔の間の相互作用を作り出す薬剤または分子を指す。実施形態において、フソゲンは、膜の融合を促進する。他の実施形態において、フソゲンは、2つの内腔（例えば、フソソームの内腔と標的細胞の細胞質）との間に接続、例えば、孔を作り出す。いくつかの実施形態において、フソゲンは、例えば、いずれのタンパク質も融合活性を単独で有していない、2つ以上のタンパク質の複合体を含む。いくつかの実施形態において、フソゲンは、標的化ドメインを含む。

【0273】

本明細書で使用される、「フソゲン結合パートナー」とは、フソゲンと相互作用して、2つの膜の間の融合を促進する薬剤または分子を指す。いくつかの実施形態において、フソゲン結合パートナーは、細胞の表面特徴であり得るか、またはそれを含み得る。

【0274】

本明細書で使用される、「フソソーム」とは、膜封入調製物および両親媒性脂質二重層と相互作用するフソゲンを指す。

【0275】

本明細書で使用される、「フソソーム組成物」とは、1つ以上のフソソームを含む組成物を指す。

【0276】

本明細書で使用される、「膜封入調製物」とは、内腔または空洞内のカーゴを囲んでいる両親媒性脂質二重層を指す。いくつかの実施形態において、カーゴは、内腔または空洞に対して外因性である。他の実施形態において、カーゴは、内腔または空洞に対して内因性、例えば、供給源細胞に対して内因性である。

【0277】

本明細書で使用される、「ミトコンドリア生物発生」は、ミトコンドリアのバイオマスを増加させるプロセスを示す。ミトコンドリア生物発生には、細胞中のミトコンドリアの数および／またはサイズを増加させることが含まれる。

【0278】

本明細書で使用される、「精製された」という用語は、自然状態から変更または取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物に自然に存在する細胞または細胞断片は、「精製されて」いないが、その自然状態の共存材料から部分的または完全に分離された同じ細胞または細胞断片は、「精製されて」いる。精製されたフソソーム組成物は、実質的に純粋な形態で存在することができるか、または例えば、細胞を含む培養培地などの培

10

20

30

40

50

養培地などの非天然の環境に存在することができる。

【0279】

本明細書で使用される、「再標的化されたフソゲン」とは、天然に存在する形態のフソゲンの一部ではない配列を有する標的化部分を含むフソゲンを指す。実施形態において、フソゲンは、天然に存在する形態のフソゲンにおける標的化部分と比較して、異なる標的化部分を含む。実施形態において、天然に存在する形態のフソゲンは、標的化ドメインを欠いており、再標的化フソゲンは、天然に存在する形態のフソゲンに存在しない標的化部分を含む。実施形態において、フソゲンは、標的化部分を含むように改変される。実施形態において、フソゲンは、例えば、膜貫通ドメイン、融合活性ドメイン、または細胞質ドメインにおいて、天然に存在する形態のフソゲンと比較して、標的化部分の外側に1つ以上の配列変異を含む。

10

【0280】

本明細書で使用される、「供給源細胞」（「親細胞」と交換可能に使用される）とは、フソソームが由来する細胞を指す。

【0281】

フソソーム

いくつかの態様では、本明細書に記載のフソソーム組成物および方法は、フソゲンを含む膜封入調製物、例えば、天然由来のまたは操作された脂質膜を含む。いくつかの態様では、本開示は、非植物細胞、例えば、哺乳動物細胞、またはそれらの誘導体（例えば、ミトコンドリア、コンドリソーム、オルガネラ、小胞、または除核細胞）の一部を提供し、これには、フソゲン、例えば、タンパク質、脂質、および化学的フソゲンが含まれる。

20

【0282】

カプセル化

本明細書に記載の組成物および方法のいくつかの実施形態において、フソソーム、例えば、フソゲンを有する、天然由来のまたは操作された両親媒性脂質の二重層が含まれる。そのような組成物は、驚くべきことに、本発明の方法に使用することができる。いくつかの例では、膜は、Ahmad et al. 2014 Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. EMBO Journal. 33 (9) : 994-1010に記載されるように、自己、同種異系、異種、または操作された細胞の形をとり得る。いくつかの実施形態において、組成物は、例えば、Orive. et al. 2015. Cell encapsulation: technical and clinical advances. Trends in Pharmacology Sciences; 36 (8) : 537-46、およびMishra. 2016. Handbook of Encapsulation and Controlled Release. CRC Pressに記載されているような、操作された膜を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、天然に存在する膜を含む (McBride et al. 2012. A Vesicular Transport Pathway Shuttles Cargo from mitochondria to lysosomes. Current Biology 22: 135-141)。

30

【0283】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物は、天然由来の膜、例えば、細胞または組織から調製された膜小胞を含む。一実施形態において、フソソームは、MSCまたは星状細胞からの小胞である。

【0284】

一実施形態において、フソソームは、エキソソームである。

【0285】

例示的なエキソソームおよび他の膜封入体は、例えば、US 2016137716（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態に

50

において、フソソームは、例えば、細胞から得られる小胞、例えば、微小胞、エキソソーム、アポトーシス体（アポトーシス細胞から）、微粒子（例えば、血小板に由来し得る）、エクソソーム（*ectosome*）（例えば、血清中の好中球および単球から誘導することができる）、プロスタトソーム（*prostatosome*）（前立腺がん細胞から得ることができる）、カルディオソーム（*cardiosome*）（心臓細胞から誘導することができる）などを含む。

【0286】

例示的なエキソソームおよび他の膜封入体はまた、WO／2017／161010、WO／2016／077639、US20160168572、US20150290343、およびUS20070298118に記載されており、これらのそれぞれは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞外小胞、ナノ小胞、またはエキソソームを含む。実施形態において、フソソームは、細胞外小胞、例えば、内部空間を取り囲み、それが由来する細胞よりも小さい直径を有する膜を含む細胞由来の小胞を含む。実施形態において、細胞外小胞は、20nm～1000nmの直径を有する。実施形態において、フソソームは、アポトーシス体、細胞の断片、直接的または間接的な操作による細胞に由来する小胞、小胞化されたオルガネラ、および生細胞によって（例えば、直接的な原形質膜の出芽または原形質膜を有する後期エンドソームの融合によって）生成された小胞を含む。実施形態において、細胞外小胞は、生きているまたは死んだ生物、外植された組織または器官、または培養細胞に由来する。実施形態において、フソソームは、ナノ小胞、例えば、内部空間を取り囲む膜を含む細胞由来の小さい（例えば、直径20～250nm、または直径30～150nm）小胞を含み、これは、直接的または間接的な操作によって前記小胞から生成される。ナノ小胞の生成は、場合によっては、供給源細胞の破壊を引き起こし得る。ナノ小胞は、脂質または脂肪酸およびポリペプチドを含み得る。実施形態において、フソソームは、エキソソームを含む。実施形態において、エキソソームは、内部空間を取り囲む膜を含む細胞由来の小さい（例えば、直径20～300nm、または直径40～200nm）小胞であり、直接的な原形質膜の出芽または原形質膜を有する後期エンドソームの融合によって前記細胞から生成される。実施形態において、エキソソームの生成は、供給源細胞の破壊をもたらさない。実施形態において、エキソソームは、脂質または脂肪酸およびポリペプチドを含む。

【0287】

例示的なエキソソームおよび他の膜封入体はまた、US20160354313（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）にも記載されている。実施形態において、フソソームは、生体適合性送達モジュール、エキソソーム（例えば、直径約30nm～約200nm）、微小胞（例えば、直径約100nm～約2000nm）、アポトーシス体（例えば、直径約300nm～約2000nm）、膜粒子、膜小胞、エキソソーム様小胞、エクソソーム様小胞、エクソソーム、またはエキソベシクル（*exovesicle*）を含む。

【0288】

一実施形態において、フソソームは、微小胞である。いくつかの実施形態において、微小胞は、直径が約10～10,000nmの間の細胞内または細胞外小胞である。いくつかの実施形態において、微小胞は、細胞から自然に放出され、いくつかの実施形態において、細胞は、小胞の形成を促進するために処理される。一実施形態において、フソソームは、エキソソームである。場合によっては、エキソソームは、直径約30～100nmである。いくつかの実施形態において、エキソソームは、多小胞体から生成される。いくつかの実施形態において、細胞は、エキソソームの形成を促進するために処理される。一実施形態において、フソソームは、細胞ゴーストである。一実施形態において、小胞は、原形質膜小胞、例えば、巨大な原形質膜小胞である。

【0289】

フソソームは、いくつかの異なるタイプの脂質、例えば、リン脂質などの両親媒性脂質から作製され得る。フソソームは、最外表面として脂質二重層を含んでもよい。この二重

10

20

30

40

50

層は、同じまたは異なるタイプの1つ以上の脂質で構成されてもよい。例には、ホスホコリンおよびホスホイノシトールなどのリン脂質が含まれるが、これらに限定されない。特定の例には、DMP C、DOP C、およびDSP Cが含まれるが、これらに限定されない。

【0290】

フソソームは、主に、天然のリン脂質と、1, 2-ジステアロリル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン(DSP C)、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリン、およびモノシアロガングリオシドなどの脂質と、からなり得る。実施形態において、フソソームは、リン脂質のみを含み、血漿中での安定性が低い。しかしながら、コレステロールによる脂質膜の操作は、実施形態において、安定性を高め、血漿へのカプセル化された生物活性化合物の急速な放出を減らすことができる。いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、安定性を高めるために、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)を含む(例えば、総説についてはSpuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi: 10.1155/2011/469679を参照のこと)。

【0291】

いくつかの実施形態において、フソソームは、膜の湾曲に影響する脂質を含むか、または濃縮されている(例えば、Thiam et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 14(12):775-785, 2013を参照のこと)。いくつかの脂質は、小さな親水性頭部と大きな疎水性尾部を有し、これは、局所領域に集中することによって融合孔の形成を促進する。いくつかの実施形態において、フソソームは、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ジグリセリド(DAG)、ホスファチジン酸(PA)、脂肪酸(FA)などの負曲率の脂質を含むか、または濃縮されている。いくつかの実施形態において、フソソームは、リゾホスファチジルコリン(LPC)、ホスファチジルイノシトール(PtdIns)、リゾホスファチジル酸(LPA)、リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)、モノアシルグリセロール(MAG)などの正曲率の脂質を含まないか、枯渇しないか、またはほとんど含まない。

【0292】

いくつかの実施形態において、脂質は、フソソームに添加される。いくつかの実施形態において、脂質は、フソソームの形成前または形成中に、脂質をそれらの膜に組み込む培養中の供給源細胞に添加される。いくつかの実施形態において、脂質は、リボソームの形態で細胞またはフソソームに添加される。いくつかの実施形態において、メチル-β-シクロデキストラン(mβ-CD)を使用して、脂質を濃縮または枯渇させる(例えば、Kainu et al, Journal of Lipid Research, 51(12):3533-3541, 2010を参照のこと)。

【0293】

フソソームは、限定されないが、DOPE(ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)、DOTMA、DOTAP、DOTIM、DDABを単独で、またはコレステロールと一緒に含むことで、DOPEおよびコレステロール、DOTMAおよびコレステロール、DOTAPおよびコレステロール、DOTIMおよびコレステロール、ならびにDDABおよびコレステロールを含み得る。多重膜小胞脂質の調製のための方法は、当該技術分野で知られている(例えば、米国特許第6,693,086号を参照されたく、多重膜小胞脂質調製に関する教示は参照により本明細書に組み込まれる)。脂質膜が水溶液と混合されるときに、フソソームの形成は自発的になり得るが、ホモジナイザー、ソニケーター、または押出装置を使用することによって、振とうする形で力を加えることによって促進することもできる(総説についてはSpuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi: 10.1155/2011/469679を参照のこと)。押し出された脂質は、Templeton et al., Natu

re Biotech, 15:647-652, 1997 (押し出された脂質調製に関連する教示は、参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるように、サイズを小さくするフィルターを通して押し出すことによって調製することができる。

【0294】

別の実施形態において、脂質は、フソソームを形成するために使用することができる。DLin-KC2-DMA4、C12-200、補脂質ジステオイルホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG-DMGを含むが、これらに限定されない、脂質は、自発的な小胞形成手順を使用して製剤化され得る(例えば、Novobrantseva, Molecular Therapy-Nucleic Acids (2012) 1, e4; doi:10.1038/mtna.2011.3を参照のこと)。Tekmiraの刊行物には、脂質小胞および脂質小胞製剤の様々な態様が記載されている(例えば、米国特許第7,982,027号、同第7,799,565号、同第8,058,069号、同第8,283,333号、同第7,901,708号、同第7,745,651号、同第7,803,397号、同第8,101,741号、同第8,188,263号、同第7,915,399号、同第8,236,943号、および同第7,838,658号、ならびに欧州特許第1766035号、同第1519714号、同第1781593号、および同第1664316号を参照のこと)、これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれ、本発明に使用および/または適合され得る。

10

【0295】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるフソソームは、1つ以上のポリマーを含み得る。ポリマーは、生分解性であり得る。生分解性ポリマー小胞は、当該技術分野で公知の方法を使用して合成され得る。ポリマー小胞を合成するための例示的な方法は、Bershteyn et al., Soft Matter 4:1787-1787, 2008およびUS2008/0014144 A1によって記載されており、微粒子合成に関する特定の教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0296】

使用することができる例示的な合成ポリマーには、脂肪族ポリエステル、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(乳酸)(PLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、乳酸とグリコール酸(PLGA)のコポリマー、ポリカルプロラクトン(PCL)、ポリ無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、およびポリ(ラクチド-コ-カプロラクトン)、ならびに天然ポリマー、例えば、アルブミン、アルギン酸塩、および他の多糖類(デキストランおよびセルロースを含む)、コラーゲン、それらの化学誘導体(化学基(例えば、アルキル、アルキレン)の置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者によって通常なされる他の修飾)、アルブミンおよび他の親水性タンパク質、ゼインおよびその他プロラミンおよび疎水性タンパク質、これらのコポリマーおよび混合物が含まれるが、これらに限定されない。一般に、これらの材料は、酵素加水分解またはインビボでの水への曝露、表面侵食またはバルク侵食によって分解する。

30

【0297】

フソゲン

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソーム(例えば、小胞または細胞の一部を含む)は、例えば、膜、例えば細胞膜へのフソソームの融合を促進するために、1つ以上のフソゲンを含む。また、これらの組成物は、1つ以上のフソゲンを含むために、合成中または合成後になされる表面修飾を含んでもよく、例えば、フソゲンは、標的細胞に相補的であってもよい。表面修飾は、膜への修飾、例えば、膜への脂質またはタンパク質の挿入を含み得る。

40

【0298】

いくつかの実施形態において、フソソームは、特定の細胞または組織タイプ(例えば、心筋細胞)を標的とするために、(例えば、細胞膜に統合された)それらの外部表面上に1つ以上のフソゲンを含む。フソゲンには、タンパク質ベース、脂質ベース、および化学

50

ベースのフソゲンが含まれるが、これらに限定されない。フソゲンは、標的細胞の表面上のパートナーに結合し得る。いくつかの実施形態において、フソゲンを含むフソソームは、膜を標的細胞の脂質二重層に統合するであろう。

【0299】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の1つ以上のフソゲンは、フソソームに含まれ得る。

【0300】

タンパク質フソゲン

いくつかの実施形態において、フソゲンは、タンパク質フソゲン、例えば、哺乳動物タンパク質または哺乳動物タンパク質のホモログ（例えば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性を有する）、ウイルスタンパク質またはウイルスタンパク質のホモログなどの非哺乳類動物タンパク質（例えば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性を有する）、天然タンパク質または天然タンパク質の誘導体、合成タンパク質、その断片、そのバリエーション、フソゲンまたは断片のうちの1つ以上を含むタンパク質フソゲン、およびそれらの任意の組み合わせを含む。

【0301】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、フソソーム中の脂質と標的細胞中の脂質との間の混合をもたらす。いくつかの実施形態において、フソゲンは、フソソームの内腔と標的細胞のサイトゾルとの間に1つ以上の孔の形成をもたらす、例えば、フソソームは、本明細書に記載のコネキシンであるか、またはそれを含む。

【0302】

哺乳動物タンパク質

いくつかの実施形態において、フソゲンは、哺乳動物タンパク質を含んでもよい（表1を参照）。哺乳動物フソゲンの例には、vSNAREおよびtSNAREなどのSNAREファミリーのタンパク質、シンシチン-1（DOI:10.1128/JVI.76.13.6442-6452.2002）およびシンシチン-2などのシンシチンタンパク質、ミオメーカ（biorxiv.org/content/early/2017/04/02/123158、doi.org/10.1101/123158、doi:10.1096/fj.201600945R、doi:10.1038/nature12343）、ミオミキサー（www.nature.com/nature/journal/v499/n7458/full/nature12343.html、doi:10.1038/nature12343）、ミオマージャー（science.sciencemag.org/content/early/2017/04/05/science.aam9361、DOI:10.1126/science.aam9361）、FGFRL1（線維芽細胞成長因子受容体様1）、Minion（doi.org/10.1101/122697）、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）のアイソフォーム（例えば、US6,099,857Aに開示されている）、コネキシン43、コネキシン40、コネキシン45、コネキシン32、またはコネキシン37などのギャップ結合タンパク質（例えば、US2007/0224176に開示されている）、Hap2、異種細胞間でシンシチウム形成を誘導可能な任意のタンパク質（表2を参照）、フソゲン特性を有する任意のタンパク質（表3を参照）、そのホモログ、その断片、そのバリエーション、および1つ以上のタンパク質またはそれらの断片を含むタンパク質融合体が含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フソゲンは、ヒトゲノムに見られるヒト内在性レトロウイルス要素（HERV）によってコードされる。追加の例示的なフソゲンは、US6,099,857AおよびUS2007/0224176に開示されており、これらの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1：ヒトおよび非ヒトフソゲンの非限定的な例。

ヒトおよび非ヒトフソゲンのクラス		
Uniprot Protein		
フソゲンクラス	Family ID	配列の数
EFF-AFF	PF14884	191
SNARE	PF05739	5977
DC-STAMP	PF07782	633
ENV	PF00429	312

10

【表 2 - 1】

表 2：フソゲン特性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

以下の遺伝子オントロジー注釈付きのヒト遺伝子：	
原形質膜融合タンパク質によるシンシチウム形成	
ID	記号
A0A024R0I0	DYRK1B
A0A024R1N1	MYH9
A0A024R2D8	CAV3
A0A096LNV2	FER1L5
A0A096LPA8	FER1L5
A0A096LPB1	FER1L5
A0AVI2	FER1L5
A6NI61	TMEM8C (ミオメーカー)
B3KSL7	—
B7ZLI3	FER1L5
H0YD14	MYOF
O43184	ADAM12
O60242	ADGRB3
O60500	NPHS1
O95180	CACNA1H
O95259	KCNH1
P04628	WNT1
P15172	MYOD1
P17655	CAPN2
P29475	NOS1

20

30

40

50

【表 2 - 2】

P 3 5 5 7 9	MYH9
P 5 6 5 3 9	CAV3
Q 2 N N Q 7	FER1L5
Q 4 K M G 0	CDON
Q 5 3 G L 0	PLEKHO1
Q 5 T C Z 1	SH3PXD2A
Q 6 Y H K 3	CD109
Q 8 6 V 2 5	VASH2
Q 9 9 6 9 7	PITX2
Q 9 C 0 D 5	TANC1
Q 9 H 2 9 5	DCSTAMP
Q 9 N Z M 1	MYOF
Q 9 Y 4 6 3	DYRK1B

10

【表 3 - 1】

20

表 3 : ヒトフソゲン候補

フソゲンクラス	遺伝子ID
SNARE	O 1 5 4 0 0
	Q 1 6 6 2 3
	K 7 E Q B 1
	Q 8 6 Y 8 2
	E 9 P N 3 3
	Q 9 6 N A 8
	H 3 B T 8 2
	Q 9 U N K 0
	P 3 2 8 5 6
	Q 1 3 1 9 0
	O 1 4 6 6 2
	P 6 1 2 6 6
	O 4 3 7 5 2
	O 6 0 4 9 9
	Q 1 3 2 7 7
	B 7 Z B M 8
	A 0 A V G 3
	Q 1 2 8 4 6
DC-STAMP	Q 9 H 2 9 5

30

40

50

【表 3 - 2】

	Q 5 T 1 A 1
	Q 5 T 1 9 7
	E 9 P J X 3
	Q 9 B R 2 6
ENV	Q 9 U Q F 0
	Q 9 N 2 K 0
	P 6 0 5 0 7
	P 6 0 6 0 8
	B 6 S E H 9
	P 6 0 5 0 8
	B 6 S E H 8
	P 6 1 5 5 0
	P 6 0 5 0 9
	Q 9 N 2 J 8
筋融合（ミオメーカー）	H 0 Y 5 B 2
	H 7 C 1 S 0
	Q 9 H C N 3
	A 6 N D V 4
	K 4 D I 8 3
筋融合（ミオミキサー）	NP_001302423. 1
	ACT64390. 1
	XP_018884517. 1
	XP_017826615. 1
	XP_020012665. 1
	XP_017402927. 1
	XP_019498363. 1
	ELW65617. 1
	ERE90100. 1
	XP_017813001. 1
	XP_017733785. 1
	XP_017531750. 1
	XP_020142594. 1
	XP_019649987. 1
	XP_019805280. 1
	NP_001170939. 1

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

	NP__001170941. 1
	XP__019590171. 1
	XP__019062106. 1
	EPQ04443. 1
	EPY76709. 1
	XP__017652630. 1
	XP__017459263. 1
	OBS58441. 1
	XP__017459262. 1
	XP__017894180. 1
	XP__020746447. 1
	ELK00259. 1
	XP__019312826. 1
	XP__017200354. 1
	BAH40091. 1
HA	P03452
	Q9Q0U6
	P03460
ギャップ結合	P36382
	P17302
	P36383
	P08034
	P35212
その他	FGFRL1
	GAPDH

10

20

30

【0303】

いくつかの実施形態において、フソソームは、曲率生成タンパク質、例えば、エプシン1、ダイナミン、またはBARドメインを含むタンパク質を含む。例えば、Kozlov et al, CurrOp StrucBio 2015、Zimmerberget al. Nat Rev 2006、Richard et al, Biochem J 2011を参照のこと。

40

【0304】

非哺乳動物タンパク質

ウイルスタンパク質

いくつかの実施形態において、フソゲンは、非哺乳動物タンパク質、例えば、ウイルスタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、ウイルスフソゲンは、クラスEウイルス膜融合タンパク質、クラスEウイルス膜タンパク質、クラスEウイルス膜融合タンパク質、ウイルス膜糖タンパク質、または他のウイルス融合タンパク質、またはそれらのホモログ、それらの断片、それらのバリエーション、または1つ以上のタンパク質もしくはそれらの断片を含むタンパク質融合体である。

【0305】

50

いくつかの実施形態において、クラスⅠウイルス膜融合タンパク質には、バキュロウイルスFタンパク質、例えば、核多角体ウイルス(NPV)属のFタンパク質、例えば、*Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) Fタンパク質および*Lymantiria dispar* MNPV (LdMNPV)、およびパラミクソウイルスFタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

【0306】

いくつかの実施形態において、クラスⅡウイルス膜タンパク質には、ダニ骨脳炎E(TBEV E)、セムリキ森林熱ウイルスE1/E2が含まれるが、これらに限定されない。

【0307】

いくつかの実施形態において、クラスⅢウイルス膜融合タンパク質には、ラブドウイルスG(例えば、水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)の膜融合タンパク質G)、ヘルペスウイルス糖タンパク質B(例えば、単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)gB)、エプスタインバーウイルス糖タンパク質B(EBV gB)、トゴトウイルスG、バキュロウイルスgp64(例えば、*Autographa California multiple* NPV (AcMNPV) gp64)、およびボルナ病ウイルス(BDV)糖タンパク質(BDV G)が含まれるが、これらに限定されない。

【0308】

他のウイルスフソゲン、例えば、膜糖タンパク質およびウイルス融合タンパク質の例には、インフルエンザ血球凝集素(HA)などのウイルス合胞体タンパク質または変異体、またはその融合タンパク質；ヒト免疫不全ウイルス1型エンベロープタンパク質(HIV-1 ENV)、リンパ球合胞体を形成するためにHIV結合LFA-1からのgp120、HIV gp41、HIV gp160、またはHIV転写のトランス活性化因子(TAT)；ウイルス糖タンパク質VSV-G、ラブドウイルス科の水疱性口内炎ウイルスからのウイルス糖タンパク質；水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の糖タンパク質gBおよびgH-gL；マウス白血病ウイルス(MLV)-10A1；テナガザル白血病ウイルス糖タンパク質(GaLV)；狂犬病、モコラ、水疱性口内炎ウイルス、およびトガウイルスのG型糖タンパク質；マウス肝炎ウイルスJHM表面投影タンパク質；ブタ呼吸器コロナウイルススパイクおよび膜糖タンパク質；鳥類伝染性気管支炎スパイク糖タンパク質およびその前駆体；ウシ腸内コロナウイルススパイクタンパク質；麻疹ウイルスのFおよびH、HNまたはG遺伝子；イヌジステンパーウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス3、シミアンウイルス41、センダイウイルス、およびヒト呼吸器合胞体ウイルス；シャペロンタンパク質gLを含むヒトヘルペスウイルス1型およびサル水痘ウイルスのgH；ヒト、ウシ、およびセルコピチシンヘルペスウイルスgB；フレンドマウス白血病ウイルスおよびメイソンファイザーサルウイルスのエンベロープ糖タンパク質；流行性耳下腺炎ウイルス血球凝集素ノイラミニダーゼ、ならびに糖タンパク質F1およびF2；ベネズエラマ脳脊髄炎からの膜糖タンパク質；パラミクソウイルスFタンパク質；SIV gp160タンパク質；エボラウイルスGタンパク質；またはセンダイウイルス融合タンパク質、またはそのホモログ、その断片、そのバリエーション、および1つ以上のタンパク質またはそれらの断片を含むタンパク質融合体が含まれるが、これらに限定されない。

【0309】

非哺乳動物フソゲンには、ウイルスフソゲン、そのホモログ、その断片、および1つ以上のタンパク質またはそれらの断片を含む融合タンパク質が含まれる。ウイルスフソゲンには、クラスⅠフソゲン、クラスⅡフソゲン、クラスⅢフソゲン、およびクラスⅣフソゲンが含まれる。実施形態において、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) gp41などのクラスⅠフソゲンは、中央コイルドコイル構造を有するαヘリックスヘアピンの特徴的な三量体との特徴的な融合後構造を有する。クラスⅠウイルス融合タンパク質には、中央融合後6ヘリックスバンドルを有するタンパク質が含まれる。クラスⅠウイルス融合タンパク質には、インフルエンザHA、パラインフルエンザF、HIV Env、エボラG

10

20

30

40

50

P、オルトミクソウイルスからのヘマグルチニン、パラミクソウイルスからのFタンパク質（例えば、麻疹、（Kato et al. BMC Biotechnology 2010、10：37））、レトロウイルスからのENVタンパク質、およびフィロウイルスおよびコロナウイルスのフソゲンが含まれる。実施形態において、デングE糖タンパク質などのクラスEウイルスフソゲンは、折り畳まれてヘアピンの三量体をもたらす細長い細胞外ドメインを形成するβシートの構造的特徴を有する。実施形態において、クラスEウイルスフソゲンは、中央コイルドコイルを欠いている。クラスEウイルスフソゲンは、アルファウイルス（例えばE1タンパク質）およびフラビウイルス（例えばE糖タンパク質）に見られ得る。クラスEウイルスフソゲンには、セムリキ森林ウイルス、シンビス、風疹ウイルス、およびデング熱ウイルスからのフソゲンが含まれる。実施形態において、水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質などのクラスEウイルスフソゲンは、クラスIおよびIIに見られる構造的特徴を組み合わせる。実施形態において、クラスEウイルスフソゲンは、αヘリックス（例えば、クラスEウイルスフソゲンと同様にタンパク質を折り返す6ヘリックスバンドルを形成する）、およびクラスEウイルスフソゲンを連想させる、両親媒性融合ペプチドをその末端に有するβシートを含む。クラスEウイルスフソゲンは、ラブドウイルスおよびヘルペスウイルスに見られ得る。実施形態において、クラスIVウイルスフソゲンは、非エンベロープレオウイルスによってコードされる、融合関連小膜貫通（FAST）タンパク質である（doi：10.1038/sj.emboj.7600767, Nesbitt, Rae L., “Targeted Intracellular Therapeutic Delivery Using Liposomes Formulated with Multifunctional FAST proteins” (2012). Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 388）。実施形態において、クラスIVウイルスフソゲンは、ヘアピンを形成しないほど十分に小さい（doi：10.1146/annurev-cellbio-101512-122422、doi：10.1016/j.devcel.2007.12.008）。

【0310】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、パラミクソウイルスフソゲンである。いくつかの実施形態において、フソゲンは、ニパウイルスタンパク質F、麻疹ウイルスFタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFタンパク質、パラミクソウイルスFタンパク質、ヘンドラウイルスFタンパク質、ヘニパウイルスFタンパク質、モルビリウイルスFタンパク質、レスピロウイルスFタンパク質、センダイウイルスFタンパク質、ルブラウイルスFタンパク質、またはアブラウイルスFタンパク質である。

【0311】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、ボックスウイルス科フソゲンである。

【0312】

さらなる例示的なフソゲンは、US9,695,446、US2004/0028687、US6,416,997、US7,329,807、US2017/0112773、US2009/0202622、WO2006/027202、およびUS2004/0009604（これらのすべての全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0313】

他のタンパク質

いくつかの実施形態において、フソゲンは、pH依存性（例えば、虚血性傷害の場合のように）タンパク質、そのホモログ、その断片、および1つ以上のタンパク質またはそれらの断片を含むタンパク質融合体を含み得る。フソゲンは、細胞表面またはエンドソームまたは別の細胞膜結合空間における膜融合を媒介し得る。

【0314】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、EFF-1、AFF-1、ギャップ結合タンパク質、例えば、コネキシン（Cn43、GAP43、CX43など）（DOI：10

10

20

30

40

50

．1021/jacs.6b05191)、他の腫瘍結合タンパク質、そのホモログ、その断片、そのバリエーション、および1つ以上のタンパク質またはそれらの断片を含むタンパク質融合体を含む。

【0315】

タンパク質フソゲンの修飾

タンパク質フソゲンは、融合タンパク質または標的化タンパク質（例えば、血球凝集素タンパク質）のアミノ酸残基を変異させることによって再標的化され得る。いくつかの実施形態において、フソゲンは、ランダムに変異している。いくつかの実施形態において、フソゲンは、合理的に変異している。いくつかの実施形態において、フソゲンは、指向進化に供される。いくつかの実施形態において、フソゲンは、切断され、ペプチドのサブセットのみがフソソームで使用される。例えば、麻疹血球凝集素タンパク質のアミノ酸残基を変異させて、タンパク質の結合特性を変更し、融合の方向を変えることができる（doi:10.1038/nbt942, Molecular Therapy vol. 16 no. 8, 1427-1436 Aug. 2008, doi:10.1038/nbt1060, DOI:10.1128/JVI.76.7.3558-3563.2002, DOI:10.1128/JVI.75.17.8016-8020.2001, doi:10.1073/pnas.0604993103）。

【0316】

タンパク質フソゲンは、標的化部分を融合タンパク質または標的化タンパク質（血球凝集素タンパク質など）に共有結合させることによって再標的化され得る。いくつかの実施形態において、フソゲンおよび標的化部分は、標的化部分に連結されたフソゲンを含むキメラタンパク質の発現によって共有結合している。標的は、標的細胞に提示される任意のペプチド（例えば受容体）を含む。いくつかの例では、標的は、非標的細胞よりも標的細胞でより高いレベルで発現される。例えば、単鎖可変断片（scFv）を、フソゲンにコンジュゲートして、scFv結合標的（doi:10.1038/nbt1060, DOI 10.1182/blood-2012-11-468579, doi:10.1038/nmeth.1514, doi:10.1006/mthe.2002.0550, HUMAN GENE THERAPY 11:817-826, doi:10.1038/nbt942, doi:10.1371/journal.pone.0026381, DOI 10.1186/s12896-015-0142-z）を提示する細胞に対する融合活性を再指向し得る。例えば、設計されたアンキリン反復タンパク質（DARPin）を、フソゲンにコンジュゲートして、DARPin結合標的（doi:10.1038/mt.2013.16, doi:10.1038/mt.2010.298, doi:10.4049/jimmunol.1500956）、および異なるDARPin（doi:10.1038/mt.2016.3）の組み合わせを提示する細胞に対する融合活性を再指向し得る。例えば、受容体リガンドおよび抗原を、フソゲンにコンジュゲートして、標的受容体（DOI:10.1089/hgtb.2012.054, DOI:10.1128/JVI.76.7.3558-3563.2002）を提示する細胞に対する融合活性を再指向し得る。標的化タンパク質はまた、例えば、抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、線形抗体、sdAbなどの単ドメイン抗体（VLまたはVHのいずれか）、ナノボディ、またはラクダ科VHHドメイン）、フィブロネクチンポリペプチドミニボディなどの抗原結合フィブロネクチンタイプIII（Fn3）足場、リガンド、サイトカイン、ケモカイン、またはT細胞受容体（TCR）も含み得る。タンパク質フソゲンは、標的化部分を融合タンパク質または標的化タンパク質（例えば、血球凝集素タンパク質）に非共有結合させることによって再標的化され得る。例えば、融合タンパク質を操作して、標的細胞上の抗原を標的とする抗体のFc領域に結合し、抗体の標的を提示する細胞に融合活性を再指向し得る（DOI:10.1128/JVI.75.17.8016-8020.2001, doi:10.1038/nm1192）。変化したおよび変化していないフソ

10

20

30

40

50

ゲンは、同じフソソームに提示され得る (doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.051)。

【0317】

標的化部分は、例えば、ヒト化抗体分子、無傷のIgA、IgG、IgE、またはIgM抗体；二重または多重特異性抗体（例えば、Zybodies（登録商標））；Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd'断片、Fd断片、および単離されたCDRまたはそれらのセットなどの抗体断片；単鎖Fv；ポリペプチド-Fc融合；単ドメイン抗体（例えば、IgNARまたはその断片などのサメ単ドメイン抗体）；カメロイド抗体；マスクされた抗体（例えば、Probodies（登録商標））；Small Modular Immunopharmaceuticals（「SMIPs™」）；単鎖またはタンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））；VHH；Anticalins（登録商標）；Nanobodies（登録商標）；ミニボディ；BiTE（登録商標）；アンキリン反復タンパク質またはDARPin（登録商標）；Avimers（登録商標）；DART；TCR様抗体；Adnectins（登録商標）；Affilins（登録商標）；Trans-bodies（登録商標）；Affibodies（登録商標）；TrimerX（登録商標）；MicroProteins；Fynomers（登録商標）、Centyrins（登録商標）；およびKALBITOR（登録商標）を含み得る。

10

【0318】

実施形態において、再標的化フソゲンは、標的細胞上の細胞表面マーカー、例えば、タンパク質、糖タンパク質、受容体、細胞表面リガンド、アゴニスト、脂質、糖、クラスII膜貫通タンパク質、クラスIII膜貫通タンパク質、またはクラスIIII膜貫通タンパク質に結合する。

20

【0319】

フソソームは、標的化部分に結合した細胞に融合活性を再指するために、またはフソソームのホーミングに影響を与えるために、タンパク質フソゲンにコンジュゲートしていない標的化部分を提示し得る。

【0320】

フソソームに追加された標的化部分は、異なる結合強度を有するように調節され得る。例えば、scFvおよび様々な結合強度を有する抗体を使用して、大量または少量の標的抗原を提示する細胞に対してフソソームの融合活性を変化させ得る (doi: 10.1128/JVI.01415-07、doi: 10.1038/cgt.2014.25、DOI: 10.1002/jgm.1151)。例えば、異なる親和性を有するDARPinを使用して、大量または少量の標的抗原を提示する細胞に対してフソソームの融合活性を変化させ得る (doi: 10.1038/mt.2010.298)。標的化部分はまた、標的リガンド上の異なる領域を標的とするように調節され得、これは、標的を提示する細胞との融合速度に影響を与える (doi: 10.1093/protein/gzv005)。

30

【0321】

いくつかの実施形態において、タンパク質フソゲンは、免疫反応性を低下させるために、変化させることができる。例えば、タンパク質フソゲンは、PEGなどの免疫相互作用を低下させる分子で装飾され得る (DOI: 10.1128/JVI.78.2.912-921.2004)。したがって、いくつかの実施形態において、フソゲンは、PEGを含み、例えば、PEG化ポリペプチドである。免疫系によって標的となるフソゲンのアミノ酸残基は、免疫系によって認識されないように変化させ得る (doi: 10.1016/j.virol.2014.01.027、doi: 10.1371/journal.pone.0046667)。いくつかの実施形態において、フソゲンのタンパク質配列は、ヒト（ヒト化）に見られるアミノ酸配列に類似するように変化させる。いくつかの実施形態において、フソゲンのタンパク質配列は、MHC複合体にあまり強く結合しないタンパク質配列に変化させる。いくつかの実施形態において、タンパク質フソゲンは、

40

50

ヒトに感染しない（およびヒトがワクチン接種を受けていない）ウイルスまたは生物に由来し、患者の免疫系がタンパク質フソゲンに対してナイーブである可能性を高める（例えば、フソゲンに対する無視できる程度の体液性または細胞媒介性の適応免疫応答である）（doi:10.1006/mthe.2002.0550、doi:10.1371/journal.ppat.1005641、doi:10.1038/gt.2011.209、DOI 10.1182/blood-2014-02-558163）。いくつかの実施形態において、フソゲンのグリコシル化は、免疫相互作用を変化させるか、または免疫反応性を低下させるために、変化させ得る。理論に拘束されることを望まないが、いくつかの実施形態において、ヒトに感染しないウイルスまたは生物に由来するタンパク質フソゲンは、患者に天然の融合標的を持たず、したがって高い特異性を有する。

10

【0322】

脂質フソゲン

いくつかの実施形態において、フソソームは、飽和脂肪酸などの融合脂質で処理されてもよい。いくつかの実施形態において、飽和脂肪酸は、10～14個の炭素を有する。いくつかの実施形態において、飽和脂肪酸は、長鎖カルボン酸を有する。いくつかの実施形態において、飽和脂肪酸は、モノエステルである。

【0323】

いくつかの実施形態において、フソソームは、不飽和脂肪酸で処理されてもよい。いくつかの実施形態において、不飽和脂肪酸は、C16からC18の不飽和脂肪酸を有する。いくつかの実施形態において、不飽和脂肪酸には、オレイン酸、グリセロールモノオレート、グリセリド、ジアシルグリセロール、修飾不飽和脂肪酸、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。

20

【0324】

理論に拘束されることを望まないが、いくつかの実施形態において、負曲率の脂質は、膜融合を促進する。いくつかの実施形態において、フソソームは、膜中に1つ以上の負曲率の脂質、例えば、外因性の負曲率の脂質を含む。実施形態において、負曲率の脂質またはその前駆体は、供給源細胞またはフソソームを含む培地に添加される。実施形態において、供給源細胞は、1つ以上の脂質合成遺伝子を発現または過剰発現するように操作される。負曲率の脂質は、例えば、ジアシルグリセロール（DAG）、コレステロール、ホスファチジン酸（PA）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、または脂肪酸（FA）であり得る。

30

【0325】

理論に拘束されることを望まないが、いくつかの実施形態において、正曲率の脂質は、膜融合を阻害する。いくつかの実施形態において、フソソームは、膜中に1つ以上の正曲率の脂質、例えば、外因性の正曲率の脂質の減少したレベルを含む。実施形態において、このレベルは、供給源細胞における脂質合成を阻害することによって、例えば、脂質合成遺伝子のノックアウトまたはノックダウンによって低下する。正曲率の脂質は、例えば、リゾホスファチジルコリン（LPC）、ホスファチジルイノシトール（PtdIns）、リゾホスファチジン酸（LPA）、リゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）、またはモノアシルグリセロール（MAG）であり得る。

40

【0326】

化学的フソゲン

いくつかの実施形態において、フソソームは、融合化学物質で処理されてもよい。いくつかの実施形態において、融合化学物質は、ポリエチレングリコール（PEG）またはその誘導体である。

【0327】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、二層の好ましくない分子充填をもたらす2つの膜間の局所的脱水を誘発する。いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、脂質二重層付近の領域の脱水を誘発し、細胞間の水性分子の置換を引き起こし、2つの膜間の相互作用を可能にする。

50

【0328】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、陽性イオンである。陽性イオンのいくつかの非限定的な例には、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 La^{3+} 、 Sr^{3+} 、および H^{+} が含まれる。

【0329】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、表面極性を改変することによって標的膜に結合し、水和依存性の膜間反発力を変化させる。

【0330】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、可溶性脂溶性である。いくつかの非限定的な例には、オレオイルグリセロール、ジオレオイルグリセロール、トリオレオイルグリセロール、ならびにそれらのバリエーションおよび誘導体が含まれる。

10

【0331】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、水溶性化学物質である。いくつかの非限定的な例には、ポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ならびにそれらのバリエーションおよび誘導体が含まれる。

【0332】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、小有機分子である。非限定的な例には、臭化 n -ヘキシルが含まれる。

【0333】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、フソゲンまたは標的膜の構成、細胞生存率、またはイオン輸送特性を変化させない。

20

【0334】

いくつかの実施形態において、化学的フソゲンは、ホルモンまたはビタミンである。いくつかの非限定的な例には、アブシジン酸、レチノール（ビタミンA1）、トコフェロール（ビタミンE）、ならびにそれらのバリエーションおよび誘導体が含まれる。

【0335】

いくつかの実施形態において、フソソームは、アクチン、および重合アクチンを安定化する薬剤を含む。理論に拘束されることを望まないが、フソソーム内の安定化されたアクチンは、標的細胞との融合を促進し得る。実施形態において、重合アクチンを安定化する薬剤は、アクチン、ミオシン、ビオチン-ストレプトアビジン、ATP、ニューロンのウィスコット-アルドリッチ症候群タンパク質（N-WASP）、またはホルミンから選択される。例えば、Langmuir, 2011 Aug 16; 27(16): 10061-71およびWenet al., Nat Commun, 2016 Aug 31; 7を参照のこと。実施形態において、フソソームは、外因性アクチン、例えば、野生型アクチン、または重合を促進する変異を含むアクチンを含む。実施形態において、フソソームは、ATPまたはホスホクレアチン、例えば、外因性ATPまたはホスホクレアチンを含む。

30

【0336】

小分子フソゲン

いくつかの実施形態において、フソソームは、融合性小分子で処理されてもよい。いくつかの非限定的な例には、ハロタン、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、例えば、メロキシカム、ピロキシカム、テノキシカム、およびクロルプロマジンが含まれる。

40

【0337】

いくつかの実施形態において、小分子フソゲンは、ミセル様凝集体中に存在し得るか、または凝集体を含み得る。

【0338】

フソゲンの修飾

いくつかの実施形態において、フソゲンは、切断可能なタンパク質に結合している。場合によっては、切断可能なタンパク質は、プロテアーゼへの曝露によって切断され得る。操作された融合タンパク質は、膜貫通タンパク質の任意のドメインに結合し得る。操作さ

50

れた融合タンパク質は、切断可能なペプチドによって膜間空間内に位置するタンパク質ドメインに結合し得る。切断可能なペプチドは、膜間プロテアーゼのうちの1つまたはこれらの組み合わせによって切断され得る（例えば、非極性脂肪族アミノ酸－バリン、イソロイシン、またはメチオニンを必要とするHTRA2／OMIは、P1位で好ましく、親水性残基－アルギニンは、P2およびP3位で好ましい）。

【0339】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、親和性タグに結合している。いくつかの実施形態において、親和性タグは、フソソームの分離および単離に役立つ。いくつかの実施形態において、親和性タグは、切断可能である。いくつかの実施形態において、親和性タグは、フソゲンに非共有結合している。いくつかの実施形態において、親和性タグは、フソソーム上に存在し、フソゲンから分離している。

【0340】

いくつかの実施形態において、フソゲンタンパク質は、タンパク質分解配列、例えば、ミトコンドリアまたは細胞質分解配列を含むように、当該技術分野で公知の任意の方法または本明細書に記載の任意の方法によって操作される。タンパク質分解配列、例えば、カスパーゼ2タンパク質配列（例えば、Val-Asp-Val-Ala-Asp-|-）または他のタンパク質分解配列（例えば、Gasteiger et al., The Proteomics Protocols Handbook; 2005: 571-607を参照のこと）、野生型タンパク質分解配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の同一性を有する修飾タンパク質分解配列、例えば、細胞質タンパク質分解配列、例えばユビキチン、または野生型タンパク質分解配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の同一性を有する修飾された細胞質タンパク質分解配列が含まれるが、これらに限定されない、フソゲンタンパク質が、操作され得る。一実施形態において、本発明は、例えば、野生型タンパク質分解配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の同一性のあるタンパク質分解配列で修飾されたタンパク質、例えば、細胞質タンパク質分解配列、例えばユビキチン、または野生型タンパク質分解配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の同一性を有する修飾された細胞質タンパク質分解配列を含む供給源またはコンドソームにおけるミトコンドリアの組成物を含む。

【0341】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、特定のタンパク質、例えば、プロテアーゼの過剰発現、例えばプロテアーゼ活性を有する操作された融合タンパク質を認識するプロテアーゼドメインで修飾され得る。例えば、MMP、ミトコンドリア処理ペプチダーゼ、ミトコンドリア中間体ペプチダーゼ、内膜ペプチダーゼなどのプロテアーゼまたはプロテアーゼからのプロテアーゼドメイン。

【0342】

Alfonzo, J. D. & Soll, D. Mitochondrial tRNA import - the challenge to understand has just begun. Biological Chemistry 390: 717-722. 2009、Langer, T. et al. Characterization of Peptides Released from Mitochondria. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 280, No. 4. 2691-2699, 2005、Vliegh, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. Drug Discovery Today. 15 (1/2). 2010、Quiros P. M. et al., New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology. V16, 2015、Weber-Lotfi, F. et al. DNA import competence and mitochondrial genetics. Biopolyme

10

20

30

40

50

rs and Cell. Vol. 30. N 1. 71-73, 2014を参照のこと。

【0343】

フソソームの生成

細胞から生成されたフソソーム

フソソームの組成物は、培養中の細胞、例えば培養された哺乳動物細胞、例えば、培養されたヒト細胞から生成され得る。細胞は、前駆細胞または非前駆（例えば、分化）細胞であり得る。細胞は、初代細胞または細胞株（例えば、本明細書に記載の哺乳動物、例えばヒトの細胞株）であり得る。実施形態において、培養細胞は、前駆細胞、例えば、骨髓間質細胞、骨髓由来成体前駆細胞（MAPC）、内皮前駆細胞（EPC）、芽細胞、脳室下帯で形成された中間前駆細胞、神経幹細胞、筋肉幹細胞、衛星細胞、肝臓幹細胞、造血幹細胞、骨髓間質細胞、表皮幹細胞、胚性幹細胞、間葉性幹細胞、臍帯幹細胞、前駆細胞、筋肉前駆細胞、筋芽細胞、心筋芽細胞、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、神経前駆細胞、肝芽細胞である。

10

【0344】

いくつかの実施形態において、供給源細胞は、内皮細胞、線維芽細胞、血液細胞（例えば、マクロファージ、好中球、顆粒球、白血球）、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、骨髓幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞、例えば、対象の細胞に由来する人工多能性幹細胞）、胚性幹細胞（例えば、胚性卵黄嚢、胎盤、臍帯、胎児の皮膚、思春期の皮膚、血液、骨髓、脂肪組織、赤血球生成組織、造血組織からの幹細胞）、筋芽細胞、実質細胞（例えば肝細胞）、肺胞細胞、ニューロン（例えば、網膜神経細胞）前駆細胞（例えば、網膜前駆細胞、骨髓芽球、骨髓前駆細胞、胸腺細胞、減数細胞、巨核芽細胞、前巨核芽球、メラニン芽細胞、リンパ芽球、骨髓前駆細胞、正常細胞、または血管芽細胞）、前駆細胞（例えば、心臓前駆細胞、衛星細胞、放射線膠細胞、骨髓間質細胞、脾臓前駆細胞、内皮前駆細胞、芽球細胞）、または不死化細胞（例えば、HeLa、HEK293、HFF-1、MRC-5、WI-38、IMR 90、IMR 91、PER.C6、HT-1080、またはBJ細胞）である。

20

【0345】

培養細胞は、上皮、結合、筋肉、または神経組織もしくは細胞、およびそれらの組み合わせからのものであり得る。フソソームは、例えば、心臓血管系（心臓、血管系）、消化器系（食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、腸、結腸、直腸、および肛門）；内分泌系（視床下部、下垂体、松果体もしくは松果腺、甲状腺、副甲状腺、副腎）；排泄系（腎臓、尿管、膀胱）；リンパ系（リンパ、リンパ節、リンパ管、扁桃、アデノイド、胸腺、脾臓）；外皮系（皮膚、髪、爪）；筋肉系（例えば、骨格筋）；神経系（脳、脊髄、神経）；生殖器系（卵巣、子宮、乳腺、精巣、輸精管、精嚢、前立腺）；呼吸器系（咽頭、喉頭、気管、気管支、肺、横隔膜）；骨格系（骨、軟骨）、およびそれらの組み合わせからの任意の真核生物（例えば、哺乳動物）臓器系からの培養細胞から生成され得る。実施形態において、細胞は、高度に有糸分裂した組織（例えば、上皮、胚組織、骨髓、腸陰窩などの高度に有糸分裂した健康な組織）からのものである。実施形態において、組織試料は、高度に代謝性の組織（例えば、骨格組織、神経組織、心筋細胞）である。

30

【0346】

いくつかの実施形態において、細胞は、若いドナー、例えば、25歳、20歳、18歳、16歳、12歳、10歳、8歳、5歳、1歳未満のドナーからのものである。いくつかの実施形態において、細胞は、胎児組織からのものである。

40

【0347】

いくつかの実施形態において、細胞は、対象に由来し、同じ対象、または同様の遺伝的特徴（例えば、MHC適合）を有する対象に投与される。

【0348】

特定の実施形態において、細胞は、長さが3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、または10000ヌクレオチドを超える（例えば、長さが4,000~10,000ヌクレオチド、長さが6,000~10,000ヌクレオチ

50

ドの) 平均サイズのテロマーを有する。

【0349】

フソソームは、当該技術分野で公知の方法に従って、一般的に培養された細胞から生成され得る。いくつかの実施形態において、細胞は、培養のバイオマスを増殖および増加させる条件下で、「産生」期で、細胞を培養される場合、細胞の表現型を変更する（例えば、ミトコンドリアの表現型を最大化する、ミトコンドリアの数またはサイズを増加させる、酸化的リン酸化状態を増加させる）条件下で、細胞を培養する場合、2つ以上の「期」、例えば成長期において培養され得る。細胞膜上のタンパク質フソゲンまたは外因性薬剤の発現を最大にし、他の期における望ましくない融合を制限する条件下で、細胞を培養する場合、「発現」期もあり得る。

10

【0350】

いくつかの実施形態において、フソソームは、例えば、成長期または産生期の間に同期された細胞から生成される。例えば、培養培地から血清を除去することによって（例えば、約12〜24時間）、またはチミジン、アミノプテリン、ヒドロキシ尿素、およびシトシンアラビノシドなどのDNA合成阻害剤の培養培地で使用することによって、細胞をG1期に同期され得る。哺乳動物の細胞周期同期のためのさらなる方法が、知られており、例えば、Rosner et al., 2013, Nature Protocols 8: 602-626（具体的にはRosnerの表1）に開示されている。

【0351】

いくつかの実施形態において、細胞は、本明細書に記載のフソソーム組成物の供給源として使用するための望ましい表現型または遺伝子型について評価され、任意に濃縮することができる。例えば、細胞は、例えば、膜電位（例えば、 $-5 \sim -200$ mVの膜電位、カルジオリピン含量（例えば、総脂質の1〜20%）、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ジグリセリド（DAG）、ホスファチジン酸（PA）、または脂肪酸（FA）含有量；遺伝的品質>80%、>85%、>90%；フソゲンの発現または含有量；カーゴの発現または含有量のうちの1つ以上について、例えば、培養前、培養中（例えば、成長期もしくは産生期）、または培養後であるがフソソーム産生前に、評価され、任意に濃縮することができる。

20

【0352】

いくつかの実施形態において、フソソームは、本明細書に記載のフソソーム組成物のための供給源として使用するための望ましい表現型または遺伝子型に基づいて特定され、選ばれ、または選択された細胞クローンから生成される。例えば、細胞クローンは、低いミトコンドリア変異負荷、長いテロメア長、分化状態、または特定の遺伝子シグネチャー（例えば、レシピエントに一致する遺伝子シグネチャー）に基づいて特定され、選ばれ、または選択される。

30

【0353】

本明細書に記載のフソソーム組成物は、1つの細胞もしくは組織の供給源、または供給源の組み合わせからのフソソームからなり得る。例えば、フソソーム組成物は、異種源（例えば、動物、前述の種の細胞の組織培養）、同種異系、自己から、異なるタンパク質濃度および分布（肝臓、骨格、神経、脂肪など）をもたらす特定の細胞から、異なる代謝状態（例えば、解糖、呼吸）の細胞からフソソームを含み得る。組成物はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、異なる代謝状態、例えば、結合または非結合のフソソームも含み得る。

40

【0354】

いくつかの実施形態において、フソソームは、フソゲン、例えば、本明細書に記載のフソゲンを発現する供給源細胞から生成される。いくつかの実施形態において、フソゲンは、供給源細胞の膜、例えば脂質二重層膜、例えば細胞表面膜、または細胞内膜（例えばリソソーム膜）内に配置される。いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞表面膜内に配置されたフソゲンを有する供給源細胞から生成される。

【0355】

50

いくつかの実施形態において、フソソームは、エキソソーム、微小胞、膜小胞、細胞外膜小胞、原形質膜小胞、巨大原形質膜小胞、アポトーシス体、ミト粒子、ピレノサイト、リソソーム、または他の膜封入小胞の出芽を誘導することによって生成される。

【0356】

いくつかの実施形態において、フソソームの産生は、供給源細胞にとって異種または内因性であるタンパク質の発現を上方調節することを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質は、原形質膜からのフソソーム放出を上方調節する。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ウイルス構造タンパク質、例えば、ウイルスGagタンパク質、マトリックスタンパク質、カプシドタンパク質、またはヌクレオカプシドタンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ウイルス後期タンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ヒトゲノムによってコードされるタンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ESCRT経路に関与する。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ESCRT-1に関与する。いくつかの実施形態において、タンパク質は、Tsg101に関与する。いくつかの実施形態において、タンパク質は、フソソームに組み込まれる。いくつかの実施形態において、タンパク質は、フソソームに組み込まれない。いくつかの実施形態において、タンパク質は、アレスチンである。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ARRDC1である。いくつかの実施形態において、TSG101は、親細胞またはエキソソームよりもフソソーム中により高いレベルで存在する。いくつかの実施形態において、総タンパク質含有量の割合としてTSG101のレベルは、フソソームにおいて少なくとも約0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、または0.007%である。いくつかの実施形態において、ARRDC1は、親細胞またはエキソソームよりもフソソーム中により高いレベルで存在する。いくつかの実施形態において、総タンパク質含有量の割合としてARRDC1のレベルは、フソソームにおいて少なくとも約0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、または0.05%であるだろう。いくつかの実施形態において、タンパク質は、ESCRT-1、WWP2などのNedd4ファミリーユビキチンリガーゼ、またはAlixを補充する、PSAP、PTAP、PPxY、またはYPxLモチーフを含有する。例えば、そのようなタンパク質は、US9737480B2、Scourfield and Martin-Serrano, Biochemical Society Transactions 2017、Zhadina and Bieniasz, PLoS Pathogens 2010に記載されており、これらのすべては、参照により組み込まれる。

【0357】

いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞核の除去を誘導することによって生成される。除核は、遺伝的、化学的などのアッセイ（例えば、アクチノマイシンDを使用、Bayona-Bafaluyet al., "A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to prokaryotic cells" Nucleic Acids Res. 2003 Aug 15; 31(16): e98を参照のこと）、機械的方法（例えば、圧搾または吸引、Lee et al., "A comparative study on the efficiency of two enucleation methods in pig somatic cell nuclear transfer: effects of the squeezing and the aspiration methods." Anim Biotechnol. 2008; 19(2): 71-9を参照のこと）、またはこれらの組み合わせを使用して、実施され得る。除核とは、核の完全な除去だけでなく、細胞が核を含むが機能しないようにその典型的な位置からの核の変位も指す。

【0358】

実施形態において、フソソームを作製することは、細胞ゴースト、巨大な原形質膜小胞、またはアポトーシス体を生成することを含む。実施形態において、フソソーム組成物は、細胞ゴースト、巨大な原形質膜小胞、およびアポトーシス体のうちの1つ以上を含む。

【0359】

いくつかの実施形態において、フソソームは、細胞断片化を誘導することによって生成される。いくつかの実施形態において、細胞断片化は、化学的方法、機械的方法（例えば、遠心分離（例えば、超遠心分離、または密度遠心分離）、凍結融解、または超音波処理）、またはこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、方法を使用して実施され得る。

【0360】

一実施形態において、フソソームは、例えば、本明細書に記載されるように、以下の方法のうちのいずれか1つ、すべて、またはこれらの組み合わせによって、フソゲンを発現する供給源細胞から生成することができる：

i) ミト粒子、エキソソーム、または他の膜封入小胞の出芽を誘導すること、

ii)

a) 遺伝的方法、

b) 例えばアクチノマイシンDを使用する化学的方法、または

c) 例えば、圧搾または吸引などの機械的方法、のうちのいずれかまたはこれらの組み合わせによる核の不活性化、例えば除核を誘導すること、あるいは

iii) 例えば、以下の方法のいずれかまたはそれらの組み合わせにより、細胞の断片化を誘導する：例えば、

a) 化学的方法、

b) 機械的方法、例えば、遠心分離（例えば、超遠心分離または密度遠心分離）、凍結融解、または超音波処理、の方法のうちのいずれかまたはこれらの組み合わせによって細胞断片化を誘導すること。

【0361】

疑念を避けるために、多くの場合、フソソームを作製するために実際に使用された供給源細胞は、フソソームが作製された後の試験に利用することができないことを理解されたい。したがって、供給源細胞とフソソームとの比較は、フソソームを作製するために実際に修飾された（例えば、除核された）供給源細胞をアッセイする必要はない。むしろ、例えば同じ培養物、同じ遺伝子型、同じ組織型、またはそれらの任意の組み合わせからの、そうでなければ供給源細胞に類似する細胞を代わりにアッセイすることができる。

【0362】

フソソームの生成前の細胞への修飾

一態様では、対象、組織、または細胞の修飾などの修飾が、フソソームの生成前に、細胞に対して行われる。そのような修飾は、例えば、融合、フソゲンの発現もしくは活性、カーゴの構造もしくは機能、または標的細胞の構造もしくは機能を改善するのに効果的であり得る。

【0363】

物理的修飾

いくつかの実施形態において、細胞は、フソソームを生成する前に、物理的に修飾される。例えば、本明細書の他の箇所に記載されるように、フソゲンは、細胞の表面に結合してもよい。

【0364】

いくつかの実施形態において、細胞は、フソソームを生成する前に、化学薬剤で処理される。例えば、細胞は、化学的または脂質フソゲンが細胞の表面と非共有的または共有的に相互作用するか、または細胞の表面内に埋め込むために、化学的または脂質フソゲンで処理され得る。いくつかの実施形態において、細胞は、細胞膜中の脂質の融合特性を増強する薬剤で処理される。

【0365】

いくつかの実施形態において、細胞は、フソソームの臓器、組織、または細胞型への標的化を強化する細胞表面上の合成または内因性小分子または脂質における1つ以上の共有または非共有結合部位でフソソームを生成する前に、物理的に修飾される。

10

20

30

40

50

【0366】

実施形態において、フソソームは、増加または減少されたレベルの内因性分子を含む。例えば、フソソームは、天然に存在する供給源細胞にも天然に存在するが、フソソームよりも高いまたは低いレベルの内因性分子を含み得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、供給源細胞またはフソソーム内の外因性核酸から発現される。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、供給源から単離され、供給源細胞またはフソソームに負荷されるか、またはコンジュゲートされる。

【0367】

いくつかの実施形態において、細胞は、細胞内の内因性フソゲンの発現または活性を増加させるために、フソソームを生成する前に化学薬剤で処理される。一実施形態において、小分子は、内因性フソゲンの転写活性化因子の発現または活性を増加させ得る。別の実施形態において、小分子は、内因性フソゲンの転写抑制因子の発現または活性を低下させ得る。さらに別の実施形態において、小分子は、内因性フソゲンの発現を増加させる後成的修飾因子である。

10

【0368】

いくつかの実施形態において、フソソームは、融合阻止化合物、例えばリゾホスファチジルコリンで処理された細胞から生成される。いくつかの実施形態において、フソソームは、フソゲンを切断しない解離試薬、例えば、アキュターゼで処理された細胞から生成される。

【0369】

いくつかの実施形態において、細胞は、フソゲンの濃度を追加または増加させるために、フソソームを生成する前に、例えば、CRISPR活性化因子で物理的に修飾される。

20

【0370】

いくつかの実施形態において、細胞は、ミトコンドリア、ゴルジ装置、小胞体、細胞内小胞（リソソーム、オートファゴソームなど）のオルガネラの量を増加または減少させるか、あるいはその構造または機能を高めるために物理的に修飾される。

【0371】

遺伝子修飾

いくつかの実施形態において、細胞は、細胞内の内因性フソゲンの発現を増加させるために、フソソームを生成する前に遺伝的に修飾される。一実施形態において、遺伝子修飾は、内因性フソゲンの転写活性化因子の発現または活性を増加させ得る。別の実施形態において、遺伝子修飾は、内因性フソゲンの転写抑制因子の発現または活性を低下させ得る。いくつかの実施形態において、活性化因子または抑制因子は、ガイドRNAによって内因性フソゲンを標的とする転写活性化因子または抑制因子に結合したヌクレアーゼ不活性cas9（dCas9）である。さらに別の実施形態において、遺伝子修飾は、内因性フソゲン遺伝子を後成的に修飾して、その発現を増加させる。いくつかの実施形態において、後成的活性化因子は、ガイドRNAによって内因性フソゲンを標的とする後成的修飾因子に結合したヌクレアーゼ不活性cas9（dCas9）である。

30

【0372】

いくつかの実施形態において、細胞は、細胞内の外因性フソゲンの発現、例えば導入遺伝子の送達を増加させるために、フソソームを生成する前に遺伝的に修飾される。いくつかの実施形態において、核酸、例えばDNA、mRNA、またはsiRNAは、例えば、臓器、組織、または細胞標的化のために使用された細胞表面分子（タンパク質、グリカン、脂質、または低分子量分子）の発現を増加または減少させるために、フソソームを生成する前に、細胞に移される。いくつかの実施形態において、核酸は、フソゲンの抑制因子、例えば、shRNA、siRNA構築物を標的とする。いくつかの実施形態において、核酸は、フソゲン抑制因子の阻害剤をコードする。

40

【0373】

いくつかの実施形態において、本方法は、フソゲンをコードする外因性核酸を供給源細胞に導入することを含む。外因性核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり得る。いく

50

つかの実施形態において、外因性DNAは、線状DNA、環状DNA、または人工染色体であり得る。いくつかの実施形態において、DNAは、後成的に維持される。いくつかの実施形態において、DNAは、ゲノムに組み込まれる。外因性RNAは、化学的に修飾されたRNAであってもよく、例えば、1つ以上の骨格修飾、糖修飾、非標準塩基、またはキャップを含み得る。骨格修飾には、例えば、ホスホロチオエート、N3'ホスホロアミダイト、ボラノホスフェート、ホスホノアセテート、チオPACE、モルホリノホスホロアミダイト、またはPNAが含まれる。糖修飾には、例えば、2'-O-Me、2'-F、2'-F-ANA、LNA、UNA、および2'-O-MOEが含まれる。非標準塩基には、例えば、5-ブロモ-U、および5-ヨード-U、2,6-ジアミノプリン、C-5プロピニルピリミジン、ジフルオロトルエン、ジフルオロベンゼン、ジクロロベンゼン、2-チオウリジン、プソイドウリジン、およびジヒドロウリジンが含まれる。キャップには、例えば、ARCAが含まれる。追加の修飾は、例えば、Deleavey et al., "Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing" Chemistry & Biology Volume 19, Issue 8, 24 August 2012, Pages 937-954 (これは、その全体が参照により組み込まれる)において論じられている。

10

【0374】

いくつかの実施形態において、細胞は、細胞内の外因性フソゲンの発現または活性を増加させるために、フソソームを生成する前に化学薬剤で処理される。一実施形態において、小分子は、外因性フソゲンの転写活性化因子の発現または活性を増加させ得る。別の実施形態において、小分子は、外因性フソゲンの転写抑制因子の発現または活性を低下させ得る。さらに別の実施形態において、小分子は、外因性フソゲンの発現を増加させる後成的修飾因子である。

20

【0375】

いくつかの態様では、核酸は、修飾されたフソゲンをコードする。例えば、調節可能な融合活性、例えば、特定の細胞型、組織型、または局所微小環境活性を有するフソゲン。そのような調節可能な融合活性には、低pH、高pH、熱、赤外線、細胞外酵素活性（真核生物または原核生物）、または小分子、タンパク質、もしくは脂質の曝露による融合活性の活性化および／または開始が含まれ得る。いくつかの実施形態において、小分子、タンパク質、または脂質は、標的細胞上に提示される。

30

【0376】

いくつかの実施形態において、細胞は、シグナル伝達経路（例えば、Wnt/ベータカテニン経路）の発現を変化させる（すなわち、上方調節または下方調節する）ために、フソソームを生成する前に遺伝的に修飾される。いくつかの実施形態において、細胞は、対象となる遺伝子（複数可）の発現を変化させる（例えば、上方調節または下方調節する）ために、フソソームを生成する前に遺伝的に修飾される。いくつかの実施形態において、細胞は、対象となる核酸（例えば、miRNAまたはmRNA）（複数可）の発現を変化させる（例えば、上方調節または下方調節する）ために、フソソームを生成する前に遺伝的に修飾される。いくつかの実施形態において、核酸、例えば、DNA、mRNA、またはsiRNAは、例えば、シグナル伝達経路、遺伝子、または核酸の発現を増加または減少させるために、フソソームを生成する前に、細胞に移される。いくつかの実施形態において、核酸は、シグナル伝達経路、遺伝子、または核酸の抑制因子を標的とするか、あるいはシグナル伝達経路、遺伝子、または核酸を抑制する。いくつかの実施形態において、核酸は、シグナル伝達経路、遺伝子、または核酸を上方調節または下方調節する転写因子をコードする。いくつかの実施形態において、活性化因子または抑制因子は、ガイドRNAによってシグナル伝達経路、遺伝子、または核酸を標的とする転写活性化因子または抑制因子に結合したヌクレアーゼ不活性cas9 (dcas9) である。さらに別の実施形態において、遺伝子修飾は、内因性シグナル伝達経路、遺伝子、または核酸をその発現に後成的に修飾する。いくつかの実施形態において、後成的活性化因子は、ガイドRNAに

40

50

よってシグナル伝達経路、遺伝子、または核酸を標的とする後成的修飾因子に結合したヌクレアーゼ不活性 *cas9* (*dcas9*) である。いくつかの実施形態において、細胞の DNA は、シグナル経路（例えば、Wnt/ベータカテニン経路）、遺伝子、または核酸の発現を変化させる（例えば、上方調節または下方調節する）ために、フソソームを生成する前に編集される。いくつかの実施形態において、DNA は、ガイド RNA および CRISPR-*Cas9*/Cpf1 または他の遺伝子編集技術を使用して編集される。

【0377】

細胞は、組換え法を使用して、遺伝的に修飾され得る。所望の遺伝子をコードする核酸配列は、組換え法を使用して、例えば、遺伝子を発現する細胞からライブラリーをスクリーニングすることによって、同じものを含むことが知られているベクターから遺伝子を誘導することによって、または同じものを含む細胞および組織から直接単離することによって、標準技術を使用して、得ることができる。あるいは、対象となる遺伝子は、クローン化するのではなく、合成的に生成することができる。

【0378】

天然または合成核酸の発現は、典型的に、対象となる遺伝子をコードする核酸をプロモーターに機能的に連結し、構築物を発現ベクターに組み込むことによって達成される。このベクターは、真核生物における複製および組み込みに適し得る。典型的なクローニングベクターは、所望の核酸配列の発現に有用な転写および翻訳のターミネーター、開始配列、およびプロモーターを含む。

【0379】

いくつかの実施形態において、細胞は、1つ以上の発現領域、例えば遺伝子で遺伝的に修飾され得る。いくつかの実施形態において、細胞は、外因性遺伝子（例えば、RNA またはポリペプチド産物などの外因性遺伝子産物を発現することができる）および／または外因性調節核酸で遺伝的に修飾され得る。いくつかの実施形態において、細胞は、標的細胞に内因性である遺伝子産物をコードする外因性配列および／または内因性遺伝子の発現を調節することができる外因性調節核酸で遺伝的に修飾され得る。いくつかの実施形態において、細胞は、外因性遺伝子および／または外因性遺伝子の発現を調節する調節核酸で遺伝的に修飾され得る。いくつかの実施形態において、細胞は、外因性遺伝子および／または内因性遺伝子の発現を調節する調節核酸で遺伝的に修飾され得る。本明細書に記載の細胞は、例えば、標的細胞の内因性または外因性ゲノムの遺伝子産物に作用し得るタンパク質または調節分子をコードする様々な外因性遺伝子を発現するように遺伝的に修飾され得ることを当業者は理解するであろう。いくつかの実施形態において、そのような遺伝子は、フソソームに特徴を付与し、例えば、標的細胞との融合を調節する。いくつかの実施形態において、細胞は、内因性遺伝子および／または調節核酸を発現するように遺伝的に修飾され得る。いくつかの実施形態において、内因性遺伝子または調節核酸は、他の内因性遺伝子の発現を調節する。いくつかの実施形態において、細胞は、他の染色体上の内因性遺伝子および／または調節核酸のバージョンとは異なって（例えば、誘導的に、組織特異的に、構成的に、またはより高いレベルまたはより低いレベルで）発現する、内因性遺伝子および／または調節核酸を発現するように遺伝的に修飾され得る。

【0380】

エンハンサーなどのプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは、開始部位の 30~110 bp 上流の領域に位置しているが、近年、多くのプロモーターが、開始部位の下流にも機能性エレメントを同様に含むことが示されている。プロモーターエレメント間の間隔は頻繁に柔軟性があることがしばしばであるため、プロモーターの機能は、エレメントが互いに対して反転または移動しても保存される。チミジンキナーゼ (*tk*) プロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔を 50 bp まで広げても、活性の低下は見られない。プロモーターに応じて、個々のエレメントは、転写を活性化させるために、協調してまたは独立して機能し得る。

【0381】

適切なプロモーターの一例は、最初期サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配

10

20

30

40

50

列である。このプロモーター配列は、そこに機能的に連結した任意のポリヌクレオチド配列を高いレベルで発現させることができる強力な構成的プロモーター配列である。適切なプロモーターの別の例は、伸長成長因子-1 α (EF-1 α) である。しかしながら、シミアンウイルス40 (SV40) 初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 長い末端反復 (LTR) プロモーター、MoMuLV プロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、Epstein-Barr ウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターを含むが、これらに限定されない、他の構成的プロモーター配列、ならびにアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターなどであるが、これらに限定されない、ヒト遺伝子プロモーターはまた、使用され得る。

10

【0382】

さらに、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターもまた、本発明の一部として企図される。誘導性プロモーターの使用は、そのような発現が望まれる場合に機能的に連結されたポリヌクレオチド配列の発現をオンにするか、または発現が望まれない場合に発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例には、組織特異的プロモーター、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、フソゲンの発現は、フソソームが生成される前に、例えば、フソソームが生成される3、6、9、12、24、26、48、60、または72時間前に上方調節される。

20

【0383】

供給源に導入される発現ベクターは、トランスフェクションまたはウイルスベクターによる感染が求められている細胞の集団から発現細胞を特定および選択するのを促進するために、選択可能なマーカー遺伝子またはレポーター遺伝子のいずれか、またはその両方とも含み得る。他の態様では、選択可能なマーカーは、DNAの別個の断片上で運ばれ、同時にトランスフェクション手順で使用され得る。選択可能なマーカーおよびレポーター遺伝子は両方とも、宿主細胞における発現を可能にするために適切な調節配列に隣接されてもよい。有用な選択可能なマーカーには、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子が含まれる。

【0384】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされた可能性のある細胞を特定するため、および調節配列の機能を評価するために使用され得る。一般的に、レポーター遺伝子は、レシピエント供給源に存在しないか、またはレシピエント供給源によって発現されず、その発現が何らかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性によって明らかにされるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入された後に適切な時間でアッセイされる。適切なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、 β -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、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子を含み得る (例えば、Uiet al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82)。適切な発現系は、周知であり、既知の技術を使用して調製されても、商業的に入手してもよい。一般的に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小の5' 隣接領域を持つ構築物が、プロモーターとして特定される。そのようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され、プロモーターによって引き起こされる転写を調整する能力について薬剤を評価するために使用され得る。

30

40

【0385】

いくつかの実施形態において、細胞は、1つ以上のタンパク質の発現を変化させるように遺伝的に修飾され得る。1つ以上のタンパク質の発現は、特定の時間、例えば、供給源の発生または分化状態のために修飾され得る。一実施形態において、本発明は、融合活性、構造、または機能に影響を与える、1つ以上のタンパク質、例えば、フソゲンタンパク質または非フソゲンタンパク質の発現を変化させるように遺伝的に修飾された細胞の供給源から生成されるフソソームを含む。1つ以上のタンパク質の発現は、特定の位置 (複数

50

可)に制限されているか、供給源全体に広まっている。

【0386】

いくつかの実施形態において、フソゲンタンパク質の発現は、修飾される。一実施形態において、本発明は、フソソームタンパク質の修飾された発現、例えば、少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%またはそれ以上のフソゲンの発現の増加または減少を有する細胞から生成されたフソソームを含む。

【0387】

いくつかの実施形態において、細胞は、フソゲンタンパク質を標的とする細胞質内酵素（例えば、プロテアーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、デメチラーゼ、メチルトランスフェラーゼ、アセチラーゼ）を発現するように操作され得る。いくつかの実施形態において、細胞質内酵素は、翻訳後修飾を改変することによって1つ以上のフソゲンに影響を与える。タンパク質の翻訳後タンパク質修飾は、栄養素利用性および酸化還元条件、およびタンパク質間相互作用への応答性に影響を与え得る。一実施形態において、本発明は、翻訳後修飾の改変、例えば、少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%またはそれ以上の翻訳後修飾の増加または減少を有するフソゲンを含むフソソームを含む。

【0388】

修飾を細胞に導入する方法には、物理的、生物学的、および化学的方法が含まれる。例えば、Geng. & Lu, *Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery. Lab on a Chip*. 13 (19): 3803-21. 2013、Sharei, A. et al. *A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. PNAS vol. 110 no. 6*. 2013、Yin, H. et al., *Non-viral vectors for gene-based therapy. Nature Reviews Genetics*. 15: 541-555. 2014を参照のこと。本明細書に記載のフソソームの生成に使用するための細胞を修飾するための適切な方法には、例えば、拡散、浸透、浸透圧パルス、浸透圧ショック、低張溶解、低張透析、イオン泳動、電気穿孔、音波処理、マイクロインジェクション、カルシウム沈殿、膜インターカレーション、脂質媒介性トランスフェクション、デタージェント処理、ウイルス感染、受容体媒介性エンドサイトーシス、タンパク質伝達ドメインの使用、粒子発火、膜融合、凍結融解、機械的破壊、および濾過が含まれる。

【0389】

遺伝子修飾の存在の確認には、様々なアッセイが含まれる。このようなアッセイには、例えば、サザンおよびノーザンブロッティング、RT-PCRおよびPCRなどの分子生物学的アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウエスタンブロット）による、または本明細書のアッセイによる特定のペプチドの有無の検出などの生化学的アッセイが含まれる。

【0390】

ミトコンドリア生合成への修飾

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、

(a) ミトコンドリア生合成の調節剤と接触した複数の供給源細胞を提供することと、例えば、複数の供給源細胞をミトコンドリア生合成の調節剤（例えば、(i) mtDNA増幅を調節する薬剤、(ii) ミトコンドリアの脂質合成を調節する薬剤、または(iii) 核コード化ミトコンドリアタンパク質またはそれらの組み合わせの産生を調節する薬剤）と接触させることと、

(b) 複数の細胞からフソソームを分離することと、を含む。

【0391】

実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、ミトコンドリア生合成を上方調

10

20

30

40

50

節または刺激する。他の実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、ミトコンドリア生合成を下方調節または阻害する。

【0392】

実施形態において、mtDNA増幅を調節する薬剤は、mtDNA増幅を促進または阻害する薬剤である。実施形態において、ミトコンドリア脂質合成を調節する薬剤は、ミトコンドリア脂質合成を促進または阻害する薬剤である。実施形態において、核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を調節する薬剤は、核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を促進または阻害する薬剤である。

【0393】

実施形態において、mtDNA増幅を促進する薬剤は、mtDNA増幅に関与するタンパク質、mtDNA複製に関与するタンパク質を上方調節するタンパク質、またはデオキシリボヌクレオチドもしくはその前駆体を含む。実施形態において、ミトコンドリア脂質合成を促進する薬剤は、脂質合成遺伝子である。実施形態において、核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を促進する薬剤は、転写因子である。

【0394】

実施形態において、mtDNA増幅を阻害する薬剤は、mtDNA増幅に関与するタンパク質の阻害剤（例えば、トポイソメラーゼ阻害剤、挿入剤、mtDNA増幅に関与するタンパク質を下方調節するsiRNA、mtDNA増幅に関与するタンパク質を下方調節する標的化ヌクレアーゼ、mtDNA増幅に関与するタンパク質の遺伝子に干渉するCRISPR/Cas9分子）、mtDNA複製に関与するタンパク質を下方調節するタンパク質、またはデオキシリボヌクレオチドアナログもしくはその前駆体を含む。実施形態において、ミトコンドリア脂質合成を阻害する薬剤は、脂質合成遺伝子の阻害剤である。実施形態において、核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を阻害する薬剤は、転写抑制因子である。

【0395】

実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節は、表4のタンパク質を調節することを含む。実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節は、直接制御遺伝子（例えば、マスターレギュレーターまたはDNA結合因子）の上方調節、下方調節、刺激、または阻害を調節することを含む。実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節は、表4の直接制御遺伝子（例えば、表4のマスターレギュレーターまたは表4のDNA結合因子）を上方調節、下方調節、刺激、または阻害することを含む。実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節は、間接制御遺伝子（例えば、活性化因子または阻害剤）を上方調節、下方調節、刺激、または阻害することを含む。実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節は、表4の間接制御遺伝子（例えば、表4の活性化因子または表4の阻害剤）を上方調節、下方調節、刺激、または阻害することを含む。実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節は、代謝産物、例えば、表4の代謝産物を上方調節または下方調節することを含む。

【0396】

実施形態において、ミトコンドリア脂質の合成を促進または阻害する薬剤は、ミトコンドリア膜中の脂質の割合の変化を引き起こすことができるか、またはそれをもたらす。実施形態において、ミトコンドリア脂質の合成を調節する薬剤は、ミトコンドリア脂質：カルジオリピン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、CDP-ジアシルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、コレステロール、またはセラミド、のうちの1つの割合、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の増加または減少をもたらす。

【0397】

いくつかの実施形態において、本方法は、(i)、(ii)、および(iii)のうちの1つ、2つ、または3つすべてを提供することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、(i)、(ii)、および(iii)のうちの2つ、例えば、(i)および(

10

20

30

40

50

i i)、(i) および (i i i)、または (i i) および (i i i) を提供することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、ミトコンドリア生合成を刺激するのに十分なレベルで、(i)、(i i)、および (i i i) のうちの1つ、2つ、または3つすべてのうちの1つを提供することを含む。

【0398】

実施形態において、本方法は、mtDNA増幅を（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）調節する（例えば、刺激する）ことを含む。実施形態において、mtDNA増幅の調節は、脂質合成および核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生の一方または両方の検出可能な調節（例えば、刺激）なしに起こる。実施形態において、本方法は、脂質合成を（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）調節する（例えば、刺激する）ことを含む。実施形態において、調節は、mtDNA増幅および核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生の一方または両方の検出可能な調節（例えば、刺激）なしに起こる。実施形態において、本方法は、核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）調節する（例えば、刺激する）ことを含む。実施形態において、核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生の調節は、脂質合成およびmtDNA増幅の一方または両方の検出可能な調節（例えば、刺激）なしに起こる。

【0399】

実施形態において、本方法は、mtDNA増幅および脂質合成を（例えば、それぞれ独立して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）調節する（例えば、刺激する）ことを含む。実施形態において、mtDNA増幅および脂質合成の調節は、核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生の検出可能な調節（例えば、刺激）なしに起こる。実施形態において、本方法は、mtDNA増幅および核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を（例えば、それぞれ独立して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）調節する（例えば、刺激する）ことを含む。実施形態において、mtDNA増幅の調節および核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生の調節は、脂質合成の検出可能な調節（例えば、刺激）なしに起こる。実施形態において、本方法は、脂質合成および核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を（例えば、それぞれ独立して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）調節する（例えば、刺激する）ことを含む。実施形態において、脂質合成および核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生は、mtDNA増幅の検出可能な調節（例えば、刺激）なしに起こる。

【0400】

実施形態において、本方法は、mtDNA増幅、脂質合成、および核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生を（例えば、それぞれ独立して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）調節する（例えば、刺激する）ことを含む。

【0401】

実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、ミトコンドリア生合成の刺激因子である。実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、褐色化の刺激因子である。実施形態において、褐色化の刺激因子は、PGC1αである。実施形態において、褐色化の刺激因子は、キノン、FGF21、イリシン、アペリン、またはイソプロテレノールである。実施形態において、複数の供給源細胞または複数の供給源細胞に由来するフソソーム組成物は、例えば、Spaethling et al “Single-cell transcriptomics and functional target validation of brown adipocytes show their complex roles in metabolic homeostasis.” in: FASEB Journal, Vol. 30, Issue 1, pp. 81-92, 201

6に記載されるように、UCP1発現のためのELISAによって、褐色化についてアッセイされる。

【0402】

実施形態において、複数の供給源細胞または複数に由来するフソソーム組成物は、mtDNA増幅、ミトコンドリア脂質合成、または核コード化ミトコンドリアタンパク質の産生、またはそれらの任意の組み合わせの存在またはレベルについてアッセイされる。

【0403】

供給源細胞は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分な量および時間（例えば、少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%またはそれ以上）、ミトコンドリア生合成の調節剤と接触させられ得る。ミトコンドリア生合成のこのような調節剤は、例えば、Cameron et al. 2016. Development of Therapeutics That Induce Mitochondrial Biogenesis for the Treatment of Acute and Chronic Degenerative Diseases. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00669に記載されている。実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、成長期および／または産生期の間に供給源細胞培養に加えられる。実施形態において、ミトコンドリア細胞発生の調節剤は、供給源細胞培養物が所定の標的密度を有するときに加えられる。

【0404】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分な天然産物またはその合成等価体から抽出された薬剤である。そのような薬剤の例には、レスベラトロール、エピカテキン、クルクミン、フィトエストロゲン（例えば、ゲニステイン、ダイゼイン、ピロロキノリン、キノン、クメストロール、およびエクオール）が含まれる。

【0405】

別の実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞、供給源細胞のミトコンドリアにおけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分な代謝産物、例えば、一次または二次代謝産物である。このような代謝産物、例えば、一次代謝産物には、エタノール、乳酸などのアルコールが含まれ、ある特定のアミノ酸および二次代謝産物には、一次代謝産物の修飾により生成される有機化合物が含まれ、“Primary and Secondary Metabolites.” Boundless Microbiology. Boundless, 26 May, 2016に記載されている。

【0406】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞、または供給源細胞のミトコンドリア生合成を増加させるのに十分なエネルギー源、例えば、糖、ATP、NADHおよびFADH₂としてのレドックス補因子である。そのようなエネルギー源、例えば、ピルベートまたはパルミテートは、Mehlman, M. Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria; Academic Press, 1972に記載されている。

【0407】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分な転写因子調節剤である。そのような転写因子調節剤の例には、チアゾリジンジオン（例えば、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、トログリタゾン、およびシグリタゾン）、エストロゲン（例えば、17β-エストラジオール、プロゲステロン）、およびエストロゲン受容体アゴニスト；SIRT1活性化因子（例えば、SIRT1720、SIRT1460、SIRT2183、SIRT2104）が含まれる。

【0408】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分なキナーゼ調節剤である。例には、AICAR、メト

10

20

30

40

50

ホルミン、フェンホルミン、A 7 6 9 6 6 2などのAMPKおよびAMPK活性化剤、およびU 0 1 2 6、トラメチニブなどのERK1／2阻害剤が含まれる。

【0409】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分な環状ヌクレオチド調節剤である。例には、NO-cGMP-PKG経路の調節剤（例えば、ニトロプルシドナトリウムなどの酸化窒素（NO）ドナー、（±）S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン（SNAP）、ジエチルアミンNONOate（DEA-NONOate）、ジエチレントリアミン-NONOate（DETA-NONOate）；シナシグアト、リオシグアト、およびBAY 41-2272などのsGC刺激剤および活性化剤；およびザプリナスト、シルデナフィル、ウデナフィル、タダラフィル、バルデナフィルなどのホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤、およびcAMP-ロリプラムなどのホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤などのPKA-CREB軸。

10

【0410】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分なGPCRリガンドなどのGタンパク質共役受容体（GPCR）の調節剤である。

【0411】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分なカンナビノイド-1受容体の調節剤である。例には、タラナバントおよびリモノバントが含まれる。

20

【0412】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分な5-ヒドロキシトリプタミン受容体の調節剤である。例には、アルファ-メチル-5-ヒドロキシトリプタミン、DOI、CP809101、SB242084、フルオキセチンなどのセロトニン再取り込み阻害剤、アルファ-メチル5HT、1-（2,5-ジメトキシ-4-ヨードフェニル）-2-アミノプロパン、LY334370、およびLY344864が含まれる。

【0413】

一実施形態において、ミトコンドリア生合成の調節剤は、供給源細胞におけるミトコンドリア生合成を増加させるのに十分なベータアドレナリン受容体の調節剤である。例には、エピネフリン、ノルエピネフリン、イソプロテレノール、メトプロロール、ホルモテロール、フェノテロール、およびプロカテロールが含まれる。

30

【0414】

一実施形態において、供給源細胞は、ミトコンドリア生合成の転写活性化因子、例えば、転写因子、またはPGC1αなどの転写共活性化因子を発現するように、修飾、例えば、遺伝的に修飾される。いくつかの実施形態において、細胞は、PGC1αを発現する（例えば、内因性を過剰発現する、または外因性のPGC1αを発現する）。

表4. ミトコンドリア生合成の転写制御例えば、Scarpulla et al., "Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis" Trends in Endocrinology & Metabolism, Volume 23, Issue 9, p459-466, September 2012, Hock et al. "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function." Annu Rev Physiol. 2009; 71:177-203. Santra et al., "Ketogenic Treatment Reduces Deleted Mitochondrial DNAs in Cultured Human Cells" Ann Neurol. 2004 Nov; 56 (5): 662-9. Kanabus et al., "The pleiotropic effects of decanoic acid treatment on mitochondrial

40

50

function in fibroblasts from patients with complex I deficient Leigh syndrome” J Inherit Metab Dis. 2016 May; 39 (3) : 415–26を参照されたく、これらのそれぞれは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【表 4－1】

直接制御遺伝子	
遺伝子	標的または制御された機能
マスターレギュレーター	
PGC-1 a	マスターレギュレーター、PPAR-デルタ、a、ガンマ；ERR a、b、ガンマ；GABP；NRF-1；YY1；CREB；c-MYC、の共活性化因子
PGC-1 b	マスターレギュレーター、PPAR-デルタ、a、ガンマ；ERR a、b、ガンマ；GABP；NRF-1；YY1；CREB；c-MYC、の共活性化因子
RIP140	PPAR-デルタ、a、ガンマおよびERR a、ベータ、ガンマとのコリプレッサー
PRC	マスターレギュレーター、PPAR-デルタ、a、ガンマ；ERR a、b、ガンマ；GABP；NRF-1；YY1；CREB；c-MYC、の共活性化因子
DNA結合因子	
RXR（レチノイドX受容体）	脂肪酸ベータ酸化および脱共役タンパク質
PPAR a	脂肪酸ベータ酸化および脱共役タンパク質
PPAR-デルタ	脂肪酸ベータ酸化および脱共役タンパク質
PPAR-ガンマ	脱共役タンパク質
NRF-1	mt DNAの維持およびETCの発現；mt DNA転写；ミトコンドリア輸入
NRF-2	mt DNAの維持および複数のETCコンポーネントの発現
ERR（a、B、およびガンマ）	PGC1 aとの相互作用、脂肪酸B-oxの発現調節、ミトコンドリアの動的（分裂／融合）；ETC；mt DNAの複製と転写；ミトコンドリア輸入

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

G A B P	m t D N A の維持および E T C の発現 ; m t D N A 転写 ; ミトコンドリア 輸入
Y Y 1	m t D N A の維持および E T C の発現 ; m t D N A 転写 ; ミトコンドリア 輸入
c - M Y C	m t D N A の維持および E T C の発現 ; m t D N A 転写 ; ミトコンドリア 輸入
C R E B	m t D N A の維持および E T C の発現 ; m t D N A 転写 ; ミトコンドリア 輸入
間接制御遺伝子	
遺伝子	標的または制御された機能
阻害剤	
S R C - 3	P G C - 1 a をアセチル化し、阻害する
G C N 5	P G C - 1 a をアセチル化し、阻害する
A K T	
S C F - c d c 4	
M Y B B P 1 a	
活性化剤	
S I R T 1	P G C - 1 a を脱アセチル化し、活性化する
A M P K	P G C - 1 a をリン酸化し、活性化する
C d k / サイクリ ン H / M A T 1	
P R M T 1	
G S K - 3 B	
他のプロセスのための間接制御遺伝子	
遺伝子	標的または制御された機能
S I R T 3	m t S O D 2 および G S H / G P X を制御して、R O S レベルを阻害する
生合成を刺激する代謝産物	
名称	クラス
β -ヒドロキシブ チレート (B H B)	ケトン体
アセトアセテート (A C A)	ケトン体
デカン酸 (C 1 0)	中鎖トリグリセリド

【表 4 - 3】

オクタン酸	中鎖トリグリセリド
-------	-----------

【 0 4 1 5 】

フソソームの修飾

一態様では、修飾は、フソソームに対して行われる。そのような修飾は、例えば、標的化、機能、または構造を改善するのに効果的であり得る。

【 0 4 1 6 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、フソソームは、膜の表面に非共有結合または共有結合し得るフソゲン、例えば本明細書に記載の化学フソゲンで処理される。いくつかの実施形態において、フソソームは、膜に非共有結合または共有結合またはそれ自体を埋め込むことができるフソゲン、例えば、タンパク質または脂質フソゲンで処理される。

【0417】

いくつかの実施形態において、リガンドは、フソソームの表面上に存在する官能化学基（カルボン酸、アルデヒド、アミン、スルフヒドリル、およびヒドロキシル）を介してフソソームの表面にコンジュゲートされる。

【0418】

そのような反応性基には、マレイミド基が含まれるが、これに限定されない。一例として、フソソームは、DSPE-MALE-PEG2000などであるが、これに限定されない、マレイミドでコンジュゲートしたリン脂質を含むように合成され得る。

【0419】

いくつかの実施形態において、合成または天然の小分子または脂質は、フソソームの表面に共有結合しても、共有結合しなくてもよい。いくつかの実施形態において、フソソーム中の膜脂質は、融合特性を促進、誘導、または増強するために修飾され得る。

【0420】

いくつかの実施形態において、フソソームは、修飾タンパク質をロードする（例えば、新規機能を可能にする、翻訳後修飾を改変する、ミトコンドリア膜および／またはミトコンドリア膜タンパク質に結合する、異種機能を有する切断可能なタンパク質を形成する、タンパク質分解を目的とするタンパク質を形成する、薬剤の位置およびレベルを分析する、または担体として薬剤を送達する）ことによって修飾される。一実施形態において、本発明は、修飾タンパク質をロードするフソソームを含む。

【0421】

いくつかの実施形態において、外因性タンパク質は、フソソームに非共有結合している。タンパク質は、放出のために切断可能なドメインを含み得る。一実施形態において、本発明は、切断可能なドメインを有する外因性タンパク質を含むフソソームを含む。

【0422】

いくつかの実施形態において、フソソームは、タンパク質分解を目的とするタンパク質で修飾される。様々なプロテアーゼが、特定のタンパク質のアミノ酸配列を認識し、分解のためのタンパク質を標的とする。これらのタンパク質分解酵素は、タンパク質分解配列を有するタンパク質を特異的に分解するために使用することができる。一実施形態において、本発明は、1つ以上のタンパク質分解酵素の調節したレベル、例えば、少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%またはそれ以上のタンパク質分解酵素の増加または減少を含むフソソームを含む。

【0423】

本明細書に記載されるように、非フソゲン添加剤をフソソームに添加して、それらの構造および／または特性を修飾することができる。例えば、コレステロールまたはスフィンゴミエリンのいずれかを膜に加えて、構造を安定させ、内部カーゴの漏れを防ぐことができる。さらに、膜は、水素化卵ホスファチジルコリンまたは卵ホスファチジルコリン、コレステロール、およびリン酸ジセチルから調製することができる。（例えば、総説については Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi: 10.1155/2011/469679 を参照のこと）。

【0424】

いくつかの実施形態において、フソソームは、特定の細胞または組織タイプ（例えば、心筋細胞）を標的とするために、外面上に1つ以上の標的化グループ（例えば、標的化タンパク質）を含む。これらの標的化グループには、受容体、リガンド、抗体などが含まれるが、これらに限定されない。これらの標的化グループは、標的細胞の表面上でパートナーと結合する。実施形態において、標的化タンパク質は、本明細書に記載の標的細胞、例

10

20

30

40

50

例えば、皮膚細胞、心筋細胞、肝細胞、腸細胞（例えば、小腸の細胞）、膵臓細胞、脳細胞、前立腺細胞、肺細胞、結腸細胞、または骨髄細胞の細胞表面マーカーに特異的である。

【0425】

いくつかの実施形態において、標的化タンパク質は、標的細胞上の細胞表面マーカーに結合する。実施形態において、細胞表面マーカーは、タンパク質、糖タンパク質、受容体、細胞表面リガンド、クラスⅠ膜貫通タンパク質、クラスⅡ膜貫通タンパク質、またはクラスⅢ膜貫通タンパク質を含む。

【0426】

いくつかの実施形態において、標的化部分は、フソゲンとは別個のポリペプチドであるポリペプチドに含まれる。いくつかの実施形態において、標的化部分を含むポリペプチドは、膜貫通ドメインおよび細胞外標的化ドメインを含む。実施形態において、細胞外標的化ドメインは、scFv、DARPin、ナノボディ、受容体リガンド、または抗原を含む。いくつかの実施形態において、細胞外標的化ドメインは、抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、線形抗体、sdAbなどの単ドメイン抗体（VLまたはVHのいずれか）、またはラクダ科VHHドメイン）、フィブロネクチンポリペプチドミニボディなどの抗原結合フィブロネクチンタイプⅢ（Fn3）足場、リガンド、サイトカイン、ケモカイン、またはT細胞受容体（TCR）も含み得る。

【0427】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソームは、診断剤で機能化されている。診断剤の例には、陽電子放出断層撮影（PET）、コンピューター支援断層撮影（CAT）、単一光子放出コンピューター断層撮影、X線、蛍光透視法、および磁気共鳴イメージング（MRI）、およびコントラスト剤で使用される市販の造影剤が含まれるが、これらに限定されない。MRIにおいてコントラスト剤として使用するのに適した材料の例には、ガドリニウムキレート、ならびに鉄、マグネシウム、マンガン、銅、およびクロムが含まれる。

【0428】

官能基をフソソームに導入する別の例は、調製後、ホモまたはヘテロ二官能性架橋剤でフソソームおよびリガンドを直接架橋することによるものである。この手順では、適切な化学およびクラスの架橋剤（本明細書に論じられるように、CDI、EDAC、グルタルアルデヒドなど）、または調製後のフソソーム表面の化学修飾を介してリガンドをフソソーム表面に結合する任意の他の架橋剤を使用し得る。これには、脂肪酸、脂質、または官能性の安定剤などの両親媒性分子を受動的に吸着して、フソソーム表面に付着させ、それによってリガンドに係留するための官能末端基を導入するプロセスも含まれる。

【0429】

カーゴ

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソームは、カーゴ、例えば、細胞内カーゴを含む。

【0430】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソームは、カーゴ、例えば治療剤、例えば、内因性治療剤または外因性治療剤を含む。

【0431】

いくつかの実施形態において、カーゴは、フソソームが由来する細胞において自然に発現されない。いくつかの実施形態において、カーゴは、フソソームが由来する細胞において自然に発現される。いくつかの実施形態において、カーゴは、フソソームが由来する細胞において自然に発現される野生型核において自然に発現される野生型の変異体である。

【0432】

いくつかの実施形態において、カーゴは、フソソームが由来する細胞における発現（例えば、トランスフェクション、形質導入、またはエレクトロポレーションを介して導入さ

10

20

30

40

50

れるDNAまたはmRNAからの発現)を介してフソソームにロードされる。いくつかの実施形態において、カーゴは、ゲノムに組み込まれた、またはエピソームに維持されたDNAから発現される。いくつかの実施形態において、カーゴの発現は、構成的である。いくつかの実施形態において、カーゴの発現が、誘導される。いくつかの実施形態において、カーゴの発現が、フソソームを生成する直前に誘導される。いくつかの実施形態において、カーゴの発現が、フソゲンの発現と同時に誘導される。

【0433】

いくつかの実施形態において、カーゴは、フソソーム自体またはフソソームが由来する細胞へのエレクトロポレーションを介してフソソームにロードされる。いくつかの実施形態において、カーゴは、フソソーム自体またはフソソームが由来する細胞へのトランスフェクションを介して(例えば、カーゴをコードするDNAまたはmRNAの)フソソームにロードされる。

【0434】

いくつかの態様では、本開示は、

(i) 1つ以上のコンドリソーム(例えば、国際出願、PCT/US16/64251に記載されるように)、ミトコンドリア、オルガネラ(例えば、ミトコンドリア、リソソーム、核、細胞膜、細胞質、小胞体、リボソーム、液胞、エンドソーム、スプライセオソーム、ポリメラーゼ、カプシド、アクロソーム、オートファゴソーム、中心小体、グリコソーム、グリオキシソーム、ヒドロゲノソーム、メラノソーム、マイトソーム、筋原線維、刺胞、ペルオキシソーム、プロテアソーム、小胞、ストレス顆粒、およびオルガネラのネットワーク)、または除核細胞、例えば、前述のいずれかを含む除核細胞、ならびに(ii) フソゲン、例えば、ミオメーカータンパク質、を含むフソソーム組成物(例えば、薬学的組成物)を提供する。

【0435】

実施形態において、フソゲンは、ミトコンドリアまたはコンドリソームの外部の脂質二重層に存在する。実施形態において、コンドリソームは、例えば、国際出願、PCT/US16/64251に記載されるように、特性のうちの1つ以上を有し、これは、実施例および本発明の概要を含む、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0436】

いくつかの実施形態において、カーゴは、1つ以上の核酸配列、1つ以上のポリペプチド、核酸配列および/またはポリペプチドの組み合わせ、1つ以上のオルガネラ、ならびにそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、カーゴは、1つ以上の細胞成分を含んでもよい。いくつかの実施形態において、カーゴは、1つ以上の細胞質成分および/または核成分を含む。

【0437】

いくつかの実施形態において、カーゴは、核酸、例えば、DNA、nDNA(核DNA)、mtDNA(ミトコンドリアDNA)、タンパク質コードDNA、遺伝子、オペロン、染色体、ゲノム、トランスポゾン、レトロトランスポゾン、ウイルスゲノム、イントロン、エクソン、修飾DNA、mRNA(メッセンジャーRNA)、tRNA(トランスファーRNA)、修飾RNA、マイクロRNA、siRNA(低分子干渉RNA)、tmRNA(トランスファーマッセンジャーRNA)、rRNA(リボソームRNA)、mtRNA(ミトコンドリアRNA)、snRNA(小核RNA)、小核RNA(snoRNA)、SmY RNA(mRNAトランススプライシングRNA)、gRNA(ガイドRNA)、TERC(テロメラーゼRNA成分)、aRNA(アンチセンスRNA)、cis-NAT(シス天然アンチセンス転写物)、CRISPR RNA(crRNA)、lncRNA(長鎖ノンコーディングRNA)、piRNA(piwi相互作用性RNA)、shRNA(短ヘアピンRNA)、tasRNA(トランス作用siRNA)、eRNA(エンハンサーRNA)、衛星RNA、pcRNA(タンパク質コーディングRNA)、dsRNA(二本鎖RNA)、RNAi(干渉RNA)、circRNA(環状RNA)、リプログラミングRNA、アプタマー、およびそれらの任意の組み合わせを含む。い

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、核酸は、野生型核酸である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、変異体核酸である。いくつかの実施形態において、核酸は、複数の核酸配列の融合またはキメラである。

【0438】

いくつかの実施形態において、フソソームが由来する細胞中のフソソームまたはDNAは、遺伝子編集技術、例えば、ガイドRNAおよびCRISPR-Cas9/Cpf1を使用して、または異なる標的化エンドヌクレアーゼ（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（TALEN））を使用して、遺伝子変異を修正するために編集される。いくつかの実施形態において、遺伝子変異は、対象における疾患に関連している。DNAの編集の例には、小さな挿入／欠失、大きな欠失、テンプレートDNAによる遺伝子修正、またはDNAの大きな挿入が含まれる。いくつかの実施形態において、遺伝子編集は、非相同末端結合（NHEJ）または相同性指向修復（HDR）により達成される。いくつかの実施形態において、編集は、ノックアウトである。いくつかの実施形態において、編集は、ノックインである。いくつかの実施形態において、DNAの両方の対立遺伝子が、編集される。いくつかの実施形態において、単一の対立遺伝子が、編集される。いくつかの実施形態において、複数の編集が、行われる。いくつかの実施形態において、フソソームまたは細胞は、対象に由来するか、または対象と遺伝的に一致するか、または（例えば、同様のMHCを有する）対象と免疫学的に適合している。

【0439】

いくつかの実施形態において、カーゴは、核酸を含み得る。例えば、カーゴは、内在性タンパク質の発現を増強するRNA、または内在性タンパク質のタンパク質発現を阻害するsiRNAもしくはmiRNAを含み得る。例えば、内因性タンパク質は、標的細胞の構造または機能を調節し得る。いくつかの実施形態において、カーゴは、標的細胞の構造または機能を調節する人工タンパク質をコードする核酸を含み得る。いくつかの実施形態において、カーゴは、標的細胞の構造または機能を調節する転写活性化因子を標的とする核酸である。

【0440】

いくつかの実施形態において、カーゴは、ポリペプチド、例えば、酵素、構造ポリペプチド、シグナル伝達ポリペプチド、調節ポリペプチド、輸送ポリペプチド、感覚ポリペプチド、モーターポリペプチド、防御ポリペプチド、貯蔵ポリペプチド、転写因子、抗体、サイトカイン、ホルモン、異化ポリペプチド、タンパク同化ポリペプチド、タンパク質分解ポリペプチド、代謝ポリペプチド、キナーゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、酵素調節剤ポリペプチド、タンパク質結合ポリペプチド、脂質結合ポリペプチド、膜融合ポリペプチド、細胞分化ポリペプチド、後成的ポリペプチド、細胞死ポリペプチド、核輸送ポリペプチド、核酸結合ポリペプチド、再プログラミングポリペプチド、DNA編集ポリペプチド、DNA修復ポリペプチド、DNA組換えポリペプチド、トランスポザーゼポリペプチド、DNA組み込みポリペプチド、標的化エンドヌクレアーゼ（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（TALEN）、cas9およびそのホモログ）、リコンビナーゼ、ならびにそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質は、分解のために細胞内のタンパク質を標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質は、タンパク質をプロテアソームに局在化させることによって、分解のために細胞内のタンパク質を標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質は、野生型タンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、変異体タンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、融合またはキメラタンパク質である。

【0441】

いくつかの実施形態において、カーゴには、小分子、例えば、イオン（例えば、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 Fe^{2+} ）、炭水化物、脂質、反応性酸素種、反応性窒素種、イソプレノイド、シグナル伝達分子、ヘム、ポリペプチド補因子、電子受容化合物、電子供与化合物、代謝産物、リガンド、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、小分子は、細胞内の標的と相互作用する医薬品である。いくつかの実施形態において、小分子は、分解のために細胞内のタンパク質を標的とする。いくつかの実施形態において、小分子は、タンパク質をプロテアソームに局在化させることによって、分解のために細胞内のタンパク質を標的とする。いくつかの実施形態において、その小分子は、キメラ分子を標的とするタンパク質分解（P R O T A C）である。

【0442】

いくつかの実施形態において、カーゴには、タンパク質、核酸、または代謝産物の混合物、例えば、複数のポリペプチド、複数の核酸、複数の小分子；核酸、ポリペプチド、および小分子の組み合わせ；リボ核タンパク質複合体（例えば、C a s 9 – g R N A 複合体）；複数の転写因子、複数の後成的因子、再プログラミング因子（例えば、O c t 4、S o x 2、c M y c、およびK l f 4）；複数の調節RNA；ならびにそれらの任意の組み合わせが含まれる。

10

【0443】

いくつかの実施形態において、カーゴには、1つ以上のオルガネラ、例えば、コンドソーム、ミトコンドリア、リソソーム、核、細胞膜、細胞質、小胞体、リボソーム、液胞、エンドソーム、スプライセオソーム、ポリメラーゼ、カプシド、アクロソーム、オートファゴソーム、中心小体、グリコソーム、グリオキシソーム、ヒドロゲノソーム、メラノソーム、マイトソーム、筋原線維、刺胞、ペルオキシソーム、プロテアソーム、小胞、ストレス顆粒、オルガネラのネットワークス、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0444】

20

いくつかの実施形態において、カーゴは、フソソームまたは細胞膜で濃縮されている。いくつかの実施形態において、カーゴは、ペプチドシグナル配列を介して膜を標的とすることによって濃縮されている。いくつかの実施形態において、カーゴは、膜結合タンパク質、脂質、または小分子と結合することによって濃縮されている。いくつかの実施形態において、カーゴは、膜結合タンパク質、脂質、または小分子に共有結合する。いくつかの実施形態において、共有結合は、プロテアーゼによって切断可能である。いくつかの実施形態において、カーゴは、膜結合タンパク質、脂質、または小分子との非共有相互作用を介して結合する。いくつかの実施形態において、膜タンパク質は、フソゲンである。いくつかの実施形態において、カーゴは、二次メディエーターを介して濃縮されている。例えば、いくつかの実施形態において、カーゴは、中間タンパク質によって結合される核酸であり、中間タンパク質は、膜結合タンパク質、脂質、または小分子に結合し、それにより核酸カーゴを膜に局在化させる。いくつかの実施形態において、核酸と中間タンパク質の間の相互作用は、共有結合または非共有結合である。いくつかの実施形態において、中間タンパク質と膜結合タンパク質、脂質、または小分子の間の相互作用は、共有結合性、またはプロテアーゼによって共有結合性および切断可能であるか、または非共有結合性である。例えば、U S 2 0 1 7 0 1 7 5 0 8 6 A 1 および U S 9 8 1 6 0 8 0 B 2 は、カーゴタンパク質の断片と膜結合タンパク質の間の非共有結合によるカーゴタンパク質の濃縮について説明している。いくつかの実施形態において、カーゴは、膜結合タンパク質、脂質、または小分子で二量体化することによって濃縮されている。いくつかの実施形態において、カーゴは、キメラ（例えば、キメラタンパク質、または核酸）であり、膜結合タンパク質、脂質、または小分子との結合または二量体化を媒介するドメインを含む。対象となる膜結合タンパク質には、例えば、細胞膜（すなわち、膜結合ドメイン）に安定して結合する、例えば、結合する、組み込む、ドメインを有する任意のタンパク質が含まれるが、これらに限定されず、そのようなドメインは、ミリストイル化ドメイン、ファルネシル化ドメイン、膜貫通ドメインなどを含み得る。対象となる特定の膜結合タンパク質には、ミリストイル化タンパク質、例えば、p 6 0 v – s r c など；ファルネシル化タンパク質、例えば、R a s、R h e b、およびC E N P – E、F、ホスファチジルセリンへの結合によるタンパク質結合特異的脂質二重層成分、例えばアネキシンV、細胞膜二重層の脂質成分など；膜アンカータンパク質；膜貫通タンパク質、例えば、トランスフェリン受容体およびそれらの一部；ならびに膜融合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

50

いくつかの実施形態において、膜結合タンパク質は、第1の二量体化ドメインを含む。第1の二量体化ドメインは、例えば、カーゴの第2の二量体化ドメインに直接結合するか、または二量体化メディエーターを介して第2の二量体化ドメインに結合するドメインであり得る。いくつかの実施形態において、カーゴは、第2の二量体化ドメインを含む。第2の二量体化ドメインは、例えば、膜結合タンパク質の第1の二量体化ドメインと直接または二量化メディエーターを介して二量体化する（例えば、非共有結合相互作用により直接またはメディエーターを通して安定して結合する）ドメインであり得る。二量体化ドメインに関して、これらのドメインは、直接または二量体化メディエーターを介して結合事象に関与するドメインであり、この結合事象は、所望の多量体、例えば、膜結合タンパク質および標的タンパク質の二量体の複合体をもたらす。第1および第2の二量体化ドメインは、アミノ酸の同じ配列で構成されるようなホモ二量体であっても、アミノ酸の異なる配列で構成されるようなヘテロ二量体であってもよい。対象となるドメインには、SH2ドメイン、Pazドメイン、RINGドメイン、転写活性化因子ドメイン、DNA結合ドメイン、酵素触媒ドメイン、酵素調節ドメイン、酵素サブユニット、定義された細胞位置への局在化のためのドメイン、局在化ドメインのための認識ドメイン、URL: pawsonlab.mshri.on.ca/index.php?option=com_content&task=view&id=30&Itemid=63 に列挙されるドメインなど、対象となる特定のタンパク質に特異的に結合するリガンド（例えば、タンパク質：タンパク質相互作用ドメイン）などの標的生体分子のリガンドが含まれますが、これらに限定されない場合、二量体化ドメインは、異なり得る。いくつかの実施形態において、第1の二量体化ドメインは、核酸（例えば、mRNA、miRNA、siRNA、DNA）に結合し、第2の二量体化ドメインは、カーゴ上に存在する核酸配列である（例えば、第1の二量体化ドメインは、MS2であり、第2の二量体化ドメインは、MS2 RNAの高親和性結合ループである）。二量化メディエーターとして機能する任意の便利な化合物が、使用され得る。天然に存在する物質および合成物質の両方を含む多種多様な化合物は、二量化メディエーターとして使用され得る。二量体化メディエーターを選択するための適用可能かつ容易に観察可能なまたは測定可能な基準には、（A）リガンドが生理学的に許容される（すなわち、それが使用される細胞または動物に対して過度の毒性を欠いている）、（B）適切な治療用量範囲を有する、（C）必要に応じて、細胞膜および他の膜を通過することができる（場合によっては、細胞の外側から二量体化を媒介可能であり得る）、ならびに（D）所望の適用のために適切な親和性で設計されているキメラタンパク質の標的ドメインに結合する、が含まれる。第1の望ましい基準は、この化合物の二量化メディエーター活性がなかったら、比較的生理学的に不活性であることである。場合によっては、リガンドは、非ペプチドおよび非核酸であろう。さらなる二量体化ドメインは、例えば、US20170087087およびUS20170130197（これらのそれぞれは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）において記載されている。

【0445】

コンドリソームの特徴

一態様では、フソソーム、例えば、フソソームの薬学的組成物、またはフソソームの組成物は、ミトコンドリアの細胞源に由来する単離されたコンドリソーム（例えば、コンドリソーム調製物）を含む。

【0446】

別の態様では、フソソーム、例えば、フソソームの薬学的組成物、またはフソソームの組成物は、ミトコンドリアの細胞源に由来する単離された修飾コンドリソーム（例えば、修飾コンドリソーム調製物）を含む。

【0447】

別の態様では、フソソーム、例えば、フソソームの薬学的組成物、またはフソソームの組成物は、外因性タンパク質を発現するコンドリソーム（例えば、コンドリソーム調製物）を含む。

【0448】

10

20

30

40

50

本明細書に開示されるコンドリソーム（例えば、コンドリソーム調製物）、方法、および使用を含む、さらなる特徴および実施形態は、以下のうちの1つ以上を含む。

【0449】

いくつかの実施形態において、コンドリソーム（または組成物中のコンドリソーム）は、以下の特徴のうちの1つ以上（2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つまたはそれ以上、例えばすべて）を有する：

組成物が20%未満（例えば、15%未満、10%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満）を示す外側のコンドリソーム膜の完全性が、還元シトクロムcの添加後、酸素消費速度において状態4の速度を超えて増加する、

表5に記載されたすべての遺伝子座について、コンドリソーム調製物の「遺伝子の質」は、意味する、配列決定の割合が、野生型対立遺伝子へのマッピングを読み取ることを意味する場合、遺伝子の質が、80%超、例えば、85%超、90%超、95%超、97%超、98%超、99%超である、

グルタメート／マレートのRCRが、1～15、例えば、2～15、5～15、2～10、2～5、10～15の3/2、

グルタメート／マレートのRCRが、1～30、1～20、2～20、5～20、3～15、10～30の3/4、

スクシナート／ロテノンのRCRが、1～15、2～15、5～15、1～10、10～15の3/2、

スクシナート／ロテノンのRCRが、1～30、1～20、2～20、5～20、3～15、10～30の3/4、

パルミトイルカルニチンおよびマレートのRCRが、1～10（例えば、1～5）の3/2状態3/2状態の呼吸制御比（RCRの3/2）、

カルジオリピン含有量0.05～25（0.1～20、0.5～20、1～20、5～20、5～25、1～25、10～25、15～25）100*pmol/pmol総脂質、

ゲノム濃度0.001～2（例えば、0.001～1、0.01～1、0.01～0.1、0.01～0.05、0.1～0.2）mtDNA ug/mgタンパク質、または

1000超（例えば、1,500超、2000超、2,500超、3,000超、4,000超、5000超、10,000超、25,000超、50,000超、100,000超、200,000超、500,000）のmtDNA／核DNAの相対比。

【0450】

いくつかの実施形態において、コンドリソーム（または組成物中のコンドリソーム）は、以下の特徴のうちの1つ以上（2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上）を有する：

組成物中のコンドリソームは、150～1500nm、例えば200～1200nm、例えば500～1200nm、例えば175～950nmの中間の平均サイズを有する、

組成物中のコンドリソームは、1.1～6、例えば1.5～5の多分散性（D90/D10）を有する、実施形態において、培養細胞源（例えば、培養線維芽細胞）からの組成物中のコンドリソームは、2～5、例えば2.5～5の多分散性（D90/D10）を有する、

組成物が20%未満（例えば、15%未満、10%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満）を示す外側のコンドリソーム膜の完全性が、還元シトクロムcの添加後、酸素消費速度において状態4の速度を超えて増加する、

1～8mOD/ug総タンパク質、例えば3～7mOD/ug総タンパク質、1～5mOD/ug総タンパク質の複合体Iレベル、実施形態において、培養細胞供給源（例えば、培養線維芽細胞）からの調製物のコンドリソームは、1～5mOD/ug総タンパク質の複合体Iレベル、

0.05～5mOD/μg総タンパク質、例えば0.1～4mOD/μg総タンパク質、例えば0.5～3mOD/μg総タンパク質の複合体IIレベル、を有する。実施形態

10

20

30

40

50

において、培養細胞供給源（例えば、培養線維芽細胞）からの調製物のコンドリソームは、 $0.05 \sim 1 \text{ mOD} / \mu\text{g}$ 総タンパク質の複合体 I I レベル、

$1 \sim 30 \text{ mOD} / \mu\text{g}$ 総タンパク質、例えば、 $2 \sim 30$ 、 $5 \sim 10$ 、 $10 \sim 30 \text{ mOD} / \mu\text{g}$ 総タンパク質の複合体 I I I レベルを有する。実施形態において、培養細胞源（例えば、培養線維芽細胞）からのコンドリソームは、 $1 \sim 5 \text{ mOD} / \mu\text{g}$ 総タンパク質の複合体 I I I レベル、

$4 \sim 50 \text{ mOD} / \mu\text{g}$ 総タンパク質、例えば、 $5 \sim 50$ 、例えば、 $10 \sim 50$ 、 $20 \sim 50 \text{ mOD} / \mu\text{g}$ 総タンパク質の複合体 I V レベルを有する。実施形態において、培養細胞源（例えば、培養線維芽細胞）からのコンドリソームは、 $3 \sim 10 \text{ mOD} / \mu\text{g}$ 総タンパク質、

10

ゲノム濃度 $0.001 \sim 2$ （例えば、 $0.001 \sim 1$ 、 $0.01 \sim 1$ 、 $0.01 \sim 0.1$ 、 $0.01 \sim 0.05$ 、 $0.1 \sim 0.2$ ） $\text{mtDNA} \mu\text{g} / \text{mg}$ タンパク質、を有し、調製物の膜電位は、 $-5 \sim -200 \text{ mV}$ 、例えば、 $-100 \sim -200 \text{ mV}$ 、 $-50 \sim -200 \text{ mV}$ 、 $-50 \sim -75 \text{ mV}$ 、 $-50 \sim -100 \text{ mV}$ である。いくつかの実施形態において、調製物の膜電位は、 -150 mV 未満、 -100 mV 未満、 -75 mV 未満、 -50 mV 未満、例えば $-5 \sim -20 \text{ mV}$ であり、

100 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質（例えば、 90 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質未満、 80 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 70 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 60 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 50 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 40 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 30 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 25 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 20 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 15 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 10 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 5 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 4 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、 3 nmol 未満のカルボニル/ mg コンドリソームタンパク質、のタンパク質カルボニルレベル、

20

$20 \text{ mol}\%$ 未満/ mol ER タンパク質（例えば、 $15 \text{ mol}\%$ 超、 $10 \text{ mol}\%$ 超、 $5 \text{ mol}\%$ 超、 $3 \text{ mol}\%$ 超、 $2 \text{ mol}\%$ 超、 $1 \text{ mol}\%$ 超）/ mol ER タンパク質、

30

$5 \text{ mol}\%$ 超/ mol ミトコンドリアタンパク質（Mitochondria データベース（Calvo et al., NAR 2015 doi:10.1093/nar/gkv1003）においてミトコンドリアとして特定されたタンパク質）、例えば、 $10 \text{ mol}\%$ 超、 $15 \text{ mol}\%$ 超、 $20 \text{ mol}\%$ 超、 $25 \text{ mol}\%$ 超、 $30 \text{ mol}\%$ 超、 $35 \text{ mol}\%$ 超、 $40 \text{ mol}\%$ 超、 $50 \text{ mol}\%$ 超、 $55 \text{ mol}\%$ 超、 $60 \text{ mol}\%$ 超、 $65 \text{ mol}\%$ 超、 $70 \text{ mol}\%$ 超、 $75 \text{ mol}\%$ 超、 $80 \text{ mol}\%$ 超、 $90 \text{ mol}\%$ 超/ mol ミトコンドリアタンパク質）、

$0.05 \text{ mol}\%$ 超/ mol の MT- CO_2 、MT-ATP6、MT-ND5、および MT-ND6 タンパク質（組み合わせ）（例えば、 $0.1 \text{ mol}\%$ 超、 $0.5 \text{ mol}\%$ 超、 $1 \text{ mol}\%$ 超、 $2 \text{ mol}\%$ 超、 $3 \text{ mol}\%$ 超、 $4 \text{ mol}\%$ 超、 $5 \text{ mol}\%$ 超、 $7 \text{ mol}\%$ 超、 $8 \text{ mol}\%$ 超、 $9 \text{ mol}\%$ 超、 $10 \text{ mol}\%$ 超、 $15 \text{ mol}\%$ 超/ mol の MT- CO_2 、MT-ATP6、MT-ND5、および MT-ND6 タンパク質）、

40

遺伝的の質 80% 超、例えば、 85% 超、 90% 超、 95% 超、 97% 超、 98% 超、 99% 超、

mtDNA/核DNAの相対比は、 1000 超（例えば、 $1,500$ 超、 2000 超、 $2,500$ 超、 $3,000$ 超、 $4,000$ 超、 5000 超、 $10,000$ 超、 $25,000$ 超、 $50,000$ 超、 $100,000$ 超、 $200,000$ 超、 $500,000$ 超）であり、

エンドトキシンレベル 0.2 未満の EU/ μg タンパク質（例えば、 0.1 未満、 0.05 未満、 0.02 未満、 0.01 未満の EU/ μg タンパク質）、

外因性の非ヒト血清が実質的に存在しない、

50

グルタメート／マレートのRCRが、1～15、例えば、2～15、5～15、2～10、2～5、10～15の3/2、

グルタメート／マレートのRCRが、1～30、1～20、2～20、5～20、3～15、10～30の3/40、

スクシナート／ロテノンのRCRが、1～15、2～15、5～15、1～10、10～15の3/2、

スクシナート／ロテノンのRCRが、1～30、1～20、2～20、5～20、3～15、10～30の3/40、

0.05～100nmol/分/mg 総タンパク質（例えば、0.05～50、0.05～20、0.5～10、0.1～50、1～50、2～50、5～100、1～20nmol/分/mg 総タンパク質）の複合体Iの活性、

10

0.05～50nmol/分/mg 総タンパク質（例えば、0.05～50、0.05～20、0.5～10、0.1～50、1～50、2～50、5～50、1～20nmol/分/mg 総タンパク質）の複合体IIの活性、

0.05～20nmol/分/mg 総タンパク質（例えば、0.05～50、0.05～20、0.5～10、0.1～50、1～50、2～50、5～100、1～20nmol/分/mg 総タンパク質）の複合体IIIの活性、

0.1～50nmol/分/mg 総タンパク質（例えば、0.05～50、0.05～20、0.5～10、0.1～50、1～50、2～50、5～50、1～20nmol/分/mg 総タンパク質）の複合体IV活性、

20

1～500nmol/分/mg 総タンパク質（例えば、10～500、10～250、10～200、100～500nmol/分/mg 総タンパク質）の複合体V活性、

0.01～50pmol H₂O₂/ug タンパク質/時間の活性酸素種（ROS）生産レベル（例えば、0.05～40、0.05～25、1～20、2～20、0.05～20、1～20pmol H₂O₂/ug タンパク質/時間）、

0.05～5（例えば、0.5～5、0.5～2、1～5、1～4）mOD/分/ug 総タンパク質のクエン酸シンターゼ活性、

0.05～10（例えば、0.1～10、0.1～8、0.5～8、0.1～5、0.5～5、0.5～3、1～3）mOD/分/ug 総タンパク質のアルファケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性、

30

0.1～100（例えば、0.5～50、1～100、1～50、1～25、1～15、5～15）mOD/分/ug 総タンパク質のクレアチンキナーゼ活性、

0.1～10（例えば、0.5～10、0.5～8、1～10、1～8、1～5、2～3）mOD/分/ug 総タンパク質のピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性、

0.1～50（例えば、5～50、0.1～2、0.1～20、0.5～30）mOD/分/ug 総タンパク質のアコニターゼ活性である。実施形態において、血小板からのコンドリソーム調製物中のアコニターゼ活性は、0.5～5mOD/分/ug 総タンパク質である。実施形態において、培養細胞、例えば、線維芽細胞からのコンドリソーム調製物中のアコニターゼ活性は、5～50mOD/分/ug 総タンパク質であり、

0.05～50（例えば、0.05～40、0.05～30、0.05～10、0.5～50、0.5～25、0.5～10、1～5）pmol O₂/分/ug コンドリソームタンパク質の最大脂肪酸酸化レベル、

40

パルミトイルカルニチンおよびマレートのRCRが、1～10（例えば、1～5）の3/2状態3/2状態の呼吸制御比（RCRの3/2）、

1～1000（例えば、10～1000、10～800、10～700、50～1000、100～1000、500～1000、10～400、100～800）nmol Om/分/mg タンパク質/ΔGATP（kcal/モル）の電子伝達鎖効率、

50，000～2，000，000pmol/mg（例えば、50，000～1，000，000、50，000～500，000pmol/mg）の総脂質含有量、

0.8～8（例えば、1～5、2～5、1～7、1～6）pmol/pmolの二重結

50

合／総脂質比、

50～100（例えば、60～80、70～100、50～80）100*pmol／pmolのリン脂質／総脂質比、

0.2～20（例えば、0.5～15、0.5～10、1～10、0.5～10、1～5、5～20）100*pmol／pmolのリンスフィンゴ脂質／総脂質比、

セラミド含有量0.05～5（例えば、0.1～5、0.1～4、1～5、0.05～3）100*pmol／pmol 総脂質、

カルジオリピン含有量0.05～25（0.1～20、0.5～20、1～20、5～20、5～25、1～25、10～25、15～25）100*pmol／pmol 総脂質、

リゾホスファチジルコリン（LPC）含有量0.05～5（例えば、0.1～5、1～5、0.1～3、1～3、0.05～2）100*pmol／pmol 総脂質、

リゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）含有量0.005～2（例えば、0.005～1、0.05～2、0.05～1）100*pmol／pmol 総脂質、

ホスファチジルコリン（PC）含有量10～80（例えば、20～60、30～70、20～80、10～60、30～50）100*pmol／pmol 総脂質、

ホスファチジルコリンエーテル（PC O-）含有量0.1～10（例えば、0.5～10、1～10、2～8、1～8）100*pmol／pmol 総脂質、

ホスファチジルエタノールアミン（PE）含有量1～30（例えば、2～20、1～20、5～20）100*pmol／pmol 総脂質、

ホスファチジルエタノールアミンエーテル（PE O-）含有量0.05～30（例えば、0.1～30、0.1～20、1～20、0.1～5、1～10、5～20）100*pmol／pmol 総脂質、

ホスファチジルイノシトール（PI）含有量0.05～15（例えば、0.1～15、0.1～10、1～10、0.1～5、1～10、5～15）100*pmol／pmol 総脂質、

ホスファチジルセリン（PS）含有量0.05～20（例えば、0.1～15、0.1～20、1～20、1～10、0.1～5、1～10、5～15）100*pmol／pmol 総脂質、

スフィンゴミエリン（SM）含有量0.01～20（例えば、0.01～15、0.01～10、0.5～20、0.5～15、1～20、1～15、5～20）100*pmol／pmol 総脂質、

トリアシルグリセロール（TAG）含有量0.005～50（例えば、0.01～50、0.1～50、1～50、5～50、10～50、0.005～30、0.01～25、0.1～30）100*pmol／pmol 総脂質、

PE：LPE比 30～350（例えば、50～250、100～200、150～300）、

PC：LPC比 30～700（例えば、50～300、50～250、100～300、400～700、300～500、50～600、50～500、100～500、100～400）、

PE 18：n（n>0）含有量0.5～20%（例えば、1～20%、1～10%、5～20%、5～10%、3～9%）pmol AA／pmol 脂質クラス、

PE 20：4含有量0.05～20%（例えば、1～20%、1～10%、5～20%、5～10%）pmol AA／pmol 脂質クラス、

PC 18：n（n>0）含有量5～50%（5～40%、5～30%、20～40%、20～50%）pmol AA／pmol 脂質クラス、

PC 20：4含有量1～20%（例えば、2～20%、2～15%、5～20%、5～15%）pmol AA／pmol 脂質クラスである。

【0451】

ある特定の実施形態において、コンドリソーム（または組成物中のコンドリソーム）は

10

20

30

40

50

、レシピエント細胞、組織、もしくは対象（対照は、陰性対照（例えば、組成物を投与していない対照組織もしくは対象）、または投与前のベースライン、例えば、組成物の投与前の細胞、組織、もしくは対象であり得る）への投与時に、以下の特徴のうちの1つ以上を有する、

レシピエント細胞の基底呼吸を、対照と比較して、少なくとも10%（例えば、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超）増加させる、

組成物中のコンドリソームは、レシピエント細胞の少なくとも1%（例えば、少なくとも2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%）取り込まれる、

組成物中のコンドリソームが取り込まれ、レシピエント細胞の膜電位を維持する、

組成物中のコンドリソームは、レシピエント細胞中の少なくとも6時間、例えば、少なくとも12時間、18時間、24時間、2日間、3日間、4日間、1週間、2週間、1カ月間、2カ月間、3カ月間、6カ月間持続する、

レシピエント細胞、組織、または対象中のATPレベルを（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）増加させる、

レシピエント細胞、組織、または対象のアポトーシスを（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）減少させる、

レシピエント細胞、組織、または対象中の細胞脂質レベルを（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）減少させる、

レシピエント細胞、組織、または対象の膜電位を（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）増加させる、

レシピエント細胞、組織、または対象の脱共役呼吸を（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）増加させる、

レシピエント細胞、組織、または対象のPI3K活性を（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）増加させる、

レシピエント細胞、組織、または対象の還元ストレスを（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）増加させる、

対象（例えば、標的対象の血清中）の細胞、組織中の反応性酸素種（例えば、 H_2O_2 ）を（例えば参照値、例えば対照値、例えば未処理の対照と比較して、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）減少させる、

レシピエント細胞の細胞脂質レベルを、対照と比較して、少なくとも5%（例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超）減少させる、

レシピエント細胞の脱共役呼吸を、対照と比較して、少なくとも5%（例えば、10%

10

20

30

40

50

超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

レシピエント細胞中でのミトコンドリア透過性移行孔(MPTP)形成を、対照と比較して、少なくとも5%減少させ、10%超増加しない、

レシピエント細胞のAktレベルを、対照と比較して、少なくとも10%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

レシピエント細胞の総NAD/NADH比を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる、

10

レシピエント細胞のROSレベルを、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる、

心虚血に罹患している対象における短縮率を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

心虚血に罹患している対象における心臓拡張末期容積を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

心虚血に罹患している対象における収縮末期容積を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる、

20

虚血性心臓の梗塞領域を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる、

心虚血に罹患している対象における1回拍出量を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

心虚血に罹患している対象における駆出率を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

30

心虚血に罹患している対象における心拍出量を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

心虚血に罹患している対象における心係数を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)増加させる、

心虚血に罹患している対象における血清CKNBレベルを、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる、

40

心虚血に罹患している対象における血清cTnIレベルを、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる、

心虚血に罹患している対象における過酸化水素を、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる、

対象における血清コレステロールレベルおよび/またはトリグリセリドを、対照と比較して、少なくとも5%(例えば、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超)減少させる。

【0452】

50

いくつかの実施形態において、フソソームは、以下の特徴のうちの1つ以上を有する、コンドリソーム、例えば、ミトコンドリア源からの単離されたコンドソームを含む：
 組成物中のコンドリソームは、150～1500 nmの中間の平均サイズを有する、
 組成物中のコンドリソームは、1.1～6の多分散性（D90/D10）を有する、
 組成物中のコンドリソームの外側コンドリソーム膜の完全性は、還元シトクロムcの添加後、酸素消費速度において状態4の速度を上回る酸素消費速度の20%未満の増加を示す、

1～8 mOD / u g 総タンパク質の複合体Iレベル、
 0.05～5 mOD / u g 総タンパク質の複合体IIレベル、
 1～30 mOD / u g 総タンパク質の複合体IIIレベル、
 4～50 mOD / u g 総タンパク質の複合体IVレベル、
 ゲノム濃度 0.001～2 mtDNA u g / m g タンパク質、および／または
 組成物中のコンドリソームの膜電位は、-5～-200 mVである。

【0453】

いくつかの実施形態において、フソソームは、以下の特徴のうちの1つ以上を有する、コンドリソーム、例えば、ミトコンドリア源からの単離されたコンドソームを含む：
 100 nmol未満のカルボニル / m g コンドリソームタンパク質のタンパク質カルボニルレベル。

20モル%未満 / モル ERタンパク質
 5モル%超 / モル ミトコンドリアタンパク質 (Mitocarta)、
 0.05モル%超 / モルのMT-CO₂、MT-ATP6、MT-ND5、およびMT-ND6タンパク質、
 遺伝的の質 80%超、
 相対比 mtDNA / 核DNA 1000超、
 エンドトキシンレベル 0.2 EU未満 / u g タンパク質、および／または
 外因性の非ヒト血清が実質的に存在しない。

【0454】

いくつかの実施形態において、フソソームは、以下の特徴のうちの1つ以上を有する、コンドリソーム、例えば、ミトコンドリア源からの単離されたコンドソームを含む：
 グルタメート / マレートのRCRが、1～15の3/2、
 グルタメート / マレートのRCRが、1～30の3/4o、
 スクシナート / ロテノンのRCRが、1～15の3/2、
 スクシナート / ロテノンのRCRが、1～30の3/4o、
 0.05～100 nmol / 分 / m g 総タンパク質の複合体I活性、
 0.05～50 nmol / 分 / m g 総タンパク質の複合体II活性、
 0.05～20 nmol / 分 / m g 総タンパク質の複合体III活性、
 0.1～50 nmol / 分 / m g 総タンパク質の複合体IV活性、
 1～500 nmol / 分 / m g 総タンパク質の複合体V活性、
 0.01～50 pmol H₂O₂ / u g タンパク質 / 時間の活性酸素種 (ROS) 生産レベル、
 0.05～5 mOD / 分 / u g 総タンパク質のクエン酸シンターゼ活性、
 0.05～10 mOD / 分 / u g 総タンパク質のアルファケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性、
 0.1～100 mOD / 分 / u g 総タンパク質のクレアチンキナーゼ活性、
 0.1～10 mOD / 分 / u g 総タンパク質のピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性、
 0.1～50 mOD / 分 / u g 総タンパク質のアコニターゼ活性、
 0.05～50 pmol O₂ / 分 / u g コンドリソームタンパク質の最大脂肪酸酸化レベル、

パルミトイルカルニチンおよびマレートのRCRが、1～10の3/2状態3/2状態の呼吸制御比 (RCRの3/2)、および／または

1～1000nmol O₂/分/mg タンパク質/ΔGATP (kcal/モル単位) の電子伝達鎖効率。

【0455】

いくつかの実施形態において、フソソームは、以下の特徴のうちの1つ以上を有する、コンドドリソーム、例えば、ミトコンドリア源からの単離されたコンドソームを含む：

50,000～2,000,000pmol/mgの総脂質含有量、
0.8～8pmol/pmolの二重結合/総脂質比、
50～100 100*pmol/pmolのリン脂質/総脂質比、
0.2～20 100*pmol/pmolのリンスフィンゴ脂質/総脂質比、
セラミド含有量0.05～5 100*pmol/pmol 総脂質、
カルジオリピン含有量0.05～25 100*pmol/pmol 総脂質、
リゾホスファチジルコリン (LPC) 含有量0.05～5 100*pmol/pmol 総脂質、

10

リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) 含有量0.005～2 100*pmol/pmol 総脂質、

ホスファチジルコリン (PC) 含有量10～80 100*pmol/pmol 総脂質、

ホスファチジルコリンエーテル (PC O-) 含有量0.1～10 100*pmol/pmol 総脂質、

ホスファチジルエタノールアミン (PE) 含有量1～30 100*pmol/pmol 総脂質、

20

ホスファチジルエタノールアミン-エーテル (PE O-) 含有量0.05～30 100*pmol/pmol 総脂質、

ホスファチジルイノシトール (PI) 含有量0.05～15 100*pmol/pmol 総脂質、

ホスファチジルセリン (PS) 含有量0.05～20 100*pmol/pmol 総脂質、

スフィンゴミエリン (SM) 含有量0.01～20 100*pmol/pmol 総脂質、

トリアシルグリセロール (TAG) 含有量0.005～50 100*pmol/pmol 総脂質、

30

PE:LPE比 30～350、

PC:LPC比 30～700、

PE 18:n (n>0) 含有量0.5～20%pmol AA/pmol 脂質クラス、

PE 20:4 含有量0.05～20%pmol AA/pmol 脂質クラス、

PC 18:n (n>0) 含有量5～50%pmol AA/pmol 脂質クラス、および/または

PC 20:4 含有量1～20%。

【0456】

いくつかの実施形態において、フソソームは、以下の特徴のうちの1つ以上を有する、コンドドリソーム、例えば、ミトコンドリア源からの単離されたコンドソームを含む：

40

レシピエント細胞の基礎呼吸を、少なくとも10%増加させる、

組成物中のコンドドリソームは、レシピエント細胞の少なくとも1%に取り込まれる、

組成物中のコンドドリソームが取り込まれ、レシピエント細胞の膜電位を維持する、

組成物中のコンドドリソームは、レシピエント細胞に少なくとも6時間持続する、

レシピエント細胞の細胞脂質レベルを、少なくとも5%減少させる、

レシピエント細胞の脱共役呼吸を、少なくとも5%増加させる、

レシピエント細胞のミトコンドリア透過性移行孔 (MPTP) 形成を、少なくとも5%減少させ、10%超増加しない、

レシピエント細胞のAktレベルを、少なくとも10%増加させる、

レシピエント細胞の総NAD/NADH比を、少なくとも5%減少させる、および/ま

50

たは

レシピエント細胞のROSレベルを少なくとも5%減少させる。

【0457】

いくつかの実施形態において、コンドリソームを含むフソソームは、以下の特徴のうちの1つ以上をさらに有する：

心虚血に罹患している対象における短縮率を、少なくとも5%増加させる、
心虚血に罹患している対象における心臓拡張末期容積を、少なくとも5%増加させる、
心虚血に罹患している対象における収縮末期容積を、少なくとも5%減少させる、
虚血性心臓の梗塞領域を、少なくとも5%減少させる、
心虚血に罹患している対象における1回拍出量を、少なくとも5%増加させる、
心虚血に罹患している対象における駆出率を、少なくとも5%増加させる、
心虚血に罹患している対象における心拍出量を、少なくとも5%増加させる、
心虚血に罹患している対象における心係数を、少なくとも5%増加させる、
心虚血に罹患している対象における血清CKNBレベルを、少なくとも5%減少させる、
心虚血に罹患している対象における血清cTnIレベルを、少なくとも5%減少させる

10

、および／または

心虚血に罹患している対象における血清過酸化水素を、少なくとも5%減少させる。

【0458】

実施形態において、コンドリソームを含むフソソームは、少なくとも6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、5日間、7日間、10日間、14日間、21日間、30日間、45日間、60日間、90日間、120日間、180日間、またはそれ以上（例えば、4℃、0℃、-4℃、または-20℃、-80℃で）安定である。

20

【0459】

実施形態において、薬剤（例えば、コンドリソーム）を含むフソソームは、例えば、脂質ベースの材料などの天然、合成、もしくは操作されたカプセル封入材料、小胞、エキソソーム、脂質ラフト、クラスリン被覆小胞、または血小板（マイト粒子）、MSCもしくは星状細胞微小胞膜を含み得る。

【0460】

実施形態において、コンドリソームを含むフソソームは、150~20,000μgタンパク質/ml、150~15,000ug/ml、200~15,000ug/ml、300~15,000ug/ml、500~15,000ug/ml、200~10,000ug/ml、200~5,000ug/ml、300~10,000ug/ml、200ug/ml超、250ug/ml超、300ug/ml超、350ug/ml超、400ug/ml超、450ug/ml超、500ug/ml超、600ug/ml超、700ug/ml超、800ug/ml超、900ug/ml超、1mg/ml超、2mg/ml超、3mg/ml超、4mg/ml超、5mg/ml超、6mg/ml超、7mg/ml超、8mg/ml超、9mg/ml超、10mg/ml超、11mg/ml超、12mg/ml超、14mg/ml超、15mg/ml超（および、例えば、20mg/ml以下）で組成物中に存在する。

30

【0461】

実施形態において、コンドリソームを含むフソソームは、レシピエント動物、例えば、ヒトなどのレシピエント哺乳動物において望ましくない免疫応答を生じない（例えば、レシピエントにおけるIL-1-ベータ、IL-6、GM-CSF、TNF-アルファのレベル、またはリンパ節サイズを著しく増加させない）。

40

【0462】

カーゴへの修飾には、例えば、国際出願PCT/US16/64251に記載されるように、コンドリソームまたはコンドリソームの供給源への修飾が含まれる。いくつかの実施形態において、フソソームは、本明細書に記載の薬学的組成物を作製する方法を使用して作製されたコンドリソームを含む。

【0463】

50

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソーム組成物、例えば、ミトコンドリアまたはコンドリソームを含むフソソーム組成物は、以下のうちの1つ以上（例えば、2つ、3つ、または4つ）が可能である：

a) 標的細胞における最大呼吸を増加させることであって、例えば、最大呼吸の増加が少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、もしくは5倍、または10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、90%~100%、1倍~2倍、2倍~3倍、3倍~4倍、または4倍~5倍である、標的細胞における最大呼吸を増加させること、

b) 標的細胞における予備呼吸能を増加させることであって、例えば、予備呼吸能の増加が少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、または10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、90%~100%、1倍~2倍、2倍~3倍、3倍~4倍、または4倍~5倍である、標的細胞における予備呼吸能を増加させること、

c) 標的細胞におけるミトコンドリア生合成を刺激させることであって、例えば、ミトコンドリア生合成の刺激は、ミトコンドリアバイオマスを少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、もしくは5倍、または10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、90%~100%、1倍~2倍、2倍~3倍、3倍~4倍、または4倍~5倍増加させることを含む、標的細胞におけるミトコンドリア生合成を刺激させること、または

d) 標的細胞における核遺伝子の転写を調節（例えば、刺激または阻害）することであって、例えば、核遺伝子の転写レベルの変化は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、または10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、90%~100%、1倍~2倍、2倍~3倍、3倍~4倍、または4倍~5倍である、標的細胞における核遺伝子の転写を調節（例えば、刺激または阻害）すること。

【0464】

免疫原性

本明細書に記載の態様のいずれかのいくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、実質的に非免疫原性である。免疫原性は、例えば、本明細書に記載されるように定量化され得る。

【0465】

いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞と融合して、レシピエント細胞を生成する。いくつかの実施形態において、1つ以上のフソソームに融合したレシピエント細胞は、免疫原性について評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、例えば、抗IgM抗体で染色することによって、細胞表面上の抗体の存在について分析される。他の実施形態において、免疫原性は、PBMC細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）とインキュベートされ、次いで、PBMCによる細胞の溶解について評価される。他の実施形態において、免疫原性は、ナチュラルキラー（NK）細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、NK細胞とインキュベートされ、次いで、NK細胞による細胞の溶解について評価される。他の実施形態において、免疫原性は、CD8+T細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、CD8+T細胞とインキュベートされ、次いで、CD8+T細胞による細胞の溶解について評価される。

【0466】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、実質的に非免疫原性であるか、ま

たは既知である細胞、例えば、幹細胞、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、セルトリ細胞、または網膜色素上皮細胞の膜対称性を有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、本明細書に記載のアッセイによって測定されるように、幹細胞、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、セルトリ細胞、または網膜色素上皮細胞の免疫原性よりも5%、10%、20%、30%、40%、または50%以下よりも高い免疫原性を有する。

【0467】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照細胞、例えば、供給源細胞またはJurkat細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、上昇したレベルの免疫抑制剤を含む。いくつかの実施形態において、上昇レベルは、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍である。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照細胞には存在しない免疫抑制剤を含む。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照細胞、例えば、供給源細胞またはJurkat細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、低下したレベルの免疫活性化剤を含む。いくつかの実施形態において、低下したレベルは、参照細胞と比較して、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%である。いくつかの実施形態において、免疫活性化剤は、フソソームに実質的に存在しない。

【0468】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、例えば、プロテオミクスによって測定されるように、供給源細胞、例えば実質的に非免疫原性の供給源細胞の組成物と実質的に類似の組成物を有する膜を含む。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、供給源細胞の膜タンパク質の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%を含む膜を含む。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、供給源細胞の膜上の膜タンパク質の発現レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%で発現される膜タンパク質を含む膜を含む。

【0469】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物、またはフソソーム組成物が由来する供給源細胞は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、またはそれ以上を有する：

a. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはHeLa細胞と比較して、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

b. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞または本明細書に記載の参照細胞と比較して、LAG3、ICOS-L、ICOS、OX40L、OX40、CD28、B7、CD30、CD30L、4-1BB、4-1BBL、SLAM、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、B7-H3、またはB7-H4を含むが、これらに限定されない、1つ以上の共刺激タンパク質の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

c. マクロファージの貪食作用を抑制する表面タンパク質、例えばCD47の発現、例えば本明細書に記載の方法による検出可能な発現、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJurkat細胞と比較して、マクロファージの貪食作用を抑制する表面タンパク質、例えばCD47の1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上より高い発現、

d. 可溶性免疫抑制性サイトカイン、例えばIL-10の発現、例えば本明細書に記載の方法による検出可能な発現、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJurkat細胞と比較して、可溶性免疫抑制性サイトカイン、例えばIL

10

20

30

40

50

－10の発現の1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上より高い発現、

e. 可溶性免疫抑制タンパク質、例えばPD-L1の発現、例えば本明細書に記載の方法による検出可能な発現、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJurkat細胞と比較して、可溶性免疫抑制性タンパク質、例えばPD-L1の発現の1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上より高い発現、

f. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはU-266細胞と比較して、可溶性免疫刺激サイトカイン、例えば、IFN- γ またはTNF- α の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

g. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞、またはA549細胞もしくはSK-BR-3細胞と比較して、内因性免疫刺激抗原、例えば、Zg16またはHormad1の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

h. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJurkat細胞と比較して、例えば、本明細書に記載の方法による検出可能な発現、HLA-EまたはHLA-Gの発現、

i. 例えば、NK細胞の活性化を抑制するように作用する、例えばシアル酸を含む表面グリコシル化プロファイル、

j. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJurkat細胞と比較して、TCR α/β の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

k. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはHeLa細胞と比較して、ABO血液型の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

l. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJurkat細胞と比較して、副組織適合抗原(MHA)の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

m. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJurkat細胞と比較して、未修飾細胞などの参照細胞と比較して、ミトコンドリアMHAが10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下より少ないか、または検出可能なミトコンドリアMHAを有しない。

【0470】

実施形態において、共刺激タンパク質は、4-1BB、B7、SLAM、LAG3、HVEM、またはLIGHTであり、参照細胞は、HDLM-2である。いくつかの実施形態において、共刺激タンパク質は、BY-H3であり、参照細胞は、HeLaである。いくつかの実施形態において、共刺激タンパク質は、ICOSLまたはB7-H4であり、参照細胞は、SK-BR-3である。いくつかの実施形態において、共刺激タンパク質は、ICOSまたはOX40であり、参照細胞は、MOLT-4である。いくつかの実施形態において、共刺激タンパク質は、CD28であり、参照細胞は、U-266である。いくつかの実施形態において、共刺激タンパク質は、CD30LまたはCD27であり、参照細胞は、Daudiである。

【0471】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫系、例えば先天性免疫系による免疫原性応答を実質的に誘発しない。実施形態において、免疫原性応答は、例えば本明細書に記載されるように定量化され得る。いくつかの実施形態において、先天性免疫系による免疫原性応答は、NK細胞、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、樹状細胞、肥満細胞、またはガンマ/デルタT細胞を含むが、これらに限定されない、先天性免疫細胞による応答を含む。いくつかの実施形態において、先天性免疫系による免疫原性応答は、可溶性血液成分および膜結合成分を含む補体系による応答を含む。

【0472】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫系、例えば適応免疫系による

免疫原性応答を実質的に誘発しない。実施形態において、免疫原性応答は、例えば本明細書に記載されるように定量化され得る。いくつかの実施形態において、適応免疫系による免疫原性応答は、Ｔリンパ球（例えば、ＣＤ４ Ｔ細胞、ＣＤ８ Ｔ細胞、またはガンマデルタＴ細胞）、またはＢリンパ球の数または活性の変化、例えば、増加を含むが、これらに限定されない、適応免疫細胞による免疫原性応答を含む。いくつかの実施形態において、適応免疫系による免疫原性応答は、サイトカインまたは抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、またはＩｇＤ）の数または活性の変化、例えば、増加を含むが、これらに限定されない、可溶性血液成分のレベルの増加を含む。

【０４７３】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫原性が減少するように修飾される。免疫原性は、例えば、本明細書に記載されるように定量化され得る。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはＪｕｒｋａｔ細胞の免疫原性よりも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、または５０％未満より低い免疫原性を有する。

【０４７４】

本明細書に記載の態様のいずれかのいくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、例えば本明細書に記載の方法を使用して改変された、例えば免疫原性を減少させる、例えば、低減するように改変ゲノムを有する供給源細胞、例えば哺乳動物細胞に由来する。免疫原性は、例えば、本明細書に記載されるように定量化され得る。

【０４７５】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、例えば、以下のうちの１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、またはそれ以上のノックアウトなどで枯渇した哺乳動物細胞に由来する：

- a. ＭＨＣクラスⅠ、ＭＨＣクラスⅡ、またはＭＨＡ、
- b. ＬＡＧ３、ＩＣＯＳ－Ｌ、ＩＣＯＳ、Ｏｘ４０Ｌ、ＯＸ４０、ＣＤ２８、Ｂ７、ＣＤ３０、ＣＤ３０Ｌ ４－１ＢＢ、４－１ＢＢＬ、ＳＬＡＭ、ＣＤ２７、ＣＤ７０、ＨＶＥＭ、ＬＩＧＨＴ、Ｂ７－Ｈ３、またはＢ７－Ｈ４を含むが、これらに限定されない、１つ以上の共刺激タンパク質、
- c. 可溶性免疫刺激サイトカイン、例えば、ＩＦＮ－ガンマまたはＴＮＦ－α、
- d. 内因性免疫刺激抗原、例えば、Ｚｇ１６またはＨｏｒｍａｄ１、
- e. Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、
- f. ＡＢＯ血液型をコードする遺伝子、例えばＡＢＯ遺伝子、
- g. 免疫の活性化を駆動する転写因子、例えばＮＦκＢ、
- h. ＭＨＣ発現を制御する転写因子、例えば、クラスⅡトランス活性化因子（ＣＩＩＴＡ）、Ｘｂｏｘ ５の調節因子（ＲＦＸ５）、ＲＦＸ関連タンパク質（ＲＦＸＡＰ）、またはＲＦＸアンキリン反復（ＲＦＸＡＮＫ、ＲＦＸＢとしても知られている）、あるいは
- i. ＭＨＣクラスⅠ発現を低下させるＴＡＰタンパク質、例えば、ＴＡＰ２、ＴＡＰ１、またはＴＡＰＢＰ。

【０４７６】

いくつかの実施形態において、フソソームは、免疫抑制剤の発現の増加、例えば、以下のうちの１つ、２つ、３つまたはそれ以上（例えば、遺伝子修飾の前に、細胞は因子を発現しなかった）をもたらす遺伝子修飾を伴う供給源細胞に由来する：

- a. マクロファージの貪食作用を抑制する表面タンパク質、例えばＣＤ４７、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはＪｕｒｋａｔ細胞と比較して、ＣＤ４７の発現の増加、
- b. 可溶性免疫抑制性サイトカイン、例えばＩＬ－１０、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはＪｕｒｋａｔ細胞と比較して、ＩＬ－１０の発現の増加、
- c. 可溶性免疫抑制タンパク質、例えば、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、またはＢＴＬＡ、例えば、参照細胞、例えば、細胞供給源と他の類似の非修飾細胞またはＪｕｒ

10

20

30

40

50

k a t細胞と比較して、免疫抑制タンパク質の発現の増加、

d. 寛容原性タンパク質、例えば、I L T-2もしくはI L T-4アゴニスト、例えばH L A-EもしくはH L A-Gまたは任意の他の内因性I L T-2もしくはI L T-4アゴニスト、例えば、参照細胞、例えば、細胞供給源と他の類似の非修飾細胞またはJ u r k a t細胞と比較して、H L A-E、H L A-G、I L T-2、またはI L T-4の発現の増加、あるいは

e. 補体活性を抑制する表面タンパク質、例えば補体調節タンパク質、例えば崩壊促進因子(D A F、C D 5 5)に結合するタンパク質、例えば因子H(F H)様タンパク質-1(F H L-1)、例えばC 4 b結合タンパク質(C 4 B P)、例えば補体受容体1(C D 3 5)、例えば膜補因子タンパク質(M C P、C D 4 6)、例えばプロフェクチン(C D 5 9)、例えば、古典的および代替補体経路C D / C 5変換酵素を阻害するタンパク質、例えば、参照細胞、例えば、細胞供給源と他の類似の非修飾細胞またはJ u r k a t細胞と比較して、補体調節タンパク質の発現の増加。

【0477】

いくつかの実施形態において、発現レベルの増加は、参照細胞と比較して、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い。

【0478】

いくつかの実施形態において、フソソームは、免疫活性化剤の発現が低下するように修飾された供給源細胞、例えば、以下の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つまたはそれ以上に由来する：

a. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはH e L a細胞と比較して、M H CクラスIまたはM H CクラスIIの発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

b. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞または本明細書に記載の参照細胞と比較して、L A G 3、I C O S-L、I C O S、O x 4 0 L、O X 4 0、C D 2 8、B 7、C D 3 0、C D 3 0 L 4-1 B B、4-1 B B L、S L A M、C D 2 7、C D 7 0、H V E M、L I G H T、B 7-H 3、またはB 7-H 4を含むが、これらに限定されない、1つ以上の共刺激タンパク質の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

c. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはU-266細胞と比較して、可溶性免疫刺激サイトカイン、例えば、I F N-ガンマまたはT N F-aの発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

d. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞、またはA 5 4 9細胞もしくはS K-B R-3細胞と比較して、内因性免疫刺激抗原、例えば、Z g 1 6またはH o r m a d 1の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

e. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJ u r k a t細胞と比較して、T細胞受容体(T C R)の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

f. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはH e L a細胞と比較して、A B O血液型の発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

g. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJ u r k a t細胞と比較して、免疫の活性化を駆動する転写因子、例えば、N F k Bの発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない、

h. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはJ u r k a t細胞と比較して、M H C発現を制御する転写因子、例えばクラスIIトランス活性化因子(C I I T A)、X b o x 5の調節因子(R F X 5)、R F X関連タンパク質(R F X A P)、またはR F Xアンキリン反復(R F X A N K、R F X Bとしても知られている)の発現

10

20

30

40

50

が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ないか、あるいは

i. 参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞またはHeLa細胞と比較して、MHCクラスIの発現を減少させる、TAPタンパク質、例えば、TAP2、TAP1、またはTAPBPの発現が50%、40%、30%、20%、15%、10%、または5%以下より少ない。

【0479】

いくつかの実施形態において、MHCクラスIの発現を減少させるために、shRNAを発現するレンチウイルスを使用して修飾された哺乳動物細胞、例えば間葉幹細胞に由来するフソソーム組成物は、非修飾細胞、例えば修飾されていない間葉幹細胞と比較して、MHCクラスIの発現が少ない。いくつかの実施形態において、HLA-Gの発現を増加させるために、HLA-Gを発現するレンチウイルスを使用して修飾された哺乳動物細胞、例えば間葉幹細胞に由来するフソソーム組成物は、哺乳動物細胞、例えば間葉幹細胞に由来するフソソーム組成物は、非修飾細胞、例えば修飾されていない間葉幹細胞と比較して、HLA-Gの発現を増加している。

【0480】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、実質的に免疫原性ではない、供給源細胞、例えば哺乳動物細胞に由来し、供給源細胞は、例えば、IFN-ガンマELISPOTアッセイによってインビトロでアッセイされるように、0pg/mLからの0pg/mL超のレベルでT細胞IFN-ガンマ分泌を刺激、例えば誘導する。

【0481】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、供給源細胞、例えば哺乳動物細胞に由来し、哺乳動物細胞は、免疫抑制剤、例えば、グルココルチコイド（例えば、デキサメタゾン）、細胞増殖抑制剤（例えば、メトトレキサート）、抗体（例えば、ムロモナブ-CD3）、またはイムノフィリン調節剤（例えば、シクロスポリンまたはラパマイシン）で処理した細胞培養物からのものである。

【0482】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、供給源細胞、例えば哺乳動物細胞に由来し、哺乳動物細胞は、外因性薬剤、例えば治療剤を含む。

【0483】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、供給源細胞、例えば哺乳動物細胞に由来し、哺乳動物細胞は、組換え細胞である。

【0484】

いくつかの実施形態において、フソソームは、ウイルスイムノエバシン、例えば、hCMV US2またはUS11を発現するように遺伝子修飾された哺乳動物細胞に由来する。

【0485】

いくつかの実施形態において、フソソームの表面、またはフソソームが由来する哺乳動物細胞の表面は、ポリマー、例えば、免疫原性および免疫介在性クリアランスを低下させる生体適合性ポリマー、例えばPEGで共有結合または非共有結合的に修飾される。

【0486】

いくつかの実施形態において、フソソームの表面、またはフソソームが由来する哺乳動物細胞の表面は、シアル酸、例えば、NK抑制グリカンエピトープを含む糖ポリマーを含むシアル酸で共有結合または非共有結合的に修飾される。

【0487】

いくつかの実施形態において、フソソームの表面、またはフソソームが由来する哺乳動物細胞の表面は、ABO血液型を除去するために、例えばグリコシダーゼ酵素、例えばα-N-アセチルガラクトサミニダーゼで酵素処理される。

【0488】

いくつかの実施形態において、フソソームの表面、またはフソソームが由来する哺乳動物細胞の表面は、レシピエントの血液型と一致するABO血液型の発現を引き起こす、例

10

20

30

40

50

えば発現を誘発するために、酵素処理される。

【0489】

免疫原性を評価するためのパラメーター

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫原性の低下を有するように、実質的に免疫原性ではない、または修飾、例えば本明細書に記載の方法を使用して修飾された、供給源細胞、例えば、哺乳動物細胞に由来する。供給源細胞およびフソソーム組成物の免疫原性は、本明細書に記載のアッセイのいずれかによって決定することができる。

【0490】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、インビボでの移植片生着の増加、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のインビボでの移植片生着の増加を有する。いくつかの実施形態において、移植片生着は、適切な動物モデル、例えば本明細書に記載の動物モデルにおける、本明細書に記載のインビボでの移植片生着を測定するアッセイによって決定される。

10

【0491】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、奇形腫の形成の増加、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の奇形腫の形成の増加を有する。いくつかの実施形態において、奇形腫の形成は、適切な動物モデル、例えば、本明細書に記載の動物モデルにおける、本明細書に記載の奇形腫の形成を測定するアッセイによって決定される。

20

【0492】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、奇形腫の生存の増加、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の奇形腫の生存の増加を有する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、奇形腫の生存のアッセイにおいて1日以上生存する。いくつかの実施形態において、奇形腫の生存は、適切な動物モデル、例えば、本明細書に記載の動物モデルにおける、本明細書に記載の奇形腫の生存を測定するアッセイによって決定される。一実施形態において、奇形腫の形成は、実施例に記載されるように、固定組織、例えば、凍結またはホルマリン固定の画像解析、例えば、IHC染色、蛍光染色、またはH&Eによって測定される。いくつかの実施形態において、固定組織は、抗ヒトCD3、抗ヒトCD4、または抗ヒトCD8の抗体のうちのいずれか1つまたはすべてで染色され得る。

30

【0493】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、移植片または奇形腫へのCD8+T細胞浸潤の低下、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、例えば、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有する。一実施形態において、CD8+T細胞浸潤は、本明細書に記載のCD8+T細胞浸潤を測定するアッセイ、例えば、適切な動物モデル、例えば本明細書に記載の動物モデルにおける組織学的分析によって判定される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物に由来する奇形腫は、組織学組織切片の50倍の画像フィールドの0%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のCD8+T細胞浸潤を有する。

40

【0494】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、移植片または奇形腫へのCD4+T細胞浸潤の減少、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、CD4+T細胞浸潤は、本明細書に記載のCD4+T細胞浸潤を測定するアッセイ、例えば、適切な動物モデル、例えば本明細書に記載の動物モデルにおける組織学的分析によって判定される。いくつかの

50

実施形態において、フソソーム組成物に由来する奇形腫は、組織学組織切片の50倍の画像フィールドの0%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のCD4+T細胞浸潤を有する。

【0495】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、移植片または奇形腫へのCD3+NK細胞浸潤の減少、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の減少を有する。一実施形態において、CD3+NK細胞浸潤は、本明細書に記載のCD3+NK細胞浸潤を測定するアッセイ、例えば、適切な動物モデル、例えば本明細書に記載の動物モデルにおける組織学的分析によって判定される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物に由来する奇形腫は、組織学組織切片の50倍の画像フィールドの0%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のCD3+NK細胞浸潤を有する。

【0496】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、適切な動物モデル、例えば本明細書に記載の動物モデルへの、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞の1つ以上の移植後の体液性応答と比較して、適切な動物モデル、例えば本明細書に記載の動物モデルに由来するフソソームの1つ以上の移植後の体液性応答の減少によって測定される、免疫原性の減少を有する。いくつかの実施形態において、体液性応答の減少は、例えば、ELISAによって、抗細胞抗体価、例えば抗フソソーム抗体価によって血清試料で測定される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物が投与された動物からの血清試料は、非修飾細胞を投与した動物からの血清試料と比較して、抗細胞抗体価の1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上の減少を有する。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物が投与された動物からの血清試料は、抗細胞抗体価が増加しており、例えば、ベースラインから1%、2%、5%、10%、20%、30%、または40%増加しており、例えば、ベースラインは、フソソーム組成物の投与前の同じ動物からの血清試料を指す。

【0497】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、マクロファージ食作用の低下、例えば、マクロファージ食作用の1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の減少を有し、マクロファージ食作用の低下は、例えば、実施例82に記載されるように、インビトロで食作用指数をアッセイすることによって判定される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、マクロファージ食作用のインビトロアッセイにおいてマクロファージとインキュベートした場合、例えば、実施例82のアッセイによって測定されるように、0、1、10、100、またはそれ以上の食作用指数を有する。

【0498】

いくつかの実施形態において、供給源細胞は、例えば、実施例83のアッセイを使用し、PBMCによる細胞毒性媒介性細胞溶解の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞または間葉系幹細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の細胞溶解の低下を有する。実施形態において、供給源細胞は、外因性HLA-Gを発現する。

【0499】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、NK媒介性細胞溶解の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のNK媒介性細胞溶解の低下を有し、NK媒介性細胞溶解は、クロム放出アッセイまたはユーロピウム放出によってインビトロでアッセイされる。

【0500】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、CD8+T細胞媒介性細胞溶解の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のCD8+T細胞媒介性細胞溶解の低下を有し、CD8+T細胞媒介性細胞溶解は、クロム放出アッセイまたはユーロピウム放出によってインビトロでアッセイされる。実施形態において、活性化および／または増殖は、実施例85に記載されるように測定される。

【0501】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、CD4+T細胞の増殖および／または活性化の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有し、CD4+T細胞の増殖は、例えば、実施例86に記載されるように、インビトロでアッセイされる（例えば、CD3/CD28 Dynabeadsを用いた、修飾または非修飾哺乳動物供給源細胞、およびCD4+T細胞の共培養アッセイ）。

10

【0502】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、T細胞IFN-γ分泌の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のT細胞IFN-γ分泌の低下を有し、T細胞IFN-γ分泌は、例えば、IFN-γELISPOTによって、インビトロでアッセイされる。

20

【0503】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫原性サイトカインの分泌の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の免疫原性サイトカインの分泌の低下を有し、免疫原性サイトカインの分泌は、ELISAまたはELISPOTを使用して、インビトロでアッセイされる。

【0504】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫抑制性サイトカインの分泌の増加、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の免疫抑制性サイトカインの分泌の増加をもたらす、免疫抑制性サイトカインの分泌は、ELISAまたはELISPOTを使用して、インビトロでアッセイされる。

30

【0505】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、HLA-GまたはHLA-Eの発現の増加、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のHLA-GまたはHLA-Eの発現の増加を有し、HLA-GまたはHLA-Eの発現は、フローサイトメトリー、例えばFACSを使用して、インビトロでアッセイされる。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、HLA-GまたはHLA-Eの発現の増加、例えば、非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のHLA-GまたはHLA-Eの発現の増加を有するように修飾された供給源細胞に由来し、HLA-GまたはHLA-Eの発現は、フローサイトメトリー、例えばFACSを使用して、インビトロでアッセイされる。いくつかの実施形態において、HLA-G発現の増加を伴う修飾された細胞に由来するフソソーム組成物は、奇形腫形成アッセイ、例えば本明細書に記載の奇形腫形成アッセイにおいて、例えば、免疫細胞浸潤の減少によって測定されるように、免疫原性の低下を示す。

40

【0506】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、T細胞阻害剤リガンド（例えば、CTLA4、PD1、PD-L1）の発現の増加、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞

50

胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のT細胞阻害剤リガンドの発現の増加を有し、T細胞阻害剤リガンドの発現は、フローサイトメトリー、例えばFACSを使用して、インビトロでアッセイされる。

【0507】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、共刺激リガンドの発現の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の共刺激リガンドの発現の低下を有し、共刺激リガンドの発現は、フローサイトメトリー、例えばFACSを使用して、インビトロでアッセイされる。

10

【0508】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの発現の低下、例えば、参照細胞、例えば、供給源細胞またはHeLa細胞と他の類似の非修飾細胞と比較して、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上のMHCクラスIまたはMHCクラスIIの発現の低下を有し、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの発現は、フローサイトメトリー、例えばFACSを使用して、インビトロでアッセイされる。

【0509】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、実質的に非免疫原性である、細胞源、例えば哺乳動物細胞源に由来する。いくつかの実施形態において、免疫原性は、例えば、本明細書に記載されるように、定量化され得る。いくつかの実施形態において、哺乳動物細胞源は、以下の特徴のうちのいずれか1つ、すべて、またはそれらの組み合わせを含む：

20

a. 供給源細胞は、自己細胞源から得られ、例えば、細胞が、フソソーム組成物を受容する、例えば投与されるレシピエントから得られる、

b. 供給源細胞は、レシピエント、例えば、フソソーム組成物を受容する、例えば投与される本明細書に記載のレシピエントと、例えば、同様の性別が一致する、同種異系細胞源から得られる、

c. 供給源細胞は、例えば、1つ以上の対立遺伝子においてレシピエントのHLAと一致するHLAである同種異系細胞源から得られる、

30

d. 供給源細胞は、HLAホモ接合体である同種異系細胞源から得られる、

e. 供給源細胞は、MHCクラスIおよびIIを欠いている（または参照細胞と比較してレベルが低下した）同種異系細胞源から得られるか、または

f. 供給源細胞は、幹細胞、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、セルトリ細胞、または網膜色素上皮細胞を含むが、これらに限定されない、実質的に非免疫原性であることが知られている細胞源から得られる。

【0510】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物を投与される対象は、フソソームと反応する既存の抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有するか、有することが知られているか、または試験される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物を投与される対象は、フソソームと反応する既存の抗体の検出可能なレベルを有さない。抗体の試験は、例えば、実施例78に記載されている。

40

【0511】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物を受容している対象は、フソソームと反応する抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有するか、有することが知られているか、または試験される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物を受容した対象（例えば、少なくとも、1回、2回、3回、4回、5回、またはそれ以上）は、フソソームと反応する抗体の検出可能なレベルを有さない。実施形態において、抗体のレベルは、2つの時点間で1%、2%、5%、10%、20%、または50%を超えて上昇せず、最初の時点はフソソームの第1の投与前であり、第2の時点はフソソームの1回以上の投与後

50

である。抗体の試験は、例えば、実施例 79 に記載されている。

【0512】

さらなる治療剤

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、さらなる薬剤、例えば治療剤と、対象、例えばレシピエント、例えば本明細書に記載のレシピエントに同時投与される。いくつかの実施形態において、同時投与される治療剤は、免疫抑制剤、例えば、グルココルチコイド（例えば、デキサメタゾン）、細胞増殖抑制剤（例えば、メトトレキサート）、抗体（例えば、ムロモナブ-CD3）、またはイムノフィリン調節剤（例えば、シクロスポリンまたはラパマイシン）である。実施形態において、免疫抑制剤は、フソソームの免疫介在性クリアランスを減少させる。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫賦活剤、例えばアジュバント、インターロイキン、サイトカイン、またはケモカインと同時に投与される。

10

【0513】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物および免疫抑制剤は、同時に投与され、例えば同時に投与される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫抑制剤の投与前に投与される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫抑制剤の投与後に投与される。

【0514】

いくつかの実施形態において、免疫抑制剤は、イブプロフェン、アセトアミノフェン、シクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸、シクロホスファミド、グルココルチコイド、シロリムス、アザトリオピン、またはメトトレキサートなどの小分子である。

20

【0515】

いくつかの実施形態において、免疫抑制剤は、ムロノマブ（抗CD3）、ダクリズマブ（抗IL12）、バシリキシマブ、インフリキシマブ（抗TNF α ）、またはリツキシマブ（抗CD20）を含むが、これらに限定されない、抗体分子である。

【0516】

いくつかの実施形態において、免疫抑制剤とフソソーム組成物の同時投与は、フソソーム組成物の単独での投与と比較して、対象におけるフソソーム組成物の持続性の向上をもたらす。いくつかの実施形態において、同時投与におけるフソソーム組成物の持続性の向上は、単独で投与した場合のフソソーム組成物の持続性と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、同時投与におけるフソソーム組成物の持続性の向上は、単独で投与した場合のフソソーム組成物の生存率と比較して、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、または30日もしくはそれ以上である。

30

【0517】

送達

いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、タンパク質、脂質、もしくは化学的フソゲン）またはフソゲン結合パートナーは、フソソームの送達の前に、同時に、またはその後に、標的細胞または組織に送達される。

40

【0518】

いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、タンパク質、脂質、もしくは化学的フソゲン）またはフソゲン結合パートナーは、フソソームの送達の前、同時に、またはその後に、非標的細胞または組織に送達される。

【0519】

いくつかの実施形態において、フソゲン（例えば、タンパク質もしくは脂質フソゲン）またはフソゲン結合パートナーをコードする核酸は、フソソームの送達の前、同時に、またはその後に、標的細胞または組織に送達される。

【0520】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド、核酸、リボ核タンパク質、またはフソゲ

50

ン（例えば、タンパク質、脂質、もしくは化学的フソゲン）またはフソゲン結合パートナーの発現を上方調節または下方調節する小分子は、フソソームの送達の前に、同時に、またはその後に、標的細胞または組織に送達される。

【0521】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド、核酸、リボ核タンパク質、またはフソゲン（例えば、タンパク質、脂質、もしくは化学的フソゲン）またはフソゲン結合パートナーの発現を上方調節または下方調節する小分子は、フソソームの送達の前に、同時に、またはその後に、非標的細胞または組織に送達される。

【0522】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、フソソームの送達の前、同時、またはその後に、融合速度を増加させるために、（例えば、ストレスを誘発するまたは細胞分裂によって）修飾される。いくつかの非限定的な例には、虚血の誘発、化学療法、抗生物質、照射、毒素、炎症、炎症性分子、抗炎症性分子、酸傷害、塩基性傷害、火傷、ポリエチレングリコール、神経伝達物質、骨髄毒性薬、成長因子、またはホルモンによる治療、組織切除、飢餓、および／または運動が含まれる。

10

【0523】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、標的組織へのフソソームの輸送速度を増加させるために、血管拡張剤（例えば、一酸化窒素（NO）、一酸化炭素、プロスタサイクリン（PGI₂）、ニトログリセリン、フェントラミン）または血管収縮剤（例えば、アンジオテンシン（AGT）、エンドセリン（EDN）、ノルエピネフリン）で処置される。

20

【0524】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、化学薬剤、例えば化学療法剤で処置される。そのような実施形態において、化学療法剤は、標的細胞または組織の融合活性を高める標的細胞または組織への損傷を誘発する。

【0525】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、物理的ストレス、例えば電気融合で処置される。そのような実施形態において、物理的ストレスは、標的細胞または組織の膜を不安定化し、標的細胞または組織の融合活性を高める。

【0526】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、フソソームとの融合を強化するために、薬剤で処置され得る。例えば、特定のニューロン受容体は、融合特性を強化するために、抗うつ薬で刺激され得る。

30

【0527】

本明細書に記載のフソソームを含む組成物は、循環系、肝臓系、腎臓系、心肺系、中枢神経系、末梢神経系、筋骨格系、リンパ系、免疫系、感覚神経系（視覚、聴覚、嗅覚、触覚、味覚）、消化器系、内分泌系（脂肪組織代謝調節を含む）、および生殖系に投与され得るか、または標的化され得る。

【0528】

実施形態において、本明細書に記載のフソソーム組成物は、細胞または組織、例えばヒト細胞または組織にエクスピボで送達される。いくつかの実施形態において、組成物は、（例えば、外傷、疾患、低酸素症、虚血または他の損傷からの）損傷状態にあるエクスピボ組織に送達される。

40

【0529】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、エクスピボ移植（例えば、組織外植片または移植のための組織、例えば、ヒトの静脈、骨または腱などの筋骨格移植片、角膜、皮膚、心臓弁、神経；または、単離もしくは培養された臓器、例えば、ヒトに移植される臓器、例えば、ヒトの心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、腸、胸腺、眼）に送達される。組成物は、移植の生存率、呼吸、または他の機能を改善する。組成物は、移植前、移植中、および／または移植後に、組織または臓器に送達され得る。

50

【0530】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソーム組成物は、対象に由来する細胞または組織にエクスピボで送達される。いくつかの実施形態において、細胞または組織は、対象に再投与される（すなわち、細胞または組織は、自己移植である）。

【0531】

フソソームは、任意の哺乳動物（例えば、ヒト）組織、例えば、上皮、結合、筋肉、または神経組織もしくは細胞、およびそれらの組み合わせからの細胞と融合し得る。フソソームは、例えば、心臓血管系（心臓、血管系）、消化器系（食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、腸、結腸、直腸、および肛門）；内分泌系（視床下部、下垂体、松果体もしくは松果腺、甲状腺、副甲状腺、副腎）；排泄系（腎臓、尿管、膀胱）；リンパ系（リンパ、リンパ節、リンパ管、扁桃、アデノイド、胸腺、脾臓）；外皮系（皮膚、髪、爪）；筋肉系（例えば、骨格筋）；神経系（脳、脊髄、神経）；生殖器系（卵巣、子宮、乳腺、精巣、輸精管、精嚢、前立腺）；呼吸器系（咽頭、喉頭、気管、気管支、肺、横隔膜）；骨格系（骨、軟骨）、およびそれらの組み合わせからの任意の真核生物（例えば、哺乳動物）臓器系に送達され得る。

10

【0532】

実施形態において、フソソームは、組織、例えば、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、胃腸管、腎臓、精巣、卵巣、脳、生殖器官、中枢神経系、末梢神経系、骨格筋、内皮、内耳、脂肪組織（例えば、茶色脂肪組織または白色脂肪組織）、または眼を標的とし、対象、例えば、マウスに投与される場合、投与されたフソソームの集団中のフソソームの少なくとも0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%は、例えば、実施例87または100のアッセイによって、24、48、または72時間後、標的組織中に存在する。

20

【0533】

実施形態において、フソソームは、幹細胞または前駆細胞、例えば、骨髄間質細胞、骨髄由来成体前駆細胞（MAPC）、内皮前駆細胞（EPC）、芽細胞、脳室下帯で形成された中間前駆細胞、神経幹細胞、筋肉幹細胞、衛星細胞、肝臓幹細胞、造血幹細胞、骨髄間質細胞、表皮幹細胞、胚性幹細胞、間葉性幹細胞、臍帯幹細胞、前駆細胞、筋肉前駆細胞、筋芽細胞、心筋芽細胞、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、神経前駆細胞、肝芽細胞の供給源からの細胞と融合し得る。

30

【0534】

実施形態において、標的細胞は、がん細胞ではなく、例えば、膠芽腫細胞ではない。実施形態において、標的細胞は、幹細胞または完全に分化した細胞である。

【0535】

ランディングパッドの実施形態などのためのフソゲン結合パートナー

ある特定の態様では、本開示は、対象における標的細胞に膜封入調製物を送達する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本方法は、対象に、フソソーム、例えば、フソゲン、例えば、ミオメーカータンパク質をコードする核酸を含む膜封入調製物を投与することを含み、核酸は、対象におけるフソソームの表面上にフソゲンを発現させる条件下で、細胞内で存在しないまたは発現しない（例えば、存在するが、転写または翻訳されない）。いくつかの実施形態において、本方法は、対象に、薬剤、例えば治療剤、およびフソゲン結合パートナーを含み、任意に担体、例えば膜を含む組成物を、フソソームにおけるフソゲンおよびフソゲン結合パートナーの融合を可能にする条件下で投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、担体は、膜、例えば脂質二重層を含み、例えば、薬剤は、脂質二重層内に配置される。いくつかの実施形態において、脂質二重層は、標的細胞と融合し、それによって、対象における薬剤を標的細胞に送達する。

40

【0536】

一実施形態において、フソゲン結合パートナーは、例えば、標的細胞、例えば、本明細書に開示される標的細胞の膜（例えば脂質二重層）内に配置されている部分、例えばタン

50

パク質分子である。一実施形態において、膜は、細胞表面膜、またはオルガネラの細胞内膜、例えば、ミトコンドリア、リソソーム、またはゴルジ装置であり得る。一実施形態において、フソゲン結合パートナーは、（例えば、本明細書に記載の方法によって）内因的に発現され得るか、または外因的に発現され得る。一実施形態において、フソゲン結合パートナーは、膜で他のフソゲン結合パートナーとクラスター化することができる。

【0537】

一実施形態において、標的細胞の膜におけるフソゲン結合パートナーまたは複数のフソゲン結合パートナーの存在は、標的細胞（例えば、本明細書に記載の細胞）上のフソゲン結合パートナーと、フソソーム（例えば、本明細書に記載のフソソーム）におけるフソゲンとの間の相互作用、例えば結合を促進することができる界面を作り出す。いくつかの実施形態において、フソソームにおけるフソゲンは、例えば、標的細胞上の、例えば、標的細胞の膜（例えば、脂質二重層）上のフソゲン結合パートナーと相互作用、例えば結合して、標的膜とのフソソームの融合を誘導する。いくつかの実施形態において、フソゲンは、ミトコンドリアを含む細胞内オルガネラ上のランディングパッド上のフソゲン結合パートナーと相互作用、例えば結合して、細胞内オルガネラとのフソソームの融合を誘導する。

【0538】

フソゲン結合パートナーは、以下で議論される方法のいずれかによって、標的細胞、例えば本明細書に開示される標的細胞に導入され得る。

【0539】

一実施形態において、フソゲン結合パートナーを標的細胞に導入する方法は、対象（例えば、本明細書に記載の対象）からの（例えば、アフェレーシスまたは生検を介して）標的細胞の除去、例えば、抽出、および例えば、フソゲン結合パートナーが標的細胞の膜上で発現することを可能にする条件下でのフソゲン結合パートナーの投与、例えば、それへの曝露を含む。一実施形態において、本方法は、エキスピボでフソゲン結合パートナーを発現する標的細胞を、フソゲンを含むフソソームと接触させて、フソソームの標的細胞膜との融合を誘導することをさらに含む。一実施形態において、フソソームに融合した標的細胞は、対象に、例えば静脈内で再導入される。

【0540】

一実施形態において、フソゲン結合パートナーを発現する標的細胞は、対象に、例えば静脈内で再導入される。一実施形態において、本方法は、対象に、フソゲンを含むフソソームを投与して、フソソームにおけるフソゲンと標的細胞におけるフソゲン結合パートナーとの相互作用、例えば結合、およびフソソームの標的細胞との融合を可能にすることをさらに含む。

【0541】

いくつかの実施形態において、標的細胞は、内因性細胞表面分子、例えば、フソゲン結合パートナー、例えば、臓器、組織、または細胞標的化分子の発現を増加または減少させるために、後成的修飾因子、例えば、小分子後成的修飾因子で処置され、細胞表面分子は、タンパク質、グリカン、脂質または低分子量分子である。一実施形態において、標的細胞は、内因性細胞表面分子、例えば、フソゲン結合パートナー、例えば、臓器、組織、または細胞標的化分子の発現を増加させるために、遺伝的に修飾され、細胞表面分子は、タンパク質、グリカン、脂質または低分子量分子である。一実施形態において、遺伝子修飾は、内因性細胞表面分子、例えば、フソゲン結合パートナーの転写活性化因子の発現を減少させ得る。

【0542】

一実施形態において、標的細胞は、外因性細胞表面分子、例えば、フソゲン結合パートナーを発現させる、例えば過剰発現させるために、遺伝的に修飾され、細胞表面分子は、タンパク質、グリカン、脂質、または低分子量分子である。

【0543】

いくつかの実施形態において、標的細胞は、細胞内の外因性フソゲンの発現、例えば導入遺伝子の送達を増加させるために、遺伝的に修飾される。いくつかの実施形態において

10

20

30

40

50

、核酸、例えば、DNA、mRNA、またはsiRNAは、例えば、細胞表面分子（タンパク質、グリカン、脂質、または低分子量分子）の発現を増加または減少させるために、標的細胞に移される。いくつかの実施形態において、核酸は、フソゲン結合パートナー、例えば、shRNAまたはsiRNA構築物のリプレッサーを標的とする。いくつかの実施形態において、核酸は、フソゲン結合パートナーリプレッサーの阻害剤をコードする。

【0544】

使用方法

本明細書に記載の薬学的組成物の投与は、経口、吸入、経皮または非経口（静脈内、腫瘍内、腹腔内、筋肉内、腔内、および皮下を含む）投与によるものであり得る。フソソームは、単独で投与され得るか、または薬学的組成物として製剤化され得る。

【0545】

フソソームは、単位用量の経口、非経口、経皮、または吸入組成物などの単位用量組成物の形態で投与され得る。そのような組成物は、混合によって調製され、経口、吸入、経皮、または非経口投与に適切に適応し、それ自体、錠剤、カプセル、経口液体製剤、粉末、顆粒、ロゼンジ、再構成可能な粉末、注射可能および注入可能な溶液もしくは懸濁液、または座薬もしくはエアロゾルの形態であり得る。

【0546】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソーム組成物の送達は、細胞の分化、脱分化、または分化転換を誘導またはブロックし得る。標的哺乳動物細胞は、前駆細胞であり得る。あるいは、標的哺乳動物細胞は、分化細胞であってもよく、細胞運命の変化には、多能性前駆細胞への脱分化の促進、またはそのような脱分化の遮断が含まれる。細胞運命の変化が望まれる状況では、細胞運命誘導分子またはシグナルをコードする本明細書に記載のフソソームの有効量が、細胞運命の変化が誘導されるような条件下で標的細胞に導入される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフソソームは、細胞の亜集団を第1の表現型から第2の表現型に再プログラムするのに有用である。このような再プログラミングは、一時的または永続的であり得る。任意に、再プログラミングは、標的細胞に中間表現型を採用するように誘導する。

【0547】

標的細胞集団における細胞分化を減少させる方法も提供される。例えば、1つ以上の前駆細胞タイプを含む標的細胞集団は、組成物が前駆細胞の分化を低減するような条件下で、本明細書に記載のフソソーム組成物と接触する。ある特定の実施形態において、標的細胞集団は、哺乳動物対象の損傷組織、または外科的処置の影響を受ける組織を含む。前駆細胞は、例えば、間質前駆細胞、神経前駆細胞、または間葉前駆細胞である。

【0548】

カーゴを含む本明細書に記載のフソソーム組成物は、細胞組織または対象にそのようなカーゴを送達するために使用してもよい。本明細書に記載のフソソーム組成物の投与によるカーゴの送達は、細胞タンパク質発現レベルを修正してもよい。ある特定の実施形態において、投与される組成物は、ポリペプチドが送達される細胞中で実質的に存在しないまたは減少する機能的活性を提供する1つ以上のカーゴ（例えば、ポリペプチドまたはmRNA）の上方調節（細胞中の発現、細胞中の送達、または細胞内での誘導を介して）を導く。例えば、欠損している機能的活性は、本質的には酵素的、構造的、または調節的であり得る。関連する実施形態において、投与される組成物は、ポリペプチドが上方調節される細胞に存在するが、実質的に欠損する機能的活性を（例えば相乗的に）増加させる1つ以上のポリペプチドの上方調節を導く。ある特定の実施形態において、投与される組成物は、ポリペプチド、siRNA、もしくはmiRNAが送達される細胞に存在するか、または上方調節される機能的活性を抑制する1つ以上のカーゴ（例えば、ポリペプチド、siRNA、もしくはmiRNA）の下方調節（細胞中の発現、細胞中の送達、または細胞内での誘導を介して）を導く。例えば、上方調節された機能的活性は、本質的には酵素的、構造的、または調節的であり得る。関連する実施形態において、投与される組成物は、ポリペプチドが下方調節される細胞に存在するか、または上方調節される機能的活性を（

10

20

30

40

50

例えば相乗的に) 減少加させる1つ以上のポリペプチドの下方調節を導く。ある特定の実施形態において、投与される組成物は、ある特定の機能的活性の上方調節および他の機能的活性の下方調節を導く。

【0549】

実施形態において、フソソーム組成物(例えば、ミトコンドリアまたはDNAを含むもの)は、標的細胞への効果を媒介し、この効果は、少なくとも1、2、3、4、5、6、もしくは7日間、2、3、もしくは4週間、または1、2、3、6、もしくは12カ月持続する。いくつかの実施形態(例えば、フソソーム組成物が外因性タンパク質を含む)において、この効果は、1、2、3、4、5、6、もしくは7日間、2、3、もしくは4週間、または1、2、3、6、もしくは12カ月未満持続する。

10

【0550】

エクスピボ適用

実施形態において、本明細書に記載のフソソーム組成物は、細胞または組織、例えばヒト細胞または組織にエクスピボで送達される。実施形態において、組成物は、エクスピボで細胞または組織の機能を改善し、例えば、細胞生存率、呼吸、または他の機能(例えば、本明細書に記載の別の機能)を改善する。

【0551】

いくつかの実施形態において、組成物は、(例えば、外傷、疾患、低酸素症、虚血または他の損傷からの)損傷状態にあるエクスピボ組織に送達される。

【0552】

いくつかの実施形態において、組成物は、エクスピボ移植(例えば、組織外植片または移植のための組織、例えば、ヒトの静脈、骨または腱などの筋骨格移植片、角膜、皮膚、心臓弁、神経;または、単離もしくは培養された臓器、例えば、ヒトに移植される臓器、例えば、ヒトの心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、腸、胸腺、眼)に送達される。組成物は、移植前、移植中、および/または移植後に、組織または臓器に送達され得る。

20

【0553】

いくつかの実施形態において、組成物は、細胞、例えば細胞調製物と送達、投与、または接触される。細胞調製物は、細胞療法調製物(ヒト対象への投与を意図した細胞調製物)であり得る。実施形態において、細胞調製物は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する、例えば、組換えCARを発現する細胞を含む。CARを発現する細胞は、例えば、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、制御性T細胞であり得る。実施形態において、細胞調製物は、神経幹細胞調製物である。実施形態において、細胞調製物は、間葉系幹細胞(MSC)調製物である。実施形態において、細胞調製物は、造血幹細胞(HSC)調製物である。実施形態において、細胞調製物は、膵島細胞調製物である。

30

【0554】

インピボでの使用

本明細書に記載のフソソーム組成物は、対象、例えば哺乳動物、例えばヒトに投与することができる。そのような実施形態において、対象は、特定の疾患または状態(例えば、本明細書に記載の疾患または状態)のリスクがあり得るか、その症状を有し得るか、あるいはそれを有すると診断または特定され得る。

40

【0555】

いくつかの実施形態において、フソソームの供給源は、フソソーム組成物を投与される同じ対象からのものである。他の実施形態において、それらは、異なる。例えば、フソソームの供給源およびレシピエント組織は、自己(同じ対象から)または異種(異なる対象から)であり得る。いずれの場合でも、本明細書に記載のフソソーム組成物のドナー組織は、レシピエント組織とは異なる組織タイプであってもよい。例えば、ドナー組織は、筋肉組織であってもよく、レシピエント組織は、結合組織(例えば脂肪組織)であってもよい。他の実施形態において、ドナー組織およびレシピエント組織は、同じまたは異なるタイプであってもよいが、異なる器官系からののものであってもよい。

50

【0556】

本明細書に記載のフソソーム組成物は、がん、自己免疫疾患、感染症、代謝性疾患、神経変性疾患、または遺伝病（例えば、酵素欠乏症）を有する対象に投与され得る。いくつかの実施形態において、対象は、再生を必要としている。

【0557】

いくつかの実施形態において、フソソームは、膜融合を阻害するタンパク質の阻害剤と同時投与される。例えば、サプレシン（Suppressyn）は、細胞間融合を阻害するヒトタンパク質である（Sugimoto et al., “A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion” Scientific Reports 3:1462 DOI:10.1038/srep01462）。したがって、いくつかの実施形態において、フソソームは、サプレシン、例えばsiRNAまたは阻害抗体の阻害剤と同時投与される。

10

【0558】

非ヒト適用

本明細書に記載の組成物はまた、農場または作業動物（ウマ、ウシ、ブタ、ニワトリなど）、ペットまたは動物園の動物（ネコ、イヌ、トカゲ、トリ、ライオン、トラ、およびクマなど）、水産養殖動物（サカナ、カニ、エビ、カキなど）、植物種（木、作物、観賞用の花など）、発酵種（サッカロミセスなど）を含むが、これらに限定されない、様々な他の生物の細胞または組織機能または生理学を同様に調節するために使用してもよい。本明細書に記載のフソソーム組成物は、そのような非ヒト供給源から作製され、非ヒト標的細胞または組織または対象に投与され得る。

20

【0559】

フソソーム組成物は、標的に対して自己由来、同種異系、または異種であり得る。

【0560】

本明細書に引用されるすべての参考文献および刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0561】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態をさらに説明するために提供されるが、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、当業者に知られている他の手順、方法論、または技術を代わりに使用され得る、それらの例示的な性質によって理解されるであろう。

30

【実施例】

【0562】

実施例1．化学的処置（PEG）を介して除核融合細胞の生成

ドナーHeLa細胞を発現するMito-DsRed（ミトコンドリア特異的標的色素）を、0.25%トリプシンでトリプシン処理し、収集し、500xgで5分間回転させ、PBSで1回洗浄し、計数した。続いて、 1.0×10^6 細胞を、10ug/mlのサイトカラシン-Bが追加される完全MEM-アルファ（+10%FBS、+1%ペニシリン/ストレプトマイシン、+グルタミン）中の3mlの12.5%フィコールに15分間再懸濁した。細胞を除核するために、それらを、以下のフィコール画分からなる不連続フィコール勾配に移した（上から下へ）：2mlの12.5%フィコール、0.5mlの15%フィコール、0.5mlの16%フィコール、2mlの17%フィコール勾配、2mlの25%フィコール。すべてのフィコール勾配画分は、10ug/mlのサイトカラシンBが対かされる完全なDMEMで作製した。勾配を、Beckman SW-40超遠心機、Ti-70ローターで107971xg、37℃で1時間回転させた。遠心分離後、除核されたHeLa細胞を、12.5%、15%、16%、および17%フィコール画分の1/2から収集し、完全なDMEM（+10%FBS、+1%ペニシリン/ストレプトマイシン、+グルタミン）に再懸濁し、500xgで5分間回転してペレットにする。除核したMito-DsRedドナー細胞を、DMEM中で2回洗浄した。同時に、レシ

40

50

ピエントHeLa細胞を発現するMito-GFP（ミトコンドリア特異的標的化色素）をトリプシン処理し、計数し、融合のために調製した。

【0563】

融合のために、除核されたMito-DsRedドナーHeLa細胞を、50%ポリエチレングリコール溶液（10%DMSOでDMEM完全で調製された、50w/v%PEG）中で、37℃で1分間、Mito-GFPレシピエントHeLa細胞（各200,000個）と1:1の比で混合した。続いて、細胞を、10mlの完全DMEMで3回洗浄し、35mmのガラス底の象限イメージング皿に50k細胞/象限の密度で播種し、各象限は1.9cm²の面積を有した。

【0564】

実施例2. 化学処理（PEG）による有核融合細胞の生成

ドナーHeLa細胞を発現するMito-DsRed（ミトコンドリア特異的標的色素）を0.25%トリプシンでトリプシン処理し、収集し、500xgで5分間回転させ、PBSで1回洗浄し、計数した。続いて、 2×10^6 細胞を、完全なDMEM（+10%FBS、+1%ペニシリン/ストレプトマイシン、+グルタミン）に再懸濁し、計数し、融合のために調製した。

【0565】

Mito-DsRedドナー細胞を、DMEMで3回洗浄した。同時に、レシピエントHeLa細胞を発現するMito-GFP（ミトコンドリア特異的標的化色素）をトリプシン処理し、計数し、融合のために調製した。

【0566】

融合のために、Mito-DsRedドナーHeLa細胞を、50%ポリエチレングリコール溶液（10%DMSOでDMEM完全で調製された、50w/v%PEG）中で、37℃で1分間、Mito-GFPレシピエントHeLa細胞（各200,000個）と1:1の比で混合した。続いて、細胞を、10mlの完全DMEMで3回洗浄し、35mmのガラス底の象限イメージング皿に50k細胞/象限の密度で播種し、各象限は1.9cm²の面積を有した。

【0567】

実施例3. 外因性フソゲンを発現するHeLa細胞の作製

この実施例は、外因性フソゲンを発現する組織培養細胞の作製について説明する。次の実施例は、任意のタンパク質ベースのフソゲンに等しく適用でき、初代細胞（懸濁液または付着）および組織での産生にも等しく適用できる。ある特定の場合によっては、（フソゲンおよびフソゲン結合パートナーとして表される）融合を誘発するために必要なフソゲンペアを使用することができる。

【0568】

フソゲン遺伝子、融合障害1（EFF-1）を、pIRES2-AcGFP1ベクター（Clontech）にクローン化し、次いで、この構築物を、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬（Invitrogen）を使用して、HeLa細胞（CCL-2（商標）、ATCC）にトランスフェクトする。フソゲン結合パートナー遺伝子であるアンカー細胞融合障害1（AFF-1）を、pIRES2-DsRed-Express 2ベクター（Clontech）にクローン化し、次いで、この構築物を、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬（Invitrogen）を使用して、HeLa細胞（CCL-2（商標）、ATCC）にトランスフェクトする。トランスフェクトしたHeLa細胞は、GlutaMAX（GIBCO）、10%ウシ胎児血清（GIBCO）、および500mg/mLのゼオシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で、37℃、5%CO₂で維持される。EFF-1発現細胞は、EFF-1フソゲンを発現するGFP+HeLa細胞の純粋な集団を得るために、蛍光活性化細胞選別（FACS）を選別することによって単離される。AFF-1発現細胞は、AFF-1フソゲン結合パートナーを発現するDSRED+HeLa細胞の純粋な集団を得るために、蛍光活性化細胞選別（FACS）を選別することによって単離さ

10

20

30

40

50

れる。

【0569】

実施例4．化学的に強化された融合性除核細胞を介したオルガネラ送達

実施例1に記載のように産生および融合された融合性細胞（Mito-DsRedドナー除核細胞およびMito-GFPレシピエントHeLa細胞）を、イメージング皿への堆積から24時間後、63倍の倍率でZeiss LSM 780倒立共焦点顕微鏡で画像化した。Mito-DsRedのみおよびMito-GFPのみを発現する細胞を、Mito-DsRedおよびMito-GFPの両方が存在し、同時に取得される条件下で、2つのチャンネル間でシグナルの重複がないことを確保するような方法で、取得設定を構成するために、別々に画像化した。対象となる10個の領域は、完全に公平な方法で選択され、最低100個の細胞が下流分析に使用可能であるように、唯一の基準が、最低10個の細胞が各ROI内に含まれた。これらの画像中の所与のピクセルは、いずれかのチャンネル（mito-DsRedおよびmito-GFP）の強度が3つのROI全体のそれぞれのチャンネルの最大強度値の10%を超える場合、ミトコンドリアが陽性であると判断された。

10

【0570】

細胞内のミトコンドリアの50%超（mito-GFP+またはmito-Ds-Red+であるすべてのピクセルによって特定される）が、上記の閾値に基づいて、mito-Ds-Redおよびmito-GFPの両方で陽性であるという基準に基づいて特定され、これらのタンパク質を含むオルガネラ（この場合、ミトコンドリア）が送達され、融合され、それらの内容が混ざり合っていることを示す。24時間の時点で、図7に示すように、複数の細胞は、融合を介してオルガネラの陽性送達を示した。これは、ドナーHeLa細胞とレシピエントのHeLa細胞との間での融合を介した陽性オルガネラ送達の画像である。白で示された細胞内領域は、ドナーのミトコンドリアとレシピエントのミトコンドリアとの間での重複を示す。灰色の細胞内領域は、ドナーおよびレシピエントのオルガネラが重複しない場所を示す。

20

【0571】

実施例5．化学的に強化された融合性有核細胞を介したオルガネラ送達

実施例2に記載のように産生および組み合わせられた融合性細胞（Mito-DsRedドナー細胞およびMito-GFPレシピエントHeLa細胞）を、イメージング皿への堆積から24時間後、63倍の倍率でZeiss LSM 780倒立共焦点顕微鏡で画像化した。Mito-DsRedのみおよびMito-GFPのみを発現する細胞を、Mito-DsRedおよびMito-GFPの両方が存在し、同時に取得される条件下で、2つのチャンネル間でシグナルの重複がないことを確保するような方法で、取得設定を構成するために、別々に画像化した。対象となる10個の領域は、完全に公平な方法で選択され、最低100個の細胞が下流分析に使用可能であるように、唯一の基準が、最低10個の細胞が各ROI内に含まれた。これらの画像中の所与のピクセルは、いずれかのチャンネル（mito-DsRedおよびmito-GFP）の強度が3つのROI全体のそれぞれのチャンネルの最大強度値の20%を超える場合、ミトコンドリアが陽性であると判断された。

30

40

【0572】

細胞内のミトコンドリアの50%超（mito-GFP+またはmito-Ds-Red+であるすべてのピクセルによって特定される）が、上記の閾値に基づいて、mito-Ds-Redおよびmito-GFPの両方で陽性であるという基準に基づいて特定され、これらのタンパク質を含むオルガネラ（この場合、ミトコンドリア）が送達され、融合され、それらの内容が混ざり合っていることを示す。24時間の時点で、図8に示すように、複数の細胞は、融合を介してオルガネラの陽性送達を示した。これは、ドナーHeLa細胞とレシピエントのHeLa細胞との間での融合を介した陽性オルガネラ送達の画像である。白で示された細胞内領域は、ドナーのミトコンドリアとレシピエントのミトコンドリアとの間での重複を示す。灰色の細胞内領域は、ドナーおよびレシピエントのオルガ

50

ネラが重複しない場所を示す。

【0573】

実施例6．タンパク質強化された融合性除核細胞を介したミトコンドリアの送達

実施例3に記載のように産生および組み合わされた融合性細胞を、イメージング皿への堆積から24時間後、63倍の倍率でZeiss LSM 780倒立共焦点顕微鏡で画像化する。Mito-DsRedのみおよびMito-GFPのみを発現する細胞を、Mito-DsRedおよびMito-GFPの両方が存在し、同時に取得される条件下で、2つのチャンネル間でシグナルの重複がないことを確保するような方法で、取得設定を構成するために、別々に画像化する。対象となる10個の領域は、完全に公平な方法で選択され、最低の細胞の数が下流分析に使用可能であるように、唯一の基準が、最低10個の細胞が各ROI内に含まれる。これらの画像中の所与のピクセルは、いずれかのチャンネル（mito-DsRedおよびmito-GFP）の強度が3つのROI全体のそれぞれのチャンネルの最大強度値の10%を超える場合、ミトコンドリアが陽性であると判断される。

【0574】

細胞内のミトコンドリアの50%超（mito-GFP+またはmito-Ds-Red+であるすべてのピクセルによって特定される）が、上記の閾値に基づいて、mito-Ds-Redおよびmito-GFPの両方で陽性であるという基準に基づいて特定され、これらのタンパク質を含むオルガネラ（この場合、ミトコンドリア）が送達され、融合され、それらの内容が混ざり合っていることを示すであろう。24時間の時点で、複数の細胞は、融合を介してオルガネラの陽性送達を示すと予想される。

【0575】

実施例7：核酸のエレクトロポレーションによるフソソームの生成

この実施例は、フソゲンをコードする核酸（例えば、mRNAまたはDNA）を用いた細胞または小胞のエレクトロポレーションによるフソソームの生成について説明する。

【0576】

クローン断片（例えば、水疱性口内炎ウイルス[VSV-G]からの糖タンパク質、Oxford Genetics番号OG592）のオープンリーディングフレームと一緒にピューロマイシン耐性遺伝子のオープンリーディングフレームを含むトランスポザーゼベクター（System Biosciences, Inc.）は、エレクトロポレーター（Amaxa）および293T細胞株特異的核トランスフェクションキット（Lonza）を使用して、293Tにエレクトロポレーションされる。

【0577】

20%ウシ胎児血清および1倍のペニシリン／ストレプトマイシンを含むDMEM中で3～5日間1μg／μLのピューロマイシンで選択した後、細胞を、1×PBS、氷冷溶解緩衝液（150mMのNaCl、0.1%Triton X-100、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、50mMのTris-HCl、pH8.0、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル（Abcam, ab201117））で洗浄し、1回当たり10～15秒間、3回超音波処理し、16,000xgで20分間遠心分離する。VSV-Gに特異的なプローブを使用して、回収された上清画分に対してウエスタンブロットを行い、安定にトランスフェクトされた細胞もしくは対照細胞から調製されたフソソームからVSV-Gの非膜特異的濃度を決定し、VSV-Gタンパク質の標準と比較する。

【0578】

実施形態において、安定にトランスフェクトされた細胞からのフソソームは、安定してトランスフェクトされなかった細胞から生成されたフソソームよりも多くのVSV-Gを有するであろう。

【0579】

実施例8：タンパク質のエレクトロポレーションによるフソソームの生成

この実施例は、フソソームを生成するためのフソゲンのエレクトロポレーションについて説明する。

【0580】

約 5×10^6 個の細胞または小胞は、エレクトロポレーショントランスフェクションシステム (Thermo Fisher Scientific) を使用して、エレクトロポレーションのために使用される。マスターミックスを設定するために、 $24 \mu\text{g}$ の精製タンパク質フソゲンを、再懸濁緩衝液 (キットに提供される) に添加する。混合物を、室温で 10 分間インキュベートする。それと同時に、細胞または小胞を、滅菌試験管に移し、 $500 \times g$ で 5 分間遠心分離する。上清を吸引し、ペレットを、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない 1mL の PBS に再懸濁する。次いで、フソゲンを含む緩衝液を使用して、細胞または小胞のペレットを再懸濁する。細胞または小胞の懸濁液はまた、パルス電圧、パルス幅、およびパルスの数が異なる最適化条件にも使用される。エレクトロポレーション後、フソゲンを含むエレクトロポレーションした細胞または小胞を、PBS で洗浄し、PBS に再懸濁し、氷上に保持する。

10

【0581】

例えば、Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology 208: 44–53, 2015 を参照のこと。

【0582】

実施例 9：小胞形成および遠心分離によるフソソームの生成および単離

この実施例は、小胞形成および遠心分離を介したフソソームの生成および単離について説明する。これは、フソソームが単離され得る方法のうちの 1 つである。

20

【0583】

フソソームは、以下のように調製される。約 4×10^6 個の HEK-293T 細胞を、完全培地 (DMEM + 10% FBS + Pen/Strep) 中の 10cm 皿に播種する。播種から 1 日後、 $15 \mu\text{g}$ のフソゲン発現プラスミドまたはウイルスを、細胞に送達する。フソゲンの発現に十分な時間が経過した後、培地を、 $100 \mu\text{M}$ の ATP を補充した新鮮な培地によって慎重に置き換える。上清を、フソゲンの発現から 48~72 時間後に回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過することによって清澄化し、 $150,000 \times g$ で 1 時間超遠心分離する。ペレット化した材料を、氷冷 PBS に一晚再懸濁する。フソソームを、実験のために所望の緩衝液に再懸濁する。

【0584】

例えば、Mangeot et al., Molecular Therapy, vol. 19 no. 9, 1656–1666, Sept. 2011 を参照のこと。

30

【0585】

実施例 10：巨大原形質膜フソソームの生成および単離

この実施例は、小胞形成および遠心分離を介したフソソームの生成および単離について説明する。これは、フソソームが単離され得る方法のうちの 1 つである。フソソームは、以下のように調製される。

【0586】

簡単に説明すると、フソゲンを発現する HeLa 細胞を、緩衝液 (10mM の HEPES、 150mM の NaCl、 2mM の CaCl_2 、 $\text{pH} 7.4$) で 2 回洗浄し、溶液 (GPMV 緩衝液中の 1mM の DTT、 12.5mM のパラホルムアルデヒド、 1mM の N-エチルマレイミド) に再懸濁し、 37°C で 1 時間インキュベートする。フソソームは、まず、 $100 \times g$ で 10 分間の遠心分離により細胞を除去し、次いで、 $20,000 \times g$ で、 4°C で 1 時間、フソソームを回収することによって、細胞から清澄化される。フソソームを、実験のために所望の緩衝液に再懸濁する。

40

【0587】

例えば、Sezgin E et al. Elucidating membrane structure and protein behavior using giant membrane plasma vesicles. Nat. Protocols. 7 (6): 1042–51 2012 を参照のこと。

50

【0588】

実施例11：フソソームゴーストの生成および単離

この実施例は、低張処理および遠心分離を介したフソソームの生成および単離について説明する。これは、フソソームが生成され得る方法のうちの1つである。

【0589】

第1に、フソソームは、主に細胞破裂およびフソソームが形成されるように低張処理を使用することによって、フソゲンを発現する間葉系幹細胞（ 10^9 個の細胞）から単離される。特定の実施形態によれば、細胞を、低張液、トリスマグネシウム緩衝液（TM、例えば、 4°C で $\text{pH}7.4$ または $\text{pH}8.6$ 、 HCl で行われた pH 調整）に再懸濁する。細胞膨張は、位相差顕微鏡法によってモニタリングされる。細胞が膨張してフソソームが形成されたら、懸濁液を、ホモジナイザーに入れる。典型的には、約95%の細胞破裂は、細胞計数および標準のAOP染色を通して測定するのに十分である。次いで、膜／フソソームを、保存のためにスクロース（0.25M以上）に入れる。あるいは、フソソームは、軽度の超音波処理（Arkhi anatomi i, gistolog i i embriolog i i; 1979, Aug, 77 (8) 5-13; PMID: 496657）、凍結融解（Nature. 1999, Dec 2; 402 (6761): 551-5; PMID: 10591218）、French-press（Methods in Enzymology, Volume 541, 2014, Pages 169-176; PMID: 24423265）、針通過（www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/nuclear-protein-extraction.html）、または洗剤含有溶液への可溶化（www.thermofisher.com/order/catalog/product/89900）などの細胞を溶解するために、当該技術分野で周知の他のアプローチによって形成され得る。

【0590】

付着を避けるために、フソソームを、プラスチックチューブに入れて、遠心分離する。最上部のより明るい灰色の薄層がほとんどフソソームを含む、積層ペレットが生成される。しかしながら、収穫を高めるために、ペレット全体が処理される。遠心分離（例えば、 4°C で15分間3,000rpm）および洗浄（例えば、20容量のトリスマグネシウム／TM-スクロース $\text{pH}7.4$ ）は、繰り返してもよい。

【0591】

次のステップでは、フソソーム画分を、不連続スクロース密度勾配での浮遊によって分離する。洗浄したペレットには少量の過剰な上清が残っており、これには、フソソーム、核、および不完全に破裂した全細胞を含む。TM、 $\text{pH}8.6$ 中のさらなる60w/w%のスクロースを、懸濁液に添加して、屈折計で45%のスクロースの読み取り値を得る。このステップ後、すべての溶液は、TM $\text{pH}8.6$ である。15mlの懸濁液を、SW-25.2硝酸セルロースチューブに入れ、それぞれ、40w/w%および35w/w%のスクロースの15mlの層を追加し、次いで、5mlのTM-スクロース（0.25M）を追加することによって、懸濁液に不連続勾配を形成する。次いで、試料を、20,000rpmで、 4°C で10分間遠心分離する。核沈殿物は、ペレットを形成し、不完全に破壊した全細胞を、40%~45%の界面で収集し、フソソームを、35%~40%の界面で収集する。複数のチューブからフソソームを、収集し、プールする。

【0592】

例えば、国際特許公開WO2011024172A2を参照のこと。

【0593】

実施例12：押し出しによるフソソームの生成

この実施例は、膜を通して押し出すことによるフソソームの製造について説明する。

【0594】

簡単に説明すると、フソゲンを発現する造血幹細胞は、プロテアーゼ阻害剤カクテル（セットV、Calbiochem 539137-1ML）を含む無血清培地中に 1×10

6 個の細胞/mLの密度で 37°C の懸濁液中にある。細胞を、ルアーロックシリンジで吸引し、使い捨ての 5 mm のシリンジフィルターを1回通過させて滅菌チューブに入れる。膜が汚れて目詰まりした場合、取り外して新しいフィルターを取り付ける。全細胞懸濁液がフィルターを通過した後、 5 mL の無血清培地を、プロセスで使用されるすべてのフィルターに通過させて、フィルター（複数可）を通して任意の残りの物質を洗浄する。次いで、溶液を、濾液中の押し出されたフソソームと組み合わせる。

【0595】

フソソームは、 $5\text{ mm}\sim 0.2\text{ mm}$ の範囲内でますます小さいフィルターの細孔サイズを有する同じ方法に従って押し出しを続けることでさらに小さくすることができる。最終的な押し出しが完了すると、懸濁液は、遠心分離によってペレット化され（必要な時間および速度はサイズによって異なる）、培地に再懸濁される。

【0596】

さらに、このプロセスは、既存の細胞骨格構造が押し出しに与える影響を減らすために、アクチン細胞骨格阻害剤を使用して補充することができる。簡単に説明すると、 1×10^6 個の細胞/mL懸濁液を、 500 nM のラトランキュリンB（ab144291, Abcam, Cambridge, MA）を含む無血清培地でインキュベートし、 $5\%\text{ CO}_2$ の存在下で、 37°C で30分間インキュベートする。インキュベーション後、プロテアーゼ阻害剤カクテルを添加し、細胞をルアーロックシリンジに吸引し、前述のように押し出しを行う。

【0597】

フソソームをペレット化し、PBSで1回洗浄して、培地に再懸濁する前に、細胞骨格阻害剤を除去する。

【0598】

実施例13：タンパク質による化学処理によるフソソームの生成

この実施例は、フソソームを生成するための化学物質を媒介したフソゲンの送達について説明する。約 5×10^6 個の細胞または小胞は、化学物質を媒介したフソゲンの送達のために使用される。細胞または小胞を、 $50\text{ }\mu\text{L}$ のOpti-MEM培地に懸濁する。マスターミックスを設定するために、 $24\text{ }\mu\text{g}$ の精製タンパク質フソゲンを、 $25\text{ }\mu\text{L}$ のOpti-MEM培地と混合し、 $2\text{ }\mu\text{L}$ の脂質トランスフェクション試薬3000を含む $25\text{ }\mu\text{L}$ のOpti-MEMに添加する。細胞または小胞およびフソゲン溶液は、フソゲンが細胞または小胞膜に組み込まれるように、プレート静静地に回転させ、 37°C で6時間インキュベートすることによって混合される。次いで、フソソームをPBSで洗浄し、PBSに再懸濁し、氷上で保持する。

【0599】

Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology 208:44-53, 2015も参照のこと。

【0600】

実施例14：フソゲン含有リボソームによる処理によるフソソームの生成

この実施例は、フソソームを生成するための供給源細胞へのリボソームを媒介したフソゲンの送達について説明する。約 5×10^6 個の細胞または小胞は、リボソームを媒介したフソゲンの送達のために使用される。細胞または小胞を、 $50\text{ }\mu\text{L}$ のOpti-MEM培地に懸濁する。フソゲンタンパク質は、 n -オクチル b -D-グルコピラノシドの存在下で細胞から精製される。 n -オクチル b -D-グルコピラノシドは、内在性膜タンパク質を可溶化するのに使用される軽度の洗剤である。次いで、フソゲンタンパク質は、Top et al., EMBO 24:2980-2988, 2005に記載されるように、 n -オクチル b -D-グルコピラノシド-懸濁タンパク質を n -オクチル b -D-グルコピラノシドで予め飽和させたLUVと混合し、続いて、 n -オクチル b -D-グルコピラノシドを除去することによって、大きな（直径 400 nm ）単層小胞（LUV）に再構成

される。マスターミックスを設定するために、 $24\text{ }\mu\text{g}$ の総融合タンパク質を含む多量のリポソームを、 $50\text{ }\mu\text{l}$ のOpti-MEM培地と混合する。次いで、リポソームおよび供給源細胞またはベシクルの溶液は、フソゲンタンパク質が供給源細胞または小胞膜に組み込まれるように、プレートを静かに回転させ、フソゲン含有リポソームおよび供給源細胞または小胞の融合を可能にする条件下で、 37°C で6時間インキュベートすることによって混合される。次いで、フソソームをPBSで洗浄し、PBSに再懸濁し、氷上で保持する。

【0601】

Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology 208:44-53, 2015も参照のこと。

10

【0602】

実施例15：細胞から自由に放出される融合性微小胞の単離

この実施例は、遠心分離によるフソソームの分離について説明する。これは、フソソームが単離され得る方法のうちの1つである。

【0603】

フソソームは、示差遠心分離によってフソゲンを発現する細胞から単離される。培養培地(DMEM+10%ウシ胎児血清)は、まず、超遠心分離によって、 $100,000\times g$ 超で1時間、小粒子を清澄化する。次いで、清澄化した培養培地を使用して、フソゲンを発現するマウス胚線維芽細胞を成長させる。 $200\times g$ で10分間の遠心分離によって、細胞を、培養培地から分離する。上清を収集し、 $500\times g$ で10分間で2回、 $2,000\times g$ で15分間で1回、 $10,000\times g$ で30分間で1回、および $70,000\times g$ で60分間で1回、連続して遠心分離する。自由に放出されたフソソームを、最後の遠心分離ステップでペレット化し、PBSに再懸濁し、 $70,000\times g$ で再ペレット化する。最終ペレットを、PBSに再懸濁する。

20

【0604】

Wubbolts R et al. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: Potential Implications for their Function and Multivesicular Body Formation. J. Biol. Chem. 278:10963-10972 2003も参照のこと。

30

【0605】

実施例16：フソソームの物理的除核

この実施例は、細胞骨格の不活性化および遠心分離によるフソソームの除核について説明する。これは、フソソームが修飾され得る方法のうちの1つである。

【0606】

フソソームは、フソゲンを発現する哺乳動物の初代または不死化細胞株から単離される。細胞は、アクチン骨格阻害剤による処理および超遠心分離によって除核される。簡単に説明すると、C2C12細胞を収集し、ペレット化し、 12.5% Ficoll 400 (F2637、Sigma、St. Louis MO) および 500 nM のラトランキュリンB (ab144291、Abcam、Cambridge、MA) を含むDMEMに再懸濁し、 $37^{\circ}\text{C}+5\%\text{CO}_2$ で30分間インキュベートする。懸濁液を、 $5\%\text{CO}_2$ の存在下で、 37°C で一晩平衡化したDMEMに溶解したFicoll 400の増加する濃度(15% 、 16% 、 17% 、 18% 、 19% 、 20% 、1層あたり 3 mL)を含む超遠心分離チューブに慎重に層にする。Ficoll勾配を、Ti-70ローター(Beckman-Coulter、Brea、CA)で $32,300\text{ RPM}$ 、 37°C で60分間回転させる。超遠心分離後、 $16\sim 18\%$ のFicollの間に見られるフソソームを取り除き、DMEMで洗浄し、DMEMに再懸濁する。

40

【0607】

50

実施例 35 に記載されるように、Hoechst 33342 による核内容物の染色、続いて、フローサイトメトリーおよび／または画像の使用を実施して、核の放出を確認する。

【0608】

実施例 17：照射によるフソソームの修飾

次の実施例は、ガンマ線照射によるフソソームの修飾について説明する。理論によって拘束されることなく、ガンマ線照射は、DNA の二本鎖切断を引き起こし、細胞にアポトーシスを誘導し得る。

【0609】

まず、フソゲンを発現している細胞を、（例えば、細胞を培養または播種することによって）コンフルエントな密度を下回る組織培養フラスコまたはプレート上で単層で培養する。次いで、コンフルエントなフラスコから培地を除去し、細胞を Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない HBSS ですすぎ、トリプシン処理して、培養マトリックスから細胞を除去する。次いで、細胞ペレットを、ペニシリン／ストレプトマイシンを含まない 10 ml の組織培養培地に再懸濁し、100 mm のペトリ皿に移す。ペレット中の細胞の数は、 150 cm^2 のフラスコで 10 ～ 15 個のコンフルエントな MEF 培養から得られ得るものと同等でなければならない。次いで、細胞を、 γ 線源から 4000 ラドに照射して、フソソームを生成する。次いで、フソソームを洗浄し、使用した最終緩衝液または培地に再懸濁する。

【0610】

実施例 18：化学処理によるフソソームの修飾

次の実施例は、マイトマイシン C 処理によるフソソームの修飾について説明する。いかなる特定の理論によって拘束されることなく、マイトマイシン C 処理は、細胞周期を不活性化することによってフソソームを修飾する。

【0611】

まず、フソゲンを発現している細胞を、（例えば、細胞を培養または播種することによって）コンフルエントな密度で組織培養フラスコまたはプレート上で単層から培養する。1 mg/ml のマイトマイシン C ストック溶液を培地に加えて、最終濃度を $10 \mu\text{g/ml}$ にする。次いで、プレートをインキュベーターに 2 ～ 3 時間戻す。次いで、コンフルエントなフラスコから培地を除去し、細胞を Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない HBSS ですすぎ、トリプシン処理して、培養マトリックスから細胞を除去する。次いで、細胞を洗浄し、使用する最終緩衝液または培地に再懸濁する。

【0612】

例えば、Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation, Current Protocols in Molecular Biology, David A. Conner 2001 を参照のこと。

【0613】

実施例 19：フソソームにおける転写活性の欠如

この実施例は、フソソームの生成に使用される親細胞、例えば供給源細胞と比較したフソソームにおける転写活性を定量化する。一実施形態において、転写活性は、親細胞、例えば供給源細胞と比較して、フソソームでは低いか、または存在しないであろう。

【0614】

フソソームは、治療剤を送達するための筐体である。高効率で細胞または局所組織環境に送達され得る miRNA、mRNA、タンパク質、および／またはオルガネラなどの治療剤は、通常は、レシピエント組織中で病理学的に低いまたは高いレベルで活性ではない経路または活性のある経路を調節するために使用することができる。一実施形態において、フソソームが転写することができない、またはフソソームがそれらの親細胞よりも低い転写活性を有するという観察は、核物質の除去が十分に起こったことを実証するであろう。

【0615】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか 1 つによって調製され

る。十分な数のフソソームおよびフソソームを生成するために使用される親細胞を、20%ウシ胎児血清、1倍のペニシリン／ストレプトマイシン、および蛍光標識可能なアルキンヌクレオシドEUを含むDMEM中の6ウェル低付着マルチウェルプレートに、37℃および5%CO₂で1時間播種する。陰性対照の場合、十分な数のフソソームおよび親細胞はまた、20%ウシ胎児血清、1倍のペニシリン／ストレプトマイシンを含むが、アルキンヌクレオシドEUを含まないDMEM中のマルチウェルプレートにも播種する。

【0616】

1時間のインキュベーション後、画像キット（ThermoFisher Scientific）の製造業者の取扱説明書に従って、試料を処理する。陰性対照を含む細胞およびフソソーム試料を、1×PBS緩衝液で3回洗浄し、1×PBS緩衝液に再懸濁し、488nmの励起用アルゴンレーザーおよび530+/-30nmの発光を使用してフローサイトメトリー（Becton Dickinson、San Jose、CA、USA）によって分析する。BD FACSDivaソフトウェアを、取得および分析のために使用した。光散乱チャネルは、線形利得に設定され、蛍光チャネルは、対数尺度で設定され、最低10,000個の細胞が各条件で分析される。

【0617】

一実施形態において、陰性対照の530+/-30nm発光により測定されるように、転写活性は、アルキンヌクレオシドEUの排除によりヌルになるであろう。いくつかの実施形態において、フソソームは、親細胞よりも約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%以下より少ない転写活性を有する。

【0618】

Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, Oct 14; 105 (41): 15779-84. doi: 10.1073/pnas.0808480105. Epub 2008 Oct 7も参照のこと。

【0619】

実施例20：DNA複製または複製活性の欠如

この実施例は、フソソームにおけるDNA複製を定量化する。一実施形態において、フソソームは、細胞と比較して低い割合でDNAを複製するであろう。

【0620】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。フソソームおよび親細胞のDNA複製活性は、蛍光標識可能なヌクレオチド（ThermoFisher Scientific #C10632）の取り込みによって評価される。ジメチルスルホキシドを含むEdUストック溶液の調製後、フソソームおよび同等数の細胞を、10μMの最終濃度のEdUで2時間インキュベートする。次いで、試料を、3.7%PFAを使用して15分間固定し、1×PBS緩衝液、pH7.4で洗浄し、1×PBS緩衝液、pH7.4の0.5%洗剤溶液で15分間透過処理する。

【0621】

透過処理後、0.5%洗剤を含むPBS緩衝液に懸濁したフソソームおよび細胞を、1×PBS緩衝液、pH7.4で洗浄し、反応カクテル、1×PBS緩衝液、CuSO₄（成分F）、アジド蛍光488、1×反応緩衝液添加剤で21℃で30分間インキュベートする。

【0622】

フソソームおよび細胞DNA複製活性の陰性対照は、上記と同じように処理された試料で作製されるが、1×反応カクテルにはアジド蛍光488は含まれない。

【0623】

次いで、細胞およびフソソームの試料を洗浄し、1×PBS緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析する。フローサイトメトリーは、488nmの励起用アルゴンレーザーで、FACSサイトメーター（Becton Dickinson、San Jose、CA、USA）で行い、530+/-30nmの発光スペクトルを収集する。FACS分析ソフトウェアは、取得および分析のために使用される。光散乱チャネルは、

線形利得に設定され、蛍光チャンネルは、対数尺度で設定され、最低10,000個の細胞が各条件で分析される。相対的なDNA複製活性は、各試料中のアジド蛍光488の中央値強度に基づいて計算される。すべての事象は、前方および側方散乱チャンネルで獲得される（あるいは、ゲートは、フソソーム集団のみを選択するためにゲートを適用され得る）。フソソームのために正規化された蛍光強度値は、フソソームの中央値蛍光強度値からそれぞれの陰性対照試料の中央値蛍光強度値を減じることによって決定される。次いで、フソソーム試料のために正規化された相対的なDNA複製活性は、DNA複製活性の定量的測定値を生成するために、それぞれの有核細胞試料に対して正規化される。

【0624】

一実施形態において、フソソームは、親細胞よりも少ないDNA複製活性を有する。
Salic, 2415-2420, doi:10.1073/pnas.0712168105も参照のこと。

【0625】

実施例21：核酸カーゴでフソソームを修飾するためのエレクトロポレーション

この実施例は、核酸カーゴによるフソソームのエレクトロポレーションについて説明する。

【0626】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。約 10^9 個のフソソームおよび $1\mu\text{g}$ の核酸、例えばRNAを、エレクトロポレーション緩衝液（水中の1.15mMのリン酸カリウムpH7.2、25mMの塩化カリウム、60w/v%イオジキサノール）中で混合する。フソソームは、エレクトロポレーションシステム（BioRad、165-2081）を使用して、単一の4mmキュベットを使用してエレクトロポレーションされる。フソソームおよび核酸は、400V、 $125\mu\text{F}$ 、 ∞ オームでエレクトロポレーションされ、キュベットは、すぐに氷に移される。エレクトロポレーション後、フソソームをPBSで洗浄し、PBSに再懸濁し、氷上で保持する。

【0627】

例えば、Kamerkar et al., Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer, Nature, 2017を参照のこと。

【0628】

実施例22：タンパク質カーゴでフソソームを修飾するためのエレクトロポレーション

この実施例は、タンパク質カーゴによるフソソームのエレクトロポレーションについて説明する。

【0629】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。約 5×10^6 個のフソソームは、エレクトロポレーショントランスフェクションシステム（Thermo Fisher Scientific）を使用して、エレクトロポレーションのために使用される。マスターミックスを設定するために、 $24\mu\text{g}$ の精製タンパク質カーゴを、再懸濁緩衝液（キットに提供される）に添加する。混合物を、室温で10分間インキュベートする。その間に、フソソームを、滅菌試験管に移し、 $500 \times g$ で5分間遠心分離する。上清を吸引し、ペレットを、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない1mLのPBSに再懸濁する。次いで、タンパク質カーゴを含む緩衝液を使用して、フソソームのペレットを再懸濁する。次いで、フソソーム懸濁液は、パルス電圧、パルス幅、およびパルスの数が異なる最適化条件に使用される。エレクトロポレーション後、フソソームをPBSで洗浄し、PBSに再懸濁し、氷上で保持する。

【0630】

例えば、Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnol

10

20

30

40

50

ogy 2008: 44-53, 2015を参照のこと。

【0631】

実施例23：核酸カーゴで修飾するためのフソソームの化学処理

この実施例は、化学処理を介したフソソームへの核酸カーゴのローディングについて説明する。

【0632】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。約 10^6 個のフソソームを、10,000g、4℃で5分間の遠心分離によってペレット化する。次いで、ペレット化したフソソームを、20μgのDNAを含むTE緩衝液（10mMのTris-HCl（pH8.0）、0.1mMのEDTA）に再懸濁する。フソソーム：DNA溶液を、穏やかな洗剤で処理して、フソソーム膜にわたってDNA透過性を高める（試薬B、Cosmo Bio Co., LTD, カタログ番号ISK-GN-001-EX）。溶液を、再び遠心分離し、ペレットを、硫酸プロタミンなどの正電荷ペプチドを含む緩衝液に再懸濁して、DNAをローディングしたフソソームと標的レシピエント細胞との間の親和性を増加させる（試薬C、Cosmo Bio Co., LTD, カタログ番号ISK-GN-001-EX）。DNAをローディングした後、ローディングしたフソソームを、使用前に氷上に保持する。

【0633】

Kaneda, Y., et al., New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. Curr. Drug Targets, 2003も参照のこと。

【0634】

実施例24：タンパク質カーゴで修飾するためのフソソームの化学処理

この実施例は、化学処理を介したフソソームへのタンパク質カーゴのローディングについて説明する。

【0635】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。約 10^6 個のフソソームを、10,000g、4℃で5分間の遠心分離によってペレット化する。次いで、ペレット化したフソソームを、硫酸プロタミンなどの正電荷ペプチドを含む緩衝液に再懸濁して、フソソームとカーゴタンパク質との間の親和性を増加させる（試薬A、Cosmo Bio Co., LTD, カタログ番号ISK-GN-001-EX）。次に、10μgのカーゴタンパク質を、フソソーム溶液に添加し、続いて、穏やかな潜在を添加して、フソソーム膜にわたってタンパク質透過性を高める（試薬B、Cosmo Bio Co., LTD, カタログ番号ISK-GN-001-EX）。溶液を、再び遠心分離し、ペレットを、硫酸プロタミンなどの正電荷ペプチドを含む緩衝液に再懸濁して、タンパク質をローディングしたフソソームと標的レシピエント細胞との間の親和性を増加させる（試薬C、Cosmo Bio Co., LTD, カタログ番号ISK-GN-001-EX）。タンパク質をローディングした後、ローディングしたフソソームを、使用前に氷上に保持する。

【0636】

Yasouka, E., et al., Needleless intranasal administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis. J. Mol. Med., 2007も参照のこと。

【0637】

実施例25：核酸カーゴで修飾するためのフソソームのトランスフェクション

この実施例は、フソソームへの核酸カーゴ（例えば、DNAまたはmRNA）のトランスフェクションについて説明する。フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。

【0638】

5×10⁶個のフソソームが、Opti-Memで維持される。0.5 μgの核酸を、25 μlのOpti-MEM培地と混合し、2 μlの脂質トランスフェクション試薬2000を含む25 μlのOpti-MEMに添加する。核酸、Opti-MEM、および脂質トランスフェクション試薬の混合物を、室温で15分間維持し、次いで、フソソームに添加する。全溶液は、プレートを静かに回転させ、37℃で6時間インキュベートすることによって混合される。次いで、フソソームをPBSで洗浄し、PBSに再懸濁し、氷上で保持する。

【0639】

Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology 208: 44-53, 2015も参照のこと。

10

【0640】

実施例26：タンパク質カーゴで修飾するためのフソソームのトランスフェクション

この実施例は、フソソームへのタンパク質カーゴのトランスフェクションについて説明する。

【0641】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。5×10⁶個のフソソームが、Opti-Memで維持される。0.5 μgの精製したタンパク質を、25 μlのOpti-MEM培地と混合し、2 μlの脂質トランスフェクション試薬3000を含む25 μlのOpti-MEMに添加する。タンパク質、Opti-MEM、および脂質トランスフェクション試薬の混合物を、室温で15分間維持し、次いで、フソソームに添加する。全溶液は、プレートを静かに回転させ、37℃で6時間インキュベートすることによって混合される。次いで、フソソームをPBSで洗浄し、PBSに再懸濁し、氷上で保持する。

20

【0642】

Liang et al., Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, Journal of Biotechnology 208: 44-53, 2015も参照のこと。

30

【0643】

実施例27：脂質二重層構造を有するフソソーム

この実施例は、フソソームの組成について説明する。一実施形態において、フソソーム組成物は、中心に内腔を有する脂質二重層構造を含む。

【0644】

理論に拘束されることを望まないが、フソソームの脂質二重層構造は、標的細胞との融合を促進し、フソソームが異なる治療剤のローディングを可能にする。

【0645】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法を使用して新たに調製される。陽性対照は、陰性細胞株（HEK293）であり、陰性対照は、冷DPBSおよび膜破壊HEK293細胞調製物であり、36ゲージの針に50回通過させている。

40

【0646】

試料を、エッペンドルフチューブ中でスピンドウンし、上清を慎重に除去する。次いで、事前に温めた固定液（0.1 MのNaClを含む0.05 Mのカコジル酸緩衝液中の2.5%グルタルアルデヒド、pH 7.5；使用前に37℃で30分間維持する）を、試料ペレットに添加し、室温で20分間保持する。固定後、試料をPBSで2回洗浄する。四酸化オスmium溶液を、試料ペレットに添加し、30分間インキュベートする。PBSで1回すすいだ後、30%、50%、70%、および90%のヘキシレングリコールを添加し、それぞれ15分間回転させながら洗浄する。次いで、100%ヘキシレングリコール

50

を、それぞれ、10分間、3回回転させながら添加する。

【0647】

樹脂を、ヘキシレングリコールと1:2の比率で混合し、試料に添加して、室温で2時間インキュベートする。インキュベーション後、溶液を、100%樹脂に置き換え、4~6時間インキュベートする。このステップは、新たな100%樹脂でもう1回繰り返される。次いで、100%新たな樹脂と交換し、このレベルを深さ約1~2mmに調整し、8~12時間焼く。エッペンドルフチューブを切断し、試料を含むエポキシキャストの切片を、さらに16~24時間焼く。次いで、エポキシキャストを、細胞を有する側面に留意する小片に切断する。市販の5分間のエポキシ接着剤を使用して、セクションングのためのブロックにピースを接着する。透過型電子顕微鏡（JOEL、米国）を使用して、80kVの電圧で試料を画像化する。

10

【0648】

一実施形態において、フソソームは、陽性対照（HEK293細胞）と同様の脂質二重層構造を示し、DPBS対照では明らかな構造は観察されない。一実施形態において、内腔構造は、破壊された細胞調製物において観察されないであろう。

【0649】

実施例28：フソゲン発現の検出

この実施例は、フソソームにおけるフソゲンの発現を定量化する。

【0650】

クローン断片（例えば、水疱性口内炎ウイルス[VSV-G]からの糖タンパク質、Oxford Genetics番号#OG592）のオープンリーディングフレームと一緒にピューロマイシン耐性遺伝子のオープンリーディングフレームを含むトランスポザゼベクター（System Biosciences, Inc.）は、エレクトロポレーター（Amaxa）および293T細胞株特異的核トランスフェクションキット（Lonza）を使用して、293Tにエレクトロポレーションされる。

20

【0651】

20%ウシ胎仔血清および1倍のペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEMで、1μg/μLピューロマイシンで3~5日間選択した後、フソソームは、前述の実施例に記載の方法のうちのいずれか1つによって、安定発現した細胞株または対照細胞から調製される。

30

【0652】

次いで、フソソームを、1×PBS、氷冷溶解緩衝液（150mMのNaCl、0.1% Triton X-100、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、50mMのTris-HCl、pH8.0、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルIII（Abcam, ab201117））で洗浄し、毎回10~15秒間、3回超音波処理し、16,000xgで20分間遠心分離する。VSV-Gに特異的なプローブを使用して、回収された上清画分に対してウェスタンブロットを行い、安定にトランスフェクトされた細胞もしくは対照細胞から調製されたフソソームからVSV-Gの非膜特異的濃度を決定し、VSV-Gタンパク質の標準と比較する。

【0653】

一実施形態において、安定にトランスフェクトされた細胞からのフソソームは、安定してトランスフェクトされなかった細胞から生成されたフソソームよりも多くのVSV-Gを有するであろう。

40

【0654】

実施例29：フソゲンの定量化

この実施例は、フソソーム当たりのフソゲンの絶対数の定量化について説明する。

【0655】

フソソームは、GFPでタグ付けされたフソゲン（VSV-G）を発現するように前述の実施例に記載されるようにフソゲンが操作されることを除いて、前述の実施例に記載の方法のうちのいずれか1つによって生成される。さらに、陰性対照のフソソームは、フソ

50

ゲン（VSV-G）またはGFPが存在しないで操作される。

【0656】

次いで、GFPでタグ付けされたフソゲンおよび陰性対照（複数可）を含むフソソームを、以下のようにフソゲンの絶対数についてアッセイする。市販の組換えGFPを段階希釈して、タンパク質濃度の校正曲線を作成する。次いで、校正曲線のGFP蛍光および既知量のフソソームの試料を、GFPライトキューブ（469/35励起フィルターおよび525/39発光フィルター）を使用して蛍光光度計で測定して、フソソーム調製物におけるGFP分子の平均モル濃度を計算する。次いで、モル濃度を、GFP分子の数に変換し、1試料当たりのフソソームの数で除算して、1フソソーム当たりのGFPでタグ付けされたフソゲン分子の平均数を得、1フソソーム当たりのフソゲンの数の相対的評価を提供する。

10

【0657】

一実施形態において、GFP蛍光は、フソゲンまたはGFPが存在しない陰性対照と比較して、GFPタグを有するフソソームにおいてより高いであろう。一実施形態において、GFP蛍光は、存在するフソゲン分子の数に対して相対的である。

【0658】

あるいは、個々のフソソームを、製造業者の取扱説明書によって単一細胞調製システム（Fluidigm）を使用して単離し、市販のプロブセット（Taqman）およびC_t値に基づいてフソゲンまたはGFP cDNAレベルを定量化するように設計されたマスターミックスを使用して、qRT-PCRを実施する。フソゲン遺伝子またはGFP遺伝子のクローニングされた断片と同じ配列のRNA標準は、合成（Ambio）によって生成され、次いで、C_tの標準曲線対フソゲンまたはGFP RNAの濃度を構築するために、連続希釈法における単一細胞調製システムqRT-PCR実験反応に添加される。

20

【0659】

フソソームからのC_t値を、標準曲線と比較して、1フソソーム当たりのフソゲンまたはGFP RNAの量を決定する。

【0660】

一実施形態において、フソゲンおよびGFP RNAは、フソゲンまたはGFPが存在しない陰性対照と比較して、フソゲンを発現するように操作されたフソソームにおいてより高くなるであろう。

30

【0661】

フソゲンは、前述のように脂質二重層構造を分析し、本明細書の他の実施例に記載されるようにLC-MSによって脂質二重層中のフソゲンを定量化することによって、脂質二重層中でさらに定量化され得る。

【0662】

実施例30：フソソームの平均サイズの測定

この実施例は、フソソームの平均サイズの測定について説明する。

【0663】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。市販のシステム（iZON Science）を使用して平均サイズを決定するために測定されたフソソーム。このシステムは、製造業者の取扱説明書に従ってソフトウェアと、40nm～10μmのサイズ範囲内の粒子を分析するために設計されたナノ細孔とともに使用される。フソソームおよび親細胞を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に再懸濁し、最終濃度範囲を0.01～0.1μgのタンパク質/mLにする。他の機器設定は、以下の表に示すように調整される。

40

【表 6】

表 6：フソソームの測定パラメーターおよび設定

測定パラメーター	設定
圧力	6
ナノ細孔タイプ	NP 3 0 0
校正試料	C P C 4 0 0 _ 6 P
ゴールドスタンダード分析	なし
獲得支援	なし

10

【0 6 6 4】

すべてのフソソームは、単離から2時間以内に分析される。一実施形態において、フソソームは、親細胞よりも約1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以内、またはそれより大きいサイズを有する。

【0 6 6 5】

実施例 3 1：フソソームの平均サイズ分布の測定

この実施例は、フソソームのサイズ分布の測定について説明する。

【0 6 6 6】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成され、前述の実施例で説明されたような市販のシステムを使用して粒子の平均サイズを決定するために試験される。一実施形態において、中央値を中心とするフソソームの10%、50%、および90%のサイズ閾値を親細胞と比較して、フソソームのサイズ分布を評価する。

20

【0 6 6 7】

一実施形態において、フソソームは、試料の10%、50%、または90%以内に、約90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%未満またはそれより少ない親細胞のサイズ分布の変動を有するであろう。

【0 6 6 8】

実施例 3 2：フソソームの平均体積

この実施例は、フソソームの平均体積の測定について説明する。理論に拘束されることを望まないが、フソソームのサイズ（例えば、体積）を変えることにより、異なるカーゴローディング、治療設計、または用途に対して万能であり得る。

30

【0 6 6 9】

フソソームは、前述の実施例で説明したように調製される。陽性対照は、既知のサイズの H E K 2 9 3 細胞またはポリスチレンビーズである。陰性対照は、36ゲージの針に約50回通過されている H E K 2 9 3 細胞である。

【0 6 7 0】

前述の実施例で説明されたように、透過型電子顕微鏡による分析を使用して、フソソームのサイズを決定する。フソソームの直径を測定し、体積を計算する。

40

【0 6 7 1】

一実施形態において、フソソームは、直径が約50nm以上の平均サイズを有するであろう。

【0 6 7 2】

実施例 3 3：フソソームの平均密度

フソソーム密度は、Thery et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22に記載されるように、連続的なショ糖勾配遠心分離アッセイを介して測定される。フソソームは、前述の実施例で説明したように得られる。

50

【0673】

まず、ショ糖勾配が調製される。2 Mおよび0.25スクロース溶液は、それぞれ、4 mlのHEPES／スクロースストック溶液および1 mlのHEPESストック溶液または0.5 mlのHEPES／スクロースストック溶液および4.5 mlのHEPESストック溶液を混合することによって生成される。これらの2つの画分を、すべてのシャッターを閉じた状態で勾配マーカーに、磁気攪拌棒を用いて、近位コンパートメント中に2 Mのスクロース溶液を、そして遠位コンパートメント中に0.25 Mのスクロース溶液をローディングする。勾配マーカーを、磁気攪拌プレート上に置き、近位コンパートメントと遠位コンパートメントの間のシャッターを開き、磁気攪拌プレートをオンにする。HEPESストック溶液は、以下のように作製される：2.4 gのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（HEPES；20 mM最終）、300 H₂O、10 N NaOHでpHを7.4に調整し、最終的にH₂Oを用いて容積を500 mlに調整する。HEPES／ショ糖ストック溶液は、以下のように作製される：2.4 gのヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（HEPES；20 mM最終）、428 gのプロテアーゼフリーショ糖（ICN；2.5 M最終）、150 mlのH₂O、10 N NaOHでpHを7.4に調整し、最終的にH₂Oを用いて容積を500 mlに調整する。

10

【0674】

フソソームを、2 mlのHEPES／スクロースストック溶液に再懸濁し、SW 41遠心分離チューブの底に注ぐ。外側のチューブを、2 mlのフソソームのすぐ上にあるSW 41チューブに配置される。外側のシャッターを開き、連続した2 M（下）から0.25 M（上）のショ糖勾配を、フソソームの上にゆっくりと注ぐ。勾配が注がれるとSW 41チューブが下がり、そのため、チューブは、常に液体の上部よりわずかに上になる。

20

【0675】

勾配のあるすべてのチューブは、互いに、または同じ重量のショ糖溶液を含む他のチューブと釣り合いをとる。勾配は、ブレーキをローに設定したSW 41スイングバケットローターで、210,000 x g、4℃で一晩（14時間以上）遠心分離する。

【0676】

マイクロピペッターを使用して、上から下に11個の1 mlの画分を収集し、TLA-100.3ローター用の3 mlチューブに入れる。試料を脇に置き、96ウェルプレートの別々のウェルで、各画分の50 μlを使用して屈折率を測定する。プレートは、蒸発を防ぐために粘着ホイルで覆われており、室温で1時間以下保管される。屈折計を使用して、96ウェルプレートに保存された材料からの各画分の10～20 μlの屈折率（したがって、ショ糖濃度および密度）を測定する。

30

【0677】

屈折率をg/mlに変換するための表は、Beckmanのウェブサイトからダウンロード可能な超遠心分離カタログ内にある。

【0678】

次いで、各画分は、タンパク質含有量分析用に調製される。2ミリリットルの20 mMのHEPES、pH 7.4を、各1 mlの勾配画分に加え、2～3回ピペッティングすることによって混合する。各チューブの片側には、永久マーカーでマークが付けられ、チューブはTLA-100.3ローターでマークされた側を上にして配置される。

40

【0679】

希釈画分を含む3 mlのチューブを、110,000 x g、4℃で1時間遠心分離する。TLA-100.3ローターは、6本のチューブを保持するため、各勾配に対して2回の遠心分離が実行され、他のチューブは遠心分離することができるまで4℃に保たれる。

【0680】

上清を、各3 mlのチューブから吸引し、ペレットの上に一滴を残す。ペレットはほとんど見えないが、その位置は、チューブのマークから推測され得る。目に見えないペレットを再懸濁し、微量遠心管に移す。各再懸濁画分の半分は、別の実施例に記載されている

50

ビシンコニン酸アッセイによるタンパク質含有量分析に使用される。これは、フソソーム調製物の様々な勾配画分にわたる分布が提供する。この分布は、フソソームの平均密度を決定するために使用される。タンパク質分析により画分にわたるフソソーム分布が明らかになったら、後半の体積画分を -80°C で保存し、他の目的（例えば、機能分析、または免疫分離によるさらなる精製）のために使用する。

【0681】

一実施形態において、このアッセイを使用して、フソソームの平均密度は、 $1.25\text{ g/ml} \pm 0.05$ 標準偏差になる。一実施形態において、フソソームの平均密度は、 $1 \sim 1.1$ 、 $1.05 \sim 1.15$ 、 $1.1 \sim 1.2$ 、 $1.15 \sim 1.25$ 、 $1.2 \sim 1.3$ 、または $1.25 \sim 1.35$ の範囲にある。一実施形態において、フソソームの平均密度は、1未満または1.35を超える。

10

【0682】

実施例34：フソソーム中のオルガネラ含有量の測定

この実施例は、フソソーム中のオルガネラの検出について説明する。

【0683】

フソソームは、本明細書に記載されるように調製された。小胞体（ER）およびミトコンドリアの検出のために、フソソームまたはC2C12細胞を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のER染色（E34251、Thermo Fisher、Waltham、MA）および $1\text{ }\mu\text{M}$ のミトコンドリア染色（M22426、Thermo Fisher Waltham、MA）で染色した。リソソームの検出のために、フソソームまたは細胞を、 50 nM のリソソーム染色（L7526、Thermo Fisher、Waltham、MA）で染色した。

20

【0684】

染色したフソソームを、フローサイトメーター（Thermo Fisher、Waltham、MA）で泳動し、以下の表に従って各色素の蛍光強度を測定した。オルガネラの存在の検証は、染色したフソソームの蛍光強度を非染色のフソソーム（陰性対照）および染色された細胞（陽性対照）と比較することによって行われた。

【0685】

除核から5時間後、小胞体（図1）、ミトコンドリア（図2）、およびリソソーム（図3）に陽性である、フソソームを染色した。

【表7】

30

表7：フソソーム染色

染色	同調レーザー／フィルター	レーザー波長	発光フィルター (nm)
Hoechst 33342	VL1	405	450/40
ERトラッカーグリーン	BL1	488	530/30
MitoトラッカーディープレッドFM	RL1	638	670/14
Lysotrackerグリーン	BL1	488	530/30

40

【0686】

実施例35：フソソームの核含有量の測定

この実施例は、フソソームの核含有量を測定する一実施形態を説明する。フソソームは核を含まないことを検証するために、フソソームを、 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342および $1\text{ }\mu\text{M}$ のCalceinAM（C3100MP、Thermo Fisher、Waltham、MA）で染色し、染色したフソソームを、Attune NX Tフローサイトメーター（Thermo Fisher、Waltham、MA）で作動させ、以下の表に従って各色素の蛍光強度を決定する。一実施形態において、サイトゾル（CalceinAM）の存在および核の不在（Hoechst 33342）の検証は

50

、染色したフソソームの平均蛍光強度を非染色のフソソームおよび染色した細胞と比較することによって行われる。

【表 8】

表 8：フローサイトメーターの設定

染色	同調レーザー／フィルター	レーザー波長	発光フィルター (nm)
Hoechst 33342	VL1	405	450/40
カルセインAM	BL1	488	530/30

10

【0687】

実施例 36：核エンベロープ含有量の測定

この実施例は、除核されたフソソーム中の核エンベロープ含有量の測定を説明する。核エンベロープは、細胞の細胞質からDNAを分離する。

【0688】

一実施形態において、精製フソソーム組成物は、本明細書に記載のように除核されたHEK-293T (293 [HEK-293] (ATCC (登録商標) CRL-1573 (商標)) などの哺乳動物細胞を含む。この実施例は、フソソーム生成後に残る無傷の核膜の量を測定するためのプロキシとして、異なる核膜タンパク質の定量化について説明する。

20

【0689】

この実施例は、 1.0×10^6 HEK-293T および 1.0×10^6 HEK-293T から調製したフソソームの等量を、 $1 \times$ PBS 緩衝液、pH 7.4 で洗浄し、3.7% PFA を用いて15分間固定し、同時に透過処理し、次いで、1% ウシ血清アルブミンおよび0.5% Triton (登録商標) X-100、pH 7.4 を含む $1 \times$ PBS 緩衝液を使用して15分間ブロックする。透過処理後、フソソームおよび細胞を、1% ウシ血清アルブミンおよび0.5% Triton (登録商標) X-100、pH 7.4 を含む $1 \times$ PBS 緩衝液で希釈されたメーカー推奨濃度で、異なる一次抗体、例えば (抗RanGAP1 抗体 [EPR3295] (Abcam-ab92360)、抗NUP98 抗体 [EPR6678] - 核膜孔マーカー (Abcam-ab124980)、抗核孔複合体タンパク質抗体 [Mab414] - (Abcam-ab24609)、抗インポーチン7 抗体 (Abcam-ab213670) を使用して、4°C で12時間インキュベートする。次いで、フソソームおよび細胞を、 $1 \times$ PBS 緩衝液、pH 7.4 で洗浄し、1% ウシ血清アルブミンおよび0.5% 洗剤、pH 7.4 を含む $1 \times$ PBS 緩衝液で希釈されたメーカー推奨濃度で、これまでに特定された一次抗体を検出する適当な蛍光二次抗体を使用して、21°C で2時間インキュベートする。次いで、フソソームおよび細胞を、 $1 \times$ PBS 緩衝液で洗浄し、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のHoechst 33342を含む300 μL の $1 \times$ PBS 緩衝液、pH 7.4 に再懸濁し、20 μm のFACSチューブで濾過し、フローサイトメトリによって分析する。

30

【0690】

陰性対照は、同じ染色手順を使用して生成されるが、一次抗体は、添加されない。フローサイトメトリは、488 nm のアルゴンレーザー励起で、FACS サイトメーター (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) で行い、530+/−30 nm の発光スペクトルを収集する。FACS 取得ソフトウェアは、取得および分析のために使用される。光散乱チャンネルは、線形利得に設定され、蛍光チャンネルは、対数尺度で設定され、最低10,000個の細胞が各条件で分析される。相対的な無傷の核膜含有量は、各試料の蛍光強度の中央値に基づいて計算される。すべての事象は、前方および側方散乱チャンネルで獲得される。

40

【0691】

50

フソソームのために正規化された蛍光強度値は、フソソームの中央値蛍光強度値からそれぞれの陰性対照試料の中央値蛍光強度値を減じることによって決定される。次いで、フソソーム試料のために正規化された蛍光は、無傷の核膜含有量の定量的測定値を生成するために、それぞれの有核細胞試料に対して正規化される。

【0692】

一実施形態において、除核されたフソソームは、有核親細胞と比較して、蛍光強度または核エンベロープ含有量を1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%未満含む。

【0693】

実施例37：クロマチンレベルの測定

この実施例は、除核されたフソソームのクロマチンの測定について説明する。

【0694】

DNAをクロマチンに凝縮して、核内に収めることができる。一実施形態において、本明細書に記載の方法のうちのいずれか1つによって生成された精製フソソーム組成物は、低レベルのクロマチンを含む。

【0695】

前述の方法のうちのいずれかによって調製された除核されたフソソームおよび陽性対照細胞（例えば、親細胞）を、ヒストンタンパク質H3またはヒストンタンパク質H4に特異的な抗体を用いたELISAを使用して、クロマチン含有量についてアッセイする。ヒストンは、クロマチンの主要なタンパク質成分であり、H3およびH4が主要なヒストンタンパク質である。

【0696】

ヒストンは、市販のキット（例えば、Abcam Histone抽出キット（ab113476））または当該技術分野で知られている他の方法を使用して、フソソーム調製物および細胞調製物から抽出される。これらのアリコートは、使用するまで-80℃で保存される。標準の連続希釈液は、精製ヒストンタンパク質（H3またはH4のいずれか）をアッセイ緩衝液の溶液で1~50 ng/μlに希釈することによって調製される。アッセイ緩衝液は、メーカーによって供給されるキット（Abcam Histone H4 Total Quantificationキット（ab156909）またはAbcam Histone H3 total Quantificationキット（ab115091））から取得され得る。アッセイ緩衝液を、48ウェルまたは96ウェルプレートの各ウェルに添加し、抗ヒストンH3抗体または抗H4抗体でコーティングし、試料または標準対照をウェルに添加して、各ウェルの総容量を50 μlにする。次いで、プレートを覆い、37℃で90~120分間インキュベートする。

【0697】

インキュベーション後、プレートに付着した抗ヒストン抗体に結合したヒストンは、検出用に調製される。上清を吸引し、このプレートを150 μlの洗浄緩衝液で洗浄する。次いで、抗ヒストンH3または抗H4捕捉抗体を含む捕捉緩衝液を、50 μlの容量で1 μg/mLの濃度でプレートに添加する。次いで、プレートをオービタルシェーカー上で室温で60分間インキュベートする。

【0698】

次いで、プレートを吸引し、洗浄緩衝液を使用して6回洗浄する。次いで、捕捉抗体によって活性化可能なシグナルレポーター分子を、各ウェルに添加する。プレートを覆い、室温で30分間インキュベートする。次いで、プレートを吸引し、洗浄緩衝液を使用して4回洗浄する。停止液を添加することによって、反応を停止する。プレートの各ウェルの吸光度は、450 nmで読み取られ、各試料のヒストン濃度は、450 nmの吸光度対標準試料中のヒストン濃度の標準曲線に従って計算される。

【0699】

一実施形態において、フソソーム試料は、有核親細胞のヒストン濃度を1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、

10

20

30

40

50

または90%未満含む。

【0700】

実施例38：フソソームのDNA含有量の測定

この実施例は、有核の対照物と比較した、フソソーム内のDNA量の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、有核の対照物よりも少ないDNAを有するであろう。核酸レベルは、総DNAまたは特定のハウスキーピング遺伝子のレベルを測定することによって決定される。一実施形態において、DNA含有量が減少したか、またはDNAを実質的に欠いているフソソームは、遺伝子を複製、分化、または転写することができず、このことは、対象に投与されたときに、それらの用量および機能が変化しないことを保証する。

【0701】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。フソソームおよび供給源細胞のタンパク質によって測定されるのと同じ質量の調製物を使用して、総DNAを単離し（例えば、Qiagen DNeasyカタログ番号69504などのキットを使用して）、続いて、DNAによる吸光度を評価するための標準分光法を使用して、DNA濃度を決定する（例えば、Thermo Scientific NanoDropを使用して）。

【0702】

一実施形態において、除核されたフソソーム中のDNAの濃度は、親細胞よりも約50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%以下より少ない。

【0703】

あるいは、GAPDHなどの特定のハウスキーピング遺伝子の濃度は、半定量リアルタイムPCR（RT-PCR）を用いて有核細胞とフソソームの間で比較することができる。総DNAは、親細胞およびフソソームから単離され、DNA濃度は、本明細書に記載されるように測定される。RT-PCRは、以下の反応テンプレートを使用して、PCRキット（Applied Biosystems、カタログ番号4309155）で実行される。

SYBR Green Master Mix：10 μ L

0.45 μ Mの順方向プライマー：1 μ L

0.45 μ Mの逆方向プライマー：1 μ L

DNAテンプレート：10 ng

PCRグレード水：可変

【0704】

順方向および逆方向プライマーは、Integrated DNA Technologiesから得られる。以下の表は、プライマー対およびそれに関連する配列を詳述する。

【表9】

表9：プライマー配列

標的	順方向プライマー配列（5' → 3'）	逆方向プライマー配列（5' → 3'）
ヒトnDNA (GAPDH)	GGAGTCCACTGGCGTCT TCAC	GAGGCATTGCTGATGAT CTTGAGG

【0705】

リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）を使用して、以下のプロトコルで増幅および検出を実行する。

変性、94℃ 2分

次の配列の40サイクル：

変性、94℃ 15秒

アニーリング、伸長、60℃ 1分

【0706】

C_t対DNA濃度の標準曲線は、GAPDH DNAの連続希釈液で作成され、フソソームPCR結果からC_t核値を特定量（ng）のDNAに正規化するために使用される。

【0707】

一実施形態において、除核されたフソソーム中のGAPDH DNAの濃度は、親細胞中よりも約50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%以下より少ない。

【0708】

実施例39：フソソームのmiRNA含有量の測定

この実施例は、フソソーム内のmicroRNA（miRNA）の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、miRNAを含む。

【0709】

MiRNAは、他の活性の中でも、メッセンジャーRNA（mRNA）がタンパク質に翻訳される速度を制御する調節要素である。一実施形態において、miRNAを運ぶフソソームを使用して、miRNAを標的部位に送達することができる。

【0710】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。フソソームまたは親細胞からのRNAは、前述のように調製される。少なくとも1つのmiRNA遺伝子は、www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtmlのSanger Center miRNA Registryから選択される。miRNAは、Chen et al, Nucleic Acids Research, 33(20), 2005に記載されるように調製される。すべてのTaqMan miRNAアッセイは、Thermo Fisher (A25576, Waltham, MA)を通して入手できる。

【0711】

qPCRは、miRNA cDNAに関する製造業者の仕様に従って実行され、C_T値は、本明細書に記載のリアルタイムPCRシステムを使用して、生成および分析される。

【0712】

一実施形態において、フソソームのmiRNA含有量は、親細胞のmiRNA含有量よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上である。

【0713】

実施例40：フソソームの内因性RNAまたは合成RNAの発現の定量化

この実施例は、発現が変化した内因性RNA、またはフソソームで発現する合成RNAのレベルの定量化について説明する。

【0714】

フソソームまたは親細胞は、細胞機能をフソソームに媒介する内因性または合成RNAの発現を変えるように操作されている。

【0715】

トランスポザーゼベクター（System Biosciences, Inc.）は、タンパク質剤のクローン断片のオープンリーディングフレームと一緒にピューロマイシン耐性遺伝子のオープンリーディングフレームを含む。ベクターは、エレクトロポレーター（Amaxa）および293T細胞株特異的核トランスフェクションキット（Lonza）を使用して、293Tにエレクトロポレーションされる。

【0716】

20%ウシ胎児血清および1倍のペニシリン／ストレプトマイシンを含むDMEMで、ピューロマイシンで3～5日間選択した後、フソソームは、前述の実施例に記載の方法のうちのいずれか1つによって、安定発現した細胞株から調製される。

【0717】

前述の実施例に記載されるように、個々のフソソームを単離し、1フソソーム当たりのタンパク質剤またはRNAを定量化する。

10

20

30

40

50

【0718】

実施形態において、フソソームは、1フソソーム当たり少なくとも1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 またはそれ以上のRNAを有する。

【0719】

実施例41：フソソーム中の脂質組成の測定

この実施例は、フソソームの脂質組成の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームの脂質組成は、それらが由来する細胞と同様である。脂質組成は、サイズ、静電相互作用、およびコロイド挙動などのフソソームおよび細胞の重要な生物物理学的パラメーターに影響する。

【0720】

脂質の測定は、質量分析に基づいている。フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。

【0721】

質量分析に基づいた脂質分析は、記載されるように、脂質分析サービス(Dresden, Germany)で実行される(Sampaio, et al., Proc Natl Acad Sci, 2011, Feb 1; 108(5): 1903-7)。脂質は、2段階のクロロホルム/メタノール手順を使用して抽出される(Ejsing, et al., Proc Natl Acad Sci, 2009, Mar 17; 106(7): 2136-41)。試料に、カルジオリピン16:1/15:0/15:0/15:0(CL)、セラミド18:1;2/17:0(Cer)、ジアシルグリセロール17:0/17:0(DAG)、ヘキサシルセラミド18:1;2/12:0(HexCer)、リゾホスファチデート17:0(LPA)、リゾホスファチジルコリン12:0(LPC)、リゾホスファチジルエタノールアミン17:1(LPE)、リゾホスファチジルグリセロール17:1(LPG)、リゾホスファチジルイノシトール17:1(LPI)、リゾホスファチジルセリン17:1(LPS)、ホスファチデート17:0/17:0(PA)、ホスファチジルコリン17:0/17:0(PC)、ホスファチジルエタノールアミン17:0/17:0(PE)、ホスファチジルグリセロール17:0/17:0(PG)、ホスファチジルイノシトール16:0/16:0(PI)、ホスファチジルセリン17:0/17:0(PS)、コレステロールエステル20:0(CE)、スフィンゴミエリン18:1;2/12:0;0(SM)、およびトリアシルグリセロール17:0/17:0/17:0(TAG)の内部脂質標準混合物をスパイクする。

【0722】

抽出後、有機相を注入プレートに移し、速度真空濃縮機で乾燥させる。第1のステップの乾燥抽出物を、クロロホルム/メタノール/プロパノール(1:2:4、V:V:V)中の7.5mMの酢酸アンモニウムに再懸濁し、第2のステップの乾燥抽出物を、クロロホルム/メタノールのメチルアミン(0.003:5:1;V:V:V)の33%エタノール溶液に再懸濁する。すべての液体処理ステップは、ピペッティング用の抗液滴制御特性(Hamilton Robotics)を備えた有機溶媒用ロボットプラットフォームを使用して実行される。

【0723】

試料は、イオン源(Advion Biosciences)を備えた質量分析計(Thermo Scientific)直接注入することによって分析される。試料は、1回の取り込みで、MSの場合は $Rm/z = 200 = 280000$ 、タンデムMS/MS実験の場合は $Rm/z = 200 = 17500$ の解像度で、陽性および陰性イオンモードの両方で分析される。MS/MSは、1Da単位でスキャンされた対応するMS質量範囲を含む包含リストによって引き起こされる(Surma, et al., Eur J Lipid Sci Technol, 2015, Oct; 117(10): 1540-9)。MSデータおよびMS/MSデータの両方を組み合わせて、アンモニウム付加物としてCE、DAG、およびTAGイオン、アセテート付加物としてPC、PC-O-、ならびに脱ブ

10

20

30

40

50

ロトン化アニオンとしてCL、PA、PE、PE O⁻、PG、PI、およびPSをモニタリングする。MSのみを使用して、脱プロトン化アニオンとしてLPA、LPE、LPE O⁻、LPI、およびLPS、アセテートとしてCer、HexCer、SM、LPC、およびLPC O⁻をモニタリングする。

【0724】

以下の参考文献に記載されるように、社内で開発された脂質同定ソフトウェアを使用してデータを分析する(Herzog, et al., Genome Biol, 2011, Jan 19; 12(1): R8、Herzog, et al., PLoS One, 2012, Jan; 7(1): e29851)。シグナル対ノイズ比が5を超え、対応する空試料よりも5倍高いシグナル強度を持つ脂質の同定のみに対して、さらなるデータ分析が考慮される。

10

【0725】

フソソームの脂質組成は、親細胞の脂質組成と比較される。一実施形態において、親細胞の同定された脂質の50%超がフソソームに存在する場合、フソソームおよび親細胞は、同様の脂質組成を有し、これらの同定された脂質のフソソームのレベルは、親細胞の対応する脂質レベルの25%超である。

【0726】

実施例42：フソソーム中のプロテオーム組成の測定

この実施例は、フソソームのタンパク質組成の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームのタンパク質組成は、それらが由来する細胞に同様である。

20

【0727】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。フソソームを、溶解緩衝液(7Mの尿素、2Mのチオ尿素、50mMのトリスpH8.0中の4w/v% Chaps)に再懸濁し、時々ボルテックスしながら室温で15分間インキュベートする。次いで、混合物を氷浴で5分間超音波処理して溶解し、13,000RPMで5分間遠心分離する。タンパク質含有量は、比色アッセイ(Pierce)によって決定され、各試料のタンパク質は、新しいチューブに移され、体積は、50mMのトリスpH8で均等化される。

【0728】

タンパク質を、10mMのDTTを使用して65℃で15分間還元し、暗所で室温で30分間、15mMのヨードアセトアミドでアルキル化する。6容量の冷(-20℃)アセトンを徐々に加えてタンパク質を沈殿させ、-80℃で一晩インキュベートする。タンパク質ペレットを、冷(-20℃)メタノールで3回洗浄する。タンパク質を、50mMのトリスpH8.3に再懸濁する。

30

【0729】

次いで、攪拌しながら37℃で消化の最初の4時間、トリプシン/LysCをタンパク質に添加する。試料を、50mMのトリスpH8で希釈し、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを追加のトリプシン/LysCと共に添加して、攪拌しながら37℃で一晩消化する。消化が停止し、2v/v%ギ酸の添加によってデオキシコール酸ナトリウムを除去する。試料をボルテックスし、13,000RPMで1分間の遠心分離によって透明にする。ペプチドを、逆相固相抽出(SPE)によって精製し、乾燥させる。試料を、20μlの3%DMSO、0.2%ギ酸水溶液で再構成し、LC-MSによって分析される。

40

【0730】

定量的測定を行うために、タンパク質標準も機器で実行される。標準ペプチド(Pierce、等モル、LC-MSグレード、番号88342)を、4、8、20、40、および100fmol/μlに希釈し、LC-MS/MSによって分析される。1タンパク質当たり5つの最高ペプチド(3MS/MSトランジション/ペプチド)の平均AUC(曲線下面積)を、各濃度について計算し、標準曲線を作成する。

【0731】

25μmの内径キャピラリーを有するエレクトロスプレーインターフェースを備え、マ

50

イクロ超高速液体クロマトグラフィー (μ UHP LC) (Eksigent, Redwood City, CA, USA) と連結した高分解能質量分析計 (ABSciex, Foster City, CA, USA) で、取得を実行する。分析ソフトウェアは、機器を制御し、データの処理および取得のために使用される。電源電圧は、5.2 kV に設定され、225 °C に維持され、カーテンガスは、27 psi、ガス1は12 psi、ガス2は10 psi に設定される。取得は、タンパク質データベースでは情報依存性取得 (IDA) モードで、試料では SWATH 取得モードで実行される。分離は、逆相カラムで内径 0.3 μ m、粒子 2.7 μ m、長さ 150 mm (Advance Materials Technology, Wilmington, DE) で行われ、60 °C に維持される。試料は、5 μ L のループにループを埋めることによって注入される。120 分間 (試料) LC 勾配の場合、移動相には、3 μ L / 分の流速で、溶媒 A (0.2 v / v % ギ酸および 3 v / v % DMSO 水溶液) および溶媒 B (0.2 v / v % ギ酸および EtOH 中 3 % の DMSO) が含まれる。

【0732】

タンパク質の絶対定量では、1 タンパク質当たり 5 つの最良ペプチド (1 ペプチド当たり 3 MS / MS イオン) の AUC の合計を使用して、標準曲線 (5 ポイント、 $R^2 > 0.99$) が生成される。試料分析用のデータベースを生成するために、DIAMPIRE アルゴリズムが 12 個の試料のそれぞれで実行され、出力 MGF ファイルと組み合わせられて 1 つのデータベースになる。このデータベースは、ソフトウェア (ABSciex) で使用され、最大 5 つのトランジション / ペプチドおよび 5 つのペプチド / タンパク質を使用して、各試料のタンパク質を定量化する。計算されたスコアが 1.5 を上回るか、または FDR が 1 % 未満である場合、ペプチドは適切に測定されたと見なされる。適切に測定されたペプチドの各々の AUC の合計は、標準曲線にマッピングされ、fmol として報告される。

【0733】

次いで、得られたタンパク質定量データを分析して、次のようにタンパク質レベルおよび既知のタンパク質クラスの割合を決定する：酵素は、酵素委員会 (EC) 番号で注釈されるタンパク質として特定され、ER 関連タンパク質は、ミトコンドリアではなく ER の遺伝子オントロジー (GO; <http://www.geneontology.org>) 細胞コンパートメント分類を持つタンパク質として特定され、エキソソーム関連タンパク質は、ミトコンドリアではなくエキソソームの遺伝子オントロジー細胞内コンパートメント分類を持つタンパク質として特定され、ミトコンドリアタンパク質は、Mitocarta データベースでミトコンドリアとして特定されるタンパク質として特定される (Calvo et al., NAR 2015 [doi:10.1093/nar/gkv1003](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003))。これらのカテゴリーの各々のモル比は、各クラスのすべてのタンパク質のモル量の合計を、各試料ですべての同定されたタンパク質のモル量の合計で除算することによって決定される。

【0734】

フソソームのプロテオーム組成は、親細胞のプロテオーム組成と比較される。一実施形態において、特定されたタンパク質の 50 % 超がフソソームに存在し、それらの同定されたタンパク質のレベルが親細胞の対応するタンパク質レベルの 25 % 超である場合、フソソームと親細胞の間の同様のプロテオーム組成が観察される。

【0735】

実施例 43：1 フソソーム当たりの内因性または合成タンパク質レベルの定量化

この実施例は、フソソーム内の内因性または合成タンパク質カーゴの定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、内因性または合成タンパク質カーゴを含む。

【0736】

フソソームまたは親細胞は、内因性タンパク質の発現を変化させるか、または治療的もしくは新規の細胞機能を媒介する合成カーゴを発現するように操作されている。

【0737】

緑色蛍光タンパク質（GFP）のオープンリーディングフレームに任意に翻訳融合された、タンパク質薬剤のクローン断片のオープンリーディングフレームと一緒にピューロマイシン耐性遺伝子のオープンリーディングフレームを含むトランスポザーゼベクター（System Biosciences, Inc.）。ベクターは、エレクトロポレーター（Amaxa）および293T細胞株特異的核トランスフェクションキット（Lonza）を使用して、293Tにエレクトロポレーションされる。

【0738】

20%ウシ胎児血清および1倍のペニシリン／ストレプトマイシンを含むDMEMで、ピューロマイシンで3～5日間選択した後、フソソームは、前述の実施例に記載の方法のうちのいずれか1つによって、安定発現した細胞株から調製される。

【0739】

内因性タンパク質の発現レベルの変化、またはGFPに融合されていない合成タンパク質の発現レベルは、上記のように質量分析によって定量化される。実施形態において、フソソームは、1フソソーム当たり少なくとも1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 またはそれ以上のタンパク質薬剤を有する。

【0740】

あるいは、精製GFPを、20%ウシ胎児血清および1倍のペニシリン／ストレプトマイシンを含むDMEMで連続希釈して、タンパク質濃度の標準曲線を作成する。標準曲線のGFP蛍光およびフソソームの試料を、GFPライトキューブ（469／35励起フィルターおよび525／39発光フィルター）を使用して蛍光計（BioTek）で測定して、フソソームにおけるGFP分子の平均モル濃度を計算する。次いで、モル濃度を、GFP分子の数に変換し、1試料当たりのフソソームの数で除算して、1フソソーム当たりのタンパク質薬剤の数の平均数に達する。

【0741】

実施形態において、フソソームは、1フソソーム当たり少なくとも1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、 10^3 、 5.0×10^3 、 10^4 、 5.0×10^4 、 10^5 、 5.0×10^5 、 10^6 、 5.0×10^6 またはそれ以上のタンパク質薬剤を有する。

【0742】

実施例44：フソソーム中のエキソソームタンパク質のマーカーの測定

このアッセイでは、試料調製のプロテオミクス構造の定量化について説明し、エキソソームの特異的マーカーであることが知られているタンパク質の割合を定量化する。

【0743】

フソソームはペレット化され、標準的な生物学的試料の取り扱い手順に従ってプロテオミクス分析センターに冷凍されて出荷される。

【0744】

フソソームは、タンパク質の抽出および分析のために解凍される。まず、フソソームを、溶解緩衝液（7Mの尿素、2Mのチオ尿素、50mMのトリスpH8.0中の4w/v% Chaps）に再懸濁し、時々ボルテックスしながら室温で15分間インキュベートする。次いで、混合物を氷浴で5分間超音波処理して溶解し、13,000RPMで5分間遠心分離する。総タンパク質含有量は、比色アッセイ（Pierce）によって決定され、各試料の100μgのタンパク質は、新しいチューブに移され、体積は、50mMのトリスpH8で均等化される。

【0745】

タンパク質を、10mMのDTTを使用して65℃で15分間還元し、暗所で室温で30分間、15mMのヨードアセトアミドでアルキル化する。次いで、6容量の冷（-20℃）アセトンを徐々に加えてタンパク質を沈殿させ、-80℃で一晩インキュベートする。

【0746】

タンパク質をペレット化し、冷（-20℃）メタノールで3回洗浄し、50mMのトリ

10

20

30

40

50

ス pH 8 に再懸濁する。攪拌しながら 37℃ で消化の最初の 4 時間、3.33 μg のトリプシン／lysC をタンパク質に添加する。試料を、50 mM のトリス pH 8 で希釈し、0.1% デオキシコール酸ナトリウムをさらに 3.3 μg のトリプシン／lysC と共に添加して、攪拌しながら 37℃ で一晩消化する。消化が停止し、2 v/v % ギ酸の添加によってデオキシコール酸ナトリウムを除去する。試料をボルテックスし、13,000 RPM で 1 分間の遠心分離によって透明にする。

【0747】

タンパク質は、逆相固相抽出 (SPE) によって精製され、乾燥される。試料を、3% DMSO、0.2% ギ酸水溶液で再構成し、前述のように LC-MS によって分析される。

【0748】

得られたタンパク質定量データを分析して、既知のエキソソームマーカータンパク質のタンパク質レベルおよび割合を決定する。具体的には、テトラスパニンファミリータンパク質 (CD63、CD9、または CD81)、ESCRT 関連タンパク質 (TSG101、CHMP4A-B、または VPS4B)、Alix、TSG101、MHC I、MHC II、GP96、アクチニン-4、ミトフィリン、シンテニン-1、TSG101、ADAM10、EHD4、シンテニン-1、TSG101、EHD1、フロチリン-1、熱ショック 70 kDa タンパク質 (HSC70/HSP73、HSP70/HSP72)。測定されたすべてのタンパク質に対するこれらのエキソソームマーカータンパク質のモル比は、各試料ですべての同定されたタンパク質のモル量の合計で除算した上記の各特定のエキソソームマーカータンパク質のモル量として決定され、割合として表す。

【0749】

同様に、測定されたすべてのタンパク質に対するすべてのエキソソームマーカータンパク質のモル比は、各試料ですべての同定されたタンパク質のモル量の合計で除算した上記のすべての特定のエキソソームマーカータンパク質のモル量の合計として決定され、合計の割合として表す。

【0750】

一実施形態において、このアプローチを使用すると、試料は、任意の個々のエキソソームマーカータンパク質の 5% 未満および総エキソソームマーカータンパク質の 15% 未満含む。

【0751】

一実施形態において、任意の個々のエキソソームマーカータンパク質は、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、または 10% 未満で存在する。

【0752】

一実施形態において、すべてのエキソソームマーカータンパク質の合計は、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、または 25% 未満である。

【0753】

実施例 45：フソソーム中の GAPDH の測定

このアッセイでは、フソソームのグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のレベル、および親細胞と比較したフソソームの GAPDH の相対レベルの定量化について説明する。

【0754】

GAPDH は、製造業者の取扱説明書に従って、GAPDH の標準的な市販の ELISA (ab176642、Abcam) を使用して、親細胞およびフソソームで測定される。

【0755】

総タンパク質レベルは、GAPDH を測定するために使用した同じ体積の試料において前述したように、ビシンコニン酸アッセイによって同様に測定される。実施形態において、このアッセイを使用して、フソソーム中の総タンパク質当たりの GAPDH のレベルは、100 ng 未満の GAPDH/μg 総タンパク質である。同様に、実施形態において、親細胞からフソソームへの総タンパク質と比較した GAPDH レベルの減少は、10% の

10

20

30

40

50

減少よりも大きい。

【0756】

一実施形態において、 $\text{ng GAPDH} / \mu\text{g}$ 総タンパク質における調製中のGAPDH含有量は、500未満、250未満、100未満、50未満、20未満、10未満、5未満、または1未満である。

【0757】

一実施形態において、親細胞から調製物への $\text{ng} / \mu\text{g}$ 単位の総タンパク質当たりのGAPDHの減少は、1%超、2.5%超、5%超、10%超、15%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、または90%超である。

【0758】

実施例46：フソソーム中のカルネキシンの測定

このアッセイは、フソソーム中のカルネキシン(CNX)のレベル、および親細胞と比較したフソソーム中のCNXの相対レベルの定量化について説明する。

【0759】

カルネキシンは、製造業者の取扱説明書に従って、カルネキシンの標準的な市販のELISA(MBS721668、MyBioSource)を使用して、出発細胞および調製物で測定される。

【0760】

総タンパク質レベルは、カルネキシンを測定するために使用した同じ体積の試料において前述したように、ビシンコニン酸アッセイによって同様に測定される。実施形態において、このアッセイを使用して、フソソーム中の総タンパク質当たりのカルネキシンのレベルは、100ng未満のカルネキシン/ μg 総タンパク質である。同様に、実施形態において、親細胞からフソソームまでの総タンパク質と比較したカルネキシンレベルの増加は、10%の増加よりも大きい。

【0761】

一実施形態において、 $\text{ng カルネキシン} / \mu\text{g}$ 総タンパク質における調製中のカルネキシン含有量は、500、250、100、50、20、10、5、または1未満である。

【0762】

一実施形態において、親細胞から調製物への $\text{ng} / \mu\text{g}$ 単位の総タンパク質当たりのカルネキシンの減少は、1%、2.5%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%超である。

【0763】

実施例47：可溶性タンパク質質量と不溶性タンパク質質量の比較

この実施例は、フソソーム中の可溶性タンパク質質量：不溶性タンパク質質量の比の定量化について説明する。一実施形態において、フソソーム中の可溶性タンパク質質量：不溶性タンパク質質量の比は、有核細胞に類似するであろう。

【0764】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。フソソーム調製物は、標準的なビシンコニン酸アッセイ(BCA)(例えば、市販のPierce(商標)BCAプロテインアッセイキット、ThermoFisher製品番号23225を使用)を使用して、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比を決定するために試験を行った。可溶性タンパク質試料は、PBS中の 1×10^7 個の細胞またはフソソーム/mLの濃度で調製したフソソームまたは親細胞を懸濁し、1600gで遠心分離して、フソソームまたは細胞をペレット化する。上清は、可溶性タンパク質画分として収集される。

【0765】

ペレット中のフソソームまたは細胞は、2%Triton-X-100を含むPBSで激しくピペティングおよびボルテックスすることによって溶解される。溶解画分は、不溶性タンパク質画分を表す。

【0766】

10

20

30

40

50

1 ウェル当たり 0 ~ 20 μ g の BSA の供給された BSA を (3 重に) 使用して、標準曲線を作成する。測定した量が標準の範囲内になるように、フソソームまたは細胞調製物を希釈する。フソソーム調製物を 3 重に分析し、平均値を使用する。可溶性タンパク質濃度を、不溶性タンパク質濃度で除算して、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比を得る。

【0767】

一実施形態において、フソソームの可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比は、親細胞と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 以内、またはそれより大きい。

【0768】

実施例 48：フソソーム中の LPS の測定

この実施例は、親細胞と比較したフソソーム中のリポ多糖 (LPS) のレベルの定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して低レベルの LPS を有するであろう。

【0769】

LPS は、細菌膜の成分であり、先天性免疫応答の強力な誘導因子である。

【0770】

LPS 測定は、前述の実施例で説明した質量分析に基づいている。

【0771】

一実施形態において、フソソームの脂質含有量の 5%、1%、0.5%、0.01%、0.005%、0.0001%、0.00001% 未満またはそれより低いのは LPS である。

【0772】

実施例 49：フソソーム中の脂質とタンパク質の比

この実施例は、フソソーム中の脂質量とタンパク質量の比の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、有核細胞に類似する脂質量とタンパク質量の比を有するであろう。

【0773】

総脂質含有量は、前述の実施例で概説したリポドミクスデータセットで特定されたすべての脂質のモル含有量の合計として計算される。フソソームの総タンパク質含有量は、本明細書に記載のビシンコニン酸アッセイによって測定される。

【0774】

あるいは、脂質とタンパク質の比率は、特定の脂質種と特定のタンパク質の比率として説明され得る。特定の脂質種は、前述の実施例において生成されたリポドミクスデータから選択される。特定のタンパク質は、前述の実施例において生成されたプロテオミクスデータから選択される。選択した脂質種とタンパク質の様々な組み合わせを使用して、特定の脂質：タンパク質の比を定義する。

【0775】

実施例 50：フソソーム中のタンパク質と DNA の比

この実施例は、フソソーム中のタンパク質量と DNA 質量の比の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、細胞よりもはるかに大きい、タンパク質量と DNA 質量の比を有するであろう。

【0776】

フソソームおよび細胞の総タンパク質含有量は、前述の実施例で説明したように測定される。フソソームおよび細胞の DNA 質量は、前述の実施例で説明したように測定される。次いで、タンパク質と総核酸の比は、総タンパク質含有量を総 DNA 含有量で除算することによって決定され、典型的なフソソーム調製物の所定の範囲内の比が得られる。

【0777】

あるいは、タンパク質と核酸の比は、半定量的リアルタイム PCR (RT-PCR) を使用して、GAPDH などの特定のハウスキーピング遺伝子のレベルとして核酸レベルを

10

20

30

40

50

定義することによって決定される。

【0778】

次いで、タンパク質とGAPDH核酸の比は、典型的なフソソーム調製物におけるタンパク質：核酸の比の特定の範囲を定義するために、総タンパク質含有量を総GAPDH DNA含有量で除算することによって決定される。

【0779】

実施例51：フソソーム中の脂質とDNAの比

この実施例は、親細胞と比較したフソソーム中の脂質とDNAの比の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して脂質とDNAの比がより大きい。

【0780】

この比率は、総脂質含量（上記の実施例で概説）または特定の脂質種として定義される。特定の脂質種の場合、範囲は、選択された特定の脂質種に応じて異なる。特定の脂質種は、前述の実施例において生成されたリポドミクスデータから選択される。核酸含量は、前述の実施例で説明されているように決定される。

【0781】

核酸含有量に正規化された選択された脂質種の異なる組み合わせを使用して、特定のフソソーム調製物に特有である特定の脂質：核酸の比を定義する。

【0782】

実施例52：フソソーム上の表面マーカーの分析

このアッセイは、フソソーム上の表面マーカーの特定について説明する。

【0783】

フソソームはペレット化され、標準的な生物学的試料の取り扱い手順に従ってプロテオミクス分析センターに冷凍されて出荷される。

【0784】

フソソーム上の表面マーカーの有無を特定するために、それらを、ホスファチジルセリンおよびCD40リガンドに対するマーカーで染色し、FACSシステム（Becton Dickinson）を使用したフローサイトメトリーによって分析する。表面ホスファチジルセリンの検出のために、製造業者によって記載されるように、生成物を、アネキシンVアッセイ（556547、BD Biosciences）で分析する。

【0785】

簡単に説明すると、フソソームを、冷PBSで2回洗浄し、次いで、 1×10^6 個のフソソーム／mlの濃度で1倍の結合緩衝液に再懸濁する。再懸濁液の10%を、5mlの培養チューブに移し、5μlのFITCアネキシンVを添加する。細胞を穏やかにボルテックスし、室温（25℃）で15分間、暗所でインキュベートする。

【0786】

並行して、再懸濁液の別の10%を、非染色対照の役割を果たすように、異なるチューブに移す。1倍の結合緩衝液を、各チューブに添加する。試料は、1時間以内にフローサイトメトリーで分析する。

【0787】

いくつかの実施形態において、このアッセイを使用して、染色したフソソームの集団の平均は、非染色細胞の平均を超えると判定され、これは、フソソームがホスファチジルセリンを含むことを示す。

【0788】

同様に、CD40リガンドについては、製造業者の取扱説明書に従って、PE-CF594マウス抗ヒトCD154クローンTRAP1（563589、BD Pharmingen）のモノクローナル抗体を、さらに10%の洗浄したフソソームを添加する。簡単に説明すると、飽和量の抗体が、使用される。並行して、フソソームの別の10%を、非染色対照の役割を果たすように、異なるのチューブに移す。チューブを、 $400 \times g$ で5分間、室温で遠心分離する。上清をデカントし、ペレットをフローサイトメトリー洗浄液で

10

20

30

40

50

2回洗浄する。0.5 mlの1%パラホルムアルデヒド固定剤を、各チューブに添加する。それぞれを短時間ボルテックスし、フローサイトメーターで分析するまで4℃で保存する。

【0789】

一実施形態において、このアッセイを使用して、染色したフソソームの集団の平均は、非染色細胞の平均を超え、これは、フソソームがCD40リガンドを含むことを示す。

【0790】

実施例53：フソソーム中のウイルスカプシドタンパク質の分析

このアッセイは、試料調製の構成の分析について説明し、ウイルスカプシド源に由来するタンパク質の割合を評価する。

【0791】

フソソームはペレット化され、標準的な生物学的試料の取り扱い手順に従ってプロテオミクス分析センターに冷凍されて出荷される。

【0792】

フソソームは、タンパク質の抽出および分析のために解凍される。まず、フソソームを、溶解緩衝液（7 M 尿素、2 M チオ尿素、50 mMのトリスpH 8.0中の4 w/v % Chaps）に再懸濁し、時々ボルテックスしながら室温で15分間インキュベートする。次いで、混合物を氷浴で5分間超音波処理して溶解し、13,000 RPMで5分間遠心分離する。総タンパク質含有量は、比色アッセイ（Pierce）によって決定され、各試料の100 μgのタンパク質は、新しいチューブに移され、体積は、50 mMのトリスpH 8で均等化される。

【0793】

タンパク質を、10 mMのDTTを使用して65℃で15分間還元し、暗所で室温で30分間、15 mMのヨードアセトアミドでアルキル化する。次いで、6容量の冷（-20℃）アセトンを徐々に加えてタンパク質を沈殿させ、-80℃で一晩インキュベートする。

【0794】

タンパク質をペレット化し、冷（-20℃）メタノールで3回洗浄し、50 mMのトリスpH 8に再懸濁する。攪拌しながら37℃で消化の最初の4時間、3.33 μgのトリプシン/lys Cをタンパク質に添加する。試料を、50 mMのトリスpH 8で希釈し、0.1%デオキシコール酸ナトリウムをさらに3.3 μgのトリプシン/lys Cと共に添加して、攪拌しながら37℃で一晩消化する。消化が停止し、2 v/v %ギ酸の添加によってデオキシコール酸ナトリウムを除去する。試料をボルテックスし、13,000 RPMで1分間の遠心分離によって透明にする。

【0795】

タンパク質は、逆相固相抽出（SPE）によって精製され、乾燥される。試料を、3% DMSO、0.2%ギ酸水溶液で再構成し、前述のようにLC-MSによって分析される。

【0796】

測定されたすべてのタンパク質に対するウイルスカプシドタンパク質のモル比は、各試料ですべての同定されたタンパク質のモル量の合計で除算したすべてのウイルスカプシドタンパク質のモル量として決定され、割合として表す。

【0797】

一実施形態において、このアプローチを使用すると、試料は、10%未満のウイルスカプシドタンパク質を含む。一実施形態において、試料は、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、または90%未満のウイルスカプシドタンパク質を含む。

【0798】

実施例54：標的細胞による融合の測定

この実施例は、非標的細胞と比較した標的細胞によるフソソーム融合の定量化について説明する。

【0799】

10

20

30

40

50

一実施形態において、標的細胞によるフソソーム融合は、フソソームの内腔内に運ばれたカーゴのレシピエント細胞のサイトゾルへの細胞特異的送達を可能にする。本明細書に記載の方法によって生成されたフソソームは、以下のように標的細胞との融合率についてアッセイされる。

【0800】

この実施例では、フソソームは、その原形質膜上でミオメーカーを発現するHEK293T細胞を含む。さらに、フソソームは、mTagBFP2蛍光タンパク質およびCreリコンビナーゼを発現する。標的細胞は、ミオメーカーおよびミオミキサーの両方を発現する筋芽細胞であり、非標的細胞は、ミオメーカーまたはミオミキサーのいずれも発現しない線維芽細胞である。ミオメーカーを発現するフソソームは、ミオメーカーおよびミオミキサーの両方を発現するが、非標的細胞では発現しない標的細胞と融合すると予測される(Quinn et al., 2017, Nature Communications, 8, 15665. doi.org/10.1038/ncomms15665) (Milly et al., 2013, Nature, 499 (7458), 301-305. doi.org/10.1038/nature12343)。標的細胞および非標的細胞の両方がマウスから分離され、CMVプロモーターの下で「LoxP-stop-LoxP-tdTomato」カセットを安定的に発現し、Creによる組換え時に、融合体を示すtdTomato発現を引き起こす。

【0801】

標的または非標的レシピエント細胞を、黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種する。標的細胞および非標的細胞の両方を、異なる融合群のために播種する。次いで、レシピエント細胞を播種してから24時間後に、Creリコンビナーゼタンパク質およびミオメーカーを発現するフソソームを、DMEM培地中で標的または非標的のレシピエント細胞に適用する。フソソームの用量は、ウェルに播種したレシピエント細胞の数と相関する。フソソームを適用した後、細胞プレートを、400gで5分間遠心分離して、フソソームとレシピエント細胞の接触を開始するのに役立つ。

【0802】

フソソームを適用した4時間後に開始して、細胞ウェルを画像化して、フィールドまたはウェル内のGFP陽性細胞に対してRFP陽性細胞を明確に特定する。

【0803】

この実施例では、自動顕微鏡(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)を使用して、細胞プレートを画像化する。所定のウェル中の総細胞集団は、まず、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定される。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用される。染色後、Hoechst培地を、通常のDMEM培地に交換する。

【0804】

Hoechstは、405nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化される。GFPは、465nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、一方、RFPは、523nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化される。標的細胞および非標的細胞のウェルの画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞のLED強度および積分時間を確立することによって得られる。

【0805】

取得設定は、RFPおよびGFP強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定される。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化される。ウェルは、4時間毎に画像化され、融合活性の速度の時間経過データを得る。

【0806】

GFPおよびRFP陽性ウェルの分析は、蛍光顕微鏡に付属のソフトウェアまたは他のソフトウェア (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007) で実施される。

【0807】

画像は、幅60 μ mのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理される。総細胞マスクは、Hoechst陽性細胞に設定される。バックグラウンド強度を大幅に上回るHoechst強度を有する細胞は、閾値処理され、Hoechst陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外される。

10

【0808】

総細胞マスク内で、GFPおよびRFP陽性細胞は、バックグラウンドを大幅に上回る細胞の閾値を再度設定し、細胞領域全体のHoechst (核) マスクを拡張して、GFPおよびRFP細胞蛍光全体を含めることによって特定される。標的または非標的レシピエント細胞を含む対照ウェルで特定されたRFP陽性細胞の数は、フソソームを含むウェル内のRFP陽性細胞の数から減算するため (非特異的Loxp組換えを減算するため) に使用される。次いで、RFP陽性細胞 (融合レシピエント細胞) の数を、各時点でGFP陽性細胞 (融合していないレシピエント細胞) およびRFP陽性細胞の合計で除算して、レシピエント細胞集団内のフソソーム融合速度を定量化する。この速度は、レシピエント細胞に適用される所定の用量のフソソームに正規化される。標的融合速度 (標的細胞へのフソソーム融合) の場合、非標的細胞への融合速度は、標的融合速度を定量化するために、標的細胞への融合速度から除算する。

20

【0809】

一実施形態において、標的細胞とのフソソームの平均融合速度は、標的細胞融合の場合、1時間当たり0.01~4.0 RFP/GFP細胞の範囲内であるか、またはフソソームを有する非標的レシピエント細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれより大きい。一実施形態において、フソソームが適用されていない群は、1時間当たり0.01未満のRFP/GFP細胞のバックグラウンド速度を示す。

【0810】

30

実施例55：膜タンパク質を送達するためのインビトロ融合

この実施例は、インビトロでの細胞とのフソソーム融合について説明する。一実施形態において、インビトロでの細胞とのフソソーム融合は、レシピエント細胞に対して活性な膜タンパク質の送達をもたらす。

【0811】

この実施例では、フソソームは、センダイウイルスHVJ-Eタンパク質を発現するHEK293T細胞から生成される (Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22 (October 2014), 1-8. doi.org/10.1038/gt.2014.12)。一実施形態において、フソソームは、主に筋肉および脂肪組織に見られ、細胞へのグルコースのインスリン調節輸送に関与する膜タンパク質、GLUT4を発現するために生成される。GLUT4を伴うおよび伴わないフソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって記載されるように、HEK293T細胞から調製される。

40

【0812】

次いで、C2C12細胞などの筋肉細胞を、GLUT4を発現するフソソーム、GLUT4を発現しないフソソーム、PBS (陰性対照)、またはインスリン (陽性対照) で処理する。C2C12細胞におけるGLUT4の活性は、蛍光2-デオキシグルコース類似体、2-[N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアキソール-4-イル)アミノ]-2-デオキシグルコース (2-NBDG) の取り込みによって測定される。C2C12細胞の蛍光は、前述の実施例で説明された方法を使用して顕微鏡検査により評価さ

50

れる。

【0813】

一実施形態において、GLUT4およびインスリンを発現するフソソームで処理されたC2C12細胞は、PBSまたはGLUT4を発現しないフソソームで処理されたC2C12細胞と比較して蛍光の増加を示すと予想される。

【0814】

また、Yang et al., Advanced Materials 29, 1605604, 2017も参照のこと。

【0815】

実施例56：膜タンパク質のインビボ送達

この実施例は、インビボでの細胞とのフソソーム融合について説明する。一実施形態において、インビボでの細胞とのフソソーム融合は、レシピエント細胞に対して活性な膜タンパク質の送達をもたらす。

【0816】

この実施例では、フソソームは、前述の実施例と同様に、センダイウイルスHVJ-Eタンパク質を発現するHEK293T細胞から生成される。一実施形態において、フソソームは、膜タンパク質GLUT4を発現するために生成される。GLUT4を伴うおよび伴わないフソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって記載されるように、HEK293T細胞から調製される。

【0817】

BALB/c-mouseに、GLUT4を発現するフソソーム、GLUT4を発現しないフソソーム、またはPBS（陰性対照）を投与する。マウスに、フソソームまたはPBSを前脛骨筋に筋肉内注射する。フソソーム投与の直前に、マウスを12時間絶食させ、ポジトロン放出断層撮影（PET画像）を可能にするグルコースの類似体である[18F] 2-フルオロ-2デオキシ-D-グルコース（18F-FDG）を注射する。マウスに、麻酔（2%イソフルラン）下で尾静脈を介して18F-FDGを注射する。PET画像は、ナノスケール画像システム（1T、Mediso, Hungary）を使用して実行される。画像は、フソソームの投与から4時間後に行われる。画像直後に、マウスを殺処分し、前脛骨筋の重さを量る。PET画像は、完全検出モードで3D画像システムを使用して再構成され、すべての補正がオンになり、高度に正規化され、8回反復される。再構成画像の3次元関心体積（VOI）分析は、画像ソフトウェアパッケージ（Mediso, Hungary）を使用して、標準摂取率（SUV）分析を適用して実行される。直径2mmの球で固定されたVOIは、前脛骨筋の部位に描かれている。各VOI部位のSUVは、次の式を使用して計算される： $SUV = (Bq / cc \times \text{体重}) / \text{測定される、関心体積の放射能} / \text{注入された放射能}$ 。

【0818】

一実施形態において、GLUT4を発現するフソソームを投与されたマウスは、PBSまたはGLUT4を発現しないフソソームを投与したマウスと比較して、VOIにおける放射性シグナルの増加を示すと予想される。

【0819】

また、Yang et al., Advanced Materials 29, 1605604, 2017も参照のこと。

【0820】

実施例57：血管からの溢出の測定

この実施例は、インビトロでの微小流体システムで試験された内皮単層にわたるフソソームの溢出の定量化について説明する（J. S. Joen et al. 2013, journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056910）。

【0821】

細胞は、血管系から周囲組織に溢出する。理論に拘束されることを望まないが、溢出は

10

20

30

40

50

、フソソームが血管外組織に達するための1つの方法である。

【0822】

このシステムには、ECM模倣ゲルを注入することができるチャンバーで区切られた、独立してアドレス指定可能な3つのメディアチャンネルが含まれる。簡単に説明すると、マイクロ流体システムは、PDMS（ポリジメチルシロキサン；Silgard 184；Dow Chemical、MI）を成形し、アクセスポートを開けてカバーガラスに接着し、マイクロ流体チャンネルを形成する。チャンネルの断面寸法は、1mm（幅）×120μm（高さ）である。マトリックス接着を強化するために、PDMSチャンネルは、PDL（ポリ-D-リジン臭化水素酸塩；1mg/ml；Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）溶液でコーティングされる。

10

【0823】

次いで、リン酸緩衝生理食塩水（PBS；Gibco）およびNaOHを含むI型コラーゲン（BD Biosciences、San Jose、CA、USA）溶液（2.0mg/ml）を、4つの別個の充填ポートを介してデバイスのゲル領域に注入し、30分間インキュベートして、ヒドロゲルを形成する。ゲルが重合すると、内皮細胞培地（LonzaまたはSigmaなどの供給業者から入手）を、チャンネルに直ちにピペッティングして、ゲルの脱水を防止する。培地を吸引すると、希釈されたヒドロゲル（BD science）溶液（3.0mg/ml）を細胞チャンネルに導入し、過剰なヒドロゲル溶液を、冷たい培地を使用して洗い流す。

【0824】

20

内皮細胞を、中間チャンネルに導入し、定着して内皮を形成することができる。内皮細胞を播種してから2日後、フソソームまたはマクロファージ細胞（陽性対照）を、内皮細胞が完全な単層を形成したのと同じチャンネルに導入する。フソソームを、単層に付着し、単層を横切ってゲル領域に移動するように導入する。培養物は、37℃および5%CO₂で加湿インキュベーターで保管される。GFP発現バージョンのフソソームは、蛍光顕微鏡を介して生細胞画像を可能にするために使用される。翌日、細胞を固定し、チャンバー内でDAPI染色を使用して核を染色し、共焦点顕微鏡を使用して複数の対象となる領域を画像化し、内皮単層を通過したフソソームの数を決定する。

【0825】

一実施形態において、DAPI染色は、フソソームおよび陽性対照細胞が播種後に内皮障壁を通過することができることを示す。

30

【0826】

実施例58：走化性細胞の可動性の測定

この実施例は、フソソームの走化性の定量化について説明する。細胞は、走化性を介して化学勾配に向かってまたは化学勾配から離れて移動することができる。一実施形態において、走化性は、フソソームが損傷部位に存在するか、または病原体を追跡することが可能になる。前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成された精製フソソーム組成物は、以下のようにその走化性能力についてアッセイされる。

【0827】

十分な数のフソソームまたはマクロファージ細胞（陽性対照）が、DMEM培地（ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_8032X_Chemotaxis/IN_8032X_Chemotaxis.pdf）中の製造業者が提供したプロトコルに従って、マイクロスライドウェルにロードされる。フソソームは、37℃および5%CO₂で1時間放置して付着させる。細胞付着後、MCP1化学誘引物質を含むDMEM（陰性対照）またはDMEMを、中央チャンネルの隣接するリザーバーにロードし、フソソームを、Zeiss倒立広視野顕微鏡を使用して連続的に2時間画像化する。ImageJソフトウェアを使用して画像を分析する（Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007）。

40

50

観測された各フソソームまたは細胞の移行連携データは、手動追跡プラグイン (Fabric Cordelieres, Institut Curie, Orsay, France) で取得される。走化性プロットおよび移動速度は、走化性および移行ツール (ibidi) で決定される。

【0828】

一実施形態において、フソソームの平均累積距離および移動速度は、ケモカインに対する陽性対照細胞の応答よりも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内、またはそれより大きい。ケモカインに対する細胞の応答は、例えば、Howard E. Gendelman et al., Journal of Neuroimmune Pharmacology, 4 (1): 47-59, 2009に記載されている。

10

【0829】

実施例59：ホーミングポテンシャルの測定

この実施例は、損傷部位へのフソソームのホーミングについて説明する。細胞は、遠位部位から移動し、および／または特定の部位を蓄積する、例えば部位に帰着させることができる。典型的には、部位は、損傷部位である。一実施形態において、フソソームは、損傷部位に帰着させる、例えば、損傷部位に移動するか、または損傷部位に蓄積する。

【0830】

8週齢のC57BL/6Jマウス (Jackson Laboratories) に、右前脛骨筋 (TA) への30G針を使用した筋肉内 (IM) 注射による滅菌生理食塩水中のノテキシン (NTX) (Accurate Chemical & Scientific Corp)、ミオトキシンを2 µg/mLの濃度で投与する。前脛骨筋 (TA) 筋肉上の皮膚を、45秒間化学脱毛剤を使用して領域を脱毛し、続いて、水で3回すすぐことによって調製する。この濃度は、筋線維の変性を最大限にし、衛星細胞、運動性軸索、および血管への損傷を最小限に抑えるために選択される。

20

【0831】

NTX注射後の1日目に、マウスは、ホタルルシフェラーゼを発現するフソソームまたは細胞のIV注射を受容する。フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する細胞から生成される。生物発光画像システム (Perkin Elmer) を使用して、注入から0、1、3、7、21、および28後の生物発光の動物全体の画像を取得する。

30

【0832】

画像化する5分前に、ルシフェラーゼを視覚化するために、マウスに150 mg/kgの用量で生物発光基質 (Perkin Elmer) を腹腔内注射する。画像システムは、すべてのデバイス設定を補正するために較正される。生物発光シグナルは、Radiance Photonsを使用して、測定値として使用された全フラックスで測定される。関心領域 (ROI) は、光子/秒の値を得るために、ROIのシグナルを囲むことによって生成される。ROIは、NTXで処理されたTA筋肉と対側TA筋肉の両方で評価され、NTX処理されたTA筋肉とNTX未処理のTA筋肉間の光子/秒の比率は、NTX処理された筋肉へのホーミングの尺度として計算される。

40

【0833】

一実施形態において、フソソームおよび細胞中のNTX処理されたTA筋肉とNTX未処理のTA筋肉間の光子/秒の比率は、1より大きくなり、損傷でのルシフェラーゼ発現フソソームの部位特異的蓄積を示す。

【0834】

例えば、Plant et al., Muscle Nerve 34 (5) L 577-85, 2006を参照のこと。

【0835】

実施例60：食作用活性の測定

この実施例は、フソソームの食作用活性を実証する。一実施形態において、フソソーム

50

は、食作用活性を有し、例えば食作用が可能である。細胞は、食作用に関与し、粒子を貪食し、細菌および死細胞などの外来侵入者の隔離および破壊を可能にする。

【0836】

部分的または完全な核不活性化を有する哺乳動物マクロファージからのフソソームを含む前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成された精製フソソーム組成物は、病原体生体粒子を介して食作用アッセイが可能であった。この推定は、以下のプロトコルに従って蛍光食作用アッセイを使用することによって行われた。

【0837】

マクロファージ（陽性対照）およびフソソームを、採取直後に別の共焦点ガラス底皿に播種した。マクロファージおよびフソソームを、DMEM+10%FBS+1%P/Sで1時間インキュベートして付着させた。フルオレセイン標識大腸菌K12および非フルオレセイン標識大腸菌K-12（陰性対照）を、製造業者のプロトコルに示されているようにマクロファージ/フソソームに添加し、2時間インキュベートした、tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdf。2時間後、遊離蛍光粒子は、トリパンブルーを添加することによって消光された。取り込まれた粒子から放出された細胞内蛍光は、488励起での共焦点顕微鏡によって画像化された。食作用陽性のフソソームの数は、image Jソフトウェアを使用して定量化された。

10

【0838】

食作用性フソソームの平均数は、生体粒子導入から2時間後、少なくとも30%であり、陽性対照マクロファージでは30%よりも多かった。

20

【0839】

実施例61：細胞膜または血液脳関門を通過する能力の測定

この実施例は、血液脳関門を通過するフソソームの定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、例えば、中枢神経系への送達のために、血液脳関門を通過し、例えば、出入りするであろう。

【0840】

8週齢のC57BL/6Jマウス（Jackson Laboratories）に、ホタルルシフェラーゼを発現するフソソームまたは白血球（陽性対照）を静脈内注射する。フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって、ホタルルシフェラーゼを安定して発現する細胞またはルシフェラーゼを発現しない細胞（陰性対照）から生成される。生物発光画像システム（Perkin Elmer）を使用して、フソソームまたは細胞の注入から1、2、3、4、5、6、8、12、および24時間後の生物発光の動物全体の画像を取得する。

30

【0841】

画像化する5分前に、ルシフェラーゼを視覚化するために、マウスに150mg/kgの用量で生物発光基質（Perkin Elmer）を腹腔内注射する。画像システムは、すべてのデバイス設定を補正するために較正される。生物発光シグナルは、測定値として使用された全フラックスで測定される関心領域（ROI）は、光子/秒の値を得るために、ROIのシグナルを囲むことによって生成される。選択されたROIは、脳を含む領域周辺のマウスの頭部である。

40

【0842】

一実施形態において、ROIの光子/秒は、ルシフェラーゼを発現しない陰性対照のフソソームよりもルシフェラーゼを発現する細胞またはフソソームを注射した動物において多く、これは、脳内または脳周辺のルシフェラーゼを発現するフソソームの蓄積を示す。

【0843】

実施例62：タンパク質分泌の可能性の測定

この実施例は、フソソームによる分泌の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、分泌、例えばタンパク質分泌が可能である。細胞は、分泌物を介して物質を廃棄または排出することができる。一実施形態において、フソソームは、分泌を介し

50

てそれらの環境内で化学的に相互作用し、連通する。

【0844】

所定の速度でタンパク質を分泌するフソソームの能力は、ThermoFisher Scientific (カタログ番号16158) からのガウシアルシフェラーゼフラッシュアッセイを使用して決定される。前述の実施例で説明した方法のうちのいずれか1つによって生成されたマウス胚線維芽細胞 (陽性対照) またはフソソームを、成長培地でインキュベートし、培地の試料は、まず、フソソームを1600gで5分間ペレット化し、次いで、上清を収集することによって15分ごとに収集する。収集した試料を、透明な底の96ウェルプレートにピペティングする。次いで、アッセイ緩衝液の作業溶液は、製造業者の取扱説明書に従って調製される。

10

【0845】

簡単に説明すると、ルシフェリンまたは発光分子であるコレンテラジンをフラッシュアッセイ緩衝液と混合し、試料を含む96ウェルプレートの各ウェルにピペティングする。細胞またはフソソームを欠いている陰性対照ウェルには、バックグラウンドのガウシアルシフェラーゼシグナルを決定するための成長培地またはアッセイ緩衝液が含まれる。さらに、発光シグナルを1時間当たりのガウシアルシフェラーゼ分泌分子に変換するために、精製ガウシアルシフェラーゼ (Athena Enzyme Systems、カタログ番号0308) の標準曲線を調製する。

【0846】

プレートは、500msecの積分を使用して、発光についてアッセイされる。バックグラウンドのガウシアルシフェラーゼシグナルを、すべての試料から減じた後、線形最適曲線を、ガウシアルシフェラーゼ標準曲線に対して計算する。試料の測定値が標準曲線内に適合しない場合、それらを、適切に希釈して、再アッセイする。このアッセイを使用して、所定の範囲内の速度 (分子/時間) でガウシアルシフェラーゼを分泌するフソソームの能力が決定される。

20

【0847】

一実施形態において、フソソームは、陽性対照細胞よりも、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれより大きい速度でタンパク質を分泌することができる。

【0848】

実施例63：シグナル伝達電位の測定

この実施例は、フソソームにおけるシグナル伝達の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、シグナル伝達が可能である。細胞は、シグナル伝達として知られるプロセスで、リン酸化などのシグナル伝達カスケードを通じて細胞外環境からの分子シグナルを送受信することができる。部分的または完全な核不活性化を有する哺乳動物細胞からのフソソームを含む前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成された精製フソソーム組成物は、インスリンによって誘導されるシグナル伝達を可能にする。インスリンによって誘導されるシグナル伝達は、AKTリン酸化レベル、インスリン受容体シグナル伝達カスケードの重要な経路、およびインスリンに応答するグルコース取り込みを測定することによって評価される。

30

40

【0849】

AKTリン酸化を測定するために、細胞、例えばマウス胚性線維芽細胞 (MEF) (陽性対照) およびフソソームを、48ウェルプレートに播種し、37℃および5%CO₂の加湿インキュベーターに2時間放置する。細胞の接着後、インスリン (例えば、10nMで)、またはインスリンを含まない陰性対照溶液を、細胞またはフソソームを含むウェルに30分間添加する。30分後、タンパク質溶解物はフソソームまたは細胞から作製され、リン酸化AKTレベルは、インスリンで刺激した試料および対照で刺激されていない試料中でウェスタンブロッティングによって測定される。

【0850】

インスリンまたは陰性対照溶液に応答したグルコース取り込みは、標識グルコース (2

50

－NBDG)を使用することによって、グルコース取り込みの項で説明されているように測定される(S. Galic et al., Molecular Cell Biology 25(2):819-829, 2005)。

【0851】

一実施形態において、フソソームは、陰性対照よりもインスリンに応答してAKTリン酸化およびグルコース取り込みを、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%またはそれ以上増強する。

【0852】

実施例64：細胞膜を横断してグルコースを輸送する能力の測定

10

この実施例は、生細胞でのグルコース取り込みをモニタリングし、脂質二重層を横断する能動輸送を測定するために使用することができる、2-NBDG(2-(N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアキソール-4-イル)アミノ)-2-デオキシグルコース)の蛍光グルコース類似体のレベルの定量について説明する。一実施形態において、このアッセイを使用して、グルコース取り込みのレベルおよびフソソームの脂質二重層を横断する能動輸送を測定することができる。

【0853】

フソソーム組成物は、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。次いで、十分な数のフソソームを、グルコースを含まず、20%ウシ胎児血清、および1倍のペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM中で、37℃および5%CO₂で2時間インキュベートする。2時間のグルコース飢餓期間の後、グルコースを含まず、20%ウシ胎児血清、1倍のペニシリン/ストレプトマイシン、および20μMの2-NBDG(ThermoFisher)を含むDMEMを含むように交換し、37℃および5%CO₂でさらに2時間インキュベートする。

20

【0854】

等量のDMSOを2-NBDGの代わりに添加することを除いて、陰性対照フソソームも同じように処理される。

【0855】

次いで、フソソームを1×PBSで3回洗浄し、適切な緩衝液に再懸濁し、96ウェル画像プレートに移す。次いで、2-NBDG蛍光を、GFPライトキューブ(469/35励起フィルターおよび525/39発光フィルター)を使用した蛍光光度計で測定して、フソソーム膜を横断して輸送され、1時間の装填期間、フソソームに蓄積された2-NBDGの量を定量化する。

30

【0856】

一実施形態において、2-NBDG蛍光は、陰性(DMSO)対照と比較して、2-NBDG処理を伴うフソソームにおいてより高いであろう。525/39発光フィルターを使用した蛍光測定は、存在する2-NBDG分子の数と相関する。

【0857】

実施例65：フソソームの内腔は、水溶液と混和する

この実施例は、フソソームの内腔と水などの水溶液との混和性を評価する。

40

【0858】

フソソームは、前述の実施例で説明したように調製される。対照は、低張溶液、高浸透圧溶液、または通常の浸透圧溶液のいずれかを備えた透析膜である。

【0859】

フソソーム、陽性対照(通常の浸透圧溶液)および陰性対照(低張溶液)を、低張溶液(150mOsmol)でインキュベートする。各試料を水溶液にさらした後、細胞サイズを、顕微鏡下で測定する。一実施形態において、低張溶液中のフソソームおよび陽性対照のサイズは、陰性対照と比較して増加する。

【0860】

フソソーム、陽性対照(通常の浸透圧溶液)、および陰性対照(高浸透圧溶液)を、高

50

浸透圧溶液（400mOsmol）でインキュベートする。各試料を水溶液にさらした後、細胞サイズを、顕微鏡下で測定する。一実施形態において、高浸透圧溶液中のフソソームおよび陽性対照のサイズは、陰性対照と比較して減少するだろう。

【0861】

フソソーム、陽性対照（低張または高浸透圧溶液）、および陰性対照（通常の浸透圧）を、通常の浸透圧溶液（290mOsmol）でインキュベートする。各試料を水溶液にさらした後、細胞サイズを、顕微鏡下で測定する。一実施形態において、通常の浸透圧溶液中のフソソームおよび陽性対照のサイズは、依然として、陰性対照と比較して実質的に同じであろう。

【0862】

実施例66：サイトゾルにおけるエステラーゼ活性の測定

この実施例は、フソソームにおける代謝活性の代理としてのエステラーゼ活性の定量化について説明する。フソソームにおけるサイトゾルエステラーゼ活性は、カルセインーAM染色の定量的評価によって決定される（Bratosin et al., Cytometry 66 (1) : 78-84, 2005）。

【0863】

膜透過性色素であるカルセインーAM（Molecular Probes, Eugene OR USA）は、ジメチルスルホキシド中の10mMのストック溶液として、pH 7.4のPBS緩衝液中の100mMの作業溶液として調製される。前述の実施例で説明した方法のうちのいずれか1つによって生成されたフソソームまたは陽性対照の親マウス胚線維芽細胞を、PBS緩衝液に懸濁し、37℃でカルセインーAM作業溶液（カルセインーAMの最終濃度：5mM）で暗所で30分間インキュベートし、次いで、カルセインーAM蛍光保持の即時フローサイトメトリー分析のためにPBS緩衝液で希釈する。

【0864】

フソソームおよび対照の親マウス胚性線維芽細胞は、（Jacob et al., Cytometry 12 (6) : 550-558, 1991）に記載されるように、サポニンによるゼロエステラーゼ活性の陰性対照として実験的に透過処理される。フソソームおよび細胞を、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS緩衝液、pH 7.4の1%サポニン溶液で15分間インキュベートする。細胞膜透過処理の可逆性により、サポニンは、さらに染色および洗浄ステップに使用されるすべての緩衝液に含まれる。サポニン透過処理後、フソソームおよび細胞を、0.1%サポニンおよび0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS緩衝液に懸濁し、カルセインーAMで5mMの最終濃度で（暗所で、37℃で45分間）インキュベートし、0.1%サポニンおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む同じPBS緩衝液で3回洗浄し、フローサイトメトリーによって分析する。フローサイトメトリー分析は、488nmのアルゴンレーザー励起で、FACSサイトメーター（Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA）で行い、530+/-30nmで発光を収集する。FACSソフトウェアは、取得および分析のために使用される。光散乱チャネルは、線形利得に設定され、蛍光チャネルは、対数尺度で設定され、最低10,000個の細胞が各条件で分析される。相対エステラーゼ活性は、各試料のカルセインーAMの強度に基づいて計算される。すべての事象は、前方および側方散乱チャネルで獲得される（あるいは、ゲートは、フソソーム集団のみを選択するためにゲートを適用され得る）。フソソームのための蛍光強度（FI）値は、それぞれの陰性対照サポニン処理試料のFI値を減じることによって決定される。フソソーム試料のために正規化されたエステラーゼ活性は、サイトゾルエステラーゼ活性のために定量的測定値を生成するために、それぞれの陽性対照細胞試料に対して正規化される。

【0865】

一実施形態において、フソソーム調製物は、陽性対照細胞と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内、またはそれより大きいエステラーゼ活性を有するであろう。

【0866】

10

20

30

40

50

Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*. 2005 Jul; 66 (1) : 78-84、および Jacob BC, Favre M, Bensa JC. Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* 1991; 12 : 550-558 も参照のこと。

【0867】

実施例 67：フソソームにおけるアセチルコリンエステラーゼ活性の測定

アセチルコリンエステラーゼ活性は、前述の手順 (Ellman, et al., *Biochem. Pharmacol.* 7, 88, 1961) および製造業者の推奨事項に従って、キット (MAK119、SIGMA) を使用して測定される。

【0868】

簡単に説明すると、フソソームを、PBS、pH8中の1.25mMのアセチルチオコリンに懸濁し、PBS、pH7中の0.1mMの5, 5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)と混合する。インキュベーションは、室温で行われるが、光学密度の読み取りを開始する前に、フソソームおよび基質溶液を37℃で10分間予熱する。

【0869】

吸収の変化は、プレートリーダー分光光度計 (ELX808、BIO-TEK instruments、Winooski、VT、USA) で450nmで10分間モニタリングされる。別々に、試料は、正規化のためのビシンコニン酸アッセイを介してフソソームのタンパク質含有量を決定するために使用される。このアッセイを使用して、フソソームは、100未満のAChE活性単位/μgタンパク質であると判断される。

【0870】

一実施形態において、AChE活性単位/μgタンパク質値は、0.001、0.01、0.1、1、10、100、または1000未満である。

【0871】

実施例 68：代謝活性レベルの測定

この実施例は、フソソームにおけるクエン酸シンターゼ活性の測定の定量化について説明する。

【0872】

クエン酸シンターゼは、オキサロ酢酸 (OAA) とアセチルCoAの反応を触媒してクエン酸を生成する、トリカルボン酸 (TCA) サイクル内の酵素である。アセチルCoAの加水分解により、チオール基 (CoA-SH) を有するCoAの放出がある。チオール基は、化学試薬5, 5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と反応して、412nmで分光光度法で測定され得る黄色生成物である、5-チオ-2-ニトロ安息香酸 (TNB) を形成する (Green 2008)。Abcam Human Citrate Synthase Activity アッセイキット (製品番号 ab119692) などの市販のキットには、この測定に必要なすべての試薬が得られる。

【0873】

アッセイは、製造業者の推奨に従って実行される。フソソーム試料溶解物は、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成されたフソソームを収集し、抽出緩衝液 (Abcam) で氷上で20分間可溶化することによって調製される。遠心分離後に上清を収集し、タンパク質含有量をビシンコニン酸アッセイ (BCA、Thermo Fisher Scientific) によって評価し、次の定量プロトコルが開始されるまで調製物を氷上に保持する。

【0874】

簡単に説明すると、フソソーム溶解物試料は、提供されたマイクロプレートウェルの1

10

20

30

40

50

倍のインキュベーション緩衝液 (A b c a m) で希釈され、1 セットのウェルは、1 倍のインキュベーション緩衝液のみを受容する。プレートに密封し、3 0 0 r p m で振盪しながら室温で4 時間インキュベートする。次いで、緩衝液をウェルから吸引し、1 倍の洗浄緩衝液を添加する。この洗浄ステップをもう一度繰り返す。次いで、1 倍の活性溶液を各ウェルに添加し、プレートを、読み取りと読み取りの間で振とうしながら、2 0 秒毎に3 0 分間、4 1 2 n m で吸光度を測定することによってマイクロプレートリーダー上で分析する。

【0 8 7 5】

バックグラウンド値 (1 倍のインキュベーション緩衝液のみを有するウェル) は、すべてのウェルから減じ、クエン酸シンターゼ活性は、装填されたフソソーム溶解物試料 1 μ g 当たりの1 分当たりの吸光度の変化として表される (4 1 2 n m / 分 / μ g タンパク質で Δ m O D)。1 0 0 ~ 4 0 0 秒の反応速度測定の線形部分のみを使用して、活性を計算する。

【0 8 7 6】

一実施形態において、フソソーム調製物は、対照細胞と比較して、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 % 以内、またはそれより大きいシンターゼ活性を有するであろう。

【0 8 7 7】

例えば、Green H J et al. Metabolic, enzymatic, and transporter response in human muscle during three consecutive days of exercise and recovery. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295: R1238-R1250, 2008 を参照のこと。

【0 8 7 8】

実施例 6 9 : 呼吸レベルの測定

この実施例は、フソソームにおける呼吸レベルの測定の定量化について説明する。細胞の呼吸レベルは、代謝を促進する酸素消費量の尺度であり得る。フソソーム呼吸は、タツノオトシゴ細胞外フラックス分析器 (A g i l e n t) によって酸素消費率を測定する (Z h a n g 2 0 1 2)。

【0 8 7 9】

前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか 1 つによって生成されたフソソームまたは細胞を、9 6 ウェルのタツノオトシゴマイクロプレート (A g i l e n t) に播種する。マイクロプレートを短時間遠心分離して、ウェルの底にあるフソソームおよび細胞をペレット化する。酸素消費アッセイは、成長培地を除去し、2 5 m M のグルコースおよび 2 m M のグルタミン (A g i l e n t) を含む低緩衝 D M E M 最小培地と交換し、温度および p H の平衡を保つためにマイクロプレートを 3 7 $^{\circ}$ C で 6 0 分間インキュベートすることによって開始する。

【0 8 8 0】

次いで、付着したフソソームおよび細胞を直接取り巻く培地の細胞外酸素および p H の変化を測定する細胞外フラックス分析器 (A g i l e n t) でマイクロプレートをアッセイする。定常状態の酸素消費量 (基礎呼吸速度) および細胞外酸性化速度を取得した後、A T P シンターゼを阻害するオリゴマイシン (5 μ M)、およびミトコンドリアを脱共役するプロトンイオノフォア F C C P (カルボニルシアニド 4 - (トリフルオロメトキシ) フェニルヒドラゾン; 2 μ M) を、マイクロプレートの各ウェルに添加して、最大酸素消費速度の値を得る。

【0 8 8 1】

最後に、5 μ M のアンチマイシン A (ミトコンドリア複合体 I I I の阻害剤) を添加して、呼吸の変化が主にミトコンドリア呼吸によるものであることを確認する。アンチマイシン A の添加後の最小酸素消費速度をすべての酸素消費量測定値から減じて、非ミトコンドリア呼吸成分を除去する。オリゴマイシン (基礎からの酸素消費速度の少なくとも 2 5

10

20

30

40

50

％の減少)またはFCCP(オリゴマイシン後の酸素消費速度の少なくとも50％の増加)に適切に応答しない細胞試料は、分析から除外される。フソソームの呼吸レベルは、 $\text{pmol O}_2/\text{分}/1\text{e}4$ のフソソームとして測定される。

【0882】

次いで、この呼吸レベルを、それぞれの細胞呼吸レベルに正規化する。一実施形態において、フソソームは、それぞれの細胞試料と比較して、少なくとも1％、2％、3％、4％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％またはそれより大きい呼吸レベルを有するであろう。

【0883】

例えば、Zhang J, Nuebel E, Wisidagama DRR, et al. Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells. Nature protocols. 2012; 7(6):10.1038/nprot.2012.048. doi:10.1038/nprot.2012.048を参照のこと。

【0884】

実施例70：フソソームのホスファチジルセリンレベルの測定

この実施例は、フソソームの表面へのアネキシン-V結合のレベルの定量化について説明する。

【0885】

瀕死の細胞は、プログラムされた細胞死経路のアポトーシスのマーカーである、細胞表面上にホスファチジルセリンを表示することができる。アネキシン-Vは、ホスファチジルセリンに結合するため、アネキシン-Vの結合は、細胞内の生存率の代理である。

【0886】

フソソームは、本明細書に記載されるように生成された。アポトーシスシグナルの検出のために、フソソームまたは陽性対照細胞を、5％アネキシンV蛍光594(A13203、Thermo Fisher、Waltham、MA)で染色した。各群(下の表に詳述される)には、アポトーシス誘導物質であるメナジオンで処理された実験的アームが含まれた。メナジオンを、100 μM のメナジオンで4時間添加した。すべての試料を、フローサイトメーター(Thermo Fisher、Waltham、MA)で実行し、蛍光強度を、波長561nmのYL1レーザーおよび585/16nmの発光フィルターで測定した。細胞外ホスファチジルセリンの存在は、すべての群におけるアネキシンVの蛍光強度を比較することによって定量化された。

【0887】

陰性対照の非染色フソソームは、アネキシンV染色では陽性ではなかった。

【0888】

一実施形態において、フソソームは、メナジオンに応答して細胞表面上のホスファチジルセリンディスプレイを上方調節することができ、非メナジオンで刺激したフソソームがアポトーシスを受けていないことを示している。一実施形態において、メナジオンで刺激した陽性対照細胞は、メナジオンで刺激されていないフソソームよりも高レベルのアネキシンV染色を示した。

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10：アネキシンV染色パラメーター

実験的アーム	アネキシンVシグナルの平均蛍光強度（および標準偏差）
非染色のフソソーム（陰性対照）	941（937）
染色したフソソーム	11257（15826）
染色したフソソーム+メナジオン	18733（17146）
染色マクロファージ+メナジオン（陽性対照）	14301（18142）

10

【0889】

実施例 71：ジュスタクリンシグナル伝達レベルの測定

この実施例は、フソソームにおけるジュスタクリンシグナル伝達の定量化について説明する。

【0890】

細胞は、ジュスタクリンシグナル伝達を介して細胞接触依存性シグナル伝達を形成することができる。一実施形態において、フソソームにおけるジャクタクリンシグナル伝達の存在は、フソソームがそれらのすぐ近くの細胞を刺激し、抑制し、一般に連通することができることを実証するであろう。

20

【0891】

部分的または完全な核不活性化を有する哺乳動物骨髄間質細胞（BMSC）から前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成されたフソソームは、マクロファージのジャクタクリンシグナル伝達を介してIL-6分泌を引き起こす。一次マクロファージおよびBMSCを、共培養する。骨髄由来マクロファージを、まず、6ウェルプレートに播種し、24時間インキュベートし、次いで、初代マウスBMSC由来フソソームまたはBMSC細胞（陽性対照親細胞）を、10%FBSを含むDMEM培地中のマクロファージに置く。上清を、異なる時点（2、4、6、24時間）で収集し、ELISAアッセイによってIL-6分泌について分析する。（Chang J. et al., 2015）。

30

【0892】

一実施形態において、BMSCフソソームによって誘導されるジュスタクリンシグナル伝達のレベルは、培地中のマクロファージ分泌IL-6レベルの増加によって測定される。一実施形態において、ジュスタクリンシグナル伝達のレベルは、陽性対照骨髄間質細胞（BMSC）によって誘導されるレベルよりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%またはそれより大きい。

【0893】

実施例 72：パラクリンシグナルレベルの測定

この実施例は、フソソームにおけるパラクリンシグナル伝達の定量化について説明する。

40

【0894】

細胞は、パラクリンシグナル伝達を介して、局所微小環境内の他の細胞と連通することができる。一実施形態において、フソソームは、例えば、それらの局所環境内の細胞と連通するために、パラクリンシグナル伝達が可能である。一実施形態において、以下のプロトコルでパラクリン由来の分泌を介して内皮細胞でCa²⁺シグナル伝達を引き起こすフソソームの能力は、カルシウム指示薬、fluor-4 AMを介してCa²⁺シグナル伝達を測定する。

【0895】

実験プレートを準備するために、マウス肺微小血管内皮細胞（MPMVEC）を、0.2%ゼラチンでコーティングした25mmのガラス底共焦点皿（80%コンフルエンス）

50

に播種する。MPMVECを、室温で30分間、2%BSAおよび0.003%プルロン酸を含むECM中で5 μ Mのfluor-4 AM (Invitrogen)の最終濃度でインキュベートし、fluor-4 AMを装填することができる。装填後、MPMVECを、スルフィンピラゾンを含む実験的画像溶液(0.25%BSAを含むECM)で洗浄して、色素の損失を最小限に抑える。fluor-4を装填した後、500 μ lの予熱した実験用画像溶液をプレートに添加し、Zeiss共焦点画像システムによって画像化する。

【0896】

別のチューブで、新たに単離したマウスマクロファージは、培養培地中の1 μ g/mlのLPS(DMEM+10%FBS)で処理されたか、またはLPSで処理されない(陰性対照)。刺激後、フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによってマクロファージから生成される。

10

【0897】

次いで、フソソームまたは親マクロファージ(陽性対照)を、2%BSAおよび0.003%プルロン酸を含むECMで、細胞追跡レッドCMTPX (Invitrogen)で標識する。次いで、フソソームおよびマクロファージを洗浄し、実験用画像溶液に再懸濁する。標識されたフソソームおよびマクロファージを、共焦点プレートのfluor-4 AM装填したMPMVECに添加する。

【0898】

緑および赤の蛍光信号は、それぞれ、fluor-4 AMおよび細胞追跡レッドの蛍光に対して488nmおよび561nmで励起するアルゴンイオンレーザー光源を備えたZeiss共焦点画像システムを使用して、10~20分間3秒毎に記録される。Fluor-4蛍光強度の変化は、画像ソフトウェアを使用して分析される(Mallilankaraman, K. et al., J Vis Exp. (58):3511, 2011)。陰性対照フソソームおよび細胞群で測定されたFluor-4強度のレベルは、LPSで刺激したフソソームおよび細胞群から減じる。

20

【0899】

一実施形態において、フソソーム、例えば活性化フソソームは、陽性対照細胞群よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれより大きいFluor-4蛍光強度の増加を誘発する。

30

【0900】

実施例73：可動性のためにアクチンを重合する能力の測定

この実施例は、フソソームにおけるアクチンなどの細胞骨格成分の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、アクチンなどの細胞骨格成分を含み、アクチン重合が可能である。

【0901】

細胞は、運動性および他の細胞質プロセスのために、細胞骨格成分であるアクチンを使用する。細胞骨格は、運動推進力を作り出し、運動のプロセスを調整するために不可欠である。

【0902】

40

C2C12細胞を、本明細書に記載されるように摘出した。12.5%および15%のFicol1層から得られたフソソームは、プールされ、「Light」というラベルが付けられたが、16~17%の層からのフソソームは、プールされ、「Medium」というラベルが付けられた。フソソームまたは細胞(親のC2C12細胞、陽性対照)を、DMEM+Glutamax+10%ウシ胎児血清(FBS)に再懸濁し、24ウェルの超低付着プレート(番号3473、Corning Inc、Corning、NY)に37 $^{\circ}$ C + 5%CO₂で播種した。試料を、定期的に採取し(5.25時間、8.75時間、26.5時間)、165 μ Mのローダミンファロイジンで染色し(陰性対照は染色せず)、FCレーザーYL1(585/16フィルターを用いて561nm)を使用してフローサイトメーター(番号A24858、Thermo Fisher、Waltham

50

、MA)で測定し、F-アクチン細胞骨格含有量を測定した。フソソーム中のローダミンファロイジンの蛍光強度を、非染色のフソソームおよび染色した親C2C12細胞とともに測定した。

【0903】

フソソームの蛍光強度は、すべての時点で陰性対照よりも大きく(図4)、フソソームは、親C2C12細胞と同様の速度でアクチンを重合することができた。

【0904】

下の表に列挙されているようなさらなる細胞骨格成分は、製造業者の取扱説明書に従って、市販のELISAシステム(Cell Signaling TechnologyおよびMyBioSource)を介して測定される。

【表11】

表11：細胞骨格成分

測定された細胞骨格タンパク質	市販キットタイプ	キットID
アクチン	Path Scan Total B-Actin Sandwich ELISAキット	細胞シグナル伝達、7880
Arp2/3	ヒトアクチン関連タンパク質2/3複合サブユニット(APRC2)ELISAキット	MyBioSource、MBS7224740
ホルミン	ホルミン結合タンパク質1(FNBP1)、ELISAキット	MyBioSource、MBS9308864
コロニン	ヒトコロニン1A ELISAキット	MyBioSource、MBS073640
ジストロフィン	ヒトジストロフィンELISAキット	MyBioSource MBS722223
ケラチン	ヒトケラチン5 ELISAキット	MyBioSource、MBS081200
ミオシン	ヒトミオシンIG(MYO1G)ELISAキット	MyBioSource、MBS9312965
チューブリン	ヒトチューブリンベータ3 ELISAキット	MyBioSource、MBS097321

【0905】

次いで、100μLの適切に希釈した溶解物を、マイクロウェルストリップからの適切なウェルに添加する。マイクロウェルを、テープで密封し、37℃で2時間インキュベートする。インキュベーション後、シールテープを取り除き、内容物を廃棄する。各マイクロウェルを、200uLの1倍の洗浄緩衝液で4回洗浄する。それぞれ個々の洗浄の後、プレートを、吸収布に当てて、残留洗浄液を各ウェルから除去する。しかしながら、ウェルは、実験中のどの時点でも完全に乾燥しているわけではない。

【0906】

次いで、100uLの再構成検出抗体(緑色)を各ウェルに添加する(陰性対照ウェルを除く)。次いで、ウェルを密閉し、37℃で1時間インキュベートする。インキュベーションが完了した後、洗浄手順を繰り返す。100uLの再構成されたHRP結合二次抗

体（赤）を、各ウェルに添加する。ウェルをテープで密封し、37℃で30分間インキュベートする。次いで、シールテープを取り除き、洗浄手順を繰り返す。次いで、100 μ LのTMB基質を各ウェルに添加する。ウェルをテープで密封し、37℃で10分間インキュベートする。この最終インキュベーションが完了したら、100 μ Lの停止溶液を各ウェルに添加し、プレートを数秒間穏やかに振とうする。

【0907】

アッセイの分光光度分析は、停止溶液を添加してから30分以内に行われる。ウェルの下側を柔らかいティッシュで拭き、次いで、450 nmで吸光度を読み取る。一実施形態において、検出抗体で染色したフソソーム試料は、陰性対照のフソソーム試料よりも450 nmでより多くの光を吸収し、検出抗体で染色された細胞試料よりも少ない光を吸収する。

【0908】

実施例74：平均膜電位の測定

この実施例は、フソソームのミトコンドリア膜電位の定量化について説明する。一実施形態において、ミトコンドリア膜を含むフソソームは、ミトコンドリア膜電位を維持するであろう。

【0909】

ミトコンドリアの代謝活性は、ミトコンドリアの膜電位によって測定することができる。ミトコンドリア膜電位を評価するために、フソソーム調製物の膜電位を、市販の色素TMRE（TMRE：テトラメチルローダミン、エチルエステル、過塩素酸塩、Abcam、カタログ番号T669）を使用して定量化する。

【0910】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームまたは親細胞を、成長培地（10%ウシ胎児血清を含むフェノールレッドを含まないDMEM）で6アリコート（未処理およびFCCP処理の3重）に希釈する。試料の1つのアリコートを、ミトコンドリア膜電位を除去し、TMRE染色を防ぐ脱共役剤であるFCCPでインキュベートする。FCCP処理試料の場合、2 μ MのFCCPを試料に添加し、分析前に5分間インキュベートする。次いで、フソソームおよび親細胞を、30 nMのTMREで染色する。各試料に対して、非染色（TMREなし）試料も並行して調製する。試料を、37℃で30分間インキュベートする。次いで、試料を、488 nmのアルゴンレーザーを備えたフローサイトメーターで分析し、530+/-30 nmで励起および発光を収集する。

【0911】

膜電位値（ミリボルト、mV）は、TMREの強度に基づいて計算される。すべての事象は、前方および側方散乱チャネルで獲得される（あるいは、ゲートは、小さな破片を排除するためにゲートを適用され得る）。未処理試料およびFCCP処理試料の両方の蛍光強度（FI）値は、未処理試料およびFCCP処理試料の幾何平均から非染色試料の蛍光強度の幾何平均を減じることによって正規化される。各調製物の膜電位状態は、（TMREがNernstian様式でミトコンドリアに蓄積するとき）TMRE蛍光に基づいてフソソームまたは細胞のミトコンドリア膜電位を決定するために使用することができる修正されたネルンスト方程式（下記参照）で正規化された蛍光強度値を使用して計算される。

【0912】

フソソームまたは細胞膜電位は、次の式で計算される： $(mV) = -61.5 * \log(FI_{\text{処理}} - \text{正規化} / FI_{\text{FCCP}} - \text{正規化})$ 。一実施形態において、C2C12マウス筋芽細胞からのフソソーム調製物にこのアッセイを使用して、フソソーム調製物の膜電位状態は、親細胞よりも約1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内、またはそれより大きい。一実施形態において、膜電位の範囲は、約-20~-150 mVである。

【0913】

実施例75：対象における持続性半減期の測定

この実施例は、フソソーム半減期の測定について説明する。

【0914】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成されたガウシアルシフェラーゼを発現する細胞に由来し、緩衝液での純粋な1:2、1:5、および1:10希釈が行われる。フソソームを欠いている緩衝液は、陰性対照として使用される。

【0915】

各用量は、3匹の8週齢の雄のC57BL/6Jマウス（Jackson Laboratories）に静脈内投与される。フソソームの静脈内投与から1、2、3、4、5、6、12、24、48、および72時間後に、血液を、眼窩後静脈から採血する。動物は、実験終了時にCO₂吸入により殺処分される。

【0916】

血液を、室温で20分間遠心分離する。血清試料は、生体分析まで-80℃で直ちに凍結される。次いで、各血液試料を使用して、試料をガウシアルシフェラーゼ基質（Nanolight、Pinetop、AZ）と混合した後、ガウシアルシフェラーゼ活性アッセイを実行する。簡単に説明すると、ルシフェリンまたは発光分子であるコレンテラジンをフラッシュアッセイ緩衝液と混合し、混合物を96ウェルプレートの血液試料を含むウェルにピペティングする。血液を欠いている陰性対照ウェルには、バックグラウンドのガウシアルシフェラーゼシグナルを決定するためのアッセイ緩衝液が含まれる。

【0917】

さらに、発光シグナルを1時間当たりのガウシアルシフェラーゼ分泌分子に変換するために、陽性対照の精製ガウシアルシフェラーゼ（Athena Enzyme Systems、カタログ番号0308）の標準曲線を調製する。プレートは、500msecの積分を使用して、発光についてアッセイされる。バックグラウンドのガウシアルシフェラーゼシグナルを、すべての試料から減じた後、線形最適曲線を、ガウシアルシフェラーゼ標準曲線に対して計算する。試料の測定値が標準曲線内に適合しない場合、それらを、適切に希釈して、再アッセイする。1、2、3、4、5、6、12、24、48、および72時間で採取した試料からのルシフェラーゼシグナルを、標準曲線に補間する。消失速度定数 k_e (h^{-1}) は、1コンパートメントモデルの方程式： $C(t) = C_0 \times e^{-k_e \times t}$ （式中、 $C(t)$ (ng/mL) は、時間 t (h) でのフソソームの濃度であり、 C_0 は時間=0 (ng/mL) でのフソソームの濃度である）を使用して計算される。消失半減期 $t_{1/2}$, e (h) は、 $\ln(2) / k_e$ として計算される。

【0918】

一実施形態において、フソソームは、陰性対照細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれより大きい半減期を有するであろう。

【0919】

実施例76：循環中のフソソームの保持の測定

この実施例は、循環へのフソソームの送達および臓器での保持の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、循環中に送達され、臓器部位では捕捉されず、保持されない。

【0920】

一実施形態において、末梢循環に送達されたフソソームは、高効率で標的部位に到達するために、細網内皮系（RES）による捕捉および保持を回避する。RESは、脾臓、リンパ節、および肝臓などの固形臓器に存在する、細胞系、主にマクロファージを含む。これらの細胞は、通常、赤血球などの「古い」細胞の除去を課せられる。

【0921】

フソソームは、CREリコンビナーゼを発現する細胞（薬剤）、またはCREを発現しない細胞（陰性対照）に由来する。これらのフソソームは、実施例62のようにインビボ注射用に調製される。

【0922】

レシピエントマウスは、ルシフェラーゼの発現を除去するために、フソソームによって送達されたmRNAから作製されたCREタンパク質によって修飾されたloxP-ルシフェラーゼゲノムDNA遺伝子座を保有する（JAX番号005125）。ルシフェラーゼは、生きている動物における生物発光イメージングによって検出することができる。この実施例の陽性対照は、その独自のゲノムからマクロファージおよび単球細胞でのみ同じタンパク質を発現するマウス系統と交配したレシピエントマウスの子孫である（Cx3cr1-CRE JAX番号025524）。この交配からの子孫は、各対立遺伝子のうちの1つ（loxP-ルシフェラーゼ、Cx3cr1-CRE）を保有する。

【0923】

フソソームは、CREタンパク質によって作用される場合、ルシフェラーゼの発現を引き起こす遺伝子座を保有するマウスに、尾静脈注射（IV、実施例48）を介して末梢循環に注射される。RESの非特異的な捕捉メカニズムは、本来は貪食性であり、フソソームからのある割合のCREタンパク質を、ゲノム組換えをもたらすマクロファージに放出する。IVIS測定（実施例62で説明された）は、非フソソーム対照が蓄積および融合する場所を特定する。脾臓、リンパ節、および肝臓への蓄積は、フソソームの非特異的RES媒介捕捉の指標を示す。IVISは、フソソーム注射から24、48、96時間後に実行される。

【0924】

マウスを殺処分し、腸内の脾臓、肝臓、および主要なリンパ鎖を採取する。

【0925】

ゲノムDNAは、これらの臓器から単離され、組換えゲノムDNAの残りに対して定量的なポリメラーゼ連鎖反応を受ける。別のゲノム遺伝子座（CREの標的ではない）も定量化され、試料中の細胞の数の測定値を提供する。

【0926】

実施形態において、動物全体、具体的には肝臓および脾臓部位で、薬剤および陰性対照の両方について低い生物発光シグナルが観察されるであろう。実施形態において、陽性対照は、肝臓におけるシグナルの増加（陰性対照および薬剤を上回る）および脾臓における高シグナル、ならびにリンパ節と一致する分布を示す。

【0927】

一実施形態において、これらの組織のゲノムPCR定量化は、検査されたすべての組織における陽性対照の代替遺伝子座を上回る組換えシグナルの割合が高いことを示し、一方、薬剤および陰性対照の場合、組換えのレベルは、すべての組織で無視できる。

【0928】

一実施形態において、この実施例の結果は、非フソゲン対照がRESによって保持されず、広範な分布を達成し、高い生物学的利用能を示すことができることを示すであろう。

【0929】

実施例77：免疫抑制によるフソソームの寿命

この実施例は、免疫抑制薬と同時投与される場合のフソソーム組成物の免疫原性の定量化について説明する。

【0930】

免疫応答を刺激する治療法は、治療効果を低下させ得る、またはレシピエントに毒性を引き起こし得る。一実施形態において、フソソームは、実質的に非免疫原性である。

【0931】

前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成された精製フソソーム組成物は、免疫抑制薬と同時投与され、免疫原性は、インビボでのフソソームの寿命によってアッセイされる。ルシフェラーゼで標識された十分な数のフソソームを、タクロリムス（TAC、4mg/kg/日；Sigma Aldrich）、またはビヒクル（陰性対照）で、またはいかなる薬剤も含まない（陽性対照）正常マウスの腓腹筋に局所注射する。次いで、マウスは、注射から1、2、3、4、5、6、12、24、48、および

10

20

30

40

50

72時間後、インビボイメージングに供される。

【0932】

簡単に説明すると、マウスをイソフルランで麻酔し、D-ルシフェリンを体重1キログラム当たり375mgの用量で腹腔内投与する。イメージング時に、動物を遮光チャンバーに入れ、動物に移植したルシフェラーゼ発現フソソームから放出された光子を、生物発光の強度に応じて5秒から5分の積分時間で収集する。上記の様々な時点で、同じマウスを、繰り返しスキャンする。BLIシグナルは、1秒当たりの光子数（全光束）の単位で定量化され、 $\log$ [1秒当たりの光子数] として表示される。データは、TACを使用した場合と使用しない場合の強度およびフソソーム注射を比較することによって分析される。

10

【0933】

実施形態において、アッセイは、最終時点でのフソソームのみおよびビヒクル群と比較して、TAC同時投与群におけるフソソームの寿命の増加を示すであろう。いくつかの実施形態において、フソソームの寿命の増加に加えて、各時点でのフソソームとビヒクルまたはフソソームのみに対するフソソームとTACアームからのBLIシグナルの増加が観察される。

【0934】

実施例78：フソソームに対して反応する既存のIgGおよびIgM抗体の測定

この実施例は、フローサイトメトリーを使用して測定された既存の抗フソソーム抗体価の定量化について説明する。

20

【0935】

フソソームにおける免疫原性の基準は、抗体応答である。フソソームを認識する抗体は、フソソームの活性または寿命を制限することができる方法で結合することができる。一実施形態において、本明細書に記載のフソソームの一部のレシピエントは、フソソームに結合し、それを認識する既存の抗体を有するであろう。

【0936】

この実施例において、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって、調前述の実施例に記載された方法のいずれかにより異種供給源細胞を使用して生成されたフソソームを使用して、抗フソソーム抗体価を試験する。この実施例において、フソソームナイーブマウスを、抗フソソーム抗体の存在について評価する。特に、本明細書に記載の方法は、プロトコルに対する最適化を備えたヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。

30

【0937】

陰性対照は、IgMおよびIgGが枯渇したマウス血清であり、陽性対照は、異種供給源細胞から生成されたフソソームの複数回注射を受けたマウスに由来する血清である。

【0938】

フソソームに結合する既存の抗体の存在を評価するために、フソソームナイーブマウスからの血清は、まず、56℃で30分間加熱することによって補完されず、続いて、3% FCSおよび0.1% NaN₃を含むPBSで33%に希釈される。等量の血清およびフソソーム（1mL当たり $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ 個のフソソーム）懸濁液を、4℃で30分間インキュベートし、仔ウシ血清クッションを通してPBSで洗浄する。

40

【0939】

IgM異種反応性抗体は、4℃で45分間、マウスIgM（BD Biosciences）のFc部分に特異的なPE結合ヤギ抗体で細胞をインキュベートすることによって染色される。特に、抗マウスIgG1またはIgG2二次抗体も使用してもよい。すべての群からの細胞を、2% FCSを含むPBSで2回洗浄し、FACSシステム（BD Biosciences）で分析する。蛍光データは、対数増幅を使用して収集され、平均蛍光強度として表される。

【0940】

一実施形態において、陰性対照血清は、無血清または二次単独対照に匹敵する無視でき

50

る蛍光を示す。一実施形態において、陽性対照は、陰性対照よりも多くの蛍光を示し、無血清または二次単独対照よりも多くを示す。一実施形態において、免疫原性が生じる場合、フソソームナイーブマウスからの血清は、陰性対照よりも多くの蛍光を示す。一実施形態において、免疫原性が生じない場合、フソソームナイーブマウスからの血清は、陰性対照と比較して同様の蛍光を示す。

【0941】

実施例79：フソソームの複数回投与後のIgGおよびIgM抗体応答の測定

この実施例は、修飾フソソームの複数回投与後の修飾フソソームの体液性応答の定量化について説明する。一実施形態において、例えば、本明細書に記載の方法によって修飾された修飾フソソームは、修飾フソソームの複数（例えば、1つを超える、例えば2つ以上）の投与後に体液性応答が低下する（例えば、非修飾フソソームの投与と比較して低下する）。

10

【0942】

フソソームにおける免疫原性の基準は、抗体応答である。一実施形態において、フソソームの反復注射は、抗フソソーム抗体、例えば、フソソームを認識する抗体の開発をもたらし得る。一実施形態において、フソソームを認識する抗体は、フソソームの活性または寿命を制限することができる方法で結合することができる。

【0943】

この実施例において、フソソームの1回以上の投与後に抗フソソーム抗体力価を試験した。フソソームは、前述の実施例のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームは、非修飾間葉性幹細胞（以下、MSC）、HLA-Gのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSC-HLA-G）、および空ベクターのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSCの空ベクター）から生成される。血清は、異なるコホート：ピヒクル（フソソームナイーブ群）、MSCフソソーム、MSC-HLA-Gフソソーム、またはMSCの空ベクターフソソームで、1、2、3、5、10回の注射で全身のおよび／または局所的に注射されたマウスから引き出される。

20

【0944】

抗フソソーム抗体の存在および存在量を評価するために、マウスからの血清は、まず、56℃で30分間加熱することによって補完されず、続いて、3%FCSおよび0.1%NaN₃を含むPBSで33%に希釈される。等量の血清およびフソソーム（1mL当たり $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ 個のフソソーム）を、4℃で30分間インキュベートし、仔ウシ血清クッションを通してPBSで洗浄する。

30

【0945】

フソソーム反応性IgM抗体は、4℃で45分間、マウスIgM（BD Bioscience）のFc部分に特異的なPE結合ヤギ抗体で細胞をインキュベートすることによって染色される。特に、抗マウスIgG1またはIgG2二次抗体も使用してもよい。すべての群からの細胞を、2%FCSを含むPBSで2回洗浄し、FACSシステム（BD Biosciences）で分析する。蛍光データは、対数増幅を使用して収集され、平均蛍光強度として表される。

【0946】

40

一実施形態において、MSC-HLA-Gフソソームは、MSCフソソームまたはMSC-空ベクターフソソームと比較して、注射後、（FACSでの蛍光強度によって測定されたように）抗フソソームIgM（またはIgG1／2）抗体力価が低下する。

【0947】

実施例80：免疫原性を低下させる寛容原性タンパク質を発現するためのフソソーム供給源細胞の修飾

この実施例は、修飾細胞源に由来するフソソームにおける免疫原性の定量化について説明する。一実施形態において、修飾細胞源に由来するフソソームは、非修飾細胞源に由来するフソソームと比較して免疫原性が低下する。

【0948】

50

免疫応答を刺激する治療法は、治療効果を低下させ得る、またはレシピエントに毒性を引き起こし得る。一実施形態において、実質的に非免疫原性のフソソームは、対象に投与される。一実施形態において、細胞供給源の免疫原性は、フソソーム免疫原性の代用物としてアッセイすることができる。

【0949】

H L A - G のレンチウイルス媒介性発現を使用して修飾されるか、または空ベクターを発現する i P S 細胞（陰性対照）を、免疫原性について以下のようにアッセイする。潜在的なフソソーム細胞供給源として十分な数の i P S 細胞を、C 5 7 / B 6 マウスの後ろ腹部に皮下注射し、奇形腫を形成させるのに適切な時間を与える。

【0950】

奇形腫が形成されると、組織が採取される。蛍光染色のために準備された組織は、O C T で凍結され、免疫組織化学および H & E 染色のために準備された組織は、10%緩衝ホルマリンで固定され、パラフィンに包埋される。組織切片を、一般的な免疫組織化学プロトコルに従って、抗体、ポリクローナルウサギ抗ヒト C D 3 抗体（D A K O）、マウス抗ヒト C D 4 m A b（R P A - T 4、B D P h a r M i n g e n）、マウス抗ヒト C D 8 m A b（R P A - T 8、B D P h a r M i n g e n）で染色する。これらは、適切な検出試薬、すなわち、抗マウス二次 H R P（T h e r m o f i s h e r）または抗ウサギ二次 H R P（T h e r m o f i s h e r）を使用することによって検出される。

【0951】

検出は、ペルオキシダーゼベースの可視化システム（A g i l e n t）を使用して達成される。データは、光学顕微鏡を使用して20倍の視野で試験された25、50、または100の組織切片に存在する浸潤 C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 3 + N K 細胞の平均数をとることによって分析される。一実施形態において、修飾されていない i P S C または空ベクターを発現する i P S C は、H L A - G を発現する i P S C と比較して試験された視野に存在する浸潤 C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 3 + N K 細胞の数が多

い。

【0952】

一実施形態において、フソソームの免疫原性特性は、供給源細胞の免疫原性特性と実質的に同等であろう。一実施形態において、H L A - G で修飾された i P S 細胞に由来するフソソームは、それらの修飾されていない対応物と比較して免疫細胞浸潤が低減されている。

【0953】

実施例 81：免疫原性を低下させる免疫原性タンパク質をノックダウンするためのフソソーム供給源細胞の修飾

この実施例は、免疫原性である分子の発現を低減するように修飾されている、細胞供給源に由来するフソソーム組成物の生成の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、免疫原性である分子の発現を低減するように修飾された細胞供給源に由来し得る。

【0954】

免疫応答を刺激する治療法は、治療効果を低下させ得る、またはレシピエントに毒性を引き起こし得る。したがって、免疫原性は、安全かつ効果的な治療フソソームにとって重要な特性である。ある特定の免疫活性化剤の発現は、免疫応答を引き起こし得る。M H C クラス I は、免疫活性化剤の一例を表す。

【0955】

この実施例において、フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームは、非修飾間葉性幹細胞（以下、M S C、陽性対照）、M H C クラス I を標的とする s h R N A のレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、M S C - s h M H C クラス I）、および非標的化スクランブル s h R N A のレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、M S C - スクランブル、陰性対照）から生成される。

【0956】

フソソームは、フローサイトメトリーを使用してMHCクラスIの発現についてアッセイされる。適切な数のフソソームを洗浄し、PBSに再懸濁し、MHCクラスIに対する蛍光結合モノクローナル抗体（Harlan Sera-Lab、Belton, UK）の1:10~1:4000希釈液で30分間氷上に保持する。フソソームをPBSで3回洗浄し、PBSに再懸濁する。非特異的蛍光は、同等の希釈度で適切に蛍光結合したアイソタイプ対照抗体とインキュベートした等アリコートのフソソーム調製物を使用して決定される。フソソームを、フローサイトメーター（FACS Sort、Becton-Dickinson）でアッセイし、データを、フロー分析ソフトウェア（Becton-Dickinson）で分析する。

10

【0957】

MSC、MSC-shMHCクラスI、MSCスクランブルに由来するフソソームの平均蛍光データが、比較される。一実施形態において、MSC-shMHCクラスIに由来するフソソームは、MSCおよびMSCスクランブルと比較して、MHCクラスIのより低い発現を有するであろう。

【0958】

実施例82：マクロファージによる食作用を回避するためのフソソーム供給源細胞の修飾
この実施例は、修飾されたフソソームによる食作用の回避の定量化について説明する。一実施形態において、修飾されたフソソームは、マクロファージによる食作用を回避するであろう。

20

【0959】

細胞は、食作用に関与し、粒子を貪食し、細菌および死細胞などの外来侵入者の隔離および破壊を可能にする。いくつかの実施形態において、マクロファージによるフソソームの食作用は、それらの活性を低下させ得る。

【0960】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームは、CD47を欠いているCSFE標識哺乳動物細胞（以下、NMC、陽性対照）、CD47 cDNAのレンチウイルス媒介性発現を使用してCD47を発現するように操作されたCSFE標識細胞（以下、NMC-CD47）、および空ベクター対照のレンチウイルス媒介性発現を使用して操作されたCSFE標識細胞（以下、NMC空ベクター、陰性対照）から生成される。

30

【0961】

マクロファージ媒介の免疫クリアランスの減少は、以下のプロトコルに従って食作用アッセイで決定される。マクロファージを、共焦点ガラス底皿に収穫直後に播種する。マクロファージを、DMEM+10%FBS+1%P/Sで1時間インキュベートして付着させる。NMC、NMC-CD47、NMC-空ベクターに由来する適切な数のフソソームを、プロトコルに示されているようにマクロファージに追加し、tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdfで2時間インキュベートする。

【0962】

2時間後、皿を静かに洗浄し、細胞内蛍光を試験する。取り込まれた粒子から放出された細胞内蛍光は、488励起での共焦点顕微鏡によって画像化される。食作用陽性のマクロファージの数は、イメージングソフトウェアを使用して定量化される。データは、食細胞指数=（取り込まれた細胞の総数/計数されたマクロファージの総数）×（取り込まれた細胞を含むマクロファージの数/計数されたマクロファージの総数）×100として表される。

40

【0963】

一実施形態において、マクロファージがNMC-CD47に由来するフソソームとインキュベートされる場合、NMCまたはNMC-空ベクターに由来するものと比べて、食細胞指数が低下する。

50

【0964】

実施例83：PBM C細胞溶解により媒介される細胞毒性の減少のためのフソソーム供給源細胞の修飾

この実施例は、PBM Cによる細胞溶解により細胞毒性が低下するように修飾された細胞に由来するフソソームの生成について説明する。

【0965】

一実施形態において、溶解はフソソームの活性を低下させる、例えば阻害または停止するので、PBM Cによる供給源細胞またはフソソームの細胞毒性媒介性細胞溶解は、フソソームの免疫原性の基準である。

【0966】

この実施例において、フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームは、非修飾間葉性幹細胞（以下、MSC、陽性対照）、HLA-Gのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSC-HLA-G）、および空ベクターのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSCの空ベクター、陰性対照）から生成される。

【0967】

フソソームのPBM C媒介溶解は、Bouma, et al. Hum. Immunol. 35 (2) : 85-92; 1992およびvan Besouw et al. Transplantation 70 (1) : 136-143; 2000において記載されるようにユーロピウム放出アッセイによって決定される。PBM C（以下、エフェクター細胞）を、適切なドナーから単離し、同種ガンマ線を照射したPBM Cおよび200 IU/mL IL-2（プロロイキン、Chiron BV Amsterdam, The Netherlands）で、丸底96ウェルプレート中で37℃で7日間刺激する。フソソームは、ユーロピウム-ジエチレントリアミンペンタアセテート（DTPA）（sigma, St. Louis, MO, USA）で標識される。

【0968】

7日目に、細胞毒性媒介溶解アッセイは、1000:1~1:1および1:1.25~1:1000の範囲内のエフェクター／標的の比で播種後から1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48時間、96ウェルプレート中で、エフェクター細胞で⁶³Eu標識フソソームをインキュベートすることによって行われる。インキュベーション後、プレートを、遠心分離し、上清の試料を、低バックグラウンドの96ウェルプレートに移す（フルオロ免疫プレート、Nunc, Roskilde, Denmark）。

【0969】

続いて、強化溶液（PerkinElmer, Groningen, The Netherlands）を、各ウェルに添加する。放出されたユーロピウムは、時間分解蛍光計（Victor 1420マルチラベルカウンタ、LKB-Wallac, Finland）で測定される。蛍光は、1秒当たりの計数（CPS）で表される。標的フソソームによるユーロピウムの最大パーセント放出は、適切な数（ $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ ）のフソソームを1%トリトン（sigma-aldrich）と適切な時間インキュベートすることによって決定される。標的フソソームによるユーロピウムの自然放出は、エフェクター細胞なしで標識された標的フソソームのインキュベーションによって測定される。次いで、漏出率は、（自然放出／最大放出） $\times 100\%$ 、のように計算される。最後に、細胞傷害性媒介溶解の割合は、 $\text{溶解}(\%) = [(\text{測定された溶解} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})] \times 100\%$ 、のように計算される。データは、異なるエフェクター標的の比率の関数として溶解の割合を調べることによって分析される。

【0970】

一実施形態において、MSC-HLA-G細胞から生成されたフソソームは、MSCまたはMSCスクランブル生成フソソームと比較して、特定の時点で標的細胞による溶解の割合が減少するであろう。

【0971】

実施例 84：NK 溶解活性の低下のためのフソソーム供給源細胞の修飾

この実施例は、NK 細胞による細胞毒性媒介性細胞溶解を低減するように修飾されている、細胞供給源に由来するフソソーム組成物の生成について説明する。一実施形態において、NK 細胞による供給源細胞またはフソソームの細胞毒性媒介性細胞溶解は、フソソームの免疫原性の基準である。

【0972】

この実施例において、フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか 1 つによって生成される。フソソームは、非修飾間葉性幹細胞（以下、MSC、陽性対照）、HLA-G のレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSC-HLA-G）、および空ベクターのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSC の空ベクター、陰性対照）から生成される。

【0973】

フソソームの NK 細胞媒介性溶解は、Bouma, et al. Hum. Immunol. 35 (2) : 85-92 ; 1992 および van Besouw et al. Transplantation 70 (1) : 136-143 ; 2000 において記載されるようにユーロピウム放出アッセイによって決定される。NK 細胞（以下、エフェクター細胞）は、Crop et al. Cell transplantation (20) : 1547-1559 ; 2011 における方法に従って適切なドナーから単離され、同種ガンマ線を照射した PMBC および 200 IU/mL IL-2（プロロイキン、Chiron BV Amsterdam, The Netherlands）で、丸底 96 ウェルプレート中、37℃で 7 日間刺激する。フソソームは、ユーロピウム-ジエチレントリアミンペンタアセテート（DTPA）（sigma, St. Louis, MO, USA）で標識される。

【0974】

7 日目に、細胞毒性媒介溶解アッセイは、1000 : 1 ~ 1 : 1 および 1 : 1.25 ~ 1 : 1000 の範囲内のエフェクター／標的の比で播種後から 1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48 時間、96 ウェルプレート中で、エフェクター細胞で ^{63}Eu 標識フソソームをインキュベートすることによって行われる。インキュベーション後、プレートを、遠心分離し、上清の試料を、低バックグラウンドの 96 ウェルプレートに移す（フルオロ免疫プレート、Nunc、Roskilde、Denmark）。

【0975】

続いて、強化溶液（PerkinElmer、Groningen、The Netherlands）を、各ウェルに添加する。放出されたユーロピウムは、時間分解蛍光計（Victor 1420 マルチラベルカウンタ、LKB-Wallac、Finland）で測定される。蛍光は、1 秒当たりの計数（CPS）で表される。標的フソソームによるユーロピウムの最大パーセント放出は、適切な数（ $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ ）のフソソームを 1% トリトン（Sigma-Aldrich）と適切な時間インキュベートすることによって決定される。標的フソソームによるユーロピウムの自然放出は、エフェクター細胞なしで標識された標的フソソームのインキュベーションによって測定される。次いで、漏出率は、（自然放出／最大放出） $\times 100\%$ 、のように計算される。最後に、細胞傷害性媒介溶解の割合は、 $\text{溶解}(\%) = [(\text{測定された溶解} - \text{自然溶解} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})] \times 100\%$ 、のように計算される。データは、異なるエフェクター標的の比率の関数として溶解の割合を調べることによって分析される。

【0976】

一実施形態において、MSC-HLA-G 細胞から生成されたフソソームは、MSC または MSC スクランブル生成フソソームと比較して、適切な時点で溶解の割合が減少するであろう。

【0977】

実施例 85：CD8 キラー T 細胞溶解の減少のためのフソソーム供給源細胞の修飾

この実施例は、CD8+ T 細胞による細胞毒性媒介性細胞溶解を低減するように修飾さ

10

20

30

40

50

れている、細胞供給源に由来するフソソーム組成物の生成について説明する。一実施形態において、CD8+T細胞による供給源細胞またはフソソームの細胞毒性媒介性細胞溶解は、フソソームの免疫原性の基準である。

【0978】

この実施例において、フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームは、非修飾間葉性幹細胞（以下、MSC、陽性対照）、HLA-Gのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSC-HLA-G）、および空ベクターのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSCの空ベクター、陰性対照）から生成される。

【0979】

フソソームのCD8+T細胞媒介性溶解は、Bouma, et al. Hum. Immunol. 35 (2) : 85-92 ; 1992およびvan Besouw et al. Transplantation 70 (1) : 136-143 ; 2000において記載されるようにユーロピウム放出アッセイによって決定される。CD8+T細胞（以下、エフェクター細胞）は、Crop et al. Cell transplantation (20) : 1547-1559 ; 2011における方法に従って適切なドナーから単離され、同種ガンマ線を照射したPMBCおよび200IU/mL IL-2（プロロイキン、Chiron BV Amsterdam, The Netherlands）で、丸底96ウェルプレート中、37℃で7日間刺激する。フソソームは、ユーロピウムジエチレントリアミンペンタアセテート（DTPA）（sigma、St. Louis、MO、USA）で標識される。

【0980】

7日目に、細胞毒性媒介溶解アッセイは、1000:1~1:1および1:1.25~1:1000の範囲内のエフェクター／標的の比で播種後から1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48時間、96ウェルプレート中で、エフェクター細胞で⁶³Eu標識フソソームをインキュベートすることによって行われる。インキュベーション後、プレートを、遠心分離し、20ulの上清を、低バックグラウンドの96ウェルプレートに移す（フルオロ免疫プレート、Nunc、Roskilde、Denmark）。

【0981】

続いて、強化溶液（PerkinElmer、Groningen、The Netherlands）を、各ウェルに添加する。放出されたユーロピウムは、時間分解蛍光計（Victor 1420マルチラベルカウンター、LKB-Wallac、Finland）で測定される。蛍光は、1秒当たりの計数（CPS）で表される。標的フソソームによるユーロピウムの最大パーセント放出は、適切な数（ $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ ）のフソソームを1%トリトン（sigma-aldrich）と適切な時間インキュベートすることによって決定される。標的フソソームによるユーロピウムの自然放出は、エフェクター細胞なしで標識された標的フソソームのインキュベーションによって測定される。次いで、漏出率は、（自然放出／最大放出）×100%、のように計算される。最後に、細胞傷害性媒介溶解の割合は、 $\text{溶解}(\%) = [(\text{測定された溶解} - \text{自然溶解} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})] \times 100\%$ 、のように計算される。データは、異なるエフェクター標的の比率の関数として溶解の割合を調べることによって分析される。

【0982】

一実施形態において、MSC-HLA-G細胞から生成されたフソソームは、MSCまたはMSCスクランブル生成フソソームと比較して、適切な時点で溶解の割合が減少するであろう。

【0983】

実施例86：T細胞活性化の低下のためのフソソーム供給源細胞の修飾

この実施例は、混合リンパ球反応（MLR）によって評価されるT細胞の活性化および増殖が低下した修飾フソソームの生成について説明する。

【0984】

T細胞の増殖および活性化は、フソソームの免疫原性の評価基準である。フソソーム組成物によるMLR反応におけるT細胞の増殖の刺激は、インビボでのT細胞の増殖の刺激を示唆し得る。

【0985】

一実施形態において、修飾された供給源細胞から生成されたフソソームは、混合リンパ球反応（MLR）によって評価されるように、T細胞の活性化および増殖が低下する。一実施形態において、修飾された供給源細胞から生成されたフソソームは、インビボで免疫応答を生成せず、したがって、フソソーム組成物の有効性を維持する。

【0986】

この実施例において、フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームは、非修飾間葉性幹細胞（以下、MSC、陽性対照）、IL-10のレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSC-IL-10）、および空ベクターのレンチウイルス媒介性発現で修飾された間葉性幹細胞（以下、MSCの空ベクター、陰性対照）から生成される。

【0987】

BALB/cおよびC57BL/6脾細胞は、刺激細胞または応答細胞として使用される。特に、これらの細胞の供給源は、一般的に使用されているヒト由来の刺激/応答細胞と交換することができる。さらに、任意の哺乳動物精製同種CD4+T細胞集団、CD8+T細胞集団、またはCD4-/CD8-は、応答集団として使用してもよい。

【0988】

マウス脾細胞は、完全に凍結したスライドを使用した機械的解離、続いて、溶解緩衝液（Sigma-Aldrich、St-Louis、MO）による赤血球溶解によって単離される。実験前に、刺激細胞に、20 Gyのγ線を照射して、応答細胞に対する応答を防ぐ。次いで、完全なDMEM-10培地中で丸底96ウェルプレートに同数の刺激細胞および応答細胞（または、1:1の比を維持しながら代替の濃度）を添加することによって共培養を行う。適切な数のフソソーム（ $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ の範囲からいくつかの濃度で）を、異なる時間間隔、 $t = 0, 6, 12, 24, 36, 48$ 時間で、共培養に添加する。

【0989】

増殖は、取り込みを可能にする $1 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ -チミジン（Amersham, Buckinghamshire, UK）を添加することによって評価される。 $[^3\text{H}]$ -チミジンを、 $t = 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72$ 時間、MLRに添加し、長期培養から2、6、12、18、24、36、および48時間後、96ウェル細胞採取器（Inotek, Bertold, Japan）を使用してガラス繊維フィルター上に細胞を採取する。T細胞増殖実験はすべて、3重に行われる。 $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込みは、マイクロベータ発光カウンター（Perkin Elmer, Wellesley, MA）を使用して測定する。これらの結果は、1分当たりの計数（cpm）として表すことができる。

【0990】

一実施形態において、MSC-IL10フソソームは、MSC-空ベクターまたはMSC非修飾フソソーム対照と比較して、T細胞の増殖の減少を示すであろう。

【0991】

実施例87：対象における標的電位の測定

この実施例は、特定の身体部位を標的とするフソソームの能力を評価する。一実施形態において、フソソームは、特定の身体部位を標的とすることができる。標的化は、1つ以上の関連する治療部位に対して治療剤の活性を制限する方法である。

【0992】

8週齢のC57BL/6Jマウス（Jackson Laboratories）に、ホタルルシフェラーゼを発現するフソソームまたは細胞を静脈内注射する。フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって、ホタルルシフェラーゼ

10

20

30

40

50

を安定して発現する細胞またはルシフェラーゼを発現しない細胞（陰性対照）から生成される。マウスの群は、フソソームまたは細胞注射の1、2、3、4、5、6、8、12、および24時間後に殺処分する。

【0993】

殺処分する5分前に、ルシフェラーゼを視覚化するために、マウスに150mg/kgの用量で生物発光基質（Perkin Elmer）をIP注射する。生物発光画像システムは、すべてのデバイス設定を補正するために較正される。次いで、マウスを殺処分し、肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、GI、および腎臓を収集する。画像システム（Perkin Elmer）を使用して、これらのエキスピボで臓器の生物発光の画像を取得する。生物発光シグナルは、Radiance Photonsを使用して、測定値として使用された全フラックスで測定される。関心領域（ROI）は、光子/秒の値を得るために、エキスピボで臓器を囲むことによって生成される。標的臓器（例えば肝臓）と非標的臓器（例えば、肺、心臓、脾臓、膵臓、GI、および腎臓からの光子/秒の合計）の光子/秒の比率は、肝臓への標的化の評価基準として計算される。

10

【0994】

一実施形態において、フソソームおよび細胞の両方において、肝臓と他の臓器との間の光子/秒の比率は、1より大きくなり、これはフソソームが肝臓を標的とすることを示し得る。一実施形態において、陰性対照動物は、すべての臓器ではるかに低い光子/秒を表す。

20

【0995】

実施例88：対象における外因性因子の送達の測定

この実施例は、対象における外因性因子を含むフソソームの送達の定量化について説明する。フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって、ガウシアルルシフェラーゼを発現する細胞またはルシフェラーゼを発現しない細胞（陰性対照）から調製される。

【0996】

陽性対照細胞またはフソソームを、マウスに静脈内注射する。フソソームまたは細胞は、26ゲージのインスリン注射針を使用して5～8秒以内に送達される。インビボでの生物発光イメージングは、インビボイメージングシステム（Xenogen Corporation, Alameda, CA）を使用して、注射から1、2、または3日後にマウスで実行される。

30

【0997】

使用直前に、セレンテラジン、ルシフェリン、または発光分子（5mg/mL）を、酸性化メタノールで調製し、マウスの尾静脈に直ちに注入する。マウスは、XGE-8ガス麻酔システムを使用した加熱ステージ上で連続麻酔下にある。

【0998】

生物発光イメージングは、セレンテラジン（4μg/g体重）の静脈内尾静脈注射の直後に5分間にわたって光子数を取得することによって得られる。取得したデータは、ソフトウェア（Xenogen）を使用してライトビュー画像にオーバーレイして分析される。関心領域（ROI）は、自動シグナル強度等高線ツールを使用して作成され、同じ動物のバックグラウンド減算で正規化される。マウス内の生物発光光源の位置を特定するために、露光時間3～10分の580、600、および620nmの波長で3つのフィルターを使用した連続データ収集が行われる。

40

【0999】

さらに、各時点で、尿試料が腹部の触診によって収集される。

【1000】

血液試料（50μL）を、各マウスの尾静脈からヘパリン化またはEDTAチューブに採取する。血漿単離のために、血液試料を、4℃で1.3×gで25分間遠心分離する。

【1001】

次いで、5μLの血液、血漿、または尿試料を使用して、試料を50μMのガウシアル

50

シフェラーゼ基質（Nanolight、Pinetop、AZ）と混合した後、ガウシアルシフェラーゼ活性アッセイを実行する。

【1002】

一実施形態において、陰性対照試料は、ルシフェラーゼに対して陰性であり、陽性対照試料は、細胞を投与された動物からのものである。一実施形態において、ガウシアルシフェラーゼを発現するフソソームを投与した動物からの試料は、各試料のルシフェラーゼに対して陽性であろう。

【1003】

例えば、El-Amouri SS et al., Molecular biotechnology 53 (1): 63-73, 2013を参照のこと。

【1004】

実施例89：フソソームの脂質二重層を横断する能動輸送

この実施例は、生細胞でのグルコース取り込みをモニタリングし、脂質二重層を横断する能動輸送を測定するために使用することができる、2-NBDG（2-（N-（7-ニトロベンズ-2-オキサー-1,3-ジアキソール-4-イル）アミノ）-2-デオキシグルコース）、蛍光グルコース類似体のレベルの定量について説明する。一実施形態において、このアッセイを使用して、グルコース取り込みのレベルおよびフソソームの脂質二重層を横断する能動輸送を測定することができる。

【1005】

フソソーム組成物は、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。次いで、十分な数のフソソームを、グルコースを含まず、20%ウシ胎児血清、および1倍のペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM中で、37℃および5%CO₂で2時間インキュベートする。2時間のグルコース飢餓期間の後、グルコースを含まず、20%ウシ胎児血清、1倍のペニシリン/ストレプトマイシン、および20μMの2-NBDG（ThermoFisher）を含むDMEMを含むように交換し、37℃および5%CO₂で2時間インキュベートする。等量の2-NBDGのためのビヒクルであるDMSOを2-NBDGの代わりに添加することを除いて、陰性対照フソソームも同じように処理される。

【1006】

次いで、フソソームを1×PBSで3回洗浄し、適切な緩衝液に再懸濁し、96ウェル画像プレートに移す。次いで、2-NBDG蛍光を、GFPLightキューブ（469/35励起フィルターおよび525/39発光フィルター）を使用した蛍光光度計で測定して、フソソーム膜を横断して輸送され、1時間の装填期間、フソソームに蓄積された2-NBDGの量を定量化する。

【1007】

一実施形態において、2-NBDG蛍光は、陰性（DMSO）対照と比較して、2-NBDG処理を伴うフソソームにおいてより高いであろう。525/39発光フィルターを使用した蛍光測定は、存在する2-NBDG分子の数と相対的である。

【1008】

実施例90：非エンドサイトーシス経路を介したフソソームの送達

この実施例は、非エンドサイトーシス経路を介したレシピエント細胞へのCreのフソソーム送達について説明する。

【1009】

一実施形態において、フソソームは、フソソーム媒介性の非エンドサイトーシス経路を介して薬剤を送達する。理論によって拘束されることを望まないが、フソソームの内腔内に、フソソームのエンドサイトーシス媒介性の取り込みのためにいかなる要件もなく、レシピエント細胞のサイトゾルに直接運ばれる薬剤、例えばCreの送達は、フソソーム媒介性の非エンドサイトーシス経路送達を通じて起こるであろう。

【1010】

この実施例において、フソソームは、その原形質膜上にセンダイウイルスHおよびEタ

10

20

30

40

50

ンパク質を発現するHEK293T細胞を含む(Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22 (October 2014), 1-8. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.123>)。さらに、フソソームは、mTagBFP2蛍光タンパク質およびCreリコンビナーゼを発現する。標的細胞は、CMVプロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを安定的に発現するRPMI8226細胞であり、Creによる組換え時に、GFP発現からRFP発現に切り替わり、マーカーとして、融合およびCreの送達を示す。

【1011】

本明細書に記載の方法によって生成されたフソソームは、以下のように非エンドサイトーシス経路を介したCreの送達についてアッセイされる。レシピエント細胞を、黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種する。次いで、レシピエント細胞を播種してから24時間後に、Creリコンビナーゼタンパク質を発現し、特定のフソゲンタンパク質を保有するフソソームを、DMEM培地中でレシピエント細胞に適用する。非エンドサイトーシス経路を介したCreの送達のレベルを決定するために、フソソームを受け取るレシピエント細胞の並行群を、エンドソーム酸性化の阻害剤であるクロロキン(30 µg/mL)で処理する。フソソームの用量は、ウェルに播種したレシピエント細胞の数と相関する。フソソームを適用した後、細胞プレートを、400gで5分間遠心分離して、フソソームとレシピエント細胞の接触を開始するのに役立つ。次いで、細胞を16時間インキュベートし、薬剤送達であるCreを、イメージングを介して評価する。

【1012】

細胞を画像化して、フィールドまたはウェル内のGFP陽性細胞に対してRFP陽性細胞を明確に特定する。この実施例において、自動蛍光顕微鏡を使用して、細胞プレートを画像化する。所定のウェル中の総細胞集団は、まず、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定される。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用される。染色後、Hoechst培地を、通常のDMEM培地に交換する。

【1013】

Hoechstは、405 nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化される。GFPは、465 nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、RFPは、523 nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化される。異なる細胞群の画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞のLED強度および積分時間を確立することによって得られる。

【1014】

取得設定は、RFPおよびGFP強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定される。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化される。

【1015】

GFPおよびRFP陽性ウェルの分析は、蛍光顕微鏡に付属のソフトウェアまたは他のソフトウェア(Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2007)で実施される。画像は、幅60 µmのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理される。総細胞マスクは、Hoechst陽性細胞に設定される。バックグラウンド強度を大幅に上回るHoechst強度を有する細胞は、閾値を設定するために使用され、Hoechst陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外される。

【1016】

総細胞マスク内で、GFPおよびRFP陽性細胞は、バックグラウンドを大幅に上回る細胞の閾値を再度設定し、細胞領域全体のHoechst(核)マスクを拡張して、GFPおよびRFP細胞蛍光全体を含めることによって特定される。

【1017】

レシピエント細胞を含む対照ウェルで特定されたRFP陽性細胞の数は、フソソームを含むウェル内のRFP陽性細胞の数から減算するため（非特異的LoxP組換えを減算するため）に使用される。次いで、RFP陽性細胞（Creを受容したレシピエント細胞）の数を、GFP陽性細胞（Creを受容していないレシピエント細胞）およびRFP陽性細胞の合計で除算して、レシピエント細胞集団に送達されたフソソームCreの画分を定量化する。このレベルは、レシピエント細胞に適用される所定の用量のフソソームに正規化される。非エンドサイトーシス経路を介して送達されたフソソームCreの値を計算するために、クロロキンの非存在（FusL-CQ）下でのフソソームCre送達のレベルと同様に、クロロキンの存在（FusL+CQ）下でのフソソームCre送達のレベルが決定される。非エンドサイトーシス経路を介して送達されるフソソームCreの正規化された値を決定するために、次の式を使用する：
$$\left[\left(\text{FusL-CQ} \right) - \left(\text{FusL+CQ} \right) \right] / \left(\text{FusL-CQ} \right)。$$

10

【1018】

一実施形態において、所定のフソソームについて非エンドサイトーシス経路を介して送達されるフソソームCreの平均レベルは、0.1～0.95の範囲内であるか、またはクロロキンで処理されたレシピエント細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれより大きい。

【1019】

実施例91：エンドサイトーシス経路を介したフソソームの送達

20

この実施例は、エンドサイトーシス経路を介したレシピエント細胞へのCreのフソソーム送達について説明する。

【1020】

一実施形態において、フソソームは、フソソーム媒介性エンドサイトーシス経路を介して薬剤を送達する。理論によって拘束されることを望まないが、エンドサイトーシス依存性の取り込みの経路によるレシピエント細胞へのフソソームの内腔内に運ばれる薬剤、例えばカーゴの送達は、フソソーム媒介性のエンドサイトーシス経路送達を通じて起こるであろう。

【1021】

この実施例において、フソソームは、2 μmのフィルターを通してその原形質膜上にフソゲンタンパク質を発現するHEK293T細胞を押し出すことによって生成された微小胞を含む（Lin et al., 2016, Biomedical Microdevices, 18 (3). doi.org/10.1007/s10544-016-0066-y）（Riedel, Kondor-Koch, & Garoff, 1984, The EMBO Journal, 3 (7), 1477-83. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6086326から検索される）。さらに、フソソームは、mTagBFP2蛍光タンパク質およびCreリコンビナーゼを発現する。標的細胞は、CMVプロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを安定的に発現するPC3細胞であり、Creによる組換え時に、GFP発現からRFP発現に切り替わり、マーカーとして、融合およびCreの送達を示す。

30

【1022】

本明細書に記載の方法によって生成されたフソソームは、以下のようにエンドサイトーシス経路を介したCreの送達についてアッセイされる。レシピエント細胞を、使用した画像システムと互換性のある細胞培養マルチウェルプレートに播種する（この実施例において、細胞を、黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種する）。次いで、レシピエント細胞を播種してから24時間後に、Creリコンビナーゼタンパク質を発現し、特定のフソゲンタンパク質を保有するフソソームを、DMEM培地中でレシピエント細胞に適用する。エンドサイトーシス経路を介したCreの送達のレベルを決定するために、フソソームを受け取るレシピエント細胞の並行群を、エンドソーム酸性化の阻害剤であるクロロ

40

50

キン ($30 \mu\text{g}/\text{mL}$) で処理する。フソソームの用量は、ウェルに播種したレシピエント細胞の数と相関する。フソソームを適用した後、細胞プレートを、 400g で5分間遠心分離して、フソソームとレシピエント細胞の接触を開始するのに役立つ。次いで、細胞を16時間インキュベートし、薬剤送達であるCreを、イメージングを介して評価する。
【1023】

細胞を画像化して、フィールドまたはウェル内のGFP陽性細胞に対してRFP陽性細胞を明確に特定する。この実施例では、自動蛍光顕微鏡を使用して、細胞プレートを画像化する。所定のウェル中の総細胞集団は、まず、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定される。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用される。染色後、Hoechst培地を、通常のDMEM培地に交換する。

10

【1024】

Hoechstは、 405nm のLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化される。GFPは、 465nm のLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、RFPは、 523nm のLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化される。異なる細胞群の画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞のLED強度および積分時間を確立することによって得られる。

【1025】

取得設定は、RFPおよびGFP強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定される。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化される。

20

【1026】

GFPおよびRFP陽性ウェルの分析は、蛍光顕微鏡に付属のソフトウェアまたは他のソフトウェア (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2007) で実施される。画像は、幅 $60\mu\text{m}$ のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理される。総細胞マスクは、Hoechst陽性細胞に設定される。バックグラウンド強度を大幅に上回るHoechst強度を有する細胞は、閾値処理され、Hoechst陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外される。

30

【1027】

総細胞マスク内で、GFPおよびRFP陽性細胞は、バックグラウンドを大幅に上回る細胞の閾値を再度設定し、細胞領域全体のHoechst (核) マスクを拡張して、GFPおよびRFP細胞蛍光全体を含めることによって特定される。

【1028】

レシピエント細胞を含む対照ウェルで特定されたRFP陽性細胞の数は、フソソームを含むウェル内のRFP陽性細胞の数から減算するため (非特異的LoxP組換えを減算するため) に使用される。次いで、RFP陽性細胞 (Creを受容したレシピエント細胞) の数を、GFP陽性細胞 (Creを受容していないレシピエント細胞) およびRFP陽性細胞の合計で除算して、レシピエント細胞集団に送達されたフソソームCreの画分を定量化する。このレベルは、レシピエント細胞に適用される所定の用量のフソソームに正規化される。エンドサイトーシス経路を介して送達されたフソソームCreの値を計算するために、クロロキンの非存在 (FusL-CQ) 下でのフソソームCre送達のレベルと同様に、クロロキンの存在 (FusL+CQ) 下でのフソソームCre送達のレベルが決定される。エンドサイトーシス経路を介して送達されるフソソームCreの正規化された値を決定するために、次の式を使用する: $(\text{FusL} + \text{CQ}) / (\text{FusL} - \text{CQ})$ 。

40

【1029】

一実施形態において、所定のフソソームについてエンドサイトーシス経路を介して送達されるフソソームCreの平均レベルは、 $0.01 \sim 0.6$ の範囲内であるか、またはクロロキンで処理したレシピエント細胞よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、

50

10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれより大きい。

【1030】

実施例92：ダイナミン媒介経路、マクロピノサイトーシス経路、またはアクチン媒介経路を介したフソソームの送達

この実施例は、ダイナミン媒介経路を介したレシピエント細胞へのCreのフソソーム送達について説明する。微小胞を含むフソソームは、前述の実施例で説明したように生成され得る。フソソームは、フソソームを受容する一連のレシピエント細胞がダイナミンの阻害剤であるDynasore (120 μM) で処理したことを除いて、前述の実施例に従ってダイナミン媒介経路を介したCreの送達についてアッセイされる。ダイナミン媒介経路を介して送達されたフソソームCreの値を計算するために、Dynasoreの非存在 (FusL-D S) 下でのフソソームCre送達のレベルと同様に、Dynasoreの存在 (FusL+D S) 下でのフソソームCre送達のレベルが決定される。送達されたフソソームCreの正規化された値は、前述の実施例で説明したように計算され得る。

10

【1031】

この実施例はまた、マクロピノサイトーシスを介したレシピエント細胞へのCreの送達についても説明する。微小胞を含むフソソームは、前述の実施例で説明したように生成され得る。フソソームは、フソソームを受容する一連のレシピエント細胞がマクロピノサイトーシスの阻害剤である5-(N-エチル-N-イソプロピル) アミロリド (EIPA) (25 μM) で処理したことを除いて、前述の実施例に従ってマクロピノサイトーシスを介したCreの送達についてアッセイされる。マクロピノサイトーシスを介して送達されたフソソームCreの値を計算するために、EIPAの非存在 (FusL-EIPA) 下でのフソソームCre送達のレベルと同様に、EIPAの存在 (FusL+EIPA) 下でのフソソームCre送達のレベルが決定される。送達されたフソソームCreの正規化された値は、前述の実施例で説明したように計算され得る。

20

【1032】

この実施例はまた、アクチン媒介性経路を介したレシピエント細胞へのCreのフソソーム送達についても説明する。微小胞を含むフソソームは、前述の実施例で説明したように生成され得る。フソソームは、フソソームを受容する一連のレシピエント細胞がアクチン重合の阻害剤であるラトランクリンB (6 μM) で処理したことを除いて、前述の実施例に従ってマクロピノサイトーシスを介したCreの送達についてアッセイされる。アクチン媒介経路を介して送達されたフソソームCreの値を計算するために、ラトランクリンBの非存在 (FusL-LatB) 下でのフソソームCre送達のレベルと同様に、ラトランクリンBの存在 (FusL+LatB) 下でのフソソームCre送達のレベルが決定される。送達されたフソソームCreの正規化された値は、前述の実施例で説明したように計算され得る。

30

【1033】

実施例93：オルガネラの送達

この実施例は、インビトロでの細胞とのフソソーム融合について説明する。一実施形態において、インビトロでの細胞とのフソソーム融合は、レシピエント細胞へのフソソームミトコンドリアカーゴの送達をもたらす得る。

40

【1034】

本明細書に記載の方法により記載された方法により生成されたフソソームを、以下のよう、レシピエント細胞にそのミトコンドリアを送達する能力についてアッセイした。

【1035】

この特定の実施例において、フソソームは、ミトコンドリアを標識するミトコンドリア標的DsRED (mito-DsRED) タンパク質と同様に、その膜上にフソゲンタンパク質を発現するHEK293T細胞であった。レシピエント細胞を、使用した画像システムと互換性のある細胞培養マルチウェルプレートに播種した (この実施例において、細

50

胞を、ガラス底のイメージング皿に播種した)。レシピエント細胞は、細胞質GFPを安定して発現した。

【1036】

次いで、レシピエント細胞を播種してから24時間後に、mito-DsREDを発現し、特定の融合タンパク質を保有するフソソームを、DMEM培地中でレシピエント細胞に適用した。フソソームの用量は、ウェルに播種したレシピエント細胞の数と相関した。フソソームを適用した後、細胞プレートを、400gで5分間遠心分離して、フソソームとレシピエント細胞の接触を開始するのに役立った。次いで、細胞を4時間インキュベートし、VSVG媒介性融合を、pH6.0のリン酸緩衝生理食塩水への1分間の曝露によって誘導した(または対照細胞を、pH7.4のリン酸緩衝生理食塩水に曝露する)。融合の誘導後、細胞を、さらに16時間インキュベートし、ミトコンドリア送達を、イメージングを介して評価した。

【1037】

この実施例において、細胞は、37℃および5%CO₂に維持しながら、63倍の油浸対物レンズを備えたZeiss LSM 710共焦点顕微鏡上に画像化した。GFPを、488nmのレーザー励起に供し、495~530nmの帯域通過フィルターを通して発光を記録した。DsREDを、543nmのレーザー励起に供し、560~610nmの帯域通過フィルターを通して発光を記録した。細胞をスキャンして、細胞質GFP蛍光およびmito-DsRED蛍光が陽性の細胞を明確に特定した。

【1038】

細胞質GFPおよびmito-DsREDミトコンドリアの両方の存在が、同じ細胞中に見出され、細胞がVSVG媒介性融合を受けているため、ミトコンドリアがフソソームからレシピエント細胞に送達されたことを示す。

【1039】

実施例94：DNAのインビトロ送達

この実施例は、インビトロでのフソソームを使用した細胞へのDNAの送達について説明する。この実施例は、外因性遺伝子をコードするプラスミド、GFP、代替治療用カーゴを使用して、フソソームがDNAを送達する能力を定量化する。

【1040】

フソソームがCreのオープンリーディングフレームとインフレームであるように操作されていることを除いて、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成された細胞由来の小胞または細胞由来の細胞生物学から生じる、フソソーム組成物。フソソームの生成後、GFPをコードする配列を有するプラスミド(System Biosciences, Inc.)でさらにヌクレオフェクションされる。

【1041】

例えば、Chen X, et al., Genes Dis. 2015 Mar; 2(1): 96-105. DOI: 10.1016/j.gendis.2014.12.001を参照のこと。

【1042】

陰性対照として、フソソームは、ベータアクチンをコードする配列を有するプラスミドでヌクレオフェクションされる。

【1043】

次いで、十分な数のフソソームを、20%ウシ胎児血清および1倍のペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM中で、loxP-STOP-loxP-tdTomatoレポーターを有するレシピエントNIH/3T3線維芽細胞株とともに、37℃および5%CO₂で48時間インキュベートする。48時間のインキュベーション後、561nmのレーザー励起でFACSサイトメーター(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)を使用してtdTomato陽性細胞をFACSを介して単離し、590+/-20nmで発光を収集する。次いで、DNA抽出溶液(Epicentre)を使用して、全DNAを単離し、600bp断片を増幅するGFPに特異的なプラ

10

20

30

40

50

イマー（表 12 を参照）を使用して、PCR を実行する。ゲル電気泳動後にゲル上に存在する 600 bp 断片は、レシピエント細胞への DNA デリバリーの存在を実証し得る。

【表 12】

表 12. 500 bp 断片を増幅する GFP プライマー配列

プライマー	配列
GFP-F	ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC
GFP-R	GTCCTTTTACCAGACAACCATTAAC

【1044】

一実施形態において、インビトロでのフソソームを含む核酸カーゴの送達は、陰性対照と比較して、GFP プラスミドを含むフソソームにおいてより高い。ごくわずかな GFP 蛍光が、陰性対照中で検出される。

【1045】

実施例 95：DNA のインビボ送達

この実施例は、フソソームを介したインビボでの細胞への DNA の送達について説明する。インビボでの細胞への DNA の送達は、レシピエント細胞内にタンパク質の発現をもたらす。

【1046】

インビボでのフソソーム DNA の送達は、生物（マウス）内のレシピエント細胞における DNA およびタンパク質発現の送達を実証する。

【1047】

肝臓指向性フソゲンを発現するフソソームは、本明細書に記載されるように調製される。フソソームの生成後、それは、Cre リコンビナーゼをコードする配列を有するプラスミドでさらにヌクレオフェクションされる。

【1048】

フソソームは、インビボ送達用に調製される。フソソーム懸濁液は、遠心分離に供される。フソソームのペレットは、注射用の滅菌リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁される。

【1049】

フソソームは、核酸検出法、例えば PCR を使用して DNA を含有することが確認されている。

【1050】

レシピエントマウスは、ルシフェラーゼの発現を除去するために、フソソームによって送達された DNA から作製された CRE タンパク質によって修飾された loxP-ルシフェラーゼゲノム DNA 遺伝子座を保有する（JAX 番号 005125）。この実施例の陽性対照は、その独自のゲノムから肝臓でのみ同じタンパク質を発現するマウス系統と交配したレシピエントマウスの子孫である（アルブミン-CRE JAX 番号 003574）。この交配からの子孫は、各対立遺伝子のうちの 1 つ（loxP-ルシフェラーゼ、アルブミン-CRE）を保有する。陰性対照は、フソゲンを発現しないフソソームまたはフソゲンを含むが、Cre DNA を含まないフソソームでレシピエントマウスを注射することによって実施される。

【1051】

フソソームは、静脈内（IV）尾静脈投与によってマウスに送達される。マウスを、市販のマウス拘束具（Harvard Apparatus）に入れる。拘束する前に、動物は、循環水浴にケージを乗せて温める。拘束具の中に入ると、動物は順応させることができる。30G 針の先端、3 インチの長さの PE-10 チューブ、28G 針で構成される IV カテーテルを準備し、ヘパリン添加生理食塩水で洗い流す。尾は 70% のアルコール準備パッドできれいにする。次いで、カテーテルの針を鉗子で保持し、血液がチューブ内で見えるようになるまで外側尾静脈にゆっくりと導入する。フソソーム溶液（約 500 K ~ 5 M フソソーム）を、1 cc のツベルクリンシリンジに吸引し、注入ポンプに接続する

10

20

30

40

50

。フソソーム溶液は、用量に応じて30秒～5分間、毎分20μLの速度で送達される。注入が完了すると、カテーテルを取り除き、出血が止まるまで注射部位に圧力を加える。マウスをケージに戻し、回復させる。

【1052】

融合後、DNAは転写され、CREタンパク質に翻訳され、核に移行して組換えを行い、ルシフェラーゼの構成的発現をもたらす。D-ルシフェリン（Perkin Elmer、150mg/kg）の腹腔内投与により、生物発光の生成を介したルシフェラーゼ発現の検出が可能になる。動物を、動物の動きを防ぐためにコーン麻酔器（イソフルラン）を収容するインビボ生物発光イメージングチャンバー（パーキンエルマー）に配置する。D-ルシフェリンの薬物動態的クリアランスによる生物発光の最大値を観察するために、注入後8～20分間に光子収集が行われる。肝臓の特定の領域をソフトウェアで作成し、収集露光時間は、計数率が（この領域内で）600を超えて、解釈可能な放射輝度（光子/秒/cm²/ステラジアン）の測定値を得るように設定する。生物発光輝度の最大値は、生物発光分布の画像として記録される。肝臓組織は、バックグラウンドを上回る放射輝度測定（未処理動物）および陰性対照の放射輝度測定のために特にモニタリングされる。ルシフェラーゼ活性を観察するために、注射から24時間後に測定が行われる。次いで、マウスを殺処分し、肝臓を収集する。

【1053】

収集したばかりの組織を、4%パラホルムアルデヒド/0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液pH7.4に4℃で1～3時間浸漬し、固定および包埋する。次いで、組織を、4℃で滅菌15%スクロース/1×PBSに浸漬する（3時間から一晩）。次いで、組織を、O.C.T.（Baxter番号M7148-4）に包埋する。組織を、セクションング（断面）に適したブロック内に配置する。次いで、次の方法を使用して、組織を、液体窒素で凍結する：ブロックの下部3分の1を液体窒素に入れ、O.C.T.の中心を除くすべてが凍結するまで凍結させ、ドライアイスで凍結させる。ブロックを、スライド上に置いた5～7ミクロンの切片にクライオスタットで切片化し、染色のために再凍結する。

【1054】

In situハイブリダイゼーションは、（標準的な方法を使用して）ジゴキシゲニン標識核酸プローブ（CRE DNAおよびルシフェラーゼmRNA検出用）を使用して組織切片で実行され、抗ジゴキシゲニン蛍光抗体によって標識され、共焦点顕微鏡によって観察される。

【1055】

実施形態において、陽性対照動物（フソソーム注射なしの繁殖を介した組換え）は、未処理動物（CREおよびフソソームなし）および陰性対照と比較して、肝臓で生物発光強度を示し、一方、薬剤を注射した動物は、陰性対照（フソゲンを含まないフソソーム）および未処理の動物と比較して、肝臓で生物発光を示す。

【1056】

実施形態において、薬剤を注射した動物の組織切片における核酸の検出は、組織中の細胞における陰性対照および未処理動物と比較して、CREリコンビナーゼおよびルシフェラーゼmRNAの検出を示し、一方、陽性対照は、組織全体にわたってルシフェラーゼmRNAおよびCREリコンビナーゼDNAの両方のレベルを示す。

【1057】

フソソームによるDNA送達の証拠は、DNAのin situハイブリダイゼーションベースの検出および動物のレシピエント組織におけるその共局在化によって検出される。DNAから発現したタンパク質の活性は、生物発光イメージングによって検出される。実施形態において、フソソームは、タンパク質の生成および活性をもたらすDNAを送達する。

【1058】

実施例96：mRNAのインビトロ送達

この実施例は、インビトロでの細胞とのフソソーム融合について説明する。一実施形態

10

20

30

40

50

において、インビトロでの細胞とのフソソーム融合は、レシピエント細胞に対して特定の mRNA の送達をもたらす。

【1059】

本明細書に記載の方法により記載された方法により生成されたフソソームを、以下のように、レシピエント細胞に特定の mRNA を送達する能力についてアッセイした。この特定の実施例において、フソソームは、Cre および GFP を発現する 3T3 マウス線維芽細胞から生成された細胞生物（核を欠いている）であった。次いで、細胞生物を、HVJ-E フソゲンタンパク質で処理して、フソソームを生成した。

【1060】

レシピエントマウスマクロファージ細胞を、使用した画像システムと互換性のある細胞培養マルチウェルプレートに播種した（この実施例において、細胞を、ガラス底のイメージング皿に播種した）。レシピエント細胞は、CMV プロモーターの下で「LoxP-stop-LoxP-tdTomato」カセットを安定的に発現し、Cre による組換え時に tdTomato 発現を誘導し、レシピエント細胞への Cre タンパク質の送達を示す。

【1061】

次いで、レシピエント細胞を播種してから 24 時間後に、Cre リコンビナーゼタンパク質を発現し、特定のフソゲンタンパク質を保有するフソソームを、DMEM 培地中でレシピエント細胞に適用した。フソソームの用量は、ウェルに播種したレシピエント細胞の数と相関した。フソソームを適用した後、細胞プレートを、400g で 5 分間遠心分離して、フソソームとレシピエント細胞の接触を開始するのに役立った。次いで、細胞を 16 時間インキュベートし、mRNA 送達をイメージングにより評価した。

【1062】

細胞を、イメージング前に 10 分間、DMEM 培地中の $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の Hoechst 33342 で染色した。この実施例において、細胞は、 37°C および $5\%\text{CO}_2$ に維持しながら、63 倍の油浸対物レンズを備えた Zeiss LSM 710 共焦点顕微鏡上に画像化した。Hoechst を、 405nm のレーザー励起に供し、 $430\sim 460\text{nm}$ の帯域通過フィルターを通して発光を記録した。GFP を、 488nm のレーザー励起に供し、 $495\sim 530\text{nm}$ の帯域通過フィルターを通して発光を記録した。tdTomato を、 543nm のレーザー励起に供し、 $560\sim 610\text{nm}$ の帯域通過フィルターを通して発光を記録した。

【1063】

まず、細胞をスキャンして、単核の tdTomato 陽性細胞を明確に特定した。tdTomato 陽性細胞の存在は、融合を受けた細胞を示し、単一の核は、融合が細胞生物学的フソソームドナーによるものであることを示した。これらの特定した細胞を、まず、画像化し、次いで、 488nm のレーザーを使用して GFP 蛍光を部分的に消光するために光退色した。次いで、GFP 蛍光の回復を評価するために、細胞を経時的にイメージングし、新しい GFP タンパク質の翻訳を示し、ドナーフソソームによって送達された GFP mRNA の存在を示し得る。

【1064】

対象となる細胞の Hoechst、GFP、および tdTomato 蛍光の分析は、ImageJ ソフトウェアを使用して画像を実施する (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007)。まず、画像は、幅 $60\mu\text{m}$ のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。光退色した細胞内で、GFP 蛍光を閾値処理して、バックグラウンドを除去した。次いで、光退色細胞の GFP 平均蛍光強度を、光退色の前後の異なる時点で分析した。

【1065】

この特定の実施例では、Cre および GFP を発現し、適用したフソゲン HVJ-E (

10

20

30

40

50

+フソゲン)のいずれかを有する3T3マウス線維芽細胞の細胞生物を、「LoxP-stop-LoxP-tetTomato」カセットを発現するレシピエントマウスマクロファージ細胞に適用した。代表的な画像およびデータを、図5に示す。この特定の実施例では、GFP蛍光強度は、光退色から10時間後に、元の強度の25%まで回復し、レシピエント細胞において能動的に翻訳されたmRNAの送達を示した。

【1066】

実施例97：siRNAのインビトロ送達

この実施例は、フソソームを介したインビトロでの細胞への短鎖干渉RNA (siRNA)の送達について説明する。インビトロでの細胞へのsiRNAの送達は、レシピエント細胞内にタンパク質の発現の抑制をもたらす。これは、発現が細胞にとって有害であるタンパク質の活性を阻害するために使用することができ、それにより細胞が正常に挙動することを可能にする。

【1067】

本明細書に記載の方法により記載された方法により生成されたフソソームを、以下のよう、レシピエント細胞に特定のsiRNAを送達する能力についてアッセイする。フソソームは、本明細書に記載されるように調製される。フソソームの生成後、それは、GFPを特異的に阻害する配列を有するsiRNAでさらにエレクトロポレーションする。GFPを標的とする二本鎖siRNAの配列は、5'GACGUAAACGGCCACAAGUUC3'およびその相補体3'CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCA5'である (siRNA配列の3'末端には2塩基対長のオーバーハングがあることに留意する)。陰性対照として、フソソームを、ルシフェラーゼを特異的に阻害する配列を有するsiRNAでエレクトロポレーションする。ルシフェラーゼを標的とする二本鎖siRNAの配列は、5'CUUACGCUGAGUACUUCGATT3'およびその相補体3'TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU5'である (siRNA配列の3'末端に2塩基対長のオーバーハングがあることに留意する)。

【1068】

次いで、フソソームを、GFPを構成的に発現するレシピエント細胞に適用する。レシピエント細胞を、黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種する。次いで、レシピエント細胞を播種してから24時間後に、発現しているフソソームを、DMEM培地中でレシピエント細胞に適用する。フソソームの用量は、ウェルに播種したレシピエント細胞の数と相関する。フソソームを適用した後、細胞プレートを、400gで5分間遠心分離して、フソソームとレシピエント細胞の接触を開始するのに役立つ。次いで、細胞を16時間インキュベートし、薬剤送達であるsiRNAを、イメージングを介して評価する。

【1069】

細胞を画像化して、フィールドまたはウェル内のGFP陽性細胞を明確に特定する。この実施例において、自動蛍光顕微鏡 (www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)を使用して、細胞プレートを画像化する。所定のウェル中の総細胞集団は、まず、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定される。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用される。染色後、Hoechst培地を、通常のDMEM培地に交換する。

【1070】

Hoechstは、405nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化される。GFPは、465nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化される。異なる細胞群の画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、いかなるフソソームでも処理されなかったレシピエント細胞上のLED強度および積分時間を確立することによって得られる。

【1071】

10

20

30

40

50

取得設定は、GFP強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定される。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化される。

【1072】

GFP陽性ウェルの分析は、蛍光顕微鏡に付属のソフトウェアまたは他のソフトウェア(Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007)で実施される。画像は、幅60μmのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理される。総細胞マスクは、Hoechst陽性細胞に設定される。バックグラウンド強度を大幅に上回るHoechst強度を有する細胞は、閾値処理され、Hoechst陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外される。

10

【1073】

総細胞マスク内で、GFP陽性細胞は、バックグラウンドを大幅に上回る細胞の閾値を再度設定し、細胞領域全体のHoechst(核)マスクを拡張して、GFP細胞蛍光全体を含めることによって特定される。全細胞のうちGFP陽性細胞の割合が、計算される。

【1074】

実施形態において、GFPに対してsiRNAを含有するフソソームで処理したウェル中のGFP陽性細胞の割合は、ルシフェラーゼに対してsiRNAを含有するフソソームで処理したウェル中のGFP陽性細胞の割合よりも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%未満である。

20

【1075】

実施例98：mRNAのインビボ送達

この実施例は、フソソームを介したインビボでの細胞へのメッセンジャーRNA(mRNA)の送達について説明する。一実施形態において、インビボでの細胞へのmRNAの送達は、レシピエント細胞内にタンパク質の発現をもたらす。一実施形態において、この送達方法を使用して、遺伝子突然変異のために存在しないタンパク質を補充し、細胞が正常に挙動することを可能にするか、または細胞の活性を再指向して機能、例えば治療機能を実行することができる。

【1076】

一実施形態において、インビボでのフソソームmRNA送達は、生物(例えば、マウス)内のレシピエント細胞におけるメッセンジャーRNAおよびタンパク質発現の送達を実証する。

30

【1077】

一実施形態において、肝臓指向性フソゲンを発現し、Creを発現するmRNAを生成するフソソームは、インビボ送達のために調製される。

【1078】

フソソームは、本明細書に記載されるように調製される。フソソーム懸濁液は、遠心分離に供される。フソソームのペレットは、注射用の滅菌リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁される。

40

【1079】

フソソームは、核酸検出法、例えばPCRを使用してmRNAを発現することが確認されている。

【1080】

レシピエントマウスは、ルシフェラーゼの発現を除去するために、フソソームによって送達されたmRNAから作製されたCREタンパク質によって修飾されたloxP-ルシフェラーゼゲノムDNA遺伝子座を保有する(JAX番号005125)。この実施例の陽性対照は、その独自のゲノムから肝臓でのみ同じタンパク質を発現するマウス系統と交配したレシピエントマウスの子孫である(アルブミン-CRE JAX番号003574)。この交配からの子孫は、各対立遺伝子のうちの1つ(loxP-ルシフェラーゼ、ア

50

ルブミン-CRE)を保有する。陰性対照は、フソゲンを発現しないフソソームまたはフソゲンを含むが、Cre mRNAを含まないフソソームでレシピエントマウスを注射することによって実施される。

【1081】

フソソームは、静脈内(IV)尾静脈投与によってマウスに送達される。マウスを、市販のマウス拘束具(Harvard Apparatus)に入れる。拘束する前に、動物は、循環水浴にケージを乗せて温める。拘束具の中に入ると、動物は順応させることができる。30G針の先端、3インチの長さのPE-10チューブ、28G針で構成されるIVカテーテルを準備し、ヘパリン添加生理食塩水で洗い流す。尾は70%のアルコール準備パッドできれいにする。次いで、カテーテルの針を鉗子で保持し、血液がチューブ内で見えるようになるまで外側尾静脈にゆっくりと導入する。フソソーム溶液(約500K~5Mフソソーム)を、1ccのツベルクリンシリンジに吸引し、注入ポンプに接続する。フソソーム溶液は、用量に応じて30秒~5分間、毎分20uLの速度で送達される。注入が完了すると、カテーテルを取り除き、出血が止まるまで注射部位に圧力を加える。マウスをケージに戻し、回復させる。

【1082】

融合後、mRNAは、レシピエント細胞質においてCREタンパク質に翻訳され、核に移行して組換えを行い、ルシフェラーゼの構成的発現をもたらす。D-ルシフェリン(Perklin Elmer、150mg/kg)の腹腔内投与により、生物発光の生成を介したルシフェラーゼ発現の検出が可能になる。動物を、動物の動きを防ぐためにコーン麻酔器(イソフルラン)を収容するインビボ生物発光イメージングチャンバー(パーキンエルマー)に配置する。D-ルシフェリンの薬物動態的クリアランスによる生物発光の最大値を観察するために、注入後8~20分間に光子収集が行われる。肝臓の特定の領域をソフトウェアで作成し、収集露光時間は、計数率が(この領域内で)600を超えて、解釈可能な放射輝度(光子/秒/cm²/ステラジアン)の測定値を得るように設定する。生物発光輝度の最大値は、生物発光分布の画像として記録される。肝臓組織は、バックグラウンドを上回る放射輝度測定(未処理動物)および陰性対照の放射輝度測定のために特にモニタリングされる。ルシフェラーゼ活性を観察するために、注射から24時間後に測定が行われる。次いで、マウスを殺処分し、肝臓を収集する。

【1083】

収集したばかりの組織を、4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.4に4℃で1~3時間浸漬し、固定および包埋する。次いで、組織を、4℃で滅菌15%スクロース/1xPBSに浸漬する(3時間から一晩)。次いで、組織を、O.C.T.(Baxter番号M7148-4)に包埋する。組織を、セクションング(断面)に適したブロック内に配置する。次いで、次の方法を使用して、組織を、液体窒素で凍結する:ブロックの下部3分の1を液体窒素に入れ、O.C.T.の中心を除くすべてが凍結するまで凍結させ、ドライアイスで凍結させる。ブロックを、スライド上に置いた5~7ミクロンの切片にクライオスタットで切片化し、染色のために再凍結する。

【1084】

In situハイブリダイゼーションは、(標準的な方法を使用して)ジゴキシゲニン標識RNAプローブ(CRE mRNAおよびルシフェラーゼmRNA検出用)を使用して組織切片で実行され、抗ジゴキシゲニン蛍光抗体によって標識され、共焦点顕微鏡によって観察される。

【1085】

一実施形態において、陽性対照動物(例えば、フソソーム注射なしの繁殖を介した組換え)は、未処理動物(例えば、CREおよびフソソームなし)ならびに陰性対照と比較して、肝臓で生物発光強度を示す。一実施形態において、フソソームを注射した動物は、陰性対照(例えば、フソゲンを含まないフソソーム)および未処理動物と比較して、肝臓で生物発光を示す。

【1086】

実施形態において、フソソーム投与した動物の組織切片におけるmRNAの検出は、組織中の細胞における陰性対照および未処理動物と比較して、CREリコンビナーゼおよびルシフェラーゼmRNAの検出を示す。一実施形態において、陽性対照は、組織全体にわたってルシフェラーゼmRNAおよびCREリコンビナーゼmRNAの両方のレベルを示す。

【1087】

一実施形態において、フソソームによるmRNA送達の証拠は、mRNAのin situハイブリダイゼーションベースの検出および動物のレシピエント組織におけるその共局在化によって検出される。一実施形態において、フソソームによって送達されたmRNAから発現したタンパク質の活性は、生物発光イメージングによって検出される。一実施形態において、フソソームは、タンパク質の生成および活性をもたらすmRNAを送達する。

【1088】

実施例99：タンパク質のインビトロ送達

この実施例は、インビトロでの細胞とのフソソーム融合を実証する。この実施例において、インビトロでの細胞とのフソソーム融合は、レシピエント細胞へのCreタンパク質の送達をもたらす。

【1089】

この実施例は、フソソームは、センダイウイルスHVJ-Eタンパク質を発現する3T3マウス線維芽細胞から生成された(Tanaka et al., 2015, Gene Therapy, 22 (October 2014), 1-8. doi.org/10.1038/gt.2014.12)。さらに、フソソームは、Creリコンビナーゼを発現した。標的細胞は、CMVプロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを安定的に発現する一次HEK293T細胞であり、Creによる組換え時に、GFP発現からRFP発現に切り替わり、マーカーとして、融合およびCreの送達を示した。

【1090】

本明細書に記載の方法により生成されたフソソームを、以下のように、レシピエント細胞にCreタンパク質を送達する能力についてアッセイした。レシピエント細胞を、使用した画像システムと互換性のある細胞培養マルチウェルプレートに播種した(この実施例において、細胞を、黒色の透明底の96ウェルプレートに播種した)。次いで、レシピエント細胞を播種してから24時間後に、Creリコンビナーゼタンパク質を発現し、特定のフソゲンタンパク質を保有するフソソームを、DMEM培地中でレシピエント細胞に適用した。フソソームの用量は、ウェルに播種したレシピエント細胞の数と相関した。フソソームを適用した後、細胞プレートを、400gで5分間遠心分離して、フソソームとレシピエント細胞の接触を開始するのに役立った。次いで、細胞を16時間インキュベートし、タンパク質送達をイメージングにより評価した。

【1091】

これらの細胞を画像化して、フィールドまたはウェル内のGFP陽性細胞に対してRFP陽性細胞を明確に特定した。この実施例において、自動顕微鏡を使用して細胞プレートを画像化した。所定のウェル中の総細胞集団は、まず、1μg/mLのHoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定された。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用される。染色後、Hoechst培地を、通常のDMEM培地に交換した。Hoechstは、405nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化された。GFPは、465nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、一方、RFPは、523nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。異なる細胞群の画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、Creリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理された細胞上のLED強度および積分時間を確立することによって得られた。取得設定は、RFPおよびGFP強

10

20

30

40

50

度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。

【1092】

Hoechst、GFP、およびRFP陽性ウェルの分析は、LionHeart FXに付属のGen5ソフトウェアまたはImageJソフトウェア(Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007)で実施された。まず、画像は、幅60 μ mのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。次いで、総細胞マスクは、Hoechst陽性細胞に設定された。バックグラウンド強度を大幅に上回るHoechst強度を有する細胞は、閾値処理され、Hoechst陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。総細胞マスク内で、GFPおよびRFP陽性細胞は、バックグラウンドを大幅に上回る細胞の閾値を再度設定し、細胞領域全体のHoechst(核)マスクを拡張して、GFPおよびRFP細胞蛍光全体を含めることによって特定された。

10

【1093】

レシピエント細胞のみを含む対照ウェルで特定されたRFP陽性細胞の数は、フソソームを含むウェル内のRFP陽性細胞の数から減算するため(非特異的LoxP組換えを減算するため)に使用された。次いで、RFP陽性細胞(薬剤を受容したレシピエント細胞)の数を、GFP陽性細胞(薬剤を受容していないレシピエント細胞)およびRFP陽性細胞の合計で除算して、レシピエント細胞集団に送達されたフソソーム薬剤の画分を定量化する。

20

【1094】

この特定の実施例では、Creを発現し、適用したフソゲンHVJ-E(+フソゲン)を有するかまたは有しない(-フソゲン)のいずれかを有する3T3マウス線維芽細胞を、「LoxP-stop-LoxP-tdTomato」カセットを発現するレシピエント293T細胞に適用した。Creタンパク質の送達は、レシピエント細胞におけるRFP発現の誘導により評価される。図6のグラフは、Hoechst陽性に染色された全細胞(各ペアの最左のバー)のうち、RFP陽性細胞(各ペアの最右のバー)の定量化を示す。この特定の実施例について、レシピエント細胞へのフソソーム送達の画分は、HVJ-Eフソゲンを有する3T3 Cre細胞について0.44である。

30

【1095】

実施例100:タンパク質のインビボ送達

この実施例は、フソソームによる眼への治療剤の送達について説明する。

【1096】

フソソームは、前述の実施例で説明した方法のうちのいずれかを使用して、造血幹細胞および前駆細胞に由来し、マウスノックアウトが欠けているタンパク質をローディングする。

【1097】

フソソームを、タンパク質を欠いているマウスの右眼に網膜下に注射し、ビヒクル対照を、マウスの左眼に注射する。マウスのサブセットは、2月齢に達すると殺処分される。

40

【1098】

収集した網膜組織の組織学およびH&E染色を行って、マウスの各網膜で救助された細胞の数を計数する(Sanges et al., The Journal of Clinical Investigation, 126(8):3104-3116, 2016に記載)。

【1099】

注射したタンパク質のレベルは、PDE6Bタンパク質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロットを介して、2月齢で殺処分したマウスから収集した網膜で測定される。

【1100】

50

一実施形態において、フソソームを投与したマウスの左眼は、ビヒクルで処置したマウスの右眼と比較して、網膜の外側核レベルに存在する核の数が増加する。増加したタンパク質は、変異PBE6Bタンパク質の相補性を示唆する。

【1101】

実施例101：レシピエントDNAを編集するための送達

この実施例は、インビトロでの細胞へのゲノムCRISPR-Cas9編集機構の送達のためのフソソームについて説明する。一実施形態において、フソソームを介したインビトロでの細胞へのゲノムCRISPR-Cas9編集機構の送達は、レシピエント細胞内で特定のタンパク質の機能の喪失をもたらす。この実施例において参照されるゲノム編集機構は、GFPに特異的なガイドRNA (gRNA) と複合したS. pyogenes Cas9タンパク質である。

【1102】

一実施形態において、フソソームは、治療剤の送達のための筐体である。一実施形態において、高い特異性および効率で細胞に送達することができるゲノム編集機構などの治療剤を使用して、遺伝子、ひいては高レベルまたは誤った細胞型で発現した場合に病的になる、その後の遺伝子産物（例えばタンパク質）を不活性化することができる。

【1103】

フソソームがA. Victoria EGFPの配列に特異的なガイドRNA (gRNA) 配列と複合化したS. pyogenes Cas9タンパク質も含むように操作されていることを除いて、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成された、フソソーム組成物。これは、P2A切断配列によって分離されたS. pyogenes Cas9のオープンリーディングフレームとのインフレーム融合であるネオマイシン耐性遺伝子のオープンリーディングフレームを有するPiggyBacベクターを同時ヌクレオフェクションすることによって達成される。さらなる同時ヌクレオフェクションしたPiggyBacベクターには、U6プロモーターによって駆動されるgRNA配列 (GAAGTTTCGAGGGCGACACCC) も含まれる。陰性対照として、フソソームは、マウスゲノムのいずれの標的にも特異的ではないスクランブルgRNA (GCACCTACCAAGAGCTAACTCA) 配列と複合化したS. pyogenes Cas9タンパク質を含むように操作されている。

【1104】

十分な数のフソソームを、20%ウシ胎児血清および1倍のペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM中で、NIH/3T3 GFP+細胞とともに、37℃および5% CO₂で48時間インキュベートする。48時間のインキュベーション後、ゲノムDNAを調製し、GFP遺伝子の予測したgRNA切断部位から500bp以内の領域に特異的なプライマーとともにテンプレートとして使用する（表13を参照のこと）。

【表13】

表13. TIDE分析のために500bp断片を増幅するGFPプライマー配列

プライマー	配列
GFP-F	ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC
GFP-R	GTCCTTTTACCAGACAACCATTTAC

【1105】

次いで、PCRアンプリコンを精製し、キャピラリーシーケンシングによって配列決定し、ガイドRNAによって決定されるウェブツールであるTide Calculatorにアップロードする。2つの標準的なキャピラリーシーケンシング反応からの定量的配列トレースデータに基づいて、ソフトウェアは、編集の有効性を定量化する。GFP遺伝子座を有する予測されたgRNA切断部位でのインデル（挿入または欠失）は、細胞内のGFP発現の喪失をもたらし、488nmの励起アルゴンレーザーでFACS分析を使用して、FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

で定量化され、 $530 \pm 30 \text{ nm}$ で発光を収集する。FACSソフトウェアは、取得および分析のために使用される。光散乱チャンネルは、線形利得に設定され、蛍光チャンネルは、対数尺度で設定され、最低10,000個の細胞が各条件で分析される。GFP機能のインデルおよびその後の喪失は、各試料のGFPシグナルの強度に基づいて計算される。

【1106】

一実施形態において、陰性対照と比較して、細胞内のGFP遺伝子座およびGFP蛍光の喪失を伴う予測されたgRNA切断部位でのインデル（挿入または欠失）は、DNAを編集するフソソームの能力を示し、インビトロでのタンパク質機能の喪失をもたらす。一実施形態において、スクランブルgRNA配列を有するフソソームは、インデルもタンパク質機能のその後の喪失も示さないであろう。

【1107】

実施例102：フソソーム投与後の奇形腫の形成の評価

この実施例は、フソソームによる奇形腫の形成の欠如について説明する。一実施形態において、フソソームは、対象に投与されたときに奇形腫の形成をもたらさないであろう。

【1108】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって生成される。フソソーム、腫瘍細胞（陽性対照）、またはビヒクル（陰性対照）を、マウス（12～20週齢）の左脇腹にPBSで皮下注射する。奇形腫、例えば腫瘍の成長は、フソソーム、腫瘍細胞、またはビヒクル注射後の8週間のキャリパー測定による腫瘍体積の決定により、週に2～3回分析される。

【1109】

一実施形態において、フソソームまたはビヒクルを投与されたマウスは、キャリパー測定を介して、測定可能な腫瘍形成、例えば奇形腫を有さないであろう。一実施形態において、腫瘍細胞で処置された陽性対照動物は、8週間の観察にわたってキャリパーによって測定される、かなりの腫瘍、例えば奇形腫の大きさを実証するであろう。

【1110】

実施例103：フソソームは、インビボで対象のレシピエント細胞に活性タンパク質を送達する

この実施例は、フソソームがインビボで対象にタンパク質を送達することができることを実証する。これは、核編集タンパク質Creの送達によって例示される。細胞内に入ると、Creは核に移行し、2つのLoxP部位の間でDNAを再結合および切除する。2つのLoxP部位間のDNAが停止コドンであり、赤色蛍光タンパク質tdTomatoなどの遠位蛍光タンパク質の上流にある場合、Creを媒介した組換えを顕微鏡で測定することができる。

【1111】

Takara (Cre Recombinase Gesicles, Takara製品631449) から購入したCREおよびフソゲンVSV-Gを含むフソソームを、B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sortm9 (CAG-tdTomato) Hze/Jマウス (Jackson Laboratories系統007909) に注射した。表14に記載されるように、動物に、解剖学的部位、注射量、および注射部位で注射した。tdTomato (FVB.129S6 (B6)-GT (ROSA) 26Sortm1 (Luc) Kael/J, Jackson Laboratories系統005125) を有さず、フソソームを注射したマウスおよびフソソームを注射しなかったB6.Cg-Gt (ROSA) 26Sortm14 (CAG-tdTomato) /Jマウスを、陰性対照として使用した。

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 1 4：注射パラメーター

脳	1 0 u l	前後軸：－2 横／中心軸：1. 8 腹： 1. 5 側：右
眼	1 u l	硝子体内
肝臓	2 5 u l	前頭葉の中心
脾臓	1 0 u l	縦方向および横方向のほぼ中央
腎臓	2 0 u l	左腎臓の中心
小腸のライニング	1 0 u l	腹膜壁に最も近い小腸のループを、腹膜の 外側で隔離し、ライニングに注入した。
心臓	5 u l	頂点付近
白い脂肪（精巣上体脂肪パッド）	2 5 u l	左、上、および中央
褐色脂肪（肩甲骨内）	2 5 u l	左葉、可能な限り中央
肺	1 0 u l	下葉右肺
精巣	1 0 u l	左精巣、可能な限り中央
卵巣	1 u l	左卵巣、可能な限り中央

10

20

【1 1 1 2】

注射から2日後、動物を殺処分し、試料を収集した。試料を、2 % P F Aで8時間固定し、3 0 %スクロースで一晩固定し、O C Tへの即時包埋およびスライドへのセクションングのために出荷した。スライドは、D A P Iを用いて核を染色した。D A P Iおよびt d T o m a t o 蛍光を、顕微鏡で画像化した。

【1 1 1 3】

表 1 4 に列挙されているすべての解剖学的部位は、t d T o m a t o 蛍光を示した（図 9）。さらに、t d T o m a t o のために蛍光顕微鏡を使用して、筋肉組織への送達を確認した（図 1 1）。陰性対照マウスは、t d T o m a t o 蛍光を有するいかなる組織も有さなかった。この結果は、フソソームが様々な解剖学的部位のマウスの細胞でt d T o m a t o 蛍光をオンにできることと、マウスがフソソームで処理されていない場合、またはマウスがそれらのゲノムにt d T o m a t o を有さない場合、これが発生しないことと、を示す。したがって、フソソームは、インビボでマウス細胞の核に、活性なC r e リコンビナーゼを送達する。

30

【1 1 1 4】

異なる投与経路により、インビボで組織にフソソームを送達送達することができることも示された。T a k a r a (C r e R e c o m b i n a s e G e s i c l e s、T a k a r a 製品 6 3 1 4 4 9) から購入したC R E およびフソゲンV S V - Gを含むフソソームを、F V B . 1 2 9 S 6 (B 6) - G T (R O S A) 2 6 S o r t m 1 (L u c) K a e l / J (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s 系統 0 0 5 1 2 5) に筋肉注射で（右前脛骨筋に5 0 u l）、腹腔内で（腹膜腔に5 0 u l）、および皮下に（背面皮膚下で5 0 u l）注射した。

40

【1 1 1 5】

脚、腹側、および背面皮膚を、4 5 秒間化学脱毛剤を使用して領域を脱毛し、続いて、水で3回すすぐことによって、それぞれ、筋肉内、腹腔内、および皮下注射用に調製した。

【1 1 1 6】

50

注射後3日目に、インビボ画像システム (Perkin Elmer) を使用して、生物発光の動物全体の画像を取得した。画像化する5分前に、ルシフェラーゼを視覚化するために、マウスに150mg/kgの用量で生物発光基質 (Perkin Elmer) を腹腔内注射した。画像システムは、すべてのデバイス設定を補正するために較正された。

【1117】

3つすべての経路による投与は、インビボでのマウス細胞への活性Creリコンビナーゼの成功した送達を示す発光をもたらした (図10)。

【1118】

結論として、フソソームは、インビボで対象の細胞に活性なタンパク質を送達することができる。

【1119】

実施例104：フソソームにおける核酸の超音波処理を媒介したローディング

この実施例は、超音波処理を介したフソソームへの核酸ペイロードのローディングについて説明する。超音波処理方法は、例えば、Lamichhane, TN, et al., *Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication*, Cell Mol Bioeng, (2016) に開示されており、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【1120】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。約 10^6 個のフソソームを、5~20 μ gの核酸と混合し、室温で30分間インキュベートする。次いで、フソソーム/核酸の混合物を、40kHzで操作した水浴ソニケーター (Brasonモデル番号1510R-DTH) を使用して、室温で30秒間超音波処理する。次いで、混合物を氷上に1分間置き、続いて40kHzで30秒間2回目の超音波処理を行う。次いで、混合物を4℃で5分間、16,000gで遠心分離して、核酸を含むフソソームをペレット化する。組み込まれていない核酸を含む上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁する。DNAをローディングした後、フソソームを、使用前に氷上に保持する。

【1121】

実施例105：フソソームにおける超音波処理を媒介したタンパク質のローディング

この実施例は、超音波処理を介したフソソームへのタンパク質ペイロードのローディングについて説明する。超音波処理方法は、例えば、Lamichhane, TN, et al., *Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication*, Cell Mol Bioeng, (2016) に開示されており、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【1122】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。約 10^6 個のフソソームを、5~20 μ gのタンパク質と混合し、室温で30分間インキュベートする。次いで、フソソーム/タンパク質の混合物を、40kHzで操作した水浴ソニケーター (Brasonモデル番号1510R-DTH) を使用して、室温で30秒間超音波処理する。次いで、混合物を氷上に1分間置き、続いて40kHzで30秒間2回目の超音波処理を行う。次いで、混合物を4℃で5分間、16,000gで遠心分離して、タンパク質を含むフソソームをペレット化する。組み込まれていないタンパク質を含む上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁する。タンパク質をローディングした後、フソソームを、使用前に氷上に保持する。

【1123】

実施例106：フソソームにおける核酸の疎水性担体を媒介したローディング

この実施例は、疎水性担体を介したフソソームへの核酸ペイロードのローディングについて説明する。疎水性ローディングの例示的な方法は、例えば、Didiot et al

10

20

30

40

50

., Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing, Molecular Therapy 24 (10): 1836-1847, (2016)に開示されており、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【1124】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。RNA分子の3'末端は、生物活性疎水性複合体（トリエチレングリコール-コレステロール）にコンジュゲートされる。500rpmで振盪しながら37℃で90分間インキュベートすることによって、約 10^6 個のフソソームを、1mlのPBS中の $10\mu\text{mol/l}$ のsiRNA複合体と混合する。疎水性担体は、RNAとフソソームの膜との結合を媒介する。いくつかの実施形態において、いくつかのRNA分子は、フソソームの内腔に組み込まれ、いくつかは、フソソームの表面上に存在する。TLA-110ローターを使用して、卓上型超遠心機で100,000gで、4℃で1時間超遠心分離することによって、RNAをローディングしたフソソームからローディングしていないフソソームを分離する。ローディングしていないフソソームは、上清に残り、RNAをローディングしたフソソームは、ペレットを形成する。RNAをローディングしたフソソームを、1mlのPBSに再懸濁し、使用前に氷上で保持する。

【1125】

実施例107：フソソームの処理

この実施例は、フソソームの処理について説明する。前述の実施例で説明した方法のうちのいずれかを介して生成されたフソソームは、さらに処理され得る。

【1126】

いくつかの実施形態において、フソソームは、まず、例えば、超音波処理によって均質化される。例えば、超音波処理プロトコルには、8の振幅設定でマイクロプローブを備えたMSEソニケーターを使用した5秒間の超音波処理が含まれる（Instrumentation Associates, N.Y.）。いくつかの実施形態において、この短期間の超音波処理は、フソソームの原形質膜を均一なサイズのフソソームに分解させるのに十分である。これらの条件下では、オルガネラ膜は、破壊されず、遠心分離（3,000rpm、15分間4℃）によって除去される。次いで、実施例16に記載されるように、フソソームを分画遠心法によって精製する。

【1127】

（例えば、Sterlitech, Washingtonから）市販のポリカーボネート膜またはPall Execia, Franceから市販の非対称セラミック膜（例えば、Membralox）を通したフソソームの押出は、フソソームサイズを比較的明確なサイズ分布に縮小するための効果的な方法である。典型的には、懸濁液は、所望のフソソームサイズ分布が達成されるまで膜を通して1回以上循環する。フソソームは、連続的により小さい細孔膜（例えば、400nm、100nm、および／または50nmの細孔サイズ）を通して押し出され、サイズの漸進的な減少および均一な分布を達成し得る。

【1128】

いくつかの実施形態において、典型的には、均質化、超音波処理、および／または押出ステップの前に、フソソーム生成の任意のステップで、得られたフソソームが医薬品をカプセル化するように、医薬品（治療剤など）を反応混合物に添加し得る。

【1129】

実施例108：フソソームおよび供給源細胞における総RNAの測定

この実施例は、供給源細胞と比較した、フソソーム中のRNAの量を定量化するための方法について説明する。一実施形態において、フソソームは、供給源細胞と同様のRNAレベルを有するであろう。このアッセイでは、RNAレベルは、総RNAを測定することによって決定される。

【1130】

フソソームは、前述の実施例で説明された方法のうちのいずれか1つによって調製される。フソソームおよび供給源細胞のタンパク質によって測定されるのと同じ質量の調製物を使用して、総RNAを単離し（例えば、Qiagen RNeasyカタログ番号74104などのキットを使用して）、続いて、RNAによる吸光度を評価するための標準分光法を使用して、RNA濃度を決定する（例えば、Thermo Scientific NanoDropを使用して）。

【1131】

一実施形態において、フソソーム中のRNAの濃度は、タンパク質の質量当たり供給源細胞の濃度の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%であろう。

【1132】

実施例109. 外因性フソゲンを発現するHEK-293T細胞の作製

この実施例は、外因性フソゲンを発現する組織培養細胞の作製について説明する。フソゲン遺伝子、VSV-G（水疱性口内炎ウイルスGタンパク質）を、pcDNA3.1ベクター（ThermoFisher）にクローニングした。次いで、VSV-G構築物を、Xfectトランスフェクション試薬（Takara）を使用して、HEK-293T細胞（ATCC、カタログ番号CRL-3216）にトランスフェクトした。トランスフェクトしたHEK-293T細胞は、GlutaMAX（GIBCO）、10%ウシ胎児血清（GIBCO）、およびペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質（GIBCO）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中で、37℃、5%CO₂で、さらなる実験に利用する前の適切な期間培養した。

【1133】

実施例110. タンパク質強化された融合性除核細胞を介したミトコンドリアの送達

細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現し、ミトコンドリアを標的とするDsRED蛍光タンパク質（mtDsRED）を発現することによってタンパク質が強化されたHeLa細胞を含む融合性除核細胞が生成された。VSV-Gを発現するHeLa細胞を、フィコール勾配による超遠心分離の標準手順に従って、除核して、除核細胞を得た（例えば、実施例1に記載のとおり）。レシピエント細胞は、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤であるザルシタピンでのHeLa細胞の長期間（6週間超）の培養によってミトコンドリアDNA（mtDNA）を欠くように生成されたHeLa Rho0細胞であった。HeLa Rho0細胞は、mtDNAが欠損しており（qPCRで評価）、ミトコンドリア酸素消費量が著しく不足していることを示す（タツノオトシゴ細胞外フラックスアッセイで測定される）。レシピエントのHeLa Rho0細胞はまた、2日間アデノウイルス形質導入を介してミトコンドリア標的GFP（mtGFP）を発現するように操作された。

【1134】

レシピエントHeLa Rho0細胞を、6ウェル皿に播種し、1時間後に除核したVSV-G HeLa細胞を、レシピエント細胞に適用した。次いで、細胞を、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。次いで、BD FACS Aria SORP細胞選別機を使用した蛍光支援細胞選別を介して、細胞を二重陽性（融合）細胞用を選別した。mtGFPおよびmtDsREDに対して二重陽性の細胞集団を評価して、除核したVSV-G HeLa細胞からミトコンドリア提供（mtDsRED）を受けたレシピエントHeLa Rho0細胞を選別した。mtGFPを、488nmのレーザーで励起し、513±26nmで、発光を獲得した。mtDsREDを、543nmのレーザーで励起し、570±26nmで、発光を獲得した。前方および側方散乱ゲーティングは、まず、細胞サイズの事象を捕捉し、小さな破片を廃棄するために使用した。mtGFPおよびmtDsREDに対する二重陽性の事象は、適切に各陰性対照試料が特定の蛍光マーカーに陽性の1%未満の事象を示す（すなわち、未染色および単一のmtGFP陽性試料は、mtDsREDに陽性の1%未満の事象を示す）最小レベルでゲーティングすることによって決定された。次いで、二重陽性の事象、ならびに単一陽性mtGFP（ミトコン

10

20

30

40

50

ドリア送達のないレシピエント細胞) および単一陽性mtDsRED (レシピエント細胞に融合しなかったドナー除核VSV-G HeLa細胞) の事象を、10% FBSおよび抗生物質を含むDMEM培地に選別した。選別した細胞を計数し、96ウェルタツノオトシゴプレート (Agilent) に1ウェル当たり25,000個の細胞を (各群で6反復で) 播種した。プレートを、37℃および5% CO₂で24時間インキュベートした。

【1135】

酸素消費アッセイは、成長培地を除去し、25mMのグルコースおよび2mMのグルタミン (Agilent) を含む低緩衝DMEM最小培地と交換し、温度およびpHの平衡に達するために37℃で60分間インキュベートすることによって開始した。次いで、附着した細胞を直接取り巻く培地中の酸素およびpHの細胞外フラックス変化を測定するために、XF96細胞外フラックス分析器 (Agilent) でマイクロプレートをアッセイした。定常状態の酸素消費量および細胞外酸性化速度を取得した後、ATPシンターゼを阻害するオリゴマイシン (5 μM)、およびミトコンドリアを脱共役するプロトンイオノフォア FCCP (カルボニルシアニド4-(トリフルオロメトキシ) フェニルヒドラゾン; 2 μM) を、マイクロプレートの各細胞ウェルに試薬送達チャンバーを通して連続的に注射して、最大酸素消費速度の値を得る。最後に、5 μMのアンチマイシンA (ミトコンドリア複合体IIIの阻害剤) を注射して、呼吸の変化が主にミトコンドリア呼吸によるものであることを確認した。基礎非結合 (オリゴマイシン耐性)、および最大 (FCCP誘発) のミトコンドリア呼吸速度を決定するために、アンチマイシンA呼吸速度を他の3つの呼吸速度から減じた。

【1136】

このアッセイを使用して、ドナーVSV-G HeLa細胞は、活性な基礎および最大酸素消費速度を示し、一方、送達のない標的細胞は、ミトコンドリアの酸素消費の3つの状態すべての低い速度を示すことが決定された。レシピエントHeLa Rho0細胞へのタンパク質が増強された除核VSV-G HeLa細胞を含むミトコンドリアの送達は、ドナーVSV-G HeLa細胞速度に近いミトコンドリア酸素消費速度への戻りを示した (図12)。

【1137】

実施例111: 小胞形成および遠心分離によるフソソームの生成および単離

この実施例は、小胞形成および遠心分離を介したフソソームの生成および単離について説明する。これは、フソソームが単離される方法のうちの1つである。フソソームは、以下のように調製された。9.2 × 10⁶個のHEK-293T (ATCC、カタログ番号CRL-3216) を、100mmのコラーゲンコーティング皿 (Corning) に、Xfectトランスフェクション試薬 (Takara、カタログ番号631317) を使用して、VSVgのオープンリーディングフレームを含有する10 μgのpCDNA3.1発現プラスミド、ならびに7.5 mLの完全培地 (GlutaMAX (ThermoFisher)、10% ウシ胎児血清 (ThermoFisher)、およびペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質 (ThermoFisher) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中のSV40核局在化配列を有するバクテリオファージP1 Creリコンビナーゼのオープンリーディングフレームを含有する15 μgのpCDNA3.1発現プラスミドで、逆トランスフェクトした。播種から12時間後、培地を吸引し、100 μMのATP (Sigma) を添加した15 mLの新鮮な完全培地と慎重に交換した。次いで、トランスフェクションから48時間後に上清を収集し、遠心分離 (2000 × g、10分) で清澄化し、0.45 μmのPESフィルター (Cell Treat) で濾過し、120,000 × gで1.5時間超遠心分離した。次いで、ペレット化した材料を、50% 1 × PBS / 50% 完全培地の氷冷混合液に再懸濁し、最大速度で2分間ボルトエクスし、さらなる実験に利用するまで-80℃で凍結した。

【1138】

実施例112: 巨大原形質膜フソソームの生成および単離

この実施例は、細胞小胞形成および遠心分離を介したフソソームの生成、ローディング

10

20

30

40

50

、および単離について説明する。これは、フソソームがカーゴで生成し、単離し、カーゴをローディングする方法のうちの1つである。

【1139】

フソソームは、以下のように調製された。9.2×10⁶個のHEK-293Tを、100mmのコラーゲンコーティング皿に、ポリマートランスフェクション試薬を使用して、VSVgのオープンリーディングフレームを含有する10μgのpCDNA3.1発現プラスミド、ならびに7.5mLの完全培地（DMEM+10% FBS+1倍のPen/Strep）中のSV40核局在化配列を有するバクテリオファージP1 Creリコンビナーゼのオープンリーディングフレームを含有する15μgのpCDNA3.1発現プラスミドで、逆トランスフェクトした。

【1140】

カーゴをローディングしたフソソームを生成するために、トランスフェクションから24時間後に、細胞を洗浄緩衝液（10mMのHEPES、pH7.4、150mMのNaCl、2mMのCaCl₂）中で2回、形成緩衝液（10mMのHEPES、pH7.4、2mMのCaCl₂、150mMのNaCl、25mMのPFA、2mMのDTT、125mMのグリシン）中で1回洗浄した。次いで、細胞を、形成緩衝液中で、37℃で最低6時間インキュベートした。フソソームを含む上清を収集し、2,000×gで5分間の遠心分離により細胞および細胞破片からフソソームを清澄化した。最後に、フソソームを、17,000×gで20分間の遠心分離により濃縮し、実験用の所望の緩衝液に再懸濁した。フソソームがレシピエント細胞と融合して、それらのカーゴを配達することができるかどうかを試験するために、再懸濁したフソソームを、所望の用量でレシピエント293T LoxPグリーン/レッドスイッチレポーター細胞に添加した。小胞の融合およびカーゴの送達を検証するために、レシピエント細胞のLoxP組換えを、自動蛍光顕微鏡（www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-tfx-automated-live-cell-imager/）を使用して画像化した。視野中のRFP陽性細胞を明確に特定するために、各ウェル中の総細胞集団は、まず、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定された。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用され得る。染色後、Hoechst培地を、通常のDMEM培地に交換し、RFP+細胞を特定した。

【1141】

Hoechst染色は、405nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化された。RFPは、523nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。異なる細胞群の画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、いかなるフソソームでも処理されなかったレシピエント細胞上のLED強度および積分時間を確立することによって得られた。取得設定は、RFP強度が最大ピクセル強度値であったが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。

【1142】

RFP陽性ウェルの分析は、蛍光顕微鏡に付属のGen 5ソフトウェア（BioTek）で実施された。画像は、幅10μm（Hoechst 33342）、幅20μm（RFP）のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。総細胞マスクは、Hoechst陽性細胞に設定された。バックグラウンド強度を大幅に上回るHoechst強度を有する細胞は、閾値処理され、Hoechst陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。

【1143】

総細胞マスク内で、RFP陽性細胞は、バックグラウンドを大幅に上回る細胞の閾値を再度設定し、細胞領域全体のHoechst（核）マスクを拡張して、RFP細胞蛍光全体を含めることによって特定された。視野毎の合計のうち、RFP陽性細胞の総数を計算

10

20

30

40

50

した。一実施形態において、フソソーム処理レシピエント細胞は、未処理細胞よりも視野当たりのRFP+細胞がより多かった（図13）。

【1144】

実施例113：押し出しによるフソソームの生成

この実施例は、膜を通して押し出すことによるフソソームの製造について説明する。

【1145】

VSV-GおよびCreリコンビナーゼを発現するHEK293T細胞を、TrypLeEでトリプシン処理し、収集し、500xgで5分間回転させて計数した。続いて、 30×10^6 個の細胞を、500nMのラトランキュリンBを補充したDMEM培地中の1mLの12.5%フィコールに37℃で30分間再懸濁した。細胞を除核するために、それらを、以下のフィコール画分からなる不連続フィコール勾配に移した（上から下へ）：5mLの12.5%フィコール、6mLの16%フィコール、10mLの18%フィコール。すべてのフィコール勾配画分は、500nMのラトランキュリンBを添加したDMEM培地中で作製した。勾配を、Ti-70ローター付きのBeckman SW-40超遠心機で、32,300RPMで、37℃で1時間回転させた。遠心分離後、除核したHEK293T細胞を、12.5%と16%フィコール層の間の勾配から収集し、PBSで希釈し、3,000xgで5分間回転させた。次いで、除核細胞を、1mLのPBSに再懸濁した。

【1146】

簡単に説明すると、押出のために、融合性除核HEK293T細胞を、PBS中のピシンコニン酸アッセイによってアッセイされるように、1~5mg/mLのタンパク質の密度に再懸濁した。細胞を1mLの気密シリンジで吸引し、5μm、0.8μm、または0.4μmの膜を1~20回通過した。濾液を収集し、LoxP:GFP/RFPレポーター構築物を安定して発現するHEK293T細胞を含む96ウェルプレートに添加した。16~24時間後、プレートを画像化し、RFPの発現について分析した（図14）。

【1147】

実施例114：細胞から自由に放出される融合性微小胞の単離

この実施例は、細胞から自由に放出される融合性微小胞の単離について説明する。融合性微小胞を、以下のように単離した。 9.2×10^6 個のHEK-293T(ATCC、カタログ番号CRL-3216)を、100mmのコラーゲンコーティング皿(Corning)に、Xfectトランスフェクション試薬(Takara、カタログ番号631317)を使用して、VSVgのオープンリーディングフレームを含有する10μgのpcDNA3.1発現プラスミド、ならびに7.5mLの完全培地(Glutamax(ThermoFisher)、10%ウシ胎児血清(ThermoFisher)、およびペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質(ThermoFisher)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM))中のSV40核局在化配列を有するバクテリオファージP1 Creリコンビナーゼのオープンリーディングフレームを含有する15ugのpcDNA3.1発現プラスミドで、逆トランスフェクトした。播種から12時間後、追加の7.5mLの完全培地を、慎重に添加した。200xgで10分間の遠心分離によって、細胞を、培養培地から分離した。上清を収集し、500xgで10分間で2回、2,000xgで15分間で1回、10,000xgで30分間で1回、および70,000xgで60分間で1回、連続して遠心分離した。自由に放出されたフソソームを、最後の遠心分離ステップでペレット化し、PBSに再懸濁し、70,000xgで再ペレット化した。最終ペレットを、PBSに再懸濁した。

【1148】

Wubbolts R et al. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: Potential Implications for their Function and Multivesicular Body Formation. J. Biol. Chem. 278:10963-10972 2003も参照のこと。

10

20

30

40

50

【1149】

実施例115：フソソームにおける転写活性の欠如

この実施例は、フソソームの生成に使用される親細胞、例えば供給源細胞と比較したフソソームにおける転写活性の定量化について説明する。転写活性は、親細胞、例えば供給源細胞と比較して、フソソームでは低いか、または存在し得ない。

【1150】

フソソームは、治療剤を送達するための筐体として使用することができる。高効率で細胞または局所組織環境に送達され得るmiRNA、mRNA、タンパク質、および／またはオルガネラなどの治療剤は、通常は、レシピエント組織中で病理学的に低いまたは高いレベルで活性ではない経路または活性のある経路を調節するために使用することができる。フソソームが転写することができない、またはフソソームがそれらの親細胞よりも低い転写活性を有し得るという観察は、核物質の除去が十分に起こったことを実証し得る。

【1151】

フソソームは、本明細書に記載されるように調製された。対照粒子（非融合フソソーム）を、pcDNA3.1が空のベクターで一過性に逆トランスフェクトしたHEK-293T細胞から生成した。次いで、フソソームの転写活性を、Click-iT EUイメージングキット（ThermoFisher）を使用することによって、フソソームの生成に使用される、親細胞、例えば供給源細胞と比較した。

【1152】

簡単に説明すると、60 μLの標準のVSV-Gフソソーム調製物に対応する約 3×10^6 個のフソソーム、およびフソソームを生成するために使用される 1×10^6 個の親細胞を、1 mMの蛍光標識可能なアルキンヌクレオシドEUを含む完全な6ウェルの低付着マルチウェルの1 mLの完全培地中に、37℃、5% CO₂で4時間、3重に播種した。陰性対照のために、 3×10^6 個のフソソームを、完全培地中でアルキンヌクレオシドEUを含まない6ウェル低付着マルチウェルプレートに播種した。4時間のインキュベーション後、製造業者の取扱説明書（ThermoFisher Scientific）に従って、試料を処理した。簡単に説明すると、陰性対照を含む細胞およびフソソーム試料を、下の表に示すように、1×PBS緩衝液で3回洗浄し、1×PBS緩衝液に再懸濁し、488 nmの励起アルゴンレーザーおよび530+/-30 nmのフィルター発光を使用してフローサイトメトリー（Attune、ThermoFisher）によって分析する。

フローサイトメーターの設定

【表15】

染料	同調レーザー／フィルター	レーザー波長	発光フィルター（nm）
AF488	BL1	488	530/30

【1153】

Attune NxTソフトウェアを、取得およびFlowJoを使用した分析のために使用した。データ取得のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、FSCおよびSSCチャンネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、530+/-30 nmの発光チャンネルの事象を対数スケールで表示した。細胞またはフソソームゲート内の最小10,000の事象が、各条件で収集された。データ分析のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、FSCおよびSSCチャンネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、530+/-30 nmの発光チャンネルの事象を対数スケールで表示した。陰性対照530+/-30 nmの発光を使用して、ゲートが1%未満の陽性を含むようにヒストグラム上にゲートを配置する場所を決定した。上記の分析基準を使用して、フソソームが70.17%±7.60 AF488事象を示した場合に、新規に転写したmRNA転写物にEuを含めることによる転写活性の代替的測定値として、親細胞

は、 $99.17\% \pm 0.20$ Eu:AF488 事象を示した (図 14B)。AF488 の蛍光強度の中央値、したがって、Eu の取り込み量についての測定値、したがって、新規に合成された mRNA 転写物の数は、親細胞では 9867 ± 3121 の事象であり、フソソームでは 1883 ± 366.3 の事象であった (図 14B)。この実施例は、フソソームが親細胞と比較して転写活性がないことを示す。

【1154】

実施例 116: DNA 複製または複製活性の欠如

この実施例は、フソソームの生成に使用される親細胞、例えば供給源細胞と比較したフソソームにおける DNA 複製の定量化について説明する。DNA 複製活性は、親細胞、例えば供給源細胞と比較して、フソソームでは低いか、または存在し得ない。

【1155】

フソソームは、治療剤を送達するための筐体として使用することができる。高効率で細胞または局所組織環境に送達され得る miRNA、mRNA、タンパク質、および／またはオルガネラなどの治療剤は、通常は、レシピエント組織中で病理学的に低いまたは高いレベルで活性ではない経路または活性のある経路を調節するために使用することができる。フソソームが DNA 複製をすることができない、またはフソソームがそれらの親細胞よりも低い DNA 複製活性を有し得るという観察は、核物質の除去が十分に起こったことを実証し得る。

【1156】

フソソームは、本明細書に記載されるように調製された。対照粒子 (非融合フソソーム) を、pcDNA3.1 が空のベクターで一過性に逆トランスフェクトした HEK-293T 細胞から生成した。次いで、フソソームの翻訳活性を、Click-iT EdU イメージングキット (ThermoFisher) を使用することによって、フソソームの生成に使用される、親細胞、例えば供給源細胞と比較した。

【1157】

簡単に説明すると、 $60 \mu\text{L}$ の標準の VSV-G フソソーム調製物に対応する約 3×10^6 個のフソソーム、およびフソソームを生成するために使用される 1×10^6 個の親細胞を、 1 mM の蛍光標識可能なアルキルヌクレオシド EdU を含む完全な 6 ウェルの低付着マルチウェルの 1 mL の完全培地中に、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で 4 時間、3 重に播種した。陰性対照のために、 3×10^6 個のフソソームを、完全培地中でアルキルヌクレオシド EdU を含まない 6 ウェル低付着マルチウェルプレートに播種した。4 時間のインキュベーション後、製造業者の取扱説明書 (ThermoFisher Scientific) に従って、試料を処理した。簡単に説明すると、陰性対照を含む細胞およびフソソーム試料を、下の表に示すように、 $1 \times \text{PBS}$ 緩衝液で 3 回洗浄し、 $1 \times \text{PBS}$ 緩衝液に再懸濁し、 638 nm の励起アルゴンレーザーおよび $670 + / - 14 \text{ nm}$ のフィルター発光を使用してフローサイトメトリー (Attune、ThermoFisher) によって分析する。

フローサイトメーターの設定

【表 16】

染料	同調レーザー／フィルター	レーザー波長	発光フィルター (nm)
AF47	RL1	638	670 / 14

【1158】

Attune NxT ソフトウェアを、取得および FlowJo を使用した分析のために使用した。データ取得のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、FSC および SSC チャネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、 $670 + / - 14 \text{ nm}$ の発光チャネルの事象を対数スケールで表示した。細胞またはフソソームゲート内の最小 10,000 の事象が、各条件で収集された。データ分析のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、F

SCおよびSSCチャネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、670+/-14nmの発光チャネルの事象を対数スケールで表示した。陰性対照670+/-14nmの発光を使用して、ゲートが1%未満の陽性を含むようにヒストグラム上にゲートを配置する場所を決定した。上記の分析基準を使用して、フソソームが6.23%±4.65 AF488事象を示した場合に、新規に合成したDNAにEduを含めることによる翻訳活性の代替的測定値として、親細胞は、56.17%±8.13 Edu:647事象を示した(図14C)。AF647の蛍光強度の中央値、したがって、Eduの取り込みの測定値、したがって、新規に合成したDNAは、親細胞では1311±426.2であり、フソソームでは116.6±40.74であった(図14C)。この実施例は、フソソームが親細胞と比較してDNA複製がないことを示す。

10

【1159】

実施例117: 脂質二重層構造を有するフソソーム

この実施例は、フソソームの組成について説明する。一実施形態において、フソソーム組成物は、中心に内腔を有する脂質二重層構造を含む。理論に拘束されることを望まないが、フソソームの脂質二重層構造は、標的細胞との融合を促進し、フソソームが異なる治療剤のローディングを可能にする。

【1160】

フソソームは、VSF-Gによる293F細胞の一過性トランスフェクション、続いて、トランスフェクションから48時間後、馴化培地の濾過および超遠心分離によって、前述の実施例に記載されるように調製された。各試料について、小分子量の汚染物質は、製造業者の取扱説明書に従って、エキソソームスピナラム(Invitrogen番号4484449)で除去した。Amicon Ultra 0.5mLの遠心分離フィルターUltracel 100K 100,000 NMWLユニット(Millipore番号UFC510024)を使用して、大量のタンパク質の除去、脱塩、および緩衝液の交換を行った。フソソームは、PBSで再構成された。試料毎に3つのホーリーカーボングリッド(電子顕微鏡サービス番号Q2100CR1.3)を、25秒間グロー放電させて、表面を親水性にした。試料を、短時間ボルテックスし、3μLのフソソームを、各グリッドの上部に置き、1~2分間インキュベートした。フソソームを、製造業者の取扱説明書に従って、Gatan Cryopluger 3半自動ブランジ凍結装置を使用して、ブランジ凍結した。凍結した水和グリッドを、FEI Tecnai Arctica Cryo-TEMの凍結移送ホルダーに装填した。次いで、フソソームを、低用量検索モードでスキャンし、23,500Xおよび39,000Xの倍率で200kVで画像化した(図15)。

20

30

【1161】

実施例118: フソゲン発現の検出

この実施例は、フソソームにおけるフソゲン発現の定量化について説明する。フソソームは、10cm皿でVSV-G、Creリコンビナーゼ、およびmiRFP670を使用したHEK293Tの一過性トランスフェクション、続いて、トランスフェクションから48時間後、馴化培地の濾過および超遠心分離によって、本明細書に記載されるように調製された。陽性対照は、未処理の一過性にトランスフェクトされた293T細胞であった。陰性対照は、トランスフェクトされていない293T細胞であった。

40

【1162】

フソソームを、RIPA緩衝液で溶解し、15,000xgで10分間遠心分離し、その後、タンパク質を上清から回収した。試料を、4~12%Bis-Tris変性SDS-PAGEゲルで泳動し、PVDf膜に移した。各膜は、PBS中の3%BSA+0.1%Triton X-100で30分間ブロックした。次いで、膜を、ブロッキング溶液中の抗VSVGタグ(ab1874、Abcam、Cambridge, MA)一次抗体で4℃で一晩インキュベートし、次いで、PBS中の0.1%Triton X-100で、それぞれ5分間3回洗浄した。次いで、膜を、ブロッキング溶液中のHRP結合二次

50

抗体（番号7074P2、Cell Signaling Technologies、Danvers、MA）で4℃で4時間インキュベートした。HRP基質を添加し、化学発光シグナルを、Alpha Innotech MultiImage3で記録した（図16）。

【1163】

実施例119：フソソームの平均サイズの測定

この実施例は、フソソームの平均サイズの測定について説明する。

【1164】

フソソームは、VSV-Gを使用したHEK293Tの一過性トランスフェクション、続いて、除核、およびその後のフィコールによる画分によって、本明細書に記載されるように調製された。フソソームは、市販のサブミクロン（Nanosight NS300、Malvern Instruments）および超ミクロン（Zeiss 780 Inverted Laser Confocal、Zeiss）測定システムを使用して測定して、平均サイズを決定した。各システムは、製造業者の取扱説明書に従ってソフトウェアとともに使用された。フソソームおよび親細胞を、PBSに再懸濁し、1μMのカルセインAMで染色して、約1mgのタンパク質/mLの最終濃度にした。次いで、フソソームおよび親細胞は、測定前にPBS中で100倍に希釈した。Nanosight NS300でのサブミクロン測定には、図17Aに示すパラメーターを使用した。780倒立共焦点顕微鏡での超ミクロン測定には、図17Bに示すパラメーターを使用した。

【1165】

すべてのフソソームは、単離から8時間以内に分析された。500nm未満の粒子の測定値は、NTAから取得し、Zeiss顕微鏡の粒子の500nm以上の測定値に追加して、50~20,000nmの完全な測定値を得た。フソソームおよび親細胞のサイズ分布を、図17Cに示す。図17Dに示すように、すべての粒子の分布を平均化して、フソソームの平均サイズを得た。フソソームは、親細胞よりも小さいサイズを有することができると企図される。フソソームは、親細胞の約73%以内のサイズを有することができると企図される。

【1166】

実施例120：フソソームの平均サイズ分布の測定

この実施例は、フソソームのサイズ分布の測定について説明する。

【1167】

フソソームは、VSV-Gを使用したHEK293Tの一過性トランスフェクション、続いて、除核、およびその後のフィコールによる画分によって、本明細書に記載されるように調製された。図18に示すように、フソソームは、実施例30の方法を使用して測定して、サイズ分布を決定した。フソソームは、試料の90%以内に、約50%、40%、30%、20%、10%、5%未満またはそれより少ない親細胞のサイズ分布の変動を有し得ると企図される。フソソームは、試料の90%以内に、58%より少なく親細胞のサイズ分布の変動を有し得ると企図される。

【1168】

実施例121：フソソームの平均体積

この実施例は、フソソームの平均体積の測定について説明する。フソソームのサイズ（例えば、体積）を変えることにより、異なるカーゴローディング、治療設計、または用途に対して万能であり得る。

【1169】

フソソームは、VSV-Gを使用したHEK293Tの一過性トランスフェクション、続いて、除核、およびその後のフィコールによる画分によって、本明細書に記載されるように調製された。陽性対照は、HEK293T細胞であった。

【1170】

実施例30に記載されるように、NTAと共焦点顕微鏡の組み合わせによる分析を使用して、フソソームのサイズを決定した。図19に示すように、フソソームの直径を測定し

10

20

30

40

50

、体積を計算した。フソソームは、直径が50 nmを超える平均サイズを有し得ると企図される。フソソームは、直径が129 nmの平均サイズを有し得ると企図される。

【1171】

実施例122：フソソーム中のオルガネラ含有量の測定

この実施例は、フソソーム中のオルガネラの検出について説明する。

【1172】

フソソームは、VSV-Gを使用したHEK293T細胞の一過性トランスフェクション、続いて、除核、およびその後のフィコールによる画分によって、本明細書に記載されるように調製された。小胞体（ER）、リソソーム、およびミトコンドリアの検出のために、フソソームまたはHEK293T細胞を、1 μ MのER染色（E34251、Thermo Fisher、Waltham、MA）、50 nMのリソソーム染色（L7528、Thermo Fisher Waltham、MA）、または100 nMのミトコンドリア染色（M22426、Thermo Fisher Waltham、MA）で染色した。

【1173】

染色したフソソームを、フローサイトメーター（Thermo Fisher、Waltham、MA）で泳動し、以下の表に従って各色素の蛍光強度を測定した。オルガネラの存在の検証は、染色したフソソームの蛍光強度を非染色のフソソーム（陰性対照）および染色された細胞（陽性対照）と比較することによって行われた。表Yに示す顕微鏡設定を使用して、フソソーム染色を実施した：

表Y：

【表Y】

染色	同調レーザー／ フィルター	レーザー波長	発光フィルター (nm)
ERトラッカーグリーン	BL1	488	530/30
Lysotrackerレッド	YL1	561	585/16
Mitotrackerディープ レッドFM	RL1	638	670/14

【1174】

図20に示すように、核除去から4時間後、フソソームは、小胞体（図20A）、ミトコンドリア（図20B）、およびリソソーム（図20C）に陽性に染色した。

【1175】

実施例123：可溶性タンパク質質量と不溶性タンパク質質量の比較

この実施例は、フソソームにおける可溶性タンパク質質量：不溶性タンパク質質量の比の定量化について説明する。フソソームにおける可溶性タンパク質質量：不溶性タンパク質質量の比は、場合によっては、有核細胞のその比に類似し得る。

【1176】

フソソームは、VSV-Gを使用したHEK293Tの一過性トランスフェクション、続いて、除核、およびその後のフィコールによる画分によって、本明細書に記載されるように調製された。フソソーム調製物は、標準的なビスニコニン酸アッセイ（BCA）（Pierce（商標）BCAプロテインアッセイキット、Thermo Fischer製品番号23225）を使用して、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比を決定するために試験を行った。可溶性タンパク質試料は、PBS中の 1×10^7 個の細胞または約1 mg/mLの総フソソームの濃度で調製したフソソームまたは親細胞を懸濁し、1,500 x gで遠心分離して、細胞をペレット化するか、または16,000 x gで遠心分離して、フソソームをペレット化することによって調製された。上清は、可溶性タンパク質画

分として収集した。

【1177】

次いで、フソソームまたは細胞を、PBSに再懸濁した。この懸濁液は、不溶性タンパク質画分を表す。

【1178】

1ウェル当たり0～15 μgのBSAの供給されたBSAを（2重に）使用して、標準曲線を作成した。測定した量が標準の範囲内になるように、フソソームまたは細胞調製物を希釈した。フソソーム調製物を2重に分析し、平均値を使用した。可溶性タンパク質濃度を、不溶性タンパク質濃度で除算して、可溶性タンパク質：不溶性タンパク質の比を得た（図21）。

【1179】

実施例124：標的細胞による融合の測定

麻疹ウイルス（MvH）の操作されたヘマグルチニン糖タンパク質および細胞表面上の融合タンパク質（F）を発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を含有するHEK-293T細胞に由来するフソソームを、本明細書に記載されるように生成した。MvHは、その天然の受容体結合が除去され、標的細胞特異性が細胞表面抗原を認識する一本鎖抗体（scFv）によって提供されるように操作され、この場合、scFvは、T細胞受容体に対して共受容体であるCD8を標的にするように設計される。フソゲンVSV-Gをその表面上に発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を含有するHEK-293T細胞に由来した対照フソソームを、使用した。標的細胞は、CMVプロモーター下で「Loxp-GFP-stop-Loxp-RFP」カセットを発現するように操作され、共受容体CD8aおよびCD8bを過剰発現するように操作された、HEK-293T細胞であった。非標的細胞は、「Loxp-GFP-stop-Loxp-RFP」カセットを発現するが、CD8a/bを過剰発現しない、同じHEK-293T細胞であった。標的または非標的レシピエント細胞を、30,000個の細胞/ウェルで黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種し、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中で37℃および5%CO₂で培養した。レシピエント細胞を播種してから4～6時間後、Creリコンビナーゼタンパク質およびMvH+Fを発現するフソソームを、DMEM培地中で標的または非標的のレシピエント細胞に適用した。レシピエント細胞を、10 μgのフソソームで処理し、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。

【1180】

自動顕微鏡（www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/）を使用して、細胞プレートを画像化した。所定のウェル中の総細胞集団は、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定された。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用される。Hoechstは、405 nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化された。GFPは、465 nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、一方、RFPは、523 nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。標的細胞および非標的細胞のウェルの画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞のLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1181】

取得設定は、Hoescht、RFP、およびGFP強度が最大ピクセル強度値にあるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。Hoeschtチャンネルでオートフォーカスし、GFPおよびRFPチャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。GFPおよびRFP陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡（<https://www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/>）を使用して行われた。

10

20

30

40

50

k.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/) に付属の Gen5 ソフトウェアを使用して実行された。

【1182】

画像は、幅 60 μm のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回る GFP 強度を有する細胞は、閾値処理され、GFP 陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、RFP チャンネルに適用された。次いで、RFP 陽性細胞 (Cre を受容したレシピエント細胞) の数を、GFP 陽性細胞 (送達を示さなかったレシピエント細胞) および RFP 陽性細胞の合計で除算して、標的および非標的レシピエント細胞集団内のフソソーム融合の量を記載する RFP 変換の割合を定量化した。標的融合 (標的レシピエント細胞へのフソソーム融合) の量について、RFP 変換値の割合は、標的レシピエント細胞 (すなわち、CD8 を発現する) であるレシピエント細胞の割合に正規化され、フィコエリトリン (PE) にコンジュゲートされた抗 CD8 抗体を染色することによって評価し、フローサイトメトリーによって分析した。最後に、標的融合の絶対量は、標的細胞融合量から非標的細胞融合量を減じることによって決定した (0 未満のいかなる値も 0 と見なされた)。

【1183】

このアッセイでは、操作された MvH (CD8) + F をその表面上に発現し、Cre リコンビナーゼタンパク質を含有する HEK-293T 細胞に由来するフソソームは、レシピエント細胞が「Loxp-GFP-stop-Loxp-RFP」カセットを発現する標的 HEK-293T 細胞であった場合、25.2 + / - 6.4 % の RFP 変換の割合を示し、これらのレシピエント細胞の 51.1 % が CD8 陽性であることが観察された。これらの結果から、RFP 変換の正規化された割合または標的融合の量は、標的融合では、49.3 + / - 12.7 % であると決定された。同じフソソームは、レシピエントが「Loxp-GFP-stop-Loxp-RFP」を発現するが、CD8 を発現しない非標的 HEK-293T 細胞であった場合、0.5 + / - 0.1 % の RFP 変換の割合を示した。上記に基づいて、MvH (CD8) + F フソソームの標的融合の絶対量は、48.8 % であると決定され、対照 VSV-G フソソームの標的融合の絶対量は、0 % であると決定された (図 22)。

【1184】

実施例 125: 膜タンパク質を送達するためのインビトロ融合

細胞表面上に、胎盤細胞間融合タンパク質シンシチン-1 (Syn1) および膜タンパク質、ヒト OX40 リガンド (hOX40L、CD134 のリガンド) を発現する HEK-293T 細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように作製した。hOX40L を発現するが、Syn1 を発現しない同じ細胞からの対照粒子 (非融合フソソーム) もまた、レシピエント細胞への hOX40L の非融合媒介性送達を制御するように作製した。レシピエント細胞は、ヒト前立腺がん細胞 (PC-3) であり、フソソームで処理する 4~6 時間前に、24 ウェル組織培養プレートに 120,000 個の細胞/ウェルで播種した。レシピエント細胞を、t=0 で 40 μg の Syn1 フソソームまたは対照粒子で処理し、37°C および 5 % CO₂ で 24 時間インキュベートした。

【1185】

フソソームまたは粒子で 24 時間インキュベートした後、レシピエント細胞を、トリプシン処理してプレートから剥離し、500 g で 5 分間の遠心分離によってペレット化し、PBS 中の 4 % PFA に 15 分間再懸濁して、細胞を固定した。固定後、細胞を、PBS で 2 回洗浄し、続いて、1 % ウシ血清アルブミン中 (PBS 中) で室温で 30 分間インキュベートした。次いで、hOX40L に対する一次抗体であり、ブリリアントバイオレット 421 色素 (BV421、BD Biosciences、カタログ番号 744881) にコンジュゲートした一次抗体を、0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で細胞に添加し、室温で 30 分間インキュベートした。次いで、細胞を、PBS で 3 回洗浄し、最後に、ヨウ化ブ

ロピジウムを含むPBSに再懸濁した。ヨウ化プロピジウムは、DNAに挿入することによって固定した／透過性細胞の細胞核を染色するため、個々の細胞と小さな破片またはフソソーム／粒子（ヨウ化プロピジウム陰性）を特定するために使用される。

【1186】

次いで、細胞は、Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher, Waltham, MA) を使用して、BV421およびヨウ化プロピジウムの蛍光について分析し、以下の表Zに従って各フルオロフォアの蛍光強度を決定した。

表Z. フローサイトメーターの設定

【表Z】

染色	同調レーザー／ フィルター	レーザー波長	発光フィルター (nm)
BV421	VL1	405	450／40
ヨウ化プロピジウム	YL1	561	585／16

【1187】

陰性対照は、同じ染色手順を使用して生成されるが、一次抗体は、添加されない。Attune NxT取得ソフトウェアは、取得のために使用され、FlowJoソフトウェアは、分析のために使用される。光散乱チャンネルは、線形利得に設定され、蛍光チャンネルは、対数尺度で設定され、最低10,000個の細胞が各条件で分析される。細胞事象は、まず、前方および側方散乱チャンネルでゲートされて、小さな破片事象を除去し、次いで、ヨウ化プロピジウム陽性細胞が、「すべての細胞」ゲートとしてゲートされる（ヨウ化プロピジウム陽性ゲートは、ヨウ化プロピジウムで染色しない細胞が0.5%未満の陽性細胞を示すように設定される）。次いで、「すべての細胞」ゲートに基づいてBV421蛍光の強度を調べ、BV421陽性細胞ゲートは、フソソーム／粒子で処理しないPC-3細胞が0.5%未満のBV421陽性細胞を示すように設定される（図23中の黒線ゲートを参照）。次いで、BV421陽性細胞値の割合を、各群に対して計算し、hOx40Lの送達による細胞の定量化率(%)として使用した。

【1188】

このアッセイで、Syn1およびhOx40Lを発現するHEK-293T細胞に由来するフソソームは、PC-3レシピエント細胞への43.6%のhOx40Lの送達を伴う細胞の割合を示した。Syn1を発現しない対照粒子は、11.4%のhOx40Lの送達を伴う細胞の割合を示した。対照粒子で観察されたhOx40Lの送達の量は、非フソソーム媒介性の送達によって生じるhOx40Lの送達のバックグラウンドレベルを表した。したがって、フソソーム媒介性のhOx40Lの送達を伴う細胞の割合を計算するために、対照粒子処理条件下でのhOx40Lの送達を伴う細胞の割合を、フソソーム処理条件下でのhOx40Lの送達を伴う細胞の割合から減じた。フソソーム媒介性のhOx40Lの送達を伴う細胞の割合は、32.2%であり（図23）、これは膜タンパク質のインビトロでのフソソーム媒介性の送達を実証した。

【1189】

実施例126: 細胞膜を横断してグルコースを輸送する能力の測定

細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を発現するHEK-293T細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように、小粒子フソソームを得るためのフィコール勾配による超遠心分離の標準手順に従って作製した。細胞膜を横断してグルコースを輸送するフソソームの能力を測定するために、生細胞でのグルコース取り込みをモニタリングするために使用することができる2-NBDG(2-(N-(7-ニトロベンズ-2-オキサー-1,3-ジアキソール-4-イル)アミノ)-2-デオキシグルコース)の蛍光グルコース類似体のレベルを定量化して、脂質二重層を横断する能動輸送を評価した。Bio

i s i o n I n c . (カ タ ロ グ 番 号 K 6 8 2) から市販のキットを、製造業者の取扱説明書に従ってアッセイに使用した。

【1190】

簡単に説明すると、フソソーム試料は、製造業者の取扱説明書に従って、ピソコニン酸アッセイ (B C A , T h e r m o F i s h e r , カ タ ロ グ 番 号 2 3 2 2 5) によって総タンパク質含有量について測定した。次に、卓上型遠心分離機で3000gで5分間遠心分離し、続いて、0.5%ウシ胎児血清を補充した400uLのDMEMに再懸濁することによって、40ugのフソソーム総タンパク質をペレット化した。これは各試料について2重に行われ、2重の1つは、グルコース取り込み阻害の対照として、グルコース取り込みを阻害する天然フェノールである4uLのフロレチン (キットに付属) で処理した。次いで、試料を、室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、フソソーム試料をペレット化し、これまでに調製した400uLのグルコース取り込みミックスに再懸濁した (製剤については、下の表Aを参照のこと) 。フロレチンで前処理した試料は、フロレチンとのグルコース取り込みミックスに再懸濁し、前処理されていない試料は、フロレチンの代わりに20uLのPBSを含むグルコース取り込みミックスに再懸濁した。また、フソソーム試料の並行セットを、フローサイトメトリー分析の陰性対照として、0.5%FBSのみを含むDMEM培地中に再懸濁した。

表A：グルコース取り込みミックス製剤

【表A】

試薬	体積 (u L)
0.5%FBSを含むDMEM培地	1880
2-NBDG試薬	20
グルコース取り込みエンハンサー	100
任意選択：フロレチン	20

【1191】

次いで、試料を、37℃、5%CO₂で30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をペレット化し、1mLの1倍の分析緩衝液 (キットに付属) で1回洗浄し、再度ペレット化し、400uLの1倍の分析緩衝液に再懸濁した。

【1192】

次いで、試料を、Invitrogen Attune NxT音響集束サイトメーターを使用したフローサイトメトリー分析によって2-NBDG取り込みについて測定した。2-NBDGを、488nmのレーザーで励起し、513±26nmで、発光を獲得した。前方および側方散乱ゲーティングは、まず、フソソームサイズの事象を獲得し、小さな破片を廃棄するために使用した。2-NBDG陽性の事象は、2-NBDG陰性対照試料が2-NBDG染色陽性の0.5%未満の事象を示す最小レベルでゲーティングすることによって決定された。次いで、フロレチン処理の有無によるフソソームのグルコース取り込みの値を計算するために、2-NBDG蛍光陽性のゲート細胞を、2-NBDGの平均蛍光強度 (F . I .) について評価した。

【1193】

このアッセイでは、VSV-GおよびCreを発現するHEK-293T細胞に由来するフソソームは、フロレチン治療なしで631.0+/-1.4の2-NBDG平均F.I.を示し、フロレチン治療ありで565.5+/-4.9の平均F.I.を示した (図24) 。

【1194】

実施例127：サイトゾルにおけるエステラーゼ活性の測定

C2C12細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように、小粒子フソソームを得るためのフィコール勾配による超遠心分離の標準手順に従って作製した。フソソーム

のサイトゾルのエステラーゼ活性を測定するために、試料を、カルセインAM (BD Pharmingen、カタログ番号564061)、フルオレセイン誘導体、および生細胞の細胞膜を受動的に通過し、無傷の膜および不活性な多剤耐性タンパク質を含む細胞によって保持される緑色蛍光カルセインに、サイトゾルエステラーゼによって変換される非蛍光生体色素で染色した。

【1195】

簡単に説明すると、フソソーム試料は、製造業者の取扱説明書に従って、ビスコニン酸アッセイ (BCA、ThermoFisher、カタログ番号23225) によって総タンパク質含有量について測定した。次に、卓上型遠心分離機で3000gで5分間遠心分離し、続いて、0.5%ウシ胎児血清を補充した400uLのDMEMに再懸濁することによって、20ugのフソソーム総タンパク質をペレット化した。膜透過性色素であるカルセイン-AMは、ジメチルスルホキシド中の10mMのストック溶液として、pH7.4のPBS緩衝液中の1mMの作業溶液として調製された。VSV-Gフソソームを、DMEM培地中で希釈した1μMのカルセインAM溶液で染色した。試料を、37℃の暗所で30分間インキュベートし、次いで、遠心分離によってペレット化した。PBS緩衝液で2回洗浄した後、フソソームを、PBSに再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

【1196】

試料を、Invitrogen Attune NxT音響集束サイトメーターを使用してカルセイン蛍光の保持について測定した。カルセインAMを、488nmのレーザーで励起し、513±26nmで、発光を獲得した。前方および側方散乱ゲーティングは、まず、フソソームサイズの事象を獲得し、小さな破片を廃棄するために使用した。カルセイン陽性の事象は、カルセイン陰性対照試料がカルセイン染色陽性の0.5%未満の事象を示す最小レベルでゲーティングすることによって決定された。次いで、フソソームのサイトゾルのエステラーゼ活性の値を計算するために、カルセインの平均蛍光強度 (F.I.) について評価した。

【1197】

このアッセイでは、C2C12細胞に由来するフソソームは、631.0+/-1.4のエステラーゼ活性 (平均カルセインF.I.) を示した (図25)。

【1198】

実施例128：フソソームにおけるアセチルコリンエステラーゼ活性の測定

細胞表面上に胎盤細胞間融合タンパク質シンシチン-1 (Syn1) を発現し、Creリコビナーゼタンパク質を発現するHEK-293T細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように作製した。アセチルコリンエステラーゼ活性は、製造業者の推奨に従って、FluoroCet Quantitationキット (System Biosciences、カタログ番号FCET96A-1) を使用して測定した。

【1199】

簡単に説明すると、フソソームを、120,000gで90分間超遠心分離してペレット化し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に慎重に再懸濁した。次に、フソソームは、製造業者の取扱説明書に従って、ビスコニン酸アッセイ (BCA、ThermoFisher、カタログ番号23225) によって総タンパク質含有量について定量化した。タンパク質濃度のBCA定量化後、1000ngの総フソソームタンパク質を、PBSで60uLの体積に希釈し、60uLの溶解緩衝液を添加して、粒子を溶解した。氷上で30分間インキュベートした後、試料を、FluoroCetアッセイで実行するように準備した。

【1200】

96ウェルプレートの2重のウェルで、50μLの溶解フソソーム試料を、50μLの緩衝液Aの作業ストックおよび50μLの緩衝液Bの作業ストックと混合した。並行して、2uLの提供された標準液を126uLの1倍の反応緩衝液にピペティングすることによって、標準曲線を作成した。次いで、この標準溶液を、5倍に段階希釈して、アセチ

10

20

30

40

50

ルコリンエステラーゼ活性の 2.0×10^8 、 1.0×10^8 、 5.0×10^7 、 2.5×10^7 、 1.25×10^7 、および 6.25×10^6 のエキソソーム等価物からなる 6 点標準曲線を作成した。次いで、 $50 \mu\text{L}$ の各ウェルを、96 ウェルプレートの 2 重のウェルで、 $50 \mu\text{L}$ の緩衝液 A の作業ストックおよび $50 \mu\text{L}$ の緩衝液 B の作業ストックと混合した。 $50 \mu\text{L}$ の 1 倍の反応緩衝液を、ブランクとして使用した。プレートを、側面を軽くたたいて混合し、続いて、室温で 20 分間暗所でインキュベートした。次いで、励起： $530 \sim 570 \text{ nm}$ および発光： $590 \sim 600 \text{ nm}$ に設定された蛍光プレートリーダーを使用して、プレートを直ちに測定した。プレートは、読む前に 30 秒間振とうした。

【1201】

次いで、ブランクウェルから RFU 値を減じた後、アセチルコリンエステラーゼ活性の既知のエキソソーム等価物に対して、相対蛍光単位 (RFU) をプロット化した。次いで、線形回帰線を計算し、式を使用して、測定された RFU 値からフソソーム試料のアセチルコリンエステラーゼ活性 (エキソソーム等価物における) を決定した。Syn1 フソソームの測定したアセチルコリンエステラーゼ活性を、表 B に示す。

【表 B】

表 B：フソソームおよび対照粒子におけるアセチルコリンエステラーゼ活性

試料	アセチルコリンエステラーゼ活性 (エキソソーム等価物)
Syn1 フソソーム	$6.83 \times 10^5 \pm 2.21 \times 10^5$

【1202】

実施例 129：代謝活性レベルの測定

細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス (VSV-G) からのエンベロープ糖タンパク質 G を発現し、Cre リコンビナーゼタンパク質を発現する HEK-293T 細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように作製した。フソソーム調製物の代謝活性レベルを決定するために、必要な試薬のすべてを提供する Sigma の市販キット (カタログ番号 CS0720) を使用して、クエン酸シンターゼ活性を評価した。クエン酸シンターゼは、オキサロ酢酸 (OAA) とアセチル CoA の反応を触媒してクエン酸を生成する、トリカルボン酸 (TCA) サイクル内の酵素である。アセチル-CoA の加水分解により、チオール基 (CoA-SH) を有する CoA の放出がある。チオール基は、化学試薬 5, 5-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と反応して、 412 nm で分光光度法で測定され得る黄色生成物を有する、5-チオ-2-ニトロ安息香酸 (TNB) を形成する。

【1203】

アッセイは、製造業者の推奨に従って実行された。簡単に説明すると、フソソーム試料は、製造業者の取扱説明書に従って、ビスコニン酸アッセイ (BCA、ThermoFisher、カタログ番号 23225) によって総タンパク質含有量について測定した。次に、卓上型遠心分離機で 3000 g で 5 分間遠心分離することによって、 $400 \mu\text{g}$ のフソソーム総タンパク質をペレット化した。フソソームを再度ペレット化し、氷冷 PBS に再懸濁することによって 1 回洗浄した。フソソームを再びペレット化し、上清を除去した。ペレットを、1 倍のプロテアーゼ阻害剤を含む $100 \mu\text{L}$ の Cell Lytic M 緩衝液に溶解した。ピペティングによる混合後、溶解した試料を、室温で 15 分間インキュベートして溶解を完了した。次いで、試料を、 $12,000 \text{ g}$ で 10 分間遠心分離し、上清を新しい微量遠心管に移し、次のアッセイが実行されるまで -80°C で保存した。

【1204】

クエン酸シンターゼ活性アッセイを開始するために、すべてのアッセイ溶液を、使用前に室温まで加温した。溶解したフソソーム試料を、下の表 C に従ってアッセイ溶液と混合した：

【表 C】

表C：96ウェルプレート中でのクエン酸シンターゼ活性測定の実験スキーム

試料	アッセイ緩衝液	30 mMのアセチルCoA溶液	10 mMのDTNB溶液	10 mMのOAA溶液 (最後に添加)
4 μ L	182 μ L	2 μ L	2 μ L	10 μ L

【1205】

表C中の体積は、96ウェルプレートの1つのウェルの体積を表す。試料を、2重に測定した。反応物のすべての成分を混合し、96ウェルプレートの1つのウェルにピペティングした。次いで、ベースライン反応を測定するために、412 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで1.5分間分析した。次いで、10 μ Lの10 mMのOAA溶液を、各ウェルに添加して反応を開始した。プレートを、マイクロプレートリーダーで10秒間振とうした後、10秒毎に測定しながら412 nmでの吸光度を1.5分間読み取った。

【1206】

クエン酸シンターゼ活性を計算するために、412 nmでの吸光度を、各反応の時間に対してプロット化した。OAA添加前（内因性活性）およびその後（総活性）のプロットの線形範囲について、1分当たりの吸光度の変化を計算した。次いで、試料の総活性から内因性活性を減じることによって、正味のクエン酸シンターゼ活性を計算した。次いで、この値を使用して、製造業者によって提供された式および定数値に基づいてクエン酸シンターゼ活性を計算した。VSV-Gフソソームに対して測定されたクエン酸シンターゼ活性は、 $1.57 \times 10^{-2} \pm 1.86 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol} / \text{ug フソソーム} / \text{分}$ であった。

【1207】

実施例130：呼吸レベルの測定

細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように、小粒子フソソームを得るためのフィコール勾配による超遠心分離の標準手順に従って作製した。フソソーム呼吸は、タツノオトシゴ細胞外フラックス分析器（Agilent）によってミトコンドリア酸素消費率を測定することによって決定した。

【1208】

簡単に説明すると、フソソーム試料は、製造業者の取扱説明書に従って、ビスコニン酸アッセイ（BCA、ThermoFisher、カタログ番号23225）によって総タンパク質含有量について測定した。次に、卓上型遠心分離機で3000 gで5分間遠心分離し、続いて、25 mMのグルコースおよび2 mMのグルタミン（pH 7.4）を補充した150 μ LのXF Assay培地（Agilentカタログ番号103575-100）に再懸濁することによって、20 μ gのフソソーム総タンパク質をペレット化した。次いで、再懸濁した試料を、96ウェルのタツノオトシゴプレート（Agilent）の1つのウェルに添加した。

【1209】

酸素消費アッセイは、温度およびpHの平衡に達するために、96ウェルプレートタツノオトシゴプレートを37°Cで60分間試料とインキュベートすることによって開始した。次いで、フソソームを直接取り巻く培地中の酸素およびpHの細胞外フラックス変化を測定するために、XF96細胞外フラックス分析器（Agilent）で、マイクロプレートをアッセイした。定常状態の酸素消費量および細胞外酸性化速度を取得した後、ATPシンターゼを阻害するオリゴマイシン（5 μ M）、およびミトコンドリアを脱共役するプロトンイオノフォア FCCP（カルボニルシアニド4-（トリフルオロメトキシ）フェニルヒドラゾン；2 μ M）を、マイクロプレートの各ウェルに試薬送達チャンバーを通して連続的に注射して、最大酸素消費速度の値を得る。最後に、5 μ MのアンチマイシンA（ミトコンドリア複合体IIIの阻害剤）を注射して、呼吸の変化が主にミトコンドリア呼吸によるものであることを確認した。基礎非結合（オリゴマイシン耐性）、および最大

(FCCP誘発)のミトコンドリア呼吸速度を決定するために、アンチマイシンA呼吸速度を他の3つの呼吸速度から減じた。

【1210】

このアッセイを使用して、下の表Dに従って、ドナーVSV-Gフソソームが基底、脱共役、および最大酸素消費(呼吸)速度を示すことを決定した。

【表D】

表D：VSV-Gフソソームの呼吸速度

呼吸状態	ミトコンドリアの酸素消費(呼吸)速度 (pmol/分/20μgフソソーム) 平均値±標準誤差
基礎	11.3±3.0
非結合	10.1±2.3
最大	20.0±1.9

10

【1211】

実施例131：フソソームのホスファチジルセリンレベルの測定

細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)からのエンベロップ糖タンパク質Gを発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を発現するHEK-293T細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように、小粒子フソソームを得るためのフィコール勾配による超遠心分離の標準手順に従って作製した。フソソームのホスファチジルセリンレベルを測定するために、製造業者の取扱説明書に従って、Alexa Fluor 647色素とコンジュゲートした市販のアネキシンV(カタログ番号A23204)を使用して、アネキシンV染色を実施した。アネキシンVは、ホスファチジルセリンが細胞膜の外葉に露出するときにホスファチジルセリンに結合することができる細胞タンパク質であり、したがって、試料へのアネキシンV結合の読み出しは、試料中のホスファチジルセリンレベルの評価を提供することができる。

20

【1212】

簡単に説明すると、フソソーム試料は、製造業者の取扱説明書に従って、ビスコニン酸アッセイ(BCA、ThermoFisher、カタログ番号23225)によって総タンパク質含有量について測定した。次いで、卓上型遠心分離機で3000gで5分間遠心分離し、続いて、2%ウシ胎児血清を補充した400μLのDMEMに再懸濁することによって、40μgのフソソーム総タンパク質をペレット化した。1つの試料を、40μMのアンチマイシンAで処理した。次いで、試料を、37℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後、試料を、再度遠心分離によりペレット化し、100μLのアネキシン結合緩衝液(ABB; 10mMのHEPES、140mMのNaCl、2.5mMのCaCl₂、pH7.4)に再懸濁した。次いで、Alexa Fluor 647とコンジュゲートした5μLのアネキシンVを、(アネキシンV染色のない陰性対照を除く)各試料に添加した。試料を、室温で15分間インキュベートした後、400μLのABBを添加した。

30

40

【1213】

次いで、試料を、Invitrogen Attune NxT音響集束サイトメーターを使用したフローサイトメトリー分析によってアネキシンVについて測定した。Alexa Fluor 647とコンジュゲートしたアネキシンVを、638nmのレーザーで励起し、670±14nmで、発光を獲得した。前方および側方散乱ゲーティングは、まず、フソソームサイズの事象を獲得し、小さな破片を廃棄するために使用した。Alexa Fluor 647(アネキシンV)染色に陽性の事象は、染色されていないアネキシンV陰性対照試料がAlexa Fluor 647染色に陽性の0.5%未満の事象を示す最小レベルでゲーティングすることによって決定された。次いで、Alexa Fluor 647染色に陽性のゲート事象を、親母集団全体のアネキシンV陽性事象の割合(前方／

50

側方散乱ゲートのフソソームサイズの事象)について評価し、この値を、フソソーム試料中のホスファチジルセリンレベルの定量化として使用した。

【1214】

このアッセイでは、VSV-GおよびCreを発現するHEK-293T細胞に由来するフソソームは、アンチマイシンA治療なしで63.3±2.3%のアネキシンV陽性フソソームの割合を示し、アンチマイシンA治療ありで67.6±5.7%のアネキシンV陽性フソソームの割合を示した。

【1215】

実施例132：平均ミトコンドリア膜電位の測定

細胞表面上に水泡性口内炎ウイルス(VSV-G)からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を発現するHEK-293T細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように、小粒子フソソームを得るためのフィコール勾配による超遠心分離の標準手順に従って作製した。フソソームの平均ミトコンドリア膜電位レベルを測定するために、ミトコンドリア膜電位に感受性を持つ市販の色素、テトラメチルローダミン、エチルエステル、過塩素酸塩(TMRE; Abcam、カタログ番号T669)を使用して、ミトコンドリア膜電位を評価した。試料中のミトコンドリアの量へのTMRE蛍光強度(FI)を正規化するために、MitoTracker Green FM色素(MTG; ThermoFisher、カタログ番号M7514)を使用して試料を共染色して、MTG FI、ひいては試料中のミトコンドリアの量へのTMRE FIを正規化した。さらに、カルボニルシアニド-pトリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン(FCCP; Sigmaカタログ番号C2920)を使用して並行セットの試料を処理して、ミトコンドリア膜電位を完全に脱分極し、そのため、TMRE FIの減少に基づいてミトコンドリア膜電位(ミニボルト)の定量化を可能にした。

【1216】

簡単に説明すると、フソソーム試料は、製造業者の取扱説明書に従って、ビスコニン酸アッセイ(BCA、ThermoFisher、カタログ番号23225)によって総タンパク質含有量について測定した。次いで、卓上型遠心分離機で3000gで5分間(処理されていないおよびFCCP処理した複製に対して4重の試料中で)遠心分離し、続いて、2%ウシ胎児血清を補充し、それぞれ、30nMおよび200nMの最終濃度でTMREおよびMTG色素を含む100μLのDMEMに再懸濁することによって、40μgのフソソーム総タンパク質をペレット化した。フソソーム試料の並行セットは、陰性対照として染色しないままであった。試料を、37℃で45分間インキュベートした。インキュベーション後、試料を、遠心分離によりペレット化し、30nmのTMREを含む、400μLのフェノールレッドを含まないDMEM培地に再懸濁した。フローサイトメトリーによる評価前に5分間、1組の複製を20μMのFCCPで処理した。

【1217】

次いで、試料を、Invitrogen Attune NxT音響集束サイトメーターを使用したフローサイトメトリー分析によってアネキシンVについて測定した。MTGを、488nmのレーザーで励起し、530±30nmで、発光を獲得した。TMREを、561nmのレーザーで励起し、585±16nmで、発光を獲得した。前方および側方散乱ゲーティングは、まず、フソソームサイズの事象を獲得し、小さな破片を廃棄するために使用した。MTGおよびTMRE染色に陽性の事象は、非染色の対照試料がMTGまたはTMRE染色に陽性の0.5%未満の事象を示す最小レベルでゲーティングすることによって決定された。次いで、MTGおよびTMRE染色に陽性のゲート事象を、MTGおよびTMREの平均FIについて評価した。

【1218】

膜電位値(ミリボルト、mV)は、MTG FI値へのTMRE FI値を正規化した後のTMREの強度に基づいて計算される。このTMRE/MTG比の値により、試料中のミトコンドリアの量へのTMRE強度を正規化することができる。未処理試料およびFCCP処理試料の両方のTMRE/MTG比の値は、(TMREがNernstian様式

10

20

30

40

50

でミトコンドリアに蓄積するとき) T M R E 蛍光に基づいてミトコンドリア膜電位を決定することができる修正されたネルンスト方程式(下記参照)を使用して膜電位(ミリボルト)を決定するために計算し、使用する。フソソーム膜電位は、次の式で計算される:

$$(mV) = -61.5 \times \log(FI(\text{未処理}) / FI(FCCP\text{処理}))$$
この式を使用すると、V S V - G フソソーム試料の計算されたミトコンドリア膜電位は、 -29.6 ± 1.5 ミリボルトであった。

【1219】

実施例133:対象における持続性半減期の測定

この実施例は、フソソーム半減期の測定について説明する。フソソームは、調製前に2時間急性トランスフェクションを受け、それらは、本明細書に記載の方法を使用して得られ、ホタルルシフェラーゼmRNAがロードされた。

【1220】

調製後、フソソームを、遠心分離によってペレット化し、フソソーム粒子を、注射用の滅菌リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。フソソームを欠いている緩衝液を、陰性対照として使用した。

【1221】

フソソームは、前脛骨筋への筋肉内(IM)投与を介して、9週齢のFVB(Jackson Laboratory、001800)マウスに送達された。溶液は、内容物の継続的な無菌性を確保する方法で処理された。麻酔は、誘導チャンパーで行われ(約4%イソフルラン、効果を得るまで)、ノーズコーンを介して維持され(約2%イソフルラン、効果を得るまで)、動物を温めた(35℃)手術台に置いた。前脛骨筋(TA)筋肉の中央腹部の皮膚を、その領域を脱毛する(45秒間Nair Hair Removerクリーム、続いて70%エタノールで領域を洗浄する)ことによって調製した。ツベルクリン注射器を使用して、50μLのフソソーム溶液15μgのタンパク質/μL、平均値(標準誤差))を、TAの腹部に筋肉内注射した。注射が完了したら、注射器を取り外し、注射部位に圧力を加えた。対照と同じ方法を利用して、対側脚を、PBSで治療した。

【1222】

送達後、mRNAルシフェラーゼは、レシピエント細胞質でルシフェラーゼタンパク質に翻訳する。D-ルシフェリン(Perkin Elmer、150mg/kg)の腹腔内(I.P.)投与により、インビボ生物発光イメージングを介したルシフェラーゼ発現の検出が可能になった。動物を、動物の動きを防ぐためにコーン麻酔器(イソフルラン)を収容するインビボ生物発光イメージングチャンパー(Perkin Elmer)に配置した。D-ルシフェリンの薬物動態的クリアランスによる最大の生物発光シグナルを観察するために、注入後3~35分間に光子収集が行われた。最大放射輝度は、光子/秒/cm²/ラジアンで記録された。領域全体の放射輝度を積分する全光束は、Living Image Software(Perkin Elmer)内の関心領域(ROI)ツールを使用して定量化され、光子/秒で報告された。フソソーム処理およびPBS処理した前脛骨筋組織を、陰性対照(陰性対照のスレッドなし(胸部)および病期)と比較して、特に放射輝度測定のためにモニタリングした。ホタルルシフェラーゼの存在を観察するために、注射から1、6、12、24、および48時間後に測定が行われた。

【1223】

図26A~26Bに示すように、ホタルルシフェラーゼの存在の証拠は、動物のレシピエント組織における生物発光イメージングによって検出された。

【1224】

実施例134:対象における標的電位の測定(Bivs-Cre Gesicles)

この実施例は、特定の身体部位を標的とするフソソームの能力を評価する。フソソームは、本明細書に記載の方法を使用して得られ、cre-リコンビナーゼタンパク質がロードされた。

【1225】

2用量のフソソーム(1倍および3倍)を、Loxpルシフェラーゼ(Jackson

10

20

30

40

50

Laboratory、005125)に送達し、マウスに尾静脈を介して静脈内(I.V.)注射した。マウスを、約5分間(またはマウスがひげを過度に手入れし始めるまで)加熱ランプ(250W(赤外線)加熱ランプ電球を使用)の下に置き、尾静脈を拡張した。マウスを拘束具の上に置き、尾部を70%エタノールで拭き取り、静脈をより良好に視覚化した。

【1226】

ツベルクリン注射器を使用して、200 μ Lのフソソーム1倍溶液($8.5 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^8$ 粒子/ μ L、平均値(標準誤差))または3倍溶液($2.55 \times 10^9 \pm 1.4 \times 10^8$ 粒子/ μ L、平均値(標準誤差))をIV注射した。注射が完了したら、注射器を取り外し、注射部位に圧力を加えた。

【1227】

融合後、CREタンパク質は、核に移動して組換えを実行し、ルシフェラーゼの構成的発現をもたらした。処置から3日後、対象の腹部領域を、その領域を脱毛する(45秒間Nair Hair Removerクリーム、続いて70%エタノールで領域を洗浄することによって調製した。次いで、対象を、腹腔内投与を介してDールシフェリン(Perkin Elmer、150mg/kg)で処置した。これにより、インビボ生物発光イメージングを介したルシフェラーゼ発現の検出が可能になった。動物を、動物の動きを防ぐためにコーン麻酔器(イソフルラン)を収容するインビボ生物発光イメージングチャンバー(Perkin Elmer)に配置した。Dールシフェリンの薬物動態的クリアランスによる最大の生物発光シグナルを観察するために、注入後3~15分間に光子収集が行われた。最大放射輝度は、光子/秒/cm²/ラジアンで記録された。領域全体の放射輝度を積分する全光束は、Living Image Software(Perkin Elmer)内の関心領域(ROI)ツールを使用して定量化され、光子/秒で報告された。

【1228】

図27A~27Bに示すように、フソソームによるタンパク質(Creリコンビナーゼ)送達の証拠は、動物のレシピエント組織での生物発光イメージングによって検出された。シグナルは、主に脾臓および肝臓で見られ、3倍の群が最高のシグナルを示した。

【1229】

全身イメージングの後、マウスを頸部脱臼させ、殺処分から5分以内に肝臓、心臓、肺、腎臓、小腸、脾臓、および脾臓を収集し、イメージングした。フソソームによる肝臓および脾臓へのタンパク質(Creリコンビナーゼ)送達の証拠は、動物の抽出されたレシピエント組織の生物発光イメージングによって検出された。これは、図28A~28Bにおいて見出され得る。シグナルは、脾臓で最も高く、心臓で最も低く、3倍の群は、最も有意なシグナルを示した(心臓と比較して、 $p = 0.0004$)。

【1230】

実施例135：リソソーム酸性化に無関係である経路を介したフソソームの送達

多くの場合、標的細胞への複雑な生物学的カーゴの侵入は、エンドサイトーシスによって達成される。エンドサイトーシスは、カーゴがエンドソームに入ることを必要とし、エンドソームは酸性化されたリソソームに成熟する。不都合なことに、エンドサイトーシスを介して細胞に入るカーゴは、エンドソームまたはリソソームに閉じ込められ、細胞質に到達できなくなり得る。カーゴはまた、リソソームの酸性条件によって損傷し得る。一部のウイルスは、標的細胞への非エンドサイトーシス侵入が可能であるが、このプロセスは、完全には理解されていない。この実施例は、ウイルスフソゲンが残りのウイルスから分離され、他のウイルスタンパク質を欠いているフソソームに非エンドサイトーシス侵入を付与できることを示す。

【1231】

細胞表面上にニパウイルス受容体結合Gタンパク質および融合Fタンパク質(NivG+F)を発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を発現するHEK-293T細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように、小粒子フソソームを得るためのフィコー

10

20

30

40

50

ル勾配による超遠心分離の標準手順に従って作製した。非エンドサイトーシス経路を介したレシピエント細胞へのフソソームの送達を実証するために、NivG+Fフソソームを使用して、CMVプロモーター下で「Loxp-GFP-stop-Loxp-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を処理した。NivFタンパク質は、pH非依存性エンベロープ糖タンパク質であり、活性化およびその後の融合活性のために環境酸性化を必要としないことが示されている(Tamin, 2002)。

【1232】

レシピエント細胞を、30,000個の細胞/ウェルで黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞を播種してから4~6時間後、Creリコンビナーゼタンパク質を発現するNivG+Fフソソームを、DMEM培地中で標的または非標的のレシピエント細胞に適用した。フソソーム試料は、まず、製造業者の取扱説明書に従って、ビスコニン酸アッセイ(BCA、ThermoFisher、カタログ番号23225)によって総タンパク質含有量について測定した。レシピエント細胞を、10μgのフソソームで処理し、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。NivG+Fフソソームを介したCre送達が非エンドサイトーシス経路によって行われたことを実証するために、NivG+Fフソソーム処理を受けているレシピエント細胞の並行ウェルを、エンドソーム/リソソーム酸性化の阻害剤、バフィロマイシンA1(Baf; 100nM; Sigma、カタログ番号B1793)で同時処理した。

【1233】

自動顕微鏡(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)を使用して、細胞プレートを画像化した。所定のウェル中の総細胞集団は、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定された。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用された。Hoechst染色は、405nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化された。GFPは、465nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、一方、RFPは、523nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。標的細胞および非標的細胞のウェルの画像は、まず、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞を含む陽性対照ウェルのLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1234】

取得設定は、Hoescht、RFP、およびGFP強度が最大ピクセル強度値にあるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。Hoeschtチャンネルでオートフォーカスし、GFPおよびRFPチャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。GFPおよびRFP陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡(<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>)に付属のGen5ソフトウェアを使用して実行された。

【1235】

画像は、幅60μmのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回るGFP強度を有する細胞は、閾値処理され、GFP陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、RFPチャンネルに適用された。次いで、RFP陽性細胞(Creを受容したレシピエント細胞)の数を、GFP陽性細胞(送達を示さなかったレシピエント細胞)およびRFP陽性細胞の合計で除算して、レシピエント細胞によるフソソーム融合の量を示すRFP変換の割合を定量化した。

【1236】

このアッセイでは、NivG+Fをその表面上に発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を含むHEK-293T細胞に由来するフソソームは、リソソーム非依存性経路を介した有意な送達を示し、レシピエント細胞をBafで同時処理し、エンドサイトーシスを媒介した取り込みを阻害する場合にでさえ、NivG+FフソソームによるCreカーゴの有意な送達からも明らかなように、非エンドサイトーシス経路を介した侵入と一致する(図29)。この場合、Bafでの同時処理によるカーゴ送達の阻害は、23.4%であった。

【1237】

実施例136：リソソーム酸性化を伴う経路を介したフソソームの送達

細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)からのエンベロップ糖タンパク質Gを発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を発現するHEK-293T細胞からのフソソームを、本明細書に記載されるように、小粒子フソソームを得るためのフィコール勾配による超遠心分離の標準手順に従って作製した。エンドサイトーシス経路を介したレシピエント細胞へのフソソームの送達を実証するために、VSV-Gフソソームを使用して、CMVプロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を処理した。VSV-Gは、後期エンドソームまたはリソソームの低pH環境(pH約6)で活性化されることが示されているpH依存性エンベロップ糖タンパク質である(Yao, 2003)。レシピエント細胞を、30,000個の細胞/ウェルで黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞を播種してから4~6時間後、Creリコンビナーゼタンパク質を発現するVSV-Gフソソームを、DMEM培地中で標的または非標的のレシピエント細胞に適用した。フソソーム試料は、まず、製造業者の取扱説明書に従って、ピソコン酸アッセイ(BCA, ThermoFisher、カタログ番号23225)によって総タンパク質含有量について測定した。レシピエント細胞を、10µgのフソソームで処理し、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。VSV-Gフソソームを介したCre送達がエンドサイトーシス経路によって行われたことを実証するために、VSV-Gフソソーム処理を受けているレシピエント細胞の並行ウェルを、エンドソーム/リソソーム酸性化の阻害剤、バフィロマイシンA1(Baf; 100nM; Sigma、カタログ番号B1793)で同時処理した。

【1238】

自動顕微鏡(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)を使用して、細胞プレートを画像化した。所定のウェル中の総細胞集団は、Hoechst 33342でDMEM培地中の細胞を10分間染色することによって決定された。Hoechst 33342は、DNAに挿入することによって細胞核を染色するため、個々の細胞を特定するために使用された。Hoechst染色は、405nmのLEDおよびDAPIフィルターキューブを使用して画像化された。GFPは、465nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、一方、RFPは、523nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。細胞のウェルの画像は、まず、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞を含む陽性対照ウェルのLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1239】

取得設定は、Hoescht、RFP、およびGFP強度が最大ピクセル強度値にあるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。Hoeschtチャンネルでオートフォーカスし、GFPおよびRFPチャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。GFPおよびRFP陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡(www.biotek.com/pr

10

20

30

40

50

products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/を参照)に付属のGen5ソフトウェアを使用して実行された。

【1240】

画像は、幅60 μm のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回るGFP強度を有する細胞は、閾値処理され、GFP陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、RFPチャンネルに適用された。次いで、RFP陽性細胞(Creを受容したレシピエント細胞)の数を、GFP陽性細胞(送達を示さなかったレシピエント細胞)およびRFP陽性細胞の合計で除算して、レシピエント細胞によるフソソーム融合の量を示すRFP変換の割合を定量化した。

10

【1241】

このアッセイでは、VSV-Gをその表面上に発現し、Creリコンビナーゼタンパク質を含むHEK-293T細胞に由来するフソソームは、レシピエント細胞をBafで同時処理し、エンドサイトーシスを媒介した取り込みを阻害する場合に、VSV-GフソソームによるCreカーゴ送達の有意な阻害からも明らかのように、エンドサイトーシス経路を介した有意な送達を示した(図30)。この場合、Bafでの同時処理によるカーゴ送達の阻害は、95.7%であった。

【1242】

実施例137:オルガネラの送達

20

細胞表面上に胎盤細胞間融合タンパク質シンシチン-1(Syn1)を発現し、ミトコンドリアを標的とするDsRED蛍光タンパク質(mtDsRED)を発現するHeLa細胞を含むフソソームが、作製された。レシピエント細胞は、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤であるザルシタピンでのHeLa細胞の長期間(6週間超)の培養によってミトコンドリアDNA(mtDNA)を欠くように生成されたHeLa Rho0細胞であった。HeLa Rho0細胞は、mtDNAが欠損しており(qPCRで評価)、ミトコンドリア酸素消費量が著しく不足していることを示す(タツノオトシゴ細胞外フラックスアッセイで測定される)。レシピエントのHeLa Rho0細胞はまた、2日間アデノウイルス形質導入を介してミトコンドリア標的GFP(mtGFP)を発現するように操作された。

30

【1243】

レシピエントHeLa Rho0細胞を、6ウェル皿に播種し、1時間後にSyn1 HeLa細胞フソソームを、レシピエント細胞に適用した。次いで、細胞を、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。次いで、BD FACS Aria SORP細胞選別機を使用した蛍光支援細胞選別を介して、細胞を二重陽性(融合)細胞用に選別した。mtGFPおよびmtDsREDに対して二重陽性の細胞集団を評価して、Syn1 HeLa細胞フソソームからミトコンドリア提供(mtDsRED)を受けたレシピエントHeLa Rho0細胞を選別した。mtGFPを、488nmのレーザーで励起し、513 $\pm$ 26nmで、発光を獲得した。mtDsREDを、543nmのレーザーで励起し、570 $\pm$ 26nmで、発光を獲得した。前方および側方散乱ゲーティングは、まず、細胞サイズの事象を獲得し、小さな破片を廃棄するために使用した。mtGFPおよびmtDsREDに対する二重陽性の事象は、適切に各陰性対照試料が特定の蛍光マーカーに陽性の1%未満の事象を示す(すなわち、未染色および単一のmtGFP陽性試料は、mtDsREDに陽性の1%未満の事象を示す)最小レベルでゲーティングすることによって決定された。次いで、二重陽性の事象、および単一陽性mtGFP(フソソーム送達のないレシピエント細胞)および単一陽性mtDsRED(レシピエント細胞に融合しなかったドナーフソソーム)の事象を、10%FBSおよび抗生物質を含むDMEM培地に選別した。選別した細胞を計数し、96ウェルタツノオトシゴプレート(Agilent)に1ウェル当たり25,000個の細胞を(各群で6反復で)播種した。プレートを、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。

40

50

【1244】

酸素消費アッセイは、成長培地を除去し、25 mMのグルコースおよび2 mMのグルタミン (Agilent) を含む低緩衝DMEM最小培地と交換し、温度およびpHの平衡に達するために37℃で60分間インキュベートすることによって開始した。次いで、附着した細胞を直接取り巻く培地中の酸素およびpHの細胞外フラックス変化を測定するために、XF96細胞外フラックス分析器 (Agilent) でマイクロプレートのアッセイした。定常状態の酸素消費量および細胞外酸性化速度を取得した後、ATPシンターゼを阻害するオリゴマイシン (5 μM)、およびミトコンドリアを脱共役するプロトンイオノフォアFCCP (カルボニルシアニド4-(トリフルオロメトキシ) フェニルヒドラゾン; 2 μM) を、マイクロプレートの各細胞ウェルに試薬送達チャンバーを通して連続的に注射して、最大酸素消費速度の値を得る。最後に、5 μMのアンチマイシンA (ミトコンドリア複合体IIIの阻害剤) を注射して、呼吸の変化が主にミトコンドリア呼吸によるものであることを確認した。基礎非結合 (オリゴマイシン耐性)、および最大 (FCCP誘発) のミトコンドリア呼吸速度を決定するために、アンチマイシンA呼吸速度を他の3つの呼吸速度から減じた。

10

【1245】

このアッセイを使用して、ドナーSyn1 HeLa細胞は、活性な基礎および最大酸素消費速度を示し、一方、フソソーム送達のないレシピエント細胞は、ミトコンドリアの酸素消費の3つの状態すべての低い速度を示すことが決定された。レシピエントHeLa Rho0細胞へのSyn1 HeLa細胞フソソームによるミトコンドリアの送達は、ドナーSyn1 HeLa細胞速度に近いミトコンドリア酸素消費速度への戻りを示した (図31)。

20

【1246】

実施例138: DNAのインビトロ送達

フソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス (VSV-G) からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。対照粒子 (非融合フソソーム) を、pcDNA3.1が空のベクターで一過性に逆トランスフェクトしたHEK-293T細胞から生成した。次いで、ペイロードを、Lamichhane, TN, et al., *Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication*. Cell Mol Bioeng, (2016) に概説されるように、超音波処理によってVSV-Gフソソームにローディングした。この実験では、核酸ペイロードは、SV40核局在化配列 (ThermoFisher) を持つバクテリオファージP1 CreリコンビナーゼをコードするプラスミドDNAであった。次いで、DNAをローディングしたフソソームを使用して、CMVプロモーターの制御下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞へのペイロード送達を処理し、示した。

30

【1247】

簡単に説明すると、80 μgの標準的なVSV-Gフソソーム調製物に対応する約40⁶個のフソソームまたは対照粒子 (非融合フソソーム) を、140 μgのDNAと混合し、室温で30分間インキュベートした。次いで、フソソーム (または対照粒子) /核酸混合物を、40 kHzで操作した水浴ソニケーター (Bransonモデル番号1510R-DTH) を使用して、室温で30秒間超音波処理した。次いで、混合物を氷上に1分間置き、続いて40 kHzで30秒間の2回目の超音波処理を行った。次いで、混合物を4℃で5分間16,000 gで遠心分離して、核酸を含むフソソームをペレット化した。組み込まれていない核酸を含む上清を除去し、ペレットを30 μLのリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。DNAをローディングした後、ローディングしたフソソーム/対照粒子を、使用前に氷上に保持した。

40

【1248】

50

「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を、30,000個の細胞／ウェルで完全培地中の黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞を播種してから24時間後、DNAをローディングしたフソソームを、LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP HEK-293T細胞に適用した。レシピエント細胞を、8μLのDNAをローディングしたフソソームまたは8μLのDNAをローディングした対照粒子（非融合フソソーム）で処理し、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。24時間後、細胞プレートを、自動顕微鏡（www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/）を使用して画像化される前に、完全培地中で希釈された1μg/mLのHoechst 33342で、37℃および5%CO₂で30分間インキュベートした。レシピエント細胞のHoechst蛍光は、405nmのLEDおよびBFPフィルターキューブを使用して画像化され、レシピエント細胞のGFP蛍光は、488nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化された。レシピエント細胞のRFP蛍光は、523nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。ウェル内の細胞の画像は、まず、1.25μLのCreリコンビナーゼゲシクル（Takara、カタログ番号631449）で処理したレシピエント細胞を含む陽性対照ウェルのLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1249】

取得設定は、RFP、GFP、およびRFP強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。BFPチャンネルでオートフォーカスし、GFPおよびRFPチャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。RFP陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡（<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>）に付属のGen5ソフトウェアを使用して実行された。

【1250】

画像は、幅60μmのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回るGFP強度を有する細胞は、閾値処理され、GFP陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、RFPチャンネルに適用された。次いで、RFP陽性細胞（Cre DNAを受容したレシピエント細胞）の数を、GFP陽性細胞の合計（総レシピエント細胞）で除算して、超音波処理を介してフソソームにローディングしたCre DNAペイロードを受容したレシピエント細胞の量を示す、Cre DNA送達を受けた細胞の割合を定量化した。

【1251】

このアッセイで、Cre DNAをローディングしたフソソームは、総GFP陽性レシピエント細胞の10.7±3.3%のRFP陽性細胞に相当する観察可能なレベルのCre DNA送達を示した（図32）。未処理のレシピエント細胞またはフソソームのみで処理した細胞、またはDNAをローディングした対照粒子は、いかなる感知できるほどのRFP陽性細胞も示さなかった。

【1252】

実施例139：mRNAのインビトロ送達

フソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。対照粒子（非融合フソソーム）を、pcDNA3.1が空のベクターで一過性に逆トランスフェクトしたHEK-293T細胞から生成した。次いで、ペイロードを、Lamichhane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loadi

ng of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016)に概説されるように、超音波処理によってVSV-Gフソソームにローディングした。この実験では、核酸ペイロードは、SV40核局在化配列(Trilink、カタログ番号L-7211)を持つバクテリオファージP1 Creリコンビナーゼをコードするインビトロで転写したメッセンジャーRNAであった。次いで、mRNAをロードしたフソソームを使用して、CMVプロモーターの制御下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞へのペイロード送達を処理し、示した。

【1253】

簡単に説明すると、20 μ gの標準的なVSV-Gフソソーム調製物に対応する約10⁶個のフソソームまたは対照粒子(非融合フソソーム)を、10 μ gのmRNAと混合し、室温で30分間インキュベートした。次いで、フソソーム(または対照粒子)/核酸混合物を、40 kHzで操作した水浴ソニケーター(Bransonモデル番号1510 RDTH)を使用して、室温で30秒間超音波処理した。次いで、混合物を氷上に1分間置き、続いて40 kHzで30秒間の2回目の超音波処理を行った。次いで、混合物を4℃で5分間16,000 gで遠心分離して、核酸を含むフソソームをペレット化した。組み込まれていない核酸を含む上清を除去し、ペレットを30 μ Lのリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。mRNAをローディングした後、ローディングしたフソソーム/対照粒子を、使用前に氷上に保持した。

【1254】

「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を、30,000個の細胞/ウェルで完全培地中の黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞をプレーティングしてから24時間後、mRNAをローディングしたフソソームを、LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP HEK-293T細胞に適用した。レシピエント細胞を、8 μ LのmRNAをローディングしたフソソームまたは8 μ LのmRNAをローディングした対照粒子(非融合フソソーム)で処理し、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。24時間後、細胞プレートを、自動顕微鏡(www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)を使用して画像化される前に、完全培地中で希釈された1 μ g/mLのHoechst 33342で、37℃および5%CO₂で30分間インキュベートした。レシピエント細胞のHoechst蛍光は、405 nmのLEDおよびBFPフィルターキューブを使用して画像化され、レシピエント細胞のGFP蛍光は、488 nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化された。レシピエント細胞のRFP蛍光は、523 nmのLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。ウェル内の細胞の画像は、まず、Creリコンビナーゼゲシクル(Takara、カタログ番号631449)で処理したレシピエント細胞を含む陽性対照ウェルのLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1255】

取得設定は、RFP、GFP、およびRFP強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。BFPチャンネルでオートフォーカスし、GFPおよびRFPチャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。RFP陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡(<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>)に付属のGen5ソフトウェアを使用して実行された。

【1256】

画像は、幅 $60\text{ }\mu\text{m}$ のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回る GFP 強度を有する細胞は、閾値処理され、GFP 陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、RFP チャンネルに適用された。次いで、RFP 陽性細胞 (Cre mRNA を受容したレシピエント細胞) の数を、GFP 陽性細胞の合計 (総レシピエント細胞) で除算して、超音波処理を介してフソソームにローディングした Cre mRNA ペイロードを受容したレシピエント細胞の量を示す、Cre mRNA 送達を受けた細胞の割合を定量化した。

【1257】

このアッセイで、Cre mRNA をローディングしたフソソームは、総 GFP 陽性レシピエント細胞の $52.8 \pm 7.8\%$ の RFP 陽性細胞に相当する観察可能なレベルの Cre mRNA 送達を示した (図 96)。miRFP670 DNA のみ、フソソームのみ、または超音波処理したフソソームのみで処理したレシピエント細胞は、いかなる感知できるほどの miRFP670 陽性細胞も示さなかった。

【1258】

実施例 140: mRNA のインビボ送達

この実施例は、フソソームを介したインビボでの細胞へのメッセンジャー RNA (mRNA) の送達について説明する。インビボでの細胞への mRNA の送達は、レシピエント細胞内にタンパク質の発現をもたらした。この送達方法を使用して、存在しないタンパク質を導入し、これにより、loxP 部位の切断、その後の非内在性分子の発現が可能になり得る。フソソームは、調製前に 2 時間急性トランスフェクションを受け、それらは、本明細書に記載の方法を使用して得られ、ホタルルシフェラーゼ mRNA がロードされた。

【1259】

調製後、フソソームを、遠心分離によってペレット化し、フソソーム粒子を、注射用の滅菌リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。フソソームを欠いている緩衝液を、陰性対照として使用した。

【1260】

フソソームは、前脛骨筋への筋肉内 (IM) 投与を介して、9 週齢の FVB (Jackson Laboratory、001800) マウスに送達された。溶液は、内容物の継続的な無菌性を確保する方法で処理された。麻酔は、誘導チャンバーで行われ (約 4% イソフルラン、効果を得るまで)、ノーズコーンを介して維持され (約 2% イソフルラン、効果を得るまで)、動物を温めた (35°C) 手術台に置いた。前脛骨筋 (TA) 筋肉の中央腹部の皮膚を、その領域を脱毛する (45 秒間 Nair Hair Remover クリーム、続いて 70% エタノールで領域を洗浄する) ことによって調製した。ツベルクリン注射器を使用して、 $50\text{ }\mu\text{L}$ のフソソーム溶液 $15\text{ }\mu\text{g}$ のタンパク質/ μL 、平均値 (標準誤差)) を、TA の腹部に筋肉内注射した。注射が完了したら、注射器を取り外し、注射部位に圧力を加えた。対照と同じ方法を利用して、対側脚を、PBS で治療した。

【1261】

送達後、mRNA ルシフェラーゼは、レシピエント細胞質でルシフェラーゼタンパク質に翻訳する。D-ルシフェリン (Perkin Elmer、 150 mg/kg) の腹腔内 (I.P.) 投与により、インビボ生物発光イメージングを介したルシフェラーゼ発現の検出が可能になった。動物を、動物の動きを防ぐためにコーン麻酔器 (イソフルラン) を収容するインビボ生物発光イメージングチャンバー (Perkin Elmer) に配置した。D-ルシフェリンの薬物動態的クリアランスによる最大の生物発光シグナルを観察するために、注入後 3~35 分間に光子収集が行われた。最大放射輝度は、光子/秒/ cm^2 /ラジアンで記録される。領域全体の放射輝度を積分する全光束は、Living Image Software (Perkin Elmer) 内の関心領域 (ROI) ツールを使用して定量化され、光子/秒で報告される。フソソーム処理および PBS 処理した前脛骨筋組織を、陰性対照 (陰性対照のスレッドなし (胸部) および病期) と比較して、特に放射輝度測定のためにモニタリングした。ホタルルシフェラーゼの存在を観察するた

10

20

30

40

50

めに、注射から1、6、12、24、および48時間後に測定が行われた。

【1262】

図15A～15Bに示すように、ホタルルシフェラーゼの存在の証拠は、動物のレシピエント組織における生物発光イメージングによって検出された。(A)FVBマウスのフソソームで処置した(右脚)とPBSで処置した(左脚)の腹部画像および発光シグナル。左側は、画像および発光シグナルのオーバーレイであり、右側は、発光シグナルのみである。(B)フソソームで処置したTA(黒四角)、PBSで処置したTA(白丸)、マウスバックグラウンド(黒六角形)、およびステージバックグラウンド(白六角形)の全磁束シグナル。yスケールは、log10スケールである。フソソームで処置した脚は、処置から1時間後($p < 0.0001$)、6時間後($p < 0.01$)、および12時間後($p < 0.01$)、著しく大きなシグナルを有した。

10

【1263】

実施例141：タンパク質のインビトロ送達

フソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。対照粒子(非融合フソソーム)を、pcDNA3.1が空のベクターで一過性に逆トランスフェクトしたHEK-293T細胞から生成した。次いで、ペイロードを、Lamichhane, TN, et al., *Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication*, *Cell Mol Bioeng*, (2016)に概説されるように、超音波処理によってVSV-Gフソソームにローディングした。この実験では、核酸ペイロードは、SV40核局在化配列組換えタンパク質(NEB、カタログ番号M0298M)を持つバクテリオファージP1 Creリコンビナーゼであった。次いで、タンパク質をローディングしたフソソームを使用して、CMVプロモーターの制御下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞へのペイロード送達を処理し、示した。

20

【1264】

簡単に説明すると、20 μ gの標準的なVSV-Gフソソーム調製物に対応する約10⁶個のフソソームまたは対照粒子(非融合フソソーム)を、5 μ gのタンパク質(NEB番号M0298M)と混合し、室温で30分間インキュベートした。次いで、フソソーム(または対照粒子)/タンパク質混合物を、40 kHzで操作した水浴ソニケーター(Brasonモデル番号1510R-DTH)を使用して、室温で30秒間超音波処理した。次いで、混合物を氷上に1分間置き、続いて40 kHzで30秒間の2回目の超音波処理を行った。次いで、混合物を4℃で5分間16,000 gで遠心分離して、核酸を含むフソソームをペレット化した。組み込まれていないタンパク質を含む上清を除去し、ペレットを30 μ Lのリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。タンパク質をローディングした後、ローディングしたフソソーム/対照粒子を、使用前に氷上に保持した。

30

【1265】

「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を、30,000個の細胞/ウェルで完全培地中の黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞をプレーティングしてから24時間後、タンパク質をローディングしたフソソームを、LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP HEK-293T細胞に適用した。レシピエント細胞を、8 μ Lのタンパク質をローディングしたフソソームまたは8 μ Lのタンパク質をローディングした対照粒子(非融合フソソーム)で処理し、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。24時間後、細胞プレートを、自動顕微鏡(www.bioteck.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/)を使用して画像化される前に、完全培地中で希釈され

40

50

た $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のHoechst 33342で、 37°C および $5\%\text{CO}_2$ で30分間インキュベートした。レシピエント細胞のHoechst蛍光は、 405nm のLEDおよびBFPフィルターキューブを使用して画像化され、レシピエント細胞のGFP蛍光は、 488nm のLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化された。レシピエント細胞のRFP蛍光は、 523nm のLEDおよびRFPフィルターキューブを使用して画像化された。ウェル内の細胞の画像は、まず、Creリコンビナーゼゲシクル (Takara、カタログ番号631449) で処理したレシピエント細胞を含む陽性対照ウェルのLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1266】

取得設定は、RFP、GFP、およびRFP強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。BFPチャンネルでオートフォーカスし、GFPおよびRFPチャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。RFP陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡 (www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/を参照) に付属のGen5ソフトウェアを使用して実行された。

【1267】

画像は、幅 $60\mu\text{m}$ のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回るGFP強度を有する細胞は、閾値処理され、GFP陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、RFPチャンネルに適用された。次いで、RFP陽性細胞 (Creタンパク質を受容したレシピエント細胞) の数を、GFP陽性細胞の合計 (総レシピエント細胞) で除算して、超音波処理を介してフソソームにローディングしたCreタンパク質ペイロードを受容したレシピエント細胞の量を示す、Creタンパク質送達を受けた細胞の割合を定量化した。

【1268】

このアッセイで、Creタンパク質をローディングしたフソソームは、総GFP陽性レシピエント細胞の $27.4 \pm 6.8\%$ RFPの陽性細胞に相当する統計学的に有意なレベルのCreタンパク質送達を示した (図35)。未処理のレシピエント細胞またはフソソームのみで処理した細胞、またはタンパク質をローディングした対照粒子は、いかなる感知できるほどのRFP陽性細胞も示さなかった。

【1269】

実施例142：タンパク質のインビボ送達 (BiVs-Creゲシクル)

この実施例は、フソソームによる筋肉への治療剤の送達について説明する。フソソームは、本明細書に記載の方法を使用して得られ、CRE-リコンビナーゼタンパク質がロードされた。

【1270】

フソソームは、前脛骨筋への筋肉内 (IM) 投与を介して、LoxPルシフェラーゼ (Jackson Laboratory、005125) マウスに送達された。溶液は、内容物の継続的な無菌性を確保する方法で処理された。麻酔は、誘導チャンバーで誘導され (約 4% イソフルラン、効果を得るまで)、ノーゾコーンを介して維持され (約 2% イソフルラン、効果を得るまで)、動物を温めた (35°C) 手術台に置いた。前脛骨筋 (TA) 筋肉の中央腹部の皮膚を、その領域を脱毛する (45 秒間Nair Hair Removerクリーム、続いて 70% エタノールで領域を洗浄する) ことによって調製した。ツベルクリン注射器を使用して、 $50\mu\text{L}$ のフソソーム溶液 ($8.5 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^8$ 粒子/ μL 、平均値 (標準誤差)) を、TAの腹部に筋肉内注射した。注射が完了したら、注射器を取り外し、注射部位に圧力を加えた。対側脚は、処置しなかった。

【1271】

融合後、CREタンパク質は、核に移動して組換えを実行し、ルシフェラーゼの構成的

10

20

30

40

50

発現をもたらした。D-ルシフェリン (Perkin Elmer、150 mg/kg) の腹腔内投与により、インビボ生物発光イメージングを介したルシフェラーゼ発現の検出が可能になった。動物を、動物の動きを防ぐためにコーン麻酔器 (イソフルラン) を収容するインビボ生物発光イメージングチャンバー (Perkin Elmer) に配置した。D-ルシフェリンの薬物動態的クリアランスによる最大の生物発光シグナルを観察するために、注入後3〜35分間に光子収集が行われた。最大放射輝度は、光子/秒/cm²/ラジアンで記録される。領域全体の放射輝度を積分する全光束は、Living Image Software (Perkin Elmer) 内の関心領域 (ROI) ツールを使用して定量化され、光子/秒で報告される。フソソーム処理した前脛骨筋組織を、陰性対照 (陰性対照のスレッドなし (胸部)、対側後肢、および病期) と比較して、特に放射輝度測定のためにモニタリングした。ホタルルシフェラーゼの存在を観察するために、注射から14日目に測定が行われた。

【1272】

図36A〜36Bに示すように、フソソームによるタンパク質 (Creリコンビナーゼ) 送達の証拠は、動物のレシピエント組織での生物発光イメージングによって検出された。

【1273】

実施例143：フソソームにおける核酸の超音波処理を媒介したローディング

フソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス (VSV-G) からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現し、Creリコンビナーゼを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。次いで、核酸ペイロードを、Lamichhane, TN, et al., *Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication*, *Cell Mol Bioeng*, (2016) に概説されるように、超音波処理によってVSV-Gフソソームにローディングした。この実験では、核酸ペイロードは、蛍光タンパク質mRFP670をコードするDNAプラスミドであった。次いで、核酸をローディングしたフソソームを使用して、CMVプロモーターの制御下で「Loxp-BFP-stop-Loxp-Clover」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞へのペイロード送達を処理し、示した。

【1274】

簡単に説明すると、50 µgの標準的なVSV-Gフソソーム調製物に対応する約10⁶個のフソソームを、10 µgの核酸と混合し、室温で30分間インキュベートした。次いで、フソソーム/核酸の混合物を、40 kHzで操作した水浴ソニケーター (Brascanモデル番号1510R-DTH) を使用して、室温で30秒間超音波処理した。次いで、混合物を氷上に1分間置き、続いて40 kHzで30秒間の2回目の超音波処理を行った。次いで、混合物を4℃で5分間16,000 gで遠心分離して、核酸を含むフソソームをペレット化した。組み込まれていない核酸を含む上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。DNAをローディングした後、ローディングしたフソソームを、使用前に氷上に保持した。

【1275】

「Loxp-BFP-stop-Loxp-Clover」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を、30,000個の細胞/ウェルで黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞を播種してから4〜6時間後、DNAをローディングしたフソソームを、DMEM培地中で標的または非標的のレシピエント細胞に適用した。レシピエント細胞を、4 µgのDNAをローディングしたフソソームで処理し、37℃および5% CO₂で48時間インキュベートした。自動顕微鏡 (www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/) を使用して、細胞プレートを画像化した。レシピエント細胞のBFP蛍光は、405 nmのLEDおよびBFPフィ

ルターキューブを使用して画像化された。レシピエント細胞のクローバー蛍光は、465 nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、一方、miRFP 670は、623 nmのLEDおよびCy5フィルターキューブを使用して画像化された。細胞のウェルの画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞のLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1276】

取得設定は、BFP、クローバー、およびmiRFP 670強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。BFPチャンネルでオートフォーカスし、クローバーおよびmiRFP 670チャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。miRFP 670陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡(www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/を参照)に付属のGen5ソフトウェアを使用して実行された。

【1277】

画像は、幅60 μmのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回るBFP強度を有する細胞は、閾値処理され、BFP陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、クローバーおよびmiRFP 670チャンネルに適用された。次いで、miRFP 670陽性細胞(miRFP 670 DNAプラスミドを受容したレシピエント細胞)の数を、BFP陽性細胞の合計(総レシピエント細胞)で除算して、超音波処理を介してフソソームにローディングしたmiRFP 670ペイロードを受容したレシピエント細胞の量を示す、miRFP 670 DNA送達の割合を定量化した。

【1278】

このアッセイで、miRFP 670 DNAをローディングしたフソソームは、総BFP陽性レシピエント細胞の $2.9 \pm 0.4\%$ のmiRFP 670陽性細胞に相当する観察可能なレベルのmiRFP 670送達を示した(図37)。miRFP 670 DNAのみ、フソソームのみ、または超音波処理したフソソームのみで処理したレシピエント細胞は、(0.5%未満と定義)いかなる感知できるほどのmiRFP 670陽性細胞も示さなかった。

【1279】

実施例144：フソソームにおける超音波処理を媒介したタンパク質のローディング
フソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現し、Creリコンビナーゼを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。次いで、タンパク質ペイロードを、Lamichhane, TN, et al., Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. Cell Mol Bioeng, (2016)に概説されるように、超音波処理によってVSV-Gフソソームにローディングした。この実験では、タンパク質ペイロードは、蛍光色素Alexa Fluor 647(BSA-AF647; ThermoFisherカタログ番号A34785)にコンジュゲートしたウシ血清アルブミンタンパク質であった。次いで、タンパク質をローディングしたフソソームを使用して、CMVプロモーター下で「Loxp-BFP-stop-Loxp-Clover」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞へのペイロード送達を処理し、示した。

【1280】

簡単に説明すると、50 μLの標準的なVSV-Gフソソーム調製物に対応する約 10^6 個のフソソームを、10 μgのBSA-AF647と混合し、室温で30分間インキュ

10

20

30

40

50

ベートした。次いで、フソソーム／タンパク質の混合物を、40 kHzで操作した水浴ソニケーター（Bras onモデル番号1510R-DTH）を使用して、室温で30秒間超音波処理した。次いで、混合物を氷上に1分間置き、続いて40 kHzで30秒間の2回目の超音波処理を行った。次いで、混合物を4℃で5分間16,000 gで遠心分離して、BSA-AF647を含むフソソームをペレット化した。組み込まれていないタンパク質を含む上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。タンパク質をローディングした後、ローディングしたフソソームを、使用前に氷上に保持した。

【1281】

「Loxp-BFP-stop-Loxp-Clover」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を、30,000個の細胞／ウェルで黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞を播種してから4～6時間後、BSA-AF647をローディングしたフソソームを、DMEM培地中で標的または非標的のレシピエント細胞に適用した。レシピエント細胞を、4 μLのBSA-AF647をローディングしたフソソームで処理し、37℃および5%CO₂で72時間インキュベートした。自動顕微鏡（www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/lionheart-fx-automated-live-cell-imager/）を使用して、細胞プレートを画像化した。レシピエント細胞のBFP蛍光は、405 nmのLEDおよびBFPフィルターキューブを使用して画像化された。レシピエント細胞のクローバー蛍光は、465 nmのLEDおよびGFPフィルターキューブを使用して画像化され、一方、BSA-AF647は、623 nmのLEDおよびCy5フィルターキューブを使用して画像化された。細胞のウェルの画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、フソソームの代わりにCreリコンビナーゼをコードするアデノウイルスで処理されたレシピエント細胞のLED強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1282】

取得設定は、BFP、クローバー、およびBSA-AF647強度が最大ピクセル強度値であるが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。BFPチャンネルでオートフォーカスし、クローバーおよびBSA-AF647チャンネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。BSA-AF647陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡（www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/を参照）に付属のGen5ソフトウェアを使用して実行された。

【1283】

画像は、幅60 μmのローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用して前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回るBFP強度を有する細胞は、閾値処理され、BFP陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、クローバーおよびBSA-AF647チャンネルに適用された。次いで、BSA-AF647陽性細胞（BSA-AF647タンパク質を受容したレシピエント細胞）の数を、BFP陽性細胞の合計（総レシピエント細胞）で除算して、超音波処理を介してフソソームにローディングしたBSA-AF647タンパク質を受容したレシピエント細胞の量を示す、BSA-AF647送達の割合を定量化した。

【1284】

このアッセイで、BSA-AF647をローディングしたフソソームは、総BFP陽性レシピエント細胞の43.2 ± 0.2% BSA-AF647の陽性細胞に相当する観察可能なレベルのBSA-AF647送達を示した（図38）。BSA-AF647タンパク質のみ、フソソームのみ、または超音波処理したフソソームのみで処理したレシピエント細胞は、（0.5%未満と定義された）いかなる感知できるほどのBSA-AF647陽性細胞も示さなかった。

【1285】

実施例 145：フソソームゴーストの生成および単離

この実施例は、低張処理および遠心分離を介したフソソームゴーストの生成および単離について説明する。これは、フソソームが生成され得る方法のうちの1つである。

【1286】

フソソームゴーストは、本明細書に記載されるように、水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞から作製された。フソソームゴーストは、作製され、蛍光ナノ粒子追跡分析（fNTA）によって分析された。

【1287】

フソソームは、以下のように調製された。9.2×10⁶個のHEK-293Tを、100mmのコラーゲンコーティング皿に、ポリマートランスフェクション試薬を使用して、VSVgのオープンリーディングフレームを含有する10μgのpcDNA3.1発現プラスミド、ならびに7.5mLの完全培地（DMEM+10% FBS+1倍のPen/Strep）中の15μgのpcDNA3.1が空の発現プラスミドで、逆トランスフェクトした。フソソームゴーストを生成するために、トランスフェクションから24時間後に、細胞を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、TryPLEで解離し、500×gで5分間遠心分離し、培地に再懸濁した。1×10⁷個の細胞を、7mLのPBSに再懸濁し、500×gで5分間の遠心分離を介してペレット化した。細胞を、冷TM緩衝液（10mMのトリス、1.6mMのMgCl₂、pH7.4）に再懸濁し、27%振幅で5秒間超音波処理した（ColeParmerカタログ番号CPX130）。超音波処理の直後に、スクロース（60w/v%）を含むTM緩衝液を、0.25Mのスクロースの最終濃度で溶液に添加した。次いで、溶液を、6,000×g、4℃で15分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを0.25MのスクロースTM緩衝液、pH7.4で2回洗浄した。次いで、ペレットを、0.25MのスクロースTM緩衝液、pH7.4に再懸濁し、再懸濁したペレットを、27%振幅で5秒間超音波処理した（ColeParmerカタログ番号CPX130）。次いで、溶液を、6,000×g、4℃で15分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを0.25MのスクロースTM緩衝液、pH7.4で2回洗浄した。次いで、ペレットを、0.25MのスクロースTM緩衝液、pH7.4に再懸濁し、再懸濁したペレットを、27%振幅で2分間超音波処理した（ColeParmerカタログ番号CPX130）。次いで、溶液を、800×g、4℃で15分間遠心分離し、0.45μmのシリンジフィルターで濾過した。

【1288】

最後に、フソソームゴーストを濃縮するために、溶液を、150,000×g、4℃で45分間超遠心分離し、フソソームゴーストを含むペレットを、PBSに再懸濁した。fNTAを介してフソソームゴースト組成物を分析するために、フソソームゴーストを、CellMask Orange（ThermoFisher）と1:1でインキュベートし、追跡機にローディングする前に1:1000に希釈して、製造業者の取扱説明書に従って分析した。フソソームゴーストのサイズ分布を、図39に示す。フソソームは、VSV-Gを発現するHEK-293T細胞からゴーストを調製することによって作製が成功した。

【1289】**実施例 146：フソソームにおける翻訳活性の欠如**

フソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。対照粒子（非融合フソソーム）を、pcDNA3.1が空のベクターで一過性に逆トランスフェクトしたHEK-293T細胞から生成した。次いで、フソソームの翻訳活性を、Click-iT EdUイメージングキット（ThermoFisher）を使用することによって、フソソームの生成に使用される、親細胞、例えば供給源細胞と比較した。

【1290】

簡単に説明すると、 $60\mu\text{L}$ の標準のVSV-Gフソソーム調製物に対応する約 3×10^6 個のフソソーム、およびフソソームを生成するために使用される 1×10^6 個の親細胞を、 1mM の蛍光標識可能なアルキヌクレオシドEdUを含む完全な6ウェルの低付着マルチウェルの 1mL の完全培地中に、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で4時間、3重に播種した。陰性対照のために、 3×10^6 個のフソソームを、完全培地中でアルキヌクレオシドEdUを含まない6ウェル低付着マルチウェルプレートに播種した。4時間のインキュベーション後、製造業者の取扱説明書（ThermoFisher Scientific）に従って、試料を処理した。簡単に説明すると、陰性対照を含む細胞およびフソソーム試料を、 $1 \times \text{PBS}$ 緩衝液で3回洗浄し、 $1 \times \text{PBS}$ 緩衝液に再懸濁し、 638nm の励起レーザーおよび $670+/-14\text{nm}$ のフィルター発光を使用してフローサイトメトリー（Attune、ThermoFisher）によって分析した（表M）。Attune NxTソフトウェアを、取得およびFlowJoを使用した分析のために使用した。データ取得のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、FSCおよびSSCチャンネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、 $670+/-14\text{nm}$ の発光チャンネルの事象を対数スケールで表示した。細胞またはフソソームゲート内の最小10,000の事象が、各条件で収集された。

【1291】

データ分析のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、FSCおよびSSCチャンネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、 $670+/-14\text{nm}$ の発光チャンネルの事象を対数スケールで表示した。陰性対照 $670+/-14\text{nm}$ の発光を使用して、ゲートが1%未満の陽性を含むようにヒストグラム上にゲートを配置する場所を決定した。上記の分析基準を使用して、新規に合成したDNAにEdUを含めることによる翻訳活性の代替的測定値として、親細胞は、 $56.17\% \pm 8.13$ EdU:647事象を示し、一方、フソソームは、 $6.23\% \pm 4.65$ AF488事象を示した（図40、左パネル）。EdUの取り込みの測定値である、AF647の蛍光強度の中央値、したがって、新規に合成したDNAの相対的測定値は、親細胞では 1311 ± 426.2 の事象であり、フソソームでは 116.6 ± 40.74 であった（図40、右パネル）。これは、フソソームが親細胞と比較して翻訳活性がないことを示す。

【表M】

表M：フローサイトメーターの設定

染料	同調レーザー／フィルター	レーザー波長	発光フィルター（nm）
AF47	RL1	638	670/14

【1292】

実施例147：可動性のためにアクチンを重合する能力の測定

フソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）からのエンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。対照粒子（非融合フソソーム）を、pcDNA3.1が空のベクターで一過性に逆トランスフェクトしたHEK-293T細胞から生成した。次いで、フソソームおよび親細胞を、ロードミンファロイジンフローサイトメトリーアッセイおよびチューブリンELISAを使用して、アクチンを重合する能力について（経時的に）アッセイした。簡単に説明すると、 $60\mu\text{L}$ の標準のVSV-Gフソソーム調製物に対応する約 1×10^6 個のフソソーム、およびフソソームを生成するために使用される 1×10^5 個の親細胞を、完全な96ウェルの低付着マルチウェルの 1mL の完全培地中に、 37°C および $5\%\text{CO}_2$ でインキュベートした。播種してから3時間、5時間、および24時間後に、試料を、定期的に採取した。試料を、 $21,000 \times g$ で10分間遠心分離し、リン酸緩衝生理食塩水中の $200\mu\text{L}$ の4（v/v）%PFAに10分間再懸濁し、 1mL のリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、 $21,000$

0 x g で 10 分間遠心分離し、再度洗浄し、さらに使用するまで 4℃で保存した。

【1293】

ローダミン-ファロイジン染色では、試料を、21,000 x g で 10 分間遠心分離し、リン酸緩衝生理食塩水中の 100 uL の 0.1 (v/v) % Triton X-100 で 20 分間インキュベートした。20 分間のインキュベーション後、165 μM のローダミン-ファロイジンを含むリン酸緩衝生理食塩水中の追加の 100 uL の 0.1 (v/v) % Triton X-100 を試料に添加し、ピペット混合し、陰性対照を得、100 uL の 0.1 (v/v) % Triton X-100 (リン酸緩衝生理食塩水のみ) を添加した。試料を 45 分間インキュベートした後、1 mL のリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、21,000 x g で 10 分間遠心分離し、再度洗浄し、300 uL のリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁し、下表に示すように、561 nm の励起レーザーおよび 585 + / - 16 nm のフィルター発光を使用してフローサイトメトリー (Attune、ThermoFisher) によって分析した。

フローサイトメーターの設定

【表 17】

染料	同調レーザー／ フィルター	レーザー波長	発光フィルター (nm)
AF47	YL1	585	585 / 16

【1294】

Attune NxT ソフトウェアを、取得および FlowJo を使用した分析のために使用した。データ取得のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、FSC および SSC チャネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、585 + / - 16 nm の発光チャネルの事象を対数スケールで表示した。細胞またはフソソームゲート内の最小 10,000 の事象が、各条件で収集された。データ分析のために、細胞またはフソソームを示す集団を決定するために、FSC および SSC チャネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、このゲート内の事象のみを使用して、585 + / - 16 nm の発光チャネルの事象を対数スケールで表示した。陰性対照 585 + / - 16 nm の発光を使用して、ゲートが 1% 未満の陽性を含むようにヒストグラム上にゲートを配置する場所を決定した。上記の分析基準を使用して、親細胞は、3 時間、5 時間、および 24 時間の時点で、それぞれ、19.9%、24.8%、および 82.5% のローダミン-ファロイジン陽性事象を示した。フソソームは、3 時間、5 時間、および 24 時間の時点で、それぞれ、44.6%、41.9%、および 34.9% のローダミン-ファロイジンであった (図 14D)。この実施例は、フソソームは経時的にアクチンの量が増加しないが、一方、親細胞はその量が増加することを示す。

【1295】

実施例 148：レシピエント細胞組成物の免疫原性

1. IgG および IgM 応答

この実施例は、フローサイトメトリーを使用してレシピエント細胞 (フソソームと融合した細胞) に対する抗体価の定量化について説明する。レシピエント細胞の免疫原性の基準は、抗体応答である。レシピエント細胞を認識する抗体は、細胞の活性または寿命を制限することができる方法で結合することができる。一実施形態において、レシピエント細胞は、抗体応答によって標的化されないか、または抗体応答は参照レベル未満であろう。

【1296】

この実施例では、対象 (例えば、ヒト、ラット、またはサル) における抗レシピエント細胞抗体価が、試験される。さらに、プロトコルは、適切な表面マーカーが存在する任意の細胞型に適合させ得る。この実施例では、標的レシピエント細胞は、CD3+細胞で

ある。

【1297】

マウスは、この出願に記載される方法のうちのいずれかを介して生成されたフソソームまたはPBS（陰性対照）で5日間毎日処置される。最終処置から28日後、フソソームを施したマウスおよびPBS処置を施したマウスから末梢血を採血する。血液を、5 μ MのEDTAを含む1mLのPBSに収集し、凝固を防ぐために直ちに混合する。チューブを、氷上に保持し、緩衝塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して赤血球を除去する。細胞を、ウシ血清アルブミンで10分間ブロックした後、マウスCD3-FITC抗体（Thermo Fisherカタログ番号：11-0032-82）で、4℃で30分間暗所で染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、488nmの励起レーザーおよび530+/-30nmで収集した発光を用いて、LSRII（BD Biosciences、San Jose、CA）で分析し、FACSDiva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、San Jose、CA）を実行する。CD3+細胞を、選別する。

10

【1298】

次いで、選別したCD3+細胞は、4℃で45分間、マウスIgM（BD Bioscience）のFc部分に特異的なPE共役ヤギ抗体で反応混合物をインキュベートすることによってIgM抗体で染色される。特に、抗マウスIgG1またはIgG2二次抗体も使用してもよい。すべての群からの細胞を、2%FCSを含むPBSで2回洗浄し、FACSシステム（BD Biosciences）で分析する。蛍光データは、対数増幅を使用して収集され、平均蛍光強度として表される。平均蛍光強度は、フソソームで処置したマウスおよびPBSで処置したマウスからの選別したCD3細胞について計算される。

20

【1299】

低い平均蛍光強度は、レシピエント細胞に対する体液性応答が低いことを示す。PBSで処置したマウスは、平均蛍光強度が低いと予想される。一実施形態において、平均蛍光強度は、フソソームで処置したマウスおよびPBSで処置したマウスからのレシピエント細胞と同様であろう。

【1300】

2. マクロファージの食作用

この実施例は、貪食アッセイによるレシピエント細胞に対するマクロファージ応答の定量化について説明する。

30

【1301】

レシピエント細胞の免疫原性の基準は、マクロファージ応答である。マクロファージは、食作用に関与し、細胞を貪食し、細菌または死細胞などの外来侵入者の隔離および破壊を可能にする。いくつかの実施形態において、マクロファージによるレシピエント細胞の食作用は、それらの活性を低下させ得る。

【1302】

一実施形態において、レシピエント細胞は、マクロファージによって標的化されない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するマクロファージ応答が、試験される。さらに、プロトコルは、適切な表面マーカーが存在する任意の細胞型に適合させ得る。この実施例では、標的レシピエント細胞は、CD3+細胞である。

40

【1303】

マウスは、この出願に記載される方法のうちのいずれかを介して生成されたフソソームまたはPBS（陰性対照）で5日間毎日処置される。最終処置から28日後、フソソームを施したマウスおよびPBS処置を施したマウスから末梢血を採血する。血液を、5 μ MのEDTAを含む1mLのPBSに収集し、凝固を防ぐために直ちに混合する。チューブを、氷上に保持し、緩衝塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して赤血球を除去する。

【1304】

細胞を、ウシ血清アルブミンで10分間ブロックした後、マウスCD3-FITC抗体（Thermo Fisherカタログ番号：11-0032-82）で、4℃で30分

50

間暗所で染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、488nmの励起レーザーおよび530+/-30nmで収集した発光を用いて、LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) で分析し、FACSDiva (商標) ソフトウェア (BD Biosciences, San Jose, CA) を実行する。次いで、CD3+細胞を、選別する。

【1305】

食作用アッセイは、以下のプロトコルに従ってマクロファージ媒介性免疫クリアランスを評価するために実行される。マクロファージを、共焦点ガラス底皿に収穫直後に播種する。マクロファージを、DMEM+10% FBS+1% P/Sで1時間インキュベートして付着させる。フソソームおよびPBSを施したマウスに由来する適切な数の選別およびFITC染色CD3+細胞を、プロトコルに示されているようにマクロファージに添加し、例えば、tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdfに記載されるように2時間インキュベートする。

【1306】

2時間後、皿を静かに洗浄し、細胞内蛍光を試験する。マクロファージを特定するために、細胞を、まず、Fc受容体ブロッキング抗体 (eBioscienceカタログ番号14-0161-86、クローン93) で氷上で15分間インキュベートして、マクロファージに豊富に発現されるFc受容体への標識mAbの結合をブロックする。このステップの後、抗F4/80-PE (ThermoFisherカタログ番号12-4801-82、クローンBM8) および抗CD11b-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciencesカタログ番号550993、クローンM1/70) コンジュゲート抗体を添加して、マクロファージ表面抗原を染色する。細胞を、4℃で30分間、暗所でインキュベートし、続いて、遠心分離し、PBSで洗浄する。次いで、細胞を、PBSに再懸濁する。次いで、試料のフローサイトメトリーを実行し、533nmおよび647nmの励起レーザーをそれぞれ使用して、F4/80-PEおよびCD11b-PerCP-Cy5.5の陽性蛍光シグナルを介してマクロファージを特定する。マクロファージのゲーティング後、飲み込まれたレシピエント細胞から発光される細胞内蛍光は、488nmのレーザー励起によって評価される。食作用陽性のマクロファージの数は、イメージングソフトウェアを使用して定量化される。データは、食細胞指数 = (取り込まれた細胞の総数 / 計数されたマクロファージの総数) × (取り込まれた細胞を含むマクロファージの数 / 計数されたマクロファージの総数) × 100として表される。

【1307】

食作用指数が低いことは、食作用が低いことと、マクロファージによる標的化を示す。PBSで処置したマウスは、食作用指数が低いと予想される。一実施形態において、食作用指数は、フソソームで処置したマウスおよびPBSで処置したマウスに由来するレシピエント細胞と同様であろう。

【1308】

3. PBMC溶解により測定された細胞毒性

この実施例は、細胞溶解アッセイによるレシピエント細胞に対するPBMC応答の定量化について説明する。

【1309】

レシピエント細胞の免疫原性の基準は、PBMC応答である。一実施形態において、溶解はフソソームの活性を低下させる、例えば阻害または停止するので、PBMCによるレシピエント細胞の細胞毒性媒介性細胞溶解は、免疫原性の基準である。

【1310】

一実施形態において、レシピエント細胞は、PBMC応答を引き起こさない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するPBMC応答が、試験される。

【1311】

さらに、プロトコルは、適切な表面マーカーが存在する任意の細胞型に適合させ得る。この実施例では、標的レシピエント細胞は、CD3+細胞である。

【1312】

マウスは、この出願に記載される方法のうちのいずれかを介して生成されたフソソームまたはPBS（陰性対照）で5日間毎日処置される。最終処置から28日後、フソソームを施したマウスおよびPBS処置を施したマウスから末梢血を採血する。血液を、5 μ MのEDTAを含む1mlのPBSに収集し、凝固を防ぐために直ちに混合する。チューブを、氷上に保持し、緩衝塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して赤血球を除去する。細胞を、細胞染色緩衝液（Biogendカタログ番号420201）でFcで10分間ブロック（Biogendカタログ番号：101319）した後、マウスCD3：APC-Cy7抗体（Biogendカタログ番号100330）またはアイソタイプ対照APC-Cy7（IC：APC-Cy7）抗体（Biogendカタログ番号400230）で、4℃で30分間暗所で染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、640nmのレーザー励起および780+/-60nmで収集した発光を用いて、FACS Aria（BD Biosciences、San Jose、CA）で分析し、FACS Diva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、San Jose、CA）を実行して、アイソタイプ対照APC-Cy7抗体標識細胞を使用して陰性ゲートを設定し、APC-Cy7陽性細胞を選別し、収集する。次いで、選別したCD3+細胞は、CellMask（商標）Green Plasma membrane Stain（CMG、ThermoFisherカタログ番号C37608）、または陰性対照としてDMSOで標識される。

10

【1313】

フソソームまたはPBSで処置したマウスからCD3+細胞を単離する7日前に、Crop et al. Cell transplantation (20) : 1547-1559 ; 2011の方法に従って、フソソームまたはPBSで処置したマウスからPBMCを単離し、IL-2組換えマウスタンパク質（R&D Systemsカタログ番号402-ML-020）およびCD3/CD28ビーズ（ThermoFisherカタログ番号11456D）の存在下で、丸底96ウェルプレート中で、37℃で7日間模擬実験した。7日目に、模擬実験したPBMCを、1000：1～1：1および1：1.25～1：1000の範囲内のPBMC：CD3+/CMG+またはPBMC：CD3+/DMSO対照細胞の播種比で、1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48時間、CD3+/CMG+またはCD3+/DMSO96対照細胞で同時インキュベートする。一連のウェルの陰性対照は、CD3+/CMG+およびCD3+/DMSO対照細胞のみを受容し、PBMCは受容し得ない。インキュベーション後、プレートを、遠心分離して処理し、そのため、上記のようにマウスCD3：APC-Cy7抗体またはIC：APC-Cy7抗体のいずれかで標識する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、PBSに再懸濁し、FACS Aria（APC-Cy7：640nmのレーザー励起/780-/+60nmで収集した発光、およびCMG 561nmのレーザー励起/585-/+16nmで収集した発光）で分析し、FACS Diva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、San Jose、CA）を実行する。次いで、FSC/SSC事象データは、まず、「細胞」というラベルを付けた事象のゲートを設定するために使用され得る。次いで、この「細胞」ゲートを使用して、事象を示し、IC：APC-Cy7/DMSOのみでラベルを付けた試料を分析する640nmおよび561nmのレーザーのPMT電圧を設定する。この試料はまた、APC-Cy7およびCMGの両方の陰性細胞のゲートを設定するためにも使用され得る。次いで、いかなるPBMCも施さなかったCD3+/CMG+細胞を使用して、CD3+およびCMG+細胞の陽性ゲートを設定し得る。

20

30

40

【1314】

データは、総細胞集団におけるCD3+/CMG+細胞の割合を調べることによって分析される。処置群を比較すると、PBMC：CD3+/CMG+細胞の任意の所与のアッセイ比でのCD3+/CMG+細胞の割合が比較的低いことは、レシピエント細胞の溶解を示す。一実施形態において、CD3+/CMG+の割合は、フソソームで処置したマウ

50

スおよびPBSで処置したマウスに由来するレシピエント細胞と同様であろう。

【1315】

4. NK細胞の標的化

この実施例は、細胞溶解アッセイによるレシピエント細胞に対するナチュラルキラー細胞応答の定量化について説明する。

【1316】

レシピエント細胞の免疫原性の基準は、ナチュラルキラー細胞の応答である。一実施形態において、溶解はフソソームの活性を低下させる、例えば阻害または停止するので、ナチュラルキラー細胞によるレシピエント細胞の細胞毒性媒介性細胞溶解は、免疫原性の基準である。

【1317】

一実施形態において、レシピエント細胞は、ナチュラルキラー細胞の応答を引き起こさない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するナチュラルキラー応答が、試験される。さらに、プロトコルは、適切な表面マーカーが存在する任意の細胞型に適合させ得る。この実施例では、標的レシピエント細胞は、CD3+細胞である。

【1318】

マウスは、この出願に記載される方法のうちのいずれかを介して生成されたフソソームまたはPBS（陰性対照）で5日間毎日処置される。最終処置から28日後、フソソームを施したマウスおよびPBS処置を施したマウスから末梢血を採血する。血液を、5 μ MのEDTAを含む1mlのPBSに収集し、凝固を防ぐために直ちに混合する。チューブを、氷上に保持し、緩衝塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して赤血球を除去する。細胞を、細胞染色緩衝液（Biolgendカタログ番号420201）でFcで10分間ブロック（Biolgendカタログ番号101319）した後、マウスCD3：APC-Cy7抗体（Biolgendカタログ番号100330）またはアイソタイプ対照APC-Cy7抗体（Biolgendカタログ番号400230）で、4℃で30分間暗所で染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、640nmのレーザー励起および780+/-60nmで収集した発光を用いて、FACS Aria（BD Biosciences、San Jose、CA）で分析し、FACSDiva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、San Jose、CA）を実行して、アイソタイプ対照APC-Cy7抗体標識細胞を使用して陰性ゲートを設定し、APC-Cy7陽性細胞を選別し、収集する。選別したCD3+細胞は、CellMask（商標）Green Plasma membrane Stain（CMG、ThermoFisherカタログ番号C37608）で標識される。

【1319】

フソソームまたはPBSで処置したマウスからCD3+細胞を単離する7日前に、Crop et al. Cell transplantation（20）：1547-1559；2011の方法に従って、フソソームまたはPBSで処置したマウスからNK細胞を単離し、IL-2組換えマウスタンパク質（R&D Systemsカタログ番号402-ML-020）およびCD3/CD28ビーズ（ThermoFisherカタログ番号11456D）の存在下で、丸底96ウェルプレート中で、37℃で7日間模擬実験した。7日目に、模擬実験したNK細胞を、1000：1～1：1および1：1.25～1：1000の範囲内のNK細胞：CD3+/CMG+またはNK細胞：CD3+/DMSO対照細胞の播種比で、1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48時間、CD3+/CMG+またはCD3+/DMSO96対照細胞で同時インキュベートする。一連のウェルの陰性対照は、CD3+/CMG+およびCD3+/DMSO対照細胞のみを受容し、NK細胞は受容し得ない。インキュベーション後、プレートを、遠心分離して処理し、そのため、上記のようにマウスCD3：APC-Cy7抗体またはIC：APC-Cy7抗体のいずれかで標識する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、PBSに再懸濁し、FACS Aria（APC-Cy7：640nmのレーザー励起/780-/+60nmで収集した発光、およびCMG 561nmのレーザー励起/585-/+

10

20

30

40

50

16 nmで収集した発光)で分析し、FACSDiva (商標)ソフトウェア (BD Biosciences, San Jose, CA)を実行する。次いで、FSC/SSC事象データは、まず、「細胞」というラベルを付けた事象のゲートを設定するために使用され得る。次いで、この「細胞」ゲートを使用して、事象を示し、IC:APC-Cy7/DMSOのみでラベルを付けた試料を分析する640 nmおよび561 nmのレーザーのPMT電圧を設定する。この試料はまた、APC-Cy7およびCMGの両方の陰性細胞のゲートを設定するためにも使用され得る。次いで、いかなるNK細胞も施さなかったCD3+/CMG+細胞を使用して、CD3+およびCMG+細胞の陽性ゲートを設定し得る。

【1320】

データは、総細胞集団におけるCD3+/CMG+細胞の割合を調べることによって分析される。処置群を比較すると、NK細胞:CD3+/CMG+細胞の任意の所与のアッセイ比でのCD3+/CMG+細胞の割合が比較的低いことは、レシピエント細胞の溶解を示す。一実施形態において、CD3+/CMG+の割合は、フソソームで処置したマウスおよびPBSで処置したマウスに由来するレシピエント細胞と同様であろう。

【1321】

5. CD8 T細胞溶解

この実施例は、細胞溶解アッセイによるレシピエント細胞 (フソソームと融合した細胞) に対するCD8+T細胞応答の定量化について説明する。

【1322】

レシピエント細胞の免疫原性の基準は、CD8+T細胞の応答である。一実施形態において、溶解はフソソームの活性を低下させる、例えば阻害または停止するので、CD8+T細胞によるレシピエント細胞の細胞毒性媒介性細胞溶解は、免疫原性の基準である。

【1323】

一実施形態において、レシピエント細胞は、CD8+T細胞の応答を引き起こさない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するCD8+T応答が、試験される。さらに、プロトコルは、適切な表面マーカーが存在する任意の細胞型に適合させ得る。この実施例では、標的レシピエント細胞は、CD3+細胞である。

【1324】

マウスは、この出願に記載される方法のうちのいずれかを介して生成されたフソソームまたはPBS (陰性対照)で5日間毎日処置される。最終処置から28日後、フソソームを施したマウスおよびPBS処置を施したマウスから末梢血を採血する。血液を、5 μMのEDTAを含む1 mlのPBSに収集し、凝固を防ぐために直ちに混合する。チューブを、氷上に保持し、緩衝塩化アンモニウム (ACK) 溶液を使用して赤血球を除去する。細胞を、細胞染色緩衝液 (Biolegendカタログ番号420201)でFcで10分間ブロック (Biolegendカタログ番号101319)した後、マウスCD3:APC-Cy7抗体 (Biolegendカタログ番号100330)またはアイソタイプ対照APC-Cy7抗体 (Biolegendカタログ番号400230)で、4℃で30分間暗所で染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、640 nmのレーザー励起および780+/-60 nmで収集した発光を用いて、FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, CA)で分析し、FACSDiva (商標)ソフトウェア (BD Biosciences, San Jose, CA)を実行して、アイソタイプ対照APC-Cy7抗体標識細胞を使用して陰性ゲートを設定し、APC-Cy7陽性細胞を選別し、収集する。選別したCD3+細胞は、CellMask (商標) Green Plasma membrane Stain (CMG, ThermoFisherカタログ番号C37608)で標識される。

【1325】

フソソームまたはPBSで処置したマウスからCD3+細胞を単離する7日前に、Crop et al. Cell transplantation (20):1547-1559;2011の方法に従って、フソソームまたはPBSで処置したマウスからCD8+細

10

20

30

40

50

胞を単離し、IL-2組換えマウスタンパク質（R&D Systemsカタログ番号402-ML-020）およびCD3/CD28ビーズ（ThermoFisherカタログ番号11456D）の存在下で、丸底96ウェルプレート中で、37℃で7日間模擬実験した。7日目に、模擬実験したCD8+細胞を、1000:1～1:1および1:1.25～1:1000の範囲内のCD8+細胞:CD3+/CMG+またはCD8+細胞:CD3+/DMSO対照細胞の播種比で、1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48時間、CD3+/CMG+またはCD3+/DMSO96対照細胞で同時インキュベートする。一連のウェルの陰性対照は、CD3+/CMG+およびCD3+/DMSO対照細胞のみを受容し、CD8+細胞は受容し得ない。インキュベーション後、プレートを、遠心分離して処理し、そのため、上記のようにマウスCD3:APC-Cy7抗体またはIC:APC-Cy7抗体のいずれかで標識する。PBSで2回洗浄した後、細胞を、PBSに再懸濁し、FACS Aria（APC-Cy7:640nmのレーザー励起/780-/+60nmで収集した発光、およびCMG 561nmのレーザー励起/585-/+16nmで収集した発光）で分析し、FACSDiva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、San Jose、CA）を実行する。次いで、FSC/SSC事象データは、まず、「細胞」というラベルを付けた事象のゲートを設定するために使用され得る。次いで、この「細胞」ゲートを使用して、事象を示し、IC:APC-Cy7/DMSOのみでラベルを付けた試料を分析する640nmおよび561nmのレーザーのPMT電圧を設定する。この試料はまた、APC-Cy7およびCMGの両方の陰性細胞のゲートを設定するためにも使用され得る。次いで、いかなるCD8+細胞も施さなかったCD3+/CMG+細胞を使用して、CD3+およびCMG+細胞の陽性ゲートを設定し得る。

【1326】

データは、総細胞集団におけるCD3+/CMG+細胞の割合を調べることによって分析される。処置群を比較すると、CD8+細胞:CD3+/CMG+細胞の任意の所与のアッセイ比でのCD3+/CMG+細胞の割合が比較的低いことは、レシピエント細胞の溶解を示す。一実施形態において、CD3+/CMG+の割合は、フソソームで処置したマウスおよびPBSで処置したマウスに由来するレシピエント細胞と同様であろう。

【1327】

実施例149：フソソーム中のGAPDHの測定

この実施例は、フソソームのグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）のレベル、および親細胞と比較したフソソームのGAPDHの相対レベルの定量化について説明する。フソソームは、実施例114および154に記載されるように調製された。

【1328】

GAPDHは、製造業者の取扱説明書に従って、GAPDHの標準的な市販のELISA（ab176642、Abcam）を使用して、親細胞およびフソソームで測定された。総タンパク質レベルは、ピシンコニン酸アッセイを介して同様に測定された。測定されたGAPDHおよびタンパク質レベルを、以下の表に示す。

【表18】

	[タンパク質] (mg/mL)	[GAPDH] (ng/mL)	GAPDH:タンパク質 (μg/g)
フソソーム	0.82	37.2	45.3
細胞	0.45	50.4	112.0

GAPDH：総タンパク質の比も、図41に示す。

【1329】

実施例150：フソソーム中の脂質とタンパク質の比

この実施例は、フソソーム中の脂質量とタンパク質量の比の定量化について説明す

る。フソソームが、有核細胞の脂質質量とタンパク質質量の比が類似する脂質質量とタンパク質質量の比を有し得ると企図される。フソソームおよび親細胞は、本明細書の実施例 114 および 154 に記載されるように調製された。

【1330】

脂質含有量は、製造業者の取扱説明書に従って、市販のリン脂質アッセイキット（MAK122 Sigma St. Louis, MO）を使用して、総脂質のサブセットとしてコリン含有リン脂質を使用して計算された。フソソームの総タンパク質含有量は、本明細書に記載のビシンコニン酸アッセイを介して測定された。測定したリン脂質レベル、タンパク質レベル、およびリン脂質とタンパク質の比率を、図 42 および下の表に示す。

【表 19】

	リン脂質 (μM)	タンパク質 (g/L)	リン脂質：タンパク質 ($\mu\text{mol/g}$)
フソソーム	115.6	0.82	141.0
細胞	47.9	0.45	106.4

10

【1331】

実施例 151：フソソーム中のタンパク質と DNA の比

この実施例は、フソソーム中のタンパク質質量と DNA 質量の比の定量化について説明する。フソソームが、細胞のタンパク質質量と DNA 質量の比よりもはるかに大きいタンパク質質量と DNA 質量の比を有し得ると企図される。フソソームは、実施例 114 および 154 に記載されるように調製された。

20

【1332】

フソソームおよび細胞の総タンパク質含有量は、本明細書に記載のビシンコニン酸を介して測定された。フソソームおよび細胞の DNA 質量は、製造業者の取扱説明書に従って市販の単離キット（番号 69504 Qiagen Hilden, Germany）を使用して全 DNA を抽出した後、280 nm での吸収によって測定された。タンパク質と総核酸の比は、総タンパク質含有量を総 DNA 含有量で除算することによって決定され、典型的なフソソーム調製物の所定の範囲内の比が得られた。測定したタンパク質レベル、DNA レベル、およびタンパク質と DNA の比率を、図 43 および下の表に示す。

30

【表 20】

	[タンパク質] (mg/mL)	[DNA] ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	タンパク質： DNA (g/g)
フソソーム	0.82	29.5	27.8
細胞	0.45	15.9	28.3

【1333】

実施例 152：フソソーム中の脂質と DNA の比

この実施例は、親細胞と比較したフソソーム中の脂質と DNA の比の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して脂質と DNA の比がより大きい。フソソームは、実施例 114 および 154 に前述されたように調製された。

40

【1334】

この比率は、実施例 49 に概説されている脂質含有量として定義され、核酸含有量は、実施例 50 に記載されるように決定される。測定した脂質レベル、DNA レベル、および脂質と DNA の比率を、図 44 および下の表に示す。

50

【表 2 1】

	[脂質] (μM)	[DNA] ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	脂質 : DNA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
フソソーム	115.6	29.5	3.92
細胞	47.9	15.9	3.01

【1335】

実施例 153 : ダイナミン媒介経路を介したフソソームの送達

この実施例は、ダイナミン媒介経路を介したレシピエント細胞への Cre のフソソームベースの送達について説明する。簡単に説明すると、Cre を封入するフソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上に水疱性口内炎ウイルス (VSV-G) からのエンベロープ糖タンパク質 G を発現する HEK-293T 細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。次いで、ダイナミン媒介経路における Cre 送達の依存性を、次のように決定した。

【1336】

「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエント HEK-293T 細胞を、30,000 個の細胞/ウェルで完全培地中の黒色の透明な底の 96 ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞を播種してから 24 時間後、Cre を封入しているフソソームを、レシピエント LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP HEK-293T 細胞に適用した。

【1337】

Cre 送達がダイナミン媒介経路に依存する程度を定量化するために、フソソーム適用時に、レシピエント細胞の 1 つの群を、ダイナミンを介したエンドサイトーシスを部分的に阻害するのに十分な濃度である $120\mu\text{M}$ のダイナミン阻害剤 Dynasore で処理した。フソソームを、レシピエント細胞で、 37°C および $5\%\text{CO}_2$ で 24 時間インキュベートした。24 時間後、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の Hoechst 33342 を、完全培地中で希釈し、細胞で、 37°C および $5\%\text{CO}_2$ で 30 分間インキュベートした。Hoechst の添加後、自動顕微鏡 (www.biotek.com/products/imaging-microscopy-automated-cell-imagers/ionheart-fx-automated-live-cell-imager/) を使用して、細胞を画像化した。レシピエント細胞の Hoechst 蛍光は、 405nm の LED および BFP フィルターキューブを使用して画像化された。レシピエント細胞の GFP 蛍光は、 488nm の LED および GFP フィルターキューブを使用して画像化された。レシピエント細胞の RFP 蛍光は、 523nm の LED および RFP フィルターキューブを使用して画像化された。ウェル内の細胞の画像は、まず、陽性対照ウェル、すなわち、 $1.25\mu\text{L}$ のゲシクルリコンビナーゼゲシクル (Takara、カタログ番号 631449) で処理したレシピエント細胞の LED 強度および積分時間を確立することによって得られた。

【1338】

取得設定は、BFP、GFP、および RFP 強度が最大ピクセル強度値であったが飽和しないように設定された。次いで、対象となるウェルは、確立された設定を使用して画像化された。BFP チャネルでオートフォーカスし、GFP および RFP チャネルに確立された焦点面を使用することによって、各ウェルに焦点を設定した。RFP 陽性細胞の分析は、自動蛍光顕微鏡 (www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/ を参照) に付属の Gen5 ソフトウェアを使用して実行された。

【1339】

画像は、幅 $60\mu\text{m}$ のローリングボールのバックグラウンド減算アルゴリズムを使用し

て前処理された。バックグラウンド強度を大幅に上回るGFP強度を有する細胞は、閾値処理され、GFP陽性細胞には小さすぎるまたは大きすぎる領域は除外された。同じ分析手順が、RFPチャンネルに適用された。次いで、RFP陽性細胞(Creリコンビナーゼを受容したレシピエント細胞)の数を、GFP陽性細胞の合計(総レシピエント細胞))で除算して、Cre送達の指標としてRFP陽性細胞の割合を定量化した。

【1340】

Dynasoreの不在下で、Creをローディングしたフソソームは、総GFP陽性レシピエント細胞の $82.1 \pm 4.5\%$ のRFP陽性細胞に相当する観察可能なレベルのCre送達を示した(図45)。上記のように、使用したDynasore濃度は、エンドサイトーシスを部分的に阻害するのに十分であった。これと一致して、この実施例で使用されるVSV-Gフソソームは、エンドサイトーシス経路を通して動作することが知られており、 $120 \mu\text{M}$ のDynasoreの存在下で部分的に阻害され、Cre送達レベルは、 $68.5 \pm 5.5\%$ のRFP陽性細胞に相当した(図45)。未処理のレシピエント細胞は、いかなる感知できるほどのRFP陽性細胞も示さなかった。総合すると、これらのデータは、フソソームベースのCre送達のダイナミン依存性を示す。

【1341】

実施例154：フソソーム中の脂質組成の測定

この実施例は、フソソームの脂質組成の定量化について説明する。フソソームの脂質組成は、それらが由来する細胞と同様であり得ると企図される。脂質組成は、サイズ、静電相互作用、およびコロイド挙動などのフソソームおよび細胞の重要な生物物理学的パラメーターに影響する。

【1342】

脂質の測定は、質量分析に基づいた。フソソームは、 10 cm 皿でVSV-GおよびGFPの一過性トランスフェクション、続いて、トランスフェクションから48時間後、馴化培地の濾過および超遠心分離によって、本明細書に記載されるように調製された。トランスフェクトした細胞を、馴化培地と並行して収集し、分析に提出した。エキソソームはまた、VSV-GまたはGFPでトランスフェクトされなかった細胞からも収集された。

【1343】

質量分析に基づいた脂質分析は、記載されるように、Lipotype GmbH (Dresden, Germany)によって実行された(Sampaio et al., 2011)。脂質は、2段階のクロロホルム/メタノール手順を使用して抽出された(Ejsing et al., 2009)。試料に、カルジオリピン $16:1/15:0/15:0/15:0$ (CL)、セラミド $18:1;2/17:0$ (Cer)、ジアシルグリセロール $17:0/17:0$ (DAG)、ヘキサシルセラミド $18:1;2/12:0$ (HexCer)、リゾホスファチデート $17:0$ (LPA)、リゾホスファチジルコリン $12:0$ (LPC)、リゾホスファチジルエタノールアミン $17:1$ (LPE)、リゾホスファチジルグリセロール $17:1$ (LPG)、リゾホスファチジルイノシトール $17:1$ (LPI)、リゾホスファチジルセリン $17:1$ (LPS)、ホスファチデート $17:0/17:0$ (PA)、ホスファチジルコリン $17:0/17:0$ (PC)、ホスファチジルエタノールアミン $17:0/17:0$ (PE)、ホスファチジルグリセロール $17:0/17:0$ (PG)、ホスファチジルイノシトール $16:0/16:0$ (PI)、ホスファチジルセリン $17:0/17:0$ (PS)、コレステロールエステル $20:0$ (CE)、スフィンゴミエリン $18:1;2/12:0;0$ (SM)、トリアシルグリセロール $17:0/17:0/17:0$ (TAG)、およびコレステロールD6(Chol)を含有する内部脂質標準混合物をスパイクした。

【1344】

抽出後、有機相を注入プレートに移し、速度真空濃縮機で乾燥させた。第1のステップの乾燥抽出物を、クロロホルム/メタノール/プロパノール(1:2:4、V:V:V)中の7.5mMの酢酸アンモニウムに再懸濁し、第2のステップの乾燥抽出物を、クロロホルム/メタノールのメチルアミン(0.003:5:1;V:V:V)の33%エタノ

10

20

30

40

50

ール溶液に再懸濁した。すべての液体処理ステップは、有機溶媒ピペッティング用の液垂れ防止制御 (Anti Droplet Control) 機能を備えた Hamilton Robotics STARlet ロボットプラットフォームを使用して実行された。

【1345】

試料は、TriVersa NanoMate イオン源 (Advion Biosciences) を備えた QExactive 質量分析計 (Thermo Scientific) 直接注入することによって分析された。試料は、1 回の取り込みで、MS の場合は $Rm/z = 200 = 280000$ 、MSMS 実験の場合は $Rm/z = 200 = 17500$ の解像度で、陽性および陰性イオンモードの両方で分析された。MSMS は、1 Da 単位でスキャンされた対応する MS 質量範囲を含む包含リストによって引き起こされた (Surma et al., 2015)。MS データおよび MSMS データの両方を組み合わせて、アンモニウム付加物として CE、DAG、および TAG イオン、アセテート付加物として PC、PC O⁻、ならびに脱プロトン化アニオンとして CL、PA、PE、PE O⁻、PG、PI、および PS をモニタリングした。MS のみを使用して、脱プロトン化アニオンとして LPA、LPE、LPE O⁻、LPI、および LPS、アセテート付加物として Cer、Hex Cer、SM、LPC、および LPC O⁻、ならびにアセチル化誘導体のアンモニウム付加物としてコレステロールをモニタリングした (Liebisch et al., 2006)。

【1346】

LipidXplorer に基づいた社内で開発された脂質同定ソフトウェアを使用して、データを分析した (Herzog et al., 2011、Herzog et al., 2012)。社内で開発されたデータ管理システムを使用して、データの後処理および正規化を実行した。シグナル対ノイズ比が 5 を超え、対応する空試料よりも 5 倍高いシグナル強度を持つ脂質の同定のみに対して、さらなるデータ分析が考慮された。

【1347】

フソソームの脂質組成は、親細胞の脂質組成と比較され、検出されない脂質種には、ゼロの値が割り当てられた。フソソームおよび親細胞で同定された脂質種を、下の表に示す。

【表 22】

	同定された総脂質種	共有脂質種 (親細胞およびフソソームの両方で同定)	フソソーム中の親の発現の 25% を持つ共有脂質種	総脂質に対する共有脂質種の割合
フソソーム	679	569	548	0.700
親細胞	783			

【1348】

親細胞の任意の複製試料中で同定された脂質の 70% 以上がフソソームの任意の複製試料中に存在する場合、フソソームおよび親細胞は、同様の脂質組成を有し得、これらの同定された脂質のフソソームの平均レベルは、親細胞の対応する平均脂質種レベルの 25% 超であり得ることが企図される。

【1349】

実施例 155：フソソーム中のプロテオーム組成の測定

この実施例は、フソソームのタンパク質組成の定量化について説明する。フソソームのタンパク質組成は、それらが由来する親細胞と同様であり得ると企図される。

【1350】

フソソームおよび親細胞は、実施例 114 および 154 の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。

【1351】

各試料を、溶解緩衝液 (6 M の尿素、2 M のチオ尿素、4% CHAPS、50 mM のト

リス pH 8.0) に再懸濁し、氷浴で超音波処理し、小型ゲージ注射器を通過させた。タンパク質を、10 mM の DTT を使用して 65 °C で 15 分間還元し、暗所で室温で 30 分間、15 mM のヨードアセトアミド (IAA) でアルキル化した。過剰な IAA を、追加の 10 mM の DTT で反応停止した。次いで、8 体積の氷冷アセトンおよび 1 体積の氷冷メタノールを添加して、タンパク質を沈殿させ、-80 °C で一晩静置した。沈殿したタンパク質を、遠心分離によってペレット化した。残りの溶解緩衝液を、200 µL の氷冷メタノールで 3 回洗浄した。タンパク質を、0.75 M の尿素 + 50 mM のトリス pH 8.0 + 1 µg のトリプシン / Lys C に再懸濁し、攪拌しながら 37 °C で 4 時間前消化した。追加の 1 µg のトリプシン / Lys C を、タンパク質に添加し、消化を一晩持続した。ペプチドは、逆相 SPE によって精製し、LC-MS で分析した。

10

【1352】

各条件の複製試料を溶解し、1 つのチューブ中で合わせた。次いで、このプールを、試料と同じ調製プロトコルに供し、情報依存性取得で LC-MS によって分析するか、または下述のようにゲルで分離した。

【1353】

合計 100 µg のプールしたタンパク質を、2 倍の Laemmli ローディング緩衝液に入れ、12.5 % SDS PAGE で分離した。タンパク質を、クマシーブルーで簡単に染色し、タンパク質レーンを、12 の画分に分けた。次いで、各画分を、50 % アセトニトリルで脱水し、還元のために 10 mM の DTT で再水和した。ゲル切片を、65 °C で 15 分間置き、暗所で室温で 30 分間、15 mM の IAA でアルキル化した。ゲルを、50 % アセトニトリルでさらに脱水し、1 µg のトリプシン / Lys C を含む 50 mM のトリス pH 8 で 37 °C で一晩再水和した。ペプチドを、脱水および超音波処理によってゲルから抽出した。ペプチドを、逆相 SPE で精製し、LC-MS / MS で分析した (1 画分当たり 1 × IDA)。

20

【1354】

25 µm の内径キャピラリーを有するエレクトロスプレーインターフェースを備え、Eksigent µUHPLC (Eksigent, Redwood City, CA, USA) と連結している AB Sciex TripleTOF 5600 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) を使用して、取得を実行した。Analyst TF 1.7 ソフトウェアは、機器を制御し、データの処理および取得のために使用された。ゲルまたは未分画プールからの 12 の画分に対して、情報依存性取得 (IDA) モードで取得を実行した。試料は、SWATH 取得モードで分析された。IDA モードでは、電源電圧は、5.2 kV に設定され、225 °C に維持され、カーテングスは、27 psi、ガス 1 は 12 psi、ガス 2 は 10 psi に設定された。SWATH モードでは、電源電圧は、5.5 kV に設定され、225 °C に維持され、カーテングスは、25 psi、ガス 1 は 16 psi、ガス 2 は 15 psi に設定された。分離は、逆相 HALO C18-ES カラムで内径 0.3 µm、粒子 2.7 µm、長さ 150 mm (Advance Materials Technology, Wilmington, DE) で行われ、60 °C に維持された。試料は、5 µL のループにループを過剰充填することによって注入された。60 分間 LC 勾配の場合、移動相は、3 µL / 分の流速で、溶媒 A (0.2 v / v % ギ酸および 3 v / v % DMSO 水溶液) および溶媒 B (0.2 v / v % ギ酸および EtOH 中 3 % の DMSO) からなった。

30

40

【1355】

試料分析用のイオンライブラリを生成するために、Protein Pilot ソフトウェアを、IDA 実行によって生成された wiff ファイルで実行した。このデータベースは、3 つのトランジション / ペプチドおよび 15 のペプチド / タンパク質を使用して、各試料のタンパク質を定量化するために、Peakview ソフトウェア (AB Sciex) で使用した。定量化されたタンパク質の数を最大化するために、同じパラメーターを使用して、公的に入手可能なヒト SWATH データベース (Atlas) で、試料を定量化した。Peakview によって計算されたスコアが 1.5 を上回り、かつ FDR が 1 %

50

未満である場合、ペプチドは適切に測定されたと見なされた。各データベースからの定量を、両方のデータベースからのタンパク質名を使用して、1つの最終定量に組み合わせた。補正率は、すべての試料の合計シグナルの平均と比較したときに、その試料のすべてのタンパク質の合計シグナルを考慮して、すべての試料に対して計算された。

【1356】

フソソームのプロテオーム組成物は、親細胞のプロテオーム組成と比較した。同定されたタンパク質の33%超がフソソーム中に存在する場合、フソソームと親細胞の類似のプロテオーム組成が観察され、これらの同定されたタンパク質のレベルは、下の表に示すように、親細胞の対応するタンパク質レベルの25%超であった。

【表23】

	同定された総タンパク質	共有タンパク質（親細胞とフソームの両方で同定）	フソソーム中の親の発現の25%を持つ共有タンパク質	総タンパク質に対する共有タンパク質の割合
フソソーム	1926	1487	957	0.333
細胞	2870			

【1357】

実施例156：1フソソーム当たりの内因性または合成タンパク質レベルの定量化

この実施例は、フソソーム内の内因性または合成タンパク質カーゴの定量化について説明する。いくつかの例では、フソソームは、内因性または合成タンパク質カーゴを含み得る。この実施例に記載されるフソソームまたは親細胞は、内因性タンパク質の発現を変化させるか、または治療的もしくは新規の細胞機能を媒介する合成カーゴを発現するように操作された。

【1358】

GFPを発現するフソソームおよび親細胞は、実施例114および154の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。フソソーム中のGFPの定量化は、製造業者の取扱説明書に従って市販のELISAキット（ab171581 Abcam Cambridge, United Kingdom）を使用して達成された。NanoSight NS300（Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, United Kingdom）を使用したナノ粒子追跡分析によって、フソソームの定量化を実行した。結果を、下の表に示す。

【表24】

	濃度（数/mL）
GFPタンパク質	4.41×10^{13}
フソソーム	2.66×10^{11}
GFP：フソソーム	165.8

【1359】

フソソームは、1フソソーム当たり少なくとも1、2、3、4、5、10、20、50、100、またはそれ以上のタンパク質薬剤分子を有し得ると企図される。一実施形態において、フソソームは、1フソソーム当たり166個のタンパク質薬剤分子を有する。

【1360】

実施例157：フソソーム中のエキソソームタンパク質のマーカーの測定

このアッセイは、エキソソームの特異的マーカーであることが知られているタンパク質の割合の定量化について説明する。

【1361】

フソソームは、実施例 1 1 4 および 1 5 4 の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。エキソソームは、親細胞に V S V - G または G F P をトランスフェクトされなかったことを除いて、実施例 1 1 4 および 1 5 4 の方法によって、フソソームについて本明細書に記載されるように調製された。フソソームおよびエキソソームの質量分析によるタンパク質の定量化は、本明細書の実施例 4 2 に記載されるように行った。

【1 3 6 2】

得られたタンパク質定量データを分析して、既知のエキソソームマーカー C D 6 3 のタンパク質レベルおよび割合を決定した。群当たりの平均ログ強度は、質量分析からの強度値に 1 を加算し、ログ 1 0 で変換し、複製全体の平均を計算することによって計算された。結果を、図 4 6 に示す。

【1 3 6 3】

実施例 1 5 8：フソソーム中のカルネキシンの測定

このアッセイは、フソソーム中のカルネキシン (C N X) のレベル、および親細胞と比較したフソソーム中の C N X の相対レベルの定量化について説明する。

【1 3 6 4】

フソソームおよび親細胞は、本明細書の実施例 1 1 4 および 1 5 4 に記載されるように調製された。カルネキシンおよび総タンパク質は、実施例 4 2 の方法に従って行われた質量分析を使用して測定された。親細胞およびフソソームについて決定されたカルネキシンシグナル強度を、図 4 7 に示す。

【1 3 6 5】

実施形態において、このアッセイを使用すると、フソソーム中の C N X の平均分率含有量 (本明細書の実施例 4 2 に記載されるように計算される) は、 2.43×10^{-4} 未満であろう。

【1 3 6 6】

一実施形態において、親細胞から調製物への $\text{ng} / \mu\text{g}$ 単位の総タンパク質当たりのカルネキシンの減少は、88%であろう。

【1 3 6 7】

実施例 1 5 9：フソソーム中の脂質と DNA の比

この実施例は、親細胞と比較したフソソーム中の脂質と DNA の比の定量化について説明する。一実施形態において、フソソームは、親細胞と比較して脂質と DNA の比がより大きい。フソソームは、実施例 1 1 4 および 1 5 4 に前述されたように調製された。

【1 3 6 8】

この比率は、実施例 4 9 に概説されている脂質含有量として定義され、核酸含有量は、実施例 5 0 に記載されるように決定される。図 4 8 および下の表に示すように、フソソームは、親細胞よりも高い脂質：DNA 比を示すことが見出された。

【表 2 5】

	[脂質] (μM)	[DNA] ($\text{ng} / \mu\text{L}$)	脂質：DNA ($\mu\text{mol} / \text{mg}$)
フソソーム	1 1 5. 6	2 9. 5	3. 9 2
細胞	4 7. 9	1 5. 9	3. 0 1

【1 3 6 9】

実施例 1 6 0：フソソーム上の表面マーカーの分析

このアッセイは、フソソーム上の表面マーカーの特定について説明する。

【1 3 7 0】

フソソームは、本明細書の実施例 1 1 4 および 1 5 4 に記載されるように調製された。ホスファチジルセリンは、本明細書の実施例 1 1 4 および 1 5 4 に記載されるように質量分析により測定された。下の表に示すように、フソソームの総脂質に対するホスファチジ

ルセリンの量は、親細胞の総脂質に対するホスファチジルセリンの量よりも 121%多いと決定された。

【表 26】

	ホスファチジルセリン (モル%)	ホスファチジルセリン の変化率
フソソーム	14.6	121%
親細胞	6.6	

10

【1371】

実施例 161：フソソーム中のウイルスカプシドタンパク質の分析

この実施例では、試料調製の構成を分析し、ウイルスカプシド源に由来するタンパク質の割合を評価した。

【1372】

フソソームは、実施例 114 および 154 の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。フソソームの質量分析によるタンパク質の定量化は、本明細書の実施例 42 に記載されるように行った。本明細書の実施例 42 に記載されるように、ウイルスカプシドタンパク質の画分含有量を計算し、フソソーム試料にわたって平均化し、割合として表した。

20

【1373】

このアプローチを使用すると、下の表に示すように、試料は、0.05%のウイルスカプシドタンパク質を含むことが見出された。検出された唯一のウイルスカプシドタンパク質は、ウサギ内因性レンチウイルス (RELK) カプシドとシクロフィリン A (PDB 2XGY B) との複合体であった。

【表 27】

	生のMS強度	ウイルス：総タンパク質 (%)
ウイルスカプシドタンパク質	5.10×10^5	0.05
総タンパク質	9.46×10^8	

30

【1374】

実施例 162：フソソーム中のフソゲンタンパク質比の定量化

この実施例は、フソソーム中のフソゲンタンパク質と総タンパク質または対象となる他のタンパク質の比の定量化について説明する。対象となる他のタンパク質には、EGFP、CD63、ARRDC1、GAPDH、カルネキシン (CNX)、および TSG101 が含まれるが、これらに限定されない。フソソームは、実施例 114 および 154 の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。フソソームの質量分析によるタンパク質の定量化は、本明細書の実施例 42 に記載されるように行った。本明細書の実施例 42 に記載されるように、すべてのタンパク質の定量化を計算し、フソソーム試料にわたって平均化し、割合として表した。

40

【1375】

下の表に示すように、フソゲンは、EGFP に対する比率が 156.9、CD63 に対する比率が 2912.0、ARRDC1 に対する比率が 664.9、GAPDH に対する比率が 69.0、CNX に対する比率が 558.4、および TSG101 に対する比率が 3064.1 を有すると見出された。

50

【表 28】

タンパク質	生のMS強度	フソゲン：タンパク質（複数可）の比
VSV-G	1.29×10^8	なし
総タンパク質	9.46×10^8	0.136
EGFP	8.22×10^5	156.9
CD63	4.43×10^4	2912.0
ARRDC1	1.94×10^5	664.9
GAPDH	1.87×10^6	69.0
CNX	2.31×10^5	558.4
TSG101	4.21×10^4	3064.1

10

【1376】

実施例163：フソソーム中の内因性および合成タンパク質比の定量化

この実施例は、フソソーム中の総タンパク質または対象となる他のタンパク質と比較して内因性または合成タンパク質カーゴの定量化について説明する。対象となる他のタンパク質には、VSV-G、CD63、ARRDC1、GAPDH、カルネキシン（CNX）、またはTSG101が含まれるが、これらに限定されない。フソソームは、実施例114および154の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。フソソームの質量分析によるタンパク質の定量化は、本明細書の実施例42に記載されるように行った。本明細書の実施例42に記載されるように、すべてのタンパク質の定量化を計算し、フソソーム試料にわたって平均化し、割合として表した。

20

【1377】

下の表に示すように、合成タンパク質カーゴは、VSV-Gに対する比率が 6.37×10^{-3} 、CD63に対する比率が18.6、ARRDC1に対する比率が4.24、GAPDHに対する比率が0.44、CNXに対する比率が3.56、およびTSG101に対する比率が19.52を有すると見出された。

【表 29】

タンパク質	生のMS強度	タンパク質カーゴ：タンパク質（複数可）の比
EGFP	8.22×10^5	なし
総タンパク質	9.46×10^8	8.69×10^{-4}
VSV-G	1.29×10^8	6.37×10^{-3}
CD63	4.43×10^4	18.6
ARRDC1	1.94×10^5	4.24
GAPDH	1.87×10^6	0.44
CNX	2.31×10^5	3.56
TSG101	4.21×10^4	19.52

30

40

【1378】

実施例164：フソソーム中の濃縮脂質組成

この実施例は、フソソーム、親細胞、およびエキソソームの脂質組成の定量化について説明する。フソソームの脂質組成は、それらが由来する細胞と比較して特定の脂質について濃縮および／または枯渇させ得ると企図される。脂質組成は、サイズ、静電相互作用、およびコロイド挙動などのフソソームおよび細胞の重要な生物物理学的パラメーターに影

50

響する。

【1379】

脂質組成は、実施例114および154に記載されるように測定された。フソソームは、10cm皿でVSV-GおよびGFPの一過性トランスフェクション、続いて、トランスフェクションから48時間後、馴化培地の濾過および超遠心分離によって、本明細書に記載されるように調製された。トランスフェクトした細胞を、馴化培地と並行して収集し、分析に提出した。エキソソームは、親細胞にVSV-GまたはGFPをトランスフェクトされなかったことを除いて、フソソームについて本明細書に記載されるように調製された。

【1380】

フソソーム、エキソソーム、および親細胞の脂質組成を、図49A～49Bに示す。親細胞と比較して、フソソームは、コレステリルエステル、遊離コレステロール、エーテル結合リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルセリン、ホスファチジン酸塩、エーテル結合ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、およびスフィンゴミエリンが濃縮された。親細胞と比較して、フソソームは、セラミド、カルジオリピン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルイノシトール、エーテル結合ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、およびトリアシルグリセロールが枯渇している。エキソソームと比較して、フソソームは、コレステリルエステル、セラミド、ジアシルグリセロール、リゾホスファチデート、およびホスファチジルエタノールアミン、トリアシルグリセロールが濃縮された。エキソソームと比較して、フソソームは、遊離コレステロール、ヘキサシルセラミド、リゾホスファチジルコリン、エーテル結合リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、エーテル結合リゾホスファチジルエタノールアミン、およびリゾホスファチジルが枯渇している。

【1381】

実施例165：フソソームの区画特異的なプロテオーム含有量の測定

この実施例は、フソソーム、フソソーム親細胞、およびエキソソームの特定の細胞内区画に由来することが知られているタンパク質の割合の定量化について説明する。

【1382】

フソソームおよび親細胞は、実施例114および154の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。エキソソームは、親細胞にVSV-GまたはGFPをトランスフェクトされなかったことを除いて、実施例114および154の方法によって、フソソームについて本明細書に記載されるように調製された。フソソームおよびエキソソームの質量分析によるタンパク質の定量化は、本明細書の実施例42に記載されるように行った。得られたタンパク質定量データを分析して、証拠コードIDA（直接アッセイによって推定される）を用いて、Gene Ontology Cellular Compartmentの注釈用語（エキソソーム：GO：0070062、小胞体：GO：0005783、リボソーム：GO：0005840、GO：0022625、GO：0022626、GO：0022627、GO：0044391、GO：0042788、GO：0000313）によって注釈されるように、既知のエキソソーム、小胞体、リボソーム、核、およびミトコンドリアタンパク質のタンパク質レベルおよび割合を決定した。各試料の総タンパク質に対する区画特異的なタンパク質の割合は、フソソーム試料、エキソソーム試料、および親細胞について決定された。

【1383】

図50に示すように、フソソームは、親細胞およびエキソソームと比較して、小胞体タンパク質が枯渇していることが見出された。フソソームはまた、エキソソームと比較して、エキソソームのタンパク質が枯渇していることが見出された。フソソームは、親細胞と比較して、ミトコンドリアタンパク質が枯渇した。フソソームは、親細胞と比較して、核タンパク質が濃縮された。フソソームは、親細胞およびエキソソームと比較して、リボソ

ームタンパク質が濃縮された。

【1384】

実施例166：フソソーム中のTSGL1およびARRDC1含有量の測定

この実施例は、細胞からのフソソーム放出において重要であることが知られているタンパク質の割合の定量化について説明する。

【1385】

フソソームおよび親細胞は、実施例114および154の方法によって、本明細書に記載されるように調製された。エキソソームは、親細胞にVSV-GまたはGFPをトランスフェクトされなかったことを除いて、実施例114および154の方法によって、フソソームについて本明細書に記載されるように調製された。フソソームおよびエキソソームの質量分析によるタンパク質の定量化は、本明細書の実施例42に記載されるように行った。得られたタンパク質定量データを分析して、タンパク質TSGL1およびARRDC1のタンパク質レベルおよび割合を決定した。群当たりの平均ログ強度は、質量分析からの強度値に1を加算し、ログ10で変換し、複製全体の平均を計算することによって計算された。エキソソームまたは親細胞と比較した、フソソーム中のTSGL1またはARRDC1の総タンパク質含有量の割合は、同じ試料中のすべてのタンパク質の強度の合計で除算し、複製にわたって平均化し、割合として表して、各試料のTSGL1またはARRDC1の平均対数強度として決定された。

【1386】

図51に示すように、ARRDC1は、親細胞またはエキソソームよりもフソソーム中の総タンパク質含有量の割合としてより高いレベルで存在することが見出された。総タンパク質含有量の割合としてARRDC1のレベルは、フソソームにおいて少なくとも0.02%であった。TSGL1は、親細胞またはエキソソームよりもフソソーム中の総タンパク質含有量の割合として高いレベルで存在することが見出された。総タンパク質含有量の割合としてTSGL1のレベルは、フソソームにおいて少なくとも0.004%であった。

【1387】

実施例167：フソソームの既存の血清の不活性化の測定

この実施例は、インビトロ送達アッセイを使用してフソソームの既存の血清の不活性化の定量化について説明する。

【1388】

フソソームにおける免疫原性の基準は、血清の不活性化である。フソソームの血清の不活性化は、抗体媒介中和または補体媒介分解によるものであり得る。一実施形態において、本明細書に記載のフソソームの一部のレシピエントは、フソソームに結合し、それを不活化する血清中の因子を有するであろう。

【1389】

この実施例は、フソソームナীবマウスを、血清中のフソソームを不活性化する因子の存在について評価する。特に、本明細書に記載の方法は、プロトコルに対する最適化を備えたヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。陰性対照は、熱不活性化マウス血清であり、陽性対照は、異種供給源細胞から生成されたフソソームの複数回注射を受けたマウスに由来する血清である。新鮮な全血を採血し、数時間完全に凝固させることによって、マウスから血清を収集する。凝固物を、遠心分離によってペレット化し、血清上清を除去する。陰性対照試料は、摂氏56度で1時間加熱される。血清は、アリコートで凍結され得る。

【1390】

フソソームは、レシピエント集団中の細胞の50%がフソソーム中のペイロードを受け取る用量について試験される。フソソームは、本明細書に記載される他の実施例のいずれかを介して生成され得、本明細書に記載されるペイロードのいずれかを含み得る。レシピエント細胞へのペイロードのフソソーム送達をアッセイするための多くの方法も、本明細書に記載されている。この特定の実施例では、ペイロードは、Creタンパク質であり、

レシピエント細胞は、CMVプロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを安定的に発現するRPMI 8226細胞であり、Creによる組換え時に、GFP発現からRFP発現に切り替わり、マーカーとして、融合およびCreの送達を示す。レシピエント細胞の50%がRFP陽性であると特定された用量は、さらなる実験に使用される。他の実施形態において、レシピエント細胞の50%がペイロードを受け取る特定された用量は、さらなる実験に使用される。好ましい実施形態において、レシピエント細胞の50%がペイロードを受け取る特定の用量は、フソソーム全体で同様である。

【1391】

フソソームの血清の不活化を評価するために、フソソームを、通常または熱不活化血清（または無血清対照として10%熱不活化FBSを含む培地）に1:5で希釈し、混合物を、37℃で1時間インキュベートする。インキュベーション後、培地を、さらに1:5で希釈し、1:10の比率で2回連続希釈するために反応物に添加する。このステップ後、フソソームは、レシピエント細胞の50%がペイロードを受け取った（例えば、RFP陽性である）これまでに特定された用量で存在しなければならない。

【1392】

次いで、血清にさらされたフソソームを、レシピエント細胞でインキュベートする。ペイロードを受け取り、RFP陽性である細胞の割合が、計算される。いくつかの実施形態において、ペイロードを受け取る細胞の割合は、フソソームナイーブマウスからの血清およびフソソームナイーブマウスからの熱不活化血清でインキュベートしたフソソーム試料との間で異なり、これは、フソソームの血清の不活化がないことを示す。いくつかの実施形態において、ペイロードを受け取る細胞の割合は、フソソームナイーブマウスからの血清でインキュベートしたフソソーム試料と無血清対照インキュベーションとの間で異なり、これは、フソソームの血清の不活性化がないことを示す。いくつかの実施形態において、ペイロードを受け取る細胞の割合は、フソソームナイーブマウスからの血清でインキュベートしたフソソーム試料中よりも陽性対照血清でインキュベートしたフソソーム試料中よりも少なく、これは、フソソームの血清の不活性化がないことを示す。

【1393】

実施例168：複数回投与後のフソソームの血清の不活性化の測定

この実施例は、フソソームの複数回投与後のインビトロ送達アッセイを使用した、フソソームの血清の不活性化の定量化について説明する。例えば、本明細書に記載の方法によって修飾された修飾フソソームは、修飾フソソームの複数回（例えば、1回を超える、例えば2回以上）の投与後に血清の不活性化が低下し得る（例えば、非修飾フソソームの投与と比較して低下し得る）ことが企図される。場合によっては、本明細書に記載のフソソームは、複数回投与後に血清によって不活性化されないだろう。

【1394】

フソソームにおける免疫原性の基準は、血清の不活性化である。一実施形態において、フソソームの反復注射は、抗フソソーム抗体、例えば、フソソームを認識する抗体の開発をもたらし得る。一実施形態において、フソソームを認識する抗体は、フソソームの活性または寿命を制限し、補体分解を媒介することができる方法で結合することができる。

【1395】

この実施例において、フソソームの1回以上の投与後に血清の不活性化を試験する。フソソームは、前述の実施例のうちのいずれか1つによって生成される。この実施例において、フソソームは、HLA-Gのレンチウイルス媒介性発現で修飾されたHEK293細胞（以下、HEK293-HLA-G）、および空ベクターのレンチウイルス媒介性発現で修飾されたHEK293（以下、HEK293）から生成される。いくつかの実施形態において、フソソームは、他の免疫調節タンパク質を発現している細胞に由来する。

【1396】

血清は、異なるコホート：ビヒクル（フソソームナイーブ群）、HEK293-HLA-Gフソソーム、またはHEK293フソソームで、1、2、3、5、10回の注射で全

10

20

30

40

50

身のおよび／または局所的に注射されたマウスから引き出される。新鮮な全血を採血し、数時間完全に凝固させることによって、マウスから血清を収集する。凝固物を、遠心分離によってペレット化し、血清上清を除去する。陰性対照は、熱不活化マウス血清である。陰性対照試料は、摂氏 56 度で 1 時間加熱される。血清は、アリコートで凍結され得る。

【1397】

フソソームは、レシピエント集団中の細胞の 50 % がフソソーム中のペイロードを受け取る用量について試験される。フソソームは、本明細書に記載される他の実施例のいずれかを介して生成され得、本明細書に記載されるペイロードのいずれかを含み得る。レシピエント細胞へのペイロードのフソソーム送達をアッセイするための多くの方法も、本明細書に記載されている。この特定の実施例では、ペイロードは、Cre タンパク質であり、レシピエント細胞は、CMV プロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを安定的に発現する RPMI 8226 細胞であり、Cre による組換え時に、GFP 発現から RFP 発現に切り替わり、マーカーとして、融合および Cre の送達を示す。レシピエント細胞の 50 % が RFP 陽性であると特定された用量は、さらなる実験に使用される。他の実施形態において、レシピエント細胞の 50 % がペイロードを受け取る特定された用量は、さらなる実験に使用される。

【1398】

フソソームの血清の不活化を評価するために、フソソームを、通常または熱不活化血清（または無血清対照として 10 % 熱不活化 FBS を含む培地）に 1 : 5 で希釈し、混合物を、37 °C で 1 時間インキュベートする。インキュベーション後、培地を、さらに 1 : 5 で希釈し、1 : 10 の比率で 2 回連続希釈するために反応物に添加する。このステップ後、フソソームは、レシピエント細胞の 50 % がペイロードを受け取った（例えば、RFP 陽性である）これまでに特定された用量で存在しなければならない。レシピエント細胞の 50 % がペイロードを受け取る特定の用量は、フソソーム全体で同様であり得ることが企図される。

【1399】

次いで、血清にさらされたフソソームを、レシピエント細胞でインキュベートする。ペイロードを受け取り、RFP 陽性である細胞の割合が、計算される。ペイロードを受け取る細胞の割合は、血清でインキュベートしたフソソーム試料と、HEK293-HLA-G フソソームで処置したマウスからの熱不活化血清との間で異なり得、これは、フソソームの血清の不活化または適応免疫応答がないことを示す。ペイロードを受け取る細胞の割合は、HEK293-HLA-G フソソームで 1、2、3、5、または 10 回処置したマウスからインキュベートしたフソソーム試料間で異なり得ず、これは、フソソームの血清の不活化または適応免疫応答がないことを示す。場合によっては、ペイロードを受け取る細胞の割合は、ビヒクルで処置したマウスからの血清および HEK293-HLA-G フソソームで処置したマウスからの血清でインキュベートしたフソソーム試料の間で異なり得ず、これは、フソソームの血清の不活化または適応免疫応答がないことを示す。場合によっては、ペイロードを受け取る細胞の割合は、HEK293-HLA-G フソソームに対してよりも HEK293 に由来するフソソームに対してより少なく、これは、HEK293-HLA-G フソソームの血清不活性化または適応免疫応答がないことを示す。

【1400】

実施例 169：フソソームの補体標的化の測定

この実施例は、インビトロアッセイを使用したフソソームに対する補体活性の定量化について説明する。本明細書に記載の修飾フソソームは、対応する非修飾フソソームと比較して、低下した補体活性を誘導し得ると企図される。

【1401】

この実施例は、マウスからの血清を、フソソームに対する補体活性について評価する。この実施例は、すべての補体経路の中心ノードである補体 C3a のレベルを測定する。特に、本明細書に記載の方法は、プロトコルに対する最適化を備えたヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。

【1402】

この実施例では、フソソームは、前述の実施例のうちのいずれか1つによって生成される。フソソームは、補体調節タンパク質DAF（HEK293-DAFフソソーム）のレンチウイルス媒介性発現で修飾されたHEK293細胞、または相補的な調節タンパク質を発現しないHEK293細胞（HEK293フソソーム）から生成される。他の補体調節タンパク質はまた、例えば、崩壊促進因子（DAF、CD55）に結合するタンパク質、例えば因子H（FH）様タンパク質-1（FHL-1）、例えばC4b結合タンパク質（C4BP）、例えば補体受容体1（CD35）、例えば膜補因子タンパク質（MCP、CD46）、例えばプロフェクチン（CD59）、例えば、古典的および代替補体経路CD/C5変換酵素を阻害するタンパク質、例えば、MACを調節するタンパク質を使用してもよい。

10

【1403】

血清は、ナイーブマウス、HEK293-DAFフソソームを投与したマウス、またはHEK293フソソームを投与したマウスから回収される。新鮮な全血を採血し、数時間完全に凝固させることによって、マウスから血清を収集する。凝固物を、遠心分離によってペレット化し、血清上清を除去する。陰性対照は、熱不活化マウス血清である。陰性対照試料は、摂氏56度で1時間加熱される。血清は、アリコートで凍結され得る。

【1404】

異なるフソソームは、レシピエント集団中の細胞の50%がフソソーム中のペイロードを受け取る用量について試験される。フソソームは、本明細書に記載される他の実施例のいずれかを介して生成され得、本明細書に記載されるペイロードのいずれかを含み得る。レシピエント細胞へのペイロードのフソソーム送達をアッセイするための多くの方法も、本明細書に記載されている。この特定の実施例では、ペイロードは、Creタンパク質であり、レシピエント細胞は、CMVプロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを安定的に発現するRPMI8226細胞であり、Creによる組換え時に、GFP発現からRFP発現に切り替わり、マーカーとして、融合およびCreの送達を示す。レシピエント細胞の50%がRFP陽性であると特定された用量は、さらなる実験に使用される。他の実施形態において、レシピエント細胞の50%がペイロードを受け取る特定された用量は、さらなる実験に使用される。好ましい実施形態において、レシピエント細胞の50%がペイロードを受け取る特定の用量は、フソソーム全体で同様である。

20

30

【1405】

レシピエント細胞の50%がリン酸緩衝生理食塩水（PBS、pH7.4）でペイロードを受け取るフソソームの用量から始まるフソソームの2倍希釈液を、同じフソソームで処置したマウスまたはナイーブマウスからの血清の1:10希釈液（アッセイ量、20μl）と混合し、37℃で1時間インキュベートする。試料は、1:500にさらに希釈し、C3aに特異的な酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）で使用される。ELISAは、LifeSpan BioSciences Incにより販売されているマウス補体C3a ELISAキット製品LS-F4210であり、試料中のC3aの濃度を測定する。200pg/mlのC3aが存在するフソソームの用量を、マウスから単離した血清全体で比較する。

40

【1406】

場合によっては、200pg/mlのC3aが存在するフソソームの用量は、HEK293マウス血清でインキュベートしたHEK293フソソームに対してよりもHEK293 DAFマウス血清でインキュベートしたHEK293-DAFフソソームに対しての方が大きく、これは、フソソームを標的とする補体活性がHEK293-DAFフソソームよりもHEK293フソソームで処置したマウスにおいてより大きいことを示す。場合によっては、200pg/mlのC3aが存在するフソソームの用量は、ナイーブマウス血清でインキュベートしたHEK293フソソームに対してよりもナイーブマウス血清でインキュベートしたHEK293-DAFフソソームに対しての方が大きく、これは、

50

フソソームを標的とする補体活性がHEK293-DAFフソソームよりもHEK293フソソームで処置したマウスにおいてより大きいことを示す。

【1407】

実施例170：フソソーム生成プロトコルへのARRDC1の取り込み

この実施例は、フソソーム生成プロトコルへのアレシンドメイン含有タンパク質1 (ARRDC1) の使用について説明し、フソソーム数および得られたフソソームによるCreの送達へのARRDC1の効果について説明する。Creを封入するフソソームを、本明細書に記載されるように、細胞表面上にニパウイルス付着 (NiV-G) および融合 (NiV-F) エンベロープ糖タンパク質Gを発現するHEK-293T細胞から生成されたフソソームを収集し、調製する標準手順によって作製した。対照フソソームは、CreおよびNiV-GおよびNiV-F糖タンパク質のみを発現するHEK-293T細胞から生成された。次いで、Creおよびフソソーム数を送達するフソソームの能力へのARRDC1の効果をも、以下のように決定した。

【1408】

「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを発現するように操作されたレシピエントHEK-293T細胞を、30,000個の細胞/ウェルで完全培地中の黒色の透明な底の96ウェルプレートに播種した。レシピエント細胞を播種してから24時間後、Creを封入している様々な範囲のフソソーム量を、レシピエントLoxP-GFP-stop-LoxP-RFP HEK-293T細胞に適用した。

【1409】

Cre送達が生成プロトコルへのARRDC1の取り込みによって強化された程度を定量化するために、レシピエント細胞の1つの群を、ARRDC1 (NiV-G+NiV-F+NLS-Cre+ARRDC1) でトランスフェクトされた細胞から生成されたフソソームで処理し、細胞の1つの群を、対照フソソーム (NiV-G+NiV-F+NLS-Cre) で処理した。フソソームを、レシピエント細胞で、37℃および5%CO₂で24時間インキュベートした。対照として、レシピエント細胞の追加群も、1.25μLのcerリコンビナーゼゲシクル (Takara、カタログ番号631449) で処理した。24時間後、1μg/mLのHoechst 33342を、完全培地中で希釈し、細胞で、に37℃および5%CO₂で30分間インキュベートした。

【1410】

Hoeschtの添加後、細胞を、フローサイトメトリーを介して分析した。簡単に説明すると、レシピエント細胞試料を解離し、収集し、1×PBS緩衝液で3回洗浄し、1×PBS緩衝液に再懸濁し、405nm、488nm、および561nmの励起用レーザー、ならびに440/50BP (Hoescht)、530/30BP (GFP)、および585/16BP (RFP) の取得用発光フィルターセットをそれぞれ使用して、フローサイトメトリー (Attune、ThermoFisher) によって分析した。Attune NxTソフトウェアを、取得のために使用し、FlowJoソフトウェアを、分析のために使用した。データの取得および分析のために、レシピエント細胞を表す集団を決定するために、FSCおよびSSCチャネルを線形軸に設定した。次いで、この集団をゲートし、細胞ゲート内の最小10,000の事象が、各条件で収集された。次いで、Hoescht (440/50BP) 発光チャネル中のレシピエント細胞を表す集団をゲートし、このゲートを使用して、GFP (530/30BP) の事象を表示した。次いで、GFP+レシピエント細胞を表す集団をゲートし、このゲートを使用して、RFP (585/16BP) の事象を表示した。次いで、RFP陽性細胞 (Creを受容したレシピエント細胞) は、まず、未処理細胞に基づいて陰性ゲートおよびCreリコンビナーゼゲシクルで処理したRFP陽性細胞に基づいて陽性ゲートを設定することによって、Cre送達の計量として定量化された。最高用量で、ARRDC1でトランスフェクトした細胞から生成されたCreをローディングしたフソソームは、総GFP陽性レシピエント細胞の9.2% RFP陽性細胞に相当する観察可能なレベルのCre送達を示した (図52A)。しかしながら、ARRDC1の不在下で、Creの送達は、1.8% RFP陽性細胞

10

20

30

40

50

に相当する送達のレベルに伴って実質的に減少した（図 5 2 A）。未処理のレシピエント細胞は、いかなる感知できるほどの R F P 陽性細胞も示さなかった。総合すると、これらのデータは、フソソームベースの C r e 送達を増強する A R R D C 1 の能力を示す。

【 1 4 1 1 】

蛍光ナノ粒子追跡分析（f N T A）を使用して、A R R D C 1 でトランスフェクトした細胞から生成されたフソソームは、 2.8×10^{11} 個の粒子/mL の濃度を示したが、一方、A R R D C 1 の不在下で生成されたフソソームは、 1.2×10^{11} 個の粒子/mL の濃度を示し（図 5 2 B）、これは、プロデューサー細胞中の A R R D C 1 の存在が、さらなる C e l l M a s k O r a n g e + （f N T A）粒子の生成をもたらすことを示す。

10

20

30

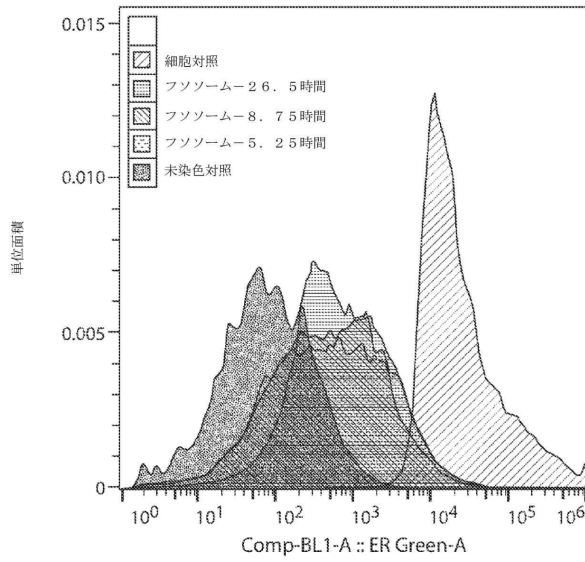
40

50

【図面】

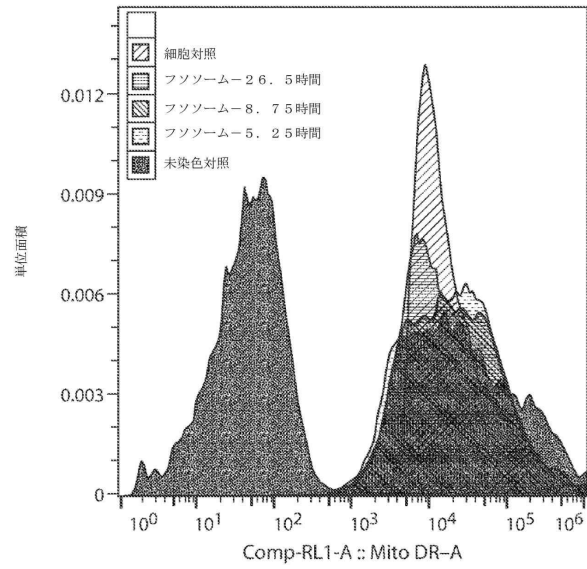
【図 1】

【図 1】



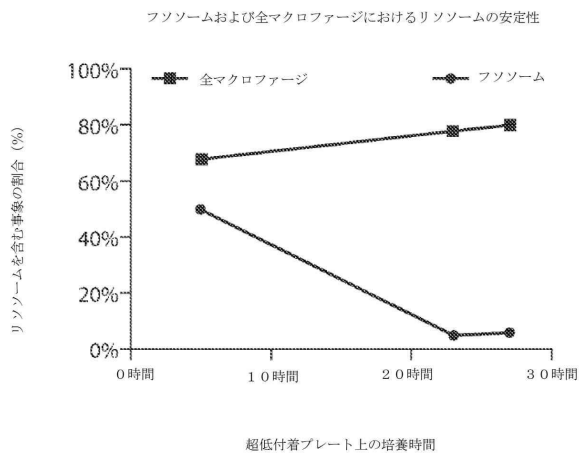
【図 2】

【図 2】



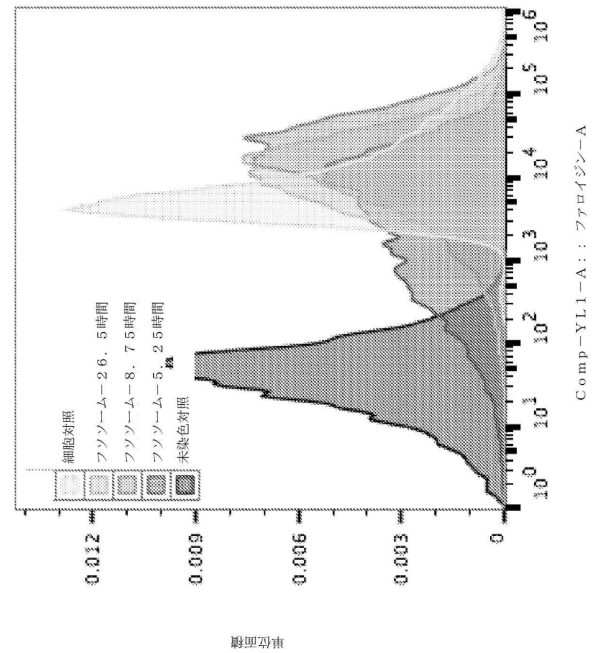
【図 3】

【図 3】



【図 4】

【図 4】



10

20

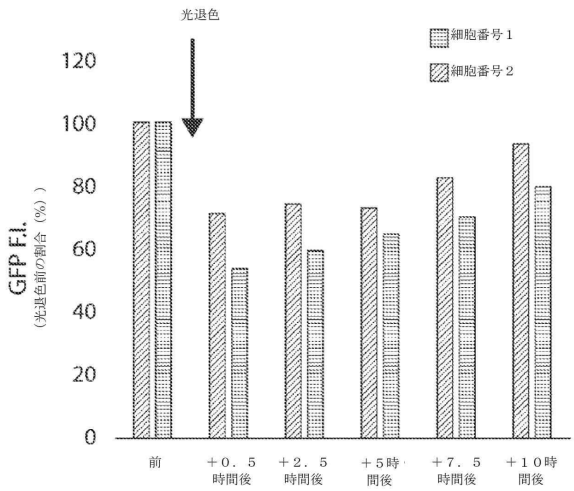
30

40

50

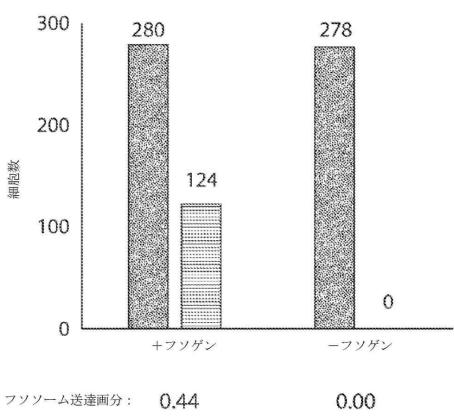
【図 5】

【図 5】



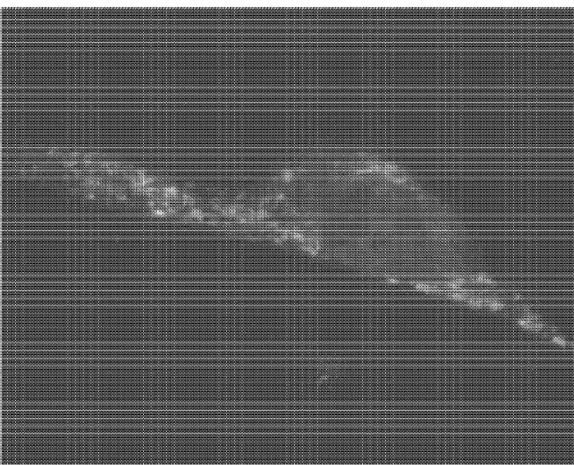
【図 6】

【図 6】



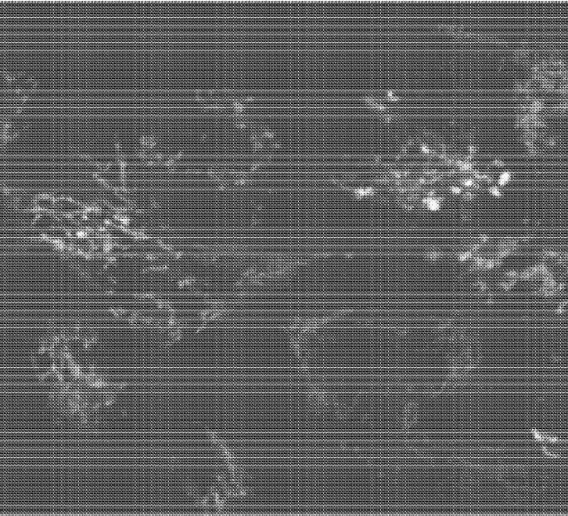
【図 7】

【図 7】



【図 8】

【図 8】



10

20

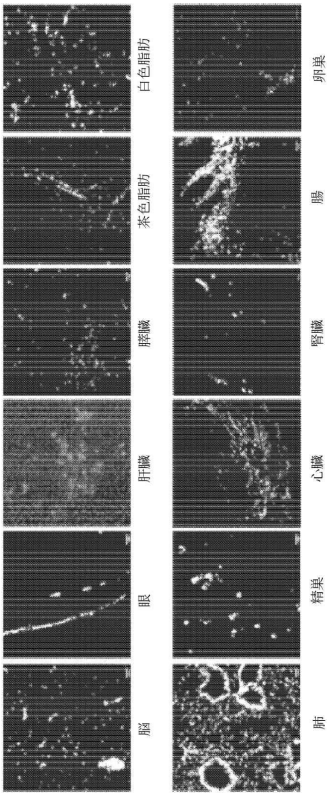
30

40

50

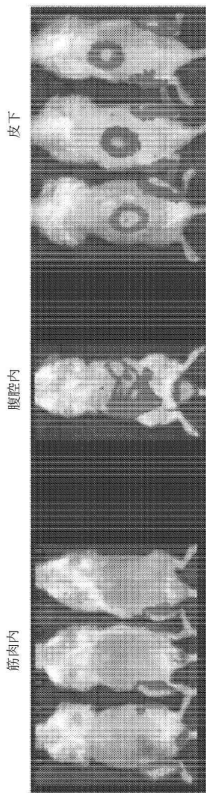
【図 9】

【図 9】



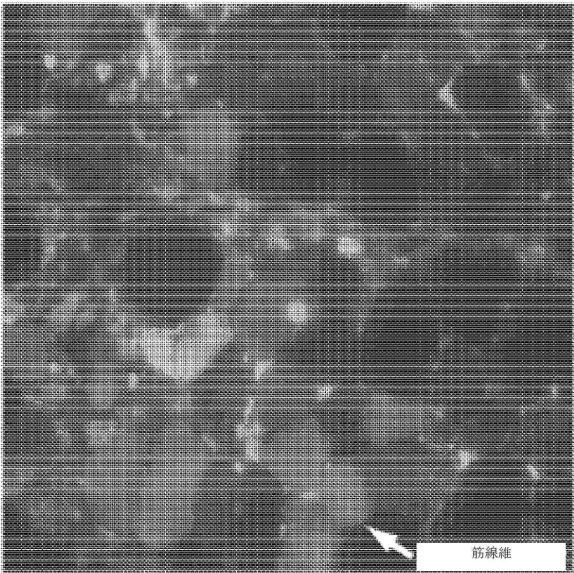
【図 10】

【図 10】



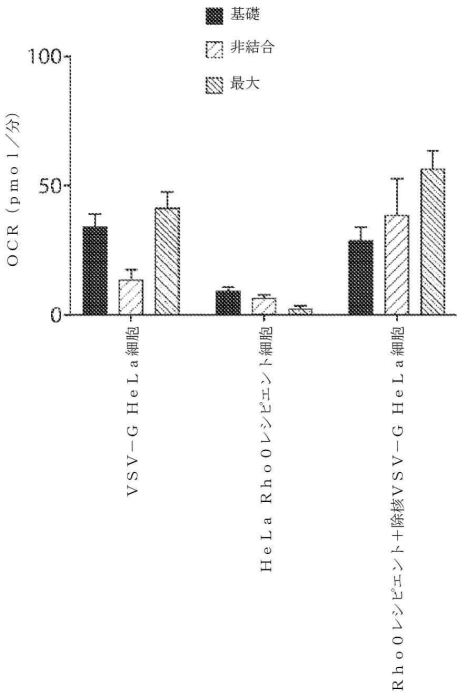
【図 11】

【図 11】



【図 12】

【図 12】



10

20

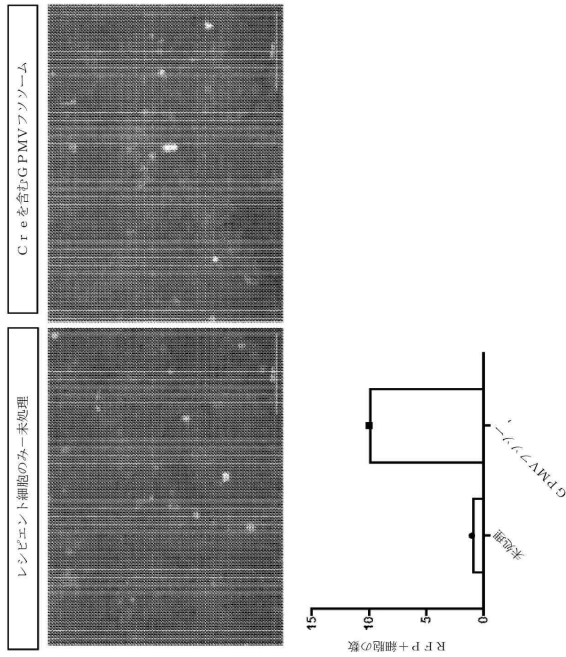
30

40

50

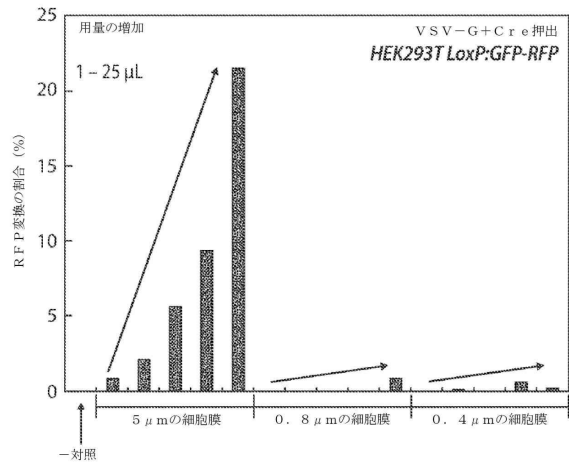
【図 1 3】

【図 1 3】



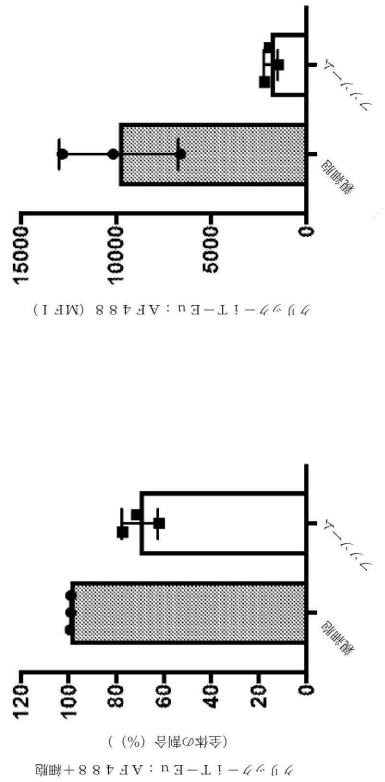
【図 1 4 A】

【図 1 4 A】



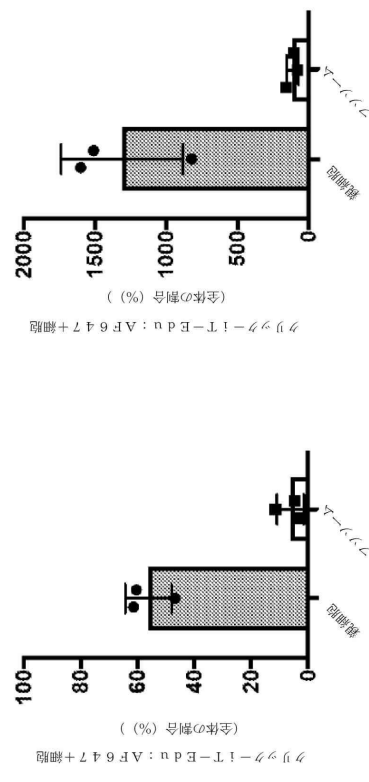
【図 1 4 B】

【図 1 4 B】



【図 1 4 C】

【図 1 4 C】



10

20

30

40

50

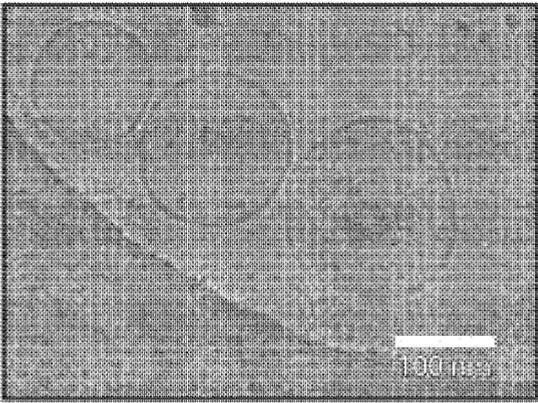
【図 1 4 D】

【図 1 4 D】



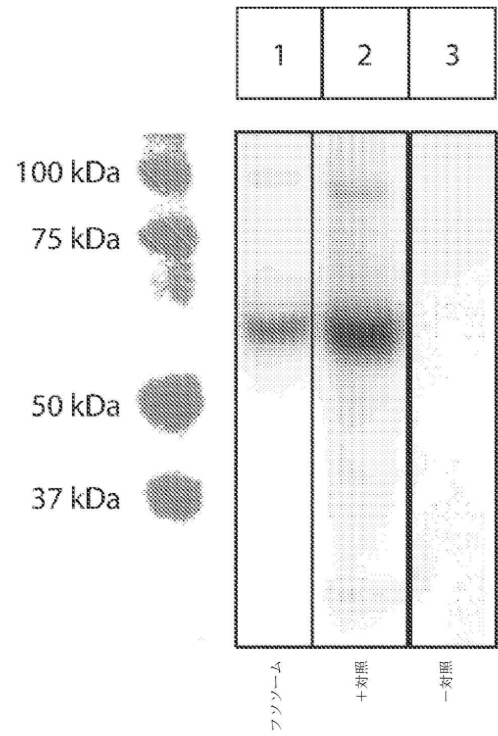
【図 1 5】

【図 1 5】



【図 1 6】

【図 1 6】



【図 1 7 A】

【図 1 7 A】

Nanosight NS300 状態		Nanosight NS300 設定	
温度 / C	24.089	検出閾値	17
粘度 / cP	0.907452	最大ジャンプモード	自動
カメラタイプ	sCMOS	最大ジャンプ距離	24.9209
レーザータイプ	緑色	ブラー	自動
カメラレベル	15	最小トラック長さ	自動
スライダージャック	1206	第 1 のフレーム	0
スライダージェイン	366	分析した総フレーム	1498
シャッター / ms	30.15		
カメラヒストグラム上限	3294		
カメラヒストグラム下限	0		
フレーム率 / fps	24.9825		
シリジポンプ速度 / AU	50		

10

20

30

40

50

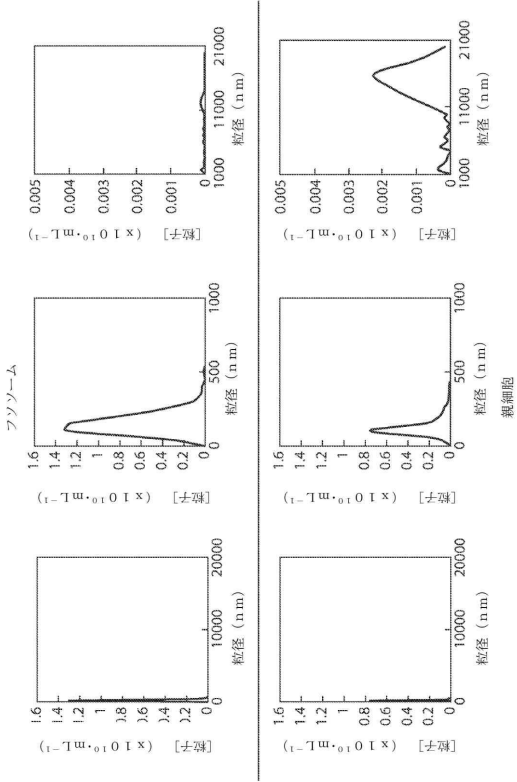
【図 1 7 B】

【図 1 7 B】

共焦点顕微鏡設定	
対物	63X
励起 (nm)	488
発光 (nm)	556

【図 1 7 C】

【図 1 7 C】



【図 1 7 D】

【図 1 7 D】

	フゾウム	親細胞
平均径 (nm)	128.7	175.4
平均体積 (μm^3)	0.067	7.421

【図 1 8】

【図 1 8】

	フゾウム	親細胞
平均径 (nm)	128.7	175.4
最小直径 (nm)	14	29
最大径 (nm)	18720	19802
中位径 (nm)	134	99
10% 変位値 (nm)	53	52
25% 変位値 (nm)	88	66
75% 変位値 (nm)	226	241
90% 変位値 (nm)	4450	10649
平均体積 (μm^3)	0.067	7.421

10

20

30

40

50

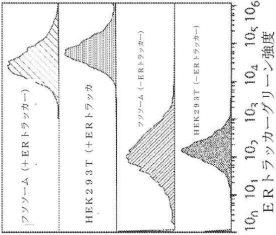
【図 19】

【図 19】

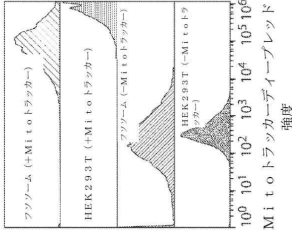
	フソソーム	親細胞
平均径 (nm)	128.7	175.4
平均体積 (μm^3)	0.067	7.421

【図 20】

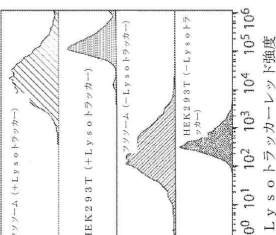
【図 20 A】



【図 20 B】



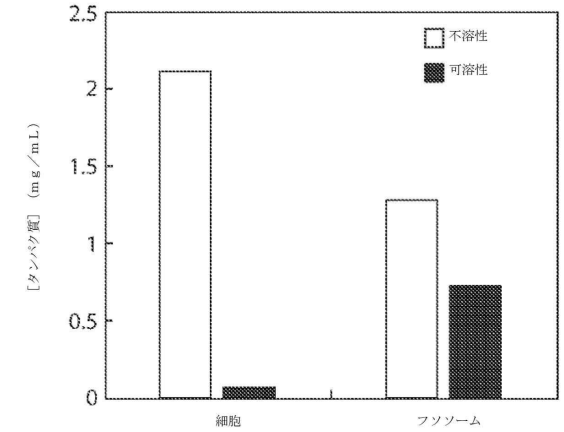
【図 20 C】



【図 21】

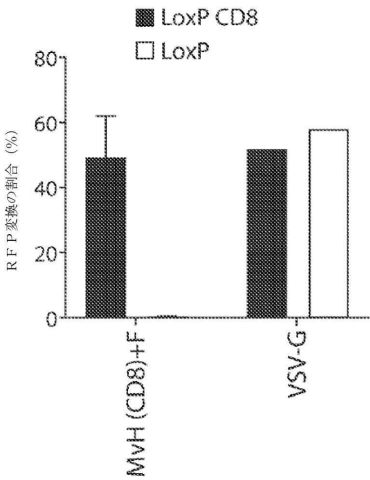
【図 21】

	[タンパク質] (mg/mL)		比率
	不溶性	可溶性	
細胞	2.12	0.06	0.028
フソソーム	1.28	0.72	0.563



【図 22】

【図 22】



フソソーム	標的融合の絶対量
MvH(CD8)+F	48.8%
VSV-G	0%

10

20

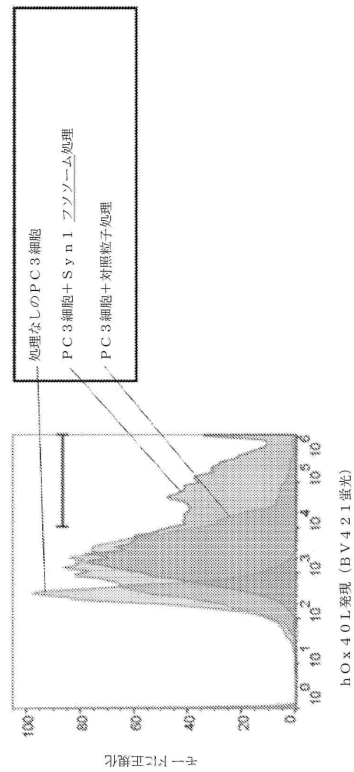
30

40

50

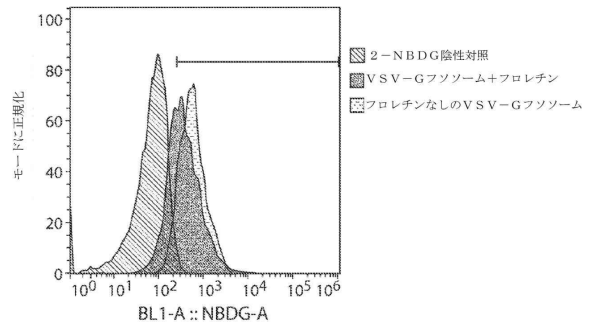
【図 2 3】

【図 2 3】



【図 2 4】

【図 2 4】

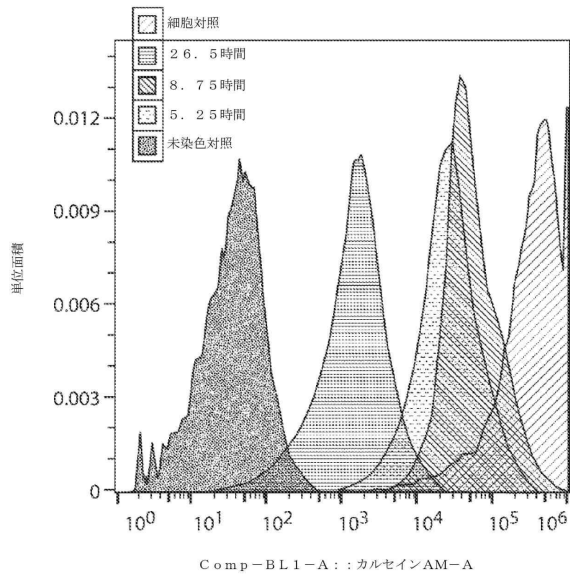


10

20

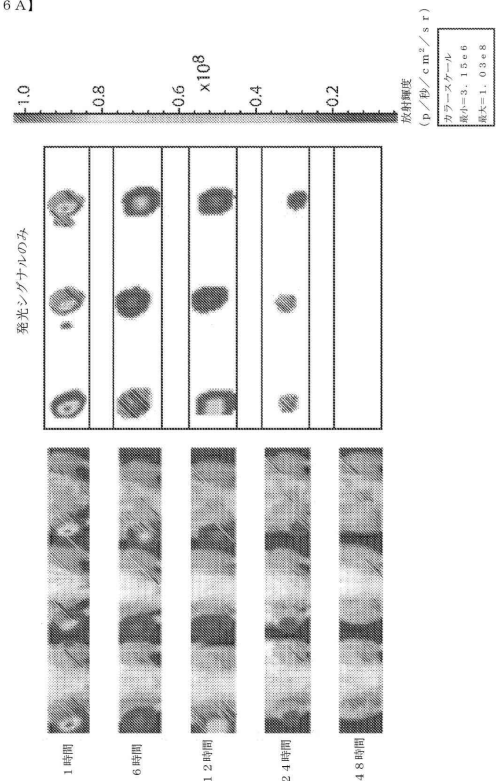
【図 2 5】

【図 2 5】



【図 2 6 A】

【図 2 6 A】



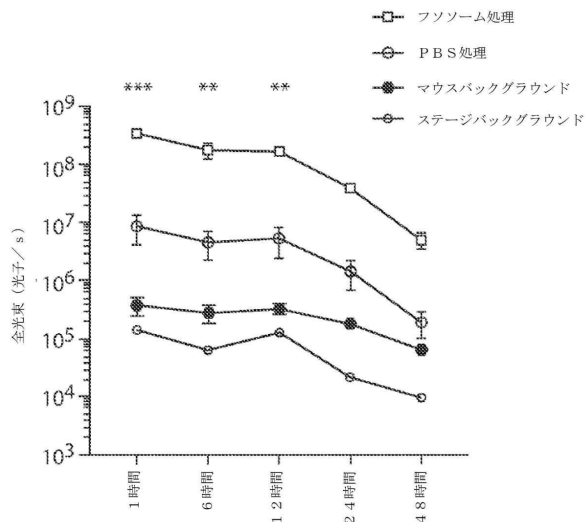
30

40

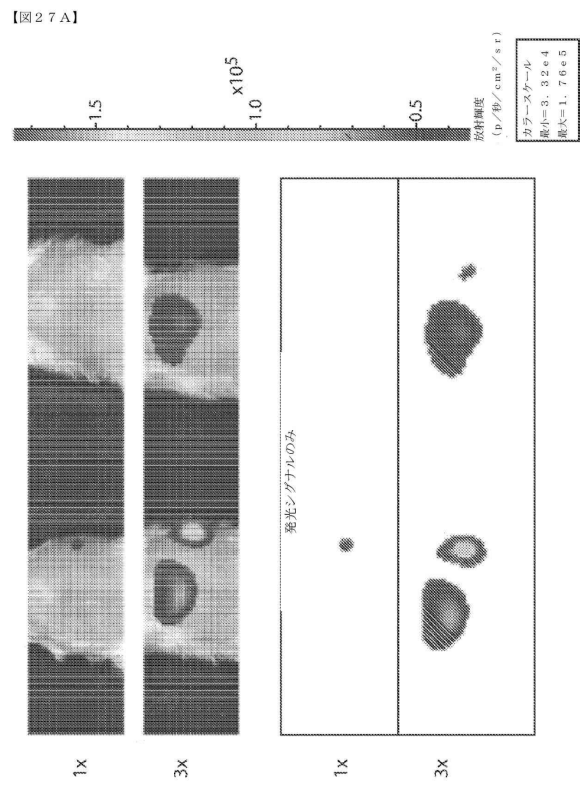
50

【図 2 6 B】

【図 2 6 B】

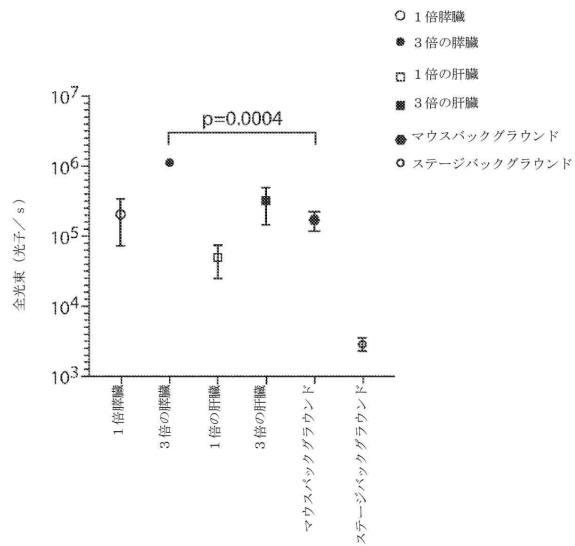


【図 2 7 A】

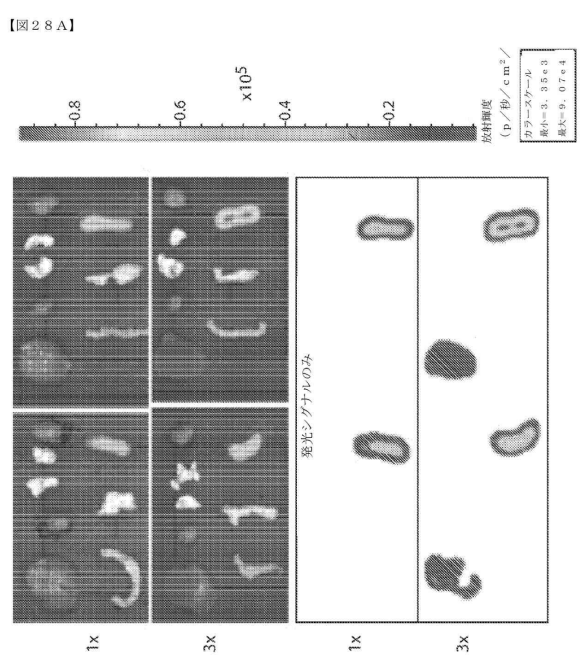


【図 2 7 B】

【図 2 7 B】



【図 2 8 A】



10

20

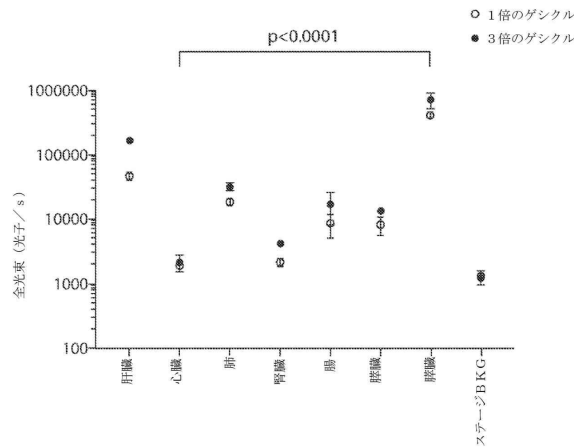
30

40

50

【図 2 8 B】

【図 2 8 B】



【図 2 9】

【図 2 9】

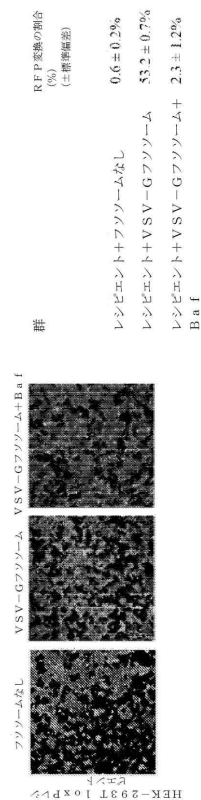


10

20

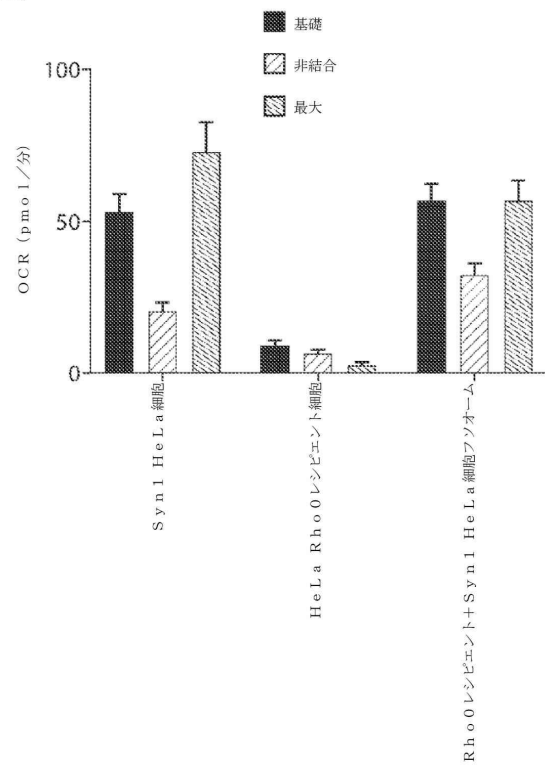
【図 3 0】

【図 3 0】



【図 3 1】

【図 3 1】



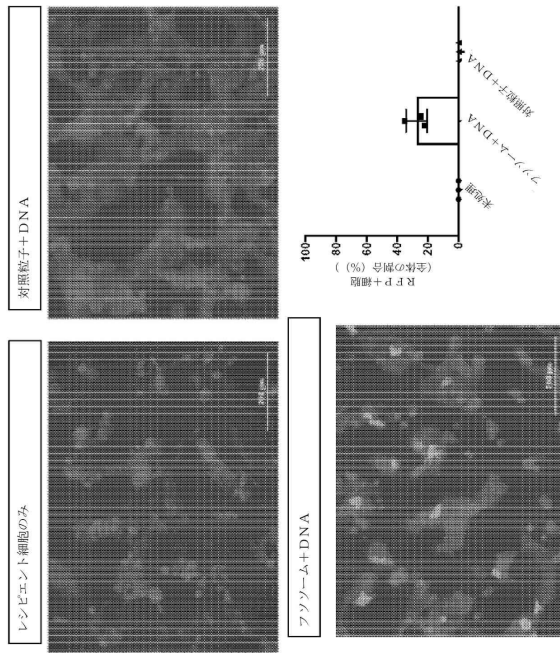
30

40

50

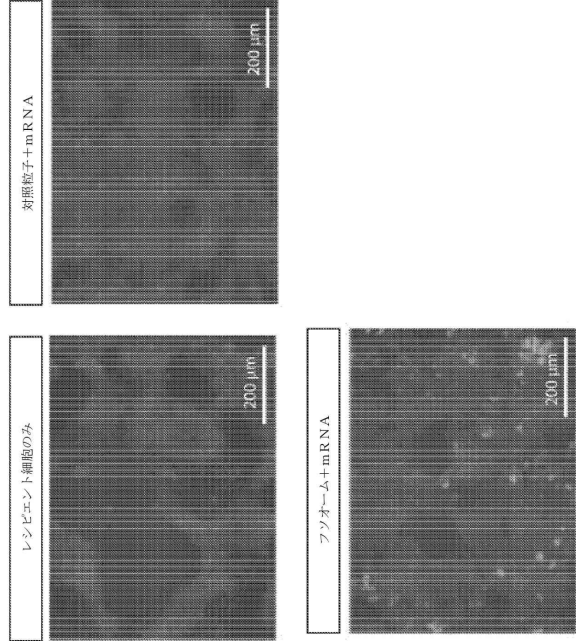
【図 3 2】

【図 3 2】



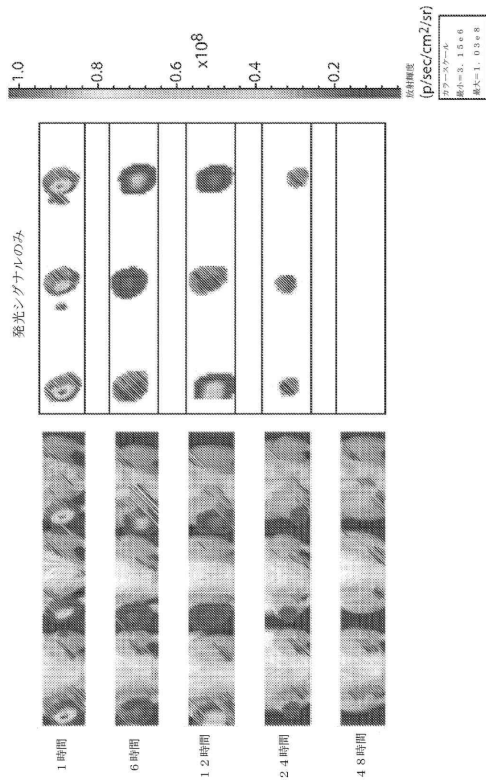
【図 3 3】

【図 3 3】



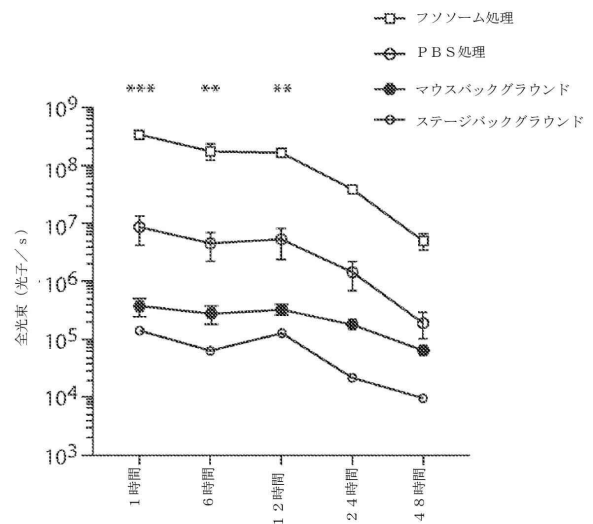
【図 3 4 A】

【図 3 4 A】



【図 3 4 B】

【図 3 4 B】



10

20

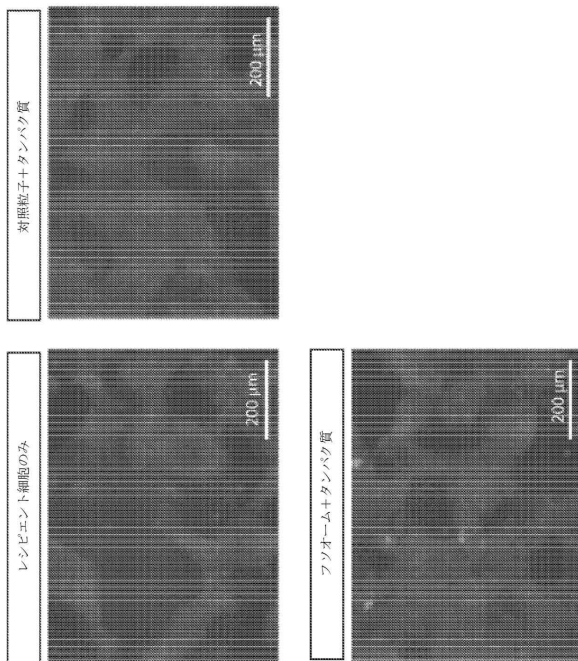
30

40

50

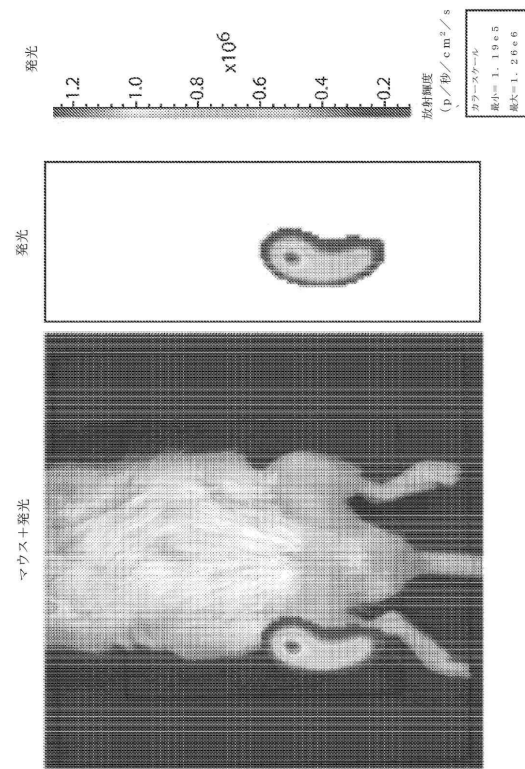
【図 3 5】

【図 3 5】



【図 3 6 A】

【図 3 6 A】

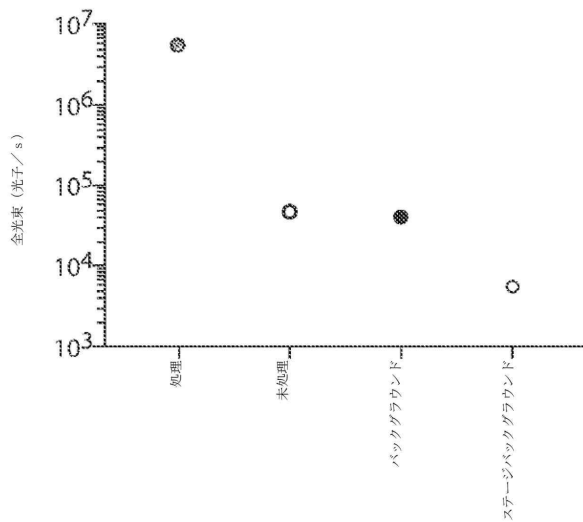


10

20

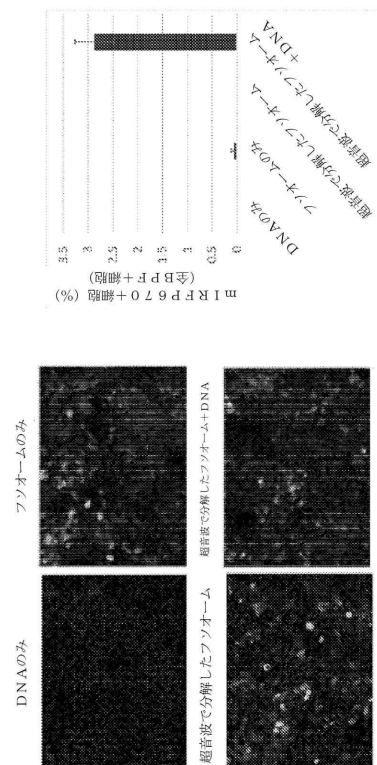
【図 3 6 B】

【図 3 6 B】



【図 3 7】

【図 3 7】



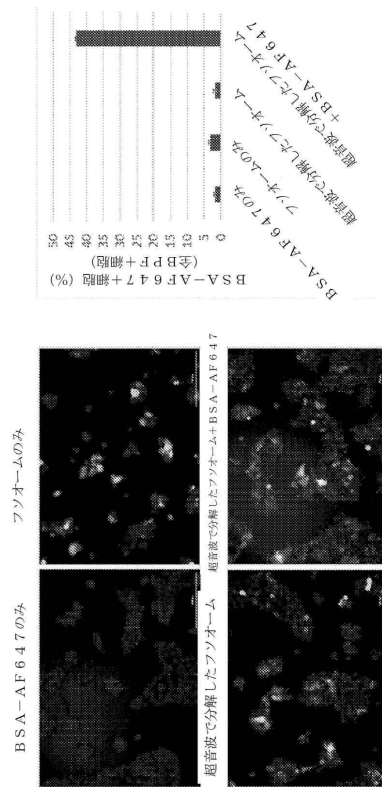
30

40

50

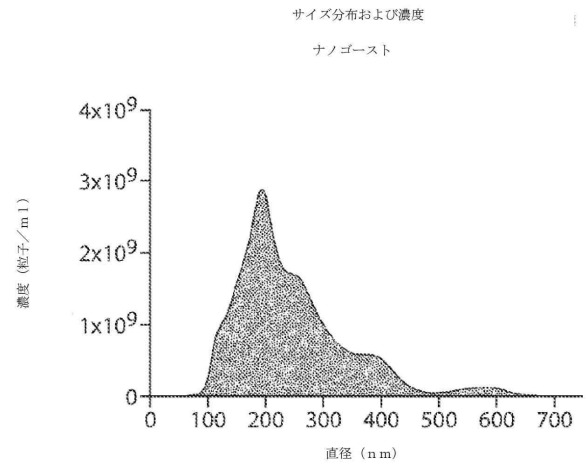
【図 3 8】

【図 3 8】



【図 3 9】

【図 3 9】

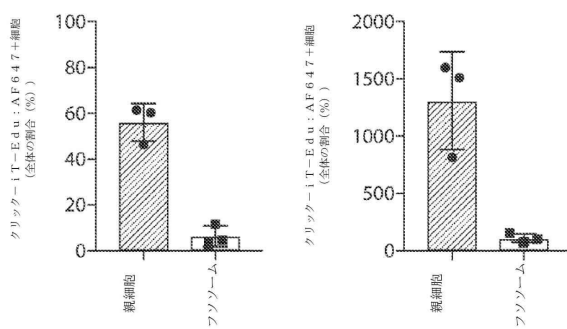


10

20

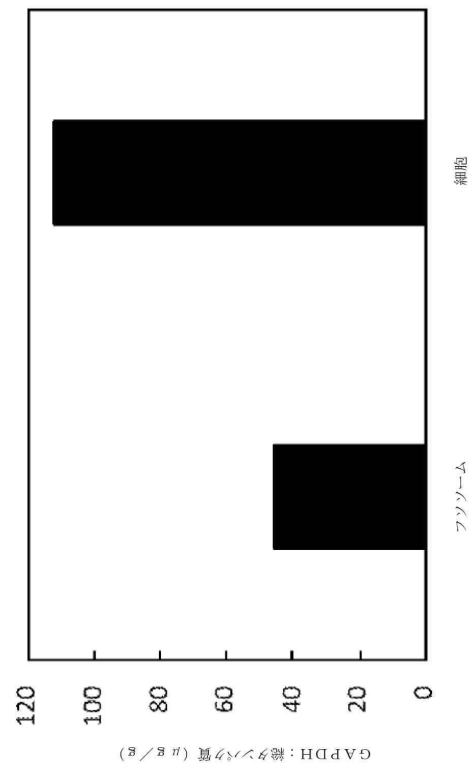
【図 4 0】

【図 4 0】



【図 4 1】

【図 4 1】



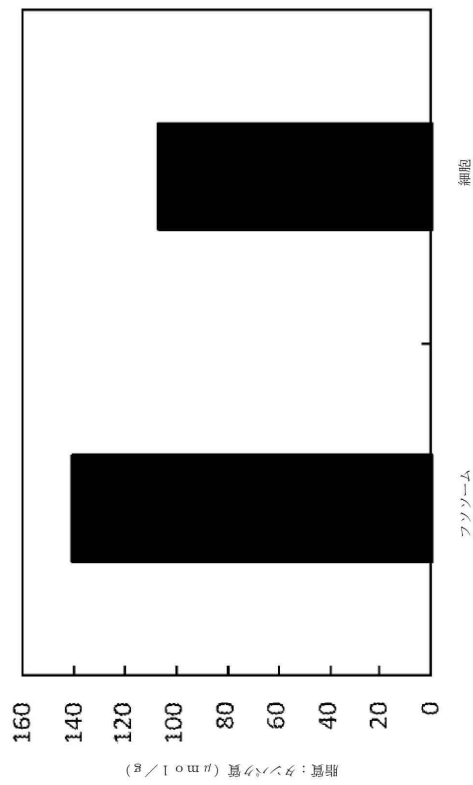
30

40

50

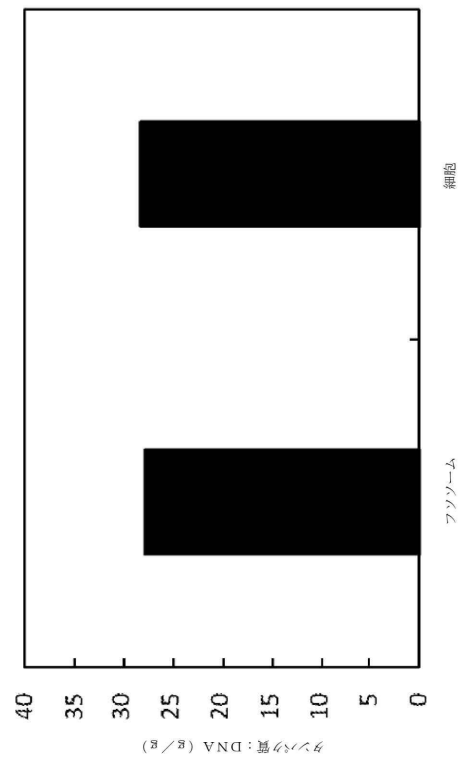
【図 4 2】

【図 4 2】



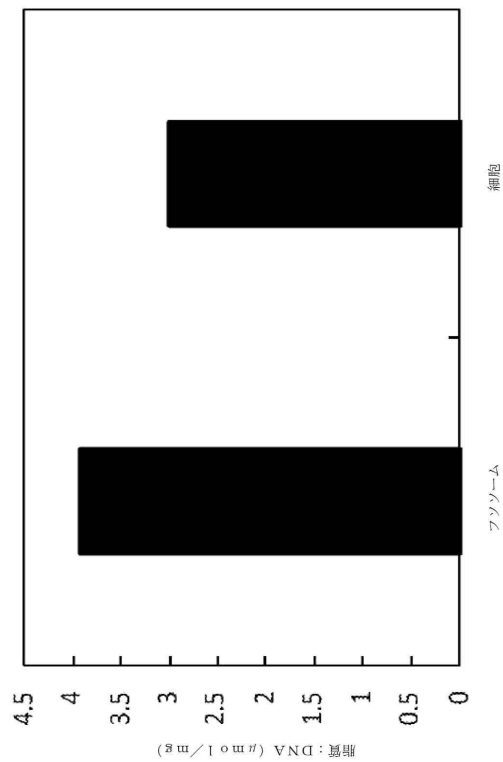
【図 4 3】

【図 4 3】



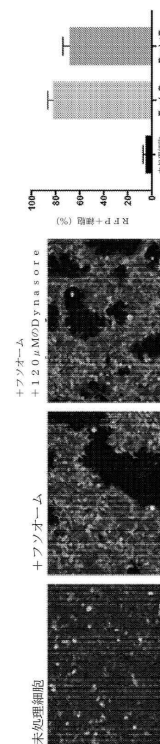
【図 4 4】

【図 4 4】



【図 4 5】

【図 4 5】



10

20

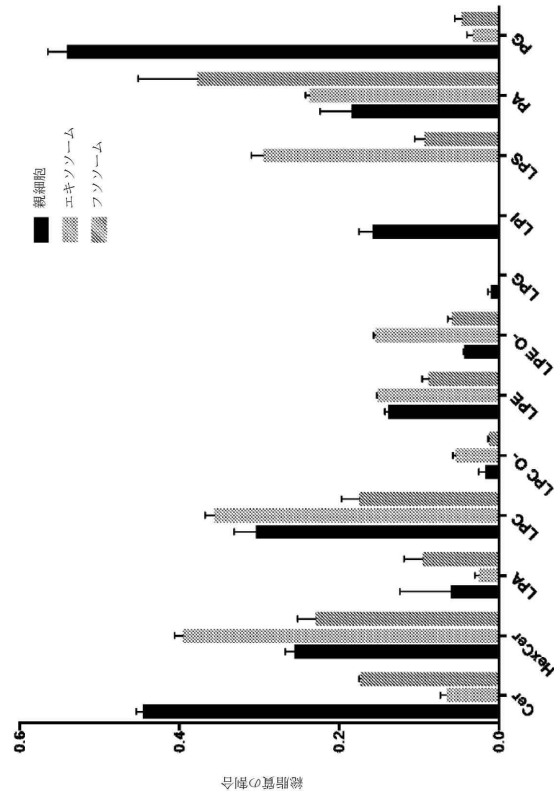
30

40

50

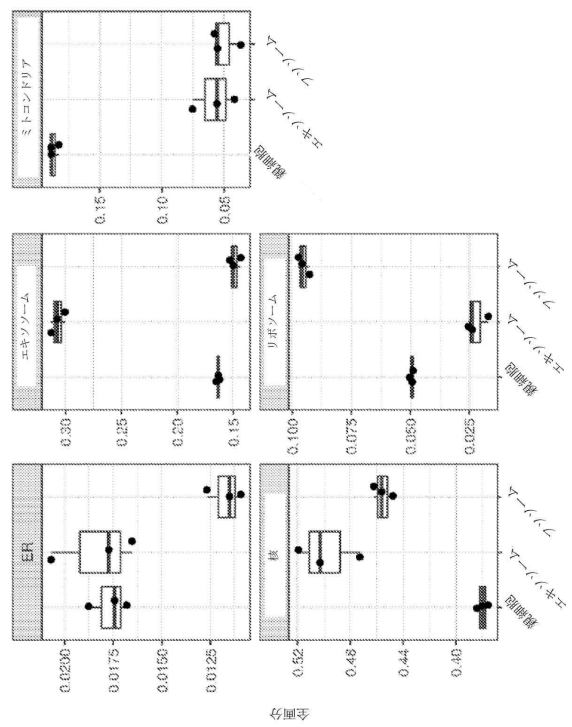
【図 4 9 B】

【図 4 9 B】



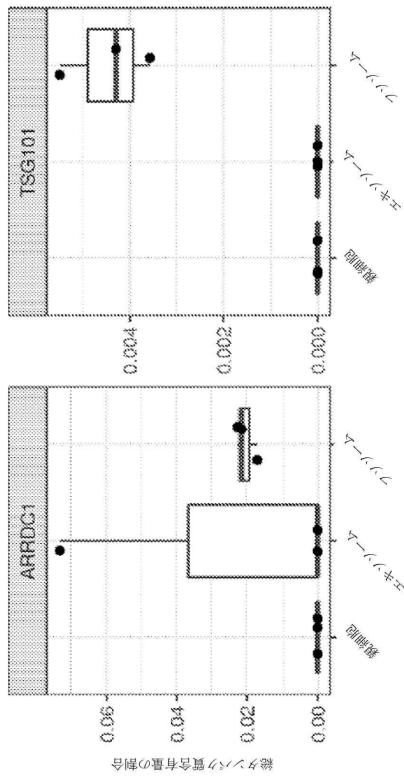
【図 5 0】

【図 5 0】



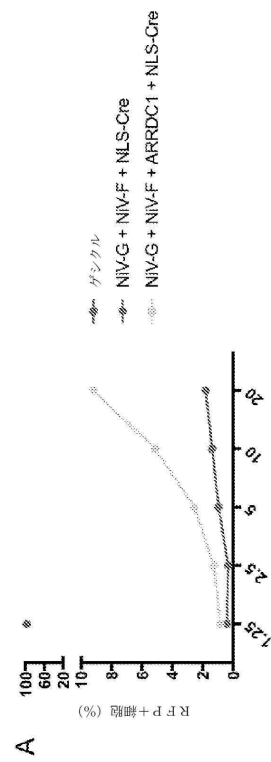
【図 5 1】

【図 5 1】



【図 5 2 A】

【図 5 2 A】



10

20

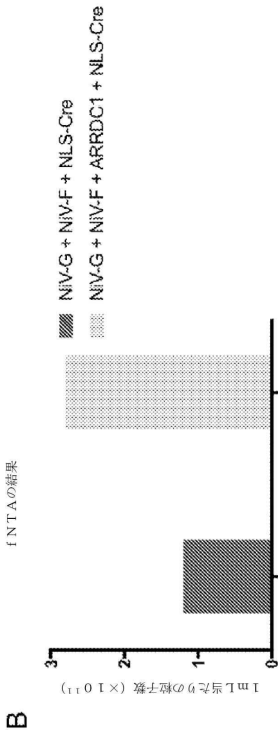
30

40

50

【図 5 2 B】

【図 5 2 B】



【配列表】

0007395355000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 C 1 2 N 15/88 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 C 1 2 N 15/88
 C 1 2 N 5/10

Z Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/575,147

(32)優先日 平成29年10月20日(2017.10.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁理士 山本 健策

(72)発明者 ヴォン マルツァーン, ジェフリー エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ミルウィド, ジョン マイルズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ミー, マイケル トラヴィス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ルーベンス, ジェイコブ ローゼンブラム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ステビンズ, ネイサン ウィルソン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ギブソン, モリー クリサン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ゴードン, ニール フランシス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ジャン, ボー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 トルドー, カイル マーヴィン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 ハートレー, ブリガム ジェイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 プティリ, タマル ローズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
 5 5, 8ティールエイチ フロア

(72)発明者 マーダヴィアニ, キアナ

-
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
55, 8ティーエイチ フロア
(72)発明者 ドビン, マシュー ミルネス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
55, 8ティーエイチ フロア
- 審査官 榎本 佳予子
(56)参考文献 特表2017-502997 (JP, A)
特表2013-510562 (JP, A)
特表2008-521430 (JP, A)
特表2014-512409 (JP, A)
米国特許出願公開第2006/0045910 (US, A1)
Nature Biotechnology, Vol.29, No.4, 2011年, p.341-345
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 47/00-47/69
A61K 9/00-9/72
A61K 38/16
A61K 31/7088
A61K 45/00
A61K 48/00
A61K 35/76
C12N 15/88
C12N 5/10
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)