

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-528697
(P2024-528697A)

(43)公表日 令和6年7月30日(2024.7.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	36/05 (2006.01)	A 6 1 K	36/05		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/12 (2006.01)	C 1 2 N	1/12	Z N A	4 C 0 8 3
C 1 2 N	1/13 (2006.01)	C 1 2 N	1/13		4 C 0 8 4
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	4 C 0 8 5
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00		4 C 0 8 8
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全180頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2024-503826(P2024-503826)		(71)出願人	524026469	
(86)(22)出願日	令和4年7月20日(2022.7.20)			エイジーエス・セラピューティクス・ソシエテ・パール・アクション・サンプリフィエ	
(85)翻訳文提出日	令和6年3月18日(2024.3.18)			AGS Therapeutics SAS	
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/070371			フランス75003パリ、リュ・グルヌタ10	
(87)国際公開番号	WO2023/001894				
(87)国際公開日	令和5年1月26日(2023.1.26)				
(31)優先権主張番号	63/223,828		(71)出願人	524026470	
(32)優先日	令和3年7月20日(2021.7.20)			エイジーエス・エム・ソシエテ・パール・アクション・サンプリフィエ	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			AGS-M SAS	
(31)優先権主張番号	63/224,656			フランス44000ナント、ケ・ドゥ・マラコフ41-43	
(32)優先日	令和3年7月22日(2021.7.22)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(71)出願人	507421289	
(31)優先権主張番号	63/305,230			ナント・ユニヴェルシテ	
最終頁に続く			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 微細藻類由来の細胞外小胞、その調製および使用

(57)【要約】

治療的、工業的、診断的および美容的使用などのために、目的の生物活性カーゴまたは他のカーゴが外因的に負荷された微細藻類由来の細胞外小胞（MEV）を含有する組成物が提供される。MEVは、ワクチンとして、抗がん治療薬として、診断薬としておよび他のこのような使用を含め、治療薬としてのさまざまな適用を有する。

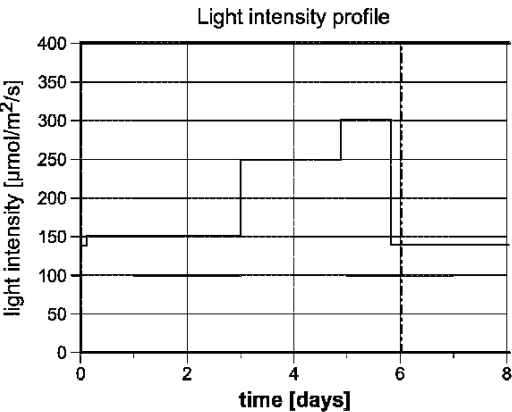


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された微細藻類細胞外小胞（MEV）を含む組成物であって、
微細藻類はクロレラ属の種であり、
組成物は、対象への投与のために製剤化され、および
対象は動物である、組成物。

【請求項 2】

タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸および小分子の中から選択される外因的に
負荷された（エキソロードされた）生物活性分子を含む微細藻類細胞外小胞（MEV）で
あって、微細藻類は、クロレラ属の種である、微細藻類細胞外小胞（MEV）。 10

【請求項 3】

クロレラ属細胞外小胞が、単離された細胞外小胞中に導入されている異種生物活性カー
ゴ分子を含み、外因的に負荷された（エキソロードされた）MEVを生成し、それによっ
て、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物またはMEV中の小胞が、導入された生物
活性分子カーゴを含有し、

生物活性カーゴ分子は、クロレラ属にとって異種であり、および

生物活性カーゴは、生体分子または小分子である、請求項 1 に記載の組成物または請求
項 2 に記載のMEV。

【請求項 4】

単離された微細藻類細胞外小胞（MEV）を含む組成物であって、 20

微細藻類は、クロレラ属の種であり、

組成物中のMEVは、単離されたMEV中に導入されている異種生物活性分子カーゴを
含有し、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、概して、
同一カーゴを含有し、

カーゴは、クロレラ属にとって異種であり、および

カーゴは、生体分子または小分子である、組成物。

【請求項 5】

各MEV中の異種のエキソロードされたカーゴの量が、平均的にMEVあたり少なくと
も10分子のカーゴ、またはMEVあたり少なくとも50、100、500、1000、
10⁴もしくはそれより多い分子である、請求項 1、3 および 4 のいずれかに記載の組成
物または請求項 2 に記載のMEV。 30

【請求項 6】

クロレラ属が、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロ
キニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスの中から選択されるクロ
レラ属の種である、請求項 1 および 3 から 5 のいずれかに記載の組成物または請求項 2 に
記載のMEV。

【請求項 7】

クロレラ属が、クロレラ・ブルガリスである、請求項 1 および 3 から 6 のいずれかに記
載の組成物または請求項 2 に記載のMEV。

【請求項 8】

外因的に負荷された（エキソロードされた）カーゴを含むクロレラ属MEVを含み、カー
ゴが、生物活性分子を含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の組成物またはMEV。 40

【請求項 9】

MEVが、小分子薬物または診断薬である小分子を含む異種のエキソロードされたカー
ゴを含む、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の組成物またはMEV。

【請求項 10】

MEVが、生体分子を含む異種のエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 8 の
いずれかに記載の組成物またはMEV。

【請求項 11】

MEVが、疾患、障害もしくは状態を処置するための治療薬である、または疾患、障害 50

もしくは状態の診断のためである、またはインビボもしくはインビトロでの投与の際の M E V の検出のためである生物活性カーゴを含む、請求項 1 から 1 0 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 1 2】

M E V が、複数の異なる異種のエキソロードされたカーゴを含む異種のエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 1 1 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 1 3】

M E V が、疾患もしくは状態を処置もしくは防止するまたはそのリスクもしくは重症度を低減するための、またはその症状を処置もしくは防止するための治療薬である異種のエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の組成物または M E V。

10

【請求項 1 4】

M E V が、核酸分子、ポリペプチド、タンパク質、アプタマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、異種のエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 1 5】

M E V 中の異種のエキソロードされたカーゴが D N A または R N A である、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 1 6】

M E V 中の異種のエキソロードされたカーゴが阻害性 R N A (R N A i) である、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の組成物または M E V。

20

【請求項 1 7】

エキソロードされたカーゴが m R N A または改変 m R N A を含む、請求項 2 から 1 5 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 1 8】

R N A i が、サイレンシング R N A (s i R N A) または低分子ヘアピン型 R N A (s h R N A) またはマイクロ R N A (m i R N A) である、請求項 1 6 に記載の組成物または M E V。

【請求項 1 9】

異種のエキソロードされたカーゴが、低分子活性化 R N A (s a R N A) または長鎖ノンコーディング R N A (l n c R N A) である R N A 分子である、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の組成物または M E V。

30

【請求項 2 0】

エキソロードされたカーゴが、コーディング R N A またはノンコーディング R N A である核酸を含む、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の組成物または M E V。

【請求項 2 1】

エキソロードされたカーゴが、異種のメッセンジャー R N A (m R N A)、s O R F を含む長鎖ノンコーディング R N A (l n c R N A)、長鎖ノンコーディング R N A (l n c R N A)、低分子ヘアピン R N A (s h R N A)、低分子活性化 R N A (s a R N A) および／または自己活性化 R N A である核酸を含む、請求項 1 4 から 1 7 のいずれかに記載の組成物または M E V。

40

【請求項 2 2】

エキソロードされた異種カーゴが、異種 R N A i である核酸を含むが、R N A 分子が、病原体遺伝子および宿主病原体感受性因子を標的化する異種 R N A i を含まないことを条件とする、請求項 1 4 から 1 7 および 2 1 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 2 3】

異種のエキソロードされたカーゴが、オリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 4 に記載の組成物または M E V。

【請求項 2 4】

異種のエキソロードされたものが、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) または

50

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドまたはリボザイムを含む、請求項 23 に記載の組成物または MEV。

【請求項 25】

異種のエキソロードされたカーゴが、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を含む、請求項 24 に記載の組成物または MEV。

【請求項 26】

MEV が、疾患、障害もしくは状態を処置もしくは防止するための、またはその症状を処置もしくは防止するための治療薬であるエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 25 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 27】

MEV が、疾患、障害もしくは状態になるリスクを防止もしくは低減するための、または疾患、障害もしくは状態の重症度を低減するための予防薬であるタンパク質または治療薬を含む、またはコードするエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 26 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 28】

MEV が核酸、タンパク質、小ペプチド、ペプチドおよび／またはポリペプチドを含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 27 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 29】

MEV が、遺伝子編集システムを含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 28 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 30】

遺伝子編集システムが、CRISPR-CAS システムまたは CRISPR 関連もしくは CRISPR 様システムまたは転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) またはジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) またはホーミングエンドヌクレアーゼまたはメガヌクレアーゼを含む、請求項 31 に記載の組成物または MEV。

【請求項 31】

MEV が、免疫モジュレーターを含む、または免疫モジュレーターをコードする核酸を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 30 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 32】

MEV が、1 つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、MHC 抗原をマスクする、または 1 つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション剤をコードする核酸を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 31 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 33】

MEV が、免疫調節活性を有する小ペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 32 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 34】

MEV が、1 つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、MHC 抗原をマスクする、または 1 つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション性のエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 33 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 35】

MEV が、ホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインをコードする、またはホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインである、あるいはホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインをコードする核酸を含むエキソロードされたカーゴを含む、

10

20

30

40

50

請求項 1 から 32 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 36】

エキソロードされたカーゴが、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、レラキシン、プロリラキシン、糖タンパク質ホルモン、例えば、卵胞刺激ホルモン (F S H)、甲状腺刺激ホルモン (T S H) および黄体形成ホルモン (L H)、肝増殖因子、線維芽細胞増殖因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ、ミューラー管抑制物質、ゴナドトロピン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン (T P O)、神経増殖因子、トランスフォーミング増殖因子 (T G F)、インスリン様増殖因子-I および-II、エリスロポエチン (E P O)、骨誘導因子、インターフェロン、例えば、インターフェロン-アルファ、-ベータ、および-ガンマ、コロニー刺激因子 (C S F)、例えば、マクロファージ-C S F (M-C S F)、顆粒球-マクロファージ-C S F (G M-C S F)、顆粒球-C S F (G-C S F) およびインターロイキン (I L) の中から選択されるホルモンもしくはサイトカインもしくは増殖因子を含む、またはそれをコードする、請求項 35 に記載の組成物。

10

【請求項 37】

エキソロードされたカーゴが、m R N A 媒介性遺伝子療法、遺伝子サイレンシング、遺伝子置換、遺伝子過剰発現および／または遺伝子編集のための核酸を含む、請求項 35 に記載の組成物または M E V。

20

【請求項 38】

エキソロードされたカーゴが、遺伝子調節、遺伝子置換、遺伝子過剰発現、遺伝子編集、細胞代謝の調節、細胞機能の調節および／またはタンパク質療法のための、ペプチドまたはタンパク質のうち 1 つまたは複数を含む、請求項 36 に記載の組成物または M E V。

【請求項 39】

m R N A 媒介性遺伝子療法またはタンパク質療法が、先天性代謝異常を処置するためのものである、請求項 37 または請求項 38 に記載の組成物または M E V。

【請求項 40】

組成物中の M E V が、2 つまたはそれより多いエキソロードされたカーゴ生成物を含む、請求項 1 から 39 のいずれかに記載の組成物または M E V。

30

【請求項 41】

M E V が、ワクチンを含む、またはワクチンであるエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 40 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 42】

ワクチンが、がん特異的抗原もしくは感染性疾患関連抗原を含む、またはそれをコードする、請求項 41 に記載の組成物または M E V。

【請求項 43】

ワクチンが免疫防御的および／または予防的である、請求項 41 または請求項 42 に記載の組成物または M E V。

【請求項 44】

ワクチンが、m R N A、ペプチド、小ペプチド、ポリペプチドおよび／もしくはタンパク質を含む、またはそれをコードする、または D N A、R N A、タンパク質もしくはウイルスワクチンである、請求項 41 から 43 のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 45】

M E V が、がんまたは感染性疾患または代謝性疾患または神経変性疾患または他の C N S 障害または加齢または加齢関連疾患または遺伝病または眼性障害または免疫学的障害または内臓、心血管系および関連臓器および組織、造血もしくはリンパ組織、感覚系臓器および組織、泌尿生殖器性臓器および組織、筋肉組織、骨および／もしくは内分泌組織が関わるものの処置のための治療用生成物である、核酸またはタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 44 のいずれかに

50

記載の組成物または M E V。

【請求項 4 6】

M E V が、プラスミドを含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 4 5 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 4 7】

プラスミドが、治療用生成物または診断用生成物をコードする、請求項 4 6 に記載の組成物または M E V。

【請求項 4 8】

プラスミドが、治療用 R N A 生成物をコードする、請求項 4 6 に記載の組成物または M E V。

【請求項 4 9】

プラスミドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムまたは二本鎖 R N A をコードする、請求項 4 6 に記載の組成物または M E V。

【請求項 5 0】

プラスミドが、真核生物のプロモーターの制御下にカーゴ生成物をコードする、請求項 4 6 から 4 9 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 5 1】

プロモーターが、R N A ポリメラーゼ I I または I I I プロモーターである、請求項 5 0 に記載の組成物または M E V。

【請求項 5 2】

プロモーターが、R N A ポリメラーゼ I I によって認識され、真核生物のウイルスプロモーターである、請求項 5 1 に記載の組成物または M E V。

【請求項 5 3】

プロモーターが、サイトメガロウイルスプロモーター、サルウイルス 4 0 プロモーター、単純ヘルペスプロモーター、エプスタイン・バーウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、合成プロモーター、アクチンプロモーターおよび合成キメラプロモーターの中から選択される、請求項 5 1 または請求項 5 2 に記載の組成物または M E V。

【請求項 5 4】

プラスミドが、他の真核生物の転写配列および真核生物の翻訳配列をさらに含む、請求項 4 6 から 5 3 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 5 5】

配列が、エンハンサー、ポリ A 配列および配列内リボソーム進入部位 (I R E S) 配列のうち 1 つまたは複数を含む、請求項 5 4 に記載の組成物または M E V。

【請求項 5 6】

プラスミドが、2 つまたはそれより多いカーゴ生成物をコードする、請求項 4 6 から 5 5 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 5 7】

M E V が、化粧品である、または美容的活性を有する、または機能性化粧品である、または工業的使用を有するエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 5 6 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 5 8】

M E V が、天然に存在する生体高分子である、または合成生体高分子である、または改変生体高分子である生体高分子を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 5 7 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 5 9】

生体高分子が核酸またはタンパク質を含み、および
生体高分子が改変を含み、
改変が、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基の挿入、欠失、置き換えおよび転位を含み、および／または生体高分子がタンパク質である場合には、改変が翻訳後修飾を含み得る、請求項 5 8 に記載の組成物または M E V。

10

20

30

40

50

【請求項 60】

改変が、グリコシル化、超グリコシル化、ペグ化、シアリル化、アルブミン化、他の半減期延長部分および／またはタンパク質の薬理学的動力的もしくは動態学的特性を改善する他の改変を含む翻訳後修飾を含む、請求項 59 に記載の組成物または MEV。

【請求項 61】

生体高分子が核酸またはポリペプチドであり、および

生体高分子が天然に存在する生体高分子であるか、またはアミノ酸残基もしくはヌクレオチド残基の置き換え、挿入、欠失もしくは転位によって改変されているか、またはタンパク質である場合には、タンパク質が翻訳後修飾を含む、請求項 58 から 60 のいずれかに記載の組成物または MEV。

10

【請求項 62】

MEV が、治療用または診断用タンパク質またはペプチドを含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 61 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 63】

MEV が、タンパク質複合体を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 62 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 64】

タンパク質複合体が、2つのタンパク質、またはタンパク質および核酸、またはタンパク質およびアプタマー、またはタンパク質、核酸および他の分子の組合せを含む、請求項 63 に記載の組成物または MEV。

20

【請求項 65】

エキソロードされたカーゴが、抗体またはその抗原結合性断片であるタンパク質を含む、またはそれをコードする、請求項 1 から 64 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 66】

抗体が scFv、二重特異性抗体、ナノボディまたはラクダ類またはそれらの抗原結合性断片またはそれらの他の形態である、請求項 65 に記載の組成物または MEV。

【請求項 67】

抗体もしくはその抗原結合性断片もしくは他の形態が、チェックポイント阻害剤抗体もしくはその抗原結合性断片または腫瘍抗原特異的抗体もしくはその抗原結合性断片または抗がん遺伝子特異的抗体もしくはその抗原結合性断片であり、または腫瘍特異的受容体またはシグナル伝達分子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項 66 に記載の組成物または MEV。

30

【請求項 68】

抗体またはその抗原結合性断片が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、PD-1 / PDL1 経路、PD-1 / PDL2 経路、HER2、EGFR、TIM-3、LAG-3、BTLA-4、HHLA-2、CD28 または他の免疫チェックポイントまたは免疫抑制剤または腫瘍抗原のうち 1 つまたは複数に特異的に結合し、阻害する、請求項 66 または請求項 67 に記載の組成物または MEV。

【請求項 69】

MEV が、がんまたは感染性疾患または神経変性疾患または他の CNS 障害または加齢または加齢関連疾患または眼性障害または免疫学的障害の処置のための治療用生成物である、核酸またはタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 55 のいずれかに記載の組成物または MEV。

40

【請求項 70】

エキソロードされたカーゴ生成物が、組成物または MEV を用いて処置された対象の免疫系を刺激する、請求項 69 に記載の組成物または MEV。

【請求項 71】

MEV が、小分子生物活性分子を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 70 のいずれかに記載の組成物または MEV。

【請求項 72】

50

小分子生物活性分子が小分子薬物である、請求項 7 1 に記載の組成物または M E V。

【請求項 7 3】

M E V が、化学療法薬を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 7 2 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 7 4】

M E V が、プロドラッグを含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 7 3 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 7 5】

M E V が、診断用マーカーまたは検出可能な生成物を含むエキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 7 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7 6】

診断用マーカーが、ルシフェラーゼもしくはルシフェラーゼをコードする核酸、蛍光タンパク質もしくは蛍光タンパク質をコードする核酸またはルシフェラーゼオペロンを含む、請求項 7 5 に記載の組成物または M E V。

【請求項 7 7】

M E V が単離されているか、または部分精製されている、カーゴを M E V 中に導入することを含む、請求項 1 から 7 6 のいずれかに記載の組成物または M E V を調製する方法。

【請求項 7 8】

疾患、障害または状態の処置を達成するために組成物または M E V を対象に投与することを含む、疾患、障害または状態を処置する方法。

【請求項 7 9】

エレクトロポレーション、超音波処理、押出および界面活性剤のうち 1 つまたは複数から選択される方法によって、カーゴが M E V 中に負荷される、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

微細藻類がクロレラ・ブルガリスである、請求項 7 8 または請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

微細藻類がクロレラ・ブルガリスである、請求項 7 7 から 8 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 2】

微細藻類がクロレラ属であり、クロレラ属が、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアピリスの中から選択されるクロレラ属の種である、請求項 7 7 から 7 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 3】

エキソロードされたカーゴが生体高分子を含む、請求項 7 7 から 8 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 4】

生体高分子が、合成生体高分子または天然に存在する生体高分子または改変生体高分子である、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

エキソロードされたカーゴが、タンパク質、核酸または小分子を含む、請求項 7 7 から 8 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 6】

M E V が、診断の方法、またはワクチンとして、または疾患の処置もしくは診断のための療法または疾患もしくは状態の処置として、または美容的使用のため、または工業的使用のためのうち 1 つまたは複数において使用するためのものである、請求項 1 から 8 5 のいずれかに記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 8 7】

疾患ががんである、請求項 8 6 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 8 8】

がんが、固形腫瘍または血液学的悪性腫瘍を含む、請求項 87 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 89】

疾患または状態が、呼吸器系の疾患またはそれが関与する疾患である、請求項 86 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 90】

疾患または状態が、中枢神経系または神経系の疾患もしくはそれが関与する疾患である、請求項 86 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 91】

疾患または状態が、皮膚および／もしくは露出上皮および／もしくは粘膜の疾患またはそれが関与する疾患である、請求項 86 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 92】

疾患または状態が、消化管の疾患もしくはそれが関与する疾患である、請求項 86 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 93】

疾患または状態が、感染性病原体の疾患もしくはそれが関与する疾患である、請求項 86 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 94】

感染性病原体が、細菌、ウイルス、卵菌または真菌である、請求項 93 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 95】

M E V が、免疫賦活性タンパク質もしくは抗原を含む、または免疫賦活性タンパク質もしくは抗原をコードするエキソロードされたカーゴを含有し、それによって、投与されると、M E V が免疫賦活性であり、自然もしくは適応免疫応答を誘発する、請求項 1 から 94 のいずれかに記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 96】

M E V が、免疫防御応答を誘発して、疾患または状態を防止または処置する、請求項 95 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 97】

M E V が、外傷に起因する状態を処置する効果を誘発する、請求項 1 から 96 のいずれかに記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 98】

外傷が、創傷、火傷、手術、皮膚の傷口、骨折、毛髪脱落、真皮の露出、粘膜の露出、線維症、裂傷および潰瘍の中から選択される、請求項 97 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 99】

M E V が、自然老化または病原性もしくは疾患もしくはそれ以外で誘導された老化に起因する状態を処置する効果を誘発する、請求項 1 から 98 のいずれかに記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 100】

状態が、皮膚の状態または視覚に影響を及ぼす状態である、請求項 99 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 101】

状態が、しわである、または皮膚の変色である、または黄斑変性である、または白内障である、または糖尿病性網膜症に起因する状態である、請求項 100 に記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 102】

組成物または M E V が、局所投与のために製剤化される、請求項 1 から 101 のいずれかに記載の組成物または M E V または方法。

【請求項 103】

10

20

30

40

50

組成物またはMEVが、粘膜投与のために製剤化される、請求項1から101のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項104】

組成物またはMEVが、静脈内投与のために製剤化される、請求項1から101のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項105】

組成物またはMEVが、エアロゾルとしての投与のために製剤化される、請求項1から101のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項106】

組成物またはMEVが、鼻腔内投与のために、または吸入のために、または吸入投与のために製剤化される、請求項1から101のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項107】

組成物またはMEVが、経口投与のために製剤化される、請求項1から101のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項108】

組成物またはMEVが、錠剤または散剤またはカプセル剤として製剤化される、請求項107に記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項109】

対象において疾患、障害もしくは状態を処置するための、または疾患、障害もしくは状態の診断のための、または細胞、組織もしくは臓器を検出するための使用のための、請求項1から76のいずれかに記載の組成物またはMEV。

【請求項110】

遺伝子サイレンシング、遺伝子干渉、遺伝子療法、遺伝子／タンパク質過剰発現、遺伝子編集、タンパク質活性および経路シグナル伝達の阻害または刺激のうち1つまたは複数のための使用のための、請求項1から76のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項111】

予防および／またはワクチン接種において使用するためのものである、請求項1から76のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項112】

農業－獣医用適用、例えば、作物科学、植物病原体および動物疾患における使用のための、請求項1から108のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項113】

化粧品における、皮膚科学の適用のための、および美容的適用のための使用のための、請求項1から108のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項114】

工業目的のための、例えば、製造、特性決定および較正のための使用のための、請求項1から108のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項115】

MEVが、全身、局所性または局所的投与のために製剤化される、請求項1から108のいずれかに記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項116】

投与経路が、局所的、局所性、全身、非経口、経腸および経口経路のうち1つまたは複数の中から選択される、請求項115に記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項117】

投与経路が、非経口、経腸、腹膜、静脈内、皮下、筋肉内、直腸、吸入による、粘膜、鼻腔内および膈内の中から選択される、請求項115または請求項116に記載の組成物またはMEVまたは方法。

【請求項118】

10

20

30

40

50

薬学的に許容される媒体中のMEVを含む医薬組成物として製剤化された、請求項1から76のいずれかに記載の組成物またはMEV。

【請求項119】

疾患、障害または状態の処置方法であって、疾患、障害または状態の処置を達成するために、請求項118に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。

【請求項120】

疾患、障害または状態を処置するための使用のための、請求項118に記載の組成物またはMEV。

【請求項121】

経口デリバリー、静脈内デリバリー、筋肉内デリバリー、鼻腔内デリバリー、皮下デリバリー、局所的デリバリー、粘膜デリバリー、腹膜内デリバリー、腫瘍内デリバリーまたは吸入デリバリーのために製剤化された微細藻類細胞外小胞（MEV）を含む組成物であって、MEVが外因的に（エキソロードされた）カーゴを含む、組成物。

10

【請求項122】

MEVが、請求項1から76のいずれかに記載されるいずれかである、請求項121に記載の組成物。

【請求項123】

MEVがデリバリーの経路のために製剤化され、それによって、カーゴが標的臓器または組織または細胞に送達される、請求項121または請求項122に記載の組成物。

【請求項124】

標的臓器または組織または細胞が、肺、肝臓、脾臓、腸、脳、脊髄、末梢神経、リンパ組織、眼、粘膜組織、皮膚、造血組織、膵臓、筋肉、骨、心臓、内分泌組織および腎臓のうち1つまたは複数の中から選択される、請求項123に記載の組成物。

20

【請求項125】

標的臓器または組織が、鼻-頬側、眼性、泌尿生殖器性、腔内または直腸である粘膜組織である、請求項124に記載の組成物。

【請求項126】

懸濁液またはエマルジョンとして製剤化される、請求項121から125のいずれかに記載の組成物。

【請求項127】

ナノエマルジョンであるか、またはマイクロエマルジョンである、請求項126に記載の組成物。

30

【請求項128】

経口投与用の錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、散剤、トローチ剤、顆粒剤、液体、オイルとして製剤化される、または鼻腔投与もしくは経口投与もしくは吸入もしくは吸入投与もしくは気管内投与用の懸濁液もしくはエマルジョンである、請求項1から76および121から127のいずれかに記載の組成物またはMEV。

【請求項129】

MEVがクロレラ属細胞外小胞であり、および

クロレラ属細胞外小胞が、MEV中に外因的に負荷された異種生物活性分子カーゴを含む、請求項121から128のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項130】

クロレラ属が、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアピリスの中から選択される、請求項129に記載の組成物。

【請求項131】

クロレラ属がクロレラ・ブルガリスである、請求項130に記載の組成物。

【請求項132】

MEVが、がんまたは感染性疾患または代謝性疾患または神経変性疾患または他のCNS障害または加齢または加齢関連疾患または遺伝病または眼性障害または免疫学的障害ま

50

たは内臓泌尿生殖器性臓器、心血管系および関連臓器および組織、造血もしくはリンパ組織、感覚系臓器および組織、泌尿生殖器性臓器および組織、筋肉組織、骨および／もしくは内分泌組織が関わるものの処置のための治療用生成物である、エキソロードされたカーゴを含む、請求項 1 から 76 および 121 から 131 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 133】

内臓が、肝臓、膵臓、脾臓および／または脳を含む、請求項 132 に記載の組成物または M E V。

【請求項 134】

経口投与、非経口投与、局所的投与、局所性投与、腫瘍内投与、全身投与、粘膜投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹膜内投与、経皮投与、鼻腔内投与、吸入または気管内投与のために製剤化される、請求項 1 から 76 および 121 から 133 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 135】

組成物が、経口デリバリーのために製剤化される、または鼻腔内デリバリー、吸入もしくは吸入投与のためのエアゾールとして製剤化される、請求項 1 から 76 および 121 から 134 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 136】

M E V 中のエキソロードされたカーゴを臓器または組織へ送達するために使用するための、投与様式が、臓器または組織を標的とするために選択される、請求項 1 から 76 および 121 から 135 のいずれかに記載の組成物または M E V。

【請求項 137】

疾患、障害または状態を処置または防止する方法であって、請求項 1 から 76 および 121 から 136 のいずれかに記載の組成物または M E V を投与することを含む、方法。

【請求項 138】

組成物中の M E V 中のエキソロードされたカーゴが、疾患、障害または状態の防止または処置のためのワクチンを含む、請求項 137 に記載の方法。

【請求項 139】

疾患、障害または状態を処置または防止するための使用のための、請求項 1 から 138 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 140】

疾患、障害または状態が、がん、遺伝障害、肝臓疾患、免疫系または免疫細胞が関与する疾患、感染性疾患、呼吸器疾患、肺疾患、神経変性疾患、胃腸疾患および脳がん、または内臓、泌尿生殖器性臓器、心血管系および関連臓器および組織、造血もしくはリンパ組織、感覚系臓器および組織、泌尿生殖器性臓器および組織、筋肉組織、骨、および／もしくは内分泌組織が関わるものの中から選択される、請求項 139 に記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 141】

内臓が、膵臓、肝臓および／または脾臓を含む、請求項 140 に記載の方法または組成物。

【請求項 142】

M E V が、経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、鼻腔内および／または気管内投与または吸入または吸入投与、局所的投与、局所性投与、腫瘍内投与、全身投与、粘膜投与および／または腹膜内投与のために製剤化される、請求項 136 から 141 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 143】

疾患が、がん、がん転移、メタボリックシンドローム、遺伝障害、アルファアンチトリプシン (AAT) 欠乏症、他の先天性代謝異常、血友病、高コレステロール血症、肝臓炎症、脂肪性肝炎ならびに肝臓への治療薬のデリバリーによって処置できる他の疾患および障害の中から選択される、請求項 136 から 142 のいずれかに記載の方法または M E

10

20

30

40

50

V または組成物または使用。

【請求項 1 4 4】

疾患、障害または状態が、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病またはアルツハイマー病またはハンチントン病またはクロイツフェルトヤコブ病または他の神経変性疾患）または認知障害（例えば、認知症または健忘症またはせん妄または他の認知障害）または脳障害（例えば、脳炎またはてんかん発作または腫瘍または他の脳障害）または神経系障害（例えば、疼痛またはてんかん発作または感染症または他の神経系障害）または遺伝性疾患（例えば、嚢胞性線維症、地中海貧血症、鎌形赤血球貧血、ハンチントン病、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、テイサックス病または他の遺伝性疾患）または多因子疾患〔例えば、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患（COPD）または他の多因子疾患〕またはがん（例えば、乳房または卵巣または腸または前立腺または皮膚のがんまたは他のがん）または高血圧症または高コレステロールまたは統合失調症または双極性障害または関節炎または代謝性疾患〔例えば、家族性高コレステロール血症またはゴーシェ病またはハンター症候群またはクラッペ病またはメープルシロップ尿症または異染性白質ジストロフィーまたはMELAS（ミトコンドリア脳症、乳酸アシドーシス、脳卒中様エピソード）またはニーマンピック病またはフェニルケトン尿症（PKU）またはポルフィリン症またはテイサックス病またはウィルソン病または他の代謝性疾患〕または呼吸器系の疾患〔例えば、喘息または慢性閉塞性肺疾患（COPD）または慢性気管支炎または肺気腫または肺がんまたは嚢胞性線維症または気管支拡張症または肺炎または呼吸器系の他の疾患〕または消化管の疾患〔例えば、過敏性腸症候群（IBS）または炎症性腸疾患（IBD）または胃食道逆流症（GERD）またはセリアック病または憩室炎または消化管の疾患〕または粘膜の疾患（例えば、ベーチェット病または口腔灼熱症候群または口腔扁平苔癬または天然痘および類天疱瘡または再発性アフタ性口内炎またはシェーグレン症候群または泌尿生殖器感染症または副鼻腔炎または鼻腔もしくは副鼻腔ポリープまたは嗅覚および味覚障害またはアレルギーまたは眼性粘膜類天疱瘡または粘膜の他の疾患）または筋肉もしくは神経筋組織の疾患〔例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）またはシャルコーマリートゥース病または多発性硬化症または筋ジストロフィーまたは重症筋無力症または筋疾患または筋炎または末梢神経障害または他の筋肉もしくは神経筋疾患〕または骨の疾患（例えば、頸椎症または骨粗しょう症または中足骨痛またはリウマチ性多発性筋痛または骨がんまたは関節リウマチまたは変形性関節症または他のもの）または内分泌組織の疾患〔例えば、先端巨大症または副腎不全症またはアジソン病またはクッシング症候群またはグレーブス病または橋本病またはクロイツフェルトヤコブ病または甲状腺機能亢進症または甲状腺機能低下症または多発性内分泌新生物または多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）または原発性副甲状腺機能亢進症または内分泌組織の他の疾患〕または造血系もしくはリンパ組織の疾患〔例えば、ファンコニ貧血または血小板減少症またはダイヤモンドブラックファン貧血またはシュワックマンダイヤモンド症候群または慢性肉芽腫性疾患またはゴーシュ病または骨髄増殖性腫瘍、骨髄異形成障害、慢性骨髄単球性白血病、急性骨髄球性白血病（AML）を含む骨髄悪性腫瘍またはリンパ腫またはホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫またはリンパ節炎またはリンパ管炎またはリンパ浮腫またはリンパ球増加症〕である、請求項 1 3 6 から 1 4 2 のいずれかに記載の方法またはMEVまたは組成物または使用。

【請求項 1 4 5】

MEV が経口投与用に製剤化され、疾患が消化管もしくは免疫系もしくは白脾臓に関与する、またはエキソロードされたカーゴが処置のためにそれを標的とする、請求項 1 から 1 4 4 のいずれかに記載の方法またはMEVまたは組成物または使用。

【請求項 1 4 6】

疾患が免疫モジュレーションによって処置される、請求項 1 4 5 に記載の方法またはMEVまたは組成物または使用。

【請求項 1 4 7】

MEV が経口投与用に製剤化され、疾患が血流を介して到達できる臓器および組織のいずれかに関与する、またはエキソロードされたカーゴがそれを標的とする、請求項 1 から

1 4 6 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 1 4 8】

疾患が、がんおよび／または免疫細胞障害および／またはワクチンによって処置もしくは防止される疾患である、請求項 1 から 1 4 7 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 1 4 9】

疾患が腸管感染症、クローン病またはがんである、請求項 1 から 1 4 8 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 1 5 0】

M E V または組成物が、細菌叢モジュレーションのための方法または処置または使用のためのものである、請求項 1 から 1 4 9 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

10

【請求項 1 5 1】

M E V が気管内投与または吸入または吸入投与用に製剤化され、疾患が気道および／または肺に関与する、またはエキソロードされたカーゴが処置のためにそれを標的とする、もしくは呼吸器疾患を処置する、請求項 1 から 1 5 0 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 1 5 2】

疾患が、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、肺高血圧症、喘息、他の炎症性肺疾患、嚢胞性線維症、アルファアンチトリプシン（A A T）欠乏症、先天性代謝異常、肺疾患、肺および呼吸器系に関与するがんおよびがん転移の中から選択される、請求項 1 5 1 に記載の方法または組成物 M E V または使用。

20

【請求項 1 5 3】

疾患または状態が、中枢神経系または神経系または感覚系臓器もしくは組織のもの、またはそれらが関与するものである、請求項 1 から 1 5 2 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 1 5 4】

M E V が鼻腔内投与用または粘膜投与用または眼球内投与用に製剤化される、請求項 1 5 3 に記載の方法または組成物または使用。

【請求項 1 5 5】

30

製剤が、眼への投与用である、請求項 1 5 4 に記載の方法または組成物または使用。

【請求項 1 5 6】

M E V が、鼻腔内投与用に製剤化され、疾患が脳に関与する、またはエキソロードされたカーゴ処置が処置のために脳へのデリバリーを標的化する、請求項 1 から 1 5 5 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 1 5 7】

疾患が感染性病原体に関与する、請求項 1 から 1 5 6 のいずれかに記載の方法または M E V または組成物または使用。

【請求項 1 5 8】

感染性病原体が、細菌、ウイルス、卵菌および真菌のうち 1 つまたは複数である、請求項 1 5 7 に記載の方法または M E V または組成物または使用。

40

【請求項 1 5 9】

生物活性剤を免疫系に送達する方法であって、カーゴとして生物活性剤を含む M E V を含む組成物を経口投与することを含み、生物活性剤が M E V 中に外因的に負荷されている、方法。

【請求項 1 6 0】

M E V が、クロレラ・エリブソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスの中から選択されるクロレラ属の種に由来する、請求項 1 5 9 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

50

クロレラ属がクロレラ・ブルガリスである、請求項160に記載の方法またはMEVまたは組成物または使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

発明者Lila Drittanti、Juan Pablo Vega、Jeremy PruvostおよびManuel Vegaの、ならびに出願人：AGS Therapeutics SAS、10 rue Greneta、75003 Paris、France；AGS-M SAS、41-43 Quai de Malakoff、44000 Nantes、France；および2022年1月1日にナント大学（Nantes Universite）に改名されたナント大学（Universite de Nantes）、1 Quai de Tourville、44035 Nantes、Franceの、「Extracellular Vesicles from Microalgae, Their Preparation, and Uses」と題された2021年7月20日出願された米国仮出願番号第63/223,828号の優先権の利益が主張される。

10

【0002】

発明者Lila Drittanti、Juan Pablo Vega、Jeremy PruvostおよびManuel Vegaの、ならびに出願人：AGS Therapeutics SAS、10 rue Greneta、75003 Paris、France；AGS-M SAS、41-43 Quai de Malakoff、44000 Nantes、France；および2022年1月1日にナント大学（Nantes Universite）に改名されたナント大学（Universite de Nantes）、1 Quai de Tourville、44035 Nantes、Franceの、「Extracellular Vesicles from Microalgae, Their Preparation, and Uses」と題された2021年7月22日出願された米国仮出願番号第63/224,656号の優先権の利益が主張される。

20

【0003】

発明者Lila DrittantiおよびManuel Vegaの、ならびに出願人AGS Therapeutics SASの、「Extracellular Vesicles from Microalgae, Their Biodistribution Upon Administration, and Uses」と題された2022年1月31日出願された米国仮出願番号第63/305,230号の優先権の利益が主張される。

30

【0004】

許可される場合には、上記で参照された出願の各々の主題は、その全文で参照によって組み込まれる。

【0005】

電子的に提出された配列表の参照による組み込み

配列表の電子版が本明細書とともに提出され、その内容はその全体で参照により組み込まれる。電子ファイルは2022年7月19日に作出され、484キロバイトの大きさであり、5503PCSEQ001.XMLと題されている。修正された配列表が本明細書とともに電子的に提出され、その内容はその全体で参照により組み込まれる。電子ファイルは、2022年10月31日に作出され、528キロバイトの大きさであり、5503PCSEQ002.XMLと題されている。

40

【0006】

分野

治療的、工業的、診断的、および美容的使用などのための目的の生物活性カーゴおよび

50

／または他のカーゴが外因的に負荷されている微細藻類由来の細胞外小胞（MEV）を含有する組成物が提供される。MEVは、ワクチンとして、抗がん剤として、診断薬としておよび他のこのような使用を含む治療薬として、さまざまな適用がある。

【背景技術】

【0007】

細胞外小胞（EV）は、ほとんどの細胞によって産生される天然粒子である。EVは、多胞性エンドソームの細胞膜との融合時に細胞外環境に放出されるエキソソーム（約30～120nmのサイズ）を含み、細胞表面からの膜小胞の外向き出芽によって生成される微小胞（約50～1000nm）を含む。エキソソームおよび微小胞は、類似の特性を有し、一般に、EVと呼ばれる。

10

【0008】

EVは、タンパク質および核酸、例えば、マイクロRNA（miRNA）、長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）およびmRNAの細胞間移動による細胞間コミュニケーションにおいて機能する。このために、哺乳動物および植物に由来するEVは、低分子干渉RNA（siRNA）デリバリー、マイクロRNA（miRNA）および小分子薬の担体として使用されてきた。それらはデリバリービヒクルとして使用できる。さまざまな投与経路によって細胞および組織に容易に送達される、ならびに目的の細胞、臓器および組織にカーゴを標的化または送達できる好都合に生成されたEVが必要である。このようなEVを提供することが本明細書における目的である。

20

【発明の概要】

【0009】

外因的に負荷された微細藻類細胞外小胞が提供される。それらに、生体分子および小分子を含む生物活性分子を含むカーゴが負荷される。生物活性分子には、それだけには限らないが、産業において治療薬、化粧品、診断薬および他の使用として使用される分子が含まれる。EVは、単細胞の緑色藻類であり、クロレラ目（Chlorellales）、特にクロレラ科（Chlorellaceae）に属するもの、特に、クロレラ属（Chlorella）に属するもの、例えば、クロレラ・ブルガリス（Chlorella vulgaris）を含む、微細藻類由来である。微細藻類細胞外小胞（MEV）は、大規模で製造され得る。MEVには、生物活性分子カーゴが外因的に負荷される（エキソロードされる）。得られた組成物は、したがって、同一の外因的に負荷された異種カーゴを含有するMEVを含有する。MEV中に外因的に負荷している（エキソローディング）カーゴの利点は、カーゴ／MEVの量を制御できることおよびMEVにおける外因性カーゴの分布が予測可能であり、実質的に均一であり、その結果、平均カーゴ分子またはカーゴ／MEVの量を知ることができることである。生体分子および小分子を含む多種多様な生物活性分子、例えば、薬物および有機化合物を、MEV中に負荷できる。MEVには、得られるMEVが毒性ではないカーゴを負荷できること、およびインビトロ（in vitro）でそれらを細胞中に投与できる、インビボ（in vivo）で投与できる、投与経路に応じて変わる分布パターンを有することが本明細書に示されている。他の供給源由来のほとんどの細胞外小胞（EV）、例えば、哺乳動物EVとは異なり、それらは経口的に投与できる。経口投与の際、それらはGALTを通して輸送され、最後には、脾臓に行き着く、それらは、他の供給源由来のEVのように消化プロセスによって分解されない。

30

40

【0010】

それだけには限らないが、RNA、例えば、阻害性RNAおよび他のRNA産物、オリゴヌクレオチド、プラスミド、ペプチド、タンパク質および小分子を含むさまざまなカーゴ（「ペイロード」とも呼ばれる）が負荷されたMEVが提供される。MEVは、カーゴを臓器、組織および細胞に送達でき、デリバリーの経路によって標的化される場合があり、そこにそれらが送達され得る。本明細書において、クロレラ属MEVを含むMEVは、消化管および嗅神経細胞などの厳しい天然バリアを通過する著しい能力を有し、これは哺乳動物EVを含む他の供給源に由来する他の細胞外小胞（EV）によって共有されないことが示される。

50

【0011】

本明細書において記載されるように、MEVには、さまざまな治療的および診断的および他の使用を可能にする、多様なさまざまな分子、特に、生物学的に活性な分子、例えば、siRNA、mRNA、プラスミド、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、ペプチド、タンパク質および小分子を外因的に負荷（エキソロード）できる。本明細書に示されるように、投与の際にMEV体内分布は、投与経路によって決定される。したがって、MEVは、気管内に、経口的に、静脈内に、鼻腔内に投与されるか、または他の経路か否かに応じて、それらのカーゴを、例えば、肺、腸へ、GALTへ、脾臓へ、肝臓へ、および脳を含むさまざまな組織および臓器に送達できる。

【0012】

本明細書において実証され、記載されるように、MEVは、治療的使用、例えば、それだけには限らないが、疾患、障害および状態の処置および／または防止（リスクまたは重症度を低減することを含む）のための治療薬のデリバリーを含む多数の使用を有する。これらの使用は、中でも、免疫モジュレーション、免疫腫瘍学、ならびに遺伝障害、代謝障害、神経障害、精神障害および呼吸障害の処置を含む治療的使用を含む。

【0013】

外因的に負荷された（エキソロードされた）生物活性分子、例えば、それだけには限らないが、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸および小分子またはそれらの複数を含む微細藻類細胞外小胞（MEV）が提供される。MEVを含む、異なるカーゴを含有するMEVの混合物を含む、またはカーゴの混合物を含有するMEVを含む組成物が提供される。

【0014】

外因的にカーゴが負荷されたMEV、特に、クロレラ目、特に、クロレラ科、特に、クロレラ属、例えば、クロレラ・ブルガリスによって産生されるものを含有する組成物が提供される。MEVに付加する方法が提供される。カーゴは、生体分子および小分子を含む、生物活性分子またはその組合せである。カーゴは、例えば、バイオポリマー、例えば、DNAおよびRNA、タンパク質、タンパク質複合体、タンパク質-核酸複合体、プラスミドを含む生体分子を含み、小分子、例えば、小分子薬も含む。生物活性分子には、治療薬、例えば、抗がん化合物および生体分子、例えば、RNAi、オリゴヌクレオチドおよびタンパク質および複合体および診断分子、例えば、検出可能なマーカー、化粧品である分子ならびにヒト、動物および植物用の抗感染薬として作用する分子が含まれる。組成物は、対象への投与のために製剤化され得る。病原体感染症およびがんを含む疾患および障害を処置する方法ならびに疾患および障害の処置のためのMEVの使用が、診断の方法と同様に提供される。

【0015】

得られたカーゴが負荷されたMEVは、ヒトおよび他の動物の疾患の診断、予防、処置、工業的使用、化粧品、獣医学的使用および作物産業を含むさまざまな分野における適用を有する。各適用にとって適切なカーゴを有するMEVを、産業および研究、分析法、細胞ベースのアッセイならびに他の使用および適用のために、ワクチンとして、遺伝子療法デリバリーベクターとして、遺伝子サイレンシング、遺伝子編集、トランスフェクションのために使用できる。

【0016】

カーゴが負荷されたMEVは、疾患、障害および状態の処置、工業的および美容的使用を含むさまざまな使用のために使用できる。疾患、障害および状態には、それだけには限らないが、遺伝障害、消化管の障害、気道の障害、中枢神経系（CNS）の障害、自然障害および外傷によって誘導される障害を含む皮膚の障害、尿生殖路の障害、鼻-頬側口腔の障害、心血管系の障害、免疫および免疫モジュレーション障害、がん、眼の障害、肝臓の障害、全身障害、病原体、例えば、細菌、ウイルスまたは寄生生物によって引き起こされるか、またはそれが関与する疾患、障害および状態が含まれる。

【0017】

10

20

30

40

50

処置／デリバリーの標的組織として、例えば、上皮および粘膜細胞（任意の種類の外部または内部粘膜のいずれか：口、腸、子宮、気管、膀胱など）、内皮細胞、感覚細胞（視覚の、聴覚の）、がん細胞、腫瘍細胞、血液細胞、血液細胞前駆体、神経系細胞（ニューロン、グリア細胞および他のCNSおよび末梢神経細胞）、免疫系の細胞（リンパ球、免疫調節性細胞、エフェクター細胞）、生殖細胞、分泌細胞、腺細胞、筋肉細胞、例えば、胚性または組織特異的幹細胞を含む幹細胞、肝臓細胞、感染細胞、例えば、ウイルス、細菌、真菌または他の病原体に感染した細胞、天然細胞および遺伝子操作されたNS細胞が挙げられる。

【0018】

したがって、単離された微細藻類細胞外小胞（MEV）を含有する組成物が提供され、微細藻類は、クロレラ属の種である場合があり、組成物は対象への投与のために製剤化される。クロレラ属の細胞外小胞は、単離された細胞外小胞中に導入されている異種生物活性カーゴ分子であるカーゴ（またはペイロード）を含有でき、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、実質的に同一の生物活性分子カーゴを含有し、カーゴ分子は、クロレラ属にとって異種であり、生物活性カーゴは、生体分子または小分子、例えば、小分子薬および試薬を含む。

【0019】

すべての実施形態のために、クロレラ属は、クロレラ属の任意の種、例えば、それだけには限らないが、クロレラ・エリプソイデア（*Chlorella ellipsoidea*）、クロレラ・ピレノイドサ（*Chlorella pyrenoidosa*）、クロレラ・ソロキニアナ（*Chlorella sorokiniana*）、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリス（*Chlorella variabilis*）の中から選択されるクロレラ属である。特定の実施形態では、クロレラ属は、クロレラ・ブルガリスである。

【0020】

単離された微細藻類細胞外小胞（MEV）を含有する組成物が提供され、微細藻類は、クロレラ属の種であり、組成物中のMEVは、単離されたMEV中に導入されている異種生物活性分子カーゴを含有し、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、実質的に同一の負荷されたカーゴを含有する。カーゴは、クロレラ属にとって異種であり、内因性ではなく、カーゴは、検出可能な試薬、例えば、蛍光タンパク質またはルシフェラーゼを含む、生体分子または小分子薬物または他のこのような分子である。カーゴを含有するMEVの各々は、複数の異なる異種カーゴを含み得る。

【0021】

カーゴは、植物もしくは動物への、または植物もしくは動物でのデリバリーのために意図される任意の分子を含む。一般に、カーゴは、生物活性である。生物活性カーゴは、例えば、投与された場合に植物または動物に対して効果を有し得るバイオポリマーおよび小分子を含む生体分子などの任意の分子を含む。カーゴには、例えば、タンパク質、ペプチドおよび核酸が含まれる。生物活性分子は、合成である場合も、天然に存在する場合も、特性または活性を変更するように改変される場合もある。薬物または治療薬または診断薬または化粧品として、または産業において使用されている任意の分子が含まれる。カーゴは、それだけには限らないが、疾患もしくは状態を処置もしくは防止するための、またはその症状を処置もしくは防止するための治療薬であり得る。カーゴは、核酸分子、ポリペプチド、タンパク質、プラスミド、アプタマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。

【0022】

組成物中のMEV中のカーゴは、生体高分子を含み得る。バイオポリマーには、天然に存在する生体高分子または合成生体高分子または改変生体高分子が含まれる。生体高分子は、改変を含む、核酸またはタンパク質である場合があり、改変は、ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の挿入、欠失、置き換えおよび転位を含み、および／または生体高分子は、タンパク質であり、改変はまた、翻訳後修飾を含み得る。翻訳後修飾として、それだけ

10

20

30

40

50

には限らないが、グリコシル化、超グリコシル化、ペグ化、シアリル化、アルブミン化 (albumination)、他の半減期延長部分、およびタンパク質の薬理学的動力学または動態学的特性を改善または変更する他の改変が挙げられる。

【0023】

DNAおよびRNAなどの核酸は、カーゴであり得る分子の中にある。カーゴがRNAまたはタンパク質である場合には、カーゴとして提供される場合がある、または核酸によってコードされる場合もあり、次いで、投与される生物において発現される。RNAの例として、改変mRNAを含む阻害性RNA (RNAi) およびmRNAがある。RNAiには、例えば、サイレンシングRNA (siRNA) または低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、低分子活性化RNA (saRNA) および長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) が含まれる。RNA産物はまた、二本鎖RNAおよびリボザイムを含む。カーゴはまた、オリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドであり得る。カーゴは、遺伝子編集システム、例えば、CRISPR-CASシステムを含み得る。

10

【0024】

カーゴは、mRNAまたは改変mRNAを含み得る。改変mRNAは、合成mRNA中のウリジンヌクレオチドの少なくとも一定パーセンテージが改変されている、少なくとも1つのヌクレオチド改変を含有する翻訳可能領域を含む合成mRNAであり得る (例えば、デリバリーおよび翻訳のための例示的改変mRNAを説明する米国特許第9,464,124号を参照されたい)。例えば、少なくとも1つのヌクレオチド改変は、ピリジン-4-オンリボヌクレオチド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トリオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-トリオニルカルバモイルアデノシン、N6,N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ウィオシン (w

20

30

40

50

yosine)、ウィブトシン(wybutosine)、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2, N2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシンおよびN2, N2-ジメチル-6-チオ-グアノシンであり得る。mRNAは、a) 連結されたヌクレオチドの配列、5' UTR、3' UTRおよび少なくとも1つの5' キャップ構造を含み得る。mRNAはまた、真核生物の、例えば、哺乳動物の、例えば、ヒトの宿主細胞における翻訳および輸送のための他の調節配列を含み得る。

10

【0025】

MEVは、レポーター遺伝子およびタンパク質および他の検出可能な生成物、例えば、蛍光タンパク質、例えば、それだけには限らないが、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP; 配列番号10)、ルシフェラーゼ遺伝子(配列番号11)、luxA(配列番号8)、luxB(配列番号9)およびluxオペロン(luxCDABEおよびluxABCDE; 配列番号12)などを含むカーゴを保有し得る。

【0026】

他のカーゴは、疾患に関与する遺伝子または産物、例えば、それだけには限らないが、ペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼFKBP4またはFKBP52(配列番号1); ガンマ-アミノ酪酸B型受容体サブユニット1(GABBR1; 配列番号3); がん遺伝子、例えば、MYCNまたはNMYC(配列番号38)、RAS(H-RAS、N-RASおよびK-RAS; それぞれ配列番号39、40および41を参照されたい)、BCL2(配列番号43)およびPLK1(配列番号44)を標的化できる。疾患に関与する遺伝子、例えば、がん遺伝子およびチェックポイントは、遺伝子の発現を阻害する、もしくはアゴナイズする産物をコードする、または遺伝子産物を阻害する、もしくはアゴナイズするカーゴによってモジュレートされ得る。このようなモジュレーターの例示的なものとして、RNAi、例えば、siRNA、miRNA、shRNA、ペプチドおよび/またはテトラトリコペプチドなどがある。例えば、EGFP(配列番号5および6)、ホタルルシフェラーゼ(配列番号7)、MYCN(配列番号13~19)、RAS(配列番号20~27)、BCL2(配列番号29~31)およびPLK1(配列番号32~35)を標的化するsiRNAおよびASOならびにMYCおよびBCL2を標的化するマイクロRNA-34A(配列番号28)が、本明細書で例示されている。

20

30

【0027】

カーゴは、治療用または診断用またはセラグノスティック(theragnostic)タンパク質またはペプチド、タンパク質複合体、2つまたはそれより多いタンパク質またはタンパク質および核酸またはタンパク質およびアプタマーまたはタンパク質、核酸および他の分子の組合せを含有するこのような複合体を含む。カーゴは、抗体またはその抗原結合性断片であるタンパク質であり得る、またはそれをコードし得る。抗体は、単鎖形態、ナノボディ、ラクダ科動物および他の形態、例えば、scFv、二重特異性抗体またはその抗原結合性断片を含む任意の形態のものであり得る。抗体およびその抗原結合性断片は、チェックポイント阻害剤抗体もしくはその抗原結合性断片または腫瘍抗原特異的抗体もしくはその抗原結合性断片または抗がん遺伝子特異的抗体またはその抗原結合性断片を含み、または腫瘍特異的受容体またはシグナル伝達分子抗体もしくはその抗原結合性断片である。例示的抗体およびその抗原結合性断片は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、PD-1/PD-L1経路、PD-1/PD-L2経路、HER2、EGFR、TIM-3、LAG-3、BTLA-4、HHLA-2、CD28および他のチェックポイントまたは免疫抑制剤または腫瘍抗原のうち1つまたは複数に特異的に結合し、阻害する。

40

【0028】

50

組成物中のMEV中のカーゴは、免疫賦活性生成物または抗原を含む場合があり、ワクチンとして使用して、投与の際に免疫防御応答を誘導することができる。カーゴは、DNA、RNA、タンパク質またはウイルスであり得る。カーゴは、がんもしくは感染性疾患もしくは神経変性疾患もしくは他のCNS障害もしくは加齢または加齢関連疾患または眼性障害または免疫学的障害の処置のための治療用生成物である、核酸またはタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を含有し得る。カーゴは、機能性化粧品または化粧品または美容的に活性な製品であり得る。カーゴは、小分子生物活性分子、例えば、小分子薬物などの小分子生物活性分子を含み得る。例示的薬物には、化学療法薬または薬物が含まれる。薬物には、プロドラッグが含まれる。組成物中のMEV中のカーゴは、診断用マーカーまたは検出可能な生成物、例えば、それだけには限らないが、ルシフェラーゼもしくはルシフェラーゼをコードする核酸、蛍光タンパク質もしくは蛍光タンパク質をコードする核酸またはルシフェラーゼオペロンであり得る、または含み得る。

10

【0029】

カーゴは、DNAを含み得る。DNAは、プラスミド、例えば、投与される動物または植物における発現のための生成物をコードするものであり得る。例示的生成物には、治療用生成物および診断薬が含まれる。これらとして、タンパク質および上記で列挙されたRNA産物を含むRNA産物が挙げられる。MEVは動物および植物への投与のために意図されるので、プラスミドは、一般に、RNAポリメラーゼIIおよびIIIプロモーターなどの真核生物のプロモーターおよび翻訳配列を含む、真核生物の調節シグナルおよび配列の制御下に生成物をコードする。例示的プロモーターとして、例えば、動物、植物および植物または動物ウイルス由来のプロモーター由来のRNAポリメラーゼIIプロモーターが挙げられる。例示的プロモーターとして、それだけには限らないが、サイトメガロウイルスプロモーター、サルウイルス40プロモーター、単純ヘルペスプロモーター、エプスタイン・バーウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、合成プロモーター、アクチンプロモーターおよび合成キメラプロモーターが挙げられる。他の真核生物の転写配列および真核生物の翻訳配列として、それだけには限らないが、エンハンサー、ポリA配列および／または配列内リボソーム進入部位(IRES)配列のうち1つまたは複数

20

【0030】

プラスミドは、1つまたは2つまたはそれより多いカーゴ生成物をコードする場合がある。カーゴ生成物の発現のために、コードする核酸は、真核細胞によって認識される調節配列に作動可能に連結される。

30

【0031】

MEVを調製する方法が提供される。方法は、カーゴを単離されたMEV中に導入することを含む。カーゴは、動物または植物中への、または動物または植物上へのデリバリーが望まれる任意の分子を含む。一般に、カーゴは、小分子およびバイオポリマーを含む生物活性分子生成物である、またはそれを含有する、またはそれを提供する。バイオポリマーは、天然に存在する、または合成である、または改変されている、またはそれらの組合せである。カーゴは、タンパク質、核酸または小分子を含む。カーゴは、当業者に公知の任意の方法によってMEV中に負荷され得る；これらの方法には、例えば、エレクトロポレーション、超音波処理、押出および界面活性剤の使用のうち1つまたは複数が含まれる。一部の実施形態では、MEVは、それだけには限らないが、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアピリスの中から選択されるクロレラ属の種のようなクロレラ属に由来する。MEVを含有する組成物を含む、方法によって生成されるMEVおよび本明細書で提供されるMEVのいずれかを、診断の方法、またはワクチンとして、または疾患の処置もしくは診断のための療法、または疾患もしくは状態の処置、または美容的使用のため、または工業的使用のため、または当業者に公知の任意の使用のうち1つまたは複数において使用できる。

40

【0032】

50

MEVは、疾患、障害または状態の処置の方法を含む任意のこのような方法において使用できる。疾患、障害および状態の例示的なものとして、がんがあり、例えば、がんは、固形腫瘍または血液学的悪性腫瘍またはそれらの転移を含む。他の疾患、障害および状態として、呼吸器系のものもしくはそれが関与するもの、中枢神経系もしくは神経系のものまたはそれが関与するもの、皮膚および露出上皮もしくは粘膜のものまたはそれが関与するもの、消化管のものもしくはそれが関与するもの、感染性病原体のものもしくはそれが関与するものが挙げられる。感染性病原体には、細菌、ウイルス、寄生生物、プリオン、卵菌および真菌が含まれる。

【0033】

カーゴは、処置のために治療用分子を提供し得る、または免疫応答を誘導して、ワクチンとして働くことができる。MEVは、免疫賦活性タンパク質もしくは抗原を含む、または免疫賦活性タンパク質もしくは抗原をコードし、それによって、投与されると、MEVが免疫賦活性であり、自然もしくは適応免疫応答を誘発するカーゴを含有し得る、あるいはMEVおよび／またはカーゴは、免疫防御応答を誘発して、疾患もしくは状態を防ぐことができるまたは処置できる。MEVを使用して、外傷に起因する疾患、障害または状態を処置できる。外傷は、創傷、火傷、手術、皮膚の傷口、骨折、毛髪脱落、真皮の露出、粘膜の露出、線維症、裂傷および潰瘍の中からの外傷またはその中に関与する外傷を含むが、それらに限定されない。MEVを使用して、自然老化または病原性もしくは疾患もしくはそれ以外で誘導された老化に起因する状態を処置する効果を誘発できる。MEVによって処置できる他の疾患、障害および状態として、皮膚または眼の疾患、障害および状態がある。これらとして、皮膚炎、しわおよび／もしくは他の皮膚の年齢関連変化、黄斑変性、緑内障、糖尿病性網膜症、白内障または糖尿病性網膜症に起因する状態が挙げられる。

【0034】

MEVを含有する組成物は、任意の投与経路による投与のために製剤化できる。経路には、それだけには限らないが、局所性（local）、全身、局所的（topical）、非経口、経腸、粘膜、肺への吸入用のエアロゾルまたは鼻腔内、非経口、経腸、膈内、直腸、耳内、経口、および他の投与経路が含まれる。MEVは、経口投与のために、吸入投与のために、吸入のために、錠剤として、液体、例えば、エマルジョンとして、粉末として、クリームとして、ゲルとしてを含む任意の形態に製剤化できる。

【0035】

組成物またはMEVは、本明細書に記載される、または当業者に公知の方法および処置のいずれにおいても使用できる。方法には、例えば、遺伝子サイレンシング、遺伝子干渉、遺伝子療法、遺伝子／タンパク質過剰発現、遺伝子編集、タンパク質活性の阻害または刺激、経路シグナル伝達および診断薬または検出のうち1つまたは複数のための使用のためを含む、本明細書に記載されるいずれも含まれる。組成物およびMEVは、予防および／またはワクチン接種のために使用できる。それらは農業－獣医用適用、例えば、作物科学、植物病原体および動物疾患において、皮膚科学適用のために、および美容的適用のために使用できる。それらは、工業目的のために、例えば、製造、特性決定および校正のために使用できる。

【0036】

したがって、組成物および外因的に負荷されたMEVの中で、経口デリバリー、静脈内デリバリー、筋肉内デリバリー、鼻腔内デリバリー、皮下デリバリー、局所的デリバリー、粘膜デリバリー、腹膜内デリバリー、腫瘍内デリバリーまたは吸入デリバリーのために製剤化された微細藻類細胞外小胞（MEV）を含む組成物が提供され、MEVは外因的に負荷された。本明細書で提供される組成物は、デリバリーの経路のために製剤化でき、それによって、エキソロードされたカーゴを含有するMEVが、標的臓器または組織または細胞に送達される。標的臓器、細胞または組織の例示的なものは、肺、肝臓、脾臓、腸、脳、脊髄、末梢神経、リンパ組織、眼、粘膜組織、皮膚、造血組織、膵臓、筋肉、骨、心臓、内分泌組織および腎臓の中から選択される。他のものとして、鼻－頬側性、眼性、泌尿生殖器性、膈性または直腸性である粘膜組織が挙げられる。

【0037】

組成物は、任意の適した形態、例えば、懸濁液またはエマルジョン、例えば、ナノエマルジョンまたはマイクロエマルジョンに製剤化できる。組成物は、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、散剤、トローチ剤、顆粒剤および経口投与用の液体、オイルとして製剤化でき、または鼻腔投与もしくは経口投与もしくは吸入もしくは吸入投与もしくは気管内投与のための懸濁液もしくはエマルジョンである。

【0038】

本明細書において記載されるように、微細藻類の例示的なものとして、クロレラ属がある。MEVがクロレラ属細胞外小胞であり、クロレラ属細胞外小胞が、MEV中に外因的に負荷された異種生物活性分子カーゴを含む組成物が提供される。本明細書におけるすべての実施形態において、微細藻類にはクロレラ属が含まれる。クロレラ属は、クロレラ・エリブソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアピリスの中から選択される。例示的实施形態では、クロレラ属は、クロレラ・ブルガリスである。

【0039】

本明細書で提供される組成物では、エキソロードされたカーゴは、疾患、障害もしくは状態を処置もしくは防止するための、またはその症状を処置もしくは防止するための治療薬を含む。例えば、エキソロードされたカーゴは、疾患、障害もしくは状態になるリスクを防止もしくは低減するための；または疾患、障害もしくは状態の重症度を低減するための予防薬であるタンパク質または治療薬を含み得る、またはコードし得る。得られたMEVは、例えば、ワクチンとして使用できる。エキソロードされたカーゴは、細胞、組織または臓器にデリバリーするための、目的の核酸、タンパク質、小ペプチド、ペプチド、ポリペプチドおよび／または小分子、例えば、小分子薬物もしくは任意の他の分子を含み得る。エキソロードされたカーゴは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、小ペプチド、核酸および他の分子、例えば、小分子薬、複合体、アプタマーおよび標的へのそのデリバリーが目的のものである任意の分子を含み得る。有利なことに、エキソロードされたMEVに、MEVがインビボまたはインビトロで送達され得る任意の目的のために、目的の任意の分子を負荷できる。核酸の例示的なものとして、コーディングRNAまたはノンコーディングRNA、例えば、異種メッセンジャーRNA (mRNA)、sORFを含む長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)、長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、低分子活性化RNA (saRNA) および／もしくは自己活性化RNAがある。異種RNAi、未改変mRNAまたは改変mRNAまたはsiRNAであるRNAiおよび／またはmiRNAであるカーゴが含まれる。改変RNAには、上記で記載される、当技術分野で公知の安定性を増大するように改変されているRNAが含まれている（例えば、デリバリーおよび翻訳のための例示的に改変されたmRNAを説明する米国特許第9,464,124号を参照されたい）。

【0040】

エキソロードされたカーゴは、遺伝子編集システム（例えば、配列番号59、60、81および82を参照されたい）を含み得る。遺伝子編集システムは、CRISPR-CASシステムまたはCRISPR関連もしくはCRISPR様システムまたは転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) またはホーミングエンドヌクレアーゼまたはメガヌクレアーゼを含み得る。エキソロードされたカーゴは、免疫モジュレーション活性を有する、もしくは一部の場合には、核酸をコードする、小ペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含むエキソロードされたカーゴを含み得る。例えば、免疫モジュレーターは、1つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、MHC抗原をマスクする、または1つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション剤であり得る。免疫モジュレーション性のエキソロードされたカーゴは、1つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させ得る、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御し得る、MHC抗原

10

20

30

40

50

をマスクし得る、または1つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進し得る。免疫モジュレーション性であるカーゴを含むMEVを使用して、免疫モジュレーションによって処置される疾患を処置できる。

【0041】

エキソロードされたカーゴは、ホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインを含み得る、またはホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインをコードする核酸を含み得る。ホルモンもしくはサイトカインもしくは増殖因子を含むエキソロードされたカーゴの例示的なものとして、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、レラキシン、プロリラキシン、糖タンパク質ホルモン、例えば、卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)および黄体形成ホルモン(LH)、肝増殖因子(hepatic growth factors)、線維芽細胞増殖因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ、ミューラー管抑制物質(Mullerian-inhibiting substance)、ゴナドトロピン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン(TPO)、神経増殖因子、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、インスリン様増殖因子-Iおよび-II、エリスロポエチン(EPO)、骨誘導因子、インターフェロン、例えば、インターフェロン-アルファ、-ベータ、および-ガンマ、コロニー刺激因子(CSF)例えば、マクロファージ-CSF(M-CSF)、顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)、顆粒球-CSF(G-CSF)ならびにインターロイキン(IL)の中から選択されるものがある。

10

20

【0042】

エキソロードされたカーゴは、mRNA媒介性遺伝子療法、遺伝子サイレンシング、遺伝子置換、遺伝子過剰発現および／または遺伝子編集のための核酸を含み得る。これは、遺伝子調節、遺伝子置換、遺伝子過剰発現、遺伝子編集、細胞代謝の調節、細胞機能の調節およびタンパク質療法のための、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のうち1つまたは複数を含み得る。カーゴは、先天性代謝異常を処置するためのものであり得る。エキソロードされたMEVは、ワクチン、例えば、予防用ワクチンまたは免疫防御ワクチン、または既存の疾患、障害または状態を処置するためのワクチンとしてあり得る。MEVカーゴは、がんまたは感染性疾患または代謝性疾患または神経変性疾患または他のCNS障害または加齢または加齢関連疾患または遺伝病または眼性障害または免疫学的障害または内臓、泌尿生殖器性臓器、心血管系および関連臓器および組織、造血もしくはリンパ組織、感覚系臓器および組織、泌尿生殖器性臓器および組織、筋肉組織、骨および／もしくは内分泌組織に関わるものの処置のための治療用生成物である、タンパク質またはポリペプチドまたはペプチドを含み得る。すべての実施形態において、組成物中のMEVは、2つまたはそれより多いカーゴ生成物を含む、または異なるカーゴ生成物を含むMEVの混合物があり得る。

30

【0043】

本明細書で提供される組成物は、それだけには限らないが、経口投与、非経口投与、局所的投与、局所性投与、腫瘍内投与、全身投与、粘膜投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹膜内投与、経皮投与、鼻腔内投与、吸入または気管内投与を含む任意の投与経路のために製剤化され得る。それらは、経口デリバリーのために製剤化される場合があり、または鼻腔内デリバリー、吸入または吸入投与のためにエアゾールとして製剤化される。組成物は、必要に応じて製剤化され得る、例えば、経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、鼻腔内および／または気管内投与または吸入または吸入投与、局所的投与、局所性投与、腫瘍内投与、全身投与、粘膜投与および／または腹膜内投与のために製剤化される。MEVは、投与経路に応じて異なる部位に輸送されるので、製剤および投与経路(複数可)は、標的臓器(複数可)、組織(複数可)および／または細胞に基づいて選択される。種々の疾患、障害および状態が、種々の臓器、組織および細胞に関与し得る、または影響を及ぼし得る。したがって、投与経路および製剤を適切に選択することによって

40

50

、治療薬を、疾患、障害または状態に関与する部位に標的化することができる。

【0044】

組成物は、MEV中のエキソロードされたカーゴを臓器または組織に送達するための方法のために、または方法において使用するためのものである場合があり、投与様式は、臓器または組織を標的とするために選択される。

【0045】

疾患、障害または状態のリスクまたは重症度を処置または防止または低減する方法であって、本明細書において記載されたまたは提供されたようなエキソロードされたMEVを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。疾患、障害または状態は、がん、遺伝障害、肝臓疾患、免疫系または免疫細胞が関与する疾患、感染性疾患、呼吸器疾患、肺疾患、神経変性疾患、胃腸疾患および脳がん、または内臓、泌尿生殖器性臓器、心血管系および関連臓器および組織、造血もしくはリンパ組織、感覚系臓器および組織、泌尿生殖器性臓器および組織、筋肉組織、骨および／もしくは内分泌組織に関わるものの中から選択され得る。内臓には、それだけには限らないが、脾臓、肝臓および／または脾臓が含まれる。

10

【0046】

疾患、障害および状態には、MEV中にエキソロードすることができる治療薬がある当業者に公知のいずれもが含まれる。疾患、障害および状態の例示的なものとして、がん、がん転移、メタボリックシンドローム、遺伝障害、アルファアンチトリプシン（AAT）欠乏症、他の先天性代謝異常、血友病、高コレステロール血症、肝臓炎症、脂肪性肝炎ならびに肝臓への治療薬のデリバリーによって処置できる他の疾患および障害がある。他の疾患、障害および状態には、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病またはアルツハイマー病またはハンチントン病またはクロイツフェルトヤコブ病または他の神経変性疾患）または認知障害（例えば、認知症または健忘症またはせん妄または他の認知障害）または脳障害（例えば、脳炎またはてんかん発作または腫瘍または他の脳障害）または神経系障害（例えば、疼痛またはてんかん発作または感染症または他の神経系障害）または遺伝性疾患（例えば、嚢胞性線維症、地中海貧血症、鎌形赤血球貧血、ハンチントン病、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、テイサックス病または他の遺伝性疾患）または多因子疾患〔例えば、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患（COPD）または他の多因子疾患〕またはがん（例えば、乳房または卵巣または腸または前立腺または皮膚のがんまたは他のがん）または高血圧症または高コレステロールまたは統合失調症または双極性障害または関節炎または代謝性疾患〔例えば、家族性高コレステロール血症またはゴーシェ病またはハンター症候群またはクラッペ病またはメープルシロップ尿症または異染性白質ジストロフィーまたはMELAS（ミトコンドリア脳症、乳酸アシドーシス、脳卒中様エピソード）またはニーマンピック病またはフェニルケトン尿症（PKU）またはポルフィリン症またはテイサックス病またはウィルソン病または他の代謝性疾患〕または呼吸器系の疾患〔例えば、喘息または慢性閉塞性肺疾患（COPD）または慢性気管支炎または肺気腫または肺がんまたは嚢胞性線維症または気管支拡張症または肺炎または呼吸器系の他の疾患〕または消化管の疾患〔例えば、過敏性腸症候群（IBS）または炎症性腸疾患（IBD）または胃食道逆流症（GERD）またはセリアック病または憩室炎または消化管の疾患〕または粘膜の疾患（例えば、ベーチェット病または口腔灼熱症候群または口腔扁平苔癬または天然痘および類天疱瘡または再発性アフタ性口内炎またはシェーグレン症候群または泌尿生殖器感染症または副鼻腔炎または鼻腔もしくは副鼻腔ポリープまたは嗅覚および味覚障害またはアレルギーまたは眼性粘膜類天疱瘡または粘膜の他の疾患）または筋肉もしくは神経筋組織の疾患〔例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）またはシャルコーマリートゥース病または多発性硬化症または筋ジストロフィーまたは重症筋無力症または筋疾患または筋炎または末梢神経障害または他の筋肉もしくは神経筋疾患〕または骨の疾患（例えば、頸椎症または骨粗しょう症または中足骨痛またはリウマチ性多発性筋痛または骨がんまたは関節リウマチまたは変形性関節症または他のもの）または内分泌組織の疾患〔例えば、先端巨大症または副腎不全症またはアジソン病またはクッシング症候群またはグレーブス病または

20

30

40

50

橋本病またはクロイツフェルトヤコブ病または甲状腺機能亢進症または甲状腺機能低下症または多発性内分泌新生物または多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）または原発性副甲状腺機能亢進症または内分泌組織の他の疾患）または造血系もしくはリンパ組織の疾患〔例えば、ファンconi貧血または血小板減少症またはダイヤモンドブラックファン貧血またはシュワックマンダイヤモンド症候群または慢性肉芽腫性疾患またはゴーシュ病または骨髄増殖性腫瘍、骨髄異形成障害、慢性骨髄単球性白血病、急性骨髄球性白血病（AML）を含む骨髄悪性腫瘍またはリンパ腫またはホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫またはリンパ節炎またはリンパ管炎またはリンパ浮腫またはリンパ球増加症〕が含まれる。

【0047】

MEVは、投与経路およびこのような経路のための製剤化の適切な選択によって、特定の疾患の処置において投与のために製剤化され得る、および／または使用され得る。例えば、MEVは、例えば、疾患が消化管もしくは免疫系もしくは白脾臓に関与する、またはエキソロードされたカーゴが処置のためにそれを標的とする場合に、経口投与用に製剤化され得る。本明細書で提供される処置の方法および組成物は、MEVが経口投与用に製剤化され、疾患が血流を介して到達できる臓器および組織のいずれかに関与する、もしくはエキソロードされたカーゴがそれを標的とするもの、または疾患ががんおよび／もしくは免疫細胞障害もしくはワクチンによって処置もしくは防止される疾患であるもの、または疾患が腸管感染症、クローン病もしくはがんであるもの、またはMEVの方法もしくは処置、カーゴもしくは使用が細菌叢モジュレーションを含むもの、またはMEVが気管内投与もしくは吸入もしくは吸入投与用に製剤化され、疾患が気道および／もしくは肺に関与する、もしくはエキソロードされたカーゴが処置のためにそれを標的とする、もしくは呼吸器疾患を処置するものを含む。

【0048】

本明細書で提供される組成物、方法および使用を用いて処置されるさらなる疾患、障害および状態として、例えば、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺高血圧症、喘息、他の炎症性肺疾患、嚢胞性線維症、アルファアンチトリプシン（AAT）欠乏症、先天性代謝異常、肺疾患、肺および呼吸器系が関与するがんおよびがん転移が挙げられる。他の疾患、障害および状態として、中枢神経系または神経系または感覚系臓器もしくは組織のもの、またはそれらが関与するものがある。MEVを使用して、例えば、鼻腔内投与によって脳を標的化するように製剤化できる。

【0049】

組成物、方法および使用は、MEVが鼻腔内投与用または粘膜投与用または角膜もしくは網膜上への局所的投与もしくは硝子体内投与によるなどによる眼球内投与用に製剤化されるものであり得る。MEVは、送達し、感染性病原体、例えば、細菌、ウイルス、卵菌、寄生生物および真菌のうち1つまたは複数からの疾患、障害または状態の処置のために使用できる。

【0050】

したがって、生物活性剤を標的化された臓器、組織、細胞または系、例えば、免疫系に送達する方法（および送達のための組成物の使用）が提供される。これは、カーゴとして生物活性剤を含むMEVを含む組成物を経口的に投与することまたはそれを使用のために提供することによって達成でき、生物活性剤は、本明細書において記載されるようなMEV中に外因的に負荷されている。記載されたように、実施形態、特に、または組成物では、MEVは、緑藻綱（Chlorophyceae）またはトレボウクシア藻綱（Trebouxiophyceae）の種、特に、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアピリスの中から選択されるクロレラ属の種である微細藻類に由来する。クロレラ属であるその例示的なものとして、クロレラ・ブルガリスがある。

【0051】

本明細書で提供される組成物は、薬物デリバリーシステム、例えば、経口デリバリー、静脈内デリバリー、気管内デリバリー、筋肉内デリバリー、鼻腔内デリバリーまたは肺中

10

20

30

40

50

への吸入デリバリーのために製剤化された、外因的に負荷された微細藻類細胞外小胞（MEV）を含む、薬物デリバリーシステムとして働くことができる。このような組成物または薬物デリバリーシステムは、微細藻類細胞外小胞（MEV）が、カーゴを標的組織、例えば、肺、肝臓、脾臓、腸、脳、鼻—口腔粘膜、心臓および腎臓などへ送達するデリバリーの経路のために製剤化される組成物を含有する。一部の実施形態では、MEVは、クロレラ属細胞外小胞であり、クロレラ属細胞外小胞は、単離された細胞外小胞中に導入されている異種生物活性分子カーゴを含み、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、概して同一生物活性分子カーゴを含有し、カーゴ分子（複数可）は、クロレラ属にとって異種である。カーゴは、インビボまたはインビトロでの細胞、組織または臓器中へのデリバリーのために、目的の複合体、生体分子、核酸、RNA、DNA、プラスミド、アプタマー、小薬物、抗体および任意の分子を含む任意の分子を含む。例示的カーゴには、本明細書で記載される、または当業者に公知の任意のものが含まれ、DNA、プラスミド、治療用生成物または診断薬、治療用RNA生成物、例えば、RNA（RNAi）、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムまたは二本鎖RNA、1つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、MHC抗原をマスクする、または1つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーター、それだけには限らないが、上記で列挙されたものを含むホルモンまたはサイトカインまたはケモカイン、抗感染症剤、例えば、抗ウイルス剤、抗真菌剤または抗生物質、例えば、呼吸器感染症もしくは副鼻腔感染症の処置のためのものを含むカーゴが含まれ、例えば、抗生物質は、アミノグリコシド抗生物質（例えば、アブラマイシン、アルベカシン、バンベルマイシン、ブチロシン、ジベカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、シソマイシンおよびスペクチノマイシン）；アミノシクリトール（例えば、スペクチノマイシン）；アムフェニコール抗生物質（例えば、アジダムフェニコール、クロラムフェニコール、フロルフエニコールおよびチアンフェニコール）；アンサマイシン抗生物質（例えば、リファミドおよびリファンピン）；カルバペネム（例えば、イミペネム、メロペネムおよびパニペネム）；セファロスポリン（例えば、セファクロル、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド、セフピロム、セフプロジル、セフロキシム、セフィキシム、セファレキシンおよびセフラジン）；セファマイシン（セフペラゾン、セフォキシチン、セフミノクス、セフメタゾールおよびセフォテタン）；リンコサミド（例えば、クリンダマイシンおよびリンコマイシン）；マクロライド（例えば、アジスロマイシン、ブレフェルジンA、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシンおよびトブラマイシン）；モノバクタム〔例えば、アズトレオナム、カルモナムおよびチゲモナム（tigemonam）〕；ムピロシン；オキサセフェム（例えば、フロモキセフ、ラタモキセフおよびモキサラクタム）；ペニシリン〔例えば、アムジノシリン、アムジノシリルピボキシル、アモキシシリン、バカンピシリン、ベンジルペニシリン酸、ベンジルペニシリンナトリウム、エピシリン、フェンペニシリン（fenbenicillin）、フロキサシリン、ペナメシリン、ペネタマートヨウ化水素酸塩、ペニシリンオーベネタミン、ペニシリンO、ペニシリンV、ペニシリンV安息香酸塩、ペニシリンVヒドラバミン、ペニメピサイクリンおよびフェネチシリンカリウム〕；ポリペプチド（例えば、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシンB、テイコプラニンおよびバンコマイシン）；キノロン（アミフロキサシン、シノキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、エンロフロキサシン、フレロキサシン、フルメキン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキシリン酸、ペフロキサシン、ピペミド酸、ロソクサシン、ルフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシンおよびトロバフロキサシン）；リファンピン；ストレプトグラミン（例えば、キヌプリスチンおよびダルホプリスチン）；スルホンアミド（スルファニルアミドおよびスルファメトキサゾール）；およびテトラサイクリン（クロルテトラサイクリン、デメ

10

20

30

40

50

クロサイクリン塩酸塩、デメチルクロロテトラサイクリン、ドキシサイクリン、デュラマイシン、ミノサイクリン、ネオマイシン、オキシテトラサイクリン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびバンコマイシン)の中から選択される。MEVは、遺伝子療法のための、例えば、先天性代謝異常を処置するための核酸を含み得る。カーゴは、化粧品である、または美容的活性を有する、または工業的使用を有する生成物を含む場合があり、カーゴは、抗体もしくはその抗原結合性断片であるタンパク質を含む場合がある、またはコードする場合がある。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、HECTOR PBR培養物において使用された光強度の例示的プロファイルを提供する。

10

【図2】図2は、高純度のMEV調製物の例示的溶出プロファイルを表し、ここでTFFによって事前に濃縮され、超遠心によって精製され、PBSで1mLあたり $10^{11} \sim 10^{13}$ の濃度で製剤化されたMEVが、IZON製のプレパックカラムqEV1に播種された。MEVは、PBS溶液を使用して溶出されている。0.5mLの溶出画分が収集されている。MEVは、以下の図で示されるように第1の画分において回収される。最も濃縮された画分(4-5)がプールされ、4℃で保存され、その後使用される。

【図3】図3は、透過型電子顕微鏡(TEM)を使用して得られたMEVの例示的画像を提供する。

【図4】図4は、小さいRNAライブラリーの電気泳動図を提供する。

20

【図5】図5は、静脈内、気管内および経口経路についての投与経路による体内分布の代表的なパターンを提供する。

【図6】図6は、実施例5に記載されるような静脈内投与後の代表的な動物のインビボ全身イメージングを表す。

【図7】図7は、実施例5に記載されるような代表的な動物経口(per os) [経口(oral)] 投与のインビボ全身イメージングを表す。

【図8】図8は、実施例5に記載されるような鼻腔内投与後の代表的な動物のインビボ全身イメージングを表す。

【図9】図9は、実施例5に記載されるような気管内投与後の代表的な動物のインビボ全身イメージングを表す。

30

【図10】図10は、実施例5に記載されるような静脈内投与後の肝臓、肺および脾臓における蓄積の動態学(6個体の動物の平均)を表す。

【図11】図11は、実施例5に記載されるような経口投与後の肺、脾臓および腸における蓄積の動態学(6個体の動物の平均)を表す。

【図12】図12は、実施例5に記載されるような鼻腔内投与後の肺および腎臓における蓄積の動態学(4個体の動物の平均)を表す。

【図13】図13は、実施例5に記載されるような気管内投与後の肺、脾臓および腸における蓄積の動態学(3個体の動物の平均)を表す。

【図14】図14A~Dは、静脈内(IV)、鼻腔内(IN)、経口(PO)および気管内(IT)投与の3日後に単離された臓器[A)肝臓; B)脾臓; C)肺; およびD)脳]におけるエクスビボ蛍光分析(総放射効率)を表す。

40

【図15】図15Aおよび15Bは、A)腸(G=GALT組織)のヘマトキシリンエオジン染色およびB)DAPI(核)染色およびMEV-PKH26蛍光を表す。

【図16】図16は、白色の斑点として示される、DAPI(核用)およびMEV-PKH26(赤色蛍光)を用いて染色された脾臓を表す。

【図17】図17は、GALTから脾臓へのMEVの移動を示す図表を示す。

【図18】図18A~Iは、各パラメータについて4群のマウスにおける、さまざまな用量での経口(PO)または気管内(IT)投与後のマウスモデルにおけるMEVの毒性の評価の結果を示す。MEV毒性は、化学パラメータ: ALAT、ASAT、尿素およびクレアチン(それぞれ図12A~D)によって、および2)血液学パラメータ: 赤血球、ヘ

50

モグロビン、ヘマトクリット、MCVおよび好酸球（それぞれ図12E～I）によって評価した。群は以下とした：POデリバリーによって100μlのPBSが投与された群1マウス（白色バー）、群2マウスは、POデリバリーによって100μlの4×10¹¹MEV／マウスが投与された（黒色および白色タイルを有するバー）；群3マウスは、POデリバリーによって100μlの4×10¹²MEV／マウスが投与された（垂直線を有するバー）；群4マウスは、ITデリバリーによって100μlの4×10¹¹MEV／マウスが投与された（四角のバー）。データは、各パラメータについて群あたり6個体のマウスについて測定した。図18AはALAT：アラニンアミノトランスフェラーゼを示し、図18BはASAT：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）を示し、図18Cは尿素を示し、図18Dはクレアチンを示し、図18Eは赤血球を示し、図18Fはヘモグロビンを示し、図18Gはヘマトクリットを示し、図18HはMCV（平均血球体積）を示し、図18Iは好酸球を示す。POは経口（per os）〔経口（oral）デリバリー〕を示し、ITは気管内投与を示す。

10

【図19】図19は、ウサギの眼へのMEVの局所的滴下注入後のmRNAのインビボデリバリーおよび発現を示す。

【図20】図20Aおよび20Bは、GFPタンパク質のヒト単球へのインビトロデリバリーを表す。

【図21】図21Aおよび21Bは、GFPタンパク質のヒトケラチノサイトへのインビトロデリバリーを表す。

【図22】図22は、GFPタンパク質が負荷されたMEV（MEV-GFP）またはmRNA-eGFPが負荷されたMEV（MEV-mRNA）との24時間のインキュベーション後のHep-G2細胞におけるGFPタンパク質発現を含むHep-G2細胞の共焦点顕微鏡観察を示す。

20

【図23】図23は、Hep-G2細胞におけるGFPタンパク質発現を含むHuH7細胞の共焦点顕微鏡観察を示す。

【図24】図24は、GFPタンパク質およびGFP-mRNAのヒト線維芽細胞へのインビトロデリバリーを示す。

【図25】図25A～Dは、ヒト線維芽細胞を使用するMEV浸透およびデリバリー研究におけるフローサイトメトリー分析の結果を示す。

【図26】図26は、Pto DC3000 cfa6およびhrpL遺伝子に対して向けられたsiRNAが外因的に負荷されたクロレラ属MEVの抗菌活性を示す。

30

【図27】図27は、クロレラ属MEV中の外因的に負荷された生物活性flg22ペプチドのデリバリーを示す。

【発明を実施するための形態】

【0053】

概要

A．定義

B．微細藻類および概説

C．細胞外小胞

1．細胞外小胞（EV）の種類

a．エキソソーム

b．微小胞

c．アポトーシス小体

2．EVの取り込み

3．EVを単離する一般的な方法

a．超遠心

b．サイズベースの技術

c．免疫親和性捕捉ベースの技術

d．エキソソーム沈殿

e．微小流体ベースの単離技術

40

50

4. 微細藻類由来細胞外小胞 (M E V)	
5. 緑藻類－クロレラ属の種	
a. 生活環	
b. クロレラ属の種のゲノム分析	
c. クロレラ属の商業的使用および生物工学的使用	
d. クロレラ属 M E V	
D. 外因的に負荷された微細藻類細胞外小胞 (M E V)、カーゴおよび標的	
1. M E V の単離	
2. M E V 負荷およびカーゴ	
3. ペイロードが負荷された M E V の作製	10
a. エレクトロポレーション	
b. 超音波処理	
c. 押出	
d. 界面活性剤	
e. 他の方法	
4. 外因的に負荷された M E V の例示的カーゴおよび例示的使用	
a. カーゴ	
1) R N A カーゴ	
2) 抗体カーゴ	
b. 疾患および処置の方法	20
c. 農業－獣医用適用	
d. 美容的および皮膚科学的適用	
e. 他の例示的カーゴ	
E. 医薬組成物、製剤、キット、製造品および組合せ	
1. 医薬組成物および製剤	
2. 製造品／キットおよび組合せ	
3. 併用療法	
F. 外因的に負荷された M E V の投与および投与経路	
1. 投与経路	
2. 薬物デリバリーシステムとしての M E V を含有する組成物	30
G. 種々の経路による投与後の M E V の体内分布	
1. 哺乳動物 E V の体内分布	
2. 微細藻類 E V 体内分布	
a. リンパ系の構成成分	
b. G A L T を標的化すること	
3. M E V によって処置される例示的疾患および状態	
H. 実施例	
【0054】	
A. 定義	
別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（複数可）が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書における開示全体を通して参照されるすべての特許、特許出願、公開出願および刊行物、G e n B a n k 配列、データベース、ウェブサイトおよび他の公開資料は、別に記載されない限り、その全体が参照により組み込まれる。本明細書において用語について複数の定義が存在する事象では、この節におけるものが優先される。U R L または他のこのような識別子またはアドレスが参照される場合には、このような識別子は変化する場合があります、特にインターネットでの情報は、移り変わる場合があるが、インターネットを検索することによって同等の情報を見出すことができるということは理解される。そこへの言及は、このような情報が利用可能であり、公に配布されていることを証明する。	40
	50

【0055】

本明細書で使用される場合、カーゴとは、MEVが単離された後に本明細書で提供される微細藻類細胞外小胞（MEV）中に負荷される、任意の異種または外因性分子、例えば、生体分子および小分子を含む生物活性分子を指す。カーゴは、「ペイロード」と同義的に使用され得る。

【0056】

本明細書で使用される場合、外因性カーゴとは、MEVが生成され、外因性カーゴの導入のために十分に単離または部分単離された後に負荷されたカーゴを指す。

【0057】

本明細書で使用される場合、生物活性分子とは、生物活性を有し得る、または対象に対してインビボで作用し得る任意の分子を指す。生物活性分子には、療法、診断薬、例えば、検出可能な分子および他のこのような使用、例えば、美容的使用および工業的使用に関連して、対象、例えば、ヒトまたは他の動物または植物または微生物（細菌または他のもの）に送達されるであろう、生体分子、例えば、DNA、RNA、タンパク質、他のバイオリマーおよび小分子、例えば、小分子薬および医薬品ならびに任意の分子が含まれる。生体分子は、例えば、治療薬、免疫原、診断薬、検出可能なマーカーもしくは化粧品として機能し得る、またはそれとしての活性を有し得る。本明細書における使用のための生物活性分子は、微細藻類から単離または部分単離された後に微細藻類細胞外小胞（MEV）中に負荷され得る任意のものである。

【0058】

本明細書で使用される場合、生体分子とは、生存生物もしくはウイルス中に生じる、または生じる場合がある任意の生物学的に活性な生体高分子もしくは分子、またはこのような生体高分子もしくは分子の改変形態である生体高分子もしくは分子を指す。したがって、生体分子には、改変された天然に存在する生体分子、例えば、一次配列を変更するためのアミノ酸の欠失、挿入および／もしくは置き換えによって、ならびに／またはタンパク質の翻訳後修飾などの改変によって改変された一次配列を含むタンパク質などが含まれる。

【0059】

本明細書で使用される場合、MEVが同一のまたは実質的に同一の負荷されたカーゴまたはその量を有すると示される場合には、これは、組成物中のMEVの集団の中の平均値を指すということが理解される。MEVが外因的に負荷される場合には、カーゴ／MEVの比率は、各MEVが平均で所定の量のカーゴを有するように選択できるということが理解される。簡単な例として、平均で1分子のカーゴ／MEVを負荷するために、当業者は、MEVの組成物中に負荷するカーゴの量を算出でき、MEVの組成物において、一部は1分子よりも多いカーゴ／MEVを有し、他のものは有さないであろうということを理解する。平均して、MEVは、1分子のカーゴ／MEVを有するであろう。当業者は、一般に、カーゴ／MEVの量は1より多い分子／MEVとなること、ならびにカーゴの量は、カーゴ、標的組織および／または細胞、処置される疾患、障害または状態および処置される対象を含むさまざまなパラメータに応じて変わること理解する。一般に、MEVあたり1より多いカーゴの分子、平均的に、例えば、少なくとも10または約10分子／MEVが負荷される。実質的により多くのカーゴも負荷される場合がある。記載したように、量は、標的、疾患、障害、状態および／または対象およびカーゴに応じて変わる。量を選択することは当技術分野における技術の範囲内である。

【0060】

本明細書で使用される場合、対象は、任意の生物、一般に、その中にまたはその上にMEVを含有する組成物が導入される動物または植物である。対象には、それだけには限らないが、ヒト、植物、特に、作物植物ならびに家畜およびペット、例えば、イヌおよびネコおよび動物園の動物を含む動物が含まれる。

【0061】

本明細書で使用される場合、疾患または障害または状態とは、それだけには限らないが

、感染症、後天的な状態および遺伝子状態を含む原因または状態に起因する、同定可能な症状によって特徴付けられる、生物における病的なまたは望ましくないまたは望まれない状態を指す。

【0062】

本明細書で使用される場合、疾患または状態を有する対象を処置することは、対象の疾患または状態の症状または徴候が、部分的もしくは完全軽減されるか、または処置後に変化しないままであることを意味する。

【0063】

本明細書で使用される場合、処置とは、疾患または障害の症状を回復させる任意の効果を指す。処置は、予防、療法および／または治療を包含する。処置はまた、本明細書で提供される任意のMEVまたは組成物の任意の医薬的使用を包含する。処置は、疾患または障害の任意の症状または徴候を回復させる、または防ぐ、または低減する、または排除する任意の効果を指す。処置はまた、本明細書で提供される任意のMEVまたは組成物の任意の医薬的使用を包含する。

【0064】

本明細書で使用される場合、予防とは、潜在的な疾患を防ぐことおよび／または症状の悪化または疾患の進行を防ぐことを指す。防止または予防およびそれらの文法的に同等の形式は、疾患または状態を発症するリスクまたは確率が低減または排除される方法および疾患または状態を発症するリスクまたは確率を低減または排除する製品を指す。

【0065】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドのアミノ酸の配列または核酸分子中のヌクレオチド配列の改変に関して改変とは、それぞれアミノ酸またはヌクレオチドの欠失、挿入および置き換えを指し、含む。これらは、ポリペプチドまたはタンパク質の一次配列の改変を含む。例えば、組換えDNA方法論を使用することによってポリペプチドおよび核酸分子を改変する方法は、当業者には日常的なものである。改変は、配列ではなく、ポリペプチドまたはタンパク質を指す場合、翻訳後または精製後変化、例えば、ポリペプチドまたはタンパク質の特性を変更する部分、例えば、半減期延長部分、グリコシル化、精製タグ、検出可能なレポーターおよび他のこのような部分のコンジュゲーションまたは連結を指す。

【0066】

本明細書で使用される場合、ゲノムまたはプラスミドまたは遺伝子の改変には、核酸の欠失、置き換え、挿入および転位置が含まれる。これには、天然のまたは天然に存在する核酸配列への任意の変更が含まれる。

【0067】

本明細書で使用される場合、RNA干渉(RNAi)は、RNA分子が遺伝子発現または翻訳を阻害して、標的化されたmRNA分子を中和して、標的とされた遺伝子の翻訳およびそれによる発現を阻害する生物学的プロセスである。

【0068】

本明細書で使用される場合、RNAiによって作用するRNA分子は、標的とされた遺伝子の発現のそのサイレンシングによって阻害性と呼ばれる。発現をサイレンシングすることは、標的とされた遺伝子の発現が低減または抑制または阻害されることを意味する。

【0069】

本明細書で使用される場合、RNAiによる遺伝子サイレンシングは、標的とされた遺伝子の発現を阻害、抑制、破壊または発現をサイレンシングすると言われる。標的とされた遺伝子は、阻害性RNA中の配列に対応するヌクレオチドの配列を含有し、それによって、阻害性RNAがmRNAの発現をサイレンシングする。低分子干渉RNA(sRNA)は、二本鎖(ds)RNAの小片であり、普通約21ヌクレオチド長であり、各末端に3'オーバーハング(2ヌクレオチド)を有し、これを使用して、特定の配列でメッセンジャーRNA(mRNA)に結合し、その分解を促進することによってタンパク質の翻訳に干渉できる。そうすることで、sRNAは、その対応するmRNAのヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列に基づいて、特異的タンパク質の生成を防ぐ。このプロセスは、RNA干渉（RNAi）と呼ばれ、また、siRNAサイレンシングまたはsiRNAノックダウンとも呼ばれる。低分子ヘアピン型（short-hairpin）RNAまたは低分子ヘアピン型（small-hairpin）RNA（shRNA）は、RNA干渉（RNAi）によって標的遺伝子発現をサイレンシングするために使用できる、狭いヘアピンターンを有する人工RNA分子である。細胞におけるshRNAの発現は通常、プラスミドのデリバリーによって、またはウイルスもしくは細菌ベクターを介して達成される。

【0070】

本明細書で使用される場合、ノンコーディングRNAは、タンパク質をコードしないRNAである。ノンコーディングRNAのクラスには、それだけには限らないが、低分子干渉RNA（siRNA）およびマイクロRNA（miRNA）が含まれる。また、長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）も含んでいた。

【0071】

本明細書で使用される場合、標的とされた遺伝子を阻害、抑制、破壊またはサイレンシングすることは、標的とされた遺伝子の発現、例えば、翻訳を変更し、それによって、標的とされた遺伝子によってコードされる生成物の活性または発現が低減されるプロセスを指す。低減は、それによって、本明細書で提供されるMEVおよび本明細書における投与に関して処置が達成される、完全ノックアウトまたは部分ノックアウトを含む。

【0072】

本明細書で使用される場合、低分子活性化RNA（saRNA）は、遺伝子プロモーターを標的として遺伝子を活性化する小さい二本鎖RNAである。それらは、一般に、小さく、一般に、21ヌクレオチド長である。それらは、siRNAと構造的に類似しているが、saRNAの活性は、発現を活性化することであるのに対し、siRNAは、その標的の発現を阻害する。

【0073】

本明細書で使用される場合、自己増幅性RNAは、ウイルスレプリカーゼをコードするRNAを指す。宿主細胞中に侵入するとレプリカーゼが翻訳され、それがmRNAの相補的なネガティブコピーを作製し、次いで、それが、レプリカーゼによって、より多くのmRNAを合成するための鋳型として使用される。

【0074】

本明細書で使用される場合、オープンリーディングフレーム（ORF）は、開始コドン、続いて、下流のインフレームの停止コドンをコードするヌクレオチドの配列である。真核生物のmRNAは主に単一の一次ORFを有し、タンパク質コード配列（CDS）を含む。転写物ではより短いORFも生じる場合がある。これらは小さいORF（sORF）と呼ばれる。

【0075】

本明細書で使用される場合、小さいORFによってコードされるペプチド（sORF）は、長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）、環状RNAおよびリボソームRNAを含むノンコーディングRNAで生じる。sORFは、一般に100未満のアミノ酸である、タンパク質、小ペプチドおよびペプチドをコードする。sORFは、AUG正準開始コドンを含む場合があるが、AUGとは1ヌクレオチド異なるCUG、GUG、UUGおよびACGのような近同族（near-cognate）コドンも含み得る；sORFは一般に、停止コドン（UAA、UGAおよびUAG）で終結する。sORFによってコードされる生成物の多くは、リボソームのモジュレーションなどの調節機能を有する。

【0076】

本明細書で使用される場合、長鎖RNAは、より短いRNA、例えば、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、マイクロRNAおよびmRNAの発現を阻害もしくはサイレンシングする他のRNAに酵素的にプロセシングされ得る、または長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）であるRNA分子である。例えば、低分子干渉RNA（siRNA）は、二本鎖（ds）RNAの小片であり、普通約18～23ヌクレオチド長であり、

10

20

30

40

50

各末端に3'オーバーハング(2ヌクレオチド)を有し、特定の配列でメッセンジャーRNA(mRNA)に結合し、その分解を促進することによってタンパク質の翻訳に干渉できる。そうすることで、siRNAは、その対応するmRNAのヌクレオチド配列に基づいて、特異的タンパク質の生成を防ぐ。このプロセスは、RNA干渉(RNAi)と呼ばれ、また、siRNAサイレンシングまたはsiRNAノックダウンとも呼ばれる。低分子ヘアピン型(short-hairpin)RNAまたは低分子ヘアピン型(small-hairpin)RNA(shRNA)は、RNA干渉(RNAi)によって標的遺伝子発現をサイレンシングするために使用できる、狭いヘアピンターンを有する人工RNA分子である。細胞におけるshRNAの発現は、プラスミドのデリバリーによって、またはウイルスもしくは細菌ベクターを介して達成され得る。

10

【0077】

本明細書で使用される場合、標的とされた遺伝子を阻害、抑制、破壊またはサイレンシングすることは、標的とされた遺伝子の発現、例えば、翻訳を変更し、それによって、標的とされた遺伝子によってコードされる生成物の活性または発現が低減されるプロセスを指す。低減は、それによって、本明細書で提供されるMEVおよび本明細書における投与に関して処置が達成される、完全ノックアウトまたは部分ノックアウトを含む。

【0078】

本明細書で使用される場合、コーディングRNAは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは小さいオープンリーディングフレーム(sORF)または小ペプチド、一般に10またはそれより少ないアミノ酸またはペプチド(100未満のアミノ酸)をコードするRNAである。コーディングRNAのクラスには、それだけには限らないが、タンパク質およびペプチドをコードするmRNAまたはメッセンジャーRNAならびに小ペプチドまたはペプチドをコードするsORFをコードする長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)も含まれる。

20

【0079】

本明細書で使用される場合、腫瘍微小環境(TME)は、周囲の血管、免疫細胞、線維芽細胞、骨髄由来炎症細胞、リンパ球、シグナル伝達分子および細胞外マトリックス(ECM)を含む、腫瘍が存在する細胞環境である。存在する状態として、それだけには限らないが、血管新生の増大、低酸素、低pH、乳酸塩濃度の増大、ビルビン酸塩濃度の増大、間質液圧の増大および代謝産物または代謝の変更、例えば、腫瘍を示す高レベルのアデノシンが挙げられる。

30

【0080】

本明細書で使用される場合、核酸またはコードされるRNAが遺伝子を標的とするという記述は、それが任意の機序によって遺伝子の発現を阻害または抑制またはサイレンシングすることを意味する。一般に、このような核酸は、少なくとも、標的とされた遺伝子と相補的である部分を含み、その部分は、相補的部分とハイブリッドを形成するのに十分である。

【0081】

本明細書で使用される場合、欠失とは、核酸またはポリペプチド配列に言及する場合、配列、例えば、標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたは天然もしくは野生型配列と比較して、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の欠失を指す。

40

【0082】

本明細書で使用される場合、挿入とは、核酸またはアミノ酸配列に言及する場合、標的、天然、野生型または他の関連配列内に1つまたは複数のさらなるヌクレオチドまたはアミノ酸を含めることを説明する。したがって、野生型配列と比較して1つまたは複数の挿入を含有する核酸分子は、配列の直線長内に1つまたは複数の追加のヌクレオチドを含有する。

【0083】

本明細書で使用される場合、核酸およびアミノ酸配列への付加は、別の配列と比較して、いずれかの末端へのヌクレオチドまたはアミノ酸の付加を説明する。

50

【0084】

本明細書で使用される場合、置換または置き換えとは、天然、標的、野生型または他の核酸またはポリペプチド配列中の1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸を、代替ヌクレオチドまたはアミノ酸と、分子の長さ（残基の数で記載されるような）を変更することなく置き換えることを指す。したがって、分子中の1つまたは複数の置換は、分子のアミノ酸残基またはヌクレオチドの数を変更しない。特定のポリペプチドと比較したアミノ酸置き換えは、ポリペプチド配列の長さに沿ったアミノ酸残基の数の点で表すことができる。

【0085】

本明細書で使用される場合、配列表に示されるものなどの開示された配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸位置に対応する位置で、またはヌクレオチドまたはアミノ酸位置が、配列表に示されるものなどの開示された配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸位置に対応するという記述は、標準アラインメントアルゴリズム、例えば、GAPアルゴリズムを使用して同一性を最大にするための、開示された配列とのアラインメントの際に同定されるヌクレオチドまたはアミノ酸位置を指す。配列をアラインすることによって、当業者は、例えば、ガイドとして保存されたおよび同一のアミノ酸残基を使用して対応する残基を同定できる。一般に、対応する位置を同定するために、最高次のマッチが得られるようにアミノ酸の配列がアラインされる〔例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991;およびCarrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073を参照されたい〕。

【0086】

本明細書で使用される場合、配列のアラインメントは、2つまたはそれより多いヌクレオチドまたはアミノ酸の配列をアラインするための相同性の使用を指す。通常、50%以上の同一性によって関連する2つまたはそれより多い配列がアラインされる。アラインされた配列のセットとは、対応する位置でアラインされている2つまたはそれより多い配列を指し、ゲノムDNA配列とアラインされた、RNAに由来するアラインしている配列、例えば、ESTおよび他のcDNAを含み得る。関連するまたはバリエーションポリペプチドまたは核酸分子は、当業者に公知の任意の方法によってアラインできる。このような方法は通常、マッチを最大化し、手作業でのアラインメントを使用する、および入手可能な多数のアラインメントプログラム（例えば、BLASTP）および当業者に公知の他のものを使用するなどによる方法を含む。ポリペプチドまたは核酸の配列をアラインすることによって、当業者は、ガイドとして保存されたおよび同一のアミノ酸残基を使用して類似の部分または位置を同定できる。さらに、当業者はまた、保存されたアミノ酸またはヌクレオチド残基をガイドとして使用して、ヒトと非ヒト配列の間およびその中で対応するアミノ酸またはヌクレオチド残基を見出すことができる。対応する位置はまた、例えば、タンパク質構造のコンピュータシミュレーションされたアラインメントを使用することによる、構造的アラインメントに基づく場合もある。他の場合には、対応する領域を同定できる。当業者はまた、保存されたアミノ酸残基をガイドとして使用して、ヒトと非ヒト配列の間およびその中で対応するアミノ酸残基を見出すことができる。

【0087】

本明細書で使用される場合、ポリペプチド、例えば、抗体の特性とは、それだけには限らないが、結合特異性、構造的立体配置またはコンホメーション、タンパク質安定性、タンパク質分解に対する耐性、コンホメーション的安定性、熱耐性およびpH条件に対する耐性を含む、ポリペプチドによって示される任意の特性を指す。特性の変化は、ポリペ

10

20

30

40

50

チドの活性を変更する場合がある。例えば、抗体ポリペプチドの結合特異性の変化は、ポリペプチドの抗原に結合する能力および／または種々の結合活性、例えば、親和性またはアビディティまたはインビボ活性を変更する場合がある。

【0088】

本明細書で使用される場合、ポリペプチド、例えば、抗体の活性または機能活性とは、ポリペプチドによって示される任意の活性を指す。このような活性は、経験的に決定できる。例示的活性として、それだけには限らないが、例えば、抗原-結合、DNA結合、リガンド結合、二量体化によって生体分子と相互作用する能力または酵素活性、例えば、キナーゼ活性またはタンパク質分解活性が挙げられる。抗体（抗体断片を含む）について、活性として、それだけには限らないが、特定の抗原に特異的に結合する能力、抗原-結合の親和性（例えば、高いまたは低い親和性）、抗原-結合のアビディティ（例えば、高または低アビディティ）、結合速度（*on-rate*）、解離速度（*off-rate*）、エフェクター機能、例えば、抗原中和またはクリアランス、ウイルス中和を促進する能力およびインビボ活性、例えば、感染もしくは病原体の侵襲を防ぐ能力またはクリアランスを促進する能力または身体中の特定の組織もしくは流体もしくは細胞に浸透する能力が挙げられる。活性は、認識されたアッセイ、例えば、ELISA、フローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴または結合速度（*on-rate*）もしくは解離速度（*off-rate*）を測定するための同等のアッセイ、免疫組織化学および免疫蛍光組織学および顕微鏡観察、細胞ベースのアッセイ、フローサイトメトリーおよび結合アッセイ（例えば、パニングアッセイ）を使用してインビトロまたはインビボで評価できる。

10

20

【0089】

本明細書で使用される場合、結合する、結合されたおよびそれらの文法的な差異は、分子が互いに極めて近接している安定な会合をもたらす、別の分子との、または分子の間での任意の相互作用における分子の関与を指す。結合には、それだけには限らないが、非共有結合性結合、共有結合性結合（例えば、可逆性および不可逆性共有結合性結合）が含まれ、分子、例えば、それだけには限らないが、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質および小分子、例えば、薬物を含む化合物間の相互作用が含まれる。

【0090】

本明細書で使用される場合、抗体とは、天然にまたは部分的もしくは全体的に合成された、例えば、組換え生成されたか否かに関わらず免疫グロブリンおよび免疫グロブリン断片を指し、抗原結合部位を形成するのに十分であり、組み立てられると、抗原に特異的に結合する、免疫グロブリン分子の重鎖可変鎖および軽鎖領域の少なくとも一部分を含有する任意の断片を含む。したがって、抗体は、免疫グロブリン抗原結合ドメインに相同であるまたは実質的に相同である結合ドメイン（抗体結合部位）を有する任意のタンパク質を含む。例えば、抗体とは、2つの重鎖（HおよびH'と表すことができる）および2つの軽鎖（LおよびL'と表すことができる）を含有する抗体を指し、各重鎖は、全長免疫グロブリン重鎖または抗原結合部位を形成するのに十分なその部分である場合があり（例えば、重鎖は、それだけには限らないが、VH鎖、VH-CH1鎖およびVH-CH1-CH2-CH3鎖を含む）、各軽鎖は、全長軽鎖または抗原結合部位を形成するのに十分なその部分である場合がある（例えば、軽鎖は、それだけには限らないが、VL鎖およびVL-CL鎖を含む）。各重鎖（HおよびH'）は、1つの軽鎖（それぞれLおよびL'）と対形成する。通常、抗体は、最小限で、重鎖可変（VH）鎖および／または軽鎖可変（VL）鎖のすべてまたは少なくとも一部分を含む。抗体はまた、定常領域のすべてまたは一部分も含む場合がある。

30

40

【0091】

本明細書における目的のために、抗体という用語は、全長抗体および抗体断片を含むその部分、例えば、抗腫瘍抗体または抗病原体または遺伝子サイレンシング断片を含む。抗体断片には、それだけには限らないが、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fv断片、ジスルフィド結合性Fv(dsFv)、Fd断片、Fd'断片、単鎖Fv(scFv)、単鎖Fab(scFab)、ダイアボディー、抗イディオタイプ（抗Id）抗

50

体または上記のいずれかの抗原結合性断片が含まれる。抗体にはまた、合成抗体、組換え生成された抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト抗体、非ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体およびイントラボディが含まれる。本明細書で提供される抗体には、任意の免疫グロブリンクラス（例えば、Ig G、Ig M、Ig D、Ig E、Ig A および Ig Y）、任意のサブクラス（例えば、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1 および Ig A 2）またはサブサブクラス（例えば、Ig G 2 a および Ig G 2 b）のメンバーが含まれる。

【0092】

本明細書で使用される場合、核酸とは、通常、ホスホジエステル結合によって一緒に接続されたデオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）を含む、少なくとも2つの連結されたヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を指す。また、核酸という用語に、核酸の類似体、例えば、ペプチド核酸（PNA）、ホスホリチオエートDNAおよび他のこのような類似体および誘導体またはそれらの組合せも含まれる。核酸はまた、例えば、ヌクレオチド類似体またはリン酸ジエステル結合以外の骨格結合、例えば、ホスホトリエステル結合、ホスホルアミデート結合、ホスホリチオエート結合、チオエステル結合またはペプチド結合（ペプチド核酸）を含有するDNAおよびRNA誘導体も含む。この用語はまた、等価物として、ヌクレオチド類似体、単鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖核酸から作製された、RNAまたはDNAいずれかの誘導体、変異体および類似体を含む。デオキシリボヌクレオチドには、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシンおよびデオキシチミジンが含まれる。RNAについては、ウラシル塩基は、ウリジンである。

【0093】

本明細書で使用される場合、単離された核酸分子は、核酸分子の天然供給源中に存在する他の核酸分子から分離されているものである。単離された核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術によって生成される場合には他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まない、または化学合成される場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないことができる。本明細書で提供される例示的な単離された核酸分子として、RNAiまたは治療用タンパク質をコードする単離された核酸分子が挙げられる。

【0094】

本明細書で使用される場合、核酸配列、領域、エレメントまたはドメインに関して作動可能に連結されたとは、核酸領域が互いに機能的に関連していることを意味する。例えば、リーダーペプチドをコードする核酸を、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結することができ、それによって核酸を転写し、翻訳して、機能的な融合タンパク質を発現させることができ、ここで、リーダーペプチドは、融合ポリペプチドの分泌を達成する。一部の場合には、第1のポリペプチド（例えば、リーダーペプチド）をコードする核酸が、第2のポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結され、核酸が単一のmRNA転写物として転写されるが、mRNA転写物の翻訳が、2つのポリペプチドのうち一方が発現されることをもたらす場合がある。例えば、部分的アンバーサプレッサー細胞中に導入された場合に、結果として生じた単一mRNA転写物が翻訳されて、第1および第2のポリペプチドを含有する融合タンパク質を生成できるか、または翻訳されて、第1のポリペプチドのみを生成できるように、アンバー停止コドンで第1のポリペプチドをコードする核酸と第2のポリペプチドをコードする核酸の間に位置付けることができる。別の例では、プロモーターを、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結でき、それによって、プロモーターは、核酸の転写を調節または媒介する。

【0095】

本明細書で使用される場合、例えば、合成核酸分子または合成遺伝子または合成ペプチドに関して合成とは、組換え法によって、および／または化学合成法によって生成される核酸分子またはポリペプチド分子を指す。

【0096】

本明細書で使用される場合、天然に存在するα-アミノ酸の残基は、自然界に見出され

る 20 種の α -アミノ酸の残基であり、ヒトではその同族 mRNA コドンを用いて荷電 tRNA 分子の特異的認識によってタンパク質中に組み込まれる。

【0097】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドとは、共有結合によって接続された 2 つまたはそれより多いアミノ酸を指す。ポリペプチドおよびタンパク質という用語は、一般に、同義的に使用される。ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質とは、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。同義的に使用されない場合には、以下に定義されるように、他の特徴、例えば、サイズおよび構造が考慮される。ポリマーは、線形である場合も分岐している場合もあり、改変アミノ酸を含有するまたは含む場合があり、非アミノ酸によって中断される場合もある。また、置き換え、挿入、欠失および転位を含む配列改変を含むアミノ酸ポリマーも含まれる。また、翻訳後修飾、例えば、ジスルフィド結合、グリコシル化、シアリル化、それだけには限らないが、検出可能なマーカーまたはレポーターへのコンジュゲーションのような他のタンパク質、ペプチドおよびポリペプチドへのコンジュゲーションを含有するアミノ酸ポリマーも含まれる。

10

【0098】

本明細書で使用される場合、ペプチドは、少なくとも 2 個のアミノ酸、一般に、2 ~ 40 など 100 個より少ないアミノ酸を含有する。小ペプチドは、10 個より少ないアミノ酸、通常、2 ~ 6 個のアミノ酸を含有するペプチドである。

【0099】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドは、複数のペプチドを含有するアミノ酸鎖であり、一般に、100 個のアミノ酸であるか、またはそれより長い。

20

【0100】

本明細書で使用される場合、タンパク質は、三次元構造を有するポリペプチドであり、ペプチド結合に加えて、二次元および三次元構造の形成に関与する、ジスルフィド結合などの結合および他の相互作用を含む場合がある。

【0101】

本明細書で使用される場合、アミノ酸は、アミノ基およびカルボン酸基を含有する有機化合物である。ポリペプチドは、2 個またはそれより多いアミノ酸を含有する。本明細書における目的のために、提供される抗体中に含有されるアミノ酸は、20 種の天然に存在するアミノ酸（以下の表を参照されたい）、非天然アミノ酸およびアミノ酸類似体（例えば、 α -炭素が側鎖を有するアミノ酸）を含む。本明細書で使用される場合、本明細書で現れるポリペプチドの種々のアミノ酸配列中で生じるアミノ酸は、周知の三文字または一文字略語に従って識別される（以下の表を参照されたい）。種々の核酸分子および断片中に生じるヌクレオチドは、当技術分野で日常的に使用される標準的な一文字名称で指定される。

30

【0102】

本明細書で使用される場合、アミノ酸残基とは、そのペプチド結合でのポリペプチドの化学的消化（加水分解）の際に形成されるアミノ酸を指す。本明細書で記載されるアミノ酸残基は、一般に、L 異性体形態である。D 異性体形態の残基は、ポリペプチドによって所望の機能的特性が保持される限り、任意の L-アミノ酸残基と置換され得る。NH₂とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。COOHとは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基を指す。J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1968) に記載され、37 C. F. R. §§ 1.821-1.822 で採用された標準ポリペプチド命名法に沿って、アミノ酸残基の略語は、以下の表に示されている：

40

【0103】

50

対応の表

記号		
1 文字	3 文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	グルタミン酸および/またはグルタミン
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	アスパラギン酸および/またはアスパラギン
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知または他のもの

10

20

30

【0104】

式によって本明細書で表されるアミノ酸残基のすべての配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の従来の方向で左から右の配向を有する。アミノ酸残基という語句は、上記の対応の表に列挙されるアミノ酸、改変された、非天然のおよび普通ではないアミノ酸を含むように定義される。アミノ酸残基配列の最初または最後のダッシュは、1つもしくは複数のアミノ酸残基のさらなる配列への、またはアミノ末端基、例えば、 NH_2 への、またはカルボキシル末端基、例えば COOH へのペプチド結合を示す。

【0105】

ペプチドまたはタンパク質では、アミノ酸の適した保存的置換は当業者に公知であり、一般に、結果として生じる分子の生物活性を変更することなく行うことができる。当業者ならば、一般に、ポリペプチドの非必須領域中の単一アミノ酸置換は、生物活性を実質的に変更しないことは認識している（例えば、Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224を参照されたい）。

40

【0106】

このような置換は、以下の表に示される例示的置換に従って行うことができる：

【0107】

50

例示的保存的アミノ酸置換

元の残基	例示的保存的置換(複数可)
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

10

20

【0108】

他の置換も許容され、経験的にまたは他の公知の保存的もしくは非保存的置換に従って決定できる。

【0109】

本明細書で使用される場合、天然に存在するアミノ酸とは、ポリペプチド中に生じる20種のL-アミノ酸を指す。

【0110】

本明細書で使用される場合、非天然アミノ酸という用語は、天然アミノ酸と類似しているが、天然アミノ酸の構造および反応性を模倣するように構造的に改変されている構造を有する有機化合物を指す。したがって、天然に存在しないアミノ酸には、例えば、20種の天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸またはアミノ酸の類似体が含まれ、それだけには限らないが、アミノ酸のD-立体異性体が含まれる。例示的非天然アミノ酸には、当業者に公知であり、それだけには限らないが、2-アミノアジピン酸 (Aad)、3-アミノアジピン酸 (bAad)、 β -アラニン/ β -アミノプロピオン酸 (Bala)、2-アミノ酪酸 (Abu)、4-アミノ酪酸/ピペリジン酸 (4Abu)、6-アミノカプロン酸 (Acp)、2-アミノヘプタン酸 (Ahe)、2-アミノイソ酪酸 (Aib)、3-アミノイソ酪酸 (Bai b)、2-アミノピメリン酸 (Apm)、2,4-ジアミノ酪酸 (Dbu)、デスモシン (Des)、2,2'-ジアミノピメリン酸 (Dpm)、2,3-ジアミノプロピオン酸 (Dpr)、N-エチルグリシン (EtGly)、N-エチルアスパラギン (EtAsn)、ヒドロキシリジン (HyL)、アローヒドロキシリジン (AhyL)、3-ヒドロキシプロリン (3Hyp)、4-ヒドロキシプロリン (4Hyp)、イソデスモシン (Ide)、アローイソロイシン (Aile)、N-メチルグリシン、サルコシン (MeGly)、N-メチルイソロイシン (MeIle)、6-N-メチルリジン (MeLys)、N-メチルバリン (MeVal)、ノルバリン (Nva)、ノルロイシン (Nle) およびオルニチン (Orn) が含まれる。

30

40

【0111】

本明細書で使用される場合、DNAコンストラクトは、天然には見出されない方法で組み合わされ、並置されたDNAのセグメントを含有する、一本鎖または二本鎖であり、直鎖または環状DNA分子である。DNAコンストラクトは、ヒトによる操作の結果として存在し、操作された分子のクローンおよび他のコピーを含む。

50

【0112】

本明細書で使用される場合、DNAセグメントは、指定の特質を有するより大きなDNA分子の一部である。例えば、指定のポリペプチドをコードするDNAセグメントは、より長いDNA分子の一部、例えば、プラスミドまたはプラスミド断片であり、5'から3'方向に読まれた場合に、指定のポリペプチドのアミノ酸の配列をコードする。

【0113】

本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドという用語は、5'から3'末端に読まれる、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを意味する。ポリヌクレオチドはRNAおよびDNAを含み、天然供給源から単離でき、インビトロで合成でき、または天然および合成分子の組合せから調製できる。ポリヌクレオチド分子の長さは、本明細書においてヌクレオチド（ntと略される）または塩基対（bpと略される）を単位として与えられる。「ヌクレオチド」という用語は、文脈が許可する場合には一本鎖および二本鎖分子に対して使用される。この用語が二本鎖分子に適用される場合には、全長を表すために使用され、塩基対という用語と同等であると理解される。二本鎖ポリヌクレオチドの2つの鎖は、長さがわずかに異なっている場合があり、その末端がねじれ型である場合があり、したがって、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドが対形成できないということは当業者によって認識される。このような不對末端は、一般に、20ヌクレオチド長を超えない。

【0114】

本明細書で使用される場合、組換え法による生成とは、クローニングされたDNAによってコードされるタンパク質を発現するための分子生物学の周知の方法の使用を指す、または意味する。

【0115】

本明細書で使用される場合、異種核酸は、それが発現される細胞によってインビボでは普通生成されない生成物（すなわち、RNAおよび／またはタンパク質）をコードする核酸、または普通生じない遺伝子座中にある、もしくは転写、翻訳もしくは他の調節可能な生化学プロセスに影響を及ぼすことによって、内因性核酸、例えば、DNAの発現を変更するメディアーターを媒介する、もしくはコードする核酸である。異種核酸、例えば、DNAはまた、外来核酸と呼ばれる。当業者が認識し、またはそれが発現される細胞にとって異種もしくは外来として考慮するであろう任意の核酸、例えば、DNAは、本明細書では異種核酸によって包含され、異種核酸は、内因的にも発現される外因的に付加された核酸を含む。異種核酸は一般に、それが導入される細胞にとって内因性ではないが、別の細胞から入手されているか、または合成的に調製されている、または天然に生じないゲノム遺伝子座中に導入される、またはその発現が調節配列もしくは天然の調節配列（単数または複数）とは異なる配列の制御下にある。

【0116】

本明細書における異種核酸の例として、それだけには限らないが、DNA分子、RNA分子、プラスミドおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。MEVでは、異種核酸は、プラスミドにコードされ得る。異種核酸、例えば、DNAは、何らかの方法で、治療用生成物をコードするDNAの発現を媒介できる、または何らかの方法で治療用生成物の発現を直接的もしくは間接的に媒介する生成物、例えば、ペプチドもしくはRNAをコードできる核酸を含む。

【0117】

本明細書で使用される場合、細胞療法は、疾患または状態を処置するための対象へのMEVのデリバリーを含む。これらにはカーゴが外因的に負荷されており、その結果、それらは対象に導入されると生成物を送達するまたは発現する。

【0118】

本明細書で使用される場合、遺伝子療法は、このような療法が求められる障害または状態を有する哺乳動物、特にヒトのある特定の細胞、例えば、標的細胞中への異種核酸、例えば、DNAの移動を含む。核酸、例えば、DNAは、異種核酸、例えば、DNAが発現

され、それによってコードされた治療用生成物（複数可）が生成されるような方法で選択された標的細胞中へ導入される。また、遺伝子療法を使用して、欠陥のある遺伝子と置き換わる遺伝子産物をコードする核酸を送達する、またはそれが導入される哺乳動物もしくは細胞によって産生される遺伝子産物を補充することができる。導入される核酸は、哺乳動物宿主において普通は産生されない、または治療有効量で、もしくは治療上有用な時間に産生されない治療用化合物、例えば、増殖因子もしくはその阻害剤または腫瘍壊死因子もしくはその阻害剤、例えば、その受容体をコードする場合がある。治療用生成物をコードする異種核酸、例えば、DNAは、苦しめられた宿主の細胞中に導入される前に、生成物またはその発現を増強するか、そうでなければ変更するために改変され得る。遺伝子療法はまた、遺伝子発現の阻害剤またはレプレッサーまたは他のモジュレーターのデリバリーを含み得る。

10

【0119】

本明細書で使用される場合、発現とは、ポリペプチドが、ポリヌクレオチドの転写および翻訳によって産生されるプロセスを指す。ポリペプチドの発現のレベルは、例えば、宿主細胞から産生されたポリペプチドの量を決定する方法を含む、当技術分野で公知の任意の方法を使用して評価できる。このような方法は、それだけには限らないが、ELISA、ゲル電気泳動後のクーマシーブルー染色、ローリータンパク質アッセイおよびブラッドフォードタンパク質アッセイによる細胞溶解物中のポリペプチドの定量化を含み得る。

【0120】

本明細書で使用される場合、宿主細胞は、ベクターを受け取り、維持し、複製し、および／または増幅するために使用される細胞である。宿主細胞はまた、ベクターによってコードされるポリペプチドを発現するために使用され得る。ベクター中に含有される核酸は、宿主細胞が分裂する場合に複製され、それによって核酸を増幅する。

20

【0121】

本明細書で使用される場合、ベクターは、ベクターが適切な宿主細胞中に形質転換される場合に、1つまたは複数の異種タンパク質を発現させることができる複製可能な核酸である。ベクターへの言及は、ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸が、通常、制限酵素消化およびライゲーションによって導入され得るベクターを含む。ベクターへの言及はまた、ポリペプチドまたはRNAをコードする核酸を含有するベクターも含む。ベクターは、核酸の増幅のために、または核酸によってコードされるポリペプチドの発現／ディスプレイのために、ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞中に導入するために使用される。ベクターは通常、エピソームのままであるが、遺伝子またはその部分のゲノムの染色体中への組み込みを達成するように設計される場合もある。また、人工染色体、例えば、酵母人工染色体および哺乳動物人工染色体であるベクターも企図される。このような媒体の選択および使用は、当業者に周知である。ベクターはまた、ウイルスベクター（virus vectors）またはウイルスベクター（viral vectors）を含む。ウイルスベクター（Viral vectors）は、外因性遺伝子を細胞中に移動するために外因性遺伝子に作動可能に連結された（媒体またはシャトルとして）操作されたウイルスである。

30

【0122】

本明細書で使用される場合、発現ベクターは、このようなDNA断片の発現を達成可能である調節配列、例えば、プロモーター領域と作動可能に連結されたDNAを発現可能であるベクターを含む。このような追加のセグメントは、プロモーターおよびターミネーター配列を含む場合があり、適宜、1つまたは複数の複製起点、1つまたは複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含む場合がある。発現ベクターは一般に、プラスミドまたはウイルスDNAに由来し、または両方のエレメントを含有し得る。したがって、発現ベクターとは、組換えDNAまたはRNAコンストラクト、例えば、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、または適切な宿主細胞中に導入されるとクロニングされたDNAの発現をもたらす他のベクターを指す。適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、真核細胞および／または原核細胞において複製可能であるものならびに

40

50

エピソームのままであるもの、または宿主細胞ゲノム中に組み込まれるものが含まれる。

【0123】

本明細書で使用される場合、一次配列とは、ポリペプチド中のアミノ酸残基の配列または核酸分子中のヌクレオチドの配列を指す。

【0124】

本明細書で使用される場合、配列同一性とは、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの間の比較における同一または類似のアミノ酸またはヌクレオチド塩基の数を指す。配列同一性は、類似性または同一性の領域を同定するための核酸またはタンパク質配列の配列アラインメントによって決定できる。本明細書における目的のために、配列同一性は一般に、同一残基を同定するためのアラインメントによって決定される。アラインメントは、ローカルである場合もグローバルである場合もある。マッチ、ミスマッチおよびギャップを比較される配列の間で同定できる。ギャップは、同一または類似の文字がアラインされるようにアラインされた配列の残基の間に挿入されるヌルアミノ酸またはヌクレオチドである。一般に、内部および末端ギャップがあり得る。ギャップペナルティーを使用する場合には、末端ギャップのペナルティーを用いずに配列同一性を決定できる（例えば、末端ギャップはペナルティーを科されない）。あるいは、配列同一性は、同一位置／アラインされた配列全体の長さ×100の数としてギャップを考慮せずに決定できる。

10

【0125】

本明細書で使用される場合、グローバルアラインメントは、2つの配列を最初から最後までアラインし、各配列中の各文字を1回のみアラインするアラインメントである。アラインメントは、配列の間に類似性または同一性があるか否かに関わらず生成される。例えば、グローバルアラインメントに基づく50%の配列同一性は、各々100ヌクレオチドの長さの2つの比較された配列の全配列のアラインメントにおいて、残基の50%が同一であることを意味する。グローバルアラインメントはまた、アラインされた配列の長さが同一ではない場合でさえ配列同一性の決定において使用され得るということが理解される。配列の末端の終端の相違は、末端ギャップの「ペナルティーなし」が選択されない限り配列同一性の決定において考慮される。一般に、グローバルアラインメントは、その長さのほとんどにわたってかなりの類似性を共有する配列で使用される。グローバルアラインメントを実施するための例示的アルゴリズムには、Needleman-Wunschアルゴリズム [Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443] が含まれる。グローバルアラインメントを実施するための例示的プログラムは、公的に利用可能であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI) ウェブサイト (ncbi.nlm.nih.gov/) で入手可能なグローバル配列アラインメントツールおよび deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html で入手可能なプログラムが含まれる。

20

30

【0126】

本明細書で使用される場合、ローカルアラインメントは、2つの配列をアラインするが、類似性または同一性を共有する配列の部分のみをアラインするアラインメントである。したがって、ローカルアラインメントは、ある配列のサブセグメントが別の配列中に存在するか否かを決定する。類似性がない場合には、アラインメントは返されない。ローカルアラインメントアルゴリズムには、BLASTまたはSmith-Watermanアルゴリズム [Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)] が含まれる。例えば、ローカルアラインメントに基づく50%の配列同一性は、任意の長さの2つの比較された配列の全配列のアラインメントにおいて、100ヌクレオチドの長さの類似性または同一性の領域が、類似性または同一性の領域において同一である50%の残基を有することを意味する。

40

【0127】

本明細書における目的のために、各供給業者によって確立されたデフォルトギャップペナルティーを用いて使用される標準アラインメントアルゴリズムプログラムによって配列

50

同一性を決定できる。GAPプログラムのデフォルトパラメータは以下を含み得る：（１）単項比較行列（同一性に対して１の値および非同一性に対して０を含有する）およびSchwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)によって記載されたような、Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745の加重比較行列；（２）各ギャップに対して３．０のペナルティーおよび各ギャップ中の各記号に対して追加の０．１０のペナルティーおよび（３）末端ギャップに対してペナルティーなし。任意の２つの核酸分子が、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるヌクレオチド配列を有する、または任意の２つのポリペプチドが、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるアミノ酸配列を有するか、同一性パーセントを列挙する他の類似の変動を有するか否かは、ローカルまたはグローバルアラインメントに基づいた公知のコンピュータアルゴリズムを使用して決定できる（例えば、数十の公知のおよび公的に入手可能なアラインメントデータベースおよびプログラムへのリンクを提供するwikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_softwareを参照されたい）。一般に、本明細書における目的のために、配列同一性は、グローバルアラインメントに基づくコンピュータアルゴリズム、例えば、NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page__TYPE=BlastHome) から入手可能なNeedleman-Wunschグローバル配列アラインメントツール；LAlign [William Pearson implementing the Huang and Miller algorithm (Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357)]；およびdeepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.htmlで入手可能なXiaoqui Huang製のプログラムを使用して決定される。通常、比較されるポリペプチドまたはヌクレオチドの各々の全長配列は、グローバルアラインメントにおいて各配列の全長にわたってアラインされる。ローカルアラインメントはまた、比較されている配列が、実質的に同じ長さである場合に使用される。

10

20

30

40

【０１２８】

したがって、本明細書で使用される場合、同一性という用語は、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較またはアラインメントを表す。１つの限定されない例では、少なくとも９０％同一であるとは、参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する９０～１００％の同一性パーセントを指す。９０％以上のレベルの同一性は、例示目的で１００アミノ酸またはヌクレオチドの試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド長が比較されると仮定して、試験ポリペプチドまたはポリヌクレオチド中のアミノ酸またはヌクレオチドのうち１０％（すなわち１００のうち１０）以下が、参照ポリペプチドのものと異なるという事実を示す。試験および参照ポリヌクレオチドの間で類似の比較を行うことができる。このような相違は、アミノ酸配列の全長にわたって無作為に分布する点突然変異として表される場合があり、またはそれらは、最大許容値、例えば、１０／１００のアミノ酸相違（およそ９０％の同一性）まで、変動する長さの１つまたは複数の位置でクラスター形成している場合もある。相違は、アミノ酸残基の欠失またはトランケーションによるものでもあり得る。相違は、核酸またはアミノ酸置換、挿入または欠失として定義される。比較される配列の長さに応じて、約８５～９０％を上回る相同性または同一性のレベルでは、結果はプログラムおよびギャップパラメータセットと無関係である場合もあり、このような同一性のレベルは、しばしばソフトウェアに頼ることなく容易に評価できる。

【０１２９】

本明細書で使用される場合、薬学的に有効な薬剤には、それだけには限らないが、例えば、麻酔薬、血管収縮剤、分散剤ならびに小分子薬および治療用タンパク質を含む従来の治療用薬物を含む、任意の治療薬または生物活性剤が含まれる。

【０１３０】

50

本明細書で使用される場合、治療効果は、疾患もしくは状態の症状を変更する、通常、改善するもしくは回復させる、または疾患もしくは状態を治療する、対象の処置に起因する効果を意味する。

【0131】

本明細書で使用される場合、治療有効量または治療有効用量とは、少なくとも、対象への投与後に治療効果をもたらすのに十分である、薬剤、化合物、材料または化合物を含有する組成物の量を指す。したがって、疾患もしくは障害の症状を防止する、治療する、回復させる、停止するまたは部分的に停止するのに必要な量である。

【0132】

本明細書で使用される場合、治療効力とは、薬剤、化合物、材料または化合物を含有する組成物の、薬剤、化合物、材料または化合物を含有する組成物が投与されている対象において治療効果をもたらす能力を指す。

【0133】

本明細書で使用される場合、予防有効量または予防有効用量とは、対象へ投与された場合に、意図された予防効果、例えば、疾患もしくは症状の発症もしくは再発を防ぐこともしくは遅延すること、疾患もしくは症状の発症もしくは再発の確率を低減すること、またはウイルス感染の罹患率を低減することを有するであろう、薬剤、化合物、材料または化合物を含有する組成物の量を指す。完全予防効果は、1用量の投与によって必ずしも生じず、一連の用量の投与後にのみ生じる場合がある。したがって、予防有効量は、1回または複数の投与で投与される場合がある。

【0134】

本明細書で使用される場合、処置によって、例えば、医薬組成物または他の治療薬の投与によって特定の疾患または障害の症状を回復させることとは、永久的または一時的に関わらず、持続性または一過性に関わらず、組成物または治療薬の投与に起因し得る、またはそれと関連し得る症状の任意の軽減を指す。

【0135】

本明細書で使用される場合、抗がん剤とは、悪性細胞および組織に対して破壊性または毒性である任意の薬剤を指す。例えば、抗がん剤には、がん細胞を死滅させる、そうでなければ腫瘍もしくはがん細胞の増殖を阻害するもしくは損なう薬剤が含まれる。例示的抗がん剤として、化学療法薬がある。

【0136】

本明細書で使用される場合、遺伝子編集システムまたは技術は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）-CRISPR関連タンパク質9（Cas9）およびまた、ゲノムを編集するために使用される他のシステムおよび技術を含む。これらには、例えば、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）およびホーミングエンドヌクレアーゼまたはメガヌクレアーゼおよび他の「CRISPR様」およびCRISPR関連システム、例えば、Metagenomiによって開発されたシステムが含まれる。

【0137】

本明細書で使用される場合、治療活性とは、治療用ポリペプチドのインビボ活性を指す。一般に、治療活性とは、疾患または状態の処置と関連する活性である。

【0138】

本明細書で使用される場合、ワクチンとは、MEV、例えば、抗原（例えば、小ペプチド、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質）または抗原生成体分子（例えば、mRNA）がエキソロードされたMEVを含む組成物を指す。ワクチンを使用して、疾患を処置できる、または例えば、予防のために防止（疾患になるリスクを低減）できる。ワクチンは、介入のために、例えば、病原体、がん細胞、免疫チェックポイントおよび他の治療標的に対する体液性免疫応答または細胞性免疫応答またはそれらの組合せを誘発できる。

【0139】

本明細書で使用される場合、対象という用語は、哺乳動物、例えば、ヒトを含む動物を

10

20

30

40

50

指す。

【0140】

本明細書で使用される場合、患者とは、ヒト対象を指す。

【0141】

本明細書で使用される場合、動物には、任意の動物、例えば、それだけには限らないが、ヒト、ゴリラおよびサルを含む霊長類；げっ歯類、例えば、マウスおよびラット；家禽、例えば、ニワトリ；反芻動物、例えば、ヤギ、ウシ、シカおよびヒツジ；ならびにブタおよび他の動物が含まれる。非ヒト動物には、企図される動物としてヒトは含まれない。

【0142】

本明細書で使用される場合、組成物は、任意の混合物を指す。溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはそれらの任意の組合せであり得る。

【0143】

本明細書で使用される場合、組合せは、2つまたはそれより多い品目の間またはその中の任意の会合を指す。組合せは、2つまたはそれより多い別個の品目、例えば、2つの組成物または2つの収集物、それらの混合物、例えば、2つまたはそれより多い品目の単一混合物またはそれらの任意のバリエーションであり得る。組合せの要素は、一般に、機能的に関連しているまたは相関している。

【0144】

本明細書で使用される場合、併用療法とは、2種またはそれより多い異なる治療薬の投与を指す。異なる治療薬は、別個に、逐次、断続的に提供され、投与される場合があり、または単一組成物で提供される場合がある。

【0145】

本明細書で使用される場合、キットは、それだけには限らないが、活性化、投与、診断および生物活性または特性の評価を含む目的のために、他の要素、例えば、追加の試薬および組合せまたはその要素の使用のための説明書を含んでもよいパッケージ化された組合せである。

【0146】

本明細書で使用される場合、単位用量形態とは、当技術分野で公知のように、ヒトおよび動物対象に適した、個別にパッケージ化された物理的に別々の単位を指す。

【0147】

本明細書で使用される場合、単回投与形製剤とは、直接投与のための製剤を指す。

【0148】

本明細書で使用される場合、複数回用量製剤とは、治療薬のいくつかの単回用量を提供するように治療薬の複数回用量を含有し、直接投与できる製剤を指す。用量は、数分、数時間、数週間、数日または数ヶ月の過程にわたって投与できる。複数回用量製剤は用量調整、用量貯蔵および／または用量分割を可能にすることができる。複数回用量製剤は経時的に使用されるので、それらは一般に微生物の成長を防ぐために1つまたは複数の保存料を含有する。

【0149】

本明細書で使用される場合、製造品は、作製され、販売される生成物である。本出願を通じて使用されるように、この用語は、パッケージング物品中に含有される本明細書で提供される組成物のいずれも包含するように意図される。

【0150】

本明細書で使用される場合、流体とは、流れることができる任意の組成物を指す。したがって、流体は、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリームの形態である組成物および他のこのような組成物を包含する。

【0151】

本明細書で使用される場合、単離された、または精製されたポリペプチドまたはタンパク質（例えば、単離された抗体またはその抗原結合性断片）またはその生物学的に活性な部分（例えば、単離された抗原結合性断片）は、タンパク質が由来する細胞または組織か

10

20

30

40

50

らの細胞性材料もしくは他の混入タンパク質を実質的に含まない、または化学合成された場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。調製物は、それらがこのような純度を評価するために当業者によって使用される標準的な分析方法、例えば、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）によって決定されるような容易に検出可能な不純物を含まない、またはさらなる精製が物質の物理的および化学的特性、例えば、酵素活性および生物学的活性を検出可能に変更しないように十分に純粋であると見える場合に、実質的に含まないと決定され得る。実質的に化学的に純粋な化合物をもたらすための化合物の精製方法は、当業者に公知である。しかし、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物であり得る。このような場合には、さらなる精製は、化合物の特定の活性を増大する可能性がある。本明細書で使用される場合、細胞性抽出物または溶解物とは、溶解または破壊された細胞から作製される調製物または画分を指す。

10

【0152】

本明細書で使用される場合、対照とは、試験パラメータで処置されていない点を除いて試験試料と実質的に同一である試料を指し、または血漿試料である場合には、目的の状態に罹患していない正常ボランティアから得たものであり得る。対照はまた、内部対照である場合もある。

【0153】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」および「その（the）」は、文脈が別に明確に示さない限り複数の言及を含む。したがって、例えば、免疫グロブリンドメインを含むポリペプチドへの言及は、1つまたは複数の免疫グロブリンドメインを有するポリペプチドを含む。

20

【0154】

本明細書で使用される場合、「または」という用語は、代替物のみを指すように明確に示されない限り、または代替物が相互排他的でない限り、「および／または」を意味するように使用される。

【0155】

本明細書で使用される場合、範囲および量は、約特定の値または範囲として表され得る。「約」はまた、正確な量も含む。したがって、約5個のアミノ酸は、約5個のアミノ酸およびまた、5個のアミノ酸を意味する。

30

【0156】

本明細書で使用される場合、適宜のまたは適宜とは、その後に記載される事象または状況が生じる、または生じないことならびに記載が、前記事象または状況が生じる場合および生じない場合を含むことを意味する。例えば、適宜変異型の部分とは、部分が変異型または非変異型であることを意味する。

【0157】

本明細書で使用される場合、任意の保護基、アミノ酸および他の化合物の略語は、別に示されない限り、その一般的な利用、認識される略語またはIUPAC-IUB生化学命名委員会[Biochem. (1972) 11(9):1726-1732を参照されたい]に従う。

【0158】

本開示の明確性のために、限定のためではなく、詳細な説明は以下の小節に分けられる。

40

【0159】

B. 微細藻類および概説

藻類は、主に光合成生物の複雑な多系統的収集物である。これらの生物には、微視的および巨視的形態が含まれる。大型藻類（海藻）は、多細胞性の大きなサイズの藻類で、肉眼で目に見える。微細藻類は、顕微鏡的単細胞であり、原核生物（例えば、シアノバクテリア）および真核生物、例えば、緑藻類を含む。

【0160】

光合成作物と比較して、微細藻類は、より高い成長速度を有し、非耕作地で、またバイ

50

オリアクター中で栽培できる。微細藻類の多数の種を、制御された栽培条件下で工業的規模のフォトバイオリアクター中で年間を通じて増殖させることができる [Adamo et al. (2021) Journal of Extracellular Vesicles 10:e12081]。

【0161】

藻類は、一般に11の主要な門に分類される：藍色植物門 (Cyanophyta)、緑藻植物門 (Chlorophyta)、紅藻植物門 (Rhodophyta)、灰色植物門 (Glaucophyta)、ユーグレナ植物門 (Euglenophyta)、クロラクニオン植物門 (Chlorarachniophyta)、車軸藻植物門 (Charophyta)、クリプト植物門 (Cryptophyta)、ハプト植物門 (Haptophyta)、不等毛植物門 (Heterokontophyta) および渦鞭毛植物門 (Dinophyta) [Barkia et al. (2019) Mar. Drugs 17(5):304]

。各藻類群において異なる色素が生じる。シアノバクテリア (または藍色植物門) は、フィコビリントタンパク質 (光エネルギーを捕捉するタンパク質)、フィコシアニン、アロフィコシアニンおよびフィコエリトリンに加えて、クロロフィル-a、-d および -f を含有する。灰色藻 (Glaucophyte) は、クロロフィル-a を含有し、フィコビリントタンパク質を介して集光する。緑藻植物は、クロロフィル-a および -b ならびに β -カロテンを含むカロテノイドおよび種々のキサントフィル (例えば、アスタキサンチン、カンタキサンチン、ルテインおよびゼアキサンチン) を有する。紅藻植物門 (紅藻類) の主な色素は、フィコエリトリンおよびフィコシアニンであり、これはクロロフィル-a をマスクでき、紅藻類はまた、広範囲のカロテンおよびキサントフィル集光性色素を産生する [Barkia et al. (2019) Mar. Drugs 17(5):304]。

【0162】

動物および植物への外因的に負荷されたカーゴのデリバリーのために使用するための、藻類、特に、単細胞緑藻類、例えば、クロレラ属の種によって産生される細胞外小胞が本明細書で提供される。藻類は、通常、単数体であるが、生活環の2倍体段階を有する場合もある単細胞の真核生物である。藻類をバイオリアクター中で培養し、細胞外小胞をそれから単離できる。得られた細胞外小胞に、エレクトロポレーションなどの方法によってカーゴ、一般に、異種生物活性分子のカーゴを負荷して、動物への、およびまた植物への投与のための細胞外小胞を含有する組成物を生成することができる。組成物は、局所的、局所性、全身、非経口および経口を含む任意の所望の投与経路のために製剤化できる。これらの経路には、経口、静脈内、皮下、吸入、粘膜、直腸、腔内および他の適した経路が含まれる。カーゴは、生体分子、例えば、DNA、RNA、タンパク質、タンパク質複合体、タンパク質-核酸複合体、プラスミドを含み、また、小分子、例えば、小分子薬を含む。細胞外小胞は、液体、凍結乾燥散剤を含む散剤、錠剤、カプセル剤、エマルジョン、粒子、スプレー、ゲル、軟膏、クリームおよび他の製剤として製剤化できる。それらを治療的、診断的、セラグノスティック、美容的および他の使用のために使用できる。細胞外小胞を使用して、がん、炎症性疾患および免疫系が病因論または症状において役割を果たす状態、神経系障害ならびにウイルスおよび細菌および他の病原体を含む病原体感染症を含む、疾患および状態を処置できる。それらを使用して、皮膚科疾患および状態、肺疾患および状態ならびに胃疾患および状態を処置できる。細胞外小胞は、特定の臓器もしくは組織を標的化できる、または局所性に投与できる。

【0163】

哺乳動物EVなどの他の供給源由来の細胞外小胞 (EV) と同様に、微細藻類EV (MEV) は、遺伝物質および他の種類の分子を細胞から細胞へ効率的に受け渡すように進化した。それらは生物学的に活性な分子の交換を介して、細胞内および細胞間の界をまたぐコミュニケーションを組織化する。MEVは、天然のナノ粒子である。それらは細胞由来であり、そのため、合成カーゴおよび遺伝子改変が存在せず、合成構成成分がなく、それらは安全であり、例えば、ヒトにとって潜在的に危険である内因性ウイルスのリスクがない。

【0164】

10

20

30

40

50

本明細書で提供されるMEVは、クロレラ属、MEV、特に、クロレラ・ブルガリス、淡水性微細藻類を含む。クロレラ属は、細胞外小胞の天然の、効率的な生成体である単細胞の単数体藻類である。クロレラ・ブルガリスは、数十年間栄養補助食品として世界中で消費されており、非毒性、非免疫原性であり、大きな工業的規模で、低コストで培養できる。本明細書で提供されるMEVを直接的に使用して、広範囲の革新的な治療用分子を保護する、運搬する、特定の疾患と関連する標的細胞中に送達することができる。

【0165】

本明細書で示され、記載されるように、MEVは、例えば、投与経路による体内分布パターン、低い毒性、インビボでの良好な薬物動態プロファイルを含む、いくつかの有利な特徴を有する。それらは、他の経路の中でも経口投与、気道への投与、鼻腔内、静脈内を含むさまざまな経路によって投与できる。それらは、投与経路に従って、腸、GALT、脾臓、肺、肝臓および脳などの特定の臓器に輸送される。本明細書におけるデータならびに他のEVおよび他の薬物デリバリーシステムのデータとの比較に基づいて、MEVは、より長いクリアランス速度を有し、その結果、標的化された臓器、組織および細胞において、哺乳動物EVを含む他のデリバリーシステムについて報告されるものよりもインビボで長く持続する可能性がある。本明細書で示されるように、MEVは、天然の身体バリア（例えば、経口デリバリーまたは特定のリンパ組織デリバリーまたは鼻から脳へのデリバリー）を克服し、これは、液体のナノ粒子および哺乳動物起源のEVを用いた場合には達成されなかった。

【0166】

本明細書で提供されるMEVは、満たされていない必要性に対処する。これらは、治療薬がすでに存在するが適切に送達することができない疾患の処置のために、免疫系による、または酵素による治療薬の早期分解または不活性化を避けながら、処置の部位に特異的に治療用分子を運搬し、確実に送達する能力を含む。

【0167】

本明細書で示されるように、物理的方法（外因性負荷；エキソローディング）によって精製または部分精製されたMEVに負荷できる。エキソローディングは、拡張可能であり、工業化可能である。MEVには、サイズ、疎水性および性質が変動するさまざまな分子、例えば、それだけには限らないが、siRNA、mRNA、ペプチド、タンパク質、プラスミド、オリゴヌクレオチドおよび小分子をエキソロードできる。エキソロードされたカーゴの生物活性および／または特性は保たれ、同時に酵素およびインビボで存在する他の物質による分解から保護される。MEVは、そのカーゴを、無数の起源、例えば、微細藻類、細菌、高等植物、哺乳動物およびヒトのレシピエント細胞に送達できる。MEVはまた、カーゴを適切な細胞コンパートメントに送達して、複雑な生物学的経路を有するもの、例えば、中でもsiRNA、mRNA、受容体結合性ペプチドを含むカーゴ分子の適切な発現および生物活性を確実にできる。

【0168】

C. 細胞外小胞

細胞外小胞（EV）は、細胞間コミュニケーションにおいて役割を果たす、植物および動物細胞から放出される生体分子構造である。構造的に、EVは、負電荷を有する脂質二重層小胞であり、 $1.13 \sim 1.19 \text{ g/mL}$ の密度を有する。EVは、バリア、例えば、細胞（または細胞質）膜および血液／脳バリアを通過でき、ドナーからレシピエント細胞へのその機能的な内容物（すなわち、タンパク質、脂質、RNA分子および循環DNA）の水平移動を可能にする [Kuruvinnashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357]。EVはまた、種々の生物学的流体中で天然に安定であり、免疫学的に不活性であり、臓器特異的標的化能力を示すことができる [Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a]。

【0169】

EVは、内因性脂質、核酸およびタンパク質を含有する。単離技術およびデータの分析方法の変動のために結果は異なるが、EVは、一般に、細胞膜、サイトソールおよび脂質代

謝に關与するものと關連するタンパク質を含有する〔例えば、Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727を参照されたい〕。EVのバイオジェネシス（例えば、ESCRTの構成成分）、EV形成および放出（例えば、RAB27A、RAB11BおよびARF6）、シグナル形質導入および抗原提示に關与するタンパク質ならびにテトラスパニンは、一般に、EV中で生じる〔Abels and Breakefield (2016) Mol. Neurobiol. 36(3):301-312〕。EVは、コレステロール、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質およびホスファチジルセリンが豊富である〔Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357〕。研究によってEV中でゲノムおよびミトコンドリアDNAが同定されたが、EVは、微細藻類において生じるので、主に内因性（微細藻類にとって）小RNAが豊富である。研究によって、EV中でmRNA、miRNA、rRNA、長鎖および単鎖ノンコーディングRNA、tRNA断片、piwi結合RNA、ヴォールトRNPおよびY RNAが同定された。EV中に天然に生じるRNAのほとんどは、約200ヌクレオチド長（最大4kbの小部分を有する）であり、したがって、EV中では断片化されているが、環状RNAも濃縮され、安定であると示された。EV中のRNAは、脂質二重層による細胞外環境においてRNAアーゼ消化から保護されている〔Abels and Breakefield (2016) Mol. Neurobiol. 36(3):301-312〕。Exocarta、VesiclepediaおよびEVpediaデータベースは公的に利用可能であり、EV研究からの、EVのタンパク質、核酸および脂質含量（一般に、哺乳動物起源、例えば、ヒト起源のEV）ならびに使用される単離および精製手順に關するデータを提供する〔Abels and Breakefield (2016) Mol. Neurobiol. 36(3):301-312〕。

10

20

【0170】

EVは、いくつかの生理学的プロセスを媒介する、あるいは免疫応答の活性化と關連する種々の病状または疾患もしくは感染の広がりに影響を及ぼすために細胞によって使用され、また異種間コミュニケーションを構成し、あらゆる生命界に存在する。EVの供給源として、哺乳動物細胞、細菌、牛乳および植物が挙げられる〔Adamo et al. (2021) J. Extracell. Vesicles 10:e12081〕。植物および藻類はその細胞膜の外側に細胞壁を有し、これがEVの放出にとって物理的バリアである可能性があるが、植物および藻類はEVを放出する〔Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a〕。

30

【0171】

1. 細胞外小胞（EV）の種類

a. エキソソーム

EVの3つの主なサブタイプがある；それらは、バイオジェネシス、放出様式、サイズ、含量および機能に基づいて分類される：微小胞（MV）、エキソソームおよびアポトーシス小体〔Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727〕。エキソソームまたは腔内小胞（ILV）は、直径30～150nmであり、エンドソーム経路において多胞体（MVB）を介して放出される。エンドソーム経路では、初期エンドソームは細胞膜の内向き出芽によって形成され、後期エンドソームに変形する可能性があり、これが、エンドソーム膜の内向き出芽によってILVを蓄積する。いくつかの小さい小胞を含有する後期エンドソームは、MVBと呼ばれる。MVBは、リソソームと融合し、分解されるか、または細胞膜と融合してエキソソームとしてILVを細胞外間隙中に放出する。輸送に必要なエンドソーム選別複合体（ESCRT）経路は、MVB輸送とエキソソーム形成を調節し、エキソソームバイオジェネシスの主な推進力であると報告されているが、膜陥入を促進し得るスフィンゴ脂質セラミドまたはテトラスパニンファミリー中のタンパク質によって媒介されるものを含む、エキソソームバイオジェネシスの他の機序が存在する。ESCRTアクセサリタンパク質Alix、TSG101、HSC70およびHSP90βは、エキソソームマーカータンパク質と呼ばれることが多い〔Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727〕。

40

【0172】

50

エキソソームは、MVB境界膜の細胞膜との融合によって細胞外間隙中に放出される。Rab GTPアーゼ、ジアシルグリセロールキナーゼαおよびSNAREタンパク質を含むいくつかのタンパク質がエキソソームの放出に関与している [Abels and Breakefield (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):301-312]。

【0173】

エキソソームは、薬物デリバリーシステムの候補である：それらは長い循環半減期を有する；エキソソームは、ヒト身体によって許容され、細胞膜を透過でき、特定の細胞種を標的化できる；またそれらに遺伝物質、タンパク質または小分子を負荷できる [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

【0174】

b. 微小胞

微小胞 (MVまたはエクトソーム) は、細胞の細胞膜の外向き出芽またはピンチング (pinching) によって形成され、100nm~1μmの直径を有する。MVの形成には、細胞骨格構成成分、例えば、アクチンおよび微小管、分子モーター、例えば、キネシンおよびミオシンならびに融合機構、例えば、SNAREおよび繫留因子が関与する。ドナー細胞の生理学的状態および微小環境は、生成されるMVの数に影響を及ぼし、レシピエント細胞の生理学的状態および微小環境は、消費されるMVの数に影響を及ぼす。MVはまた、細胞質および細胞膜関連タンパク質、ならびに細胞骨格タンパク質、熱ショックタンパク質、インテグリンならびに翻訳後修飾を含有するタンパク質を含むいくつかのマーカートンパク質を有するが、MVをエキソソームと区別する公知の特異的マーカーはない。エキソソームと同様に、MVには、別の細胞へのデリバリーのためにカーゴ (例えば、タンパク質、核酸および脂質) を負荷し、それによって、レシピエント細胞の機能を変更することができる (Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727)。

【0175】

c. アポトーシス小体

アポトーシス小体は、死滅細胞によって細胞外間隙中に放出され、50nm~500nmの直径を有する。アポトーシス小体は、細胞が収縮した後の静水圧の増大によって細胞の細胞膜が細胞骨格から分離する際に形成される。エキソソームおよびMVとは異なり、アポトーシス小体は、無傷のオルガネラ、クロマチンおよび少量のグリコシル化タンパク質を含有する [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

【0176】

2. EVの取り込み

細胞は、細胞膜との融合によって、より一般的には、エンドサイトーシスによってEVを内部移行させる [Abels and Breakefield (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):301-312]。エンドサイトーシスによる取り込みは、いくつかの種類のエンドサイトーシスプロセスを介してである可能性があり、異なるプロセスが異なる細胞種において記載されている：ニューロンではクラスリン依存性エンドサイトーシスおよび食作用が、ミクログリアではマクロピノサイトーシスが、樹状細胞では食作用および受容体媒介性エンドサイトーシスが、上皮細胞ではカベオリン媒介性エンドサイトーシスが、腫瘍細胞ではコレステロールおよび脂質ラフト依存性エンドサイトーシスが記載されている。細胞膜上のヘパリン硫酸プロテオグリカン (HSPG) を、ヘパリンを用いてブロッキングすることによって、細胞培養物におけるEVの取り込みが低減され、スカベンジャー受容体B-1型 (SR-B1) をHDLの合成ナノ粒子ミミックを用いてブロッキングすることもそうであり、これは、EV取り込みにおけるHSPGおよびSR-B1の役割を示唆する [Abels and Breakefield (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):301-312]。

EVの細胞膜との融合もまた、取り込みの1つの方法であり、低pH条件を必要とし、pH感受性膜融合ペプチドのカチオン性脂質との組合せを用いるEVの処置は、エキソソームの細胞取り込みおよびエキソソーム内のカーゴの細胞質放出の増大をもたらした [Nakase and Futaki (2015) Sci. Rep. 5:10112]。低pH条件は、腫瘍において生じ [Abels and Breakefield (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):301-312]、

10

20

30

40

50

その結果、治療用ペイロードを腫瘍細胞に送達するためのEVは、細胞膜との融合を介して細胞に入ることができる。

【0177】

細胞と同様に、EVは、外側に細胞外受容体およびリガンドを、内側に細胞質タンパク質および核酸を有し、したがって、種々の方法で細胞とコミュニケーションをとる。EVは細胞表面に結合し、エンドサイトーシスを起こし、および／または細胞膜と融合し、細胞外間隙中にそのカーゴを放出する。EVカーゴは、エンドサイトーシスによって入る場合には、分解性経路から逃れなければならない、後期エンドソームがリソソームまたは細胞膜と融合することができるので、カーゴは、リソソームにおいて分解される、または細胞膜とのMVBの融合を介して再放出される前に出なくてはならない。mRNAおよびノンコーディングRNAを含むカーゴを含有するEVを、培養物中で、およびインビボでレシピエント細胞に移動させることができる [Abels and Breakefield (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):301-312; Maas et al. (2017) Trends Cell Biol. 27(3):172-188]。

10

【0178】

3. EVを単離するための一般的な方法

a. 超遠心

エキソソームを単離するために超遠心方法が使用され、代替方法も開発されている。エキソソームが単離される生物学的流体の複雑な性質、エキソソームと他の種類のEVの間の生理化学的および生化学的特性の重複およびエキソソーム間の不均一性のために、単離方法は、EVと細胞外間隙の他の構成成分の複雑な混合物をもたらす場合がある。分画超遠心は、細胞外マトリックスの大きな、高密度の粒子の最初の沈降に依存し、エキソソームの濃縮をもたらすが、細胞外間隙中の他の構成成分からのエキソソームの完全な分離をもたらすものではない。密度勾配遠心分離は、別の超遠心方法であり、遠心分離管中での密度勾配 [通常、スクロースまたはヨードキシノール (iodoxinol) で作製されている] の存在下でのサイズおよび密度による分離に基づいている。密度勾配遠心分離は、タンパク質凝集体および非膜性粒子からEVを効果的に分離するもののエキソソーム回収率が低い、分画超遠心を速度ゾーン遠心分離または等密度遠心分離などの密度勾配遠心分離の種類と組み合わせることによって純度を改善することができる [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

20

30

【0179】

b. サイズベースの技術

エキソソームを単離するためのいくつかのサイズベースの技術がある [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。限外濾過は、サイズおよびメンブレンの分子量カットオフに基づいて粒子を分離し、それによって、メンブレンの分子量カットオフよりも大きい粒子は保持され、メンブレンの分子量カットオフより小さい粒子は濾液中に通り抜け、しかし、フィルターが詰まるようになり、小胞が捕捉されるようになる場合には低い単離効率が生じる可能性がある。ExoMir (商標) キット (Bioo Scientific; テキサス州、オースティン) は、2つのメンブレン (200nmおよび20nm) がシリンジ中に配置されており、試料 (通常、遠心分離およびプロテイナーゼKで前処理された) がシリンジに通される市販のキットであり、大きな小胞は第1の200nmフィルター上に残存し、最小の小胞はシリンジを通され、廃棄され、20から200nmの間的小胞がシリンジ中の2つのフィルターの間に残存する。連続濾過はまた、エキソソームを単離するための一連の濾過工程に依存する [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

40

【0180】

エキソソームの超遠心方法 (超遠心から得られたエキソソームペレットが再懸濁され、SECを使用してさらに精製される) と並んで、よく使用されるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、SECを使用してタンパク質を分離することと類似している。SECでは、カラムに、小粒子が透過でき、したがって、大きな粒子の後に溶出できる多孔性

50

固定相が充填される。通常、SEC方法は、数時間の実行時間を必要とするが、qEVエキソソーム単離キット (iZON Science、ニュージーランド) によって、SECによる15分以内の迅速な、正確なエキソソーム単離が可能となる [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

【0181】

フローフィールドフロー分別 (FFFF) では、チャンバー中に注入された試料は、放物線状フローに垂直なフローであるクロスフローに加えて、チャンバーに押し下げられるときに放物線状フローに付されて、試料中の粒子が分離される。より大きな粒子は、クロスフローによってより影響を受け、より遅い放物線状フローを有するチャンバーの壁に向けて押され、より小さい粒子は中心に留まる。FFFFでは、より小さい粒子はより速く溶出し、より大きな粒子は遅い [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

10

【0182】

静水圧濾過透析 (HFD) では、静水圧によって試料が1000 kDaの分子量カットオフを有するメンブレンを備えた透析チューブに通される。結果は、小さい溶質はチューブを通過することができるが、エキソソームおよびEVを含むより大きな粒子は、チューブ中に留まり、例えば、超遠心を使用してさらに分離され得るということである [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

【0183】

c. 免疫親和性捕捉ベースの技術

免疫親和性捕捉ベースの技術は、エキソソームの表面上での抗原の発現に基づいてエキソソームを単離でき、特定の供給源に由来するエキソソームの単離を可能にする。これらの方法では、標的抗原に特異的な抗体をプレート (例えば、酵素結合免疫吸着測定法、ELISAにおいて)、磁性ビーズ (例えば、磁気-免疫沈降において)、樹脂および微小流体デバイスに付着することができ、次いで、これらの表面がエキソソーム試料に曝露され、その結果、抗原を発現するエキソソームが固定化される。このアッセイは、エキソソームを単離するためのタンパク質/抗原がエキソソームの表面で発現されることを必要とし、その特異性が、使用されている抗体の特異性によって制限され、その結果、単離されたエキソソームの収率は低いことが多いが、純度は高い。これらの方法はまた、EVの混合集団内のエキソソームを分離するために使用できる。免疫親和性捕捉ベースの技術は、超遠心または限外濾過後に使用されることが多い [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

20

30

【0184】

d. エキソソーム沈殿

エキソソームを沈殿させる方法には、ポリエチレングリコール (PEG) およびレクチンによる沈殿が含まれる。PEG沈殿では、PEGポリマーは、水分子を結び付け、エキソソームを含む他の粒子が溶液から沈殿することを可能にする。PEG沈殿は、迅速であり、溶液の出発体積に制限されないが、EVとともに他のEV、細胞外タンパク質およびタンパク質凝集体が沈殿されるので選択性を欠く。濾過および/または超遠心を使用する試料前処置は、エキソソーム収率を改善できる。沈殿を使用するエキソソームを単離するための市販のキットとして、例えば、ExoQuick (登録商標) キット (System Biosciences、カリフォルニア州、パロアルト) および総エキソソーム単離キット (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州、ウォルサム) が挙げられる。あるいは、レクチン沈殿を通常、超遠心後に使用でき、それによって、レクチンがエキソソームの表面上の炭水化物に結合し、その溶解度を変更し、溶液からのその沈殿につながる [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。

40

【0185】

e. 微小流体ベースの単離技術

微小流体ベースの技術は、その物理的および生化学的特性に同時に基づいてエキソソームを単離し、迅速で、効率的であり、小さい出発体積を必要とする。音響ナノフィルターでは、EVおよび他の細胞構成成分を含有するマトリックスが、チャンバー中に注入され

50

、超音波に曝露される。粒子は、そのサイズおよび密度に従って、波によって発揮される放射力に対して異なって応答し、大きな粒子は、より強い力を経験し、圧力ノードに向かってより迅速に移動する。免疫ベースの微小流体単離技術は、ELISAのものに類似しているが、ELISAとは異なり、エキソソームの事前の限外濾過または超遠心を必要としない [Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727]。微小流体技術を使用してエキソソームを単離するために、ExoChip [Kanwar et al. (2014) Lab Chip. 14(11):1891-1900] および ExoSearchチップ [Zhao et al. (2016) Lab Chip. 16(3):489-496] が開発されている。

【0186】

4. 微細藻類由来の細胞外小胞 (MEV)

微細藻類は、ナノ医療および他の分野において使用するためのEVの生成のための生物資源である。微細藻類からのEVの分泌の機序は、一次および運動性繊毛／鞭毛に関連して公知である [Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a]。クラミドモナス属 (Chlamydomonas) の鞭毛は、MVBを欠き、したがって、クラミドモナス属から排出された繊毛様EVは、エクトソームとして分類される。研究によって、緑藻植物コナミドリムシ (Chlamydomonas reinhardtii) の鞭毛および繊毛様先端からのエクトソームの排出が示されている。EVはまた、クラミドモナス属における繊毛の長さに沿って観察されている。膜出芽および繊毛様EV形成は、輸送に必要なエンドソーム選別複合体 (ESCRT) の構成成分によって媒介され、エンドソーム選別複合体はクラミドモナス属において単離された繊毛様移行帯、繊毛様膜および繊毛様EVにおいて見出され、膜屈曲のセンサーとして作用し得る。繊毛様EVの形成はまた、繊毛様膜輸送が破壊される場合または繊毛様再吸収の際に生じ得る [Wang and Barr (2018) Essays Biochem. 62(2):205-213]。クラミドモナス属由来の繊毛様エクトソームは、母細胞壁を消化し、娘細胞の放出に必要である溶解除酵素を含有する。鞭毛を有さないIf t88ヌル突然変異体は、母細胞から放出されることはできず、野生型細胞由来の繊毛様エクトソームの添加によって表現型がレスキューされたが、これは、EV生成における鞭毛および鞭毛内輸送 (IFT) 機構の役割を示唆する [Wang and Barr (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):449-457]。

【0187】

EVは、超遠心分離を使用して藻類細胞から抽出された [Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357]。この方法は、EVの単離のために十分に確率されている。手短には、藻類細胞を培養、培養した藻類細胞を収集し、遠心分離し、上清を収集し（さらに遠心分離し）、上清にスクロース溶液を添加し、スクロース溶液を含む藻類上清を超遠心し、スクロース溶液のために、高密度EVが超遠心分離管の底に沈み、ペレットを使用して収集することができる。抽出された藻類EVは、ナノ粒子トラッキング分析 (NTA) を使用してサイズおよび濃度で特性決定できる。この方法を使用する研究によって25~200 nmのサイズの範囲の、 $0.89 \times 10^8 \sim 0.94 \times 10^8$ 粒子/mLの濃度の緑藻類EVが単離された [Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357]。

【0188】

超遠心分離プロトコールはまた、種々の条件下で成長させた海洋微細藻類からEVを単離するために使用できる；NTAは、ナノ粒子が100から200 nmの間のサイズ分布を有することおよびタンパク質のウエスタンブロッティングによって、EVマーカーの存在が確認されたことを示した (VES4US, Extracellular vesicles from a natural source for tailor-made nanomaterials, 2020)。その後の研究によって、ナノアルゴソーム (nanoealgosomes) と呼ばれる海洋光合成微細藻類緑藻植物テトラセルミス・チュイイ (Tetraselmis chuii) から単離された微細藻類の小EV (sEV) が同定された。類似の結果が2つの他の微細藻類の種、緑藻植物のデュナリエラ・ターティオレクタ (Dunaliella tertiolecta) お

よび渦鞭毛藻類のアンフィディニウム属 (*Amphidinium*) の種のバッチ培養物から単離された sEV を使用して得られたので、ナノアルゴソームの生成は、微細藻類の株内で進化的に保存された形質である。ナノアルゴソームは、分画超遠心 (dUC) およびタンジェンシャルフロー濾過 (TFF) ならびに TFF または dUC によって小 EV について濃縮された試料をさらに精製するために使用された勾配超遠心を使用して単離された。単離されたナノアルゴソームは、他の供給源からの EV の特徴を共有すると示された。dUC および TFF からの EV 収率 (sEV タンパク質含量および sEV 数によって測定された) は、単離された EV の報告された数、およそ 10^9 EV 粒子 / μg EV タンパク質と一致していた。多角度動的光散乱 (DLS)、ナノ粒子トラッキング分析 (NTA)、蛍光ナノ粒子トラッキング分析 (F-NTA) および蛍光相関分光法 (FCS) を使用する粒子サイズの生物物理学的分析は、一貫したサイズ分布をもたらし、DLS (DLS モード) から最も頻繁に現れたサイズは、およそ 70 nm であった。1.15 ~ 1.19 g / mol の密度を有する哺乳動物細胞に由来するエキソソームと比較して、ナノアルゴソームは、1.13 g / mol のわずかに低い密度を有していた。電子顕微鏡により、ナノアルゴソームは、球状であり、サイズおよび形状が不均一であり、脂質二層構造を有することが示された。微小胞 (または大きな EV、LEV) および溶解物と比較して、sEV は 4 種の標的タンパク質バイオマーカー (Alix、エノラーゼ、HSP70 および β -アクチン) のうち 3 種について濃縮される。DLS 測定値は、ナノアルゴソームは pH の変化に対して耐性であり、ヒト血漿中で安定であることを示した。腫瘍原性 MDA-MB 231 乳がん細胞株、非腫瘍原性 1-7 HB2 細胞株およびヒト肝細胞がん Hep G2 細胞株は、ナノアルゴソーム処置後に細胞傷害性または遺伝毒性効果を示さなかった。さらに、ナノアルゴソームは、MDA-MB 231 および 1-7 HB2 細胞株によって成功裏に取り込まれた [Adamo et al. (2021) J. Extracell. Vesicles 10:e12081]。

10

20

30

40

50

【0189】

EV は、種々の微細藻類株から単離でき、微細藻類から単離された EV は、EV の重要な特徴を示す。主な微細藻類系統から 18 種の微細藻類株 [アンキストロデスムス属 (*Ankistrodesmus*) の種、ブラキオモナス属 (*Brachiomonas*) の種、コナミドリムシ、デュナリエラ・ターティオレクタ、テトラセルミス・チュイイ、クロロモナス属 (*Chloromonas*) の種、ロデラ・ビオラセア (*Rhodella violacea*)、キルクネリエラ属 (*Kirchneriella*) の種、クンショウモ属 (*Pediastrum*) の種、ナンノクロロプシス属 (*Nannochloropsis*) の種、シアノフォラ・パラドキサ (*Cyanophora paradoxa*)、クリプトモナス・ピレノイディフェラ (*Cryptomonas pyrenoidifera*)、ファエオダクチルム・トリコルヌツム (*Phaeodactylum tricornutum*)、ファエオタムニオン属 (*Phaeothamnion*) の種、ダイアクロネマ属 (*Diacronema*) の種、イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*)、スタウロネイス属 (*Stauroneis*) の種およびアンフィディニウム属 (*Amphidinium*) の種] を研究し、さまざまな特徴、例えば、塩水性および淡水性生息者、小さいおよび大きいサイズの細胞、コロニーおよび単細胞を有する株ならびに配列決定されたゲノムを有する種が含まれた。EV は、分画超遠心プロトコルを使用して単離し、国際細胞外小胞学会 [International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)] ガイドラインに従って特性決定し、試験したすべての株が培養培地中の EV の存在を示した。EV 生成微細藻類株は、EV タンパク質含量、EV タンパク質マーカー (例えば、Alix、Hsp70、エノラーゼおよび β -アクチン) の発現、総散乱シグナル (動的光散乱、DLS によって測定された) または総粒子数 (NTA によって測定された) および sEV 平均サイズおよびサイズ範囲に基づいて確立された。これらの有望な EV 生成株として、シアノフォラ・パラドキサ、テトラセルミス・チュイイ、アンフィディニウム属の種、ロデラ・ビオラセア、ダイアクロネマ属の種、デュナリエラ・ターティオレクタ、

ファエオダクチルム・トリコルヌツム、クンショウモ属の種およびファエオタムニオン属の種が挙げられる。具体的には、シアノフォラ・パラドキサのデータは、微細藻類コンディショニング培地 1 mL あたり約 2×10^9 sEV 粒子を示し、EV マーカーの最も強い陽性シグナルおよび植物由来小胞からのデータと一致する 130 ± 5 nm の様式のサイズ分布を有していた。細胞毒性および遺伝毒性研究によって、淡水性灰色藻であるシアノフォラ・パラドキサから単離された sEV は、腫瘍原性 MDA-MB 231 乳がんまたは C2C12 筋芽細胞株に対して、経時的にでも、種々の濃度でも毒性を示さず、sEV で処置された MDA-MB 231 細胞もまたアポトーシス事象と関連する形態学的な核の変化を示さなかったことが示された [Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a]。このような研究では、クロレラ属の種は考慮されなかった。

10

【0190】

EV はまた、細胞成長の異なる段階で、および異なる種類の非生物学的ストレス下で、コナミドリムシ (C. reinhardtii) から単離された EV における RNomic およびプロテオミクス解析も実施した Zhao らによって行われた研究において、シネコシステイス属 (Synechocystis) の種である PCC6803 (ラン藻)、コナミドリムシ (緑色微細藻類)、ユーグレナ・グラシリス (Euglena gracilis) (ミドリムシ植物 (euglenophyte)) およびヘマトコッカス・ブルビアリス (Haematococcus pluvialis) (緑藻植物) から単離されている [Zhao et al. (2020) doi:10.21203/rs.3.rs-38027/v1]。EV は分画超遠心および濾過を使用して単離され、再懸濁によって、エキソソームおよび小 MV の報告された直径と一致して直径 110~120 nm の粒子の小さい凝集塊を有する膜構造を含有すると示されたが、微細藻類の種間で直径の相違があった。具体的には、コナミドリムシ由来の EV は、37~710 nm の間の直径を有し、平均粒子径は 120.1 nm であった。シネコシステイス属由来の EV は、24~450 nm の間の直径を有し、平均粒子径は 94.68 nm であった。クラミドモナス属の細胞は、細胞壁の存在にもかかわらず、微細藻類細胞の内側での蛍光親油性色素で標識された EV の存在によって示されるように EV を取り込むことができた。したがって、微細藻類 EV は、レシピエント細胞によって吸収され得る。ノンコーディング RNA は、異なる成長段階および処置 (生物学的ストレス、窒素枯渇および窒素回復) で微細藻類 EV において検出され、プロテオミクス解析によって、微細藻類 EV において多数の鞭毛関連膜タンパク質が同定された [Zhao et al. (2020) doi:10.21203/rs.3.rs-38027/v1]。

20

30

【0191】

これらの研究は、微細藻類が EV を生成し、これを伝統的な方法を使用して単離でき、微細藻類由来 EV が、他の種から単離された EV と比較して、サイズおよび濃度が類似しており、類似のマーカーを示し、微細藻類から単離された EV が、インビトロで細胞傷害性または遺伝毒性効果を示さないことならびに微細藻類由来 EV が、細胞によって取り込まれ得ることを示す。

【0192】

哺乳動物起源の EV は、カーゴを標的細胞に送達でき、したがって、いくつかの疾患または状態の処置において使用するためのさまざまなカーゴのデリバリーのための治療的使用を有することが示されている。例えば、小分子、例えば、疎水性および親水性薬物をエキソソーム中に注入できる、または高分子タンパク質および核酸をエキソソーム中に埋め込むことができる。核酸は、目的の遺伝子をコードするものを含み得る。特定の標的化リガンド、イメージングプローブおよび共有結合性結合をエキソソーム表面に付着させ、NTA、蛍光を使用して、または生物発光によって追跡できる可能性がある。標的化細胞、組織または臓器へ目的の薬物を送達するために微細藻類 EV を使用できる可能性があるという刊行物における言及 [Kuruvinishetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357] 以外には、哺乳動物 EV について記載された使用を微細藻類由来細胞外小胞に適用できる、または微細藻類由来細胞外小胞のため

40

50

に開発できるという公開された証拠も技術的説明もない。

【0193】

しかし、本明細書において記載され、示されるように、藻類EVは、既存の薬物デリバリーシステム、例えば、間葉系幹細胞に由来するエキソソーム、金ナノ粒子、リポソームおよび他の植物-および動物-由来EVの使用を上回るいくつかの利点を有する。間葉系幹細胞は、よく使用されるエキソソームの供給源であり、間葉系幹細胞由来のエキソソームは、それらが、その小さいサイズ、固有の性質および生物学的バリアを通過する能力の結果として、増強された受動的標的化（血流中を循環するままであるように薬物担体システムを調製する方法）を有するので、薬物デリバリー、例えば、抗がんワクチンにおいて使用される。しかし、間葉系幹細胞は、エキソソームの分泌が制限されており、エキソソームの生成の規模拡大は、精製を最適化し、エキソソームの均一性を増大し効率的なトランスフェクション戦略を確立する必要があるために困難である。ナノ粒子は、毒性につながる可能性があり、ナノ粒子を合成するための現在の技術は、製造目的に合わせて拡張するその能力において制限されている。ナノ粒子およびリポソームベースの薬物デリバリー法も奇形腫（いくつかの異なる種類の組織から構成される腫瘍）の形成につながる可能性がある。リポソームベースの薬物デリバリー法は、エキソソームと比較して、特定の細胞、組織または臓器中への内部移行についてあまり効率的ではないとさらに示されている。植物由来EV、例えば、クルクミン、ショウガ、グレープフルーツおよびレモンに由来するものが薬物デリバリーのために使用されてきたが、その抽出プロセスおよび処置における使用は、まだ最適化されていない。農産物、例えば、果実およびミルクからのEVの生成は、経済的に实际的ではなく、どこでも数日以内に成長できる藻類EVと比較して、成長するために3~4ヶ月を必要とする。藻類EVは、マクロファージによる食作用または分解を回避し、インビボで長時間循環し、免疫原性が低い。藻類EVはまた、奇形腫形成のリスクが低い。したがって、藻類は、純粋な、高品質の十分に特性決定されたEVを得ることができる供給源を提供する [Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357]。Kuruvinashettiらは、EVの供給源としてのクロレラ属の種の使用も、供給源としてのその利点も記載していない。

【0194】

5. 緑藻類-クロレラ属の種

EVのこれまでの研究および考察のほとんどは、EVの供給源としてクロレラ属の種に焦点を当てておらず、評価していなかった。クロレラ属および結果として生じるEVは、他の種およびEVが提供しない、成長、操作および薬物の投与についての利点を有する。緑藻類は、緑藻植物門に属し、光合成真核生物の多様な群を包含する。緑藻類は、単細胞生物および多細胞生物を含む。クロレラ属に元々含まれている藻類は、淡水で最も広く分布し、頻繁に遭遇される藻類の1つである。これらの藻類は、水性環境中および陸上に存在する。それらは通常、小さく（直径約2~10 μm）、単細胞で、球状の形状で、非運動性であり、単一の葉緑体を含むし、一部は強固な細胞壁を有する [Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955]。

【0195】

分子解析によって、クロレラ属の種は2つの緑藻植物の綱：真のクロレラ属を含むトレボウクシア藻綱と、緑藻綱に分けられている。本明細書における使用には、クロレラ属の種は、食品補完物であり得る、もしくは食品補完物として使用される任意のもの、またはヒトもしくは他の動物、例えば、家畜によって消費され得る任意のものを含む。例示的な種として、それだけには限らないが、種：クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスが挙げられる。

【0196】

真のクロレラ属の種は、その強固な細胞壁の主要成分としてグルコサミンを特徴とする。ほとんどのクロレラ属の種は本来自由生活性であるが、トレボウクシオ藻類には、地衣

類、単細胞真核生物、植物、動物（イガイやヒドラなど）に生息する既知の緑藻類の内部共生生物のほとんどが含まれる。例えば、クロレラ・バリアビリス NC 6 4 A は、単細胞原生動物であるミドリゾウリムシ（*Paramecium bursaria*）の遺伝性光合成内部共生体（またはフォトバイオン）であり、NC 6 4 A はまた、淡水に生じる大きな二本鎖 DNA ウイルスのファミリーの宿主である [Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955]。

【0197】

a. 生活環

単細胞生物、例えば微細藻類では、生活環は、細胞周期と同一である。クロレラ属は、自家孢子形成によって無性生殖する単数体生物である。クロレラ・ブルガリスの細胞周期および増殖は、R i o b o o らによる 5 (6) - カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (C F S E) によって染色された藻類細胞のフローサイトメトリ分析を使用して調査されている。彼らの結果は、微細藻類について一般に記載されるように、C. ブルガリス母細胞の成長は、明期間の間に起こるが、細胞質分裂および娘細胞の放出は、暗期間の間に起こることを示す。C. ブルガリスはまた、96 時間の期間にわたって測定される細胞サイズ、細胞複雑性および明期間の間の自己蛍光の増大によって示される明確な明／暗周期を示す。娘細胞の 1 つのみのピークを示す C F S E 染色された C. ブルガリス細胞のモノパラメトリックヒストグラムは、各母細胞が 96 時間で 1 回のみの分裂周期を起こすことを示し、細胞質分裂は、暗期間の間に起こることがさらに示された。したがって、使用された C. ブルガリスの株は、3 つの生活環相：1) 母細胞の成長、2) 細胞分裂および 3) 娘細胞の放出を示す。C. ブルガリス細胞は、2 つの明期間の間に成長し、続く暗期間の間に分裂し始めた；母細胞が娘細胞のサイズの 2 倍となると、細胞分裂が生じる。さらに、除草剤テルブトリンに曝露された C. ブルガリス細胞は、分裂するために十分に大きい細胞サイズに到達するためにより長い成長期間を必要とする。これは、C. ブルガリスが増殖期を完了し、分裂相を開始するのに必要な重要な閾値サイズがあり、この重要な閾値が C. ブルガリス細胞周期の G 1 相の進行を制御し得ることを示唆する。最後に、この研究は、母細胞の C F S E 蛍光のピークの強度は、娘細胞のものよりも 4 倍大きいことを実証し、これは、各母細胞から 4 個の娘細胞が生成されることを示す。したがって、C. ブルガリス細胞は、第 1 の有糸分裂、続いて、細胞質分裂および次いで、2 つの他の同時有糸分裂を起こし、これが 4 個の娘細胞の放出をもたらす [R i o b o o et al. (2009) Aquat Toxicol 94(3):229-37]。

【0198】

b. クロレラ属の種のゲノム分析

クロレラ属の種は、非運動性であり、生殖周期を欠くと報告されているが、クロレラ・バリアビリス NC 6 4 A (NC 6 4 A) およびクロレラ・ブルガリス 2 1 1 / 1 1 P (2 1 1 / 1 1 P) のゲノム分析は、有性生殖および運動性に関与する遺伝子の存在を明らかにする [Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955; Cecchin et al. (2019) Plant J. 100(6):1289-1305]。NC 6 4 A 核ゲノム (G e n B a n k 受託番号 A D I C 0 0 0 0 0 0 0 0 . 1) は、46.2 Mb であり、12 の染色体から構成される。NC 6 4 A では、M C k 1 D M C 1 の減数分裂特異的タンパク質の投与量抑制因子、相同対形成タンパク質 H O P 1 および H O P 2、減数分裂組換えタンパク質 M E R 3、減数分裂核分裂タンパク質 M N D 1 および m u t S 相同体タンパク質 M S H 4 がコードされており、これらの遺伝子はまた、他の配列決定された緑藻植物藻類の種のほとんどにも存在する。配偶子細胞壁の分解を促進し、配偶子融合を可能にするクラミドモナス属のガメトリシン (g a m e t o l y s i n) タンパク質の 19 の相同体は、NC 6 4 A においても同定された。さらに、細胞融合に必須であるクラミドモナス属の G C S 1 タンパク質のオーソログが NC 6 4 A 中に存在する [Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955]。ガメトリシンをコードする遺伝子 (g 3 3 4 7) および推定 G C S 1 / H A P 2 機能を有するドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子に加えて、減数分裂に関与する主な遺伝子も、クロレラ・ブルガリス 2 1 1 / 1 1 P 40 Mb ゲノ

ム中に存在する (GenBank 受託番号 S I D B 0 0 0 0 0 0 0 0) [Cecchin et al. (2019) Plant J. 100(6):1289-1305]。したがって、クロレラ属の種は、単数体相でのみ観察されているが、減数分裂遺伝子の存在は、クロレラ属の生活環が 2 倍体相を含む可能性があることを示す。

【0199】

同様に、NC64Aでは鞭毛は観察されていないが、NC64Aゲノムにおいて、鞭毛内輸送 (IFT) タンパク質 IFT52、IFT57 および IFT88、キネシン-2 モータータンパク質 FLA8、キネシン関連タンパク質 KAP および軸系ダイニン外腕に關与するタンパク質のオーソログを含むクラミドモナス属の鞭毛タンパク質のオーソログが同定された [Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955]。

10

【0200】

3 種のクロレラ・ソロキニアナ株、株 1228、UTEX 1230 および DOE1412 の配列決定は、性-および鞭毛-関連遺伝子の存在を明らかにする [Hovde et al. (2018) Algal Research 35:449-461]。いくつかの他のクロレラ属の種のゲノムが配列決定されている: クロレラ・プロトセコイデス (*Chlorella protothecoides*) の種 0710 [Gao et al. (2014) BMC Genomics 15(1):582; GenBank 受託番号 A P J O 0 0 0 0 0 0 0 0]; クロレラ・ソロキニアナ UTEX 1602 (GenBank 受託番号 L H P G 0 0 0 0 0 0 0 0) およびクロレラ属の種の株 SAG 241.80 (ミクラクチニウム・コンダクトリックス (*Micractinium conductrix*); GenBank 受託番号 L H P F 0 0 0 0 0 0 0 0) [Arriola et al. (2018) Plant J. 93(3):566-586]; およびクロレラ・ブルガリス株 UTEX 395 [Guarnieri et al. (2018) Front. Bioeng. Biotechnol. 6:37; GenBank 受託番号 L D K B 0 0 0 0 0 0 0 0]、UMT-M1 [Teh et al. (2019) Data Brief 27:104680; GenBank 受託番号 V J N P 0 0 0 0 0 0 0 0]、UTEX 259 (GenBank 受託番号 V A T W 0 0 0 0 0 0 0 0) および NJ-7 [Wang et al. (2020) Mol. Biol. Evol. 37(3):849-863; GenBank 受託番号 V A T V 0 0 0 0 0 0 0 0]。

20

【0201】

c. クロレラ属の商業的および生物工学的使用

食品目的の微細藻類の商業的栽培は、1960年代に日本および台湾においてクロレラ・ブルガリスの生成で始まった。アルトロスピラ属 (*Arthrospira*) およびクロレラ属からの乾燥バイオマス製品は、高タンパク質含量、栄養価および健康上の利益の報告のために栄養補助食品に含まれている。例えば、クロレラ属抽出物は、コレステロールを低下させ、抗酸化、抗菌および抗腫瘍活性を有すると示されている。高収率のクロレラ属の生成は、日常的なものであり、本明細書で詳述されるように、MEVは細胞培養培地から単離できる。医薬品としてのその使用のために、ヒトではクロレラ属の経口摂取は非毒性であり、非免疫原性であることが知られている。

30

【0202】

クロレラ属は、バイオ燃料、CO₂を捕捉すること、高経済価値の分子を生成することまたは廃水から重金属を除去することを含む、さまざまなバイオテクノロジー適用において使用されてきた [Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955]。クロレラ属の種は、環境攪乱に応じて代謝柔軟性を示し、成長のために廃水から直接的に栄養素、例えば、有機炭素およびミネラルを使用可能である。微細藻類の中でも、クロレラ属の種は、他の光合成生物を上回って高い光合成効率を有する。さらに、クロレラ・ブルガリスは、独立栄養性、従属栄養性または混合栄養性条件のいずれかで成長できる (Zuniga et al. (2016) Plant Physiol. 172(1):589-602)。

40

【0203】

クロレラ属の種はまた、アグロバクテリウム媒介性形質転換によって遺伝的に改変できる。Charaによる研究によって、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の株 LBA4404 を使用してクロレラ・

50

ブルガリスを遺伝的に形質転換する方法が開発され、野生型非感染クロレラ属と比較して、トランスジェニック株の30%における遺伝子断片の存在が、クロレラ属ゲノム中にT-DNAが組み込まれたことを示す [Cha et al. (2012) World J. Microbiol. Biotechnol. 28:1771-1779]。

【0204】

d. クロレラ属MEV

本明細書において記載されるように、クロレラ属の種、例えば、C. ブルガリスは、治療的、診断的および美容的使用を含む多数の適用のために生体分子および小分子のデリバリーのための使用のための、本明細書においてMEVと呼ばれるEVの生成にとって有利な種である。本明細書において特に興味深いものとして、クロレラ属の種によって生成されたMEVがある。クロレラ属のEVは、生体分子生成物または小分子薬または診断薬の外因性負荷のためのMEVの供給源として利用されていなかった。クロレラ属は、このような適用のためのEVの供給源として、多数の利点を提供する。クロレラ属は単数体生物であり、これは特異的な、標的化された変異体は、遺伝子工学によって生成できる、生物学的に活性な分子および小分子を生成または含有するように、容易に遺伝的に改変または負荷できることを意味する。コードされる生成物の安定な生成体を含む、安定な細胞株を生成できる。それらは定義された生成物であり、外因的に負荷された場合に、結果として生じる組成物は、同一カーゴを含有するEVを含有する。

【0205】

詳細な遺伝地図を得ることができ、遺伝子型と表現型の間の相関関係を確立することができる。クロレラ属ゲノムは十分に配列決定されているため、種々の遺伝子の構造および機能を知ることができる。系統学的に、クロレラ属は、高等植物と微細藻類間のまさに交差点にある。そのようなものとして、クロレラ属は、相当な（および有用な）数の分子生物学的および代謝的特徴を高等植物と共有するが、依然として、単細胞の単数体微細藻類である。真核生物と共有される分子生物学的特徴の例示的なものとして、外因性RNAをsiRNAにプロセッシングするダイサー酵素システムを含む細胞内機構がある。クロレラ属は、哺乳動物および他の動物細胞とは異なり独立栄養性であり、したがって、栄養素または動物起源の因子を必要とすることなく培養および複製できる。

【0206】

治療薬としてのそのEVの使用に関して、クロレラ属の種は、毒性ではない。例えば、クロレラ・ブルガリスバイオマスから製造された錠剤（すなわち、圧縮された全クロレラ属細胞）は、毒性または免疫原性に関連する制約を伴わずに、栄養補助食品として世界中の人々によって長年にわたって定期的に消費されてきた。日本は、クロレラ属バイオマスの消費において世界のリーダーである。例えば、日本では、免疫モジュレーション特性および称されている抗がん活性を有すると示されているので医学的処置のために、抗老化適用、例えば、心血管疾患、高血圧症および白内障のために使用するためにも使用され、アテローム性動脈硬化症のリスクを低減し、皮膚のコラーゲンの合成を刺激する。

【0207】

クロレラ属細胞は、より知られているEV（例えば、哺乳動物EV）の「標準仕様書」に依拠する細胞外小胞（EV）を天然に生成する。植物起源のEVは、それによってヒトにおいて薬物デリバリーシステムとして使用するために合成ナノ粒子または半合成EVよりも有望に／好都合になる、いくつかの特徴を有する。これらには、例えば、より高い安定性、より低い毒性およびより低い免疫原性が含まれる。クロレラ属は植物と限りなく近いので、植物EVと類似の特徴を有するEVの供給源を提供する。同時に、クロレラ属の大規模での大量生産は、高等植物よりも容易で、安価である。クロレラ属における膜タンパク質のグリコシル化パターンは、高等植物において存在するグリコシル化パターンと類似している／同一である。

【0208】

D. 外因的に負荷された微細藻類細胞外小胞（MEV）、カーゴおよび標的

標的およびカーゴ（以下の考察を参照されたい）は、当業者に公知のいずれをも含む。

【0209】

1. MEVの単離

単離の方法は、上記の節で論じられており、実施例において詳述されている。

【0210】

2. MEV負荷およびカーゴ

MEVに、それだけには限らないが、例えば、RNAi、プラスミド、アンチセンス核酸、RNAiまたはアンチセンス核酸をコードする核酸を含む核酸分子、検出可能なマーカータンパク質およびタグ、小分子薬、遺伝子編集システムおよび他のものならびにそれらの組合せを含む任意の所望のカーゴ（ペイロードとも呼ばれる）を負荷できる。MEVは、治療用分子を送達でき、ワクチンとして働くことができ、ヒトおよび他の動物の健康、農業的適用、デリバリー遺伝子、遺伝子編集システムを用いる遺伝子の改変および遺伝子サイレンシング核酸を含む遺伝子療法適用、美容的適用、皮膚科学適用、診断的適用、工業的使用および他のものにおいて使用できる。MEVは、栄養素または有益な生成物を産生するための遺伝子経路の制御因子を送達でき、遺伝子編集システム、例えば、CRISPR/Casを送達するために、遺伝子編集を達成するために使用できる。MEVは、遺伝子療法ベクター、例えば、それだけには限らないが、アデノ随伴（AAV）ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルス由来ベクターおよびその他のものおよび生成物を送達するために使用できる。

10

【0211】

処置できる疾患および状態には、それだけには限らないが、心血管疾患、代謝性疾患、呼吸器感染症、膀胱感染症および他の尿路感染症、ウイルス疾患、例えば、肝炎、HIV、SARS-CoV-2を含むコロナウイルスを含む感染性疾患を含む感染症、CNS疾患、眼性疾患および肝臓疾患を含む当業者に公知の任意のものが含まれる。論じられたように、送達されたカーゴは、タンパク質生成物、例えば、抗体およびその抗原結合性形態、RNA産物、例えば、それだけには限らないが、siRNA、miRNA（マイクロRNA）、lncRNA（長鎖ノンコーディングRNA）、saRNA（低分子活性化RNA）、shRNAおよびmRNA、生成物をコードする核酸、例えば、プラスミド、核酸生成物、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするDNAおよびまたアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび小分子薬を含む。

20

【0212】

MEVは、レポーター遺伝子およびタンパク質および他の検出可能な生成物、例えば、蛍光タンパク質、例えば、それだけには限らないが、高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP；配列番号10）、ルシフェラーゼ遺伝子（配列番号11）、luxA（配列番号8）、luxB（配列番号9）およびluxオペロン（luxCDABEおよびluxABCDE；配列番号12）などを含むカーゴを保有し得る。

30

【0213】

他のカーゴは、疾患に関与する遺伝子または産物、例えば、それだけには限らないが、ペプチジルプロリルシーストランソメラーゼFKBP4またはFKBP52（配列番号1）；ガンマーアミノ酪酸B型受容体サブユニット1（GABBR1；配列番号3）；がん遺伝子、例えば、MYCNまたはNMYC（配列番号38）、RAS（H-RAS、N-RASおよびK-RAS；それぞれ配列番号39、40および41を参照されたい）、BCL2（配列番号43）およびPLK1（配列番号44）を標的化できる。疾患に関与する遺伝子、例えば、がん遺伝子およびチェックポイントは、遺伝子の発現を阻害する、もしくはアゴナイズする産物をコードする、または遺伝子産物を阻害する、もしくはアゴナイズするカーゴによってモジュレートされ得る。このようなモジュレーターの例示的なものとして、RNAi、例えば、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、ペプチドおよび／またはテトラトリコペプチドなどがある。例えば、EGFP（配列番号5および6）、ホタルルシフェラーゼ（配列番号7）、MYCN（配列番号13～19）、RAS（配列番号20～27）、BCL2（配列番号29～31）およびPLK1（配列番号32～35）を標的化するsiRNAおよびA

40

50

S OならびにMYCおよびBCL2を標的化するマイクロRNA-34A（配列番号28）が、本明細書で例示されている。

【0214】

s iRNAおよびマイクロRNAを含むRNA干渉を使用する遺伝子サイレンシングを使用して、発生遺伝子、例えば、接着分子、サイクリンキナーゼ阻害剤、Wntファミリーメンバー、Paxファミリーメンバー、ウィングドヘリックスファミリーメンバー、Hoxファミリーメンバー、サイトカイン／リンホカインおよびその受容体、成長／分化因子およびその受容体ならびに神経伝達物質およびその受容体、がん遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、酵素、病的状態と関連する遺伝子、自己免疫疾患と関連する遺伝子、抗血管新生遺伝子、血管新生遺伝子、免疫モジュレーター遺伝子、アルコール代謝および肝臓機能と関連する遺伝子、神経学的疾患と関連する遺伝子、腫瘍形成もしくは細胞形質転換と関連する遺伝子、ならびに代謝性疾患および障害と関連する遺伝子などをサイレンシングできる（例えば、WO2009/082606、JP2014-240428A、WO2011/072292A2、WO2010/141724およびWO2020/097540を参照されたい）。これらの種類の生成物はMEV中に送達されて、またはMEVにおいてコードされて、遺伝子または経路を活性化できる、または治療的效果を提供できる。ある特定のサイトカインを使用して、免疫抑制が役割を果たす、疾患／障害、例えば、ある特定のがんを処置できる。

10

【0215】

また、細胞外小胞およびエキソソームを使用して、治療薬、例えば、核酸、例えば、マイクロRNA、mRNA、tRNA、rRNA、s iRNA、調節RNA、ノンコーディングおよびコーディングRNA、DNA断片およびDNAプラスミドを（例えば、CN105821081AおよびCN110699382Aを参照されたい）、検出可能な部分もしくは毒素を含む、またはそれぞれ転写もしくは翻訳を破壊するヌクレオチドまたはアミノ酸を、ポリペプチド（例えば、酵素）を、脂質を、炭水化物を、ならびに小分子（例えば、小分子薬および毒素）を移動できる（米国特許第10,195,290号を参照されたい）。核酸カーゴについて、核酸カーゴ分子によってコードされ得るタンパク質の限定されない例として、それだけには限らないが、抗体、イントラボディ、単鎖可変断片、アフイボディ、酵素、トランスポーター、腫瘍抑制因子、ウイルスもしくは細菌阻害剤、細胞成分タンパク質、DNAおよび／またはRNA結合性タンパク質、DNA修復阻害剤、ヌクレアーゼ、プロテイナーゼ、インテグラーゼ、転写因子、増殖因子、アポトーシス阻害剤および誘導因子、毒素、構造タンパク質、神経栄養因子、膜トランスポーター、ヌクレオチド結合性タンパク質、熱ショックタンパク質、CRISPR関連タンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、カスパーゼおよびそれらの任意の組合せおよび／または誘導體（例えば、AU2018365299を参照されたい）が挙げられる。

20

30

【0216】

例えば、以下の表にまとめられるように、配列の3'末端に2つのチミジン残基（dTdT）を有するヒトMYCNを標的化する3種のs iRNAオリゴヌクレオチドのカクテル[B-Bridge International Inc.（カリフォルニア州、サニーベール）から購入した]を使用できる。抗MYCN s iRNA（s iMYCN）および陰性対照s iRNA（非標的対照プール）（s iNeg）（ON-TARGETplus s iRNAの両方、Dharmacon、英国、ケンブリッジ）を使用した[参考文献1（Nara et al. (2007) Int. J. Oncol. 30(5):1189-1196）を参照されたい]。s iRNAの例示的標的がん遺伝子および例示的配列は、以下の表に提供されている。

40

【0217】

標的がん遺伝子	配列の種類	配列(複数可)	配列番号
¹ MYCN	siRNA カクテル	siMYCN-1:センス 5'-CGGAGATGCTGCTTGAGAA-3' siMYCN-2:センス 5'-CGGAGTTGGTAAAGAATGA-3' siMYCN-3:センス 5'-CAGCAGTTGCTAAAGAAAA-3'	90 91 92
² MYCN	siRNA	センス 5'-CAGCAGUUGCUAAAAGAAAAUU-3' アンチセンス 5'-UUUUCUUUAGCAACUGCUGUU-3'	93 94
³ MYCN	siRNA	5'-UGAUCUGCAAGAACCCAGA-3'	95
⁴ MYCN	ASO	5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'	96
⁵ RAS	合成 miRNA	Syn-miR-143s 1 番:野生型 S 3'-GGUCUCUACGUCGUGACGUGGAGU-5' AS 5'-UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGG-3' 12 番: F/Ome 型 S 3'- GGUCUCUACGUCGUGACGUGGAGU-5' AS 5'-U [^] G [^] AGAUGAAGCACUGUAGCUCA [^] dT [^] dT-3' キー: N (イタリック体の): 2'-F RNA N (太字): 2'-Ome RNA N (通常のフォント): RNA ^:PS N (下線が引かれた): ミスマッチ	97 98 97 99
⁶ RAS	siRNA	siR-KRAS: 5'-AAUGCAUGA CAACACUGGAUGACCG-3' siR-HRAS: 5'-CCAUCACGUGAUCCAGAACCAUUU-3'	100 101
⁷ RAS	siRNA	GGACUCUGAAGAUGUACCUAGGUACAUCUUCAGAGUCC	102
⁸ 突然変異した K-RAS	ASO	5'-CTACGCCACAAGCTCCA-3'	103
⁹ MYC, BCL2	miRNA	ヒト(Homo sapiens)マイクロ RNA 34a (MIR34A)、 マイクロ RNA	28
¹⁰ BCL2	3p-siRNA	センス GCAUGCGGCCUCUGUUUGA アンチセンス CGUACGCCGGAGACAAACU	104 105
¹¹ BCL2	ASO	TCT CCC AGC GTG CGC CAT	106
¹² PLK1	改変 siRNA	センス: 5'-AGA UCA CCC UCC UUA AAU AUU-3' アンチセンス: 5'-UAU UUA AGG AGG GUG AUC UUU-3' 注記: 太字で 2'-O-メチル化改変ヌクレオチド	107 108
¹³ PLK1	siRNA	5'-AAGGGCGGCCUUUGCCAAGUGC-3'	109
¹⁴ PLK1	ASO	P12: ACC AGT CCG GAG GGG AGG GC	110

10

20

30

40

50

- 1 Nara et al. (2007) Int. J. Oncol. 30(5):1189-1196; Silencing of MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification
- 2 Maeshima et al. (2020) Nucleic Acid Ther. 30(4):237-248; MYCN Silencing by RNAi Induces Neurogenesis and Suppresses Proliferation in Models of Neuroblastoma with Resistance to Retinoic Acid
- 3 Veas-Perez de Tudela et al. (2010) J. Neurochem. 113(4):819-825; Human neuroblastoma cells with MYCN amplification are selectively resistant to oxidative stress by transcriptionally up-regulating glutamate cysteine ligase
- 4 Watson et al. (1991) Cancer Res. 51(15):3996-4000; Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer
- 5 Yoshikawa et al. (2019) Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 13:290-302; Anti-cancer Effects of a Chemically Modified miR-143 on Bladder Cancer by Either Systemic or Intravesical Treatment
- 6 Tsujino et al. (2019) Cancer Sci. 110(7):2189-2199; MicroRNA-143/Musashi-2/KRAS cascade contributes positively to carcinogenesis in human bladder cancer

- 7 Tirella et al. (2019) Int. J. Pharm. 561:114-123; CD44 targeted delivery of siRNA by using HA-decorated nanotechnologies for KRAS silencing in cancer treatment
- 8 Nakada et al. (2001) Pancreatology 1(4):314-319; Antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines
- 9 Adams et al. (2015) Expert Opin. Ther. Targets 20(6):737-753; The Tumor-Suppressive and Potential Therapeutic Functions of miR-34a in Epithelial Carcinomas
- 10 Poeck et al. (2008) Nat. Med. 14(11):1256-1263; 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma
- 11 Szegedi et al. (2008) Pathol. Oncol. Res. 14(3):275-279; Bcl-2 Antisense Oligonucleotide Inhibits the Proliferation of Childhood Leukemia/lymphoma Cells of the B-cell Lineage
- 12 Ripoll et al. (2018) RSC Adv. 8:20758-20763; Co-delivery of anti-PLK-1 siRNA and camptothecin by nanometric polydiacetylenic micelles results in a synergistic cell killing
- 13 Liu et al. (2012) BMC Cancer 12:519; MicroRNA-100 is a potential molecular marker of non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting polo-like kinase 1
- 14 Spankuch et al. (2008) Neoplasia 10(3):223-234; Downregulation of Plk1 expression by receptor-mediated uptake of antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles

10

20

30

40

50

【0218】

カーゴ生物活性分子は、中枢神経系疾患、例えば、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病を標的化できる。このようなものの例示的なものとして、FKBP52およびそれからのテトラトリコペプチド誘導体がある。ヒトペプチジルプロリルシーストランスイソメラーゼFKBP4の全配列は、（配列番号1）である：

MTAEEMKATESGAQSAPLPMEGVDISPKQDEGV LKVIKREGTGTEMPMIGDRV FVH
YTGW
LLDGTKFDSSLDRKDKFSFDLGKG EVIKAWDIAIATMKVGEVCHITCKPEYAYGSAGS
PP
KIPPNATLVFEVELFEFKGEDLTEEEDGGIIRRIQTRGEGYAKPNEGAIVEVALEGGYK
D
KLFDQRELRF EIGEGENLDLPYGLERAIQRMEKGEHSIVYLKPSYAFGSVGKEKFQIP
PN
AELKYELHLKSFEKAKESWEMNSEEKLEQSTIVKERGT VYFKEGKYKQALLQYKKIV
SWL
EYESSFSNEEAQKAQALRLASHNLAMCHLKLQAFSAAIESCNKALELDSNNEKGLF
RRG
EAHLAVNDFELARADFQKVLQLYPNNKAAKTQLAVCQQRIRRLAREKKLYANMF E
RLAE
EENKAKAEASSGDHPTDTEMKEEQKSNTAGSQSQVETEA

【0219】

テトラトリコペプチドリピート（TPR）ドメイン260～400は、（配列番号2）である：

MNSEEKLEQSTIVKERGT VYFKEGKYKQALLQYKKIVSWLEYESSFSNEEAQKAQAL
RLA
SHNLAMCHLKLQAFSAAIESCNKALELDSNNEKGLFRRGEAHLAVNDFELARADFQ
KVL

QLYPNNKAAKTQLAVCQQR I

【0220】

パリ第11大学国立健康医学研究所 (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, Universite Paris XI) からのグループによって比較的簡単なインビトロモデルが開発され、その研究が記載された [Chambraud et al. (2007) FASEB J. 21(11):2787-97; および Chambraud et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(6):2658-63を参照されたい]。RNAi 1 および RNAi 2 と名付けられた、ラット FKBP52 に特異的な2つの異なる低分子干渉RNA (siRNA) 二本鎖を導入することによって、PC12 培養細胞における FKBP52 の枯渇の効果を調べた。siRNA のセンス配列および RNAi 1 に対応するスクランブル配列を有するオリゴヌクレオチド二本鎖を陰性対照として使用した。これらの実験では、ウエスタンブロットによって分析された FKBP52 のレベルは、48時間後で実質的に低減され、トランスフェクションの72時間後で低いままであった。トランスフェクションの72時間後にチューブリンおよび FKBP52 染色を実施した。RNAi 1 または2でトランスフェクトされた細胞では、FKBP52 染色は、対照細胞において観察されたものよりも有意に低く、チューブリン染色は、PC12 細胞表現型の変化を明らかにし、特に、PC12 細胞における FKBP52 の喪失の結果、これらの細胞は伸長を形成した。したがって、これらの細胞は、NGF で処置された PC12 細胞と比較され得る、分化した表現型を獲得した。対照でトランスフェクトされた細胞では、有意な変化は観察できなかった。別の研究において、Chambraud ら (上記で引用された、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) が、FKBP52 が、PC12 細胞においてタウ蓄積および神経突起成長を防ぐことを報告している。テトラサイクリン応答性エレメントに基づく、FKBP52 誘導可能発現システムを使用した。このシステムによって、FKBP52 の細胞性役割を決定するための安定に形質転換された PC12 細胞株の作製が可能となる。陽性に試験されたクローンの中で、1つのクローン、いわゆる H7C2 が選択され、PC12 細胞に対する FKBP52 過剰発現の効果を研究するために、FKBP52 とタウの間の関係をさらに調査するために使用された。基本条件下で、H7C2 細胞は、内因性 FKBP52 を発現し、ドキシサイクリン (Dox) を用いる処置の結果、組換え FKBP52 タンパク質発現が著しく増大した。H7C2 細胞における FKBP52 誘導は、Dox 処置の5日後に約4倍であった。次いで、タウの蓄積に対する FKBP52 の効果が調べられた。タウタンパク質の量は、Dox とともに、または伴わずに神経増殖因子 (NGF) (50 nM) を用いて5日間処置した、または処置していない、PC12 細胞または H7C2 細胞いずれかの培養物からの抽出物のウエスタンブロッティングによって決定された。PC12 細胞では、FKBP52 発現は NGF での処置後に変化しなかった。予測されたように、PC12 および H7C2 細胞の両方において、NGF 処置後にタウの増大が観察された。H7C2 細胞が、FKBP52 を過剰発現するように NGF に加えて Dox に曝露された場合には、タウタンパク質の追加の蓄積は生じなかった。NGF および Dox で処置された PC12 細胞では、タウタンパク質の増大が依然として観察され、Dox がタウの減少の欠如の原因である可能性は除外された。この報告は、FKBP52 は PC12 細胞において NGF によって誘導されるタウの蓄積を防ぐと結論付けている。

【0221】

タウの1つの役割が神経突起成長を刺激することであるので、PC12 および H7C2 細胞における神経突起長に対する FKBP52 過剰発現の結果も調査された。H7C2 細胞では、Dox を用いて1週間処置されたか否かに関わらず、NGF の不在下で神経突起成長は観察されなかった。50 nM の NGF および Dox を用いて処置された H7C2 細胞では、対照 (Dox で処置されていない H7C2) と比較して神経突起長の40% (±7) の低下が観察された。10 または 20 nM の NGF で処置された H7C2 細胞において、神経突起長に対する Dox の同一の効果が観察された。Dox 処置および未処置 PC12 細胞の間で神経突起長の相違が観察されなかったため、Dox はそれ自体、神経突起

成長のプロセスに関与していなかった。FKBP52過剰発現に起因する神経突起成長の阻害は、PC12細胞におけるFKBP52の喪失の結果、神経突起伸長が形成されることを示すChambraudからの以前の報告と一致している。神経突起長に対するFKBP52効果は、タウがFKBP52へ結合し、タウを微小管から除去することによって説明できる可能性がある。FKBP52の過剰発現によってタウ蓄積を防ぐことは、神経突起長の減少と一致し、タウ機能におけるこのイムノフィリンの潜在的な役割を示唆する。したがって、タウの蓄積を防ぐことによるアルツハイマー病の処置のために、上記の標的および配列をMEV中で送達できる、またはコードできる。

【0222】

レポーター遺伝子、レポータータンパク質および／またはそのモジュレーターを、MEV中で送達できる。

【0223】

レポータータンパク質

各マーカー遺伝子、例えば、GFPタンパク質、真核生物のルシフェラーゼまたは原核生物のルシフェラーゼをモジュレート（阻害または刺激）するための、siRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、ペプチドおよび／またはテトラトリコペプチドの形態の標的配列、例えば、Luxオペロン（luxCDAE）およびluxオペロン（luxABCDE）を、例えば、診断法および遺伝子発現評価（それぞれ配列番号5～6、7および62～65）のために使用できる：

【0224】

標的 遺伝子	配列の 種類	配列(複数可)	配列番号
EGFP	siRNA	センス: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAUUU-3'	5
		アンチセンス: 5'-	6
		AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG-3'	
ホタルル シフェラ ーゼ	shRNA	5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'	7
luxA (Lux オペ ロン)	siRNA	センス: 5'-CAAACAGAGGUAAUGAAAUGGUUG-3'	62
		アンチセンス: 3'-	63
		CAACCAUUUCAUUACCUCUGUUUG-5'	
luxB (Lux オペ ロン)	siRNA	センス: 5'-AUGUUAAGUUGAAUAAGUUCUGCA-3'	64
		アンチセンス: 3'-	65
		UGCUCUUGAAUAAGUUGAAUUGAU-5'	

【0225】

他の例示的カーゴは、それだけには限らないが、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド〔商標シトキサン（登録商標）の下で入手可能〕；アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタンおよびテストラクトン；抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタンおよびトリロスタン；抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、リユープロリドおよびゴセレリン；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カルピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-1-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルピシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベ

ルシジン、ウベニメクス、ジノスタチンおよびゾルピシン；例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、4（5）-イミダゾールを阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン（trioxifene）、ケオキシフェン（keoxifene）、LY 117018、オナプリストンおよびトレミフェン〔フェアストン（登録商標）〕を含む抗エストロゲン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロウテリンおよびトリメトトレキセート；アジリジン、例えば、ベンゾデパ、カルボコン、メツレデパおよびウレデパ；エチレンイミンならびにアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミンを含むメチルメラミン；葉酸補給剤、例えば、フォリン酸；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン、トロホスファミドおよびウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチン；白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；タンパク質、例えば、アルギニンデイミナーゼおよびアスパラギナーゼ；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリンおよびチオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU；タキサン、例えば、パクリタキセル（例えば、商標タキソール（登録商標）の下で販売される、Bristol-Myers Squibb Oncology、ニュージャージー州、プリンストン）およびドセタキセル（例えば、商標タキソテル（登録商標）の下で販売される、Rhône-Poulenc Rorer、フランス、アントニー）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；チミジル酸シンターゼ阻害剤（例えば、Tomudex（登録商標）化学療法薬）；アセグラトンを含む追加の化学療法薬；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキセート；デフォスファミド（defosfamide）；デメコルシン；ジアジクオン；ジフルオロメチルオルニチン（DFMO）；エフロールニチン；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシル尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット（phenamet）；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）医薬；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（Ara-C）；シクロホスファミド；チオテパ；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルビン；ナベルピン（登録商標）；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ（登録商標）；イバンドロネート；CPT-11；レチノイン酸；エスペラマイシン；カペシタビン；ならびにトポイソメラーゼ阻害剤、例えば、イリノテカンを含む化学療法薬を含み得る。上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体も使用できる。

【0226】

化学療法薬には、それだけには限らないが、より活性な細胞傷害性遊離薬物に変換され得る、リン酸含有プロドラッグ、チオリン酸含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ペーターラクタム含有プロドラッグ、適宜置換されたフェノキシアセトアミドを含有するプロドラッグまたは適宜置換されたフェニルアセトアミドを含有するプロドラッグ、5

10

20

30

40

50

ーフルオロシトシンおよび他の 5-フルオロウリジンプロドラッグを含むプロドラッグが含まれる。

【0227】

他のカーゴは、例えば、抗血管新生剤を含む。抗血管新生剤は、血管新生の促進に関与する増殖因子または増殖因子受容体に結合する、小分子またはタンパク質、例えば、抗体、Fc 融合物およびサイトカインであり得る。抗血管新生剤の例として、それだけには限らないが、血管内皮増殖因子 (VEGF) に結合する、または VEGF-R に結合する抗体、VEGF もしくは VEGF-R 発現のレベルを低減する RNA ベースの治療薬、VEGF-毒素融合物、Regeneron の VEGF トラップ、アンギオスタチン (プラスミノゲン断片)、抗トロンピン III、アンギオザイム (angiozyme)、ABT-627、Bay 12-9566、BeneFin、ベバシズマブ、ビスホスホネート、BMS-275291、軟骨由来阻害剤 (CDI)、CAI、CD59 補体断片、CEP-7055、Col 3、コンプレタスタチン A-4、エンドスタチン (コラーゲン XVIII 断片)、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、フィブロネクチン断片、GRO-ベータ、ハロフジノン、ヘパリナーゼ、ヘパリン六糖 (hexasaccharide) 断片、HMV833、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG)、IM-862、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロガンマ、インターフェロン誘導可能タンパク質 10 (IP-10)、インターロイキン-12、クリングル 5 (プラスミノゲン断片)、マリマスタット、メタロプロテイナーゼ阻害剤 (例えば、TIMP)、2-メトキシエストラジオール、MMI 270 (CGS 27023A)、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤 (PAI)、血小板因子-4 (PF4)、プリノマスタット、プロラクチン 16 kDa 断片、プロリフェリン (proliferin) 関連タンパク質 (PRP)、PTK 787/ZK 222594、レチノイド、ソリマスタット (solimastat)、スクアラミン、SS3304、SU5416、SU6668、SU11248、テトラヒドロコルチゾール-S、テトラチオモリブデート、サリドマイド、トロンボスポンジン-1 (TSP-1)、TNP470、トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF-β)、バスキュロスタチン (vasculostatin)、バソスタチン (vasostatin) (カルレティキュリン断片)、ZS6126 および ZD6474 が挙げられる。

【0228】

他のカーゴはチロシンキナーゼ阻害剤を含み、それだけには限らないが、キナゾリン、例えば、PD 153035、4-(3-クロロアニリノ)キナゾリン；ピリドピリミジン；ピリミドピリミジン；ピロロピリミジン、例えば、CGP 59326、CGP 60261 および CGP 62706；ピラゾロピリミジン、4-(フェニルアミノ)-7-H-ピロロ (2,3-d) ピリミジン；クルクミン (ジフェルロイルメタン、4,5-ビス (4-フルオロアニリノ) フタルイミド)；ニトロチオフエン部分を含有するチロホスチン；PD-0183805 (Warner-Lambert)；アンチセンス分子 (例えば、ErbB をコードする核酸に結合するもの)；キノキサリン (米国特許第 5,804,396 号)；チロホスチン (米国特許第 5,804,396 号)；PTK-787 (Novartis/Schering AG)；汎 ErbB 阻害剤、例えば、C1-1033 (Pfizer)；Affinitac (商標) がん処置 (ISIS 3521；ISIS/Lilly)；メシル酸イマチニブ (STI571、グリーベック (登録商標) 化学療法医薬；Novartis)；PKI 166 (Novartis)；GW2016 (Glaxo SmithKline)；C1-1033 (Pfizer)；EKB-569 (Wyeth)；セマキシニブ (Sugen)；ZD6474 (AstraZeneca)；PTK-787 (Novartis/Schering AG)；IMC-1C11 (ImClone)；または以下の特許公報のいずれかに記載されるようなもの：米国特許第 5,804,396 号；PCT WO99/09016 (American Cyanamid)；PCT WO98/43960 (American Cyanamid)；PCT WO97/38983 (Warner-Lambert)；PCT

WO99/06378 (Warner-Lambert) ; PCT WO99/06396 (Warner-Lambert) ; PCT WO96/30347 (Pfizer, Inc.) ; PCT WO96/33978 (AstraZeneca) ; PCT WO96/33979 (AstraZeneca) ; PCT WO96/33980 (AstraZeneca)、ゲフィチニブ (イレッサ (登録商標) 医薬、ZD1839、AstraZeneca) および OSI-774 (タルセバ (登録商標) 医薬、OSI Pharmaceuticals/Genentech) が含まれる。

【0229】

他のカーゴは、1つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、MHC抗原をマスクする、または1つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション剤を含む。免疫モジュレーション剤の例として、それだけには限らないが、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID)、例えば、アスピリン、イブプロフェン、セレコキシブ、ジクロフェナク、エトドラック、フェノプロフェン、インドメタシン、ケトロラク、オキサプロジン、ナブメトン、スリンダク、トルメチン、ロフェコキシブ、ナプロキセン、ケトプロフェンおよびナブメトン；ステロイド (例えば、グルココルチコイド、デキサメタゾン、コルチゾン、ヒドロキシコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、アザルフィジンエイコサノイド、例えば、プロスタグランジン、トロンボキサンのようなロイコトリエン；ならびに局所的ステロイド、例えば、アントラリン、カルシポトリエン、クロベタゾールおよびタザロテン)；サイトカイン、例えば、TGF β 、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-10；エンブレル (登録商標) (エタネルセプト)、ヒュミラ (登録商標) (アダリムマブ) およびレミケード (登録商標) (インフリキシマブ) 医薬を含む、抗体、可溶性受容体および受容体-Fc融合物、例えば、BAFF、B7、CCR2、CCR5、CD2、CD3、CD4、CD6、CD7、CD8、CD11、CD14、CD15、CD17、CD18、CD20、CD23、CD28、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD52、CD64、CD80、CD86、CD147、CD152、補体因子 (C5、D)、CTLA4、エオタキシン、Fas、ICAM、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IFNAR、IgE、IL-1、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-5R、IL-6、IL-8、IL-9、IL-12、IL-13、IL-13R1、IL-15、IL-18R、IL-23、インテグリン、LFA-1、LFA-3、MHC、セレクチン、TGF β 、TNF α 、TNF β 、TNF-R1、T細胞受容体に対するものを含む、サイトカイン、ケモカインまたは受容体アンタゴニスト；異種抗リンパ球グロブリン；他の免疫調節分子、例えば、2-アミノ-6-アリール-5置換ピリミジン、MHC結合性ペプチドおよびMHC断片の抗イディオタイプ抗体、アザチオプリン、ブレキナル、プロモクリプチン、シクロホスファミド、シクロスポリンA、D-ペニシラミン、デオキシスベルグアリン (deoxyspergualin)、FK506、グルタルアルデヒド、金、ヒドロキシシクロロキン、レフルノミド、マロノニトリロアミド (例えば、レフルノミド)、メトトレキセート、ミノサイクリン、ミゾリビン、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシンおよびスルファサラジンが挙げられる。

【0230】

他のカーゴは、サイトカインを含み、それだけには限らないが、リンホカイン、モノカインおよび伝統的なポリペプチドホルモンが含まれる。サイトカインの中に含まれるものとして、成長ホルモン、例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロリラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば、卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) および黄体形成ホルモン (LH)；肝臓増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α および β ；ミューラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン (TPO)；神経増殖因子

、例えば、NGF-ベータ；血小板増殖因子；トランスフォーミング増殖因子（TGF）
 、例えば、TGF-アルファおよびTGF-ベータ；インスリン様増殖因子-Iおよび-I I；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン、例えば、インターフェロン-アルファ、-ベータおよび-ガンマ；コロニー刺激因子（CSF）、例えば、マクロファージ-CSF（M-CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（IL）、例えば、IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；IL-15、腫瘍壊死因子、例えば、TNF-アルファまたはTNF-ベータ；ならびにLIFおよびkitリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子がある。

10

【0231】

他の例示的カーゴは、免疫系の細胞を刺激し、所望のエフェクター機能を増強するサイトカインおよび他の薬剤を含む。例えば、NK細胞を刺激する薬剤としてIL-2が挙げられ、マクロファージを刺激する薬剤として、それだけには限らないが、C5a、ホルミルペプチド、例えば、N-ホルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニルアラニンが挙げられる。カーゴは、好中球を刺激する薬剤、例えば、G-CSFおよびGM-CSFなどを含む。追加の薬剤として、それだけには限らないが、インターフェロンガンマ、IL-3およびIL-7が挙げられる。

【0232】

カーゴは、感染症の処置のための、特に、嚢胞性線維症および局所性投与によって、例えば、MEVを含有するエアロゾルの吸入によって処置できる副鼻腔感染症を有する対象における、尿路感染症、呼吸器感染症、特に、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）または黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）感染症を含む、処置が困難な細菌感染症のための抗生物質を含む。嚢胞性線維症を有する対象における肺の感染症のための抗生物質処置を、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）タンパク質をコードする、もしくはCFTRタンパク質中の欠陥を修正するための遺伝子編集システムを提供する、核酸、DNAまたはRNAを含む、同一または異なるMEVを使用する遺伝子療法と組み合わせることができる。

20

【0233】

MEV中にカーゴとして負荷され得る抗生物質として、それだけには限らないが：アミノグリコシド抗生物質（例えば、アブラマイシン、アルベカシン、バンベルマイシン、ブチロシン、ジベカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、シソマイシンおよびスペクチノマイシン）、アミノシクリトール（例えば、スペクチノマイシン）、アンフェニコール（*amphenicol*）抗生物質（例えば、アジダムフェニコール、クロラムフェニコール、フロルフェニコールおよびチアンフェニコール）、アンサマイシン抗生物質（例えば、リファミドおよびリファンピン）、カルバペネム（例えば、イミペネム、メロペネムおよびパニペネム）；セファロスポリン（例えば、セファクロル、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド、セフピロム、セフプロジル、セフロキシム、セフィキシム、セファレキシンおよびセフラジン）
 、セファマイシン（セフペラゾン、セフォキシチン、セフミノクス、セフメタゾールおよびセフォテタン）；リンコサミド（例えば、クリンダマイシンおよびリンコマイシン）
 ；マクロライド（例えば、アジスロマイシン、ブレフェルジンA、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシンおよびトブラマイシン）、モノバクタム（例えば、アズトレオナム、カルモナムおよびチゲモナム）；ムピロシン；オキサセフェム（例えば、フロモキシセフ、ラタモキシセフおよびモキサラクタム）；ペニシリン〔例えば、アムジノシリン、アムジノシリンピボキシル、アモキシシリン、バカンピシリン、ベンジルペニシリン酸、ベンジルペニシリンナトリウム、エピシリン、フェンペニシリン（*fenbenicillin*）、フロキサシリン、ペナメシリン、ペネタメートヨウ化水素酸塩、ペニシリンo-ベネタミン、ペニシリンO、ペニシリンV、ペニシリンV安息香酸塩、ペニ

30

40

50

シリンVヒドラバミン、ペニメピサイクリンおよびフェネチシリンカリウム]；ポリペプチド（例えば、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシムB、テイコプラニンおよびバンコマイシン）；キノロン（例えば、アミフロキサシン、シノキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、エンロフロキサシン、フレロキサシン、フルメキン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキシソリン酸、ペフロキサシン、ピペミド酸、ロソクサシン、ルフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシンおよびトロバフロキサシンなど）；リファンピン；ストレプトグラミン（例えば、キヌプリスチンおよびダルホプリスチン）；スルホンアミド（スルファニルアミドおよびスルファメトキサゾール）；およびテトラサイクリン（クロルテトラサイクリン、デメクロサイクリンヒドロクロリド、デメチルクロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、デュラマイシン、ミノサイクリン、ネオマイシン、オキシテトラサイクリン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびバンコマイシン）が挙げられる。

10

【0234】

カーゴはまた、抗真菌剤を含み、それだけには限らないが、アンホテリシンB、シクロピロクス、クロトリマゾール、エコナゾール、フルコナゾール、フルシトシン、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール、ナイスタチン、テルビナフィン、テルコナゾールおよびチオコナゾールが含まれる。一部の例では、本明細書で記載されるカーゴが負荷されたMEVは、それだけには限らないが、I型インターフェロン、ウイルス融合阻害剤、ノイラミニダーゼ阻害剤、アシクロビル、アデホビル、アマンタジン、アンプレナビル、クレブジン、エンフビルチド、エンテカビル、ホスカルネット、ガンシクロビル、イドクスウリジン、インジナビル、ロピナビル、プレコナリル、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、トリフルリジン、ビダラビンおよびジドブジンを含む、プロテアーゼ阻害剤、逆転写酵素阻害剤および他のものを含む1つまたは複数の抗ウイルス剤とともに投与される。

20

【0235】

すべての例において、カーゴの形態は、タンパク質を、また、タンパク質をコードする核酸、例えば、プラスミドを、また、mRNAを含む。核酸は、送達されるべき特定の対象、例えば、哺乳動物において認識される調節エレメントに作動可能に連結され得る。

【0236】

30

標的臓器/組織	例示的適応症	例示的投与経路
肺	嚢胞性線維症	吸入
肺	嚢胞性線維症	吸入
肺	特発性肺線維症	吸入
肺	原発性線毛機能不全	吸入
肺	肺動脈性肺高血圧症	吸入
肝臓	先天性代謝異常	静脈内または肝臓への直接注射
肺	Covid-19 (防止的または治療的)	鼻腔内または吸入
リンパ系	Covid-19 (ワクチン)	静脈内または筋肉内
肺	インフルエンザ (防止的または治療的)	鼻腔内または吸入
リンパ系	インフルエンザ (ワクチン)	静脈内または筋肉内
リンパ系	ウイルス病原体	静脈内または筋肉内
リンパ系	細菌病原体	静脈内または筋肉内

40

【0237】

3. ペイロードが負荷されたMEVの作製

本明細書で示されるように、それだけには限らないが、媒体、例えば、脂質ナノ粒子、

50

ベクター、治療用細菌および治療用ウイルスのデリバリーのための、静脈内、経口、局所的、粘膜、吸入および当業者に公知の任意の他の経路を含む任意の適した経路によるヒトへのデリバリーのために、単離されたクロレラ属にカーゴを負荷できる。投与の際、MEVは細胞によって取り込まれる。ベクター、細菌、エキソソーム、ナノ粒子および他のこのようなデリバリービヒクルにおいて現在送達される任意のカーゴを、本明細書で提供されるMEV中に負荷できる。負荷されるカーゴは、カーゴが治療用生成物をコードするプラスミドである場合などにおいて、標的化細胞においてのみ発現され、または生成されるように選択できる。コードされた生成物が標的化細胞において発現されるように転写調節シグナルを選択できる。例えば、肝臓における発現のために、コードされる生成物を、肝臓特異的プロモーターの制御下で発現させることができる、または生成物を、例えば、腫瘍中または腫瘍微小環境中の標的化細胞において発現される受容体または標的に標的化できる。上記の、および以下の実施例におけるデリバリー法は、それだけには限らないが、以下を含む：

10

- a. エレクトロポレーション
- b. 超音波処理
- c. 押出
- d. 界面活性剤
- e. 他の方法

【0238】

4. 外因的に負荷されたMEVの例示的カーゴおよび例示的使用

20

a. カーゴ

上記のように、MEVには、他のデリバリービヒクルが使用される任意のものを含む目的の任意の目的のために使用できるカーゴが負荷される。これらの使用は、mRNA、例えば、コロナウイルススパイクタンパク質およびウイルスに対する免疫応答を改善するための改変スパイクタンパク質をコードするmRNA、遺伝子、例えば、細菌およびウイルス病原体病原性遺伝子、抗生物質耐性遺伝子、抗菌耐性遺伝子、免疫系を抑制する遺伝子、腫瘍遺伝子、例えば、がん遺伝子およびウイルス感染のための宿主因子、例えば、標的化アンジオテンシン変換酵素-2 (ACE2)、膜貫通タンパク質セリン2 (TMPRSS2) および他のこのような遺伝子をサイレンシングするためのRNAi、例えば、siRNAおよびアンチセンスRNAまたはアンチセンスDNA (ASO) のデリバリーを含む。カーゴはまた、任意の治療用抗体を含み得る。治療用抗体には、それだけには限らないが、抗がん抗体、自己免疫または炎症疾患を処置するための抗体、移植拒絶を処置するための抗体、移植片対宿主病 (GVHD) を処置するための抗体および感染性疾患を処置するための抗体が含まれる。

30

【0239】

1) RNAカーゴ

RNA干渉またはRNAiの機序は元々、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) における遺伝子発現の配列特異的サイレンシングのプロセスとして記載された [Fire et al. (1998) *Nature* 391(6669):806-11; Fire and Mello, 2006 Nobel Prize in Medicine awarded to Andrew Fire and Craig Mello]。メッセンジャーRNAを標的化する (およびサイレンシングする) 低分子RNAのプロセスには、特定のRNAi機構 (サイレンシング因子、例えば、ダイサーおよびARGONAUTEを含む) が関与している。

40

【0240】

植物界では、RNAiは、抗ウイルス防御機序に、ならびに植物病原性真菌および卵菌に対する防御機序に関与している。低分子調節RNAは、前記RNAi機構を欠く細菌細胞内のサイレンシング遺伝子において活性であり得る。siRNAのサイレンシング活性は、界間であると実証されている [例えば、Singla, Navarro., 2019a, PCT / EP2019 / 072169; Singla, Navarro., 2019b, PCT / EP2019 / 072170; Singla et al. (2019c) *bioRxiv*, doi: doi.org/10.1101/863902を参照されたい]。

50

【0241】

遺伝子発現のRNAi媒介性調節は、ウイルスに対する耐性を付与するためにバイオテクノロジーの分野において数年間利用されている [Baulcombe (2015) Current Opinion in Plant Biology 26:141-146]。界間RNAiは、真核生物の病原体／寄生生物の遺伝子の機能の特徴づけるために、ならびにこれらの生物からの保護を誘導するために使用されている。

【0242】

ショウジョウバエ属 (*Drosophila*) および線虫属 (*Caenorhabditis*) では、RNAiは、ウイルスに応じて宿主によって産生された低分子RNAを介してウイルスRNAを直接標的化することによって抗ウイルス防御において重要な役割を果たす。最近の研究によって、ヒトの食用植物からの低分子RNAが天然に負荷された植物EV (EVを生成する植物細胞によって負荷された) は、ある特定の共生細菌において特定の遺伝子の発現をサイレンシングすることによって、ヒト腸微生物叢および口腔微生物叢の組成を改変できることが示された [Teng et al. (2018) Cell Host & Microbes 24:637-652; Sundaram et al. (2019) iScience 21:308-327]。

【0243】

低分子干渉RNA (siRNA) およびマイクロRNA (miRNA) は、遺伝子調節において重要な役割を有するノンコーディングRNAである。それらは、がんおよび感染症を含む広範囲の障害の処置のための新規クラスの治療薬として最近調査された。siRNAおよびmiRNAベースの薬物の臨床試験はすでに開始されている。siRNAおよびmiRNAは、多数の類似性を共有し、両方とも、メッセンジャーRNA (mRNA) を標的化することによって、転写後レベルで遺伝子サイレンシング効果を発揮する短い二本鎖RNA分子であるが、その作用機序および臨床適用は、別個である。siRNAとmiRNAの間の大きな相違は、前者は高度に特異的であり、1つのみのmRNA標的を有するが、後者は、複数の標的を有することである。siRNAおよびmiRNAは、遺伝子調節において役割を有し、薬物発見および開発のための標的として働く。従来の小さい治療用分子と比較して、siRNAおよびmiRNAは、高度に強力である可能性を提供し、「新薬の開発につながるようなものではない」標的 (例えば、酵素機能を欠くタンパク質) に対して作用でき、さらに、RNAiは、目的の任意の遺伝子を標的化し、および／または目的の任意の遺伝子の発現に影響を及ぼすように設計できる。

【0244】

2) 抗体カーゴ

抗がん抗体および他の抗体の例として、それだけには限らないが、抗17-1A細胞表面抗原抗体、例えば、商標Panorex (登録商標) (エドレコロマブ) の下で販売または提供されている抗体; 抗4-1BB抗体; 抗4Dc抗体; 抗A33抗体、例えば、A33およびCDP-833; 抗 α 1インテグリン抗体、例えば、ナタリズマブ; 抗 α 4 β 7インテグリン抗体、例えば、LDP-02; 抗 α V β 1インテグリン抗体、例えば、F-200、M-200およびSJ-749; 抗 α V β 3インテグリン抗体、例えば、アブシキマブ、CNTO-95、Mab-17E6およびビタキシン (登録商標) 抗体; 抗補体因子5 (C5) 抗体、例えば、5G1.1; 抗CA125抗体、例えば、商標Ovarex (登録商標) (オレゴボマブ) の下で販売または提供されるもの; 抗CD3抗体、例えば、商標Nuvion (登録商標) (ビジリズマブ) およびRexomab (登録商標) の下で販売または提供されるもの; 抗CD4抗体、例えば、IDEC-151、MDX-CD4、OKT4A; 抗CD6抗体、例えば、オンコリシン (Oncolysin) BおよびオンコリシンCD6; 抗CD7抗体、例えば、HB2; 抗CD19抗体、例えば、B43、MT-103およびオンコリシンB; 抗CD20抗体、例えば、2H7、2H7.v16、2H7.v114、2H7.v115、商標ベキサール (登録商標) (トシツモマブ) の下で販売または提供される製品、商標リツキサン (登録商標) (リツキシマブ) の下で販売または提供される抗体および商標ゼバリン (登録商標) (イブリツモマブチウキセタン) の下で販売または提供される抗体; 抗CD22抗体、例えば、以下のジェネ

リック名、商標名または商標の下で販売または提供されるもの：リンホサイド（L y m p h o c i d e）（登録商標）（エピラツズマブ）；抗CD23抗体、例えば、I D E C - 1 5 2；抗CD25抗体、例えば、バシリキシマブおよび商標ゼナパックス（登録商標）（ダクリズマブ）の下で販売される抗体；抗CD30抗体、例えば、A C 1 0、M D X - 0 6 0およびS G N - 3 0；抗CD33抗体、例えば、商標マイロターゲット（登録商標）（ゲムツズマブオゾガマイシン）、オンコリシンMおよびS m a r t M 1 9 5の下で販売されるもの；抗CD38抗体；抗CD40抗体、例えば、S G N - 4 0およびトラリズマブ（t o r a l i z u m a b）；抗CD40L抗体、例えば、5 c 8、商標A n t o v a（登録商標）の下で販売される抗体およびI D E C - 1 3 1；抗CD44抗体、例えば、10
 ビバツズマブ；抗CD46抗体；抗CD52抗体、例えば、商標キャンパス（登録商標）（アレムツズマブ）の下で販売されるもの；抗CD55抗体、例えば、S C - 1；抗CD56抗体、例えば、h u N 9 0 1 - D M 1；抗CD64抗体、例えば、M D X - 3 3；抗CD66e抗体、例えば、X R - 3 0 3；抗CD74抗体、例えば、I M M U - 1 1 0；抗CD80抗体、例えば、ガリキシマブおよびI D E C - 1 1 4；抗CD89抗体、例えば、M D X - 2 1 4；抗CD123抗体；抗CD138抗体、例えば、B - B 4 - D M 1；抗CD146抗体、例えば、A A - 9 8；抗CD148抗体；抗CEA抗体、例えば、c T 8 4 . 6 6、ラベツズマブおよび商標P e n t a c e a（登録商標）の下で販売されるもの；抗CTLA-4抗体、例えば、M D X - 1 0 1；抗CXCR4抗体；抗EGFR抗体、例えば、A B X - E G F、商標E r b i t u x（登録商標）（セツキシマブ）の下20
 で販売されるもの、I M C - C 2 2 5およびM e r c k M a b 4 2 5；抗EpCAM抗体、例えば、C r u c e l lの抗EpCAM、I N G - 1およびK S - I L - 2；抗エフリンB2／E p h B 4抗体；抗Her2抗体、例えば、商標H e r c e p t i n（登録商標）の下で販売されるもの、M D X - 2 1 0；抗FAP（線維芽細胞活性化タンパク質）抗体、例えば、シプロツズマブ；抗フェリチン抗体、例えば、N X T - 2 1 1；抗FGF-1抗体；抗FGF-3抗体；抗FGF-8抗体；抗FGFR抗体、抗フィブリン抗体；抗G250抗体、例えば、W X - G 2 5 0および商標R e n c a r e x（商標登録）の下で販売されるもの；抗GD2ガングリオシド抗体、例えば、E M D - 2 7 3 0 6 3およびT r i G e m；抗GD3ガングリオシド抗体、例えば、B E C 2、K W - 2 8 7 1およびミツモマブ；抗g p I I b／I I I a抗体、例えば、レオプロ；抗ヘパリーゼ抗体；抗Her2／E r b B 2抗体、例えば、H e r c e p t i n（登録商標）（トラスツズマブ）、M D X - 2 1 0およびベルツズマブ；抗HLA抗体、例えば、商標O n c o l y m（登録商標）の下で販売されるもの、S m a r t 1 D 1 0；抗HM1.24抗体；抗ICAM抗体、例えば、I C M 3；抗IgA受容体抗体；抗IGF-1抗体、例えば、C P - 7 5 1 8 7 1およびE M - 1 6 4；抗IGF-1R抗体、例えば、I M C - A 1 2；抗IL-6抗体、例えば、C N T O - 3 2 8およびエルシリモマブ（e l s i l i m o m a b）；抗IL-15抗体、例えば、商標H u M a x（登録商標）- I L 1 5の下で販売されるもの；抗KDR抗体；抗ラミニン5抗体；抗Lewis Y抗原抗体、例えば、H u 3 S 1 9 3およびI G N - 3 1 1；抗MCAM抗体；抗Muc1抗体、例えば、B r a v a R e xおよびT r i A b；抗NCAM抗体、例えば、E R I C - 1およびI C R T；抗PEM抗原抗体、例えば、T h e r a g y nおよびT h e r e x；抗PSA抗体；抗PS30
 CA抗体、例えば、I G 8；抗Ptk抗体；抗PTN抗体；抗RANKL抗体、例えば、A M G - 1 6 2；抗RLIP76抗体；抗SK-1抗原抗体、例えば、M o n o p h a r m C；抗STEAP抗体；抗TAG72抗体、例えば、C C 4 9 - S C AおよびM D X - 2 2 0；抗TGF-β抗体、例えば、C A T - 1 5 2；抗TNF-α抗体、例えば、C D P 5 7 1、C D P 8 7 0、D 2 E 7、商標H u m i r a（登録商標）（アダリムマブ）の下で販売されるものおよび商標R e m i c a d e（登録商標）（インフリキシマブ）の下で販売されるもの；抗TRAIL-R1およびTRAIL-R2抗体；抗VE-カドヘリン-2抗体；および抗VLA-4抗体（例えば、商標A n t e g r e n（登録商標）の下で販売されるもの）が挙げられる。さらに、それだけには限らないが、GD3エピトープ抗体B E C 2およびg p 7 2エピトープ抗体1 0 5 A D 7を含む抗イディオタイプ抗体40
 50

を使用できる。さらに、それだけには限らないが、抗CD3／CD20抗体Bi20を含む二重特異性抗体を使用できる。

【0245】

さらなる例示的カーゴ、カーゴが負荷されたMEVを用いて達成できる使用および処置が、例として以下のように記載されている。

【0246】

b. 疾患および処置の方法

上記のように、治療用分子を送達する、ワクチンとして働くための、ならびにヒトおよび他の動物の健康、農業的適用、美容的適用、皮膚科学適用および診断的適用、工業的使用および他の使用において使用するために、MEVに、それだけには限らないが、核酸分子、検出可能なマーカータンパク質およびタグ、小分子薬、遺伝子編集システムおよび他のものおよびそれらの組合せを含む任意の所望のカーゴを負荷できる。MEVは、栄養素または有益な生成物を生成するための遺伝子経路の制御因子、遺伝子編集システム、例えば、遺伝子編集を達成するためのCRISPR／casならびに遺伝子療法ベクターおよび生成物を送達できる。

【0247】

MEVは、例えば、機能的タンパク質の欠乏をもたらす遺伝的欠陥を特徴とする疾患を処置するために、またはポリペプチドの過剰発現を特徴とする疾患を処置するためにカーゴを保有できる。例えば、siRNAまたはマイクロRNAを使用する標的遺伝子のサイレンシングによって処置できる疾患の限定されない例（例えば、国際公開番号WO2013／048734を参照されたい）として、がん（例えば、肺がん、白血病およびリンパ腫、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、神経膠芽腫、卵巣がん、乳がん、頭頸部がん、肝臓がん、皮膚がんおよび子宮がん）、心血管疾患、眼性疾患（例えば、加齢性黄斑変性症、ヘルペス間質角膜炎、緑内障、ドライアイ症候群、糖尿病性網膜症ならびに眼性血管新生および高眼圧症と関連する状態）、神経疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、筋無力症障害、ハンチントン病疾患、脊髄小脳失調症、前頭側頭型認知症、パーキンソン病、プリオン病およびラフォラ病および虚血性または低酸素性状態から生じるもの）、腎臓障害、炎症または自己免疫疾患（例えば、虚血または再灌流傷害、再狭窄、関節リウマチ、炎症性腸疾患、例えば、クローン病または潰瘍性大腸炎、ループス、多発性硬化症、糖尿病、例えば、II型糖尿病および糖尿病状態、関節炎、例えば、リウマチ様または乾癬性）、呼吸器疾患（例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、嚢胞性線維症、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、肺気腫および急性肺傷害）、聴覚障害、てんかん、脊髄損傷、口腔粘膜炎、男性不妊症、子宮障害、子宮内膜障害または状態ならびに代謝と関連する状態（例えば、肥満症）、虚血、卒中、アルコール代謝および肝臓機能が挙げられる（例えば、国際公開番号WO2006／029161、WO2007／022470、WO2007／130604、WO2008／021157、WO2009／104051、WO2009／142822、WO2019／217459、WO2020／123083；欧州公開番号EP2504435および米国特許公開番号U.S. 2011／0223665、U.S. 2012／0116360、U.S. 2012／0071540、U.S. 2016／0257956、U.S. 2015／0196648およびU.S. 2017／0304459を参照されたい）。RNAi分子は、例えば、がん遺伝子、転写因子、受容体、酵素、構造タンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、レクチン、セレクチン、免疫グロブリン、キナーゼおよびホスファターゼをコードする遺伝子を標的化し得る。

【0248】

他のカーゴおよび使用が企図される。例えば、MEVは、例えば、外傷、例えば、創傷、火傷、皮膚の傷口、骨折、毛髪脱落、真皮の露出、粘膜の露出、線維症、裂傷および潰瘍に起因する状態を処置するためにカーゴを保有できる。MEVは、例えば、特に、皮膚での、または視覚の、自然老化または誘導された老化に起因する状態を処置するためにカーゴを保有できる。

10

20

30

40

50

【0249】

MEVを使用してカーゴを送達して、感染性疾患を、例えば、遺伝子サイレンシングを用いて処置できる、または例えば、ワクチン接種によって防ぐことができる。例えば、抗原パルスマクロファージまたは樹状細胞に由来するMEVは、ナイーブ動物中に導入された場合に免疫応答を誘発すると示された (Gyorgy et al. (2015) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 55:439-464)。遺伝子サイレンシングを使用してまた、病原体関連タンパク質、例えば、宿主の免疫抑制、病原体の複製、病原体の伝播もしくは感染の維持に關与するウイルスタンパク質；または病原体の宿主への侵入、病原体もしくは宿主による薬物代謝、病原体のゲノムの複製もしくは組み込み、宿主における感染の確立もしくは広がりもしくは病原体の次の世代のアセンブリーを促進する宿主タンパク質を標的化できる。病原体には、例えば、RNAおよびDNAウイルス、例えば、アレナウイルス、コロナウイルス、インフルエンザウイルス、パラミキソウイルス、フラビウイルス（例えば、West Nileウイルス）、ピコナウイルス（例えば、コクサッキーウイルス、ポリオウイルスおよびライノウイルス）、ラブドウイルス、フィロウイルス、レトロウイルス（例えば、レンチウイルスおよびラウス肉腫ウイルス）、アデノウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス、サイトメガロウイルス、ヘパドナウイルス（例えば、B型およびC型肝炎）、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ポリオマウイルスおよび他のもの；細菌；真菌；蠕虫；住血吸虫；トリパノソーマ；マラリア原虫〔例えば、四日熱マラリア原虫 (plasmodium malariae) および他のもの〕を含む寄生生物；および哺乳動物転位因子が含まれ得る（例えば、国際公開番号WO2010/141724、WO2011/071860、WO2011/072292、WO2013/126803、WO2020/035620およびWO2020/097540；オーストラリア公開番号AU2004257373 A1、AU2013203219 B2およびAU2016225873 A1；欧州公開番号EP2395012およびEP2888240；米国特許公開番号U.S. 2011/0223665、U.S. 2014/0256785およびU.S. 2019/0032051；日本公開番号JP 2018-197239A；および台湾公開番号TW 201204351Aを参照されたい）。

10

20

【0250】

MEVを使用してまた、治療上有用なポリペプチドをコードするDNAまたはmRNA配列を送達できる。例えば、対象が特定の遺伝子産物を欠く場合には、核酸分子、例えば、DNAまたはRNA分子中で遺伝子がコードされ得る。遺伝子産物をコードする核酸分子をMEVに負荷し、遺伝子産物を欠く対象に送達できる。例えば、遺伝子産物が存在しないことまたは欠乏によって生じる疾患として、それだけには限らないが、リソソーム蓄積障害、尿素回路の代謝性障害、SMN1関連脊髄性筋萎縮症 (SMA)；筋萎縮性側索硬化症 (ALS)；GALT関連ガラクトース血症；嚢胞性線維症 (CF)；シスチン尿症を含むSLC3A1関連障害；アルポート症候群を含むCOL4A5関連障害；ガラクトセレブロシダーゼ欠乏症；X連鎖副腎白質ジストロフィーおよび副腎脊髄ニューロパチー；フリートライヒ運動失調症；ペリツェウス・メルツバッハ病；TSC1およびTSC2関連結節性硬化症；サンフィリポB症候群 (MPS IIIB)；CTNS関連シスチン症；脆弱X症候群、脆弱X関連振戦／運動失調症候群および脆弱X未熟卵巣機能不全症候群を含むFMR1関連障害；プラダーウィリー症候群；遺伝性出血性末梢血管拡張症；ニーマンピック病C1型；若年型神経セロイドリポフスチン症 (JNCL)を含む神経セロイドリポフスチン症関連疾患、若年性バッテン病、ハルティアサンタブオリ病、ヤンスキービールショウスキー病ならびにPTT-1およびTPP1欠乏症；中枢神経系ミエリン形成不全／白質消失を伴うEIF2B1-、EIF2B2-、EIF2B3-、EIF2B4-およびEIF2B5-関連小児運動失調；CACNA1A-およびCACNB4-関連突発性運動失調症2型；古典的レット症候群を含むMECP2関連障害、MECP2関連重度の新生児脳症およびPPM-X症候群；CDKL5関連非定型レット症候群；ケネディ病 (SBMA)；Notch-3関連皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優性

30

40

50

脳動脈症 (CADASIL) ; SCN1A および SCN1B 関連発作性障害 ; アルパース・ハッテンロッカー症候群、POLG 関連感覚失調性神経障害、構音障害および眼麻痺を含む、ポリメラーゼ G 関連障害ならびにミトコンドリア DNA 欠失を伴う常染色体優性および劣性進行性外眼筋麻痺 ; X 連鎖性副腎形成不全 ; X 連鎖無ガンマグロブリン血症 ; ならびにウィルソン病が挙げられる (例えば、国際公開番号 WO2011/068810、WO2019/243574、WO2019/092287 および WO2020/099682 を参照されたい)。

【0251】

MEV に CRISPR/Cas システムを負荷して、遺伝子編集を達成できる。クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) 技術によって、生存している生物におけるゲノムの改変が可能となり、細菌 CRISPR/Cas9 抗ウイルス防御システムに基づいている。このシステムによって、標的部位での DNA 切断が可能となる。II 型 CRISPR システムは、侵入している外来核酸由来の配列、例えば、ウイルスまたはプラスミドの DNA を、宿主ゲノム内にコードされる CRISPR リピート配列の間に組み込む。CRISPR リピート配列からの転写物は、CRISPR RNA (crRNA) にプロセシングされる。各 crRNA は、外来 DNA から転写された可変配列および CRISPR リピートの一部を有する。各 crRNA は、第 2 のトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) とハイブリダイズし、これら 2 つの RNA は、Cas9 ヌクレアーゼと複合体形成し、Cas9 ヌクレアーゼに標的 DNA 配列を切断するように指示する。crRNA および tracrRNA の融合からなる合成ガイド RNA (gRNA) と複合体形成された Cas ヌクレアーゼを、細胞中に送達することによって、インビボで細胞のゲノムを所望の位置で切断することができ、既存の遺伝子が除去され、および／または新しいものが付加されることが可能になる [Sander and Joung (2014) Nat. Biotechnol. 32(4):347-355]。CRISPR 技術を、Cas ポリペプチドまたは単一 RNA 誘導型エンドヌクレアーゼ Cpf1 とともに使用して、ゲノム改変を達成でき、脂質ナノ粒子、EV および他の小胞中に送達できる (例えば、国際公開番号 WO2017/161010、WO2019/238626 および WO2020/097540 を参照されたい)。

【0252】

MEV を使用してまた、それだけには限らないが、上記で列举されたものを含む疾患を、標的細胞への治療用タンパク質、ポリペプチドまたは小さい有機分子または化合物の形態のペイロードの導入によって処置できる。このような治療上有効な薬剤のまたは薬物の限定されない例として、腫瘍治療薬 (例えば、化学療法薬、ホルモン治療薬、免疫治療薬および放射治療薬)、脂質疾患を処置するための脂質低下剤、抗ウイルス薬、抗真菌剤、抗コリン薬、抗炎症化合物、抗うつ薬、刺激薬、鎮痛薬、抗生物質、避妊薬、解熱薬、血管拡張薬、抗血管形成剤、細胞血管作用剤 (cytovascular agents)、抗線維化剤 (antifibrotics)、降圧薬、アロマトラーゼまたはエステラーゼ阻害剤、シグナル形質導入阻害剤、合成酵素阻害剤、心血管薬、例えば、抗不整脈剤、ホルモンまたはホルモンアンタゴニスト、イオンチャネルモディファイヤー、抗新生物剤、向神経活性剤、血管収縮剤、細胞傷害性薬剤、核酸分解化合物、放射性同位元素、プロドラッグ活性化酵素およびステロイドが挙げられる (例えば、国際公開番号 WO2015110957A2 および WO2019018349A1 ; ならびに米国特許公開番号 U.S. 2019/0032051、U.S. 2012/0315324、U.S. 2019/0388347 および U.S. 2019/0175506 を参照されたい)。治療薬はまた、アレルゲン、アジュバント、抗原または免疫原、抗体 (例えば、全抗体、ポリクローナル、モノクローナルおよび組換え抗体、その断片、および単鎖抗体、ヒト化抗体、マウス抗体、キメラ、マウスーヒト、マウスー霊長類、霊長類ーヒトモノクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、抗体断片、例えば、scFv、(scFv)₂、Fab、Fab' および F(ab')₂、F(ab)₂、Fv、dAb および Fd 断片、ダイアボディーおよび抗体関連ポリペプチドをさらに含む)、サイトカイン、ホルモン、因子、補因子、細

胞成分タンパク質、代謝酵素、免疫調節酵素、インターフェロン、インターロイキン、胃腸酵素、止血に関わる酵素または因子、成長調節酵素、ワクチン、抗血栓溶解剤、毒素、抗毒素または診断用もしくはイメージング生物剤から選択される生物学的治療薬であり得る（例えば、国際公開番号WO2017/203260、WO2018/102397、WO2019/081474、WO2019/155060、WO2020/041720；オーストラリア公開番号AU2018365299A1；シンガポール公開番号SG11201811149TA；および米国特許公開番号U.S. 2019/0202892を参照されたい）。例えば、MEV療法を使用して、クローン病、潰瘍性大腸炎、強直性脊椎炎、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシス、特発性肺線維症、乾癬、腫瘍壊死因子（TNF）受容体関連周期性症候群（TRAPS）、インターロイキン-1受容体アンタゴニストの欠乏症（DIRA）、子宮内膜症、自己免疫肝炎、強皮症、筋炎、卒中、急性脊髄損傷、脈管炎、ギラン・バレー症候群、急性心筋梗塞、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、敗血症、髄膜炎、脳炎、肝不全、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、腎不全、心不全または任意の急性もしくは慢性臓器不全および関連する根底にある病因論、移植片対宿主病、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび他の筋ジストロフィー、リソソーム蓄積症、神経変性疾患、がん誘導性悪液質、拒食症、2型糖尿病およびがん〔例えば、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄球性白血病、副腎皮質癌、AIDS関連がん、AIDS関連リンパ腫、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、小脳または大脳基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨腫瘍、脳幹神経膠腫、脳がん、脳腫瘍（小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽細胞腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫）、乳がん、気管支腺腫／カルチノイド、バーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍（小児、胃腸）、原発不明の癌腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、子宮頸がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、結腸がん、皮膚T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、頭蓋外生殖細胞腫瘍、性腺外生殖細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん（眼球内黒色腫、網膜芽細胞腫）、胆嚢がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、生殖細胞腫瘍（頭蓋外、性腺外または卵巣）、妊娠性絨毛性腫瘍、神経膠腫（脳幹の神経膠腫、大脳星状細胞腫、視覚路および視床下部神経膠腫）、胃カルチノイド、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、心臓がん、肝細胞（肝臓）がん、下咽頭がん、眼球内黒色腫、島細胞癌（内分泌臓器）、腎臓がん（腎細胞がん）、咽頭がん、白血病（急性リンパ芽球性、急性骨髄球性、慢性リンパ性、慢性骨髄性、ヘアリー細胞白血病）、口唇および口腔がん、空洞がん、脂肪肉腫、肝臓がん（原発性）、肺がん（非小細胞、小細胞）、リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、バーキットリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、髄芽細胞腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明の転移性扁平上皮頸部がん、口腔がん、多発性内分泌新生物症候群、多発性骨髄腫／形質細胞新生物、菌状息肉症、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、骨髄性白血病、慢性骨髄球性白血病、骨髄腫、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫、卵巣がん、卵巣上皮がん（表面上皮-間質腫瘍）、卵巣生殖細胞腫瘍、卵巣低悪性度潜在的腫瘍、膵臓がん、膵島細胞がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、松果体胚細胞腫、松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍、下垂体腺腫、胸膜肺芽細胞腫、前立腺がん、直腸がん、腎細胞癌（腎臓がん）、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫（腫瘍肉腫のユーイングファミリー、カボジ肉腫、軟部組織肉腫、子宮肉腫）、セザリー症候群、皮膚がん（非黒色腫、黒色腫）、小腸がん、扁平細胞、扁平細胞頸部がん、胃がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、精巣がん、咽喉がん、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、腎盂および尿管の移行上皮がん、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、外陰部がん、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症および／またはウィルムス腫瘍〕を処置できる（例えば、国際公開番号WO2017/203260およびWO2019/155060A1；ならびに米国特許公開番号U.S. 2019/0388347を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0253】

c. 農業－獣医用適用

生体分子のカーゴを保有するMEVは、農業－獣医用適用のために使用できる。例えば、家禽疾患の処置および防止のために免疫リボ核酸を使用でき、miRNA経路の選択的モジュレーションによって植物および動物において病原性病原体に対する耐性を増強できる（国際公開番号WO2008/087562を参照されたい）。したがって、カーゴが負荷されたMEVを使用して、家畜を含む動物において疾患を処置できる。

【0254】

カーゴが負荷されたMEVを使用して、植物の疾患を処置できる。例示されるように、MEVに治療用分子、例えば、細菌およびウイルスを含む植物病原体中の病原性遺伝子を標的化するsiRNAを負荷し、葉および／または他の表面上に塗布または噴霧することなどによって植物に送達し、遺伝子を標的化して、病原体を排除する、または制御することができる。

【0255】

d. 美容的および皮膚科学適用

薬理学的薬剤のペイロードを保有するMEVも、美容的および皮膚科学適用のために使用できる。例えば、ドライスキン、弾力、しわ、ひだ、隆起および／または皮膚の縦溝などの症状および問題を改善ならびに／または軽減するために、特に、幹細胞由来のEVを含む、皮膚ケア製品、例えば、クリーム、ローション、ジェル、エマルジョン、軟膏、ペースト、散剤、リニメント剤、日焼け止めおよびシャンプーを使用できる（例えば、シンガポール公開番号SG11201811149TAを参照されたい）。そのカーゴの中でもサイトカイン、成長および転写因子を固有に保有する幹細胞EVはまた、炎症を制御し、皮膚細胞遊走および増殖を促進し、創傷癒着を制御し、血管新生を改善し、皮膚老化の徴候を回復させることがわかっている。正確な機序は解明中であるが、創傷治療に対する幹細胞EVの効果は、マイクロRNAまたはタンパク質の皮膚（skin）細胞への垂直移動に依存し得る。血管新生は、創傷治療の一部であり、幹細胞EVによって誘導され得る。幹細胞EVはまた、細胞マトリックス維持およびコラーゲン生成にとって有益な効果を有し、皮膚細胞の若返りにおいて役割を果たすとわかっている [da Fonseca Ferreira, A. and Gomes, D. (2019) Bioengineering (Basel) 6(1):4]。したがって、所望のカーゴが負荷されたMEVを美容的および皮膚科学適用のために使用できる。

【0256】

e. 他の例示的カーゴ

MEVには、それだけには限らないが、例えば、改変mRNAを含むRNAiを含む核酸分子、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド、検出可能なマーカータンパク質およびタグ、任意の治療用または予防用またはワクチンポリペプチドまたはペプチド、遺伝子編集システムおよび他のものおよびそれらの組合せを含む、任意の適した異種カーゴが、外因的に負荷され得る。MEVは、治療用分子を送達でき、ワクチンとして働くことができ、ヒトの健康、デリバリー遺伝子、遺伝子編集システムを用いる遺伝子の改変および遺伝子サイレンシング核酸を含む遺伝子療法適用、美容的適用、皮膚科学適用、診断的適用、工業的使用および他のものにおいて使用できる。MEVは、有益な生成物を産生するための遺伝子経路の制御因子を送達でき、遺伝子編集システム、例えば、CRISPR/Casを送達し、遺伝子編集を達成するために使用できる [例えば、例示的CRISPR/Casタンパク質について、それぞれヌクレイック（nucleic）配列をコードする配列番号73および74を参照されたい]。

【0257】

処置できる疾患および状態として、それだけには限らないが、心血管疾患、代謝性疾患、呼吸器感染症、膀胱感染症および他の尿路感染症を含む感染症、ウイルス疾患、例えば、肝炎、HIV、SARS-CoV-2を含むコロナウイルスを含む感染性疾患、CNS疾患、眼性疾患および肝臓疾患を含む当業者に公知の任意のものが挙げられる。論じられ

るように、送達されるカーゴは、タンパク質生成物、例えば、それだけには限らないが、酵素、調節因子、シグナル伝達タンパク質、抗原、抗体およびその抗原結合性形態、RNA産物、例えば、それだけには限らないが、siRNA、miRNA（マイクロRNA）、lncRNA（長鎖ノンコーディングRNA）、saRNA（低分子活性化RNA）、shRNAおよび改変mRNA、例えば、デリバリーのための安定性を増大するように改変されたmRNAを含むmRNAを含む。

【0258】

デリバリーのためのMEVの利点は、RNAが不安定分子であり、そのため、脂質ナノ粒子（LNP）のような他の種類のナノ粒子によって送達されるmRNAは、RNA安定性を増大するように改変されているということである。MEV中でのデリバリーのために、mRNAは、必ずしも改変されなくてもよい。改変mRNAは、合成mRNA中のウリジンヌクレオチドの少なくとも一定パーセンテージが改変されている、少なくとも1つのヌクレオチド改変を含有する翻訳可能領域を含む合成mRNAであり得る（例えば、デリバリーおよび翻訳のための改変mRNAを記載する米国特許第9,464,124号を参照されたい；また、米国特許第9,464,124号を参照されたい）。例えば、少なくとも1つのヌクレオチド改変は、ピリジン-4-オンリボヌクレオチド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノエチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6,N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ウィオシン、ウィプトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2,N2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-

10

20

30

40

50

グアノシン、7-メチル-8-オキソグアノシン、1-メチル-6-チオグアノシン、N2-メチル-6-チオグアノシンおよびN2, N2-ジメチル-6-チオグアノシンであり得る。mRNAは、a) 連結されたヌクレオチド、5' UTR、3' UTRおよび少なくとも1つの5' キャップ構造の配列を含み得る。mRNAはまた、真核生物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト宿主細胞における翻訳および輸送のための他の調節配列も含み得る。

【0259】

MEVは、レポーター遺伝子およびタンパク質および他の検出可能な生成物、例えば、蛍光タンパク質、例えば、それだけには限らないが、高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP; 配列番号10)、ルシフェラーゼ遺伝子 (配列番号11)、luxA (配列番号8)、luxB (配列番号9) およびLuxオペロン (luxC D A B E および lux A B C D E; 配列番号12) などを含むカーゴを保有し得る。

10

【0260】

他のカーゴは、疾患に関与する遺伝子または産物、例えば、それだけには限らないが、ペプチジルプロリルシスートランスイソメラーゼFKBP4またはFKBP52 (配列番号1); ガンマーアミノ酪酸B型受容体サブユニット1 (GABBR1; 配列番号3); がん遺伝子、例えば、MYCNまたはNMYC (配列番号38)、RAS (H-RAS、N-RAS および K-RAS; それぞれ配列番号39、40 および 41を参照されたい)、BCL2 (配列番号43) およびPLK1 (配列番号44) を標的化できる。疾患に関与する遺伝子、例えば、がん遺伝子およびチェックポイントは、遺伝子の発現を阻害する、もしくはアゴナイズする産物をコードする、または遺伝子産物を阻害する、もしくはアゴナイズするカーゴによってモジュレートされ得る。このようなモジュレーターの例示的なものとして、RNAi、例えば、siRNA、miRNA、shRNA、ペプチドおよび／またはテトラトリコペプチドなどがある。例えば、EGFP (配列番号5 および 6)、ホタルルシフェラーゼ (配列番号7)、MYCN (配列番号13~19)、RAS (配列番号20~27)、BCL2 (配列番号29~31) およびPLK1 (配列番号32~35) を標的化するsiRNAおよびASOならびにMYCおよびBCL2を標的とするマイクロRNA-34A (配列番号28) が、本明細書で例示されている。

20

【0261】

siRNAおよびmiRNAを含むRNA干渉を使用する遺伝子サイレンシングを使用して、発生遺伝子、例えば、接着分子、サイクリンキナーゼ阻害剤、Wntファミリーメンバー、Paxファミリーメンバー、ウィングドヘリックスファミリーメンバー、Hoxファミリーメンバー、サイトカイン／リンホカインおよびその受容体、成長／分化因子およびその受容体ならびに神経伝達物質およびその受容体、がん遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、酵素、病的状態と関連する遺伝子、自己免疫疾患と関連する遺伝子、抗血管新生遺伝子、血管新生遺伝子、免疫モジュレーター遺伝子、アルコール代謝および肝臓機能と関連する遺伝子、神経学的疾患と関連する遺伝子、腫瘍形成もしくは細胞形質転換と関連する遺伝子、ならびに代謝性疾患および障害と関連する遺伝子などをサイレンシングできる (例えば、WO2009/082606、JP2014-240428A、WO2011/072292A2、WO2010/141724 および WO2020/097540を参照されたい)。これらの種類の異種生成物はMEV中に送達されて、またはMEVにおいてコードされて、遺伝子または経路を活性化できる、または治療的効果を提供できる。ある特定のサイトカインを使用して、免疫抑制が役割を果たす、疾患／障害、例えば、ある特定のがんを処置できる。

30

40

【0262】

エキソロードされたMEVを使用して、治療薬、例えば、核酸、例えば、マイクロRNA、mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、調節RNA、ノンコーディングおよびコーディングRNAおよびDNA断片を (例えば、CN105821081A および CN110699382Aを参照されたい)、検出可能な部分を含むヌクレオチドまたはアミノ酸を、ポリペプチドを (例えば、酵素; 米国特許第10,195,290号を参照され

50

たい) 移動できる。MEV中に負荷できる(または一部の実施形態では、エキソロードされたDNAによってコードされる)タンパク質の限定されない例として、それだけには限らないが、抗体、イントラボディ、単鎖可変断片、アフィボディ、酵素、トランスポーター、腫瘍抑制因子、ウイルスもしくは細菌阻害剤、細胞成分タンパク質、DNAおよび/またはRNA結合性タンパク質、DNA修復阻害剤、ヌクレアーゼ、プロテイナーゼ、インテグラーゼ、転写因子、増殖因子、アポトーシス阻害剤および誘導因子、毒素、構造タンパク質、神経栄養因子、膜トランスポーター、ヌクレオチド結合性タンパク質、熱ショックタンパク質、CRISPR関連タンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、カスパーゼおよびそれらの任意の組合せおよび/または誘導體(例えば、AU2018365299を参照されたい)が挙げられる。

10

【0263】

カーゴ生物活性分子は、中枢神経系疾患、例えば、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病を標的化できる。このようなものの例示的なものとして、FKBP52およびそれからのテトラトリコペプチド誘導體がある。ヒトペプチジルプロリルシーストランスイソメラーゼFKBP4の全配列は、(配列番号1)である:

MTAEEMKATESGAQSAPLPMEGVDISPKQDEGV LKVIKREGTGTEMPMIGDRV FVH
YTGW
LLDGT KFDSSLDRKDKFSFDLGKG EVIKAWDIAIATMKVGEVCHITCKPEYAYGSAGS
PP
KIPPNATLVFEVELFEFKGEDLTEEEDGGIIRRIQTRGEGYAKPNEGAIVEVALEGGYK
D
KLFDQRELRF EIGEGENLDLPYGLERAIQRMEKGEHSIVYLKPSYAFGSVGKEKFQIP
PN
AELKYELHLKSFEKAKESWEMNSEEEKLEQSTIVKERGTVYFKEGKYKQALLQYKKIV
SWL
EYESSFSNEEAQKAQALRLASHLNLAMCHLKLQAFSAAIESCNKALELDSNNEKGLF
RRG
EAHLAVNDFELARADFQKVLQLYPNNKAAKTQLAVCQQRIRRLAREKKLYANMF E
RLAE
EENKAKAEASSGDHPTDTEMKEEQKSNTAGSQSQVETEA

20

30

【0264】

テトラトリコペプチドリピート(TPR)ドメイン260~400は、(配列番号2)である:

MNSEEEKLEQSTIVKERGTVYFKEGKYKQALLQYKKIVSWLEYESSFSNEEAQKAQAL
RLA
SHLNLAMCHLKLQAFSAAIESCNKALELDSNNEKGLFRRGEAHLAVNDFELARADFQ
KVL
QLYPNNKAAKTQLAVCQQR I

【0265】

例えば、カーゴを、タウの蓄積を防ぐことによるアルツハイマー病の処置のためにMEV中で送達できる、またはコードできる。インビトロモデルは入手可能であり、パリ第11大学国立健康医学研究所からのグループによって開発された[Chambraud et al. (2007) FASEB J. 21(11):2787-97; およびChabraud et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(6):2658-63を参照されたい]。RNAi 1およびRNAi 2と名付けられた、ラットFKBP52に特異的な2つの異なる低分子干渉RNA(s iRNA)二本鎖を導入することによって、PC12培養細胞におけるFKBP52の枯渇の効果を調べた。s iRNAのセンス配列およびRNAi 1に対応するスクランブル配列を有するオリゴヌクレオチド二本鎖を陰性対照として使用した。これらの実験では、ウェスタンブロットによって分析されたFKBP52のレベルは、48時間後で実質的に低減され、トランスフェクションの72時間後で低いままであった。トランスフェクション

40

50

の72時間後にチューブリンおよびFKBP52染色を実施した。RNAi 1または2でトランスフェクトされた細胞では、FKBP52染色は、対照細胞において観察されたものよりも有意に低く、チューブリン染色は、PC12細胞表現型の変化を明らかにし、特に、PC12細胞におけるFKBP52の喪失の結果、これらの細胞は伸長を形成した。したがって、これらの細胞は、NGFで処置されたPC12細胞と比較され得る、分化した表現型を獲得した。対照でトランスフェクトされた細胞では、有意な変化は観察できなかった。別の研究において、Chambraudら[(2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(6):2658-63]が、FKBP52が、PC12細胞においてタウ蓄積および神経突起成長を防ぐことを報告している。テトラサイクリン応答性エレメントに基づく、FKBP52誘導可能発現システムを使用した。このシステムによって、FKBP52の細胞性役割を決定するための安定に形質転換されたPC12細胞株の作製が可能となる。陽性に試験されたクローンの中で、1つのクローン、いわゆるH7C2が選択され、PC12細胞に対するFKBP52過剰発現の効果を研究するために、FKBP52とタウの間の関係をさらに調査するために使用された。基本条件下で、H7C2細胞は、内因性FKBP52を発現し、ドキシサイクリン(Dox)を用いる処置の結果、組換えFKBP52タンパク質発現が著しく増大した。H7C2細胞におけるFKBP52誘導は、Dox処置の5日後に約4倍であった。次いで、タウの蓄積に対するFKBP52の効果が調べられた。タウタンパク質の量は、Doxとともに、または伴わずに神経増殖因子(NGF)(50nM)を用いて5日間処置した、または処置していない、PC12細胞またはH7C2細胞いずれかの培養物からの抽出物のウェスタンブロッティングによって決定された。PC12細胞では、FKBP52発現はNGFでの処置後に変化しなかった。予測されたように、PC12およびH7C2細胞の両方において、NGF処置後にタウの増大が観察された。H7C2細胞が、FKBP52を過剰発現するようにNGFに加えてDoxに曝露された場合には、タウタンパク質の追加の蓄積は生じなかった。NGFおよびDoxで処置されたPC12細胞では、タウタンパク質の増大が依然として観察され、Doxがタウの減少の欠如の原因である可能性は除外された。この報告は、FKBP52はPC12細胞においてNGFによって誘導されるタウの蓄積を防ぐと結論付けている。

10

20

30

40

50

【0266】

タウの1つの役割が神経突起成長を刺激することであるので、PC12およびH7C2細胞における神経突起長に対するFKBP52過剰発現の結果も調査された。H7C2細胞では、Doxを用いて1週間処置されたか否かに関わらず、NGFの不在下で神経突起成長は観察されなかった。50nMのNGFおよびDoxを用いて処置されたH7C2細胞では、対照(Doxで処置されていないH7C2)と比較して神経突起長の40%(±7)の低下が観察された。10または20nMのNGFで処置されたH7C2細胞において、神経突起長に対するDoxの同一の効果が観察された。Dox処置および未処置PC12細胞の間に神経突起長の相違が観察されなかったため、Doxはそれ自体、神経突起成長のプロセスに関与していなかった。FKBP52過剰発現に起因する神経突起成長の阻害は、PC12細胞におけるFKBP52の喪失の結果、神経突起伸長が形成されることを示す以前の報告[Chambraud et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(6):2658-63]と一致している。神経突起長に対するFKBP52効果は、タウがFKBP52へ結合し、タウを微小管から除去することによって説明できる可能性がある。FKBP52の過剰発現によってタウ蓄積を防ぐことは、神経突起長の減少と一致し、タウ機能におけるこのイムノフィリンの役割を示す。したがって、タウの蓄積を防ぐことによるアルツハイマー病の処置のために、上記の標的および配列をMEV中で送達できる、またはコードできる。

【0267】

MEVは、RNAiを送達できる。各マーカー遺伝子、例えば、ベータグルクロニダーゼ(GUS)、緑色蛍光タンパク質(GFP)真核細胞のルシフェラーゼまたは原核生物のルシフェラーゼをモジュレート(阻害または刺激)するための、例えば、siRNA

、*miRNA*の形態の標的配列、例えば、*Lux*オペロン（*luxC D A B E*）および *lux*オペロン（*luxA B C D E*）を、例えば、診断法および遺伝子発現評価（それぞれ配列番号75～80、5、6、7および62～65）のために使用できる。コーディング核酸を標的化する例示的 *siRNA*が、以下の表に示される：

【0268】

標的遺伝子	配列の種類	配列(複数可)	配列番号:
GUS	siRNA ¹	GT1 センス: 5'- TACTACTGTGGAATTGATCAGCGTTCAGATGACGCTGA TCAATTCCACAGTTTTTTTT	75
		GT1 アンチセンス: 5'- CTAGAAAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTCATCT GAACGCTGATCAATTCCACAGTGTA	76
		GT2 センス: 5'- TACTTGATCAGCGTTGGTGGGATTCAGATGATCCAC CAACGCTGATCAATTTTTTT	77
		GT2 アンチセンス: 5'- CTAGAAAAAAATTGATCAGCGTTGGTGGGATCATCT GAATCCCACCAACGCTGATCAAGTA	78
		GT3 センス: 5'- TACCTGTGGAATTGATCAGCGTTTCAGATGAACGCTG ATCAATTCCACAGTTTTTTTT	79
		GT3 アンチセンス: 5'- CTAGAAAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTCATCT GAAACGCTGATCAATTCCACAGGTA	80
		センス: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAAGUUCUUU-3' アンチセンス: 5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG-3'	83 87
		5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'	84
ホタルルシフェラーゼ	shRNA		
luxA (Lux オペロン)	siRNA	センス: 5'-CAAACAGAGGUAAUGAAAUGGUUG-3' アンチセンス: 3'-CAACCAUUUCAUACCUCUGUUUG-5'	85 88
luxB (Lux オペロン)	siRNA	センス: 5'-AUGUUAAGUUGAAUAAGUUCUGCA-3' アンチセンス: 3'-UGCUCUUGAAUAAGUUGAAUUGAU-5'	86 89

Lu et al., (2004). RNA silencing in plants by the expression of siRNA duplexes. *Nucleic Acids Research*, 32(21):e171).

【0269】

GUS コーディング配列は、配列番号81に示され、コードされるタンパク質は、配列番号82に [Lu et al., (2004) *Nucleic Acids Research* 32(21):e171を参照されたい]；また配列番号59および60に示されている。

【0270】

当業者に公知の他のレポーターを、エキソロードされたMEVを用いて送達できる。

【0271】

他の異種カーゴは、例えば、抗血管新生剤を含む。抗血管新生剤は、血管新生の促進に関与する増殖因子または増殖因子受容体に結合する、タンパク質、例えば、抗体、Fc融合物およびサイトカインであり得る。抗血管新生剤の例として、それだけには限らないが、血管内皮増殖因子(VEGF)に結合する、またはVEGF-Rに結合する抗体、VEGFもしくはVEGF-R発現のレベルを低減するRNAベースの治療薬、VEGF-毒素融合物、RegeneronのVEGFトラップ、アンギオスタチン(プラスミノゲン

断片)、抗トロンビンⅢ、アンギオザイム、ABT-627、Bay 12-9566、Benefin、ベバシズマブ、ビスホスホネート、BMS-275291、軟骨由来阻害剤(CDI)、CAI、CD59補体断片、CEP-7055、Col 3、コンプレタスタチンA-4、エンドスタチン(コラーゲンXVII断片)、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、フィブロネクチン断片、GRO-ベータ、ハロフジノン、ヘパリナーゼ、ヘパリン六糖断片、HMV833、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)、IM-862、インターフェロナルファ、インターフェロンベータ、インターフェロングamma、インターフェロン誘導可能タンパク質10(IP-10)、インターロイキン-12、クリングル5(プラスミノゲン断片)、マリマスタット、メタロプロテインナーゼ阻害剤(例えば、TIMP)、2-メトキシエストラジオール、MMI 270(CGS 27023A)、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤(PAI)、血小板因子-4(PF4)、プリノマスタット、プロラクチン16kDa断片、プロリフェリン関連タンパク質(PRP)、PTK 787/ZK 222594、レチノイド、ソリマスタット、スクアラミン、SS3304、SU5416、SU6668、SU11248、テトラヒドロコルチゾール-S、テトラチオモリブデート、サリドマイド、トロンボスポンジン-1(TSP-1)、TNP470、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF-β)、バスキュロスタチン、バソスタチン(カルレティキュリン断片)、ZS6126およびZD6474が挙げられる。

10

【0272】

異種カーゴは、1つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、MHC抗原をマスクする、または1つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション剤を含む。免疫モジュレーション剤の例として、それだけには限らないが、サイトカイン、例えば、TGFβ、IFNα、IFNβ、IFNγ、IL-2、IL-4、IL-10；商標エンブレル(登録商標)(エタネルセプト)、ヒュミラ(登録商標)(アダリムマブ)およびレミケード(登録商標)(インフリキシマブ)の下で販売されるものを含む、抗体、可溶性受容体および受容体-Fc融合物、例えば、BAFF、B7、CCR2、CCR5、CD2、CD3、CD4、CD6、CD7、CD8、CD11、CD14、CD15、CD17、CD18、CD20、CD23、CD28、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD52、CD64、CD80、CD86、CD147、CD152、補体因子(C5、D)、CTLA4、エオタキシン、Fas、ICAM、IFNα、IFNβ、IFNγ、IFNAR、IgE、IL-1、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-5R、IL-6、IL-8、IL-9、IL-12、IL-13、IL-13R1、IL-15、IL-18R、IL-23、インテグリン、LFA-1、LFA-3、MHC、セレクトリン、TGFβ、TNFα、TNFβ、TNF-R1、T細胞受容体に対するものを含む、サイトカイン、ケモカインまたは受容体アンタゴニスト；異種抗リンパ球グロブリン；他の免疫調節分子、例えば、MHC結合性ペプチドおよびMHC断片の抗イディオタイプ抗体が挙げられる。

20

30

【0273】

他の異種カーゴは、サイトカインを含み、それだけには限らないが、リンホカイン、モノカインおよびポリペプチドホルモンが含まれる。サイトカインの中に含まれるものとして、成長ホルモン、例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロリラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば、卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)および黄体形成ホルモン(LH)；肝臓増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ；ミューラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；神経増殖因子、例えば、NGF-ベータ；血小板増殖因子；トランスフォーミング増殖因子(TGF)、例えば、TGF-アルファおよびTGF-ベータ；インスリン様増殖因子-Iおよび-II

40

50

；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン、例えば、インターフェロン-アルファ、ベータおよびガンマ；コロニー刺激因子（CSF）、例えば、マクロファージ-CSF（M-CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（IL）、例えば、IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；IL-15、腫瘍壊死因子、例えば、TNF-アルファまたはTNF-ベータ；ならびにLIFおよびkitリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子がある。

【0274】

他の例示的異種カーゴは、免疫系の細胞を刺激し、所望のエフェクター機能を増強するサイトカインおよび他の薬剤を含む。例えば、NK細胞を刺激する薬剤としてIL-2が挙げられ、マクロファージを刺激する薬剤として、それだけには限らないが、C5a、ホルミルペプチド、例えば、N-ホルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニルアラニンが挙げられる。異種カーゴは、好中球を刺激する薬剤、例えば、G-CSFおよびGM-CSFなどを含む。追加の薬剤として、それだけには限らないが、インターフェロンガンマ、IL-3およびIL-7が挙げられる。

【0275】

上記のカーゴおよび説明全体を通じて他のものは、デリバリーのためにMEV中にエキソロードできるカーゴの限定されない例である。適応症および投与経路の例示的なものは、以下の表に示されている。当業者ならば、本明細書における開示内容を考慮して、他の適応症および標的を選択し、適した投与経路およびそのための製剤を同定することができる。

【0276】

標的臓器/組織	例示的適応症	例示的投与経路
肺	嚢胞性線維症	吸入
肺	嚢胞性線維症	吸入
肺	特発性肺線維症	吸入
肺	原発性線毛機能不全	吸入
肺	肺動脈性肺高血圧症	吸入
肝臓	先天性代謝異常	静脈内または肝臓への直接注射
肺	Covid-19 (防止的または治療的)	鼻腔内または吸入
リンパ系	Covid-19 (ワクチン)	静脈内または筋肉内
肺	インフルエンザ (防止的または治療的)	鼻腔内または吸入
リンパ系	インフルエンザ (ワクチン)	静脈内または筋肉内
リンパ系	ウイルス病原体	静脈内または筋肉内
リンパ系	細菌病原体	静脈内または筋肉内

【0277】

E. 医薬組成物、製剤、キット、製造品および組合せ

1. 医薬組成物および製剤

本明細書で提供されるMEVおよび負荷されたMEVを含有する組成物を、所望の経路、例えば、経口、粘膜、静脈内および他のものによる投与のために提供される医薬組成物として製剤化できる。薬学的に許容される組成物は、動物における、およびヒトにおける使用のために、また、農業適用のために、植物のために一般に認められた薬局方に従って用意された規制当局または他の当局の承認を考慮して調製される。通常、化合物は、当技術分野で周知の技術および手順を使用して医薬組成物に製剤化される（例えば、Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126

を参照されたい)。

【0278】

医薬組成物は、治療的、予防的、美容的および／または診断的適用のために使用できる。本明細書で提供されるMEVおよびカーゴが負荷されたMEVは、薬学的に許容される担体または希釈剤を用いて製剤化できる。一般に、このような医薬組成物は、カーゴの生物学的特性または他の特性を大幅に損なうことのない構成成分を含む。各構成成分は、他の成分と適合性であり、それが投与されるべき対象にとって傷害性ではないように、薬学的に、および生理学的に許容される。製剤は、それだけには限らないが、錠剤、丸剤、散剤、液体溶液または懸濁液〔例えば、注射可能な、摂取可能な、局所的製剤（例えば、点眼薬、ジェル、ペースト、クリームまたは軟膏）を含む〕、エアロゾル（例えば、鼻腔スプレーおよび吸入剤）、リボソーム、坐剤、ペッサリー、注射用および不溶解性溶液および徐放性形態を含む単位投与形で提供でき、薬学の技術分野で周知の方法によって調製できる。例えば、Gilman, et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; および Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pa.; Avis, et al. (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; および Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NYを参照されたい。全身に投与される場合には、治療用組成物は、無菌であり、発熱物質不含であり、一般に、粒状物質を含まず、pH、等張性および安定性について十分に考慮されている非経口的に許容される溶液中にある。これらの条件は、当業者には公知である。非経口的に投与可能な組成物を調製する方法は、周知であるか、または当業者には明らかとなり、例えば、"Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Formerly Remington's Pharmaceutical Sciences)", 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)に、より詳細に記載されている。

【0279】

本明細書で提供される医薬組成物は、種々の形態で、例えば、固体、半固体、液体、粉末、水性および凍結乾燥形態であり得る。適した医薬担体の例は、当技術分野で公知であり、それだけには限らないが、中でも、水、緩衝剤、生理食塩水溶液、リン酸緩衝生理食塩水溶液、種々の種類の湿潤剤、滅菌溶液、アルコール、アラビアガム、植物油、ベンジルアルコール、ゼラチン、グリセリン、炭水化物、例えば、ラクトース、スクロース、アミロースまたはデンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロースおよび散剤が挙げられる。本明細書で提供される医薬組成物は、例えば、中でも、抗酸化剤、保存料、抗菌剤、鎮痛剤、結合剤、崩壊剤、着色料、希釈剤、賦形剤、増量剤、流動促進剤、可溶化剤、安定化剤、等張化剤、媒体、粘性剤、香味剤、エマルジョン、例えば、油／水エマルジョン、乳化および懸濁剤、例えば、アラビアガム、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ベントナイト、カルボマー、カラゲナン、カルボキシメチルセルロース、セルロース、コレステロール、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、オクトキシノール-9、オレイルアルコール、ポビドン、モノステアリン酸プロピレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンエステル、ステアリルアルコール、トラガカント、キサンタンゴムおよびその誘導体、溶解剤および多岐にわたる成分、例えば、結晶性セルロース、微晶質セルロース、クエン酸、デキストリン、デキストロース、液体グルコース、乳酸、ラクトース、塩化マグネシウム、メタリン酸カリウムおよびデンプンを含む他の添加剤を含有し得る〔全般的に、Alfonso R. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkinsを参照されたい〕。このような担体および／または添加剤は、従来の方法によって製剤化でき、適した用量で対

象に投与できる。安定化剤、例えば、脂質、ヌクレアーゼ阻害剤、ポリマーおよびキレート化剤は、身体内の分解から組成物を保存できる。

【0280】

投与経路は、公知の方法、例えば、静脈内、腹腔内、大脳内、筋肉内、皮下、眼球内、動脈内、くも膜下腔内、吸入または病巣内経路による注射または注入、局所的、直腸、粘膜および徐放性システムによる方法と一致する。MEVまたはカーゴが負荷されたMEVは、注入によって、またはボラス注射によって連続的に投与できる。MEVまたはカーゴが負荷されたMEVを、局所性または全身性の方法で投与できる。

【0281】

MEVまたはカーゴが負荷されたMEVは、薬学的に許容される担体との混合物で調製できる。化合物を製剤化し、投与するための技術は、当業者には公知である（例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa. を参照されたい）。液体または粉末エアゾール（凍結乾燥した）などのこの治療用組成物は、静脈内に、または鼻もしくは肺を通して投与できる。組成物はまた、所望のように非経口的に、または皮下に投与できる。全身的に投与される場合には、治療用組成物は無菌であり、発熱物質不含であり、pH、等張性および安定性について十分に考慮されている非経口的に許容される溶液中になくてはならない。これらの条件は、当業者に公知である。

10

【0282】

使用に適した医薬組成物として、MEVまたはカーゴが負荷されたMEVが、その意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物が挙げられる。治療有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。治療上有効な投与量は、インビトロおよびインビボ法を使用することによって、および／または当業者によって決定できる。

20

【0283】

治療用製剤は、多数の従来の投与形製剤で投与できる。本明細書で提供されるMEVおよびカーゴが負荷されたMEVの投与形製剤は、所望の程度の純度を有する化合物を、生理学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することによって保存または投与のために調製される。このような材料は、使用される投与量及び濃度でレシピエントにとって非毒性であり、緩衝剤、例えば、Tris HCl、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩および他の有機酸塩；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸；低分子量（約10残基未満）のペプチド、例えば、ポリアルギニン、タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリジノン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニン；単糖、二糖およびセルロースもしくはその誘導体、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート化剤、例えば、EDTA；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール；対イオン、例えば、ナトリウムおよび／または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（ポリソルベート）、Pluronic、ポリエチレングリコールなどを含み得る。

30

【0284】

本明細書において特定の例では、安定化剤を含有する医薬組成物が提供される。安定化剤は、アミノ酸、アミノ酸誘導体、アミン、糖、ポリオール、塩または界面活性剤であり得る。一部の例では、安定な共製剤は、単一の安定化剤を含有する。他の例では、安定な共製剤は、2、3、4、5または6種の異なる安定化剤を含有する。例えば、安定化剤は、糖またはポリオール、例えば、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、イノシトール、スクロースまたはトレハロースであり得る。特定の例では、安定化剤はスクロースである。他の例では、安定化剤はトレハロースである。糖またはポリオールの濃度は、両端を含む、100mM～500mM、100mM～400mM、100mM～300mM、100mM～200mM、200mM～500mM、200mM～400mM、200mM～300mM、250mM～500mM、250mM～400mM、250mM～300mM、300mM～500mM、300mM～400mMもしくは400mM～500mM。

40

50

0 mM または約 100 mM ~ 500 mM、100 mM ~ 400 mM、100 mM ~ 300 mM、100 mM ~ 200 mM、200 mM ~ 500 mM、200 mM ~ 400 mM、200 mM ~ 300 mM、250 mM ~ 500 mM、250 mM ~ 400 mM、250 mM ~ 300 mM、300 mM ~ 500 mM、300 mM ~ 400 mM もしくは 400 mM ~ 500 mM である。

【0285】

例では、安定化剤は、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、ソルビトール、ポロキサマーおよびポリソルベートである界面活性剤であり得る。例えば、界面活性剤は、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、ソルビトール、ポロキサマーおよびポリソルベート、例えば、ポロキサマー 188、ポリソルベート 20 およびポリソルベート 80 であり得る。特定の例では、安定化剤は、ポリソルベート 80 である。界面活性剤の濃度は、製剤における質量濃度 (w/v) の%として、両端を含む、0.005% ~ 1.0%、0.01% ~ 0.5%、0.01% ~ 0.1%、0.01% ~ 0.05% もしくは 0.01% ~ 0.02% の間または約 0.005% ~ 1.0%、0.01% ~ 0.5%、0.01% ~ 0.1%、0.01% ~ 0.05% もしくは 0.01% ~ 0.02% の間である。

10

【0286】

製剤は、インビボ投与のために使用される場合には、無菌でなくてはならず、従来の薬務に従って製剤化できる。これは、凍結乾燥および再構成の前の、またはその後の滅菌濾過メンブレンを通る濾過によって容易に達成される。MEV またはカーゴが負荷された MEV は、凍結乾燥形態で、または溶液中で保存でき；それらは、凍結または冷蔵できる。ゴマ、ピーナッツまたは綿実油のような天然に存在する植物油またはエチルオレエートのような合成脂肪ビヒクルなどの他の媒体が含まれ得る。承認された薬務に従って緩衝剤、保存料および抗酸化剤が組み込まれる場合もある。

20

【0287】

本明細書で提供される MEV またはカーゴが負荷された MEV は、0.1 ~ 10 mg/mL もしくは約 0.1 ~ 10 mg/mL または適用および対象に応じて、例えば、少なくとも 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10 mg/mL もしくはそれより多くもしくは少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10 mg/mL もしくはそれより多くである濃度など、より高いまたはより低い量の組成物中の濃度で提供され得る。溶液の容量は、1 ~ 100 mL または約 1 ~ 100 mL、例えば、少なくとも 0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 mL もしくはそれより多くもしくは約 0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 mL もしくはそれより多くなどであり得る。一部の例では、MEV またはカーゴが負荷された MEV は、リン酸緩衝生理食塩水中で供給される。

30

40

【0288】

本明細書で提供される MEV またはカーゴが負荷された MEV は、制御放出または徐放性組成物として提供され得る。高分子材料は、本明細書で提供される MEV およびカーゴが負荷された MEV の制御放出または徐放を達成できる丸剤およびカプセル剤の製剤化のために当技術分野で公知である [例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Langer and Peppas (1983)]

50

J. Macromol. Sci. 23:61を参照されたい；Levy et al. (1985) Science 228:190；During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351；Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105；米国特許第5,679,377号、同5,916,597号、同5,912,015号、同5,989,463号、同5,128,326号；およびPCT公開番号WO99/15154およびWO99/20253も参照されたい。徐放性製剤において使用されるポリマーの例として、それだけには限らないが、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－ｃｏ－酢酸ビニル）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（PLG）、ポリ無水物、ポリ（N－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（PLA）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（PLGA）およびポリオルトエステルが挙げられる。一般に、徐放性製剤において使用されるポリマーは、不活性であり、浸出可能不純物を含まず、保存の際に安定であり、無菌であり、生分解性である。徐放性製剤の生成のために当技術分野で公知の任意の技術を使用して、本明細書で提供されるMEVまたはカーゴが負荷されたMEVを含有する徐放性製剤を生成できる。

10

【0289】

一部の例では、医薬組成物は、本明細書で提供されるMEVまたはカーゴが負荷されたMEVおよび併用療法のための1つまたは複数の追加の薬剤、例えば、抗体または他の治療薬を含有する。

20

【0290】

2. 製造品／キットおよび組合せ

MEVまたはカーゴが負荷されたMEVの医薬組成物を、パッケージング材料、特定のMEVまたはカーゴが負荷されたMEVの投与によって処置できる疾患または状態、例えば、本明細書で記載される、または当技術分野で公知の疾患および状態を処置するのに有効である医薬組成物、ならびにカーゴ、例えば、抗体または核酸分子が、感染、疾患または障害を処置するために使用されるべきであることを示す標識を含有する製造品としてパッケージングできる。医薬組成物は、単回用量または複数回用量のための一定量の医薬組成物を含有する単位投与形でパッケージングされ得る。パッケージングされた組成物は、投与の前に再構成され得る（例えば、水または生理食塩水を用いて）カーゴが負荷されたMEVを含有する医薬組成物の凍結乾燥粉末を含有し得る。

30

【0291】

本明細書で提供される製造品は、パッケージング材料を含有する。医薬品製品のパッケージングにおいて使用するためのパッケージング材料は、当業者に周知である（例えば、米国特許第5,323,907号、同5,052,558号および同5,033,252号を参照されたい）。医薬品パッケージング材料の例として、それだけには限らないが、ブリスターパック、ボトル、チューブ、吸入器〔例えば、加圧定量吸入器（MDI）、ドライパウダー吸入器（DPI）、ネブライザー（例えば、ジェットまたは超音波ネブライザー）および他の1回呼吸液体システム〕、ポンプ、バッグ、バイアル、容器、シリンジ、ボトルならびに選択された製剤および意図される投与様式および処置に適した任意のパッケージング材料が挙げられる。

40

【0292】

MEVまたはカーゴが負荷されたMEVは、組合せとして、およびキットとして提供され得る。キットは、1つまたは複数の構成成分、例えば、使用のための使用説明書、デバイスおよび追加の試薬（例えば、組成物の希釈および／または凍結乾燥されたタンパク質の再構成のための滅菌水または生理食塩水溶液）、ならびに方法の実行のための構成成分、例えば、チューブ、容器およびシリンジを含んでもよい。例示的キットは、本明細書で提供されるMEVまたはカーゴが負荷されたMEVを含み得る、また、使用のための使用説明書、MEVまたはカーゴが負荷されたMEVを対象に投与するためのデバイス、対象から得られた試料においてMEVまたはカーゴが負荷されたMEVを検出するためのデバイス、および対象へ追加の治療薬を投与するためのデバイスを含んでもよい。

50

【0293】

キットは、使用説明書を含んでもよい。使用説明書は通常、M E Vまたはカーゴが負荷されたM E V、適宜、キットに含まれる他の構成成分ならびにM E Vまたはカーゴが負荷されたM E Vを投与するための、対象の適切な状態、適切な投与量、投与計画および適切な投与方法を決定するための方法を含む投与の方法を説明する具体的な表現を含む。使用説明書はまた、処置時間の持続期間にわたって対象をモニタリングするためのガイダンスを含み得る。

【0294】

キットはまた、本明細書で記載される医薬組成物および診断のための物品を含み得る。例えば、このようなキットは、対象においてM E Vおよびカーゴが負荷されたM E Vの濃度、量または活性を測定するための物品を含み得る。

10

【0295】

一部の例では、M E Vまたはカーゴが負荷されたM E Vは、M E Vまたはカーゴが負荷されたM E Vまたは単離された生体試料（例えば、腫瘍細胞、例えば、対象から得られた循環腫瘍細胞または対象から切り出された腫瘍細胞）中のカーゴの検出のために診断キットにおいて提供される。

【0296】

本明細書で提供されるキットはまた、M E Vを対象に投与するためのデバイスを含み得る。対象に医薬を投与するための当技術分野で公知のさまざまなデバイスのいずれも、本明細書で提供されるキットに含めることができる。例示的デバイスとして、それだけには限らないが、皮下ニードル、静脈内ニードル、カテーテル、ネブライザー、および吸入器が挙げられる。通常、組成物を投与するためのデバイスは、組成物の投与の所望の方法と適合する。

20

【0297】

3. 併用療法

本明細書で提供されるカーゴが負荷されたM E Vは、1つまたは複数の他の治療レジメンまたは薬剤の前、後またはそれと同時に投与できる。熟練した医師は、経験的に、または薬剤の薬物動態および作用様式を考慮することによって、各治療レジメンもしくは薬剤の適当な用量（単数または複数）ならびに投与の適当なタイミングおよび方法を決定できる。追加の治療レジメンまたは薬剤は、カーゴが負荷されたM E Vの有効性または安全性または他の特性を改善する場合がある。一部の例では、追加の治療レジメンまたは薬剤は、同一疾患または併存疾患を処置できる。一部の例では、追加の治療レジメンまたは薬剤は、カーゴが負荷されたM E Vまたはカーゴの投与に関連する、当技術分野で公知のもしくは本明細書に記載の1つまたは複数の副作用を回復させる、低減するまたは排除することができる。

30

【0298】

例えば、本明細書で記載されるカーゴが負荷されたM E Vは、化学療法、放射線療法または化学療法および放射線療法とともに、または抗ウイルスもしくは抗菌もしくは他の病原体療法のため投与でき、カーゴが負荷されたM E Vは、他の抗病原体治療薬および処置とともに投与できる。カーゴが負荷されたM E Vは、それだけには限らないが、抗体、細胞傷害性薬剤、化学療法薬、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、キナーゼ阻害剤、抗血管新生剤、心臓保護剤、免疫賦活性剤、免疫抑制剤、血液細胞の増殖を促進する薬剤、血管新生阻害剤、タンパク質チロシンキナーゼ（PTK）阻害剤、FcγRIIbまたは他のFc受容体阻害剤または他の治療薬を含む、1つまたは複数の他の予防薬または治療薬と組み合わせて投与できる。

40

【0299】

1つまたは複数の追加の薬剤は、カーゴが負荷されたM E Vと同時に、逐次または断続的に投与できる。薬剤は、例えば、同一医薬組成物または同一デリバリー方法の一部として同時投与できる。一部の例では、薬剤は、カーゴが負荷されたM E Vと同時に同時投与できるが、異なるデリバリー手段によってである。薬剤はまた、カーゴが負荷されたM E

50

Vの投与とは異なる時間であるが、組み合わせられた予防的または治療的效果を有するのに十分に近い時間で投与できる。一部の例では、1つまたは複数の追加の薬剤は、選択された期間によって隔てられたカーゴが負荷されたMEVの投与に続いて、またはその前に投与される。一部の例では、期間は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月、2ヶ月または3ヶ月である。一部の例では、1つまたは複数の追加の薬剤は、複数回投与される、および／または本明細書で提供されるカーゴが負荷されたMEVは、複数回投与される。

【0300】

F. カーゴが負荷されたMEVの投与および投与経路

1. 投与経路

本明細書で提供されるカーゴが負荷されたMEVは、生物製剤を含む医薬品の投与のための当技術分野で公知の任意の方法または経路によって対象に投与できる。カーゴが負荷されたMEVは、種々の経路によって投与できる。投与経路には、それだけには限らないが、全身、局所および局所性投与が含まれる。論じられるような投与経路には、経口投与、経腸投与、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下および腔内投与、局所的、硬膜外を含む非経口、局所的、鼻腔内、膈内、外陰膈、食道(esophageal)、食道(roesophageal)、気管支、直腸および肺を含む粘膜が含まれる。

【0301】

カーゴが負荷されたMEVは、局所性または経皮作用のために疾患の部位で対象に外部から投与できる。カーゴが負荷されたMEVを含有する組成物は、上記で論じられたように、処置される疾患、障害または状態の標的組織または臓器に応じて任意の経路によって投与できる。脾臓を標的化するために、例えば、経口投与が利用される。このような投与のためのMEVは、液体または固体として製剤化される。実施例で示されるように、経口投与後、示されるようにMEVは胃を通して腸へ入り、次いで、脾臓において見出される。これは、胃の中の厳しい条件を生き残ることができないので経口投与できない哺乳動物MEVと比較して、MEVの差異であり、利点である。投与は、注入、吸入によって、ボラス注射によって、上皮または粘膜皮膚層(例えば、局所、経口、膈内、直腸および腸管粘膜)を介した吸収によってであり得る。

【0302】

カーゴが負荷されたMEVを含有する組成物は、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に、またはそれと連続して投与できる。例えば、カーゴが負荷されたMEVは、注入ポンプまたはシリンジポンプなどによる注入デリバリーによって投与され、また別の治療薬と組み合わせ、もしくは単剤療法として投与される場合もある。

【0303】

方法および／または投与経路は、本明細書で提供される投与と関連する有害副作用を軽減するために変更できる。例えば、患者が軽度または中程度(すなわち、グレード1または2)の注入反応を起こす場合には、注入速度を低減する(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれより多く低減する)ことができる。患者が重度(すなわち、グレード3または4)の注入反応を起こす場合には、注入を一時的または永久に中止することができる。

【0304】

一部の例では、対象が有害副作用、例えば、重度皮膚毒性、例えば、重度ざ瘡様発疹を起こす場合には、処置調整を行うことができる。例えば、有害副作用の出現後、例えば、1~2週間、または有害副作用が改善するまで投与を遅延することができる。一部の例では、有害副作用の追加の出現後、投与量を低減することができる。当技術分野における熟練した医師または他の熟練した施術者によって、特定のレジメンおよび処置プロトコルを確立することができる。

【0305】

デリバリーのための適当な方法は、カーゴが負荷されたMEVまたはカーゴが負荷されたMEVを含有する医薬組成物の投与量の特性に基づいて当業者によって選択できる。こ

10

20

30

40

50

のような特性には、それだけには限らないが、溶解度、吸湿性、結晶化特性、融点、密度、粘性、流動性、安定性および分解プロファイルが含まれる。実施例に詳述されるように、MEVの投与経路がその体内分布を決定する。示されるように、投与後、MEVは、哺乳動物および他のEVとは異なる組織および臓器中に分布する。

【0306】

2. 薬物デリバリーシステムとしてのMEVを含有する組成物

上記で論じられ、実施例において実証されるように、MEVおよびMEVを含有する組成物は、MEVが、選択されたカーゴによって処置できる疾患、障害または状態に關与する臓器または組織を標的化するための特定の投与経路のために製剤化される、薬物デリバリーシステムと考えることができる。組成物は、追加の構成成分、例えば、併用療法のための、および／または投与のためのデバイスのための別の治療薬を含んでもよい。

10

【0307】

組成物または薬物デリバリーシステムは、例えば、経口デリバリー、静脈内デリバリー、筋肉内デリバリー、鼻腔内デリバリー、皮下デリバリー、局所的デリバリー、粘膜デリバリー、腹膜内デリバリー、腫瘍内デリバリーまたは吸入デリバリーのために製剤化された細胞外小胞（MEV）を含有する。MEVは、細胞培養物から単離され、カーゴが外因的に負荷される。MEVは、カーゴが標的臓器または組織に送達されるデリバリーの経路のために製剤化される。標的臓器または組織には、肺、肝臓、脾臓、腸、脳、脊髄、末梢神経、リンパ組織、眼、粘膜組織、皮膚、造血組織、脾臓、筋肉、骨、心臓、内分泌組織および腎臓が含まれる。標的臓器または組織は、例えば、鼻－頬側、眼性、泌尿生殖器性、腔内または直腸であり得る粘膜組織である。カーゴが負荷されたMEVを含有する組成物または薬物デリバリーシステムは、懸濁液または、ナノエマルジョンであり得るもしくはマイクロエマルジョンであるエマルジョンとして製剤化され得る。薬物デリバリーシステムは、経口投与用の錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、散剤、トローチ剤、顆粒剤、液体、オイルとして製剤化され得る、または鼻腔投与もしくは経口投与もしくは吸入もしくは吸入投与もしくは気管内投与用の懸濁液もしくはエマルジョンである。上記のように、MEVの例示的なものとして、クロレラ属の細胞外小胞があり、その中に生物活性分子カーゴが負荷される。クロレラ属の種として、それだけには限らないが、クロレラ・エリブソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスが挙げられる。

20

30

【0308】

外因的に負荷されたカーゴは、疾患、障害もしくは状態を処置もしくは防止するための、またはその症状を処置もしくは防止するための治療薬であり得る、例えば、カーゴは、タンパク質を含むまたはコードする、あるいは、疾患、障害もしくは状態になるリスクを防止もしくは低減するための、または疾患、障害もしくは状態の重症度を低減するための予防薬である小分子治療薬であるなど。カーゴは、核酸、タンパク質、小ペプチド、ペプチド、ポリペプチド、小分子薬物、または診断法のための検出可能な試薬を含む任意の目的の他の分子を含み得る。カーゴは、MEV中にエキソローディングするための、および／または当業者に公知の目的の複合体を含む、本明細書に記載された任意のものおよび任意の分子（複数可）を含む。例えば、上記および下記節において記載される、薬物デリバリーシステムのための外因性カーゴならびに組成物およびMEVは、例えば、1つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、MHC抗原をマスクする、または1つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション剤を含み得る。外因性カーゴは、ホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインを含み得る、またはホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインをコードする核酸を含み得る。それらの例示的なものとして、ヒト成長ホルモン、N－メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、レラキシン、プロリラキシン、糖タンパク質ホルモン、例えば、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）および黄体形成ホルモン（LH）、肝増殖因子、線維芽細胞増殖因

40

50

子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子ーアルファおよびーベータ、ミューー管抑制物質、ゴナドトロピン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン（TPO）、神経増殖因子、トランスフォーミング増殖因子（TGF）、インスリン様増殖因子ーIおよびーII、エリスロポエチン（EPO）、骨誘導因子、インターフェロン、例えば、インターフェロンーアルファ、ーベータ、およびーガンマ、コロニー刺激因子（CSF）例えば、マクロファージーCSF（M-CSF）、顆粒球ーマクロファージーCSF（GM-CSF）、および顆粒球ーCSF（G-CSF）またはインターロイキン（IL）の中から選択されるホルモンまたはサイトカインまたは増殖因子のうち1つまたは複数がある。カーゴは、mRNA媒介性遺伝子療法、遺伝子サイレンシング、遺伝子置換、遺伝子過剰発現および／または遺伝子編集のために含むことができる、遺伝子調節、遺伝子置換、遺伝子過剰発現、遺伝子編集、細胞代謝の調節、細胞機能およびタンパク質療法のためのペプチドまたはタンパク質のうち1つまたは複数を含むことができる。mRNA媒介性遺伝子療法またはタンパク質療法は、先天性代謝異常を処置することであり得る。カーゴは、ワクチン、例えば、タンパク質ワクチンまたはmRNAワクチンを含むことができる。本明細書において記載されるようなワクチンは、免疫防御的および／または予防的であり得る、および／または疾患、障害もしくは状態を処置できる。

10

【0309】

MEVカーゴは、がんまたは感染性疾患または代謝性疾患または神経変性疾患または他のCNS障害または加齢または加齢関連疾患または遺伝病または眼性障害または免疫学的障害または内臓泌尿生殖器性臓器、心血管系および関連臓器および組織、造血もしくはリンパ組織、感覚系臓器および組織、泌尿生殖器性臓器および組織、筋肉組織、骨および／もしくは内分泌組織が関わるものの処置のための治療用生成物である、核酸またはタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を含み得る。内臓には、例えば、肝臓または脾臓または肺臓または脳が含まれる。MEVを含有する組成物および薬物デリバリーシステムは、経口投与、非経口投与、局所的投与、局所性投与、腫瘍内投与、全身投与、粘膜投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹膜内投与、経皮投与、鼻腔内投与、吸入、気管内投与のために製剤化され得る。それらは、経口デリバリーのために、または鼻腔内、吸入もしくは吸入投与のためのエアゾールのために製剤化され得る。本明細書で提供される組成物は、MEV中のカーゴを臓器または組織へ送達するために使用でき、投与経路は、目的の臓器または組織を標的化するために選択される。

20

30

【0310】

G. 種々の経路による投与後のMEVの体内分布

本明細書で提供されるカーゴが負荷されたMEVは、例えば、全身および局所性投与を含むポリペプチドの投与のために当技術分野で公知の任意の方法によって対象に投与できる。カーゴが負荷されたMEVは、非経口（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下および腔内などの経路）、局所的、硬膜外または粘膜（例えば、局所的、鼻腔内、経口、膣内、外陰膣、食道（esophageal）、食道（oro-esophageal）、気管支、直腸および肺などの経路）などの経路によって投与できる。カーゴが負荷されたMEVは、局所性または経皮作用の発揮のために対象に疾患の部位で外部から投与できる。カーゴが負荷されたMEVを含有する組成物は、任意の従来経路、例えば、注入、吸入によって、ボラス注射によって、または上皮もしくは粘膜皮膚層（例えば、局所、経口、膣内、直腸および腸管粘膜）を介した吸収によって投与できる。カーゴが負荷されたMEVを含有する組成物は、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に、またはそれと連続して投与できる。例えば、カーゴが負荷されたMEVは、注入ポンプまたはシリンジポンプなどによる注入デリバリーによって投与され、また別の治療薬と組み合わせて、もしくは単剤療法として投与される場合もある。

40

【0311】

方法および／または投与経路は、本明細書で提供される投与と関連する有害副作用を軽減するために変更できる。例えば、患者が軽度または中程度（すなわち、グレード1また

50

は 2) の注入反応を起こす場合には、注入速度を低減する（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% またはそれより多く低減する）ことができる。患者が重度（すなわち、グレード 3 または 4）の注入反応を起こす場合には、注入を一時的または永久に中止することができる。

【0312】

一部の例では、対象が有害副作用、例えば、皮膚毒性、例えば、重度ざ瘡様発疹を起こす場合には、処置調整を行うことができる。例えば、有害副作用の出現後、例えば、1～2 週間、または有害副作用が改善するまで投与を遅延することができる。一部の例では、有害副作用の追加の出現後、投与量を低減することができる。熟練した医師または他の熟練した施術者によって、特定のレジメンおよび処置プロトコルを確立することができる。

10

【0313】

デリバリーのための適当な方法は、カーゴが負荷された MEV またはカーゴが負荷された MEV を含有する医薬組成物の投与量の特性に基づいて当業者によって選択できる。このような特性には、それだけには限らないが、溶解度、吸湿性、結晶化特性、融点、密度、粘性、流動性、安定性および分解プロファイルが含まれる。

【0314】

1. 哺乳動物 EV の体内分布

哺乳動物起源の EV の体内分布および薬物動態は、広く研究されている。哺乳動物細胞由来 EV を用いる処置は、一般に、静脈内または腹膜内投与経路に基づいている。哺乳動物 EV の全身投与の際の主な標的臓器は、肝臓、脾臓および肺である。種々の細胞供給源由来の蛍光標識された哺乳動物 EV の組織分布の包括的研究 [Wiklander et al. (2015) J. Extracellular Vesicles 4:26316 を参照されたい] によって、マウスにおける静脈内 (i.v.) 注射の 24 時間後、肝臓において最高蛍光シグナルがあり、続いて、脾臓、消化管および肺においてであることが実証された。さらに、細胞供給源、EV 用量および投与経路は、EV 分布に影響を及ぼすと示された；例えば、より高い EV 用量の注射は、より低い用量と比較して、おそらくは単核食細胞系 (MPS) の飽和によって引き起こされる、相対的に低い肝臓蓄積をもたらした。腹膜内 (i.p.)、皮下 (s.c.) および i.v. 投与の比較によって、腹膜内および皮下用量は、i.v. 注射と比較して、肝臓および脾臓における EV 蓄積の低減ならびに脾臓および消化管蓄積の増強をもたらすことが示された。全身投与された EV は、単核食細胞系 (MPS) によって、特に、肝臓および脾臓において取り込まれると報告されている。クリアランスの機序は、合成ナノ粒子、例えば、リポソームについて記載されたものと似ている [Van der Meel et al. (2014) J. Control. Release 195:72-85]。脾臓蓄積の大部分は、脾臓による取り込みではなく脾臓における EV 保存によって引き起こされる [Lai C.P. et al. (2014) ACS Nano 8:483-494]。他の投与経路後の哺乳動物 EV の体内分布も調査されている。中枢神経系の標的化のために、クルクミンが負荷された哺乳動物 EV の鼻腔内投与は、脳における EV 局在性をもたらした。薬物レベルは、投与の 1 時間後にピークに達し、12 時間後に相当な量が検出されたが、毒性効果は観察されなかった [Zhuang et al. (2011) Mol. Ther. 19:1769-1779]。

20

30

40

【0315】

一般に、哺乳動物 EV は、種々の pH および温度でのその低い安定性、消化管における生体分子の迅速な分解および経口投薬のための工業的規模の生成の制限が理由で、経口デリバリーのために利用されない [Cheng et al. (2019) Protein Cell 10:295-299]。今までのところ唯一の例外は、牛乳由来 EV であり、これはマウスへの経口デリバリーの際、腸における迅速蓄積を含んでいた、全身インビボイメージングシステム (IVIS) を用いて分析された分布のパターンを示し、EV は、2 および 6 時間後に検出可能であり、続いて、蛍光シグナルは、24 時間で、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓および消化管において観察された。48 時間後、蛍光シグナルは、臓器のほとんど内で鎮静し、系からのナノ小胞のクリアランスを示した [Samuel et al. (2021) Nat Commun 12:395

50

0、doi.org/10.1038/s41467-021-24273-8]。したがって、哺乳動物EV（乳以外の供給源由来の）は、腸管によっておよび腸から吸収されることができず、標的臓器において生体利用可能となる [Zhong et al. (2021) Biomaterials. 277:121126, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121126]。

【0316】

実施例において本明細書において示され、以下に論じられるように、MEVは、哺乳動物細胞由来EVと比較して、消化管の厳しい環境中で安定である。したがって、本明細書において記載されるような微細藻類EVは、経口投与および薬物デリバリーに特に適している。

【0317】

10

2. 微細藻類EV体内分布

本明細書において、クロレラ属由来の本明細書で提供されるものを含むMEVは、牛乳EVを含む哺乳動物EVとは別個である特性を有することが示されている。例えば、以下で論じられる著しい相違は、MEVは経口的に投与できることおよび主な標的は脾臓、おそらくは白脾臓であることである。

【0318】

本明細書で提供されるMEVは、さまざまな生物活性分子、例えば、mRNA、siRNAおよびmiRNAなどのRNA、タンパク質、ペプチドおよび小分子を送達できる。これらは、組織特異的生成物および／または疾患特異的生成物などを含む。以下に論じられるように、各経路を使用して、特定の臓器を標的化でき、特定の疾患を処置できる。MEVは、各経路による投与のために製剤化できる。したがって、特定の疾患を処置するため、および特定の投与経路のためであるMEVを含有する組成物が提供される。

20

【0319】

本明細書において、投与経路によって、MEVの運命が決定されること、またMEVの最終的な位置は、投与経路の関数であることが示されている。MEVの標的およびエンドポイントには、それだけには限らないが、肝臓、脾臓、肺、腸および脳が含まれる。投与経路には、それだけには限らないが、呼吸器（鼻、肺）、経口（消化性）、静脈内、中枢神経系（CNS）および局所的が挙げられる。経路の選択は、最終的な標的およびペイロードに応じて変わる。本明細書において、鼻腔内投与は、肺に進み、スプレーを介した気管内は、肺（複数可）に進み、静脈内は脾臓および肝臓に蓄積し、経口（oral）[経口（per os）]は消化管および脾臓に進むことが示されている。対照的に、哺乳動物EVは、経口的に摂取することはできない。

30

【0320】

MEVはヒト細胞によって容易に内部移行される。例えば、インビトロで、1000／1のMEV／細胞の比率で培養中の細胞、例えば、A549細胞に投与される場合には、細胞の93%がMEVを内部移行し、これは細胞をMEVと接触させた24～48時間以内に生じた。

【0321】

DIR標識されたMEVを、4つの経路：鼻腔内（IN）、気管内（IT）、静脈内（IV）および経口を介してマウスに投与し、時間の関数としての全身イメージングによって、MEVの運命を3日間可視化し、続いて、マウスを殺して研究のために臓器を回収した。実施例において示されるように、静脈内投与は、投与後約4～12時間で肝臓を標的化し、10～30時間で脾臓を標的化し、赤脾臓中にあると思われる。経口投与は腸および脾臓を標的化する。本明細書において、MEVは、経口的に利用可能であり、それらは、胃を通る通過に耐え、0.5時間～4時間で腸に、次いで、0.5時間～10時間で脾臓に到達することが示されている。興味深いことは、脾臓への経路であり、免疫系ヘカージを標的化し、送達し、4時間～28時間蓄積することすることに関連がある、血液を介する（赤脾臓へ）、およびリンパ球を介する（白脾臓へ）脾臓への2つのあり得る経路がある。これは、活性化され、脾臓に行き着き、そこで増加するリンパ球による、および／または活性化されない、脾臓（白脾臓）に進み、そこから免疫系によって広がる、ME

40

50

Vを貪食するリンパ球による、内部移行によって達成され得る。

【0322】

したがって、経口的に摂取されたMEVは、腸に進み、次いで、示されるように、脾臓に、おそらくは、白脾臓に行き着く。脾臓は、血液由来抗原に対する免疫反応を開始すること、および血液から外来材料および古いまたは損傷を受けた赤血球を濾過することに関与している。これらの機能は、脾臓中の2つの異なるコンパートメント：白脾髄（白脾臓）および赤脾髄（赤脾臓）によって実施される。2つのコンパートメントは、構造、血管組織化および細胞組成が大きく異なる〔例えば、脾臓の構造、機能および組織学の概説については、Cesta (2006) Toxicologic Pathology 34:455-465を参照された〕。

【0323】

腸において豊富な白血球細胞は、白脾臓に移動する。MEVは、経口的に摂取されると、腸の細胞によって内部移行される場合も、また以下に論じられるように、腸のリンパ球によって内部移行される場合もあり、これによってMEVは脾臓へ運ばれる。これは、経口的に投与されることができない哺乳動物小胞とは対照的である。したがって、MEVは、免疫系が標的である薬剤の、例えば、免疫モジュレーションカーゴのデリバリービヒクルを提供する。上記で論じられたように、白脾臓への経路は、例えば、活性化されたリンパ球および／または貪食リンパ球を介して起こり得る。リンパ球は、MEVを貪食でき、脾臓にホーミングする。MEVは、哺乳動物EVとは異なり、経口的に投与できない、小分子薬およびタンパク質および他の治療薬、例えば、核酸治療薬を経口的に送達する方法を提供する。特に、経口的に投与されたMEVは、免疫系が関与している、または処置が免疫系を標的化することによって達成され得る、疾患、例えば、がんおよび炎症性疾患の処置の経路を提供する。このような疾患として、それだけには限らないが、感染性疾患、自己免疫疾患、がんおよび臓器移植拒絶の防止が挙げられる。これらの疾患は、免疫細胞の活性を抑制または増強することによって処置される。

【0324】

a. リンパ系の構成成分

リンパ系は、リンパ、リンパ管およびリンパ性臓器を含む [Zgair et al., (2016) Targeting Immunomodulatory Agents to the Gut-Associated Lymphoid Tissue. In: Constantinescu C., Arsenescu R., Arsenescu V. (eds) Neuro-Immuno-Gastroenterology. Springer, Cham. (doi.org/10.1007/978-3-319-28609-9_14) における考察および以下にまとめられていることを参照されたい]。

【0325】

リンパ

リンパは、一般に、間質から排出される透明で、無色の流体であり、回収された流体および血漿タンパク質を含有し、また、脂質、免疫細胞、ホルモン、細菌、ウイルス、細胞片およびがん細胞も含有する場合がある。

【0326】

リンパ管

リンパ系は、身体第2の循環系である。リンパ系は、リンパが駆動される、一方向性であり、盲端の、毛細血管の薄壁系である。毛細リンパ管は求心性集合管に流れ込み、次いで、1つまたは複数のリンパ節の集まりを通過する。次いで、リンパ流体は、遠心性集合管、より大きな幹を、次いで、リンパ管を通過し、これが、リンパを全身循環に排出する。一次リンパ器官には、抗原を同定し、応答する成熟リンパ球を生成する胸腺および骨髄が含まれ、二次リンパ器官には、リンパ節、脾臓および粘膜関連リンパ組織 (MALT) が含まれる。二次リンパ器官内で、リンパ球が免疫応答を開始する。MALTは、粘膜全体に分布しており、多種多様な吸入された、または摂取された抗原に対する防御機序を提供する。MALTは、解剖学的位置に従って、気管支関連リンパ組織 (BALT)、鼻腔関連リンパ組織 (NALT)、唾液腺管関連リンパ組織 (DALT)、結膜関連リンパ組織 (CALT)、涙管関連リンパ組織 (LDALT) および腸関連リンパ組織 (GALT) としてカテゴリー化される。

【0327】

腸関連リンパ組織（GALT）

GALTは、エフェクターおよび免疫誘導部位から構成される。エフェクター部位は、粘膜固有層（LP）および腸管上皮全体に分布するリンパ球を含み、誘導部位は、組織、例えば、腸間膜リンパ節（MLN）、PPおよびより小さい単離されたリンパ濾胞（ILF）を含む。腸間膜（mesentary）の基部に生じる腸間膜リンパ節（MLN）は、身体中のリンパ節の最も大きい集合体である。MLNの構造は、2つの領域：髄質および皮質に分けられる。皮質は主に、T細胞領域およびB細胞濾胞から構成される。T細胞領域内で、循環リンパ球はリンパ節に入り、樹状細胞（DC）はT細胞に対して抗原を提示する。リンパ（細胞、抗原およびカイクロミクロンを含む）は、腸管粘膜から収集され、輸入リンパ管を介してMLNに到達する。リンパ流体は、その後、遠心性リンパ管を通してMLNを離れ、胸管に到達し、血液へ流れる。

10

【0328】

パイエル板（PP）は、腸の粘膜および粘膜下層中に分布するリンパ小節の収集物である。それらは、上皮ドーム領域およびT細胞領域中に分散したB細胞濾胞を含む。濾胞関連上皮（FAE）と呼ばれる上皮細胞の単層は、PPのリンパ系領域を腸管腔から分離する。FAEは、マイクロフォールド（M）細胞と呼ばれる特殊な腸細胞によって浸透されている。これらの細胞は、PPへの管腔抗原の輸送のゲートである。

【0329】

単離されたリンパ濾胞（ILF）は、腸のLP中のリンパ系細胞の組合せである。ILFは、M細胞を含むFAEによって覆われた胚中心から構成される。ILFは、腸の免疫性の誘導のためのPPの補完的系である。

20

【0330】

GALTは、ヒト身体における最大リンパ器官であり、身体中のリンパ球の半量より多くを含む。GALTは、身体中の任意の他の部分よりも、侵襲的病原体に由来するものに加えて共生細菌および食事性抗原の形態のより多くの抗原に曝露される。腸のリンパ管輸送は、親油性薬物の吸収を門脈よりも腸のリンパ管に向けてそらすことによって肝臓の初回通過代謝損失を回避する。腸の免疫系は、防御的免疫応答を必要とする抗原を区別し、無害な抗原に対する免疫低応答性（経口耐性）の状態を発生させなければならない。これは、DCによる腸管上皮における管腔抗原のサンプリングによって達成される。抗原は、GI管の濾胞関連上皮の特殊な上皮細胞であるM細胞を介して上皮を通過することができる。抗原は、根底にある上皮ドーム領域においてDCと相互作用する。抗原は、DCによってPP中の局所性T細胞に対して提示される。

30

【0331】

DCはまた、流入領域MLNに移動し、そこで局所性リンパ球に対して抗原を提示する。腸の上皮細胞を通過する抗原輸送の代替経路は、受容体媒介性輸送およびDC突起による管腔からの直接サンプリングを含む。次いで、抗原が負荷されたDCは、輸入リンパ管を介してMLNに移動し、そこでT細胞に対して抗原を提示する。その後、分化したリンパ球はMLNから胸管および血流を介して移動し、最終的に適当な免疫応答のために粘膜において蓄積する。

40

【0332】

b. GALTの標的化

経口的に投与されたMEVは、腸関連リンパ組織（GALT）を標的化できる。したがって、GALTは、MEVおよびその治療薬カーゴが、カーゴを臓器、組織および／または全身循環に送達するために使用され得る、標的（有効コンパートメント）および／または経路である。GALTは、例えば、免疫モジュレーター、化学療法薬および抗感染薬などの種々の薬理学的薬剤の有利な標的である。リンパ系は、腸のおよび他の腫瘍転移の主な経路であり、したがって、細胞傷害性薬を腸のリンパ管に標的化することを使用して、腫瘍転移を処置できる。GALTは、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、モルビリウイルス、イヌジステンパーウイルス、または重症急性呼吸器症候群（SARS）関連

50

コロナウイルス、B型肝炎およびC型肝炎などの一部のウイルスが、リンパ系内で広がり、発達するので、抗ウイルス剤のデリバリー標的である。

【0333】

したがって、本明細書で例示されるクロレラ属MEVを含むMEVは、経口デリバリーの際に免疫細胞を標的化するために使用できる。上記のように、微細藻類MEVは、経口的に投与された場合に別個のパターンの体内分布を示す。このパターンには、最初に腸蓄積し、続いて、脾臓を標的化し、そこで、最大24時間検出可能であることが含まれる（例えば、図7を参照されたい）。

【0334】

微細藻類MEVは脾臓に送達されるので、このデリバリーの機序は、免疫系の細胞に基づいている可能性がある。免疫細胞は、腸関連リンパ組織（GALT）の腸管上皮および根底にある粘膜固有層の単一細胞層に大量に存在する。免疫細胞には、T細胞、血漿細胞、肥満細胞、樹状細胞およびマクロファージが含まれる [Luongo et al. (2009) *Current perspectives. International Reviews of Immunology* 28(6):446-464、doi.org/10.3109/08830180903236486]。マクロファージ、樹状細胞、好中球およびまたB細胞は、食作用を行う。したがって、腸における免疫細胞は、MEVを食食して、それらを脾臓に送達する可能性がある。食作用後、MEVカーゴの運命は、カーゴの種類に応じて変わる可能性がある。例えば、マクロファージおよび樹状細胞は抗原提示に関与し、MEV中で送達される存在するタンパク質またはMEV中の生成物は分泌される場合があり、またはRNAのような生成物は、翻訳される場合がある。

【0335】

腸の腸管上皮および粘膜固有層中に存在する免疫細胞は、脾臓に移動し、腸に戻る。この脾臓へのホーミングは、腸から二次リンパ器官、特に、脾臓へのMEV輸送に関与している可能性がある。T細胞は、経口デリバリーの際の脾臓へのMEV輸送の一部である可能性がある、特異的なリンパ球再循環経路を示す [Mackay et al. (1990) *J Exp Med* 171:801-17]。したがって、免疫系の細胞は、経口投与されたMEVによって標的化され、この現象が、投与後数時間以内での脾臓におけるMEV局在性に寄与する。

【0336】

本明細書で示されるように、経口投与の際、MEVは腸に進み、次いで、脾臓に移動する。脾臓への経路は、血液中への吸収および／または腸における免疫細胞による内部移行によってである可能性がある。血液経路は、MEVが静脈内投与について示されたように次いで肝臓において現れるはずであるため、可能性が低い経路である。MEVが静脈内に投与される場合には、それらは主に肝臓（大量に）に、およびかなり少ない程度に脾臓に到達する。脾臓からのMEVのクリアランスは、その起源（経口またはIV）に応じて異なる動態学をたどることが本明細書で示されている。したがって、経口投与後の脾臓への移動は、静脈内に投与されたMEVとは異なる経路を使用する。口によってMEVが投与される場合には、それらは腸を通過した後に脾臓に到達する。これらの結果は、MEVが到着の経路、腸から、または血液からのいずれかに応じて脾臓内の「異なるコンパートメント」に位置づけられることを示す。論じられるように、経口投与の際には、可能性が高い経路は、腸中のMEVがGALT中に存在するリンパ球によって内部移行されるということおよび腸／GALTから脾臓へのMEVのその後の移動は、MEVがリンパ球によって輸送されるために生じるということである。腸／GALTから来ることによって、MEVは白脾臓コンパートメントに行き着く。したがって、MEVは、カーゴを、経口的に投与されることができない哺乳動物EVとは異なる臓器に送達する方法を提供する。

【0337】

3. MEVによって処置される例示的疾患および状態

標的化される臓器に基づいて、さまざまな疾患および障害がMEVによって処置され得る。MEVは、これらの疾患および状態を処置するための治療薬を含有するように負荷され、生成され得る。標的化された臓器および疾患の適当な投与経路が選択される。例えば、脾臓および腸を標的化するためには、経口投与が選択され、肺を標的化するためには、

吸入または鼻腔投与が選択される。体内分布および薬物動態データに基づいて、以下の臓器が、以下のとおりに例示される疾患を処置するために標的化され得る。

【0338】

肝臓：がん、がん転移、メタボリックシンドローム、遺伝障害（遺伝子療法のデリバリー）、アルファアンチトリプシン（AAT）欠乏症および他の先天性代謝異常、血友病、高コレステロール血症、肝臓炎症、脂肪性肝炎ならびに肝臓への治療薬のデリバリーによって治療され得る他の疾患および障害；

【0339】

脾臓：がんおよび免疫細胞障害を含む免疫モジュレーションによって処置される疾患、および脾臓への投与によって、特に、白脾臓において生じる、または白脾臓へ行き来する免疫細胞によって処置され得る、がんおよび他の疾患；

【0340】

腸：ワクチンによって処置または防止される疾患および障害、腸管感染症、細菌叢モジュレーション、クローン病、がん、潰瘍、経口的に投与された薬物、例えば、小分子およびタンパク質によって処置される疾患ならびに他のこのような疾患、障害および状態；ならびに

【0341】

肺：感染性疾患、特に、呼吸器疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺高血圧症、喘息、他の炎症性肺疾患、嚢胞性線維症、AAT欠乏症、肺疾患、がん、がん転移および他のこのような疾患および障害。

【実施例】

【0342】

H. 実施例

以下の実施例は、単に例示目的で含まれるものであり、本発明の範囲を制限しようとするものではない。

【実施例1】

【0343】

クロレラ細胞の生産および微細藻類細胞外小胞（MEV）の単離

A. 播種材料のバッチ生産

任意の株のクロレラ・ブルガリスを使用して、MEVを生成できる。例示的株として、それだけには限らないが、UTEX 265株、UTEX 395株、UTEX 26株、15 UTEX 30株、UTEX 259株、UTEX 2219株、UTEX 2714株 UTEX B 1811（UTEX Culture Collection から入手可能）、CCAP 211/19と名付けられた株、GEPEA、フランス、ナント大学（University of Nantes, France）および任意の他の適した株が挙げられ、形質転換されている、されていないに関わらず藻類細胞材料を生産するために使用できる。例示的目的のために、UTEX 265株を使用した。

【0344】

クロレラは、フラスコ／光バイオリアクター（PBR）播種まで栄養寒天スロープ上で保存した。異なる実験のために、400mL（フラスコ）～170L（異なる総容量を有するいくつかのPBR）培養物の間の異なる規模の生産を使用した。この説明は、使用したPBRの最高容量（170L、HECTOR PBR [微細藻類の培養のためにLaboratory of Process Engineering-Environment-Agri-food（GEPEA）／CNRSによって設計された「Hector」光バイオリアクター。参考文献：20160067_0017。製造年：2016年。最大サイズ：56.43×37.66cm／170L／300dpi]）に関する。

【0345】

5リットルPBRに、4Lの滅菌BG11培地を充填し（例えば、その調製の説明についてはutex.org/products/bg-11-mediumを参照されたい、および独立栄養性成長については、以下の表（表1）を参照されたい）、栄養寒天上の

10

20

30

40

50

ストック藻類スロープから直接播種した。次いで、クロレラ株を、以下の培養パラメータを使用してバブルカラムにおいてバッチ培養として増殖させた：23℃の温度；培地 pH 7.5～8.0；光強度： $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ；光周期：連続。クロレラのバイオマス濃度、比増殖速度およびバイオマス生産性を毎日推定した。通常、6日の連続成長後、培養物は、およそ1.2g/Lのバイオマス濃度に到達した。H E C T O R P B Rへのその後の生産スケールアップのために20L総収穫量を収集した。

【0346】

【表1】

表1. BG11 培地の組成

	濃度	MI
塩ミックス	100x	10
鉄*	1000x	1
硝酸塩*	100x	10
微量金属	1000x	1
寒天		14
H ₂ O		最大 1L
pH 7		

*沈殿の場合には、滅菌化後に添加する。

【0347】

BG11 培地のストック溶液:

硝酸塩 100×	g/L	MW	μM
NaNO ₃	150	85	1764.71
鉄 1000×			
Fe-EDTA	3	344.06	8.72
塩ミックス 100×			
K ₂ PO ₄	4	173.17	23.10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5	246.48	30.43
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3.6	147.01	24.49
Na ₂ CO ₃	2	105.99	18.87
必要に応じて HCl を添加する			
微量金属 1000×	g/L	MW	μM
H ₃ BO ₃	2.9	61.84	46.25
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.8	197.91	9.15
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	287.56	0.77
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.4	241.95	1.61
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1	249.68	0.32
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.3	237.93	0.14

【0348】

B. 準工業的光バイリアクター（PBR）における生産スケールアップ

クロレラ細胞を、170リットルの光バイリアクターシステム（H E C T O R）においてさらに培養した。滅菌 BG 1 1 培地（表1を参照されたい）に播種材料を添加して150Lの総容量にし、細胞を、バブルカラム混合を用いるセミバッチ培養として独立栄養的に増殖させた。以下の培養パラメータを使用した：18±4℃の温度；培地 pH 8.0

± 0.05 ; 光強度 : 150 ~ 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 光周期として、150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、各バッチの最初の3日、250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、4日目および5日目と、300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、6日目および7日目の間、その後収穫 : 連続、光強度の段階的増大を行う (図1を参照されたい)。

【0349】

クロレラのバイオマス濃度、成長速度およびバイオマス生産性を毎日推定した。次いで、栽培の6日目に、およそ1.5 g / Lのバイオマス濃度でクロレラ生産を実施した。

【0350】

C. クロレラの3連続バッチの生産

3つの130 Lのセミバッチでクロレラ生産を実施し、下流処置のためにそれから培養体積の約80%を無菌的に取り出し、滅菌BG11培地を補給した。収穫後、過剰の光子取り込みを避けるために光強度を140 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に下げた。播種株を100 mLの培養物から150 Lの培養物となるように設定した。微細藻類を含まない小胞濃縮物を抽出する目的で、6~7日持続する3つの連続バッチを実施した。

【0351】

培養パラメータモニタリング

1. タンパク質含量の決定

元素分析によって培養物のタンパク質含量を、製造業者によって提供された手順に従ってVario el III (Vario EL, Elementar Analyse r systeme、GmbH、ドイツ、ハーナウ)を頼って決定した。最終タンパク質含量を、元素分析によって与えられた窒素のパーセンテージに6.25を掛けることによって算出した。

【0352】

2. クロロフィル含量の推定

培養物サンプルを、Hermle遠心機 (HERMLE Labortechnik GmbH、ドイツ、ヴェーインゲン)を使用して2547 gで15分間遠心分離した。アセトン中でのビーズミリングによって得られたペレットから色素を抽出した。Genesys (商標) 10S UV-VIS分光光度計 (Thermo Scientific、米国、マサチューセッツ州)を用いて抽出物の全吸光度スペクトルを得、標準色素スペクトルに対して反復してデコンポーズして、総クロロフィル含量を得た。

【0353】

3. 増殖推定

予め秤量した0.7 μm GF / C 698フィルター (VWR、米国、ペンシルベニア州)を使用して培養物試料を濾過し、DBS 60-30 電子水分計 (KERN & SOHN GmbH、ドイツ、バーリンゲン)を使用して一定質量が得られるまで120 °Cで乾燥させることによって、乾重を得た。成長培地塩類を除去するために、すべての乾重試料をミネラル除去水で洗浄した。

【0354】

D. 微細藻類細胞外小胞の単離 : 濃縮されたMEV調製物の生成 (下流処理 : 清澄および濃縮工程)

光バイオリアクターから収穫した培養物を、細胞除去のために2,700 gで5分間室温で遠心分離した。上清を新しいボトル中に移し、2,700 gで5分間室温で再度遠心分離した。次いで、透明なMEV含有溶液を1.2 μm カットオフカートリッジフィルターを使用する膜濾過に付した。濾液を100 kDaのMWCOタンジェンシャル濾過システムを使用して濃縮した。各単離工程で、材料をクロロフィルおよび粒状物質について分光光度的に分析した。最終生成物の乾重は、< 0.01 g / Lであり、処理された培養物の初期体積に対する濃縮係数は、およそ20であった。したがって、得られたMEV溶液を、さらなる精製のために1~1.2 Lのポケット中で-50 °Cで保存した。

【0355】

E. クロレラ属微細藻類細胞外小胞の精製のための詳細なプロトコール

1. MEVと、次いで節Dに記載されるとおりに事前に清澄化され、濃縮され、保存された調製物（1.0～1.2L）を、4℃の低温室において生成物を一晩解凍する。

2. 調製物が解凍された時点で、バイオマスを遠心分離（4℃に温度を設定する）：4℃で $2 \times 10000g$ で10分間によって収穫する。

3. 上清（MEV）を収集し、 $0.65 \mu m$ フィルター上での真空フィルターによって濾過して、残存する細胞を取り除く。

4. Sartorius VivaFlowシステムを使用するタンジェンシャルフロー濾過（TFF）によってMEVを濃縮し、精製する。

a. 製造業者によって記載されるように約 $100 ml$ ／分の流水によってメンブレンを洗浄する。その後、約 $200 ml$ ／分（2／2，5バールの圧力読み取り値）で細胞不含培地（BG-11培地）を用いて回路を洗浄する。

b. MEV調製物（上清）を、約 $200 ml$ ／分（2／2，5バールの圧力読み取り値）で回路に流す。

回路およびリザーバー中の残存容量が約 $200 ml$ である時点で、TFFを使用して、ダイアフィルトレーションし、1LのPBSを使用して培地をBG-11からPBSへ変更する。

c. 回路およびリザーバー中の残存容量がPBSで約 $200 ml$ である時点で、流れを約 $100 ml$ ／分（20分、1バール）に減速する。

d. メンブレン表面上に捕捉された粒子を回収するために、 $30 \sim 60 ml$ の残存容量から、流れを $50 ml$ ／分より低い速度に減速し、PBS中のMEVが再循環することを30分間可能にする。

e. 次いで、 $0.45 \mu m$ のフィルターを使用してMEVを濾過し、超遠心によって精製する。

f. 濾過されたMEVを超遠心管に充填し、例えば、Sorvall（商標）WX Ultra 80 TST 28.38において $10000g$ （ $27400 rpm$ ）で4℃で1時間遠心分離する（最大10で加速および減速）。MEVを含有するペレットを1～2mlのPBSバッファーで再懸濁し、 $0.2 \mu m$ フィルターを使用する濾過によって滅菌し、ナノ粒子トラッキング分析（NTA；1：1000まで希釈し、その後NTA分析）によって粒子を分析する。

【0356】

F. サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によるクロレラ属微細藻類細胞外小胞の精製のためのプロトコール

MEV調製物のより高い純度が必要とされる場合には、精製の最後の工程を加える。TFFによって事前に濃縮され、超遠心によって精製され、PBSで $1 ml$ あたり 10×10^6 ～ 10×10^8 の濃度で製剤化されたMEVを、IZON製のプレパックカラムqEV1に播種する。PBS溶液でMEVを溶出する。 $0.5 ml$ の溶出画分を収集する。図2に示されるように、MEVは第1の画分において回収される。

【0357】

最初の試料中および溶出を通じて収集された画分中のMEV濃度を、ZetaView（登録商標）エンジン（Particle Matrix製のナノ粒子トラッキング分析機）を用い、Bradfordアッセイによるタンパク質の量として評価する。最も濃縮された画分（4～5）をプールし、使用まで4℃で保存する。

【実施例2】

【0358】

MEV特性決定

A. ナノ粒子トラッキング分析（NTA）

MEVを、NanoSight NS500システム（Malvern Panalytical Instruments）を使用してサイズおよび分散度（サイズ分布）について分析した。この機器は、 $488 nm$ のレーザー、高感度sCMOSカメラおよびシリジポンプを備えていた。MEV試料を、粒子を含まないPBS（ $0.02 \mu m$ 濾過し

10

20

30

40

50

たもの)で希釈して、初期試料濃度に応じて1/1000~1/10000の希釈に対応する、推奨測定範囲(1~10×10⁸粒子/mL)内の濃度を得た。

【0359】

各試料について、5つの60秒の期間の実験ビデオを、シリンジポンプ速度30を用いてNTA 3.4 Build 3.4.003(カメラレベル15-16)を使用して分析した。試料あたり合計1500フレームを調べ、これらは、観察された粒子が赤色十字でマークされ、5つ以下の青色十字が見られるように、適した検出閾値を使用して機器最適化設定を適用することによってキャプチャし、分析した。さらなる設定を「自動」に、粘性を「水」に設定した。

【0360】

特性決定のために、以下のとおりに実施例1に記載のとおりMEV試料を生成し、精製する：MEVをタンジェンシャルフロー濾過(TFF)、ダイアフィルトレーションおよび超遠心によって濃縮し、SECによって精製し、0.22μm濾過によって滅菌する。SEC精製および濾過後、MEVをPBS(1X)で10,000倍希釈し、Zeta View(登録商標)(Particle Metrix GmbH、ドイツ、アマーゼー)で測定する。

【0361】

以下の表2は、3回の独立測定の結果を示す。

【0362】

【表2】

試料(SEC後のMEV)	濃度(MEV/mL)	MEV中央値サイズ(nm)	MEVゼータ電位(mV)
#1	2.9Exp12	159.9	-20
#2	2.9Exp12	163.6	-22.58
#3	2.9Exp12	161.7	-22.3
平均	2.9Exp12	161.6	-21.63
SD	5.7Exp8	2.6	-2.3

【0363】

B. 透過型電子顕微鏡(TEM)

無傷のMEVの存在を検証するために、調製物を透過型電子顕微鏡(TEM)を使用して分析した。固定された(4%のホルムアルデヒド、0.2%のグルタルアルデヒド)MEV試料を、15~20分間Formvar/炭素コーティングされたグリッドに付着させ、PBS、続いて蒸留水で再度洗浄し、最後に0.4%の酢酸ウラニル/1.8%のメチルセルロースを用いて染色し、次いで、乾燥させた。調製物をJEOL-JEM 1230(JEOL Ltd.、日本、東京)を使用して80kVで観察し、MoradaデジタルカメラおよびiTEMソフトウェア(Olympus、ドイツ、ミュンスター)を使用して画像を獲得した。

【0364】

図3に示されたTEMイメージングは、MEVが直径約50~250nmのサイズの円形形状の小胞であることを実証する。MEVは、単一の脂質二重層膜で包まれており、その管腔は、わずかに高い電子密度を有し、膜の厚みは、約5~10nmと推定された。

【0365】

C. DiR蛍光標識

さらなる特性決定研究のために、水中で低い蛍光を有するが、膜に組み込まれると高度に蛍光するようになり、細胞膜内で外側に拡散する、親油性カルボシアニン誘導体(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;ThermoFisher Scientific)であるDiRを用いてMEVを標識した。P40画分(上記のように調製された)の新鮮な試料を、1mLのBG11

培養培地に再懸濁した。試料に5 μ lの1 mg/mLのDiR溶液を添加し、37°Cで1時間インキュベートした。次いで、28,100 rpmでKontron TST 55.5ローターを使用して、試料を100,000 gで30分間超遠心した。上清を除去し、ペレットを1 mlのPBSで2回洗浄し、100,000 gで30分間遠心分離した。最後に、ペレットを1 mlのPBSに再懸濁した。DiR標識されたMEVを4°Cで保存し、最大のあり得る蛍光強度を確実にするために迅速に使用した。750 nmで励起および780 nmで発光を用いてSpectraMax（登録商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Molecular Devices、米国）を使用して、標識されたMEVのDiR蛍光を測定した。

【0366】

D. PKH26 蛍光標識

取り込みおよび内部移行研究のために、MEVを、488 nmのレーザーによっても励起され得るピーク励起（551 nm）および発光（567 nm）を有する赤色スペクトルの蛍光色素であるPKH26（Sigma-Aldrich）を用いて標識した。P40画分（上記のように調製された）の新鮮な試料を、1 mlのPKH26キットからの希釈剤Cに再懸濁した。試料に6 μ lのPKH26色素を添加し、続いて、穏やかにピペティングすることによって30秒間連続混合する。室温で5分インキュベートした後、2 mlの、1 $\times$ PBS中の10%のBSAを添加することによって試料をクエンチする。容量を培地で最大8.5 mlにし、1.5 mlの0.971 Mスクロース溶液を、確実に乱れを作出しないようにしながら、ゆっくり、注意深くピペティングすることによってチューブの底に添加する。PKH26標識されたMEVは、スクロースクッションの上部に留まる。次いで、試料を、Kontron TST 55.5ローターを使用して2~8°Cで190,000 gで2時間超遠心分離する。上清を除去し、ペレットを1 $\times$ PBSとともに穏やかにピペティングすることによって洗浄し、100,000 gで30分間再度遠心分離する。最後に、ペレットを1 mlの1 $\times$ PBSで再懸濁する。PKH26標識されたMEVを4°Cで保存し、細胞に添加する前に0.45 μ mフィルターを用いて濾過する。

【0367】

E. フローサイトメトリー実験

LSRIIFローサイトメーターを使用し、CellQuest Proソフトウェア（BD Biosciences）を用いて分析を行った。直径0.3および1.1 μ mのラテックスビーズを調製し、製造業者の推奨に従って使用して、MEVゲートを規定した。ラテックスビーズは通常、MEVよりも、より高い屈折率を、したがってフローサイトメトリーによるより低いサイズ検出限界を有するので、獲得の間バックグラウンドノイズを避けるように前方および側方散乱の閾値を調整した。事前に規定されたMEVゲートを、分析の間すべての試料に適用した。

【0368】

F. クロレラMEV中に存在するタンパク質の同定

1. プロテオミクス解析

クロレラMEVと会合しているタンパク質の同一性および配列を決定するために、MEV試料をSDS-PAGE分離に付し、主なタンパク質バンドを小片に切り出し、アセトニトリル/100 mM重炭酸アンモニウムpH 8の1/1（v/v）溶液で数回洗浄した。次いで、タンパク質を56°Cで重炭酸アンモニウムpH 8中の100 mMジチオトレイトールを用いて45分間還元し、次いで、システイン残基を、100 mMの重炭酸アンモニウムpH 8中の55 mMヨードアセトアミドを用いて室温、暗所で30分間アルキル化した。次いで、ゲル片を100 mMの重炭酸アンモニウムpH 8中のトリプシン（1:20の比率でPROMEGA、参照V511A）によって消化し、4°Cで45分間に置き、その後、37°Cで一晩インキュベートした。質量分析計でLC-MS/MSによってトリプシンペプチドを分析し、クロレラ・ブルガリスのプロテオームを用いるMS/MSシーケンシングから推定されたペプチド配列の比較によってタンパク質を同定した。10%

10

20

30

40

50

より高い配列包括度を示すタンパク質を同定した。

【0369】

2. プロテオミクス解析からのタンパク質の配列相同性 (BLASTによる)

以下のタンパク質を、NCBI-Blast Proteinを使用して個別に「ブラスト」した。同定されたタンパク質は、クロレラ・ブルガリスに存在すると以前に特性決定されていたか、または他のクロレラ属の種：クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータ (*Chlorella desiccata*) およびクロレラ・ソロキニアナ由来の多数のタンパク質との中程度もしくは強い相同性を示したかのいずれかであった。

【0370】

－ タンパク質 CHLNCDRAFT__26010: 'アセチル-補酵素Aシンターゼ」と注釈がつけられ、アセテート-CoAリガーゼ、AMP結合およびATP結合活性を有し (MF)、アセテートからのアセチル-CoA生合成プロセス (解糖、糖新生、ピルビン酸、グリオキシル酸、ジカルボン酸およびプロピオン酸代謝) に関与する (BP)。

10

【0371】

－ タンパク質 CHLNCDRAFT__56016: 'Clp Rdメイン含有タンパク質」と注釈がつけられ、ATP結合およびATP加水分解活性を有する (MF)。

【0372】

－ タンパク質 atpA: 'ATPシンターゼサブユニットアルファ、葉緑体の」と注釈がつけられ、葉緑体チラコイド膜の成分 (CC)、ATP結合、プロトン輸送性ATPシンターゼ活性、プロトン輸送性ATPアーゼおよび加水分解酵素活性を有し (MF)、おそらくは酸化的リン酸化および光合成に関与する (BP)。

20

【0373】

－ タンパク質 atpB: 'ATPシンターゼサブユニットベータ、葉緑体の」と注釈がつけられ、葉緑体チラコイド膜の成分 (CC)、ATP結合、プロトン輸送性ATPシンターゼ活性、プロトン輸送性ATPアーゼおよび加水分解酵素活性を有し (MF)、おそらくは、酸化的リン酸化および光合成に関与する (BP)。

【0374】

－ タンパク質 tufA: '延長因子Tu」と注釈がつけられ、葉緑体の成分 (CC)、GTP結合、GTPアーゼおよび翻訳延長因子活性を有する (MF)。

30

【0375】

－ 仮定上のタンパク質 D9Q98__001761 (包括度48%)。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質 D9Q98__001760 に対する (85.6%)、およびクロレラ属の異なる種 (バリアビリス、デシカータおよびソロキニアナ) 由来の他のタンパク質に対する高度な相同体、これらの相同体のうち3つはクロレラ・ソロキニアナにおいて特性決定されている：それぞれ73%、84%および89%の配列相同性を有する、「クロロフィルa b-結合性」、「LHCII1型葉緑体のクロロフィルa b-結合性」および「MYST様ヒストンアセチルトランスフェラーゼ1」。

【0376】

－ 仮定上のタンパク質 D9Q98__002614 (包括度33%)。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質 D9Q98__001760 (72%) および D9Q98__001761 (70%) に対する、およびクロレラ属の異なる種 (バリアビリス、デシカータおよびソロキニアナ) 由来の他のタンパク質に対する高度な相同体、これらの相同体のうち2つはクロレラ・ソロキニアナにおいて特性決定されている：それぞれ89%および70%の配列相同性を有する、「クロロフィルa b-結合性」、「LHCII型の葉緑体のクロロフィルa b-結合性」；ならびにこれらの相同体のうち1つはクロレラ・デシカータにおいて特性決定されている：60%の配列相同性を有する、推定「LHCII1型葉緑体のクロロフィルa b-結合性」。

40

【0377】

－ 仮定上のタンパク質 D9Q98__006265 (包括度26%)。クロレラ・ブル

50

ガリスに相同性なし。クロレラ・ソロキニアナ由来の「DNA複製ライセンス化因子MCM3」と1つのみ相同性、56%の配列相同性を有する。

【0378】

－ 仮定上のタンパク質D9Q98__000265（包括度19%）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の2種のタンパク質と2つのみ相同性、1つのみは「鞭毛関連タンパク質」と特性決定され、58%の配列相同性を有する（クロレラ・ソロキニアナ）。

【0379】

－ 仮定上のタンパク質D9Q98__007183（包括度19%）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の5種のタンパク質と5つのみ相同性、その1つのみが「F_e-同化性1」と特性決定され、47%の配列相同性を有する、クロレラ・ソロキニアナ）。

【0380】

－ 仮定上のタンパク質D9Q98__009617（包括度15%）。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質D9Q98__000026およびD9Q98__009618に対する大部分相同体（それぞれ55%および33%の配列相同性を有する）、クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の11の他のタンパク質と、そのうち5つはクロレラ・ソロキニアナにおいて特性決定され：2つは「溶解性トランスグリコシラーゼ」、2つは「ペプチドグリカン-結合性」および1つは「スポアコートアセンブリードメイン」、それぞれ52%、34%、42%、42%および55%の配列相同性を有する。

【0381】

－ 仮定上のタンパク質D9Q98__005959（包括度12%）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の4種のタンパク質と4つのみ相同性、そのうち2つのみが特性決定されている：「延長因子ミトコンドリア性」（87%の配列相同性、クロレラ・ソロキニアナ）および「推定延長因子Tuミトコンドリア性」（86%の配列相同性、クロレラ・デシカータ）。

【0382】

－ 仮定上のタンパク質D9Q98__003812（包括度11%）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・バリアビリスおよびクロレラ・デシカータ由来の3種のタンパク質と3つのみの相同性、そのうち1つのみが特性決定されている：「推定鉄取り込み系成分EfeO」（58%の配列相同性、クロレラ・デシカータ）。

【0383】

－ 仮定上のタンパク質D9Q98__010620、部分[クロレラ・ブルガリス]（包括度11%）。クロレラ・ブルガリス由来の9種のタンパク質：D9Q98__004806、D9Q98__004582、D9Q98__004143、D9Q98__002326、D9Q98__002347、D9Q98__008273、D9Q98__008254、D9Q98__008251およびD9Q98__008376と大部分相同体（それぞれ63%、59%、47%、49%、48%、41%、41%、44%および47%の配列相同性を有する）。クロレラ・バリアビリスおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の7種のタンパク質と7つのみの相同性、そのうち3つのみが特性決定されている：「セルロソーム固定コヒーシ領域」、「新生ポリペプチド関連複合体サブユニットアルファイソ型X1」および「タンパク質CBG24242」（それぞれ43%、42%および58%の配列相同性を有する、クロレラ・ソロキニアナ）。

【0384】

－ 仮定上のタンパク質D9Q98__009216（包括度11%）。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質D9Q98__009214およびD9Q98__009215に対する高度に相同体（それぞれ98%および98%の配列相同性を有する）。クロレラ・ソロキニアナ由来の2種のタンパク質と2つのみが相同性、両方とも特性決定され

10

20

30

40

50

ている：「機械感受性イオンチャネル10」および「ベーターIg-H3ファシクリン」（それぞれ52%および53%の配列相同性を有する）。

【0385】

N-グリコシル化に感受性の部位を含有するタンパク質が、以下の表3に報告されている。

【0386】

【表3】

表3. プロテオミクスアプローチによって同定されたタンパク質のリスト。配列包括度および潜在的なN-グリコシル化部位の数が示されている。

タンパク質	配列包括度	潜在的なグリコ部位	同定された断片と関連する推定タンパク質の名称
D9Q98_001761	48%	1	LHCII型、葉緑体のクロロフィルa/b結合性タンパク質
D9Q98_002614	33%	1	LHCII型、葉緑体のクロロフィルa/b結合性タンパク質
D9Q98_006265	26%	1	n/a
D9Q98_007183	19%	1	n/a
D9Q98_000265	19%	3	n/a
D9Q98_009617	15%	0	n/a
D9Q98_005959	12%	2	翻訳延長因子Tu、ミトコンドリアのもの
D9Q98_003812	11%	4	n/a
D9Q98_010620	11%	1	n/a
D9Q98_009216	11%	4	n/a

【0387】

G. クロレラ属MEV中に存在するRNAの特性決定

クロレラ・ブルガリスの細胞外小胞中に存在するRNAの一覧を作成する目的で、本発明者らは、全RNAシーケンシング（低分子RNAおよび長いRNA）のシーケンシングを実施した。この研究では2種のシーケンシングを実施した：全RNAシーケンシング（短いランダムプライマーからの逆転写に基づく）および低分子RNAシーケンシング（RNAがライゲーションされるアダプターからの逆転写に基づく）。

【0388】

1. RNA抽出

300μLからDirect-zol（商標）RNA Microprepキット（Ozzyne、参照：ZR2061）を使用して「MEV」試料から全RNAを抽出した。RNAの濃度およびその品質は、それぞれQubit RNAアッセイキット（Fisher Scientific、参照：Q32852）およびQubit RNA IQキット（Fisher Scientific、参照：Q33221）キットを用いてQubitで蛍光光度分析によって決定した。単離後、10⁹MEVあたり約80ngの総天然RNAの濃度が定量化された。

【0389】

2. 全RNAライブラリーの調製

全RNAを、NEBNext（登録商標）Ultra（商標）II Directional RNAライブラリー調製キット（New England Biolabs、参照：E7760S）を、この研究に適している製造業者のプロトコールに従って使用して生成した。したがって、工程1.1.1では、10 μ lの容量のヌクレアーゼ不含有水がこの研究には適していた。

【0390】

得られたPCR産物を、Qiaxcel（QIAGEN、QIAxcel DNAスクリーニングキット、参照：929004）でキャピラリー電気泳動によって分析した。移動プロファイルによって、サイズが81から200塩基対の間である断片の増幅が示された（図4を参照されたい）。

10

【0391】

次いで、GeneJET PCR精製キット（Thermo Fisher Scientific、参照：K0702）を使用してライブラリーを精製した。サイズが125から175bpの間であるすべての断片を、3%のアガロースカセット、マーカー30G（Sage Sciences、参照：HTG3010）を使用するPippinHT（Sage Science）での電気泳動によって精製した。

【0392】

精製後、キャピラリー電気泳動によって精製されたプールを構成する断片のサイズを調べ、その濃度をQubit 4.0での蛍光定量的アッセイによって決定し、その後シーケンシングを行った。

20

【0393】

3. MiSeqでの、およびNovaSeq 6000システム（Illumina）でのシーケンシング

全RNAライブラリーの品質を検証するために、MiSeq試薬キットv2（500サイクル）（Illumina；参照：MS-102-2003）を使用して2X250bpでMiSeqシステム（Illumina）でPCR産物のシーケンシングを実施した。ライブラリーの混合物を、800から1000K/mm²の間のクラスターの理論的密度を得ることを可能にする濃度で充填した。陽性品質対照からの結果によって、NovaSeq 6000機器でのシーケンシングでのフォローアップが可能となった。全RNAライブラリーのシーケンシングを、ペアエンドリード（2X150bp）においてNovaSeq 6000システムで実施した。総リード数は、94,850,242であった。

30

【0394】

低分子RNAライブラリーを、MiSeq試薬キットv2（500サイクル）（Illumina；参照：MS-102-2003）を使用して2X250bpにおいてMiSeq（Illumina）でシーケンシングした。ライブラリーの混合物を、800から1000K/mm²の間のクラスターの理論的密度を得ることを可能にする濃度で充填した。

【0395】

40

H. 生物情報科学解析

FastQCツール（TotalRNA.R1.fastqc.htmlおよびTotalRNA.R2.fastqc.htmlファイル）を用いてリードの品質を評価した。cutadaptツールを使用してリードから不十分な品質のアダプター配列および外部塩基を除去した。次いで、Hisat2を使用して（デフォルト設定を使用して）、リードをクロレラ・ブルガリス参照ゲノム（cvul assembly、GenBank番号：GCA_023343905.1）に対してアラインした。40リードをクロレラ・ブルガリスゲノムとアラインした。得られたリードがクロレラ・ブルガリスゲノムとアラインされる遺伝子（対応する注釈を有する）のみを含有するcvulゲノムの注釈から、Stringtie（デフォルトパラメータ）を用いて異なるアラインメントの計数を

50

実施した。公的データに由来する利用可能な注釈は、RNA型を各配列に割り当てることを可能にしない。

【0396】

ミトコンドリアのゲノムおよびクロレラ・ブルガリスの葉緑体のものを用いて、同一アラインメント研究が実施された。リードのうちこれら2種のゲノムとアラインされたものはなかった。

【0397】

総ライブラリーの生物情報学解析は、クロレラ・ブルガリスゲノムを用いてブラストし、同定されていないタンパク質をコードする、140から250ヌクレオチドの間の約40種のRNAを示す。

【0398】

FastQCツール(SmallRNA.R1.fastqc.htmlおよびSmallRNA.R2.fastqc.htmlファイル)を用いてリードの品質を評価した。cutadaptツールを使用してリードから不十分な品質アダプター配列および外部塩基を除去した。次いで、Hisat2を使用して(デフォルト設定を使用して)、リードをクロレラ・ブルガリス参照ゲノム(cvul assembly、GenBank番号: GCA_023343905.1)に対してアラインした。cvulゲノムの注釈から、Stringtie(デフォルトパラメータ)を用いて異なるアラインメントの計数を実施した。得られたリードがアラインされる遺伝子のみを収載するSmallRNA_quantitative_measures_filtered.xlsxファイルは、1つのみの遺伝子を含む。

【0399】

分析に使用されたMEVが、ルシフェラーゼに対するsiRNAの混合物を含有していたので、少なくとも18bpの配列からbowtie2ツールを使用してルシフェラーゼ配列でのアラインメントを実施した。配列の約3.7%がルシフェラーゼ配列とアラインする。

【0400】

I. MEVリピドミクス分析

1. 試料処理

試料を氷上でゆっくりと解凍し、1.5mLのクロロホルム/メタノール(2/1、v/v)溶液を、続いて、0.5mLの純水を添加した。試料を1分間ボルテックス処理し、4℃で30分間超音波処理し、3000rpmで10分間遠心分離した。有機相を清潔な試験管に取り出し、窒素を用いて乾燥させ、200μLのイソプロパノール/メタノール(1/1、v/v)を用いて再構成した。5μLの内部標準[125μg/mLのLPC(12:0)]を添加した後、試料を12000rpm、4℃で10分間再度遠心分離した。上清を注射ボトル中に移した。

【0401】

2. LC-MS検出

分析プラットフォーム: LC-MS(Waters、UPLC; Thermo、Q Exactive); カラム: (ACQUITY UPLC BEH C18(2.1*100mm 1.7μm)); クロマトグラフィー分離条件:

- ・カラム温度: 40℃; 流量: 0.3mL/分;
- ・移動相A: アセトニトリル/水(6:4、v/v、10mMギ酸アンモニウムを有する);
- ・移動相B: イソプロピルアルコール/アセトニトリル(9:1、v/v、10mMギ酸アンモニウムを有する);
- ・注射容量: 3μL(陽イオン); 3μL(陰イオン); 自動注入温度: 4℃。

【0402】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. LC-MS 検出法において使用される移動相の勾配。

時間(分)	流量(mL/分)	A (%)	B (%)
0	0.3	70	30
10.50	0.3	0	100
12.50	0.3	0	100
12.51	0.3	70	30
16.00	0.3	70	30

10

【0403】

3. 質量分析検出パラメータ:

・ESI+: ヒーター温度 300℃; シースガス流量、45 arb; 補助ガス流量、15 arb; スweepガス流量、1 arb; スプレー電圧、3.0 KV; キャピラリー温度、350℃; S-レンズRFレベル、30%。

・ESI-: ヒーター温度 300℃、シースガス流量、45 arb; 補助ガス流量、15 arb; スweepガス流量、1 arb; スプレー電圧、3.2 KV; キャピラリー温度 350℃; S-レンズRFレベル、60%。

・スキャンモード: フルスキャン (M/Z 70~1050) およびデータ依存性質量分析 (DD-MS2、TopN=10); 分解能: 70,000 (一次質量分析) & AMP;

・衝突モード: 高エネルギー衝突解離 (HCD)

20

【0404】

4. リピドミクス分析結果

【0405】

【表 5】

30

表 5. MEV の ESI+リピドミクス分析結果

脂質イオン	脂質基	クラス	Rt	イオン式	ピーク面積
LPC(12:0)+H	LPC(12:0)+H	LPC	0.97	C20 H43 O7 N1 P1	13265407632.00
LPC(12:0)+Na	LPC(12:0)+Na	LPC	0.93	C20 H42 O7 N1 P1 Na1	2093451784.00
MG(16:0)+H	MG(16:0)+H	MG	2.72	C19 H39 O4	627421076.70
TG(36:3e)+H	TG(36:3e)+H	TG	9.64	C39 H71 O5	597367444.40
DG(18:0_16:0)+NH4	DG(34:0)+NH4	DG	9.76	C37 H76 O5 N1	545916845.40
Cer(d16:0_16:0)+H	Cer(d32:0)+H	Cer	8.67	C32 H66 O3 N1	434951801.90
DG(16:0_16:0)+NH4	DG(32:0)+NH4	DG	9.16	C35 H72 O5 N1	430757024.40
DG(18:0_16:0)+NH4	DG(34:0)+NH4	DG	9.64	C37 H76 O5 N1	408179029.10
MG(18:0)+H	MG(18:0)+H	MG	3.81	C21 H43 O4	402213163.90

40

50

【 0 4 0 6 】

【 表 6 】

表 6. MEV の ESI-リピドミクス分析結果

脂質イオン	脂質基	クラス	Rt[c-1]	イオン式	ピーク面積
Cer(d35:1+O)-H	Cer(d35:1+O)-H	Cer	7.28	C35 H68 O4 N1	31988627.10
Cer(d20:0_23:0)+HCOO	Cer(d43:0)+HCOO	Cer	10.63	C44 H88 O5 N1	12403541.83
Cer(d18:0_18:1)-H	Cer(d36:1)-H	Cer	8.41	C36 H70 O3 N1	5523529.96
Cer(m18:0_13:0)+HCOO	Cer(m31:0)+HCOO	Cer	6.75	C32 H64 O4 N1	4409871.47
Cer(d18:0_18:1)-H	Cer(d36:1)-H	Cer	8.27	C36 H70 O3 N1	3956710.64
Cer(d15:1_18:1)+HCOO	Cer(d33:2)+HCOO	Cer	6.38	C34 H64 O5 N1	2457056.42
Cer(d15:1_18:1)+HCOO	Cer(d33:2)+HCOO	Cer	6.51	C34 H64 O5 N1	2373869.91
Cer(d20:2_13:0)+HCOO	Cer(d33:2)+HCOO	Cer	4.22	C34 H64 O5 N1	2255771.34
ビオチニル PE(31:1)-H	ビオチニル PE(31:1)-H	ビオチ ニル PE	5.43	C46 H83 O10 N3 S1 P1	1767937.80
Cer(d15:0_18:2)+HCOO	Cer(d33:2)+HCOO	Cer	4.11	C34 H64 O5 N1	1324275.01

10

20

【 0 4 0 7 】

抽出された主な脂質種は以下である：リゾーホスファチジルーコリン（LPC）、モノアシルグリセロール（MG）、ジアシルグリセロール（DG）、トリアシルグリセロール（TG）およびセラミド（Cer）。クロレラ属細胞の総抽出物は、異なる脂質組成を有する（ホスファチジルーコリン（PC）、ホスファチジルーエタノールアミン（PE）、ホスファチジルーグリセロール（PG）およびジアシルグリセロール（DG） [Cecchin et al. (2019) The Plant Journal, 100:1289-1305] 。

【 0 4 0 8 】

脂肪酸組成に関して、クロレラ・ブルガリス由来のMEVは、クロレラ属総細胞抽出物に対して異なる組成を示した。MEVは、細胞抽出物よりもより長い脂肪酸を有し、より不飽和である。これらの結果は、本明細書における表にまとめられている。

30

【 0 4 0 9 】

J. MEVメタボロミクス解析

【 0 4 1 0 】

40

50

【表 7】

表 7. MEV の ESI+メタボロミクス分析結果

名称	式	分子量	m/z	RT[分]	ピーク面積
[5-クロロ-8-ヒドロキシ-6-メトキシ-3-メチル-3,4-ジヒドロ-1H-2-ベンゾピラン-1-オンと同様; Δ 質量: -130.0268 Da]	C6 H5 Cl	112.01	113.02	2.79	2275517912.00
ベンゾチアゾール	C7 H5 N S	135.01	136.02	5.58	884980308.30
N,N-ジメチルドデシルアミン	C14 H31 N	213.25	214.25	11.70	834705736.40
パルミチン酸	C16 H32 O2	273.27	274.27	9.56	574595945.20
インドール	C8 H7 N	100.03	101.04	2.80	541857154.80
n/a	n/a	101.04	102.05	2.79	514881461.80
2-(メチルチオ)ベンゾチアゾール	C8 H7 N S2	181.00	182.01	7.96	448808384.80
1-ラウロイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホクロリン	C20 H42 N O7 P	439.27	440.28	7.65	346845832.20
[2-(メチルチオ)ベンゾチアゾールと同様; Δ 質量: -15.0236 Da]	C3 H7 N2 P S2	165.98	166.99	7.96	321761664.00
2-アミノ-1,3,4-オクタデカントリオール	C18 H39 N O3	317.29	318.30	9.69	286436435.80

10

20

【 0 4 1 1 】

【表 8】

表 8. MEV の ESI-メタボロミクス分析結果

名称	式	分子量	m/z	RT[分]	ピーク面積
IS_2-クロロ-フェニルアラニン	C9 H10 Cl N O2	199.04	198.03	2.76	4768994771.00
LPE 14:0; [M-H]-	C19 H40 N O7 P	425.25	424.25	7.65	1457941932.00
2-メルカプトベンゾチアゾール	C7 H5 N S2	166.99	165.98	5.83	613566495.90
n/a	n/a	93.93	92.93	0.72	567261536.20
n/a	n/a	179.98	178.98	14.66	480949549.40
[3'-デホスホ補酵素 A と同様; Δ 質量: -589.1732 Da]	n/a	97.98	96.97	0.75	392534007.80
n/a	C25 H32 O8	460.21	459.20	8.39	304244723.20
キサントシン	C5 H4 N4 O2	152.03	151.03	0.98	269743132.80
DL-β-ロイシン	C6 H13 N O2	131.09	130.09	1.16	266337552.60
n/a	C2 H4 N2 O4 S	151.99	150.98	14.67	246714926.90

30

40

【 0 4 1 2 】

50

結果は、MEVが、いくつかの小分子構成成分、例えば、芳香族複素環式化合物（プリン塩基および有機硫黄化合物を含む）、脂肪酸、陽イオン界面活性剤、アミノ酸およびその誘導体を天然に保有することを示す。

【実施例3】

【0413】

生体分子カーゴの微細藻類細胞外小胞（MEV）中への負荷

A．例示的生体分子としてプラスミドDNA（pDNA）およびGFP（タンパク質）を使用する、生体分子（例えば、タンパク質、ペプチド、siRNA、mRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、プラスミド、複合体）の受動的および界面活性剤補助負荷

実施例1に記載されるように精製されたMEVを、PBSで特定の濃度（ 10^8 、 10^9 または 10^{10} ）に希釈した。次いで、MEV懸濁液に種々の濃度のカーゴ（pDNAについて0.2、1または $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ；GFPについて2または $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加し（ $500\sim 1000\mu\text{l}$ の総容量）、pDNAについて1または24時間、GFP（受動的負荷）について0、1または6時間インキュベートした。界面活性剤補助負荷については、MEVとpDNAの混合物に0.2%または0.5%のサポニンを補給し、 700rpm で撹拌しながら、または撹拌せずに室温で5または30分間インキュベートした。

【0414】

【表9】

表9.DNA(プラスミド、ASO)の受動的な、界面活性剤補助負荷のプロトコール;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	DNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	サポニン濃度 (%)	インキュベーション温度	インキュベーション時間	撹拌(rpm)
4.00E+08	0.05	0 0.2 0.5	RT 37°C	5 分	0 700
4.00E+09	0.15			30 分	
4.00E+10	0.25			1 時間	
	0.35			24 時間	
	0.50				
	0.70				

【0415】

【表10】

表10.タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の受動的な、界面活性剤補助負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	サポニン濃度 (%)	インキュベーション温度	インキュベーション時間	撹拌(rpm)
6.00E+08	0.1	0 0.2 0.5	RT 37°C	5 分	0 700
6.00E+09	0.5			30 分	
1.40E+10	1.0			1 時間	
6.00E+10	2.0			24 時間	

【0416】

B．例示的生体分子としてプラスミドDNA（pDNA）、GFP（タンパク質）およびmRNA（eGFPをコードする）を使用する生体分子（例えば、タンパク質、ペプチド、siRNA、mRNA、ASOs、プラスミド、複合体）の凍結解凍サイクル負荷

実施例 1 に記載されるように精製された M E V を、P B S で特定の濃度 (10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} および 10^{12}) に希釈した。次いで、M E V 懸濁液に種々の濃度のカーゴ (p D N A について 0.2 、 1 、 2 または $40 \mu\text{g}/\text{ml}$; m R N A について 0 、 2 および $2 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した ($500 \mu\text{l}$ の総容量)。M E V およびカーゴの混合物を -80°C で凍結し、または液体窒素 (-196°C) 中に浸漬した。次いで、試料を水浴中 37°C で解凍した。この凍結-解凍サイクルを、各試料について 2 または 4 回反復した。

【 0 4 1 7 】

【表 1 1】

表 1 1. DNA(プラスミド、ASO)の凍結解凍サイクル負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	DNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	凍結温度	解凍温度	サイクル数
$8.00\text{E}+07$ $1.00\text{E}+08$ $8.00\text{E}+08$ $9.00\text{E}+08$ $1.00\text{E}+09$ $6.00\text{E}+09$ $8.00\text{E}+09$ $9.00\text{E}+09$ $6.00\text{E}+10$ $9.00\text{E}+10$ $9.00\text{E}+11$	0.2 1.0 2.0 20	-80°C -196°C	37°C	2 4

【 0 4 1 8 】

【表 1 2】

表 1 2. RNA(mRNA、siRNA、miRNA)の凍結解凍サイクル負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	RNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	凍結温度	解凍温度	サイクル数
$8.00\text{E}+07$ $1.00\text{E}+08$ $8.00\text{E}+08$ $9.00\text{E}+08$ $1.00\text{E}+09$ $6.00\text{E}+09$ $8.00\text{E}+09$ $9.00\text{E}+09$ $6.00\text{E}+10$ $8.00\text{E}+10$ $9.00\text{E}+10$ $9.00\text{E}+11$	0.2 1.0 2.0 20	-80°C -196°C	37°C	2 4

【 0 4 1 9 】

【表 1 3】

表 1 3. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の凍結解凍サイクル負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	凍結温度	解凍温度	サイクル数
8.00E+07				
1.00E+08				
8.00E+08				
9.00E+08				
1.00E+09	0.2			
6.00E+09	1.0	-80°C	37°C	2
8.00E+09	2.0	-196°C		4
9.00E+09	20			
6.00E+10				
8.00E+10				
9.00E+10				
9.00E+11				

10

【0 4 2 0】

C. 例示的生体分子としてプラスミド DNA (pDNA)、mRNA (eGFP をコードする) および GFP (タンパク質) を使用する、生体分子 (タンパク質、ペプチド、siRNA、mRNA、ASOs、プラスミド、複合体) の超音波処理負荷

20

実施例 1 に記載されるように精製された MEV を、PBS で所定の濃度 (10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} および 10^{12} MEV/mL) に希釈した。次いで、MEV 懸濁液に種々の濃度のカーゴ (pDNA について 0.2、1、2 または $20 \mu\text{g/ml}$; mRNA について 2 および $20 \mu\text{g/ml}$; GFP について 2 または $20 \mu\text{g/ml}$) を添加した ($500 \sim 1000 \mu\text{l}$ の総容量)。MEV およびカーゴの混合物を、Fisher brand モデル 50 ソニックディスマンブレター (Sonic Dismembrator) (周波数: 20 kHz 、ワット数: 50 W) を使用して超音波処理した。超音波処理の前に、シグナル振幅を 20%、40%、50% または 60% に設定した。各試料は、30 秒間超音波処理し、続いて、氷上で 30 秒間中止し、または 4 秒間超音波処理し、続いて、氷上で 120 秒間休止した。各試料についてこのサイクルを 2、6 または 8 回反復した。

30

【0 4 2 1】

【表 1 4】

表 1 4. DNA(プラスミド、ASO)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	DNA 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	振幅(Pa)	サイクルタイミ ング	サイクル数
8.00E+08	0.2	20	4 秒オン、2 秒オフ、氷上で 2 分	
8.00E+09	1.0	40	30 秒オン、30 秒	2
9.00E+10	2.0	50	オフ、氷上で 2	6
1.50E+10	20	60	分	8
1.50E+11			氷上で 30 秒オン、30 秒オフ	

40

【0 4 2 2】

50

【表 1 5】

表 1 5. RNA(mRNA、siRNA、miRNA)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	RNA 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	振幅(Pa)	サイクルタイミング	サイクル数
8.00E+08 8.00E+09 9.00E+10 1.40E+10 1.50E+10	0.2 1.0 2.0 20	20 40 50 60	30 秒オン、30 秒オフ、氷上で 2 分 4 秒オン、2 秒オフ、氷上で 2 分 氷上で 30 秒オン、30 秒オフ	2 6 8

10

【0 4 2 3】

【表 1 6】

表 1 6. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	振幅(Pa)	サイクルタイミング	サイクル数
1.40E+10 1.50E+10 1.50E+11 2.00E+11 6.00E+11 1.50E+12	2.0 20	20 50 70	氷上で、30 秒オン、30 秒オフ	4 6 8

20

【0 4 2 4】

【表 1 7】

表 1 7. 小分子(親水性分子)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	振幅(Pa)	サイクルタイミング	サイクル数
1.40E+10 1.50E+10 1.50E+11 2.00E+11 6.00E+11 1.50E+12	2.0 20	20 50 70	氷上で 30 秒オン、30 秒オフ	4 6 8

30

40

【0 4 2 5】

D. 例示的生体分子としてプラスミド DNA (pDNA)、mRNA および GFP を使用する生体分子 (例えば、タンパク質、ペプチド、siRNA、mRNA、ASO、プラスミド、複合体) の押出負荷

実施例 1 に記載されるように精製された MEV を、PBS で特定の濃度 (10^{-10}) に希釈した。次いで、MEV 懸濁液に種々の濃度のカーゴ (pDNA について 2 または $20 \mu\text{g/ml}$; mRNA について 0.1、1、2 および $10 \mu\text{g/ml}$; GFP について 2 または $20 \mu\text{g/ml}$) を添加した ($500 \sim 1000 \mu\text{l}$ の総容量)。MEV および

50

カーゴの混合物を、シリンジベースのハンドヘルドミニ押出機（SKU：610023-1 EA、Avanti（登録商標）Polar Lipids）を通して押し出した。2つの対面するシリンジを使用し、100nmの直径の孔を有するメンブレンフィルターを超えて10～15回試料を押し出した。一部の実験では、200nm、100nmおよび50nmの直径の孔のメンブレンを通して試料を連続的に押し出した。押出は、室温または65℃で実施した。

【0426】

【表18】

表18. DNA(プラスミド、ASO)の押出負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	DNA 濃度 (μg/ml)	温度	押出サイクル	メンブランの孔 径(nm)
4.00E+08 9.00E+08 4.00E+09 4.00E+10 6.00E+10 8.00E+10 9.00E+10	0.2 1.0 2.0 20	RT	10 11 20	100 200

10

20

【0427】

【表19】

表19. RNA(mRNA、siRNA、miRNA)の押出負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	RNA 濃度 (μg/ml)	温度	押出サイクル	メンブランの孔 径(nm)
4.00E+08 9.00E+08 4.00E+09 7.00E+09 1.50E+10 4.00E+10 6.00E+10 8.00E+10 9.00E+10	0.2 1.0 2.0 20	RT 65℃	10 11 20	100 200

30

【0428】

40

50

【表 2 0】

表 2 0 . タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の押出負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	温度	押出サイクル	メンブランの孔径 (nm)
6.00E+08	0.1	RT 65°C	10 11 20	50 100 200
6.00E+09	0.5			
1.50E+10	1.0			
6.00E+10	2.0			
9.00E+10	10			
	20			

10

【 0 4 2 9】

E . 例示的生体分子として mRNA および GFP を負荷する、生体分子（例えば、タンパク質、ペプチド、siRNA、mRNA、ASO、プラスミド、複合体）の超音波処理および押出補助能動的負荷（SEAL）

実施例 1 に記載されるように精製された MEV を、PBS で特定の濃度（ 10^{-11} ）に希釈した。次いで、MEV 懸濁液に種々の濃度のカーゴ（mRNA について 2 または $20 \mu\text{g/ml}$; GFP について 2 または $20 \mu\text{g/ml}$ ）を添加した（ $500 \sim 600 \mu\text{l}$ の総容量）。MEV およびカーゴの混合物を、Fisherbrand モデル 50 ソニックディスクメンブレーター（周波数：20 kHz、ワット数：50 W）によって 20 % の振幅で 8 分間（30 秒オン／30 秒オフ、氷上で）超音波処理した。次いで、超音波処理した MEV をカーゴとともに 100 nm のポリカーボネート（PC）メンブレンを通して室温で 10 サイクルさらに押し出した。

20

【 0 4 3 0】

【表 2 1】

表 2 1 . RNA(mRNA、siRNA、miRNA)の SEAL 負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	RNA 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	振幅(Pa)	サイク ルタイ ミング	サイクル数	温度	押出サイク ル (メンブ ランあたり)	メンブラ ンの孔径 (nm)
1.50E+10	0.2 2.0 20	20	氷上で 30 秒オ ン、30 秒オフ	8	RT	9 10	200、続い て 100

30

【 0 4 3 1】

40

50

【表 2 2】

表 2 2. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の SEAL 負荷のプロトコール最適化 ; 感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	振幅(Pa)	サイク ルタイ ミング	サイクル数	温度	押出サイク ル(メンブ ラあたり)	メンブラン の孔径(nm)
1.50E+10	2.0 20	20	氷上で 30 秒 オン、 30 秒 オフ	8	RT	10	100

10

【0 4 3 2】

F. MEV に負荷されたカタラーゼの酵素活性

上記のように負荷された MEV 製剤の負荷効率を、過酸化水素分解を使用するカタラーゼ活性アッセイによって評価した。1 mL の PBS (pH 7. 4) を、それぞれ 1 ~ 4 μL H_2O_2 (7. 5 ~ 30 % v/w) および 2 μL のカタラーゼ (0. 06 ~ 0. 5 mg/mL) またはカーゴが負荷された MEV の試料を含む石英キュベット中に混合した。ラムダ 25 UV VIS 分光光度計 (Perkin Elmer Instruments) を使用して 240 nm で吸光度をモニタリングすることによって酵素活性を測定した。負荷された MEV におけるカタラーゼ安定性を、プロナーゼ (0. 1 ~ 0. 2 mg/mL) とともに 37 °C で 3 時間のインキュベーションによって評価した。試料をその後、上記のように触媒活性についてアッセイした。カタラーゼの安定性を、カタラーゼの初期活性に対する残存活性として表した。

20

【0 4 3 3】

G. 例示的生体分子としてカタラーゼまたはローダミン B を使用する、生体分子 (例えば、タンパク質、ペプチド、siRNA、mRNA、ASO、プラスミド、複合体) の能動透析

低張透析は、MEV およびローダミン B (Sigma-Aldrich) を、200 mL の 10 mM リン酸緩衝剤 (pH 7. 4) 中に入れた透析膜 (セルロースエステル、分子量カットオフ 100 ~ 500 Da、Spectrum Labs) 中に移し、室温で 4 時間攪拌することによって実施される。試料をその後、300 kDa の分子量カットオフ遠心分離フィルターを使用し、500 μL の TE 緩衝剤 (10 mM Tris、pH 7. 5 および 1 mM EDTA、pH 8. 0) を用いて洗浄し、5, 000 g で、4 °C で 5 分間遠心分離し、3 回反復することを用いて遊離生体分子 (カーゴ) 分子から精製される。

30

【0 4 3 4】

低張透析は、MEV およびカタラーゼを、200 mL の 10 mM リン酸緩衝剤 (pH 7. 4) 中に入れた透析膜 (セルロースエステル、分子量カットオフ 100 ~ 500 Da、Spectrum Labs) 中に移し、室温で 4 時間攪拌することによって実施される。試料をその後、300 kDa の分子量カットオフ遠心分離フィルターを使用し、500 μL の TE 緩衝剤 (10 mM Tris、pH 7. 5 および 1 mM EDTA、pH 8. 0) を用いて洗浄し、5, 000 g で、4 °C で 5 分間遠心分離し、3 回反復することを用いて遊離カーゴ分子から精製される。

40

【0 4 3 5】

H. 例示的生体分子としてプラスミド DNA (pDNA) および mRNA を使用する生体分子 (例えば、タンパク質、ペプチド、siRNA、mRNA、ASO、プラスミド、複合体) のエレクトロポレーション

実施例 1 に記載されるように精製された MEV を、PBS で特定の濃度 (10^8 、 10^9 または 10^{10}) に希釈した。次いで、MEV 懸濁液に種々の濃度のカーゴ (p

50

DNAについて1、2、5、10または20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; mRNAについて2および20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加した(110~150 μl の総容量)。MEVおよびカーゴの混合物を、100 μl のエレクトロポレーションキュベット中に移し、Electroporator NEPA 21 (NEPAGENE) デバイスに入れた。各エレクトロポレーションについて以下のパラメータを設定した：電圧(50 V、100 Vまたは200 V)、パルス長(5 ms、10 msまたは15 ms)、パルス間隔(50 msに設定)、減衰率(10 %に設定)、極性(陽性に設定)、パルス数(1、9または15)および転送パルスの有無(50 msの間隔および10 %の減衰率で50 msの間に20 Vの5パルス)。各条件のエレクトロポレーションの前に、凝集を評価するために、20 mMのEDTAまたは10 mMのクエン酸塩を添加した。

10

【0436】

【表23】

表23. DNA(プラスミド、ASO)のエレクトロポレーション負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	DNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	電圧(V)	長さ(ms)	パルス数	トランスファ ーパルス(s)
8.00E+08	0.2 1.0 2.0 10 20	50 100 200	5 10 15	1 9	0 1 6
9.00E+08					
1.50E+09					
8.00E+09					
9.00E+09					
1.50E+10					
6.00E+10					
8.00E+10					
9.00E+10					
8.00E+11					
9.00E+11					

20

【0437】

【表24】

表24. RNA(mRNA、siRNA、miRNA)のエレクトロポレーション負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	RNA 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	電圧(V)	長さ(ms)	パルス数	トランスファ ーパルス(s)
8.00E+08	0.2 0.1 2.0 10 20	50 100 200	5 10 15	1 9	0 1 6
9.00E+08					
1.50E+09					
8.00E+09					
9.00E+09					
1.50E+10					
6.00E+10					
8.00E+10					
9.00E+10					
8.00E+11					
9.00E+11					

40

【0438】

50

【表 2 5】

表 2 5. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)のエレクトロポレーション負荷のプロトコル最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	電圧(V)	長さ(ms)	パルス数	トランスファー パルス(s)
6.00E+10	1.0	100	5	1 9	0
	10		10		1
			15		6

10

【0 4 3 9】

I. DNアーゼ治療:

各負荷法後、試料の一部にすべての遊離核酸（負荷によって被包されていない）を排除するためにデオキシリボヌクレアーゼ I（DNアーゼ）（10104159001、Roche）を用いる処置を行った。DNアーゼおよびDNアーゼ緩衝剤（Tris-HCl 10mM、MgCl₂ 2.5mM、CaCl₂ 0.5mM、pH7.6）を、試料と混合し、37℃でインキュベーター中で40分間インキュベートした。最後に、DNアーゼ作用を阻害するためにエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）（20mM）を添加した。次いで、試料を4℃で保存した。

20

【0 4 4 0】

J. RNアーゼ処置:

各負荷法後、試料の一部分をリボヌクレアーゼ I（RNアーゼ）（EN0601、Thermo Scientific）を用いて処置して、任意の遊離（負荷被包されていない）リボ核酸を除去した。RNアーゼを試料と混合し、37℃インキュベーター中で15分間インキュベートした。最後に、SUPERase-In（AM2694、Invitrogen）、RNアーゼ阻害剤を添加して、RNアーゼの作用を阻害した。次いで、試料を37℃インキュベーター中で4時間インキュベートした。最後に、試料を4℃で保存した。

30

【実施例 4】

【0 4 4 1】

生体分子カーゴの負荷後のMEV特性決定

A. DNA抽出:

QIAprep Spin Miniprepキット（QIAGEN）を製造業者の推奨に従って使用して、MEVによって被包された核酸を抽出した。プロトコルの最後に、核酸を50 μL のヌクレアーゼ不含有水で溶出した。

【0 4 4 2】

B. RNA抽出:

RNeasy Microキット（50）（QIAGEN）を製造業者の推奨に従って使用して、MEVによって被包されたリボ核酸を抽出した。プロトコルの最後に、核酸を14 μL のヌクレアーゼ不含有水で溶出した。

40

【0 4 4 3】

C. 逆転写:

MEVの負荷方法から、eGFPをコードするCleanCap mRNA（Tebubio）[50ngのRNA（mCherry（Tebubio））]が添加されている）を用い、製造業者のプロトコル（Qiagen-RNeasy Micro Handbook）によって記載されるRNeasy Microキット（参照番号74004、Qiagen GmbH、ドイツ）を用いて単一工程精製法によってRNAを単離した。プロトコルの最後に、核酸を14 μL のヌクレアーゼ不含有水で溶出した。

【0 4 4 4】

50

逆転写およびリアルタイムPCR：定量的RT-PCR（RT-qPCR）を以下のとおり実施した：16 μ lの反応物容量（ヘキサマーランダムプライマー、dNTP Mix、緩衝剤、DTT、純粋なRNA、スーパースクリプト（商標）II RTおよびRnase Outで構成された）中でスーパースクリプト（商標）II逆転写酵素（ThermoFisher Scientific カタログ番号18064~071、製造業者のプロトコール：パート番号18064.pps、MAN0001342）を使用して、4 μ lの抽出された全RNAを逆転写した。反応物を、すべての試薬が完全に混合されることを確実にするために極めて穏やかにピペティングすることによって混合した。ヘキサマーランダムプライマー、dNTP Mix、RNAおよび水を混合後、試料を遠沈させ、65℃で5分間インキュベートし、氷上に置き、最後に25℃で12分間インキュベートし、これに、緩衝剤、DTT、Rnase Outおよびスーパースクリプト（商標）II RTを添加した。次いで、反応物を42℃で50分間インキュベートする。mRNA逆転写プロトコールの最後の工程のために、逆転写酵素を70℃で15分間熱不活化した。RT後のcDNAの得られた容量は、16 μ lであった。

10

20

30

40

50

【0445】

RT反応後、試料に56 μ lのH₂Oを添加して、試料あたり合計72 μ lのcDNA出発溶液を得た。リアルタイムPCR測定の前に、72 μ lのcDNA出発溶液の必要とされる希釈係数は、プレスクリーニング実験によって1000倍と決定した。適切な希釈係数を規定することによって、測定されたCqアウトプット値が20から30の間の値を有するであろうことが確実となる。このCq 20~30の範囲で、より良好な直線性が保証され、30より高いCqで開始すると予測されるシグナルのノイズ領域が避けられる。

【0446】

D. qPCR：

MEVから抽出されたプラスミドを定量化するために、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）を実施した。NanoDrop（商標）2000（ThermoFisher Scientific,）を使用して試料においてDNA濃度を測定し、qPCRの際に正しく増幅されるために必要な場合には試料を希釈した（各条件の容量は添付書類に一覧されている）。0.4 ng $\times$ 10⁻⁶ ng ~ 5.1 $\times$ 10⁻⁶ ngのpDNAのプラスミド範囲を実現した。ウェルあたり5 μ LのPowerUp（商標）SYBR（商標）Green [A25776、Fisher Scientific（商標）Applied Biosystems（商標）]、ウェルあたり0.5 μ Lのフォワードプライマー（濃度=10 μ M）およびウェルあたり0.5 μ Lのリバースプライマー（濃度=10 μ M）を用いてマスターミックスを調製した。目的のプラスミドのみを増幅するために、pDNAの耐性遺伝子配列の相補的なプライマーがこれまでに設計されている（プライマー配列は添付書類にある）。MicroAmp（商標）Optical 384ウェル反応プレート（10411785、Fisher Scientific（商標）、Applied Biosystems（商標））を使用し、6 μ Lのマスターミックス、続いて、4 μ Lの試料を各ウェルに入れた。2つの陰性対照を作製した：SYBR（商標）グリーンを有するヌクレアーゼ不含有水ならびにSYBR（商標）グリーンおよびプライマーを有するヌクレアーゼ不含有水。すべての条件を2連で行った。プレートを密閉し、短時間遠心分離した。サーモサイクラーはCFX384 TouchリアルタイムPCR検出システム（Bio-Rad）であった。3工程サイクリング、続いて、融解曲線プロトコールが以下の表にまとめられている。

【0447】

【表 2 6】

表 2 6. qPCR の 3 工程サイクリングプロトコール

工程	温度(°C)	時間	サイクル数
デュアルロック DNA ポリメラーゼ	95	10 分	1
変性	95	15 秒	40
アニーリング	60	1 分	

10

【0 4 4 8】

【表 2 7】

表 2 7. qPCR の融解曲線プロトコール

工程	ランプレート	温度(°C)	時間
1	1.6°C/秒	95	15 秒
2	1.6°C/秒	60	1 分
3	0.15°C/秒	95	15 秒

20

【0 4 4 9】

RT 後の RNA 検出のために、リアルタイム qPCR を、迅速サーマルサイクラーシステム [Light Cycler (登録商標) 480 II、384 (ウェル)] を用いて qPCR プレートにおいて技術的に 2 連で実施した。プロトコールは以下とした：3 μ l の cDNA (1000 倍の規定された希釈係数を有する) を、1 つのフォワードおよび 1 つのリバースプライマー (普通 200 nM から 1.0 μ M の間の最適化された濃度で添加される) と混合し、Takyon (登録商標) No ROX SYBR 2X Master Mix ブルー dTTP (Eurogentec、UF-NSMT-B0701) を、dNTPs、MgCl₂、Taq DNA ポリメラーゼおよび緩衝剤と混合し、合計 10 μ l の容量を構成した。次いで、このミックスを Light Cycler プレート中に入れた。

30

【0 4 5 0】

増幅プロトコールは、95°C で 10 分間の最初のインキュベーション (Taq DNA ポリメラーゼの活性化のために働く) で開始し、45 の、2 つの工程：工程 I) 10 秒間の 95°C 変性、工程 II) 40 秒間の 60°C プライマーアニーリングおよび伸長、から構成される増幅サイクルが続いた (この 60°C 伸長期間の最後で、単一獲得モードを用いて蛍光生成物の検出を実施した)。増幅プロトコールに、5 秒間の 95°C 変性、40 秒間の 60°C アニーリングおよび 95°C エンドポイント (60°C から 95°C へ 0.04°C/秒の勾配率の温度上昇によって達成され、蛍光生成物の連続検出を伴う) の 1 サイクルを用いて融解曲線を実施する工程が続けられる。増幅プロトコールは、10 秒間 37°C で冷却することによって終了した。

40

【0 4 5 1】

プラスミド定量化のために (1000 倍希釈)、cDNA 定量化と同様に Light Cycler (登録商標) の同一プロトコール (混合およびサイクル) が使用される。プライマーのみが改変される。

【0 4 5 2】

qPCR のプライマーおよびその濃度は、以下に一覧される：

50

RNAプライマー（配列番号66および67）：

・eGfP（1-1）For3 AGCAAAGACCCCAACGAGA
・eGfP（1-1）Rev3 TCGTCCATGCCGAGAGTG
・eGfP（1-1）For3Rev3： 400nM

RNA参照プライマー（配列番号68および69）：

・mCherry（1-1）F1： GACCACCTACAAGGCCAAGA
・mCherry（1-1）R1： CCGCTCGTACTGCTCCAC
・mCherry（1-1）FR1： 500nM

プラスミド（pDNA）pcDNA3.1+プライマー（配列番号70および71）：

・左プライマーPCDNA3.1+1： GACCACCAAGCGAAACATGG
・右プライマーPCDNA3.1+1： CCATGGGTACACGACGAGATC
・PCDNA3.1 LR1（左プライマーPCDNA3.1+1、右プライマーPCDNA3.1+1）：700nM

【0453】

RT-qPCRアッセイの対照

本発明者らのRT-qPCR分析が正しく機能していることを確認するために、2つの異なる対照を実験に含めた：陰性対照ならびに有効性および定量化対照。各qPCRプレートですべての2つの対照を適用した。

【0454】

各qPCRプレートにRNA不含試料（H₂Oのみ）からなる本発明者らの陰性対照を添加し、qPCRプレート上で対応するプライマーと混合した。この陰性H₂O対照によって、ハイブリダイズしているプライマーが作出する各アンプリコンのC_qバックグラウンドレベルの推定が可能となった。

【0455】

各qPCRプレートで有効性および定量化対照を使用して種々のcDNA濃度でのプライマーのアニーリング有効性を制御し、定量化した。

【0456】

「RNA有効性および定量化対照」試料のために、eGFPをコードするCleanCap mRNAの混合物を調製した。その後、RNAアーゼ／DNAアーゼ不含水（1000ng、500ng、100ng、50ng、10ng、5ng、1ng、0.5ng、0.1ng）を用いて9つの異なる濃度〔50ngのRNA（mCherry（Tebubio））が添加されている〕を調製し、抽出し、逆転写し、次いで、希釈し（試料と同じように、1000倍の希釈係数）、qPCRプレート上で使用される対応するプライマーと混合した。

【0457】

各qPCRプレートで有効性および定量化対照を使用して種々のDNA濃度でのプライマーのアニーリング有効性を制御し、定量化した。

【0458】

「DNA有効性および定量化対照」試料のために、プラスミド（pDNA）pcDNA3.1+の混合物を調製した。その後、RNAアーゼ／DNAアーゼ不含水（1000ng、500ng、100ng、50ng、10ng、5ng、1ng、0.5ng、0.1ng）を用いて9つの異なる濃度を調製し、抽出し、希釈し（試料と同じように、1000倍の希釈係数）、qPCRプレート上で使用される対応するプライマーと混合した。

【0459】

E. Zeta View（登録商標）ナノ粒子トラッキング分析（NTA）機器による蛍光読み取り

Particle Metrix製のZeta View（登録商標）NTA機器（エンジン）は、水力学的粒子サイズ、ゼータ電位、濃度および蛍光を測定するためのナノ粒子トラッキング分析エンジンである。ポリスチレンビーズを用いて製造業者の推奨に従って実験の前に校正した。当日の実験のために使用されるPBSを、Zeta View（登録

10

20

30

40

50

商標) エンジンを用いて評価した (P B S 中でのスクリーニングでの粒子の正常平均数: 0 ~ 5)。製造業者の推奨される読み取り範囲 (フレームあたり 50 ~ 200 粒子) 内で Z e t a V i e w (登録商標) によって測定されるように、試料を P B S で希釈した。希釈は P B S で行い、次いで、試料をボルテックス処理し、分析のために 1 m L のシリンジ中に入れた。

【0460】

Z e t a V i e w (登録商標) エンジンで散乱モード (レーザー 488 nm) で用いて試料を分析して、粒子の数およびサイズ分布を決定した。次いで、488 nm のレーザーおよび 500 nm の蛍光フィルターを使用して、異なる感度のパーセンテージ (95 % または 90 %) で、蛍光で Z e t a V i e w (登録商標) エンジンを用いて試料を分析した。Z e t a V i e w (登録商標) エンジンのアナログビューを蛍光分析の際に活性化して、バックグラウンドノイズを可視化した。

10

【0461】

F. カタラーゼが負荷された M E V の酵素活性

上記のように負荷された M E V 製剤の負荷効率を、過酸化水素分解を使用するカタラーゼ活性アッセイによって評価した。手短には、1 m L の P B S (p H 7.4) を、それぞれ 1 ~ 4 μ L H_2O_2 (7.5 ~ 30 % v / w) および 2 μ L のカタラーゼ (0.06 ~ 0.5 m g / m L) またはカーゴが負荷された M E V の試料を含む石英キュベット中に混合した。ラムダ 25 UV V I S 分光光度計 (P e r k i n E l m e r I n s t r u m e n t s) を使用して 240 nm で吸光度をモニタリングすることによって酵素活性を測定した。負荷された M E V におけるカタラーゼ安定性を、プロナーゼ (0.1 ~ 0.2 m g / m L) とともに 37 °C で 3 時間のインキュベーションによって評価した。試料をその後、上記のように触媒活性についてアッセイした。カタラーゼの安定性を、カタラーゼの初期活性に対する残存活性で表した。

20

【0462】

G. ローダミン B カーゴの定量化

95 μ L の M E V 混合物中に 5 μ L の 0.4 % の S D S を添加し、十分にピペッティングし、サーモサイ클ラーにおいて 85 °C で 15 分間インキュベートすることによって、上記のように付加されたカーゴを保有する M E V を溶解して、カーゴを放出させた。次いで、試料を黒色壁の透明底未処理ポリスチレン 96 ウェルプレート中に移した。対照試料は、0.1、0.5、1.0、5.0 n m o l のローダミン B 単独を含有していた。試料蛍光を、540 nm での励起および 625 nm での発光を用いる S p e c t r a M a x (登録商標) 蛍光マイクロプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s、米国) を使用して測定した。

30

【0463】

H. s i R N A カーゴの定量化

カーゴが負荷された M E V を上記のように溶解した。次いで、s i R N A カーゴを、核酸をピコグラム感度で定量化可能な Q u a n t - i T (登録商標) P i c o G r e e n (登録商標) アッセイキット (L i f e T e c h n o l o g i e s) を使用して検出した。手短には、100 μ L の各試料に 100 μ L の色素試薬作業溶液を添加して、200 μ L の最終容積とした。同一緩衝剤で調製された対照試料は、10 p m o l の s i R N A 単独を含有していた。試料を黒色壁の透明底未処理ポリスチレン 96 ウェルプレート中に移し、室温、暗所で 10 分間インキュベートした。試料蛍光を、480 nm での励起および 520 nm での発光を用いる S p e c t r a M a x (登録商標) 蛍光マイクロプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s、米国) を使用して測定した。

40

【0464】

I. 総タンパク質の定量化

B C A または B r a d f o r d 試験によって総タンパク質を定量化した。

【0465】

J. 統計解析:

50

スクリーニングおよび最適化された実験設計をNemrodWソフトウェアを用いて作成した。結果は、R Studio (1.4.1717バージョン) およびPrism (8.3バージョン) を使用して分析されている。対照と比較された変数の有意性を、独立パラメトリックt検定で評価した。「ns」は、0.05より大きいp値を意味する「有意ではない」を表し、「*」は、0.05より小さいp値を表し、「**」は、0.01より小さいp値を表し、「***」は、0.001より小さいp値を表す。負荷効率は、各条件について初期pDNA量と比較したqPCRによって得られたpDNA量に基づいて算出した。線形回帰モデリングを実現して、プラスミド被包に対する試験された変数の効果を評価した。

【0466】

K. エキソローディング効率

実施例1～4に記載されたように決定された、取得され、精製され、特性決定され、負荷されたMEVのエキソローディングおよびペイロードの内部移行の効率が、以下の表28に示されている。異なるペイロードについて異なる負荷方法を使用するエキソローディングの効率は、以下のパラメータを使用して算出される：(i) 負荷有効性および／または(ii) 負荷能力または(iii) 負荷されたMEVのパーセンテージ。

【0467】

【表28-1】

ペイロード	方法	試験された条件	負荷効率	負荷能力
DNA (プラスミド /ASO)	A インキュベーション	9	(0)	(0)
	B けん化	12	(+)	(++)
	C 凍結解凍サイクル	28	(++)	(+++)
	D エレクトロポレーション	46	(+++)	(+++)
	E 超音波	23	(++)	(++)
	F 押出	25	(+)	(+)
	G 連続押出	12	(+)	(+)
	H SEAL	(-)	ND	ND

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 2】

ペイロード	方法	試験された条件	負荷効率	負荷能力
RNA (mRNA / siRNA / miRNA)	A インキュベーション	(-)	ND	ND
	B けん化	(-)	ND	ND
	C 凍結解凍サイクル	6	(++)	(++)
	D エレクトロポレーション	12	(++)	(++)
	E 超音波	6	(++)	(++)
	F 押出	24	(++)	(++)
	G 連続押出	21	(+++)	(+++)
	H SEAL	10	(0)	(0)

10

20

【表 2 8 - 3】

ペイロード	方法	試験された条件	負荷効率	MEV陽性の% (蛍光)
タンパク質 (ペプチド/ GFP/他の タンパク質)	A インキュベーション	9	(+)	(+)
	B けん化	12	(++)	(++)
	C 凍結解凍サイクル	12	(++)	(++)
	D エレクトロポレーション	12	(++)	(++)
	E 超音波	40	(+++)	(+++)
	F 押出	14	(++)	(++)
	G 連続押出	14	(++)	(++)
	H SEAL	15	(++)	(++)

30

40

キー：負荷（0）極めて低い；（+）低い；（++）満足できる；（+++）最良の結果；
NDパラメータが以下の通りである場合には決定されていない：

・内部移行されたペイロードは、負荷反応後にMEV内に測定されたペイロード分子（
DNA、RNA、タンパク質または他の分子）の総量である。内部移行されたペイロード

50

は、特定の酵素処置（例えば、DNアーゼ、RNアーゼ、プロテアーゼ、その他）による反応の最後に負荷反応培地中に残存するペイロード分子の排出後に、特定の定量化方法（例えば、qPCR、RT-qPCR、タンパク質の決定および他のもの）によって決定される。

・ペイロードのコピー数：初期量または内部移行されたペイロード量のいずれかにおけるペイロード分子（DNAまたはRNA）のコピー数。コピー数は、以下の計算を使用して得られる：

$$\text{コピー数} = (ng \times [6.022 \times 10^{23}]) / (\text{長さ} \times [1 \times 10^9] \times 650)$$

式中：

ng は、核酸（プラスミド、RNA）の量であり、

6.022×10^{23} = アボガドロ数である。

長さは、1000 (kb) を乗じた、塩基対でのDNA断片の長さであり、

1×10^9 を乗じるとナノグラムに変換される。

・負荷効率は、微細藻類由来の細胞外小胞（MEV）中に内部移行された初期時点での負荷反応培地中のペイロード分子の初期量のパーセンテージである。

・負荷能力は、MEVあたりの内部移行されたペイロードのコピー数である。内部移行されたペイロードコピーと反応物中のMEV数の間の比率として算出された負荷能力。

・一例として：負荷反応中に、最初に 3.6×10^9 コピーのDNAおよび 1×10^9 のMEVがあり、qPCRによって、 1.8×10^9 コピーのDNAがMEV中に内部移行されていると決定される場合。この負荷反応について、負荷パラメータは以下である：

－ 負荷効率 = $(1.8 \times 10^9 \text{ DNAコピー} / 3.6 \times 10^9 \text{ DNAコピー}) \times 100 = 5\%$

－ 負荷能力 = $1.8 \times 10^9 \text{ DNAコピー} / 1 \times 10^9 \text{ MEV} = 1.8 \text{ DNAコピー} / \text{MEV}$ 。

・負荷しているMEVのパーセンテージは、100あたりのMEVの総数あたりの蛍光MEV数である。蛍光は、ZettaView（登録商標）デバイスを使用してf90およびf95の感度値で決定される。感度値は、0～100の範囲の任意単位で表される。ZettaView（登録商標）デバイス中のカメラセンサーの感度を表す。この感度設定は、デジタル写真において使用されるカメラの感度設定と同等である。視野中の検出される粒子の数は、感度カメラと関連する：感度の増大→各試料において検出される粒子の数の増大。感度は、事象が測定可能ではない最高感度を選択した陰性対照に基づいて測定の前に較正される。

【0468】

以下の表29は、容認可能な結果を有するMEV中に負荷された種々のペイロードを示す。

【0469】

10

20

30

40

50

【表 29 - 1】

表 29:

ペイロード		配列番号/式	配列番号
タンパク質&ペプチド	GFP	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMK QHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDT LVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQK NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDN HYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELY K	111
	ルシフェラーゼ	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGT IAFTDAHIEVNITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIV VCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLSMN SQPTVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKIIIMDSKTDYQGFQ SMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSGSTG LPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHH GFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKI QSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLNLHEIASGGAPLSKEV GEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDKPGAVGK VVPFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVN NPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRKSLIK YKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAA VVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKL RGGVVFVDEV PKGLTGKLDARKIREILKAKKGGKSKL	112
	カタラーゼ	MADSRDPASDQMQRHWKEQRAAQKADVLTTGAGNPVGD KLNVTIVGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDREPERVHAK GAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKKTPIAVRFSTVA GESGSADTVRDPGRFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRD PILFPSFIHSQKRNPQTHLKDPDMVWDFWSLRPESLHQVSF LFSDRGIPDGRHNMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYK TDQGIKNLSVEDAARLSQEDPDYGIRDLFNAIATG KYPSTWTFYIQVMTFNQAETFPFNPFDLTKVWPHKDYPLIP VGKLVNLRNPVNYFAEVEQIAFDPSNMPPGIEASPDKMLQ GRLFAYPDTHRHRLGPNYLHIPVNCYPYRVRVANYQRDGP MCMQDNQGGAPNYYPNSFGAPEQQPSALEHSIQYSGEVR RFNTANDDNVTQVRAFYVNVNLNEEQRKRLCENIAGHLKD AQIFIQKKAVKNFTEVHPDYGSHIQALLDKYNAEKPKNAI HTFVQSGSHLAAREKANL	113
	卵白アルブミン	MGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALA MVYLGAKDSTRQINKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGTSVNV HSSLRDILNQITKPNVDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCV KELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQ PSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDQAMPFRVT EQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMS MLVLLPDEVSGLEQLESIIIFEKLTWTSSNVMEERKIK VYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSANLSGSSAE SLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAGVDAASVSEEFR ADHPFLFCIKHIATNAVLFGRGVSP	114

10

20

30

40

50

【表 29-2】

ペイロード		配列番号/式	配列番号
	フラグリンペプチド(flag22)	QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA	115
	GUS	MARGSAVAWAALGPLLWGCALGLQGGMLYPQESPSREC KELDGLWSFRADFSNRRRGFEEQWYRRPLWESGPTVDM PVPSSFNDISQDWRLRHFVGVWVWYEREVILPERWTQDLR TRVVLRIKSAHSYAIVWVNGVDLEHEGGYLPFEADISNL VQVGPLPSRLRITIAINNTLTPTTLPPTIYLTDTSKYPKG YFVQNTYDFEFNYAGLQRSVLLYTPTTYIDDTVTSVEQ DSGLVNYQISVKGSNLFKLEVRLDAENKVANGT GTQGQLKVPVSLWWPYLMHERPAYLYSLEVQLTAQTS LPVSDFYTLPGVIRTVAVTKSQFLINGKPFYFHGVNKHED ADIRGKGFDWPLLVKDFNLLRWLGANAFRTSHYPYAEV MQMCDRYGIVVIDECPGVGLALPQFFNNVSLHHMQVME EVVRRDKNHPAVVMWSVANEPASHLESAGYYLKMVIAH TKSLDPSRPVTFVSNSNYAADKGAPYVDVICLSYYSWY HDYGHLELIQLQLATQFENWYKKYQKPIIQSEYGAETI AGFHQDPLMFTEEYQKSLLEQYHLGLDQKRRKYVVGEL IWNFADFMTQSPTRVLGNKKGIFTRQRQPKSAAFLRER YWKIANETRYPHSVAKSQCLENSLFT	116
DNA	プラスミド pcDNA3.1	GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCCTCTCA GTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCT CCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCAGCAGCAA AATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCAT GAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAT GTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG ACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGC AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTA CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTACA TCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCCTAA GTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCA AAATCAACGGGACTTTCCTAAATGTCTGTAACAACCTCCGCCCC ATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTA TATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTA CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCA AGCTGGCTAGCGTTTAAACTT AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGG AATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTA GAGGGCCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTCCTTC CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCTAATAA AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA TTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC TATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGG	117

10

20

30

40

50

ペイロード	配列番号/式	配列番号
	GTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAA AAACTTGATTAGGGGTAGTGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCC TGATAGACGGTTTTTGCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAATGGAACAACATCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACGCGAATTAATCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTG GAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAAGATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCACTCTCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGATATCCATTTCGGATCTGATCAAGACAGGATGAGGATCGTTTCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCGGCTGTGACGCGAGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAGACCGACCTGTCCGGTGGCTGATGAATGTCAGGACGAGCAGCGGCTATCGGTGCTTGCCA CGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATGAGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGCTCT TGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGTTGGAAATGGCCGCTTTTCTGGATTGATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGACAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTCTTGAGCGGCACTTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGAGATTTGATTCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGTGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTTTATGTCAGCTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGCTGATAGCTGTTTCTGTGTGAATTGTTATCCGCTACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAGAGCGGTTTGCTGATTGGGCGCTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAAGCAAGAAACATGTAGACAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGACCGTA	

40

ペイロード	配列番号/式	配列番号
	GCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTCCCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG GCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGA GTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG AAGAACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCGATTAC CTTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAAC CACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTGTTCGAAAGCAGCAGATTACG CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAC TCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC TTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTAAATCAA TCAAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAAT GCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTG TTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACG ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA CCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCAGATTTATCAGCAATA AACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCA ACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA GCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGCAAGTGT GTTGCCATTGCTACAGCGCTCGTGGTGTACGCTCGCTGTTTG GTATGGCTTCATTACAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAG TTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTT CGGTCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGT ATCATTATGTTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTG ATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAA CCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT CTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA GAACTTTAAAAAGTGCTCATCATTTGAAAAACGTTCTCGGGGC GAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGA TGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTAC TTTACACAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAA TGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTGAA TACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAG GGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTAGA AAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAG TGCCACCTGACGTC	
プラスミド pEGFP-N1	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGC CCATATAGGAGTTCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGC CCGCTGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCA ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT ATTGACGTCAATGACGTTAAATGGCCGCTGGCATTTATGCC CAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCA GTACATCAATGGGCTGGATAGCGGTTTGACTACGGGGATT TCCAAGTCTCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTGG CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC GCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAG TCTCATATAAGCAGAGCTGGTTTGTGTAACCGTCAGATCCG GTACGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTC	118

40

【表 29 - 5】

ペイロード	配列番号/式	配列番号
	TGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCA CCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGC CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGT TCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA AGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCC TGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGC AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACT TCTTCAAGTCCGCCATGCCCAGGGCTACGTCCAGGAGCGCA CCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGC ACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCA TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAG ATCCGCCACAACATCGAGGAC GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTG AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG CGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGA CTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC TTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC ATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGC TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCAC AAATAAAGCAITTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC AAACTCATCAATGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAA TATTTTGTATAAATTGCGGTTAAATTTTTGTTAAATCAGGTCA TTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAA TCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTT TGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTC AAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGT GAACCATCACCCCTAATCAAGTTTTTGTGCGTAAAGCACTAA ATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGG GAAAGCCGGCGAACGTGGCGGAGAAAGGAAGGAAGAAAGC GAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCA CGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGC TACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCG GAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA TTGAAAAAGGAAGAGTCTTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTG GAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCC AGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC AACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAA GTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCC CGCCCCTAACCTCCGCCCATCCCGCCCCTAACCTCCGCCAGTTC CGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATG CAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATC GATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAA GATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGG CTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCT GATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGAGGGGCGCCCGGTT CTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAGTGC AAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGC GTTCTTGGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCAGTGAAGCGGGA AGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC CTGTCTATCTACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGG CTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCT	10 20 30 40

10

20

30

40

50

【表 29 - 6】

ペイロード		配列番号/式	配列番号
		GCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGAACGTTCGCCA GGCTCAAGGCGAGCATGCCCCAGGCGAGGATCTCGTCGTGA CCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATG GCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGGTGGGTGTGGC GGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGC TGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCT TTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTAT CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGA AATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTT CGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAAT CGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGA TCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGTGAAACACGG AAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTTAAAAAGACAG AATAAAACGCACGGTGTGGGTCTGTTGTTTCATAAACCGGG GTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGA CCCCATGGGGCCAATACGCCCGCTTCTTCTTTTCCCCAC CCCACCCCAAGTTCCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCA ACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCAT ATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAG GATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATC CCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGT AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCACCGCTACCAGCGGT GGTGTTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAG GTAACGTGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT CTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA GCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACCAGTGG CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGACT CAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTTCGGGCTGA ACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACC TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTC GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGG GGGGCGGAGCCTATGGAACGACGCAACGCGGCCCTTTT ACGGTTCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCATATGTTCTTTC CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCAT GCAT	10
	ASO k-ras	GCTATTAGGAGTCTTT	119
	ASO c-myc	AACGTTGAGGGGCAT	120
RNA	mRNA (eGFP)	AUGGUGAGCA AGGGCGAGGA GCUGUUCACC GGGGUGGUGC CCAUCCUGGU CGAGCUGGAC GGCGACGUAA ACGGCCACAA GUUCAGCGUG UCCGGCGAGG GCGAGGGCGA UGCCACCUAC GGCAAGCUGA CCCUGAAGUU CAUCUGCACC ACCGGCAAGC UGCCCCGUGCC CUGGCCCACC CUCGUGACCA CCCUGACCUA CGGCGUGCAG UGCUUCAGCC GCUACCCCGA CCACAUGAAG CAGCACGACU UCUUCAAGUC CGCCAUGCCC GAAGGCUACG UCCAGGAGCG CACCAUCUUC UUCAAGGACG ACGGCAACUA CAAGACCCGC	121

10

20

30

40

50

ベイロード	配列番号/式	配列番号
	GCCGAGGUGA AGUUCGAGGG CGACACCCUG GUGAACCGCA UCGAGCUGAA GGGCAUCGAC UUCAAGGAGG ACGGCAACAU CCUGGGGCAC AAGCUGGAGU ACAACUACAA CAGCCACAAC GUCUAUAUCA UGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCAUCAAGG UGAACUUCAA GAUCCGCCAC AACAUCGAGG ACGGCAGCGU GCAGCUCGCC GACCACUACC AGCAGAACAC CCCCAUCGGC GACGGCCCCG UGCUGCUGCC CGACAACCAC UACCUGAGCA CCCAGUCCGC CCUGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA UCACAUGGUC CUGCUGGAGU UCGUGACCGC CGCCGGGAUC ACUCUCGGCA UGGACGAGCU GUACAAGUAA	
mRNA(ルシフェラーゼ)	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGC CATTCTATCCTCTAGAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAA CTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTTG AACAATTGCTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACA TCACGTACGCGGAATACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGG CAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCAC AGAATCGTCGTATGTCAGTGAAACTCTCTCAATTCT TTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAG TTGCGCCCGCAACGACATTTATAATGAACGTGAATTG CTCAACAGTATGAACATTTTCGACGCTACCGTAGTGTTT GTTTCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCA AAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATTATCATGG ATCTAAAACGGATTACCGGGATTTCAGTCGATGTAC ACGTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTAAATGAA TACGATTTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTGACAAAACA ATTGCACTGATAATGAATTCCTCTGGATCTACTGGGTTA CCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAACTGCCTGCGTC AGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAA ATCATTCGGGATACGCGATTTTAAAGTGTGTTCATTC CATCACGGTTTTGGAAATGTTTACTACACTCGGATATTG ATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTT GAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTCAGGATTACAA AATTCAAAGTTCGTTGCTAGTACCAACCCCTATTTTCATT CTTCCGCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATC TAAATTACACGAAATGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTC GAAGAAAGTCGGGGAAGCGGTTGCAAAACGCTTCCATC TTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACT ACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATA AACCAGGGCGCGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTGAAG CGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGC GTTAATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTAT GATTATGTCCGGTTATG TAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAG GATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGA CGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGTC TTTAATTAATAACAAAGG ATATCAGGTGGCCCCCGCTGAATTGGAATCGATATTGTT	122

40

【表 29-8】

ペイロード		配列番号/式	配列番号
		ACAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGCGTGGCAGGTC TTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTG TTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAAAAGAG ATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAA AAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTAC CGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAA AATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGA AAGTCCAAATTGTAA	
	mRNA (GUS)	AUGUUACGUCCUGUAGAAACCCCAACCCGUGAAAUCA AAAAACUCGACGGCCUGUGGGCAUUCAGUCUGGAUCG CGAAAACUGUGGAAUUGAUCAGCGUUGGUGGGAAAGC GCGUUAACAAGAAA GCCGGGCAAUUGCUGUGCCAGGCAGUUUUAACGAUCA GUUCGCCGAUGCAGAUUUCGUAAUUAUGCGGGCAAC GUCUGGUAUCAGCGCGAAGUCUUUAUACCGAAAGGUU GGGCAGGCCAGC GUAUCGUGCUGCGUUUCGAUGCGGUCACUCAUACGG CAAAGUGUGGGUCAUUAUCAGGAAGUGAUGGAGCAU CAGGGCGGCUAUACGCCAUUUGAAGCCGAUGUCACGC CGUAUGUUUAUUG CCGGGAAAAGUGUACGUACCCGUUUGUGUGAACAA CGAACUGAACUGGCAGACUAUCCCGCCGGGAAUGGUG AUUACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGUCUUACU UCCAUGAUUUUUUAACUAUGCCGGAAUCCAUCGCAG CGUAAUGCUCUACACCACGCCGAACACCUGGGUGGAC GAUAUCACCGUGGUGACGCAUGUCGCGCAAGACUGUA ACCACGCGUCUGUUGACUGGCAGGUGGUGGCCAAUGG UGAUGUCAGCGUUGAACUGCGUGAUGCGGAUACAACAG GUGGUUGCAACUGGACAAGGCACUAGCGGGACUUUGC AAGUGGUGAAUCCGCACCUCUGGCAACCGGGUGAAGG UUAUUCUUAUGAACUGUGCGUCACAGCCAAAAGCCAG ACAGAGUGUGAUUACUACCCGCUUCGCGUCGGCAUCC GGUCAGUGGCAGUGAAGGGCCAACAGUUCUGAUUAA CCACAAACCGUUCUACUUUACUGGCUUUGGUCGUCAU GAAGAUGCGGACUUACGUGGCAAAGGAUUCGAUAACG UGCUGAUGGUGCACGACCACGCAUUAUUGGACUGGAU UGGGGCCAACUCCUACCGUACCUUGCAU UACCCUUACGCUGAAGAGAUGCUCGACUGGGCAGAUG AACAUGGCAUCGUGGUGAUUGAUGAAACUGCUGCUGU CGGCUUUAACCUUCUUUAGGCAUUGGUUUCGAAGCG GGCAACAAGCCGAAAGAACUGUACAGCGAAGAGGCAG UCAACGGGGAAACUCAGCAAGCGCACUACAGGCGAU UAAAGAGCUGAUAGCGCGUGACAAAAACCAACCAAGC GUGGUGAUGUGGAGUAUUGCCAACGAACCGGAUACCC GUCCGCAAGUGCACGGGAAUUAUUCGCCACUGGCGGA AGCAACGCGUAAACUCGACCCGACGCGUCCGAUACCC UGCGUCAAUUGUAAUGUUCUGCGACGCUCACACCGAU CCAUCAGCGAUCUCUUUGAUGUGCUGUGCCUGAACCG UUUUUACGGAUGGUAUGUCCAAAGCGGCGAUUUGGAA ACGGCAGAGAAGGUACUGGAAAAAGAACUUCUGGCCU	123

10

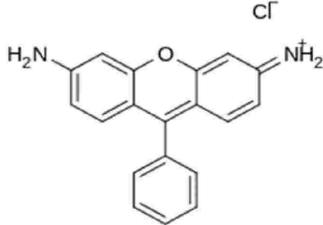
20

30

40

50

【表 29-9】

ペイロード		配列番号/式	配列番号
		GGCAGGAGAAACUGCAUCAGCCGAUUAUCAUCACCGA AUACGGCGUGGAUACGUUAGCCGGGCUGCACUCAAUG UACACCGACAUGUGGAGUGAAGAGUAUCAGUGUGCAU GGCUGGAUAUGUAUCACCGCGUCUUUGAUCGCGUCAG CGCCGUCGUCGGUGAACAGGUAUGGAAUUUCGCCGAU UUUGCGACCUCGCAAGGCAUAUUGCGCGUUGGCGGUA ACAAGAAAGGGAUCUUCACUCGCGACCGCAAACCGAA GUCG GCGGCUUUUCUGCUGCAAAAACGCUGGACUGGCAUGA ACUUCGGUGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAA	
	siRNA k-ras	GUCUCUUGGAUUAUUCUGA (センス) UCGAGAAUAUCCAAGAGAC (アンチセンス)	124 125
	miRNA c-myc	CAAAAACCGCAAUUACUUUUGCA (センス) UGCAAAAGUAAUUGAGAUUUUUG (アンチセンス)	126 127
	siRNA 混合集団	<i>cfa6</i> gen および <i>hrpL</i> gen から T7 ポリメラーゼによって生成された合成 siRNA の混合物(実施例 12 を参照されたい)	
小分子	ローダミン		

10

20

30

40

50

【実施例 5】

【0470】

A. MEV のインビボ体内分布

種々の経路によって投与された場合の経路および運命を決定するために実験を実施した。

1. DiR 蛍光を使用する MEV 標識

実施例 2 に記載されるように、近赤外線蛍光性、親油性カルボシアニン 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) は、水中で弱く蛍光するが、膜に組み込まれると高度に蛍光し、光安定性であり、インビボで追跡することができる (上記の実施例 2; Thermo Fisher Scientific を参照されたい)。DiR 標識された (MEV) はヒト細胞とともにインキュベートされる。ヒト細胞によるその取り込みは、マイクロプレートリーダーで蛍光定量分析 (蛍光分光法) によって測定される。DiR は、750 nm の励起および 780 nm の発光を有する。

【0471】

体内分布研究の方法論は以下のようにまとめられる：クロレラ属細胞を上記のような光バイオリアクター (バッチあたり 120 L) で増殖させ、単離し、DiR で標識し、実施例 1 および 2 に記載されるように標識効率を評価した。

【0472】

2. マウスにおける MEV の体内分布

標識された MEV を、4 つの経路：鼻腔内、気管内、経口および静脈内投与のうち 1 つ

によってマウスモデル動物に投与して、各経路ごとのMEV経路および運命を決定した。マウスを、時間の関数として全身イメージングに付し、3日目にマウスを殺し、臓器を、異なる経路の適用後にいくつかのマウスの臓器においてエキスピボで、組織学によって画像化した。

【0473】

動物モデル

MEV薬物動態および体内分布を、特定病原体不含(SPF)の7週齢の雄Balb/c By Jマウスにおいて研究した(Charles River Laboratories)。動物を固有の耳IDタグで標識し、少なくとも2日間気候順応させた。バックグラウンド(対照)マウスは個別に収容し、MEV処置されたマウスは $21 \pm 3^\circ\text{C}$ (記録され、制御された温度)で、12時間-12時間の明/暗サイクルで換気したラック中の使い捨ての標準ケージ中でまとめて収容した。濾過された水およびげっ歯類用低蛍光実験食を自由に与えた。インビボ実験の最後にすべてのマウスを安楽死させた。

10

【0474】

体内分布研究のためのDIR標識したMEVのインビボ投与

DIR標識されたMEV(実施例2において上記のように調製された)を使用して、異なる経路の適用後に動物の身体全体において、またはいくつかのマウス臓器においてMEVの体内分布を決定した。

【0475】

イメージングの前に、各動物の毛皮を以下の領域:腹部、胸部、頭部および背中全体において電気バリカンを使用して刈り取った。できる限り均一に毛皮を刈り取るために注意した。次いで、DIR標識されたMEV調製物を、ボルテックス処理することによって再懸濁し、その後、注射のためにシリンジに充填した。

20

【0476】

投与経路

以下の経路を使用して、動物にMEVを投与した:

【0477】

静脈内(IV): $50\mu\text{L}$ の、 $0.6 \times 10^{12}\text{MEV}/\text{mL}$ を含有するMEV懸濁液を使い捨てプラスチックシリンジおよび適切なニードルによって尾静脈に注射した。投与されるMEVの投与量: $3 \times 10^{10}\text{MEV}/\text{マウス}$ 。

30

【0478】

鼻腔内(IN):動物を、担体ガスとしてイソフルランおよび酸素の混合物によってIN投与の際に麻酔下に誘導し、維持した。 $100\mu\text{L}$ の容量の、 $0.3 \times 10^{12}\text{MEV}/\text{mL}$ を含有するMEV懸濁液を、薄いピペットコーンを使用してマウスの鼻孔中に投与した。投与されたMEVの投与量: $3 \times 10^{10}\text{MEV}/\text{マウス}$ 。

【0479】

経口(PO): $100\mu\text{L}$ の、 $0.3 \times 10^{12}\text{MEV}/\text{mL}$ を含有するMEV懸濁液を、使い捨てプラスチックシリンジおよび適切な給餌プローブを使用して経口投与した。投与されたMEVの投与量: $3 \times 10^{10}\text{MEV}/\text{マウス}$ 。

【0480】

気管内(IT):動物を、担体ガスとしてイソフルランおよび酸素の混合物によってIT投与の際に麻酔下に誘導し、維持した。十分な麻酔が観察されると、動物をマウス挿管プラットフォーム上に置き、気管の見え方を最大にするように背臥位で前切歯から吊り下げた。次いで、気管の背後から光を当てるために気管位置付近の皮膚に冷光を置いた。必要な場合には、Microsprayer(登録商標)噴霧器のシリンジを気管中に導くために喉頭鏡を挿入した。 $0.6 \times 10^{12}\text{MEV}/\text{mL}$ を含有する $50\mu\text{L}$ のMEV懸濁液の注射物を、気管中に滴下注入した。手順全体で麻酔を維持した。注射後、マウスを挿管プラットフォーム上で同一位置で少なくとも30秒間維持し、その後、そのケージに戻した。投与されたMEVの投与量: $3 \times 10^{10}\text{MEV}/\text{マウス}$ 。

40

【0481】

50

体内分布研究のインビボイメージング

蛍光獲得を、PerkinElmerの光学イメージングシステムIVIS Spectrumを用いて実施した。DiR標識されたMEVによって放出された光の高感度検出によって、二次元(2D)蛍光イメージングを実施した。MEV投与の1時間前にマウスに麻酔し、画像化した。次いで、2つの異なるペトリ皿中に堆積させた最小20 μ Lの少なくとも1滴のMEV懸濁液で実施されたインビトロ獲得を用いて、投与されるべき材料の蛍光を確認した。蛍光の実際の発光および選択されたパラメータ(以下を参照されたい)を用いる検出を調べるために、蛍光の発光を測定した。最後に、MEVを投与されたマウスでインビボ蛍光獲得を実施した。動物を、イソフルランおよび酸素の混合物に麻酔下に誘導し、維持した。マウスを、腹側画像を得るために背側横臥に、および背側画像を得るために腹側横臥に配置した。少なくとも2つの獲得/マウス/時点を行い、最大3匹のマウスの群/獲得においてマウスを画像化した。画像を分析し、6つの臓器(肝臓、脾臓、肺、腎臓、腸および脳)で蛍光を定量化した。

10

【0482】

以下の時点を使用した(T0=MEV投与)：

0日目-6時点：T0-1時間 $\pm$ 10分、T0+30分 $\pm$ 5分、T0+2時間 $\pm$ 15分、T0+4時間 $\pm$ 30分、T0+8時間 $\pm$ 30分、T0+10時間 $\pm$ 30分

1日目-1時点：T0+24時間 $\pm$ 3時間

2日目-1時点：T0+48時間 $\pm$ 3時間

3日目-1時点：T0+72時間 $\pm$ 3時間

20

データは、IVISソフトウェア(IVIS用Living Image Software)を用いて分析した。

【0483】

インビボおよびエクスビボ蛍光獲得のために以下のパラメータを使用した：

視野(FOV) 14 $\times$ 14cm(FOV C)

画像数： インビボ：各適用可能な時点で各マウスについて、少なくとも2の獲得(腹側および背側)を実施した-3匹のマウス(最大で)は1獲得で画像化した。

エクスビボ：少なくとも1匹のマウスの臓器を1つの獲得で画像化した

画像形式 TIFF形式

蛍光プローブ DiR

30

励起波長 745nm

発光波長 800nm

露光時間 検出される蛍光シグナルに応じて自動

最小カウント 20000

ビニング 16と1の間(検出される蛍光シグナルに応じて)

F/STOP 2(蛍光シグナル飽和の場合には、4に自動的に増大された、または弱いシグナルの場合には1に減少された)

対象の高さ インビボ：1.5cm

エクスビボ：0.5cm

【0484】

40

体内分布研究のためのエクスビボイメージング

MEVの生成、精製、特性決定、標識および投与(種々の経路による)は上記のとおりであった。投与後3日目に、マウスを安楽死させ、各マウスの目的の臓器を採取し、エクスビボ獲得を実施するためにペトリ皿に入れた。以下の臓器を採取した：肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳および腸。データをIVISソフトウェア(IVIS用Living Image Software)を用いて分析した。

【0485】

図5は、静脈内、気管内および経口経路について投与経路に従う体内分布の代表的なパターンを示す。

【0486】

50

結果、考察および結論

1. 体内分布－全身イメージングが図6～9に表わされており、これは、静脈内（図6）、経口（図7）、鼻腔内（図8）および気管内（図9）投与によって投与された代表的な動物のインビボ全身イメージングを示す。

【0487】

薬物動態

静脈内、経口、鼻腔内および気管内投与後の経時的な（時間）、ベースラインのパーセントとして蓄積を実証する薬物動態曲線が、それぞれ図10～13に示されている。

【0488】

体内分布－単離された臓器－エクスビボイメージング

静脈内、経口、鼻腔内および気管内投与後の肝臓、脾臓、肺および脳におけるエクスビボ蛍光分析（総放射効率）による体内分布が、図14A～Dに示されている。

【0489】

3. 各経路による結果のまとめ

a. 静脈内投与

・未改変MEVによって標的化される臓器－肝臓および脾臓

・PKパラメータ：

○ピーク／プラトー時間：2～24時間（肝臓）、4～24時間（脾臓）

○ピーク／プラトーと比較した $t = 3$ 日目での%、およそ62%（肝臓）、およそ61%（脾臓）

・哺乳動物EVと比較してより長い存在または持続期間 [例えば、Kang et al., Biodistribution of extracellular vesicles following administration into animals: A systematic review. J Extracell Vesicles. 2021;10:e12085. (doi.org/10.1002/jev2.12085)を参照されたい]。

・毒性の眼に見える徴候なし

【0490】

b. 経口（per os）[経口（oral）] 投与

・経口投与に続いて標的化される臓器：腸および脾臓

・経口利用可能性：

○MEVは、経口的に利用可能であり、それらは胃を通る通過に耐え、腸に到達し、その後、脾臓に現れる。

○牛乳EVを除く哺乳動物EVは、経口的に利用可能ではない。

・PKパラメータ：

○ピーク／プラトー時間：1～6時間（腸）、1～10時間（脾臓）

○ピーク／プラトーと比較した $t = 10$ 時間での%：およそ33%（腸）、およそ44%（脾臓）

○ピーク／プラトーと比較した $t = 48$ 時間での%：0%（腸）、0%（脾臓）

・毒性の眼に見える徴候なし

【0491】

c. 静脈内および経口投与後の臓器における分布。

MEVの分布は、投与経路に応じて変わる。肝臓については、投与が静脈内であるか、経口であるかに応じて異なる分布プロファイルがある。静脈内投与後、肝臓は、主な標的臓器であり、経口投与後、肝臓は、わずかにしか標的化されない。同様に、脾臓については、体内分布プロファイルおよび薬物動態は、投与経路に応じて変わる。薬物動態プロファイルは、投与が、静脈内であるか、経口（oral）[経口（per os）]であるかに応じて変わる。静脈内投与は、より長く持続する。3日目に、ピークの50～70%が依然として残存する。経口投与は、より短くしか持続しない；48時間では、0%が残存する。

【0492】

d. 鼻腔内投与

- ・未改変 M E V によって標的化される臓器は、肺である
- ・予備的 P K パラメータ：
 - ピーク／プラトー時間：4～28 時間
 - ピーク／プラトーと比較した $t = 3$ 日目での %：70～80 %
- ・毒性の眼に見える徴候なし

【0493】

e. 気管内投与

- ・M E V によって標的化される臓器は、肺である
- P K パラメータ：
 - ピーク／プラトー時間：2～72 時間
 - ピーク／プラトーと比較した $t = 3$ 日目での %：およそ 80 %
- 毒性の眼に見える徴候なし

【0494】

4. B A L B / c B y J マウスにおける経口 (P O) 投与後の P K H 2 6 で標識した M E V の体内分布

M E V がマウスに経口的に投与される場合には、それらは消化管を通り抜ける。M E V は最初に胃に到達し、ここで胃液の厳しい条件に耐える。投与後約 30 分で、それらは腸に到達し、ここで数時間留まる。

【0495】

M E V はひとたび腸の管腔中にあると、上皮層を通過して G A L T 中に入る。G A L T は消化管と関連するリンパ系構造である (腸関連リンパ組織)。腸全体に沿って位置する。G A L T は、B および T リンパ球、形質細胞ならびに樹状細胞およびマクロファージを含む自然免疫細胞を含む胚中心から構成される高密度組織である。腸では、蛍光は G A L T においてほとんど観察される。蛍光は、核の周囲の別個のスポットで濃縮されると思われる、これは、M E V が血漿中の空間すべてを占有する血漿の細胞に局所化されることを意味する。これによって、細胞の形状を明らかにすることが可能となる。内側に M E V を有する細胞は、それぞれ組織球 (常在性マクロファージ) または樹状細胞に対応し、G A L T の末梢および G A L T の中心に主に位置する。代表的な画像は、図 15 A および B に示されている。

【0496】

眼に見える M E V は、評価したすべての時間 (30 分～24 時間) で肝臓には現れない。注射後数時間で、内側に M E V を有する細胞は G A L T から脾臓に移動し、脾臓中に数時間留まる。M E V は、主に脾臓の赤脾髄 (血液細胞および一部の T h および B 細胞) に、より少ない程度に白脾髄 (リンパ系細胞) に到達する (図 16 を参照されたい)。

【0497】

脾臓では、蛍光は、白脾髄に、および赤脾髄に対応するいくつかの領域で眼に見える。蛍光の強度は、赤脾髄から白脾髄への勾配で減少する。蛍光は細胞の細胞質の内側の点において検出される。内側に M E V を有する細胞は、円形または網状であり、類似のサイズを有し、それらはそれぞれ組織球および樹状細胞またはマクロファージであり得る。

【0498】

細胞は G A L T から血流中に直接移動することができる、または最初にリンパ流を通過した後に血流に加わることもできる。内側に M E V を保有する G A L T 細胞は、門脈によって最終的に肝臓に到着するが、天然にそれらを脾臓に輸送する G A L T 細胞によって内部移行されているので肝臓にとっては見えない (図 17 を参照されたい)。

【実施例 6】

【0499】

マウスにおける M E V の毒性の評価

経口および気管内投与後に B a l b / C マウスモデルを使用してインビボで M E V 毒性の徴候を評価するために、実験を実施した。

【0500】

10

20

30

40

50

A．インビボでのMEV毒性の分析：

いくつかの方法で毒性を評価した：主な臓器（肝臓、脾臓、腎臓、肺および脳）での臨床徴候、体重、血液学的分析、生化学的分析、組織学的分析。MEV試料は－80で保存し、インビボ投与の直前に解凍した。解凍後、各試料を1～2分間激しくボルテックス処理することによって混合した。各約20gの質量を有する5週齢の雄のB a l b／Cマウスを使用した。動物を気候順応させた。動物を、12：12明－暗の制御された環境において、 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ （平均 $\pm$ SD）の温度でポリエチレンケージで飼育し（＜5匹の動物／ケージ）、適応したペレット化飼料を用いて1日1回給餌した。水は自由に与えた。動物を実験群に無作為に割り当て、少なくとも7日間気候順応させ、その後、設計された研究を開始した。実験群は、以下の表30に記載されている。

【0501】

試験化合物の、経口および気道（気管内）経路を含む例示的経路によるマウスにおけるその投与後の最終的な毒性を決定するために実験を設計した。上記のように、各約20gの質量を有する雄のB a l b／Cマウスを使用した。動物を気候順応させた。試験品目が投与された後、すべてのマウスを10日間密接にモニタリングする。

【0502】**【表30】**

表30. MEV 毒性研究における実験群

群番号	群の種類	投与経路	MEV 投与量
1	媒体対照(PBS)	PO(経口)	-
2	実験	PO(経口)	動物あたり $4 \times 10^{\text{exp}11}$
3	実験	PO(経口)	動物あたり $1 \times 10^{\text{exp}12}$
4	媒体対照(PBS)	IT(気管内)	-
5	実験	IT(気管内)	動物あたり $4 \times 10^{\text{exp}11}$

【0503】**臨床検査**

すべての動物の毎日の臨床検査、挙動、苦痛の徴候（悪液質、衰弱、移動または摂食の困難など）；試験品目毒性（円背位、痙攣）および他のこのようなパラメータ。各動物について週に1回の体重の決定、体重曲線を設計した（平均 $\pm$ SD）。試験化合物の投与後に急性反応の観察を行った。

【0504】**臨床病理学調査**

生存相の終了後、すべての動物を安楽死させた。実験終結で、臨床病理学調査を実施した。

【0505】**血液採取**

心臓内穿刺によってマウスから血液試料を、異なるバイアル中に収集した。種々の臨床病理学調査のために血液のアリコートをし、抗凝固剤を含有する、血液学的分析のためにK2 E D T Aを有し、生化学分析のためにリチウムヘパリンを有するチューブ中に収集した。

【0506】**臨床化学**

すべての動物の処置の最後に、全血試料の45000rpmで15分の遠心分離後に血漿を分離し、以下のパラメータについて分析した。臨床化学分析パラメータは以下のとおり示される：リットルあたりの単位（U/L）で、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびガンマーグルタミルトランスフェラーゼ（GGT）；g/Lで尿素およびmg/Lでクレアチニン。

【0507】

血液学

すべての動物の処置の最後に以下の血液学的パラメータを決定した：g/Lでヘモグロビン（HGB）、L/Lでヘマトクリット（HCT）、fLで平均血球体積（MCV）、 $10^9/L$ および%として好酸球（EO）およびMHCH（BASO）。

【0508】

動物を安楽死させた場合に、剖検を実施し、注意深い巨視的評価を実施する。任意の臓器が異常に見える場合には、詳細な記載および分析を実施する。

【0509】

組織学的分析

組織学的分析は5つの以下の臓器について実施する：肺、脾臓、肝臓、腎臓および脳。臓器を採取し、秤量し、巨視的に観察し、4%のパラホルムアルデヒド（PFA）で固定し、パラフィン包埋し、5~7μMの切片に切断し、次いで、蛍光顕微鏡下で観察する。

【0510】

病理組織学的スコアリング

各H&E（ヘマトキシリン-およびエオシン-染色された）切片を組織学的に十分に検査し、観察された病変をエクセルスプレッドシートに記録した。病変の重症度を段階分けした（最小、軽度、中程度または重度）。その分布（局所的、多焦性、局所的に広範囲またはびまん性）ならびにその局在性も特性決定した。

【0511】

B. 毒性研究結果：臨床検査

臨床化学

以下に示されるように、2つのパラメータ尿素およびクレアチニンは、対照群と比較してすべての処置された群において変化しなかった。酵素アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）はランダムな有意でない偏差を示した。パラメータガンマーグルタミルトランスフェラーゼ値は、すべての群において低レベル（<6）で検出され、これはプロトコルエラーを示し、提示されていない。図18は、これらの結果を提示する。

【0512】

臨床化学パラメータの結果は、経口または気管内投与のいずれかによるマウスにおいてすべての試験された用量で毒性を全く示さない。

【0513】

血液学

測定されたパラメータは、対照と比較して有意に変更されなかった。図18A~Iは、MEV毒性が、（1）化学パラメータ：ALAT、ASAT、尿素およびクレアチンによって、および（2）4つのマウスの群における血液学パラメータによって評価された結果を提示する：群1のマウスには、100μlのPBSをPOデリバリーによって投与し、群2のマウスには、100μlの 4×10^{11} MEV/マウスをPOデリバリーによって投与し（黒色および白色のタイルを有するバー）、群3のマウスには、100μlの 4×10^{12} MEV/マウスをPOデリバリーによって投与し（垂直線を有するバー）、群4のマウスには、100μlの 4×10^{11} MEV/マウスをITデリバリーによって投与した。

【0514】

結果は、血液-、腎臓-、および肝臓-関連毒性のうち1つまたは複数がある場合に変更され得る血液パラメータを提示する。ヘマトクリット、ヘモグロビン、好酸球レベル、

10

20

30

40

50

RBC数および体積(MCV)は血液学的パラメータであり、尿素およびクレアチンは腎臓傷害の生化学的マーカーであり、ALAT(またはALT)およびASAT(またはAST)は肝臓傷害の生化学的マーカーである。アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)とも呼ばれるアラントランスアミナーゼ(ALT)は、血漿において、および種々の身体の組織において生じるが、最も一般的には肝臓において生じるトランスアミナーゼ酵素である。ALATの有意に上昇したレベルは、肝臓関連問題、例えば、肝炎および/または肝臓損傷と関連付けることができる。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)としても知られるアスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)は、アミノ酸代謝において重要な別のトランスアミナーゼ酵素である。肝臓毒性を超えて、他の臓器に影響を及ぼす疾患においてもASTは上昇され得る。血清ALTレベル、血清ASTレベルおよびその比率(AST/ALT比率)は、肝臓の健康のバイオマーカーとして臨床的に使用される。本研究では、ALTおよびASTレベルには実験群間に統計的に有意な相違は観察されなかった。

10

【0515】

好酸球(複数可)は、さまざまな白血球であり、脊椎動物において多細胞性寄生生物およびある特定の感染症との闘いに関与する免疫系構成成分の1つである。好酸球は普通、循環白血球の7%未満を占める。感染または寄生生物感染と関連する原因を超えて、好酸球レベルの上昇(好酸球増加症としても知られる)はまた、アレルギー性またはアトピー性反応の徴候でもある。本研究では、好酸球レベルにおいて実験群間で統計的に有意な相違は観察されなかった。

20

【0516】

組織学

主な臓器を採取し、4%のPFAで固定し、パラフィン包埋し、切片に切断し、H&Eで染色した。

【0517】

肺

肺切片で観察された病理組織学的変化は、気管内陰性対照材料および試験品目を投与されている動物において検査された8/10肺切片において最小から軽度の局所的から多焦性の肺泡出血に主に制限されている。変化は相対的にわずかであり、肺泡空間の一部に制限されていた。この観察結果は、陰性対照および処置された動物において同等の罹患率および重症度で観察された。

30

【0518】

腎臓

4 x 10¹¹ MEV用量を用いてPO処置された1匹の動物において少数の好塩基性尿細管の存在が観察された。この所見は、重症度が最小であったが、実験室げっ歯類動物において低罹患率および重症度で自発的に観察されることが多い。したがって、本研究において起源が偶発的なものであると考えられる。

【0519】

脾臓、肝臓および脳

検査されたすべての切片において脾臓、脳または肝臓において病理組織学的変化は観察されなかった。

40

【0520】

まとめ

気管内に実験材料を投与されているほとんどの動物において観察された肺の変化は、処置関連ではないと考えられた。検査されたすべての臓器において処置関連は観察されず、これは、MEVは実験条件下で動物にとって毒性ではないことを示した。

【0521】

C. 結論

臨床態様に関して、研究の各時点ですべての動物が、正常な挙動、体重、水および食物消費を示した。臨床所見は、試験MEV生成物のマウスモデルにおける一般的な耐性を示

50

す。実験条件下で、陰性対照（PBS）ならびに経口投与による 4×10^{11} MEV / マウスまたは 4×10^{12} MEV / マウスの濃度およびIT投与による 4×10^{11} MEV / マウスの濃度のMEVの両方とも、動物に対して異常な、毒性効果を何ら誘導しなかった。

【実施例 7】

【0522】

外因的に負荷された siRNA のインビボデリバリーおよび発現

この研究は、原核生物および真核生物微生物の遺伝子に対する siRNA が負荷された MEV の有効性を評価し、実証する。種々の細菌株 [大腸菌 (*E. coli*)、緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)] および酵母 [カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)] は、グラム陽性種に対してグラム陰性種 (LuxABCDE) の細菌ルシフェラーゼ遺伝子 Lux オペロン (luxCDAE) を、酵母種に対してカイアシ類ガウシア属 (*Gaussia*) の種由来のルシフェラーゼ遺伝子を保有するように遺伝子改変されている。これらの微生物は、以下のようなインビボ感染モデルを提供する：

- －緑膿菌、黄色ブドウ球菌／呼吸器系、
 - －緑膿菌、黄色ブドウ球菌およびカンジダ・アルビカンス／皮膚、
 - －大腸菌／消化系、
 - －大腸菌／泌尿生殖器性、および
- カンジダ・アルビカンス／泌尿生殖器系および皮膚。

【0523】

細菌ルシフェラーゼ遺伝子 Lux オペロンまたは真核生物ルシフェラーゼに対する siRNA が負荷された MEV の干渉活性のリアルタイムモニタリングは、中でも、MEV のインビボで感染性細菌および酵母に浸透する能力を追跡する方法、異なる経路の適用および組織による感染部位における MEV の広がりモニタリングする方法、MEV のコーディング遺伝子を干渉する能力をモニタリングする方法、および抗菌治療薬、例えば、siRNA を送達する MEV の抗菌作用を評価する方法を提供する。

【0524】

1. インビボイメージング

動物は、上記のような雄の Balb / C マウスである。感染後、マウスを密接にモニタリングし、IVIS 生物発光によって画像化して、インビボでルシフェラーゼによって放出される低レベルの光および生存動物において特定の組織に局在化する可能性がある生物発光細菌を検出し、これによって感染プロセスを時間的にモニタリングすることが可能になった。マウスを 1×10^{10} 粒子 / g の MEV を用いて処置した後、密接にモニタリングし、IVIS 生物発光によって画像化して、ルシフェラーゼ mRNA に対する種々の siRNA 集団の干渉活性によって表されるような干渉抗菌処置の有効性を追跡した。データは、IVIS ソフトウェア (IVIS 用 Living Image Software) を用いて分析した。

【実施例 8】

【0525】

外因的に負荷された mRNA のインビボデリバリーおよび発現

アルビノウサギにおける単回眼性局所投与後の眼性分布

A. 材料および方法

ウサギ、ニュージーランドホワイト (アルビノ) は、眼性体内分布のために最も使用される種の 1 つである。眼性局所投与研究では、8 匹の、2 ~ 2.5 kg の間の体重の 3 ヶ月齢の雄を使用した。

【0526】

すべての動物に到着時に耳タグをつけ、組入れ検査後に消えないインクを使用して耳に識別番号も標識した。

【0527】

B．臨床検査および健康状態

動物を疾病の徴候について毎日観察し、その眼に特に注意をはらった。研究には、眼に見える眼性欠陥のない健康な動物のみを使用した。

【0528】

C．飼育

動物を標準ケージにおいて個別に飼育した。温度を $18 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で、相対湿度を45～80%で保った。室内は連続的に換気した（1時間あたり15～20空気体積）。動物を12時間明（7:00 a.m. から7:00 p.m.）および暗さ制御サイクルで10～200 lxの光に日常的に曝露させた（ケージ中）。

【0529】

D．食餌および水

動物は、プラスチックボトルから自由に利用可能な食餌（90 g／日）および水を自由に利用できた。

【0530】

E．手順

適切なマイクロピペットを使用して、 2×10^8 の、mRNA-eGFPが負荷されたMEVの用量で、すべての動物に両眼で50 μL の単回滴下注入を投与した。蛍光測定法を以下のとおりに実施した：数時点で（投与後0、6、24、30、48、54および72時間）、動物に麻酔し、瞳孔が散大し、両眼においてFM-2 Fluorotron Master 眼性蛍光光度計を用いて眼性蛍光の測定を実施した。光学軸に沿って角膜から網膜まで、刻み幅0.25 mmで一連の148スキャンを記録した。

【0531】

F．結果：

蛍光光度計によって光学軸に沿って0.25 mm離れるデータ点で、種々の眼性組織（脈絡膜／網膜、硝子体、レンズ、前房、角膜）における蛍光シグナルを取得した。硝子体または前房において任意の検出可能な蛍光が測定された。すべての動物の結果が、図19にまとめられている。

【実施例9】

【0532】

異なるペイロードのインビトロデリバリー**A．神経細胞へ**

神経保護効果のインビトロ評価のモデルとしてPC12神経細胞を使用する。手短には、PC12細胞を96ウェルプレート（50,000細胞／ウェル）に播種し、3日間培養する。次いで、カタラーゼを保有するMEV（上記のように負荷された）をDiR（5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ）を用いて染色し、種々の時間、段階希釈でウェルに添加する。インキュベーション後、細胞を氷冷PBSで3回洗浄し、1%のTriton X-100中で可溶化する。750 nmで励起および780 nmで発光を用いてSpectraMax（登録商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Molecular Devices、米国）を使用して試料蛍光を測定する。神経細胞に蓄積されたMEVの量は、総タンパク質含量について正規化され、タンパク質1 mgあたりのMEVの数として表わされる。すべてのMEV製剤は、同一レベルの蛍光で調製され、各MEV製剤のために別個の校正曲線が使用される。

【0533】

B．神経細胞へー共焦点顕微鏡

カタラーゼが負荷されたMEV（100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の総タンパク質）を超音波処理し、DiR（5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ）を用いて染色し、チャンバースライド上で増殖させたPC12細胞（ 1×10^5 細胞／チャンバー）とともに種々の時間間隔の間インキュベートする。インキュベーション後、細胞をPBSで洗浄し、4%のパラホルムアルデヒドで固定し、0.1%のTriton X-100で透過処理する。蛍光染色は、抗アクチン抗体（Abcam ab179467、1:100）を使用して、二次抗体としてのヤギ抗ウサギI

10

20

30

40

50

g G A l e x a F l u o r 4 8 8 (A b c a m a b 1 5 0 0 7 7、1 : 1 0 0 0) を用いて実施する。イメージングの前に、D A P I (4 ' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール) を核の対比染色として使用する。L S M 7 0 0 レーザースキャニング共焦点顕微鏡 (Z e i s s) によって蛍光標識された M E V の蓄積を可視化し、L S M 画像ブラウザーを用いて画像を処理する。

【 0 5 3 4 】

C. 負荷された M E V の神経保護効果

6 - O H D A 誘導性細胞毒性からの P C 1 2 細胞の保護を M T T アッセイによって評価する。この目的のために、9 6 ウェルプレートに P C 1 2 細胞 (1×10^5 細胞 / m L) を播種し、一晚付着させた。次いで、細胞を $200 \mu\text{M}$ の 6 - ヒドロキシドパミン (6 - O H D A) および種々のカタラーゼが負荷された M E V 製剤またはカタラーゼ単独または空の M E V に対して 4 時間曝露する。インキュベーション後、細胞を氷冷 P B S を用いて 3 回洗浄し、対応するカタラーゼが負荷された M E V 製剤またはカタラーゼ単独または空の M E V とともにさらに 2 4 時間インキュベートする。処置後、各ウェルに $20 \mu\text{L}$ の M T T テトラゾリウム色素溶液 ($5 \text{ mg} / \text{mL}$) を添加する。 37°C で 3 時間のインキュベーション後、M T T 含有培地を除去し、各ウェルに $100 \mu\text{L}$ の D M S O を添加して、紫色のホルマザン沈殿物を溶解する。S p e c t r a M a x (登録商標) マイクロプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s、米国) を使用して 570 nm で吸光度を測定し、細胞生存率は、未処置対照群と比較した処置群における生存細胞のパーセンテージとして表される。

【 0 5 3 5 】

D. がん細胞

G F P が負荷された M E V の取り込みを研究するために、ヒト子宮頸部類上皮癌の H e L a 細胞株を使用する。フローサイトメトリー分析のために、細胞を 2 4 ウェルプレート (1 5 , 0 0 0 細胞 / ウェル) に播種する。2 4 時間後、細胞をカーゴが負荷された M E V とともに 4 時間インキュベートし、その後、P B S で洗浄し、酸性洗浄緩衝剤 (0.5 M NaCl 、 0.2 M 酢酸) を用いて再度洗浄して、膜結合 M E V を除去し、もう一度 P B S を用いて洗浄する。トリプシンを用いて細胞を剥離し、P B S 中 0.2% のパラホルムアルデヒドで固定し、L S R I I フローサイトメーターを使用し、C e l l Q u e s t P r o ソフトウェア (B D B i o s c i e n c e s) を用いて分析する。共焦点顕微鏡分析のために、H e L a 細胞を、4 , 0 0 0 細胞 / ウェルで 1 6 ウェルチャンバースライド (L a b - T e k) に播種する。2 4 時間後、細胞をカーゴが負荷された M E V とともに 4 時間インキュベートし、その後、P B S で洗浄し、酸性洗浄緩衝剤 (0.5 M NaCl 、 0.2 M 酢酸) を用いて再度洗浄して、膜結合 M E V を除去し、もう一度 P B S を用いて洗浄する。細胞を P B S 中 4% のパラホルムアルデヒドを用い、室温で 2 0 分間固定する。次いで、スライドを P B S を用いて洗浄し、F l u o r S a v e (商標) (C a l b i o c h e m) を使用してマウントする。L S M 7 0 0 レーザースキャニング共焦点顕微鏡 (Z e i s s) を使用して共焦点蛍光イメージングを実施し、L S M 画像ブラウザーを用いて画像を処理する。

【 0 5 3 6 】

E. G F P (緑色蛍光タンパク質) の正常ヒト肝細胞へのデリバリー

1. 原発性ヒト肝細胞 (P H H) の単離および培養

結腸直腸がん転移または原発性肝臓がんの処置のために部分肝切除術を行っている対象から組織学的に正常な肝臓組織試料を得る。すべての試料は、C 型肝炎ウイルス (H C V)、B 型肝炎ウイルス (H B V) およびヒト免疫不全ウイルス (H I V) について血清陰性である。手短には、肝臓断片を予め加温した (37°C)、 $5 \text{ mmol} / \text{L}$ エチレンジアミン四酢酸 (S i g m a - A l d r i c h) を補給したカルシウム不含緩衝剤を用いて最初に灌流し、続いて、予め加温した (37°C)、 $6 \text{ mmol} / \text{L}$ カルシウム (CaCl_2) および 0.05% のコラゲナーゼ (S i g m a - A l d r i c h) を含有する緩衝剤を用いて灌流する。次いで、肝臓断片を穏やかに振盪して、肝細胞洗浄培地 (L i f e

10

20

30

40

50

Technologies) 中に肝臓細胞を分散させる。得られた細胞懸濁液を、ガーゼを敷いた漏斗を通して濾過する。次いで、細胞を低速 (50 g) で遠心分離し、上清を除去し、ペレット化された肝細胞を肝細胞洗浄培地に再懸濁する。トリパンブルー排除を使用して生存細胞数を決定する。新たに単離された肝細胞を、10% のウシ胎児血清 (Eurobio)、ペニシリン (200 U/ml) - ストレプトマイシン (200 µg/ml; Life Technologies)、ファンギゾン (2.5 µg/ml; Life Technologies) およびインスリン (0.1 U/ml; Sigma-Aldrich) を含有する William の E 培地 (Life Technologies) に懸濁する。次いで、細胞を、I 型コラーゲンを用いてプレコーティングされた 12 -、24 - および 96 ウェルプレートにそれぞれ 0.78×10^6 、 0.4×10^6 および 0.5×10^5 生存細胞 / ウェルの密度で播種し、5% の CO₂ 中、37 °C で一晩インキュベートする。培地を 1 µmol / L ヘミコハク酸ヒドロコルチゾン (SERB) を補給した新鮮な完全肝細胞培地と置き換え、カーゴが負荷された MEV とのインキュベーションまで細胞をこの培地で維持する。

10

【0537】

2. PHH 生存率に対する MEV の効果

PHH (1×10^5 個細胞 / mL) を 96 ウェルプレート播種し、一晩付着させる。次いで、細胞を、種々のカーゴが負荷された MEV 製剤または空の MEV に 4 時間曝露する。インキュベーション後、各ウェルに 20 µL の MTT テトラゾリウム色素溶液 (5 mg / mL) を添加する。37 °C で 3 時間のインキュベーション後、MTT 含有培地を除去し、各ウェルに 100 µL の DMSO を添加して、紫色のホルマザン沈殿物を溶解する。SpectraMax (登録商標) マイクロプレートリーダー (Molecular Devices、米国) を使用して 570 nm で吸光度を測定し、細胞生存率は、未処置対照群と比較した処置群における生存細胞のパーセンテージとして表される。

20

【0538】

3. PHH における MEV 内部移行

PHH における GFP - タンパク質 - カーゴが負荷された MEV の内部移行を、フローサイトメトリーによって決定した。フローサイトメトリー分析のために、PHH を 24 ウェルプレートに播種する (15,000 細胞 / ウェル)。24 時間後、細胞を MEV とともに 4 時間インキュベートし、その後、PBS で洗浄し、酸性洗浄緩衝剤 (0.5 M NaCl、0.2 M 酢酸) を用いて再度洗浄して、膜結合 MEV を除去し、もう一度 PBS を用いて洗浄する。トリプシンを用いて細胞を剥離し、PBS 中 0.2% のパラホルムアルデヒドで固定し、LSRII フローサイトメーターを使用し、CellQuest Pro ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて分析する。共焦点顕微鏡分析のために、PHH を、4,000 細胞 / ウェルで 16 ウェルチャンバースライド (Lab-Tek) に播種する。24 時間後、細胞を MEV とともに 4 時間インキュベートし、その後、PBS で洗浄し、酸性洗浄緩衝剤 (0.5 M NaCl、0.2 M 酢酸) を用いて再度洗浄して、膜結合 MEV を除去し、もう一度 PBS を用いて洗浄する。細胞を PBS 中 4% のパラホルムアルデヒドを用い、室温で 20 分間固定する。次いで、スライドを PBS を用いて洗浄し、FluorSave (商標) (Calbiochem) を使用してマウントする。LSM700 レーザースキャニング共焦点顕微鏡 (Zeiss) を使用して共焦点蛍光イメージングを実施し、LSM 画像ブラウザーを用いて画像を処理する。

30

40

【0539】

4. 遺伝子発現研究

GFP - mRNA - カーゴが負荷された MEV の、PHH における内部移行および生物活性を、RNeasy ミニキット (Qiagen) を製造業者の使用説明書に従って使用して PHH から抽出された全 RNA によって決定する。次いで、500 ng の全 RNA を、逆転写酵素 (Promega) を使用して cDNA に逆転写し、LC480 デバイスで LightCycler (登録商標) 480 SYBR グリーン I マスターキットを使用して (両方とも Roche Diagnostics 製)、リアルタイム PCR を実施す

50

る。28SリボソームRNAハウスキーピング遺伝子のCTに対して標的遺伝子の閾値サイクル(CT)を正規化することによってmRNAレベルを算出する。プライマーは、Roche Diagnostics製のプライマーソフトウェアを使用して設計され、Eurogentecから購入する。

【0540】

5. タンパク質発現研究

さらに、標的化されたタンパク質発現は、SDS-PAGEと、それに続くウエスタンブロット解析を使用して検証する。細胞を氷上でβ-メルカプトエタノール(Sigma-Aldrich)を補給したRIPA緩衝剤で溶解する。次いで、30μgのタンパク質を煮沸し、SDS-PAGEに付し、ニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad)にトランスファーする。ブロットを、5%のBSAを含有するTris緩衝生理食塩水(TBS)、0.1%のTween-20を用いてブロッキングし、以下の抗体とともに4℃で一晩インキュベートする。その後、ブロットを、関連するHRPがコンジュゲートされた二次抗体とともに室温で1時間インキュベートする。化学発光(Thermo Fisher Scientific)によって、シグナルが明らかにされる。

【0541】

F. ヒト単球およびケラチノサイト

蛍光プローブ(GFP)またはGFPコーディングRNAが負荷されたMEVを用いるペイロードデリバリーを研究するためのインビトロモデルとしてヒト一次細胞を使用した。ヒト単球および／または正常ヒト上皮ケラチノサイト(NHEK)において細胞浸透および蛍光効果をアッセイした。

【0542】

1. 材料:

健康なボランティアからの末梢血単核細胞(PBMC)をl'Etablissement Francais du Sang(EFS)から入手した。細胞培養培地マクロファージ-SFM(M-SFM)は、Gibcoから購入した。NHEK細胞および培養培地(KGM-Gold Bulletキット)はLonzaから購入した。

【0543】

2. 単球単離、細胞培養:

PBMCは、標準フィコール-ハイパーク勾配法によって健康な血液ドナーバフィーコートから入手した。37℃で、5%のCO₂を含有する加湿雰囲気中、マクロファージ培養のために最適化された血清不含培地(M-SFM)において2時間のプラスチックへの付着によって、単球をPBMCから単離した。NHEKを製造業者(Lonza)の推奨に従って培養し、アッセイの前日に96ウェルプレートに播種した。

【0544】

3. MEV浸透アッセイ:

GFPタンパク質(MEV-GFP)またはmRNA-eGFP(MEV-mRNA)のいずれかが負荷されたMEVを、96ウェルプレートにおいてNHEKおよび単球とともに4時間、8時間および24時間インキュベートした。

【0545】

使用した用量は以下とした:

GFPタンパク質のために:

D1 = 1×10^7 MEV / ウェル

D2 = 5×10^6 MEV / ウェル

D3 = 1×10^6 MEV / ウェル

mRNA-eGFPのために:

D1 = 1×10^7 MEV / ウェル

D2 = 5×10^6 MEV / ウェル

D3 = 2.5×10^6 MEV / ウェル

【0546】

次いで、細胞をPBSで2回洗浄し、新鮮培地を添加した。次いで、プレートをIncucyte装置に入れ、Prot-GFPについては0、6、12、24および48時間で、mRNA-GFPについては0、12、24、48および72時間で画像を撮影した。

。

10

20

30

40

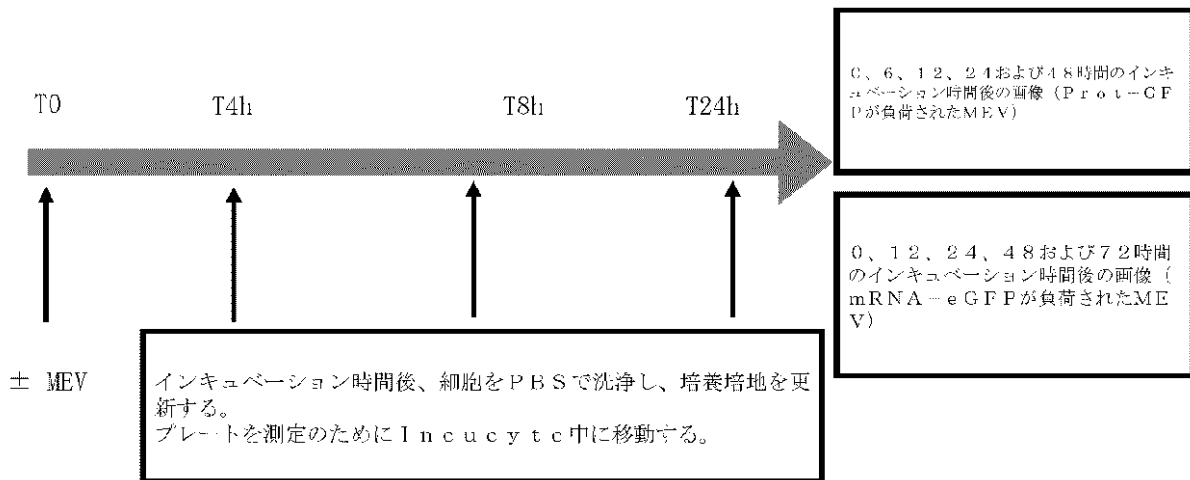
50

【0547】

4. 画像分析：

Incucyteソフトウェアを使用して画像を分析した。最初に細胞数を、続いて、蛍光レベルに対して閾値を適用することによって緑色蛍光を含有していた細胞数を定量化した。すべての画像で同一閾値を適用した。次いで、緑色蛍光を示す細胞のパーセンテージを、比率＝（緑色蛍光を含有する細胞／総細胞数）×100として算出した。

【0548】



【0549】

5. 単球の内部デリバリー：

Incucyteによって48時間の蛍光の間隔で、インキュベーションのすべての時間で緑色蛍光細胞を観察した。この観察結果は、ヒト単球へのMEVの浸透およびMEVから単球への緑色蛍光タンパク質（GFP）のデリバリーを実証する。

【0550】

第1の蛍光測定での結果に基づいて最適インキュベーション時間は8時間とした。細胞とともにインキュベートされた異なる量の小胞（ $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ の間）後の用量効果が観察された。図20は、8時間および24時間のインキュベーション後の結果（洗浄後の48時間の動態学における）を示す。

【0551】

6. ケラチノサイトの内部デリバリー：

Incucyteによって48時間の蛍光の間隔で、インキュベーションのすべての時間で緑色蛍光細胞を観察した。この観察結果は、ヒトケラチノサイトへのMEVの浸透およびMEVからケラチノサイトへの緑色蛍光タンパク質（GFP）のデリバリーを実証する。

【0552】

第1の蛍光測定での結果に基づいて最適インキュベーション時間は8時間～24時間である。細胞とともにインキュベートされた異なる量の小胞（ $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ の間）後の用量効果が観察された。図21は、8時間および24時間のインキュベーション後の結果（洗浄後の48時間の動態学における）を示す。

【0553】

G. ヒト肝細胞へ

1. 材料および方法

・ヒト肝細胞の単離

PHH（原発性ヒト肝細胞）を、部分肝切除術を行っている患者から得られた正常な肝臓組織から単離する。解離は、これまでに記載された2つの工程のコラゲナーゼ灌流法に基づいている（L. Aoudjehane, DMM, 2020）。次いで、勾配にわたる遠心分離によって細胞を分ける。異なる勾配を用いて、ペレットから肝細胞を、上清から非実質細胞（

NPC)を単離する。トリパンブルー色素排除によって細胞生存率を決定し、次いで、新たに単離されたPHHを、I型コラーゲンでプレコーティングした12-、96-ウェルプレートに、それぞれ 1×10^6 、 6×10^4 生存細胞/ウェルの密度で播種し、5%のCO₂中、37℃で一晩インキュベートした。

【0554】

・細胞培養条件

細胞株Huh7およびHepG2ヒト肝細胞細胞株を、DMEM培地で培養し、コンフルエンスまで37℃、5%のCO₂でインキュベートした。PHH単離細胞の培地を、ヒドロコルチゾンを経過した新鮮な完全肝細胞培地と置き換え、5%のCO₂中、37℃で24時間および48時間の異なる条件を用いるMEVとのD3とD5の間のインキュベーションまでこの培地で細胞を維持した。Huh7およびHepG2(12ウェルプレートにおいてウェルあたり 2×10^6 細胞)を、DMEM(10%のFCS)中プラスチック上に3連で播種し、24時間付着させた。次いで、すべての実験において、培地をFCS不含DMEMと置き換え、MEVを伴わずに(陰性対照のために)または研究される種々のMEVとともに24時間、48時間細胞を培養した。

【0555】

・細胞生存率評価

可溶性テトラゾリウム塩、MTTを、ミトコンドリアデヒドロゲナーゼ酵素によって青色ホルマザン最終生成物に変換する生存細胞の能力を試験する、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(MTT)比色アッセイによって、細胞生存率を決定した。各ウェルにMTT(0.5mg/mL)を添加し、37℃でのインキュベーションをさらに2時間延長した。次いで、培地を破棄し、各ウェルにDMSOを添加して着色したホルマザン生成物を可溶化した。スキャニングマイクロタイター分光光度計プレートリーダーで550nmで吸光度を読み取った。

【0556】

・蛍光イメージングおよび共焦点イメージング:

MEVで処置されたPHHおよび細胞株の蛍光画像をOlympus microscope(IX83、Olympus)で観察し、CellSens V1.6を用いて取得し、FIJIソフトウェアを用いて分析した。

【0557】

・mRNA検出のための逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

全RNAを、RNeasyミニキット(Qiagen SA、Courtaboeuf、フランス)を製造業者の推奨に従って使用して調製した。cDNA合成を、500ngの全RNAのために2ユニットのRNアーゼ阻害剤(Promega、Charbonnières、フランス)、3ユニットの鳥類骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素(Promega)、120ngのランダムヘキサマープライマー(Sigma-Genosys Ltd、Saint-Quentin Fallavier、フランス)および1mM dNTP(Promega)を含有する反応混合物中で42℃で90分間実施した。

【0558】

・コラーゲンおよびα-SMA評価のためのリアルタイム定量的PCR

HLMFにおけるコラーゲン-1およびα-SMA遺伝子発現を、LC480機器および技術(Roche Diagnostics)を用いてLightCycler(登録商標)480 SYBRグリーンIマスター(2×濃縮)キット(Roche、Grenoble、フランス)を使用してRT-PCRによって分析した。LC480機器および技術(Roche Diagnostics)を用いてSYBRグリーンIマスター(2×濃縮)キット(Roche Diagnostics)を使用して、反応を確実にした。5μlのSYBRグリーンIマスターミックス(2×)、10ngの各プライマー(Sigma-Genosys Ltd;表を参照されたい)および2μlのcDNA(1/10eme)を含有する、10μlの総容量でPCR増幅を実施した。PCR増幅プロト

10

20

30

40

50

コールは、94℃で10分間の最初の変性、続いて40サイクル：変性（95℃、10秒間）、アニーリング（60℃、10秒間）および伸長（72℃、10秒間）の1工程からなっていた。

【0559】

【表31】

表31. 定量的リアルタイムPCRに使用されたプライマー

遺伝子	フォワード(F)およびリバース(R)プライマーの配列	
eGFP	F:5'-AGCAAAGACCCCAACGAGA-3'	配列番号:66
	R:5'-TCGTCCATGCCGAGAGTG-3'	配列番号:67
アルブミン (ALB)	F: 5'-TTTTATGCCCCGGAACCTCCT-3'	配列番号:128
	R: 5'-TTGGAGACTGGCACACTTGA-3'	配列番号:129
サイトケラチ ン18 (CK18)	F: 5'-CATAGACAAGGTACGGTTCCTG-3'	配列番号:130
	R: 5'-TGTTGTCCATGTTGCTTCGAGC-3'	配列番号:131
28S (RN28S1)	F:5'- TTGAAAATCCGGGGGAGAG -3'	配列番号:132
	R:5'- ACATTGTTCCAACATGCCAG-3'	配列番号:133

10

20

【0560】

・ウエスタンブロット解析

細胞および組織を、補給されたRIPA緩衝剤（Sigma Aldrich）に直接氷上で溶解した。20μgのタンパク質を煮沸し、SDS-PAGEに付し、ニトロセルロースメンブレン（Bio-Rad、カリフォルニア州、ハーキュリーズ）にトランスファーした。ブロットを、5%の脱脂粉乳を含有するTBS、0.1%のTween-20を用いてブロッキングし、以下の抗体：抗アルブミン（Dako）、抗eGFP（Roc
he）とともに4℃で一晩、二次HRP-連結抗体（1/2000、GE Health
care Europe GmbH）とともに室温で1時間インキュベートした。化学発
光（ThermoScientific、フランス）によって、シグナルが明らかにされ
た。

30

【0561】

2. 結果：

表32は、種々の実験条件のRT-qPCR分析によるmRNA発現の結果を示す。

【0562】

40

50

【表 3 2】

表 3 2. ヒト肝細胞を用いるME V内部移行研究における定量的リアルタイムPCRを使用する遺伝子発現分析の結果

実験条件	eGFP	28S	ALB	CK18
2 4 時間後				
PHH (陰性対照)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH (非負荷ME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH (GFPタンパク質が負荷されたME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH (mRNA eGFPが負荷されたME V)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
Hu h 7 細胞 (陰性対照)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
Hu h 7 細胞 (非負荷ME V)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
Hu h 7 細胞 (GFPタンパク質が負荷されたME V)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
Hu h 7 細胞 (mRNA eGFPが負荷されたME V)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (陰性対照)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (非負荷ME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (GFPタンパク質が負荷されたME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (mRNA eGFPが負荷されたME V)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
4 8 時間後				
PHH (陰性対照)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH (非負荷ME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH (GFPタンパク質が負荷されたME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH (mRNA eGFPが負荷されたME V)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
Hu h 7 細胞 (陰性対照)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hu h 7 細胞 (非負荷ME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hu h 7 細胞 (GFPタンパク質が負荷されたME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hu h 7 細胞 (mRNA eGFPが負荷されたME V)	(+)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (陰性対照)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (非負荷ME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (GFPタンパク質が負荷されたME V)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
He p-G 2 細胞 (mRNA eGFPが負荷されたME V)	(+)	(+++)	(+++)	(++)
mRNA eGFPが負荷されたME V (陽性対照)	(++++)	(-)	(-)	(-)

参照：(-) 陰性結果 (mRNAが存在しない)；(+) 陽性結果 (低)；(++) 陽性結果 (満足できる)；(++) 陽性結果 (最良)；(++) 陽性結果 (mRNA eGFPが負荷されたME V／陽性対照)

【0 5 6 3】

表 3 3 は、種々の実験条件の共焦点分析後の蛍光発現による GFP 発現の結果を示す。結果は、細胞数および蛍光強度を総合する。さらなるイメージング結果は、図 2 2 および 2 3 に提示されている。

【0 5 6 4】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

表 3 3. ヒト肝細胞を用いるMEV内部移行研究における共焦点顕微鏡を使用するタンパク質発現分析の結果

実験条件	細胞あたり100が 負荷されたMEV	細胞あたり200が 負荷されたMEV	細胞あたり400が 負荷されたMEV
Huh7細胞（陰性対照）	(-)	(-)	(-)
Huh7細胞（非負荷MEV）	(-)	(-)	(-)
Huh7細胞（GFPタンパク質が負荷されたMEV）	(+)	(+++)	(+++)
Huh7細胞（mRNA eGFPが負荷されたMEV）	(++)	(+++)	(+++)
Hep-G2細胞（陰性対照）	(-)	(-)	(-)
Hep-G2細胞（非負荷MEV）	(-)	(-)	(-)
Hep-G2細胞（GFPタンパク質が負荷されたMEV）	(+)	(++)	(+++)
Hep-G2細胞（mRNA eGFPが負荷されたMEV）	(++)	(++)	(+++)

参照：（-）陰性結果（GFP蛍光検出されない）；（+）陽性結果（GFP蛍光が検出された）；（++）陽性結果（満足できる）；（+++）陽性結果（最良）。

【0565】

以下の表 3 4 は、MTT 比色アッセイによる生存率結果を示す。多量のMEV（負荷されたまたは負荷されていないMEV）とのインキュベーション後に非毒性が観察された。

【0566】

【表 3 4】

表 3 4. ヒト肝細胞を用いるMEV内部移行研究における細胞生存率アッセイ結果

実験条件	生存率の%
Huh7細胞（陰性対照）	100%
Huh7細胞（10,000 MEV）	80%
Huh7細胞（20,000 MEV）	80%
Huh7細胞（40,000 MEV）	80%
Hep-G2細胞（陰性対照）	100%
Hep-G2細胞（10,000 MEV）	100%
Hep-G2細胞（20,000 MEV）	100%
Hep-G2細胞（20,000 MEV）	100%

【0567】

H. 異なるヒト細胞モデル（線維芽細胞）におけるMEVの浸透およびペイロードの送達の評価

1. 蛍光顕微鏡：

線維芽細胞（ATCCヒト皮膚CRL 2522 バッチ：70027155）を、ウェルあたり 2×10^4 細胞で96ウェルプレート中に播種した。使用されたプレートは、最

適解像度を提供し、参照は、細胞培養用、96ウェルのThermo Fisher Nunc lon Delta Surface Disposableプレートである。カタログ番号167425。20時間後、緑色蛍光タンパク質（GFP）または緑色蛍光タンパク質をコードするmRNA（mRNA-eGFP）が負荷されたMEVの異なる条件（MEV／細胞の比率は100～1000の間である）を用いて、非完全培地中で細胞を一晩インキュベートした。16時間後、細胞を2回すすぎ、新鮮な完全培地を添加した。1：2000の希釈のHoechst溶液を培地に添加して、核を染色した。その後、プレートのウェルの周囲に、このために作製されたコンパートメントに1mLの水を入れた。Cellinsightによってt=20時間、t=48時間およびt=72時間でレーザーオートフォーカスカメラによって画像を撮像した。Cellinsight培養条件は、37℃のインキュベーターと同一である。写真は20倍の対物レンズを備えた共焦点モジュールで撮像された。図24は、100の比率MEV／細胞で3つの独立実験の結果を示す。

10

【0568】

2. フローサイトメトリー：

線維芽細胞（ATCCヒト皮膚CRL 2522バッチ：70027155）を、ウェルあたり 2×10^6 細胞で6ウェルプレート中に播種した。20時間後、緑色蛍光タンパク質（GFP）または緑色蛍光タンパク質をコードするmRNA（mRNA-eGFP）が負荷されたMEVの異なる条件（MEV／細胞の比率は100～1000の間である）を用いて非完全培地中で細胞を一晩インキュベートした。16時間後、細胞を2回すすぎ、新鮮な完全培地を添加した。異なる時間で、細胞をすすぎ、トリプシンで処置し、1，200gで遠心分離し、PBSを用いて1回洗浄し、次いで、1mLのPBSに再懸濁した。

20

【0569】

3. 線維芽細胞蛍光活性化細胞選別

GFP-タンパク質が負荷されたMEVまたはmRNA-eGFPが負荷されたMEVとともに、または伴わずにインキュベーションした後、培養線維芽細胞におけるGFP発現をFACS分析によって評価した。線維芽細胞を、96ウェルプレート中で、ウェルあたり2000個細胞で培養した。24時間後、線維芽細胞をMEVとともにまたは伴わずに（異なる条件）インキュベートした。24時間で、トリプシン処理によって細胞をウェルから剥離し、PBSで2回洗浄した後、GFP発現蛍光細胞数測定のために生存細胞を分析した。

30

【0570】

図25A～Dは、緑色蛍光陽性細胞を示す。図25Aは、MEVを伴わずにインキュベートされた線維芽細胞を表す。図25B～および25Cは、異なる方法（それぞれ凍結および解凍またはエレクトロポレーション）によってmRNA-eGFPが負荷されたMEVとともにインキュベートされた線維芽細胞を表す。図25Dは、超音波処理によってGFPタンパク質が負荷されたMEVとともにインキュベートされた線維芽細胞を示す。結果は、BおよびD条件において5%ならびにCにおいて8%の対照を上回る陽性細胞のパーセンテージを示す。

40

【0571】

I. 抗菌ペプチドが負荷されたMEVに関する研究

単離されたMEVに、ProteoGenix（Lille、フランス）によって商業的に合成され、90%の純度を有する抗菌ペプチドLL-37（LLGDFFRKSKKKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES；配列番号37）を用いて上記のように超音波処理を使用して負荷する。抗菌ペプチドの放出は、透析およびフルオレサミンアッセイ（Thermo Scientific）によって製造業者のプロトコールに従ってモニタリングされる。1mLの試料を、透析デバイス（Float-A-Lyzer（登録商標）G2100 kDa MWCO、Spectrum Laboratories Inc.）に入れ、室温で20mLの20mM酢酸ナトリウム緩衝剤pH5.

50

5 中で透析を可能にする。0、1、2、4、6 および 24 時間の透析後に 200 μ L の試料を取り出す。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices、米国) を使用するフルオレサミンアッセイを用いてペプチド定量化を実施し、標準曲線は 2.5 ~ 150 μ g / mL のペプチドの範囲で良好な直線性を示す。

【0572】

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) エラスターゼ (PE) またはヒト好中球エラスターゼ (HNE) との MEV 分散物のインキュベーション後に、ペプチド LL-37 のタンパク質分解性保護を調査する。ペプチドが負荷された MEV (2 μ g のペプチドの総量) を、15 μ L の容量の 0.2 μ g の PE (BioCol) または 0.4 μ g の HNE (Calbiochem) と一緒に、10 mM TRIS 緩衝剤 pH 7.4 中で 37 $^{\circ}$ C で 6 時間インキュベートする。対照試料のために、MEV を溶解し、その後、95 μ L の MEV 混合物中に 5 μ L の 0.4 % の SDS を添加し、十分にピペッティングし、85 $^{\circ}$ C のサーモサイクラー中で 15 分間インキュベートすることによって、酵素とともにインキュベートして、生体分子カーゴを放出する。ペプチド分解は、SDS-PAGE 後にクマシーブリリアントブルー染色を用いて可視化する。Image Lab ソフトウェア (Bio-Rad) を用い、Molecular Imager Gel DOC によってバンド強度を定量化する。

【0573】

タンパク質分解後の殺菌特性を評価するために、大腸菌 (*Escherichia coli*) (ATCC 25922) および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) (ATCC 25923) を使用して、酵素とのインキュベーションの前後に MEV 製剤で放射性拡散アッセイを実施する。85 mM ペトリ皿中で成形された下層アガロースゲルに 4×10^6 CFU を添加し、固化後に 4 mm 直径のウェルの穴がけられる。各ウェルに 6 μ L の試料を添加し、プレートを 37 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートする。溶解した MEV を対照試料として使用する。その後、融解した上層アガロースゲルで下層ゲルを覆い、室温で一晩インキュベートする。各ウェルの周りの透明なゾーンとして試料の抗菌活性が可視化される。結果は、種々の製剤によって形成された透明なゾーンの平均直径として提示される。

【実施例 10】

【0574】

がん細胞における外因的に負荷された siRNA のインビトロデリバリーおよび発現

A. 細胞培養

ヒト細胞株 (ATCC) を、10 % のウシ胎児血清 (FBS)、50 ユニット / mL のペニシリンおよび 50 μ g / mL のストレプトマイシンを補給した DMEM (ダルベッコ改変イーグル培地) 中で増殖させる。細胞は培養物で 37 $^{\circ}$ C および 5 % の CO₂ 中で維持され、培地は 3 日毎に交換される。細胞を最適増殖条件で維持するために、それらを 80 % のコンフルエンスで継代し、20 % のコンフルエンスで播種する。以下の細胞株が研究に使用された：

- 1) HT29 を発現する MYC がん遺伝子 (結腸がん)、PANC-1 (膵臓がん) および MYC 陰性 LN-18 (悪性神経膠腫)、
- 2) SCLC-21H を発現する RAS がん遺伝子 (小細胞肺がん)、MCF-7 (乳がん) および RAS 陰性 PC3 (前立腺がん)、
- 3) AsPC-1 を発現する BCL-2 がん遺伝子 (膵臓がん)、U-937 (前単球性骨髄球性白血病) および BCL-2 陰性 LM-MEL-53 (悪性黒色腫)、
- 4) HepG2 を発現する PLK-1 がん遺伝子 (肝細胞腫)、PC3 (前立腺がん) および PLK-1 陰性 AsPC-1 (膵臓がん)。

【0575】

B. RT-PCR 分析およびゲル電気泳動

細胞 (1×10^6) を、培養プレート中で 24 時間増殖させる。次いで、siRNA を保有する MEV (上記のようにエレクトロポレーションによって負荷された) または空の

10

20

30

40

50

MEVまたはsiRNA単独を、段階希釈でウェルに添加し、1～24時間インキュベートする。インキュベーション後、培地を通常の培養培地と交換する。MEV処置の72時間後、Trizol試薬を使用して培養細胞から全RNAを抽出する。RNA沈殿物を遠心分離し、20μlのRNAアーゼ不含水に溶解する。260/280nmでのUV分光光度計分析およびアガロースゲル電気泳動を使用して、精製されたRNAの品質を確認する。42℃で1時間1μgの全RNAを逆転写して、cDNAを合成し、次いでこのcDNAを25μlの反応物中で特異的プライマーを用いるPCR増幅に付す。次いで、PCR産物を2%のアガロースゲルで分離し、臭化エチジウムで染色し、UVトランスイルミネーターを用いて観察する。ImageJ分析ソフトウェアを用いてデジタル画像を定量化し、結果はGAPDHに対する関連遺伝子の相対発現レベルとして表されている。

10

【0576】

C. 定量的RT-PCRを用いる遺伝子発現分析

MEVで処置され、合計72時間培養された細胞を、トリプシン処理し、PBSで洗浄する。RNeasyミニキット(Qiagen)を製造業者の使用説明書に従って使用して細胞ペレットから全RNAを抽出する。次いで、500ngの全RNAを、逆転写酵素(Promega)を使用してcDNAに逆転写し、LC480デバイスでLightCycler(登録商標)480 SYBRグリーンIマスターキットを使用して(両方ともRoche Diagnostics製)リアルタイムPCRを実施する。18SリボソームRNAハウスキーピング遺伝子のCTに対して標的遺伝子の閾値サイクル(CT)を正規化することによってmRNAレベルを算出する。プライマーはRoche Diagnostics製のプライマーソフトウェアを使用して設計され、Eurogentecから購入する。

20

【0577】

D. ウェスタンブロット解析

MEVで処置され、合計72時間培養された細胞(2×10^6)を、トリプシン処理し、PBSで洗浄し、β-メルカプトエタノール(Sigma-Aldrich)を補給したRIPA緩衝剤中に氷上で溶解する。次いで、総タンパク質の50μgの試料を、10%の標準ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に付し、事前染色された分子量マーカーが並行して流される。その後、分離したタンパク質を、PVDFメンブレンにエレクトロトランスファーする。徹底的に洗浄した後、メンブレンを、関連する西洋ワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートしている抗体(Sigma-Aldrich)とともに室温で1時間インキュベートし、化学発光検出キット(Thermo Fisher Scientific)を用いて発色させる。負荷および/または定量化誤差について正規化し、また標的タンパク質発現の比較を可能にするために、腫瘍性タンパク質についてプローブされたメンブレンが、β-アクチンについて再度プローブされる。タンパク質発現は、ゲル分析システム(Bio-Rad)を用いて定量化される。

30

【0578】

E. 細胞増殖アッセイ

細胞を96ウェルプレート(10,000細胞/ウェル)中に播種し、18時間付着させる。次いで、細胞を上記のようにMEVを用いて処置し、処置の24、48および72時間後、各ウェルにおいて細胞に10μlの10mg/mL MTTを添加する。細胞を4時間インキュベートし、その後、100μlのDMSOを添加し、細胞を15分間溶解させる。すべての分析は、3連で実施する。492nmの光学濃度は、SpectraMax(登録商標)マイクロプレートリーダー(Molecular Devices、米国)を用いて決定する。阻害剤比率を決定するために、次いで、吸光度値をブランク対照細胞から得られた値に対して正規化する。

40

【0579】

1. アポトーシス細胞形態学観察

アポトーシス細胞死と関連する細胞形態学が、細胞核をDNA結合性蛍光色素Hoechst

50

h s t 3 3 2 5 8を用いて染色することおよび蛍光顕微鏡によってクロマチン縮合を評価することによって確立される。手短には、ウェルの底にガラススライドを備えた24ウェルプレートに細胞を播種し、上記のようにMEVを用いて処置する。その後、冷PBSを用いてスライドを穏やかに洗浄し、4%のパラホルムアルデヒドを用いて1時間固定し、PBSを用いて3回洗浄する。暗室中で37℃で0.5mlのHoechst 33258 (10 µg/ml)を用いて10分間、スライドを染色する。各群において、5つの顕微鏡視野を無作為に選択し、100個の細胞をカウントする。次いで、アポトーシス細胞レベルを、蛍光細胞の総数に対するアポトーシス細胞のパーセンテージとして算出する。

【0580】

2. 壊死性／アポトーシス細胞死の蛍光分析

フローサイトメトリー分析のために、細胞を24ウェルプレート(15,000細胞/ウェル)に播種する。24時間後、細胞を上記のようなMEVを用いて処置する。その後、細胞をPBSで洗浄し、トリプシンを用いて剥離する。PBS中0.2%のパラホルムアルデヒドで固定した後、細胞をアネキシンV FITC/PI (Thermo Fisher Scientific)を用いて標識し、LSRIIFローサイトメーターを使用しCellQuest Proソフトウェア(BD Biosciences)を用いて分析する。

【実施例11】

【0581】

微細藻類細胞外小胞(MEV)を用いて神経細胞を標的化すること

インビトロでニューロンにおけるsiRNAおよびmRNAが負荷された微細藻類細胞外小胞(MEV)の生物活性

1. マウスニューロン培養物におけるRNAiによって誘導されるノックダウン

DIV10-14海馬解離培養物中のマウス錐体細胞を、全細胞パッチクランプ技術を使用して分析し、自発的興奮活動(sEPSC)を記録する。培養物は、未処置であるか、または異なる濃度(10⁶~5×10¹⁰個の粒子)もしくはプレインキュベーション期間(0.5~24時間)でsiRNAが負荷されたMEVとともにプレインキュベートされるかのいずれかである。各細胞について、ベースラインシグナルが3分間記録され、ノックダウン有効性を評価するために記録される適用後バクロフェン(20 µM)と比較される。分析には、sEPSC周波数、振幅および膜パラメータ(Rm、Rs、Cm)が含まれる。

【0582】

2. KOニューロンマウス培養物における過剰発現／レスキュー

GABAB1a^{-/-}マウスからのDIV10-14海馬解離培養物中の錐体細胞を、全細胞パッチクランプ技術を使用して分析し、自発的興奮活動(sEPSC)を記録する。培養物は、未処置であるか、または異なる濃度(10⁶~5×10¹⁰個の粒子)もしくはプレインキュベーション期間(0.5~24時間)でMEVとともにプレインキュベートされるかのいずれかである。各細胞について、ベースラインシグナルが3分間記録され、レスキュー有効性を評価するために記録される適用後バクロフェン(20 µM)と比較される。分析には、sEPSC周波数、振幅および膜パラメータ(Rm、Rs、Cm)が含まれる。

【0583】

3. ヒトニューロン培養物におけるRNAi誘導性ノックダウン

iPSC由来のヒトグルタミン酸作動性神経細胞を、全細胞パッチクランプ技術を使用して分析し、自発的興奮活動(sEPSC)を記録する。培養物は、未処置であるか、または異なる濃度(10⁶~5×10¹⁰個の粒子)もしくはプレインキュベーション期間(0.5~24時間)でMEVとともにプレインキュベートされるかのいずれかである。各細胞について、ベースラインシグナルが3分間記録され、ノックダウン有効性を評価するために記録される適用後バクロフェン(20 µM)と比較される。分析には、sEPSC周波数、振幅および膜パラメータ(Rm、Rs、Cm)が含まれる。

10

20

30

40

50

[実施例 12]

【0584】

実施例 13～16 の材料および方法

A. 全 RNA 抽出 (クロレラ属)

200～800 ml の液体クロレラ属培養物 ($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞 / ml) を、遠心分離 (Beckman ローター JA18、10000 g、10 分、4℃) によって回収し、ペレットを 1×PBS で洗浄し、液体窒素中で急速凍結した。凍結されたペレットを、乳鉢および乳棒を使用して液体窒素中で微粉に粉碎した。約 100 mg の粉末を使用して、Trizol 試薬 (Sigma、ミズーリ州、セントルイス) を製造業者の使用説明書に従って使用して全 RNA 抽出を実施した。

10

【0585】

B. 気孔再開口アッセイ

気孔の完全な拡張を確実にするために、植物 (4/5 週齢、8 時間 / 16 時間の明 / 暗光周期) を、少なくとも 3 時間光 ($100 \mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{s}$) 下で維持し、その後、それらを任意の処置に付した。条件あたり少なくとも 6 つの無傷の若い葉の切片を、水または細菌懸濁液に浸漬した ($10^8 \text{ cfu} / \text{ml}$ の濃度で、 $\text{OD}_{600} = 0.2$)。細菌感染の 1 時間前に、切片を MEV (約 10 pM から) または全 RNA (20 μg) のいずれかで処置した。3 時間の細菌による感染で、葉切片をプロピジウムヨージド (H_2O 中の 10 ng / ml) を用いて 10 分間標識し、 H_2O で 5 分間洗浄し、SP5 レーザースキャニング共焦点顕微鏡下で観察した。各状態について、異なる葉表面領域から約 10～15 の写真を撮影した。写真から、ImageJ 1.53c を使用して条件あたり少なくとも 60 の気孔を手作業で測定して、その幅および長さを得た。エクセルを使用して幅 / 長さの比率を算出し、分散分析 (ANOVA) 試験を使用して統計分析を実施した。

20

【0586】

C. 気孔閉鎖アッセイ

気孔の完全な拡張を確実にするために、植物 (4/5 週齢、8 時間 / 16 時間の明 / 暗光周期) を、少なくとも 3 時間光 ($100 \mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{s}$) 下で維持し、その後、それらを任意の処置に付した。条件あたり少なくとも 6 つの無傷の若い葉の切片を、水に浸漬し、MEV (約 10 pM から) または flg22 1 μM (QR LSTGSRI NSAKD DAAGLQIA、配列番号 50、GeneScript から提供される) のいずれかを

30

【0587】

D. 実生成長阻害アッセイ

実生を、22℃ で 16 時間 / 8 時間光周期下で、13 Murashige Skoog (MS) 培地 (Duchefa)、1% のスクロースおよび 1% の寒天を含有するプレートで 7～8 日間成長させた。次いで、実生を flg22 ペプチド (QR LSTGSRI NSAKD DAAGLQIA、配列番号 50、GeneScript から提供される) が負荷された MEV、flg22 ペプチド単独、水または対照 MEV を含有する MS 液体培地 (24 ウェルプレートのウェル中、500 μl の培地あたり 1 つの実生) に移した。Col-0 遺伝子型の対照対処置された実生の新鮮重を、7～8 日後に測定した。

40

【0588】

E. パターン誘導免疫性 (PTI) マーカー遺伝子の RT-qPCR 定量化

シロイヌナズナ属 (Arabidopsis) における PTI マーカーの発現を定量化するために、4/5 週齢植物の葉に、flg22 が負荷されたクロレラ属 MEV、flg22 1 μM 、水または対照 MEV を浸潤させた。浸潤後、処置の 3、6 および 9 時間後、葉を収集し、液体窒素中で凍結した。凍結した葉を、乳鉢および乳棒を用いて粉末に粉碎し、その後、NucleoSpin RNA Plant キット (Macherey-Nagel、740949.250) を製造業者の使用説明書に従って用い、約 100 m

50

gの粉末を使用してRNA抽出を実施した。NanoDropシステムと、すべての混入しているゲノムDNAを排除するためにDNアーゼI (RQ1 RNアーゼ不含DNアーゼ、Promega、M6101)を用いて消化された500ngとを使用して全RNAを定量化した。DNアーゼ処置は製造業者のプロトコールに従って実施した。次いで、消化されたRNAを、qScript cDNA SuperMix (Quantabio、733-1178)を製造業者によって記載されたように使用してレトロ転写 (retro-transcribed)した。得られたcDNAを水で1:3希釈し、1μlを使用し、適当な遺伝子特異的オリゴヌクレオチドおよびTakyon No ROX SYBR 2X MasterMixブルードTTP (Eurogentec、UF-NSMT-B0701)ミックスを使用してqRT-PCR反応を設定した。95℃で1分の第1の変性工程、続いて、95℃で10秒および60℃で40秒の45サイクルを有する「2工程」プロトコールを用いてRT-qPCRを実施した。反応の最後に、融解曲線生成の最後の工程を実施した。発現をシロイヌナズナ属ユビキチン遺伝子のものに対して正規化した [Pfaffl (2001) Nucleic Acids Res. 29(9):e45]。分析したPTIマーカー遺伝子は以下であった: WRKY29 (Fw: TATCCAACGGATCAAGAGCTGA; Rv: TTTTCTTGCCAAACACCCCTTTT)、FRK1 (Fw: TATCTTGAGCTGGGAAGAGAGG; Rv: AGTCGAATAGTACTCGGGGTCA) およびWRKY53 (Fw: CAGACGGGGGATGCTACGG; Rv: GGCAGAGGCTAATGGTGGTG) (それぞれ配列番号51、52、53、54、55および56)。

10

20

【0589】

F. トリパンブルー染色による細胞死アッセイ

GUSまたはAvrRpm1タンパク質 (それぞれ配列番号60および61)を含有するクロレラ属MEVが浸潤した約16~20枚の葉を、エタノールで1:1希釈した、Lactophenolトリパンブルー溶液 (10ml乳酸 [DL Sigma L-1250]、10gグリセロール、10ml H₂Oおよび10mgトリパンブルー) 中に移し、1~2分間煮沸した。次いで、葉を抱水クロラル (2.5g/ml) 中で一晚脱染し、水で数回 (5~6回、10分) 洗浄した後、Olympus Macro Zoom System顕微鏡下で観察した。トリパンブルー染色をImageJ 1.53cを使用して定量化した。

30

【0590】

G. 細菌株

Pto DC3000ΔhrpL株はDr. Cayo Ramosから寄贈された。Pto DC3000-WT-HrpLおよびmut-HrpL株、Pto DC3000ΔhrpL株は、NPTIIproを発現する、WT-HrpLおよびNPTIIpro:mut-HrpLプラスミドはそれぞれ、以前に特性決定された (それぞれ国際PCT公開番号WO2020035619およびWO2020035620として公開されている、国際PCT出願番号PCT/EP2019/072169およびPCT/EP2019/072170)。

【0591】

40

H. dsRNAおよびsRNAインビトロ合成

インビトロ合成の鑄型をPCRによって増幅させて、オリゴヌクレオチド配列の5'および3'末端の両方にT7プロモーターを導入した。寄生生物増幅を排除するために、NucleoSpin (登録商標) ゲルおよびPCR Clean upキット (Macherey-Nagel) を使用してPCR産物をゲル精製し、精製されたPCR産物を定量化し、インビトロRNA合成のために直接使用した。MEGAscript (登録商標) RNAiキット (Life Technologies、カリフォルニア州、カールスバッド) を製造業者の使用説明書に従って使用してインビトロ合成を実施した。2μgのPCR産物を、20μlの総反応体積 (ヌクレアーゼ不含水で調整した) 中で2μlのT7ポリメラーゼ (T7酵素ミックス)、2μlの10× T7反応緩衝剤および2μlの

50

リボヌクレオチド（ATP、CTP；GTPおよびUTP、各75mMで）とともに37℃で一晩インキュベートした。

【0592】

転写反応後、DNA鋳型およびssRNAを排除するために、dsRNAを2μmのDNアーゼI、2μlのRNアーゼおよび5μlの反応緩衝剤を用いて処置した。キットとともに提供されるフィルターカートリッジを用いてdsRNAを精製し、この工程後に得られた長いdsRNAをNanodropを用いて定量化し、その後の経験のために直接使用した。精製された長いdsRNAをShortCut（登録商標）RNアーゼIII（NEB、マサチューセッツ州、イプスウィッチ）で消化することによってsiRNAを得た。消化は37℃で30分間実施し、siRNAをmirVana（商標）miRNA単離キット（Life Technologies、カリフォルニア州、カールスバッド）を使用して精製した。その後の経験のために精製されたsiRNAを直接使用した。プロトコールの各工程で、ゲル電気泳動（TAE 1×、DNA用に1%のアガロースおよびRNA用に2%）を実施して、種々の核酸の品質を調べた。

10

【0593】

I. フザリウム・グラミネアラム（*Fusarium graminearum*）胞子を用いる感染アッセイ

すべてのインビトロ感染アッセイについて、葉での、およびPDA（ジャガイモデキストロース寒天）プレートでの感染の各々のために、 mL^{-1} あたり 5×10^4 分生子を使用した。F. グラミネアラム（F. *graminearum*）胞子を、種々の量のcyp51 dsRNAが負荷されたクロレラ属EVとともに室温（約25℃）で2時間インキュベートすることによって、PDAプレートでのアッセイを実施した。300μlの総容量をPDAプレート表面上に堆積させ、滅菌条件で乾燥させた。成長阻害の有効性を決定するために、外因的に負荷された小胞を、クロレラ属cyp51 IRTランスジェニック株（IT19）と名付けられた安定細胞株からの全RNAおよびクロレラ属MEVならびに参照殺真菌剤と比較した。24、48および72時間でのプレートの写真を撮像し、成長阻害を決定するために発達した菌糸体の量を測定した。シロイヌナズナ属の接種は、F. グラミネアラムを用いて剥離された葉に創傷接種することによって行った。15の異なる4/5週齢のWt植物の約20枚のロゼット葉を剥離し、1%の寒天を含有する方形のペトリプレートに移した。外因的に負荷されたMEVを各葉の表面上に堆積させ（deposited）、短時間乾燥させた。F. グラミネアラム胞子の接種は、以前に記載されたように実施した[Koch A et al., (2012) J Phytopathol 160(10):606-610]。疾患症状の進行は、Image J 1.53cを使用してペトリ皿のデジタル写真から3dpiで病変サイズ（センチメートルで）を測定することによって決定した。これらの測定によって、非接種葉に対する感染症状を示す葉面積のパーセンテージを算出することが可能となった。

20

30

【0594】

J. β-グルクロニダーゼ（GUS）染色アッセイ

このアッセイのために、4/5週齢植物から約20枚の葉に種々の濃度のMEV懸濁液を浸潤させた。浸潤の約24/48時間後、葉を剥離し、GUS染色溶液中に浸漬し、各15分間2/3回真空浸潤させた。葉を含有するプレートをパラフィルムで密閉し、37℃で一晩インキュベートした。翌日、葉が完全に透明になり、青色のGUS染色だけが眼に見えるようになるまで、75%のEtOHを用いて数回の洗浄を実施した。GUS染色溶液は、1mM X-Gluc、50mM PBS pH7.2、10mM EDTA pH8.0、0.5%のTriton X-100を含有する。染色された葉の写真を撮像し、Image J 1.53cを使用して青色シグナルを定量化した。

40

【実施例13】

【0595】

Pto DC3000 hrpL病原性因子を標的化するsiRNAが外因的に負荷されたクロレラ属MEVの生物活性の決定

50

P t o D C 3 0 0 0 の 2 つの主要な病原性因子と配列相同性を有する逆方向反復 (I R) 導入遺伝子を発現するトランスジェニッククロレラ属株を作成することによって、M E V の内因性負荷を試験した。第 1 の標的化される P t o D C 3 0 0 0 病原性因子は、植物毒素コロナチン (C O R) の主要な構成成分をコードする、コロナファシン酸ポリケタイドシンターゼ I (c f a 6) 遺伝子である [Brooks et al. (2004) Mol Plant Microbe Interact. 17(2):162-174]。第 2 のものは、I I I 型分泌系関連遺伝子の発現を直接制御し、C O R 生合成遺伝子の発現を間接的に調節すると知られている代替シグマ因子をコードする h r p L である [Fouts et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:2275-2280; Sreedharan et al. (2006) Molecular plant-microbe interactions MPMI 19:768-779]。

10

【 0 5 9 6 】

クロレラ属 M E V 中に s i R N A を外因的に付加することが有効であり得ることを実証するために、P t o D C 3 0 0 0 0 h r p L (配列番号 57) に対して向けられる低分子 R N A 二本鎖をインビトロで合成して、クロレラ属 M E V 中に外因的に負荷し、P t o D C 3 0 0 0 誘導性の気孔再開口を抑制する能力をモニタリングすることによって、その生物学的有効性を試験した。このアッセイでは、s i R N A が負荷された M E V による気孔再開口事象の阻害における有効性を、c f a 6 および h r p L に対して向けられる s i R N A を発現する安定なクロレラ属のトランスジェニック株から M E V によって誘導された事象と比較した (それぞれ国際 P C T 公開番号 W O 2 0 2 0 0 3 5 6 1 9 および W O 2 0 2 0 0 3 5 6 2 0 として公開される、国際 P C T 出願番号 P C T / E P 2 0 1 9 / 0 7 2 1 6 9 および P C T / E P 2 0 1 9 / 0 7 2 1 7 0 に記載される)。合成 s i R N A 二重鎖 (1 μ g) をクロレラ属 M E V 中に負荷した (試料 12)。観察される効果が、s i R N A 混入に応じて変わる可能性を排除するために、試料を、小球菌ヌクレアーゼ (M N a s e)、一本鎖または二本鎖いずれかの形態であるすべての保護されていない R N A を消化できる広範な R N アーゼを用いて処理した。陰性対照として空の M E V を使用し、P t o D C 3 0 0 0 c f a 6 および h r p L 遺伝子を標的化する s i R N A を発現するトランスジェニック株 I T 2 0 - 3 に由来する M N アーゼ処置された M E V を、陽性対照として使用した。アッセイのために、すべての小胞を約 2 0 p M (約 1 . 2 E 1 0 粒子 / m l) の濃度で使用した。結果は、s i R N A が負荷された M E V は、安定な I T 2 0 - 3 トランスジェニック株に由来する M E V と同程度に気孔再開口を十分に阻害できることを明らかにした (図 26)。さらに、M N アーゼ処置の際に試料はその生物活性を維持し、クロレラ属 M E V が酵素分解から s i R N A を保護することを示した。これらの結果は、十分な量の外因的に負荷された抗菌剤 s i R N A が E V の内側に位置して、予測された生物活性を誘発することをさらに示す。全体として、これらの知見は、クロレラ属 M E V に生物学的に活性な s i R N A を外因的に負荷できること、およびそれらがこのような低分子 R N A を酵素分解から保護できること、およびこれらの s i R N A が特定の生物活性を誘導するのに十分な量で細胞中に送達されることを証明する。

20

30

【 0 5 9 7 】

感染の 1 時間前に種々の M E V とともにインキュベートされた葉切片での 3 h p i での気孔再開口アッセイ。対照として、空の M E V (C t l -) および P t o D C 3 0 0 0 病原性遺伝子 c f a 6 および h r p L を標的化する s i R N A を発現するクロレラ属の安定なトランスジェニック株 I T 2 0 - 3 (C t l +) に由来する M E V を使用した。s i R N A 試料 12 は、c f a 6 および h r p L 遺伝子を標的化する合成 s i R N A 二重鎖が外因的に負荷された M E V に対応する。M N アーゼ処置は、s i R N A 試料 12 で、ならびに C t l + 小胞で 37 °C で 15 分間実施した。N、分析された気孔の総数。統計分析は、一元配置分散分析を使用して実施し、各条件の平均を、すべての他の条件の平均と比較した (p 値: n s > 0 . 05、*** < 0 . 001、**** < 0 . 0001)。

40

【実施例 14】

【 0 5 9 8 】

植物病原性真菌フザリウム・グラミネアラム中の c y p 5 1 遺伝子を標的化する d s R N

50

Aが外因的に負荷されたクロレラ属MEVの生物活性の決定

F. グラミネアラムは、穀類における壊滅的な疾患：赤カビ病（FHB）および根腐れを引き起こす病原性子嚢菌真菌である。最近、3つのパラログシトクロム遺伝子、cyp51A、BおよびCを標的化するdsRNAを使用する宿主誘導性遺伝子サイレンシング（HIGS）戦略は、インビトロ条件においてこの真菌病原体の成長の制限において有効であることが示された [Koch et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110: 19324-19329]。Kochらにおいて報告された研究では、著者らは、同一真菌成長阻害が、真菌感染に先立って葉表面にdsRNAを噴霧することによって達成され得ることを実証した [Spray Induced gene Silencing; Koch et al. (2016) PLOS Pathogens 12(10): e1005901を参照されたい]。クロレラ属MEV中に抗真菌剤dsRNAを外因的に負荷できることを実証するために、cyp51A、BおよびCに対して配列相同性を有するdsRNAのインビトロ合成を実施して、それらをクロレラ属MEV中に負荷し、その抗真菌活性をインビトロで、および植物体アッセイにおいてさらに試験した。この試験を実施するために、2つのインビトロアプローチを用いた：PDAプレートでの、および剥離されたシロイヌナズナ属の葉でのF. グラミネアラム成長の分析。両場合において、800、80および8 ng/mlのcyp51（配列番号58）dsRNAの等価物を有するMEV濃度を使用し、対照として、トランスジェニッククロレラ属株（IT19）からの、裸のcyp51 dsRNA、全RNAおよびMEVならびに参照殺真菌剤も適用した。

【実施例15】

【0599】

mRNAおよびタンパク質が外因的に負荷されたクロレラ属MEVの生物活性の決定

mRNAまたはタンパク質が負荷されたクロレラ属MEVの生物活性を特徴づける2つの異なるアプローチは、以下である：1) GUS mRNAおよびタンパク質（それぞれ配列番号59および60）を使用する、シロイヌナズナ属の葉におけるGUS染色アッセイ、ならびに2) 超高感度応答（HR）としても知られる植物細胞死アッセイ。このアッセイは、細胞内宿主免疫受容体RPM1によって認識され、RPM1の機能的コピーを発現するシロイヌナズナ属系統（例えば、Col-0参照系統）において強力なHRを誘発することが知られている、細菌エフェクターAvrRpm1（配列番号61）によってコードされるタンパク質を利用する。第1のアプローチのために、本発明者らは、種々の濃度の、GUS mRNAまたはタンパク質のいずれかが負荷されたMEVを、剥離されたシロイヌナズナ属の葉に直接的にシリンジ浸潤させた。100 ng/μlのmRNAと同等である、単一のmRNAが埋め込まれたMEV濃度、ならびに1、5および10 μg/μlのGUSタンパク質と同等である3つの異なる量のタンパク質が負荷されたMEVを使用した。MEV浸潤後、GUS染色溶液を用いて葉に真空浸潤させ、一晩オーバーナイトでインキュベーションのままとした。GUS酵素の活性に起因する青色シグナルの定量化によって、mRNAとタンパク質デリバリー効率の間の直接比較が可能となった。第2のアプローチのために、エフェクタータンパク質AvrRpm1が負荷されたMEVをシロイヌナズナ属の葉に浸潤させた。GUS（陰性対照）またはAvrRpm1タンパク質のいずれかを保有するMEVを用いて処置された、少なくとも30枚のシロイヌナズナ属のCol-0葉で、マクロ-HRをトリパンブルー染色によってモニタリングした。

【実施例16】

【0600】

ペプチドが外因的に負荷されたクロレラ属MEVの生物活性の決定

10個～50個のアミノ酸の範囲の小ペプチドは、細胞間コミュニケーション、植物発達、植物免疫応答ならびに他のプロセスおよび経路においてさまざまな応答を媒介できる強力なエフェクターである。このようなクラスの分子はまた、ペプチドを含む病原体から放出される分子の、宿主の細胞表面受容体からの認識に依存する機序である病原体関連分子パターン（PAMP）応答を介して免疫防御の第一層を引き起こすこともできる。これに関連して、細菌フラグゼリンの保存されたN末端領域を模倣する22個のアミノ酸の合

10

20

30

40

50

成ペプチドが使用され、細菌フラジェリンは、表面受容体フラジェリンセンシング2 (FLS2) によって感知され、それによって種々の植物種において強力な免疫応答を引き起こす。種々の濃度の合成ペプチド flg22 (10 nM、100 nM および 1 μ M; 配列番号 50) がクロレラ属 MEV に負荷され、PAMP によって引き起こされる免疫性の特徴、例えば、flg22 によって誘導される気孔の閉鎖、flg22 によって誘導される成長阻害および／または PTI マーカー遺伝子の flg22 によって引き起こされる誘導を引き起こす MEV の能力が評価される。陰性対照として、空の MEV と、生物活性が予測されない 1 nM の flg22 ペプチドがアッセイにおいて使用され、一方で陽性対照として、3 つの異なる濃度の合成ペプチド flg22 (10 nM、0.1 および 1 μ M) が使用された。MEV 調製後に依然として存在する任意の可能性ある flg22 ペプチド混入を排除するために、また、クロレラ属 MEV がペプチドをプロテアーゼ活性から実際に保護できるか否かを試験するために 2 つの追加の対照も含まれた。この目的のために、プロテイナーゼ K (ProK) 単独 (+ProK 条件)、または植物 EV を破壊することが証明されている界面活性剤である (Rutter and Innes, 2017)、Triton X100 と組み合わせて (+ProK + Triton) のいずれかで、flg22 が負荷された MEV を処置した。知見によって、flg22 ペプチドが外因的に負荷されたクロレラ属 MEV は、プロテイナーゼ K 処置後でさえ気孔閉鎖を誘導できることが明らかになった。これらのデータは、負荷された場合に、flg22 ペプチドは、生物活性であり、宿主細胞に効率的に送達され、EV によって酵素分解から保護されることを示す (図 27)。追加の Triton 処置は、おそらくはクロレラ属 MEV の完全性を変更し、それによって、ProK が flg22 ペプチドを分解することを可能にすることによって、このような生物活性を消失させた。これは、クロレラ属 MEV が、MEV の内側に位置する flg22 ペプチドを ProK によって引き起こされる分解から保護することを示す。結果は、flg22 が負荷された EV によって引き起こされる気孔に対する生物学的効果が、少なくとも 10 nM の遊離 flg22 ペプチドと同等であることを示す。使用される MEV の濃度に基づいて [約 16 pM (約 1E10 粒子/ml)]、気孔に対する観察された効果を引き起こすには、各小胞に 10² より多いペプチド分子が負荷されると推測される。全体的に、結果は、クロレラ属 MEV には、生物学的に活性なペプチドを外因的に負荷できること、MEV はペプチドを酵素分解から保護できること、およびこれらのペプチドは特定の生物活性を引き起こすのに十分な量で細胞中に送達されることを示す。

10

20

30

40

50

【0601】

flg22 ペプチドおよび同一分子が負荷された MEV とともにインキュベートされた、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) [系統 Columbia-0 (Col-0)] の葉の切片での処置後 1.5 時間での気孔閉鎖アッセイ。対照として、空の EV (Ctl-) および 1 nM の flg22 ペプチドを使用した。種々の濃度の flg22 ペプチド (10 nM、0.1 および 1 μ M) を陽性対照として使用した。flg22 が負荷された EV は、可能性のある flg22 混入 (ProK 単独) を除去するために、および／または小胞完全性に影響を及ぼすために、未処置のまま (-ProK) か、またはプロテイナーゼ K 単独 (+ProK) とともに、もしくは 1% の Triton X100 と組み合わせて (+ProK + Triton) インキュベートされるのいずれかとした。N は、分析された気孔の総数を表す。統計分析は、一元配置分散分析を使用して実施し、各条件の平均を、すべての他の条件の平均と比較した。文字 a と b は、ANOVA 分析 (コンパクトな文字表示形式を使用した統計の視覚化) からペアワイズテーブルを分析することによって決定された異なる統計グループを表す。

【0602】

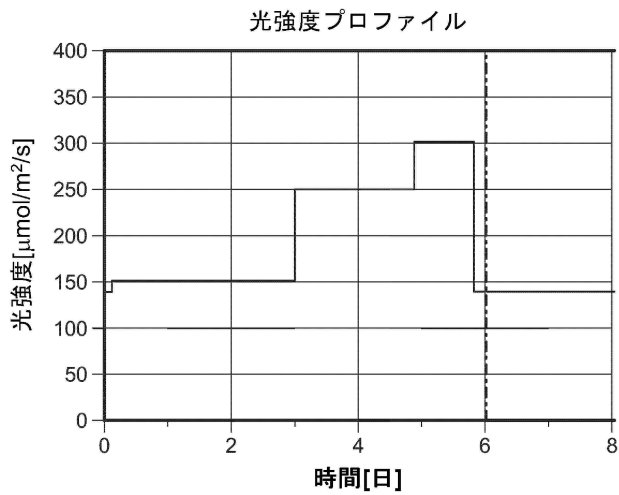
これらの実施例および説明における結果は、微細藻類 MEV、特に、クロレラ属 MEV には、生物活性カーゴを外因的に負荷でき、これは、細胞および組織に送達されることができ、カーゴは活性であることを示す。この結果および他のデータおよび本明細書で提供される結果に基づくと、クロレラ属 MEV には、生物活性カーゴを外因的に負荷でき、これは細胞および組織に送達されることができ、ここで生物活性カーゴは活性である。

【0603】

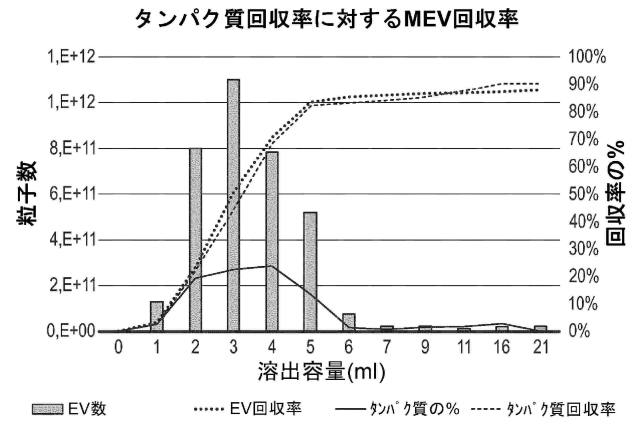
改変は当業者には明らかであるので、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることが意図される。

【図面】

【図1】



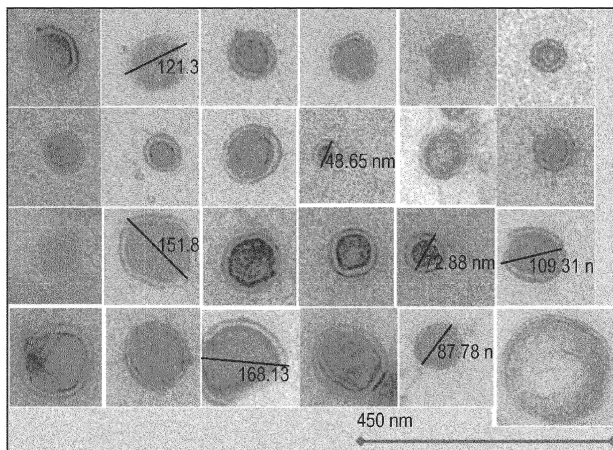
【図2】



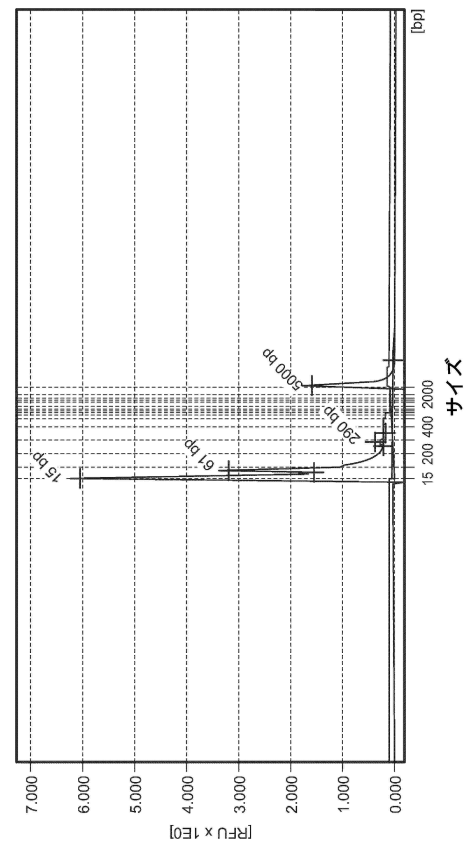
10

20

【図3】



【図4】

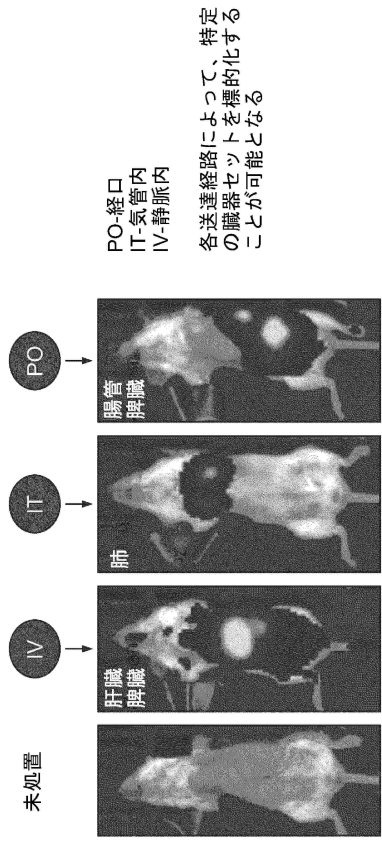


30

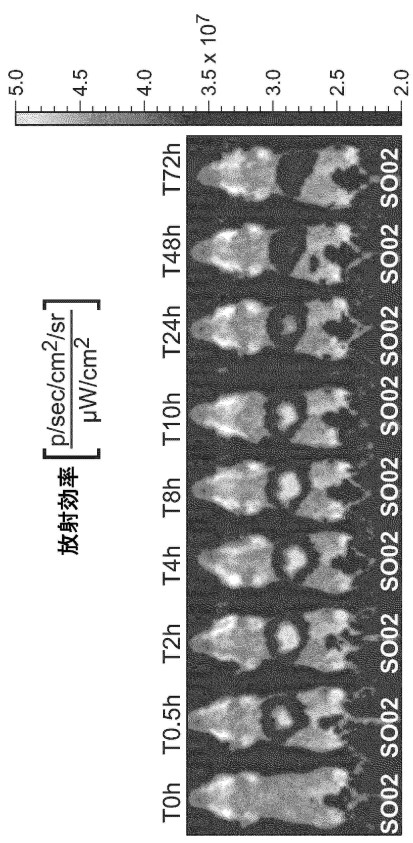
40

50

【 図 5 】



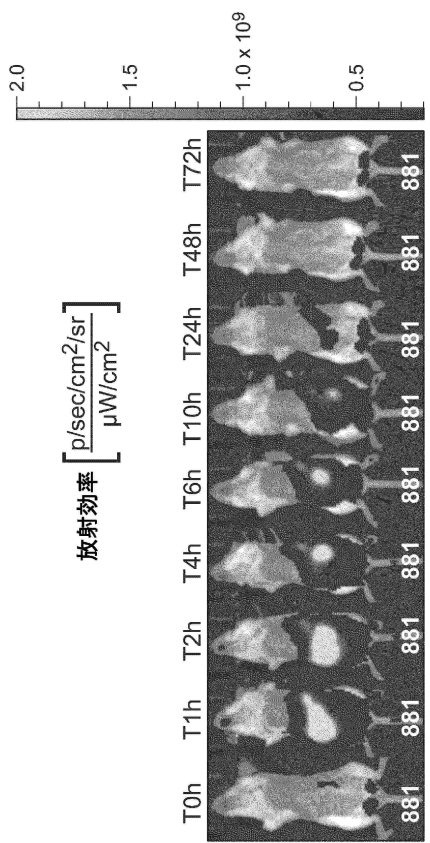
【 図 6 】



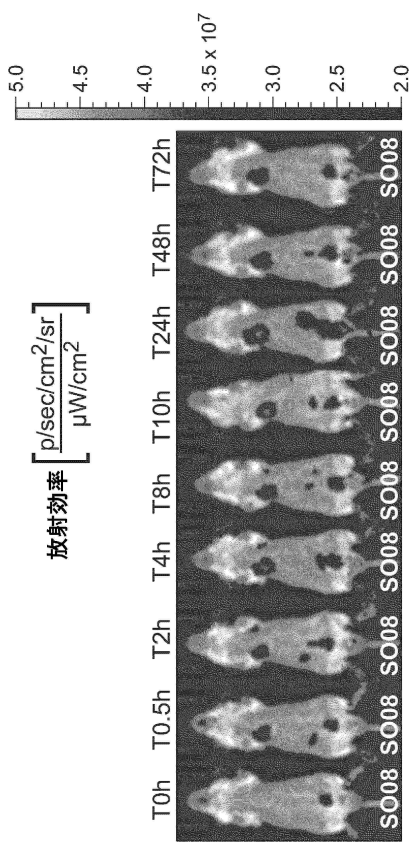
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

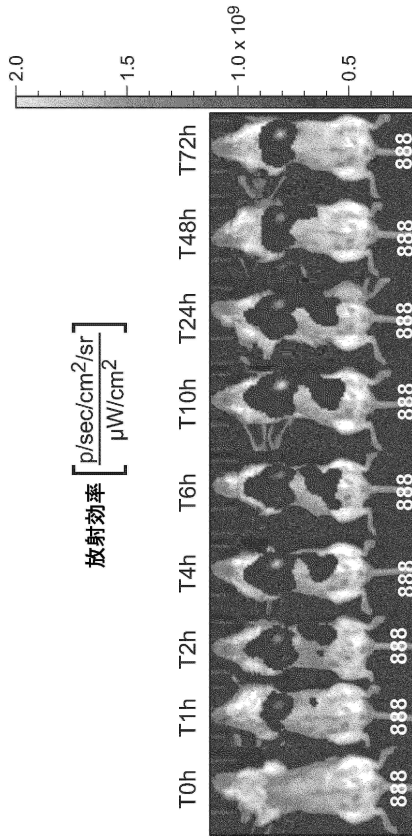


30

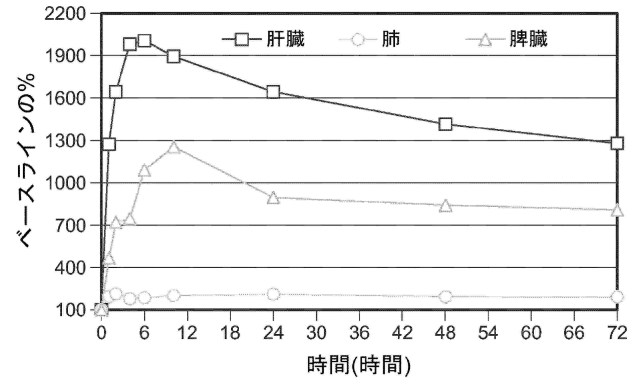
40

50

【図 9】



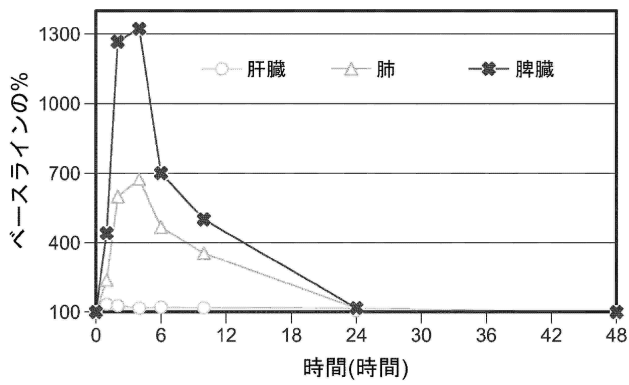
【図 10】



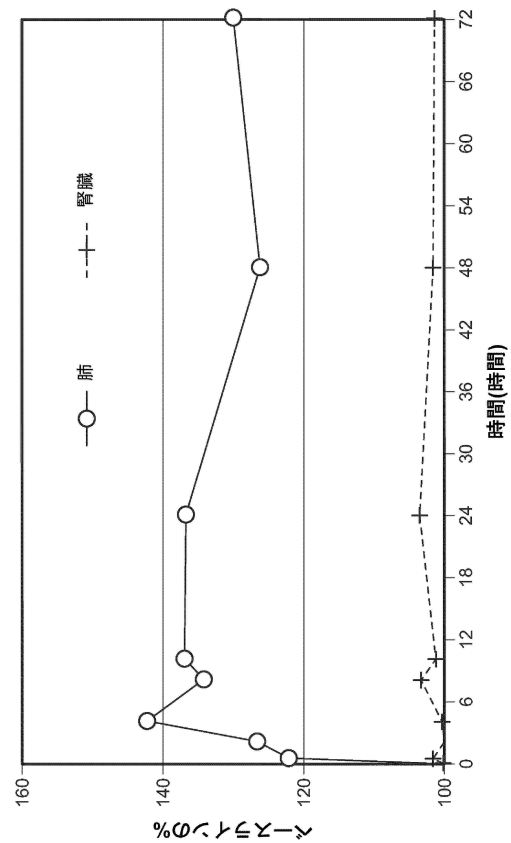
10

20

【図 11】



【図 12】

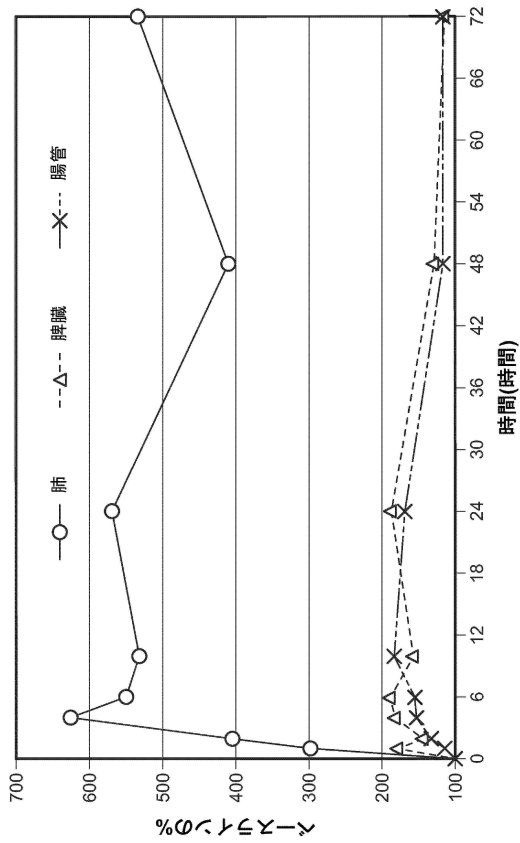


30

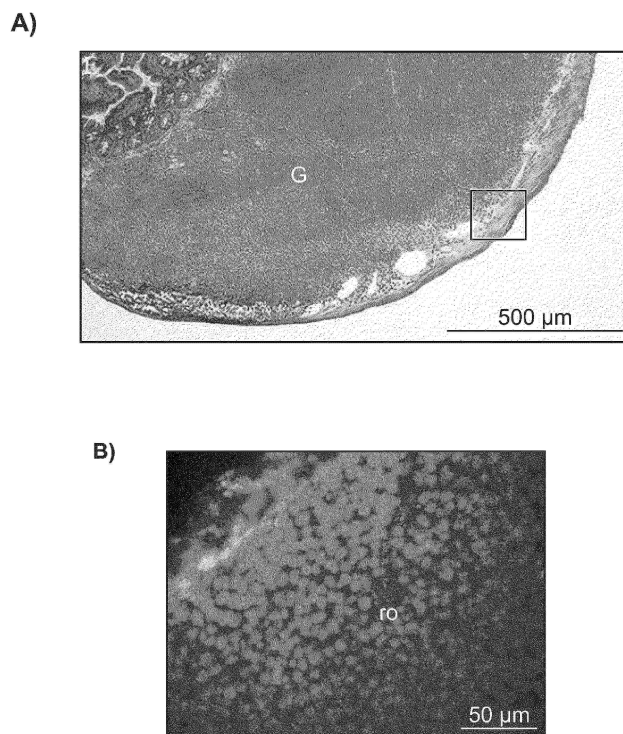
40

50

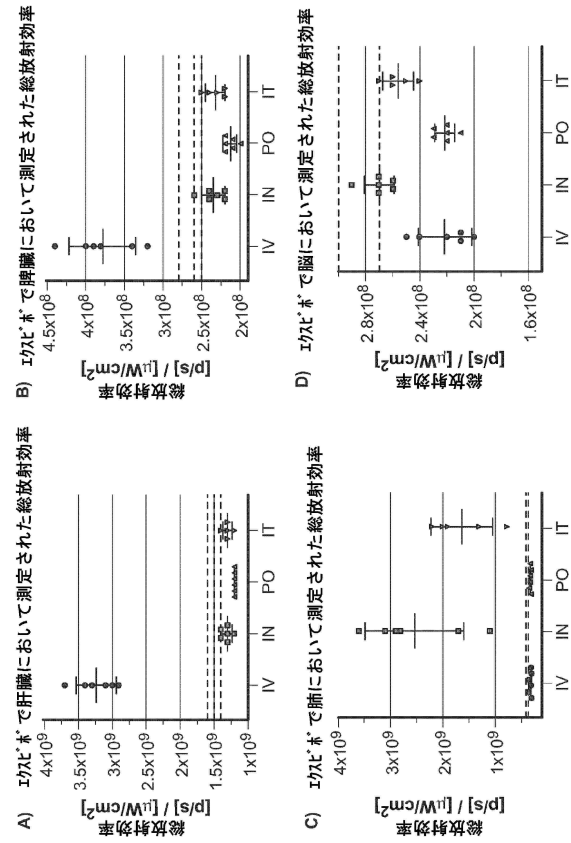
【図 1 3】



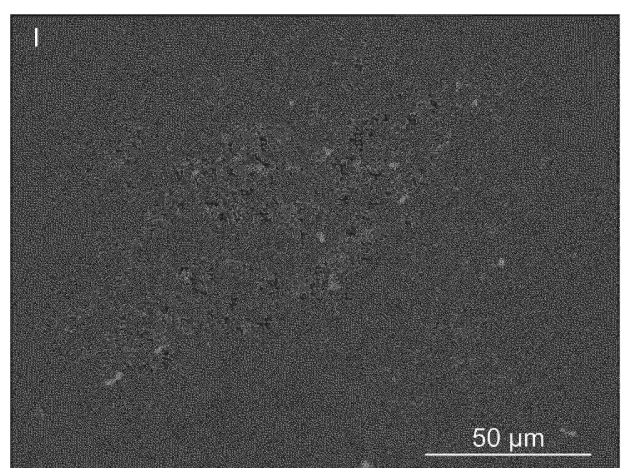
【図 1 5】



【図 1 4】



【図 1 6】



10

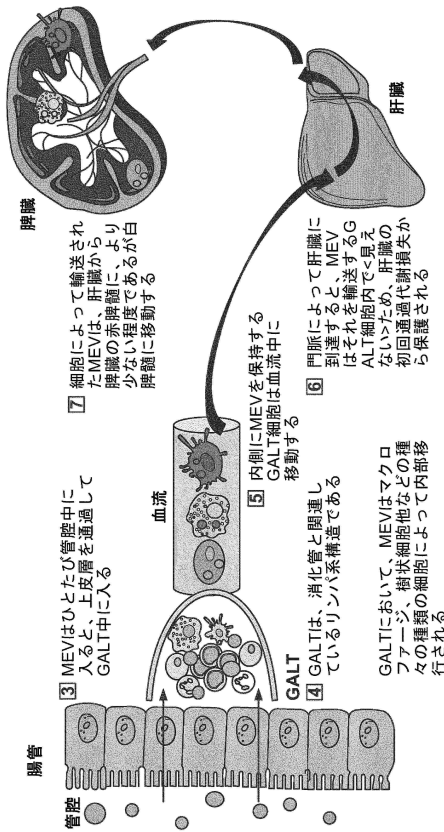
20

30

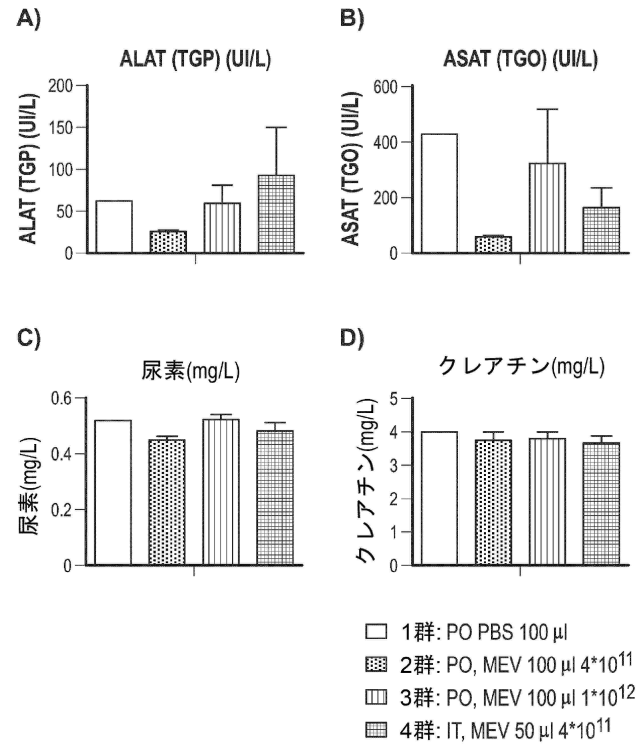
40

50

【図 17】



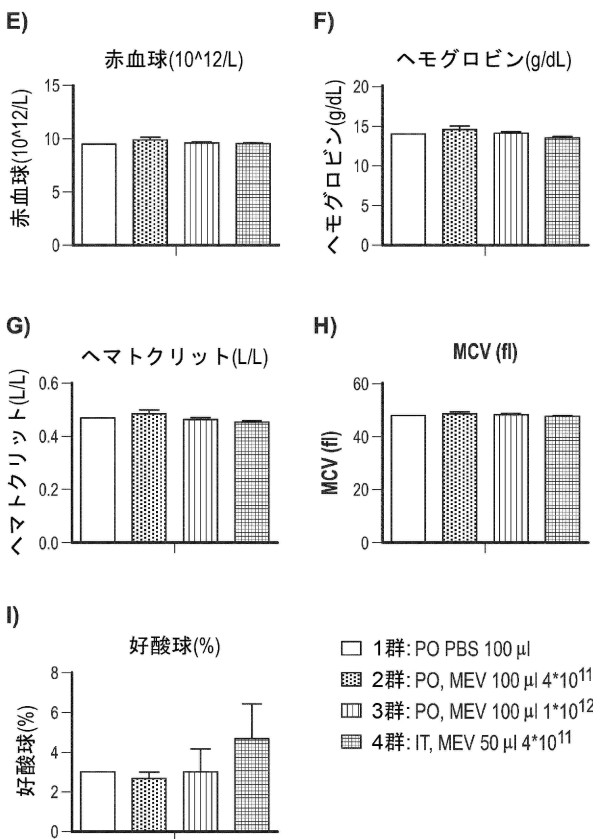
【図 18 - 1】



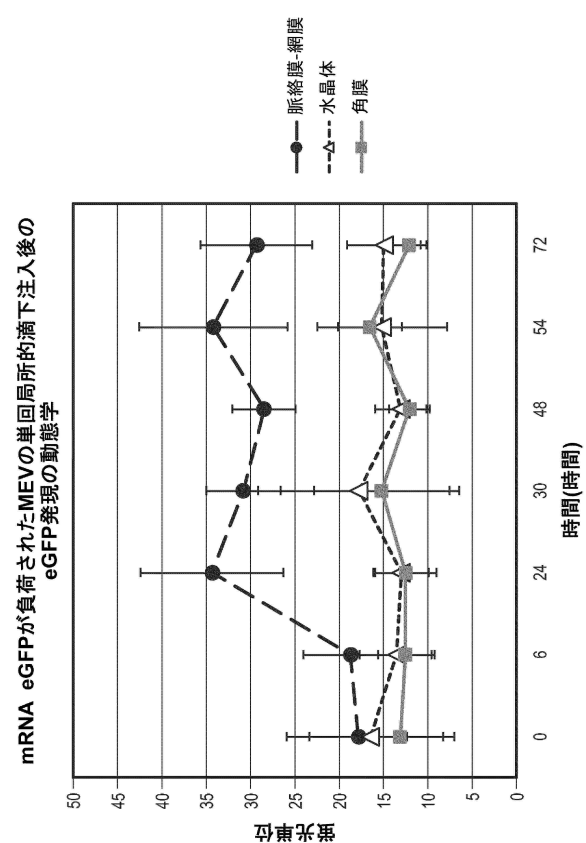
10

20

【図 18 - 2】



【図 19】

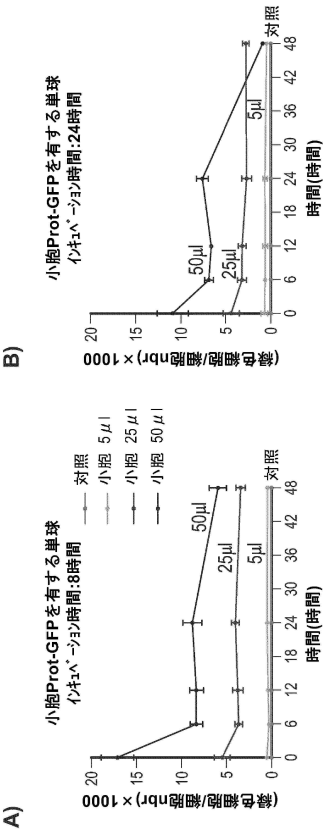


30

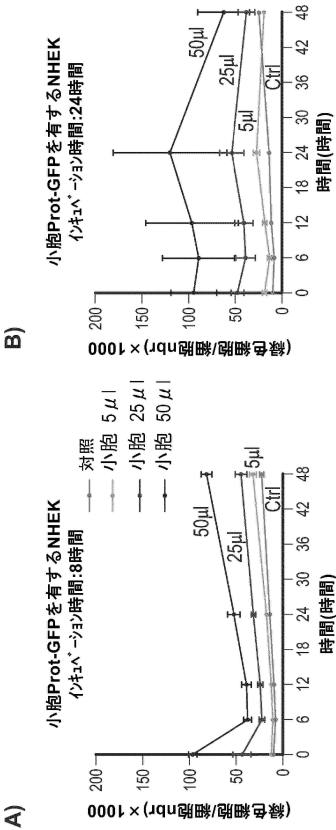
40

50

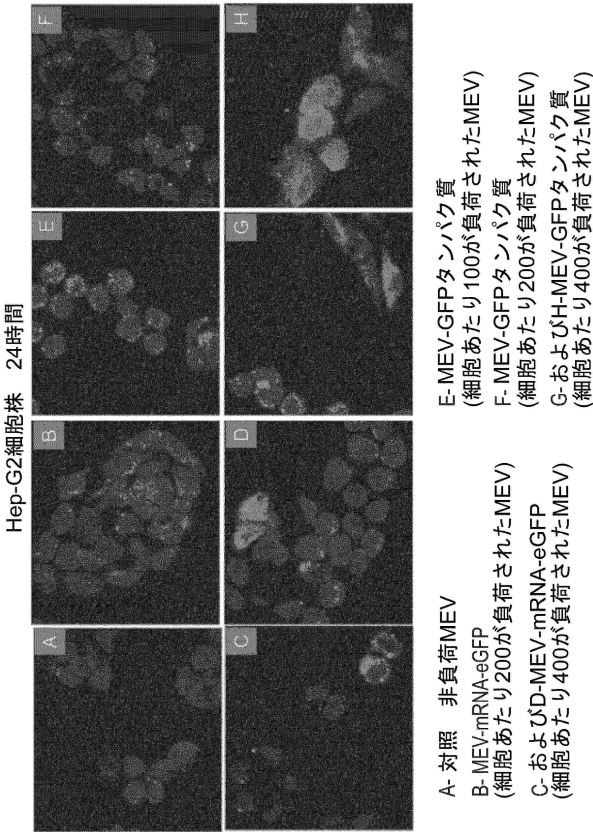
【図 2 0】



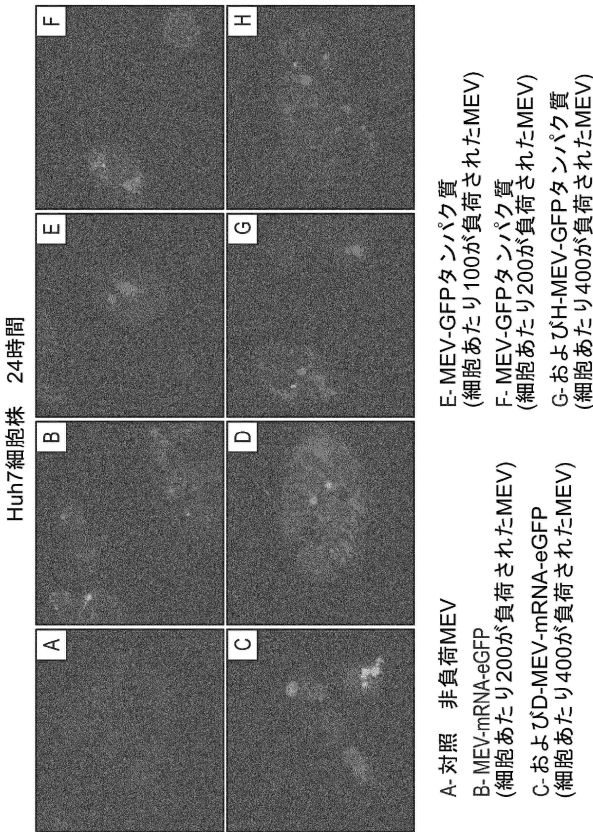
【図 2 1】



【図 2 2】



【図 2 3】



10

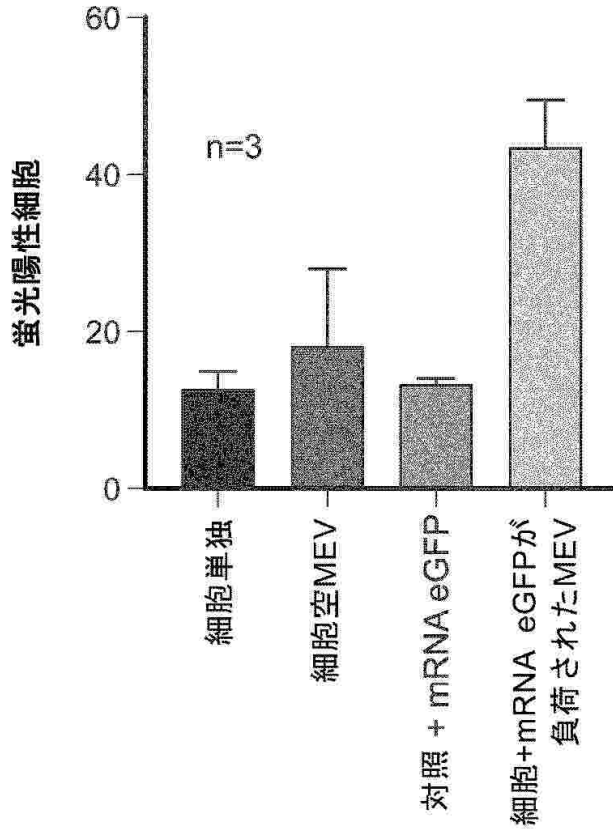
20

30

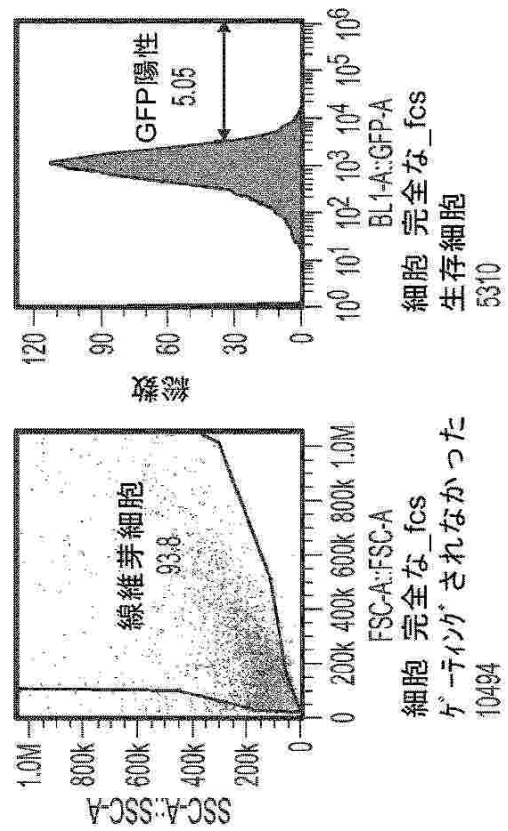
40

50

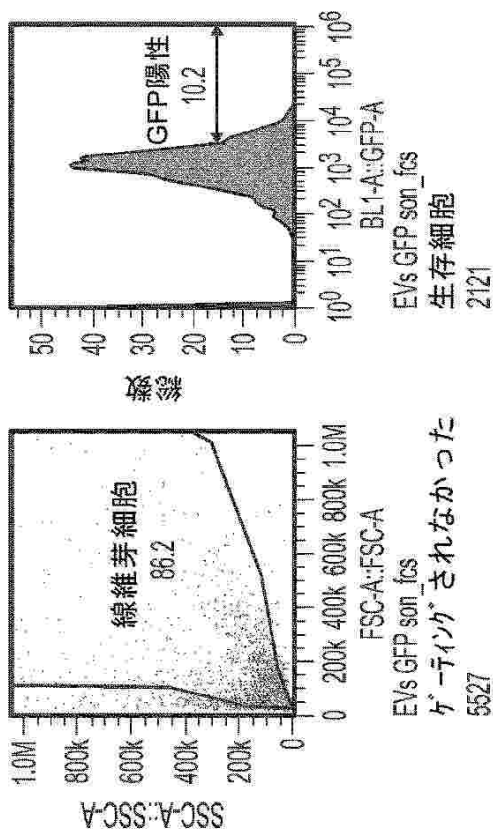
【図 2 4】



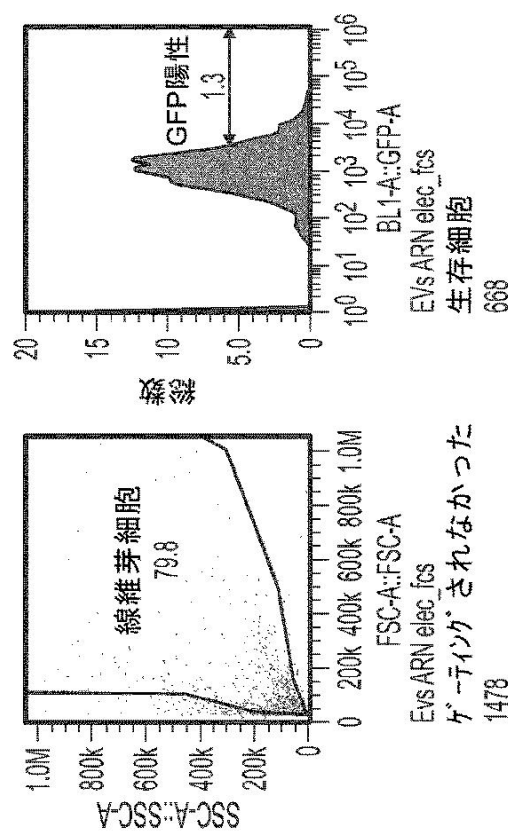
【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



【図 2 5 C】



10

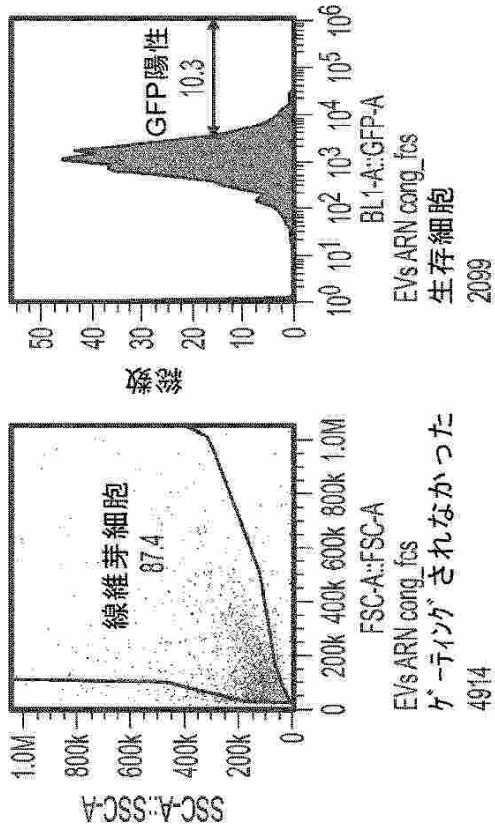
20

30

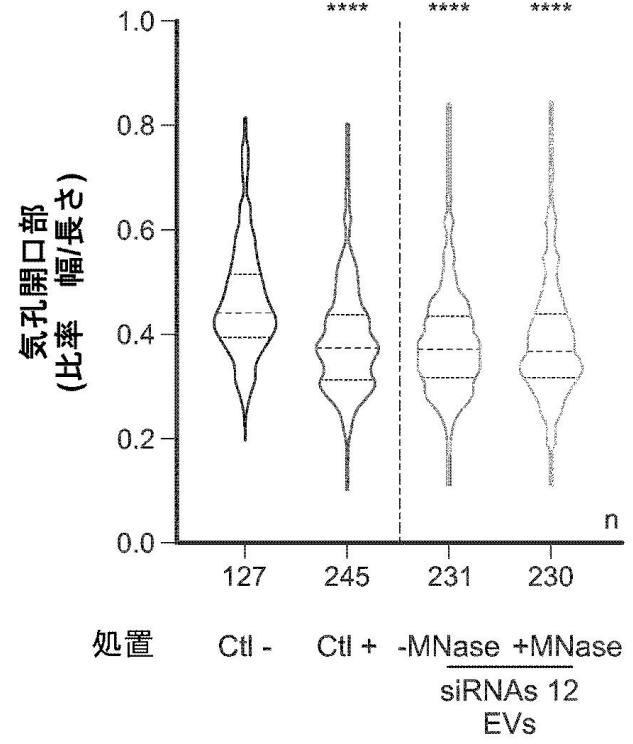
40

50

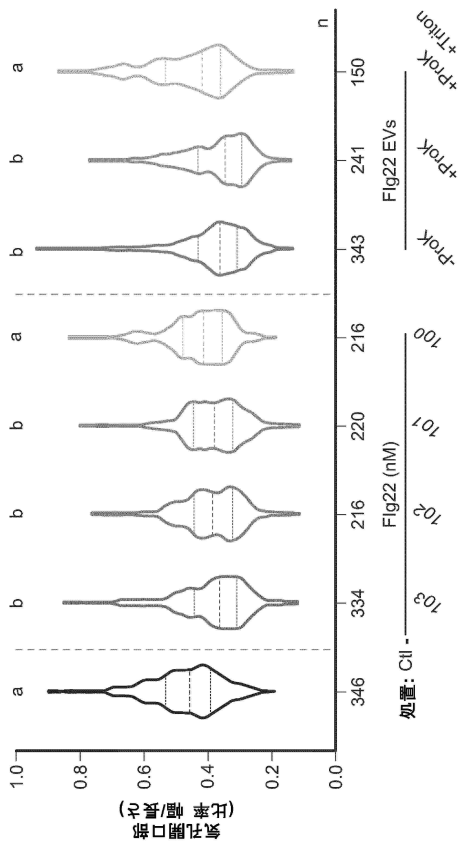
【図 2 5 D】



【図 2 6】



【図 2 7】



10

20

30

40

50

【配列表】
2024528697000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/070371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K36/05 A61K9/51 C12N15/88 C12N15/00 A61K48/00 ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	PICCIOTTO S. ET AL.: "Isolation of extracellular vesicles from microalgae: towards the production of sustainable and natural nanocarriers of bioactive compounds", BIOMATERIALS SCIENCE, vol. 9, no. 8, 20 April 2021 (2021-04-20), pages 2917-2930, XP055979612, GB ISSN: 2047-4830, DOI: 10.1039/D0BM01696A Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2021/bm/d0bm01696a> the whole document	78, 79, 121, 159		
A	----- -/--	1-77, 80-120, 122-158, 160, 161		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
21 November 2022		28/11/2022		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Giménez Miralles, J		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/070371

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KURUVINASHETTI K. ET AL.: "Algal Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications", 2020 IEEE 20TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOTECHNOLOGY (IEEE-NANO), IEEE, 29 July 2020 (2020-07-29), pages 354-357, XP033817380, DOI: 10.1109/NANO47656.2020.9183452 [retrieved on 2020-08-31]	78, 79, 121, 159
A	the whole document	1-77, 80-120, 122-158, 160, 161
X	----- WO 2017/161010 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 21 September 2017 (2017-09-21)	78, 79
A	examples	1-77, 80-161
X,P	----- EP 3 967 745 A1 (IMMUNRISE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 16 March 2022 (2022-03-16)	1
X,P	----- EP 3 967 746 A1 (IMMUNRISE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 16 March 2022 (2022-03-16)	1
	examples -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/070371

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017161010 A1	21-09-2017	AU 2017232498 A1	18-10-2018
		BR 112018068746 A2	22-01-2019
		CA 3017586 A1	21-09-2017
		CN 109071597 A	21-12-2018
		EP 3430024 A1	23-01-2019
		IL 261490 A	31-10-2018
		JP 2019513019 A	23-05-2019
		KR 20180122433 A	12-11-2018
		RU 2018136151 A	15-04-2020
		SG 10202008883S A	29-10-2020
		SG 11201807401R A	27-09-2018
		US 2020155703 A1	21-05-2020
		WO 2017161010 A1	21-09-2017

EP 3967745 A1	16-03-2022	EP 3967745 A1	16-03-2022
		WO 2022053689 A2	17-03-2022

EP 3967746 A1	16-03-2022	EP 3967746 A1	16-03-2022
		WO 2022053687 A2	17-03-2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/070371

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08		
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00		
A 6 1 P	13/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/00		
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/00		
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	A 6 1 Q	19/00		
A 6 1 K	8/9722(2017.01)		A 6 1 K	8/9722		
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/14		
A 6 1 Q	7/00	(2006.01)	A 6 1 Q	7/00		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 Q	19/02	(2006.01)	A 6 1 Q	19/02		
A 6 1 P	27/12	(2006.01)	A 6 1 P	27/12		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	

(32)優先日 令和4年1月31日(2022.1.31)

(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,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. P L U R O N I C

3. T R I T O N

N A N T E S U N I V E R S I T E

フランス国 4 4 0 3 5 ナント シデックス 1 ケ ド トゥールヴィル 1 ビーピー 1 3 5 2 2

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 ドリッタンティ, リラ

フランス 7 5 0 1 1 パリ、アブニュ・フィリップ・オーギュスト 8 9

(72)発明者 ヴェガ, フアン パブロ
フランス 9 3 3 0 0 オーベルヴィリエ、リュ・ドゥ・ラベユ 3 1

(72)発明者 ブルヴォスト, ジェレミー
フランス 4 4 2 5 0 サン＝ブルヴァン＝レーパン、アブニュ・ドゥ・ラ・クロワ・デュ・シュード
4

(72)発明者 ヴェガ, マニユエル
フランス 7 5 0 1 1 パリ、アブニュ・フィリップ・オーギュスト 9 0

F ターム (参考) 4B065 AA84X AB01 AC20 BA01 BA30 CA44
4C083 AA111 EE12 EE16 EE22 FF01
4C084 AA13 MA13 MA16 MA22 MA23 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56
MA59 MA63 MA65 MA66 NA14 ZA02 ZA33 ZA36 ZA59 ZA81 ZA89
ZA94 ZA96 ZB07 ZB21 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZC03 ZC21 ZC52
4C085 AA03 BA01 BB01 CC01 EE01 GG02 GG08
4C088 AA16 AC15 MA13 MA16 MA22 MA23 MA35 MA37 MA43 MA52
MA56 MA59 MA63 MA65 MA66 NA14 ZA02 ZA33 ZA36 ZA59 ZA81
ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB21 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZC03 ZC21
ZC52