(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0120624
(43) 공개일자 2020년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 35/22 (2015.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0686 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7022341
(22) 출원일자(국제) 2019년02월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년07월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/017731
(87) 국제공개번호 WO 2019/157535
국제공개일자 2019년08월15일
(30) 우선권주장
62/629,563 2018년02월12일 미국(US)

(71) 출원인
코디악 바이오사이언시즈, 인크.
미국, 02140, 매사추세츠 캠브릿지, 수이트 500, 캠버리지파크 드라이브 35
(72) 발명자
사티아나라야난 스리람
미국 02140 매사추세츠주 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 35 스위트 500 코디악 바이오사이언시즈, 인크.
윌리엄스 더글라스 이
미국 02140 매사추세츠주 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 35 스위트 500 코디악 바이오사이언시즈, 인크.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 **대식세포 분극화를 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

유전자를 표적화하는 핵산을 포함하는 세포외 소포를 포함하여, 종양 관련된 대식세포의 대식세포 분극화로 이어지게 하는 조성물 및 방법이 본 명세서에 개시된다. 어떤 실시형태에서, 암의 치료를 위해 대식세포 분극화를 증가시키는 방법 및 조성물이 본 명세서에 개시된다.

(52) CPC특허분류
A61K 35/22 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C12N 15/1135 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2509/10 (2013.01)

(72) 발명자
버진 달리아
미국 02140 매사추세츠주 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 35 스위트 500 코디악 바이오사이언시즈, 인크.
부틴 아담 토마스
미국 02140 매사추세츠주 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 35 스위트 500 코디악 바이오사이언시즈, 인크.
카메르카르 수쉬루트
미국 02140 매사추세츠주 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 35 스위트 500 코디악 바이오사이언시즈, 인크.

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포외 소포로서, 대식세포와 접촉시 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)는 적어도 하나의 대식세포 표적 유전자를 억제하는, 세포외 소포.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 세포외 소포는 엑소좀인, 세포외 소포.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 핵산인, 세포외 소포.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 핵산은 억제성 RNA인, 세포외 소포.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 억제성 RNA는 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA인, 세포외 소포.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)인, 세포외 소포.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 및 PKM2로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 유전자를 억제하는, 세포외 소포.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자는 STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kγ, KRAS, 및 HIF1-알파로 구성된 군으로부터 선택되는, 세포외 소포.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 서열번호:1-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 세포외 소포.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 서열번호:1-6으로부터 선택된 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 세포외 소포.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자는 STAT3인, 세포외 소포.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 STAT3을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 세포외 소포.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자는 KRAS인, 세포외 소포.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 야생형 인간 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA인, 세포외 소포.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 억제성 RNA는 또한 마우스 $Kras^{G12D}$를 표적화하는, 세포외 소포.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대식세포는 종양 상주하는 대식세포인, 세포외 소포.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 종양은 췌장 종양인, 세포외 소포.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 부가의 면역조절 구성요소를 추가로 포함하는, 세포외 소포.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 부가의 면역조절 구성요소는 소분자 약물, 항체 또는 이의 활성 단편 또는 이의 치료적 단백질 또는 활성 단편인, 세포외 소포.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 부가의 면역조절 구성요소는 항체 또는 이의 활성 단편인, 세포외 소포.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1에 결합하는 면역 관문 억제제 또는 CSF1-R에 결합하는 억제제인, 세포외 소포.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 니볼루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 세미플리맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 펨브롤리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 아테졸리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 아벨루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 더발루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 펙시다티닙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 PLX7486의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 ARRY-382의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 JNJ-40346527의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 BLZ945의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 에막투주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 AMG820의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 IMC-CS4의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 카비랄리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일한 CDR을 포함하는, 세포외 소포.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙, 니볼루맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항체인, 세포외 소포.

청구항 25

청구항 22에 있어서, 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙, 니볼루맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 항체와 결합을 경쟁하는 적어도 하나의 항체인, 세포외 소포.

청구항 26

청구항 20 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, PTGFRN 또는 이의 단편을 추가로 포함하는, 세포외 소포.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 항체 또는 이의 단편은 PTGFRN 또는 이의 단편에 융합되는, 세포외 소포.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비교는 세포외 소포 흡수 검정, 표적 유전자 발현 검정, 다운스트림 유전자 발현 검정, 사이토카인 방출 검정 및 대식세포 세포 표면 단백질 검정으로 구성된 군으로부터 선택된 검정을 사용하여 결정되는, 세포외 소포.

청구항 29

청구항 1 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 M2 대식세포는 M2a, M2b, 및 M2c 대식세포로 구성된 군으로부터 선택된 종양 관련된 대식세포인, 세포외 소포.

청구항 30

청구항 1 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 및 CXCL11로 구성된 군으로부터 선택된 염증성 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 나타내는, 세포외 소포.

청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 및 CCL24로 구성된 군으로부터 선택된 면역억제성 사이토카인 및 케모카인의 줄어든 분비를 나타내는, 세포외 소포.

청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 증가된 종양 관련된 항원을 발현하는, 세포외 소포.

청구항 33

청구항 1 내지 32 중 어느 한 항에 있어서, 상기 M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 $CD8^+$ T-세포 및/또는 천연 살해 세포의 자극을 증가시키는, 세포외 소포

청구항 34

청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 35

질환 치료를 필요로 하는 환자에서 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 환자에게 청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 세포외 소포 또는 청구항 34의 약제학적 조성물을 투여하고, 그것에 의해 환자에서 질환을 치료하는 단계를 포함하는, 질환 치료를 필요로 하는 환자에서 질환을 치료하는 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 질환은 암인, 방법.

청구항 37

청구항 35 또는 36에 있어서, 상기 환자는 인간인, 방법.

청구항 38

청구항 35 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 원종양유전자(proto-oncogene)를 표적화하는 억제성 RNA인, 방법.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 원종양유전자는 인간 KRAS인, 방법.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 상기 암은 췌장 암인, 방법.

청구항 41

청구항 35 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 제2 요법을 수행하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 제2 요법은 외과적 요법, 화학 요법, 방사선 요법, 한랭 요법, 호르몬 요법, 또는 면역요법을 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 26 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여는 정맥내, 복강내 및 종양내 투여로 구성된 군으로부터 선택된 경로를 통해서 되는, 방법.

청구항 44

대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 방법으로서, 상기 대식세포를 적어도 하나의 유전자를 억제하는 하나 이상의 면역조절 구성요소를 포함하는 세포외 소포와 접촉시키고 그것에 의해 대식세포를 등몰 양(들)의 면역조절 구성요소 단독과 접촉시킨 것에 비교하여 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 단계를 포함하는, 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 방법.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 상기 접촉은 *생체외* 또는 *생체내*인, 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 상기 접촉은 *생체내*인, 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 상기 *생체내* 접촉은 대상체에게 세포외 소포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 48

청구항 46에 있어서, 상기 투여는 정맥내, 복강내 및 종양내 투여로 구성된 군으로부터 선택된 경로를 통해서 되는, 방법.

청구항 49

청구항 46 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 50

청구항 46 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 암 및 섬유증으로부터 선택된 병태를 앓고 있는, 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 병태는 췌장 암인, 방법.

청구항 52

청구항 44 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 소포는 엑소좀인, 방법.

청구항 53

청구항 44 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 핵산인, 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 핵산은 억제성 RNA인, 방법.

청구항 55

청구항 54에 있어서, 상기 억제성 RNA는 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA인, 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 상기 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)인, 방법.

청구항 57

청구항 44 내지 56 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자는 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 및 PKM2로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자는 STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kγ, KRAS, 및 HIF1-알파로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 서열번호:1-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 서열번호:1-6으로부터 선택된 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 61

청구항 58에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자는 STAT3인, 방법.

청구항 62

청구항 61에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 STAT3을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 63

청구항 58에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자는 KRAS인, 방법.

청구항 64

청구항 63에 있어서, 상기 면역조절 구성요소는 야생형 인간 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA인, 방법.

청구항 65

대상체에서 췌장 암을 치료하는 방법으로서, 인간 야생형 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA를 포함하는 세포외 소포를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고; 상기 치료는 M2로부터 M1 표현형으로 종양-상주하는 대식세포의 분극화의 백분율을, 인간 $KRAS^{G12D}$를 표적화하는 억제성 RNA로 치료된 환자에서 관측된 것보다 더 큰 수준으로 증가시키는, 방법.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 종양-상주하는 대식세포의 분극화의 백분율은 종양 샘플로부터 수득된 종양-상주하는 대식세포의 *생체외* 검정을 사용하여 결정되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자를 표적으로 하는 핵산을 담지하여 종양 관련된 대식세포의 대식세포 분극화로 이어지는 세포외 소포를 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역요법은 면역 반응을 유도, 향상 또는 억제함에 의한 질환의 치료법이다. 암 면역요법은 일반적으로 전통적 암 요법, 예컨대 화학 요법 및 방사선 요법보다 부작용이 적다. 한 가지 접근법에서, 암 면역요법은 암 세포를 공격하기 위해 환자 자신의 대식세포를 자극하기 위해 사용되어 왔다. 대식세포는 상이한 표현형을 나타내며, *예를 들어* 이들은 암을 촉진하거나 항암 활성을 가질 수 있다. M2 표현형, 또는 "대안적으로 활성화된 대식세포"는 전형적으로 암을 촉진하는 활성, 예컨대 면역계의 억제 및 세포외 기질- 및 조직-리모델링 활성을 나타낸다. M1 표현형, 또는 "고전적으로 활성화된 대식세포"는 전형적으로 항암 활성 예컨대 종양 세포의 식균작용 및 적응 면역성의 자극을 나타내므로 종양 세포가 인식되고 공격될 수 있다. 대식세포 분극화 (즉, M1 표현형으로의 전환)을 촉진하는 면역조절 방법 및 조성물에서의 개선이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0003] **요약**

[0004] 본 개시내용의 양태는 대식세포와 접촉시 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포를 포괄한다. 일부 양태에서 본 개시내용은 대식세포와 접촉시 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 엑소좀인 세포외 소포를 포괄한다

[0005] 일부 양태에서, 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀은 대식세포와 접촉시 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하고, 상기 면역조절 구성요소(들)는 핵산, 예를 들어, 억제성 RNA, 예를 들어, 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA, 또는, 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이거나 또는, 예를 들어, 상기 면역조절 구성요소는 서열번호:1-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

[0006] 일부 양태에서, 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하고, 상기 면역조절하는 (구성요소), 예를 들어, 핵산, 예를 들어, 억제성 RNA, 예를 들어, 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA, 또는, 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO) 또는, 예를 들어, 상기 면역조절 구성

요소는 서열번호:1-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 적어도 하나의 대식세포 표적 유전자를 억제하고, 예를 들어, 적어도 하나의 유전자는: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kɣ, 및 PKM2, 예를 들어, STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kɣ, KRAS, 및 HIF1-알파, 예를 들어, STAT3, 예를 들어, KRAS로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0007] 일부 양태에서, 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하고, 상기 면역조절 구성요소는 STAT3을 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

[0008] 일부 양태에서, 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하고, 상기 면역조절 구성요소는 KRAS를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

[0009] 일부 양태에서, 세포외 소포, *예를 들어,* 엑소좀은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하고, 상기 면역조절 구성요소는 KRAS, *예를 들어,* 야생형 인간 KRAS, 또는 야생형 인간 KRAS 및 또한 마우스 $KRAS^{G12D}$를 표적화하는 억제성 RNA, *예를 들어,* 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA이다.

[0010] 임의의 상기-기재된 양태에서, 세포외 소포, *예를 들어,* 엑소좀은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들), *예를 들어,* 핵산, 억제성 RNA, 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA, 또는 ASO를 포함하고, 대식세포는 종양- (*예를 들어,* 췌장 종양) 상주하는 대식세포이다.

[0011] 임의의 상기-기재된 양태에서, 세포외 소포, *예를 들어,* 엑소좀은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하고, 추가로 부가의 면역조절 구성요소, *예를 들어,* 소분자 약물, 항체 또는 이의 활성 단편, *예를 들어,* CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1에 결합하는 면역 관문 억제제, 또는 CSF1-R, 또는 이의 치료적 단백질 또는 활성 단편에 결합하는 억제제를 포함하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들), *예를 들어,* 핵산, 억제성 RNA, 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA, 또는 ASO를 포함한다.

[0012] 임의의 상기-기재된 양태에서, 세포외 소포, *예를 들어,* 엑소좀은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하고, 추가로 부가의 면역조절 구성요소, *예를 들어,* 항체 또는 이의 활성 단편, *예를 들어,* CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1에 결합하는 면역 관문 억제제, 또는 CSF1-R에 결합하는 억제제를 포함하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들), *예를 들어,* 핵산, 억제성 RNA, 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA, 또는 ASO를 포함하고, 여기서 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 니볼루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 세미플리맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 펨브롤리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 아테졸리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 아벨루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 더발루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 펙시다티닙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 PLX7486의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 ARRY-382의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 JNJ-40346527의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 BLZ945의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 에막투주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 AMG820의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 IMC-CS4의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 카비랄리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일한 CDR을 포함하거나, 또는 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙, 니볼루맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항체이거나, 또는 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙, 니볼루맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 항체와 결합에 대해 경쟁하는 적어도 하나의 항체이다.

[0013] 세포외 소포, *예를 들어,* 엑소좀이 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하고 부가의 면역조절 구성요소, *예를 들어,* 항체 또는 이의 활성 단편, *예를 들어,* CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1에 결합하는 면역 관문 억제제, 또는 CSF1-R에 결합하는 억제제를 추가로 포함하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들), *예를 들어,* 핵산, 억제성 RNA, 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA, 또는 ASO를 포함하는 임의의 상기-기재된 양태에서, 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙의

CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 니볼루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 세미플리맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 펨브롤리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 아테졸리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 아벨루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 더발루맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 펙시다티닙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 PLX7486의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 ARRY-382의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 JNJ-40346527의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 BLZ945의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 에막투주맙의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 AMG820의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 IMC-CS4의 CDR에 적어도 95% 동일하거나, 또는 카비랄리주맙의 CDR에 적어도 95% 동일한 CDR을 포함하거나, 또는 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙, 니볼루맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항체이거나 또는 상기 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙, 니볼루맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 항체와 결합에 대해 경쟁하는 적어도 하나의 항체이고, 이것은 PTGFRN 또는 이의 단편을 추가로 포함하고, 그리고 상기 항체 또는 이의 단편은 PTGFRN 또는 이의 단편에 선택적으로 융합될 수 있다.

[0014] 임의의 상기-기재된 양태에서, 비교는 세포외 소포 흡수 검정, 표적 유전자 발현 검정, 다운스트림 유전자 발현 검정, 사이토카인 방출 검정 및 대식세포 세포 표면 단백질 검정으로 구성된 군으로부터 선택된 검정을 사용하여 결정된다.

[0015] 임의의 상기-기재된 양태에서, M2 대식세포는 M2a, M2b, 및 M2c 대식세포로 구성된 군으로부터 선택된 종양 관련된 대식세포인 종양 관련된 대식세포이다.

[0016] 임의의 상기-기재된 양태에서, M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 및 CXCL11로 구성된 군으로부터 선택된 염증성 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 나타내고, 및/또는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 및 CCL24로 구성된 군으로부터 선택된 면역억제성 사이토카인 및 케모카인의 줄어든 분비를 나타내고, 및 또는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 증가된 종양 관련된 항원을 발현하고, 및/또는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 $CD8^+$ T-세포 및/또는 천연 살해 세포의 자극을 증가시킨다.

[0017] 양태에서, 본 개시내용은 대식세포와 접촉시, 상기 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포, *예를 들어,* 엑소좀을 포함하는 약제학적 조성물을 포괄한다.

[0018] 일부 양태에서, 본 개시내용은 대식세포와 접촉시, 임의의 상기-기재된 양태의 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들) (*예를 들어,* 원종양유전자 (*예를 들어,* KRAS)를 표적화하는 억제성 RNA)를 포함하는 임의의 상기-기재된 양태의 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀을 (*예를 들어,* 정맥내, 복강내 및 종양내 투여로 구성된 군으로부터 선택된 경로를 통해) 투여하는 것을 포함하거나, 또는 대식세포와 접촉시, 임의의 상기-기재된 양태의 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 선택적으로 재분극화하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 임의의 상기-기재된 양태의 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환 (*예를 들어,* 암 예컨대, *예를 들어,* 췌장 암)의 치료가 필요한 환자 (*예를 들어,* 인간)에서 질환을 치료하는 방법을 포괄한다.

[0019] 일부 양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 치료 방법을 포괄하고 추가로 제2 요법, *예를 들어,* 외과적 요법, 화학 요법, 방사선 요법, 한랭 요법, 호르몬 요법, 또는 면역요법을 포함한다.

[0020] 일부 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 유전자를 억제하는 하나 이상의 면역조절 구성요소를 포함하는 세포외 소포와 대식세포를 접촉시키고 그것에 의해 면역조절 구성요소 단독의 등몰 양(들)과 대식세포를 접촉시킨 것에 비교하여 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 것을 포함하는 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 방법을 포괄한다.

[0021] 일부 양태에서, 적어도 하나의 유전자를 억제하는 하나 이상의 면역조절 구성요소를 포함하는 세포외 소포와 대식세포를 *생체외 또는 시험관내* 접촉시키고 그것에 의해 면역조절 구성요소 단독의 등몰 양(들)과 대식세포를 접촉시킨 것에 비교하여 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 것을 포함하는 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 방법.

[0022] 일부 양태에서, 적어도 하나의 유전자를 억제하는 하나 이상의 면역조절 구성요소를 포함하는 세포외 소포와 대

식세포를 (*예를 들어,* 세포외 소포를 대상체, *예를 들어,* 인간 대상체에게, *예를 들어,* 정맥내, 복강내 및 종양내 투여로 구성된 군으로부터 선택된 경로에 의해 투여함에 의해) *생체내* 접촉시키고 그것에 의해 면역조절 구성요소 단독의 등몰 양(들)과 대식세포를 접촉시킨 것에 비교하여 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 것을 포함하는 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 방법.

[0023] 일부 양태에서, 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 상기-개시된 방법의 대상체는 암 (*예를 들어,* 췌장 암) 및 섬유증으로부터 선택된 병태를 앓고 있다

[0024] 일부 양태에서, 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 임의의 상기-개시된 방법에서 사용된 세포외 소포는 엑소좀이고, 면역조절 구성요소는 핵산, *예를 들어,* 억제성 RNA, 예컨대, *예를 들어,* 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA이다.

[0025] 일부 양태에서, 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 임의의 상기-개시된 방법에서 사용된 세포외 소포는 엑소좀이고, 면역조절 구성요소는 핵산, *예를 들어,* ASO이다.

[0026] 일부 양태에서, 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 임의의 상기-개시된 방법에서 사용된 세포외 소포는 엑소좀이고, 면역조절 구성요소는 핵산, *예를 들어,* 서열번호: 1-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 서열번호: 1-6으로부터 선택된 서열을 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 적어도 하나의 유전자는 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 및 PKM2로 구성된 군, 또는 STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kγ, KRAS, 및 HIF1-알파로 구성된 군으로부터 선택되거나, 또는 STAT3이거나, 또는 KRAS이고, 만일 KRAS이면, 면역조절 구성요소는 선택적으로 야생형 인간 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA일 수 있다.

[0027] 일부 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 인간 야생형 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA를 포함하는 세포외 소포를 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 췌장 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 상기 치료는 M2로부터 M1 표현형으로 종양-상주하는 대식세포의 분극화의 백분율을 인간 $KRAS^{G12D}$를 표적화하는 억제성 RNA로 치료된 환자에서 관측된 것보다 더 큰 수준으로 증가시킨다.

[0028] 일부 양태에서 본 개시내용은 종양-상주하는 대식세포의 분극화의 백분율이 종양 샘플로부터 수득된 종양-상주하는 대식세포의 *생체외* 검정을 사용하여 결정되는, 대상체에서 췌장 암을 치료하는 상기-기재된 방법을 제공한다.

[0029] 대식세포의 활성을 개질시킬 수 있는 하나 이상의 면역조절 구성요소로 선택, 농축, 또는 조작된 세포외 소포를 포함하고, M2로부터 M1 표현형으로 대식세포의 스위칭 (대식세포 분극화)을 촉진시키고 암과 싸우는 환자의 면역계를 증강시키는 조성물 및 방법이 본 명세서에서 제공된다.

[0030] 따라서, 제1 양태에서, 표적 세포에서 적어도 하나의 유전자를 억제하는 하나 이상의 면역조절 구성요소, 예를 들어, 핵산 분자를 포함하는 세포외 소포가 본 명세서에서 제공된다. 어떤 실시형태에서 표적 세포는 대식세포이고 유전자 억제는 면역조절 구성요소(들) 단독의 등몰 양에 비교할 때 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시킨다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 엑소좀이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 억제성 RNA이다. 어떤 실시형태에서, 억제성 RNA는 안티센스 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, lncRNA, pri-miRNA 또는 pre-miRNA이다. 어떤 실시형태에서, 적어도 하나의 유전자는 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 및 PKM2로 구성된 군으로부터 선택된다. 어떤 실시형태에서, 유전자는 KRAS이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 야생형 인간 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA이다. 어떤 실시형태에서, 억제성 RNA는 또한 마우스 $Kras^{G12D}$를 표적화한다. 어떤 실시형태에서, 대식세포는 종양 상주하는 대식세포이다. 어떤 실시형태에서, 종양은 췌장 종양이다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 부가의 면역조절 구성요소를 더 포함한다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 소분자 약물, 항체 또는 치료적 단백질이다. 어떤 실시형태에서, 항체는 면역 관문 억제제이다. 특정 양태에서, 임의의 상기 언급된 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에서 제공된다.

[0031] 특정 양태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 또는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하고, 그것에 의해 환자에서 질환을 치료하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 것을 필요로 하는 환자에서 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에서 기재된다. 어떤 실시형태에서, 상기 질환은 암이다. 어떤 실시형태에서, 상기 암은 췌장 암이다. 일

부 실시형태에서, 상기 질환은 섬유성 병태이다. 일부 실시형태에서, 상기 섬유성 병태는 폐 섬유증, 간 섬유증, 또는 췌장 섬유증이다. 어떤 실시형태에서, 상기 간 섬유증은 비-알코올성 지방간염, 또는 NASH이다. 어떤 실시형태에서, 환자는 인간이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 원종양유전자를 표적화하는 억제성 RNA이다. 어떤 실시형태에서, 원종양유전자는 인간 KRAS이다. 어떤 실시형태에서, 상기 암은 췌장 암이다. 어떤 실시형태에서, 본 방법은 적어도 제2 요법을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 어떤 실시형태에서, 상기 제2 요법은 외과적 요법, 화학 요법, 방사선 요법, 한랭 요법, 호르몬 요법, 또는 면역요법을 포함한다.

[0032] 어떤 실시형태에서, 표적 세포 M2 대식세포는 M2a, M2b, 및 M2c 대식세포로 구성된 군으로부터 선택된 종양 관련된 대식세포이다. 어떤 실시형태에서, M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 및 CXCL11로 구성된 군으로부터 선택된 염증성 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 나타낸다. 어떤 실시형태에서, M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 및 CCL24로 구성된 군으로부터 선택된 면역억제성 사이토카인 및 케모카인의 줄어든 분비를 나타낸다. 어떤 실시형태에서, M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 증가된 종양 관련된 항원을 발현한다. 어떤 실시형태에서, M1 대식세포는 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 $CD8^+$ T-세포 및/또는 천연 살해 세포의 자극을 증가시킨다.

[0033] 특정 양태에서, 대상체에게 인간 야생형 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA를 포함하는 세포외 소포를 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 췌장 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 기재되며; 여기서 상기 치료는 인간 $KRAS^{G12D}$를 표적화하는 억제성 RNA로 치료된 환자에서 관측된 것보다 더 큰 수준으로 M2로부터 M1 표현형으로 종양-상주하는 대식세포의 분극화의 백분율을 증가시킨다.

도면의 간단한 설명

[0034] **도 1**은 유전자 각각을 표적화하는 증가하는 양의 siRNA의 형질감염 후 Stat 3, Stat 6, Cebpβ-1, Pi3Kγ, CEBPβ-2, 및 Kras의 유전자 발현 수준을 도시한다.

도 2는 Stat 3, Stat 6, Cebpβ-1, Pi3Kγ, CEBPβ-2, 및 Kras 각각을 표적화하는 증가하는 양의 siRNA의 형질감염 후 Arg1 발현을 도시한다. 스크램블드 siRNA 형질감염된 대식세포가 대조군으로 사용되었다.

도 3은 6개 대식세포 부분모집단 (M0, M1, M2a, M2c, M2++, 및 TAM)의 총 세포 GFP 강도에 의해 결정된 바와 같은 엑소좀 흡수를 도시한다.

도 4는 총 형광 강도에 의해 측정된 바와 같은 M2 또는 M0 대식세포에 의한 유리 안티센스 올리고 (프리-ASO) 및 ASO-장입된 엑소좀 (Exo-ASO)의 흡수를 도시한다.

도 5a는 미접촉 마우스에 $1x10^{11}$ 또는 $1x10^{12}$ GFP-함유 엑소좀의 복강내 주입 후 생체내 대식세포에 의한 엑소좀 흡수를 도시한다. **도 5b**는 B16F10 종양-담지 마우스에 단일 용량의 천연 비표지된 엑소좀 또는 Cy5-표지된 Exo-ASO의 주입 후 생체내 천연 엑소좀 및 종양 세포와 대식세포에 의한 Exo-ASO 업데이트를 도시한다.

도 6은 5μM 유리 콜레스테롤-태깅된 ASO 또는 콜레스테롤-태깅된 ASO가 장입된 $1x10^5$ 또는 $1x10^6$ 엑소좀으로 인큐베이션 후 M2 분극된 쥣과 RAW264.7 세포에서 Stat 3 발현을 도시한다. STAT3을 표적화하는 5개의 상이한 콜레스테롤-태깅된 ASO가 시험되었다: 이중-가닥 MOE 화학특징인 ASO 4.1; 단일-가닥 O-메틸 화학특징인 ASO 5.1 및 ASO 5.2; 단일-가닥 MOE 화학특징인 ASO 5.3 및 ASO 5.4. 미처리된 분극된 대식세포 및 비변형된 엑소좀으로 인큐베이션된 분극된 대식세포가 음성 대조군으로 사용되었다. Stat 3 siRNA 형질감염된 대식세포는 양성 대조군으로 사용되었다.

도 7은 5μM 유리 콜레스테롤-태깅된 ASO 또는 콜레스테롤-태깅된 ASO가 장입된 $1x10^5$ 또는 $1x10^6$ 엑소좀으로 인큐베이션 후 M2 분극된 쥣과 RAW264.7 세포에서 Arg1 전사체 수준을 도시한다. STAT3을 표적화하는 5개의 상이한 콜레스테롤-태깅된 ASO가 시험되었다: 이중-가닥 MOE 화학특징인 ASO 4.1; 단일-가닥 O-메틸 화학특징인 ASO 5.1 및 ASO 5.2; 단일-가닥 MOE 화학특징인 ASO 5.3 및 ASO 5.4. 미처리된 분극된 대식세포 및 비변형된 엑소좀으로 인큐베이션된 분극된 대식세포가 음성 대조군으로 사용되었다. Stat 3 siRNA 형질감염된 대식세포는 양성 대조군으로 사용되었다.

도 8a는 STAT3에 대해 높은 (4μM) 용량의 ASO 또는 높은 (4μM) 및 낮은 (0.4μM) 용량의 Exo-ASO로 인큐베이션 후 M2 분극된 쥣과 RAW264.7 세포에서 STAT3 발현을 도시한다. **도 8b**는 KRAS에 대해 높은 (4μM) 고용량의

ASO 또는 Exo-ASO로 인큐베이션 후 M2 분극된 쥣과 RAW264.7 세포에서 KRAS 발현을 도시한다. **도 8c**는 C/EBPβ에 대한 높은 (4μM) 및 낮은 (0.4μM) 용량의 ASO 또는 Exo-ASO로 인큐베이션 후 M2 분극된 쥣과 RAW264.7 세포에서 C/EBPβ 발현을 도시한다.

도 9a는 가변 용량의 유리 STAT3 ASO 또는 STAT3 Exo-ASO로 처리 후 3개의 별도 공여체로부터 원발성 인간 대식세포에서 STAT3 전사체 수준을 도시한다. 유리 STAT3 ASO에 비교된 STAT3 Exo-ASO의 각각의 처리의 IC50 및 개선 배수가 제시된다. **도 9b**는 가변 용량의 유리 STAT3 ASO 또는 STAT3 Exo-ASO로 처리 후 3개의 별도 공여체로부터 원발성 인간 대식세포에서 CD163 수준을 도시한다. 유리 STAT3 ASO에 비교된 STAT3 Exo-ASO의 각각의 처리의 IC50 및 개선 배수가 제시된다.

도 10은 HIF1α, Pi3Kγ, CEBP/β, STAT6, 및 STAT3 각각에 대해 4μM 유리 ASO 또는 Exo-ASO로 처리 후 인간 M2 대식세포에서 표적 유전자 발현을 도시한다. 미처리된 인간 M2 대식세포 및 4μM 스크램블드 Exo ASO로 처리된 인간 M2 대식세포가 대조군으로 사용되었다.

도 11은 HIF1α, Pi3Kγ, CEBP/β, STAT6, 및 STAT3 각각에 대한 4μM 유리 ASO 또는 Exo-ASO로 처리 후 인간 M2 대식세포에서 CD163 발현을 도시한다. 미처리된 인간 M2 대식세포 및 4μM 스크램블드 Exo ASO로 처리된 인간 M2 대식세포가 대조군으로 사용되었다.

도 12a는 LPS의 존재 또는 부재에서 4μM 유리 STAT3 ASO, 4μM STAT3 Exo-ASO, 4μM 스크램블드 Exo-ASO, 천연 엑소좀, 또는 STAT3의 소분자 억제제인, C188-9로 처리 후 IL-12의 유도를 도시한다. **도 12b**는 LPS의 존재 또는 부재에서 4μM 유리 STAT3 ASO, 4μM STAT3 Exo-ASO, 4μM 스크램블드 Exo-ASO, 천연 엑소좀, 또는 STAT3의 소분자 억제제인, C188-9로 처리 후 IL-23의 유도를 도시한다.

도 13a는 비변형된 엑소좀 (EV 단독), 및 농도-매칭된 Stat 3 유리 ASO 및 Stat 3 Exo-ASO로 처리 후 STAT3 전사체 수준을 도시한다. **도 13b**는 비변형된 엑소좀 (EV 단독), 및 농도-매칭된 Stat 3 유리 ASO 및 Stat 3 Exo-ASO로 처리 후 CD163 전사체 수준을 도시한다. **도 13c**는 비변형된 엑소좀 (EV 단독), 및 농도-매칭된 Stat 3 유리 ASO 및 Stat 3 Exo-ASO로 처리 후 TGFβ 전사체 수준을 도시한다. **도 13d**는 비변형된 엑소좀 (EV 단독), 및 농도-매칭된 Stat 3 유리 ASO 및 Stat 3 Exo-ASO로 처리 후 STAT6 전사체 수준을 도시한다.

도 14는 각각 STAT3 (MOE 및 LNA 화학특징 둘 모두), STAT6 (MOE 화학특징), 및 CEBP/β (MOE 화학특징)에 대한 ASO가 장입된 엑소좀으로 처리 후 TGFβ 발현 수준을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 대식세포 분극화는 대식세포가 그것의 미세환경으로부터의 신호에 반응하여 상이한 기능적 프로그램을 채택하는 과정이다. 이 능력은 유기체에서 그것의 여러 역할과 연관되어 있다: 그들은 선천적 면역계의 강력한 효과기 세포이지만, 또한 세포 잔해의 제거, 배아 발생 및 조직 치유에도 중요하다.

[0036] 대식세포 표현형은 크게 2개의 군: M1 (고전적으로-활성화된 대식세포) 및 M2 (대안적으로-활성화된 대식세포)로 분할된다. 이 광범위한 분류는 배양된 대식세포가 그것의 표현형을 특정 상태로 전환시키도록 자극하는 분자로 처리되는 *시험관내* 연구에 기초한다. M1 대식세포는 식균작용 및 전-염증성 사이토카인과 살균 분자의 분비와 같은 직접적인 숙주-방어에 중요한 전-염증성이다. M2 대식세포는 상당히 반대의 기능: 염증의 해소기의 조절 및 손상된 조직의 회복을 갖는다. *예를 들어,* Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 496(7446), 445-455; Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173 *참고*. 많은 고형 종양은 종양-관련된 대식세포 (TAM)로 알려진 M2 대식세포의 유형을 종종 포함하는 골수성-풍부 세포 침윤물을 특징으로 한다. M2 대식세포 (예컨대 TAM)는 대사 효소 아르기나제 (Arg1)의 발현을 촉진하는, 높은 수준의 인산화된 STAT3 및 STAT6을 발현한다. TAM은 암 세포 운동성, 전이 형성 및 혈관신생의 촉진과 같은 수많은 종양-촉진성 활성을 매개하고, TAM 형성은 종양을 전개하는데 존재하는 미세환경적 요인에 의존한다. TAM은 면역억제성 사이토카인 예컨대, *예를 들어,* IL-10, TGFβ, PGE2 및 매우 소량의 NO 또는 ROI와 저수준의 염증성 사이토카인 (IL-12, IL-1β, TNFα, IL-6)을 생산한다. "고전적으로-활성화된" M1 대식세포에 비교하여, TAM에 의한 종양-관련된 항원의 제시는 T 및 NK 세포의 항종양 기능의 자극이 감소됨에 따라 감소된다. M1 대식세포와 달리, TAM은 종양 세포를 용해시킬 수 없다.https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization - cite_note-Sica2008-31 따라서, TAM 및 다른 M2 대식세포의 표적화는 TAM의 동원 및 분포를 변경하거나, 존재하는 TAM을 고갈시키거나, 또는 M2로부터 M1 표현형으로 TAM의 재-교육을 유도하기 위한 제제의 전달을 통해 실증된 바와 같이 암에 대한

신규한 치료적 전략을 제공한다.

[0037] 본 발명의 엑소좀 치료제는 이들 질환의 맥락에서 비정상적인 대식세포를 M1 표현형으로 "재분극화"함에 의해 암 및 섬유증과 같은 질환을 치료하기 위해 조직-상주하는 미세환경을 촉진하기 위해 M2 대식세포에 대한 선택적 효과를 갖는다. 본 명세서에서 기재된 엑소좀은 인간 질환을 치료하기 위해 M2 대식세포를 M1 표현형으로 재분극시키는 경로와 결합하는 후보를 생성하기 위해 엑소좀 표면 상에 또는 엑소좀 내강 내부에 다양한 생물학적 활성 분자로 정확하게 조작된다.

[0038] 종양 관련된 M2 분극된 대식세포, 또는 TAM은 T 세포 증식 및 효과기 기능을 효과적으로 억제할 수 있고 종양 성장을 촉진시킬 수 있다. CSF-1 수용체에 대해 지향된 대식세포를 고갈시키는 항체를 사용한 M1 표현형으로 뒤로 TAM의 복귀가 또한 보고되었다. 이들 접근법은 좁은 치료적 윈도우로 인해 임상 시험에서 제한된 성공을 보였고, 단지 의도된 대로 비정상적인 M2 대식세포가 아닌 모든 대식세포를 표적화하기 때문에 특이성이 결여되어 있었다. 이러한 대식세포의 대대적인 고갈은 증가된 감염 위험 및 다른 안전성 우려를 초래하는 것으로 예상된다. 본 발명의 엑소좀은 대식세포에 대한 천연 엑소좀 굴성으로 인해 M2 대식세포를 보다 선택적으로 표적화하고 원하는 M1 표현형에 대한 기능의 균형을 가한다. 이들 엑소좀은 대식세포를 재분극화시켜, 항종양 면역 반응에 필요한 원하는 염증성 사이토카인의 스펙트럼의 생성을 초래한다. 하기 실시예에서 나타낸 바와 같이, 엑소좀은 *시험관내* 면역억제성 M2 대식세포를 M1 표현형으로 재프로그래밍하였다.

[0039] 종양 미세환경에서 유도된 면역 억제에 부가하여, M2 분극된 대식세포는 세포 신호전달에 관여된 중요한 사이토카인인 형질전환 성장 인자 베타, 또는 TGFβ를 다량 분비하여, 콜라겐 침착 및 조직 리모델링으로 이어지는 섬유모세포 축적을 유도하여, 궁극적으로 조직 섬유증을 초래한다. STAT3과 같은 주요 신호전달 분자를 표적화함으로써 TGFβ 생성을 감소시키기 위해 이들 M2 대식세포를 재프로그래밍하는 것은 폐 섬유증의 전임상 모델에서 유리한 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. STAT3을 표적화하기 위한 몇 개의 소분자 접근법이 이용되었지만, 비정상적인 M2 대식세포 내에서만 억제의 특이성의 결여는 치료에 대한 이러한 접근법이 실행되는 것을 방지하였다. 본원에 기재된 특정 엑소좀은 M2 대식세포에서 주요 경로를 선택적으로 표적화하여 그들을 폐 및 다른 조직 섬유증 증후군에서 STAT3 및 다른 세포 경로를 표적화할 수 있게 한다.

[0040] 면역계의 대식세포를 조절하는데 유용한 세포외 소포가 본 명세서에서 개시된다. 이들 세포외 소포는, 대식세포와 접촉시, 적어도 하나의 대식세포 표적 유전자를 억제하고 그것에 의해, 하나 이상의 면역조절 구성요소(들) 단독의 등몰 양(들)에 비교하여 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함한다. 세포외 소포를 생산하는 방법, 및 암 및 다른 면역계 관련된 질환 예컨대, 예를 들어, 섬유성 병태를 치료하기 위해 이들 세포외 소포를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

[0041] 본 발명이 더 상세히 기재되기 전에, 본 발명은 기재된 특정 실시형태로 제한되지 않으며, 물론 그와 같이 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 실시형태들을 설명하기 위한 목적을 위한 것이며, 본 발명의 범위가 첨부된 청구항들에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 제한하는 것으로 의도되지 않음을 이해해야 한다.

[0042] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 달리 분명히 지시하지 않는 한 하한의 단위의 10분의 1까지 각각의 개재하는 값, 그 범위의 상한과 하한 사이 및 임의의 다른 언급된 또는 그 언급된 범위에 개재하는 값이 본 발명에 포함된다는 것을 이해해야 한다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있으며, 또한 언급된 범위에서 어떤 구체적으로 배제된 한계에 따라 본 발명에 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계 중 어느 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 또한 본 발명에 포함된다.

[0043] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 또한 사용될 수 있지만, 대표적인 예시적인 방법 및 물질이 이제 설명된다.

[0044] 본 명세서에 인용된 모든 공보 및 특허는 각각의 개별 공보 또는 특허가 구체적으로 및 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 지시되고 공보가 인용되는 것과 관련하여 방법 및/또는 물질을 개시하고 기술하기 위해 본 명세서에 참고로 포함되는 것처럼 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0045] 본 명세서에서 그리고 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다는 점에 유의한다. 유사하게, 용어 "적어도 하나"는 복수

의 지시대상을 포함한다 (즉, 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 "하나 이상"이라는 어구와 동등하다). 청구항은 임의의 선택적인 요소를 배제하기 위해 작성될 수 있음이 추가로 주목된다. 이와 같이, 이 서술은 청구항 구성요소의 인용 또는 부정적 제한의 사용과 관련하여 "단독으로", "단지" 및 기타 동종의 것과 같은 배타적인 용어의 사용을 위한 선행된 기초로 기능하도록 의도된다.

[0046] 수치를 수정하기 위해 사용될 때 용어 "약"은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있는 바와 같이, 기재된 기술을 실시하기 위해 언급된 값과 기능적으로 동등한 언급된 값에서의 변형을 포함하는 것으로 의도된다. 어떤 실시형태에서 용어 "약"은 언급된 값으로부터 +/- 5%, +/- 10%, +/- 20%, +/- 30%, +/- 40% 또는 +/- 50% 변형을 포함한다.

[0047] 본 개시내용을 읽을 때 당해 분야의 숙련가에게 명백한 바와 같이, 본 명세서에 기재되고 예시된 각각의 개별 실시형태는 본 발명의 범위 또는 사상을 벗어남이 없이 임의의 다른 몇 개의 실시형태의 특징과 쉽게 분리되거나 조합될 수 있는 별개의 구성요소 및 특징을 갖는다. 임의의 인용된 방법은 인용된 사건의 순서 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0048] 본 발명을 추가로 설명함에 있어서, 본 방법을 실시하는데 사용하기 위한 본 시스템이 보다 상세하게 논의될 것이고, 이어서 관련된 방법의 검토가 논의될 것이다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포외 소포"는 내부 공간을 둘러싸는 멤브레인을 포함하는 세포-유래된 소포를 지칭한다. 세포외 소포는 이들이 유래되는 세포보다 더 작은 직경을 갖는 모든 막-결합 소포를 포함한다. 일반적으로 세포외 소포는 직경이 20 nm 내지 1000 nm의 범위이고, 내부 공간 내에서, 세포외 소포의 외부 표면에 표시되고/되거나 멤브레인에 걸쳐 있는 다양한 거대분자 전달대상물을 포함할 수 있다. 본 전달대상물은 핵산, 단백질, 탄수화물, 지질, 소분자, 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예로써 그리고 비제한적으로, 세포외 소포는 세포자멸적 바디, 세포의 단편, 직접 또는 간접 조작에 의해 (*예를 들어*, 연속 압출 또는 알칼리 용액으로의 처리에 의해) 세포로부터 유래된 소포, 소포형성된 소기관 및 살아 있는 세포에 의해 (*예를 들어*, 직접적인 원형질막 발아 또는 후기 엔도좀과 원형질막의 융합에 의해) 생성된 소포를 포함한다. 세포외 소포는 살아 있는 또는 죽은 유기체, 외식된 조직 또는 기관, 및/또는 배양 세포로부터 유래될 수 있다. 세포외 소포의 종은, *예를 들어*, 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된, 공유의 미국 특허 번호 10,195,290에 기재된 바와 같이, 엑소좀 및 나노소포를 포함한다.

[0050] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "엑소좀"은 내부 공간을 둘러싸고 직접적인 원형질막 발아 또는 후기 엔도좀과 원형질막의 융합에 의해 세포로부터 생성되는 멤브레인을 포함하는 세포-유래된 작은 (직경이 20-300 nm, 보다 바람직하게는 직경이 40-200 nm 사이) 소포를 지칭한다. 엑소좀은 세포외 소포의 종이다. 엑소좀은 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함하고 선택적으로 적재물 (*예를 들어,* 치료제), 리시버 (*예를 들어,* 표적화 모이어티), 폴리뉴클레오타이드 (*예를 들어,* 핵산, RNA, 또는 DNA), 당 (*예를 들어,* 단당, 다당류, 또는 글리칸) 또는 다른 분자를 포함한다. 엑소좀은 생산자 세포로부터 유래될 수 있고, 그것의 크기, 밀도, 생화학적 파라미터, 또는 이들의 조합에 기초하여 생산자 세포로부터 단리될 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "나노소포"는 내부 공간을 둘러싸고 나노소포가 조작 없이 생산자 세포에 의해 생산되지 않도록 직접 또는 간접적 조작에 의해 세포로부터 생성되는 멤브레인을 포함하는 세포-유래된 작은 (직경이 20-250 nm, 보다 바람직하게는 직경이 30-150 nm 사이) 소포를 지칭한다. 생산자 세포의 적절한 조작은, 여기에 제한되지는 않지만, 연속 압출, 알칼리성 용액으로 처리, 초음파처리, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 경우에서, 나노소포의 생산은 생산자 세포의 파괴를 초래한다. 바람직하게는, 나노소포의 모집단은 원형질막으로부터 직접적인 발아 또는 후기 엔도좀과 원형질막의 융합의 방식에 의해 생산자 세포로부터 유래된 소포가 실질적으로 없다. 나노소포는 세포외 소포의 종이다. 나노소포는 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함하고, 선택적으로 적재물 (*예를 들어,* 치료제), 리시버 (*예를 들어,* 표적화 모이어티), 폴리뉴클레오타이드 (*예를 들어,* 핵산, RNA, 또는 DNA), 당 (*예를 들어,* 단당, 다당류, 또는 글리칸) 또는 다른 분자를 포함한다. 나노소포는, 일단 이것이 조작에 따라 생산자 세포로부터 유래되면, 그것의 크기, 밀도, 생화학적 파라미터, 또는 이들의 조합에 기초하여 생산자 세포로부터 단리될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "M2 표현형"은 하나 이상의 종양 촉진 활성을 나타내거나, 또는 M2 표현형과 관련된 것으로 당업계에서 알려진 마커 예컨대, 비제한적으로, $CD8^+$ T-세포 및/또는 천연 살해 세포의 자극의 감소 또는 결여; 종양 세포의 식균작용의 결여; M2 관련된 사이토카인 (*예를 들어,* IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 및 CCL24)의 분비 및/또는 발현; 성장 인자 (*예를 들어,* VEGF-A, VEGF-C, EGF, 및 TGF-β)의 분비 및/또는 발현; 전이성 효소 (*예를 들어,* 매트릭스 메탈로프로테이나제 MMP2, MMP9, 시스테인 카

텝신 프로테아제)의 분비 및/또는 발현; 면역억제성 인자 (*예를 들어,* 유도성 산화질소 합성효소 (iNOS)로부터 기질 L-아르기닌을 제거하는 아르기나제 I (ArgI))의 분비/발현; 세포 표면 마커 YM1, FIZZ1, 덱틴-1, MGL의 발현, M2 관련된 miRNA (*예를 들어,* miRNA146a, miRNA let 7b, 및 miR-223)의 발현 (*예를 들어,* Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-96; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20; 및 Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520-5299 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌을 참고하고, 그 각각은 모든 목적을 위해 참고로 편입됨) 및/또는, 참조 샘플이 M1-활성화된 대식세포의 모집단을 포함하는 적어도 하나의 참조 샘플에 비교된 하기에 열거된 M1 관련된 인자의 감소된 발현/분비 또는 감소된 M1 관련된 활성을 표시하는 대식세포를 지칭한다. *시험관내* M1-활성화는 TLR 리간드 예컨대 박테리아 리포폴리사카라이드 (LPS) - 그램-음성 박테리아에 대해 전형적인 것임 및 리포테이코산 (LTA) - 그램-양성 박테리아에 대해 전형적인 것임, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF) 또는 LPS와 인터페론-감마 (IFN-γ)의 조합으로 처리에 의해 유발된다. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm *참조*. The Journal of *Immunology*, 164(12), 6166-6173; Krausgruber, Thomas, *et al*. "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." *Nature immunology* 12.3 (2011): 231-238 및 Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6(March), 1-13 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌을 참고하고, 그 각각은 모든 목적을 위해 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0053] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "M1 표현형"은 항종양 활성 또는 M1 표현형과 관련된 것으로 당업계에서 알려진 마커 예컨대, 비제한적으로, $CD8^+$ T-세포 및/또는 천연 살해 세포의 자극, 종양 세포의 식균작용, M1 관련된 사이토카인 (*예를 들어,* INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CCL5, CSCL9, CXCL10 및 CXCL11)의 분비 및/또는 발현, M1 관련된 miRNA (*예를 들어,* miRNA155, miR-33)의 발현 (*예를 들어,* Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-96; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20; 및 Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520-5299 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌을 참고하고, 그 각각은 모든 목적을 위해 참고로 편입됨) 및/또는 참조 샘플이 M2-활성화된 대식세포의 모집단을 포함하는 적어도 하나의 참조 샘플에 비교된 상기에 열거된 M2 관련된 인자의 감소된 발현/분비 또는 감소된 M2 관련된 활성을 나타내는 대식세포를 지칭한다. *시험관내* M2-활성화는 IL-4 및 IL-13으로 처리에 의해 유발된다 (*예를 들어,* 모든 목적을 위해 참고로 포함된, Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520-529을 참고한다).

[0054] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "대식세포 분극화"는 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포의 변화를 지칭하고/하거나 적어도 하나의 참조 샘플 (*예를 들어,* 테스트 샘플 또는 이력 데이터 이전의 동일한 환자로부터 취해진 샘플)에 비교될 때 M1 표현형을 나타내는 대식세포의 환자에서 발견된 대식세포 (*예를 들어,* 종양과 관련된 대식세포, 또는 순환하는 대식세포)의 모집단의 백분율에서의 증가를 지칭한다. *예를 들어,* Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173; Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-969; 및 Xue, J., Schmidt, S. V. and Schultze, J. L. (2014), Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*, 40(2)L 274-288을 참고하고, 그 각각은 모든 목적을 위해 참고로 포함된다.

[0055] 용어 "세포외 소포 전달" 또는 "세포외 소포의 전달"은 대상체의 조직, 세포, 및/또는 기관을 치료하기 위해 세포외 소포의 투여 및 편재화를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 표적 세포의 세포질에 전달될 수 있다. 다른 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 표적 세포의 멤브레인에 전달된다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포의 멤브레인은 표적 세포의 멤브레인과 융합한다.

[0056] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "생산자 세포"는 세포외 소포가 단리될 수 있는 임의의 세포를 지칭한다. 생산자 세포는 세포외 소포에 대한 출처로서 기능하는 세포이다. 생산자 세포는 단백질, 지질, 당, 또는 핵산 성분을 세포외 소포와 공유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 변형된 또는 합성 세포이다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 배양된 또는 단리된 세포이다. 어떤 실시형태에서, 생산자 세포는 세포주이다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포주는 인간 배아 신장 세포주이다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포주는 HEK293SF 세포주이다. 특정 다른 실시형태에서, 생산자 세포는 일차 세포이다. 일부 특정 실시형태에서, 생산자 세포는 면역 세포, 예컨대, *예를 들어,* B 림프구, T 림프구, 수지상 세포, 비만 세포, 대식세포, 천연 살해 세포 (NK 세포), 항원 제시 세포, T 도움 세포, 또는 조절 T 세포 (Treg 세포)이다.

[0057] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "멤브레인"은 하나 이상의 생물학적 화합물, 전형적으로 지질, 및 선택적으로 폴리펩타이드 및/또는 탄수화물을 포함하는 외측 공간으로부터 내측 공간을 분리하는 경계 층이다. 일부 실시형태에서, 멤브레인은 지질 및 지방산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 멤브레인은 인지질, 당지질, 지방산, 스핑고지질, 포스포글리세라이드, 스테롤, 콜레스테롤, 및 포스파티딜세린을 포함한다. 이들 실시형태 중 일부에서, 멤브레인은 하나 이상의 폴리펩타이드 및/또는 하나 이상의 다당류, 예컨대 글리칸을 추가로 포함한다. 세포외 소포는 본 명세서에서 정의된 바와 같이 멤브레인을 포함한다.

[0058] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역조절 구성요소"는 제제와 접촉되는 표적 (*예를 들어,* 예로써 그러나 비제한적으로 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 및 PKM2를 포함하는, 표적 유전자)에 작용하고 면역 세포 (*예를 들어,* 대식세포 또는 다른 면역 세포)를 변화시키는 치료제를 지칭한다. 세포외 소포 및/또는 생산자 세포 안으로 도입될 수 있는 면역조절 구성요소는 치료제 예컨대, 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 억제성 핵산 (*예를 들어,* 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO), siRNA, miRNA, 안티센스 RNA, shRNA, lncRNA, pri-miRNA 및 pre-miRNA), 효능제, 길항제, 항체, 및/또는 항원-결합 단편, 면역 관문 억제제의 조절제 또는 면역 관문 억제제의 리간드, 표면 항원 및 이의 유도체, 및/또는 사이토카인 및 이의 유도체를 포함한다. 어떤 실시형태에서 면역조절 구성요소는 억제성 핵산 (*예를 들어,* 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO), siRNA, miRNA, 안티센스 RNA, shRNA, lncRNA, pri-miRNA 및 pre-miRNA)이다. *예를 들어,* Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". *Nature.* ***411*** *(6836):* 494-988; Bartel DP (1월 2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function". *Cell.* **116** (2): 281-97; Paddison, PJ; Caudy, AA; Bernstein, E; Hannon, GJ; Conklin, DS (15 April 2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells". *Genes & Development.* **16** (8): 948-58; Ma L, Bajic VB, Zhang Z (June 2013). "On the classification of long non-coding RNAs". *RNA Biology.* 10 (6): 925-33; 및 Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (March 2003). "A uniform system for microRNA annotation". *RNA.* 9 (3): 277-9을 참고하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 본 명세서에 포함된다.

[0059] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "억제하는 핵산 분자" 또는 "억제성 핵산"은 표적 유전자와 상호작용하도록 세포 안으로 도입될 때, 표적 유전자의 발현 또는 활성의 억제를 초래하는 임의의 핵산을 지칭한다. 억제하는 핵산 분자, 즉, 억제성 핵산은 DNA, 또는 억제성 RNA (*예를 들어,* siRNA, miRNA, 안티센스 RNA, shRNA, lncRNA, pre-miRNA, 또는 mRNA)일 수 있으며, 여기서 상기 RNA는 단일가닥, 이중가닥이거나, 또는 단일가닥 및 이중가닥 영역 둘 모두를 함유한다. 일부 실시형태에서, 억제성 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. ASO는 단일-가닥 또는 이중-가닥 DNA, RNA, 또는 DNA/RNA 하이브리드일 수 있다. *예를 들어,* 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된, Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997 *참고.* "EXO ASO"는 *예를 들어,* 소포 멤브레인과 상호작용을 통해 (*예를 들어,* 콜레스테롤- 또는 지방-아실-유도된 ASO와 함께 발생함으로), 또는 전기천공과 같은 기술을 사용하여 소포 내강 안으로 장입에 의해, 또는 *예를 들어,* 원하는 ASO를 인코딩하는 생산자 세포 작제물 안으로 도입하기 위한 형질감염 또는 형질도입에 의한 것과 같이, 생산자 세포의 유전공학과, 이어서 조작된 생산자 세포로부터 세포외 소포의 단리를 통해, 엑소좀과 같은 세포외 소포와 물리적으로 관련된 ASO이다.

[0060] 용어 "리시버"는 세포외 소포를 표적으로 향하게 하고/하거나 대상체에서 표적과 세포외 소포의 상호작용을 촉

진하는 분자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 리시버는 폴리펩타이드이고, 또한 때때로 본 명세서에서 "리시버 폴리펩타이드"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 리시버는 대상체의 표적 조직으로 지향된 이동조절에 의하는 것과 같이, 대상체의 조직에서 면역조절 구성요소의 농도를 증가시킬 수 있다. 리시버의 예는 표 3에 열거된 예를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0061] 용어 "표적"은 그 활성이 본 개시내용의 면역조절 구성요소에 의해 조절되도록 되는 유전자 (즉, 표적 유전자)를 지칭할 수 있다. 어떤 실시형태에서, 표적 유전자는, *예를 들어,* 억제성 ASO와 같은 세포외 소포와 관련된 (즉, 멤브레인 표면에 결합된, 지질 이중층 내에 개재된, 또는 소포의 봉입된 부피 내에 캡슐화된) 핵산 분자에 의해 억제된다. 표적 유전자의 예는 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 및 PKM2를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. "표적"은 또한 본 개시내용의 세포외 소포가 지향된 세포 (즉, 표적 세포)를 지칭할 수 있다. 어떤 실시형태에서, 표적 세포는 면역 세포 (*예를 들어,* 대식세포)이다. 어떤 실시형태에서, 표적 세포는 조혈 줄기 세포 또는 만능 줄기 세포이다. 어떤 실시형태에서, 표적 세포는 순환하는 대식세포이다. 어떤 실시형태에서, 표적 세포는 종양 상주하는 대식세포 (즉, 종양 미세환경에, 종양 조직에 또는 종양 표면 근처에 위치한 대식세포)이다. 추가로, "표적"은 또한 그 활성이 본 개시내용의 면역조절 구성요소와 접촉에 의해 조절되는 표적 세포 상의 단백질, 또는 본 개시내용의 세포외 소포를 결합하기 위한 리간드로 작용하는 단백질 (즉, 표적 단백질)을 지칭할 수 있고, 따라서, 어떤 실시형태에서, 표적 단백질은 표적 세포 상에 있고 세포외 소포와 상호작용한다.

[0062] "치료제" 또는 "치료적 분자"는 유효량으로 존재할 때 치료적 효과, 약리적 및/또는 생리적 효과를 필요로 하는 대상체에서 원하는 치료적 효과, 약리적 및/또는 생리적 효과를 생산하는 화합물 또는 분자를 포함한다. 그것은 대상체에게 투여될 때 대상체에 측정가능한 또는 전달할 수 있는 효과를 갖는, *예를 들어,* 질환, 장애 또는 병태의 증상을 완화시키거나 또는 감소시키는 임의의 화합물, *예를 들어,* 소분자 약물, 또는 생물학적 (*예를 들어,* 폴리펩타이드 약물 또는 핵산 약물)을 포함한다.

[0063] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "면역 관문 억제제" 또는 "관문 억제제"는 면역 세포를 억제하는 면역억제성 체크포인트 경로를 감소시킴에 의해 면역 세포 활성을 자극하는 치료제 (*예를 들어,* PD-1/PD-L1을 억제하는 제제 (예컨대 PD-1을 표적화하는 니볼루맙 세미플리맙 및 펨브롤리주맙, 및 PD-L1을 각각 표적화하는 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙) 및 CTLA-4/B7-1/B7-2, 예컨대 이필리무맙)를 지칭한다. *예를 들어,* Pardoll DM (March 2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy". *Nature Reviews*. Cancer. 12 (4): 252-64 *참고*.

[0064] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 천연이든 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성으로 생산되든 간에 면역글로불린, 및 이의 단편을 포괄한다. 본 용어는 또한 면역글로불린 결합 도메인에 상동성인 결합 도메인을 갖는 임의의 단백질을 커버한다. "항체"는 항원을 특이적으로 결합하고 인식하는 면역글로불린 유전자 또는 이의 단편으로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 용어 항체의 사용은 전체의 항체, 다클론성, 단클론성 및 재조합 항체, 이의 단편을 포함하고, 추가로 단일-사슬 항체, 인간화된 항체, 쥣과 항체, 키메라, 마우스-인간, 마우스-영장류, 영장류-인간 단클론성 항체, 항-개체특이형 항체, 항체 단편, 예컨대, *예를 들어,* scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(ab1)_2$, Fv, dAb, 및 Fd 단편, 디아바디, 및 항체-관련된 폴리펩타이드를 포함하기 위한 것이다. 항체는 이들이 원하는 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 한 이중특이적 항체 및 다중특이적 항체를 포함한다. 예시적인 항체 조성은 CTLA-4를 억제하는 항체, 예컨대, *예를 들어,* 이필리무맙, PD-1을 억제하는 항체, 예컨대, *예를 들어,* 니볼루맙 세미플리맙 및 펨브롤리주맙, PD-L1을 억제하는 항체, 예컨대, *예를 들어,* 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 및 CSFR1을 억제하는 항체, 예컨대, *예를 들어,* 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "항원-결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 항원 결합 영역을 포함한 폴리펩타이드의 온전한 면역글로불린의 단편, 및 임의의 일부를 지칭한다. 예를 들어, 항원-결합 단편은 $F(ab')_2$ 단편, Fab' 단편, Fab 단편, Fv 단편, 또는 scFv 단편일 수 있지만, 여기에 제한되지 않는다. Fab 단편은 하나의 항원 결합 부위를 가지고 경쇄 및 중쇄의 가변 영역, 경쇄의 불변 영역, 및 중쇄의 제1 불변 영역 CH1을 함유한다. Fab' 단편은 Fab' 단편이 중쇄 CH1 영역의 C-말단에서 적어도 하나의 시스테인 잔기를 포함한, 중쇄의 힌지 영역을 추가로 포함한다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. $F(ab')_2$ 단편이 생산되고 이에 의해 Fab' 단편의 시스테인 잔기는 힌지 영역에서 디설파이드 결합에 의해 연결된다. Fv 단편은 단지 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 갖는 최소 항체 단편이고, Fv 단편을 생산하기 위한 재조합 기술은 당업계

에서 잘 알려져 있다. 2-사슬 Fv 단편은 중쇄 가변 영역이 비-공유결합에 의해 경쇄 가변 영역에 연결된 구조를 가질 수 있다. 단일-사슬 Fv (scFv) 단편은 일반적으로 중쇄 가변 영역이 펩타이드 링커를 통해 경쇄 가변 영역에 공유결합되거나 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 그의 C-말단에서 서로에 대해서 직접적으로 연결된 2-사슬 Fv 단편에서와 같은 이량체 구조를 가질 수 있다. 항원-결합 단편은 프로테아제를 사용하여 수득될 수 있고 (예를 들어, 전체의 항체는 파파인으로 소화되어 Fab 단편을 획득하고, 펩신으로 소화되어 $F(ab')_2$ 단편을 획득함), 유전적 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다. dAb 단편은 VH 도메인으로 구성된다. 단일-사슬 항체 분자는 수많은 개별 분자, 예를 들어, 이량체, 삼량체 또는 다른 폴리머를 갖는 폴리머를 포함할 수 있다.

[0065] 어구 "핵산 분자"는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 염기의 단일 또는 이중-가닥 폴리머를 지칭한다. 그것은 염색체 DNA 및 자가-복제 플라스미드, 벡터, mRNA, tRNA, siRNA, miRNA, 등을 포함한다. 핵산 분자는 재조합일 수 있고 외인성 폴리펩타이드는 핵산이 세포 안으로 도입될 때 발현될 수 있다. 본 용어는 *예를 들어,* Selvam C, Mutisya D, Prakash S, Ranganna K, Thilagavathi R. "Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends," *Chem Biol Drug Des*. 2017 Nov;90(5):665-678에 기재된 것들과 같은 화학적으로 변형된 핵산, *예를 들어,* Petersen M, Wengel J (2월 2003). "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics". *Trends Biotechnol*. 21 (2): 74-81에 기재된 바와 같은 잠금 핵산 (LNA); 및 *예를 들어,* Summerton, J; Weller, D (1997). "Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties". *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*. 7 (3): 187-195; Goodchild, J (2011). Therapeutic oligonucleotides. *Methods in Molecular Biology*. 764. pp. 1-15에서 기재된 것과 같은 다른 유형의 임상적으로-관련된, 화학적으로 변형된 핵산을 포괄하고, 그 각각은 모든 목적을 위해 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0066] 용어 "효능제"는 수용체에 결합하고 수용체를 활성화시켜 생물학적 반응을 생성하는 분자를 지칭한다. 수용체는 내인성 또는 외인성 효능제 중 어느 하나에 의해 활성화될 수 있다. 내인성 효능제의 비-제한적인 예는 호르몬 및 신경전달물질을 포함한다. 외인성 효능제의 비-제한적인 예는 소분자, 항체, 합성 펩타이드, 등을 비롯한 다양한 부류의 화합물을 포함한다. 효능제는 전체, 부분적, 또는 역 효능제일 수 있다.

[0067] 용어 "길항제"는 수용체에 결합시 생물학적 반응 자체를 유발하기보다는 효능제 매개된 반응을 차단하거나 또는 약화시키는 분자를 지칭한다. 많은 길항제는 수용체 상의 구조적으로 정의된 결합 부위에서 내인성 리간드 또는 기질과 경쟁함으로써 그것의 효력을 달성한다. 길항제의 비-제한적인 예는 알파 차단제, 베타-차단제 및 칼슘 채널 차단제를 포함한다. 길항제는 경쟁적, 비-경쟁적 또는 무경쟁적 길항제일 수 있다.

[0068] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적 조성물"은 하나 이상의 다른 화학 구성요소, 예컨대 약제학적으로-허용가능한 캐리어 및 부형제와 혼합되거나 또는 서로 섞이거나, 또는 그 안에 현탁된 본 명세서에서 기재된 화합물 중 하나 이상, 예컨대, *예를 들어,* 세포외 소포를 지칭한다. 약제학적 조성물의 하나의 목적은 대상체에게 세포외 소포의 제제의 투여를 용이하게 하는 것이다. 용어 "약제학적으로-허용가능한" 및 이의 문법적 변형은 조성물의 투여를 금지하는 정도로 바람직하지 않은 생리적 효과의 생성 없이 대상에게 또는 위에 투여할 수 있는 조성물, 캐리어, 희석제 및 시약을 지칭한다. 용어 "부형제" 또는 "담체"는 화합물의 투여를 추가로 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 용어 "약제학적으로-허용가능한 담체" 또는 "약제학적으로-허용가능한 부형제"는 미국 연방 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나 인간을 포함한 동물에서 사용하기 위한 미국 약전에 열거된 임의의 제제뿐만 아니라 대상체에 대한 심각한 자극을 유발하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 제거하지 않는 임의의 담체 또는 희석제를 포괄한다. 약제학적 조성물을 제조하는데 유용하고 일반적으로 안전하고, 무독성이고 바람직한 부형제 및 캐리어가 포함된다.

[0069] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "단리한다", "단리된" 및 "분리하는" 또는 "정제한다", "정제된" 및 "정제하는"뿐만 아니라 "추출된" 및 "추출하는"은 상호교환적으로 사용되고 하나 이상의 정제 공정, *예를 들어,* 원하는 세포외 소포 제제의 선택 또는 농축을 거친, 원하는 세포외 소포의 제제의 상태 (*예를 들어,* 복수의 알려진 또는 알려지지 않은 양 및/또는 농도)를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용된 바와 같은 단리하는 또는 정제하는 것은 생산자 세포를 함유하는 샘플로부터 세포외 소포의 제거, 부분적으로 제거 (*예를 들어,* 분획)하는 과정이다. 일부 실시형태에서, 단리된 세포외 소포 조성물은 검출가능한 바람직하지 않은 활성을 갖지 않거나 또는, 대안적으로, 바람직하지 않은 활성의 수준 또는 양이 허용가능한 수준 또는 양이거나 그 미만이다. 다른 실시형태에서, 단리된 세포외 소포 조성물은 허용가능한 양 및/또는 농도이거나 그 초과로 원하는 세포외 소포의 양 및/또는 농도를 갖는다. 다른 실시형태에서, 단리된 세포외 소포 조성물은 본 조성물이 수득된 개시 물질 (*예를 들어* 생산자 세포 제제)에 비교하여 농축된다. 이 농축은 개시 물질에 비교하여

10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99%, 99.999%, 99.9999%, 또는 99.9999% 초과로 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단리된 세포외 소포 제제는 잔류 생물학적 생성물이 실질적으로 없다. 일부 실시형태에서, 단리된 세포외 소포 제제는 임의의 오염성 생물학적 물질이 100% 없거나, 99% 없거나, 98% 없거나, 97% 없거나, 96% 없거나, 또는 95% 없다. 잔류 생물학적 생성물은 비생물 물질 (화학물질을 포함함) 또는 원치않는 핵산, 단백질, 지질, 또는 대사물을 포함할 수 있다. 잔류 생물학적 생성물이 실질적으로 없는 것은 또한 세포외 소포 조성물이 검출가능한 생산자 세포를 함유하지 않고 세포외 소포만이 검출가능하다는 것을 의미할 수 있다.

[0070] 용어들 "투여", "투여하는" 및 이의 변이형은 조성물, 예컨대 세포외 소포, 또는 제제를 대상체 안으로 도입하는 것을 지칭하고 치료적 효과를 생성하는 것과 일치하는 임의의 스케줄로 하나 이상의 추가의 조성물 또는 제제의 동반 및 순차적인 도입을 포함한다. 용량 투여의 타이밍은 투여되는 제제의 대상체 내에서 일정한 수준 (예를 들어, 혈장 수준)을 달성하기 위해, 또는 *예를 들어,* 독성을 감소시키거나 탈민감화를 예방하기 위해 간헐적 노출에 대해 선택될 수 있다. 이들 결과를 달성하는 방법은, *예를 들어,* Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Macmillan Publishing Co. 13th Ed.)에 제시된 알려진 약동학적 원리에 기초하여 통상적으로-당업자에게 잘 알려져 있다. 대상체 안으로 조성물 또는 제제의 도입은 경구로, 폐로, 비강내로, 비경구로 (정맥내로, 동맥내로, 근육내로, 복강내로, 또는 피하로), 직장으로, 림프내로, 척추강내로, 눈주위로, 종양내로 또는 국소적으로를 비롯한 임의의 적합한 경로에 의한다. 투여는 자가-투여 및 또 다른 투여를 포함한다. 적합한 투여 경로는 조성물 또는 제제가 그것의 의도된 기능을 수행할 수 있게 한다. 예를 들어, 적합한 경로가 정맥내인 경우, 본 조성물은 대상체의 정맥 안으로 조성물 또는 제제를 도입함에 의해 투여된다.

[0071] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "조절한다", "조절하는", "변경한다" 및/또는 "조절제"는 일반적으로 증가 또는 감소에 의해 변경하는 능력, *예를 들어,* 특이적 농도, 수준, 발현, 기능 또는 행동, 예컨대, *예를 들어,* 길항제 또는 효능제로서 행동하는 것을 직접적으로 또는 간접적으로 촉진/자극/상향조절 또는 방해/억제/하향조절하는 능력을 지칭한다. 일부 경우에서 조절제는 대조군에 비하여, 또는 일반적으로 예상되는 활성의 평균 수준에 비하거나 대조군의 활성 수준에 비하여 특정 농도, 수준, 활성 또는 기능을 증가 및/또는 감소시킬 수 있다. 용어들 "억제", "억압", "조절"은 면역조절 구성요소(들)가 없는 조건과 비교하여 표적 유전자의 발현 또는 활성에서의 변화를 설명하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 억제는 유전자 발현 또는 활성의 제거 또는 실질적인 제거를 지칭한다. 억압은 유전자 발현 또는 활성의 완전한 제거 또는 실질적인 제거는 아니지만, 감소를 의미한다. 조절은 유전자 발현 또는 활성의 상하로의 임의의 변경을 의미한다.

[0072] 용어 "충분한 양"은 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양, *예를 들어,* 대상체에서의 병태를 조절하기에 충분한 양을 의미한다.

[0073] 용어 "치료 유효량"은 질환의 증상을 개선시키는데 효과적인 양이다. 예방이 치료법으로 고려될 수 있기 때문에 치료 유효량은 "예방적 유효량"일 수 있다.

[0074] 뉴클레오타이드 서열과 참조 서열 사이의 퍼센트 "동일성"은, 필요하면, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 간극을 도입한 후, 참조 서열에서 단일 뉴클레오타이드에 동일한 뉴클레오타이드 서열에서의 단일 뉴클레오타이드의 백분율로 정의된다. 퍼센트 뉴클레오타이드 서열 동일성을 결정할 목적을 위한 정렬은, 예를 들어, 공공연하게 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA, 또는 MUSCLE 소프트웨어를 사용하여, 당업계의 기술 내에서 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 비교되어 지는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함한, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. BLAST 알고리즘에 대한 추가의 세부사항은 Mount, D. W. (2004). Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9을 참고한다.

[0075] 폴리펩타이드 서열과 참조 서열 사이의 퍼센트 "동일성"은, 필요하면, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 간극을 도입한 후, 참조 서열에서 아미노산 잔기에 동일한 폴리펩타이드 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정할 목적을 위한 정렬은, 예를 들어, 공공연하게 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA, 또는 MUSCLE 소프트웨어를 사용하여, 당업계의 기술 내에서 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 비교되어지는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함한, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. BLAST 알고리즘에 대한 추가의 세부사항은 Mount, D.

W. (2004). Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2nd ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9을 참고한다.

[0076] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로" 또는 "실질적인"은, *예를 들어,* 특정 공간에 독립체의 존재, 수준, 또는 농도, 또 다른 독립체에 대한 일 독립체의 효과, 또는 치료의 효과를 지칭한다. 예를 들어, 독립체의 활성, 수준 또는 농도는 기준선에 비하여 증가가 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 50-배, 100-배, 또는 1000-배인 경우 실질적으로 증가된다. 독립체의 활성, 수준 또는 농도는 기준선에 비하여 증가가 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 또는 500%인 경우 또한 실질적으로 증가된다.

[0077] 용어 "*생체내*"는 살아 있는 유기체에서 발생하는 과정을 지칭한다.

[0078] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "포유동물"은 인간 및 비-인간 포유동물 둘 모두를 포함한다.

[0079] 본원에서 사용된 약어는 하기를 포함한다: "mRNA"는 메신저 RNA를 지칭한다; "miRNA"는 마이크로RNA를 지칭한다; "siRNA"는 작은 간섭하는 RNA를 지칭한다; "안티센스 RNA"는 mRNA에 상보성이고, DNA 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있고 종종 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 "ASO"로 지칭되는 단일가닥 RNA를 지칭한다; "shRNA"는 작은 또는 짧은 헤어핀 RNA를 지칭한다; "lncRNA"는 긴 비-코딩 RNA를 지칭한다; 그리고 "dsDNA"는 이중가닥 DNA를 지칭한다.

[0080] **조성물**

[0081] 본 개시내용의 양태는 면역계를 조절할 수 있는 조성물을 포함한다. 본 조성물은 세포막을 포함하는 세포외 소포, 및 세포막과 관련되거나 막-결합 봉입된 부피 내에 봉입된 적어도 하나의 면역조절 구성요소를 포함한다. 막-결합 부피 내에 봉입은 전기천공, 동결건조를 포함하는 기술을 사용하거나, 생산자 세포 (예컨대, *예를 들어,* HEK293 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 및 간엽 줄기 세포 (MSC))의 조작을 통해 달성되어 면역조절 구성요소 예컨대 핵산 (ASO를 인코딩함) 또는 단백질을 인코딩하는 작제물을 도입할 수 있다. 세포막과의 회합은 멤브레인의 내부 또는 외부 지질 소엽에의 결합 및 지질 이중층 안으로 막관통 삽입을 포괄한다. 일부 경우에서 멤브레인 회합은 단백질 (*예를 들어,* 스캐폴드 단백질 또는 이의 단편) 예컨대, *예를 들어,* 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자 (PTGFRN); 바시긴 (BSG); 면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 2 (IGSF2); 면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 3 (IGSF3); 면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 8 (IGSF8); 인테그린 베타-1 (ITGB1); 인테그린 알파-4 (ITGA4); 4F2 세포-표면 항원 중쇄 (SLC3A2); 및 ATP 수송체 단백질의 부류 (스캐폴드 및 면역조절 구성요소를 포함하는 융합 단백질의 요소를 제공할 수 있는 (공유의 미국 특허 번호 10,195,290에서 기재된 바와 같은) 엑소좀의 표면 상에 고도로 농축되는 것으로 확인된 ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4를 사용하여 달성된다. 이러한 세포외 소포 및 예시적인 기술은, 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된, 공유의 미국 특허 번호 10,195,290에 상세히 기재되어 있다. 공유의 미국 특허 번호 10,195,290에 기재된 바와 같이, 표면-조작된 엑소좀은 엑소좀 또는 생산자 세포 안으로 이들 스캐폴드 단백질 (및 이의 단편)을 도입하기 위한 화학 및/또는 물리적 방법, 예컨대 PEG-유도된 융합 및/또는 초음파 융합에 의해 생성될 수 있다. 외인성 치료적 단백질과 스캐폴드 단백질 사이에 복합체가 생성될 수 있다. 대안적으로, 융합 단백질은 스캐폴드 단백질과 외인성 치료적 단백질, 예컨대, 예를 들어, 면역조절하는 단백질을 접합하고, 상기 언급된 화학 및/또는 물리적 방법을 사용하여, 표면 상에 복합체 또는 융합 단백질을 함유하는 조작된 엑소좀을 생성함에 의해 생산될 수 있다. 치료적 단백질의 천연 전장 또는 생물학적 활성 단편은 스캐폴드 단백질에 접합되어 짐에 의해 엑소좀의 표면으로 수송될 수 있다. 이러한 엑소좀은 또한 세포의 게놈 안으로 삽입된 외인성 서열을 포함하는 생산자 세포로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 인코딩하는 유전자 서열의 3' 또는 5' 말단에 위치한 게놈 부위 안으로 삽입될 수 있다. 예를 들어, 외인성 서열은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 또는 ATP 수송체를 인코딩하는 유전자 서열 안으로 삽입될 수 있다. 세포막과의 회합은 내부 또는 외부 멤브레인 표면에 면역조절 구성요소의 결합, 지질 이중층 내에 면역조절 구성요소의 고착, 또는 지질 이중층을 통한 면역조절 구성요소의 연장을 포괄한다. 면역조절 구성요소는 스캐폴드 단백질에 결박될 수 있거나, 또는 공유의 미국 특허 번호 10,195,290에 기재된 바와 같이 스캐폴드 단백질을 갖는 융합 단백질로 발현될 수 있다.

[0082] *세포외 소포*

[0083] 다양한 실시형태에서, 본 조성물은 세포외 소포를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 공유의 미국 특허 번호 10,195,290에 기재된 바와 같이 내부 공간을 둘러싸는 멤브레인을 포함한 세포-유래된 소포이다.

[0084] 다양한 실시형태에서, 세포외 소포는 그것이 유래되는 세포보다 더 작은 직경을 갖는 막-결합 소포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 약 20-1000 nm 사이, 예컨대 약 20-100 nm, 20-200 nm, 20-300 nm, 20-400 nm, 20-500 nm, 20-600 nm, 20-700 nm, 20-800 nm, 20-900 nm, 30-100 nm, 30-200 nm, 30-300 nm, 30-400 nm, 30-500 nm, 30-600 nm, 30-700 nm, 30-800 nm, 30-900 nm, 40-100 nm, 40-200 nm, 40-300 nm, 40-400 nm, 40-500 nm, 40-600 nm, 40-700 nm, 40-800 nm, 40-900 nm, 50-150 nm, 50-500 nm, 50-750 nm, 100-200 nm, 100-500 nm, 또는 500-1000 nm 사이의 최장 치수를 갖는다.

[0085] 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 엑소좀이다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 나노소포이다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 세포자멸체이다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 세포의 단편이다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 직접적 또는 간접적 조작에 의해 세포로부터 유래된 소포이다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 소포형성된 소기관이다. 다양한 실시형태에서, 세포외 소포는 살아 있는 세포에 의해 생산된 소포이다.

[0086] 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 살아 있는 유기체로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 죽은 유기체로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 외식된 조직으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 외식된 장기로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 배양 세포로부터 유래된다. 일부의 이들 실시형태에서, 세포외 소포가 세포 배양 시스템에서 생성될 때, 세포외 소포는 (*예를 들어,* 배양 세포로부터 세포외 소포를 분리함에 의해) 추가로 단리된다. 분리는 침강에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 세포외 소포는 0.5-2.0, 0.6-1.0, 0.7-1.0, 0.8-1.0, 0.9-1.0, 1.0-1.1, 1.1-1.2, 1.2-1.3, 1.4-1.5, 1.0-1.5, 1.5-2.0, 및 1.0-2.0 kg/㎥ 사이의 비밀도를 가질 수 있다. 분리는 또한 친화도 정제에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 세포외 소포는 세포외 소포를 포함하는 모집단을 수지에 결합시킴에 의해 정제될 수 있으며, 상기 수지는 세포외 소포의 표면 상의 하나 이상의 단백질에 대한 특이적 친화력을 갖는 복수의 리간드를 포함한다. 단백질은 테트라스파닌 (*예를 들어,* CD63, CD81, CD9), EWI 단백질/면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 (*예를 들어,* PTGFRN, IGSF8, IGSF3), 인테그린 (*예를 들어,* ITGB1, ITGA4), ATP 수송체 단백질 (*예를 들어,* ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), SLC3A2, BSG, 또는 CD98hc일 수 있다.

[0087] 다양한 실시형태에서, 세포외 소포는 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 당을 추가로 포함한다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[0088] 다양한 실시형태에서, 세포외 소포 멤브레인은 내측 표면 및 외측 표면을 포함하고 내부 공간을 둘러싼다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 적재물, 예컨대 본 명세서에서 기재된 바와 같은 면역조절 구성요소를 추가로 포함한다. 어떤 실시형태에서, 적재물은 내부 공간 내로 봉입된다. 어떤 실시형태에서, 적재물은 세포외 소포의 외부 표면 상에 표시된다. 어떤 실시형태에서, 적재물은 세포외 소포의 멤브레인에 걸쳐있다. 다양한 실시형태에서, 적재물은 핵산, 단백질, 탄수화물, 지질, 소분자, 및/또는 이들의 조합을 포함한다. 적재물을 갖는 세포외 소포를 생성하는 방법은 세포외 소포가 단리될 수 있는 생산자 세포의 전기천공, 동결건조, 및 유전공학을 포함한다. *예를 들어,* 공유의 미국 특허 번호 10,195,290 및 상동 참고. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 공유의 미국 특허 번호 10,195,290에서 기재된 바와 같이 장기, 조직, 또는 세포에 대해 특이적일 수 있는 리시버, 즉, 표적화 모이어티를 추가로 포함한다. 표적화 모이어티를 갖는 융합 단백질이 사용된다. 예를 들어, 융합 단백질은 PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, ATP 수송체, 또는 단편 또는 그것의 변이체, 및 표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 표적화 모이어티는 엑소좀을 사용한 치료에 대해 특이적 장기, 조직, 또는 세포에 엑소좀을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 항체 및 항원-결합 이의 단편은 전체의 항체, 다클론성, 단클론성 및 재조합 항체, 이의 단편을 포함하고, 추가로 단일-사슬 항체, 인간화된 항체, 쥣과 항체, 키메라, 마우스-인간, 마우스-영장류, 영장류-인간 단클론성 항체, 항-개체특이형 항체, 항체 단편, 예컨대, 예를 들어, scFv, (scFv) 2, Fab, Fab' 및 F(ab') 2, F(ab1) 2, Fv, dAb, 및 Fd 단편, 디아바디, 및 항체-관련된 폴리펩타이드를 포함한다. 항체 및 이의 항원-결합 단편은 또한 이들이 원하는 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 한 이중특이적 항체 및 다중특이적 항체를 포함한다.

[0089] 엑소좀

[0090] 다양한 실시형태에서, 세포외 소포는 엑소좀이다. 어떤 실시형태에서, 엑소좀은 생산자 세포에 의해 분비된 작은 막-결합 소포이다.

[0091] 일부 실시형태에서, 생산자 세포로부터 엑소좀은 약 20-300 nm 사이, 예컨대 약 20-290 nm, 20-280 nm, 20-270 nm, 20-260 nm, 20-250 nm, 20-240 nm, 20-230 nm, 20-220 nm, 20-210 nm, 20-200 nm, 20-190 nm, 20-180 nm, 20-170 nm, 20-160 nm, 20-150 nm, 20-140 nm, 20-130 nm, 20-120 nm, 20-110 nm, 20-100 nm, 20-90 nm, 20-

80 nm, 20-70 nm, 20-60 nm, 20-50 nm, 20-40 nm, 20-30 nm, 30-300 nm, 30-290 nm, 30-280 nm, 30-270 nm, 30-260 nm, 30-250 nm, 30-240 nm, 30-230 nm, 30-220 nm, 30-210 nm, 30-200 nm, 30-190 nm, 30-180 nm, 30-170 nm, 30-160 nm, 30-150 nm, 30-140 nm, 30-130 nm, 30-120 nm, 30-110 nm, 30-100 nm, 30-90 nm, 30-80 nm, 30-70 nm, 30-60 nm, 30-50 nm, 30-40 nm, 40-300 nm, 40-290 nm, 40-280 nm, 40-270 nm, 40-260 nm, 40-250 nm, 40-240 nm, 40-230 nm, 40-220 nm, 40-210 nm, 40-200 nm, 40-190 nm, 40-180 nm, 40-170 nm, 40-160 nm, 40-150 nm, 40-140 nm, 40-130 nm, 40-120 nm, 40-110 nm, 40-100 nm, 40-90 nm, 40-80 nm, 40-70 nm, 40-60 nm, 40-50 nm, 50-300 nm, 50-290 nm, 50-280 nm, 50-270 nm, 50-260 nm, 50-250 nm, 50-240 nm, 50-230 nm, 50-220 nm, 50-210 nm, 50-200 nm, 50-190 nm, 50-180 nm, 50-170 nm, 50-160 nm, 50-150 nm, 50-140 nm, 50-130 nm, 50-120 nm, 50-110 nm, 50-100 nm, 50-90 nm, 50-80 nm, 50-70 nm, 50-60 nm, 60-300 nm, 60-290 nm, 60-280 nm, 60-270 nm, 60-260 nm, 60-250 nm, 60-240 nm, 60-230 nm, 60-220 nm, 60-210 nm, 60-200 nm, 60-190 nm, 60-180 nm, 60-170 nm, 60-160 nm, 60-150 nm, 60-140 nm, 60-130 nm, 60-120 nm, 60-110 nm, 60-100 nm, 60-90 nm, 60-80 nm, 60-70 nm, 70-300 nm, 70-290 nm, 70-280 nm, 70-270 nm, 70-260 nm, 70-250 nm, 70-240 nm, 70-230 nm, 70-220 nm, 70-210 nm, 70-200 nm, 70-190 nm, 70-180 nm, 70-170 nm, 70-160 nm, 70-150 nm, 70-140 nm, 70-130 nm, 70-120 nm, 70-110 nm, 70-100 nm, 70-90 nm, 70-80 nm, 80-300 nm, 80-290 nm, 80-280 nm, 80-270 nm, 80-260 nm, 80-250 nm, 80-240 nm, 80-230 nm, 80-220 nm, 80-210 nm, 80-200 nm, 80-190 nm, 80-180 nm, 80-170 nm, 80-160 nm, 80-150 nm, 80-140 nm, 80-130 nm, 80-120 nm, 80-110 nm, 80-100 nm, 80-90 nm, 90-300 nm, 90-290 nm, 90-280 nm, 90-270 nm, 90-260 nm, 90-250 nm, 90-240 nm, 90-230 nm, 90-220 nm, 90-210 nm, 90-200 nm, 90-190 nm, 90-180 nm, 90-170 nm, 90-160 nm, 90-150 nm, 90-140 nm, 90-130 nm, 90-120 nm, 90-110 nm, 90-100 nm, 100-300 nm, 110-290 nm, 120-280 nm, 130-270 nm, 140-260 nm, 150-250 nm, 160-240 nm, 170-230 nm, 180-220 nm, 또는 190-210 nm 사이의 최장 치수를 갖는다.

[0092] 특히 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 생산자 세포로부터 엑소좀은 약 30-100 nm 사이의 최장 치수를 갖는다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 생산자 세포로부터 엑소좀은 약 20-300 nm 사이의 최장 치수를 갖는다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 생산자 세포로부터 엑소좀은 약 40-200 nm 사이의 최장 치수를 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 엑소좀의 모집단은 엑소좀의 90%가 20-300 nm 사이의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 엑소좀의 모집단은 엑소좀의 95%가 최장 치수 20-300 nm를 갖는 모집단을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 엑소좀의 모집단은 엑소좀의 99%가 최장 치수 20-300 nm를 갖는 모집단을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 엑소좀의 모집단은 엑소좀의 90%가 최장 치수 40-200 nm를 갖는 모집단을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 엑소좀의 모집단은 엑소좀의 95%가 최장 치수 40-200 nm를 갖는 모집단을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 엑소좀의 모집단은 엑소좀의 99%가 최장 치수 40-200 nm를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 엑소좀 또는 엑소좀의 모집단의 크기는 하기 기재된 방법에 따라 측정된다.

[0093] 일부 실시형태에서, 엑소좀은 생산자 세포에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, 엑소좀의 멤브레인은 생산자 세포로부터 유래된 하나 이상의 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소좀은 세포 배양 시스템으로부터 생성되고 (*예를 들어,* 생산자 세포로부터 엑소좀을 분리함에 의해) 단리된다. 분리는 침강에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 엑소좀은 0.5-2.0, 0.6-1.0, 0.7-1.0, 0.8-1.0, 0.9-1.0, 1.0-1.1, 1.1-1.2, 1.2-1.3, 1.4-1.5, 1.0-1.5, 1.5-2.0, 및 1.0-2.0 kg/㎥ 사이의 비밀도를 가질 수 있다. 분리는 또한 친화도 정제에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 세포외 소포는 세포외 소포를 포함하는 모집단을 수지에 결합시킴에 의해 정제될 수 있으며, 상기 수지는 세포외 소포의 표면 상의 하나 이상의 단백질에 대한 특이적 친화력을 갖는 복수의 리간드를 포함한다. 세포외 소포의 표면 상의 하나 이상의 단백질은 테트라스파닌 (*예를 들어,* CD63, CD81 및/또는 CD9), EWI 단백질/면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 (*예를 들어,* PTGFRN, IGSF8 및/또는 IGSF3), 인테그린 (*예를 들어,* ITGB1 및/또는 ITGA4), ATP 수송체 단백질 (*예를 들어,* ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 및/또는 ATP2B4), SLC3A2, BSG, 또는 CD98hc일 수 있다. 단백질은, 선택적으로 체크포인트 억제 활성과 함께, 원하는 약리적 활성, 예컨대, *예를 들어,* 항체, 항체 단편, scFv, 등을 갖는 폴리펩타이드 모이어티에 대한 융합을 통해, 엑소좀의 표면 상에 표시된 면역조절 구성요소로서 활성을 추가로 가질 수 있다. 이러한 항체는 당해 기술에 공지되어 있고, *예를 들어,* CTLA-4를 표적화하는 이필리무맙, PD-1을 표적화하는 니볼루맙 세미플리맙 및 펨브롤리주맙, 및 PD-L1을 각각 표적화하는 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙이다 (*예를 들어,* 본 명세서에 참고로 포함된, Pardoll DM (March 2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy". *Nature Reviews. Cancer*. 12 (4): 252-64을 참고한다.

[0094] 일부 실시형태에서, 엑소좀 멤브레인은 내측 표면 및 외측 표면을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 내측 표면은

엑소좀의 내부 코어에 면한다. 어떤 실시형태에서, 외측 표면은 생산자 세포 또는 표적 세포의 엔도좀, 다중소포체, 또는 멤브레인/세포질과 접촉할 수 있다.

[0095] 일부 실시형태에서, 엑소좀 멤브레인은 지질 및 지방산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소좀 멤브레인은 인지질, 당지질, 지방산, 스핑고지질, 포스포글리세라이드, 스테롤, 콜레스테롤, 및 포스파티딜세린을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지질 및 지방산은 표 1에 열거된 것들 중 하나 이상일 수 있다.

[0096] 어떤 실시형태에서, 엑소좀은 내부 소엽 및 외부 소엽으로 구성된 지질 이중층을 포함한다. 내부 및 외부 소엽의 조성은 당업계에서 알려진 횡이중층 분포 검정에 의해 결정될 수 있으며, *예를 들어,* Kuypers *et al.* Biohim Biophys Acta 1985 819:170을 참고한다. 일부 실시형태에서, 외부 소엽의 조성은 대략 70-90% 콜린 인지질, 대략 0-15% 산성 인지질, 및 대략 5-30% 포스파티딜에탄올아민이다. 일부 실시형태에서, 내부 소엽의 조성은 대략 15-40% 콜린 인지질, 대략 10-50% 산성 인지질, 및 대략 30-60% 포스파티딜에탄올아민이다.

[0097] 일부 실시형태에서, 엑소좀 멤브레인은 하나 이상의 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 실시형태에서, 엑소좀은 비제한적으로, 스펙트린, 미오신-유사 폴리펩타이드, 밴드 3, SLC4A1, 액틴, 액틴-유사 폴리펩타이드, 글리세르알데하이드 3-P 탈수소효소 (G3PD), 테트라스파닌 (*예를 들어,* CD63, CD81 및/또는 CD9), Alix 및 TSG101, 인테그린 (*예를 들어,* ITGB1 및/또는 ITGA4), 셀렉틴, CR1, TNFRI, 단백질분해 효소, 글리코실포스파티딜이노시톨 (GPI)-연결된 단백질 또는 히스톤, EWI 단백질/면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 (*예를 들어,* PTGFRN, IGSF8 및/또는 IGSF3), ATP 수송체 단백질 (*예를 들어,* ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 및/또는 ATP2B4), SLC3A2, BSG, 또는 CD98hc.)을 포함한, 목록으로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소좀은 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함한다.

[0098] 일부 실시형태에서, 엑소좀은 그것의 표면 상에 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소좀은 하나 이상의 폴리펩타이드를 함유하도록 변형된다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 하나 이상의 폴리펩타이드를 함유하도록 변형된다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 자연적으로 하나 이상의 폴리펩타이드를 함유하고 이로부터 유래된 엑소좀 또한 폴리펩타이드를 함유한다. 임의의 원하는 표면 마커의 수준은 (*예를 들어,* 복합체의 멤브레인에 삽입 또는 콘주게이션이 일어나도록 재조합으로 생산된 폴리펩타이드와 복합체를 접촉시킴에 의해) 엑소좀 상에서 직접적으로 변형될 수 있다. 대안적으로 또는 부가하여, 임의의 원하는 표면 마커의 수준은 (*예를 들어,* 세포의 멤브레인에 삽입 또는 콘주게이션이 일어나도록 재조합으로 생산된 폴리펩타이드와 복합체를 접촉시킴에 의해) 생산자 세포 상에서 직접적으로 변형될 수 있다. 대안적으로, 생산자 세포는 원하는 표면 마커를 발현하기 위해 생산자 세포 안으로 외인성 핵산을 형질도입함에 의해 변형될 수 있다. 표면 마커는 생산자 세포 상에 이미 자연적으로 존재할 수 있으며, 이 경우에 외인성 작제물은 생산자 세포 내 또는 그 위에 마커의 과발현 및 마커의 증가된 농도로 이어질 수 있다. 대안적으로, 자연적으로 발현된 표면 마커는 (*예를 들어,* 생산자 세포에서 유전자 사일런싱을 유도함에 의해) 생산자 세포로부터 제거될 수 있다. 폴리펩타이드는 엑소좀에 상이한 기능성 (*예를 들어,* 특정 표적화 능력, 전달 기능 (*예를 들어,* 융합 분자), 효소적 기능, *생체내* 증가된 또는 줄어든 반감기, 등)을 부여할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 CD47, CD55, CD49, CD40, CD133, CD59, 글리피칸-1, CD9, CD63, CD81, 인테그린, 셀렉틴, 렉틴, 및 카드헤린을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.

[0099] 특이적 실시형태에서, 엑소좀은 그것의 표면 상에 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 상기 폴리펩타이드는 (그것의 전체로 참고로 본 명세서에 포함된, 공유의 미국 특허 출원 62/550,543, 및 PCT/US2018/048026에 상세히 기재된) 엑소좀의 표면 상에 농축되는 것으로 최근에 확인된 단백질의 군으로부터 선택된다. 이 폴리펩타이드의 군은 프로스타글란딘 F2 수용체 음성 조절인자 (PTGFRN); 바시긴 (BSG); 면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 3 (IGSF3); 면역글로불린 슈퍼패밀리 일원 8 (IGSF8); 인테그린 베타-1 (ITGB1); 인테그린 알파-4 (ITGA4); 4F2 세포-표면 항원 중쇄 (SLC3A2); 및 ATP 수송체 단백질의 부류 (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4))를 포함한다.

[0100] 다양한 실시형태에서, 엑소좀 표면 상의 하나 이상의 폴리펩타이드는 항체 또는 항원-결합 단편을 포함한다. 항체 또는 항원-결합 단편은 천연 공급원으로부터 유래될 수 있거나, 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성으로 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 단클론성 항체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 단클론성 항체는 IgG 항체이다. 어떤 실시형태에서, 단클론성 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4이다. 일부 다른 실시형태에서, 항체는 다클론성 항체이다. 어떤 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(ab1)_2$, Fv, dAb, 및 Fd 단편으로부터 선택된다. 어떤 실시형태에서, 항원-결합 단편은 scFv 또는 $(scFv)_2$ 단

편이다. 특정 다른 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 Nanobody® (단일-도메인 항체)이다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다. 다양한 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 메소텔린에 결합한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 엑소좀은 그것의 표면 상에 (1) PTGFRN 또는 이의 단편 및 (2) 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함하며, 여기서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-1, PD-1L, CSF1-R, 또는 다른 면역조절 구성요소에 결합한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 엑소좀 멤브레인은 하나 이상의 다당류, 예컨대 글리칸을 추가로 포함한다.

[0103] 일부 실시형태에서, 엑소좀은 적재물 (치료제)을 표적에 전달한다. 적재물은 엑소좀과 접촉되는 표적 (*예를 들어,* 표적 세포) 상에 작용하는 치료제이다. 어떤 실시형태에서, 적재물은 면역조절 구성요소, 예를 들어, 억제성 RNA이다. 접촉은 *시험관내* 또는 대상체에서 일어날 수 있다. 엑소좀 및/또는 생산자 세포 안으로 도입될 수 있는 적재물은 치료제 예컨대, 뉴클레오타이드 (*예를 들어,* 검출가능 분체 또는 독소를 포함하는 뉴클레오타이드 또는 전사를 방해하는 뉴클레오타이드), 핵산 (*예를 들어,* miRNA, dsDNA, lncRNA, 또는 siRNA와 같이 조절 기능을 갖는 RNA 분자, 또는 효소와 같은 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 또는 mRNA 분자), 아미노산 (*예를 들어,* 번역을 방해하는 검출가능 분체 또는 독소를 포함하는 아미노산), 폴리펩타이드 (*예를 들어,* 효소), 지질, 탄수화물, 소분자 (*예를 들어,* 소분자 약물 및 독소), 및 이들의 조합을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 엑소좀은 1 초과 치료제를 전달한다. 어떤 실시형태에서, 치료제는 하나 이상의 표적 유전자를 억제하는 하나 이상의 핵산이다. 어떤 실시형태에서, 치료제는 항체 및 핵산을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 치료제는 핵산 및 소분자를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 치료제는 CSF1R 억제제, 예컨대 임상 후보 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, 및 IMC-CS4와 *예를 들어,* Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D (2017). "Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy". *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 5 (1): 53에 기재된 기타를 포함하고; *또한 하기를 참조한다: 예를 들어,* Patel S, Player MR (2009). "Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease". Curr Top Med Chem. 9: 599-610, 단클론성 항체이고 전이성 췌장 암에 대해 초기 임상시험 중에 있는 카비랄리주맙 (cabira; FPA-008) (카비랄리주맙의 I/II상 용량 증가 및 확장 연구 (cabira; FPA-008), 건활막 자이언트 세포 종양에서 항-CSF1R 항체 (TGCT, 착색된 융모결절성활막염 D-PVNS을 분산시킴(diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS); 진전된 암 또는 퍼진 암에서 그 자체에 의해 또는 니볼루맙과 함께 제공되는 카비랄리주맙의 연구(A Study of Cabiralzumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread); 및 신규 조합이 췌장암에서 유망한 반응을 보여준다 Nov 2017 참고) 어떤 실시형태에서, 치료제는 면역 관문 억제제를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 항체에서 면역 관문 억제제 예컨대, *예를 들어,* CTLA-4를 표적화하는, 이필리무맙, PD-1을 표적화하는 니볼루맙 세미플리맙 및 펨브롤리주맙, 및 각각 PD-L1을 표적화하는 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙

[0104] 엑소좀은 멤브레인 융합을 통해 표적 세포와 상호작용할 수 있고 엑소좀 조성물에서의 적재물 (예를 들어, 치료제)을 표적 세포의 표면 또는 세포질로 전달할 수 있다. 일부 실시형태에서, 멤브레인 융합은 표적 세포의 원형질막과 엑소좀 사이에 일어난다. 다른 실시형태에서, 멤브레인 융합은 표적 세포의 엔도좀 멤브레인과 엑소좀 사이에 일어난다.

[0105] 일부 실시형태에서, 엑소좀은 리시버 폴리펩타이드를 포함한다. 리시버 폴리펩타이드는 합성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 리시버 폴리펩타이드는 생산자 세포 (*예를 들어,* 리시버 폴리펩타이드를 인코딩하는 외인성 핵산은 생산자 세포 안으로 도입됨) 또는 (*예를 들어,* 단백질 발현 시스템에 의해 합성된) 생산자 세포 외측에 제조된 재조합 리시버 폴리펩타이드 안으로 도입된다. 일부 실시형태에서, 리시버 폴리펩타이드 (*예를 들어,* 재조합으로 생산된 폴리펩타이드)는 (*예를 들어,* 엑소좀이 생산자 세포로부터 단리된 후) 직접적으로 엑소좀 안으로 도입된다. 일부 실시형태에서, 리시버 폴리펩타이드는 엑소좀의 표면 상에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 리시버 폴리펩타이드는 엑소좀을 대상체의 순환계, 예컨대 혈액에서 순환하는 특정 표적 (*예를 들어,* 표적 예컨대 병원체, 대사물, 단백질, 폴리펩타이드 복합체 또는 세포 예컨대 비-기능 세포 또는 암 세포), 또는 조직 (예컨대 이환 조직)에 잔류하는 표적에 대해 표적화할 수 있다.

[0106] 일부 실시형태에서, 엑소좀은 합성이다. 다시 말해서 추가의 구성요소를 부가하기 위해 생산자 세포로부터 엑소좀의 회수 후 엑소좀에 변형이 이루어진다. 예를 들어, 엑소좀은 생산자 세포로부터 회수 시에 엑소좀에서 발견되지 않는 적재물, 예컨대, *예를 들어,* 치료적 폴리펩타이드, 핵산 (예컨대 DNA 또는 RNA) 또는 다른 폴리뉴클

레오타이드, 다당류 또는 글리칸, 지질 또는 지방산, 큰 생물학적, 소분자 또는 독소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소좀은 (*예를 들어,* 적재물을 도입하거나 또는 달리는 복합체의 함량을 변형시킴에 의해, 예컨대 멤브레인의 단백질, 지질 또는 글리칸 함량을 변화시킴에 의해) 변형된다. 예를 들어, 엑소좀은 생산자 세포로부터 먼저 단리되고 그 다음 원하는 대로 변형되며, 그것에 의해 합성 엑소좀을 생성한다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포가 변형된다. 예를 들어, 외인성 핵산, 외인성 폴리펩타이드 또는 소분자 또는 독소가 생산자 세포 안으로 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 부가하여, 생산자 세포는 달리는 (*예를 들어,* 세포 또는 멤브레인 함량을 변형시킴에 의해, 예컨대 세포막의 지질 또는 글리칸 함량을 변화시킴에 의해) 변형될 수 있다. 변형된 생산자 세포로부터 생성된 엑소좀은 생산자 세포의 변형 중 하나 이상을 포함한다. 본 과정은 합성 엑소좀을 생성한다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포 및 생산자 세포로부터 단리된 엑소좀 둘 모두가 본 명세서에서 기재된 바와 같이 변형된다.

[0107] 나노소포

[0108] 다양한 실시형태에서, 세포외 소포는 나노소포이다. 어떤 실시형태에서, 나노소포는 내부 공간을 둘러싸고, 나노소포가 조작 없이 세포에 의해 생산되지 않도록 직접적 또는 간접적 조작에 의해 세포로부터 생성된 멤브레인을 포함하는 세포-유래된 작은 소포이다. 세포의 적절한 조작은 연속 압출, 알칼리성 용액으로 처리, 초음파처리, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지 않고, 일부 경우에, 생산자 세포의 파괴를 초래할 수 있다.

[0109] 다양한 실시형태에서, 나노소포는 약 20-250 nm 사이, 예컨대 약 20-100 nm, 20-150 nm, 20-200 nm, 30-100 nm, 30-150 nm, 30-200 nm, 30-250 nm, 40-100 nm, 40-150 nm, 40-200 nm, 40-250 nm, 50-100 nm, 50-150 nm, 50-200 nm, 50-250 nm, 100-200 nm, 또는 150-250 nm 사이의 최장 치수를 갖는다.

[0110] 다양한 실시형태에서, 나노소포는 생산자 세포로부터 유래된다. 어떤 실시형태에서, 나노소포는 직접적 또는 간접적 조작에 의해 생산자 세포로부터 생성된다. 적절한 조작은 연속 압출, 알칼리성 용액으로 처리, 초음파처리, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일부의 이들 실시형태에서, 본 조작은 생산자 세포의 파괴를 초래할 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에서, 나노소포의 모집단은 원형질막으로부터 직접적인 발아 또는 후기 엔도좀과 원형질막의 융합의 방식에 의해 생산자 세포로부터 유래된 소포가 실질적으로 없다.

[0111] 일부 실시형태에서, 나노소포는 그것의 크기, 밀도, 생화학적 파라미터, 또는 이들의 조합에 기초하여 생산자 세포로부터 단리된다. 어떤 실시형태에서, 단리는 침강에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 나노소포는 0.5-2.0, 0.6-1.0, 0.7-1.0, 0.8-1.0, 0.9-1.0, 1.0-1.1, 1.1-1.2, 1.2-1.3, 1.4-1.5, 1.0-1.5, 1.5-2.0, 및 1.0-2.0 kg/㎥ 사이의 비밀도를 가질 수 있다.

[0112] 다양한 실시형태에서, 나노소포는 지질 또는 지방산 및 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 나노소포는 당을 추가로 포함한다. 어떤 실시형태에서, 나노소포는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노소포는 리시버를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노소포는 적재물을 추가로 포함한다. 일부의 이들 실시형태에서, 적재물은 핵산, 단백질, 탄수화물, 지질, 소분자, 및/또는 이들의 조합을 포함한다.

[0113] *면역조절 구성요소*

[0114] 일 양태에서, 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀은 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 적어도 하나의 면역조절 구성요소를 포함한다. 양태에서 M2로부터 M1 표현형으로의 증가는 M2 대식세포의 모집단을 포함하는 참조 샘플에 관하여 평가된다. 양태에서 본 개시내용의 세포외 소포에 의해 달성된 증가는 면역조절 구성요소 단독의 등몰 양에 의해 달성된 것보다 크거나 동등하다. 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 대식세포 분극화를 증가시키는 폴리뉴클레오타이드이다. 어떤 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 유전자, 예컨대, *예를 들어,* 원발종양유전자 및 다른 유형의 유전자를 억제하는 핵산이며, 그것의 억제는 예로써, 그러나 비제한적으로, 하기 유전자: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 및 PKM2를 포함하는, M2로부터 M1 표현형으로의 증가된 분극화를 촉진한다. 어떤 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 및 단백질성 면역조절 구성요소의 조합이 고려되며, 이는 PD-1, PD-L1, CTLA-4를 표적화하는 단백질성 면역조절 구성요소 예컨대, *예를 들어,* 항체 또는 항체 단편 (예컨대, *예를 들어,* CTLA-4를 표적화하는, 이필리무맙, PD-1을 표적화하는 니볼루맙 세미플리맙 및 펨브롤리주맙, 및 PD-L1을 각각 표적화하는 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙), CSF1R 억제제 (예컨대, *예를 들어,* 예컨대 임상 후보 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527,

BLZ945, 에막투주맙, AMG820, 및 IMC-CS4 및 *예를 들어,* Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, RÜttinger D (2017). "Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy". *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 5 (1): 53에 기재된 기타를 포함하며; *또한 하기를 참조한다: 예를 들어,* Patel S, Player MR (2009). "Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease". Curr Top Med Chem. 9: 599-610, 단클론성 항체이고 전이성 췌장 암에 대해 초기 임상시험 중에 있는 카비랄리주맙 (cabira; FPA-008) (카비랄리주맙의 I/II상 용량 증가 및 확장 연구 (cabira; FPA-008), 건활막 자이언트 세포 종양에서 항-CSF1R 항체 (TGCT, 착색된 융모결절성활막염 D-PVNS을 분산시킴(diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS); 진전된 암 또는 퍼진 암에서 그 자체에 의해 또는 니볼루맙과 함께 제공되는 카비랄리주맙의 연구(A Study of Cabiralzumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread); 및 신규 조합이 췌장암에서 유망한 반응을 보여준다 Nov 2017 참고, 및 암과 염증성 병태의 치료에 유용한 다른 면역조절 구성요소.

[0115] 일부의 이들 실시형태에서, 핵산은, 비제한적으로, mRNA, miRNA, siRNA, 안티센스 RNA, shRNA, lncRNA, 및 dsDNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 RNA (*예를 들어,* mRNA, miRNA, siRNA, 안티센스 RNA, shRNA, 또는 lncRNA)이다. 일부의 이들 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드가 mRNA일 때, 이것은 원하는 폴리펩타이드로 번역될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 마이크로RNA (miRNA), pri-miRNA, 또는 pre-miRNA 분자이다. 일부의 이들 실시형태에서, miRNA는 miRNA 분자가 표적 세포에서 천연 mRNA를 침묵시킬 수 있도록 표적 세포의 세포질에 전달된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 종양유전자 또는 다른 조절장애 폴리펩타이드의 발현을 방해할 수 있는 작은 간섭하는 RNA (siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)이다. 일부의 이들 실시형태에서, siRNA는 상기 siRNA 분자가 표적 세포에서 천연 mRNA를 침묵시킬 수 있도록 표적 세포의 세포질에 전달된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 mRNA에 상보성인 안티센스 RNA이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 유전자 발현을 조정하고 질환을 조절할 수 있는 긴 비-코딩 RNA (lncRNA)이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 다양한 실시형태에서, ASO는 단일-가닥 또는 이중-가닥 DNA, RNA, 또는 DNA/RNA 하이브리드이다. *예를 들어,* 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된, Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997 *참고.*

[0116] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 RNA로 전사될 수 있는 DNA이다. 일부의 이들 실시형태에서, 전사된 RNA는 원하는 폴리펩타이드로 번역될 수 있다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 글루타미나제, 및 PKM2로 구성되는 적어도 하나의 유전자를 억제한다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kγ, KRAS, 및 HIF1-알파로 구성되는 적어도 하나의 유전자를 억제한다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 글루타미나제, 및 PKM2로 구성되는 적어도 하나의 유전자를 억제하는 억제성 RNA이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kγ, KRAS, 및 HIF1-알파로 구성되는 적어도 하나의 유전자를 억제하는 억제성 RNA이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, CEBP/β, Pi3Kγ, 글루타미나제, 및 PKM2로 구성되는 적어도 하나의 유전자를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Kγ, KRAS, 및 HIF1-알파로 구성되는 적어도 하나의 유전자를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 인간 KRAS 원종양유전자를 억제한다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 인간 KRAS 원종양유전자를 억제하는 억제성 RNA이다. 어떤 실시형태에서, 핵산은 STAT3을 억제한다.

[0117] 본 발명의 일부 실시형태에서, 핵산은 알려진 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이고, 그것의 예는 표 0에 열거되어 있다. 어떤 실시형태에서 ASO는 알려진 ASO, 예를 들어, 표 0에 열거된 것들에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서 ASO는 STAT3을 억제한다. 다양한 실시형태에서, ASO는 TAAGCTGATAATTCAACTCA (서열번호:1)에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 91% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 92% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 93% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 94% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 96% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번

호:1에 적어도 97% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1에 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:1의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 MOE, O-메틸, 또는 LNA 화학특징에 의해 변형된다. 일부 실시형태에서, ASO는 5' 또는 3' 말단에 콜레스테롤 태그를 추가로 포함한다.

[0118] 일부 실시형태에서, 핵산은 STAT6을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 다양한 실시형태에서, ASO는 TGAGCGAATGGACAGGTCTT (서열번호:2)에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 91% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 92% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 93% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 94% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 96% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 97% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2에 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:2의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 MOE, O-메틸, 또는 LNA 화학특징에 의해 변형된다. 일부 실시형태에서, ASO는 5' 또는 3' 말단에 콜레스테롤 태그를 추가로 포함한다.

[0119] 일부 실시형태에서, 핵산은 CebpB을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 다양한 실시형태에서, ASO는 TGGATTTAAAGGCAGGCGGC (서열번호:3)에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 91% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 92% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 93% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 94% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 96% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 97% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3에 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:3의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 MOE, O-메틸, 또는 LNA 화학특징에 의해 변형된다. 일부 실시형태에서, ASO는 5' 또는 3' 말단에 콜레스테롤 태그를 추가로 포함한다.

[0120] 일부 실시형태에서, 핵산은 Pi3Kγ를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 다양한 실시형태에서, ASO는 TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA (서열번호:4)에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 91% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 92% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 93% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 94% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 96% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 97% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4에 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:4의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 MOE, O-메틸, 또는 LNA 화학특징에 의해 변형된다. 일부 실시형태에서, ASO는 5' 또는 3' 말단에 콜레스테롤 태그를 추가로 포함한다.

[0121] 일부 실시형태에서, 핵산은 HIF1α를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 다양한 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 91% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 92% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 93% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 94% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 96% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 97% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 MOE, O-메틸, 또는 LNA 화학특징에 의해 변형된다. 일부 실시형태에서, ASO는 5' 또는 3' 말단에 콜레스테롤 태그를 추가로 포함한다.

[0122] 일부 실시형태에서, 핵산은 HIF1α를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 다양한 실시형태에서, ASO는 GTGCAGTATTGTAGCCAGGC (서열번호:5)에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 91% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 92% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 93% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 94% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 96% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 97% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5에 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:5의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 MOE, O-메틸, 또는 LNA 화학특징에 의해 변형된다. 일부 실시형태에서, ASO는 5' 또는 3' 말단에 콜레스테롤 태그를 추가로 포함한다.

[0123] 일부 실시형태에서, 핵산은 Kras를 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 다양한 실시형태에서, ASO는 GTAGCATGTAAATATAGCCC (서열번호:6)에 적어도 90% 내지 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 91% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 92% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 93% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 94% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 96% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 97% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6에 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 어떤 실시형태에서, ASO는 서열번호:6의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ASO는 MOE, O-메틸, 또는 LNA 화학특징에 의해 변형된다. 일부 실시형태에서, ASO는 5' 또는 3' 말단에 콜레스테롤 태그를 추가로 포함한다.

[0124] 어떤 실시형태에서, 본 조성물은 세포외 소포, 예를 들어, 대식세포 분극화를 촉진하는 것으로 알려진 소분자, 항체 또는 항체 단편인 부가의 면역조절 구성요소를 더 포함하는 엑소좀을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 집락 자극 인자 1 수용체 (CSF1R) 억제제이다.

[0125] 어떤 실시형태에서, 본 조성물은 항종양 활성을 갖는 부가의 면역조절 구성요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 선천적 면역 반응을 조절한다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 천연 살해 세포를 표적화한다. 일부 다른 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 순응성 면역 반응을 조절한다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 세포독성 T 세포를 표적화한다.

[0126] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 세포외 소포의 표면 상에 위치된다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 세포외 소포의 외부에 위치된다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 세포외 소포의 표면 상과 내부 둘 모두에 위치된다.

[0127] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 그것의 전장 형태로 생산자 세포에서 발현된다. 다른 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 엑소좀 표면 단백질에 대한 번역 융합 단백질로 발현되어, 엑소좀의 표면 상에 면역조절하는 화합물의 생물학적으로 활성부의 더 높은 발현 수준을 초래한다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절하는 화합물은 엑소좀 표면 단백질에 대한 번역 융합 단백질로 발현된 가용성 단백질로서, 상기 가용성 단백질은 엑소좀의 표면 상에 유지되도록 된다.

[0128] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 음성 체크포인트 조절인자, 예컨대, *예를 들어,* A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, TIM-3, VISTA, SIGLEC7 (CD328) 및 SIGLEC9 (CD329)에 대한 억제제이다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 음성 체크포인트 조절인자, 예컨대, *예를 들어,* PD-L1 및 PD-L2의 결합 파트너에 대한 억제제이다.

[0129] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 세포독성 T-림프구-연관 단백질 4 (CTLA-4)의 억제제이다. 일부의 이들 실시형태에서, CTLA-4 억제제는 CTLA-4의 단클론성 항체이다. 어떤 실시형태에서, 억제제는 CTLA-4의 단클론성 항체의 단편이다. 어떤 실시형태에서, 항체 단편은 CTLA-4의 단클론성 항체의 scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(abl)_2$, Fv, dAb, 또는 Fd이다. 어떤 실시형태에서, 억제제는 CTLA-4에 대한 나노바디, 이

중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체이다. 일부 특이적 실시형태에서, 단클론성 항체는 이필리무맙이다. 일부 특이적 실시형태에서, 단클론성 항체는 트레멜리무맙이다.

[0130] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 프로그래밍된 세포사 단백질 1 (PD-1)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 프로그래밍된 사망-리간드 1 (PD-L1)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 프로그래밍된 사망-리간드 2 (PD-L2)의 억제제이다. 일부 실시형태에서, PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2의 억제제는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2의 단클론성 항체이다. 어떤 실시형태에서, 억제제는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2의 단클론성 항체의 단편이다. 어떤 실시형태에서, 항체 단편은 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2의 단클론성 항체의 scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(ab1)_2$, Fv, dAb, 또는 Fd이다. 어떤 실시형태에서, 억제제는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 대한 나노바디, 이중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체이다. 일부 특이적 실시형태에서, 단클론성 항체는 니볼루맙이다. 일부 특이적 실시형태에서, 단클론성 항체는 펨브롤리주맙이다. 일부 특이적 실시형태에서, 단클론성 항체는 피딜리주맙이다. 일부 특이적 실시형태에서, 단클론성 항체는 아테졸리주맙이다. 일부 특이적 실시형태에서, 단클론성 항체는 아벨루맙이다.

[0131] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 림프구-활성화된 유전자 3 (LAG3)의 억제제이다. 일부의 이들 실시형태에서, LAG3의 억제제는 LAG3의 단클론성 항체, 예컨대, *예를 들어,* BMS-986016이다 (ClinicalTrials.gov에서의 명칭 "Safety Study of Anti-LAG-3 With and Without Anti-PD-1 in the Treatment of Solid Tumors"에 대한 임상시험 번호 NCT01968109 참고).

[0132] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 T-세포 면역글로불린 뮤신-함유 단백질 3 (TIM-3)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 B 및 T 림프구 감쇠기 (BTLA)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제 (VISTA)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 아데노신 A2a 수용체 (A2aR)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 살해 세포 면역글로불린 유사 수용체 (KIR)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 인돌아민 2,3-디옥시게나제 (IDO)의 억제제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CD20, CD39, 또는 CD73의 억제제이다.

[0133] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 양성 공통자극 분자에 대한 활성제이다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 양성 공통자극 분자의 결합 파트너에 대한 활성제이다.

[0134] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 TNF 수용체 슈퍼패밀리 일원, 예컨대 효능적 항체 또는 천연 리간드 또는 TNF 수용체 슈퍼패밀리 일원의 활성제이다. 어떤 실시형태에서, TNF 수용체 슈퍼패밀리 일원은 CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, Fas 수용체, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, TWEAK 수용체, TACI, BAFF 수용체, ATAR, CD271, CD269, GITR, TROY, CD358, TRAMP, 및 XEDAR로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 TNF 슈퍼패밀리 일원이다. 어떤 실시형태에서, TNF 슈퍼패밀리 일원은 TNFα, TNF-C, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, 4-1BB 리간드, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, GITR 리간드, 및 EDA-2로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0135] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 TNF 수용체 슈퍼패밀리 일원 4 (OX40)의 활성제이다. 일부의 이들 실시형태에서, OX40의 활성제는 OX40의 효능제 항체이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, OX40의 활성제는 OX40 리간드 (OX40L)이다.

[0136] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CD27의 활성제이다. 일부의 이들 실시형태에서, CD27의 활성제는 CD27의 효능제 항체이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, CD27의 활성제는 CD27 리간드 (CD27L)이다.

[0137] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CD40의 활성제이다. 일부의 이들 실시형태에서, CD40의 활성제는 CD40의 효능제 항체이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, CD40의 활성제는 CD40 리간드 (CD40L)이다.

[0138] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련된 단백질 (GITR)의 활성제이다. 일부의 이들 실시형태에서, GITR의 활성제는 GITR의 효능제 항체이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, GITR의 활성제는 GITR의 천연 리간드이다.

[0139] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 4-1BB의 활성제이다. 일부의 이들 실시형태에서, 4-1BB의 활성제는 4-1BB의 효능제 항체이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, 4-1BB의 활성제는 4-1BB의 천연 리간드이다.

[0140] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 Fas 수용체 (Fas)이다. 일부의 이들 실시형태에서, Fas 수용체는 세포외 소포의 표면 상에 표시된다. 일부 다른 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 Fas 리간드 (FasL)이다. 일부의 이들 실시형태에서, Fas 리간드는 세포외 소포의 표면 상에 표시된다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 Fas 수용체의 항체이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 Fas 리간드의 항체이다.

[0141] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CD28-상과 공통자극 분자의 활성제이다. 어떤 실시형태에서, CD28-상과 공통자극 분자는 ICOS 또는 CD28이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 ICOSL, CD80, 또는 CD86이다.

[0142] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 유도성 T 세포 공동자극인자 (ICOS)의 활성제이다. 일부의 이들 실시형태에서, ICOS의 활성제는 ICOS의 효능제 항체이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, ICOS의 활성제는 ICOS 리간드 (ICOSL)이다.

[0143] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CD28의 활성제이다. 일부의 이들 실시형태에서, CD28의 활성제는 CD28의 효능제 항체이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, CD28의 활성제는 CD28의 천연 리간드이다. 어떤 실시형태에서, CD28의 리간드는 CD80이다.

[0144] 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 사이토카인이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 엑소좀 표면 단백질 또는 이의 단편에 번역적으로 융합된 가용성 사이토카인이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-2이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-7이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-12이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-15이다.

[0145] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 T-세포 수용체 (TCR) 또는 이의 유도체이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 TCR α-사슬 또는 이의 유도체이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 TCR β-사슬 또는 이의 유도체이다. 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 T-세포 또는 이의 유도체의 공동-수용체이다.

[0146] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 종양 항원이다. 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 알파-태아단백 (AFP), 암종배아 항원 (CEA), 상피 종양 항원 (ETA), 뮤신 1 (MUC1), Tn-MUC1, 뮤신 16 (MUC16), 티로시나제, 흑색종-관련된 항원 (MAGE), 종양 단백질 p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, 프로그래밍된 사망 리간드 1 (PD-L1), 프로그래밍된 사망 리간드 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, 메소텔린, VEGFR, 알파-엽산 수용체, CE7R, IL-3, 암-고환 항원, MART-1 gp100, 및 TNF-관련된 세포자멸사-유도 리간드로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0147] 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 암종배아 항원 (CEA)이다. 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 상피 종양 항원 (ETA)이다.

[0148] 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 뮤신이다. 일부의 이들 실시형태에서, 뮤신은 분비된 뮤신이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, 뮤신은 막관통 뮤신이다. 특이적 실시형태에서, 종양 항원은 뮤신 1 (MUC1)이다. 특이적 실시형태에서, 종양 항원은 Tn-MUC1이다. 특이적 실시형태에서, 종양 항원은 뮤신 16 (MUC16)이다.

[0149] 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 흑색종-관련된 항원 (MAGE)이다. 일부의 이들 실시형태에서, MAGE는 유형-I MAGE이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, MAGE는 유형-II MAGE이다. 특이적 실시형태에서, 유형-I MAGE는 MAGE-A2이다. 특이적 실시형태에서, 유형-I MAGE는 MAGE-A4이다.

[0150] 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 알파-태아단백 (AFP)이다. 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 종양 단백질 p53 (p53)이다. 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 티로시나제이다. 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 티로시나제-관련된 단백질 (TRP)이다. 일부 실시형태에서, 종양 항원은 프로그래밍된 사망 리간드 1 (PD-L1) 또는 프로그래밍된 사망 리간드 2 (PD-L2)이다. 다양한 실시형태에서, 종양 항원은 CD4, CD8, CD45, CD80, 및 CD86으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0151] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 이의 유도체이다. 일부 실시형태에서, CAR은 알파-태아단백 (AFP), 암종배아 항원 (CEA), 상피 종양 항원 (ETA), 뮤신 1 (MUC1), Tn-MUC1, 뮤신 16 (MUC16), 티로시나제, 흑색종-관련된 항원 (MAGE), 종양 단백질 p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, 프로그래밍된 사망 리간드 1 (PD-L1), 프로그래밍된 사망 리간드 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, 메소텔린, VEGFR, 알파-엽산 수용체, CE7R, IL-3, 암-고환 항원, MART-1 gp100, 및 TNF-관련된 세

포자멸사-유도 리간드 중 하나 이상에 결합한다.

[0152] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 T-세포 수용체 또는 공동-수용체의 활성제이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CD3의 활성제이다. 어떤 실시형태에서, 활성제는 CD3의 단클론성 항체의 단편이다. 어떤 실시형태에서, 항체 단편은 CD3의 단클론성 항체의 scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(ab1)_2$, Fv, dAb, 또는 Fd이다. 어떤 실시형태에서, 활성제는 CD3에 대한 나노바디, 이중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체이다. 어떤 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CD28의 활성제이다. 어떤 실시형태에서, 활성제는 CD28의 단클론성 항체의 단편이다. 어떤 실시형태에서, 항체 단편은 CD28의 단클론성 항체의 scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(ab1)_2$, Fv, dAb, 또는 Fd이다. 어떤 실시형태에서, 활성제는 CD28에 대한 나노바디, 이중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체이다.

[0153] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 주조직 적합성 복합체 (MHC) 또는 이의 유도체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 MHC 부류 I 또는 이의 유도체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 MHC 부류 II 또는 이의 유도체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 MHC 부류 III 또는 이의 유도체이다.

[0154] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 인간 백혈구 항원 (HLA) 또는 이의 유도체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, 또는 이의 유도체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 HLA-E, HLA-F, HLA-G, 또는 이의 유도체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, 또는 이의 유도체이다.

[0155] 다양한 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 다당류, 지질, 소분자, 또는 독소일 수 있다.

[0156] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 단백질, 펩타이드, 당지질, 또는 당단백질일 수 있다.

[0157] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 효능제이다. 일부의 이들 실시형태에서, 효능제는 내인성 효능제, 예컨대 호르몬, 또는 신경전달물질이다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, 효능제는 외인성 효능제, 예컨대 약물이다. 일부 실시형태에서, 효능제는 수용체에 결합함이 없이 효능제 반응을 생성할 수 있는 물리적 효능제이다. 일부 실시형태에서, 효능제는 내인성 효능제보다 더 큰 최대 반응을 생산할 수 있는 초효능제이다. 어떤 실시형태에서, 효능제는 수용체에서 전체 효능을 갖는 전체 효능제이다. 특정 다른 실시형태에서, 효능제는 전체 효능제에 비하여 수용체에서 부분적인 효능만을 갖는 부분적인 효능제이다. 일부 실시형태에서, 효능제는 수용체의 구성적 활성을 억제할 수 있는 역효능제이다. 일부 실시형태에서, 효능제는 수용체에 대해 효과를 생성하는 다른 공동-효능제와 함께 작용하는 공동-효능제이다. 어떤 실시형태에서, 효능제는 공유결합의 형성을 통해 수용체에 영구적으로 결합하는 비가역 효능제이다. 어떤 실시형태에서, 효능제는 특정 유형의 수용체에 대한 선택적 효능제이다.

[0158] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 길항제이다. 일부의 이들 실시형태에서, 길항제는 수용체를 활성화시킴이 없이 내인성 리간드 또는 효능제와 동일한 결합 부위에서 수용체에 가역적으로 결합하는 경쟁적 길항제이다. 경쟁적 길항제는 최대 반응을 달성하는데 필요한 효능제의 양에 영향을 미칠 수 있다. 이들의 일부 다른 실시형태에서, 길항제는 수용체의 활성 부위 또는 수용체의 알로스테릭 부위에 결합하는 비-경쟁적 길항제이다. 비-경쟁적 길항제는 임의의 양의 효능제에 의해 획득될 수 있는 최대 반응의 규모를 감소시킬 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, 길항제는 별개의 알로스테릭 결합 부위에 대한 그것의 결합 전에 효능제에 의해 수용체 활성화를 필요로 하는 비경쟁적 길항제이다.

[0159] 다양한 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 항체 또는 항원-결합 단편을 포함한다. 면역조절 구성요소는 전장 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 천연 공급원으로부터 유래될 수 있거나, 부분적으로 또는 전체적으로 합성으로 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 단클론성 항체이다. 일부의 이들 실시형태에서, 단클론성 항체는 IgG 항체이다. 어떤 실시형태에서, 단클론성 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4이다. 일부 다른 실시형태에서, 항체는 다클론성 항체이다. 어떤 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$, $F(ab1)_2$, Fv, dAb, 및 Fd 단편으로부터 선택된다. 어떤 실시형태에서, 항원-결합 단편은 scFv 또는 $(scFv)_2$ 단편이다. 특정 다른 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 Nanobody® (단일-도메인 항체)이다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다.

[0160] 다양한 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 완전 인간이다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 키메라이다. 일부의 이들 실시형태에서, 키메라 항체는 비-인간 V 영역 도메인 및 인간 C 영역 도메인을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 비-인간, 예컨대 쥣과 또는 수의과이다.

[0161] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 단백질, 펩타이드, 당지질, 또는 당단백질이다.

[0162] 다양한 실시형태에서, 본 조성물은 원자, 분자, 등의 혼합물, 융합, 조합 및 콘주게이트를 비롯한, 2 또는 그 초과의 상기 언급된 면역조절 구성요소를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 본 조성물은 폴리펩타이드와 조합된 핵산을 포함한다. 어떤 실시형태에서, 본 조성물은 서로에 대해서 접합된 2 또는 그 초과의 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 본 조성물은 생물학적 활성 분자에 접합된 단백질을 포함한다. 일부의 이들 실시형태에서, 생물학적 활성 분자는 전구약물이다.

[0163] *약제학적 조성물*

[0164] 약제학적 조성물은 일반적으로 대상체에게 투여에 대해 적합한 형태로 복수의 세포외 소포 및 약제학적으로-허용가능한 부형제 또는 담체를 포함한다. 약제학적으로-허용가능한 부형제 또는 캐리어는 투여되는 특정한 조성물뿐만 아니라 조성물을 투여하기 위해 사용된 특정한 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 복수의 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물의 다양한 적합한 제형이 있다. (예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21st ed. (2005) 참고). 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균되고 미국 식품 의약품국의 모든 양호한 제작 실시 (GMP) 규정을 완전히 준수하여 제형화된다.

[0165] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에서 기재된 하나 이상의 치료제 및 세포외 소포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 하나 이상의 별개의 치료제와 공동-투여되고, 여기서 공동-투여는 세포외 소포의 투여 전, 후 또는 동반하여 별개의 치료제의 투여를 포함한다.

[0166] 약제학적으로-허용가능한 부형제는 수의적 용도뿐만 아니라 인간의 약제학적 용도에도 허용가능한 부형제를 포함하여 일반적으로 안전하고, 무독성이고 바람직한 부형제를 포함한다.

[0167] 캐리어 또는 희석제의 예는 물, 염수, 링거액, 덱스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 약제학적으로 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 화합물의 사용은 당해 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 배지 또는 화합물이 본 명세서에 기재된 세포외 소포와 양립불가능한 경우를 제외하고, 조성물에서의 이의 사용이 고려된다. 보충 치료제가 또한 조성물에 포함될 수 있다. 전형적으로, 약제학적 조성물은 그것의 의도된 투여 경로와 양립가능하게 되도록 제형화된다. 세포외 소포는 비경구, 국소, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 진피내, 경피, 직장, 두개내, 복강내, 비강내, 근육내 경로에 의하거나 흡입제로 투여될 수 있다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물은 정맥내로, *예를 들어,* 주입으로 투여된다. 세포외 소포는 선택적으로 세포외 소포가 의도되는 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 적어도 부분적으로 효과적인 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0168] 용액 또는 현탁액은 하기 구성요소를 포함할 수 있다: 멸균 희석제 예컨대 물, 염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항균 화합물 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 산화방지제 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이트 화합물 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA); 완충액 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 긴장성의 조정을 위한 화합물 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조정될 수 있다. 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제작된 앰풀, 일회용 주사기 또는 다중 용량 바이알에 봉입될 수 있다.

[0169] 주입가능 사용에 대해 적합한 약제학적 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산물 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 캐리어는 생리적 염수, 정균 물, 크레모포어(Cremophor) EL™ (BASF, 뉴저지 주 파시파니 소재) 또는 포스페이트 완충 식염수 (PBS)를 포함한다. 본 조성물은 일반적으로 용이한 주사능이 존재하는 정도로 멸균되고 유동적이다. 담체는, *예를 들어,* 물, 에탄올, 폴리올 (*예를 들어,* 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 기타 동종의 것), 및 적합한 이들의 혼합물을 함유한 용매 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유체성은, *예를 들어,* 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균 화합물, *예를 들어,* 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살, 및 기타 동종의 것에 의해 달성될 수 있다. 원한다면, 등장성 화합물, *예를 들어,* 당, 폴리알코올 예컨대 만니톨, 소르비톨, 및 염화나트륨이 조성물에 첨가될 수 있다. 주입가능 조성물의 장기적인 흡수는 흡수를 지연시키는 화합물, *예를 들어,* 알루미늄 모노스테아레

이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴에 의해 초래될 수 있다.

[0170] 멸균 주입가능 용액은 세포외 소포를 유효량으로, 원하는 대로 본 명세서에서 열거된 성분 중 하나 또는 조합을 갖는 적절한 용매에 혼입함에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 세포외 소포를 염기성 분산매 및 임의의 원하는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입함에 의해 제조된다. 멸균 주입가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 활성 성분의 분말 플러스 이의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 원하는 성분을 생성하는 진공 건조 및 냉동-건조이다. 세포외 소포는 세포외 소포의 지속 또는 맥동성 방출을 허용하는 방식으로 제형화될 수 있는 데포 주사 또는 이식 제제의 형태로 투여될 수 있다.

[0171] 세포외 소포를 포함하는 조성물의 전신 투여는 또한 경점막 수단에 의해 이루어질 수 있다. 경점막 투여를 위해, 침투될 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 그와 같은 침투제는 당업계에 일반적으로 공지되어 있고, *예를 들어*, 경점막 투여를 위한, 세제, 담즙산염 및 후시딘산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는, *예를 들어*, 비강 스프레이의 사용을 통해 달성될 수 있다.

[0172] 어떤 실시형태에서 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물은 약제학적 조성물로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체에게 정맥내로 투여된다. 특정 다른 실시형태에서, 본 조성물은, *예를 들어*, 림프내 주입 또는 결절내 주입에 의해 (*예를 들어*, Senti *et al*., PNAS 105(46): 17908 (2008) 참고), 또는 근육내 주입에 의해, 피하 투여에 의해, 가슴샘, 또는 간으로 직접적인 주입에 의해 림프계에 투여된다.

[0173] 어떤 실시형태에서, 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물은 액체 현탁액으로 투여된다. 어떤 실시형태에서, 약제학적 조성물은 투여에 이어서 데포를 형성할 수 있는 제형으로 투여된다. 특정 바람직한 실시형태에서, 데포는 세포외 소포를 순환으로 느리게 방출하거나, 또는 데포 형태에 남아 있다.

[0174] 전형적으로, 약제학적으로-허용가능한 조성물은 오염물질이 없도록 고도로 정제되고, 생체적합성이고 독성이 없고, 그리고 대상체에게 투여하기에 적합하다. 물이 담체의 구성성분인 경우, 물은 고도로 정제되고 오염 물질, *예를 들어*, 내독소가 없도록 처리된다.

[0175] 약제학적으로-허용가능한 담체는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아검, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 실리케이트, 마이크로-결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 탈크, 스테아르산마그네슘, 및/또는 광유일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 약제학적 조성물은 추가로 윤활제, 습윤제, 감미제, 풍미 증강제, 유화제, 현탁화제, 및/또는 보존제를 포함할 수 있다.

[0176] 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 및 선택적으로 약제학적으로 활성제 또는 치료제를 포함한다. 치료제는 생물 제제, 소분자 제제, 또는 핵산 제제일 수 있다.

[0177] 본 명세서에 기재된 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물을 포함하는 투약 형태가 제공된다. 일부 실시형태에서, 투약 형태는 정맥내 주입을 위한 액체 현탁액으로 제형화된다.

[0178] 어떤 실시형태에서, 세포외 소포의 제제는 잔류 복제 가능 핵산을 손상시키기 위해 방사선, *예를 들어*, X 선, 감마선, 베타 입자, 알파 입자, 중성자, 양성자, 원소 핵, UV 선에 노출된다.

[0179] 어떤 실시형태에서, 세포외 소포의 제제는 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 초과, 또는 100 kGy 초과의 조사선량을 사용한 감마 조사에 노출된다.

[0180] 어떤 실시형태에서, 세포외 소포의 제제는 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 초과, 또는 10000 mSv 초과의 조사선량을 사용한 X-선 조사에 노출된다.

[0181] **방법**

[0182] 본 개시내용의 양태는 또한 세포외 소포 및 면역조절 구성요소를 포함하는 조성물을 제조하는 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은: 생산자 세포로부터 세포외 소포를 수득하는 단계로, 여기서 상기 생산자 세포는 면역조절 구성요소를 자연적으로 함유하는, 단계; 및 수득된 세포외 소포를 선택적으로 단리하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은: 면역조절 구성요소로 생산자 세포를 변형시키는 단계; 변형된 생산자 세포로부터 세포외 소포를 수득하는 단계; 및 수득된 세포외 소포를 선택적으로 단리하는 단계를 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 본 방법은: 생산자 세포로부터 세포외 소포를 획득하는 단계; 수득된 세포외 소포를 단리하는 단계; 및 면역조절 구성요소로 단리된 세포외 소포를 변형시키는 단계를 포함한다. 어떤 실시형태에서,

본 방법은 단리된 세포외 소포를 약제학적 조성물로 제형화하는 것을 추가로 포함한다.

[0183] *세포외 소포를 생산하는 방법*

[0184] 면역조절 구성요소로 생산자 세포를 변형시키는 방법

[0185] 다양한 실시형태에서, 본 방법은 면역조절 구성요소로 생산자 세포를 변형시키는 것을 포함한다.

[0186] 생산자 세포는 포유동물 세포주, 식물 세포주, 곤충 세포주, 진균 세포주, 또는 원핵 세포주일 수 있다. 어떤 실시형태에서, 생산자 세포는 포유동물 세포주이다. 포유동물 세포주는 인간 배아 신장 (HEK) 세포주, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주, HT-1080 세포주, HeLa 세포주, PERC-6 세포주, CEVEC 세포주, 섬유아세포주, 양수 세포주, 상피 세포주, 및 간엽 줄기 세포 (MSC) 세포주를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일부 바람직한 실시형태에서, 포유동물 세포주는 HEK-293 세포, BJ 인간 포피 섬유아세포, fHDF 섬유아세포, AGE.HN® 뉴런 전구체 세포, CAP® 양수 세포, 지방질 간엽 줄기 세포, 또는 RPTEC/TERT1 세포일 수 있다. 생산자 세포는 또한 일차 세포일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 일차 세포는 일차 포유동물 세포, 일차 식물 세포, 일차 곤충 세포, 일차 진균 세포, 또는 일차 원핵 세포일 수 있다.

[0187] 특정 바람직한 실시형태에서, 생산자 세포는 면역 세포, 예컨대 수지상 세포, T 세포, B 세포, 천연 살해 세포 (NK 세포), 항원 제시 세포, 대식세포, T 도움 세포, 또는 조절 T 세포 (Treg 세포)이다.

[0188] 다양한 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 형질감염 (*예를 들어,* Bacchetti S, Graham FL (April 1977). "Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (4): 1590-4; Kriegler M (1991). Transfer and Expression: A Laboratory Manual. W. H. Freeman. pp. 96-97; Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (11월 1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84 (21): 7413-7; Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (1월 1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations". *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (4): 2550-61 *참고*), 바이러스 형질도입 (*예를 들어,* Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2000). "*Transduction*". An Introduction to Genetic Analysis (7th ed.)), electroporation (*see, e.g.,* Neumann, E; Schaefer-Ridder, M; Wang, Y; Hofschneider, PH (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields". *The EMBO Journal*. 1 (7): 841-5) *참고*) 압출 (*예를 들어,* Sharei A, Zoldan J, Adamo A, Sim WY, Cho N, Jackson E, Mao S, Schneider S, Han MJ, Lytton-Jean A, Basto PA, Jhunjhunwala S, Lee J, Heller DA, Kang JW, Hartoularos GC, Kim KS, Anderson DG, Langer R, Jensen KF (2월 2013). "A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (6): 2082-7 *참고*), 초음파처리 (*예를 들어,* Yizhi Song (2007). "Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria". *Nucleic Acids Res.* 35 (19): e129. *참고*), 세포 융합 (*예를 들어,* Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (11월 1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 84 (21): 7413- *참고*), 또는 당업계에서의 숙련가에게 알려진 다른 방법에 의해 생산자 세포 안으로 도입된 이식유전자 또는 mRNA로부터 생산자 세포에 발현될 수 있다.

[0189] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 형질감염에 의해 생산자 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 합성 거대분자 예컨대 양이온성 지질 및 폴리머를 사용하여 적합한 생산자 세포 안으로 도입될 수 있다 (Papapetrou *et al.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). 일부 실시형태에서, 양이온성 지질은 전하 상호작용을 통해 면역조절 구성요소와 복합체를 형성한다. 일부의 이들 실시형태에서, 양으로 하전된 복합체는 음으로 하전된 세포 표면에 결합하고 세포내이입에 의해 세포에 흡수된다. 일부 다른 실시형태에서, 양이온성 폴리머는 생산자 세포를 형질전환시키기 위해 사용될 수 있다. 일부의 이들 실시형태에서, 양이온성 폴리머는 폴리에틸렌이민 (PEI)이다. 어떤 실시형태에서, 화학물질 예컨대 인산칼슘, 사이클로덱스트린, 또는 폴리브렌이 생산자 세포에 면역조절 구성요소를 도입하기 위해 사용될 수 있다. 면역조절 구성요소는 또한 물리적 방법 예컨대 입자-매개된 형질감염, "유전자 건", 바이오리스틱, 또는 입자 폭격 기술 (Papapetrou *et al.*, Gene

Therapy 12: S118-S130 (2005))을 사용하여 생산자 세포 안으로 도입될 수 있다. 리포터 유전자 예컨대, 예를 들어, 베타-갈락토시다아제, 클로르암페니콜 아세틸전달효소, 루시퍼라제, 또는 녹색 형광 단백질이 생산자 세포의 형질감염 효율을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0190] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 바이러스 형질도입에 의해 생산자 세포에 도입된다. 몰로니 쥣과 백혈병 바이러스 (MMLV), 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스 (AAV), 단순 포진 바이러스 (HSV), 렌티바이러스, 및 스퓨마바이러스를 포함한, 수많은 바이러스가 유전자 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 바이러스 매개된 유전자 전달 비히클은 DNA 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스 및 헤르페스 바이러스에 기초한 벡터뿐만 아니라 레트로바이러스 기초 벡터를 포함한다.

[0191] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 전기천공에 의해 생산자 세포에 도입된다. 전기천공은 세포막에 일시적 기공을 형성하여, 세포 안으로 다양한 분자의 도입을 허용한다. 일부 실시형태에서, DNA 및 RNA 뿐만 아니라 폴리펩타이드 및 비-폴리펩타이드 치료제가 전기천공에 의해 생산자 세포 안으로 도입될 수 있다.

[0192] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 미세주입에 의해 생산자 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 현미경적 수준에서 생산자 세포 안으로 면역조절 구성요소를 주입하기 위해 글라스 마이크로피펫이 사용될 수 있다.

[0193] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 압출에 의해 생산자 세포에 도입된다.

[0194] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 초음파처리에 의해 생산자 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 높은 강도 음파에 노출되어, 면역조절 구성요소의 장입을 허용하는 세포막의 일시적 파쇄를 야기한다.

[0195] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 세포 융합에 의해 생산자 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 전기 세포 융합에 의해 도입된다. 일부 다른 실시형태에서, 생산자 세포를 융합하기 위해 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 사용된다. 일부 다른 실시형태에서, 생산자 세포를 융합하기 위해 센다이 바이러스가 사용된다.

[0196] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 저삼투압 용해에 의해 생산자 세포에 도입된다. 일부의 이들 실시형태에서, 생산자 세포는 낮은 이온 강도 완충액에 노출되어 이들이 파열되도록 하여 면역조절 구성요소의 장입을 허용한다. 일부 대안적인 실시형태에서, 생산자 세포를 팽윤시키고 생산자 세포막에 기공을 창출하기 위해 저삼투압 용액에 대해 제어된 투석이 사용된다. 생산자 세포는 후속으로 멤브레인의 재밀봉을 허용하는 상태에 노출된다.

[0197] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 세제 처리에 의해 생산자 세포에 도입된다. 어떤 실시형태에서, 생산자 세포는 면역조절 구성요소의 장입을 허용하는 기공을 창출함에 의해 일시적으로 생산자 세포막을 손상시키는 중성 세제로 처리된다. 생산자 세포가 장입된 후, 세제는 세정되어 그것에 의해 멤브레인을 재밀봉한다.

[0198] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 수용체 매개된 세포내이입에 의해 생산자 세포에 도입된다. 어떤 실시형태에서, 생산자 세포는 면역조절 구성요소의 결합시 수용체 및 관련된 면역조절 구성요소의 내재화를 유도하는 표면 수용체를 갖는다.

[0199] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 여과에 의해 생산자 세포에 도입된다. 어떤 실시형태에서, 생산자 세포 및 면역조절 구성요소는 생산자 세포보다 더 작은 기공 크기의 필터를 통해 강제되어, 생산자 세포막의 일시적인 파괴를 유발하고 면역조절 구성요소가 생산자 세포로 들어가게 할 수 있다.

[0200] 일부 실시형태에서, 생산자 세포는 몇 개의 동결 해동 사이클을 거쳐서, 면역조절 구성요소의 장입을 허용하는 세포막 파괴를 초래한다.

[0201] 면역조절 구성요소로 세포외 소포를 변형시키는 방법

[0202] 다양한 대안적인 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 세포외 소포의 단리 후 세포외 소포에 직접적으로 도입된다.

[0203] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 형질감염에 의해 세포외 소포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 합성 거대분자 예컨대 양이온성 지질 및 폴리머를 사용하여 세포외 소포 안으로 도입될 수 있다 (Papapetrou *et al.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). 어떤 실시형태에서, 화학물질 예컨대 인산칼슘, 사이클로덱스트린, 또는 폴리브렌이 세포외 소포에 면역조절 구성요소를 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0204] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 전기천공에 의해 세포외 소포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 세포외 소포 멤브레인에 일시적 홀을 야기하는 전기장에 노출되어, 면역조절 구성요소의 장입을 허용한다.

[0205] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 미세주입에 의해 세포외 소포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 현미경적 수준에서 세포외 소포 안으로 직접적으로 면역조절 구성요소를 주입하기 위해 글라스 마이크로피펫이 사용될 수 있다.

[0206] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 압출에 의해 세포외 소포에 도입된다 .

[0207] 어떤 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 초음파처리에 의해 세포외 소포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 높은 강도 음파에 노출되어, 면역조절 구성요소의 장입을 허용하는 세포외 소포 멤브레인의 일시적 파쇄를 야기한다.

[0208] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 세포외 소포의 표면 접합될 수 있다. 접합은 당해 분야에서 알려진 방법에 의해 화학적으로 또는 효소적으로 달성될 수 있다.

[0209] 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 화학적으로 접합된 면역조절 구성요소를 포함한다. 화학적 접합은 링커의 사용으로 또는 사용 없이 또 다른 분자에 면역조절 구성요소의 공유결합에 의해 달성될 수 있다. 이러한 접합의 형성은 당업자의 기술 내에 있고 접합되어 지는 물질에 의해 유도되는 특정한 기술의 선택으로, 접합을 완성하기 위한 다양한 기술이 알려져 있다. 어떤 실시형태에서, 폴리펩타이드는 세포외 소포에 접합된다. 특정 다른 실시형태에서, 비-폴리펩타이드, 예컨대 지질, 탄수화물, 핵산, 및 소분자가 세포외 소포에 접합된다.

[0210] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 저삼투압 용해에 의해 세포외 소포에 도입된다. 일부의 이들 실시형태에서, 세포외 소포는 낮은 이온 강도 완충액에 노출되어 이들이 파열되도록 하여 면역조절 구성요소의 장입을 허용한다. 일부 대안적인 실시형태에서, 세포외 소포를 팽윤시키고 세포외 소포 멤브레인에 기공을 창출하기 위해 저삼투압 용액에 대해 제어된 투석이 사용된다. 세포외 소포는 후속으로 멤브레인의 재밀봉을 허용하는 상태에 노출된다.

[0211] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 세제 처리에 의해 세포외 소포에 도입된다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 면역조절 구성요소의 장입을 허용하는 기공을 창출함에 의해 일시적으로 세포외 소포 멤브레인을 손상시키는 중성 세제로 처리된다. 세포외 소포가 장입된 후, 세제는 세정되어 그것에 의해 멤브레인을 재밀봉한다.

[0212] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 수용체 매개된 세포내이입에 의해 세포외 소포에 도입된다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 면역조절 구성요소의 결합시 수용체 및 관련된 면역조절 구성요소의 내재화를 유도하는 표면 수용체를 갖는다.

[0213] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 기계적 소성에 의해 세포외 소포에 도입된다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 금 미세캐리어와 같은 무거운 또는 하전된 입자에 부착된 면역조절 구성요소로 충격을 받을 수 있다. 일부의 이들 실시형태에서, 입자는 이것이 세포외 소포 멤브레인을 가로지르도록 기계적으로 또는 전기적으로 가속화될 수 있다.

[0214] 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 여과에 의해 세포외 소포에 도입된다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포 및 면역조절 구성요소는 세포외 소포보다 더 작은 기공 크기의 필터를 통해 강제되어, 세포외 소포 멤브레인의 일시적인 파괴를 유발하고 면역조절 구성요소가 세포외 소포로 들어가게 할 수 있다.

[0215] 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 몇 개의 동결 해동 사이클을 거쳐서, 면역조절 구성요소의 장입을 허용하는 세포외 소포 멤브레인 파괴를 초래한다.

[0216] 세포외 소포를 단리하는 방법

[0217] 세포외 소포는 생산자 세포로부터 단리될 수 있다. 어떤 실시형태에서, 세포외 소포는 생산자 세포에 의해 세포 배양 배지 안으로 방출된다. 세포외 소포의 단리의 모든 알려진 방식이 본 명세서에서의 사용에 적합한 것으로 간주된다는 것이 고려된다. 예를 들어, 전하 (*예를 들어,* 전기영동 분리), 크기 (*예를 들어,* 여과, 분자 체질, *등*), 밀도 (*예를 들어,* 규칙적 또는 구배 원심분리), 스베드베르그 상수 (*예를 들어,* 외부 힘으로 또는 없이 침강, *등*)에 기초한 분리를 포함한, 배지 또는 다른 원료 물질로부터 이들을 분리하기 위해 세포외 소포의 물리적 특성이 이용될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 단리는 하나 이상의 생물학적 특성에 기초할 수 있고, 표면

마커를 이용할 수 있는 방법 (*예를 들어,* 침전을 위해, 고상에 대한 가역 결합, FACS 분리, 특이적 리간드 결합, 비-특이적 리간드 결합, 친화도 정제 등)을 포함한다.

[0218] 단리 및 농축은 전형적으로 연속 원심분리를 포함하는 일반적이고 비-선택적인 방식으로 수행될 수 있다. 대안적으로, 단리 및 농축은 세포외 소포 또는 생산자 세포-특이적 표면 마커를 사용하는 것과 같이 보다 구체적이고 선택적인 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 특정한 표면 마커가 면역침전, FACS 분류, 친화도 정제 및 비드-결합된 리간드로의 자기 분리에 사용될 수 있다.

[0219] 일부 실시형태에서, 크기 배제 크로마토그래피가 세포외 소포를 단리하기 위해 이용될 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 기술은 당해 기술에 공지되어 있다. 예시적인, 비제한적인 기술이 본 명세서에서 제공된다. 일부 실시형태에서, 공동 부피 분율이 단리되고 관심 있는 세포외 소포를 포함한다. 또한, 일부 실시형태에서, 세포외 소포는 일반적으로 당업계에서 알려진 바와 같이 (하나 이상의 크로마토그래피 분획의) 원심분리 기술에 의해 크로마토그래피 분리 후 추가로 단리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 세포외 소포를 추가로 단리하기 위해 밀도 구배 원심분리가 이용될 수 있다. 어떤 실시형태에서, 다른 기원의 세포외 소포로부터 생산자 세포-유래된 세포외 소포를 추가로 분리하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 생산자 세포-유래된 세포외 소포는 생산자 세포에 특이적인 항원 항체를 사용하여 면역흡착 포획에 의해 비-생산자 세포-유래된 세포외 소포로부터 분리될 수 있다.

[0220] 일부 실시형태에서, 세포외 소포의 단리는 차별적인 원심분리, 크기-기반 멤브레인 여과, 면역침강, FACS 분류, 및 자기 분리를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 방법의 조합을 포함할 수 있다.

[0221] *세포외 소포의 크기를 측정하는 방법*

[0222] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 방법은 세포외 소포 및/또는 세포외 소포의 모집단의 크기를 측정하는 것을 포함한다. 일반적으로, 세포외 소포 크기는 가장 긴 측정가능한 치수로 측정된다. 일반적으로, 세포외 소포의 가장 긴 측정가능한 치수는 또한 직경으로 지칭된다.

[0223] 세포외 소포 크기는 동적 광 산란 (DLS) 및/또는 다중각 광 산란 (MALS)을 사용하여 측정될 수 있다. 세포외 소포의 크기를 측정하기 위해 DLS 및/또는 MALS를 사용하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있고, 나노입자 추적 검정 (NTA, *예를 들어,* Malvern NanoSight NS300 나노입자 추적 장치를 사용함)을 포함한다. 특이적 실시형태에서, 세포외 소포 크기는 Malvern NanoSight NS300을 사용하여 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포는 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포는 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 90%가 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 95%가 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 99%가 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 90%가 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 95%가 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 99%가 NTA (*예를 들어,* Malvern NanoSight NS300을 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다.

[0224] 세포외 소포 크기는 조절가능 저항 펄스 감지 (TRPS)를 사용하여 측정될 수 있다. 특이적 실시형태에서, TRPS에 의해 측정된 세포외 소포 크기는 iZON qNANO Gold를 사용하여 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포는 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포는 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 90%가 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 95%가 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수

를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 99%가 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 90%가 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 95%가 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 99%가 TRPS (*예를 들어,* iZON qNano Gold를 사용함)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다.

[0225] 세포외 소포 크기는 전자 현미경검사를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포외 소포 크기를 측정하기 위해 사용된 전자 현미경검사의 방법은 투과 전자 현미경검사이다. 특이적 실시형태에서, 세포외 소포 크기를 측정하기 위해 사용된 투과 전자현미경은 Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN이다. 전자현미경을 사용한 세포외 소포 크기를 측정하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 잘-알려져 있고, 임의의 그와 같은 방법이 세포외 소포 크기를 측정하는데 적절할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포는 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포는 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 90%가 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 95%가 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 99%가 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 20-300 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 90%가 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 95%가 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에서 기재된 세포외 소포 모집단은 세포외 소포의 99%가 주사전자현미경 (*예를 들어,* Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN 주사전자현미경)에 의해 측정될 때 약 40-200 nm의 최장 치수를 갖는 모집단을 포함한다.

[0226] *대식세포 분극화를 결정하는 방법*

[0227] 대식세포 표적 유전자의 발현을 억제하는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포를 사용하여 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 방법 및 조성물이 본 명세서에서 개시된다. 조성물은 (다른 세포 유형 예컨대 T-세포, B-세포, 대식세포, 또는 수지상 세포에 비교할 때) 우선적으로 대식세포를 취하고, 면역조절 구성요소 단독의 등몰 양보다 대식세포 분극화를 증가시키는데 동등하거나 더 효과적이다. 대식세포의 M2 및 M1 표현형의 검출을 포함하여, 대식세포 분극화를 결정하는 방법은 M2 및 M1 표현형의 결정에 대해 당해 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 비제한적으로, M2 세포 표면 마커 (*예를 들어,* YM1, FIZZ1, 렉틴-1, MGL), M2 관련된 사이토카인 (*예를 들어,* IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 및 CCL24), M1 관련된 사이토카인 (*예를 들어,* INFɣ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CCL5, CSCL9, CXCL10 및 CXCL11), 성장 인자 (*예를 들어,* VEGF-A, VEGF-C, EGF, 및 TGF-β), 효소 (*예를 들어,* 매트릭스 메탈로프로테이나제 MMP2, MMP9, 시스테인 카텝신 프로테아제); M2 관련된 miRNA (*예를 들어,* miRNA146a, miRNA let 7b, 및 miR-223) 및/또는 M1 관련된 miRNA (*예를 들어,* miRNA155, miR-33)를 포함한 M2 및 M1 대식세포뿐만 아니라 범-대식세포의 마커에 대해 조직 절편 (*예를 들어,* 종양 생검으로부터의 것), 혈액 샘플, 등이 분석될 수 있다 (*예를 들어,* 염색될 수 있다). *예를 들어,* Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-969; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20 참고. 샘

플 내에서의 대식세포 및/또는 대식세포 구성요소, 분비 또는 대식세포 활성 (*예를 들어,* Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Randolph, G. J. (2007). Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity, *Nature* Immunology 13(11), 1118-1128 참고)은 유세포측정, 면역조직-화학, 면역블로팅, 정량적 PCR, 또는 생물학적 샘플에서 세포, 또는 세포 생성물을 검출하기 위해 당업계에서 알려진 임의의 다른 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0228] *암을 치료하는 방법*

[0229] 또한, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 제공된다.

[0230] 다양한 실시형태에서, 적어도 하나의 유전자를 억제하고 그것에 의해 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 하나 이상의 면역조절 구성요소를 포함하는 세포외 소포, 예를 들어, 엑소좀의 조성물이 암이 있는 대상체에게 투여된다. 일부의 이들 실시형태에서, 본 조성물은 면역 반응을 상향 조절할 수 있고 대상체의 면역계의 종양 표적화를 향상시킬 수 있다. 일부 양태에서, M2로부터 M1 표현형으로 증가된 대식세포 분극화 자체는 대상체의 면역 반응을 상향 조절하고 대상체의 면역계의 종양 표적화를 향상시킨다. 일부 저자들은 IL-6 및 아데노신에 대한 반응으로서 M2d 아형 활성화를 언급하고, 이들 대식세포는 또한 종양-관련 대식세포 (TAM)로 지칭된다. *예를 들어,* Rőszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. Mediators of Inflammation, 2015, 1-16; Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. Immunology, 154(2), 186-195; 및 Q. Wang, H. Ni, L. Lan, X. Wei, R. Xiang, and Y. Wang, "Fra-1 protooncogene regulates IL6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages," Cell Research,vol. 20, no. 6, pp. 701-712, 2010 *참고*. 종양-관련 대식세포 (TAM)는 암 세포 운동성, 전이 형성 및 혈관형성의 촉진과 같은 이들의 종양성 기능에 대해 전형적이며, 이들의 형성은 발달하는 종양에 존재하는 미세환경 인자에 의존적이다. TAM은 IL-10, TGFβ, PGE2 및 매우 소량의 NO 또는 ROI와 같은 면역억제성 사이토카인 및 낮은 수준의 염증성 사이토카인 (IL-12, IL-1β, TNFα, IL-6)을 생성한다. 종양-관련 항원을 제시하는 TAM의 능력은 T 및 NK 세포의 항-종양 기능의 자극과 마찬가지로 감소된다. 또한 TAM은 종양 세포를 용해시킬 수 없다. https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization - cite_note-Sica2008-31 TAM의 표적화는 제제의 전달을 통해 TAM의 보충 및 분배를 변경하거나, 존재하는 TAM을 고갈시키거나 M2로부터 M1 표현형으로 TAM의 재-교육을 유도하는 것이 입증되었기 때문에 암에 대한 새로운 치료 전략일 수 있다. *예를 들어,* Lewis, Claire E., and Jeffrey W. Pollard. "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments." Cancer research 66.2 (2006): 605-612; Sica, Antonio, et al. "Macrophage polarization in tumour progression."Seminars in Cancer Biology. Vol. 18. No. 5. Academic Press, 2008; Sica, Antonio, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. J Immunol. 2000 1월 15;164(2):762-7; Cuccarese, Michael F.; Dubach, J. Matthew; Pfirschke, Christina; Engblom, Camilla; Garris, Christopher; Miller, Miles A.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2017-02-08). "Heterogeneity of macrophage infiltration and therapeutic response in lung carcinoma revealed by 3D organ imaging". Nature Communications. 8: 14293; Zeisberger, S M; Odermatt, B; Marty, C; Zehnder-Fjδllman, A H M; Ballmer-Hofer, K; Schwendener, R A (2006-07-11). "Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach". British Journal of Cancer. 95 (3): 272-281; Rodell, Christopher B.; Arlauckas, Sean P.; Cuccarese, Michael F.; Garris, Christopher S.; Li, Ran; Ahmed, Maaz S.; Kohler, Rainer H.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2018-05-21). "TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy". Nature Biomedical Engineering; Guerriero, Jennifer L.; Sotayo, Alaba; Ponichtera, Holly E.; Castrillon, Jessica A.; Pourzia, Alexandra L.; Schad, Sara; Johnson, Shawn F.; Carrasco, Ruben D.; Lazo, Suzan (March 2017). "Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages". Nature. 543 (7645): 428-432 *참고*.

[0231] 일부 실시형태에서, 치료되어지는 암은 종양 미세환경으로 백혈구 (T-세포, B-세포, 대식세포, 수지상 세포, 단핵구)의 침윤, 또는 소위 "뜨거운 종양" 또는 "염증성 종양"임을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 치료되어지는 암은 종양 미세환경으로 낮은 수준 또는 검출불가능한 수준의 백혈구 침윤, 또는 소위 "차가운 종양" 또는 "비-염증성 종양"임을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 "차가운 종양"을 "뜨거운 종양"으로 전

환시키기에 충분한 양으로 그리고 충분한 시간 동안 투여되며, 즉, 상기 투여는 종양 미세환경으로 백혈구 (예컨대 T-세포)의 침윤을 초래한다.

[0232] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 세포외 소포와 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 촉진하는 구성요소, 및 면역 반응을 추가로 향상시키는 구성요소, 예컨대 체크포인트 차단 억제제, *예를 들어,* CTLA-4를 표적화하는, 이필리무맙, PD-1을 표적화하는 니볼루맙 세미플리맙 및 펨브롤리주맙, 및 PD-L1을 각각 표적화하는, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 및 CSFR-1의 억제제, 예컨대 펙시다티닙, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, 에막투주맙, AMG820, IMC-CS4 및 카비랄리주맙을 포함한 1 초과 면역조절 구성요소의 조합을 포함한다. 암이 있는 대상체에 대한 치료로서 이들 조성물의 투여는 면역 반응을 추가로 상향 조절할 수 있고 면역조절 구성요소의 조합된 작용을 통해 대상체의 면역계의 종양 표적화를 증진할 수 있다.

[0233] 일부 실시형태에서, 부가의 면역조절 구성요소는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, 또는 CSF1-R을 표적화하는 항체 또는 활성 단편이다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 이필리무맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 니볼루맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 세미플리맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 펨브롤리주맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 아테졸리주맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 아벨루맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 더발루맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 펙시다티닙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 PLX7486의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 ARRY-382의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 JNJ-40346527의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 BLZ945의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 에막투주맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 AMG820의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 IMC-CS4의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다. 실시형태에서, 항체 또는 이의 활성 단편은 카비랄리주맙의 CDR에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 CDR을 포함한다.

[0234] 일부 실시형태에서, 세포외 소포 및 면역조절 구성요소를 포함하는 조성물은 암 백신으로 대상체에게 투여된다. 일부의 이들 실시형태에서, 본 조성물은 개인화된 암 백신으로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 종양 항원 또는 종양 항원으로부터 유래된 펩타이드이다. 적합한 종양 항원의 예는: 알파-태아단백 (AFP), 암종배아 항원 (CEA), 상피 종양 항원 (ETA), 뮤신 1 (MUC1), Tn-MUC1, 뮤신 16 (MUC16), 티로시나제, 흑색종-관련된 항원 (MAGE), 종양 단백질 p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, 프로그래밍된 사망 리간드 1 (PD-L1), 프로그래밍된 사망 리간드 2 (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, 메소텔린, VEGFR, 알파-엽산 수용체, CE7R, IL-3, 암-고환 항원, MART-1 gp100, 및 TNF-관련된 세포자멸사-유도 리간드를 포함한다. 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 기준 게놈 서열로부터 유래된다. 어떤 실시형태에서, 종양 항원은 조성물을 받은 대상체의 게놈 서열에서 유래된다.

[0235] 본 조성물로 치료될 수 있는 암은 표 5에 열거된 암을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0236] *대식세포에서 유전자 발현, 전사 네트워크 및 분극화를 조절하는 방법*

[0237] 일부 실시형태는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 면역조절 구성요소는 유전자에 표적화되고, 상기 조절은 유전자에 표적화된 면역조절 구성요소 없는 등몰 양의 투여에 의해 생성된 조절과 동등하

거나 그 초과이다. 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대식세포에서 유전자 발현을 억제하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 상기 면역조절 구성요소는 유전자에 표적화되고, 상기 억제는 유전자에 표적화된 면역조절 구성요소 없는 등몰 양의 투여에 의해 생성된 억제와 동등하거나 그 초과이다. 일부 실시형태는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대식세포에서 유전자의 다운스트림 표적을 억압하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 면역조절 구성요소는 유전자에 표적화되고, 상기 억압은 유전자에 표적화된 면역조절 구성요소 없는 등몰 양의 투여에 의해 생성된 억압과 동등하거나 그 초과이다. 일부 실시형태는 하나 이상의 면역조절 구성요소(들)를 포함하는 세포외 소포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대식세포의 모집단의 분극화를 변경하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 면역조절 구성요소는 유전자에 표적화되고, 상기 분극화의 변경은 유전자에 표적화된 면역조절 구성요소 없는 등몰 양의 투여에 의해 생성된 분극화의 변경과 동등하거나 그 초과이다. 일부 실시형태에서 세포외 소포는 엑소좀이다. 일부 실시형태에서, 면역조절 구성요소는 ASO이다. 일부 실시형태에서 분극화에서의 변경은 M2로부터 M1 표현형으로의 변화이다.

[0238] *섬유성 병태를 치료하는 방법*

[0239] 또한, 대식세포를 M2로부터 M1 표현형으로 재분극화하는 면역조절 구성요소를 포함한 엑소좀을 포함하는 조성물의 유효량을 섬유성 병태를 치료하는 것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 섬유성 병태를 치료하는 방법이 본 명세서에서 제공된다. 일부 실시형태에서, 섬유성 병태는 폐 섬유증, 간 섬유증, 또는 췌장 섬유증이다. 어떤 실시형태에서, 간 섬유증은 비-알코올성 지방간염, 또는 NASH이다. 참고, *예를 들어,* webmayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353690에서 월드 와이드로부터 이용가능한, Mayo Clinic Staff. "Definition [of pulmonary fibrosis". Mayo Foundation for Medical Education and Research. 2014년 7월 15일 원본으로부터 파일보관됨. 2014년 7월 26일에 검색됨; Ferri FF. Idiopathic pulmonary fibrosis. In: Ferri's *Clinical Advisor* 2016. Philadelphia, Pa.: Mosby Elsevier; 2016; Gross TJ, Hunninghake GW (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis". *N Engl J Med*. 345 (7): 517-525; Friedman LS (2014). *Current medical diagnosis and treatment* 2014. [S.l.: Mcgraw-Hill. pp. Chapter 16. Liver, Biliary Tract, & Pancreas Disorders; Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ (1월 2018). "The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases". *Hepatology*. 67 (1): 328-357; Xue J, Sharma V, Hsieh MH, Chawla A, Murali R, Pandol SJ, Habtezion A. *Nat Commun*. 2015 5월 18;6:7158 *참고.*

[0240] *투여 방식*

[0241] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 대상체의 순환계로 정맥내로 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 적합한 액체에 주입되어 대상체의 정맥 안으로 투여된다.

[0242] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 동맥내로 대상체의 순환계에 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 적합한 액체에 주입되어 대상체의 동맥 안으로 투여된다.

[0243] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 척추강내 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 척추관 안으로, 또는 지주막하 공간 안으로 주입을 통해 투여되어 뇌척수액 (CSF)에 도달한다.

[0244] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 비강내 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 국소 투여 또는 전신 투여 중 어느 하나의 형태로 코를 통해 살포될 수 있다. 어떤 실시형태에서, 본 조성물은 비강 스프레이로 투여된다.

[0245] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 복강내 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 적합한 액체에 주입되고 대상체의 복막 안으로 주입된다. 일부 실시형태에서, 상기 복강내 투여는 림프에 조성물 (*예를 들어,* 조성물에서의 세포외 소포)의 분산을 초래한다. 일부 실시형태에서, 상기 복강내 투여는 가슴샘, 비장, 및/또는 골수에 조성물 (*예를 들어,* 조성물에서의 세포외 소포)의 분산을 초래한다. 일부 실시형태에서, 상기 복강내 투여는 하나 이상의 림프절에 조성물 (*예를 들어,* 조성물에서의 세포외 소포)의 분산을 초래한다. 일부 실시형태에서, 상기 복강내 투여는 자궁경부 림프절, 서혜 림프절, 종격 림프절, 또는 흉골 림프절 중 하나 이상에 조성물 (*예를 들어,* 조성물에서의 세포외 소포)의 분산을 초래한다. 일부 실시형태에서, 상기 복강내 투여는 췌장에 조성물 (*예를 들어,* 조성물에서의 세포외 소포)의 분산을 초래한다.

[0246] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 눈주위 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 눈

주위 조직 안으로 주입된다. 눈주위 약물 투여는 결막하, 전측 하위-태논, 후측 하위-태논, 및 안구뒤 투여의 경로를 포함한다.

[0247] 일부 실시형태에서, 본 조성물은 다중 투여 경로에 의해 동일한 대상체 안으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 상기 다중 투여 경로는 정맥내 투여, 동맥내 투여, 척추강내 투여, 비강내 투여, 복강내 투여, 및/또는 눈주위 투여를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 다중 투여 경로는 정맥내 투여 및 복강내 투여를 포함한다.

[0248] 어떤 실시형태에서, 세포외 소포의 투약량은 1ng 내지 10 ng, 10 ng 내지 100 ng, 100 ng 내지 1 μg, 1 μg 내지 5 μg, 5 μg 내지 10 μg, 10 μg 내지 50 μg, 50 μg 내지 75 μg, 75 μg 내지 100 μg, 100 μg 내지 150 μg, 150 μg 내지 200 μg, 200 μg 내지 300 μg, 300 μg 내지 500 μg, 500 μg 내지 1 mg, 또는 1mg 내지 10 mg이다.

[0249] 본 조성물은 대상체에게 1회 투여될 수 있다. 대안적으로, 일정 기간에 걸쳐 다중 투여가 수행될 수 있다. 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 그 초과 투여가 대상체에게 주어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여는 필요에 따라, *예를 들어,* 질환, 장애 또는 병태와 관련된 증상이 지속되는 동안 주어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 반복된 투여는 대상체의 나머지 생애 동안 지시될 수 있다. 치료 기간은 다양할 수 있으며, *예를 들어* 1년 이하, 6개월, 3개월, 2개월, 1개월, 2주, 1주, 3일, 2일 또는 1일 이하일 수 있다.

[0250] 어떤 실시형태에서, 세포외 소포의 용량은 하루에 1회, 격일로, 매주 1회, 매주 2회, 매월 1회 또는 매월 2회와 같은 간격으로 투여된다.

[0251] 일부 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 질환, 장애 또는 병태의 증상과 관련된 수준 이상으로 표적 세포 또는 조직에서 면역 조절 구성요소의 농도를 효과적으로 증가시키기에 충분한 빈도로 투여된다.

[0252] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 질환, 장애 또는 병태가 치료되거나, 또는 이의 증상이 개선되도록 치료 기간에 걸쳐 적어도 2회 투여된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 질환, 장애 또는 병태가 치료되거나, 또는 이의 증상이 예방되도록 치료 기간에 걸쳐 적어도 2회 투여된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 충분한 양의 면역조절 구성요소가 치료 기간 동안 표적 세포 또는 조직에 전달되도록 치료 기간에 걸쳐 충분한 횟수로 투여된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 질환, 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상이 예방되거나, 줄어들거나, 개선되거나 또는 지연되도록 충분한 양의 면역조절 구성요소가 치료 기간 동안 표적 세포 또는 조직에 전달되도록 치료 기간에 걸쳐 충분한 횟수로 투여된다. 일부 실시형태에서, 표적 세포 또는 조직에서 면역조절 구성요소 농도를 증가시키는 것은 피크 농도를 증가시키는 것을 포함하고, 반면에 기타로 평균 농도를 증가시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 기간 동안의 실질적인 증가는 대상체에서 치료전 또는 치료-후 기간을 비교하거나, 치료를 한 모집단에서 이루어진 측정치를 매칭된 미처리된 대조군 모집단과 비교함에 의해 결정될 수 있다.

[0253] 일부 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 표적 세포 또는 조직에서 면역조절 구성요소의 농도가 적어도 약 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 6개월 초과 동안 증가되도록 치료 기간당 충분한 횟수로 투여된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 표적 세포 또는 조직에서 면역조절 구성요소의 농도가 적어도 치료 기간만큼 긴 기간 동안 증가되도록 치료 기간당 충분한 횟수로 투여된다.

[0254] 일부 실시형태에서, 치료 기간 내에서 반복된 투여 사이의 시간 간격은 순환에서 세포외 소포의 수가 투여된 약제학적 조성물에 존재하는 세포외 소포의 수의 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 미만으로 감소되는 기간보다 더 길지 않다.

[0255] 일부 실시형태에서, 치료 방법은 치료제를 담지하는 세포외 소포의 적합한 치료적 용량의 주입 이전에 하나 또는 다중 용량의 비-치료적 세포외 소포를 추가로 포함한다. 어떤 실시형태에서, 본 비-치료적 세포외 소포는 치료적 세포외 소포와 별도로 그리고 상이한 투약량으로 투여된다. 어떤 실시형태에서, 비-치료적 세포외 소포의 투약량은 치료적 세포외 소포의 투약량보다 더 크다. 특정 다른 실시형태에서, 비-치료적 세포외 소포의 투약량은 치료적 세포외 소포의 투약량보다 더 작다. 어떤 실시형태에서, 비-치료적 세포외 소포의 투약량은 치료적 세포외 소포와 동일하다. 다양한 실시형태에서, 적합한 용량의 치료적 세포외 소포의 주입 이전에 비-치료적 세포외 소포의 방법은 간, 폐, 및/또는 비장에서 치료적 세포외 소포의 업데이트를 감소시킨다. 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된, 공유의 PCT 출원 PCT/US2017/047794를 참고한다.

[0256] 본 조성물의 유효량은 표적 조직, 표적 세포 유형, 투여 수단, 세포외 소포의 물리적 특성 (*예를 들어*, 크기, 및 일부 경우에 분자의 전달되는 정도) 및 기타 결정요인에 적어도 부분적으로 기초하여 제공된다. 일반적으로, 조성물의 유효량은 표적 세포의 효율적인 세포 반응을 제공한다. 상승된 효능은 증가된 세포 형질감염 (즉, 세

포외 소포 구성성분으로 형질감염된 세포의 백분율), 증가된 세포 반응 또는 숙주 대상체의 감소된 선천적 면역 반응에 의해 입증될 수 있다.

[0257] 세포외 소포 및 이의 약제학적 조성물의 투약 및 투여의 빈도는, *예를 들어*, 다양한 인자 예컨대 질환의 중증도, 환자의 연령, 성별 및 다이어트, 임의의 염증의 중증도, 투여 시간 및 다른 임상 인자에 기초하여 주치의에 의해 결정될 수 있다. 일 예에서, 정맥내 투여는 최소로 효과적인 용량으로 개시되고, 긍정적인 효과가 관찰될 때까지 사전-선택된 시간 경과에 걸쳐 용량이 증가된다. 후속으로, 투약량에서의 증분적 증가는 나타날 수 있는 임의의 역효과를 고려하면서 상응하는 효과에서의 증가를 생성하는 수준으로 제한된다.

[0258] **추가의 실시형태**

[0259] 다른 양태 및 실시형태가 하기 넘버링된 항목에서 제공된다.

[0260] 1. 적어도 하나의 유전자를 억제하고 그것에 의해 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포 분극화를 증가시키는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 세포외 소포.

[0261] 2. 세포외 소포가 엑소좀인, 실시형태 1의 세포외 소포.

[0262] 3. 핵산이 억제성 RNA인, 실시형태 1 또는 2의 세포외 소포.

[0263] 4. 억제성 RNA가 안티센스 RNA, siRNA, ShRNA, miRNA, lncRNA 또는 pre-miRNA인, 실시형태 1-3 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0264] 5. 적어도 하나의 유전자가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는, 실시형태 1-4 중 임의의 하나의 세포외 소포:

[0265] KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-알파, HIF1-베타, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, 및 c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, 아르기나제, 글루타미나제, 및 PKM2.

[0266] 6. 유전자가 KRAS인, 실시형태 5의 세포외 소포.

[0267] 7. 핵산이 야생형 인간 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA인, 실시형태 6의 세포외 소포.

[0268] 8. 억제성 RNA가 또한 마우스 $Kras^{G12D}$를 표적화하는, 실시형태 7의 세포외 소포.

[0269] 9. 대식세포가 종양 상주하는 대식세포인, 실시형태 1-8 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0270] 10. 종양은 췌장 종양인, 실시형태 9의 세포외 소포.

[0271] 11. 부가의 면역조절 구성요소를 추가로 포함하는, 실시형태 1-10 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0272] 12. 부가의 면역조절 구성요소가 소분자 약물, 항체 또는 치료적 단백질인, 실시형태 11의 세포외 소포.

[0273] 13. 항체가 면역 관문 억제제인, 실시형태 12의 세포외 소포.

[0274] 14. 실시형태 1-13 중 임의의 하나의 세포외 소포를 포함하는 약제학적 조성물.

[0275] 15. 실시형태 1-13 중 임의의 하나의 세포외 소포 또는 실시형태 14의 약제학적 조성물을 투여하고, 그것에 의해 환자에서의 질환을 치료하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 것을 필요로 하는 환자에서 질환을 치료하는 방법.

[0276] 16. 질환이 암인, 실시형태 15의 방법.

[0277] 17. 환자가 인간인, 실시형태 15 또는 16의 방법.

[0278] 18. 핵산이 원종양유전자을 표적화하는 억제성 RNA인, 실시형태 1-17 중 임의의 하나의 방법.

[0279] 19. 원종양유전자가 인간 KRAS인, 실시형태 18의 방법.

[0280] 20. 암이 췌장 암인, 실시형태 19의 방법.

[0281] 21. 적어도 제2 요법을 수행하는 것을 추가로 포함하는, 실시형태 15-20 중 임의의 하나의 방법.

[0282] 22. 제2 요법이 외과적 요법, 화학 요법, 방사선 요법, 한랭 요법, 호르몬 요법, 또는 면역요법을 포함하는, 실시형태 21의 방법.

[0283] 23. M2 대식세포가 M2a, M2b, 및 M2c 대식세포로 구성된 군으로부터 선택된 종양 관련된 대식세포인, 상기 실시

형태 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0284] **24.** M1 대식세포가 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 및 CXCL11로 구성된 군으로부터 선택된 염증성 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 나타내는 상기 실시형태 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0285] **25.** M1 대식세포가 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 IL-10, TGFβ, PGE_2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 및 CCL24로 구성된 군으로부터 선택된 면역억제성 사이토카인 및 케모카인의 줄어든 분비를 나타내는 상기 실시형태 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0286] **26.** M1 대식세포가 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 증가된 종양 관련된 항원을 발현하는 상기 실시형태 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0287] **27.** M1 대식세포가 분극화 이전의 M2 대식세포에 비교하여 $CD8^+$ T-세포 및/또는 천연 살해 세포의 자극을 증가시키는 상기 실시형태 중 임의의 하나의 세포외 소포.

[0288] **28.** 대상체에게 인간 야생형 KRAS를 표적화하는 억제성 RNA를 포함하는 세포외 소포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 췌장 암을 치료하는 방법으로서; 상기 치료는 인간 $KRAS^{G12D}$를 표적화하는 억제성 RNA로 치료된 환자에서 관측된 것보다 더 큰 수준으로 M2로부터 M1 표현형으로 종양-상주하는 대식세포의 분극화의 백분율을 증가시키는 방법.

[0289] **실시예**

[0290] 하기 실시예는 당해 분야의 숙련가에게 본 발명을 만들고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제공되고, 본 발명자들이 그것의 발명으로 간주하는 것의 범위를 한정하고자 하는 것도 아니고, 이하의 실험이 전부이거나 또는 수행된 유일한 실험임을 나타내는 것을 의도하는 것도 이니다. 사용된 숫자 (*예를 들어,* 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력했지만 일부 실험 오차 및 편차를 고려해야 한다. 달리 나타내지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 또는 그 근처이다. 표준 약어가 사용될 수 있고, 그 예는 bp, 염기쌍(들); kb, 킬로베이스(들); pl, 피코리터(들); s 또는 sec, 초(들); min, 분(들); h 또는 hr, 시간(들); aa, 아미노산(들); nt, 뉴클레오타이드(들); 등이다.

[0291] 본 발명의 실시는, 달리 나타내지 않는 한, 당업계의 기술 내에서 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약리학의 통상적인 방법을 이용할 것이다. 그와 같은 기술은 문헌에 완전하게 설명되어 있다. *예를 들어,* T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (제2판, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 제21판 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 제3판 (Plenum Press) Vols A and B(1992)을 참고한다.

[0292] **실시예 1: M2 대식세포에서 전사 인자의 녹다운**

[0293] 방법:

[0294] *PBMC로부터 단핵구 단리:*

[0295] · 50ml의 버피 코트를 수령하였다

[0296] · 15ml의 피콜을 50ml STEMCELL SepMate 튜브 안으로 피펫팅하였다

[0297] · 버피 코트를 최종 부피가 ~250mL가 되도록 PBS 2mM EDTA에서 희석하였다

[0298] · 희석된 버피 코트 샘플은 튜브에서 최종 부피가 ~45-50ml로 될 때까지 Sepmate 튜브에 부었다

[0299] · 튜브를 1에서 브레이크로 1000g에서 15분 동안 원심분리하였다

[0300] · 혈장을 스핀 튜브로부터 흡인하고, 버피 코트 층은 50ml 원뿔형 튜브 안으로 피펫에이드로 수집하였다. 튜브는 PBS/EDTA로 채우고 원심분리하여 500g에서 3분 동안 세포를 펠릿화하였다.

[0301] · 적혈구가 고도로 존재하는 경우, 세포를 10ml의 ACK 용해 완충액 (ThermoFisher, 카탈로그 번호 A1049201)에 재현탁시키고 실온에서 3분 동안 (제조자 프로토콜) 인큐베이션하였다. 튜브는 PBS/EDTA로 채우고 500g에서 3분 동안 원심분리하였다.

[0302] · 튜브는 5분 400 x g에서 스핀 다운하고, 펠릿은 PBS EDTA로 한번 더 세정하고 재-펠릿화하였다

[0303] · 펠릿은 RoboSep 완충액 (STEMCELL, 카탈로그 번호 20104)에서 재현탁시키고 트립판 블루 (Thermofisher)로 1:1 희석을 사용하여 세포를 계수하였다 (하나의 버피 코트로부터 생성된 ~5억개 PBMC)

[0304] · 제조자의 프로토콜에 따라 EasySep 인간 단핵구 농축 키트 (STEMCELL, 카탈로그 번호 19059RF)를 사용하여 CD14+ 단핵구를 단리하였다 (총 세포의 ~10%가 단핵구로 단리됨)

[0305] · 5백만개 단핵구를 RPMI 10%FBS 1% Anti Anti+40ng/ml M-CSF에서 하나의 플레이트에 도말하였다

[0306] *대식세포 분화 및 분극화:*

[0307] (https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2015-0012OC*로부터 채택됨*)

[0308] · 도말된 세포를 37C, 5% CO2에서 5-6일 동안 RPMI-1640 10%FBS 1% Anti Anti 1% PenStrep + 40ng/ml M-CSF (Biolegend)에서 배양했다. 도말 후 1일 및 3일차에서 5ml의 동일한 신선한 배지를 첨가하였다. 5일차에, 편광 사이토카인을 아래와 같이 첨가하였다 (40ng/ml MSCF와 함께; 모든 사이토카인은 20ng/ml로 첨가됨):

[0309] · M0: 무 사이토카인

[0310] · M2a: IL-4

[0311] · M2c: IL-10

[0312] · M2++: I14, I110, TGFb

[0313] · M1: IFN-g + LPS (100ng/ml)

[0314] · TAM: 75% Panc-1 상청액

[0315] · 세포는 24시간 동안 사이토카인으로 인큐베이션하였다

[0316] · 6일차에, 배지를 흡인하고, 세포를 PBS로 세정하고 그 다음 플레이트 당 10ml의 PBS 5mM EDTA (빙랭됨)를 첨가하고, 4C에서 30분 동안 배양하였다

[0317] · 세포를 플레이트에서 부드럽게 긁어내어 계수하였다.

[0318] · 그 다음 웰 당 50,000개 세포를 24시간 동안 상이한 대식세포 모집단 (상기 참고)에 대해 각각의 사이토카인과 함께 RPMI-1640 10%FBS 1% Anti Anti 1% PenStrep + 40ng/ml M-CSF (Biolegend)에서의 96 웰 플레이트에 도말하고, 그 후 처리를 개시하였다.

[0319] *엑소좀 정제:*

[0320] 엑소좀은 9일 후 HEK293 SF 세포의 고밀도 현탁 배양의 상청액으로부터 수집하였다. 상청액을 여과하고 음이온 교환 크로마토그래피로 분별하고 염화나트륨의 단계 구배로 용출시켰다. 최고 단백질 농도를 갖는 피크 분획이 엑소좀과 오염성 세포 구성요소를 함유했다. 피크 분획을 단리하고 초원심분리에 의해 Optiprep™ (60% 아이오딕사놀 w/v) 밀도 구배에서 추가로 분별하였다.

[0321] 엑소좀 분획을 4℃에서 3시간 동안 133,900 x g에서 SW 32 Ti 로터에 대한 38.5 mL 울트라-클리어 (Ultra-Clear) (344058) 튜브에서 초원심분리에 의해 농축시켰다. 펠릿화된 물질을 1 mL PBS 및 3 mL의 Optiprep™에서 재현탁시켜, 최종 아이오딕사놀 농도를 45%로 하였다. Optiprep™ 구배를 위해, 재현탁된 물질을 함유하는 4mL의 45% 아이오딕사놀, 3 mL 30% 아이오딕사놀, 2mL 22.5% 아이오딕사놀, 2mL 17.5% 아이오딕사놀, 및 1mL PBS를 SW 41 Ti 로터에 대한 12 mL 울트라-클리어 (344059) 튜브에서 4-단계 멸균 구배를 준비하였다. Optiprep™ 구배는 4℃에서 16시간 동안 150,000 x g에서 초원심분리하여 엑소좀 분획을 분리하였다. 초원심분리는 엑소좀을 함유하는 것으로 알려진 최상부 분획, 중간 정도 밀도의 세포 잔해를 함유하는 중간 분획 및 고밀도 응집체와 세포 잔해를 함유하는 최하부 분획을 초래했다. 엑소좀 층은 그 다음 튜브의 최상부 ~ 3mL로부터 부드럽게 수집하였다.

[0322] 엑소좀 분획은 38.5 mL 울트라-클리어 (344058) 튜브에서 ~32 mL PBS에 희석하고 4℃에서 3시간 동안 133,900 x g에서 초원심분리하여 정제된 엑소좀을 펠릿화하였다. 펠릿화된 엑소좀은 그 다음 최소 부피의 PBS (~200 μL)에 재현탁시키고 4℃에서 보관하였다.

[0323] 많은 고형 종양은, 종종 대안적으로-활성화되거나 또는 M2인 표현형을 갖는 것을 특징으로 하는 종양-관련된 대식세포를 포함하는, 골수성-풍부 세포 침윤물을 특징으로 한다. M2 대식세포는 높은 수준의 인산화된 STAT3 및 STAT6을 발현하여, 대사 효소 아르기나제 (Arg1)의 발현을 촉진시킨다. 중요한 M2 유전자의 녹다운이 *시험관내* 분화된 대식세포의 M2 표현형을 변형시키는 것을 입증하기 위해, 쥣과 RAW264.7 대식세포를 상기에 기재된 바와 같이 M2 상태로 분극화시켰다. 배양된 분극된 대식세포는 STAT3, STAT6, CEBPβ-1, CEBPβ-2, Pi3Kγ, 또는 KRAS를 표적화하는 증가하는 양의 siRNA (12.5nM, 25nM, 50nM, 및 100nM)로 형질감염시켰다. 유전자 각각은 용량- 의존 방식으로 억제되었고 (도 1), 각각의 M2 유전자의 녹다운은 Arg1의 병행한 감소를 야기하여 (도 2), M2 표현형이 업스트림 조절인자의 발현을 감소시킴으로써 변경될 수 있음을 입증하였다.

[0324] **실시예 2: 대식세포 아형에 의한 차별적인 엑소좀 흡수**

[0325] 대식세포 아형은 대사 및 다른 표현형 활성에서의 변경을 특징으로 한다. 특정 대식세포 아형이 우선적으로 엑소좀을 흡수하는지 여부를 이해하기 위해, 6개 대식세포 부분모집단 (M0, M1, M2a, M2c, M2++, 및 TAM)을 내강 GFP를 발현하도록 조작된 HEK293SF-유래된 엑소좀의 수준을 증가시키면서 인큐베이션하였다. IncuCyte® 생존 세포 분석 시스템 (Essen Bioscience)에서 36시간에 걸친 총 세포 GFP 강도를 측정함에 의해 엑소좀 흡수를 결정하였다. 도 3에서 나타낸 바와 같이, 모든 대식세포 아형이 엑소좀의 흡수를 나타냈지만, M0 대식세포는 엑소좀을 흡수하는 데 최소로 효율적이었고, 반면 M2++ 대식세포는 다른 대식세포 아형에 비해 엑소좀을 흡수하는 데 실질적으로 더 효율적이었다.

[0326] M2 대식세포가 엑소좀을 흡수하는데 효율적이기 때문에, 본 발명자들은 ASO-장입된 엑소좀이 ASO 단독보다 세포 내 대식세포 표적을 표적화하는데 보다 효율적인지 (*예를 들어*, 유전자의 신호전달 경로 내에서 표적 유전자의 하향 발현, 및 다운-스트림 효과기 분자를 녹다운하는데 보다 효율적인지) 여부를 조사하였다. STAT3을 표적화하고 Cy5 형광 추적자 및 5' 콜레스테롤 링커를 수반하는 2'-메톡시에틸 (MOE) 단일가닥 DNA/RNA ASO가 생성되었다. HEK293SF 엑소좀은 콜레스테롤-태깅된 형광 ASO와 혼합되고 유리 ASO는 초원심분리 및 ASO-함유 상청액의 제거에 의해 제거되었다. M2 및 M0 대식세포는 동등한 밀도로 도말되고 총 형광 강도에 의해 측정될 때 매칭된 농도의 유리 ASO 또는 ASO-장입된 엑소좀 (Exo-ASO)으로 인큐베이션되었다. 총 세포 형광은 48시간에 걸쳐 측정되고 IncuCyte® 생-세포 분석 시스템을 사용하여 정량화되었다. 도 4에서 나타낸 바와 같이, M2 대식세포는 M0 대식세포에 비교하여 유리 ASO 및 Exo-ASO 둘 모두를 보다 쉽게 흡수하였다. 흥미롭게도, Exo-ASO는 M0 및 M2 대식세포 둘 모두에 의해 보다 효율적으로 흡수되어, 엑소좀 상에 장입으로써 M2 대식세포로 ASO의 전달이 향상될 수 있음을 시사한다.

[0327] *생체내* 다른 세포 유형과 비교하여 엑소좀 또는 Exo-ASO가 대식세포에 의해 차등적으로 흡수되었는지 여부를 결정하기 위해, 미접촉 마우스에 $1x10^{11}$ 또는 $1x10^{12}$ GFP-함유 엑소좀을 복강내로 투약하였다. 주사후 1시간에, 총 복막 세포를 단리하고 상이한 면역 세포 서브셋, *즉*, B 세포, 수지상 세포, 중성구, 자연 살해 (NK) 세포, T 세포 및 대식세포 사이의 GFP 양성율에 대해 유세포측정에 의해 특성규명하였다. 도 5a에서 나타낸 바와 같이, 둘 모두의 용량에서, 대식세포는 형광 엑소좀을 흡수하는데 우세한 세포 유형이었다. 이 차이가 질환 환경에서 발생했는지 여부를 결정하기 위해, B16F10 종양-담지 마우스에 단일 용량의 Cy5-표지된 Exo-ASO 또는 천연 비표지된 엑소좀을 주입하였다. 주입된 종양을 단리하고, 해리하고 그리고 유세포측정에 의해 측정하였다. 도 5b에서 나타낸 바와 같이, 대식세포는 종양 세포보다 훨씬 더 쉽게 Exo-ASO를 흡수하여 (~100-배 더 큰 전체적인 Cy5 신호), Exo-ASO의 전달이 여러 복합체 세포 혼합물에서 대식세포 모집단에 도달할 수 있음을 시사한다. 게다가, 다른 시험된 세포 유형 (B 세포, 수지상 세포, 중성구, 자연 살해 (NK) 세포 및 T 세포)에 비교할 때 대식세포에 의한 Exo-ASO의 우선적인 흡수는 대상체에게 Exo-ASO 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대식세포 세포에 대해 표적화된 ASO 전달의 방법을 가능하게 하며, 여기서 투여된 조성물은 (다른 면역 세포 서브셋, *예를 들어*, B 세포, 수지상 세포, 중성구, 자연 살해 (NK) 세포 및 T 세포에 의한 흡수에 비교하여) 대상체에 존재하는 대식세포에 의해 우선적으로 흡수된다. Exo-ASO 조성물의 이 향상된 대식세포 특이성은 표적을 벗어난 세포에서의 효과를 감소시킴에 의해 투여된 조성물의 안전성을 개선한다.

[0328] **실시예 3: 안티센스 올리고의 엑소좀-매개된 전달은 대식세포 전사 네트워크를 강력하게 이상조절하고 분극화를 변경시킨다**

[0329] 이전의 실험은 ASO의 엑소좀-매개된 전달이 대식세포 유전자 발현 패턴을 변경하는 효과적인 방법일 수 있음을 시사한다. 상기 방법에 따라 정제된 HEK293SF-유래된 엑소좀은 STAT3을 표적화하는 5개의 상이한 콜레스테롤-태깅된 ASO (4.1, 이중-가닥 MOE 화학특징; 5.1 및 5.2, 단일-가닥 O-메틸 화학특징; 5.3 및 5.4, 단일-가닥 MOE 화학특징) 중 하나로 장입되었다. ASO 서열은 표 0에 도시되어 있다. M2 분극된 쥣과 RAW264.7 세포는 5μM 유리 콜레스테롤-태깅된 ASO 또는 콜레스테롤-태깅된 ASO가 장입된 $1x10^5$ 또는 $1x10^6$ 엑소좀으로 인큐베이션되었다. STAT3 전사체 수준이 처리 24시간 후에 측정되어, 유리 ASO에 비교하여 Exo-ASO 처리로 STAT3의 비교할만하거나 또는 우월한 녹다운을 밝혀냈다. 분극된 대식세포로 인큐베이션된 비변형된 엑소좀은 STAT3 발현에 대해 영향을 미치지 않았다 (도 6). STAT3의 다운스트림 표적을 조사하기 위해, 처리 후 48시간에 ARG1 전사체 수준을 측정하였다. 도 7에서 나타낸 바와 같이, 유리 ASO 또는 Exo-ASO로 STAT3 녹다운은 여러 경우에서 90% 초과로 Arg1의 강력한 억압을 야기했다 (도 7). M2-분극된 RAW264.7 세포는 STAT3, KRAS, 및 C/EBPβ에 대해 높은 (4μM) 및 낮은 (0.4μM) ASO 또는 Exo-ASO로 인큐베이션되었다. 도 8a-c에서 나타낸 바와 같이, Exo-ASO 샘플은 모든 시험된 용량에서 동등하거나 (STAT3) 또는 더 강력하였다 (KRAS, C/EBPβ) (도 8a-c). ASO 서열은 표 0에 도시되어 있다.

[0330] 이 결과는 Exo-ASO가 대식세포 발현 네트워크의 강력한 조절제이고, 다양한 치료적 적용을 위한 유리 ASO의 투여와 비교하여 우월한 차별화된 양식을 제공할 수 있음을 입증한다. 대상체에게 Exo-ASO를 투여하는 것을 포함하는, 대식세포에서 유전자 발현을 조절하는 하나의 이러한 방법으로, 여기서 상기 ASO는 유전자에 표적화되고, 조절은 유전자에 표적화된 등몰 양의 유리 ASO의 투여에 의해 생성된 조절과 같거나 그 초과이다. 또 다른 실시형태는 대상체에게 Exo-ASO를 투여하는 것을 포함하는, 대식세포에서 유전자 발현을 억제하는 방법을 포함하며, 여기서 상기 ASO는 유전자에 표적화되고, 억제는 유전자에 표적화된 등몰 양의 유리 ASO의 투여에 의해 생성된 억제와 같거나 그 초과이다. 또 다른 실시형태는 대상체에게 Exo-ASO를 투여하는 것을 포함하는, 대식세포에서 유전자의 다운스트림 표적을 억압하는 방법을 포함하며, 여기서 상기 ASO는 유전자에 표적화되고, 억압은 유전자에 표적화된 등몰 양의 유리 ASO의 투여에 의해 생성된 억압과 같거나 그 초과이다. 또 다른 실시형태는 대상체에게 Exo-ASO를 투여하는 것을 포함하는, 대식세포의 모집단의 분극화를 변경하는 방법을 포함하며, 여기서 상기 ASO는 대식세포에 발현된 유전자에 표적화되고, 분극화의 변경은 유전자에 표적화된 등몰 양의 유리 ASO의 투여에 의해 생성된 분극화의 변경과 같거나 그 초과이다. 이러한 실시형태에서 분극화에서의 변경은 M2로부터 M1 표현형으로의 변화일 수 있다.

[0331] 인간 세포에서 Exo-ASO의 역할을 시험하기 위해, 원발성 인간 대식세포를 M2 표현형으로 분극화시키고 다양한 용량의 유리 STAT3 ASO 또는 STAT3 Exo-ASO로 처리하였다. 3개의 별도 인간 공여체로부터의 대식세포를 사용하여, Exo-ASO는 처리 24시간 후 STAT3 전사체 수준을 억압하는데 일관되게 더욱 강력하였다 (도 9a). M2 분극화의 다운스트림 인간 마커인 CD163은 또한 유리 ASO에 비교하여 Exo-ASO에 의해 더욱 극적으로 조절되었다 (도 9b). 인간 M2 대식세포는 또한 HIF1α, Pi3Kγ, CEBP/β, STAT6 및 STAT3에 대해 4μM 유리 ASO 또는 Exo-ASO로 처리되었다. 도 10에서 나타낸 바와 같이, 모든 처리 그룹은 표적 유전자의 억압을 초래했지만, 모든 경우에 Exo-ASO는 유리 ASO 처리보다 더 강력하였다. 중요하게는, 임의의 대식세포 표적의 Exo-ASO 녹다운은 CD163 발현에서 강력한 감소를 야기하여 (도 11), ASO의 엑소좀-매개된 전달이 강력하고 재현성있게 중요한 대식세포 신호전달 네트워크를 방해한다는 것을 입증한다.

[0332] M2 대식세포 분극화의 기능적 결과는 전-염증 사이토카인에서 감소이며, 이는 전-종양형성 미세환경에 기여한다. 따라서 M2로부터 M1 표현형으로 대식세포의 전환은 향상된 전-염증 신호전달을 초래해야 한다. M1 상태로 M2 대식세포의 전환은 LPS에 의해 유도될 수 있으며, 이는 IL-12 및 IL-23을 포함하는 사이토카인의 유도를 초래한다. STAT3은 이 사이토카인 발현 네트워크의 음성 조절인자이고, 따라서 본 발명자들은 LPS의 존재에서 STAT3 억제가 전-염증성 사이토카인의 생성을 추가로 향상시킬 수 있는지 여부를 시험하였다. ,M2-분극된 인간 대식세포를 4μM 유리 STAT3 ASO, 4μM STAT3 Exo-ASO, 4μM 스크램블드 Exo-ASO, 천연 엑소좀, 또는 STAT3의 소분자 억제제인, C188-9로 처리하였다. 24시간 후, 배지를 10ng/ml LPS를 함유하는 배지로 교환하고, 24시간 후에 상청액을 단리하였다. 도 12에서 나타낸 바와 같이, LPS는 IL-12 및 IL-23의 분비를 유도하였다 (LPS 10ng/ml 그룹 대 무 LPS 그룹). 유리 STAT3 ASO가 아닌 STAT3 Exo-ASO로 처리는 각각의 사이토카인의 발현을 추가로 향상시켜, Exo-ASO가 관련된 면역-조절 신호에 반응하여 M1 표현형의 촉진을 더욱 강력하게 야기할 수 있음을 시사한다.

[0333] STAT3, STAT6, 및 다른 대식세포 조절 경로의 조절장애는 유전자 발현 패턴에서의 광범위한 변화로 이어진다. Exo-ASO 처리의 차별화된 전반적인 영향을 이해하기 위해, 나노스트링 (NanoString) mRNA 분석이 그것의 정상 상태에서 그리고 비변형된 엑소좀 (EV 단독), 및 농도-매칭된 ASO 및 Exo-ASO로의 처리에 반응하여 인간 M2 대

식세포에 대해 수행되었다. nCounter® 인간 골수성 선천적 면역 패널을 사용한 정규화된 mRNA 계수는 유리 ASO 및 Exo-ASO 둘 모두 처리 후 STAT3 전사체가 감소되었음을 실증하였다 (도 13a). 다운스트림 마커 CD163 (도 13d), TGFβ (도 13c) 및 STAT6 (도 13d)는 모두 ASO 처리 후 강력하게 하향조절되었다.

[0334] TGFβ의 강력한 억압 (<85%)은 M2 대식세포 분극화의 중요한 조절인자이다, (Yang and Zhang Journal of Hematology & Oncology (2017) 10:58). 본 발명자들은 TGFβ 발현에 대한 STAT3, STAT6 및 CEBP/β Exo-ASO 처리의 영향을 조사하였다. 인간 M2-분극된 대식세포를 STAT3 (MOE 및 LNA 화학특징 둘 모두), STAT6 (MOE 화학특징), 및 CEBP/β (MOE 화학특징)에 대해 ASO가 장입된 엑소좀으로 처리하였다. 모든 경우에, TGFβ 수준은 마이크로몰 수준 이하의 ASO로 처리 후에 극적으로 감소되었다 (도 14). 이들 결과는 다수의 대식세포 분극화 조절인자에 대한 ASO의 엑소좀-매개된 전달이 다수의 암의 치료에 매우 효과적일 수 있는 세포 프로그램의 강력하고 안정한 조절장애로 이어질 수 있음을 입증한다. 중요하게는, 이 과정의 조절인자로서 KRAS의 신규한 인식을 포함하여, 각각의 대식세포 표적은 질환 및 다른 세포 과정에서의 그것의 역할이 잘-인식되어 있지만, 안전하고 효과적인 치료는 약물 개발의 고전적인 접근법을 회피하였다는 점에서 "난공불락" 표적으로 특징화되었다.

[0335] **실시예 4: 야생형 KRAS의 억제는 췌장 암의 동소성 마우스 모델에서 생체내 증가된 대식세포 분극화 및 감소된 종양 크기로 이어진다.**

[0336] 방법:

[0337] *KRAS 엑소좀의 생산 및 단리*: 전기천공 방법을 사용하여 엑소좀을 기능적으로 손상함이 없이 엑소좀 안으로 KRAS siRNA 작제물을 삽입한다. 엑소좀은 확립된 초원심분리 방법 (Kahlert *et al.*, 2014)을 사용하여 화학적으로-한정 배지에서 성장된 인간 배아 신장 (HEK) 293SF 현탁액 세포로부터 단리한다. 엑소좀의 순도 및 동종성 (80-150 nm 직경 입자)은 Nanosight™ 측정, 투과 전자 현미경검사, 및 CD9 면역금 라벨링에 의해 입증된다. 수크로스 구배 초원심분리 및 qPCR을 또한 수행하여 KRAS siRNA의 존재 및 존재도를 검증한다. 엑소좀을 함유하는 스크램블드 siRNA가 또한 생성된다.

[0338] *RNAi 전략*. 마우스 야생형 KRAS에 대해 표적화된 KRAS siRNA 서열은 침묵화 효율을 증진시키기 위해 TT 뉴클레오타이드 돌출부를 포함한다. RNAi는 또한 센스 가닥 상의 3' 말단에서 Alexa Fluor® 647 형광단으로 표지되어 그것의 전달을 추적한다.

[0339] *마우스 및 이미지형성*. 4-6 주령의 암컷 무흉선 nu/nu 마우스 (Charles Rivers)를 21-23℃ 및 40%-60% 습도에서 12시간의 명암 주기로 개별적으로 환기된 케이지에 수용한다. 마우스는 조사된 식이 및 멸균된 물에 자유로운 접근이 허용된다. 일반적인 마취 하에서, 종양형성 인간 췌장 Panc-1 ($Kras^{asp12}$ (Rejiba *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2001)) 세포 또는 BXPC-3 세포 (10^6, 10 μl PBS에서 재현탁됨)를 27-게이지 주사기를 사용하여 췌장의 끝 안으로 주입한다. 동소성 종양 크기/부피 분석을 위해, 리빙 이미지 (Living Image) 버전 4.4 (Caliper Life Sciences)를 사용하여 모든 종양 계산을 정량화한다. 췌장 및 종양 주위 원형의 관심 있는 영역 (ROI)은 동일한 실험 그룹 내의 모든 이미지를 비교하기 위한 표준으로 정의하고 설정한다. 또한, 노출 조건 (시간, 소구멍, 스테이지 위치, 비닝)은 모든 실험 그룹에서 모든 측정에 대해 동일하게 유지한다. 그 다음 모든 실험 그룹에 대해 동일한 조건 하에서 후속적인 종양 측정 (p/sec/㎠/sr)을 수득하였다. 마우스는 규칙적으로 이미지화되고 치료를 위해 그룹으로 무작위로 분할된다. 마우스는 2×10^8 엑소좀을 격일로 100 μl 부피의 PBS에 복강내로 투여받는다. 엑소좀은 2 μg의 siRNA로 전기천공되고 주입 전에 PBS로 세정된다.

[0340] *조직학, 조직병리, 및 면역조직화학*. 조직을 포르말린에 고정하고 파라핀 포매를 위해 가공한다. 5 μm 두께의 조직 절편을 절단하고 헤마톡실린과 에오신 (H&E) 및 Masson's 트리크롬 (MTS) (Leica)을 위해 염색한다. 조직병리적 평점을 위해, H&E 염색된 슬라이드를 췌장암의 형태적 단계: 정상, 췌장 상피내 신조직형성 (PaNIN) 및 췌장 관상 선암종 (PDAC)에 기초하여 채점하였다. 각각의 조직 절편에 대해, 세 단계 (정상, PaNIN, PDAC) 각각에 대한 백분율 점수를 췌장 조직학에서의 전문가에 의해 맹검 방식으로 수작업으로 수득하고, 그 다음 이것을 각각의 집단에 대해 100점 만점의 전체적인 점수를 제공도록 평균화하였다. 그런 다음 각각의 집단에서 각각의 마우스에 대해 이들 백분율 점수의 평균을 취한다. 종양 조직 절편은 또한 (어느 하나의 범-대식세포 마커로 (*예를 들어*, 종양 상주하는 대식세포의 검출을 위한 F4/80 애니바디 및/또는 M2 및 M1 특정 세포 마커) 대식세포에 대해 염색된다.

[0341] *대식세포 표현형 특성규명을 위한 검정*. 혈액 샘플 및 종양 샘플을 마우스로부터 수집한다. 대식세포를 유세포측정에 의한 M1 및 M2 마커의 분석을 위해 단리 및 염색한다. 대식세포를 범-대식세포 마커뿐만 아니라 M2 표현

형 세포 표면 마커 (*예를 들어*, YM1, FIZZ1, 렉틴-1 및/또는 MGL) 및 M1 표현형 세포 표면 마커를 위해 염색한다. M2 및 M1 대식세포를 그 다음 추가의 분석, 예컨대 M1 및/또는 M2 표현형 중 어느 하나와 관련된 miRNA의 사이토카인 및/또는 miRNA 발현을 검출하기 위한 정량적 PCR을 위해 계수 및 분류한다).

[0342] 이종이식 실험 및 동소성 종양 부피 분석으로부터의 결과는 KRAS 야생형 siRNA를 포함하는 엑소좀이 췌장 종양의 크기를 효과적으로 감소시키고 스크램블드 siRNA를 보유하는 엑소좀에 비교해 M1 표현형 종양 관련된 대식세포의 수를 증가시킨다는 것을 확인하여, 인간 야생형 KRAS에 대해 표적화된 억제성 RNA를 포함하는 엑소좀의 투여가 암의 치료에 효과적임을 나타낸다.

표

[0343]

표 0. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)의 서열		
표적	**서열**	**서열번호:**
Stat3	TAAGCTGATAATTCAACTCA	서열번호:1
Stat6	TGAGCGAATGGACAGGTCTT	서열번호:2
CebpB	TGGATTTAAAGGCAGGCGGC	서열번호:3
Pi3Kγ	TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA	서열번호:4
HIF1-α	GTGCAGTATTGTAGCCAGGC	서열번호:5
Kras	GTAGCATGTAAATATAGCCC	서열번호:6
모든 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 각각의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 갖는다		

[0344]

표 1. 엑소좀 지질	
리소비스포스파티드산	강글리오사이드 GM3 24:1
스핑고미엘린 (SM)	강글리오사이드 GM3 16:0
강글리오사이드 GM3	PE40:5
포스파티딜세린 (PS)	PE40:6
포스파티딜이노시톨 (PI)	PE38:3
포스파티딜콜린 (PC)	PE38:4
포스파티딜에탄올아민 (PE)	PE36:1
라이소포스파티딜콜린 (LPC)	PE36:2
콜레스테롤 (Chol)	PE34:1
디아실글리세롤 (DG)	PE34:2
PI18:0/20:3	PE-에테르38:5
PI18:0/20:4	PE-에테르38:6
PI18:0/18:1	PE-에테르34:1
PI18:1/18:1	PE-에테르34:2
PI18:0/16:0	PC34:1
PA18:0/18:1	PC36:4
PS18:0/18:1	PC34:3
BMP18:0/18:1	PC32:0
BMP18:1/18:1	PC30:0
BMP18:1/16:0	SM24:1
CL(18:1)3/16:1	SM16:0
CL(18:1)2/(16:1)2	디하이드로스핑고미엘린16:0

[0345]

표 2. 엑소좀 폴리펩타이드			
ACLY	TCP1	ACTR1A	LY75
ACTB	PRDX2	THOC4	ABCC1
ACTG1	TSPAN6	INADL	MYO1E
ALB	CCT3	CTDSPL	NACA
ALDOA	TSTA3	ZMPSTE24	NAP1L4
ALDOB	TUBA3C	DNAJA2	NCL
AKR1B1	HIST1H2AK	NDRG1	NEDD8
AMBP	HIST1H2AJ	RAPGEF3	YBX1
ANPEP	HIST1H2AB	SPON2	PA2G4
ANXA2	HIST2H2AC	UBAC1	PECAM1
ANXA3	IFITM1	N4BP2L2	PFAS
ANXA4	PDXK	CAP1	SERPINB9
ANXA5	LIN7A	VAT1	PI4KA
ANXA6	BUB3	NEBL	PLAT
ANXA7	MAP4K4	DCTN2	PLCG2
ANXA11	EDIL3	ARPC1A	PPA1
	ATP6AP2	C6orf108	PPP2CA
CAPZB	PSME3	SMC2	PRKCB
CD63	TUBB3	AHSA1	PSMA6
CD81	IFITM3	STAMBP	PSMA7
CKB	ACAA2	PMVK	PSMB8
CLU	CCT7	GIPC1	PSMB9
CLIC1	CCT4	HBS1L	PSMD7
TPP1	IFITM2	NCKAP1	PSME1
CLTC	GNA13	ALDH1L1	PTPRA
CNP	RUVBL2	FTCD	RAC2
COL6A1	PRSS23	FGL2	RPL3
CR1	ACOT7	CFHR3	RPL4
CTNND1	CCT5	MMP24	RPL5
ACE	DIP2C	COPS8	RPL11
DDT	ASCC3L1	CKAP4	RPL22
DEFA1	TNIK	C10orf116	RPL24
DEFA3	NEDD4L	SLC27A2	RPL27
DNAH8	NCSTN	MID2	RPL30
DPEP1	TSPAN15	KIF3A	RPL28
DPP4	PLXNB2	NUDT5	RPL31
EEF1A1	SDCBP2	TREH	RPL34
EEF2	IGKV1-5	CEP250	RPL35A
EGF	IGHV4-31	PDCD10	RPL37A
EIF5A	IGKV3-20	PADI2	RPS2
ENO1	IGKV2-24	PACSIN2	RPS3A
ENO3	MINK1	CHP	RPS5
ENPEP	IGKα	SNF8	RPS9
STOM	VPS36	DDX19B	RPS19
EPS8	DERA	SCN11A	RPS25

FABP3	GOLGA7	LYPLA2	RPS26
FGA	KRT76	PARK7	RPS28
MLANA	EIF3EIP	COBLL1	RPS29
FN1	LSR	CNKSR2	RSU1
FTL	TUBA8	ENPP4	SARS
FUS	RAB4B	RAB3GAP1	SLAMF1
GAA	SETD4	AKR7A3	SLC1A4
GAPDH	TOLLIP	SPEN	SLC2A3
GDI2	PLEKHB2	GANAB	SNRPD2
GGT1	VPS37C	MGRN1	SPINK1
GLB1	LIN7C	CUX2	SPN
GLG1	H2AFJ	DNAJC13	STK10
GNA11	CAND1	ZCCHC11	STXBP3
GNAI1	PLSCR3	PHF15	TALDO1
GNAI2	KIAA1199	KIAA0841	TNFAIP3
GNAI3	GNB4	ARHGEF12	TPM3
GNAS	MYH14	COTL1	TPM4
GNB1	TSPAN14	ANGPTL2	TYK2
GNB2	NCALD	DDAH2	VIM
GNG7	REG4	HEBP2	WARS
SFN	VPS25	CD2AP	WAS
GPI	TUBB6	PLD3	LAT2
GSTA1	TUBA1C	TMEM2	HIST1H2BL
GSTA2	TNKS1BP1	SH3BP4	STX7
GSTA3	FAM125B	BHMT2	CPNE1
GSTM3	LRSAM1	GCA	RPL14
GSTP1	HIST3H2A	MXRA5	PDCD5
GUSB	TUBA3E	AHCTF1	SYNGR2
HIST1H2AD	TUBA3D	PTPN23	RPL23
HLA-A	DCD	DAK	RAB9A
HLA-B	HIST4H4	ACOT11	IGSF2
HLA-DQB1	ALDH16A1	APPL1	EEF1E1
HLA-DRA	RPS4Y2	PHGDH	SCAMP2
HLA-DRB1	MYL6B	TIAM2	SCAMP3
HLA-DRB5	BRI3BP	KCNG2	DPP3
HPGD	AGR3	CYFIP2	ARPC1B
HRAS	EEF1AL3	GHITM	PDIA6
HSPA1A	KRT28	C11orf54	WASF2
HSPA1B	KRT24	DBNL	ANP32B
HSPA8	RPLP0-like	ATAD2	PAICS
HSP90AA1	RPSAP15	PHPT1	AHCYL1
	RANP1	C16orf80	VAMP5
KRT1	PCSK9	OLA1	41891
KRT9	METRNL	ZDHHC1	HSPH1
KRT10	LOC284889	SNX12	SUB1
LDHA	KRT6C	PSAT1	CDC37
LDHB	KRT79	NT5C	CORO1A
TACSTD1	RAB43	EHD2	CD300A

[0346]

MCAM	KRT27	TAX1BP3	TMC6
MDH1	ACTBL2	CRNN	RFTN1
MEP1A	RP11-631M21.2	NOX3	SCRIB
MSN	TUBB2B	ATP6V0A4	SERBP1
2-Sep	KRT77	ITSN2	TTLL3
PGAM1	AGRN	GEMIN4	CACYBP
PGK1	RAB15	LAP3	SIT1
PKM2	LOC388524	CRYL1	SLC43A3
PPP1CA	LOC388720	MYO15A	PILRA
	HSP90AB2P	ATP6V1D	RPL26L1
PTPRC	ACTBL3	SNX9	MPP6
RAN	LOC442497	PCYOX1	GNG2
RDX	A26C1A	ANKFY1	TMED9
SDCBP	HIST2H4B	UFC1	DOCK10
STX3	hCG_1757335	FAM49B	C3orf10
STXBP1	HLA-A29.1	CUTA	MYO1G
STXBP2	LOC653269	ATP6V1H	FLJ21438
TPI1	A26C1B	VPS24	SLC38A1
EZR	LOC100128936	CMPK1	FERMT3
YWHAE	LOC100130553	UPB1	ITFG3
TUBA1A	LOC100133382	CLIC5	HIST1H2AH
WDR1	LOC100133739	MUPCDH	SLAMF6
PDCD6IP	AP2A2	CLIC6	TMC8
GPA33	ALDH3B1	SIAE	LOC153364
TUBA1B	FASLG	CPVL	SVIP
TUBB2C	ATP4A	RHOF	TMEM189-UBE2V1
CAPN7	CAPS	ARL15	hCG_16001
DDAH1	COL12A1	ZNHIT6	FABP5L7
PGLS	DMBT1	GIPC2	Del(X)1Brd
SAMM50	DSP	PCDH24	ABP1
CLIC4	EGFR	VPS13C	ACTN3
CHMP2B	EPHA5	CC2D1A	AFM
ULK3	EPHB1	EPS8L1	AKT1
RNF11	FAT	C10orf18	ALDH3A2
VPS4A	HSD17B4	CHCHD3	ALOX12P2
ARFIP1	L1CAM	C2orf18	ANXA2P1
CHMP2A	LAMA5	C17orf80	KRT33B
SMPDL3B	MUC4	EPN3	MYOC
PACSIN3	NOTCH1	UACA	SERPINE1
EHD4	PPP2R1B	VPS13D	PIK3CA
EHD3	PTPRF	APPL2	NRP1
HEBP1	SORT1	ARL8B	SPRY1
VPS28	SERPINB3	DDX19A	EMILIN1
DCXR	SELP	NAGK	LRG1
RHCG	FSCN1	ITLN1	AZGP1P1
CHMP5	TGFB1	CCDC132	LOC728533
VTA1	CLTCL1	OTUB1	ALDH7A1

[0347]

[0348]

RAB14	CHST1	CDK5RAP2	AXL
GPRC5B	EIF3I	MBD5	CFB
CAB39	TNFSF10	SLC22A11	C1S
RAB8B	MAP7	SUSD2	CAT
TM7SF3	COPB2	SUCNR1	CD47
MXRA8	HEPH	BDH2	CD151
C11orf59		NIT2	CDH13
MOBKL1B	CIB1	RPL23AP13	CFTR
UEVLD	SLC34A2	FAM20C	CEACAM8
TSNAXIP1	SLC6A14	SLC12A9	AP1S1
GPRC5C	DIP2A	RAB25	CLTA
GNG12	TNPO3	SMURF1	CNGB1
BAIAP2L1	FER1L3	TMEM27	COL1A1
MUC13	CNTLN	RAB22A	COL1A2
CHMP1B	TUBB4Q	NDRG3	COL2A1
SLC44A2	KIF15	ERMN	COL3A1
CPNE5	SERINC1	TAOK1	COL4A1
TMBIM1	PDIA2	KIAA1529	COL4A2
EPS8L3	EPS8L2	RNF213	COL4A3
MMRN2	PLVAP	WIZ	COL5A1
TTYH3	MYADM	ACE2	COL5A2
SLC44A4	MUC16	PLEKHA1	COL7A1
RAB1B	KRT25	SCPEP1	COMP
RAB33B	SERINC5	AASDHPPT	CPS1
RBP5	LOC440264	FIGNL1	CSF1
C5orf32	AGT	PBLD	VCAN
ABHD14B	ALPP	KIF9	SLC25A10
MOBKL1A	APOA2	LEPRE1	CTBP2
ARRDC1	APOB	RAB17	CTNNA2
	APOE	IKZF5	DCTN1
FAM125A	SERPING1	MMP25	DECR1
SNX18	C1QB	MPP5	DNASE1L1
CHMP4B	C1R	TEKT3	ENG
MITD1	C4A	ALDH8A1	STX2
S100A16	C4B	SLC13A3	ETFB
CPNE8	C4BPA	DUSP26	F2R
C1orf58	C4BPB	GGCT	F8
GLIPR2	CD5L	TMEM38A	ACSL1
TUBB	FCN1	C1orf116	FAP
ATP6V1C2	FCN2	GDPD3	FBLN1
FTLL1	FGB	OR2A4	FBN1
PEF1	FGG	FAM65A	FBN2
SERPINA3	GRIN1	NARG1L	FEN1
ACP2	MSH6	CHMP6	FLT1
ACPP	HBA1	DYNC2H1	FUCA2
ACTA2	HBA2	PRKRIP1	GAS6
ACTC1	ITGA2B	GSTCD	GDI1
ACTG2	PPARG	PIP4K2C	GLDC

[0349]

ACY1	PDLIM7	CYBRD1	GNAL
APCS	CD274	FUZ	GRM2
APOD	A1BG	ARMC9	GRM3
APRT	ACAT1	NAT13	GRM7
AQP1	ACO1	COASY	GSTM1
AQP2	ADCY1	UBXN6	GSTM5
ARF1	ADFP	COL18A1	H2AFX
ARF3	ADH5	BHLHB9	HBE1
ARF4	ADH6	WNT5B	HMGCS2
ARF5	PARP4	CAB39L	TNC
ARF6	AHSG	ITM2C	IDH3B
RHOA	AK1	LOC81691	IFRD1
ARL3	ALAD	AMN	ITGA5
ASAH1	ALCAM	SH3BGRL3	ITGB5
ASS1	ALDH2	C9orf58	ITPR2
FXYD2	ALDH9A1	BCL2L12	KRT84
BHMT	ALDOC	RAB34	LAMB1
BST2	ALK	TBC1D10A	LCN1
C3	ALOX12	GPR98	LGALS8
CA2	ALPL	HDHD2	LMNA
CA4	ANXA13	ARL6	LOXL2
CALB1	AOX1	IQCG	LTBP2
CALR	APAF1	C2orf16	MAP1A
CD9	APOA4	PARD6B	MAT1A
CD59	SHROOM2	TXNDC17	MC1R
HSPA5	RHOB	ABCC11	MCC
HSPA6	ARHGAP1	FAM40A	ME1
HSP90AB1	ARHGDIB	SCIN	MECP2
HSPD1	ARSE	SCRN2	MAP3K1
IDH1	ARSF	ZNF486	MFAP4
KNG1	ASL	ACY3	SCGB2A1
KRAS	ASNA1	C11orf52	ALDH6A1
LAMP1	ATIC	CRB3	MOS
LGALS3BP	ATP6V1A	C20orf114	CITED1
LRP2	ATP6V1B1	NAPRT1	NEFH
MAN1A1	ATP6V1B2	RG9MTD2	OPRM1
RAB8A	ATP6V0C	SAT2	OTC
MIF	ATP6V1C1	KIF12	OXTR
MME	ATP6V1E1	MAL2	PAPPA
MUC1	ATP6V0A1	OSBPL1A	PC
MYH9	ATP6AP1	VASN	PCOLCE
NAGLU	AZU1	SLC22A12	PDGFRB
NONO	BCR	ACSM1	PFKFB3
NPM1	BGN	TTC18	PGAM2
NRAS	BLMH	GSTO2	SERPINE2
P2RX4	BLVRA	CLRN3	PLP2
P4HB	BLVRB	LRRK2	PPP1CC
PEBP1	BPI	C12orf59	SRGN

[0350]

SERPINA5	BTG1	LOC124220	MAP2K6
PFN1	BTN1A1	SLC5A10	PSMB7
PFN2	TSPO	CCDC105	PSMB10
ABCB1	C1QC	C1orf93	PTK7
SERPINA1	CAPN5	ARL8A	PTPRK
PIGR	C5	LOC128192	PZP
PIK3C2B	C9	GALM	RAD21
PKD1	PTTG1IP	LRRC15	RASA1
PLSCR1	CACNA2D1	LOC131691	RDH5
PODXL	CALML3	H1FOO	RPL18
CTSA	CAMK4	ENPP6	RPL29
PPIA	CAMP	CMBL	RPS10
PSAP	CAPG	MUM1L1	RPS24
PSMB3	CAPN1	C20orf117	S100A13
PTBP1	CAPN2	SIRPA	SAA4
PTPRJ	CAPZA2	PLEKHA7	ATXN1
RAB1A	CD14	A2ML1	CLEC11A
RAB2A	CD80	C16orf89	SDC2
RAB3B	CD36	TOM1L2	SMARCA4
RAB5A	SCARB2	KIF18B	SPOCK1
RAB5B	CD40	C19orf18	STAT1
RAB13	CDC2	PM20D1	STC1
RAB27B	CEL	PROM2	SURF4
RAB5C	CETP	GPR155	SYT1
RAC1	CTSC	SLC36A2	TAGLN
RALB	AP2M1	VPS37D	TCN1
RAP1B	CSN1S1	SLC5A12	TERF1
RBM3	CSN2	SLC5A8	TGFB2
RNASE2	CSN3	EML5	TSPAN4
S100A6	ACSL3	TBC1D21	TSN
S100A11	FOLR1	ZNF114	TSNAX
S100P	B4GALT1	ANO6	COL14A1
SLC1A1	GNAQ	SLC5A9	WNT5A
SLC2A5	HBB	CRTC2	ZNF134
SLC12A1	HBD	C20orf106	PXDN
SLC12A3	CFH	TMEM192	SMC1A
SNCG	HLA-G	ARMC3	OFD1
SNRPD1	HP	NAPEPLD	COPS3
SOD1	HPR	C10orf30	STC2
SRI	IGHA1	ATP6V0D2	ADAM9
TF	IGJ	STXBP4	CREG1
THBS1	IGLC1	C17orf61	CDK5R2
THY1	IGLC2	TXNDC8	TNFSF18
TMPRSS2	IGLC3	LRRC57	MPZL1
TSG101	LAMC1	HSPA12A	SEMA5A
TUBB2A	LPA	MAGI3	CLDN1
UBE2N	LPL	C11orf47	RGN
UMOD	LRP1	SLC39A5	SLC16A3

[0351]

UPK2	LTF	C12orf51	ARHGEF1
VTN	TACSTD2	SLC46A3	LRRFIP2
EIF4H	MBL2	VMO1	TAAR2
YWHAB	MYH8	SLC26A11	CRIPT
YWHAG	NEB	LOC284422	ENTPD4
YWHAZ	PON1	CRB2	IFT140
NPHS2	PKN2	HIST2H2AB	RNF40
RAB7A	PROS1	FAM151A	RB1CC1
PSCA	MASP1	SLC6A19	PSMD6
CUBN	RELN	PKD1L3	MRC2
BBOX1	PTX3	LOC342897	HDAC5
RAB11A	RARS	EGFL11	RASA4
NAPA	SILV	SERINC2	SLC25A13
PROM1	THBS2	PDDC1	PSMD14
FCGBP	TLR2	SLCO4C1	TFG
CPNE3	TTN	SFT2D2	CDIPT
MGAM	TTR	C9orf169	CRTAP
GPRC5A	TYRP1	LOC377711	UNC13B
RAB11B	VWF	OR11L1	ARL6IP5
VAMP3	CLIP2	RAB19	TGOLN2
SLC9A3R1	XDH	LOC440335	POSTN
ITM2B	APOL1	HIST2H2BF	CLPX
NAPSA	FCN3	LOC441241	TSPAN9
VPS4B	SELENBP1	KPRP	TMED10
RAB3D	SMC3	HSP90AB6P	SLC38A3
PRDX6	DDX21	LOC643751	IL1RAPL1
KIAA0174	CCPG1	LOC651536	GALNT5
PDCD6	ABCG2	LOC652968	PRR4
ARPC4	SFI1	AEBP1	ITGA11
TSPAN1	MVP	AMY1A	CLASP2
PDZK1IP1	AKAP9	AMY1B	EPB41L3
NUTF2	PRG4	AMY1C	KIAA0467
FLOT1	AKR1A1	AMY2A	DULLARD
HRSP12	ABCA7	ANGPT1	NOMO1
A2M	COLEC10	APLP2	KIAA0146
ACP1	GNB5	APP	SLC39A14
ACTA1	MMRN1	AQP5	DNPEP
ACTN4	CLASP1	AZGP1	CASP14
ACTN1	SYNE1	CEACAM1	STX12
ACTN2	NIPBL	BMP3	BRMS1
ADAM10	CHRDL2	CA6	ABI3BP
AHCY	HSPB8	DDR1	PLEKHG3
ALDH1A1	ANGPTL4	CAPNS1	FBXW8
SLC25A4	NIN	COL6A2	GAPDHS
SLC25A5	ZNF571	COPA	GREM1
SLC25A6	LRP1B	CPD	DKK3
ANXA1	CNDP2	DLD	SRPX2
ANXA2P2	DNAH7	ETFA	IGHV3-11

APOA1	HCN3	GLUD1	IGHV3-7
ARHGDIA	EXOC4	HSD17B10	IGLV4-3
ARVCF	SNX25	IMPDH2	IGLV3-21
	TC2N	HTATIP2	IGLV1-40
	HAPLN3	MARVELD2	ST6GALNAC6
ATP1B1	CD163L1	CST4	COPS4
ATP5A1	HRNR	CST5	HERC5
ATP5B	P704P	CTSB	NUSAP1
ATP5I	CD24	DAG1	PLUNC
ATP5O	COL6A3	DSG2	PPME1
B2M	COL15A1	TOR1A	MBD3
CALM1	COMT	ECM1	SLC38A2
CALM2	CP	EIF4G1	FAM64A
CALM3	CPN2	EXT2	GTPBP2
CANX	CRABP2	FAT2	DIRAS2
CAPZA1	CRK	GPC4	DCHS2
CD2	CRYAB	FOLH1	QPCTL
CD247	CRYM	FUT2	PARP16
CD86	CSE1L	FUT3	TMEM51
CD37	CSK	FUT6	MCM10
CD44	CSTB	FUT8	CHST12
CD53	CTH	GLRX	LYAR
CDC42	CTNS	GPC1	ODZ3
CDH1	CTSD	GPX3	WDR52
CFL1	CTSG	IGHA2	ASH1L
CFL2	DDB1	IGHVα	UNC45A
COX4I1	DDC	IGLα	SLC7A10
COX5B	DDX3X	IVL	PNO1
CLDN3	DDX5	KRT12	CD248
CSPG4	CFD	LAMA4	AHRR
CSRP1	DNM2	LAMB2	ZBTB4
CST3	DPYS	LGALS7	SPTBN4
CTNNA1	DSC2	LMAN1	LGR6
CTNNB1	DSG3	LPO	RNF123
NQO1	ECE1	LTBP3	PRDM16
DYNC1H1	MEGF8	DNAJB9	PARVG
EEF1A2	ELA2	MEST	RMND5A
EFNB1	SERPINB1	MGAT1	FAT4
CTTN	EPHX2	MGP	FLJ13197
EPHB4	FBL	MUC5AC	TREML2
ERBB2	EVPL	MUC7	SVEP1
F5	F11	NEU1	OBFC1
FASN	FABP1	NUCB1	ZNF614
FKBP1A	ACSL4	NUCB2	FLJ22184
FLNA	FAH	FURIN	DBF4B
FLNB	EFEMP1	PAM	CD276
G6PD	FBP1	PLG	CMIP
GCNT2	FKBP4	FXYD3	ADAMTS12

[0352]

PDIA3	FKBP5	PLOD2	SPACA1
GSN	FRK	PLTP	VANGL1
HADHA	FTH1	PON3	SPRY4
HLA-DMB	FUCA1	PPP1CB	HYI
HLA-E	GABRB2	PRELP	FAM108A1
HNRNPA2B1	GALK1	DNAJC3	TMEM47
HNRNPH2	GBE1	HTRA1	MYCBPAP
HSPA1L	GDF2	RARRES1	RAB6C
HSPA2	GFRA1	SAA1	FAM71F1
HSPA4	GK2	SAA2	ZNF503
HSPA7	GLO1	SEPP1	PARP10
HSPA9	GLUL	SFRP1	SHANK3
HSP90AA4P	GM2A	ST3GAL1	LACRT
HSP90AA2	GNG5	SLC5A5	TRIM41
HSP90AB3P	GOT1	SLC9A1	OXNAD1
HSPE1	GPD1	SLC20A2	LDHAL6B
HSPG2	GPM6A	SLPI	LOC92755
ICAM1	GPT	SRPR	CACNA2D4
ITGA6	GPX4	STAU1	ARHGAP18
ITGA2	GRB2	HSPA13	AHNAK2
ITGAV	GRID1	TGFBI	RPLP0P2
	GSR	TGM1	PGLYRP2
ITGB2	GSS	TGM3	RAB39B
ITGB4	GSTM2	YES1	GYLTL1B
JUP	HGD	HIST2H2AA3	KRT74
CD82	HINT1	HIST2H2BE	SLAIN1
KPNB1	HNMT	GALNT4	LOC122589
KRT2	HNRNPL	B4GALT3	NLRP8
KRT5	HPD	TNFSF13	PODN
KRT8	HPX	TNFSF12	C5orf24
KRT13	HRG	ANGPTL1	CD109
KRT14	DNAJA1	GCNT3	TRIM40
KRT15	HSPB1	TM9SF2	GPR112
KRT16	DNAJB1	DDX23	KRT72
KRT18	CFI	ADAMTS3	VTI1A
KRT19	IGF2R	GPR64	SYT9
LAMP2	IGFALS	LHFPL2	KRT80
LGALS4	IL1RN	ST3GAL6	CCDC64B
LYZ	IRF6	PRDX4	ATP8B3
	ITGA1	MAN1A2	C1orf84
MFGE8	EIF6	OS9	LOC149501
MMP7	ITGB8	MGAT4A	LOC150786
MYH10	ITIH4	TWF2	WDR49
MYL6	KHK	CLCA4	NEK10
MYO1C	KIFC3	TXNDC4	STOML3
MYO1D	KLK1	PLCB1	SASS6
NME1	LBP	CES3	DCLK2
NME2	LCN2	B3GAT3	FREM3

[0353]

PRDX1	LCP1	TOR1B	C9orf91
PCBP1	LTA4H	IGHV3OR16-13	TREML2P
CHMP1A	BCAM	IGLV2-11	CCDC129
SERPINF1	MAN2A1	IGLV1-44	PAN3
PHB	MDH2	IGKV3D-15	MAMDC2
PPIB	MFI2	IGKV4-1	RCOR2
PRKAR2A	MLLT3	C1GALT1C1	LOC283412
PRKDC	MLLT4	RACGAP1	LOC283523
PSMA2	MNDA	EFEMP2	NOMO2
QSOX1	MPO	DUOX2	SEC14L4
PYGB	MPST	SDF4	LCN1L1
RAB6A	MYO1B	CYB5R1	LOC286444
RALA	MSRA	ERAP1	TAS2R60
RAP1A	MTAP	NUDT9	KRT18P19
RPL6	MTHFD1	FAM3B	LOC343184
RPL8	MYH3	FAM20A	LOC345041
RPLP1	MYO5B	FAM55D	GNAT3
RPLP2	MYO6	ANO1	POLN
RPN1	NID1	LRRC16A	LOC376693
RPS3	NKX6-1	TTC17	ARMS2
RPS7	NQO2	PDGFC	LOC387867
RPS13	NP	PCDHGB5	LOC388339
RPS14	NPC1	CCL28	FLG2
RPS15A	NPHS1	UGCGL1	LOC388707
RPS18	NRF1	SEMA3G	LOC389141
RPS20	NT5E	CORO1B	LOC390183
RPS21	PAFAH1B1	NDRG2	KRT8P9
RPS27A	PAFAH1B2	KIAA1324	LOC391777
RRAS	PCBD1	TXNDC16	LOC391833
S100A10	PCK1	ARHGAP23	LOC399942
SDC1	PDCD2	MUTED	LOC400389
SDC4	PDE8A	TINAGL1	LOC400578
SLC1A5	ENPP3	TOR3A	LOC400750
SLC2A1	SLC26A4	VWA1	LOC400963
	PDZK1	CHID1	FLJ21767
SLC12A2	PEPD	TMEM109	LOC401817
SLC16A1	PFKL	GAL3ST4	NOMO3
SPTBN1	PGD	THSD4	LOC439953
SSBP1	PGM1	UXS1	RPL12P6
SSR4	SLC25A3	TXNDC5	LOC440589
TBCA	SERPINA4	CRISPLD1	LOC440917
TCEB1	SERPINB6	LOXL4	LOC440991
TFRC	SERPINB13	GNPTG	LOC441876
TKT	PIK3C2A	SCGB3A1	LOC442308
TSPAN8	PIP	CHST14	DIPAS
TPM1	PKD2	C1QTNF1	LOC643300
HSP90B1	PKLR	C1QTNF3	LOC643358
TUBA4A	PKHD1	SLC26A9	LOC643531

[0354]

TUFM	PLCD1	FAM129A	RPSAP8
TXN	PLOD1	HIST2H3C	LOC644464
UBA52	PLS1	TPRG1L	LOC644745
UBB	UBL3	TMPRSS11B	LOC645018
UBC	PPL	C20orf70	LOC645548
UBA1	PPP1R7	PPM1L	LOC646127
UBE2V2	PRCP	GBP6	LOC646316
UGDH	PRKCA	KRT78	LOC646359
UQCRC2	PRKCD	SLC37A2	LOC646785
VCP	PRKCH	NPNT	LOC646875
VIL1	PRKCI	KRT73	LOC646949
YWHAH	PRKCZ	HIST2H3A	LOC647000
CXCR4	PRNP	VWA2	LOC647285
SLC7A5	PRSS8	GSTK1	LOC650405
HIST1H4I	PRTN3	SBSN	LOC650901
HIST1H4A	PSMA1	C5orf46	LOC652493
HIST1H4D	PSMA3	LRRC26	LOC652797
HIST1H4F	PSMA4	C4orf40	LOC653162
HIST1H4K	PSMA5	LOC440786	PPIAL3
HIST1H4J	PSMB1	SCFV	LOC653232
HIST1H4C	PSMB2	LGALS7B	HSPBL2
HIST1H4H	PSMB5	HIST2H3D	LOC728002
HIST1H4B	PSMB6	ACAT2	LOC728088
HIST1H4E	PSMC5	ACTL6A	LOC728576
HIST1H4L	PSMD12	ADK	LOC728590
HIST2H4A	PSME2	ANXA8L2	LOC728791
TAGLN2	PTPN6		LOC728979
RUVBL1	PTPN13		ANG
VAMP8	PTPRO		BDNF
SNAP23	QDPR	CAV1	CALU
IQGAP1	RAB27A	CD70	CCR4
KRT75	RAP1GDS1	CS	CCR5
TJP2	RBL2	DARS	CSF2
ROCK2	RBP4	DHX9	CSF3
ARPC3	RENBP	DPYSL2	DCN
ACTR3	RFC1	EEF1D	EPO
LRPPRC	RHEB	EPRS	F3
TRAP1	RNH1	FDPS	GPC5
TUBB4	RNPEP	FLNC	GDF1
GNB2L1	ROBO2	XRCC6	GDF9
BAIAP2	RP2	GFPT1	GFRA3
HYOU1	RPS11	HIST1H1B	GRN
AGR2	RREB1	HIST1H2BB	CXCL2
OLFM4	RYR1	H3F3A	GZMA
CCT2	S100A4	H3F3B	HIST1H2BD
ATP5L	S100A8	HNRNPF	HGF
CCT8	S100A9	HNRNPK	IFNG
SLC12A7	SERPINB4	IARS	IGFBP3

[0355]

MASP2	SCN10A	LAMA3	IGFBP4
IQGAP2	SEC13	LAMB3	IGFBP6
RAB10	SECTM1	LAMC2	IGFBP7
PRDX3	SH3BGRL	LGALS1	IL1RAP
EHD1	SHMT1	NBR1	IL3
TMED2	SHMT2	MARS	IL5
LMAN2	SLC3A1	MX1	IL6ST
YWHAQ	SLC4A1	PFKP	IL7
GCN1L1	SLC5A1	PLAU	IL8
RAB35	SLC5A2	PSMB4	IL10
DSTN	SLC6A13	PSMC2	IL11
UPK1A	SLC9A3	PSMC4	IL13
PHB2	SLC15A2	PSMD2	IL15RA
RRAS2	SLC25A1	PSMD13	INHBA
SEC31A	SLC22A2	PYGL	INHBB
CLSTN1	SLC22A5	RPL10	IPO5
PTGR1	SMO	RPL15	LIF
RAB21	SORD	STX4	LRP6
CYFIP1	SORL1	TARS	LTBP1
SLC44A1	SPAST	CLDN5	MMP1
CORO1C	SPR	TPBG	MMP2
MTCH2	SPRR3	XPO1	MMP3
QPCT	SRC	XRCC5	MMP10
PRDX5	ST13	BAT1	NBL1
SND1	STK11	HIST1H2BG	TNFRSF11B
F11R	VAMP7	HIST1H2BF	OSM
LIMA1	SYPL1	HIST1H2BE	PDGFA
RAB6B	SERPINA7	HIST1H2BI	PRKCSH
KRT20	TECTA	HIST1H2BC	CCL2
VPS35	TGM4	HIST1H4G	CCL7
TOMM22	TGFBR3	EIF3A	CCL20
AKR1B10	TGM2	EIF3B	SFRP4
S100A14	TLN1	EIF3C	SOD3
DIP2B	DNAJC7	SLC5A6	SPARC
RAP2C	UBE2G1	HIST2H2AA4	TIMP1
FAM129B	UPK1B	LOC728358	TIMP2
	UGP2	LOC730839	TIMP3
AHNAK	UPK3A	LOC100126583	ICAM5
VPS37B	UTRN	AARS	TNFRSF1A
TUBA4B	VASP	AK2	VEGFC
ARPC5L	VCL	APEH	GDF5
EPPK1	VDAC1	FAS	HIST3H3
ADSL	VDAC3	BAX	HIST1H2AI
AP2A1	XPNPEP2	FMNL1	HIST1H2AL
RHOC	BTG2	CASP9	HIST1H2AC
RHOG	GCS1	CD19	HIST1H2AM
ASNS	BAT2	MS4A1	HIST1H2BN
	PTP4A2	CD22	HIST1H2BM

[0356]

[0357]

CAD	DYSF	TNFRSF8	HIST1H2BH
CBR1	EEA1	SCARB1	HIST1H2BO
CBR3	STK24	ENTPD1	HIST1H3A
CCT6A	CUL4B	CD48	HIST1H3D
CDH17	CUL3	CD58	HIST1H3C
CEACAM5	ATRN	CD74	HIST1H3E
COPB1	CDC42BPA	CD79B	HIST1H3I
CLDN4	PPFIA2	CD97	HIST1H3G
CLDN7	AKR7A2	41889	HIST1H3J
CRYZ	PPAP2A	CR2	HIST1H3H
CD55	ABCB11	CSNK2B	HIST1H3B
EEF1G	MAP2K1IP1	DBI	FADD
EPHA2	EIF3H	DHCR7	IL1RL2
EIF4A1	SLC4A4	DLG1	FGF18
EIF4A2	SNX3	DOCK2	FGF16
ENO2	MYH13	DUT	HIST1H3F
SLC29A1	NAPG	ECH1	HIST1H2AG
EPHB2	FBP2	VAPA	HIST1H2BJ
EPHB3	SCEL	H2AFY	NRG2
ESD	SUCLA2	PDIA4	GDF3
F7	GGH	EIF4A3	FGF19
FLOT2	PROZ	ACTR1B	GDF11
GARS	SQSTM1	OPTN	FST
GMDS	AP1M1	NAMPT	LASS1
GNB3	RAB7L1	MPZL2	HPSE
HIST1H2AE	WASL	STIP1	ESM1
HLA-C	PLOD3	PKP3	DKK1
HLA-H	PGLYRP1	POFUT2	IL17B
HPCAL1	KALRN	QPRT	IL19
	CLIC3	WBP2	TNFRSF12A
IGHα	BAZ1B	ERO1L	IL23A
IGHG1	SPAG9	H2AFY2	FGFRL1
IGHG2	SLC13A2	RCC2	TREM1
IGHG3	ATP6V0D1	RTN4	IL1F9
IGHG4	HGS	GLT25D1	CXCL16
IGHM	AP4M1	RNASE7	IL22RA1
IGKC	ATP6V1F	FCRLA	HIST1H2BK
ITGA3	PTER	H2AFV	HIST3H2BB
KRT3	TRIP10	MRLC2	LOC440093
KRT4	SLC9A3R2	PAGE2	PGAM4
KRT6A	SLIT2	HIST1H2BA	PC-3
KRT6B	SLC22A6	SNX33	LOC729500
KRT7	KL	PTRF	KRT18P26
KRT17	KIF3B	HIST2H2BC	S100A11P
RPSA	SLC22A8	ANXA8	LOC729679
LFNG	GRHPR	NME1-NME2	KRT17P3
LGALS3	SLC22A13	EIF2S1	RCTPI1
LRP4	TMPRSS11D	EIF2S3	LOC729903

[0358]

CD46	GSTO1	EIF4E	RP11-556K13.1
MICA	NPEPPS	EPB41L2	LOC100129982
MYH11	TMEM59	EVI2B	LOC100130100
NARS	ATP6V1G1	FCER2	LOC100130446
NEDD4	CDC42BPB	FGR	LOC100130562
RPL10A	CREB5	FH	LOC100130624
PCNA	CROCC	GART	LOC100130711
PLEC1	DHX34	GOT2	LOC100130819
PLXNA1	TMEM63A	NCKAP1L	LOC100131713
PPP2R1A	SLK	HLA-DPB1	LOC100131863
PSMC6	RUSC2	HLA-DQA1	LOC100132795
PSMD3	OXSR1	HNRNPA1	LOC100133211
PSMD11	SLC23A1	HNRNPC	LOC100133690
RAC3	DOPEY2	HPRT1	SET
RAP2A	ABI1	ICAM3	CCT6B
RAP2B	GNPDA1	INSR	ACTR3B
RPL12	TOM1	EIF3E	PSMA8
RPLP0	ABCB6	ITGAL	ARP11
RPS4X	ABCC9	ITGB3	BCHE
RPS4Y1	HUWE1	ITGB7	H2AFZ
RPS8	ARPC5	ITIH2	SNRPE
RPS16	ACTR2	STMN1	TFPI
SPTAN1	TSPAN3	LCK	ADAMTS1
VAMP1	ARPC2	LSP1	GDF15

[0359]

표 3. 폴리펩타이드 적재물 및 리시버			
일반적인 부류			
안키린 반복 단백질		**파이브로넥틴**	**리아제**
항체	보체 수용체	GPI-연결된 폴리펩타이드	나노바디
압타머	환형 펩타이드	HEAT 반복 단백질	핵산
ARM 반복 단백질	DARPins	가수분해효소	폴리펩타이드
탄수화물	DNAses	키나제	단일-사슬 가변성 단편 (scFv)
세포 표면 수용체	효소	지질단백질	테트라트리코펩타이드 반복 단백질
보체			
C1 억제제	C4 결합 단백질	CR3	인자 I
C3 베타 사슬 수용체	CD59	CR4	상동성 제한 인자
C3aR	CR1	부패-가속 인자 (DAF)	멤브레인 보조인자 단백질 (MCP)
C3eR	CR2	인자 H	PRELP
효소			
트리아실글리세롤 리파제	담즙산-CoA 가수분해효소	페룰로일 에스테라제	포스파티데이트 포스파타제
(S)-메틸말로닐-CoA 가수분해효소	비스(2-에틸헥실)프탈레이트 에스테라제	포르밀-CoA 가수분해효소	포스파티딜글리세로포스파타제
[아실-담체-단백질] 포스포디에스테라제	비스포스포글리세레이트 포스파타제	푸룩토스-비스포스파타제	포스파티딜이노시톨 데아실라제
[포스포릴라제] 포스파타제	카복실-에스테르 가수분해효소	푸마릴아세토아세타제	포스포디에스테라제 I

1,4-락토나제	카복시메틸렌부테노리다제	푸사리닌-C 오르니틴에스테라제	포스포글리세레이트 포스파타제
11-시스-레티닐-팔미테이트 가수분해효소	셀룰로스-폴리설파타제	갈락토리파제	포스포글라이콜레이트 포스파타제
1-알킬-2-아세틸글리세로포스포콜린 에스테라제	세팔로스포린-C 탈아세틸화효소	글루코노락토나제	포스포이노시티드 포스포리파제 C
2'-하이드록시바이페닐-2-설피네이트 디설피나제	세레브로시드-설파타제	글루코스-1-포스파타제	포스포리파제 A1
2-피론-4,6-디카복실레이트 락토나제	세트락세이트 벤질에스테라제	글루코스-6-포스파타제	포스포리파제 A2
3', 5'-비스포스페이트 뉴클레오티다제	클로로게네이트 가수분해효소	글루타티온 티올에스테라제	포스포리파제 C
3-하이드록시이소부티릴-CoA 가수분해효소	클로로필라제	글리세롤-1-포스파타제	포스포리파제 D
3'-뉴클레오티다제	콜린에스테라아제	글리세롤-2-포스파타제	포스포노아세트알데하이드 가수분해효소
3-옥소아디페이트 엔올-락토나제	콜린-설파타제	글리세로포스포콜린 포스포디에스테라제	포스포노아세테이트 가수분해효소

[0360]

[0361]

3-피타아제	콜로일-CoA 가수분해효소	글리코시다아제, 즉 O- 및 S-글리코실 화합물을 가수분해하는 효소	포스포노피루베이트 가수분해효소
4-하이드록시벤조일-CoA 티오에스테라제	콘드로-4-설파타제	글리코설파타제	인단백질 포스파타제
4-메틸옥살로아세테이트 에스테라제	콘드로-6-설파타제	글리코실라제	포스포르-디에스테르 가수분해효소
4-피타아제	시트레이트-분해효소 탈아세틸화효소	히스티디놀-포스파타제	포스포르-모노에스테르 가수분해효소
4-피리독소락토나제	코카인 에스테라제	호르몬-민감한 리파제	포스포르-트리에스테르 가수분해효소
5'-뉴클레오티다제	커티나제	가수분해성 N-글리코실 화합물	포스포세린 포스파타제
6-아세틸글루코스 탈아세틸화효소	사이클라메이트 설포가수분해효소	가수분해성 S-글리코실 화합물	폴리(3-하이드록시부티레이트) 해중합효소
6-포스포글루코노락토나제	시스테인 엔도펩티다아제	하이드록시아실글루타티온 가수분해효소	폴리(3-하이드록시옥타노에이트) 해중합효소
a-아미노-산 에스테라제	시스테인-유형 카복시펩티다아제	하이드록시부티레이트-이량체 가수분해효소	폴리뉴리딘-알데하이드 에스테라제
a-아미노-아실-펩타이드 가수분해효소	D-아라비노놀락토나제	하이드록시메틸글루타릴-CoA 가수분해효소	단백질-글루타메이트 메틸에스테라제

아세토아세틸-CoA 가수분해효소	데옥실리모네이트 A-고리-락토나제	이듀로네이트-2-설파타제	퀴럼-켄칭 N-아실-호모세린 락토나제
아세톡시부티닐 바이피오펜 탈아세틸화효소	dGTPase	이노시톨-포스페이트 포스파타제	레티닐-팔미테이트 에스테라제
아세틸아즈말린 에스테라제	디하이드로쿠마린 가수분해효소	유년-호르몬 에스테라제	세린 디하일다타제 또는 세린 하이드록시메틸 전달효소
아세틸알킬글리세롤 아세틸가수분해효소	디펩티다아제	카이뉴레니나제	세린 엔도펩티다아제
아세틸콜린에스테라제	디펩타이드 가수분해효소	L-아라비노놀락토나제	세린-에탄올아민포스페이트 포스포디에스테라제
아세틸-CoA 가수분해효소	디펩티딜-펩티다아제 및 트리펩티딜-펩티다아제	라이모닌-D-고리-락토나제	세린-유형 카복시펩티다아제
아세틸에스테라제	이중인산-모노에스테르 가수분해효소	지질단백질 리파제	S-포르밀글루타티온 가수분해효소
아세틸피루베이트 가수분해효소	디설포글루코사민-6-설파타제	L-람노노-1,4-락토나제	시알레이트 O-아세틸에스테라제
아세틸살리실레이트 탈아세틸화효소	도데카노일-[아실-담체-단백질] 가수분해효소	라이소포스포리파제	시나핀 에스테라제

[0362]

아세틸실란 에스테라제	엔도데옥시리보뉴클레아제 생산 3'-포스포모노에스테르	만니톨-1-포스파타제	부위 특이적 엔도데옥시리보뉴클레아제: 절단은 서열 특이적이 아님
산 포스파타제	엔도데옥시리보뉴클레아제 생산 5'-포스포모노에스테르	메탈로카복시펩티다아제	변경된 염기에 대해 특이적인 부위-특이적 엔도데옥시리보뉴클레아제.
물질의 막관통 운동을 촉매하기 위해 산 무수물에 작용	알려지지 않은 촉매 기전의 엔도펩티다아제	메탈로엔도펩티다아제 .	부위-특이적 엔도데옥시리보뉴클레아제: 절단은 서열 특이적임
세포 및 세포하 운동을 촉진하기 위해 산 무수물에 작용	엔도리보뉴클레아제 생산 3'-포스포모노에스테르	메틸포스포티오글리세레이트 포스파타제	스핑고미엘린 포스포디에스테라제
세포 및 세포하 운동을 촉진하기 위해 GTP에 작용	엔도리보뉴클레아제 생산 5'-포스포모노에스테르	메틸엄벨리페릴-아세테이트 탈아세틸화효소	S-석시닐글루타티온 가수분해효소
인-질소 결합에 작용	리보- 또는 데옥시리보핵산으로 활성이고 3'-포스포모노에스테르를 생산하는 엔도리보뉴클레아제	모노테르펜 ε-락톤 가수분해효소	스테로이드-락토나제

[0363]

[0364]

황-질소 결합에 작용	리보- 또는 데옥시리보핵산으로 활성이고 5'-포스포모노에스테르를 생산하는 엔도리보뉴클레아제	N-아세틸갈락토사민-4-설파타제	스테롤 에스테라제
악티노마이신 락토나제	산 무수물에 작용하는 효소	N-아세틸갈락토사민-6-설파타제	스테릴-설파타제
아실카르니틴 가수분해효소	탄소-탄소 결합에 작용하는 효소	N-아세틸갈락토스아미노글리칸 탈아세틸화효소	석시닐-CoA 가수분해효소
아실-CoA 가수분해효소	펩타이드 결합 이외의 탄소-질소 결합에 작용하는 효소	N-아세틸글루코사민-6-설파타제	수크로스-포스페이트 포스파타제
아실글리세롤 리파제	탄소-인 결합에 작용하는 효소	N-설포글루코사민 설포가수분해효소	당-포스파타제
아실옥시아실 가수분해효소	탄소-황 결합에 작용하는 효소	올레오일-[아실-담체-단백질] 가수분해효소	황산-에스테르 가수분해효소
아실피루베이트 가수분해효소	에테르 결합에 작용하는 효소	오메가 펩티다아제	탄나제
ADAMTS13	할라이드 결합에 작용하는 효소	오르셀리네이트-디프사이드 가수분해효소	티오에스테르 가수분해효소
아데노신 데아미나제	펩타이드 결합에 작용하는 효소 (펩티다아제)	옥살로아세타제	티오에테르 및 트리알킬설포늄 가수분해효소

[0365]

아데닐릴-[글루타메이트—암모니아 리가제] 가수분해효소	인-질소 결합에 작용하는 효소	팔미토일[단백질] 가수분해효소	트레오닌 엔도펩티다아제
ADP-의존적 중간-사슬-아실-CoA 가수분해효소	황-질소 결합에 작용하는 효소	팔미토일-CoA 가수분해효소	티미딘 포스포릴라제
ADP-의존적 단쇄-아실-CoA 가수분해효소	황-황 결합에 작용하는 효소	펙틴에스테라제	트레할로스-포스파타제
ADP-포스포글리세레이트 포스파타제	에테르 가수분해효소 .	펩티딜 펩타이드 가수분해효소	트리아세테이트-락토나제
알칼리성 포스파타제	엑소데옥시리보뉴클레아제 생산 5'-포스포모노에스테르	펩티딜-아미노-산 가수분해효소	트리포스포르-모노에스테르 가수분해효소
전-트랜스-레티닐-팔미테이트 가수분해효소	리보- 또는 데옥시리보핵산으로 활성이고 3'-포스포모노에스테르를 생산하는 엑소뉴클레아제	펩티딜아미노-산 가수분해효소 또는 아실아미노-산 가수분해효소	트리티오네이트 가수분해효소
아미노아실-tRNA 가수분해효소	리보- 또는 데옥시리보핵산으로 활성이고 5'-포스포모노에스테르를 생산하는 엑소뉴클레아제	펩티딜-디펩티다아제	트로핀에스테라제
아미노펩티다아제	엑소리보뉴클레아제 생산 3'-포스포모노에스테르	페닐아세틸-CoA 가수분해효소	유비퀴틴 티올에스테라제

[0366]

아릴에스테라제	엑소리보뉴클레아제 생산 5'-포스포모노에스테르 .	페닐알라닌 암모니아 분해효소	UDP-설포퀴노보스 합성효소
아릴설파타제	인자 IX	페닐알라닌 하이드록실라제	우리카제
아스파라기나제	인자 VIII	페오포르비다제	우로노락토나제
아스파르트산 엔도펩티다아제	지방-아실-에틸-에스테르 합성효소	플로레틴 가수분해효소	왁스-에스테르 가수분해효소
b-디케톤 가수분해효소		포르볼-디에스테르 가수분해효소	실로노-1,4-락토나제

[0367]

표 4. 표적			
표적의 일반적인 부류			
미생물	폴리펩타이드	DNA	아미노산
진균	독소	RNA	프리온
박테리아	지질	기생충	사이토카인
바이러스	세포	세포 잔해	
감염성 질환-관련된 표적			
리포폴리사카라이드	세포 침입 단백질	인터메딜리신	분비된 효과기 단백질 sptP
조나 폐색 독소	콜레라 장독소	침습 단백질 sipA	실리게리올리신
액틴 중합 단백질 RickA	시스테인 프로테아제	아이오타 독소 구성요소 Ia	세린 프로테아제
액틴 중합 단백질 RickA	세포치명적인 팽창성 독소	이반올리신	시가 독소
아데노신 일인산염-단백질 전달효소 vopS	사이톨라이신	LepB	스핑고미엘리나제
아데닐레이트 사이클라제	세포독성 괴사성 인자	치명적인 인자	스타필로키나제
아데닐레이트 사이클라제 ExoY	세포독소	류코톡신	스트렙토키나제
ADP-리보실전달효소 효소적 구성요소	피부괴저성 독소	리스테리올리신	스트렙토리신
에어로리신	데유비퀴티나제	미생물 콜라겐분해효소	스트렙토파인
알파-독소	디프테리아 독소	외막 단백질 IcsA 자가수송체	수일리신
알베올리신	엔테로헤몰라이신	판톤-발렌타인 류코시딘 F	초항원
알베올리신	장독소	퍼프링올리신	T3SS 분비된

			효과기 EspF
안트롤리신 O	표피 세포 분화 억제제	백일해 독소	테타누스독소증 독소
Arp2/3 복합체-활성화 단백질 rickA	세포외효소	포스포리파제	Tir
2원 ADP-리보실전달효소 CDT 독소	외독소	플라스미노겐 활성제	TolC
보툴리눔 신경독소	G-뉴클레오타이드 교환 인자	뉴몰리신	독소 충격 증후군 독소
C2 독소, 구성요소 II	구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자 sopE	보호 항원	아연-카복시펩티다아제
CagA	열 안정한 장독소	단백질 키나제	아연-카복시펩티다아제
칼모듈린-민감한 아데닐레이트 사이클라제	IgA-특이적 세린 엔도펩티다아제 자가수송체	피올리신	Zn-의존적 펩티다아제
세포 주기 억제 인자	이노시톨 포스페이트 포스파타제 sopB	RTX 독소	
지질 & 세포 표적			
순환하는 종양 세포	초저밀도 지질 (VLDL)	트리글리세라이드	지방산
전이	고밀도 지질단백질	카일로마이크론	콜레스테롤
진핵 세포	저밀도 지질단백질	아포지질단백질	

[0368]

[0369]

표 5. 암			
급성 림프아구성 백혈병 (ALL)	결장직장암	거대글로불린혈증, 발덴스트롬	흉막폐 모세포종, 소아기
급성 골수성 백혈병 (AML)	두개인두종, 소아기	남성 유방암	임신 및 유방암
부신피질 암종	피부 T-세포 림프종	뼈 및 골육종의 악성 섬유질 조직구종	원발성 중추신경계 (CNS) 림프종
AIDS-관련된 카포시 육종	관상피내 암종 (DCIS)	흑색종	전립선암
AIDS-관련된 림프종	배아 종양, 소아기	머켈 세포 암종	희귀 암
항문암	자궁내막 암	중피종	직장암
맹장암	뇌실막세포종, 소아기	잠복 원발을 갖는 전이성 편평상피 목암	신장 세포 암종
별아교세포종, 소아기	상피 암	NUT 유전자를 포함한 정중선 관 암종	신우 및 요관, 이행 세포 암
비전형적 기형/횡문근양 종양, 소아기	식도암	몰 임신	망막모세포종
기저 세포 암종	비강신경교세포종, 소아기	입 및 구강인두 암	횡문근육종
담도암	유잉 육종	다중 내분비 신조직형성 증후군, 소아기	타액샘 암
방광암	고환외 생식세포 종양	다발성 골수종/형질 세포 신생물	육종
골암	간외 담도암	균상식육종	이차 암
장암	안암	골수이형성 증후군	세자리 증후군
뇌간 신경아교종,	담낭암	골수이형성/골수증식	피부암

소아기		성 신생물	
뇌 종양	위암	골수증식성 장애, 만성	피부암 (비 흑색종)
유방암	위장 유암종	비강 및 부비동 암	소세포 폐암
기관지 종양, 소아기	생식세포 종양	비인두 암	소장 암
버킷 림프종	임신성 융모성 종양 (GTT)	신경교세포종	연조직 육종
알려지지 않은 원발성의 암	신경아교종	비-호지킨 림프종	편평상피 세포 암종
뼈로 퍼진 암	모발 세포 백혈병	비-소세포 폐암	잠복 원발, 전이성을 갖는 편평상피 목 암
뇌로 퍼진 암	두경부 암	식도암	위 (위의) 암
간으로 퍼진 암	심장 암, 소아기	구강암	위암
폐로 퍼진 암	간세포 (간) 암	구강 암	T-세포 림프종, 피부 - 균상식육종 및 세자리 증후군 참고
유암종	조직구증, 랑게르한스 세포	구강인두 암	고환암
알려지지 않은 원발성의 암종	호지킨 림프종	골육종 (골암)	인후두암
심장 (심장) 종양, 소아기	하인두 암	골육종 및 악성 섬유질 조직구종	흉선종 및 흉선 암종
중추신경계 비전형적 기형/횡문근양 종양, 소아기	안구내 흑색종	난소암	갑상선암
중추신경계 배아 종양, 소아기	소도세포 종양, 췌장 신경내분비 종양	췌장 암	신우 및 요관의 이행 세포 암
중추신경계,	신장암	췌장 신경내분비	알려지지 않은

[0370]

소아기		종양 (소도세포 종양)	원발성 암
자궁경부암	랑게르한스 세포 조직구증	유두종증, 소아기	요관 및 신우, 이행 세포 암
척색종, 소아기	후두 암	부신경절종	요도 암
융모막암종	백혈병	부갑상선암	자궁암, 자궁내막
만성 림프구성 백혈병 (CLL)	입술 및 구강 암	음경암	자궁 육종
만성 골수성 백혈병 (CML)	간암	인두 암	질암
만성 골수증식성 장애	상피내 소엽 암종 (LCIS)	크롬친화세포종	외음부암
결장암	낮은 악성 잠재적 종양	뇌하수체 종양	발덴스트롬 거대글로불린혈증
림프종	폐암	형질 세포 신생물/다발성 골수종	윌름스 종양

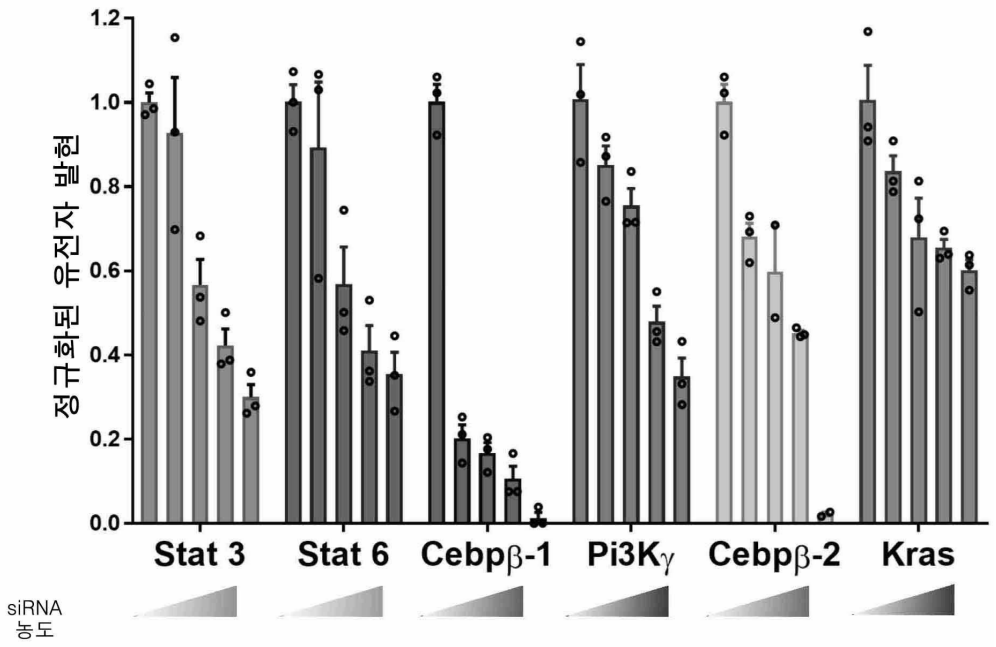
[0371]

[0372] 본 발명은 단지 청구범위에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하지 않는 예시적인 실시형태로 간주되어야 하는 대표적인 실시예와 관련하여 설명되었다. 과학 간행물, 논문, 교과서, 특허 출원 및 발행된 특허를 포

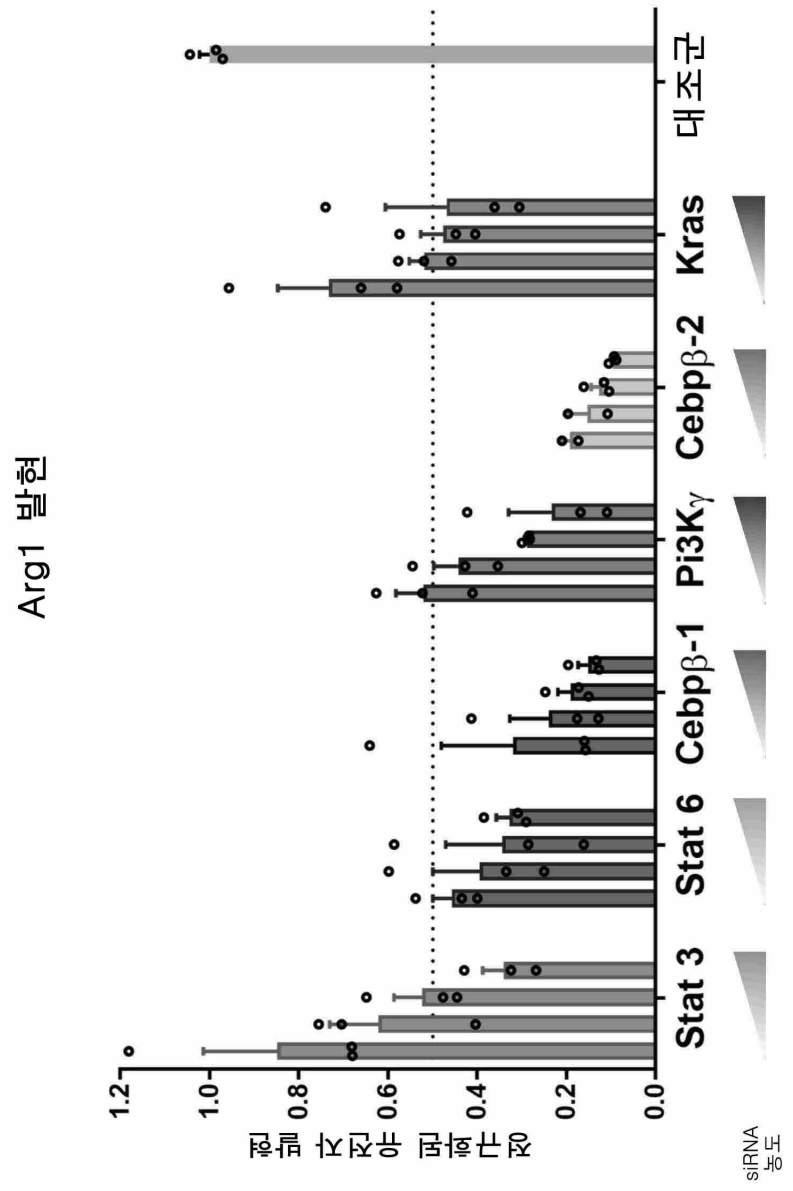
함한 출판물에 대한 모든 언급은 이로써 모든 목적을 위해 참고로 포함된다.

도면

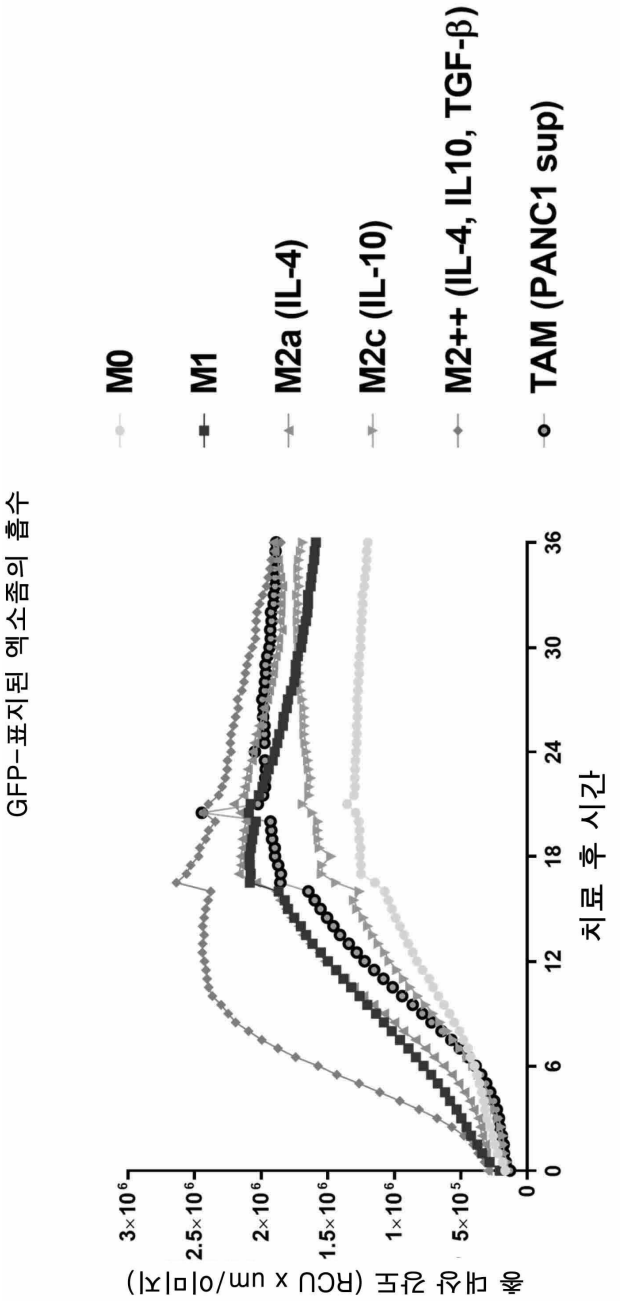
도면1



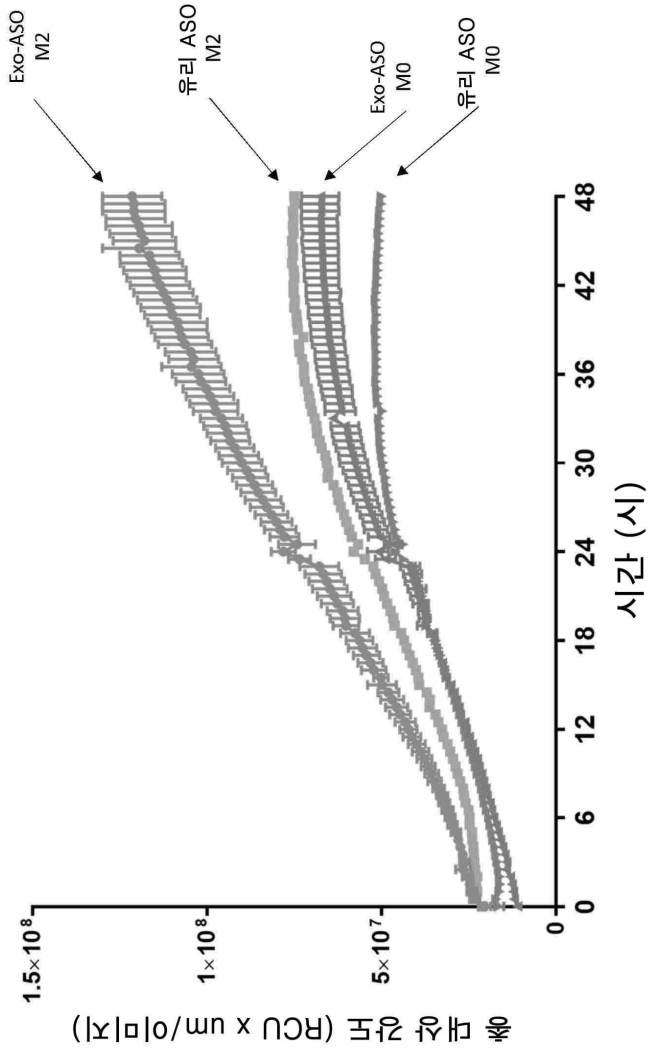
도면2


Arg1 발현
정규화된 유전자 발현
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Stat 3
Stat 6
Cebpβ-1
Pi3Kγ
Cebpβ-2
Kras
대조군
siRNA 농도

도면3


GFP-표지된 엑소좀의 흡수
M0
M1
M2a (IL-4)
M2c (IL-10)
M2++ (IL-4, IL10, TGF-β)
TAM (PANC1 sup)
3×10^6
2.5×10^6
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
0
6
12
18
24
30
36
치료 후 시간
총 면적 강도 (RCU x um/이미지)

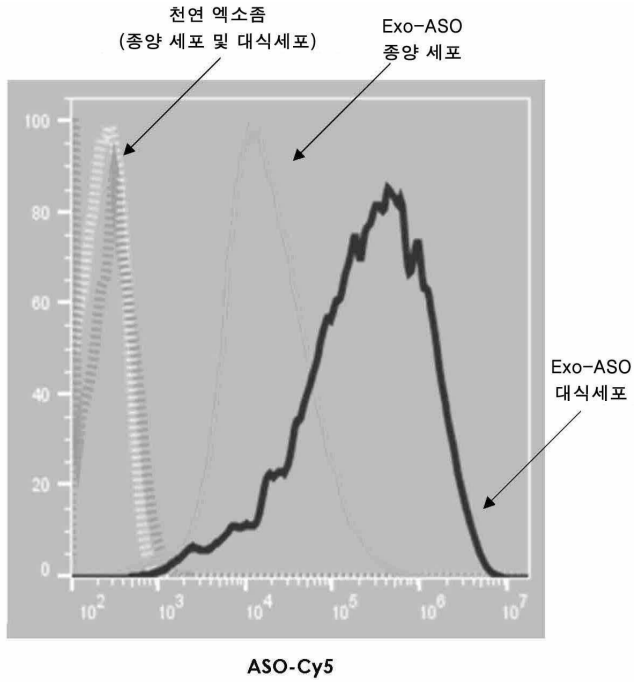
도면4


Exo-ASO M2
유리 ASO M2
Exo-ASO M0
유리 ASO M0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시)
0
5×10⁷
1×10⁸
1.5×10⁸
총 대상 강도 (RCU x um/이미지)

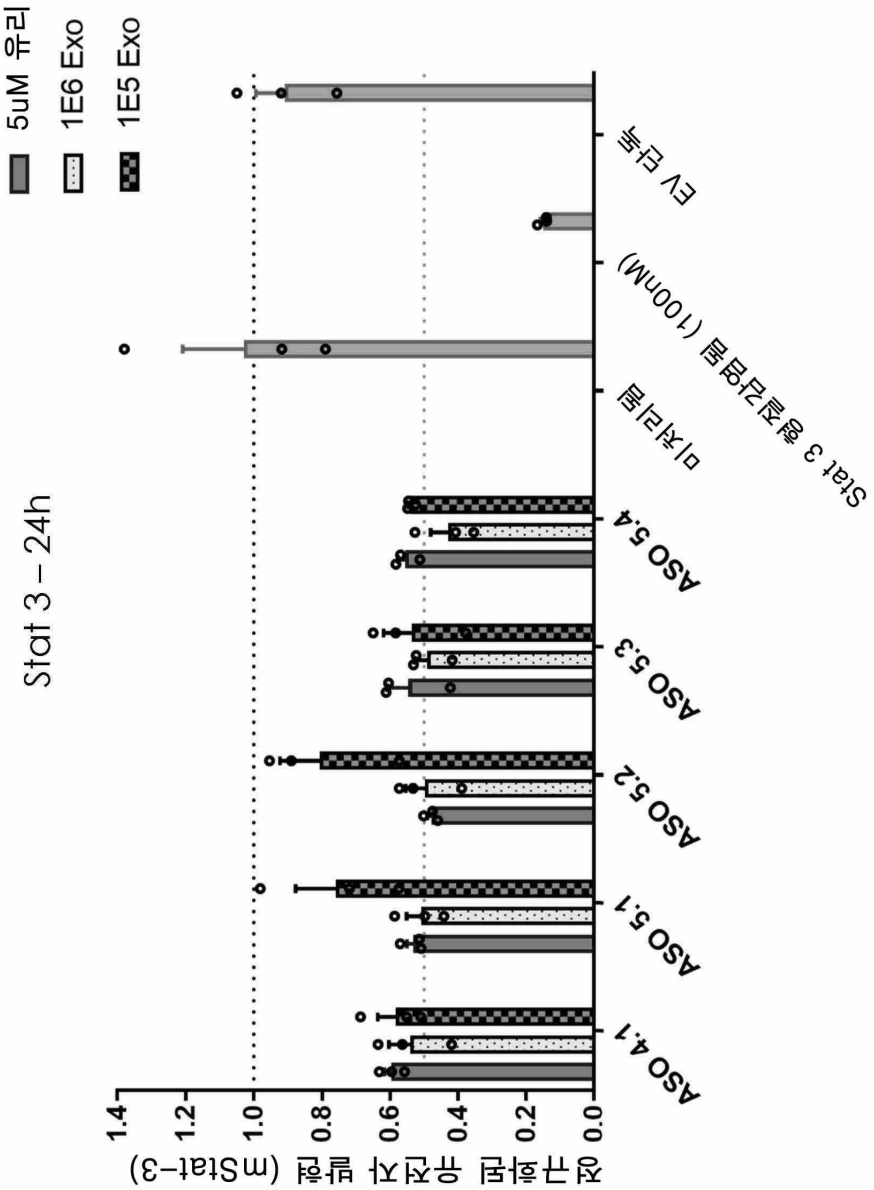
도면5a


복막 엑소좀 흡수 (1시간)
복막 평균
10⁶
10⁵
10⁴
1e12 EVs
1e11 EVs
B 세포
DC
중성구
NK 세포
T 세포
대식세포

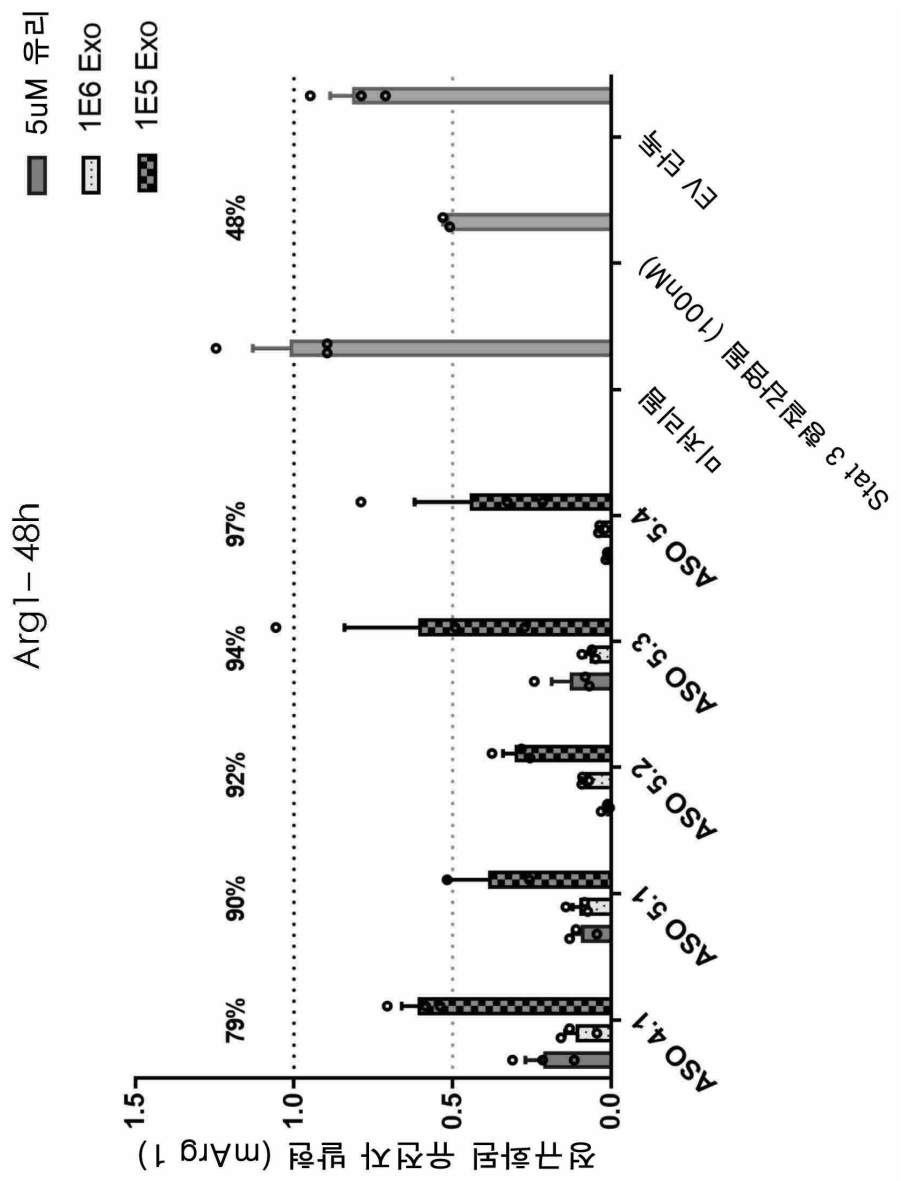
도면5b


천연 엑소좀
(종양 세포 및 대식세포)
Exo-ASO
종양 세포
Exo-ASO
대식세포
100
80
60
40
20
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
ASO-Cy5

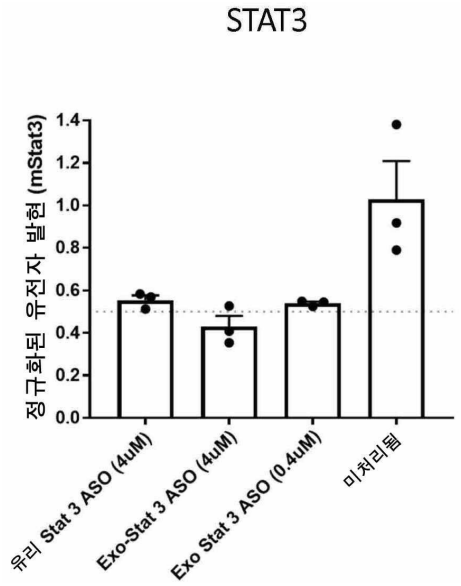
도면6


5uM 유리
1E6 Exo
1E5 Exo
Stat 3 – 24h
정규화된 유전자 발현 (mStat-3)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
EV 단독
Stat 3 형질감염물 (100nM)
미처리물
ASO 5.4
ASO 5.3
ASO 5.2
ASO 5.1
ASO 4.1

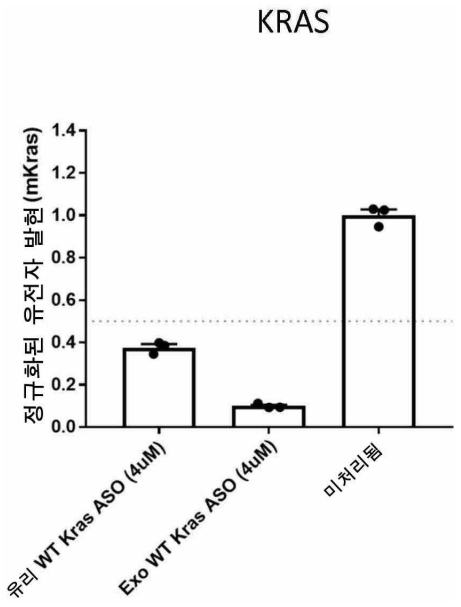
도면7


5uM 유리
1E6 Exo
1E5 Exo
Arg1- 48h
정규화된 유전자 발현 (mArg 1)
1.5
1.0
0.5
0.0
79%
90%
92%
94%
97%
48%
ASO 4.1
ASO 5.1
ASO 5.2
ASO 5.3
ASO 5.4
미처리군
Stat 3 억제제 물질 (100nM)
EV 단독

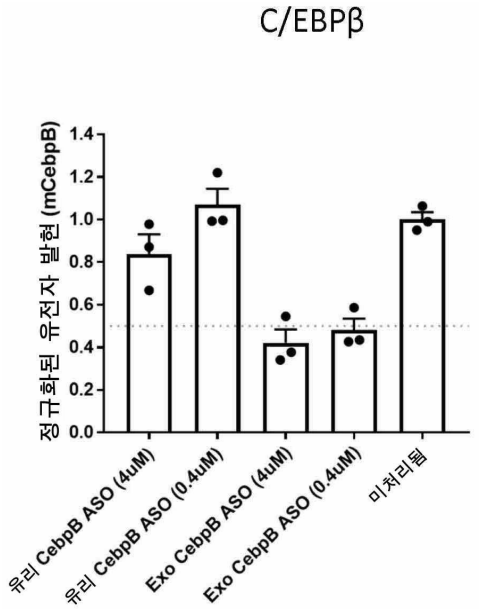
도면8a


STAT3
정규화된 유전자 발현 (mStat3)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
유리 Stat 3 ASO (4uM)
Exo-Stat 3 ASO (4uM)
Exo Stat 3 ASO (0.4uM)
미처리됨

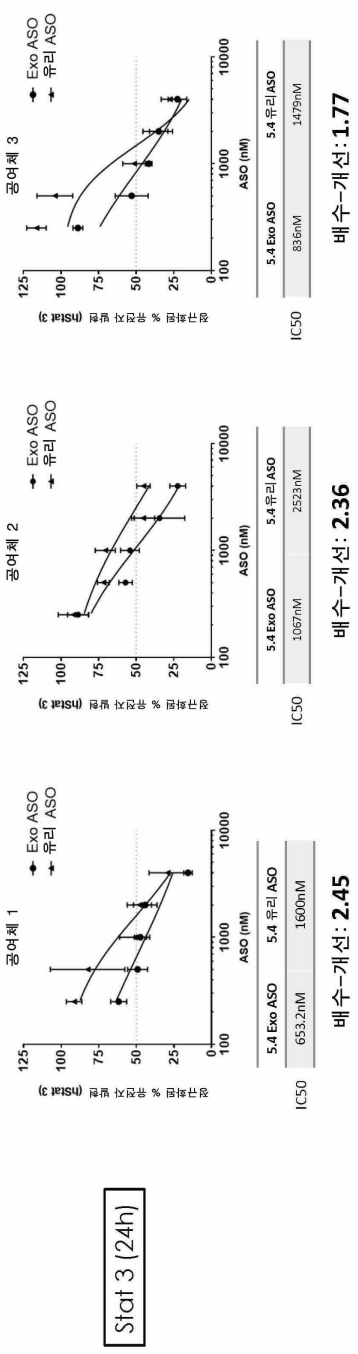
도면8b


KRAS
정규화된 유전자 발현 (mKras)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
유리 WT Kras ASO (4uM)
Exo WT Kras ASO (4uM)
미처리됨

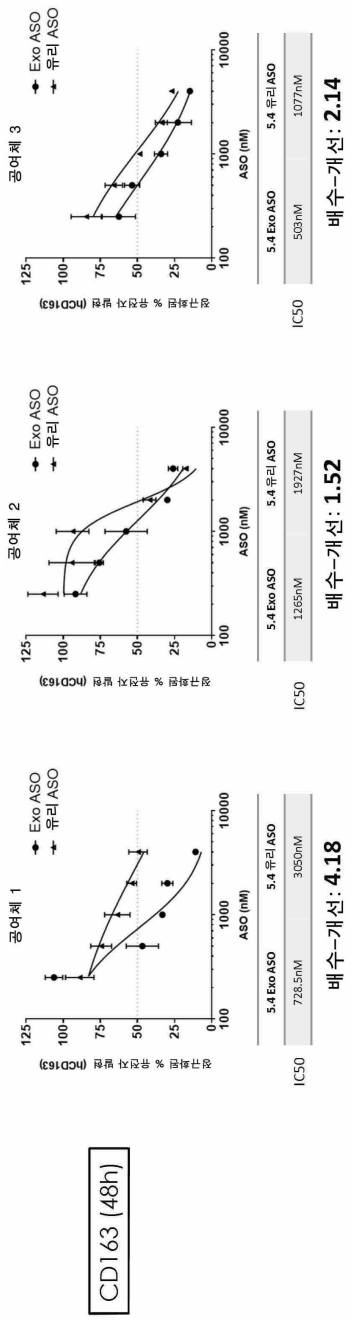
도면8c


C/EBPβ
정규화된 유전자 발현 (mCebpB)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
유리 CebpB ASO (4uM)
유리 CebpB ASO (0.4uM)
Exo CebpB ASO (4uM)
Exo CebpB ASO (0.4uM)
미처리됨

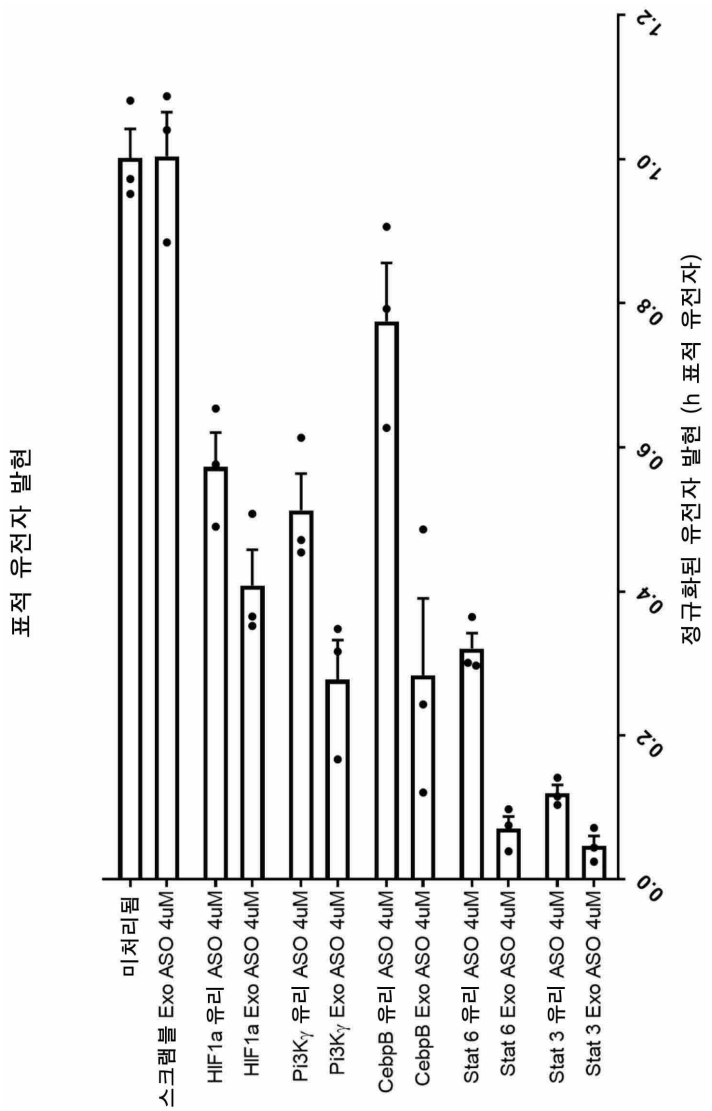
도면9a


Stat 3 (24h)
공여체 1
Exo ASO
유리 ASO
정규화된 % 유전자 발현 (hStat 3)
ASO (nM)
IC50
5.4 Exo ASO
5.4 유리 ASO
653.2nM
1600nM
배수-개선: 2.45
공여체 2
Exo ASO
유리 ASO
정규화된 % 유전자 발현 (hStat 3)
ASO (nM)
IC50
5.4 Exo ASO
5.4 유리 ASO
1067nM
2523nM
배수-개선: 2.36
공여체 3
Exo ASO
유리 ASO
정규화된 % 유전자 발현 (hStat 3)
ASO (nM)
IC50
5.4 Exo ASO
5.4 유리 ASO
836nM
1479nM
배수-개선: 1.77

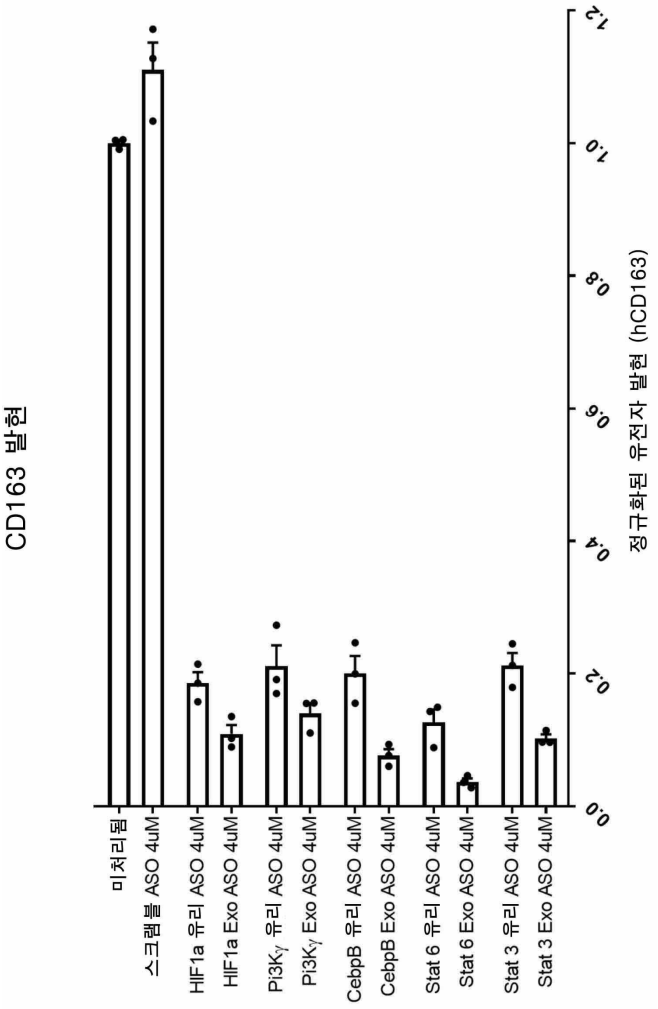
도면9b


CD163 (48h)
공여체 1
Exo ASO
유리 ASO
정규화된 % 유전자 발현 (HCD163)
ASO (nM)
IC50
5.4 Exo ASO
5.4 유리 ASO
728.5nM
3050nM
배수-개선: 4.18
공여체 2
Exo ASO
유리 ASO
정규화된 % 유전자 발현 (HCD163)
ASO (nM)
IC50
5.4 Exo ASO
5.4 유리 ASO
1265nM
1927nM
배수-개선: 1.52
공여체 3
Exo ASO
유리 ASO
정규화된 % 유전자 발현 (HCD163)
ASO (nM)
IC50
5.4 Exo ASO
5.4 유리 ASO
503nM
1077nM
배수-개선: 2.14

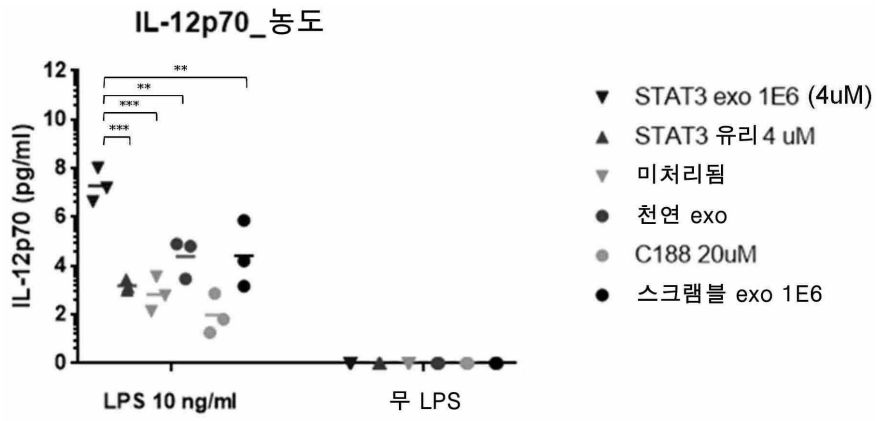
도면10


표적 유전자 발현
정규화된 유전자 발현 (h 표적 유전자)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
미처리됨
스크램블 Exo ASO 4uM
HIF1a 유리 ASO 4uM
HIF1a Exo ASO 4uM
Pi3Kγ 유리 ASO 4uM
Pi3Kγ Exo ASO 4uM
CebpB 유리 ASO 4uM
CebpB Exo ASO 4uM
Stat 6 유리 ASO 4uM
Stat 6 Exo ASO 4uM
Stat 3 유리 ASO 4uM
Stat 3 Exo ASO 4uM

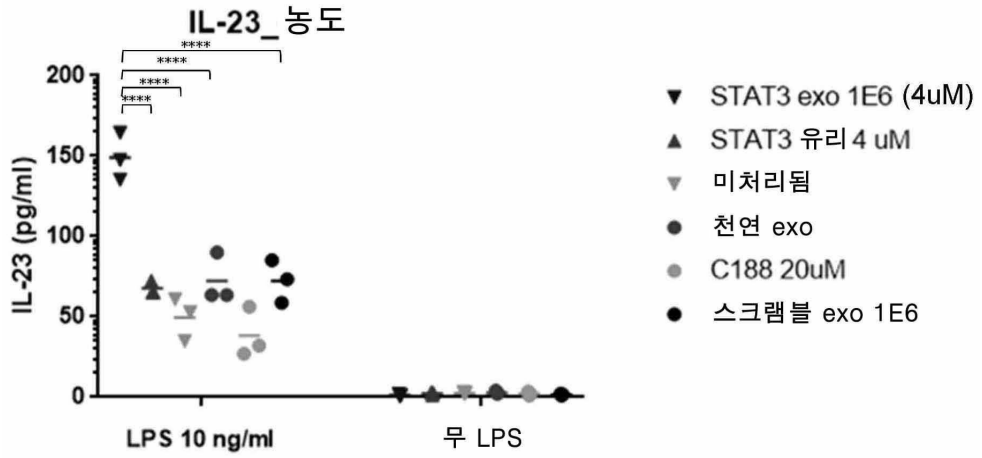
도면11


CD163 발현
정규화된 유전자 발현 (hCD163)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
미처리됨
스크램블 ASO 4uM
HIF1a 유리 ASO 4uM
HIF1a Exo ASO 4uM
PI3Kγ 유리 ASO 4uM
PI3Kγ Exo ASO 4uM
CebpB 유리 ASO 4uM
CebpB Exo ASO 4uM
Stat 6 유리 ASO 4uM
Stat 6 Exo ASO 4uM
Stat 3 유리 ASO 4uM
Stat 3 Exo ASO 4uM

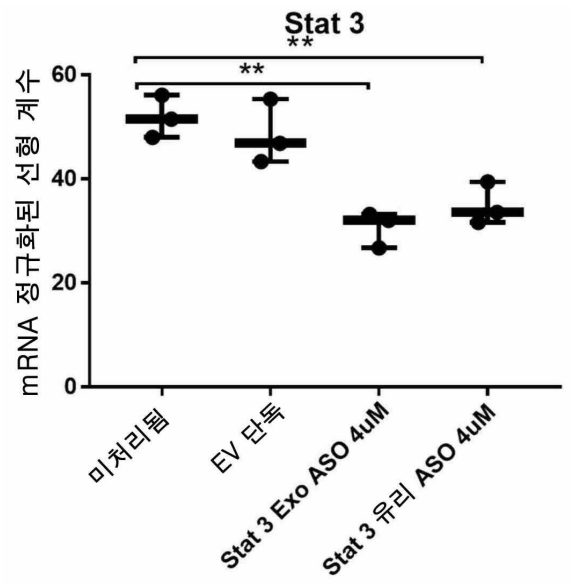
도면12a


IL-12p70_농도
IL-12p70 (pg/ml)
0
2
4
6
8
10
12
**
**
***
***
LPS 10 ng/ml
무 LPS
STAT3 exo 1E6 (4uM)
STAT3 유리 4 uM
미처리됨
천연 exo
C188 20uM
스크램블 exo 1E6

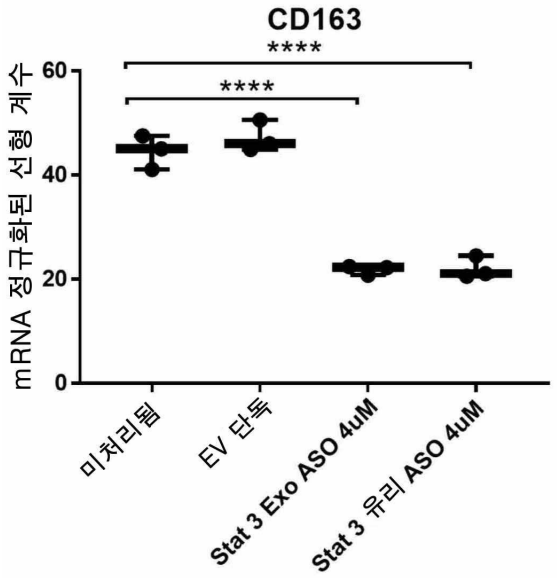
도면12b


IL-23_농도
IL-23 (pg/ml)
200
150
100
50
0
****
****
****
****
LPS 10 ng/ml
무 LPS
STAT3 exo 1E6 (4uM)
STAT3 유리 4 uM
미처리됨
천연 exo
C188 20uM
스크램블 exo 1E6

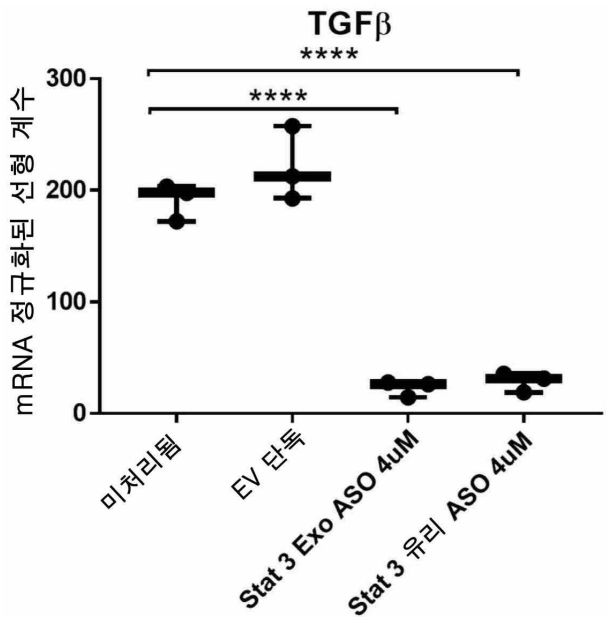
도면13a


Stat 3
**
**
mRNA 정규화된 선형 계수
60
40
20
0
미처리됨
EV 단독
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 유리 ASO 4uM

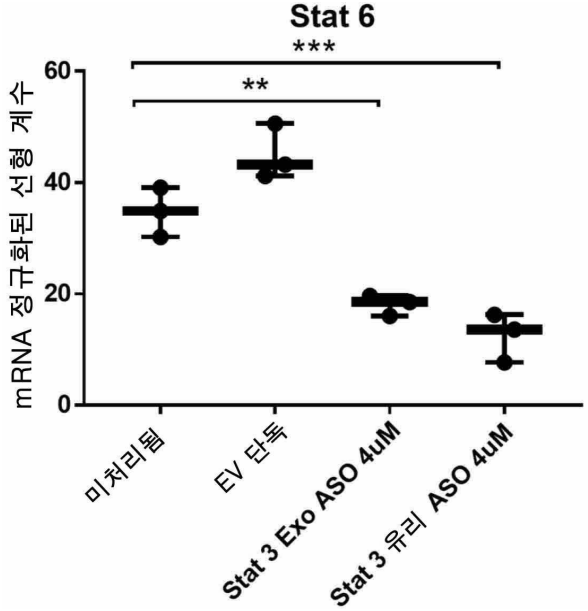
도면13b


CD163
****
****
mRNA 정규화된 선형 계수
60
40
20
0
미처리됨
EV 단독
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 유리 ASO 4uM

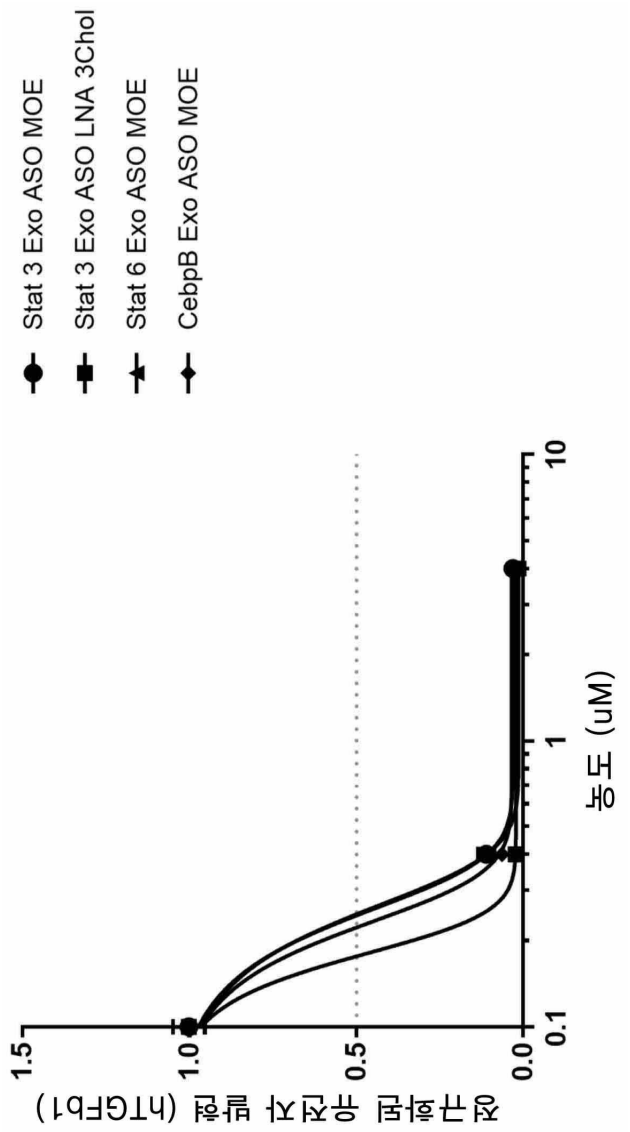
도면13c


TGFβ
****
****
mRNA 정규화된 선형 계수
300
200
100
0
미처리됨
EV 단독
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 유리 ASO 4uM

도면13d


Stat 6
***
**
60
40
20
0
mRNA 정규화된 선형 계수
미처리됨
EV 단독
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 유리 ASO 4uM

도면14



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CODIAK BIOSCIENCES, INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR MACROPHAGE POLARIZATION

<130> 32724-42664/WO

<140> PCT/US2019/017731

<141> 2019-02-12

<150> 62/629,563

<151> 2018-02-12

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 1

taagctgata attcaactca 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 2

tgagcgaatg gacaggtctt 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 3

tggatttaaa ggcaggcggc 20

<210>

4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 4

ttgggtaaag tcgtgcagca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 5

gtgcagtatt gtagccaggc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 6

gtagcatgta aatatagccc 20