(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-505440
(P2025-505440A)
(43)公表日　令和7年2月26日(2025.2.26)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/46 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/46	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*9/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/10	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*9/107(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/107	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*9/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/20	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*9/48 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/48	４Ｃ０８６

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全261頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-545180(P2024-545180)
(86)(22)出願日　令和5年1月24日(2023.1.24)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月27日(2024.9.27)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/051650
(87)国際公開番号　WO2023/144127
(87)国際公開日　令和5年8月3日(2023.8.3)
(31)優先権主張番号　63/305,230
(32)優先日　令和4年1月31日(2022.1.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/368,975
(32)優先日　令和4年7月20日(2022.7.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/418,959
最終頁に続く

(71)出願人　524026469
エイジーエス・セラピューティクス・ソシエテ・パール・アクシオン・サンプリフィエ
ＡＧＳ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＳＡＳ
フランス７５００３パリ、リュ・グルヌタ１０
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井 陽子
(72)発明者　ドリッタンティ，リラ
フランス７５０１１パリ、アブニュ・フ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　微細藻類由来の細胞外小胞、投与の際のその体内分布および使用

(57)【要約】
生物活性カーゴが負荷されている微細藻類由来の細胞外小胞（ＭＥＶ）を含有する組成物および薬物デリバリーシステムが提供される。ＭＥＶは、さまざまな投与経路によって製剤化され、投与され、ワクチンとして、抗がん治療薬として、精神疾患、障害および状態の治療薬として、診断薬として、ならびに他のこのような使用を含め、治療薬としてのさまざまな適用を有する。

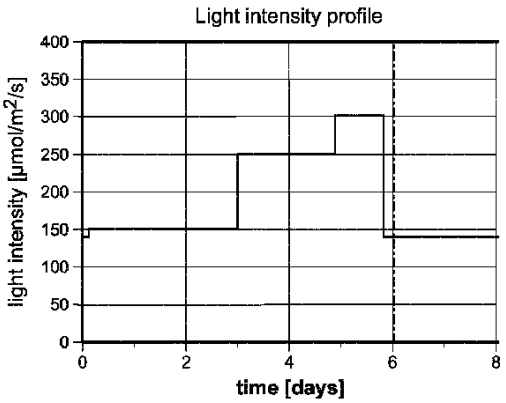


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
経口デリバリー、静脈内デリバリー、気管内デリバリー、筋肉内デリバリー、鼻腔内デリバリーまたは肺への吸入デリバリーによる投与のために製剤化された、微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物である薬物デリバリーシステムであって、それによって、ＭＥＶは、生物活性カーゴを標的組織に送達するために製剤化され、
ＭＥＶは、生物活性カーゴを含み、
薬物デリバリーシステムは、ＭＥＶを含む組成物であり、標的化された組織へのデリバリーのための投与経路のために製剤化される、薬物デリバリーシステム。
【請求項２】
標的組織が、肺、肝臓、脾臓、腸、脳、鼻－口腔粘膜、心臓および腎臓の中から選択される、請求項１に記載の薬物デリバリーシステム。
【請求項３】
組成物が、懸濁液またはエマルジョンとして製剤化される、請求項１または請求項２に記載の薬物デリバリーシステム。
【請求項４】
組成物が、ナノエマルジョンまたはマイクロエマルジョンであるエマルジョンとして製剤化される、請求項３に記載の薬物デリバリーシステム。
【請求項５】
組成物が、経口投与用の錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、散剤、トローチ剤、顆粒剤、液体、鼻腔投与もしくは経口吸入もしくは気管内投与用のオイル、懸濁液またはエマルジョンとして製剤化される、請求項１から４のいずれか記載の薬物デリバリーシステム。
【請求項６】
ＭＥＶがクロレラ属細胞外小胞であり、
クロレラ属細胞外小胞が、単離された細胞外小胞中に導入されている異種生物活性分子カーゴを含み、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞が、平均して同一の生物活性分子カーゴを含有し、
カーゴ分子が、クロレラ属にとって異種であり、
生物活性カーゴが、生体分子または小分子である、請求項１から５のいずれかに記載の薬物デリバリーシステム。
【請求項７】
ＭＥＶがクロレラ属細胞外小胞であり、
クロレラ属細胞外小胞が、微細藻類によって細胞外小胞中に内因的に導入される異種生物活性分子カーゴを含み、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞が、同一の生物活性分子カーゴを含有し、
カーゴ分子が、クロレラ属にとって異種であり、
生物活性カーゴが、生体分子または小分子である、請求項１から６のいずれかに記載の薬物デリバリーシステム。
【請求項８】
微細藻類が、クロレラ属の種であり、
組成物中のＭＥＶが、単離されたＭＥＶ中に導入されている異種生物活性分子カーゴを含有し、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞が、平均して同一の異種カーゴを含有し、
カーゴが、クロレラ属にとって異種であり、
カーゴが、生体分子または小分子薬物である、請求項１から７のいずれかに記載の薬物デリバリーシステム。
【請求項９】
ＭＥＶがクロレラ属細胞外小胞であり、
クロレラ属細胞外小胞が、微細藻類によって細胞外小胞中に外因的に導入されている異

種生物活性分子カーゴを含み、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞が、同一の生物活性分子カーゴを含有し、
カーゴ分子が、クロレラ属にとって異種であり、
生物活性カーゴが、生体分子または小分子である、請求項１から７のいずれかに記載の組成物または薬物デリバリーシステム。
【請求項１０】
ＭＥＶが、ミドリムシ植物門（ユーグレナ藻類）、黄金色植物門（黄金藻類および珪藻類）、炎色植物門（炎色藻類）、緑藻植物門（緑藻類）、紅色植物門（紅藻類）、褐色植物門（褐藻類）および黄緑色植物門（黄緑藻類）の中から選択される微細藻類の門に由来する、請求項１から９のいずれかに記載の組成物または薬物デリバリーシステム。
【請求項１１】
微細藻類は、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスの中から選択されるクロレラ属の１種である、請求項１から１０のいずれかに記載の組成物または薬物デリバリーシステム。
【請求項１２】
クロレラ属が、クロレラ・ブルガリスである、請求項１１に記載の組成物または薬物デリバリーシステム。
【請求項１３】
ＭＥＶが、緑藻綱またはトレボウクシア藻綱の１種である微細藻類に由来する、請求項１から１２のいずれかに記載の組成物または薬物デリバリー。
【請求項１４】
門が、緑藻植物門である、請求項１０に記載の組成物または薬物デリバリーシステム。
【請求項１５】
ＭＥＶが、クロレラ属またはクラミドモナス属に由来する、請求項１３に記載の組成物または薬物デリバリーシステム。
【請求項１６】
単離された微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む、生物活性薬剤のデリバリーに使用するための組成物であって、
微細藻類が、クロレラ属の１種であり、
ＭＥＶが、デリバリーのためのカーゴとして１種または複数の生物活性薬剤を含み、
組成物が、対象への投与のために製剤化される、組成物。
【請求項１７】
経口投与用の薬学的に許容される媒体中に微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む、活性薬剤の経口投与用組成物。
【請求項１８】
免疫系への活性薬剤のデリバリーに使用するための組成物であって、経口デリバリー用に製剤化され、経口投与用の薬学的に許容される媒体中に微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む、組成物。
【請求項１９】
免疫系へ生物活性薬剤を送達するために使用するための、請求項１６から１８のいずれかに記載の組成物。
【請求項２０】
脾臓へのデリバリーのために微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む、請求項１６から１９のいずれかに記載の組成物。
【請求項２１】
微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）が、白脾臓へのデリバリーのためである、請求項２０に記載の組成物。
【請求項２２】
ＭＥＶが、免疫モジュレーション性である異種カーゴを含む、請求項２０または請求項

２１に記載の組成物。
【請求項２３】
微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物であって、
鼻腔内投与用に製剤化され、
ＭＥＶが、異種カーゴを含み、
異種カーゴが、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態の処置、検出もしくは診断のための、または脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングするための生物活性分子を含む、組成物。
【請求項２４】
脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を処置、検出、診断またはその処置をモニタリングするための使用のための、請求項２３に記載の組成物。
【請求項２５】
カーゴを含有するＭＥＶの各々が、複数の異なる異種カーゴを含む、請求項１から２４のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項２６】
ＭＥＶが、２つより多いカーゴ生成物を含む、請求項１から２５のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項２７】
カーゴが、疾患もしくは状態を処置もしくは予防するための、またはその症状を処置もしくは予防するための治療薬である、請求項１から２５のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項２８】
カーゴが生体分子である、請求項１から２７のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項２９】
カーゴが生体高分子を含む、請求項１から２８のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３０】
生体高分子が、天然に存在する生体高分子であるか、または合成生体高分子であるか、または改変された生体高分子である、請求項２９に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３１】
カーゴが、核酸分子、ポリペプチド、タンパク質、プラスミド、アプタマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項１から３０のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３２】
カーゴが、ＤＮＡまたはＲＮＡである核酸である、請求項３１に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３３】
カーゴが、阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）である、請求項３１または請求項３２に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３４】
ＲＮＡｉが、サイレンシングＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）または低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）またはマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）である、請求項３３に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３５】
カーゴが、ｍＲＮＡまたは改変ｍＲＮＡである、請求項３１または請求項３２に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３６】
カーゴが、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌ

ｎｃＲＮＡ）であるＲＮＡ分子である、請求項３２に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３７】
カーゴがオリゴヌクレオチドである、請求項３１または請求項３２に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３８】
カーゴが、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）である、請求項３７に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項３９】
カーゴが、遺伝子編集システムを含む、請求項３１または請求項３２に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４０】
遺伝子編集システムが、ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳシステムを含む、請求項３９に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４１】
遺伝子編集システムが、ＣＲＩＳＰＲ関連またはＣＲＩＳＰＲ様システムを含む、請求項４０に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４２】
カーゴがＤＮＡを含む、請求項１から４１のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４３】
カーゴがプラスミドを含む、請求項４２に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４４】
プラスミドが、治療用生成物または診断用生成物をコードする、請求項４３に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４５】
プラスミドが、治療用ＲＮＡ生成物をコードする、請求項４３または請求項４４に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４６】
ＲＮＡ生成物が、阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）である、請求項４５に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４７】
生成物が、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡまたはｍｉＲＮＡである、請求項４６に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４８】
プラスミドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムまたは二本鎖ＲＮＡをコードする、請求項４３から４６のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項４９】
プラスミドが、真核生物のプロモーターの制御下にカーゴ生成物をコードする、請求項４３から４８のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項５０】
プロモーターが、ＲＮＡポリメラーゼＩＩまたはＩＩＩである、請求項４９に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項５１】
プロモーターが、ＲＮＡポリメラーゼＩＩによって認識され、真核生物のウイルスプロモーターである、請求項５０に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項５２】

プロモーターが、サイトメガロウイルスプロモーター、サルウイルス４０プロモーター、単純ヘルペスプロモーター、エプスタイン・バーウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、合成プロモーター、アクチンプロモーターおよび合成キメラプロモーターの中から選択される、請求項５０または請求項５１に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項５３】

プラスミドが、他の真核生物の転写配列および真核生物の翻訳配列をさらに含む、請求項４３から５２のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項５４】

カーゴが、免疫モジュレーターをコードするか、またはそれを含む、請求項１から５３のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項５５】

組成物が、経口デリバリー用に製剤化される、請求項５４に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項５６】

カーゴが、１つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、ＭＨＣ抗原をマスクする、または１つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション剤を含むか、またはそれをコードする、請求項１から５５のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項５７】

カーゴが、ホルモンまたはサイトカインまたはケモカインを含むか、またはそれをコードする、請求項１から５６のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項５８】

カーゴが、ヒト成長ホルモン、Ｎ－メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロリラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）および黄体形成ホルモン（ＬＨ）；肝増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子－アルファおよび－ベータ；ミュラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（ＴＰＯ）；神経増殖因子；トランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ）；インスリン様増殖因子－Ｉおよび－ＩＩ；エリスロポエチン（ＥＰＯ）；骨誘導因子；インターフェロン、例えば、インターフェロン－アルファ、ベータおよび－ガンマ；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えば、マクロファージ－ＣＳＦ（Ｍ－ＣＳＦ）；顆粒球－マクロファージ－ＣＳＦ（ＧＭ－ＣＳＦ）；および顆粒球－ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ）；またはインターロイキン（ＩＬ）の中から選択されるホルモンまたはサイトカインまたは増殖因子を含むか、またはそれをコードする、請求項１から５７のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項５９】

カーゴが、感染症の処置のための抗生物質または他の薬剤を含むか、またはそれをコードする、請求項１から５８のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項６０】

抗生物質または他の薬剤が、呼吸器感染症または副鼻腔感染症の処置のためのものである、請求項５９に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項６１】

抗生物質または他の薬剤が、真菌感染症または寄生虫感染症またはウイルス感染症を処置するためのものである、請求項５９または請求項６０に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項６２】

抗生物質または他の薬剤が、抗真菌剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤または抗寄生虫剤であ

る、請求項５９から６１のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項６３】
カーゴが、アミノグリコシド抗生物質、アミノシクリトール、アムフェニコール抗生物質、アンサマイシン抗生物質、カルバペネム、セファロスポリン、セファマイシン、リンコサミド、マクロライド、モノバクタム、ムピロシン、オキサセフェム、ペニシリン、ポリペプチド抗生物質、キノロン、リファンピン、ストレプトグラミン、スルホンアミドおよびテトラサイクリンの中から選択される抗生物質を含む、請求項５９から６２のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項６４】
抗生物質が、スペクチノマイシン、アジダムフェニコール、クロラムフェニコール、フロルフェニコール、チアンフェニコール、リファミド、リファンピン、イミペネム、メロペネム、パニペネム、セファクロル、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド、セフピロム、セフプロジル、セフロキシム、セフィキシム、セファレキシン、セフラジン、セフブペラゾン、セフォキシチン、セフミノクス、セフメタゾール、セフォテタン、クリンダマイシン、リンコマイシン、アジスロマイシン、ブレフェルジンＡ、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、トブラマイシン、アズトレオナム、カルモナム、チゲモナム、ムピロシン、フロモキセフ、ラタモキセフ、モキサラクタム、アムジノシリン、アムジノシリンピボキシル、アモキシシリン、バカンピシリン、ベンジルペニシリン酸、ベンジルペニシリンナトリウム、エピシリン、フェンベニシリン（ｆｅｎｂｅｎｉｃｉｌｌｉｎ）、フロキサシリン、ペナメシリン、ペネタマートヨウ化水素酸塩、ペニシリンｏ－ベネタミン、ペニシリンＯ、ペニシリンＶ、ペニシリンＶ安息香酸塩、ペニシリンＶヒドラバミン、ペニメピサイクリンおよびフェネチシリンカリウム、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシンＢ、テイコプラニン、アミフロキサシン、シノキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、エンロフロキサシン、フレロキサシン、フルメキン、ガチフロキサシン、ゲミフロキサシン、グレパフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキソリン酸、ペフロキサシン、ピペミド酸、ロソクサシン、ルフロキサシン、スパルフロキサシン、テマフロキサシン、トスフロキサシン、トロバフロキサシン、リファンピン、キヌプリスチン、ダルホプリスチン、スルファニルアミド、スルファメトキサゾール、クロルテトラサイクリン、デメクロサイクリン塩酸塩、デメチルクロロテトラサイクリン、ドキシサイクリン、デュラマイシン、ミノサイクリン、ネオマイシン、オキシテトラサイクリン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびバンコマイシンの中から選択される抗生物質を含む、請求項６３に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項６５】
カーゴが、抗真菌剤を含む、請求項５９から６２のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項６６】
投与経路が、肝臓を標的とするか、またはそれを含む、請求項１から６５のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項６７】
カーゴが、遺伝子療法のための核酸である、請求項６６に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項６８】
遺伝子療法が、先天性代謝異常を処置するためのものである、請求項６７に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項６９】
カーゴが、化粧品であるか、または化粧的活性を有するか、または工業的使用を有する生成物を含む、請求項１から６８のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項７０】
ＭＥＶカーゴが、抗体もしくはその抗原結合性断片であるタンパク質を含むか、またはそれをコードする、請求項１から６９のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項７１】
抗体が、ｓｃＦｖ、二重特異性抗体またはその抗原結合性断片である、請求項６６から７０のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項７２】
抗体またはその抗原結合性断片が、チェックポイント阻害剤抗体もしくはその抗原結合性断片または腫瘍抗原特異的抗体もしくはその抗原結合性断片または抗がん遺伝子特異的抗体もしくはその抗原結合性断片である、または腫瘍特異的受容体またはシグナル伝達分子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項７０または請求項７１に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項７３】
抗体またはその抗原結合性断片が、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＰＤ－１／ＰＤＬ１経路、ＰＤ－１／ＰＤＬ２経路、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＨＨＬＡ－２、ＣＤ２８または他の免疫チェックポイントまたは免疫抑制剤または腫瘍抗原のうち１つまたは複数に特異的に結合し、阻害する、請求項７０または請求項７１に記載の組成物。
【請求項７４】
ＭＥＶカーゴが、疾患、障害または状態を処置または防止する、またはそのリスクを低減するためのワクチンを含む、請求項１から７３のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項７５】
ワクチンが、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質ワクチンである、請求項７４に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項７６】
ワクチンが、改変された細菌またはウイルスを含む、請求項７４または請求項７５に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項７７】
ＭＥＶカーゴが、がんもしくは感染性疾患もしくは神経変性疾患もしくは他の中枢神経系（ＣＮＳ）障害を処置するための、または加齢の影響を回復させる、もしくは加齢を減速もしくは逆転させるための、または加齢関連疾患もしくは眼性障害もしくは免疫学的障害を処置するための治療用生成物である、核酸またはタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を含む、請求項１から７６のいずれかに記載の組成物。
【請求項７８】
異種カーゴが、薬物デリバリーシステムまたは組成物を用いて処置される対象の免疫系を刺激する生成物を含む、請求項１から７７のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項７９】
経口投与用に製剤化される、請求項７０から７８のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８０】
カーゴが、機能性化粧品または化粧品または化粧的に活性な生成物を含む、請求項１から７９のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８１】
カーゴが、小分子生物活性分子を含む、請求項１から８０のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８２】
小分子生物活性分子が、小分子薬物である、請求項８１に記載の薬物デリバリーシステ

ムまたは組成物。
【請求項８３】
カーゴが、化学療法薬を含む、請求項１から８２のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８４】
カーゴがプロドラッグを含む、請求項１から８３のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８５】
カーゴが、診断用マーカーまたは検出可能生成物を含む、請求項１から８４のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８６】
診断用マーカーが、ルシフェラーゼもしくはルシフェラーゼをコードする核酸、蛍光タンパク質もしくは蛍光タンパク質をコードする核酸またはルシフェラーゼオペロンを含む、請求項８５に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８７】
ＭＥＶ中の異種カーゴが、診断の方法、またはワクチンとして、または処置の療法、または疾患、障害もしくは状態の診断のため、または疾患、障害もしくは状態の処置のため、または化粧用使用のため、または工業的使用のためのうち１つまたは複数において使用するためものである、請求項１から８６のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８８】
疾患ががんである、請求項８７に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項８９】
がんが、固形腫瘍または血液学的悪性腫瘍を含む、請求項８８に記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項９０】
経口投与用に製剤化される、請求項８７から８９のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項９１】
疾患、障害または状態を処置するために使用するための、請求項１から９０のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項９２】
疾患、障害または状態を処置または防止する方法であって、疾患、障害または状態を有する対象に、請求項１から９０のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物を投与することを含む、方法。
【請求項９３】
疾患、障害または状態が、がん、遺伝障害、肝臓疾患、免疫系または免疫細胞が関与する疾患、感染性疾患、呼吸器疾患、肺疾患および神経変性疾患、胃腸疾患および脳がんの中から選択される、請求項９２に記載の方法または請求項９１に記載の使用のための薬物デリバリーシステムもしくは組成物。
【請求項９４】
ＭＥＶが、吸入、経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、鼻腔内および／または気管内投与用に製剤化される、請求項９１から９３のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項９５】
ＭＥＶが、静脈内投与用に製剤化され、疾患が肝臓に関与しているか、または処置が肝臓を標的とする、請求項９１から９４のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項９６】
疾患が、がん、がん転移、メタボリックシンドローム、遺伝障害（遺伝子療法のデリバ

リー）、アルファ－アンチトリプシン（ＡＡＴ）欠乏症、他の先天性代謝異常、血友病、高コレステロール血症、肝臓炎症、脂肪性肝炎ならびに肝臓への治療薬のデリバリーによって処置され得る他の疾患および障害の中から選択される、請求項９５に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項９７】

ＭＥＶが、経口投与用に製剤化され、疾患が腸または脾臓に関与しているか、または処置が腸または脾臓へのデリバリーを標的とする、請求項９１から９４のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項９８】

疾患が、免疫モジュレーションによって処置される、請求項９７に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項９９】

疾患が、がんおよび／または免疫細胞障害またはワクチンによって処置もしくは防止される疾患である、請求項９７または請求項９８に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１００】

疾患が、腸感染、クローン病またはがんであり、ＭＥＶによって送達される適宜の処置が、微生物叢モジュレーションを含む、請求項９７から９９のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１０１】

ＭＥＶが気管内投与または吸入用に製剤化され、疾患が、肺または呼吸疾患に関与しているか、または処置が肺を標的とするか、もしくは呼吸疾患を標的とする、請求項９１から９４のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１０２】

疾患が、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺高血圧症、喘息、他の炎症性肺疾患、嚢胞性線維症、アルファ－アンチトリプシン（ＡＡＴ）欠乏症、先天性代謝異常、肺疾患、肺および呼吸器系が関与するがんおよびがん転移の中から選択される、請求項１０１に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１０３】

ＭＥＶが経口投与用に製剤化され、疾患が消化管または免疫系または白脾臓に関与しているか、または処置が、消化管または免疫系または白脾臓を標的とする、請求項９１から９４のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１０４】

疾患または状態が、中枢神経系または神経系の、またはそれが関与する疾患である、請求項９１から９４のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１０５】

ＭＥＶが鼻腔または鼻腔内投与用に製剤化される、請求項１０４に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１０６】

ＭＥＶが、鼻腔内投与用に製剤化され、疾患が脳に関与しているか、または処置が、脳へのデリバリーを標的とする、請求項９１から９４のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。

【請求項１０７】

疾患または状態が、細菌、ウイルス、卵菌または真菌である感染性病原体に関与している、請求項９１から１０６のいずれかに記載の方法。

【請求項１０８】

免疫系に生物活性薬剤を送達する方法であって、生物活性薬剤をカーゴとして含むＭＥＶを含む組成物を経口投与することを含む、方法。

【請求項１０９】
ＭＥＶが、ミドリムシ植物門（ユーグレナ藻類）、黄金色植物門（黄金藻類および珪藻類）、炎色植物門（炎色藻類）、緑藻植物門（緑藻類）、紅色植物門（紅藻類）、褐色植物門（褐藻類）および黄緑色植物門（黄緑藻類）の中から選択される微細藻類の門に由来する、請求項９１から１０８のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１１０】
ＭＥＶが、緑藻綱またはトレボウクシア藻綱の１種である微細藻類に由来する、請求項９１から１０８のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１１１】
門が緑藻植物門である、請求項１０９に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１１２】
ＭＥＶが、クロレラ属またはクラミドモナス属に由来する、請求項９１から１１１のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１１３】
ＭＥＶが、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスの中から選択されるクロレラ属の種に由来する、請求項９１から１１２のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１１４】
クロレラ属がクロレラ・ブルガリスである、請求項１１３に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１１５】
疾患、障害または状態を処置または防止する方法であって、請求項１から９０のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムを投与することを含む、方法。
【請求項１１６】
疾患、障害または状態を処置するために使用するための、請求項１から９０のいずれかに記載の薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１１７】
ＭＥＶにカーゴが外因的に負荷されている、請求項１１５に記載の方法または請求項１１６に記載の使用のための薬物デリバリーシステムもしくは組成物。
【請求項１１８】
ＭＥＶにカーゴが内因的に負荷されている、請求項１１５に記載の方法または請求項１１６に記載の使用のための薬物デリバリーシステムもしくは組成物。
【請求項１１９】
疾患、障害または状態が、がん、遺伝障害、肝臓疾患、免疫系もしくは免疫細胞が関与する疾患、感染性疾患、呼吸器疾患、肺疾患、神経変性疾患、胃腸疾患および脳がん、または内部臓器、泌尿生殖器性臓器、心血管系および関連臓器および組織、造血もしくはリンパ系組織、感覚臓器および組織、泌尿生殖器性臓器および組織、筋肉組織、骨および／もしくは内分泌組織が関与している疾患の中から選択される、請求項９１から１１８のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１２０】
内部臓器が、膵臓、肝臓および／または脾臓を含む、請求項１１９に記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１２１】
ＭＥＶが、経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、鼻腔内投与、気管内投与または吸入投与もしくは噴霧投与、局所（ｔｏｐｉｃａｌ）投与、局所（ｌｏｃａｌ）投与、腫瘍内投与、全身投与、粘膜投与および／または腹膜内投与用に製剤化される、請求項

９１から１２０のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１２２】
疾患が、がん、がん転移、メタボリックシンドローム、遺伝障害、アルファ－アンチトリプシン（ＡＡＴ）欠乏症、他の先天性代謝異常、血友病、高コレステロール血症、肝臓炎症、脂肪性肝炎ならびに肝臓への治療薬のデリバリーによって処置され得る他の疾患および障害の中から選択される、請求項９１から１２１のいずれか記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１２３】
疾患、障害または状態が、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病またはアルツハイマー病またはハンチントン病またはクロイツフェルトヤコブ病または他の神経変性疾患）または認知障害（例えば、認知症または健忘症またはせん妄または他の認知障害）または脳障害（例えば、脳炎またはてんかん発作または腫瘍または他の脳障害）または神経系障害（例えば、疼痛またはてんかん発作または感染症または他の神経系障害）または遺伝性疾患（例えば、嚢胞性線維症、地中海貧血症、鎌形赤血球貧血、ハンチントン病、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、テイサックス病または他の遺伝性疾患）または多因子疾患［例えば、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）または他の多因子疾患］またはがん（例えば、乳房または卵巣または腸または前立腺または皮膚のがんまたは他のがん）または高血圧症または高コレステロールまたは統合失調症または双極性障害または関節炎または代謝性疾患［例えば、家族性高コレステロール血症またはゴーシェ病またはハンター症候群またはクラッベ病またはメープルシロップ尿症または異染性白質ジストロフィーまたはＭＥＬＡＳ（ミトコンドリア脳症、乳酸アシドーシス、脳卒中様エピソード）またはニーマンピック病またはフェニルケトン尿症（ＰＫＵ）またはポルフィリン症またはテイサックス病またはウィルソン病または他の代謝性疾患］または呼吸器系の疾患［例えば、喘息または慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）または慢性気管支炎または肺気腫または肺がんまたは嚢胞性線維症または気管支拡張症または肺炎または呼吸器系の他の疾患］または消化管の疾患［例えば、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）または炎症性腸疾患（ＩＢＤ）または胃食道逆流症（ＧＥＲＤ）またはセリアック病または憩室炎または消化管の疾患］または粘膜の疾患（例えば、ベーチェット病または口腔灼熱症候群または口腔扁平苔癬または天然痘および類天疱瘡または再発性アフタ性口内炎またはシェーグレン症候群または泌尿生殖器感染症または副鼻腔炎または鼻腔もしくは副鼻腔ポリープまたは嗅覚および味覚障害またはアレルギーまたは眼性粘膜類天疱瘡または粘膜の他の疾患）または筋肉もしくは神経筋組織の疾患［例えば、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）またはシャルコーマリートゥース病または多発性硬化症または筋ジストロフィーまたは重症筋無力症または筋疾患または筋炎または末梢神経障害または他の筋肉もしくは神経筋疾患］または骨の疾患（例えば、頸椎症または骨粗しょう症または中足骨痛またはリウマチ性多発性筋痛または骨がんまたは関節リウマチまたは変形性関節症または他のもの）または内分泌組織の疾患［例えば、先端巨大症または副腎不全症またはアジソン病またはクッシング症候群またはグレーブス病または橋本病またはクロイツフェルトヤコブ病または甲状腺機能亢進症または甲状腺機能低下症または多発性内分泌新生物または多嚢胞性卵巣症候群（ＰＣＯＳ）または原発性副甲状腺機能亢進症または内分泌組織の他の疾患］または造血系もしくはリンパ組織の疾患［例えば、ファンコニ貧血または血小板減少症またはダイアモンドブラックファン貧血またはシュワックマンダイアモンド症候群または慢性肉芽腫性疾患またはゴーシュ病または骨髄増殖性腫瘍、骨髄異形成障害、慢性骨髄単球性白血病、急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ）を含む骨髄悪性腫瘍またはリンパ腫またはホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫またはリンパ節炎またはリンパ管炎またはリンパ浮腫またはリンパ球増加症］である、請求項９１から１２１のいずれかに記載の使用のための方法または薬物デリバリーシステムまたは組成物。
【請求項１２４】
ＭＥＶが、経口投与用に製剤化され、疾患、障害または状態が、消化管または免疫系に

関与しており、
異種カーゴが、処置のために消化管または免疫系または白脾臓を標的とする、請求項１から１２３のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１２５】
疾患、障害または状態が、免疫モジュレーションによって処置される、請求項１２４に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１２６】
ＭＥＶが、経口投与用に製剤化され、疾患、障害または状態が、血流を介して到達できる臓器および組織のいずれかに関与しているか、カーゴが、血流を介して到達できる臓器および組織のいずれかを標的とする、請求項１から１２５のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１２７】
カーゴが、単離されたＭＥＶ中に外因的に負荷された、請求項１から１２６のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１２８】
カーゴが、微細藻類によるＭＥＶ中に内因的に負荷された、請求項１から１２６のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１２９】
疾患、障害または状態が、がんおよび／または免疫細胞障害および／またはワクチンによって処置もしくは防止される疾患である、請求項１から１２８のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３０】
疾患が、腸感染症、クローン病またはがんである、請求項１から１２９のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３１】
ＭＥＶ中のカーゴが、マイクロバイオームをモジュレートする（微生物叢モジュレーション）ために使用するためのものである、請求項１から１３０のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３２】
ＭＥＶが、気管内投与または吸入投与または噴霧投与用に製剤化され、疾患が気道に関与しているか、もしくは気道のものであり、ならびに／または負荷されたカーゴが、呼吸疾患もしくは気道が関与している疾患を処置するために気道および／もしくは肺を標的とする、請求項１から１３１のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３３】
疾患、障害または状態が、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺高血圧症、喘息、他の炎症性肺疾患、嚢胞性線維症、アルファ－アンチトリプシン（ＡＡＴ）欠乏症、先天性代謝異常、肺疾患、がんおよび肺および／もしくは呼吸系が関与しているがん転移の中から選択される、請求項１３２に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３４】
疾患、障害または状態が、中枢神経系または神経系または二次臓器または組織のものであるか、またはそれが関与する、請求項１から１３３のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３５】
ＭＥＶが、鼻腔内投与用にまたは粘膜投与用に、または眼球内投与用に製剤化される、請求項１３４に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。

【請求項１３６】
製剤が、眼への投与用である、請求項１３５に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３７】
ＭＥＶが、鼻腔内投与用に製剤化され、疾患が脳のものであるか、または脳が関与している、請求項１から１３６のいずれかに記載の使用のための、薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３８】
疾患、障害または状態が、感染性病原体と関与している、請求項１から１３７のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１３９】
感染性病原体が、細菌、ウイルス、卵菌および真菌のうち１つまたは複数である、請求項１３８に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１４０】
ＭＥＶが、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスの中から選択されるクロレラ属の種によって産生される、請求項１から１３９のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１４１】
クロレラ属がクロレラ・ブルガリスである、請求項１４０に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１４２】
脳へ生物活性分子を送達する方法であって、生物活性分子であるカーゴを含む微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物を鼻腔内に投与することを含む、方法。
【請求項１４３】
鼻腔内投与後の脳への、またはインビトロで細胞への生物活性分子のデリバリーのために使用するための微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物であって、ＭＥＶがカーゴとして生物活性分子を含む、組成物。
【請求項１４４】
ニューロン、星状細胞、グリア細胞および／もしくは神経幹細胞へのインビトロデリバリー用に、インビボで鼻腔内投与を介した投与用に、またはインビトロで細胞への投与用に製剤化される、請求項１４３に記載の組成物。
【請求項１４５】
脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態の処置のための細胞療法に使用するための請求項１４４に記載の組成物。
【請求項１４６】
インビトロで細胞中への生物活性分子のデリバリーのための方法であって、細胞療法、診断法および／または検出のためにインビトロで生物活性カーゴを含有する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物を細胞中に導入することを含み、
生物活性分子が、疾患、障害もしくは状態の処置を達成できる、または疾患、障害もしくは状態を検出するために使用できる、または疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングするために使用できる任意の分子であり、
生物活性分子が、微細藻類および／またはＭＥＶに対して異種である、方法。
【請求項１４７】
細胞の組成物が、ＭＥＶを含み、請求項１４６に記載の方法によって生成され、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を処置するための細胞療法のために使用するための、請求項１４３から１４５のいずれかに記載の組成物。
【請求項１４８】
細胞療法のための細胞には、幹細胞、免疫細胞または細胞株が含まれ、ただし、幹細胞

は、胚性または多能性または全能性幹細胞を排除する管轄区域においては胚性または多能性または全能性幹細胞のうち１つまたは複数ではない、請求項１４３から１４７のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項１４９】

細胞療法の方法であって、請求項１４３から１４５および１４７のいずれかに記載の細胞の組成物を対象に投与することを含む、方法。

【請求項１５０】

脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を有する対象に細胞が投与される、請求項１４９に記載の方法。

【請求項１５１】

細胞療法のための細胞に、幹細胞、免疫細胞または細胞株が含まれ、ただし、幹細胞は、胚性または多能性幹細胞を排除する管轄区域においては胚性または多能性ではない、請求項１４９または請求項１５０に記載の方法。

【請求項１５２】

カーゴが、インビトロでニューロン、星状細胞、グリア細胞および神経幹細胞に送達されて、細胞療法組成物が生成される、請求項１４３から１５１のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項１５３】

生物活性カーゴが、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害および状態の処置または防止、またはそのリスクの低減のためのものである、請求項１４３から１５２のいずれかに記載の組成物または方法。

【請求項１５４】

Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の、内部移行された受容体の、および／または細胞内（エンドソーム）受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを含むカーゴを含有する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物。

【請求項１５５】

ＭＥＶ中のカーゴが、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の、内部移行された受容体の、および／または細胞内（エンドソーム）受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを含む、請求項１から１５４のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。

【請求項１５６】

ＴＬＲおよびそのアゴニストが以下：

TLRメンバー	リガンド/アゴニスト
TLR1	トリアシルリポペプチド(Pam3CSK4)
TLR2	ザイモサン、ポリン、モジュリン、リポタンパク質、リポテイコ酸、ジアシルリポペプチド、非定型LPS、ペプチドグリカン、トリアシルリポペプチド
TLR3	dsRNA
TLR4	マンナン、タキソール、LPS
TLR5	細菌フラジェリン、プロフィリン、HMGB1、小分子アゴニスト(CBLB502)
TLR6	ザイモサン、ポリン、モジュリン、リポタンパク質、リポテイコ酸、ジアシルリポペプチド(Pam2CSK4) 、非定型LPS、ペプチドグリカン
TLR7	イミダゾキノリン、ロキソリビン、ssRNA、ブロピリミン、レシキモド
TLR8	ssRNA、低分子合成化合物
TLR9	CpG DNA
TLR10	ジアシルおよびトリアシルリポペプチド
TLR11	プロフィリン様タンパク質、尿路病原性細菌

のうち１つまたは複数である、請求項１５４または請求項１５５に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。

【請求項１５７】

ＴＬＲおよびアンタゴニストは、以下：

TLRメンバー	リガンド/アンタゴニスト
TLR1	小分子アンタゴニスト(CU-T12-9、MMG-11)
TLR2	小分子アンタゴニスト(AT1-AT8、CU-CPT22、CU-T12-9、MMG-11、NPT1220-312)、フロレチン、スルホ糖脂質
TLR3	小分子アンタゴニスト(CU-CPT4a)、モノクローナル抗体(CNTO4685、CNTO5429)
TLR4	小分子アンタゴニスト(ノルビナルトルフィミン、T4ICs、T5342126、シンバスタチン
TLR5	小分子アンタゴニスト(TH1020)
TLR6	シンバスタチン
TLR7	クロロキン、ヒドロキシクロロキン、キナクリン
TLR8	小分子アンタゴニスト(CU-CPT8m、CU-CPT9a)
TLR9	小分子アンタゴニスト (NPT1220-312)、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、キナクリン;抑制性または阻害性オリゴヌクレオチド

のうち１つまたは複数である、請求項１５４または請求項１５５に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。

【請求項１５８】

脳もしくは中枢神経系（ＣＮＳ）の、または脳もしくはＣＮＳが関わる疾患、障害または状態を処置するために使用するための微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物であ

って、
ＭＥＶが、疾患、障害または状態を処置するための生物活性分子を含むカーゴを含み、
ＭＥＶが、鼻腔内投与用に製剤化される、組成物。
【請求項１５９】
脳へのカーゴのデリバリーのために使用するための異種カーゴを含むＭＥＶを含む組成物であって、鼻腔内投与用に製剤化される、組成物。
【請求項１６０】
脳へ生物活性分子を送達する方法であって、生物活性分子を含むＭＥＶを含む組成物を鼻腔内に投与することを含む、方法。
【請求項１６１】
ＭＥＶが、エマルジョンとして、懸濁液として、または散剤として製剤化される、請求項１から１６０のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６２】
ＭＥＶが、液滴としての、またはエアロゾルとしての投与用に製剤化される請求項１から１６１のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６３】
ＭＥＶがエマルジョンとして製剤化される、請求項１４２から１６２のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６４】
ＭＥＶが、ナノエマルジョンとして、またはマイクロエマルジョンとして製剤化される、請求項１５４に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６５】
ＭＥＶが、経口投与用の散剤として、顆粒剤として、液体として、鼻腔投与用のオイルで、懸濁液として、またはエマルジョンとして製剤化される、請求項１４２から１６３のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６６】
ＭＥＶ中のカーゴが、遺伝子改変された微細藻類によって内因的に負荷される、請求項１から１６５のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６７】
ＭＥＶ中のカーゴが、精製または部分精製されたＭＥＶに外因的に負荷された、請求項１から１６５のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６８】
微細藻類が、クロレラ属の１種であり、
組成物中のＭＥＶが、単離されたＭＥＶ中に外因的に導入されている異種生物活性分子カーゴを含有し、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、同一のカーゴを含有し、
カーゴが、クロレラ属にとって異種であり、
カーゴが、生体分子または小分子薬物である、請求項１から１６７のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１６９】
ＭＥＶが、クロレラ属細胞外小胞であり、
クロレラ属細胞外小胞が、微細藻類によって細胞外小胞中に内因的に導入される異種生物活性分子カーゴを含み、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞が、同一の生物活性分子カーゴを含有し、

カーゴ分子が、クロレラ属にとって異種であり、
生物活性カーゴが、生体分子である、請求項１から１６８のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１７０】
ＭＥＶが、ミドリムシ植物門（ユーグレナ藻類）、黄金色植物門（黄金藻類および珪藻類）、炎色植物門（炎色藻類）、緑藻植物門（緑藻類）、紅色植物門（紅藻類）、褐色植物門（褐藻類）および黄緑色植物門（黄緑藻類）の中から選択される微細藻類の門に由来する、請求項１４２から１６９のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１７１】
クロレラ属が、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスの中から選択されるクロレラ属の種である、請求項１４２から１６９のいずれかに記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【請求項１７２】
クロレラ属がクロレラ・ブルガリスである、請求項１７１に記載の使用のための薬物デリバリーシステムまたは組成物または方法または組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
発明者Ｌｉｌａ ＤｒｉｔｔａｎｔｉおよびＭａｎｕｅｌ Ｖｅｇａの、ならびに出願人ＡＧＳ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＳＡＳの「Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｖｅｓｉｃｌｅｓ ｆｒｏｍ Ｍｉｃｒｏａｌｇａｅ，Ｔｈｅｉｒ Ｂｉｏｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｕｐｏｎ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅｓ」と題された２０２２年１０月２４日に出願された米国仮出願番号第６３／４１８，９５９号の優先権の利益が主張される。
【０００２】
発明者Ｌｉｌａ ＤｒｉｔｔａｎｔｉおよびＭａｎｕｅｌ Ｖｅｇａの、ならびに出願人ＡＧＳ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＳＡＳの「Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｖｅｓｉｃｌｅｓ ｆｒｏｍ Ｍｉｃｒｏａｌｇａｅ，Ｔｈｅｉｒ Ｂｉｏｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｕｐｏｎ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅｓ」と題された２０２２年７月２０日に出願された米国仮出願番号第６３／３６８，９７５号の優先権の利益が主張される。
【０００３】
発明者Ｌｉｌａ ＤｒｉｔｔａｎｔｉおよびＭａｎｕｅｌ Ｖｅｇａの、ならびに出願人ＡＧＳ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＳＡＳの、「Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｖｅｓｉｃｌｅｓ ｆｒｏｍ Ｍｉｃｒｏａｌｇａｅ，Ｔｈｅｉｒ Ｂｉｏｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｕｐｏｎ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅｓ」と題された２０２２年１月３１日に出願された米国仮出願番号第６３／３０５，２３０号の優先権の利益が主張される。
【０００４】
本出願は、発明者Ｌｉｌａ Ｄｒｉｔｔａｎｔｉ、Ｊｕａｎ Ｐａｂｌｏ Ｖｅｇａ、Ｊｅｒｅｍｙ ＰｒｕｖｏｓｔおよびＭａｎｕｅｌ Ｖｅｇａの、ならびに出願人ＡＧＳ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＳＡＳ、１０ ｒｕｅ Ｇｒｅｎｅｔａ、７５００３ Ｐａｒｉｓ、Ｆｒａｎｃｅ；ＡＧＳ－Ｍ ＳＡＳ、４１－４３ Ｑｕａｉ ｄｅ Ｍａｌａｋｏｆｆ、４４０００ Ｎａｎｔｅｓ、Ｆｒａｎｃｅ；およびＮａｎｔｅｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅ、１ Ｑｕａｉ ｄｅ Ｔｏｕｒｖｉｌｌｅ、４４０００ Ｎａｎｔｅｓ、Ｆｒａｎｃｅの、「Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｖｅｓｉｃｌｅｓ ｆｒｏｍ Ｍｉｃｒｏａｌｇａｅ，Ｔｈｅｉｒ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅｓ」と題された

２０２２年７月２０日に出願された国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０７０３７１に関する。

【０００５】

本出願はまた、発明者Ｌｉｌａ Ｄｒｉｔｔａｎｔｉ、Ｊｕａｎ Ｐａｂｌｏ Ｖｅｇａ、Ｊｅｒｅｍｙ ＰｒｕｖｏｓｔおよびＭａｎｕｅｌ Ｖｅｇａの、ならびに出願人ＡＧＳ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＳＡＳ、１０ ｒｕｅ Ｇｒｅｎｅｔａ、７５００３ Ｐａｒｉｓ、Ｆｒａｎｃｅ；ＡＧＳ－Ｍ ＳＡＳ、４１－４３ Ｑｕａｉ ｄｅ Ｍａｌａｋｏｆｆ、４４０００ Ｎａｎｔｅｓ、Ｆｒａｎｃｅ；および２０２２年１月１日にナント大学（Ｎａｎｔｅｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅ）に改名されたナント大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅ ｄｅ Ｎａｎｔｅｓ）、１ Ｑｕａｉ ｄｅ Ｔｏｕｒｖｉｌｌｅ、４４０００ Ｎａｎｔｅｓ、Ｆｒａｎｃｅの、各々「Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｖｅｓｉｃｌｅｓ ｆｒｏｍ Ｍｉｃｒｏａｌｇａｅ，Ｔｈｅｉｒ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅｓ」と題された、２０２１年７月２０日に出願された優先出願米国仮出願番号第６３／２２３，８２８号および２０２１年７月２２日に出願された米国仮出願番号第６３／２２４，６５６号に関する。

【０００６】

本出願はまた、発明者Ｌｉｌａ ＤｒｉｔｔａｎｔｉおよびＭａｎｕｅｌ Ｖｅｇａの、ならびに出願人ＡＧＳ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＳＡＳの、「Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ Ｖｅｓｉｃｌｅｓ ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ－Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｍｉｃｒｏａｌｇａｅ Ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ Ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓｌｙ Ｌｏａｄｅｄ Ｃａｒｇｏ，Ｔｈｅｉｒ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｕｓｅｓ」と題された２０２２年６月３日に出願された米国仮出願番号第６３／３４９，００６号に関する。

【０００７】

許可される場合には、これらの出願の各々の主題は、その全文で参照によって組み込まれる。

【０００８】

電子的に提出された配列表の参照による組込み

配列表の電子版が本明細書とともに提出され、その内容はその全体で参照により組み込まれる。電子ファイルは２０２３年１月２０日に作出され、５６３キロバイトの大きさであり、５５０５ＳＥＱＰＣ０１．ＸＭＬと題されている。

【０００９】

分野

生物活性カーゴが外因的に負荷されている微細藻類由来の細胞外小胞（ＭＥＶ）を含有する組成物および種々の組織および臓器へ送達するためのその使用が提供される。ＭＥＶは、生物活性カーゴ、例えば、治療薬を含有し、ＭＥＶは、疾患、障害および状態の処置のために特定の臓器および組織にカーゴを送達するように働くことができる。

【背景技術】

【００１０】

細胞外小胞（ＥＶ）は、ほとんどの細胞によって産生される天然粒子である。ＥＶは、多胞性エンドソームの細胞膜との融合時に細胞外環境に放出されるエキソソーム（一般に、約３０～１５０ｎｍのサイズ）を含み、細胞表面からの膜小胞の外向き出芽によって生成される微小胞（約５０～１０００ｎｍ）を含む。エキソソームおよび微小胞は、類似の特性を有し、一般に、ＥＶと呼ばれる。

【００１１】

ＥＶは、タンパク質および核酸、例えば、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）およびｍＲＮＡの細胞間移動による細胞間コミュニケーションを促進する。このために、哺乳動物および植物に由来するＥＶは、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）デリバリー、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）および小分子薬物の担体として使用されてきた。それらは有望なデリバリービヒクルである。細胞および組織に容

易に送達される、好都合に生成されたＥＶが必要である。このようなＥＶを提供することが本明細書における目的である。

【発明の概要】

【００１２】

インビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で対象への、ならびにインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で細胞および細胞株への投与のために使用するためのカーゴが負荷された細胞外小胞（ＥＶ）が提供される。ＥＶには、生体分子および小分子、例えば、診断用および／または治療用分子を含む生物活性分子を含むカーゴが負荷される。ＥＶは本明細書において、微細藻類に由来する。微細藻類は、単細胞の緑藻類であり、クロレラ目（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａｌｅｓ）、特にクロレラ科（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａｃｅａｅ）に属するもの、特に、クロレラ属（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ）に属するもの、例えば、クロレラ・ブルガリス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｖｕｌｇａｒｉｓ）を含む。微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）は、大規模で製造され得る。ＭＥＶには、生物活性分子カーゴが外因的に負荷される。ＭＥＶは、微細藻類が発現し、それによってＭＥＶ中にパッケージ化されるように遺伝的にプログラムされ得るタンパク質、ポリペプチド、小ペプチド、種々のＲＮＡ分子および／または他の生体分子をコードするか、または発現する、遺伝子改変された微細藻類においてそれらを産生することによって内因的に負荷され（エンドロードされ）得る。

【００１３】

ＭＥＶは、ＭＥＶをカーゴと接触させて、ＭＥＶの実質的にすべてが、実質的に同一の外因的に負荷された異種カーゴを有する組成物を生成することによって、微細藻類由来のＭＥＶの単離または部分精製／単離後に外因的に負荷され得る。体内分布パターンは、ＭＥＶが負荷される方法に応じて変わらない［例えば、外因的および内因的に負荷されたＭＥＶ（対照として）が、生物学的に活性なカーゴを送達する実施例１４を参照されたい］。

【００１４】

本明細書で提供されるＭＥＶは、投与経路の関数である固有の体内分布パターンを有する。ＭＥＶの体内分布は、哺乳動物ＥＶおよび他のＥＶならびに／またはナノ粒子とは異なっている。例えば、全身に送達された哺乳動物ＥＶは、肝臓、腎臓および脾臓に蓄積する。一部の哺乳動物由来の分泌型ＥＶは、医薬品許容性が制限されている（例えば、国際ＰＣＴ公開番号ＷＯ２０２１／１２２８８０を参照されたい）。他のものが、ある特定の光合成性微細藻類が成長培地中にＥＶを放出することを示しているが、薬物としての、または薬物デリバリービヒクルとしてのこのようなＥＶの使用の記載または理解はなく、投与の際のその運命の記載または理解もない。本明細書において、ＭＥＶは、種々の経路を介した投与の際に、哺乳動物ＥＶとは異なるように臓器および組織に分配されることが示されている。一例として、哺乳動物ＥＶは、ウシ乳ＥＶを除いて、胃の厳しい環境を生き残らないので経口投与することができないが、ＭＥＶは、経口投与し、腸に送達することができ、そこから白脾臓を含む脾臓に輸送される。例えば、鼻腔内投与されたＭＥＶは、固有の輸送パターンをたどり、脳の特定の領域に輸送されることが本明細書において示されている。

【００１５】

本明細書において示され、記載されるように、ＭＥＶは、鼻腔内（ＩＮ）投与の際に、脳への固有の経路を通る。ＩＮ投与の際に、ＭＥＶは、嗅神経細胞（ＯＳＮ）によって内部移行され、そこから、糸球体へ向かう。ＭＥＶは、嗅神経細胞（ＯＳＮ）から糸球体に到達すると、僧帽ニューロンおよび房飾ニューロンに入り、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて明確な動態学で明確な経路をたどって細胞内を移動する。ＬＯＴは、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体および嗅内皮質を含む繋がりの嗅覚ネットワークに直接関与する、嗅球（ＯＢ）から種々の前－後脳領域に通じる僧帽および房飾ニューロンの長い軸索から構成される。僧帽／房飾ニューロンの主な長い軸索の側枝が、脳領域の各々、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体および嗅内皮質に入り、コロニー形成する。これらの領域の内側で、僧帽／房飾軸索は、前頭皮質、視床下部、視床および海馬を含む他の領域

からのニューロン（より多くの二次的嗅覚的役割を有する）と繋げられる（シナプスを介して）。

【００１６】

ＩＮ投与を介してＭＥＶによって到達される領域は、両半球において嗅覚神経および外側嗅索（ＬＯＴ）に繋がる脳領域のすべておよび各々、前後軸に沿って、腹側、外側および背側領域、外部および内部領域に及ぶ。これらの領域は、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床および海馬（海馬采、歯状回）である。

【００１７】

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

【００１８】

本明細書で記載されるように、ＭＥＶには、さまざまな治療的、診断的および他の使用を可能にする、多様な生物学的に活性な分子、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、プラスミド、ＡＳＯ、ペプチド、タンパク質および／または小分子を外因的に負荷（エキソロード）できる。ＭＥＶはまた、産生される微細藻類によって内因的に負荷され得る（本明細書における説明を参照されたい、また、２０２２年６月３日に出願された米国仮出願番号第６３／３４９，００６号も参照されたい）。本明細書で示されるように、ＭＥＶ体内分布は、投与経路によって決定される。したがって、ＭＥＶは、気管内に、経口的に、静脈内に、または鼻腔内に投与されるか否かに応じて、それらのカーゴを、例えば、肺へ、腸へ、ＧＡＬＴへ、脾臓へ、肝臓へ、および脳へを含む、さまざまな組織および臓器に送達できる。

【００１９】

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

【００２０】

カーゴ（「ペイロード」とも呼ばれる）は、それだけには限らないが、ＲＮＡ、例えば、阻害性ＲＮＡおよび他のＲＮＡ産物、オリゴヌクレオチド、プラスミド、ペプチド、タンパク質および小分子を含む。外因的に負荷されるＭＥＶには、目的のほとんどいかなる分子も負荷することができ、微細藻類細胞が産物を発現するか、またはコードするように遺伝子改変されている内因的に負荷されるＭＥＶは、微細藻類によってＥＶにおいて産生され、パッケージ化されるカーゴ、例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ペプチド、小ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を含有するＭＥＶを生成する。

【００２１】

ＭＥＶは、カーゴを臓器、組織および細胞に送達でき、デリバリーの経路によって標的化される場合があり、そこにそれらが送達され得る。本明細書において、クロレラ属ＭＥＶを含むＭＥＶは、消化管および嗅神経細胞などの厳しい天然バリアを通過する著しい能力を有し、これは哺乳動物ＥＶを含む他の供給源に由来する他の細胞外小胞（ＥＶ）によって共有されないことが示される。

【００２２】

ＭＥＶ、例えば、外因的にカーゴが負荷されたＭＥＶ、特に、クロレラ目、特に、クロレラ科、特に、クロレラ属、例えば、クロレラ・ブルガリスによって産生されるものを含有する組成物が提供される。組成物は、デリバリーの特定の経路のために製剤化できる医薬組成物を含む。

【００２３】

ＭＥＶに負荷する方法が記載され、提供されている。カーゴは、生体分子および小分子を含む、生物活性分子またはその組合せである。カーゴは、例えば、生体高分子、例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡ、タンパク質、タンパク質複合体、タンパク質－核酸複合体、プラスミドを含む生体分子を含み、小分子、例えば、小分子薬物も含む。生物活性分子には、治療薬、例えば、抗がん化合物および生体分子、例えば、ＲＮＡｉ、オリゴヌクレオチドおよびタンパク質および複合体および診断分子、例えば、検出可能なマーカー、化粧用である分子ならびにヒト、動物および植物用の抗感染薬として作用する分子が含まれる。病原体感染症およびがんを含む疾患および障害を処置する方法ならびに疾患および障害の処置のためのＭＥＶの使用が、診断の方法と同様に提供される。

【００２４】

カーゴが負荷されたＭＥＶは、ヒトおよび他の動物の疾患の診断、予防、処置、工業的使用、化粧用使用、獣医学的使用および作物産業における使用を含むさまざまな分野における適用を有する。各適用にとって適切なカーゴを有するＭＥＶを、産業および研究のため、分析法のため、細胞ベースのアッセイのため、ならびに他の使用および適用のために、例えば、ワクチンとして、遺伝子療法デリバリーベクターとして、遺伝子サイレンシングのため、遺伝子編集のため、トランスフェクションのために使用できる。カーゴが負荷されたＭＥＶは、疾患、障害および状態の処置、ならびに工業的および化粧用使用のために使用できる。疾患、障害および状態には、それだけには限らないが、遺伝障害、消化管の障害、気道の障害、中枢神経系（ＣＮＳ）の障害、自然障害および外傷によって誘導される障害を含む皮膚の障害、尿生殖路の障害、鼻－頬側口腔の障害、心血管系の障害、免疫および免疫モジュレーション障害、がん、眼の障害、肝臓の障害、全身障害、ならびに病原体、例えば、細菌、ウイルスまたは寄生生物によって引き起こされるか、またはそれが関与する疾患、障害および状態が含まれる。

【００２５】

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

【００２６】

単離された微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含有する組成物が提供され、微細藻類は、クロレラ属の１つの種であり、組成物は対象への投与のために製剤化される。クロレラ属の細胞外小胞は、単離された細胞外小胞中に導入されている異種生物活性カーゴ分子を含有でき、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、同一の生物活性分子カーゴを含有し、カーゴ分子は、クロレラ属にとって異種であり、生物活性カーゴは、生体分子または小分子である。

【００２７】

すべての実施形態のために、クロレラ属は、クロレラ属の任意の種、例えば、それだけには限らないが、クロレラ・エリプソイデア（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｅｌｌｉｐｓｏｉｄｅａ）、クロレラ・ピレノイドサ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｐｙｒｅｎｏｉｄｏｓａ）、クロレラ・ソロキニアナ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｓｏｒｏｋｉｎｉａｎａ）、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ）

の中から選択されるクロレラ属である。特定の実施形態では、クロレラ属は、クロレラ・ブルガリスである。

【００２８】

単離された微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含有する組成物が提供され、微細藻類は、クロレラ属の１つの種であり、組成物中のＭＥＶは、単離されたＭＥＶ中に導入されている異種生物活性分子カーゴを含有し、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、同一のカーゴを含有する。カーゴは、クロレラ属にとって異種であり、内因性ではなく、カーゴは、生体分子または小分子薬物である。カーゴを含有するＭＥＶの各々は、複数の異なる異種カーゴを含み得る。

【００２９】

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

【００３０】

組成物中のＭＥＶ中のカーゴは、生体高分子を含み得る。生体高分子には、天然に存在する生体高分子または合成生体高分子または改変生体高分子が含まれる。生体高分子は、改変を含む、核酸またはタンパク質である場合があり、改変は、ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の挿入、欠失、置き換えおよび転位を含み、および／または生体高分子は、タンパク質であり、改変はまた、翻訳後修飾を含み得る。翻訳後修飾として、それだけには限らないが、グリコシル化、超グリコシル化、ペグ化、シアリル化、アルブミン化（ａｌｂｕｍｉｎａｔｉｏｎ）、他の半減期延長部分、およびタンパク質の薬理学的動力学的または動態学的特性を改善または変更する他の改変が挙げられる。

【００３１】

ＤＮＡおよびＲＮＡなどの核酸は、カーゴであり得る分子の中にある。カーゴがＲＮＡまたはタンパク質である場合には、カーゴとして提供される場合がある、または核酸によってコードされる場合もあり、次いで、投与される生物において発現される。ＲＮＡの例として、改変ｍＲＮＡを含む阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）およびｍＲＮＡがある。ＲＮＡｉには、例えば、サイレンシングＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）または低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロ－ＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）および長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）が含まれる。ＲＮＡ産物はまた、二本鎖ＲＮＡおよびリボザイムも含む。カーゴはまた、オリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドであり得る。カーゴは、遺伝子編集システム、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳシステムならびに改変されたおよび改善された遺伝子編集システム、例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連およびＣＲＩＳＰＲ様システム（例えば、各々、出願人Ｍｅｔａｇｅｎｏｍｉの、公開された米国特許出願番号第２０２００３３２２７３号および同２０２００３３２２７４号を参照されたい）を含み得る。

【００３２】

カーゴは、治療用または診断用またはセラグノスティック（ｔｈｅｒａｇｎｏｓｔｉｃ）タンパク質またはペプチド、タンパク質複合体、２つまたはそれより多いタンパク質またはタンパク質および核酸またはタンパク質およびアプタマーまたはタンパク質、核酸および他の分子の組合せを含有するこのような複合体を含む。カーゴは、抗体またはその抗

原結合性断片であるタンパク質であり得る、またはそれをコードし得る。抗体は、単鎖形態、ナノボディ、ラクダ科動物および他の形態、例えば、ｓｃＦｖ、二重特異性抗体またはその抗原結合性断片を含む任意の形態のものであり得る。抗体およびその抗原結合性断片は、チェックポイント阻害剤抗体もしくはその抗原結合性断片または腫瘍抗原特異的抗体もしくはその抗原結合性断片または抗がん遺伝子特異的抗体またはその抗原結合性断片、または腫瘍特異的受容体またはシグナル伝達分子抗体もしくはその抗原結合性断片を含む。例示的抗体およびその抗原結合性断片は、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＰＤ－１／ＰＤＬ１経路、ＰＤ－１／ＰＤＬ２経路、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＨＨＬＡ－２、ＣＤ２８および他のチェックポイントまたは免疫抑制剤または腫瘍抗原のうち１つまたは複数に特異的に結合し、阻害する。

【００３３】

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

【００３４】

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

【００３５】

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

【００３６】

ＭＥＶを調製する方法が提供される。方法は、カーゴを単離されたＭＥＶ中に導入することを含む。カーゴは、動物または植物中への、または動物または植物上へのデリバリーが望まれる任意の分子を含む。一般に、カーゴは、小分子および生体高分子を含む生物活性分子生成物である、またはそれを含有する、またはそれを提供する。生体高分子は、天然に存在する、または合成である、または改変されている、またはそれらの組合せである。カーゴは、タンパク質、核酸または小分子を含む。カーゴは、当業者に公知の任意の方

法によってＭＥＶ中に負荷され得る；これらの方法には、例えば、エレクトロポレーション、超音波処理、押出および界面活性剤の使用のうち１つまたは複数が含まれる。一部の実施形態では、ＭＥＶは、クロレラ属、例えば、それだけには限らないが、クロレラ・エリプソイデア、クロレラ・ピレノイドサ、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスの１つの種に由来する。ＭＥＶを含有する組成物を含む、方法によって生成されるＭＥＶおよび本明細書で提供されるＭＥＶのいずれかを、診断の方法、ワクチン、処置のための療法、疾患の診断薬、疾患もしくは障害もしくは状態の処置、化粧品、工業的適用および／または当業者に公知の任意の使用のうち１つまたは複数として使用できる。

【００３７】

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

【００３８】

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

【００３９】

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

【００４０】

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

【００４１】
疾患、障害および状態を処置するための方法であって、処置が、脳への活性薬剤のデリバリーによって達成され得る方法が提供される。鼻腔内デリバリーのために調製された組成物が提供される。組成物は、活性薬剤を含有する微細藻類細胞外小胞を含有する。微細藻類細胞外小胞には、任意の適した方法によって負荷することができ（国際特許公開番号ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０７０３７１、米国仮出願番号第６３／３４９，００６号に記載される方法およびＭＥＶを参照されたい）、これには、ＭＥＶの生成後の外因性負荷およびまた核酸またはコードされる産物をＭＥＶ中にパッケージ化するように遺伝子改変された微細藻類によるインビボでの内因性負荷が含まれる。

【００４２】
ＥＶは、単細胞の緑藻類であり、クロレラ目、特にクロレラ科に属するもの、特に、クロレラ属に属するもの、例えば、クロレラ・ブルガリスを含む微細藻類に由来する。ＭＥＶは、鼻腔投与用に製剤化された組成物中で提供される。ＭＥＶは、単離後に外因的に負荷される場合も、インビボでＭＥＶにおいて異種核酸および／またはタンパク質をコードし、パッケージ化する遺伝子改変された微細藻類によって内因的に負荷される場合もある。ＭＥＶ中に外因的に負荷している（エキソローディング）カーゴの利点は、カーゴ／ＭＥＶの量を制御できることおよびＭＥＶにおける外因性カーゴの分布が予測可能であり、実質的に均一であり、その結果、平均カーゴ分子またはカーゴ／ＭＥＶの量を知ることができることである。生体分子および小分子を含む多種多様な生物活性分子、例えば、薬物および有機化合物を、ＭＥＶ中に負荷できる。ＭＥＶはまた、異種核酸および／またはタンパク質をパッケージ化するように遺伝子改変された微細藻類によって内因的に負荷できる。

【００４３】
得られたＭＥＶは、エンドロードされたか、エキソロードされたかに関わらず、毒性ではなく、インビトロでそれらを細胞中に投与でき、またはインビボで投与でき、投与経路に応じて変わる分布パターンを有する。本明細書における目的のためには、ＭＥＶは、鼻腔内投与による脳へのデリバリーのためのものである。

【００４４】
ＭＥＶが、鼻腔内（ＩＮ）投与後に固有の経路および機序を介して脳へ輸送されることが本明細書で示されている。これらの経路および機序は、他の供給源由来のエキソソームによっても、ナノ粒子によっても共有されない。鼻腔内デリバリー後、ＭＥＶは、嗅覚神経を介して、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて、多数の相互接続された脳領域に輸送されることが本明細書で示されている。ＭＥＶは、ニューロン内軸索輸送およびまたシナプスを超えたニューロン間の輸送を介して輸送される。ＭＥＶは、シナプスを超える：少なくとも（ｉ）嗅神経細胞（ＯＳＮ）と僧帽／房飾ニューロンの間のシナプス、（ｉｉ）僧帽／房飾ニューロンと外側嗅索（ＬＯＴ）によってコロニー形成された種々の脳領域における局所ニューロンの間のシナプス、および（ｉｉｉ）ＬＯＴによってコロニー形成された脳領域中のニューロンと、前頭皮質、海馬、視床および視床下部由来のニューロンの間のシナプスを超える能力を有する。

【００４５】
ＭＥＶの体内分布は、嗅覚神経の神経ネットワークにおける経路および繋がりならびに脳全体にわたる僧帽／房飾ニューロンに従う。輸送および経路は、脳領域へのアクセス（体内分布）を提供し（ＩＮ投与後１から１６時間以内）、脳領域には、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床、海馬（海馬采、歯状回）が含まれる。したがって、ＭＥＶは、活性薬剤、特に、生物学的に活性なペイロードを脳の特定の領域に送達できる。ペイロードはまた、それだけには限らないが、タンパク質、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ、小分子、ＭＥＶ中に外因的に負荷できる（エキソロードできる）、または薬剤をコードするか、もしくは産生する微細藻類、特に、遺伝子改変された微細藻類によってインビボでＭＥＶにパッ

ケージ化され得る任意の薬剤を含むことができる。ＭＥＶはしたがって、ニューロン、星状細胞、グリア細胞および神経幹細胞への、親油性小分子を含む生物活性小分子、タンパク質、ＤＮＡおよびｍＲＮＡの効果的なデリバリーを提供する。インビボでＭＥＶは、治療的および診断的使用ならびに診断的および実験的使用を提供する。デリバリーは、実施例において例示されており、これは、インビトロおよびインビボでのニューロン、星状細胞、グリア細胞および／または神経幹細胞への、種々の例示的カーゴ、例えば、カタラーゼ、ＧＦＰ、ルシフェラーゼ、神経成長因子（ＮＧＦ）、ＴｒｋＡ（トロポミオシンキナーゼＡ）、神経栄養因子［ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子、ＣＮＴＦ（繊毛様神経栄養因子）、ＥＰＯ、ＩＧＦ－１、ｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子）、ｈＧＨ、シロシビン／シロシン、ハルミン、テモゾロミド、リバスチグミン、および／またはローダミンの効果的なデリバリーおよび発現を示す。

【００４６】

ＭＥＶは、特定の組織へのカーゴのデリバリーのための固有の媒体であり、デリバリーは、投与経路に応じて変わる。示されるようなインビボでのＭＥＶの輸送は、他の供給源由来のＭＥＶとは区別され得る。例えば、哺乳動物ＥＶとは対照的に、ＭＥＶは、経口的に投与でき、ＧＡＬＴを通って輸送される。鼻腔内に投与されたＭＥＶは、固有の経路で脳に輸送され、例えば、（ｉ）それだけには限らないが、認知性、情動性、行動性、精神性、神経性、変性性およびがんを含む脳障害の処置および／または防止のために、（ｉｉ）脳障害のインビトロまたはインビボ研究のために、（ｉｉｉ）脳障害の診断のために、ならびに（ｉｖ）娯楽的および治療的使用のために使用され得る。

【００４７】

ＭＥＶおよび脳へのデリバリー

本明細書における目的のためには、ＭＥＶは、鼻腔内投与による脳へのデリバリーのためのものである。ＭＥＶは、脳のもしくは脳が関わる疾患、障害および状態のリスクを防止もしくは低減することを含む処置のために、および／または脳のもしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態の検出もしくは診断のために、および／またはこのような疾患、障害および状態の処置をモニタリングするために生物活性カーゴを送達するために使用され得る。

【００４８】

一般に、脳へのデリバリーのための組成物および薬物デリバリーシステムが提供される。上記および本明細書に記載されるように、鼻腔内投与は、脳へのデリバリーを達成する。ＭＥＶは、鼻腔内（ＩＮ）投与後に固有の経路および機序を介して脳に輸送されることも本明細書に示されている。これらの経路および機序は、他の供給源由来のエキソソームによっても、ナノ粒子によっても共有されない。鼻腔内デリバリー後、ＭＥＶは、嗅覚神経を介して、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて、多数の相互接続された脳領域に輸送されることが本明細書で示されている。ＭＥＶは、ニューロン軸索輸送を介して輸送される。ＭＥＶは、シナプスを超える：少なくとも（ｉ）嗅神経細胞（ＯＳＮ）と僧帽／房飾ニューロンの間のシナプス、（ｉｉ）僧帽／房飾ニューロンと外側嗅索（ＬＯＴ）によってコロニー形成された種々の脳領域における局所ニューロンの間のシナプス、および（ｉｉｉ）ＬＯＴによってコロニー形成された脳領域中のニューロンと、前頭皮質、海馬、視床および視床下部由来のニューロンの間のシナプスを超える能力を有する。

【００４９】

組成物およびその使用が提供され、組成物は、鼻腔内投与後に生物活性分子を脳へ、またはインビトロで細胞へ送達する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含み、ＭＥＶは、生物活性分子をカーゴとして含む。生物活性分子であるカーゴを含む微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物を鼻腔内投与することによる、生物活性分子を脳へ送達する方法が提供される。

【００５０】

また、ＭＥＶを含有する細胞組成物および細胞療法組成物が提供され、カーゴは、特定の臓器、組織および系の疾患、障害および状態の処置のためのものである。細胞組成物は

、特定の疾患、障害または状態を処置するためのカーゴを含有するＭＥＶを導入することによってインビトロで調製でき、次いで、細胞療法を細胞に投与する。例えば、ＭＥＶを含有する組成物を、インビトロでニューロン、星状細胞、グリア細胞および／または神経幹細胞に投与でき、得られた細胞を脳への投与などによって細胞療法のために使用できる。

【００５１】

本明細書において記載および企図される方法および組成物のすべての実施形態について、疾患、障害および状態には、鼻腔内投与による脳への分子のデリバリーによって処置、検出、診断および／またはモニタリングされ得る、本明細書で記載される、当業者に公知の任意のものが含まれる。

【００５２】

ＭＥＶの体内分布は、嗅覚神経の神経ネットワークにおける経路および繋がりならびに脳全体にわたる僧帽／房飾ニューロンに従う。輸送および経路は、脳領域へのアクセス（体内分布）を提供し（ＩＮ投与後１から１６時間以内）、脳領域には、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床、海馬（海馬采、歯状回）が含まれる。したがって、ＭＥＶは、活性薬剤、特に、生物学的に活性なペイロードを脳の特定の領域に送達できる。ペイロードはまた、それだけには限らないが、タンパク質、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ、小分子、およびＭＥＶ中に外因的に負荷できる（エキソロードできる）、または薬剤をコードするか、もしくは産生する微細藻類、特に、遺伝子改変された微細藻類によってインビボでＭＥＶにパッケージ化され得る任意の薬剤を含むことができる。ＭＥＶはしたがって、ニューロン、星状細胞、グリア細胞および神経幹細胞への親油性小分子を含む生物活性小分子、タンパク質、ＤＮＡおよびｍＲＮＡの効果的なデリバリーを提供する。インビボでＭＥＶは、治療的および診断的使用ならびに診断的および実験的使用を提供する。デリバリーは、実施例において例示されており、これは、インビトロおよびインビボでのニューロン、星状細胞、グリア細胞および／または神経幹細胞への、カタラーゼ、ＧＦＰ、ルシフェラーゼ、神経成長因子（ＮＧＦ）、ＴｒｋＡ（トロポミオシンキナーゼＡ）、神経栄養因子［ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子）、ＣＮＴＦ（繊毛様神経栄養因子）、ＥＰＯ、ＩＧＦ－１、ｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子）、ｈＧＨ］、シロシビン／シロシン、ハルミン、トモゾロニド（ｔｏｍｏｚｏｌｏｎｉｄｅ）、リバスチグミンおよびローダミンの効果的なデリバリーおよび発現を示す。

【００５３】

ＭＥＶは、多数の使用および方法の中で、ｉ）それだけには限らないが、認知性、情動性、行動性、精神性、神経性、変性性およびがんを含む脳障害の処置および／または防止のための、（ｉｉ）脳障害のインビトロまたはインビボ研究のために、（ｉｉｉ）脳障害の診断のために、および（ｉｖ）娯楽的および治療的使用のために固有の媒体を提供する。

【００５４】

生物活性分子を含むカーゴを含有する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物を鼻腔内に投与し、それによって、ＭＥＶが、嗅球、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、乳頭体、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床および海馬のうち１つまたは複数へのデリバリーのために、嗅覚神経を介して、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて、相互接続された脳領域に移動し、ここで、生物活性分子は、疾患、障害もしくは状態の処置を達成できる、または疾患、障害もしくは状態を検出するために使用され得る、または疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングするために使用され得る任意の分子であり、生物活性分子は、微細藻類および／またはＭＥＶにとって異種であることによる、脳へ生物活性分子を送達する方法が提供される。

【００５５】

送達する方法は、処置の方法を含む。生物活性分子を含むカーゴを含有する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物を鼻腔内に投与し、それによって、ＭＥＶが、嗅覚神経を介して脳へ、嗅球、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、乳頭体、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床および海馬のうち１つまたは複数へのデリバリーのために、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて相互接続された脳領域に移動し、ここで、生物活性分子は、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態の処置を達成できる任意の分子であり、生物活性分子は、微細藻類および／またはＭＥＶにとって異種であることによって、脳の疾患、障害もしくは状態または脳が関わる疾患、障害もしくは状態を処置する方法もしくはその処置が提供される。

【００５６】

また、生物活性分子を含有する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物を鼻腔内に投与し、それによって、ＭＥＶが、嗅覚神経を介して脳へ、嗅球、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、乳頭体、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床および海馬（海馬采、歯状回）のうち１つまたは複数へのデリバリーのために、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて相互接続された脳領域に移動し、ここで、生物活性分子は、リポーターまたは検出可能なマーカーを含み、生物活性分子は、疾患、障害もしくは状態を検出もしくは診断するために使用され得る、または疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングするために使用され得る、または疾患、障害もしくは状態を検出もしくは診断する、および疾患、障害もしくは状態を処置するために使用され得る任意の分子であり、疾患、障害もしくは状態は、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態であり、生物活性分子は、微細藻類および／またはＭＥＶにとって異種であることによる、脳の疾患、障害もしくは状態または脳が関わる疾患、障害もしくは状態を検出する方法、または脳の疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングする方法が提供される。

【００５７】

生物活性分子を含むカーゴを含有する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物が提供され、組成物は、嗅覚神経を介して脳へ、嗅球、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、乳頭体、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床および海馬のうち１つまたは複数へのデリバリーのために、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて相互接続された脳領域への鼻腔内デリバリー用に製剤化され、生物活性分子は、疾患、障害もしくは状態の処置を達成できる、または疾患、障害もしくは状態を検出もしくは診断するために使用され得る、または疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングするために使用され得る、または疾患、障害もしくは状態を検出、診断、モニタリングおよび／もしくは処置する任意の分子であり、疾患、障害もしくは状態は、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態であり、生物活性分子は、微細藻類および／またはＭＥＶにとって異種である。

【００５８】

また、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態を処置するための、または脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態を診断もしくは検出もしくはその処置をモニタリングするための、または脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態を処置、診断、検出および／もしくはモニタリングするための、生物活性分子を含むカーゴを脳に送達するために使用するための微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物も提供され、ここで、ＭＥＶは、脳へのデリバリーのための生物活性分子を含み、組成物は、嗅覚神経を介して脳へ、嗅球、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、乳頭体、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床および海馬のうち１つまたは複数へのデリバリーのために、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて相互接

続された脳領域への鼻腔内デリバリー用に製剤化され、生物活性分子は、疾患、障害もしくは状態の処置を達成できる、または疾患、障害もしくは状態を検出するために使用され得る、または疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングするために使用され得る任意の分子であり、生物活性分子は、微細藻類および／またはＭＥＶにとって異種である。

【００５９】

これらの方法および組成物と一致して、ＭＥＶは、ニューロン内軸索輸送およびシナプスを超えたニューロン間の輸送を介して輸送される。例えば、ＭＥＶは、ニューロン軸索輸送によって脳において輸送され、ＭＥＶは、海馬の海馬采または歯状回に送達される。ＭＥＶは、嗅覚神経を含む神経ネットワークにおける経路および繋がりならびに脳全体にわたる僧帽／房飾ニューロンに従う。鼻腔内投与の際、ＭＥＶは、（ｉ）嗅神経細胞（ＯＳＮ）と僧帽／房飾ニューロンの間のシナプス、（ｉｉ）僧帽／房飾ニューロンとＬＯＴによってコロニー形成された脳領域における局所ニューロンの間のシナプス、および（ｉｉｉ）ＬＯＴによってコロニー形成された脳領域中のニューロンと、前頭皮質、海馬、視床および視床下部からの、またはそれへのニューロンの間のシナプスのうち１つまたは複数を通る。例えば、ＭＥＶは、（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）または（ｉ）および（ｉｉ）、例えば、図３５に表される鼻腔内投与の際にＭＥＶによって通られた経路を通る。

【００６０】

本明細書で提供される方法および組成物は、鼻腔内投与用である。鼻腔内投与後、ＭＥＶは、例えば、脳梁、背側脳弓、背側海馬交連および海馬の海馬采のうち１つまたは複数へ送達される、または脳梁、背側脳弓、背側海馬交連および海馬の海馬采のうち１つまたは複数へのデリバリーのためのものである。

【００６１】

本明細書で提供される組成物および本方法において使用される組成物は、懸濁液として、またはエマルジョン、例えば、ナノエマルジョンとして、またはマイクロエマルジョンとして製剤化され得る。当業者は、ナノエマルジョンおよびマイクロエマルジョンの特性ならびにそれらの形成を理解し、精通している。組成物において、ＭＥＶは、生物活性カーゴを含有する。例えば、ＭＥＶは、平均して、各ＭＥＶが所定量の生物活性分子、例えば、ＭＥＶあたり１～１００の生物活性分子を含有するように調製され得る。ＭＥＶあたりのカーゴの量の選択は、当業者のレベル内であり、当業者に公知の因子、例えば、処置される個々の疾患、障害もしくは状態またはＭＥＶの使用、対象、個々のカーゴならびに他のこのようなパラメータおよび因子に応じて変わる。同様に、ＭＥＶの濃度は、個々のカーゴおよび使用に応じて変わる。例えば、組成物中のＭＥＶの濃度は、約０．１～１０ｍｇ／ｍＬまたは０．１～１０ｍｇ／ｍＬ、およびより低いまたはより高いおよび中間の濃度であり得る。組成物は、単位量投与（希釈を行わない直接投与）またはアリコートでの投与のための複数回用量投与のために、および／または所望の濃度への希釈のために製剤化され得る。投与のための組成物の例示的量は、０．１～１００ｍＬ、例えば、１～１０ｍＬ、１～５ｍＬ、０．１～１ｍＬおよび任意の適した量である。組成物は、単回用量として、または一連の用量もしくは他のレジメンとして投与され得る。組成物は、併用療法プロトコールの一部として投与され得る。

【００６２】

組成物は、鼻腔内投与または鼻腔内投与のための希釈もしくは溶解などによる処理に適した、例えば、液体、散剤、トローチ剤、顆粒剤、液体、オイル、懸濁液またはエマルジョンとして製剤化され得る。

【００６３】

組成物および方法は、ＭＥＶが、生物活性分子またはその生成のための経路をコードする遺伝子改変された微細藻類によって内因的に負荷されたものを含む。ＭＥＶはまた、カーゴが、精製または部分精製されたＭＥＶ中に外因的に負荷されたものを含む。ＭＥＶは、複数の異なる異種カーゴを含有する場合もある。本明細書における目的のためには、カーゴは、脳の、もしくは脳が関わる疾患もしくは状態を処置もしくは防止するための、ま

たはその症状を処置もしくは防止するための治療薬を含む。

【００６４】

本方法において使用するためのＭＥＶを生成するために使用される微細藻類は、ミドリムシ植物門（Ｅｕｇｌｅｎｏｐｈｙｔａ）（ユーグレナ藻類）、黄金色植物門（Ｃｈｒｙｓｏｐｈｙｔａ）（黄金藻類および珪藻類）、炎色植物門（Ｐｙｒｒｏｐｈｙｔａ）（炎色藻類（Ｆｉｒｅ　ａｌｇａｅ））、緑藻植物門（Ｃｈｌｏｒｏｐｈｙｔａ）（緑藻類）、紅色植物門（Ｒｈｏｄｏｐｈｙｔａ）（紅藻類）、褐色植物門（Ｐｈａｅｏｐｈｙｔａ）（褐藻類）および黄緑色植物門（Ｘａｎｔｈｏｐｈｙｔａ）（黄緑藻類）の中から選択される微細藻類の門に由来する微細藻類であり得る。例えば、微細藻類は、緑藻綱（Ｃｈｌｏｒｏｐｈｙｃｅａｅ）またはトレボウクシア藻綱（Ｔｒｅｂｏｕｘｉｏｐｈｙｃｅａｅ）または緑藻植物門、例えば、クロレラ属またはクラミドモナス属（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ）の種である。

【００６５】

クロレラ属の種には、それだけには限らないが、クロレラ・エリプソイデア（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｅｌｌｉｐｓｏｉｄｅａ）、クロレラ・ピレノイドサ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｐｙｒｅｎｏｉｄｏｓａ）、クロレラ・ソロキニアナ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｓｏｒｏｋｉｎｉａｎａ）、クロレラ・ブルガリス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｖｕｌｇａｒｉｓ）およびクロレラ・バリアビリス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ）、例えば、クロレラ・ブルガリスおよびクロレラ・バリアビリスが含まれる。特定の実施形態では、クロレラ属は、クロレラ・ブルガリスである。例えば、方法および組成物は、微細藻類がクロレラ属の１つの種であるものを含み、組成物中のＭＥＶは、単離されたＭＥＶ中に外因的に導入されている異種生物活性分子カーゴを含有し、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、平均して、同一の異種カーゴを含有し、カーゴは、クロレラ属にとって異種であり、カーゴは、本明細書で記載されるようなおよび／または当業者に公知の、脳へのデリバリーのための生体分子または小分子薬物または任意のカーゴである。また、ＭＥＶが、クロレラ属の細胞外小胞であり、クロレラ属の細胞外小胞が、微細藻類によって細胞外小胞中に内因的に導入される異種生物活性分子カーゴを含み、カーゴ分子が、クロレラ属にとって異種であり、生物活性カーゴが、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を処置するための生体分子である、方法および組成物も含まれる。

【００６６】

ＭＥＶが、クロレラ属の細胞外小胞であり、クロレラ属の細胞外小胞が、単離された細胞外小胞中に導入されている異種生物活性分子カーゴを含み、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞が、平均して、同一の生物活性分子カーゴを含有し、カーゴ分子が、クロレラ属にとって異種であり、生物活性カーゴが、脳の、または脳が関わる疾患、障害または状態を処置、モニタリングおよび／または診断するための治療用分子または検出可能分子である、方法および組成物が提供される。他の実施形態では、ＭＥＶは、クロレラ属の細胞外小胞であり、クロレラ属の細胞外小胞は、微細藻類によって細胞外小胞中に内因的に導入される異種生物活性分子カーゴを含み、それによって、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、同一の生物活性分子カーゴを含有し、カーゴ分子は、クロレラ属にとって異種であり、生物活性カーゴは、生体分子または小分子である。他の実施形態では、組成物中のＭＥＶは、単離されたＭＥＶ中に外因的に導入されている異種生物活性分子カーゴを含有し、それによって、平均して、異種生物活性分子カーゴを含有する組成物中の小胞は、同一のカーゴを含有し、カーゴは、クロレラ属にとって異種であり、カーゴは、生体分子または小分子である。他の実施形態では、カーゴは、微細藻類をカーゴ、例えば、核酸またはタンパク質または生化学的経路の産物を発現または産生するように改変することによってＭＥＶ中に内因的に導入される。例示的実施形態では、クロレラ属は、クロレラ・ブルガリスである。

【００６７】

カーゴは、それだけには限らないが、生体分子、生体高分子、例えば、天然に存在する

生体高分子を含むか、または合成生体高分子であるか、または改変された生体高分子、例えば、核酸分子、ポリペプチド、タンパク質、プラスミド、アプタマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどである。カーゴは、それだけには限らないが、ＤＮＡまたはＲＮＡ、例えば、阻害性ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）、ｍＲＮＡまたは改変ｍＲＮＡ、サイレンシングＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、自己増幅性ＲＮＡ、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）、リボザイムまたは二本鎖ＲＮＡなどを含む。カーゴは、オリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、遺伝子編集システム、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳシステム、ＣＲＩＳＰＲ関連またはＣＲＩＳＰＲ様システムなどを含む。カーゴは、ＤＮＡ、例えば、プラスミドを含む場合があり、プラスミドは、治療用および／もしくは検出可能な、もしくは診断用産物またはＲＮＡ産物、例えば、ＲＮＡｉおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはリボザイムもしくは二本鎖ＲＮＡを含む上記のＲＮＡの形態をコードする。プラスミドは、真核生物のプロモーター、例えば、ＲＮＡポリメラーゼＩＩまたはＩＩＩプロモーター、例えば、真核生物のウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルスプロモーター、サルウイルス４０プロモーター、単純ヘルペスプロモーター、エプスタイン・バーウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、合成プロモーター、アクチンプロモーターまたは合成キメラプロモーターなどの他のプロモーターなどの制御下にカーゴ生成物をコードできる。プラスミドはまた、発現のための他の調節配列、例えば、他の真核生物の転写配列および真核生物の翻訳配列も含むことができる。ＭＥＶカーゴは、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態の処置または検出または診断を達成するための、またはそれをモニタリングするための小分子を含むことができる。

【００６８】

カーゴは、脳へのデリバリーのための目的の任意の分子を含む。これには、例えば、１つもしくは複数のサイトカインの生成を増大もしくは減少させる、自己抗原提示を上方制御もしくは下方制御する、ＭＨＣ抗原をマスクする、または１つもしくは複数の種類の免疫細胞の増殖、分化、遊走もしくは活性化状態を促進する免疫モジュレーション剤などの免疫モジュレーターをコードするか、またはそれであるカーゴが含まれる。カーゴは、ホルモンもしくはサイトカインもしくはケモカインを含むことができる、またはコードすることができる。カーゴは、プロドラッグまたはプロドラッグを脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態を処置するための薬物に変換する酵素をコードするベクターを含むことができる。カーゴは、脳の、もしくは脳が関わる感染症の処置のための抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫剤または他の抗感染剤を含むことができる、またはコードすることができる。カーゴは、脳におけるがんもしくは腫瘍、もしくは脳における感染性疾患、もしくは神経変性疾患もしくは他の中枢神経系（ＣＮＳ）障害の処置のための、または認知症を処置するための、治療用核酸もしくはタンパク質または治療用生成物であるタンパク質をコードする核酸を含むことができる。カーゴは、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態を処置するための化学療法薬を含むことができる、および／または抗体もしくはその抗原結合性断片、例えば、ｓｃＦｖ、二重特異性抗体もしくはその抗原結合性断片などをコードする、もしくは含む。カーゴは、遺伝子療法のための核酸を含むことができる。

【００６９】

ＭＥＶは、２つより多いカーゴ生成物を含み得る。カーゴは、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態またはそれらの組合せを検出、診断および／またはモニタリングするための、治療用生成物または診断用生成物または検出可能生成物またはそれらの組合せを含み得る。診断薬には、ルシフェラーゼまたはルシフェラーゼをコードする核酸、蛍光タンパク質もしくは蛍光タンパク質をコードする核酸またはルシフェラーゼオペロンまたはそれらの組合せが含まれ得る。生物活性分子カーゴは、送達される細胞もしくは生物に対して効果を有する、または検出可能であるか、もしくは検出可能なマーカーもしくは

バイオマーカーとして働き、それによって、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害もしくは状態の処置、検出、診断もしくは処置のモニタリングを達成する任意の分子を含み得る。

【００７０】

カーゴは、生物活性小分子、ペプチド（ポリペプチド、タンパク質）、ＲＮＡ（ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ）、ＤＮＡ［アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、プラスミド、ＤＮＡ断片］および遺伝子編集複合体のうち１つまたは複数を含み得る。生物活性分子は、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を処置、診断、検出および／または処置をモニタリングするための診断薬または治療薬またはセラグノスティック（ｔｈｅｒａｇｎｏｓｔｉｃ）であり得る。カーゴは、例えば、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を処置するためのホルモン、増殖因子、酵素、免疫モジュレーション化合物、受容体、受容体アゴニストまたは受容体アンタゴニストのうち１つまたは複数を含み得る。

【００７１】

疾患、障害または状態は、脳における腫瘍を含み得る。カーゴは、例えば、神経腫瘍に感染する腫瘍溶解性ウイルスを含み得る、または神経腫瘍の処置のための治療薬を含み得る。疾患、障害または状態は、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病またはアルツハイマー病またはハンチントン病またはクロイツフェルトヤコブ病または他の神経変性疾患）または認知障害（例えば、認知症または健忘症またはせん妄または他の認知障害）または脳障害（例えば、脳炎またはてんかん発作または腫瘍または他の脳障害）または神経系障害（例えば、疼痛またはてんかん発作または感染症または他の神経系障害）または遺伝性疾患（例えば、嚢胞性線維症、地中海貧血症、鎌形赤血球貧血、ハンチントン病、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、テイサックス病または他の遺伝性疾患）または脳腫瘍またはニーマンピック病またはプリオン疾患またはパーキンソン病または多発性硬化症または筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）または筋ジストロフィーまたは脳の、もしくは脳が関わる他の疾患であり得る。脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態は、がんまたはワクチンによって処置もしくは防止される疾患、障害もしくは状態であり得る、および／または感染性病原体によって引き起こされる、もしくはそれが関与する疾患、障害もしくは状態であり得る。感染性病原体には、細菌、ウイルス、卵菌、寄生生物、プリオンおよび真菌のうち１つまたは複数が含まれる。

【００７２】

処置または診断または検出またはモニタリングのために、ＭＥＶは、鼻腔内投与されると、カーゴを、ニューロン、星状細胞、グリア細胞および神経幹細胞のうち１つまたは複数に送達できる。ＭＥＶを含有する組成物は、カーゴを、インビボでニューロン、星状細胞、グリア細胞および／または神経幹細胞に送達するために使用され得る。以下に論じられるように、ＭＥＶはまた、細胞療法のためにインビトロでカーゴを細胞に送達するために使用され得る。得られた細胞を投与できる。細胞療法、診断薬および／または検出のためにインビトロで生物活性カーゴを含有する微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含む組成物を細胞中に導入することによる、インビトロでの細胞中への生物活性分子のデリバリーのための組成物および方法が提供され、ここで、生物活性分子は、疾患、障害もしくは状態の処置を達成できる、または疾患、障害もしくは状態を検出するために使用され得る、または疾患、障害もしくは状態の処置をモニタリングするために使用され得る任意の分子であり、生物活性分子は、微細藻類および／またはＭＥＶにとって異種である。本明細書で提供されるＭＥＶを含有する得られた細胞は、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を処置するための細胞療法のために使用され得る。細胞療法のための細胞には、それだけには限らないが、幹細胞、免疫細胞または細胞株が含まれ、ただし、幹細胞は、胚性または多能性または全能性幹細胞を排除する管轄区域においては胚性または多能性または全能性幹細胞のうち１つまたは複数ではない。細胞は、改変細胞、例えば、特定の細胞、組織および臓器を標的とするように設計されているＣＡＲ－Ｔ細胞であり得る。

【００７３】

疾患、障害および状態には、認知性、情動性、行動性、精神性、神経性、変性性、遺伝性、悪性（がん）および／または外傷性脳疾患、障害または状態のうち１つまたは複数が含まれる。脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態は、脳または中枢神経系（ＣＮＳ）への傷害に起因するものであり得る。ＭＥＶは、精神賦活性である、または精神障害を処置する、または免疫モジュレーション生成物である、または検出可能な生成物である、または脳傷害もしくは外傷を処置する、またはがんを処置する、または神経性脳障害を処置する、またはＣＮＳ障害を処置する、または遺伝性脳障害を処置する、または脳がんを処置する、または抗老化活性を有する、または脳再生活性を有する治療用カーゴを含み得る。

【００７４】

ＭＥＶは、例えば、（ｉ）脳疾患、障害および状態のリスクの処置または防止または低減すること、（ｉｉ）脳疾患、障害および状態のインビトロおよび／またはインビボ研究、（ｉｉｉ）脳疾患、障害および状態の診断ならびに（ｉｖ）娯楽的使用のうち１つまたは複数のためにカーゴを含むことができる。疾患、障害および状態には、それだけには限らないが、認知性、情動性、行動性、精神性、神経性および／または神経変性疾患、障害および状態または脳もしくは中枢神経系（ＣＮＳ）の傷害に起因する疾患、障害もしくは状態が含まれる。疾患、障害および状態は、脳および／またはＣＮＳがんまたは腫瘍、遺伝障害、脳傷害もしくは外傷および感染症の中から選択される。

【００７５】

カーゴは、抗うつ薬、抗精神病薬、抗不安薬、鎮痛薬、サイケデリックス（ｐｓｙｃｈｅｄｅｌｉｃｓ）、幻覚剤および記憶増強剤の中から選択され得る。例えば、カーゴは、カルボリンまたはリセルグ酸またはシロシビンまたはそれらの誘導体を含み得る。脳の領域への直接経路のために、鼻腔内投与されたＭＥＶは、精神賦活性薬剤のデリバリーのための媒体を提供する。ＭＥＶは、精神障害および／または精神病の処置のために薬剤を送達できる。

【００７６】

ＭＥＶは、カーゴ、例えば、全身にもしくは鼻以外の位置に局所的に投与された場合に、肝臓の初回通過代謝後に脳に到達できない、または不十分な腸管吸収を有する親水性化合物、および血液脳関門を通過できないカーゴなどを送達するために使用され得る。ＭＥＶ中での鼻腔内投与は、一般に、そうでなければ、脳に到達するように投与することはできないこのような化合物のデリバリーを提供する。

【００７７】

鼻腔内に投与されたＭＥＶを用いる処置のための疾患、障害および状態には、それだけには限らないが、境界性人格障害、摂食障害、統合失調症、注意欠如／多動性障害（ＡＤＨＤ）、自閉症、双極性障害、境界性人格障害、不安神経症、うつ病、強迫性障害（ＯＣＤ）および外傷後ストレス障害（ＯＣＤ）が含まれる。

【００７８】

一部の例では、カーゴは、以下のとおりの状態の処置のための生物活性分子を含む：

【００７９】

生物活性分子または薬物	状態
3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン(MDMA;「エクスタシー」)	不安神経症、双極性障害、統合失調症
5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT_1)受容体アゴニスト	統合失調症
AGN-241751	うつ病
アゴメラチン	うつ病
ALKS-5461	うつ病
アマンタジン	自閉症またはアルツハイマー病
アミトリプチリン(エラビル(登録商標)、Merck and Co.)	不安神経症、うつ病、摂食障害
アモキサピン	不安神経症、うつ病
アンフェタミン: (持続放出性アンフェタミンXR-OS、EROS;硫酸デキストロアンフェタミン;リスデキサンフェタミン;メタンフェタミン;混合アンフェタミン塩;ラセミ体硫酸アンフェタミン;トリプルビーズ混合アンフェタミン塩)	ADHD
アリピプラゾール	自閉症、双極性障害、境界性人格障害、統合失調症
アールケタミン	双極性障害
アセナピン	双極性障害、統合失調症
アスピリン	双極性障害、うつ病
アトモキセチン	ADHD
AV-101	うつ病
AVP-786	うつ病
AVP-923	うつ病
AXS-05	うつ病
アヤワスカ	うつ病
アザピロン	不安神経症
AZD2327	うつ病
ベンゾジアゼピン	不安神経症、双極性障害
ベータ遮断薬/アザピロン	不安神経症
ビペリデン	うつ病
ブレキサノロン	うつ病
BTRX-246040(以前はLY2940094)	うつ病
ブプレノルフィン	うつ病
ブプロピオン(ウェルブトリン(登録商標)、ザイバン(登録商標)、アプレンジン(登録商標))	不安神経症、うつ病
ブスピロン (ブスパール、Bristol Myers Squibb)	うつ病、摂食障害
カフェイン	OCD
カンナビジオール(CBD)	不安神経症
カルバマゼピン	双極性障害

生物活性分子または薬物	状態
カリプラジン	双極性障害、統合失調症
セレコキシブ	双極性障害
クロルプロマジン	双極性障害、統合失調症
シロスタゾール	うつ病
シタロプラム(セレクサ(登録商標))	不安神経症、うつ病、OCD、PTSD
クロミプラミン	OCD、自閉症
クロニジン	自閉症
クロニジン-XR	ADHD
クロザピン	双極性障害、統合失調症、自閉症
補酵素 Q10	双極性障害
副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)アンタゴニスト	不安神経症
システアミン	うつ病
D-サイクロセリン	うつ病
デシプラミン(ノルプラミン(登録商標))	不安神経症、うつ病
デシプラミン(ノルプラミン(登録商標)、Aventis)	摂食障害
デスベンラファキシン(プリスティーク(登録商標))	不安神経症、うつ病
デキサメタゾン	PTSD
デキストロメトルファン	うつ病
ジバルプロエクス	境界性人格障害
ドネペジル	自閉症
ドキセピン	不安神経症、うつ病
デュロキセチン (シンバルタ(登録商標))	不安神経症、うつ病、境界性人格障害
エブセレン	双極性障害
エンドキシフェン	双極性障害
エスシタロプラム (レクサプロ(登録商標))	不安神経症、うつ病、OCD、PTSD、自閉症
エスケタミン	双極性障害、うつ病
エスリカルバゼピン	双極性障害
フルドロコルチゾン	うつ病
フルオキセチン (プロザック(登録商標))	不安神経症、うつ病、境界性人格障害、OCD、PTSD、自閉症、摂食障害
フルボキサミン	うつ病、OCD、自閉症
ガバペンチン	不安神経症、PTSD
ガランタミン	自閉症
グリシン	OCD
グアンファシン-XR	ADHD
グアンファシン	自閉症

生物活性分子または薬物	状態
ハロペリドール	双極性障害、境界性人格障害
ヒドロコルチゾン	PTSD
イブプロフェン	双極性障害、うつ病
イミプラミン(トフラニール(登録商標)、Ciba Geigy)	不安神経症、うつ病、摂食障害
インフリキシマブ	うつ病
イソカルボキサジド(マルプラン(登録商標))	不安神経症、うつ病
JNJ-67953964	うつ病
ケタミン	不安神経症、うつ病、OCD、PTSD、双極性障害
ラモトリジン	双極性障害、OCD、自閉症
レベチラセタム	自閉症
レボミルナシプラン(フェッツィマ(登録商標))	不安神経症、うつ病
リカルバゼピン	双極性障害
リチウム塩	双極性障害
ルマテペロントシル酸塩(カプリタ(登録商標))	双極性障害、統合失調症
リゼルギン酸ジエチルアミド(LSD)	不安神経症、うつ病
メマンチン	双極性障害、自閉症、OCD
メチル葉酸塩補充	うつ病
メチルフェニデート: デクスメチルフェニデート	ADHD、自閉症
メチラポン	うつ病
ミフェプリストン	うつ病
ミノサイクリン	双極性障害、うつ病、OCD、不安神経症
MK0869	うつ病
ミオ-イノシトール	OCD
N-アセチル-システイン	双極性障害、OCD
ナルメフェン	境界性人格障害
ナルトレキソン	うつ病、自閉症、境界性人格障害
ナプロキセン	双極性障害、うつ病
ニューロキニン-1 (NK_1)アンタゴニスト	不安神経症、うつ病
ニューロペプチド-Y (NPY)受容体アゴニスト	不安神経症、双極性障害、うつ病、PTSD
ノルトリプチレン (パメロール(Pamelor)(登録商標))	不安神経症、自閉症、うつ病
オランザピン	双極性障害、境界性人格障害、PTSD、統合失調症

生物活性分子または薬物	状態
オメガ-3 ポリ不飽和脂肪酸;魚油	境界性人格障害、うつ病、PTSD
オンダンセトロン (ゾフラン(登録商標)、GlaxoSmithKline)	OCD、摂食障害
オキシカルバゼピン	双極性障害
オキシトシン	不安神経症、自閉症、うつ病、PTSD、統合失調症
パリペリドン	双極性障害、境界性人格障害、統合失調症
パロキセチン(パキシル(登録商標)、ペクセバ(Pexeva)(登録商標))	不安神経症、自閉症、うつ病、OCD、PTSD
フェネルジン (ナルディル(Nardil)(登録商標))	不安神経症、うつ病
ピオグリタゾン	双極性障害
プラゾシン	PTSD
プレガバリン	不安神経症
プロバイオティクス	不安神経症、双極性障害、うつ病
プロパノロール	PTSD
プロトリプチリン	不安神経症、うつ病
シロシビン	不安神経症、うつ病
クエチアピン	不安神経症、双極性障害、境界性人格障害
ラパスチネル	うつ病
リルゾール	不安神経症、OCD
リスペリドン	不安神経症、自閉症、双極性障害、OCD、PTSD、統合失調症
リバスチグミン	自閉症
S-アデノシルメチオニン(SAMe)	うつ病
SAGE-217	うつ病
サルコシン	OCD
スコポラミン	うつ病
セレギリン (エムサム(登録商標))	不安神経症、うつ病
セルトラリン (ゾロフト(登録商標))	不安神経症、自閉症、境界性人格障害、OCD、PTSD
シルデナフィル	うつ病
SSR149415	うつ病
タモキシフェン	双極性障害
TNF-α 阻害剤	双極性障害
トピラメート (トポマックス(登録商標)、Ortho-McNeil Pharmaceutical)	双極性障害、摂食障害、OCD、PTSD
トラニルシプロミン (パルネート(登録商標))	不安神経症、うつ病

生物活性分子または薬物	状態
トリミプラミン。四環系:マプロチリン	不安神経症
バルプロ酸塩	双極性障害
バルプロ酸および誘導体	自閉症、双極性障害、境界性人格障害
バソプレシン(V1B)アンタゴニスト	不安神経症、うつ病
ベンラファクシン	不安神経症、自閉症、うつ病、OCD、PTSD
ベラパミル	双極性障害
ビラゾドン	うつ病
ビルダグリプチン	うつ病
ボルチオキセチン	うつ病
ジプラシドン	双極性障害、統合失調症

【００８０】

脳が関わる、または脳の疾患、障害および状態には、それだけには限らないが、脳機能に影響を及ぼす、遺伝障害、神経変性疾患および代謝傷害、他の脳関連状態および／または代謝疾患が含まれる。疾患、障害および状態の例示的なものとして、それだけには限らないが、ヒト精神障害；非ヒト動物脳障害、ＣＮＳ障害；不安障害、例えば、パニック障害、社会不安、恐怖と関連する障害および全般性不安障害；注意欠如多動性障害、例えば、不注意型、活動亢進－衝動型、組合せ型；自閉症スペクトラム障害、例えば、アスペルガー症候群、小児期崩壊性障害（ＣＤＤ）、カナー症候群、広汎性発達障害（ＰＤＤ－ＮＯＳ）；双極性障害、例えば、双極性障害Ｉ型、双極性障害ＩＩ型、混合特徴を有する双極性、季節性パターン大うつ病を有する双極性、循環気質、迅速循環性双極性；摂食障害、例えば、神経性拒食症、神経性過食症、筋肉異形症、過食性障害、他の特定の摂食障害または栄養補給障害（ＯＳＦＥＤ）、強迫性過食、プラダーウィリー症候群、糖尿病過食、神経性オルトレキシア、選択的摂食、ドランクオレキシア、妊娠中の食欲不振；それだけには限らないが、非社会性人格障害、境界性人格障害、演技性人格障害、自己愛性人格障害、回避性人格障害、依存性人格障害、強迫性障害（ＯＣＤ）を含む人格障害；外傷後ストレス障害（ＰＴＳＤ）、例えば、急性ストレス障害、無併発性ＰＴＳＤ、複雑性ＰＴＳＤ、併存性ＰＴＳＤ；古典的レット症候群、ＣＤＫＬ５関連非定型レット症候群；統合失調症障害、例えば、緊張型統合失調症、解体型統合失調症、妄想型統合失調症、残遺型統合失調症および未分化型統合失調症；他のこのような精神および脳が関連する状態が挙げられる。脳の、もしくは脳が関わる他の疾患、障害および状態として、例えば、アルツハイマー病、プリオン疾患、例えば、クロイツフェルトヤコブ病、ニーマンピック病、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、フリートライヒ運動失調症、ハンチントン舞踏病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、テイサックス病、ウィルソン病、白質ジストロフィー、てんかん、多発性硬化症、脳炎および片頭痛が挙げられる。

【００８１】

脳へのデリバリーのためのＭＥＶカーゴには、例えば、脳の、もしくは脳が関わる疾患、障害または状態を処置または検出またはモニタリングするための、精神賦活性薬剤、酵素、増殖因子および検出可能な生成物のうち１つまたは複数を含むカーゴが含まれる。このようなカーゴには、例えば、ＴｒｋＡ（トロポミオシンキナーゼＡ）、ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子）、ＣＮＴＦ（繊毛様神経栄養因子）、シロシビンおよび／またはシロシン、ハルミン、トモゾロニド（ｔｏｍｏｚｏｌｏｎｉｄｅ）、リバスチグミン、ＧＡＢＡＢ１Ａ受容体、ＧＡＢＡＢ１Ａ受容体ｓｉＲＮＡ、ＰＴＥＮ　ｓｉ

ＲＮＡ（配列番号１３６～１３８）の中から選択される向神経性因子；ｍｉＲ－１７（ｍｉＲＮＡ；配列番号１３９～１４１）、ＭＡＬＡＴ１（配列番号１４２）；５－ヒドロキシトリプタミン－１Ａ（５－）および５－ヒドロキシトリプタミン－３（５－ＨＴ３）受容体アゴニスト、例えば、アザピロン、メチルフェニデート、デクスメチルフェニデート、オンダンセトロン（例えば、商標ゾフラン（登録商標）の下で販売される製品）；アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、例えば、ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン；アルファ－１－受容体アンタゴニスト、例えば、プラゾシン；抗けいれん薬、例えば、ガバペンチン、プレガバリン、トピラメート（例えば、トポマックス（登録商標）として販売される製品）、カルバマゼピン、エスリカルバゼピン、レベチラセタム、リカルバゼピン、オキシカルバゼピン、バルプロ酸および誘導体、ラモトリジン；抗精神病薬、例えば、アプリプラゾン（Ａｐｒｉｐｒａｚｏｎｅ）、アセナピン、カリプラジン、クロルプロマジン、クロザピン、ハロペリドール、ルマテペロントシル酸塩（例えば、カプリタ（登録商標）として販売される製品）、オランザピン、パリペリドン、クエチアピン、リスペリドン、ジプラシドン；ベータ遮断薬、例えば、アザピロン、プロプラノロール；コリン作動性の系をモジュレートする薬物、例えば、ビペリデン、スコポラミン；副腎皮質刺激ホルモン放出因子（ＣＲＦ）アンタゴニスト；ＧＡＢＡ作動性の系をモジュレートする薬物、例えば、ベンゾジアゼピン、ブレキサノロン、ＳＡＧＥ－２１７；グルココルチコイド受容体アゴニスト、例えば、ヒドロコルチゾン；グルタミン酸作動性モジュレーションに関与する薬物、例えば、ＡＧＮ－２４１７５１、ＡＶ－１０１、ＡＶＰ－７８６、ＡＶＰ－９２３、ＡＸＳ－０５、Ｄ－サイクロセリン、デキストロメトルファン、ラパスチネル；グリシンおよびグリシン再取り込み阻害剤、例えば、サルコシン；視床下部－下垂体－副腎（ＨＰＡ）系をモジュレートする薬物、例えば、フルドロコルチゾン、メチラポン、ミフェプリストンおよびプロバイオティクス；キヌレニン経路（ＫＰ）をモジュレートする薬物；辺縁系および傍辺縁系脳領域をモジュレートする薬物、例えば、カンナビジオール（ＣＢＤ）；メラトニン作動性の系をモジュレートする薬物、例えば、アゴメラチン；脂肪酸、ペプチド、核酸および他の前駆体分子、例えば、アルファ－オメガ脂肪酸、補酵素Ｑ１０、ミオ－イノシトール、メチル葉酸塩、Ｓ－アデノシルメチオニン、システアミンおよびオキシトシン；モノアミンオキシダーゼ阻害剤（ＭＡＯＩ）、例えば、イソカルボキサジド（マルプラン（登録商標））、フェネルジン（ナルディル（登録商標））、セレギリン（エムサム（登録商標））およびトラニルシプロミン（パルネート（登録商標））；気分安定薬、例えば、リチウム塩、バルプロ酸、エブセレンおよびジバルプロエクス；多様式抗うつ剤、例えば、ビラゾドンおよびボルチオキセチン；Ｎ－ニトロソジメチルアミン（ＮＤＭＡ）－受容体アンタゴニスト、例えば、アマンタジン、アールケタミン、ケタミン、メマンチン、リルゾール、エスケタミン；ニューロキニン－１（ＮＫ１）受容体アンタゴニスト；ニューロペプチドＹ（ＮＰＹ）受容体アゴニスト；神経栄養性効果を有する薬物、シロスタゾール、シルデナフィルおよびビルダグリプチン；ノルエピネフリン－ドーパミン再取り込み阻害剤（ＮＤＲＩ）、ブプロピオン（ウェルブトリン（登録商標）、ザイバン（登録商標）、アプレンジン（登録商標））；オピエート系に作用する薬物、例えば、ＡＬＫＳ－５４６１、ＡＺＤ２３２７、ＢＴＲＸ－２４６０４０（ＬＹ２９４００９４）、ブプレノルフィン、ＪＮＪ－６７９５３９６４、ナルメフェンおよびナルトレキソン；タンパク質キナーゼＣ阻害剤または抗エストロゲン薬、例えば、エンドキシフェン、タモキシフェンおよびベラパミル；サイケデリック薬、例えば、３，４－メチレンジオキシメタンフェタミン（ＭＤＭＡ）、アヤワスカ、リゼルギン酸ジエチルアミド（ＬＳＤ）、シロシビン；選択的セロトニン再取り込み阻害剤（ＳＳＲＩ）、例えば、シタロプラム（セレクサ（登録商標））、エスシタロプラム（レクサプロ（登録商標））、フルボキサミン、パロキセチン（パキシル（登録商標）、パクセバ（Ｐａｘｅｖａ）（登録商標））およびセルトラリン（ゾロフト（登録商標））；選択的ノルエピネフリン輸送体阻害剤、例えば、アトモキセチン；セロトニン－ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（ＳＮＲＩ）、例えば、デスベンラファキシン（プリスティーク（登録商標））、デュロキセチン（シンバルタ（登録商標））、レボミラシラン（Ｌｅｖｏｍｉｌａｃｉｒａｎ）（

フェッツィマ（登録商標））およびベンラファクシン；アデノシン受容体アンタゴニストおよびアルファ－２－アドレナリン受容体アゴニストを含む刺激物質、例えば、カフェイン、クロニジン、グアンファシン、持続放出性アンフェタミンＸＲ－ＯＳ、硫酸デキストロアンフェタミン、リスデキサンフェタミン、メタンフェタミン、混合アンフェタミン塩、ラセミ体硫酸アンフェタミン、トリプルビーズ混合アンフェタミン塩；サブスタンスＰ－アンタゴニスト、例えば、アプレピタント（ＭＫ０８６９）およびホスアプレピタント（ＭＫ－０５１７）；三環系セロトニン－ノルエピネフリン再取り込み阻害剤、例えば、アミトリプチリン（エラビル（登録商標））、アモキサピン、プスピロン（ブスパール）、クロミプラミン、デシプラミン（ノルプラミン（登録商標））、ドキセピン、イミプラミン（トフラニール（登録商標））、マプロチリン、ノルトリプチリン（パメロール）、プロトリプチリンおよびトリミプラミン；ならびにバソプレシン１Ｂ（Ｖ１Ｂ）受容体アンタゴニスト、例えば、ネリバプタン（Ｎｅｌｉｖａｐｔａｎ）（ＳＳＲ１４９４１５）のうち１つまたは複数が含まれる。脳へのデリバリーのための例示的カーゴは、例えば、カタラーゼ、ＧＦＰ、ルシフェラーゼ、神経成長因子（ＮＧＦ）、ＴｒｋＡ（トロポミオシンキナーゼＡ）、それだけには限らないが、ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子）、ＣＮＴＦ（繊毛様神経栄養因子）、シロシビン／シロシン、ハルミン、トモゾロニド、リバスチグミンおよび／またはローダミンを含む神経栄養因子を含む場合がある。上記で記載したように、ＭＥＶを含有する組成物は、遺伝子療法のために、鼻腔内投与を介した投与またはインビトロでの細胞への投与のために、ニューロン、星状細胞、グリア細胞および／または神経幹細胞に送達され得る。

【００８２】

Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）のアゴニストおよびアンタゴニストのデリバリー

本明細書で提供される薬物デリバリーシステムおよび組成物は、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）のアゴニストおよび／またはアンタゴニストを送達するために使用され得る。Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の、内部移行された受容体の、および／または細胞内（エンドソーム）受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを含むカーゴを含有する微細藻類細胞外（ＭＥＶ）を含む薬物デリバリーシステムおよび組成物が提供される。例えば、ＭＥＶ中のカーゴは、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）、内部移行された受容体および／または細胞内（エンドソーム）受容体のアゴニストまたはアンタゴニストを含み得る。ＴＬＲおよびそのアゴニストは、以下のうち１つまたは複数である場合がある：

【００８３】

TLR メンバー	リガンド/アゴニスト
TLR1	トリアシルリポペプチド(Pam3CSK4)
TLR2	ザイモサン、ポリン、モジュリン、リポタンパク質、リポテイコ酸(Lipotechoic acid)、ジアシルリポペプチド、非定型 LPS、ペプチドグリカン、トリアシルリポペプチド
TLR3	dsRNA
TLR4	マンナン、タキソール、LPS
TLR5	細菌フラジェリン、プロフィリン、HMGB1、小分子アゴニスト(CBLB502)
TLR6	ザイモサン、ポリン、モジュリン、リポタンパク質、リポテイコ酸、ジアシルリポペプチド(Pam2CSK4)、非定型 LPS、ペプチドグリカン
TLR7	イミダゾキノリン、ロキソリビン、ssRNA、ブロピリミン、レシキモド
TLR8	ssRNA、低分子合成化合物
TLR9	CpG DNA
TLR10	ジアシルおよびトリアシルリポペプチド
TLR11	プロフィリン様タンパク質、尿路病原性細菌

【００８４】

ＴＬＲおよびアンタゴニストは、以下のうち１つまたは複数である場合がある：

【００８５】

TLR メンバー	リガンド/アンタゴニスト
TLR1	小分子アンタゴニスト (CU-T12-9、MMG-11)
TLR2	小分子アンタゴニスト(AT1-AT8、CU-CPT22、CU-T12-9、MMG-11、NPT1220-312)、フロレチン、スルホ糖脂質
TLR3	小分子アンタゴニスト(CU-CPT4a)、モノクローナル抗体(CNTO4685、CNTO5429)
TLR4	小分子アンタゴニスト(ノルビナルトルフィミン、T4Ics、T5342126、シンバスタチン
TLR5	小分子アンタゴニスト(TH1020)
TLR6	シンバスタチン
TLR7	クロロキン、ヒドロキシクロロキン、キナクリン
TLR8	小分子アンタゴニスト(CU-CPT8m、CU-CPT9a)
TLR9	小分子アンタゴニスト(NPT1220-312)、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、キナクリン;抑制性または阻害性オリゴヌクレオチド

【００８６】

したがって、カーゴを含有するＭＥＶが本明細書で提供され、カーゴを、特定の疾患、障害または状態に関与する臓器、組織および／または細胞に送達するために使用され得る。カーゴは、疾患、障害もしくは状態を処置、診断および／もしくは検出するために、および／または処置をモニタリングするために選択され得る。本明細書で記載され、実証されるようにＭＥＶの固有の輸送のために、ＭＥＶは、固有のデリバリービヒクルを提供する。

【図面の簡単な説明】

【００８７】
【図１】図１は、ＨＥＣＴＯＲ　ＰＢＲ培養物において使用された光強度の例示的プロファイルを提供する。
【図２】図２は、高純度のＭＥＶ調製物の例示的溶出プロファイルを表し、ここでＴＦＦによって事前に濃縮され、超遠心によって精製され、ＰＢＳで１ｍＬあたり10^{11}～10^{13}の濃度で製剤化されたＭＥＶが、ＩＺＯＮ製のプレパックカラムｑＥＶ１に播種された。ＭＥＶは、ＰＢＳ溶液を使用して溶出されている。０．５ｍＬの溶出画分が収集されている。ＭＥＶは、図で示されるように第１の画分において回収される。最も濃縮された画分（４－５）がプールされ、４℃で保存され、その後使用される。
【図３】図３は、透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）を使用して得られたＭＥＶの例示的画像を提供する。
【図４】図４は、小さいＲＮＡライブラリーの電気泳動図を提供する。
【図５】図５は、静脈内（ＩＶ）、気管内（ＩＴ）および経口（ＰＯ）経路についての投与経路による体内分布の代表的なパターンを提供する。
【図６】図６は、実施例５に記載されるような静脈内投与後の代表的な動物のインビボ全身イメージングを表す。
【図７】図７は、実施例５に記載されるような代表的な動物経口（ｐｅｒ　ｏｓ）［経口（ｏｒａｌ）］投与のインビボ全身イメージングを表す。
【図８】図８は、実施例５に記載されるような鼻腔内投与後の代表的な動物のインビボ全身イメージングを表す。
【図９】図９は、実施例５に記載されるような気管内投与後の代表的な動物のインビボ全身イメージングを表す。
【図１０】図１０は、実施例５に記載されるような静脈内投与後の肝臓、肺および脾臓における蓄積の動態学（６個体の動物の平均）を表す。
【図１１】図１１は、実施例５に記載されるような経口投与後の肺、脾臓および腸における蓄積の動態学（６個体の動物の平均）を表す。
【図１２】図１２は、実施例５に記載されるような鼻腔内投与後の肺および腎臓における蓄積の動態学（４個体の動物の平均）を表す。
【図１３】図１３は、実施例５に記載されるような気管内投与後の肺、脾臓および腸における蓄積の動態学（３個体の動物の平均）を表す。
【図１４】図１４Ａ～Ｄは、静脈内（ＩＶ）、鼻腔内（ＩＮ）、経口（ＰＯ）および気管内（ＩＴ）投与の３日後に単離された臓器［Ａ）肝臓；Ｂ）脾臓；Ｃ）肺；およびＤ）脳］におけるエクスビボ蛍光分析（総放射効率）を表す。
【図１５】図１５Ａおよび１５Ｂは、Ａ）腸（Ｇ＝ＧＡＬＴ組織）のヘマトキシリンおよびエオジン染色ならびにＢ）ＤＡＰＩ（核）染色およびＭＥＶ－ＰＫＨ２６蛍光を表す。
【図１６】図１６は、白色の斑点として示される、ＤＡＰＩ（核用）およびＭＥＶ－ＰＫＨ２６（赤色蛍光）を用いて染色された脾髄を表す。
【図１７】図１７は、ＧＡＬＴから脾臓へのＭＥＶの移動を示す図表を示す。
【図１８】図１８Ａ～Ｉは、各パラメータについて４群のマウスにおける、さまざまな用量での経口（ＰＯ）または気管内（ＩＴ）投与後のマウスモデルにおけるＭＥＶの毒性の評価の結果を示す。ＭＥＶ毒性は、化学パラメータ：ＡＬＡＴ、ＡＳＡＴ、尿素およびクレアチン（それぞれ図１８Ａ～Ｄ）によって、および２）血液学パラメータ：赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、ＭＣＶおよび好酸球（それぞれ図１８Ｅ～Ｉ）によって評価した。群は以下とした：ＰＯデリバリーによって１００μｌのＰＢＳが投与された群１マウス（白色バー）、群２マウスは、ＰＯデリバリーによって１００μｌの$4*10^{11}$ＭＥＶ／マウスが投与された（黒色ドットを有する白色バー）；群３マウスは、ＰＯデリバリーによって１００μｌの$4*10^{12}$ＭＥＶ／マウスが投与された（垂直線を有する白色バー）；群４マウスは、ＩＴデリバリーによって１００μｌの$4*10^{11}$ＭＥＶ／マウスが投与された（四角のバー）。データは、各パラメータについて群あたり６個体のマウスについて測定した。図１８ＡはＡＬＡＴ：アラニンアミノトランスフェラーゼを示

し、図１８ＢはＡＳＡＴ：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを示し、図１８Ｃは尿素を示し、図１８Ｄはクレアチンを示し、図１８Ｅは赤血球を示し、図１８Ｆはヘモグロビンを示し、図１８Ｇはヘマトクリットを示し、図１８ＨはＭＣＶ（平均血球体積）を示し、図１８Ｉは好酸球を示す。ＰＯは経口（ｐｅｒ　ｏｓ）［経口（ｏｒａｌ）デリバリー］を示し、ＩＴは気管内投与を示す。

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

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

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

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

【図２３】図２３は、Ｈｅｐ－Ｇ２細胞におけるＧＦＰタンパク質発現を含むＨｕｈ７細胞の共焦点顕微鏡観察を示す。

【図２４】図２４は、ＧＦＰ－ｍＲＮＡおよびＧＦＰをコードするｍＲＮＡが負荷されたＭＥＶのヒト線維芽細胞へのインビトロデリバリーを示す。

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

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

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

【図２８】図２８は、嗅上皮を通る経路を表す模式図である。

【図２９】図２９は、ＤＡＰＩ染色脳切片上の陽性対照Ｄｉｒ－ＭＥＶ：脳組織切片の上部に置かれた１滴のＭＥＶ懸濁液を示す。点は、Ｄｉｒ標識されたＭＥＶである。

【図３０】図３０は、島およびその繋がりの模式図である（Gogolla (2017) "The insular cortex," Current Biology:27(12): R580-R586から再現された。

【図３１】図３１は、嗅神経細胞（ＯＳＮ）から嗅球（ＯＢ）を通り、僧帽および房飾ニューロンへ、嗅索（ＯＴ）までの脳ニューロン経路の模式図である。

【図３２】図３２は、嗅上皮および呼吸上皮からＣＮＳ標的までの経路およびおよその平均距離を示す模式図である［Lochhead et al. (2019). "Perivascular and Perineural Pathways Involved in Brain Delivery and Distribution of Drugs after Intranasal Administration" Pharmaceutics 11(11):598, doi.org/10.3390/pharmaceutics11110598から再現された］。

【図３３】図３３は、僧帽および房飾細胞の皮質投射の模式図であり、脳の腹側外側図を示す［Imai (2014) "Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb," Seminars in Cell and Developmental Biology 35, DOI:10.1016/j.semcdb.2014.07.012から再現された］。

【図３４】図３４は、嗅覚経路によるＭＥＶの輸送を示す。ＩＮ投与後、ＭＥＶは嗅上皮によって取り込まれ、嗅覚ニューロンによる軸索輸送によって、嗅球に、次いで、僧帽および房飾ニューロンによって、嗅覚シグナルを処理する一次嗅覚領域に輸送される［Selvaraj et al.(2018) Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal 46:2088-2095, doi.org/10.1080/21691401.2017.1420073から再現された］。

【図３５】図３５は、ＩＮ投与後にＭＥＶによって使用される嗅覚路を表す［「深いチュートリアルおよび情報、嗅覚および味覚、感覚システム、パート１におけるＷｈａｔ－ｗｈｅｎ－ｈｏｗ（Ｗｈａｔ－ｗｈｅｎ－ｈｏｗ　ｉｎ　Ｄｅｐｔｈ　ｔｕｔｏｒｉａｌｓ

ａｎｄ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｏｌｆａｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔａｓｔｅ，Ｓｅｎｓｏｒｙ ｓｙｓｔｅｍ，ｐａｒｔ １）」（ｗｈａｔ－ｗｈｅｎ－ｈｏｗ．ｃｏｍ）から再現された一般経路の模式図］。

【図３６】図３６（ａ）～（ｇ）は以下である。（ａ）脳の体内分布研究の実験計画の概要。（ｂ）研究された５つの脳切片の位置、（ｃ）５つの研究された脳切片の各々におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布を決定するために分析された領域、（ｄ）～（ｇ）は、ＩＮ投与後の脳中のＭＥＶを示す以下の図を参照して脳の領域を表し、同定する。

【図３７】図３７（ａ）～（ｄ）は、図３６からの切片１の異なる領域におけるＭＥＶの薬物動態（ＰＫ）および体内分布を示す。ＤｉＲで標識されたＭＥＶの画像は、黒色点である。

【図３８】図３８は、切片１の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布を示し、分析された総面積によって正規化された切片１の領域の表面あたりのＤｉＲスポットを有する標識されたＭＥＶの総数のグラフを提供する。

【図３９】図３９（ａ）～（ｄ）は、切片２の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布を示す（ＤｉＲで標識されたＭＥＶの画像を示す）。

【図４０】図４０（ａ）～（ｄ）は、分析された総面積によって正規化された切片２の領域の表面あたりのＤｉＲスポットを有する標識されたＭＥＶの総数のグラフとして、切片２の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布を示す。

【図４１】図４１（ａ）～（ｄ）は、切片３の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布；ＤｉＲ標識されたＭＥＶの画像を示す。

【図４２】図４２（ａ）～（ｆ）は、分析された総面積によって正規化された切片３の領域の表面あたりのＤｉＲスポットを有する標識されたＭＥＶの総数のグラフにおける切片３の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布を示す。

【図４３】図４３（ａ）～（ｄ）は、ＤｉＲを用いて標識されたＭＥＶの画像として、切片４の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布を示す。

【図４４】図４４（ａ）～（ｄ）は、切片４の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布を示し、分析された総面積によって正規化された切片４の領域の表面あたりのＤｉＲスポットを有する標識されたＭＥＶの総数のグラフを提供する。

【図４５】図４５（ａ）～（ｄ）は、切片５の異なる領域におけるＭＥＶのＰＫおよび体内分布；ＤｉＲ標識されたＭＥＶの画像を示す。

【図４６】図４６（ａ）および（ｂ）は、脳の吻側から遠位部分へのＭＥＶによる脳浸透の動態学を示す。

【図４７】図４７（ａ）および（ｂ）は、血液脳関門を表す［Cecchelli et al. (2007) Nat Rev Drug Discov. 6(8):650-661から再現された］。

【図４８】図４８は、ＰＫＨ２６標識されたＭＥＶの投与の８時間後のマウス腸管上皮の顕微鏡画像を示す。

【図４９】図４９は、ルシフェラーゼｍＲＮＡが負荷されたＭＥＶで処置された代表的な動物の全身生物発光画像を示す。

【図５０】図５０は、ルシフェラーゼ酵素が負荷されたＭＥＶで処置された代表的な動物の全身生物発光画像を表す。

【図５１】図５１は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）生細胞アナライザーを使用する画像解析のタイムラインを表す。

【発明を実施するための形態】

【００８８】

概要

Ａ．定義

Ｂ．微細藻類および概説

Ｃ．細胞外小胞

１．細胞外小胞（ＥＶ）の種類

ａ．エキソソーム

ｂ．微小胞
ｃ．アポトーシス小体
２．ＥＶの取り込み
３．ＥＶを単離する一般的な方法
ａ．超遠心
ｂ．サイズベースの技術
ｃ．免疫親和性捕捉ベースの技術
ｄ．エキソソーム沈殿
ｅ．微小流体ベースの単離技術
４．微細藻類および微細藻類由来細胞外小胞（ＭＥＶ）
５．緑藻類－クロレラ属の種
ａ．生活環
ｂ．クロレラ属の種のゲノム分析
ｃ．クロレラ属の商業的使用および生物工学的使用
ｄ．クロレラ属ＭＥＶ
Ｄ．外因的に負荷された微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）、カーゴおよび標的
１．ＭＥＶの単離
２．ＭＥＶ負荷およびカーゴ
３．ペイロードが負荷されたＭＥＶの作製
ａ．エレクトロポレーション
ｂ．超音波処理
ｃ．押出
ｄ．界面活性剤
ｅ．他の方法
４．外因的に負荷されたＭＥＶの例示的カーゴおよび例示的使用
ａ．カーゴ
１）ＲＮＡカーゴ
２）抗体カーゴ
ｂ．疾患および処置の方法
ｃ．農業－獣医用適用
ｄ．化粧用および皮膚科学的適用
Ｅ．医薬組成物、製剤、キット、製造品および組合せ
１．医薬組成物および製剤
２．製造品／キットおよび組合せ
３．外因的に負荷されたＭＥＶの投与および投与経路
４．併用療法
Ｆ．種々の経路による投与後のＭＥＶの体内分布
１．哺乳動物ＥＶの体内分布
２．微細藻類ＥＶ体内分布
ａ．経口投与
１）リンパ系の構成成分
２）ＧＡＬＴを標的化すること
３．ＭＥＶによって処置される疾患および状態
Ｇ．製剤、投与経路ならびに疾患および障害
Ｈ．脳およびＣＮＳの疾患、障害および状態を処置するための、鼻腔内（ＩＮ）投与を介した脳へのＭＥＶの体内分布およびデリバリー
１．脳構造
ａ．前嗅核
ｂ．蓋紐
ｃ．嗅結節

ｄ．梨状葉皮質
ｅ．扁桃体
ｆ．嗅内皮質
ｇ．前頭皮質
ｈ．線条体：尾状核および被殻
ｉ．側坐核
ｊ．視床
ｋ．視床下部
ｌ．黒質緻密部
ｍ．海馬
ｎ．丘
ｏ．橋縫線核
２．脳血液関門
３．脳および標的細胞
４．ＭＥＶおよび他のデリバリービヒクルの体内分布間の距離
５．鼻腔内投与
６．ＭＥＶおよび鼻腔内投与後の脳へのデリバリー
７．鼻腔内（ＩＮ）投与後のＭＥＶの輸送および体内分布
８．ＩＮ投与の際にＭＥＶによって到達される嗅覚系および領域の一次および二次回路網
９．ＩＮ投与を介した脳へのＭＥＶのデリバリー－例示的生物活性カーゴおよびその使用
Ｉ．ＭＥＶ媒介性細胞内シグナル伝達
Ｊ．実施例

【００８９】

Ａ．定義

別に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書における開示全体を通して参照されるすべての特許、特許出願、公開出願および刊行物、ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）配列、データベース、ウェブサイトおよび他の公開資料は、別に記載されない限り、その全体が参照により組み込まれる。本明細書において用語について複数の定義が存在する事象では、この節におけるものが優先される。ＵＲＬまたは他のこのような識別子またはアドレスが参照される場合には、このような識別子は変化する場合があり、特にインターネットでの情報は、移り変わる場合があるが、インターネットを検索することによって同等の情報を見出すことができるということは理解される。そこへの言及は、このような情報が利用可能であり、公に配布されていることを証明する。

【００９０】

本明細書で使用される場合、カーゴとは、ＭＥＶが単離された後に本明細書で提供される微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）中に負荷される、外因性分子、例えば、生体分子および小分子を含む生物活性分子を指す。これは、ＭＥＶにとって異種であるカーゴを含む。

【００９１】

本明細書で使用される場合、一般に、ＭＥＶ中のカーゴに関して異種とは、ＭＥＶにおいて天然に存在しないが、上記で論じられたように外因的に負荷されるＭＥＶ中のカーゴを指す。遺伝子改変された微細藻類によってＭＥＶにおいて内因的に負荷されているＭＥＶ中のカーゴも指す。異種カーゴを有するＭＥＶは、ＭＥＶでは天然に生じないカーゴを含む。

【００９２】

本明細書で使用される場合、生物活性分子または生物活性剤とは、生物活性、例えば、治療活性を有し得る、または検出可能なマーカーとしての、または対象に対してインビボ

で作用し得る任意の分子または薬剤を指す。生物活性薬剤および分子には、療法、診断的適用または他のこのような使用、例えば、化粧品に関連して、対象、例えば、ヒトまたは他の動物または植物または微生物（細菌または他のもの）に送達されるであろう、生体分子、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、他の生体高分子および小分子、例えば、小分子薬物および医薬品、免疫原ならびに任意の分子が含まれる。生物活性剤または分子は、例えば、治療薬、免疫原、診断薬、検出可能なマーカーもしくは化粧品として機能し得る、またはそれとして活性を有し得る。本明細書における使用のための生物活性分子は、微細藻類から微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）中に負荷され得る任意のものである。

【００９３】

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

【００９４】

本明細書で使用される場合、ＭＥＶが同一のまたは実質的に同一の負荷されたカーゴまたはその量を有すると示される場合には、これは、組成物中のＭＥＶの集団の中の平均値を指すということが理解される。ＭＥＶが外因的に負荷される場合には、カーゴ／ＭＥＶの比率は、各ＭＥＶが平均で所定の量のカーゴを有するように選択できるということが理解される。簡単な例として、平均で１分子のカーゴ／ＭＥＶを負荷するために、当業者は、ＭＥＶの組成物中に負荷するカーゴの量を算出でき、ＭＥＶの組成物において、一部は１分子よりも多いカーゴ／ＭＥＶを有し、他のものは有さないであろうということを理解する。平均して、ＭＥＶは、１分子のカーゴ／ＭＥＶを有するであろう。当業者は、一般に、カーゴ／ＭＥＶの量は１より多い分子／ＭＥＶとなること、ならびにカーゴの量は、カーゴ、標的組織および／または細胞、処置される疾患、障害または状態および処置される対象を含むさまざまなパラメータに応じて変わることを理解する。一般に、ＭＥＶあたり１より多いカーゴの分子、平均的に、例えば、少なくとも１０または約１０分子／ＭＥＶが負荷される。実質的により多くのカーゴ、１００、５００、１０００、10^4個の分子／ＭＥＶおよびそれより多くも負荷され得る。負荷される量は、標的、疾患、障害または状態、対象およびカーゴおよびＭＥＶの能力に応じて変わる。量を選択することは当技術分野における技術の範囲内である。

【００９５】

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

【００９６】

本明細書で使用される場合、薬物デリバリーシステムとは、組織へのデリバリーのためにカーゴを含有する本明細書で提供されるＭＥＶを含有する組成物を指す。本明細書で示されるように、ＭＥＶを含有する組成物の製剤化および投与経路によって、投与の際のＭＥＶの輸送経路および／または最終目的地が選択され得る。例えば、本明細書で実証されるように、ＭＥＶの鼻腔内投与は、脳へのＭＥＶの輸送をもたらす。経口投与されたＭＥＶは、腸管関連リンパ組織（ＧＡＬＴ）を標的とすることができる。したがって、ＧＡＬＴは、カーゴを送達するためにＭＥＶおよびその治療薬カーゴを使用ことができる標的（有効なコンパートメント）および／または経路である。デリバリーシステムとは、これらの組織の、またはこれらの組織が関わる疾患、障害および状態の処置のために特定の組織を標的とする特定の投与経路のための製剤の組合せを指す。

【００９７】

本明細書で使用される場合、疾患または障害または状態とは、それだけには限らないが、感染、後天的な状態および遺伝的状態および同定可能な症状または特徴によって特徴付けられるものを含む原因または状態に起因する生物における病的または望ましくないまたは望まれない状態を指す。

【００９８】

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

【００９９】

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

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

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

【０１０３】

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

【０１０４】

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

【０１０５】

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

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

【０１０６】

本明細書で使用される場合、ノンコーディングＲＮＡは、タンパク質をコードしないＲＮＡである。ノンコーディングＲＮＡのクラスには、それだけには限らないが、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）およびマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）が含まれる。本明細書で使用される場合、標的とされた遺伝子を阻害、抑制、破壊またはサイレンシングすることは、標的とされた遺伝子の発現、例えば、翻訳を変更し、それによって、標的とされた遺伝子によってコードされる生成物の活性または発現が低減されるプロセスを指す。低減は、それによって、本明細書で提供されるＭＥＶおよび本明細書における投与に関して処置が達成される、完全ノックアウトまたは部分ノックアウトを含む。

【０１０７】

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

【０１０８】

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

【０１０９】

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

【０１１０】

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

【０１１１】

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

【０１１２】

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

きる。
【０１１３】
本明細書で使用される場合、配列表に示されるものなどの開示された配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸位置に対応する位置で、またはヌクレオチドまたはアミノ酸位置が、配列表に示されるものなどの開示された配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸位置に対応するという記述は、標準アラインメントアルゴリズム、例えば、ＧＡＰアルゴリズムを使用して同一性を最大にするための、開示された配列とのアラインメントの際に同定されるヌクレオチドまたはアミノ酸位置を指す。配列をアラインすることによって、当業者は、例えば、ガイドとして保存されたおよび同一のアミノ酸残基を使用して対応する残基を同定できる。一般に、対応する位置を同定するために、最高次のマッチが得られるようにアミノ酸の配列がアラインされる［例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988； Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993； Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994； Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987； Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991;およびCarrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073を参照されたい］。
【０１１４】
本明細書で使用される場合、配列のアラインメントは、２つまたはそれより多いヌクレオチドまたはアミノ酸の配列をアラインするための相同性の使用を指す。通常、５０％以上の同一性によって関連する２つまたはそれより多い配列がアラインされる。アラインされた配列のセットとは、対応する位置でアラインされている２つまたはそれより多い配列を指し、ゲノムＤＮＡ配列とアラインされた、ＲＮＡに由来するアラインしている配列、例えば、ＥＳＴおよび他のｃＤＮＡを含み得る。関連するまたはバリアントポリペプチドまたは核酸分子は、当業者に公知の任意の方法によってアラインできる。このような方法は通常、マッチを最大化し、手作業でのアラインメントを使用する、および入手可能な多数のアラインメントプログラム（例えば、ＢＬＡＳＴＰ）および当業者に公知の他のものを使用するなどによる方法を含む。ポリペプチドまたは核酸の配列をアラインすることによって、当業者は、ガイドとして保存されたおよび同一のアミノ酸残基を使用して類似の部分または位置を同定できる。さらに、当業者はまた、保存されたアミノ酸またはヌクレオチド残基をガイドとして使用して、ヒトと非ヒト配列の間およびその中で対応するアミノ酸またはヌクレオチド残基を見出すことができる。対応する位置はまた、例えば、タンパク質構造のコンピュータシミュレーションされたアラインメントを使用することによる、構造的アラインメントに基づく場合もある。他の場合には、対応する領域を同定できる。当業者はまた、保存されたアミノ酸残基をガイドとして使用して、ヒトと非ヒト配列の間およびその中で対応するアミノ酸残基を見出すことができる。
【０１１５】
本明細書で使用される場合、ポリペプチド、例えば、抗体の特性とは、それだけには限らないが、結合特異性、構造的立体配置またはコンホメーション、タンパク質安定性、タンパク質分解に対する耐性、コンホメーション的安定性、熱耐性およびｐＨ条件に対する耐性を含む、ポリペプチドによって示される任意の特性を指す。特性の変化は、ポリペプチドの活性を変更する場合がある。例えば、抗体ポリペプチドの結合特異性の変化は、ポリペプチドの抗原に結合する能力および／または種々の結合活性、例えば、親和性またはアビディティーまたはインビボ活性を変更する場合がある。
【０１１６】
本明細書で使用される場合、ポリペプチド、例えば、抗体の活性または機能活性とは、ポリペプチドによって示される任意の活性を指す。このような活性は、経験的に決定できる。例示的活性として、それだけには限らないが、例えば、抗原－結合、ＤＮＡ結合、リ

ガンド結合、もしくは二量体化によって生体分子と相互作用する能力または酵素活性、例えば、キナーゼ活性またはタンパク質分解活性が挙げられる。抗体（抗体断片を含む）について、活性として、それだけには限らないが、特定の抗原に特異的に結合する能力、抗原－結合の親和性（例えば、高いまたは低い親和性）、抗原－結合のアビディティー（例えば、高または低アビディティー）、結合速度（ｏｎ－ｒａｔｅ）、解離速度（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）、エフェクター機能、例えば、抗原中和またはクリアランス、ウイルス中和を促進する能力およびインビボ活性、例えば、感染もしくは病原体の侵襲を防ぐ能力またはクリアランスを促進する能力または身体中の特定の組織もしくは流体もしくは細胞に浸透する能力が挙げられる。活性は、認識されたアッセイ、例えば、ＥＬＩＳＡ、フローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴または結合速度（ｏｎ－ｒａｔｅ）もしくは解離速度（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）を測定するための同等のアッセイ、免疫組織化学および免疫蛍光組織学および顕微鏡観察、細胞ベースのアッセイ、フローサイトメトリーおよび結合アッセイ（例えば、パニングアッセイ）を使用してインビトロまたはインビボで評価できる。

【０１１７】

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

【０１１８】

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

【０１１９】

本明細書における目的のために、抗体という用語は、全長抗体および抗体断片を含むその部分、例えば、抗腫瘍抗体または抗病原体または遺伝子サイレンシング断片を含む。抗体断片には、それだけには限らないが、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）2断片、Ｆｖ断片、ジスルフィド結合性Ｆｖ（ｄｓＦｖ）、Ｆｄ断片、Ｆｄ’断片、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単鎖Ｆａｂ（ｓｃＦａｂ）、ダイアボディー、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体または上記のいずれかの抗原結合性断片が含まれる。抗体にはまた、合成抗体、組換え生成された抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト抗体、非ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体およびイントラボディが含まれる。本明細書で提供される抗体には、任意の免疫グロブリンクラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、任意のサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはサブサブクラス（例えば、ＩｇＧ２ａおよびＩｇＧ２ｂ）のメンバーが含まれる。

【０１２０】
本明細書で使用される場合、核酸とは、通常、ホスホジエステル結合によって一緒に接続されたデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）およびリボ核酸（ＲＮＡ）を含む、少なくとも２つの連結されたヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を指す。また、核酸という用語に、核酸の類似体、例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホスホロチオエートＤＮＡおよび他のこのような類似体および誘導体またはそれらの組合せも含まれる。核酸はまた、例えば、ヌクレオチド類似体またはリン酸ジエステル結合以外の骨格結合、例えば、ホスホトリエステル結合、ホスホルアミデート結合、ホスホロチオエート結合、チオエステル結合またはペプチド結合（ペプチド核酸）を含有するＤＮＡおよびＲＮＡ誘導体も含む。この用語はまた、等価物として、ヌクレオチド類似体、単鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖核酸から作製された、ＲＮＡまたはＤＮＡいずれかの誘導体、変異体および類似体を含む。デオキシリボヌクレオチドには、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシンおよびデオキシチミジンが含まれる。ＲＮＡについては、ウラシル塩基は、ウリジンである。

【０１２１】
本明細書で使用される場合、単離された核酸分子は、核酸分子の天然供給源中に存在する他の核酸分子から分離されているものである。単離された核酸分子、例えば、ｃＤＮＡ分子は、組換え技術によって生成される場合には他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まない、または化学合成される場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないことができる。本明細書で提供される例示的な単離された核酸分子として、ＲＮＡｉまたは治療用タンパク質をコードする単離された核酸分子が挙げられる。

【０１２２】
本明細書で使用される場合、核酸配列、領域、エレメントまたはドメインに関して作動可能に連結されたとは、核酸領域が互いに機能的に関連していることを意味する。例えば、リーダーペプチドをコードする核酸を、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結することができ、それによって核酸を転写し、翻訳して、機能的な融合タンパク質を発現させることができ、ここで、リーダーペプチドは、融合ポリペプチドの分泌を達成する。一部の場合には、第１のポリペプチド（例えば、リーダーペプチド）をコードする核酸が、第２のポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結され、核酸が単一のｍＲＮＡ転写物として転写されるが、ｍＲＮＡ転写物の翻訳が、２つのポリペプチドのうち一方が発現されることをもたらす場合がある。例えば、部分的アンバーサプレッサー細胞中に導入された場合に、結果として生じた単一ｍＲＮＡ転写物が翻訳されて、第１および第２のポリペプチドを含有する融合タンパク質を生成できるか、または翻訳されて、第１のポリペプチドのみを生成できるように、アンバー停止コドンを第１のポリペプチドをコードする核酸と第２のポリペプチドをコードする核酸の間に位置付けることができる。別の例では、プロモーターを、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結でき、それによって、プロモーターは、核酸の転写を調節または媒介する。

【０１２３】
本明細書で使用される場合、例えば、合成核酸分子または合成遺伝子または合成ペプチドに関して合成とは、組換え法によって、および／または化学合成法によって生成される核酸分子またはポリペプチド分子を指す。

【０１２４】
本明細書で使用される場合、天然に存在するα－アミノ酸の残基は、自然界に見出される２０種のα－アミノ酸の残基であり、ヒトではその同族ｍＲＮＡコドンを用いて荷電ｔＲＮＡ分子の特異的認識によってタンパク質中に組み込まれる。

【０１２５】
本明細書で使用される場合、ポリペプチドとは、共有結合によって接続された２つまたはそれより多いアミノ酸を指す。ポリペプチドおよびタンパク質という用語は、本明細書において同義的に使用される。

【０１２６】

本明細書で使用される場合、ペプチドとは、２～約４０または４０個のアミノ酸の長さであるポリペプチドを指す。

【０１２７】

本明細書で使用される場合、タンパク質への言及は、特に断りのない限り、ペプチド、ポリペプチド、小ペプチドおよびタンパク質のすべての形態を含む。

【０１２８】

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

【０１２９】

本明細書で使用される場合、アミノ酸残基とは、そのペプチド結合でのポリペプチドの化学的消化（加水分解）の際に形成されるアミノ酸を指す。本明細書で記載されるアミノ酸残基は、一般に、Ｌ異性体形態である。Ｄ異性体形態の残基は、ポリペプチドによって所望の機能的特性が保持される限り、任意のＬ－アミノ酸残基と置換され得る。NH_2とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。ＣＯＯＨとは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基を指す。J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1968)に記載され、３７　Ｃ．Ｆ．Ｒ．　§§　１．８２１－１．８２２で採用された標準ポリペプチド命名法に沿って、アミノ酸残基の略語は、以下の表に示されている：

【０１３０】

対応の表

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

【０１３１】
式によって本明細書で表されるアミノ酸残基のすべての配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の従来の方向で左から右の配向を有する。アミノ酸残基という語句は、上記の対応の表に列挙されるアミノ酸、改変された、非天然のおよび普通ではないアミノ酸を含むように定義される。アミノ酸残基配列の最初または最後のダッシュは、１つもしくは複数のアミノ酸残基のさらなる配列への、またはアミノ末端基、例えば、NH_2への、またはカルボキシル末端基、例えばＣＯＯＨへのペプチド結合を示す。
【０１３２】
ペプチドまたはタンパク質では、アミノ酸の適した保存的置換は当業者に公知であり、一般に、結果として生じる分子の生物活性を変更することなく行うことができる。当業者ならば、一般に、ポリペプチドの非必須領域中の単一アミノ酸置換は、生物活性を実質的に変更しないことは認識している（例えば、Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224を参照されたい）。
【０１３３】
このような置換は、以下の表に示される例示的置換に従って行うことができる：
【０１３４】

例示的保存的アミノ酸置換

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

【０１３５】
他の置換も許容され、経験的にまたは他の公知の保存的もしくは非保存的置換に従って決定できる。
【０１３６】
本明細書で使用される場合、天然に存在するアミノ酸とは、ポリペプチド中に生じる２０種のＬ－アミノ酸を指す。
【０１３７】
本明細書で使用される場合、非天然アミノ酸という用語は、天然アミノ酸と類似しているが、天然アミノ酸の構造および反応性を模倣するように構造的に改変されている構造を有する有機化合物を指す。したがって、天然に存在しないアミノ酸には、例えば、２０種の天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸またはアミノ酸の類似体が含まれ、それだけには限らないが、アミノ酸のＤ－立体異性体が含まれる。例示的非天然アミノ酸には、当業者に公知であり、それだけには限らないが、２－アミノアジピン酸（Ａａｄ）、３－アミノアジピン酸（ｂＡａｄ）、β－アラニン／β－アミノ－プロピオン酸（Ｂａｌａ）、２－アミノ酪酸（Ａｂｕ）、４－アミノ酪酸／ピペリジン酸（４Ａｂｕ）、６－アミノカプロン酸（Ａｃｐ）、２－アミノヘプタン酸（Ａｈｅ）、２－アミノイソ酪酸（Ａｉｂ）、３－アミノイソ酪酸（Ｂａｉｂ）、２－アミノピメリン酸（Ａｐｍ）、２，４－ジアミノ酪酸（Ｄｂｕ）、デスモシン（Ｄｅｓ）、２，２’－ジアミノピメリン酸（Ｄｐｍ）、２，３－ジアミノプロピオン酸（Ｄｐｒ）、Ｎ－エチルグリシン（ＥｔＧｌｙ）、Ｎ－エチルアスパラギン（ＥｔＡｓｎ）、ヒドロキシリジン（Ｈｙｌ）、アロ－ヒドロキシリジン（Ａｈｙｌ）、３－ヒドロキシプロリン（３Ｈｙｐ）、４－ヒドロキシプロリン（４Ｈｙｐ）、イソデスモシン（Ｉｄｅ）、アロ－イソロイシン（Ａｉｌｅ）、Ｎ－メチルグリシン、サルコシン（ＭｅＧｌｙ）、Ｎ－メチルイソロイシン（ＭｅＩｌｅ）、６－Ｎ－メチルリジン（ＭｅＬｙｓ）、Ｎ－メチルバリン（ＭｅＶａｌ）、ノルバリン（Ｎｖａ）、ノルロイシン（Ｎｌｅ）およびオルニチン（Ｏｒｎ）が含まれる。
【０１３８】
本明細書で使用される場合、ＤＮＡコンストラクトは、天然には見出されない方法で組み合わされ、並置されたＤＮＡのセグメントを含有する、一本鎖または二本鎖であり、直鎖または環状ＤＮＡ分子である。ＤＮＡコンストラクトは、ヒトによる操作の結果として

存在し、操作された分子のクローンおよび他のコピーを含む。

【０１３９】

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

【０１４０】

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

【０１４１】

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

【０１４２】

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

【０１４３】

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

【０１４４】

本明細書で使用される場合、細胞療法は、疾患または状態を処置するための対象へのＭＥＶのデリバリーを含む。ＭＥＶにはカーゴが外因的に負荷されており、その結果、それらは対象に導入されると生成物を送達するまたは発現する。ＭＥＶにはまた、カーゴが内因的に負荷される場合があり（例えば、内因的に負荷されたＭＥＶの調製およびその生成体細胞株を詳述する、２０２２年６月３日に出願された、同時係属米国仮出願番号第６３／３４９，００６号を参照されたい）、本明細書で記載されるように使用される。ＭＥＶ

の輸送は、一般に、カーゴが負荷される方法に依存しない。微細藻類は、得られるＭＥＶの特性を変更するように改変され得る。内因的に負荷されたＭＥＶは、本明細書で記載される方法および組成物において使用され得る。

【０１４５】

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

【０１４６】

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

【０１４７】

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

【０１４８】

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

【０１４９】

本明細書で使用される場合、発現ベクターは、このようなＤＮＡ断片の発現を達成可能である調節配列、例えば、プロモーター領域と作動可能に連結されたＤＮＡを発現可能であるベクターを含む。このような追加のセグメントは、プロモーターおよびターミネータ

ー配列を含む場合があり、適宜、１つまたは複数の複製起点、１つまたは複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含む場合がある。発現ベクターは一般に、プラスミドまたはウイルスＤＮＡに由来し、または両方のエレメントを含有し得る。したがって、発現ベクターとは、組換えＤＮＡまたはＲＮＡコンストラクト、例えば、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、または適切な宿主細胞中に導入されるとクローニングされたＤＮＡの発現をもたらす他のベクターを指す。適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、真核細胞および／または原核細胞において複製可能であるものならびにエピソームのままであるもの、または宿主細胞ゲノム中に組み込まれるものが含まれる。

【０１５０】

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

【０１５１】

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

【０１５２】

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

【０１５３】

本明細書で使用される場合、ローカルアラインメントは、２つの配列をアラインするが、類似性または同一性を共有する配列の部分のみをアラインするアラインメントである。したがって、ローカルアラインメントは、ある配列のサブセグメントが別の配列中に存在するか否かを決定する。類似性がない場合には、アラインメントは返されない。ローカルアラインメントアルゴリズムには、ＢＬＡＳＴまたはＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム［Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)］が含まれる。例えば、ローカルアラ

インメントに基づく５０％の配列同一性は、任意の長さの２つの比較された配列の全配列のアラインメントにおいて、１００ヌクレオチドの長さの類似性または同一性の領域が、類似性または同一性の領域において同一である５０％の残基を有することを意味する。

【０１５４】

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

【０１５５】

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

容易に評価できる。

【０１５６】

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

【０１５７】

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

【０１５８】

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

【０１５９】

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

【０１６０】

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

【０１６１】

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

【０１６２】

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

【０１６３】

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

【０１６４】

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

【０１６５】

本明細書で使用される場合、患者とは、ヒト対象を指す。

【０１６６】

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

【０１６７】

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

【０１６８】

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

【０１６９】

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

【０１７０】

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

【０１７１】

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

【０１７２】

本明細書で使用される場合、単回投与形製剤とは、直接投与のための製剤を指す。

【０１７３】

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

【０１７４】

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

【０１７５】

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

【０１７６】

本明細書で使用される場合、単離された、または精製されたポリペプチドまたはタンパク質（例えば、単離された抗体またはその抗原結合性断片）またはその生物学的に活性な部分（例えば、単離された抗原結合性断片）は、タンパク質が由来する細胞または組織からの細胞性材料もしくは他の混入タンパク質を実質的に含まない、または化学合成された場合には化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。調製物は、それらがこのような純度を評価するために当業者によって使用される標準的な分析方法、例えば、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって決定されるような容易に検出可能な不純物を含まない、またはさらなる精製が物質の物理的および化学的特性、例えば、酵素活性および生物学的活性を検出可能に変更しないように十分に純粋であると見える場合に、実質的に含まないと決定され得る。実質的に化学的に純粋な化合物をもたらすための化合物の精製方法は、当業者に公知である。しかし、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物であり得る。こ

のような場合には、さらなる精製は、化合物の特定の活性を増大する可能性がある。

【０１７７】

本明細書で使用される場合、細胞性抽出物または溶解物とは、溶解または破壊された細胞から作製される調製物または画分を指す。

【０１７８】

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

【０１７９】

本明細書で使用される場合、シロシンは、シロシビンの活性形態である。シロシンは、肝臓においてシロシビンの酸化によって生成される。本明細書における目的のために、ＭＥＶ媒介性デリバリーの状況では、シロシビンおよびシロシンは、同一の意味を有するはずであり、「シロシビン」への言及は、「シロシン」を意味するはずであり、逆もまた同様である。

【０１８０】

本明細書で使用される場合、ブレグマは、脳中の位置と、頭蓋の冠状縫合と矢状縫合の間の接合点の間の距離を測定する単位である。

【０１８１】

本明細書で使用される場合、ＭＥＶの向性とは、ＭＥＶが投与の際に蓄積する、細胞、組織および／または臓器を指す。

【０１８２】

本明細書で使用される場合、本明細書で提供されるＭＥＶに関連して天然の向性とは、ＭＥＶが特定の向性または標的化特性を提供するように改変されていないという意味を指す。

【０１８３】

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

【０１８４】

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

【０１８５】

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

【０１８６】

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

【０１８７】

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

【０１８８】

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

【０１８９】
Ｂ．微細藻類および概説
藻類は、主に光合成生物の複雑な多系統的収集物である。これらの生物には、微視的および巨視的形態が含まれる。大型藻類（海藻）は、多細胞性の大きなサイズの藻類で、肉眼で目に見える。微細藻類は、顕微鏡的単細胞であり、原核生物（例えば、シアノバクテリア）および真核生物、例えば、緑藻類を含む。
【０１９０】
光合成作物と比較して、微細藻類は、より高い成長速度を有し、非耕作地で、またバイオリアクター中で栽培できる。微細藻類の多数の種を、制御された栽培条件下で工業的規模のフォトバイオリアクター中で年間を通じて増殖させることができる［Adamo et al. (2021) Journal of Extracellular Vesicles 10:e12081］。
【０１９１】
藻類は、一般に１１の主要な門に分類される：藍色植物門（Ｃｙａｎｏｐｈｙｔａ）、緑藻植物門（Ｃｈｌｏｒｏｐｈｙｔａ）、紅藻植物門（Ｒｈｏｄｏｐｈｙｔａ）、灰色植物門（Ｇｌａｕｃｏｐｈｙｔａ）、ユーグレナ植物門（Ｅｕｇｌｅｎｏｐｈｙｔａ）、クロララクニオン植物門（Ｃｈｌｏｒａｒａｃｈｎｉｏｐｈｙｔａ）、車軸藻植物門（Ｃｈａｒｏｐｈｙｔａ）、クリプト植物門（Ｃｒｙｐｔｏｐｈｙｔａ）、ハプト植物門（Ｈａｐｔｏｐｈｙｔａ）、不等毛植物門（Ｈｅｔｅｒｏｋｏｎｔｏｐｈｙｔａ）および渦鞭毛植物門（Ｄｉｎｏｐｈｙｔａ）［Barkia et al. (2019) Mar. Drugs 17(5):304］。各藻類群において異なる色素が生じる。シアノバクテリア（または藍色植物門）は、フィコビリンタンパク質（光エネルギーを捕捉するタンパク質）、フィコシアニン、アロフィコシアニンおよびフィコエリトリンに加えて、クロロフィル－ａ、－ｄおよび－ｆを含有する。灰色藻（Ｇｌａｕｃｏｐｈｙｔｅ）は、クロロフィル－ａを含有し、フィコビリンタンパク質を介して集光する。緑藻植物は、クロロフィル－ａおよび－ｂならびにβ－カロテンを含むカロテノイドおよび種々のキサントフィル（例えば、アスタキサンチン、カンタキサンチン、ルテインおよびゼアキサンチン）を有する。紅藻植物門（紅藻類）の主な色素は、フィコエリトリンおよびフィコシアニンであり、これはクロロフィル－ａをマスクでき、紅藻類はまた、広範囲のカロテンおよびキサントフィル集光性色素を産生する［Barkia et al. (2019) Mar. Drugs 17(5):304］。
【０１９２】
動物および植物への外因的に負荷されたカーゴのデリバリーのために使用するための、藻類、特に、単細胞緑藻類、例えば、クロレラ属の種によって産生される細胞外小胞が本明細書で提供される。藻類は、通常、単数体であるが、生活環の２倍体段階を有する場合もある単細胞の真核生物である。藻類をバイオリアクター中で培養し、細胞外小胞をそれから単離できる。得られた細胞外小胞に、エレクトロポレーションなどの方法によってカーゴ、一般に、異種生物活性分子のカーゴを負荷して、動物への、およびまた植物への投与のための細胞外小胞を含有する組成物を生成することができる。組成物は、局所的、局所性、全身、非経口および経口を含む任意の所望の投与経路のために製剤化できる。これらの経路には、経口、静脈内、皮下、吸入、粘膜、直腸、膣内および他の適した経路が含まれる。カーゴは、生体分子、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、タンパク質複合体、タンパク質－核酸複合体、プラスミドを含み、また、小分子、例えば、小分子薬物を含む。細胞外小胞は、液体、凍結乾燥散剤を含む散剤、錠剤、カプセル剤、エマルジョン、粒子、スプレー、ゲル、軟膏、クリームおよび他の製剤として製剤化できる。それらを治療的、診断的、セラグノスティック、化粧用および他の使用のために使用できる。細胞外小胞を使用して、がん、炎症性疾患および免疫系が病因論または症状において役割を果たす状態、神経系障害ならびにウイルスおよび細菌および他の病原体を含む病原体感染症を含む、疾患および状態を処置できる。それらを使用して、皮膚科疾患および状態、肺疾患および状態ならびに胃疾患および状態を処置できる。細胞外小胞は、特定の臓器もしくは組織を標的化できる、または局所性に投与できる。
【０１９３】

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

【０１９４】

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

【０１９５】

本明細書で示され、記載されるように、ＭＥＶは、例えば、投与経路による体内分布パターン、低い毒性、インビボでの良好な薬物動態プロファイルを含む、いくつかの有利な特徴を有する。それらは、他の経路の中でも経口投与、気道への投与、鼻腔内、静脈内を含むさまざまな経路によって投与できる。それらは、投与経路に従って、腸、ＧＡＬＴ、脾臓、肺、肝臓および脳などの特定の臓器に輸送される。本明細書におけるデータならびに他のＥＶおよび薬物デリバリーシステムのデータとの比較に基づいて、ＭＥＶは、より長いクリアランス速度を有し、その結果、標的化された臓器、組織および細胞において、哺乳動物ＥＶを含む他のデリバリーシステムについて報告されるものよりも長く持続する可能性がある。

【０１９６】

本明細書で示されるように、ＭＥＶは、天然の身体バリア（例えば、経口デリバリーまたは特定のリンパ組織デリバリーまたは鼻から脳へのデリバリー）を克服し、これは、液体のナノ粒子および哺乳動物起源のＥＶを用いた場合には達成されなかった。

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

Ｃ．細胞外小胞

細胞外小胞（ＥＶ）は、細胞間コミュニケーションにおいて役割を果たす、植物および動物細胞から放出される生体分子構造である。構造的に、ＥＶは、負電荷を有する脂質二重層小胞であり、１．１３～１．１９ｇ／ｍＬの密度を有する。ＥＶは、バリア、例えば、細胞（または細胞質）膜および血液／脳バリアを通過でき、ドナーからレシピエント細

胞へのその機能的内容物（すなわち、タンパク質、脂質、ＲＮＡ分子および循環ＤＮＡ）の水平移動を可能にする［Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357］。ＥＶはまた、種々の生物学的流体中で天然に安定であり、免疫学的に不活性であり、臓器特異的標的化能力を示すことができる［Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a］。

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

１．細胞外小胞（ＥＶ）の種類

ａ．エキソソーム

ＥＶの３つの主なサブタイプがある；それらは、バイオジェネシス、放出様式、サイズ、含量および機能に基づいて分類される：微小胞（ＭＶ）、エキソソームおよびアポトーシス小体［Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727］。エキソソームまたは腔内小胞（ＩＬＶ）は、一般に直径３０～１５０ｎｍであり、エンドソーム経路において多胞体（ＭＶＢ）を介して放出される。エンドソーム経路では、初期エンドソームは細胞膜の内向き出芽によって形成され、後期エンドソームに変形する可能性があり、これが、エンドソーム膜の内向き出芽によってＩＬＶを蓄積する。いくつかの小さい小胞を含有する後期エンドソームは、ＭＶＢと呼ばれる。ＭＶＢは、リソソームと融合し、分解されるか、または細胞膜と融合してエキソソームとしてＩＬＶを細胞外間隙中に放出する。輸送に必要なエンドソーム選別複合体（ＥＳＣＲＴ）経路は、ＭＶＢ輸送とエキソソーム形成を調

節し、エキソソームバイオジェネシスの主な推進力であると報告されているが、膜陥入を促進し得るスフィンゴ脂質セラミドまたはテトラスパニンファミリー中のタンパク質によって媒介されるものを含む、エキソソームバイオジェネシスの他の機序が存在する。ＥＳＣＲＴアクセサリータンパク質Ａｌｉｘ、ＴＳＧ１０１、ＨＳＣ７０およびＨＳＰ９０βは、エキソソームマーカータンパク質と呼ばれることが多い［Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727］。

【０２０３】

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

【０２０４】

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

【０２０５】

ｂ．微小胞

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

【０２０６】

ｃ．アポトーシス小体

アポトーシス小体は、死滅細胞によって細胞外間隙中に放出され、５０ｎｍ～５０００ｎｍの直径を有する。アポトーシス小体は、細胞が収縮した後の静水圧の増大によって細胞の細胞膜が細胞骨格から分離する際に形成される。エキソソームおよびＭＶとは異なり、アポトーシス小体は、無傷のオルガネラ、クロマチンおよび少量のグリコシル化タンパク質を含有する［Doyle and Wang (2019)Cells 8(7):727］。

【０２０７】

２．ＥＶの取り込み

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

そうであり、これは、ＥＶ取り込みにおけるＨＳＰＧおよびＳＲ－Ｂ１の役割を示唆する［Abels and Breakefield (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):301-312］。ＥＶの細胞膜との融合もまた、取り込みの１つの方法であり、低ｐＨ条件を必要とし、ｐＨ感受性膜融合ペプチドのカチオン性脂質との組合せを用いるＥＶの処置は、エキソソームの細胞取り込みおよびエキソソーム内のカーゴの細胞質放出の増大をもたらした［Nakase and Futaki (2015) Sci. Rep. 5:10112］。低ｐＨ条件は、腫瘍において生じ［Abels and Breakefield (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):301-312］、その結果、治療用ペイロードを腫瘍細胞に送達するためのＥＶは、細胞膜との融合を介して細胞に入ることができる。

【０２０８】

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

【０２０９】

３．ＥＶを単離するための一般的な方法

ａ．超遠心

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

【０２１０】

ｂ．サイズベースの技術

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

を単離するための一連の濾過工程に依存する［Doyle and Wang (2019)Cells 8(7):727］。

【０２１１】

エキソソームの超遠心方法（超遠心から得られたエキソソームペレットが再懸濁され、ＳＥＣを使用してさらに精製される）と並んで、よく使用されるサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）は、ＳＥＣを使用してタンパク質を分離することと類似している。ＳＥＣでは、カラムに、小粒子が透過でき、したがって、大きな粒子の後に溶出できる多孔性固定相が充填される。通常、ＳＥＣ方法は、数時間の実行時間を必要とするが、ｑＥＶエキソソーム単離キット（ｉＺＯＮ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、ニュージーランド）によって、ＳＥＣによる１５分以内の迅速な、正確なエキソソーム単離が可能となる［Doyle and Wang (2019)Cells 8(7):727］。

【０２１２】

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

【０２１３】

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

【０２１４】

ｃ．免疫親和性捕捉ベースの技術

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

【０２１５】

ｄ．エキソソーム沈殿

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

超遠心後に使用でき、それによって、レクチンがエキソソームの表面上の炭水化物に結合し、その溶解度を変更し、溶液からのその沈殿につながる［Doyle and Wang (2019) Cells 8(7):727］。

【０２１６】

ｅ．微小流体ベースの単離技術

微小流体ベースの技術は、その物理的および生化学的特性に同時に基づいてエキソソームを単離し、迅速で、効率的であり、小さい出発体積を必要とする。音響ナノフィルターでは、ＥＶおよび他の細胞構成成分を含有するマトリックスが、チャンバー中に注入され、超音波に曝露される。粒子は、そのサイズおよび密度に従って、波によって発揮される放射力に対して異なって応答し、大きな粒子は、より強い力を経験し、圧力ノードに向かってより迅速に移動する。免疫ベースの微小流体単離技術は、ＥＬＩＳＡのものに類似しているが、ＥＬＩＳＡとは異なり、エキソソームの事前の限外濾過または超遠心を必要としない［Doyle and Wang (2019)Cells 8(7):727］。微小流体技術を使用してエキソソームを単離するために、ＥｘｏＣｈｉｐ［Kanwar et al. (2014) Lab Chip. 14(11):1891-1900］およびＥｘｏＳｅａｒｃｈチップ［Zhao et al. (2016) Lab Chip. 16(3):489-496］が開発されている。

【０２１７】

４．微細藻類および微細藻類由来の細胞外小胞（ＭＥＶ）

微細藻類の分類学および分類は、異なる場合がある。いくつかのスキームに従って、微細藻類の７（７）つの門がある：ミドリムシ植物門（ユーグレナ藻類）、黄金色植物門（黄金藻類および珪藻類）、炎色植物門（炎色藻類）、緑藻植物門（緑藻類）、紅色植物門（紅藻類）、褐色植物門（褐藻類）および黄緑色植物門（黄緑藻類）。本明細書において興味深いものとして、光合成性微細藻類、例えば、クロレラ属およびクラミドモナス属の種がある。本明細書で記載される方法および使用は、一般に緑藻類に由来するＭＥＶを使用する。このような藻類の例示的なものとして、クラミドモナス属およびクロレラ属があり、これらは、それぞれ緑藻綱およびトレボウクシア藻綱に属する。

【０２１８】

微細藻類は、ナノ医療および他の分野において使用するためのＥＶの生成のための生物資源である。微細藻類からのＥＶの分泌の機序は、一次および運動性繊毛／鞭毛に関連して公知である［Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a］。クラミドモナス属（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ）の鞭毛は、ＭＶＢを欠き、したがって、クラミドモナス属から排出された繊毛様ＥＶは、エクトソームとして分類される。研究によって、緑藻植物コナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）の鞭毛および繊毛様尖端からのエクトソームの排出が示されている。ＥＶはまた、クラミドモナス属における繊毛の長さに沿って観察されている。膜出芽および繊毛様ＥＶ形成は、輸送に必要なエンドソーム選別複合体（ＥＳＣＲＴ）の構成成分によって媒介され、エンドソーム選別複合体はクラミドモナス属において単離された繊毛様移行帯、繊毛様膜および繊毛様ＥＶにおいて見出され、膜屈曲のセンサーとして作用し得る。繊毛様ＥＶの形成はまた、繊毛様膜輸送が破壊される場合または繊毛様再吸収の際に生じ得る［Wang and Barr (2018) Essays Biochem. 62(2):205-213］。クラミドモナス属由来の繊毛様エクトソームは、母細胞壁を消化し、娘細胞の放出に必要である溶解酵素を含有する。鞭毛を有さないＩｆｔ８８ヌル突然変異体は、母細胞から放出されることはできず、野生型細胞由来の繊毛様エクトソームの添加によって表現型がレスキューされたが、これは、ＥＶ生成における鞭毛および鞭毛内輸送（ＩＦＴ）機構の役割を示唆する［Wang and Barr (2016) Cell Mol. Neurobiol. 36(3):449-457］。

【０２１９】

ＥＶは、超遠心分離を使用して藻類細胞から抽出された［Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357］。この方法に従って、藻類細胞を培養、培養した藻類細胞を収集し、遠心分離し、上清を収集し（さらに遠心分離し）、上清にスクロース溶液を添加し、スクロース溶液を含む藻類上

清を超遠心し、スクロース溶液のために、高密度ＥＶが超遠心分離管の底に沈み、ピペットを使用して収集することができる。抽出された藻類ＥＶは、ナノ粒子トラッキング分析（ＮＴＡ）を使用してサイズおよび濃度で特性決定できる。この方法を使用する研究によって２５～２００ｎｍのサイズの範囲の、０．８９Ｅ８～０．９４Ｅ８粒子／ｍＬの濃度の緑藻類ＥＶが単離された［Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357］。

【０２２０】

超遠心分離プロトコールはまた、種々の条件下で成長させた海洋微細藻類からＥＶを単離するために使用できる；ＮＴＡは、ナノ粒子が１００から２００ｎｍの間のサイズ分布を有することおよびタンパク質のウエスタンブロッティングによって、ＥＶマーカーの存在が確認されたことを示した（VES4US, Extracellular vesicles from a natural source for tailor-made nanomaterials, 2020）。その後の研究によって、ナノアルゴソーム（ｎａｎｏａｌｇｏｓｏｍｅｓ）と呼ばれる海洋光合成微細藻類緑藻植物テトラセルミス・チュイイ（Ｔｅｔｒａｓｅｌｍｉｓ　ｃｈｕｉｉ）から単離された微細藻類の小ＥＶ（ｓＥＶ）が同定された。類似の結果が２つの他の微細藻類の種、緑藻植物のデュナリエラ・ターティオレクタ（Ｄｕｎａｌｉｅｌｌａ　ｔｅｒｔｉｏｌｅｃｔａ）および渦鞭毛藻類のアンフィディニウム属（Ａｍｐｈｉｄｉｎｉｕｍ）の種のバッチ培養物から単離されたｓＥＶを使用して得られたので、ナノアルゴソームの生成は、微細藻類の株内で進化的に保存された形質である。ナノアルゴソームは、分画遠心（ｄＵＣ）およびタンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）ならびにＴＦＦまたはｄＵＣによって小ＥＶについて濃縮された試料をさらに精製するために使用された勾配超遠心を使用して単離された。単離されたナノアルゴソームは、他の供給源からのＥＶの特徴を共有すると示された。ｄＵＣおよびＴＦＦからのＥＶ収率（ｓＥＶタンパク質含量およびｓＥＶ数によって測定された）は、単離されたＥＶの報告された数、およそ10^9ＥＶ粒子／μｇ　ＥＶタンパク質と一致していた。多角度動的光散乱（ＤＬＳ）、ナノ粒子トラッキング分析（ＮＴＡ）、蛍光ナノ粒子トラッキング分析（Ｆ－ＮＴＡ）および蛍光相関分光法（ＦＣＳ）を使用する粒子サイズの生物物理学的分析は、一貫したサイズ分布をもたらし、ＤＬＳ（ＤＬＳモード）から最も頻繁に現れたサイズは、およそ７０ｎｍであった。１．１５～１．１９ｇ／ｍｏｌの密度を有する哺乳動物細胞に由来するエキソソームと比較して、ナノアルゴソームは、１．１３ｇ／ｍｏｌのわずかに低い密度を有していた。電子顕微鏡により、ナノアルゴソームは、球状であり、サイズおよび形状が不均一であり、脂質二層構造を有することが示された。微小胞（または大きなＥＶ、ｌＥＶ）および溶解物と比較して、ｓＥＶは４種の標的タンパク質バイオマーカー（Ａｌｉｘ、エノラーゼ、ＨＳＰ７０およびβ－アクチン）のうち３種について濃縮される。ＤＬＳ測定値は、ナノアルゴソームはｐＨの変化に対して耐性であり、ヒト血漿中で安定であることを示した。腫瘍原性ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳がん細胞株、非腫瘍原性１－７　ＨＢ２細胞株およびヒト肝細胞がんＨｅｐ　Ｇ２細胞株は、ナノアルゴソーム処置後に細胞傷害性または遺伝毒性効果を示さなかった。さらに、ナノアルゴソームは、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１および１－７　ＨＢ２細胞株によって取り込まれた［Adamo et al. (2021) J. Extracell. Vesicles 10:e12081］。

【０２２１】

ＥＶは、さまざまな特徴、例えば、塩水性および淡水性生息者、小さいおよび大きいサイズの細胞、コロニーおよび単細胞を有する株ならびに配列決定されたゲノムを有する株を含む、研究されている主な微細藻類系統から少なくとも１８種の微細藻類株［アンキストロデスムス属（Ａｎｋｉｓｔｒｏｄｅｓｍｕｓ）の種、ブラキオモナス属（Ｂｒａｃｈｉｏｍｏｎａｓ）の種、コナミドリムシ、デュナリエラ・ターティオレクタ、テトラセルミス・チュイイ、クロロモナス属（Ｃｈｌｏｒｏｍｏｎａｓ）の種、ロデラ・ビオラセア（Ｒｈｏｄｅｌｌａ　ｖｉｏｌａｃｅａ）、キルクネリエラ属（Ｋｉｒｃｈｎｅｒｉｅｌｌａ）の種、クンショウモ属（Ｐｅｄｉａｓｔｒｕｍ）の種、ナンノクロロプシス属（Ｎａｎｎｏｃｈｌｏｒｏｐｓｉｓ）の種、シアノフォラ・パラドキサ（Ｃｙａｎｏｐｈｏｒ

ａ ｐａｒａｄｏｘａ）、クリプトモナス・ピレノイディフェラ（Ｃｒｙｐｔｏｍｏｎａｓ ｐｙｒｅｎｏｉｄｉｆｅｒａ）、ファエオダクチルム・トリコルヌツム（Ｐｈａｅｏｄａｃｔｙｌｕｍ ｔｒｉｃｏｒｎｕｔｕｍ）、ファエオタムニオン属（Ｐｈａｅｏｔｈａｍｎｉｏｎ）の種、ダイアクロネマ属（Ｄｉａｃｒｏｎｅｍａ）の種、イソクリシス・ガルバナ（Ｉｓｏｃｈｒｙｓｉｓ ｇａｌｂａｎａ）、スタウロネイス属（Ｓｔａｕｒｏｎｅｉｓ）の種およびアンフィディニウム属（Ａｍｐｈｉｄｉｎｉｕｍ）の種］から単離された。

【０２２２】

ＭＥＶは、分画超遠心プロトコールを使用して単離し、国際細胞外小胞学会［Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｌａｒ Ｖｅｓｉｃｌｅｓ （ＩＳＥＶ）］ガイドラインに従って特性決定できる。試験したすべての株が培養培地中のＭＥＶの存在を示した。ＥＶ生成微細藻類株は、ＥＶタンパク質含量、ＥＶタンパク質マーカー（例えば、Ａｌｉｘ、Ｈｓｐ７０、エノラーゼおよびβ－アクチン）の発現、総散乱シグナル（動的光散乱、ＤＬＳによって測定された）または総粒子数（ＮＴＡによって測定された）およびｓＥＶ平均サイズおよびサイズ範囲に基づいて確立された。これらのＥＶ生成株として、シアノフォラ・パラドキサ、テトラセルミス・チュイイ、アンフィディニウム属の種、ロデラ・ビオラセア、ダイアクロネマ属の種、デュナリエラ・ターティオレクタ、ファエオダクチルム・トリコルヌツム、クンショウモ属の種およびファエオタムニオン属の種が挙げられる［Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a］。シアノフォラ・パラドキサのデータは、微細藻類コンディショニング培地１ｍＬあたり約２×１０^{9} ｓＥＶ粒子を示し、ＥＶマーカーの最も強い陽性シグナルおよび植物由来小胞からのデータと一致する１３０±５ｎｍの様式のサイズ分布を有していた。細胞毒性および遺伝毒性研究によって、淡水性灰色藻であるシアノフォラ・パラドキサから単離されたｓＥＶは、腫瘍原性ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳がんまたはＣ２Ｃ１２筋芽細胞株に対して、経時的にでも、種々の濃度でも毒性を示さず、ｓＥＶで処置されたＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞もまたアポトーシス事象と関連する形態学的な核の変化を示さなかったことが示された［Picciotto et al. (2021) Biomater. Sci. doi:10.1039/d0bm01696a］。

【０２２３】

ＥＶはまた、細胞成長の異なる段階で、および異なる種類の非生物的ストレス下で、コナミドリムシ（Ｃ． ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）から単離されたＥＶにおけるＲＮｏｍｉｃおよびプロテオミクス解析も実施したＺｈａｏらによって行われた研究において、シネコシスティス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ）の種であるＰＣＣ６８０３（ラン藻）、コナミドリムシ（緑色微細藻類）、ユーグレナ・グラシリス（Ｅｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ）（ミドリムシ植物（ｅｕｇｌｅｎｏｐｈｙｔｅ））およびヘマトコッカス・プルビアリス（Ｈａｅｍａｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｌｕｖｉａｌｉｓ）（緑藻植物）からも単離されている［Zhao et al. (2020) doi:10.21203/rs.3.rs-38027/v1］。ＥＶは分画超遠心および濾過を使用して単離され、再懸濁によって、エキソソームおよび小ＭＶの報告された直径と一致して直径１１０～１２０ｎｍの粒子の小さい凝集塊を有する膜構造を含有すると示されたが、微細藻類の種間で直径の相違があった。具体的には、コナミドリムシ由来のＥＶは、３７～７１０ｎｍの間の直径を有し、平均粒子径は１２０．１ｎｍであった。シネコシスティス属由来のＥＶは、２４～４５０ｎｍの間の直径を有し、平均粒子径は９４．６８ｎｍであった。クラミドモナス属の細胞は、細胞壁の存在にもかかわらず、微細藻類細胞の内側での蛍光親油性色素で標識されたＥＶの存在によって示されるようにＥＶを取り込むことができた。したがって、微細藻類ＥＶは、レシピエント細胞によって吸収され得る。ノンコーディングＲＮＡは、異なる成長段階および処置（生物的ストレス、窒素枯渇および窒素回復）で微細藻類ＥＶにおいて検出され、プロテオミクス解析によって、微細藻類ＥＶにおいて多数の鞭毛関連膜タンパク質が同定された［Zhao et al. (2020) doi:10.21203/rs.3.rs-38027/v1］。

【０２２４】

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

【０２２５】

哺乳動物起源のＥＶは、カーゴを標的細胞に送達でき、したがって、いくつかの疾患または状態の処置において使用するためのさまざまなカーゴのデリバリーのための治療的使用を有することが示されており、これは、ＭＥＶについては一般に示されていなかった。しかし、哺乳動物ＥＶは、ウシ乳ＥＶを除いて、胃の厳しい環境を生き残らないので経口投与することができない。例えば、小分子、例えば、疎水性および親水性薬物をエキソソーム中に注入できる、または高分子タンパク質および核酸をエキソソーム中に埋め込むことができる。核酸は、目的の遺伝子をコードするものを含み得る。特定の標的化リガンド、イメージングプローブおよび共有結合性結合をエキソソーム表面に付着させ、ＮＴＡ、蛍光を使用して、または生物発光によって追跡できる可能性がある。

【０２２６】

目的の薬物を標的とされる細胞、組織または臓器に送達するために微細藻類ＥＶを使用できるという刊行物における言及［Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357］以外には、哺乳動物の疾患、障害または状態の処置のためのデリバリーのためのＭＥＶの使用について公開された証拠も技術的説明もない。ＥＶ技術を微細藻類由来の細胞外小胞に適用するための知識、それを行うことが可能であるか否かについても、それを行う方法についても、説明する刊行物または技術的説明もない。以前の研究は、クロレラ属の種を考慮しておらず、また以前の研究は、ＭＥＶの体内分布および関連特性を全般に評価していなかった。したがって、クロレラ属を用いて本明細書において例示された経口デリバリーの方法などの方法は、他の微細藻類由来のＭＥＶを使用できる。

【０２２７】

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

Kuruvinashetti et al. (2020) 20th International Conference on Nanotechnology 354-357]。Kuruvinashettiらは、EVの供給源としてのクロレラ属の種の使用も、供給源としてのその利点も記載していない。先行技術はMEVの体内分布自体を説明しておらず、MEVの投与を特定の臓器、組織または系に向けられた薬物と関連付けることもない。

【0228】

5．緑藻類－クロレラ属の種

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

【0229】

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

【0230】

真のクロレラ属の種は、その強固な細胞壁の主要成分としてグルコサミンを特徴とする。ほとんどのクロレラ属の種は本来自由生活性であるが、トレボウクシオ藻類には、地衣類、単細胞真核生物、植物、動物（イガイやヒドラなど）に生息する既知の緑藻類の内部共生生物のほとんどが含まれる。例えば、クロレラ・バリアビリスNC64Aは、単細胞原生動物であるミドリゾウリムシ（Paramecium bursaria）の遺伝性光合成内部共生体（またはフォトバイオント）であり、NC64Aはまた、淡水に生じる大きな二本鎖DNAウイルスのファミリーの宿主である［Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955］。

【0231】

a．生活環

単細胞生物、例えば微細藻類では、生活環は、細胞周期と同一である。クロレラ属は、自家胞子形成によって無性生殖する単数体生物である。クロレラ・ブルガリスの細胞周期および増殖は、Rioboらによる5（6）カルボキシフルオレセインジアセテートN－スクシンイミジルエステル（CFSE）によって染色された藻類細胞のフローサイトメトリー分析を使用して調査されている。彼らの結果は、微細藻類について一般に記載されるように、C．ブルガリス母細胞の成長は、明期間の間に起こるが、細胞質分裂および娘細胞の放出は、暗期間の間に起こることを示す。C．ブルガリスはまた、96時間の期間にわたって測定される細胞サイズ、細胞複雑性および明期間の間の自己蛍光の増大によって示される明確な明／暗周期を示す。娘細胞の1つのみのピークを示すCFSE染色されたC．ブルガリス細胞のモノパラメトリックヒストグラムは、各母細胞が96時間で1回のみの分裂周期を起こすことを示し、細胞質分裂は、暗期間の間に起こることがさらに示された。したがって、使用されたC．ブルガリスの株は、3つの生活環相：1）母細胞の成長、2）細胞分裂および3）娘細胞の放出を示す。C．ブルガリス細胞は、2つの明期間の間に成長し、続く暗期間の間に分裂し始めた；母細胞が娘細胞のサイズの2倍となると、細胞分裂が生じる。さらに、除草剤テルブトリンに曝露されたC．ブルガリス細胞は

、分裂するために十分に大きい細胞サイズに到達するためにより長い成長期間を必要とする。これは、Ｃ．ブルガリスが増殖期を完了し、分裂相を開始するのに必要な重要な閾値サイズがあり、この重要な閾値がＣ．ブルガリス細胞周期のＧ１相の進行を制御し得ることを示唆する。最後に、この研究は、母細胞のＣＦＳＥ蛍光のピークの強度は、娘細胞のものよりも４倍大きいことを実証し、これは、各母細胞から４個の娘細胞が生成されることを示す。したがって、Ｃ．ブルガリス細胞は、第１の有糸分裂、続いて、細胞質分裂および次いで、２つの他の同時有糸分裂を起こし、これが４個の娘細胞の放出をもたらす［Rioboo et al. (2009) doi:10.1016/j.aquatox.2009.07.009］。

【０２３２】

ｂ．クロレラ属の種のゲノム分析

クロレラ属の種は、非運動性であり、生殖周期を欠くと報告されているが、クロレラ・バリアビリスＮＣ６４Ａ（ＮＣ６４Ａ）およびクロレラ・ブルガリス２１１／１１Ｐ（２１１／１１Ｐ）のゲノム分析は、有性生殖および運動性に関与する遺伝子の存在を明らかにする［Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955; Cecchin et al. (2019) Plant J. 100(6):1289-1305］。ＮＣ６４Ａ核ゲノム（ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＡＤＩＣ０００００００００．１）は、４６．２Ｍｂであり、１２の染色体から構成される。ＮＣ６４Ａでは、ＭＣｋ１　ＤＭＣ１の減数分裂特異的タンパク質の投与量抑制因子、相同対形成タンパク質ＨＯＰ１およびＨＯＰ２、減数分裂組換えタンパク質ＭＥＲ３、減数分裂核分裂タンパク質ＭＮＤ１およびｍｕｔＳ相同体タンパク質ＭＳＨ４がコードされており、これらの遺伝子はまた、他の配列決定された緑藻植物藻類の種のほとんどにも存在する。配偶子細胞壁の分解を促進し、配偶子融合を可能にするクラミドモナス属のガメトリシン（ｇａｍｅｔｏｌｙｓｉｎ）タンパク質の１９の相同体は、ＮＣ６４Ａにおいても同定された。さらに、細胞融合に必須であるクラミドモナス属のＧＣＳ１タンパク質のオーソログがＮＣ６４Ａ中に存在する［Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955］。ガメトリシンをコードする遺伝子（ｇ３３４７）および推定ＧＣＳ１／ＨＡＰ２機能を有するドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子に加えて、減数分裂に関与する主な遺伝子も、クロレラ・ブルガリス２１１／１１Ｐ　４０Ｍｂゲノム中に存在する（ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＳＩＤＢ０００００００００）［Cecchin et al. (2019) Plant J. 100(6):1289-1305］。したがって、クロレラ属の種は、単数体相でのみ観察されているが、減数分裂遺伝子の存在は、クロレラ属の生活環が２倍体相を含む可能性があることを示す。

【０２３３】

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

【０２３４】

３種のクロレラ・ソロキニアナ株、株１２２８、ＵＴＥＸ　１２３０およびＤＯＥ１４１２の配列決定は、性－および鞭毛－関連遺伝子の存在を明らかにする［Hovde et al. (2018) Algal Research 35:449-461］。いくつかの他のクロレラ属の種のゲノムが配列決定されている：クロレラ・プロトセコイデス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｐｒｏｔｏｔｈｅｃｏｉｄｅｓ）の種０７１０［Gao et al. (2014) BMC Genomics 15(1):582；ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＡＰＪＯ０００００００００］；クロレラ・ソロキニアナＵＴＥＸ　１６０２（ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＬＨＰＧ０００００００００）およびクロレラ属の種の株ＳＡＧ　２４１．８０（ミクラクチニウム・コンダクトリックス（Ｍｉｃｒａｃｔｉｎｉｕｍ　ｃｏｎｄｕｃｔｒｉｘ）；ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＬＨＰＦ０００００００００）［Arriola et al. (2018) Plant J. 93(3):566-586］；およびクロレラ・ブルガリス株ＵＴＥＸ３９５［Guarnieri et al. (2018) Front. Bioeng. Biotechnol. 6:37；ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号

ＬＤＫＢ０００００００００］、ＵＭＴ－Ｍ１［Teh et al. (2019) Data Brief 27:104680；ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＶＪＮＰ０００００００００］、ＵＴＥＸ２５９（ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＶＡＴＷ０００００００００）およびＮＪ－７［Wang et al. (2020) Mol. Biol. Evol. 37(3):849-863；ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）受託番号ＶＡＴＶ０００００００００］。

【０２３５】

ｃ．クロレラ属の商業的および生物工学的使用

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

【０２３６】

クロレラ属は、バイオ燃料、CO_2を捕捉すること、高経済価値の分子を生成することまたは廃水から重金属を除去することを含む、さまざまなバイオテクノロジー適用において使用されてきた［Blanc et al. (2010) Plant Cell 22(9):2943-2955］。クロレラ属の種は、環境撹乱に応じて代謝柔軟性を示し、成長のために廃水から直接的に栄養素、例えば、有機炭素およびミネラルを使用可能である。微細藻類の中でも、クロレラ属の種は、他の光合成生物を上回って高い光合成効率を有する。さらに、クロレラ・ブルガリスは、独立栄養性、従属栄養性または混合栄養性条件のいずれかで成長できる（Zuniga et al. (2016) Plant Physiol. 172(1):589-602）。

【０２３７】

クロレラ属の種はまた、アグロバクテリウム媒介性形質転換によって遺伝的に改変できる。Ｃｈａらによる研究によって、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）の株ＬＢＡ４４０４を使用してクロレラ・ブルガリスを遺伝的に形質転換する方法が開発され、野生型非感染クロレラ属と比較して、トランスジェニック株の３０％における遺伝子断片の存在が、クロレラ属ゲノム中にＴ－ＤＮＡが組み込まれたことを示す［Cha et al. (2012) World J. Microbiol. Biotechnol. 28:1771-1779］。

【０２３８】

ｄ．クロレラ属ＭＥＶ

本明細書において記載されるように、クロレラ属の種、例えば、Ｃ．ブルガリスは、治療的、診断的および化粧用使用を含む多数の適用のために生体分子および小分子のデリバリーのための使用のための、本明細書においてＭＥＶと呼ばれるＥＶの生成にとって有利な種である。本明細書において特に興味深いものとして、クロレラ属の種によって生成されたＭＥＶがある。クロレラ属のＥＶは、生体分子生成物または小分子薬物または診断薬の外因性負荷のためのＭＥＶの供給源として利用されていなかった。クロレラ属は、このような適用のためのＥＶの供給源として、多数の利点を提供する。クロレラ属は単数体生物であり、これは特異的な、標的化された変異体は、遺伝子工学によって生成できる、生物学的に活性な分子および小分子を生成または含有するように、容易に遺伝的に改変または負荷できることを意味する。コードされる生成物の安定な生成体を含む、安定な細胞株を生成できる。それらは定義された生成物であり、外因的に負荷された場合に、結果として生じる組成物は、同一のカーゴを含有するＥＶを含有する。

【０２３９】

詳細な遺伝地図を得ることができ、遺伝子型と表現型の間の相関関係を確立することができる。クロレラ属ゲノムは十分に配列決定されているため、種々の遺伝子の構造および機能を知ることができる。系統学的に、クロレラ属は、高等植物と微細藻類間のまさに交

差点にある。そのようなものとして、クロレラ属は、相当な（および有用な）数の分子生物学的および代謝的特徴を高等植物と共有するが、依然として、単細胞の単数体微細藻類である。真核生物と共有される分子生物学的特徴の例示的なものとして、外因性ＲＮＡをｓｉＲＮＡにプロセシングするダイサー酵素システムを含む細胞内機構がある。クロレラ属は、哺乳動物および他の動物細胞とは異なり独立栄養性であり、したがって、栄養素または動物起源の因子を必要とすることなく培養および複製できる。

【０２４０】

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

【０２４１】

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

【０２４２】

クロレラ属ＭＥＶのサイズは、約５０ｎｍから２００ｍの間または５０ｎｍから２００ｍの間の範囲であり、約１３０ｎｍの平均サイズを有する。形態は、植物および哺乳動物エキソソームと似ている。投与に使用するために、ＭＥＶをサイズ別に分離することおよび目的のサイズのものを選択することによって、サイズ分布をより均一にすることができ、これは、意図される使用および投与経路に応じて変わり得る。

【０２４３】

Ｄ．外因的に負荷された微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）、カーゴおよび標的

標的およびカーゴ（以下の考察を参照されたい）は、当業者に公知のいずれをも含む。節ＦおよびＧおよび以下の実施例は、種々の経路による投与後のＭＥＶの体内分布、ならびに特定の疾患、障害および状態を標的とするためまたは処置するための、ならびにＭＥＶを製剤化するための、および投与するための関連、使用および方法を記載する。

【０２４４】

１．ＭＥＶの単離

単離の方法は、上記の節で論じられており、実施例において詳述されている。

【０２４５】

２．ＭＥＶ負荷およびカーゴ

ＭＥＶに、それだけには限らないが、例えば、ＲＮＡｉ、プラスミド、アンチセンス核酸、ＲＮＡｉまたはアンチセンス核酸をコードする核酸を含む核酸分子、検出可能なマーカータンパク質およびタグ、小分子薬物、遺伝子編集システムおよび他のものならびにそれらの組合せを含む任意の所望のカーゴ（ペイロードとも呼ばれる）を負荷できる。ＭＥＶは、治療用分子を送達でき、ワクチンとして働くことができ、ヒトおよび他の動物の健康、農業的適用、デリバリー遺伝子、遺伝子編集システムを用いる遺伝子の改変および遺伝子サイレンシング核酸を含む遺伝子療法適用、化粧用適用、皮膚科学適用、診断的適用、工業的使用および他のものにおいて使用できる。ＭＥＶは、栄養素または有益な生成物

を産生するための遺伝子経路の制御因子を送達でき、遺伝子編集システム、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓを送達するために、遺伝子編集を達成するために使用できる。ＭＥＶは、遺伝子療法ベクター、例えば、それだけには限らないが、アデノ随伴（ＡＡＶ）ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルス由来ベクターおよびその他のものおよび生成物を送達するために使用できる。

【０２４６】

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

【０２４７】

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

【０２４８】

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

【０２４９】

ｓｉＲＮＡおよびマイクロＲＮＡを含むＲＮＡ干渉を使用する遺伝子サイレンシングを使用して、発生遺伝子、例えば、接着分子、サイクリンキナーゼ阻害剤、Ｗｎｔファミリーメンバー、Ｐａｘファミリーメンバー、ウィングドヘリックスファミリーメンバー、Ｈｏｘファミリーメンバー、サイトカイン／リンホカインおよびその受容体、成長／分化因子およびその受容体ならびに神経伝達物質およびその受容体、がん遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、酵素、病的状態と関連する遺伝子、自己免疫疾患と関連する遺伝子、抗血管新生遺伝子、血管新生遺伝子、免疫モジュレーター遺伝子、アルコール代謝および肝臓機能と関連する遺伝子、神経学的疾患と関連する遺伝子、腫瘍形成もしくは細胞形質転換と関連する遺伝子、ならびに代謝性疾患および障害と関連する遺伝子などをサイレンシングできる（例えば、ＷＯ２００９／０８２６０６、ＪＰ２０１４－２４０４２８Ａ、ＷＯ２０１１／

０７２２９２Ａ２、ＷＯ２０１０／１４１７２４およびＷＯ２０２０／０９７５４０を参照されたい）。これらの種類の生成物はＭＥＶ中に送達されて、またはＭＥＶにおいてコードされて、遺伝子または経路を活性化できる、または治療的効果を提供できる。ある特定のサイトカインを使用して、免疫抑制が役割を果たす、疾患／障害、例えば、ある特定のがんを処置できる。

【０２５０】

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

【０２５１】

例えば、以下の表にまとめられるように、配列の３’末端に２つのチミジン残基（ｄＴｄＴ）を有するヒトＭＹＣＮを標的化する３種のｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドのカクテル［Ｂ－Ｂｒｉｄｇｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｃ．（カリフォルニア州、サニーベール）から購入した］を使用できる。抗ＭＹＣＮ　ｓｉＲＮＡ（ｓｉＭＹＣＮ）および陰性対照ｓｉＲＮＡ（非標的対照プール）（ｓｉＮｅｇ）（ＯＮ－ＴＡＲＧＥＴｐｌｕｓ　ｓｉＲＮＡの両方、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ、英国、ケンブリッジ）を使用した［参考文献１を参照されたい］。ｓｉＲＮＡの例示的標的がん遺伝子および例示的配列（配列番号１３～３５も参照されたい）は、以下の表に提供されている。

【０２５２】

標的 がん遺伝子	配列の 種類	配列
[1]MYCN	siRNA カクテル	siMYCN-1:センス 5'-CGGAGATGCTGCTTGAGAA-3' siMYCN-2:センス 5'-CGGAGTTGGTAAAGAATGA-3' siMYCN-3:センス 5'-CAGCAGTTGCTAAAGAAAA-3'
[2]MYCN	siRNA	センス 5'-CAGCAGUUGCUAAAGAAAAUU-3' アンチセンス 5'-UUUUCUUUAGCAACUGCUGUU-3'
[3]MYCN	siRNA	5′-UGAUCUGCAAGAACCCAGA-3′
[4]MYCN	ASO	5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
[5]RAS	合成miRNA	Syn-miR-143s 番号 / 種類 / 配列 #1 / 野生型 / S: 3'-GGUCUCUACGUCGUGACGUGGAGU-5' AS: 5'-UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGG-3' #12 / F/Ome / S: 3'-GGUCUCUACGUCGUGACGUGGAGU-5' AS: 5'-U^G^AGAUGAAGCACUGUAGCUCA^Dt^Dt-3' N:2'-F RNA **N: 2'-Ome** RNA N:RNA ^: PS _:ミスマッチ
[6]RAS	siRNA	siR-KRAS: 5'-AAUGCAUGA CAACACUGGAUGACCG-3' siR-HRAS: 5'-CCAUCCAGCUGAUCCAGAACCAUUU-3'
[7]RAS	siRNA	GGACUCUGAAGAUGUACCUAGGUACAUCUUCAGAGUCC
[8]突然変異したK-RAS	ASO	5'-CTACGCCACAAGCTCCA-3'
[9]MYC, BCL2,	miRNA	ヒト(Homo sapiens)マイクロ RNA 34a (MIR34A)、マイクロ RNA
[10]BLC2	3p-siRNA	センス GCAUGCGGCCUCUGUUUGA アンチセンス CGUACGCCGGAGACAAACU
[11]BLC2	ASO	TCT CCC AGC GTG CGC CAT
[12]PLK1	改変siRNA	センス: 5′-AGA **U**CA CCC **U**CC U**U**A AA**U** AUU-3′ アンチセンス: 5′-UAU UUA A**G**G AGG GUG A**U**C UUU-3′ *注記: **太字**の 2′-O-メチル化改変ヌクレオチド*
[13]PLK1	siRNA	5'-AAGGGCGGCUUUGCCAAGUGC-3'
[14]PLK1	ASO	P12: ACC AGT CCG GAG GGG AGG GC

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

6 Tsujino et al. (2019) Cancer Sci. 110(7):2189-2199; MicroRNA-143/Musashi-2/KRAS cascade contributes positively to carcinogenesis in human bladder cancer
7 Tirella et al. (2019) Int. J. Pharm. 561:114-123; CD44 targeted delivery of siRNA by using HA-decorated nanotechnologies for KRAS silencing in cancer treatment
8 Nakada et al. (2001) Pancreatology 1(4):314-319; Antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines
9 Adams et al. (2015) Expert Opin. Ther. Targets 20(6):737-753; The Tumor-Suppressive and Potential Therapeutic Functions of miR-34a in Epithelial Carcinomas
10 Poeck et al. (2008) Nat. Med. 14(11):1256-1263; 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma
11 Szegedi et al. (2008) Pathol. Oncol. Res. 14(3):275-279; Bcl-2 Antisense Oligonucleotide Inhibits the Proliferation of Childhood Leukemia/lymphoma Cells of the B-cell Lineage
12 Ripoll et al. (2018) RSC Adv. 8:20758-20763; Co-delivery of anti-PLK-1 siRNA and camptothecin by nanometric polydiacetylenic micelles results in a synergistic cell killing
13 Liu et al. (2012) BMC Cancer 12(1):519-529; MicroRNA-100 is a potential molecular marker of non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting polo-like kinase 1
14 Spankuch et al. (2008) Neoplasia 10(3):223-234; Downregulation of Plk1 expression by receptor-mediated uptake of antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles

【０２５３】

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

MTAEEMKATESGAQSAPLPMEGVDISPKQDEGVLKVIKREGTGTEMPMIGDRVFVHYTGW
LLDGTKFDSSLDRKDKFSFDLGKGEVIKAWDIAIATMKVGEVCHITCKPEYAYGSAGSPP
KIPPNATLVFEVELFEFKGEDLTEEEDGGIIRRIQTRGEGYAKPNEGAIVEVALEGYYKD
KLFDQRELRFEIGEGENLDLPYGLERAIQRMEKGEHSIVYLKPSYAFGSVGKEKFQIPPN
AELKYELHLKSFEKAKESWEMNSEEKLEQSTIVKERGTVYFKEGKYKQALLQYKKIVSWL
EYESSFSNEEAQKAQALRLASHLNLAMCHLKLQAFSAAIESCNKALELDSNNEKGLFRRG
EAHLAVNDFELARADFQKVLQLYPNNKAAKTQLAVCQQRIRRQLAREKKLYANMFERLAE
EENKAKAEASSGDHPTDTEMKEEQKSNTAGSQSQVETEA

【０２５４】

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

MNSEEKLEQSTIVKERGTVYFKEGKYKQALLQYKKIVSWLEYESSFSNEEAQKAQAL

RLA
SHLNLAMCHLKLQAFSAAIESCNKALELDSNNEKGLFRRGEAHLAVNDFELARADFQKVL
QLYPNNKAAKTQLAVCQQRI

【０２５５】

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

【０２５６】

タウの１つの役割が神経突起成長を刺激することであるので、ＰＣ１２およびＨ７Ｃ２細胞における神経突起長に対するＦＫＢＰ５２過剰発現の結果も調査された。Ｈ７Ｃ２細胞では、Ｄｏｘを用いて１週間処置されたか否かに関わらず、ＮＧＦの不在下で神経突起成長は観察されなかった。５０ｎＭのＮＧＦおよびＤｏｘを用いて処置されたＨ７Ｃ２細胞では、対照（Ｄｏｘで処置されていないＨ７Ｃ２）と比較して神経突起長の４０％（±

７）の低下が観察された。１０または２０ｎＭのＮＧＦで処置されたＨ７Ｃ２細胞において、神経突起長に対するＤｏｘの同一の効果が観察された。Ｄｏｘ処置および未処置ＰＣ１２細胞の間で神経突起長の相違が観察されなかったので、Ｄｏｘはそれ自体、神経突起成長のプロセスに関与していなかった。ＦＫＢＰ５２過剰発現に起因する神経突起成長の阻害は、ＰＣ１２細胞におけるＦＫＢＰ５２の喪失の結果、神経突起伸長が形成されることを示すＣｈａｍｂｒａｕｄからの以前の報告と一致している。神経突起長に対するＦＫＢＰ５２効果は、タウがＦＫＢＰ５２へ結合し、タウを微小管から除去することによって説明できる可能性がある。ＦＫＢＰ５２の過剰発現によってタウ蓄積を防ぐことは、神経突起長の減少と一致し、タウ機能におけるこのイムノフィリンの潜在的な役割を示唆する。したがって、タウの蓄積を防ぐことによるアルツハイマー病の処置のために、上記の標的および配列をＭＥＶ中で送達できる、またはコードできる。

【０２５７】

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

【０２５８】

レポータータンパク質

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

【０２５９】

標的遺伝子	配列の種類	配列
EGFP	siRNA	センス: 5′-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAUUU-3' アンチセンス:5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG-3′
ホタルルシフェラーゼ	shRNA	5′-CTGACGCGGAATACTTCGA-3′
luxA (Lux オペロン)	siRNA	センス: 5'-CAAACAGAGGUAAUGAAAUGGUUG-3' アンチセンス:3'-CAACCAUUUCAUUACCUCUGUUUG-5'
luxB (Lux オペロン)	siRNA	センス: 5'-AUGUUAAGUUGAAUAAGUUCUGCA-3' アンチセンス:3'-UGCUCUUGAAUAAGUUGAAUUGAU-5'

【０２６０】

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

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

【０２６１】

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

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

【０２６２】

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

【０２６３】

他のカーゴはチロシンキナーゼ阻害剤を含み、それだけには限らないが、キナゾリン、例えば、ＰＤ　１５３０３５、４－（３－クロロアニリノ）キナゾリン；ピリドピリミジン；ピリミドピリミジン；ピロロピリミジン、例えば、ＣＧＰ　５９３２６、ＣＧＰ　６０２６１およびＣＧＰ　６２７０６；ピラゾロピリミジン、４－（フェニルアミノ）－７Ｈ－ピロロ（２，３－ｄ）ピリミジン；クルクミン（ジフェルロイルメタン、４，５－ビス（４－フルオロアニリノ）フタルイミド）；ニトロチオフェン部分を含有するチロホスチン；ＰＤ－０１８３８０５（Ｗａｒｎｅｒ－Ｌａｍｂｅｒｔ）；アンチセンス分子（例えば、ＥｒｂＢをコードする核酸に結合するもの）；キノキサリン（米国特許第５，８０４，３９６号）；チロホスチン（米国特許第５，８０４，３９６号）；ＰＴＫ－７８７（Ｎｏｖａｒｔｉｓ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　Ａ　Ｇ）；汎ＥｒｂＢ阻害剤、例えば、ＣＩ－１０３３（Ｐｆｉｚｅｒ）；Ａｆｆｉｎｉｔａｃ（ＩＳＩＳ　３５２１；Ｉｓｉｓ／Ｌｉｌｌｙ）；メシル酸イマチニブ（ＳＴＩ５７１、グリーベック（登録商標）；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）；ＰＫＩ　１６６（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）；ＧＷ２０１６（Ｇｌａｘｏ　Ｓｍｉｔｈ　Ｋｌｉｎｅ）；ＣＩ－１０３３（Ｐｆｉｚｅｒ）；ＥＫＢ－５６９（Ｗｙｅｔｈ）；セマキシニブ（Ｓｕｇｅｎ）；ＺＤ６４７４（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）；ＩＭＣ－１Ｃ１１（ＩｍＣｌｏｎｅ）；または以下の特許公報のいずれかに記載されるようなもの：米国特許第５，８０４，３９６号；ＰＣＴ　ＷＯ９９／０９０１６（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｙａｎａｍｉｄ）；ＰＣＴ　ＷＯ９８／４３９６０（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｙａｎａｍｉｄ）；ＰＣＴ　ＷＯ９７／３８９８３（Ｗａｒｎｅｒ－Ｌａｍｂｅｒｔ）；ＰＣＴ　ＷＯ９９／０６３７８（Ｗａｒｎｅｒ－Ｌａｍｂｅｒｔ）；ＰＣＴ　ＷＯ９９／０６３９６（Ｗａ

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

【０２６４】

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

【０２６５】

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

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

【０２６６】

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

【０２６７】

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

【０２６８】

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

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

【０２６９】

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

【０２７０】

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

【０２７１】

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

【０２７２】

３．ペイロードが負荷されたＭＥＶの作製

本明細書で示されるように、それだけには限らないが、媒体、例えば、脂質ナノ粒子、ベクター、治療用細菌および治療用ウイルスのデリバリーのための、静脈内、経口、局所的、粘膜、吸入および当業者に公知の任意の他の経路を含む任意の適した経路によるヒト

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

ａ．エレクトロポレーション
ｂ．超音波処理
ｃ．押出
ｄ．界面活性剤
ｅ．エキソソームを細胞中に導入するための当業者に公知の他の方法。

【０２７３】

４．外因的に負荷されたＭＥＶの例示的カーゴおよび例示的使用

ａ．カーゴ

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

【０２７４】

１）ＲＮＡカーゴ

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

【０２７５】

植物界では、ＲＮＡｉは、抗ウイルス防御機序に、ならびに植物病原性真菌および卵菌に対する防御機序に関与している。低分子調節ＲＮＡは、前記ＲＮＡｉ機構を欠く細菌細胞内のサイレンシング遺伝子において活性であり得る。ｓｉＲＮＡのサイレンシング活性は、界間であると実証されている（例えば、国際ＰＣＴ公開番号ＷＯ２０２０／０３５６１９として公開されたＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０７２１６９、ＷＯ２０２０／０３５６２０として公開されたＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０７２１７０； Singla et al. (2019c) bioRxiv, doi: doi.org/10.1101/863902を参照されたい）。

【０２７６】

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

【０２７７】

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

【０２７８】

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

【０２７９】

２）抗体カーゴ

抗がん抗体および他の抗体の例として、それだけには限らないが、抗１７－１Ａ細胞表面抗原抗体、例えば、商標Ｐａｎｏｒｅｘ（登録商標）（エドレコロマブ）の下で販売または提供されている抗体；抗４－１ＢＢ抗体；抗４Ｄｃ抗体；抗Ａ３３抗体、例えば、Ａ３３およびＣＤＰ－８３３；抗α１インテグリン抗体、例えば、ナタリズマブ；抗α４β７インテグリン抗体、例えば、ＬＤＰ－０２；抗αＶβ１インテグリン抗体、例えば、Ｆ－２００、Ｍ－２００およびＳＪ－７４９；抗αＶβ３インテグリン抗体、例えば、アブシキマブ、ＣＮＴＯ－９５、Ｍａｂ－１７Ｅ６およびビタキシン（登録商標）；抗補体因子５（Ｃ５）抗体、例えば、５Ｇ１．１；抗ＣＡ１２５抗体、例えば、商標ＯｖａＲｅｘ（登録商標）（オレゴボマブ）の下で販売または提供されるもの；抗ＣＤ３抗体、例えば、商標Ｎｕｖｉｏｎ（登録商標）（ビジリズマブ）およびＲｅｘｏｍａｂの下で販売または提供されるもの；抗ＣＤ４抗体、例えば、ＩＤＥＣ－１５１、ＭＤＸ－ＣＤ４、ＯＫＴ４Ａ；抗ＣＤ６抗体、例えば、オンコリシン（Ｏｎｃｏｌｙｓｉｎ）ＢおよびオンコリシンｃＤ６；抗ＣＤ７抗体、例えば、ＨＢ２；抗ＣＤ１９抗体、例えば、Ｂ４３、ＭＴ－１０３およびオンコリシンＢ；抗ＣＤ２０抗体、例えば、２Ｈ７、２Ｈ７．ｖ１６、２Ｈ７．ｖ１１４、２Ｈ７．ｖ１１５、商標ベキサール（登録商標）（トシツモマブ）の下で販売または提供される製品、商標リツキサン（登録商標）（リツキシマブ）の下で販売または提供される抗体および商標ゼバリン（登録商標）（イブリツモマブチウキセタン）の下で販売または提供される抗体；抗ＣＤ２２抗体、例えば、以下のジェネリック名、商標名または商標の下で販売または提供されるもの：リンホサイド（Ｌｙｍｐｈｏｃｉｄｅ）（

登録商標）（エピラツズマブ）；抗ＣＤ２３抗体、例えば、ＩＤＥＣ－１５２；抗ＣＤ２５抗体、例えば、バシリキシマブおよびゼナパックス（登録商標）（ダクリズマブ）；抗ＣＤ３０抗体、例えば、ＡＣ１０、ＭＤＸ－０６０およびＳＧＮ－３０；抗ＣＤ３３抗体、例えば、ゲムツズマブオゾガマイシン［商標マイロターグ（登録商標）の下で販売される］、オンコリシンＭおよびＳｍａｒｔ　Ｍ１９５；抗ＣＤ３８抗体；抗ＣＤ４０抗体、例えば、ＳＧＮ－４０およびトラリズマブ（ｔｏｒａｌｉｚｕｍａｂ）；抗ＣＤ４０Ｌ抗体、例えば、５ｃ８、Ａｎｔｏｖａ（登録商標）およびＩＤＥＣ－１３１；抗ＣＤ４４抗体、例えば、ビバツズマブ；抗ＣＤ４６抗体；抗ＣＤ５２抗体、例えば、アレムツズマブ［商標キャンパス（登録商標）の下で販売される］；抗ＣＤ５５抗体、例えば、ＳＣ－１；抗ＣＤ５６抗体、例えば、ｈｕＮ９０１－ＤＭ１；抗ＣＤ６４抗体、例えば、ＭＤＸ－３３；抗ＣＤ６６ｅ抗体、例えば、ＸＲ－３０３；抗ＣＤ７４抗体、例えば、ＩＭＭＵ－１１０；抗ＣＤ８０抗体、例えば、ガリキシマブおよびＩＤＥＣ－１１４；抗ＣＤ８９抗体、例えば、ＭＤＸ－２１４；抗ＣＤ１２３抗体；抗ＣＤ１３８抗体、例えば、Ｂ－Ｂ４－ＤＭ１；抗ＣＤ１４６抗体、例えば、ＡＡ－９８；抗ＣＤ１４８抗体；抗ＣＥＡ抗体、例えば、ｃＴ８４．６６、ラベツズマブおよびＰｅｎｔａｃｅａ（商標）；抗ＣＴＬＡ－４抗体、例えば、ＭＤＸ－１０１；抗ＣＸＣＲ４抗体；抗ＥＧＦＲ抗体、例えば、ＡＢＸ－ＥＧＦ、セツキシマブ［例えば、商標Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標）の下で販売される製品］、ＩＭＣ－Ｃ２２５およびＭｅｒｃｋ　Ｍａｂ　４２５；抗ＥｐＣＡＭ抗体、例えば、Ｃｒｕｃｅｌｌの抗ＥｐＣＡＭ、ＩＮＧ－１およびＫＳ－ＩＬ－２；抗エフリンＢ２／ＥｐｈＢ４抗体；抗Ｈｅｒ２抗体、例えば、トラツズマブ［商標Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）］、ＭＤＸ－２１０；抗ＦＡＰ（線維芽細胞活性化タンパク質）抗体、例えば、シブロツズマブ；抗フェリチン抗体、例えば、ＮＸＴ－２１１；抗ＦＧＦ－１抗体；抗ＦＧＦ－３抗体；抗ＦＧＦ－８抗体；抗ＦＧＦＲ抗体、抗フィブリン抗体；抗Ｇ２５０抗体、例えば、ＷＸ－Ｇ２５０およびギレンツキシマブ（Ｇｉｒｅｎｔｕｘｉｍａｂ）［商標Ｒｅｎｃａｒｅｘ（登録商標）の下で販売される］；抗ＧＤ２ガングリオシド抗体、例えば、ＥＭＤ－２７３０６３およびＴｒｉＧｅｍ（登録商標）；抗ＧＤ３ガングリオシド抗体、例えば、ＢＥＣ２、ＫＷ－２８７１およびミツモマブ；抗ｇｐＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体、例えば、レオプロ（登録商標）；抗ヘパリナーゼ抗体；抗Ｈｅｒ２／ＥｒｂＢ２抗体、例えば、トラスツズマブ、ＭＤＸ－２１０およびペルツズマブ；抗ＨＬＡ抗体［例えば、商標Ｏｎｃｏｌｙｍ（登録商標）の下で販売される製品］、Ｓｍａｒｔ（商標）１Ｄ１０；抗ＨＭ１．２４抗体；抗ＩＣＡＭ抗体、例えば、ＩＣＭ３；抗ＩｇＡ受容体抗体；抗ＩＧＦ－１抗体、例えば、ＣＰ－７５１８７１およびＥＭ－１６４；抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体、例えば、ＩＭＣ－Ａ１２；抗ＩＬ－６抗体、例えば、ＣＮＴＯ－３２８およびエルシリモマブ（ｅｌｓｉｌｉｍｏｍａｂ）；抗ＩＬ－１５抗体［例えば、商標ＨｕＭａｘ（登録商標）－ＩＬ１５の下で販売される製品］；抗ＫＤＲ抗体；抗ラミニン５抗体；抗Ｌｅｗｉｓ　Ｙ抗原抗体、例えば、Ｈｕ３Ｓ１９３およびＩＧＮ－３１１；抗ＭＣＡＭ抗体；抗Ｍｕｃ１抗体、例えば、ＢｒａｖａＲｅｘおよびＴｒｉＡｂ（登録商標）；抗ＮＣＡＭ抗体、例えば、ＥＲＩＣ－１およびＩＣＲＴ；抗ＰＥＭ抗原抗体、例えば、Ｔｈｅｒａｇｙｎ（登録商標）およびＴｈｅｒｅｘ（登録商標）；抗ＰＳＡ抗体；抗ＰＳＣＡ抗体、例えば、ＩＧ８；抗Ｐｔｋ抗体；抗ＰＴＮ抗体；抗ＲＡＮＫＬ抗体、例えば、ＡＭＧ－１６２；抗ＲＬＩＰ７６抗体；抗ＳＫ－１抗原抗体、例えば、Ｍｏｎｏｐｈａｒｍ　Ｃ；抗ＳＴＥＡＰ抗体；抗ＴＡＧ７２抗体、例えば、ＣＣ４９－ＳＣＡおよびＭＤＸ－２２０；抗ＴＧＦ－β抗体、例えば、ＣＡＴ－１５２；抗ＴＮＦ－α抗体、例えば、ＣＤＰ５７１、ＣＤＰ８７０、Ｄ２Ｅ７、アダリムマブ［例えば、商標Ｈｕｍｉｒａ（登録商標）の下で販売される製品］およびインフリキシマブ［例えば、商標Ｒｅｍｉｃａｄｅ（登録商標）の下で販売される製品］；抗ＴＲＡＩＬ－Ｒ１およびＴＲＡＩＬ－Ｒ２抗体；抗ＶＥ－カドヘリン－２抗体；および抗ＶＬＡ－４抗体［例えば、商標Ａｎｔｅｇｒｅｎ（登録商標）の下で販売される製品］が挙げられる。さらに、それだけには限らないが、ＧＤ３エピトープ抗体ＢＥＣ２およびｇｐ７２エピトープ抗体１０５ＡＤ７を含む抗イディオタイプ抗体を使用できる。さらに、それだけには限らないが、抗ＣＤ３／ＣＤ２０抗体Ｂｉ２０を含

む二重特異性抗体を使用できる。

【０２８０】

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

【０２８１】

ｂ．疾患および処置の方法

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

【０２８２】

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

【０２８３】

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

【０２８４】

ＭＥＶを使用してカーゴを送達して、感染性疾患を、例えば、遺伝子サイレンシングを用いて処置できる、または例えば、ワクチン接種によって防ぐことができる。例えば、抗原パルスマクロファージまたは樹状細胞に由来するＭＥＶは、ナイーブ動物中に導入された場合に免疫応答を誘発すると示された（Gyorgy et al. (2015) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 55:439-464）。遺伝子サイレンシングを使用してまた、病原体関連タンパク質、例えば、宿主の免疫抑制、病原体の複製、病原体の伝播もしくは感染の維持に関与するウイルスタンパク質；または病原体の宿主への侵入、病原体もしくは宿主による薬物代謝、病原体のゲノムの複製もしくは組込み、宿主における感染の確立もしくは広がりもしくは病原体の次の世代のアセンブリーを促進する宿主タンパク質を標的化できる。病原体には、例えば、ＲＮＡおよびＤＮＡウイルス、例えば、アレナウイルス、コロナウイルス、インフルエンザウイルス、パラミキソウイルス、フラビウイルス（例えば、Ｗｅｓｔ　Ｎｉｌｅウイルス）、ピコナウイルス（例えば、コクサッキーウイルス、ポリオウイルスおよびライノウイルス）、ラブドウイルス、フィロウイルス、レトロウイルス（例えば、レンチウイルスおよびラウス肉腫ウイルス）、アデノウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス、サイトメガロウイルス、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型およびＣ型肝炎）、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ポリオーマウイルスおよび他のもの；細菌；真菌；蠕虫；住血吸虫；トリパノソーマ；マラリア原虫［例えば、四日熱マラリア原虫（ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）および他のもの］を含む寄生生物；および哺乳動物転位因子が含まれ得る（例えば、国際公開番号ＷＯ２０１０／１４１７２４、ＷＯ２０１１／０７１８６０、ＷＯ２０１１／０７２２９２、ＷＯ２０１３／１２６８０３、ＷＯ２０２０／０３５６２０およびＷＯ２０２０／０９７５４０；オーストラリア公開番号ＡＵ２００４２５７３７３　Ａ１、ＡＵ２０１３２０３２１９　Ｂ２およびＡＵ２０１６２２５８７３　Ａ１；欧州公開番号ＥＰ２３９５０１２およびＥＰ２８８２４０；米国特許公開番号Ｕ．Ｓ．２０１１／０２２３６６５、Ｕ．Ｓ．２０１４／０２５６７８５およびＵ．Ｓ．２０１９／００３２０５１；日本公開番号ＪＰ　２０１８－１９７２３９Ａ；および台湾公開番号ＴＷ　２０１２０４３５１Ａを参照されたい）。

【０２８５】

ＭＥＶを使用してまた、治療上有用なポリペプチドをコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡ配列を送達できる。例えば、対象が特定の遺伝子産物を欠く場合には、核酸分子、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ分子中で遺伝子がコードされ得る。遺伝子産物をコードする核酸分子をＭＥＶに負荷し、遺伝子産物を欠く対象に送達できる。例えば、遺伝子産物が存在しないことまたは欠乏によって生じる疾患として、それだけには限らないが、リソソーム蓄積障害；尿素回路の代謝性障害；ＳＭＮ１関連脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）；筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）；ＧＡＬＴ関連ガラクトース血症；嚢胞性線維症（ＣＦ）；シスチン尿症を含むＳＬＣ３Ａ１関連障害；アルポート症候群を含むＣＯＬ４Ａ５関連障害；ガラクトセレブロシダーゼ欠乏症；Ｘ連鎖副腎白質ジストロフィーおよび副腎脊髄ニューロパチー；フリートライヒ運動失調症；ペリツェウス・メルツバッハ病；ＴＳＣ１およびＴＳＣ２関連結節性硬化症；サンフィリポＢ症候群（ＭＰＳ　ＩＩＩＢ）；ＣＴＮＳ関連シスチン症；脆弱Ｘ症候群、脆弱Ｘ関連振戦／運動失調症候群および脆弱Ｘ未熟卵巣機能不全症候群を含むＦＭＲ１関連障害；プラダーウィリー症候群；遺伝性出血性末梢血管拡張症；ニーマンピック病Ｃ１型；若年型神経セロイドリポフスチン症（ＪＮＣＬ）を含む神経セロイドリポフスチン症関連疾患、若年性バッテン病、ハルティアサンタブオリ病、ヤンスキービールショウスキー病ならびにＰＴＴ－１およびＴＰＰ１欠乏症；中枢神経系ミエリン形成不全／白質消失を伴うＥＩＦ２Ｂ１－、ＥＩＦ２Ｂ２－、ＥＩＦ２Ｂ３－、ＥＩＦ２Ｂ４－およびＥＩＦ２Ｂ５－関連小児運動失調；ＣＡＣＮＡ１Ａ－およびＣＡＣＮＢ４－関連突発性運動失調症２型；古典的レット症候群を含むＭＥＣＰ２関連障害、ＭＥＣＰ２関連重度の新生児脳症およびＰＰＭ－Ｘ症候群；ＣＤＫＬ５関連非定型レット症候群；ケネディ病（ＳＢＭＡ）；Ｎｏｔｃｈ－３関連皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症（ＣＡＤＡＳＩＬ）；ＳＣＮ１ＡおよびＳＣＮ１Ｂ関連発作性障害；アルパース

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

【０２８６】

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

【０２８７】

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

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

【０２８８】

ｃ．農業－獣医用適用

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

【０２８９】

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

【０２９０】

ｄ．化粧用および皮膚科学適用

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

【０２９１】

Ｅ．医薬組成物、製剤、キット、製造品および組合せ

１．医薬組成物および製剤

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

【０２９２】

医薬組成物は、治療的、予防的、化粧用および／または診断的適用のために使用できる。本明細書で提供されるＭＥＶおよびカーゴが負荷されたＭＥＶは、薬学的に許容される担体または希釈剤を用いて製剤化できる。一般に、このような医薬組成物は、カーゴの生物学的特性または他の特性を大幅に損なうことのない構成成分を含む。各構成成分は、他の成分と適合性であり、それが投与されるべき対象にとって傷害性ではないように、薬学的に、および生理学的に許容される。製剤は、それだけには限らないが、錠剤、丸剤、散剤、液体溶液または懸濁液（例えば、注射可能な、摂取可能な、局所的製剤、例えば、点眼薬、ジェル、ペースト、クリームまたは軟膏を含む）、エアロゾル（例えば、鼻腔スプレーおよび吸入剤）、リポソーム、坐剤、ペッサリー、注射用および不溶解性溶液および

徐放性形態を含む単位投与形で提供でき、薬学の技術分野で周知の方法によって調製できる。例えば、Gilman, et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press；およびRemington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pa.； Avis, et al. (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY；およびLieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NYを参照されたい。全身に投与される場合には、治療用組成物は、無菌であり、発熱物質不含であり、一般に、粒状物質を含まず、ｐＨ、等張性および安定性について十分に考慮されている非経口的に許容される溶液中にある。これらの条件は、当業者には公知である。非経口的に投与可能な組成物を調製する方法は、周知であるか、または当業者には明らかとなり、例えば、"Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Formerly Remington's Pharmaceutical Sciences)", 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)に、より詳細に記載されている。

【０２９３】

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

【０２９４】

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

【０２９５】

ＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶは、薬学的に許容される担体との混合物で調製できる。化合物を製剤化し、投与するための技術は、当業者には公知である（例えば、"

Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa.を参照されたい）。液体または粉末エアゾール（凍結乾燥した）などのこの治療用組成物は、静脈内に、または鼻もしくは肺を通って投与できる。組成物はまた、所望のように非経口的に、または皮下に投与できる。全身的に投与される場合には、治療用組成物は無菌であり、発熱物質不含であり、ｐＨ、等張性および安定性について十分に考慮されている非経口的に許容される溶液中になくてはならない。これらの条件は、当業者に公知である。

【０２９６】

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

【０２９７】

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

【０２９８】

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

【０２９９】

例では、安定化剤は、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、ソルビトール、ポロキサマーおよびポリソルベートである界面活性剤であり得る。例えば、界面活性剤は、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、ソルビトール、ポロキサマーおよびポリソルベート、例えば、ポロキサマー１８８、ポリソルベート２０およびポリソルベート８０であり得る。特定の例では、安定化剤は、ポ

リソルベート８０である。界面活性剤の濃度は、製剤における質量濃度（ｗ／ｖ）の％として、両端を含む、０．００５％～１．０％、０．０１％～０．５％、０．０１％～０．１％、０．０１％～０．０５％もしくは０．０１％～０．０２％の間または約０．００５％～１．０％、０．０１％～０．５％、０．０１％～０．１％、０．０１％～０．０５％もしくは０．０１％～０．０２％の間である。

【０３００】

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

【０３０１】

本明細書で提供されるＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶは、０．１～１０ｍｇ／ｍＬもしくは約０．１～１０ｍｇ／ｍＬまたは適用および対象に応じて、例えば、少なくとも０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．５、２．０、２．５、３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、８．５、９．０、９．５、１０ｍｇ／ｍＬもしくはそれより多くもしくは少なくとも約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．５、２．０、２．５、３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、８．５、９．０、９．５、１０ｍｇ／ｍＬもしくはそれより多くである濃度など、より高いまたはより低い量の組成物中の濃度で提供され得る。溶液の容量は、１～１００ｍＬまたは約１～１００ｍＬ、例えば、少なくとも０．５、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００ｍＬもしくはそれより多くもしくは約少なくとも０．５、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００ｍＬもしくはそれより多くなどであり得る。一部の例では、ＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶは、リン酸緩衝生理食塩水中で供給される。

【０３０２】

本明細書で提供されるＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶは、制御放出または徐放性組成物として提供され得る。高分子材料は、本明細書で提供されるＭＥＶおよびカーゴが負荷されたＭＥＶの制御放出または徐放を達成できる丸剤およびカプセル剤の製剤化のために当技術分野で公知である［例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Langer and Peppas (1983) J. Macromol. Sci. 23:61を参照されたい；Levy et al. (1985) Science 228:190； During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105；米国特許第５，６７９，３７７号、同５，９１６，５９７号、同５，９１２，０１５号、同５，９８９，４６３号、同５，１２８，３２６号；およびＰＣＴ公開番号ＷＯ９９／１５１５４およびＷＯ９９／２０２５３も参照されたい］。徐放性製剤において使用されるポリマーの例として、それだけには限らないが、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－ｃｏ－酢酸ビニル）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（ＰＬＧ）、ポリ無水物、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）およびポリオルトエステルが挙げられる。一般に、徐放

性製剤において使用されるポリマーは、不活性であり、浸出可能不純物を含まず、保存の際に安定であり、無菌であり、生分解性である。徐放性製剤の生成のために当技術分野で公知の任意の技術を使用して、本明細書で提供されるＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶを含有する徐放性製剤を生成できる。

【０３０３】

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

【０３０４】

２．製造品／キットおよび組合せ

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

【０３０５】

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

【０３０６】

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

【０３０７】

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

【０３０８】

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

【０３０９】
一部の例では、ＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶは、ＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶまたは単離された生体試料（例えば、腫瘍細胞、例えば、対象から得られた循環腫瘍細胞または対象から切り出された腫瘍細胞）中のカーゴの検出のために診断キットにおいて提供される。
【０３１０】
本明細書で提供されるキットはまた、ＭＥＶを対象に投与するためのデバイスを含み得る。対象に医薬を投与するための当技術分野で公知のさまざまなデバイスのいずれも、本明細書で提供されるキットに含めることができる。例示的デバイスとして、それだけには限らないが、皮下ニードル、静脈内ニードル、カテーテル、ネブライザー、および吸入器が挙げられる。通常、組成物を投与するためのデバイスは、組成物の投与の所望の方法と適合する。
【０３１１】
３．外因的に負荷されたＭＥＶの投与および投与経路
本明細書で提供されるカーゴが負荷されたＭＥＶは、例えば、全身または局所性投与を含む投与のために、ポリペプチドの投与のための当技術分野で公知の任意の方法によって対象に投与できる。カーゴが負荷されたＭＥＶは、非経口（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下および腔内などの経路）、局所的、硬膜外または粘膜［例えば、局所的、鼻腔内、経口、膣内、外陰膣、食道（ｅｓｏｐｈａｇｅａｌ）、食道（ｏｒｏｅｓｏｐｈａｇｅａｌ）、気管支、直腸および肺などの経路］などの経路によって投与できる。カーゴが負荷されたＭＥＶは、局所性または経皮作用の発揮のために対象に疾患の部位で外部から投与できる。カーゴが負荷されたＭＥＶを含有する組成物は、任意の従来経路、例えば、注入、吸入によって、ボーラス注射によって、または上皮もしくは粘膜皮膚層（例えば、局所、経口、膣内、直腸および腸管粘膜）を介した吸収によって投与できる。カーゴが負荷されたＭＥＶを含有する組成物は、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に、またはそれと連続して投与できる。例えば、カーゴが負荷されたＭＥＶは、注入ポンプまたはシリンジポンプなどによる注入デリバリーによって投与され、また別の治療薬と組み合わせて、もしくは単剤療法として投与される場合もある。
【０３１２】
方法および／または投与経路は、本明細書で提供される投与と関連する有害副作用を軽減するために変更できる。例えば、患者が軽度または中程度（すなわち、グレード１または２）の注入反応を起こす場合には、注入速度を低減する（例えば、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％またはそれより多く低減する）ことができる。患者が重度（すなわち、グレード３または４）の注入反応を起こす場合には、注入を一時的または永久に中止することができる。
【０３１３】
一部の例では、対象が有害副作用、例えば、重度皮膚毒性、例えば、重度ざ瘡様発疹を起こす場合には、処置調整を行うことができる。例えば、有害副作用の出現後、例えば、１～２週間、または有害副作用が改善するまで投与を遅延することができる。一部の例では、有害副作用の追加の出現後、投与量を低減することができる。当技術分野における熟練した医師または他の熟練した施術者によって、特定のレジメンおよび処置プロトコールを確立することができる。
【０３１４】
デリバリーのための適当な方法は、カーゴが負荷されたＭＥＶまたはカーゴが負荷されたＭＥＶを含有する医薬組成物の投与量の特性に基づいて当業者によって選択できる。このような特性には、それだけには限らないが、溶解度、吸湿性、結晶化特性、融点、密度、粘性、流動、安定性および分解プロファイルが含まれる。
【０３１５】
４．併用療法
本明細書で提供されるカーゴが負荷されたＭＥＶは、１つまたは複数の他の治療レジメ

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

【０３１６】

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

【０３１７】

１つまたは複数の追加の薬剤は、カーゴが負荷されたＭＥＶと同時に、逐次または断続的に投与できる。薬剤は、例えば、同一医薬組成物または同一デリバリー方法の一部として同時投与できる。一部の例では、薬剤は、カーゴが負荷されたＭＥＶと同時に同時投与できるが、異なるデリバリー手段によってである。薬剤はまた、カーゴが負荷されたＭＥＶの投与とは異なる時間であるが、組み合わされた予防的または治療的効果を有するのに十分に近い時間で投与できる。一部の例では、１つまたは複数の追加の薬剤は、選択された期間によって隔てられたカーゴが負荷されたＭＥＶの投与に続いて、またはその前に投与される。一部の例では、期間は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、１ヶ月、２ヶ月または３ヶ月である。一部の例では、１つまたは複数の追加の薬剤は、複数回投与される、および／または本明細書で提供されるカーゴが負荷されたＭＥＶは、複数回投与される。

【０３１８】

Ｆ．種々の経路による投与後のＭＥＶの体内分布

１．哺乳動物ＥＶの体内分布

哺乳動物ＥＶの臓器および組織における薬物動態および体内分布は、臓器および組織におけるその薬物動態および分布について広く研究されている［Vader et al. (2016) Advanced drug delivery reviews 106(Pt A):148-156, doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.006； Morishita et al. (2017) Journal of pharmaceutical sciences 106(9):2265-2269, hdoi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.030］。哺乳動物細胞由来ＥＶを用いる処置は、一般に、静脈内または腹膜内投与経路に基づいている。哺乳動物ＥＶの全身投与の際の主な標的臓器は、肝臓、脾臓および肺である。種々の細胞供給源由来の蛍光標識された哺乳動物ＥＶの組織分布の包括的研究［Wiklander et al. (2015) J. Extracellular Vesicles 4:26316を参照されたい］によって、マウスにおける静脈内（ｉ．ｖ．）注射の２４時間後、肝臓において最高蛍光シグナルがあり、続いて、脾臓、消化管および肺においてであることが実証された。さらに、細胞供給源、ＥＶ用量および投与経路は、ＥＶ分布に影響を及ぼすと示された；例えば、より高いＥＶ用量の注射は、より低い用量と比較して、おそらくは単核食細胞系（ＭＰＳ）の飽和によって引き起こされる、相対的に低い肝臓蓄積をもたらした。腹膜内（ｉ．ｐ．）、皮下（ｓ．ｃ．）およびｉ．ｖ．投与の比較によって、腹膜内および皮下用量は、ｉ．ｖ．注射と比較して、肝臓および脾臓におけるＥＶ蓄積の低減ならびに膵臓および消化管蓄積の

増強をもたらすことが示された。全身投与されたＥＶは、単核食細胞系（ＭＰＳ）によって、特に、肝臓および脾臓において迅速に取り込まれると報告されている。クリアランスの機序は、合成ナノ粒子、例えば、リポソームについて記載されたものと似ている［Van der Meel et al. (2014) J. Control. Release 195:72-8］。脾臓蓄積の大部分は、脾臓による取り込みではなく脾臓におけるＥＶ保存によって引き起こされる［Lai C.P. et al. (2014) ACS Nano 8:483-494］。他の投与経路後の哺乳動物ＥＶの体内分布も調査されている。中枢神経系の標的化のために、クルクミンが負荷された哺乳動物ＥＶの鼻腔内投与は、脳におけるＥＶ局在性をもたらした。薬物レベルは、投与の１時間後にピークに達し、１２時間後に相当な量が検出されたが、毒性効果は観察されなかった［Zhuang et al. (2011) Mol. Ther. 19:1769-1779］。

【０３１９】

一般に、哺乳動物ＥＶは、種々のｐＨおよび温度でのその低い安定性、消化管における生体分子の迅速な分解および経口投薬のための工業的規模の生成の制限が理由で、経口デリバリーのために利用されない［Cheng et al. (2019) Protein Cell 10:295-299］。今までのところ唯一の例外は、牛乳由来ＥＶであり、これはマウスへの経口デリバリーの際、腸における迅速蓄積を含んでいた、全身インビボイメージングシステム（ＩＶＩＳ）を用いて分析された分布のパターンを示し、ＥＶは、２および６時間後に検出可能であり、続いて、蛍光シグナルは、２４時間で、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓および消化管において観察された。４８時間後、蛍光シグナルは、臓器のほとんど内で鎮静し、系からのナノ小胞のクリアランスを示した［Samuel et al. (2021) Nat Commun 12:3950、doi.org/10.1038/s41467-021-24273-8］。したがって、哺乳動物ＥＶ（乳以外の供給源由来の）は、腸管によっておよび腸から吸収されることができず、標的臓器において生体利用可能となる［Zhong et al. (2021) Biomaterials. 277:121126. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121126］。

【０３２０】

哺乳動物細胞由来のＥＶを用いる処置は、一般に、全身投与のために静脈内または腹膜内投与経路を使用し、標的臓器は、肝臓、脾臓および肺である。記載したように、ほとんどの哺乳動物ＥＶは、種々のｐＨおよび温度でのその低い安定性、消化管における生体分子の迅速な分解および経口投薬のための工業規模の製造の制限のために経口デリバリーのために使用されていなかった［Cheng et al. (2019) Protein Cell 10(4):295-299］。唯一の例外はウシ乳由来ＥＶであり、これは、マウスへの経口デリバリーの際に、全身インビボ画像化システム（ＩＶＩＳ）を用いて分析された、腸における迅速な蓄積を含む分布のパターンを示しており、ここで、ＥＶは、２および６時間後に検出可能であり、続いて、２４時間の時点で蛍光シグナルが、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓および消化管において観察された。４８時間後、蛍光シグナルは臓器のほとんど内で鎮静し、系からのナノ小胞のクリアランスを示した。

【０３２１】

実施例において本明細書において示され、以下に論じられるように、ＭＥＶは、哺乳動物ＥＶ由来とは異なる特性を有する。例えば、それらは、哺乳動物細胞由来のＥＶと比較して消化管の厳しい環境で安定である。したがって、本明細書において記載されるような微細藻類ＥＶは、経口投与および薬物デリバリーに、ならびに本明細書において記載されるようなデリバリーの他の経路に特に適している。

【０３２２】

２．微細藻類ＥＶ体内分布

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

【０３２３】

本明細書で提供されるＭＥＶは、外因的にまたは内因的に負荷され得る、さまざまな生

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

【０３２４】

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

【０３２５】

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

【０３２６】

ＤＩＲ標識されたＭＥＶを、４つの経路：鼻腔内（ＩＮ）、気管内（ＩＴ）、静脈内（ＩＶ）および経口を介してマウスに投与し、時間の関数としての全身イメージングによって、ＭＥＶの運命を３日間可視化し、続いて、マウスを　　殺して研究のために臓器を回収した。実施例において示されるように、静脈内投与は、投与後約４～１２時間で肝臓を標的化し、１０～３０時間で脾臓を標的とし、脾臓の赤色髄（赤脾臓）にあると思われる。経口投与は腸および脾臓を標的化する。本明細書において、ＭＥＶは、経口的に利用可能であり、それらは、胃を通る通過に耐え、０．５時間～４時間で腸に、次いで、０．５時間～１０時間で脾臓に到達することが示されている。興味深いことは、脾臓への経路であり、免疫系へカーゴを標的化し、送達し、４時間～２８時間蓄積することすることに関連がある、血液を介する（赤脾臓へ）、およびリンパ球を介する（白脾臓へ）脾臓への２つのあり得る経路がある。これは、活性化され、脾臓に行き着き、そこで増加するリンパ球による、および／または活性化されない、脾臓の白色髄（白脾臓）に進み、そこから免疫系によって広がる、ＭＥＶを貪食するリンパ球による、内部移行によって達成され得る。

【０３２７】

ａ．経口投与

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

【０３２８】

腸において豊富な白血球細胞は、白脾臓に移動する。ＭＥＶは、経口的に摂取されると、腸の細胞によって、また以下に論じられるように、例えば、腸のリンパ球によって内部移行される場合があり、これによってＭＥＶは脾臓へ運ばれる。これは、経口的に投与されることができない哺乳動物小胞とは対照的である。したがって、ＭＥＶは、免疫系が標的である薬剤の、例えば、免疫モジュレーションカーゴのデリバリービヒクルを提供する

。上記で論じられたように、白脾臓への経路は、例えば、活性化されたリンパ球および／または貪食リンパ球を介して起こり得る。リンパ球は、ＭＥＶを貪食でき、脾臓にホーミングする。ＭＥＶは、哺乳動物ＥＶとは異なり、経口的に投与できない、小分子薬物およびタンパク質および他の治療薬、例えば、核酸治療薬を経口的に送達する方法を提供する。特に、経口的に投与されたＭＥＶは、免疫系が関与している、または処置が免疫系を標的化することによって達成され得る、疾患、例えば、がんおよび炎症性疾患の処置の経路を提供する。このような疾患として、それだけには限らないが、感染性疾患、自己免疫疾患、がん、臓器移植拒絶の防止が挙げられる。これらの疾患は、免疫細胞の活性を抑制または増強することによって処置される。

【０３２９】

１）リンパ系の構成成分

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

【０３３０】

リンパ

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

【０３３１】

リンパ管

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

【０３３２】

腸関連リンパ組織（ＧＡＬＴ）

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

【０３３３】

パイエル板（ＰＰ）は、腸の粘膜および粘膜下層中に分布するリンパ小節の収集物である。それらは、上皮下ドーム領域およびＴ細胞領域中に分散したＢ細胞濾胞を含有する。

濾胞関連上皮（ＦＡＥ）と呼ばれる上皮細胞の単層は、ＰＰのリンパ系領域を腸管腔から分離する。ＦＡＥは、マイクロフォールド（Ｍ）細胞と呼ばれる特殊な腸細胞によって浸透されている。これらの細胞は、ＰＰへの管腔抗原の輸送のゲートである。

【０３３４】

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

【０３３５】

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

【０３３６】

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

【０３３７】

２）ＧＡＬＴの標的化

経口投与されたＭＥＶは、腸管関連リンパ組織（ＧＡＬＴ）を標的とすることができる。したがって、ＧＡＬＴは、ＭＥＶおよびその治療薬カーゴが、カーゴを臓器、組織および／または全身循環に送達するために使用され得る、標的（有効コンパートメント）および／または経路である。ＧＡＬＴは、例えば、免疫モジュレーター、化学療法薬、抗感染薬などの種々の薬理学的薬剤の有利な標的である。リンパ系は、腸のおよび他の腫瘍転移の主な経路であり、したがって、細胞傷害性薬を腸のリンパ管に標的化することを使用して、腫瘍転移を処置できる。ＧＡＬＴは、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、モルビリウイルス、イヌジステンパーウイルス、または重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）関連コロナウイルス、Ｂ型肝炎およびＣ型肝炎などの一部のウイルスが、リンパ系内で広がり、発達するので、抗ウイルス剤のデリバリー標的である。

【０３３８】

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

【０３３９】

微細藻類ＭＥＶは脾臓に送達されるので、このデリバリーの機序は、免疫系の細胞に基づいている可能性がある。免疫細胞は、腸関連リンパ組織（ＧＡＬＴ）の腸管上皮および根底にある粘膜固有層の単一細胞層に大量に存在する。免疫細胞には、Ｔ細胞、血漿細胞、肥満細胞、樹状細胞およびマクロファージが含まれる［Luongo et al. (2009) Current perspectives. International Reviews of Immunology 28(6):446-464、doi.org/10.3109/08830180903236486］。マクロファージ、樹状細胞、好中

球およびまたＢ細胞は、食作用を行う。したがって、腸における免疫細胞は、ＭＥＶを貪食して、それらを脾臓に送達する可能性がある。食作用後、ＭＥＶカーゴの運命は、カーゴの種類に応じて変わる可能性がある。例えば、マクロファージおよび樹状細胞は抗原提示に関与し、ＭＥＶ中で送達される存在するタンパク質またはＭＥＶ中の生成物は分泌される場合があり、またはＲＮＡのような生成物は、翻訳される場合がある。

【０３４０】

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

【０３４１】

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

【０３４２】

３．ＭＥＶによって処置される疾患および状態

標的化される臓器に基づいて、さまざまな疾患および障害がＭＥＶによって処置され得る。ＭＥＶは、これらの疾患および状態を処置するための治療薬を含有するように負荷され、生成され得る。標的化された臓器および疾患の適当な投与経路が選択される。例えば、脾臓および腸を標的化するためには、経口投与が選択され、肺を標的化するためには、吸入または鼻腔投与が選択される。体内分布および薬物動態データに基づいて、以下の臓器が、以下のとおりに例示される疾患を処置するために標的化され得る。

【０３４３】

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

【０３４４】

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

【０３４５】

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

ならびに
【０３４６】
肺：感染性疾患、特に、呼吸器疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺高血圧症、喘息、他の炎症性肺疾患、嚢胞性線維症、ＡＴＴ欠乏症、肺疾患、がん、がん転移および他のこのような疾患および障害。
【０３４７】
Ｇ．製剤、投与経路ならびに疾患および障害
ＭＥＶを特定の疾患または障害の処置を達成するのに適した量で含有する組成物が提供される。量は、治療用カーゴ、疾患または障害および処置される対象に応じて変わり得る。ＭＥＶの個々の投与量を確認することは当業者のレベルの範囲内である。製剤には、当業者に公知の任意のものが含まれ、例えば、
肝臓および脾臓に到達する静脈内投与のための注射液、
経口用の、例えば、錠剤、カプセル剤、フィルムおよびトローチ剤など、
腸に到達する、例えば、ワクチン、免疫系（免疫細胞）および脾臓に到達する経口投与用の液滴剤、
肺に到達する気管内、肺内投与用のような吸入用の組成物、例えば、エマルジョン（マイクロエマルジョンおよびナノエマルジョン）、
鼻腔内投与用の液滴剤、および
製剤、例えば、クリーム、オイル、ジェル、ローション、皮膚および粘膜のための軟膏が挙げられる。
【０３４８】
薬学的に許容される媒体中に、微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を含有する医薬組成物が提供される。ＭＥＶは、薬剤、一般に、治療薬または生物学的に活性な薬剤、例えば、核酸、特に、ＲＮＡ、タンパク質、小分子および他のこのような薬剤を含有し得る。組成物は、薬剤の治療有効量を送達するために希釈され得る量のＭＥＶを含有するか、または希釈を行わない直接投与のために製剤化される。ＭＥＶの個々の濃度は、例えば、処置される適応症；活性薬剤；投与経路；処置されるべき疾患、障害または状態；およびレジメンを含む、当業者の範囲内のさまざまなパラメータに応じて変わる。投与経路には、全身および局所経路、経口、直腸、静脈内、筋肉内、皮下、粘膜、吸入、鼻腔、眼、腹腔、気管内、硝子体内、膣および当業者に公知の任意の適した経路が含まれる。
【０３４９】
本明細書で提供される化合物の投与に適した医薬担体または媒体は、特定の投与様式に適している当業者に公知の任意のこのような担体を含む。
【０３５０】
例示的製剤
ＭＥＶを含有する医薬組成物は、選択された量の活性化合物を、１種または複数の生理学的に許容される担体または賦形剤と混合することによって、任意の従来法で製剤化できる。担体または賦形剤の選択は、投与する専門家の範囲内であり、いくつかのパラメータに応じて変わり得る。これらには、例えば、投与様式（すなわち、全身、経口、鼻腔、肺、局所（ｌｏｃａｌ）、局所（ｔｏｐｉｃａｌ）または任意の他の様式）および処置される障害が含まれる。製剤はまた、併用療法のための他の活性薬剤との共製剤であり得る。
【０３５１】
選択された量のＭＥＶが、選択された経路による投与のために適した媒体中で製剤化される。医薬組成物は、選択された量のＭＥＶを、１種または複数の生理学的に許容される担体または賦形剤または媒体と混合することによって任意の従来法で製剤化できる。医薬組成物は、治療的、予防的、化粧用および／または診断的適用のために使用できる。組成物中のＭＥＶの濃度は、上記のものならびに活性薬剤カーゴの吸収、不活性化および排出速度、カーゴの放出、放出の機序、投与量スケジュールおよび投与される量、対象の年齢およびサイズならびに当業者に公知の、ＭＥＶの特性と関連する他の因子を含むさまざまな因子に応じて変わる。

【０３５２】
本明細書で提供される医薬組成物は、種々の形態、例えば、それだけには限らないが、固体、半固体、液体、エマルジョン、粉末、水性および凍結乾燥形態であり得る。本明細書で提供される医薬組成物は、単回投与量（直接）投与のために、または希釈もしくは他のレジメンのために製剤化され得る。製剤中の化合物の濃度は、直接投与のために、投与の際に、意図される処置のために有効である量のデリバリーのために、希釈または別の組成物との混合後のいずれかで有効である。組成物は、単回または複数回投与量直接投与のための量で製剤化できる。組成物の形態は、意図される投与様式を含むさまざまな因子に応じて変わる。得られる混合物は、溶液、懸濁液、エマルジョンおよび他のこのような混合物であり、クリーム、ジェル、軟膏、エマルジョン、溶液、ローション、懸濁液、チンキ、ペースト、泡状物質、エアロゾル、灌注およびスプレーとして製剤化できる。経口投与のために、ＭＥＶを、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、液体および他のものとして製剤化できる。

【０３５３】
局所内部投与、例えば、筋肉内、非経口または関節内投与のために、ＭＥＶを、等張に緩衝された生理食塩水で製剤化できる。ＭＥＶの有効濃度は、意図される目的のために十分な量のカーゴ剤を提供するのに十分であり、経験的に決定できる。

【０３５４】
一般に、薬学的に許容される組成物は、規制当局または他の当局の承認を考慮して調製され、ならびに／または動物およびヒトにおける使用のために一般に認められた薬局方に従って調製される。医薬組成物は、ともにポリペプチドが投与される担体、例えば、希釈剤、アジュバント、賦形剤または媒体を含み得る。このような医薬担体は、滅菌液体、例えば、水およびオイル、例えば、石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば、ピーナッツオイル、ダイズオイル、ミネラルオイルおよびゴマ油であり得る。水は、医薬組成物が静脈内に投与される場合の典型的な担体である。生理食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、特に注射用溶液のための液体担体として使用され得る。組成物は、有効成分とともに、希釈剤、例えば、ラクトース、スクロース、第二リン酸カルシウムおよびカルボキシメチルセルロース；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムおよびタルク；ならびに結合剤、例えば、デンプン、天然ゴム、例えば、アラビアガム、ゼラチン、グルコース、モラセス、ポリビニルピロリドン、セルロースおよびその誘導体、ポビドン、クロスポビドンおよび当業者に公知の他のこのような結合剤を含有し得る。適した医薬賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水およびエタノールが挙げられる。組成物はまた、必要に応じて、微量の湿潤剤または乳化剤またはｐＨ緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミン酢酸ナトリウム、トリエタノールアミンオレエートおよび他のこのような薬剤を含有し得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤および徐放性製剤の形態をとることができる。治療用化合物および適した散剤基剤、例えば、ラクトースまたはデンプンの散剤ミックスを含有する、吸入器（ｉｎｈａｌｅｒ）または吸入器（ｉｎｓｕｆｆｌａｔｏｒ）において使用するための例えば、ゼラチンのカプセル剤およびカートリッジを製剤化できる。組成物は、伝統的な結合剤および担体、例えば、トリグリセリドを用いて坐剤として製剤化できる。経口製剤は、標準担体、例えば、医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムおよび他のこのような薬剤を含み得る。経口投与用の調製物も、プロテアーゼ阻害剤、例えば、ボウマンバーク阻害剤、コンジュゲート型ボウマンバーク阻害剤、アプロチニンおよびカモスタットを用いて適宜製剤化できる。適した医薬担体の例は、"Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martinに記載されている。このような組成物は、対象または患者への適

切な投与のための形態で化合物を提供するために、一般に、精製形態の化合物の治療有効量を、適した量の担体と一緒に含有する。

【０３５５】

本明細書で提供される医薬組成物は、中でも、例えば、抗酸化剤、保存料、抗微生物剤、鎮痛剤、結合剤、崩壊剤、着色料、希釈剤、賦形剤、増量剤、流動促進剤、可溶化剤、安定化剤、等張化剤、媒体、粘性剤、香味剤、エマルジョン、例えば、水中油または油中水エマルジョン、乳化および懸濁剤、例えば、アラビアガム、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ベントナイト、カルボマー、カラゲナン、カルボキシメチルセルロース、セルロース、コレステロール、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、オクトキシノール－９、オレイルアルコール、ポビドン、モノステアリン酸プロピレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンエステル、ステアリルアルコール、トラガカント、キサンタンゴムおよびその誘導体、溶解剤および多岐にわたる成分、例えば、結晶性セルロース、微晶質セルロース、クエン酸、デキストリン、デキストロース、液体グルコース、乳酸、ラクトース、塩化マグネシウム、メタリン酸カリウムおよびデンプンを含む他の添加剤を含有し得る［全般的に、Alfonso R. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkinsを参照されたい］。このような担体および／または添加剤は、従来の方法によって製剤化でき、適した用量で対象に投与できる。安定化剤、例えば、脂質、ヌクレアーゼ阻害剤、ポリマーおよびキレート化剤は、身体内の分解から組成物を保存できる。

【０３５６】

製剤は、投与様式に適合しなくてはならない。例えば、ＭＥＶは、注射による（例えば、ボーラス注射または連続注入による）非経口投与用に製剤化できる。注射用組成物は、油性または水性媒体中の懸濁剤、溶液またはエマルジョンなどの形態をとることができる。滅菌注射用製剤はまた、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の例えば、１，４－ブタンジオール中の溶液としての滅菌注射用溶液または懸濁液であり得る。滅菌、固定油は、溶媒または懸濁媒体として従来使用されている。この目的のために、それだけには限らないが、合成モノ－またはトリグリセリド、脂肪酸（オレイン酸を含む）、天然に存在する植物油、例えば、ゴマ油、ココナッツオイル、ピーナッツオイル、綿実油および他のオイルまたはオレイン酸エチルのような合成脂肪媒体を含む任意の無菌性固定油が使用され得る。緩衝剤、保存料、抗酸化剤および適した成分を必要に応じて組み込むことができる、あるいは、それらは製剤を構成できる。本明細書で提供されるＭＥＶは、組成物中の唯一の薬学的に有効な成分として製剤化できる、または他の有効成分と組み合わせることができる。ＭＥＶの懸濁液は、投与に適したものであり得る。これらは、当業者に公知の方法に従って調製できる。

【０３５７】

鼻腔内投与に適した組成物には、それだけには限らないが、散剤、スプレー、液体、懸濁液、エマルジョンおよび鼻に直接投与でき、ＭＥＶを含有できる任意の他の形態が含まれる。ＭＥＶの濃度は、経験的に決定でき、カーゴ、処置される適応症または意図される使用に応じて変わる。

【０３５８】

ＭＥＶの治療上の濃度は、公知のインビトロおよびインビボ系において化合物を試験することによって経験的に決定できる。治療上有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

【０３５９】

Ｈ．脳およびＣＮＳの疾患、障害および状態を処置するための鼻腔内（ＩＮ）投与を介した脳へのＭＥＶの体内分布およびデリバリー

本開示を通じて論じられるように、ＭＥＶは、植物供給源を含む他の供給源由来のＥＶを含む他の媒体と比較して、治療用および診断用または検出可能な分子を含む生物活性分

子のデリバリーのための多数の利点を提供する（以下の節におけるおよび本開示を通じた考察を参照されたい）。特に、本明細書において記載され、示されるように、ＭＥＶは、鼻腔内に投与され、固有の経路を介して脳中の目的の領域に輸送され得る。ＭＥＶには、核酸、例えば、プラスミド、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ｍＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡおよび他のＲＮＡ、タンパク質／ペプチド／ポリペプチドを含むペプチド、小分子、薬物、診断薬および他の分子を含むカーゴを負荷できる。ＭＥＶは、胃腸液における不十分な安定性、不十分な腸管吸収および／または大規模な肝臓初回通過消失を有する薬理学的に活性な化合物、例えば、極性薬物の脳へのベクターとして働くことができる。

【０３６０】

ＩＮ投与によるＭＥＶの投与は、脳において作用する薬物、例えば、抗うつ薬、抗精神病薬、抗不安薬、記憶増強剤、認知症の処置のための薬剤およびがんの処置のための薬剤などを標的細胞に輸送することを提供し、そこで、静脈内投与などの全身投与によって、または経口投与によって生じ得る身体における全身分布を伴わずに、その効果が示される。ＭＥＶは、ＣＮＳおよび脳の疾患、障害および状態のために標的化された薬物を送達するための非侵襲性溶液を提供する。ＭＥＶは、血液脳関門（ＢＢＢ）を通過できない分子を送達できる。親水性化合物については、脳へのアクセスは、血管コンパートメントから脳組織への輸送を許可しないＢＢＢによって制限される。ＩＮ投与はまた、初回通過代謝後に脳に到達できない分子を送達できる。

【０３６１】

１．脳構造

脳におけるＭＥＶの体内分布に関する本明細書において記載され、例示される知見を考慮して（例えば、実施例および添付の図面を参照されたい）、以下の脳領域／核が、精神および神経障害を含む脳の疾患、障害および状態ならびに中枢神経系の主要な機能におけるその認識される関与を考慮して興味深い。

【０３６２】

ａ．前嗅核

前嗅核とは、嗅球からの入力を受け取る神経細胞の最も吻側のグループを指す。ヒトおよびマカクザルでは、それらは、嗅球から嗅脚を通り、眼窩回の下側の索の背側面上の大きなグループまで、嗅索内に散在する小さなグループを形成する。トポロジーによって規定されるいくつかのサブグループから構成されている。

【０３６３】

前嗅核は、嗅脚中の嗅球の後方に位置している。主要な嗅覚処理センターの１つであり、嗅球は、主要な求心性入力であり、またその軸索の主な標的である。前嗅核（ＡＯＮ）は、嗅球からの匂い情報の最初のレシピエントであり、海馬からの時空的合図を伝達する密な神経支配の標的である。ＡＯＮ内にエピソード的および文脈上関連する匂いの潜在記憶が保存され、その活性が匂い記憶の行動的表現にとって必要であり、十分である。

【０３６４】

ｂ．蓋紐

蓋紐とは、脳梁の吻を超える梁上回の腹側の継続部分を指す（例えば、URL:/braininfo.rprc.washington.edu/centraldirectory.aspx?ID=1870を参照されたい）。ヒトおよびマカクザルでは、終板の吻側面上にあり、終板傍回と同一であるか、その一部であると考えられている。ラットおよびマウスでは、梁上回に関して同様に位置し、前嗅核を覆う内側面上を吻側に延びるより顕著な層状構造である。大脳皮質の嗅覚領域の一部（げっ歯類）と考えられている。げっ歯類では、背側蓋紐および腹側蓋紐の２つの部分からなる。腹側蓋紐（ｖＴＴ）は、嗅覚皮質の成分であり、ボトムアップの匂いシグナルおよびトップダウンシグナルの両方を受け取る。蓋紐（ｖＴＴ）、嗅脚の腹内側面に位置する嗅覚皮質の領域は、匂いシグナルの知覚を報酬指向の行動に変換する。

【０３６５】

ｃ．嗅結節

嗅結節とは、ニッスル染色に基づいて定義される主に細胞性の構造を指す。前嗅核の尾側、嗅索の内側、梨状領域の吻側および側坐核および無名質の腹側の終脳の腹側面に位置する。カジェハ島の一部を含有する。

【０３６６】

ヒトでは、嗅結節は、あまり発達しておらず、側坐核を覆うものとかろうじて識別可能である。マカクザルでは、幾分かより顕著であり、蓋紐によって内側に境界がある。霊長類では、周囲の領域から突出しておらず、多数の小血管が侵入している。これらは、ヒト神経細胞学において「前有孔質」という名称の原因となる解剖の際の外観を与える。ラットおよびマウスにおける位置は、マカクザルにおいてと同一である。終脳の吻側腹側面で突出し、そこでより明確に層化され、霊長類では脳のサイズに比例してより大きい。適切な嗅覚に関与している。

【０３６７】

ｄ．梨状葉皮質

一次嗅覚皮質または梨状葉皮質は、側頭葉に位置する。梨状葉皮質（ＰＣ）は、嗅覚情報の処理および符号化に関与する重要な脳領域である。種々の脳障害、例えば、てんかん、アルツハイマー病および自閉症に関わっている。ＰＣは、前側（ＡＰＣ）および後側（ＰＰＣ）部分からなり、これらは解剖学的におよび機能的に異なっている。

【０３６８】

梨状葉皮質（ＰＣ）は、前脳の腹外側領域に位置し、哺乳動物では前側から後側（ＡＰ）軸に沿って広く延びる。一次嗅覚皮質の１つとして、ＰＣは、匂い識別の符号化［Gottfried et al. (2006) Neuron 49:467-479; Howard et al.(2009) Nature Neuro-science 12:932-938; Wilson et al. (2011) Neuron 72: 506-519; Bekkers et al. (2013) Trends in Neuroscience 36:429-438; Courtiol et al.(2017) Perception 46(3-4):320-332, doi.org/10.1177/0301006616663216］、匂いに関連する値または文脈［Gottfried et al.(2003) Neuron 39:375-386; Calu et al. (2007) In: Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991) 17:1342-1349, Roesch et al. (2007) In: Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991) 17:643-652］および匂い記憶［Zelano et al. (2011) Neuron 72:178-187; Strauch et al. (2018) Cerebral Cortex 28:764-776］に関与している。

【０３６９】

ＰＣはまた、種々の神経疾患、例えば、てんかん［Loscher et al. (1996) Progress in Neurobiology 50:427-481; Vismer et al. (May, 2015) Front. Neural Circuits, 29, doi.org/10.3389/fncir.2015.00027; Young et al. (2019) Experimental Neurology 320:113013］、アルツハイマー病［Samudralwar et al. (1995) Journal of the Neurological Sciences 130:139-145; Saiz-Sanchez et al. (2015) Brain Struct Funct 220:2011-2025.,doi.org/10.1007/s00429-014-0771-3］、自閉症スペクトラム障害［Menassa et al. (2018) Neuroscience Letters 665:86-91; Koehler et al. (2018) Chemical Senses 43:627-634］およびパーキンソン病［Wu et al. (2011) Human Brain Mapping 32:1443-1457］と関わっている。

【０３７０】

ｅ．扁桃体

いくつかの精神障害では、社会的行動が破壊される。扁桃体は、社会的行動に関与する重要な脳領域であり、扁桃体の病理は、社会不安障害から自閉症までの範囲の疾患状態と関わっている。精神病性スペクトラム障害に頻繁に関わっている扁桃体は、精神病性スペクトラム状態の２つの最も研究されたグループである統合失調症および双極性障害において収束性精神基質および多様な神経基質を解明するための中心として働く。

【０３７１】

ｆ．嗅内皮質

嗅内皮質（ＥＣ）は、鼻周囲皮質および海馬傍回皮質（ＰＲＣ、ＰＨＣ）から海馬（Ｈ

Ｃ）へ物体関連情報および空間情報を中継する。嗅内皮質は、基底核に弱く投射する。嗅内皮質からの遠心性線維は、外側核を通るが、線維が核内にシナプスまたは末端神経叢を形成するか否かは明らかではない。扁桃体から嗅内皮質への投射は、主に外側核から生じ、皮質の前側部分に最も頑強に伝えられる。皮質の他の領域へのその投射とは異なり、基底核は、嗅内皮質へ弱い投射しか与えない。海馬へのすべての皮質投射の３分の２が、嗅内皮質を通って中継される。嗅内皮質が、海馬へ提供するのと同じ情報を扁桃体へ提供するか否かは知られていない。

【０３７２】

嗅内皮質は、近心側頭葉に位置し、海馬と新皮質の間のインターフェースとして作用する。海馬形成の一部と考えられてきた。内側側頭領域の中央部分を占め、海馬傍回の一部および迂回回２を含む。海馬との繋がりによってますます定義されるようになっている。

【０３７３】

ｇ．前頭皮質

前頭皮質（ＦＣ）は、前頭葉の前部を対象とする大脳皮質である。この脳領域は、複雑な認知行動の計画、人格表現、意思決定、社会的行動の調整に関わっている。この脳領域の基本的な活動は、内部の目標に従って思考や行動を組織化することである。前頭皮質領域によって実施される機能は、実行機能と呼ばれる。

【０３７４】

ｈ．線条体：尾状核および被殻

大脳基底核内の２つの皮質下核、両側尾状核および両側被殻は、線条体を形成する。尾状核は、主に、情動表出の制御、報酬処理、意思決定および実行機能に関与しており、被殻は、主に、運動機能の関係書類の実施とは独立して、制御の観点から計画および生成および精製と関連している。前頭線条体回路内の尾状核および被殻の戦略的位置および繋がりのために、これらの核の形態学的変化は、パーキンソン病の患者の臨床機能と関連づけられてきた。

【０３７５】

ｉ．側坐核

側坐核は、動機づけと活動の間の神経インターフェースと考えられており、食物摂取、性的行動、報酬に動機づけされた行動、ストレス関連行動および物質依存において重要な役割を有する。いくつかの認知、情動および精神運動機能に関与しており、一部の精神病理において変更されている。しかし、最も一般的な、最も重症の精神障害、例えば、うつ病、統合失調症、強迫性障害および他の不安障害のうちいくつかに、ならびに薬物乱用、アルコール依存症および喫煙を含む嗜癖に関与している。側坐核はまた、他の精神障害、例えば、双極性障害、注意欠如／多動性障害および外傷後ストレス障害においても役割を有する。側坐核深部脳刺激はまた、抗うつおよび抗不安効果ならびに重症抵抗性うつ病を患う患者における生活の質の改善と関連している。最後に、側坐核深部脳刺激は、チックを含むトゥレット症候群の運動徴候の著しい低減で、トゥレット症候群のすべての表現形構成要素にとって有益であると証明されている。

【０３７６】

ｊ．視床

視床は、高度な神経機能、例えば、言語、認知、記憶および知能に関係している。クロイツフェルトヤコブ病を患う患者の視床中の連合核（ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｎｕｃｌｅｉ）および知覚中継核において、肥大性アストログリアの増殖を伴う重症神経細胞喪失が観察されている。脳画像化研究では、統合失調症の患者の視床において、視床、特に、背内側核の体積低減およびグルコース代謝の分解が観察された。統合失調症は、皮質下神経伝達物質不均衡症候群であると考えられてきた。統合失調症は、大脳皮質－小脳－視床－皮質回路（ＣＣＴＣＣ）の機能不全によって誘導される誤った繋がりの症候群または認知測定障害として説明されている。

【０３７７】

ｋ．視床下部

視床下部は、ＣＲＨ（コルチコトロピン放出ホルモン）、ＴＲＨ［サイロトロピン（ｔｙｒｏｔｒｏｐｉｎ）放出ホルモン］、ＧｎＲＨ［ゴナドトロピン放出ホルモンまたは黄体形成放出ホルモン、オキシトシン、バソプレシン、ソマトスタチン（成長ホルモン阻害ホルモン、ＧＨＩＨ）、ＧＨＲＨ（成長ホルモン放出ホルモン）などのいくつかのホルモンの放出による重要な生命維持機能の制御に関与しており、中でも、体温調節の制御、毎日の生理学的周期の維持、食欲の制御、性的行動の管理および情動応答の調節に関与している。

【０３７８】

ｌ．黒質緻密部

病理学的に、パーキンソン病は、黒質の緻密部におけるドーパミン作動性ニューロンの喪失を特徴とする。

【０３７９】

ｍ．海馬

海馬は、学習において、ならびに記憶の形成および定着において非常に重要な役割を有し、情動、恐怖、不安およびストレスの調節において非常に重要に関与している。海馬の研究は、ヒトにおける記憶の研究の中心であった。海馬は、長期間増強および抑制などのシナプス可塑性の多数の例が海馬回路において同定され、実証されているように、神経可塑性の研究のモデルである。

【０３８０】

ｎ．丘

上丘の広範な繋がりのために、上丘は眼球運動の開始ならびにそれらを頭部および頸部の運動と協調させることの主要な中心となる。上丘の上層は、環境の網膜部位マップを含有し、深部層は、サッケードおよび頭部の運動をもたらすネットワークと繋がった運動前野ニューロンを含有する。上丘で収束する聴覚的、体性感覚的および視覚的シグナルが、眼、頭部および身体を動かして、定位行動のために目的の物体に視線を向ける。

【０３８１】

ｏ．橋縫線核

縫線核は高含量のセロトニン（５ＨＴ）を特徴とする。それらは、脳の他の部分への５ＨＴの放出に関与している。例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（ＳＳＲＩ）薬物は、その抗うつ作用を達成するために縫線核に対して作用すると考えられている。

【０３８２】

２．血液脳関門

中枢神経系（ＣＮＳ）疾患および精神障害のための薬物開発は、薬物の副作用、脳の複雑性および特に、血液脳関門（ＢＢＢ）を超えて薬物を送達するための効率的な戦略がないことのために困難である。血液脳関門（ＢＢＢ）は、脳への薬物のアクセスを制限し、親油性薬物を制限する。これに関連して、脳へのデリバリーのための分子の開発は、（１）３Ｄモデルから発見された構造－活性ルール、ヒト身体における薬物の薬物動態にとって重要な分子特性を説明するリピンスキーの５つのルール［Lipinski (2004) Drug Discovery Today: Technologies 1(4):337-34］に一致する標的の結晶構造に従う活性分子の設計、ならびに（２）ＢＢＢを超える分子の浸透の最適化を必要とし、次に、分子量、親油性、Ｈ結合ドナーおよびアクセプター、電荷および極性表面積に応じて変わる、ＢＢＢによって課せられる特定の制約のために困難である。

【０３８３】

これらの問題は、ＢＢＢを迂回するか、またはＢＢＢによって制限されない、ＭＥＶのＩＮデリバリーによって解決され得る。血液脳関門（ＢＢＢ）は、脳の毛細血管のレベルで内皮細胞によって形成される。これらの内皮細胞は、血管周囲の要素、例えば、基底板および密接に関連するアストロサイトのエンドフィートの突起、血管周囲のニューロン（図４７において介在ニューロンによって表される）および周皮細胞と相互作用して、機能的ＢＢＢを形成する。脳の内皮細胞は、それらが、傍細胞経路を効果的に密閉するいくつかの膜貫通タンパク質の相互作用によって生成される複雑な密着結合（ＴＪ）を形成する

点で固有である（図４７ｂ）。これらの複雑な分子結合によって、極性分子にとって、それらが脳の微小環境を調節するＢＢＢの輸送経路によって移動されない限り、脳が実際にアクセス不能になる。また、接着結合（ＡＪ）もあり、それらが結合ゾーンにおいて細胞間相互作用を安定化する。さらに、細胞内および細胞外酵素、例えば、モノアミンオキシダーゼ（ＭＡＯ）、γ－グルタミルトランスペプチダーゼ（γ－ＧＴ）、アルカリホスファターゼ、ペプチダーゼ、ヌクレオチダーゼおよびいくつかのシトクロムＰ４５０酵素の存在が、この動的境界面に代謝活性を与える。抗体、リポタンパク質、タンパク質およびペプチドなどの大きな分子を、受容体媒介性経細胞輸送または非特異的吸着媒介性経細胞輸送によって中心コンパートメントに移動することができる。含まれるのは、経細胞輸送に関与している、タンパク質であり、インスリンの受容体、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）、鉄トランスフェリン（Ｔｆ）およびレプチンである。他のものとして、例えば、多剤耐性関連タンパク質ファミリー、例えば、Ｐ－糖タンパク質が挙げられる。

【０３８４】

可溶性分子は、異なる機序によってＢＢＢを超えることができる。いくつかの脂溶性分子は、受動拡散によって脳に入ることができる。この機序では、分子親油性が、一般に、脳における浸透速度および程度を規定する。これらの分子の多くは、普通、ＢＢＢで発現されるいくつかの流出ポンプによって循環系に戻される。アミノ酸、グルコース、ヌクレオシドおよび有機アニオンおよびカチオンなどの小さい極性分子は、担体媒介性輸送によって輸送される。別の機序として、受容体媒介性経細胞輸送があり、これは、大きな分子、例えば、鉄Ｔｆ、インスリンおよびレプチンを輸送する。リピンスキーの５つのルールと同様に、ＢＢＢを超える分子の浸透は、その分子量、親油性、Ｈ結合ドナーおよびアクセプター、電荷および極性表面積に応じて変わる。したがって、少数の疎水性および低分子量分子のみがＢＢＢを超えることができるが、他のものは、ＢＢＢの関門の特徴によって制限され、これによって、脳を標的とする薬物を開発することが困難になる。

【０３８５】

３．脳および標的細胞

中枢神経系（脳および脊髄を含む）は、２つの細胞種：ニューロンおよびグリア細胞から主に構成される。グリア細胞は、いくつかの種類があり、構造的支持、代謝的支持、絶縁および発達の誘導を含むいくつかの非常に重要な機能を果たす。グリア細胞およびニューロンは、いずれかの種類の細胞への治療用カーゴのデリバリーが臨床的に関連するので、両方ともＭＥＶの標的であり得る。グリア細胞における機能障害は、さまざまな脳疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、神経膠芽腫、自閉症および精神障害と関連している。他方、ニューロン変性も、アルツハイマー病およびパーキンソン病ならびに虚血性脳卒中および筋萎縮性側索硬化症およびハンチントン舞踏病を含むいくつかの遺伝的神経変性状態に関与している。両細胞種とも、悪性形質転換を起こして、脳腫瘍、例えば、星状細胞腫、神経膠芽腫および髄芽細胞腫をもたらす可能性がある。

【０３８６】

４．ＭＥＶおよび他のデリバリービヒクルの体内分布間の相違

ＭＥＶは、いずれか他の種類のＥＶおよびナノ粒子とは異なっている。哺乳動物ＥＶは、それらが異なる細胞、組織および臓器から、例えば、幹細胞、樹状細胞、腫瘍細胞および他の供給源から生じるので、ＥＶの極めて不均一な群である。単一哺乳動物ＥＶはなく、各々は異なる特性を有し、別個に開発しなくてはならない。それらは、いくつかの共通の表現型マーカーを共有するが、それらは、構造的に異なっており、インビボで異なるペイロードを保持し、異なる細胞種を起源とする。工業的／医薬的観点から、各種は、多かれ少なかれ、哺乳動物ＥＶの各種について構成されなくてはならない適応したプロセスを必要とし、それらは、生成することが必ずしも日常的または容易ではない。

【０３８７】

ＭＥＶは、本明細書で示されるように、組成物中で均一である。外因的に負荷されるＭＥＶについては、生成および精製のための単一の共通のプロセスによって、外因的に負荷される場合に、異なるペイロード、例えば、小分子、ＲＮＡ生成物、タンパク質、ペプチ

ド、ポリペプチドおよび他のものを保持し得る同一ＭＥＶを使用して無数の生成物が結果として生じ得る。ＭＥＶは、構造および含量は均一である。規制的観点からは、ＭＥＶの外側は同一である（内側のペイロードには関わらず）ので、ＭＥＶは、存在する場合には同一の毒性を共有し、またはそれがない。カーゴ（ペイロード）とは独立してデリバリーの各経路のために製剤を開発することができる。内因的に負荷されたＭＥＶは、構造が同様に均一である。

【０３８８】

ＭＥＶは、投与経路に応じて固有の経路を通ることが本明細書で示され、記載される。例えば、本明細書において別の場所で論じられるように、ＭＥＶは、他の供給源由来のＥＶ、ナノ粒子およびウイルスと比較して、経口投与を介して固有のデリバリーの経路を提供する。鼻腔内投与については、先行技術によって、例えば、

１）ＩＮ投与経路は、脳にアクセスするための、薬物および生物製剤を送達するための適した方法である、

２）哺乳動物起源の細胞外小胞は、ＩＮおよび他の投与経路によってペイロード（タンパク質、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡを含む）を脳に送達すると報告されている。例えば、ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6202788/, ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7409518/, ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8363003/を参照されたい、

３）合成分子／脂質およびグレープフルーツエキソソーム様ナノ粒子から抽出された脂質で製造された合成ナノ粒子（ナノベクターとも呼ばれる）は、ＩＮ投与によってｓｉＲＮＡを脳に送達すると報告されている。これらの合成ナノベクターは、嗅球、海馬、視床、小脳、大脳皮質および線条体に到達すると報告されている、

４）ポリカプロラクトン（ポリカプロラクトンナノ粒子（ＰＣＬ　ＮＰ）およびＰＥＧ改変ＰＣＬ　ＮＰで製造された合成ナノ粒子は、ＩＮ投与によってクルクミン（小分子）を脳に送達すると報告されている。これらの粒子は、三叉神経を介して脳に入ると報告されており、それらは嗅覚神経を通ることはできない、

５）感染性ウイルスならびに内因性細胞内小胞は、軸索輸送を介して脳内を移動すると報告されている、

６）シナプスを超えるウイルスおよび細胞内小胞の通過が実証されている

ということが確立されている。

【０３８９】

以下の表は、本明細書で示され、記載されるようなＭＥＶを使用する結果と対比する、哺乳動物ＥＶを含む他の供給源由来の先行技術の細胞外小胞（ＥＶ）および他のナノ粒子および投与の際のその経路の概要を提供する。ＭＥＶは投与された場合に、他の供給源由来のＥＶとは異なって、他の媒体、例えば、脂質ナノ粒子とは異なって行動することが表から明らかである。これは、投与が鼻腔内投与を介してである場合に特に明らかである（経口投与を介して本明細書で他の場所で論じられるように）。ＭＥＶは、投与の際に固有の経路をたどることは、本明細書で示される表および説明および結果から明らかである。ＭＥＶは、他の供給源由来のＥＶとは異なって行動する。ＭＥＶがたどる経路のために、それらは脳ならびに他の臓器への標的化デリバリーを提供できる。

【０３９０】

番号	ナノ粒子の種類	脳への投与経路	報告された侵入部位	移動経路	経路(標的とされる/到達される脳領域)	参考文献
1	培養哺乳動物細胞由来の EV	鼻腔内	嗅球中の一次位置	神経以外の経路	吻側脳領域	Zhuang *et al.*, Mol Ther. 19(10):1769-1779 (2011).
2	GM 哺乳動物細胞由来の EV	静脈内、全身	N/A	BBB 通過	脳中のニューロン、ミクログリア、オリゴデンドロサイト	Alvarez-Erviti *et al.*, " Nat. Biotechnol. 29(4):341-5 (2011).
3	グレープフルーツ由来のナノベクター(GNV)	鼻腔内	指定されていない	指定されていない	*「GNV の大部分が、肺および脳中に位置していた」*	Wang *et al.*, Nat. Commun. 4:1867 (2013).
4	酵素が負荷された哺乳動物 EV	鼻腔内	嗅覚神経細胞に沿った輸送が示されている	経路は指定されていない。仮説:エキソソーム上のテトラスパニンおよびインテグリンが、標的細胞上の細胞膜と付着できる	主に、大脳前頭皮質、中心溝、および小脳	Haney *et al.*, J. Control Release 207:18-30 (2015).
5	グレープフルーツ由来のナノベクター(GNV)	鼻腔内	嗅球によって	経路は指定されていない、仮説:IN 投与の 1.5 時間以内の GNV の脳への迅速な移動から、神経以外の経路	嗅球、海馬、視床および小脳中の一次位置	Zhuang *et al.*, Mol. Ther. 24(1):96-105 (2016).
6	哺乳動物細胞由来の、金ナノ粒子が負荷された EV	鼻腔内、静脈内	嗅球によって	経路は指定されていない。仮説:神経以外の経路;血液脳関門を超える経細胞輸送も示されている	正常脳における広範な体内分布;虚血様損傷領域における蓄積	Betzer *et al.*, ACS Nano. 11(11):10883-10893 (2017).
7	固体液体ナノ粒子 (SLN)	腹腔内、鼻腔内	指定されていない、仮説:IN 投与について嗅球、IP 投与後 BBB	IN 経路:SLN は、1)嗅覚および三叉神経経路に沿った、直接嗅覚輸送または 2)経粘膜吸収を介した全身	IN:鼻領域、肝臓、脾臓および腎臓、脳中の一部	Esposito *et al.*, Eur J Pharm Biopharm. 115:285-296 (2017).

番号	ナノ粒子の種類	脳への投与経路	報告された侵入部位	移動経路	経路(標的とされる/到達される脳領域)	参考文献
				循環経路によってCNSに到達するIP経路:肝門脈系およびBBB		
8	哺乳動物細胞由来の改変EV	静脈内	N/A	BBB通過	虚血病変領域、ミクログリア、ニューロンおよび星状細胞に侵入	Tian *et al.*, Biomaterials 150:137-149 (2018).
9	グレープフルーツ由来のナノベクター(GNV)	鼻腔内	嗅球によって	指定されていない経路仮説:著者がIN投与の1.5時間以内のGNVの脳への迅速な移動を見出したので、神経以外の経路	嗅球、海馬、視床および小脳中の一次位置	US application publication 20180362974
10	刺激された哺乳動物細胞由来のEV	鼻腔内	指定されていない	EVは、ミクログリア細胞からとられている	ミクログリア、4時間で、主に肺、脳、腸、肝臓および心臓において、24時間で、脳および心臓において、ただし、肺および腸には存在しない	Hu *et al.*, Mol. Ther. Nucleic Acids. 13:450-463 (2018).
11	薬物が負荷された人工リン脂質ベースの小胞	鼻腔内	嗅覚領域	インビトロ実験から、鼻粘膜が示された。仮説:インビボでは全身吸収	大脳における、およびまた嗅球における高い蓄積(10分以内)	Natsheh *et al.*, Drug Deliv. Transl. Res. 8(3):806-819 (2018).
12	ヒト幹細胞由来の、金ナノ粒子が負荷されたEV	鼻腔内	EVの脊髄への遊走は、走化性によるものであるが、EVの侵入は、特定されていない	BBB通過	健康な動物では、脳および嗅球において、傷害のモデルでは脊髄病変	Guo *et al.*, ACS Nano. 13(9):10015-10028 (2019).
13	ヒト幹細胞由来の、金ナノ粒子が負荷されたEV	鼻腔内	EVの脊髄への遊走は、走化性によるものであるが、EVの侵入は、特	BBB通過	健康な動物では、脳および嗅球、傷害のモデルでは脊髄病変	WO2019186558A1

番号	ナノ粒子の種類	脳への投与経路	報告された侵入部位	移動経路	経路(標的とされる/到達される脳領域)	参考文献
			定されていない			
14	酵素が負荷された哺乳動物 EV	くも膜下腔内、鼻腔内、静脈内、腹腔内	指定されていない	指定されていない	視床下部、視床、脳橋、脊髄 *IN 投与後はほとんどない、あるとすれば、DiR シグナル*(6～480 時間にわたって)	Haney *et al*., Cells. 9(5):1273 (2020).
15	ヒト幹細胞由来の EV	海馬内移植、後眼窩静脈注射、鼻腔内	指定されていない。投与経路に応じてかわる:*i.h.*-CA1 放射状層によって遊走する、*r.o.*-三叉神経、*i.n.*-嗅球/三叉神経。	細胞外空間または循環	*大まかに同等のレベルで、脳の種々の小領域*	Ioannides *et al*. J. Cancer Metastisis Treat. 6(15):10.20517/2394-4722 (2020).
16	刺激されたヒト幹細胞由来の EV	鼻腔内	指定されていない、嗅覚および三叉神経経路の可能性が高い。	詳述されていないが、脳における迅速な検出は、神経以外の経路、血液脳関門を超える経細胞輸送を示す	内側海馬の CA1 領域(EV は、*CA1 ミクログリア中に頑強に組み込まれ、ある程度までニューロン中に組み込まれ、ただし、星状細胞には組み込まれない*)	Losurdo *et al*. " Stem Cells Transl Med. 9(9):1068-1084 (2020).
17	ヒト幹細胞由来の EV	鼻腔内	指定されていない、嗅覚および三叉神経経路の可能性が高い。	指定されていない、BBB 通過の可能性が高い	EV は、健康なマウスにおいて *24 時間の期間にわたって脳に蓄積しなかった*;統合失調症のモデルでは、前頭前野に蓄積	Tsivion-Visbord *et al*. Transl. Psychiatry 10(1):305 doi:10.1038 (2020).
18	培養哺乳動物細胞由来の、RNA が負荷された EV	鼻腔内	指定されていない。嗅覚および三叉神経経路。	詳述されていない。脳における迅速な検出は、神経以外の経路を示す;血液脳関門を超える経細胞輸送	ミクログリア、4 時間で、標識された RNA カーゴは、脳において検出可能である	Chivero *et al*. Front Cell Dev Bio. 8:573 doi:10.3389 (2020).

番号	ナノ粒子の種類	脳への投与経路	報告された侵入部位	移動経路	経路(標的とされる/到達される脳領域)	参考文献
19	薬物が負荷された人工多重層小胞	鼻腔内	指定されていない。仮説: 鼻粘膜、嗅覚および三叉神経経路の可能性が高い。	BBB 通過	機能アッセイによって、脳蓄積が確認された	Touitou *et al.* Int. J. Pharm. 580:119243 (2020).
20	酵素が負荷された哺乳動物 EV	鼻腔内	嗅覚神経細胞に沿った輸送が示されている	BBB 通過	主に、大脳前頭皮質、中心溝および小脳	US patent application pub 20200297631 A1
21	培養哺乳動物細胞由来の EV	鼻腔内	嗅球における一次位置	神経以外の経路が示された;BBB を超えることができる	鼻腔内送達は、ミクログリアにおいて蓄積する	US 10,799,457 B2
22	ヒト幹細胞由来の EV	鼻腔内	指定されていない、嗅覚および三叉神経経路の可能性が高い	指定されていない、BBB 通過の可能性が高い	皮質損傷領域(外傷性脳傷害モデル)。	US 10,857,187 B2
23	ヒト幹細胞由来の EV	鼻腔内	指定されていない、嗅覚および三叉神経経路の可能性が高い	BBB 通過	皮質損傷領域(外傷性脳傷害モデル)	Moss *et al.* Neurochem Int. 150:105173 (2021).
24	刺激された哺乳動物細胞由来の EV	鼻腔内	嗅覚および三叉神経経路	機序は明らかではない。 仮説: 傍細胞または経細胞経路による鼻粘膜;BBB 通過	脳および頸部脊髄の吻側部分	Pusic *et al.* PloS one 16(8):e0255778 (2021).
25	ナノ粒子が負荷された天然グレープフルーツ EV	静脈内	全身循環系	BBB 通過	実験的脳腫瘍取り込み	Niu *et al.* Nano Lett. 21(3):1484-1492 (2021).
26	酵素が負荷された哺乳動物 EV	鼻腔内	嗅覚および三叉神経路;鼻粘膜上皮を介した血液	BBB 通過	前頭前野、脳梁および海馬における広範なシグナル	Hayes *et al.* Neurotox. Res. 39(5):1418-1429 (2021).
27	GM 哺乳動物細胞由来の EV	鼻腔内	嗅覚神経細胞に沿った輸送が示されている	BBB 通過	LFA1/ICAM1 相互作用による炎症を起こした脳組織	Zhao *et al.* Cells 11(12):1933 (2022).
28	哺乳動物細胞由来の、	鼻腔内 (複数回投与)	嗅覚および三叉神経経	BBB 通過	脳では、投与の 1 日後	Kutchy *et al.* Front.

番号	ナノ粒子の種類	脳への投与経路	報告された侵入部位	移動経路	経路(標的とされる/到達される脳領域)	参考文献
	磁性ナノ粒子が負荷されたEV		路に沿った鼻腔内灌流			Pharmacol. 13, 819516:1-9 (2022).
29	薬物が負荷された人工ビロソーム(胆汁酸塩ベースのナノ小胞)	鼻腔内 (21日間にわたって毎日投与	指定されていない	BBB通過	機能アッセイのみが、アルツハイマー病のマウスモデルにおける改善を示す	Elsheikh *et al.* Pharmaceutics vol. 14(3):576 (2022).

【０３９１】

ＭＥＶは、他のＥＶとは別個の体内分布を含む特性を有することが、本明細書で示され、記載されている。ＭＥＶが脳に入る経路およびその最終目的地は、他のデリバリービヒクルについて観察されたものとは異なっている。ＩＮ投与によって、ＭＥＶの脳への浸透が可能になる。本明細書において論じられ、実証されたように、ＭＥＶのＩＮ投与の際の脳の浸透の一次経路および体内分布は、三叉神経を介する先行技術のＥＶおよびナノ粒子の体内分布とは対照的に、嗅覚神経（ＯＮ）、僧帽／房飾ニューロンおよび外側嗅索（ＬＯＴ）を介してである。ＭＥＶは、嗅神経細胞（ＯＳＮ）によって内部移行され、頭蓋中の篩板を通り嗅上皮から嗅球へ細胞内を移動する。これは、他のデリバリービヒクルの経路ならびに先行技術の媒体が傍細胞輸送または経細胞輸送によって嗅上皮から脳に輸送されることを示すか、推測され得る先行技術とは対照的である。本明細書で示され、記載されるように、鼻腔内に投与されたＭＥＶは、軸索輸送を介して、より詳しくは、ＬＯＴ回路を通じて僧帽／房飾ニューロンの軸索に沿って１つの脳領域から別のものへ移動する。本明細書で示され、記載されるように、ＭＥＶは、少なくとも３つの段階でシナプス空間を通過する：（１）嗅神経細胞（ＯＳＮ）と、嗅球中の糸球体の内側の僧帽／房飾ニューロンの間のシナプス、（２）僧帽／房飾軸索と、前嗅核、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質を含む、外側嗅索（ＬＯＴ）によって一次コロニー形成された脳領域に存在するニューロンの間のシナプス、ならびに（３）嗅索のそれらの一次領域から求心性の軸索と、嗅索に繋がっている他の脳領域、例えば、皮質、海馬および視床下部におけるニューロンの間のシナプス。

【０３９２】

実施例で示されるように、ＩＮ投与後にＭＥＶが見出される脳領域は、（１）ＬＯＴ中の僧帽および房飾ニューロンによって直接コロニー形成される領域（前嗅核、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質）ならびに（２）一次標的領域と二次的に繋がっている脳中の領域、例えば、皮質、海馬、視床下部と完全に一致する。脳およびＣＮＳの疾患、障害および状態または脳および／もしくはＣＮＳが関わる疾患、障害および状態の処置および／または検出から選択される治療薬および診断薬を用いて標的化され得る脳中のこれらの位置である。

【０３９３】

５．鼻腔内投与

脳の内側の経路および機能の知識が増大するにつれ、また新規治療薬に対するニーズが増大するにつれ、新規のより強力なＣＮＳ薬に対する需用がある。１つの領域として、理解されていない病態形成であるだけではなく、薬物分子が適切な濃度レベルで脳中の標的組織に到達できない神経変性障害がある。ＩＮ投与は、脳の柔組織における治療上有効な薬物濃度のデリバリーの方法を提供できる。鼻腔からの薬物の吸収および細胞外（細胞間）または細胞内（経細胞）経路を介して輸送される方法が、研究中である。細胞内輸送は、嗅神経細胞中へのエンドサイトーシスの第１のステップを含む。ニューロン取り込み後

、分子は、軸索に沿ってシナプスへ移動し、そこでエキソサイトーシスを受け（図２８）、種々のシナプスを通って脳中にさらに輸送される。

【０３９４】

しかし、裸の薬物（保護されていない、被包されていない、ナノ粒子、小胞または他のデリバリービヒクルの内側に負荷されていない）のＩＮデリバリーについては制限がある。裸の薬物のＩＮデリバリーは、小容量（ヒトにおいて２５～２００μＬ）で送達される、活性粘液線毛クリアランス、短い保持時間、鼻腔シトクロムＰ４５０／ペプチダーゼ／プロテアーゼによる酵素分解（偽初回通過効果）、親水性薬についての低浸透性、吸収促進剤の必要性、低い鼻腔上皮ｐＨ、個体間の変動、タンパク質の低いＣＮＳデリバリーおよび鼻腔分泌を有する強力な薬物に限定される。

【０３９５】

ＩＮ投与のために少数の生成物が承認されており、より多くが開発中であり、それらのすべてが小分子である。承認された製品には、１９９７年に承認されたイミトレックス（登録商標）（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）、１９９７年に承認されたミグラナル（ＭＩＧＲＡＮＡＬ）（登録商標）（Ｂａｕｓｃｈ Ｈｅａｌｔｈ Ｃｏｍｐａｎｉｅｓ）、２００３年に承認されたゾーミッグ（登録商標）（Ａｍｎｅａｌ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、２０１６年に承認されたオンゼトラ（ＯＮＺＥＴＲＡ）（登録商標）Ｘ（Ｃｕｒｒａｘ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）および２０１９年に承認されたトシムラ（ＴＯＳＹＭＲＡ）（登録商標）（Ｕｐｓｈｅｒ－Ｓｍｉｔｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）がある。これらの製品はＩＮ経路によって投与されるが、それらは、高度に血管形成された呼吸上皮（嗅上皮ではない）を通って血液に入り、ひとたび、血液中に入ると、それらはさらに血液脳関門を通過する必要がある。嗅上皮に入ることによって血液脳関門を迂回することができるという課題は、今日まで達成されておらず、ＩＮデリバリーの全潜在能力は、まだ捉えられていない。

【０３９６】

嗅覚経路、三叉神経経路および鋤鼻経路は、そうでなければ到達可能ではない、脳のある特定の領域への直接アクセスを提供できる。この経路の最適化ならびに鼻腔薬物投与後の投薬および安全性の完全な理解がさらに必要である。治療薬のＩＮデリバリーは、神経疾患を処置するための将来の展望である。

【０３９７】

ＩＮ経路を通る投与は、脳への医薬の投与のための経路として認識されているが、十分に開発されておらず、効果的に利用もされていない。ほとんどの裸の薬物は、鼻腔上皮において不安定であり、および／または嗅上皮から嗅球への関門を通過することができず、および／または軸索ネットワークに従ってニューロンの内側を効率的に移動して、脳の本質的な特定の領域に到達できない。このような努力は小さい化学分子に対してのみ使用されてきたが、ほとんどの（すべてではないが）生体分子［例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ（ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ）、複雑なタンパク質（抗体）はＩＮ経路を介して投与することができない。したがって、このデリバリー経路を効果的に利用する媒体を開発する必要がある。本明細書で実証されるように、ＭＥＶは、このような媒体を提供する。

【０３９８】

鼻の嗅覚領域は、ＣＮＳが、嗅球と神経性に連結している嗅覚受容体の存在のために末梢環境と接触している身体中の唯一の部分である。嗅覚および三叉神経経路によって、嗅覚領域において活性薬剤が吸収され、ＢＢＢを迂回して脳中に直接移されることが可能になる。

【０３９９】

鼻腔は、呼吸領域（外鼻孔の近く）および嗅覚領域（腔中の高い位置にある）に分けられる［Sahin-Yilmaz et al. (2011) Proc. American Thoracic Society 8:31-39］。鼻腔上皮は、十分に血管形成されており［Sahin-Yilmaz (2011) Proc. American Thoracic Society 8:31-39］、嗅覚領域内で、嗅覚ニューロンは露出し、嗅覚ニューロンを介した脳中への直接的な裸の薬物化合物の輸送を提供する。裸の分子の吸収

は、嗅覚および呼吸上皮で起こる［Lochhead et al. (2012) Advanced Drug Delivery Reviews 64: 614-628］。鼻腔嗅覚領域から嗅球への裸の分子の輸送経路は、支持細胞または露出した嗅神経細胞のいずれかを通る経細胞である。鼻腔の呼吸上皮から脳へのこのような化合物の輸送経路は、三叉神経を介してである［Ying (Dec. 2007 online) Future Neurol.3 no. 1, doi.org/10.2217/14796708.3.1.1; Lochhead et al. (2012) Advanced Drug Delivery Reviews 64: 614-628］。脳への侵入後の他の脳領域への輸送（例えば、嗅球から中脳へ、または三叉神経から脳幹へ）は、主に細胞外の対流性細胞間隙流によって［Lochhead et al. (2012) Advanced Drug Delivery Reviews 64: 614-628］または血管周囲経路を介して［Lochhead et al.(2015) J. Cerebral Blood Flow Metab. 35:371-381, doi.org/10.1038/jcbfm.2014.215］のいずれかによってであると考えられている。

【０４００】

一般に、ラットまたはマウスについて実証された得られた直接的な鼻から脳へのデリバリーによって、相対表面積の相違が適切に考慮されない場合には、ヒトにおける直接的な鼻から脳への輸送が過大評価される。対照的に、鼻腔の呼吸上皮は、ラットでは鼻腔のおよそ５０％を、ヒトでは８０～９０％を覆っている。したがって、霊長類における三叉神経経路による脳へのアクセスは、げっ歯類で実施された実験からは過小評価される可能性がある。

【０４０１】

６．ＭＥＶおよび鼻腔内投与後の脳へのデリバリー

上記でおよび本明細書で論じられるように、鼻腔内投与を含む種々の経路を介した投与の際のＭＥＶの運命は知られておらず、他のデリバリービヒクル、例えば、ナノ粒子および他の供給源由来のＥＶのＩＮ投与を含む投与の輸送および体内分布を説明する先行技術から予測することもできなかった。以下の節においてより詳細に論じられるように、ＭＥＶは、クロレラ属ＭＥＶのＩＮ投与によって例示されるように、ＩＮ投与後に脳に送達されることが本明細書で示され、記載されている。上記で論じられ、実施例において示されるように、ＭＥＶは、嗅神経細胞（ＯＳＮ）の樹状突起によって内部移行され、その後、頭蓋中の篩板を通り嗅上皮から嗅球へ細胞内を通過する。本明細書で示されるように、ＩＮ投与の際のＭＥＶの脳へのデリバリーは、ＭＥＶによる体内分布および脳の浸透において、嗅覚神経（ＯＮ）、僧帽／房飾ニューロンおよび／または外側嗅索（ＬＯＴ）を介して起こる。公知のＥＶは、三叉神経経路を使用すると報告されており、それらは嗅覚神経に入らない、上記の表に記載され、ナノベクターを説明する先行技術の一部は、嗅覚神経、僧帽／房飾またはＬＯＴに言及していない。記載されたように、先行技術において、脳の内側のある領域から別の領域への任意のデリバリービヒクルの移動における軸索輸送の関与の示唆はない。さらに、先行技術において、脳への粒子の侵入および脳の内側でのその移動は、傍細胞または細胞外であることが体系的に示唆されている。したがって、それらの粒子は、脳細胞の間の間質性液または周囲の毛細血管に到達し、その場合、それらはさらにＢＢＢを超える必要がある。本明細書で示されるように、ＭＥＶが通る領域は、僧帽および房飾ニューロンによって直接コロニー形成される領域（すなわち、嗅覚ネットワーク）と一致し、また脳皮質中のそれらの領域は、一次標的領域と二次的に繋がっている。

【０４０２】

７．鼻腔内（ＩＮ）投与後のＭＥＶの輸送および体内分布

ＩＮ投与後のＭＥＶの運命に関する輸送および体内分布研究が実施され、分布経路およびパターンがマッピングされた。例示された研究では、ＭＥＶが、親油性であり、近赤外蛍光シアニン色素であるＤｉＲ（ＤｉＩＣ１８（７）；１，１’－ジオクタデシル－３，３，３’，３’－テトラメチルインドトリカルボシアニンヨージド）で染色された。色素は、近赤外インビボイメージングを用いて検出された脂質膜を標識するのに適している。２つの長い１８－炭素鎖が膜中に挿入され、その結果、特定の安定な小胞染色が得られ、小胞間の色素移行はないか、または最小である。研究は、認識されたげっ歯類モデルにおい

て実施された。

【０４０３】

マウス脳における神経細胞のサイズは変動するが、通常の核の直径は、およそ５～８ミクロンである。ＭＥＶのサイズは、約５０～２００ｎｍであり、中央値直径はＮａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｔｒａｃｋｅｒ　Ａｎａｌｙｓｉｓ（ＮＴＡ）によって測定されたように１２５ｎｍまたは０．１２５ミクロンである。陽性対照スライドからの画像（図２９）から、Ｄｉｒ標識されたＭＥＶの存在および検出性が確認され、ならびにＭＥＶ材料のサイズの均一性が実証される。

【０４０４】

マウスへのＩＮ投与後１時間から８時間、ＭＥＶを脳の以下の領域：（１）嗅球、（２）皮質領域（一次体性感覚性、一次視覚、一次運動、梨状、無顆粒島、前頭、脳梁膨大後部顆粒、側頭連合、聴覚性、嗅内）、（３）扁桃核（基底内側および基底外側扁桃核、扁桃体－海馬領域、扁桃体－梨状移行領域）、（４）視床下部弓状核、（５）乳頭核において観察することができることが本明細書で示されている。ＩＮ投与後１６時間で、ＭＥＶを視床において、皮質においておよび異なるレベルの海馬（海馬采および歯状回）において見ることができる。嗅球は、投与後１６時間まで依然として蛍光ＭＥＶを含有し、これは、ＭＥＶが相当な期間にわたって鼻腔から嗅球／脳中に入り続けている可能性があることを示唆する。

【０４０５】

したがって、インビボモデルにおいて鼻腔内（ＩＮ）投与後、ＭＥＶは、嗅覚ネットワークを通る嗅球（ＯＢ）の投射に対応する脳の領域において、ならびに嗅覚ネットワークに繋がっている他の領域において見出される。このような領域は、梨状葉皮質（焦点性てんかん発作において重要な役割を果たし、一次嗅覚皮質の主要な部分を形成し、嗅覚ネットワークの他の部分と広範な繋がりを有する）ならびに他の皮質領域、例えば、側頭連合野（複合刺激の識別および統合に関与する）、嗅外皮質（作業記憶実施の際にＯＢの制御下にある）ならびに聴覚および嗅覚符号が多感覚調節に付される聴覚皮質を含む。

【０４０６】

（１）ホメオスタシスにおいて中心的な役割を有する視床下部の弓状核、（２）パニック、不安、ストレスおよび嗜癖に関連する行動の中心の扁桃体ならびに（３）パペッツ（Ｐａｐｅｚ）回路内のエピソード記憶処理において極めて重要である乳頭体において最高密度の小胞が見出される。輸送データと一致して、ＩＮ投与後、ＭＥＶは、嗅覚回路網に従って、行動、記憶、情動および環境の知覚に強く関与する脳核に繋がっている種々の脳領域まで輸送される。結果的に、ＭＥＶは、例えば、てんかん、食物摂取、食欲、性的行動、ストレス（ＰＴＳＤ）、不安、うつ病、嗜癖、記憶および他のものと関連するものを含む、非常に多様な脳およびＣＮＳ疾患、障害および状態の治療用ツールであるカーゴを脳に直接送達するために使用できる。それらはまた、診断薬および／またはセラノスティクスのための検出可能なカーゴを保持し、送達するために使用できる。

【０４０７】

データは、ＭＥＶのＩＮ投与が、異なるが特定の脳領域における小胞の漸進的な体内分布に繋がることを示す。この体内分布は、時間依存性であり、脳の吻側から尾側領域まで観察される。ＭＥＶ投与の１時間後、ＭＥＶは、他のより多くの尾側領域ではなく嗅覚神経層においてのみ検出される。投与の２時間後、ＭＥＶは、皮質領域、例えば、一次運動皮質、梨状葉皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質および側頭連合野に到達する。ＭＥＶはまた、扁桃体基底外側核および視床下部弓状核において見出された。蛍光は、同一ブレグマで他の領域では観察されなかった；ブレグマは、脳中の位置と、頭蓋の冠状縫合と矢状縫合の間の接合点の間の距離を測定する単位である。

【０４０８】

島は、ＩＮ投与の際にＭＥＶが迅速に到達する脳の領域の１つであり、多数の精神疾患および神経疾患によって影響を受ける、またはそれに関与するコア領域である。島の解剖

学的および機能的特徴の多くは、げっ歯類および人類にわたって共有され、その結果、げっ歯類モデルは、ヒトのための効果および使用を実証するのに有用である。島は、大規模な脳システムを連結するハブである。島皮質は、感覚、情動、動機づけおよび認知機能を果たす皮質および皮質下脳領域の広範なネットワークへ重い繋がりを有する真の解剖学的統合ハブである（図３０を参照されたい）。島は、すべてのモダリティから重い感覚入力を受け取る。直接視床および水平皮質求心性線維は、身体の外側からの（聴覚性、体性感覚性、嗅覚、味覚および視覚情報）および身体の内側からの（内受容情報）島への情報を保持する。これらの入力のいくつかは、組織分布的に組織化された島感覚領域に投射され、「内臓性島皮質」および「味覚皮質」（一次味覚皮質）および島聴覚性および体性感覚性野をもたらす。これらの感覚領域のうち、その主要な感覚入力のみを処理するものはなく、島のすべての領域が、重い多感覚求心性線維を受け取り、多様式統合部位であると考えることができる。その感覚求心性線維に加えて、島は、辺縁系と相互性の繋がりを作る。例えば、外側および基底外側扁桃体は、島の顆粒および異化粒領域に重く投射され、次いで、それが基底外側、外側および中心扁桃体核に密な遠心性シグナルを送る。島はまた、分界条床核の外側部分、視床の背内側核、視床下部外側野および鼻周囲および外側嗅内皮質を含む海馬傍回領域と繋がっている。島は、前頭脳領域、例えば、前側帯状、眼窩前頭および内側前頭前皮質と相互性に繋がり、これらは、認知、情動および実行機能と関わっており、動機づけおよび報酬と関わる脳の部分、例えば、側坐核および尾状核被殻に投射される。島皮質は、コリン作動性、ドーパミン作動性、セロトニン作動性およびノルアドレナリン作動性求心性線維から強い神経調節性入力を受け取る。

【０４０９】

投与後４時間で、ＭＥＶは、より尾側の脳領域まで移動し、扁桃体の本体、左および右側聴覚皮質、側頭連合野および嗅外皮質に到達する。

【０４１０】

投与後８時間以内で、ＭＥＶは、尾状核被殻、視床、海馬または黒質において観察されず、三叉核のような構造、下丘、被蓋核および傍小脳脚核に対応する調べたほとんどの尾側セクションにおいても観察されず、これは、ＭＥＶは、８時間の時間域内で脳のほとんどの尾側部分に到達しないことを示す。

【０４１１】

分子または他の構造の直接的な鼻から脳への輸送は、嗅覚神経を介して、または三叉神経を介して生じる場合があるということが知られている。嗅覚神経の投射は、嗅球（ＯＢ）において始まり、篩板を透過して、鼻腔の最高部に位置する嗅覚神経上皮の頂端膜側で終結する。嗅覚神経の繊維は、中鼻甲介の前側および後側部分の両方に存在する。他方、呼吸粘膜（鼻腔の壁に位置する）は、感覚および副交感神経三叉神経によって密に神経支配され、嗅覚神経よりもさらにより広範である。感覚上顎枝は、嗅裂を含む最も深い鼻腔セグメントを神経支配する。嗅神経細胞とは異なり、三叉神経終末は、粘膜表面を透過しない。三叉神経終末の密なネットワークへの分子のアクセスは、結果、粘膜層を通過するその能力によって制限される。

【０４１２】

鼻腔から脳への裸の分子の輸送に関与する機序は、周知であり、［^{125}Ｉ］－タンパク質を使用することによって調査されてきた。嗅覚および／または呼吸上皮によって示される「関門」を超える輸送は、細胞内または細胞外経路のいずれかによって生じ得る。嗅上皮を超える細胞内経路は、図２８および３２に示されるように、（ｉ）嗅神経細胞（ＯＳＮ）中へのエンドサイトーシスおよびその後のニューロン内軸索輸送を含むニューロン内輸送およびまたシナプスを超えるニューロン間の嗅球への輸送ならびに（ｉｉ）支持細胞を超えて、粘膜固有層への経細胞輸送（すなわち、経細胞輸送）を含む。

【０４１３】

図２８は、嗅上皮を通る経路を表す。鼻から脳への薬物デリバリーについて４つの異なる経路が記載されている：（１）ＯＳＮ細胞外輸送：化合物は、細胞周囲の組織液を通る細胞間隙流プロセスを介してＯＳＮ（または図には示されていない三叉神経）に沿ってＣ

ＮＳに直接入る、（２）ＯＳＮ細胞内輸送：化合物は、エンドサイトーシスを受け、次いで、ＯＳＮの内側の細胞内構造の十分に組織化された経路によってＣＮＳにシャトル輸送される）、（３）上皮または支持細胞の細胞内輸送：化合物は、支持上皮細胞によるエンドサイトーシスを受け、次いで、細胞内空間を通って移動する、（４）上皮または支持細胞の細胞外経路：化合物は、密着帯（ＺＯ）、クローディン（ＣＬ）およびオクルディン（ＯＣ）のような密着結合を通らなくてはならない。略語：支持細胞（ＳＵＳ）、嗅神経細胞（ＯＳＮ）、嗅神経鞘細胞（ＯＥＣ）、球状基底細胞（ｇｌｏｂｏｓｅ ｂａｓａｌ ｃｅｌｌｓ）（ＧＯＢ）、水平基底細胞（ＨＢＣ）、ボーマン腺（ＢＧ）、篩板（ＣＰ）、嗅球（ＯＢ）。

【０４１４】

図３２は、嗅覚および呼吸上皮からＣＮＳ標的までの経路およびおよその平均距離を示す模式図である。図の参照：Perivascular and Perineural Pathways Involved in Brain Delivery and Distribution of Drugs after Intranasal Administration, Jeffrey J. Lochhead and Thomas P. Davis, Department of Pharmacology, University of Arizona. Pharmaceutics 2019, 11(11):598; doi.org/10.3390/pharmaceutics11110598

【０４１５】

ＯＳＮは、鼻腔経路からある特定のウイルス、例えば、ヘルペス、灰白髄炎、ラブドウイルス、コロナウイルスならびにまた大きな分子、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、小麦胚芽凝集素－西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＷＧＡ－ＨＲＰ）およびアルブミンをエンドサイトーシスし、次いで、それらを嗅球に向けて順行性方向に軸索に沿って細胞内で輸送する能力を有する。ＨＲＰは、液相エンドサイトーシスを介して限定された程度にＯＳＮによって取り込まれるが、ＷＧＡ－ＨＲＰは、吸着性エンドサイトーシスを介してＯＳＮによってより貪欲に内部移行される［Ganger et al. (2018) Pharmaceutics 10:116, doi:103390/10030116］。

【０４１６】

嗅神経細胞（ＯＳＮ）は、いくつかの固有の特質を有する：それらは、遠位上皮およびその樹状突起の先端に位置する細胞体を有する唯一の一次ニューロンであり、いくつかの非運動性微小突起を有する拡大小頭部として終結し、外部環境に直接曝露される上を覆う粘液層中まで遠く延びる［図３１； Son et al. (2021) BMB Reports 54(6):295-304］。

【０４１７】

あるいは、呼吸上皮を超える細胞内経路は、上皮表面近くに位置する末梢三叉神経ニューロン中へのエンドサイトーシスおよびその後の脳幹への細胞内輸送または呼吸上皮の他の細胞を超えて粘膜固有層への経細胞輸送を含み得る（図３２を参照されたい）。ＯＳＮにおいて観察されるように、鼻腔内ＷＧＡ－ＨＲＰは、内部移行され、三叉神経内で神経内に、脳幹まで輸送される。ウイルスおよび細菌はまた、鼻腔経路内の三叉神経構成要素に沿ってＣＮＳに伝達され得る［Lochhead et al. (2012) Advanced Drug Delivery Reviews 64:614-628］。

【０４１８】

本明細書で示され、記載されるデータに基づいて、ＭＥＶは、嗅覚神経および嗅索を通って、脳における嗅覚ネットワーク中に輸送される。研究の期間のために観察されないが、データは、三叉神経を通るＭＥＶの輸送を排除せず、三叉神経を通る輸送は、脳の後側部分（脳橋）において侵入点に到達する前に実質的に長い時間がかかるであろうために、三叉ネットワークを排除できない。しかし、観察された経路は、ＭＥＶに固有である。

【０４１９】

嗅覚または呼吸上皮からＣＮＳまでのそれぞれの距離によって、タンパク質の輸送時間の算出が可能になった。キタカワカマス嗅覚神経の外因性タンパク質の速い（１３０ｍｍ／日）および遅い（３６ｍｍ／日）軸索輸送（３７℃で補正された）の公開データ［Buchner et al. (1987) Neuroscience 22:697-707］を使用することで、ＯＳＮおよ

び三叉神経細胞における同様の輸送速度を仮定して、ＭＥＶの嗅覚ニューロン内の嗅球への細胞内輸送（軸索輸送を介した）は０．７４時間～２．７時間、また三叉神経節細胞内の脳幹への細胞内輸送（軸索輸送を介した）については３．７時間～１３時間かかるはずであると示される。以下に論じられるように、本明細書におけるデータに基づいて、少なくとも投与後研究の期間を通してＭＥＶの脳内浸透における三叉神経の関与を示す証拠はない。

【０４２０】

データは、ＭＥＶが嗅球中の僧帽／房飾細胞から投射された軸索を介して輸送されることを示す。僧帽／房飾細胞の軸索は、束状化され、脳の各側に１つで２つの外側嗅索（ＬＯＴ）を形成する。それらは、中でも前嗅核、嗅結節、梨状葉皮質、外側嗅内皮質、扁桃体皮質核を含む嗅覚皮質の種々の領域に投射される複数の側枝を延ばす（図２８、３１および３３～３５を参照されたい）。

【０４２１】

図３１は、嗅神経細胞（ＯＳＮ）から嗅球（ＯＢ）を通って、僧帽および房飾ニューロンへ、嗅索（ＯＴ）への脳のニューロン経路の模式図を示す。

【０４２２】

図３３は、僧帽および房飾細胞の皮質投射を示す。脳の腹外側図が図式的に示されている［Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb, November 2014. Seminars in Cell and Developmental Biology 35, DOI:10.1016/j.semcdb.2014.07.012, Takeshi Imai, Kyushu University］から再現された）。

【０４２３】

図３４は、ＩＮ投与後の可能性ある経路を示す。本明細書におけるデータに基づいて、ＩＮ投与後のＭＥＶについて、経路は、鼻から嗅上皮へ、次いで、嗅覚ニューロンへであり、次いで、ＭＥＶは、軸索輸送によって嗅球へ、次いで、僧帽および房飾ニューロンによって、嗅覚シグナルを処理する一次嗅覚領域へ輸送される［Selvaraj et al.(2018) Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal 46:2088-2095, doi.org/10.1080/21691401.2017.1420073から再現された図］。

【０４２４】

図３５［「深いチュートリアルおよび情報、嗅覚および味覚、感覚システム、パート１におけるＷｈａｔ－ｗｈｅｎ－ｈｏｗ（Ｗｈａｔ－ｗｈｅｎ－ｈｏｗ ｉｎ Ｄｅｐｔｈ ｔｕｔｏｒｉａｌｓ ａｎｄ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｏｌｆａｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔａｓｔｅ，Ｓｅｎｓｏｒｙ ｓｙｓｔｅｍ，ｐａｒｔ １）」（ｗｈａｔ－ｗｈｅｎ－ｈｏｗ．ｃｏｍ）から再現された］は、図について記載されるようにＯＢに到達した後のＩＮ投与後の経路の模式図を示す。ＩＮ投与後にＭＥＶによって使用された嗅覚路は、以下のとおりである。嗅球（ＯＢ）は、ＣＮＳの第１の領域であり、ここで嗅神経細胞（ＯＳＮ）からの感覚シグナルが処理される。ＯＳＮの軸索は、嗅覚神経中に移動し、表面ＯＢに広がり、嗅覚神経層を形成する。ＯＢの表面近くに位置するのは、糸球体層である。各糸球体は、ＯＳＮからの神経終末のクラスター、房飾細胞、僧帽細胞および傍糸球体細胞と呼ばれるｙ－アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）作動性介在ニューロンの樹状突起を含有する。一次ＯＳＮの末端は、房飾、僧帽および傍糸球体ニューロンの樹状突起を有するシナプスを形成する。僧帽および房飾細胞の軸索の投射が図中に図式的に示されている。嗅索（ＬＯＴ）は、前頭葉の腹側（下方）表面に位置し、ＯＢから生じる。僧帽および房飾細胞からの軸索の最大の束は、ＬＯＴ中のＯＢから出て、一次嗅覚皮質、梨状葉皮質、扁桃体および嗅内皮質に投射される。嗅内および梨状皮質、海馬および扁桃体は、側頭葉中にあり、海馬は、内側側頭葉にある。梨状葉皮質、扁桃体および嗅内皮質中のニューロンは、前頭前皮質に投射される。嗅覚投射系は、投射経路が、他の感覚系の通常である、まず視床においてシナプスを作成することを伴わずに、前頭前皮質に到達できる点で他の感覚系とは異なるということは留意されたい。嗅内皮質中のニューロンは、貫通線維路と呼ば

れる線維束を介して海馬（主要な辺縁系構造）に投射される。したがって、嗅覚入力は、扁桃体についてと同様の方法で海馬機能の調節において重要な役割を果たす。嗅覚投射は、視床においてシナプスを作成することなく前頭前皮質に到達できるが、梨状葉皮質から視床背内側核への直接的な三次入力があり、前頭前皮質を含む前頭葉の広い領域に投射される。僧帽および房飾細胞からの一部の線維は、内側嗅索を介してＬＯＴを出る。これらの軸索は、基底辺縁系前脳構造、例えば、無名質、内側中隔核および分界条床核に同側性に投射される。内側嗅条中の他の線維は、対側性前嗅核から生じる。この核は、各ＯＢの後側部分に位置し、僧帽および房飾細胞から感覚シグナルを受け取り、それらを前交連を介して対側性ＯＢに中継する。

【０４２５】

ＭＥＶカーゴのデリバリーによって標的化され得るか、または影響を受け得る脳のＭＥＶ輸送および領域

扁桃体は、情動処理の態様に関わっている。嗅球の扁桃体の一部の部分領域との直接的な繋がりは、嗅覚処理における特定の役割を示す；扁桃体は、特に、アプローチ／回避応答の学習および記憶を含む嗅覚関連報酬処理におけるアプローチ／回避の状況における、嗅覚刺激に対する迅速な応答（戦闘／逃走を含む）の生成に関与している［Noto et al. (2021) Front Syst Neurosci 15:752320, doi: 10.3389/fnsys.2021.752320］。扁桃体は、生物学的応答を誘発するためにシロシンを含むサイケデリックスによって標的化される領域の１つである。扁桃体はまた、心的外傷後ストレス障害（ＰＴＳＤ）において役割を果たす［Badura-Brack et al. (2018) Psychiatry Research: Neuroimaging 271:135-141; Badura-Brack et al. (2018) Biological Psychology 132:228-232］。これらの知見は、このような応答が関わる疾患、障害および状態の処置のための薬物および他の薬剤を輸送するためにＭＥＶを使用できることを示す。

【０４２６】

乳頭体は、前嗅核との固有の繋がりを有する［Zhou et al. (2019) eLife 8:e47177, doi.org/10.7554/eLife.47177］。乳頭体は、扁桃体および視床を含むパペッツ回路において中心的な役割を有し、認識的記憶がどのように処理されるかにおいて能動的な役割を果たす。

【０４２７】

視床下部弓状核におけるＭＥＶの存在は、嗅球中のグレリン含有ニューロンは、側枝形成された突起をこの脳領域に送るという事実と一致する［Russo et al.(2018) Algorithms 11:134, doi.org/10.3390/a11090134］。グレリンは、摂食行動に関与し、弓状核は、末梢満腹シグナルおよび摂食行動の主要な統合中心である。

【０４２８】

データは、ＭＥＶのＩＮ投与後１６時間までに、それらは脳梁、背側脳弓、背側海馬交連および脳弓と繋がっている海馬の海馬采にあるということを示す。すべてのこれらの領域は、白質を形成する神経の束に対応する。

【０４２９】

嗅球は、いくつかの一次皮質脳構造に直接的に投射され、これらの構造の各々から脳の残部への投射は、広い嗅覚ネットワークを構成する。前嗅核、嗅結節および前頭および側頭梨状皮質を含む、嗅覚ネットワークのこのような一次脳構造の各々は、その後、分離できる全脳ネットワークを形成し、それに繋がる。このようなネットワークは、各部分領域の固有の機能的繋がりのプロファイルを特徴とし、嗅覚系のより高度のプロファイル、大規模処理経路に繋がる［Zhou et al. (2019) Nucleic Acids Research 47(Issue W1):W234-W241, doi.org/10.1093/nar/gkz240］。

【０４３０】

本明細書におけるデータは、嗅覚神経を介し、外側嗅索（ＬＯＴ）を通り、いくつかの脳領域へのＭＥＶの有効なＩＮデリバリーを示す。ＭＥＶは、ＩＮ投与の際、嗅覚神経を介して脳に入る。ＭＥＶは、嗅上皮（鼻腔の最高部の）において嗅神経細胞（ＯＳＮ）の樹状突起によって内部移行され、次いで、ＯＳＮの体内を通り細胞内で嗅球（ＯＢ）に輸

送される。嗅覚神経は、鼻腔の嗅上皮で始まり、嗅球（ＯＢ）で終わる。記載されるように、本明細書におけるデータに基づいて、評価されている投与後時間においてＭＥＶの脳浸透における三叉神経の関与を示す証拠はない。

【０４３１】

嗅球（ＯＢ）の内側は、糸球体であり、ここで入ってくる軸索は、僧帽ニューロンおよび房飾ニューロンの樹状突起を有するＯＳＮシナプスを形成する（ｆｒｏｍ）。僧帽／房飾ニューロンは、ＯＢにおける主要なニューロンである。ＬＯＴは、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体および嗅内皮質から構成される嗅覚系に直接関与する、ＯＢから種々の前側－後側脳領域に移動する僧帽および房飾ニューロンの長い軸索から構成される。僧帽／房飾ニューロンの主な長い軸索の外側分枝は、脳領域の各々（前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体および嗅内皮質）に入り、コロニー形成する。それらの領域の内側で、僧帽／房飾軸索は、前頭皮質、視床下部および海馬を含む他の領域（より多くの二次的嗅覚役割を有する）からのニューロンと繋がっている（シナプスを介して）。

【０４３２】

データは、ＩＮによって投与されたＭＥＶが、脳全体で嗅覚神経および外側嗅索（ＬＯＴ）によって到達される脳領域のすべておよび各々に到達することを示す。ＭＥＶは、ＯＳＮ軸索から糸球体に到達すると、僧帽ニューロンおよび房飾ニューロンに入り、両半球：腹側、外側および背側領域；外部および内部領域中を、前後軸に沿って、外側嗅索（ＬＯＴ）を通じて明確な動態学で明確な経路をたどって移動する。ＩＮ投与後１および１６時間以内にＭＥＶによって到達される脳領域には、前嗅核、嗅結節、蓋紐、梨状葉皮質、扁桃体、嗅内皮質、一次運動皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野、扁桃体基底外側核、視床下部弓状核、脳梁、内包、視床および海馬（海馬采、歯状回）がある。ＭＥＶの体内分布パターンは、したがって、脳全体での嗅覚神経、僧帽／房飾軸索およびＬＯＴ（外側嗅索）の経路および繋がりと完全に一致する。

【０４３３】

図における画像（例えば、図３６を参照されたい）は、ＭＥＶが到達する種々の領域において、ＭＥＶは個々のスポットというより、クラスターで配置されていることを示し、これは、ＭＥＶがそれらをそれらの領域に輸送した軸索終末の周囲の細胞外間隙中に放出されることを示す。ＭＥＶが局在していた脳領域のほとんどは、嗅球回路網に相当する［例えば、Imai (2014) Seminars in Cell & Developmental Biology 35: 180-188; Igarashi et al. (2012) Journal of Neuroscience 32:7970-7985; doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0154-12.2012；およびNagayama et al. (23 September 2010) Front. NeuralCircuits, 23; doi.org/10.3389/fncir.2010.00120を参照されたい）。

【０４３４】

ＭＥＶが到達するほとんどの脳領域は、嗅球からの直接的な軸索の繋がりの結論、例えば、（１）僧帽細胞から視床下部弓状核へのグレリンニューロンの投射［Russo et al. (2018) Experimental Brain Research 236:2223-2229］、（２）嗅球による嗅内皮質活性の直接的な調節［Salimi et al. (2021) The Journal of Physiological Sciences 71:Article number 21］、（３）無顆粒島皮質の嗅球との相反性の繋がり［Gehrlach et al.(2020) eLife 9:e55585］と一致する。他の皮質領域におけるＭＥＶの存在は、嗅球からの直接的な軸索投射によるものではなく、むしろ扁桃体または乳頭体のような領域からの間接的な投射による［扁桃体と運動皮質の間の直接的な繋がり(Grezes et al., 2014)、脳梁膨大後部顆粒皮質とＲＧＣの間の繋がり［Buckwalter et al. (2008) Experimental Brain Research 186:47-57］、体性感覚皮質との繋がり［Macdonald et al. (1998) J. Neurophysiol.79: 474-477］、乳頭体とＲＧＣの間の直接的な繋がり［Groen et al.(2003) J. Comparative Neurology 463: 249-263, doi.org/10.1002/cne.10757］によるものである。他方、聴覚皮質における、および一次視覚皮質におけるＭＥＶの存在は、分布の領域のいずれかからの直

接的なニューロンの繋がりが報告されているので、それぞれ近位嗅内皮質またはＲＣＧからの拡散によると思われる。

【０４３５】

８．ＩＮ投与の際にＭＥＶが到達する嗅覚系および領域の一次および二次回路網

この節では、ＩＮ投与の際にＭＥＶが到達する脳領域は、太字でアスタリスク＊を用いて示されている。嗅神経細胞＊（ＯＳＮ）は、上部鼻腔の中の嗅上皮内に位置する一次感覚ニューロンである。ＯＳＮの軸索は、嗅球＊（ＯＢ）において嗅上皮およびシナプスを離れる。これらの軸索は、篩骨の篩板を通って前側頭蓋窩に入る。僧帽細胞と呼ばれるＯＢ中のニューロンは、嗅覚系の二次感覚ニューロンである。その軸索は、ＯＢを離れて嗅索＊（２つの外側嗅索またはＬＯＴ）に入り、これは、末梢神経ではなく、中枢神経系の一部である。

【０４３６】

ＭＥＶは、皮質領域、例えば、一次運動皮質＊、梨状葉皮質＊、前頭皮質＊、無顆粒島皮質＊、一次体性感覚皮質＊、聴覚皮質＊、脳梁膨大後部顆粒皮質＊、側頭連合野＊、扁桃体基底外側核＊および視床下部弓状核＊に到達する。

【０４３７】

ＬＯＴの一部の線維は、側方に曲がり、嗅覚皮質＊（ＯＢからの出力を受け取るすべての灰白質領域）にそれ自体が投射される。嗅覚皮質の主な領域は、梨状葉皮質＊（眼窩前頭皮質の最も後ろ側の部分）、扁桃体皮質核＊（これは扁桃体の表層部分である）である。嗅覚皮質は、視床下部＊に投射される。視床下部は、嗅覚情報を使用して、摂食、生殖活動および嗅覚シグナルによって引き起こされる自律神経反射に影響を及ぼすと記載されている。

【０４３８】

嗅覚皮質（および味覚皮質）は、眼窩前頭前皮質＊（前頭葉の下表面）に投射され、ここで、フレーバーの感覚のために両感覚モダリティからの情報が組み合わされ得る。辺縁系は、辺縁葉および辺縁葉と繋がりを有する他の皮質領域を含有する。この群の構造は、学習、記憶、情動および動機づけと関連している。辺縁葉は、帯状回、海馬傍回および海馬から構成される。

【０４３９】

帯状回＊は、脳梁＊と隣接する皮質である。海馬傍回の前側の半分は、嗅内皮質＊と呼ばれ、海馬の４つの構成要素のうちの１つである。嗅内皮質は、海馬傍回および海馬＊の両方の一部である。

【０４４０】

海馬の４つの構成要素：嗅内皮質と、海馬の巻き込まれた部分の３つの構成要素－歯状回、アンモン角および海馬台がある。嗅内軸索は、歯状回中の顆粒細胞にシナプス形成し、顆粒細胞軸索は、アンモン角の錐体細胞にシナプス形成し、これは、海馬台の錐体細胞にシナプス形成する。海馬は、事実および事象の最近の記憶を保存するために必要である。すべての感覚皮質からの処理された情報を受け取り、これは、下側頭皮質に投影され、次いで、軸索を嗅内皮質に送る。海馬は、これらの繋がりを通してすべての皮質領域における感覚処理についての情報を受け取る。

【０４４１】

帯および海馬傍回を通り、海馬から乳頭体＊へ、前側視床＊へ、帯状皮質へ、および海馬へと戻る繋がりの一回りは、パペッツ回路として知られている。海馬中の細胞の軸索は、海馬采＊として知られる白質の層を形成する。脳弓は、海馬＊からの主要な投射であり、視床下部＊に潜り込み、乳頭体＊で終結する。乳頭体＊は視床＊の前側核に投射され、これは、その後、軸索を帯状回に送る。帯状回からの軸索は、海馬傍回および嗅内皮質＊へ向かい、海馬＊に戻る回路を完了する。

【０４４２】

嗅上皮における嗅覚ニューロンを介した（三叉神経を介してとは対照的に）、ＭＥＶの観察された鼻から脳への通過は、例えば、以下を含む種々の理由のために有利である：上

部鼻腔（嗅上皮が位置している）の上皮における粘液のターンオーバーが数日で起こり、これは経時的に一貫した薬物吸収を可能にし、支持し、一方で、下部鼻腔（三叉神経の終末を含有する呼吸上皮が位置する）では、ターンオーバーが数分で生じる。

【０４４３】

１時間から８時間の分布の動態分析は、脳の吻側から尾側部分の分析したすべての領域における漸増するＭＥＶの時間依存的密度を示す（図３７～４６）。動態研究によって、脳の内側でのＭＥＶの移動において強力な方向性が示される。脳の前側または前頭部分（嗅球）における入口部位から、すべて僧帽／房飾ニューロンの軸索に沿ってより後側または遠位部分、それらがコロニー形成する領域およびその天然ネットワーク中の第２の領域へのＭＥＶの明確な移動がある。

【０４４４】

ニューロンオルガネラおよびミトコンドリアならびに内因性細胞内小胞（ニューロンの細胞内）は、軸索輸送の、十分に開発され構造化された機序を介して移動する。軸索輸送の機序および根底にある構造はまた、例えば、ヘルペスウイルス、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２および他のものなどのウイルスによって、それらが例えば、嗅覚神経などの神経に感染して、内部脳構造へ移動し、感染を拡大する場合に使用される。軸索輸送を介した感染ウイルスおよび細胞内ニューロン小胞移動は、シナプス接合部を通り越し、ニューロンから別のニューロンへ移動することができる。

【０４４５】

本明細書で示され、記載されるように、ＭＥＶは、軸索輸送を介して細胞内で移動し、シナプスを、少なくとも（ｉ）ＯＳＮと僧帽／房飾ニューロンの間のシナプス、（ｉｉ）ＬＯＴによってコロニー形成された種々の脳領域における僧帽／房飾ニューロンと局所ニューロンの間のシナプス、ならびに（ｉｉｉ）ＬＯＴによってコロニー形成された脳領域中のニューロンと前頭皮質、海馬および視床下部由来のニューロンの間のシナプスを超えることができる。嗅上皮から脳へ通過する代替方法は、傍細胞輸送または経細胞輸送であったが、これらの種類の輸送は、観察されたデータと同等ではない。

【０４４６】

要約すると、ＭＥＶはＩＮ投与の際、嗅神経細胞（ＯＳＮ）の樹状突起によって内部移行され、嗅上皮から嗅球まで、頭蓋中の篩板を通って細胞内で移動する［嗅神経細胞（ＯＳＮ）の内側］。嗅覚神経（ＯＮ）、僧帽／房飾ニューロンおよび外側嗅索（ＬＯＴ）は、ＭＥＶによる脳の体内分布および浸透に関与する主要な動作主体である。ＭＥＶは、ある脳領域から別のものへ軸索輸送を介して、より詳しくは、ＬＯＴ回路中を僧帽／房飾ニューロンの軸索に沿って移動する。

【０４４７】

ＩＮ投与の際にＭＥＶが主に到達する脳領域と、一部の精神賦活性薬、例えば、サイケデリックス、例えば、シロシビンおよび／またはシロシビン誘導体ならびにＣＮＳを処置するための他の薬物の標的部位である領域の間には強力な相関がある。ＭＥＶは、本明細書で記載されるように、抗うつまたはその他の活性のような生物活性が誘発される脳中の標的部位へのシロシビン誘導体などのカーゴのデリバリーのために使用できる。

【０４４８】

９．脳へのＩＮ投与を介したＭＥＶのデリバリー－例示的生物活性カーゴおよびその使用

カーゴが負荷されたＭＥＶを、脳障害、精神障害、認知症、脳がん、脳外傷、脳傷害の処置のために、脳が関与している任意の疾患、障害または状態の処置のために使用し、鼻腔内に投与できる。ＭＥＶはまた、脳障害、例えば、がんを検出するための診断のために、また処置をモニタリングするために使用できる。一般に、ＭＥＶは、ヒトの処置のために使用されるが、動物がヒトと同様または同一の脳関連障害を患うことが多いので、それらは動物の処置のために使用できる。脳デリバリーのために、カーゴは、一般に、脳および／またはＣＮＳの疾患、障害および状態に影響を及ぼす、またはそれを処置する、またはそれを検出する分子（小分子薬物、タンパク質、核酸および他のもの）を含む。

【０４４９】
脳が関与する疾患、障害および状態には、例えば、不安障害（パニック障害、社会不安、恐怖と関連する障害および全般性不安障害）；注意欠如多動性障害（不注意型、活動亢進－衝動型、組合せ型）；自閉症スペクトラム障害［アスペルガー症候群、小児期崩壊性障害（ＣＤＤ）、カナー症候群、広汎性発達障害（ＰＤＤ－ＮＯＳ）］；双極性障害（双極性障害Ｉ型、双極性障害ＩＩ型、混合特徴を有する双極性、季節性パターン大うつ病を有する双極性、循環気質、迅速循環性双極性）；摂食障害［神経性拒食症、神経性過食症、筋肉異形症、過食性障害、他の特定の摂食障害または栄養補給障害（ＯＳＦＥＤ）、強迫性過食、プラダーウィリー症候群、糖尿病過食、神経性オルトレキシア、選択的摂食、ドランクオレキシア、妊娠中の食欲不振）；人格障害［非社会性人格障害、境界性人格障害、演技性人格障害、自己愛性人格障害、回避性人格障害、依存性人格障害、強迫性障害（ＯＣＤ）］；外傷後ストレス障害（ＰＴＳＤ）（急性ストレス障害、無併発性ＰＴＳＤ、複雑性ＰＴＳＤ、併存性ＰＴＳＤ）；統合失調症（緊張型統合失調症、解体型統合失調症、妄想型統合失調症、残遺型統合失調症および未分化型統合失調症）；他のこのような精神および脳関連状態を含むヒト精神障害、また動物障害も含まれる。

【０４５０】
ＭＥＶは、鼻腔内投与および本明細書で記載されるような他の経路を介したデリバリーならびに脳の内側での活性小分子、タンパク質、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）およびＲＮＡの発現を提供する。脳へのデリバリーのためのＭＥＶカーゴは、ＩＮ経路による脳中への、精神賦活性薬剤、酵素、増殖因子、検出可能な生成物、例えば、シロシビン誘導体、ハルミン、テモゾロミド、リバスチグミンローダミン（小分子）；カタラーゼ、ＧＦＰ、神経成長因子（ＮＧＦ）、ＴｒｋＡ（トロポミオシンキナーゼＡ）、神経栄養因子［ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子、ＣＮＴＦ（繊毛様神経栄養因子）、ＥＰＯ、ＩＧＦ－１、ｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子）、ｈＧＨまたはルシフェラーゼ（タンパク質）；ＧＡＢＡＢ１Ａ受容体、ｅＧＦＰまたはルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ）；ＧＡＢＡＢ１Ａ受容体（ｓｉＲＮＡ）、ＰＴＥＮ（ｓｉＲＮＡ；配列番号１３６～１３８）；ｍｉＲ－１７（ｍｉＲＮＡ；配列番号１３９～１４１）；またはＭＡＬＡＴ１（配列番号１４２；ｌｎｃＲＮＡ）を含む。ＭＡＬＡＴ１（配列番号１４２）、転移関連肺腺癌転写物１は、長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃ　ＲＮＡ）である。脳では、長鎖ノンコーディングＲＮＡ　ＭＡＬＡＴ１の過剰発現は、ＡＱＰ４およびＮＦ－κＢ／ＩＬ－６経路を阻害することによって外傷性脳傷害誘導性脳浮腫を回復させる［例えば、Zhang et al., first published 19 June 2019, J. Cellular Biochemistry 120(10):17584-17592, doi.org/10.1002/jcb.29025を参照されたい］。

【０４５１】
ＭＥＶにおけるデリバリーのためのカーゴは、上記の状態のいずれかの処置のために以下の単一分子のいずれか、または組み合わせて含み得る、例えば：５－ヒドロキシトリプタミン－１Ａ（５－ＨＴ１Ａ）および５－ヒドロキシトリプタミン－３（５－ＨＴ３）受容体アゴニスト、例えば、アザピロン、メチルフェニデート、デクスメチルフェニデート、オンダンセトロン［ゾフラン（登録商標）、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ］；アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、例えば、ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン；アルファ－１－受容体アンタゴニスト、例えば、プラゾシン；抗けいれん薬、例えば、ガバペンチン、プレガバリン、トピラメート［商標トポマックス（登録商標）の下で販売される、Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ］、カルバマゼピン、エスリカルバゼピン、レベチラセタム、リカルバゼピン、オキシカルバゼピン、バルプロ酸および誘導体、ラモトリジン；非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）ならびに選択的および非選択的ＣＯＸ－２阻害剤を含む種々の機序の抗炎症薬およびサプリメント、例えば、セレコキシブ、アセチルサリチル酸（アスピリン）、イブプロフェンおよびナプロキセン、インフリキシマブ、オメガ－３ポリ不飽和脂肪酸、ピオグリタゾン、ＴＮＦ－アルファ阻害剤、Ｎ－アセチル－システイン、デキサメタゾン、ミノサイクリン；抗精神病薬、例えば、アリピプラゾール、アセナピン、カリプラジン、クロルプロマジン、クロザピ

ン、ハロペリドール、ルマテペロントシル酸塩［カプリタ（登録商標）、Ｉｎｔｒａ－Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｉｅｓ）、オランザピン、パリペリドン、クエチアピン、リスペリドン、ジプラシドン；ベータ遮断薬、例えば、アザピロン、プロプラノロール；コリン作動性の系をモジュレートする薬物、例えば、ビペリデン、スコポラミン；副腎皮質刺激ホルモン放出因子（ＣＲＦ）アンタゴニスト；ＧＡＢＡ作動性の系をモジュレートする薬物、例えば、ベンゾジアゼピン、ブレキサノロン、Ｓａｇｅ－２１７；グルココルチコイド受容体アゴニスト、例えば，ヒドロコルチゾン；グルタミン酸作動性モジュレーションに関与する薬物、例えば、ＡＧＮ－２４１７５１、ＡＶ－１０１、ＡＶＰ－７８６、ＡＶＰ－９２３、ＡＸＳ－０５、Ｄ－サイクロセリン、デキストロメトルファン、ラパスチネル；グリシンおよびグリシン再取り込み阻害剤、例えば、サルコシン；視床下部－下垂体－副腎（ＨＰＡ）軸をモジュレートする薬物、例えば、フルドロコルチゾン、メチラポン、ミフェプリストンおよびプロバイオティクス；キヌレニン経路（ＫＰ）をモジュレートする薬物；辺縁系および傍辺縁系脳領域をモジュレートする薬物、例えば、カンナビジオール（ＣＢＤ）；メラトニン作動性の系をモジュレートする薬物、例えば、アゴメラチン；脂肪酸、ペプチド、核酸および他の前駆体分子、例えば、アルファ－オメガ脂肪酸、補酵素Ｑ１０、ミオ－イノシトール、メチル葉酸塩、Ｓ－アデノシルメチオニン、システアミンおよびオキシトシン；モノアミンオキシダーゼ阻害剤（ＭＡＯＩ）、例えば、イソカルボキサジド［マルプラン（登録商標）、Ｖａｌｉｄｕｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｉｎｃ．］、フェネルジン［ナルディル（登録商標）、Ｗａｒｎｅｒ－Ｌａｍｂｅｒｔ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ］、セレギリン［エムサム（登録商標）、Ｓｏｍｅｒｓｅｔ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｉｎｃ．］およびトラニルシプロミン［パルネート（登録商標）、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ］；気分安定薬、例えば、リチウム塩、バルプロ酸塩、エブセレンおよびジバルプロエクス；多様式抗うつ剤、例えば、ビラゾドンおよびボルチオキセチン；Ｎ－ニトロソジメチルアミン（ＮＤＭＡ）－受容体アンタゴニスト、例えば、アマンタジン、アールケタミン、ケタミン、メマンチン、リルゾール、エスケタミン；ニューロキニン－１（ＮＫ１）受容体アンタゴニスト；ニューロペプチドＹ（ＮＰＹ）受容体アゴニスト；神経栄養性効果を有する薬物、シロスタゾール、シルデナフィルおよびビルダグリプチン；ノルエピネフリン－ドーパミン再取り込み阻害剤（ＮＤＲＩ）、ブプロピオン［ウェルブトリン（登録商標）、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ；ザイバン（登録商標）、Ｇｌａｘｏ　Ｇｒｏｕｐ　Ｌｔｄ．；アプレンジン（登録商標）、Ｂｉｏｖａｉｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ］；オピエート系に作用する薬物、例えば、ＡＬＫＳ－５４６１、ＡＺＤ２３２７、ＢＴＲＸ－２４６０４０（ＬＹ２９４００９４）、ブプレノルフィン、ＪＮＪ－６７９５３９６４、ナルメフェンおよびナルトレキソン；タンパク質キナーゼＣ阻害剤または抗エストロゲン薬、例えば、エンドキシフェン、タモキシフェンおよびベラパミル；サイケデリック薬、例えば、３，４－メチレンジオキシメタンフェタミン（ＭＤＭＡ）、アヤワスカ、リゼルギン酸ジエチルアミド（ＬＳＤ）、シロシビンおよび／またはその誘導体；選択的セロトニン再取り込み阻害剤（ＳＳＲＩ）、例えば、シタロプラム［セレクサ（登録商標）、Ｆｏｒｅｓｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．）、エスシタロプラム（レクサプロ（登録商標）、Ｆｏｒｅｓｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．］、フルボキサミン、パロキセチン（パキシル（登録商標）；ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ；ペクセバ（登録商標）、Ｓｙｎｔｈｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ　Ｉｎｃ．）およびセルトラリン（ゾロフト（登録商標）、Ｐｆｉｚｅｒ）；選択的ノルエピネフリン輸送体阻害剤、例えば、アトモキセチン；セロトニン－ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（ＳＮＲＩ）、例えば、デスベンラファキシン［プリスティーク（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ］、デュロキセチン［シンバルタ（登録商標）、Ｅｌｉ　Ｌｉｌｙ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ］レボミルナシプラン［フェッツィマ（登録商標）、Ｆｏｒｅｓｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．］およびベンラファクシン；刺激物質、例えば、アデノシン受容体アンタゴニストおよびアルファ－２－アドレナリン作動性受容体アゴニスト、例えば、カフェイン、クロニジン、グアンファシン

、持続放出性アンフェタミンＸＲ－ＯＳ、硫酸デキストロアンフェタミン、リスデキサンフェタミン、メタンフェタミン、混合アンフェタミン塩、ラセミ体硫酸アンフェタミンおよびトリプルビーズ混合アンフェタミン塩；サブスタンスＰ－アンタゴニスト、例えば、ＭＫ０８６９；三環系セロトニン－ノルエピネフリン再取り込み阻害剤、例えば、アミトリプチリン［エラビル（登録商標）、Ｍｅｒｃｋ ａｎｄ Ｃｏ．］、アモキサピン、ブスピロン（ブスパール、Ｂｒｉｓｔｏｌ Ｍｅｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、クロミプラミン、デシプラミン［ノルプラミン（登録商標）、Ｌａｋｅｓｉｄｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ．； Ａｖｅｎｔｉｓ、Ａｖｅｎｔｉｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ］、ドキセピン、イミプラミン［トフラニール（登録商標）、Ｍａｌｌｉｎｃｋｒｏｄｔ ＬＬＣ；Ｃｉｂａ Ｇｅｉｇｙ、Ｍａｒｉａ Ｓｉｓｔｒｏ］、マプロチリン、ノルトリプチリン（パメロール、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｈｏｍｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ ｏｆ Ｄｅｌａｗａｒｅ）、プロトリプチリンおよびトリミプラミン；ならびにバソプレシン１Ｂ（Ｖ１Ｂ）受容体アンタゴニスト、例えば、ＳＳＲ１４９４１５。

【０４５２】

したがって、ＭＥＶは、ＩＮ投与を介して、ペプチド、小ペプチド、タンパク質、ポリペプチド、核酸および小分子を含む治療用および診断用分子を送達できる。このようなカーゴは、それだけには限らないが、任意の種類のＥＶを使用してＩＮ経路によって脳への、抗がん治療薬および診断薬、精神賦活性分子、例えば、シロシビン／シロシン、ハルミン、テモゾロミド、リバスチグミン、ローダミン（小分子）を含む他の分子；カタラーゼ、ＧＦＰ、神経成長因子（ＮＧＦ）、ＴｒｋＡ（トロポミオシンキナーゼＡ）、神経栄養因子［ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子、ＣＮＴＦ（繊毛様神経栄養因子）、ＥＰＯ、ＩＧＦ－１、ｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子）、ｈＧＨおよびルシフェラーゼ（タンパク質）を含む。活性ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡまたはｍｉＲＮＡの脳における発現は、ペイロードとしてＥＶによって運ばれるＧＡＢＡＢ１Ａ受容体、ｅＧＦＰおよびルシフェラーゼ（ｍＲＮＡ）；神経成長因子（ＮＧＦ）、ＴｒｋＡ（トロポミオシンキナーゼＡ）、神経栄養因子（ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子、ＣＮＴＦ（繊毛様神経栄養因子）、ＥＰＯ、ＩＧＦ－１、ｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子）、ｈＧＨ、ＧＡＢＡＢ１Ａ受容体（ｓｉＲＮＡ）、ＰＴＥＮ（ｓｉＲＮＡ）；ｍｉＲ－１７（ｍｉＲＮＡ）；およびＭＡＬＡＴ１（ｌｎｃＲＮＡ）についてである。ＭＡＬＡＴ１を、脳傷害および外傷を処置するために使用でき、また、がんなどの一部の状態では過剰発現され、阻害の標的であり得る。

【０４５３】

目的のものは、精神障害および他のこのような障害の処置のための精神賦活性薬のデリバリーである。このような処置のための例示的生物活性分子およびＭＥＶ中に負荷され得る薬物は、以下の表に示されている。

【０４５４】

生物活性分子または薬物	薬物分類または作用機序	状態
3,4-メチレンジオキシメタン-フェタミン(MDMA;「エクスタシー」)	サイケデリック;セロトニン、ドーパミン、ノルエピネフリンの短期放出を誘導する	不安神経症、双極性障害、統合失調症
5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT_1)受容体アゴニスト	5-ヒドロキシトリプタミン受容体またはセロトニン受容体をアゴナイズする	統合失調症
AGN-241751	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
アゴメラチン	メラトニン作動性(melatonergic)の系をモジュレートする	うつ病
ALKS-5461	オピエート系	うつ病
アマンタジン	NDMA-受容体アンタゴニスト;	自閉症
アミトリプチリン(エラビル(登録商標)、Merck and Co.)	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症、うつ病、摂食障害
アモキサピン	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症、うつ病
アンフェタミン:(持続放出性アンフェタミンXR-OS、EROS;硫酸デキストロアンフェタミン;リスデキサンフェタミン;メタンフェタミン;混合アンフェタミン塩;ラセミ体硫酸アンフェタミン;トリプルビーズ混合アンフェタミン塩)	刺激物質;ドーパミンおよびノルエピネフリンを増大する;モノアミンオキシダーゼを阻害する;ACH、5-HT、オピオイドおよびグルタミン酸経路と相互作用する	ADHD
アリピプラゾール	抗精神病薬	自閉症、双極性障害、境界性人格障害、統合失調症
アールケタミン	NDMA-受容体アンタゴニスト;グルタミン酸作動性モジュレーション	双極性障害
アセナピン	抗精神病薬	双極性障害、統合失調症
アスピリン	抗炎症性;COX-1 および COX-2 阻害剤	双極性障害、うつ病
アトモキセチン	NE トランスポーターを選択的に阻害する;前頭前野における NE およびドーパミンの細胞外シナプスレベルを増大する	ADHD
AV-101	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
AVP-786	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
AVP-923	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
AXS-05	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
アヤワスカ	サイケデリック効果-複数の機序	うつ病
アザピロン	5-HT_{1A}アゴニスト	不安神経症
AZD2327	オピエート系	うつ病
ベンゾジアゼピン	GABA 作動性の系	不安神経症、双極性障害
ベータ遮断薬/アザピロン	ベータ遮断薬	不安神経症
ビペリデン	コリン作動性の系	うつ病
ブレキサノロン	GABA 作動性の系	うつ病

生物活性分子または薬物	薬物分類または作用機序	状態
BTRX-246040 (以前は LY2940094)	オピエート系	うつ病
ブプレノルフィン	オピエート系	うつ病
ブプロピオン(ウェルブトリン(登録商標) 、ザイバン(登録商標)、アプレンジン(登録商標))	ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)	不安神経症、うつ病
ブスピロン (ブスパール、Bristol Myers Squibb)	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	うつ病、摂食障害
カフェイン	刺激物質、アデノシン受容体のアンタゴニズム	OCD
カンナビジオール (CBD)	辺縁系および傍辺縁系脳領域に対して直接的に作用する	不安神経症
カルバマゼピン	抗けいれん薬	双極性障害
カリプラジン	抗精神病薬	双極性障害、統合失調症
セレコキシブ	抗炎症性;COX-2 阻害剤	双極性障害
クロルプロマジン	抗精神病薬	双極性障害、統合失調症
シロスタゾール	神経栄養性効果	うつ病
シタロプラム (セレクサ(登録商標))	選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI)	不安神経症、うつ病、OCD、PTSD
クロミプラミン	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	OCD、自閉症
クロニジン	刺激物質;α-2 受容体アゴニスト	自閉症
クロニジン-XR	シナプス後 α-2-アドレナリン作動性受容体を刺激する	ADHD
クロザピン	抗精神病薬	双極性障害、統合失調症、自閉症
補酵素 Q10	種々;酸化防止剤,代謝を補助する	双極性障害
副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)アンタゴニスト	副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)アンタゴニスト	不安神経症
システアミン	種々;前駆体分子; 神経栄養性効果	うつ病
D-サイクロセリン	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
デシプラミン(ノルプラミン(登録商標))	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症、うつ病
デシプラミン(ノルプラミン(登録商標)、Aventis)	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害	摂食障害
デスベンラファキシン (プリスティーク(登録商標))	セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI)	不安神経症、うつ病
デキサメタゾン	抗炎症性、免疫抑制性;制吐剤;	PTSD
デキストロメトルファン	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
ジバルプロエクス	気分安定薬	境界性人格障害
ドネペジル	アセチルコリンエステラーゼ阻害剤	自閉症
ドキセピン	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症、うつ病
デュロキセチン (シンバルタ(登録商標))	セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (SNRIs)	不安神経症、うつ病、境界性人格障害
エブセレン	気分安定薬;リチウムミメティック	双極性障害

生物活性分子または薬物	薬物分類または作用機序	状態
エンドキシフェン	タンパク質キナーゼ C 阻害剤, 抗エストロゲン薬	双極性障害
エスシタロプラム (レクサプロ(登録商標))	選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)	不安神経症、うつ病、OCD、PTSD、自閉症
エスケタミン	NDMA-受容体アンタゴニスト;グルタミン酸作動性モジュレーション;ミュー-オピオイド	双極性障害、うつ病
エスリカルバゼピン	抗けいれん薬	双極性障害
フルドロコルチゾン	視床下部-下垂体-副腎(HPA)系	うつ病
フルオキセチン (プロザック(登録商標))	選択的セロトニン	不安神経症、うつ病、境界性人格障害、OCD、PTSD、自閉症、摂食障害
フルボキサミン	選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)	うつ病、OCD、自閉症
ガバペンチン	アルファ-デルタカルシウムチャネル抗けいれん薬	不安神経症、PTSD
ガランタミン	アセチルコリンエステラーゼ阻害剤	自閉症
グリシン	種々;アミノ酸、前駆体分子	OCD
グアンファシン-XR	シナプス後アルファ 2A-アドレナリン作動性受容体を刺激する	ADHD
グアンファシン	刺激物質;アルファ-2 受容体アゴニスト	自閉症
ハロペリドール	抗精神病薬	双極性障害、境界性人格障害
ヒドロコルチゾン	グルココルチコイド受容体アゴニスト	PTSD
イブプロフェン	抗炎症性;COX-1 および COX-2 阻害剤	双極性障害、うつ病
イミプラミン (トフラニール(登録商標)、Ciba Geigy)	三環系: セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症、うつ病、摂食障害
インフリキシマブ	抗炎症性;TNF アルファ阻害剤;免疫/炎症系	うつ病
イソカルボキサジド(マルプラン(登録商標))	モノアミンオキシダーゼ阻害剤(MAOI)	不安神経症、うつ病
JNJ-67953964	オピエート系	うつ病
ケタミン	NDMA-受容体アンタゴニスト;グルタミン酸作動性モジュレーション	不安神経症、うつ病、OCD、PTSD、双極性障害
ラモトリジン	抗けいれん薬;ニューロンのグルタミン酸レベルをモジュレートする	双極性障害、OCD、自閉症
レベチラセタム (Levetriracetam)	抗けいれん薬	自閉症
レボミルナシプラン (フェッツィマ(登録商標))	セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI)	不安神経症、うつ病
リカルバゼピン	抗けいれん薬	双極性障害
リチウム塩	気分安定薬	双極性障害
ルマテペロントシル酸塩 (カプリタ(登録商標))	抗精神病薬	双極性障害、統合失調症
リゼルギン酸ジエチルアミド (LSD)	サイケデリック効果-複数の機序	不安神経症、うつ病

生物活性分子または薬物	薬物分類または作用機序	状態
メマンチン	NDMA-受容体アンタゴニスト;グルタミン酸作動性モジュレーション	双極性障害、自閉症、OCD
メチル葉酸塩補充	種々;前駆体分子, 栄養補助	うつ病
メチルフェニデート:デクスメチルフェニデート	5-HT1A 受容体アゴニスト;精神刺激物質	ADHD、自閉症
メチラポン	視床下部-下垂体-副腎(HPA)系	うつ病
ミフェプリストン	視床下部-下垂体-副腎(HPA)系	うつ病
ミノサイクリン	抗炎症性;免疫モジュレーター;アルファ-2 受容体アンタゴニスト;免疫系の活性化	双極性障害、うつ病、OCD、不安神経症
MK-0869	サブスタンス P アンタゴニズム	うつ病
ミオ-イノシトール	種々;前駆体分子は、グルコース取り込みを刺激し、血糖レベルを低下させることができる	OCD
N-アセチル-システイン	抗炎症性、グルタミン酸モジュレート特性を有する抗酸化剤	双極性障害、OCD
ナルメフェン	オピエート系	境界性人格障害
ナルトレキソン	オピエート系	うつ病、自閉症、境界性人格障害
ナプロキセン	抗炎症性;COX-1 および COX-2 阻害剤	双極性障害、うつ病
ニューロキニン-1 (NK_1)アンタゴニスト	ニューロキニン-1 NK(sub.1)アンタゴニスト	不安神経症、うつ病
ニューロペプチド-Y (NPY)受容体アゴニスト	ニューロペプチド Y (NPY)受容体アゴニスト	不安神経症、双極性障害、うつ病、PTSD
ノルトリプチレン (パメロール)	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症、自閉症、うつ病
オランザピン	抗精神病薬	双極性障害、境界性人格障害、PTSD、統合失調症
オメガ-3 ポリ不飽和脂肪酸;魚油	抗炎症性	境界性人格障害、うつ病、PTSD
オンダンセトロン (ゾフラン(登録商標))	5-HT3 受容体アゴニスト;制吐剤	OCD、摂食障害
オキシカルバゼピン	抗けいれん薬	双極性障害
オキシトシン	種々;向社会的ニューロペプチド	不安神経症、自閉症、うつ病、PTSD、統合失調症
パリペリドン	抗精神病薬	双極性障害、境界性人格障害、統合失調症
パロキセチン (パキシル(登録商標)、ペクセバ(登録商標))	選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)	不安神経症、自閉症、うつ病、OCD、PTSD
フェネルジン (ナルディル(登録商標))	モノアミンオキシダーゼ阻害剤(MAOI)	不安神経症、うつ病
ピオグリタゾン	抗炎症性	双極性障害
プラゾシン	アルファ 1-アドレナリン作動性受容体アンタゴニスト	PTSD
プレガバリン	抗けいれん薬	不安神経症
プロバイオティクス	視床下部-下垂体-副腎(HPA)系	不安神経症、双極性障害、うつ病

生物活性分子または薬物	薬物分類または作用機序	状態
プロパノロール	ベータ 1&2 アドレナリン作動性受容体を遮断する	PTSD
プロトリプチリン	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症、うつ病
シロシビン	サイケデリック効果-複数の機序	不安神経症、うつ病
クエチアピン	抗精神病薬	不安神経症、双極性障害、境界性人格障害
ラパスチネル	グルタミン酸作動性モジュレーション	うつ病
リルゾール	NDMA-受容体アンタゴニスト;グルタミン酸作動性モジュレーション	不安神経症、OCD
リスペリドン	抗精神病薬	不安神経症、自閉症、双極性障害、OCD、PTSD、統合失調症
リバスチグミン	アセチルコリンエステラーゼ阻害剤	自閉症
S-アデノシルメチオニン (SAMe)	種々;前駆体分子;	うつ病
SAGE-217	GABA 作動性の系	うつ病
サルコシン	グリシン再取り込み阻害剤	OCD
スコポラミン	コリン作動性の系	うつ病
セレギリン (エムサム(登録商標))	モノアミンオキシダーゼ阻害剤 (MAOI)	不安神経症、うつ病
セルトラリン(ゾロフト(登録商標))	選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI);非定型抗精神病薬	不安神経症、自閉症、境界性人格障害、OCD、PTSD
シルデナフィル	神経栄養性効果	うつ病
SSR149415	バソプレシン 1b 受容体アンタゴニスト	うつ病
タモキシフェン	タンパク質キナーゼ C 阻害剤、抗エストロゲン薬	双極性障害
TNF-α 阻害剤	抗炎症性	双極性障害
トピラメート(トパマックス (Topamax)(登録商標))	抗けいれん薬;ニューロンのグルタミン酸レベルをモジュレートする	双極性障害、摂食障害、OCD、PTSD
トラニルシプロミン(パルネート(登録商標))	モノアミンオキシダーゼ阻害剤 (MAOI)	不安神経症、うつ病
トリミプラミン、四環系:マプロチリン	三環系:セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤	不安神経症
バルプロ酸	気分安定薬	双極性障害
バルプロ酸および誘導体	抗けいれん薬	自閉症、双極性障害、境界性人格障害
バソプレシン(V1B)アンタゴニスト	バソプレシン(V1B)アンタゴニスト	不安神経症、うつ病
ベンラファクシン	セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI)	不安神経症、自閉症、うつ病、OCD、PTSD
ベラパミル	タンパク質キナーゼ C 阻害剤、抗エストロゲン薬	双極性障害
ビラゾドン	多様式抗うつ効果	うつ病
ビルダグリプチン	神経栄養性効果	うつ病

生物活性分子または薬物	薬物分類または作用機序	状態
ボルチオキセチン	多様式抗うつ効果	うつ病
ジプラシドン	抗精神病薬	双極性障害、統合失調症

【０４５５】

したがって、本明細書で提供されるのは、精神状態、脳疾患、ＣＮＳの障害および状態の処置のための鼻腔内投与を介した薬物のデリバリーのために、ＭＥＶを使用する方法である。例として、以下の表に、（１）シロシビン（または誘導体）および他のサイケデリ

ックスの生物活性の作用の部位であると報告された脳領域ならびに（２）ＩＮ経路によって投与された場合にＭＥＶによって同様に標的とされる領域がまとめられている。

【０４５６】

表　幻覚剤および MEV によって標的とされる脳領域の神経解剖学

脳領域	MEV 密度	サイケデリック薬物標的	参考文献
嗅球	+++	5-HT5A 受容体に相当する、嗅球、新皮質および内側手綱に濃縮されている[125I]LSD に対して高親和性を有する結合部位の存在	(Grailhe *et al*. (1999) *Neuron* 22(3):581-591; Increased Exploratory Activity and Altered Response to LSD in Mice Lacking the 5-HT5A Receptor)
一次運動皮質	+	単回用量のシロシビンが、樹状突起リモデリングを引き起こし、内側前頭前野において興奮性神経伝達を増強する	(Shao, Liao *et al*. (2021) *Neuron* 109(16):2535-2544; Psilocybin induces rapid and persistent growth of dendritic spines in frontal cortex in vivo)
梨状葉皮質	++	SD および DOI は、梨状皮質性皮質中の皮質 5HT21 受容体で高度に強力な部分アゴニストとして作用する	(Marek and Aghajanian (1996) *Eur. J. Pharmacol.* 305(1-3):95-100; Alpha 1B-adrenoceptor-mediated excitation of piriform cortical interneurons)
前頭皮質	+	本発明者らは、単回用量のシロシビンが、脊椎形成速度の上昇によって駆動された、脊椎サイズおよび密度のおよそ 10%の増大につながったことを見出した。構造的リモデリングが、24 時間以内に迅速に生じ、後に 1 ヶ月持続した。	(Shao *et al*. (2021) *Neuron* 109(16):2535-2544; Psilocybin induces rapid and persistent growth of dendritic spines in frontal cortex *in vivo*)
		研究は、サイケデリックの単回投与が、分子、ニューロン、シナプスおよび樹状突起レベルで塑性機序において迅速な変化をもたらすことを示す。	(de Vos *et al*. (2021) *Frontiers in Psychiatry* 12:724606; Psychedelics and Neuroplasticity: A Systematic Review Unraveling the Biological Underpinnings of Psychedelics)
無顆粒島皮質	+	シロシビンおよびケタミンは、前側帯状皮質、青斑核、一次視覚野、扁桃体中心核および基底外側部, ならびに前障を含む多数の脳領域において、c-Fos 発現の急性的な同等の上昇をもたらした	(Davoudian *et al*. (2022) bioRxviv 14(3):468-480, doi: doi.org/10.1101/2022.03.18.484437; Shared and distinct brain regions targeted for immediate early gene expression by ketamine and psilocybin)
一次体性感覚皮質	+	最高密度の 5-HT_{2A} 結合部位を含有する領域は、新皮質であり、オートラジオグラフィーシグナルは、異なる皮質領域の細胞構築上の組織化に従って分布された錐体ニューロンに主に対応するバンドパターンを示した	(Lopez-Gimenez and Gonzalez-Maeso (2018) *Curr. Top Behav. Neurosci.* 36:45-73; Hallucinogens and Serotonin 5-HT2A Receptor-Mediated Signaling Pathways)
聴覚皮質	+	サイケデリック薬物はまた、音楽の知覚に対して著しい効果を有する。これは $5HT_{2A}$ シグナル伝達が、蝸牛神経核から前皮	(Barrett *et al*. (2018) *Intl. Rev. Psychiatry* 30(4):350-362; Psychedelics and music: neuroscience and therapeutic implications)

脳領域	MEV密度	サイケデリック薬物標的	参考文献
		質的一次聴覚感覚経路に沿って一次聴覚皮質までの聴覚刺激に対するニューロンの応答を変更すると示されているように驚くべきことではない	
		LSDは、音楽に対する情動的応答を増強する	(Kaelen *et al*. (2015) *Psychopharmacology (Berl)* 232(19):3607-14; LSD enhances the emotional response to music)
		LSD(100μg)の単回経口投与は、音楽に応じて前頭前野における血中酸素レベルを増大し、これは、パーソナル関連処理に関連する脳領域における誇張された活性を示唆した	(Preller *et al*. (2017) *Curr. Biol.* 27(3):451-457; The Fabric of Meaning and Subjective Effects in LSD-Induced States Depend on Serotonin 2A Receptor Activation)
脳梁膨大後部顆粒皮質	+	シロシビンの効果と、遺伝子発現の相関は、NMDA受容体の5-HT2AおよびGluN2Bサブユニットの潜在的な役割を強調した	(Davoudian *et al*. (2022) *bioRxviv* 14(3):468-480, 1.6kkdoi.org/10.1101/2022.03.18.484437; Shared and distinct brain regions targeted for immediate early gene expression by ketamine and psilocybin)
側頭連合野	+		
嗅外皮質	+		
扁桃核	+++	シロシビンを用いる急性処置は、情動処理の間、扁桃体反応性を低下させ、これは、健康なボランティアでは、積極的な気分の増大と関連していた	(Kraehenmann *et al*. (2015) *Biol. Psychiatry* 78(8):572-581; Psilocybin-Induced Decrease in Amygdala Reactivity Correlates with Enhanced Positive Mood in Healthy Volunteers)
		LSDの投与は、おびえた顔が提示される間、左扁桃体および右内側前頭前野の反応性を、プラセボと比較して低減させた	(Mueller *et al*. (2017) *Transl. Psychiatry* 7(4):e1084; Acute effects of LSD on amygdala activity during processing of fearful stimuli in healthy subjects)
		LSD投与は、内側前頭前野、前側帯状皮質、および扁桃体中心核においてFos様免疫反応性の5～8倍の増大をもたらした。	(Gresch *et al*. (2002) *Neuroscience* 114(3):707-713; Lysergic acid diethylamide-induced Fos expression in rat brain: role of serotonin-2A Receptors)
		したがって、本発明者らは、扁桃体の主要な接続性ハブのモジュレーターとしてのシロシビンの効果を示す	(Grimm *et al*. (2018) *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 28(6):691-700; Psilocybin modulates functional connectivity of the amygdala during emotional face discrimination)
		5-HT2A受容体アンタゴニストM100907の扁桃体への局所注入は、恐れの表現に対するDOIの全身投与の効果を逆転し、一方で、扁桃体へのDOIの局	(Pedzich et al. (2022) *Neuropsychopharmacology* 47:1304-1314; Effects of a psychedelic 5-HT2A receptor agonist on anxiety-related behavior and fear processing in mice)

脳領域	MEV密度	サイケデリック薬物標的	参考文献
		所投与は、恐れの表現を抑制するのに十分であった。	
		恐れの知覚と扁桃体反応性の相関は、心理療法中に役立つ可能性がある。	(Dolder *et al*. (2016) *Neuropsychopharmacology* 41(11):2638-2646; LSD Acutely Impairs Fear Recognition and Enhances Emotional Empathy and Sociality)
視床下部弓状核	+++		
乳頭核	+++	ラット脳は、蓋紐および乳頭核において[125I]LSDの高レベルの特異的結合を示した	(Watts *et al*. (1994) *Neurochem. Intl*. 24(6):565-574; Autoradiographic comparison of [125I]LSD-labeled 5-HT2A receptor distribution in rat and guinea pig brain)
		高濃度の[^{125}I]LSD部位が、大脳皮質の第IV層、尾状核被殻、前障、嗅結節、側坐核、上衣、乳頭核および下オリーブにおいて観察された	(Nakada *et al*. (1984) *Neuroscience Letters* 49(1-2):13-18; Localization and characterization by quantitative autoradiography of [125I]LSD binding sites in rat brain)

【０４５７】

サイケデリックスの標的領域およびＩＮ投与の際のＭＥＶの標的領域は一致するので、サイケデリックの投与によって処置される、またはそれによって処置できる精神および他の疾患、障害および状態の処置のためにこれを利用できると本明細書で記載され、示される。サイケデリックスによる処置に応答性の障害として、それだけには限らないが、中でもＰＴＳＤおよびうつ病が挙げられる。ＭＥＶ媒介性の鼻から脳へのデリバリーによる治療用サイケデリックスの投与と関連する利点として、それだけには限らないが、以下が挙げられる：

１）脳に直接入ることによって、全身の全身性曝露、分解、代謝および濾過臓器（肝臓、腎臓）によるクリアランスに繋がる血流を通ることが避けられる。

２）身体（腎臓、腸管粘膜）における酸化不活性化からのシロシビンおよび／またはその誘導体の保護。

３）消化管（消化管は、５－ＨＴ２受容体の最高レベルの発現を有する組織の中にある）および脳におけるものよりも有意に高い受容体のレベルを発現する他の臓器（肝臓、腎臓、心血管）における望ましくない作用を避けること。

４）プロセス（薬物の投与から処置の最後までの）に関与するタイミングのより良好な管理ならびに経口投与および消化管および血液を通過することによって導入される揺らぎによる患者間の可変性が小さいこと。

【０４５８】

本明細書で示されるように、ＭＥＶ媒介性デリバリーは、嗅覚神経を介して脳に入ることを提供し、シロシビンおよび／またはその誘導体などの精神賦活性薬物の、嗅索全体を僧帽／房飾軸索を介し、したがって、関連脳領域への直接的な分布をもたらす。したがって、精神薬、例えば、サイケデリックスおよび他のものの精神状態の処置のための鼻腔内投与を介したデリバリーのためにＭＥＶを使用するための方法が本明細書で提供される。

【０４５９】

Ｉ．ＭＥＶ媒介性細胞内シグナル伝達

他のインビボ治療標的には、一般に、脳に限定されず、疾患、障害または状態に関与す

る受容体が挙げられる。これらには、ＭＥＶがアゴニスト、アンタゴニスト、リガンドまたは他の活性のモジュレーターを送達する、細胞表面受容体および内部移行された受容体が含まれる。目的の標的として、例えば、内部移行されるＴＬＲなどの受容体を含む、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）および他の受容体のモジュレーションが含まれる。このような受容体は、小胞中に内部移行され、ＭＥＶによって送達されるリガンドと相互作用できる。これは、リガンドフラジェリンがＭＥＶを介して細胞中に送達され、フラジェリンが、ＴＬＲ－５を活性化し、次いで、炎症性サイトカインを活性化する実施例において例示される。

【０４６０】

フラジェリンは、移動性細菌における細菌鞭毛の構成要素である保存されたタンパク質である。細菌感染に対する防御を保証する植物におけるおよび動物における免疫系は、フラジェリンまたはその代替（ｓｕｂｒｏｇａｔｅ）ペプチドを認識するように、侵入する細菌に対して反応するように設定されている。したがって、細菌、その鞭毛またはその断片の存在は、推定感染因子に対する宿主の反応に繋がるシグナル伝達経路を引き起こす。植物では、フラジェリンは、ＦＬＳ２受容体（フラジェリンセンシング２受容体）によって認識される。例えば、フラジェリンの、またはその代替ペプチドの存在は、気孔（葉の表面上の呼吸孔）の周囲の葉上皮によって検出される。開いた気孔は、フラジェリンを有する細菌などの感染体の葉の柔組織中への入口のドアである。フラジェリンの存在が葉上皮において検出される場合には、植物は、気孔による細菌の侵入を物理的に防ぐために気孔を直ちに閉じることを含む免疫応答を引き起こす。フラジェリン（または代替ペプチドの）の検出によって始まり、気孔を閉じることで終わるシグナル伝達経路は、フラジェリンの（または代替ペプチドの）ＦＬＳ２受容体への結合によって引き起こされる。膜貫通タンパク質受容体であるＦＬＳ２は、シグナル伝達経路における極めて最初の成分である。植物モデルとしてよく使用される種であるシロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ）では、ＦＬＳ２受容体は、細胞膜において、および植物細胞の内側のエンドソーム小胞の膜において見出される［Beck et al., (2012) The Plant Cell 24(10):4205-4219およびOtegui et al. (2008) Traffic (Copenhagen, Denmark) 9(10):1589-1598を参照されたい］。フラジェリン結合ドメインは、「細胞外間隙」（細胞膜中に位置するＦＬＳ２分子について）、または「エンドソーム内空間」（細胞内エンドソーム小胞中に位置するＦＬＳ２分子について）のいずれかに向けられている。シグナル伝達経路を引き起こすことを任されたＦＬＳ２ドメインは、両方の場合において、膜の細胞質側に向けられている。したがって、フラジェリンの（または代替ペプチドの）ＦＬＳ２への結合によって引き起こされるシグナル伝達経路およびその後の生物学的免疫応答は、引き金となるＦＬＳ２が細胞膜に位置し、細胞表面のフラジェリンを検出するのか、エンドソーム小胞中に位置し、同じエンドソーム小胞内に由来するフラジェリンを検出するのか区別がつかないということを予測できる。ただし、細胞膜に位置するＦＬＳ２が、フラジェリン（または代替ペプチド）を同定し、結合することが単純であり、ＦＬＳ２が、細胞内ＦＬＳ２形態が位置するエンドソーム小胞の内側のフラジェリン（または代替ペプチド）を見出すと期待する可能性は低い。本明細書において実施例で示される実験は、フラジェリンの代替ペプチドであるｆｌｐ２２がエキソロードされているＭＥＶは、期待された生物学的免疫反応、すなわち、おそらくはＦＬＳ２が位置しているエンドソーム小胞中へ生物活性ペプチドを直接送達することによって気孔を直ちに閉じることを引き起こすことができることを実証する。エキソロード反応から残存する可能性がある外部ｆｌｐ２２のいかなる痕跡も破壊するために、ｆｌｐ２２が負荷されたＭＥＶはプロテアーゼを用いて処置されるので、免疫反応を、細胞膜中のＦＬＳ２との遊離ｆｌｐ２２結合によって説明することはできない。さらに、ＭＥＶ（または他のＥＶ）がそのカーゴを細胞外または培養培地中に自発的に放出し、それが、植物の膜においてＦＬＳ２からシグナル伝達経路を引き起こす可能性があるという証拠はない。したがって、観察されたデータは、ｆｌｐ２２が負荷されたＭＥＶが、上皮植物細胞によってエンドサイトーシスを受け、負荷されたＭＥＶを保持する細胞内小胞は、ひとたび細胞の内側に入ると、ＦＬＳ２タ

ンパク質を保持するエンドソーム小胞を見出し、融合する可能性があると仮説を立てない限り、説明することが困難である。

【０４６１】

ｆｌｇ２２ペプチドは、細菌フラジェリンの保存されたＮ末端領域を模倣する２２個のアミノ酸の合成ペプチドである。ｆｌｐ２２は細胞膜ＦＬＳ２と結合し、細菌に対する細胞の防御応答を引き起こすことが示されている。しかし、先行技術では、遊離ｆｌｐ２２がエンドソーム小胞に直接送達され得る、またはそこから、細胞表面から引き起こすものと同じ生物学的応答を引き起こすことができるということは示されていなかった。ペプチドが負荷されたＭＥＶによって媒介される、エンドソーム小胞の内側のペプチドの有効なデリバリーによって、このような現象が起こり、観察されることが可能になる。

【０４６２】

エンドサイトーシスの複数のクラスリン独立性機序が記載され、特性決定されており、その一部は、膜の細胞間隙流および細胞膜ターンオーバーにおいて役割を果たす。ＦＬＳ２は、リガンド結合の際だけでなく、構成的再利用のためにリガンド独立的にも小胞中に内部移行され得ることも知られている（Beck et al., (2012) The Plant Cell 24(10):4205-4219を参照されたい）。ＦＬＳ２シグナル伝達はまた、内部移行後にエンドソームから生じる（Otegui et al. (2008) Traffic (Copenhagen, Denmark) 9(10):1589-1598を参照されたい）。植物エンドソームは、高度に動的なオルガネラであり、したがって、細胞内でリガンドを保持するＭＥＶと受容体を保持する小胞が集合することは可能である。この細胞内相互作用は、ＭＥＶおよびエンドソームの融合をもたらし、ＦＬＳ２のリガンドによって媒介される活性化およびエフェクターシグナル伝達の生成を提供する。エンドソームターンオーバーの同様の機序は、酵母および哺乳動物において存在し、ここでは、エンドソームはまた、液胞型カーゴ受容体をトランスゴルジネットワークに戻して再利用し、液胞／リソソームにおける分解のために膜タンパク質を選別すると知られている。

【０４６３】

これらの結果は、内部移行された受容体の、またはエンドソーム細胞内受容体、例えば、ＦＬＳ２受容体、ＴＬＲもしくは同様のもののリガンド（アゴニストまたはアンタゴニスト）が負荷されたＭＥＶが、内部移行されると、実施例におけるように、それらは、標的受容体が局在する小胞内に到達し、そのペイロードを送達し、したがって、「細胞内」から生物学的応答を誘発することが起きる可能性があることを示す。したがって、ＭＥＶは、アゴニスト／アンタゴニストまたはリガンドを、内部移行された、または細胞内受容体に送達できる。他の代替技術は、このような試みが可能であると示されていない。

【０４６４】

上記の観察結果の重大な関連性は、植物ＦＬＳ２タンパク質が、いわゆるＴＬＲ（またはＴｏｌｌ様受容体）の大きなファミリーのメンバーであるという事実に由来し、ヒト、哺乳動物および他の動物における自然免疫性において、ならびに免疫応答のモジュレーションおよび誘発において非常に重要な役割を果たす。

【０４６５】

植物および動物が病原体を知覚する方法の間に類似性がある。植物は、高感度の知覚システムを有し、これが防御応答を刺激し、動物における自然免疫性は、同様の病原体関連分子パターンの認識に基づいている。フラジェリン知覚にとって必須であるシロイヌナズナ属（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）におけるＦＬＳ２は、動物における感染性疾患に対する防御の第一線であるＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）ファミリーと相同性を共有する［Gomez-Gomez et al. (2002) Trends in plant science 7(6):251-256を参照されたい］。

【０４６６】

ＴＬＲ５は、哺乳動物においてフラジェリン知覚に関与しているが、ＴＬＲ３、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、ＴＬＲ１３（細胞の細胞内小胞中に天然に局在する）を含むこのファミリー由来の他の受容体も、細胞内ＭＥＶ媒介性リガンドデリバリーの標的であり得る。この現象は、特定のリガンドが負荷されたＭＥＶを使用して、異なるＴＬＲファミ

リーメンバーと関連する免疫調節性シグナル伝達経路を誘発するいくつかの治療適応症の処置のための、例えば、感染症（敗血症などのような）のための、炎症（関節リウマチなどのような）のための、ワクチンアジュバント（がんワクチンを含む）として、ならびにアレルギー処置のための道を開く。

【０４６７】

以下の表には、ＴＬＲメンバー、そのリガンドおよびアゴニスト／アンタゴニストおよび下流効果がまとめられている：

【０４６８】

TLR メンバー	リガンド/アゴニスト	作用/下流効果
TLR1	トリアシルリポペプチド (Pam3CSK4)	ミエロイド分化一次応答(MyD88)*および 炎症性サイトカイン、NF-KB および AP-1 の MAL/TIRAP**依存性活性化;リガンドまたは結合される分子の貪食を誘導する
TLR2	ザイモサン、ポリン、モジュリン、リポタンパク質、リポテイコ酸、ジアシルリポペプチド、非定型 LPS、ペプチドグリカン、トリアシルリポペプチド	炎症性サイトカイン、NF-KB および AP-1 の MyD88 および MAL/TIRAP 依存性活性化;リガンドまたは結合される分子の貪食を誘導する
TLR3	dsRNA	炎症性サイトカインおよび I 型 IFN の Trif 依存性誘導;適応免疫を開始する;局所サイトカインバーストおよび局所炎症応答を活性化する;TNF-アルファ、IL-12, MCP1 の生成。
TLR4	マンナン, タキソール, LPS	炎症性サイトカインおよび I 型 IFN の Trif および TRAM 依存性誘導、炎症性サイトカインの TIRAP および MyD88 誘導;嗜癖を促進する;神経炎症性応答
TLR5	細菌フラジェリン、プロフィリン、HMGB1、小分子アゴニスト(CBLB502)	NF-kB および炎症性サイトカインの MyD88 依存性誘導、自然および適応免疫の活性化
TLR6	ザイモサン、ポリン、モジュリン、リポタンパク質、リポテイコ酸、ジアシルリポペプチド(Pam2CSK4)、非定型 LPS、ペプチドグリカン	炎症性サイトカイン、NF-KB および AP-1 の MyD88 および MAL/TIRAP 依存性活性化;リガンドまたは結合される分子の貪食を誘導する
TLR7	イミダゾキノリノン、ロキソリビン、ssRNA、ブロピリミン、レシキモド	炎症性サイトカインおよび I 型 IFN の MyD88 依存性誘導
TLR8	ssRNA、低分子合成化合物	炎症性サイトカインおよび I 型 IFN の MyD88 依存性誘導
TLR9	CpG DNA	炎症性サイトカインおよび I 型 IFN の MyD88 依存性誘導
TLR10	ジアシルおよびトリアシルリポペプチド	IFN-B の TRIF 依存性活性化;炎症促進性サイトカインの TRADD 依存性ならびに/または MyD88 および TIRAP 依存性活性化;IL-1Ra の PI3K/Akt 依存性活性化;MyD88 または MAPK--抗炎症性の直接阻害;
TLR11	プロフィリン様タンパク質、非病原性細菌	炎症性サイトカインの MyD88 依存性誘導

【０４６９】

TLR メンバー	リガンド/アンタゴニスト	作用/下流作用
TLR1	小分子アンタゴニスト(CU-T12-9、MMG-11)	シグナル伝達カスケードの競合阻害; TLR1/2 のヘテロ二量体化の阻害; M1 マクロファージを M2 表現型へ誘導する; 免疫応答の阻害; 炎症性応答の阻害
TLR2	小分子アンタゴニスト(AT1-AT8、CU-CPT22、CU-T12-9、MMG-11、NPT1220-312)、フロレチン、スルホ糖脂質	シグナル伝達カスケードの競合阻害; TLR1/2 のヘテロ二量体化の阻害; M1 マクロファージを M2 表現型へ誘導する; 免疫応答の低減; 炎症応答の低減; TNF-アルファ生成の低減、一酸化窒素(NO)形成の低減;TLR2 誘導性 NF-KB 転写活性の低減; IL-1B,および 1L-18 を含む NLRP3 の低減
TLR3	小分子アンタゴニスト(CU-CPT4a) 、モノクローナル抗体(CNTO4685、CNTO5429)	IL-6、IL-8、MIP1-アルファ、および TNF-アルファの生成の減少
TLR4	小分子アンタゴニスト(ノルビナルトルフィミン、T4ICs、T5342126、シンバスタチン	NF-kB 活性化およびサイトカイン生成の減少、一酸化窒素(NO)形成の低減;嗜癖の減少
TLR5	小分子アンタゴニスト(TH1020)	NF-kB、AP-1 シグナル伝達の減少ならびに炎症促進性サイトカインの誘導の減少;腸内マイクロバイオーム、腫瘍成長、メタボリックシンドローム、肝臓線維症の変更
TLR6	シンバスタチン	サイトカイン生成の低減;マクロファージ活性化の防止
TLR7	クロロキン、ヒドロキシクロロキン、キナクリン	IFN-1 およびサイトカインシグナル伝達の低減、炎症の低減
TLR8	小分子アンタゴニスト(CU-CPT8m、CU-CPT9a)	TNF、IL-6、および IL-10 の誘導の低減
TLR9	小分子アンタゴニスト(NPT1220-312)、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、キナクリン 、抑制性または阻害性オリゴヌクレオチド	単球/マクロファージ細胞における炎症性サイトカインの放出を遮断する;免疫刺激性応答の減少
TLR10	-	-

【０４７０】

したがって、ＭＥＶ媒介性デリバリーおよび発現の治療標的には、疾患、障害または状態に関与する受容体が含まれ、その結果、前記受容体は、細胞表面受容体、または最も重要な、内部移行される受容体もしくはＴＬＲなどのような内部（細胞内エンドソームの）受容体である。ＭＥＶは、このような受容体の活性のアゴニスト、アンタゴニスト、リガンドまたは他のモジュレーターを送達できる。目的の標的には、例えば、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の調節が含まれる。このような受容体は、エンドソーム小胞中に内部移行され、ＭＥＶによって送達されるリガンドと相互作用できる。これは、フラジェリン、その代替物およびＴＬＲの他の公知のリガンドが、ＭＥＶを介して細胞中に送達され、ＴＬＲの活性化が、次いで、炎症性サイトカインを活性化する実施例において例示される。

【実施例】

【０４７１】

Ｊ．実施例

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

［実施例１］

【０４７２】

クロレラ細胞の生産および微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）の単離

Ａ．播種材料のバッチ生産

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

【０４７３】

クロレラは、フラスコ／光バイオリアクター（ＰＢＲ）播種まで栄養寒天スロープ上で保存した。異なる実験のために、４００ｍＬ（フラスコ）～１７０Ｌ（異なる総容量を有するいくつかのＰＢＲ）培養物の間の異なる規模の生産を使用した。この説明は、使用したＰＢＲの最高容量（１７０Ｌ、ＨＥＣＴＯＲ　ＰＢＲ［微細藻類の培養のためにＬａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｏｆ　Ｐｒｏｃｅｓｓ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ－Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ－Ａｇｒｉ－ｆｏｏｄ（ＧＥＰＥＡ）／ＣＮＲＳによって設計された「Ｈｅｃｔｏｒ」光バイオリアクター。参考文献：２０１６００６７＿００１７。製造年：２０１６年。最大サイズ：５６．４３×３７．６６ｃｍ／１７０Ｌ／３００ｄｐｉ］）に関する。

【０４７４】

５リットルＰＢＲに、４Ｌの滅菌ＢＧ１１培地を充填し（例えば、その調製の説明についてはｕｔｅｘ．ｏｒｇ／ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ｂｇ－１１－ｍｅｄｉｕｍを参照されたい、および独立栄養性成長については、以下の表（表１）を参照されたい）、栄養寒天上のストック藻類スロープから直接播種した。次いで、クロレラ株を、以下の培養パラメータを使用してバブルカラムにおいてバッチ培養として増殖させた：２３℃の温度；培地ｐＨ７．５～８．０；光強度：１００μｍｏｌ・ｍ$^{-2}$・ｓ$^{-1}$；光周期：連続。クロレラのバイオマス濃度、比増殖速度およびバイオマス生産性を毎日推定した。通常、６日の連続成長後、培養物は、およそ１．２ｇ／Ｌのバイオマス濃度に到達した。ＨＥＣＴＯＲ　ＰＢＲへのその後の生産スケールアップのために２０Ｌ総収穫量を収集した。

【０４７５】

【表１】

表 1. BG11 培地の組成

	濃度	Ml
塩ミックス	100x	10
鉄*	1000x	1
硝酸塩*	100x	10
微量金属	1000x	1
寒天		14
H_2O		最大 1L
pH 7		

*沈殿の場合には、滅菌化後に添加する。

BG11 培地のストック溶液:

硝酸塩 100×	**g/L**	**MW**	**μM**
$NaNO_3$	150	85	1764.71
鉄 1000×			
Fe-EDTA	3	344.06	8.72
塩ミックス 100×			
K_2PO_4	4	173.17	23.10
$MgSO_4・7H_2O$	7.5	246.48	30.43
$CaCl_2・2H_2O$	3.6	147.01	24.49
Na_2CO_3	2	105.99	18.87
必要に応じて HCl を添加する			
微量金属 1000×	g/L	MW	μM
H_3BO_3	2.9	61.84	46.25
$MnCl_2・4H_2O$	1.8	197.91	9.15
$ZnSO_4・7H_2O$	0.2	287.56	0.77
$Na_2MoO_4・2H_2O$	0.4	241.95	1.61
$CuSO_4・5H_2O$	0.1	249.68	0.32
$CoCl_2・6H_2O$	0.3	237.93	0.14

【０４７６】

Ｂ．準工業的光バイオリアクター（ＰＢＲ）における生産スケールアップ

クロレラ細胞を、１７０リットルの光バイオリアクターシステム（ＨＥＣＴＯＲ）においてさらに培養した。滅菌ＢＧ１１培地（表１を参照されたい）に播種材料を添加して１５０Ｌの総容量にし、細胞を、バブルカラム混合を用いるセミバッチ培養として独立栄養的に増殖させた。以下の培養パラメータを使用した：１８±４℃の温度；培地ｐＨ８．０±０．０５；光強度：１５０～３００μｍｏｌ・ｍ$^{-2}$・ｓ$^{-1}$；光周期として、１５０μｍｏｌ・ｍ－２・ｓ－１、各バッチの最初の３日、２５０μｍｏｌ・ｍ－２・ｓ－１、４日目および５日目と、３００μｍｏｌ・ｍ－２・ｓ－１、６日目および７日目の間、その後収穫：連続、光強度の段階的増大を行う（図１を参照されたい）。

【０４７７】
クロレラのバイオマス濃度、成長速度およびバイオマス生産性を毎日推定した。次いで、栽培の６日目に、およそ１．５ｇ／Ｌのバイオマス濃度のクロレラ収穫を実施した。
【０４７８】
Ｃ．クロレラの３連続バッチの生産
３つの１３０Ｌのセミバッチでクロレラ生産を実施し、下流処置のためにそれから培養体積の約８０％を無菌的に取り出し、滅菌ＢＧ１１培地を補給した。収穫後、過剰の光子取り込みを避けるために光強度を１４０μｍｏｌ・ｍ$^{-2}$・ｓ$^{-1}$に下げた。播種株を１００ｍＬの培養物から１５０Ｌの培養物となるように設定した。微細藻類を含まない小胞濃縮物を抽出する目的で、６～７日持続する３つの連続バッチを実施した。
【０４７９】
培養パラメータモニタリング
１．タンパク質含量の決定
元素分析によって培養物のタンパク質含量を、製造業者によって提供された手順に従ってＶａｒｉｏ ｅｌ ＩＩＩ（Ｖａｒｉｏ ＥＬ、Ｅｌｅｍｅｎｔａｒ Ａｎａｌｙｓｅｒ ｓｙｓｔｅｍｅ、ＧｍｂＨ、ドイツ、ハーナウ）を頼って決定した。最終タンパク質含量を、元素分析によって与えられた窒素のパーセンテージに６．２５を掛けることによって算出した。
【０４８０】
２．クロロフィル含量の推定
培養物サンプルを、Ｈｅｒｍｌｅ遠心機（ＨＥＲＭＬＥ Ｌａｂｏｒｔｅｃｈｎｉｋ ＧｍｂＨ、ドイツ、ヴェーインゲン）を使用して２５４７ｇで１５分間遠心分離した。アセトン中でのビーズミリングによって得られたペレットから色素を抽出した。Ｇｅｎｅｓｙｓ（商標）１０Ｓ ＵＶ－ＶＩＳ分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて抽出物の全吸光度スペクトルを得、標準色素スペクトルに対して反復してデコンポーズして、総クロロフィル含量を得た。
【０４８１】
３．増殖推定
予め秤量した０．７μｍ ＧＦ／Ｃ ６９８フィルター（ＶＷＲ、米国、ペンシルベニア州）を使用して培養物試料を濾過し、ＤＢＳ ６０－３０ 電子水分計（ＫＥＲＮ ＆ ＳＯＨＮ ＧｍｂＨ、ドイツ、バーリンゲン）を使用して一定質量が得られるまで１２０℃で乾燥させることによって、乾重を得た。成長培地塩類を除去するために、すべての乾重試料をミネラル除去水で洗浄した。
【０４８２】
Ｄ．微細藻類細胞外小胞の単離：濃縮されたＭＥＶ調製物の生成（下流処理：清澄および濃縮工程）
光バイオリアクターから収穫した培養物を、細胞除去のために２，７００ｇで５分間室温で遠心分離した。上清を新しいボトル中に移し、２，７００ｇで５分間室温で再度遠心分離した。次いで、透明なＭＥＶ含有溶液を１．２μｍカットオフカートリッジフィルターを使用する膜濾過に付した。濾液を１００ｋＤａの分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）タンジェンシャル濾過システムを使用して濃縮した。各単離工程で、材料をクロロフィルおよび粒状物質について分光光度的に分析した。最終生成物の乾重は、＜０．０１ｇ／Ｌであり、処理された培養物の初期体積に対する濃縮係数は、およそ２０であった。このように得られたＭＥＶの懸濁液を、さらなる精製のために１～１．２Ｌのポケット中で－５０℃で保存した。
【０４８３】
Ｅ．クロレラ属微細藻類細胞外小胞の精製のための詳細なプロトコール
１．節Ｄに記載されるとおりに濃縮され、保存されたＭＥＤの事前に清澄化された調製物（１．０～１．２Ｌ）を、４℃の低温室において一晩解凍する。
２．調製物が解凍された時点で、バイオマスを遠心分離（４℃に温度を設定する）：４

℃で２×１００００ｇで１０分間によって収穫する。
３．上清（ＭＥＶ）を収集し、０．６５μｍフィルター上での真空フィルターによって濾過して、残存する細胞を取り除く。
４．Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ ＶｉｖａＦｌｏｗシステムを使用するタンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）によってＭＥＶを濃縮し、精製する。
ａ．製造業者によって記載されるように約１００ｍｌ／分の流水によってメンブレンを洗浄する。その後、約２００ｍｌ／分（２／２，５バールの圧力読み取り値）で細胞不含培地（ＢＧ－１１培地）を用いて回路を洗浄する。
ｂ．ＭＥＶ調製物（上清）を、約２００ｍｌ／分（２／２，５バールの圧力読み取り値）で回路に流す。
回路およびリザーバー中の残存容量が約２００ｍＬである時点で、ＴＦＦを使用して、ダイアフィルトレーションし、１ＬのＰＢＳを使用して培地をＢＧ－１１からＰＢＳへ変更する。
ｃ．回路およびリザーバー中の残存容量がＰＢＳで約２００ｍｌである時点で、流動を約１００ｍｌ／分（２０分、１バール）に減速する。
ｄ．メンブレン表面上に捕捉された粒子を回収するために、３０～６０ｍｌの残存容量から、流動を５０ｍｌ／分より低い速度に減速し、ＰＢＳ中のＭＥＶが再循環することを３０分間可能にする。
ｅ．次いで、０．４５μｍのフィルターを使用してＭＥＶを濾過し、超遠心によって精製する。
ｆ．濾過されたＭＥＶを超遠心管に充填し、例えば、ＳｏｒＶａｌｌ（商標）ＷＸ ｕｌｔｒａ ８０ ＴＳＴ ２８．３８において１００００００ｇ（２７４００ｒｐｍ）で４℃で１時間遠心分離する（最大１０で加速および減速）。ＭＥＶを含有するペレットを１～２ｍｌのＰＢＳバッファーで再懸濁し、０．２μｍフィルターを使用して濾過滅菌し、ナノ粒子トラッキング分析（ＮＴＡ；１：１０００まで希釈し、その後ＮＴＡ分析）によって粒子を分析する。

【０４８４】

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

ＭＥＶのより高い純度が必要とされる場合には、精製の最後の工程を加える。ＴＦＦによって事前に濃縮され、超遠心によって精製され、ＰＢＳで１ｍＬあたり10^{11}～10^{13}の濃度で製剤化されたＭＥＶを、ＩＺＯＮ製のプレパックカラムｑＥＶ１に播種する。ＰＢＳ溶液でＭＥＶを溶出する。０．５ｍＬの溶出画分を収集する。以下の図２に示されるように、ＭＥＶは第１の画分において回収される。

【０４８５】

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

［実施例２］

【０４８６】

ＭＥＶ特性決定

Ａ．ナノ粒子トラッキング分析（ＮＴＡ）

ＭＥＶを、ＮａｎｏＳｉｇｈｔ ＮＳ５００システム（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用してサイズおよび分散度（サイズ分布）について分析した。この機器は、４８８ｎｍのレーザー、高感度ｓＣＭＯＳカメラおよびシリンジポンプを備えていた。ＭＥＶ試料を、粒子を含まないＰＢＳ（０．０２μｍ濾過したもの）で希釈して、初期試料濃度に応じて１／１０００～１／１００００の希釈に対応する、推奨測定範囲（１～１０×10^{8}粒子／ｍＬ）内の濃度を得た。

【０４８７】

各試料について、５つの６０秒の期間の実験ビデオを、シリンジポンプ速度３０を用いてＮＴＡ　３．４　Ｂｕｉｌｄ　３．４．００３（カメラレベル１５－１６）を使用して分析した。試料あたり合計１５００フレームを調べ、これらは、観察された粒子が赤色十字でマークされ、５つ以下の青色十字が見られるように、適した検出閾値を使用して機器最適化設定を適用することによってキャプチャし、分析した。さらなる設定を「自動」に、粘性を「水」に設定した。

【０４８８】

ＭＥＶの特性決定のために、以下のとおりに実施例１に記載のとおりにＭＥＶ試料を生成し、精製する：ＭＥＶをタンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、ダイアフィルトレーションおよび超遠心によって濃縮し、ＳＥＣによって精製し、０．２２μｍ濾過によって滅菌する。ＳＥＣ精製および濾過後、ＭＥＶをＰＢＳ（１Ｘ）で１０，０００倍希釈し、ＺｅｔａＶｉｅｗ（登録商標）アナライザー（Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｍｅｔｒｉｘ　ＧｍｂＨ、ドイツ、アマーゼー）で測定する。

【０４８９】

以下の表２は、３つの独立実験の結果を示す。

【０４９０】

【表２】

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

【０４９１】

Ｂ．透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）

無傷のＭＥＶの存在を検証するために、調製物を透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）を使用して分析した。固定された（４％のホルムアルデヒド、０．２％のグルタルアルデヒド）ＭＥＶ試料を、１５～２０分間Ｆｏｒｍｖａｒ／炭素コーティングされたグリッドに付着させ、ＰＢＳ、続いて蒸留水で再度洗浄し、最後に０．４％の酢酸ウラニル／１．８％のメチルセルロースを用いて染色し、次いで、乾燥させた。調製物をＪＥＯＬ－ＪＥＭ　１２３０（ＪＥＯＬ　Ｌｔｄ．、日本、東京）を使用して８０ｋＶで観察し、ＭｏｒａｄａデジタルカメラおよびｉＴＥＭソフトウェア（Ｏｌｙｍｐｕｓ、ドイツ、ミュンスター）を使用して画像を獲得した。

【０４９２】

図３に示されたＴＥＭイメージングは、ＭＥＶが直径約５０～２５０ｎｍのサイズの円形形状の小胞であることを実証する。ＭＥＶは、単一の脂質二重層膜で包まれており、その管腔は、わずかに高い電子密度を有し、膜の厚みは、約５～１０ｎｍと推定され、これは、細胞膜の厚みと一致する。図３は、透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）を使用して得られたＭＥＶの例示的画像を示す。

【０４９３】

Ｃ．ＤｉＲ蛍光標識

取り込みおよび内部移行研究のため、ならびにインビボでのさらなる特性決定のために、水中で低い蛍光を有するが、膜に組み込まれると高度に蛍光するようになり、細胞膜内で外側に拡散する、親油性カルボシアニン誘導体（１，１’－ジオクタデシル－３，３，３’，３’－テトラメチルインドトリカルボシアニンヨージド；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）であるＤｉＲを用いてＭＥＶを標識した。Ｐ４０画分（上記のように調製された）の新鮮な試料を、１ｍｌのＢＧ１１培養培地に再懸濁した。試料に５μ

ｌの１ｍｇ／ｍＬのＤｉＲ溶液を添加し、３７℃で１時間インキュベートした。次いで、２８，１００ｒｐｍでＫｏｎｔｒｏｎ　ＴＳＴ　５５．５ローターを使用して、試料を１００，０００ｇで３０分間超遠心した。上清を除去し、ペレットを１ｍｌのＰＢＳで２回洗浄し、１００，０００ｇで３０分間遠心分離した。最後に、ペレットを１ｍｌのＰＢＳに再懸濁した。ＤｉＲ標識されたＭＥＶを４℃で保存し、最大のあり得る蛍光強度を確実にするために迅速に使用した。７５０ｎｍで励起および７８０ｎｍで発光を用いてＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して、標識されたＭＥＶのＤｉＲ蛍光を測定した。

【０４９４】

Ｄ．ＰＫＨ２６蛍光標識

取り込みおよび内部移行研究のため、ならびにインビボでのさらなる特性決定のために、ＭＥＶをＰＫＨ２６（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、４８８ｎｍのレーザーによっても励起され得る、ピーク励起（５５１ｎｍ）および発光（５６７ｎｍ）を有する赤色スペクトルの蛍光色素で代わりに標識する。Ｐ４０画分（上記のように調製された）の新鮮な試料を、１ｍｌのＰＫＨ２６キットからの希釈剤Ｃに再懸濁した。試料に６μｌのＰＫＨ２６色素を添加し、続いて、穏やかにピペッティングすることによって３０秒間連続混合する。室温で５分インキュベートした後、２ｍｌの、１×ＰＢＳ中の１０％のＢＳＡを添加することによって試料をクエンチする。容量を培地で最大８．５ｍｌにし、１．５ｍｌの０．９７１Ｍスクロース溶液を、確実に乱れを作出しないようにしながら、ゆっくり、注意深くピペッティングすることによってチューブの底に添加する。ＰＫＨ２６標識されたＭＥＶは、スクロースクッションの上部に留まる。次いで、試料を、Ｋｏｎｔｒｏｎ　ＴＳＴ　５５．５ローターを使用して２～８℃で１９０，０００ｇで２時間超遠心分離する。上清を除去し、ペレットを１×ＰＢＳとともに穏やかにピペッティングすることによって洗浄し、１００，０００ｇで３０分間再度遠心分離する。最後に、ペレットを１ｍｌの１×ＰＢＳで再懸濁する。ＰＫＨ２６標識されたＭＥＶを４℃で保存し、細胞に添加する前に０．４５μｍフィルターを用いて濾過する。

【０４９５】

Ｅ．フローサイトメトリー実験

ＬＳＲＩＩフローサイトメーターを使用し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ　Ｐｒｏソフトウェア（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カリフォルニア州、サンジョゼ）を用いてフローサイトメトリー分析を行った。直径０．３および１．１μｍのラテックスビーズを調製し、製造業者の推奨に従って使用して、ＭＥＶゲートを規定した。ラテックスビーズは通常、ＭＥＶよりも、より高い屈折率を、したがってフローサイトメトリーによるより低いサイズ検出限界を有するので、獲得の間バックグラウンドノイズを避けるように前方および側方散乱の閾値を調整した。事前に規定されたＭＥＶゲートを、分析の間すべての試料に適用した。

【０４９６】

Ｆ．クロレラＭＥＶ中に存在するタンパク質の同定

１．プロテオミクス解析

クロレラＭＥＶと会合しているタンパク質の同一性および配列を決定するために、ＭＥＶ試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分離に付し、主なタンパク質バンドを小片に切り出し、アセトニトリル／１００ｍＭ重炭酸アンモニウムｐＨ８の１／１（ｖ／ｖ）溶液で数回洗浄した。次いで、タンパク質を５６℃で重炭酸アンモニウムｐＨ８中の１００ｍＭジチオトレイトールを用いて４５分間還元し、次いで、システイン残基を、１００ｍＭの重炭酸アンモニウムｐＨ８中の５５ｍＭヨードアセトアミドを用いて室温、暗所で３０分間アルキル化した。次いで、ゲル片を１００ｍＭの重炭酸アンモニウムｐＨ８中のトリプシン（１：２０の比率でＰＲＯＭＥＧＡ、参照Ｖ５１１Ａ）によって消化し、４℃で４５分間に置き、その後、３７℃で一晩インキュベートした。質量分析計でＬＣ－ＭＳ／ＭＳによってトリプシンペプチドを分析し、クロレラ・ブルガリスのプロテオームを用いるＭＳ／ＭＳシークエンシングから推定されたペプチド配列の比較によってタンパク質を同定した。１０％

より高い配列包括度を示すタンパク質を同定した。
【０４９７】
２．プロテオミクス解析からのタンパク質の配列相同性（ＢＬＡＳＴによる）
以下のタンパク質を、ＮＣＢＩ－Ｂｌａｓｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎを使用して個別に「ブラスト」した。同定されたタンパク質は、クロレラ・ブルガリスに存在すると以前に特性決定されていたか、または他のクロレラ属の種、例えば、クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｄｅｓｉｃｃａｔａ）およびクロレラ・ソロキニアナ由来のタンパク質との中程度もしくは強い相同性を示したかのいずれかであった。
【０４９８】
－　タンパク質ＣＨＬＮＣＤＲＡＦＴ＿２６０１０：≪アセチル－補酵素Ａシンセターゼ≫と注釈がつけられ、アセテート－ＣｏＡリガーゼ、ＡＭＰ結合およびＡＴＰ結合活性を有し（ＭＦ）、アセテートからのアセチル－ＣｏＡ生合成プロセス（解糖、糖新生、ピルビン酸、グリオキシル酸、ジカルボン酸およびプロピオン酸代謝）に関与する（ＢＰ）。
【０４９９】
－　タンパク質ＣＨＬＮＣＤＲＡＦＴ＿５６０１６：’Ｃｌｐ　Ｒドメイン含有タンパク質≫と注釈がつけられ、ＡＴＰ結合およびＡＴＰ加水分解活性を有する（ＭＦ）。
【０５００】
－　タンパク質ａｔｐＡ：’ＡＴＰシンターゼサブユニットアルファ、葉緑体の≫と注釈がつけられ、葉緑体チラコイド膜の成分（ＣＣ）、ＡＴＰ結合、プロトン輸送性ＡＴＰシンターゼ活性、プロトン輸送性ＡＴＰアーゼおよび加水分解酵素活性を有し（ＭＦ）、おそらくは酸化的リン酸化および光合成に関与する（ＢＰ）。
【０５０１】
－　タンパク質ａｔｐＢ：’ＡＴＰシンターゼサブユニットベータ、葉緑体の≫と注釈がつけられ、葉緑体チラコイド膜の成分（ＣＣ）、ＡＴＰ結合、プロトン輸送性ＡＴＰシンターゼ活性、プロトン輸送性ＡＴＰアーゼおよび加水分解酵素活性を有し（ＭＦ）、おそらくは、酸化的リン酸化および光合成に関与する（ＢＰ）。
【０５０２】
－　タンパク質ｔｕｆＡ：’延長因子Ｔｕ≫と注釈がつけられ、葉緑体の成分（ＣＣ）、ＧＴＰ結合、ＧＴＰアーゼおよび翻訳延長因子活性を有する（ＭＦ）。
【０５０３】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００１７６１（包括度４８％）。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００１７６０に対する（８５．６％）、およびクロレラ属の異なる種（バリアビリス、デシカータおよびソロキニアナ）由来の他のタンパク質に対する高度な相同体、これらの相同体のうち３つはクロレラ・ソロキニアナにおいて特性決定されている：それぞれ７３％、８４％および８９％の配列相同性を有する、「クロロフィルａ　ｂ－結合性」、「ＬＨＣＩＩ１型葉緑体のクロロフィルａ　ｂ－結合性」および「ＭＹＳＴ様ヒストンアセチルトランスフェラーゼ１」。
【０５０４】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００２６１４（包括度３３％）。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００１７６０（７２％）およびＤ９Ｑ９８＿００１７６１（７０％）に対する、およびクロレラ属の異なる種（バリアビリス、デシカータおよびソロキニアナ）由来の他のタンパク質に対する高度な相同体、これらの相同体のうち２つはクロレラ・ソロキニアナにおいて特性決定されている：それぞれ８９％および７０％の配列相同性を有する、「クロロフィルａ　ｂ－結合性」、「ＬＨＣＩＩ型の葉緑体のクロロフィルａ　ｂ－結合性」；ならびにこれらの相同体のうち１つはクロレラ・デシカータにおいて特性決定されている：６０％の配列相同性を有する、推定「ＬＨＣＩＩ１型葉緑体のクロロフィルａ　ｂ－結合性」。
【０５０５】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００６２６５（包括度２６％）。クロレラ・ブル

ガリスに相同性なし。クロレラ・ソロキニアナ由来の「ＤＮＡ複製ライセンス化因子ＭＣＭ３」と１つのみ相同性、５６％の配列相同性を有する。
【０５０６】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿０００２６５（包括度１９％）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の２種のタンパク質と２つのみ相同性、１つのみは「鞭毛関連タンパク質」と特性決定され、５８％の配列相同性を有する（クロレラ・ソロキニアナ）。
【０５０７】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００７１８３（包括度１９％）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の５種のタンパク質と５つのみ相同性、その１つのみが「Ｆｅ－同化性１」と特性決定され、４７％の配列相同性を有する、クロレラ・ソロキニアナ）。
【０５０８】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００９６１７（包括度１５％）。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿０００２６およびＤ９Ｑ９８＿００９６１８に対する大部分相同体（それぞれ５５％および３３％の配列相同性を有する）、クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の１１の他のタンパク質と、そのうち５つはクロレラ・ソロキニアナにおいて特性決定され：２つは「溶解性トランスグリコシラーゼ」、２つは「ペプチドグリカン－結合性」および１つは「スポアコートアセンブリードメイン」、それぞれ５２％、３４％、４２％、４２％および５５％の配列相同性を有する。
【０５０９】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００５９５９（包括度１２％）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・バリアビリス、クロレラ・デシカータおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の４種のタンパク質と４つのみ相同性、そのうち２つのみが特性決定されている：「延長因子ミトコンドリア性」（８７％の配列相同性、クロレラ・ソロキニアナ）および「推定延長因子Ｔｕミトコンドリア性」（８６％の配列相同性、クロレラ・デシカータ）。
【０５１０】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００３８１２（包括度１１％）。クロレラ・ブルガリスに相同性なし。クロレラ・バリアビリスおよびクロレラ・デシカータ由来の３種のタンパク質と３つのみの相同性、そのうち１つのみが特性決定されている：「推定鉄取り込み系成分ＥｆｅＯ」（５８％の配列相同性、クロレラ・デシカータ）。
【０５１１】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿０１０６２０、部分［クロレラ・ブルガリス］（包括度１１％）。クロレラ・ブルガリス由来の９種のタンパク質：Ｄ９Ｑ９８＿００４８０６、Ｄ９Ｑ９８＿００４５８２、Ｄ９Ｑ９８＿００４１４３、Ｄ９Ｑ９８＿００２３２６、Ｄ９Ｑ９８＿００２３４７、Ｄ９Ｑ９８＿００８２７３、Ｄ９Ｑ９８＿００８２５４、Ｄ９Ｑ９８＿００８２５１およびＤ９Ｑ９８＿００８３７６と大部分相同体（それぞれ６３％、５９％、４７％、４９％、４８％、４１％、４１％、４４％および４７％の配列相同性を有する）。クロレラ・バリアビリスおよびクロレラ・ソロキニアナ由来の７種のタンパク質と７つのみの相同性、そのうち３つのみが特性決定されている：「セルロソーム固定コヒーシン領域」、「新生ポリペプチド関連複合体サブユニットアルファイソ型Ｘ１」および「タンパク質ＣＢＧ２４２４２」（それぞれ４３％、４２％および５８％の配列相同性を有する、クロレラ・ソロキニアナ）。
【０５１２】
－　仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００９２１６（包括度１１％）。クロレラ・ブルガリス由来の仮定上のタンパク質Ｄ９Ｑ９８＿００９２１４およびＤ９Ｑ９８＿００９２１５に対する高度に相同体（それぞれ９８％および９８％の配列相同性を有する）。クロレラ・ソロキニアナ由来の２種のタンパク質と２つのみが相同性、両方とも特性決定され

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

【０５１３】

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

【０５１４】

【表３】

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

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

【０５１５】

Ｇ．クロレラ属ＭＥＶ中に存在するＲＮＡの特性決定

クロレラ・ブルガリスのＭＥＶ中に存在するＲＮＡの一覧を目的として、全ＲＮＡ（低分子ＲＮＡおよび長いＲＮＡ）のシークエンシングを実施した。この研究では２種のシークエンシングを実施した：全ＲＮＡシークエンシング（短いランダムプライマーからの逆転写に基づく）および低分子ＲＮＡシークエンシング（ＲＮＡがライゲーションされるアダプターからの逆転写に基づく）。

【０５１６】

１．ＲＮＡ抽出

３００μＬからＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ（商標）ＲＮＡ Ｍｉｃｒｏｐｒｅｐキット（Ｏｚｙｍｅ、参照：ＺＲ２０６１）を使用して「ＭＥＶ」試料から全ＲＮＡを抽出した。ＲＮＡの濃度およびその品質は、それぞれＱｕｂｉｔ（商標）ＲＮＡアッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、参照：Ｑ３２８５２）およびＱｕｂｉｔ（商標）ＲＮＡ ＩＱキット（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、参照：Ｑ３３２２１）キットを用いてＱｕｂｉｔ（商標）蛍光光度計での蛍光光度分析によって決定した。単離後、10^9ＭＥＶあたり約８０ｎｇの総天然ＲＮＡの濃度が定量化された。

【０５１７】

２．全ＲＮＡライブラリーの調製

全ＲＮＡを、ＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ（商標）ＩＩ Ｄｉｒｅｃｔｉｏｎａｌ ＲＮＡライブラリー調製キット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、参照：Ｅ７７６０Ｓ）を、この研究に適している製造業者のプロトコールに従って使用して生成した。したがって、工程１．１．１では、１０μｌの容量のヌクレアーゼ不含水がこの研究には適していた。

【０５１８】

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

【０５１９】

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

【０５２０】

精製後、キャピラリー電気泳動によって、精製されたプールを構成する断片のサイズを調べ、その濃度をＱｕｂｉｔ（商標）４．０蛍光光度計での蛍光アッセイによって決定し、その後シークエンシングを行った。

【０５２１】

３．ＭｉＳｅｑ（登録商標）での、およびＮｏｖａＳｅｑ ６０００（登録商標）システム（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）でのシークエンシング

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

【０５２２】

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

【０５２３】

Ｈ．生物情報科学解析

ＦａｓｔＱＣツール（ＴｏｔａｌＲＮＡ．Ｒ１．ｆａｓｔｑｃ．ｈｔｍｌおよびＴｏｔａｌＲＮＡ．Ｒ２．ｆａｓｔｑｃ．ｈｔｍｌファイル）を用いてリードの品質を評価した。ｃｕｔａｄａｐｔツールを使用してリードから不十分な品質のアダプター配列および外部塩基を除去した。次いで、Ｈｉｓａｔ２を使用して（デフォルト設定を使用して）、リードをクロレラ・ブルガリス参照ゲノム（ｃｖｕｌ ａｓｓｅｍｂｌｙ、ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）番号：ＧＣＡ＿０２３３４３９０５．１）に対してアラインした。４０リードをクロレラ・ブルガリスゲノムとアラインした。得られたリードがクロレラ・ブルガリスゲノムとアラインされる遺伝子（対応する注釈を有する）のみを含有するクロレラ・ブ

ルガリスゲノムの注釈から、Ｓｔｒｉｎｇｔｉｅ（デフォルトパラメータ）を用いて異なるアラインメントの計数を実施した。公的データに由来する利用可能な注釈は、ＲＮＡ型を各配列に割り当てることを可能にしない。ミトコンドリアのゲノムおよびクロレラ・ブルガリスの葉緑体のものを用いて、同一アラインメント研究が実施された。リードのうちこれら２種のゲノムとアラインされたものはなかった。

【０５２４】

総ライブラリーの生物情報学解析は、ＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴを使用してクロレラ・ブルガリスゲノムとアラインし、同定されなかったタンパク質をコードする、１４０から２５０ヌクレオチドの間の約４０種のＲＮＡを示す。Ｆａｓｔｓｅｑツール（ＳｍａｌｌＲＮＡ．Ｒ１．ｆａｓｔｑｃ．ｈｔｍｌおよびＳｍａｌｌＲＮＡ．Ｒ２．ｆａｓｔｑｃ．ｈｔｍｌファイル）を用いてリードの品質を評価した。ｃｕｔａｄａｐｔツールを使用してリードから不十分な品質アダプター配列および外部塩基を除去した。次いで、Ｈｉｓａｔ２を使用して（デフォルト設定を使用して）、リードをクロレラ・ブルガリス参照ゲノム（ｃｖｕｌ　ａｓｓｅｍｂｌｙ、ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）番号：ＧＣＡ＿０２３３４３９０５．１）に対してアラインした。クロレラ・ブルガリスゲノムの注釈から、Ｓｔｒｉｎｇｔｉｅ（デフォルトパラメータ）を用いて異なるアラインメントの計数を実施した。得られたリードがアラインされる遺伝子のみを収載するＳｍａｌｌＲＮＡ＿ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ＿ｍｅａｓｕｒｅｓ＿ｆｉｌｔｒｅｄ．ｘｌｓｘファイルは、１つのみの遺伝子を含有する。

【０５２５】

分析に使用されたＭＥＶが、ルシフェラーゼに対するｓｉＲＮＡの混合物を含有していたので、少なくとも１８ｂｐの配列からｂｏｗｔｉｅ２ツールを使用してルシフェラーゼ配列でのアラインメントを実施した。配列の約３．７％がルシフェラーゼ配列とアラインする。

【０５２６】

Ｉ．ＭＥＶリピドミクス分析

１．試料処理

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

【０５２７】

２．ＬＣ－ＭＳ検出

分析プラットフォーム：ＬＣ－ＭＳ（Ｗａｔｅｒｓ、ＵＰＬＣ；Ｔｈｅｒｍｏ、Ｑ　Ｅｘａｃｔｉｖｅ）；カラム：（ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　Ｃ１８（２．１＊１００ｍｍ　１．７μｍ））；クロマトグラフィー分離条件：

・カラム温度：４０℃；流動速度：０．３ｍＬ／分；

・移動相Ａ：アセトニトリル／水（６：４、ｖ／ｖ、１０ｍＭギ酸アンモニウムを有する）；

・移動相Ｂ：イソプロピルアルコール／アセトニトリル（９：１、ｖ／ｖ、１０ｍＭギ酸アンモニウムを有する）；

・注射容量：３μＬ（陽イオン）；３μＬ（陰イオン）；自動注入温度：４℃。

【０５２８】

【表４】

表 4. LC-MS 検出法において使用される移動相の勾配。

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

【０５２９】

３．質量分析検出パラメータ：

・ＥＳＩ＋：ヒーター温度３００℃；シースガス流動速度、４５ａｒｂ；補助ガス流動速度、１５ａｒｂ；スイープガス流動速度、１ａｒｂ；スプレー電圧、３．０ＫＶ；キャピラリー温度、３５０℃；Ｓ－レンズＲＦレベル、３０％。

・ＥＳＩ－：ヒーター温度３００℃、シースガス流動速度、４５ａｒｂ；補助ガス流動速度、１５ａｒｂ；スイープガス流動速度、１ａｒｂ；スプレー電圧、３．２ＫＶ；キャピラリー温度３５０℃；Ｓ－レンズＲＦレベル、６０％。

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

・衝突モード：高エネルギー衝突解離（ＨＣＤ）

４．リピドミクス分析結果

【０５３０】

【表５】

表 5. MEV の ESI+リピドミック分析結果。

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

【０５３１】

【表６】

表 6. MEV の ESI-リピドミック分析結果。

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

【０５３２】

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

【０５３３】

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

【０５３４】

Ｊ．ＭＥＶメタボロミクス解析

【０５３５】

【表７】

表 7. MEV の ESI+メタボロミクス分析結果

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

【０５３６】

【表８】

表 8. MEV の ESI-メタボロミクス分析結果

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

【０５３７】
結果は、ＭＥＶが、いくつかの小分子構成成分、例えば、芳香族複素環式化合物（プリン塩基および有機硫黄化合物を含む）、脂肪酸、陽イオン界面活性剤、アミノ酸およびその誘導体を天然に保有することを示す。
［実施例３］
【０５３８】
生体分子カーゴの微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）中への負荷
Ａ．例示的生体分子としてプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）およびＧＦＰ（タンパク質）を使用する、生体分子（例えば、タンパク質、ペプチド、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、プラスミド、複合体）の受動的および界面活性剤補助負荷
実施例１に記載されるように精製されたＭＥＶを、ＰＢＳで特定の濃度（１０＾８、１０＾９または１０＾１０）に希釈した。次いで、ＭＥＶ懸濁液に種々の濃度のカーゴ（ｐＤＮＡについて０．２、１または２μｇ／ｍｌ；ＧＦＰについて２または２０μｇ／ｍｌ）を添加し（５００～１０００μｌの総容量）、ｐＤＮＡについて１または２４時間、ＧＦＰ（受動的負荷）について０、１または６時間インキュベートした。界面活性剤補助負荷については、ＭＥＶとｐＤＮＡの混合物に０．２％または０．５％のサポニンを補給し、７００ｒｐｍで撹拌しながら、または撹拌せずに室温で５または３０分間インキュベートした。
【０５３９】
【表９】
表 9. DNA(プラスミド、ASO)の受動的な、界面活性剤補助負荷のプロトコール;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５４０】
【表１０】
表 10. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の受動的な、界面活性剤補助負荷のプロトコール最適化; 感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５４１】
Ｂ．例示的生体分子としてプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）、ＧＦＰ（タンパク質）およびｍＲＮＡ（ｅＧＦＰをコードする）を使用する生体分子（例えば、タンパク質、ペプチド、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＡＳＯｓ、プラスミド、複合体）の凍結解凍サイクル負荷

実施例１に記載されるように精製されたＭＥＶを、ＰＢＳで特定の濃度（１０＾８、１０＾９、１０＾１０、１０＾１１および１０＾１２）に希釈した。次いで、ＭＥＶ懸濁液に種々の濃度のカーゴ（ｐＤＮＡについて０．２、１、２または４０μｇ／ｍｌ；ｍＲＮＡについて０、２および２μｇ／ｍｌ）を添加した（５００μｌの総容量）。ＭＥＶおよびカーゴの混合物を－８０℃で凍結し、または液体窒素（－１９６℃）中に浸漬した。次いで、試料を水浴中３７℃で解凍した。この凍結－解凍サイクルを、各試料について２または４回反復した。

【０５４２】

【表１１】

表 11. DNA(プラスミド、ASO)の凍結解凍サイクル負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５４３】

【表１２】

表 12. RNA(mRNA、siRNA、miRNA)の凍結解凍サイクル負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	RNA 濃度 (μg/ml)	凍結温度	解凍温度	サイクル数
8.00E+07 1.00E+08 8.00E+08 9.00E+08 1.00E+09 6.00E+09 8.00E+09 9.00E+09 6.00E+10 8.00E+10 9.00E+010 9.00E+11	0.2 1.0 2.0 20	-80°C -196°C	37°C	2 4

【０５４４】

【表１３】

表 13. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の凍結解凍サイクル負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５４５】

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

実施例１に記載されるように精製されたＭＥＶを、ＰＢＳで所定の濃度（１０＾８、１０＾９、１０＾１０、１０＾１１および１０＾１２ＭＥＶ／ｍＬ）に希釈した。次いで、ＭＥＶ懸濁液に種々の濃度のカーゴ（ｐＤＮＡについて０．２、１、２または２０μｇ／ｍｌ；ｍＲＮＡについて２および２０μｇ／ｍｌ；ＧＦＰについて２または２０μｇ／ｍｌ）を添加した（５００～１０００μｌの総容量）。ＭＥＶおよびカーゴの混合物を、Ｆｉｓｈｅｒｂｒａｎｄ（商標）モデル５０ソニックディスメンブレーター（Ｓｏｎｉｃ Ｄｉｓｍｅｍｂｒａｔｏｒ）（周波数：２０ｋＨｚ、ワット数：５０Ｗ）を使用して超音波処理した。超音波処理の前に、シグナル振幅を２０％、４０％、５０％または６０％に設定した。各試料は、３０秒間超音波処理し、続いて、氷上で３０秒間中止するか、または４秒間超音波処理し、続いて、氷上で１２０秒間休止した。各試料についてこのサイクルを２、６または８回反復した。

【０５４６】

【表１４】

表 14. DNA(プラスミド、ASO)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５４７】

【表１５】

表 15. RNA(mRNA、siRNA、miRNA)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５４８】

【表１６】

表 16. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５４９】

【表１７】

表 17. 小分子(親水性分子)の超音波負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５５０】

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

実施例１に記載されるように精製されたＭＥＶを、ＰＢＳで特定の濃度（１０＾１０）に希釈した。次いで、ＭＥＶ懸濁液に種々の濃度のカーゴ（ｐＤＮＡについて２または２０μｇ／ｍｌ；ｍＲＮＡについて０．１、１、２および１０μｇ／ｍｌ；ＧＦＰについて２または２０μｇ／ｍｌ）を添加した（５００～１０００μｌの総容量）。ＭＥＶおよびカーゴの混合物を、シリンジベースのハンドヘルドミニ押出機（ＳＫＵ：６１００２３－１　ＥＡ、Ａｖａｎｔｉ（登録商標）Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）を通して押し出した。

２つの対面するシリンジを使用し、１００ｎｍの直径の孔を有するメンブレンフィルターを超えて１０～１５回試料を押し出した。一部の実験では、２００ｎｍ、１００ｎｍおよび５０ｎｍの直径の孔のメンブレンを通して試料を連続的に押し出した。押出は、室温または６５℃で実施した。

【０５５１】

【表１８】

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

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

【０５５２】

【表１９】

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

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

【０５５３】

【表２０】

表 20. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の押出負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５５４】

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

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

【０５５５】

【表２１】

表 21. RNA(mRNA、siRNA、miRNA)の SEAL 負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	RNA 濃度 (μg/ml)	振幅(Pa)	サイクルタイミング	サイクル数	温度	押出サイクル (メンブランあたり)	メンブランの孔径 (nm)
1.50E+10	0.2 2.0 20	20	氷上で 30 秒オン、30 秒オフ	8	RT	9 10	200、続いて 100

【０５５６】

【表２２】

表 22. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)の SEAL 負荷のプロトコール最適化 ;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

MEV 濃度 (ml あたり)	タンパク質濃度 (μg/ml)	振幅(Pa)	サイクルタイミング	サイクル数	温度	押出サイクル(メンブランあたり)	メンブランの孔径(nm)
1.50E+10	2.0 20	20	氷上で 30 秒オン、30 秒オフ	8	RT	10	100

【０５５７】

Ｆ．ＭＥＶに負荷されたカタラーゼの酵素活性

上記のように負荷されたＭＥＶ製剤の負荷効率を、過酸化水素分解を使用するカタラーゼ活性アッセイによって評価した。１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）を、それぞれ１～４μＬ H_2O_2（７．５～３０％　ｖ／ｗ）および２μＬのカタラーゼ（０．０６～０．５ｍｇ／ｍＬ）またはカーゴが負荷されたＭＥＶの試料を含む石英キュベット中に混合した。ＬＡＭＢＤＡ（商標）２５ＵＶ　ＶＩＳ分光光度計（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用して２４０ｎｍで吸光度をモニタリングすることによって酵素

活性を測定した。負荷されたＭＥＶにおけるカタラーゼ安定性を、プロナーゼ（０．１～０．２ｍｇ／ｍＬ）とともに３７℃で３時間のインキュベーションによって評価した。試料をその後、上記のように触媒活性についてアッセイした。カタラーゼの安定性を、カタラーゼの初期活性に対する残存活性として表した。

【０５５８】

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

低張透析は、ＭＥＶおよびローダミンＢ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手）を、２００ｍＬの１０ｍＭリン酸緩衝剤（ｐＨ７．４）中に入れた透析膜（セルロースエステル、分子量カットオフ１００～５００Ｄａ、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｌａｂｓから入手）中に移し、室温で４時間撹拌することによって実施される。試料をその後、３００ｋＤａの分子量カットオフ遠心分離フィルターを使用し、５００μＬのＴＥ緩衝剤（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ、ｐＨ７．５および１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０）を用いて洗浄し、５，０００ｇで、４℃で５分間遠心分離し、３回反復することを用いて遊離生体分子（カーゴ）分子から精製される。

【０５５９】

低張透析は、ＭＥＶおよびカタラーゼを、２００ｍＬの１０ｍＭリン酸緩衝剤（ｐＨ７．４）中に入れた透析膜（セルロースエステル、分子量カットオフ１００～５００Ｄａ、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｌａｂｓ）中に移し、室温で４時間撹拌することによって実施される。試料をその後、３００ｋＤａの分子量カットオフ遠心分離フィルターを使用し、５００μＬのＴＥ緩衝剤（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ、ｐＨ７．５および１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０）を用いて洗浄し、５，０００ｇで、４℃で５分間遠心分離し、３回反復することを用いて遊離カーゴ分子から精製される。

【０５６０】

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

実施例１に記載されるように精製されたＭＥＶを、ＰＢＳで特定の濃度（１０＾８、１０＾９または１０＾１０）に希釈した。次いで、ＭＥＶ懸濁液に種々の濃度のカーゴ（ｐＤＮＡについて１、２、５、１０または２０μｇ／ｍｌ；ｍＲＮＡについて２および２０μｇ／ｍｌ）を添加した（１１０～１５０μｌの総容量）。ＭＥＶおよびカーゴの混合物を、１００μｌのエレクトロポレーションキュベット中に移し、Ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｏｒ ＮＥＰＡ ２１（ＮＥＰＡＧＥＮＥ）デバイスに入れた。各エレクトロポレーションについて以下のパラメータを設定した：電圧（５０Ｖ、１００Ｖまたは２００Ｖ）、パルス長（５ｍｓ、１０ｍｓまたは１５ｍｓ）、パルス間隔（５０ｍｓに設定）、減衰率（１０％に設定）、極性（陽性に設定）、パルス数（１、９または１５）および転送パルスの有無（５０ｍｓの間隔および１０％の減衰率で５０ｍｓの間に２０Ｖの５パルス）。各条件のエレクトロポレーションの前に、凝集を評価するために、２０ｍＭのＥＤＴＡまたは１０ｍＭのクエン酸塩を添加した。

【０５６１】

【表２３】

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

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

【０５６２】

【表２４】

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

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

【０５６３】

【表２５】

表 25. タンパク質(オリゴペプチド、ポリペプチド)のエレクトロポレーション負荷のプロトコール最適化;感度分析の変数として使用されるパラメータおよび値。

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

【０５６４】

Ｉ．ＤＮアーゼ治療：

各負荷法後、試料の一部にすべての遊離核酸（負荷によって被包されていない）を排除するためにデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮアーゼ）（１０１０４１５９００１、Ｒｏｃｈｅ）を用いる処置を行った。ＤＮアーゼおよびＤＮアーゼ緩衝剤（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ１０ｍＭ、$MgCl_2$ ２．５ｍＭ、$CaCl_2$ ０．５ｍＭ、ｐＨ７．６）を、試料と混合し、３７℃でインキュベーター中で４０分間インキュベートした。最後に、ＤＮアーゼ作用を阻害するためにエチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）（２０ｍＭ）を添加した。次いで、試料を４℃で保存した。

【０５６５】

Ｊ．ＲＮアーゼ処置：

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

［実施例４］

【０５６６】

生体分子カーゴの負荷後のＭＥＶ特性決定

Ａ．ＤＮＡ抽出：

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

【０５６７】

Ｂ．ＲＮＡ抽出：

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

【０５６８】

Ｃ．逆転写：

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

【０５６９】

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

ｍＲＮＡ逆転写プロトコールを完了するために、逆転写酵素を７０℃で１５分間熱不活化した。ＲＴ後のｃＤＮＡの得られた容量は、１６μｌであった。

【０５７０】

ＲＴ反応後、試料に５６μｌのH_2Oを添加して、試料あたり合計７２μｌのｃＤＮＡ出発溶液を得た。リアルタイムＰＣＲ測定の前に、７２μｌのｃＤＮＡ出発溶液の必要とされる希釈係数は、プレスクリーニング実験によって１０００倍と決定した。適切な希釈係数を規定することによって、測定されたＣｑアウトプット値が２０から３０の間の値を有するであろうことが確実となる。このＣｑ　２０～３０の範囲で、より良好な直線性が保証され、３０より高いＣｑで開始すると予測されるシグナルのノイズ領域が避けられる。

【０５７１】

Ｄ．ｑＰＣＲ：

ＭＥＶから抽出されたプラスミドを定量化するために、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）を実施した。ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）２０００アナライザー（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから取得）を使用して試料においてＤＮＡ濃度を測定し、ｑＰＣＲの際に正しく増幅されるために必要な場合には試料を希釈した（各条件の容量は添付書類に一覧されている）。0.4×10^{-6}ｎｇ～5.1×10^{-6}ｎｇのｐＤＮＡのプラスミド範囲を実現した。ウェルあたり５μＬのＰｏｗｅｒＵｐ（商標）ＳＹＢＲ（商標）Ｇｒｅｅｎ（カタログ番号Ａ２５７７６、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ウェルあたり０．５μＬのフォワードプライマー（濃度＝１０μＭ）およびウェルあたり０．５μＬのリバースプライマー（濃度＝１０μＭ）を用いてマスターミックスを調製した。目的のプラスミドのみを増幅するために、ｐＤＮＡの耐性遺伝子配列に相補的なプライマーがこれまでに設計されている（プライマー配列は添付書類にある）。Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（商標）ＭｉｃｒｏＡｍｐ（商標）Ｏｐｔｉｃａｌ３８４ウェル反応プレート（カタログ番号１０４１１７８５、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用し、６μＬのマスターミックス、続いて、４μＬの試料を各ウェルに入れた。２つの陰性対照を作製した：ＳＹＢＲ（登録商標）緑色色素を有するヌクレアーゼ不含水ならびにＳＹＢＲ（登録商標）緑色色素およびプライマーを有するヌクレアーゼ不含水。すべての条件を２連で行った。プレートを密閉し、短時間遠心分離した。サーモサイクラーはＣＦＸ３８４　ＴｏｕｃｈリアルタイムＰＣＲ検出システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ製）であった。３工程サイクリング、続いて、融解曲線プロトコールが以下の表にまとめられている。

【０５７２】

【表２６】

表 26. qPCR の 3 工程サイクリングプロトコール

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

【０５７３】

【表２７】

表 27. qPCR の融解曲線プロトコール

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

【０５７４】

ＲＴ後のＲＮＡ検出のために、リアルタイムｑＰＣＲを、迅速サーマルサイクラーシステム［ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０　ＩＩ、３８４ウェル］を用いてｑＰＣＲプレートにおいて技術的に２連で実施した。プロトコールは以下とした：３μｌのｃＤＮＡ（１０００倍の規定された希釈係数を有する）を、１つのフォワードおよび１つのリバースプライマー（普通２００ｎＭから１．０μＭの間の最適化された濃度で添加される）と混合し、Ｔａｋｙｏｎ（登録商標）Ｎｏ　ＲＯＸ　ＳＹＢＲ　２Ｘ　ＭａｓｔｅｒＭｉｘブルーｄＴＴＰ（Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃ、ＵＦ－ＮＳＭＴ－Ｂ０７０１）を、ｄＮＴＰｓ、$MgCl_2$、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼおよび緩衝剤と混合し、合計１０μｌの容量を構成した。次いで、このミックスをＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）プレート中に入れた。

【０５７５】

増幅プロトコールは、９５℃で１０分間の最初のインキュベーション（Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼの活性化のために働く）で開始し、４５の、２つの工程：工程Ｉ）１０秒間の９５℃変性、工程ＩＩ）４０秒間の６０℃プライマーアニーリングおよび伸長、から構成される増幅サイクルが続いた（この６０℃伸長期間の最後で、単一獲得モードを用いて蛍光生成物の検出を実施した）。増幅プロトコールに、５秒間の９５℃変性、４０秒間の６０℃アニーリングおよび９５℃エンドポイント（６０℃から９５℃へ０．０４℃／秒の勾配率の温度上昇によって達成され、蛍光生成物の連続検出を伴う）の１サイクルを用いて融解曲線を実施する工程が続けられる。増幅プロトコールは、１０秒間３７℃で冷却することによって終了した。

【０５７６】

プラスミド定量化のために（１０００倍希釈）、プライマーが改変されることを除いて、ｃＤＮＡ定量化と同様にＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（登録商標）機器の同一プロトコール（混合およびサイクル）が使用される。

【０５７７】

ｑＰＣＲのプライマーおよびその濃度は、以下に一覧される：

ＲＮＡプライマー（配列番号６６および６７）：

・ｅＧｆＰ（１－１）Ｆｏｒ３　　ＡＧＣＡＡＡＧＡＣＣＣＣＡＡＣＧＡＧＡ

・ｅＧｆＰ（１－１）Ｒｅｖ３　　ＴＣＧＴＣＣＡＴＧＣＣＧＡＧＡＧＴＧ

・ｅＧｆＰ（１－１）　Ｆｏｒ３Ｒｅｖ３：　４００ｎＭ

ＲＮＡ参照プライマー（配列番号６８および６９）：

・ｍＣｈｅｒｒｙ（１－１）Ｆ１：　　ＧＡＣＣＡＣＣＴＡＣＡＡＧＧＣＣＡＡＧＡ

・ｍＣｈｅｒｒｙ（１－１）Ｒ１：　　ＣＣＧＣＴＣＧＴＡＣＴＧＣＴＣＣＡＣ

・ｍＣｈｅｒｒｙ（１－１）　ＦＲ１：　５００ｎＭ

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

・左プライマーＰＣＤＮＡ３．１＋１：　ＧＡＣＣＡＣＣＡＡＧＣＧＡＡＡＣＡＴＧＧ

・右プライマーＰＣＤＮＡ３．１＋１：　ＣＣＡＴＧＧＧＴＣＡＣＧＡＣＧＡＧＡＴＣ

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

【０５７８】

ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイの対照

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

【０５７９】

各ｑＰＣＲプレートにＲＮＡ不含試料（H_2Oのみ）からなる本発明者らの陰性対照を添加し、ｑＰＣＲプレート上で対応するプライマーと混合した。この陰性H_2O対照によって、ハイブリダイズしているプライマーが作出する各アンプリコンのＣｑバックグラウンドレベルの推定が可能となった。

【０５８０】

「ＲＮＡ有効性および定量化対照」試料のために、ｅＧＦＰをコードするＣｌｅａｎＣａｐ　ｍＲＮＡの混合物を調製した。その後、ＲＮアーゼ／ＤＮアーゼ不含水（１０００ｎｇ、５００ｎｇ、１００ｎｇ、５０ｎｇ、１０ｎｇ、５ｎｇ、１ｎｇ、０．５ｎｇ、０．１ｎｇ）を用いて９つの異なる濃度［５０ｎｇのＲＮＡ（ｍＣｈｅｒｒｙ（Ｔｅｂｕ－ｂｉｏ））が添加されている］を調製し、抽出し、逆転写し、次いで、希釈し（試料と同じように、１０００倍の希釈係数）、ｑＰＣＲプレート上で使用される対応するプライマーと混合した。

【０５８１】

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

【０５８２】

「ＤＮＡ有効性および定量化対照」試料のために、プラスミド（ｐＤＮＡ）ｐｃＤＮＡ３．１＋の混合物を調製した。その後、ＲＮアーゼ／ＤＮアーゼ不含水（１０００ｎｇ、５００ｎｇ、１００ｎｇ、５０ｎｇ、１０ｎｇ、５ｎｇ、１ｎｇ、０．５ｎｇ、０．１ｎｇ）を用いて９つの異なる濃度を調製し、抽出し、希釈し（試料と同じように、１０００倍の希釈係数）、ｑＰＣＲプレート上で使用される対応するプライマーと混合した。

【０５８３】

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

Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｍｅｔｒｉｘ製のＺｅｔａＶｉｅｗ（登録商標）ＮＴＡ機器（エンジン）は、水力学的粒子サイズ、ゼータ電位、濃度および蛍光を測定するためのナノ粒子トラッキング分析エンジンである。ポリスチレンビーズを用いて製造業者の推奨に従って実験の前に較正した。当日の実験のために使用されるＰＢＳを、ＺｅｔａＶｉｅｗ（登録商標）エンジンを用いて評価した（ＰＢＳ中でのスクリーニングでの粒子の正常平均数：０～５）。製造業者の推奨される読み取り範囲（フレームあたり５０～２００粒子）内でＺｅｔａＶｉｅｗ（登録商標）によって測定されるように、試料をＰＢＳで希釈した。希釈はＰＢＳで行い、次いで、試料をボルテックス処理し、分析のために１ｍＬのシリンジ中に入れた。

【０５８４】

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

【０５８５】

Ｆ．カタラーゼが負荷されたＭＥＶの酵素活性

上記のように負荷されたＭＥＶ製剤の負荷効率を、過酸化水素分解を使用するカタラーゼ活性アッセイによって評価した。手短には、１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）を、それぞれ１～４μＬ　H_2O_2（７．５～３０％　ｖ／ｗ）および２μＬのカタラーゼ（０．０６～０．５ｍｇ／ｍＬ）またはカーゴが負荷されたＭＥＶの試料を含む石英キュベット中に混合した。ラムダ２５ＵＶ　ＶＩＳ分光光度計（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用して２４０ｎｍで吸光度をモニタリングすることによって酵素活性を測定した。負荷されたＭＥＶにおけるカタラーゼ安定性を、プロナーゼ（０．１～０．２ｍｇ／ｍＬ）とともに３７℃で３時間のインキュベーションによって評価した。試料をその後、上記のように触媒活性についてアッセイした。カタラーゼの安定性を、カタラーゼの初期活性に対する残存活性で表した。

【０５８６】

Ｇ．ローダミンＢカーゴの定量化

９５μＬのＭＥＶ混合物中に５μＬの０．４％のＳＤＳを添加し、十分にピペッティングし、サーモサイクラーにおいて８５℃で１５分間インキュベートすることによって、上記のように付加されたカーゴを保有するＭＥＶを溶解して、カーゴを放出させた。次いで、試料を黒色壁の透明底未処理ポリスチレン９６ウェルプレート中に移した。対照試料は、０．１、０．５、１．０、５．０ｎｍｏｌのローダミンＢ単独を含有していた。試料蛍光を、５４０ｎｍでの励起および６２５ｎｍでの発光を用いるＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して測定した。

【０５８７】

Ｈ．ｓｉＲＮＡカーゴの定量化

カーゴが負荷されたＭＥＶを上記のように溶解した。次いで、ｓｉＲＮＡカーゴを、核酸をピコグラム感度で定量化可能なＱｕａｎｔ－ｉＴ（登録商標）ＰｉｃｏＧｒｅｅｎ（登録商標）アッセイキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製）を使用して検出した。手短には、１００μＬの各試料に１００μＬの色素試薬作業溶液を添加して、２００μｌの最終容積とした。同一緩衝剤で調製された対照試料は、１０ｐｍｏｌのｓｉＲＮＡ単独を含有していた。試料を黒色壁の透明底未処理ポリスチレン９６ウェルプレート中に移し、室温、暗所で１０分間インキュベートした。試料蛍光を、４８０ｎｍでの励起および５２０ｎｍでの発光を用いるＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ製、米国）を使用して測定した。

【０５８８】

Ｉ．総タンパク質の定量化

ＢＣＡまたはＢｒａｄｆｏｒｄ試験によって総タンパク質を定量化した。

【０５８９】

Ｊ．統計解析：

スクリーニングおよび最適化された実験設計をＮｅｍｒｏｄＷソフトウェアを用いて作成した。結果は、ＲＳｔｕｄｉｏ（登録商標）（１．４．１７１７バージョン）およびＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）（８．３バージョン）ソフトウェアを使用して分析されている。対照と比較された変数の有意性を、独立パラメトリックｔ検定で評価した。「ｎｓ」は、０．０５より大きいｐ値を意味する「有意ではない」を表し、「＊」は、０．０５より小さいｐ値を表し、「＊＊」は、０．０１より小さいｐ値を表し、「＊＊＊」は、０．００１より小さいｐ値を表す。負荷効率は、各条件について初期ｐＤＮＡ量と比較したｑＰＣＲによって得られたｐＤＮＡ量に基づいて算出した。線形回帰モデリングを実現して、プラスミド被包に対する試験された変数の効果を評価した。

【０５９０】

Ｋ．外因的負荷（エキソローディング）効率

ＭＥＶを生成し、単離した後に、ＭＥＶにカーゴを外因的に負荷できる。カーゴをＭＥＶ中に導入するための多数の方法が、公知であり、本明細書に記載されている。実施例１～４には、種々のカーゴ（ペイロード）を用いるＭＥＶのエキソローディングが記載され

、例示されている。ＭＥＶの調製、生成、負荷、特性決定。さまざまな異なるペイロードについて異なる負荷方法を使用するエキソローディングの効率は、以下のパラメータを使用して算出される：（ｉ）負荷有効性および／または（ｉｉ）負荷能力または（ｉｉｉ）負荷されたＭＥＶのパーセンテージが表（表２８）に示されている。

【０５９１】

【表２８－１】

表28：

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

【表２８－２】

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

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

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

・　内部移行されたペイロードは、負荷反応後にＭＥＶ内で測定されたペイロード分子（ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質または他の分子）の総量である。内部移行されたペイロードは、特定の酵素処置（例えば、ＤＮアーゼ、ＲＮアーゼ、プロテアーゼ、その他）による反応の最後に負荷反応培地中に残存するペイロード分子の排出後に、特定の定量化方法（例えば、ｑＰＣＲ、ＲＴ－ｑＰＣＲ、タンパク質の決定および他のもの）によって決定される。

・　ペイロードのコピー数：初期量または内部移行されたペイロード量のいずれかにおけ

るペイロード分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）のコピー数。コピー数は、以下の計算を使用して得られる：
コピー数＝（ｎｇ×［６．０２２Ｅｘｐ２３］）／（長さ×［１Ｅｘｐ９］×６５０）
式中：
ｎｇは、核酸（プラスミド、ＲＮＡ）の量であり、６．０２２Ｅｘｐ２３＝アボガドロ数であり、長さは、１０００（ｋｂ）を乗じた、塩基対でのＤＮＡ断片の長さであり、１Ｅｘｐ９が、ナノグラムの単位に変換するための変換係数である。
・負荷効率は、微細藻類由来の細胞外小胞（ＭＥＶ）中に内部移行された初期時点での負荷反応培地中のペイロード分子の初期量のパーセンテージである。
・負荷能力は、ＭＥＶあたりの内部移行されたペイロードのコピー数である。内部移行されたペイロードコピーと反応物中のＭＥＶ数の間の比率として算出される負荷能力。
・一例として：負荷反応中に、最初に３．６Ｅｘｐ１０コピーのＤＮＡおよび１Ｅｘｐ９のＭＥＶがあり、ｑＰＣＲによって、１．８Ｅｘｐ９コピーのＤＮＡがＭＥＶ中に内部移行されていると決定される場合。この負荷反応について、負荷パラメータは以下である：
－　負荷効率＝（１，８Ｅｘｐ９　ＤＮＡコピー／３，６Ｅｘｐ１０　ＤＮＡコピー）＊１００＝５％
－　負荷能力＝１，８Ｅｘｐ９　ＤＮＡコピー／１Ｅｘｐ９　ＭＥＶ＝１．８　ＤＮＡコピー／ＭＥＶ。
・　負荷しているＭＥＶのパーセンテージは、１００あたりのＭＥＶの総数あたりの蛍光ＭＥＶ数である。蛍光は、ＺｅｔａＶｉｅｗ（登録商標）デバイスを使用してｆ９０およびｆ９５の感度値で決定される。感度値は、０～１００の範囲の任意単位で表される。ＺｅｔａＶｉｅｗ（登録商標）デバイス中のカメラセンサーの感度を表す。この感度設定は、デジタル写真において使用されるカメラの感度設定と同等である。視野中の検出される粒子の数は、感度カメラと関連する：感度の増大→各試料において検出される粒子の数の増大。感度は、事象が測定可能ではない最高感度を選択した陰性対照に基づいて測定の前に較正される。
【０５９２】
以下の表２９は、十分な／許容されるローディング効率でＭＥＶ中に負荷された異なるペイロードを示す（配列番号１１１～１２７）。
【０５９３】

【表２９－１】

表 29

ペイロード		配列/配列番号または式
タンパク質&ペプチド	GFP	MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKL TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFK SAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEK RDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK (配列番号 111)
	ルシフェラーゼ	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAF TDAHIEVNITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENS LQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNSMNISQPTVVFVS KKGLQKILNVQKKLPIIQKIIIMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLP PGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTACV RFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVVPFHHGFGMFTTLGYLICGFRV VLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDL SNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAIL ITPEGDDKPGAVGKVVPFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCV RGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFI VDRLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDA GELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVFV DEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL (配列番号 112)
	カタラーゼ	MADSRDPASDQMQHWKEQRAAQKADVLTTGAGNPVGDKLN VITVGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAF GYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKKTPIAVRFSTVAGESGSADTV RDPRGFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDPILFPSFIHSQKR NPQTHLKDPDMVWDFWSLRPESLHQVSFLFSDRGIPDGHRHM NGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLS QEDPDYGIRDLFNAIATGKYPSWTFYIQVMTFNQAETFPFNPFD LTKVWPHKDYPLIPVGKLVLNRNPVNYFAEVEQIAFDPSNMPP GIEASPDKMLQGRLFAYPDTHRHRLGPNYLHIPVNCPYRARVA NYQRDGPMCMQDNQGGAPNYYPNSFGAPEQQPSALEHSIQYS GEVRRFNTANDDNVTQVRAFYVNVLNEEQRKRLCENIAGHLK DAQIFIQKKAVKNFTEVHPDYGSHIQALLDKYNAEKPKNAIHT FVQSGSHLAAREKANL (配列番号 113)
	卵白アルブミン	MGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVY LGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDI LNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLE PINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVL VNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGL FRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIN FEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGI TDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAE AGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP (配列番号 114)
	フラゲリンペプチド (flg22)	QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (配列番号 115)
	GUS	MARGSAVAWAALGPLLWGCALGLQGGMLYPQESPSRECKEL DGLWSFRADFSDNRRRGFEEQWYRRPLWESGPTVDMPVPSSF NDISQDWRLRHFVGWVWYEREVILPERWTQDLRTRVVLRIGS AHSYAIVWVNGVDTLEHEGGYLPFEADISNLVQVGPLPSRLRI TIAINNTLTPTTLPPGTIQYLTDTSKYPKGYFVQNTYFDFFNYA GLQRSVLLYTTPTTYIDDITVTTSVEQDSGLVNYQISVKGSNLF KLEVRLLDAENKVVANGTGTQGQLKVPGVSLWWPYLMHERP AYLYSLEVQLTAQTSLGPVSDFYTLPVGIRTVAVTKSQFLINGK PFYFHGVNKHEDADIRGKGFDWPLLVKDFNLLRWLGANAFRT SHYPYAEEVMQMCDRYGIVVIDECPGVGLALPQFFNNVSLHH HMQVMEEVVRRDKNHPAVVMWSVANEPASHLESAGYYLKM VIAHTKSLDPSRPVTFVSNSNYAADKGAPYVDVICLNSYYSWY HDYGHLELIQLQLATQFENWYKKYQKPIIQSEYGAETIAGFHQ DPPLMFTEEYQKSLLEQYHLGLDQKRRKYVVGELIWNFADFM	

10

20

30

40

50

【表２９－２】

ペイロード		配列/配列番号または式
		TEQSPTRVLGNKKGIFTRQRQPKSAAFLLRERYWKIANETRYP HSVAKSQCLENSLFT (配列番号 116)
DNA	プラスミド pcDNA3.1	GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTC AGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCT GCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGA GCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAAT TGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTT CGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATT GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC ATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAA ACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG ATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTT TGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCA ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA AAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCT GGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATT AATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTT AAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGT GTGGTGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCT CGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCC CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCC TTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG GATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAG CTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCG CATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC TTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAA GCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCT TTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGG TTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCC TTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTT CCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTT TGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAA AAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCT GTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCT CCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAG TCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGG CAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA TAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGC CCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTT TGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCT GATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACA AGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA GGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGC TCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCC GGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGA ACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGA CGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAA

【表２９－３】

ペイロード		配列/配列番号または式
		GCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGC
		AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTAT
		CCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT
		CCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCAT
		CGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATC
		AGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGC
		CGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCG
		AGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAAT
		ATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGT
		GGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTT
		GGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGG
		CTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT
		CGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCT
		GAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACG
		CCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTC
		TATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGG
		CTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCT
		TCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACA
		AATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTT
		TTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAAT
		GTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGC
		TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT
		TATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT
		AAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCA
		CATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
		ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG
		GGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTC
		GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAG
		CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
		GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
		GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT
		GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACA
		AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
		ACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
		TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGT
		CCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCT
		CACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCA
		AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGC
		TGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
		AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG
		GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
		TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTA
		TTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA
		AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG
		TAGCGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
		AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
		TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAA
		CTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA
		TCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAAT
		CAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTAC
		CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
		ATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGAT
		AACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG
		CAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTA
		TCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAA
		GTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATT
		GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
		TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCA
		CGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAA
		CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAA

【表２９－４】

ペイロード		配列/配列番号または式
		AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA AGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTG CATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC ATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTT ACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTG GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCC TTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCA TGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAA ATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGA CGTC (配列番号 117)
	プラスミド pEGFP-N1	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG CCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACG TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCG GTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACT CACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGG AGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGC GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTG AACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAG CTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCG GGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG CTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGG CGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC TGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGT GACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATG CCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA CTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT ACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAG CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACA ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG CAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGA CAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA GTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCAC ATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT CCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTG TTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCA ATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGC ATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAG GCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTA AATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAA ATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGAT AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTAT TAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGT

【表２９－５】

ペイロード		配列/配列番号または式
		CTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAAT
		CAAGTTTTTGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAG
		GGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAA
		CGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGG
		CGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAA
		CCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCG
		TCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAT
		TTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
		GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAA
		GGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTG
		TGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGG
		CAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
		GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATG
		CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCC
		CCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGC
		CCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGC
		AGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT
		AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGAT
		CGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAAC
		AAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAG
		AGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTG
		CTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCC
		CGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG
		AACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACG
		ACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGA
		AGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGG
		CAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTA
		TCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGA
		TCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCA
		TCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGAT
		CAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAG
		CCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGC
		GAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAA
		TATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTG
		TGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGT
		TGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGG
		GCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGAT
		TCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTC
		TGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACG
		CCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTC
		TATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGG
		CTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCT
		TCGCCCACCCTAGGGTGAAACACGGAAGGAGACAATACCG
		GAAGGAACCCGCGCTTAAAAAGACAGAATAAAACGCACGG
		TGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGG
		GCTGGCACTCTGTCGATACCCCACCGAGACCCCATTGGGGC
		CAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCCCA
		AGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGC
		GGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTA
		GATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT
		GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACG
		TGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA
		TCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCT
		GCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTT
		TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA
		ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCT
		AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG
		CACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG
		CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGAC
		TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTG

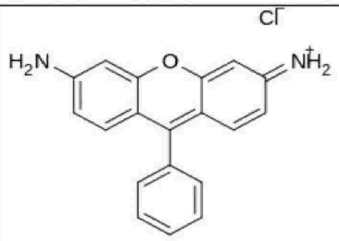
【表２９－６】

ペイロード		配列/配列番号または式
		AACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTC GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACG CGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCG TATTACCGCCATGCAT (配列番号 118)
	ASO k-ras	GCTATTAGGAGTCTTT (配列番号 119)
	ASO c-myc	AACGTTGAGGGGCAT (配列番号 120)
RNA	mRNA (eGFP)	AUGGUGAGCA AGGGCGAGGA GCUGUUCACC GGGUGGUGC CCAUCCUGGU CGAGCUGGAC GGCGACGUAA ACGGCCACAA GUUCAGCGUG UCCGGCGAGG GCGAGGGCGA UGCCACCUAC GGCAAGCUGA CCCUGAAGUU CAUCUGCACC ACCGGCAAGC UGCCCGUGCC CUGGCCCACC CUCGUGACCA CCCUGACCUA CGGCGUGCAG UGCUUCAGCC GCUACCCCGA CCACAUGAAG CAGCACGACU UCUUCAAGUC CGCCAUGCCC GAAGGCUACG UCCAGGAGCG CACCAUCUUC UUCAAGGACG ACGGCAACUA CAAGACCCGC GCCGAGGUGA AGUUCGAGGG CGACACCCUG GUGAACCGCA UCGAGCUGAA GGGCAUCGACUUCAAGGAGG ACGGCAACAU CCUGGGGCAC AGCUGGAGU ACAACUACAA CAGCCACAAC GUCUAUAUCA UGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCAUCAAGGUGAACUUCAA GAUCCGCCAC AACAUCGAGG ACGGCAGCGU GCAGCUCGCC GACCACUACC AGCAGAACAC CCCCAUCGGC GACGGCCCCG UGCUGCUGCC CGACAACCAC UACCUGAGCA CCCAGUCCGC CCUGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA UCACAUGGUC CUGCUGGAGU UCGUGACCGC CGCCGGGAUC ACUCUCGGCA UGGACGAGCU GUACAAGUAA (配列番号 121)
	mRNA (ルシフェラーゼ)	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCAT TCTATCCTCTAGAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCAT AAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGC TTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGG AATACTTCGAAATGTCCGTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAA CGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAG TGAAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTTGGGCGCGTT ATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATA ATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATTTCGCAGCCT ACCGTAGTGTTTGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTT GAACGTGCAAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATTA TCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAGTCGATG TACACGTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAA TACGATTTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTGACAAAACAATT GCACTGATAATGAATTCCTCTGGATCTACTGGGTTACCTAA GGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAACTGCCTGCGTCAGATTCT CGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCG GATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTT GGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTCGA GTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGA TCCCTTCAGGATTACAAAATTCAAAGTGCGTTGCTAGTACC AACCCTATTTTCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAA ATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGGGGCGC

【表２９－７】

ペイロード		配列/配列番号または式
		ACCTCTTTCGAAAGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCAAAACGCT TCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAG ACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAA ACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGA AGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAAT CAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTC CGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTG ACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGG GACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGTC TTTAATTAAATACAAAGGATATCAGGTGGCCCCCGCTGAAT TGGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTTCGACGCG GGCGTGGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACTTCC CGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGG AAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACC GCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGT ACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAAATC AGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCA AATTGTAA (配列番号 122)
	mRNA (GUS)	AUGUUACGUCCUGUAGAAACCCCAACCCGUGAAAUCAAAA AACUCGACGGCCUGUGGGCAUUCAGUCUGGAUCGCGAAAA CUGUGGAAUUGAUCAGCGUUGGUGGGAAAGCGCGUUACA AGAAAGCCGGGCAAUUGCUGUGCCAGGCAGUUUUAACGA UCAGUUCGCCGAUGCAGAUAUUCGUAAUUAUGCGGGCAAC GUCUGGUAUCAGCGCGAAGUCUUUAUACCGAAAGGUUGG GCAGGCCAGCGUAUCGUGCUGCGUUUCGAUGCGGUCACUC AUUACGGCAAAGUGUGGGUCAAUAAUCAGGAAGUGAUGG AGCAUCAGGGCGGCUAUACGCCAUUUGAAGCCGAUGUCAC GCCGUAUGUUAUUGCCGGGAAAAGUGUACGUAUCACCGU UUGUGUGAACAACGAACUGAACUGGCAGACUAUCCCGCCG GGAAUGGUGAUUACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAG UCUUACUUCCAUGAUUUCUUUAACUAUGCCGGAAUCCAUC GCAGCGUAAUGCUCUACACCACGCCGAACACCUGGGUGGA CGAUAUCACCGUGGUGACGCAUGUCGCGCAAGACUGUAAC CACGCGUCUGUUGACUGGCAGGUGGUGGCCAAUGGUGAU GUCAGCGUUGAACUGCGUGAUGCGGAUCAACAGGUGGUU GCAACUGGACAAGGCACUAGCGGGACUUUGCAAGUGGUG AAUCCGCACCUCUGGCAACCGGGUGAAGGUUAUCUCUAUG AACUGUGCGUCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGUGUGAUAU CUACCCGCUUCGCGUCGGCAUCCGGUCAGUGGCAGUGAAG GGCCAACAGUUCCUGAUUAACCACAAACCGUUCUACUUUA CUGGCUUUGGUCGUCAUGAAGAUGCGGACUUACGUGGCA AAGGAUUCGAUAACGUGCUGAUGGUGCACGACCACGCAUU AAUGGACUGGAUUGGGGCCAACUCCUACCGUACCUCGCAU UACCCUUACGCUGAAGAGAUGCUCGACUGGGCAGAUGAAC AUGGCAUCGUGGUGAUUGAUGAAACUGCUGCUGUCGGCU UUAACCUCUCUUUAGGCAUUGGUUUCGAAGCGGGCAACAA GCCGAAAGAACUGUACAGCGAAGAGGCAGUCAACGGGGA AACUCAGCAAGCGCACUUACAGGCGAUUAAAGAGCUGAUA GCGCGUGACAAAAACCACCCAAGCGUGGUGAUGUGGAGUA UUGCCAACGAACCGGAUACCCGUCCGCAAGUGCACGGGAA UAUUUCGCCACUGGCGGAAGCAACGCGUAAACUCGACCCG ACGCGUCCGAUCACCUGCGUCAAUGUAAUGUUCUGCGACG CUCACACCGAUACCAUCAGCGAUCUCUUUGAUGUGCUGUG CCUGAACCGUUAUUACGGAUGGUAUGUCCAAAGCGGCGAU UUGGAAACGGCAGAGAAGGUACUGGAAAAAGAACUUCUG GCCUGGCAGGAGAAACUGCAUCAGCCGAUUAUCAUCACCG AAUACGGCGUGGAUACGUUAGCCGGGCUGCACUCAAUGUA CACCGACAUGUGGAGUGAAGAGUAUCAGUGUGCAUGGCU GGAUAUGUAUCACCGCGUCUUUGAUCGCGUCAGCGCCGUC GUCGGUGAACAGGUAUGGAAUUUCGCCGAUUUUGCGACC

【表２９－８】

ペイロード		配列/配列番号または式
		UCGCAAGGCAUAUUGCGCGUUGGCGGUAACAAGAAAGGG AUCUUCACUCGCGACCGCAAACCGAAGUCGCGGCUUUUCU GCUGCAAAAACGCUGGACUGGCAUGAACUUCGGUGAAAA ACCGCAGCAGGGAGGCAAACAA (配列番号 123)
	siRNA k-ras	GUCUCUUGGAUAUUCUCGA (センス) (配列番号 124) UCGAGAAUAUCCAAGAGAC (アンチセンス) (配列番号 125)
	miRNA c-myc	CAAAAACCGCAAUUACUUUUGCA (センス) (配列番号 126) UGCAAAAGUAAUUGAGAUUUUUG (アンチセンス) (配列番号 127)
	siRNA 混合集団	*cfa6* gen および *hrpL* gen から T7 ポリメラーゼによって生成された合成 siRNA の混合物(実施例 12 を参照されたい)
小分子	ローダミン	

［実施例５］

【０５９４】

体内分布研究

Ａ．ＭＥＶのインビボ体内分布

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

１．ＤｉＲ蛍光を使用するＭＥＶ標識

実施例２に記載されるように、蛍光性、親油性カルボシアニンＤｉＲ（１，１－ジオクタデシル－３，３，３，３－テトラメチルインドトリカルボシアニンヨージド）は、水中で弱く蛍光するが、膜に組み込まれると高度に蛍光し、光安定性であり、インビボで追跡することができる（上記の実施例２；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃを参照されたい）。ＤｉＲ標識された（ＭＥＶ）はヒト細胞とともにインキュベートされる。ヒト細胞によるその取り込みは、マイクロプレートリーダーで蛍光定量分析（蛍光分光法）によって測定される。ＤｉＲは、７５０ｎｍの励起および７８０ｎｍの発光を有する。

【０５９５】

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

【０５９６】

２．マウスにおけるＭＥＶの体内分布

標識されたＭＥＶを、４つの経路：鼻腔内、気管内、経口および静脈内投与のうち１つによってマウスモデル動物に投与して、各経路ごとのＭＥＶ経路および運命を決定した。処置されたマウスを、時間の関数として全身イメージングに付し、３日目にマウスを　殺し、臓器を、異なる経路の適用後にいくつかのマウスの臓器においてエクスビボで、組織学によって画像化した。

【０５９７】

動物モデル

ＭＥＶの薬物動態および体内分布を、特定病原体不含（ＳＰＦ）の７週齢の雄Ｂａｌｂ

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

【０５９８】

体内分布研究のためのＤｉＲ標識したＭＥＶのインビボ投与

ＤｉＲ標識されたＭＥＶ（実施例２において上記のように調製された）を使用して、異なる経路の適用後に動物の身体全体において、またはいくつかの臓器においてＭＥＶの体内分布を決定した。

【０５９９】

イメージングの前に、各動物の毛皮を以下の領域：腹部、胸部、頭部および背中全体において電気バリカンを使用して刈り取った。できる限り均一に毛皮を刈り取るために注意した。次いで、ＤｉＲ標識されたＭＥＶ調製物を、ボルテックス処理することによって再懸濁し、その後、注射のためにシリンジに充填した。

【０６００】

投与経路

以下の経路を使用して、動物にＭＥＶを投与した：

【０６０１】

静脈内（ＩＶ）：５０μＬの、０．６ｘ１０^{12}ＭＥＶ／ｍＬを含有するＭＥＶ懸濁液を使い捨てプラスチックシリンジおよび適切なニードルによって尾静脈に注射した。投与されるＭＥＶの投与量：３×１０^{10}ＭＥＶ／マウス。

【０６０２】

鼻腔内（ＩＮ）：動物を、担体ガスとしてイソフルランおよび酸素の混合物によってＩＮ投与の際に麻酔下に誘導し、維持した。１００μＬの容量の、０．３×１０^{12}ＭＥＶ／ｍＬを含有するＭＥＶ懸濁液を、薄いピペットコーンを使用してマウスの鼻孔中に投与した。投与されたＭＥＶの投与量：３×１０^{10}ＭＥＶ／マウス。

【０６０３】

経口（ＰＯ）：１００μＬの、０．３×１０^{12}ＭＥＶ／ｍＬを含有するＭＥＶ懸濁液を、使い捨てプラスチックシリンジおよび適切な給餌プローブを使用して経口投与した。投与されたＭＥＶの投与量：３×１０^{10}ＭＥＶ／マウス。

【０６０４】

気管内（ＩＴ）：動物を、担体ガスとしてイソフルランおよび酸素の混合物によってＩＴ投与の際に麻酔下に誘導し、維持した。十分な麻酔が観察されると、動物をマウス挿管プラットフォーム上に置き、気管の見え方を最大にするように背臥位で前切歯から吊り下げた。次いで、気管の背後から光を当てるために気管位置付近の皮膚に冷光を置いた。必要な場合には、Ｍｉｃｒｏｓｐｒａｙｅｒ（登録商標）噴霧器のシリンジを気管中に導くために喉頭鏡を挿入した。０．６×１０^{12}ＭＥＶ／ｍＬを含有する５０μＬのＭＥＶ懸濁液の注射物を、気管中に滴下注入した。手順全体で麻酔を維持した。注射後、マウスを挿管プラットフォーム上で同一位置で少なくとも３０秒間維持し、その後、そのケージに戻した。投与されたＭＥＶの投与量：３×１０^{10}ＭＥＶ／マウス。

【０６０５】

体内分布研究のインビボイメージング

蛍光獲得を、ＩＶＩＳ（登録商標）Ｓｐｅｃｔｒｕｍ光学イメージングシステム（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒから取得）を用いて実施した。ＤｉＲ標識されたＭＥＶによって放出された光の高感度検出によって、二次元（２Ｄ）蛍光イメージングを実施した。ＭＥＶ投与の１時間前にマウスに麻酔し、画像化した。次いで、２つの異なるペトリ皿中に堆積させた最小２０μＬの少なくとも１滴のＭＥＶ懸濁液で実施されたインビトロ獲得を用いて、投与されるべき材料の蛍光を確認した。選択されたパラメータ（以下を参照されたい）

を用いて、蛍光発光を測定し、検出した。最後に、ＭＥＶを投与されたマウスでインビボ蛍光獲得を実施した。動物を、イソフルランおよび酸素の混合物に麻酔下に誘導し、維持した。マウスを、腹側画像を得るために背側横臥に、および背側画像を得るために腹側横臥に配置した。少なくとも２つの獲得／マウス／時点を行い、最大３匹のマウスの群／獲得においてマウスを画像化した。画像を分析し、６つの臓器（肝臓、脾臓、肺、腎臓、腸および脳）で蛍光を定量化した。

【０６０６】

以下の時点を使用した（Ｔ０＝ＭＥＶ投与）：

０日目－６時点：Ｔ０－１時間±１０分、Ｔ０＋３０分±５分、Ｔ０＋２時間±１５分、Ｔ０＋４時間±３０分、Ｔ０＋８時間±３０分、Ｔ０＋１０時間±３０分

１日目－１時点：Ｔ０＋２４時間±３時間

２日目－１時点：Ｔ０＋４８時間±３時間

３日目－１時点：Ｔ０＋７２時間±３時間

データは、ＩＶＩＳ（登録商標）ソフトウェア（ＩＶＩＳ（登録商標）用Ｌｉｖｉｎｇ Ｉｍａｇｅ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて分析した。

【０６０７】

インビボおよびエクスビボ蛍光獲得のために以下のパラメータを使用した：

視野（ＦＯＶ） １４×１４ｃｍ（ＦＯＶ Ｃ）

画像数： インビボ：各適用可能な時点で各マウスについて、少なくとも２の獲得（腹側および背側）を実施した；３匹のマウス（最大で）は１獲得で画像化した。

エクスビボ：少なくとも１匹のマウスの臓器を１つの獲得で画像化した

画像形式 ＴＩＦＦ形式

蛍光プローブ ＤｉＲ

励起波長 ７４５ｎｍ

発光波長 ８００ｎｍ

露光時間 検出される蛍光シグナルに応じて自動

最小カウント ２００００

ビニング １６と１の間（検出される蛍光シグナルに応じて）

Ｆ／ＳＴＯＰ ２（蛍光シグナル飽和の場合には、４に自動的に増大された、または弱いシグナルの場合には１に減少された）

対象の高さ インビボ：１．５ｃｍ

エクスビボ：０．５ｃｍ

【０６０８】

体内分布研究のためのエクスビボイメージング

ＭＥＶの生成、精製、特性決定、標識および投与（種々の経路による）は上記のとおりであった。投与後３日目に、マウスを安楽死させ、各マウスの目的の臓器を採取し、エクスビボ獲得を実施するためにペトリ皿に入れた。以下の臓器を採取した：肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳および腸。データをＩＶＩＳ（登録商標）ソフトウェア（ＩＶＩＳ（登録商標）用Ｌｉｖｉｎｇ Ｉｍａｇｅ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて分析した。図５は、静脈内（ＩＶ）、気管内（ＩＴ）および経口（ＰＯ）経路についての、投与経路に従う体内分布の代表的なパターンを示す。

【０６０９】

結果、考察および結論

薬物動態

静脈内、経口、鼻腔内および気管内投与後の経時的な（時間）、ベースラインのパーセントとして蓄積を実証する薬物動態曲線が、それぞれ図１０～１３に示されている。

【０６１０】

体内分布－単離された臓器－エクスビボイメージング

体内分布－代表的な動物のインビボ全身イメージングが図６～９に表わされている。静脈内（ＩＶ）、経口（ＰＯ）、鼻腔内（ＩＮ）および気管内（ＩＴ）投与後の肝臓、脾臓

、肺および脳におけるエクスビボ蛍光分析（総放射効率）による体内分布が、図１４Ａ～Ｄに示されている。

【０６１１】

１．各経路による結果のまとめ

ａ．静脈内投与

・未改変ＭＥＶによって標的化される臓器－肝臓および脾臓

・ＰＫパラメータ：

○ピーク／プラトー時間：２～２４時間（肝臓）、４～２４時間（脾臓）

○ピーク／プラトーと比較したｔ＝３日目での％、およそ６２％（肝臓）、およそ６１％（脾臓）

・哺乳動物ＥＶと比較してより長い存在または持続期間［例えば、Kang et al., Biodistribution of extracellular vesicles following administration into animals: A systematic review. J Extracell Vesicles. 2021;10:e12085. (doi.org/10.1002/jev2.12085)を参照されたい］。

・毒性の眼に見える徴候なし

【０６１２】

ｂ．経口（ｐｅｒ　ｏｓ）［経口（ｏｒａｌ）］投与

・経口投与に続いて標的化される臓器：腸および脾臓

・経口利用可能性：

○ＭＥＶは、経口的に利用可能であり、それらは胃を通る通過に耐え、腸に到達し、その後、脾臓に現れる。

○牛乳ＥＶを除いて、哺乳動物ＥＶは、経口的に利用可能ではない。

・ＰＫパラメータ：

○ピーク／プラトー時間：１～６時間（腸）、１～１０時間（脾臓）

○ピーク／プラトーと比較したｔ＝１０時間での％：およそ３３％（腸）、およそ４４％（脾臓）

○ピーク／プラトーと比較したｔ＝４８時間での％：０％（腸）、０％（脾臓）

・毒性の眼に見える徴候なし

【０６１３】

ｃ．静脈内および経口投与後の臓器における分布。

肝臓：静脈内投与後、肝臓は、主な標的臓器である。経口投与後、肝臓は、あったとしてもわずかにしか標的化されない。

脾臓：薬物動態プロファイルは、投与が、静脈内であるか、経口（ｏｒａｌ）［経口（ｐｅｒ　ｏｓ）］であるかに応じて変わる。静脈内投与は、より長く持続する。３日目に、ピークの５０～７０％が依然として残存する。経口投与は、より短くしか持続しない；４８時間では、０％が残存する。

【０６１４】

ｄ．鼻腔内投与

・未改変ＭＥＶによって標的化される臓器は、肺である

・予備的ＰＫパラメータ：

○ピーク／プラトー時間：４～２８時間

○ピーク／プラトーと比較したｔ＝３日目での％：７０～８０％

・毒性の眼に見える徴候なし

【０６１５】

ｅ．気管内投与

・ＭＥＶによって標的化される臓器は、肺である

○ＰＫパラメータ：

○ピーク／プラトー時間：２～７２時間

○ピーク／プラトーと比較したｔ＝３日目での％：およそ８０％

○毒性の眼に見える徴候なし

【０６１６】
２．ＢＡＬＢ／ｃＢｙＪマウスにおける経口（ＰＯ）投与後のＰＫＨ２６で標識したＭＥＶの体内分布
ＭＥＶがマウスに経口的に投与される場合には、それらは消化管を通り抜ける。ＭＥＶは最初に胃に到達し、ここで胃液の厳しい条件に耐える。投与後約３０分で、それらは腸に到達し、ここで数時間留まる。
【０６１７】
ＭＥＶは、実施例３２に示されるように、ひとたび腸の管腔中にあると、腸管上皮の細胞または腸細胞によって内部移行される。ＭＥＶはまた上皮層を通過してＧＡＬＴ中に入る。ＧＡＬＴは、腸管上皮の下に位置する、消化管と関連するリンパ系構造である（腸関連リンパ組織）。腸に沿って特定のスポットに位置する。ＧＡＬＴは、ＢおよびＴリンパ球、形質細胞ならびに樹状細胞およびマクロファージを含む自然免疫細胞を含む胚中心から構成される高密度組織である。腸では、蛍光はＧＡＬＴにおいてほとんど観察される。蛍光は、核の周囲の別個のスポットで濃縮されると思われ、これは、ＭＥＶが血漿中の空間すべてを占有する血漿の細胞に局所化されることを意味する。これによって、細胞の形状を明らかにすることが可能となる。内側にＭＥＶを有する細胞は、それぞれ組織球（常在性マクロファージ）または樹状細胞に対応し、ＧＡＬＴの末梢およびＧＡＬＴの中心に主に位置する。代表的な画像は、図１５Ａおよび図１５Ｂに示されている。眼に見えるＭＥＶは、評価したすべての時間（３０分～２４時間）で肝臓には現れない。投与の２、３時間後、ＭＥＶを内側に有する樹状細胞／マクロファージ細胞は、ＧＡＬＴから脾臓に移動し、脾臓中に数時間留まる。ＭＥＶは、主に脾臓の赤脾髄（血液細胞および一部のＴｈおよびＢ細胞）に到達し、より少ない程度に脾臓の白脾髄（リンパ系細胞）にある（図１６を参照されたい）。
【０６１８】
脾臓では、蛍光は、白脾髄に、および赤脾髄に対応するいくつかの領域で眼に見える。蛍光の強度は、赤脾髄から白脾髄への勾配で減少する。蛍光は細胞の細胞質の内側の点において検出される。内側にＭＥＶを有する細胞は、円形または網状であり、類似のサイズを有し、それらはそれぞれ組織球および樹状細胞またはマクロファージであり得る。
【０６１９】
細胞はＧＡＬＴから血流中に直接移動することができる、または最初にリンパ流を通過した後に血流に加わることもできる。内側にＭＥＶを保有するＧＡＬＴ細胞は、門脈によって最終的に肝臓に到着するが、ＭＥＶは天然にそれらを脾臓に輸送するＧＡＬＴ細胞によって内部移行されているので肝臓にとっては見えない（図１７を参照されたい）。したがって、これらのＭＥＶは、静脈内に投与されたＭＥＶのように、肝臓によって捕捉されない。
［実施例６］
【０６２０】
微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）によるゲストカーゴのインビトロデリバリー
Ａ．ニューロン細胞による負荷されたＭＥＶの取り込み－マイクロプレートアッセイ
神経保護効果のインビトロ評価のモデルとしてＰＣ１２神経細胞を使用する。手短には、ＰＣ１２細胞を９６ウェルプレート（５０，０００細胞／ウェル）に播種し、３日間培養する。次いで、カタラーゼを保有するＭＥＶ（上記のように負荷された）をＤｉＲ（５μｇ／ｍＬ）を用いて染色し、種々の時間、段階希釈でウェルに添加する。インキュベーション後、細胞を氷冷ＰＢＳで３回洗浄し、１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００中で可溶化する。７５０ｎｍで励起および７８０ｎｍで発光を用いてＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して試料蛍光を測定する。神経細胞に蓄積されたＭＥＶの量は、総タンパク質含量について正規化され、タンパク質１ｍｇあたりのＭＥＶの数として表わされる。すべてのＭＥＶ製剤は、同一レベルの蛍光で調製され、各ＭＥＶ製剤のために別個の較正曲線が使用される。

【０６２１】
Ｂ．神経細胞による負荷されたＭＥＶの取り込み－共焦点顕微鏡
カタラーゼが負荷されたＭＥＶ（１００μｇ／ｍＬの総タンパク質）を超音波処理し、ＤｉＲ（５μｇ／ｍＬ）を用いて染色し、チャンバースライド上で増殖させたＰＣ１２細胞（１×１０^{5}細胞／チャンバー）とともに種々の時間間隔の間インキュベートする。インキュベーション後、細胞をＰＢＳで洗浄し、４％のパラホルムアルデヒドで固定し、０．１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で透過処理する。蛍光染色は、抗アクチン抗体（Ａｂｃａｍ　ａｂ１７９４６７、１：１００）を使用して、二次抗体としてのヤギ抗ウサギＩｇＧ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８（Ａｂｃａｍ　ａｂ１５００７７、１：１０００）を用いて実施する。イメージングの前に、ＤＡＰＩ（４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）を核の対比染色として使用する。ＬＳＭ７００レーザースキャニング共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）によって蛍光標識されたＭＥＶの蓄積を可視化し、ＬＳＭ画像ブラウザーを用いて画像を処理する。

【０６２２】
Ｃ．負荷されたＭＥＶの神経保護効果
６－ＯＨＤＡ誘導性細胞毒性からのＰＣ１２細胞の保護をＭＴＴアッセイによって評価する。この目的のために、９６ウェルプレートにＰＣ１２細胞（１×１０^{5}細胞／ｍＬ）を播種し、一晩付着させた。次いで、細胞を２００μＭの６－ヒドロキシドパミン（６－ＯＨＤＡ）および種々のカタラーゼが負荷されたＭＥＶ製剤またはカタラーゼ単独または空のＭＥＶに対して４時間曝露する。インキュベーション後、細胞を氷冷ＰＢＳを用いて３回洗浄し、対応するカタラーゼが負荷されたＭＥＶ製剤またはカタラーゼ単独または空のＭＥＶとともにさらに２４時間インキュベートする。処置後、各ウェルに２０μＬのＭＴＴテトラゾリウム色素溶液（５ｍｇ／ｍＬ）を添加する。３７℃で３時間のインキュベーション後、ＭＴＴ含有培地を除去し、各ウェルに１００μＬのＤＭＳＯを添加して、紫色のホルマザン沈殿物を溶解する。ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して５７０ｎｍで吸光度を測定し、細胞生存率は、未処置対照群と比較した処置群における生存細胞のパーセンテージとして表される。

【０６２３】
Ｄ．ヒトがん細胞におけるＭＥＶ内部移行
ＧＦＰが負荷されたＭＥＶの取り込みを研究するために、ヒト子宮頸部類上皮癌のＨｅＬａ細胞株を使用する。フローサイトメトリー分析のために、細胞を２４ウェルプレート（１５，０００細胞／ウェル）に播種する。２４時間後、細胞をカーゴが負荷されたＭＥＶとともに４時間インキュベートし、その後、ＰＢＳで洗浄し、酸性洗浄緩衝剤（０．５Ｍ　ＮａＣｌ、０．２Ｍ酢酸）を用いて再度洗浄して、膜結合ＭＥＶを除去し、もう一度ＰＢＳを用いて洗浄する。トリプシンを用いて細胞を剥離し、ＰＢＳ中０．２％のパラホルムアルデヒドで固定し、ＬＳＲＩＩフローサイトメーターを使用し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ　Ｐｒｏソフトウェア（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて分析する。共焦点顕微鏡分析のために、ＨｅＬａ細胞を、４，０００細胞／ウェルで１６ウェルチャンバースライド（Ｌａｂ－Ｔｅｋ）に播種する。２４時間後、細胞をカーゴが負荷されたＭＥＶとともに４時間インキュベートし、その後、ＰＢＳで洗浄し、酸性洗浄緩衝剤（０．５Ｍ　ＮａＣｌ、０．２Ｍ酢酸）を用いて再度洗浄して、膜結合ＭＥＶを除去し、もう一度ＰＢＳを用いて洗浄する。細胞をＰＢＳ中４％のパラホルムアルデヒドを用い、室温で２０分間固定する。次いで、スライドをＰＢＳを用いて洗浄し、ＦｌｕｏｒＳａｖｅ（商標）試薬（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、カリフォルニア州、サンディエゴ）を使用してマウントする。ＬＳＭ７００レーザースキャニング共焦点顕微鏡［Ｚｅｉｓｓ（登録商標）］を使用して共焦点蛍光イメージングを実施し、ＬＳＭ画像ブラウザーを用いて画像を処理する。

［実施例７］
【０６２４】
マウスにおけるＭＥＶの毒性の評価

経口および気管内投与後にＢａｌｂ／Ｃマウスモデルを使用してインビボでＭＥＶ毒性の徴候を評価するために、実験を実施した。

【０６２５】

Ａ．インビボでのＭＥＶ毒性の分析：

いくつかの方法で毒性を評価した：主な臓器（肝臓、脾臓、腎臓、肺および脳）での臨床徴候、体重、血液学的分析、生化学的分析、組織学的分析。ＭＥＶ試料は－８０で保存し、インビボ投与の直前に解凍した。解凍後、各試料を１～２分間激しくボルテックス処理することによって混合した。各約２０ｇの質量を有する５週齢の雄のＢａｌｂ／Ｃマウスを使用した。動物を気候順応させた。動物を、１２：１２明－暗の制御された環境において、２４±１℃（平均±ＳＤ）の温度でポリエチレンケージで飼育し（＜５匹の動物／ケージ）、適応したペレット化飼料を用いて１日１回給餌した。水は自由に与えた。動物を実験群に無作為に割り当て、少なくとも７日間気候順応させ、その後、設計された研究を開始した。実験群は、以下の表３０に記載されている。

【０６２６】

試験化合物の、経口および気道（気管内）経路を含む例示的経路によるマウスにおけるその投与後の最終的な毒性を決定するために実験を設計した。上記のように、各約２０ｇの質量を有する雄のＢａｌｂ／Ｃマウスを使用した。動物を気候順応させた。試験品目が投与された後、すべてのマウスを１０日間密接にモニタリングする。

【０６２７】

【表３０】

表 30. MEV 毒性研究における実験群

群番号	群の種類	投与経路	MEV 投与量
1	媒体対照(PBS)	PO(経口)	-
2	実験	PO(経口)	動物あたり 4×10exp11
3	実験	PO(経口)	動物あたり 1×10exp12
4	媒体対照(PBS)	IT(気管内)	-
5	実験	IT(気管内)	動物あたり 4×10exp11

【０６２８】

臨床検査

すべての動物の毎日の臨床検査は、挙動および苦痛の徴候（悪液質、衰弱、移動または摂食の困難など）の観察結果；試験品目毒性（円背位、痙攣）および他のこのようなパラメータを含んでいた。各動物について週に１回の体重の決定、体重曲線を設計した（平均＋ＳＤ）。試験化合物の投与後に急性反応の観察を行った。

【０６２９】

臨床病理学調査

生存相の終了後、すべての動物を安楽死させた。実験終結で、臨床病理学調査を実施した。

【０６３０】

血液採取

心臓内穿刺によってマウスから血液試料を、異なるバイアル中に収集した。種々の臨床病理学調査のために血液のアリコートを、抗凝固剤を含有する、血液学的分析のためにＫ

２　ＥＤＴＡを有し、生化学分析のためにリチウムヘパリンを有するチューブ中に収集した。

【０６３１】

臨床化学

すべての動物の処置の最後に、全血試料の４５０００ｒｐｍで１５分の遠心分離後に血漿を分離し、以下のパラメータについて分析した。臨床化学分析パラメータは以下のとおりに示される：リットルあたりの単位（Ｕ／Ｌ）で、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）およびガンマ－グルタミルトランスフェラーゼ（ＧＧＴ）；ｇ／Ｌで尿素およびｍｇ／Ｌでクレアチニン。

【０６３２】

血液学

すべての動物の処置の最後に以下の血液学的パラメータを決定した：ｇ／Ｌでヘモグロビン（ＨＧＢ）、Ｌ／Ｌでヘマトクリット（ＨＣＴ）、ｆＬで平均血球体積（ＭＣＶ）、10^9／Ｌとして好酸球（ＥＯ）およびＭＨＣＨ（ＢＡＳＯ）。

【０６３３】

動物を安楽死させた場合に、剖検を実施し、注意深い巨視的評価を実施する。任意の臓器が異常に見える場合には、詳細な記載および分析を実施する。

【０６３４】

組織学的分析

組織学的分析は５つの以下の臓器について実施する：肺、脾臓、肝臓、腎臓および脳。臓器を採取し、秤量し、巨視的に観察し、４％のパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、パラフィン包埋し、５～７μＭの切片に切断し、次いで、蛍光顕微鏡下で観察する。

【０６３５】

病理組織学的スコアリング

各Ｈ＆Ｅ（ヘマトキシリン－およびエオシン－染色された）切片を組織学的に十分に検査し、観察された病変を、エクセルスプレッドシート、その段階分けされた重症度（最小、軽度、中程度または重度）で記録した。その分布（すなわち、局所的、多焦性、局所的に広範囲またはびまん性のような）ならびにその局在性も特性決定した。

【０６３６】

Ｂ．毒性研究結果：臨床検査

各パラメータについて４つのマウスの群における異なる用量で経口（ＰＯ）または気管内（ＩＴ）投与後のマウスモデルにおけるＭＥＶの毒性の評価の結果が、図１８Ａ～Ｉに示されており、これは、ＭＥＶの投与（ＰＯ、ＩＴ）後のマウスにおける臨床化学および血液学を示す。

【０６３７】

臨床化学

以下に示されるように、２つのパラメータ尿素およびクレアチニンは、対照群と比較してすべての処置された群において変化しなかった。酵素アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）はランダムな有意でない偏差を示した。図１８は、これらの結果を示す。パラメータガンマ－グルタミルトランスフェラーゼ値は、すべての群において低レベル（＜６）で検出され、これはプロトコールエラーを示し、提示されていない。

【０６３８】

臨床化学パラメータの結果は、経口または気管内投与のいずれかによるマウスにおいてすべての試験された用量で毒性を全く示さない。

【０６３９】

血液学

測定されたパラメータは、対照と比較して有意に変更されなかった。図１８Ａ～Ｉは、ＭＥＶ毒性が、（１）化学パラメータ：ＡＬＡＴ、ＡＳＡＴ、尿素およびクレアチンによって、および（２）４つのマウスの群における血液学パラメータによって評価された結果

を提示する：群１のマウスには、１００μｌのＰＢＳをＰＯデリバリーによって投与し、群２のマウスには、１００μｌの４＊１０^{11}ＭＥＶ／マウスをＰＯデリバリーによって投与し（黒色および白色のタイルを有するバー）、群３のマウスには、１００μｌの４＊１０^{12}ＭＥＶ／マウスをＰＯデリバリーによって投与し（垂直線を有するバー）、群４のマウスには、１００μｌの４＊１０^{11}ＭＥＶ／マウスをＩＴデリバリーによって投与した。

【０６４０】

結果は、血液－、腎臓－、および肝臓－関連毒性のうち１つまたは複数がある場合に変更され得る血液パラメータを提示する。ヘマトクリット、ヘモグロビン、好酸球レベル、ＲＢＣ数および体積（ＭＣＶ）は血液学的パラメータであり、尿素およびクレアチンは腎臓傷害の生化学的マーカーであり、ＡＬＡＴ（またはＡＬＴ）およびＡＳＡＴ（またはＡＳＴ）は肝臓傷害の生化学的マーカーである。アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＡＴ）とも呼ばれるアラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）は、血漿において、および種々の身体の組織において生じるが、最も一般的には肝臓において生じるトランスアミナーゼ酵素である。ＡＬＴの有意に上昇したレベルは、肝臓関連問題、例えば、肝炎および／または肝臓損傷と関連付けることができる。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＡＴ）としても知られるアスパラギン酸トランスアミナーゼ（ＡＳＴ）は、アミノ酸代謝において重要な別のトランスアミナーゼ酵素である。肝臓毒性を超えて、他の臓器に影響を及ぼす疾患においてもＡＳＴは上昇され得る。血清ＡＬＴレベル、血清ＡＳＴレベルおよびその比率（ＡＳＴ／ＡＬＴ比率）は、肝臓の健康のバイオマーカーとして臨床的に使用される。本研究では、ＡＬＴおよびＡＳＴレベルには実験群間に統計的に有意な相違は観察されなかった。

【０６４１】

好酸球は、さまざまな白血球であり、脊椎動物において多細胞性寄生生物およびある特定の感染症との闘いに関与する免疫系構成成分の１つである。好酸球は普通、循環白血球の７％未満を占める。感染または寄生生物感染と関連する原因を超えて、好酸球レベルの上昇（好酸球増加症としても知られる）はまた、アレルギー性またはアトピー性反応の徴候でもある。本研究では、好酸球レベルにおいて実験群間で統計的に有意な相違は観察されなかった。

【０６４２】

組織学

主な臓器を採取し、４％のＰＦＡで固定し、パラフィン包埋し、切片に切断し、Ｈ＆Ｅで染色した。

【０６４３】

肺

肺切片で観察された病理組織学的変化は、気管内陰性対照材料および試験品目を投与されている動物において検査された８／１０肺切片において最小から軽度の局所的から多焦性の肺胞出血に主に制限されている。変化は相対的にわずかであり、肺胞空間の一部に制限されていた。この観察結果は、陰性対照および処置された動物において同等の罹患率および重症度で観察された。

【０６４４】

腎臓

４×１０^{11}ＭＥＶ用量を用いてＰＯ処置された１匹の動物において少数の好塩基性尿細管の存在が観察された。この所見は、重症度が最小であったが、実験室げっ歯類動物において低罹患率および重症度で自発的に観察されることが多い。したがって、本研究において起源が偶発的なものであると考えられる。

【０６４５】

脾臓、肝臓および脳

検査されたすべての切片において脾臓、脳または肝臓において病理組織学的変化は観察されなかった。

【０６４６】
まとめ
気管内に実験材料を投与されているほとんどの動物において観察された肺の変化は、処置関連ではないと考えられた。検査されたすべての臓器において処置関連は観察されず、これは、ＭＥＶは実験条件下で動物にとって毒性ではないことを示した。
【０６４７】
Ｃ．結論
臨床態様に関して、研究の各時点ですべての動物が、正常な挙動、体重、水および食物消費を示した。臨床所見は、試験ＭＥＶ生成物のマウスモデルにおける一般的な耐性を示す。実験条件下で、陰性対照（ＰＢＳ）ならびに経口投与による４＊１０^{11}ＭＥＶ／マウスまたは４＊１０^{12}ＭＥＶ／マウスの濃度およびＩＴ投与による４＊１０^{11}ＭＥＶ／マウスの濃度のＭＥＶの両方とも、動物に対して異常な、毒性効果を何ら誘導しなかった。
［実施例８］
【０６４８】
正常ヒトケラチノサイトにおけるカーゴが負荷されたＭＥＶの内部移行
Ａ．細胞培養
健康なボランティアの皮膚からヒトケラチノサイトを単離し、４回の最大継代で実験のために使用する。細胞を、７５ｃｍ^{2}フラスコ中で単層として増殖させ、１００％の湿度および５％のCO_2を用いて３７℃でインキュベートする。２０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１％のペニシリン／ストレプトマイシンおよび１％のファンギゾンを用いて強化したＲＰＭＩ１６４０を培養培地として使用する。培養培地は、細胞の増殖を確実にし、コンタミネーションを避けるために２日毎に交換する。細胞がひとたびサブコンフルエンスに到達すると、トリプシン（０．２５％）を用いて細胞をフラスコの底から剥離し、遠心分離し（１６００ｇ、４分）、新鮮な培養培地に再懸濁し、２×１０^{5}個細胞／プレートで播種する。
【０６４９】
Ｂ．ＧＦＰが負荷されたＭＥＶの細胞取り込み
ケラチノサイトによるＭＥＶの内部移行は、共焦点顕微鏡によって研究される。実験は、ガラススライド上で増殖されたサブコンフルエントのケラチノサイトで実施される。ＭＥＶに、上記のようにＧＦＰタンパク質を負荷し、種々の濃度で細胞に添加し、３７℃で２、４、８および２４時間インキュベートする。その後、細胞をＲＰＭＩ１６４０で２回洗浄し、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中４％のパラホルムアルデヒドで固定し、細胞膜の透過性を増大するためにＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（０．１％）で処置する。固定された細胞をＰＢＳで洗浄し、次いで、細胞核を可視化するためにヘキストブルーで染色し、アクチン細胞骨格を染色するためにファロイジン－フルオレセインイソチオシアネートコンジュゲートを用いる。染色後、細胞をＰＢＳで再度洗浄し、一晩乾燥させた。２０×　ＵＰｌａｎＳＡｐｏ対物レンズを備えた倒立共焦点顕微鏡ＦｌｕｏＶｉｅｗ　ＦＶ１０００　（Ｏｌｙｍｐｕｓ）を使用して顕微鏡画像を得る。それぞれ５５９／５７８ｎｍおよび３６０／４６０ｎｍの励起／発光の波長を用いてＧＦＰおよびヘキストを可視化する。
［実施例９］
【０６５０】
微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）によるヒトがん細胞のインビトロモジュレーション
Ａ．細胞培養
ヒト細胞株［ＡＴＣＣ（登録商標）］を、１０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ）、５０ユニット／ｍｌのペニシリンおよび５０μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補給したＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地）中で増殖させる。細胞は培養物で３７℃および５％のCO_2中で維持され、培地は３日毎に交換される。細胞を最適増殖条件で維持するために、それらを８０％のコンフルエンスで継代し、２０％のコンフルエンスで播種する。以下の細胞株が研究に使用された：

１）ＨＴ２９を発現するＭＹＣがん遺伝子（結腸がん）、ＰＡＮＣ－１（膵臓がん）およびＭＹＣ陰性ＬＮ－１８（悪性神経膠腫）、
２）ＳＣＬＣ－２１Ｈを発現するＲＡＳがん遺伝子（小細胞肺がん）、ＭＣＦ－７（乳がん）およびＲＡＳ陰性ＰＣ３（前立腺がん）、
３）ＡｓＰＣ－１を発現するＢＣＬ－２がん遺伝子（膵臓がん）、Ｕ－９３７（前単球性骨髄球性白血病）およびＢＣＬ－２陰性ＬＭ－ＭＥＬ－５３（悪性黒色腫）、
４）ＨｅｐＧ２を発現するＰＬＫ－１がん遺伝子（肝細胞腫）、ＰＣ３（前立腺がん）およびＰＬＫ－１陰性ＡｓＰＣ－１（膵臓がん）。

【０６５１】

Ｂ．ＲＴ－ＰＣＲ分析およびゲル電気泳動

細胞（１×１０^{6}）を、培養プレート中で２４時間増殖させる。次いで、ｓｉＲＮＡを保有するＭＥＶ（上記のようにエレクトロポレーションによって負荷された）または空のＭＥＶまたはｓｉＲＮＡ単独を、段階希釈でウェルに添加し、１～２４時間インキュベートする。インキュベーション後、培地を通常の培養培地と交換する。ＭＥＶ処置の７２時間後、ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）試薬を使用して培養細胞から全ＲＮＡを抽出する。ＲＮＡ沈殿物を遠心分離し、２０μｌのＲＮアーゼ不含水に溶解する。２６０／２８０ｎｍでのＵＶ分光光度計分析およびアガロースゲル電気泳動を使用して、精製されたＲＮＡの品質を確認する。４２℃で１時間１μｇの全ＲＮＡを逆転写して、ｃＤＮＡを合成し、次いでこのｃＤＮＡを２５μｌの反応物中で特異的プライマーを用いるＰＣＲ増幅に付す。次いで、ＰＣＲ産物を２％のアガロースゲルで分離し、臭化エチジウムで染色し、ＵＶトランスイルミネーターを用いて観察する。ＩｍａｇｅＪ分析ソフトウェアを用いてデジタル画像を定量化し、結果はＧＡＰＤＨに対する関連遺伝子の相対発現レベルとして表されている。

【０６５２】

Ｃ．定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いる遺伝子発現分析

ＭＥＶで処置され、合計７２時間培養された細胞を、トリプシン処理し、ＰＢＳで洗浄する。ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット（ＱＩＡＧＥＮ）を製造業者の使用説明書に従って使用して細胞ペレットから全ＲＮＡを抽出する。次いで、５００ｎｇの全ＲＮＡを、逆転写酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用してｃＤＮＡに逆転写し、ＬＣ４８０デバイスでＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０　ＳＹＢＲグリーンＩマスターキットを使用して（両方ともＲｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ製）リアルタイムＰＣＲを実施する。１８Ｓリボソーム ＲＮＡハウスキーピング遺伝子のＣＴに対して標的遺伝子の閾値サイクル（ＣＴ）を正規化することによってｍＲＮＡレベルを算出する。プライマーはＲｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ製のプライマーソフトウェアを使用して設計され、Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃから購入する。

【０６５３】

Ｄ．ウエスタンブロット解析

ＭＥＶで処置され、合計７２時間培養された細胞（２×１０^{6}）を、トリプシン処理し、ＰＢＳで洗浄し、β－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を補給したＲＩＰＡ緩衝剤中に氷上で溶解する。次いで、総タンパク質の５０μｇの試料を、１０％の標準ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）に付し、事前染色された分子量マーカーが並行して流される。その後に、分離したタンパク質を、ＰＶＤＦメンブレンにエレクトロトランスファーする。徹底的に洗浄した後、メンブレンを、関連する西洋ワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートしている抗体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）とともに室温で１時間インキュベートし、化学発光検出キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて発色させる。負荷および／または定量化誤差について正規化し、また標的タンパク質発現の比較を可能にするために、腫瘍性タンパク質についてプローブされたメンブレンが、β－アクチンについて再度プローブされる。タンパク質発現は、ゲル分析システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて定量化される。

【０６５４】
Ｅ．細胞増殖アッセイ
細胞を９６ウェルプレート（１０，０００細胞／ウェル）中に播種し、１８時間付着させる。次いで、細胞を上記のようにＭＥＶを用いて処置し、処置の２４、４８および７２時間後、各ウェルにおいて細胞に１０μｌの１０ｍｇ／ｍＬ　ＭＴＴを添加する。細胞を４時間インキュベートし、その後、１００μｌのＤＭＳＯを添加し、細胞を１５分間溶解させる。すべての分析は、３連で実施する。４９２ｎｍの光学濃度は、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を用いて決定する。阻害剤比率を決定するために、次いで、吸光度値をブランク対照細胞から得られた値に対して正規化する。
【０６５５】
１．アポトーシス細胞形態学観察
アポトーシス細胞死と関連する細胞形態学が、細胞核をＤＮＡ結合性蛍光色素Ｈｏｅｃｈｓｔ３３２５８を用いて染色することおよび蛍光顕微鏡によってクロマチン縮合を評価することによって確立される。手短には、ウェルの底にガラススライドを備えた２４ウェルプレートに細胞を播種し、上記のようにＭＥＶを用いて処置する。その後、冷ＰＢＳを用いてスライドを穏やかに洗浄し、４％のパラホルムアルデヒドを用いて１時間固定し、ＰＢＳを用いて３回洗浄する。暗室中で３７℃で０．５ｍｌのＨｏｅｃｈｓｔ　３３２５８（１０μｇ／ｍｌ）を用いて１０分間、スライドを染色する。各群において、５つの顕微鏡視野を無作為に選択し、１００個の細胞をカウントする。次いで、アポトーシス細胞レベルを、蛍光細胞の総数に対するアポトーシス細胞のパーセンテージとして算出する。
【０６５６】
２．壊死性／アポトーシス細胞死の蛍光分析
フローサイトメトリー分析のために、細胞を２４ウェルプレート（１５，０００細胞／ウェル）に播種する。２４時間後、細胞を上記のようなＭＥＶを用いて処置する。その後に、細胞をＰＢＳで洗浄し、トリプシンを用いて剥離する。ＰＢＳ中０．２％のパラホルムアルデヒドで固定した後、細胞をアネキシンＶ　ＦＩＴＣ／ＰＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて標識し、ＬＳＲＩＩフローサイトメーターを使用しＣｅｌｌＱｕｅｓｔ（登録商標）ＰｒｏソフトウェアＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて分析する。
［実施例１０］
【０６５７】
外因的に負荷されたｓｉＲＮＡのインビボデリバリーおよび発現
この研究は、原核生物および真核生物微生物の遺伝子に対するｓｉＲＮＡが負荷されたＭＥＶの有効性を評価し、実証する。種々の細菌株［大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）］および酵母［カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）］は、グラム陽性種に対してグラム陰性種（ｌｕｘＡＢＣＤＥ）の細菌ルシフェラーゼ遺伝子ＬｕｘオペロンＣＤＡＢＥ）を、酵母種に対してカイアシ類ガウシア属（Ｇａｕｓｓｉａ）の種由来のルシフェラーゼ遺伝子を保有するように遺伝子改変されている。これらの微生物は、以下のようなインビボ感染モデルを提供する：
－緑膿菌、黄色ブドウ球菌／呼吸器系、
－緑膿菌、黄色ブドウ球菌およびカンジダ・アルビカンス／皮膚、
－大腸菌／消化系、
－大腸菌／泌尿生殖器性、および
カンジダ・アルビカンス／泌尿生殖器系および皮膚。
【０６５８】
細菌ルシフェラーゼ遺伝子Ｌｕｘオペロンまたは真核生物ルシフェラーゼに対するｓｉＲＮＡが負荷されたＭＥＶの干渉活性のリアルタイムモニタリングは、中でも、ＭＥＶのインビボで感染性細菌および酵母に浸透する能力を追跡する方法、異なる経路の適用およ

び組織による感染部位におけるＭＥＶの広がりをモニタリングする方法、ＭＥＶのコーディング遺伝子を干渉する能力をモニタリングする方法、および抗微生物治療薬、例えば、ｓｉＲＮＡを送達するＭＥＶの抗菌作用を評価する方法を提供する。

【０６５９】

１．インビボイメージング

動物は、上記のような雄のＢａｌｂ／Ｃマウスである。感染後、マウスを密接にモニタリングし、ＩＶＩＳ生物発光によって画像化して、インビボでルシフェラーゼによって放出される低レベルの光および生存動物において特定の組織に局在化する可能性がある生物発光細菌を検出し、これによって感染プロセスを時間的にモニタリングすることが可能になった。マウスを１ｘ１０^{10}粒子／ｇのＭＥＶを用いて処置した後、密接にモニタリングし、ＩＶＩＳ生物発光によって画像化して、ルシフェラーゼｍＲＮＡに対する種々のｓｉＲＮＡ集団の干渉活性によって表されるような干渉抗微生物処置の有効性を追跡した。データは、ＩＶＩＳソフトウェア（ＩＶＩＳ用Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いて分析した。

［実施例１１］

【０６６０】

外因的に負荷されたｍＲＮＡのインビボデリバリーおよび発現

アルビノウサギにおける単回眼性局所投与後の眼性分布

Ａ．材料および方法

ニュージーランドホワイト（アルビノ）ウサギは、眼性体内分布のために最も使用される種の１つである。眼性局所性投与研究では、８匹の、２～２．５ｋｇの間の体重の３ヶ月齢の雄を使用した。

【０６６１】

すべての動物に到着時に耳タグをつけ、組入れ検査後に消えないインクを使用して耳に識別番号も標識した。

【０６６２】

Ｂ．臨床検査および健康状態

動物を疾病の徴候について毎日観察し、その眼に特に注意をはらった。研究には、眼に見える眼性欠陥のない健康な動物のみを使用した。

【０６６３】

Ｃ．飼育

動物を標準ケージにおいて個別に飼育した。温度を１８＋／－３℃で、相対湿度を４５～８０％で保った。室内は連続的に換気した（１時間あたり１５～２０空気体積）。動物を１２時間明（７：００　ａ．ｍ．から７：００　ｐ．ｍ．）および暗さ制御サイクルで１０～２００　ｌｘの光に日常的に曝露させた（ケージ中）。

【０６６４】

Ｄ．食餌および水

動物は、プラスチックボトルから自由に利用可能な食餌（９０ｇ／日）および水を自由に利用できた。

【０６６５】

Ｅ．手順

適切なマイクロピペットを使用して、２×１０^{8}の、ｍＲＮＡ－ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶの用量で、すべての動物に両眼で５０μＬの単回滴下注入を投与した。蛍光測定法を以下のとおりに実施した：数時点で（投与後０、６、２４、３０、４８、５４および７２時間）、動物に麻酔し、瞳孔が散大し、両眼においてＦＭ－２　Ｆｌｕｏｒｏｔｒｏｎ（商標）　Ｍａｓｔｅｒ眼性蛍光光度計を用いて眼性蛍光の測定を実施した。光学軸に沿って角膜から網膜まで、刻み幅０．２５ｍＭで一連の１４８スキャンを記録した。

【０６６６】

Ｆ．結果：

蛍光光度計によって光学軸に沿って０．２５ｍＭ離れるデータ点で、種々の眼性組織（

脈絡膜／網膜、硝子体、レンズ、前房、角膜）における蛍光シグナルを取得した。硝子体または前房において任意の検出可能な蛍光が測定された。すべての動物の結果が、図１９にまとめられている。

【０６６７】

Ａ．ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）の正常ヒト肝細胞へのデリバリー

１．原発性ヒト肝細胞（ＰＨＨ）の単離および培養

結腸直腸がん転移または原発性肝臓がんの処置のために部分肝切除術を行っている対象から組織学的に正常な肝臓組織試料を得る。すべての試料は、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）およびヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）について血清陰性である。手短には、肝臓断片を予め加温した（３７℃）、５ｍＭｏｌ／Ｌエチレングリコール四酢酸（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を補給したカルシウム不含緩衝剤を用いて最初に灌流し、続いて、予め加温した（３７℃）、６ｍＭｏｌ／ＬカルシウムＣａＣｌ$_2$）および０．０５％のコラゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を含有する緩衝剤を用いて灌流する。次いで、肝臓断片を穏やかに振盪して、肝細胞洗浄培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中に肝臓細胞を分散させる。得られた細胞懸濁液を、ガーゼを敷いた漏斗を通して濾過する。次いで、細胞を低速（５０ｇ）で遠心分離し、上清を除去し、ペレット化された肝細胞を肝細胞洗浄培地に再懸濁する。トリパンブルー排除を使用して生存細胞数を決定する。新たに単離された肝細胞を、１０％のウシ胎児血清（Ｅｕｒｏｂｉｏ）、ペニシリン（２００Ｕ／ｍｌ）－ストレプトマイシン（２００μｇ／ｍｌ；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ファンギゾン（２．５μｇ／ｍｌ；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）およびインスリン（０．１Ｕ／ｍｌ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を含有するＷｉｌｌｉａｍのＥ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に懸濁する。次いで、細胞を、Ｉ型コラーゲンを用いてプレコーティングされた１２－、２４－および９６ウェルプレートにそれぞれ０．７８×１０^6、０．４×１０^{6}および０．５×１０^{5}生存細胞／ウェルの密度で播種し、５％のＣＯ$_2$中、３７℃で一晩インキュベートする。培地を１μｍｏｌ／Ｌヘミコハク酸ヒドロコルチゾン（ＳＥＲＢ）を補給した新鮮な完全肝細胞培地と置き換え、カーゴが負荷されたＭＥＶとのインキュベーションまで細胞をこの培地で維持する。

【０６６８】

２．ＰＨＨ生存率に対するＭＥＶの効果

ＰＨＨ（１×１０^{5}個細胞／ｍＬ）を９６ウェルプレート播種し、一晩付着させる。次いで、細胞を、種々のカーゴが負荷されたＭＥＶ製剤または空のＭＥＶに４時間曝露する。インキュベーション後、各ウェルに２０μＬのＭＴＴテトラゾリウム色素溶液（５ｍｇ／ｍＬ）を添加する。３７℃で３時間のインキュベーション後、ＭＴＴ含有培地を除去し、各ウェルに１００μＬのＤＭＳＯを添加して、紫色のホルマザン沈殿物を溶解する。ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して５７０ｎｍで吸光度を測定し、細胞生存率は、未処置対照群と比較した処置群における生存細胞のパーセンテージとして表される。

【０６６９】

３．ＰＨＨにおけるＭＥＶ内部移行

ＰＨＨにおけるＧＦＰ－タンパク質－カーゴが負荷されたＭＥＶの内部移行を、フローサイトメトリーによって決定した。フローサイトメトリー分析のために、ＰＨＨを２４ウェルプレートに播種する（１５，０００細胞／ウェル）。２４時間後、細胞をＭＥＶとともに４時間インキュベートし、その後、ＰＢＳで洗浄し、酸性洗浄緩衝剤（０．５Ｍ ＮａＣｌ、０．２Ｍ酢酸）を用いて再度洗浄して、膜結合ＭＥＶを除去し、もう一度ＰＢＳを用いて洗浄する。トリプシンを用いて細胞を剥離し、ＰＢＳ中０．２％のパラホルムアルデヒドで固定し、ＬＳＲＩＩフローサイトメーターを使用し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ（登録商標） Ｐｒｏソフトウェア（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて分析する。共焦点顕微鏡分析のために、ＰＨＨを、４，０００細胞／ウェルで１６ウェルチャンバースライド（Ｌａｂ－Ｔｅｋ）に播種する。２４時間後、細胞をＭＥＶとともに４時間インキ

ュベートし、その後、ＰＢＳで洗浄し、酸性洗浄緩衝剤（０．５Ｍ　ＮａＣｌ、０．２Ｍ酢酸）を用いて再度洗浄して、膜結合ＭＥＶを除去し、もう一度ＰＢＳを用いて洗浄する。細胞をＰＢＳ中４％のパラホルムアルデヒドを用い、室温で２０分間固定する。次いで、スライドをＰＢＳを用いて洗浄し、ＦｌｕｏｒＳａｖｅ（商標）試薬（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を使用してマウントする。ＬＳＭ７００レーザースキャニング共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）を使用して共焦点蛍光イメージングを実施し、ＬＳＭ画像ブラウザーを用いて画像を処理する。

【０６７０】

４．遺伝子発現研究

ＧＦＰ－ｍＲＮＡ－カーゴが負荷されたＭＥＶの、ＰＨＨにおける内部移行および生物活性を、ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット（ＱＩＡＧＥＮ）を製造業者の使用説明書に従って使用してＰＰＨから抽出された全ＲＮＡによって決定する。次いで、５００ｎｇの全ＲＮＡを、逆転写酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用してｃＤＮＡに逆転写し、ＬＣ４８０デバイスでＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０　ＳＹＢＲグリーンＩマスターキットを使用して（両方ともＲｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ製）、リアルタイムＰＣＲを実施する。２８Ｓリボソーム ＲＮＡハウスキーピング遺伝子のＣＴに対して標的遺伝子の閾値サイクル（ＣＴ）を正規化することによってｍＲＮＡレベルを算出する。プライマーは、Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ製のプライマーソフトウェアを使用して設計され、Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃから購入する。

【０６７１】

５．タンパク質発現研究

さらに、標的化されたタンパク質発現は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥと、それに続くウエスタンブロット解析を使用して検証する。細胞を氷上でβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を補給したＲＩＰＡ緩衝剤で溶解する。次いで、３０μｇのタンパク質を煮沸し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに付し、ニトロセルロースメンブレン（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）にトランスファーする。ブロットを、５％のＢＳＡを含有するＴｒｉｓ緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）、０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を用いてブロッキングし、以下の抗体とともに４℃で一晩インキュベートする。その後に、ブロットを、関連するＨＲＰがコンジュゲートされた二次抗体とともに室温で１時間インキュベートする。化学発光（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって、シグナルが明らかにされる。

【０６７２】

Ｂ．ヒト肝細胞へのデリバリー

１．ヒト肝細胞の単離

ＰＨＨ（原発性ヒト肝細胞）を、部分肝切除術を行っている患者から得られた正常な肝臓組織から単離する。解離は、これまでに記載された２つの工程のコラゲナーゼ灌流法に基づいている（Ｌ．Ａｏｕｄｊｅｈａｎｅ，ＤＭＭ，２０２０）。次いで、勾配にわたる遠心分離によって細胞を分ける。異なる勾配を用いて、ペレットから肝細胞を、上清から非実質細胞（ＮＰＣ）を単離する。トリパンブルー色素排除によって細胞生存率を決定し、次いで、新たに単離されたＰＨＨを、Ｉ型コラーゲンでプレコーティングした１２－、９６－ウェルプレートに、それぞれ1×10^{6}、6×10^{4}生存細胞／ウェルの密度で播種し、５％のCO_2中、３７℃で一晩インキュベートした。

【０６７３】

２．細胞培養条件

細胞株Ｈｕｈ７およびＨｅｐＧ２ヒト肝細胞細胞株をＤＭＥＭ培地で培養し、コンフルエンスまで３７℃、５％のCO_2でインキュベートした。ＰＨＨ単離細胞の培地を、ヒドロコルチゾンを補給した新鮮な完全肝細胞培地と置き換え、５％のCO_2中、３７℃で２４時間および４８時間の異なる条件を用い、ＭＥＶと共にＤ３とＤ５の間のインキュベーションまでこの培地で細胞を維持した。Ｈｕｈ７およびＨｅｐＧ２（１２ウェルプレートにおいてウェルあたり2×10^{6}細胞）を、ＤＭＥＭ（１０％のＦＣＳ）中プラスチック上に３連で播種し、２４時間付着させた。次いで、すべての実験において、培地をＦＣＳ

不含ＤＭＥＭと置き換え、ＭＥＶを伴わずに（陰性対照のために）または研究される種々のＭＥＶとともに２４時間、４８時間細胞を培養した。

【０６７４】

３．細胞生存率評価

可溶性テトラゾリウム塩、ＭＴＴを、ミトコンドリアデヒドロゲナーゼ酵素によって青色ホルマザン最終生成物に変換する生存細胞の能力を試験する、３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－５－（３－カルボキシメトキシフェニル）－２－（４－スルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム（ＭＴＴ）比色アッセイによって、細胞生存率を決定した。各ウェルにＭＴＴ（０．５ｍｇ／ｍＬ）を添加し、３７℃でのインキュベーションをさらに２時間延長した。次いで、培地を破棄し、各ウェルにＤＭＳＯを添加して着色したホルマザン生成物を可溶化した。スキャニングマイクロタイター分光光度計プレートリーダーで５５０ｎｍで吸光度を読み取った。

【０６７５】

４．蛍光イメージングおよび共焦点イメージング：

ＭＥＶで処置されたＰＨＨおよび細胞株の蛍光画像をＯｌｙｍｐｕｓ（登録商標）ＩＸ８３顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ）で観察し、ｃｅｌｌＳｅｎｓ（登録商標）Ｖ１．６イメージングソフトウェアを用いて取得し、ＦＩＪＩソフトウェアを用いて分析した。

【０６７６】

５．ｍＲＮＡ検出のための逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）

全ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット（Ｑｉａｇｅｎ　ＳＡ、Ｃｏｕｒｔａｂｏｅｕｆ、フランス）を製造業者の推奨に従って使用して調製した。ｃＤＮＡ合成を、５００ｎｇの全ＲＮＡのために２ユニットのＲＮアーゼ阻害剤（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｃｈａｒｂｏｎｎｉｅｒｅｓ、フランス）、３ユニットの鳥類骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）、１２０ｎｇのランダムヘキサマープライマー（Ｓｉｇｍａ－Ｇｅｎｏｓｙｓ　Ｌｔｄ、Ｓａｉｎｔ－Ｑｕｅｎｔｉｎ　Ｆａｌｌａｖｉｅｒ、フランス）および１ｍＭ　ｄＮＴＰ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を含有する反応混合物中で４２℃で９０分間実施した。

【０６７７】

６．コラーゲンおよびα－ＳＭＡ評価のためのリアルタイム定量的ＰＣＲ

ＨＬＭＦにおけるコラーゲン－１およびα－ＳＭＡ遺伝子発現を、ＬＣ４８０機器および技術（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を用いてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０　ＳＹＢＲグリーンＩマスター（２×濃縮）キット（Ｒｏｃｈｅ、Ｇｒｅｎｏｂｌｅ、フランス）を使用してＲＴ－ＰＣＲによって分析した。ＬＣ４８０機器および技術（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を用いてＳＹＢＲ（登録商標）グリーンＩマスター（２×濃縮）キット（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を使用して、反応を確実にした。５μｌのＳＹＢＲ（登録商標）グリーンＩマスターミックス（２×）、１０ｎｇの各プライマー（Ｓｉｇｍａ－Ｇｅｎｏｓｙｓ　Ｌｔｄ；表を参照されたい）および２μｌのｃＤＮＡ（１／１０ｅｍｅ）を含有する、１０μｌの総容量でＰＣＲ増幅を実施した。ＰＣＲ増幅プロトコールは、９４℃で１０分間の最初の変性、続いて４０サイクル：変性（９５℃、１０秒間）、６０℃で１０秒間のアニーリングおよび伸長（７２℃、１０秒間）の１工程からなっていた。

【０６７８】

【表３１】

表 31. 定量的リアルタイム PCR に使用されたプライマー

遺伝子	フォワード(F)およびリバース(R)プライマーの配列	
eGFP	F:5'-AGCAAAGACCCCAACGAGA-3'	配列番号 66
	R:5'-TCGTCCATGCCGAGAGTG-3'	配列番号 67
アルブミン (ALB)	F: 5'-TTTTATGCCCCGGAACTCCT-3'	配列番号 128
	R: 5'-TTGGAGACTGGCACACTTGA-3'	配列番号 129
サイトケラチン 18 (CK18)	F: 5'-CATAGACAAGGTACGGTTCCTG-3'	配列番号 130
	R: 5'-TGTTGTCCATGTTGCTTCGAGC-3'	配列番号 131
28S (RN28S1)	F:5'- TTGAAAATCCGGGGGAGAG -3'	配列番号 132
	R:5'- ACATTGTTCCAACATGCCAG-3	配列番号 133

【０６７９】

７．ウエスタンブロット解析

細胞および組織を、補給されたＲＩＰＡ緩衝剤（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）に直接氷上で溶解した。２０μｇのタンパク質を煮沸し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに付し、ニトロセルロースメンブレン（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カリフォルニア州、ハーキュリーズ）にトランスファーした。ブロットを、５％の脱脂粉乳を含有するＴＢＳ、０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を用いてブロッキングし、以下の抗体：抗アルブミン（Ｄａｋｏ）、抗ｅＧＦＰ（Ｒｏｃｈｅ）とともに４℃で一晩、二次ＨＲＰ－連結抗体（１／２０００、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｅｕｒｏｐｅ　ＧｍｂＨ）とともに室温で１時間インキュベートした。化学発光（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって、シグナルが明らかにされた。

【０６８０】

８．結果：

表３２は、種々の実験条件のＲＴ－ｑＰＣＲ分析によるｍＲＮＡ発現の結果を示す。

【０６８１】

【表３２】

表32. ヒト肝細胞を用いるＭＥＶ内部移行研究における定量的リアルタイムＰＣＲを使用する遺伝子発現分析の結果。

実験条件	eGFP	28S	ALB	CK18
２４時間後				
PHH（　陰性対照　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH（　非負荷ＭＥＶ　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH（ＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶ）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH（ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ）	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
Huh7 細胞（　陰性対照　）	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
Huh7 細胞（　非負荷ＭＥＶ　）	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
Huh7 細胞（ＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶ）	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
Huh7 細胞（ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ）	(++)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（　陰性対照　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（　非負荷ＭＥＶ　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（ＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶ）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ）	(++)	(+++)	(+++)	(++)
４８時間後				
PHH（　陰性対照　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH（　非負荷ＭＥＶ　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH（ＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶ）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
PHH（ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ）	(++)	(+++)	(+++)	(++)
Huh7 細胞（　陰性対照　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Huh7 細胞（　非負荷ＭＥＶ　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Huh7 細胞（ＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶ）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Huh7 細胞（ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ）	(+)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（　陰性対照　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（　非負荷ＭＥＶ　）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（ＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶ）	(-)	(+++)	(+++)	(++)
Hep-G2 細胞（ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ）	(+)	(+++)	(+++)	(++)
ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ（　陽性対照　）	(++++)	(-)	(-)	(-)

キー：（－）陰性結果（ｍＲＮＡが存在しない）；（＋）陽性結果（低）；（＋＋）陽性結果（満足できる）；（＋＋＋）陽性結果（最良）；（＋＋＋＋）陽性結果（ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶ／陽性対照）

【０６８２】

表３３は、種々の実験条件の共焦点分析後の蛍光発現によるＧＦＰ発現の結果を示す。結果は、細胞数および蛍光強度を総合する。さらなるイメージング結果は、図２２および２３に提示されている。

【０６８３】

【表３３】

表33. ヒト肝細胞を用いるＭＥＶ内部移行研究における共焦点顕微鏡を使用するタンパク質発現分析の結果

実験条件	細胞あたり１００が負荷されたＭＥＶ	細胞あたり２００が負荷されたＭＥＶ	細胞あたり４００が負荷されたＭＥＶ
Huh7 細胞（ 陰性対照 ）	(-)	(-)	(-)
Huh7 細胞（ 非負荷ＭＥＶ ）	(-)	(-)	(-)
Huh7 細胞（ ＧＦＰタンパク質が負荷されたMEV ）	(+)	(+++)	(+++)
Huh7 細胞（ mRNA eGFPが負荷されたMEV ）	(++)	(+++)	(+++)
Hep-G2 細胞（ 陰性対照 ）	(-)	(-)	(-)
Hep-G2 細胞（ 非負荷ＭＥＶ ）	(-)	(-)	(-)
Hep-G2 細胞（ ＧＦＰタンパク質が負荷されたMEV ）	(+)	(++)	(+++)
Hep-G2 細胞（ mRNA eGFPが負荷されたMEV ）	(++)	(++)	(+++)

キー：（－）陰性結果（ＧＦＰ蛍光検出されない）；（＋）陽性結果（ＧＦＰ蛍光が検出された）；（＋＋）陽性結果（満足できる）；（＋＋＋）陽性結果

【０６８４】

以下の表３４は、ＭＴＴ比色アッセイによる生存率結果を示す。多量のＭＥＶ（負荷されたまたは負荷されていないＭＥＶ）とのインキュベーション後に非毒性が観察された。

【０６８５】

【表３４】

表34. ヒト肝細胞を用いるＭＥＶ内部移行研究における細胞生存率アッセイ結果

実験条件	生存率の%
Huh7 細胞（ 陰性対照 ）	100%
Huh7 細胞 (10,000 MEV)	80%
Huh7 細胞 (20,000 MEV)	80%
Huh7 細胞 (40,000 MEV)	80%
Hep-G2 細胞（ 陰性対照 ）	100%
Hep-G2 細胞 (10,000 MEV)	100%
Hep-G2 細胞 (20,000 MEV)	100%
Hep-G2 細胞 (20,000 MEV)	100%

【０６８６】

Ｃ．ヒト単球およびケラチノサイト

蛍光プローブ（ＧＦＰ）またはＧＦＰコーディングＲＮＡが負荷されたＭＥＶを用いるペイロードデリバリーを研究するためのインビトロモデルとしてヒト一次細胞を使用した。ヒト単球および／または正常ヒト上皮ケラチノサイト（ＮＨＥＫ）において細胞浸透および蛍光効果をアッセイした。

【０６８７】

１．一次細胞：

健康なボランティアからの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）をｌ’Ｅｔａｂｌｉｓｓｅｍｅｎｔ Ｆｒａｎｃａｉｓ ｄｕ Ｓａｎｇ（ＥＦＳ）から入手した。細胞培養培地マクロファージ－ＳＦＭ（Ｍ－ＳＦＭ）は、Ｇｉｂｃｏから購入した。ＮＨＥＫ細胞および培養培地（ＫＧＭ－Ｇｏｌｄ Ｂｕｌｌｅｔキット）はＬｏｎｚａから購入した。

【０６８８】

２．単球単離、細胞培養：

ＰＢＭＣは、標準フィコール－ハイパーク勾配法によって健康な血液ドナーバフィーコートから入手した。３７℃で、５％のＣＯ$_2$を含有する加湿雰囲気中、マクロファージ培養のために最適化された血清不含培地（Ｍ－ＳＦＭ）において２時間のプラスチックへの付着によって、単球をＰＢＭＣから単離した。ＮＨＥＫを製造業者（Ｌｏｎｚａ）の推奨に従って培養し、アッセイの前日に９６ウェルプレートに播種した。

【０６８９】

３．ＭＥＶ浸透アッセイ：

ＧＦＰタンパク質（ＭＥＶ－ＧＦＰ）またはｍＲＮＡｅＧＦＰ（ＭＥＶ－ｍＲＮＡ）のいずれかが負荷されたＭＥＶを、９６ウェルプレートにおいてＮＨＥＫおよび単球とともに４時間、８時間および２４時間インキュベートした。

【０６９０】

使用した用量は以下とした：

ＧＦＰタンパク質のために：	ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰのために：
Ｄ１＝１×１０^{7}ＭＥＶ／ウェル	Ｄ１＝１×１０^{7}ＭＥＶ／ウェル
Ｄ２＝５×１０^{6}ＭＥＶ／ウェル	Ｄ２＝５×１０^{6}ＭＥＶ／ウェル
Ｄ３＝１×１０^{6}ＭＥＶ／ウェル	Ｄ３＝２．５×１０^{6}ＭＥＶ／ウェル

【０６９１】

次いで、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、新鮮培地を添加した。次いで、プレートをＩｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）生細胞アナライザー装置に入れ、Ｐｒｏｔ－ＧＦＰについては０、６、１２、２４および４８時間で、ｍＲＮＡ－ＧＦＰについては０、１２、２４、４８および７２時間で画像を撮影した。

【０６９２】

４．画像解析：

Ｉｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）生細胞アナライザーソフトウェアを使用して画像を分析した。最初に細胞数を、続いて、蛍光レベルに対して閾値を適用することによって緑色蛍光を含有していた細胞数を定量化した。すべての画像で同一閾値を適用した。次いで、緑色蛍光を示す細胞のパーセンテージを、比率＝（緑色蛍光を含有する細胞／総細胞数）×１００として算出した。分析のタイムラインを示す図５１を参照されたい。

【０６９３】

５．単球の内部デリバリー：

Ｉｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）Ｎｕｃｌｉｇｈｔ試薬による処置後４８時間の蛍光の間隔の間、インキュベーションのすべての時間で緑色蛍光細胞を観察した。この観察結果は、ヒト単球へのＭＥＶの浸透およびＭＥＶから単球への緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）のデリバリーを実証する。第１の蛍光測定での結果に基づいて最適インキュベーション時間は８時間とした。細胞とともにインキュベートされた異なる量の小胞（１×１０^6～５×１０^{7}の間）後の用量効果が観察された。図２０ＡおよびＢは、８時間および２４時間のインキュベーション後の結果（洗浄後の４８時間の動態学における）を示す。

【０６９４】

６．ケラチノサイトの内部デリバリー：

Ｉｎｃｕｃｙｔｅ（登録商標）試薬による処置後４８時間の蛍光の間隔の間、インキュベーションのすべての時間で緑色蛍光細胞を観察した。この観察結果は、ヒトケラチノサイトへのＭＥＶの浸透およびＭＥＶからケラチノサイトへの緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）のデリバリーを実証する。第１の蛍光測定での結果に基づいて最適インキュベーション時間は８時間～２４時間である。細胞とともにインキュベートされた異なる量の小胞（１×１０^6～５×１０^{7}の間）後の用量効果が観察された。図２１は、８時間および２４時間のインキュベーション後の結果（洗浄後の４８時間の動態学における）を示す。

【０６９５】

Ｄ．異なるヒト細胞モデル（線維芽細胞）におけるＭＥＶの浸透およびペイロードの送達の評価

１．蛍光顕微鏡：

線維芽細胞（ヒト皮膚ＣＲＬ　２５２２　ＡＴＣＣ（登録商標）バッチ：７００２７１５５）を、ウェルごとに２×１０^{4}細胞で９６ウェルプレート中に播種した。Ｔｈｅｒｍｏ　Ｎｕｎｃｌｏｎ（登録商標）Ｄｅｌｔａ　Ｓｕｒｆａｃｅ　Ｄｉｓｐｏｒｓａｂｌｅプレート（９６ウェル）は、細胞培養にとって最適解像度を提供する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｎｕｎｃｌｏｎ、カタログ番号１６７４２５）。２０時間後、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）または緑色蛍光タンパク質をコードするｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ－ｅＧＦＰ）が負荷されたＭＥＶの異なる条件（ＭＥＶ／細胞の比率は１００～１０００の間である）を用いて、非完全培地中で細胞を一晩インキュベートした。１６時間後、細胞を２回すすぎ、新鮮な完全培地を添加した。１：２０００の希釈のＨｏｅｃｈｓｔ溶液を培地に添加して、核を染色した。その後、プレートのウェルの周囲に、このために作製されたコンパートメントに１ｍＬの水を入れた。Ｃｅｌｌｉｎｓｉｇｈｔ（登録商標）レーザーオートフォーカスカメラによってｔ＝２０時間、ｔ＝４８時間およびｔ＝７２時間で画像を撮像した。Ｃｅｌｌｉｎｓｉｇｈｔ（登録商標）プラットフォームと共に使用される培養条件は、３７℃のインキュベーターにおいてと同一である。写真は２０倍の対物レンズを備えた共焦点モジュールで撮像された。図２４は、１００の比率ＭＥＶ／細胞で３つの独立実験の結果を示す。

【０６９６】

２．フローサイトメトリー：

線維芽細胞（ヒト皮膚ＣＲＬ　２５２２ＡＴＣＣ（登録商標）バッチ：７００２７１５５）を、ウェルあたり２×１０^{6}細胞で６ウェルプレート中に播種した。２０時間後、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）または緑色蛍光タンパク質をコードするｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ－ｅＧＦＰ）が負荷されたＭＥＶの異なる条件（ＭＥＶ／細胞の比率は１００～１０００の間である）を用いて非完全培地中で細胞を一晩インキュベートした。１６時間後、細胞を２回すすぎ、新鮮な完全培地を添加した。異なる時間で、細胞をすすぎ、トリプシンで処置し、１，２００ｇで遠心分離し、ＰＢＳを用いて１回洗浄し、次いで、１ｍＬのＰＢＳに再懸濁した。

【０６９７】

３．線維芽細胞蛍光活性化細胞選別

ＧＦＰ－タンパク質が負荷されたＭＥＶまたはｍＲＮＡ－ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶとともに、または伴わずにインキュベーションした後、培養線維芽細胞におけるＧＦＰ発現をＦＡＣＳ分析によって評価した。線維芽細胞を、９６ウェルプレート中で、ウェルあたり２０００個細胞で培養した。２４時間後、線維芽細胞をＭＥＶとともにまたは伴わずに（異なる条件）インキュベートした。２４時間後に、トリプシン処理によって細胞をウェルから剥離し、ＰＢＳで２回洗浄し、次いで、ＧＦＰ発現蛍光細胞数測定のために生存細胞を分析した。図２５Ａ～Ｄは、緑色蛍光陽性細胞を示す。図２５Ａは、ＭＥＶを伴わずにインキュベートされた線維芽細胞を表す。図２５Ｂおよび２５Ｃは、異なる方法（それぞれ凍結および解凍またはエレクトロポレーション）によってｍＲＮＡ－ｅＧＦＰが負荷されたＭＥＶと共にインキュベートされた線維芽細胞を表す。図２５Ｄは、超音波処理によってＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶとともにインキュベートされた線維芽細胞を示す。結果は、ＢおよびＤ条件において５％ならびにＣにおいて８％の対照を上回る陽性細胞のパーセンテージを示す。

【０６９８】

Ｅ．抗菌ペプチドが負荷されたＭＥＶに関する研究

単離されたＭＥＶに、Ｐｒｏｔｅｏｇｅｎｉｘ（Ｌｉｌｌｅ、フランス）によって商業的に合成され、９０％の純度を有する抗微生物ペプチドＬＬ－３７（ＬＬＧＤＦＦＲＫＳＫＥＫＩＧＫＥＦＫＲＩＶＱＲＩＫＤＦＬＲＮＬＶＰＲＴＥＳ；配列番号３７）を用いて上記のように超音波処理を使用して負荷する。抗微生物ペプチドの放出は、透析およびフルオレサミンアッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって製造業者のプロトコールに従ってモニタリングされる。１ｍＬの試料を、透析デバイス（Ｆｌｏａｔ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ（登録商標）Ｇ２１００ｋＤａ　ＭＷＣＯデバイス、Ｓｐｅ

ｃｔｒｕｍ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ．）に入れ、室温で２０ｍＬの２０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝剤ｐＨ５．５中で透析を可能にする。０、１、２、４、６および２４時間の透析後に２００μＬの試料を取り出す。マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用するフルオレサミンアッセイを用いてペプチド定量化を実施し、標準曲線は２．５～１５０μｇ／ｍＬのペプチドの範囲で良好な直線性を示す。

【０６９９】

緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）エラスターゼ（ＰＥ）またはヒト好中球エラスターゼ（ＨＮＥ）とのＭＥＶ分散物のインキュベーション後に、ペプチドＬＬ－３７のタンパク質分解性保護を調査する。ペプチドが負荷されたＭＥＶ（２μｇのペプチドの総量）を、１５μＬの容量の０．２μｇのＰＥ（ＢｉｏＣｏｌ Ｌａｂｓ）または０．４μｇのＨＮＥ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）と一緒に、１０ｍＭ ＴＲＩＳ緩衝剤ｐＨ７．４中で３７℃で６時間インキュベートする。対照試料のために、ＭＥＶを溶解し、その後、９５μＬのＭＥＶ混合物中に５μＬの０．４％のＳＤＳを添加し、十分にピペッティングし、８５℃のサーモサイクラー中で１５分間インキュベートすることによって、酵素とともにインキュベートして、生体分子カーゴを放出する。ペプチド分解は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後にクマシーブリリアントブルー染色を用いて可視化する。ＩｍａｇｅＬａｂソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用い、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍａｇｅｒ Ｇｅｌ ＤＯＣによってバンド強度を定量化する。

【０７００】

タンパク質分解後の殺菌特性を評価するために、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）［ＡＴＣＣ（登録商標）２５９２２］および黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）［ＡＴＣＣ（登録商標）２５９２３］を使用して、酵素とのインキュベーションの前後にＭＥＶ製剤で放射性拡散アッセイを実施する。８５ｍｍペトリ皿中で成形された下層アガロースゲルに４×１０^{6}ＣＦＵを添加し、固化後に４ｍｍ直径のウェルの穴があけられる。各ウェルに６μＬの試料を添加し、プレートを３７℃で３時間インキュベートする。溶解したＭＥＶを対照試料として使用する。その後、融解した上層アガロースゲルで下層ゲルを覆い、室温で一晩インキュベートする。各ウェルの周りの透明なゾーンとして試料の抗細菌活性が可視化される。結果は、種々の製剤によって形成された透明なゾーンの平均直径として提示される。

［実施例１２］

【０７０１】

微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）を用いて神経細胞を標的化すること

インビトロでニューロンにおけるｓｉＲＮＡ－およびｍＲＮＡが負荷された微細藻類細胞外小胞（ＭＥＶ）の生物活性

１．マウスニューロン培養物におけるＲＮＡｉによって誘導されるノックダウン

ＤＩＶ１０－１４海馬解離培養物中のマウス錐体細胞を、全細胞パッチクランプ技術を使用して分析し、自発的興奮活動（ｓＥＰＳＣ）を記録する。培養物は、未処置であるか、または異なる濃度（１０^{6}～５×１０^{10}個の粒子）もしくはプレインキュベーション期間（０．５～２４時間）でｓｉＲＮＡが負荷されたＭＥＶとともにプレインキュベートされるかのいずれかである。各細胞について、ベースラインシグナルが３分間記録され、ノックダウン有効性を評価するために記録される適用後バクロフェン（２０μＭ）と比較される。分析には、ｓＥＰＳＣ周波数、振幅および膜パラメータ（Ｒｍ、Ｒｓ、Ｃｍ）が含まれる。

【０７０２】

２．ＫＯニューロンマウス培養物における過剰発現／レスキュー

ＧＡＢＡＢ１ａ$^{-}$／$^{-}$マウスからのＤＩＶ１０－１４海馬解離培養物中の錐体細胞を、全細胞パッチクランプ技術を使用して分析し、自発的興奮活動（ｓＥＰＳＣ）を記録する。培養物は、未処置であるか、または異なる濃度（１０^{6}～５×１０^{10}個の粒子）もしくはプレインキュベーション期間（０．５～２４時間）でＭＥＶとともにプレインキュベ

ートされるかのいずれかである。各細胞について、ベースラインシグナルが３分間記録され、レスキュー有効性を評価するために記録される適用後バクロフェン（２０μＭ）と比較される。分析には、ｓＥＰＳＣ周波数、振幅および膜パラメータ（Ｒｍ、Ｒｓ、Ｃｍ）が含まれる。

【０７０３】

３．ヒトニューロン培養物におけるＲＮＡｉ誘導性ノックダウン

ｉＰＳＣ由来のヒトグルタミン酸作動性神経細胞を、全細胞パッチクランプ技術を使用して分析し、自発的興奮活動（ｓＥＰＳＣ）を記録する。培養物は、未処置であるか、または異なる濃度（10^6～5×10^{10}個の粒子）もしくはプレインキュベーション期間（０．５～２４時間）でＭＥＶとともにプレインキュベートされるかのいずれかである。各細胞について、ベースラインシグナルが３分間記録され、ノックダウン有効性を評価するために記録される適用後バクロフェン（２０μＭ）と比較される。分析には、ｓＥＰＳＣ周波数、振幅および膜パラメータ（Ｒｍ、Ｒｓ、Ｃｍ）が含まれる。

【０７０４】

４．パッチ－クランプ分析

電圧－クランプ記録のために、カバーガラス上の８～１０日齢の培養脊髄ニューロンを、１３０．５ｍＭ　ＮａＣｌ、２．４ｍＭ　ＫＣｌ、２．４ｍＭ　$CaCl_2$、１９．５ｍＭ　$NaHCO_3$、１．３ｍＭ　$MgSO_4$、１．２ｍＭ　KH_2PO_4、１．２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１０．０ｍＭグルコースを含有し、９５％のO_2および５％のCO_2で平衡化された通常のＫｒｅｂｓ液、ｐＨ７．４に、室温（２０～２３℃）で浸漬した。カバーガラスをチャンバーに入れ、４０ｘ水液浸レンズ（ＬＵＭＰｌａｎＦＩ／ＩＲ）およびＣＣＤカメラＣ２４００－０３（Ｈａｍａｍａｔｓｕ、日本、浜松市）を備えた正立顕微鏡ＢＸ５１ＷＩ（Ｏｌｙｍｐｕｓ　Ｆｒａｎｃｅ、フランス、ランジス）を使用し、赤外ＤＩＣビデオ顕微鏡によって可視化した。培養物を、Ｋｒｅｂ溶液を用い、１．６ｍＬ．mn^{-1}で継続的に灌流した。パッチピペット（６～８Ｍ　Ω）を１２０ｍＭグルコン酸カリウム、２０ｍＭ　ＫＣｌ、０．１ｍＭ　$CaCl_2$、１．３ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＥＧＴＡ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、０．１ｍＭ　ＧＴＰ、０．２ｍＭ　ｃＡＭＰ、０．１ｍＭ　ロイペプチン、３ｍＭ　Na_2－ＡＴＰおよび７７ｍＭ　Ｄ－マンニトール、ｐＨ７．３で満たした。シリーズ抵抗は無視できるものであった。ミニチュアＥＰＳＣを、１０－６Ｍのテトロドトキシン（ＴＴＸ）の存在下で電圧クランプ様式（保持電位－６０ｍＶ）で記録した。このような実験条件では、記録されるニューロン中に正電流を注入した後に活動電位を誘発できず、これは、活動電位伝播の完全遮断を実証する。シグナルはＡｘｏｃｌａｍｐ　２Ｂ増幅器を使用して増幅され、１０ｋＨｚでデジタル化された。２分の期間にわたってミニ分析ソフトウェアを使用して生データから個々の事象を抽出し、一般的な形状に従って視覚的にフィルタリングした。

［実施例１３］

【０７０５】

実施例１３および１４の材料および方法

Ａ．全ＲＮＡ抽出（クロレラ属）

２００～８００ｍｌの液体クロレラ属培養物（5×10^6～1×10^7細胞／ｍｌ）を、遠心分離（Ｂｅｃｋｍａｎローター　ＪＡ１８、１００００ｇ、１０分、４℃）によって回収し、ペレットを１×ＰＢＳで洗浄し、液体窒素中で急速凍結した。凍結されたペレットを、乳鉢および乳棒を使用して液体窒素中で微粉に粉砕した。約１００ｍｇの粉末を使用して、ＴＲＩ試薬（登録商標）ＲＮＡ単離試薬（Ｓｉｇｍａ、ミズーリ州、セントルイス）を製造業者の使用説明書に従って使用して全ＲＮＡ抽出を実施した。

【０７０６】

Ｂ．気孔再開口アッセイ

気孔の完全な拡張を確実にするために、植物（４／５週齢、８時間／１６時間の明／暗光周期）を、少なくとも３時間光（１００μＥ／m^2／ｓ）下で維持し、その後、それらを任意の処置に付した。条件あたり少なくとも６つの無傷の若い葉の切片を、水または細

菌懸濁液に浸漬した（10^8ｃｆｕ／ｍｌの濃度で、ＯＤ$_{600}$＝０．２）。細菌感染の１時間前に、切片をＭＥＶ（約１０ｐＭから）または全ＲＮＡ（２０μｇ）のいずれかで処置した。３時間の細菌による感染で、葉切片をプロピジウムヨージド（H_2O中の１０ｎｇ／ｍｌ）を用いて１０分間標識し、H_2Oで５分間洗浄し、ＳＰ５レーザースキャニング共焦点顕微鏡下で観察した。各状態について、異なる葉表面領域から約１０～１５の写真を撮像した。写真から、ＩｍａｇｅＪ　１．５３ｃを使用して条件あたり少なくとも６０の気孔を手作業で測定して、その幅および長さを得た。エクセルを使用して幅／長さの比率を算出し、分散分析（ＡＮＯＶＡ）試験を使用して統計分析を実施した。

【０７０７】

Ｃ．気孔閉鎖アッセイ

気孔の完全な拡張を確実にするために、植物（４／５週齢、８時間／１６時間の明／暗光周期）を、少なくとも３時間光（１００μＥ／m^2／ｓ）下で維持し、その後、それらを任意の処置に付した。条件あたり少なくとも６つの無傷の若い葉の切片を、水に浸漬し、ＭＥＶ（約１０ｐＭから）またはｆｌｇ２２　１μＭ（ＱＲＬＳＴＧＳＲＩＮＳＡＫＤＤＡＡＧＬＱＩＡ、配列番号５０、ＧｅｎｅＳｃｒｉｐｔから提供される）のいずれかを用いて処置した。処置後１時間で、切片をプロピジウムヨージドで染色し、水で洗浄し、ＳＰ５レーザースキャニング共焦点顕微鏡下で観察した。データ分析を含むすべてのこれらのステップを、気孔再開口アッセイプロトコールに記載されるように実施した。

【０７０８】

Ｄ．実生成長阻害アッセイ

実生を、２２℃で１６時間／８時間光周期下で、１３　ＭｕｒａｓｈｉｇｅおよびＳｋｏｏｇ（ＭＳ）培地（Ｄｕｃｈｅｆａ）、１％のスクロースおよび１％の寒天を含有するプレートで７～８日間成長させた。次いで、実生をｆｌｇ２２ペプチド（ＱＲＬＳＴＧＳＲＩＮＳＡＫＤＤＡＡＧＬＱＩＡ、配列番号５０、ＧｅｎｅＳｃｒｉｐｔから提供される）が負荷されたＭＥＶ、ｆｌｇ２２ペプチド単独、水または対照ＭＥＶを含有するＭＳ液体培地（２４ウェルプレートのウェル中、５００μｌの培地あたり１つの実生）に移した。Ｃｏｌ－０遺伝子型の対照対処置された実生の新鮮重を、７～８日後に測定した。

【０７０９】

Ｅ．パターン誘導免疫性（ＰＴＩ）マーカー遺伝子のＲＴ－ｑＰＣＲ定量化

シロイヌナズナ属（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）におけるＰＴＩマーカーの発現を定量化するために、４／５週齢植物の葉に、ｆｌｇ２２　１μＭが負荷されたクロレラ属ＭＥＶ、水または対照ＭＥＶを浸潤させた。浸潤後、処置の３、６および９時間後、葉を収集し、液体窒素中で凍結した。凍結した葉を、乳鉢および乳棒を用いて粉末に粉砕し、その後、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）　ＲＮＡ　Ｐｌａｎｔキット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ、７４０９４９．２５０）を製造業者の使用説明書に従って用い、約１００ｍｇの粉末を使用してＲＮＡ抽出を実施した。ＮａｎｏＤｒｏｐ（登録商標）システムと、すべての混入しているゲノムＤＮＡを排除するためにＤＮアーゼＩ（ＲＱ１　ＲＮアーゼ不含ＤＮアーゼ、Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍ６１０１）を用いて消化された５００ｎｇとを使用して全ＲＮＡを定量化した。ＤＮアーゼ処置は製造業者のプロトコールに従って実施した。次いで、消化されたＲＮＡを、ｑＳｃｒｉｐｔ（登録商標）　ｃＤＮＡ　ＳｕｐｅｒＭｉｘ（Ｑｕａｎｔａｂｉｏ、７３３－１１７８）を製造業者によって記載されたように使用してレトロ転写（ｒｅｔｒｏ－ｔｒａｎｓｃｒｉｂｅｄ）した。得られたｃＤＮＡを水で１：３希釈し、１μｌを使用し、適当な遺伝子特異的オリゴヌクレオチドおよびＴａｋｙｏｎ（商標）　Ｎｏ　ＲＯＸ　ＳＹＢＲ　２Ｘ　ＭａｓｔｅｒＭｉｘブルーｄＴＴＰ（Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃ、ＵＦ－ＮＳＭＴ－Ｂ０７０１）ミックスを使用してｑＲＴ－ＰＣＲ反応を設定した。９５℃で１分の第１の変性工程、続いて、９５℃で１０秒および６０℃で４０秒の４５サイクルを有する「２工程」プロトコールを用いてｑＲＴ－ＰＣＲを実施した。反応の最後に、融解曲線生成の最後の工程を実施した。発現をシロイヌナズナ属ユビキチン遺伝子のものに対して正規化した［Pfaffl (2001) Nucleic Acids Res. 29(9):e45］。分析したＰＴＩ－マーカー遺伝子は以下であった：ＷＲＫＹ２９（Ｆｗ：

ＴＡＴＣＣＡＡＣＧＧＡＴＣＡＡＧＡＧＣＴＧＡ；Ｒｖ：ＴＴＴＴＣＴＴＧＣＣＡＡＡＣＡＣＣＣＴＴＴＴ）、ＦＲＫ１（Ｆｗ：ＴＡＴＣＴＴＧＡＧＣＴＧＧＧＡＡＧＡＧＡＧＧ；Ｒｖ：ＡＧＴＣＧＡＡＴＡＧＴＡＣＴＣＧＧＧＧＴＣＡ）およびＷＲＫＹ５３（Ｆｗ：ＣＡＧＡＣＧＧＧＧＡＴＧＣＴＡＣＧＧ；Ｒｖ：ＧＧＣＧＡＧＧＣＴＡＡＴＧＧＴＧＧＴＧ）（それぞれ配列番号５１、５２、５３、５４、５５および５６）。

【０７１０】

Ｆ．トリパンブルー染色による細胞死アッセイ

ＧＵＳまたはＡｖｒＲｐｍ１タンパク質（それぞれ配列番号６０および６１）を含有するクロレラ属ＭＥＶが浸潤した約１６～２０枚の葉を、エタノールで１：１希釈した、Ｌａｃｔｏｐｈｅｎｏｌトリパンブルー溶液（１０ｍｌ乳酸［ＤＬ　Ｓｉｇｍａ　Ｌ－１２５０］、１０ｇグリセロール、１０ｍｌ　$Ｈ_2Ｏ$および１０ｍｇトリパンブルー）中に移し、１～２分間煮沸した。次いで、葉を抱水クロラール（２．５ｇ／ｍｌ）中で一晩脱染し、水で数回（５～６回、１０分）洗浄した後、Ｏｌｙｍｐｕｓ　Ｍａｃｒｏ　Ｚｏｏｍ　Ｓｙｓｔｅｍ顕微鏡下で観察した。トリパンブルー染色をＩｍａｇｅＪ　１．５３ｃを使用して定量化した。

【０７１１】

Ｇ．細菌株

Ｐｔｏ　ＤＣ３０００ΔｈｒｐＬ株はＤｒ．　Ｃａｙｏ　Ｒａｍｏｓから寄贈された。Ｐｔｏ　ＤＣ３０００－ＷＴ－ＨｒｐＬおよび－ｍｕｔ－ＨｒｐＬ株、Ｐｔｏ　ＤＣ３０００ΔｈｒｐＬ株は、ＮＰＴＩＩｐｒｏを発現する、ＷＴ－ＨｒｐＬおよびＮＰＴＩＩｐｒｏ：ｍｕｔ－ＨｒｐＬプラスミドはそれぞれ、以前に特性決定された（それぞれ国際ＰＣＴ公開番号ＷＯ２０２００３５６１９およびＷＯ２０２００３５６２０として公開されている、国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０７２１６９およびＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０７２１７０）。

【０７１２】

Ｈ．ｄｓＲＮＡおよびｓＲＮＡインビトロ合成

インビトロ合成の鋳型をＰＣＲによって増幅させて、オリゴヌクレオチド配列の５’および３’末端の両方にＴ７プロモーターを導入した。寄生生物増幅を排除するために、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ゲルおよびＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ　ｕｐキット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ）を使用してＰＣＲ産物をゲル精製し、精製されたＰＣＲ産物を定量化し、インビトロＲＮＡ合成のために直接使用した。ＭＥＧＡｓｃｒｉｐｔ（登録商標）ＲＮＡｉキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カリフォルニア州、カールスバッド）を製造業者の使用説明書に従って使用してインビトロ合成を実施した。２μｇのＰＣＲ産物を、２０μｌの総反応体積（ヌクレアーゼ不含水で調整した）中で２μｌのＴ７ポリメラーゼ（Ｔ７酵素ミックス）、２μｌの１０×　Ｔ７反応緩衝剤および２μｌのリボヌクレオチド（ＡＴＰ、ＣＴＰ；ＧＴＰおよびＵＴＰ、各７５ｍＭで）とともに３７℃で一晩インキュベートした。

【０７１３】

転写反応後、ＤＮＡ鋳型およびｓｓＲＮＡを排除するために、ｄｓＲＮＡを２μｍのＤＮアーゼＩ、２μｌのＲＮアーゼおよび５μｌの反応緩衝剤を用いて処置した。キットとともに提供されるフィルターカートリッジを用いてｄｓＲＮＡを精製し、この工程後に得られた長いｄｓＲＮＡをＮａｎｏｄｒｏｐを用いて定量化し、その後の経験のために直接使用した。精製された長いｄｓＲＮＡをＳｈｏｒｔＣｕｔ（登録商標）ＲＮアーゼＩＩＩ（ＮＥＢ、マサチューセッツ州、イプスウィッチ）で消化することによってｓｉＲＮＡを得た。消化は３７℃で３０分間実施し、ｓｉＲＮＡをｍｉｒＶａｎａ（商標）ｍｉＲＮＡ単離キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カリフォルニア州、カールスバッド）を使用して精製した。その後の経験のために精製されたｓｉＲＮＡを直接使用した。プロトコールの各工程で、ゲル電気泳動（ＴＡＥ　１×、ＤＮＡ用に１％のアガロースおよびＲＮＡ用に２％）を実施して、種々の核酸の品質を調べた。

【０７１４】

Ｉ．フザリウム・グラミネアラム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ）胞子を用いる感染アッセイ

すべてのインビトロ感染アッセイについて、葉での、およびＰＤＡ（ジャガイモデキストロース寒天）プレートでの感染の各々のために、ｍＬ$^{-1}$あたり５×１０^{4}分生子を使用した。Ｆ．グラミネアラム（Ｆ．　ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ）胞子を、種々の量のｃｙｐ５１　ｄｓＲＮＡが負荷されたクロレラ属ＥＶとともに室温（約２５℃）で２時間インキュベートすることによって、ＰＤＡプレートでのアッセイを実施した。３００μｌの総容量をＰＤＡプレート表面上に堆積させ、滅菌条件で乾燥させた。成長阻害の有効性を決定するために、外因的に負荷された小胞を、クロレラ属ｃｙｐ５１　ＩＲトランスジェニック株（ＩＴ１９）と名付けられた安定細胞株からの全ＲＮＡおよびクロレラ属ＭＥＶならびに参照殺真菌剤と比較した。２４、４８および７２時間でのプレートの写真を撮像し、成長阻害を決定するために発達した菌糸体の量を測定した。シロイヌナズナ属の接種は、Ｆ．グラミネアラムを用いて剥離された葉に創傷接種することによって行った。１５の異なる４／５週齢のＷｔ植物の約２０枚のロゼット葉を剥離し、１％の寒天を含有する方形のペトリプレートに移した。外因的に負荷されたＭＥＶを各葉の表面上に堆積させ（ｄｅｐｏｓｅｄ）、短時間乾燥させた。Ｆ．グラミネアラム胞子の接種は、以前に記載されたように実施した［Koch A et al., (2012) J Phytopathol 60:606-610］。疾患症状の進行は、ＩｍａｇｅＪ　１．５３ｃアナライザーを使用してペトリ皿のデジタル写真から３ｄｐｉで病変サイズ（センチメートルで）を測定することによって決定した。これらの測定によって、非接種葉に対する感染症状を示す葉面積のパーセンテージを算出することが可能となった。

【０７１５】

Ｊ．β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）染色アッセイ

このアッセイのために、４／５週齢植物から約２０枚の葉に種々の濃度のＭＥＶ懸濁液を浸潤させた。浸潤の約２４／４８時間後、葉を剥離し、ＧＵＳ染色溶液中に浸漬し、各１５分間２／３回真空浸潤させた。葉を含有するプレートをパラフィルムで密閉し、３７℃で一晩インキュベートした。翌日、葉が完全に透明になり、青色のＧＵＳ染色だけが眼に見えるようになるまで、７５％のＥｔＯＨを用いて数回の洗浄を実施した。ＧＵＳ染色溶液は、１ｍＭ　Ｘ－Ｇｌｕｃ、５０ｍＭ　ＰＢＳ　ｐＨ７．２、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ　ｐＨ８、０．５％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含有する。染色された葉の写真を撮像し、ＩｍａｇｅＪ　１．５３ｃを使用して青色シグナルを定量化した。

［実施例１４］

【０７１６】

Ｐｔｏ　ＤＣ３０００　ｈｒｐＬ病原性因子を標的化するｓｉＲＮＡが外因的に負荷されたクロレラ属ＭＥＶの生物活性の決定

Ｐｔｏ　ＤＣ３０００の２つの主要な病原性因子と配列相同性を有する逆方向反復（ＩＲ）導入遺伝子を発現するトランスジェニッククロレラ属株を作成することによって、ＭＥＶの内因性負荷を試験した。第１の標的化されるＰｔｏ　ＤＣ３０００病原性因子は、植物毒素コロナチン（ＣＯＲ）の主要な構造成分をコードする、コロナファシン酸ポリケタイドシンターゼＩ（ｃｆａ６）遺伝子である［Brooks et al. (2004) Mol Plant Microbe Interact. 17(2):162-174］。第２のものは、ＩＩＩ型分泌系関連遺伝子の発現を直接制御し、ＣＯＲ生合成遺伝子の発現を間接的に調節すると知られている代替シグマ因子をコードするｈｒｐＬである［Fouts et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:2275-2280; Sreedharan et al. (2006) Molecular plant-microbe interactions MPMI 19:768-779］。

【０７１７】

クロレラ属ＭＥＶ中にｓｉＲＮＡを外因的に付加することが有効であり得ることを実証するために、Ｐｔｏ　ＤＣ３０００　ｈｒｐＬ（配列番号５７）に対して向けられる低分子ＲＮＡ二本鎖をインビトロで合成して、クロレラ属ＭＥＶ中に外因的に負荷し、Ｐｔｏ　ＤＣ３０００誘導性の気孔再開口を抑制する能力をモニタリングすることによって、

その生物学的有効性を試験した。このアッセイでは、ｓｉＲＮＡが負荷されたＭＥＶによる気孔再開口事象の阻害における有効性を、ｃｆａ６およびｈｒｐＬに対して向けられるｓｉＲＮＡを発現する安定なクロレラ属のトランスジェニック株からＭＥＶによって誘導された事象と比較した（それぞれ国際ＰＣＴ公開番号ＷＯ２０２００３５６１９およびＷＯ２０２００３５６２０として公開される、国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０７２１６９およびＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０７２１７０に記載される）。合成ｓｉＲＮＡ二重鎖（１μｇ）をクロレラ属ＭＥＶ中に負荷した（試料１２）。観察される効果が、ｓｉＲＮＡ混入に応じて変わる可能性を排除するために、試料を、小球菌ヌクレアーゼ（ＭＮａｓｅ）、一本鎖または二本鎖いずれかの形態であるすべての保護されていないＲＮＡを消化できる広範なＲＮアーゼを用いて処理した。陰性対照として空のＭＥＶを使用し、Ｐｔｏ　ＤＣ３０００　ｃｆａ６およびｈｒｐＬ遺伝子を標的化するｓｉＲＮＡを発現するトランスジェニック株ＩＴ２０－３に由来するＭＮアーゼ処置されたＭＥＶを、陽性対照として使用した。アッセイのために、すべての小胞を約２０ｐＭ（約１．２Ｅ１０粒子／ｍｌ）の濃度で使用した。結果は、ｓｉＲＮＡが負荷されたＭＥＶは、安定なＩＴ２０－３トランスジェニック株に由来するＭＥＶと同程度に気孔再開口を十分に阻害できることを明らかにした（図２６）。さらに、ＭＮアーゼ処置の際に試料はその生物活性を維持し、クロレラ属ＭＥＶが酵素分解からｓｉＲＮＡを保護することを示した。これらの結果は、十分な量の外因的に負荷された抗微生物剤ｓｉＲＮＡがＥＶの内側に位置して、予測された生物活性を誘発することをさらに示す。全体として、これらの知見は、クロレラ属ＭＥＶに生物学的に活性なｓｉＲＮＡを外因的に負荷できること、およびそれらがこのような低分子ＲＮＡを酵素分解から保護できること、およびこれらのｓｉＲＮＡが特定の生物活性を誘導するのに十分な量で細胞中に送達されることを証明する。

【０７１８】

感染の１時間前に種々のＭＥＶとともにインキュベートされた葉切片での３ｈｐｉでの気孔再開口アッセイ。対照として、空のＭＥＶ（Ｃｔｌ－）を陰性対照として使用した。Ｐｔｏ　ＤＣ３０００病原性遺伝子ｃｆａ６およびｈｒｐＬを標的化するｓｉＲＮＡをコードし、発現するクロレラ属の安定なトランスジェニック株ＩＴ２０－３（Ｃｔｌ＋）に由来するＭＥＶを陽性対照として使用した。ＩＴ２０－３細胞株は、ｓｉＲＮＡをコードし、したがって、内因的に負荷される（国際ＰＣＴ公開番号ＷＯ／２０２２／０５３６８７を参照されたい；ＥＰ　３９６７７４６も参照されたい）。

【０７１９】

ｓｉＲＮＡ試料１２は、ｃｆａ６およびｈｒｐＬ遺伝子を標的化する合成ｓｉＲＮＡ二重鎖が外因的に負荷されたＭＥＶに対応する。ＭＮアーゼ処置は、ｓｉＲＮＡ試料１２で、ならびにＣｔｌ＋小胞で３７℃で１５分間実施した。Ｎ、分析された気孔の総数。統計分析は、一元配置分散分析を使用して実施し、各条件の平均を、すべての他の条件の平均と比較した（ｐ値：ｎｓ＞０．０５、＊＊＊＜０．００１、＊＊＊＊＜０．０００１）。

［実施例１５］

【０７２０】

植物病原性真菌フザリウム・グラミネアラム中のＣｙｐ５１遺伝子を標的とするｄｓＲＮＡが外因的に負荷されたクロレラ属ＭＥＶの生物活性の決定

Ｆ．グラミネアラムは、穀類における壊滅的な疾患：赤カビ病（ＦＨＢ）および根腐れを引き起こす病原性子嚢菌真菌である。最近、３つのパラログシトクロム遺伝子、ｃｙｐ５１Ａ、ＢおよびＣを標的化するｄｓＲＮＡを使用する宿主誘導性遺伝子サイレンシング（ＨＩＧＳ）戦略は、インビトロ条件においてこの真菌病原体の成長の制限において有効であることが示された［Koch et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110: 19324-19329］。Ｋｏｃｈらにおいて報告された研究では、著者らは、同一真菌成長阻害が、真菌感染に先立って葉表面にｄｓＲＮＡを噴霧することによって達成され得ることを実証した［Spray Induced gene Silencing; Koch et al. (2016) PLOS Pathogens 12(10): e100590を参照されたい］。クロレラ属ＭＥＶ中に抗真菌剤ｄｓＲＮＡを外因的に負荷できることを実証するために、ｃｙｐ５１Ａ、ＢおよびＣに対して配

列相同性を有するｄｓＲＮＡのインビトロ合成を実施して、それらをクロレラ属ＭＥＶ中に負荷し、その抗真菌活性をインビトロで、および植物体アッセイにおいてさらに試験した。この試験を実施するために、２つのインビトロアプローチを用いた：ＰＤＡプレートでの、および剥離されたシロイヌナズナ属の葉でのＦ．グラミネアラム成長の分析。両場合において、８００、８０および８ｎｇ／ｍｌのｃｙｐ５１（配列番号５８）ｄｓＲＮＡの等価物を有するＭＥＶ濃度を使用し、対照として、トランスジェニッククロレラ属株（ＩＴ１９）からの、裸のｃｙｐ５１　ｄｓＲＮＡ、全ＲＮＡおよびＭＥＶならびに参照殺真菌剤も適用した。

［実施例１６］

【０７２１】

ｍＲＮＡおよびタンパク質が外因的に負荷されているクロレラ属ＭＥＶの生物活性の決定

ｍＲＮＡまたはタンパク質が負荷されたクロレラ属ＭＥＶの生物活性を特徴づける２つの異なるアプローチ：１）ＧＵＳ　ｍＲＮＡおよびタンパク質（それぞれ配列番号５９および６０）を使用する、シロイヌナズナ属の葉におけるＧＵＳ染色アッセイ、ならびに２）超高感度応答（ＨＲ）としても知られる植物細胞死アッセイ。このアッセイは、細胞内宿主免疫受容体ＲＰＭ１によって認識され、ＲＰＭ１の機能的コピーを発現するシロイヌナズナ属系統（例えば、Ｃｏｌ－０参照系統）において強力なＨＲを誘発することが知られている、細菌エフェクターＡｖｒＲｐｍ１（配列番号６１）によってコードされるタンパク質を利用する。第１のアプローチのために、本発明者らは、種々の濃度の、ＧＵＳ　ｍＲＮＡまたはタンパク質のいずれかが負荷されたＭＥＶを、剥離されたシロイヌナズナ属の葉に直接的にシリンジ浸潤させた。１００ｎｇ／μｌのｍＲＮＡと同等の濃度を有する、単一のｍＲＮＡが埋め込まれたＭＥＶ、ならびに１、５および１０μｇ／μｌのＧＵＳタンパク質と同等である３つの異なる量のタンパク質が負荷されたＭＥＶを使用した。ＭＥＶ浸潤後、ＧＵＳ染色溶液を用いて葉に真空浸潤させ、一晩オーバーナイトでインキュベーションさせた。ＧＵＳ酵素の活性に起因する青色シグナルの定量化によって、ｍＲＮＡとタンパク質デリバリー効率の間の直接比較が可能となった。第２のアプローチのために、エフェクタータンパク質ＡｖｒＲｐｍ１が負荷されたＭＥＶをシロイヌナズナ属の葉に浸潤させた。ＧＵＳ（陰性対照）またはＡｖｒＲｐｍ１タンパク質のいずれかを保有するＭＥＶを用いて処置された、少なくとも３０枚のシロイヌナズナ属のＣｏｌ－０葉で、マクロ－ＨＲをトリパンブルー染色によってモニタリングした。

［実施例１７］

【０７２２】

ペプチドが外因的に負荷されたクロレラ属ＭＥＶの生物活性の決定

１０個～５０個のアミノ酸の範囲の小ペプチドは、細胞間コミュニケーション、植物発達、植物免疫応答ならびに他のプロセスおよび経路においてさまざまな応答を媒介できる強力なエフェクターである。このようなクラスの分子はまた、ペプチドを含む病原体から放出される分子の、宿主の細胞表面受容体からの認識に依存する機序である病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰ）応答を介して免疫防御の第一層を引き起こすこともできる。これに関連して、細菌フラジェリンの保存されたＮ末端領域を模倣する２２個のアミノ酸の合成ペプチドが使用され、これは、表面受容体フラジェリンセンシング２（ＦＬＳ２）によって感知され、それによって種々の植物種において強力な免疫応答を引き起こす。種々の濃度の合成ペプチドｆｌｇ２２（１０ｎＭ、１００ｎＭおよび１μＭ；配列番号５０）がクロレラ属ＭＥＶに負荷され、ＰＡＭＰによって引き起こされる免疫性の特徴、例えば、ｆｌｇ２２によって誘導される気孔の閉鎖、ｆｌｇ２２によって誘導される成長阻害および／またはＰＴＩマーカー遺伝子のｆｌｇ２２によって引き起こされる誘導を引き起こすＭＥＶの能力が評価される。陰性対照として、空のＭＥＶと、生物活性が予測されない１ｎＭのｆｌｇ２２ペプチドがアッセイにおいて使用され、一方で陽性対照として、３つの異なる濃度の合成ペプチドｆｌｇ２２（１０ｎＭ、０．１および１μＭ）が使用された。ＭＥＶ調製後に依然として存在する任意の可能性あるｆｌｇ２２ペプチド混入を排除するために、また、クロレラ属ＭＥＶがペプチドをプロテアーゼ活性から実際に保護できるか

否かを試験するために２つの追加の対照も含まれた。この目的のために、プロテイナーゼＫ（ＰｒｏＫ）単独（＋ＰｒｏＫ条件）、または植物ＥＶを破壊することが証明されている界面活性剤である（Rutter and Innes, 2017）、Ｔｒｉｔｏｎ（商標）　Ｘ－１００と組み合わせて（＋ＰｒｏＫ　＋Ｔｒｉｔｏｎ）のいずれかで、ｆｌｇ２２が負荷されたＭＥＶを処置した。知見によって、ｆｌｇ２２ペプチドが外因的に負荷されたクロレラ属ＭＥＶは、プロテイナーゼＫ処置後でさえ気孔閉鎖を誘導できることが明らかになった。これらのデータは、負荷された場合に、ｆｌｇ２２ペプチドは、生物活性であり、宿主細胞に効率的に送達され、ＥＶによって酵素分解から保護されることを示す（図２７）。追加のＴｒｉｔｏｎ処置は、おそらくはクロレラ属ＭＥＶの完全性を変更し、それによって、ＰｒｏＫがｆｌｇ２２ペプチドを分解することを可能にすることによって、このような生物活性を消失させた。これは、クロレラ属ＭＥＶが、ＭＥＶの内側に位置するｆｌｇ２２ペプチドをＰｒｏＫによって引き起こされる分解から保護することを示す。結果は、ｆｌｇ２２が負荷されたＥＶによって引き起こされる気孔に対する生物学的効果が、少なくとも１０ｎＭの遊離ｆｌｇ２２ペプチドと同等であることを示す。使用されるＭＥＶの濃度に基づいて［約１６ｐＭ（約１Ｅ１０粒子／ｍｌ）］、気孔に対する観察された効果を引き起こすには、各小胞に10^2より多いペプチド分子が負荷されると推測される。全体的に、結果は、クロレラ属ＭＥＶには、生物学的に活性なペプチドを外因的に負荷できること、ＭＥＶはペプチドを酵素分解から保護できること、およびこれらのペプチドは特定の生物活性を引き起こすのに十分な量で細胞中に送達されることを示す。

【０７２３】

ｆｌｇ２２ペプチドおよび同一分子が負荷されたＭＥＶとともにインキュベートされた、シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）［系統Ｃｏｌｕｍｂｉａ－０（Ｃｏｌ－０）］の葉の切片での処置後１．５時間での気孔閉鎖アッセイ。対照として、空のＥＶ（Ｃｔｌ－）および１ｎＭのｆｌｇ２２ペプチドを使用した。種々の濃度のｆｌｇ２２ペプチド（１０ｎＭ、０．１および１μＭ）を陽性対照として使用した。ｆｌｇ２２が負荷されたＥＶは、可能性のあるｆｌｇ２２混入（ＰｒｏＫ単独）を除去するために、および／または小胞完全性に影響を及ぼすために、未処置のまま（－ＰｒｏＫ）か、またはプロテイナーゼＫ単独（＋ＰｒｏＫ）とともに、もしくは１％のＴｒｉｔｏｎ Ｘ１００と組み合わせて（＋ＰｒｏＫ　＋Ｔｒｉｔｏｎ）インキュベートされるのいずれかとした。Ｎは、分析された気孔の総数である。統計分析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施し、各条件の平均を、すべての他の条件の平均と比較した。Ａ）およびＢ）は、ＡＮＯＶＡ分析（コンパクトな文字表示形式を使用した統計の視覚化）からペアワイズテーブルを分析することによって決定された異なる統計グループを表す。

【０７２４】

これらの実施例および説明における結果は、微細藻類ＭＥＶ、特に、クロレラ属ＭＥＶには、生物活性カーゴを外因的に負荷でき、これは、細胞および組織に送達されることができ、カーゴは活性であることを示す。この結果および他のデータおよび本明細書で提供される結果に基づくと、クロレラ属ＭＥＶには、生物活性カーゴを外因的に負荷でき、これは細胞および組織に送達されることができ、ここで生物活性カーゴは活性である。

【０７２５】

実施例１８～３１は、鼻腔内（ＩＮ）投与後のＭＥＶの体内分布を示し、記載する

［実施例１８］

【０７２６】

脳の特定の領域へのＭＥＶの薬物動態および体内分布

上記の実施例１および２に記載されるように、生成され、精製され、特性決定され、ＤｉＲで標識されたＭＥＶ（外因性負荷を記載する同時係属国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０７０３７１および内因性負荷を記載する同時係属米国仮出願番号第６３／３４９，００６号も参照されたい）を、鼻腔内投与によってＣ５７ＢＬ／６マウスに投与した。動物あたり単回の鼻腔内投与（各外鼻孔において２０ｍＬ）後、いくつかの時点（１時間、２時間、４時間および８時間）でマウスを安楽死させ、脳を注意深く単離し、脳

を切片にし、試料採取後最大３０分でＯＣＴに包埋し、ブレグマの異なる距離およびその動態でスライスした（図３６～４６を参照されたい；この実施例の最後に示されている）。図２９は、ＭＥＶ懸濁液の液滴が脳組織スライドの上部に堆積された、ＤＡＰＩ染色脳切片上の陽性対照ＤｉＲ－ＭＥＶを示し、赤色のドットは、ＤｉＲ標識されたＭＥＶである。

【０７２７】

Ａ．鼻腔内投与

マウスを、汚染を避けるために空気が連続的に濾過されている部屋の中でフィルターフードを備えたＭａｋｒｏｌｏｎ（登録商標）ポリカーボネートケージに収容した。実験の間、対の動物を、一定温度で、１２／１２時間の昼／夜サイクルでケージに入れた。

【０７２８】

動物は、水（対照水道水）および栄養を自由に受け取った。動物の健康を毎日調べて、良好な健康の動物のみが、試験手順および研究のフォローアップに入ることを確実にした。研究の開始時に、動物を尾に番号を付けて識別し、５群にわけた：

１群：ＰＢＳ処置動物および１時間で試料採取

２群：ＭＥＶ処置動物および１時間で試料採取

３群：ＭＥＶ処置動物および２時間で試料採取

４群：ＭＥＶ処置動物および４時間で試料採取

５群：ＭＥＶ処置動物および８時間で試料採取

【０７２９】

利き手を使用して鼻腔内化合物投与を行い、マイクロピペットに２０μｌのＭＥＶ（第１の外鼻孔のため）を充填した。満たされたピペットの先端を普通４５°の角度でマウスの左側外鼻孔の付近に置いた。液滴は、マウスが液滴を吸入できるように、マウスの外鼻孔の十分に近くに配置した。この手順を第２の外鼻孔のために再現した。動物あたり合計４０μｌのＭＥＶを投与した。完全に投与した後、マウスをこの位置で１５秒間保持した。

【０７３０】

Ｂ．臓器試料採取

マウスを頸椎脱臼によって　　殺した。側頭部の骨を開き、脳を試料採取した。各試料を５つの部分に迅速に分割し（図３６を参照されたい）、単一のクライオブロック（ｃｒｙｏｂｌｏｃｋｓ）中に入れ、イソペンタンを使用し、Ｏ．Ｃ．Ｔ．コンパウンドを用いて包埋し、－８０℃で保存した。試料の凍結切片を作成し、ＤＡＰＩ蛍光染色および／またはクレシルバイオレット染色を用いて標識した。

【０７３１】

Ｃ．イメージングおよびデータ分析

スライド画像を分析して、Ａｋｏｙａ　Ｐｈｅｎｏｃｈａｒｔ（商標）ホールスライドビューワーを使用してＤＡＰＩおよびクレシルバイオレット染色においてＤｉＲで標識されたＭＥＶの存在を決定した。群別の記述的分析は、連続変数について平均±ＳＤとして表された。各脳を独立に分析した。クレシルバイオレット染色を使用して、各切片のＤｉＲ分析された脳領域を参照推定した。

【０７３２】

脳切片１（ブレグマから＋３．９２ｍｍ）におけるＭＥＶ－ＤｉＲの定量化。切片１について、ＭＥＶ－ＤｉＲは左および右嗅覚神経層において投与の１時間後から検出され、投与の４時間後にプラトーに達した（図３７および３８）、

【０７３３】

脳切片２（ブレグマから＋１．７８ｍｍ）におけるＭＥＶ－ＤｉＲの定量化。ＭＥＶ－ＤｉＲの正規化された強度および数の漸進的増大が、投与の２時間後から一次運動皮質、梨状葉皮質、前頭皮質および無顆粒島皮質において観察された。時点あたりの動物数が正確なＰＫ曲線をプロファイルするには少なすぎたとしても、グラフ表示によって、ＭＥＶが投与後８時間で一次運動皮質、前頭皮質および無顆粒島皮質においてプラトーに達した

ことが示唆される（図３９および４０）。データは、マウスにおいてＩＮ経路によって投与された場合の一次運動皮質、梨状葉皮質、前頭皮質および無顆粒島皮質を通るＭＥＶの漸進的拡散を示す。

【０７３４】

脳切片３（ブレグマから－１．８２ｍｍ）におけるＭＥＶ－ＤｉＲの定量化。ＭＥＶ－ＤｉＲの正規化された強度および数の漸進的増大が、投与の２時間後から一次体性感覚皮質、聴覚皮質、扁桃体基底外側核、脳梁膨大後部顆粒皮質、側頭連合野および視床下部弓状核において観察された。時点あたりの動物数が正確なＰＫ曲線をプロファイルするには少なすぎたとしても、グラフ表示によって、ＭＥＶが投与後８時間で側頭連合野および視床下部弓状核においてだけでなく一次体性感覚皮質、聴覚皮質、扁桃体基底外側核および脳梁膨大後部顆粒皮質においてプラトーに達したことが示唆される（図４１および４２）。これらのデータは、マウスにおいてＩＮ経路によって投与された場合の記載された脳領域におけるＭＥＶの漸進的拡散を示す。

【０７３５】

脳切片４（ブレグマから－２．７０ｍｍ）におけるＭＥＶ－ＤｉＲの定量化。ＭＥＶ－ＤｉＲの正規化された強度および数の漸進的増大が、投与の４時間後から扁桃体、左および右聴覚皮質、側頭連合野および嗅外皮質、左および右一次視覚皮質および乳頭核において観察された（図４３および４４）。これらのデータは、マウスにおいてＩＮ経路によって投与された場合の記載された尾側脳領域におけるＭＥＶの漸進的拡散を示す。

【０７３６】

脳切片５（ブレグマから－５．２０ｍｍ）におけるＭＥＶ－ＤｉＲの定量化。ＭＥＶ－ＤｉＲは、分析された時点で一次三叉核、下丘および被蓋核、傍小脳脚核および小脳脚および任意の他の尾側領域において検出されなかった。ＭＥＶ－ＤｉＲがないことは、投与後８時間までにこれらの脳領域中への拡散がないことによって説明できる（図４５）。

【０７３７】

これらの結果は、ＭＥＶの鼻腔内投与が、異なるが特定の脳領域における小胞の漸進的体内分布に繋がることを示す。この体内分布は、時間依存性であり、マウス脳の吻側から尾側領域に観察される。ＭＥＶ投与の１時間後、小胞は、嗅覚神経層において特異的に検出されたが、他のより多くの尾側領域では検出されなかった。ＭＥＶ投与後２時間で、小胞は、皮質領域に到達し、一次運動皮質、梨状葉皮質、前頭皮質、無顆粒島皮質、一次体性感覚皮質、聴覚皮質、脳梁膨大後部顆粒皮質および側頭連合野に到達した。ＭＥＶはまた、扁桃体基底外側核および視床下部弓状核において見出された。蛍光シグナルは、海馬領域、尾状核被殻では、または側坐核では検出されなかった。投与後４時間では、ＭＥＶは、尾側脳領域まで移動し、扁桃体、左および右聴覚皮質、側頭連合野および嗅内皮質に到達した。海馬または黒質では標識は観察されなかった。投与後１～８時間で三叉核、下丘、被蓋核および傍小脳脚核などの重要な構造である調べた最も尾側の切片において小胞が検出されず、これは、小胞が分析された時点の間、脳の最も尾側の部分に到達しなかったことを示す。

【０７３８】

薬物および生物製剤（タンパク質、オリゴヌクレオチドまたはウイルスベクター）の直接的な鼻から脳への輸送が、嗅覚または三叉神経系を介して実現可能であることが知られている。嗅球（ＯＢ）から始まる嗅覚神経軸索は、篩板を透過して、鼻腔の最高部に位置する嗅覚神経上皮の頂端膜側で終結する。嗅覚神経の繊維は、中鼻甲介の前側および後側部分の両方に存在する。呼吸粘膜は、感覚および副交感神経三叉神経によって密に神経支配され、嗅覚神経よりもさらにより広範である。感覚上顎枝は、嗅裂を含む最も深い鼻腔セグメントを神経支配する。しかし、ＭＥＶが通る経路は、本明細書で示されるように、異なっている。

【０７３９】

図３６（ａ）～（ｇ）は、（ｉ）脳体内分布研究の実験計画の概要および（ｉｉ）研究された５つの脳切片の位置、（ｃ～ｇ）５つの研究された脳切片の各々におけるＭＥＶの

ＰＫおよび体内分布を決定するために分析された領域を提供する。グラフは、ＩＮ投与後の脳中のＭＥＶを示す図３７、３９、４１、４３および４５を参照して脳の領域を表し、同定する。

［実施例１９］

【０７４０】

鼻腔内投与後の脳の延髄領域における、視床下部領域におけるおよび小脳領域におけるＭＥＶの分布。

Ａ．本明細書で記載されるように生成され、精製され、特性決定され、ＤｉＲで標識されたＭＥＶ（２０２３年１月２６日に公開された同時係属国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０７０３７１および同時係属米国仮出願番号第６３／３４９，００６号も参照されたい；また米国仮出願番号第６３／２２４，６５６号も参照されたい）を、Ｃ５７ＢＬ／６マウスに鼻腔内投与によって投与した。動物あたり単回の鼻腔内投与（各外鼻孔において２０ｍＬ）後１６時間でマウスを安楽死させ、脳を注意深く単離し、脳を切片にし、試料採取後最大３０分でＯＣＴに包埋し、ブレグマの異なる距離でスライスした。

【０７４１】

Ｂ．８週齢のスイスマウスを最大２０μｌのＭＥＶ懸濁液を用いるＩＮ投与によって処置した。１６時間後、マウスに迅速に麻酔し、４％（重量／体積）のパラホルムアルデヒド抗原固定溶液（ＰＦＡ）を用いて灌流した。脳を嗅球を損傷しないように特別に注意して頭蓋から取り出し、４％のＰＦＡで後固定し、３０％のスクロース中に浸漬した。

【０７４２】

Ｃ．蛍光標識された（ＤｉＲ）ＭＥＶを組織学的検査によって脳において検出した。手短には、脳をクリオスタットを使用して自由浮遊２０μｍ冠状切片に切断した。スライスを、延髄領域に、視床下部領域におよび小脳領域に選択した。切片を顕微鏡スライドにマウントし、以下のように蛍光について分析した：

すべての細胞の核を標識することによって脳組織を可視化するために、ＤＮＡをＤＡＰＩで染色した。

【０７４３】

これまでに記載されたようにＤｉＲを用いて研究の前にＭＥＶを標識し、実施例１に従って可視化した。

【０７４４】

ＭＥＶ懸濁液単独を使用して陽性対照スライドを調製した、図２ｂを参照されたい。脳中へのＭＥＶの輸送を、脳の分析された領域：嗅球、視床下部および小脳において蛍光標識されたＭＥＶのレベルに基づいて評価した。

【０７４５】

Ｄ．得られた結果によって、ＤｉＲ染色されたＭＥＶのＩＮ投与後のマウスの脳の内側でＤｉＲ染色を同定することが可能となった。ＤｉＲ染色は、ブレグマ４ｍｍからブレグマ－１．５ｍｍまでの脳の分析された部分、例えば、嗅球、脳梁、皮質および内包、視床のすべてに沿って種々の脳領域において、ならびに異なるレベルの海馬（海馬采および歯状回の近く）で検出できる。

［実施例２０］

【０７４６】

脳におけるニューロン回路網およびネットワークを通るＭＥＶの薬物動態および体内分布。

ＩＮ投与後の脳におけるＭＥＶの３Ｄ体内分布

ＣＬＡＲＩＴＹ法を使用して処理した脳において３Ｄイメージングによって蛍光標識されたＭＥＶの存在を決定した。スイスマウス（８週齢）を４０μｌ（２０μｌ／外鼻孔）のＭＥＶ懸濁液の鼻腔内投与によって処置した。投与の４、８、１６および２４時間後、脳全体をＣＬＡＲＩＴＹを用いて固定し、３Ｄイメージングを実施した。手短には、ヒドロゲルモノマー溶液および透明化溶液を、これまでに公開されたとおりに（Chung et al. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological s

ystems. Nature 497, 332-337）調製した。深部麻酔した動物を氷冷ＰＢＳを用いて、その後、ヒドロゲルモノマー溶液を用いて灌流した。目的の臓器を注意深く収集し、直ちに氷冷ヒドロゲルモノマー溶液中に入れ、４℃で１日間暗所で維持した。次いで、試料を新鮮なヒドロゲルモノマー溶液を有するチューブ中に入れ、酸素除去のために乾燥チャンバーに移した。チューブを窒素で満たし、穏やかに振盪しながら３７℃で２時間インキュベートさせ、続いて、透明化溶液を用い、再度、穏やかに振盪しながら３７℃で２４時間の３回の洗浄工程を行った。次いで、試料を、電気泳動組織透明化（ＥＴＣ）チャンバーおよび以下の条件：４０Ｖの電圧、７．３の最小ｐＨ、３７℃の最大温度を使用して数日間、ＥＴＣに付した。透明化された試料をＥＴＣシステムから取り出し、ＰＢＳで２回、各２４時間洗浄し、２日間のインキュベーションの間、光学透明化溶液で完全に覆い、試料を気密で維持し、溶液を毎日交換した。最後に、固定され、透明化された組織試料で３Ｄイメージングを実施した。

［実施例２１］

【０７４７】

ヒトｉＰＳＣ由来神経細胞によるＭＥＶのインビトロ－内部移行およびペイロード（ｍＲＮＡまたはタンパク質または小分子）の発現。

ＭＥＶは、多種多様なカーゴ、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、小分子、ペプチドおよびタンパク質を負荷できる。中枢神経系への治療目的のデリバリーシステムとしてＭＥＶを評価するために、人工多能性幹細胞に由来するヒト脳細胞によるＧＦＰが負荷されたＭＥＶの内部移行を評価した。細胞種特異的マーカーを用いて確認された、ヒト神経幹細胞、星状細胞、グリア細胞およびニューロンを、内部移行アッセイのために使用した。

【０７４８】

Ａ．ＭＥＶを上記のとおりに生成し、負荷し、特性決定した。

【０７４９】

Ｂ．ヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）に由来する細胞の培養、分化および特性決定。

Yan et al. (2013) NeuroImage 80:246-262に記載されたプロトコールに従って、ヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）を神経誘導培地の下で培養して、神経幹細胞（ＮＳＣ）を生成した。ＮＳＣをＮＥＭ培地（神経誘導サプリメントを補給した高度ＤＭＥＭ／Ｆ１２およびＮｅｕｒｏｂａｓａｌ）で拡大増殖する。ＮＳＣは、神経前駆体マーカーを示し、多能性マーカーについて陰性であり、外胚葉系統への関係づけを示す。脳発達の際に、ＮＳＣは、すべての神経細胞（ニューロン、星状細胞およびオリゴデンドロサイト）を生じさせることが可能であり、自己再生のための能力を有する。成体期には、ＮＳＣは、海馬中で、および側脳室の脳室下帯（ＳＶＺ）中で存続する。これらは、新規神経細胞を生成すること、および神経可塑性に寄与することが可能な最も研究された領域である。ヒト神経幹細胞は、両方とも神経幹細胞マーカーであるネスチンおよびＰＡＸ６について陽性染色を示した。ＮＳＣでは、ｈｉＰＳＣにおいて高度に発現される多能性マーカーであるＯＣＴ４陽性細胞は検出されなかった（Casas et al, 2018）。

【０７５０】

星状細胞を生成するために、ＮＳＣを、Yan Y et al., 2013に記載されたプロトコールに従って、星状細胞分化培地（Ｎ２および１％のウシ胎児血清を補給したＤＭＥＭ／Ｆ１２）の下で２１日間培養する。分化ステージ後、星状細胞を星状細胞培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２　１０％のウシ胎児血清）の下で５週間培養して、細胞成熟を確実にする。成熟星状細胞は、主要な星状細胞マーカー（ＡＬＤＨ１Ｌ１、ＧＦＡＰ、ビメンチン、ＥＡＡＴ１、ＥＡＡＴ２およびＳ１００ｂのような）の発現によってこれまでに特性決定されており（Ledur et al., 2020およびTrindade et al., 2020）、機能的特徴を示す（ヒトｉＰＳＣ由来星状細胞は、ＴＮＦ－α曝露後に［３Ｈ］Ｄ－アスパラギン酸取り込みの機能障害を示すので、［３Ｈ］Ｄ－アスパラギン酸は、グルタミン酸トランスポーターの取り込み活性を測定し、星状細胞機能を評価するためによく使用されるグルタメートの非代謝型類似体である）；それぞれLedur et al., 2020およびTrindade et al., 2020。

【０７５１】
ＮＳＣは、ラミニンコートされたプレートで、神経細胞分化培地（１×Ｂ２７、１×Ｇｌｕｔａｍａｘ、１×非必須アミノ酸溶液および２００ｎＭ　アスコルビン酸を補給したＮｅｕｒｏｂａｓａｌ）（Ｙａｎ Ｙ ｅｔ ａｌ., ２０１３）の下で混合神経細胞培養において分化される。分化プロトコールの７および１４日目に、培養物をアキュターゼ（Ａｃｃｕｔａｓｅ）を用いて剥離し、神経細胞生存を改善するために１０μＭ　ＲＯＣＫ阻害剤を含有する神経細胞分化培地中でラミニンコートされたカバーガラスに再プレーティンする。
【０７５２】
実験を実施し、適切な成熟を確実にするために、ニューロンを４５日目まで培養する。特性決定には、神経細胞マーカー、例えば、ｂ－チュブリンＩＩＩ（ＢＴＵＢＩＩＩ）、微小管結合タンパク質２（ＭＡＰ２）およびシナプス前マーカーシナプトフィジン（ＳＹＰ）を使用する。ニューロンは、神経幹細胞マーカーであるネスチンに対して陰性であり、これは、培養物の成熟したプロファイルを示す。
【０７５３】
Ｃ．グリア細胞の培養および特性決定。
Ｌｏｎｚａから入手した一次ヒトグリア細胞を単離した。ヒトグリア細胞を３６，０００個細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種し、１０％のＦＢＳ、２ｍｍｏｌ／ｌ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１ｍｍｏｌ／ｌピルビン酸ナトリウム、１００ユニット／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補給したＤＭＥＭ中で１週間培養した。グリア細胞を、グリア線維酸性タンパク質（ＧＦＰＡ）およびＳ１００ｂ、ビメンチンおよびネスチンのような特異的マーカーを使用して特性決定した。
【０７５４】
Ｄ．ヒトニューロン幹細胞、ヒトニューロン、ヒト星状細胞およびヒトグリア細胞におけるＭＥＶの内部移行の評価。
細胞をＭＥＶｓ－ｍＲＮＡ　ｅＧＦＰまたはＧＦＰ（タンパク質）と共にインキュベートし、生細胞イメージングプラットフォームを使用して小胞内部移行について最大２４時間モニタリングした。ヘキスト色素を使用して、核を染色する。画像獲得後、ＧＦＰ強度を測定して、内部移行効率を推定し、ＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージを算出する。
【０７５５】
Ｅ．ｍＲＮＡ－ｅＧＦＰまたはＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶのヒト神経幹細胞への内部移行、デリバリーおよび分析。
ヒトＮＳＣをＭＥＶ－ＧＦＰと共に最大２４時間インキュベートした。核染色のためのヘキストインキュベーションの３０分後に、細胞を生細胞イメージングプラットフォームで分析した。画像獲得後、ＧＦＰ強度を測定し、ＧＦＰ陽性細胞を算出した。各細胞種の代表的なイメージングについて、細胞をＰＡＸ６について免疫染色した。行った算出：平均強度ＧＦＰ値およびＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージ。
【０７５６】
Ｆ．ｍＲＮＡ－ｅＧＦＰまたはＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶのヒト星状細胞への内部移行、デリバリーおよび分析
ヒト星状細胞をＭＥＶ－ＧＦＰと共に最大２４時間インキュベートした。核染色のためのヘキストインキュベーションの３０分後に、細胞を生細胞イメージングプラットフォームで分析した。画像獲得後、ＧＦＰ強度を測定し、ＧＦＰ陽性細胞を算出した。各細胞種の代表的なイメージングについて、細胞をＧＦＡＰについて免疫染色した。行った算出：平均強度ＧＦＰ値およびＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージ。
【０７５７】
Ｇ．ｍＲＮＡ－ｅＧＦＰまたはＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶのヒトニューロン内部移行、デリバリーおよび分析。
ヒトニューロンをＭＥＶ－ＧＦＰと共に最大２４時間インキュベートした。核染色のためのヘキストインキュベーションの３０分後に、細胞を生細胞イメージングプラットフォームで分析した。画像獲得後、ＧＦＰ強度を測定し、ＧＦＰ陽性細胞を算出した。各細胞

種の代表的なイメージングについて、細胞をＭＡＰ２について免疫染色した。行った算出：平均強度ＧＦＰ値およびＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージ。

【０７５８】

Ｈ．ｍＲＮＡ－ｅＧＦＰまたはＧＦＰタンパク質が負荷されたＭＥＶのヒトミクログリア細胞への内部移行、デリバリーおよび分析：ヒトグリア細胞をＭＥＶ－ＧＦＰと共に最大２４時間インキュベートした。核染色のためのヘキストインキュベーションの３０分後に、細胞を生細胞イメージングプラットフォームで分析した。画像獲得後、ＧＦＰ強度を測定し、ＧＦＰ陽性細胞を算出した。各細胞種の代表的なイメージングについて、細胞をＧＦＡＰについて免疫染色した。行った算出：平均強度ＧＦＰ値およびＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージ。

［実施例２２］

【０７５９】

酵素（カタラーゼ）の付加後のＭＥＶ特性決定

Ａ．ナノ粒子トラッキング分析（ＮＴＡ）

ＭＥＶを、本明細書で記載されるように生成し、精製し、負荷し、特性決定した（外因性負荷を記載する同時係属国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０７０３７１および内因性負荷を記載する同時係属米国仮出願番号第６３／３４９，００６号も参照されたい）。ＭＥＶにペイロード（例えば、小分子、タンパク質、ペプチド、ｓｉＲＮＡ、ＡＳＯまたはｍＲＮＡ）を負荷すると、ＮａｎｏＳｉｇｈｔ（登録商標）ＮＳ５００システム（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用してサイズおよび蛍光（サイズ分布）について分析した。負荷されたＭＥＶ試料を、粒子を含まないＰＢＳ（０．０２μｍ濾過したもの）で希釈して、推奨測定範囲（１～１０×１０^{8}粒子／ｍＬ）内の濃度を得た。各試料について、５つの６０秒の期間の実験ビデオを、シリンジポンプ速度３０を用いてＮＴＡ　３．４　Ｂｕｉｌｄ　３．４．００３（カメラレベル１５－１６）を使用して分析した。試料あたり合計１５００フレームを調べ、それらは、観察された粒子が赤色十字でマークされ、５つ以下の青色十字が見られるように、適した検出閾値を使用して機器最適化設定を適用することによってキャプチャし、分析した。さらなる設定を「自動」に、粘性を「水」に設定した。

【０７６０】

Ｂ．ＭＥＶに負荷されたカタラーゼの酵素活性

上記のように負荷されたＭＥＶ製剤の負荷効率を、過酸化水素分解を使用するカタラーゼ活性アッセイによって評価した。１ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）を、それぞれ１～４μＬ　H_2O_2（７．５～３０％　ｖ／ｗ）および２μＬのカタラーゼ（０．０６～０．５ｍｇ／ｍｌ）またはカーゴが負荷されたＭＥＶの試料を含む石英キュベット中に混合した。ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ（登録商標）Ｌａｍｂｄａ２５ＵＶ　ＶＩＳ分光光度計（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用して２４０ｎｍで吸光度をモニタリングすることによって酵素活性を測定した。負荷されたＭＥＶにおけるカタラーゼ安定性を、プロナーゼ（０．１～０．２ｍｇ／ｍＬ）と共に３７℃で３時間のインキュベーションによって評価した。試料をその後、上記のように触媒活性についてアッセイした。カタラーゼの安定性を、カタラーゼの初期活性に対する残存活性で表した。

［実施例２３］

【０７６１】

ニューロンへの治療用ペイロードのインビトロ－ＭＥＶ媒介性デリバリー

Ａ．神経細胞による負荷されたＭＥＶの取り込み－マイクロプレートアッセイ。

神経保護効果のインビトロ評価のモデルとしてＰＣ１２神経細胞を使用する。手短には、ＰＣ１２細胞を９６ウェルプレート（５０，０００個細胞／ウェル）に播種し、３日間培養する。次いで、カタラーゼを保有するＭＥＶ（上記のように負荷された）をＤｉＲ（５μｇ／ｍＬ）を用いて染色し、種々の時間、段階希釈でウェルに添加する。インキュベーション後、細胞を氷冷ＰＢＳで３回洗浄し、１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００中で可溶化する。７５０ｎｍで励起および７８０ｎｍで発光を用いてＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録

商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して試料蛍光を測定する。神経細胞に蓄積されたＭＥＶの量は、総タンパク質含量について正規化され、タンパク質１ｍｇあたりのＭＥＶの数として表わされる。すべてのＭＥＶ製剤は、同一レベルの蛍光で調製され、各ＭＥＶ製剤のために別個の較正曲線が使用される。

【０７６２】

Ｂ．神経細胞による負荷されたＭＥＶの取り込み－共焦点顕微鏡。

カタラーゼが負荷されたＭＥＶ（１００μｇ／ｍＬの総タンパク質）を超音波処理し、ＤｉＲ（５μｇ／ｍＬ）を用いて染色し、チャンバースライド上で増殖させたＰＣ１２細胞（１×１０^{5}細胞／チャンバー）と共に種々の時間間隔の間インキュベートする。インキュベーション後、細胞をＰＢＳで洗浄し、４％のパラホルムアルデヒドで固定し、０．１％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００で透過処理する。蛍光染色は、抗アクチン抗体（Ａｂｃａｍ　ａｂ１７９４６７、１：１００）を使用して、二次抗体としてのヤギ抗ウサギＩｇＧ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８（Ａｂｃａｍ　ａｂ１５００７７、１：１００）を用いて実施する。イメージングの前に、ＤＡＰＩ（４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）を核の対比染色として使用する。ＬＳＭ７００レーザースキャニング共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）によって蛍光標識されたＭＥＶの蓄積を可視化し、ＬＳＭ画像ブラウザーを用いて画像を処理する。

【０７６３】

Ｃ．負荷されたＭＥＶの神経保護効果。

６－ＯＨＤＡ誘導性細胞毒性からのＰＣ１２細胞の保護をＭＴＴアッセイによって評価する。この目的のために、９６ウェルプレートにＰＣ１２細胞（１×１０^{5}細胞／ｍＬ）を播種し、一晩付着させた。次いで、細胞を２００μＭの６－ヒドロキシドーパミン（６－ＯＨＤＡ）および種々のカタラーゼが負荷されたＭＥＶ製剤またはカタラーゼ単独または空のＭＥＶに対して４時間曝露する。インキュベーション後、細胞を氷冷ＰＢＳを用いて３回洗浄し、対応するカタラーゼが負荷されたＭＥＶ製剤またはカタラーゼ単独または空のＭＥＶと共にさらに２４時間インキュベートする。処置後、各ウェルに２０μＬのＭＴＴテトラゾリウム色素溶液（５ｍｇ／ｍＬ）を添加する。３７℃で３時間のインキュベーション後、ＭＴＴ含有培地を除去し、各ウェルに１００μＬのＤＭＳＯを添加して、紫色のホルマザン沈殿物を溶解する。ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して５７０ｎｍで吸光度を測定し、細胞生存率は、未処置対照群と比較した処置群における生存細胞のパーセンテージとして表される。

【０７６４】

Ｄ．グリア細胞による負荷されたＭＥＶの取り込み－マイクロプレートアッセイ。

ＡＴＣＣ（登録商標）神経膠芽腫細胞株ＧＬ２６を、治療用カーゴデリバリーのインビトロモデルとして使用する。手短には、ＧＬ２６細胞を２ｍｍｏｌ／ＬのＬ－グルタメート、１００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシンおよび１０％のウシ胎児血清を補給したダルベッコ改変イーグル培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で培養し、９６ウェルプレートに播種し、ＤｉＲ標識されたＭＥＶ（上記のように）と共に１～２４時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を氷冷ＰＢＳで３回洗浄し、１％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００中で可溶化した。７５０ｎｍで励起および７８０ｎｍで発光を用いてＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）蛍光マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、米国）を使用して試料蛍光を測定した。神経細胞に蓄積されたＭＥＶの量は、総タンパク質含量について正規化され、タンパク質１ｍｇあたりのＭＥＶの数として表わされる。すべてのＭＥＶ製剤は、同一レベルの蛍光で調製され、各ＭＥＶ製剤のために別個の較正曲線が使用される。

【０７６５】

Ｅ．グリア細胞による負荷されたＭＥＶの取り込み－共焦点顕微鏡。

混合グリア細胞を、チャンバースライド中に一晩の接着のためにそれぞれ２５，０００

個細胞／ｃｍ^{2}および５０，０００個細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種し、その後、それらをＰＫＨ２６標識ＭＥＶ（上記のように）と共に６時間共培養した。次いで、共培養物を４％のパラホルムアルデヒドを用いて固定し、ＰＢＳ中の１％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）および０．２５％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を用い、室温で１時間ブロッキングした。細胞をβ－チュブリンに対するウサギ一次抗体（１：２００、ａｂ６０４６、Ａｂｃａｍ、英国、ケンブリッジ）を用いて４℃で一晩染色し、続いて、抗ウサギＩｇＧ Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８二次抗体（１：２００、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用い、室温で１時間検出した。核を４’，６－ジアミジノ－２’－フェニルインドール－ジヒドロクロリド（ＤＡＰＩ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して対比染色した。共焦点画像を、６３×倍率を備えたレーザースキャニング顕微鏡（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ ＬＳＭ ７１０）で獲得した。画像はＩｍａｒｉｓ（登録商標）ソフトウェアで処理した。

【０７６６】

Ｆ－グリア細胞に対する負荷されたＭＥＶの保護効果。

一次混合グリア細胞を、これまでに公開されたプロトコールに従って２日齢のウィスター－ラットの仔の皮質から単離した［Chen et al. (2007), Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. Nat Protoc. 2:1044-1051］。混合グリア細胞を３６，０００個細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種し、１０％のＦＢＳ、２ｍｍｏｌ／ｌ ＧｌｕｔａＭＡＸ、１ｍｍｏｌ／ｌピルビン酸ナトリウム、１００ユニット／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補給したＤＭＥＭ中、ポリ－ｄ－リシン（１００μｇ／ｍｌ）コートしたディッシュ上で培養した。混合グリア細胞を、それぞれ１８，０００個細胞／ｃｍ^{2}および３６，０００個細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種し、その後、サイトカイン分泌分析のために１００ｎｇ／ｍｌのＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）と共に６時間および２４時間インキュベートした。セクリニン（Ｓｅｃｕｒｉｎｉｎｅ）が負荷されたＭＥＶをＬＰＳと同時に添加した。対照として、細胞をＬＰＳおよびエキソソームを添加せずに、または空のＭＥＶのみと共に培養した。混合グリア細胞からの上清におけるサイトカイン評価を、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）を製造業者の使用説明書に従って用いて実施した。ラットＩＬ－１βおよびＴＮＦα ＤｕｏＳｅｔ（登録商標）ＥＬＩＳＡ開発システム（Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈｎｅ、ミネソタ州、ミネアポリス）を使用して、６および２４時間のＭＥＶと共に共培養で上清を分析した。

［実施例２４］

【０７６７】

パーキンソン病のマウスモデルにおけるカタラーゼが負荷されたＭＥＶのインビボ効率

Ａ－炎症を有するマウス脳におけるＭＥＶの体内分布

８週齢のＣ５７ＢＬ／６雌のマウスに、６－ＯＨＤＡ溶液（１０μｇの、０．０２％のアスコルビン酸を有する０．９％のＮａＣｌ中の６－ＯＨＤＡ）を、０．１μＬ／分の流速で線条体（ＡＰ：＋０．５；Ｌ：－２．０およびＤＶ：－３．０ｍｍ）中に定位的注射する。２１日後（炎症のピークで）、マウスに蛍光標識したＭＥＶをＩＮ投与する。４時間後、マウスを　殺し、灌流し、脳スライドを共焦点顕微鏡によって調べる。ＰＢＳを注射した６－ＯＨＤＡ中毒マウスを対照として使用する。核をＤＡＰＩで標識する。どの種類の細胞が脳中にＭＥＶを蓄積するかを調べるために、細胞特異的マーカーを用いる同時局在性研究を実施する。この目的のために、（１）ニューロンに対する一次ウサギポリクローナル抗体、ＡｎｔｉＮｅｕＮ（ａｂ１２８８８６、Ａｂｃａｍ、１：５００希釈）または（２）ＴＨ－ニューロンに対する抗チロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）ウサギ抗体（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、１：１０００希釈）または（３）内皮細胞に対するウサギ抗ＣＤ１４６（ａｂ７５７６９、Ａｂｃａｍ、１：２５０希釈）または（４）星状細胞マーカーに対するウサギ抗ＧＦＡＰ抗体（ａｂ７２６０、Ａｂｃａｍ、１：５００希釈）および二次抗体、ロバ抗ウサギＩｇＧ Ｈ＆Ｌ Ａｌｅｘａ ５５５（ａｂｃａｍ ａｂ１５００７４、Ａｂｃａｍ、１：５００希釈）を用いて脳スライドを同時染色する。すべてのスラ

イドを、０．１Ｍクエン酸緩衝剤ｐＨ６．０および０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０中で６０分間透過処理し、ＰＢＳ中、０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０で３×５分洗浄し、ＰＢＳおよび５％の正常ロバ血清＋０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０を用いて３０分間ブロッキングし、記載された希釈の一次抗体を用いて、４℃で一晩染色する。インキュベーション後、スライドを３×５分／洗浄でＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎにより洗浄し、二次抗体を用い、室温で１時間染色する。次いで、スライドを３×５分／洗浄でＰＢＳ／ＴｗｅｅｎおよびｄｄH_2Oにより洗浄し、ＤＡＰＩを有するＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ（登録商標）Ｈａｒｄｓｅｔ（商標）マウント剤を使用して覆う。画像を、共焦点蛍光顕微鏡システムＡＣＡＳ－５７０および対応するフィルターセットによって調べる。

【０７６８】

Ｂ－免疫組織化学的および立体解析学的分析。

６－ＯＨＤＡ中毒マウスを、中毒（１日おきに１０回）後４８時間で、ＰＢＳまたはカタラーゼ単独または同量のカタラーゼを有するカタラーゼが負荷されたＭＥＶまたは同量の空のＭＥＶを用いるＩＮ投与によって処置する。健康な非中毒動物の２つの対照群に、ＰＢＳをｉ．ｃ．注射し、４８時間後にＰＢＳまたは空のＭＥＶをＩＮ投与した。２１日後、動物を　殺し、灌流し、脳を取り出し、洗浄し、後固定し、免疫組織化学分析法を、［Brynskikh et al. (2010). Macrophage delivery of therapeutic nanozymes in a murine model of Parkinson's disease. Nanomedicine (Lond) 5(3): 379-396］によって記載されるように、３０μｍの厚みの連続冠状脳切片で実施する。ミクログリア活性化の検出のために、組織切片を一次モノクローナルラット抗マウス抗ＣＤ１１ｂ抗体（１：５００希釈）および二次ビオチン化ヤギ抗ラット抗体（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カリフォルニア州、バーリンゲーム、１：２００希釈）と共にインキュベートする。したがって、ＳＮｐｃ内の活性化されたミクログリアは、ラミファイド型のかろうじて眼に見える休止ミクログリアと比較して、分枝を出したよりアメーバ様の形態学を示す。さらに、グリア線維酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）発現の蛍光分析によって腹側中脳領域において星状細胞増多症のレベルを評価する。ＧＦＡＰ染色のために、組織切片をＴＢＳ中、０．０１％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００を用いて３０分間透過処理し、１０％の正常ヤギ血清（ＮＧＳ、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．、カリフォルニア州、バーリンゲーム）を用いて１時間ブロッキングし、次いで、ウサギ抗ＧＦＡＰ一次ポリクローナル抗体ａｂ７２６０（ＡｂＣａｍ、マサチューセッツ州、ケンブリッジ）１：１００希釈と共に４℃で１６時間インキュベートする。組織スライドをヤギ抗ウサギＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７二次抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；１：２００希釈）と共に１時間インキュベートし、スライド上にマウントする。共焦点顕微鏡Ｚｅｉｓｓ（登録商標）５１０Ｍｅｔａ共焦点レーザースキャニング顕微鏡（Ｊｅｎａ、ドイツ）およびＩｍａｇｅＪソフトウェア（ＮＩＨ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、米国、マサチューセッツ州）を使用する蛍光分析によって免疫反応性を評価する。神経保護効果の評価のために、ＴＨ染色を使用して、ＤＡニューロン数を定量化する［Tieu et al. (2003) D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. J Clin Invest. 112(6):892-901］。ＴＨ陽性ＤＡニューロンの総数は、Ｓｔｅｒｅｏ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒ（登録商標）ソフトウェア（ＭｉｃｒｏＢｒｉｇｈｔＦｉｅｌｄ、Ｉｎｃ．、バーモント州、ウィリストン）において光学分画器モジュールを使用することによって計数する。

【０７６９】

Ｃ－アポモルヒネ試験。

Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、６－ＯＨＤＡをｉ．ｃ．注射する。ＰＢＳをｉ．ｃ．注射された健康なマウスを、対照として使用する。中毒後４８時間から開始して、マウスを、ＰＢＳまたはカタラーゼが負荷されたＭＥＶを用い、１日おきに２週間、ＩＮ処置する。２１日後、［Papathanou et al. (2011) Induction and expression of abnormal involuntary movements is related to the duration of dopaminergic stimulation in 6-OHDA-lesioned rats. Eur J Neurosci. 33(12):2247-2254］に

記載されたように、動物にアポモルヒネ（０．０５ｍｇ／ｋｇ、ｓ．ｃ．）を注射し、回転を１０分毎に９０分間スコア化する。

［実施例２５］

【０７７０】

脊髄損傷の動物モデルにおける脳へのインビボ－デリバリー

ＭＥＶ（これまでのように単離および精製された）に０．１ｎｍｏｌのＰＴＥＮ－ｓｉＲＮＡ（Ａｄｖｉｒｎａ Ｃｏｍｐａｎｙ）を３７℃で２～３時間負荷し、その後、脊髄損傷モデル動物にＩＮ投与した。成体雌スプラーグドーリーラット（２００～２５０ｇ）においてケタミン－キシラジン－イソフルラン麻酔を導入した。Ｔ９～Ｔ１１脊柱のレベルでの椎弓切除術を実施して、脊髄を露出した。脊髄フックを使用して脊髄を持ち上げた後、マイクロ剪刀を使用してＴ１０レベルで完全脊髄切断を行った。損傷の完全性を確認するために、切断された断端を持ち上げ、フックを間隙の内側に通して、管の底および外側に残存する線維がないことを確実にした。筋肉層および皮膚を縫合した後、ラットを加熱チャンバー中で回復させた。術後２～３時間で、ラットに４０μＬの生理食塩水、４０μＬの空のＭＥＶまたは４０μＬのＰＴＥＮ－ｓｉＲＮＡが負荷されたＭＥＶを鼻腔内に与え、投与を２４時間毎に5日間反復した。尿反射が再確立されるまで、膀胱を１日に２回手作業で絞り出した。ラットに、１週間の抗生物質（セファゾリン、２５ｍｇ／ｋｇ、１日２回）、１週間のシクロスポリン（１０ｍｇ／ｋｇ／ｄ）および３日間のブプレノルフィン（０．０１～０．０５ｍｇ／ｋｇ）の皮下注射を与えた。

【０７７１】

行動分析：Ｂａｓｓｏ、ＢｅａｔｔｉｅおよびＢｒｅｓｎａｈａｎ自発運動評価尺度法を使用して盲検実験者によって運動回復を評価し、スコア化した。測定は、ベースラインスコアとして２～３日毎、移植後、次いで、毎週１回に行った。感覚回復は、フォンフライフィラメント試験を使用して評価した。曲げる力の勾配を用いてフィラメント（Ｂｉｏｓｅｂ）を足に適用して、侵害受容反応（刺激からの迅速な足の引き抜き）を誘発した。引き抜き閾値は、試みの間に少なくとも３０秒をおいて３回の試みのうち少なくとも２回で正の反応を誘導する最小の力として定義される。

【０７７２】

ウエスタンブロッティング：損傷を受けた脊髄セグメントおよび肝臓を８週目に収集し、プロテアーゼ阻害剤カクテル（１００ｍＭフェニルメチルスルホニルフルオリド、２ｍｇ／ｍＬロイペプチン、５０ｍＭのＮａ－オルトバナジン酸（ｏｒｔｈａｖａｎａｄａｔｅ）、５０ｍＭアプロチニン、Ｓｉｇｍａ）を含有するＲＩＰＡ溶液［１％のデオキシコール酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１％の１００×－Ｔｒｉｔｏｎ（Ｂｉｏｌａｂ）、５ｍＭエチレン－ジアミン四酢酸（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１５０ｍＭ ＮａＣｌ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）］中に入れた。組織をホモジナイズし、４～１２％のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで２０μｇの総タンパク質分離を行い、ニトロセルロースメンブレンに９０分間トランスファーした。０．１％のＴｗｅｅｎ ２０（ＴＢＳＴ）を有するｔｒｉｓ緩衝生理食塩水中、２％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を用いて３時間ブロッキングした後、メンブレンを、ＴＢＳＴ中、２％のＢＳＡ中でマウス－抗ＰＴＥＮ、１：１０００（カタログ番号９５５６、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）または負荷対照としてウサギ－抗β－アクチン、１：１０００（カタログ番号８４５７、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）と共に一晩インキュベートした。翌日、３回ＴＢＳＴですすいだ後、メンブレンを、抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（１：５０００、カタログＮＡ９３１ Ｖ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）または抗ウサギＩｇＧ－ＨＲＰ（１：５０００、カタログＮＡ９３４ Ｖ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）と共に室温で２時間インキュベートした。ブロットをＬＡＳ－３０００イメージングシステム（ＦｕｊｉＦｉｌｍ）において増強化学発光試薬（カタログ番号１７０５０６１、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に曝露して、シグナルを発生させた。

【０７７３】

リアルタイム定量的ＰＣＲ：８週で、ＱＩＡＧＥＮ ＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキ

ットを使用して損傷を受けた脊髄組織および肝臓から全ＲＮＡを抽出し、大容量ｃＤＮＡ逆転写キット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して第１鎖ＤＮＡを合成した。ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ（登録商標）１２Ｋ　ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステムでリアルタイム定量的ＰＣＲを実施した。プライマーは、ＰＴＥＮ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、アッセイ番号：Ｒｎ００４７７２０８）またはＧＡＰＤＨ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、アッセイ番号：Ｒｎ０１７７５７６３－ｇ１）を含んでいた。増幅反応条件：１０μＬの反応物中、３連で、９５℃で２０秒、９５℃で３秒、６０℃で３０秒の４０サイクル。ΔΔＣｔ法を使用して、相対発現レベルを決定し、目的の遺伝子は、ＧＡＰＤＨ発現に対して正規化した。

【０７７４】

免疫蛍光分析：脊髄を解剖し、４％のＰＦＡ中で一晩固定し、３０％のスクロース溶液中に一晩浸漬し、最適切断温度溶液中に包埋し、次いで、縦方向に２０μｍの厚みに切断した。切片を０．５％のＴｗｅｅｎ溶液中で透過処理し、５％のウシ血清を用いてブロッキングし、次いで、ウサギ－抗チュブリン（１：５００、Ａｂｃａｍ、カタログａｂ１８２０７）、ウサギ－抗ＧＦＡＰ（１：１０００、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログＡＢ５８０４）、マウス－抗ＣＤ１１ｂ（１：５００、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログＭＣＡ２７５Ｒ）、ウサギ－抗Ｔｍｅｍ１１９（１：１５０、ＮｏｖｕｓＢｉｏ、カタログＮＢＰ２－３０５５）またはマウス－抗ＣＤ３１（１：５０、ＢＤ　ｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ５５０３００）抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。次いで、切片をヤギ抗ウサギ－Ａｌｅｘａ６４７（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１：８００）およびＤＡＰＩ（１：１０００）と共に１時間インキュベートし、カバーガラスを用いてマウントし、共焦点顕微鏡［Ｚｅｉｓｓ（登録商標）ＬＳＭ７００］を使用して、画像を得た。

［実施例２６］

【０７７５】

脳炎症のモデルにおける脳へのインビボ－デリバリー

Ａ－動物モデルおよび鼻腔内処置。

マウス（Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系）に、文献に記載されるようにｍｉＲ－１７ミミックＭＩＭＡＴ００２１８０３（配列：ＣＡＡＡＧＵＧＣＵＵＡＣＡＧＵＧＣＡＧＧＵＡＧ、配列番号１４０）カタログ番号：４４６４０６６、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を負荷したＭＥＶをＩＮ投与した。脳炎症の誘導の対照として、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに細菌ＬＰＳ（２．５ｍｇ／ｋｇ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を腹膜内に注射する。

【０７７６】

Ｂ－脳炎症の評価。

ＭＥＶのＩＮ投与後、マウスに、ＰＢＳ、続いて、ｐＨ７．４の２％のパラホルムアルデヒド溶液を経心的に灌流する。脳組織を２％のパラホルムアルデヒド中で２時間、後固定し、次いで、リン酸緩衝３０％のスクロース中で低温保存した。脳を最適切断温度コンパウンド（Ｔｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ；Ｓａｋｕｒａ、カリフォルニア州、トーランス）中に包埋し、－２０℃で一晩維持した。脳組織切片をクリオスタットで切断し（１０μｍ厚）、組織切片を－２０℃で保存した。ウサギ抗Ｉｂａ１抗体またはＦ４／８０抗体を用いる小グリア細胞の免疫蛍光染色を、これまでに記載された手順に従って実施する。Ｉｂａ１またはＦ４／８０陽性染色の存在について評価された組織を、デジタル画像解析システムを備えたＮｉｋｏｎ（登録商標）Ａ１Ｒ共焦点顕微鏡（Ｐｉｘｅｒａ、カリフォルニア州、サンディエゴ）を使用して評価した。

［実施例２７］

【０７７７】

アルツハイマーの動物モデルにおける脳へのインビボ－デリバリー

Ａ－アルツハイマー病の動物モデルにおける神経保護効果の分析。

３種の突然変異体ヒトトランスジーン－ＰＳ１Ｍ１４６Ｖ、ＡＰＰＳｗｅおよびｔａｕＰ３０１Ｌを発現する雌のトリプルトランスジェニックＡＤマウス（３ｘＴｇ－ＡＤ）を、Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（カリフォルニア州、サクラメント）

から購入した。ＭＥＶに、これまでに記載されたようにリバスチグミンを負荷する。７ヶ月齢の３ｘＴｇ雌マウスにイソフランを用いて麻酔し、その後、外鼻孔あたり５μＬの噴出中のＰＢＳ溶液またはＭＥＶを注意深く鼻腔内に投与する。全体として、各マウスに１００μＬの媒体またはＥＶを２回与え、各注射は１８時間離れている（５０μＬ／ｄ）。２１日後、トリブロモエタノール薬物（ＴＢＥ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して各マウスに麻酔し、０．１Ｍ　ＰＢＳ、続いて、ホルムアルデヒド１０体積％／体積％、緩衝された４重量％／体積％（パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）４％；Ｔｉｔｏｌｃｈｉｍｉｃａ、イタリア、ロビゴ）を用いて経心的に灌流し、次いで、ミクログリア活性化および樹状突起スパイン密度のために処理する。

【０７７８】

Ｂ－免疫蛍光。

免疫蛍光（ＩＦ）を、前頭前皮質（ブレグマから２．４０～２．８０ｍｍ）、内側海馬のＣＡ１領域（ブレグマから－１．９５５～－２．３５５ｍｍ）および嗅内皮質（ブレグマから－２．８０～－３．３０ｍｍ）の４０μｍの冠状切片で実施する。ブロッキング溶液［ＰＢＳ中の、３％のウシ血清アルブミンおよび０．３％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００［Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ］］と共の３０分のインキュベーションによって組織特異的結合部位をマスクした後、スライスを、種々の抗マウス一次抗体：ミクログリア－ウサギ抗Ｉｂａｌ（１：１０００、Ｗａｋｏ）；星状細胞－ラット抗ＧＦＡＰ（１：１０００、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）；ニューロン－マウス抗ＮｅｕＮ（１：５００、Ｃｈｅｍｉｃｏｎ）をすべて二次抗体：Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８がコンジュゲートしている抗ウサギ／抗ラット／抗マウス（１：１０００、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共に；ミクログリア－ラット抗ＣＤ６８およびＣＤ２０６（１：４００、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を二次抗体：Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４がコンジュゲートしている抗ラット（１：１０００、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共に用いて４℃でＯ／Ｎ処理する。試料を共焦点レーザースキャン顕微鏡（Ｓｐ５、Ｌｅｉｃａ）を使用して獲得する。蛍光画像は、画像処理ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）のオープンソースのソフトウェアを用いて得られた切片のｚスタック投射（最大強度）によって導かれる。

【０７７９】

Ｃ－ミクログリア活性化の分析

細胞密度および細胞体サイズを評価することによって、ミクログリア活性化を調査する。ミクログリア密度は、０．０１４４ｍｍ^{3}の総体積について５０μｍのスタックを収集することによって、各スライスについて獲得されたＺ－投射内のＩｂａ－１＋／４０，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）陽性細胞の総数として算出される。ミクログリア細胞体サイズおよびミクログリアマーカーの発現を決定することを目的とする半定量的分析は、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを用いて特別に設計されたマクロを使用して実施される。

【０７８０】

Ｄ－ゴルジ－コックス染色。

固定後、脳の各半分をゴルジ－コックス溶液（蒸留水中、１％の塩化水銀、１％の重クロム酸カリウムおよび１％のクロム酸カリウム）を用いて染色し、室温、暗所で２週間保存する。次いで、切片作成手順の間の組織脆弱性を低減するために、脳を３０％のＰＢＳスクロース溶液中で２４時間維持する。ビブラトーム［Ｌｅｉｃａ（登録商標）ＶＴ１２００、Ｌｅｉｃａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］を使用して海馬、前頭前野および嗅内皮質の１００μｍ厚のスライスを収集した後、それらをそれぞれＫｏｄａｋ（登録商標）展開剤および固定剤（ＧＢＸ　Ｃａｒｅｓｔｒｅａｍ　Ｄｅｎｔａｌ、Ｃｏｎｇｅｒｓ）を用いて５分間および１５分間処理し、各工程後に蒸留水中で５分間洗浄する。最後に、漸増濃度のエタノール（５０％－６０％－７５％－８５％）を使用してスライスを脱水し、カバーガラスを用い、Ｅｕｋｉｔｔ（登録商標）マウント剤（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用してスライド上にマウントする。

【０７８１】

Ｅ－樹状突起スパイン分析。

Ｏｌｙｍｐｕｓ ＢＸ６３顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、日本）を使用して画像を収集し、Ｎｅｕｒｏｌｕｃｉｄａ（登録商標）６４－Ｂｉｔソフトウェア（ＭＢＦ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｗｉｌｌｉｓｔｏｎ、ノースダコタ）によって獲得する。内側海馬のＣＡ１領域、前頭前野および嗅内皮質中の樹状突起スパインの獲得は、１００×で起きる。１１７×８８μｍの画像を収集し、上記のブレグマ点でマウスあたり３つのスライスを分析し、０．３５μｍのｚスタック単位を使用して各スタックを獲得する。ＡｕｔｏＱｕａｎｔ（登録商標）ソフトウェアによって画像をデコンボリューションし、８ビット画像に変換し、次いで、黒色シグナルをＩｍａｒｉｓ（登録商標）画像処理ソフトウェア（Ｂｉｔｐｌａｎｅ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、英国）を用いる分析のために反転させる。Ｉｍａｒｉｓ（登録商標）ソフトウェア（ＦＩＬＡＭＥＮＴ ＣＯＭＭＡＮＤ）のＡｕｔｏｐａｔｈシステムを使用することによって、ニューロンの樹状突起の長さおよびスパインの数を再構成し、偽陽性シグナルを避けるためにソフトウェアによって検出された各単一のスパインを手作業で調べる。異なる樹状突起の長さと関連するバイアスを低減するために、各動物の中程度のスパイン密度を、スパインの総数をすべての測定された樹状突起の全長で除することによって算出する。

［実施例２８］

【０７８２】

多発性硬化症の動物モデルにおける脳へのインビボ－デリバリー

Ａ－マウスモデルにおける実験的自己免疫脳脊髄炎（ＥＡＥ）誘導

ヒト多発性硬化症の病理を模倣するために、文献に記載されるようにマウスモデルを使用してＥＡＥを誘導する。ＥＡＥを誘導するために、３ヶ月齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス（雄および雌）を、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（ＭＯＧ）ペプチド３５－５５を用いて免疫化する（ＩＡＣＵＣ ＃１９０１４）。手短には、０日目に、５ｍｇ／ｍＬの死滅した結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）（Ｄｉｆｃｏ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を含有するフロイントの完全アジュバント（ＣＦＡ）中の３００μｇのげっ歯類ＭＯＧペプチド（アミノ酸３５～５５、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ）をマウスの皮下側腹部に投与する。０日目に、各マウスにＭＯＧ溶液の２回の皮下注射、ならびに滅菌ＰＢＳで希釈した１００μｌの用量の２ｎｇ／μｌの百日咳毒素および病原性因子（Ｌｉｓｔ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を与える。百日咳毒素および病原性因子を２日目に再度投与する。

【０７８３】

Ｂ－ ＥＡＥ動物の実験的処置

ＭＯＧ免疫化後、疾患症状発生は通常、１５～２０日でピークとなる。疾患進行をモニタリングするために、マウスを毎日秤量し、スコア化する。神経傷害を５点スケール［尾の下垂（ｌｉｍｐ ｔａｉｌ）または動揺性歩行＝１；尾の下垂および動揺性歩行＝２；片肢不全麻痺および運動失調＝２．５；両肢不全麻痺＝３；片肢麻痺および第２の肢の不全麻痺＝３．５；２つの肢の完全麻痺＝４；瀕死＝４．５；および死亡＝５］で評価する。マウス処置群を、同等数の雄および雌ならびにＥＡＥ発症を表す３．５に近い平均スコアを含有するように無作為化する。ピーク運動欠陥で、ＴＩＣＡＭ－１ ｓｉＲＮＡ（配列番号１３４および１３５、それぞれセンスおよびアンチセンスＲＮＡ：Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号ｓｃ－１５４２６６）が負荷されたＭＥＶを用いる鼻腔内処置を実施し、非特異的に制御されるｓｉＲＮＡが負荷されたＭＥＶは、対照として働く。ＥＡＥマウススコア化を、ＭＯＧ免疫化後最大４０日反復する。

【０７８４】

Ｃ－組織調製

マウスをCO_2窒息によって安楽死させ、氷冷ＰＢＳを灌流する。腰髄を収集し、４％のパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）中で室温で２時間、後固定し、３０％のスクロース中で一晩低温保存し、ＯＣＴ中に包埋する。Ｌｅｉｃａ（登録商標）クリオスタットで１４

μｍの凍結横断面を切断する。
【０７８５】
Ｄ－オリゴデンドログリア生存の定量化
凍結切片を乾燥させ、０．１％のＴｗｅｅｎ ２０および１０％のロバ血清を含有するＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して室温で１時間ブロッキングする。切片をＳＯＸ－１０（クローンＥＰ２６８、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ－Ｓｉｇｍａ）に対する一次抗体と共に４℃で一晩インキュベートし、続いて、二次抗体と共に室温で２時間インキュベートする。試料でＴＵＮＥＬ染色（末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼｄＵＴＰニック末端標識）を実施して、ＳＯＸ１０集団内の損傷を受けたＤＮＡを定量化する。ＴＵＮＥＬは、インサイツ細胞死検出キット（ＴＭＲ Ｒｅｄ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ－Ｓｉｇｍａ）を製造業者の使用説明書に従って使用して実施する。ＤＡＰＩを使用して、核を標識し、Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ（登録商標）Ａｘｉｏ Ｏｂｓｅｒｖｅｒ Ｄ１倒立顕微鏡を使用して試料を画像化し、ＮＩＨ ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して分析する。
【０７８６】
Ｅ－ミエリン喪失の定量化
処置されたＥＡＥマウスにおけるミエリンの喪失を定量化するために、ルクソールファストブルー（Ｌｕｘｏｌ Ｆａｓｔ Ｂｌｕｅ）（ＬＦＢ）を使用して、凍結切片を染色する。ＬＦＢは、ミエリン鞘内に見出されるリポタンパク質に結合する銅フタロシアニン色素である。凍結切片を乾燥させ、９５％のＥｔＯＨを使用して再水和する。ＬＦＢ染色を、製造業者の使用説明書（ＩＨＣ Ｗｏｒｌｄ、米国）に従って実施する。Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ（登録商標）Ａｘｉｏ Ｏｂｓｅｒｖｅｒ Ｄ１倒立顕微鏡を使用して試料を画像化し、ＮＩＨ ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して分析する。ミエリンは、ＬＦＢを使用して青色に染まり、したがって、閾値が標準化され、ＬＦＢ染色がないことが、定量化され、各試料においてミエリン喪失のパーセンテージを表す。
［実施例２９］
【０７８７】
脳傷害の動物モデルにおける脳へのインビボ－デリバリー
Ａ．外傷性脳傷害（ＴＢＩ）のＭＥＶ媒介性処置。
動物モデルおよび外科手技：Ｃ５７ＢＬ／６雄マウスを、制御皮質衝撃によるＴＢＩまたは骨切除開頭術のみの偽手術のいずれかに付す。マウスを以下の群に無作為に分配する：ＴＢＩなしの手術、処置なしのＴＢＩ、ＲＮＡが負荷されたＭＥＶを用いるＴＢＩおよび空のＭＥＶを用いるＴＢＩ。亜酸化窒素／酸素（６０／３０％）中１～２％のイソフランを使用して、定位固定フレーム（Ｄａｖｉｄ Ｋｏｐｆ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，カリフォルニア州、トゥジュンガ）中のマウスに深部麻酔を投与する。動物を定位固定フレーム上に固定し、眼軟膏を投与し、正中線切除によって頭蓋を露出させる。ブレグマから－０．２ｍｍ前後方向および－０．２ｍｍ内外方向の座標を有する中心を同定し、手持ち式ドリルを使用しておよそ４ｍｍの直径の骨切除開頭術を実施する。得られた骨弁を廃棄する。大脳皮質での脳の湾曲に対して調整するように垂直軸に対して、０．９５ｍｍの深度に到達する（軽度ＴＢＩ）４．０ｍ／ｓの速度および３００ｍｓの滞留時間を有する、２０°回転した３ｍｍの直径の衝撃部材の先端を用いる衝撃を脳に与える。サーマルヒーティングパッドを用いて手術の間動物の体温を調節する。手術後、頭皮を縫合して閉じ、完全に歩行可能になるまでマウスをヒーティングパッドの最上部上の回復ケージに移す。手術後すべての動物を密接にモニタリングする。マウスを実験を通して定期的なげっ歯類食で維持する。
【０７８８】
Ｂ．ＭＥＶのＩＮ投与
ＭＥＶをこれまでに記載されたように単離し、精製する。ＭＥＶにＭＡＬＡＴ１、長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）を負荷する。ＴＢＩ手術の４８時間後、亜酸化窒素／酸素（６０／３０％）中、１～２％のイソフランを用いてマウスを軽度に麻酔し、

外鼻孔間に両側に送達される等体積を用いるＩＮ投与によって処置する。偽マウスおよび処置なしＴＢＩには、ＰＢＳを鼻腔内に与えるが、他の群には、それぞれＭＡＬＡＴ１ありまたはなしでＭＥＶを与える（配列番号１４２）。

【０７８９】

長鎖ノンコーディング　ＲＮＡ　ＭＡＬＡＴ１の過剰発現は、ＡＱＰ４およびＮＦ－κＢ／ＩＬ－６経路を阻害することによって外傷性脳傷害によって誘発された脳浮腫を回復させる（例えば、Yamin et al.(2019) J. Cell. Biochem. 120: 7584-17592, doi.org/10.1002/jcb.29025を参照されたい）。ＲＮＡ（または一部の実施形態では、ＲＮＡへの転写のためのＤＮＡ）としてＭＡＬＴ１を送達するＭＥＶの投与は、傷害および脳が関わる他の外傷の処置のためである。ＭＡＬＡＴ１発現は、がんと関連しているが、脳は関わっておらず、がんおよび腫瘍の阻害の標的であろう。

【０７９０】

Ｃ．行動試験。高所体スイングテスト（Ｅｌｅｖａｔｅｄ　ｂｏｄｙ　ｓｗｉｎｇ　ｔｅｓｔ）（ＥＢＳＴ）。

高所体スイングテストは、片側性脳傷害において見られる非対称の運動行動を測定する（Borlongan and Sanberg, 1995）。手短には、マウスを空のケージに入れ、２分間慣らす。開始するために、マウスを、４つの足すべてを地面につけ、その尾の基部から約１インチに保持するニュートラルポジションにする。マウスを表面から持ち上げ、マウスが垂直軸からいずれかの側に１０°より多く移動した場合に揺れを記録する。各動物について合計２０の揺れを記録する。１０のスコアを有する動物は、バイアスなしを示すが、１４以上のスコアは、非対称性および関連する運動障害を示す。より高い側に行われた揺れの総数を合計し、群あたりの総動物で除し、処置群あたりの偏った揺れの平均数をコンピュータで算出する。外傷性脳傷害後、マウスをＴＢＩの２４時間後に試験し、処置の投与の前に群間に等しい平均スコアを与えるように、そのＥＢＳＴスコアに基づいて３群にわける。

【０７９１】

Ｄ．行動試験。ラジアルアーム水迷路。

ＴＢＩ傷害後５週で、８アームのラジアル温水（ＲＡＷＭ）を実施して、認知機能を評価する。ＲＡＷＭは、視覚的な手がかりと隠されたプラットフォームを使用して空間学習を評価する海馬依存性の記憶タスクである。手短には、８アームのＲＡＷＭ（ＢＩＯＳＥＢ）を、４フィートの直径の水槽中に入れ、水は、２０℃で維持する。２つのプラットフォームを利用する：水レベルの１インチ上にあり、中に識別されるカラフルな旗を有する眼に見えるプラットフォームおよび水ラインの１インチ下にある隠されたプラットフォーム。水を濁し、隠されたプラットフォームをさらに隠すために白色ペンキが使用される。学習フェーズでは１日目および２日目に合計１５回の試行が行われ、続いて、反転試験の３日目に１５回の試行が行われる。各試行は、マウスが開始アームに配置され、プラットフォームが割り当てられたゴールアームに配置されて開始する。ゴールアームは、１日目および２日目の学習試行を通してマウスにとって同一のままであり、開始アームは、試行毎にランダムに変化する。１日目および２日目に、プラットフォームは、最初の６試行の間、隠されたものと眼に見えるものの間で交代し、残りの試行は、隠されたプラットフォームのみを使用する。３日目に、すべての試行は、隠されたプラットフォームのみを使用し、これまでのゴールアーム位置とは真向かいのその「反転」位置に置く。マウスを２つのブロックの６試行で、続いて、１つのブロックの３試行で試験し、適切な休止期間を可能にする。３日目に、すべての試行は、隠されたプラットフォームのみを使用する。試行は最大６０秒間行い、マウスが６０秒以内にプラットフォームを見出す場合には、それらにプラットフォーム上に留まるために３０秒間を与え、その後、そのホームケージに戻す。しかし、６０秒の最後でマウスがプラットフォームを見出さない場合には、それらは、プラットフォームに案内され、３０秒間プラットフォームに座らせる。マウスがプラットフォームを含有していないアームに入ると、またはアームが１５秒間選択されない場合にはエラーがカウントされる。ＲＡＷＭ性能分析は、３日にわたって合計９ブロックについ

て、１日あたりの３ブロックの各々におけるエラーの数を分析することによって行われる。

【０７９２】

Ｅ．免疫組織化学分析法。

ＴＢＩの６週後、動物に麻酔し、ｐＨ７．２の０．１Ｍリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、続いて、ｐＨ７．２のＰＢＳ中、４％のパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）を用いて経心的に灌流する。脳を収集し、４％のＰＦＡ溶液中で一晩、続いて、ＰＢＳ中の３０％のスクロース中で脳が完全に沈み込むまで保存する。クリオスタットを用いて４０μｍの厚みで脳の冠状切片を作成し、凍結保護物質溶液中で－２０℃の冷凍庫中で保存する。

【０７９３】

損傷体積分析のために、ＴＢＩ傷害領域全体をまたぐ６つの冠状切片すべてを使用する。組織をガラススライド上にマウントし、乾燥させる。スライドをヘマトキシリンＱＳ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カタログ番号Ｈ－３４０４）中に入れ、５～１０分間完全に発色させ、次いで、水道水で５分間洗浄する。スライドを一晩乾燥させ、その後、ＤＰＸマウント剤で脱水し、カバーガラスとする。損傷体積を算出するために、スライドを光学顕微鏡［Ｎｉｋｏｎ（登録商標）Ｅ６００］下で可視化し、Ｃａｖａｌｉｅｒｉ推定器［Ｓｔｅｒｅｏ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｏｒ（登録商標）ソフトウェア、Ｍｉｃｒｏ　Ｂｒｉｇｈｔｆｉｅｌｄ　Ｉｎｃ．］を使用して、衝撃を受けた領域が、同側半球中で輪郭が描かれ、測定される。

［実施例３０］

【０７９４】

がんの動物モデルにおける脳へのインビボ－デリバリー

Ａ．脳腫瘍を保持するマウスモデルにおける鼻腔内腫瘍処置

これまでに記載された方法を使用して、マウスあたりにＧＬ２６細胞を頭蓋内に注射する。手短には、５×１０^{4}個の腫瘍細胞を含有する２μｌのＰＢＳを、Ｈａｍｉｌｔｏｎシリンジ（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して前頭葉中の正中線の１ｍｍ外側および３ｍｍ深部の冠状縫合に片側性に注射する。テモゾロミドが負荷されたＭＥＶ、空のＭＥＶまたはテモゾロミド単独を用いて腫瘍細胞移植後５日目に開始して３日毎に２１日間、腫瘍を保持するマウスを処置する。

【０７９５】

Ｂ．治療エンドポイント評価。

製剤の治療可能性を評価するための主要な因子として動物の平均生存時間（ＭＳＴ）を測定する。この目的のために、動物を体重、警戒心、歩行障害、接触に対する反応に関して毎日モニタリングし、以下の症状を一緒に示す場合に麻酔を過剰投与する：２０％の体重減少、協調運動障害、眼の出血。これらの症状は、切迫した死亡を示し、動物は、回復する可能性が低いと考えられる。カプランマイヤー分析を使用してＭＳＴを決定し、分析する。

【０７９６】

Ｃ．毒性研究。

製剤の毒性効果を、腎臓および肝臓生化学マーカーとして血中尿素窒素（ＢＵＮ）、クレアチニン、アラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（ＡＳＴ）およびアルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）の血清濃度を測定することによって評価する。病理組織学的研究を実施して、毒性測定の結果を確認する。この目的のために、すべての群のすべての動物から腎臓および肝臓を収集する。臓器を１０％のホルマリン中で固定し、パラフィン処理し、切片作成し（５μｍ）、Ｈ＆Ｅでを用いて染色する。次いで、毒性効果を盲検分析において病理学者によって半定量的スコア化システムを使用して評価し、臓器毒性は、毒性症状が観察されない場合は０、わずかな変化が知覚される場合は１、中程度の臓器変化が観察される場合は２と考えられる。

［実施例３１］

【０７９７】

脳へのサイケデリックスおよびβ－カルボリンのインビボ－デリバリー

パーキンソン病（ＰＤ）、第２の最も一般的な神経変性疾患は、６０歳を超える集団の１％超に影響を及ぼす。臨床的に、ＰＤ患者は、静止時振戦、筋硬直、動作緩慢および姿勢保持障害などの運動障害を有し、低い生活の質に苦しんでいる。ＰＤの病理学的特徴には、黒質線条体系の漸進的破壊、レビー小体（ＬＢ）の形成および持続性の炎症が含まれる。実験は、ＩＮ投与後のＭＥＶ中に負荷されたハルミンの活性を示す。

【０７９８】

Ａ．動物および試薬

実験のために雄のＣ５７ＢＬ／６マウス（８週、２２～２５ｇ）を使用した。すべてのマウスは、１２時間明／暗周期で、２２±１℃の温度で、食物および水が利用可能で育てられた。ＭＰＴＰ塩酸塩は、Ｓｉｇｍａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、米国、ミズーリ州、セントルイス）から入手した。

【０７９９】

Ｂ．試験手順

モデルを構築するために、マウスにＭＰＴＰ［０．９％の生理食塩水に溶解した、３０ｍｇ／ｋｇ、（ｉ．ｐ．）］を５連続日注射し、一方で、対照群には、等容量の生理食塩水（ｉ．ｐ．）を与えた。すべてのマウスは、１週間適応させ、行動試験のために訓練した。ＭＰＴＰ処置の３日前、処置の間または処置の３日後に、ハルミンが負荷されたＭＥＶを鼻腔内投与によって、または等容量のＰＢＳ（対照群）を１４日間マウスに与えた。

【０８００】

最後の注射の２日後、オープンフィールドテスト、ポールテストおよびロータロッドテストを使用して行動評価を実施した。

【０８０１】

Ｃ．オープンフィールド試験

オープンフィールドのために白色の不透明なプラスチックボックス（４８ｃｍ×３２ｃｍ×２０ｃｍ）を使用した。ボックスの床を８ｃｍ×８ｃｍの２４グリッドにわけた。推定の前に、すべてのマウスを５分間ボックスに予め適応させた。翌日、マウスをオープンフィールドの中心に入れ、５分間ビデオで記録した。試行の間にボックスを１０％のアルコールおよび水で清掃した。次いで、５分での移動した距離および立ち上がり量を手作業でスコア化した。

【０８０２】

Ｄ．ロータロッドテスト

マウス運動協調性を、ロータロッド装置（ＩＩＴＣ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、米国、カリフォルニア州）を使用して評価した。投与前に、すべてのマウスをロータロッドで３００秒間訓練した（３００秒線形に５～１０ｒ／分）。この訓練プロセスは３ラウンドより多く実施して、ロータロッド上を歩くようにすべてのマウスを訓練した。ＭＰＴＰ処置後、ロータロッドテストを５～３０ｒ／分の一様に加速する速度で３００秒実行し、落ちるまでの潜時を記録した。

【０８０３】

Ｅ．ポールテスト

ポールテストを本発明者のこれまでの研究に記載されたように実行して、マウスの運動障害を評価した。装置は、先端に木製ボールを有する木製ポール（５０ｃｍの高さ、直径０．５ｃｍ、滑り防止のためにガーゼで包まれている）からなっていた。ポールの基部は、マウスの傷害からの保護として寝具で覆われていた。順化後、ポールを用いて３回マウスを予め訓練し、すべての動物が、ボール上に置かれると頭を下に向けることを確実にした。ポールテストの間、マウスが頂部から底まで行き着くためにかかった総時間を測定した。

【０８０４】

Ｆ．組織調製

抱水クロラール（４００ｍｇ／ｋｇ、ｉｐ）を用いてマウスに麻酔した。線条体を迅速

に解剖し、ドライアイス中で凍結し、生化学分析のために－８０℃で保存した。組織学的分析のために、マウスに麻酔し、０．１ｍｏｌ／Ｌのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、続いて、４％のパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）を用いて灌流した。後に、マウス脳を収集し、４％のＰＦＡ中で２４時間後固定した。固定後、種々の濃度のスクロース（１０％、２０％から最終的に３０％）を用いて、脳試料が溶液の底にあるまで脳を脱水した。次いで、線条体または黒質緻密部（ＳＮｐｃ）を含有する冠状切片（２０μｍ厚）をクリオスタット（ＣＭ３０５０Ｓ、Ｌｅｉｃａ、ドイツ）で切断し、分析のためにコーティングされたスライド上に置いた。

【０８０５】

Ｇ．免疫組織化学

線条体またはＳＮのスライスを以下のとおりに処置した：０．０１ｍｏｌ／Ｌのクエン酸緩衝剤溶液中で１０分間煮沸して抗原を賦活化し、１％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００中に１０分間浸して、抗体の浸透を増大し、３％の過酸化水素（H_2O_2）と共に１０分間インキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性を排除し、５％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）中で１時間インキュベートして、非特異的結合を除去した。さらに、これらのスライスを、２つの工程の間毎にＰＢＳＴ（１回５分、３回）で洗浄した。次いで、それらを抗チロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）（１：１００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、米国、テキサス州、ダラス）、抗α－シヌクレイン（１：１００、Ａｂｃａｍ、英国、ケンブリッジシャー州、ケンブリッジ）および抗グリア線維酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）（１：５００、デンマーク、ダコ）を含む一次抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。洗浄後、スライスを対応する西洋ワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートしている二次抗体（１：２００、ＫＰＬ、米国、メリーランド州、ゲイザースバーグ）と共に２時間インキュベートし、３回洗浄した。次いで、３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）を用いて１０～６０分間スライスを染色し、最後に、Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＢＡ５１顕微鏡写真機で画像化した。本発明者らは、分析のために種々の群の中で目的の領域が同一のＳＮ形状を共有することを確実にした。

【０８０６】

Ｈ．ウエスタンブロット解析

脳組織を氷冷ＲＩＰＡ緩衝剤（５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ、０．５％のデオキシコール酸ナトリウム、１％のＮＰ－４０、０．１％のＳＤＳ、０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＰＭＳＦおよび１％のプロテアーゼ阻害剤カクテル）を用いて２０倍（μＬ／ｍｇ）希釈し、超音波装置（ＶＴＸ　１３０、Ｓｏｎｉｃｓ、米国）を使用することによって氷上で破壊した。粉砕された組織を氷上で３０分間溶解した後、３０分間遠心分離した（１２０００×ｇ、４℃）。次いで、上清を収集し、ＢＣＡキットを用いてタンパク質濃度を測定した。抽出されたタンパク質を、ローディング緩衝剤と共に１０分間煮沸した後、変性させた。同量のタンパク質試料を１５％のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルによって分離し、ＰＶＤＦメンブレン（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、米国）にトランスファーした。これらのメンブレンを３％のＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、米国、ミズーリ州、セントルイス）を用いてブロッキングし、一次抗体、例えば、抗β－アクチン（１：５０００、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ミズーリ州、セントルイス、ＵＳＡ）、抗ＴＨ（１：５００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、米国、テキサス州、ダラス）、抗ＧＦＡＰ（１：５００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、米国、テキサス州、ダラス）または抗α－シヌクレイン（１：５００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、テキサス州、ダラス、ＵＳＡ）と共に４℃で一晩インキュベートした。メンブレンを洗浄（１０分、３回）した後、それらを西洋ワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートしている二次抗体（１：５０００、ＫＰＬ、米国、メリーランド州、ゲイザースバーグ）と共に２時間インキュベートした。タンパク質バンドを増強化学発光（ＥＣＬ）および検出システムを用いて検出した。

【０８０７】

Ｉ．一例として、ＭＥＶを線条体カーゴにカーゴを送達するために使用できる。

ＭＥＶを、脳において直接注入されるか、または遺伝子療法ベクター、例えば、ＡＡＶまたはレンチウイルスベクターにおいて発現される場合に興味深い線条体カーゴに送達するために使用できる。ＭＥＶのＩＮ投与を介して送達されるべきこのようなカーゴとして、例えば、以下が挙げられる：

ｉ）細胞成長および生存を調節および促進できるグリア細胞由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）またはニュールツリン（ＮＴＮ）、

ｉｉ）ＤＡ／ＧＡＢＡ経路のバランスをとるためにＧＡＢＡ濃度を高めることができるグルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）、

ｉｉｉ）芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（ＡＡＤＣ）は、レボドパをドーパミンに変換し、ＰＤが著しく低減している。ＡＡＤＣ置換は、運動症状を改善し、総外因性レボドパ必要条件を低減して、処置の副作用を低減する可能性がある。

ｉｖ）Ｌ－チロシンをレボドパに変換するチロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）

ｖ）ＴＨによる変換を促進するグアノシン三リン酸－シクロヒドロラーゼ１（ＧＴＰＣＨ）

ｖｉ）プロサビン（ＰｒｏＳａｖｉｎ）は、パーキンソン病の療法を送達し、３種のドーパミン生合成酵素：チロシンヒドロラーゼ（ＴＨ）、ＧＴＰ－シクロヒドロラーゼ１（ＧＴＰＣＨ）および芳香族Ｌ－アミノ酸デカルボキシラーゼ（ＡＡＤＣ）をコードするレンチウイルスベクターである。

［実施例３２］

【０８０８】

経口投与後マウス腸管上皮（腸細胞）における蛍光標識されたＭＥＶの内部移行

ＰＫＨ２６は、一般的な膜標識のために使用される親油性蛍光色素である。増強された安定性（インビボ半減期は、１００日を超える）のためにインビトロ研究ならびに長期のインビボ実験ために使用される。ＭＥＶは、上記のようにＰＫＨ２６を用いて標識され、動物あたり４×１０ｅｘｐ１０　ＭＥＶ粒子の用量でＢＡＬＢ／ｃマウスに経口投与される。投与後０．５～２４時間の間に、動物を　　殺し、腸を収集した。

【０８０９】

Ａ．臓器試料採取および処理：腸

空腸および回腸を、冷ＰＢＳ溶液で穏やかにすすいだ。次いで、およそ０．５～１ｃｍの空腸および回腸の小片を瞬間凍結し、最後に、各小片をＯＣＴ封入のためにクリオモルドの底に縦方向に置いた（以下に記載されるように）。

【０８１０】

Ｂ．瞬間凍結：

小さいステンレス鋼ボウルを、ペレット形態のドライアイスおよび液体窒素を含有する容器の底に入れた。次いで、容器にイソペンタン／２－メチルブタンをゆっくりと添加した。ドライアイスペレットが激しく泡立つことを停止した時点または／およびイソペンタンが不透明になり始めた時点で、イソペンタン／２－メチルブタンは、最適温度である。臓器をイソペンタン／２－メチルブタン中に穏やかに浸漬し、次いで、カセット（肝臓、脾臓の各切片および空腸の小片を有する１つのカセット、ならびに回腸の小片のみを有する１つのカセット）中に入れた。次いで、カセットを≦－７５℃で、ＯＣＴ封入まで保存した。

【０８１１】

Ｃ．ＯＣＴ封入プロトコール

小さいステンレス鋼ボウルを、ペレット形態のドライアイスおよび液体窒素を含有する容器の底に入れた。ドライアイスの一部のペレットもボウル中に直接入れた。次いで、容器にイソペンタン／２－メチルブタンをゆっくりと添加した。ドライアイスペレットが激しく泡立つことを停止した時点および／またはイソペンタンが不透明になり始めた時点で、イソペンタン／２－メチルブタンは、最適温度である。次いで、凍結した組織試料を、各臓器について上記で記載されたようにクリオモルド中に入れ、方向づけた。組織をピンセットで穏やかに押して、組織の表面の底部が適切に配置される（底面に触れ、モールド

の中心にあり、適切に方向づけられる）ことを確実にした。凍結された組織試料を有するクリオモルドを冷イソペンタン／２－メチルブタンの表面に置いた。最適切断温度コンパウンド（ＯＣＴコンパウンド）を検体上に、それが完全に覆われるまで注意深く堆積させた。ＯＣＴコンパウンドが硬化した後（３０秒から１分の間）、ＯＣＴ包埋されたブロックをバッグ（ｚｉｐフリーザーバッグなど）中に入れた。凍結されたブロックをドライアイス中に一時的に保存した。次いで、クリオスタットで５μｍのスライスを実施し、次いで、組織学のために未処置スライド上に、および免疫化学のために処置スライド上に接着した。

【０８１２】

Ｄ．ＨＥＳ染色

ＨＥＳ染色によって、組織の形態学および構造の観察が可能になった。アセトン中で固定した後、切片を、Ｈａｒｒｉｓヘマトキシリン、エオシンおよびサフランの溶液中に連続的に浸漬した。脱水後、Ｅｎｔｅｌｌａｎ（登録商標）マウント剤を使用して切片をスライドとカバーガラスの間にマウントした。細胞質は、桃色に、核は紫青色に見えた。細胞外マトリックスは、黄色から桃色に染色された。

【０８１３】

Ｅ．ＰＫＨ２６色素

蛍光標識されたＭＥＶの蓄積をＬＳＭ７００レーザースキャニング共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ製）によって可視化し、ＬＳＭ画像ブラウザーを用いて画像を処理した。イメージングの前に、ＤＡＰＩ（４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）［Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、参照Ｓ３６９３８］を核の対比染色として使用した。蛍光スライドスキャナー観察（収集後、最大１０日）のためにＤＡＰＩを有する水性媒体を用いて切片をマウントした。

【０８１４】

図４８は、ＰＫＨ２６標識されたＭＥＶ投与の８時間後のマウス腸管上皮の顕微鏡画像を示す。腸細胞において眼に見える蛍光シグナルによって、ＭＥＶ内部移行が確認される。細胞核はＤＡＰＩを用いて染色した。

［実施例３３］

【０８１５】

ルシフェラーゼ酵素およびルシフェラーゼ－ｍＲＮＡのＭＥＶ媒介性インビボデリバリー、発現および生物学的活性

Ａ．ルシフェラーゼｍＲＮＡまたはルシフェラーゼタンパク質が負荷されたＭＥＶの気管内投与

インビボ生物発光を使用して、ルシフェラーゼｍＲＮＡおよびルシフェラーゼタンパク質の体内分布およびＭＥＶ媒介性デリバリーおよび発現を研究した。８（８）匹の雌のＢＡＬＢ／ｃＢｙＪマウスを、気管内（ＩＴ）投与のために２つの群にわけた（群あたり４匹の動物）。各群中のマウスを、ルシフェラーゼをコードするｍＲＮＡが負荷されたＭＥＶ（ＭＥＶ－ｌｕｃ　ｍＲＮＡ）またはルシフェラーゼ酵素が負荷されたＭＥＶ（ＭＥＶ－ｌｕｃタンパク質）のいずれかを用いて処置した。上記のようにＭＥＶに負荷し、特性決定した。ＩＴ投与のために、動物をイソフラン誘導性麻酔下で維持し、マウス挿管プラットフォーム上に置いた。次いで、気管をコールドライトでバックライトし、マイクロスプレイヤー（Ｍｉｃｒｏｓｐｒａｙｅｒ）（登録商標）エアロゾル化器（Ｐｅｎｎ－Ｃｅｎｔｕｒｙ）を使用して５０μＬ／マウスのＭＥＶ製剤を気管内に投与した。投与後、マウスを、挿管プラットフォーム上で同一位置で少なくとも３０秒間維持し、その後、そのケージ中に置き換えた。バックグラウンドマウスも研究に含め、このマウスは、ＭＥＶ投与を全く受け取らず、バックグラウンドレベルの生物発光獲得を測定するための対照として働いた。

【０８１６】

Ｂ．生物発光獲得

イメージングの前に、各動物の毛皮を電気式のクリッパーを使用して腹部と胸部で剃毛

した。各マウスに２００μＬのルシフェリン溶液を１６．５ｍｇ／ｍＬの濃度で腹膜内に（ＩＰ）注射した。ルシフェリン注射の１０分後、生物発光獲得を実施し、イソフラン／酸素の混合物を用いてマウスに麻酔した。マウス腹部および胸部、特に、肺、肝臓、腸および脾臓を可視化するために、動物を仰臥位（腹側画像）に配置した。ＩＶＩＳ（登録商標）ＬＵＭＩＮＡ　Ｘ５光学イメージングシステム（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いてインビボでの生物発光獲得を実施した。生物発光を６つの時点で測定した：ＭＥＶ投与の１時間前ならびに投与の６、３０、４８、５４および７２時間後。生物発光シグナルを、肺、肝臓、腸および脾臓において可視化し、定量化した。動物を最後の生物発光獲得後に安楽死させた。各時点で、生物発光獲得を、バックグラウンドマウスでまず実施して、マウスの自己生物発光および光学イメージングシステムのカメラによって発せられるノイズに対応するバックグラウンドフラックスレベルを測定した。次いで、生物発光獲得を実験マウスで実施した。

【０８１７】

Ｃ－結果：インビボでのルシフェラーゼｍＲＮＡのデリバリー、タンパク質発現およびルシフェラーゼ活性

図４９は、ルシフェラーゼｍＲＮＡが負荷されたＭＥＶで処置された代表的な動物の全身生物発光イメージングを示す。ｍＲＮＡのＭＥＶ媒介性デリバリーは、ルシフェリンの投与後に検出された発光シグナルによって証明されるように、マウス組織における酵素的に活性なルシフェラーゼの発現をもたらした。気管内投与後の標的臓器には、呼吸系（肺および鼻－頬側上皮）ならびにＭＥＶ製剤の部分逆流に起因する消化管（腸管上皮）が含まれる。ＭＥＶの単回投与後のルシフェラーゼ活性が検出可能であり、投与後６時間から始まって２～３日間持続した。対照は、ＭＥＶ投与を行わなかったバックグラウンドマウスとした。

【０８１８】

Ｄ－結果：インビボでのルシフェラーゼデリバリーおよび活性

図５０は、ルシフェラーゼ酵素が負荷されたＭＥＶで処置された代表的な動物の全身生物発光イメージングを表す。タンパク質のＭＥＶ媒介性デリバリーは、ルシフェリンの投与後に検出された発光シグナルによって証明されるように、マウス組織におけるルシフェラーゼの酵素活性をもたらした。気管内投与後の標的臓器には、呼吸系（肺および鼻－頬側上皮）ならびにＭＥＶ製剤の部分逆流に起因する消化管（腸管上皮）が含まれる。ＭＥＶの単回投与後のルシフェラーゼ活性が検出可能であり、投与後６時間から始まって３～４日間持続した。対照は、ＭＥＶ投与を行わなかったバックグラウンドマウスとする。

［実施例３４］

【０８１９】

インビトロでマクロファージ細胞におけるＭＥＶ媒介性デリバリーを使用するＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の阻害または刺激

Ａ．細胞培養：

ＴＨＰ１由来マクロファージ培養

ＡＴＣＣ（登録商標）ヒト単球ＴＨＰ－１細胞株を、１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００Ｕ／ｍＬのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシンおよび０．０５ｍＭの２－メルカプトエタノールを補給したＲＰＭＩ－１６４０培地で培養する。ＴＨＰ－１単球をＭ０マクロファージ（Ｍ０－Ｍ）に分化させる。細胞を1×10^{5}個細胞／ｍＬで播種し、３７℃で５％のCO_2を用い、５０ｎｇ／ｍＬのＰＭＡの存在下で４８時間インキュベートし、次いで、細胞回復のためにＰＭＡを有する条件付け培地を除去し、新鮮培地と3日間置き換える。マクロファージ成熟をフローサイトメトリーによって評価する。５日培養した後、細胞を回収し、抗ヒトモノクローナル抗体（ｍＡｂ）抗ＣＤ６８　ＰＥ（クローンＹ１／８２Ａ）およびそのアイソタイプ対照ＰＥマウスＩｇＧ２ｂ、κアイソタイプ対照抗体（クローンＭＰＣ－１１）を使用して成熟したマクロファージのマーカーであるＣＤ６８について染色する。ＴＨＰ－１由来マクロファージにおけるＣＤ６８の発現を、フローサイトメーターを使用して評価する。少なくとも３０，０００

個細胞を獲得し、アイソタイプ対照と比較してＣＤ６８の平均蛍光強度（ＭＦＩ）の２倍の増大は、成熟の成功と考えられる。

【０８２０】

ＲＡＷ　２６４．７マクロファージ培養

ＲＡＷ　２６４．７細胞は、ＡＴＣＣ（登録商標）から入手する。細胞をＤ１０で維持し、８０％より多いコンフルエントの場合に３日毎に継代する。食作用アッセイのための調製では、細胞を収集し、ＩＥＣ臨床卓上遠心機を使用して室温で７分間１１００ｒｐｍで遠心分離し、Ｒ１０に再懸濁し、カウントし、トリパンブルー色素排除（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して生存力アッセイを行う。すべての実験における生存力は、＞９０％である。

【０８２１】

Ｂ．試薬

ＴＬＲリガンドは、ｄｓＲＮＡ：［ポリアデニル酸－ポリウリジン酸（ｐｏｌｙｕｒｉｄｉｌｙｃ　ａｃｉｄ）（ポリＡ：Ｕ）］；［ポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリＩ：Ｃ）］；抗ウイルス剤（Ｒ８４８、Ｒ８３７、ＣＬ０７５およびＣＬ２６４として）；タキソール；フラジェリン；フラジェリンミメティックペプチドｆｌｐ２２（フラジェリン由来ペプチド）；または非メチル化ＣｐＧモチーフオリゴヌクレオチドである。食作用アッセイのために、１０％の熱不活化ウシ胎児血清（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、オンタリオ州、バーリントン）、１００Ｕ／ｍＬのペニシリン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、オンタリオ州、バーリントン）、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、オンタリオ州、バーリントン）、２５ｍＭのＮ－２－ヒドロキシエチルピペラジン－ＮＶ－２－エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、オンタリオ州、バーリントン）および１０ｍＭのＬ－グルタミン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、オンタリオ州、バーリントン）を補給したＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、オンタリオ州、バーリントン）から構成されるマクロファージを滅菌組織培養培地（Ｒ１０）中で培養する。Ｄ１０を形成するためにＲＰＭＩと同じように補給されたダルベッコの改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、オンタリオ州、バーリントン）を、ＲＡＷ　２６４．７マクロファージの成長のために使用する。

【０８２２】

Ｃ．ＭＥＶの負荷

ＭＥＶには、本明細書で記載されるようにＴＬＲの種々のリガンドが負荷される（国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０７０３７も参照されたい）。ＴＬＲリガンドには、ｄｓＲＮＡ［ポリアデニル酸－ポリウリジン酸（ｐｏｌｙｕｒｉｄｉｌｙｃ　ａｃｉｄ）（ポリ（Ａ：Ｕ）］；ポリイノシン酸：ポリシチジル酸［ポリ（Ｉ：Ｃ）］；抗ウイルス剤（Ｒ８４８、Ｒ８３７、ＣＬ０７５およびＣＬ２６４として）；タキソール；フラジェリン；フラジェリンミメティックペプチドｆｌｐ２２（フラジェリン由来ペプチド）；または非メチル化ＣｐＧモチーフオリゴヌクレオチドが含まれており、これらは、ＴＬＲ３［ｄｓＲＮＡ（ポリアデニル酸－ポリウリジン酸（ｐｏｌｙｕｒｉｄｉｌｙｃ　ａｃｉｄ）（ポリ（Ａ：Ｕ））；ポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリ（Ｉ：Ｃ）］、ＴＬＲ４（タキソール）；ＴＬＲ５［フラジェリン；フラジェリンミメティックペプチドｆｌｐ２２（フラジェリン由来ペプチド）］、ＴＬＲ７およびＴＬＲ８（抗ウイルス剤、例えば、Ｒ８４８、Ｒ８３７、ＣＬ０７５およびＣＬ２６４）およびＴＬＲ９（非メチル化ＣｐＧモチーフオリゴヌクレオチド）アゴニストである。

【０８２３】

Ｄ．ＭＥＶインキュベーションおよび内部移行

ＴＨＰ－１細胞を、ＴＬＲリガンドが負荷されたＭＥＶを用いて種々の時点で処置する。対照条件ＴＡＫ－２４２として、ＴＬＲの阻害剤をＰＢＳに再懸濁し、－８０℃で保存し、その後、ＭＥＶを用いて処置し、ＴＨＰ－１細胞をＴＡＫ－２４２（５μＭ）を用いて３０分間処置する。

【０８２４】
Ｍ０マクロファージによるｍｅｖの内部移行：ｍｅｖを、ＰＫＨ２６　Ｒｅｄ蛍光細胞リンカーキットを用い、本明細書に記載される方法に従って標識する（ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０７０３７１および米国仮出願番号第６３／３４９，００６号も参照されたい）。標識されたｍｅｖを、ＴＨＰ－１細胞と共に３および６時間、３７℃で５％のＣＯ２を用いてインキュベートする。インキュベーション後、細胞をＰＦＡの４％を用いて固定し、０．１％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００を用いて透過処理し、アクチンを高親和性で結合するアクチングリーン、米国、１滴／１ｍＬのＰＢＳ）を用いて染色し、核をＨｏｅｃｈｓｔ、希釈１：１０００）を用いて染色する。試料を共焦点顕微鏡によって分析する。

【０８２５】
Ｅ．マクロファージ食作用アッセイ
食作用アッセイのために、Ｒ１０培地中の１×１０^{5}個のＲＡＷ　２６４．７マクロファージを、滅菌４ウェルチャンバー付きＭｉｌｌｉｃｅｌｌ（登録商標）ＥＺ　ＳＬＩＤＥＳガラス培養スライド（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、マサチューセッツ州、ベドフォード）上にプレーティングし、加湿５％のＣＯ$_{2}$インキュベーター中、３７℃で３０分間マクロファージを接着させる。１０：１のザイモサン対マクロファージ比率で、細胞にザイモサン粒子を添加する。食作用を、加湿５％のＣＯ$_{2}$インキュベーター中、３７℃で１時間進行させる。ＴＬＲリガンドの効果が評価される実験では、細胞を、ザイモサンの添加の１６時間前にこれらのＴＬＲ受容体アゴニストの存在下でインキュベートする。スカベンジャー受容体遮断を評価する実験のためには、ザイモサンの添加の１５分前に阻害剤を添加する。加温Ｒ１０を用いて３回、激しく洗浄して未摂取粒子を除去することによって食作用を終結させる。ガラススライドを１５分間風乾し、Ｗｒｉｇｈｔ染色（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用して染色し、Ｎｉｋｏｎ（登録商標）Ｅｃｌｉｐｓｅ　５０ｉ顕微鏡写真機を使用して×６００倍率の光学顕微鏡によってスライドを調べた。各実験処置について１６の異なる視野で少なくとも２００のマクロファージをカウントすることによって、×６００倍率の顕微鏡写真から食作用を決定した。食作用は、細胞あたりの粒子の平均数（ＭＮＰ）として評価する。食作用指数（ＰＩ）を使用して食作用全体を表し、ＭＮＰが乗された貪食細胞のパーセンテージとして決定する（ＰＩ＝食作用パーセンテージ×ＭＮＰ）。例示のための細胞の顕微鏡写真を、倒立顕微鏡［Ｎｉｋｏｎ（登録商標）Ｅｃｌｉｐｓｅ　ＴＥ２０００Ｓ］を使用して×４００の倍率で位相差によって未染色のものを、またはＮｉｋｏｎ（登録商標）Ｅｃｌｉｐｓｅ　５０ｉ顕微鏡写真機を使用して×６００の倍率でキャプチャされた染色された細胞を撮る。

【０８２６】
Ｆ．マクロファージ細胞表面受容体発現
マクロファージ細胞表面受容体発現に対するＬＰＳの効果を評価するために、１×１０^{5}個のマクロファージ細胞をＲ１０単独で培養するか、または１０ｎｇ／ｍＬのＬＰＳを用いて一晩前処置する。Ｃａ$^{2+}$およびＭｇ$^{2+}$不含ＰＢＳを用いてウェルを洗浄し、次いで、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、オンタリオ州、ミシサガ）を使用して細胞を剥離する。クラスＡスカベンジャー受容体（ＳＲ－Ａ）およびレクチン受容体デクチン－１の細胞表面発現を、それぞれの表面タンパク質に対するＦＩＴＣ標識ＩｇＧ抗体を使用して検出し、これを適切なアイソタイプ対応対照抗体の蛍光と比較する。細胞を抗ＳＲ－Ａ　ＩｇＧ（１μｇ／ｍＬ）（アイソタイプ対照ＩｇＧ２）または抗デクチン－１　ＩｇＧ（１μｇ／ｍＬ）（アイソタイプ対照ＩｇＧ２）のいずれかを使用して染色する。すべての抗体および対照は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ（ノースカロライナ州、ローリー）から入手した。抗体を、ＰＢＳ、２％のウシ血清アルブミンおよび０．１％のナトリウムアジドから構成される染色緩衝剤に、１０^{6}個細胞／ｍＬの濃度に再懸濁された１００μｌの細胞に添加する。染色の間に、細胞を氷上でインキュベートし、暗所で４５分間維持する。その後、細胞を洗浄し、２００μｌの染色緩衝剤に再懸濁し、ＢＤ　ＦＡＣＳ－Ｊａｚｚ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カリフォルニア州、サンジョゼ）およ

びＦｌｏｗ－Ｊｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ、オレゴン州、アシュランド）を使用して分析する。前方および側方散乱を使用して、ＳＲ－Ａおよびデクチン－１発現の分析の前に生存マクロファージを識別する。

【０８２７】

Ｇ．細胞毒性決定

ＭＴＴ（３－［４，５－ジメチルチアゾール－２－イル］－２，５ジフェニルテトラゾリウムブロミド）アッセイ

細胞生存力をこれまでに記載されたようにＭＴＴアッセイによって決定する。ＴＨＰ－１細胞を４８ウェルプレートに３連で播種し、播種の２４時間後、細胞をＭＥＶを用いて２４および４８時間処置する。５４０ｎｍでＥＬＩＳＡリーダーによって吸光度を測定する。値は、対照（未処置細胞）におけるものに対する細胞成長のパーセンテージとして表される。

【０８２８】

１．ウエスタンブロッティング：

ＭＥＶを用いて処置したＴＨＰ－１細胞から総タンパク質を単離し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、続いてウエスタンブロッティングによって分析する。実験に使用される一次抗体は、以下のとおりである：抗ＰＤ－Ｌ１抗体［Ａｂｃａｍ、英国、ケンブリッジ、ａｂ２１３５２４、希釈１：１０００；抗ｐＳＴＡＴ３（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ、ＡＦ４６０７－ＳＰ、希釈１：５００）、抗ＳＴＡＴ３（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、米国、コロラド州、デンバー、ＮＢＰ２－２４４６３、希釈１：１０００）、抗ＨＳＰ７０（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、ＮＢ６００－１４６９、希釈１：１０００）、抗ＨＳＣ７０（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、米国、テキサス州、ダラス、ｓｃ－７２９８、希釈１：５００）、抗カルネキシン（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、ｓｃ－２３９５４、希釈１：５００）、抗チュブリン（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、ｓｃ－３９８１０３、希釈１：１０００）、抗βアクチン（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、ｓｃ－８１１７８、希釈１：１０００）、抗ＧＡＰＤＨ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、ｓｃ－４７７２４、希釈１：１０００）および抗ＮＦ－ｋＢ（Ｎｏｖｕｓ、ＮＢ１００－２１７６、希釈１：５００）。４℃で一次抗体と共に一晩インキュベートした後、メンブレンを、ＨＲＰがコンジュゲートしている二次抗体（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と共に４℃で１時間インキュベートし、ＣｈｅｍｉＤｏｃ（商標）ＭＰイメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して化学発光シグナルを検出する。

【０８２９】

２．リアルタイムＰＣＲ

ＴＨＰ－１細胞を、1×10^{5}個細胞／ｍＬで１２ウェルプレートに播種し、上記のようにＭ０マクロファージに分化させ、次いで、細胞をＭＥＶを用いて６および２４時間処置する。処置の最後に、ＱＩＡＧＥＮ（登録商標）キットを使用して全ＲＮＡを抽出する。Ｈｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ逆転写キットを使用して、ＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写する。次いで、ｃＤＮＡを、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）分析に付す。使用されるプライマーの配列は、以下の表に示されている。

【０８３０】

表:リアルタイム PCR のために使用されたプライマーのリスト

プライマー	フォワード	配列番号	リバース	配列番号
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	150	GGGTCATTGATGGCAACAATAT	151
PD-L1	TCACGGTTCCCAAGGACCTA	152	AGGTCTTCCTCTCCATGCAC	153
IL-6	GGTACATCCTCGACGGCATCT	154	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	155
IL-1β	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	156	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	157
TNF-α	CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC	158	AGCTGGTTATCTCTCAGCTCCAC	159

【０８３１】

３００ｎＭの各プライマー、２μＬの鋳型ｃＤＮＡおよび１８μＬの２×　ＳＹＢＲ（登録商標）グリーンＩマスターミックスを含有する２０μＬの反応物中で、ステップ１リアルタイムＰＣＲシステムサーマルサイクリングブロック（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ）を使用してリアルタイムＰＣＲを実施する。ＰＣＲを、９５℃で２０秒、続いて９５℃で３秒および６０℃で３０秒の４０サイクルで行う。ＧＡＰＤＨを内因性対照として使用する。ΔＣｔ法を使用して、対照と処置試料の間の遺伝子発現の相対変化を決定する。

【０８３２】

Ｈ．ＥＬＩＳＡ試験

ＭＥＶを用いて処置されたＴＨＰ－１細胞の培養培地中のＩＬ－６の量を、ヒトＩＬ－６　ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して決定する。ＥＬＩＳＡアッセイを、製造業者の使用説明書に従って実施する。

【０８３３】

改変は当業者には明らかであるので、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることが意図される。

【図面】

【図１】

1/73

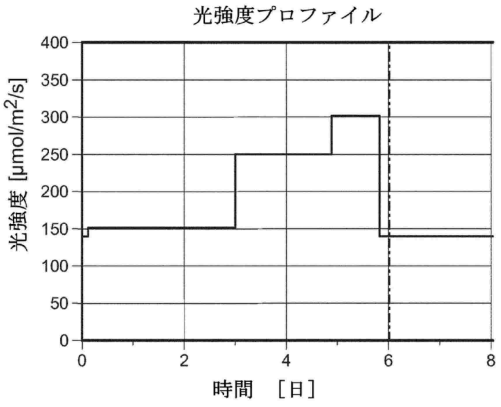


FIG. 1

【図２】

2/73

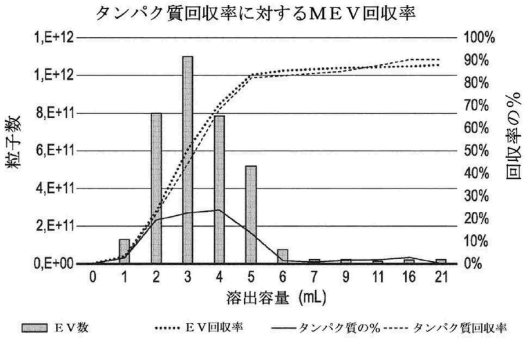
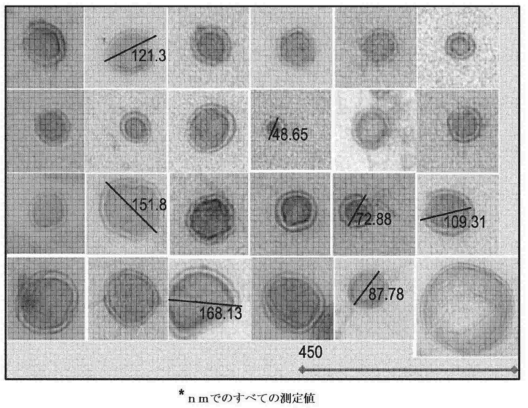


FIG. 2

【図３】

3/73



*ｎｍでのすべての測定値

FIG. 3

【図４】

4/73

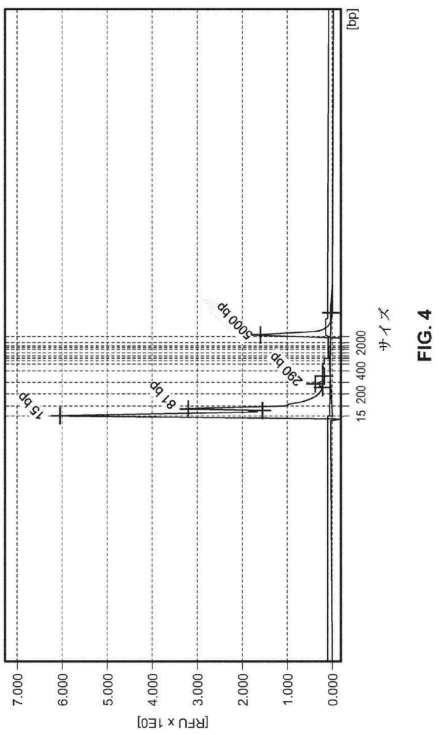


FIG. 4

【図５】

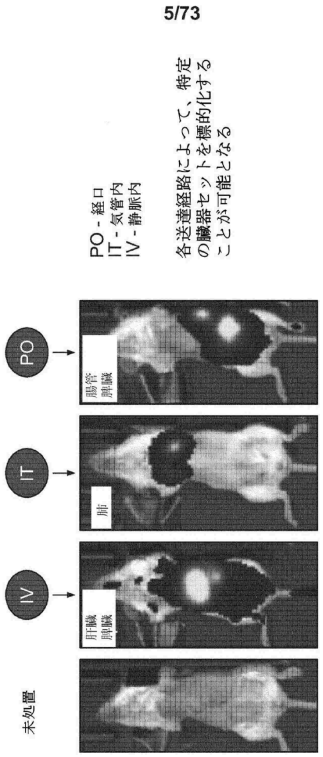


FIG. 5

【図６】

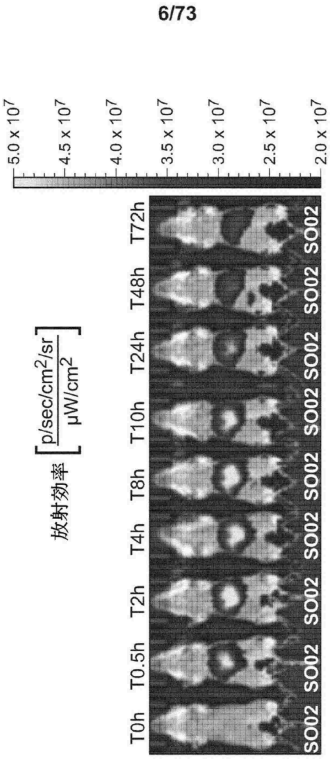


FIG. 6

【図７】

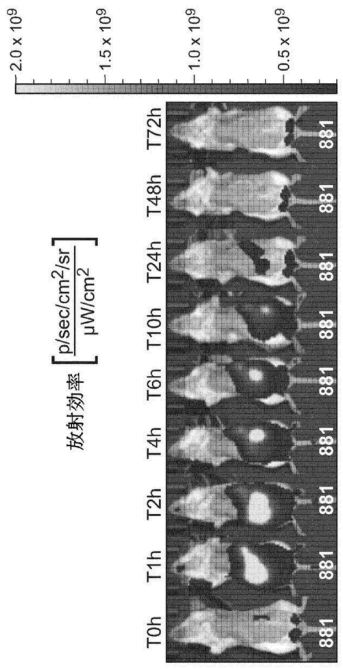


FIG. 7

【図８】

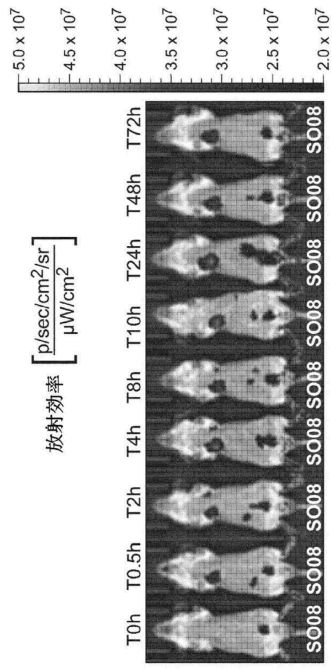


FIG. 8

【図９】

9/73

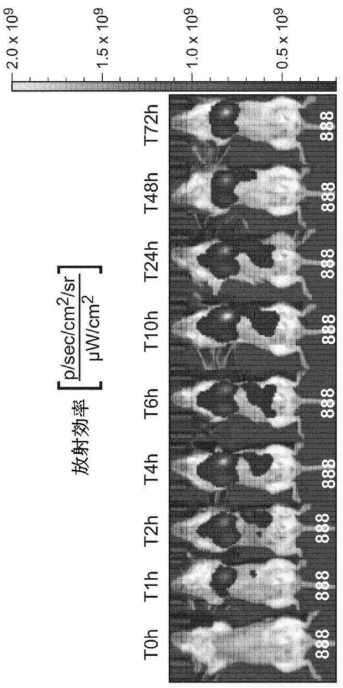


FIG. 9

【図１０】

10/73

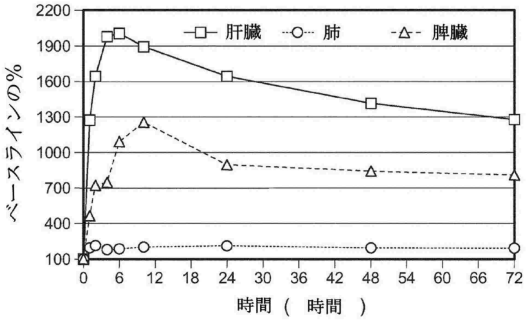


FIG. 10

【図１１】

11/73

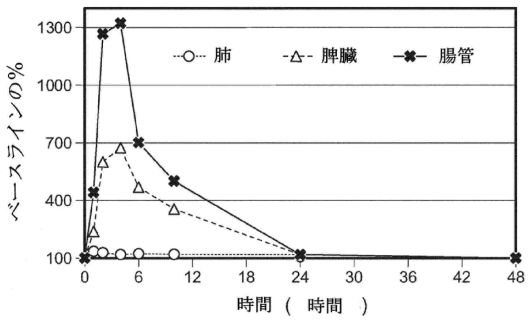


FIG. 11

【図１２】

12/73

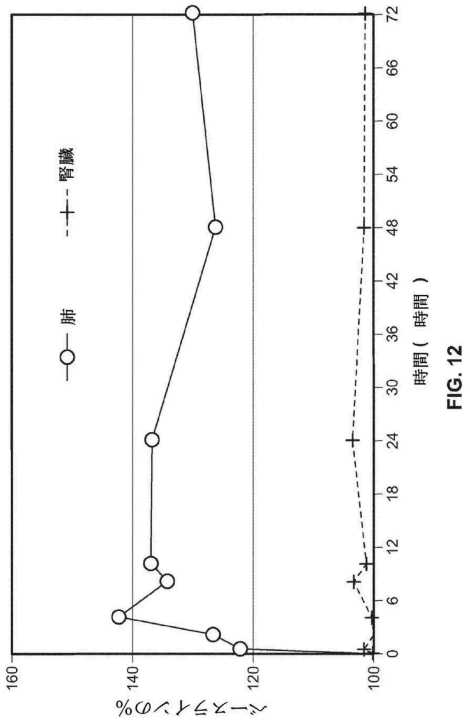


FIG. 12

【図１３】

13/73

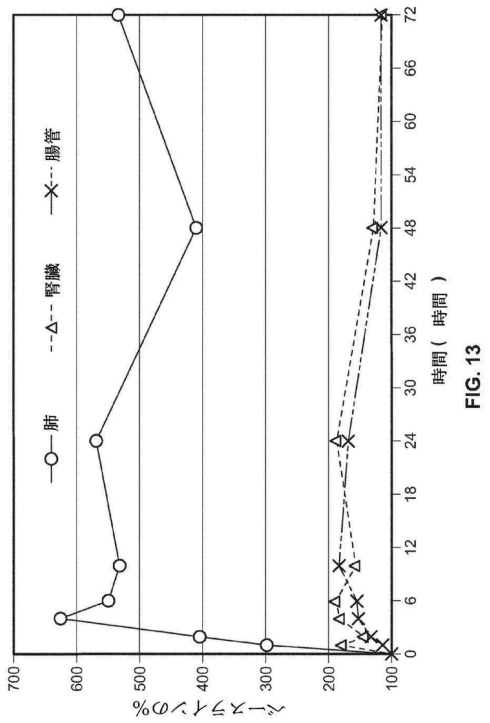


FIG. 13

【図１４】

14/73

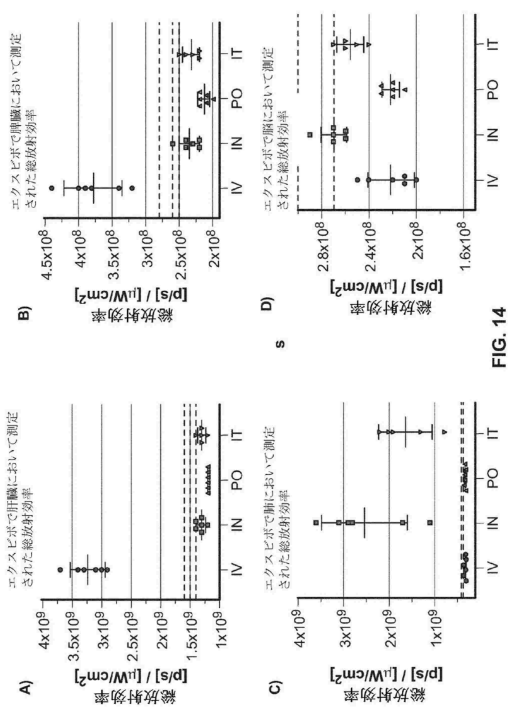


FIG. 14

【図１５】

15/73

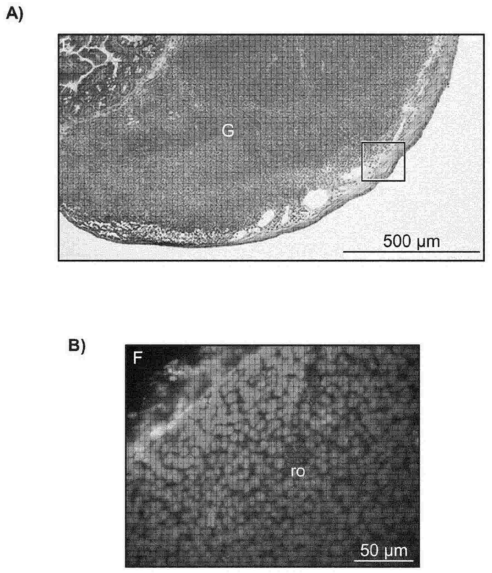


FIG. 15

【図１６】

16/73

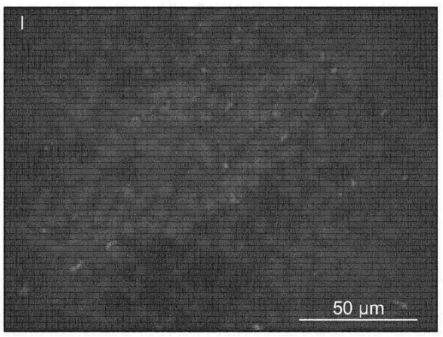


FIG. 16

【図１７】

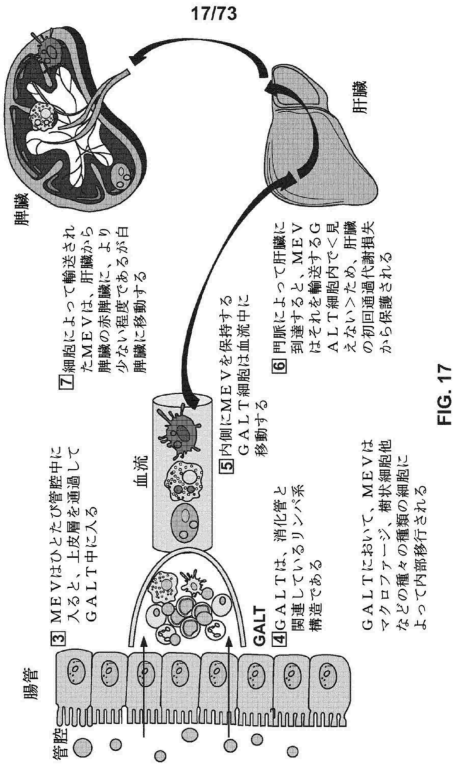


FIG. 17

【図１８－１】

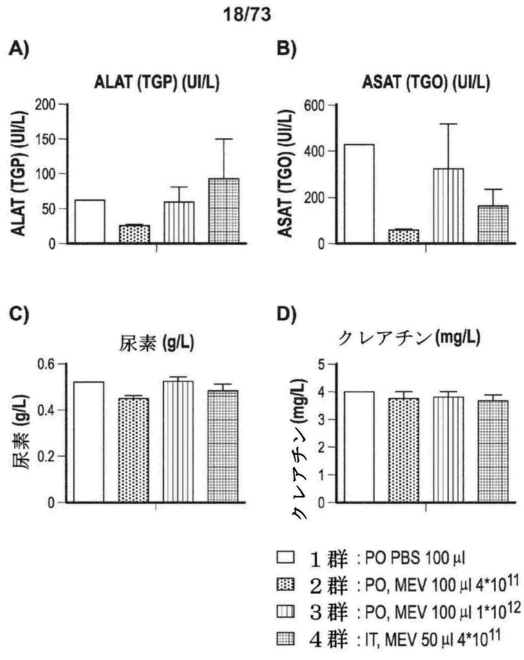


FIG. 18

【図１８－２】

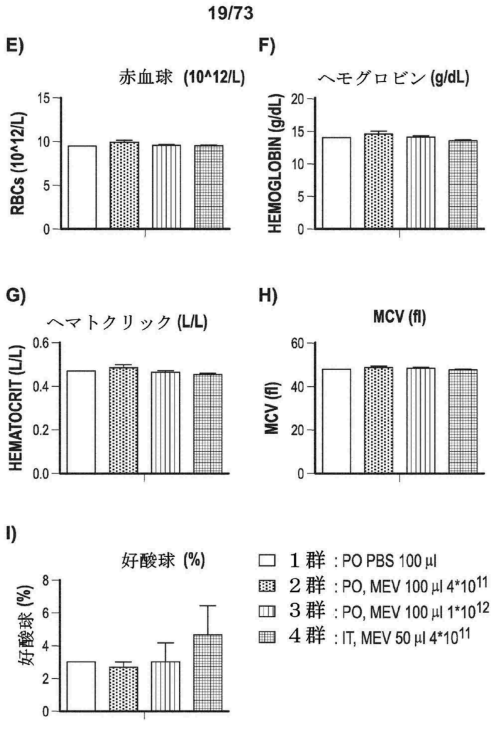


FIG. 18 (続き)

【図１９】

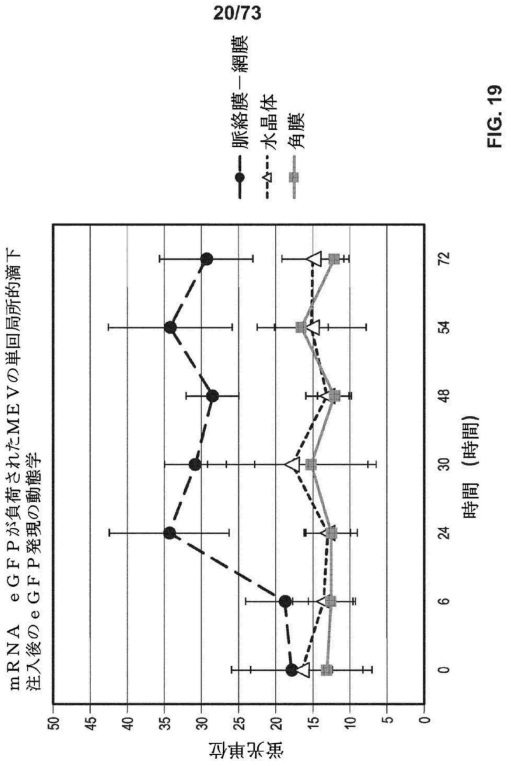


FIG. 19

【図２０】

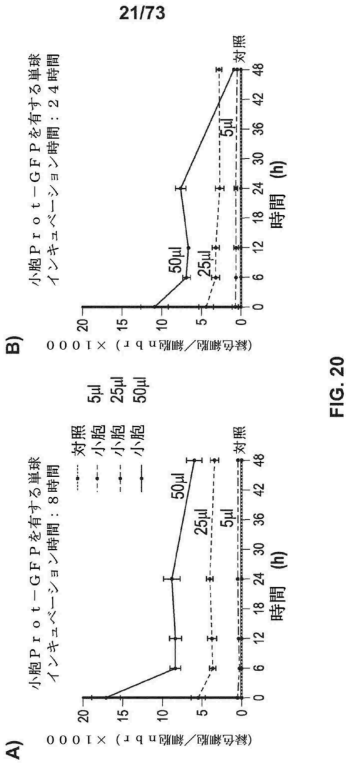


FIG. 20

【図２１】

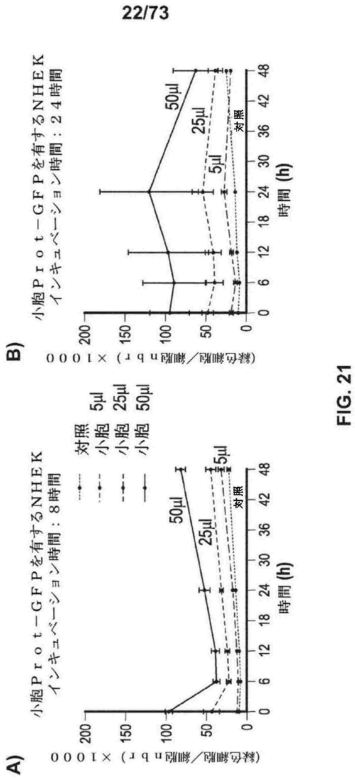


FIG. 21

【図２２】

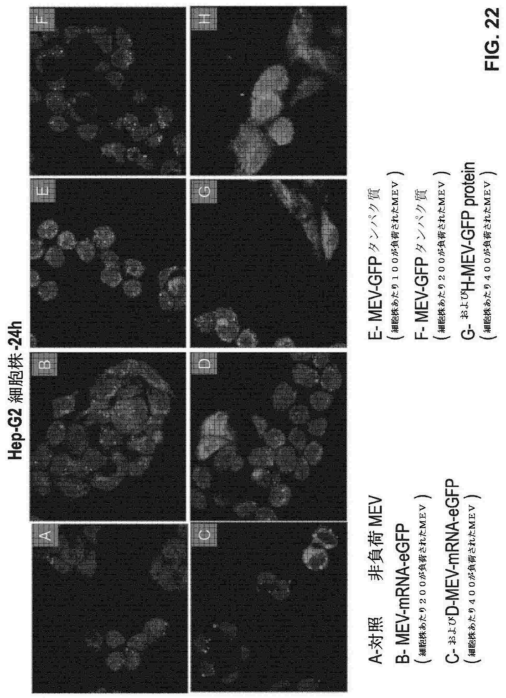


FIG. 22

【図２３】

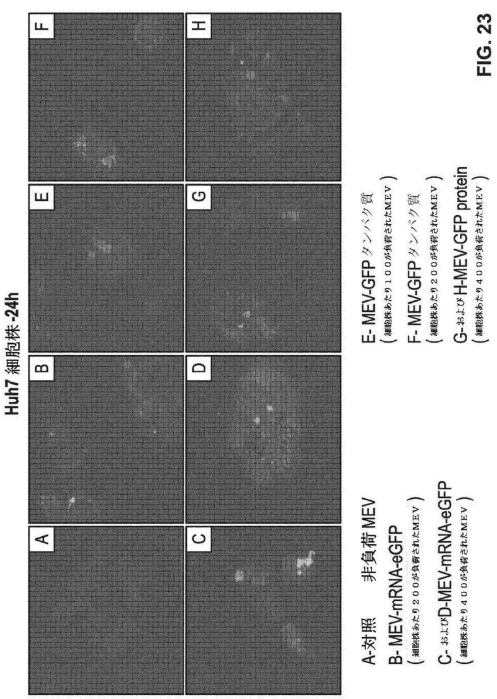


FIG. 23

【図２４】

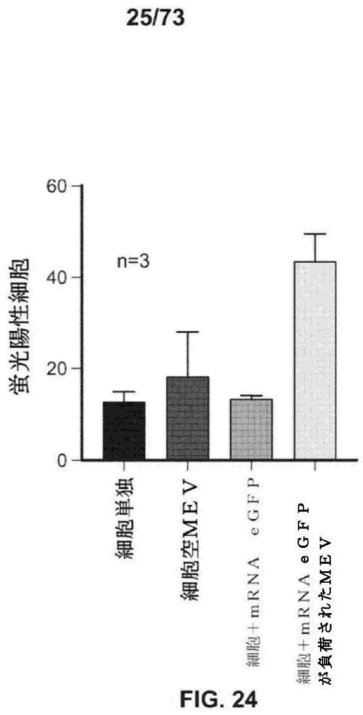


FIG. 24

【図２５】

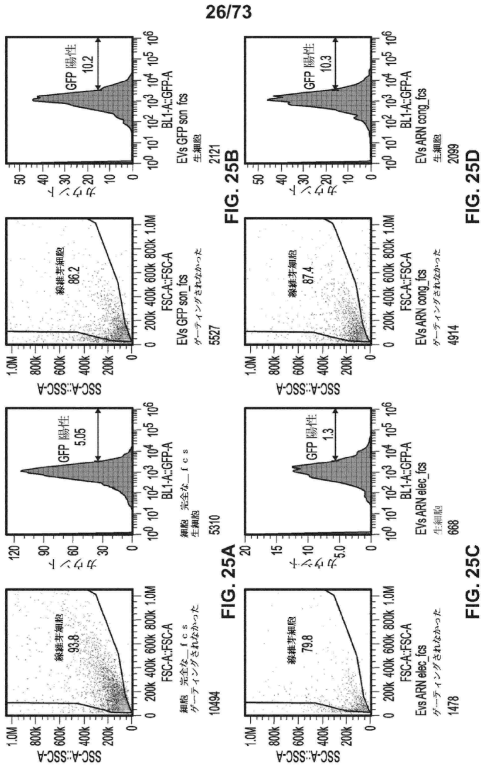


FIG. 25B
FIG. 25D
FIG. 25A
FIG. 25C

【図２６】

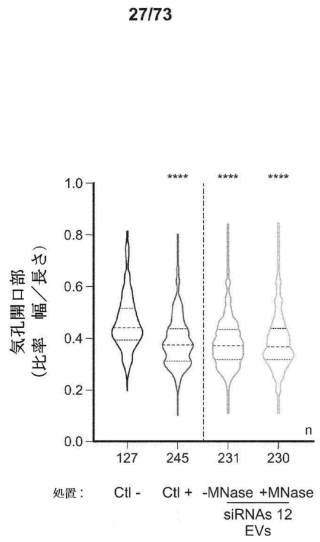


FIG. 26

【図２７】

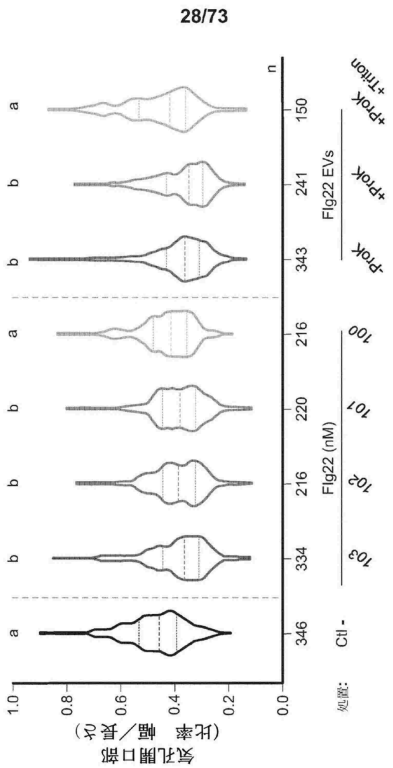


FIG. 27

【図２８】

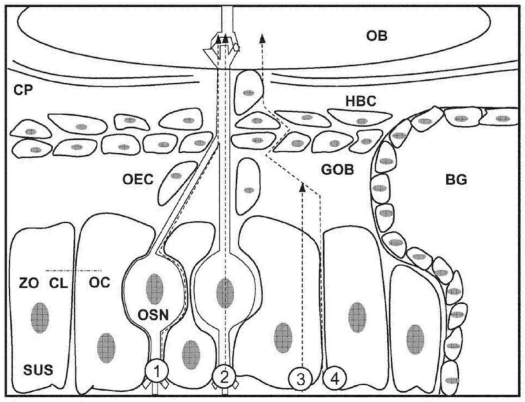


FIG. 28

【図２９】

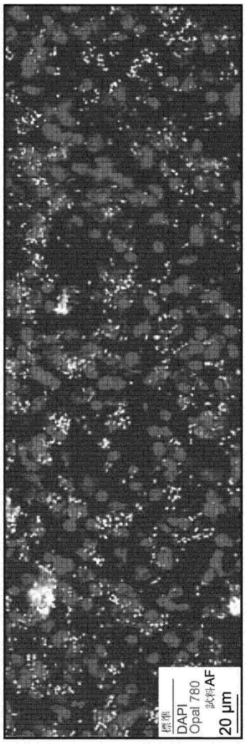


FIG. 29

【図３０】

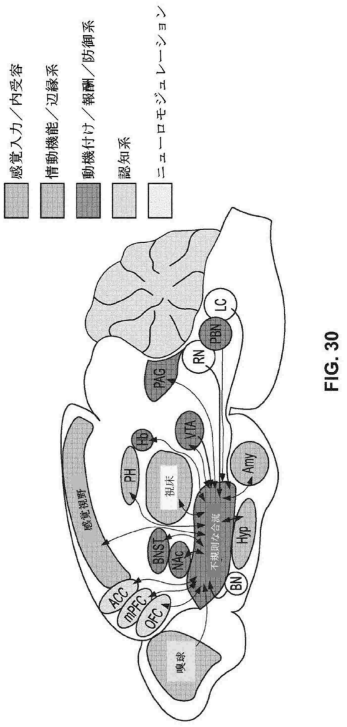


FIG. 30

【図３１】

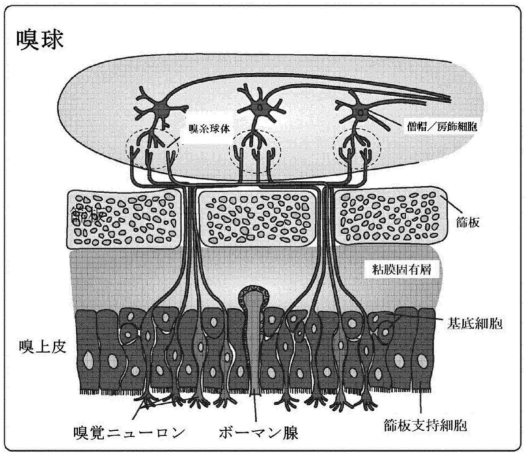


FIG. 31

【図３２】

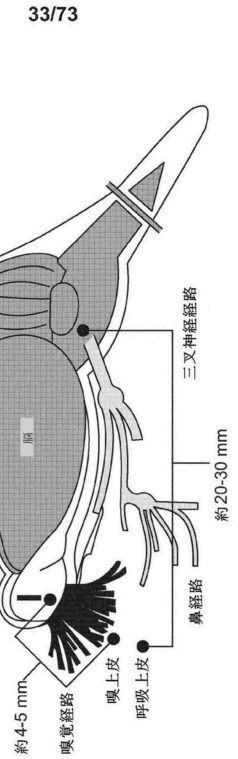


FIG. 32

【図３３】

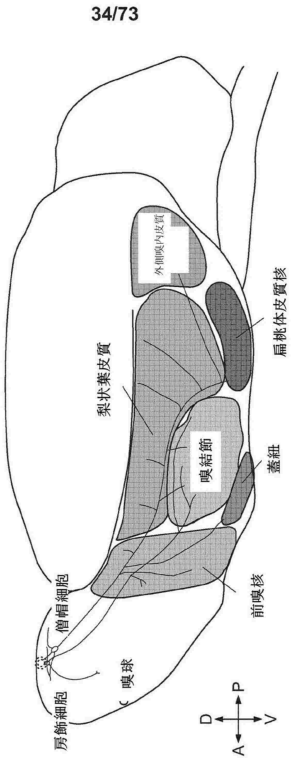


FIG. 33

【図３４】

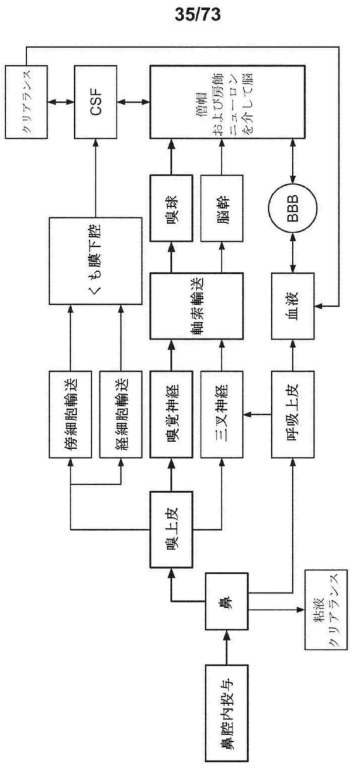


FIG. 34

【図３５】

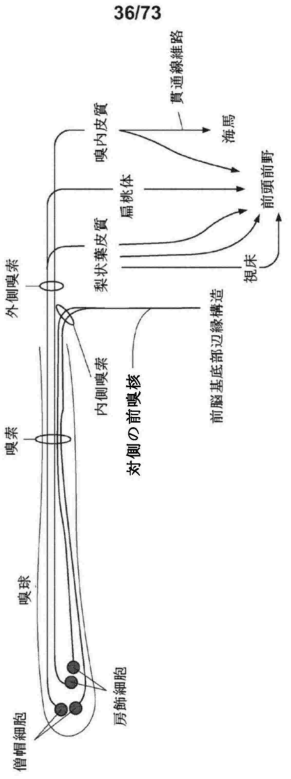
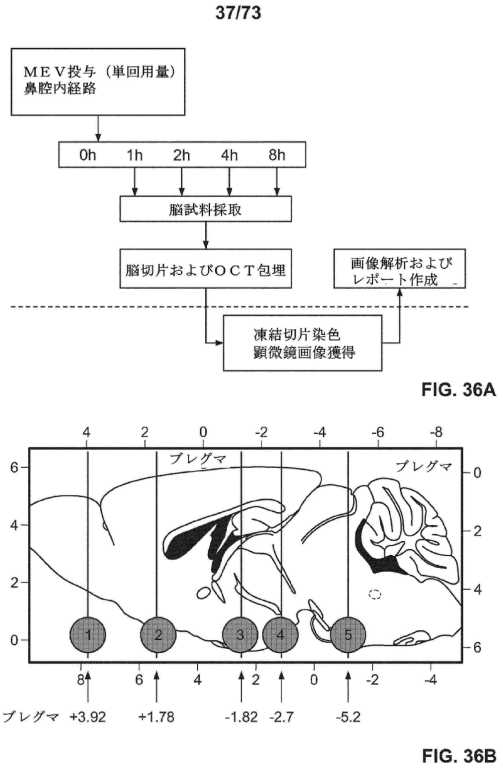
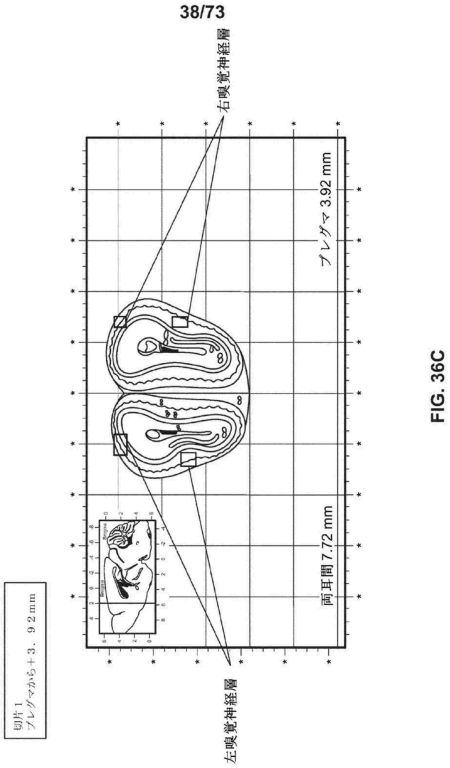


FIG. 35

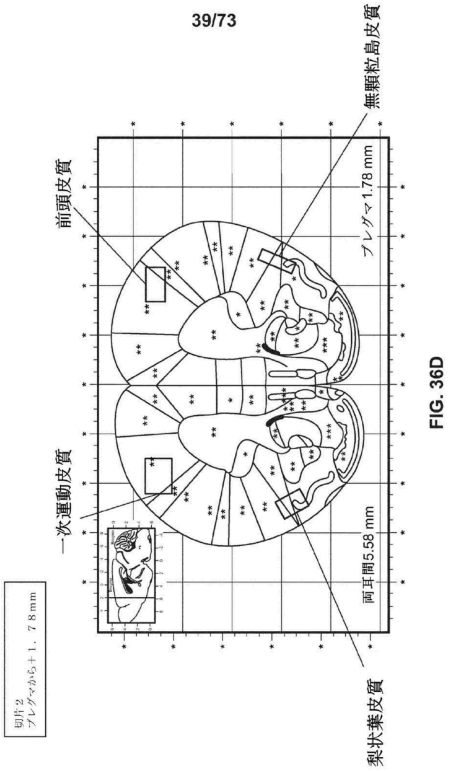
【図３６－１】



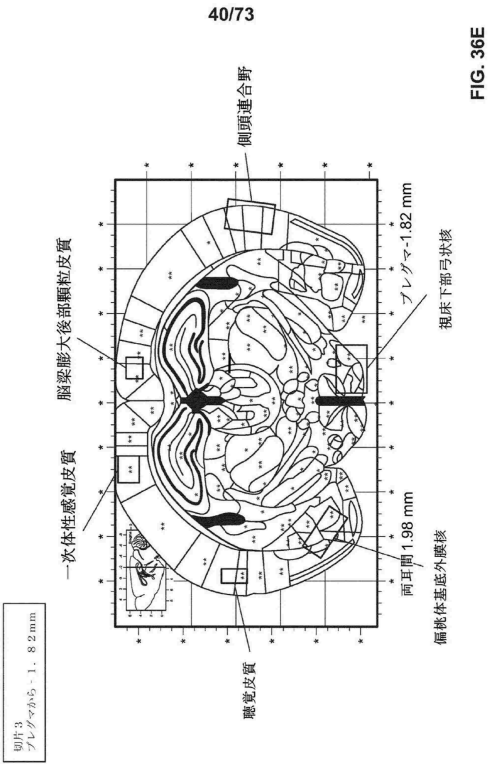
【図３６－２】



【図３６－３】



【図３６－４】



【図３６－５】

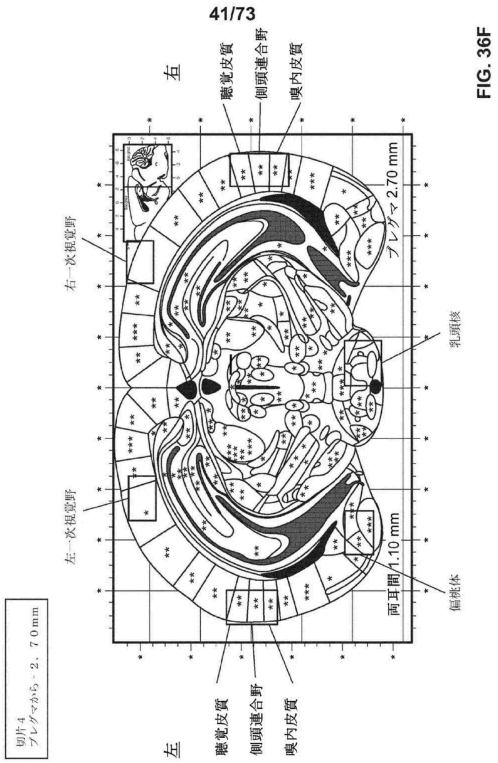


FIG. 36F

【図３６－６】

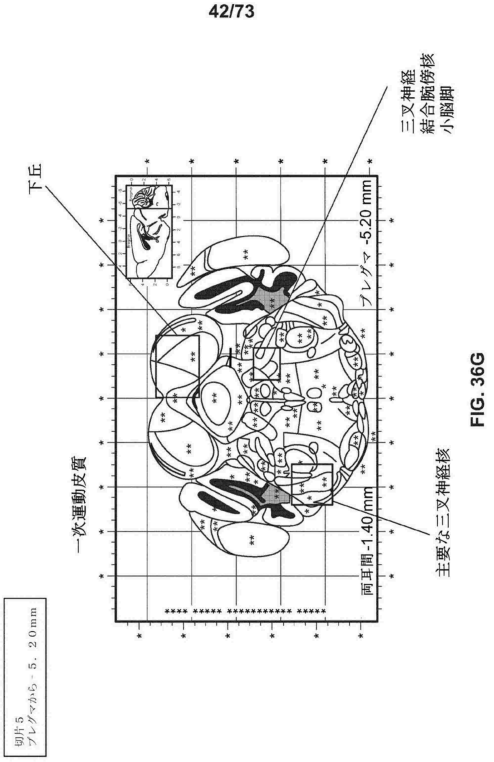


FIG. 36G

【図３７－１】

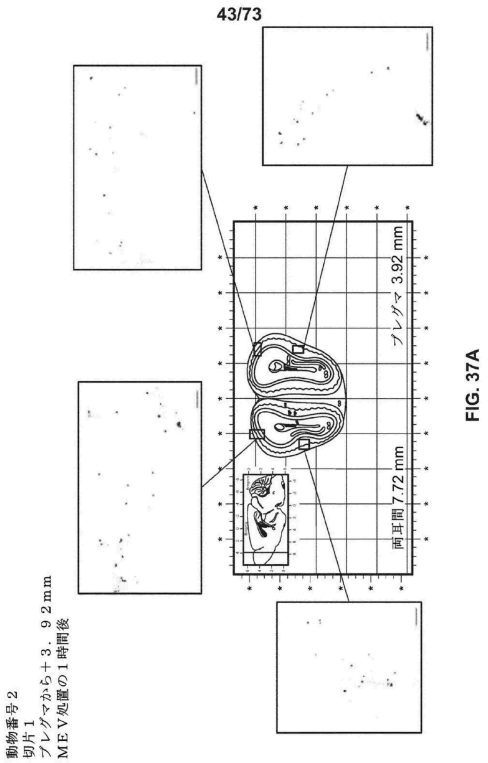


FIG. 37A

【図３７－２】

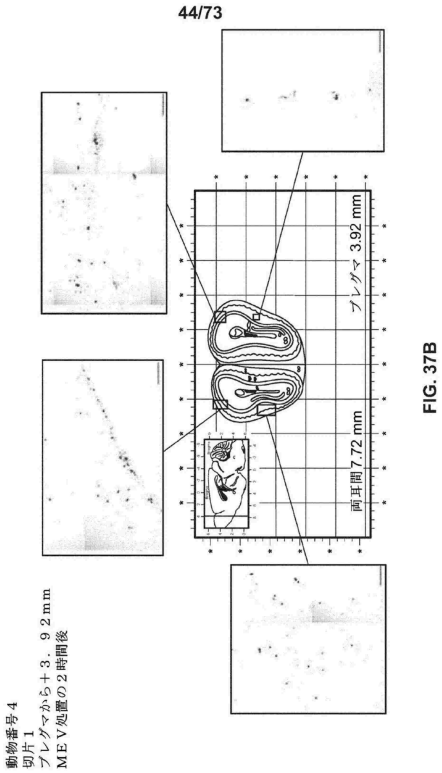


FIG. 37B

【図３７－３】

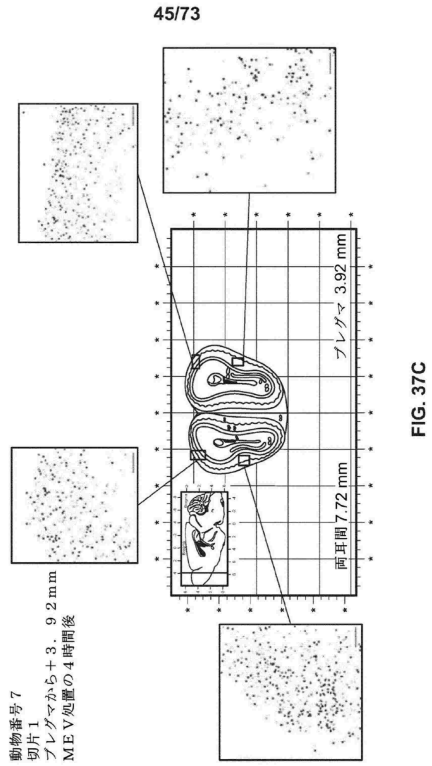


FIG. 37C

【図３７－４】

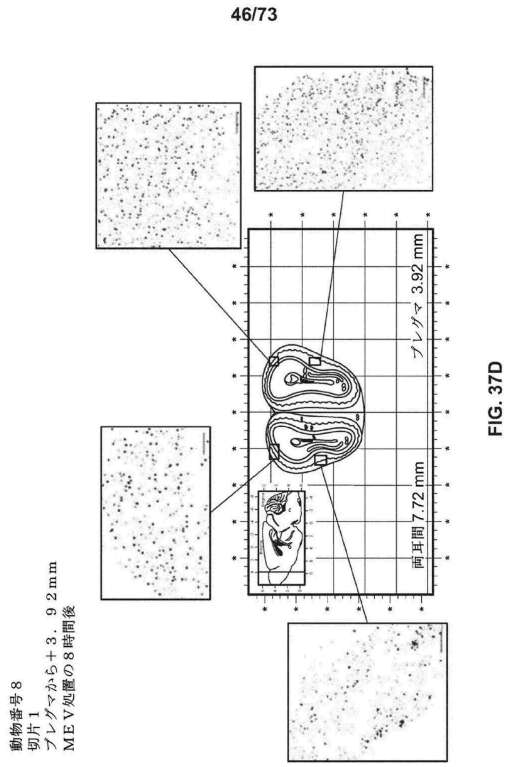


FIG. 37D

【図３８】

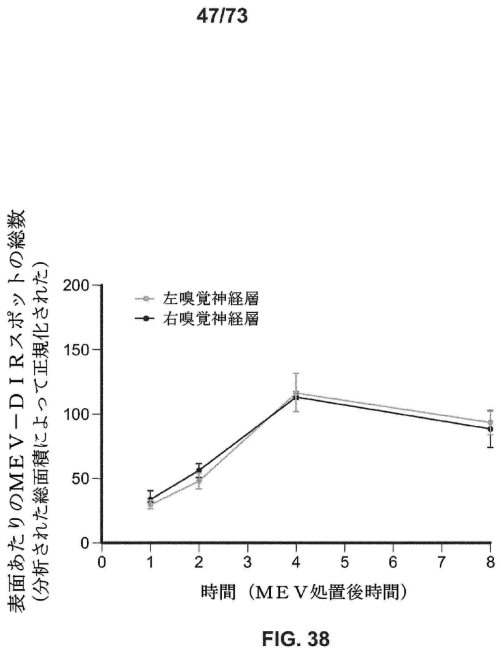


FIG. 38

【図３９－１】

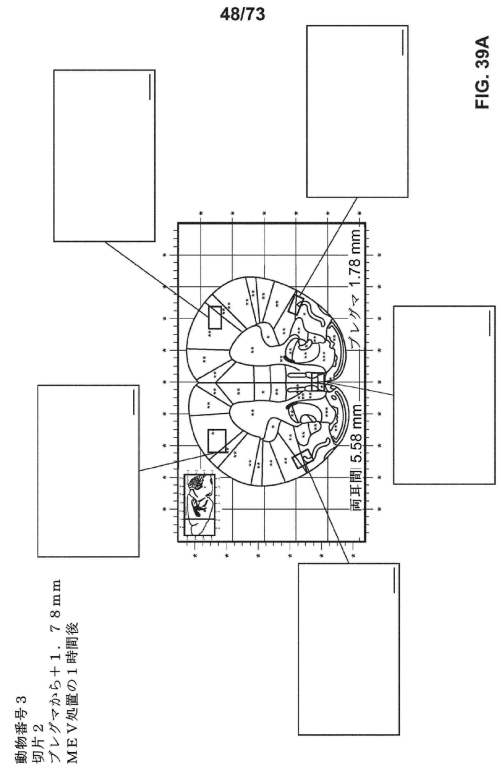


FIG. 39A

【図３９－２】

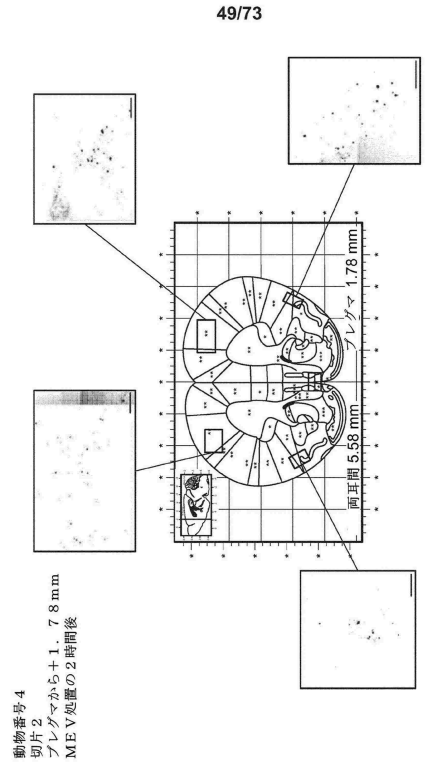


FIG. 39B

【図３９－３】

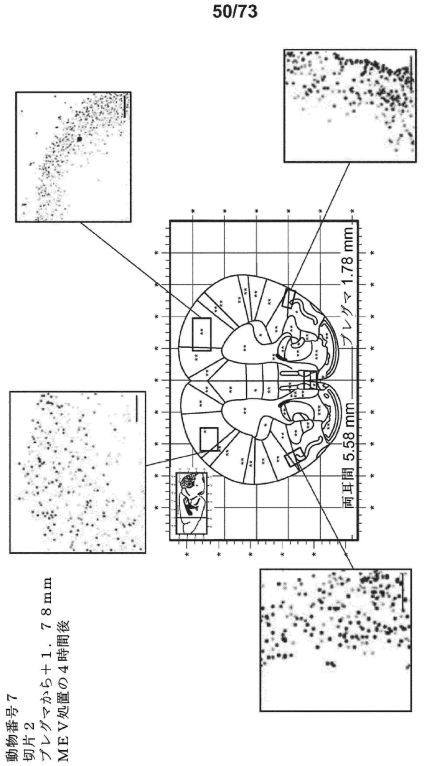


FIG. 39C

【図３９－４】

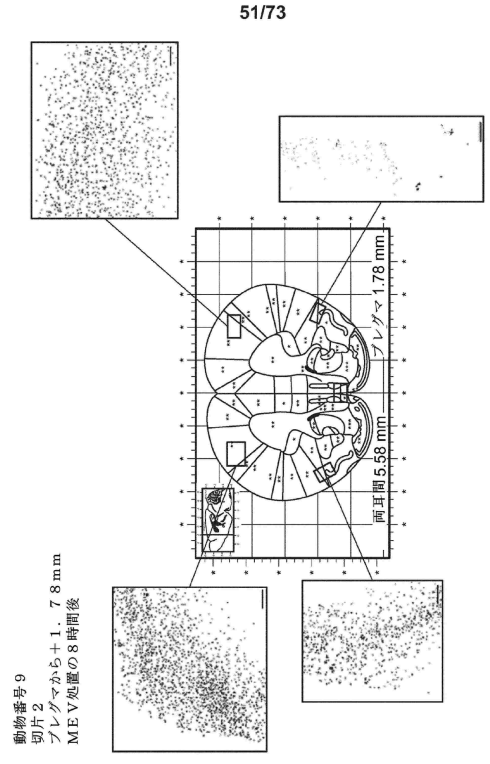


FIG. 39D

【図４０】

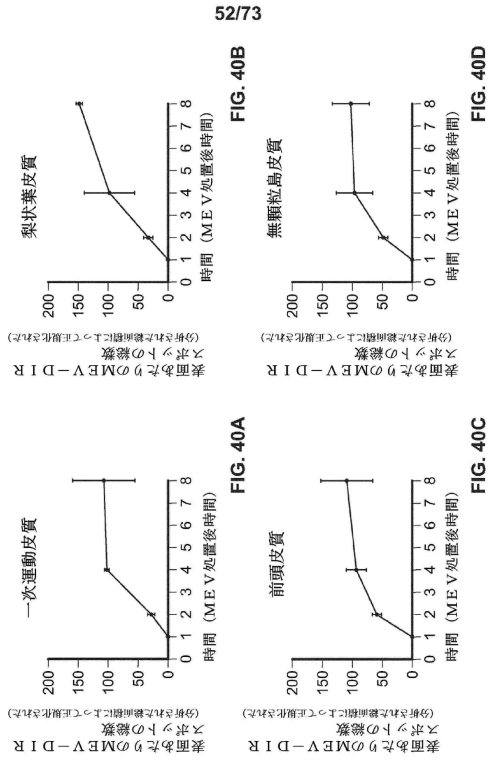


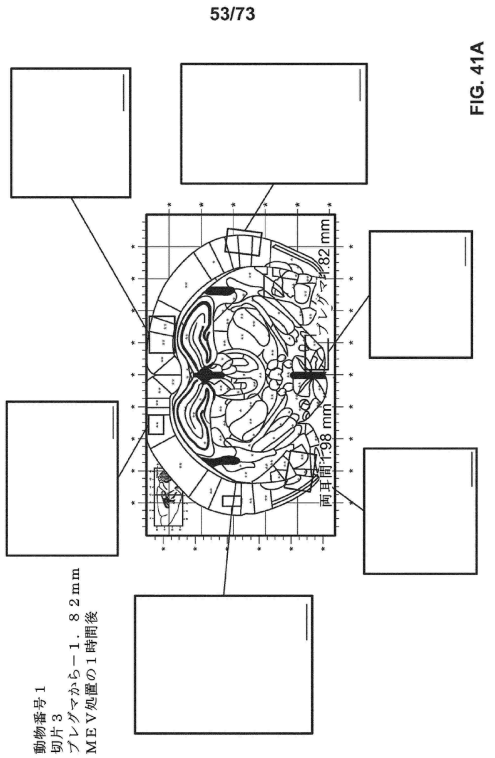
FIG. 40B

FIG. 40D

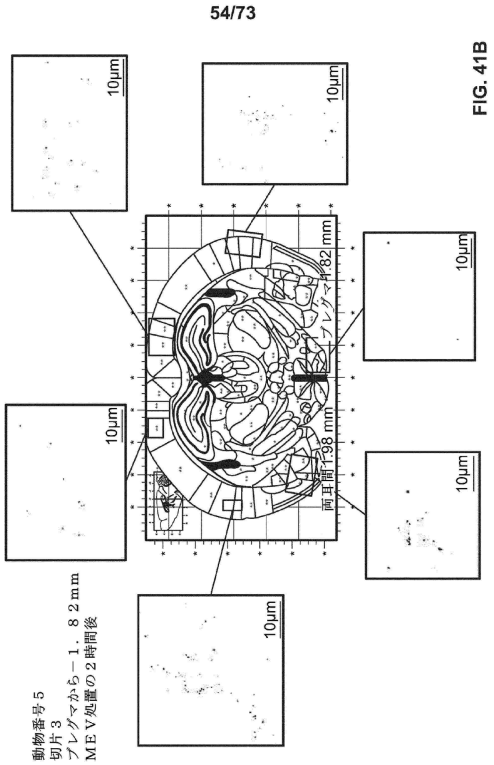
FIG. 40A

FIG. 40C

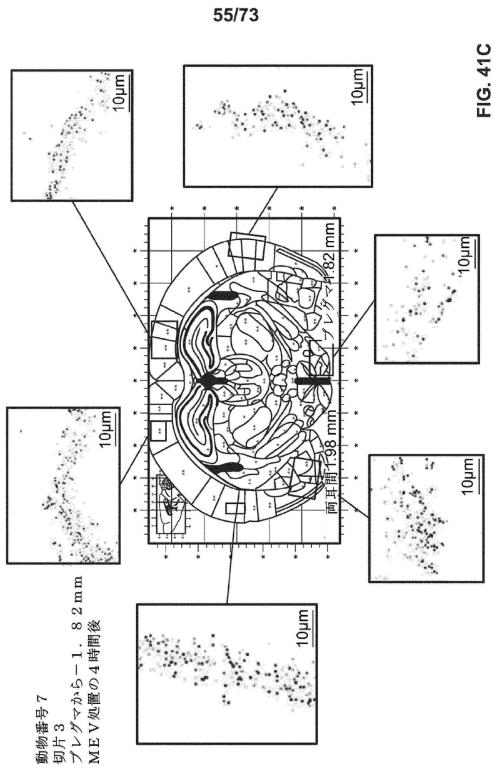
【図４１－１】



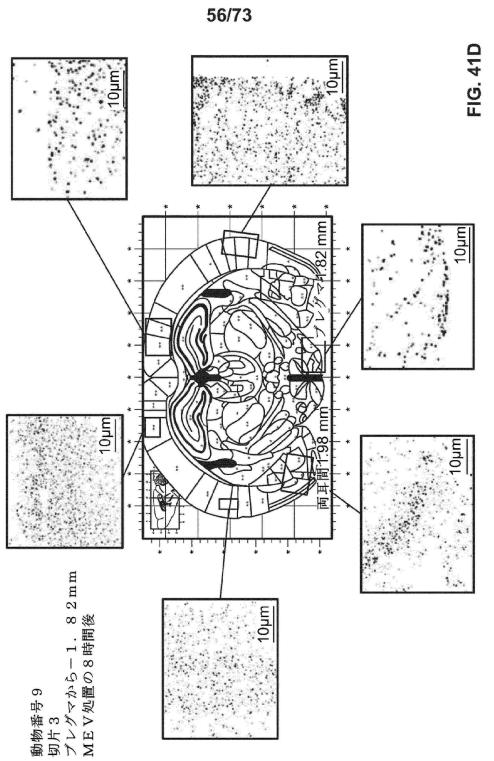
【図４１－２】



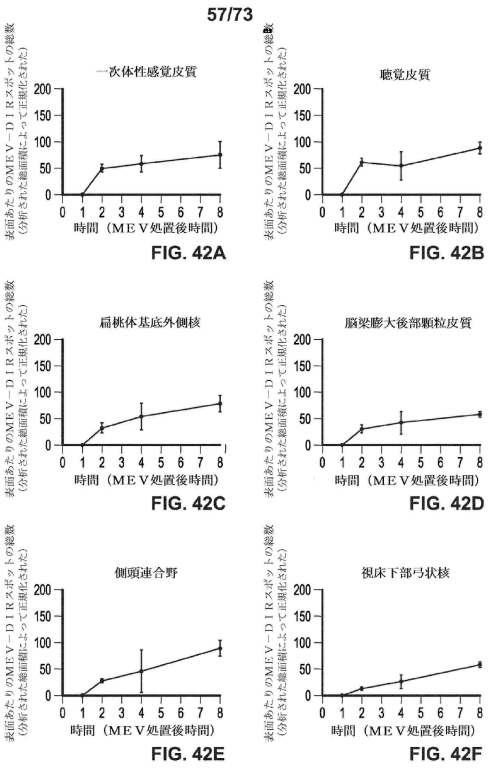
【図４１－３】



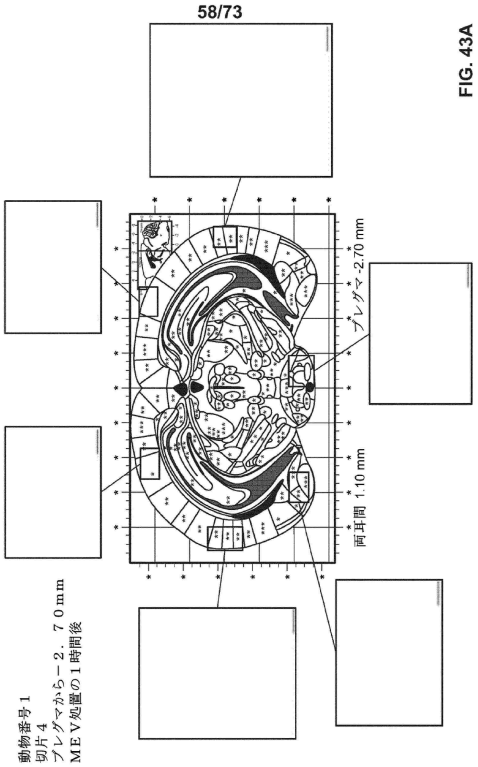
【図４１－４】



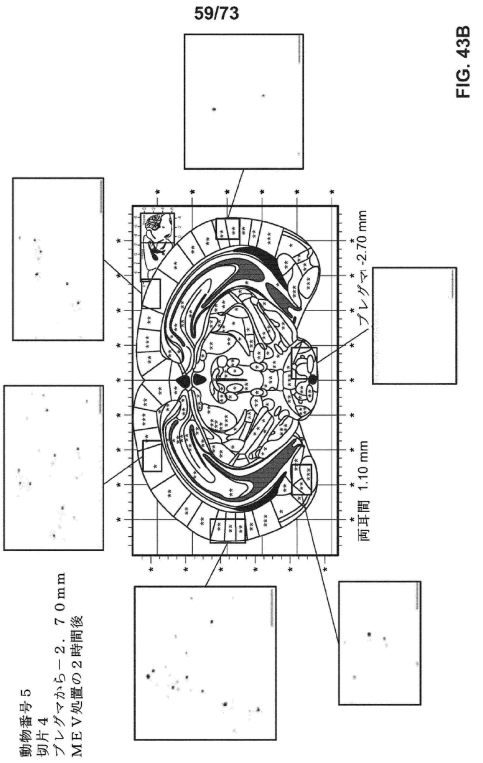
【図４２】



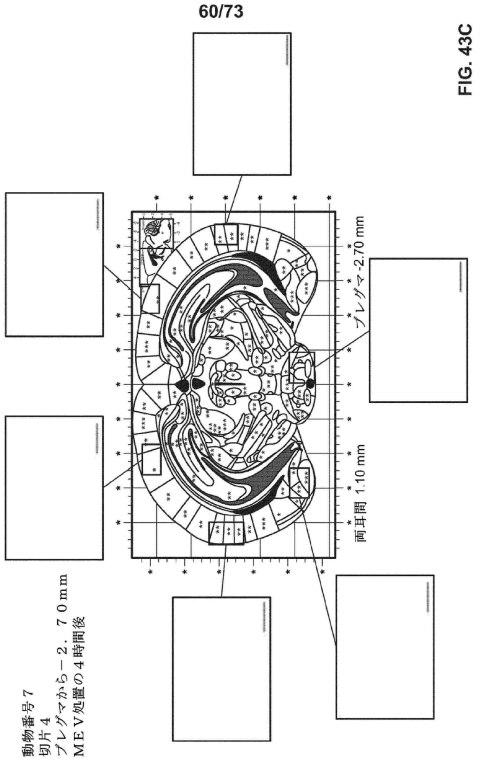
【図４３－１】



【図４３－２】



【図４３－３】



【図４３－４】

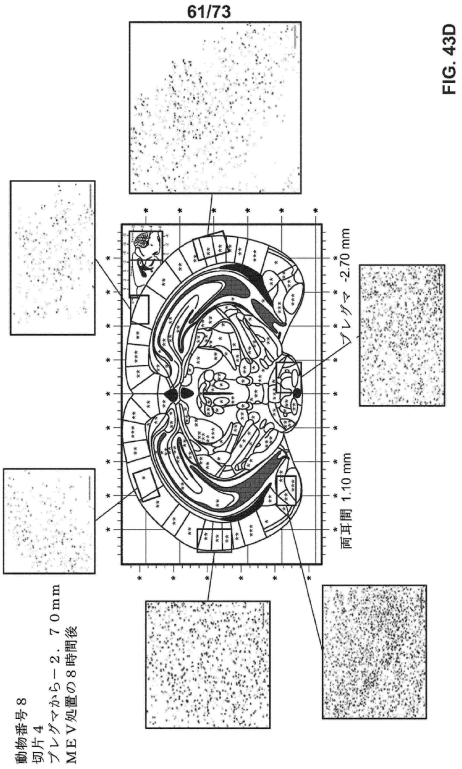


FIG. 43D

【図４４－１】

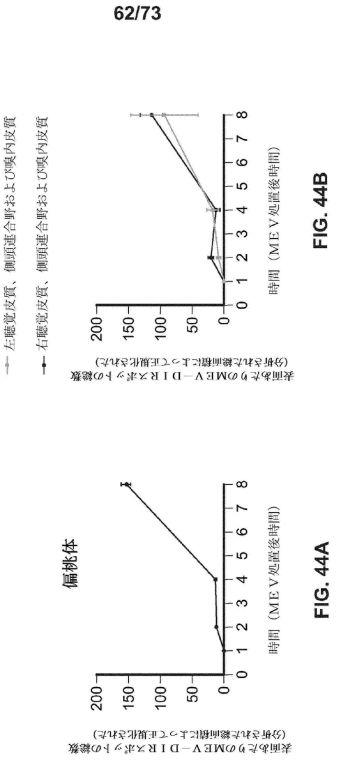


FIG. 44B

FIG. 44A

【図４４－２】

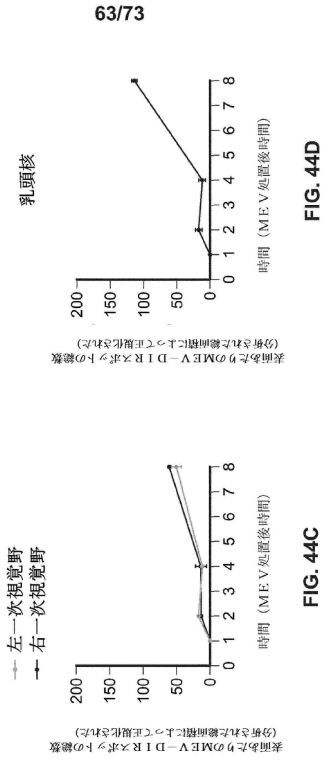


FIG. 44D

FIG. 44C

【図４５－１】

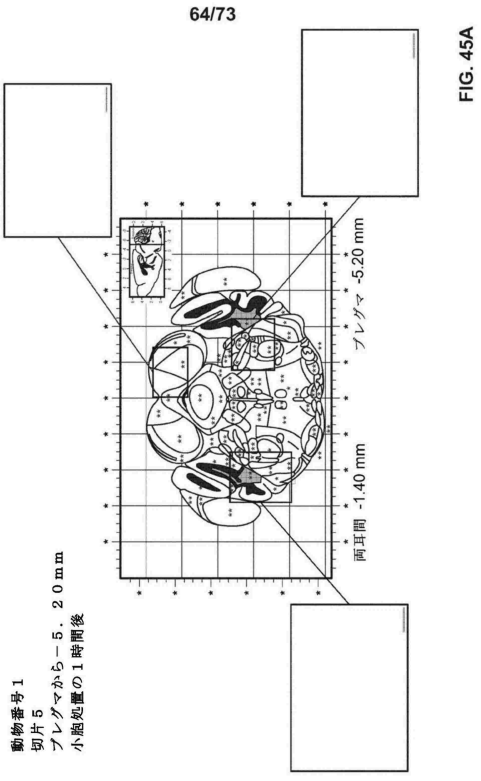
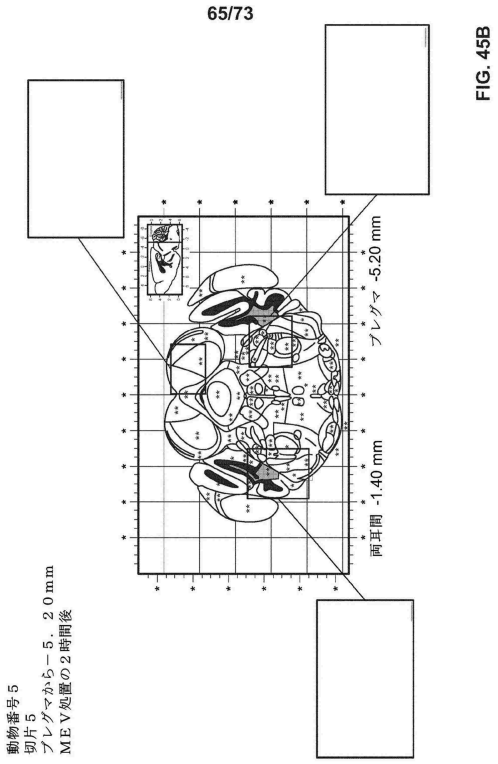
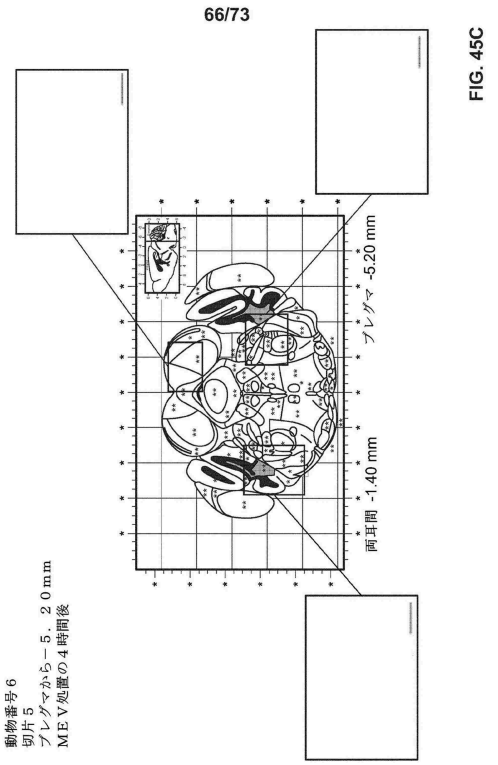


FIG. 45A

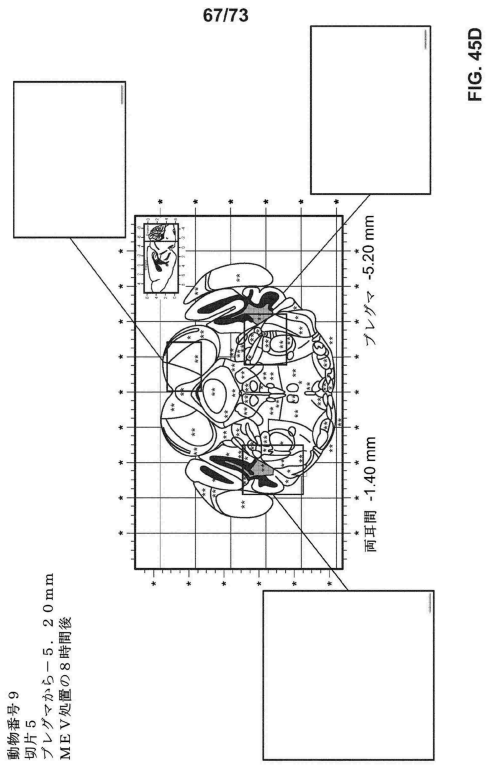
【図４５－２】



【図４５－３】



【図４５－４】



【図４６】

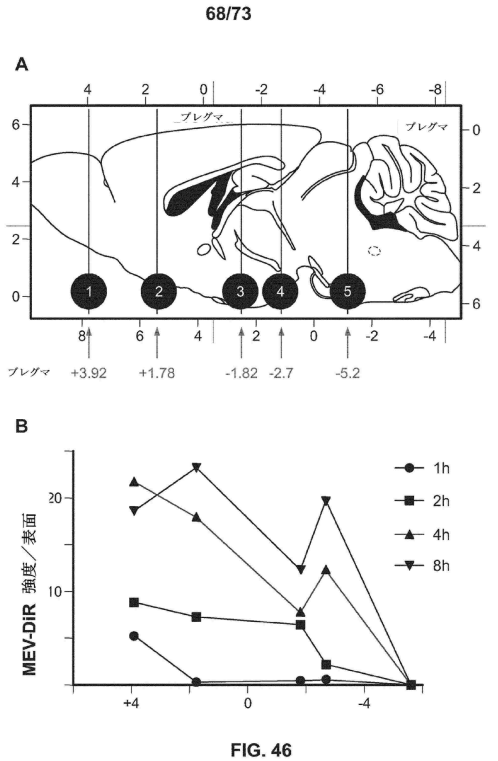


FIG. 46

【図４７】

69/73

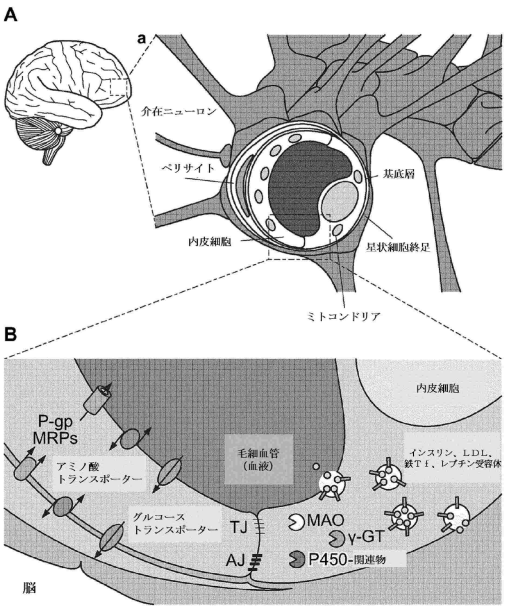


FIG. 47

【図４８】

70/73

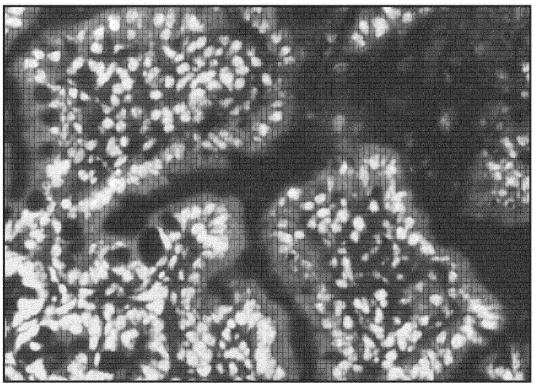


FIG. 48

【図４９】

71/73

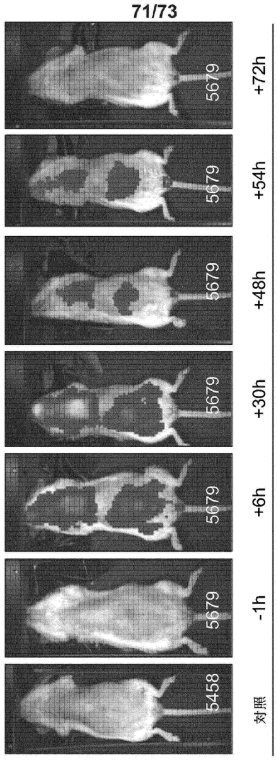


FIG. 49

【図５０】

72/73

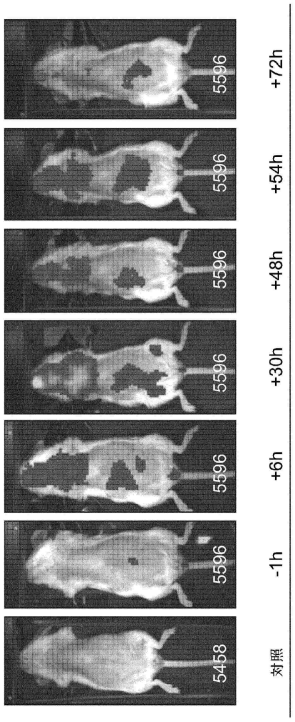


FIG. 50

【図５１】

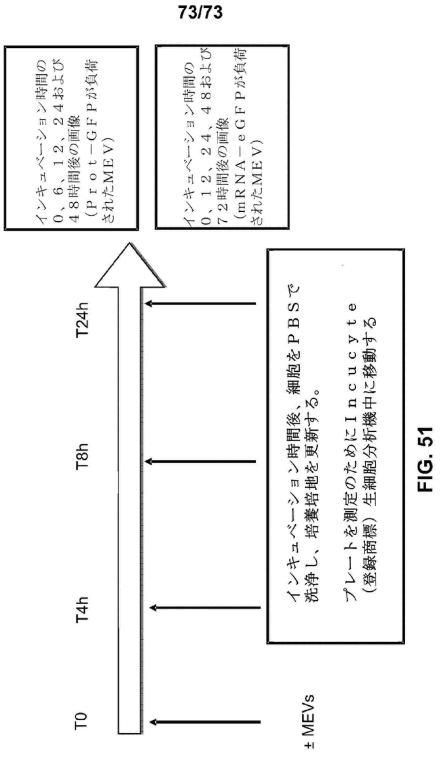


FIG. 51

【配列表】

<u>20255054400000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K36/05 A61K9/51 C12N15/88 C12N15/00 A61K48/00
A61P1/00
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PICCIOTTO S. ET AL.: "Isolation of extracellular vesicles from microalgae: towards the production of sustainable and natural nanocarriers of bioactive compounds", BIOMATERIALS SCIENCE , vol. 9, no. 8 20 April 2021 (2021-04-20), pages 2917-2930, XP055979612, GB ISSN: 2047-4830, DOI: 10.1039/D0BM01696A Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2021/bm/d0bm01696a	1,17,18, 23,92, 115,143, 158,159
Y	the whole document	1-172

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
1 March 2023	13/03/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Giménez Miralles, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051650

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KURUVINASHETTI K. ET AL.: "Algal Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications", 2020 IEEE 20TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOTECHNOLOGY (IEEE-NANO), IEEE, 29 July 2020 (2020-07-29), pages 354-357, XP033817380, DOI: 10.1109/NANO47656.2020.9183452	1,17,18, 23,92, 115,143, 158,159
Y	the whole document	1-172
Y	WO 2017/161010 A1 (CODIAK BIOSCIENCES INC [US]) 21 September 2017 (2017-09-21) examples	1-172
X,P	EP 3 967 745 A1 (IMMUNRISE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 16 March 2022 (2022-03-16) examples	1
X,P	EP 3 967 746 A1 (IMMUNRISE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 16 March 2022 (2022-03-16) examples	1

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/051650

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017161010 A1	21-09-2017	AU 2017232498 A1	18-10-2018
		BR 112018068746 A2	22-01-2019
		CA 3017586 A1	21-09-2017
		CN 109071597 A	21-12-2018
		EP 3430024 A1	23-01-2019
		IL 261490 A	31-10-2018
		JP 2019513019 A	23-05-2019
		KR 20180122433 A	12-11-2018
		RU 2018136151 A	15-04-2020
		SG 102020088838 A	29-10-2020
		SG 11201807401R A	27-09-2018
		US 2020155703 A1	21-05-2020
		WO 2017161010 A1	21-09-2017
EP 3967745 A1	16-03-2022	EP 3967745 A1	16-03-2022
		WO 2022053689 A2	17-03-2022
EP 3967746 A1	16-03-2022	EP 3967746 A1	16-03-2022
		WO 2022053687 A2	17-03-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61K 9/14 (2006.01)		A61K	9/14		
A61K 9/16 (2006.01)		A61K	9/16		
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00		
A61P 37/02 (2006.01)		A61P	37/02		
A61P 25/00 (2006.01)		A61P	25/00		
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00		
A61K 38/02 (2006.01)		A61K	38/02		
A61K 31/7105(2006.01)		A61K	31/7105		
A61K 31/713 (2006.01)		A61K	31/713		
A61K 31/7088(2006.01)		A61K	31/7088		
A61K 38/22 (2006.01)		A61K	38/22		
A61K 38/19 (2006.01)		A61K	38/19		
A61P 31/00 (2006.01)		A61P	31/00		
A61P 31/04 (2006.01)		A61P	31/04		
A61P 31/10 (2006.01)		A61P	31/10		
A61P 31/12 (2006.01)		A61P	31/12		
A61P 33/00 (2006.01)		A61P	33/00		
A61P 3/00 (2006.01)		A61P	3/00		
A61K 39/395(2006.01)		A61K	39/395	M	
A61K 39/00 (2006.01)		A61K	39/395	D	
A61P 35/00 (2006.01)		A61K	39/395	U	
A61K 49/00 (2006.01)		A61K	39/00	G	
A61P 1/16 (2006.01)		A61P	35/00		
A61P 1/00 (2006.01)		A61K	49/00		
A61P 11/00 (2006.01)		A61P	1/16		
A61P 11/06 (2006.01)		A61P	1/00		
A61P 9/12 (2006.01)		A61P	11/00		
A61P 1/04 (2006.01)		A61P	11/06		
A61P 29/00 (2006.01)		A61P	9/12		
A61P 7/04 (2006.01)		A61P	1/04		
A61P 5/48 (2006.01)		A61P	29/00		
A61P 3/06 (2006.01)		A61P	7/04		
A61P 1/18 (2006.01)		A61P	5/48		
A61P 9/00 (2006.01)		A61P	3/06		
A61P 7/00 (2006.01)		A61P	1/18		
A61P 13/00 (2006.01)		A61P	9/00		
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	7/00		
A61P 27/02 (2006.01)		A61P	13/00		
A61P 35/02 (2006.01)		A61P	43/00	１１１	
A61P 5/14 (2006.01)		A61P	27/02		
A61P 5/00 (2006.01)		A61P	35/02		
A61P 19/00 (2006.01)		A61P	5/14		
A61P 19/02 (2006.01)		A61P	5/00		
A61P 21/00 (2006.01)		A61P	19/00		
A61P 21/04 (2006.01)		A61P	19/02		
A61P 25/14 (2006.01)		A61P	29/00	１０１	
A61P 25/16 (2006.01)		A61P	21/00		
A61P 25/28 (2006.01)		A61P	21/04		
A61P 3/10 (2006.01)		A61P	25/14		

(51)国際特許分類
Ａ６１Ｋ　38/20　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/21　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　1/12　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/113　(2010.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)

ＦＩ　テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　25/16
Ａ６１Ｐ　25/28
Ａ６１Ｐ　3/10
Ａ６１Ｋ　38/20
Ａ６１Ｋ　38/21
Ｃ１２Ｎ　1/12　ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　15/113　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　15/09　１１０

(32)優先日　令和4年10月24日(2022.10.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．プルロニック
２．ＴＷＥＥＮ

ィリップ・オーギュスト８９
(72)発明者　ヴェガ，マニュエル
フランス７５０１１パリ、アブニュ・フィリップ・オーギュスト８９

Ｆターム（参考）　4B065　AA83X AA84X CA44
4C076　AA14 AA17 AA22 AA30 AA31 AA36 AA49 AA53 AA93 AA95
BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB25 BB27 CC01 CC04 CC06 CC07
CC10 CC11 CC14 CC15 CC16 CC17 CC21 CC27 CC29 CC31 CC32
CC34 CC35 EE57 EE58
4C084　AA03 AA13 AA17 AA20 AA24 BA03 CA18 DA01 DB01 MA02
MA05 MA22 MA23 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA56 MA58 MA59
MA66 NA13 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA321
ZA322 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA421 ZA422 ZA511 ZA512 ZA531 ZA532
ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA681 ZA682 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZA941
ZA942 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB111 ZB112 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262
ZB271 ZB272 ZB311 ZB312 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZC061
ZC062 ZC211 ZC212 ZC331 ZC332 ZC351 ZC352 ZC411 ZC412
4C085　AA03 AA13 AA14 HH11
4C086　AA01 EA16 MA02 MA03 MA05 MA22 MA23 MA35 MA37 MA41
MA43 MA52 MA56 MA58 MA59 MA66 NA13 ZA01 ZA02 ZA15 ZA16
ZA32 ZA33 ZA36 ZA42 ZA51 ZA53 ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81
ZA94 ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB26 ZB27 ZB31 ZB33 ZB35 ZB37
ZC21 ZC33 ZC35 ZC41