(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-533052
(P2022-533052A)
(43)公表日　令和4年7月21日(2022.7.21)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/20	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*1/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*38/19 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/19	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*9/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/02	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全40頁）

(21)出願番号　特願2021-566935(P2021-566935)
(86)(22)出願日　令和2年5月13日(2020.5.13)
(85)翻訳文提出日　令和3年11月29日(2021.11.29)
(86)国際出願番号　PCT/IL2020/050518
(87)国際公開番号　WO2020/230129
(87)国際公開日　令和2年11月19日(2020.11.19)
(31)優先権主張番号　62/847,339
(32)優先日　令和1年5月14日(2019.5.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　514263687
ハダシット メディカル リサーチ サービシズ アンド ディベラップメント リミテッド
イスラエル国 ９１１２００１ エルサレム、ピー．オー．ビー． １２０００，ハダサー エイン ケレム メディカル センター、 エルサレム バイオパーク Ｊｅｒｕｓａｌｅｍ ＢｉｏＰａｒｋ，Ｈａｄａｓｓａｈ Ｅｉｎ Ｋｅｒｅｍ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ， Ｐ．Ｏ．Ｂ． １２０００ Ｊｅｒｕｓａｌｅｍ， ９１１２００１ Ｉｓｒａｅｌ
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　炎症性腸疾患を治療する際の使用のための乳汁由来の細胞外小胞

(57)【要約】
本発明は、乳汁から単離されたエクソソームを含む組成物、および炎症性腸疾患（ＩＢＤ）を治療するためのそれらの使用に関する。特に、ＩＢＤを治療する際の使用のための、乳汁に由来するエクソソームおよびそれらで補われた経腸処方が開示されている。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
炎症性腸疾患（ＩＢＤ）またはそれに関連する状態を治療する際の使用のための、乳汁から得られるエクソソームを含む組成物であって、前記エクソソームが１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、前記組成物が経腸投与のために処方される、組成物。
【請求項２】
前記乳汁が、ウシ、ヤギ、またはヒトの乳汁である、請求項１に記載の使用のための組成物。
【請求項３】
前記エクソソームが、前記乳汁のスキム画分および／または前記乳汁の脂肪画分から得られる、請求項１または２に記載の使用のための組成物。
【請求項４】
前記１つ以上のｍｉＲＮＡ分子が、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａからなる群より選択される、請求項１～３のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項５】
前記ｍｉＲＮＡ分子が、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項６】
前記ＴＧＦ－βがＴＧＦ－β１である、請求項１～５のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項７】
前記エクソソームが、タンパク質、ペプチド、核酸分子、および脂質からなる群より選択される少なくとも１つの生物学的に活性な化合物をさらに含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項８】
前記エクソソームが、前記エクソソームの総タンパク質の約２０％（ｗ／ｗ）未満のカゼインを含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項９】
前記炎症性腸疾患（ＩＢＤ）が、クローン病および潰瘍性大腸炎からなる群より選択される、請求項１～８のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１０】
潰瘍性大腸炎が遠位大腸炎である、請求項９に記載の使用のための組成物。
【請求項１１】
遠位大腸炎が、直腸炎、直腸Ｓ状結腸炎、および左側大腸炎からなる群より選択される、請求項１０に記載の使用のための組成物。
【請求項１２】
前記ＩＢＤに関連する状態が回腸嚢炎である、請求項１に記載の使用のための組成物。
【請求項１３】
前記組成物が経口投与または経管栄養のために処方される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１４】
前記組成物が直腸投与のために処方される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１５】
前記組成物が、栄養補助もしくは医薬組成物、食事処方物、または栄養補助食品として処方される、請求項１３に記載の使用のための組成物。
【請求項１６】
前記組成物が、浣腸剤、坐剤、またはフォームとして処方される、請求項１４に記載の使用のための組成物。

【請求項１７】
前記エクソソームが、対象の約０．１ｍｇ～約２５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲の治療有効量で前記組成物中に存在する、請求項１～１６のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１８】
前記エクソソームの前記治療有効量が、前記対象の約１ｍｇ～約５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲である、請求項１７に記載の使用のための組成物。
【請求項１９】
乳汁から得られたエクソソームを含む組成物であって、前記組成物は直腸投与のために処方されており、前記エクソソームは１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含む、組成物。
【請求項２０】
前記乳汁が、ウシ、ヤギ、またはヒトの天然の乳汁である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記エクソソームが、前記乳汁のスキム画分および／または前記乳汁の脂肪画分から得られる、請求項１９または２０に記載の組成物。
【請求項２２】
前記１つ以上のｍｉＲＮＡ分子が、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａからなる群より選択される、請求項１９～２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３】
前記ｍｉＲＮＡ分子が、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含む、請求項１９～２２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２４】
前記ＴＧＦ－βがＴＧＦ－β１である、請求項１９～２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５】
前記エクソソームが、タンパク質、ペプチド、核酸分子、および脂質からなる群より選択される少なくとも１つの生物学的に活性な化合物をさらに含む、請求項１９～２４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６】
前記エクソソームが、前記エクソソームの総タンパク質の約２０％（ｗ／ｗ）未満のカゼインを含む、請求項１９～２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７】
浣腸剤、坐剤またはフォームとして処方される、請求項１９～２６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８】
担体および任意選択で増粘剤および／または潤滑剤を含む浣腸剤として処方される、請求項２７に記載の組成物。
【請求項２９】
担体および増粘剤を含む坐剤として処方される、請求項２７に記載の組成物。
【請求項３０】
炎症性腸疾患（ＩＢＤ）またはそれに関連する状態を治療する方法であって、そのような治療を必要とする対象に、乳汁から得られる治療有効量のエクソソームを含む組成物を投与することを含み、前記エクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、前記組成物は、経腸投与経路によって投与され、それによって、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療する、方法。
【請求項３１】
前記乳汁が、ウシ、ヤギ、またはヒトの乳汁である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】

前記エクソソームが、前記乳汁のスキム画分および／または前記乳汁の脂肪画分から得られる、請求項３０または３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記１つ以上のｍｉＲＮＡ分子が、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａからなる群より選択される、請求項３０～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記ｍｉＲＮＡ分子が、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含む、請求項３０～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記ＴＧＦ－βがＴＧＦ－β１である、請求項３０～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記エクソソームが、タンパク質、ペプチド、核酸分子、および脂質からなる群より選択される少なくとも１つの生物学的に活性な化合物をさらに含む、請求項３０～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記エクソソームが、前記エクソソームの総タンパク質の約２０％（ｗ／ｗ）未満のカゼインを含む、請求項３０～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記炎症性腸疾患（ＩＢＤ）が、クローン病および潰瘍性大腸炎からなる群より選択される、請求項３０～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
潰瘍性大腸炎が遠位大腸炎である、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
遠位大腸炎が、直腸炎、直腸Ｓ状結腸炎、および左側大腸炎からなる群より選択される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記ＩＢＤに関連する状態が回腸嚢炎である、請求項３０に記載の方法。
【請求項４２】
前記組成物が経口投与または経管栄養によって投与される、請求項３０～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記組成物が直腸投与によって投与される、請求項３０～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記組成物が、栄養補助もしくは医薬組成物、食事処方物、または栄養補助食品として処方される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
前記組成物が、浣腸剤、坐剤、またはフォームとして処方される、請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
前記エクソソームの前記治療有効量が、前記対象の約０．１ｍｇ～約２５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲である、請求項３０～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記エクソソームの前記治療有効量が、前記対象の約１ｍｇ～約５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲である、請求項４６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）を治療するための乳汁由来のエクソソームに関する。

特に、本発明は、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療する際の使用のために乳汁から単離されたエクソソームを含む組成物に関し、ここで、組成物は経腸投与のために処方される。

【背景技術】

【０００２】

エクソソームは、タンパク質、脂質、ｍＲＮＡ、およびｍｉＲＮＡなどのさまざまな成分を詰め込むことができる直径約３０～１５０ｎｍのナノベシクルである。エクソソームはその積荷をレシピエント細胞に移すことができ、それ自体が細胞－細胞の通信を媒介することができる細胞外メッセンジャーとして機能する。エクソソームは、関節リウマチなどの自己免疫疾患および炎症性疾患の潜在的な新しい治療法として関与してきた。

【０００３】

エクソソームは、血清、気管支肺胞洗浄液、尿、母乳などの生理液において見出されている。哺乳動物の乳汁に由来するエクソソームは、融合によって細胞内に生物学的高分子、例えば、ｍｉＲＮＡを伝達する能力を有することが見出された。哺乳動物の乳汁には、腸上皮細胞に取り込まれる可能性のあるｍｉＲＮＡ－１４８などの有益なｍｉＲＮＡを運ぶ高濃度のエクソソームが含まれていることが示された（Ｇｏｌａｎ－Ｇｅｒｓｔｌ Ｒ，ｅｔ．ａｌ．，（２０１７），Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｆ ｍｉｌｋ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍｉＲＮＡｓ．Ｍｏｌ Ｎｕｔｒ Ｆｏｏｄ Ｒｅｓ．２０１７；６１（１０））。哺乳動物の乳汁には、ＴＧＦ－βなどの免疫抑制性サイトカインを運ぶエクソソームが含まれていることもまた示された（Ｐｉｅｔｅｒｓ ＢＣＨ，ｅｔ．ａｌ．（２０１５）。市販の牛乳には、免疫調節性ＴＧＦ－βを発現する物理的に安定した細胞外小胞が含まれている（ＰＬＯＳ ＯＮＥ，ＤＯＩ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０１２１１２３）。さらなる研究は、牛乳から単離された小胞の経口送達が実験的関節炎を改善できることを示した（Ａｒｎｔｚ ＯＪ，ｅｔ．ａｌ．（２０１５），Ｏｒａｌ ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｏｖｉｎｅ ｍｉｌｋ ｄｅｒｉｖｅｄ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｖｅｓｉｃｌｅｓ ａｔｔｅｎｕａｔｅｓ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ｉｎ ｔｗｏ ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌｓ．Ｍｏｌ Ｎｕｔｒ Ｆｏｏｄ Ｒｅｓ．，５９：１７０１－１２）。

【０００４】

大腸炎は、結腸の内層の炎症状態である。大腸炎には、感染症、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、結腸内の血液供給の喪失、またはコラーゲンもしくはリンパ球による結腸壁の浸潤を含む、さまざまな原因が存在する。潰瘍性大腸炎（ＵＣ）、クローン病、虚血性大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、リンパ球性大腸炎、および顕微鏡的大腸炎を含む、さまざまな種類の大腸炎が存在する。

【０００５】

炎症性腸疾患（ＩＢＤ）は、消化管の慢性再発性炎症性疾患であり、伝統的に、２つの主要な表現型であるクローン病（ＣＤ）および潰瘍性大腸炎（ＵＣ）を特徴とする。これらの表現型は、両方とも、通常、重度の時折出血性である下痢、腹痛、倦怠感、および体重減少を特徴とする。潰瘍性大腸炎は結腸に限定されるが、クローン病は口と肛門との間のどこでも発生する可能性がある。クローン病では、炎症を起こした領域によって分離された腸の健康な部分（スキップされた領域）が存在する。一方、潰瘍性大腸炎は、小腸を伴わない結腸の連続的な炎症である。潰瘍性大腸炎は、結腸の粘膜層に影響を与える表在性炎症であるが、クローン病では、炎症は貫壁性であり、すべての腸層に影響を与える可能性がある。

【０００６】

ＩＢＤ治療の現在の療法は、主に免疫抑制薬物に焦点を合わせている。しかし、ＩＢＤの患者は、現在の医学的療法を用いても、頻繁に再発を経験する。患者のかなりの部分が現在の治療に適切に反応しないことは十分に確立されている。さらに、ＩＢＤの患者は結腸直腸癌（ＣＲＣ）のリスクが増加していることが知られている。ＩＢＤ患者は異形成病変を発症する可能性があり、その異形成前駆体は通常腺腫性ポリープである。

【０００７】
Ｗａｎｇ　Ｌら（Ｆｒｏｎｔ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１７，８：６５１）は、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ　ｊａｐｏｎｉｃｕｍ可溶性卵抗原で処理された樹状細胞に由来するエクソソームが、マウスに腹腔内注射された場合、デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）誘発性大腸炎を減弱化することができたことを開示している。
【０００８】
Ｍａｏ　Ｆら（Ｂｉｏｍｅｄ　Ｒｅｓ　Ｉｎｔ．２０１７；２０１７：５３５６７６０）は、ヒト臍帯間葉系幹細胞に由来するエクソソームが、静脈内注射された場合にマウスのＤＳＳ誘発性ＩＢＤを軽減したことを開示している。
【０００９】
本発明者らのＷＯ２０１７／０９００４９は、乳汁から単離された微小胞、それを含む組成物、および乳汁処方の調製のためのその使用を開示している。ＷＯ２０１７／０９００４９によると、エクソソームおよび脂肪球を含む微小胞は、さまざまなｍｉＲＮＡ分子をカプセル化する。
【００１０】
ＩＢＤまたはそれに関連する状態の治療および予防のための改善された組成物および方法に対する満たされていない必要性が残っている。
【発明の概要】
【００１１】
本発明は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）またはそれに関連する状態を治療する際の使用のための乳汁から得られるエクソソームを含む組成物を提供し、エクソソームは１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、組成物は経腸投与のために処方される。本発明はさらに、乳汁から得られたエクソソームを含む組成物を提供し、エクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、この組成物は、直腸投与のために処方される。本発明はさらに、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療するための方法を提供し、そのような治療を必要とする対象に、上記エクソソームを含む経腸組成物を投与することを含む。
【００１２】
本発明は、部分的に、乳汁から得られたか、または乳汁に由来するエクソソームが、既知の抗炎症性サイトカインＴＧＦ－β、特にＴＧＦ－β１を大量に含むという驚くべき発見に由来する。
【００１３】
ヒトの乳汁もしくは牛乳のスキム画分またはヒトの乳汁もしくは牛乳の脂肪画分から単離されたエクソソームが、大腸炎の動物モデル、すなわち、マウスにおいてデキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）で誘発された大腸炎に経口投与した場合に、これらのマウスの疾患の特徴的な症状を低減または緩和するのに非常に効果的であったことが初めて開示された。乳汁由来のエクソソームを経口投与すると、大腸炎マウスの体重減少を予防するだけでなく、結腸の炎症もまた低減し、大腸炎の重症度を減弱化することが現在開示されている。
【００１４】
本発明はさらに、ＤＳＳ誘発性大腸炎マウスに経口投与された乳汁由来のエクソソームが、ＴＧＦ－β１タンパク質ならびにｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含むいくつかのｍｉＲＮＡ分子の発現を増加させ、かつこれらのマウスの結腸における炎症誘発性サイトカイン、例えば、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６の発現を減少させたという予想外の発見を開示している。
【００１５】
経口投与された乳汁由来のエクソソームは、ＤＳＳ治療マウスの大腸炎を治療する際に限らず、疾患の発症を減弱化する際にも、両方で有効であったことが、現在、さらに開示されている。また、マウスにおける大腸炎の重症度を低下させる上での乳汁由来のエクソソームの効果は、既知の栄養的に粉末化された飼料、すなわちＭｏｄｕｌｅｎ（登録商標）

ＩＢＤの効果よりも大きかったか、またはより優れてさえいた。いかなる作用の理論またはメカニズムにも拘束されることはないが、大腸炎に対する乳汁由来のエクソソームの治療効果の改善は、その遊離型の、カプセル化されていない形態と比較して、エクソソーム内に含まれるか、またはカプセル化されたＴＧＦ－β、特にＴＧＦ－β１の安定性の増加に起因する可能性がある。このような治療効果の改善はまた、乳汁由来のエクソソームに含まれるＴＧＦ－βの主要な形態として、ＴＧＦ－β２ではなくＴＧＦ－β１の存在にも起因する可能性がある。

【００１６】

したがって、本発明の乳汁由来のエクソソームを含む経腸組成物は、安全であり、ＩＢＤ状態の非常に効果的な予防および／または治療薬を提供し、ＩＢＤ患者のために現在利用可能な食事処方物よりも効果的であり、そして明らかに非経口処方物よりも患者に適合している。

【００１７】

第１の態様によれば、本発明は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）またはそれに関連する状態を治療する際の使用のための乳汁から得られるエクソソームを含む組成物を提供し、エクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、組成物は経腸投与のために処方される。

【００１８】

いくつかの実施形態によれば、乳汁は、ウシ、ヤギ、またはヒトの乳汁である。追加の実施形態によれば、エクソソームは、乳汁のスキム画分および／または乳汁の脂肪画分から得られる。さらなる実施形態によれば、乳汁は、授乳前、授乳中、および／または授乳後に得られる。なおさらなる別の実施形態によれば、乳汁は低温殺菌されているか、または低温殺菌されていない。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００１９】

さらなる実施形態によれば、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａからなる群より選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。なおさらなる実施形態によれば、ｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含む。

【００２０】

さらなる実施形態によれば、ＴＧＦ－βはＴＧＦ－β１である。

【００２１】

追加の実施形態によれば、エクソソームは、タンパク質、ペプチド、核酸分子、および脂質からなる群より選択される少なくとも１つの生物学的に活性な化合物をさらに含む。

【００２２】

さらなる実施形態によれば、エクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約２０％（ｗ／ｗ）未満のカゼインを含む。

【００２３】

いくつかの実施形態によれば、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）は、クローン病および潰瘍性大腸炎からなる群より選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００２４】

追加の実施形態によれば、潰瘍性大腸炎は遠位大腸炎である。

【００２５】

さらなる実施形態によれば、遠位大腸炎は、直腸炎、直腸Ｓ状結腸炎、および左側大腸炎からなる群より選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００２６】

一実施形態によれば、ＩＢＤに関連する状態は回腸嚢炎である。

【００２７】

いくつかの実施形態によれば、この組成物は、経口投与のために、または経管栄養のために処方される。

【００２８】

さらなる実施形態によれば、この組成物は、直腸投与のために処方される。
【００２９】
なおさらなる実施形態によれば、この組成物は、栄養補助もしくは医薬組成物、食事処方物、または栄養補助食品として処方される。
【００３０】
なおさらなる別の実施形態によれば、直腸投与のために処方された組成物は、浣腸、坐剤、またはフォームの形態で存在する。
【００３１】
いくつかの実施形態によれば、エクソソームは、対象の約０．１ｍｇ～約２５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲の治療有効量で組成物中に存在する。追加の実施形態によれば、エクソソームの治療有効量は、対象の約１ｍｇ～約５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲である。
【００３２】
別の態様によれば、本発明は、乳汁から得られたエクソソームを含む組成物を提供し、この組成物は、直腸投与のために処方され、エクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含む。
【００３３】
いくつかの実施形態によれば、乳汁は、ウシ、ヤギ、またはヒトの乳汁である。追加の実施形態によれば、エクソソームは、乳汁のスキム画分および／または乳汁の脂肪画分から得られる。さらなる実施形態によれば、乳汁は、授乳前、授乳中、および／または授乳後に得られる。なおさらなる別の実施形態によれば、乳汁は低温殺菌されているか、または低温殺菌されていない。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。
【００３４】
さらなる実施形態によれば、この組成物のエクソソームに含まれるか、またはカプセル化される１つ以上のｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａからなる群より選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。なおさらなる実施形態によれば、ｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含む。
【００３５】
さらなる実施形態によれば、この組成物中のエクソソームのＴＧＦ－βはＴＧＦ－β１である。
【００３６】
なおさらなる別の実施形態によれば、この組成物のエクソソームは、タンパク質、ペプチド、核酸分子、および脂質からなる群より選択される少なくとも１つの生物学的に活性な化合物をさらに含む。
【００３７】
なおさらなる実施形態によれば、この組成物のエクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約２０％（ｗ／ｗ）未満のカゼインを含む。
【００３８】
いくつかの実施形態によれば、この組成物は、浣腸剤、坐剤またはフォームとして処方される。１つの例示的な実施形態によれば、この組成物は、担体、ならびに任意選択で増粘剤および／または潤滑剤を含む浣腸剤として処方される。別の例示的な実施形態によれば、この組成物は、担体および増粘剤を含む坐剤として処方される。
【００３９】
別の態様によれば、本発明は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）またはそれに関連する状態を治療する方法を提供し、そのような治療を必要とする対象に、乳汁から得られる治療有効量のエクソソームを含む組成物を投与することを含み、エクソソームは１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、この組成物は経腸投与経路によって投与され、それによって、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療する。
【００４０】
いくつかの実施形態によれば、本発明の方法を実施するためのエクソソームを得るために

使用される乳汁は、ウシ、ヤギ、またはヒトの乳汁である。追加の実施形態によれば、本発明の方法を実施する際に使用されるエクソソームは、乳汁のスキム画分および／または乳汁の脂肪画分から得られる。さらなる実施形態によれば、乳汁は、授乳前、授乳中、および／または授乳後に得られる。なおさらなる別の実施形態によれば、乳汁は低温殺菌されているか、または低温殺菌されていない。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００４１】

さらなる実施形態によれば、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａからなる群より選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。なおさらなる実施形態によれば、ｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含む。

【００４２】

いくつかの実施形態によれば、本発明の方法を実施するために使用されるエクソソームのＴＧＦ－βは、ＴＧＦ－β１である。

【００４３】

追加の実施形態によれば、使用されるエクソソームは、タンパク質、ペプチド、核酸分子、および脂質からなる群より選択される少なくとも１つの生物学的に活性な化合物をさらに含む。

【００４４】

さらなる実施形態によれば、エクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約２０％（ｗ／ｗ）未満のカゼインを含む。

【００４５】

なおさらなる別の実施形態によれば、治療される炎症性腸疾患（ＩＢＤ）は、クローン病および潰瘍性大腸炎からなる群より選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００４６】

なおさらなる実施形態によれば、潰瘍性大腸炎は遠位大腸炎である。

【００４７】

なおさらなる別の実施形態によれば、遠位大腸炎は、直腸炎、直腸Ｓ状結腸炎、および左側大腸炎からなる群より選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００４８】

一実施形態によれば、治療されるＩＢＤに関連する状態は、回腸嚢炎である。

【００４９】

いくつかの実施形態によれば、この組成物は、経口投与または経管栄養によって投与される。

【００５０】

追加の実施形態によれば、この組成物は、直腸投与によって投与される。

【００５１】

さらなる実施形態によれば、投与される組成物は、栄養補助もしくは医薬組成物、食事処方物、または栄養補助食品として処方される。

【００５２】

なおさらなる別の実施形態によれば、投与される組成物は、浣腸剤、坐剤、またはフォームとして処方される。

【００５３】

なおさらなる実施形態によれば、投与される組成物内の治療有効量のエクソソームは、対象の約０．１ｍｇ～約２５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲である。なおさらなる別の実施形態によれば、エクソソームの治療有効量は、対象の約１ｍｇ～約５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲である。

【００５４】

本発明の他の目的、特性および利点は、以下の説明および図面から明らかになる。

【図面の簡単な説明】
【００５５】
【図１Ａ－Ｋ】牛乳またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームの特徴を示す。図１Ａは、牛乳またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームの数を示す。図１Ｂおよび１Ｃは、それぞれ、ネガティブ染色を使用した、ウシまたはヒトのＭＤＥの透過型電子顕微鏡分析を示す。図１Ｄおよび１Ｅは、それぞれ、ウシまたはヒトのＭＤＥのナノサイト分析を示す。図１Ｆおよび１Ｇは、それぞれ、ＤＬＳによるウシまたはヒトの単離されたＭＤＥの粒子サイズ分布（強度による）を示す。図１Ｈおよび１Ｉは、それぞれ、牛乳またはヒトの乳汁由来のエクソソームにおける、エクソソームのマーカーとしてのＣＤ８１およびＣＤ９、ならびに陰性対照としてのＨＳＰ７０のタンパク質発現を示す。図１Ｊおよび１Ｋは、それぞれ、ウシまたはヒトのＭＤＥにおけるｍｉＲＮＡ－１４８およびｍｉＲＮＡ－３２０の発現を示す。
【図２Ａ－Ｃ】乳汁の脂肪画分から単離されたエクソソームの分析を示す。図２Ａは、ヒトの乳汁の脂肪画分から単離されたエクソソームにおけるＣＤ８１およびＣＤ９（エクソソームに特徴的なタンパク質）、ならびにＨＳＰ７０（陰性対照）の発現のウエスタンブロット分析である。図２Ｂ～Ｃは、牛乳の脂肪画分から単離されたエクソソームの透過型電子顕微鏡分析を示す。図２Ｄは、プロトコルＡ（Ａ）、プロトコルＢ（Ｂ）、またはプロトコルＣ（Ｃ）に従って牛乳から単離されたエクソソームにおけるｍｉＲＮＡ－１４８ａ－３ｐ（ｍｉＲＮＡ－１４８）の発現のｑＲＴ－ＰＣＲ分析を示す。
【図３】牛乳のいくつかのバッチから単離された乳汁由来エクソソーム（ＭＤＥ）、７０，０００ｇでの超遠心分離（ＵＬＴ）後のペレット、および１３５，０００ｇでの超遠心分離後の上清における、ＴＧＦ－β１およびＣＤ８１のウエスタンブロット分析を示す。
【図４Ａ－Ｃ】経口投与後、乳汁由来のエクソソームがマウスの腸に取り込まれることを示す。図４Ａ～Ｂは、牛乳（図４Ａ）またはヒトの乳汁（図４Ｂ）のいずれかから単離され、次いで蛍光染料ＤｉＲで標識されたエクソソームを強制飼養によって投与されたマウスにおけるエクソソーム分布の蛍光画像を示す。図４Ｃは、７日間の間に牛乳またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームで処理されたマウスの体重を示す。未処理のマウスの体重もまた示す。
【図５Ａ－Ｆ】ＤＳＳマウスモデルにおいて、乳汁由来のエクソソームの経口投与が大腸炎の発症をどのように予防したかを示す。図５Ａ～Ｄは、Ｈ＆Ｅ染色によって染色された、処理されたマウス（エクソソームを伴うかまたは伴わないＤＳＳ、それぞれ図５Ｄおよび５Ｂ）または対照マウス（エクソソームを伴うかまたは伴わないＤＳＳで処理されていない、図５Ｃおよび５Ａ）からの代表的な結腸切片を示す。図５Ｅは、図５Ａ～ＤのＨ＆Ｅ染色された切片の組織学的スコアを示す。図５Ｆは、試験されたグループにおける疾患活動性指数（ＤＡＩ）を示す。
【図６Ａ－Ｈ】牛乳またはヒトの乳汁から単離された乳汁由来のエクソソームの経口投与により、ＤＳＳ誘発性大腸炎の重症度が減弱化されたことを示す。図６Ａおよび６Ｃは、ＤＳＳ処理の１日目（ＤＳＳ　Ｄ１）およびＤＳＳ処理の７日後、続いてＤＳＳまたはエクソソームなしで２日の９日目（ＥＸＯ－Ｄ９）でのＤＳＳ処理マウスの体重を示す。図６Ｂおよび６Ｄは、ＤＳＳ処理の１日目（ＤＳＳ　Ｄ１）およびＤＳＳ処理の７日後、続いて牛乳から単離されたエクソソームによる２日間の処理の９日目（ＥＸＯ＋Ｄ９、図６Ｂ）またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームによる２日間の処理の９日目（ＥＸＯ＋Ｄ９、図６Ｄ）におけるＤＳＳ処理マウスの体重を示す。図６Ｅ～Ｆは、結腸の短縮に対する牛乳（図６Ｅ）またはヒトの乳汁（図６Ｆ）から単離されたエクソソーム（ＥＸＯ＋）の効果を示す。図６Ｇ～Ｈは、牛乳（図６Ｇ）またはヒトの乳汁（図６Ｈ）から単離されたエクソソーム（ＥＸＯ＋）での処理後の病理学的スコアを示す。
【図７Ａ－Ｂ】ＭＤＥ処理後の大腸炎結腸におけるＴＧＦ－β１の発現を示している。図７Ａは、未処理（ＥＸＯ－）または乳汁由来のエクソソーム（ＥＸＯ＋）で処理された大腸炎マウスの結腸におけるＴＧＦ－β１およびβ－アクチンタンパク質レベルのウエスタンブロット分析を示す。図７Ｂは、図７Ａのウエスタンブロット分析結果を提示する棒グ

ラフである。
【図８Ａ－Ｄ】ＭＤＥ処理後の大腸炎結腸マウスにおける乳汁高発現ｍｉＲＮＡの発現を示す。乳汁由来のエクソソームで処理されたか（ＥＸＯ＋）、またはエクソソームで処理されていない（ＥＸＯ－）、大腸炎マウスの結腸における、ｌｅｔ７ａ（図８Ａ）、ｍｉＲＮＡ－３２０（図８Ｂ）、ｍｉＲＮＡ－３７５（図８Ｃ）およびｍｉＲＮＡ－１４８（図８Ｄ）の発現が提示される。
【図９Ａ－Ｂ】ＭＤＥ処理後の大腸炎マウスの結腸におけるＩＬ－６およびＴＮＦ－α遺伝子の発現を示す。ＴＮＦ－α（図９Ａ）またはＩＬ－６（図９Ｂ）の遺伝子発現は、エクソソームで処理された（ＥＸＯ＋）またはエクソソームで処理されなかった（ＥＸＯ－）大腸炎マウスの結腸において決定された。
【発明を実施するための形態】
【００５６】
本発明は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）またはそれに関連する状態を治療する際の使用のための、乳汁由来のエクソソームを含む組成物を提供し、エクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含むかまたはカプセル化し、この組成物は経腸投与のために処方される。本発明はさらに、乳汁由来のエクソソームを含む組成物を提供し、この組成物は直腸投与のために処方され、エクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含むかまたはこれらをカプセル化する。本発明はさらに、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療するための方法を提供し、そのような治療を必要とする対象に、１つ以上のｍｉＲＮＡおよびＴＧＦ－βを含む組成物を投与することを含み、この組成物は経腸投与経路によって投与される。
【００５７】
定義
「乳汁」および「天然の乳汁」という用語は、説明および特許請求の範囲の全体を通して交換可能に使用され、成熟した雌性哺乳動物の乳腺によって生成されて、幼い哺乳動物に栄養を与える栄養液を指す。乳汁は、２つの主要な画分に分けることができ、これらは、本明細書では「スキム」（または「スキムミルク」もしくは「スキム画分」もしくは「スキムミルク画分」）と呼ばれる液体画分および「脂肪」画分である。スキムミルク画分は、乳脂肪の除去後に得られる乳汁画分である。いくつかの実施形態では、「ホエー」、「ホエー画分」、「スキムミルク」、「スキム画分」および「スキムミルク画分」という用語を交換可能に使用することができる。いくつかの実施形態では、スキム画分はホエー画分を含む。
【００５８】
本明細書で使用される場合、「治療」、「治療すること」などの用語は、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを指す。効果は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であり得、かつ／または疾患および／もしくは疾患に起因する有害効果の部分的もしくは完全な治癒に関して治療的であり得る。本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物、好ましくはヒトにおける疾患の任意の治療をカバーし、これは、（ａ）無症状期間中の疾患の発生率および／または再発のリスクを低減すること、（ｂ）疾患の症状を軽減または低減すること、（ｃ）疾患の素因となる可能性があるが、まだ疾患があると診断されていない対象において疾患が発生するのを予防すること、（ｄ）疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること（例えば、疾患の進行速度を低減させること）、（ｅ）疾患のエピソードの頻度を低減すること、ならびに（ｆ）疾患を軽減する、すなわち疾患の退行を引き起こすこと、を含む。
【００５９】
「エクソソーム」という用語は、直径が３０～２００ｎｍの間の微小胞の一つの型を指す。エクソソームは、多小胞体が原形質膜と融合したときに細胞から放出されるか、または原形質膜から直接放出されるかのいずれかである。エクソソームは、乳汁のスキム画分（スキムミルク画分など）および／または乳汁の脂肪画分から得られるか、または単離されるか、または由来し得る。

【００６０】
「マイクロＲＮＡ」および「ｍｉＲＮＡ」という用語は、標的遺伝子発現の転写および転写後調節において機能することができる小さな非コードＲＮＡ分子に向けられる。
【００６１】
本明細書で使用される「組成物」という用語は、乳汁由来のエクソソーム、ならびに任意選択で担体および／または１つ以上の賦形剤を含む組成物を指す。本発明の組成物は、経腸投与のために処方される。
【００６２】
本明細書で使用される「栄養補助組成物」という用語は、経口投与されたときに生理学的利益を有するか、または疾患の保護もしくは減弱化を提供する、食品から単離または精製された食用組成物を指す。したがって、栄養補助組成物は、単独で、または食用食品もしくは飲料と混合してのいずれかで、食事処方物または補助食品の形態で提示することができる。
【００６３】
「食事処方物」という用語は、完全な食事処方物、部分的または不完全な食事処方物、および疾患または状態に特有の食事処方物を含むが、これらに限定されない。完全な食事処方物（すなわち、タンパク質、炭水化物、脂肪、ビタミン、およびミネラルなどのすべての必須のマクロ栄養素とミクロ栄養素とを含む）は、患者の唯一の栄養源として使用できる。患者は、そのような完全な食事処方物から彼らの栄養要求の１００％を受け取ることができる。部分的または不完全な食事処方物は、すべての必須のマクロ栄養素およびミクロ栄養素を含んでいるわけではなく、患者の唯一の栄養源として使用することはできない。部分的または不完全な食事処方物は、食事補助食品または栄養補助食品として使用できる。疾患または状態に特有の食事処方物は、栄養素または医薬品を送達する処方物であり、完全または部分的な食事処方物であり得る。「経腸処方」、「経腸栄養処方」および「栄養組成物」という用語は、食事処方物と同じ意味を有し、本明細書および特許請求の範囲全体を通して交換可能に使用される。いくつかの実施形態では、食事処方物または補助食品は、本明細書に開示されるように、乳汁から得られたかまたは単離されたエクソソーム内にカプセル化されたｍｉＲＮＡ分子以外のｍｉＲＮＡ分子を含まない。
【００６４】
本明細書で使用される「経腸投与」という用語は、食道、胃、小腸および大腸（すなわち、胃腸管）を含む任意の投与を指す。投与方法には、経口、頬側、舌下（舌下での薬物の溶解）、および直腸投与、ならびに経管栄養が含まれる。
【００６５】
「経管栄養」という用語は、経鼻胃管、口胃管、胃管、空腸瘻チューブ（Ｊ－チューブ）、経皮内視鏡的胃瘻造設術（ＰＥＧ）、胃、空腸、およびその他の適切なアクセスポートへのアクセスを提供する胸壁ポートなどのポートを通してであることを含むがこれらに限定されない、経口投与を通して以外の、患者の胃腸管への組成物の投与を指す。
【００６６】
本明細書で使用される「担体」という用語は、組成物の活性剤と組み合わされたときに、活性剤が対象の免疫系との破壊的反応を引き起こすことなく生物学的活性を保持することを可能にする任意の材料を含む。
【００６７】
「薬学的に許容される」という用語は、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されること、または動物、より特定には、ヒトにおける使用のために、米国薬局方、またはその他の一般に認められた薬局方に列挙されていることを意味する。
【００６８】
「炎症性腸疾患」（ＩＢＤ）という用語は、消化管の全部または一部の慢性炎症を伴う疾患を指す。この用語は、当技術分野で知られているすべての種類のＩＢＤを含む。ＩＢＤには、主にクローン病および潰瘍性大腸炎が含まれる。
【００６９】

「クローン病」という用語は、消化管の内壁に沿って存在し、しばしば罹患した組織の奥深くに広がる炎症を特徴とする。クローン病によって引き起こされる炎症は、口から肛門までの消化管のさまざまな領域に関係している可能性がある。クローン病の影響を受ける最も一般的な領域は、回腸および結腸と呼ばれる小腸の最後の部分である。炎症は腸壁に限定される可能性があり、これは瘢痕化（狭窄）を引き起こし得るか、または、炎症は腸壁（瘻孔）全体を通して広がる可能性がある。クローン病の徴候および症状は、軽度から重度の範囲であり得、警告なしに徐々に発症するか、または突然発症する可能性がある。徴候および症状には、下痢、腹痛およびけいれん、吐き気および嘔吐、便中の血、腸の表面または口の潰瘍、食欲減退および体重減少、発熱、疲労、関節炎、眼の炎症、皮膚障害、肝臓または胆管の炎症、ならびに成長または性的発達の遅延（小児）が含まれるが、これらに限定されない。

【００７０】

「大腸炎」という用語は、結腸の内層の炎症を指す。潰瘍性大腸炎、クローン性大腸炎、分流性大腸炎、虚血性大腸炎、感染性大腸炎、劇症性大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、化学的大腸炎、顕微鏡的大腸炎、リンパ球性大腸炎、ベーチェット病、不確定大腸炎、および典型的な大腸炎を含むがこれらに限定されない、疾患の原因に応じて指定される様々な型の大腸炎が知られている。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００７１】

潰瘍性大腸炎（ＵＣ）は、長続きする結腸の炎症を特徴としている。症状は通常、突然ではなく、時間の経過とともに発症する。潰瘍性大腸炎は、典型的には、通常、大腸（結腸）および直腸の最も内側の内層にのみ影響を及ぼす。これは結腸の連続的な伸長を通して起こる。潰瘍性大腸炎は、直腸のみに関与する直腸炎、直腸およびＳ状結腸に関与する直腸Ｓ状結腸炎、下行結腸または脾湾曲部まで遠くの拡張に関与する左側大腸炎、および全結腸炎に分類される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【００７２】

本明細書で使用される「回腸嚢炎」という用語は、潰瘍性大腸炎、不確定大腸炎、または他の型の大腸炎の患者の管理において生じる回腸嚢（結腸切除術を受けた患者の回腸腸組織から外科的に作成された人工直腸）の炎症を指す。

【００７３】

活性剤の「治療有効量」という用語は、薬剤が投与される対象に有益な効果を提供するために十分な薬剤の量である。化合物の有効量は、個人の病状、年齢、性別、および体重などの要因によって異なる可能性がある。

【００７４】

エクソソームおよび調製方法

本発明は、乳汁から得られたエクソソーム、およびＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療するためのその使用を提供する。

【００７５】

本発明のエクソソームは、乳汁を分画すること、ならびにスキム画分および脂肪画分を得ることを含む方法によって乳汁から得られる。本発明のエクソソームは、乳汁のスキム画分および／または脂肪画分から得る／単離することができる。

【００７６】

いくつかの実施形態によれば、乳汁は、４℃にて、５０００ｇ～６５００ｇで３０分間の遠心分離によって分画される。乳汁から２つの画分、脂肪画分およびスキム画分が得られる。スキム画分を、４℃にて１２０００ｇで１時間遠心分離する。次に、上清をフィルター（例えば、０．４５および０．２２μｍフィルター）を通してろ過することができる。次いで、ろ過した上清を４℃にて５００００～１０００００ｇ（例えば、７００００ｇ）で３０～１２０分間（例えば、３０分間）超遠心分離して、カゼインを沈殿させることができる。ペレットを廃棄し、上清を、任意の回数、例えば、１回または２回、４℃にて、８００００～１５００００ｇ（例えば、１３５０００ｇ）で、３０～１８０分（例えば、９０分）で超遠心分離することができる。得られたペレットには、スキムミルク画分から

得られた／単離された乳汁エクソソームが含まれている。

【００７７】

いくつかの実施形態によれば、乳汁からエクソソームを得るための方法が提供され、この方法は、乳汁の２つの画分、脂肪画分およびスキムミルク画分を得るための、４℃での乳汁の１０００～８０００ｇ（例えば、５０００ｇ～６５００ｇ）で３０分間の遠心分離を含む。脂肪画分は、－８０℃または－２０℃から３７℃および６０℃までの冷却－加熱のサイクル（２～４サイクル）によって処理される。次に、脂肪層を４℃にて８０００～１５０００ｇ（例えば、１００００ｇ）で１０～３０分（例えば、１０分間）遠心分離することができる。この時点で、ペレットを廃棄し、上清をフィルター（例えば、０．４５および／または０．２２μｍフィルター）でろ過することができ、ろ過された溶液は、８００００～１０００００ｇ（例えば、１０００００ｇ）で３０～９０分間（例えば、６０分間）超遠心分離され得る。ペレットを廃棄し、上清を、４℃にて、１３５０００ｇで９０分間遠心分離する。得られたペレットには、脂肪画分から単離されたエクソソームが含まれている。

【００７８】

本発明によれば、これらの方法によって得られたエクソソームは、それらがさらなる使用について安全であるため、有利である。エクソソームの単離は、洗浄試薬として使用される適切な緩衝液（ＰＢＳなど）、および／または酢酸および／またはクエン酸ナトリウムの存在下での遠心分離およびろ過工程を含み、プロセスを高価にし、安全性を低下させる可能性がある他の試薬またはデバイスを含まない。これらの方法によって得られたエクソソームは、経腸処方に容易に添加して、そのような処方を補足することができる。さらに、そのようなエクソソームは、ＩＢＤまたはそれに関連する状態の予防的および／または治療的効果を提供することができる。

【００７９】

乳汁は、ウシ（ｂｏｖｉｎｅ）（ウシ（ｃｏｗ））、ヤギ、ヒト、ラクダなどを含むがこれらに限定されない様々な適切な供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、乳汁は、授乳前、授乳中、および／または授乳後の様々な時点で得ることができる。乳汁は、日中のさまざまな時点（例えば、朝、夕方、深夜）に得ることができる。乳汁は、出生後のさまざまな時点で得ることができる。

【００８０】

エクソソームは、低温殺菌の前または後に、ウシ（ｂｏｖｉｎｅ）（乳牛（ｃｏｗ））の乳汁から得ることができる。エクソソームは、牛乳のスキム画分および／または脂肪画分および／またはホエー画分から得ることができる。各可能性は、本発明の別個の実施形態である。

【００８１】

エクソソームは、低温殺菌の前または後に、ヤギ乳またはラクダ乳から得ることができる。エクソソームは、ヤギまたはラクダの乳のスキム画分および／または脂肪画分および／またはホエー画分から得ることができる。各可能性は、本発明の別個の実施形態である。

【００８２】

エクソソームは、ヒトの女性の母乳から得ることができる。エクソソームは、ヒトの乳汁のスキム画分および／または脂肪画分および／またはホエー画分から得ることができる。ヒトの乳汁は、満期産児の母体の母乳から、および／または早産児の母体の母乳から得ることができる。各可能性は、本発明の別個の実施形態である。

【００８３】

エクソソーム内の分子の同一性および／または相対的な豊富さは、異なる供給源の乳汁から得られたエクソソーム間で同一または異なる可能性がある。追加的または代替的に、ｍｉＲＮＡの同一性および／または相対的な豊富さは、１日の異なる時間に得られた乳汁から単離されたエクソソーム間で同一または異なる可能性がある。

【００８４】

本発明の原理によれば、本明細書に開示されるエクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分

子およびＴＧＦ－βを含むか、またはカプセル化するか、または封入する。エクソソームは、核酸、タンパク質、ペプチド、脂質、ミネラル、ホルモンなどを含む追加の生物学的成分をさらに含むか、またはカプセル化することができる。

【００８５】

いくつかの実施形態では、エクソソームは、ｌｅｔ－７ｂ、ｍｉｒ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａからなる群より選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ分子を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）／カプセル化する／含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）。各可能性は、別個の実施形態である。

【００８６】

いくつかの実施形態では、エクソソームは、ｌｅｔ－７ｂ、ｍｉｒ－３２０、ｍｉＲ－３７５、およびｍｉＲ－１４８ａを含むかまたはカプセル化する。いくつかの実施形態では、エクソソームは、ｍｉＲ－２６、ｍｉＲ－９９、ｍｉＲ－３０、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲ－１４６、およびｍｉＲ－２００からなる群より選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ分子をさらに含む。各可能性は、別個の実施形態である。

【００８７】

いくつかの実施形態では、エクソソームは、ＴＧＦ－β１を含むかまたはカプセル化する。いくつかの実施形態では、エクソソームは、アネキシンＡ１および／またはムチン－１を含む。各可能性は、別個の実施形態である。

【００８８】

いくつかの実施形態では、エクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約２０％未満のカゼインを含む。いくつかの実施形態では、エクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約１０％未満のカゼインを含む。いくつかの実施形態では、エクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約５％未満のカゼインを含む。いくつかの実施形態では、エクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約２％未満のカゼインを含む。いくつかの実施形態では、エクソソームは、エクソソームの総タンパク質の約１％未満のカゼインを含む。いくつかの実施形態では、エクソソームは本質的にカゼインを欠いている。

【００８９】

いくつかの実施形態では、エクソソームは、脱水された形態で組成物に添加され得る。いくつかの実施形態では、エクソソームは、凍結乾燥された形態で組成物に添加され得る。いくつかの実施形態では、エクソソームは、任意の適切な形態で組成物に添加され得る。

【００９０】

経腸組成物

本発明は、乳汁由来のエクソソームを含む組成物を提供し、この組成物は経腸投与のために処方される。組成物は、経口、頬側、舌下、もしくは直腸投与のために、または経管栄養のために処方することができる。

【００９１】

組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、カプセル、粉末、徐放性処方物などの形態をとることができる。組成物は、浣腸剤、坐剤、デポー錠剤（徐放性錠剤）、またはフォームとして直腸投与のために処方することができる。

【００９２】

錠剤またはカプセルとして処方される組成物は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。適切な医薬担体の例は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」に記載されている。

【００９３】

組成物は、乳汁から得られたか、または単離されたエクソソームを含む食事処方物または補助食品として処方することができる。食事処方物または補助食品は、タンパク質源、炭水化物源、１つ以上の必須脂肪酸、ビタミンおよびミネラル源、ならびに乳化剤などの追加の成分をさらに含むことができる。炭水化物源は、例えば、単糖、二糖、またはオリゴ

糖などの任意の単純または複雑な炭水化物であり得る。炭水化物源は、トウモロコシデンプン、デキストロース、グルコース、またはそれらの組み合わせであり得る。タンパク質源は、任意のタンパク質、タンパク質加水分解物、ペプチド混合物、またはアミノ酸混合物、例えば、乳汁、卵、大豆または肉タンパク質であり得る。タンパク質加水分解物は、本質的に部分的に加水分解することができ、可変鎖長ペプチドの実質的な画分を含む。いくつかの実施形態では、生物学的価値が最も高いタンパク質、例えば、ホエー、ラクトアルブミン、カゼイン、卵白、卵固形物、または大豆のみが加水分解される。いくつかの実施形態では、タンパク質源はラクトースを含まず、遊離アミノ酸は処方物中で回避される。食事処方物または補助食品は、現在、１日の摂取基準（Ｄａｉｌｙ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　Ｉｎｔａｋｅ（ＤＲＩ））と呼ばれている推奨食事摂取基準（Ｒｅｃｏｍｍｅｎｄｅｄ　Ｄｉｅｔａｒｙ　Ａｌｌｏｗａｎｃｅ（ＲＤＡ））に従って、ビタミンおよびミネラルをさらに含むことができる。食事処方物または補助食品は、乳化剤、または甘味料および／もしくは香味料などの他の不活性成分をさらに含むことができ、これらは人工のものであり得る。１つの例示的な実施形態によれば、食事処方物または補助食品は、液体で再構成されるべき粉末の形態である。

【００９４】

溶液、懸濁液または乳濁液として処方される場合、この組成物は、例えば、担体として、水またはリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）などを含むことができる。乳汁由来のエクソソームを含むこのような溶液、懸濁液または乳濁液は、栄養チューブによる投与のために、単回投与または複数回投与のいずれかのパッケージに包装することができる。

【００９５】

組成物は、直腸投与のために処方することができる。例えば、浣腸剤組成物は、水、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）、アルコール、または水性アルコール液などの適切な担体中に有効量の乳汁由来のエクソソームを含む。組成物は、好ましくは、天然または合成の増粘剤、またはガム、アクリレート、カルボマー、もしくは変性セルロースなどのゲル化剤で増粘される。組成物はまた、天然または合成の脂肪または油、すなわち、トリス脂肪酸グリセリン酸またはレシチンなどの有効量の潤滑剤も含むことができる。非毒性の非イオン性界面活性剤もまた、湿潤剤および分散剤として含めることができる。浣腸剤組成物の単位投与量は、事前に充填されたバッグまたは注射器から投与することができる。組成物はまた、ｎ－ブタン、プロパンまたはイソブタンなどの有効量のフォーミング剤を含み得る。このような組成物は、事前に装填された注射器加圧容器から送達することができ、その結果、この組成物は、標的部位からのその漏れを阻害するフォームとして結腸に送達される。

【００９６】

組成物を浣腸剤として投与する場合、これは、水性混合物などの少量、例えば、１００ｍｌ以下などの液体に溶解または分散させることだけが必要である。罹患した組織の水分バランスのいかなる混乱も避けるために、組成物を等張にすることが好ましい。したがって、浣腸剤のための担体は、生理学的に緩衝された生理食塩水であり得る。浣腸剤組成物を、使用時に例えば脱イオン水で再構成されるために、適切な量の緩衝剤を伴う一定用量のエクソソームを含む固形物として調製することが便利であり得る。代替的に、浣腸剤は、液体として、例えば、ＰＢＳ中に保存され、その形態で投与され得る。

【００９７】

一般に、坐剤は、通常、固体の形態で投与され、直腸で溶融して、固体マトリックス中に分散している活性剤を放出する、低融点の固体材料から調製される。伝統的に、坐剤が作製される固形物は、カカオバターなどの油性またはワックス状の材料であった。刺激の少ない石油および植物性ワックスも使用されており、植物油の混合物もこのようなワックスで増粘されている。ゲル化剤の入手可能性は、このような処方物が水性ベースの材料中で調製されることを可能にし、身体にとって全く異質である油性およびワックス状の材料の投与を回避する。このような水性ベースの坐剤は、エクソソームを水に溶解または懸濁することによって調製することができ、好ましくは適切な無機塩の添加によって等張にし、

ガムまたは変性セルロースなどの増粘剤またはゲル化剤の添加によって混合物を増粘し、組成物は室温で柔らかい固体になるが、体温で液化する。坐剤の融解温度のバランスをとる問題は、冷蔵保存する製品にラベルを付けることで簡単に低減することができる。

【００９８】

本発明の原理によれば、組成物に添加されたエクソソームは、それに含まれる成分の生物学的活性および／または化学的安定性の少なくとも一部を保持する。

【００９９】

本発明の組成物は、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を緩和または軽減することが知られている１つ以上の薬物を含むことができる。このような薬物の例には、コルチコステロイドならびにメサラミン、バルサラジド、およびオルサラジンなどのアミノサリチル酸を含むがこれらに限定されない抗炎症剤、アザチオプリン、メルカプトプリン、シクロスポリン、およびメトトレキサートを含むがこれらに限定されない免疫抑制薬、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α阻害剤、ＴＮＦ－αを中和する生物製剤、ならびに抗生物質が挙げられる。

【０１００】

治療の方法

本発明は、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療または予防する際の使用のための乳汁由来のエクソソームを含む組成物を提供し、エクソソームは１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、組成物は経腸投与のために処方される。本発明はさらに、ＩＢＤまたはそれに関連する状態を治療または予防する方法を提供し、このような治療を必要とする対象に、治療有効量の乳由来エクソソームを含む組成物を投与することを含み、ここで、エクソソームは、１つ以上のｍｉＲＮＡ分子およびＴＧＦ－βを含み、この組成物は経腸投与経路によって投与され、それによってＩＢＤを治療または予防する。

【０１０１】

いくつかの実施形態によれば、ＩＢＤは、クローン病および大腸炎からなる群より選択される。追加の実施形態によれば、大腸炎には、潰瘍性大腸炎、分流性大腸炎、虚血性大腸炎、感染性大腸炎、劇症性大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、化学的大腸炎、顕微鏡的大腸炎、リンパ球性大腸炎、ベーチェット病、不確定性大腸炎、および典型的な大腸炎が含まれるが、これらに限定されない。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【０１０２】

さらなる実施形態によれば、潰瘍性大腸炎（ＵＣ）は、直腸炎、直腸Ｓ状結腸炎、左側大腸炎、および全結腸炎を含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【０１０３】

なおさらなる別の実施形態によれば、ＩＢＤに関連する状態は、回腸嚢炎である。なおさらなる実施形態によれば、ＩＢＤに関連する状態は家族性大腸腺腫症（ＦＡＰ）である。

【０１０４】

クローン病の徴候および症状には、下痢、腹痛およびけいれん、吐き気および嘔吐、便中の血、腸の表面または口の中の潰瘍、食欲減退および体重減少が含まれるが、これらに限定されない。胃腸管外の他の合併症には、貧血、皮膚の発疹、関節炎、眼の炎症、および倦怠感が含まれる場合がある。

【０１０５】

大腸炎の一般的な症状には、軽度から重度の腹痛および圧痛（疾患の病期に応じて）、便に膿が存在するかまたは存在しないかのいずれかの持続性出血性下痢、便失禁、鼓腸、疲労、食欲不振、および体重減少が非限定的に含まれる。潰瘍性大腸炎の主な症状は、腹痛、および血液が混じった下痢である。体重減少、発熱、および貧血もまた発生する可能性がある。

【０１０６】

本発明の方法は、ＩＢＤまたはそれに関連する１つ以上の症状を予防または治療するために有用である。ＩＢＤまたはそれに関連する１つ以上の症状を治療することは、上記対象の疾患活動性指数（Ｄｉｓｅａｓｅ　Ａｃｔｉｖｉｔｙ　Ｉｎｄｅｘ（ＤＡＩ））値の減少をもたらすことに留意されたい。

【０１０７】
本発明の方法は、併用療法として使用することができる。したがって、本発明の組成物は、ＩＢＤを緩和および／または軽減することが知られている薬物の前に、同時に、または後に投与することができる。
【０１０８】
いくつかの実施形態によれば、この組成物は、少なくとも１日、少なくとも１週間、少なくとも１ヶ月間、または治療が達成される限り長い間、１日１回、１日２回、１日３回、または１日４回、投与される。代替的に、この組成物は、１週間、１ヶ月間、または治療が達成される限り長い間、１日おきに１回、３日ごとに１回、週に１回、投与される。
【０１０９】
いくつかの実施形態によれば、組成物中の治療有効量のエクソソームは、このような治療を必要とする対象の約０．１ｍｇ～２５０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲である。
【０１１０】
いくつかの実施形態によれば、ＩＢＤの予防的および／または治療的効果は、乳汁から単離されたエクソソームを含まない食事処方物または経腸処方によって達成されない。
【０１１１】
「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有すること（ｈａｖｉｎｇ）」という用語およびそれらの活用形は、「含むが、それに限定されない（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ　ｔｏ）」ことを意味する。「～からなる」という用語は、「～を含み、それに限定される」ことを意味する。「～から本質的になる」という用語は、組成物、方法、または構造が追加の成分、工程、および／または部分を含み得るが、追加の成分、工程、および／または部分が、特許請求される組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特性を実質的に変更しない場合に限ることを意味する。
【０１１２】
本明細書で使用される場合、本明細書に記載された数値について言及される「約」という用語は、記載された値＋／－１０％として理解されるべきである。
【０１１３】
本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに他の意味を示さない限り、複数形の言及を含む。例えば、「化合物」または「少なくとも１つの化合物」という用語は、それらの混合物を含む複数の化合物を含み得る。
【０１１４】
本明細書および特許請求の範囲を通じて開示される各可能性は、本発明の別個の実施形態を表すことに留意されたい。
【０１１５】
本発明の追加の目的、利点、および新規の特性は、限定することを意図しない以下の実施例の検討の際に、当業者に明らかになる。追加的に、上記に描写され、以下の特許請求の範囲のセクションで特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様の各々は、以下の実施例で実験的裏付けを見出す。
【０１１６】
以下の実施例は、本発明のより完全な理解を提供するために提示される。本発明の原理を例示するために記載された特定の技術、条件、材料、割合、および報告されたデータは、例示であり、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。
【実施例】
【０１１７】
方法
乳汁のスキム画分または脂肪画分からの乳汁由来のエクソソームの単離
エクソソームは、さまざまなプロトコルによってヒトの乳汁または牛乳のスキム画分から単離された。
【０１１８】

ヒトの乳汁から：エクソソームを、連続的な超遠心分離およびろ過によって単離した。乳汁サンプルを、４℃にて６５００ｇで３０分間の遠心分離によって分画した。各サンプルから、脂肪乳およびスキムミルクの２つの画分を得た。エクソソームをスキム画分から単離した。スキムミルクを、４℃にて１２００００ｇで１時間遠心分離し、破片を除去した。次いで、スキムを０．４５μｍおよび０．２２μｍのフィルターに通して、残留する破片を除去した。ろ過した上清を、４℃にて１３５０００ｇで９０分間遠心分離し、エクソソームをペレット化した。

【０１１９】

牛乳から：牛乳には、カゼインおよびホエーの２つのクラスのタンパク質が存在する。ヒトの乳汁には、これらのタンパク質がそれぞれ４０：６０の比率で含まれているのに対して、牛乳にはカゼインとホエータンパク質とが８０：２０の比率で含まれている。牛乳にはヒトの乳汁よりもかなり多くのカゼインが含まれているため、牛乳からのエクソソームの単離は、１つの変更を加えて、上記のヒトの乳汁のプロトコルと同様に実施した。ろ過後、４℃にてスキムを７００００ｇで３０分間遠心分離し、カゼインを廃棄した。上清を、４℃にて１３５０００ｇで９０分間遠心分離し、エクソソームをペレット化した。

【０１２０】

エクソソームペレットをＰＢＳに４℃一晩放置して、エクソソームを溶解させた。ＭＤＥを０．２２μｍフィルターを通してろ過した。エクソソーム調製物のタンパク質含有量を、ＢＣＡタンパク質アッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ）によって測定した。

【０１２１】

他の実験では、スキムミルク画分からのエクソソームの単離を次のように実施した。

プロトコルＡ－このプロトコルでは、酢酸およびクエン酸を使用してｐＨを制御した。プロトコルの工程３では、酢酸およびクエン酸ナトリウムを０．１％～１％の濃度で添加し、室温および４℃で０～５分間インキュベートした。

１．天然の乳汁（２ｍｌ～１５０ｍｌ）を４℃にて５０００ｇで３０分間遠心分離した。分離した脂肪画分を除去し、液相スキムミルクを工程２で使用した。

２．液相スキムミルクを、４℃にて１２０００ｇで６０分間遠心分離した。破片を含むペレットを廃棄し、上清（ｓｕｐ）を工程３で使用した。

３．上清を０．１％～１％の酢酸またはクエン酸ナトリウムとともに４℃および室温（ＲＴ）でインキュベートした（０～５分）。

４．インキュベーション工程の後、上清を４℃にて１０００００ｇで１０分間遠心分離した。ペレット（カゼインを含む）を廃棄し、上清を次の工程で使用した。

５．上清を０．２２μｍフィルターを使用してろ過し、ろ過した液体を４℃にて１３５０００ｇで９０分間遠心分離した。

【０１２２】

１．得られたペレットには、単離されたエクソソームが含まれていた。

【０１２３】

プロトコルＢ－このプロトコルは、エクソソームの単離の間にフィルターを使用した。

１．天然の乳汁を、４℃にて５０００ｇで３０分間遠心分離した。分離した脂肪画分を除去し、液相スキムミルクを工程２で使用した。

２．液相スキムミルクを、４℃にて１２０００ｇで６０分間遠心分離した。破片を含むペレットを廃棄し、上清（ｓｕｐ）を工程３で使用した。

３．上清を０．４５μｍフィルターを使用してろ過し、ろ過された液体は０．２２μｍフィルターを使用して再度ろ過した。得られたろ過された液体を、４℃にて１０００００ｇで６０分間遠心分離した。ペレット（カゼインを含んだ）を廃棄し、上清を次の工程で使用した。

４．上清を４℃にて１３５０００ｇで９０分間遠心分離した。

５．得られたペレットには、単離されたエクソソームが含まれていた。

【０１２４】

プロトコルＣ－乳汁の脂肪画分からの乳汁由来のエクソソームの単離

１．天然の乳汁を、４℃にて５０００ｇで３０分間遠心分離した。分離した脂肪画分をさらなる処理に使用し、液相スキムミルクを除去した。
２．脂肪乳画分を、－８０℃または－２０℃から３７℃および６０℃までの冷却加熱のサイクル（２～４サイクル）に供した。冷却加熱サイクルの結果、脂肪はＰＢＳに溶解した。
３．次に、０．２２μｍフィルターを使用して溶液をろ過し、ろ過した溶液を４℃にて１００００ｇで６０分間遠心分離した。
４．ペレットを廃棄し、上清を４℃にて１３５０００ｇで９０分間遠心分離して、エクソソームをペレット化した。
５．エクソソーム調製物のタンパク質含有量を、ＢＣＡタンパク質アッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ）によって測定した。

【０１２５】

電子顕微鏡法

エクソソームを、ネガティブ染色を使用した電子顕微鏡によって分析した。単離されたエクソソームを、水中の２％リンタングステン酸（ＰＴＡ）で染色した。簡単に説明すると、ＰＢＳで希釈した５μｌのエクソソームをＦｏｒｍｖａｒ／カーボンコーティングされた銅２００メッシュグリッド（ＥＭＡ）に置き、５μｌのＰＴＡと１０～２０秒間混合した。余分な染色を取り除き、グリッドを乾燥させた。サンプルを、Ｊｅｍ－１４００　Ｐｌｕｓ透過型電子顕微鏡（Ｊｅｏｌ、Ｐｅａｂｏｄｙ，ＭＡ，ＵＳＡ）で検査した。

【０１２６】

ナノ粒子分析

ＮＳ３００ナノ粒子アナライザー（ＮａｎｏＳｉｇｈｔ，Ｍａｌｖｅｒｎ、Ｗｏｒｃｈｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）で実施されたナノ粒子追跡分析（ＮＴＡ）を使用して、ＭＤＥのサイズ分布を測定した。ＰＢＳ中のＭＤＥの懸濁液をＮａｎｏｓｉｇｈｔユニットのサンプルチャンバーに装填し、２４．９８ｆｐｓのフレームレートで６０秒間ビデオを録画した。４８８ｎｍの青色レーザー光源を、希釈したＭＤＥ懸濁液に適用した。粒子の動きを、ＮＴＡソフトウェア（バージョン３．２、ＮａｎｏＳｉｇｈｔ）によって分析した。すべての測定を、光散乱モードで２２℃にて実施した。

【０１２７】

動的光散乱（ＤＬＳ）

ＤＬＳおよびゼータ電位の測定を、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒナノシリーズ装置（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｎａｎｏ－Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ、λ＝５３２ｎｍレーザー波長）を使用して実施した。エクソソームサイズデータは、散乱強度分布（ｚ平均）を指す。

【０１２８】

ＤｉＲラベル付きＭＤＥ

ＭＤＥは、１μＭ蛍光親油性トレーサーＤｉＲ（１，１－ジオクタデシル－３，３，３，３－テトラメチルインドトリカルボシアニンヨージド、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）と、３７℃で１５分間インキュベートした。インキュベーションの最後に、ＰＢＳを添加し、１００００ｇで６０分間の遠心分離を実施して、標識されたエクソソームをペレット化し、未結合の標識を廃棄した。

【０１２９】

マウスにおけるＤＳＳ誘発性大腸炎

ＤＳＳ投与は、その単純性、再現性、および均一性のために、大腸炎を研究するために最も広く使用されている動物モデルである。ＤＳＳモデルは、下痢、血性糞便、体重減少、粘膜潰瘍、および結腸の短縮など、ヒトの大腸炎に見られる症状と同様の多くの症状を示す。２つのプロトコル、予防プロトコルおよび治療プロトコルを使用した。

【０１３０】

予防プロトコル：大腸炎を、１日目から飲料水に５％ＤＳＳを添加することにより、８週齢のＢａｌｂ／ｃマウスで誘発した。対照マウスは定期的に飲料水を与えられた。ＤＳＳで処理されたマウスまたは対照マウスは、強制経口投与による２００μｌのＰＢＳにおい

て、マウスあたり０．５ｍｇ／ｍｌの用量で、ヒトの乳汁由来のエクソソーム（ＥＸＯ）で、７日間処理されるか、またはＰＢＳのみを投与された。マウスの体重および疾患活動性指数（ＤＡＩ）をモニターした。ＤＡＩスコアを、大腸炎の臨床的進行を毎日評価するために使用した。ＤＡＩは、体重減少、便の一貫性、および出血の組み合わせスコアである。スコアは次のように定義され、これは、体重減少：０（損失なし）、１（１～５％）、２（５～１０％）、３（１０～２０％）、および４（＞２０％）、便の一貫性：０（正常）、２（軟便）、および４（下痢）、出血：０（血液なし）、１（視覚的ペレット出血）、および２（肉眼的出血、肛門周辺の血液）、脱肛；０（なし）、１（脱肛のシグナル）、２（脱肛）、３（拡張脱肛）であった。組織学的スコアは、以下のパラメータに基づいて決定され、これは、側方伸展炎症（０～４）、深部炎症グレード（０～４）、側方伸展壊死／潰瘍（０～４）、および深部壊死／潰瘍（０～４）であった。

【０１３１】

治療プロトコル：大腸炎を、飲料水中の５％ＤＳＳを７日間添加することにより、８週齢のＢａｌｂ／ｃマウスで誘発した。過度の苦痛、瀕死、または体重減少≧２０％が出現した場合、マウスを安楽死させた。ＤＳＳ治療の開始からマウスを毎日評価した。ＤＳＳ処理の１週間後、水は通常の水に変更した。マウスは、２００μｌのＰＢＳ中のヒトの乳汁または牛乳からの０．５ｍｇ／マウスのＭＤＥの強制経口投与を６日間経口投与された。実験の終わりに、マウスを　　殺し、それらの結腸を取り出し、その外観を分析し、その長さを測定した。盲腸および脂肪組織を除去した後、結腸を近位、中間、および遠位の３つの部分に切断した。遠位部（２ｃｍ）を４％ホルマリン溶液で固定し、パラフィンに包埋し、Ｈ＆Ｅで染色し、光学顕微鏡で検査した。組織学的スコアを決定した。細胞分化、出血、フィブリン沈着、および病変分布も評価した。結腸の近位部および中央部を液体窒素で凍結し、タンパク質、遺伝子、ｍｉＲＮＡの発現分析のために使用するまで－８０℃で保存した。

【０１３２】

タンパク質分析のために、ステンレス鋼ビーズ（平均直径５ｍｍ）およびプロリナーゼ阻害剤カクテルを含む２００μｌのＲＩＰＡ緩衝液を結腸組織の切片に加えた。ＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ５で組織をホモジナイズした。サンプルを短時間遠心分離して組織片を沈殿させた。タンパク質含有量は、ＢＣＡタンパク質アッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ）によって測定した。結腸組織における遺伝子およびｍｉＲＮＡ発現分析は、ＲＮＡ抽出後に実施した。

【０１３３】

全ＲＮＡの抽出

エクソソームから

Ｔｒｉｚｏｌ試薬（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ、Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＵＳＡ）を単離されたＭＤＥのペレットに加えた。クロロホルムを加え、この混合物を激しく振とうし、室温で１５分間インキュベートした後、４℃にて１２０００ｇで１５分間遠心分離した。水相を新しいチューブに移した。続いて、イソプロパノール（１ｍｌのＴｒｉｚｏｌ試薬あたり０．５ｍｌ）を加えてＲＮＡを沈殿させ、溶液を転倒混和した。室温で１０分間のインキュベーション後、サンプルを４℃にて１２０００ｇで１０分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを７５％エタノール（Ｔｒｉｚｏｌ試薬あたり１ｍｌ）で洗浄し、４℃にて１２０００ｇで５分間遠心分離した。ペレットを風乾し、２０μｌのＲＮａｓｅフリー水に再懸濁した。

【０１３４】

結腸組織から。

ステンレス鋼ビーズ（平均直径５ｍｍ）および３００μｌのＴｒｉｚｏｌ試薬を結腸組織の切片に加えた。ＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ５で組織をホモジナイズした。サンプルを短時間遠心分離して組織片を沈殿させた。Ｚｙｍｏ　Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ　ＲＮＡ　ＭｉｎｉＰｒｅｐキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡ）を製造元の指示に従って使用して、上清のＲＮＡ分離を実施した。

【０１３５】

ＲＮＡの量および質は、ＲＮＡサンプルのＮａｎｏＤｒｏｐ分光光度計を使用してさまざまな波長での吸光度を測定することによって評価された。

【０１３６】

ｑＲＴ－ＰＣＲによるマイクロＲＮＡの検出

全ＲＮＡサンプル：５００ｎｇの全ＲＮＡ（結腸組織から抽出）および１００ｎｇ（ＭＤＥから抽出）を使用して、ｑＳｃｒｉｐｔ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｃＤＮＡ合成キット（ＱｕａｎｔａＢｉｏ、Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ，ＵＳＡ）を使用してｃＤＮＡを調製した。ｃＤＮＡ合成後、１５μｌのｑＰＣＲ反応中で、元のＲＮＡサンプルの２．４ｎｇ等価物を、Ｐｅｒｆｅｃｔａ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＳｕｐｅｒＭｉｘ（ＱｕａｎｔａＢｉｏ）およびＵｎｉｖｅｒｓａｌ ＰＣＲ Ｐｒｉｍｅｒｓ（ＱｕａｎｔａＢｉｏ）と混合した。３つまたは２つのｃＤＮＡサンプルを各９６ウェルｑＰＣＲプレートの隣接するウェルで実行した。ｑＰＣＲプレートを、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用し、２段階のサイクリングプロトコル（９５℃で５分間、続いて９５℃で５秒間および６０℃で３０秒間を４０サイクル）を使用して実行し、融解曲線を完了した。反応が完了した後、Ｃｔ値は固定しきい値設定を使用して決定された。２＾（－ΔΔＣＴ）法を使用して、ｍｉＲＮＡの相対量を決定した。

【０１３７】

ｑＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡの定量

エクソソームにおけるｍｉＲＮＡ－１４８ａ－３ｐ（ｍｉｒ－１４８ａ）の発現をｑＲＴ－ＰＣＲで分析した。ｑＲＴ－ＰＣＲの結果はＤｅｌｔａ－Ｄｅｌｔａ ＣＴ法２＾（－△△Ｃｔ）で計算し、値はＲＮＵ６Ｂに対して正規化した（使用したプライマー：ｍｉＲ－１４８ａ－３ｐ：ＣＧＣＴＣＡＧＴＧＣＡＣＴＡＣＡＧＡＡＣＴＴＴＴ（配列番号１）、ＲＮＵ６（ＮＲ＿００２７５２．１）：ＧＣＡＡＡＴＴＣＧＴＧＡ ＡＧＣＧＴＴＣＣ）（配列番号２）。

【０１３８】

ｍＲＮＡの定量化のためのｃＤＮＡを、高容量ＲＮＡ－ｃＤＮＡキット（ＡｐｐｌｉｅｄＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ，ＵＳＡ）を製造業者の指示に従って使用して生成した。

【０１３９】

結腸組織から単離された全ＲＮＡ（１μｇ）を使用してｃＤＮＡを生成した。ｃＤＮＡをｑＰＣＲに供した。ＩＬ－６およびＴＮＦ－αのｍＲＮＡレベルを、ＳｔｅｐＯｎｅ Ｐｌｕｓ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍマシン（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、マスターミックス（Ｆａｓｔ ｑＰＣＲ ＳｙＧｒｅｅｎ Ｂｌｕｅ Ｍｉｘ，ＰＣＲ Ｂｉｏｓｙｎｔｅｓｉｓ、Ｐｅｎｓｙｌｖａｎｉａ，ＵＳＡ）を用いるｑＲＴ－ＰＣＲを使用して測定した。プライマー：

ＴＮＦ－α：：フォワード５’－ＧＴＴＣＴＧＴＣＣＣＴＴＴＣＡＣＴＣＡＣ（配列番号３）、

リバース５’－ＴＧＣＣＴＣＴＴＣＴＧＣＣＡＧＴＴＣ（配列番号４）；

ＩＬ－６：フォワード５’－ＧＡＧＴＣＡＣＡＧＡＡＧＧＡＧＴＧＧＣＴＡＡＧＧＡ（配列番号５）、

リバース５’－ＣＧＣＡＣＴＡＧＧＴＴＴＧＣＣＧＡＧＴＡＧＡＴＣＴ（配列番号６）；

ＧＡＰＤＨ：フォワード５’－ＧＣＣＴＴＣＣＧＴＧＴＴＣＣＴＡＣＣ（配列番号７）、

リバース５’－ＣＴＴＣＡＣＣＡＣＣＴＴＣＴＴＧＡＴＧＴＣ（配列番号８）。

【０１４０】

ＰＣＲ反応の工程は、９５℃で５分間の１サイクル、９５℃で５秒間の４０サイクル、および６０℃で３０秒間のサイクルであった。２＾（－ΔΔＣＴ）法を使用して、ｍＲＮＡの相対量を決定した。

【０１４１】

イムノブロッティング

タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動し、ＰＶＤＦメンブレンに転写した。メンブレンを抗体でプローブし、増強された化学発光検出反応を使用して検出した。一次抗体は次のとおり、抗ＣＤ９（１：１０００；ＳＢＩ Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）、抗ＣＤ８１（１：１０００；Ｃｏｓｍｏ Ｂｉｏ、Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）、抗ＨＳＰ７０（１：１０００；ＳＢＩ Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）、ウサギ抗ＴＧＦ－β１（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ，ＵＳＡ）、ウサギ抗β－アクチン（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ，ＵＳＡ）であった。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合体化ヤギ抗マウスまたは抗ウサギ（１：３０００；Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）であった。定量化を、ＮＩＨ－Ｉｍａｇｅソフトウェア（ｈｔｔｐ：／／ｒｓｂ．ｉｎｆｏ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｎｉｈ－ｉｍａｇｅ／ｄｏｗｎｌｏａｄ．ｈｔｍｌ）を使用して実施した。

【０１４２】

実施例１．

牛乳またはヒトの乳汁のスキムまたは脂肪画分におけるエクソソームの単離および特徴付け

乳汁には、カゼインおよびホエーの２つのクラスのタンパク質が存在する。ヒトの乳汁には、カゼインとホエータンパク質とがそれぞれ４０：６０の比率で含まれており、一方、牛乳にはこれらのタンパク質がそれぞれ８０：２０の比率で含まれている。牛乳の総タンパク質量はヒトの乳汁の２倍超であるため、牛乳にはヒトの乳汁よりもかなり多くのカゼインが含まれている。牛乳またはヒトの乳汁のスキム画分から、乳汁由来のエクソソームを分離した。牛乳またはヒトの乳汁中のカゼインの量が異なるため、牛乳またはヒトの乳汁からのエクソソームの単離は、上記のプロトコルを使用して実施した。

【０１４３】

図１Ａ～Ｋに見られるように、牛乳またはヒトの乳汁から単離された小胞は類似しており、エクソソームとして同定された。透過型電子顕微鏡分析は、牛乳またはヒトの乳汁から単離されたナノベシクルが典型的な円形またはカップ形状の外観を有することを示した（それぞれ図１Ｂおよび１Ｃ）。乳汁から単離された小胞のサイズを確認するために、さまざまな手法を適用した。例えば、エクソソームを特徴付ける従来の方法であるナノ粒子追跡分析（ＮＴＡ）を利用して、ブラウン運動の追跡に基づいてエクソソームのサイズを測定した。平均サイズは、牛乳から単離された小胞では１７９ｎｍ、ヒトの乳汁から単離された小胞では１６６ｎｍであった（それぞれ図１Ｄおよび１Ｅ）。動的光散乱（ＤＬＳ）もまた、Ｚ平均によってエクソソームのサイズを測定するために適用した。ＤＬＳによって決定されたエクソソームサイズは、牛乳またはヒトの乳汁から単離された小胞について、それぞれ１３１ｎｍおよび９６．９１ｎｍであることが見出された（それぞれ、図１Ｆおよび１Ｇ）。多分散度指数（ＰＤＩ）もまた、エクソソームのサイズ分布を特徴付けるためにＤＬＳによって評価した。ＰＤＩは、牛乳から単離された小胞で０．２８１、ヒトの乳汁から単離された小胞で０．２６１であり（それぞれ図１Ｆおよび１Ｇ）、ＮＴＡ分析の鋭い単一ピークによっても確認できるエクソソームの比較的均一なサイズ分布を示している。これらの結果によると、牛乳またはヒトの乳汁から単離された小胞のサイズは、エクソソームの特徴的なサイズである。

【０１４４】

エクソソームの純度を、ウエスタンブロット分析によって評価した。図１Ｈおよび１Ｉに示すように、牛乳またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームは、エクソソーム関連タンパク質、すなわちＣＤ９およびＣＤ８１を発現したが、対照タンパク質であるＨＳＰ７０は、細胞溶解物全体でのみ検出され、エクソソームでは検出されず、このことは、単離されたエクソソームが高度に精製されており、豊富な細胞内成分および破片によって汚染されていないことを示している。

【０１４５】

エクソソームの主な積荷の１つはｍｉＲＮＡである。実際、ｍｉＲ－１４８およびｍｉＲ

３２０などのいくつかのｍｉＲＮＡは、ｑＲＴ－ＰＣＲによって牛乳またはヒトの乳汁から単離された（それぞれ図１Ｊおよび１Ｋ）。

【０１４６】

まとめると、これらの結果は、牛乳またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームが高純度であったことを示している。

【０１４７】

次に、乳汁の脂肪画分からのエクソソームの単離を実施した。

【０１４８】

図２Ａは、プロトコルＣに従って牛乳の脂肪画分から単離されたエクソソームにおけるウエスタンブロット分析による、エクソソームに特徴的なタンパク質、すなわち、ＣＤ８１およびＣＤ９の発現を示す。ＨＳＰ７０は、これらの画分では検出されなかった。図２Ｂ～Ｃは、牛乳の脂肪画分から単離されたエクソソームの透過型電子顕微鏡分析を示す。

【０１４９】

プロトコルＡ、Ｂ、またはＣに従って牛乳から単離されたエクソソームにおけるｍｉＲＮＡ－１４８ａ－３ｐ（ｍｉＲＮＡ－１４８）の発現を、ｑＲＴ－ＰＣＲによって分析した。ｑＲＴ－ＰＣＲの結果はＤｅｌｔａ－Ｄｅｌｔａ　ＣＴ法２＾（－△△Ｃｔ）で計算され、値はＲＮＵ６Ｂに対して正規化された。図２Ｄに示される結果は、エクソソームが、牛乳のスキム画分または脂肪画分から単離されたかどうかにかかわらず、ｍｉＲＮＡ分子、例えば、ｍｉＲ－１４８を含むことを示した。

【０１５０】

次の目的は、乳汁由来のエクソソームに抗炎症性ポリペプチドが含まれているかどうかを判断することであった。候補として、結腸でのその抗炎症活性で知られているタンパク質であるＴＧＦ－β１を評価した。図３に示すように、ＴＧＦ－β１は、７０，０００ｇでの超遠心分離後のペレットまたは１３５，０００ｇでの超遠心分離後の上清などの他の乳汁画分と比較して、乳汁由来のエクソソーム（ＭＤＥ）で高度に発現することが見出された（図３）。

【０１５１】

まとめると、これらの結果は、エクソソームが天然の乳汁から、スキムミルク画分または脂肪乳画分の両方から単離できること、および単離されたエクソソームが、ｍｉＲ－１４８およびｍｉＲＮＡ－３２０を含む天然ｍｉＲＮＡ分子、ならびにＴＧＦ－β１などの抗炎症タンパク質を運ぶかまたはカプセル化することを示した。

【０１５２】

実施例２．

腸に蓄積されたエクソソーム

乳汁由来のエクソソームが腸によって取り込まれることが可能かどうかを判断するために、次の実験を実施した。

【０１５３】

上記のプロトコルに従って牛乳またはヒトの乳汁から単離された乳由来のエクソソーム（ＭＤＥ）を、２００μｌのＰＢＳ中マウスあたり０．５ｍｇ／ｍｌの用量でＢａｌｂ／ｃマウス（ｎ＝４／グループ）に７日間強制経口投与した。ＭＤＥを、インビボでのエクソソーム局在パターンを追跡するために、製造元の指示に従って、赤外線蛍光膜色素ＤｉＩＲ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）で標識した。６日目から７日目まで、ＤｉＲ色素標識エクソソームを強制経口投与によりＢａｌｂ／ｃマウスに投与した。強制経口投与の２時間後、マウスを観察し、Ｔｙｐｈｏｏｎ　ＦＬＡ　９５００スキャナーを使用して７４０ｎｍの励起および７９０ｎｍの発光フィルターでエクソソーム分布の蛍光画像を取得した。イメージングにより、牛乳またはヒトの乳汁由来のエクソソームの強制経口投与後の腸内での蛍光シグナルの蓄積が明らかになった（それぞれ図４Ａおよび４Ｂ）。エクソソーム投与の間にマウスの体重を測定し、図４Ｃに提示された結果は、処理されたマウスの体重に対するエクソソームの影響が存在しなかったことを示した。

【０１５４】

したがって、これらの結果は、経口投与された乳汁由来のエクソソームが腸に蓄積したことを示した。

【０１５５】

実施例３．

経口投与された乳汁由来のエクソソームは大腸炎の発症を減弱化した

大腸炎に対する乳汁由来のエクソソームの予防効果を決定するために、マウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）誘発性大腸炎の動物モデルを使用した。

【０１５６】

大腸炎は、１日目から飲料水に５％ＤＳＳを添加することにより、Ｂａｌｂ／ｃマウスに誘発された。対照マウスは定期的に飲料水を与えられた。ＤＳＳで処理されたマウスまたは対照マウスは、強制経口投与により、２００μｌのＰＢＳ中マウスあたり０．５ｍｇ／ｍｌの用量でヒトの乳汁由来のエクソソーム（ＥＸＯ）で７日間処理されたか（それぞれＤＳＳ＋ＥＸＯおよびＥＸＯ）、またはＰＢＳのみが投与されたかのいずれかであった。

【０１５７】

処理または対照マウスからの代表的な結腸切片をＨ＆Ｅによって染色し、染色した切片を図５Ａ～Ｄに示す。Ｈ＆Ｅ染色切片の組織学的スコアを図５Ｅに示す。図５Ｆは、様々な試験されたグループ（ｎ＝５／グループ）における疾患活動性指数（これは、便の一貫性、直腸刺激および便中の血液（ＤＡＩ）の組み合わせスコアである）を示す。

【０１５８】

この実験の結果は、乳汁由来のエクソソームが、ＤＳＳ誘発性大腸炎マウス（図５Ｄおよび５Ｅ）の結腸における細胞損傷を予防し、かつ、これらのマウスにおける大腸炎症状の発症を阻害したことを示した。したがって、ＭＤＥは、ＤＳＳ誘発性大腸炎の発症を予防または減弱化する際に有益な効果を発揮することが示された。

【０１５９】

実施例４．

牛乳またはヒトの乳汁から単離された乳汁由来のエクソソームの経口投与は、ＤＳＳによって誘発された大腸炎の重症度を減弱化した

次に、大腸炎マウスに対するＭＤＥの効果を評価した。

【０１６０】

大腸炎を、飲料水中で１週間提供された５％ＤＳＳを使用してＢａｌｂ／ｃマウスにおいて誘発した。次いで、マウスを、対照として、エクソソームあり（ＥＸＯ＋）またはエクソソームなし（ＥＸＯ－）で５～６日間処理した。ＤＳＳ処理の７日間とエクソソーム投与の２日間との間に、マウスの体重を評価した。図６Ａおよび６Ｃに示されるように、マウスの体重は、ＤＳＳ処理の７日間およびエクソソーム投与なしの２日間の間に有意に減少した。しかし、牛乳またはヒトの乳汁から単離されたＭＤＥを２日間投与すると、マウスの体重が増加し（それぞれ、図６Ｂおよび６Ｄ）、その結果、最初のマウスの体重と比較して、体重のわずかな差が見られた（図６Ｂおよび６Ｄ）。これらの結果は、牛乳またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームが大腸炎に関連する体重減少を予防し、体重回復を促進することを示した。

【０１６１】

牛乳またはヒトの乳汁から単離されたエクソソームは、ＤＳＳ誘発性大腸炎の他の徴候および症状を減少させた。したがって、エクソソーム処理は結腸の短縮を有意に低減させ、牛乳由来のエクソソーム処理後、結腸の長さの中央値は、対照群の６ｃｍと比較して７．５ｃｍであった（図６Ｅ）。ヒトの乳汁由来のエクソソーム処理後、結腸の長さの中央値は、対照群の７ｃｍと比較して７．７ｃｍであった（図６Ｆ）。さらに、未処理の大腸炎マウスの結腸切片の組織学的分析は、ＭＤＥで処理された大腸炎マウスと比較して、広範な結腸損傷および免疫細胞浸潤（固有層および粘膜中）を明らかにした。この効果は組織学的スコアに反映されており、牛乳から単離されたエクソソームは組織学的スコアを５．８３から０．６に低減させ（図６Ｇ）、ヒトの乳汁から単離されたエクソソームは組織学的スコアを５．９から４．１３に低減させた（図６Ｈ）。

【０１６２】
したがって、これらの結果は、ＭＤＥがＤＳＳ誘発性大腸炎の症状発現を低減し、その重症度を減弱化したことを示している。
【０１６３】
実施例５．
ＭＤＥは、大腸炎結腸において、ＴＧＦ－β１のレベルを増加させた
次の目的は、大腸炎結腸におけるＴＧＦ－β１タンパク質のレベルに対するＭＤＥ処理の効果を決定することであった。図７Ａ～Ｂに示されるように、ＭＤＥ処理後、未処理の大腸炎マウスと比較して、ＭＤＥで処理された大腸炎マウスの結腸組織において、ＴＧＦ－β１タンパク質レベルの有意な増加が存在した。対照として使用されたβ－アクチンのタンパク質レベルは、ＭＤＥで処理された大腸炎マウスと処理されていない大腸炎マウスとで同一であった。
【０１６４】
これらの結果は、大腸炎マウスにおけるＭＤＥ治療が、結腸におけるＴＧＦ－β１発現を増加させたことを示した。
【０１６５】
実施例６．
大腸炎結腸におけるｍｉＲＮＡ発現に対するＭＤＥの効果
次に、マウスの大腸炎結腸におけるｍｉＲＮＡ発現に対するＭＤＥ処理の効果を調べた。この研究では、ｍｉＲＮＡ－３２０、ｍｉＲＮＡ－３７５、ｌｅｔ－７ａ、ｍｉＲＮＡ１４８の４つのｍｉＲＮＡを分析した。これらのｍｉＲＮＡは、追加の８つのｍｉＲＮＡとともに、ＭＤＥで高度に発現していることが見出された（ＷＯ２０１７／０９００４９を参照）。図８Ａ～Ｄに示されるように、ｌｅｔ７ａ、ｍｉＲＮＡ－３２０、およびｍｉＲＮＡ－３７５の発現は、未処理のマウスと比較して、ＭＤＥで処理されたマウスにおいて有意に高かった（それぞれ、図８Ａ、８Ｂおよび８Ｃ）。ｍｉＲＮＡ－１４８の発現は、未処理のマウスと比較して、ＭＤＥで処理したマウスでも高かった（図８Ｄ）。
【０１６６】
これらの結果は、大腸炎マウスへのＭＤＥの投与が、処理されたマウスの大腸炎結腸におけるｍｉＲＮＡの高発現をもたらしたことを示し、ＭＤＥが大腸炎結腸におけるｍｉＲＮＡ発現に影響を及ぼしたことを意味する。
【０１６７】
実施例７．
ＭＤＥは炎症関連遺伝子に影響を及ぼした
次に、大腸炎結腸における炎症誘発性サイトカインの発現に対するＭＤＥの効果を評価した。
【０１６８】
図９Ａ～Ｂに示されるように、未処理の大腸炎マウスと比較して、炎症誘発性サイトカイン、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６のより低い遺伝子発現は、ＭＤＥで処理された大腸炎マウスで観察された。ＴＮＦ－α遺伝子の発現は、ＭＤＥ処理後に有意に下方調節された（図９Ａ）。さらに、ＩＬ－６の遺伝子発現は、未処理と比較して、ＭＤＥ処理マウスにおいて下方調節された（図９Ｂ）。
【０１６９】
まとめると、これらの結果は、ＭＤＥ治療がマウスの大腸炎結腸における抗炎症性サイトカインＴＧＦ－ｂ１の発現を増加させるだけでなく、この組織における炎症誘発性サイトカイン、ＩＬ－６およびＴＮＦ－αの発現も低減させることを示した。したがって、乳汁由来のエクソソームは、大腸炎を治療および／または予防するための有用な薬剤である。
【０１７０】
前述の特定の実施形態の説明は、本発明の一般的な性質を完全に明らかにするので、他の実施形態が、現在の知識を適用することによって、様々な用途に容易に修正および／または適合することができ、このような特定の実施形態は、過度の実験なしに、および一般的

な概念から逸脱することなく、したがって、かかる適合および変更は、本開示の実施形態の均等物の意味および範囲内で理解されるべきであり、そのように意図されている。本発明は、その特定の実施形態に関連して説明されてきたが、多くの代替物、改変、およびバリエーションが当業者に明らかであることは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の技術思想および広い範囲に含まれるすべてのそのような代替物、改変、およびバリエーションを包含することが意図されている。

【図面】

【図１Ａ】

エクソソームの供給源	数
ウシ（プロトコルB）	4.78×10^8
ヒト（プロトコルB）	2.33×10^8

【図１Ｂ】

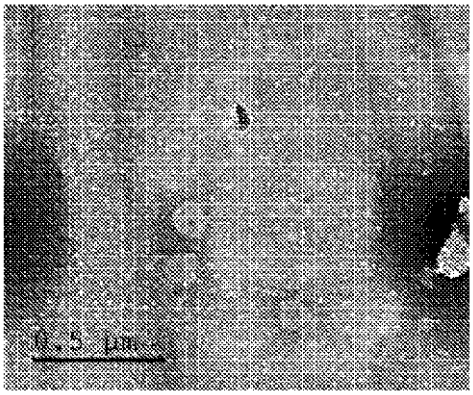


FIG. 1B

【図１Ｃ】

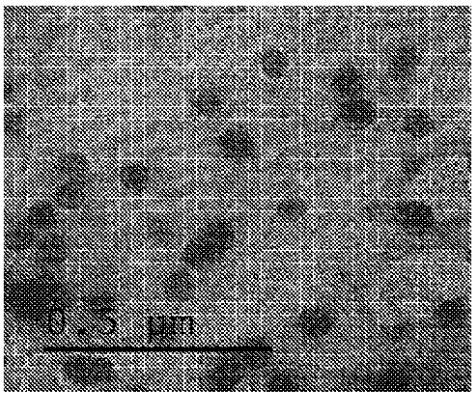
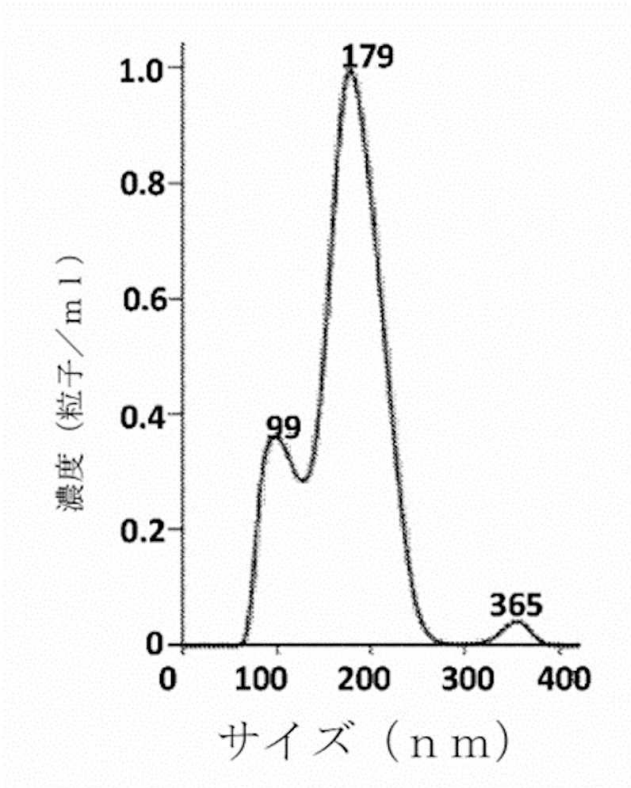
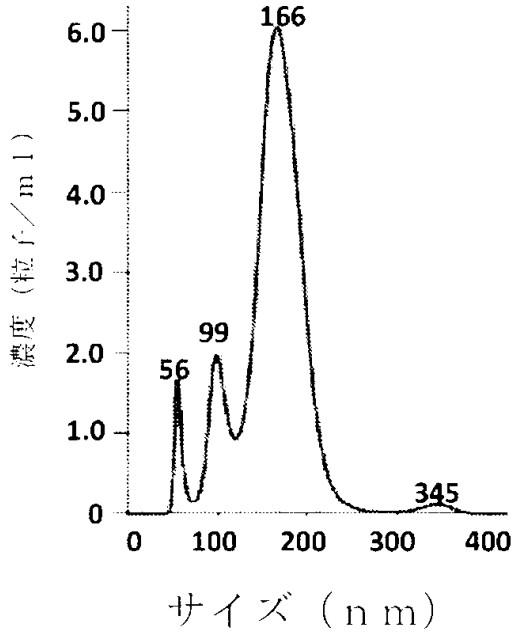


FIG. 1C

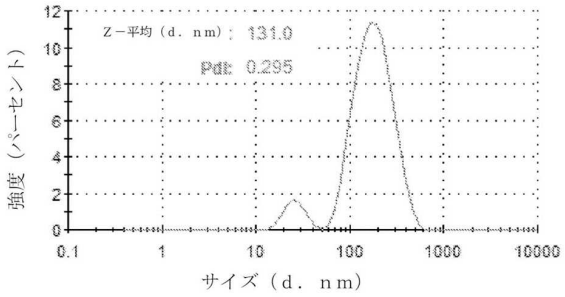
【図１Ｄ】



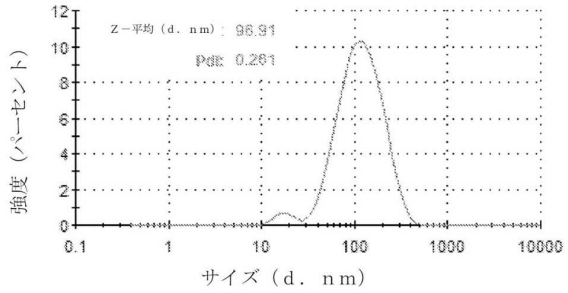
【図１Ｅ】



【図１Ｆ】



【図１Ｇ】



【図１Ｈ】



FIG. 1H

【図１Ｉ】

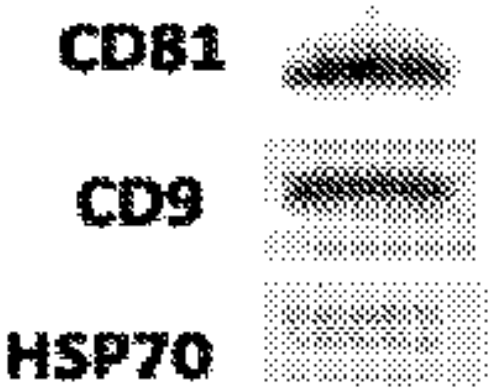


FIG. 1I

【図１Ｊ】

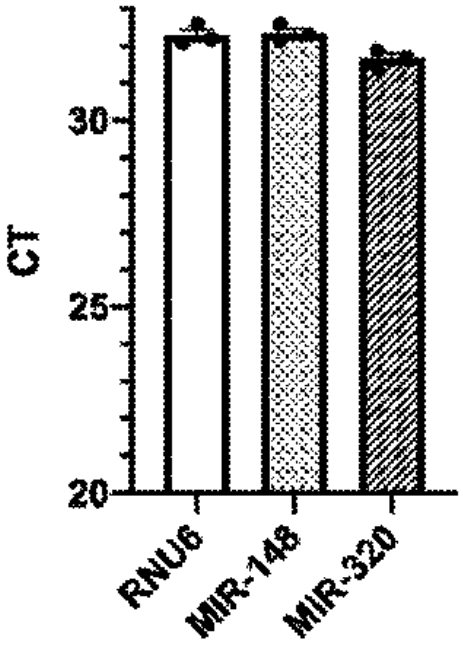


FIG. 1J

【図１Ｋ】

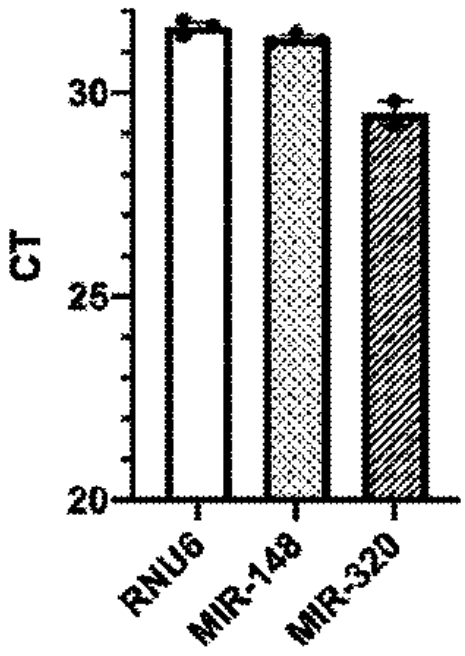
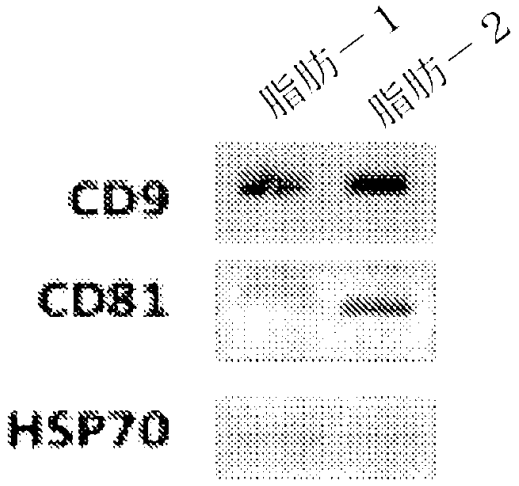


FIG. 1K

【図２Ａ】



【図２Ｂ】

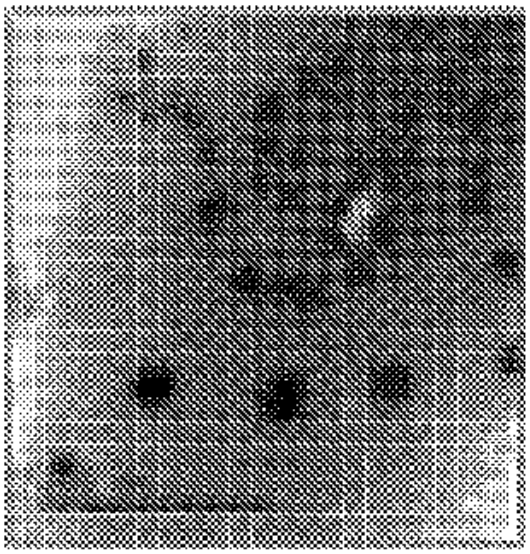


FIG. 2B

【図２Ｃ】

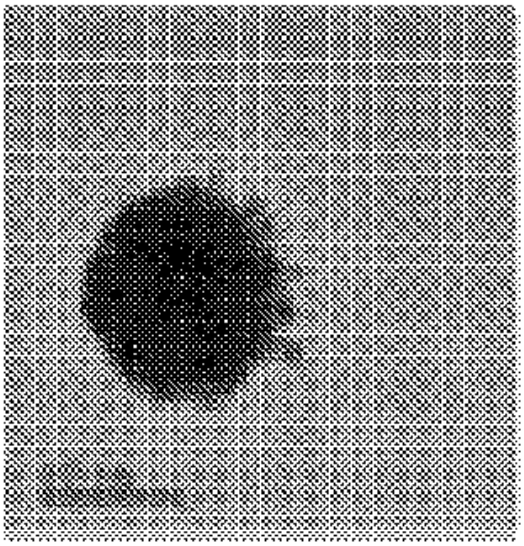
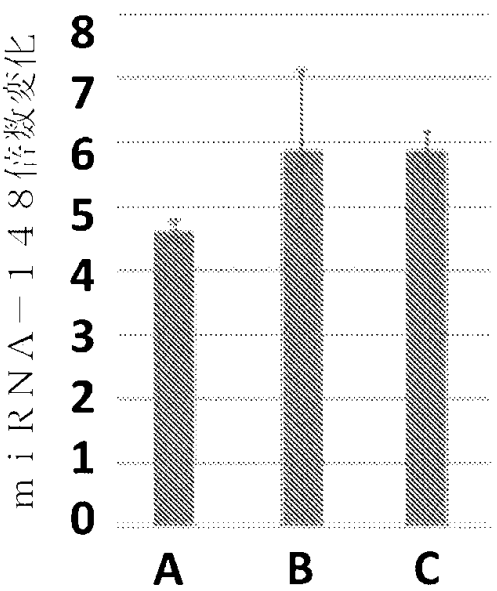
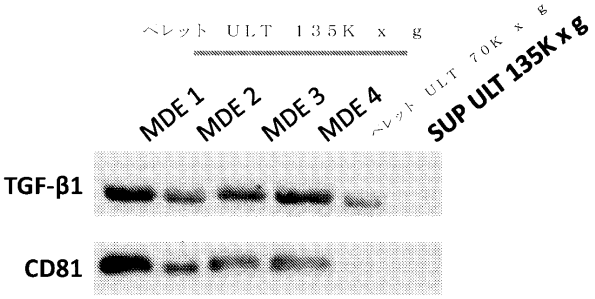


FIG. 2C

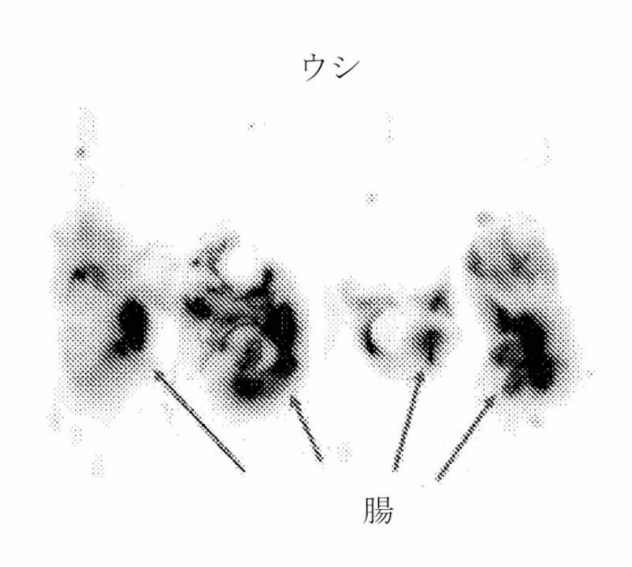
【図２Ｄ】



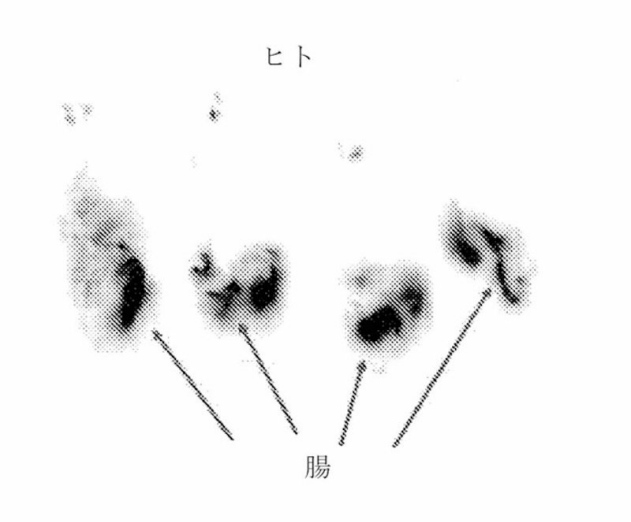
【図３】



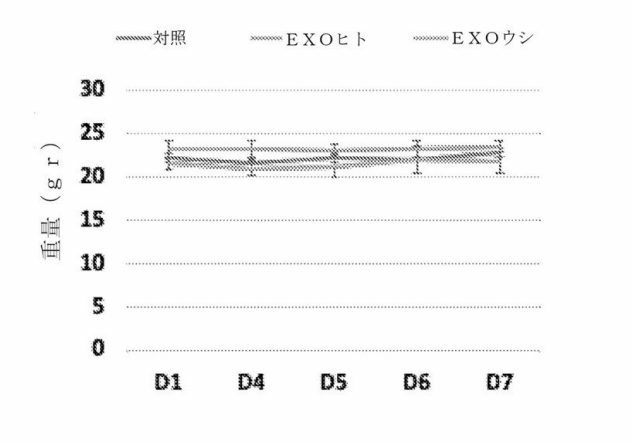
【図４Ａ】



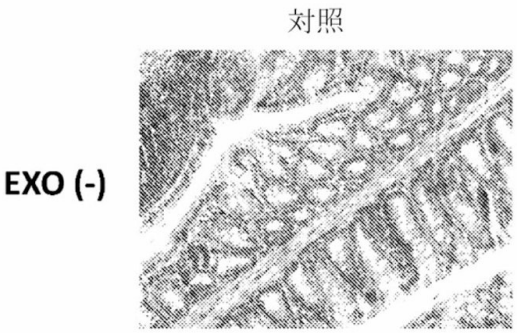
【図４Ｂ】



【図４Ｃ】



【図５Ａ】



【図５Ｂ】

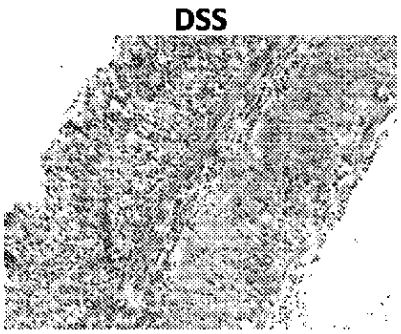
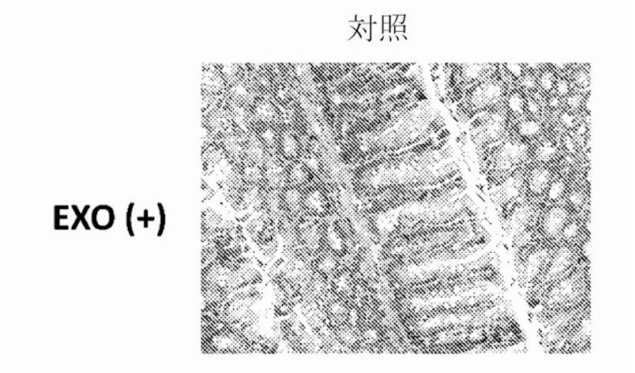


FIG. 5B

【図５Ｃ】



【図５Ｄ】

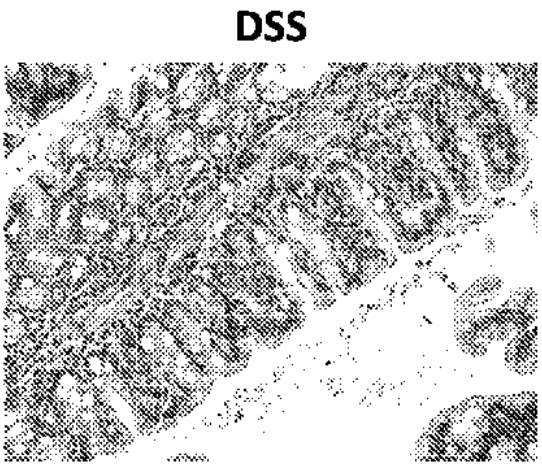
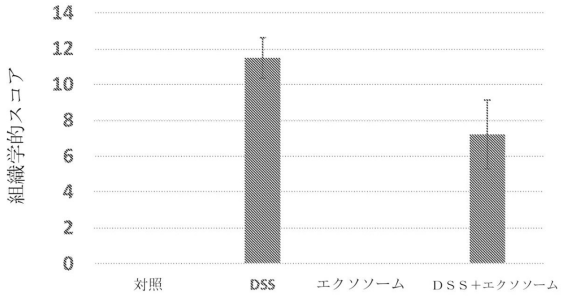
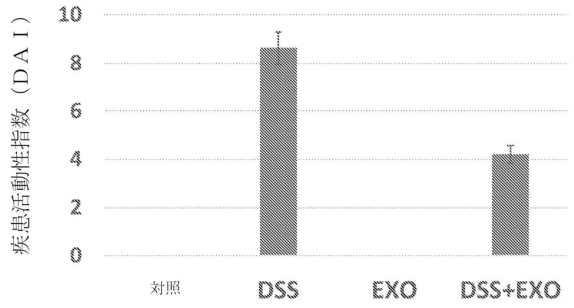


FIG. 5D

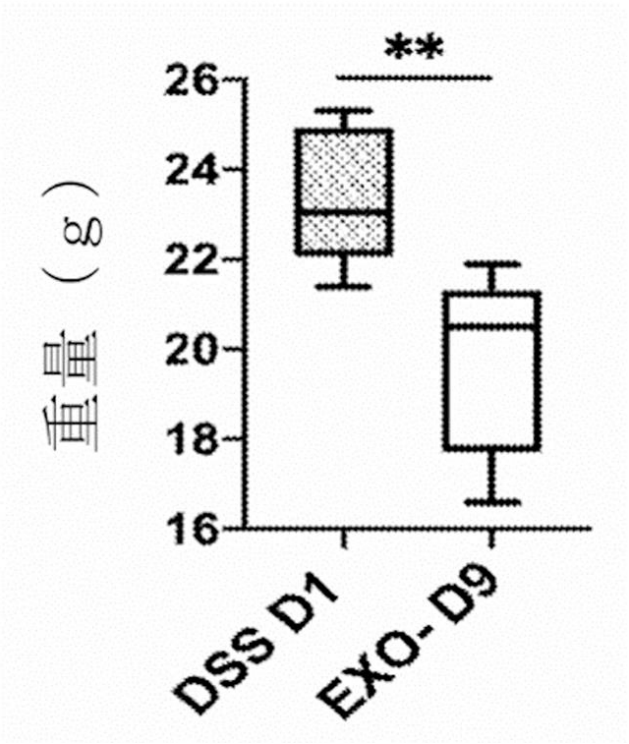
【図５Ｅ】



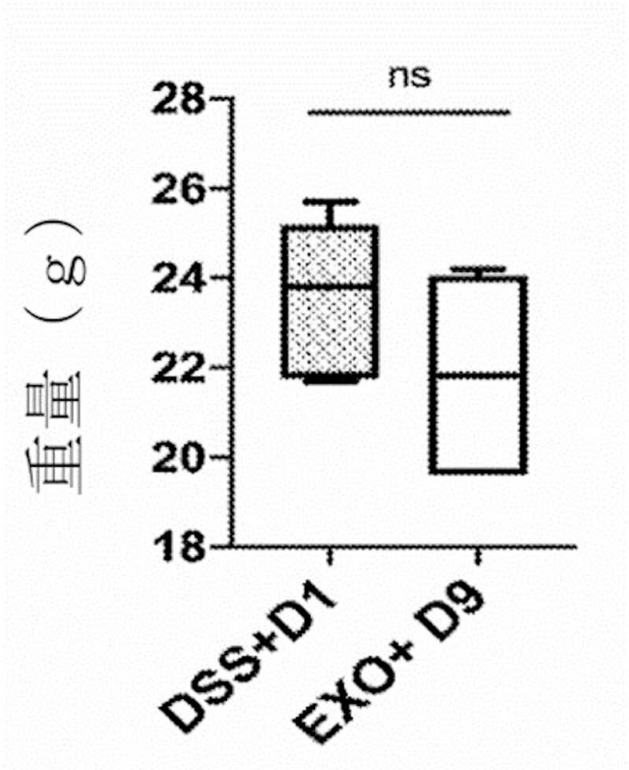
【図５Ｆ】



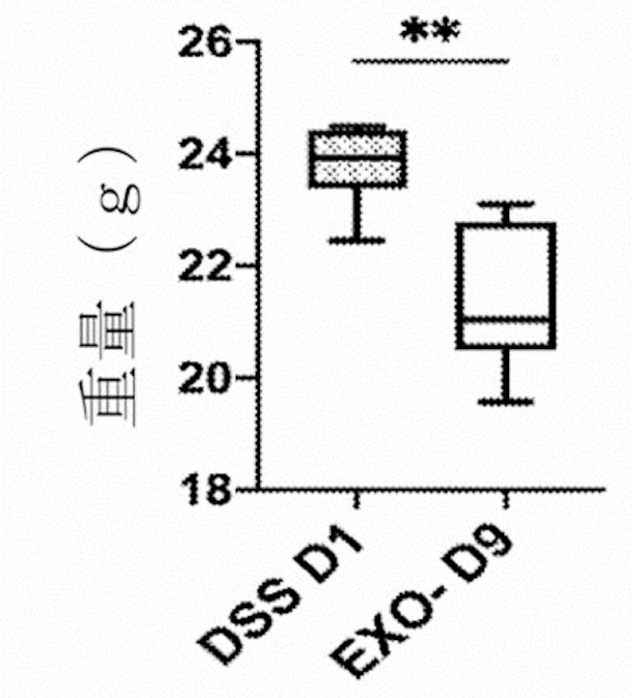
【図６Ａ】



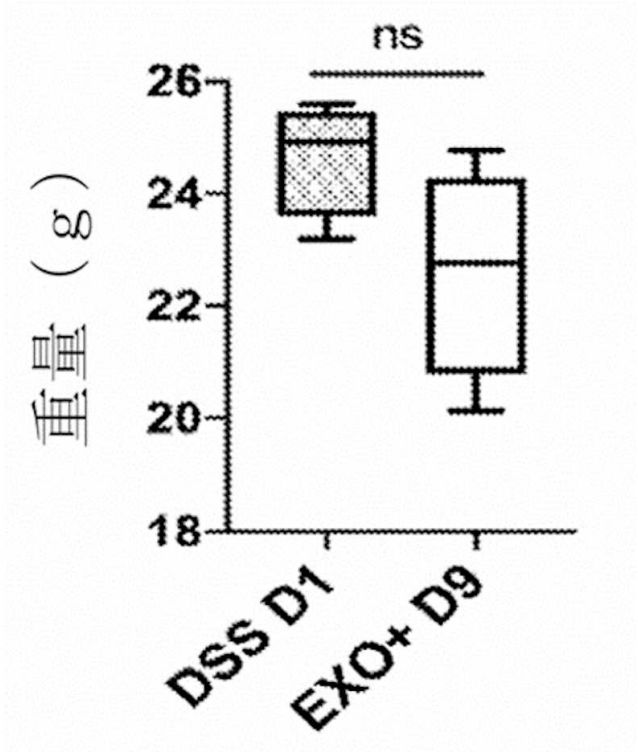
【図６Ｂ】



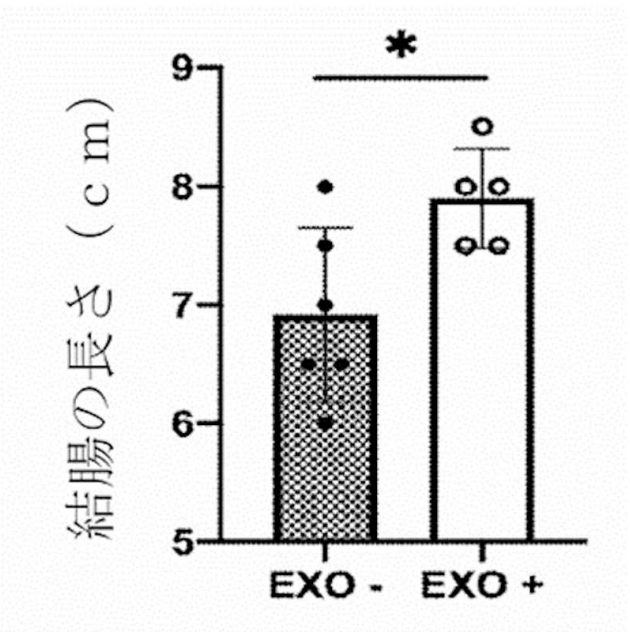
【図６Ｃ】



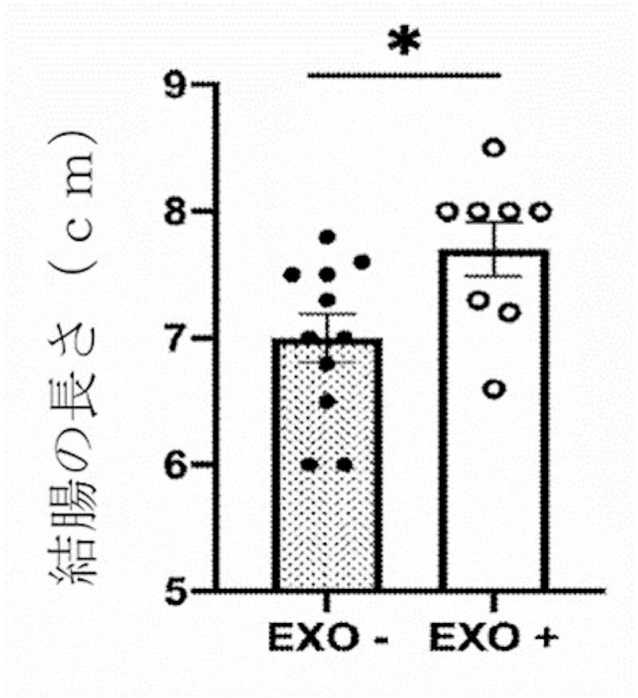
【図６Ｄ】



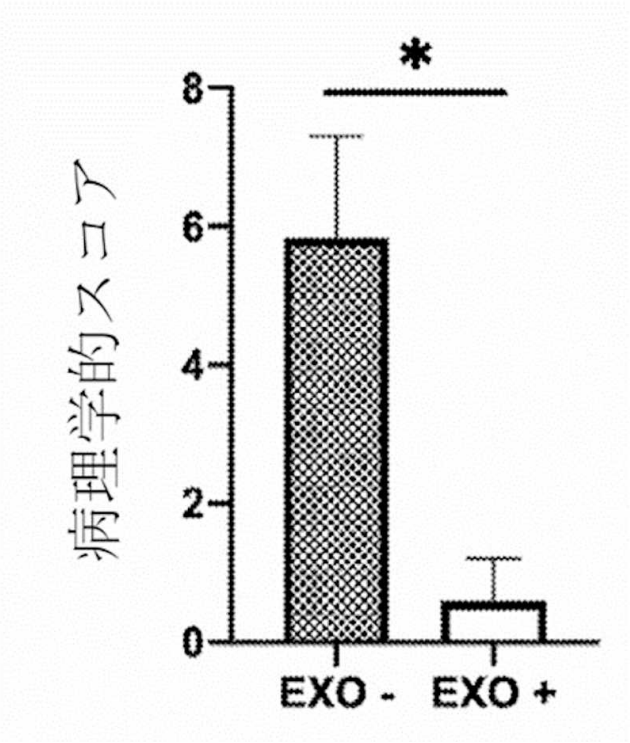
【図６Ｅ】



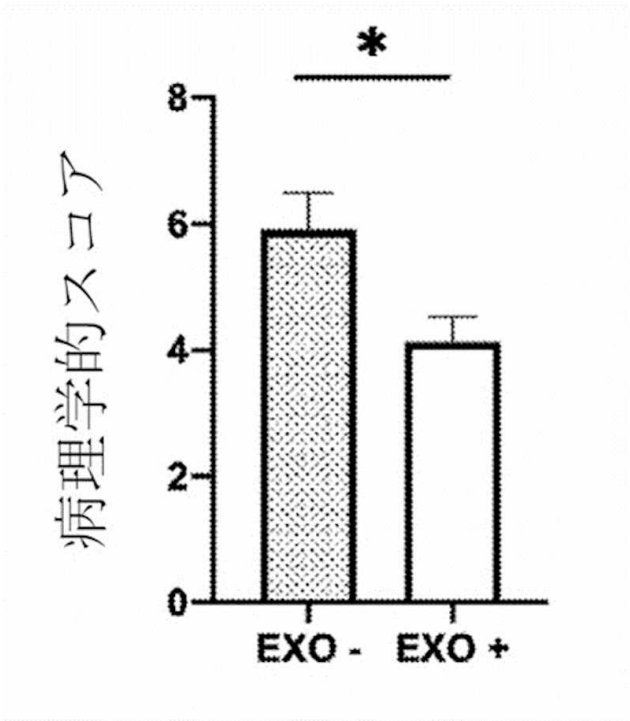
【図６Ｆ】



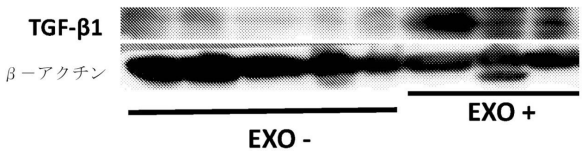
【図６Ｇ】



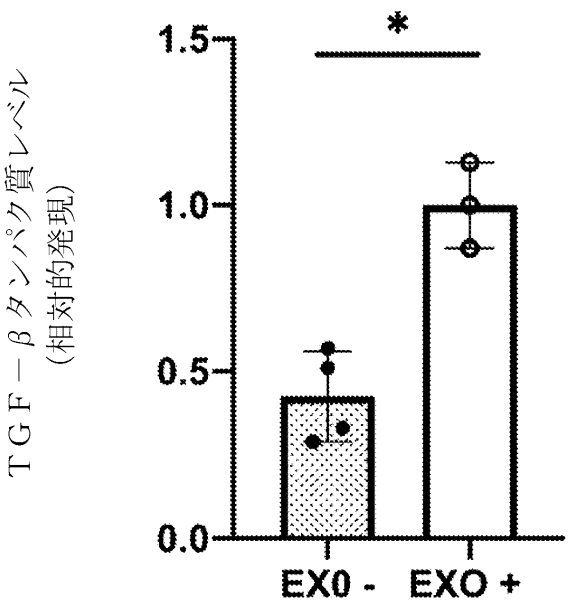
【図６Ｈ】



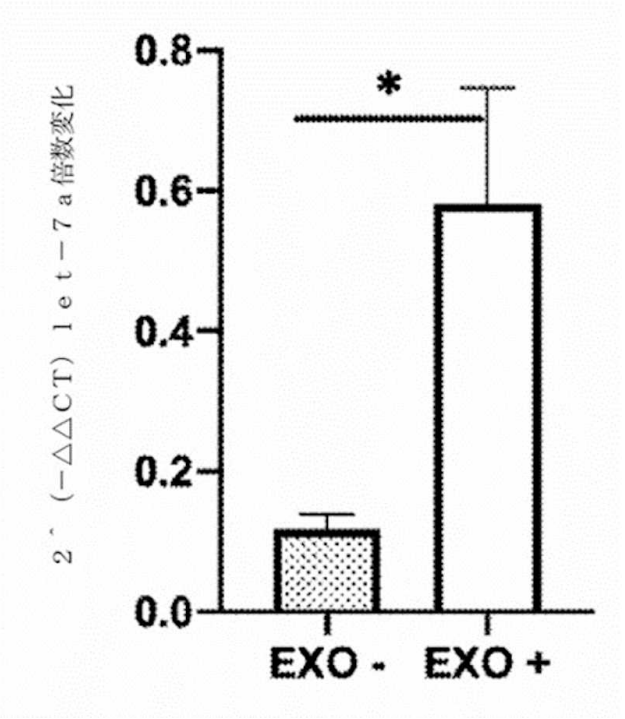
【図７Ａ】



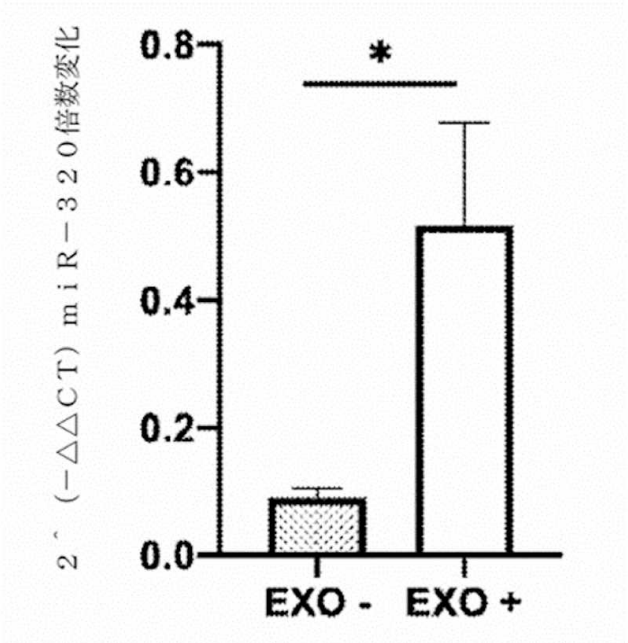
【図７Ｂ】



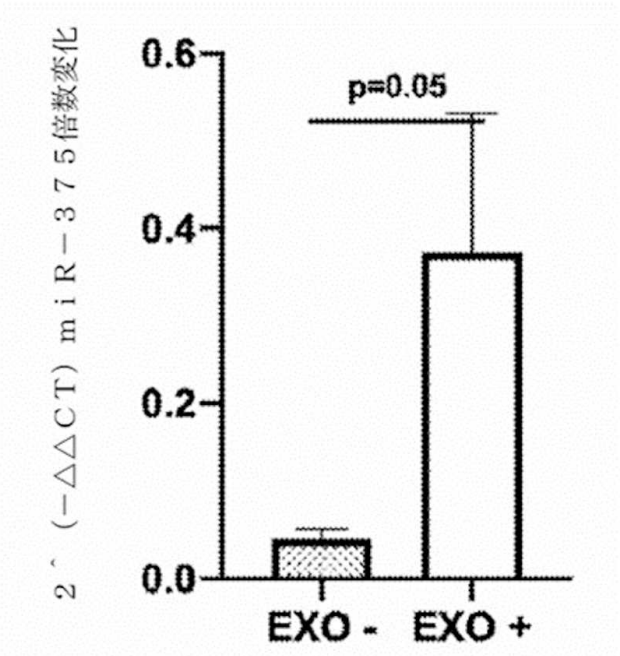
【図８Ａ】



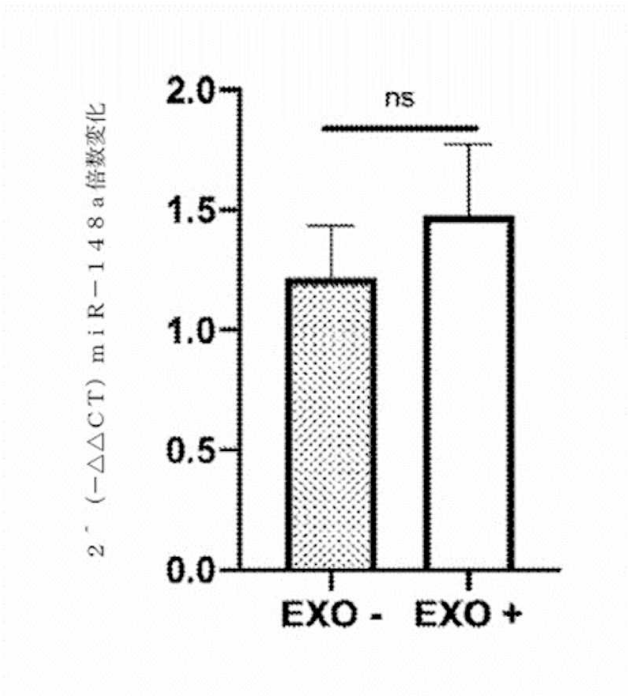
【図８Ｂ】



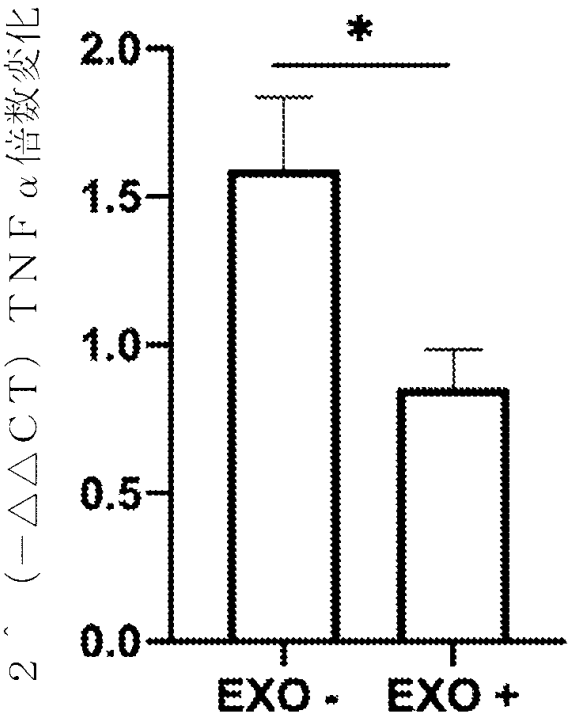
【図８Ｃ】



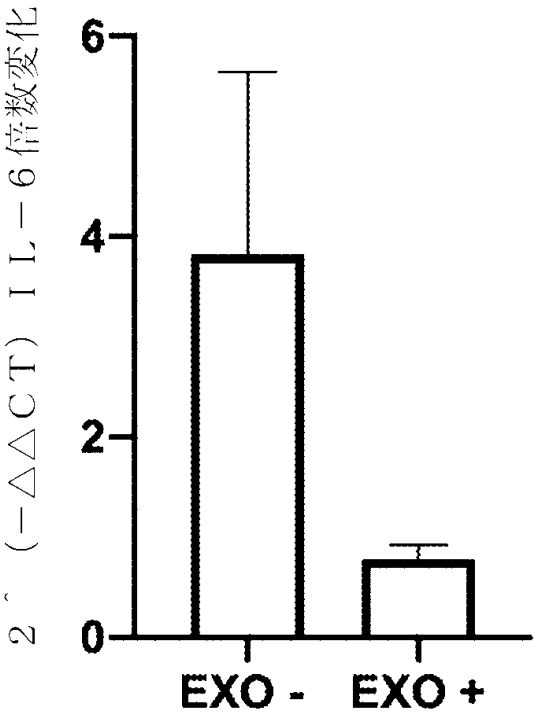
【図８Ｄ】



【図９Ａ】



【図９Ｂ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2020/050518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC (20200101) A61K 35/20, A61P 1/00, A61K 31/7105, A61K 38/18
CPC (20150115) A61K 35/20, A61P 1/00, A61K 31/7105, A61K 38/1841
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC (20200101) A61K 35/20, A61P 1/00, A61K 31/7105, A61K 38/18
CPC (20150115) A61K 35/20, A61P 1/00, A61K 31/7105, A61K 38/1841

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Databases consulted: CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar, Derwent Innovation
Search terms used: Exosome, milk, inflammatory, bowel disease, colitis, Crohn's

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3192518 A1 MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD[JP] 19 Jul 2017 (2017/07/19) examples, claims	1-47
X	WO 2018170332 A1 NUTECH VENTURES[US] 20 Sep 2018 (2018/09/20) examples, claim 84, paragraphs 0019, 0014, 00220-00222, 00227	1-47
P,X	WO 2019236873 A1 UNIV NEBRASKA[US] 12 Dec 2019 (2019/12/12) examples, claim 93, paragraphs 0020, 00252-00253	1-47
P,X	Benmoussa, Abderrahim, et al. "Concentrates of two subsets of extracellular vesicles from cow's milk modulate symptoms and inflammation in experimental colitis." Scientific reports 9 (2019) doi: 10.1038/s41598-019-51092-1 Retrieved from the internet:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6787204/> 10 Oct 2019 (2019/10/10) the whole document	1-47

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 Aug 2020	18 Aug 2020
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Email address: pctoffice@justice.gov.il	Authorized officer HOROWITZ Anat Telephone No. 972-73-3927172

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2020/050518

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
EP 3192518 A1	19 Jul 2017	EP 3192518 A1	19 Jul 2017
		EP 3192518 A4	28 Mar 2018
		AU 2015313211 A1	02 Mar 2017
		AU 2015313211 B2	18 Oct 2018
		JP WO2016039356 A1	27 Apr 2017
		JP 6349405 B2	27 Jun 2018
		NZ 728949 A	28 Sep 2018
		PH 12017500386 A1	17 Jul 2017
		WO 2016039356 A1	17 Mar 2016
WO 2018170332 A1	20 Sep 2018	WO 2018170332 A1	20 Sep 2018
WO 2019236873 A1	12 Dec 2019	WO 2019236873 A1	12 Dec 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

フロントページの続き

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

(74)代理人 100121511
弁理士 小田 直
(74)代理人 100202751
弁理士 岩堀 明代
(74)代理人 100208580
弁理士 三好 玲奈
(74)代理人 100191086
弁理士 高橋 香元
(72)発明者 レイフ，シモン
イスラエル国，９３５５８０６ エルサレム，６ ミリャム ハハシュモネ ストリート
(72)発明者 ゴラン－ジャーストル，レジナ
イスラエル国，９０６３４００ マーレ ミクマス，ハウス ５７８

Ｆターム（参考） 4C076 AA01 BB29 CC16 FF34 FF68
4C084 AA02 AA03 BA44 DA01 MA02 MA16 MA31 MA55 MA60 NA05 NA14 ZA68
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA03 MA04 MA07 MA16 MA31 MA55 MA60 NA05 NA10 NA14 ZA68
4C087 AA01 AA02 BB39 MA02 MA16 MA31 NA05 NA14 ZA68