

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-528096

(P2021-528096A)

(43) 公表日 令和3年10月21日(2021.10.21)

(51) Int.Cl.

**C 12 N 5/071 (2010.01)**  
**A 61 K 35/12 (2015.01)**  
**A 61 K 31/7088 (2006.01)**  
**A 61 K 48/00 (2006.01)**  
**A 61 P 7/06 (2006.01)**

F 1

C 12 N 5/071  
A 61 K 35/12  
A 61 K 31/7088  
A 61 K 48/00  
A 61 P 7/06

テーマコード(参考)

4 B 06 5  
4 C 08 4  
4 C 08 6  
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-573481 (P2020-573481)  
(86) (22) 出願日 令和1年6月27日 (2019.6.27)  
(85) 翻訳文提出日 令和3年2月24日 (2021.2.24)  
(86) 國際出願番号 PCT/EP2019/067232  
(87) 國際公開番号 WO2020/002540  
(87) 國際公開日 令和2年1月2日 (2020.1.2)  
(31) 優先権主張番号 62/691,348  
(32) 優先日 平成30年6月28日 (2018.6.28)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(71) 出願人 391008951  
アストラゼネカ・アクチエボラーグ  
A S T R A Z E N E C A A K T I E B O  
L A G  
スウェーデン国エスエーー 151 85セ  
ーデルティエ  
(71) 出願人 520513048  
ハディ・ヴァラディ  
H a d i V A L A D I  
スウェーデン405 30イエーテボリ、  
ユニバーシティ・オブ・イエーテボリ、ボ  
ックス100  
(74) 代理人 100106518  
弁理士 松谷 道子

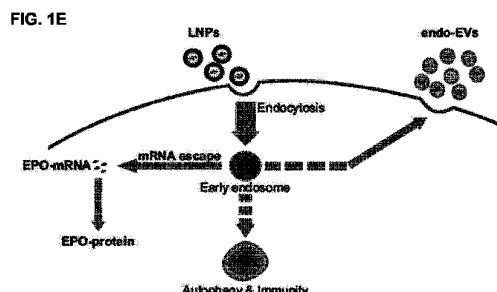
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】エキソソーム細胞外小胞及びその使用方法

## (57) 【要約】

修飾RNAを含むエキソソームが開示される。本開示の態様は、さらに、修飾RNAを含むエキソソームを使用する方法及び組成物にも関する。特定の態様では、本明細書に開示されるエキソソームは、修飾RNAを細胞に送達する上で有用である。特定の態様では、本明細書に開示されるエキソソームは、被験者の障害を処置又は予防する上で有用となり得る。開示されるエキソソームを生成するための方法及び組成物も提供される。

【選択図】なし



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下：

- (a) 修飾 RNA を含む 1 つ以上の脂質ナノ粒子 (LNP) を提供するステップ；
- (b) 細胞による LNP 取込みを可能にする条件下で、1 つ以上の前記細胞を LNP と接触させるステップ；及び
- (c) 前記 1 つ以上の細胞により產生されるエキソソームを単離するステップを含むプロセスにより調製される修飾 RNA を含む単離エキソソームであって、ここで、前記少なくとも 1 つの単離エキソソームは、前記修飾 RNA を含む、単離エキソソーム。

**【請求項 2】**

前記 LNP が、少なくとも 1 つのイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び / 又は PEG 脂質を含む、請求項 1 に記載のエキソソーム。

**【請求項 3】**

前記少なくとも 1 つのイオン化脂質が、DLin-MC3-DMA 及び / 又は DLin-DMA である、請求項 2 に記載のエキソソーム。

**【請求項 4】**

前記少なくとも 1 つのイオン化脂質が、DLin-MC3-DMA である、請求項 2 又は 3 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

**【請求項 5】**

前記少なくとも 1 つのイオン化脂質が、DLin-DMA である、請求項 2 又は 3 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

**【請求項 6】**

前記少なくとも 1 つのリン脂質が、DSPC である、請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

**【請求項 7】**

前記少なくとも 1 つの構造脂質が、コレステロールである、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

**【請求項 8】**

前記少なくとも 1 つの PEG 脂質が、PEG-DMPG 又は PEG 2000-DMPG である、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

**【請求項 9】**

前記 LNP が、DLin-MC3-DMA 若しくは DLin-DMA であるイオン化脂質、DSPC であるリン脂質、コレステロールである構造脂質、及び / 又は PEG-DMPG 若しくは PEG 2000-DMPG である PEG 脂質を含有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

**【請求項 10】**

前記 LNP が、DLin-MC3-DMA であるイオン化脂質、DSPC であるリン脂質、コレステロールである構造脂質、及び PEG-DMPG 若しくは PEG 2000-DMPG である PEG 脂質を含有する、請求項 9 に記載のエキソソーム。

**【請求項 11】**

前記 LNP が、DLin-DMA であるイオン化脂質、DSPC であるリン脂質、コレステロールである構造脂質、及び PEG-DMPG 若しくは PEG 2000-DMPG である PEG 脂質を含有する、請求項 9 に記載のエキソソーム。

**【請求項 12】**

前記 LNP が、約 2 : 1 ~ 約 4 : 1、又は約 4 : 1、約 3 : 1、又は約 2 : 1 のイオン化脂質 : 修飾 RNA ヌクレオチドモル比を有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

**【請求項 13】**

前記 LNP が、約 3 : 1 のイオン化脂質 : 修飾 RNA ヌクレオチドモル比を有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム。

10

20

30

40

50

**【請求項 14】**

前記エキソソームが、少なくとも1つのイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び／又はPEG脂質を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 15】**

前記少なくとも1つのイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び／又はPEG脂質が、LNPに由来する、請求項14に記載のエキソソーム。

**【請求項 16】**

前記少なくとも1つのイオン化脂質が、DLin-MC3-DMA及び／又はDLin-DMAである、請求項14又は15に記載のエキソソーム。

**【請求項 17】**

前記少なくとも1つのイオン化脂質が、DLin-MC3-DMAである、請求項14～16のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 18】**

前記少なくとも1つのイオン化脂質が、DLin-DMAである、請求項14～16のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 19】**

前記少なくとも1つのリン脂質が、DSPCである、請求項14～18のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 20】**

前記少なくとも1つの構造脂質が、コレステロールである、請求項14～19のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 21】**

前記エキソソームが、DLin-MC3-DMA若しくはDLin-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、及び／又はコレステロールである構造脂質を含有する、請求項1～20のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 22】**

前記エキソソームが、DLin-MC3-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、及びコレステロールである構造脂質を含有する、請求項21に記載のエキソソーム。

**【請求項 23】**

前記エキソソームが、DLin-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、及びコレステロールである構造脂質を含有する、請求項21に記載のエキソソーム。

**【請求項 24】**

前記エキソソームが、約1：1～約3：1、又は約3：1、約2：1、約1：1、又は約1：1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む、請求項1～23のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 25】**

前記エキソソームが、約1：1又は約1：1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む、請求項1～24のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 26】**

前記エキソソームは、前記LNPが含むイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比より低いイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む、請求項1～25のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 27】**

前記エキソソームは、約1：1又は約1：1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含み、前記LNPが、約3：1のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む、請求項1～26のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 28】**

前記エキソソームが、約30nm～約300nmの直径を有する、請求項1～27のいずれか1項に記載のエキソソーム。

10

20

30

40

50

**【請求項 2 9】**

前記エキソソームが、約40nm～約150nmの直径を有する、請求項1～28のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 0】**

前記細胞が、被験者から取得される、請求項1～29のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 1】**

前記細胞が、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である、請求項1～30のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 2】**

前記細胞が、Bリンパ球、Tリンパ球、又は単球である、請求項1～31のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 3】**

前記修飾RNAが、エリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項1～32のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 4】**

前記修飾RNAが、ヒトエリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項1～33のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 5】**

前記修飾RNAが、配列番号1のエリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項1～34のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 6】**

前記プロセスが、インビトロで実施される、請求項1～35のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 7】**

1つ以上の細胞を前記LNPと接触させるステップが、ヒト血清の存在下で実施される、請求項1～36のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 8】**

前記ヒト血清が、約0.5体積%、約1体積%、又は約1.5体積%で存在する、請求項37に記載のエキソソーム。

**【請求項 3 9】**

前記ヒト血清が、約1体積%で存在する、請求項37又は38に記載のエキソソーム。

**【請求項 4 0】**

1つ以上の細胞を前記LNPと接触させるステップが、前記1つ以上の細胞を、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも4つの異なる用量の前記LNPと接触させることを含む、請求項1～39のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 4 1】**

1つ以上の細胞を前記LNPと接触させるステップが、前記1つ以上の細胞を、少なくとも3つの異なる用量の前記LNPと接触させることを含む、請求項1～40のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 4 2】**

エキソソームを単離するステップが、インビトロ細胞培地のサンプルからエキソソームを単離するステップを含む、請求項1～41のいずれか1項に記載のエキソソーム。

**【請求項 4 3】**

請求項1～42のいずれか1項に記載の少なくとも1つのエキソソームと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

**【請求項 4 4】**

修飾RNAを細胞に送達する方法であって、有効量の請求項1～42のいずれか1項に記載のエキソソーム又は請求項43に記載の医薬組成物と前記細胞を接触させ、これにより、前記修飾RNAを前記細胞に送達するステップを含む方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 4 5】**

前記細胞を接触させるステップが、前記エキソソーム若しくは医薬組成物をインビトロ細胞培養物に添加するか、又は前記エキソソーム若しくは医薬組成物を被験者に投与するステップを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

**【請求項 4 6】**

前記細胞が、インビトロ細胞培地中に存在する、請求項 4 4 又は 4 5 に記載の方法。

**【請求項 4 7】**

前記細胞が、被験者から取得される、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記細胞が、被験者に存在する、請求項 4 4 又は 4 5 に記載の方法。

10

**【請求項 4 9】**

前記細胞が、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である、請求項 4 4 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記細胞が、B リンパ球、T リンパ球、又は単球である、請求項 4 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記細胞への修飾 RNA の送達が、細胞世代時間を改変しない、請求項 4 4 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

前記細胞への修飾 RNA の送達が、重量単位での総細胞タンパク質含量を改変しない、請求項 4 4 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

**【請求項 5 3】**

細胞への修飾 RNA の送達における、有効量の請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム又は請求項 4 3 に記載の医薬組成物の使用。

**【請求項 5 4】**

前記細胞が、インビトロ細胞培地中に存在する、請求項 5 3 に記載の使用。

**【請求項 5 5】**

前記細胞が、被験者から取得される、請求項 5 3 又は 5 4 に記載の使用。

**【請求項 5 6】**

前記細胞が、被験者に存在する、請求項 5 3 に記載の使用。

30

**【請求項 5 7】**

前記細胞が、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である、請求項 5 3 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 5 8】**

前記細胞が、B リンパ球、T リンパ球、又は単球である、請求項 5 3 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 5 9】**

前記細胞への前記修飾 RNA の送達が、細胞世代時間を改変しない、請求項 5 3 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

40

**【請求項 6 0】**

前記細胞への前記修飾 RNA の送達が、重量単位での総細胞タンパク質含量を改変しない、請求項 5 3 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 6 1】**

被験者の障害を処置又は予防する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム又は請求項 4 3 に記載の医薬組成物を前記被験者に投与するステップを含み、ここで、前記エキソソームが、前記障害を処置する上で有効な修飾 RNA を含む方法。

**【請求項 6 2】**

前記障害が、貧血、脊髄形成異常、免疫若しくは炎症性疾患、単一遺伝子病、及び複合

50

病から選択される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記障害が、貧血である、請求項 6 1 又は 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記障害が、脊髄形成異常である、請求項 6 1 又は 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記障害が、免疫若しくは炎症性疾患である、請求項 6 1 又は 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記修飾 R N A が、エリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項 6 1 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6 7】

前記修飾 R N A が、ヒトエリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項 6 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記修飾 R N A が、配列番号 1 のエリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項 6 1 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記被験者が、エキソソームの非存在下での処置に比べ、エキソソームの存在下での処置に対して低下した免疫及び / 又は炎症反応を有する、請求項 6 1 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 0】

前記免疫及び / 又は炎症反応の低下が、少なくとも 1 つのサイトカインのレベルの増加又は減少を含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記免疫及び / 又は炎症反応の低下が、少なくとも 1 つのサイトカインのレベルの減少を含み、ここで、前記サイトカインは、I L - 6 、I P - 1 0 、R A N T E S 、M C P - 1 、及び K C から選択される、請求項 6 9 又は 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記エキソソームが、前記被験者から取得された細胞から単離される、請求項 6 1 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7 3】

被験者の障害の処置又は予防における、有効量の請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載のエキソソーム又は請求項 4 3 に記載の医薬組成物の使用であって、前記エキソソームが、前記障害を処置する上で有効な修飾 R N A を含む使用。

【請求項 7 4】

被験者の障害を処置又は予防する方法であって、以下：

( a ) 前記被験者から取得された 1 つ以上の細胞を提供するステップ；  
( b ) 前記細胞による L N P 取込みを可能にする条件下で、修飾 R N A を含む 1 つ以上の脂質ナノ粒子 ( L N P ) と前記 1 つ以上の細胞を接触させるステップ；

( c ) 前記 1 つ以上の細胞により產生されるエキソソームを単離するステップであって、少なくとも 1 つの単離エキソソームが、前記修飾 R N A を含むステップ；並びに

( d ) 有効量の前記単離エキソソームを前記被験者に投与するステップ  
を含み、ここで、前記修飾 R N A は、前記障害を処置する上で有効である方法。

40

【請求項 7 5】

前記細胞が、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である、請求項 7 4 に記載の使用。

【請求項 7 6】

前記細胞が、B リンパ球、T リンパ球、又は単球である、請求項 7 4 又は 7 5 に記載の使用。

【請求項 7 7】

50

前記障害が、貧血、脊髄形成異常、免疫若しくは炎症性疾患、単一遺伝子病、及び複合病から選択される、請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記障害が、貧血である、請求項 7 4 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記障害が、脊髄形成異常である、請求項 7 4 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記障害が、免疫又は炎症性疾患である、請求項 7 4 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記修飾 R N A が、エリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項 7 4 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記修飾 R N A が、ヒトエリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項 7 4 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記修飾 R N A が、配列番号 1 のエリスロポエチンポリペプチドをコードする、請求項 7 4 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記被験者が、エキソソームの非存在下の処置に比べ、エキソソームの存在下での処置に対して低下した免疫及び/又は炎症反応を有する、請求項 7 4 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記免疫及び/又は炎症反応の低下が、少なくとも 1 つのサイトカインのレベルの増加又は減少を含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記免疫及び/又は炎症反応の低下が、少なくとも 1 つのサイトカインのレベルの減少を含み、ここで、前記サイトカインは、I L - 6、I P - 1 0、R A N T E S、M C P - 1、及びK C から選択される、請求項 8 4 又は 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

1 つ以上の細胞を前記 L N P と接触させるステップが、ヒト血清の存在下で実施される、請求項 7 4 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記ヒト血清が、約 0 . 5 体積%、約 1 体積%、又は約 1 . 5 体積%で存在する、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記ヒト血清が、約 1 体積%で存在する、請求項 8 7 又は 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

1 つ以上の細胞を前記 L N P と接触させるステップが、前記 1 つ以上の細胞を、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、又は少なくとも 4 つの異なる用量の前記 L N P と接触させることを含む、請求項 7 4 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 1】

1 つ以上の細胞を前記 L N P と接触させるステップが、前記 1 つ以上の細胞を、少なくとも 3 つの異なる用量の前記 L N P と接触させることを含む、請求項 7 4 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 2】

エキソソームを単離するステップが、インビトロ細胞培地のサンプルからエキソソームを単離することを含む、請求項 7 4 ~ 9 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

**【0001】**

本開示は、修飾RNAを含むエキソソームに関する。本開示は、さらに、本明細書に開示されるエキソソームを使用するための方法及び組成物にも関する。特定の態様では、本明細書に開示されるエキソソームは、修飾RNAを細胞に送達する上で有用であり得る。特定の態様では、本明細書に開示されるエキソソームは、被験者の障害を処置又は予防する上で有用であり得る。開示されるエキソソームを生成するための方法及び組成物も提供される。

**【背景技術】****【0002】**

RNAは、癌、感染症、及び遺伝性遺伝子疾患をはじめとする様々な疾患の処置にとって有望な治療用分子である（非特許文献1；非特許文献2）。RNA療法は、一般に、RNA干渉（RNAi、例えば、siRNA）を用いて病原遺伝子を抑制する、又はmRNAを細胞に送達することにより治療用タンパク質を発現させることを含む。規制当局の承認を得るために、RNA送達のために使用されるビヒクルが、安全（すなわち、非免疫原性及び非毒性）であり、且つレシピエント細胞の細胞質に治療RNAを効率的に輸送する能力を有する必要がある。

10

**【0003】**

脂質ナノ粒子（LNP）など、公知の薬物担体は、組織及び細胞への薬物の標的化、部位特異的送達を促進し、それにより、それらのバイオアベイラビリティを増大する。イオン化脂質を含有するLNPは、RNA送達のための1つのプラットフォームを表す（非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5）。しかし、LNP及び他のそうした担体を開発する上での障害は、それらの製剤の成分に関連する潜在的免疫原性応答である。

20

**【0004】**

単核食細胞による認識を回避するために、ポリエチレングリコールシールドを添加するなどの、LNPに関連する免疫原性応答を最小化する取組みにもかかわらず、LNPは、依然として免疫応答を誘発することができる（非特許文献6）。例えば、特定のLNP製剤は、レシピエント細胞に対して一部毒性であり、宿主に望ましくない免疫応答を引き起こすことがわかっている（非特許文献7；非特許文献8）。

**【0005】**

LNPの免疫刺激作用により、治療用RNAの安全且つ効果的な送達のためのそれらの使用は引き続き妨げられている。従って、免疫応答をトリガーすることなく、RNAを標的組織及び細胞に効果的に送達することができる代替的ビヒクルの開発が必要とされている。

30

**【0006】**

細胞外小胞（EV）は、ほぼ全ての細胞型により分泌される、異種クラスのナノ及びミクロサイズの小胞である（非特許文献9；非特許文献10；非特許文献11）。EVは、ほとんどの生体体液、並びに培養細胞の上清中で検出され得る（非特許文献12；非特許文献13；非特許文献14）。EV生物発生中に、EVは、多様な細胞質成分、例えば、脂質及びタンパク質、並びにコード及び非コードRNAなどを取得し得る（非特許文献15；非特許文献16；非特許文献17）。細胞はまた、RNAメッセージをEV中にパッケージすることにより、これらのメッセージを互いに送ることができる（非特許文献18）。従って、EVは、細胞間の核酸輸送のための内在性担体として作用し得る。最も広範に記載されているEVは、エキソソームであり、これらは、エンドソームに由来し、エキソサイトーシス経路を介して分泌される。

40

**【0007】**

エキソソームは、ほぼ全ての種類の細胞によって分泌され、且つ実質的にあらゆる種類の体液中に安定して存在するナノスケールのEVである（非特許文献19）。エキソソームは、核酸（例えば、mRNA及びmicroRNA）、機能性タンパク質、及び脂質を含め、様々なシグナル伝達分子を伝達することができる（非特許文献20；非特許文献21；非特許文献22）。エキソソームのサイズが小さいために、これらは、単核食細胞

50

による急速な食作用から脱出して、薬物を循環中に安定的に運搬及び送達し、血管内皮を通過して細胞をターゲティングすることができる（非特許文献23）。加えて、エキソソームは、血液・脳関門及び胎盤関門などの厳重な生物学的バリアを通過することができる（非特許文献24；非特許文献25；非特許文献26）。これらの特徴の全てによって、エキソソームは、RNA送達のための有望な担体となる。

#### 【0008】

非特許文献27に報告されているエキソソーム・リポソームハイブリッドナノ粒子など、エキソソームに基づくいくつかの送達系が治療用途のために記載されている。しかし、これまで、これらの系のどれも、特定のRNA送達製剤から生じ得る毒性作用に対処するべく開発されていない。従って、副作用を最小限にすると共に、細胞及び組織における過度の毒性を回避する有効なRNA送達系が依然として必要とされている。

10

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0009】

【非特許文献1】Pardi et al. (2018) *Nat Rev Drug Discov.* 17(4): 261-79

【非特許文献2】Dunbar et al. (2018) *Science* 359(6372): eaan4672

【非特許文献3】Semplice et al. (2010) *Nat Biotechnol.* 28(2): 172-6

20

【非特許文献4】Patel et al. (2017) *Nano Lett.* 17(9): 5711-8

【非特許文献5】Rietwyk and Peer (2017) *ACS Nano.* 11(8): 7572-86

【非特許文献6】Kumar et al. (2014) *Mol Ther Nucleic Acids* 3(e210)

【非特許文献7】Barros and Gollob (2012) *Adv Drug Deliv Rev.* 64(15): 1730-7

【非特許文献8】Kulkarni et al. (2017) *Nanomedicine* 13(4): 1377-87

30

【非特許文献9】Raposo et al. (1996) *J Exp Med.* 183(3): 1161-72

【非特許文献10】Zitvogel et al. (1998) *Nat Med.* 4(5): 594-600

【非特許文献11】Nawaz et al. (2016) *Stem Cells Int.* 2016: 1073140

【非特許文献12】Akers et al. (2015) *J Neurooncol.* 123(2): 205-16

【非特許文献13】Lassar et al. (2011) *J Transl Med.* 9: 9

40

【非特許文献14】Thery et al. (2006) *Curr Protoc Cell Biol. Chapter 3: Unit 3.22*

【非特許文献15】Keerthikumar et al. (2016) *J Mol Biol.* 428(4): 688-92

【非特許文献16】Kalra et al. (2012) *PLoS Biol.* 10(12): e1001450

【非特許文献17】Fatima et al. (2017) *Noncoding RNA* 3(1): 10

【非特許文献18】Valadi et al. (2007) *Nat Cell Biol.* 9(6): 654-9

50

【非特許文献19】Ibrahim and Marban (2016) *Annals Rev Physiol.* 78: 67 - 83

【非特許文献20】Valadi et al. (2007) *Nature Cell Biology* 9 (6): 654 - 9

【非特許文献21】Li et al. (2016) *Nature Communications* 7: 10872

【非特許文献22】Liu et al. (2015) *Cell Metabolism* 22 (4): 606 - 18

【非特許文献23】van den Boorn et al. (2011) *Nature Biotechnology* 29 (4): 325 - 6

10

【非特許文献24】Alvarez-Erviti et al. (2011) *Nature Biotechnology* 29 (4): 341 - 5

【非特許文献25】Holder et al. (2016) *Traffic* 17 (2): 168 - 78

【非特許文献26】Shi et al. (2017) *Biochemistry Biophysics Research Communications* 483 (1): 602 - 8

【非特許文献27】Lin et al. ((2018)) *Adv Sci. (Weinh)* 5 (4): 1700611

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0010】

様々な実施形態において、本開示は、一部に、治療用RNAの送達のためのエキソソーム(EV)を提供する。様々な実施形態において、本明細書に記載されるエキソソームは、細胞及び組織をターゲティングするために、高分子量mRNAをはじめとする外性RNAを送達することができる。様々な実施形態において、本明細書に記載のエキソソームは、インビトロ又はインビボ輸送中に外性RNAを保護し、RNAをレシピエント細胞の細胞質に送達することができる。様々な実施形態において、送達されたRNAは、機能性であり、治療用タンパク質を产生するように翻訳され得る。様々な実施形態において、本明細書に記載のエキソソームは、非免疫原性であってもよいし、又は代替的送達ビヒクル(例えば、LNP)で観察される免疫及び/又は炎症反応と比較して低い免疫及び/若しくは炎症反応を誘発するものでもよい。様々な実施形態において、本明細書に記載のエキソソームは、約1:1若しくは約1:1未満、例えば、約0.1:1、約0.2:1、約0.3:1、約0.4:1、約0.5:1、約0.6:1、約0.7:1、約0.8:1、又は約0.9:1のイオン化脂質:修飾RNAヌクレオチドモル比を有する。様々な実施形態において、約1:1若しくは約1:1未満のイオン化脂質:修飾RNAヌクレオチドモル比を有するエキソソームは、約1:1超のイオン化脂質:修飾RNAヌクレオチドモル比を有する代替的送達ビヒクルと比較して、宿主細胞及び組織において非毒性であるか、又は毒性が低いことがある(例えば、LNP)。様々な実施形態において、エキソソーム及び代替的送達ビヒクルは、同じイオン化脂質(例えば、DLin-MC3-DMA若しくはDLin-DMA)及び同じ修飾RNAを含むが、異なるイオン化脂質:修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。

30

【0011】

様々な実施形態において、本開示は、以下:(a)修飾RNAを含む1つ以上の脂質ナノ粒子(LNP)を提供するステップ;(b)細胞によるLNP取込みを可能にする条件下で、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップ;及び(c)1つ以上の細胞により產生されるエキソソームを単離するステップを含むプロセスにより調製される修飾RNAを含む単離エキソソームを提供し、ここで、少なくとも1つの単離エキソソームは、修飾RNAを含む。

【0012】

一部の実施形態では、LNPは、少なくとも1つのイオン化脂質、リン脂質、構造脂質

40

50

、及び／又はPEG脂質を含む。

【0013】

一部の実施形態では、LNPに含有される少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-MC3-DMA及び／又はDLin-DMAである。一部の実施形態では、LNPに含有される少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-MC3-DMAである。一部の実施形態では、LNPに含有される少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-DMAである。一部の実施形態では、LNPに含有される少なくとも1つのリン脂質は、DSPCである。一部の実施形態ではLNPに含有される少なくとも1つの構造脂質は、コレステロールである。一部の実施形態では、LNPに含有される少なくとも1つのPEG脂質は、PEG-DMPeである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約2,000Da(PEG2000)であってよい。一部の実施形態では、LNPに含有される少なくとも1つのPEG脂質は、PEG2000-DMPeである。

10

【0014】

一部の実施形態では、LNPは、DLin-MC3-DMA若しくはDLin-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、コレステロールである構造脂質、及び／又はPEG-DMPe若しくはPEG2000-DMPeであるPEG脂質を含有する。一部の実施形態では、LNPは、DLin-MC3-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、コレステロールである構造脂質、及びPEG-DMPe若しくはPEG2000-DMPeであるPEG脂質を含有する。一部の実施形態では、LNPは、DLin-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、コレステロールである構造脂質、及びPEG-DMPe若しくはPEG2000-DMPeであるPEG脂質を含有する。

20

【0015】

一部の実施形態では、LNPは、約2:1～約4:1、又は約4:1、約3:1、又は約2:1のイオン化脂質：修飾RNAスクレオチドモル比を有する。一部の実施形態では、LNPは、約3:1のイオン化脂質：修飾RNAスクレオチドモル比を有する。

【0016】

一部の実施形態では、1つ以上の細胞をLNPと接触させることにより產生されるエキソームは、少なくとも1つのイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び／又はPEG脂質を含む。一部の実施形態では、エキソームにより含有される少なくとも1つのイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び／又はPEG脂質は、LNPに由来する。

30

【0017】

一部の実施形態では、エキソームにより含有される少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-MC3-DMA及び／又はDLin-DMAである。一部の実施形態では、エキソームに含有される少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-MC3-DMAである。一部の実施形態では、エキソームに含有される少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-DMAである。一部の実施形態では、エキソームに含有される少なくとも1つのリン脂質は、DSPCである。一部の実施形態では、エキソームに含有される少なくとも1つの構造脂質は、コレステロールである。

40

【0018】

一部の実施形態では、エキソームは、DLin-MC3-DMA若しくはDLin-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、及び／又はコレステロールである構造脂質を含有する。一部の実施形態では、エキソームは、DLin-MC3-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、及びコレステロールである構造脂質を含有する。一部の他の実施形態では、エキソームは、DLin-DMAであるイオン化脂質、DSPCであるリン脂質、及びコレステロールである構造脂質を含有する。

【0019】

一部の実施形態では、エキソームは、約1:1～約3:1、又は約3:1、約2:1、約1:1、又は約1:1未満のイオン化脂質：修飾RNAスクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、エキソームは、約1:1又は約1:1未満、例えば、約0.1:

50

1、約0.2:1、約0.3:1、約0.4:1、約0.5:1、約0.6:1、約0.7:1、約0.8:1、又は約0.9:1のイオン化脂質：修飾RNAスクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、LNPが含むイオン化脂質：修飾RNAモル比より低いイオン化脂質：修飾RNAスクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、約1:1又は約1:1未満のイオン化脂質：修飾RNAスクレオチドモル比を含み、LNPは、約3:1のイオン化脂質：修飾RNAスクレオチドモル比を含む。

#### 【0020】

一部の実施形態では、エキソソームは、約30nm～約300nmの直径を有する。一部の実施形態では、エキソソームは、約40nm～約150nmの直径を有する。一部の実施形態では、エキソソームは、約40nm～約120nmの直径を有する。

10

#### 【0021】

一部の実施形態では、LNPと接触させて、エキソソームを産生させるための細胞は、被験者から取得される。一部の実施形態では、細胞は、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である。一部の実施形態では、細胞は、Bリンパ球、Tリンパ球、又は単球である。

#### 【0022】

一部の実施形態では、修飾RNAは、目的のポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、疾患を処置する上で有効なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、エリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、ヒトエリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、配列番号1のエリスロポエチンポリペプチドをコードする。

20

#### 【0023】

一部の実施形態では、エキソソームは、インビトロで実施されるプロセスにより調製される。一部の実施形態では、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップは、ヒト血清の存在下で実施される。一部の実施形態では、ヒト血清は、約0.5体積%、約1体積%、又は約1.5体積%で存在する。一部の実施形態では、ヒト血清は、約1体積%で存在する。一部の実施形態では、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップは、1つ以上の細胞を、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも4つの異なる用量のLNPと接触させることを含む。一部の実施形態では、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップは、1つ以上の細胞を、少なくとも3つの異なる用量のLNPと接触させることを含む。一部の実施形態では、エキソソームを単離するステップは、インビトロ細胞培地のサンプルからエキソソームを単離するステップを含む。

30

#### 【0024】

様々な実施形態において、本開示はまた、有効量のエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）と細胞を接触させ、これにより修飾RNAを細胞に送達することにより、修飾RNAを細胞に送達する方法も提供する。一部の実施形態では、細胞を接触させるステップは、エキソソーム若しくは医薬組成物をインビトロ細胞培養物に添加するか、又はエキソソーム若しくは医薬組成物を被験者に投与するステップを含む。

40

#### 【0025】

また様々な実施形態において、細胞への修飾RNAの送達における、有効量のエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）の使用も本明細書に提供される。

#### 【0026】

本明細書に記載される方法及び使用の一部の実施形態では、細胞は、インビトロ細胞培地中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、被験者から取得される。一部の実施形態では、細胞は、被験者に存在する。一部の実施形態では、細胞は、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である。一部の実施形態では、細胞は、Bリンパ球、Tリンパ球、又は単球である。

50

**【 0 0 2 7 】**

本明細書に記載される方法及び使用の一部の実施形態では、細胞への修飾 R N A の送達は、細胞世代時間を改変しない。一部の実施形態では、細胞への修飾 R N A の送達は、重量単位での総細胞タンパク質含量を改変しない。

**【 0 0 2 8 】**

さらに、様々な実施形態において、少なくとも 1 つのエキソソーム（例えば、本明細書に記載のエキソソームのいずれか）と、薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物が本明細書に提供される。

**【 0 0 2 9 】**

さらにまた、様々な実施形態では、例えば、障害の処置における、本明細書に開示のエキソソーム及び医薬組成物の治療方法及び使用も本明細書に提供される。

10

**【 0 0 3 0 】**

例えば、特定の態様では、本開示は、有効量のエキソソーム又は少なくとも 1 つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）を被験者に投与することにより、被験者の障害を処置又は予防する方法を提供し、ここで、エキソソームは、障害を処置する上で有効な修飾 R N A を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、被験者から得られる細胞から単離される。

**【 0 0 3 1 】**

特定の他の態様では、本開示は、被験者の障害の処置又は予防における、有効量のエキソソーム又は少なくとも 1 つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）の使用を提供し、ここで、エキソソームは、障害を処置する上で有効な修飾 R N A を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、被験者から得られる細胞から単離される。

20

**【 0 0 3 2 】**

さらに別の態様では、本開示は、以下：( a ) 被験者から取得された 1 つ以上の細胞を提供するステップ；( b ) 細胞による L N P 取込みを可能にする条件下で、修飾 R N A を含む 1 つ以上の脂質ナノ粒子（L N P）と 1 つ以上の細胞を接触させるステップ；( c ) 1 つ以上の細胞により產生されるエキソソームを単離するステップであって、少なくとも 1 つの単離エキソソームが、修飾 R N A を含むステップ；並びに( d ) 有効量の単離エキソソームを被験者に投与するステップにより、被験者の障害を処置又は予防する方法を提供し、ここで、修飾 R N A は、障害を処置する上で有効である。一部の実施形態では、細胞は、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である。一部の実施形態では、細胞は、B リンパ球、T リンパ球、又は単球である。

30

**【 0 0 3 3 】**

さらにまた別の態様では、本開示は、以下：( a ) 被験者から 1 つ以上の細胞を取得するステップ；( b ) 細胞による L N P 取込みを可能にする条件下で、修飾 R N A を含む 1 つ以上の脂質ナノ粒子（L N P）と 1 つ以上の細胞を接触させるステップ；( c ) 1 つ以上の細胞により產生されるエキソソームを単離するステップであって、少なくとも 1 つの単離エキソソームが、修飾 R N A を含むステップ；並びに( d ) 有効量の単離エキソソームを被験者に投与するステップによる、被験者の障害の処置又は予防における有効量の単離エキソソームの使用を提供し、ここで、修飾 R N A は、障害を処置する上で有効である。一部の実施形態では、細胞は、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である。一部の実施形態では、細胞は、B リンパ球、T リンパ球、又は単球である。

40

**【 0 0 3 4 】**

本明細書に開示される方法及び使用の一部の実施形態では、障害は、貧血、脊髄形成異常、免疫若しくは炎症性疾患、単一遺伝子病、及び複合病から選択される。一部の実施形態では、障害は、貧血である。一部の実施形態では、障害は、脊髄形成異常である。一部の実施形態では、障害は、免疫又は炎症性疾患である。一部の実施形態では、免疫又は炎症性疾患は、炎症性腸疾患である。一部の実施形態では、障害は、単一遺伝子病である。一部の実施形態では、単一遺伝子病は、神経変性疾患である。一部の実施形態では、障害

50

は、複合病である。一部の実施形態では、複合病は、心筋梗塞である。一部の実施形態では、複合病は、癌である。

【0035】

本明細書に開示される方法及び使用の一部の実施形態では、修飾RNAは、障害を処置する上で有効なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、エリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、ヒトエリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、配列番号1のエリスロポエチンポリペプチドをコードする。

【0036】

本明細書に開示される方法及び使用の一部の実施形態では、被験者は、エキソソームの非存在下の処置に比べ、エキソソームの存在下での処置に対して低下した免疫及び/又は炎症反応を有する。一部の実施形態では、免疫及び/又は炎症反応の低下は、少なくとも1つのサイトカインのレベルの増加又は減少を含む。一部の実施形態では、免疫及び/又は炎症反応の低下は、少なくとも1つのサイトカインのレベルの減少を含み、ここで、サイトカインは、IL-6、IP-10、RANTES、MCP-1、及びKCから選択される。

10

【0037】

本明細書に開示される方法及び使用の一部の実施形態では、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップは、ヒト血清の存在下で実施される。一部の実施形態では、ヒト血清は、約0.5体積%、約1体積%、又は約1.5体積%で存在する。一部の実施形態では、ヒト血清は、約1体積%で存在する。一部の実施形態では、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップは、1つ以上の細胞を少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも4つの異なる用量のLNPと接触させることを含む。一部の実施形態では、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップは、少なくとも3つの異なる用量のLNPと1つ以上の細胞を接触させることを含む。一部の実施形態では、エキソソームを単離するステップは、インビトロ細胞培地のサンプルからエキソソームを単離することを含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1A】LNP送達後にヒト上皮(HTB-177)細胞中で検出されたhEPO mRNAの量を示す。各々100μgのhEPO mRNAを含有する、DLin-DMAイオン化脂質を含むLNP(DD-LNP)、及びDLin-MC3-DMAイオン化脂質を含むLNP(MC3-LNP)を、独立した実験で、HTB-177細胞に移入した。非処理細胞、及びhEPO mRNAを含まないLNPで処理した細胞を対照として使用した。LNP処理の96時間後、RT-qPCRによりレシピエント細胞中でhEPO mRNAを定量した。細胞中で検出されたhEPO mRNAの量は、LNP処理の96時間後に採取した細胞の総数に対して正規化した。

30

【図1B】LNP送達後にHTB-177細胞中で検出されたhEPOタンパク質の細胞内量を示す。100μgのhEPO mRNAを、LNPを介してHTB-177細胞に送達した。LNP処理の96時間後、細胞外送達されたmRNAからのhEPOタンパク質をELISAによりレシピエントにおいて定量した。hEPOタンパク質の量は、LNP処理の96時間後に採取した細胞の総数に対して正規化した。

40

【図1C】LNP送達後にHTB-177馴化培地の上清中で検出されたhEPOタンパク質の細胞外量を示す。100μgのhEPO mRNAを、LNPを介してHTB-177細胞に送達した。LNP処理の96時間後、分泌されたhEPOタンパク質を、ELISAにより細胞培養馴化培地の上清中で定量した。hEPOタンパク質の量は、LNP処理の96時間後に採取した細胞の総数に対して正規化した。

【図1D】LNPを介して投与されるhEPO mRNAの総量(100μg)に対する、LNP処理細胞の細胞質中で検出されたhEPO mRNAのパーセンテージを示す。

【図1E】LNPのエンドサイトーシス後の細胞質中へのhEPO mRNAのエンドソームからの脱出、並びにhEPO mRNAのタンパク質への翻訳の例示的な概略図を示

50

す。或いは、h E P O m R N A は、エンドソーム由来の E V (エンド - E V ) 中にパッケージされて、エキソサイトーシスを介して分泌され得る。

【図 1 F】L N P 处理細胞から単離した E V 中で定量された h E P O m R N A の総量を示す。細胞の細胞質中の L N P 送達 h E P O m R N A を検出した後、これらの細胞から分泌された E V 中で、残りの h E P O m R N A を評価した。E V を単離し、E V 中の h E P O m R N A を R T - q P C R (絶対定量) により定量した。

【図 1 G】L N P 中のイオン化脂質及び h E P O m R N A ヌクレオチド (h E P O m R N A 当たりのイオン化脂質) のモル濃度を示す。細胞送達のために用いられる L N P (M C 3 - L N P 及び D D - L N P ) を、勾配高速液体クロマトグラフィー (U P L C ) を用いて、イオン化脂質及び h E P O m R N A ヌクレオチドのモル濃度について分析した。概して、L N P は、h E P O m R N A ヌクレオチド (μ m o l ) に比べ、約 3 倍のイオン化脂質 (μ m o l ) を含有した。

【図 1 H - 1 I】E V 中のイオン化脂質及び h E P O m R N A ヌクレオチドのモル濃度 (h E P O m R N A 当たりのイオン化脂質) を示す。E V を L N P 处理細胞から単離し、勾配高速液体クロマトグラフィー (U P L C ) を用いて、E V 中のイオン化脂質及び h E P O m R N A ヌクレオチドのモル濃度を分析した。概して、M C 3 - E V (図 1 H) 及び D D - E V (図 1 I) は、ほぼ等濃度のイオン化脂質 (μ m o l ) 及び h E P O m R N A ヌクレオチド (μ m o l ) を含有した。

【図 1 J】h E P O m R N A ヌクレオチド当たりのイオン化脂質のモル比 (m o l / m o l ) について L N P 及び E V 間の比較を示す。E V は、概して、1 : 1 モル比 (1 m o l の m R N A ヌクレオチド当たり 1 m o l のイオン化脂質) を含有したのに対し、L N P は、概して、3 : 1 モル比 (1 m o l の m R N A ヌクレオチド当たり 3 m o l のイオン化脂質) を含有した。

【図 2 A】E V を介したヒト上皮 (H T B - 1 7 7 ) 細胞への C y 5 - E G F P - m R N A の送達を示す。7 6 μ g の蛍光シアニン 5 (C y 5 ) E G F P - m R N A を含有する D D - L N P を H T B - 1 7 7 細胞に投与した。L N P 处理の 9 6 時間後、D D - L N P 处理細胞 (D D - E V ) からの E V を単離した。7 8 μ g の C y 5 - E G F P - m R N A 含有 D D - E V をオートロガス H T B - 1 7 7 細胞に移入した。E V 送達の 5 時間、2 4 時間、及び 4 8 時間後、細胞中の蛍光に基づく F A C S により、C y 5 - E G F P - m R N A 送達を評価した。データは、各時点で、E V 移入後に E G F P - m R N A を含有する H T B - 1 7 7 細胞のパーセンテージとして表示される。データは、少なくとも 3 回の生物学的反復の標準偏差 (S D ) を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立 2 群両側 t 検定を用いて、M C 3 - L N P 及び D D - L N P 群を比較した。P 値：\* \* P < 0 . 0 1 、\* \* \* \* P < 0 . 0 0 0 1 、及び n s = 有意ではない。略語：U N T (w / o E V ) - 非処理細胞；細胞 + E V (w / o C y 5 - m R N A ) - m R N A なしで移入された D D - L N P 又は M C 3 - L N P ；細胞 + E V (C y 5 - m R N A を含む) - m R N A と共に移入された D D - L N P 又は M C 3 - L N P 。

【図 2 B - 2 D】E V を介したヒト末梢血単核細胞 (P B M C ) への C y 5 - E G F P - m R N A の送達を示す。健康なヒトバフィーコートから末梢血単核細胞 (P B M C ) を単離し、C D 1 9 (B 細胞)、C D 3 (T 細胞)、及び C D 1 4 (単球) に対して特異的表面マーカで染色した。7 8 μ g の C y 5 - E G F P - m R N A 含有 D D - E V をレシピエント細胞に移入した。E V 送達の 5 時間、2 4 時間、及び 4 8 時間後に、F A C S 分析を実施して、レシピエント免疫細胞中の C y 5 - E G F P - m R N A を検出した。B 細胞 (図 2 B)、T 細胞 (図 2 C)、及び 単球 (図 2 D) 中の C y 5 - 蛍光及び抗体 - 蛍光に基づいて、C y 5 - E G F P - m R N A の送達を推定した。データは、各時点で E V 移入後に C y 5 - E G F P - m R N A を含有する細胞のパーセンテージとして表示される。データは、少なくとも 3 回の生物学的反復の標準偏差 (S D ) を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立 2 群両側 t 検定を用いて、M C 3 - L N P 及び D D - L N P 群を比較した。P 値：\* \* P < 0 . 0 1 、\* \* \* \* P < 0 . 0 0 0 1 、及び n s = 有意ではない。略語：U N T (w / o E V ) - 非処理細胞；細胞 + E V (w / o C y 5 - m R N A ) - m R N A なしで移入された D D - L N P 又は M C 3 - L N P 。

10

20

30

40

50

) - m R N A なしで移入された D D - L N P 又は M C 3 - L N P ; 細胞 + E V ( C y 5 - m R N A を含む ) - m R N A と共に移入された D D - L N P 又は M C 3 - L N P 。

【図 3】 E V を介した h E P O m R N A 送達後のマウス血液中の h E P O タンパク質の検出を示す。 1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A を含有する 100  $\mu$  L の M C 3 - E V ( マウス 1 匹当たり ) をマウスに静脈内注射した。マウス血漿中の h E P O タンパク質の濃度を、 E V 注射の 0 時間 ( 非処理 ) 、 2 時間、 5 時間、及び 24 時間後、ヒトエリスロポエチン E L I S A により決定した。 h E P O タンパク質は、 E V 注射から 2 時間後にマウス血液中で検出可能であった。対照マウスには、等量の P B S を注射し、 E L I S A により h E P O タンパク質についてマウス血漿を検定した。データは、 2 時間 ( n = 4 ) を除いて、各時点での 8 回の反復 ( n = 8 ) から表示される。散布図中の各点は、各反復 ( マウス ) を表す。パラメトリック独立 2 群両側 t 検定を用いて、 2 時間及び 5 時間の間で、 M C 3 - E V 送達後の血漿 h E P O タンパク質を比較した ( n s : 有意ではない ) 。

【図 4 A - 4 B】 E V を介した h E P O m R N A のインビオ送達後のマウス心臓中の h E P O m R N A ( 図 4 A ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 4 B ) の定量を示す。 1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A を含有する 100  $\mu$  L の M C 3 - E V ( マウス 1 匹当たり ) をマウスに静脈内注射した。 E V 注射から 5 時間、 24 時間、及び 96 時間後に、 h E P O m R N A 及び h E P O タンパク質のレベルをそれぞれ R T - q P C R 及び E L I S A により定量した。 P B S を注射したマウスを対照として使用した。データは、散布図として、各時点で 4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立 2 群両側 t 検定を用いて、各時点で、 E V 処理及び非処理群を比較した。有意な値は P 値として示す : \* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 。

【図 4 C - 4 D】 マウス肺中の h E P O m R N A ( 図 4 C ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 4 D ) の定量を示す。 E V 注射 ( マウス 1 匹当たり 1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A ) から 5 時間、 24 時間、及び 96 時間後に、肺中の h E P O m R N A のレベルを R T - q P C R で、また、 h E P O タンパク質のレベルを E L I S A により定量した。データは、散布図として、各時点で 4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立 2 群両側 t 検定を用いて、各時点で、 E V 処理及び非処理群を比較した。有意な値は P 値として示す : \* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 。

【図 4 E - 4 F】 マウス肝臓中の h E P O m R N A ( 図 4 E ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 4 F ) の定量を示す。 E V 注射 ( マウス 1 匹当たり 1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A ) から 5 時間、 24 時間、及び 96 時間後に、肝臓中の h E P O m R N A のレベルを R T - q P C R で、また、 h E P O タンパク質のレベルを E L I S A により定量した。評価した他の全ての臓器と比較して、最も多量の h E P O タンパク質が肝臓中で検出された。データは、散布図として、各時点で 4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立 2 群両側 t 検定を用いて、各時点で、 E V 処理及び非処理群を比較した。有意な値は P 値として示す : \* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 。

【図 4 G - 4 H】 マウス脾臓中の h E P O m R N A ( 図 4 G ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 4 H ) の定量を示す。 E V 注射 ( マウス 1 匹当たり 1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A ) から 5 時間、 24 時間、及び 96 時間後に、脾臓中の h E P O m R N A のレベルを R T - q P C R で、また、 h E P O タンパク質のレベルを E L I S A により定量した。評価した他の全ての臓器と比較して、最も多量の h E P O m R N A が脾臓中で検出された。データは、散布図として、各時点で 4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立 2 群両側 t 検定を用いて、各時点で、 E V 処理及び非処理群を比較した。有意な値は P 値として示す : \* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 。

【図 4 I - 4 J】 マウス腎臓中の h E P O m R N A ( 図 4 I ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 4 J ) の定量を示す。 E V 注射 ( マウス 1 匹当たり 1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A )

10

20

30

40

50

)から5時間、24時間、及び96時間後に、腎臓中のhEPO mRNAのレベルをRT-qPCRで、また、hEPOタンパク質のレベルをELISAにより定量した。データは、散布図として、各時点で4回の反復( $n=4$ )の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立2群両側t検定を用いて、各時点で、EV処理及び非処理群を比較した。有意な値はP値として示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。

【図4K-4L】マウス胸腺中のhEPO mRNA(図4K)及びhEPOタンパク質(図4L)の定量を示す。EV注射(マウス1匹当たり1.5 $\mu$ gのhEPO mRNA)から5時間、24時間、及び96時間後に、胸腺中のhEPO mRNAのレベルをRT-qPCRで、また、hEPOタンパク質のレベルをELISAにより定量した。データは、散布図として、各時点で4回の反復( $n=4$ )の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立2群両側t検定を用いて、各時点で、EV処理及び非処理群を比較した。有意な値はP値として示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。

【図4M-4N】マウス脾臓中のhEPO mRNA(図4M)及びhEPOタンパク質(図4N)の定量を示す。EV注射(マウス1匹当たり1.5 $\mu$ gのhEPO mRNA)から5時間、24時間、及び96時間後に、脾臓中のhEPO mRNAのレベルをRT-qPCRで、また、hEPOタンパク質のレベルをELISAにより定量した。データは、散布図として、各時点で4回の反復( $n=4$ )の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立2群両側t検定を用いて、各時点で、EV処理及び非処理群を比較した。有意な値はP値として示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。

【図4O-4P】マウス脳中のhEPO mRNA(図4O)及びhEPOタンパク質(図4P)の定量を示す。EV注射(マウス1匹当たり1.5 $\mu$ gのhEPO mRNA)から5時間、24時間、及び96時間後に、脳中のhEPO mRNAのレベルをRT-qPCRで、また、hEPOタンパク質のレベルをELISAにより定量した。データは、散布図として、各時点で4回の反復( $n=4$ )の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立2群両側t検定を用いて、各時点で、EV処理及び非処理群を比較した。有意な値はP値として示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 。

【図5】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血液及び臓器中のhEPOタンパク質レベルを示す。等量のhEPO mRNA(マウス1匹当たり1.5 $\mu$ g)をマウスに送達した後、MC3-EV及びMC3-LNPをhEPOタンパク質の産生について比較した。臓器において、LNPからのhEPOタンパク質の量は、脾臓を除いてEVと概ね同等であり、脾臓は、タンパク質産生に有意な差を示し、これに心臓が続いた(タンパク質のより小さい有意差を示した)。最も有意な差は、hEPOタンパク質の血漿レベルに認められ、これは、MC3-EV送達と比較して、MC3-LNP送達後で高かった。データは、各時点で、反復(散布図中で各反復を表す点)の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。パラメトリック独立2群両側t検定を用い、各時点の各臓器又は血漿について、EV処理及びLNP処理群を比較した。有意な値はP値として示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 、 $**** P < 0.0001$ 。

【図6A】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインIL-6のレベルを示す。1.5 $\mu$ gのhEPO mRNAを含有する100 $\mu$ LのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)をマウスに静脈内注射した。MC3-EV、MC3-LNP、又はPBSの注射から5時間及び24時間後に、MILLIPILEX(登録商標)MAP Mouse Cytokine磁気ビーズキットにより、マウス血漿中のIL-6の濃度を決定した。データは、各時点で、4匹のマウス( $n=4$ )から表示される。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。1元配置分散分析(one-way ANOVA)検定、続いてシダック(Sidak)の多重比較検定を実施した。有意な値はP値として示す。

10

20

30

40

50

【図6B】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインIP-10のレベルを示す。1.5μgのhEPO mRNAを含有する100μLのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)をマウスに静脈内注射した。MC3-EV、MC3-LNP、又はPBSの注射から5時間及び24時間後に、マウス血漿中のIP-10の濃度を決定した。データは、各時点で、4匹のマウス(n=4)から表示される。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。1元配置分散分析(one-way ANOVA)検定、続いてシダック(Sidak)の多重比較検定を実施した。有意な値はP値として示す。

【図6C】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインRANTESのレベルを示す。1.5μgのhEPO mRNAを含有する100μLのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)をマウスに静脈内注射した。MC3-EV、MC3-LNP、又はPBSの注射から5時間及び24時間後に、マウス血漿中のRANTESの濃度を決定した。データは、各時点で、4匹のマウス(n=4)から表示される。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。1元配置分散分析(one-way ANOVA)検定、続いてシダック(Sidak)の多重比較検定を実施した。有意な値はP値として示す。

【図6D】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインMCP-1のレベルを示す。1.5μgのhEPO mRNAを含有する100μLのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)をマウスに静脈内注射した。MC3-EV、MC3-LNP、又はPBSの注射から5時間及び24時間後に、マウス血漿中のMCP-1の濃度を決定した。データは、各時点で、4匹のマウス(n=4)から表示される。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。1元配置分散分析(one-way ANOVA)検定、続いてシダック(Sidak)の多重比較検定を実施した。有意な値はP値として示す。

【図6E】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインKCのレベルを示す。1.5μgのhEPO mRNAを含有する100μLのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)をマウスに静脈内注射した。MC3-EV、MC3-LNP、又はPBSの注射から5時間及び24時間後に、マウス血漿中のKCの濃度を決定した。データは、各時点で、4匹のマウス(n=4)から表示される。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。1元配置分散分析(one-way ANOVA)検定、続いてシダック(Sidak)の多重比較検定を実施した。有意な値はP値として示す。

【図6F】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインIL-1-のレベルを示す。1.5μgのhEPO mRNAを含有する100μLのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)をマウスに静脈内注射した。MC3-EV、MC3-LNP、又はPBSの注射から5時間及び24時間後に、マウス血漿中のIL-1-の濃度を決定した。データは、各時点で、4匹のマウス(n=4)から表示される。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。1元配置分散分析(one-way ANOVA)検定、続いてシダック(Sidak)の多重比較検定を実施した。有意な値はP値として示す。

【図6G】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインTNF-のレベルを示す。1.5μgのhEPO mRNAを含有する100μLのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)をマウスに静脈内注射した。MC3-EV、MC3-LNP、又はPBSの注射から5時間及び24時間後に、マウス血漿中のTNF-の濃度を決定した。データは、各時点で、4匹のマウス(n=4)から表示される。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。1元配置分散分析(one-way ANOVA)検定、続いてシダック(Sidak)の多重比較検定を実施した。有意な値はP値として示す。

【図6H】MC3-EV及びMC3-LNP送達後のマウス血漿中のサイトカインIFN-のレベルを示す。1.5μgのhEPO mRNAを含有する100μLのMC3-

10

20

30

40

50

E V 又は M C 3 - L N P ( マウス 1 匹当たり ) をマウスに静脈内注射した。 M C 3 - E V 、 M C 3 - L N P 、又は P B S の注射から 5 時間及び 24 時間後に、マウス血漿中の I F N - の濃度を決定した。データは、各時点で、4 匹のマウス ( n = 4 ) から表示される。散布図中の各点は、各反復 ( マウス ) を表す。 1 元配置分散分析 ( one-way ANOVA ) 検定、続いてシダック ( Sidak ) の多重比較検定を実施した。有意な値は P 値として示す。

【図 7 A】ヒトの L N P の想定上の運命の例示的な概略図を示す。

【図 7 B】 h E P O m R N A は、酸性環境 ( pH 5.8 又は 6.6 ) において L N P から放出されないことを示す。対照的に、生理的 pH ( 7.4 ) では、 L N P の h E P O m R N A 及び脂質成分は解離する。

【図 7 C】 L N P - エンドソームの想定上の運命の例示的な概略図を示す。

【図 8 A】 2 つの異なるイオン化脂質、 D L i n - M C 3 - D M A 及び D L i n - D M A を含む例示的な脂質ナノ粒子 ( L N P ) の構造を示す。

【図 8 B】 細胞増殖に対する L N P の効果を示す。独立した実験で、各々 100 μg の h E P O m R N A を含有する D D - L N P 又は M C 3 - L N P を、レシピエント細胞に移入した。また、 h E P O m R N A を含まない対照 L N P でも細胞を処理した。 L N P 処理から 96 時間後に、細胞を採取し、計数した後、細胞世代時間 ( 細胞の集団が倍加するまでの時間 ( hr ) ) を、 L N P 処理間隔の始点及び終点での細胞数の差 ( N ( 細胞数の変化 ) として定義される ) に基づいて算出した。数 ( n ) は、各処理について評価した生物学的反復を表す。 1 元配置分散分析 ( one-way ANOVA ) 検定、続いてテューキー ( Tukey ) の多重比較検定を用いて、各群の間の有意な差を評価した ( 有意な P 値 < 0.05 )。有意な P 値のみを示す : \* P < 0.05 、 \*\* P < 0.01 、 \*\*\* P < 0.001 、 \*\*\*\* P < 0.0001 。

【図 8 C】 全細胞 R N A に対する L N P の作用を示す。 L N P 処理から 96 h 後に、全細胞 R N A を定量し、 N に対して正規化した。数 ( n ) は、各処理について評価された生物学的反復を表す。 1 元配置分散分析 ( one-way ANOVA ) 検定、続いてテューキー ( Tukey ) の多重比較検定を用いて、各群の間の有意な差を評価した ( 有意な P 値 < 0.05 )。有意な P 値のみを示す : \* P < 0.05 、 \*\* P < 0.01 、 \*\*\* P < 0.001 、 \*\*\*\* P < 0.0001 。

【図 8 D - 8 E】 全細胞内タンパク質 ( 図 8 D ) 及び全分泌タンパク質 ( 図 8 E ) に対する L N P の作用を示す。 L N P 処理から 96 時間後に、全細胞タンパク質 ( 細胞内及び分泌 ) を定量し、 N に対して正規化した。数 ( n ) は、各処理について評価された生物学的反復を表す。 1 元配置分散分析 ( one-way ANOVA ) 検定、続いてテューキー ( Tukey ) の多重比較検定を用いて、各群の間の有意な差を評価した ( 有意な P 値 < 0.05 )。有意な P 値のみを示す : \* P < 0.05 、 \*\* P < 0.01 、 \*\*\* P < 0.001 、 \*\*\*\* P < 0.0001 。

【図 8 F】 E V 中の全 R N A に対する L N P の作用を示す。 L N P 処理から 96 時間後に、 E V 中の全 R N A を定量し、 N に対して正規化した。数 ( n ) は、各処理について評価された生物学的反復を表す。 1 元配置分散分析 ( one-way ANOVA ) 検定、続いてテューキー ( Tukey ) の多重比較検定を用いて、各群の間の有意な差を評価した ( 有意な P 値 < 0.05 )。有意な P 値のみを示す : \* P < 0.05 、 \*\* P < 0.01 、 \*\*\* P < 0.001 、 \*\*\*\* P < 0.0001 。

【図 8 G】 E V 中の全タンパク質に対する L N P の作用を示す。 L N P 処理から 96 時間後に、 E V 中の全タンパク質を定量し、 N に対して正規化した。数 ( n ) は、各処理について評価された生物学的反復を表す。 1 元配置分散分析 ( one-way ANOVA ) 検定、続いてテューキー ( Tukey ) の多重比較検定を用いて、各群の間の有意な差を評価した ( 有意な P 値 < 0.05 )。有意な P 値のみを示す : \* P < 0.05 、 \*\* P < 0.01 、 \*\*\* P < 0.001 、 \*\*\*\* P < 0.0001 。

【図 9】 L N P から E V への h E P O m R N A の直接移入の評価を示す。 h E P O m R N A を含有する M C 3 - L N P 及び D D - L N P を、いずれの事前の処理も受けていな

い（細胞の非存在下で）EVと一緒に、30mLのPBS中に37で2時間インキュベートした。2つの異なる割合のEV及びLNPをインキュベートした：200μgのEV + 300μLのLNP（1×）、及び50μgのEV + 300μLのLNP（4×）。2時間のインキュベーション後、超遠心分離によりEVを再度単離した。EVからの全RNAを単離し、qPCRによりhEPO mRNAを定量して、LNPからEVへのhEPO mRNAの直接移入を評価した。陽性対照として、EVの非存在下で、等量のDD-LNP又はMC3-LNPをPBS中でインキュベートした後、超遠心分離した。全RNAを単離し、hEPO mRNAをqPCRにより定量した。並列実験において、hEPO mRNAを含有するMC3-LNP及びDD-LNPを細胞に移入し、EVを細胞から単離し；EVからの全RNAを単離し、qPCRによりhEPO mRNAを定量して、LNP処理細胞からのEV中のhEPO mRNAを評価した。略語：dd-EV若しくはmc3-EV、細胞由来-hEPO mRNAを含有するDD-LNP又はMC3-LNPで処理した細胞により産生されるEV；混合EV + LNP（×1）-300μLのLNPと混合したEV（200μg）；混合EV + LNP（×4）-300μLのLNPと混合したEV（50μg）；LNP、w/oEV-hEPO mRNAを含有するLNPのみ、EVと混合されていない。生物学的三重反復で、実験を実施した。データは、LNPにより細胞に送達されたmRNAの初期量又はEVと直接混合されたmRNAの量に対する、細胞へのLNP処理後若しくはLNPとEVのインキュベーション（直接混合）後にEV中に検出されたhEPO mRNAのパーセンテージとして表示される。反復の標準偏差（SD）を伴う平均値が示される。

【図10A】EVによる細胞へのhEPO mRNAの送達及び細胞質中の翻訳タンパク質の検出を示す。hEPO mRNAが組み込まれたMC3-EV（MC3-LNP処理細胞由来）、又はhEPO mRNAが組み込まれたDD-EV（DD-LNP処理細胞由来）をHTB-177レシピエント細胞に移入した。hEPO mRNAを含まないEV（非処理細胞から取得）、及びhEPO mRNAを含まないLNPを対照として送達した。hEPO mRNAの送達から96時間後に、ヒトエリスロポエチンに特異的なELISAにより、細胞溶解物中でhEPOタンパク質を定量した。細胞溶解物中のhEPOタンパク質の量は、N（細胞数の変化、すなわち、LNP処理間隔の始点及び終点での細胞の数の差として定義される）に対して正規化した。データは、各時点での2回の（n=2）反復から表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。

【図10B】EVによる細胞へのhEPO mRNAの送達及び分泌タンパク質の検出を示す。hEPO mRNAの送達から96時間後に、ヒトエリスロポエチンに特異的なELISAを用いて、培養した馴化培地の上清中で、分泌されたhEPOタンパク質のレベルを定量した。上清中のhEPOタンパク質の量は、Nに対して正規化した。データは、各時点での2回の（n=2）反復から表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。

【図10C】細胞及び上清中で定量され、Nに対して正規化されたhEPOタンパク質の合計を示す。データは、各時点での2回の（n=2）反復から表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。

【図10D】EV処理物との96時間の培養後の、レシピエント細胞の世代時間を示す。データは、各時点での2回の（n=2）反復から表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。

【図10E】Nに対して正規化された全細胞タンパク質を示す。データは、各時点での2回の（n=2）反復から表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。

【図10F】Nに対して正規化された上清中の全細胞タンパク質を示す。データは、各時点での2回の（n=2）反復から表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。

【図11】EVを介した上皮細胞及び初代免疫細胞へのCy5-EGFP-mRNAの送達のFACS分析を示す。上皮細胞（カラム1）：76μgのCy5-EGFP-mRNAを含有するDD-LNPをヒト上皮（HTB-177）細胞に移入した後、96時間のLNP処理後、これらの細胞からEV（mRNAが組み込まれたDD-EV）を単離した。78μgのCy5-EGFP-mRNA含有DD-EVをHTB-177細胞（ウェル

10

20

30

40

50

当たり  $2 \times 10^5$  細胞で培養)に移入した。EV 移入後様々な間隔(2時間、24時間、48時間)で細胞を採取して、細胞中の Cy5 - EGF P - mRNA の存在を FACS により分析した。初代免疫細胞(カラム 2~4): 健康なヒトバフィーコートから単離した末梢血単核細胞(PBMC)を培養し(ウェル当たり  $2 \times 10^5$  細胞)、78 μg の Cy5 - EGF P - mRNA 含有 DD-EV を PBMC に移入した。EV 移入後様々な間隔(2時間、24時間、48時間)で細胞を採取して、CD19(B細胞)、CD3(T細胞)、及び CD14(单球)に対する表面マーカのモノクローナル抗体(mAb)で染色した。FACS 分析を実施して、レシピエント細胞中の Cy5 - EGF P - mRNA を検出した後、各細胞型に特異的な CY5 - 蛍光及び抗体 - 蛍光に基づいて、各細胞型における Cy5 - EGF P - mRNA の存在を推定した。FACS ドットプロットは、各時点での FCS - A(x 軸)に対する Cy5 - EGF P - mRNA(y 軸)を表す。Cy5 - EGF P - mRNA に陽性の細胞は、右上象限に掲示する。略語: 細胞 w/o EV - 非処理細胞; 細胞 + EV (w/o mRNA) - mRNA を含有しない EV で処理した細胞; 細胞 + EV (mRNA を含む) - mRNA を含有する EV で処理した細胞。

【図 12】ヒトエリスロポエチン(hEPO)に対する特異性を確認すると共に、マウス血漿 EPO タンパク質とその交差反応性を検定するためのヒトエリスロポエチン E LI SA キット(STEMCELL Technologies)の試験を示す。非処理マウスからの血漿及び正常なヒトからの新鮮な血漿(いずれも非希釈及び希釈済(2× - 2倍: 10× - 10 倍))を試験した。マウス血漿中の hEPO についてはシグナルが検出されなかった。

【図 13】MC3 - LNP を介した hEPO mRNA の送達後のマウス血液中の hEPO タンパク質の検出を示す。マウスには、1.5 μg の hEPO mRNA (マウス 1 匹当たり) を含有する 100 μL の MC3 - LNP、又は対照として等量の PBS を静脈内注射した。マウス血漿中の hEPO タンパク質の濃度は、注射から 0 時間、2 時間、5 時間、及び 24 時間後、ELISA により決定した。2 時間時点(n = 4)を除いて、8 匹のマウス(n = 8)からデータを表示する。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。非処理マウス(PBS)の数は n = 8 であった。パラメトリック独立両側 t 検定を用いて、2 時間及び 5 時間の間で、MC3 - LNP 送達からの血漿 hEPO タンパク質を比較した(\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.001、及び ns = 非有意)。

【図 14 A - 14 B】マウス心臓における hEPO mRNA(図 14 A) 及び hEPO タンパク質(図 14 B) の定量を示す。マウスには、1.5 μg の hEPO mRNA を含有する 100 μL の MC3 - LNP (マウス 1 匹当たり)、又は対照として等量の PBS を静脈内注射した。hEPO mRNA 及び hEPO タンパク質のレベルは、注射から 5 時間、24 時間、及び 96 時間後、それぞれ RT - qPCR 及び ELISA により定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出された hEPO mRNA 又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理(LNP 又は PBS)について、4 匹のマウス(n = 4)を使用した。データは、各時点で、4 回の反復(n = 4)の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側 t 検定を用いて、MC3 - LNP 及び PBS 群を比較した。有意な P 値のみを示す: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001。

【図 14 C - 14 D】マウス肺における hEPO mRNA(図 14 C) 及び hEPO タンパク質(図 14 D) の定量を示す。マウスには、1.5 μg の hEPO mRNA を含有する 100 μL の MC3 - LNP (マウス 1 匹当たり)、又は対照として等量の PBS を静脈内注射した。hEPO mRNA 及び hEPO タンパク質のレベルは、注射から 5 時間、24 時間、及び 96 時間後、それぞれ RT - qPCR 及び ELISA により定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出された hEPO mRNA 又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理(LNP 又は PBS)について、4 匹のマウス(n = 4)を使用した。データは、各時点で、4 回の反復(n = 4)

10

20

30

40

50

) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側 t 検定を用いて、M C 3 - L N P 及び P B S 群を比較した。有意な P 値のみを示す：\* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 、 \*\*\*\* P < 0 . 0 0 0 1 。

【図 1 4 E - 1 4 F】マウス肝臓における h E P O m R N A ( 図 1 4 E ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 1 4 F ) の定量を示す。マウスには、1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A を含有する 1 0 0  $\mu$  L の M C 3 - L N P ( マウス 1 匹当たり ) 、又は対照として等量の P B S を静脈内注射した。h E P O m R N A 及び h E P O タンパク質のレベルは、注射から 5 時間、 2 4 時間、及び 9 6 時間後、それぞれ R T - q P C R 及び E L I S A により定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出された h E P O m R N A 又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理 ( L N P 又は P B S ) について、4 匹のマウス ( n = 4 ) を使用した。データは、各時点で、4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側 t 検定を用いて、M C 3 - L N P 及び P B S 群を比較した。有意な P 値のみを示す：\* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 、 \*\*\*\* P < 0 . 0 0 0 1 。

【図 1 4 G - 1 4 H】マウス脾臓における h E P O m R N A ( 図 1 4 G ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 1 4 H ) の定量を示す。マウスには、1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A を含有する 1 0 0  $\mu$  L の M C 3 - L N P ( マウス 1 匹当たり ) 、又は対照として等量の P B S を静脈内注射した。h E P O m R N A 及び h E P O タンパク質のレベルは、注射から 5 時間、 2 4 時間、及び 9 6 時間後、それぞれ R T - q P C R 及び E L I S A により定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出された h E P O m R N A 又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理 ( L N P 又は P B S ) について、4 匹のマウス ( n = 4 ) を使用した。データは、各時点で、4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側 t 検定を用いて、M C 3 - L N P 及び P B S 群を比較した。有意な P 値のみを示す：\* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 、 \*\*\*\* P < 0 . 0 0 0 1 。

【図 1 4 I - 1 4 J】マウス腎臓における h E P O m R N A ( 図 1 4 I ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 1 4 J ) の定量を示す。マウスには、1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A を含有する 1 0 0  $\mu$  L の M C 3 - L N P ( マウス 1 匹当たり ) 、又は対照として等量の P B S を静脈内注射した。h E P O m R N A 及び h E P O タンパク質のレベルは、注射から 5 時間、 2 4 時間、及び 9 6 時間後、それぞれ R T - q P C R 及び E L I S A により定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出された h E P O m R N A 又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理 ( L N P 又は P B S ) について、4 匹のマウス ( n = 4 ) を使用した。データは、各時点で、4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側 t 検定を用いて、M C 3 - L N P 及び P B S 群を比較した。有意な P 値のみを示す：\* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 、 \*\*\*\* P < 0 . 0 0 0 1 。

【図 1 4 K - 1 4 L】マウス胸腺における h E P O m R N A ( 図 1 4 K ) 及び h E P O タンパク質 ( 図 1 4 L ) の定量を示す。マウスには、1 . 5  $\mu$  g の h E P O m R N A を含有する 1 0 0  $\mu$  L の M C 3 - L N P ( マウス 1 匹当たり ) 、又は対照として等量の P B S を静脈内注射した。h E P O m R N A 及び h E P O タンパク質のレベルは、注射から 5 時間、 2 4 時間、及び 9 6 時間後、それぞれ R T - q P C R 及び E L I S A により定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出された h E P O m R N A 又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理 ( L N P 又は P B S ) について、4 匹のマウス ( n = 4 ) を使用した。データは、各時点で、4 回の反復 ( n = 4 ) の標準偏差 ( S D ) を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側 t 検定を用いて、M C 3 - L N P 及び P B S 群を比較した。有意な P 値のみを示す：\* P < 0 . 0 5 、 \*\* P < 0 . 0 1 、 \*\*\* P < 0 . 0 0 1 、 \*\*\*\* P < 0 . 0 0 0 1 。

10

20

30

40

50

S群を比較した。有意なP値のみを示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 、 $**** P < 0.0001$ 。

【図14M-14N】マウス脾臓におけるhEPO mRNA(図14M)及びhEPOタンパク質(図14N)の定量を示す。マウスには、1.5 μgのhEPO mRNAを含有する100 μLのMC3-LNP(マウス1匹当たり)、又は対照として等量のPBSを静脈内注射した。hEPO mRNA及びhEPOタンパク質のレベルは、注射から5時間、24時間、及び96時間後、それぞれRT-qPCR及びELISAにより定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出されたhEPO mRNA又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理(LNP又はPBS)について、4匹のマウス(n=4)を使用した。データは、各時点で、4回の反復(n=4)の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側t検定を用いて、MC3-LNP及びPBS群を比較した。有意なP値のみを示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 、 $**** P < 0.0001$ 。

【図14O-14P】マウス脳におけるhEPO mRNA(図14O)及びhEPOタンパク質(図14P)の定量を示す。マウスには、1.5 μgのhEPO mRNAを含有する100 μLのMC3-LNP(マウス1匹当たり)、又は対照として等量のPBSを静脈内注射した。hEPO mRNA及びhEPOタンパク質のレベルは、注射から5時間、24時間、及び96時間後、それぞれRT-qPCR及びELISAにより定量した。データは、臓器重量に対して正規化した、全臓器中で検出されたhEPO mRNA又はタンパク質の総量として表示される。各時点、及び各種処理(LNP又はPBS)について、4匹のマウス(n=4)を使用した。データは、各時点で、4回の反復(n=4)の標準偏差(SD)を伴う平均値として表示される。散布図中の各点は、各反復を表す。各時点について、パラメトリック独立両側t検定を用いて、MC3-LNP及びPBS群を比較した。有意なP値のみを示す： $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$ 、 $**** P < 0.0001$ 。

【図15A-15H】MC3-EV又はMC3-LNPを介したヒトEPO mRNAのインビオ送達後の臓器重量を示す。マウスには、1.5 μgのhEPO mRNAを含有する100 μLのMC3-EV又はMC3-LNP(マウス1匹当たり)、又は対照として等量のPBSを静脈内注射した。注射から5時間、24時間、及び96時間後、各マウス臓器：胸腺(図15A)、腎臓(図15B)、心臓(図15C)、肝臓(図15D)、脾臓(図15E)、脳(図15F)、肺(図15G)及び肺(図15H)の重量を決定した。各注射(PBS、EV、LNP)の間に明らかな差は認められなかった。処理(MC3-EV、MC3-LNP)及び非処理(PBS)群について、4匹のマウス(n=4)を使用した。略語：PBS-非処理マウス；EV-hEPO mRNAを含有するMC3-EV；LNP-hEPO mRNAを含有するMC3-LNP。データは、標準偏差(SD)を伴う平均値として示す。散布図中の各点は、各反復(マウス)を表す。

【図16A-16B】非処理又はMC3-LNP処理HTB-177細胞由来の単離EVのナノ粒子トラッキング解析(NTA)の結果を示す。図16Aは、非処理HTB-177細胞(n=3、(i)~(iii))由来のEVの粒度分布及び濃度を示す。図16Bは、MC3-LNP処理HTB-177細胞(n=3、(i)~(iii))由来のEVの粒度分布及び濃度を示す。平均粒径、モードサイズ、標準偏差(SD)、D10、D50、D90、及び粒子濃度を表3~8に示す。

【図17A-17B】LNP処理細胞から得られるEVの特性決定を示す。図17Aは、CD9(x軸)に対するCy5-mRNA(y軸)を表すFACドットプロットを示す。Cy5-mRNAを含有するCD63/CD9陽性EVのパーセンテージを右上象限に表示する。EVの代わりにPBSとインキュベートしたビーズ単独を陰性対照として示す。2つの生物学的反復の1つを示す。図17Bは、対照の純粋なhEPO mRNA(細胞フリー及びEVフリー(左側))又はMC3-EV(右側)に対するRNase処理の作用を示す。実験は、3回の生物学的反復(n=3)で実施され、hEPO mRNA q

10

20

30

40

50

PCRデータを散布ドットプロット及び平均標準偏差(SD)として表す。

【図18】エタノール、1% (w/w) トリトンX-100、及び定量の「空の」EVを添加した1% (w/w) トリトンX-100中で調製したDlin-MC3-DMAサンプルのUPLC-MS分析の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本開示をさらにわかりやすくするために、詳細な説明全体を通して、特定の用語を定義する。本明細書に他に定義されない限り、本開示に関連して使用される全ての科学及び技術用語は、当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。

【0040】

本明細書で使用される通り、用語「細胞外小胞」又は「EV」は、細胞から分泌又は放出されるナノ若しくはミクロサイズの膜小胞を指す。EVは、脂質二重層により封入され、粒径約30nm~10,000nmの範囲のサイズである。特定の実施形態では、EVは、エキソソームである。

【0041】

本明細書で使用される通り、用語「エキソソーム」及び「エンド-EV」は、本明細書で置き換える可能に使用されて、エンドソーム由来のEVを指す。特定の理論に拘束されるものではないが、細胞又は他の細胞成分により貪食された物質は、エンドソームコンパートメントに分別され得て、腔内膜小胞(多胞性エンドソーム又は多胞体(MVB))を形成すると考えられる。続いて、これらの小胞は、MVBと細胞膜との融合時に、細胞外環境に放出され得る。放出された小胞は、本明細書において、エキソソームと呼ばれ得る。一部の実施形態では、エキソソームは、LNPの食作用後に細胞から分泌又は放出される。一部の実施形態では、LNPと接触させるか、又はそれで処理した細胞から分泌又は放出したエキソソームは、1つ以上のLNP成分(例えば、1つ以上のイオン化脂質及び/又は1つ以上の修飾RNA)を含み得る。一部の実施形態では、エキソソームは、エキソサイトシス経路を介して分泌される。一部の実施形態では、エキソソームは、約30nm~約300nmの直径を有する。一部の実施形態では、エキソソームは、約30nm~約150nmの直径を有する。一部の実施形態では、エキソソームは、約40nm~約150nmの直径を有する。一部の実施形態では、エキソソームは、約40nm~約120nmの直径を有する。例示的なエキソソームとしては、本明細書に記載及び例示されるように、MC3-EV及びDD-EVがある。

【0042】

本明細書で使用される場合、用語「エンドソームからの脱出」は、エンドサイトシス後に、エンドソーム経路から出て、細胞質に入るRNAを指す。エンドサイトシス経路は、DNA、RNA、若しくはタンパク質などの生物学的作用物質の主な細胞取込み機序であると考えられる。こうした物質は、エンドソーム内に閉じ込められて、リソソーム内の特定の酵素により分解される。従って、一部の実施形態では、有効な生物学的療法を達成する際の制限ステップは、治療薬(例えば、修飾RNA、例えば、mRNA)のエンドソームからの脱出を促進し、しかも、それらの細胞質送達を確実にすることである。一部の実施形態では、LNPを介して細胞に送達される全修飾RNAの約1%未満が、エンドソームからの脱出を経て、細胞質に放出され得る。一部の実施形態では、LNP成分の一部(例えば、非脱出修飾RNA及び/又はLNP脂質成分の一部)は、LNPエンドサイトシス後、最終的に、細胞から分泌されるエキソソーム内に到達する。

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「脂質ナノ粒子」又は「LNP」は、1つ以上の脂質及び1つ以上の治療薬(例えば、1つ以上の修飾RNA)を含むナノ粒子である。ナノ粒子は、典型的に、マイクロメートルほどの、又はそれを下回る大きさである。一部の実施形態では、本明細書に開示されるLNPは、直径約200nm以下、直径約150nm以下、直径約100nm以下、直径約75nm以下、又は直径約50nm以下の平均粒径を有する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるLNPは、エタノール中の脂質含有

10

20

30

40

50

溶液と、修飾RNA（例えば、mRNA）を含有する水溶液とのマイクロ流体混合により生成される高電子密度ナノ構造コアを有する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるLNPには、50体積%を超える連続水性領域がないため、単ラメラ小胞などの通常のリポソームを排除する。

【0044】

様々な実施形態において、単離エキソソームは、以下：(a)修飾RNAを含む1つ以上の脂質ナノ粒子(LNP)を提供するステップ；(b)細胞によるLNP取込みを可能にする条件下で、1つ以上の細胞をLNPと接触させるステップ；及び(c)1つ以上の細胞により產生されるエキソソームを単離するステップを含むプロセスにより調製することができ、ここで、少なくとも1つの単離エキソソームは、修飾RNAを含む。

10

【0045】

様々な実施形態において、LNPは、約50nm～約100nm、例えば、約60nm～約90nm、約70nm～約80nm、又は約80nm～約90nmの平均粒径を有する。一部の実施形態では、LNPは、約70nm、約71nm、約72nm、約73nm、約74nm、約75nm、約76nm、約77nm、約78nm、約79nm、約80nm、約81nm、約82nm、約83nm、約84nm、約85nm、約86nm、約87nm、約88nm、約89nm、又は約90nmの平均粒径を有する。一部の実施形態では、LNPは、約83nm、約84nm、約85nm、約86nm、約87nm、又は約88nmの平均粒径を有する。

20

【0046】

様々な実施形態において、LNPは、約0.01～約0.15、例えば、約0.01、約0.02、約0.03、約0.04、約0.05、約0.06、約0.07、約0.08、約0.09、約0.10、約0.11、約0.12、約0.13、約0.14、又は約0.15の多分散指数(PDI)を有する。本明細書で使用される場合、用語「多分散指数」又は「PDI」は、ナノ粒子サンプル中のナノ粒子の分布の尺度を指す(NIST Special Publication 1200-6, "Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch Mode Dynamic Light Scattering"を参照)。

30

【0047】

様々な実施形態において、LNPは、約80%以上、約85%以上、約90%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上、又は約99%以上の修飾RNAの封入効率(%EE)を有する。本明細書で使用される場合、用語「封入効率」又は「%EE」は、組成物中の総修飾RNA含量に対するLNP中に封入された修飾RNAの比を指し、これは、界面活性剤、例えば、Triton X-100を用いたLNPの溶解により測定される。

【0048】

様々な実施形態において、LNPは、脂質成分と、少なくとも1つの修飾RNAを含む。様々な実施形態において、1つ以上の細胞をLNP（例えば、本明細書に開示されるLNPのいずれか）と接触させることによって生成される1つ以上のエキソソームは、脂質成分と、少なくとも1つの修飾RNAを含む。様々な実施形態において、エキソソームの脂質成分は、少なくとも部分的に、LNPの脂質成分に由来し得る。様々な実施形態において、エキソソームの脂質成分は、LNPの脂質成分と同じ1つ以上の脂質を含み得る。

40

【0049】

本明細書で使用される場合、用語「脂質成分」は、1つ以上の脂質を含むLNP及び/又はエキソソームの成分を指す。例えば、本明細書に開示されるLNP及び/又はエキソソームの脂質成分は、1つ以上のイオン化脂質、1つ以上のリン脂質、1つ以上の構造脂質、及び/又は1つ以上のPEG脂質を含み得る。様々な実施形態において、LNP及び/又はエキソソームの脂質成分は、脂質単層及び/又は脂質二重層を含み得る。

【0050】

50

様々な実施形態において、LNPの脂質成分は、通常のナノ粒子技術で使用される任意の材料、例えば、イオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び／又はPEG脂質から構成され得る。様々な実施形態において、LNPの脂質成分に存在する少なくとも1つの脂質は、エキソソームの脂質成分中にも存在し、この場合、エキソソームは、1つ以上の細胞をLNPと接触させることによって生成される。

【0051】

様々な実施形態において、本明細書に開示されるLNP及び／又はエキソソームの脂質成分は、1つ以上のイオン化脂質を含み得る。

【0052】

イオン化脂質の非限定的例として、例えば、酸性pHで陽電荷を含む脂質、例えば、1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-DMA)、ジリノレイルメチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA；例えば、参考により本明細書に組み込まれる米国特許第8,158,601号明細書を参照)、2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、Merck-32(例えば、参考により本明細書に組み込まれる国際公開第2012/018754号パンフレットを参照)、Accuitas-5(例えば、参考により本明細書に組み込まれる国際公開第2015/199952号パンフレットを参照)、KL-10(例えば、参考により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2012/0295832号明細書を参照)、C12-200(例えば、Love et al.(2009)PNAS 107(5):1864-69)などが挙げられる。様々な実施形態において、イオン化脂質は、DLin-MC3-DMAである。様々な実施形態において、イオン化脂質は、DLin-DMAである。

【0053】

一部の実施形態では、LNPは、少なくとも1つのイオン化脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのイオン化脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約5%～約90%、約10%～約80%、約25%～約75%、又は約40%～約60%、例えば、約50%(モルパーセント)の範囲の量でLNP中に存在する。一部の実施形態では、少なくとも1つのイオン化脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約50%(モルパーセント)の量でLNP中に存在する。一部の実施形態では、少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-MC3-DMAである。一部の実施形態では、少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-DMAである。

【0054】

本明細書で使用される場合、用語「MC3-LNP」は、イオン化脂質の大部分：DLin-MC3-DMAイオン化脂質を含むLNPを指すために用いられ得る。

【0055】

本明細書で使用される場合、用語「DD-LNP」は、イオン化脂質の大部分：DLin-DMAイオン化脂質を含むLNPを指すために用いられ得る。

【0056】

一部の実施形態では、エキソソームは、少なくとも1つのイオン化脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-MC3-DMAである。一部の他の実施形態では、少なくとも1つのイオン化脂質は、DLin-DMAである。

【0057】

本明細書で使用される場合、用語「MC3-EV」は、MC3-LNPと接触させるか、又はそれで処理した細胞から単離したエキソソーム(EV)を示すために用いられ得る。

【0058】

本明細書で使用される場合、用語「DD-EV」は、DD-LNPと接触させるか、又はそれで処理した細胞から単離したエキソソーム(EV)を示すために用いられ得る。

【0059】

様々な実施形態において、本明細書に開示されるLNP及び／又はエキソソームの脂質

10

20

30

30

40

50

成分は、1つ以上のリン脂質を含み得る。様々な実施形態において、リン脂質は、1つ以上の脂質二重層にアセンブルされ得る。一般に、リン脂質は、リン酸部分及び1つ以上の炭素鎖、例えば、飽和脂肪酸鎖を含み得る。様々な実施形態において、リン脂質は、1つ以上の多重（例えば、二重又は三重）結合（すなわち、1つ以上の不飽和）を含み得る。様々な実施形態において、リン脂質は、膜との融合を促進し得る。様々な実施形態において、膜へのリン脂質の融合は、脂質含有組成物の1つ以上の要素が膜を通過するのを可能にし、これにより、例えば、1つ以上の要素の細胞への送達を可能にし得る。

#### 【0060】

例示的なリン脂質として、限定されないが、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DLPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-ホスホコリン(DMPC)、1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン(DUPC)、1-パルミトイール-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、1,2-ジ-O-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(18:0ジエーテルPC)、1-オレオイル-2-コレステリルヘミサクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(OChemsPC)、1,2-ジキサデシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(C16LysoPC)、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(ME16.0PE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-ラク-(1-グリセロ)ナトリウム塩(DOPG)、及びスフィンゴミエリンが挙げられる。様々な実施形態において、リン脂質は、DSPCである。

10

20

30

#### 【0061】

例示的なリン脂質には、例えば、生理的pHでゼロ実効電荷を含む中性脂質も挙げられる。中性脂質の非限定的な例として、生理的pHで非荷電型又は中性双性イオン型で存在する脂質、例えば、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-ホスホコリン(DMPC)などが挙げられる。様々な実施形態において、リン脂質は、DSPCである。

#### 【0062】

一部の実施形態では、LNPは、少なくとも1つのリン脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのリン脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約1%～約50%、約5%～約20%、約7.5%～約12.5%、例えば、約10%（モルパーセント）の範囲の量でLNP中に存在してもよい。一部の実施形態では、少なくとも1つのリン脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約10%（モルパーセント）でLNP中に存在する。一部の実施形態では、少なくとも1つのリン脂質は、DSPCである。

40

#### 【0063】

一部の実施形態では、エキソソームは、少なくとも1つのリン脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのリン脂質は、DSPCである。

#### 【0064】

様々な実施形態において、本明細書に開示されるLNP及び/又はエキソソームの脂質

50

成分は、1つ以上の構造脂質を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「構造脂質」は、ステロール（例えば、動物ステロール、植物ステロール、真菌ステロール）などの脂質成分の構造若しくは流動性を安定化及び／又は維持することができる分子を指す。例示的な構造脂質は、コレステロールである。

【0065】

構造脂質の非限定的な例として、例えば、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スティグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、トコフェロール、及びそれらの混合物が挙げられる。様々な実施形態において、構造脂質は、コレステロールである。

【0066】

一部の実施形態では、LNPは、少なくとも1つの構造脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの構造脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約10%～約90%、約20%～約50%、約35%～約45%、例えば、約38.5%（モルパーセント）の範囲の量でLNP中に存在してもよい。一部の実施形態では、少なくとも1つの構造脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約38.5%（モルパーセント）でLNP中に存在する。一部の実施形態では、少なくとも1つの構造脂質は、コレステロールである。

【0067】

一部の実施形態では、エキソソームは、少なくとも1つの構造脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの構造脂質は、コレステロールである。

【0068】

様々な実施形態において、本明細書に開示されるLNP及び／又はエキソソームの脂質成分は、1つ以上のPEG又はPEG修飾脂質を含み得る。こうした脂質は、PEG化脂質と呼ばれる場合もある。様々な実施形態において、PEG脂質は、脂質部分とポリエチレングリコール部分の両方を含む。

【0069】

例示的なPEG脂質として、限定されないが、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物が挙げられる。例えば、様々な実施形態において、PEG脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG（1,2-ジミリストイル-OT-グリセロールメトキシポリエチレングリコール、Avanti Polar Lipidsから入手可能）、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、又はPEG-DSPEであってよい。様々な実施形態において、PEGの分子量は、約2,000Da（PEG2000）であってよい。様々な実施形態において、PEG脂質は、PEG2000-DMPE、PEG2000-DPPE、PEG2000-DMG、PEG2000-DPG、PEG2000-c-DOMG、又はPEG2000-C-DOPGであってよい。様々な実施形態において、PEG脂質は、PEG-DMPE又はPEG2000-DMPEである。様々な実施形態において、PEGの分子量は、約500～約10,000Da、又は約1,000～約5,000Daの範囲であってよい。

【0070】

一部の実施形態では、LNPは、少なくとも1つのPEG脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのPEG脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約0%～約20%、約0.5%～約5%、約1%～約2%、例えば、約1.5%（モルパーセント）の範囲の量でLNP中に存在する。一部の実施形態では、少なくとも1つのPEG脂質は、LNP中に存在する総脂質に対して、約1.5%（モルパーセント）でLNP中に存在する。一部の実施形態では、少なくとも1つのPEG脂質は、PEG-DMPE又はPEG2000-DMPEである。

【0071】

一部の実施形態では、エキソソームは、少なくとも1つのPEG脂質を含む。一部の実

10

20

30

40

50

施形態では、少なくとも 1 つの P E G 脂質は、 P E G - D M P E 又は P E G 2 0 0 0 - D M P E である。

【 0 0 7 2 】

様々な実施形態において、本明細書に開示される L N P は、複数の脂質成分を組み合わせることにより調製することができる。例えば、様々な実施形態において、イオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び P E G 脂質のうちの 1 つ以上を組み合わせることにより、 L N P を調製することができる。様々な実施形態において、イオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び P E G 脂質を組み合わせることにより、 L N P を調製することができ、ここで、 P E G 脂質は、 L N P 中に存在する総脂質に対して、約 1 . 5 % モルパーセントで、 L N P 中に存在する。様々な実施形態において、イオン化脂質（例えば、 D L i n - M C 3 - D M A 又は D L i n - D M A ）、リン脂質（例えば、 D S P C など）、構造脂質（コレステロールなど）、及び P E G 脂質（例えば、 P E G - D M P E など）を、存在する総脂質に対して、約 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 ( m o l / m o l ) のモル比で組み合わせることにより、 L N P を調製することができる。

10

【 0 0 7 3 】

本明細書に開示される L N P を含むイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び / 又は P E G 脂質の選択、並びにこうした脂質の互いに対する相対モル比は、選択した脂質の特徴、意図される標的細胞の性質、並びに送達しようとする修飾 R N A （例えば、 m R N A ）の特徴により決定することができる。例えば、一部の実施形態では、 L N P 中のイオン化脂質のモル比は、存在する総脂質に対して、約 1 0 % 超、約 2 0 % 超、約 3 0 % 超、約 4 0 % 超、約 5 0 % 超、約 6 0 % 超、又は約 7 0 % 超であってよい。一部の実施形態では、 L N P 中のリン脂質のモルパーセントは、存在する総脂質に対して、約 5 % 超、約 1 0 % 超、約 2 0 % 超、約 3 0 % 超、又は約 4 0 % 超であってよい。一部の実施形態では、 L N P 中の構造脂質のモルパーセントは、存在する総脂質に対して、約 1 0 % 超、約 2 0 % 超、約 3 0 % 超、約 4 0 % 超、又は約 5 0 % 超であってよい。一部の実施形態では、 L N P 中の P E G 脂質のモルパーセントは、存在する総脂質に対して、約 0 . 2 5 % 超、例えば、約 1 % 超、約 1 . 5 % 超、約 2 % 超、約 5 % 超、又は約 1 0 % 超であってよい。

20

【 0 0 7 4 】

様々な実施形態において、本明細書に開示される L N P は、所望される任意の有用な配向で、イオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び / 又は P E G 脂質の各々を含み得る。一部の実施形態では、 L N P のコアは、イオン化脂質及び構造脂質を含んでもよく、続いて、リン脂質及び / 又は P E G 脂質を含む 1 つ以上の層がコアを取り囲んでもよい。例えば、一部の実施形態では、 L N P は、イオン化脂質（例えば、 D L i n - M C 3 - D M A 又は D L i n - D M A ）及び構造脂質（例えば、コレステロール）を任意の特定の比で含有するコアを含んでもよく、これらは、任意の特定の厚さのリン脂質単層（例えば、 D S P C ）で囲まれ、さらに、任意の特定の厚さの外側 P E G 脂質単層により囲まれている。一部の実施形態では、意図される標的細胞の性質、並びに送達しようとする修飾 R N A 、例えば、 m R N A などの特徴に応じてコア又はそれに続く層のいずれか 1 つに、修飾 R N A （例えば、 m R N A ）を組み込むことができる。一部の実施形態では、コア及び外層は、当該技術分野で公知の L N P に典型的に組み込まれた他の成分をさらに含んでもよい。

30

【 0 0 7 5 】

加えて、一部の実施形態では、 L N P を含むイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び / 又は P E G 脂質のモルパーセントは、 1 つ以上の脂質の表面積といった L N P 全体の特定の物理的パラメータを提供するように、選択することもできる。例えば、一部の実施形態では、 L N P を含むイオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び / 又は P E G 脂質のモルパーセントは、リン脂質（例えば、 D S P C ）当たりの表面積を達成するように選択してもよい。一部の実施形態では、イオン化脂質、リン脂質、構造脂質、及び / 又は P E G 脂質のモルパーセントは、リン脂質（例えば、 D S P C ）当たりの表面積約 1 . 0 n m <sup>2</sup> ~ 約 2 . 0 n m <sup>2</sup> を達成するように決定してよい。

40

【 0 0 7 6 】

50

脂質成分以外にも、様々な実施形態では、本明細書に開示される LNP 及び / 又はエキソソームは、少なくとも 1 つの修飾 RNA ( 例えば、mRNA ) をさらに含む。

【 0077 】

本明細書で使用される場合、用語「修飾 RNA 」は、参照 ( 非修飾 ) RNA 配列 ( 例えば、天然に存在する同等物 ) に対して、修飾された任意のリボ核酸 ( RNA ) 配列を指す。一部の実施形態では、修飾 RNA は、参照 RNA と比較して、1 つ以上のヌクレオシド / ヌクレオチド置換、欠失、及び / 又は挿入を含む。一部の実施形態では、修飾 RNA は、参照 RNA と比較して、1 つ以上のヌクレオシド / ヌクレオチドに対する化学的変更を含む。一部の実施形態では、例えば、修飾 RNA は、N1 - メチル - プソイド - UMP を形成するように修飾される少なくとも 1 つのウリジン - リン酸 ( UMP ) を含み得る。一部の実施形態では、修飾 RNA 中の全ての UMP は、N1 - メチル - プソイド - UMP により置換されている。修飾 RNA は、必ずしも参照 RNA の物理的操縦を必要とするわけではない。修飾 RNA 配列が、参照 RNA 配列と比較して、少なくとも 1 つの修飾を含む限り、これは、どのようにしてそれが合成されたかにかかわらず、「修飾された」とみなされる。一部の実施形態では、修飾 RNA は、低分子量修飾 RNA である。一部の実施形態では、修飾 RNA は、高分子量修飾 RNA である。一部の実施形態では、修飾 RNA は、修飾メッセンジャー RNA ( mRNA ) である。一部の実施形態では、修飾 RNA は、低分子量修飾 mRNA である。一部の他の実施形態では、修飾 RNA は、高分子量修飾 mRNA である。一部の実施形態では、修飾 RNA は、エリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾 RNA は、ヒトエリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾 RNA は、配列番号 1 のエリスロポエチンポリペプチドをコードする。例示的な RNA 及びアミノ酸配列を表 1 に記載する。

10

20

【 0078 】

【表1】

【0079】表1. 例示的tRNA及びアミノ酸配列

名称	配列番号	配列
ヒト エリスロポエチン (タンパク質)	1	MGVHECPAHLWLLSLPLGLPVLPVLRVLLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK VNFYAWKRMVEGQQAVEVWQGLALLSEAVLVRGQALLVNNSQPMEPLOLHVDKAVSGLRSLLTLLRGAQE AISPPDAASAAPIRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLRLYTGEACRTGDR
ヒト エリスロポエチン (mRNA)	2	CCCGGAGCCGACCGGGGCCACCGGGCCGCCCTCTGCTCCGACACGGCAGCCGCCCTGGACAGGCCGCCCTCTCCT CCAGGGCCGTGGGCTGGGCTGGCCACCGCCGAGCTTCCGGGATGGGGGTGCACGAATGGCTGGCTGGCTGGCT GCCCCAGGTGGCTGAGGGACCCGGCCAGGGCGGGAGATGGGGGTGCACGAATGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT TCTCCTGTCCTGCTGTCCTGCTGCTCCCTCTGGCCCTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAG CCGAGTCCTGGAGGGTACCTCTGGAGGGCCAGGAATATCACGACGGGGCTGGCTGAACACTG CAGCTTGAATGGAATATCACGTCCCAGACACCAAAAGTTAATTCTATGCCTGGAAAGAGGATGGAGGTGCGG GCAGCAGGGCCGTTAGAAGTCTGGOAGGGCCCTGGCAGGGCTGGCTGGGAAGGCTGTCCCTGGGGCCAGGCCCT GGTCAACTCTTCCAGCCGGCTGGGAGGGCCCTGGCAGCTGGATAAAGGCAAGGAAAGGAAAGGAAAGGCT CACCACTCTGGCTCTGGGACTTCCAGATGGGGCTTCCAGATGGGGCTCAGCTGGCT ACTCCGAACAAATCACGTGACACTTCCGAGCTTCCGAAACCTTCCGAAACTTCCGAAACTTCCGAAAGCT GAGCTGTACACAGGGAGGGCTTGAGGAACAGATGACCAGGGCTGGCTGGCAACCTGGCATATCCACC ACCTCCCTCACCAACATTTGCTTGTGCCACACCCCTCCCCGCACTCCCTGAACCCCGTGGCTGGCT TCAGCGCCAGGCTGTCCCATGGACACTCCAGTGGCAATGACATCTCAGGGCCAGAGGAACACTGGCCAGA GAGCAACTCTGAGATCTAAGGATGTCAGGGCAACTTGAGGGCAACTTGAGGGCAACTTGAGGGCA CTTAAACTCAGGGACAGGCCATTGCTGGAAAGACGCCCTGAGCTCACTCGGCACCCCTGCAAAATTGATGCC AGGACACAGCTTGGAGGGCTTACCTGTTTCGCACCTTACCATCAGGGACAGGATGACCTGGATAACTTAG GTGGCAAGCTGTGACTTCCAGGTCTCAGGGCATGGCAAGGGCCACTCCCTGGCTGGCAAGAGGCC GGGTGGGAACCATGAAGACAGGATGGGGCTGGCTCATGGCTCTGGCTCATGGCTCATGGCT CTCAACCTCATTTGACAAACCAAAAGAAACTGAAGAAGAACTGACAAACCAAAAGAA

【表2】

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用される場合、用語「低分子量」は、修飾RNAを表すとき、約750未満、約650未満、約550未満、約450未満、約350未満、約250未満、又は約

150未満のヌクレオチド長のRNA分子を指す。

【0081】

本明細書で使用される場合、用語「高分子量」は、修飾RNAを表すとき、約550超、約650超、約750超、約850超、約950超、約1000超、約1500超、又は約2000超のヌクレオチド長のRNA分子を指す。例示的な高分子量RNAは、本明細書に記載及び例示される通り、ヒトエリスロポエチンmRNA（配列番号2；コード領域、配列番号3）である。

【0082】

本明細書で使用される場合、用語「外性」は、細胞又は生物の外部に由来する、又は外部で産生される物質若しくは分子を指す。一部の実施形態では、細胞に送達されるか、又は被験者に投与される修飾RNAは、外性RNA（例えば、外性mRNA）である。

10

【0083】

一部の実施形態では、LNP及び/又はエキソソームは、複数の修飾RNA（例えば、mRNA）を含む。一部の実施形態では、LNP及び/又はエキソソームは、目的のポリペプチド若しくはタンパク質をコードする1つ以上の修飾RNA（例えば、mRNA）を含む。

【0084】

一部の実施形態では、LNP及び/又はエキソソームは、約1:1～約4:1、又は約4:1、約3:1、約2:1、約1:1、又は約1:1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、LNP及び/又はエキソソームは、約1:1のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、LNP及び/又はエキソソームは、約1:1、例えば、約0.1:1、約0.2:1、約0.3:1、約0.4:1、約0.5:1、約0.6:1、約0.7:1、約0.8:1、又は約0.9:1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。本明細書で使用される場合、語句「イオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比」は、本明細書に開示されるLNP及び/又はエキソソーム中のイオン化脂質と修飾RNAヌクレオチドのおおよそのモル比を指す。

20

【0085】

一部の実施形態では、LNPは、約2:1～約4:1、又は約4:1、約3:1、又は約2:1のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、LNPは、約3:1のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、約1:1～約3:1、又は約3:1、約2:1、約1:1、若しくは約1:1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、約1:1、又は約1:1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、LNPに含まれるイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比より低いイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、エキソソームは、約1:1、又は約1:1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含み、且つLNPは、約3:1のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、約1:1、又は約1:1未満のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含むエキソソームは、約1:1を超えるイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含むLNP又は代替的送達ビヒクルと比較して、宿主細胞及び組織において非毒性であるか、又は低毒性であり得る。一部の実施形態では、エキソソーム及びLNP又は代替的送達ビヒクルは、同じイオン化脂質（例えば、DLin-MC3-DMA又はDLin-DMA）及び同じ修飾RNAヌクレオチドを含むが、異なるイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む。一部の実施形態では、電荷をもたない（すなわち、約1:1のイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む）修飾RNA及び/又はエキソソームは、エンドソーム膜を通過することができるのでに対し、陽電荷を帯びた（すなわち、約1:1を超えるイオン化脂質：修飾RNAヌクレオチドモル比を含む）修飾RNA及び/又はLNPは、エンドソーム膜を通過することができない。

30

40

50

## 【0086】

## 組成物

様々な実施形態において、本開示は、少なくとも1つのエキソソーム（例えば、本明細書に記載のエキソソームのいずれか）を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、複数のエキソソームを含む。本明細書で使用される場合、用語「医薬組成物」は、被験者への投与に好適な他の成分、例えば、薬学的に許容可能な担体及び/又は賦形剤に加えて、少なくとも1つのエキソソームの調製物を指す。本明細書に提供される医薬組成物は、投与を可能にし、その後、有効成分の意図される生物活性を提供し、且つ/又は治療効果を達成するような形態である。本明細書に提供される医薬組成物は、好ましくは、製剤が投与される被験者に対して許容できない毒性の追加成分を一切含有しない。

10

## 【0087】

語句「薬学的に許容可能な」は、本明細書において、正しい医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又はその他の問題若しくは合併症を生じることなく、ヒト及び動物の組織との接触での使用に好適であり、妥当なベネフィット/リスク比に見合う化合物、物質、組成物、及び/又は剤形を示すために使用される。薬物承認機関（例えば、EMA、US-FDA）は指針を提供して、薬学的に許容可能な化合物、物質、組成物、及び/又は剤形を承認する。

20

## 【0088】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容可能な担体」は、被験者に有意な刺激を引き起こさず、且つ組成物中で投与されたエキソソームの生物活性及び特性を無効にしない担体又は希釈剤を指す。薬学的に許容可能な担体は、組成物を増強若しくは安定化し得るか、又は組成物の調製を容易にするために使用することができる。薬学的に許容可能な担体としては、溶剤、分散媒、コーディング剤、抗菌及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを挙げることができ、これらは、生理学的に適合性である。担体は、被験者における有害な副作用を最小限にし、且つ/又は活性成分の分解を最小限にするように選択してもよい。また、アジュvantをこれらの製剤のいずれに含有させててもよい。

20

## 【0089】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容可能な賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために、医薬組成物に添加される不活性物質を指す。非経口投与の製剤は、例えば、滅菌水若しくは塩水などの賦形剤、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物油、又は水素化ナフタレンを含有し得る。他の例示的な賦形剤として、限定されないが、重炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、各種糖類及び各種デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、並びに例えば、ポリソルベート20などの界面活性剤が挙げられる。

30

## 【0090】

本開示の医薬組成物は、当該技術分野で公知の様々な方法により投与することができる。投与経路及び/又は方法は、所望される結果に応じて変わり得る。一部の実施形態では、投与は、硝子体内、静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下投与である。薬学的に許容可能な担体は、硝子体内、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は表皮投与（例えば、注射若しくは注入による）に好適でなければならない。一部の実施形態では、少なくとも1つのエキソソームと、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤とを含む医薬組成物は、非経口投与に好適な形態であり得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、滅菌注射水性又は懸濁液の形態であってよく、これは、公知の手順に従って製剤化され得る。滅菌注射製剤はまた、非経口的に許容される非毒性緩衝液中の滅菌注射懸濁液であってもよい。

40

## 【0091】

単一剤形を製造するために、エキソソーム中の修飾RNAの量及び/又は1つ以上の担体若しくは賦形剤と組み合わせた修飾RNAを含むエキソソームの数は、処置を受ける被験者及び具体的な投与経路に応じて必然的に変動する。典型的に、修飾RNA及び/又は修飾RNAを含むエキソソームの治療有効量若しくは有効用量を本開示の医薬組成物に使

50

用する。修飾RNAを含むエキソソームは、当業者には周知の従来の方法により、薬学的に許容可能な剤形に製剤化することができる。

#### 【0092】

エキソソームの投与レジメンは、所望される最適応答（例えば、治療応答）を提供するために、調節してもよい。例えば、エキソソームの単回ボーラスを1回で投与してもよいし、所定の期間にわたって複数の分割用量で投与してもよいし、又は治療状況の要件に応じて用量を漸減若しくは漸増してもよい。いずれか特定の被験者のために、個別のニーズ、並びに担当する臨床医の専門的な判断に応じて、時間の経過とともに具体的な投与レジメンを調節してもよい。非経口組成物は、投与しやすさ及び投与の均一性のために単位剤形に製剤化してもよい。本明細書で使用される単位剤形は、処置を受ける被験者のための単位用量（unitary dosage）として適した物理的に別々の単位を指し；各単位は、所望の治療効果をもたらすように算出された所定量の有効成分（すなわち、エキソソーム）を、必要な製剤用担体と共に含有する。

10

#### 【0093】

少なくとも1つのエキソソームを含む組成物の用量の値は、有効成分のユニークな特性、及び達成しようとする具体的な治療効果に基づいて選択することができる。医師又は獣医師は、所望の治療効果を達成するのに必要なレベルより低いレベルで本開示のエキソソーム又は医薬組成物の用量を開始し、所望の効果が得られるまで、用量を漸増することができる。一般に、障害の処置の場合、本開示のエキソソーム又は医薬組成物の有効用量は、多くの様々な要因に応じて変動し得るが、そうした要因として、投与手段、標的部位、患者の生理的状態、患者がヒト又は動物のいずれであるか、投与される他の薬剤、並びに処置が予防的又は治療的のいずれであるかなどが挙げられる。選択される用量レベルはまた、多様な薬物動態要因に応じても変動し得るが、そうした要因として、使用される具体的なエキソソーム又は医薬組成物の活性、投与経路、投与時間、排泄率、処置期間、使用される具体的なエキソソーム又は医薬組成物と併用される他の薬剤、化合物及び／若しくは物質、処置を受ける患者の年齢、性別、体重、状態、全般的健康状態及び病歴などが挙げられる。処置用量を定呈して、安全性及び効力を最適化してもよい。

20

#### 【0094】

本明細書に提供されるエキソソーム及び医薬組成物の毒性及び治療効果は、細胞培養又は動物モデルにおいて標準的な薬学的方法により決定することができる。例えば、LD<sub>50</sub>、ED<sub>50</sub>、EC<sub>50</sub>、及びIC<sub>50</sub>を決定して、毒性及び治療効果の用量比（LD<sub>50</sub> / ED<sub>50</sub>）を治療指数として算出することができる。インビトロ及びインビボアッセイから得られたデータを、ヒトへの使用のための用量範囲の推定又は公式化に使用することができる。

30

#### 【0095】

様々な実施形態では、本明細書に記載の治療適用で使用するためのキットも本開示の範囲に含まれる。様々な実施形態では、本開示は、少なくとも1つのエキソソームを含むキットを提供する。様々な実施形態では、キットは、複数のエキソソームを含む。様々な実施形態では、キットは、1つ以上の追加成分をさらに含み、そうしたものとして、限定されないが、以下：使用説明；他の試薬、例えば、第2治療薬；投与のためにエキソソームを調製するための装置、容器、若しくは他の用具；薬学的に許容可能な担体；並びに被験者にエキソソームを投与するための装置、容器、若しくは他の用具が挙げられる。挿入片又はラベルのいずれかとしての使用説明は、提案される用量及び／又は投与方法をはじめ、治療適用のためのガイダンスを含み得る。様々な実施形態では、キットは、有効量のエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）と、障害を処置若しくは予防するためにエキソソーム又は医薬組成物を使用するまでの説明を含む。

40

#### 【0096】

##### 方法

様々な実施形態では、本開示は、有効量のエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソ

50

ームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）と細胞を接触させ、これにより修飾RNAを細胞に送達することによって、修飾RNAを細胞に送達する方法を提供する。

#### 【0097】

本開示は、様々な実施形態で、細胞への修飾RNAの送達における、有効量のエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）の使用をさらに提供する。

#### 【0098】

本明細書で使用される場合、用語「送達する」とは、ある実体をある目的地に提供することを意味する。例えば、一部の実施形態では、細胞への修飾RNAの送達は、修飾RNAを含有する少なくとも1つのエキソソーム、又は修飾RNAを含有する少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物と細胞を接触させるステップを含み得る。一部の実施形態では、被験者への修飾RNAの送達は、修飾RNAを含有する少なくとも1つのエキソソーム、又は修飾RNAを含有する少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物を被験者に投与するステップを含み得る。少なくとも1つのエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物の哺乳動物組織若しくは被験者への投与は、1つ以上の細胞をエキソソーム又は医薬組成物と接触させるステップを含み得る。

10

#### 【0099】

本明細書で使用される場合、用語「投与すること（administering）」は、所望の部位又は組織位置にエキソソーム及び／又は医薬組成物成分の少なくとも部分的な局在化を達成する方法若しくは経路による、哺乳動物組織内又は被験者体内への、少なくとも1つのエキソソーム及び／又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物の配置を指す。

20

#### 【0100】

用語「被験者」及び「患者」は、本明細書において置き換え可能に使用され、本明細書に記載の方法及び組成物を用いて、予防的処置を含め、処置が提供される任意のヒト又はヒト以外の動物を指す。ヒト被験者などの特定の動物に固有の状態又は疾患の処置のために、用語「被験者」は、特定の動物を指す。ヒト以外の動物は、任意の哺乳動物など、全ての脊椎動物（例えば、哺乳動物及び非哺乳動物）を含む。哺乳動物の非限定的な例として、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、及びブタが挙げられる。一部の実施形態では、被験者はヒトである。

30

#### 【0101】

一部の実施形態では、有効量のエキソソーム又は医薬組成物と細胞を接触させるステップは、エキソソーム若しくは医薬組成物をインビトロ細胞培地に添加するか、又はエキソソーム若しくは医薬組成物を被験者に投与することを含む。

#### 【0102】

一部の実施形態では、細胞は、インビトロ細胞培地中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、被験者から得られる。一部の実施形態では、細胞は、被験者に存在する。一部の実施形態では、細胞は、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である。一部の実施形態では、細胞は、Bリンパ球、Tリンパ球、又は単球である。

40

#### 【0103】

一部の実施形態では、細胞への修飾RNAの送達は、細胞世代時間を変化させない。他の実施形態では、細胞への修飾RNAの送達は、細胞世代時間を変化させる。一部の実施形態では、細胞への修飾RNAの送達は、重量当たりの総細胞タンパク質含量を変化させない。他の実施形態では、細胞への修飾RNAの送達は、重量当たりの総細胞タンパク質含量を変化させる。

#### 【0104】

様々な他の実施形態では、本開示は、さらに、例えば、疾患の処置における、本明細書に開示されるエキソソーム及び医薬組成物に関連する治療方法及びそれらの使用も提供する。一部の実施形態では、エキソソームは、障害を有し、且つ／又は処置を必要とする被

50

験者から取得した細胞から単離される。

【0105】

例えば、特定の態様では、本開示は、有効量のエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）を被験者に投与することにより、被験者の障害を処置若しくは予防する方法を提供し、ここで、エキソソームは、障害を処置する上で有効な修飾RNAを含む。

【0106】

特定の他の態様では、本開示は、被験者の障害の処置若しくは予防における、有効量のエキソソーム又は少なくとも1つのエキソソームを含む医薬組成物（例えば、本明細書に記載のエキソソーム又は医薬組成物のいずれか）の使用を提供し、ここで、エキソソームは、障害を処置する上で有効な修飾RNAを含む。

10

【0107】

特定の他の態様では、本開示は、以下：(a)被験者から取得された1つ以上の細胞を提供するステップ；(b)細胞によるLNP取込みを可能にする条件下で、修飾RNAを含む1つ以上の脂質ナノ粒子(LNP)と1つ以上の細胞を接触させるステップ；(c)1つ以上の細胞により産生されるエキソソームを単離するステップであって、少なくとも1つの単離エキソソームが、修飾RNAを含むステップ；並びに(d)有効量の単離エキソソームを被験者に投与するステップにより、被験者の障害を処置又は予防する方法を提供し、ここで、修飾RNAは、障害を処置する上で有効である。一部の実施形態では、細胞は、上皮細胞、免疫細胞、前駆細胞、又は幹細胞である。一部の実施形態では、細胞は、Bリンパ球、Tリンパ球、又は単球である。

20

【0108】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」及びその同根語は、疾患、障害、若しくは状態（例えば、貧血、脊髄形成異常、免疫若しくは炎症性疾患、単一遺伝子病（例えば、神経変性疾患）、又は複合病（例えば、心筋梗塞若しくは癌））、又は少なくとも1つのそれらの認識可能な症状の改善を指す。一部の実施形態では、「処置する」は、少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの改善を指すが、これらのパラメータは、患者により必ずしも認識可能ではない。一部の実施形態では、「処置する」は、疾患、障害、若しくは状態の進行を、物理的に（例えば、認識可能な症状の安定化）、生理学的に（例えば、物理的パラメータの安定化）阻害することのいずれか、又はその両方を指す。一部の実施形態では、「処置する」は、疾患、障害、若しくは状態の進行を緩徐にするか、又は反転させることを指す。本明細書で使用される場合、「処置する」及びその同根語は、さらに、所与の疾患、障害、若しくは状態の発症を遅らせるか、又はその獲得のリスクを低減することも含む。

30

【0109】

用語「疾患」又は「障害」は、本明細書において置き換え可能に使用され、罹患した人又は特定の人と接触した人の機能実行を中断若しくは妨害し、且つ／又はそれらの人に、不快感、機能不全、苦痛、或いは死亡などの症状を引き起こす身体若しくはいずれかの器官の状態の何らかの変化を指す。疾患又は障害は、不機嫌、病弱、不快、病気、気分の悪さ、体調不良、不満、軽い病気、又は罹患にも関係し得る。一部の実施形態では、障害は、貧血、脊髄形成異常、免疫又は炎症性疾患、単一遺伝子病（例えば、神経変性疾患）、及び複合病（例えば、心筋梗塞若しくは癌）から選択される。一部の実施形態では、障害は、貧血である。一部の実施形態では、障害は、脊髄形成異常である。一部の実施形態では、障害は、炎症性腸疾患である。一部の実施形態では、修飾RNAは、エリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、ヒトエリスロポエチンポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、修飾RNAは、配列番号1のエリスロポエチンポリペプチドをコードする。

40

【0110】

本明細書で使用される場合、用語「有効量」は、疾患若しくは障害の少なくとも1つ以上の症状を低減するか、又は所望の効果を提供する上で十分な修飾RNAを含むエキソソ

50

ームの数又は修飾 R N A を含有するエキソソームを含む医薬組成物の量を指す。例えば、これは、症状の治療的に有意な低減又は創傷治癒に関連する臨床マーカを誘導する量であり得る。エキソソーム、又は少なくとも 1 つのエキソソームを含む医薬組成物に関連して、用語「有効量」とは、修飾 R N A を送達し、しかも、標的組織及び/又は細胞型におけるタンパク質発現を調節する上で十分なエキソソーム又は医薬組成物の量を指す。一部の実施形態では、エキソソーム又は医薬組成物の有効量は、修飾 R N A により発現されるタンパク質に関連する疾患又は障害を処置する上で十分な量である。

#### 【 0 1 1 1 】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるエキソソーム及び医薬組成物は、免疫応答、例えば、代替的処置（例えば、L N P ）によって観察される免疫応答の少なくとも 1 つのバイオマーカ若しくは症状の発現若しくは活性を低減及び/又は阻害し得る。一部の実施形態では、本明細書に開示される治療方法は、代替的送達ビヒクル（例えば、L N P ）を用いた処置方法と比較して、炎症誘発性マーカ（例えば、サイトカイン、ケモカイン）の产生若しくは量を低減及び/又は阻害する。炎症誘発性マーカの非限定的な例として、サイトカイン及びケモカイン、例えば、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 8、IL - 9、IP - 10、IL - 12 (p 40)、IL - 12 (p 70)、IL - 13、IL - 15、IL - 16、IL - 17、KC、MCP - 1、エキソタキシン (Exotaxin)、FGF (塩基性)、G - CSF、GM - CSF、LIF、MIG、MIP - 1、MIP - 2、MCP - 1、INF - 、INF - 2、RANTES、TNF 、及び IL - 1 が挙げられる。

10

20

#### 【 0 1 1 2 】

本明細書で使用される場合、語句「低減及び/又は阻害する」とは、対照レベルと比較して、約 10、20、30、40、50、60、70、80、若しくは 90 % 以上の変化（プラス若しくはマイナス）を指す。本明細書で使用される場合、用語「対照レベル」とは、非処置サンプル若しくは被験者、又はエキソソームの非存在下で処置されたサンプル若しくは被験者のいずれかを示す。一部の実施形態では、対照レベルは、エキソソームの非存在下で処置された対照サンプル若しくは被験者における発現又は活性のレベル（例えば、1 つ以上の炎症誘発性マーカの発現レベル）である。

#### 【 0 1 1 3 】

一部の実施形態では、被験者は、エキソソームの非存在下、又は修飾 R N A を含有しないエキソソームの非存在下での処置に比べ、修飾 R N A を含有するエキソソームの存在下での処置に対して低減した免疫及び/又は炎症反応を有する。一部の実施形態では、低減した免疫及び/又は炎症反応は、少なくとも 1 つのサイトカインのレベルの増加若しくは減少を含む。一部の実施形態では、低減した免疫及び/又は炎症反応は、少なくとも 1 つのサイトカインのレベルの減少を含み、ここで、サイトカインは、IL - 6、IP - 10 、RANTES、MCP - 1、及び KC から選択される。

30

#### 【 0 1 1 4 】

一部の実施形態では、1 つ以上の細胞を L N P と接触させるステップは、ヒト血清の存在下で実施される。一部の実施形態では、ヒト血清は、約 0.5 体積%、約 1 体積%、又は約 1.5 体積% で存在する。一部の実施形態では、ヒト血清は、約 1 体積% で存在する。一部の実施形態では、1 つ以上の細胞を L N P と接触させるステップは、1 つ以上の細胞を少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、又は少なくとも 4 つの異なる用量の L N P と接触させることを含む。一部の実施形態では、1 つ以上の細胞を L N P と接触させるステップは、1 つ以上の細胞を少なくとも 3 つの異なる用量の L N P と接触させることを含む。一部の実施形態では、エキソソームを単離するステップは、インビトロ細胞培地のサンプルからエキソソームを単離することを含む。

40

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 1 5 】

以下の実施例は、本開示の例示的な実施形態を提供する。当業者は、本開示の趣旨又は範囲を変えることなく実施され得る多数の修正及び変更を認識されよう。こうした修正及

50

び変更は、本開示の範囲内に含まれる。提供される例は、本開示を何ら限定するものではない。

### 【0116】

#### I. 材料及び方法

##### 脂質ナノ粒子 (LNP) の製剤化及び特性決定

2つの異なるタイプのLNP、すなわち、修飾hEPO mRNA (858ヌクレオチド) (5mec、) (Trillink)を含有するDLin-MC3-DMA (MC3-LNP) 及びDLin-DMA LNP (DD-LNP)は、以前記載されている (Yanez Arteta et al. (2018) PNAS 115 (15) : E3351-60)通りに、4つの異なる脂質成分と一緒にmRNAを沈殿させることによって調製した。4つの成分は、以下：低pHでイオン化可能な（カチオン性）イオン化脂質 (DLin-MC3-DMA又はDLin-DMA)；2つのヘルパー脂質 (DSPC及びコレステロール)；並びにPEG化脂質 (PEG2000-DMPE)を含んだ。MiliQ-waterに溶解させたmRNA、100mMクエン酸バッファー (pH3)、及びMiliQ-waterを混合して、50mMクエン酸塩の溶液を取得することにより、hEPO mRNA水溶液を調製した。4つの脂質成分 (イオン化脂質：DSPC : コレステロール : PEG2000-DMPE = 50 : 10 : 38.5 : 1.5モルパーセント) 及び総脂質含量12.5mMの組成物を用いて、エタノール中の脂質溶液 (99.5%)を調製した。容積調合比がAq : EtOH = 3 : 1で、定全流量が12mL/分のNanoAssembler (Precision Nanosystems)マイクロ流体混合システムで、mRNA及び脂質溶液を混合した。混合時に、イオン化脂質上の窒素原子とmRNA鎖上のリン原子の比は、3.1であった。「空」のLNP (すなわち、mRNAを含まないLNP)が調製された場合には、エタノール相を50mMクエン酸バッファー (pH3)のみと混合した。調製されたLNP溶液の初期0.35mLと最終0.05mLを廃棄し、容積の残りをサンプル画分として収集した。

### 【0117】

上記と同じ手順を使用して、シアニン5-E GFP - mRNA (996ヌクレオチド) (5mec、) (Trillink)を含有するMC3-LNP及びDD-LNPを調製したが、hEPO mRNAの代わりに、シアニン5-E GFP - mRNAをLNPに組み込んだ。

### 【0118】

製剤化LNPの特性決定のために、25μLのサンプル画分を975μLの10mMリン酸バッファー (pH7.4)に注入し、これを用いて、Malvern Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Inc.)で強度平均粒径 (Z平均)を測定した。サンプル画分を直ちにSlide-allyzer G2透析カセット (10000 MWCO, Thermo Fischer Scientific)に移し、PBS (pH7.4)に対して4で一晩透析した。PBSバッファーの体積は、650~800×サンプル画分体積であった。次に、サンプル画分を収集した。この体積から、25μLを975μLの10mMリン酸バッファー (pH7.4)に注入した後、粒径を再度測定した (透析後粒径)。Quant-it Ribogreen Assay Kit (Thermo Fischer Scientific)により、最終mRNA濃度及び封入効率 (EE)を測定した。

### 【0119】

#### 細胞培養

ヒト上皮HTB-177 (NCI-H460)細胞株をAmerican Type Culture Collection (ATCC)から購入し、ATCCガイドラインに記載される通りに培養した。ピルビン酸ナトリウム及びHEPESを含まず、重炭酸ナトリウムを含有する RPMI-1640 増殖培地 (Sigma Aldrich)に、5%CO<sub>2</sub>の存在下、37で、エキソソーム欠失ウシ胎仔血清 (FBS) (Sigma Aldrich)、1%のL-グルタミン (2mM) (Thermo Fisher S

10

20

30

40

50

cientific) 及び 1% ペニシリン - ストレプトマイシン (10,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific) を添加した。熱不活性化 FBS は、70 Ti ロータ (Beckman Coulter) を備える Optima L-100 XP 超遠心分離機において 120,000 × g、4° で 2 時間の超遠心分離によりエキソソームを欠失させ、エキソソーム欠失上清を 0.2 μm フィルタで濾過した。

#### 【0120】

健康なドナーからの新鮮なバフィーコートを Sahlgrenska University hospital (Gothenburg, Sweden) から取得し、密度勾配遠心分離により末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。L-グルタミン、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、1% ペニシリン - ストレプトマイシン、-メルカプトエタノール、及び 10% FBS (エキソソーム欠失) で補充した完全 RPMI-1640 増殖培地で PBMC を培養し、ヤギ抗ヒト IgA / IgG / IgM F(ab')2 断片 (2.5 μg/mL; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) 及びホルボールミリストート酢酸塩 (PMA) (1 μg/mL; InvivoGen) で刺激した。

#### 【0121】

##### LNP による上皮細胞への mRNA の送達

ヒト上皮 (HTB-177) 細胞を、30 mL の増殖培地に 175 T フラスコ当たり  $3 \times 10^6$  細胞の密度で接種し、24 時間インキュベートした。24 時間のインキュベーション後、1% ヒト血清 (Sigma Aldrich) の存在下、フラスコ当たり 100 μg の hEPO mRNA を含有する 1 mL の DD-LNP 又は MC3-LNP で細胞を処理した。1 mL の LNP 溶液中 100 μg の hEPO mRNA は、以下：(1) 日目：200 μL の LNP (20 μg の mRNA)；(2) 日目：400 μL の LNP (40 μg の mRNA)；(3) 日目：400 μL の LNP (40 μg の mRNA) のように 3 つの異なる用量で投与し、96 時間後に採取した。同量 (200 μL、400 μL、400 μL) の対応する空の DD-LNP 又は空の MC3-LNP (すなわち、mRNA を含まない LNP) で処理した細胞、並びに非処理の細胞を陰性対照として使用した。

#### 【0122】

##### エキソソーム細胞外小胞 (EV) の単離及び特性決定

以前記載されている (El-Andaloussi et al. (2012) Nat Protoc. 7(12): 2112-26) 通りに、LNP 処置細胞の馴化培地及び陰性対照から EV を単離した。手短には、細胞残屑を除去するために、4K15 遠心分離機 (Sigma) により、4°、3000 × g で 15 分間遠心分離した。得られた上清を収集し、4°、60,000 × g で 35 分間の超遠心分離後、0.2 μm フィルタによる濾過を実施して、直径が 200 nm 未満の EV を取得した。続いて、濾過した上清を 4°、120,000 × g で 70 分間超遠心分離して、EV をペレット化した。EV ペレットを適切な量 (50 ~ 80 μL) の PBS (Sigma Aldrich) 中に再懸濁させた。全ての超遠心分離工程は、70 Ti ロータ (Beckman Coulter) を用いた Optima L-100 XP 超遠心分離機で実施した。

#### 【0123】

タンパク質濃度に基づいて EV を定量した。2 μL の M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) と一緒にインキュベートした 2 μL の EV 懸濁液を、Ultrasonic cleaner (VWR) により 54° で 5 分間超音波処理して、EV 抽出物を生成した。Qubit 2.0 フルオロメータ (Thermo Fisher Scientific) を用いて、EV タンパク質を定量した。1 μL の EV、1 μL の Qubit タンパク質試薬、及び 198 μL の Qubit バッファーを混合してから、室温で 15 分間インキュベートした。Qubit 2.0 フルオロメータで、読み取りを記録した。

#### 【0124】

10

20

30

40

50

## EV及びLNP投与後の細胞からのRNA単離

miRCURY (商標) RNA単離キット - 細胞及び植物 (Exiqon) を用いて、製造者の指示に従い、EV及びLNP処理細胞から全RNAを単離した。全RNAは、Qubit 2.0 フルオロメータ (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA品質 (230 / 260 比) を評価した。

## 【0125】

## EV粒径及び濃度決定のためのナノ粒子トラッキング解析 (NTA)

Hamamatsu C11440-50B/A11893-02カメラを備えたNanoSight LM10計器 (Malvern Panalytical) を用いて、HTB-177 MC3-EV及び非処理EVを粒径 (nm) 及び濃度 (粒子 / mL) について評価した。解析の前に、粒子を0.1 μM 濾過PBS (Sigma) 中で500倍希釈して、視野内の粒子数をフレーム当たり180粒子未満に減少させた。3回の独立した測定 (生物学的反復) をスキヤッターモードで実施した。各EVサンプルについての測定読み取りは、個別のサンプル及び手動での温度モニタリングに応じて、調節したカメラレベル (10 ~ 16) 及び検出閾値 (5 ~ 15) 、各々25フレーム毎秒 (fps) で、60秒間5キャプチャーにて取得した。ブラー・マックスジャンプ距離 (Blur and Max Jump Distance) は自動に設定した。NanoSight Fluorescent NTA LM10ソフトウェア バージョン3.3 (Malvern Panalytical) を用いて、読み取り、収集、及びデータ解析を実施した。

## 【0126】

## EV中のLNP由来外性hEPO mRNAの検出及びqPCRによる定量

EV、LNP投与後のそれらの親細胞の溶解物、及び対応する陰性対照におけるhEPO mRNAを、定量的リアルタイムPCR (RT-qPCR) を用いて定量した。RNA収率に基づき、0.25 ~ 1 μg の全EV RNA及び細胞の全RNAを、大容量cDNAキット (Thermo Fisher Scientific) を用いてcDNAに変換した。製造者の指示に従い、Viia7 instrument (Thermo Fisher Scientific) でのTaqManプローブアッセイを用いて、hEPO mRNAの定量に100ngの全cDNAを使用した。2 μgの純粋なhEPO mRNA (TrillinkからのRNA) を逆転写し、得られたcDNAを段階希釈 (10倍) して、7つの標準 (最高点: 100ng) を調製し、これらを3回技術反復することにより、標準曲線を作成した。続いて、EV cDNA及び細胞cDNAをhEPO mRNA解析のために使用し；最小  $R^2 > 0.975$  の標準曲線に対して、絶対定量を補間した。GAPDHを内標準として使用した。hEPO mRNAのモル量を計算するために、以下のように推定した：1モルhEPO mRNA = 858 hEPO mRNAヌクレオチド。

## 【0127】

## EVマーカ (CD63及びCD9) の検出並びにCD63 / CD9陽性EV中の外来mRNAの同定

HTB-177細胞を、前述したように、100 μgのCy5-mRNA (Trillink) を含有するMC3-LNPで処理した。非処理細胞を対照として含んだ。96時間後、分画超遠心分離 (前濃縮) により、LNP処理細胞 (MC3-EV) 及び非処理細胞 (EV) の培地から全EVを単離し、PBSに再懸濁させた後、定量した。前濃縮後、親和性に基づく方法を用いて、CD63 / CD9陽性EVを単離し、FACSにより、Cy5-mRNAの存在について評価した。細胞培地についてのエキソソーム - ヒトCD63単離 / 検出試薬 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、製造者の指示に従い、CD63陽性EVを常磁性Dynabeadsに固定化した。結合反応の際に、20 μLの常磁性Dynabeadsを25 μg又は50 μgの全MC3-EVと一緒にインキュベートした。陰性対照として、20 μLの常磁性Dynabeadsを等量のPBS (EVなし)と一緒にインキュベートした。CD63陽性EVの固定化後

10

20

30

40

50

、EVをマウス抗ヒトPE-CD9抗体（BD Pharmingen、Cat. No. 555372）で、製造者の指示に従い染色した。BD FACSLyric system（BD Biosciences）によりEVを取得した後、CD9及びCy5-mRNAを検出した。FlowJoソフトウェア（TreeStar Inc.）を用いて、データを解析した。実験は、生物学的二重反復で実施した。

#### 【0128】

##### 細胞の非存在下でのLNPからEVへのmRNAの直接移入の解析

LNPとEVを直接混合した後、様々な割合（量）のLNP及びEVを用いて、37でインキュベート（細胞の非存在下）した。いずれの事前の処理も受けていない2つの異なる割合（量）のEVを300μLのDD-LNP又はMC3-LNP（39μgのhEPO mRNA）と一緒に、37の30mLのPBS中で2時間インキュベートした。第1のセットアップにおいて、EVとLNPとの割合は、200μgのEV+300μLのLNP（1×）であったが、第2のセットアップでは、この割合は、50μgのEV+300μLのLNP（4×）であった。2時間のインキュベーション後、超遠心分離によりEVを再度単離し、EVから全RNAを単離し、hEPO mRNAをqPCRにより定量して、LNPからEVへのhEPO mRNAの直接移入を評価した。陰性対照として、等量のDD-LNP又はMC3-LNPを、EVを含まないPBS中でインキュベートした後、超遠心分離した。陽性対照として、hEPO mRNAを含有するDD-LNP又はMC3-LNPを細胞に投与した後、EVを単離した（それぞれ、DD-EV又はMC3-EV）。RNAを単離し、hEPO mRNAをqPCRにより定量した。実験は生物学的三重反復で実施した。データは、LNPにより細胞に送達されたhEPO mRNAの投与量又はEVと直接混合したhEPO mRNAの量に対して、EV中に検出されたhEPO mRNAのパーセンテージとして表示する。反復の標準偏差（SD）と共に平均値を示す。

#### 【0129】

##### EV-mRNA保護アッセイ

前述したように、100μgのhEPO mRNAを含有するMC3-LNPで、HTB-177細胞を処理した。非処理細胞を対照として含んだ。96時間後、EVを単離し、定量した。初めに、RNase A活性（Thermo Fisher Scientific）の効率を評価するために、280ngの純粋なhEPO mRNA（Trilink）をRNase A（0.5μg/μL）又は等量のPBSと一緒に37で20分間インキュベートした。次に、同じ条件を用いて、200μgのMC3-EVをRNase Aで処理した。陰性対照として、200μgのMC3-EV及び150μgの非処理EVを、RNase Aの代わりにPBSを用いた以外は同じ条件下でインキュベートした。インキュベーション後、miRCURY TM RNA Isolation Kit-cell and Plant（Exiqon）を用いて、EVからの全RNAを単離した。EVの外部に存在する場合に、hEPO mRNA含量に対するRNase Aの作用を評価するために、hEPO mRNAをqPCRにより定量した。実験は、生物学的三重反復で実施した。

#### 【0130】

##### 勾配UPLCによるEV中のイオン化カチオン性脂質の分析

EVの画分を使用して、EV中のLNP由来イオン化脂質の存在を検定した。5~10μLの各EVサンプル（MC3-LNP及びDD-LNP処理細胞から取得）をPBSで50倍希釈した後、トリス/EDTAバッファー中2w/v%のTriton（登録商標）X-100の混合物でさらに1+1希釈した。サンプルを37で30分間インキュベートした後、Single Quad Detector（SQD）（Waters）に接続したAcuity Ultra Performance LCに注入した。分析カラムは、60に維持したWaters Acuity UPLC（登録商標）C18、1.7μm、2.1×100mmであった。流量は、水中の0.1%ギ酸（A）と、アセトニトリル及びイソプロピルアルコールの等量混合物中の0.1%ギ酸（B

10

20

30

40

50

)との移動相を用いて、0.50 mL/分であった。0.0 minで10% Bを、1.0から5.0 minまで85% Bに上昇させた後、7.5 minまで85% Bに維持する勾配ランを適用した。勾配ランには、7.6 minから9.5 minまで99% Bの洗浄ステップを加えた。次に、10% Bをコンディショニングのために9.6 minから12.0 minまで適用した。これらの条件下で、DLin-DMAの溶離時間は6.3 minであり、DLin-MC3-DMAの溶離時間は6.5 minであった。エタノール99.5%に溶解させたDLin-DMA及びDLin-MC3-DMAの外部標準溶液を用いて、定量を決定した。エレクトロスプレー、ポジティブモードを用いて、SQDを実行し、DLin-MC3-DMAの溶液による自動調整を用いて調整した。カチオン性脂質の記録は、各カチオン性脂質についてM+1のSingle Ion Recording (SIR)を用いて実施した。

#### 【0131】

最後に、イオン化脂質及びhEPO mRNAヌクレオチドのモル比(hEPO mRNA当たりのイオン化脂質)をEV及びLNPの両方で決定した。少なくとも6回の生物学的反復で実験を実施した。

#### 【0132】

##### hEPOタンパク質定量

LNP処理の後、細胞馴化上清を収集し、hEPOタンパク質検出のために直接使用したのに対し、1%ハルト(halt)プロテアーゼ阻害剤カクテル(Thermo Fisher Scientific)の存在下、500 μLのM-PER Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific)を用いて、細胞溶解物から全細胞タンパク質を抽出した。手短には、細胞を3次元Bio-rockerにより4で10分間穏やかに攪拌し、14,000×gで10分間遠心分離することにより、細胞残屑をペレット化した。得られた上清(タンパク質含有)を新しいチューブに移した。同時に、培養した上清を4K15遠心分離機(Sigma)により4、3000×gで15分間遠心分離して、細胞残屑を除去した。得られた上清を新しいチューブに移した。また、hEPOタンパク質は、エリスロポエチンELISAキット(STEMCELL Technologies)を用いて、製造者の指示に従い、EV溶解物中でも分析した。2 μLのEV懸濁液を2 μLのM-PER Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific)と一緒にインキュベートし、Ultrasonic cleaner(VWR)により54で5分間超音波処理して、EV抽出物を生成した。培養上清からの全細胞タンパク質及び全タンパク質、並びに全EVタンパク質を、Qubit 2.0フルオロメータ(Thermo Fisher Scientific)を用いて、製造者のプロトコルに従い、定量した。hEPOタンパク質を検出するために、エリスロポエチンELISAキット(STEMCELL Technologies)を製造者の指示に従って使用した。50 μLの全タンパク質溶液(細胞及び培養上清の両方について)を使用し、相対標準曲線に従って、hEPOタンパク質レベルをmU/mLとして算出した。換算法(119mU=1ng)を用いて、濃度をfg/mLに変換し、細胞の総数に対して正規化した。

#### 【0133】

##### 細胞増殖、RNA、及びタンパク質含量に対するLNP投与の作用

細胞挙動に対するLNPの作用を決定すると共に、LNP処理(DD-LNP又はMC3-LNP)に対する細胞耐容性を評価するために、DD-LNP又はMC3-LNPによる96時間の処理後に、細胞世代時間(細胞増殖)、細胞全RNA、細胞内タンパク質の総含量、及び分泌されたタンパク質の総含量を計算した。LNPによる処理後の全EV RNA及びタンパク質含量を定量することにより、EVに対するLNPの作用も検定した。

#### 【0134】

細胞世代時間(G)(細胞の集団が倍加するまでの時間(hr)として定義される)は

10

20

30

40

50

、以下の式：

$$G = t / n$$

$t = L N P$  投与間隔 ( h )

【数1】

$$n = \log(n. \text{ cells post-administration}) - \log(n. \text{ cells pre-administration})$$

$$\log_2$$

を用いて、処理間隔 ( N ) の始点及び終点での細胞の数の差に基づいて算出した。

【0135】

細胞及びEV中の全RNA、EV中の全タンパク質、細胞中（細胞内）の全タンパク質、及び培養上清中（分泌）の全タンパク質のばらつきを、対応する N（細胞数の変化）に対して正規化した。

【0136】

EVを介したヒト上皮（HTB-177）細胞へのhEPO mRNA送達

ヒト上皮（HTB-177）細胞をT175フラスコ当たり $5 \times 10^6$ 細胞の密度で接種し、RPMI-1640完全培地で培養した。MC3-LNP処理細胞から単離した $600 \mu g$ のMC3-EV（700ngのhEPO mRNA）、及びDD-LNP処理細胞から単離した $600 \mu g$ のDD-EV（1100ngのhEPO mRNA）をRPMI-1640培地中に溶解させ、以下の通り2日にわたり、独立したアッセイでレシピエント細胞に移入した：（1）日目： $300 \mu g$ のMC3-EV、及び（2）日目： $300 \mu g$ のDD-EV（1日目）及び $300 \mu g$ （2日目）を独立したアッセイでレシピエント細胞に移入した。空のEV（hEPO mRNAを含まない）及び非処理細胞からのEVを、対照としてレシピエント細胞に送達した。48時間後、細胞及び培養上清を収集し、全RNAを単離した。hEPO mRNA及びhEPOタンパク質を、それぞれRT-qPCR及びELISAにより、前述のプロトコルに従って評価した。実験は、2回の独立した生物学的反復で実施した。

【0137】

EVを介した上皮及び初代血液細胞へのシアニン5-EGFP-mRNA送達

1mLのLNPが、フラスコ当たり $76 \mu g$ の蛍光Cy5-EGFP-mRNAを含有する（これに対し、hEPO mRNAは、 $100 \mu g / mL$ であった）以外は前述のプロトコルに従って、蛍光シアニン5（Cy5）-EGFP-mRNAを含有する1mLのDD-LNPを様々な用量（ $200 \mu L$ 、 $400 \mu L$ 、 $400 \mu L$ ）でHTB-177細胞に送達した。LNPの投与から96時間後、馴化培地（上清）並びに親細胞を採取し、hEPO mRNA及びhEPOタンパク質について分析したか、又はさらなる試験のために保存した。空のDD-LNP（mRNAを含まない）及び非処理細胞を対照として使用した。HTB-177細胞並びに、末梢血単核細胞（PBMC、前述した通り、バフィーコートから単離される）から精製したB細胞、T細胞、及び単球などの免疫細胞をウェル当たり $2 \times 10^5$ 細胞の密度で接種し、96ウェルの丸底プレート内の $200 \mu L$ の培地に培養し、37、5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートした。培養細胞の24時間の刺激後、 $25 \mu L$ のPBS溶液中のCy5-EGFP-mRNA（Trillink）を含有する $78 \mu g$ のDD-EVをレシピエント細胞に送達した。対照アッセイのために、空のDD-EV（EGFP-mRNAを含まない）及びネイティブEV（非処理細胞からのEV）を細胞に送達するか、又は細胞を未処理のまま残した。5時間、24時間、及び48時間のEV処理後、細胞を採取し、CD19（B細胞）、CD3（T細胞）、及びCD14（単球）（Becton-Dickinson Biosciences）に対し、モノクローナル抗体（mAb）により表面マーカについて染色した。細胞は、FACS Verse（BD Biosciences）で取得した。Cy5-EGFP-mRNAは、各細胞型における蛍光に基づいて検出し、FlowJoソフトウェア（TreeStar

10

20

30

40

50

Inc.)を用いて、データを解析した。

【0138】

LNPからのhEPO mRNA放出に対するpHの作用

0.011mg/mLの濃度でhEPO mRNAを含有するMC3-LNPを、静止条件下、37で、150mM NaCl(pH7.4、6.6、若しくは5.8)と一緒に、10mMクエン酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>バッファー溶液中でインキュベートした。RiboGreenアッセイにおいて0.125mM Triton X-100 (VWR Proteomics Grade)及び0.125mMドデシル硫酸ナトリウム(Sigma)を用い、ゼロ時点でのmRNAの総量を測定した。様々なpH(pH7.4、6.6、又は5.8)のLNPから放出されたmRNAの画分を評価するために、Perkin Elmer LS55 Luminescence Spectrometer(例えば、480nm、em:525nm)を用い、Quant-iT RiboGreen RNA Reagent Assayキット(Thermo Fisher Scientific)によるInvitrogen)で遊離量のmRNAを分析した。

【0139】

EV及びMC3-LNPを介したhEPO mRNAのインビオ移入

実験手順は、ゴーテンバーグの地域実験動物倫理委員会(Regional Laboratory Animal Ethics Committee of Gothenburg, Sweden)により承認された(倫理審査申請書番号83-2015)。手順は全て、スウェーデン動物保護法(Swedish Animal Welfare Act)及び規定SJVFS 2012:26に準拠する。C57BL6/N Crl雌マウス(n=36)、9~10週齢をCharles River Laboratory(Germany)から購入し、AstraZeneca, Molndal, Swedenにある動物施設に収容した。マウスは、標準の条件(21 RT、12:12h光周期、45~55%湿度)下でケージ当たり4匹のマウスの群で飼育し、通常の固体飼料(R70、Lactamin AB)及び水を自由に摂取させた。環境エンリッチメントを提供した(カートン、木製舌圧子、及び綿ネスティングパッド)。等量の1.5μg hEPO mRNAを含有する100μLのMC3-LNP由来EV又はMC3-LNPをマウスに静脈内注射した(群当たりn=4)。100μLのPBSを対照マウスに注射した。EV及びLNPの注射から2、5、24、及び48時間後に伏在静脈(Vena Saphena)マイクロサンプリングにより、血液サンプルをマウスの群(n=4)から収集した。35μL EDTA-プレップキャピラリーチューブに収集した血液サンプルを、血漿を収集するため1700×gで遠心分離し、分析の時間まで-86で冷凍保存した。注射から5、24、及び96時間後、臓器を収集するために、マウス群を死なせた。イソフルラン麻酔によりマウスを鎮静させ、眼窩静脈叢から採血した後、心臓を切除した。続いて、全臓器(肝臓、腎臓、脾臓、臍臓、心臓、胸腺、肺、及び脳)を収集し、液体窒素でスナップ冷凍し、分析の時間まで-86で保存した。

【0140】

マウス血漿中のヒトEPOタンパク質の検出

MC3-LNP及びMC3-EVによるhEPO mRNA送達後のマウス血漿中のhEPOタンパク質を分析するために、Gyrosプラットフォーム上でhEPOアッセイを自社開発した。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinキット(Thermo Fisher Scientific, #21327)を用いて、キット添付文書に従って、補足抗体(3F6、MAIIA Diagnostics)をビオチン化した。モノクローナル抗体標識キット(Thermo Fisher Scientific, #A20186)を用いて、検出抗体(7D3、MAIIA Diagnostics)をAlexa 647標識した。hEPOタンパク質(自社製)を用いて、12.2pg/mL~50ng/mLの範囲で、Rexxip Aバッファー(Gyros Protein Technologies)中の標準曲線を作成した。分析前に、マウス血漿サンプルをRexxip A-maxバッファー(Gyros Protein

Technologies)で1:1(v:v)希釈した。Gyrolab計器(Gyrolab xP workstation、Gyros Protein Technologies)を備えるGyrolab Bioaffy 1000 CD(Gyros Protein Technologies)でサンプルを分析した。標準曲線のために5パラメータ曲線当てはめを使用した。全ての標準及びサンプルは、10%未満のCVを有した。

#### 【0141】

##### マウス組織中のヒトEPOタンパク質の検出

1%ハルト(halt)プロテアーゼ阻害剤カクテル(Thermo Fisher Scientific)の存在下、M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific)を用いて、製造者の指示に従い、臓器からの全タンパク質を抽出した。手短には、Tissue Lyser II(Qiagen)中のプロテアーゼ阻害剤(Thermo Fisher Scientific)を添加した200~350μLの溶解バッファー(組織重量に応じて)において、最大速(30Hz)で3~5分間20~70mgの組織を溶解させた後、4、10,000×gで15分間遠心分離することにより、組織残屑を全て除去した。得られた上清は、Qubit 2.0フルオロメータ(Thermo Fisher Scientific)を用いるタンパク質定量のために使用した。エリスロポエチンELISAキット(STEMCELL Technologies)を用いて、製造者の指示に従い、hEPOタンパク質検出について50μLの全タンパク質を分析した。各臓器中のhEPOタンパク質(n g)の量を相対臓器重量(g)に対して正規化した。

#### 【0142】

##### マウス血漿中のサイトカイン分析

MC3-LNP及びMC3-EVの静脈内投与後、IL-6、KC、MCP-1、RANTES、TNF、IFN-、IL-1、及びIP-10の同時定量のために、EMD Millipore's MILLIPLEX(登録商標)MAP Mouse Cytokine磁気ビーズキット(Merck KGaA、#MCYTOMAG-70K)により、マウスサイトカインの血漿中濃度を測定した。まず、サンプルをアッセイバッファーで1:2希釈し、次に、標準及び品質対照と一緒に96ウェルプレート内に配置した。ビーズを含有する溶液を添加し；ビーズは、特定の抗体でコーティングした磁気ミクロスフィアである。混合物を4で一晩インキュベートした後、各ミクロスフィアの表面上での反応を完了させるために、ストレプトアビジン-PEコンジュゲートと一緒にインキュベートした。プレートを分析装置Bio Rad Luminex 200(登録商標)上で読み取った。個別のミクロスフィアを各々同定し、そのバイオアッセイの結果を、蛍光リポータシグナルに基づいて定量化した。5パラメータロジスティック曲線当てはめ法を使用し、蛍光強度中央値(MFI)のデータを用いて、濃度を測定した。

#### 【0143】

##### マウス臓器中のヒトEPO mRNAの検出

RNeasyキット(Qiagen)を用いて、製造者の推奨に従い、マウス臓器から全RNAを単離した。Tissue Lyser II(Qiagen)中のRLTバッファー(600μL)において10~50mgの組織を最大速(30Hz)で3~4分間溶解させた後、20、10,000×gで3分間遠心分離することにより、組織残屑を全て除去した。続いて、上清をカラムに移し、さらに処理した。RNAを定量し、Qubit 2.0フルオロメータ(Thermo Fisher Scientific)を用いて、RNAを定量し、NanoDrop 1000(Thermo Fisher Scientific)を用いて、RNA品質を評価した。RNA収率に基づき、0.5~1μgの全RNAをcDNAにレトロ転写し、100ngを用い、RT-qPCRにより、前述したプロトコルに従って、hEPO mRNAを検出した。各臓器中のhEPO mRNAの量(μg)を相対臓器重量(g)に対して正規化した。

## 【0144】

## 統計解析

全ての実験について、GraphPad Prism v.7 (GraphPad) を用いて、統計解析を実施した。インビトロデータは、独立2群両側スチュードントt検定を用いて解析したが、例外的に、HTB-177増殖、RNA含量、及びタンパク質含量に対するLNP投与の効果については、1元配置分散分析 (one-way ANOVA)、続いてテューキー (Tukey) の多重比較検定を用いて解析した (有意なP値 < 0.05)。マウス血漿及び臓器中のhEPO含量は、独立2群両側スチュードントt検定を用いて解析したのに対し、マウス血漿中のサイトカインのレベルは、1元配置分散分析、続いてシダックの多重比較検定を用いて解析した。P値の有意性のレベルは、以下のように表示した: \* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、及び\*\*\*\* p < 0.0001。

10

## 【0145】

## II. 結果

## 実施例1：脂質ナノ粒子 (LNP) の特性決定

本明細書に記載の実験で使用されるLNPは、5つの主要成分、すなわち、イオン化脂質 (DLin-MC3-DMA又はDLin-DMA)、DSPC (1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、コレステロール、PEG化脂質 (PEG2000-DMPE)、及びmRNA (hEPO mRNA) を含んだ。DLin-MC3-DMAイオン化脂質を含有するLNPは、MC3-LNPと呼ばれ；DLin-DMAイオン化脂質を含有するLNPは、DD-LNPと呼ばれる。両方のLNP製剤を、ローディング効率、平均粒径、多分散指数 (PDI)、及び個々のLNP成分間のモルパーセント比を含め、複数の生物物理的パラメータに関して、特性決定した (表2)。データは、表2に平均値±平均値の標準誤差 (SEM) として表示する (MC3-LNP、n=4；DD-LNP、n=9)。

20

## 【0146】

LNP中のhEPO mRNA構築物のローディング効率 (封入効率 (%EE) として定義される) は、93~97%の範囲であった。mRNA構築物を含有するLNPの平均測定粒径は、82~90nmの範囲であった。LNP中のhEPO mRNA構築物の濃度は、0.1mg (100μg) であった。LNP中の個々の成分の間のモルパーセント比は、50:10:38.5:1.5 (DLin-DMA:DSPC:コレステロール:PEG2000-DMPE) 及び50:10:38.5:1.5 (DLin-MC3-DMA:DSPC:コレステロール:PEG2000-DMPE) であった。2つの異なるイオン化脂質、すなわち、DLin-DMA及びDLin-MC3を含む例示的なLNPの構造を図8Aに示す。

30

## 【0147】

【表3】

イオン化脂質	粒径(nm)**	PDI	mRNA濃度 (mg/mL)	脂質濃度 (mg/mL)	EE (%)
DLin-DMA	88 ± 4	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.002	0.97 ± 0.029	94 ± 1.3
DLin-MC3	84 ± 2	0.08 ± 0.02	0.1 ± 0.002	1.02 ± 0.026	97 ± 0.2

\* 路語: PDI - 多分散指数; EE (%) - LNPへのmRNAの封入効率。

\*\* 粒径(nm)は、Z-平均粒径として表示される。

【0 1 4 8】

実施例2: LNPによる細胞へのhEPO mRNAの送達

LNPの2つの異なる製剤による、細胞へのヒトエリスロポエチン(hEPOタンパク

質)をコードするmRNAの送達を調べた。DLin-DMA-LNP (DD-LNPと称する)及びDLin-MC3-LNP (MC3-LNPと称する)を介したmRNA送達の有効性を、細胞内hEPO mRNAの量、並びに細胞内及び細胞外環境の両方で産生されたhEPOの量を決定することによって検定した。

【0149】

独立した実験で、DD-LNP又はMC3-LNPを介して、100μgのhEPO mRNAをヒト上皮(HTB-177)細胞に移入した。LNP処理から96時間後、レシピエント細胞の溶解物中でhEPO mRNAを定量した。また、hEPOタンパク質も、レシピエント細胞の溶解物中、さらには細胞培地の上清中で定量した。LNPの両製剤とも、hEPO mRNAを細胞に送達することができた(図1A)。また、LNPの両製剤とも、レシピエント細胞に欠如する、外因的に送達されるmRNAからのhEPOタンパク質の産生を達成した(図1B及び1C)。MC3-LNPは、DD-LNPと比較して、有意に高い量のhEPO mRNAを送達した。同様に、DD-LNP送達と比較して、MC3-LNP送達後に、有意に高い量のhEPOタンパク質が観測された。分泌性タンパク質として特性決定されている(Bettan et al. (2000) Mol Ther. 2(3): 204-10; Shapir et al. (2015) Hum Gene Ther Clin Dev. 26(4): 216-27)hEPOタンパク質は、細胞質(図1B)と比較して、細胞外画分(図1C)中により多くの量が検出された。

10

【0150】

ナノ粒子は、細胞ストレスを引き起こすこと、及び細胞挙動を変化させることが明らかにされている(Panariti et al. (2012) Nanotechnol Sci Appl. 5: 87-100; Halamoda Kenzaoui et al. (2012) Biochem J. 441(3): 813-21; Petersen et al. (2011) Eur J Pharm Biopharm. 79(1): 150-61)。ナノ粒子はまた、それらの化学組成物及び/又はmRNA含量の結果として、オートファジー・リソーム活性化も誘導し得る(Klionsky et al. (2016) Autophagy 12(1): 1-222; Mizushima et al. (2011) Annu Rev Cell Dev Biol. 27: 107-32; Yang and Klionsky (2010) Nat Cell Biol. 12(9): 814-22; Zabirnyk et al. (2007) Autophagy 3(3): 278-81)。

20

30

【0151】

DD-LNP又はMC3-LNPが、細胞増殖、全RNA合成、及び/又はタンパク質産生に影響を及ぼし得るか否かを決定するために、LNPで細胞を96時間処理した後、HTB-177上皮細胞を採取した。採取後、細胞を計数し、世代時間(すなわち、細胞の集団が倍加するまでの時間(hr))を算出した。細胞世代時間は、LNP処理後、特にhEPO mRNAを含有するLNPによる処理後、有意に増加した(図8B)。これは、hEPO mRNAを含有するLNPを受けると、細胞は、空のLNP(hEPO mRNAを含まない)を受けた場合又はLNPを全く受けない場合(非処理細胞)と比較して、より低速で増殖し得ることを示している。

40

【0152】

全RNA含量は、mRNAを含まないLNPで処理した細胞でやや増加したが、統計学的有意性には達さなかった(図8C)。細胞内タンパク質の総含量は、LNP処理後も不变のままであった(図8D)。しかし、細胞外環境における分泌タンパク質の総含量は、DD-LNP、特にhEPO mRNAを含むものによる処理後、有意に増加した(図8E)。

【0153】

EVの全RNA及びタンパク質含量の定量：細胞由来の細胞外小胞(EV)に対する、hEPO mRNA含有LNPの作用の評価から、mRNAロードMC3-LNPで処理

50

した細胞からのEVの全RNA含量は、非処理細胞又はmRNAロードDD-LNPで処理した細胞からのEVの全RNA含量よりも高いことが判明した。MC3-LNP、特にhEPO mRNAを含むものによる処理後にEVの全RNA含量は増加した(図8F)。これは、MC3-LNPによる処理の後、細胞RNAが最後にはEV内に留まり得ることを示唆している。加えて、全EVタンパク質含量は、MC3-LNP処理後に増加した(図8G)。総合すると、これらの結果は、細胞が、LNPを受け取ると、より多くのタンパク質を分泌する可能性があり、分泌されたタンパク質は、培養上清及び分泌EVの両方で検出され得ることを示唆している(図8E及び図8G)。従って、LNPの投与は、細胞ストレスを招き、その結果、細胞増殖及び/又は細胞により分泌されるタンパク質の量に変化を起こし得る。

10

## 【0154】

EVの粒径決定及び濃度：ナノ粒子トラッキング解析(NTA)により、粒径及び濃度についてEVを特性決定した。平均値±SEM EVモードサイズ(3重サンプルから測定)は、非処理細胞からは $100.2 \pm 3.7 \text{ nm}$ 、MC3-LNP処理細胞からは $116.4 \pm 9.23 \text{ nm}$ であった(図16A及び図16B;表3~8も参照)。平均値±SEM EV濃度(3重サンプルから測定)は、非処理細胞からは $5.81 \times 10^{11} \pm 2.25 \times 10^{10}$ 粒子/mL、MC3-LNP処理細胞からは $1.25 \times 10^{12} \pm 1.54 \times 10^{11}$ 粒子/mLであった。

## 【0155】

20

## 【表4】

表3. 非処理EV(i)

平均	$107.2 \pm 2.4 \text{ nm}$
モード	$93.5 \pm 3.4 \text{ nm}$
標準偏差 (SD)	$35.0 \pm 2.7 \text{ nm}$
D10	$70.3 \pm 2.2 \text{ nm}$
D50	$102.7 \pm 1.5 \text{ nm}$
D90	$146.8 \pm 8.5 \text{ nm}$
粒子/mL	$5.77 \times 10^{11} \pm 2.39 \times 10^{10}$

30

## 【0156】

【表 5】

表 4. 非処理 EV (ii)

平均	127.5 +/- 4.8 nm
モード	101.3 +/- 3.2 nm
標準偏差 (SD)	53.7 +/- 5.4 nm
D10	84.1 +/- 2.3 nm
D50	114.0 +/- 1.9 nm
D90	180.8 +/- 13.1 nm
粒子/mL	6.09x10 <sup>11</sup> +/- 2.03 10 <sup>10</sup>

10

20

30

【0 1 5 7】

【表 6】

表 5. 非処理 EV (iii)

平均	125.2 +/- 4.2 nm
モード	103.9 +/- 4.5 nm
標準偏差 (SD)	44.2 +/- 5.6 nm
D10	83.5 +/- 2.6 nm
D50	114.7 +/- 2.6 nm
D90	179.6 +/- 11.7 nm
粒子/mL	5.58x10 <sup>11</sup> +/- 2.34x10 <sup>10</sup>

【0 1 5 8】

【表7】

表6. MC3-EV (i)

平均	98.6 +/- 5.2 nm
モード	83.7 +/- 7.9 nm
標準偏差 (SD)	41.0 +/- 3.0 nm
D10	62.1 +/- 3.5 nm
D50	88.7 +/- 5.0 nm
D90	145.9 +/- 10.0 nm
粒子/mL	$1.78 \times 10^{12} +/- 3.35 \times 10^{11}$

10

【0 1 5 9】

【表8】

表7. MC3-EV (ii)

20

平均	160.0 +/- 5.3 nm
モード	109.7 +/- 10.2 nm
標準偏差 (SD)	70.3 +/- 3.1 nm
D10	95.4 +/- 2.0 nm
D50	137.1 +/- 5.1 nm
D90	263.9 +/- 8.3 nm
粒子/mL	$1.70 \times 10^{12} +/- 1.12 \times 10^{11}$

30

【0 1 6 0】

## 【表9】

表8. MC3-EV (iii)

平均	228.9 +/- 9.7 nm
モード	155.9 +/- 9.6 nm
標準偏差 (SD)	89.4 +/- 7.8 nm
D10	139.9 +/- 4.0 nm
D50	204.1 +/- 9.0 nm
D90	364.5 +/- 26.0 nm
粒子/mL	2.94x10 <sup>11</sup> +/- 1.37x10 <sup>10</sup>

10

## 【0161】

## 実施例3：EV中のLNP由来イオン化脂質及びmRNAの検出

研究から、大部分のLNPで送達されたRNAは、リソーム分解及び/又はエンドサイトーシス再循環経路を経るのに対し、エンドソームから脱出するのは、僅かな量のみであり；例えば、LNP送達 siRNAの正味脱出は、2%未満であり得ると推定されている (Semplice et al. (2010) Nat Biotechnol 28 (2) : 172-6; Sahay et al. (2013) Nat Biotechnol 31 (7) : 653-8; Sahay et al. (2010) J Control Release 145 (3) : 82-95)。

20

## 【0162】

これらの結果と一致して、本明細書で実施及び記載される実験は、LNP-mRNAの送達によって、投与されたmRNAの1%未満がLNP処理細胞の細胞質中で検出され得ることも明らかにする(図1D)。DLin-MC3-DMA製剤を含むLNPを介して送達されたmRNAは、DLin-DMA製剤を含むLNPを介して送達されたmRNAの約2倍のエンドソームからの脱出を呈示する。

30

## 【0163】

特定の理論に拘束されることは意図しないが、細胞内に取り込まれたLNP成分の一部は、最後には分泌エンドソーム由来EV(「エンドソーム」又は「エンド-EV」)内に留まる可能性があることから、エンドサイトーシス(LNPの取込み)とエキソサイトーシスの間には関連があると想定した(図1E)。細胞に取り込まれたときのLNP送達mRNA及びLNPの他の成分の運命を調べるために、細胞へのLNP投与(100μgのhEPO mRNA)から96時間後に、qPCRによってEV中のhEPO mRNAを定量した。これらの結果は、LNP処理細胞から分泌されたエンド-EVが、hEPO

40

mRNAを取得したことを示唆している(図1F)。MC3-LNP処理細胞から得られるエンド-EVは、同じ用量のhEPO mRNA投与を用いたDD-LNP処理細胞から得られるエンド-EVに比べ、1000倍近くのhEPO mRNAを含有した(図1F)。特に、LNP処理細胞の細胞質及びそれらの分泌EVの双方でのhEPO mRNA定量は、DLin-MC3-DMA製剤によるmRNAが、DLin-DMA製剤によるmRNAよりも多く、エンドソームからの脱出を呈示することを示した。DLin-MC3-DMA製剤の場合、より多くのmRNAがEV中でも検出された(図1D及び図1F)。

## 【0164】

さらに、LNPイオン化脂質(DLin-MC3-DMA又はDLin-DMA)の存

50

在をEV中で分析した。細胞に移入されたMC3-LNP及びDD-LNPは、3:1モル比(mol/mol)のイオン化脂質:hEPO mRNAスクレオチドを含有した(図1G)。また、LNP処理細胞から分泌されたEVも、イオン化脂質を含有することが判明した。しかし、EVは、LNPと比較して、hEPO mRNA分子当たり、より少數のイオン化カチオン性脂質を含有した(図1H及び図1I)。EVは、1:1モル比(mol/mol)のイオン化脂質:hEPO mRNAスクレオチドを含有した(図1J)。

#### 【0165】

UPLC-MS分析のために、Dlin-MC3-DMAサンプルを、エタノール、1% (w/w) トリトンX-100、又は定量の「空」EVを添加した1% (w/w) トリトンX-100に溶解させた後、UPLC-MS系に注入した。トリトンX-100サンプル(「空」EVを含む、及び含まない)の応答は、純粋エタノールに溶解させたサンプルの応答に比べて低かったが、定量の誤差は、10%未満であると推定された(図18)。サンプル調製物(mRNA及び脂質定量)並びにqPCR(mRNA)及びUPLC-MS(脂質)分析のばらつきを考慮すると、やはり、mRNA及びイオン化脂質は、分泌EV中に、化学量論的錯塩(1:1)として同時輸送されるようである。さらに、様々なEVサンプルについて、qPCRを用いて測定されるスクレオチド濃度と、UPLC-MSを用いて決定される脂質濃度との間には強力な相関が認められた(図1J)。

#### 【0166】

LNP送達の後、hEPO mRNAが細胞質中に検出され、また、hEPOタンパク質に翻訳され(図1A~C)、hEPO mRNAが分泌EV中に検出された(図1F)ことから、EVが、LNP処理細胞からのhEPOタンパク質を獲得しているか否かを調べるために、実験を実施した。手短には、LNP処理細胞から単離したEVを溶解させた後、ヒトエリスロポエチンELISAによりhEPOタンパク質を分析した。EV中にhEPOタンパク質は一切検出されなかつたが、これは、産生されるhEPOタンパク質が、EVを介して送達されたhEPO mRNAに由来し得ることを示唆している(データは示していない)。

#### 【0167】

さらには、細胞外部のLNPとEVの相互作用、並びにEVへのLNP-mRNAの直接輸送の可能性を評価した。EVを、hEPO mRNAを含有するLNPと直接混合した(細胞の非存在下)。2時間のインキュベーション後、EVを再度単離し、EV中のhEPO mRNAの存在を評価した。結果から、EVは、細胞の非存在下でLNPと直接混合すると、hEPO mRNAについて陰性であることが判明し(図9)、これは、hEPO mRNAを細胞外部のEVに直接輸送しないことを示唆している。そうではなく、EVは、細胞をLNPで処理したとき、LNPのエンドサイトーシスを介してmRNAを獲得し得る。

#### 【0168】

実施例4: EVを介した上皮及び免疫細胞へのhEPO mRNAの送達

前述した実験は、LNPのエンドサイトーシスの後、外性hEPO mRNAをエンド-EVに組み込むことができる事を示唆している(図1F及び図9)。次に、(a)EVが、その後、送達ビヒクルとして働くことにより、外性hEPO mRNAをレシピエント細胞に輸送することができるか否か;並びに(b)EVを介して細胞に送達されたhEPO mRNAが、機能性である、すなわち、mRNAを翻訳して、hEPOタンパク質を産生することができるか否かを調べた。

#### 【0169】

MC3-LNP処理細胞から単離したMC3-EV及びDD-LNP処理細胞から単離したDD-EVは、レシピエントHTB-177上皮細胞に輸送された。hEPO mRNA送達から96時間後、細胞及びそれらの培養上清を収集し、ヒトエリスロポエチンELISAにより、hEPOタンパク質を評価した。hEPOタンパク質は、細胞溶解物中、並びにレシピエント細胞(すなわち、hEPOタンパク質が欠失しているため、それら

10

20

30

40

50

自体で h E P O タンパク質を発現しない細胞) の培養上清中で検出可能であった(図 10 A ~ C)。M C 3 - L N P の細胞送達(図 1 B 及び図 1 C)と一致して、M C 3 - E V 媒介 h E P O m R N A 送達は、D D - E V 媒介 h E P O 送達に比べて高いレベルの h E P O タンパク質産生を示した(図 10 C)。

#### 【0170】

L N P による送達では、細胞の挙動にいくらかの不都合な作用が生じた(図 8 C ~ E)。対照的に、h E P O m R N A を含む E V 又は h E P O m R N A を含まない E V のいずれかを使用すると、E V による送達は、細胞世代時間又は細胞タンパク質含量に影響を与えたなかった(図 10 D ~ F)。これは、L N P による送達に対してストレスを受けた細胞が、E V による送達に対してはより耐容性であり得ることを示唆している。

10

#### 【0171】

次に、E V が、一般に他の送達ビヒクルを用いて遺伝子導入するのが困難な細胞である免疫細胞に外性 m R N A (すなわち、h E P O m R N A) を送達することができるか否かを調べた。健康なヒトのバフィーコートから末梢血単核細胞(P B M C)を単離した後、接種した。適切な免疫細胞刺激の存在下で一晩インキュベートした後、C y 5 - E G F P - m R N A を含有する D D - E V (D D - L N P 処理細胞由来) を単回用量で、個別に 5 時間、24 時間、及び 48 時間にわたりレシピエント細胞に送達した。

#### 【0172】

様々な時間(5 時間、24 時間、及び 48 時間)の、E V を介した C y 5 - E G F P - m R N A 輸送後に細胞を採取し、C D 19 (B 細胞)、C D 3 (T 細胞) 及び C D 14 (単球)(B e c t o n - D i c k i n s o n B i o s c i e n c e s) に対する表面マーカについてモノクローナル抗体(m A b)で染色した。F A C S 分析を実施して、レシピエント細胞中の C y 5 - E G F P - m R N A を検出し、抗体 - 蛍光及び C y 5 - 荧光に基づいて、C y 5 - E G F P - m R N A を含有する各細胞型のパーセンテージを推定した。5 時間の E V 媒介 m R N A 送達後、レシピエント免疫細胞中に C y 5 - E G F P - m R N A が検出可能であり、これは、E V が、m R N A を免疫細胞に送達し得ることを示している(図 2 B ~ D 及び図 11)。70% 近い H T B - 177 細胞が、E V 送達の 24 時間後に C y 5 - E G F P - m R N A の取込みを示した(図 2 A)。E V 送達の 5 時間、24 時間、及び 48 時間後に、それぞれ 6%、30%、及び 40% の B 細胞が、C y 5 - E G F P - m R N A を含有した(図 2 B)。E V 送達の 5 時間に、17% の T 細胞及び 71% の単球が、C y 5 - E G F P - m R N A を含有した(図 2 C 及び図 2 D)。

20

#### 【0173】

実施例 5 : E V を介したマウスへのヒト E P O m R N A の送達

エンド - E V が、インビトロで h E P O m R N A を送達することができると判定した後、これらの E V が、外性 m R N A (すなわち、h E P O m R N A) をインビボで送達することもできるか否かを調べた。h E P O m R N A をインビボで投与する前に、非処理の健康な C 5 7 B L 6 / N C r 1 マウスから血液を採取し、ヒトエリスロポエチン E L I S A により h E P O タンパク質を検定して、レシピエントマウスにヒト型の E P O タンパク質(h E P O) が欠失しており、且つこれを発現しないことを確認した。予想通り、非処理のマウスの血漿は、h E P O タンパク質について陰性であった(図 12)。

30

#### 【0174】

次に、C 5 7 B L 6 / N C r 1 マウスに、単回静脈内用量の M C 3 - E V (マウス 1 匹当たり 1.5  $\mu$  g の h E P O m R N A) を注射し、h E P O タンパク質の産生を血漿及び臓器の両方で調べた。E V 媒介 h E P O m R N A 送達の 2 時間後、マウス血漿中に h E P O タンパク質が検出され、24 時間持続したが、これは、E V が、外性 m R N A をマウスに送達することができ、しかも、目的のタンパク質の産生をもたらし得ることを示している(図 3)。さらに、様々な時点(5 時間、24 時間、及び 96 時間)で犠牲にしたマウスの 8 つの臓器において、h E P O m R N A 及び h E P O タンパク質の存在を検定した。結果は、E V が、h E P O m R N A を様々な臓器に送達できるだけではなく、h E P O タンパク質の産生を可能にし、これは、E V が、機能性 m R N A を臓器に送達する

40

50

ことができる事を示している(図4A～P)。心臓、肺、肝臓及び脾臓において、hEPO mRNA及びhEPOタンパク質は検出可能であった(図4A～H)。心臓及び肺において、hEPO mRNA及び翻訳hEPOタンパク質は、EV媒介mRNA送達の5時間後に検出可能であり、mRNAは、24時間持続した(図4A～D)。肝臓では、hEPO mRNAは、EV送達の5時間後にのみ検出可能であったが、翻訳hEPOタンパク質は、5時間後に検出可能であり、24時間持続した(図4E及び図4F)。しかし、脾臓では、パターンが逆であった。脾臓では、hEPO mRNAは5時間後に検出可能であり、24時間持続したが、翻訳hEPOタンパク質は、5時間後にのみ検出可能であった(図4G及び図4H)。

## 【0175】

10

特に、hEPO mRNAについて陽性であった全4つの臓器のうち、肝臓は、最も多量のhEPOタンパク質を有する臓器であった(図4F)が、脾臓は、最も多量のhEPO mRNAを有する臓器であった(図4G)。5時間後に脾臓に検出されたhEPOの量は、他の臓器に検出された量と同等であった。腎臓は、比較的少量のhEPO mRNAを示したが、タンパク質は検出不可能であった(図4I及び図4J)。分析した8つの臓器のうち3つ(胸腺、脾臓、及び脳)では、hEPO mRNA及びhEPOタンパク質は検出不可能であった(図4K～P)。

## 【0176】

20

LNP媒介hEPO mRNA送達を検定するために、MC3-LNPを用いて並列実験を実施した。C57BL6/NCr1マウスに、単一用量のMC3-LNP(マウス1匹当たり1.5μgのhEPO mRNA)を静脈内注射し、hEPOタンパク質の産生を血漿及び臓器の両方で調べた。データは、LNP媒介hEPO mRNA送達の2時間後、血漿中にhEPOタンパク質が検出可能であり、5時間持続したことを示す(図13)。さらに、LNP送達の5時間、24時間、及び96時間後に犠牲にしたマウスの8つの臓器において、hEPO mRNA及びhEPOタンパク質の存在を検定した。5つの臓器、すなわち、心臓、肺、肝臓、脾臓、及び腎臓において、hEPO mRNA及びhEPOタンパク質は検出可能であった(図14A～J)。hEPO mRNA及びhEPOタンパク質について陽性であった全ての臓器のうち、ほとんどのhEPO mRNAは腎臓(24時間持続した)で、次に脾臓(96時間持続した)で検出された。ほとんどのhEPOタンパク質は、肝臓で検出された。しかし、心臓及び肺では、hEPO mRNA及びhEPOタンパク質の両方が、注射から5時間後に検出された。胸腺、脾臓、及び脳は、hEPO mRNA及びhEPOタンパク質の両方について陰性であった(図14K～P)。

30

## 【0177】

総合すると、これらのデータは、外因的に存在するmRNAから目的の任意のタンパク質を発現するために、EVが、送達ビヒクルとして使用され得ることを示唆している。

## 【0178】

実施例6：EV又はLNPを介したマウスへのヒトEPO mRNAの送達

MC3-LNPに比べて、EVが、hEPO mRNAをいかに効率的に送達するかを決定するために、インビオでのLNP及びEVによるhEPO mRNAの送達後に、hEPOタンパク質の産生を比較した。臓器において、LNPによるhEPO mRNA送達からのhEPOタンパク質の量は、脾臓を除いて概ねEVと同等であり、脾臓は、タンパク質産生に有意な差を示し、それに心臓が続いた(有意差はより小さい)(図5)。血液中のhEPOタンパク質の量は、EVと比較して、LNP送達の方が高かった(図5)。さらに、組織に対するMC3-LNP及びMC3-EVの作用を検定した。MC3-LNP及びMC3-EVは、レシピエントマウスの臓器重量に有意な作用を示さなかった(図15A～H)。

40

## 【0179】

実施例7：EVは、LNPと比べて低い免疫／炎症反応を誘発する

EVが、レシピエントマウスに対しLNPと比べて低免疫原性であるか否かを調べるた

50

めに、単回用量のM C 3 - L N P (マウス1匹当たり1.5 μgのh E P O m R N A) 及びM C 3 - E V (マウス1匹当たり1.5 μgのh E P O m R N A) をC 5 7 B L 6 / N C r 1マウスに静脈内注射した。2つの時間間隔(5時間及び24時間)で、一般に免疫及び炎症反応に関する8つの異なるサイトカインの濃度をマウス血漿中で測定した。注射から5時間後に検出された複数の炎症誘発性サイトカイン(特に、I L - 6、I P - 1 0、R A N T E S、M C P - 1、及びK C)の分泌レベルは、E V送達後よりL N P送達後で有意に高かった(図6A~E)。

#### 【0180】

これらの結果は、L N Pの全身送達が、高い炎症性反応を誘発し得るのに対し、E Vは、免疫原性が低く、レシピエントマウスによる耐容性が良好であることを示している。L N Pは、E Vより多くh E P Oタンパク質産生をもたらし得る(図5)が、L N Pは、E Vより免疫原性が高いと考えられ、そのため、恐らく、E Vは、ヒト患者への治療用R N Aの送達のためのより安全なビヒクルとなり得る。

10

#### 【0181】

実施例8：C D 6 3 / C D 9陽性E V中のE Vマーカ及び外来m R N Aの検出

L N P - m R N Aが、E Vにより担持されていることを確認するために、H T B - 1 7細胞を、100 μgのC y 5 - m R N Aを含有するM C 3 - L N Pで処理するか、又はそれなしで処理した。96時間後、L N P処理細胞(M C 3 - E V)及び非処理細胞(E V)の培地から全E Vを分画超遠心分離により単離し、P B S中に再懸濁させた後、定量した。25 μg若しくは50 μgの全M C 3 - E V又は全非処理E Vを、抗C D 6 3抗体と共に20 μLの常磁性D y n a b e a d sと一緒にインキュベートした後、E x o s o m e - H u m a n C D 6 3 I s o l a t i o n / D e t e c t i o nキット(Thermo Fisher Scientific)を用いて、C D 6 3陽性E Vを特異的に単離した。次に、C D 6 3陽性E Vを、マウス抗ヒトP E - C D 9抗体(B D P h a r m i n g e n、C a t . N o . 5 5 5 3 7 2)で染色してから、C y 5 - m R N A検出についてF A C Sにより分析した。F A C S分析から、非処理細胞からの免疫沈降E V(50 μgアッセイ)の約96%は、C D 6 3及びC D 9について陽性であったが、m R N Aについては陰性であったことが明らかにされた。対照的に、L N P - m R N A処理細胞からの免疫沈降E V(50 μgアッセイ)の約88%は、C D 6 3及びC D 9について陽性であったが、26%が、C y 5 - m R N Aを含有するL N Pのエンドサイトーシス後に分泌されたm R N A(C y 5 - m R N A)を含有する(図17A)。陰性対照(ビーズのみ、並びに非処理細胞から得られるC D 6 3 / C D 9陽性E V)では、C y 5 - m R N Aシグナルは一切検出されず、これは、m R N AがE V(C D 6 3 / C D 9陽性E V)により担持されていることを示している。

20

#### 【0182】

実施例9：E V - m R N A保護アッセイ

m R N Aが、E V膜と結合しているのではなく、E V内部に位置し、且つ保護されていることを確認するために、h E P O m R N Aを含有するM C 3 - E VをR N a s e処理に曝露した。R N a s e処理の後、全R N AをE Vから単離し、q P C Rにより、h E P O m R N Aを定量した。R N a s eの効率的なエンドヌクレオチド結合分解活性(E VフリーR N Aに示される)にもかかわらず、R N a s eで処理しなかったM C 3 - E Vと比較して、R N a s e処理M C 3 - E Vでは、h E P O m R N A含量に2 C t倍率変化の減少しか認められなかった。3回の生物学的反復(n=3)で実験を実施し、h E P O m R N A q P C Rデータを散布ドットプロット及び平均標準偏差(S D)として表す(図17B)。R N a s e処理なしの非処理細胞から得られたE Vは、陰性対照として使用した。送達m R N Aの僅かな部分がE Vの外膜層に結合している可能性はあるが、ほとんどのh E P O m R N Aは、エンドヌクレオチド結合分解活性から保護されて、E V内に存在することが判明した。

30

40

【図 1 - 1】

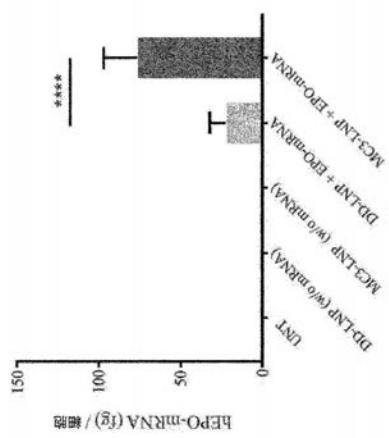


図 1A

【図 1 - 2】

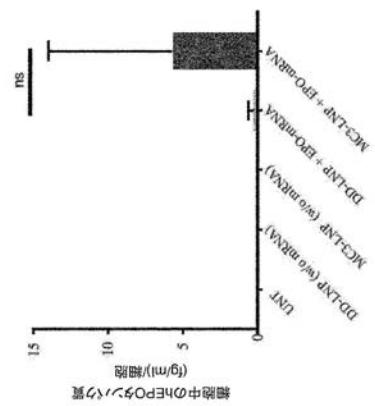


図 1B

【図 1 - 3】

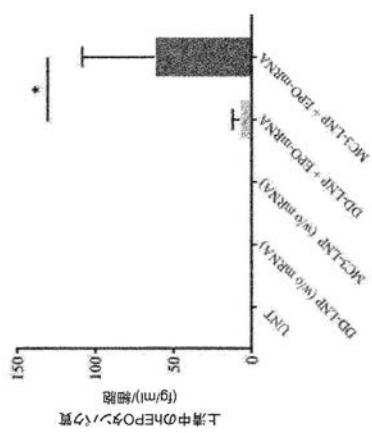


図 1C

【図 1 - 4】

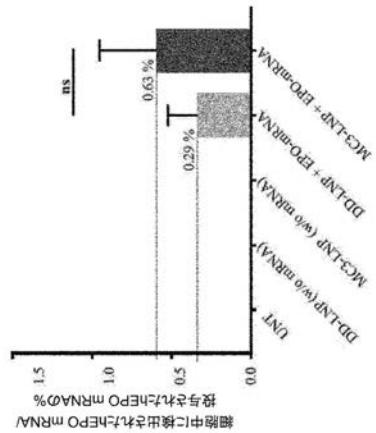


図 1D

【図 1 - 5】

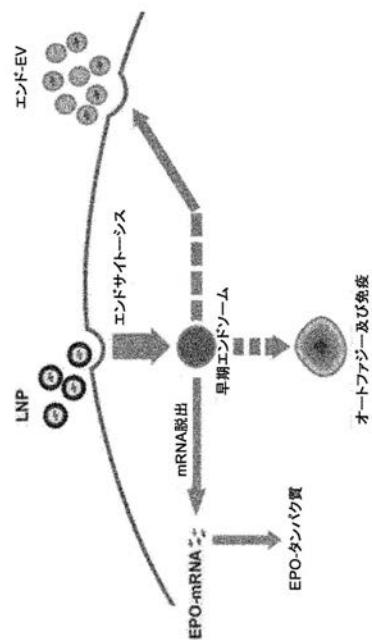


図 1E

【図 1 - 7】

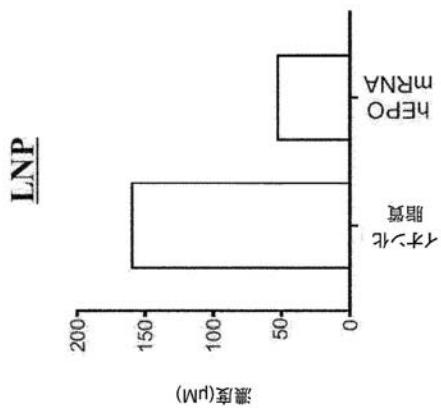


図 1G

【図 1 - 6】

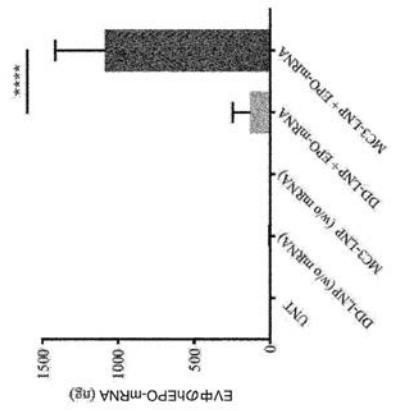


図 1F

【図 1 - 8】

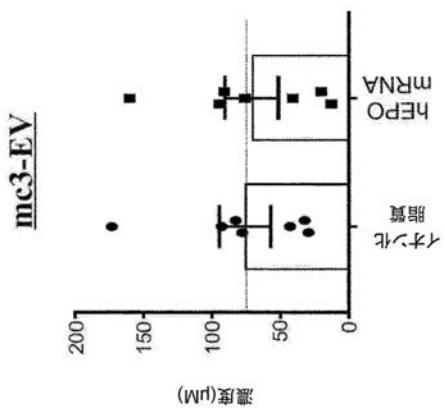


図 1H

【図 1 - 9】

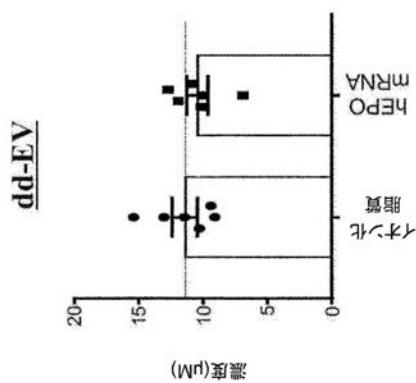


図 1

【図 1 - 10】

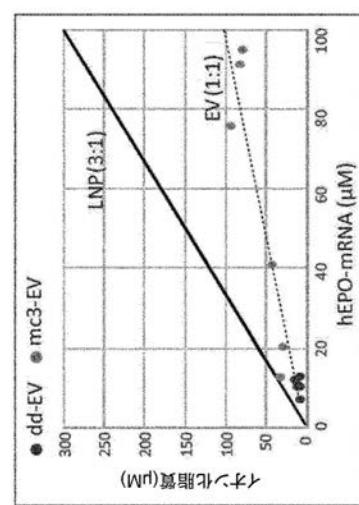


図 1

【図 2 - 1】

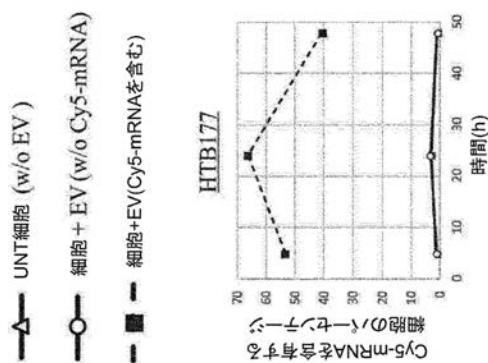


図 2A

【図 2 - 2】

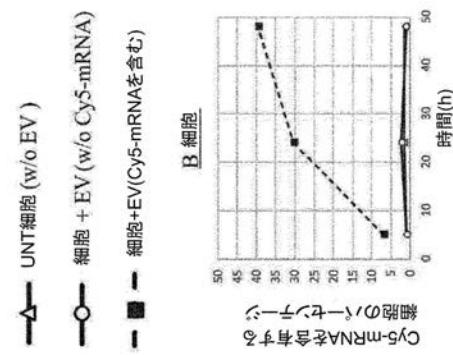


図 2B

【図 2 - 3】

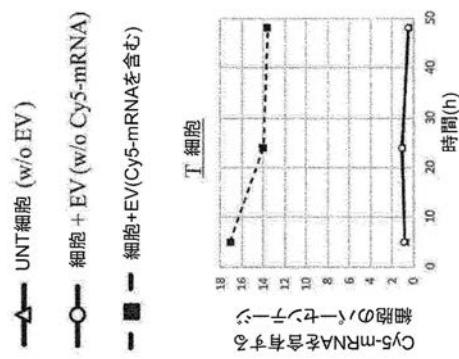


図 2C

【図 3】

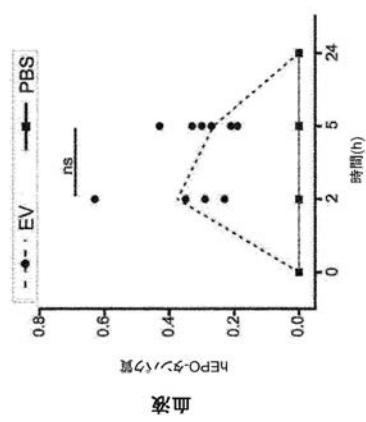


図 3

【図 2 - 4】

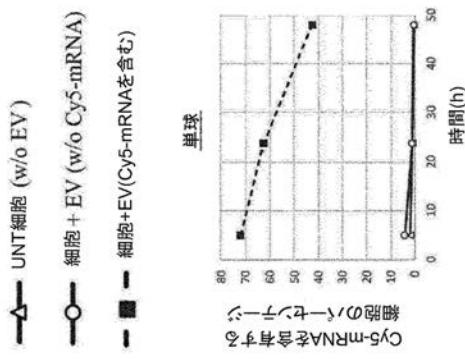


図 2D

【図 4 - 1】

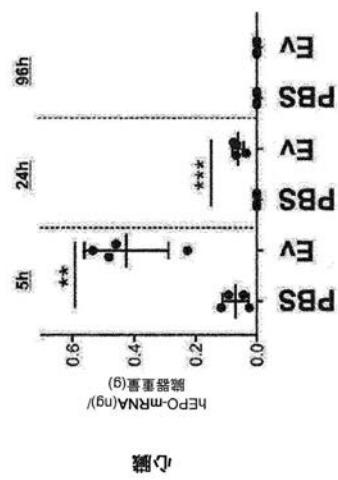


図 4A

【図4-2】

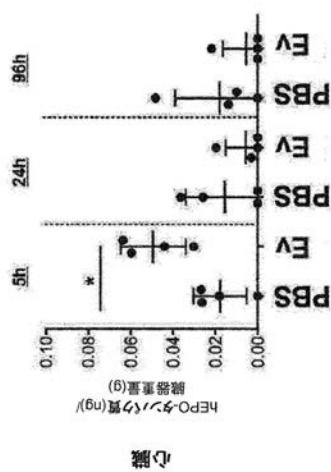


図4B

【図4-3】

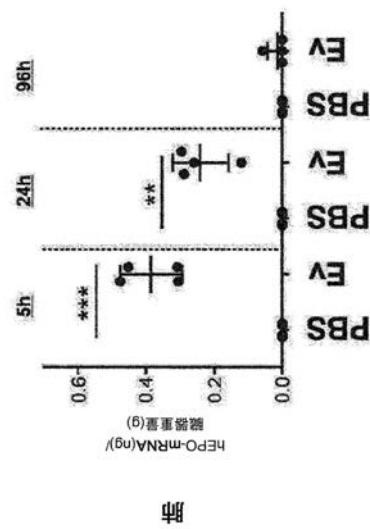


図4C

【図4-4】

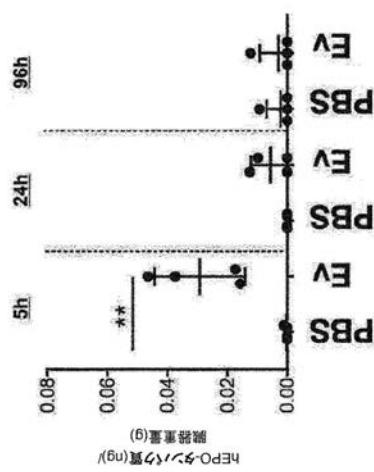


図4D

【図4-5】

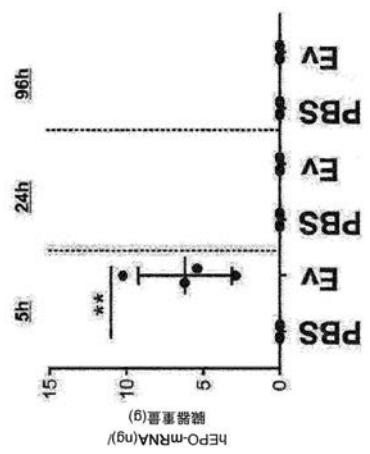
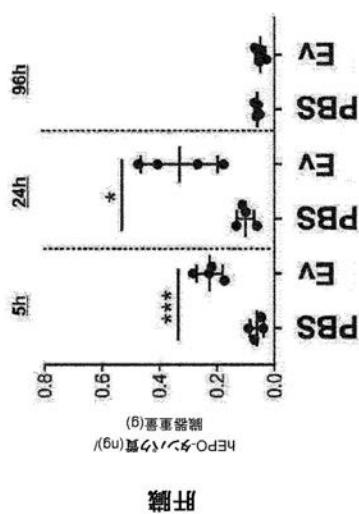


図4E

【図4-6】



【図4-7】

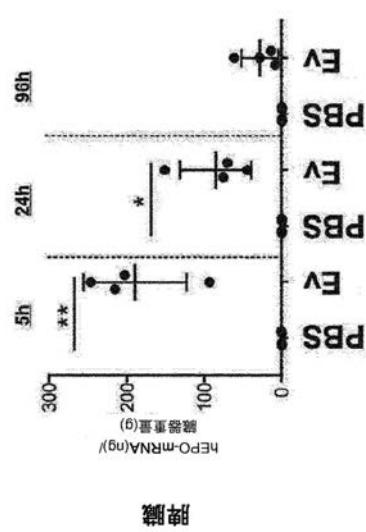


図4F

【図4-8】

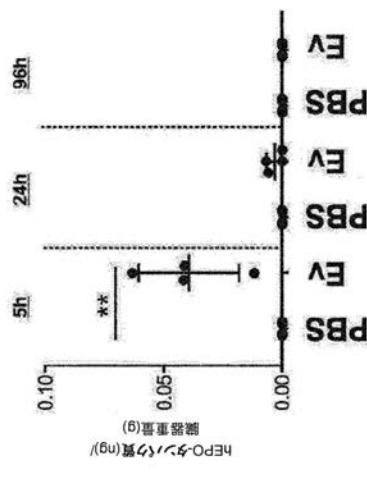


図4G

【図4-9】

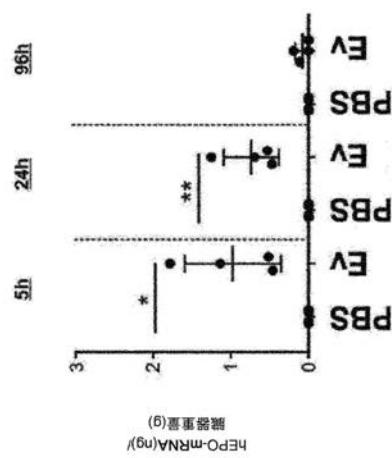


図4I

図4H

【図4-10】

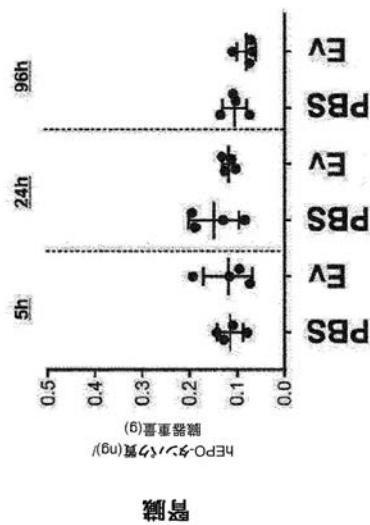


図4J

【図4-11】

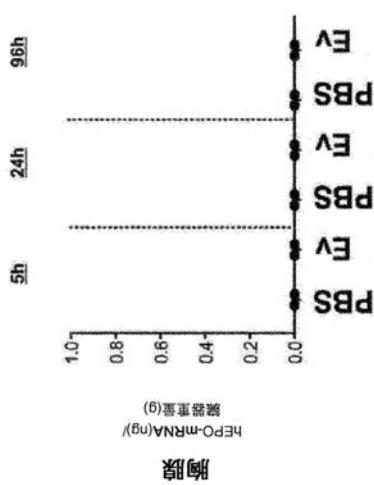


図4K

【図4-12】

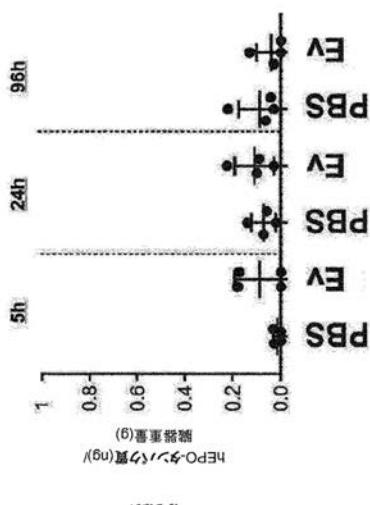


図4L

【図4-13】

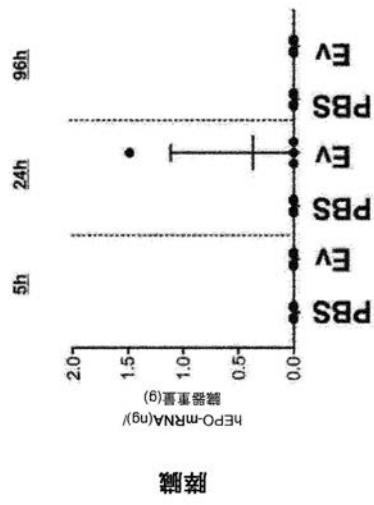


図4M

【図4-14】

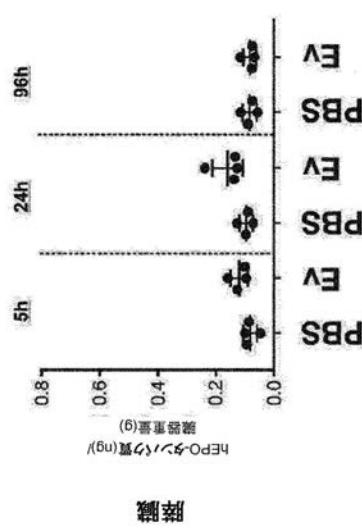


図4N

【図4-15】

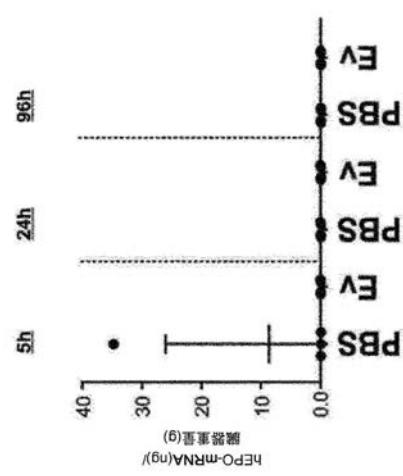


図4O

【図4-16】

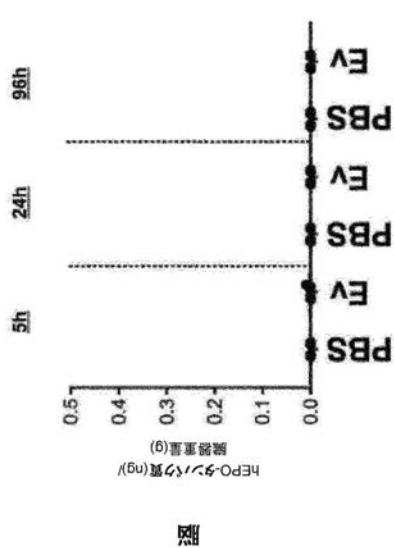


図4P

【図5】

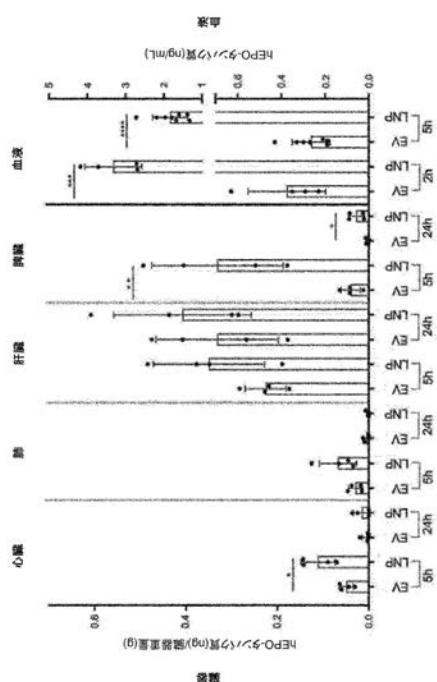


図5

【図 6 - 1】

【図 6 - 2】

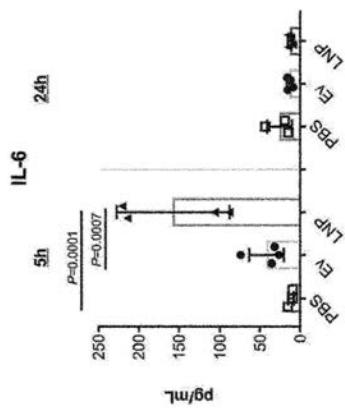


図 6A

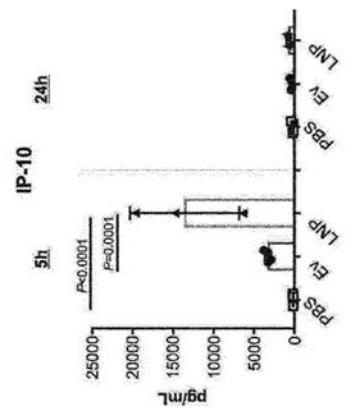


図 6B

【図 6 - 3】

【図 6 - 4】

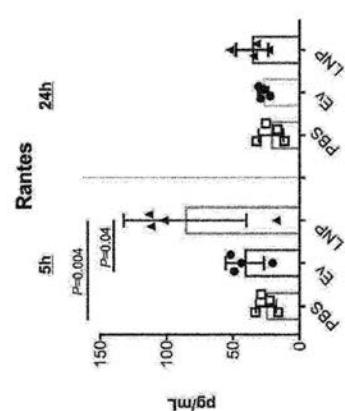


図 6C

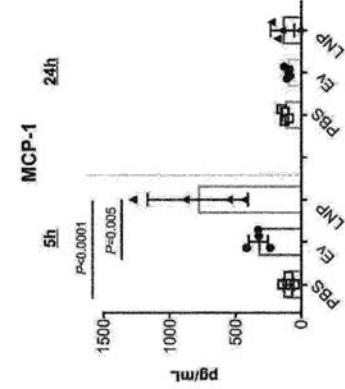


図 6D

【図 6 - 5】

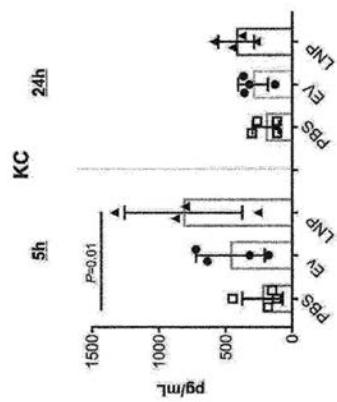


図 6E

【図 6 - 6】

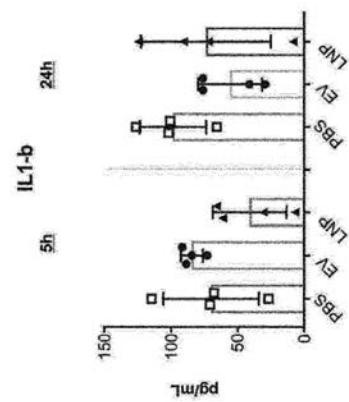


図 6F

【図 6 - 7】

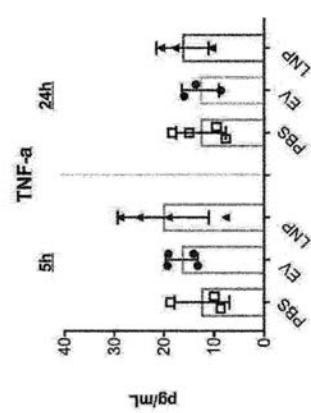


図 6G

【図 6 - 8】

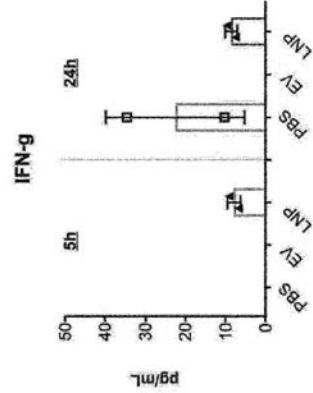


図 6H

【図 7 - 1】

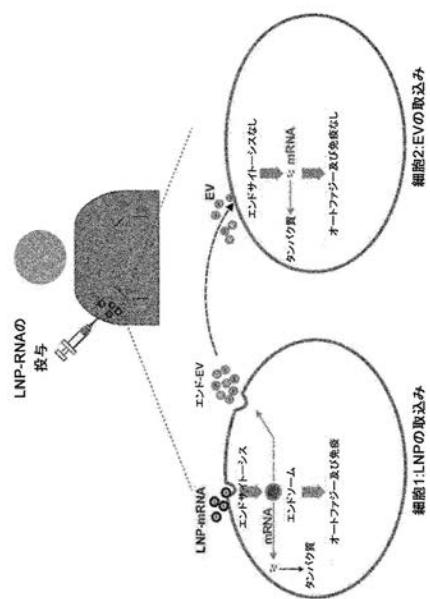


図 7A

【図 7 - 2】

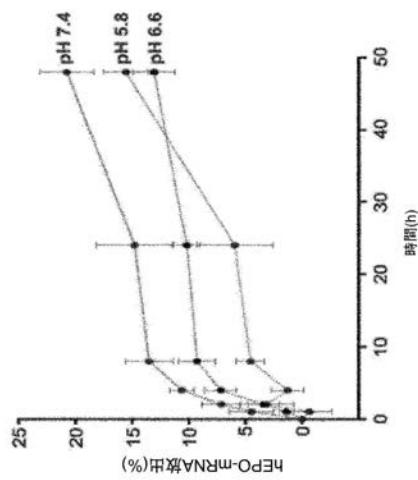


図 7B

【図 7 - 3】

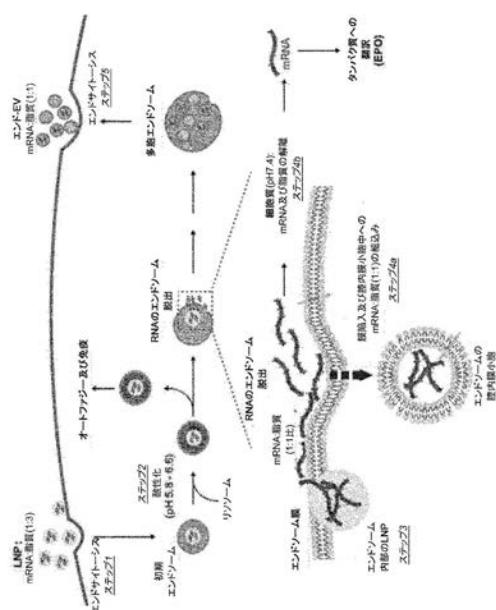
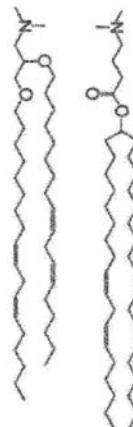


図 7C

【図 8 - 1】



DLin-DMA (DD-LNP):

DLin-Mc3-DMA (MC3-LNP):

図 8A

【図 8 - 2】

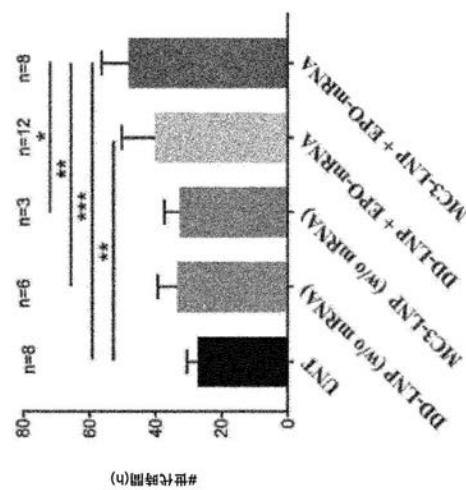


図 8B

【図 8 - 3】

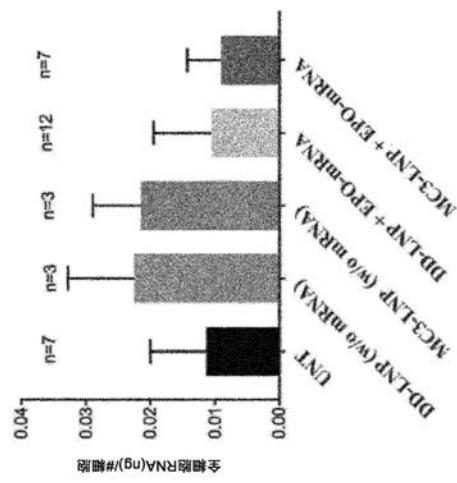


図 8C

【図 8 - 4】

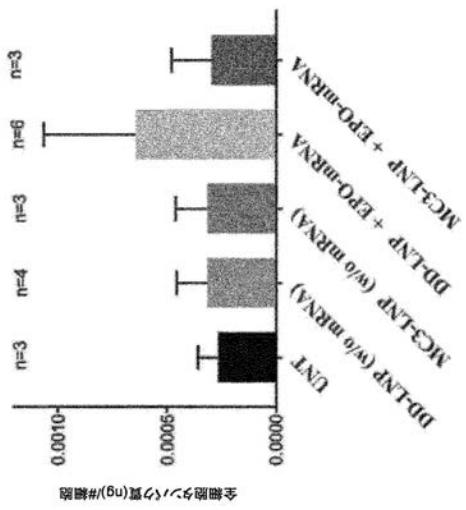


図 8D

【図 8 - 5】

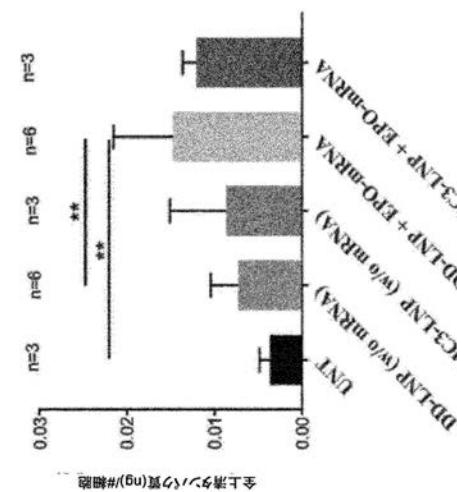
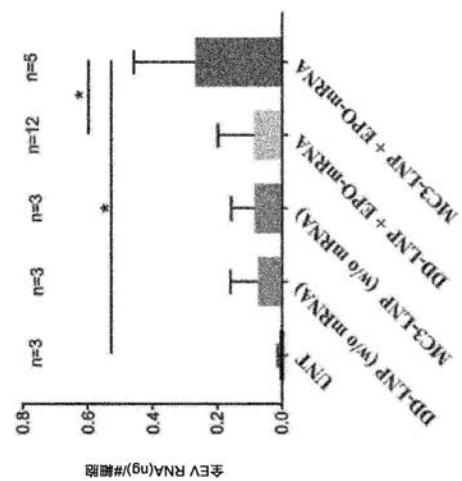


図 8E

【図 8 - 6】



【図 8 - 7】

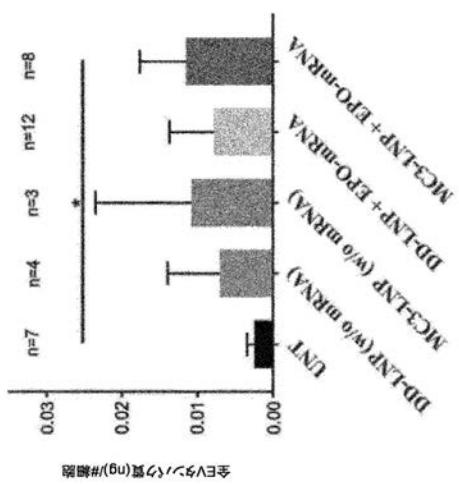


図 8F

【図 9】

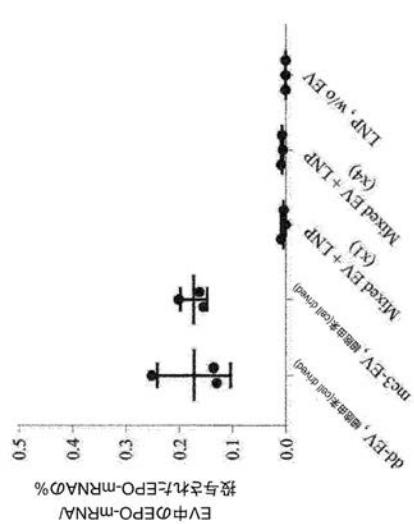


図 9

図 8G

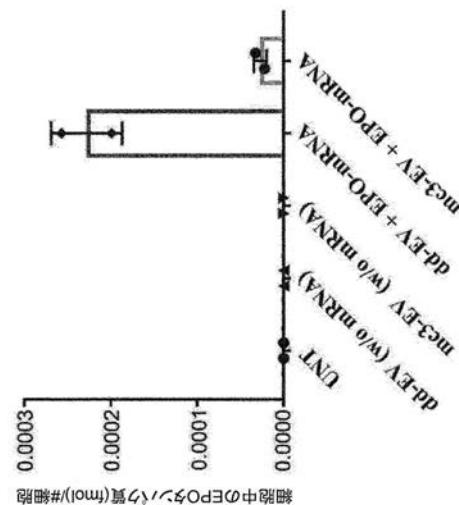


図 10A

【図 10 - 1】

【図 10-2】

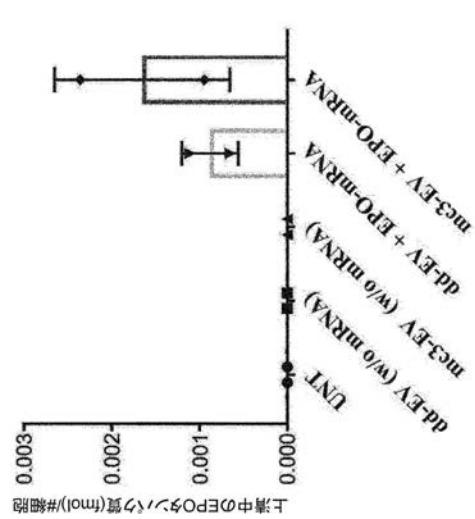


図 10B

【図 10-3】

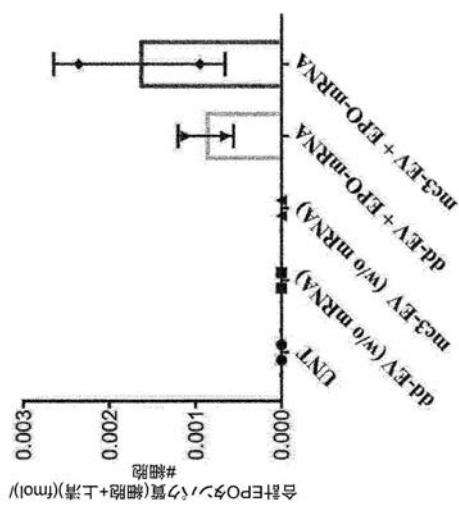


図 10C

【図 10-4】

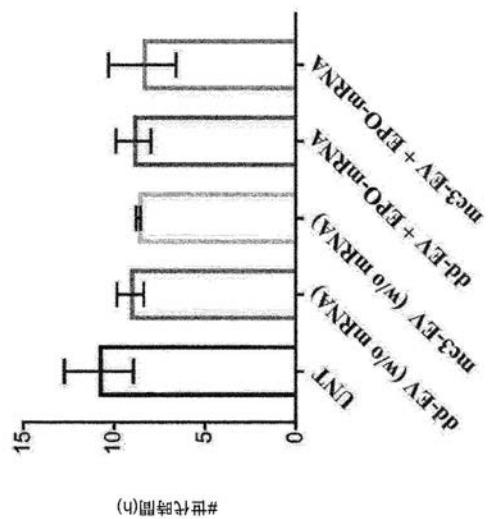


図 10D

【図 10-5】

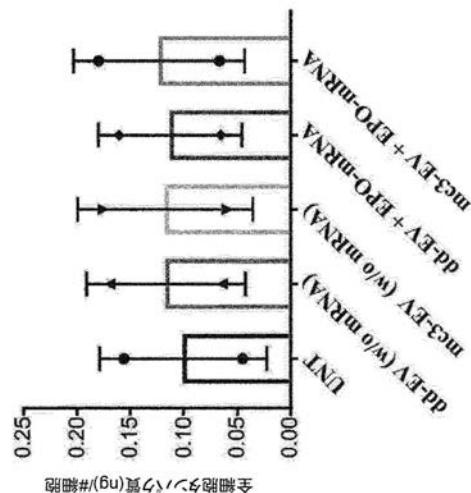


図 10E

【図 10-6】

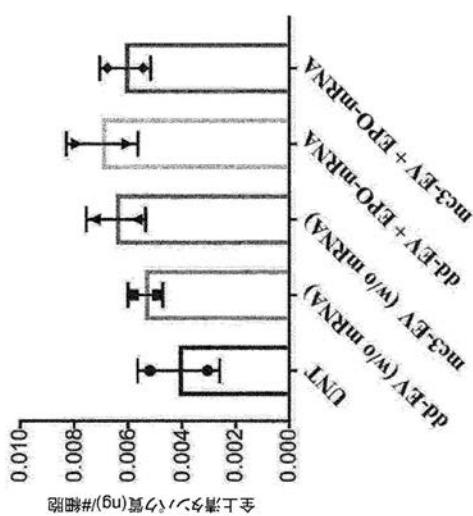


図 10F

【図 11】

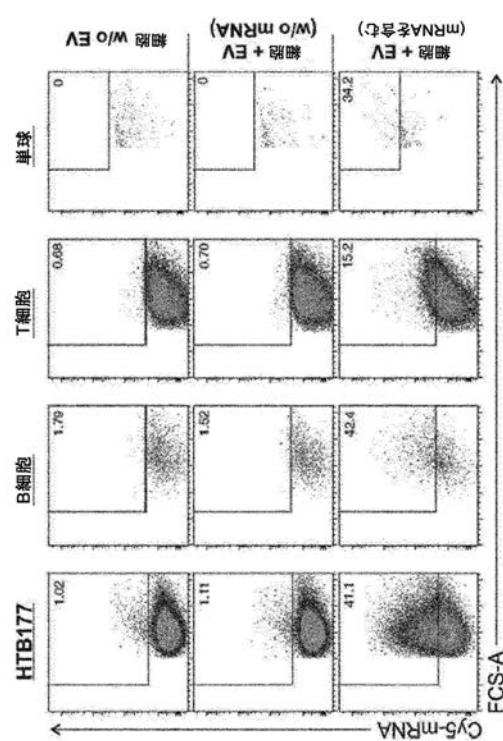


図 11

【図 12】

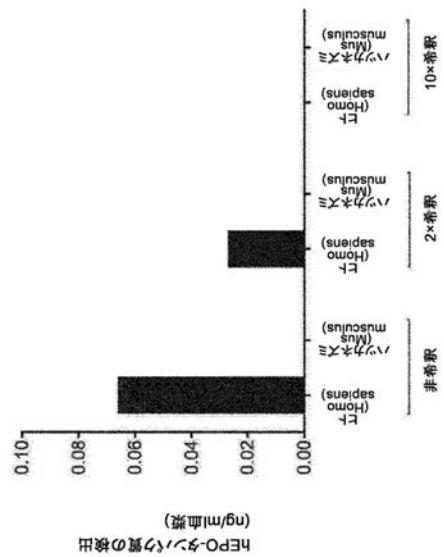


図 12

【図 13】

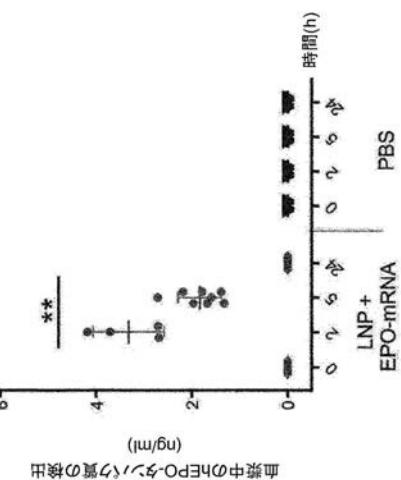


図 13

【図 14-1】

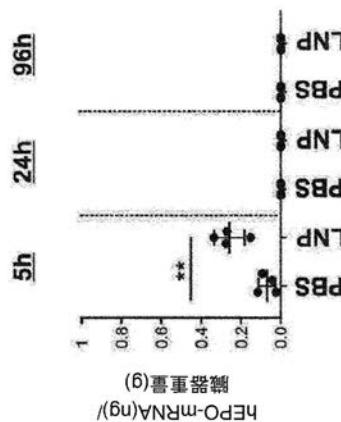


図 14A

【図 14-2】

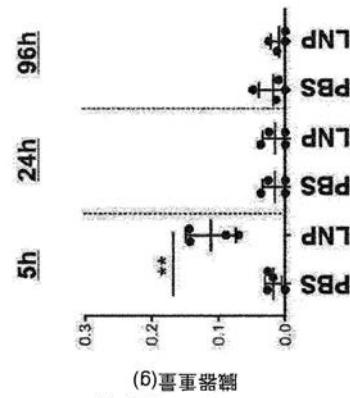


図 14B

【図 14-3】

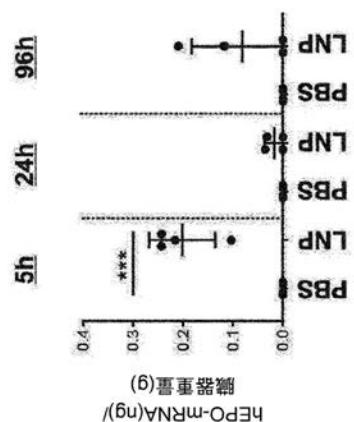


図 14C

【図 14-4】

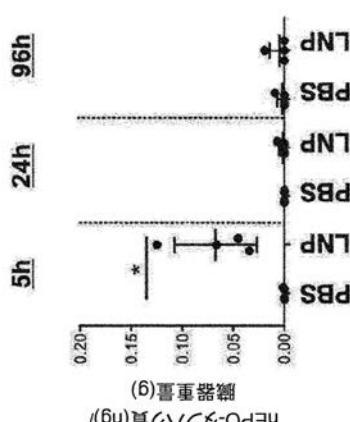


図 14D

【図 14-5】

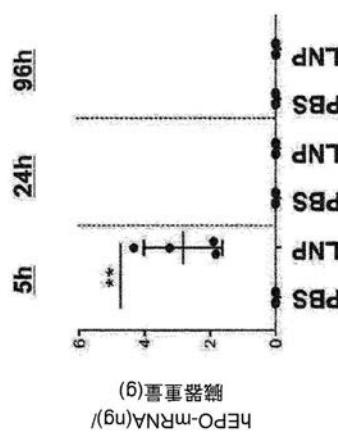


図 14E

【図 14-6】

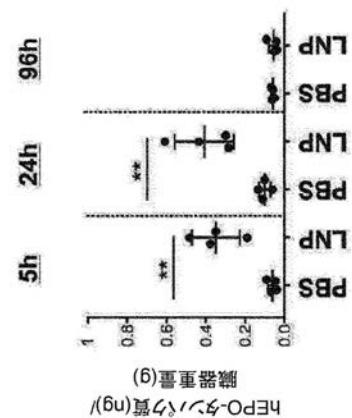


図 14F

【図 14-7】

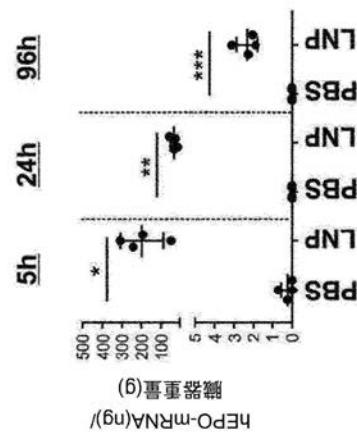


図 14G

【図 14-8】

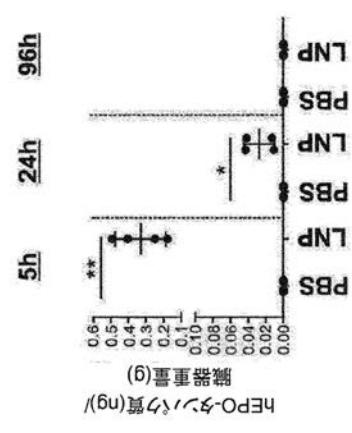


図 14H

【図 14-9】

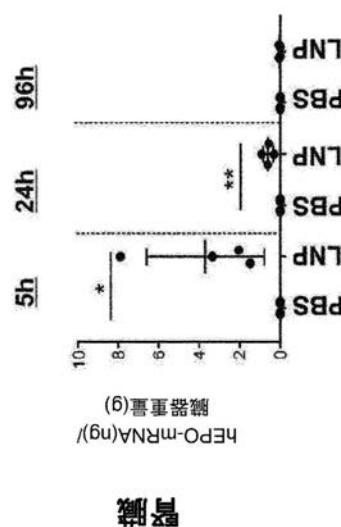


図 14I

【図 14-10】

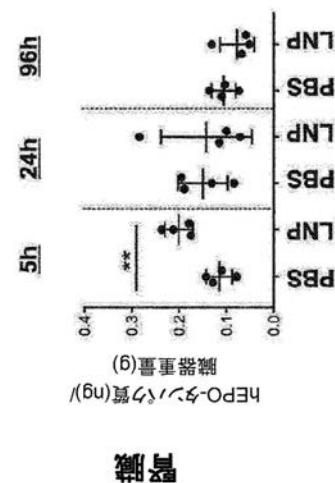


図 14J

【図 14-11】

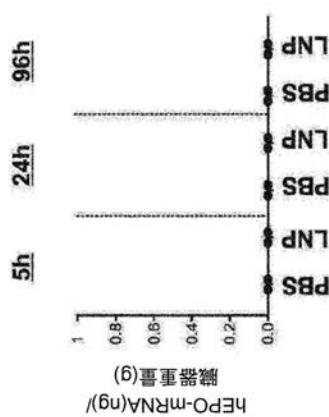


図 14K

【図 14-12】

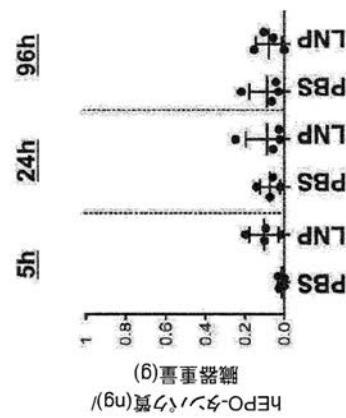
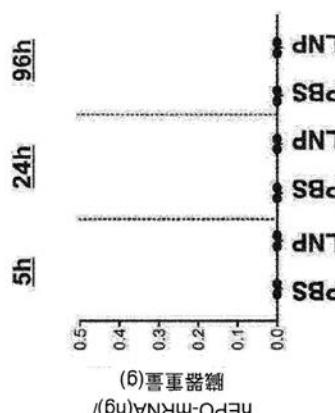


図 14L

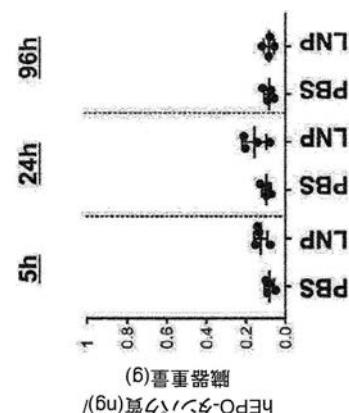
【図 14-13】



機器重量

図 14M

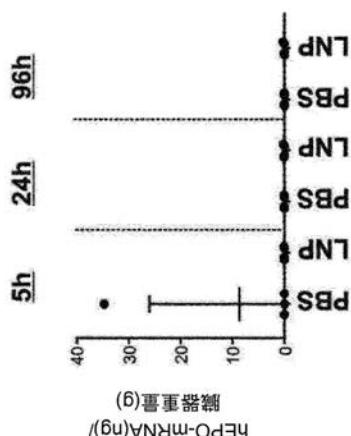
【図 14-14】



機器重量

図 14N

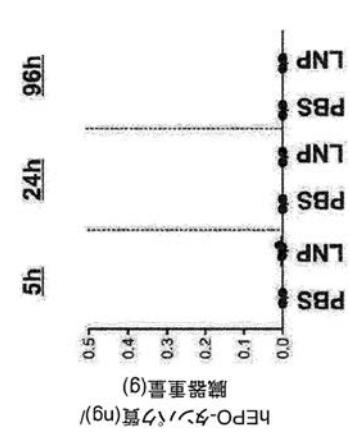
【図 14-15】



機器重量

図 14O

【図 14-16】



機器重量

図 14P

【図 15-1】

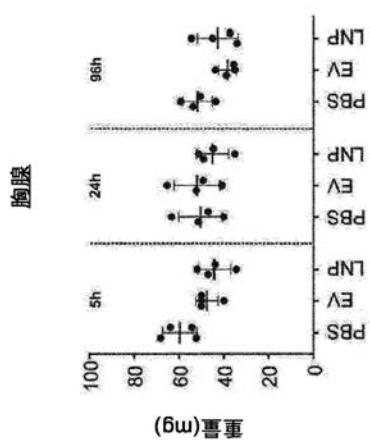


図 15A

【図 15-2】

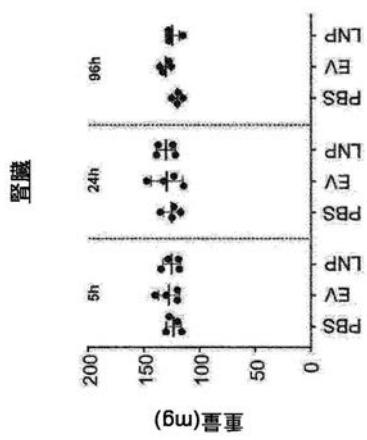


図 15B

【図 15-3】

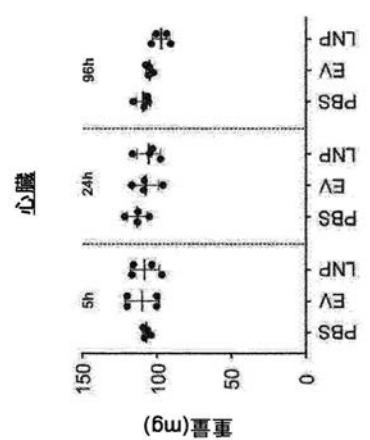


図 15C

【図 15-4】

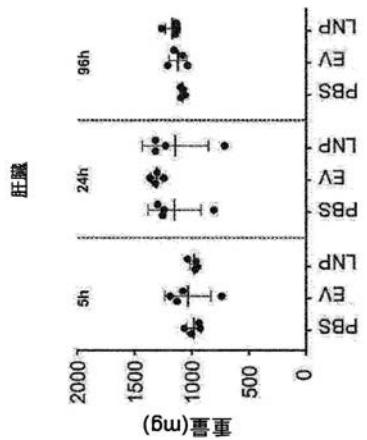


図 15D

【図 15-5】

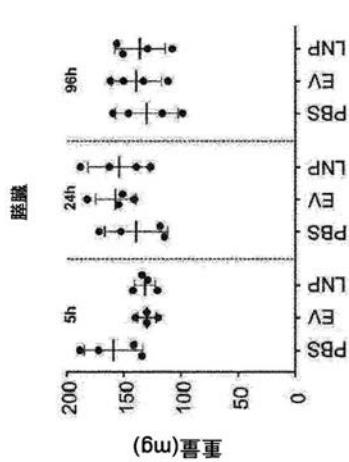


図 15E

【図 15-6】

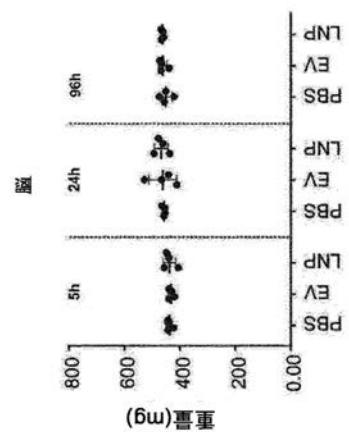


図 15F

【図 15-7】

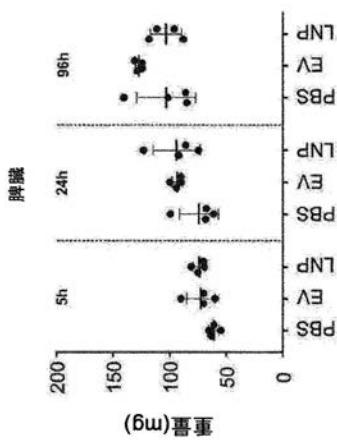


図 15G

【図 15-8】

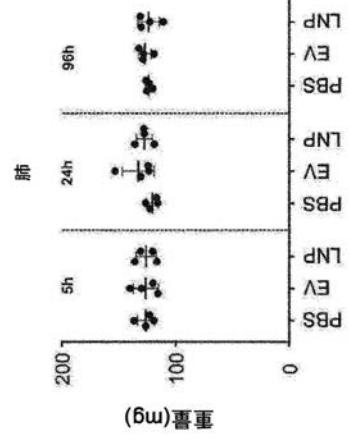


図 15H

【図 16-1】

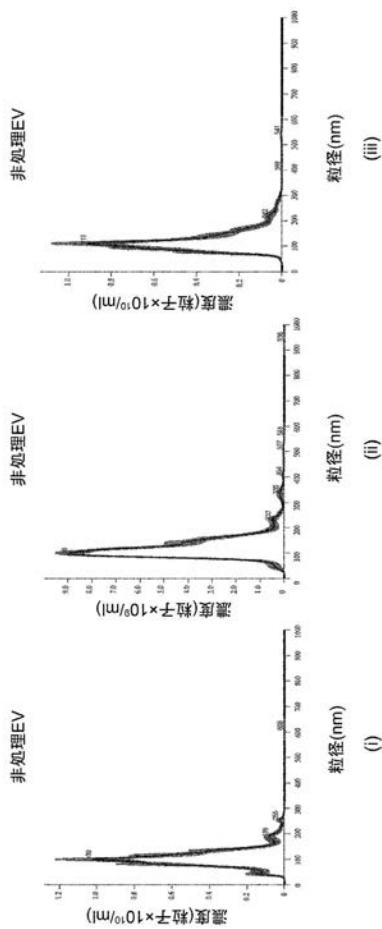


図 16A

【図 16-2】

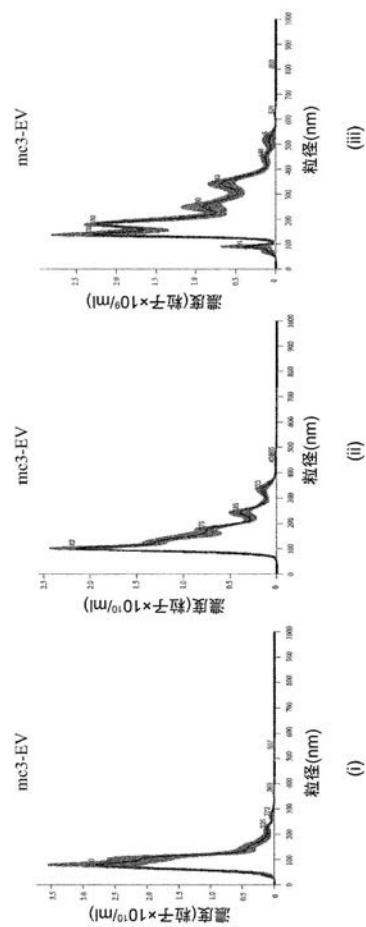


図 16B

【図 17-1】

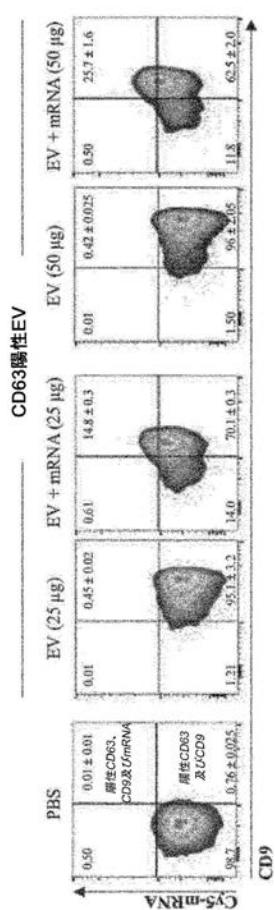


図 17A

【図 17-2】

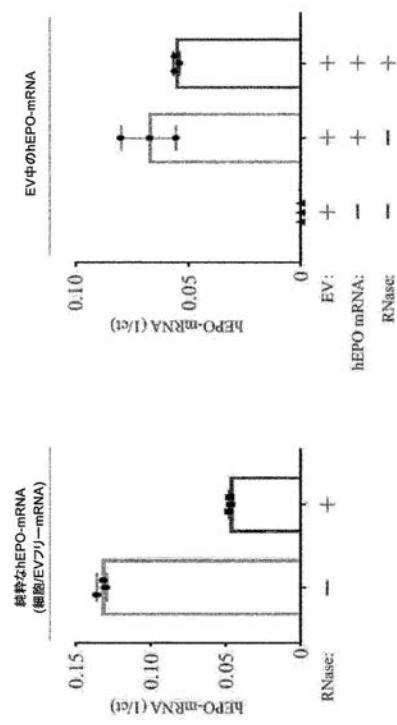


図 17B

【図 18】

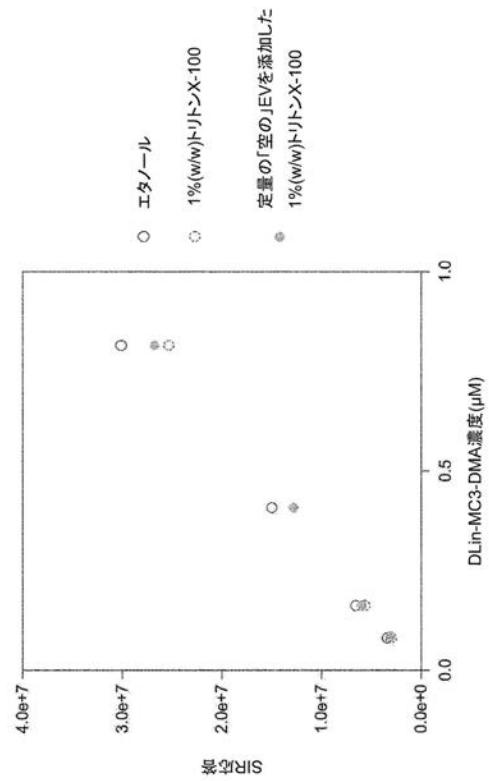


図 18

【配列表】

2021528096000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2019/067232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K9/127 A61K31/7105  
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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/156849 A1 (DE FOUGEROLLES ANTONIN [US] ET AL) 20 June 2013 (2013-06-20) paragraph [0003] - paragraph [0060] paragraph [0357] - paragraph [0479] paragraph [0835] claims 1, 3-8, 11-13, 31-34, 55-57, 61, 62 examples 9, 10, 13, 16, 22, 49; tables 4, 5, 7, 13, 27; sequences 2, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 18, 19 ----- US 2016/354313 A1 (DE BEER JOEL [CH]) 8 December 2016 (2016-12-08) paragraph [0061] - paragraph [0073] paragraph [0193] - paragraph [0235] examples 1B, 1C, 2, 6, 7, 11 figures 11, 14 claims 212-229 paragraph [0001] - paragraph [0013] ----- -/-	1-92
X		1-92

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

2 October 2019

09/10/2019

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

González Ferreiro, M

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/067232

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 3 292 861 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 14 March 2018 (2018-03-14)</p> <p>paragraph [0001] - paragraph [0033] paragraphs [0045], [0060] - paragraph [0080] paragraphs [0087], [0088], [0099], [0120], [0121], [0129] claims 1-3, 5, 7, 8, 11-14 -----</p>	1,2,14, 15,30, 31,36, 40-49, 51-57, 59-62, 69, 72-75, 77,84, 90-92

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2019/067232

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013156849	20-06-2013	AU 2012352180 A1 AU 2016231503 A1 AU 2018207584 A1 CA 2859387 A1 CA 3018046 A1 CN 104114572 A CN 110201187 A EP 2791160 A1 HK 1203077 A1 JP 2015501844 A JP 2019059793 A KR 20140102759 A RU 2014129004 A SG 10201604896T A SG 11201402666W A US 2013156849 A1 US 2013236974 A1 US 2013237592 A1 US 2013237593 A1 US 2013237594 A1 US 2013244278 A1 US 2013244279 A1 US 2013245104 A1 US 2013245105 A1 US 2013245106 A1 US 2013245107 A1 US 2013252281 A1 US 2013253043 A1 US 2013266640 A1 US 2016193299 A1 US 2018125937 A1 WO 2013090648 A1 ZA 201403783 B	31-07-2014 06-10-2016 09-08-2018 20-06-2013 20-06-2013 22-10-2014 06-09-2019 22-10-2014 16-10-2015 19-01-2015 18-04-2019 22-08-2014 10-02-2016 30-08-2016 30-10-2014 20-06-2013 12-09-2013 12-09-2013 12-09-2013 19-09-2013 19-09-2013 19-09-2013 19-09-2013 19-09-2013 26-09-2013 26-09-2013 10-10-2013 07-07-2016 10-05-2018 20-06-2013 30-09-2015
US 2016354313	08-12-2016	AU 2015208837 A1 CA 2936514 A1 CN 105934240 A EA 201691448 A1 EP 3096741 A2 JP 2017502997 A KR 20160110410 A US 2016354313 A1 WO 2015110957 A2 ZA 201604831 B	11-08-2016 30-07-2015 07-09-2016 30-12-2016 30-11-2016 26-01-2017 21-09-2016 08-12-2016 30-07-2015 30-05-2018
EP 3292861	14-03-2018	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
C 1 2 N 5/0781 (2010.01)	C 1 2 N 5/0781	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
C 1 2 N 5/0786 (2010.01)	C 1 2 N 5/0786	
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

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

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ハディ・ヴァラディ

スウェーデン 4 0 5 3 0 イエーテボリ、ユニバーシティ・オブ・イエーテボリ、ボックス 1 0 0

(72)発明者 レンナルト・リンドフォーシュ

スウェーデン 4 3 1 8 3 メルンダル、アストラゼネカ・アール・アンド・ディ・メルンダル

F ターム(参考) 4B065 AA90X BA22 BD02 BD15 CA44

4C084 AA02 AA13 DB56 NA13 NA14 ZA02 ZA55 ZB07 ZB11

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA12 NA13 ZA02 ZA55 ZB07

ZB11

4C087 AA01 AA02 BB70 CA20 NA13 NA14 ZA02 ZA55 ZB07 ZB11