(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114222564 A
(43)申请公布日 2022.03.22

(21)申请号 202080056426.2
(22)申请日 2020.06.04
(30)优先权数据
62/858,478 2019.06.07 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/036040 2020.06.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/247576 EN 2020.12.10
(71)申请人 哈佛大学校长及研究员协会
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 萨米尔·米特拉戈特里
安瓦伊·阿希施·乌基德维
赵宗民
(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
代理人 孙雪 张淑珍
(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 47/69(2006.01)

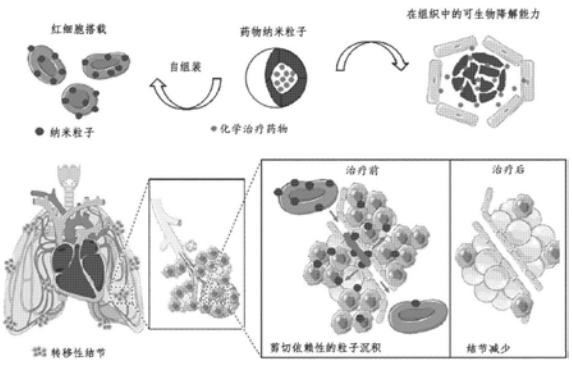
权利要求书5页 说明书100页 附图121页

(54)发明名称

与具有粘附粒子的红细胞有关的组合物和方法

(57)摘要

本文提供了具有粘附的聚合物粒子(即“背包”)的红细胞,所述红细胞向给予这些细胞的受试者提供了有效载荷治疗剂的递送。



CN 114222564 A

1.一种经工程化的细胞组合物,所述经工程化的细胞组合物含有:

a.红细胞;和

b.包含PLGA和至少一种治疗剂的粒子,其中,所述粒子位于所述红细胞的细胞表面上。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为至少50:50的L:G或更高的L。

3.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G。

4.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G。

5.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含酯末端和/或酸末端。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含酯末端。

8.根据权利要求1-6中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含酸末端。

9.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端。

10.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酸末端。

11.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

12.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

13.根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏和/或心脏。

14.根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酸末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏和/或肺。

15.根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于肾脏和/或肺。

16.根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端,由此将所述治疗剂靶向于肺、心脏和/或肾脏。

17.根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G,由此将所述治疗剂靶向于肺和/或肾脏。

18.根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例小于85:15的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的组合物,其中,所述至少一种治疗剂选自于:化学治疗剂、抗原、类固醇、免疫抑制剂、免疫刺激剂、病毒、小分子、肽、核酸和趋化因子。

20.根据权利要求19所述的组合物,其中,所述至少一种化学治疗剂选自于由以下组成的组:多柔比星、喜树碱、紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、甲氨蝶呤或它们的组合。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少100μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少150μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少200μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少250μg/3×10^8

个红细胞的浓度存在。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的组合物，其中，所述聚合物粒子的直径为约100nm至约10μm。

26.根据权利要求1-24中任一项所述的组合物，其中，所述聚合物粒子的直径为约100nm至约1μm。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的组合物，其中，所述聚合物粒子还包含一种或多种细胞粘附分子。

28.根据权利要求27所述的组合物，其中，所述一种或多种细胞粘附分子定位于所述粒子表面的区域。

29.根据权利要求27-28中任一项所述的组合物，其中，所述细胞粘附分子选自于由以下组成的组：特异性地与红血细胞上的分子结合的抗体试剂；特异性地与红血细胞上的分子结合的肽；细胞粘附聚合物；细胞粘附聚合电解质；以及红血细胞上的受体的配体。

30.根据权利要求29所述的组合物，其中，所述细胞粘附聚合电解质包括透明质酸、透明质酸-醛和/或聚(烯丙胺)盐酸盐。

31.根据权利要求30所述的组合物，其中，对所述透明质酸进行修饰以使其包含醛基。

32.根据权利要求29所述的组合物，其中，所述细胞粘附聚合物是多酚或金属-多酚网状物。

33.一种向受试者中的细胞递送治疗剂的方法，所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

34.根据权利要求33所述的方法，其中，所述细胞是癌细胞，并且所述治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如，IFN、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15和IL-27，以及其它免疫刺激拮抗剂，例如CpG ODN、咪喹莫特、瑞喹莫德(R848)、单磷酰脂A(MPLA)和聚(I:C))。

35.一种在有需要的受试者中治疗癌症和/或肿瘤的方法，所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

36.根据权利要求35所述的方法，其中，所述治疗剂是化学治疗剂或趋化因子。

37.根据权利要求33-36中任一项所述的方法，其中，所述癌细胞处于所述受试者的肺和/或所述受试者患有肺癌。

38.根据权利要求37所述的方法，其中，所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

39.根据权利要求33-36中任一项所述的方法，其中，所述癌细胞处于所述受试者的肾脏和/或所述受试者患有肾癌。

40.根据权利要求39所述的方法，其中，所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

41.根据权利要求39所述的方法，其中，所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

42.根据权利要求33-41中任一项所述的方法，其中，所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

43.根据权利要求33-42中任一项所述的方法，所述方法还包括向所述受试者给予放射或至少一种化学疗法。

44.一种在有需要的受试者中刺激免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物，其中，所述治疗剂是抗原、免疫刺激剂或趋化因

子。

45.根据权利要求44所述的方法,其中,所述免疫应答是局部的。

46.根据权利要求44-45中任一项所述的方法,其中,所述治疗剂是抗原,并且所述PGLA包含:a)比例为约50:50的L:G和酯末端;b)比例为约50:50的L:G和酸末端,或c)比例小于85:15的L:G和酯末端。

47.一种在有需要的受试者中减少或抑制免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂是免疫调节剂(例如,IL-4)或类固醇。

48.根据权利要求47所述的方法,其中,所述免疫应答是局部的。

49.根据权利要求44-48中任一项所述的方法,其中,所述受试者需要在肺中的免疫应答。

50.根据权利要求44-49中任一项所述的方法,其中,所述受试者需要治疗急性肺损伤。

51.根据权利要求47-50中任一项所述的方法,其中,所述治疗剂是类固醇或IL-4。

52.根据权利要求47-51中任一项所述的方法,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

53.根据权利要求47-51中任一项所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

54.根据权利要求33-53中任一项所述的方法,其中,给予治疗有效量的所述组合物。

55.根据权利要求33-54中任一项所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的50%以下。

56.根据权利要求33-54中任一项所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的40%以下。

57.根据权利要求33-54中任一项所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的30%以下。

58.根据权利要求33-54中任一项所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的20%以下。

59.根据权利要求33-54中任一项所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的10%以下。

60.用于向受试者中的细胞递送治疗剂的方法的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物,所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

61.根据权利要求60所述的组合物,其中,所述细胞是癌细胞,并且所述治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如,IFN、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15和IL-27,以及其它免疫刺激拮抗剂,例如CpG ODN、咪喹莫特、瑞喹莫德(R848)、单磷酰脂A(MPLA)和聚(I:C))。

62.用于在有需要的受试者中治疗癌症和/或肿瘤的方法的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物,所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

63.根据权利要求62所述的组合物,其中,所述治疗剂是化学治疗剂或趋化因子。

64.根据权利要求62-63中任一项所述的组合物,其中,所述癌细胞处于所述受试者的

肺和/或所述受试者患有肺癌。

65.根据权利要求64所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

66.根据权利要求62-65中任一项所述的组合物,其中,所述癌细胞处于所述受试者的肾脏和/或所述受试者患有肾癌。

67.根据权利要求66所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

68.根据权利要求66所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

69.根据权利要求60-68中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

70.根据权利要求60-69中任一项所述的组合物,还包括向所述受试者给予放射或至少一种化学疗法。

71.用于在有需要的受试者中刺激免疫应答的方法的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物,所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂是抗原、免疫刺激剂或趋化因子。

72.根据权利要求71所述的组合物,其中,所述免疫应答是局部的。

73.根据权利要求71-72中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂是抗原,并且所述PGLA包含:a)比例为约50:50的L:G和酯末端;b)比例为约50:50的L:G和酸末端,或c)比例小于85:15的L:G和酯末端。

74.用于在有需要的受试者中减少或抑制免疫应答的方法的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物,所述方法包括向所述受试者给予根据权利要求1-32中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂是免疫调节剂(例如,IL-4)或类固醇。

75.根据权利要求74所述的组合物,其中,所述免疫应答是局部的。

76.根据权利要求74-75中任一项所述的组合物,其中,所述受试者需要在肺中的免疫应答。

77.根据权利要求74-76中任一项所述的组合物,其中,所述受试者需要治疗急性肺损伤。

78.根据权利要求74-77中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂是类固醇或IL-4。

79.根据权利要求74-78中任一项所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

80.根据权利要求74-78中任一项的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

81.根据权利要求60-80中任一项所述的组合物,其中,给予治疗有效量的所述组合物。

82.根据权利要求60-80中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的50%以下。

83.根据权利要求60-80中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的40%以下。

84.根据权利要求60-80中任一项所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游

离形式给予时向受试者给予的量的30％以下。

85.根据权利要求60-80中任一项所述的组合物，其中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的20％以下。

86.根据权利要求60-80中任一项所述的组合物，其中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的10％以下。

与具有粘附粒子的红细胞有关的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求2019年6月7日提交的No.62/858,478的美国临时申请的权益,通过引用的方式将其内容整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文所述的技术涉及与红细胞有关的方法和组合物,所述红细胞具有粘附在其细胞表面上的粒子。

背景技术

[0004] 大多数药物治疗持续存在的问题是难以实现治疗剂的靶向递送。静脉内给予可以提供微创给予,其能够递送到体内大部分,但是患病组织或器官接收的剂量仅是总剂量的一小部分。另外,现有的给予技术还会导致治疗剂被分配给不需要治疗的器官和组织,通常引起有害副作用。本文描述的是高效的红细胞杠杆化学疗法(Erythrocyte Leveraged Chemotherapy(ELeCt))和红细胞锚定的全身性免疫疗法(Erythrocyte Anchored Systemic Immunotherapy(EASY))平台,其由自组装到红细胞表面上的可生物降解的药物纳米粒子组成,以允许有效、甚至靶向的药物递送。例如,在一个实施方式中,ELeCt平台显著延长了药物纳米粒子的循环时间,并将与游离纳米粒子相比10倍高的药物含量递送至靶器官。

发明内容

[0005] 本文描述的是允许红血细胞将治疗剂递送到体内的特定组织和/或器官的方法。该方法被证明是更有效的,因此,相较于单独给予试剂,或者在游离聚合物粒子中封装试剂,其副作用的风险更低。

[0006] 在任何实施方式的一个方面,本文所述的是一种经工程化的细胞组合物,所述经工程化的细胞组合物含有:a.红细胞;和b.包含PLGA和至少一种治疗剂的粒子,其中,所述粒子位于红细胞的细胞表面上。

[0007] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为至少50:50的L:G或更多L。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约50:50的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约85:15的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约65:35的L:G。

[0008] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含酯末端和/或酸末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含酯末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含酸末端。

[0009] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约50:50的L:G和酸末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0010] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端,由此将治疗剂靶向于脾脏和/或心脏。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约50:50的

L:G和酸末端，由此将治疗剂靶向于脾脏和/或肺。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端，由此将治疗剂靶向于肾脏和/或肺。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端，由此将治疗剂靶向于肺、心脏和/或肾脏。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例大于50:50的L:G，由此将治疗剂靶向于肺和/或肾脏。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例小于85:15的L:G和酯末端，由此将治疗剂靶向于脾脏。

[0011] 在任何方面的一些实施方式中，至少一种治疗剂选自于化学治疗剂、抗原、类固醇、免疫抑制剂、免疫刺激剂、病毒、小分子、肽、核酸和趋化因子。在任何方面的一些实施方式中，至少一种化学治疗剂选自于由以下组成的组：多柔比星、喜树碱、紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、甲氨蝶呤或它们的组合。

[0012] 在任何方面的一些实施方式中，治疗剂以至少100μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂以至少150μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂以至少200μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂以至少250μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0013] 在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径为约100nm至约10μm。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径为约100nm至约1μm。

[0014] 在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子还包含一种或多种细胞粘附分子。在任何方面的一些实施方式中，一种或多种细胞粘附分子定位于粒子表面的区域。在任何方面的一些实施方式中，细胞粘附分子选自于由以下组成的组：特异性地与红血细胞上的分子结合的抗体试剂；特异性地与红血细胞上的分子结合的肽；细胞粘附聚合物；细胞粘附聚合电解质，以及用于红血细胞上受体的配体。在任何方面的一些实施方式中，细胞粘附聚合电解质包含透明质酸、透明质酸-醛和/或聚(烯丙胺)盐酸盐。在任何方面的一些实施方式中，对透明质酸进行修饰以使其包含醛基。在任何方面的一些实施方式中，细胞粘附聚合物是多酚或金属-多酚网状物。

[0015] 在任何实施方式的一个方面，本文所述的是向受试者中的细胞递送治疗剂的方法，该方法包括向受试者给予本文所述的组合物。在任何方面的一些实施方式中，所述细胞是癌细胞，并且所述治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如，IFN、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15和IL-27，以及其它免疫刺激拮抗剂，例如CpG ODN、咪喹莫特、瑞喹莫德(R848)、单磷酰脂A(MPLA)和聚(I:C))。

[0016] 在任何实施方式的一个方面，本文所述的是在有需要的受试者中治疗癌症和/或肿瘤的方法，该方法包括向受试者给予本文所述的组合物。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂是化学治疗剂或趋化因子。

[0017] 在任何方面的一些实施方式中，癌细胞处于受试者的肺和/或受试者患有肺癌。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0018] 在任何方面的一些实施方式中，癌细胞处于受试者的肾脏和/或受试者患有肾癌。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

[0019] 在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例大于50:50的L:G。

[0020] 在任何方面的一些实施方式中，该方法还包括向受试者给予放射或至少一种化学

疗法。

[0021] 在任何实施方式的一个方面，本文所述的是在有需要的受试者中刺激免疫应答的方法，该方法包括向受试者给予本文所述的组合物，其中，治疗剂是免疫刺激剂或趋化因子。在任何方面的一些实施方式中，免疫应答是局部的。

[0022] 在任何实施方式的一个方面，本文所述的方法是在有需要的受试者中减少或抑制免疫应答的方法，该方法包括向受试者给予本文所述的组合物，其中，所述治疗剂是免疫调节剂(例如，IL-4)或类固醇。在任何方面的一些实施方式中，免疫应答是局部的。在任何方面的一些实施方式中，受试者需要在肺中的免疫应答。在任何方面的一些实施方式中，受试者需要治疗急性肺损伤。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂是类固醇或IL-4。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例大于50:50的L:G。在任何方面的一些实施方式中，PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0023] 在任何方面的一些实施方式中，给予治疗有效量的组合物。在任何方面的一些实施方式中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的50％以下。在任何方面的一些实施方式中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的40％以下。在任何方面的一些实施方式中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的30％以下。在任何方面的一些实施方式中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的20％以下。在任何方面的一些实施方式中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的10％以下。

附图说明

[0024] 图1A-图1B描绘了PLGA的性质影响其与载体红细胞的结合。图1A描绘了不同PLGA纳米粒子与红细胞的结合效率的图。图1B描绘了其上搭载有不同PLGA纳米粒子的红细胞的扫描电子显微镜(SEM)图像。

[0025] 图2A-图2B表明PLGA的性质影响其在载体红细胞上的结合和脱离。图2A描绘了在低剪切应力(旋转剪切应力，约1Pa)下从载体红细胞脱离的纳米粒子的百分比。图2B描绘了在高剪切应力(6Pa)下从红细胞脱离的纳米粒子的净百分比。

[0026] 图3表明搭载在红细胞上的PLGA的性质影响其向特定器官的递送。示出了纳米粒子和红细胞搭载的纳米粒子在肺、肾脏、脾脏、肝脏、心脏和脑中的生物分布。

[0027] 图4A-图4K描绘了红细胞杠杆化学疗法(EleCt)平台的示意图和载有药物(多柔比星)的可生物降解PLGA纳米粒子的表征。(图4A)用于肺转移瘤治疗的在红细胞平台(EleCt)上自组装的可生物降解药物纳米粒子的组成和机理的示意图。(图4B-图4D)普通和载有药物的纳米粒子的平均尺寸(图4B)、Zeta电位(图4C)和药物负载量(图4D)。(图4E)示出了纳米粒子的形态学特征的SEM图像。比例尺:200nm。(图4F)普通和载有药物的纳米粒子的尺寸分布。(图4G)在完全培养基中来自可生物降解的纳米粒子的药物释放动力学(n＝4)。(图4H-图4I)流式细胞术图(图4H)和共聚焦激光扫描显微图像(图4I)，示出了载有药物的纳米粒子与B16F10-Luc黑色素瘤细胞的相互作用。在(图4I)中，使用DAPI对细胞核进行染色。(图4J-图4K)用不同制剂处理24小时后，B16F10-Luc细胞的剂量-响应曲线(图4J)和IC_{50}值(图4K)(n＝6)。

[0028] 图5A-图5K表明，载有多柔比星的可生物降解PLGA纳米粒子有效地自组装至小鼠

和人的红细胞。(图5A)在纳米粒子与红细胞的不同比例(从左至右:0:1、50:1、200:1、400:1和800:1)下,载有DOX的PLGA纳米粒子自组装至小鼠红细胞的流式细胞术分析。(图5B)携带至少一个纳米粒子的小鼠红细胞的百分比。在纳米粒子与小鼠红细胞的不同比例下,(图5C)纳米粒子结合效率和(图5D)小鼠红细胞上的药物剂量。其上自组装有载有药物的纳米粒子的小鼠红细胞的(图5E)共聚焦激光扫描显微图像(CLSM)和(图5F)SEM图像。(图5F)中的比例尺:2μm。其上自组装有载有药物的纳米粒子的小鼠红细胞的(图5G)CLSM和(图5H)SEM图像。(图5H)中的比例尺:2μm。(图5I)在纳米粒子与红细胞的不同比例(从左至右:0:1、200:1、800:1和1600:1)下,载有药物的纳米粒子自组装至人红细胞的流式细胞术分析。在纳米粒子与人红细胞的不同比例下的(图5J)纳米粒子结合效率和(图5K)人红细胞上的药物剂量。

[0029] 图6A-图6E表明ELeCt平台使得能够实现纳米粒子药物向患有转移瘤的肺的增强和靶向的递送。(图6A)静脉内给予多柔比星制剂的药代动力学。与单独使用游离药物或纳米粒子相比,通过红细胞搭载实现了延长的多柔比星的血液循环时间(n=3)。显著性差异(ANOVA,随后是Tukey HSD分析):*p<0.05,**p<0.01。(图6B)搭载的载有药物的纳米粒子可以在肺相应的剪切应力下特异性地从小鼠和人红细胞脱离。将样品剪切20分钟(n=3)。低剪切表示旋转剪切(约1Pa),而高剪切为6Pa。显著性差异(学生t检验):***p<0.001。(图6C)在静脉内给予不同多柔比星制剂后20分钟和6小时患有B16F10-Luc肺转移瘤的小鼠的肺中的药物积累(n=3)。(图6D)红细胞搭载组的肺中药物浓度与单独的游离药物组和纳米粒子组的肺中药物浓度的比较(n=3)。(图6E)静脉内给予多柔比星制剂后20分钟在患病肺中的药物分布。虚线表示转移性结节的边缘。

[0030] 图7A-图7H表明,ELeCt平台抑制肺转移瘤进展,并改善早期B16F10-Luc转移瘤模型的存活。(图7A)治疗时间表的示意图。(图7B)不同时间点肺转移瘤的生物发光图像。(图7C)根据体内生物发光信号强度描绘的肺转移瘤进展曲线。(图7D)在不同时间点的肺转移瘤负荷的量化(n=7)。(图7E)在第16天,根据生物发光信号强度描绘的在不同治疗组中肺转移瘤负荷比较的散点图(n=7)。显著性差异(Mann-Whitney检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。(图7F)第23天肺转移瘤负荷比较的散点图(n=7)。显著性差异(Mann-Whitney检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001;n.s.:无显著性差异。(图7G)治疗期间小鼠的体重变化(n=7)。(图7H)Kaplan-Meier曲线示出的不同治疗下的小鼠的存活(n=7)。显著性差异(对数秩(log-rank)检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001;n.s.:无显著性差异。

[0031] 图8A-图8G表明ELeCt平台抑制了肺转移瘤进展,并延长了晚期B16F10-Luc转移瘤模型中的存活。(图8A)治疗时间表的示意图。(图8B)不同时间点肺转移瘤进展的生物发光图像。(图8C)用不同多柔比星制剂治疗的小鼠中的肺转移瘤生长曲线。(图8D)根据生物发光信号强度描绘的肺转移瘤负荷的量化分析(n=7)。显著性差异(Mann-Whitney检验):*p<0.05,**p<0.01;n.s.:无显著性差异。(图8E)在第16天的不同治疗组中在切除的肺上的转移性结节数量的量化(n=7)。显著性差异(Mann-Whitney检验):***p<0.001;n.s.:无显著性差异。(图8F)治疗期间小鼠的体重变化(n=7)。(图8G)不同治疗组小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。显著性差异(对数秩检验):**p<0.01,***p<0.001;n.s.:无显著性差异。

[0032] 图9表明载有其它化学治疗剂的可生物降解的纳米粒子可以有效地与红细胞结合。测试的化学治疗剂包括喜树碱、紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶+甲氨蝶呤的组合。比例尺:1μm。

[0033] 图10A-图10C描绘了小鼠肺的代表性H&E染色图像。在晚期肺转移瘤模型中肿瘤接种后16天，将用(图10A)对照(生理盐水)、(图10B)载有DOX的纳米粒子、和(图10C)自组装在红细胞上的药物纳米粒子(RBC-NP)治疗的小鼠安乐死。通过H&E染色对肺进行处理。

[0034] 图11描绘了用不同药物制剂治疗的小鼠器官的代表性H&E染色图像。在晚期肺转移瘤模型中肿瘤接种后16天，将小鼠安乐死，通过H&E染色对器官进行处理。

[0035] 图12描绘了载有不同化学治疗剂的可生物降解PLGA纳米粒子的尺寸分布。

[0036] 图13描绘了用于免疫恢复的红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASY)的示意图。(a)免疫诱饵(载有趋化因子的聚合物纳米粒子)组装至红细胞表面。(b)响应于机械-生理剪切应力，免疫诱饵特异性地从红细胞脱落，并沉积在肺转移性位点附近。(c)免疫诱饵通过释放趋化因子并恢复趋化因子梯度对局部微环境进行调节。(d)效应细胞(包括Th1 CD4、效应CD8T和天然杀伤(NK)细胞)浸润到肺转移性位点以对其进展进行控制。

[0037] 图14A-图14R表明了对PLGA纳米粒子的材料性质的调节产生了向肺的最佳靶向递送。图14A描绘了不同PLGA纳米粒子与红细胞的结合效率(n＝5)。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：相较于所有其它组，**p<0.01；&&&p<0.001。(图14B)被不同PLGA纳米粒子搭载后的载体红细胞的凝集。将200nm聚苯乙烯(PS)纳米粒子用作阳性对照。(图14C)当经历高旋转剪切应力(6Pa)时，从红细胞中脱离的纳米粒子净百分比(n＝3)。通过包封Alexa Fluor 647-卵白蛋白对纳米粒子进行荧光标记。(图14D)在静脉内给予20分钟后沉积在肺中的不同PLGA纳米粒子的量(ID%/g器官)(对于游离纳米粒子，n＝3；对于搭载的纳米粒子，n＝6)。显著性差异(单因素ANOVA，随后Tukey HSD检验)：**p<0.01，***p<0.001，****p<0.0001；n.s.：无显著性差异。(图14E)在给予搭载在红细胞上的不同PLGA纳米粒子20分钟后，切除的小鼠肺的IVIS荧光图像。(图14F)用具有或不具有抗ICAM-1抗体的PLGA-d纳米粒子治疗20分钟或6小时后，肺微血管内皮细胞的共聚焦激光扫描显微(CLSM)图像。用Alexa Fluor 647对纳米粒子进行标记，而通过DAPI对细胞核进行染色。比例尺：30μm。(图14G)在静脉内给予PLGA-d纳米粒子制剂后，不同时间点的切除的器官的IVIS荧光图像。(图14H)在肺中沉积的PLGA-d纳米粒子的量(ID%/g器官)的动力学(n＝3)。按顺序，系列是NP、无aICAM-1的EH-NP、以及具有aICAM-1的EH-NP。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001。在(图14D、图14E、图14G和图14H)中，通过包封Alexa Fluor 750-卵白蛋白对纳米粒子进行荧光标记。(图14A、图14C、图14D、图14H)中的数据表示为平均值±s.e.m.。(图14I)免疫诱饵的扫描电子显微(SEM)图像。比例尺：1μm。(图14J)免疫诱饵的透射电子显微(TEM)图像。比例尺：500nm。(图14K)免疫诱饵的尺寸分布。(图14L)在PBS、FBS和完全培养基中，来自免疫诱饵的趋化因子释放动力学(n＝3)。(图14M)其上锚定有免疫诱饵的红细胞的CLSM图像。用缀合至趋化因子的Alexa Fluor 647对免疫诱饵进行标记。(图14N)携带Alexa Fluor 647标记的免疫诱饵的红细胞的流式细胞术分析。用缀合至趋化因子的Alexa Fluor 647对免疫诱饵进行标记。未框住的点：普通红细胞；框住的点：携带免疫诱饵的红细胞。(图14O)锚定在红细胞上的免疫诱饵的SEM图像。比例尺：1μm。(图14P)被纳米粒子搭载后的载体红细胞上磷脂酰丝氨酸的表达(n＝3)。(图14Q)被纳米粒子搭载的载体红细胞的凝集。(图14P)和(图14Q)中将200nm羧基聚苯乙烯纳米粒子用作阳性对照。(图14R)被纳米粒子搭载后的载体红细胞的渗透脆性。示出了在73mM NaCl下的载体红细胞的溶血百分比(n＝3)。(图14L、图14P和图14R)中的数据表示为

平均值±s.e.m.。

[0038] 图15A-图15J表明免疫诱饵组装在红细胞上，而不会对载体红细胞引起明显的副作用。(图15A)免疫诱饵的扫描电子显微(SEM)图像。比例尺，1μm。(图15B)免疫诱饵的透射电子显微(TEM)图像。比例尺，500nm。(图15C)免疫诱饵的尺寸分布。(图15D)来自免疫诱饵的趋化因子释放动力学(n＝3)。(图15E)其上组装有免疫诱饵的红细胞的CLSM图像。用缀合至趋化因子的Alexa Fluor 647对免疫诱饵进行标记。(图15F)携带Alexa Fluor 647标记的免疫诱饵的红细胞的流式细胞术分析。用缀合至趋化因子的Alexa Fluor 647对免疫诱饵进行标记。框左侧的点：普通红细胞；框内的点：携带免疫诱饵的红细胞。(图15G)组装在红细胞上的免疫诱饵的SEM图像。比例尺，1μm。(图15H)被纳米粒子搭载后的载体红细胞上的磷脂酰丝氨酸的表达(n＝3)。普通纳米粒子和免疫诱饵均引起了载体红细胞上的可忽略的磷脂酰丝氨酸表达。按顺序，系列是普通NP和免疫诱饵。(图15I)搭载有纳米粒子的载体红细胞的凝集。(图15H)和(图15I)中将200nm羧基聚苯乙烯纳米粒子用作阳性对照。(图15J)被纳米粒子搭载后的载体红细胞的渗透脆性。示出了在73mM NaCl下的载体红细胞的溶血百分比(n＝3)。(图15D、图15H和图15J)中的数据显示为平均值±s.e.m.。

[0039] 图16A-图16M表明EASY精确地将免疫诱饵递送至患有转移瘤的肺，并实现免疫恢复。(图16A)在剪切前、剪切后或固定后剪切时，搭载在红细胞上的免疫诱饵的SEM图像。将样品在6Pa的旋转剪切应力下剪切20分钟。(图16B)当在6Pa下剪切5分钟、10分钟或20分钟时，从载体红细胞中脱离的免疫诱饵纳米粒子百分比(n＝3)。(图16C)在早期肺转移瘤模型中，静脉内给予后20分钟或6小时的免疫诱饵制剂的生物分布。在20分钟，对于所有组，n＝3。在6小时，对于NP和NP w/a ICAM-1，n＝2；对于EH-NP和EH-NP w/aICAM-1，n＝3。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001，以及****p<0.0001。(图16D)在早期肺转移瘤模型中，静脉内给予后20分钟，分布的免疫诱饵纳米粒子的肺血比(n＝3)。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：*p<0.05。(图16E)静脉内给予免疫诱饵制剂后20分钟，患有早期肺转移瘤的小鼠的肺的IVIS荧光图像。(图16F)静脉内给予免疫诱饵制剂后20分钟，患有晚期肺转移瘤的小鼠的肺的IVIS荧光图像。(图16G)静脉内给予免疫诱饵制剂后20分钟，转移性肺切片的CLSM图像。白色虚线表示转移性结节的边缘。通过DAPI对细胞核进行染色。在(图16B-图16G)中，通过与被包封在纳米粒子中的白蛋白载体蛋白缀合的Alexa Fluor 647对所有纳米粒子进行标记。(图16H)监测患有乳腺癌肺转移瘤的小鼠中CXCL10趋化因子梯度的时间-进程变化的时间表。(图16I)在原发性肿瘤切除后，在不同天的CXCL10趋化因子的肺血比(n＝5)。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：*p<0.05。(图16J)趋化因子梯度测定的时间表。(图16K)静脉内给予CXCL10制剂后20分钟或6小时，血液中CXCL10趋化因子的浓度(n＝4-5)。(图16L)静脉内给予CXCL10制剂后20分钟或6小时，血液中CXCL10趋化因子的浓度(n＝4-5)。(图16M)给予后CXCL10趋化因子浓度的肺血比(n＝4-5)。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：*p<0.05，**p<0.01。(图16B-图16D、图16I、图16K-图16M)中的数据表示为平均值±s.e.m.。按顺序，图16K-图16M的系列为对照、游离趋化因子(5X)、NP和RBC-NP。(图16O)从(图16G)中所示的共聚焦图像计算出的含有免疫诱饵NP的面积百分比(n＝5)。在ImageJ中进行计算。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：***p<0.001，****p<0.0001。(图16P)静脉内给予CXCL10制剂后20分钟、6小时、24小时、48小时和72小时，血液中CXCL10

趋化因子的浓度(n＝4-6)。(图16Q)静脉内给予CXCL10制剂后肺中CXCL10趋化因子的浓度(n＝4-6)。(图16R)给予后CXCL10趋化因子浓度的肺血比(n＝4-6)。在(图16P-图16R)中,水平条表示治疗前对照小鼠中的相应水平的平均值±s.e.m.。与治疗前的对照相比具有显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验或学生t检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。与游离趋化因子(5X)组相比具有显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验或学生t检验):##p<0.01。与免疫诱饵组相比具有显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验或学生t检验):&p<0.05,&&p<0.01,&&&&p<0.0001。(图16O-图16R)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0040] 图17A-图17H表明,EASY使得肺转移瘤进展得到显著抑制,并改善乳腺癌肺转移瘤模型中的存活。(图17A)功效研究的时间表。(图17B)在不同时间接受不同治疗的小鼠的代表性生物荧光图像。(图17C)在第37天,小鼠的切除的肺的结节数量(n＝8)。显著性差异(Mann-Whitney检验):**p<0.01,***p<0.001。(图17D)不同治疗的抑制率。(图17E)第37天的切除的肺的代表性图像。(图17F)通过不同治疗后第37天的小鼠的肺重量(n＝8)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验):*p<0.05。(图17G)治疗期间小鼠的体重变化(n＝8)。(图17H)如通过Kaplan-Meier曲线显示的不同治疗下的小鼠的存活(n＝6)。显著性差异(对数秩检验):*p<0.05。(图17C、图17F、图17G)中的数据表示为平均值±s.e.m.。(图17I)在接受不同治疗的第37天时的小鼠的切除的肺的结节数量(n＝6-7)。显著性差异(Mann-Whitney检验):**p<0.01,***p<0.001。数据显示为平均值±s.e.m.。(图17J)如通过Kaplan-Meier曲线显示的不同治疗下小鼠的存活(n＝15-16)。显著性差异(Mantel-Cox检验):***p<0.001。

[0041] 图18A-图18O表明,EASY产生了效应免疫细胞向转移性肺中的增强的浸润。(图18A)在不同治疗下分析小鼠的转移性肺的免疫细胞的时间表。(图18B)CD4+IFN-γ+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图18C)肺中IFN-γ+Th1 CD4细胞的绝对百分比(n＝7-8)。(图18D)CD8+IFN-γ+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图18E)肺中IFN-γ+CD8细胞的绝对百分比(n＝7-8)。(图18F)颗粒酶B+CD8细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图18G)肺中颗粒酶B+效应CD8细胞的绝对百分比(n＝7-8)。(图18H)CD45+NKp46+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图18I)肺中NKp46+NK细胞的绝对百分比(n＝7-8)。(图18J)CD11c+CD86+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图18K)肺中活化(CD86+)树突细胞的绝对百分比(n＝7-8)。(图18L-图18O)不同治疗后,小鼠转移性肺中(图18L)IFN-γ、(图18M)TNF-α、(图18N)IL-10和(图18O)CXCL10的浓度。(图18C、图18E、图18I、图18K和图18L-图18O)中的数据表示为平均值±s.e.m.。(图18C、图18E、图18G、图18I、图18K和图18L-图18O)中具有显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验):*p<0.05,**p<0.01,****p<0.0001。

[0042] 图19描绘了携带不同PLGA纳米粒子的小鼠红细胞的扫描电子显微(SEM)图像。

[0043] 图20A-图20C表明不同PLGA纳米粒子对载体红细胞的影响。(图20A)在搭载过程中裂解的载体红细胞百分比(n＝3)。(图20B)其上搭载有不同PLGA纳米粒子的载体红细胞的渗透脆性(渗透冲击期间的溶血)(n＝3)。放大的子图示出了72.5mM的NaCl浓度下的载体红细胞的溶血百分比。(图20C)被不同PLGA纳米粒子搭载后,在其表面上表达磷脂酰丝氨酸的载体红细胞百分比(n＝3)。数据表示为平均值±s.e.m.。按顺序,图20A和图20C的系列为PLGA-a、PLGA-b、PLGA-c和PLGA-d。

[0044] 图21描绘了在体外剪切条件下从载体红细胞脱离的纳米粒子百分比。使用流变仪

在高旋转应力(6Pa)下对其上搭载有不同PLGA纳米粒子的红细胞剪切20分钟(n＝2-3)。低剪切表示在12rpm/min下使用旋转仪进行旋转期间载体红细胞所经受的旋转应力。数据表示为平均值±s.e.m.。按顺序,系列为低剪切和高剪切。

[0045] 图22A-图22B描绘了PLGA纳米粒子的生物分布。(图22A)在静脉内给予后20分钟,处于游离形式的或搭载在红细胞上的不同PLGA纳米粒子的生物分布(对于NP,n＝3;对于EH-NP,n＝6)。按顺序,系列为NP和EH-NP。(图22B)在静脉内给予之后在不同时间点具有或不具有抗ICAM-1抗体的搭载的PLAG-d纳米粒子的生物分布(n＝3)。按顺序,系列是NP、无aICAM-1的EH-NP、以及具有aICAM-1的EH-NP。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。数据表示为平均值±s.e.m.。

[0046] 图23A-图23C描绘了免疫诱饵在小鼠红细胞表面上的组装。(图23A)用不同量的免疫诱饵纳米粒子孵育后,红细胞的流式细胞术直方图。直方图中从左到右使用的免疫诱饵与红细胞的比例分别为0:1、50:1、400:1和1000:1。(图23B)在免疫诱饵与红细胞的不同的比例下孵育后,携带免疫诱饵纳米粒子的红细胞的百分比(n＝3)。数据表示为平均值±s.e.m.。(图23C)当以免疫诱饵与红细胞的比例为400:1进行孵育时,携带免疫诱饵纳米粒子的红细胞的CLSM图像。用缀合至包封的趋化因子的Alexa Fluor 647对免疫诱饵进行标记。

[0047] 图24表明了携带其它免疫调节剂的免疫诱饵在红细胞上的组装。GM-CSF、IL-2、IL-12和IL-15被封装在免疫诱饵中。抗PD-1抗体与免疫诱饵的表面缀合。比例尺:1μm。

[0048] 图25A-图25B表明了免疫诱饵与人红细胞的组装。(图25A)其上组装有免疫诱饵纳米粒子的人红细胞的SEM图像。比例尺:1μm。(图25B)在免疫诱饵与人红细胞的不同孵育比例下,组装在人红细胞表面上的免疫诱饵纳米粒子的数量(n＝3)。数据表示为平均值±s.e.m.。

[0049] 图26描绘了免疫诱饵搭载对载体红细胞对渗透应力的敏感性的影响。示出了载体红细胞的代表性渗透脆性曲线(n＝3)。在所有测试的纳米粒子浓度下的载体红细胞表现出与初始红细胞类似的脆性曲线。数据表示为平均值±s.e.m.。

[0050] 图27A-图27B描绘了在原发性肿瘤切除后不同时间,患有乳腺癌肺转移瘤的小鼠的血液和肺中CXCL10趋化因子的浓度。

[0051] 图28描绘了在早期肺转移瘤模型中,在不同治疗下第37天,小鼠的肺后侧的代表性图像。

[0052] 图29描绘了在早期肺转移瘤模型中,不同治疗后的小鼠器官的H&E。

[0053] 图30A-图30C描绘了在晚期乳腺癌肺转移瘤模型中,EASY抑制肺转移瘤的功效。(图30A)在晚期肺转移瘤模型中的功效研究的时间表。(图30B)在不同治疗后第50天,小鼠的切除的肺的结节数量(n＝3)。显著性差异(学生t检验):*p<0.05。数据表示为平均值±s.e.m.。(图30C)在第50天的切除的肺的图像。

[0054] 图31A-图31D在不同治疗下小鼠的转移性肺中的免疫细胞。示出了肺中的(图31A)CD4、(图31B)CD8和(图31C)树突细胞的绝对百分比。(图31D)CD45+CD11c+树突细胞中CD86+细胞的百分比。数据表示为平均值±s.e.m.。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0055] 图32描绘了示出由不同治疗所治疗的小鼠的转移性肺中细胞因子浓度的热图。单位:pg/mL。

[0056] 图33A-图33P表明EASI产生了远处肿瘤(distant tumor)的原位免疫和全身性抑

制。(图33A)评估局部和全身性免疫应答的时间表。(图33B)在50:1或100:1的效应细胞与肿瘤细胞的比例下,与分离的肺淋巴细胞共培养的4T1-Luc细胞的活力(n=6)。数据显示为归一化至“对照-生理盐水”组。显著性差异(学生t检验):*p<0.05,***p<0.001。(图33C)转移性肺中CD11c+CD86+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图33D)与对照组相比,肺中活化(CD86+)的树突细胞的绝对百分比的倍数变化(n=14-15)。(图33E)血液中CD8 T细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图33F)血液中CD8 T细胞的绝对百分比。(图33G)血液中IFN-γ+CD8细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图33H)血液中IFN-γ+CD8细胞的绝对百分比。(图33I)血液中颗粒酶B+CD8细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图33J)血液中颗粒酶B+CD8细胞的绝对百分比。在(图33B、图33D、图33F、图33H和图33J)中,显著性差异(学生t检验):*p<0.05,**p<0.01,****p<0.0001。(图33K)肿瘤再激发研究的时间表。(图33L)在肿瘤再激发研究中,再接种肿瘤的个体生长曲线。(图33M)再接种肿瘤的总体生长曲线。(图33N)接种后的前10天内再接种肿瘤的总体生长曲线。(图33O)肿瘤再激发后16天提取的肿瘤的重量。(图33P)肿瘤再激发后16天提取的肿瘤的照片。“EXP”表示“终止(Expired)”。在(图33K-图33P)中,对于“健康”组,n=8;对于“对照-生理盐水”和“EASI”组,n=5。在(图33M-图33O)中,显著性差异(学生t检验):*p<0.05,**p<0.01,****p<0.0001。(图33B、图33D、图33F、图33H、图33J和图33M-图33O)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0057] 图34A-图34E描绘了纳米粒子锚定至红细胞的机制。在不同条件下锚定至红细胞的纳米粒子的相对结合效率和代表性SEM图像。(图34A)当红细胞被2.5%戊二醛固定时。(图34B)当红细胞表面被PEG化时。(图34C)当在血清中进行搭载时。(图34D)当PLGA NP被PEG化时。(图34E)当PLGA NP具有不同的表面末端(不同的氢键结合能力)时。

[0058] 图35描绘了在体外剪切条件下从载体红细胞脱离的纳米粒子的百分比。使用流变仪在高旋转应力(6Pa)下,对其上搭载有不同PLGA纳米粒子的红细胞进行剪切20分钟(n=6-7)。低剪切表示在12rpm/min下使用旋转仪进行旋转期间载体红细胞所经受的旋转应力。数据表示为平均值±s.e.m.。显著性差异(双因素ANOVA):*p<0.05,**p<0.01,***p<0.0001。与所有其它组相比具有显著性差异(双因素ANOVA):&&P<0.01。

[0059] 图36A-图36F描绘了在静脉内给予后,血液中红细胞搭载系统的表征。(图36A)追踪载体红细胞和纳米粒子的双标记策略的示意图。用CellTrace™ Far Red对载体红细胞进行标记,并用FITC对PLGA-d纳米粒子进行标记。在静脉内给予双标记系统后的不同时间点收集血液。通过流式细胞术对载体红细胞及其上的纳米粒子进行分析。(图36B)在不同时间点的血液的代表性流式图(n=3)。(图36C)在不同时间点所给予的红细胞的代表性流式图(n=3)。(图36D)在不同时间点在血液中剩余的载体红细胞的百分比,归一化至0min(n=3)。(图36E)在不同时间点携带有搭载的纳米粒子的载体红细胞的百分比,归一化至0min(n=3)。(图36F)在静脉内给予红细胞搭载系统后5分钟的小鼠器官的IVIS图像。在(图36F)中,通过封装AF647对纳米粒子进行标记,而载体红细胞未被标记。

[0060] 图37描绘了aICAM-1抗体与EH-NP复合物的结合对剪切应力下纳米粒子从载体红细胞脱离的影响。使用流变仪在高旋转应力(6Pa)下,对其上搭载有w/或w/o aICAM-1结合的PLGA-d纳米粒子的红细胞进行剪切20分钟(n=4-7)。低剪切表示在12rpm/min下使用旋转仪进行旋转期间载体红细胞所经受的旋转应力。数据表示为平均值±s.e.m.。n.s.:无显著性差异(双因素ANOVA)。

[0061] 图38A-图38B描绘了在封装到免疫诱饵中后CXCL10的稳定性。(图38A)初始CXCL10和从免疫诱饵释放的CXCL10的MALDI-TOF光谱。(图38B)初始CXCL10和从免疫诱饵释放的CXCL10的圆二色谱。

[0062] 图39A-图39B表明在剪切下免疫诱饵从载体红细胞释放。(图39A)在剪切前、剪切后、或固定后剪切时，搭载免疫诱饵的红细胞的SEM图像。在6Pa的旋转剪切应力下剪切样品20分钟。(图39B)当在低剪切应力(12rpm的旋转剪切)或高剪切应力(6Pa)下剪切3分钟、10分钟或20分钟时，从载体红细胞脱离的免疫诱饵纳米粒子的百分比(n＝3)。与低剪切相比具有显著性差异(学生t检验)：***p<0.001，****p<0.0001。(图39B)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0063] 图40A-图40B描绘了随着肺转移瘤进展，由EH递送的免疫诱饵的肺积累。在原发性肿瘤切除后7、14和21天，将具有aICAM-1的EASI静脉内给予于不同组的小鼠(n＝3-4)。注射后20分钟，将小鼠安乐死，并收集器官，用于使用IVIS的荧光测量。通过包封AF647-卵白蛋白对免疫诱饵NP进行标记。图40A)肺的代表性IVIS图像。图40B)肺中积累的免疫诱饵NP的ID％。数据表明，随着肺转移瘤的进展，通过EH递送至肺的NP量保持相似。所有组均无显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：n.s.数据表示为平均值±s.e.m.。

[0064] 图41A-图41B表明，通过红细胞搭载递送至转移性肺的免疫诱饵纳米粒子未被捕获在吞噬细胞中。在静脉内注射EASI之前48h，通过静脉内给予200μL含有5mg/mL氯膦酸盐的Clodrosome®，使吞噬细胞(主要是组织巨噬细胞)耗竭(depleted)。通过包封AF647-卵白蛋白对免疫诱饵NP进行标记。EASI给予后20分钟，将小鼠安乐死，收集包括肺、肝脏、脾脏和肾脏的主要器官，并使用IVIS成像。对ROI的荧光强度(辐射效率)进行量化和分析。(图41A)注射生理盐水、EASI或吞噬细胞耗竭后注射EASI的小鼠器官的代表性IVIS图像。(图41B)在吞噬细胞耗竭或未耗竭的小鼠主要器官中，每g器官的总辐射效率。吞噬细胞的耗竭导致肝脏和肾脏中的NP积累降低，表明在这两个器官中积累的NP主要在吞噬细胞中被捕获。相比之下，当使吞噬细胞耗竭时，肺中NP的积累不会降低，表明肺中脱离的免疫诱饵NP不主要在吞噬细胞中被捕获。数据表示为平均值±s.e.m.。显著性差异(学生t检验)：*p<0.01，**p<0.01，***p<0.001。

[0065] 图42A-图42C表明通过红细胞搭载递送RANTES(一种趋化因子)。通过在PLGA纳米粒子中包封RANTES来制备免疫诱饵-RANTES。将抗ICAM-1抗体涂覆至免疫诱饵-RANTES。在静脉内给予制剂后6小时，通过ELISA对血清和肺匀浆物(homogenate)中的RANTES浓度进行量化。(图42A)血液中RANTES趋化因子的浓度(n＝5)。(图42B)肺中RANTES趋化因子的浓度(n＝5)。(图42C)给予后RANTES趋化因子浓度的肺血比(n＝5)。数据表示为平均值±s.e.m.。显著性差异(学生t检验)：**p<0.01。无显著性差异(学生t检验)：n.s.。

[0066] 图43A-图43B描绘了在不同治疗下小鼠转移性肺中的免疫细胞。示出了在肺中(图43A)CD4和(图43B)CD8树突细胞的绝对百分比。数据表示为平均值±s.e.m.。显著性差异(单因素ANOVA，随后是Tukey HSD检验)：*p<0.05。

[0067] 图44A-图44B描绘了在不同治疗下小鼠不同器官中的免疫细胞。示出了在(图44A)脾脏和(图44B)肝脏中CD4细胞、Th1 CD4细胞、CD8细胞、效应CD8细胞、NK细胞、树突细胞和活化树突细胞的绝对百分比。数据表示为平均值±s.e.m.。显著性差异。

[0068] 图45A-图45B描绘了在抑制肺转移瘤进展方面对不同制剂的功效和安全性评价。(图45A)在早期肺转移瘤模型中在不同治疗下，第37天的小鼠肺的代表性图像。(图45B)治

疗期间小鼠的体重变化。(图45B)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0069] 图46A-图46B描绘了在不同治疗下小鼠的转移性肺中的树突细胞。(图46A)肺中树突细胞的绝对百分比。(图46B)CD45+CD11c+树突细胞中CD86+细胞的百分比。数据表示为平均值±s.e.m.。显著性差异(学生t检验):**p<0.01,****p<0.0001。

[0070] 图47A-图47F描绘了用于通过红细胞搭载在脾脏对纳米粒子传递(hand-off)进行工程化的示意图。(图47A)用于研究的蛋白质封端(capped)的聚合物纳米粒子(不同尺寸、材料或用不同蛋白质涂覆)。(图47B)针对蛋白质负载,对红细胞上负载的纳米粒子的数量进行调整,并诱导磷脂酰胆碱的临时上调。(图47C)静脉内注射搭载的纳米粒子引起脾脏中的高释放(discharge)。(图47D)上调的磷脂酰胆碱和掩蔽CD47改善了脾脏中与抗原呈递细胞(APC)的相互作用。(图47E)改善的红细胞相互作用通过APC促进了纳米粒子的摄取,而红细胞返回循环。(图47F)在脾脏传递纳米粒子改善了体液和细胞免疫应答。

[0071] 图48A-图48G描绘了蛋白质封端的纳米粒子的表征:(图48A)使用EDC化学使蛋白质附着至聚苯乙烯羧化物(polystyrene carboxylate,PS-COOH)纳米粒子的方案。(图48B)附着至PS-COOH的抗原(n=12)。(图48C)普通纳米粒子和蛋白质封端的纳米粒子以nm为单位的粒径(n=6)。显著性差异(学生t检验):****:p<0.0001。(图48D)普通纳米粒子和蛋白质封端的纳米粒子以mV为单位的Zeta电位(n=6)。显著性差异(学生t检验):****:p<0.0001。(图48E)普通纳米粒子和蛋白质封端的纳米粒子的粒径分布。(图48F)普通纳米粒子和蛋白质封端的纳米粒子的扫描电子显微照片(SEM)。比例尺:200nm。(图48G)以CD80表达%(归一化至基础表达)评估的树突细胞的成熟(对于所有组,n=3)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验):*:p<0.05,ns:不显著。(图48B-图48D、图48G)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0072] 图49A-图49K描绘了对纳米粒子-红细胞搭载参数进行工程化,以实现脾脏靶向。(图49A)对于纳米粒子与红细胞的不同进给比,每个红细胞负载的纳米粒子(对于所有组,n=3)。(图49B)对于纳米粒子与红细胞的不同进给比,携带纳米粒子的红细胞的百分比(通过流式细胞术测定)(对于所有组,n=3)。(图49C)在肺相应剪切应力(6Pa)的体外剪切研究之后,从红细胞中释放的纳米粒子的百分比。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)。*p:<0.05。(图49D)对于纳米粒子与红细胞的不同进给比,通过磷脂酰丝氨酸表达的百分比变化进行评价的由纳米粒子引起的红细胞损伤(对于所有组,n=3)。虚线表示阳性对照(聚苯乙烯珠粒)平均值。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)*:p<0.05,**:p<0.01。(图49E)光学凝集测定表明,纳米粒子对红细胞诱导了最小的凝集。所有测试的纳米粒子与红细胞的比例与初始对照相似,而与诱导基质状凝集(matrix shaped aggregate)的聚苯乙烯珠粒相反。(图49F)注射在纳米粒子与红细胞的不同比例下孵育的红细胞后20min,从小鼠收获的肺和脾脏的IVIS图像。标尺(Scale)表示低(栗色)到高(亮黄色)辐射效率。(图49G)通过使用来自IVIS成像的这些器官的辐射效率来计算肺与脾脏的积累比例(对于所有组,n=3)。虚线表示相等的肺和脾脏积累。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)。*:p<0.05。(图49H)在循环中剩余的粒子和红细胞的分数,使用流式细胞术通过它们的平行追踪进行评估(n=5)。(图49I)注射后20分钟收获的不同器官中游离纳米粒子和搭载的纳米粒子的生物分布,以每克组织的注射剂量%表示(对于所有组,n=3)。显著性差异(学生t检验)*:p<0.05。第一个系列是NP,第二个系列是RBC-NP。(图49J)

注射后24小时内监测的游离纳米粒子和搭载的纳米粒子的脾脏积累动力学(对于所有组,n＝3)。显著性差异(学生t检验)*:p<0.05。(图49K)注射后20分钟,吞噬细胞耗竭对搭载的纳米粒子在单核吞噬系统的两个最重要器官中的生物分布的影响(对于所有组,n＝3)。第一个系列是+吞噬细胞,第二个系列是-吞噬细胞。显著性差异(学生t检验)*:p<0.05,ns:不显著。(图49A-图49D、图49G-图49J)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0073] 图50A-图50I描绘了纳米粒子脾脏传递的免疫结果。(图50A)用于评估搭载的纳米粒子的全身性抗体(体液)应答的时间表。(图50B)在第一次免疫激发前一天(第1天)和第二次免疫激发后14天(第27天)评估的抗OVA IgG效价(对于所有组,n＝5)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)*:p<0.05。(图50C)用于评估搭载的纳米粒子的全身性细胞免疫应答的时间表。(图50D)脾脏中CD3+CD8+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图50E)脾脏中CD3+CD8+细胞百分比的量化分析。(对于EDIT组,n＝4;对于所有其它组,n＝5)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)。*:p<0.05。(图50F)脾脏中CCR7+CD62L+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图50G)脾脏中CCR7+CD62L+细胞百分比的量化分析。(对于EDIT组,n＝4;对于所有其它组,n＝5)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)。**:p<0.01,***:p<0.001。(图50H)脾脏中CD25+FOXP3+细胞的代表性流式细胞术分析图像。(图50I)脾脏中CD25+FOXP3+细胞的百分比的量化分析。(对于EDIT组,n＝4;对于所有其它组,n＝5)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)*:p<0.05,**:p<0.01,****:p<0.0001。(图50B、图50E、图50G、图50I)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0074] 图51A-图51I描绘了搭载的纳米粒子的免疫调节用于接种疫苗(vaccination)的治疗延伸。(图51A)预防性疫苗接种研究的时间表。(图51B)在效应子与靶标的不同比例下,各种治疗组在免疫接种后的体外细胞杀伤数据,作为归一化至未治疗对照的活力百分比进行评价(对于所有组,n＝3只小鼠)。显著性差异:生理盐水-OVA相比于EDIT,以及NP相比于EDIT(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)。*:p<0.05,&:p<0.05。(图51C)在体外细胞杀伤测定中的倍数变化,各个治疗组内的倍数变化作为效应子与靶标的比例的函数进行比较。(对于所有组,n＝3只小鼠)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)*:p<0.05。在x轴上,第一组是生理盐水-OVA,第二组是NP,第三组是EDIT,第四组是CpG。(图51D)通过不同治疗组在预防性接种疫苗后接种的小鼠的肿瘤生长曲线。该图中的统计分析在第17天进行。(图51E)在第13天对不同组的肿瘤体积的评估。图51D-图51E(对于EDIT和CpG组,n＝8;对于生理盐水和NP组,n＝7)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD)。*:p<0.05,**:p<0.01,***:p<0.001。图51F-图51I在(图51F)生理盐水、(图51G)NP、(图51H)EDIT、(图51I)CpG治疗组中单个小鼠的肿瘤生长动力学。(图51B-图51E)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0075] 图52A-图52B描绘了不同量的蛋白质在200nm聚苯乙烯羧化物纳米粒子表面上的附着。(图52A)蛋白质与PS-COOH的附着效率。(图52B)附着至PS-COOH的蛋白质的量,以每mg粒子附着的μg表示。数据表示为平均值±s.e.m.。

[0076] 图53A-图53B描绘了OVA-NP通过树突细胞的内化。(图53A)在处于游离形式或附着至PS-COOH的Alexa Fluor 647标记的卵白蛋白内化后,树突细胞的流式细胞术图像。(图53B)在处于游离形式或附着至PS-COOH的Alexa Fluor 647标记的卵白蛋白内化后,树突细胞的共聚焦光扫描显微照片(CLSM)。比例尺:10μm。

[0077] 图54A-图54D描绘了EDIT平台的粒子组合。(图54A)使用EDC化学的附着至不同粒子的不同蛋白质的量化。卵白蛋白附着至500nm聚苯乙烯羧化物和200nm聚乳酸羟基乙酸共聚物(polylactic co glycolate),KLH附着至200nm聚苯乙烯羧化物。(对于PS-KLH-200,n=6;对于所有其它组,n=5)。(图54B)不同粒子的扫描电子显微照片。比例尺:200nm。(图54C)在附着至不同粒子的Alexa Fluor 647标记的卵白蛋白或KLH内化后,树突细胞的共聚焦光扫描显微照片(CLSM)。比例尺:10μm。(图54D)根据CD 80表达%(归一化至基础表达)评价的树突细胞的成熟(对于所有组,n=3)。显著性差异(学生t检验):***:p<0.001。(图54A-图54D)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0078] 图55A-图55C描绘了对红细胞-纳米粒子结合的机制理解。(图55A)当将红细胞固定时,搭载效率会发生变化,表明需要纳米粒子的物理包裹来实现适当的搭载。(图55B)在搭载过程中添加血清影响该过程,表明即使最小量的血清也会影响蛋白质-蛋白质相互作用的发生,表明它们是支配搭载的重要相互作用。(图55C)红细胞上搭载的纳米粒子的共聚焦激光扫描显微图像。比例尺:10μm。(图55A、图55B)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0079] 图56A-图56C描绘了搭载在红细胞上的纳米粒子的扫描电子显微照片。(图56A)对照红细胞组。比例尺:10μm。(图56B)搭载的红细胞组。比例尺:10μm。(图56C)示出了搭载的纳米粒子的单个红细胞。比例尺:2μm。

[0080] 图57A-图57B描绘了红细胞膜上表面标志物表达的变化。(图57A)红细胞膜上CD47的表达百分比。初始细胞表达由虚线表示。(对于所有组,n=3)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)。*:p<0.05。(图57B)归一化至基线的磷脂酰丝氨酸表达的变化动力学。组表示注射前的搭载的红细胞,在注射后立即追踪的红细胞,以及在注射后20分钟追踪的红细胞(当期望将纳米粒子剪切下来时)(n=3)。显著性差异(单因素ANOVA,随后是Tukey HSD检验)。*:p<0.05。数据表示为平均值±s.e.m.。

[0081] 图58A-图58B描绘了静脉注射后6小时和24小时,搭载的纳米粒子和游离纳米粒子的生物分布。(图58A)6小时的生物分布。(对于所有组,n=3)。显著性差异(学生t检验)。*:p<0.05,***:p<0.001。(图58B)24小时的生物分布。数据表示为平均值±s.e.m.。在两者中,第一个系列是NP,第二个系列是RBC-NP。

[0082] 图59A-图59D描绘了EDIT将不同的纳米粒子组合递送至脾脏的潜力。(图59A)搭载有纳米粒子的红细胞(PS-OVA-500、PLGA-OVA-200、PS-KLH-200)的扫描电子显微照片。所有比例尺:2μm。(图59B)在纳米粒子与红细胞的进给比为300:1时,对于不同的蛋白质封端的粒子,通过磷脂酰丝氨酸表达百分比的变化评估的由纳米粒子引起的红细胞损伤(对于所有组,n=3)。虚线表示在初始红细胞上和由阳性对照(聚苯乙烯珠粒)引起的损伤的红细胞上的磷脂酰丝氨酸表达。(图59C)在纳米粒子与红细胞的进给比为300:1时,对于不同的蛋白质封端的粒子,证明由纳米粒子诱导的红细胞损伤的光学凝集测定。所有测试的粒子与初始对照相似,而与苯乙烯诱导的基质状凝集相反。(图59D)注射20分钟,搭载的纳米粒子的生物分布,通过IVIS成像评估。所有搭载的粒子均显示出高的脾脏递送效率。(对于所有组,n=3)。(图59B、图59D)中的数据表示为平均值±s.e.m.。

[0083] 图60A-图60B描绘了肺中的增强递送的免疫结果。(图60A)肺中存在的CD8+细胞的量化分析。(对于EDIT,n=3;对于所有其它组,n=5)。(图60B)肺中经历抗原的CCR7+CD62L+细胞的量化分析(对于EDIT,n=4;对于所有其它组,n=5)。(图60A、图60B)中的数据表示为

平均值±s.e.m.。

[0084] 图61描绘了用于预防性研究的疫苗接种治疗后的体重变化。数据表示为平均值±s.e.m.。

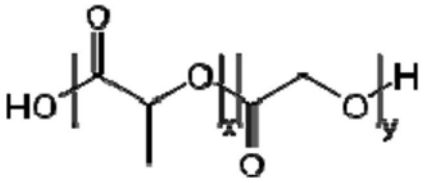
具体实施方式

[0085] 本文所述的方法和组合物涉及与某些聚合物粒子组合(例如,位于红细胞表面上)的红细胞。这些聚合物粒子至少包含治疗剂和PLGA。当本文所述的聚合物粒子粘附到红细胞并给予至受试者时,它们不太可能被吞噬并且可以优先在组织或器官中积累,以提高的效率提供药物递送。

[0086] 在任何实施方式的一个方面,本文所述的是一种经工程化的组合物(例如,细胞组合物),其包含:a.红细胞;和b.包含PLGA和至少一种治疗剂的粒子,其中,所述粒子位于红细胞的细胞表面上。粒子在本文中可互换地称为“粘附粒子(adhered particle)”、“聚合物粒子”或“背包”。

[0087] 红细胞(erythrocyte)或红血细胞(red blood cell)是在人体中没有细胞核并具有椭圆形双面凹形状的造血细胞。红细胞具有高水平的血红蛋白,是脊椎动物全身递送氧气的途径。在任何方面的一些实施方式中,红细胞是人的红细胞。在任何方面的一些实施方式中,红细胞对于受试者而言是自体的,例如,红细胞是已经在体外或体内粘附有粒子的、受试者自身的红细胞之一。在任何方面的一些实施方式中,红细胞尚未被遗传工程化和/或未将外源材料引入红细胞的细胞质中。

[0088] 本文所述的聚合物粒子包含聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(poly(lactic-co-glycolic)acid,PLGA)。在任何方面的一些实施方式中,所述粒子包含一种或多种治疗剂和PLGA。在任何方面的一些实施方式中,所述粒子基本上由一种或多种治疗剂和PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,所述粒子由一种或多种治疗剂和PLGA组成。

[0089] 

PLGA 的结构

[0090] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA可以是无规共聚物。

[0091] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为约10,000至约90,000的PLGA,或由分子量为约10,000至约90,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约10,000至约90,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为约20,000至约60,000的PLGA,或由分子量为约20,000至约60,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约20,000至约60,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为约35,000至约56,000的PLGA,或由分子量为约35,000至约56,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约35,000至约56,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为约38,000至约54,000的PLGA,或由分子量为约38,000至约54,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约38,000至约54,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为

约45,000至约80,000的PLGA,或由分子量为约45,000至约80,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约45,000至约80,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为约50,000至约75,000的PLGA,或由分子量为约50,000至约75,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约50,000至约75,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为约20,000至约40,000的PLGA,或由分子量为约20,000至约40,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约20,000至约40,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为约24,000至约38,000的PLGA,或由分子量为约24,000至约38,000的PLGA组成,或基本上由分子量为约24,000至约38,000的PLGA组成。

[0092] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为10,000至90,000的PLGA,或由分子量为10,000至90,000的PLGA组成,或基本上由分子量为10,000至90,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为20,000至60,000的PLGA,或由分子量为20,000至60,000的PLGA组成,或基本上由分子量为20,000至60,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为35,000至56,000的PLGA,或由分子量为35,000至56,000的PLGA组成,或基本上由分子量为35,000至56,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为38,000至54,000的PLGA,或由分子量为38,000至54,000的PLGA组成,或基本上由分子量为38,000至54,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为45,000至80,000的PLGA,或由分子量为45,000至80,000的PLGA组成,或基本上由分子量为45,000至80,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为50,000至75,000的PLGA,或由分子量为50,000至75,000的PLGA组成,或基本上由分子量为50,000至75,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为20,000至40,000的PLGA,或由分子量为20,000至40,000的PLGA组成,或基本上由分子量为20,000至40,000的PLGA组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA可包含分子量为24,000至38,000的PLGA,或由分子量为24,000至38,000的PLGA组成,或基本上由分子量为24,000至38,000的PLGA组成。

[0093] 在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为至少约50:50的L:G或更多L,例如,至少约50:50、约55:45、约60:40、约65:35、约70:30、约75:25、约80:20、约85:15、约90:10或约95:5以上的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为至少50:50的L:G或更多L,例如,至少50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10或95:5以上的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为至少约50:50至约95:5的L:G,例如,比例为约50:50至约85:15、约50:50至约65:35的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为至少50:50至95:5的L:G,例如比例为50:50至85:15、50:50至65:35的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为约50:50、约65:35或约85:15的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为45:55至55:45、60:40至70:30或80:20至90:10的L:G。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含比例为50:50、65:35或85:15的L:G。

[0094] PLGA能够以酯末端或酸末端封端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA包含酯末端和/或酸末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA末端包含至少90%酯末端,例如至少90%、至少95%、至少98%、至少99%以上的酯末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA末端包含至少90%的酸末端,例如至少90%、至少95%、至少98%、至少99%以上的酸末端。在任何方面的一些实施方式中,PLGA末端由酯末端组成。在任何方面的一些实施方式中,PLGA

末端由酸末端组成。

[0095] 本文考虑了包含一定L:G比例和末端特征的某些特定PLGA组合物，并证明它们的聚合物粒子靶向于某些器官。表3中提供了示例性的此类组合物。

[0096] 表3

粒子组合物#	PLGA中L:G的比例	PLGA末端组合物	靶器官
1	约50:50	包含至少90%酯末端	脾脏、心脏
2	45:55至55:45	包含至少90%酯末端	脾脏、心脏
3	50:50	包含至少90%酯末端	脾脏、心脏
4	约50:50	由酯末端组成	脾脏、心脏
5	45:55至55:45	由酯末端组成	脾脏、心脏
6	50:50	由酯末端组成	脾脏、心脏
7	约50:50	包含至少90%酸末端	脾脏、肺
8	45:55至55:45	包含至少90%酸末端	脾脏、肺
9	50:50	包含至少90%酸末端	脾脏、肺
10	约50:50	由酸末端组成	脾脏、肺
11	45:55至55:45	由酸末端组成	脾脏、肺
12	50:50	由酸末端组成	脾脏、肺
[0097] 13	约85:15	包含至少90%酯末端	肾脏、肺
14	80:20至90:10	包含至少90%酯末端	肾脏、肺
15	85:15	包含至少90%酯末端	肾脏、肺
16	约85:15	由酯末端组成	肾脏、肺
17	80:20至90:10	由酯末端组成	肾脏、肺
18	85:15	由酯末端组成	肾脏、肺
19	约65:35	包含至少90%酸末端	肺、心脏、肾脏
20	60:40至70:30	包含至少90%酸末端	肺、心脏、肾脏
21	65:35	包含至少90%酸末端	肺、心脏、肾脏
22	约65:35	由酸末端组成	肺、心脏、肾脏
23	60:40至70:30	由酸末端组成	肺、心脏、肾脏
24	65:35	由酸末端组成	肺、心脏、肾脏
25	小于约85:15	包含至少90%酯末端	脾脏
26	小于85:15	包含至少90%酯末端	脾脏
27	小于约85:15	由酯末端组成	脾脏
28	小于85:15	由酯末端组成	脾脏
29	约50:50至约85:15	包含至少90%酯末端	脾脏
[0098] 30	50:50至85:15	包含至少90%酯末端	脾脏
31	约50:50至约85:15	由酯末端组成	脾脏
32	50:50至85:15	由酯末端组成	脾脏

[0099] 可选地或另外地，孵育形成细胞组合物期间的粒子与红细胞的比例可以影响治疗剂的递送靶标。例如，在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞约150至约600个粒子的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞150至600个粒子的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞约200至约400个粒子的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞200至400个粒子的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞约300个粒子的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞300个粒子的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，粒子是纳米粒子。

[0100] 在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞超过18个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞超过20个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞超过22个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞约24个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞24个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向脾脏。在任何方面的一些实施方式中，粒子是纳米粒子。

[0101] 在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞约200个粒子以下或约500个粒子以上的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞200个粒子以下或500个粒子以上的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞约150个粒子以下或约600个粒子以上的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，通过以每个红细胞150个粒子以下或600个粒子以上的比例对粒子和红细胞进行孵育而形成的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，粒子是纳米粒子。

[0102] 在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞少于22个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞少于20个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞18个以下粒子的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞约18个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞18个粒子的细胞组合物使治疗剂靶向肺。在任何方面的一些实施方式中，粒子是纳米粒子。

[0103] 在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径尺寸为约10nm至约100μm。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径尺寸为10nm至100μm。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径尺寸为约100nm至约10μm。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径尺寸为100nm至10μm。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径尺寸为约100nm至约1μm。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的直径尺寸为100nm至1μm。

[0104] 在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的形状基本上是盘状的。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的形状是盘状的。如本文所用，“盘状(discoidal)”是指具

有盘式形状的粒子，其具有基本平坦的凹面或凸面。在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子的形状为杆、圆柱、立方体、长方体、六面体或金字塔形状。

[0105] 如本文所使用的，术语“治疗剂”是指可用于治疗、管理或改善疾病和/或与其相关症状的任何试剂。所述试剂可选自包括以下的组：化学品、有机或无机小分子、信号分子、核酸序列、核酸类似物、蛋白质、肽、酶、适体、拟肽、肽衍生物、肽类似物、抗体、胞内抗体、生物大分子、由生物材料(例如细菌、植物、真菌或动物细胞或组织)制成的提取物、天然存在或合成的组合物或它们的功能片段。在任何方面的一些实施方式中，所述试剂是任何化学品、实体或部分，包括但不限于合成和天然存在的非蛋白质实体。已知试剂可具有期望的活性和/或性质，或者可选自多种化合物的库。优选地，治疗剂是已知可用于或已经用于或当前用于治疗、管理或改善疾病或与其相关的一种或多种症状的试剂。治疗化合物在多种情况下是本领域已知的，参见例如在万维网drugs.com上可获得的数据库或在万维网catalog.data.gov/dataset/drugsfda-database上可获得的FDA批准的化合物目录，通过引用将其各自整体并入本文。治疗剂的非限制性实例包括肽、核酸、抗原(例如，用于刺激表达抗原的细胞的免疫应答)、抗体试剂、小分子、病毒、化学治疗剂、类固醇、趋化因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂或它们的组合。

[0106] 如本文所述，核酸分子可以是载体、表达载体、抑制性核酸、适体、模板分子或盒(例如，用于基因编辑)或靶向分子(例如，用于CRISPR-Cas技术)，或希望递送至细胞的任何其它核酸分子。核酸分子可以是RNA、DNA或其合成形式或修饰形式。

[0107] 如本文所使用的，术语“化学治疗剂”是指在以细胞生长异常为特征的疾病的治疗中具有治疗作用的任何化学试剂或生物试剂。这种疾病包括肿瘤、赘生物和癌症以及以增生性生长为特征的疾病。这些试剂可起到抑制癌细胞持续增殖所依赖的细胞活性的作用。在所有实施方式的一些方面，化学治疗剂是细胞周期抑制剂或细胞分裂抑制剂。在本发明的方法中可用的化学治疗剂的类别包括烷化剂/生物碱试剂、抗代谢物、激素或激素类似物以及各种抗肿瘤药物。这些试剂中的大多数对癌细胞具有直接或间接毒性。在一个实施方式中，化学治疗剂是放射性分子。化学治疗剂的非限制性实例在本文别处提供。在任何方面的一些实施方式中，至少一种化学治疗剂可以是多柔比星、喜树碱、紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、甲氨蝶呤或它们的组合。

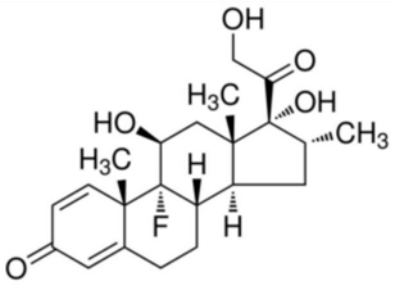
[0108] 术语“免疫调节剂”及其变体包括但不限于本文所用的免疫调节剂，是指调节宿主免疫系统的试剂。在某些实施方式中，免疫调节剂是免疫抑制剂。在某些其它实施方式中，免疫调节剂是免疫刺激剂。如本文所使用的，“免疫系统的抑制”是指如通过免疫系统的各种免疫功能的任何参数所测量的降低或抑制动物的免疫功能。免疫功能的参数的非限制性实例可以包括以下的量级(magnitude)：抗体应答、B细胞的应答、T细胞的应答、T细胞的增殖、免疫调节细胞因子的产生和/或对抗原(例如同种异体细胞或异种细胞)的应答。相比之下，“免疫系统的刺激”是指如通过免疫系统的各种免疫功能的任何参数所测量的动物免疫功能的增加或活化。示例性的非限制性免疫刺激剂包括免疫刺激细胞因子，例如IFN、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15和IL-27，以及其它免疫刺激拮抗剂，例如CpG ODN、咪喹莫特、瑞喹莫德(R848)、单磷酰脂A(MPLA)和聚(I:C)。

[0109] 如本文所使用的，术语“类固醇”是指包含三个环己烷环和一个环戊烷环的化学物质。将环布置形成四环环戊菲(tetracyclic cyclopentaphenanthrene)，即甾烷。在任何方

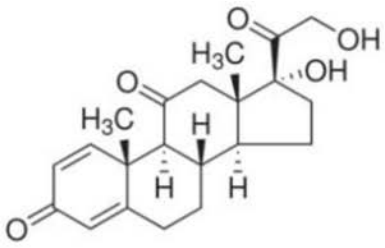
面的一些实施方式中，类固醇是皮质类固醇。如本文所使用的，术语“皮质类固醇”是指在肾上腺皮质中产生的或合成生产的一类类固醇激素。皮质类固醇参与较宽范围的生理系统，例如应激应答、免疫应答和炎症调节、碳水化合物代谢、蛋白质分解代谢、血液电解质水平和行为。基于化学结构，皮质类固醇通常被分成四种类别。A组皮质类固醇(短效至中效的糖皮质激素)包括氢化可的松、醋酸氢化可的松(hydrocortisone acetate)、醋酸可的松(cortisone acetate)、新戊酸替可的松(tixocortol pivalate)、泼尼松龙、甲基泼尼松龙和泼尼松。B组皮质类固醇包括曲安奈德(triamcinolone acetonide)、曲安西龙醇(triamcinolone alcohol)、莫米松(mometasone)、安西奈德(amcinonide)、布地奈德、地奈德、氟欣诺能(fluocinonide)、醋酸氟轻松(fluocinolone acetonide)和哈西奈德。C组皮质类固醇包括倍他米松、倍他米松磷酸钠、地塞米松、地塞米松磷酸钠和氟考龙。D组皮质类固醇包括氢化可的松-17-丁酸酯、氢化可的松-17-戊酸酯、阿氯米松二丙酸酯(aclometasone dipropionate)、倍他米松戊酸酯(betamethasone valerate)、倍他米松二丙酸酯、泼尼卡酯、氯倍他松-17-丁酸酯、氯倍他索-17-丙酸酯、氟考龙己酸酯、氟考龙新戊酸酯和氟强的松醋酸酯。皮质类固醇的非限制性实例包括醛固酮、倍氯米松、倍氯米松二丙酸酯、倍他米松(betametahasone)、倍他米松-21-磷酸二钠(betametahasone-21-phosphate disodium)、倍他米松戊酸酯(betametahasone valerate)、布地奈德、氯倍他索、氯倍他索丙酸酯、氯倍他松丁酸酯、氯可托龙特戊酸酯(clocortolone pivalate)、皮质醇、cortisteron、可的松、地夫可特(deflazacort)、地塞米松、地塞米松醋酸酯、地塞米松磷酸钠、双醋酸双氟拉松、二羟基可的松(dihydroxycortison)、氟欣诺能、醋酸氟氢可的松(fludrocortisones acetate)、氟米松、氟尼缩松、醋酸氟轻松(flucionolone acetonide)、氟替卡松糠酸酯、氟替卡松丙酸酯、哈西奈德、halpmetasone、氢化可的松、醋酸氢化可的松(hydroconrtisone acetate)、氢化可的松琥珀酸酯、16α-羟基泼尼松龙、醋酸异氟泼尼龙、甲羟松、甲基泼尼松龙、prednacinolone、predricarbate、泼尼松龙、泼尼松龙醋酸酯、泼尼松龙琥珀酸钠、泼尼松、曲安西龙(triamcinolone)、曲安西龙和曲安西龙双醋酸酯。如本文所使用的，术语“皮质类固醇”可以包括但不限于以下通用和商标名称的皮质类固醇：可的松(CORTONE™ACETATE™、ADRESON™、ALTESONA™M、CORTELAN™、CORTISTAB™、CORTISYL™、CORTOGEN™、CORTONE™、SCHEROSON™)；口服地塞米松(DECADRON-ORAL™、DEXAMETH™、DEXONE™、HEXADROL-ORAL™、DEXAMETHASONE™INTENSOL™、DEXONE 0.5™、DEXONE 0.75™、DEXONE 1.5™、DEXONE 4™)；口服氢化可的松(CORTEF™、HYDROCORTONE™)；氢化可的松环戊丙酸酯(CORTEF ORAL SUSPENSION™)；口服甲基泼尼松龙(MEDROL-ORAL™)；口服泼尼松龙(PRELONE™、DELTA-CORTEF™、PEDIAPRED™、ADNISOLONE™、CORTALONE™、DELTACORTRIL™、DELTASOLONE™、DELTASTAB™、DI-ADRESON F™、ENCORTOLONE™、HYDROCORTANCYL™、MEDISOLONE™、METICORTELONE™、OPREDSONE™、PANAAFCORTELONE™、PRECORTISYL™、PRENISOLONA™、SCHERISOLONA™、SCHERISOLONE™)；泼尼松(DELTASONE™、LIQUID PRED™、METICORTEN™、ORASONE 1™、ORASONE 5™、ORASONE 10™、ORASONE 20™、ORASONE 50™、PREDNICEN-M™、PREDNISONE INTENSOL™、STERAPRED™、STERAPRED DS™、ADASONE™、CARTANCYL™、COLISONE™、CORDROL™、CORTAN™、DACORTIN™、DECORTIN™、DECORTISYL™、DELCORTIN™、DELLACORT™、DELTADOME™、DELTACORTENE™、DELTISONA™、DIADRESON™、ECONOSONE™、ENCORTON™、FERNISONE™、NISONA™、NOVOPREDNISONE™、

PANAFCORT™、PANASOL™、PARACORT™、PARMENISON™、PEHACORT™、PREDELTIN™、PREDNICORT™、PREDNICOT™、PREDNIDIB™、PREDNIMENT™、RECTODELT™、ULTRACORTEN™、WINPRED™)；口服曲安西龙(KENACORT™、ARISTOCORT™、ATOLONE™、SHOLOG A™、TRAMACORT-D™、TRI-MED™、TRIAMCOT™、TRISTOPLEX™、TRYLONE D™、U-TRI-LONE™)。在任何方面的一些实施方式中，皮质类固醇可以是地塞米松(例如，具有式I结构的化合物)；泼尼松(例如，具有式II结构的化合物)；泼尼松龙(例如，具有式III结构的化合物)；曲安西龙(例如，具有式IV结构的化合物)；氯倍他索丙酸酯(例如，具有式V结构的化合物)；倍他米松戊酸酯(例如，具有式VI结构的化合物)；倍他米松二丙酸酯(例如，具有式VII结构的化合物)；或莫米松糠酸酯(例如，具有式VII结构的化合物)。合成类固醇和皮质类固醇的方法在本领域中是公知的，并且这些化合物也可商购获得，例如，地塞米松(Cat.No.D4902,Sigma-Aldrich;St.Louis,MO)和泼尼松(predinsone)(Cat.No.P6254,Sigma-Aldrich;St.Louis,Mo)。

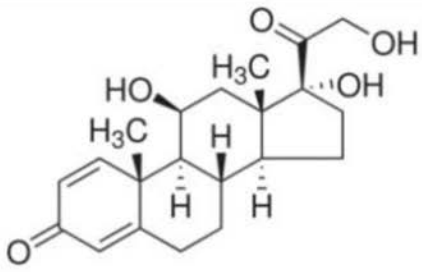
[0110]



式 I

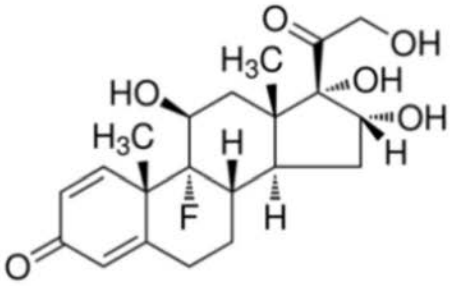


式 II

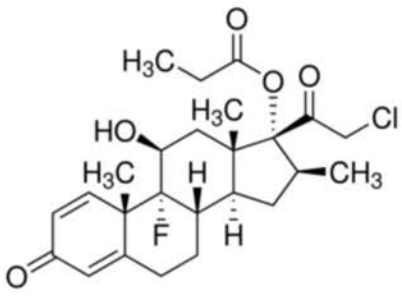


式 III

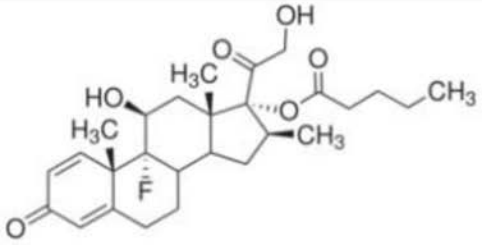
[0111]



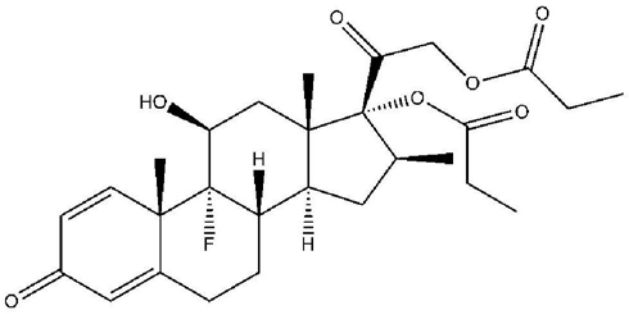
式 IV



式 IV

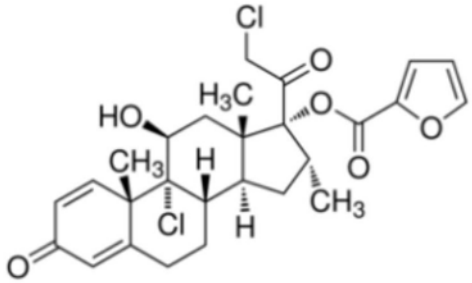


式 V



[0112]

式 VI



式 VII

[0113] 术语“趋化因子”是作用于白细胞并诱导其移动和/或被活化以进行它们的免疫系统功能的任何蛋白质的通用术语。趋化因子在本领域中是众所周知的。示例性趋化因子包括，例如但不限于TECK、ELC、BLC-1、CTACK、RANTES、分形趋化因子(fractalkine)、exotaxin、嗜酸性粒细胞趋化因子-2(eotaxin-2)、单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC、leukotactin、SDF-1.β、淋巴细胞趋化因子(lymphotactin)、TARC、ITAC、ENA-70、ENA-78、IP-10、NAP-2、白细胞介素-8(IL-8)、HCC-1、MIP-1α、MIP-1β、MIP-1δ、I-309、GRO-α、GRO-β、GRO-γ、MPIF-1、I-LINK、GCP-2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、XCL-1和CCL-5。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂可以以至少约100μg/3×10^8个红细胞的浓度存在，例如至少约150μg/3×10^8个红细胞、至少约200μg/3×10^8个红细胞、或至少约250μg/3×10^8个红细胞。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂可以以至少100μg/3×10^8个红细胞的浓度存在，例如至少150μg/3×10^8个红细胞、至少200μg/3×10^8个红细胞、或至少250μg/3×10^8个红细胞。

[0114] 在任何方面的一些实施方式中，治疗剂与PLGA混合存在。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂仅在粒子的一部分中存在，例如，它涂覆在粒子的表面，和/或存在于粒子的内部体积的一部分中。

[0115] 在任何方面的一些实施方式中，粒子可包含两种以上不同的治疗剂。在任何方面的一些实施方式中，细胞组合物包含两种以上粒子，每种粒子包含不同的治疗剂。在任何方面的一些实施方式中，细胞组合物包含两种以上红细胞-粒子组合的混合物，每种红细胞-粒子组合包含不同的治疗剂。

[0116] 在任何方面的一些实施方式中，聚合物粒子还包含一种或多种细胞粘附分子。细

胞粘附分子可以是将粘附到细胞(例如红细胞)表面的任何分子。合适的细胞粘附分子的非限制性实例包括特异性地结合红血细胞上的分子的抗体试剂;特异性地结合红血细胞上的分子的肽;细胞粘附聚合物;细胞粘附聚合电解质,以及红血细胞上的受体的配体。

[0117] 可以增强细胞粘附的特征包括例如高的表面自由能、亲水性蛋白质含量、低表面水化和低表面电荷密度。示例性的非限制性细胞粘附分子可包括聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯)(PGMA);聚己内酯(PCL);聚二甲基硅氧烷(PDMS);聚(六甲基二硅氧烷)(PHMDSO);超疏水的全氟取代的PEDOT(PEDOT-F);超疏水聚苯乙烯(PS);等离子体处理的聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA);等离子体处理的聚-3-羟基丁酸酯(P3HB);磷脂酰乙醇胺(PE);和羧甲基几丁质(CMCH)。细胞粘附分子还可包括或包含例如RGD肽、胶原蛋白、纤连蛋白、明胶和胶原蛋白。对细胞粘附分子的进一步讨论可见于例如Lih等,Progress in Polymer Science 44:28-61(2015)和Chen等,Materials Today(2017),通过引用的方式将其整体并入本文。

[0118] 在任何方面的一些实施方式中,细胞粘附聚合电解质包括透明质酸、聚(烯丙胺)盐酸盐和/或经修饰以包含醛基的透明质酸。

[0119] 在任何方面的一些实施方式中,细胞粘附聚合物可以是多酚或金属-多酚网状物。

[0120] 给定细胞表面上的受体的配体和/或靶向红血细胞的配体是本领域已知的,并且可包括天然或合成配体。通过非限制性实例的方式,用于红血细胞的示例性配体可包括葡萄糖转运体配体,例如葡萄糖;BAND3配体,例如外源凝集素;血型糖蛋白A配体,例如EBA-175;血型糖蛋白B配体,例如EBL-1;血型糖蛋白C配体,例如EBA-140;补体受体1配体,例如Rh4;基础免疫球蛋白配体,例如Rh5;以及CD59配体,例如C9。

[0121] 在任何方面的一些实施方式中,细胞粘附分子可对一种或多种细胞类型(例如红血细胞)具有特异性。然而,粒子可以在体外粘附至分离的细胞群中,因此在所有实施方式中不需要这种特异性。在任何方面的一些实施方式中,细胞粘附分子对红血细胞不具有特异性。

[0122] 在任何方面的一些实施方式中,细胞粘附分子与PLGA混合存在。在任何方面的一些实施方式中,细胞粘附分子仅在粒子的一部分中存在,例如,它涂覆在粒子的表面。在任何方面的一些实施方式中,粒子可包含两种以上不同的细胞粘附分子。在任何方面的一些实施方式中,细胞组合物包含两种以上粒子,每种粒子包含不同的细胞粘附分子。在任何方面的一些实施方式中,细胞组合物包含两种以上红细胞-粒子组合的混合物,每种红细胞-粒子组合包含不同的细胞粘附分子。

[0123] 如本文所使用的,术语“聚合物”是指低聚物、共-低聚物、聚合物和共聚物,例如,随机嵌段、多嵌段、星状、接枝状、梯度共聚物以及它们的组合。如通过凝胶渗透色谱法所测定的,聚合物的平均分子量范围可以为500至约500,000,例如,20,000至约500,000。

[0124] 在任何方面的一些实施方式中,粒子可包含一种或多种额外的聚合物。不受限制地,本领域已知的任何聚合材料均可用于本发明。因此,在任何方面的一些实施方式中,聚合物选自于由如下组成的组:多糖、多肽、多核苷酸、富马酸/癸二酸的共聚物、泊洛沙姆、聚丙交酯(polylactide)、聚乙交酯、聚己内酯、聚乳酸和聚乙醇酸的共聚物、聚酸酐、聚ε-己内酯、聚酰胺、聚氨酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚二氧环己酮、聚缩醛、聚缩酮、聚碳酸酯、聚原碳酸酯、聚二氢吡喃、聚磷腈、聚羟基丁酸酯、聚羟基戊酸酯、聚亚烷基草酸酯、聚亚烷基琥珀酸酯、聚(苹果酸)、聚(氨基酸)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、聚羟基纤维素、聚甲基丙烯

酸甲酯、甲壳素、壳聚糖、聚乳酸和聚乙醇酸的共聚物、聚(甘油癸二酸酯)(PGS)、明胶、胶原、丝、藻酸盐/酯、纤维素、聚核酸、醋酸纤维素(包括双醋酸纤维素)、聚乙烯、聚丙烯、聚丁烯、聚对苯二甲酸乙二酯(PET)、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚酰胺、尼龙、聚碳酸酯、聚硫化物、聚砜、水凝胶(例如丙烯酸类)、聚丙烯腈、聚乙酸乙烯酯、醋酸丁酸纤维素、硝酸纤维素、氨酯/碳酸酯共聚物、苯乙烯/马来酸共聚物、聚(乙烯亚胺)、透明质酸酶、肝素、琼脂糖、普鲁兰多糖,以及上述物质的共聚物、三元共聚物,以及包含上述物质的任意组合的共聚物。通过非限制性实例的方式,示例性聚合物可以包括:聚丙交酯(PLA);聚乙交酯(PGA);聚-(ε-己内酯)(PCL);聚乙烯醇(PVA)、聚(乳酸-己内酯)共聚物(PLCL)、透明质酸(HA)、明胶、胶原;聚(甘油癸二酸酯)(PGS);聚磷腈;聚原酸酯;聚酸酐;聚(α-羟基酯);聚(醚酯);包含乙交酯和丙交酯和ε-己内酯或三亚甲基碳酸酯的共聚物;聚(多元醇癸二酸酯)弹性体;弹性体;聚(多元醇柠檬酸酯);聚酯;聚(乙醇酸);聚(乳酸);聚(己内酯);聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物;聚(琥珀酸丁二醇酯);聚(三亚甲基碳酸酯);聚(对二氧环己酮);聚(对苯二甲酸丁二醇酯);聚(酯酰胺);Hybrane™S1200;DegraPol™;聚氨酯;聚酸酐;聚[(羧基苯氧基)丙烷-癸二酸];聚磷酸酯;聚[对苯二酸双(羟乙基)酯-正磷酸乙酯/对苯二甲酰氯](poly[bis(hydroxyethyl)terephthalate-ethyl orthophosphorylate/terephthaloyl chloride]);聚(原酸酯);聚(氰基丙烯酸烷基酯);聚(氰基丙烯酸丁酯);聚醚;聚(乙二醇);聚(氨基酸);酪氨酸衍生的聚碳酸酯;微生物聚酯;聚(β-羟基烷酸酯);聚(羟基丁酸酯);聚(羟基丁酸酯-羟基戊酸酯)共聚物;胶原;白蛋白;麸质;壳聚糖;透明质酸;纤维素;藻酸盐/酯;和淀粉。合适的结构聚合物在例如Bat等,Regen.Med.9:385-398(2014)和Marin等,Int.J.Nanomedicine 8:3071-3091(2013)中进行更详细地讨论,通过引用的方式将其整体并入本文。

[0125] 在任何方面的一些实施方式中,聚合物是生物相容性聚合物。如本文所使用的,术语“生物相容性”是指在接触体液或组织时显示出基本没有细胞毒性或免疫原性。术语“生物相容性聚合物”是指当在受试者体内使用时非毒性、化学惰性、以及基本上非免疫原性的聚合物以及其基本上不溶于血液的聚合物。生物相容性聚合物可以是不可生物降解的、或优选为可生物降解的。当原位使用时,生物相容性聚合物还优选是非炎性的。

[0126] 可生物降解的聚合物在本领域中已有公开。合适的可生物降解的聚合物的实例包括但不限于直链聚合物,例如多肽、多核苷酸、多糖、聚丙交酯、聚乙交酯、聚己内酯、聚乳酸和聚乙醇酸的共聚物、聚酸酐、聚ε-己内酯、聚酰胺、聚氨酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚二氧环己酮、聚缩醛、聚缩酮、聚碳酸酯、聚原碳酸酯、聚二氢吡喃、聚磷腈、聚羟基丁酸酯、聚羟基戊酸酯、聚亚烷基草酸酯、聚亚烷基琥珀酸酯、聚(苹果酸)、聚(氨基酸)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、聚羟基纤维素、聚甲基丙烯酸甲酯、甲壳素、壳聚糖、聚乳酸和聚乙醇酸的共聚物、聚(甘油癸二酸酯)(PGS)、富马酸、癸二酸,以及包含一种或多种上述物质的共聚物、三元共聚物。其它可生物降解的聚合物包括例如明胶、胶原、丝、壳聚糖、藻酸盐/酯、纤维素、聚核酸等。

[0127] 举例来说,合适的不可生物降解的生物相容性聚合物包括醋酸纤维素(包括双醋酸纤维素)、聚乙烯、聚丙烯、聚丁烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚酰胺、尼龙、聚碳酸酯、聚硫化物、聚砜、水凝胶(例如丙烯酸类)、聚丙烯腈、聚乙酸乙烯酯、醋酸丁酸纤维素、硝酸纤维素、氨酯/碳酸酯共聚物、苯乙烯/马来酸共聚物、聚(乙烯亚胺)、

泊洛沙姆(例如普朗尼克,如泊洛沙姆407和188)、透明质酸、肝素、琼脂糖、普鲁兰多糖,以及包含一种或多种上述物质的共聚物,例如乙烯/乙烯醇共聚物(EVOH)。在任何方面的一些实施方式中,生物相容性聚合物是聚乳酸和聚乙醇酸的共聚物、聚(甘油癸二酸酯)(PGS)、聚(乙烯亚胺)、普朗尼克(泊洛沙姆407、188)、透明质酸、肝素、琼脂糖或普鲁兰多糖。

[0128] 在任何方面的一些实施方式中,聚合物是均聚物、共聚物或嵌段聚合物。在任何方面的一些实施方式中,聚合物包含选自于由酰胺或酯基组成的组的侧链。在任何方面的一些实施方式中,聚合物是可生物降解的、生物相容性的且无毒的。

[0129] 聚合物可以用第二聚合物进行衍生化,并且第一聚合物和第二聚合物可以相同或不同。例如,聚合物可以用聚乙二醇(PEG)进行衍生化。

[0130] 在任何方面的一些实施方式中,可以通过接头连接聚合物或聚合物的部分。在任何方面的一些实施方式中,聚合物粒子的组分(例如治疗剂和/或细胞粘附分子)可以通过接头连接。如本文所使用的,术语"接头"是指连接化合物的两个部分的部分。接头通常包括:直接的键或原子(例如氧或硫);或单元,例如NR_1、C(O)、C(O)O、C(O)NR_1、SO、SO_2、SO_2NH;或原子链,例如取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环基烷基、杂环基烯基、杂环基炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环基烷基、烷基杂环基烯基、烷基杂环基炔基、烯基杂环基烷基、烯基杂环基烯基、烯基杂环基炔基、炔基杂环基烷基、炔基杂环基烯基、炔基杂环基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基,其中,一个或多个亚甲基可以被O、S、S(O)、SO_2、$N(R_1)_2$、C(O)、可裂解连接基团、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环中断或终止,其中,R_1是氢、酰基、脂肪族或取代的脂肪族。

[0131] 接头可以是支化接头。支化接头的分支点可为至少二价,但可为三价、四价、五价或六价原子或展现出此类多价的基团。在某些实施方式中,分支点可为-N、-N(Q)-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C(O)N(Q)-C、-OC(O)N(Q)-C、-N(Q)C(O)-C或-N(Q)C(O)O-C;其中,Q每次出现时独立地为H或任选取代的烷基。在任何方面的一些实施方式中,分支点可为丙烯酸酯、氰基丙烯酸酯或丙烯酸甲酯。

[0132] 在各种实施方式中,接头是可裂解的接头。可裂解的接头意味着接头可以被裂解以释放由接头保持在一起的两部分。可裂解的接头可易受裂解剂(例如但不限于酶、pH、氧化还原电势或降解分子的存在)的影响。此类试剂的实例:被选择用于特定底物或者不具有底物特异性的氧化还原剂,包括例如细胞中存在的氧化酶或还原酶或还原剂(例如硫醇),其可通过还原作用降解可氧化还原裂解的连接基团;酯酶;酰胺酶;可创造酸性环境(例如产生5以下的pH)的内涵体或试剂;可通过充当广义酸、肽酶(其可为底物特异性的)、蛋白酶和磷酸酶来水解或降解可酸裂解的连接基团的酶。

[0133] 在任何方面的一些实施方式中,接头是聚乙二醇。在任何方面的一些实施方式中,接头是包含序列DEVD(SEQ ID NO:1)的肽。在进一步的实施方式中,接头是包含序列KDEVDAP(SEQ ID NO:2)的肽。在更进一步的实施方式中,接头是包含序列GKDEVDAP(SEQ ID

NO:3)的肽。在任何方面的一些实施方式中,可裂解的接头可被酶裂解。

[0134] 在任何方面的一些实施方式中,可裂解的接头选自于由小分子组成的组。在一些优选的实施方式中,可裂解的接头选自于由肽或多肽组成的组。

[0135] 在本文的实施例中提供制备粒子并将其粘附在红细胞上的示例性方法。

[0136] 在任何实施方式的一个方面,本文所述的是向受试者中的细胞递送治疗剂的方法,该方法包括向受试者给予如本文所述的细胞组合物。在任何方面的一些实施方式中,所述细胞是癌细胞,所述治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如,IFN)。

[0137] 在任何实施方式的一个方面,本文所述的方法是在有需要的受试者中治疗癌症和/或肿瘤的方法,该方法包括向受试者给予如本文所述的细胞组合物,其中,治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如,IFN)。

[0138] 在任何方面的一些实施方式中,癌细胞处于受试者的肺和/或受试者患有肺癌。在任何方面的一些实施方式中,癌细胞处于受试者的肺和/或受试者患有肺癌,并且PLGA是选自靶向肺的表3的组合物,例如,其中PLGA包含比例约为65:35的L:G和酸末端。

[0139] 在任何方面的一些实施方式中,癌细胞处于受试者的肾脏和/或受试者患有肾癌。在任何方面的一些实施方式中,癌细胞处于受试者的肾脏和/或受试者患有肾癌,并且PLGA是选自靶向肾脏的表3的组合物,例如,其中PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端或PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0140] 如本文所使用的,术语“癌症”一般涉及一类疾病或病症,其中异常细胞不受控制地分裂并且可侵袭附近的组织。癌细胞还可通过血液和淋巴系统扩散至机体的其它部分。存在数种主要类型的癌症。癌是始于皮肤或者内衬于内部器官或覆盖内部器官的组织中的癌症。肉瘤是始于骨骼、软骨、脂肪、肌肉、血管或其它结缔组织或支持性组织的癌症。白血病是始于形成血液的组织(例如骨髓)并且导致大量异常血细胞产生并进入血液的癌症。淋巴瘤和多发性骨髓瘤是始于免疫系统细胞的癌症。中枢神经系统癌症是始于脑和脊髓组织的癌症。

[0141] 在任何方面的一些实施方式中,癌症为原发性癌症。在任何方面的一些实施方式中,癌症为恶性癌症。如本文所使用的,术语“恶性”是指其中一组肿瘤细胞展示出不受控制的生长(即,超出正常界限的分裂)、侵袭(即,侵入和破坏相邻组织)以及转移(即,通过淋巴或血液扩散至机体的其它位置)中的一种或多种的癌症。如本文所使用的,术语“转移”是指癌症从机体的一部分扩散至另一部分。由扩散的细胞形成的肿瘤称为“转移性肿瘤”或“转移瘤”。转移性肿瘤含有与原始(原发性)肿瘤中的细胞相似的细胞。如本文所使用的,术语“良性”或“非恶性”是指可长大但不会扩散至机体其它部分的肿瘤。良性肿瘤是自限性的,并且通常不会侵袭或转移。

[0142] “癌细胞”或“肿瘤细胞”是指癌性生长物或组织的单个细胞。肿瘤一般是指由细胞的异常生长形成的肿胀或病变,其可为良性的、恶变前的或恶性的。大多数癌细胞形成肿瘤,但一些癌细胞(例如白血病)不一定形成肿瘤。对于形成肿瘤的那些癌细胞,术语癌症(细胞)和肿瘤(细胞)可互换使用。

[0143] 如本文所使用的,术语“赘生物”是指组织的任何新的和异常的生长(例如异常的组织块),其生长超过正常组织并且与正常组织不协调。因此,赘生物可为良性赘生物、恶变前赘生物或恶性赘生物。

[0144] 患有癌症或肿瘤的受试者是在受试者体内具有在客观上可测量的癌细胞的受试者。此定义包括恶性的、活跃增殖的癌症以及潜在的休眠肿瘤或微转移瘤。从其原始位置迁移并定植其它重要器官的癌症可最终通过受影响器官的功能退化而导致受试者死亡。

[0145] 癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统癌症、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠和直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌症、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌(包括胃肠癌)、胶质母细胞瘤(GBM)、肝癌、肝细胞瘤、上皮内赘生物、肾脏癌或肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、淋巴瘤(包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、黑色素瘤、骨髓瘤、成神经细胞瘤、口腔癌(例如唇、舌、口和咽)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统癌症、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫或子宫内膜癌、泌尿系统癌症、外阴癌以及其它癌和肉瘤、以及B细胞淋巴瘤(包括低度/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL)NHL、中度/滤泡性NHL、中度弥漫性NHL、高度免疫母细胞性NHL、高度淋巴母细胞性NHL、高度小非核裂细胞NHL、大包块病变NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性成髓细胞性白血病以及移植后的淋巴组织增生性紊乱(PTLD),以及与瘢痣病、水肿(例如与脑肿瘤相关)和Meigs综合征相关的异常血管增生。

[0146] “癌细胞”是体内、离体或组织培养物中的癌细胞、癌前细胞或转化的细胞,其具有自发的或诱导的表型改变,该改变不一定涉及新遗传物质的摄取。尽管转化可产生自转化病毒感染以及新的基因组核酸的掺入或外源核酸的摄取,但它也可自发地产生或在暴露于致癌物后产生,从而使内源基因发生突变。转化/癌症与如下相关:例如形态学变化、细胞的永生化、异常的生长控制、灶形成、锚着非依赖性、恶性、生长的密度限制和接触抑制的丧失、生长因子或血清非依赖性、肿瘤特异性标志物、侵袭性或转移性、以及合适的动物宿主(例如裸鼠)中的肿瘤生长。

[0147] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的是在有需要的受试者中刺激免疫应答的方法,该方法包括向所述受试者给予如本文所述的细胞组合物,其中,所述治疗剂是抗原、免疫刺激剂或趋化因子。在任何方面的一些实施方式中,免疫应答是局部的。

[0148] 如本文实施例中所述,使用本文所述的细胞组合物中的一种来递送抗原可以提供疫苗接种效果。也就是说,治疗剂是抗原,细胞组合物刺激免疫应答,以提供针对抗原的疫苗接种。

[0149] 如本文进一步描述的,本文所述的细胞组合物可以在不使用进一步佐剂的情况下提供疫苗接种效果。如本文所使用的,在免疫、免疫应答和疫苗接种的上下文中,术语“佐剂”是指当与特异性抗原组合使用时,可产生比单独使用该抗原更强大的免疫应答的任何物质。当掺入疫苗制剂中时,佐剂通常起到加速、延长或增强对疫苗抗原的特异性免疫应答质量的作用。因此,在任何方面的一些实施方式中,包含抗原的本文所述的细胞组合物不与进一步的佐剂一起给予。在任何方面的一些实施方式中,包含抗原的本文所述的细胞组合物不包含进一步的佐剂。在任何方面的一些实施方式中,包含含有抗原的本文所述的细胞组合物的组合物不包含进一步的佐剂。在任何方面的一些实施方式中,进一步的佐剂可以是如下的任一种:明矾、氢氧化铝、磷酸铝、碱式磷酸钙(calcium phosphate hydroxide)、

石蜡油、角鲨烯、洗涤剂、植物皂苷、细胞因子、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂或镇痛药。在任何方面的一些实施方式中，包含含有抗原的本文所述的细胞组合物的组合物不包含外源或异位的明矾、氢氧化铝、磷酸铝、碱式磷酸钙、石蜡油、角鲨烯、洗涤剂、植物皂苷、细胞因子、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂或镇痛药。在任何方面的一些实施方式中，包含抗原的本文所述的细胞组合物不包含外源或异位的明矾、氢氧化铝、磷酸铝、碱式磷酸钙、石蜡油、角鲨烯、洗涤剂、植物皂苷、细胞因子、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂或镇痛药。

[0150] 如本文所述，“抗原”是由B细胞受体(BCR)、T细胞受体(TCR)和/或抗体特异性结合从而激活免疫应答的分子。抗原可以是病原体衍生的，或源自病原体。抗原可以是多肽、蛋白质、核酸或其它分子或它们的部分。术语“抗原决定簇”是指由抗原结合分子、更具体地由所述分子的抗原结合位点识别的抗原上的表位。

[0151] 在任何方面的一些实施方式中，细胞组合物可以是亚单位疫苗，包括重组亚单位疫苗。亚单位疫苗不包含全部致病微生物，而仅包含从致病微生物获得或衍生自致病微生物的抗原的子集。亚单位疫苗可包含多种不同的抗原。通过重组技术产生抗原的亚单位疫苗被称为重组亚单位疫苗。

[0152] 适用于本文所述方法和组合物的示例性的非限制性疫苗可包括：冠状病毒疫苗；SARS-CoV-2疫苗；肺炎球菌疫苗；乙型肝炎(HBV)疫苗；无细胞百日咳(aP)疫苗；白喉破伤风无细胞百日咳(DTaP)疫苗；甲型肝炎(HAV)疫苗；脑膜炎球菌(MV)疫苗；和/或肺炎球菌联合疫苗(PCV)13。在任何方面的一些实施方式中，抗原可以是(获得自、源自或发现于)如下物质的抗原：冠状病毒；SARS-CoV-2；肺炎球菌；乙型肝炎(HBV)病毒；Clostribium tetani；百日咳博代氏杆菌；白喉棒状杆菌；甲型肝炎(HAV)病毒；和/或脑膜炎球菌。

[0153] 在任何方面的一些实施方式中，给予多种抗原。在任何方面的一些实施方式中，给予多种疫苗。

[0154] 可向需要疫苗接种、免疫和/或刺激免疫应答的受试者给予本文所述的组合物和方法。在任何方面的一些实施方式中，本文所述的方法包括例如向受试者给予本文所述的有效量的组合物，以针对相关病原体(抗体源自该病原体)提供保护或刺激免疫应答。针对相关病原体提供保护是刺激免疫系统，使得随后暴露于抗原(例如，在活病原体上或在活病原体内)相比受试者原始接触抗原时引发更有效的免疫应答。保护可包括更快的病原体清除、降低症状的严重程度和/或时间、和/或无疾病或症状的发展。与等同的未治疗对照相比，通过任何标准技术测量的此种降低为至少5％、10％、20％、40％、50％、60％、80％、90％、95％、99％以上。本领域技术人员已知多种用于给予本文所述的组合物的手段。此类方法可以包括但不限于口服、肠胃外、静脉内、肌内、皮下、经皮、气道(气溶胶)、肺、皮肤、注射或局部给予。给予可以是局部的或全身性的。在任何方面的一些实施方式中，给予可以是肌内或皮下的。

[0155] 在任何方面的一些实施方式中，当治疗剂是抗原时，细胞组合物靶向于脾脏。当例如组合物的PGLA包含：a)比例为约50:50的L:G和酯末端；b)比例为约50:50的L:G和酸末端，或c)比例小于85:15的L:G和酯末端时，细胞组合物可以靶向于脾脏。

[0156] 可选地或另外地，孵育期间形成细胞组合物的粒子与红细胞的比例可以影响治疗剂的递送靶标。例如，在任何方面的一些实施方式中，通过在每个红细胞约150至约600个粒子的粒子和红细胞的比例下孵育形成的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的

一些实施方式中，通过在每个红细胞150至600个粒子的粒子和红细胞的比例下孵育形成的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过在每个红细胞约200至约400个粒子的粒子和红细胞的比例下孵育形成的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过在每个红细胞200至400个粒子的粒子和红细胞的比例下孵育形成的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过在每个红细胞约300个粒子的粒子和红细胞的比例下孵育形成的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，通过在每个红细胞300个粒子的粒子和红细胞的比例下孵育形成的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，粒子是纳米粒子。

[0157] 在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞超过18个粒子的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞超过20个粒子的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞超过22个粒子的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞超过约24个粒子的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，包含每个红细胞24个粒子的细胞组合物将使治疗剂靶向于脾脏。在任何方面的一些实施方式中，粒子是纳米粒子。

[0158] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的方法是在有需要的受试者中减少或抑制免疫应答的方法，该方法包括向受试者给予如本文所述的细胞组合物，其中，治疗剂是免疫抑制剂或类固醇。在任何方面的一些实施方式中，免疫应答是局部的。

[0159] 在任何方面的一些实施方式中，在受试者的肺中或将在受试者的肺中进行待刺激、降低或抑制的免疫应答。在任何方面的一些实施方式中，在受试者的肺中或将在受试者的肺中进行待刺激、降低或抑制的免疫应答，并且PLGA是选自表3中靶向肺的组合物，例如，其中PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0160] 如本文所使用的，“免疫应答”是指免疫系统的细胞对刺激(例如，对疾病、抗原或健康细胞，例如在自身免疫的情况下)的应答，免疫系统的细胞例如B细胞、T细胞(CD4或CD8)、调节性T细胞、抗原呈递细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、NKT细胞、NK细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞或中性粒细胞。在本文所述的方面的一些实施方式中，免疫应答是T细胞应答，例如CD4+应答或CD8+应答。这些细胞的此种应答可包括例如细胞毒性、增殖、细胞因子或趋化因子产生、运输(trafficking)或吞噬作用，并且可能取决于经历该应答的免疫细胞的性质。免疫应答的刺激是指免疫应答的诱导或增加。免疫应答的抑制是指免疫应答的消除或降低。

[0161] 对抗原的免疫应答可以是在受试者中对感兴趣的疫苗组合物或抗原中存在的分子发展出体液和/或细胞介导的免疫应答。出于本发明的目的，“体液免疫应答”是抗体介导的免疫应答并涉及抗体的诱导和产生，该抗体识别抗原并与抗原以一定的亲和力结合，而“细胞介导的免疫应答”是由T细胞和/或其它白血细胞介导的应答。“细胞介导的免疫应答”是由与主要组织相容性复合物(MHC)、CD1或其它非经典MHC样分子的I类或II类分子相关的抗原表位的呈递而引发的。这激活了抗原特异性CD4+T辅助细胞或CD8+细胞毒性淋巴细胞(“CTL”)。CTL对肽抗原具有特异性，该肽抗原的呈递与由经典或非经典MHC编码并在细胞表面上表达的蛋白质相关。CTL辅助诱导和促进细胞内微生物的细胞内破坏，或感染此种微生

物的细胞的裂解。细胞免疫的另一方面涉及通过辅助T细胞的抗原-特异性应答。辅助T细胞用于辅助刺激功能，并将非特异性效应细胞的活性集中于对抗显示肽或其它抗原的细胞，所述肽或其它抗原与它们表面上的经典或非经典MHC分子相关。“细胞介导的免疫应答”还指产生细胞因子、趋化因子和由活化的T细胞和/或其它白血细胞产生的其它此类分子，包括衍生自CD4+和CD8+T细胞的那些。特定抗原或组合物刺激细胞介导的免疫应答的能力可以通过多种测定来确定，例如通过淋巴细胞增生(淋巴细胞活化)测定、CTL细胞毒性细胞测定、通过在敏化的受试者中测定对抗原特异的T淋巴细胞、或通过测量响应于用抗原再刺激的T细胞的细胞因子产生。此种测定在本领域中是众所周知的。参见例如，Erickson等，(1993)J.Immunol.151:4189-4199;和Doe等，(1994)Eur.J.Immunol.24:2369-2376。

[0162] 经工程化的细胞组合物可包含对于待治疗的受试者而言为自体的或异源的细胞(例如，红细胞)。在任何方面的一些实施方式中，治疗方法可包括如下的第一步骤:从供体和/或受试者获得细胞，并使细胞与聚合物粒子离体接触。可对细胞进行分离，例如在进行接触/粘附步骤前从由供体/受试者获得的血液样品中分离，或可在包含多种细胞类型的样品中(例如在血液样品中)进行接触/粘附。

[0163] 可向患有或经诊断患有本文所述的病症之一的受试者给予本文所述的组合物和方法。在任何方面的一些实施方式中，本文所述的方法包括向受试者给予有效量的本文所述的组合物(例如经工程化的细胞组合物)，以缓和本文所述的病症的症状。在任何方面的一些实施方式中，给予治疗有效剂量的组合物。如本文所使用的，“缓和症状”是改善与疾病有关的任何病症或症状。相较于同等的未经治疗的对照，如通过任何标准技术所测量的，此类减少至少为5％、10％、20％、40％、50％、60％、80％、90％、95％、99％以上。向受试者给予本文所述的组合物的各种手段对本领域技术人员而言是已知的。此类方法可以包括但不限于肠胃外、静脉内、肌内、皮下、经皮、气道(气溶胶)、肺、皮肤、注射或瘤内给予。给予可以是局部的或全身性的。

[0164] 如本文所使用的，术语“有效量”是指为缓和疾病或紊乱的至少一种或多种症状所需的组合物的量，并且涉及足以提供期望的效果的药物组合物的量。因此，术语“治疗有效量”是指当给予至典型受试者时足以提供特定治疗效果的组合物的量。在各种情况下，本文所使用的有效量还包括足以延迟疾病症状的发展、改变疾病症状的进程(例如但不限于减慢疾病症状的进展)或逆转疾病症状的量。因此，指明确切的“有效量”通常是不可行的。然而，对于任何给定的情况，可由本领域普通技术人员仅使用常规实验来确定适当的“有效量”。

[0165] 可通过细胞培养或实验动物中的标准药学程序来确定有效量、毒性和治疗功效，例如用于确定LD50(使50％的群体致死的剂量)和ED50(在50％的群体中治疗上有效的剂量)的药学程序。剂量可根据所采用的剂型和所利用的给予途径而变化。毒性效果和治疗效果之间的剂量比为治疗指数，并且可表示为LD50/ED50之比。优选表现出高的治疗指数的组合物和方法。最开始可从细胞培养测定来估计治疗上有效的剂量。同样，可在动物模型中制定剂量以达到如下的循环血浆浓度范围，所述范围包括在细胞培养中或在适当的动物模型中确定的IC50(即达到症状的半数最大抑制的活性成分的浓度)。可例如通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。可通过例如用于肿瘤尺寸和/或免疫应答标志物等的合适的生物测定法来监测任何特定剂量的效果。剂量可由医生确定并根据需要进行调整，以适合观察到

的治疗效果。

[0166] 在任何方面的一些实施方式中，治疗剂的给予剂量是如果以游离形式给予(例如，不在粒子中和/或不粘附在红细胞上)时向受试者给予的量的50％以下。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂的给予剂量是如果以游离形式给予(例如，不在粒子中和/或不粘附在红细胞上)时向受试者给予的量的40％以下。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂的给予剂量是如果以游离形式给予(例如，不在粒子中和/或不粘附在红细胞上)时向受试者给予的量的30％以下。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂的给予剂量是如果以游离形式给予(例如，不在粒子中和/或不粘附在红细胞上)时向受试者给予的量的20％以下。在任何方面的一些实施方式中，治疗剂的给予剂量是如果以游离形式给予(例如，不在粒子中和/或不粘附在红细胞上)时向受试者给予的量的10％以下。

[0167] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的组合物可以是药物组合物。在任何方面的一些实施方式中，本文所述的技术涉及包含如本文所述的经工程化的细胞组合物以及任选的药学上可接受的载体的药物组合物。在任何方面的一些实施方式中，药物组合物的活性成分包括如本文所述的经工程化的细胞组合物。在任何方面的一些实施方式中，药物组合物的活性成分基本上由如本文所述的经工程化的细胞组合物组成。在任何方面的一些实施方式中，药物组合物的活性成分由如本文所述的经工程化的细胞组合物组成。药学上可接受的载体和稀释剂包括生理盐水、水性缓冲溶液、溶剂和/或分散介质。这种载体和稀释剂的使用是本领域熟知的。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些非限制性实例包括：(1)糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2)淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3)纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和醋酸纤维素；(4)黄蓍胶粉；(5)麦芽；(6)明胶；(7)润滑剂，例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石粉；(8)赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9)油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10)二醇，例如丙二醇；(11)多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG)；(12)酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13)琼脂；(14)缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15)藻酸；(16)无热原水；(17)等渗盐水；(18)林格氏溶液；(19)乙醇；(20)pH缓冲溶液；(21)聚酯，聚碳酸酯和/或聚酸酐；(22)填充剂，例如多肽和氨基酸；(23)血清成分，例如血清白蛋白、HDL和LDL；(22)C_2-C_{12}醇，例如乙醇；以及(23)药物制剂中采用的其它无毒相容性物质。制剂中也可存在润湿剂、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。例如“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”等的术语在本文中可互换使用。在任何方面的一些实施方式中，如本文所述，载体抑制活性剂的降解。

[0168] 在任何方面的一些实施方式中，包含本文所述的经工程化的细胞组合物的药物组合物可为肠胃外剂型。由于肠胃外剂型的给予通常绕过患者对抗污染物的天然防御，因此肠胃外剂型优选为无菌的或能够在给予患者前被灭菌。肠胃外剂型的实例包括但不限于准备好用于注射的溶液、准备好用于溶解或悬浮于药学上可接受的用于注射的溶媒中的干燥产品或冻干产品、准备好用于注射的混悬液以及乳剂。另外，可制备用于给予患者的控释肠胃外剂型，包括但不限于DUROS®型剂型和剂量倾卸。

[0169] 可用于提供本文内所述的经工程化的细胞组合物的肠胃外剂型的合适的载体是本领域技术人员公知的。实例包括但不限于：无菌水；USP注射用水；生理盐水溶液；葡萄糖溶液；水性溶媒，例如但不限于氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化

钠注射液以及乳酸盐林格氏注射液;与水混溶的溶媒,例如但不限于乙醇、聚乙二醇和丙二醇;以及非水性溶媒,例如但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。

[0170] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的经工程化的细胞组合物作为单一疗法给予,例如不向受试者给予针对所述病症的另一治疗。

[0171] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的方法可以进一步包括向受试者给予第二药剂和/或治疗,例如,作为组合疗法的一部分。第二药剂和/或治疗的非限制性实例可包括:放射疗法;外科手术;吉西他滨;顺铂;紫杉醇;卡铂;硼替佐米;AMG479;FK506;伏立诺他;吖啶黄;利妥昔单抗;替莫唑胺;雷帕霉素;ABT-737;PI-103;烷化剂,例如噻替哌(thiotepa)和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸酯,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,例如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和uredopa;乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;多聚乙酰,特别是布拉他辛和布拉他辛酮(bullatacinone);喜树碱,包括合成类似物拓扑替康;苔藓虫素;callystatin;CC-1065,包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物;念珠藻素(具体地,念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他汀;倍癌霉素,包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1;软珊瑚醇(eleutherobin);水鬼蕉碱;匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、氧氮芥盐酸盐、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素、特别是卡奇霉素γ1I和卡奇霉素ωI1,参见例如Agnew.Chem.Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994));dynemicin,包括dynemicin A;双膦酸盐,例如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关的色素蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、carabicin、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、道诺霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®阿霉素(包括吗啉代阿霉素、氰基吗啉代阿霉素、2-吡咯啉并阿霉素和去氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素(例如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,例如氨甲喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、氨甲喋呤、蝶罗呤、曲美沙特;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素,例如卡普睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药,例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;乙酰葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶;阿莫司汀(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛;地吖醌;elformithine;依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登木素(maytansinoid),例如美登素(maytansine)和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吖啶(nitraerine);喷司他丁;蛋氨氮芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼

臼酸;2-乙基肼;甲基苄肼;PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg.);雷佐生;根霉素;西佐喃;螺旋锗;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯,特别是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurin A)、杆孢菌素A和蛇形菌素(anguidine);氨基甲酸酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替哌;紫杉烷类,例如TAXOL®紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE®紫杉醇的不含聚氧乙烯化蓖麻油的经白蛋白工程化的纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Ill.)和TAXOTERE®多西他赛(Rhone-Poulenc Rorer,Antony,法国);苯丁酸氮芥;GEMZAR®吉西他滨;6-硫代鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲喋呤;铂类似物,例如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;NAVELBINE.RTM.长春瑞滨;米托蒽醌;替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基喋呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(Camptosar,CPT-11)(包括伊立替康与5-FU和甲酰四氢叶酸的治疗方案);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醇,例如视黄酸;卡培他滨;康普瑞汀;甲酰四氢叶酸(LV);奥沙利铂,包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);拉帕替尼(Tykerb.RTM.);减少细胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR(例如厄洛替尼(Tarceva®)和VEGF-A的抑制剂;以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0172] 此外,治疗方法还可包括放射或放射疗法的使用。此外,治疗方法可进一步包括外科手术治疗的使用。

[0173] 在某些实施方式中,可以向患者一次给予有效剂量的包含如本文所述的细胞组合物的组合物。在某些实施方式中,可以向患者重复地给予有效剂量的组合物。在任何方面的一些实施方式中,在初始治疗方案后,可以以较低频率基础给予治疗。例如,每两周一次治疗3个月后,可每月重复一次治疗,持续6个月或一年或更长。根据本文所述方法的治疗可将病症的症状或标志物水平降低例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%以上。

[0174] 如本文所述的组合物的剂量可由医生确定,并根据需要进行调整以匹配所观察到的治疗效果。关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生通常对受试者进行监测以确定该治疗何时提供治疗益处,并确定是否增加或减少剂量、增加或减少给予频率、停止治疗、恢复治疗或对治疗方案进行其它更改。取决于许多临床因素(例如受试者对组合物的敏感性),给药时间表可从每周一次到每天一次变化。期望的活化量或剂量可一次给予或分为亚剂量(例如2-4个亚剂量)并在一段时间内(例如以一天中的适当间隔或其它合适的时间表)给予。在任何方面的一些实施方式中,给药可为长期的,例如在数周或数月的时间段内每天一次或多次给药和/或治疗。给药和/或治疗方案的实例为在1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月或更长的时间段内每天一次、每天两次、每天3次或每天4次以上给予。可在一段时间内(例如在5分钟、10分钟、15分钟、20分钟或25分钟的时间段内)给予包含本文所述的经工程化的细胞组合物的组合物。

[0175] 根据本文所述的方法,本文所述的组合物的给予的剂量范围取决于:例如细胞的效力,以及本文所述病症的症状、标志物或指标的期望减少的程度(例如期望诱导的肿瘤生长期望的减少百分比)。剂量不应过大而导致不良副作用,例如过度炎症或免疫抑制。一般

地，剂量将随患者的年龄、状况和性别而变化，并且可由本领域技术人员确定。在任何并发症事件中，剂量也可由个别医生进行调整。

[0176] 细胞组合物在例如治疗本文所述的病症或诱导本文所述的应答中的功效可由熟练的临床医生确定。然而，如果以有益的方式改变本文所述的病症的一种或多种症状或体征，其它临床上接受的症状得到改善或甚至好转、或在根据本文所述方法的治疗后诱导例如至少10％的期望的应答，则治疗被视为如本文使用的术语“有效治疗”。可通过例如对根据本文所述的方法治疗的病症的标志物、指标、症状和/或发生率、或合适的任何其它可测量的参数进行测量来评估功效。也可通过需要医疗干预或住院治疗评估个体不再恶化(即疾病的进展停止)来测量功效。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文描述的。治疗包括个体或动物(一些非限制性实例包括人或动物)中的疾病的任何治疗，并且包括：(1)抑制疾病，例如预防症状(例如疼痛或炎症)的恶化；或(2)减轻疾病的严重程度，例如引起症状的消退。如该术语在本文中所定义的，疾病治疗的有效量指的是当向有需要的受试者给予时足以引起对该疾病的有效治疗的量。可通过对病症或期望的应答的物理指标进行评估来确定试剂的功效。通过测量此类参数中的任何一个或参数的任何组合来监测给予和/或治疗的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。可在本文所述病症的动物模型(例如癌症的治疗)中对功效进行评估。当使用实验动物模型时，如果观察到标志物(例如肿瘤生长、肿瘤尺寸、炎症、创伤尺寸等)的统计学上显著的变化，则证明了治疗的功效。

[0177] 为方便起见，以下提供在说明书、实施例和所附的权利要求中使用的一些术语和短语的含义。除非另有说明或从上下文中暗示得到，以下术语和短语包括以下提供的含义。提供所述定义以帮助描述特定的实施方式，而并不打算限制要求保护的发明，因为本发明的范围仅通过权利要求加以限定。除非另有定义，本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如果本领域中的术语的使用与本文提供的其定义之间存在明显差异，则以说明书中提供的定义为准。

[0178] 为方便起见，将本文在说明书、实施例和所附的权利要求中采用的一些术语汇集在此。

[0179] 术语“降低”、“减少的”、“减少”或“抑制”在本文中均用于指降低统计学上显著的量。在任何方面的一些实施方式中，“减小”、“减少”或“降低”或“抑制”通常指与参比水平(例如不存在给定的治疗或试剂)相比降低至少10％，并且可包括例如降低至少约10％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或更多。如本文所使用的，“减少”或“抑制”并未涵盖与参比水平相比的完全抑制或减少。“完全抑制”是与参比水平相比100％的抑制。降低可优选下降至作为对于没有给定的紊乱的个体而言的正常范围内接受的水平。

[0180] 术语“增加的”、“增加”、“增强”或“活化”在本文中均用于表示增加统计学上显著的量。在任何方面的一些实施方式中，术语“增加的”、“增加”、“增强”或“活化”可指与参比水平相比增加至少10％，例如与参比水平相比增加至少约20％、或至少约30％、或至少约40％、或至少约50％、或至少约60％、或至少约70％、或至少约80％、或至少约90％、或高达并且包括100％的增加、或10％-100％之间的任何增加，或与参比水平相比增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或2倍-10倍以上之间的任何增

加。在标志物或症状的上下文中，“增加”是此类水平的统计学上显著的增加。

[0181] 如本文所使用的，“受试者”指人或动物。动物通常为脊椎动物，例如灵长类动物、啮齿类动物、家养动物或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴(例如恒河猴)。啮齿类动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养动物和狩猎动物包括牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科动物(例如家猫)、犬科动物(例如狗、狐狸、狼)、鸟类(例如鸡、鸸鹋、鸵鸟)和鱼类(例如鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼)。在任何方面的一些实施方式中，受试者为哺乳动物，例如灵长类动物(例如人)。术语“个体”、“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0182] 优选地，所述受试者为哺乳动物。哺乳动物可为人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛，但不限于这些实例。除人以外的哺乳动物可有利地用作代表疾病的动物模型的受试者。受试者可为雄性或雌性。

[0183] 受试者可为先前被诊断出或鉴别为患有或具有需要治疗的病症或与此病症有关的一种或多种并发症、并且任选地已接受对该病症或与该病症有关的一种或多种并发症的治疗的受试者。可选地，受试者还可为先前未被诊断为患有该病症或与该病症有关的一种或多种并发症的受试者。例如，受试者可为表现出该病症或与该病症有关的一种或多种并发症的一个或多个风险因素的受试者、或未表现出风险因素的受试者。

[0184] 针对特定病症的“需要”治疗的“受试者”可为具有该病症、被诊断为具有该病症或处于发展出该病症的风险中的受试者。

[0185] 术语“化合物”和“试剂”是指通常不存在或不以给予和/或提供至细胞、组织或受试者的水平存在的任何实体。试剂可选自包括如下的组：化学品、有机或无机小分子、信号分子、核酸序列、核酸类似物、蛋白质、肽、酶、适体、拟肽、肽衍生物、肽类似物、抗体、胞内抗体、生物大分子、由生物材料(例如细菌、植物、真菌或动物细胞或组织)制成的提取物、天然存在的或合成的组合物或它们的功能片段。在任何方面的一些实施方式中，试剂为任何化学品、实体或部分，包括但不限于合成的和天然存在的非蛋白质实体。在某些实施方式中，试剂为具有化学部分的小分子。例如，化学部分包括未取代或取代的烷基、芳香族或杂环基部分，包括大环内酯类、细霉素和有关的天然产物或它们的类似物。已知试剂具有期望的活性和/或性质，或可选自多种化合物的库。

[0186] 如本文所使用的，术语“小分子”是指化学试剂，其可包括但不限于肽、拟肽、氨基酸、氨基酸类似物、多核苷酸、多核苷酸类似物、适体、核苷酸、核苷酸类似物、具有小于约10,000g/mol的分子量的有机或无机化合物(即包括杂有机化合物和有机金属化合物)、具有小于约5,000g/mol的分子量的有机或无机化合物、具有小于约1,000g/mol的分子量的有机或无机化合物、具有小于约500g/mol的分子量的有机或无机化合物，以及此类化合物的盐、酯和其它药学上可接受的形式。

[0187] 如本文所使用的，术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用，以指示通过相邻残基的α-氨基和羧基基团之间的肽键相互连接的一连串氨基酸残基。无论其尺寸或功能，术语“蛋白质”和“多肽”是指氨基酸的聚合物，所述氨基酸包括经修饰的氨基酸(例如磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物。“蛋白质”和“多肽”通常用于指相对大的多肽，而术语“肽”常用于指小的多肽，但在本领域中这些术语的使用有所重叠。当提及基因产物及其片段时，术语“蛋白质”和“多肽”在本文可互换使用。因此，示例性的多肽或蛋白质包括基因产物、天然存在的蛋白质、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段以及前述物质的其它等同

物、变体、片段和类似物。

[0188] 在本文所述的各种实施方式中，在进一步考虑之列的是涵盖所述的任何特定多肽的变体(天然存在的或其它的)、等位基因、同源物、保守修饰变体和/或保守置换变体。对于氨基酸序列，本领域技术人员将认识到对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的个别置换、缺失或添加(其改变经编码的序列中的单个氨基酸或小部分氨基酸)为“保守修饰变体”，其中改变引起氨基酸被化学上相似的氨基酸置换并保留了多肽的期望活性。此类保守修饰变体是与本公开相一致的多态变体、种间同源物和等位基因的补充，但不排除与本公开相一致的多态变体、种间同源物和等位基因。

[0189] 给定的氨基酸可被具有相似的理化特征的残基取代，例如，用一个脂肪族残基置换另一个(例如Ile、Val、Leu或Ala相互置换)，或用一个极性残基置换另一个(例如Lys和Arg之间；Glu和Asp之间；或Gln和Asn之间)。其它此类保守置换、例如对具有相似疏水性特征的整个区域的置换是众所周知的。能够以本文所述的任一测定对包含保守氨基酸置换的多肽进行测试，以确认期望的活性(例如天然多肽或参比多肽的M1极化活性和特异性)得以保留。

[0190] 氨基酸可根据其侧链性质的相似性进行分组(在A.L.Lehninger，in Biochemistry，第二版，第73-75页，Worth Publishers，New York(1975)中)：(1)非极性的：Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)；(2)不带电荷的极性的：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)；(3)酸性的：Asp(D)、Glu(E)；(4)碱性的：Lys(K)、Arg(R)、His(H)。可选地，可基于共同的侧链特性将天然存在的残基分入如下的组：(1)疏水的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2)中性亲水的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；(3)酸性的：Asp、Glu；(4)碱性的：His、Lys、Arg；(5)影响链取向的残基：Gly、Pro；(6)芳香族的：Trp、Tyr、Phe。非保守置换牵涉到用此类之一的成员更换另一类。特定的保守置换包括例如：用Gly或Ser置换Ala；用Lys置换Arg；用Gln或His置换Asn；用Glu置换Asp；用Ser置换Cys；用Asn置换Gln；用Asp置换Glu；用Ala或Pro置换Gly；用Asn或Gln置换His；用Leu或Val置换Ile；用Ile或Val置换Leu；用Arg、Gln或Glu置换Lys；用Leu、Tyr或Ile置换Met；用Met、Leu或Tyr置换Phe；用Thr置换Ser；用Ser置换Thr；用Tyr置换Trp；用Trp置换Tyr和/或用Val、Ile或Leu置换Phe。

[0191] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的多肽(或编码此类多肽的核酸)可为本文所述的氨基酸序列之一的功能片段。如本文使用的，“功能片段”为肽的片段或节段，其根据本文以下所述的测定保留至少50％的野生型参比多肽的活性。功能片段可包含本文公开的序列的保守置换。

[0192] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的多肽可为本文所述的序列的变体。在任何方面的一些实施方式中，变体为保守修饰变体。可通过例如天然核苷酸序列的突变获得保守置换变体。本文所指的“变体”是与天然多肽或参比多肽实质上同源的多肽，但该多肽由于一个或多个缺失、插入或置换而具有与天然多肽或参比多肽的氨基酸序列不同的氨基酸序列。编码变体多肽的DNA序列涵盖如下序列：当与天然DNA序列或参比DNA序列相比时，所述序列包含一个或多个核苷酸的添加、缺失或置换，但编码保留活性的变体蛋白或其片段。各种基于PCR的位点特异性诱变方式在本领域中是已知的，并且可由普通技术人员应用。

[0193] 变体氨基酸或DNA序列可与天然序列或参比序列至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％以上相同。天然序列和突变序列之间的同源性程度(同一性百分比)可例如通过使用万维网上通常为此目的而采用的可免费获取的计算机程序(例如带有默认设置的BLASTp或BLASTn)对两个序列进行比较来确定。

[0194] 可通过本领域技术人员已知的多种技术中的任一种来实现天然氨基酸序列的改变。例如,可通过合成含有突变序列的寡核苷酸而在特定的基因座处引入突变,所述寡核苷酸侧接有使得能够与天然序列的片段连接的限制性位点。连接后,所得的重建序列编码具有期望的氨基酸插入、置换或缺失的类似物。可选地,可采用寡核苷酸指导的位点特异性诱变程序来提供具有特定密码子的改变的核苷酸序列,所述密码子根据所需的置换、缺失或插入而改变。用于进行此类改变的技术已良好建立,并且包括例如通过Walder等(Gene 42:133,1986)、Bauer等(Gene 37:73,1985)、Craik(BioTechniques,1985年1月,12-19);Smith等,(Genetic Engineering:Principles and Methods,Plenum.Press,1981)以及美国专利Nos:4,518,584和4,737,462公开的那些技术,以引用的方式将其整体并入本文。一般也可用丝氨酸置换不参与维持多肽的适当构象的任何半胱氨酸残基,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可将半胱氨酸键添加至多肽以改善其稳定性或促进寡聚化。

[0195] 在任何方面的一些实施方式中,可对本文所述的多肽、核酸或细胞进行工程化。如本文所使用的,“经工程化的”是指已被人为操纵的方面。例如,当多肽的至少一方面(例如其序列)已被人为操纵以与其在自然中存在的方面不同时,则认为多肽是“经工程化的”。如普通的实践并且为本领域技术人员所理解的,即使实际的操纵是在先前的实体上进行,经工程化的细胞的后代通常仍被称为“经工程化的”。

[0196] 如本文所使用的,术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有免疫特异性地结合抗原的抗原结合位点的分子。该术语还指由两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链组成的抗体以及包括全长抗体及其抗原结合部分的多种形式;包括例如免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体(dAb)、双价抗体(diabody)、多特异性抗体、双重特异性抗体(dual specific antibody)、抗独特型抗体(anti-idiotypic antibody)、双特异性抗体(bispecific antibody)、它们的功能活性表位结合部分和/或双功能杂交抗体。每条重链由所述重链的可变区(本文中缩写为HCVR或VH)以及所述重链的恒定区组成。所述重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由所述轻链的可变区(本文中缩写为LCVR或VL)以及所述轻链的恒定区组成。所述轻链恒定区由CL结构域组成。VH和VL区可进一步分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,并穿插有被称为框架区(FR)的保守区。因此,每个VH和VL区由三个CDR和四个FR组成,它们从N端到C端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。该结构是本领域技术人员熟知的。

[0197] 如本文所使用的,术语“抗体试剂”是指这样的多肽:该多肽包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列,并特异性地结合给定抗原。抗体试剂可包括抗体或含有抗体的抗原结合结构域的多肽。在任何方面的一些实施方式中,抗体试剂可包含单克隆抗体或含有单克隆抗体的抗原结合结构域的多肽。例如,抗体可包含重(H)链可变区(本文中缩写为VH)和轻(L)链可变区(本文中缩写为VL)。在另一实例中,抗体包含两个

重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体试剂”涵盖了抗体的抗原结合片段(例如，单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')2、Fd片段、Fv片段、scFv和结构域抗体(dAb)片段)以及完整抗体。

[0198] 抗体和/或抗体试剂可包括免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、全人抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体以及它们的功能活性表位结合部分。

[0199] 如本文所使用的，术语“纳米体(nanobody)”或单域抗体(sdAb)是指包含从骆驼(camel)和单峰骆驼(dromedary)获得的抗体的小的单个可变结构域(VHH)的抗体。已在尺寸、结构复杂性和对人受试者抗原性方面，对从骆驼和单峰骆驼(Camelus baclrianus和Calelus dromaderius)家族成员(包括新的世界成员，例如美洲驼物种(Lama paccos、Lama glama和Lama vicugna))获得的抗体蛋白进行了表征。自然界中发现的来自该哺乳动物家族的某些IgG抗体缺少轻链，并因此在结构上不同于就来自其它动物的抗体而言的、具有两条重链和两条轻链的典型四链四级结构。参见PCT/EP93/02214(1994年3月3日公开的WO 94/04678;以引用的方式将其整体并入本文)。

[0200] 可通过基因工程获得鉴定为VHH的小的单个可变结构域的骆驼抗体的区域，以产生对靶标具有高亲和力的小蛋白质，从而产生称为“骆驼纳米体”的低分子量抗体衍生的蛋白质。参见1998年6月2日发行的U.S.Pat.No.5,759,808;还参见Stijlemans,B.等,2004J Biol Chem 279:1256-1261;Dumoulin,M.等,2003Nature 424:783-788;Pleschberger,M.等,2003Bioconjugate Chem 14:440-448;Cortez-Retamozo,V.等,2002Int J Cancer 89:456-62;以及Lauwereys,M.等,1998EMBO J.17:3512-3520;每一篇以引用的方式将其整体并入本文。骆驼抗体和抗体片段的工程库可商购获得，例如，来自Ablynx,Ghent,Belgium。与非人源的其它抗体一样，可重组改变骆驼抗体的氨基酸序列，以获得与人序列更接近的序列，即纳米体可以进行“人源化”。因此，骆驼抗体对人的天然低抗原性可进一步降低。

[0201] 骆驼纳米体的分子量约为人IgG分子的十分之一，并且所述蛋白质的物理直径仅为几纳米。小尺寸的一个结果是骆驼纳米体能够结合到更大抗体蛋白质在功能上不可见的抗原位点，即骆驼纳米体可用作使用传统免疫技术检测不到的抗原的检测试剂，并可用作可能的治疗剂。因此，小尺寸的另一结果是骆驼纳米体由于结合靶蛋白的沟(groove)或窄缝(narrow cleft)中的特异位点而因此可以抑制靶蛋白，因此与传统抗体的功能相比，可以发挥更接近传统低分子量药物功能的能力。低分子量和紧密尺寸进一步导致骆驼纳米体极其热稳定，对极端pH和蛋白酶解消化稳定，且抗原性弱。参见2004年8月19日公开的US专利申请20040161738;以引用的方式将其整体并入本文。这些特征与对人的低抗原性结合表明了巨大的治疗潜力。

[0202] 如本文所使用的，“抑制性核酸”是指可抑制靶标的表达的核酸分子，例如双链RNA(dsRNA)、抑制性RNA(iRNA)等。

[0203] 如本文所使用的，术语“治疗/处理”或“减轻”是指治疗性处理，其中，目的是逆转、缓和、减轻、抑制、减慢或停止与疾病或紊乱(例如癌症)相关的病症的严重程度或进展。术语“治疗”包括减少或缓和与病症有关的病症、疾病或紊乱的至少一种不利影响或症状。如果减少一种或多种症状或临床标志物，则治疗通常是“有效的”。可选地，如果疾病的进展减

弱或停止，则治疗是“有效的”。即，与不存在治疗时所期望的相比，“治疗”不仅包括症状或标志物的改善，而且包括症状的进展或恶化中止或至少减慢。有益或期望的临床结果(无论可检测或不可检测)包括但不限于：一种或多种症状的缓和、疾病程度的减小、疾病的稳定状态(即不恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的减轻或减缓、缓解(无论是部分还是全部)、和/或降低的死亡率。术语疾病的“治疗”还包括提供疾病的症状或副作用的纾解(包括姑息治疗)。

[0204] 如本文所使用的，术语“药物组合物”是指与药学上可接受的载体(例如制药工业中常用的载体)组合的活性试剂。本文采用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内，适用于与人类和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激性、变态反应或其它问题或并发症，与合理的收益/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。在任何方面的一些实施方式中，药学上可接受的载体可为除水外的载体。在任何方面的一些实施方式中，药学上可接受的载体可为乳膏、乳剂、凝胶、脂质体、纳米粒子和/或软膏。在任何方面的一些实施方式中，药学上可接受的载体可为人工载体或经工程化的载体，例如未发现活性成分在其中天然存在的载体。

[0205] 如本文所使用的，术语“给予”是指通过一定的方法或途径将本文公开的化合物置于受试者中，使得试剂至少部分递送至期望的部位。可通过任何合适的途径给予包含本文公开的化合物的药物组合物，从而在受试者中产生有效的治疗。

[0206] 术语“统计学上显著的”或“显著地”是指统计学显著性，并且通常指两个标准偏差(2SD)或更大的差异。

[0207] 除在操作实施例中或另外指出，本文使用的表示成分的量或反应条件的所有数字均应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。当与百分比联合使用时，术语“约”可指±1％。

[0208] 如本文所使用的，术语“包含/含有/包括”指除了所存在的指定的要素外还可存在其它要素。“包含/含有/包括”的使用表示包括而非限制性的。

[0209] 术语“由……组成”是指本文所述的组合物、方法以及它们各自的成分，其排除了在实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0210] 如本文所使用的，术语“基本上由……组成”是指给定的实施方式所需的要素。该术语允许存在不会实质上影响本发明的实施方式的基本和新颖的或功能性的特征的额外的要素。

[0211] 如本文所使用的，术语“特异性结合”是指两个分子、化合物、细胞和/或粒子之间的化学相互作用，其中，与第一实体结合至非靶标的第三实体相比，第一实体以更高的特异性和亲和力结合至第二靶实体。在任何方面的一些实施方式中，特异性结合可指与第一实体对第三非靶实体的亲和力相比，第一实体对第二靶实体的亲和力为至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍以上。对给定的靶标而言特异性的试剂是在所利用的测定的条件下表现出对该靶标的特异性结合的试剂。

[0212] 在一些情况下(例如具有醛修饰的透明质酸)，特异性结合可伴随有共价结合以加强细胞/粒子相互作用。

[0213] 除非上下文另外明确指出，单数术语“一/该/所述(a/an/the)”包括复数的指示对象。类似地，除非上下文另外明确指出，词语“或”旨在包括“和”。尽管与本文所述的方法和

材料相似或等同的方法和材料可用于本公开的实践或测试中,以下描述了合适的方法和材料。缩写“例如(e.g.)”来源于拉丁文“例如(exempli gratia)”,并且在本文中用于表示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。

[0214] 本文公开的本发明的替代要素或实施方式的分组不应被解释为限制性的。各组成员可被单独提及或要求保护,或可与该组的其它成员或本文可见的其它要素组合而被提及或要求保护。出于方便和/或专利性的原因,组中的一个或多个成员可包括在组中或从组中删除。当发生任何此类包括或删除时,申请文件在本文中被认为含有经修饰的组,从而满足所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0215] 除非本文另外定义,否则与本申请联合使用的科学和技术术语应具有本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。应理解的是,本发明不限于本文所述的特定方法学、方案和试剂等,并且因此可变化。本文使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求限定。免疫学和分子生物学中常见的术语的定义可见于:由Merck Sharp&Dohme Corp.出版的The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第19版,2011年(ISBN 978-0-911910-19-3);由Blackwell Science Ltd.出版的The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,Robert S.Porter等(编),1999-2012年(ISBN 9783527600908);以及由VCH Publishers,Inc.出版的Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,Robert A.Meyers(编),1995年(ISBN 1-56081-569-8);由Elsevier出版的Immunology by Werner Luttmann,2006年;Janeway’s Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编),Taylor&Francis Limited,2014年(ISBN 0815345305,9780815345305);由Jones&Bartlett Publishers出版的Lewin’s Genes XI,2014年(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版,Cold Spring Harbor Laboratory出版社,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012年)(ISBN 1936113414);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA(2012年)(ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology:DNA,Jon Lorsch(编),Elsevier,2013年(ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology(CPMB),Frederick M.Ausubel(编),John Wiley and Sons,2014年(ISBN 047150338X,9780471503385);Current Protocols in Protein Science(CPPS),John E.Coligan(编),John Wiley and Sons,Inc.,2005年;以及Current Protocols in Immunology(CPI)(John E.Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe(编)John Wiley and Sons,Inc.,2003年(ISBN 0471142735,9780471142737),以引用的方式将其内容以其整体全部并入本文。

[0216] 本领域技术人员可容易地鉴别有用的化学治疗剂(例如参见Physicians’Cancer Chemotherapy Drug Manual,2014年,Edward Chu,Vincent T.DeVita Jr.,Jones&Bartlett Learning;Principles of Cancer Therapy,Harrison’s Principles of Internal Medicine第18版,第85章;Therapeutic Targeting of Cancer Cells:Era of Molecularly Targeted Agents and Cancer Pharmacology,Abeloff’s Clinical Oncology的第28-29章,2013年,Elsevier;以及Fischer DS(编):The Cancer Chemotherapy Handbook,第4版,St.Louis,Mosby-Year Book,2003年)。

[0217] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的公开内容并不关注克隆人的工艺、改变人的生殖系遗传同一性的工艺、人胚胎的工业或商业目的的应用或可能导致动物痛苦而对人或动物没有任何实质性医疗益处的改变动物遗传同一性的工艺以及由此类工艺产生的动物。

[0218] 本文在本发明各个方面的描述中对其它术语进行了定义。

[0219] 出于描述和公开的目的，将在本申请全文中引用的所有专利和其它出版物(包括参考文献、已发布的专利、公开的专利申请和共同待决的专利申请)以引用的方式明确地并入本文，例如在此类出版物中描述的可与本文所述的技术联合使用的方法学。这些出版物仅由于它们的公开早于本申请的申请日而提供。在这一方面，不应当解释为承认了本发明人没有权利借助于在先的发明或因为任何其它原因而将此类公开内容提前。关于这些文件的日期的所有声明或关于这些文件的内容的所有陈述均基于申请人可获得的信息，并不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0220] 对本公开的实施方式的描述并不旨在进行穷举、或将本公开限制为所公开的精确的形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方式和实施例，然而如相关领域技术人员将认识到的，在本公开的范围内可进行多种等同的修改。例如，虽然方法步骤或功能以给定的顺序存在，替代的实施方式可以以不同的顺序执行功能、或可实质上同时执行功能。本文提供的本公开的教导可在适当时应用至其它程序或方法。可将本文所述的多种实施方式进行组合以提供进一步的实施方式。如果需要，可对本公开的各方面进行修饰以采用上述参考文献和申请的组成、功能和构思，从而提供本公开的进一步的实施方式。而且，由于生物学功能等同性的考虑，可在不影响生物学或化学作用的种类或量的情况下对蛋白质结构进行一些改变。可根据详细描述对本公开进行这些改变和其它改变。所有这些修饰都旨在被包括在所附的权利要求的范围内。

[0221] 可将前述任何实施方式的特定要素与其它实施方式中的要素进行组合或将其置换为其它实施方式中的要素。此外，尽管已在这些实施方式的上下文中描述了与本公开的某些实施方式相关的优势，然而其它实施方式也可表现出此类优势，并且并非所有实施方式都必须表现出此类优势才能落入本公开的范围内。

[0222] 通过以下实施例进一步说明了本文所述的技术，这些实施例不应以任何方式被解释为进一步限制性的。

[0223] 可以根据以下编号的段落中的任一段来定义本文所述技术的一些实施方式：

[0224] 1.一种经工程化的细胞组合物，所述经工程化的细胞组合物含有：

[0225] a.红细胞；和

[0226] b.包含PLGA和至少一种治疗剂的粒子，其中，所述粒子位于所述红细胞的细胞表面上。

[0227] 2.根据段落1所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例为至少50:50的L:G或更高的L。

[0228] 3.根据段落2所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例为约50:50的L:G。

[0229] 4.根据段落2所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例为约85:15的L:G。

[0230] 5.根据段落2所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例为约65:35的L:G。

[0231] 6.根据段落1-5中任一段所述的组合物，其中，所述PLGA包含酯末端和/或酸末端。

[0232] 7.根据段落1-6中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含酯末端。

[0233] 8.根据段落1-6中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含酸末端。

[0234] 9.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端。

[0235] 10.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酸末端。

[0236] 11.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

[0237] 12.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0238] 13.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏和/或心脏。

[0239] 14.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酸末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏和/或肺。

[0240] 15.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于肾脏和/或肺。

[0241] 16.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端,由此将所述治疗剂靶向于肺、心脏和/或肾脏。

[0242] 17.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G,由此将所述治疗剂靶向于肺和/或肾脏。

[0243] 18.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例小于85:15的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏。

[0244] 19.根据段落1-18中任一段所述的组合物,其中,所述至少一种治疗剂选自于:化学治疗剂、抗原、类固醇、免疫抑制剂、免疫刺激剂、病毒、小分子、肽、核酸和趋化因子。

[0245] 20.根据段落19所述的组合物,其中,所述至少一种化学治疗剂选自于由以下组成的组:多柔比星、喜树碱、紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、甲氨蝶呤或它们的组合。

[0246] 21.根据段落1-20中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少100μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0247] 22.根据段落1-21中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少150μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0248] 23.根据段落1-22中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少200μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0249] 24.根据段落1-23中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少250μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0250] 25.根据段落1-24中任一段所述的组合物,其中,所述聚合物粒子的直径为约100nm至约10μm。

[0251] 26.根据段落1-24中任一段所述的组合物,其中,所述聚合物粒子的直径为约100nm至约1μm。

[0252] 27.根据段落1-26中任一段所述的组合物,其中,所述聚合物粒子还包含一种或多种细胞粘附分子。

[0253] 28.根据段落27所述的组合物,其中,所述一种或多种细胞粘附分子定位于所述粒子表面的区域。

[0254] 29.根据段落27-28中任一段所述的组合物,其中,所述细胞粘附分子选自于由以下组成的组:特异性地与红血细胞上的分子结合的抗体试剂;特异性地与红血细胞上的分子结合的肽;细胞粘附聚合物;细胞粘附聚合电解质;以及红血细胞上的受体的配体。

[0255] 30.根据段落29所述的组合物,其中,所述细胞粘附聚合电解质包括透明质酸、透明质酸-醛和/或聚(烯丙胺)盐酸盐。

[0256] 31.根据段落30所述的组合物,其中,对所述透明质酸进行修饰以使其包含醛基。

[0257] 32.根据段落29所述的组合物,其中,所述细胞粘附聚合物是多酚或金属-多酚网状物。

[0258] 33.一种向受试者中的细胞递送治疗剂的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物。

[0259] 34.根据段落33所述的方法,其中,所述细胞是癌细胞,并且所述治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如,IFN、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15和IL-27,以及其它免疫刺激拮抗剂,例如CpG ODN、咪喹莫特、瑞喹莫德(R848)、单磷酰脂A(MPLA)和聚(I:C))。

[0260] 35.一种在有需要的受试者中治疗癌症和/或肿瘤的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物。

[0261] 36.根据段落35所述的方法,其中,所述治疗剂是化学治疗剂或趋化因子。

[0262] 37.根据段落33-36中任一段所述的方法,其中,所述癌细胞处于所述受试者的肺和/或所述受试者患有肺癌。

[0263] 38.根据段落37所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0264] 39.根据段落33-36中任一段所述的方法,其中,所述癌细胞处于所述受试者的肾脏和/或所述受试者患有肾癌。

[0265] 40.根据段落39所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

[0266] 41.根据段落39所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0267] 42.根据段落33-41中任一段所述的方法,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

[0268] 43.根据段落33-42中任一段所述的方法,所述方法还包括向所述受试者给予放射或至少一种化学疗法。

[0269] 44.一种在有需要的受试者中刺激免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂是抗原、免疫刺激剂或趋化因子。

[0270] 45.根据段落44所述的方法,其中,所述免疫应答是局部的。

[0271] 46.一种在有需要的受试者中减少或抑制免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予段落1-32中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂是免疫调节剂(例如,IL-4)或类固醇。

[0272] 47.根据段落46所述的方法,其中,所述免疫应答是局部的。

[0273] 48.根据段落44-47中任一段所述的方法,其中,所述受试者需要在肺中的免疫应答。

[0274] 49.根据段落46-48中任一段所述的方法,其中,所述受试者需要治疗急性肺损伤。

[0275] 50.根据段落46-49中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂是类固醇或IL-4。

[0276] 51.根据段落46-50中任一段所述的方法,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

[0277] 52.根据段落46-51中任一段所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0278] 53.根据段落33-52中任一段所述的方法,其中,给予治疗有效量的组合物。

[0279] 54.根据段落33-53中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的50%以下。

[0280] 55.根据段落33-53中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的40%以下。

[0281] 56.根据段落33-53中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的30%以下。

[0282] 57.根据段落33-53中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的20%以下。

[0283] 58.根据段落33-57中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的10%以下。

[0284] 可以根据以下编号的段落中的任一段来定义本文所述技术的一些实施方式:

[0285] 1.一种经工程化的细胞组合物,所述经工程化的细胞组合物含有:

[0286] a.红细胞;和

[0287] b.包含PLGA和至少一种治疗剂的粒子,其中,所述粒子位于所述红细胞的细胞表面上。

[0288] 2.根据段落1所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为至少50:50的L:G或更高的L。

[0289] 3.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G。

[0290] 4.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G。

[0291] 5.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G。

[0292] 6.根据段落1-5中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含酯末端和/或酸末端。

[0293] 7.根据段落1-6中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含酯末端。

[0294] 8.根据段落1-6中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含酸末端。

[0295] 9.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端。

[0296] 10.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酸末端。

[0297] 11.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

[0298] 12.根据段落2所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0299] 13.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏和/或心脏。

[0300] 14.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约50:50的L:G和酸末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏和/或肺。

[0301] 15.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于肾脏和/或肺。

[0302] 16.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端,由此将所述治疗剂靶向于肺、心脏和/或肾脏。

[0303] 17.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G,由此将所述治疗剂靶向于肺和/或肾脏。

[0304] 18.根据段落1-8中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例小于85:15的L:G和酯末端,由此将所述治疗剂靶向于脾脏。

[0305] 19.根据段落1-18中任一段所述的组合物,其中,所述至少一种治疗剂选自于:化学治疗剂、抗原、类固醇、免疫抑制剂、免疫刺激剂、病毒、小分子、肽、核酸和趋化因子。

[0306] 20.根据段落19所述的组合物,其中,所述至少一种化学治疗剂选自于由以下组成的组:多柔比星、喜树碱、紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、甲氨蝶呤或它们的组合。

[0307] 21.根据段落1-20中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少100μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0308] 22.根据段落1-21中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少150μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0309] 23.根据段落1-22中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少200μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0310] 24.根据段落1-23中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂以至少250μg/3×10^8个红细胞的浓度存在。

[0311] 25.根据段落1-24中任一段所述的组合物,其中,所述聚合物粒子的直径为约100nm至约10μm。

[0312] 26.根据段落1-24中任一段所述的组合物,其中,所述聚合物粒子的直径为约100nm至约1μm。

[0313] 27.根据段落1-26中任一段所述的组合物,其中,所述聚合物粒子还包含一种或多种细胞粘附分子。

[0314] 28.根据段落27所述的组合物,其中,所述一种或多种细胞粘附分子定位于所述粒子表面的区域。

[0315] 29.根据段落27-28中任一段所述的组合物,其中,所述细胞粘附分子选自于由以下组成的组:特异性地与红血细胞上的分子结合的抗体试剂;特异性地与红血细胞上的分子结合的肽;细胞粘附聚合物;细胞粘附聚合电解质;以及红血细胞上的受体的配体。

[0316] 30.根据段落29所述的组合物,其中,所述细胞粘附聚合电解质包括透明质酸、透明质酸-醛和/或聚(烯丙胺)盐酸盐。

[0317] 31.根据段落30所述的组合物,其中,对所述透明质酸进行修饰以使其包含醛基。

[0318] 32.根据段落29所述的组合物,其中,所述细胞粘附聚合物是多酚或金属-多酚网状物。

[0319] 33.一种向受试者中的细胞递送治疗剂的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物。

[0320] 34.根据段落33所述的方法,其中,所述细胞是癌细胞,并且所述治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如,IFN、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、

IL-13、IL-2、IL-12、IL-15和IL-27,以及其它免疫刺激拮抗剂,例如CpG ODN、咪喹莫特、瑞喹莫德(R848)、单磷酰脂A(MPLA)和聚(I:C))。

[0321] 35.一种在有需要的受试者中治疗癌症和/或肿瘤的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物。

[0322] 36.根据段落35所述的方法,其中,所述治疗剂是化学治疗剂或趋化因子。

[0323] 37.根据段落33-36中任一段所述的方法,其中,所述癌细胞处于所述受试者的肺和/或所述受试者患有肺癌。

[0324] 38.根据段落37所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0325] 39.根据段落33-36中任一段所述的方法,其中,所述癌细胞处于所述受试者的肾脏和/或所述受试者患有肾癌。

[0326] 40.根据段落39所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

[0327] 41.根据段落39所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0328] 42.根据段落33-41中任一段所述的方法,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

[0329] 43.根据段落33-42中任一段所述的方法,所述方法还包括向所述受试者给予放射或至少一种化学疗法。

[0330] 44.一种在有需要的受试者中刺激免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂是抗原、免疫刺激剂或趋化因子。

[0331] 45.根据段落44所述的方法,其中,所述免疫应答是局部的。

[0332] 46.根据段落44-45中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂是抗原,并且所述PGLA包含:a)比例为约50:50的L:G和酯末端;b)比例为约50:50的L:G和酸末端,或c)比例小于85:15的L:G和酯末端。

[0333] 47.一种在有需要的受试者中减少或抑制免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂是免疫调节剂(例如,IL-4)或类固醇。

[0334] 48.根据段落47所述的方法,其中,所述免疫应答是局部的。

[0335] 49.根据段落44-48中任一段所述的方法,其中,所述受试者需要在肺中的免疫应答。

[0336] 50.根据段落44-49中任一段所述的方法,其中,所述受试者需要治疗急性肺损伤。

[0337] 51.根据段落47-50中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂是类固醇或IL-4。

[0338] 52.根据段落47-51中任一段所述的方法,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

[0339] 53.根据段落47-51中任一段所述的方法,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0340] 54.根据段落33-53中任一段所述的方法,其中,给予治疗有效量的所述组合物。

[0341] 55.根据段落33-54中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的50%以下。

[0342] 56.根据段落33-54中任一段所述的方法,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离

形式给予时向受试者给予的量的40％以下。

[0343] 57.根据段落33-54中任一段所述的方法，其中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的30％以下。

[0344] 58.根据段落33-54中任一段所述的方法，其中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的20％以下。

[0345] 59.根据段落33-54中任一段所述的方法，其中，所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的10％以下。

[0346] 60.用于向受试者中的细胞递送治疗剂的方法的根据段落1-32中任一段所述的组合物，所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物。

[0347] 61.根据段落60所述的组合物，其中，所述细胞是癌细胞，并且所述治疗剂是化学治疗剂、趋化因子或免疫刺激剂(例如，IFN、IFN-γ、TNFα、TGF-β、IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-2、IL-12、IL-15和IL-27，以及其它免疫刺激拮抗剂，例如CpG ODN、咪喹莫特、瑞喹莫德(R848)、单磷酰脂A(MPLA)和聚(I:C))。

[0348] 62.用于在有需要的受试者中治疗癌症和/或肿瘤的方法的根据段落1-32中任一段所述的组合物，所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物。

[0349] 63.根据段落62所述的组合物，其中，所述治疗剂是化学治疗剂或趋化因子。

[0350] 64.根据段落62-63中任一段所述的组合物，其中，所述癌细胞处于所述受试者的肺和/或所述受试者患有肺癌。

[0351] 65.根据段落64所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0352] 66.根据段落62-65中任一段所述的组合物，其中，所述癌细胞处于所述受试者的肾脏和/或所述受试者患有肾癌。

[0353] 67.根据段落66所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例为约85:15的L:G和酯末端。

[0354] 68.根据段落66所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0355] 69.根据段落60-68中任一段所述的组合物，其中，所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

[0356] 70.根据段落60-69中任一段所述的组合物，还包括向所述受试者给予放射或至少一种化学疗法。

[0357] 71.用于在有需要的受试者中刺激免疫应答的方法的根据段落1-32中任一段所述的组合物，所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物，其中，所述治疗剂是抗原、免疫刺激剂或趋化因子。

[0358] 72.根据段落71所述的组合物，其中，所述免疫应答是局部的。

[0359] 73.根据段落71-72中任一段所述的组合物，其中，所述治疗剂是抗原，并且所述PGLA包含：a)比例为约50:50的L:G和酯末端；b)比例为约50:50的L:G和酸末端，或c)比例小于85:15的L:G和酯末端。

[0360] 74.用于在有需要的受试者中减少或抑制免疫应答的方法的根据段落1-32中任一段所述的组合物，所述方法包括向所述受试者给予根据段落1-32中任一段所述的组合物，

其中,所述治疗剂是免疫调节剂(例如,IL-4)或类固醇。

[0361] 75.根据段落74所述的组合物,其中,所述免疫应答是局部的。

[0362] 76.根据段落74-75中任一段所述的组合物,其中,所述受试者需要在肺中的免疫应答。

[0363] 77.根据段落74-76中任一段所述的组合物,其中,所述受试者需要治疗急性肺损伤。

[0364] 78.根据段落74-77中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂是类固醇或IL-4。

[0365] 79.根据段落74-78中任一段所述的组合物,其中,所述PLGA包含比例大于50:50的L:G。

[0366] 80.根据段落74-78中任一段的组合物,其中,所述PLGA包含比例为约65:35的L:G和酸末端。

[0367] 81.根据段落60-80中任一段所述的组合物,其中,给予治疗有效量的所述组合物。

[0368] 82.根据段落60-80中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的50%以下。

[0369] 83.根据段落60-80中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的40%以下。

[0370] 84.根据段落60-80中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的30%以下。

[0371] 85.根据段落60-80中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的20%以下。

[0372] 86.根据段落60-80中任一段所述的组合物,其中,所述治疗剂的给予剂量是以游离形式给予时向受试者给予的量的10%以下。

[0373] 实施例

[0374] 实施例1

[0375] 用本文所述的红细胞-纳米粒子方法对四个PLGA组合物进行测试。四个PLGA候选物的两个参数不同:L:G比例和末端基团,这决定它们的疏水性和形成氢键的能力。L:G比例较高的PLGA更疏水。具有酯末端的PLGA更疏水。总的来说,两个参数通过调节纳米粒子与红细胞的结合强度和纳米粒子从载体红细胞上的剪切依赖性脱离,来控制搭载PLGA纳米粒子的红细胞递送的位置。表1描绘了四个PLGA组合物,其L:G比例以摩尔比表示。

[0376] 表1

[0377]

	PLGA-a	PLGA-b	PLGA-c	PLGA-d
L:G比例	50:50	50:50	85:15	65:35
末端基团	酯末端	酸末端	酯末端	酸末端

[0378] 结合效率数据表明,对于使更多的PLGA纳米粒子与红细胞结合,疏水相互作用和氢键结合均是必需的(图1A)。SEM数据表明酸末端PLGA纳米粒子比酯末端PLGA纳米粒子更深入地进入红细胞(图1B)。L:G比例和末端基团的变化与PLGA纳米粒子从载体红细胞上的脱离相关,并且对两个参数的工程化可调节PLGA纳米粒子的结合强度和剪切依赖性脱离(图2A-图2B)。

[0379] 生物分布数据与体外剪切研究数据相关(图2A-图2B)。根据PLGA的性质,红细胞搭

载将PLGA纳米粒子递送至特定器官(图3)。将PLGA纳米粒子向高剪切器官(肺和肾脏)的递送与高剪切应力下净纳米粒子从红细胞的脱离相关。例如,PLGA-c和PLGA-d在高剪切应力下显示出最高的脱离效率,并且更多地被递送至肺和肾脏。将PLGA纳米粒子向低剪切器官(脾脏)的递送与低剪切应力下的提早纳米粒子释放有关。例如,PLGA-a在低剪切应力下显示出最高的提早脱离,并且更多地被递送至脾脏。

[0380] 实施例2:红细胞杠杆化学疗法(ELeCt):红细胞表面组装的可生物降解的纳米粒子对抗肺转移瘤

[0381] 尽管化学疗法是癌症治疗的主干,但由于无效的靶向和较差的肿瘤积累,化学疗法对肺转移瘤的治疗显示出的功效有限。本文描述的是高效的红细胞杠杆化学疗法(ELeCt)平台,该平台由自组装到红细胞表面上的可生物降解的药物纳米粒子组成,以允许将化学疗法用于肺转移瘤治疗。ELeCt平台显著延长了药物纳米粒子的循环时间,并将与游离纳米粒子相比高10倍的药物含量递送至肺。在早期和晚期的黑色素瘤肺转移瘤模型中,ELeCt平台使得肿瘤生长能够得到实质性抑制,从而使得存活能够得到显著改善。此外,ELeCt平台可用于递送许多批准的化学治疗药物。总之,发现表明,ELeCt平台提供了多功能策略,以使化学疗法能够进行有效的肺转移瘤治疗。

[0382] 介绍

[0383] 癌症是过去几十年中死亡率的主要原因之一。[1]虽然特定组织或血液中的肿瘤细胞的早期检测已经改善了癌症患者的存活,但目前的标准护理干预措施(包括外科手术、放射疗法或化学疗法)对无法早期检测的癌症的功效有限。[1-4]然而,早期检测通常是不可行的,并且在大多数患者中,在肿瘤被诊断出来时已转移到继发部位。[2、4]

[0384] 据美国国家癌症研究所(NCI)称,由于其高血管密度,各种原发性癌最常见的转移位点是肺。如果不治疗,肺转移瘤是高度致命的,并且目前尚无对其的具体治疗。[5、6]全身性化学疗法是肺转移瘤的标准治疗选择之一。[7、8]然而,它的功效远非期望的那样,这归因于对肺的无效靶向和较差的积累。纳米技术在增强晚期转移性癌症的治疗中发挥了关键作用[9-11],因此也可以应用于肺转移瘤的情况。然而,传统的纳米粒子递送通常无法在期望的作用位点积累,这是由于阻碍血管内注射的纳米粒子的生物屏障的存在。[12-17]使用组织特异性配体的主动靶向通常被探索为改善组织积累的策略,但仅引起治疗功效的适度改善,并由于生产成本增加而降低了转化能力。[18-26]

[0385] 为了实现有效的药物递送以使化学疗法能够用于有效的肺转移瘤治疗,本文考虑了靶位点的独特生理学,并开发了双管齐下的策略(红细胞杠杆化学疗法(ELeCt))-自组装至红细胞表面的可生物降解的药物纳米粒子(图4A)。作为主要药物递送系统,红细胞能够响应狭窄肺毛细血管中红细胞所经受的高剪切应力而响应性地使肺内皮和肿瘤结节中的粒子脱落。[27、28]可生物降解的纳米粒子本身能够包封大量的化学治疗剂并具有独特的控制释放机制。[29、30]它们作为次级药物递送系统,使得能够持续递送货物。在该研究中,使用模型化学治疗剂-多柔比星证明了这种肺生理学辅助的纳米粒子策略的优异的积累和治疗功效。这一概念成功地用于对抗肺转移瘤,改善了早期和晚期黑色素瘤-肺转移瘤模型的存活。证明了能够在可生物降解的纳米粒子中掺入过量的FDA批准的化学治疗药和药物组合、随后自组装至红细胞上的能力。粒子也易于自组装至人红细胞并以剪切依赖性方式脱落。总之,红细胞杠杆化学疗法(ELeCt)为对抗肺转移瘤提供了多功能的、有效的且可转

移的平台。

[0386] 结果

[0387] 载有药物的可生物降解的纳米粒子可有效地与靶癌细胞相互作用。将多柔比星用作模型药物，并使用纳米沉淀法制备载有药物的可生物降解的聚合物(聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(PLGA))纳米粒子。载有药物的PLGA纳米粒子的直径为136.0±2.7nm，略大于普通纳米粒子(图4B)。有趣的是，多柔比星的包封使得载有药物的纳米粒子的表面略微呈阳性(10.45±0.84mV)(图4C)，这可归因于纳米粒子表面上的多柔比星的存在。载有药物的PLGA纳米粒子表现出高药物负载能力(196.7±5.8mg/g)(图4D)。使用扫描电子显微镜(SEM)对纳米粒子的形态进行表征。图4E中所示的SEM图像揭示了，普通和载有药物的PLGA纳米粒子均是球形的，并且是相对单分散的。动态光散射(DLS)数据(图4F)证实所制备的纳米粒子的均匀的尺寸分布。为了测试药物是否可以从PLGA纳米粒子中释放，在完全培养基中对它们的释放曲线进行测试。观察到突释(burst)及随后的释放持续曲线，且大部分药物在前6小时内释放(图4G)。药物纳米粒子与靶癌细胞的有效相互作用对于成功的药物递送和功效至关重要。在该研究中，将B16F10-Luc黑色素瘤细胞用作评估载有药物的可生物降解PLGA纳米粒子和靶癌细胞之间的相互作用的模型。如图4H所示，载有药物的PLGA纳米粒子似乎通过B16F10-Luc细胞被快速和有效地内化。在孵育的20分钟内，大部分细胞在其中含有载有药物的纳米粒子。图4I中所示的共聚焦激光扫描显微(CLSM)图像确认了纳米粒子和B16F10-Luc细胞之间的有效相互作用。引人注目的是，细胞核内的多柔比星荧光的增加表明了负载的药物的有效的细胞内递送和充分释放。在同一细胞系的2D培养物中进一步对载有药物的PLGA纳米粒子的体外抗肿瘤功效进行评估。如剂量-响应曲线(图4J)和IC_{50}值(图4K)所示，与游离药物相比，载有药物的PLGA纳米粒子表现出稍弱的细胞杀伤功效。然而，它们之间的差异是微不足道的。

[0388] 载有药物的可生物降解的纳米粒子有效地自组装到红细胞上

[0389] 首先对载有药物的PLGA纳米粒子是否可以有效地自组装到小鼠红细胞上进行评估。为此，在纳米粒子与红细胞的一定比例(50:1至800:1)范围内，将小鼠红细胞与纳米粒子一起孵育，并使用流式细胞术对纳米粒子的结合进行检测。如图5A和图5B所示，载有药物的PLGA纳米粒子的确有效地自组装到了小鼠红细胞上。特别地，当以200:1的比例与纳米粒子进行孵育时，发现81.6％的红细胞携带纳米粒子，并且在进一步增加孵育比例时，该数量增加至>96％。还对纳米粒子与红细胞的结合效率进行量化。令人惊讶的是，根据纳米粒子与红细胞的进给比，孵育的纳米粒子的大部分(39.3-54.5％)自组装到小鼠红细胞上(图5C)。由于纳米粒子的这种高结合效率和高药物负载能力，小鼠红细胞能够携带高药物剂量(高达294.1μg/3×10^8个红细胞)(图5D)。另外，通过操纵纳米粒子与红细胞的进给比，可以容易地对小鼠红细胞上的药物剂量进行调节。接下来，使用CLSM和SEM对载有药物的PLGA纳米粒子在小鼠红细胞上的自组装进行观察。如图5E和图5F所示，CLSM和SEM数据均证实了纳米粒子在小鼠红细胞上的有效自组装。同时，搭载载有药物的PLGA纳米粒子后，小鼠红细胞保持其双凹面形状(图5E和图5F)，表明纳米粒子的自组装对载体红细胞引起了最小的损伤。为了测试红细胞搭载平台的转化潜力，对载有药物的PLGA纳米粒子在人红细胞上的自组装进行评价。图5G和图5H所示的CLSM和SEM图像均表明，药物纳米粒子也有效地自组装到人红细胞上。

[0390] 此外，还在纳米粒子与红细胞的不同进给比(200:1至1600:1)下，对载有药物的PLGA纳米粒子在人红细胞上的自组装进行评估。类似于鼠对应物，在纳米粒子与红细胞的各种进给比下，载有药物的PLGA纳米粒子以高效率(38.7%-45.7%)自组装到人红细胞上(图5I和图5J)。此外，通过改变孵育比，人红细胞上的药物剂量是可调节的，并且当以1600:1的纳米粒子与红细胞的比例孵育时，可以将非常高的药物剂量(209.1μg/1.5×10^8个红细胞)搭载在人红细胞上(图5K)。

[0391] 红细胞杠杆化学疗法(ELeCt)使得能够实现纳米粒子药物向患有转移瘤的肺的增强和靶向的递送。首先进行药代动力学研究，以检查不同药物制剂的血液循环时间。如图6A所示，通过将药物纳米粒子自组装到红细胞上，在所有测试时间点下在血液中均达到更高的药物浓度，表明了搭载的制剂的循环时间延长。小鼠肺毛细血管的平均直径为5μm，窄至小到1μm的尺寸，比小鼠红细胞直径小3-4倍。[27]在静脉内给予后，自组装到红细胞上的载有药物的纳米粒子预期由于高剪切应力而从载体红细胞脱离，并沉积在狭窄的肺毛细血管中。为了测试这一假设，首先进行体外剪切研究，其中，在低(约1Pa)或高(6Pa)剪切应力下对携带载有药物的纳米粒子的红细胞剪切20分钟。如图6B所示，药物纳米粒子从小鼠红细胞的脱离显然是剪切依赖性的，为药物纳米粒子向患病肺的特异性递送提供基础。特别地，使用流变仪，在肺相应的剪切应力(6Pa)下76%的搭载的药物纳米粒子被剪切下来。此外，还用人红细胞观察到药物纳米粒子的这种剪切依赖性脱离，支持了该ELeCt平台的转化潜力。为了测试药物纳米粒子是否可以在体内被剪切下来并沉积在患有转移瘤的肺中，在患有B16F10-Luc黑色素瘤肺转移瘤的小鼠中进行生物分布研究，并对药物的量进行量化，在本案中，药物是多柔比星。值得注意的是，如图6C和图6D所示，给予后20分钟，与其游离纳米粒子对应物相比，通过在红细胞上的自组装，载有药物的纳米粒子将高16.6倍的药物含量递送至患病的肺。甚至在较长的时间点(6小时)处，与其未搭载的对应物相比，红细胞搭载在肺中沉积了8.7倍高的药物含量。此外，给予后20分钟，与游离药物注射相比，红细胞搭载向患有黑色素瘤转移的肺递送了高6.9倍的药物含量。

[0392] 接下来，对从患有转移瘤的肺内的载体红细胞中剪切下来的药物纳米粒子的分布进行研究。如图6E所示，与生物分布数据一致，与仅用纳米粒子治疗的情况相比，在用其上自组装有纳米粒子的红细胞治疗的肺切片中发现显著更多的药物纳米粒子。显然，沉积的纳米粒子的大部分(虽然不是全部)进入肿瘤转移性结节深处，这表明自组装在红细胞上的可生物降解的药物纳米粒子能够精确地将有效载荷化学治疗剂递送至其所期望的作用位点。

[0393] 红细胞杠杆化学疗法(ELeCt)平台抑制肺转移瘤进展并改善存活。为了评估可生物降解的药物纳米粒子自组装对红细胞平台的功效，建立了B16F10-Luc黑色素瘤肺转移瘤模型，并将其用于测试同一模型的早期和后期的抗转移功效。在受控的早期肺转移瘤中对所开发的平台的功效进行测试。如图7A所示，经由尾静脉通过静脉内注射B16F10-Luc细胞来建立肺转移瘤模型。每隔一天给予四次治疗给药，在肿瘤细胞注射后的第一天给予第一次给药。通过肺中的生物发光强度测量肺转移瘤负荷。如生物荧光图像(图7B)和单个小鼠的肺转移瘤负荷生长曲线(图7C)所示，与使用单独的游离药物或纳米粒子相比，通过ELeCt实现了显著更好的肺转移瘤进展抑制作用。令人惊讶的是，在肿瘤接种后，用自组装在红细胞上的药物纳米粒子治疗31天后，两只小鼠仍然完全无肺转移瘤。基于肺中的生物发光强

度,对整体肺转移瘤负荷进行计算。如图7D所示,在肿瘤接种后的前23天中,在用自组装在红细胞上的药物纳米粒子治疗的所有小鼠中,肺转移瘤几乎得到完全抑制。特别是,如图7E所示,在第16天,用游离药物或药物纳米粒子单独治疗的小鼠对肺转移瘤负荷的抑制分别为94.2%和45.6%。在鲜明的对比下,ELeCt实现了99.5%的转移瘤抑制率。在第23天也观察到类似的发现。如图7F所示,与单独使用药物纳米粒子相比,使用自组装在红细胞上的药物纳米粒子的治疗产生了42.3%的更高肺转移瘤负荷抑制率。Kaplan-Meier存活分析(图7H)进一步证实了相较于单独使用纳米粒子,ELeCt方法具有显著改善的存活益处。单独使用游离药物或纳米粒子仅略微改善存活,中位存活时间从29天增加至32天。在鲜明的对比下,通过用自组装在红细胞上的药物纳米粒子的治疗,使动物中位存活时间从29天延长至61天。此外,七只小鼠中的一只继续存活至少70天。在整个治疗期间,对小鼠的体重变化进行监测。与游离药物治疗期间体重急剧下降相比,任何一种治疗都未检测到显著的体重下降(图7G),表明在目前的药物剂量下只有给予游离药物造成了明显的毒性。

[0394] 接下来,在晚期肺转移瘤中对所开发的疗法的抗转移活性进行研究。如图8A所示,在静脉内肿瘤细胞注射后,使小鼠每隔一天接受四次治疗给药,在接种后一周(第7天)给予第一次给药。根据生物发光图像(图8B)和单个小鼠的肺转移瘤生长曲线(图8C),单独使用药物纳米粒子不会导致肺转移瘤进展的显著抑制。然而,自组装在红细胞(ELeCt)上的药物纳米粒子能够减慢肺转移瘤进展,尽管不如早期转移瘤模型中那么引人注目。特别地,在肿瘤接种后,接受自组装在红细胞上的药物纳米粒子治疗的七只小鼠中的两只仍然完全无肺转移瘤。图8D中所示的整体肺转移瘤负荷数据证实了搭载药物的纳米粒子具有比单独使用纳米粒子更好的功效。特别是,在肿瘤接种后第16天,搭载药物的纳米粒子在抑制转移瘤生长方面表现出2.4倍的更好功效。在第16天,将肺切除,并对肺上的表面转移性结节进行计数。图8E所示的表面结节数据与用生物发光评估的生物发光转移瘤负荷数据一致。通过将药物纳米粒子自组装至红细胞,在降低表面结节方面实现了2.3倍的更好功效。小鼠肺的H&E分析证实了这一结果(图10)。另外,图5F中所示的体重变化数据和图11所示的H&E分析数据表明无与任何治疗有关的显著的毒性。进行单独的研究,以评估在延长动物存活时间方面的功效。如图4G所示,与早期转移瘤模型不同,单独使用药物纳米粒子未提供任何存活益处。然而,使用自组装在红细胞上的药物纳米粒子的治疗(ELeCt)显著改善了动物存活,将中位存活时间从28.5天延长至37天。特别是,接受搭载的药物纳米粒子的八只小鼠中的一只继续存活至少48天。

[0395] 多种化学治疗剂可负载到可生物降解的纳米粒子上,有效地自组装到红细胞上。为了测试使用ELeCt平台来递送其它化学治疗剂的可行性,选择六种其它常见的化学治疗剂或它们的组合,包括喜树碱、紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、甲氨蝶呤、和5-氟尿嘧啶+甲氨蝶呤的组合,将它们负载到可生物降解的PLGA纳米粒子中。尽管具有不同的物理化学性质(如图12和表2所示),但是载有不同的化学治疗剂的纳米粒子能够自组装至红细胞,但结合效率不同(图9)。这些数据支持可生物降解的药物纳米粒子自组装至红细胞的方法(ELeCt)是向源自不同原发性肿瘤的肺转移瘤递送所选择的化学疗法的多功能平台。

[0396] 讨论

[0397] 由于肺独特的生理学特征(如狭窄的毛细血管的高血通量和高密度),肺是从原发性肿瘤位点逃逸的(evaded)肿瘤细胞可以扩散到的主要器官之一。[31]事实上,30%-55%

的晚期癌症患者有肺转移瘤。[32]治疗肺转移瘤比治疗原发性肿瘤更具挑战性，因为它通常进展地更具侵略性。[33]全身性化学疗法是肺转移瘤的一个标准治疗选择。然而，它的功效通常远非期望的那样，这归因于其在肺中的无效靶向和较差的积累。常规纳米粒子介导的药物递送也未能实现对所期望的作用位点的良好定位。[34]本文描述的是红细胞搭载平台-ELeCt，其由自组装在红细胞上的载有药物的可生物降解的纳米粒子组成，用于促进化学疗法以进行有效的肺转移瘤治疗。

[0398] 常规的纳米药物采用活性靶向配体的附着，以增强化学疗法的有效载荷的靶向递送。[10、11、35-39]在这项工作中开发的ELeCt平台采用了全新的范式，利用了靶位点的独特生理学(高剪切应力)和化学疗法的有效载荷的响应性脱落。我们的药代动力学和生物分布数据表明，与单独的游离药物和纳米粒子相比，ELeCt平台具有两个重要的特征-延长的血液循环时间以及改善的对肺转移瘤的积累。实际上，这两个特征都有利于肺转移瘤治疗。延长的循环时间与先前的报道一致。[27、40]通过搭载至红细胞，纳米粒子所经受的网状内皮组织系统(RES)器官的免疫识别较低，使它们能够在循环中保持更长的时间。[27、28、40]ELeCt赋予的血液中的更高浓度的有效载荷药物使得更多的药物与循环肿瘤细胞相互作用并杀死循环肿瘤细胞。本文提供的体外剪切研究数据表明，药物纳米粒子从红细胞的脱离是剪切依赖性的，这是利用平台将有效载荷化学治疗剂精确递送至靶肺转移瘤位点的基础。应该注意的是，在低剪切应力下大部分药物纳米粒子也被脱离。这一事实强调了研究药物纳米粒子的表面修饰的需要，从而调节药物纳米粒子与红细胞的结合强度，用于使用该技术进行未来探索。我们的生物分布数据表明，自组装在红细胞(ELeCt)平台上的可生物降解的纳米粒子能够在短时间内向肺转移性位点递送高浓度的有效载荷化学治疗剂。令人印象深刻的是，与单独使用药物纳米粒子相比，ELeCt平台在20分钟内向患有转移瘤的肺提供了16.6倍的更多的药物。相比之下，使用靶向配体的常规靶向纳米药物方法很少能实现如此高的传递增强。[17、41]此外，在显著更长的时间点(12-24小时)处，取决于纳米药物的性质，它通常显示最大的肿瘤积累。[42]通过ELeCt平台的药物纳米粒子的快速和靶向递送将带来抑制肿瘤生长的益处。例如，不依赖于其材料来源，平常的纳米药物通常具有初始的药物突释，并由此引起提早的药物泄漏，[43]潜在地使治疗功效衰减，且通常导致毒性。ELeCt平台实现的快速和靶向的递送有潜力规避这一问题。另外，尚不令人惊讶的是，肺切片成像表明沉积的纳米粒子分布在整个肺切片、肺转移性结节的内部和外部。沉积在转移性结节外部的纳米粒子具有作为药物储存库释放药物的潜力，该药物可以在近距离内重新定位至转移性结节。

[0399] 我们的体内疗效数据表明，化学治疗剂通过ELeCt平台的增强和靶向的递送可以为抑制早期和晚期肺转移瘤生长带来益处。在早期的肺转移瘤模型中，单独使用游离药物或药物纳米粒子的治疗表现出一些减慢的肺转移瘤进展。然而，它们的抗转移功效不足以显著延长动物存活。相比之下，与单独使用游离药物或药物纳米粒子相比，ELeCt平台能够提供100-300倍的更好的抗转移功效。更重要的是，与对照组相比，其改善的抗转移功效产生了显著延长的动物存活，将患有肺转移瘤的小鼠的中位存活时间延长了32天。该数据表明，ELeCt平台有使化学疗法能够有效地治疗早期肺转移瘤的潜力。在晚期转移瘤模型中，单独药物纳米粒子的给予未能显著抑制肺转移瘤生长并改善存活时间。ELeCt平台能够显著减慢肺转移瘤进展，并适度地改善动物存活。显然，该疗法的抗转移功效与疗法的开始时

间密切相关。所开发的疗法在更晚期的肺转移瘤中治疗的功效尚不清楚。此外，还需要进行进一步研究，以揭示药物剂量和疗法时间表对其抗转移功效的影响。

[0400] 基于目前的理解，疏水相互作用、静电相互作用和氢键结合可有助于载有药物的可生物降解纳米粒子在红细胞上的自组装[27]。我们的药物纳米粒子结合数据表明，载有模型药物(本案中是多柔比星)的纳米粒子能够以非常高的结合效率自组装到小鼠红细胞上。这一特征对于进行ELeCt平台的工作至关重要。可以给予的红细胞的数量具有上限，并且仅在单个红细胞上具有高的药物剂量可以达到化学治疗剂的治疗浓度。此外，我们的数据还表明可以通过改变药物纳米粒子与红细胞的进给孵育比(feed incubation ratio)，来调节红细胞上的药物剂量，从而根据特定肺转移瘤病症提供改变药物剂量的可能性。除了多柔比星之外，能够将不同的常用化学治疗剂或它们的组合负载到可生物降解的纳米粒子上。此外，尽管结合效率不同，这些载有药物的纳米粒子也自组装到了小鼠红细胞上。这打开了利用ELeCt平台来治疗源自不同原发性位点的肺转移瘤的新窗口。肺转移瘤可以具有不同的原发性肿瘤起源，如乳腺癌、膀胱癌、黑色素瘤以及许多其它起源。来自不同起源的转移瘤优选由特定的化学治疗剂进行治疗。[44、45]通过根据它们的原发性肿瘤起源来负载最佳的化学治疗剂，ELeCt平台具有成为治疗不同肺转移瘤的多功能平台的潜力。更有趣的是，我们的数据还表明载有药物的可生物降解的纳米粒子有效地自组装到人红细胞上，并在肺相应的剪切应力下从它们中脱离。此外，用于制备可生物降解纳米粒子(PLGA)的材料是多种FDA批准的产品的一部分。[46]因此，该平台技术具有转化潜力。

[0401] 总之，开发出了红细胞杠杆化学疗法(ELeCt)平台、自组装在红细胞上的载有药物的可生物降解的纳米粒子，其使得能够实现肺生理学辅助的化学治疗剂的剪切响应性靶向递送，来对肺转移瘤进行治疗。响应于内部的机械高剪切应力，可以使自组装在红细胞上的药物纳米粒子精确地脱落在患有转移瘤的肺中。可将各种常用的化学治疗剂负载到可生物降解的纳米粒子中，并进一步使其成功地自组装到红细胞上。与单独使用纳米粒子相比，这一平台成功地将含量高出一个数量级的模型药物(多柔比星)递送至患病的肺。最重要的是，这一平台使化学疗法能够有效抑制肺转移瘤生长并显著改善存活。总而言之，ELeCt平台可作为治疗源自不同原发性肿瘤的肺转移瘤的多功能策略，具有很强的转化潜力。

[0402] 材料和方法

[0403] 纳米粒子制备和表征。使用纳米沉淀法制备封装有多柔比星(DOX)的PLGA纳米粒子。简而言之，将5mg DOX溶解在500μL甲醇和5μL三乙胺(TEA)中。将其加入到含有20mg PLGA的1mL丙酮中。然后以1mL/min使用注射器泵在恒定搅拌下将混合物注射到10mL 1％聚乙烯醇(PVA)溶液中。在使用旋转蒸发除去有机溶剂之前，使粒子在恒定搅拌下保持过夜。将形成的粒子以12000g离心15分钟，对上清液进行分析，以对药物负载(drug loading)进行量化。然后将粒子重悬于去离子水中，并使用动态光散射(Malvern Zen3600)和扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP，Zeiss FESEM Ultra 55)对其尺寸、Zeta电位和多分散指数进行评估。将纳米粒子用去离子水洗涤，共计洗涤两次，随后将它们最终重悬于PBS中。使用稍作修改的上述类似的纳米沉淀技术制备含有其它化学治疗药物的纳米粒子。

[0404] 血液收集和加工。使用肝素预涂覆的注射器通过心脏穿刺收集鼠全血，并在使用前储存在BD Microtainer®血液收集管中。全血在4℃下以1000g离心10分钟，从红细胞隔室(erythrocyte compartment)中除去血清和白膜层(buffy coat layer)。将分离的红细胞

进一步用冷的PBS洗涤3次，并在4℃下以650g离心15分钟，随后将它们以10％红细胞比容(hematocrit)的浓度最终重悬于PBS中(红细胞储备溶液)。使用与小鼠血液相同的程序，对从BioIVT(NY,USA)获得的人全血进行加工和储存。将新加工的红细胞用于本研究中的每个实验。

[0405] 药物纳米粒子在红细胞上的自组装和表征。在Axygen™1.5mL自立式螺帽管中将等体积的红细胞储备溶液和药物纳米粒子悬浮液混合，并通过倒反和移液进一步充分混合。然后使管在管旋转器(Thermo Fisher Scientific)上旋转40分钟。然后通过在4℃下以100g离心5分钟来使搭载的红细胞沉淀，小心地除去未吸附的粒子，并用1mL的1X PBS再次对沉淀进行洗涤，以除去松散结合的粒子。最终将搭载的红细胞以10％v/v重悬于1X PBS中，用于进一步表征或体内研究。

[0406] 使用荧光测量确定红细胞上的搭载效率和药物负载。对于使用荧光进行量化，使用去离子水裂解25μL红细胞，使用DOX荧光(Ex/Em 470/590nm)在酶标仪(Tecan Safire 2®,NC,USA)上对药物含量进行量化。对于纳米粒子与红细胞的不同比例，使用DOX荧光(Em/Ex 470/590nm)的流式细胞术分析仪(BD LSR Analyser II™,CA,USA)测定携带纳米粒子的红细胞的百分比，并通过共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO™ready,德国)进行确认。使用扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP ™,Zeiss FESEM Ultra 55)确认纳米粒子在红细胞上的自组装。简而言之，使用2.5％戊二醛溶液将搭载的红细胞固定，并在增加的乙醇梯度中洗涤，然后使用六甲基二硅氮烷(HMDS)进行化学干燥。最后，在成像之前，对样品进行溅射涂覆(EMT 150T ES金属溅射涂布机,PA,USA)。

[0407] 体外血清稳定性和剪切研究。对于血清稳定性研究，在37℃、12rpm下在管旋转器上，将搭载的小鼠和人红细胞在1mL胎牛血清(FBS)或人血清(来自BioIVT)中孵育。这些条件模拟低剪切生理环境。孵育20分钟后，通过以250g离心5分钟使细胞沉淀，并将其以10％v/v重悬于1X PBS中。然后使用去离子水使25μL红细胞裂解，并在酶标仪(Tecan Safire2®)上使用DOX荧光(Ex/Em 470/590nm)对剩余的药物含量进行量化。

[0408] 对于剪切研究，将搭载的小鼠和人红细胞在10mL FBS或人血清中孵育。使用圆柱形Coquette粘度计(1mm间隙,AR-G2流变仪,TA仪器,DE,USA)向血清中的红细胞施加旋转剪切(6Pa)20分钟。在施加剪切期间，使用水夹套将样品保持在37℃。这些条件模拟肺相应的高剪切生理环境。20分钟后，通过以250g离心10分钟将细胞沉积，以10％v/v重悬于1X PBS中。然后使用去离子水使25μL红细胞裂解，并在酶标仪(Tecan Safire2®)上使用DOX荧光(Ex/Em 470/590nm)对剩余的药物含量进行量化。

[0409] 动物。雌性C57BL/6只小鼠(7-9周龄)购自Charles River实验室(MA,USA)。所有实验均根据剑桥哈佛大学文理学院(FAS)的动物护理机构和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)批准的方案进行。

[0410] 体内药代动力学和生物分布研究。对于药代动力学(PK)研究，使用健康的雌性C57BL/6小鼠。将游离DOX、载有DOX的纳米粒子(NP)和自组装在红细胞上的药物纳米粒子(RBC-NP)以5.2mg/kg的剂量通过静脉内注射到尾静脉中(对于所有组，n＝3)。在注射后的2min、15min、30min、2h和5h，通过颌下出血从小鼠收集血液样品。通过以5000rpm离心10分钟将血浆与细胞组分分离。使用150μL乙腈从两个隔室(30μL)中提取DOX。采用梯度流动溶剂，使用反相液质谱联用色谱(LC-MS,Agilent 1290/6140UHPLC,CA,USA)通过Agilent C-

18柱(Poroshell™120,EC-C18,3.0×100mm,2.7μm)对药物含量进行量化。

[0411] 对于生物分布研究,将1×10^5个B16F10-Luc细胞经静脉内注射到雌性C57BL/6小鼠的尾静脉中。接种后14天,以5.2mg/kg的剂量,向小鼠的尾静脉中静脉内注射游离DOX、载有DOX的纳米粒子(NP)和自组装在红细胞上的药物纳米粒子(RBC-NP)(对于所有组,n=3)。在注射后20min和6h将小鼠处死,并收获器官以进行进一步加工。向每个器官中加入1mL冷的去离子水,使用高剪切均化器(IKA T-10Basic ®Ultra turrax,NC,USA)将器官均质化。使用乙腈(1:4匀浆物:乙腈)从匀浆物中提取DOX,并在酶标仪(Tecan Safire2®)上使用DOX荧光(Em/Ex 470/590nm)对药物含量进行量化。数据表示为归一化至器官重量的药物含量(μg)。

[0412] 对于患病肺内的纳米粒子分布,将1×10^5个B16F10-Luc细胞经静脉内注射到雌性C57BL/6小鼠的尾静脉中。接种后28天,对小鼠注射载有DOX的纳米粒子(NP)和自组装在红细胞上的药物纳米粒子(RBC-NP)。注射后20分钟,将小鼠安乐死,并收集完整的肺。肺用冷1X PBS洗涤两次,然后固定在4%多聚甲醛溶液中过夜。然后将固定的肺冷冻在Tissue Tek OCT™化合物(Sakura Finetek)中,并使用低温恒温器(Leica CM1950™,IL,USA)切片。使用Fluroshield ®安装切片组织,以进行DAPI染色(Ex/Em 340/488nm),并使用共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO™ready)进行分析。

[0413] 体内实验性肺转移瘤模型的功效研究。通过将1×10^5个B16F10-Luc细胞经静脉内注射至雌性C57BL/6小鼠的尾静脉中,建立实验性肺转移瘤模型。在早期和晚期转移模型中,对治疗组的功效进行评估。在第一次注射疗法之前,基于肺中的生物发光强度对小鼠进行随机分组。针对它们的功效,对对照(生理盐水)组和三个治疗组(DOX-NP、RBC-NP、游离DOX)(剂量为5.2mg/kg)进行评价(除非另有说明,对于所有组,n=7)。

[0414] 对于早期转移模型,在接种后第一天开始给予治疗。在六天内,即在接种后第1、3、5和7天,给予四次注射。在接种后第6、8、10、12、18、23、31天,使用体内成像(Perkin Elmer IVIS Spectrum™,MA,USA)对小鼠进行成像。简而言之,向小鼠腹腔内注射150μL的30mg/mL Xenolight™-D-荧光素的生理盐水溶液。注射后15分钟,使用体内成像对小鼠进行成像。使用软件Living system®对平均辐射(生物发光强度)进行评估。针对它们的存活,对动物进行进一步监测。

[0415] 对于晚期转移模型,接种后一周给予治疗。在六天内,即在接种后第7、9、11和13天,给予四次注射。如上所述,使用体内成像在第6、8、10、12和16天对小鼠成像。使用软件Livingsystem®对平均辐射进行评估。在第16天,将小鼠安乐死,将肺切片,并使用10%福尔马林固定。固定的肺用于表面结节计数和H&E分析。通过如上所述的注射时间表对晚期模型中的存活进行评估。(对于对照组和治疗组,n=8)。

[0416] 统计分析。所有数据均表示为平均值±SEM。使用学生t检验、单因素ANOVA及Tukey HSD分析、或Mann-Whitney检验来确定显著性。

[0417] 使用Graphpad Prism™ 6软件进行所有统计分析。对于Kaplan-Meier存活曲线的分析,使用对数秩(Mantel-Cox)分析。p值表示不同程度的显著性;p<0.05*;p<0.01*;p<0.001***。使用FlowJo™软件进行所有流式细胞术分析。

[0418] 参考文献

[0419] [1]R.L.Siegel.K.D.Miller,A.Jemal.Cancer statistics,2019,CA Cancer J

Clin 69(1)(2019)7-34.

[0420] [2]J.D.Emery,K.Shaw,B.Williams,D.Maz.za,J.Fallon-Ferguson,M.Varlow,L.J Trevena,The role of primary care in early detection and follow-up of cancer,Nat RevClin Oncol 11(1)(2014)38-48.

[0421] [3]S.A.Eccles,D.R.Welch,Metastasis:recent discoveries and novel treatment strategies,Lanceet 369(9574)(2007)1742-57.

[0422] [4]A.C.Society,Cancer Prevention&Early Detection Facts&Figures 2019-2020.2019).

[0423] [5]F.Cardoso,E.Senkus-Konefka,L.Fallowfield,A.Costa,M.Castiglione,E.G.W.Group,Locally recurrent or metastatic breast cancer:ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up,Ann Oncol 21Suppl 5(2010)v 15-9.

[0424] [6]M.Reck,S.Popat,N.Reinmuth,D.De Ruysscher,K.M.Kerr,S.Peters,E.G.W.Group,Metastatic non-small-cell lung cancer(NSCLC):ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up,Ann Oncol 25Suppl3(2014)iii27-39.

[0425] [7]G.Morgan,R.Ward,M.Barton,The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies,Clin Oncol(R Coll Radiol)16(8)(2004)549-60.

[0426] [8]B.A.Chabner,T.G.Roberts,Jr.,Timeline:Chemotherapy and the war on cancer,Nat ReV Cancer 5(I)(2005)65-72.

[0427] [9]A.Schroeder.D.A.Heller.M.M.Winslow,J.E.Dahlman,G.W.Pratt,R.Langer,T.Jacks,D.G.Anderson,Treating metastatic cancer with nanotechnology,Nat Rev Cancer 12(1)(2011)39-50.

[0428] [10]D.Peer,J.M.Karp,S.Hong,O.C.FaroKHzad,R.Margalit,R.Langer,Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy,Nat Nanotechnol 2(12)(2007)751-760.

[0429] [11]J.Shi,P.W.Kantoff,R.Wooster,O.C.Farokhzad,Cancer nanomedicine:progress,challenges and opportunities,Nat Rev Cancer 17(1)(2017)20-37.

[0430] [12]Z.Zhao,A.Ukidve,V.Krishnan,S.Mitragotri,Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate ofdrug nanocarriers,Adv Drug Deliv Rev(2019).

[0431] [13]E.Blanco,H.Shen,M.Ferrari,Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery,Nat Biotechnol 33(9)(2015)941-51.

[0432] [14]S.Mitragotri,P.A.Burke,R.Langer,Overeoming the challenges in administering biopharmaceuticals:formulation and delivery strategies,Nat Rev Drug Discov 13(9)(2014)655-72.

[0433] [15]S.Barua,S.Mitragotri,Challenges associated with Penetration of

Nanoparticlesacross Cell and Tissue Barriers:A Review of Current Status and Future Prospects,Nano Today 9(2)(2014)223-243.

[0434] [16]J.W.Nichols,Y.H.Bae,Odyssey of a cancer nanoparticle:from injection site to siteofaction,NanoToday 7(6)(2012)606-618.

[0435] [17]S.Wilhelm,A.J.Tavares,Q.Dai.S.Ohta,J.Audet,H.F.Dvorak,W.C.W.Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours,Nat Rev Mater 1(5)(2016).

[0436] [18]Y.Zhong,F.Meng,C.Deng,Z.Zhong,Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy,Biomacromolecules 15(6)(2014)1955-69.

[0437] [19]X.H.Peng,YQ.Wang,D.H.Huang,Y.X.Wang,H.J.Shin,Z.J.Chen,M.B.Spewak, H.Mao,X.Wang,Y.Wang,Z.Chen,S.M.Nie,D.M.Shin,Targeted Delivery of Cisplatin to Lung Cancer Using ScFvEGFR-Heparin-Cisplatin Nanoparticles.Acs Nano 5(12)(2011)94g0-9493.

[0438] [20]F.Pastorino,C.Brignole,D.Di Paolo,B.Nico,A.Pezzolo,D.Marimpietri, G.Pagnan,F.Piccardi,N.Cilli,R.Longhi,D.Ribatti,A.Corti,T.M.Allen,M.Ponzoni, Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy,Cancer Res66(20)(2006)10073-10082.

[0439] [21]J.D.Byrne.T.Betancourt,L.Brannon-Peppas,Active targeting schemes fornanoparticle systems in cancer therapeutics,Adv Drug Deliv Rev 60(15)(2008)1615-26.

[0440] [22]R.Kanasty,JR.Dorkin,A.Vegas,D.Anderson,Delivery materials for siRNA therapeutics,Nat Mater 12(11)(2013)967-77.

[0441] [23]T.Lammers,W.E.Hennink,G.Storm,Tumour-targeted nanomedicines: principlesandpractice,Br J Cancer99(3)(2008)392-7.

[0442] [24]N.Bertrand,J.Wu,X.Xu,N.Kamaly,O.C.Farokhzad,Cancer nanotechnology:the impact of passive and active targeting in the era of modemcancerbiology,Adv Drug Deliv Rev 66(2014)2-25.

[0443] [25]Y.Zou,Y.Liu,Z.Yang,D.Zhang,Y.Lu.M.Zheng,X.Xue,J.Geng,R.Chung, B.Shi,Effective and Targeted Human Orthotopic Glioblastoma Xenograft Therapy via a Multifunctional Biomimetic Nanomedicine,Adv Matcr30(51)(2018)e1803717.

[0444] 126]S.Wang,G.Yu,Z.Wang,O.Jacobson,R.Tian,L.S.Lin,F.Zhang,J.Wang, X.Chen.Hierarchical Tumor Microenvironment-Responsive Nanomedicine for Programmed Delivery of Chemotherapeutics,Adv Mater(2018)e1803926.

[0445] [27]A.C.Anselmo,V.Gupta,B.J.Zern,D.Pan,M.Zakrewsky, V.Muzykantov.S.Mitragotri,Delivering Nanoparticles to Lungs while Avoiding Liver and Spleen through Adsorption on Red Blood Cells,Acs Nano 7(12)(2013)11129-11137.

[0446] [28]J.S.Brenner,D.C.Pan,J.W.Myerson,O.A.Marcos-Contreras,C.H.Villa,

P.Patel,H.Hekierski,S.Chatterjee,J.Q.Tao,H.Parhiz,K.Bhamidipati,T.G.Uhler,E.D.Hood,R.Y.Kiseleva,V.S.Shuvaev,T.Shuvaeva,M.Khoshnejad,I.Johnston,J.V.Gregory,J.Lahann,T.Wang,E.Cantu,W.M.Armstead,S.Mitragotri,V.Muzykantov,Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude,Nat Commun 9(2018).

[0447] [29]Z.Zhao,S.Lou,Y.Hu,J.Zhu,C.Zhang,A Nano-in-Nano Polymer-Dendrimer Nanoparticle-Based Nanosvstem for Controlled Multidrug Delivery,Mol Pharm 14(8)(2017)2697-2710.

[0448] [30]S.Rezvantalab.N.I.Drude,M.K.Moraveji,N.Guvener,E.K.Koons,Y.Shi,T.Lammers,F.Kiessling,PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment,Front Pharmacol 9(2018)1260.

[0449] [31]F.van Zijl,G,Krupitza,W.Mikulits.Initial steps of metastasis:cell invasion and endothelial transmigration,Mutat Res 728(1-2)(2011)23-34.

[0450] [32]S.DS,Secondary Lung Tumors.20192019).

[0451] [33]N.K.Altorki,G.J.Markowitz,D.C.Gao,J.L.Port,A.Saxena,B.Stiles,T.McGraw,V.Mittal,The lung microenvironment:an important regulator of tumour growth and metastasis,Nat Rev Cancer 19(1)(2019)9-31.

[0452] [34]S.Ramalingam,C.Belani,Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer:Recent advances and future directions,Oncologist 13(2008)5-13.

[0453] [35]V.P.Chauhan,R.K.Jain,Strategies for advancing cancernanomedicine,Nat Mater 12(11)(2013)958-962.

[0454] [36]S.A.Costa,D.Mozhdehi,M.J.Dzuricky,F.J.Isaacs,E.M.Brustad,A.Chilkoti,Active Targeting of Cancer Cells by Nanobody Decorated Polypeptide Micelle with Bio-orthogonally Conjugated Drug,Nano Lett 19(1)(2019)247-254.

[0455] [37]S.S.He.C.Le,Q.F.Zhang,J X.Ding,X.J.Liang,X.S.Chen,H.H.Xiao,X.Y.Chen,D.F.Zhou,Y.B.Huang,Tailoring Platinum(IV)Amphiphiles for Self-Targeting All-in-One Assemblies as Precise Multimodal Theranostic Nanomedicine,Acs Nano 12(7)(2018)7272-7281.

[0456] [38]P.Guo,J.Yang,D.Liu,L.Huang,G.Fell,J.Huang,M.A.Moses,D.T.Auguste,Dual complementary liposomes inhibit triple-negative breast tumor progression and metastasis,Sci Adv 5(3)(2019)eaav5010.

[0457] [39]A.K.Kosmides,J.W.Sidhom,A.Fraser,C.A.Bessell.J.P.Schneck,Dual Targeting Nanoparticle Stimulates the Immune System To Inhibit Tumor Growth,Acs Nano 11(6)(2017)5417-5429.

[0458] [40]E.Chambers,S.Mitragotri,Long circulating nanoparticlesv ia adhesion on red blood cells:Mechanism and extended circulation,Exp BioI Med 232(7)(2007)958-966.

[0459] [41]Q.Dai,S.Wilhelm,D.Ding,A.M.Syed,S.Sindhwani,Y.W.Zhang,Y.Y.Chen,

P.MacMillan,W.C.W.Chan,Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors,Acs Nano 12(8)(2018)8423-8435.

[0460] [42]D.Rosenblum,N.Joshi,W.Tao,J.M.Karp,D.Peer.Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics.Nat Commun 9(2018).

[0461] [43]N.Kamaly,B.Yameen,J.Wu,O.C.Farokhzad,Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles:Mechanisms of Controlling Drug Release,Chem Rev 116(4)(2016)2602-2663.

[0462] [44]P.S.Steeg,Targeting metastasis.Nat Rev Cancer 16(4)(2016)201-218.

[0463] [45]Y.Gao,J.J.Xie,H.J.Chen,S.E.Gu,R.L.Zhao,J.W.Shao,L.Jia,Nanotechnology-bascd intelligent drug design for cancer metastasis treatment,Biotechnol Adv32(4)(2014)761-777.

[0464] [46]H.K.Makadia,S.J.Siegel,Polv Lactic-co-Glycolic Acid(PLGA)as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier,Polymers-Basel 3(3)(2011)1377-1397.

[0465] 材料。聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(PLGA)(65:35)Resomer®653、甲氨蝶呤、喜树碱、5-氟尿嘧啶、肝素钠、Fluroshield®、DMEM、胎牛血清(FBS)、青链霉素(Pen Strep)获得自SigmaAldrich(Mo,USA)。多柔比星盐酸盐、多西他赛、紫杉醇和吉西他滨盐酸盐获得自L.C.实验室(MA,USA)。Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™系统、细胞染色缓冲液、嘌呤霉素、磷酸盐缓冲生理盐水(1X)、Axygen™1.5mL自立式螺帽管获得自Thermo Fischer Scientific(MA,USA)。表达荧光素酶的B16-F10黑色素瘤细胞系(B16F10-Luc)获得自Imanis Life Sciences(MN,USA)。人全血和血清获得自BioIVT(NY,USA)。Xenolight-D-荧光素钾盐获得自Perkin Elmer(MA,USA)。锂肝素涂覆的微量采集管(microtainer tube)获得自BD Medical Technology(NJ,USA)。CellTiter96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS)试剂盒获得自Promega(CA,USA)。Tissue Tek OCT化合物获得自Sakura Finetek(CA,USA)。0.9％生理盐水溶液获得自Teknova(CA,USA)。多聚甲醛获得自Electron Microscopy sciences(PA,USA)。所有其它化学品均为试剂级,并获得自Sigma Aldrich(MO,USA)。

[0466] 细胞培养。将B16F10-Luc细胞在保持在37℃和5％CQ_2下的加湿孵育器中培养。将它们在补充有10％FBS、1％Pen Strep和1μg/mL嘌呤霉素的DMEM培养基中培养。在它们使用前将细胞传代3-4次。

[0467] 体外药物释放研究。将含有DOX的纳米粒子重悬于1mL完全培养基(DMEM+10％FBS)中,并在37℃下在管旋转器上孵育。在固定的时间点,将粒子以12000g离心15分钟,收集上清液以用于分析。将粒子进一步重悬于1mL新鲜释放培养基中,并在37℃下孵育直至下一个时间点。在开始孵育后,在1h、2h、4h、6h、12h和24h取样。在酶标仪(Tecan Safire2®,NY,USA)上使用DOX作为荧光团(Ex/Em 470/590nm)对累积释放进行量化。

[0468] 粒子内化和细胞毒性研究。使用流式细胞术和共聚焦显微镜对粒子内化进行确认。对于流式细胞术分析,将2×10^6个B16F10-Luc细胞铺于12孔板中并使其粘附过夜。然后将板吸出,并向每个孔中加入1mL新鲜培养基。向每个孔中加入30μg纳米粒子,并使其在37℃下在孵育器中孵育20分钟、2小时或6小时。在规定的时间点之后,将孔中的培养基完全吸

出并用PBS洗涤3次，使用0.25胰蛋白酶/EDTA溶液使细胞从板上脱离。用PBS洗涤后，使用DOX荧光团，通过流式细胞术分析仪(BD LSR Analyser II,CA,USA)对这些细胞进行分析。

[0469] 对于共聚焦显微镜，将2×10^{5}个B16F10-Luc细胞铺于Nunc™Lab-Tek™II Chamber Slide™系统(Thermo Fischer Scientific)的单个腔室中，使其粘附过夜。然后将板吸出，并向每个孔中加入1mL新鲜培养基。向每个孔中加入30μg纳米粒子，并使其在37℃下在孵育器中孵育20分钟、2小时或6小时。在规定的时间点之后，将孔中的培养基完全吸出并用PBS洗涤3次，随后用4％多聚甲醛固定。使用Fluroshield ®安装固定的细胞以用于DAPI染色(Ex/EM 340/488nm)，并使用共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO ready,德国)进行分析。

[0470] 根据制造商的说明，使用CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS)对负载的PLGA粒子、未负载的PLGA粒子和游离DOX的细胞毒性进行评估。简而言之，将2000个B16-F10-Luc细胞接种在96孔板中并使其粘附过夜。然后将培养基吸出，并用含有不同浓度的各种制剂的培养基替代，使其在37℃下孵育24小时。将20μL CellTiter 96® AQueous One Solution试剂加入到孔中，并使其在加湿孵育器中在37℃下孵育4小时。使用酶标仪(Epoch II,Biotek systems,VT,USA)读取490nm下的吸光度。使用Graphpad Prism 6,用可变斜率模型(四参数-剂量响应曲线)拟合各制剂的剂量响应曲线，并使用相同的软件计算IC_{50}值。

[0471] 制备载有不同化学治疗剂的可生物降解PLGA纳米粒子。使用稍作修改的纳米沉淀方法制备所有载有化学治疗剂的可生物降解PLGA纳米粒子。为了制备载有甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶+甲氨蝶呤和喜树碱的纳米粒子，将2mg药物(对于5-氟尿嘧啶+甲氨蝶呤，每个1mg)溶解在200μL DMSO中。然后将药物溶液与20mg溶解在1mL丙酮中的PLGA混合。随后的步骤与制备载有DOX的PLGA纳米粒子相同。为了制备载有多西他赛和紫杉醇的纳米粒子，将20mg PLGA和2mg药物溶于1mL丙酮中，以形成有机相。随后的步骤与制备载有DOX的PLGA纳米粒子相同。为了制备载有吉西他滨的纳米粒子，将2mg吉西他滨盐酸盐溶解在0.5mL甲醇和5μL三乙胺(TEA)中，将该药物溶液加入到20mg溶解在1mL丙酮中的PLGA中。随后的步骤与制备载有DOX的PLGA纳米粒子相同。将所有粒子收集，以12000g离心15分钟，并使用去离子水洗涤三次。使用动态光散射(Malvern Zen3600)测量纳米粒子尺寸和Zeta电位。

[0472] 表2.载有不同化学治疗剂的PLGA纳米粒子的物理化学性质

[0473]

	平均直径（nm）	Zeta-电位（mV）	PDI
喜树碱	231.3±6.5	-27.9±1.3	0.250±0.038
紫杉醇	222.0±9.7	-30.3±1.4	0.342±0.043
多西他赛	182.2±8.1	-26.5±1.2	0.256±0.092
5-氟尿嘧啶	167.7±4.7	-29.4±0.5	0.196±0.020
吉西他滨	139.5±1.8	-28.0±0.8	0.068±0.044
甲氨蝶呤	211.1±2.5	-21.8±0.5	0.236±0.016
5-氟尿嘧啶+甲氨蝶呤	197.7±6.2	-25.7±0.3	0.278±0.021

[0474] PLGA a:50:50,酯末端,无规共聚物,分子量-38000-54000。PLGA b:50:50,酸末端,无规共聚物,分子量-38000-54000。PLGA c:85:15,酯末端,无规共聚物,分子量-50000-75000。PLGA d:65:35,酸末端,无规共聚物,分子量-24000-38000。

[0475] 实施例3:红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASY):全身性给予-能够对于肺转移瘤治疗实现局部免疫恢复

[0476] 肿瘤微环境中的局部免疫恢复是利用身体自身免疫系统对患有诸如肺转移瘤的晚期癌症的患者中的肿瘤进行治疗的有希望的策略。本文描述的是一种新策略,即红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASY),其使得能够在难以到达(hard-to-reach)的转移性位点实现局部免疫恢复,以用于控制肺转移瘤进展。简而言之,自组装在红细胞上的免疫诱饵(预载有趋化因子的纳米粒子)搭载便车,并精确地沉积在转移性位点附近。免疫诱饵逐渐释放趋化因子,通过恢复趋化因子梯度来调节局部微环境,随后引起效应免疫细胞向转移性位点的显著增强的渗透。EASY显著抑制肺转移瘤的进展,并显著延长了自发性乳腺癌肺转移瘤模型中的动物存活。我们的发现表明,EASY是用于在难以到达的肺转移性位点进行局部免疫调节以对抗肺转移瘤的有效策略。

[0477] 免疫调节(对免疫系统进行精细调节来达到期望结果)近年来一直处于治疗研究的前沿。[1-8]通过操纵免疫细胞的表型来控制身体自身的免疫系统可以极大地影响疾病病症的病理结果。[2、4、5、9-12]为此,大量的科学努力致力于免疫调节的空间控制,即免疫微环境的局部改变。[13-16]通常,局部免疫调节一直是一项挑战,主要是由于缺乏免疫调节剂的位点特异性递送和对身体深层组织的可接近性(accessibility)有限。[15]静脉内给予确实有助于直接接近大多数组织,但通常无法在空间上制约免疫调节作用。即使出现纳米技术,由于身体的单核吞噬系统(该系统通常捕获包封免疫调节剂的纳米载体,使得效果是全身性的而非局部的),靶向免疫调节也是一项挑战。[17、18]

[0478] 癌症免疫疗法已经成为免疫调节策略的一大受益者,这种策略将肿瘤微环境从“冷”型转变为“热”型。[11、19-23]根据Chen和Mellman所描述的癌症免疫周期,从凋亡的癌细胞死亡到释放抗原,抗原呈递到树突细胞,细胞归巢到淋巴结,抗原特异性应答的发展,效应免疫细胞的位点特异性归巢,至到由细胞毒性免疫应答引起的最终凋亡的肿瘤细胞死亡,每一步都可以通过免疫干预来驱动更有效的治疗性应答。[24]在癌症免疫周期的所有这些阶段中,效应免疫细胞的位点特异性归巢是实现有效的抗肿瘤应答的有希望的靶标,但仍具有巨大的挑战。[11、20、22]这可以很大程度上归因于肿瘤微环境自身内源性地使化学引诱物生物制剂(趋化因子)耗竭,并缺乏可以局部实现免疫恢复以重新建立趋化因子梯度、并由此实现效应免疫细胞的成功归巢的策略。[25、26]

[0479] 本文描述的是一种新方法,即红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASY),其在全身性给予后能够在晚期肺转移瘤模型中实现局部免疫恢复(图13)。在以其它方式难以到达转移性位点,锚定在红细胞上的纳米粒子特异性地以剪切依赖性方式在肺中脱落,并大量积累。能够吸引效应免疫细胞的CXC型趋化因子CXCL10被包封在PLGA纳米载体(免疫诱饵)中。转移性结节附近的免疫诱饵的位点特异性递送恢复了局部趋化因子梯度,并且能够吸引效应免疫细胞来引发细胞毒性的而又局部的免疫应答。这种免疫恢复使得表面转移性结节的数量降低,并改善了乳腺癌自发性肺转移瘤模型的存活,突出了EASY实现全身性给予而使得微环境进行局部调节以驱动有效的治疗性应答的能力。

[0480] 对用于最佳肺靶向的PLGA纳米粒子的材料性质的工程化

[0481] 进行一组实验以通过PLGA纳米粒子的材料设计来实现最佳的肺靶向。PLGA聚合物的两种最重要的材料性质:组成(乳酸与羟基乙酸的比例,L:G比例)和表面化学(酸末端或酯末端)[27]被选择作为用于优化的参数。为此,选择四种不同的PLGA聚合物(表4)以制备纳米粒子。尽管不同的PLGA纳米粒子均会组装到红细胞上(图19),但具有高L:G比例和酸末端(PLGA-d)的PLGA纳米粒子表现出对红细胞的最高结合效率(图14A)。生物相容性测定(图14B和图20A-图20C)表明,与其它对应物相比,PLGA-d对载体红细胞引起了相对最小的损伤。有趣的是,根据体外剪切研究实验,具有较高L:G比例的酸末端聚合物在高剪切应力(6Pa)下产生了更高的纳米粒子脱离百分比,并且在低剪切应力下产生了更低的提早脱离(图14C和图21)。在所有PLGA候选物中,PLGA-d在高剪切应力下显示出最高脱离。此外,体内生物分布数据(图22A)表明,搭载在红细胞上的不同PLGA纳米粒子的器官特异性靶向与体外剪切数据相关。具体地,具有高提早脱离的纳米粒子(PLGA-a)靶向于低剪切器官(例如脾脏),而显示出高净纳米粒子脱离的纳米粒子(PLGA-c和PLGA-d)在高剪切器官(例如肺和肾)中表现出增强的积累。特别是,在自组装到红细胞上的同时,PLGA-d表现出最佳的肺靶向能力(图14D和图14E)。考虑到其高结合效率,对载体红细胞的最小损伤和优异的肺靶向,将PLGA-d(65:35L:G比例,酸末端)确立为进一步研究的先导候选物。

[0482] 从载体红细胞剪切下来后,在纳米粒子和肺内皮之间的快速、有效的相互作用是纳米粒子的长期保留的先决条件。已报道,ICAM-1在肺内皮中过表达,特别是在患病的肺中。[28-30]在此基础上,探索了抗ICAM-1抗体的附着是否可以增强脱离的纳米粒子和肺内皮之间的相互作用。在2-D细胞培养研究中,CLSM成像数据(图14F)表明,抗ICAM-1抗体与PLGA纳米粒子的附着引起了它们与肺内皮细胞的更快的且增强的相互作用。此外,时间进程的生物分布数据(图22B和图14G-图14H)揭示了,在抗ICAM-1抗体不存在的情况下,与单独的游离纳米粒子相比,红细胞搭载将显著更多的纳米粒子递送至肺,但是纳米粒子仅停留20分钟。在鲜明的对比下,抗ICAM-1抗体与纳米粒子的附着显著延长了其在肺中的保留,至少长达6小时。

[0483] 自组装在红细胞上的免疫诱饵

[0484] 使用复乳法(double-emulsion method)制备免疫诱饵(载有趋化因子的PLGA纳米粒子),其负载量为1.88μg/mg趋化因子,包封率为75%。单分散的、球形免疫诱饵纳米粒子的平均直径为187.3nm,Zeta电位为-24.5mV(图15A-图15C)。在PBS、FBS和完整培养基(它们分别模拟了体外搭载条件、血清环境和局部组织环境)中,趋化因子从免疫诱饵的释放表现为突释后的持续释放模式,大部分可释放的有效载荷在6小时内被释放(图15D)。此外,趋化因子在PBS中释放得比在FBS和完全培养基中慢得多,这对于在搭载过程中使趋化因子损失最小化是有益的。为了测试免疫诱饵是否能够有效地组装到红细胞上,用荧光探针Alexa Fluor 647对趋化因子进行标记。图15E所示的CLSM数据表明免疫诱饵纳米粒子有效组装到了小鼠红细胞上。通过提高免疫诱饵纳米粒子与小鼠红细胞的比例,携带免疫诱饵纳米粒子的小鼠红细胞的百分比显著增加(图23A-图23C)。特别地,在1000:1的免疫诱饵与红细胞的比例下,>90%的小鼠红细胞携带免疫诱饵纳米粒子(图15F)。SEM成像数据证实了免疫诱饵纳米粒子有效组装到了小鼠红细胞上(图15G)。除了CXCL10,携带其它趋化因子(GM-CSF)、细胞因子(IL-2、IL-12和IL-15)和免疫检查点抑制剂(抗PD-1抗体)的免疫诱饵也有

效地与小鼠红细胞结合(图24)。此外,免疫诱饵纳米粒子也组装到了人红细胞上,但是结合效率较低(图25A-图25B)。

[0485] 接下来,进行一组测定,以检测免疫诱饵纳米粒子的搭载对载体红细胞引起的不利影响(如果有的话)。磷脂酰丝氨酸的表面表达将红细胞标记为衰老或损伤的,并加速它们的体内清除。[31、32]如图15H所示,在所有测试比例下,免疫诱饵纳米粒子的搭载并未在载体红细胞上引起表面磷脂酰丝氨酸的明显过表达。另外,来自凝集测定[33](图15I)和渗透脆性测定[34](图26和图15J)的数据揭示了,免疫诱饵纳米粒子的搭载对载体红细胞的凝集和渗透应力敏感性带来了微不足道的变化。这些生物相容性研究表明,免疫诱饵纳米粒子在红细胞上的组装对载体红细胞引起了最小的损伤。

[0486] 使用EASY将免疫诱饵靶向递送至肺转移性位点

[0487] 为了测试免疫诱饵是否可以响应于生理肺相应的高剪切应力而从载体红细胞脱离,首先进行体外剪切研究,其中,携带免疫诱饵的红细胞被剪切3分钟、10分钟或20分钟。SEM成像数据(图16A)揭示,在剪切后红细胞表面上存在的纳米粒子的数量显著降低。量化分析证实了该发现(图16B)。免疫诱饵的脱离是剪切依赖性的,当在肺相应的剪切应力(6Pa)下剪切时,在3分钟内释放>60%的纳米粒子。

[0488] 接下来,在早期乳腺癌自发性肺转移瘤模型中进行生物分布研究。如图16C-图16E所示,通过将免疫诱饵纳米粒子搭载至红细胞,肝脏中积累的纳米粒子的数量降低,与先前的报道相一致。[33、35]此外,与健康小鼠模型中的类似,当组装到红细胞上时,与其游离对应物相比,显著更多的免疫诱饵被递送至患有转移瘤的肺。特别地,在抗ICAM-1抗体的存在下,当组装到红细胞上时,与其游离对应物相比,在其静脉内给予后20分钟,约27倍的更多的免疫诱饵被积累在患病的肺中。此外,免疫诱饵在患有转移瘤的肺中保留至少6小时。如图16D所示,免疫诱饵向转移性肺的增强的递送产生了高达94的高肺血比,为有效载荷梯度的建立形成了基础。晚期肺转移瘤模型中的进一步生物分布研究表明,即使在晚期病理条件下,免疫诱饵也可响应于生理高剪切应力而沉积在晚期转移性肺中(图16F)。

[0489] 接下来对肺切片进行分析,以研究免疫诱饵在患有转移瘤的肺中的分布。如图16G所示,红细胞搭载的方法能够将大量的免疫诱饵递送至“难以到达”的转移性位点。特别地,大多数免疫诱饵被分布在转移性结节周围,而有些还深入了转移性结节中。

[0490] 通过红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASY)使得能够实现免疫恢复

[0491] 先前的研究报道,随着黑色素瘤肺转移瘤的进展,效应免疫细胞(如效应T细胞)向转移性位点的浸润得到了显著抑制,这主要归因于趋化因子(CXCL9和CXCL10)梯度的损失。[36]进行时间进程研究以监测乳腺癌自发性肺转移瘤模型中的CXCL10趋化因子梯度(图16H)。如图27A-图27B和图16I所示,随着肺转移瘤的进展,肺到血液的CXCL10趋化因子梯度显著降低,表明了转移性肺中免疫抑制的发展。为了测试EASY递送的免疫诱饵是否可以引起免疫恢复,进行趋化因子梯度测定(图16J)。具体地,在静脉内给予趋化因子制剂后20分钟或6小时,将小鼠处死,测定肺和血液中的CXCL10趋化因子浓度。如图16K-图16M所示,仅EASY递送的免疫诱饵引起趋化因子梯度的长期恢复。具有抗ICAM-1抗体的游离免疫诱饵不能向肺提供足够的趋化因子,未能建立强的趋化因子梯度。使用了递送5倍的更高剂量的游离趋化因子的激发性比较对照。5倍游离趋化因子制剂凭借高生物利用度向血液和肺递送高含量的趋化因子,并在给予后20分钟产生了弱的趋化因子梯度。但是,这种梯度无法保持。在鲜

明的对比下,EASY递送的免疫诱饵能够向肺递送高浓度的CXCL10趋化因子,并且可以使强的趋化因子梯度保持至少6小时。

[0492] 红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASY)的体内治疗功效

[0493] 肺转移性位点处的免疫恢复可以将局部微环境调节至“热”状态,其有利于细胞毒性免疫应答并且具有控制肺转移瘤的进展的潜力。[36-38]为了测试这一假设,在乳腺癌自发性肺转移瘤模型中对EASY控制肺转移瘤的功效进行评估。如图17A所示,小鼠在10天内接受了共4次治疗给药,首次给药在原发性肿瘤切除后7天给予。如生物发光成像数据(图17B)所示,与其它组相比,EH-免疫诱饵组表现出显著更慢的肺转移瘤进展。最后一次给药后两天,将小鼠处死,并对切除的肺上的表面结节进行计数。如图17C所示,与对照组相比,只有EH-免疫诱饵产生显著降低的肺转移瘤负荷。具体而言,在抑制肺转移瘤的进展方面,与5倍游离趋化因子和游离免疫诱饵组相比,EH-免疫诱饵分别表现出3.5倍和6.0倍的更好功效。EH-免疫诱饵实现的整体肺转移瘤抑制率高达87.4%(图17D)。此外,EH-免疫诱饵组中的八只小鼠中的两只在第37天具有少于2个的可见肺结节。切除的肺的定性图像证实了EH-免疫诱饵比其它治疗功效更高(图17E和图28)。此外,通过EH-免疫诱饵治疗的小鼠的肺重量比对照和其它治疗组的肺重量显著更低,并且更接近健康小鼠的肺重量(图17F)。在整个治疗过程中,任何治疗组中均未观察到显著的体重减轻,表明没有与治疗有关的明显毒性(图17G)。小鼠器官的H&E染色数据证实了治疗的安全性(图29)。接下来,进行存活研究,以评估EASY方法是否可以延长患有乳腺癌自发性肺转移瘤的小鼠的存活时间。小鼠根据与图17A所示的相同的时间表接受治疗。与对照和其它治疗组相比,通过EH-免疫诱饵的治疗显著改善了动物存活,将中位存活时间延长了几乎3倍(图17H)。此外,六只小鼠中的一只存活至少65天。接下来,在晚期乳腺癌自发性肺转移瘤模型中,研究了EASY治疗晚期肺转移瘤的功效(图30A)。如图30B-图30C所示,与单独的游离免疫诱饵相比,EH-免疫诱饵产生显著降低的肺转移瘤负荷,表明EASY在晚期转移瘤模型中也显示出功效。

[0494] 通过EASY实现免疫恢复以用于抑制肺转移瘤进展的机制

[0495] 为了理解所观察到的EASY递送的免疫诱饵的抗转移性功效的潜在细胞机制,进行了研究以分析不同治疗后的转移性肺中的免疫细胞(图18A)。CXCL10对于表达CXCR3受体的特定类别的免疫细胞(如Th1 CD4、效应CD8和NK细胞,所有这些都有助于抗肿瘤应答)是强的化学引诱物。[25、39-41]如图31A所示,与对照(生理盐水)相比,EH-免疫诱饵使得总CD4细胞增加1.5倍。此外,与生理盐水组相比,在EH-免疫诱饵治疗的小鼠转移性肺中观察到显著更多(增加2倍)的IFN-γ+Th1 CD4细胞(图18B)。Th1 CD4细胞分泌1型细胞因子(如IFN-γ和TNF-α),维持了促炎环境,这有利于肿瘤的免疫控制。[1、42]在不同治疗组中,转移性肺内总的CD8 T细胞无显著性差异(图31B)。然而,与其它组相比,EH-免疫诱饵诱导了效应CD8 T细胞向转移性肺中的显著增强的浸润(图18D-图18G)。具体地,与对照和其它治疗相比,通过EH-免疫诱饵实现了1.7-2.0倍的IFN-γ+CD8细胞增加和1.7-2.3倍的颗粒酶B+CD8细胞增加。除了适应性免疫细胞外,还观察到,EASY递送的免疫诱饵显著地改变先天免疫细胞(特别是NK和树突细胞)向转移性肺中的浸润(图18H-图18J和图31C)。如图18H-图18I所示,在给予EH-免疫诱饵之后,观察到NK细胞向转移性肺的显著改善的浸润。EH-免疫诱饵组中的NK细胞总数比对照和其它治疗组中的高1.4-1.8倍。值得注意的是,相较于其它组,在EH-免疫诱饵组中还观察到显著更高量的CD11c+树突细胞(图31C)。此外,与对照和其它治疗组相比,

EH-免疫诱饵组中浸润的CD11c+树突细胞处于显著更活化的状态(CD86+)(图31D和图18K)。此发现是出乎意料的,因为CXCL10不是树突细胞的强化学引诱物。在本文考虑之列的是,由Th1、效应CD8和NK细胞的浸润引起的肿瘤细胞死亡产生更多的肿瘤相关抗原,导致树突细胞的浸润及其随后的活化。[43、44]上述免疫细胞分析数据明显表明,通过EASY实现的免疫恢复显著增强了效应免疫细胞向转移性肺中的浸润。此外,效应免疫细胞的改善的浸润显著调节转移性肺中的细胞因子谱(cytokine profile)。EH-免疫诱饵组中的炎性细胞因子水平通常高于对照和其它治疗组(图32)。特别地,EH-免疫诱饵组中IFN-γ和TNF-α的浓度显著高于对照或其它治疗组(图18L-图18M)。此外,EH-免疫诱饵组中抗炎细胞因子IL-10的水平低于其它组(图18N)。更有趣的是,EH-免疫诱饵组中CXCL10趋化因子的浓度也显著高于其它组(图18O),进一步证实了成功的免疫恢复。

[0496] 讨论

[0497] 总之,本文描述的是红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASY),一种红细胞介导的全身性给予方法,该方法允许在"难以到达"的肺转移性位点进行局部免疫恢复,用于肺转移瘤的管控。EASY由锚定到红细胞表面上的免疫诱饵(载有趋化因子的纳米粒子)组成。在全身性静脉内给予后,免疫诱饵响应于转移性肺中的生理高剪切应力,从载体红细胞迅速脱落,并精确地沉积在转移性位点。经工程化的免疫诱饵保留在转移性肺中,并继续释放有效载荷趋化因子,这使得能够重新建立丧失的趋化因子梯度,因此在转移性位点使免疫微环境得到局部恢复。进一步证明了,恢复的局部免疫微环境引起了效应免疫细胞(包括Th1 CD4、效应CD8、NK和活化的树突细胞)向转移性位点的显著改善的浸润。有希望的是,EASY能够显著抑制肺转移瘤的进展,并显著改善乳腺癌自发性肺转移瘤模型中的动物存活。EASY是最早的全身性给予方法之一,可以在难以到达的肺转移性位点实现局部免疫恢复,并且通过位点特异性递送一系列免疫调节剂,可以是对局部肺微环境进行调节的有效策略。

[0498] 方法

[0499] 细胞系和动物

[0500] 表达荧光素酶的4T1乳腺癌细胞系(4T1-Luc)获得自Imanis Life Sciences(MN,USA)。将4T1-Luc细胞在保持在37℃和5%CO_2下的加湿孵育器中培养。将它们在补充有10%FBS、1%Pen-Strep和0.1mg/mL G418的RPMI-1640培养基中培养。人肺微血管内皮细胞(HLMVEC)和HLMVEC生长培养基购自Sigma Aldrich(MO,USA)。根据制造商的说明,在HLMVEC生长培养基中培养HLMVEC。在它们使用前将细胞传代2-3次。雌性Balb/c小鼠(7-8周龄)购自Charles River实验室(MA,USA)。所有实验均根据剑桥哈佛大学文理学院(FAS)的动物护理机构和使用委员会(IACUC)批准的方案进行。

[0501] 免疫诱饵的制备和表征

[0502] 使用复乳法制备免疫诱饵(包封CXCL10的PLGA纳米粒子)。简而言之,将50μg的CXCL10溶解在200μL 0.1%牛血清白蛋白PBS溶液中。将其加入到含有20mg PLGA的1mL二氯甲烷中。将混合物简单地超声处理,然后在恒定搅拌下滴加至11mL 1.5%聚乙烯醇(PVA)溶液中。将整个混合物进行探针超声处理40秒。将形成的粒子保持在恒定的搅拌下过夜以除去有机溶剂。将粒子以12,000g离心10分钟,对上清液进行分析,以对药物负载进行量化。然后将粒子重悬于去离子水中,并使用动态光散射(Malvern Zen3600,PA,USA)、扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,德国)和透射电子显微镜(JEOL

2100,MA,USA)对其尺寸、Zeta电位和多分散指数进行评估。在将它们最终重悬于PBS中之前,将纳米粒子用去离子水洗涤,共计洗涤两次。对于量化和生物分布研究,使用上述方法将荧光卵白蛋白/CXCL10包封于PLGA中。

[0503] 体外药物释放研究

[0504] 将含有CXCL10的纳米粒子(免疫诱饵)重悬于1mL PBS、FBS和完全培养基(DMEM+10%FBS)中,并在37℃下在管旋转器上孵育。在固定的时间点,将粒子以12,000g离心10分钟,收集上清液以用于分析。将粒子进一步重悬于1mL新鲜释放培养基中,并在37℃下孵育直至下一个时间点。在开始孵育后,在1h、2h、4h、6h和12h取样。使用ELISA对每种释放培养基中的累积释放进行量化。

[0505] 血液收集和加工

[0506] 使用肝素预涂覆的注射器通过心脏穿刺收集鼠全血,并在使用前在4℃下储存在BDMicrotainer®血液收集管中。全血在4℃下以1,000g离心10分钟,以从红细胞隔室中除去血清和白膜层。将分离的红细胞进一步用冷的1X PBS洗涤3次,并在4℃下以650g离心15分钟,随后将它们以10%血细胞比容的浓度最终重悬于1X PBS中。本研究中将该溶液视为红细胞储备溶液。

[0507] 免疫诱饵在红细胞上的组装

[0508] 在Axygen™1.5mL自立式螺帽管中将等体积的红细胞储备溶液和免疫诱饵纳米粒子悬浮液混合,并通过倒反和移液进一步充分混合。然后使管在管旋转器(Thermo Fisher Scientific)上旋转40分钟。然后通过在4℃下以100g离心5分钟来使搭载的红细胞沉淀,小心地除去未吸附的粒子,并用1mL 1X PBS再次对沉淀进行洗涤,以除去松散结合的粒子。对于抗ICAM-1抗体的附着,将免疫诱饵纳米粒子或搭载的红细胞沉淀重悬于0.5mg/mL抗ICAM-1抗体溶液中,持续另外的20分钟。最终将搭载的红细胞以10%v/v重悬于1X PBS中并用于进一步表征,或以20%v/v重悬于1X PBS中用于体内研究。

[0509] 自发性肺转移瘤模型建立

[0510] 为了建立乳腺癌自发性肺转移瘤模型,将1×10^6个4T1-Luc细胞原位注射到雌性Balb/c小鼠的左乳腺脂肪垫中。接种后19天(早期模型)或32天(晚期模型),通过外科手术切除原发性肿瘤。原发性肿瘤切除后6天,经腹腔内向小鼠注射150μL 30mg/mL Xenolight-D-荧光素的生理盐水溶液。注射后15分钟,使用体内成像(IVIS光谱)对小鼠成像。在原发性肿瘤切除后6天,基于原发性肿瘤体积和生物发光强度,将小鼠随机分成不同的组。

[0511] 疾病模型中的体内生物分布研究

[0512] 如前所述建立早期或晚期乳腺癌肺转移瘤模型。在原发性肿瘤切除后七天,将免疫诱饵、搭载的免疫诱饵、抗ICAM-1附着的免疫诱饵和抗ICAM-1附着的搭载的免疫诱饵(对于所有组,n=3)经静脉内注射到小鼠尾静脉中。用与白蛋白载体蛋白缀合的Alexa Fluor 647对免疫诱饵纳米粒子进行荧光标记。在注射后20min和6h将小鼠处死(每组每个时间点,n=3),收获器官(肝脏、肺、脾脏、肾脏、心脏、脑和血液)以进行进一步加工。对于加工,向每个器官中加入1mL冷的RIPA裂解缓冲液(1X),使用高剪切均化器(IKA T-10Basic ®Ultra turrax,德国)将器官均质化,在酶标仪(Tecan Safire 2®,瑞士)上通过荧光对纳米粒子含量进行量化。

[0513] 体内乳腺癌自发性肺转移瘤模型上的功效研究

[0514] 在早期的乳腺癌自发性肺转移瘤模型中，在原发性肿瘤切除后一周开始给予治疗。在10天内(即第26、29、32和35天)给予四次注射。在第25、28、31、34和37天，使用体内成像(IVIS Spectrum™)对代表性小鼠成像。简而言之，向小鼠经腹膜内注射150μL 30mg/mL Xenolight™-D-荧光素的生理盐水溶液。注射后15分钟，使用体内成像对小鼠成像。在第37天，将小鼠安乐死，经腹腔内注射印度墨水(India ink)溶液，将肺切除并使用Feket溶液固定。将固定的肺用于表面结节计数。通过如上所述的注射时间表对早期模型中的存活进行评估(n＝6)。在晚期肺转移瘤模型中，每两天给予四次治疗给药，首次给药在原发性肿瘤切除后7天(第39天)给予。最后一次给药后两天(第50天)，将小鼠安乐死，并对切除的肺上的结节进行计数。

[0515] 趋化因子梯度测定

[0516] 在早期肺转移瘤模型中，测量血液和肺中CXCL10浓度的时间进程变化。肿瘤接种后19天，通过外科手术切除肿瘤。肿瘤切除后4、10、22天，将小鼠安乐死，通过心脏穿刺收集血液，将肺切除(对于所有时间点，n＝5)。对于加工，将0.5mL含有蛋白酶抑制剂的冷的组织提取缓冲液加入每个肺，使用高剪切均化器(IKA T-10Basic ®Ultra turrax，德国)将肺均质化。使用ELISA对肺和血液中的CXCL10含量进行量化。

[0517] 如下，在早期肺转移瘤模型上进行趋化因子梯度测定。为了评估该疗法的趋化因子梯度恢复能力，如前面的上下文所述建立早期自发性肺转移瘤模型。将一个生理盐水组和三个治疗组(5倍游离CXCL10趋化因子、具有抗ICAM-1的免疫诱饵和红细胞搭载的具有抗ICAM-1的免疫诱饵)纳入研究中。在外科手术后一周开始给予治疗。在外科手术后第7天和第10天给予两组注射组。(对于每组每个时间点，n＝4-5)。在第二次注射后20min和6h，将小鼠处死，通过心脏穿刺收集血液，并将肺切除。如上所述对肺和血液中的趋化因子含量进行量化。

[0518] 免疫细胞和细胞因子分析

[0519] 由如下制备不同的抗体鸡尾酒组：CD45(Biolegend，Cat no:103116，Clone:30-F11)、CD3(Biolegend，Cat no:100218，Clone:17A2)、CD4(Biolegend，Cat no:100421，Clone:GK1.5)、CD8a(Biolegend，Cat no:100711，Clone:53-6.7)、NKp46(Biolegend，Cat no:137606，Clone:29A1.4)、CD11c(Biolegend，Cat no:117307，Clone:N418)、颗粒酶B(Biolegend，Cat no:372208，Clone:QA16A02)、IFN-γ(Biolegend，Cat no:505849，Clone:XMG1.2)、IFN-γ(Biolegend，Cat no:505806，Clone:XMG1.2)、CD86(Biolegend，Cat no:105011，Clone:GL-1)和Am Cyan活/死细胞染色试剂盒(Thermo Fischer Scientific，MA，USA)。在它们使用之前，所有抗体均以最佳的稀释度(dilutions)进行稀释。

[0520] 对于免疫细胞分析，如上所述建立早期自发性肺转移瘤。将一个生理盐水组和三个治疗组(5倍游离CXCL10趋化因子、具有抗ICAM-1的免疫诱饵和红细胞搭载的具有抗ICAM-1的免疫诱饵)纳入研究中。在外科手术后一周开始给予治疗。在原发性肿瘤切除后第7、10、13天给予三组注射组。在最后一次注射后一天，将小鼠安乐死，并将肺切除。根据制造商的说明，使用肺解离试剂盒(Miltenyi Biotec，德国)形成肺细胞的单一细胞悬浮液。将细胞用上述抗体染色并通过流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II™，NJ USA)进行分析。

[0521] 对于细胞因子分析，模型建立和治疗与上述相同。在最后一次注射后一天，将小鼠安乐死，并将肺切除。对于加工，将0.5mL含有蛋白酶抑制剂的冷的组织提取缓冲液加入每

个肺,使用高剪切均化器(IKA T-10Basic ®Ultra turrax,德国)将肺均质化。根据制造商的说明,使用LEGENDplex™Mouse Inflammation Panel(Biolegend,CA,USA)进行细胞因子分析,并使用流式细胞术分析仪(BD LSR Analyser II,NJ USA)进行分析。通过ELISA对CXCL10浓度进行量化。

[0522] 统计分析

[0523] 所有实验重复至少三次。使用Graphpad prism™8软件进行所有统计分析。所有数据均表示为平均值±SEM。使用学生t检验、单因素ANOVA及Tukey HSD分析、或Mann-Whitney检验来确定显著性。对于Kaplan-Meier存活曲线的分析,使用了对数秩趋势检验。p值表示不同程度的显著性;$p<0.05$*;$p<0.01$**;$p<0.001$***,$p<0.0001$****。使用FlowJo™10软件进行所有流式细胞术分析。

[0524] 补充方法

[0525] 材料

[0526] 除非另有提及,所有化学品和试剂均获得自Sigma Aldrich(Mo,USA),并且无需进一步纯化即可使用。CXCL10/IP-10、IL-10、IL-15、GM-CSF获得自PeproTech(NJ,USA)。Nunc™Lab-Tek™II Chamber Slide™系统、细胞染色缓冲液、G418(遗传霉素)、小鼠IP-10ELISA试剂盒、Alexa Fluor 647卵白蛋白、Alexa Fluor 750NHS试剂、Alexa Fluor 647NHS试剂、磷酸盐缓冲生理盐水(1X)、Axygen™1.5mL自立式螺帽管获得自Thermo Fischer Scientific(MA,USA)。人全血和血清获得自BioIVT(NJ,USA)。Xenolight-D-荧光素钾盐获得自Perkin Elmer(MA,USA)。锂肝素涂覆的微量采集管获得自BD Medical Technology(MA,USA)。具有过滤板和抗ICAM-1抗体的LEGENDplex™Mouse Inflammation Panel(Cat no:116102,Clone:YN 1/1.7.2)获得自BioLegend(CA,USA)。组织解离管和肺解离试剂盒获得自Miltenyi Biotec(德国)。Tissue Tek OCT化合物获得自Sakura Finetek(CA,USA)。0.9%生理盐水溶液获得自Teknova(CA,USA)。多聚甲醛获得自Electron Microscopy sciences(PA,USA)。外科手术设备获得自Braintree Scientific,Inc.(MA,USA)。

[0527] 纳米粒子内化研究

[0528] 使用流式细胞术和共聚焦显微镜确认纳米粒子内化。对于流式细胞术分析,将2×10^6个HLMVEC细胞铺于12孔板中并使其粘附过夜。然后将板吸出,并向每个孔中加入1mL新鲜培养基。向每个孔中加入30μg Alexa Fluor 647标记的纳米粒子,并使其在孵育器中在37℃下孵育20分钟或6小时。在规定的时间点之后,将孔中的培养基完全吸出并用PBS洗涤3次,使用细胞刮板轻轻地刮取细胞。通过共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO ready)对这些细胞进行分析。

[0529] 搭载的红细胞的表征和生物相容性

[0530] 使用荧光测量测定搭载效率和负载在红细胞上的纳米粒子。对于使用荧光进行量化,使用去离子水裂解25μL红细胞,使用荧光在酶标仪(Tecan Safire2®,瑞士)上对纳米粒子含量进行量化。使用扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,德国)确认纳米粒子与红细胞的附着。简而言之,使用2.5%戊二醛溶液将搭载的红细胞固定,并在增加的乙醇梯度中洗涤,然后使用六甲基二硅氮烷(HMDS)进行化学干燥。最后,在成像之前,对样品进行溅射涂覆(EMT 150T ES金属溅射涂布机,PA USA)。

[0531] 对于生物相容性研究，如前所述进行渗透脆性和凝集测定[1]。

[0532] 体外剪切研究

[0533] 通过Alexa Fluor 647-OVA对纳米粒子进行标记并用于剪切研究。对于低剪切研究，在37℃、12rpm下的管旋转器上，将搭载的小鼠红细胞孵育在1mL FBS中。孵育20分钟后，通过以250g离心5分钟，将细胞沉淀并以10％v/v重悬于1X PBS中。然后使用去离子水裂解25μL的红细胞，并且在酶标仪(Tecan Safire2®，瑞士)上使用荧光对剩余的药物含量进行量化。

[0534] 对于高剪切研究，将搭载的小鼠红细胞在10mL FBS中孵育。使用圆柱形couette粘度计(1mm间隙，AR-G2流变仪，TA仪器)向血清中的红细胞施加旋转剪切(6Pa)20分钟。在施加剪切期间，使用水夹套将样品保持在37℃。这些条件模拟了高剪切生理环境。20分钟后，通过以250g离心10分钟将细胞沉积，并以10％v/v重悬于1X PBS中。然后使用去离子水使25μL红细胞裂解，并在酶标仪(Tecan Safire2®，瑞士)上使用荧光对剩余的纳米粒子含量进行量化，并使用扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP，Zeiss FESEM Ultra 55，德国)进行确认。

[0535] 肺内的纳米粒子分布

[0536] 对于患病肺内的纳米粒子分布，将1×10^6个4T1-Luc细胞原位注射到雌性Balb/c小鼠的左乳腺脂肪垫中。接种后19天，通过外科手术将肿瘤切除。肿瘤切除后28天，向小鼠注射Alexa Fluor 647标记的具有抗ICAM-1的纳米粒子、以及红细胞搭载的具有抗ICAM-1的荧光纳米粒子。注射后20分钟，将小鼠安乐死，并收集完整的肺。将肺用冷的1X PBS洗涤两次，然后固定在4％多聚甲醛溶液中过夜。然后将固定的肺冷冻在Tissue Tek OCT化合物(Sakura Finetek，CA，USA)中，并使用低温恒温器(Leica CM1950，德国)进行切片。使用Fluroshield®安装切片组织，以用于DAPI染色(Ex/Em 340/488nm)，并使用共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO ready，德国)进行分析。

[0537] 健康小鼠内的生物分布研究

[0538] 对于不同PLGA的生物分布研究，使用健康的雌性Balb/c小鼠。将包封Alexa Fluor 750-OVA的NP和搭载的NP(对于所有组，n＝3)经静脉内注射到尾静脉中。注射后20分钟将小鼠处死，并收集器官(肝脏、肺、脾脏、肾脏、心脏、脑和血液)以进行进一步加工。对于综合生物分布，将包封Alexa Fluor 750-OVA的NP、搭载的NP、包封Alexa Fluor 750-OVA的具有抗ICAM-1的NP和搭载的具有抗ICAM-1的NP(对于游离NP，n＝3，对于搭载的NP，n＝6)经静脉注射到尾静脉中。在注射后20min、2h、6h和24h，将小鼠处死，收获器官(肝脏、肺、脾脏、肾脏、心脏、脑和血液)以进行进一步加工。对于加工，向每个器官中加入1mL冷的RIPA裂解缓冲液(1X)，使用高剪切均化器(IKAT-10Basic®Ultra turrax，德国)将器官均质化，在酶标仪(Tecan Satire2®，瑞士)上通过荧光测量对纳米粒子含量进行量化。

[0539] 在乳腺癌自发性肺转移瘤模型中的晚期功效

[0540] 对于晚期功效，通过向雌性Balb/C小鼠的左乳腺脂肪垫中原位注射1×10^6个4T1-Luc，建立自发性肺转移瘤模型。接种后32天，通过外科手术切除肿瘤。在外科手术后一周开始给予治疗。每两天给予四次注射。

[0541] 在最后一次注射后两天(第50天)，将小鼠安乐死，气管内注射印度墨水溶液，将肺切除，并如前所述使用Feket溶液将肺固定。[2]将固定的肺用于表面结节计数。

[0542] 表4.四个PLGA候选物的性质

[0543]

	PLGA-a	PLGA-b	PLGA-c	PLGA-d
L:G比例*	50:50	50:50	85:15	65:35
末端基团	酯末端	酸末端	酯末端	酸末端

[0544] *聚合物中乳酸与羟基乙酸的摩尔比

[0545] 参考文献

[0546] 1.Grivennikov,S.I.,Greten,F.R.&Karin,M.Immunity,Inflammation,and Cancer.Cell 140,883-899(2010).

[0547] 2.Ha,D.et al.Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4antibody.Proc Natl Acad Sci USA116,609-618(2019).

[0548] 3.Hubbell,J.A.,Thomas,S.N.&Swartz,M.A.Materials engineering for immunomodulation.Noture 462,449-460(2009).

[0549] 4.Wing,J.B.,Tanaka,A.&Sakaguchi,S.Human FOXP3(+)Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer.Immunity 50,302-316(2019).

[0550] 5.Tanoue,T.ct al.A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity.Nature 565,600-605(2019).

[0551] 6.Singhal,S.et al.Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer.Sci Transl Med 11(2019).

[0552] 7.O′Brien,K.L.&Finlay,D.K.Immunometabolism and natural killer cell responses.Nat Rev Immunol 19,282-290(2019).

[0553] 8.Li,Q.&Verma,I.M.NF-kappaB regulation in the immune system.Nat Rev Immunol 2,725-734(2002).

[0554] 9.Zou,W.Regulatory T cells,tumour immunity and immunotherapy.Nat Rev,Immunol 6,295-307(2006).

[0555] 10.Libby,P.&Lichtman,A.I.Modulating Adaptive Immunity in Vascular Disease:CD4 to the Fore.J Am Coll Cardiol 73,1824-1826(2019).

[0556] 11.Restifo,N.P.,Dudley,M.E.&Rosenberg,S.A.Adoptive immunotherapy for cancer:harnessing the T cell response.Nat RevImmunol 12,269-281(2012).

[0557] 12.Carbo,A.et al.Systems modeling of molecular mechanisms controlling cytokinc-driven CD4+T cell differentiation and phenotype plasticity.PLoS Comput Biol 9,e1003027(2013).

[0558] 13.Salabarria,A.C.et al.Local VEGF-A blockade modulates the microenvironment of the corneal graft bed.Am J Transplant(2019).

[0559] 14.Tan,R.P.et al.Bioactive Materials Facilitating Targeted Local Modulation of Inflammation.JACC Basic Transl Sci 4,56-71(2019).

[0560] 15.Dellacherie,M.O.,Seo,B.R.&Mooney,D.J.Macroscale biomaterials

strategies for local immunomodulation.Nature Reviews Materials(2019).

[0561] 16.Zhao,Z.M.,Ukidve,A.,Dasgupta,A.&Mitragotri,S.Transdermal immunomodulation:Principles,advances and perspectives.Adv Drug Deliver Rev 127,3-19(2018).

[0562] 17.Zhao,Z.,Ukidve,A.,Krishnan,V.&Mitragotri,S.Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers.Adv Drug Deliv Rev(2019).

[0563] 18.Blanco,E.,Shen,H.&Ferrari,M.Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery.Nat Biotechnol33,941-951 (2015).

[0564] 19.Pardoll,D.M.The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.Nat Rev Cancer 12,252-264(2012).

[0565] 20.Rosenberg,S.A.Decade in review-cancer immunotherapy:entering the mainstream of cancer treatment.Nat RevClin Oncol 11,630-632(2014).

[0566] 21.Qian,Y.et al.Molecular-Targeted Immunotherapeutic Strategy for Melanoma via Dual-Targeting Nanoparticles Delivering Small Interfering RNA to Tumor-Associated Macrophages.Acs Nano 11,9536-9549(2017).

[0567] 22.Riley,R.S.,June,C.H.,Langer,R.&Mitchell,M.J.Delivery technologies for cancer immunotherapy,Nat Rev Drug Discov 18,175-196(2019).

[0568] 23.Yang,W.et al.In Situ Dendritic Cell Vaccine for Effective Cancer Immunotherapy.Acs Nano 13,3083-3094(2019).

[0569] 24.Chen,D.S.&Mellman,I.Oncology meets immunology:the cancer-immunity cycle.Immunity 39,1-10(2013).

[0570] 25.Nagarsheth,N.,Wicha,M.S.&Zou,W.P.Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy.Nat RevImmunol 17,559-572(2017).

[0571] 26.Homey,B.,Muller,A.&Zlotnik,A.Chemokines:agents for the immunotherapy of cancer?Nat Rev Immunol 2,175-184(2002).

[0572] 27.Makadia,H.K.&Siegel,S.J.Poly Lactic-co-Glycolic Acid(PLGA)as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.Polymers-Basel 3,1377-1397 (2011).

[0573] 28.Muro,S.et al.Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers.Mol Ther 16,1450-1458(2008).

[0574] 29.Scherpereel,A.et al.Cell-selective intracellular delivery of a foreign enzymeto endothelium in vivousing vascular immunotargeting.Faseb J 15,416-426(2001).

[0575] 30.Guo,P.et al.1CAM-1as a molecular target for triple negative breast cancer.P Natl Acad Sci USA 111,14710-14715(2014).

[0576] 31.Lee,S.J.,Park,S.Y.,Jung,M.Y.,Bae,SM.&Kim,IS.Mechanism for phosphatidylserine-dependent erythrophagocytosis in mouse liver.Blood 117,5215-5223(2011).

[0577] 32.Oldenborg,P.A.et al.Role of CD47 as a marker of self on red blood cells.Science 288,2051-+(2000).

[0578] 33.Brenner,J.S.et al.Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude.Nat Commun 9(2018).

[0579] 34.Pan,D.C.et al.Nanoparticle Properties Modulate Their Attachment and Effect on Carier Red Blood Cells.Sci Rep-Uk 8(2018).

[0580] 35.Anselmo,A.C.et al.Delivering Nanoparticles to Lungs while Avoiding Liver and Spleen through Adsorption on Red Blood Cells.Acs Nano 7,11129-11137(2013).

[0581] 36.Clancy-Thompson,E.et al.Melanoma Induces,and Adenosine Suppresses,CXCR3-Cognate Chemokine Production and T-cell Infiltration of Lungs Bearing Metastatic-like Disease.Cancer lmmunol Res 3,956-967(2015).

[0582] 37.Binnewies,M.ct al.Understanding the tumor immune microenvironmcnt(TIME)for effective therapy.Nat Med 24.541-550(2018).

[0583] 38.Wang,H.&Mooney,D.J.Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment.Nat Mater 17,761-772(2018).

[0584] 39.Tokunaga,R.et al.CXCL9,CXCL10,CXCL11/CXCR3 axis for immune activation-A target for novel cancer therapy.Cancer Treat Rev 63.40-47(2018).

[0585] 40.Hu,J.M.et al.CXCL9,CXCL10 and IFN gamma favor the accumulation of infused T cells in tumors following IL-12 plus doxorubicin treatment.J Immunol 196(2016).

[0586] 41.Pfirschke,C.,Siwicki,M.,Liao,H.W.&Pittet,M.J.Tumor Microenvironment:No Effector T Cells without Dendritic Cells.Cancer Cell 31,614-615(2017).

[0587] 42.Zhu,J.F.&Paul,W.E.CD4 T cells:fates,functions,and faults.Blood 112,1557-1569(2008).43.Quail,D.F.&Joyce,J.A.Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.Nat Med 19,1423-1437(2013).

[0588] 44.Palucka,K.&Banchereau.J.Cancer immunotherapy via dendritic cells.Nat Rev Cancer 12,265-277(2012).

[0589] 补充信息的参考文献

[0590] 1.Pan,D.et al.The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells.PLoS One 11,e0152074(2016).

[0591] 2.Miretti,S.et al.A Mouse Model of Pulmonary Metastasis from Spontaneous Ostcosarcoma Monitored In Vivo by Luciferase Imaging.Plos One 3(2008).

[0592] 实施例4:肺转移瘤-驱动的癌症免疫疗法用于局部和全身性的肿瘤抑制

[0593] 由于免疫抑制性微环境和内在免疫的不可接近性,难以在其主要部位引发对肿瘤的免疫应答。转移瘤、尤其是肺中的转移瘤使癌细胞暴露,并为免疫打开了独特的机会。本文描述的是红细胞锚定的全身性免疫疗法平台,该平台利用(leverage)转移瘤,将生理逆境(physiological adversity)转化为了局部和全身性肿瘤抑制的独特治疗机会。简而言之,趋化因子纳米粒子被锚定在红细胞上,这使其能够主要在肺中的转移性癌细胞附近沉积,同时使全身性积累最小化,这引起了效应免疫细胞的显著浸润,并引起原位免疫,而无需任何特定的抗原。基于自发性乳腺癌肺转移瘤模型的体内结果显示,这种策略显著抑制了局部肺转移瘤的进展,并显著延长了动物存活。此外,通过这种策略的原位免疫引发了全身性免疫,显著抑制了再激发的远处肿瘤(distant tumor)的生长。这些发现表明,肺转移瘤为癌症疫苗接种打开了有效的机会,红细胞锚定的全身性免疫疗法是利用这个机会治疗各种癌症的有效策略。

[0594] 癌症免疫疗法诱导了治疗癌症的方法中的范式转变。在最近几十年中探索了各种免疫治疗方法,其中,免疫检查点抑制剂和适应性T细胞疗法最近取得了显著的临床成功。1-7特别是,癌症免疫疗法在改善患者的整体和无进展存活方面显示出了显著的影响,这些患者被认为是通过常规干预措施(例如化学疗法)在医学上是无法治愈的。2、8癌症免疫疗法的优点之一是使身体自身的免疫系统参与对抗缺陷细胞,从而有诱导免疫记忆并防止复发的潜力。9、10尽管癌症免疫疗法具有这些突出潜力,但在其主要部位提高对肿瘤的免疫应答仍然是一个挑战。这主要归因于肿瘤的大尺寸减少了肿瘤细胞的暴露,以及肿瘤的免疫抑制性环境抑制了抗肿瘤免疫的诱导。11-13

[0595] 在许多患者中,当癌症被诊断出来时,肿瘤细胞已经转移到了继发器官。14、15由于其独特的生理特征,肺是转移瘤的主要位点,来自不同原发性肿瘤来源的细胞最终定植于肺中并不可控制地生长。16由于其侵略性的性质,转移瘤通常比原发性肿瘤更难以管控,目前尚无独立的疗法。17、18转移性位点处的有效免疫应答的诱导也受到免疫抑制性微环境的快速发展的阻碍。特别是,转移性位点处的趋化因子面貌经历内源性变化,限制了效应免疫细胞的归巢,从而阻断了免疫应答。19-21然而,即使其微环境快速变化,转移瘤(特别是早期转移瘤)通常会使癌细胞暴露于高度灌注和免疫活性的器官(例如肺)。这为利用转移瘤这种独特生理学引发积极的抗癌免疫应答开辟了机会。

[0596] 此处,我们使用红细胞介导的肺靶向,在肺中利用暴露的癌细胞。22、23具体地,我们递送了前所未有数量的免疫活性纳米粒子,使其与肺中的转移性癌细胞进行共定位,我们将这种方法称为红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASI,在本文中也互换地称为“EH-免疫诱饵”),其控制转移瘤的进展,并为全身性肿瘤抑制产生原位适应性应答。我们对能够吸引效应免疫细胞的免疫诱饵(封装有趋化因子(CXCL10)的纳米粒子)进行工程化,并将它们锚定到红细胞表面上。通过将它们与载体红细胞的相互作用工程化,免疫诱饵特异性地从红细胞表面脱落并积累在肺的转移性位点中。免疫诱饵的位点特异性积累恢复了局部趋化因子梯度,并吸引效应免疫细胞引发局部细胞毒性免疫应答,其转而诱导了全身性免疫。我们的基于自发性乳腺癌肺转移瘤模型的体内结果显示,EASI使得转移性肿瘤负荷降低并改善了存活。此外,转移性肺的原位免疫引起了全身性免疫,其在肿瘤再激发后抑制了远处肿瘤生长。这些发现突出了EASI将转移瘤的生物逆境转化为抗转移性癌症的独特治疗机会的能力。

[0597] 对用于最佳靶向的纳米粒子材料性质的工程化

[0598] 纳米粒子在红细胞上的锚定是非共价结合过程,其需要有效的表面接触和红细胞膜扩散,并且该过程通过红细胞膜和纳米粒子之间的非共价相互作用(包括静电相互作用、疏水相互作用和氢键结合)来介导(图34A-图34E)。基于这种理解,我们进行了一组实验对聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(PLGA)纳米粒子的组成(乳酸与羟基乙酸的比例,L:G比例)和表面化学(酸或酯末端)[24]进行工程化,以实现最佳器官靶向。为此,选择四种不同的PLGA聚合物(表5)以制备纳米粒子。通常,高L:G比例导致更高的疏水性。酸末端(而非酯末端)使得能够与细胞膜形成氢键。虽然不同的PLGA纳米粒子均可锚定到红细胞上(图19),但具有高L:G比例和酸末端(PLGA-d)的PLGA纳米粒子具有高疏水性和形成氢键的能力,表现出与红细胞的最高的结合效率(图14A)。生物相容性测定(图14B和图20A-图20C)表明,与其它设计相比,PLGA-d对载体红细胞引起了相对最小的损伤。有趣的是,体外剪切研究实验表明,具有较高L:G比例的酸末端的聚合物在对应于肺毛细血管中的高剪切应力(6Pa)下导致较高百分比的纳米粒子脱离,25-27并且在对应于静脉中的较低剪切应力下导致较低的提早脱离25、26(图14C、图35)。在所有PLGA候选物中,PLGA-d在高剪切应力下显示出最大的脱离。此外,体内生物分布数据(图22A)揭示了,搭载在红细胞上的不同PLGA纳米粒子的器官特异性靶向与体外剪切数据相关。根据它们与红细胞的结合强度,搭载在红细胞上的不同PLGA纳米粒子被靶向于特定器官。总体而言,其上锚定有PLGA-d的红细胞表现出最佳的肺靶向能力(图14D和图14E)。考虑到高结合效率、对载体红细胞的最小损伤以及对肺的优异靶向,PLGA-d(65:35L:G比例,酸末端)被确立为先导候选物,并用于本实施例中的所有后期研究。

[0599] 在红细胞搭载系统的体内追踪(图36A-图36F)表明,锚定的纳米粒子在5分钟内从载体红细胞迅速脱离并主要在肺沉积,而载体红细胞仍然保留在循环中至少24小时。搭载的纳米粒子的肺沉积基于:1)当红细胞流经狭窄的毛细血管时,在机械挤压红细胞过程中,机械诱导的纳米粒子向内皮的转移;以及2)在狭窄的肺毛细血管中被剪切下来的纳米粒子的剪切诱导的脱离。高毛细血管密度的存在和作为静脉内给予后第一个通过的器官,共同使肺成为粒子沉积的主要位点。23、28一旦粒子从红细胞解吸,必须在纳米粒子和内皮之间迅速实现强有力的相互作用,以确保延长的粒子保留。已报道,ICAM-1在肺内皮(特别是在患病肺中)29-31和某些癌症(例如三阴性乳腺癌)中过表达。31、32基于此,我们探索了抗ICAM-1抗体的附着(数据未示出)是否可以增强脱离的纳米粒子和肺内皮之间的相互作用。aICAM-1抗体有效地附着至游离纳米粒子和搭载的纳米粒子上。同时,aICAM-1与游离纳米粒子和搭载的纳米粒子的附着效率分别为15.4±6.7μg抗体/mg纳米粒子和6.5±3.4μg抗体/mg纳米粒子。在剪切下,抗ICAM-1抗体的附着并未显著影响纳米粒子从红细胞的体外脱离(图37)。在2-D细胞培养研究中,共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)成像数据(图14F)表明,抗ICAM-1抗体与PLGA纳米粒子的附着使得它们与肺内皮细胞的相互作用增强。另外,时间进程生物分布数据(图22B和图14G-图14H)揭示了,抗ICAM-1抗体与搭载在红细胞上的纳米粒子的附着显著延长了它们在肺中的保留,使保留时间从20分钟增加到至少6小时。

[0600] 锚定在红细胞上的免疫诱饵

[0601] 使用复乳法制备免疫诱饵粒子,其负载量为1.88μg/mg趋化因子,包封率为75%。单分散的、球形免疫诱饵纳米粒子的平均直径为187.3nm,Zeta电位为-24.5mV(图14I-图14K)。趋化因子从免疫诱饵的释放表现为突释后的持续释放模式(图14L)。释放的趋化因子

保持了良好的结构完整性，显示了与天然趋化因子相似的分子量和次级结构模式(图38A-图38B)。为了测试免疫诱饵是否能够有效地锚定至红细胞，我们用荧光探针Alexa Fluor 647对趋化因子进行标记。CLSM数据(图14M)表明了免疫诱饵在小鼠红细胞上的有效锚定。通过提高免疫诱饵与小鼠红细胞的进给比，>90％的小鼠红细胞携带免疫诱饵(图23A-图23C和图14N)。扫描电子显微镜(SEM)成像数据证实了免疫诱饵在小鼠红细胞上的有效锚定(图14O)。除了CXCL10，携带另一种趋化因子(GM-CSF)、细胞因子(IL-2、IL-12和IL-15)或免疫检查点抑制剂(抗PD-1抗体)的免疫诱饵也有效地锚定到了小鼠红细胞上(图24)。此外，免疫诱饵还可以锚定在人红细胞上，但是结合效率较低(图25A-图25B)。

[0602] 接下来，我们进行了一组测定，以检测免疫诱饵体的锚定对载体红细胞引起的任何不利影响。在所有测试比例下，免疫诱饵的搭载并未在载体红细胞上引起表面磷脂酰丝氨酸(红细胞衰老和损伤的标志物33、34)的明显过表达(图14P)。另外，来自凝集测定28(图14Q)和渗透脆性测定35(图26和图14R)的数据揭示了，免疫诱饵的锚定对载体红细胞的凝集和渗透应力敏感性带来了最小的变化。这些生物相容性研究表明，免疫诱饵在红细胞上的锚定对载体红细胞引起了最小的损伤。

[0603] 使用EASI将免疫诱饵靶向递送至转移性位点使得局部趋化因子梯度恢复

[0604] 体外剪切研究数据(图39A-图39B)揭示了，免疫诱饵从红细胞的脱离是剪切依赖性的，并且在肺中预期的剪切应力(6Pa)下，>60％的纳米粒子在3分钟内从载体红细胞释放23、25-27。接下来，我们在早期乳腺癌自发性肺转移瘤模型中进行了生物分布研究。如图16C-图16E所示，通过在红细胞上搭载免疫诱饵，肝脏中积累的纳米粒子的数量降低，这与先前的报告一致。23、28相对于它们的游离对应物，显著更多的免疫诱饵被递送至含有转移瘤的肺。包含抗ICAM-1抗体允许免疫诱饵锚定到红细胞上，其在患病肺的积累比单独的粒子高约27倍，在静脉内给予后20分钟进行评估。此外，含有抗ICAM-1抗体的免疫诱饵在肺中保留至少6小时。如图16D所示，免疫诱饵向转移性肺的增强递送产生了令人印象深刻的108的高肺血比，为有效载荷梯度的建立形成了基础。进一步的生物分布研究表明，即使在晚期病理条件下的晚期模型(图16F)中，免疫诱饵也能够以相似的效率在转移瘤的各个阶段在转移性肺中沉积(图40A-图40B)，表明肿瘤生理学的变化以最低的程度影响免疫诱饵的沉积。此外，吞噬细胞的耗竭不会降低免疫诱饵在转移性肺中的沉积(图41A-图41B)，表明免疫诱饵并不主要被肺吞噬细胞摄取。

[0605] 然后，我们对肺切片进行分析，以研究免疫诱饵在转移性肺中的分布。如图16G和图16O所示，EASI能够将大量免疫诱饵递送至这些难以到达的转移性位点。特别地，大多数免疫诱饵被分布在转移性结节周围，而有些还深入了转移性结节中。

[0606] 接下来，我们进行了时间进程研究，以监测乳腺癌自发性肺转移瘤模型中的CXCL10趋化因子梯度(图16H)。如图27A-图27B和图16I所示，肺到血液的固有CXCL10趋化因子梯度随着肺转移瘤的进展而显著降低，表明转移性肺中免疫抑制性微环境的发展。为了测试EASI是否可以引起免疫恢复，我们进行了趋化因子梯度测定(图16J)。如图16P-图16R所示，EASI引起趋化因子梯度的长期恢复。具有抗ICAM-1抗体的游离免疫诱饵不能够向肺递送足够的趋化因子，未能建立强的趋化因子梯度。使用了递送高5倍剂量的游离趋化因子的激发性比较对照。5倍游离趋化因子制剂凭借高生物利用度向血液和肺递送高含量的趋化因子，并在给予后20分钟产生了弱的趋化因子梯度。但是，这种梯度无法保持。在鲜明的

对比下,EASI能够向肺递送高浓度的CXCL10趋化因子,并且可以使强的趋化因子梯度保持长达72小时。与免疫诱饵的保留时间相比,趋化因子梯度的更长的持续时间可能源于如下的可能性:免疫恢复在肿瘤微环境中引起CXCL10的内源性表达。此外,趋化因子梯度测定表明,除了CXCL10,EASI还可以恢复其它趋化因子(例如RANTES)的梯度(图42A-图42C)。

[0607] EASI引起局部效应细胞浸润,其显著抑制转移瘤的进展并改善存活

[0608] 为了对通过转移性位点处的趋化因子梯度的恢复所引发的原位免疫应答进行评估,我们进行了研究,以对不同治疗后的转移性肺中的免疫细胞进行分析(图18A)。CXCL10是特定类别的免疫细胞(包括Th1 CD4、效应CD8和NK细胞,所有这些都有助于抗肿瘤应答)的强的化学引诱物。11、36-38如图43A所示,与对照(生理盐水)相比,EASI使得总CD4细胞增加1.4倍。此外,与生理盐水组相比,在EASI治疗的转移性肺中,我们观察到显著更多(增加2.2倍)的IFN-γ+Th1 CD4细胞(图18B-图18B)。在不同治疗组中,转移性肺中总的CD8 T细胞无显著性差异(图43B)。然而,与其它组相比,EASI显著增强了IFN-γ+CD8细胞(增加1.8-2.0倍)和颗粒酶B+CD8细胞(增加1.6-2.2倍)的浸润(图18D-图18G)。除了适应性免疫细胞外,我们还观察到,EASI显著地改变了先天免疫细胞(NK细胞)的浸润。与对照和其它治疗组相比,EASI实现了1.4-1.8倍的更高NK细胞浸润。上述免疫细胞分析数据明确表明,通过EASI实现的免疫恢复显著增强了效应免疫细胞向转移性肺中的浸润。具体而言,Th1 CD4细胞分泌1型细胞因子(如IFN-γ和TNF-α),维持了促炎环境,这有利于肿瘤的免疫控制。39、40效应CD8细胞和NK细胞是驱动癌细胞的直接细胞毒性杀伤的主要贡献者。41、42进一步地,其它器官中的免疫分析(图44A-图44B)表明,与肺中的相比,在包括肝脏和脾脏的其它器官中,所测试的免疫细胞受EASI的影响较小。此外,免疫细胞的改善的浸润显著调节了转移性肺中的细胞因子谱。EASI组中的炎性细胞因子水平通常高于对照和其它治疗组中的水平(图32)。特别地,与对照和其它治疗相比,EASI使得IFN-γ和TNF-α的浓度显著更高(图18L、图18M)。更有趣的是,EASI组中的CXCL10趋化因子的浓度也比其它组显著更高,进一步证实了成功的免疫恢复。

[0609] 肺转移性位点处的免疫恢复可以将局部微环境调节至“热”状态,其有利于细胞毒性免疫应答并且具有控制肺转移瘤的进展的潜力。20、43、44为了测试这一假设,我们在乳腺癌自发性肺转移瘤模型中对EASI控制肺转移瘤的功效进行了评估(图17A)。如生物发光成像数据(图17B)所表明的,与其它组相比,EASI组表现出显著更慢的肺转移瘤进展。最后一次给药后两天,将小鼠安乐死,并对切除的肺上的表面结节进行计数。如图17C所示,在抑制肺转移瘤的进展方面,与5倍游离趋化因子和游离免疫诱饵组相比,EASI分别表现出3.5倍和6.0倍的更好功效。此外,EASI组中的八只小鼠中的两只在第37天具有少于2个的可见结节。在单独设置的实验(图17I)中,更高剂量的游离免疫诱饵(10X)不会产生任何抗转移性效果。同时,当CXCL10被抗CXCL10抗体中和时,发现EASI失去其抗转移性功效(图17I)。切除的肺的定性图像证实了EASI比其它治疗的功效更高(图17E、图28和图45A)。此外,与其它治疗组的肺重量相比,EASI治疗的小鼠的肺重量更接近健康小鼠的肺重量(图17F)。另外,体重数据(图17G和图45B)和小鼠器官的H&E染色数据(图29)表明,没有与任何治疗有关的明显毒性,包括更高剂量的游离趋化因子(5X)和游离免疫诱饵(10X)。接下来,我们进行了存活研究,其中,小鼠根据图17A所示的相同的时间表接受治疗。与对照和其它治疗组相比,通过EASI的治疗显著改善了动物存活,将中位存活时间延长了几乎3倍(图17J)。此外,EASI

组的十六只小鼠中的三只在整个研究中存活下来。接下来，在晚期乳腺癌自发性肺转移瘤模型中，我们研究了EASI抑制晚期肺转移瘤的功效(图30A)。如图30B-图30C所示，与单独的游离免疫诱饵相比，EASI产生显著降低的肺转移瘤负荷，表明EASI在晚期转移模型中也显示出功效。

[0610] EASI诱导的原位免疫引起了全身性免疫和远处肿瘤抑制

[0611] EASI引起了效应免疫细胞的增强的浸润，所述效应免疫细胞与肺(其为免疫活性器官)中暴露的转移性细胞共定位。这打开了利用暴露的癌细胞来诱导原位免疫的机会，这可以产生全身性抗肿瘤免疫。为了测试这一假设，在EASI治疗后，我们首先将淋巴细胞与转移性肺进行分离(图33A)，并将它们与4T1细胞共培养。如图33B所示，与来自生理盐水组的那些相比，从EASI组中分离的淋巴细胞引起了显著更高的肿瘤细胞杀伤。接下来，我们测定了转移性肺中的抗原呈递细胞(APC)面貌。如图46A-图46B所示，EASI使得显著更多的树突细胞(CD45+CD11c+)浸润到转移性肺中，这些细胞处于更活化的状态。特别地，与生理盐水组相比，在EASI治疗后，存在2.6倍的更活化的树突细胞(CD45+CD11c+CD86+)(图33C-图33D)。这些数据表明EASI能够实现原位抗原呈递和APC活化。树突细胞的增强的浸润可能是由NK细胞的浸润改善引起的，因为累计的文献证据表明NK细胞刺激树突细胞向肿瘤微环境的募集。45-48此外，由增强的肿瘤细胞杀伤引起的暴露的肿瘤抗原也可能引起APC活化。接下来，我们测试了全身性免疫是否是由原位免疫产生的。如图33E-图33F所示，与对照相比，在EASI治疗的小鼠的血液中存在3.1倍的更多的CD8细胞。此外，与对照(生理盐水)组相比，EASI使得血液中的IFN-γ+CD8细胞增加2.93倍，颗粒酶B+CD8细胞增加2.7倍(图33G-图33J)。这些血液免疫分析数据揭示了，EASI诱导全身性免疫应答并产生更多的CD8和效应CD8细胞。此外，我们进行了肿瘤再激发研究，以测试通过EASI的原位免疫产生的全身性免疫是否能够引起远处肿瘤的抑制(图33K)。在疗法的最后一次给药后两天，将远处肿瘤接种在小鼠的右翼(right flank)。除了“EASI”组，两个对照组“健康”(未接受先前的肿瘤接种的年龄匹配的小鼠)和“对照-生理盐水”(接受生理盐水作为治疗的小鼠)也包括在该研究中。如图33L-图33N所示，与健康和对照-生理盐水组相比，EASI显著抑制了再接种的远处肿瘤的生长。研究结束时提取的肿瘤的重量数据(图33I)和定性图像(图33P)证实了EASI具有更好功效。肿瘤再激发研究中的所有数据都证明，转移性肺中的集中局部免疫恢复可以诱导原位免疫，其产生全身性免疫以抑制全身性肿瘤发展。

[0612] 讨论

[0613] 由于大尺寸和免疫抑制性环境，在它们的自然部位提高对肿瘤的免疫应答是困难的。与原发性肿瘤不同，转移瘤使癌细胞暴露于免疫活性器官(例如肺)中，从而为免疫打开了机会。然而，这是难以实施的，是因为转移性位点迅速经历内源性变化来获得免疫抑制性状态。在这项工作中，通过利用肺中的暴露，我们已经开发了红细胞锚定的全身性免疫疗法(EASI)，该疗法允许在免疫活性器官肺中使大量免疫活化剂与暴露的癌细胞进行共定位，以诱导原位免疫用于局部的和全身性的癌症抑制。

[0614] EASI建立在先前确立的红细胞介导的肺靶向的概念上。22、23然而，与集中于通过肺靶向来缓和局部病症的先前报道不同，EASI证明了由肺中的免疫相互作用介导的全身性结果。具体地，EASI利用肺中癌细胞的暴露来实现原位免疫，从而产生全身性应答。与涉及共价或特异性结合的其它精简(elegantly)报道的细胞递送系统(例如细胞“背包”49-51和

ERY1-结合的红细胞52、53)相比,EASI由经由非共价自发相互作用锚定到红细胞上的免疫诱饵(趋化因子纳米粒子)组成。这种设计允许EASI使免疫诱饵特异性脱落并沉积在肺毛细管内皮上,其中由于其狭窄的尺寸和内源性生理变化,循环肿瘤细胞更倾向于在转移期间驻留。此外,抗ICAM-1抗体与免疫诱饵的附着促进了其与癌细胞的共定位,因为ICAM-1在肺内皮(在转移期间)54和某些类型的癌细胞(如三阴性乳腺癌)上过表达。31

[0615] 我们证明了EASI实现的免疫诱饵与局部转移环境的共定位可以特异性地使肺转移性位点处的趋化因子梯度恢复。这种局部免疫微环境调节使得免疫级联得到活化,引起了效应免疫细胞浸润的显著增强,随后推动了抑制肺转移瘤进展和改善动物存活的强的治疗功效。此外,转移性位点处的癌细胞的细胞毒性免疫杀伤引起了原位抗原呈递细胞的活化,随后诱导全身性CD8和效应CD8细胞的生成增加,这些细胞能够抵抗远处肿瘤的发展。这些数据表明,EASI将癌细胞在转移期间的暴露转化为原位免疫的治疗机会。ESAI为晚期癌症阶段提供了潜在的治疗方法。特别地,由原位免疫引发的全身性抗癌免疫应答可以预防肿瘤复发或转移到其它器官(这往往发生在晚期癌症阶段的患者中)。先前的研究表明,改变注射位点,红细胞搭载可以将纳米粒子靶向至紧靠注射血管下游的器官。28考虑到这一点,可以施用EASI,以在除肺之外的其它器官在转移瘤处诱导原位免疫。

[0616] 参考文献

[0617] 1.Restifo,N.P.,Dudley,M.E.&Rosenberg,S.A.Adoptive immunotherapy for cancer:hamessing the T cell response.Nat Rev Immunol 12,269-281(2012).

[0618] 2.Pardoll,D.M.The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.Nat Rev Cancer 12,252-264(2012).

[0619] 3.Rosenberg,S.A.Decade in review-cancer immunotherapy:entering the mainstream of cancer treatment.Nat Rev Clin Oncol 11,630-632(2014).

[0620] 4.Qian,Y.et al.Molecular-Targeted Immunotherapeutic Strategy for Melanoma via Dual-Targeting Nanoparticles Delivering Small Interfering RNA to Tumor-Associated Macrophages.Acs Nano 11,9536-9549(2017).

[0621] 5.Riley,R.S.,June.C.H,Langer,R.&Mitchell.M.J.Delivery technologies for cancer immunotherapy,Nat Rev Drug Discov 18.175-196(2019).

[0622] 6.Shah,N.J.et al.A biomaterial-based vaccine eliciting durable tumour-specific responses against acute myeloid leukaemia.Nat Biomed Eng 4,40-51(2020).

[0623] 7.Neelapu,S.S.et al.Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma N Engl J Med 377,2531-2544(2017).

[0624] 8.Fesnak,A.D.,June,C.H.&Levine,B.L.Engineered T cells:the promise and challenges of cancer immunotherapy Nat Rev Cancer 16,566-581(2016).

[0625] 9.Sharma,P.,Hu-Lieskovan,S.,Wargo,J.A.&Ribas,A.Primary,Adaptive,and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy.Cell 168,707-723(2017).

[0626] 10.Mellman,I.,Coukos,G.&Dranoff,G.Cancer immunotherapy comes of age.Nature 480,480-489(2011).

[0627] 11.Nagarsheth,N.,Wicha,M.S.&Zou,W.P.Chemokines in the cancer

microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy.Nat Rev Immunol 17,559-572(2017).

[0628] 12.Vijayan,D.,Young,A.,Teng,M W.L.&Smyth,M.J.Targeting immunosuppressive adenosine in cancer.Nat Rev Cancer 17,765(2017).

[0629] 13.Chauhan,V.P.et al.Reprogramming the microenvironment with tumor-selective angiotensin blockers enhances cancer immunotherapy.Proc Natl Acad Sci U S A 116,10674-10680(2019).

[0630] 14.Gupta,G.P.&Massague,J.Cancer metastasis:building a framework.Cell 127,679-695(2006).

[0631] 15.Schroeder,A.et al.Treating metastatic cancer with nanotechnology.Nat Rev Cancer 12,39-50(2011).

[0632] 16.Institute,N.C.(National Cancer Institute,2019).

[0633] 17.Cardoso,F.et al.Locally recurrent or metastatic breast cancer:ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up.Ann Oncol 21 Suppl5,v15-19(2010).

[0634] 18.Eckhardt,B.L.,Francis,P.A.,Parker,B.S.&Anderson,R.L.Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer.Nat Rev Drug Discov 11,479-497(2012).

[0635] 19.Homey,B.,Muller,A.&Zlotnik,A.Chemokines:agents for the immunotherapy of cancer?Nat Rev Immunol 2,175-184(2002).

[0636] 20.Clancy-Thompson.E.et al.Melanoma Induces,and Adenosine Suppresses, CXCR3-Cognate Chemokine Production and T-cell Infiltration of Lungs Bearing Metastatic-like Disease.Cancer Immunol Res 3,956-967(2015).

[0637] 21.Altorki,N.K.et al.The lung microenvironment:an important regulator of tumnout growth and metastasis.Nat Rev Cancer 19,9-31(2019).

[0638] 22.Zhao,Z.,Ukidve,A.,Gao,Y.,Kim,J.&Mitragotri,S.Erythrocvte leveraged chemotherapy(ELeCt):Nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis.Sci Adv 5,eaax9250(2019).

[0639] 23.Anselmo,A.C.et al.Delivering Nanoparticles to Lungswhile Avoiding Liver and Spleen through Adsorption on Red Blood Cells.Acs Nano 7,11129-11137 (2013).

[0640] 24.Makadia,H.K.&Siegel.S.J.Poly Lactic-co-Glycolic Acid(PLGA)as Biodegradable Controlled Drug Delivery CarrierPolymers-Basel 3,1377-1397 (2011).

[0641] 25.Paszkowiak,J.J.&Dardik,A.Arterial wall shear stress:observations from the bench to the bedside.Vasc Endovascular Surg 37,47-57(2003).

[0642] 26.Chatterjee,S.Endothelial Mechanotransduction,Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways.Front Physiol 9,524(2018).

[0643] 27.Malek,A.M.,Alper,S.L.&Izumo,S.Hemodynamic shear stress and its

role in atherosclerosis.Jama-J Am Med Assoc 282,2035-2042(1999).

[0644] 28.Brenner,J.S.et al.Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude.Nat Commun 9(2018).

[0645] 29.Muro,S.et al.Control of endothelial targeting and intracellulardelivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers.Mol Ther 16,1450-1458(2008).

[0646] 30.Scherpereel.A.et al.Cell-selective intracellular delivery of a foreign enzyme to endothelium in vivo using vascular immunotargeting.Faseb J15.416-426(2001).

[0647] 31.Guo.P.et al.ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer.P Natl Acad Sci USA 111,14710-14715(2014).

[0648] 32.Guo,P.et al.Dual complementary liposomes inhibit triple-negative breast tumor progression and metastasis.Science Advances 5(2019).

[0649] 33.Lee,S.J.,Park,S.Y.,dung,M.Y.,Bae,S.M.&Kim,I.S.Mechanism for phosphatidylserine-dependent erythrophagocytosis in mouse liver.Blood 117, 5215-5223(2011).

[0650] 34.Oldenborg,P.A.et al.Role of CD47 as a marker of self on red blood cells.Science 288,2051-+(2000).

[0651] 35.Pan,D.C.et al.Nanoparticle Properties Modulate Their Attachment and Effect on Carrier Red Blood Cells.Sci Rep-Uk 8(2018).

[0652] 36.Tokunaga,R.et al.CXCL9,CXCL10,CXCL11/CXCR3 axis for immune activation-A target for novel cancer therapy.Cancer Treat Rev 63.40-47(2018).

[0653] 37.Hu,J.M.et al.CXCL9,CXCL 10 and IFN gamma favor the accumulation of infused T cells in tumors following IL-12 plus doxorubicin trcatmcnt.J Immunol 196(2016).

[0654] 38.Pfirschke,C.,Siwicki.M.,Liao,H.W.&Pittet,M.J.Tumor Microenvironment:No Effector T Cellswithout Dendritic Cells.Cancer Cell 31, 614-615(2017).

[0655] 39.Zhu,J.F.&Paul,W.E.CD4 T cells:fates,functions,and faults.Blood 112,1557-1569(2008).

[0656] 40.Griyennikov,S.I.,Greten,F.R.&Karin,M.Immunity,Inflammation,and Cancer.Cell 140,883-899(2010).

[0657] 41.Hsu,J.et al.Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade.J Clin Invest 128,4654-4668(2018).

[0658] 42.Vivier,E.,Ugolini,S.,Blaise,D.,Chabannon,C.&Brossay,L.Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer.Nat Rev Immunol 12, 239-252(2012).

[0659] 43.Binnewies,M.et al.Understanding the tumor immune microenvironment (TIME)for effective therapy.Nat Med 24,541-550(2018).

[0660] 44.Wang,H.&Mooney,D.J.Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment.Nat Mater 17.761-772(2018).

[0661] 45.Bottcher,J.P.et al.NK Cells Stimulate Recruitment of cDCl into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control.Cell 172,1022-+(2018).

[0662] 46.Barry,K.C.et al.A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments.Nat Med 24,1178-1191(2018).

[0663] 47,Harizi,H.Reciprocal crosstalk between dendritic cells and natural killer cells under the effects of PGE2 in immunity and immunopathology.Cell Mol Immunol 10,213-221(2013).

[0664] 48.Nguyen,KB&Spranger,S.Modulation of the immune microenvironment by tumor-intrinsic oncogenic signaling.J Cell Biol 219(2020).

[0665] 49.Schmid,D.et al.T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity.Nat Commun 8(2017).

[0666] 50.Tang,L.et al.Enhancing T cell therapy through TCR-signaling-responsive nanoparticle drug delivery.Nature Biotechnology 36,707-+(2018).

[0667] 51.Stephan,M.T.,Moon,J.J.,Um,S.H.,Bershteyn,A.&Irvine,D.J.Therapeutic Cell Engineering Using Surface-Conjugated Synthetic Nanoparticles.J Immunother 33,866-866(2010).

[0668] 52.Kontos,S.,Kourtis,I.C.,Dane,K.Y.&Hubbell,J.A.Engineering antigens for in situ erythrocvte binding induces T-cell deletion.P Natl Acad Sci USA 110,E60-E68(2013).

[0669] 53.Lorentz,K.M.,Kontos,S.,Diaceri,G.,Henry,H.&Hubbell,J.A.Engineered binding to erythrocytes induces immunological tolerance to E.coli asparaginase.Sci Adv 1,e1500112(2015).

[0670] 54.Masuda,Y.,Murata,Y.,Hayashi,M.&Nanba,H.Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis:Involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule(ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells.Biol Pharm Bull 31,1104-1108(2008).

[0671] 方法

[0672] 细胞系和动物

[0673] 表达荧光素酶的4T1乳腺癌细胞系(4T1-Luc)获得自Imanis Life Sciences(MN,USA)。将4T1-Luc细胞在保持在37℃和5％CO_2的加湿孵育器中培养。将它们在补充有10％FBS、1％Pen-Strep和0.1mg/mL G418的RPMI-1640培养基中培养。人肺微血管内皮细胞(HLMVEC)和HLMVEC生长培养基购自Sigma Aldrich(MO,USA)。根据制造商的说明,在HLMVEC生长培养基中培养HLMVEC。在它们使用前将细胞传代2-3次。雌性Balb/c小鼠(7-8周龄)购自Charles River实验室(MA,USA)。所有实验均根据剑桥哈佛大学文理学院(FAS)的动物护理机构和使用委员会(IACUC)批准的方案进行。

[0674] 免疫诱饵的制备和表征

[0675] 使用复乳法制备免疫诱饵(包封CXCL10的PLGA纳米粒子)。简而言之,将50μg的CXCL10溶解在200μL 0.1%牛血清白蛋白PBS溶液中。将其加入到含有20mg PLGA的1mL二氯甲烷中。将混合物简单地超声处理,然后在恒定搅拌下滴加至11mL 1.5%聚乙烯醇(PVA)溶液中。将整个混合物进行探针超声处理40秒。将形成的粒子保持在恒定的搅拌下过夜以除去有机溶剂。将粒子以12,000g离心10分钟,对上清液进行分析,以对药物负载进行量化。然后将粒子重悬于去离子水中,并使用动态光散射(Malvern Zen3600,PA,USA)、扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP,Zeiss FESEM Ultra 55,德国)和透射电子显微镜(JEOL 2100,MA,USA)对其尺寸、Zeta电位和多分散指数进行评估。在将它们最终重悬于PBS中之前,将纳米粒子用去离子水洗涤,共计洗涤两次。对于量化和生物分布研究,使用上述方法将荧光卵白蛋白/CXCL10包封于PLGA中。

[0676] 血液收集和加工

[0677] 使用肝素预涂覆的注射器通过心脏穿刺收集鼠全血,并在使用前在4℃下储存在BDMicrotainer®血液收集管中。全血在4℃下以1,000g离心10分钟,以从红细胞隔室中除去血清和白膜层。将分离的红细胞进一步用冷的1X PBS洗涤3次,并在4℃下以650g离心15分钟,随后将它们以10%血细胞比容的浓度最终重悬于1X PBS中。本研究中将该溶液视为红细胞储备溶液。

[0678] 免疫诱饵向红细胞的锚定

[0679] 在Axygen™ 1.5mL自立式螺帽管中将等体积的红细胞储备溶液和免疫诱饵纳米粒子悬浮液混合,并通过倒反和移液进一步充分混合。然后使管在管旋转器(Thermo Fisher Scientific)上旋转40分钟。然后通过在4℃下以100g离心5分钟来使搭载的红细胞沉淀,小心地除去未吸附的粒子,并用1mL的1X PBS再次对沉淀进行洗涤,以除去松散结合的粒子。对于抗ICAM-1抗体的附着,将免疫诱饵纳米粒子或搭载的红细胞沉淀重悬于0.5mg/mL抗ICAM-1抗体溶液中,持续另外20分钟。最终将搭载的红细胞以10%v/v重悬于1X PBS中并用于进一步表征,或以20%v/v重悬于1X PBS用于体内研究。通过PierceTM LAL显色内毒素量化试剂盒(ThermoFisher)评估搭载的样品的内毒素水平以用于体内功效研究。测定结果表明,样品中的内毒素水平较低(每剂低于0.02EU)。

[0680] 自发性肺转移瘤模型建立

[0681] 为了建立乳腺癌自发性肺转移瘤模型,将1×10^6个4T1-Luc细胞原位注射到雌性Balb/c小鼠的左乳腺脂肪垫中。接种后19天(早期模型)或32天(晚期模型),通过外科手术切除原发性肿瘤。原发性肿瘤切除后6天,经腹腔内向小鼠注射150μL 30mg/mL Xenolight-D-荧光素的生理盐水溶液。注射后15分钟,使用体内成像(IVIS光谱)对小鼠成像。在原发性肿瘤切除后6天,基于原发性肿瘤体积和生物发光强度,将小鼠随机分成不同的组。

[0682] 疾病模型中的体内生物分布研究

[0683] 如前所述建立早期或晚期乳腺癌肺转移瘤模型。对于所有的生物分布研究,使用含有17μg纳米粒子的制剂。在原发性肿瘤切除后七天,将免疫诱饵、搭载的免疫诱饵、抗ICAM-1附着的免疫诱饵和抗ICAM-1附着的搭载的免疫诱饵经静脉内注射到小鼠尾静脉中。用与白蛋白载体蛋白缀合的Alexa Fluor 647或Alexa Fluor 750对免疫诱饵纳米粒子进行荧光标记。在吞噬细胞耗竭的情况下,在静脉内注射搭载的样品前48h,向小鼠静脉内注射200μL的含有5mg/mL氯膦酸盐的Clodrosome®,其已被证明有效耗竭血管内吞噬细胞

28。在注射后20分钟和6小时将小鼠处死，收获器官(肝脏、肺、脾脏、肾脏、心脏、脑和血液)进行进一步加工。对于加工，向每个器官中加入1mL冷的RIPA裂解缓冲液(1X)，使用高剪切均化器(IKA T-10Basic ®Ultra turrax，德国)将器官均质化，在酶标仪(Tecan Safire2®，瑞士)上通过荧光对纳米粒子含量进行量化。将注射剂量百分比(ID%)定义为某一特定器官中的纳米粒子荧光总量除以所有器官的纳米粒子荧光总量。

[0684] 体内乳腺癌自发性肺转移瘤模型上的功效研究

[0685] 在早期乳腺癌自发性肺转移瘤模型中，在原发性肿瘤切除后一周开始给予治疗。将免疫诱饵或搭载的含有抗ICAM-1抗体的免疫诱饵用于功效和存活研究。在10天内(即第26、29、32和35天)给予四次注射。对于搭载的具有抗CXCL10抗体的免疫诱饵组，在静脉内注射EASI之后，立即经腹腔内给予100μg的中和抗体的大鼠抗鼠CXCL10。在第25、28、31、34和37天，使用体内成像(IVIS Spectrum)对代表性小鼠成像。简而言之，向小鼠经腹膜内注射150μL 30mg/mL Xenolight-D-荧光素的生理盐水溶液。注射后15分钟，使用体内成像对小鼠成像。在第37天，将小鼠安乐死，经腹腔内注射印度墨水溶液，将肺切除并使用Feket溶液固定。将固定的肺用于表面结节计数。通过如上所述的注射时间表对早期模型中的存活进行评估(n＝15-16)。在晚期肺转移瘤模型中，每两天给予四次治疗给药，首次给药在原发性肿瘤切除后7天(第39天)给予。最后一次给药后两天(第50天)，将小鼠安乐死，并对切除的肺上的结节进行计数。对于功效研究，除了游离趋化因子(5X)和游离免疫诱饵(10X)分别含有12.5μg和25μg的CXCL10外，注射制剂中含有2.5μg的CXCL10趋化因子。

[0686] 趋化因子梯度测定

[0687] 在早期肺转移瘤模型中，测量血液和肺中CXCL10浓度的时间进程变化。肿瘤接种后19天，通过外科手术切除肿瘤。肿瘤切除后4、10、22天，将小鼠安乐死，通过心脏穿刺收集血液，将肺切除(对于所有时间点，n＝5)。对于加工，将0.5mL含有蛋白酶抑制剂的冷的组织提取缓冲液加入每个肺，使用高剪切均化器(IKA T-10Basic ®Ultra turrax，德国)将肺均质化。使用ELISA对肺和血液中的CXCL10含量进行量化。

[0688] 如下，在早期肺转移瘤模型上进行趋化因子梯度测定。为了评估该疗法的趋化因子梯度恢复能力，如前面的上下文所述建立早期自发性肺转移瘤模型。将一个生理盐水组和三个治疗组(含有12.5μg CXCL10的5倍游离CXCL10趋化因子、含有2.5μg CXCL10的具有抗ICAM-1的免疫诱饵和含有2.5μg CXCL10的红细胞搭载的具有抗ICAM-1的免疫诱饵)纳入研究中。在外科手术后一周开始给予治疗。在外科手术后第7天和第10天给予两组注射组。(对于每组每个时间点，n＝4-6)。在第二次注射后20min、6h、24h、48h和72h，将小鼠处死，通过心脏穿刺收集血液，并将肺切除。如上所述对肺和血液中的趋化因子含量进行量化。

[0689] 免疫细胞和细胞因子分析

[0690] 由如下制备不同的抗体鸡尾酒组：CD45(Biolegend，Cat no:103116，Clone:30-F11)、CD3(Biolegend，Cat no:100218，Clone:17A2)、CD4(Biolegend，Cat no:100421，Clone:GK1.5)、CD8a(Biolegend，Cat no:100711，Clone:53-6.7)、NKp46(Biolegend，Cat no:137606，Clone:29A1.4)、CD11c(Biolegend，Cat no:117307，Clone:N418)、颗粒酶B(Biolegend，Cat no:372208，Clone:QA16A02)、IFN-γ(Biolegend，Cat no:505849，Clone:XMG1.2)、IFN-γ(Biolegend，Cat no:505806，Clone:XMG1.2)、CD86(Biolegend，Cat no:105011，Clone:GL-1)和Am Cyan活/死细胞染色试剂盒(Thermo Fischer Scientific，MA，

USA)。在它们使用之前,所有抗体均以最佳的稀释度进行稀释。

[0691] 对于免疫细胞分析,如上所述建立早期自发性肺转移瘤。将一个生理盐水组和三个治疗组(含有12.5μg CXCL10的5倍游离CXCL10趋化因子、含有2.5μg CXCL10的具有抗ICAM-1的免疫诱饵和含有2.5μg CXCL10的红细胞搭载的具有抗ICAM-1的免疫诱饵)纳入研究中。在外科手术后一周开始给予治疗。在原发性肿瘤切除后第7、10和13天给予三组注射组。在最后一次注射后一天,将小鼠安乐死。通过心脏穿刺收集血液,将包括肺、肝脏和脾脏在内的器官切除。根据制造商的说明,使用相应的器官解离试剂盒(Miltenyi Biotec,德国)形成器官细胞的单一细胞悬浮液。将细胞用上述抗体染色并通过流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II,NJ USA)进行分析。

[0692] 对于细胞因子分析,模型建立和治疗与上述相同。在最后一次注射后一天,将小鼠安乐死,并将肺切除。对于加工,将0.5mL含有蛋白酶的抑制剂的冷的组织提取缓冲液加入每个肺,使用高剪切均化器(IKA T-10Basic ®Ultra turrax,德国)将肺均质化。根据制造商的说明,使用LEGENDplex™Mouse Inflammation Panel(Biolegend,CA,USA)进行细胞因子分析,并使用流式细胞术分析仪(BD LSR Analyser II,NJ USA)进行分析。通过ELISA对CXCL10浓度进行量化。

[0693] 统计分析

[0694] 所有实验重复至少三次。使用Graphpad prism 8软件进行所有统计分析。所有数据都表示为平均值±s.e.m。使用学生t检验、单因素ANOVA及Tukey HSD分析、或Mann-Whitney检验来确定显著性。对于Kaplan-Meier存活曲线的分析,使用Mantel-Cox检验。p值表示不同程度的显著性;$p<0.05$*;$p<0.01$**;$p<0.001$***,$p<0.0001$****。使用FlowJo™10软件进行所有流式细胞术分析。

[0695] 补充方法

[0696] 材料

[0697] 除非另有提及,所有化学品和试剂均获得自Sigma Aldrich(Mo,USA),并且无需进一步纯化即可使用。PLGA(50:50酸末端,50:50酯末端,85:15酯末端,和65:35酸末端)购自Sigma-Aldrich(MO,USA)。mPEG-PLGA购自PolySciTech(IN,USA)。CXCL10/IP-10、IL-10、IL-15和GM-CSF获得自PeproTech(NJ,USA)。Nunc™Lab-Tek™II Chamber Slide™系统、细胞染色缓冲液、G418(遗传霉素)、小鼠IP-10ELISA试剂盒、Alexa Fluor 647卵白蛋白、Alexa Fluor 750NHS试剂、Alexa Fluor647NHS试剂、磷酸盐缓冲生理盐水(1X)、Axygen™1.5mL自立式螺帽管、Pierce™M LAL显色内毒素量化试剂盒和CXCL10单克隆抗体获得自Thermo Fischer Scientific(MA,USA)。人全血和血清获得自BioIVT(NJ,USA)。Xenolight-D-荧光素钾盐获得自Perkin Elmer(MA,USA)。锂肝素涂覆的微量采集管获得自BD Medical Technology(MA,USA)。具有过滤板的LEGENDplex™Mouse Inflammation Panel、重组小鼠RANTES(Cat no:594208)和抗ICAM-1抗体(Cat no:116102,Clone:YN 1/1.7.2;Cat no:353102,Clone:HA58)获得自BioLegend(CA,USA)。组织解离管和肺解离试剂盒获得自Miltenyi Biotec(德国)。Tissue Tek OCT化合物获得自Sakura Finetek(CA,USA)。0.9%生理盐水溶液获得自Teknova(CA,USA)。多聚甲醛获得自Electron Microscopy Sciences(PA,USA)。外科手术设备获得自Braintree Scientific,Inc.(MA,USA)。Clodrosome®获得自Encapsula NanoSciences(TN,USA)。

[0698] 体外药物释放研究

[0699] 将含有CXCL10的纳米粒子(免疫诱饵)重悬于1mL PBS、FBS和完全培养基(DMEM+10％FBS)中，并在37℃下在管旋转器上孵育。在固定的时间点，将粒子以12,000g离心10分钟，收集上清液以用于分析。将粒子进一步重悬于1mL新鲜释放培养基中，并在37℃下孵育直至下一个时间点。在开始孵育后，在1h、2h、4h、6h和12h取样。使用ELISA对每种释放培养基中的累积释放进行量化。此外，用MALDI-TOF和圆二色光谱仪对释放的CXCL10趋化因子进行表征，以检测任何分子量和结构变化。

[0700] 纳米粒子内化研究

[0701] 使用共聚焦显微镜确认纳米粒子内化。对于流式细胞术分析，将2×10^6个HLMVEC细胞铺于12孔板中并使其粘附过夜。然后将板吸出，并向每个孔中加入1mL新鲜培养基。向每个孔中加入30μg Alexa Fluor 647标记的纳米粒子，并使其在孵育器中在37℃下孵育20分钟或6小时。在规定的时间点之后，将孔中的培养基完全吸出并用PBS洗涤3次，使用细胞刮板轻轻地刮取细胞。通过共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO ready)对这些细胞进行分析。

[0702] 红细胞的PEG化

[0703] 根据我们组先前报道的方法进行红细胞的PEG化。1简而言之，将红细胞在含有10mg/mL氰尿酰氯官能化的5-kDa m-PEG(C-mPEG，Sigma Aldrich)的PBS中孵育30分钟。C-mPEG与红细胞表面上的胺基团形成共价键。未反应的C-mPEG通过离心将红细胞沉淀来去除，然后用PBS洗涤两次。将PEG化的红细胞重悬于PBS中使用。

[0704] 搭载的红细胞的表征和生物相容性

[0705] 使用荧光测量测定搭载效率和负载在红细胞上的纳米粒子。对于使用荧光进行量化，使用去离子水裂解25μL红细胞，并使用荧光在酶标仪(Tecan Safire2®，瑞士)上对纳米粒子含量进行量化。使用扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP，Zeiss FESEM Ultra 55，德国)确认纳米粒子与红细胞的连接。简而言之，使用2.5％戊二醛溶液将搭载的红细胞固定，并在增加的乙醇梯度中洗涤，然后使用六甲基二硅氮烷(HMDS)进行化学干燥。最后，在成像之前，对样品进行溅射涂覆(EMT 150T ES金属溅射涂布机，PA USA)。对于生物相容性研究，如前所述进行渗透脆性和凝集测定。2

[0706] 体外剪切研究

[0707] 通过Alexa Fluor 647-OVA对纳米粒子进行标记并用于剪切研究。对于低剪切研究，在37℃、12rpm下的管旋转器上，将搭载的小鼠红细胞孵育在1mL FBS中。孵育20分钟后，通过以250g离心5分钟，将细胞沉淀并以10％v/v重悬于1X PBS中。然后使用去离子水裂解25μL的红细胞，并且在酶标仪(Tecan Safire2®，瑞士)上使用荧光对剩余的药物含量进行量化。对于高剪切研究，将搭载的小鼠红细胞在10mL FBS中孵育。使用圆柱形couette粘度计(1mm间隙，AR-G2流变仪，TA仪器)向血清中的红细胞施加旋转剪切(2Pa、6Pa或10Pa)20分钟。在施加剪切期间，使用水夹套将样品保持在37℃。这些条件模拟了高剪切生理环境。20分钟后，通过以250g离心10分钟将细胞沉积，并以10％v/v重悬于1X PBS中。然后使用去离子水使25μL红细胞裂解，并在酶标仪(Tecan Safire2®，瑞士)上使用荧光对剩余的纳米粒子含量进行量化，并使用扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP，Zeiss FESEM Ultra 55，德国)进行确认。

[0708] 肺内的纳米粒子分布

[0709] 对于患病肺内的纳米粒子分布，将1×10^6个4T1-Luc细胞原位注射到雌性Balb/c小鼠的左乳腺脂肪垫中。接种后19天，通过外科手术将肿瘤切除。肿瘤切除后28天，向小鼠注射17μg Alexa Fluor 647标记的具有抗ICAM-1的纳米粒子、以及红细胞搭载的具有抗ICAM-1的荧光纳米粒子。注射后20分钟，将小鼠安乐死，并收集完整的肺。将肺用冷的1X PBS洗涤两次，然后固定在4％多聚甲醛溶液中过夜。然后将固定的肺冷冻在Tissue Tek OCT化合物(Sakura Finetek,CA,USA)中，并使用低温恒温器(Leica CM1950,德国)切片。使用Fluroshield®安装切片组织，以用于DAPI染色(Ex/Em 340/488nm)，并使用共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO ready,德国)进行分析。

[0710] 健康小鼠内的生物分布研究

[0711] 对于不同PLGA的生物分布研究，使用健康的雌性Balb/c小鼠。以包含17μg NP的剂量，将包封Alexa Fluor 750-OVA的NP和搭载的NP(对于所有组，n＝3)经静脉内注射到尾静脉中。注射后20分钟将小鼠处死，并收集器官(肝脏、肺、脾脏、肾脏、心脏、脑和血液)以进行进一步加工。对于综合生物分布，将包封Alexa Fluor 750-OVA的NP、搭载的NP、包封Alexa Fluor 750-OVA的具有抗ICAM-1的NP和搭载的具有抗ICAM-1的NP(对于游离NP，n＝3;对于搭载的NP，n＝6)经静脉内注射到尾静脉中。在注射后20min、2h、6h和24h，将小鼠处死，收获器官(肝脏、肺、脾脏、肾脏、心脏、脑和血液)以进行进一步加工。对于加工，向每个器官中加入1mL冷的RIPA裂解缓冲液(1X)，使用高剪切均化器(IKA T-10 Basic ®Ultra turrax，德国)将器官均质化，在酶标仪(Tecan Safire2®，瑞士)上通过荧光测量对纳米粒子含量进行量化。

[0712] 在乳腺癌自发性肺转移瘤模型中的晚期功效

[0713] 对于晚期功效，通过向雌性Balb/C小鼠的左乳腺脂肪垫中原位注射1×10^6个4T1-Luc，建立自发性肺转移瘤模型。接种后32天，通过外科手术切除肿瘤。在外科手术后一周开始给予治疗。每两天给予四次注射。注射剂量与早期模型中的相同。在最后一次注射后两天(第50天)，将小鼠安乐死，气管内注射印度墨水溶液，将肺切除，并如前所述使用Feket溶液将肺固定。3固定的肺用于表面结节计数。

[0714] 肿瘤再激发研究

[0715] 在早期乳腺癌自发性肺转移瘤模型中进行肿瘤再激发研究，在原发性肿瘤切除后的一周开始给予治疗(对照-生理盐水，EASI)。将含有抗ICAM-1抗体的搭载的免疫诱饵用于功效和存活研究。在10天内(即第26、29、32和35天)给予四次注射。最后一次注射后2天(第37天)，将1×10^6个4T1-Luc细胞皮下接种在疾病小鼠或年龄匹配的健康小鼠(未接受先前的肿瘤接种)的右翼。在肿瘤再接种后10天，由于身体条件差，将对照-生理盐水组中的小鼠安乐死。对肿瘤生长进行测量，直至第53天。在第53天，将小鼠安乐死，对提取的肿瘤的重量进行测量。

[0716] 补充结果

[0717] 纳米粒子锚定至红细胞的机制

[0718] 我们的假设是：1)搭载方法是接触依赖性的，即纳米粒子应该能够明确接近RBC膜，使膜扩散并最终寄存在膜中，这主要是由于非共价力;2)膜扩散之后，由于膜表面张力与膜和纳米粒子表面之间的非共价力(包括静电相互作用、疏水相互作用和氢键结合)之间

的热力学平衡，粒子能够保持附着至RBC膜。

[0719] 为了测试第一假设，我们首先将PEG缀合到红细胞表面以抑制纳米粒子和红细胞膜的表面接触。根据图34B，RBC表面上的PEG阻碍了纳米粒子向RBC的接近，从而将搭载效率降低了50％。这些数据表明纳米粒子在红细胞表面的锚定确实是接触依赖性的。接下来，我们将红细胞固定以抑制红细胞膜的扩散。如图43A所示，在固定的RBC的情况下，RBC的搭载效率急剧降低至零，表明如果纳米粒子不能使膜扩散，则它们不能与RBC膜结合。该研究表明，纳米粒子的锚定需要膜扩散，即，如果接近受到阻碍或以化学方法将膜固定来防止伸展(stretching)，则搭载过程会受到极大影响。

[0720] 为了测试第二假设，我们在血清(而非PBS)中进行搭载实验，以抑制纳米粒子和红细胞膜之间的总的非共价相互作用。血清蛋白质将在纳米粒子周围形成电晕，并且还会覆盖RBC，从而掩蔽/减少总的纳米粒子-RBC相互作用。如图43C所示，在与PBS的鲜明对比下，利用血清作为搭载介质将搭载效率降低60％，表示非共价相互作用在很大程度上负责将纳米粒子保持在红细胞膜上。

[0721] 我们假设，当RBC膜扩散时，负责将纳米粒子保持在适当位置的实际非共价力包括静电相互作用、疏水相互作用和氢键结合。在我们先前的研究中，我们报道了以超高效率(>40％)与红细胞相结合的带正电荷的纳米粒子，表明静电相互作用在纳米粒子与红细胞的结合中发挥着关键作用4。这是可以理解的，因为红细胞膜带负电荷。然而，带负电荷的纳米粒子也可以有效地与红细胞结合，在这种情况下，不涉及静电相互作用。我们假设纳米粒子和红细胞膜之间的疏水相互作用是在这种情况下将纳米粒子保持在适当位置的主要参与者。为了测试这一假设，我们通过用亲水PEG覆盖纳米粒子来抑制疏水相互作用。如图43D所示，在PEG修饰的纳米粒子的情况下，总搭载效率降低了近75％，表明疏水力对于这个过程的有效进行是至关重要的。除了静电和疏水相互作用之外，我们假设其它非共价相互作用(例如氢键结合)在将纳米粒子保持在红细胞膜上也发挥着重要作用。为了测试该假设，我们将酯末端和酸末端PLGA纳米粒子(相同组成)与红细胞的结合进行了比较。酯末端PLGA纳米粒子更疏水，而酸末端纳米粒子能够与细胞膜形成氢键结合。如图43E所示，当使用酯末端纳米粒子代替酸末端纳米粒子时，搭载效率令人惊讶地减少了25％。鉴于搭载主要被认为由疏水力主导，这是出乎意料的。这个结果表明H键结合也在某种程度上对搭载进行控制。

[0722] 总之，基于我们的数据，纳米粒子在红细胞上的锚定可以遵循所提出的机制：纳米粒子接近RBC膜，并且在无竞争性屏蔽蛋白质/力的情况下，使RBC膜以接触依赖性方式扩散。此后，由于RBC膜和纳米粒子表面之间的非共价动力(静电相互作用、疏水力和H键结合)而使纳米粒子保持在适当位置。

[0723] 不同材料性质的PLGA纳米粒子从红细胞的脱离

[0724] 我们的机制研究(图43A-图43E)表明，疏水相互作用和氢键结合均有助于纳米粒子与红细胞的结合。在非剪切条件下，H键合结合和疏水相互作用均足够强，以将纳米粒子保持在红细胞上。PLGA-d具有平衡的疏水性和氢键结合能力，因此在非剪切条件下对红细胞显示出最高的亲和力。然而，H键合结合比疏水相互作用相对更弱。因此，在剪切条件下，弱的氢键更容易被破坏并导致纳米粒子从红细胞脱落。由于氢键结合是PLGA-d与红细胞结合的主要力，因此在剪切条件下更多的纳米粒子从红细胞脱落(图35)。

[0725] 免疫诱饵在体内从红细胞的脱离

[0726] 为了进一步表征体内搭载的红细胞系统，我们对系统进行了双标记，其中，用CellTrace™ Far Red对载体红细胞进行标记，并通过FITC对纳米粒子进行标记(图36A)。我们注射了双标记的搭载的红细胞系统，并在不同时间点收集血液，通过流式细胞术对搭载系统进行分析。如图36B和图36D所示，载体红细胞残留在血液中至少24小时。相比之下，如图36C和图36E所示，载体红细胞上的大部分纳米粒子(>95％)在＜5min内从载体红细胞迅速脱离，并且图36F中所示的生物分布数据表明，脱离的纳米粒子大多数沉积在肺中。图36A-图36F中所示的数据与我们先前的研究5一起表明，锚定在红细胞上的纳米粒子在它们碰到的第一毛细管床处被迅速剪切下来。在静脉内注射的情况下，肺是载体红细胞遇到的第一个富含毛细血管的器官，因此在那里(而非其它器官)沉积最多的锚定的纳米粒子。

[0727] 表5.四个PLGA候选物的性质。

[0728]

	PLGA-a	PLGA-b	PLGA-c	PLGA-d
L:G比例*	50:50	50:50	85:15	65:35
末端基团	酯末端	酸末端	酯末端	酸末端

[0729] *聚合物中乳酸与羟基乙酸的摩尔比

[0730] 补充信息的参考文献

[0731] 1.Chambers,E.&Mitragotri,S.Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells:mechanism and extended circulation.Exp Biol Med (Maywood)232,958-966(2007).

[0732] 2.Pan,D.et al.The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells.PLoS One 11,e0152074(2016).

[0733] 3.Miretti,S.et al.A Mouse Model of Pulmonary Metastasis from Spontaneous Osteosarcoma Monitored In Vivo by Luciferase Imaging Plos One 3 (2008).

[0734] 4.Zhao,Z,Ukidve,A.,Gao,Y.,Kim,J.&Mitragotri,S.Erythrocyte leveragedchemotherapy(ELeCt):Nanoparticleassemblyonerytbrocytesurfacetocombatlungmetastasis.SciAdv 5,eaax9250(2019).

[0735] 5.Brenner,J.S.et al.Red blood cell-hitchhiking boosts delivery of nanocarriers to chosen organs by orders of magnitude.Nat Commun 9(2018).

[0736] 实施例5:通过生物模拟其天然抗原呈递功能而进行的红细胞驱动的免疫

[0737] 红细胞天然捕获循环中的某些细菌性病原体，通过氧化应激将它们杀死，并将它们呈递给脾脏中的抗原呈递细胞(APC)。通过利用红细胞的这种先天免疫功能，我们开发了红细胞驱动的免疫靶向(EDIT)，其将来自红细胞表面的纳米粒子呈递给脾脏中的APC。抗原纳米粒子被吸附在红细胞表面上。通过对吸附的纳米粒子的数量密度进工程化，使它们主要递送到脾脏中，而不是递送到通常作为红细胞介导的递送系统的靶标的肺中。与对照相比，红细胞递送的纳米颗粒向脾脏的呈递产生了改善的对抗原的抗体应答、更高的中枢记忆T细胞应答和更低的调节性T细胞应答。增强的免疫应答减慢了预防模型中的肿瘤进展。这些发现表明，EDIT是增强全身性免疫的有效策略。

[0738] 红血细胞执行捕获血液中的某些病原体并将其呈递给脾脏中的免疫细胞的独特

功能。我们开发了基于红血细胞的这一先天免疫功能的生物模拟策略，以将疫苗纳米粒子递送至脾脏。这种“天然佐剂”策略诱导了强的疫苗接种反应，而无需外源佐剂。

[0739] 介绍

[0740] 红细胞占人体中超过80％的细胞，主要功能是将氧气递送到组织。除氧气输送外，红细胞还执行一些具有高免疫相关性的额外功能。例如，在达到它们自然寿命的终点时，衰老的红细胞在脾脏中以非炎性途径被吞噬(1)。这种独特的机制已被巧妙地(elegantly)利用来发展对抗原的耐受性，以用于自身免疫紊乱和减少抗药抗体的产生(2-4)。具体地，由于对红细胞特有的非炎性捕获途径，附着在红细胞膜上的抗原多肽与衰老的红细胞一起在脾脏中被捕获，因此，产生了对抗原的耐受性应答。

[0741] 最近，红细胞与另一个有趣的且截然不同的先天免疫功能有关联(5、6)。具体地，它们在其表面捕获循环中的免疫复合物和细菌，并将它们交给肝脏中的Kupffer细胞和脾脏中的专业抗原呈递细胞(APC)，而不捕获载体红细胞(7-11)。由于静电吸引，血液中的细菌种群(例如葡萄球菌(Staphylococcus)和丙酸杆菌(Propionibacterium))附着在红细胞膜上，并被载体红细胞的氧合作用(oxycytosis)杀死。此后，红细胞将它们交给肝脏和脾脏中的细胞，无需自身隔离(9、12)。虽然APC选择性摄取货物的确切机制尚不清楚，但由细菌货物诱导的瞬时膜改变与红细胞和APC之间的交互作用(crosstalk)增加有关联(13、14)。此处，我们利用红细胞的这种先天和独特的能力在脾脏中呈递抗原，以开发用于产生对抗原的细胞免疫应答和体液免疫应答的生物模拟策略(图47A-图47F)。

[0742] 已经将分子与红细胞的附着用于几种生物医学应用(15)。已将包括蛋白质(2-4)、治疗剂(16)和纳米粒子(17-19)的一系列有效载荷附着于红细胞表面或包封在红细胞内(20)，用于各种治疗应用。货物与红细胞表面的附着是通过化学缀合(16)、与特定受体(例如血型糖蛋白A)结合(4)、分选(sortagging)(2)或被动吸附(19)实现的，而不损害其氧气输送的生理功能。在红细胞上搭载的所有先前的方法都是以对载体红细胞引起最小扰动为基础，这导致了它们的循环延长或注射后被毛细血管内皮捕获。(17、19、21)。此处，我们设计了一种搭载系统，该系统将附着的纳米粒子的递送主要诱导到脾脏而不是肺，以实现细胞免疫和体液免疫，我们将该过程称为红细胞驱动的免疫靶向(Erythrocyte Driven Immune Targeting，EDIT)。

[0743] 结果

[0744] 抗原货物的合成和表征

[0745] 选择卵白蛋白(OVA)作为模型抗原，将其在200nm聚苯乙烯羧化物(PS-COOH)的表面上进行封端，以产生附着于红细胞的蛋白质封端的纳米粒子(NP)(图48A)。如先前所报道的(22)，使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)化学方法将OVA附着于200nm NP。可以在宽范围内控制NP上的OVA的负载(图52A-图52B)，然而，使用约43μg/mg粒子的中间负载用于研究的其余部分(图48B)。通过尺寸和Zeta电位测量证实了OVA与纳米粒子的附着。OVA附着将NP的水合粒径从191nm增加至234nm(图48C)。此外，从Zeta电位从-40.4mV减少至-21.4mV也明显看出，羧化物基团在NP上的缀合(图48D)。OVA缀合不影响NP多分散性(图48E)。通过进行扫描电子显微镜检查法(SEM)进一步证实了这一点。普通的和缀合的纳米粒子的SEM图像在两种情况下均显示单分散纳米粒子(图48F)，表明OVA缀合对多分散性的影响可忽略。

[0746] 除了物理化学性质的表征之外，我们还针对由树突细胞的内化和树突细胞的活化，对OVA-NP进行了表征。树突细胞摄取OVA和OVA-NP(图53A)。然而，与游离OVA相比，OVA-NP以显著较高的量被摄取，这也通过共聚焦扫描激光显微镜(CLSM)图像得到确认(图53B)。对树突细胞的共刺激作用(通过CD80的上调进行评估)揭示了，与它们的可溶性对应物相比，OVA-NP显著上调了CD80的表达，并且与阳性对照脂多糖(LPS)相当(图48G)。我们还用OVA包封500nm PS，用OVA包封200nm PLGA(PLGA-OVA-200)，用匙孔戚血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin,KLH)的亚型1(subunit 1)包封200nm PS-COOH(PS-KLH-200)，以证实该方法的通用性。使用相同的EDC化学方法将蛋白质各自附着在不同类型的粒子上。对这些组合粒子的物理化学性质进行了评估(表6)，并对这些粒子被树突细胞内化并进而使它们活化的能力进行了表征(图54A-图54D)。所有粒子都是单分散的，并显示出优异的由树突细胞的内化和树突细胞的活化。虽然裸纳米粒子本身能够使细胞成熟(23)，但它们在评估搭载OVA-NP的益处方面无具体结果，因此未被纳入本研究。

[0747] 对纳米粒子-红细胞搭载进行工程化以在脾脏中实现传递

[0748] 纳米粒子的搭载通过两个物理性质的步骤发生(17、19、24)；纳米粒子在红细胞表面吸附，引发纳米粒子周围的膜的接触和扩散，以增强粘附强度。其中任何一个都是不够的。如果纳米粒子不与红细胞接触，则不引发粘附，如果膜扩散受到抑制，则粘附较弱，并且在洗涤过程中纳米粒子掉落。在附着期间引入竞争蛋白(血清)基本上抑制了搭载。即使添加25％血清也可以观察到这种抑制作用。同时，通过使用戊二醛固定的RBC，我们的数据表明使膜硬化几乎消除了搭载(图55A-图55C)。随着孵育期间NP:红细胞比例从75:1增加至300:1，附着至红细胞的纳米粒子的数量从每细胞12个增加至24个。然而，令人惊讶地，进一步将比例增加到600:1将每个红细胞负载的纳米粒子降低至约18个，可能是由于搭载悬浮液中存在过量的纳米粒子，从而阻碍了必要的红细胞-纳米粒子相互作用(图49A)。通过SEM(图56A-图56C)以及搭载的红细胞的流式细胞术分析，证实了红细胞上的纳米粒子的存在。特别地，携带纳米粒子的红细胞百分比从68％(比例75:1)增加至>95％(比例600:1)(图49B)。

[0749] 由于红细胞表面上的纳米粒子因与肺毛细血管内皮紧密接触而产生的高剪切应力和红细胞的挤压而在肺中被剪切下来，因此红细胞搭载先前已被探索用于肺靶向(17、18)。降低肺摄取对于使携带纳米粒子的红细胞逃离肺并将它们的货物递送到其它器官(在这种情况下是脾脏)中是至关重要的。为此，在对应于肺毛细血管的6Pa的剪切应力下，作为NP:红细胞比例的函数，我们对搭载的纳米粒子的体外剪切耐受性进行了测试。随着负载量从75:1增加至600:1，从红细胞释放的NP减少(图49C)，可能是由于在高粒子负载下红细胞变硬(stiffening)(24)。因此，为了避免粒子在肺中的机械脱落，在较高的纳米粒子负载下，足够的流动性/剪切耐受性是需要的。

[0750] 脾脏靶向是通过维持足够的负载、剪切耐受性以避免在肺中的机械脱落和诱导红细胞膜改变以促进脾脏中的捕获来介导的。通过NP剂量来控制膜中红细胞的改变程度。在红细胞膜上的磷脂酰丝氨酸的表达方面，对红细胞膜改变进行量化。相较于未负载的初始红细胞，在300:1和600:1的NP:红细胞比例下红细胞的孵育引起磷脂酰丝氨酸的表达的适度增加(图49D)。搭载过程也降低了CD47表达，可能是由于纳米粒子的物理掩蔽(图57A)。此外，光学凝集测定表明，与形成基质状凝集的阳性对照聚苯乙烯珠粒相比，用纳米粒子孵育

的红细胞没有可见的凝集/红细胞叠连(rouleaux)形成(图49E)。不存在凝集表明NP-搭载的红细胞可以体内注射(25)。

[0751] 在静脉内注射所有不同负载比但注射相同体积的红细胞后20分钟,通过进行生物分布,评估了纳米粒子负载对体内纳米粒子分布的影响。对收获的器官(特别是肺和脾脏)的荧光强度进行评估(图49F)。低NP:红细胞比例(75:1和150:1)导致高的肺:脾脏积累比例(约3),而高负载(NP:红细胞比例300:1)显示脾脏积累高于肺积累(肺:脾脏比例为约0.8)。将该比例进一步增加至600:1则再次有利于肺积累,这可能是由于纳米粒子附着相较于300:1时降低(图49A)。PS表达数据(图49D)表明在600:1的孵育比例下,红细胞膜受到的影响最大。总的来说,这些发现表明例如在这些条件下,300:1是脾脏靶向的最佳负载比(图49G)。因此,选择NP:红细胞比例300:1用于研究的剩余部分。对于我们的最佳系统而言,肺:脾脏积累比例小于1(在肺部<40%ID/g)。该比例在靶向肺的红细胞搭载纳米粒子的典型研究中为约10(在肺部达>100%ID/g)(17)。我们还通过流式细胞术单独追踪红细胞和纳米粒子,对注射的搭载的纳米粒子(NP:红细胞比例300:1)的药代动力学进行评估。注射的红细胞的比例在注射后不随时间(≤24h)变化,而搭载的纳米粒子早在注射后的20分钟就迅速从血流中消失,只有不到1%留在循环中,表明从血流中快速清除(图49H)。这清楚地表明红细胞能够快速将其有效载荷递送到特定器官,而自身抵抗清除,这可能是由于纳米粒子传递后磷脂酰丝氨酸在搭载的红细胞上的表达减少(图57B)。

[0752] 接下来,我们在静脉内注射后20min、6h和24h进行了搭载的纳米粒子的时间进程生物分布,并将其与等量的游离纳米粒子的生物分布进行了比较(图49I、图58A-图58B)。游离纳米粒子在肝脏和脾脏中累积。红细胞-搭载的NP表现出更高的脾脏积累(图49J)。我们的研究首次体现了使用红细胞搭载实现了约150%ID/g的脾剂量。与游离的纳米粒子相比,即使在注射后6h后,脾脏中的较高积累(相较于对照改善约1.5倍)也是显著的,并且在注射后保持长达24h(图49J)。进一步的研究揭示了,所研究的其它粒子组合也能够诱导瞬时损伤(transient damage),并且该策略能够进行各种粒子的传递(图59A-图59D)。

[0753] 为了评估红细胞递送至脾脏的纳米粒子是否被吞噬细胞或专业的抗原呈递细胞(APC)吸收,我们使用氯膦酸盐在小鼠中进行吞噬细胞耗竭(26),并在注射搭载的纳米粒子后20分钟进行生物分布,对两种免疫活性器官(肝脏和脾脏)的递送效率的变化进行评估。氯膦酸盐脂质体使得肝窦和脾脏的网状内皮系统中的巨噬细胞瞬时失能(26)。这种干预导致识别、吞噬和呈递外源化合物的功能被委托给其它细胞,包括接管宿主防御中抗原呈递功能的树突细胞。吞噬细胞耗竭显著降低了肝脏摄取(约2.5倍),但没有引起脾脏摄取的显著变化,表明脾脏中的纳米粒子是可行的(viable),其被APC内化而不被吞噬(图49K)。

[0754] 脾脏中纳米粒子传递的免疫结果

[0755] 我们表征了将搭载的纳米粒子从红细胞表面递送到脾脏的体液应答和细胞应答。对于体液免疫,我们使用包含每周一次注射的疫苗接种时间表,持续3周,随后是两次基于明矾的体液激发(图50A)。在激发前一天(第1天),抗-OVA抗体(IgG)效价表明搭载的OVA-NP、游离OVA-NP或可溶性OVA之间无显著性差异。对于搭载的OVA-NP(EDIT),在最后一次激发后13天评估的抗体效价最高,显著高于游离纳米粒子(约3倍)和可溶性蛋白质(约4倍)的抗体效价。在OVA-NP和游离OVA之间未发现差异(图50B)。这证明了相较于其它组,EDIT诱导更高的OVA特异性体液应答的能力。

[0756] 还评估了由EDIT产生的细胞免疫。小鼠通过EDIT或OVA-NP每周一次进行免疫，持续3周，并在最后一次疫苗接种后5天对收获的脾细胞进行综合免疫分析(图50C)。流式细胞术分析表明，与对照组相比，EDIT显示出脾脏中CD3+CD8+细胞的显著增强(约1.7倍)。有趣的是，单独的游离纳米粒子(NP)未显示出相同的效果(图50D-图50E)。对CD8亚型进行更深入的分析，我们发现，与游离NP和对照组相比，CCR7+CD62L+T细胞(对应于一组经历抗原的T细胞(antigen-experienced T cell)(27、28))在EDIT中显著增加。具体而言，相比于未治疗组和OVA-NP组，EDIT分别具有8倍和2.2倍的更多的经历抗原的细胞(antigen-experienced cell)(图50F-图50G)。此外，我们的分析还揭示了经历抗原的中央记忆T细胞的增加也与CD25+FOXP3+调节性T细胞表型的相应减少有关，相较于未治疗组和OVA-NP组，EDIT的Treg细胞分别少4倍和2.5倍(图50H-图50I)。在肺组织中未局部观察到明显的细胞免疫效应(图60A-图60B)，表明脾脏递送和由此产生的全身性效应更为突出。

[0757] 增强的免疫应答改善了预防性肿瘤模型中的介入窗口

[0758] 为了测试EDIT诱导细胞治疗性应答的能力，我们设计了预防性疫苗接种研究，其中，小鼠每周用OVA、EDIT或游离OVA-NP免疫一次，持续3周。将CpG用作阳性对照。在最后一次疫苗接种后的一天，通过皮下接种EG-7OVA细胞对小鼠进行激发，并对肿瘤生长进行监测(图51A)。如体重所示，在疫苗接种期间无治疗组引起明显毒性(图61)。此外，在最后一次疫苗接种后，从注射有不同治疗组的小鼠中分离脾细胞，以评估其体外特异性靶细胞杀伤能力。即使在效应子与靶标(E:T)的低比例下，来自用EDIT免疫的小鼠的脾细胞也表现出显著的特异性杀伤(图51B)。对于测试的所有比例，只有EDIT组的杀伤效率的倍数变化保持在1以上(图51C)。这两个研究表明，与任何其它疫苗接种相比，EDIT诱导了更高的OVA特异性应答。肿瘤生长动力学清楚地证明了EDIT免疫是有效的。具体而言，肿瘤接种后17天，EDIT免疫使得生长速度比对照组慢约2.9倍，但游离NP组与对照组相比没有表现出显著性差异(图51D)，而在第13天，EDIT使得比对照组和NP组分别慢约4.6倍和约3.5倍(图51E)。换句话说，在用抗原刺激时，通过EDIT免疫诱导的中央记忆成功地表现为对Eg-7 OVA的效应性免疫应答，并且能够显著减慢肿瘤生长速率，与阳性对照CpG同样有效，无需外源佐剂。游离的NP自身未显示出这样的记忆效果。来自所有不同治疗组的个体肿瘤生长曲线表明，与EDIT和CpG组相比，在对照组和NP组中，生长曲线指数化快得多(图51F-图51I)。值得注意的是，来自EDIT组的一只小鼠在整个研究过程中保持无肿瘤。EDIT显著延长了肿瘤指数化，从而增加了用替换策略进行治疗干预的窗口。

[0759] 讨论

[0760] 通过实施氧合过程，红细胞在维持生理稳态中起重要作用。然而，红细胞也是先天免疫系统的活性成员。已报道，某些病原体可以附着于红细胞细胞膜，被红细胞内的氧化物种中和，并最终被物理传递至脾脏中的免疫细胞(8、9)。这为开发下述靶向脾脏的生物模拟策略提供了真正的机会，所述策略为红细胞驱动的免疫靶向(EDIT)，其利用抗原从红细胞表面向脾脏进行呈递。

[0761] 通常，由于在肺毛细血管中被拉伸的红细胞所经历的剪切应力能够使粒子在肺中脱落，红细胞搭载已被探索用于肺靶向应用(17、18)。这使将货物递送至脾脏变得具有挑战性。使纳米粒子从肺到脾脏的分布发生偏斜(skewing)的主导因素是纳米粒子与红细胞的初始进给比。该参数的调节有助于改善在肺中的剪切耐受性，从而允许小部分纳米粒子在

肺中脱离，从而使更大部分能够靶向于其它地方。同时，对红细胞膜诱导的轻微改变使脾脏成为天然靶标。体外剪切研究表明，增加NP:红细胞的进给比显著降低剪切诱导的脱离。对于较高的NP:红细胞的进给比，在搭载的红细胞上的更高的纳米粒子密度是这种改善的剪切耐受性的可能原因。高负载的红细胞更具刚性，从而抵抗肺毛细血管中的生物力学拉伸(24)，从而降低肺积累。病原体从红细胞表面转移到脾脏中的APC的天然途径尚不清楚，然而，由粘附的病原体引起的膜改变已受到强烈影响。这一属性在我们的系统中是通过控制NP:红细胞的进给比并在磷脂酰丝氨酸上调方面评估暂时性损伤来进行工程化的。已知磷脂酰丝氨酸上调促进树突细胞与红细胞的相互作用(13、14)。这与在较高的纳米颗粒与红细胞比例下CD47受体的掩蔽相结合，可能使“缺失自我”的红细胞上的纳米粒子更容易被这些细胞摄取(29)。

[0762] 基于NP:红细胞比例对体外剪切耐受性和瞬时磷脂酰丝氨酸表达的影响，选择了300:1的最佳NP:红细胞比例。该比例也产生了纳米粒子在脾脏中的有效递送和持续存在。与涉及红细胞或其膜的过去的研究(其中，利用它们的衰老来靶向脾脏)相比，在我们的案例中，仅将粒子递送到脾脏，而红细胞继续保留在循环中，表明对红细胞膜的损伤是暂时性的，足以进行脾脏传递但不会导致红细胞自身被隔离。因此，EDIT提供了用于靶向脾脏(特别是脾脏中的抗原呈递细胞)的新途径。吞噬细胞耗竭研究表明，脾脏中的粒子不位于吞噬细胞内，表明它们存在于可进行利用以用于免疫调节的APC中。

[0763] 总体而言，对于对体液免疫应答和细胞免疫应答的治疗性评估，在给予治疗后接受各自的OVA激发，并监测治疗结果。因此，通过这些实验的设计，我们能够追踪对我们的预防性疫苗接种的记忆应答。体液免疫应答和细胞免疫应答显示出强的疫苗接种效果，与游离纳米粒子相比，EDIT表现出3倍高的抗体效价，2.2倍高的经历抗原的中央记忆T细胞和2.5倍低的调节性T细胞。此外，通过ELISA(用于抗OVA IgG抗体)和特异性细胞杀伤测定(对于脾细胞细胞毒性)对结果进行评估，表明这些应答是高度特异性的。

[0764] 这种佐剂效应可以有效地用于针对血液传播感染(例如疟疾)的疫苗接种，并且整体概念可以推测为在静脉内疫苗接种之后产生全身性或组织特异性记忆应答(17、30)。作为概念的证据，成功地在预防性模型中将EDIT产生的免疫应答用于驱动治疗性应答。EDIT介导的免疫能够通过增加癌症免疫周期的平衡阶段来显著减慢肿瘤生长(31)，与外源佐剂CpG表现同样出色，从而增加了治疗干预的窗口。可以注意到CpG和EDIT策略之间存在一些差异。与作为非天然分子的CpG不同，RBC在这里起到了天然佐剂的作用。此外，CpG通常与疫苗混合，从而使其从注射位点扩散开来，这可能会引起潜在的安全问题。相比之下，仅当纳米粒子附着在受扰动的红细胞上时，EDIT才有效，这固有地改善了安全性。最后，我们的数据证实了，EDIT可以加入超过200nm PS的纳米粒子，包括不同尺寸的PS、合成材料或生物材料。

[0765] 因此，EDIT为疫苗接种策略提供了新的视角。文献中已经报道了几种佐剂，并在临床上使用(32)。通常，佐剂是非人源的，这是为何免疫应答被触发的主要原因。作为第一个Gaston Ramon明矾佐剂，这种基于佐剂的策略是基于将抗原与某种刺激免疫系统的外源化学品/材料混合。相比之下，我们报道了红细胞介导的抗原递送，其作为“天然佐剂”刺激免疫应答。以身体最“自我”的细胞为基础的无佐剂疗法代表了一种推动安全疫苗发展的独特方式。

[0766] 总之，我们开发了生物模拟策略，其利用红细胞的先天免疫功能而对将纳米粒子向脾脏的高效传递进行了工程化。从根本上，它代表了将纳米粒子递送至脾脏的新途径，其不涉及对纳米粒子本身的大量修饰。由EDIT传递的纳米粒子产生了能够驱动治疗性应答的强免疫记忆。该平台是将纳米粒子靶向于脾脏的多功能策略，而无需特定修饰。

[0767] 材料和方法

[0768] 材料

[0769] 羧酸聚苯乙烯纳米粒子购自Polysciences，Inc.(PA，USA)。PLGA纳米粒子和六甲基二硅氮烷(HMDS)购自Sigma Aldrich(MO，USA)。GM-CSF获得自PeproTech(NJ，USA)。Nunc™Lab-Tek™II Chamber Slide™系统、细胞染色缓冲液、Alexa Fluor 647卵白蛋白、Alexa Fluor 647NHS试剂、以及磷酸盐缓冲生理盐水(1X)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)获得自Thermo Fischer Scientific(MA，USA)。锂肝素涂覆的微量采集管获得自BD Medical Technology(MA，USA)。组织解离管和肺解离试剂盒获得自Miltenyi Biotec(德国)。0.9％生理盐水溶液获得自Teknova(CA，USA)。多聚甲醛获得自Electron Microscopy sciences(PA，USA)。Clodrosome®获得自Encapsula NanoSciences(TN，USA)。所有用于免疫细胞染色的荧光探针缀合抗体均购自Biolegend(CA，USA)。

[0770] 抗原涂覆的聚苯乙烯纳米粒子的制备和表征

[0771] 使用基于EDC的方法制备抗原涂覆的聚苯乙烯纳米粒子。简而言之，将2mg具有羧酸表面基团(PS-COOH)的聚苯乙烯纳米粒子悬浮在MES缓冲液(pH 5.5)中15分钟以活化羧基。随后加入1mg抗原蛋白，并在室温下在温和摇动下使其反应4h。通过将纳米粒子以12000g离心15分钟来消除未缀合的蛋白质。通过使用基于荧光的方法对上清液中的未缀合的蛋白质进行量化来测量蛋白质缀合效率。使用去离子(DI)水将蛋白质涂覆的纳米粒子洗涤两次。将粒子重悬于DI水中，并使用动态光散射(Malvern Zen3600，PA，USA)和扫描电子显微镜(Zeiss FESEM Supra 55VP，Zeiss FESEM Ultra 55，德国)对其尺寸、Zeta电位和多分散性指数进行评估。纳米粒子在其使用前立即重悬于1X PBS中。使用相同的方法制备抗原涂覆的PLGA纳米粒子。

[0772] 树突细胞(DC)对纳米粒子的内化以及纳米粒子对DC的活化

[0773] JAWII DC(ATCC®CRL-11904™)获得自ATCC(VA，USA)。将它们在具有如下物质的Alpha最小基本培养基中培养：核糖核苷、脱氧核糖核苷、4mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和5ng/mL鼠GM-CSF，80％；胎牛血清，20％。通过流式细胞术和共聚焦显微镜对抗原涂覆的纳米粒子的内化进行评估。对于流式细胞术分析，将2×10^6个JAWII DC接种在12孔板中，使其粘附过夜。在添加纳米粒子之前更换培养基。向每个孔中加入30μg Alexa Fluor 647标记的抗原涂覆的纳米粒子，并使其在37℃下孵育24小时。然后除去培养基，使用PBS洗涤细胞3次。使用细胞刮板轻轻地刮取细胞。通过流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II，CA，USA)对这些细胞进行分析。对于共聚焦显微镜，将2×10^5个JAWII DC接种到2孔腔室中，并与流式细胞术分析类似地进行测试。用PBS洗涤细胞后，将细胞用4％(多聚甲醛)PFA固定10分钟。然后用0.01％Triton-X100将细胞透化，并用DAPI对细胞核染色。通过共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO ready)对加工细胞进行成像。

[0774] 为了评估抗原涂覆的纳米粒子对DC的活化，将2×10^6个JAWII DC接种在12孔板中

并使其粘附过夜。使用与纳米粒子摄取的流式细胞术分析相同的方案，将细胞与抗原涂覆的纳米粒子一起孵育。处理后，用PBS洗涤细胞三次，并使用0.25％胰蛋白酶/EDTA溶液将细胞从孔中脱离。使用流动染色缓冲液将细胞洗涤两次，并使用PE-CD80抗体(Biolegend，CA，USA)对CD80染色。通过流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II，CA，USA)对染色的细胞进行分析。

[0775] 抗原涂覆的纳米粒子在红血细胞(RBC)上的搭载

[0776] 使用肝素涂覆的注射器，通过末端心脏穿刺收集小鼠全血并储存在BD Microtainer血液收集管中。在冰上放置>30min后，在4℃下，将收集的全血以1000g离心10min，以除去血清和白膜层。使用冷的PBS将RBC层洗涤三次，并在4℃下以650g离心15min。将洗涤的RBC以10％(RBC储备溶液)的红细胞比容重悬于PBS中，并在4℃下储存以供以后使用。

[0777] 抗原涂覆的纳米粒子在RBC上的搭载使用先前报道的方法进行(18)。简而言之，通过倒反和移液将等体积的抗原涂覆的纳米粒子与等体积的10％RBC储备溶液混合。然后将混合物在12rpm下在旋转器上旋转40min。通过在4℃下以100g离心5min，将搭载的RBC与未结合的纳米粒子分离。然后使用PBS将搭载的样品洗涤两次，最终以10％(v/v)的浓度重悬于PBS中，用于进一步表征及以后使用。使用基于荧光的方法对RBC上搭载的纳米粒子的数量进行量化。使用DI水将25μL搭载的RBC样品(具有已知数量的RBC)裂解，在酶标仪上通过测量纳米粒子的荧光对纳米粒子浓度进行量化。用Alexa Fluor 647荧光，使用流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II，CA，USA)测定具有不同纳米粒子与RBC比例的携带纳米粒子的RBC的百分比，并通过共聚焦显微镜(Upright Zeiss LSM 710NLO ready，德国)进行确认。使用扫描电子显微镜(SEM)(Zeiss FESEM Supra 55VP，Zeiss FESEM Ultra 55)，以确认抗原涂覆的纳米粒子在RBC上的搭载。简而言之，使用4％戊二醛将搭载的样品固定1h。用PBS将它们洗涤两次以除去未反应的戊二醛。接下来，以增加的乙醇浓度(50-100％v/v)对固定的搭载的细胞进行连续洗涤，最终将它们重悬于六甲基二硅氮烷(HMDS)中，然后进行成像。如前所述进行体外剪切研究(18)。简而言之，将搭载的RBC重悬于10mL胎牛血清中，使用couette粘度计(AR-G2，TA仪器，DE，USA)施加6Pa的旋转剪切20min。如前所述，使用荧光对仍附着的纳米粒子进行量化。

[0778] 如前报道的，通过凝集测定(25)和磷脂酰丝氨酸(PS)测定(24)对纳米粒子搭载对载体RBC的影响进行评价。简而言之，对于凝集测定，将1％红细胞比容的初始或搭载的RBC分散到96孔U底板上。将板在37℃下放置1h，然后对凝集进行评估。考虑其被报道对载体红细胞有损伤，将200nm羧酸聚苯乙烯纳米粒子搭载的RBC用作阳性对照。对于PS测定，将0.01％红细胞比容的初始和搭载的RBC与荧光Annexin V-Alexa Fluor 488(与PS结合)在含有2mM $CaCl_2$的缓冲液中一起孵育15min。染色后，使用流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II，CA，USA)对样品进行分析。

[0779] 动物

[0780] 雌性Balb/c和C57BL/6小鼠(7-9周龄)购自Charles River实验室(MA，USA)。所有实验均根据剑桥哈佛大学文理学院的动物护理机构和使用委员会批准的方案进行。

[0781] 生物分布研究

[0782] 在健康的雌性Balb/c小鼠中进行所有生物分布研究。使用Alexa Fluor 647标记的

抗原来制备抗原涂覆的纳米粒子，用于生物分布研究。简而言之，在含有7μg抗原的剂量下，向雌性Balb/c小鼠(7-9周龄)静脉内给予游离或搭载的抗原纳米粒子。对于涉及吞噬细胞耗竭的研究，在静脉内注射制剂前48h，通过静脉内给予200μL的含有5mg/mL氯膦酸盐的Clodrosome®，使吞噬细胞耗竭。制剂给予后20min、6h或24h，将小鼠安乐死，提取包括血液、肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺和脑的主要器官。使用体内成像(PerkinElmer IVIS Spectrum，MA，USA)对提取的器官进行成像。通过分析器官的ROI，使用IVIS软件对器官中的荧光进行量化。通过用感兴趣的器官中的荧光除以所有测试器官中的总荧光，估计器官中积累的纳米粒子的注射剂量百分比(ID%)。

[0783] 对于搭载系统的体内追踪，通过CellTrace™ CFSE对RBC进行标记，并通过Alexa Fluor 647对抗原涂覆的纳米粒子进行标记。向雌性Balb/c小鼠(7-9周龄)静脉内给予双标记的搭载系统。在预定时间点(给予后0min、20min、6h和24h)收集血液。将收集的血液在流动染色缓冲液中以1:100的稀释度进行稀释，并通过流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II，CA，USA)进行分析。

[0784] EDIT诱导的免疫应答的表征

[0785] 在健康Balb/c小鼠中对EDIT诱导的体液免疫应答和细胞免疫应答进行评估。为了评估体液应答，在第0、7和14天，在含有7μg OVA的剂量下，向雌性Balb/c小鼠(7周龄)静脉内给予游离卵白蛋白(OVA)、OVA涂覆的纳米粒子和搭载的OVA涂覆的纳米粒子。随后，在三次给药免疫后7和14天，用以明矾为佐剂的OVA(7μg OVA和70μg明矾)的两次给药对小鼠进行皮下激发。在第一次给药激发前一天和第二次给药激发后13天，收集血液。使用先前报道的方法，通过ELISA对收集的血液中的抗OVA IgG抗体效价进行测量。(33)

[0786] 为了评估细胞应答，以7μg OVA的剂量，每周向雌性Balb/c小鼠(7周龄)静脉内给予生理盐水、卵白蛋白(OVA)涂覆的纳米粒子和搭载的OVA涂覆的纳米粒子，进行三次给药(第0、7和14天)。最后一次给药后5天(第19天)，收集小鼠的脾脏和肺。根据制造商的说明，使用相应的器官解离试剂盒(Miltenyi Biotec，德国)形成了器官细胞的单一细胞悬浮液。细胞用抗体染色并通过流式细胞术分析仪(BD LSR Analyzer II，NJ USA)分析。由如下制备不同的抗体鸡尾酒组：CD45(Biolegend，Cat no:103116，Clone:30-F11)、CD3(Biolegend，Cat no:100218，Clone:17A2)、CD4(Biolegend，Cat no:100421，Clone:GK1.5)、CD8a(Biolegend，Cat no:100711，Clone:53-6.7)、NKp46(Biolegend，Cat no:137606，Clone:29A1.4)、CD11c(Biolegend，Cat no:117307，Clone:N418)、颗粒酶B(Biolegend，Cat no:372208，Clone:QA16A02)、IFN-γ(Biolegend，Cat no:505849，Clone:XMG1.2)、IFN-γ(Biolegend，Cat no:505806，Clone:XMG1.2)、CD86(Biolegend，Cat no:105011，Clone:GL-1)和Am Cyan活/死细胞染色试剂盒(Thermo Fischer Scientific，MA，USA)。在它们使用之前，所有抗体均以最佳的稀释度进行稀释。

[0787] 肿瘤研究

[0788] 获得EG-7OVA(ATCC®CRL-2113™)用于ATCC(VA，USA)。在具有2mM L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基中培养细胞，所述培养基调节至含有1.5g/L碳酸氢钠、4.5g/L葡萄糖、10mM HEPES和1.0mM丙酮酸钠，并补充有0.05mM 2-巯基乙醇和0.4mg/mL G418，90％；胎牛血清，10％。在它们的体内使用前，将低传代数的细胞传代2-3次。

[0789] 在预防性模型中研究了EDIT在控制EG-7OVA肿瘤生长中的功效。在第0、7和14天，

在含有70μg OVA的剂量下,用游离OVA(处于生理盐水中)、OVA纳米粒子、搭载的OVA纳米粒子和游离OVA+CpG ODN 1826(10μg)对雌性C57BL/6小鼠(7周龄)进行免疫。在最后一次免疫后一天(第15天),将5×10^5个EG-7OVA细胞通过皮下接种到右乳腺脂肪垫中。在肿瘤接种后监测肿瘤尺寸和小鼠体重。

[0790] 统计分析

[0791] 使用Graphpad prism 8软件进行所有统计分析。使用正态性检验来确定正态性(normality)。使用学生t检验和单因素ANOVA及Tukey HSD检验来确定显著性:$p<0.05$*;$p<0.01$**;$p<0.001$***,$p<0.0001$****。使用FCS Express 7.0软件进行所有流式细胞术分析。

[0792] 参考文献

[0793] 1.T.R.Klei,S.M.Meinderts,T.K.van den Berg,R.van Bruggen,From the Cradle to the Grave:The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erytthrophagocytosis.Front Immunol 8,73(2017).

[0794] 2.N.Pishesha et al.,Engineered erythrocytes covalently linked to antigenic peptides can protect against autoimmune disease.Proc NatlAcad Sci USA 114,3157-3162(2017).

[0795] 3.K.M.Lorentz,S.Kontos,G.Diaceri,H.Henry,J.A.Hubbell,Engineered binding to erythrocytes induces immunological tolerance to E.coli asparaginase.Sci Adv 1,e1500112(2015).

[0796] 4.S.Kontos,I.C.Kourtis,K.Y.Dane,J.A.Hubbell,Engineering antigens for in situ erythrocyte binding induces T-cell deletion.Proc Natl Acad Sci USA 110,E60-68(2013).

[0797] 5.H.L.Anderson,I.E.Brodsky,N.S.Mangalmurti,The Evolving Erythrocyte:Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity.J Immunol 201,1343-1351(2018).

[0798] 6.V.Pretini etal.,Red Blood Cells:Chasing Interactions.Front Physiol 10,945(2019).

[0799] 7.J.Baum,R.H.Ward,D.J.Conway,Natural selection on the erythrocyte surface.Mol Biol Evol 19,223-229(2002).

[0800] 8.H.Minasyan,Mechanisms and pathways for the clearance of bacteria from blood circulation in health and disease.Pathophysiology 23,61-66(2016).

[0801] 9.H.Minasyan,Phagocytosis and oxvcytosis:two arms of human innate immunity.Immnol Res 66,271-280(2018).

[0802] 10.C.Halma et al.,Elimination of soluble 123I-labeled aggregates of IgG in patients with systemic lupus erythematosus.Effect of serum IgG and numbers of cryythrocyte complement receptor type 1.Arthritis Rheum 34,442-452(1991).

[0803] 11.J.C.Edberg,E.Wright,R.P.Taylor,Quantitative analyses of the binding of soluble complement-fixing antibody/dsDNA immune complexes to CR1 on human red blood cells.J Immnol 139.3739-3747(1987).

[0804] 12.C.Damgaard et al.,Viable bacteria associated with red blood cells and plasma in freshly drawn blood donations.PLoS One 10,e0120826(2015).

[0805] 13.D.B.Nguyen et al,Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells.Cell Physiol Biochem 28,847-856(2011).

[0806] 14.D.Z.de Back,E.B.Kostova,M.van Kraaij,T.K.van den Berg,R.van Bruggen,Of macrophages and red blood cells;a complex love story.Front Physiol 5,9(2014).

[0807] 15.C.H.Villa,A.C.Ansclmo,S.Mitragotri,V.Muzykantov,Red blood cells:Supercarriers for drugs,biologicals,and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems.Adv Drug Deliv Rev 106,88-103(2016).

[0808] 16.K.Danielyan et al.,Cerebrovascular thromboprophylaxis in mice by erythrocyte-coupled tissue-type plasminogen activator.Circulation 118.1442-1449(2008).

[0809] 17.J.S.Brenner et al,Red blood cell-hitchhiking boosts delivery ofnanocarners to chosen organs by orders of magnitude.Nat Commun 9,2684(2018).

[0810] 18.Z.Zhao,A.Ukidve,Y,Gao,J.Kim,S.Mitragotri,Erythrocyte leveraged chemotherapy(ELeCt):Nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis.Sci Adv 5,eaax9250(2019).

[0811] 19.A.C.Anselmo et al.,Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells.ACS Nano 7,11129-11137(2013).

[0812] 20.V.Bourgeaux,J.M.Lanao,B.E.Bax,Y.Godfrin,Drug-loaded erythrocytes:on the road toward marketing approval.Drug Des Devel Ther 10.665-676(2016).

[0813] 21.Z.Zhao,A.Ukidve,V.Krishnan.S.Mitragotri.Effect of physicochemical and surface propperties on in vivo fate of drug nanocarriers.Adv Drug Deliv Rev 143,3-21(2019).

[0814] 22.S.Kumar,A.C.Anselmo,A.Banerjee,M.Zakrewsky,S.Mitragotri.Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles.J Control Release 220,141-148(2015).

[0815] 23.S.U.Frick et al.,Functionalized polystyrene nanoparticles trigger human dendritic cell maturation resulting in enhanced CD4+ T cell activation.Macromol Biosci 12,1637-1647(2012).

[0816] 24.D.C.Pan et al.,Nanoparticle Properties Modulate Their Attachment and Effect on Carrier Red Blood Cells.Sci Rep 8,1615(2018).

[0817] 25.D.Pan et al,The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells.PLoS One 11,e0152074(2016).

[0818] 26.S.G.Moreno,Depleting Macrophages In Vivo with Clodronate-Liposomes.Methods Mol Biol 1784,259-262(2018).

[0819] 27.M.D.Martin,V.P.Badovinac,Defining Memory CD8 T Cell.Front Immunol 9,2692(2018).

[0820] 28.H.Unsoeld,H.Pircher,Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7.J Virol 79,4510-4513(2005).

[0821] 29.T.Yi et al.,Splenic Dendritic Cells Survey Red Blood Cells for Missing Self-CD47 to Trigger Adaptive Immune Responses.Immunity 43,764-775(2015).

[0822] 30.P.A.Darrah et al.,Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization.Nature 577,95-102(2020).

[0823] 31.D.S.Chen,I.Mellman,Oncology meets immunology:thecancer-immunity cycle.Immunity 39,1-10(2013).

[0824] 32.A.Di Pasquale,S.Preiss,F.Tavares Da Silva,N.Garcon,Vaccine Adjuvants:from 1920 to 2015 and Beyond Vaccines(Basel)3,320-343(2015).

[0825] 33.Z.Zhao et al.,Engineering of a hybrid nanoparticle-based nicotine nanovaccine as a next-generation immunotherapeutic strategy against nicotine addiction:A focus on hapten density.Biomaterials 123,107-117(2017).

[0826] 表6:不同粒子组合的物理化学性质

[0827]

粒子	尺寸(nm)*	多分散性(PDI)*	Zeta电位(mV)*
PS-OVA-500	540.93±13.03	0.072±0.031	-21.5±0.1
PLGA-OVA-200	155.73±1.03	0.064±0.033	-21.26±0.2
PS-KLH-200	261.43±2.98	0.073±0.01	-3.08±0.21

[0828] *数据表示为平均值±s.e.m.。

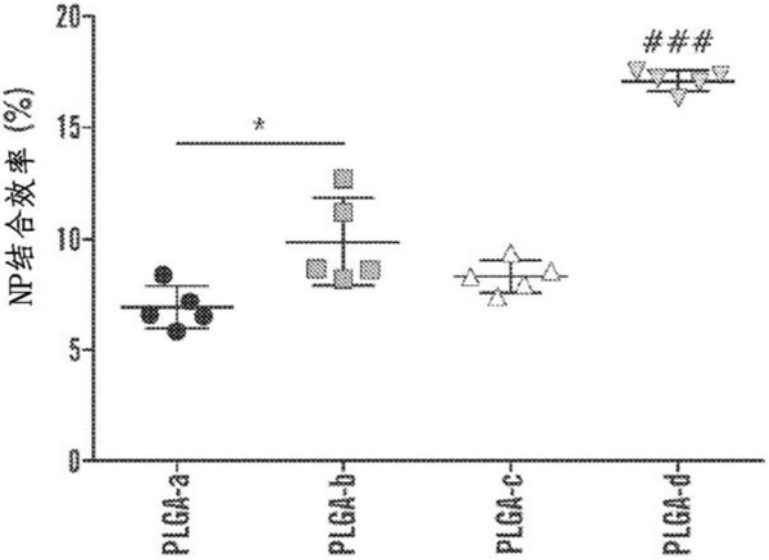

NP结合效率 (%)
20
15
10
5
0
*
###
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图1A

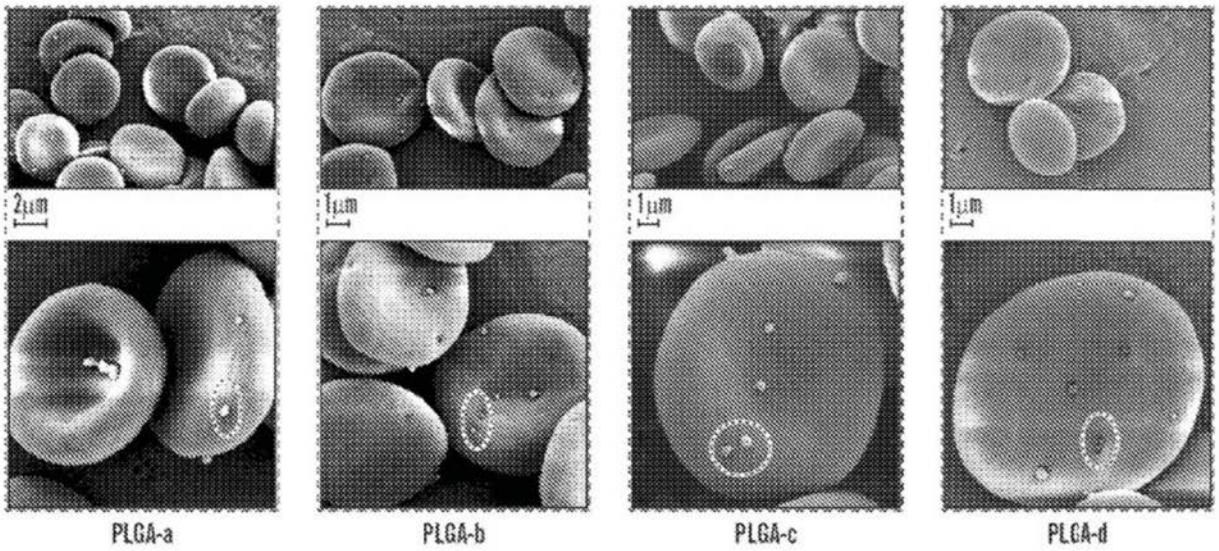

2μm
1μm
1μm
1μm
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图1B

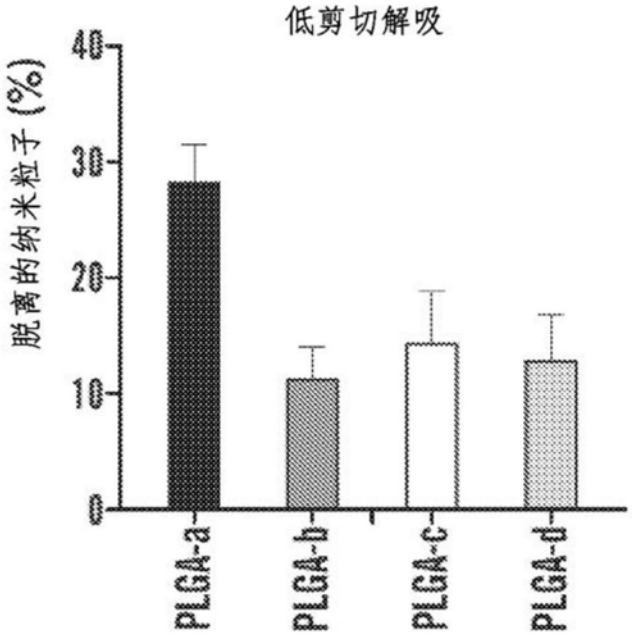

低剪切解吸
脱离的纳米粒子 (%)
0
10
20
30
40
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图2A

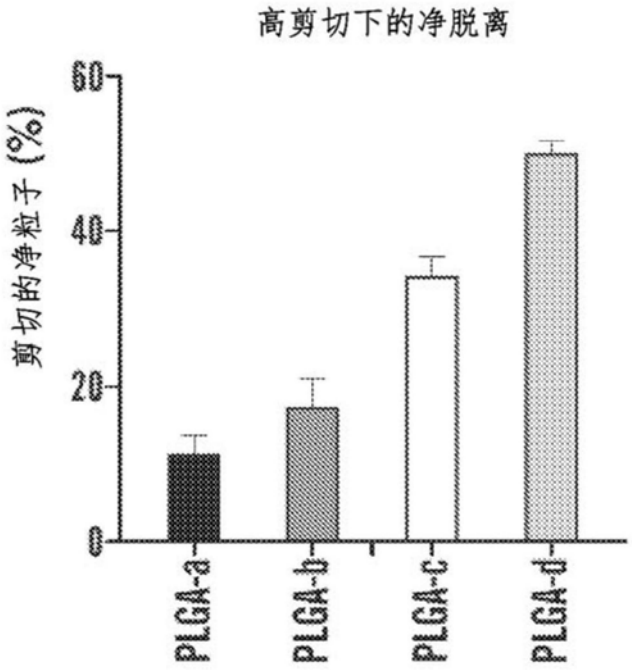

高剪切下的净脱离
剪切的净粒子 (%)
0
20
40
60
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图2B

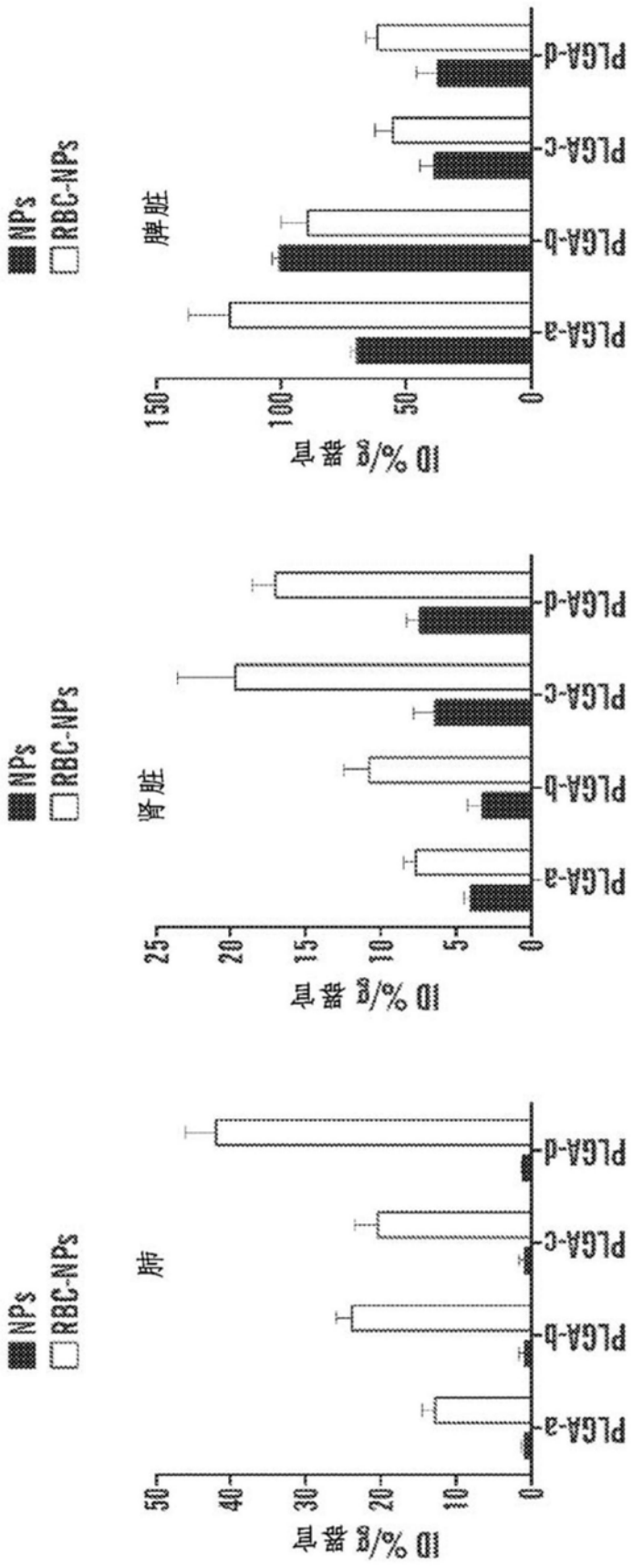

NPs
RBC-NPs
脾脏
ID %/g 器官
150
100
50
0
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d
NPs
RBC-NPs
肾脏
ID %/g 器官
25
20
15
10
5
0
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d
NPs
RBC-NPs
肺
ID %/g 器官
50
40
30
20
10
0
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图3

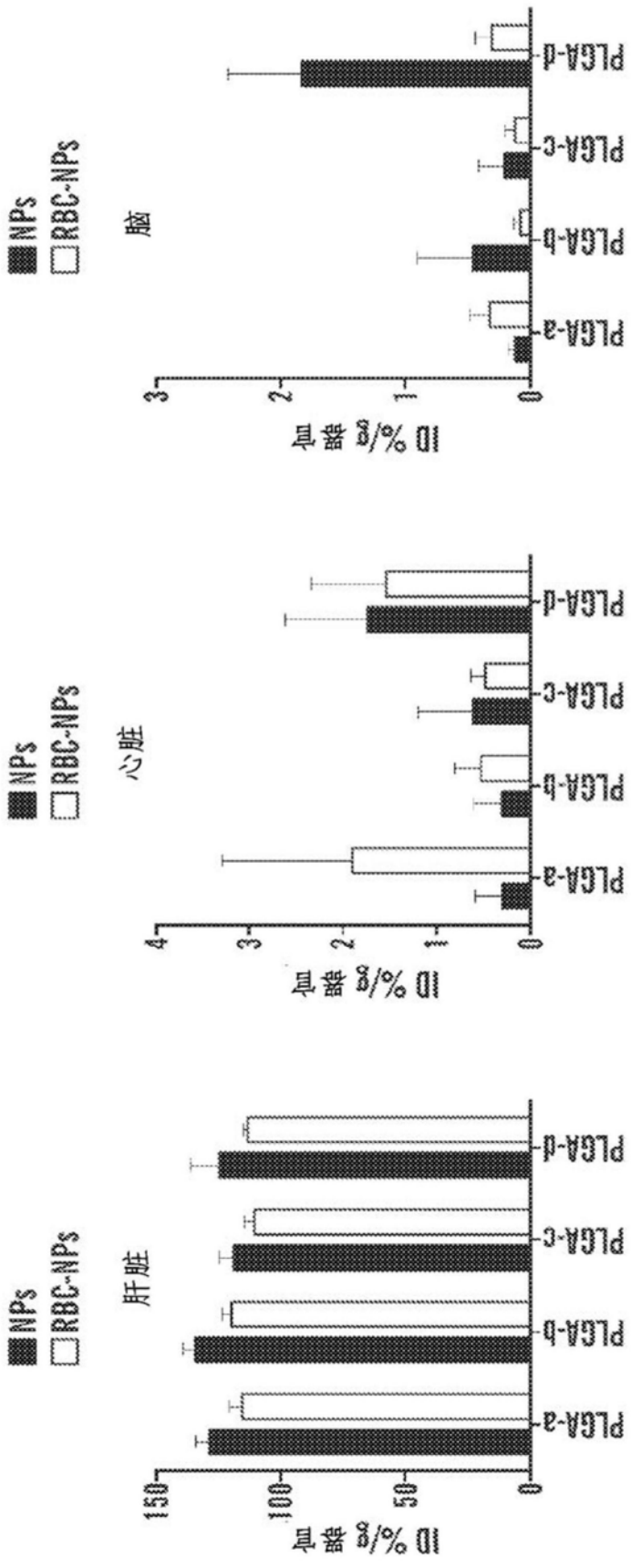

脑
NPs
RBC-NPs
ID %/g 器官
0
1
2
3
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d
心脏
NPs
RBC-NPs
ID %/g 器官
0
1
2
3
4
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d
肝脏
NPs
RBC-NPs
ID %/g 器官
0
50
100
150
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图3续

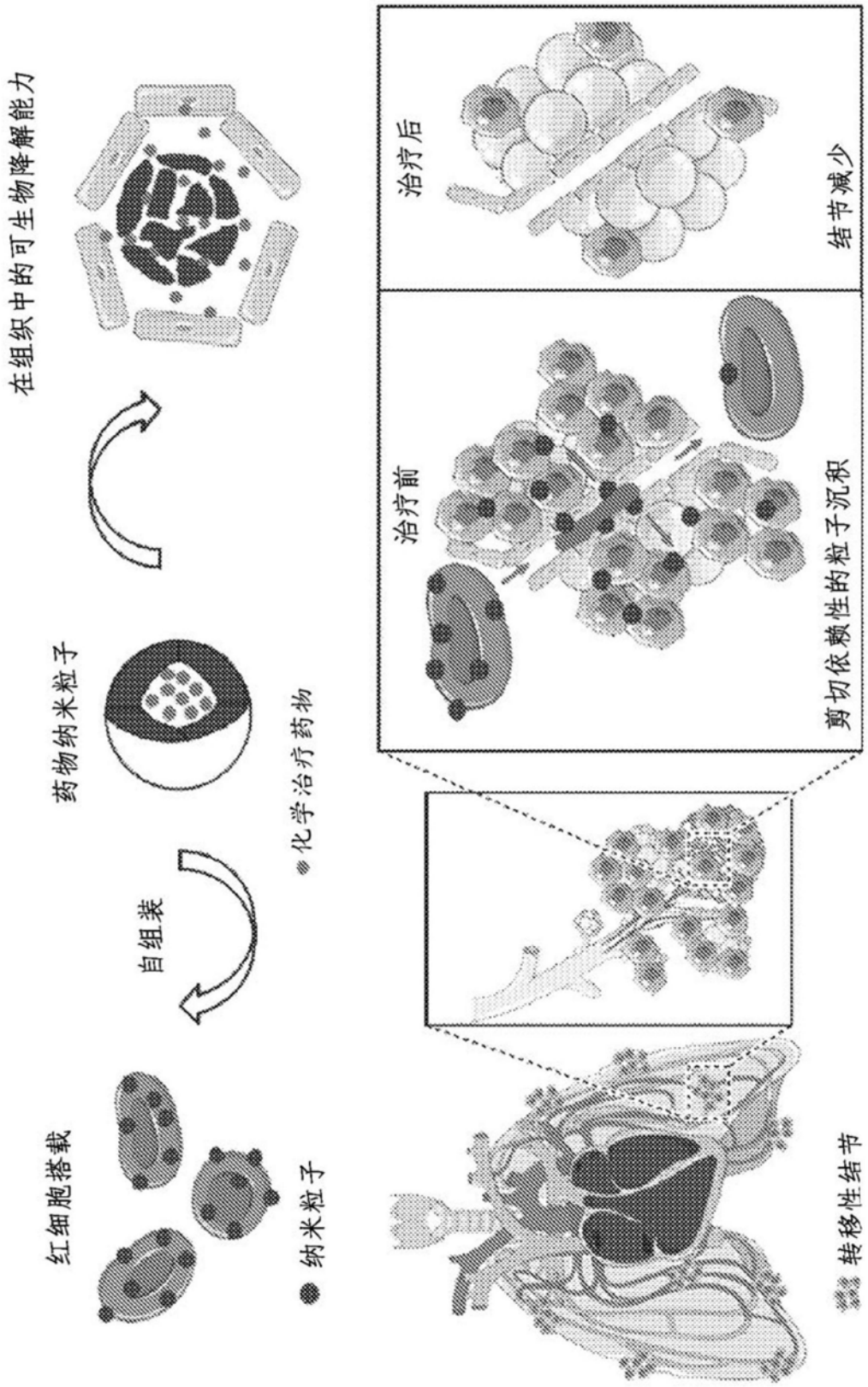

在组织中的可生物降解能力
药物纳米粒子
自组装
红细胞搭载
纳米粒子
化学治疗药物
治疗前
治疗后
剪切依赖性的粒子沉积
结节减少
转移性结节

图4A

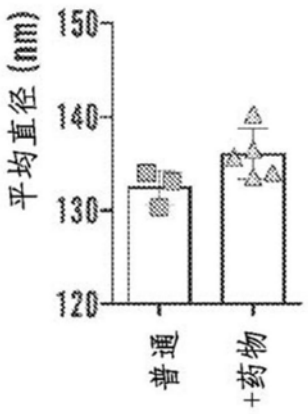

平均直径 (nm)
150
140
130
120
普通
+药物

图4B

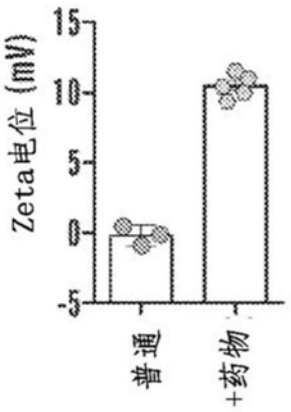

Zeta电位 (mV)
15
普通
+药物

图4C

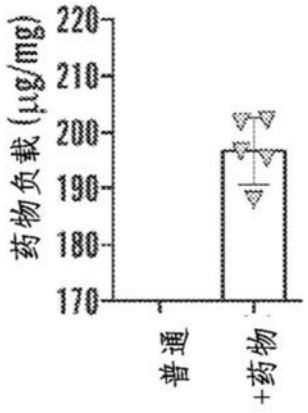

药物负载 (μg/mg)
220
210
200
190
180
170
普通
+药物

图4D

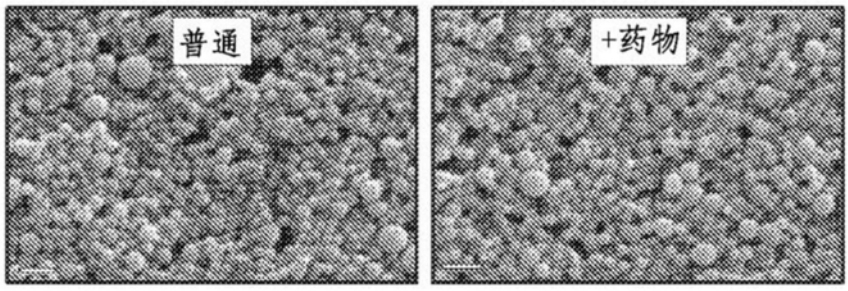

普通
+药物

图4E

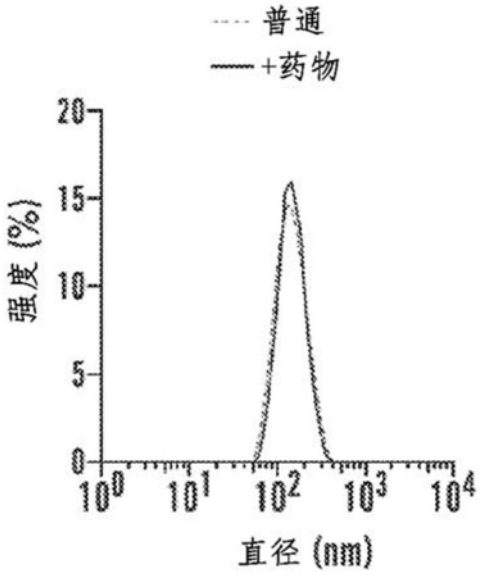

普通
+药物
强度 (%)
20
15
10
5
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
直径 (nm)

图4F

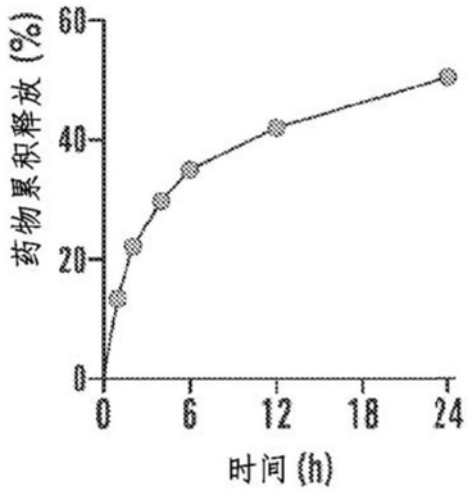

药物累积释放 (%)
60
40
20
0
0
6
12
18
24
时间 (h)

图4G

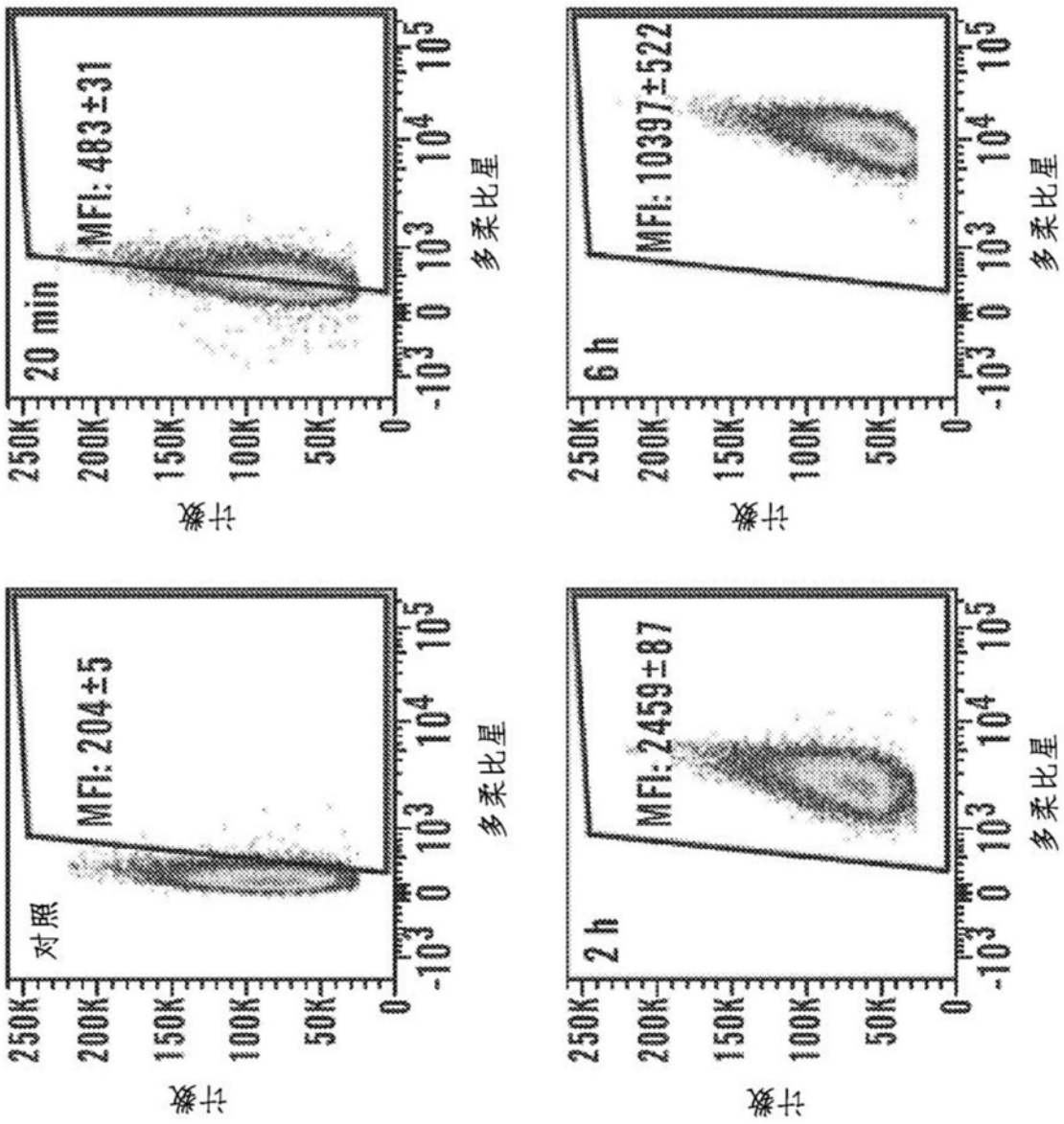

20 min
MFI: 483±31
6 h
MFI: 10397±522
对照
MFI: 204±5
2 h
MFI: 2459±87
计数
多荧比星
250K
200K
150K
100K
50K
0
-10³
0
10³
10⁴
10⁵

图4H

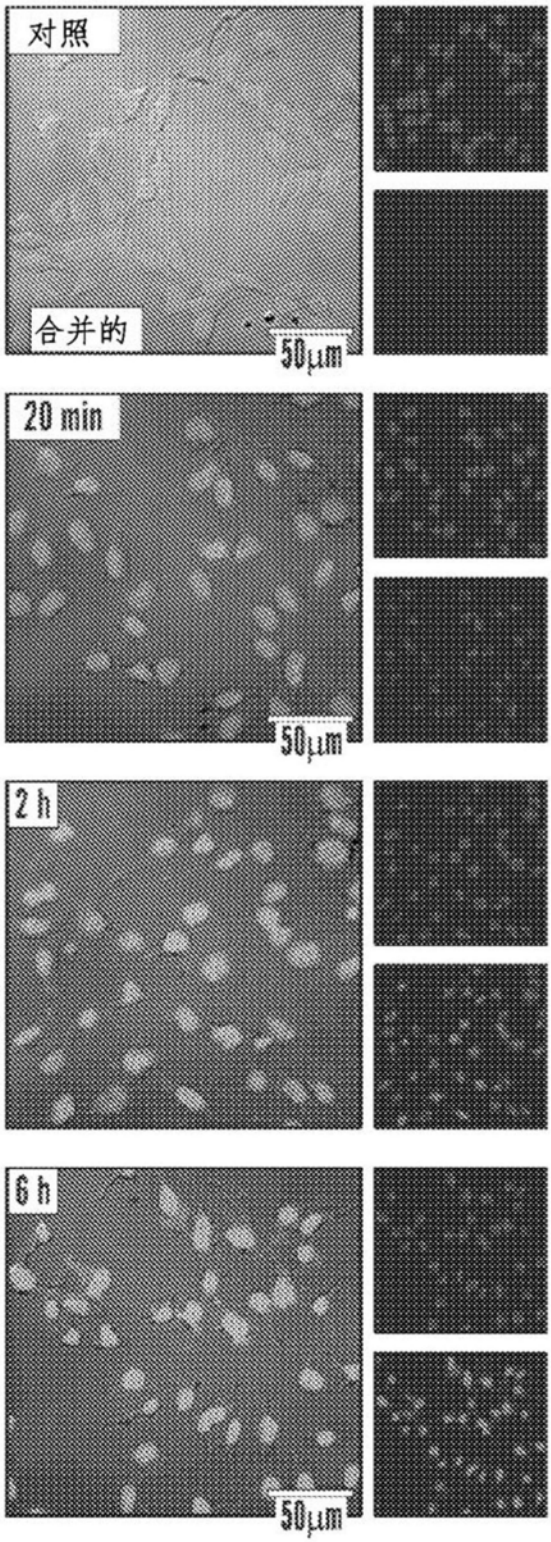


图4I

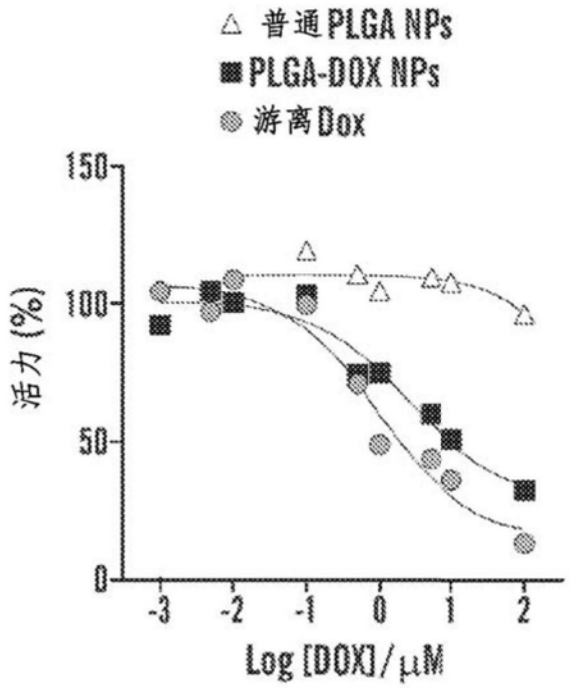

△ 普通PLGA NPs
■ PLGA-DOX NPs
● 游离Dox
150
100
50
0
活力(%)
-3
-2
-1
0
1
2
Log [DOX]/μM

图4J

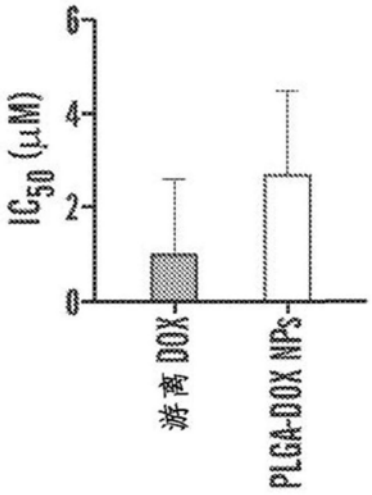

6
4
2
0
IC50 (μM)
游离 DOX
PLGA-DOX NPs

图4K

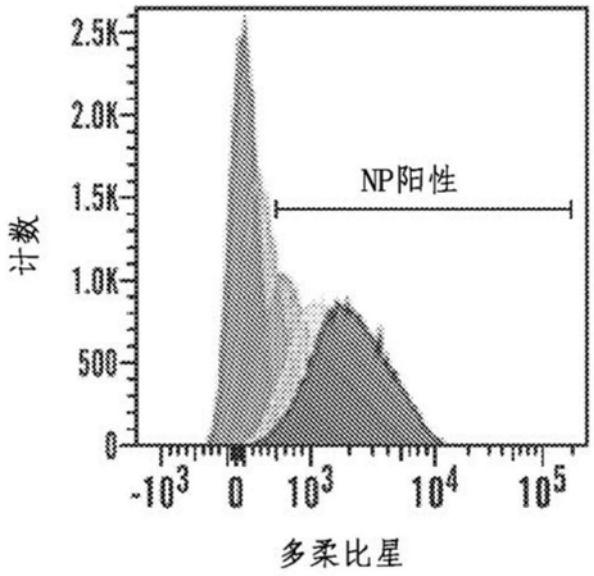

2.5K
2.0K
1.5K
1.0K
500
0
计数
NP阳性
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
多柔比星

图5A

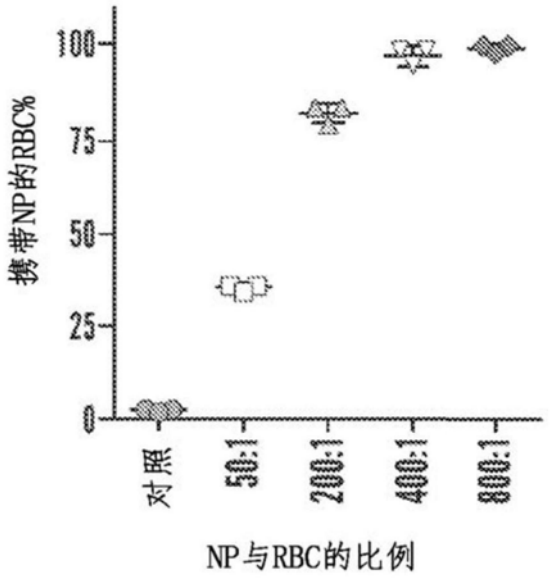

100
75
50
25
0
携带NP的RBC%
对照
50:1
200:1
400:1
800:1
NP与RBC的比例

图5B

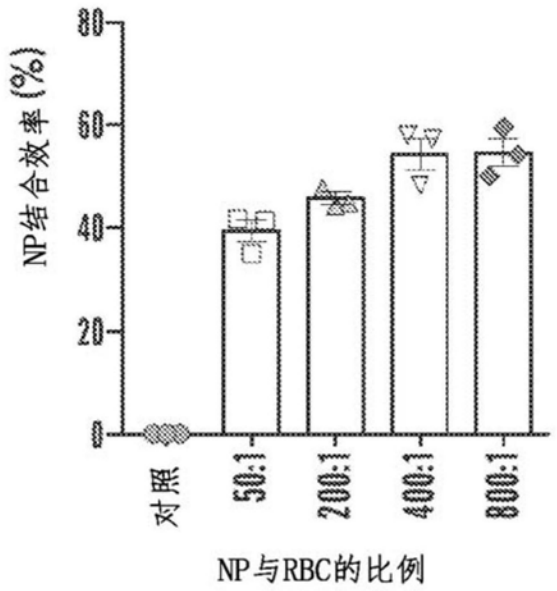

NP结合效率(%)
80
60
40
20
0
对照
50:1
200:1
400:1
800:1
NP与RBC的比例

图5C

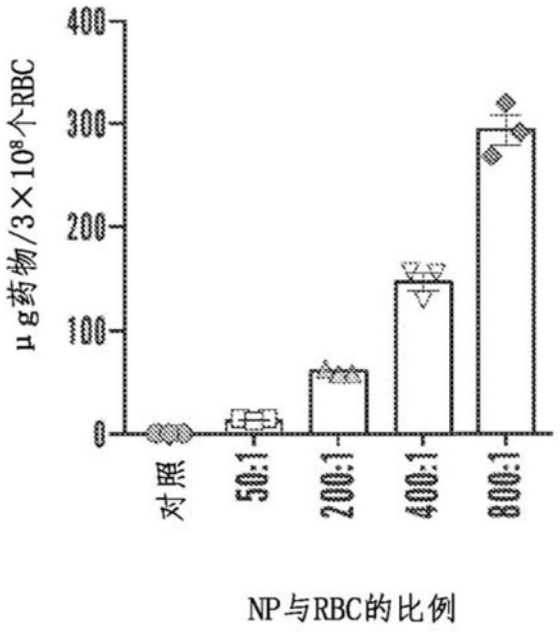

μg药物/3×10⁸个RBC
400
300
200
100
0
对照
50:1
200:1
400:1
800:1
NP与RBC的比例

图5D

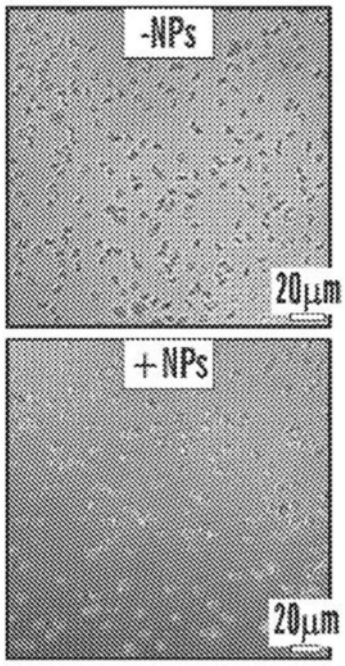


图5E

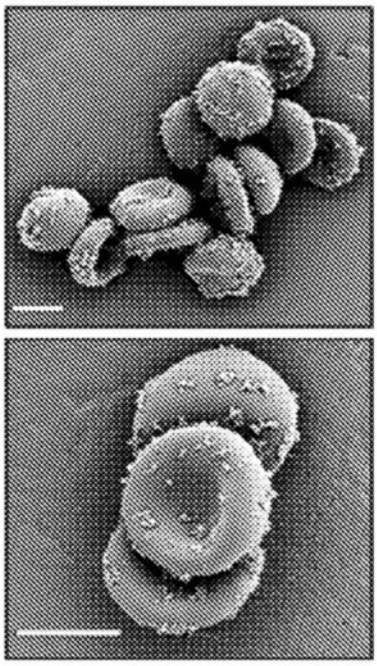


图5F

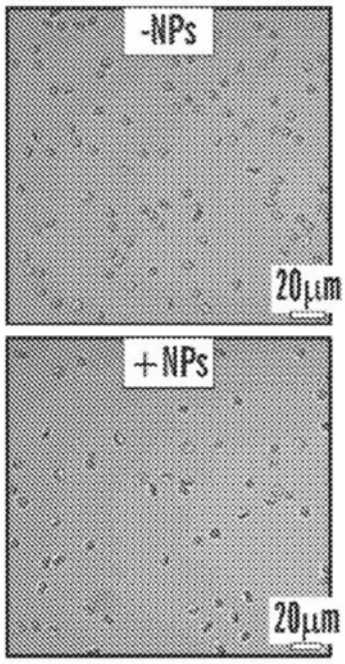


图5G

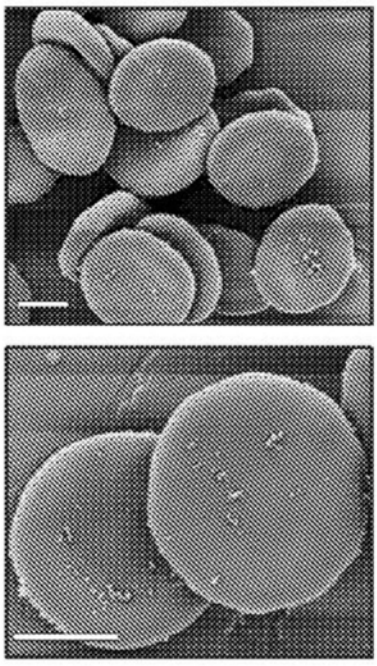


图5H

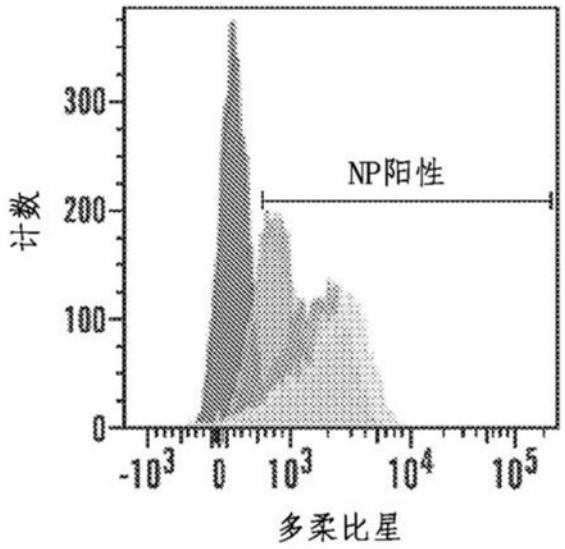

300
200
100
0
计数
NP阳性
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
多柔比星

图5I

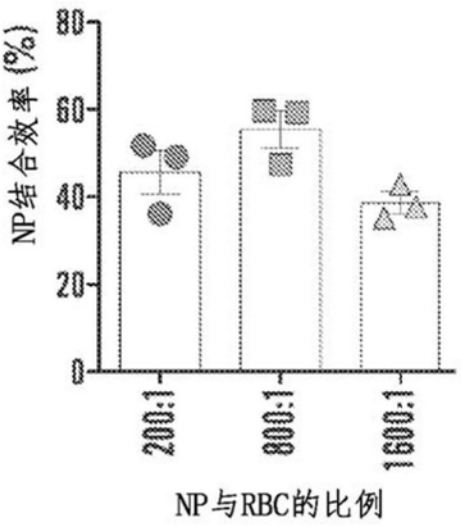

80
60
40
20
0
NP结合效率(%)
200:1
800:1
1600:1
NP与RBC的比例

图5J

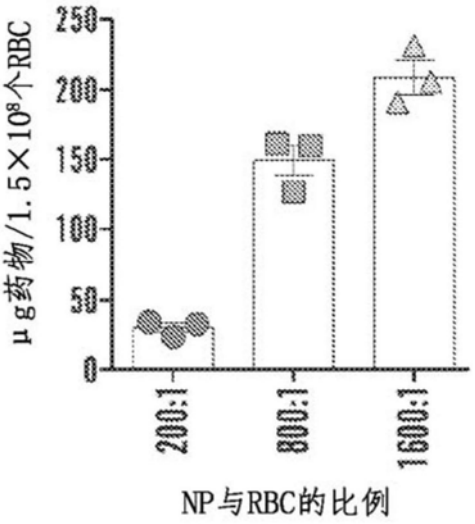

μg药物/1.5×10⁸个RBC
250
200
150
100
50
0
200:1
800:1
1600:1
NP与RBC的比例

图5K

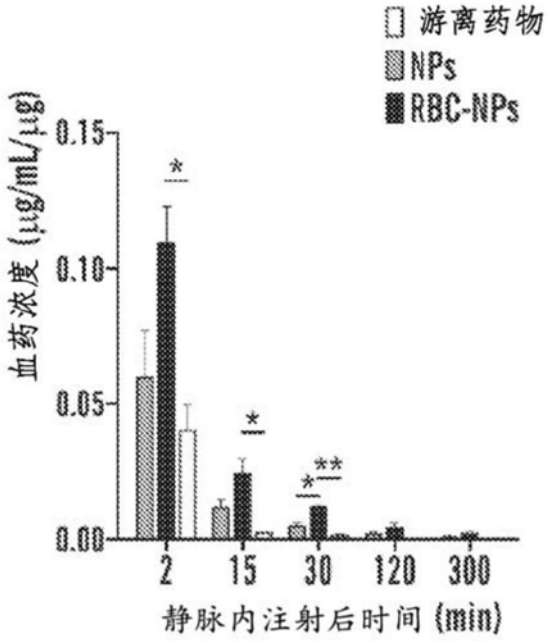

游离药物
NPs
RBC-NPs
血药浓度 (μg/mL/μg)
0.15
0.10
0.05
0.00
*
*
*
**
2
15
30
120
300
静脉内注射后时间 (min)

图6A

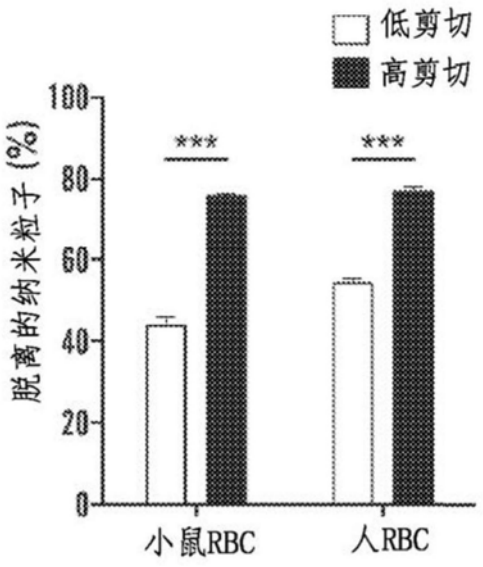

低剪切
高剪切
脱离的纳米粒子(%)
100
80
60
40
20
0
***
***
小鼠RBC
人RBC

图6B

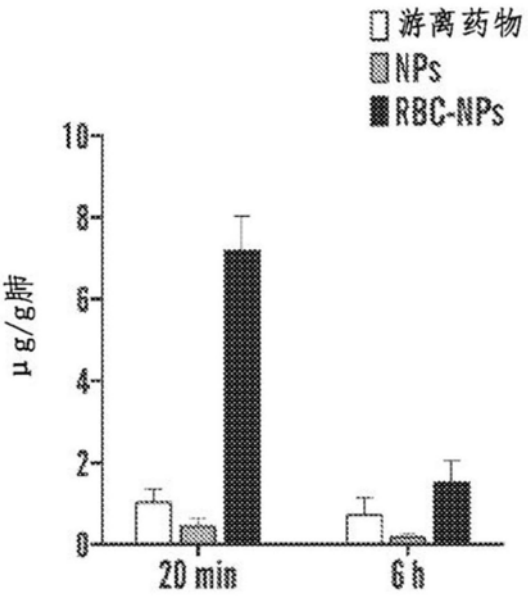

游离药物
NPs
RBC-NPs
μg/g肺
10
8
6
4
2
0
20 min
6 h

图6C

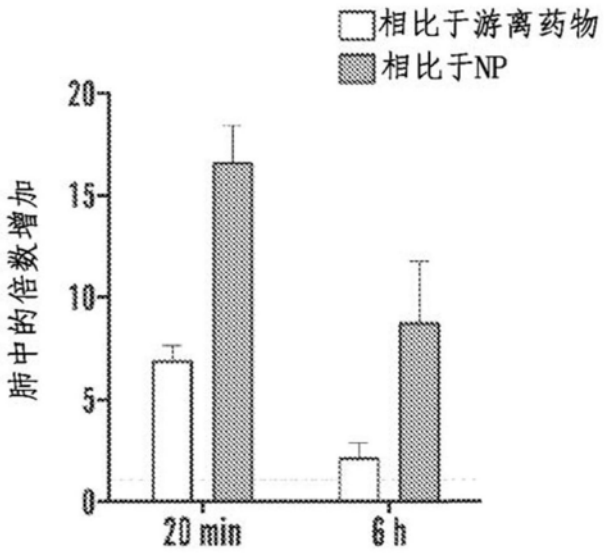


图6D

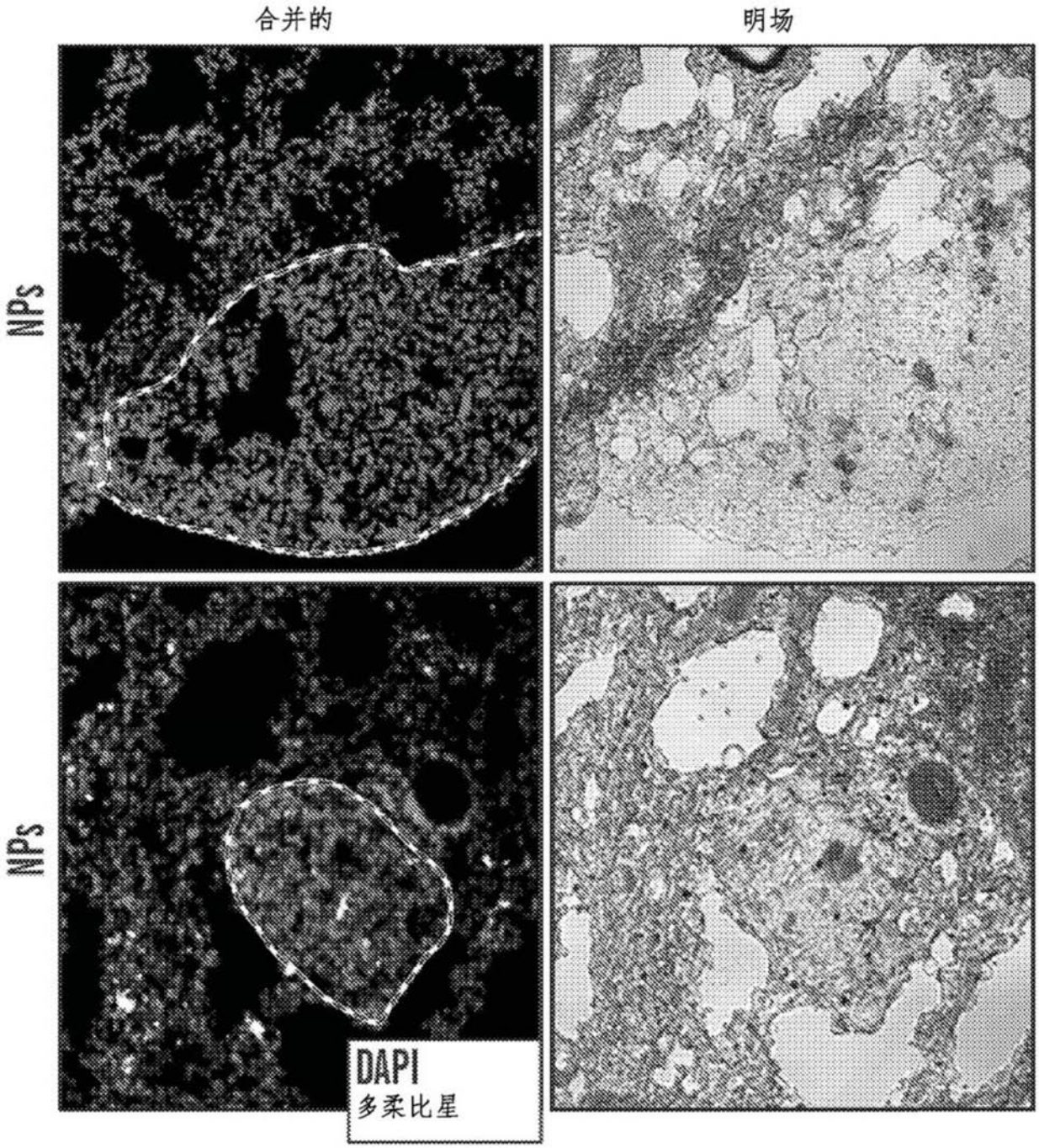


图6E

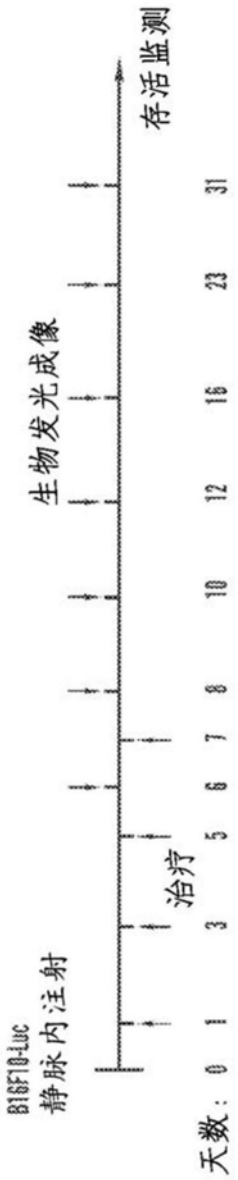


图7A

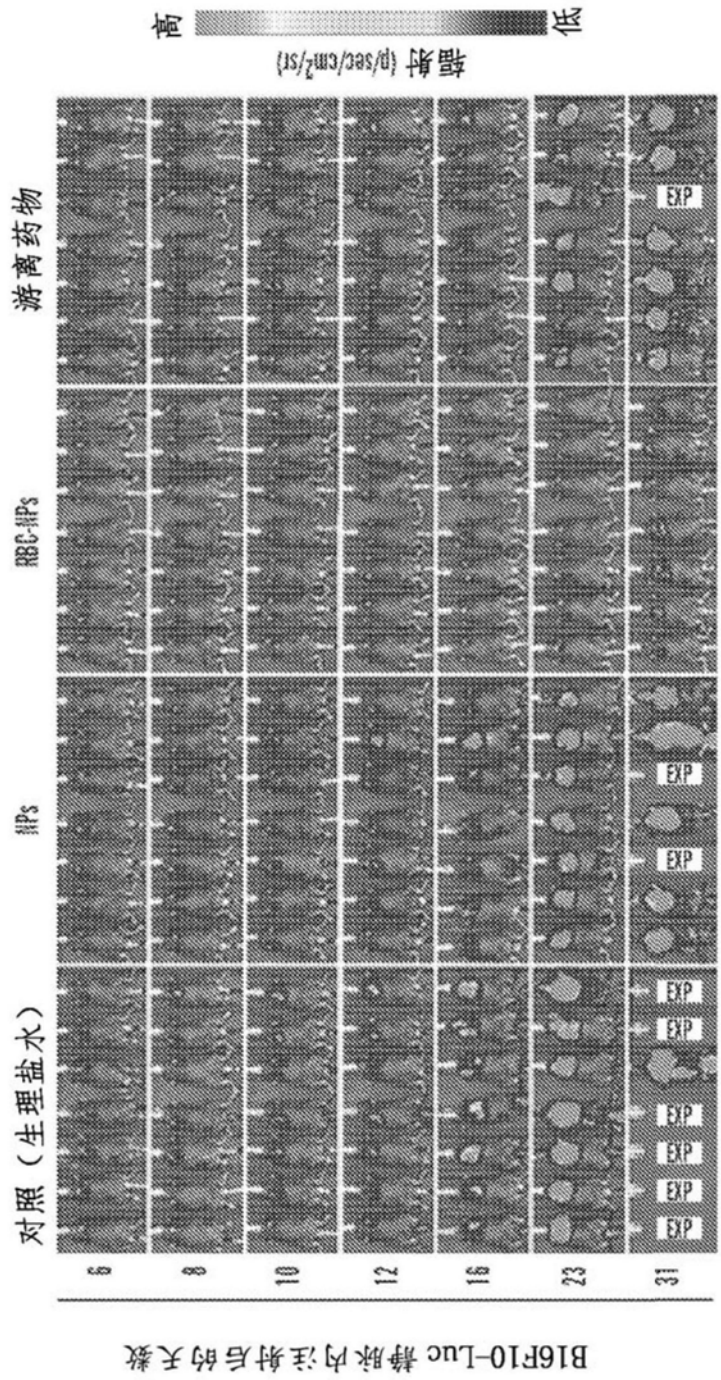

高
辐射 (p/sec/cm²/sr)
低
游离药物
RBC-MPs
MPs
对照（生理盐水）
EXP
6
8
10
12
16
23
31
B16F10-Luc 静脉内注射后的天数

图7B

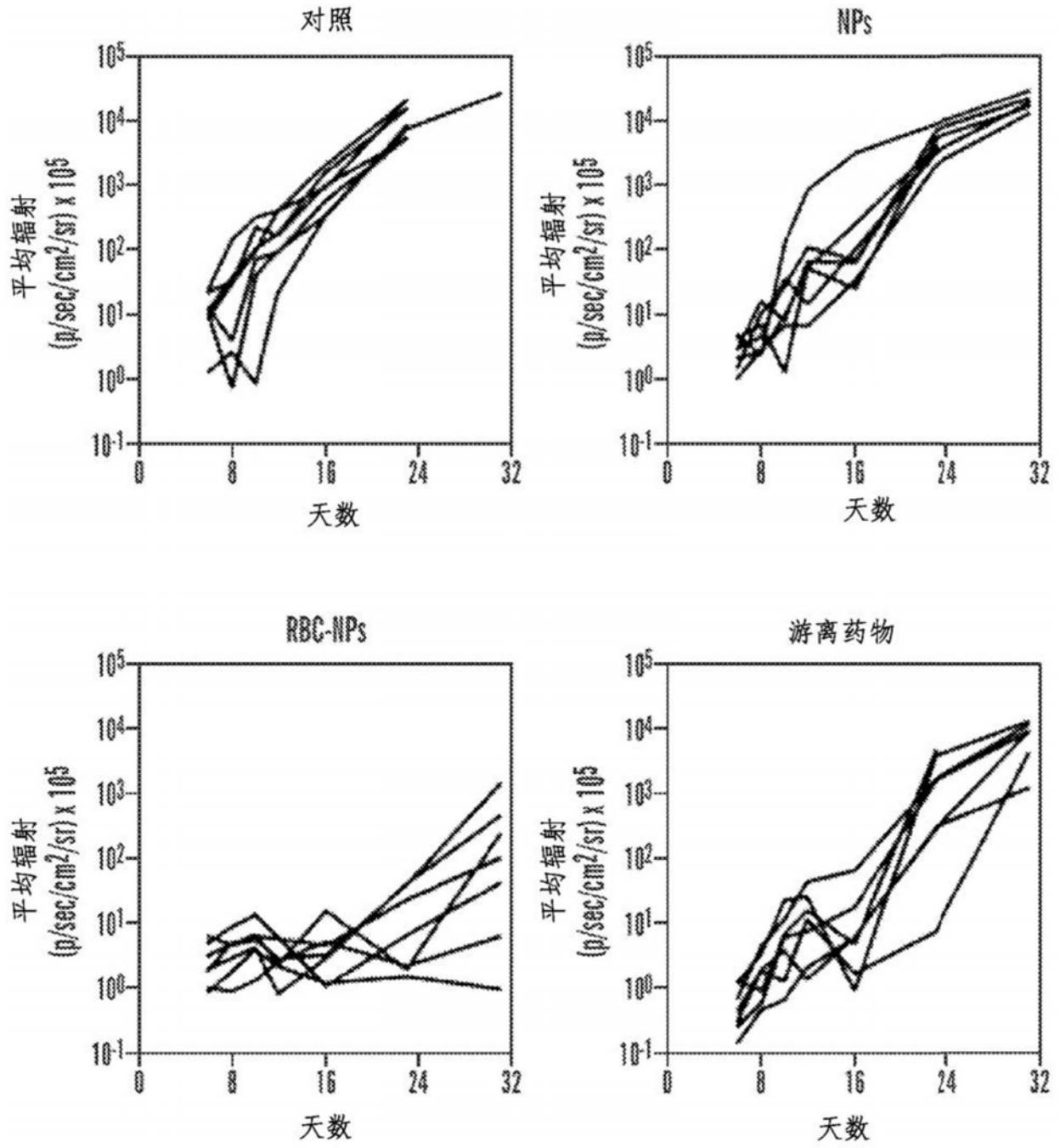


图7C

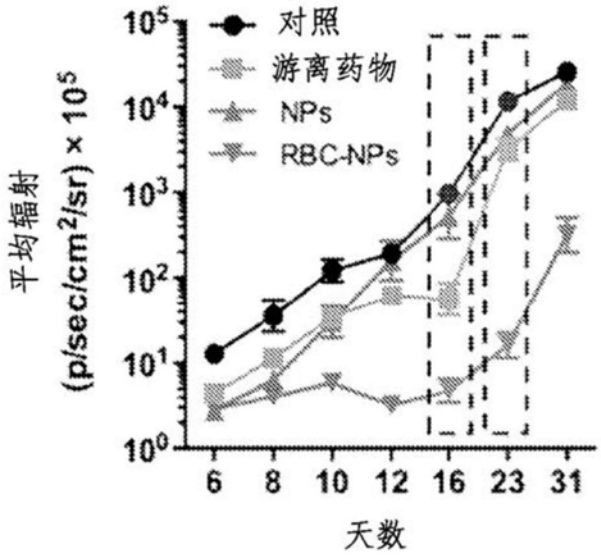

对照
游离药物
NPs
RBC-NPs
平均辐射
(p/sec/cm²/sr) × 10⁵
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
6
8
10
12
16
23
31
天数

图7D

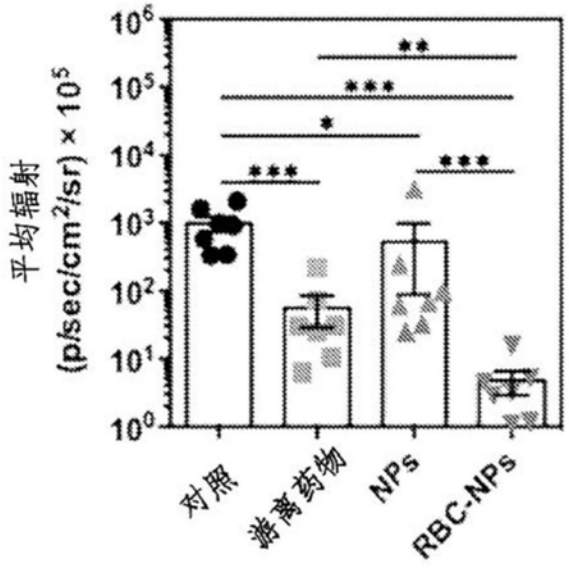

平均辐射
(p/sec/cm²/sr) × 10⁵
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
**
***
*
***
***
对照
游离药物
NPs
RBC-NPs

图7E

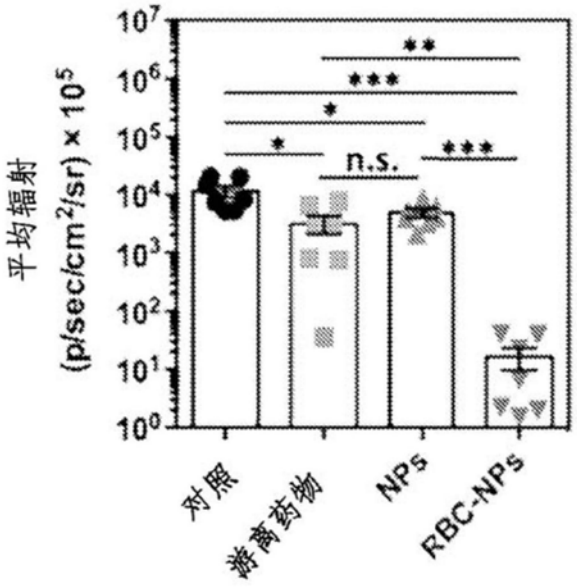

平均辐射
(p/sec/cm²/sr) × 10⁵
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
**
***
*
*
n.s.
***
对照
游离药物
NPs
RBC-NPs

图7F

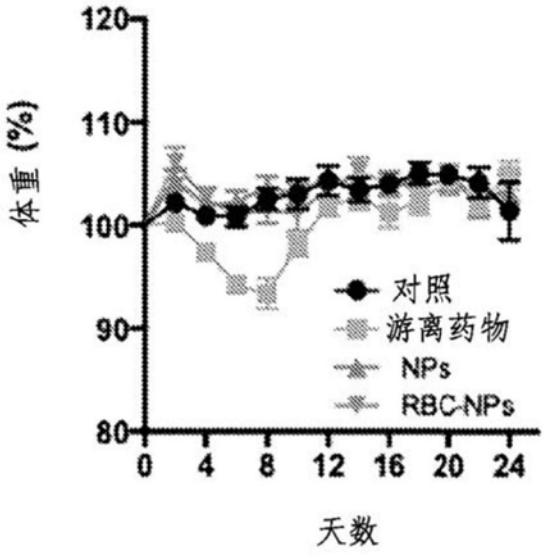

体重 (%)
120
110
100
90
80
0
4
8
12
16
20
24
天数
对照
游离药物
NPs
RBC-NPs

图7G

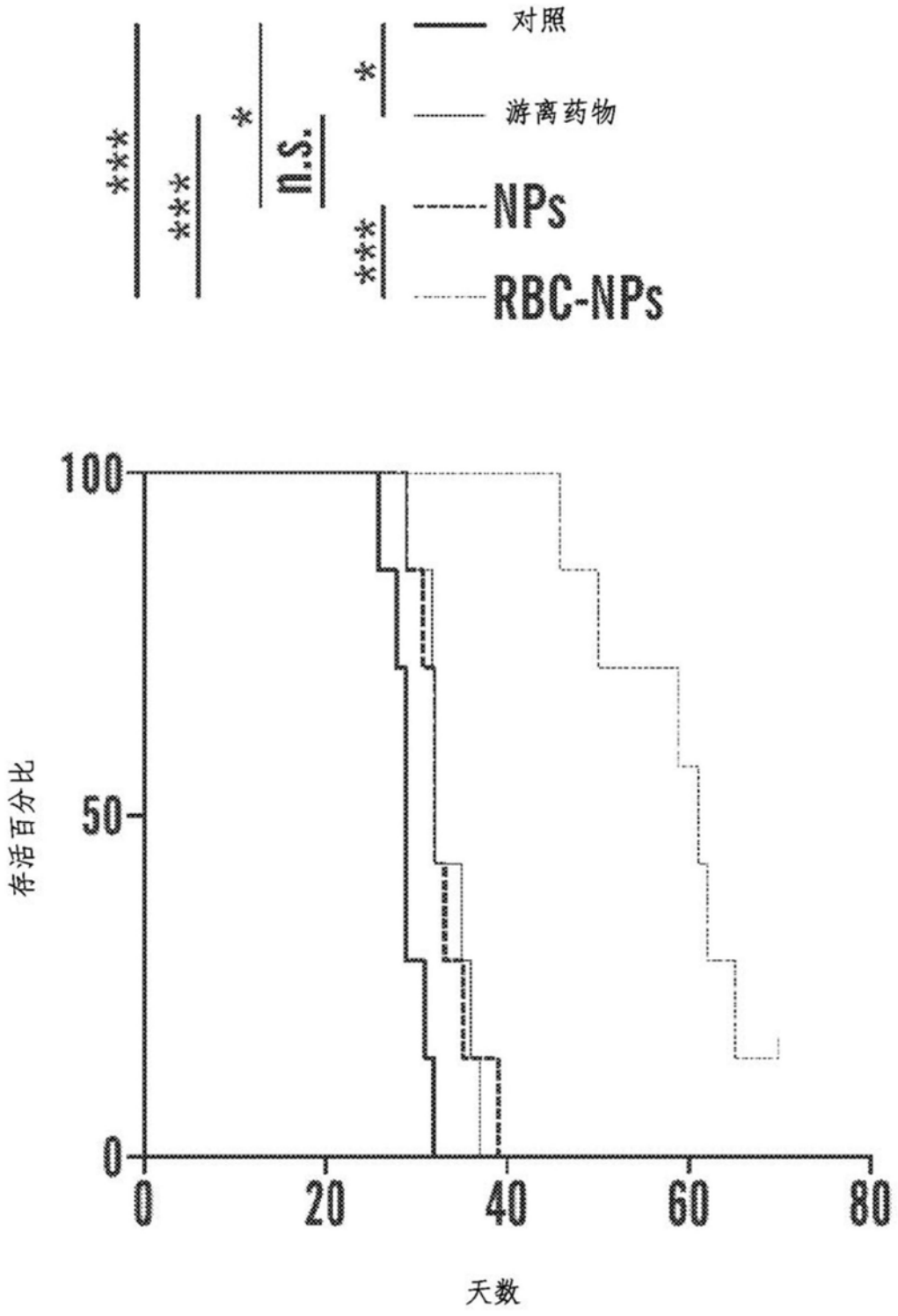


图7H



图8A

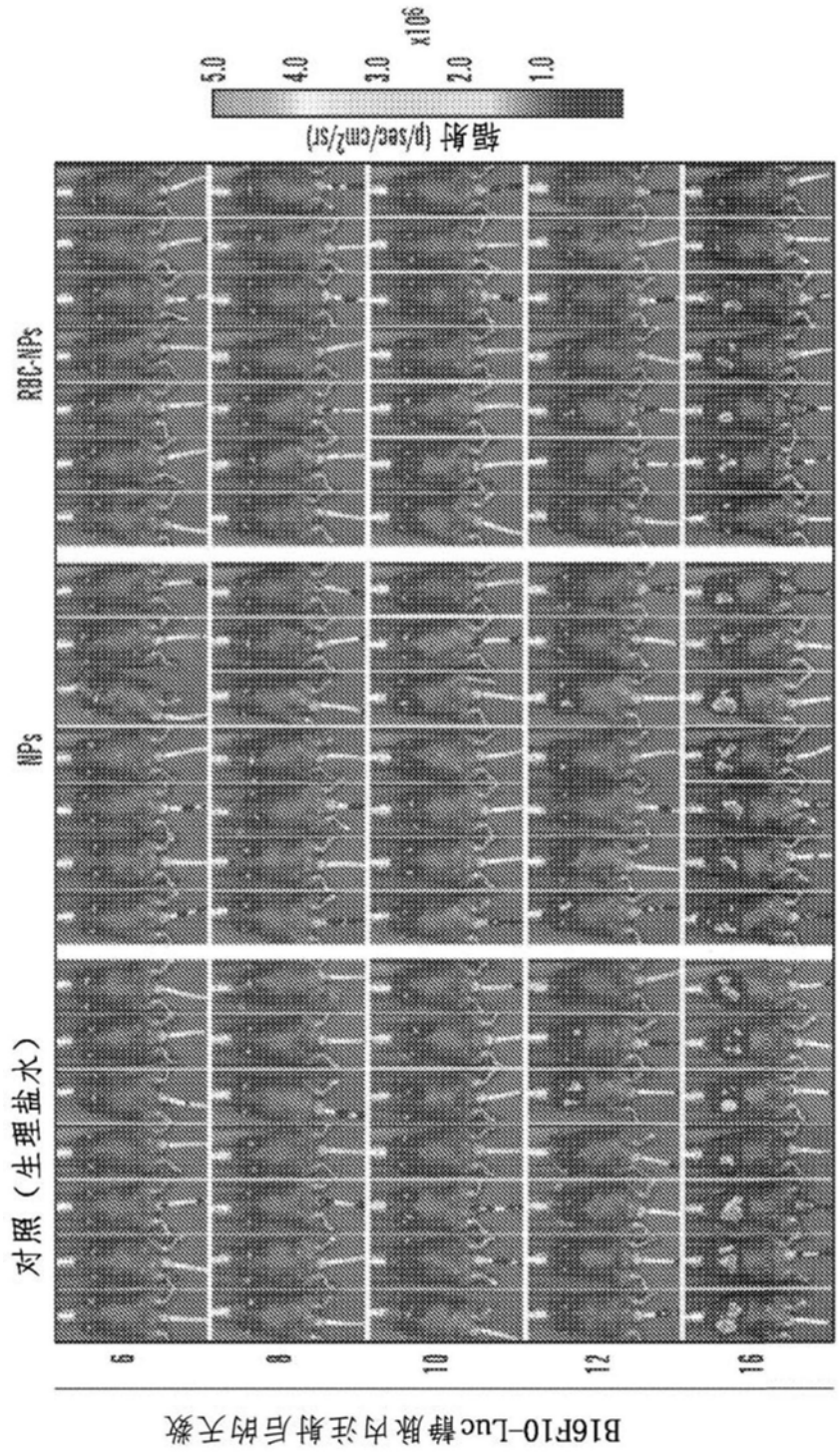

x10⁶
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
辐射 (p/sec/cm²/sr)
RBC-NPs
NPs
对照（生理盐水）
6
8
10
12
16
B16F10-Luc静脉内注射后的天数

图8B

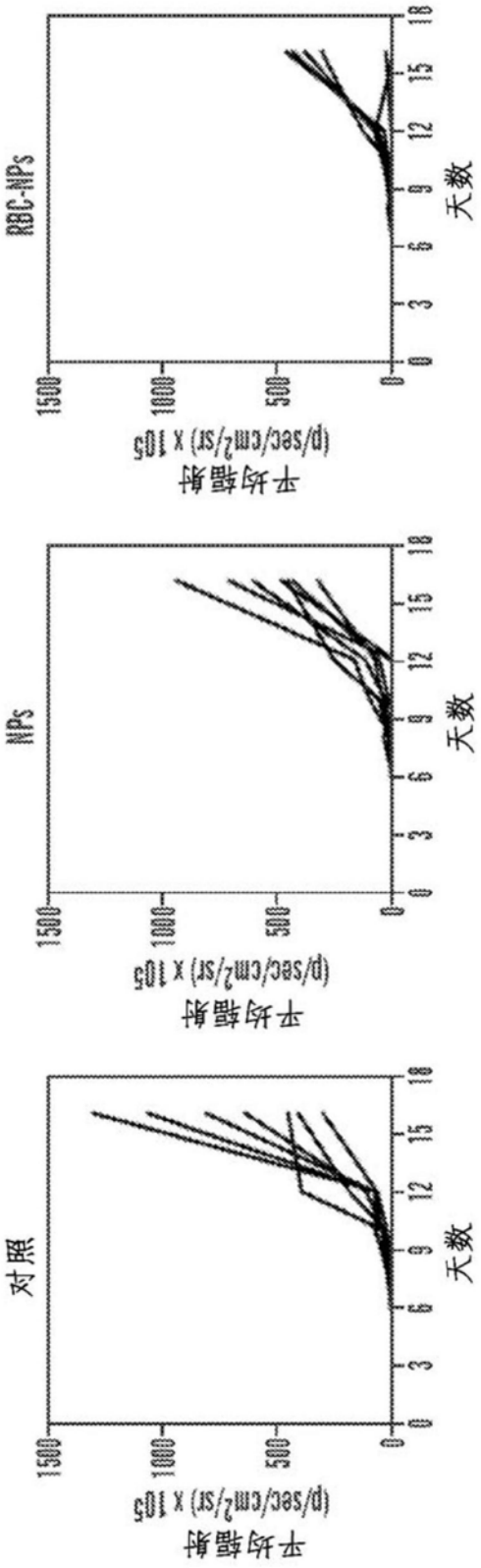

RBC-NPs
NPs
对照
平均辐射
(p/sec/cm2/sr) x 10^5
1500
1000
500
0
0
3
6
9
12
15
18
天数

图8C

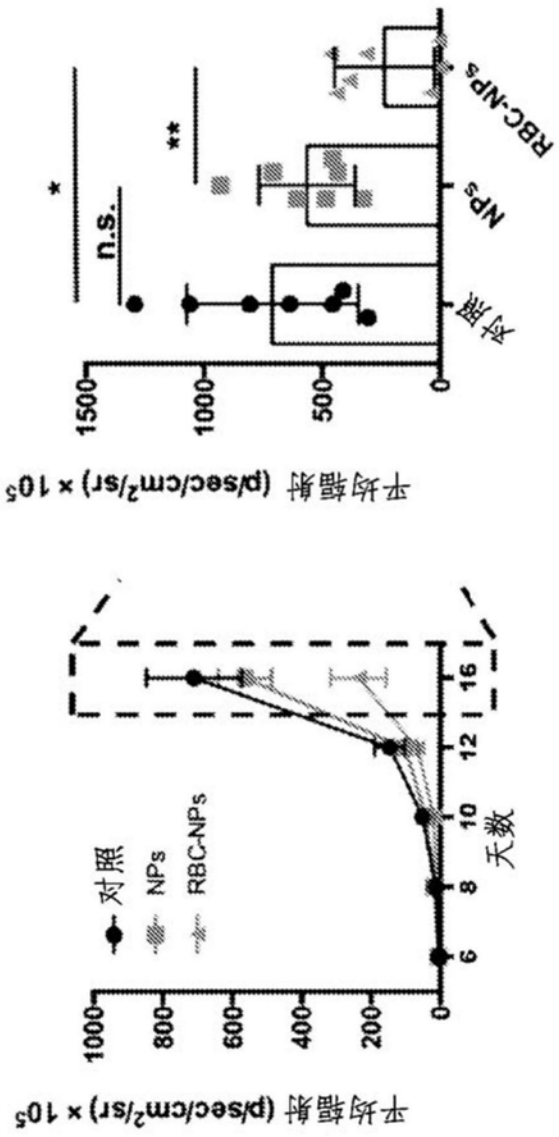

平均辐射 (p/sec/cm²/sr) × 10⁵
1500
1000
500
0
n.s.
*
**
对照
NPs
RBC-NPs
平均辐射 (p/sec/cm²/sr) × 10⁵
1000
800
600
400
200
0
6
8
10
12
16
天数
对照
NPs
RBC-NPs

图8D

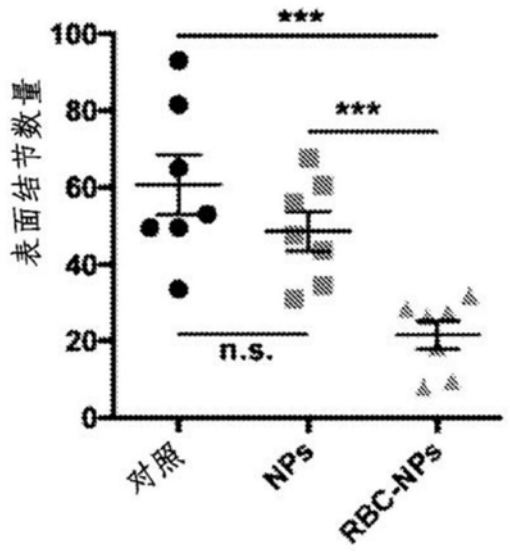

***
***
n.s.
表面结节数量
100
80
60
40
20
0
对照
NPs
RBC-NPs

图8E

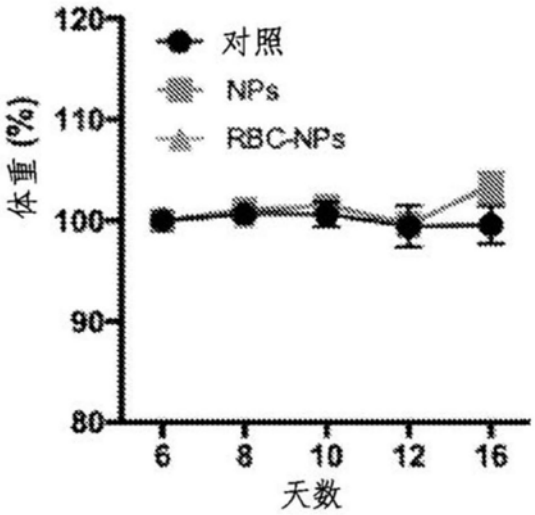

对照
NPs
RBC-NPs
体重 (%)
120
110
100
90
80
6
8
10
12
16
天数

图8F

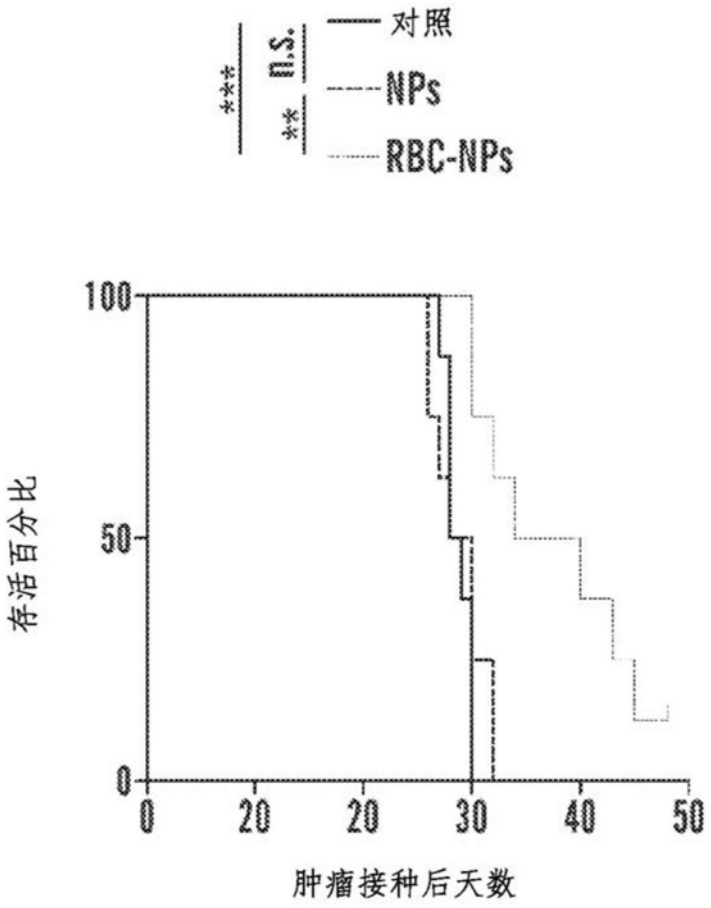


图8G

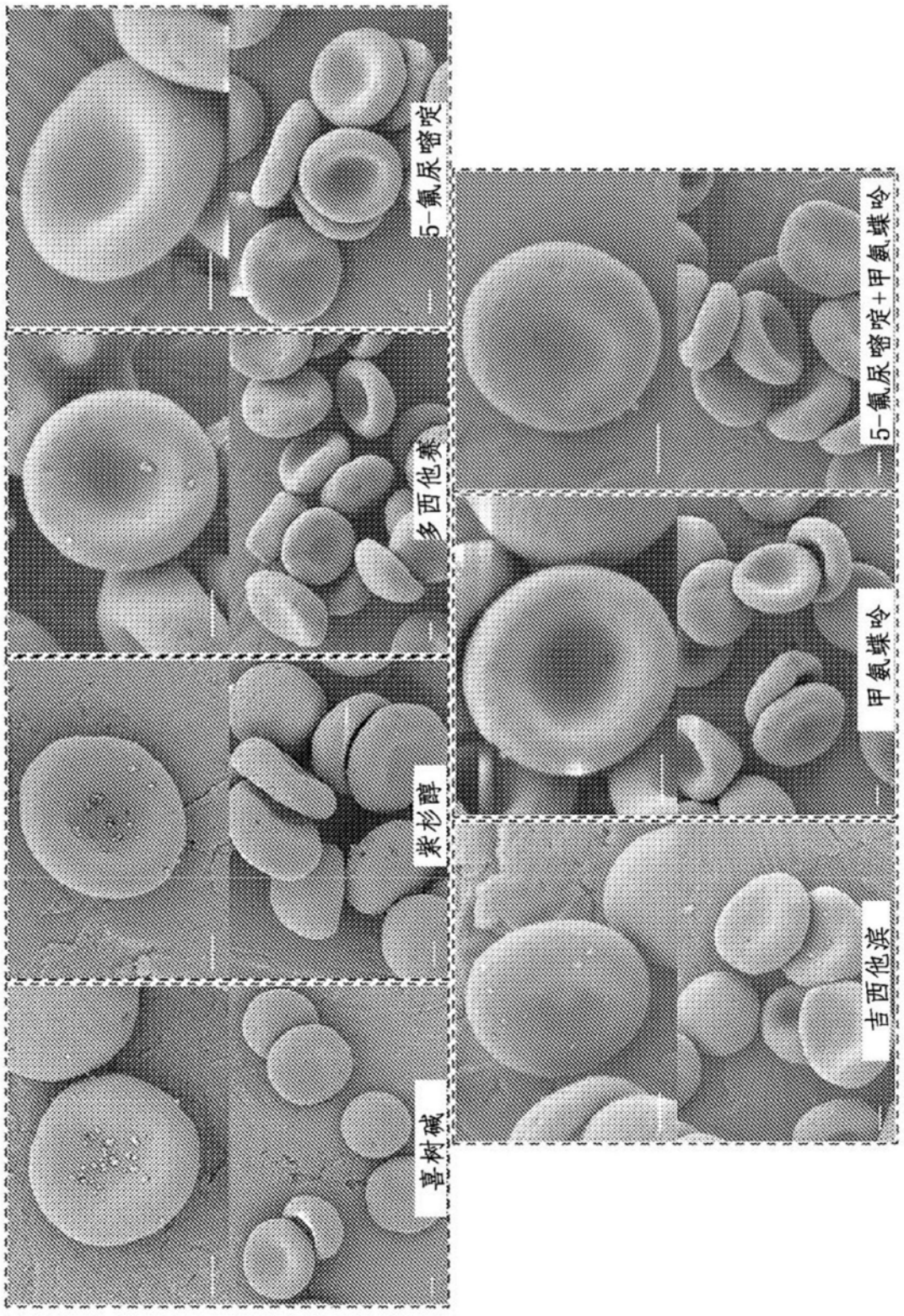


图9

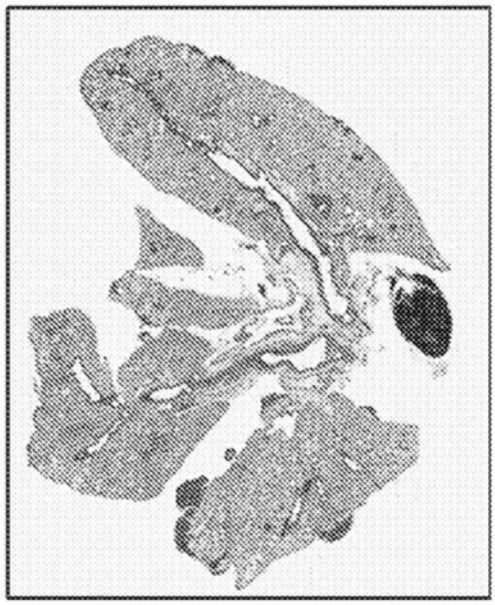


图10A

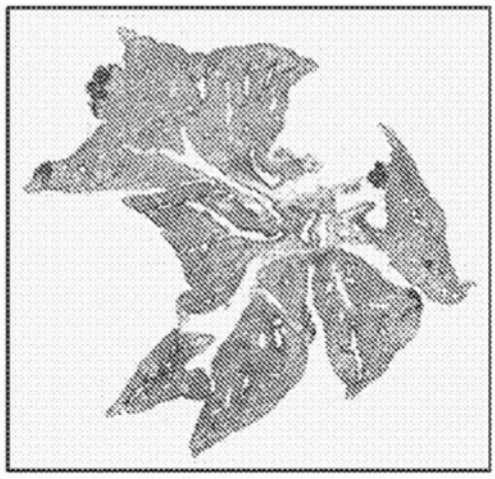


图10B

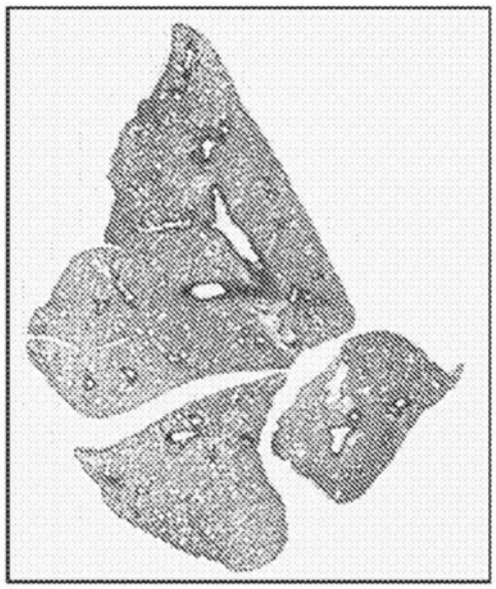


图10C

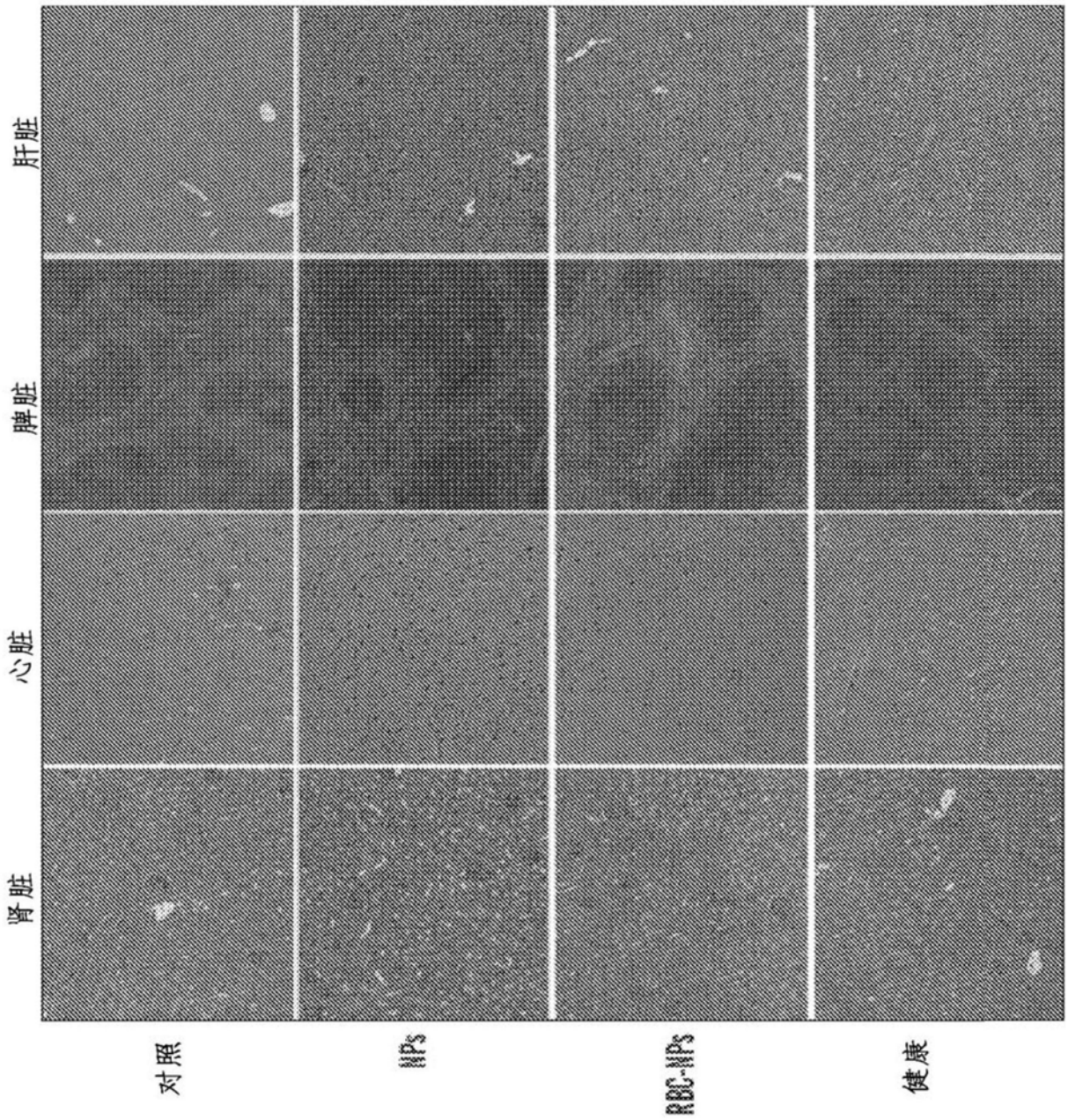


图11

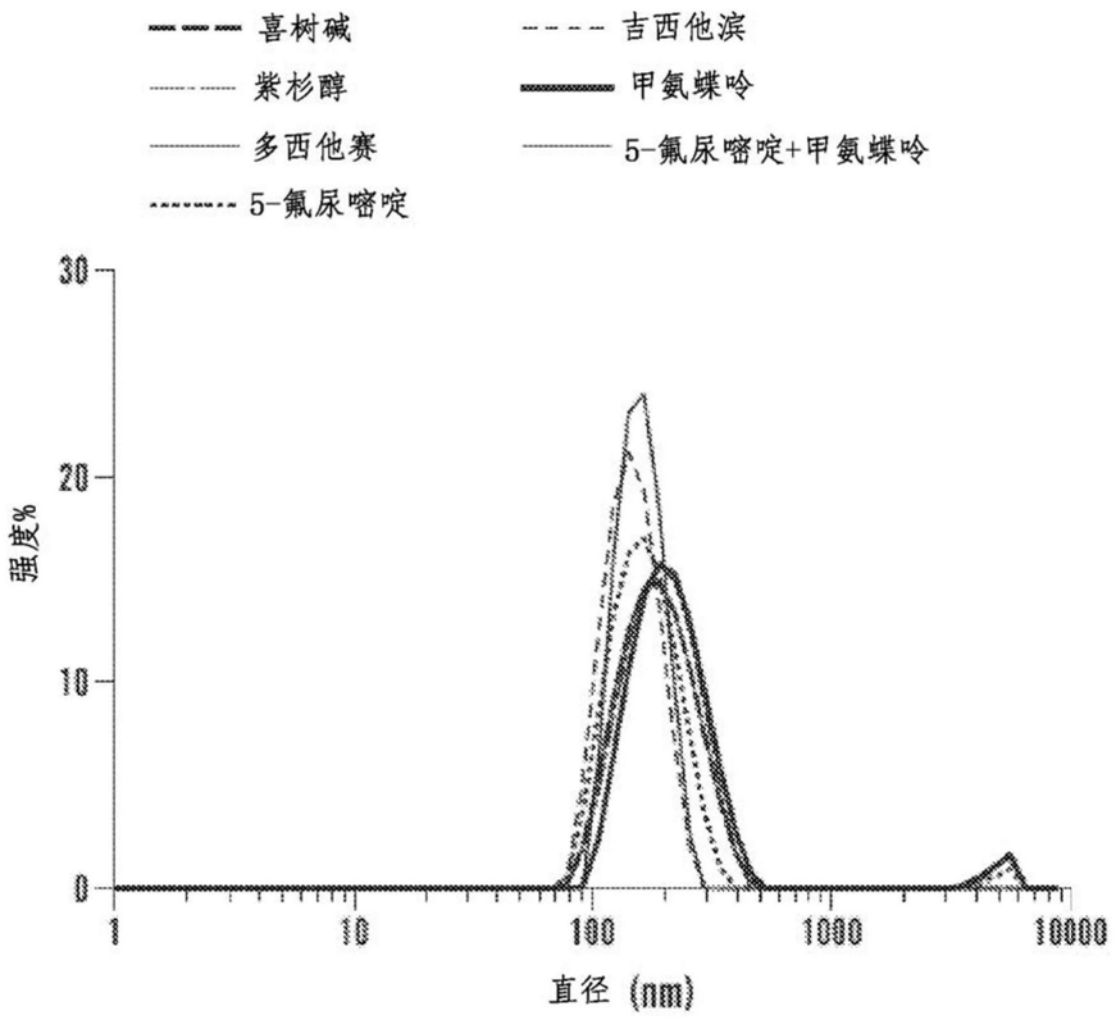

喜树碱
吉西他滨
紫杉醇
甲氨蝶呤
多西他赛
5-氟尿嘧啶+甲氨蝶呤
5-氟尿嘧啶
强度%
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
直径 (nm)

图12

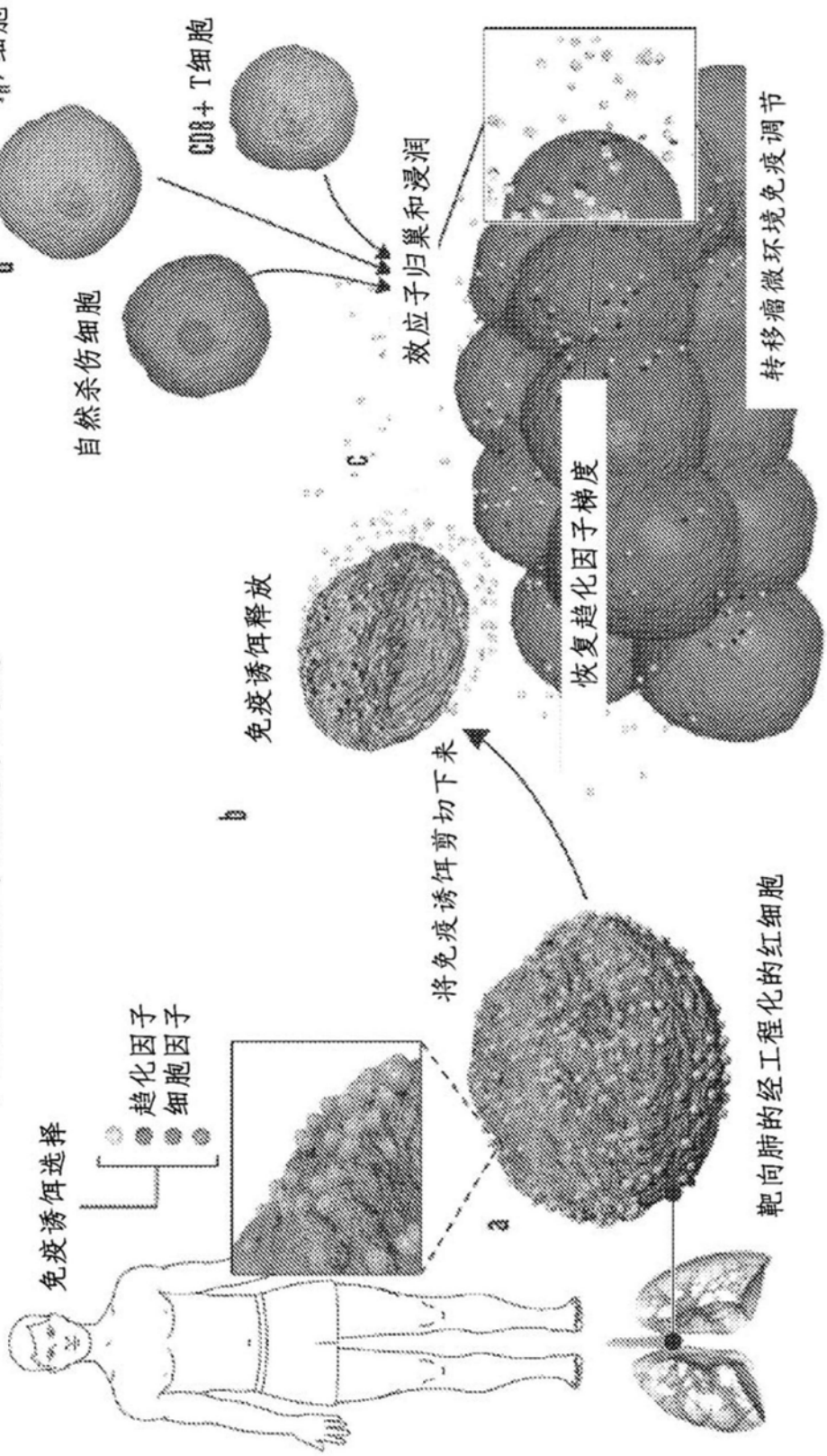

红细胞锚定的全身性免疫疗法 (EASY)
免疫诱饵选择
趋化因子
细胞因子
a
将免疫诱饵剪切下来
b
免疫诱饵释放
c
恢复趋化因子梯度
靶向肺的经工程化的红细胞
转移瘤微环境免疫调节
效应子归巢和浸润
自然杀伤细胞
CD8+ T细胞
M1 细胞

图13

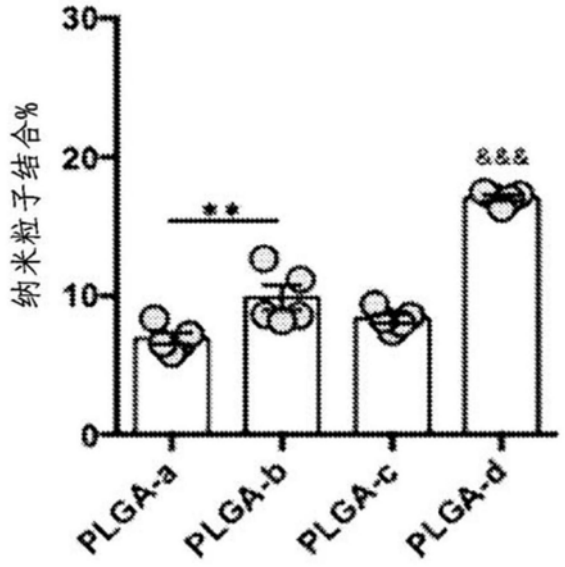

30
20
10
0
纳米粒子结合%
**
&&&
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图14A

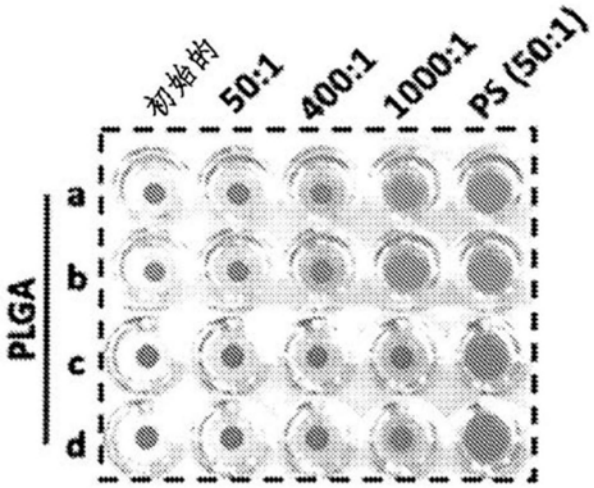

初始的
50:1
400:1
1000:1
PS (50:1)
PLGA
a
b
c
d

图14B

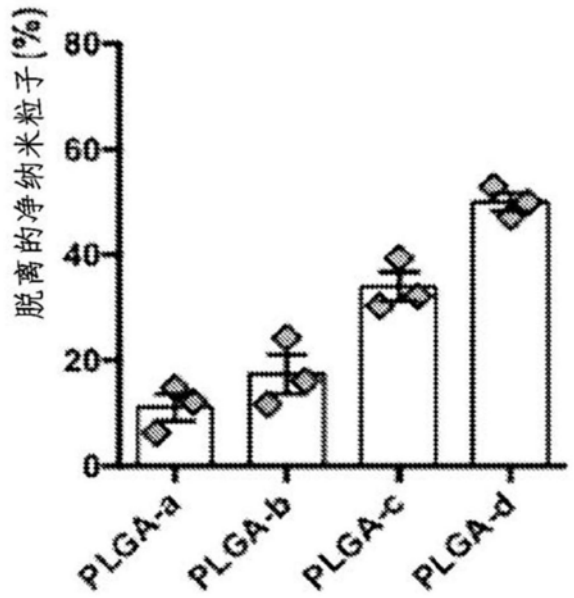

脱离的净纳米粒子(%)
80
60
40
20
0
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图14C

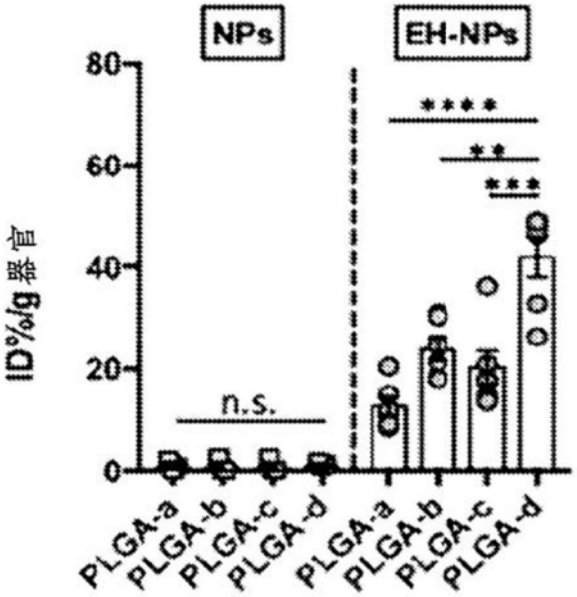

NPs
EH-NPs
ID%/g 器官
80
60
40
20
0
n.s.
****
**
***
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图14D

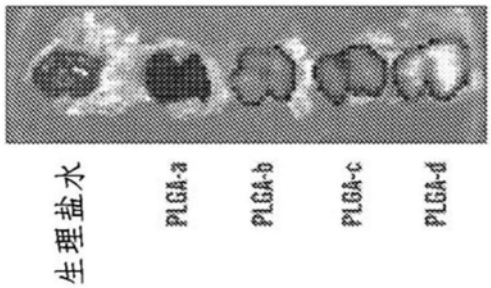


图14E

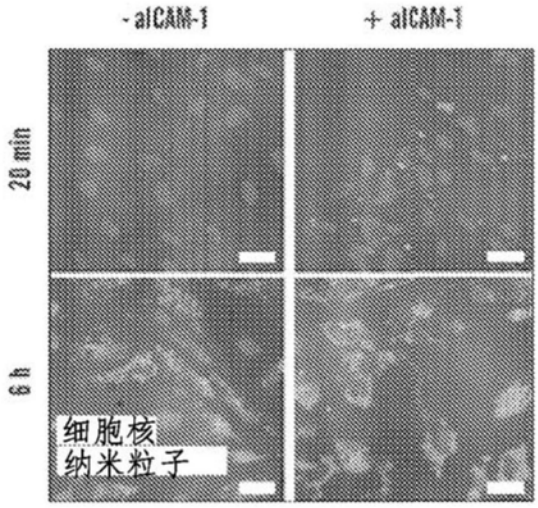


图14F

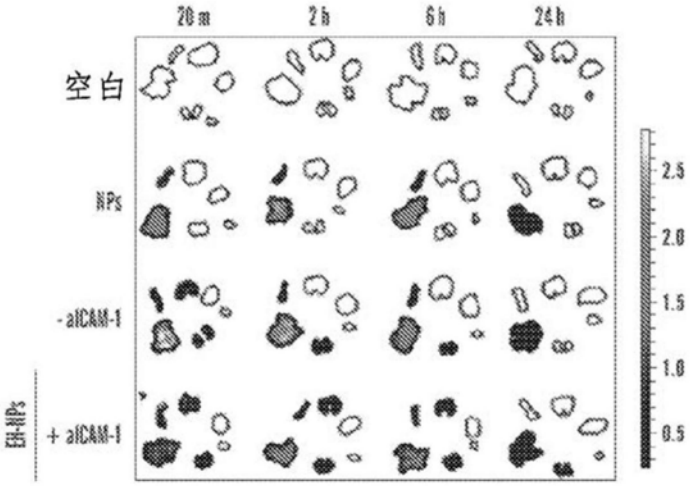


图14G

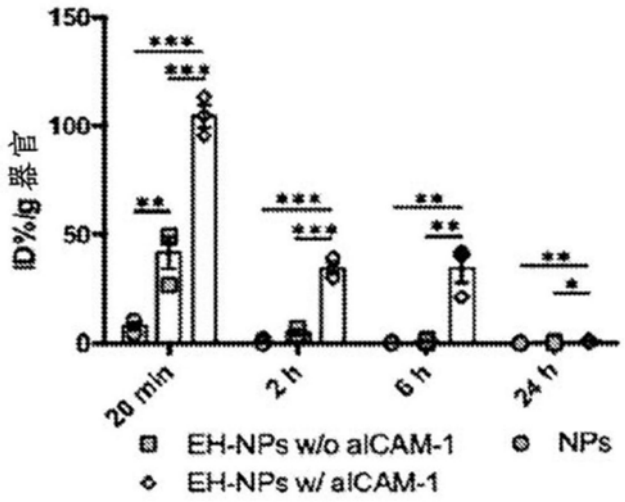

150
100
50
0
%ID/g 器官
***
***
**
***
***
**
**
**
*
20 min
2 h
6 h
24 h
EH-NPs w/o aICAM-1
NPs
EH-NPs w/ aICAM-1

图14H

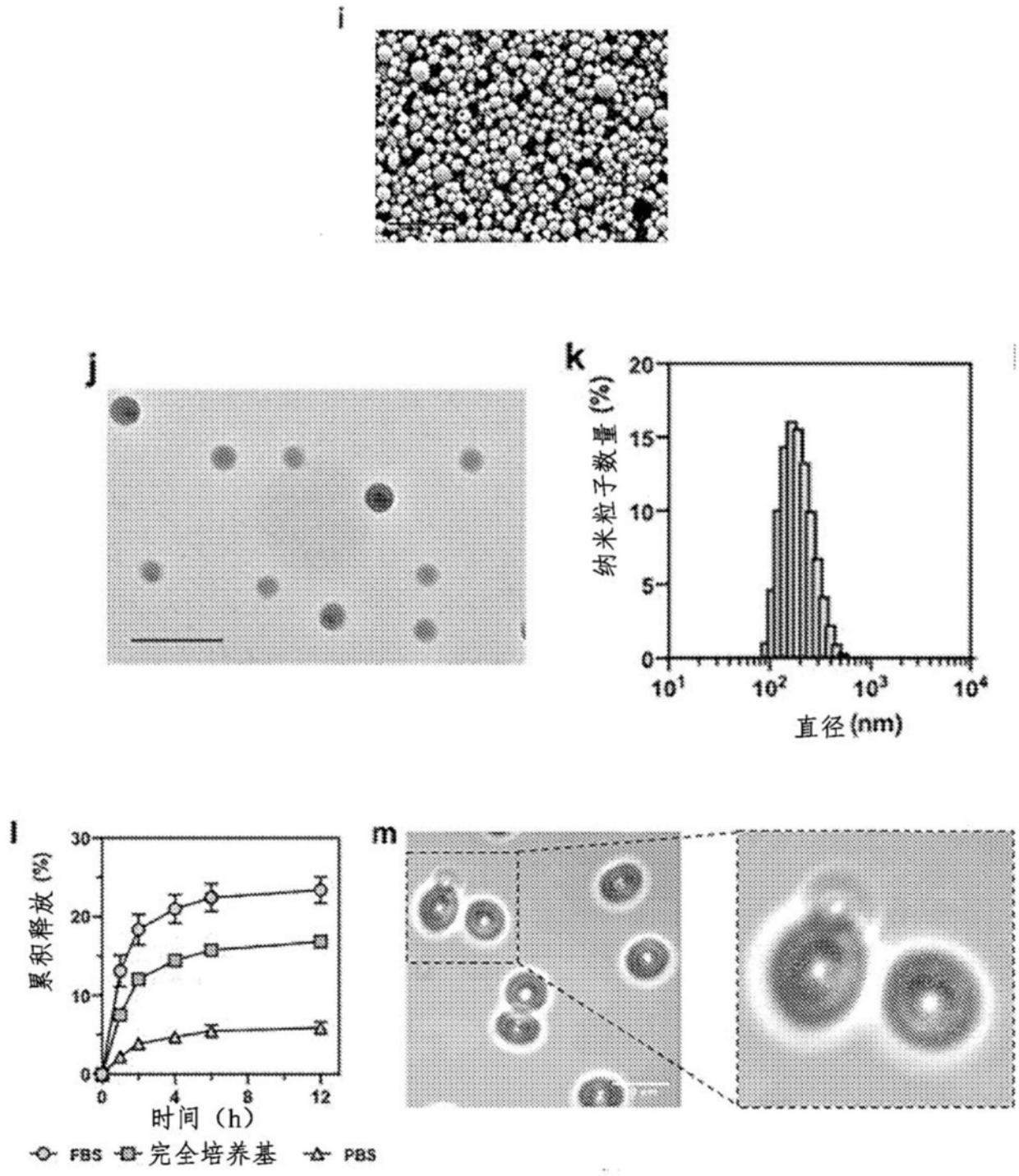

i
j
k
纳米粒子数量 (%)
20
15
10
5
0
10^1
10^2
10^3
10^4
直径 (nm)
l
累积释放 (%)
30
20
10
0
0
4
8
12
时间 (h)
FBS
完全培养基
PBS
m

图14I-图14M

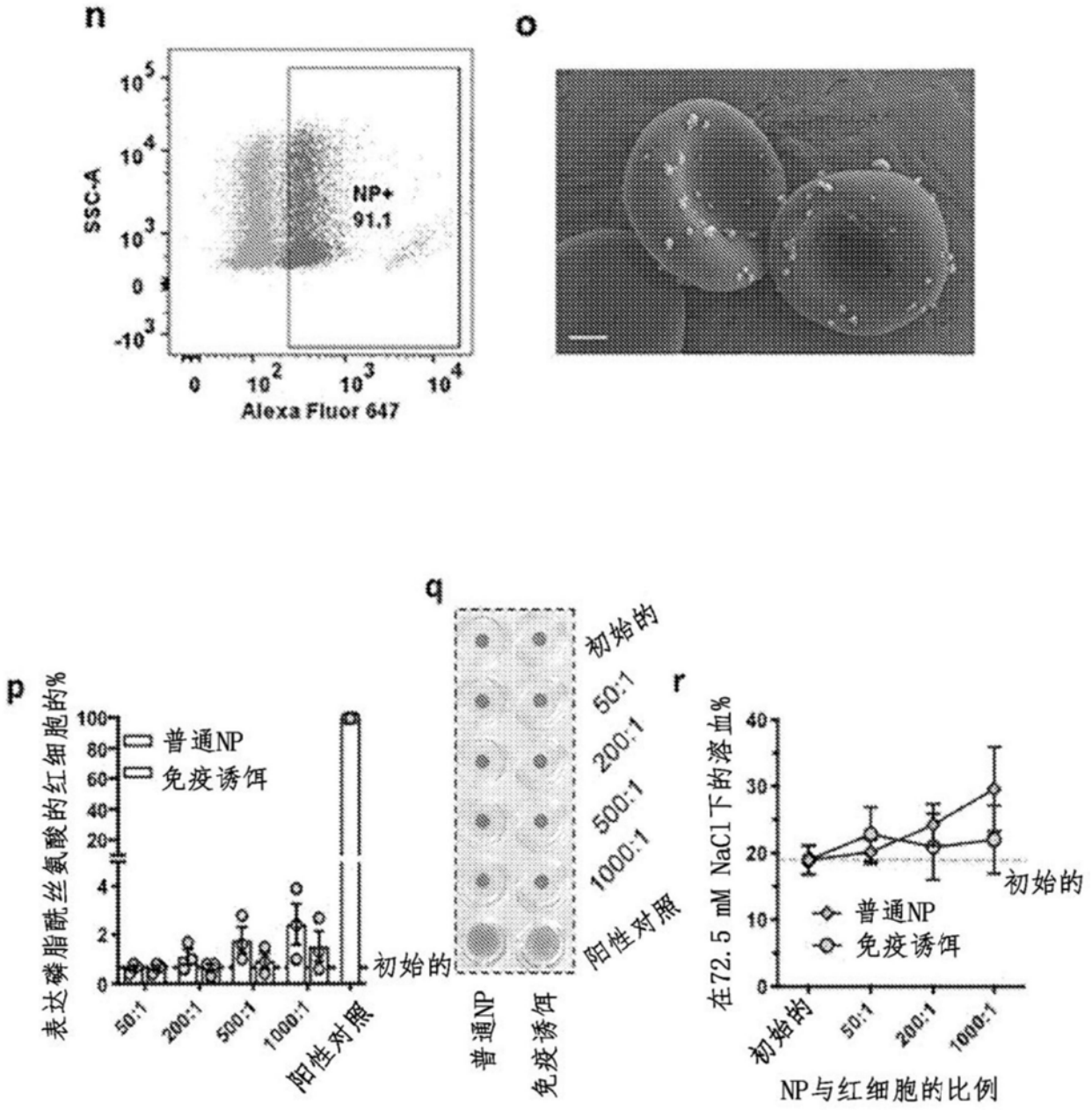

n
SSC-A
NP+
91.1
Alexa Fluor 647
o
p
表达磷脂酰丝氨酸的红细胞的%
普通NP
免疫诱饵
初始的
50:1
200:1
500:1
1000:1
阳性对照
q
初始的
50:1
200:1
500:1
1000:1
阳性对照
普通NP
免疫诱饵
r
在72.5 mM NaCl下的溶血%
普通NP
免疫诱饵
初始的
NP与红细胞的比例

图14N-图14R

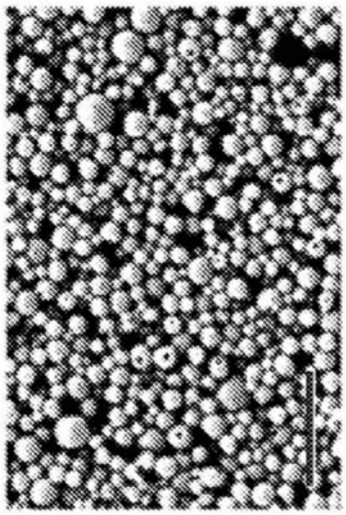


图15A

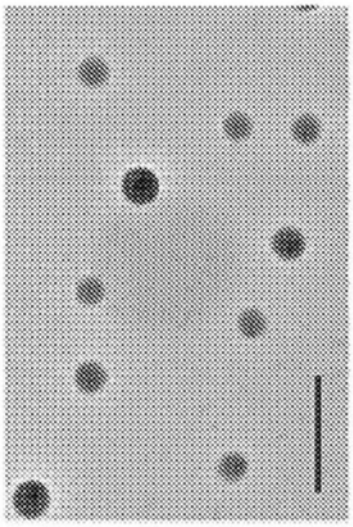


图15B

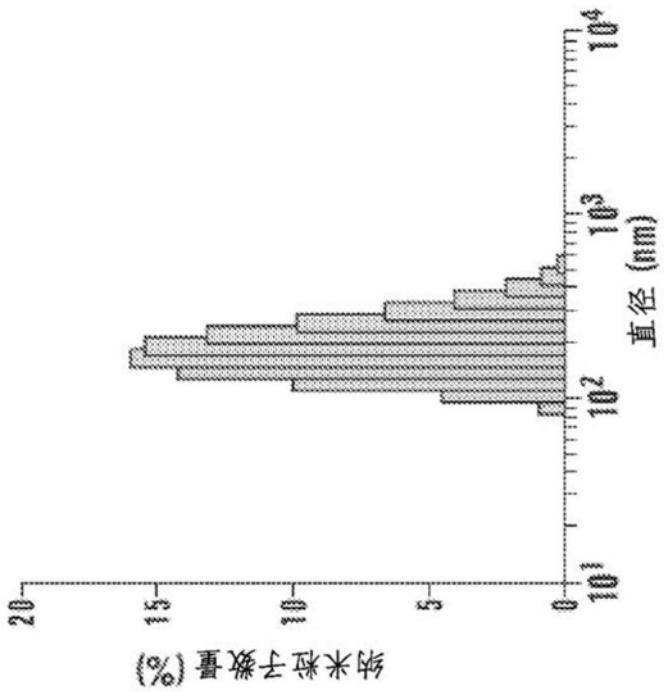

纳米粒子数量 (%)
20
15
10
5
0
10^1
10^2
10^3
10^4
直径 (nm)

图15C

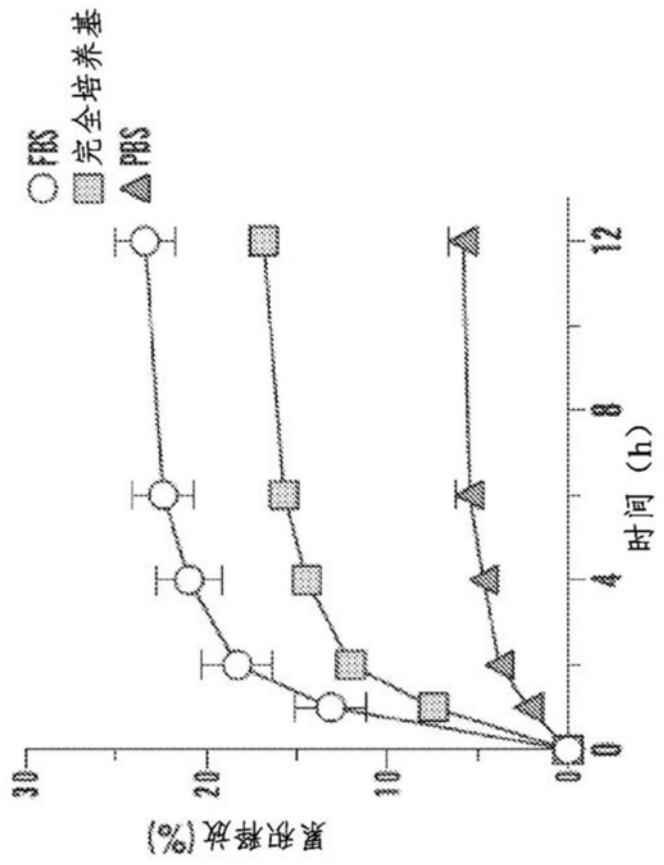

○PBS
□完全培养基
△PBS
累积释放 (%)
30
20
10
0
0
4
8
12
时间 (h)

图15D

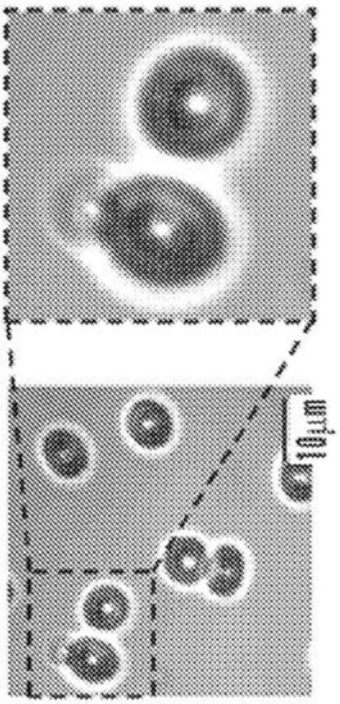


图15E

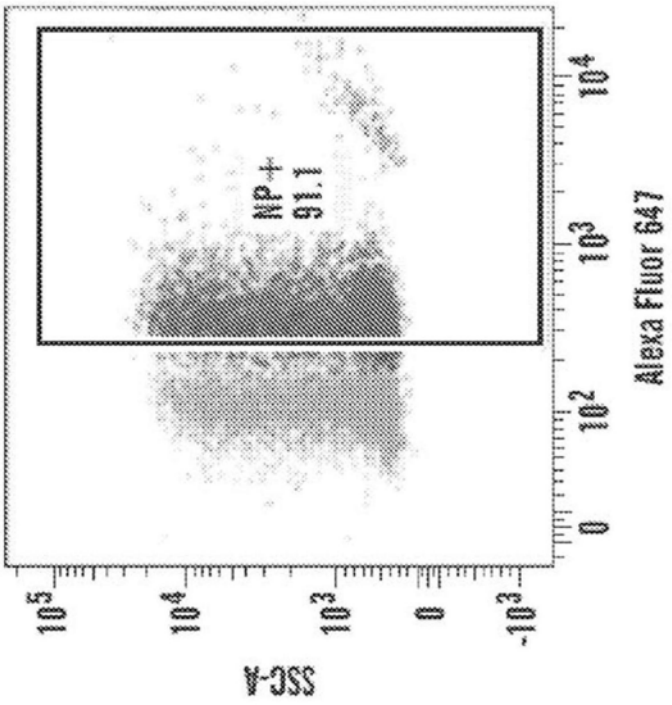


图15F

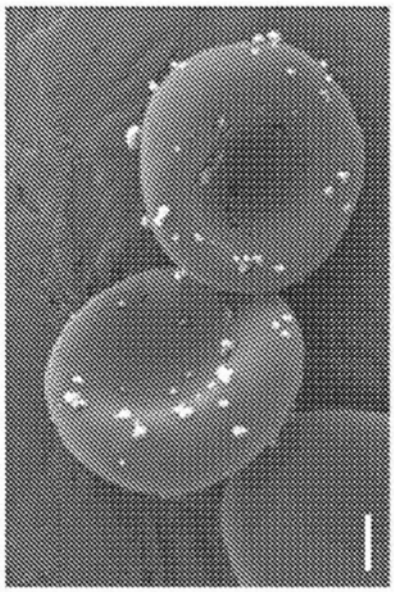


图15G

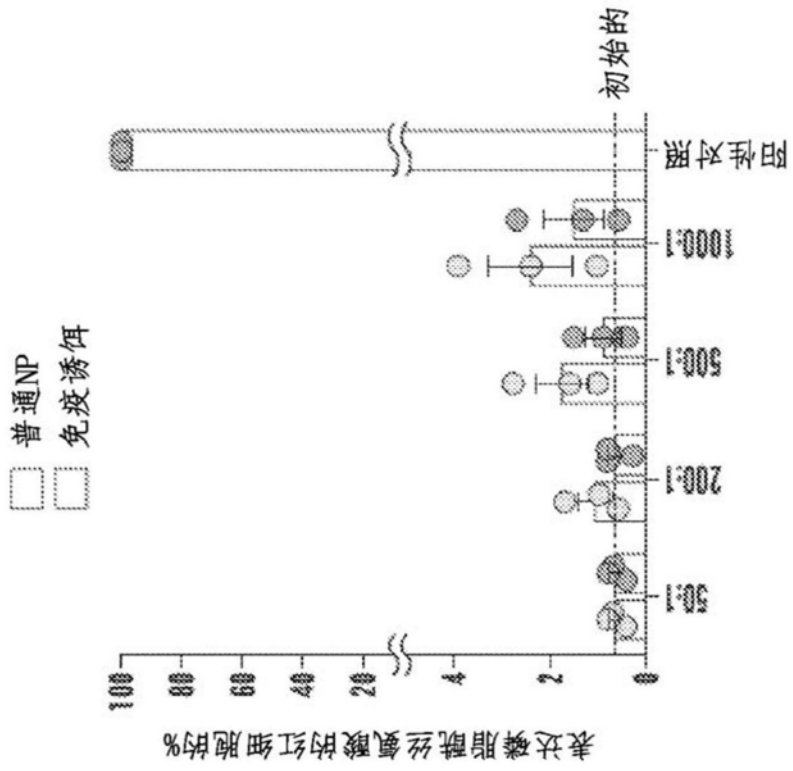

普通NP
免疫诱伴
表达磷脂酰丝氨酸的红细胞的%
100
80
60
40
20
4
2
0
初始的
阳性对照
1000:1
500:1
200:1
50:1

图15H

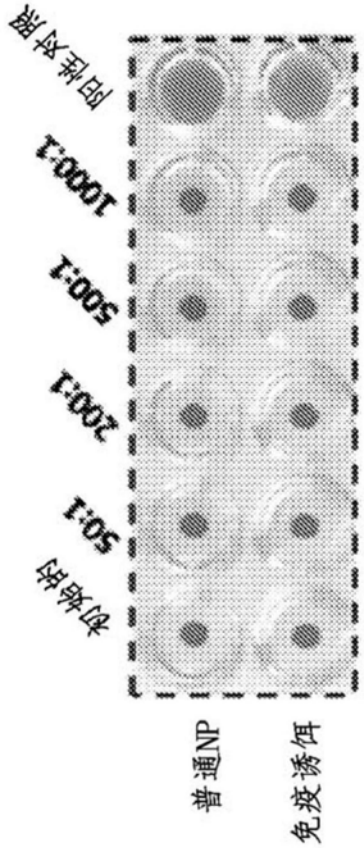


图15I

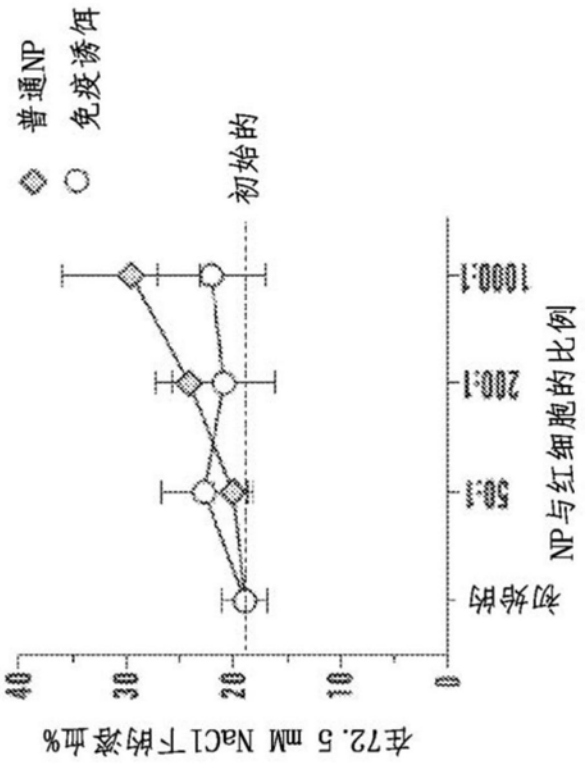

普通NP
免疫诱饵
初始的
在72.5 mM NaCl下的溶血%
0
10
20
30
40
初始的
50:1
200:1
1000:1
NP与红细胞的比例

图15J

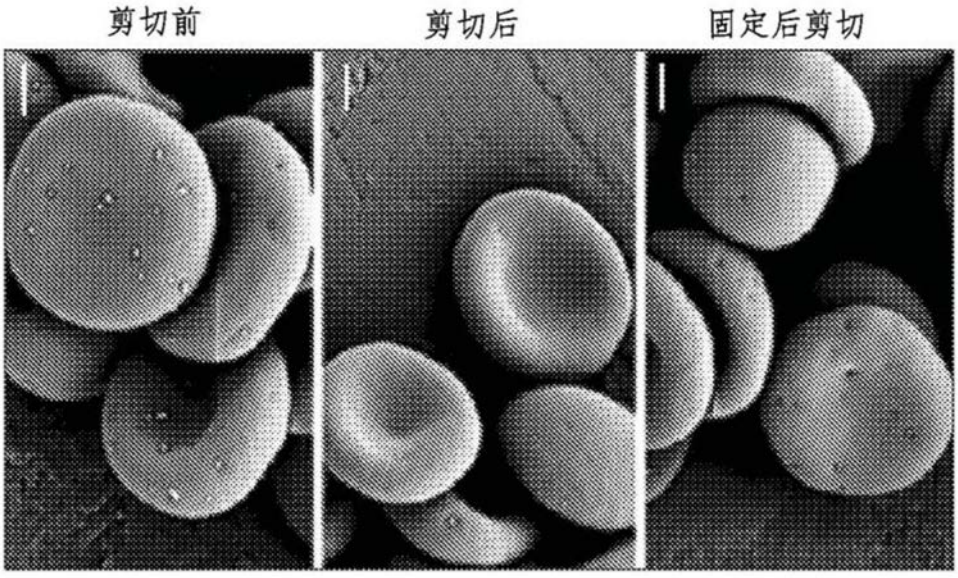

剪切前
剪切后
固定后剪切

图16A

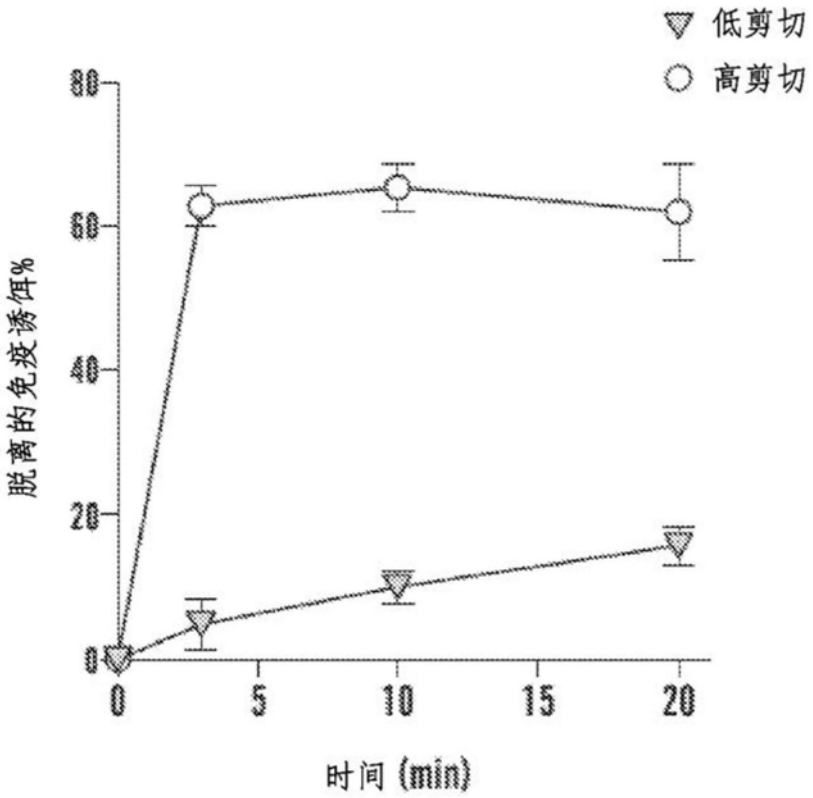


图16B

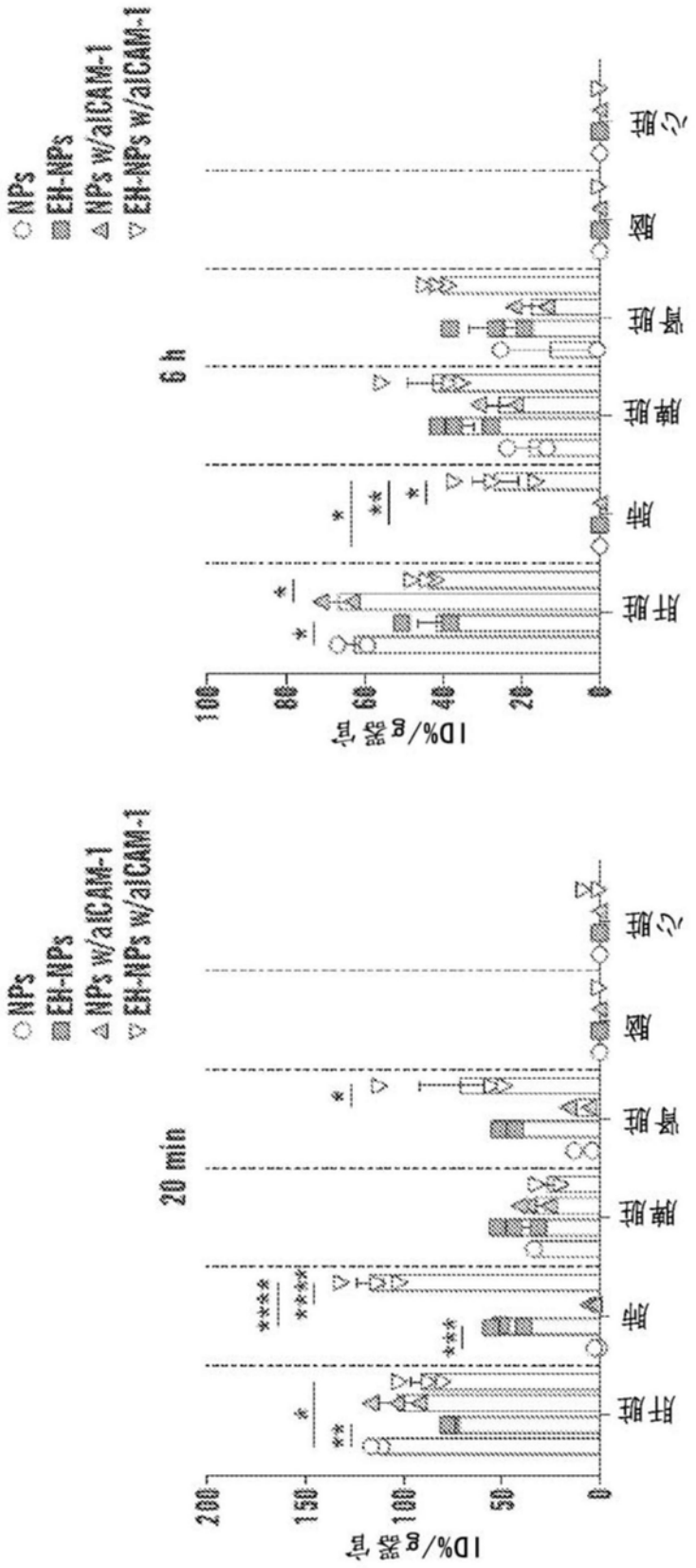

NPs
EH-NPs
NPs w/aICAM-1
EH-NPs w/aICAM-1
6 h
ID%/g器官
肝脏
肺
脾脏
肾脏
脑
心脏
20 min
ID%/g器官
肝脏
肺
脾脏
肾脏
脑
心脏

图16C

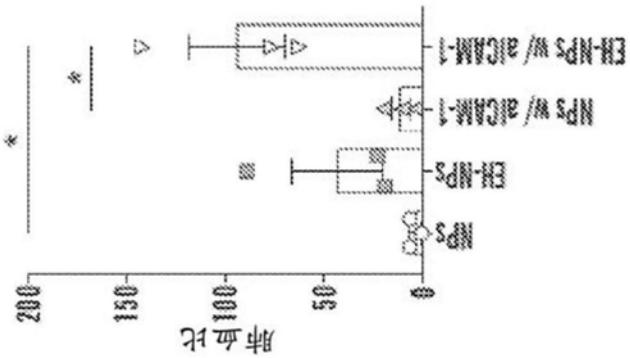

EH-NPs w/ aICAM-1
NPs w/ aICAM-1
EH-NPs
NPs
200
150
100
50
0
肺血比

图16D

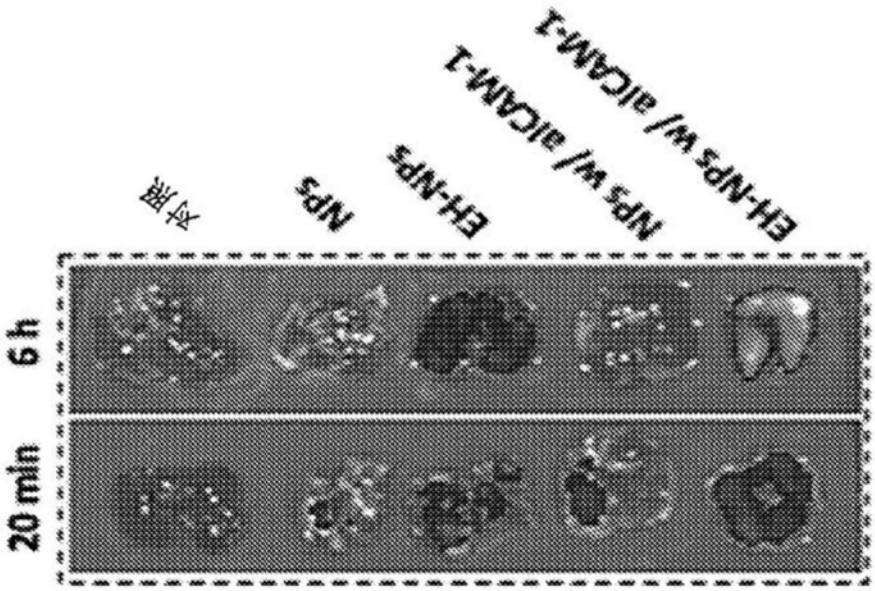

对照
NPs
EH-NPs
NPs w/ aICAM-1
EH-NPs w/ aICAM-1
6 h
20 min

图16E

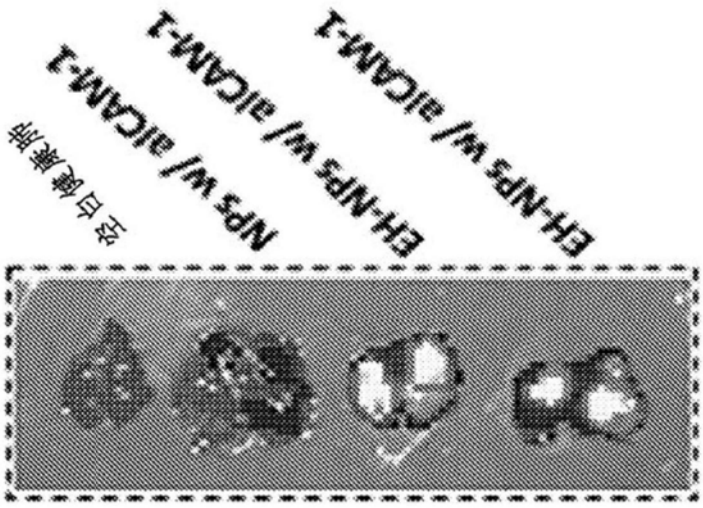

EH-NPs W/ aICAM-1
EH-NPs W/ aICAM-1
NPs W/ aICAM-1
经口服葡萄

图16F

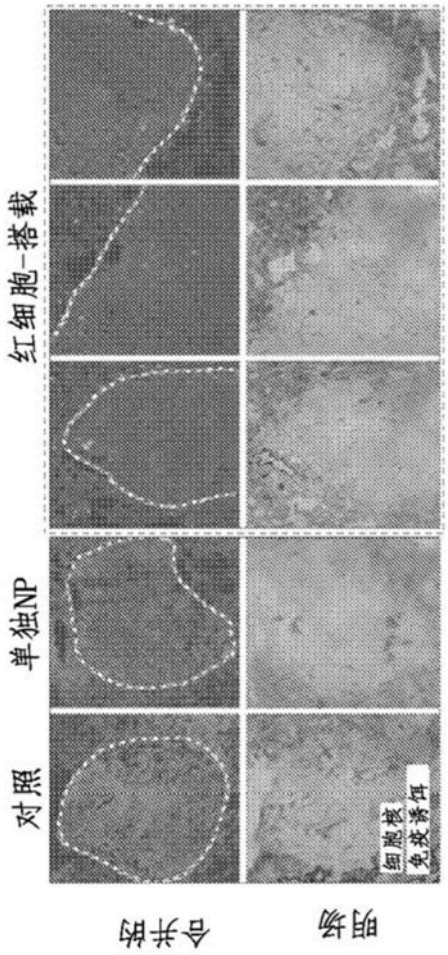

对照
单独NP
红细胞-搭载
明场
合并的
细胞核
免疫荧光

图16G

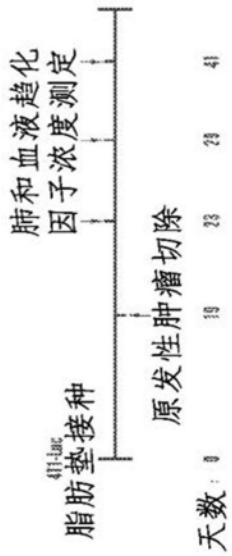

肺和血液趋化
因子浓度测定
411-Luc
脂肪垫接种
原发性肿瘤切除
天数：
0
19
23
41

图16H

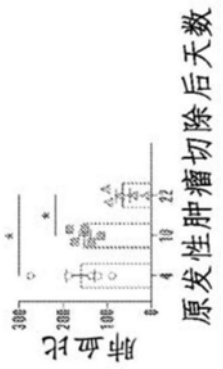

300
200
100
0
4
10
22
原发性肿瘤切除后天数

图16I

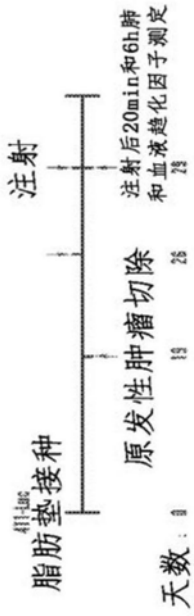

注射
注射后20min和6h肺和血液趋化因子测定
原发性肿瘤切除
脂肪垫接种
411-luc
天数：

图16J

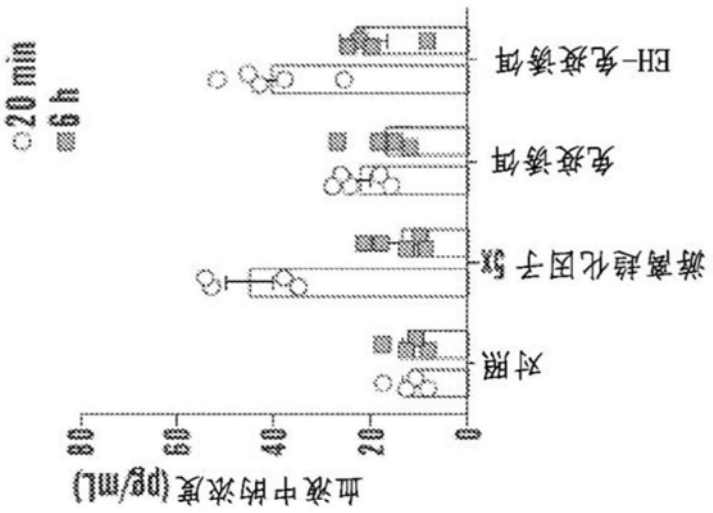

20 min
6h
血液中的浓度 (pg/mL)
0
20
40
60
80
对照
游离趋化因子 组
免疫诱导
EH-免疫诱导

图16K

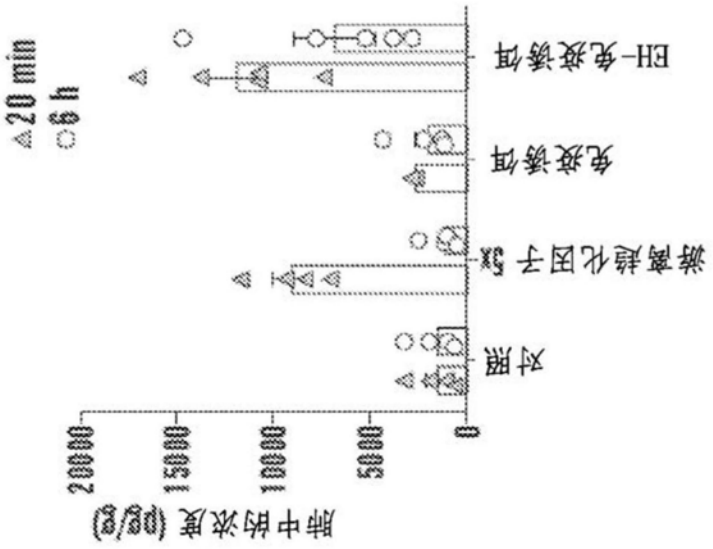

肺中的浓度 (pg/g)
20000
15000
10000
5000
0
对照
游离趋化因子 5x
免疫诱饵
EH-免疫诱饵
△20 min
○6 h

图16L

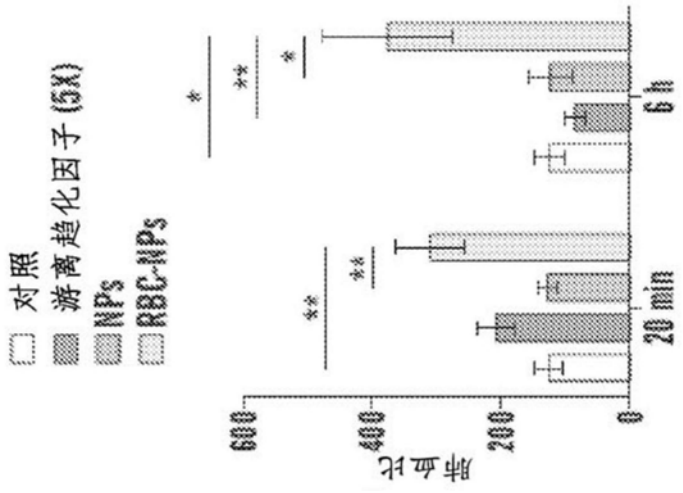

肺血比
600
400
200
0
20 min
6 h
对照
游离趋化因子 (5X)
NPs
RBC-NPs
*
**
**
**
*

图16M

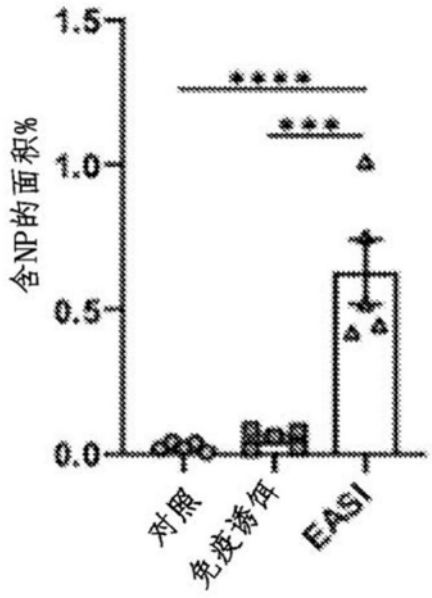


图160

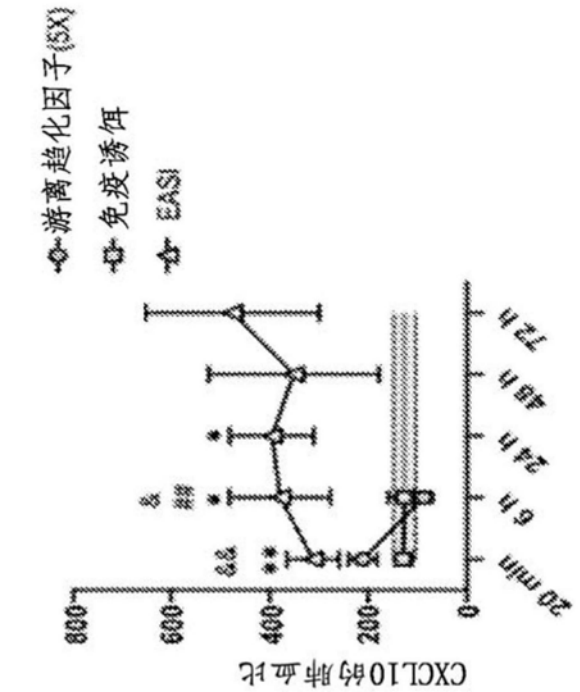


图16R

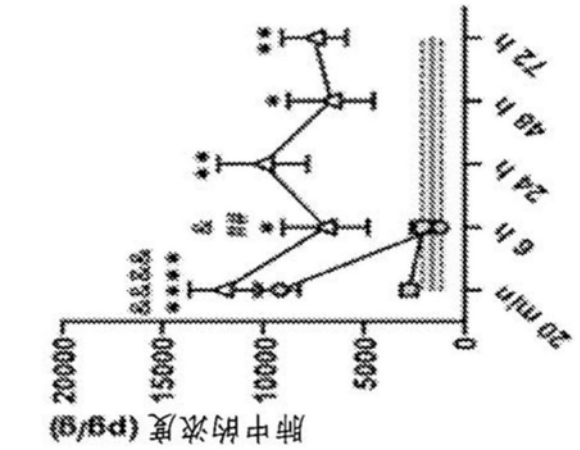


图16Q

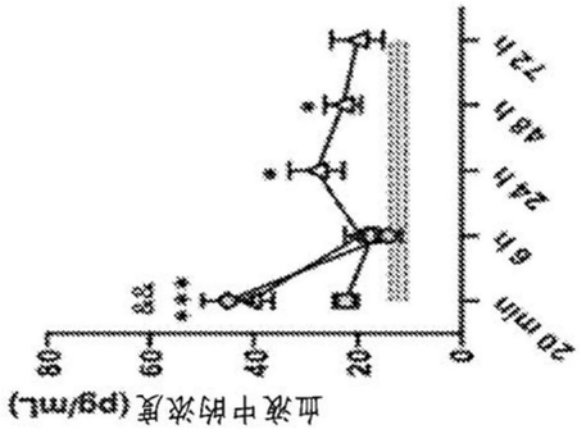


图16P

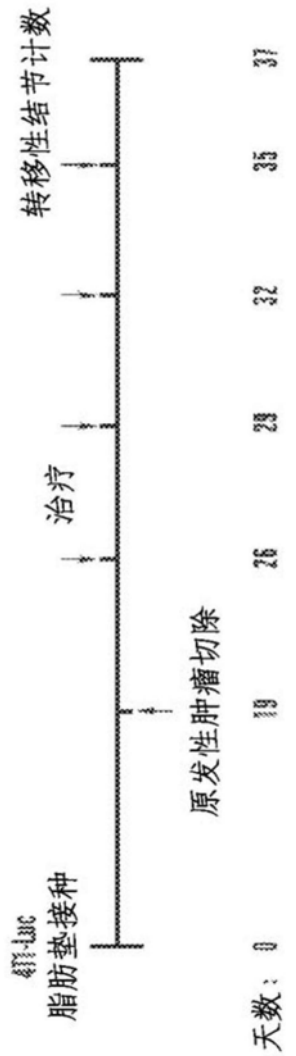


图17A

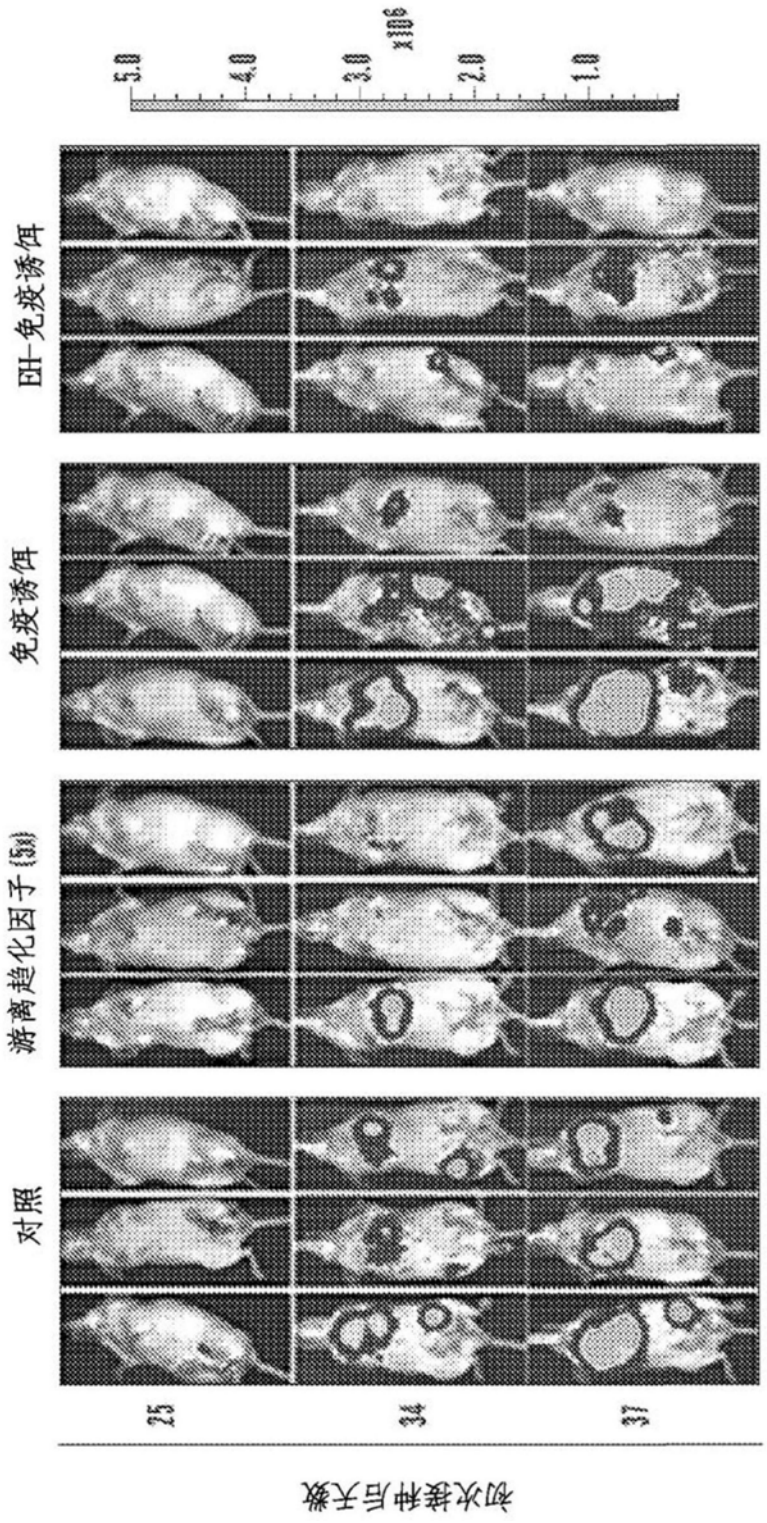


图17B

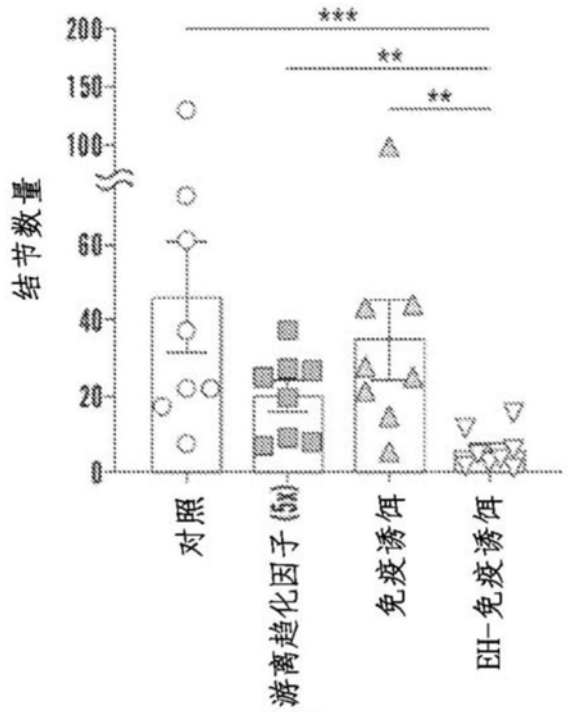

结节数量
200
150
100
50
0
***
**
**
对照
游离趋化因子(5μg)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图17C

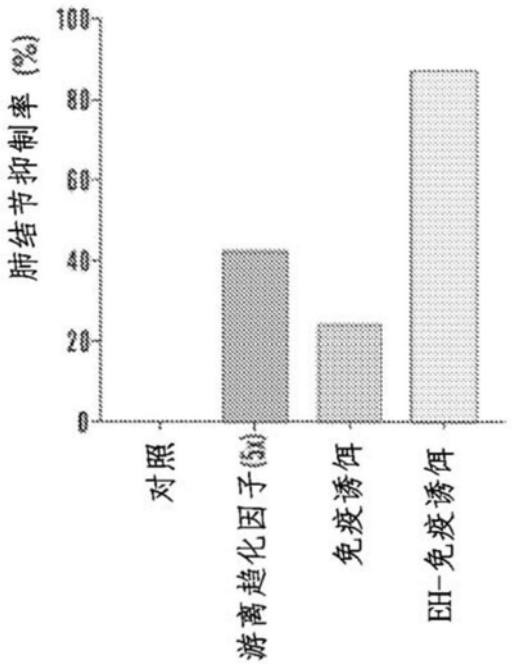

肺结节抑制率 (%)
100
80
60
40
20
0
对照
游离趋化因子(5μg)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图17D

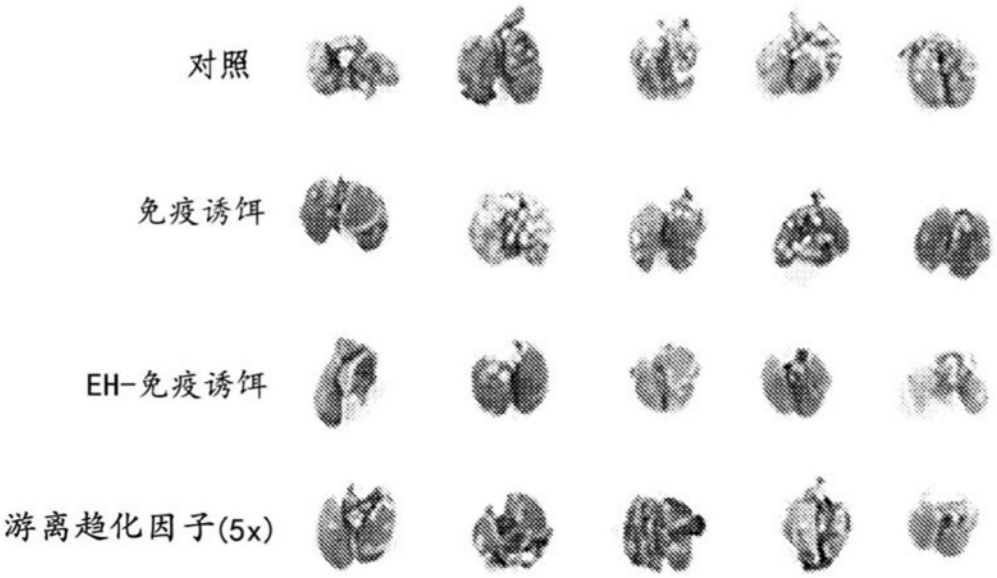

对照
免疫诱饵
EH-免疫诱饵
游离趋化因子(5x)

图17E

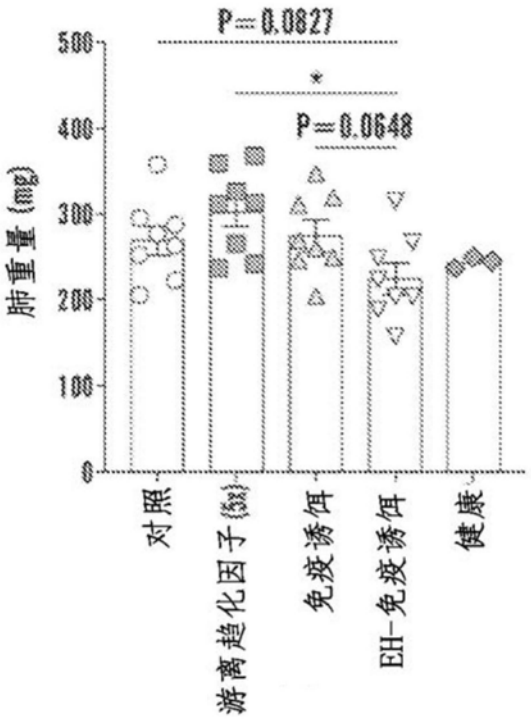

P = 0.0827
*
P = 0.0648
肺重量(mg)
500
400
300
200
100
0
对照
游离趋化因子(5x)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵
健康

图17F

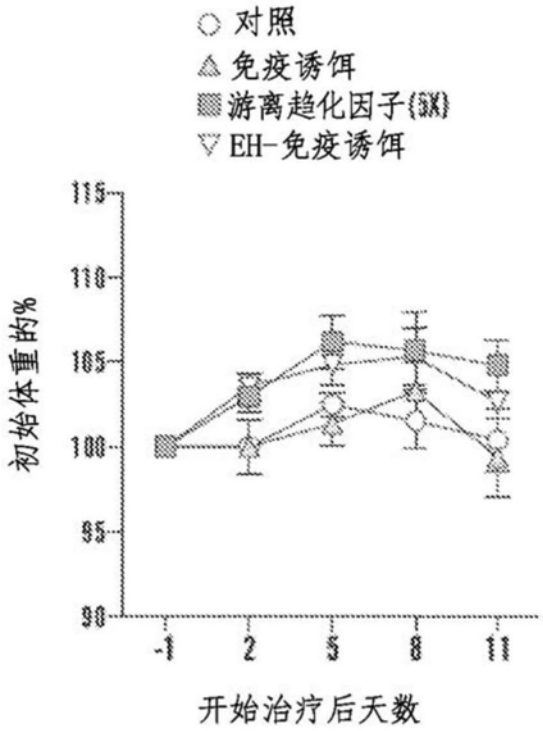

对照
免疫诱饵
游离趋化因子(5X)
EH-免疫诱饵
初始体重的%
115
110
105
100
95
90
-1
2
5
8
11
开始治疗后天数

图17G

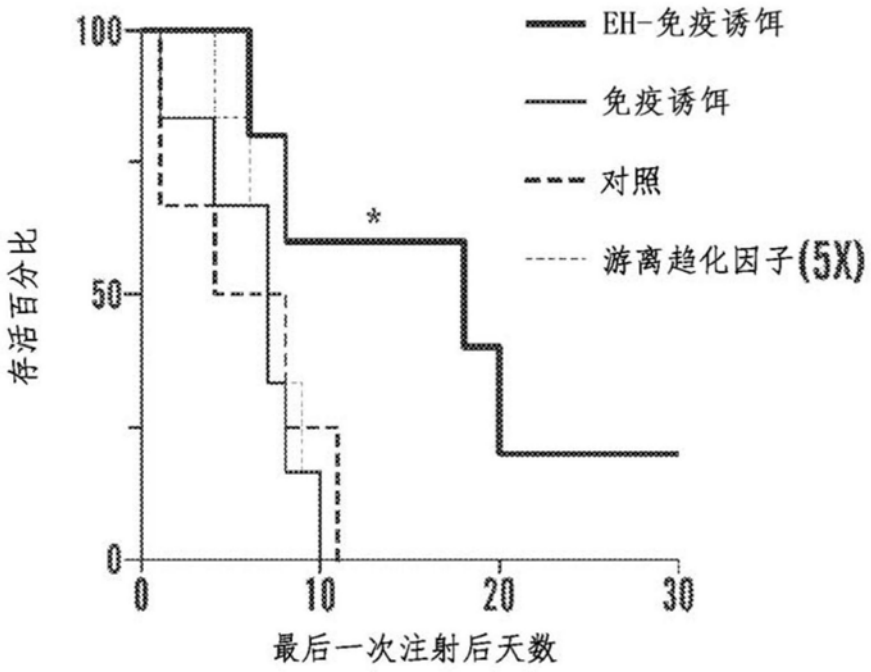

EH-免疫诱饵
免疫诱饵
对照
游离趋化因子(5X)
*
存活百分比
100
50
0
0
10
20
30
最后一次注射后天数

图17H

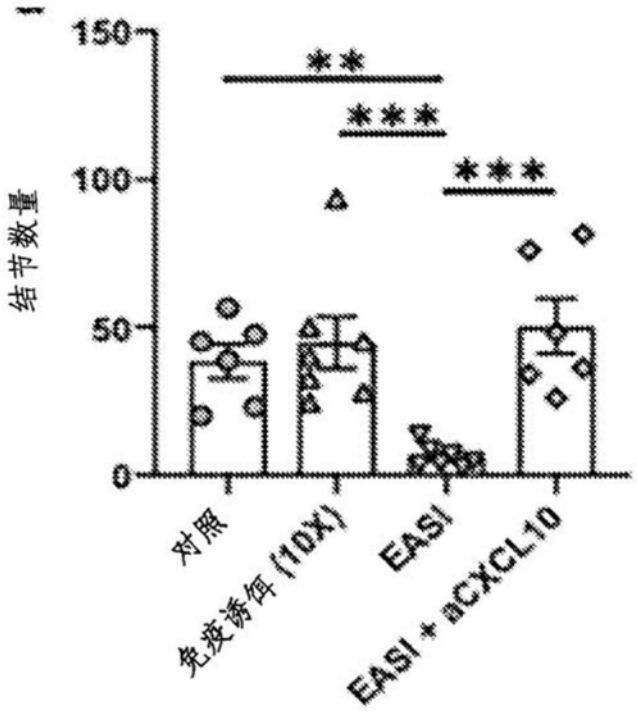

150
100
50
0
结节数量
**
***
***
对照
免疫诱饵 (10X)
EASI
EASI + αCXCL10

图17I

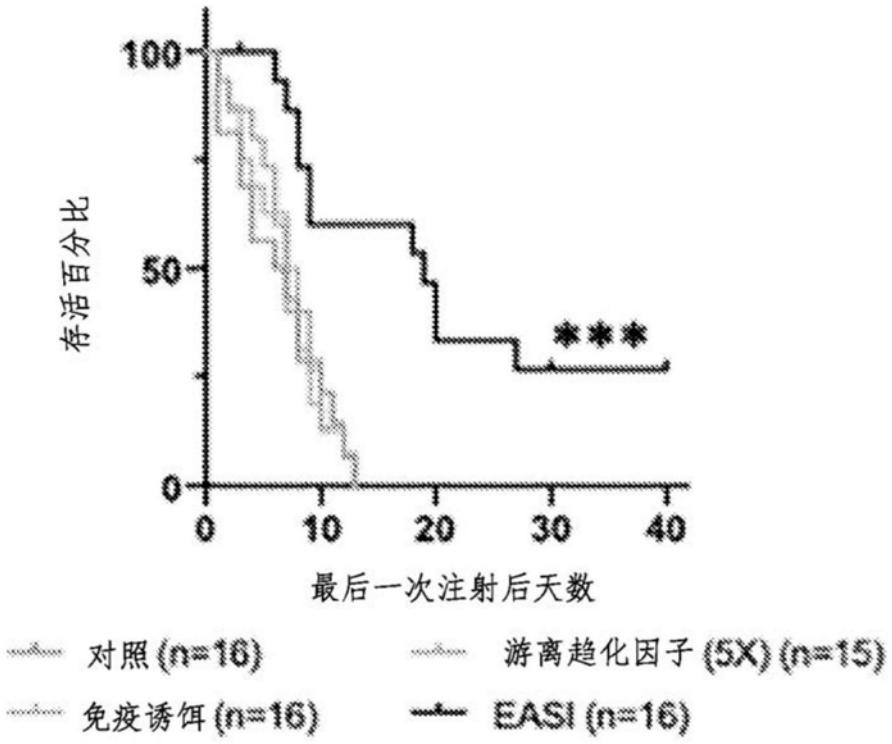

100
50
0
存活百分比
***
0
10
20
30
40
最后一次注射后天数
对照 (n=16)
游离趋化因子 (5X) (n=15)
免疫诱饵 (n=16)
EASI (n=16)

图17J

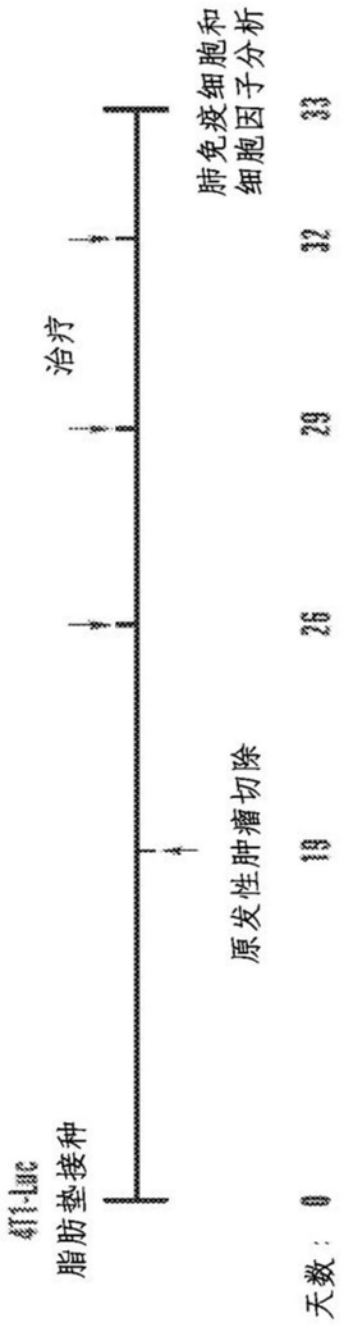


图18A

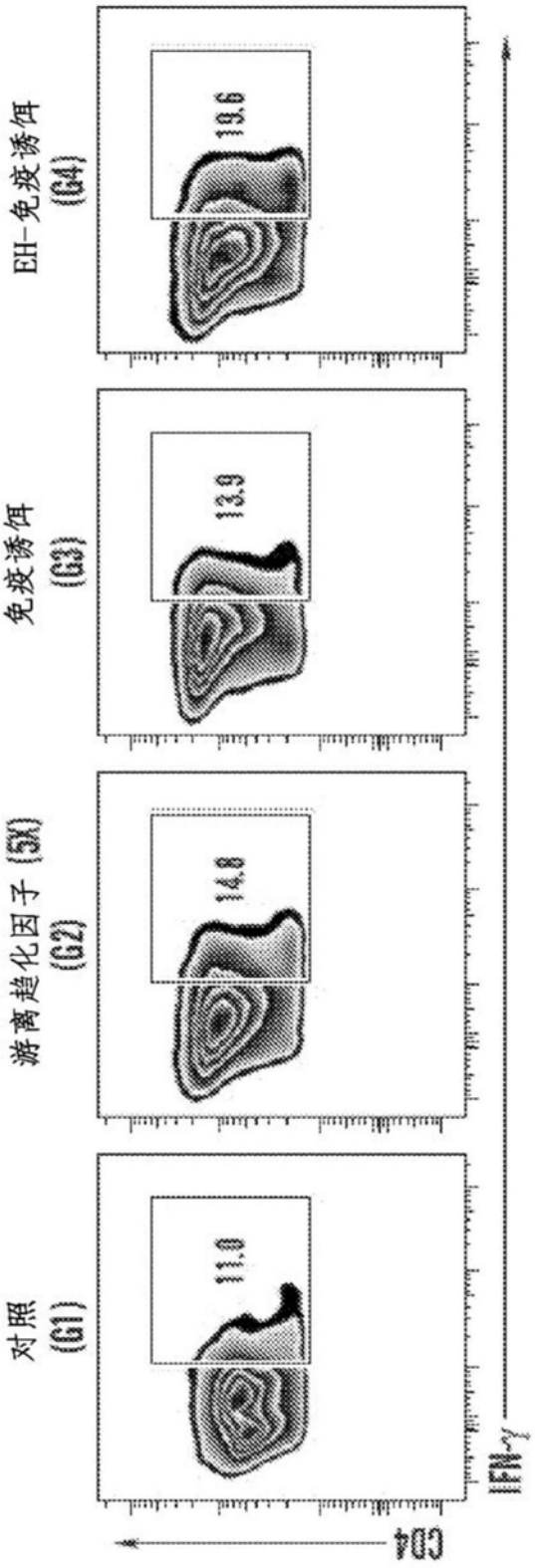


图18B

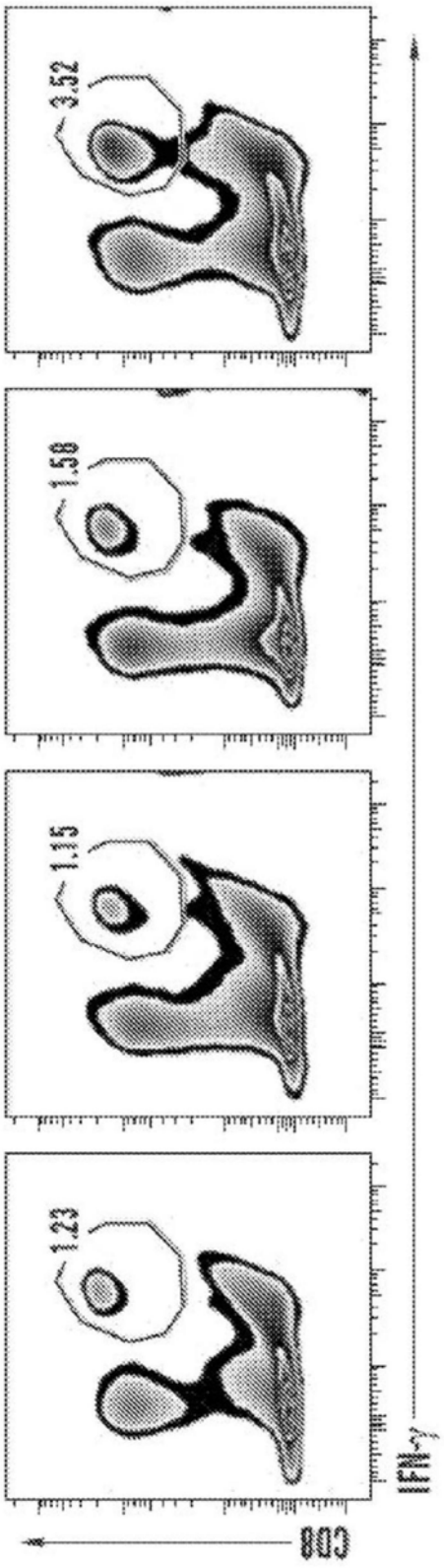


图18D

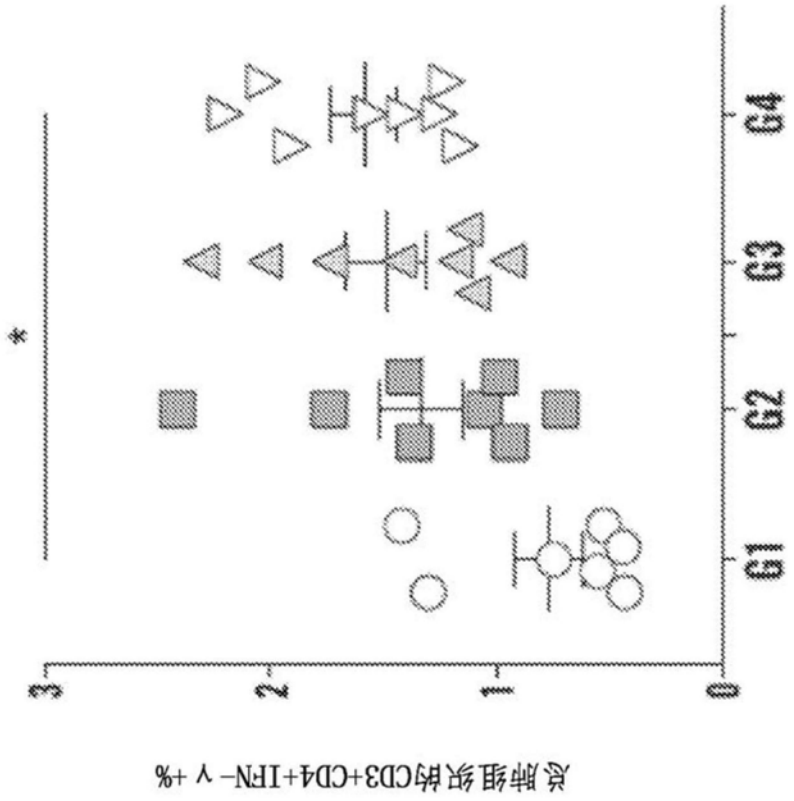

G4
G3
G2
G1
*
3
2
1
0
总肺组织的CD3+CD4+IFN-γ+%

图18C

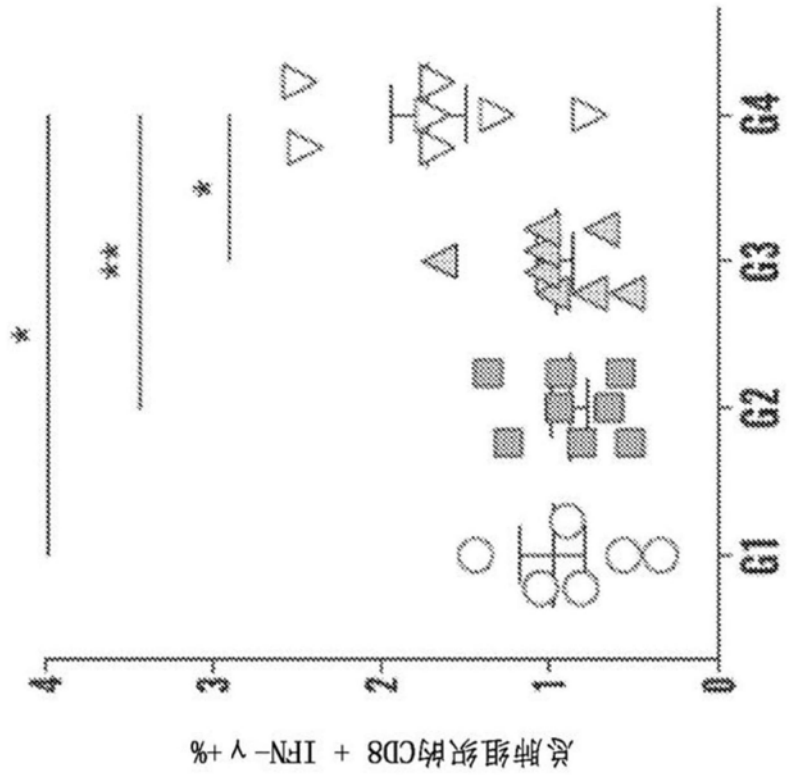

G4
G3
G2
G1
*
**
*
4
3
2
1
0
总肺组织的CD8 + IFN-γ+%

图18E

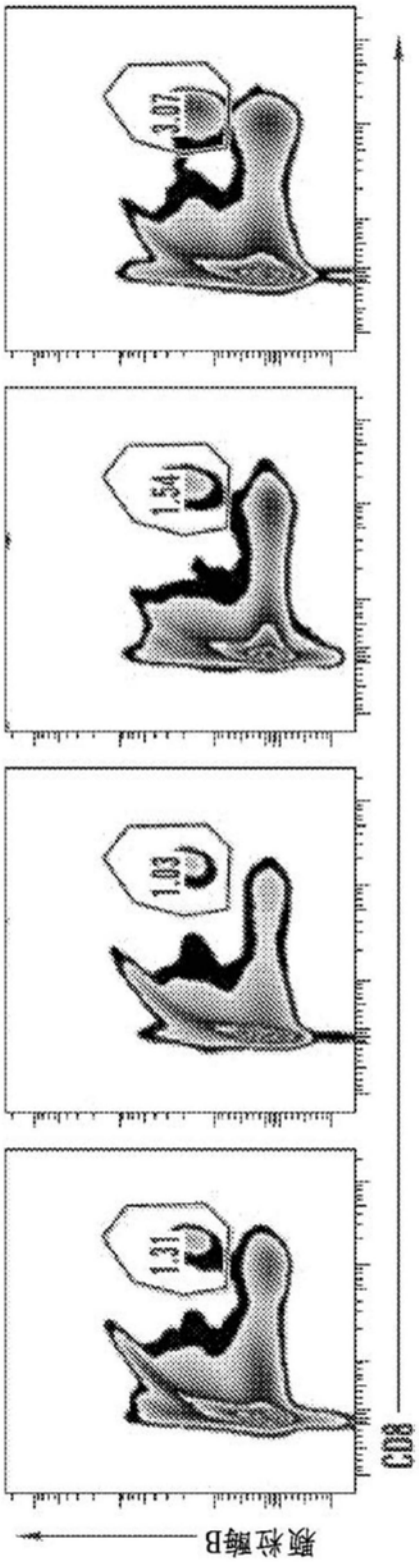


图18F

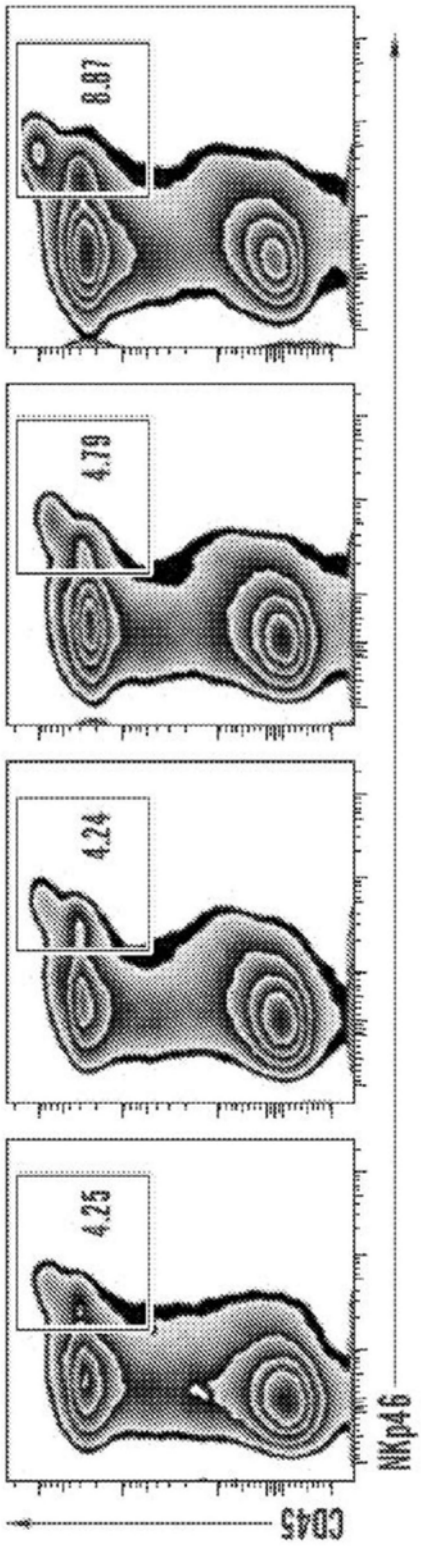


图18H

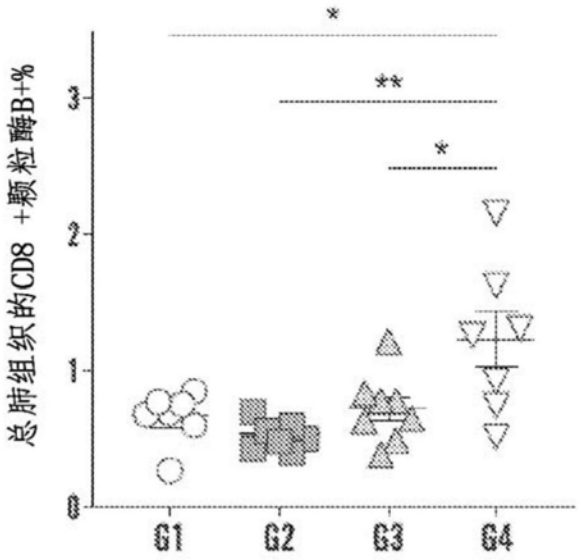


图18G

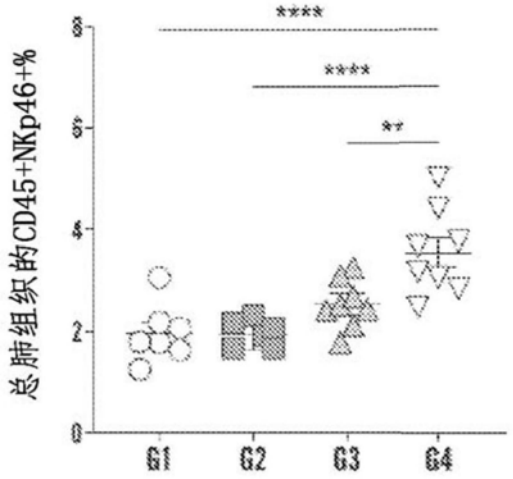


图18I

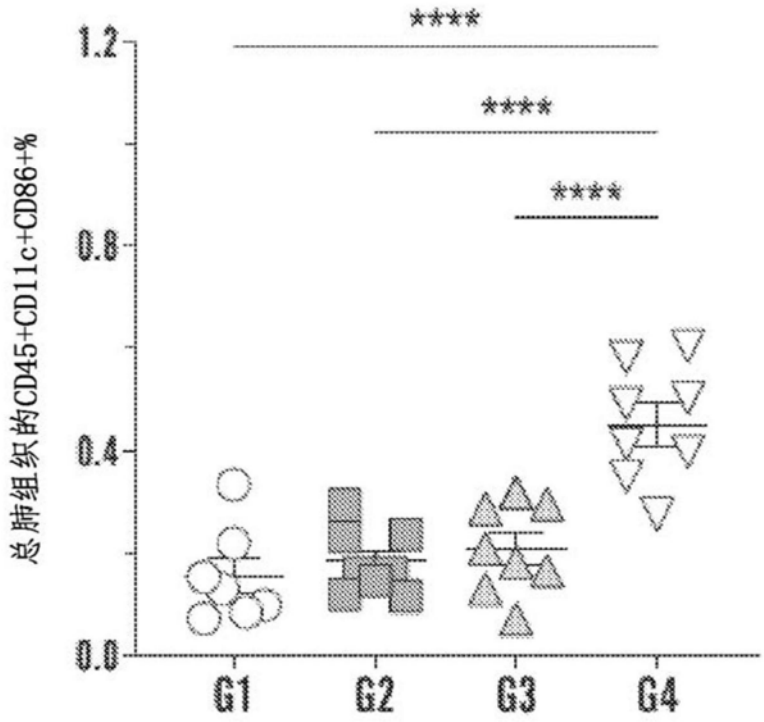


图18K

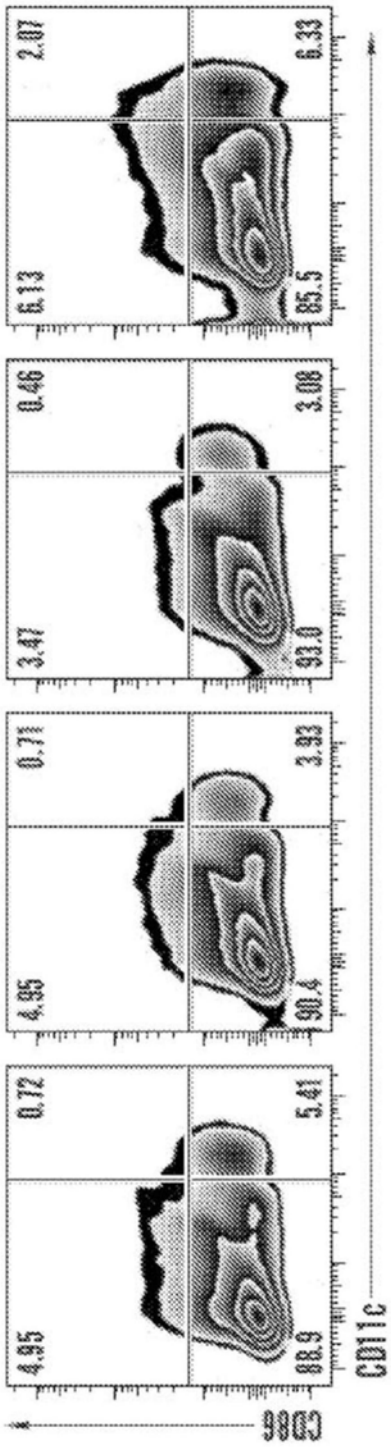

2.07
6.33
6.13
85.5
0.46
3.08
3.47
93.0
0.71
3.93
4.85
90.4
0.72
5.41
4.95
88.9
CD11c
CD86

图18J

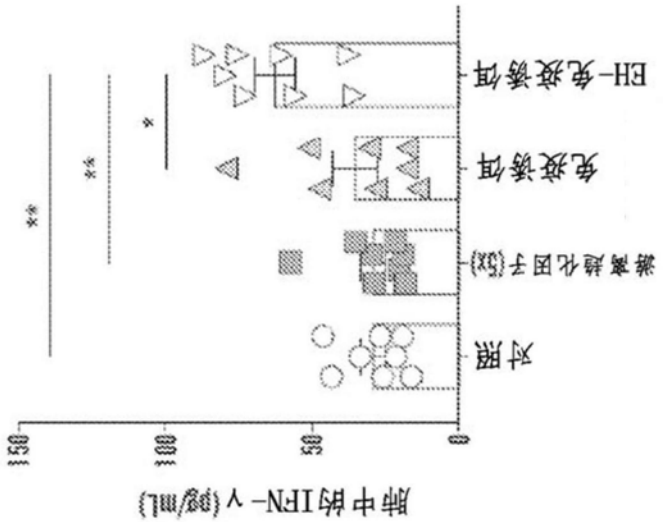

肺中的IFN-γ(pg/mL)
150
100
50
0
对照
游离抗体
免疫诱体
EH-免疫诱体
**
**
*

图18L

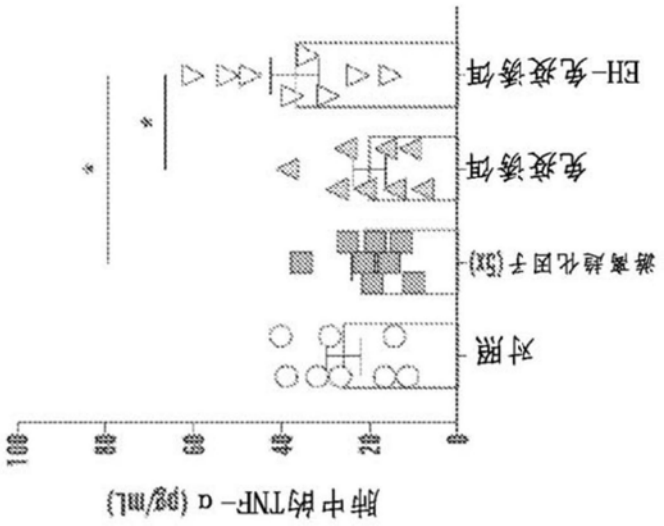

肺中的TNF-α(pg/mL)
100
80
60
40
20
0
对照
游离抗体
免疫诱体
EH-免疫诱体
*
*

图18M

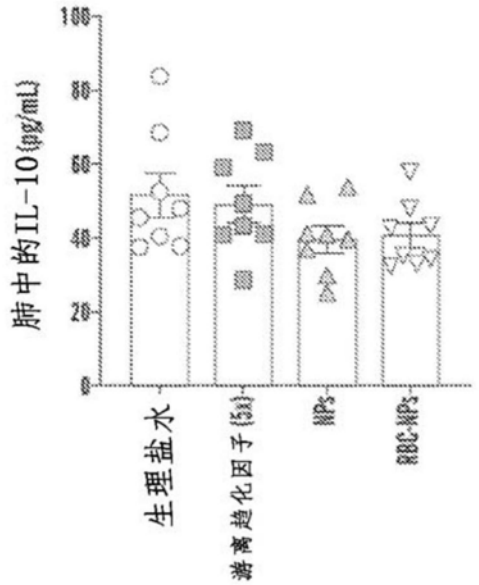

肺中的IL-10(pg/mL)
100
80
60
40
20
0
生理盐水
游离趋化因子(5x)
MPs
RBC-MPs

图18N

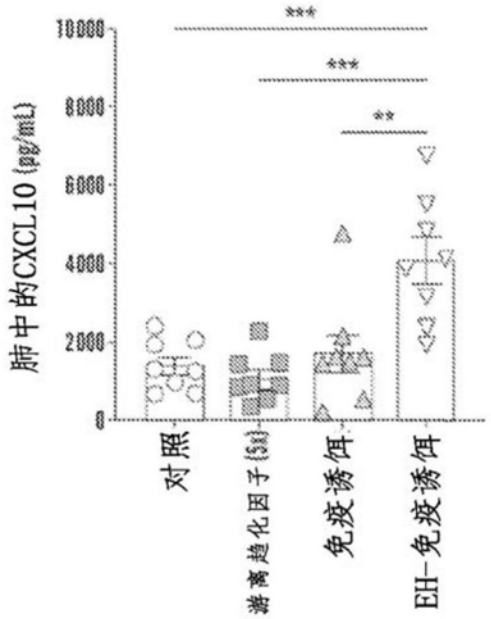

肺中的CXCL10(pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
***
***
**
对照
游离趋化因子(5x)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图180

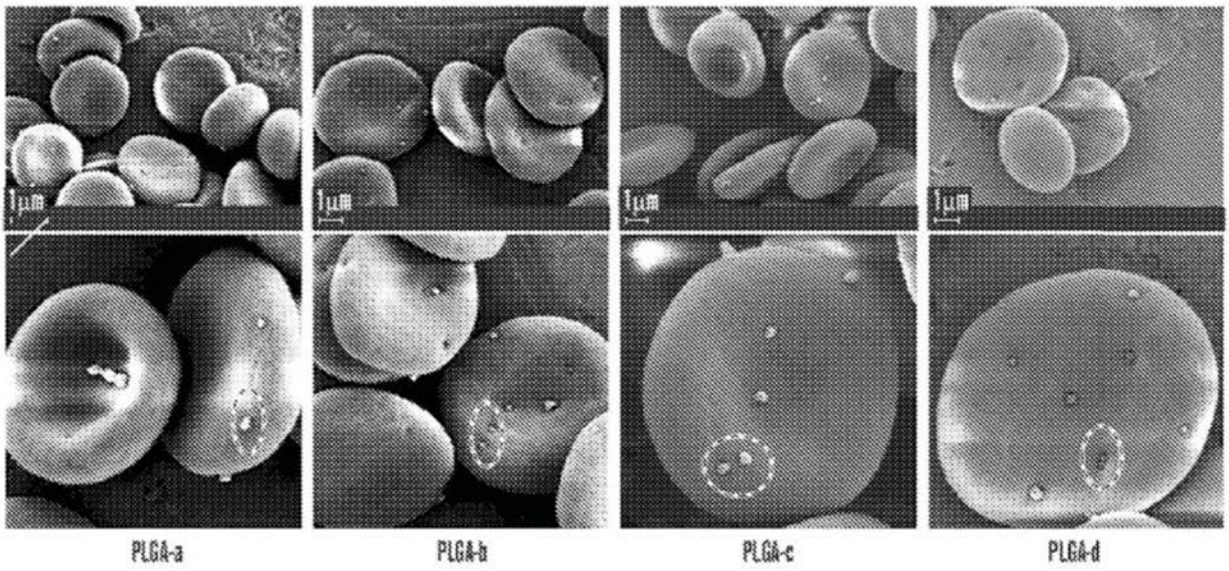

1μm
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图19

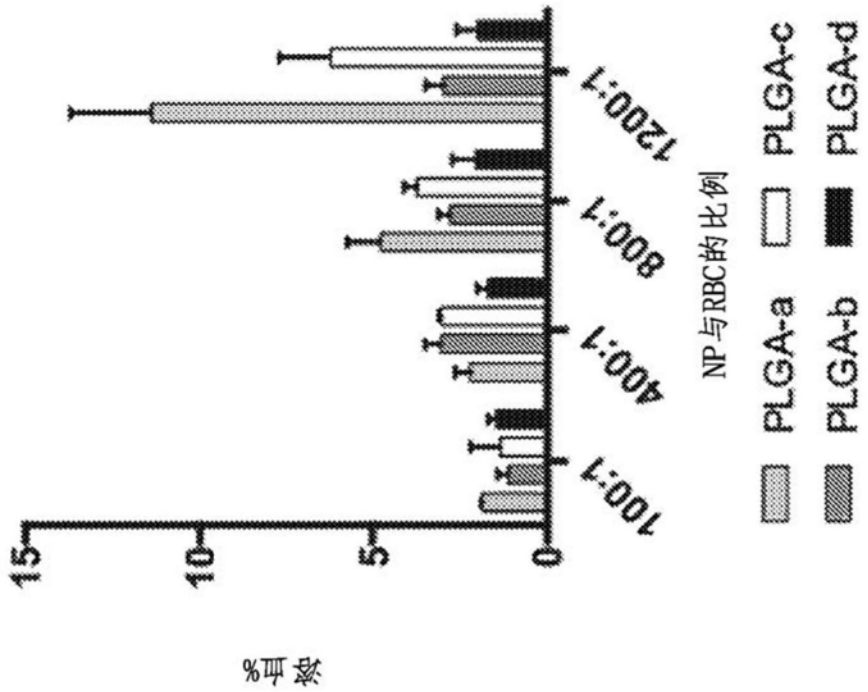

溶血%
15
10
5
0
100:1
400:1
800:1
1200:1
NP与RBC的比例
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图20A

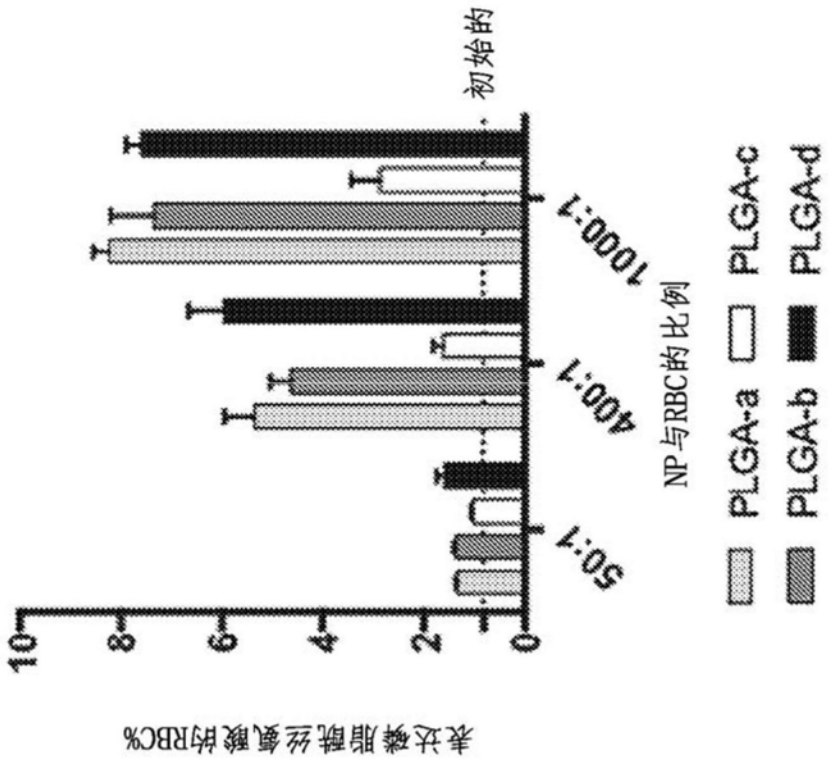

表达磷脂酰丝氨酸的RBC%
10
8
6
4
2
0
初始的
1000:1
400:1
50:1
NP与RBC的比例
PLGA-a
PLGA-c
PLGA-b
PLGA-d

图20C

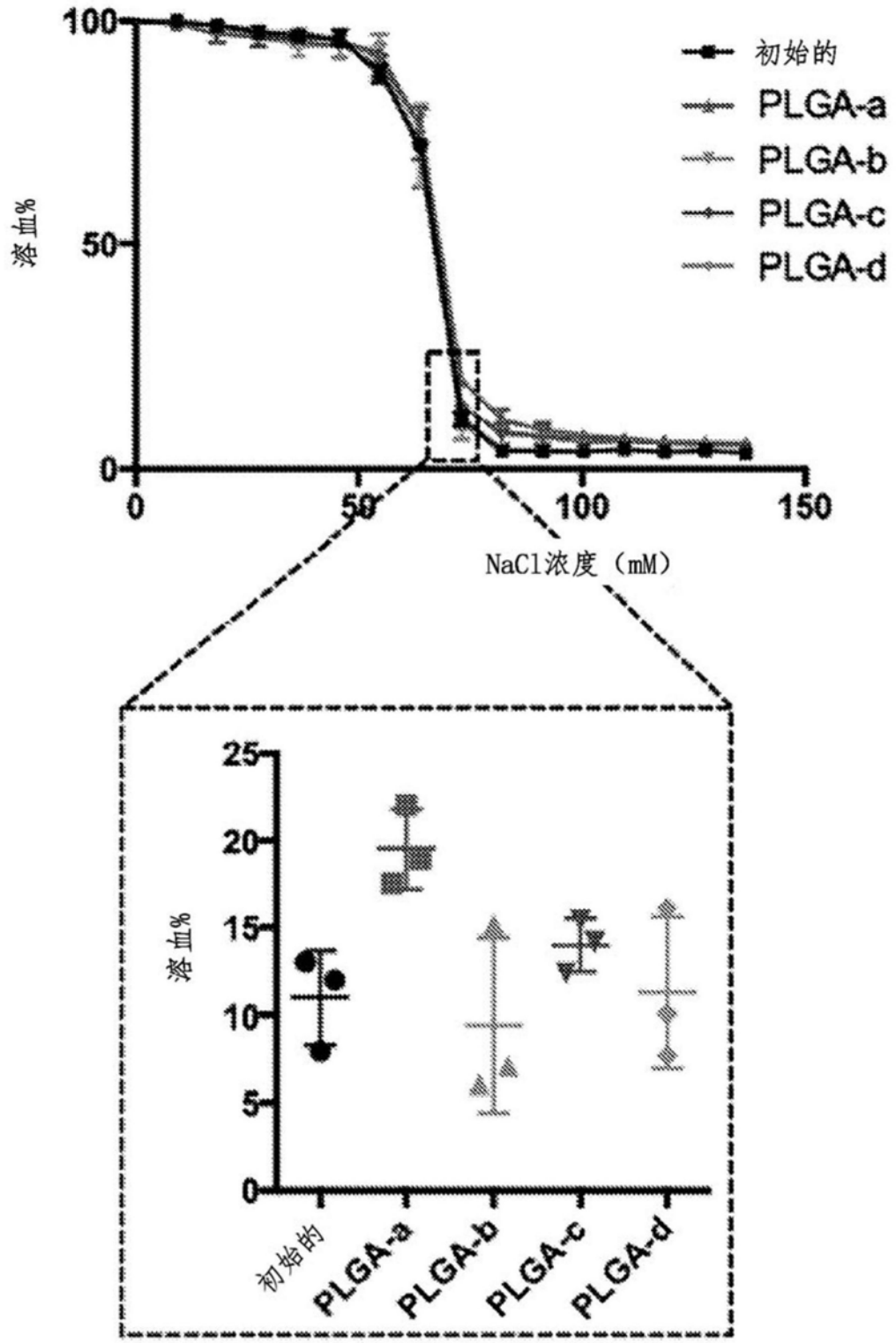

100
50
0
溶血%
0
50
100
150
NaCl浓度（mM）
初始的
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d
25
20
15
10
5
0
溶血%
初始的
PLGA-a
PLGA-b
PLGA-c
PLGA-d

图20B

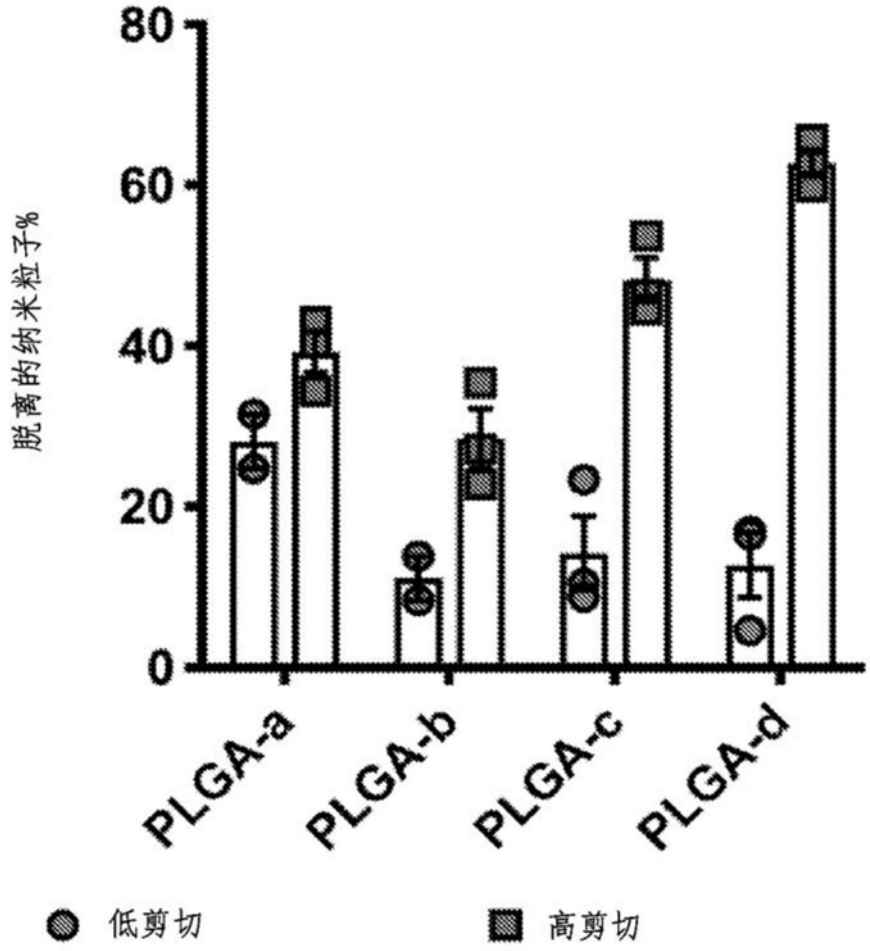


图21

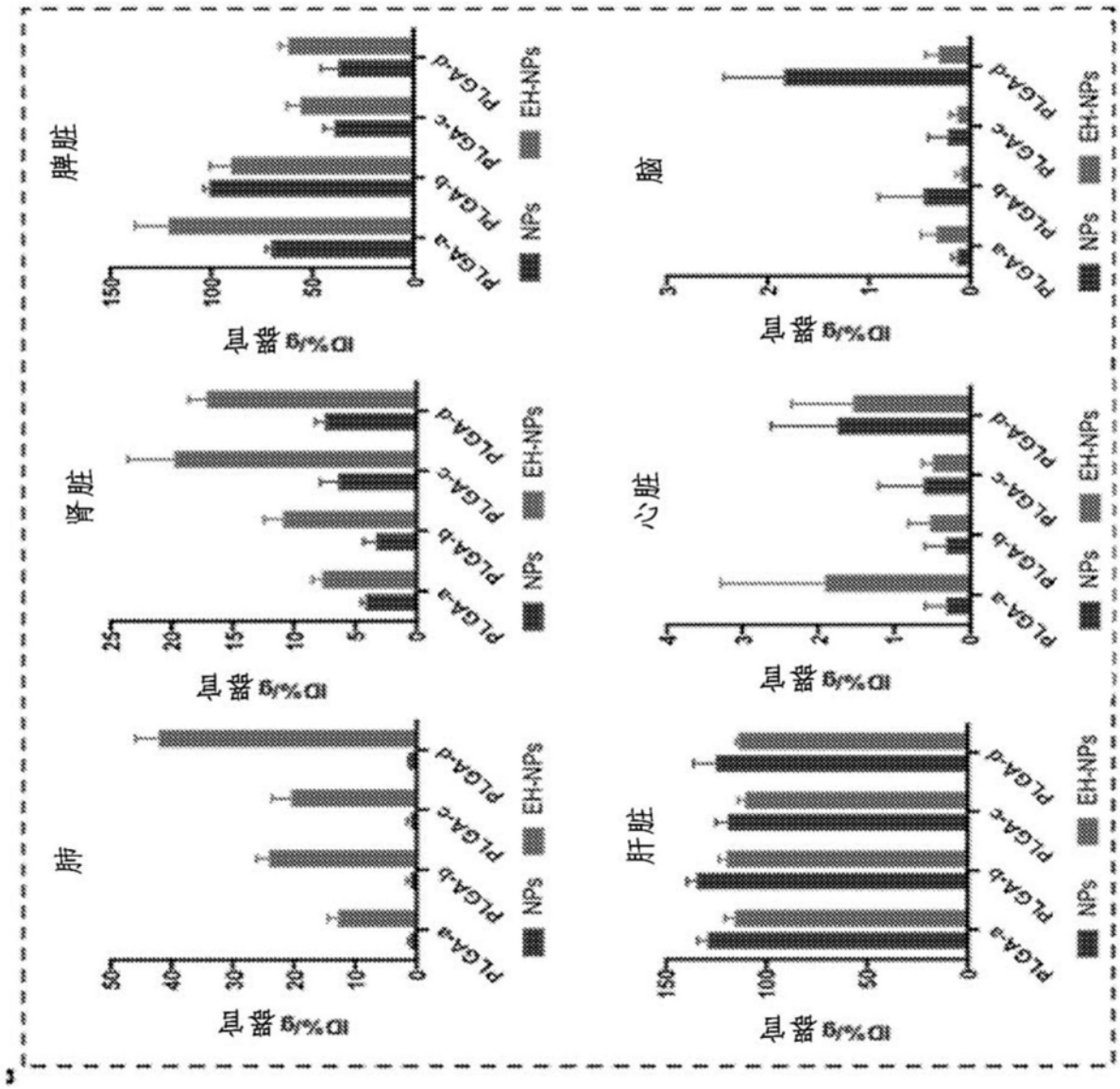


图22A

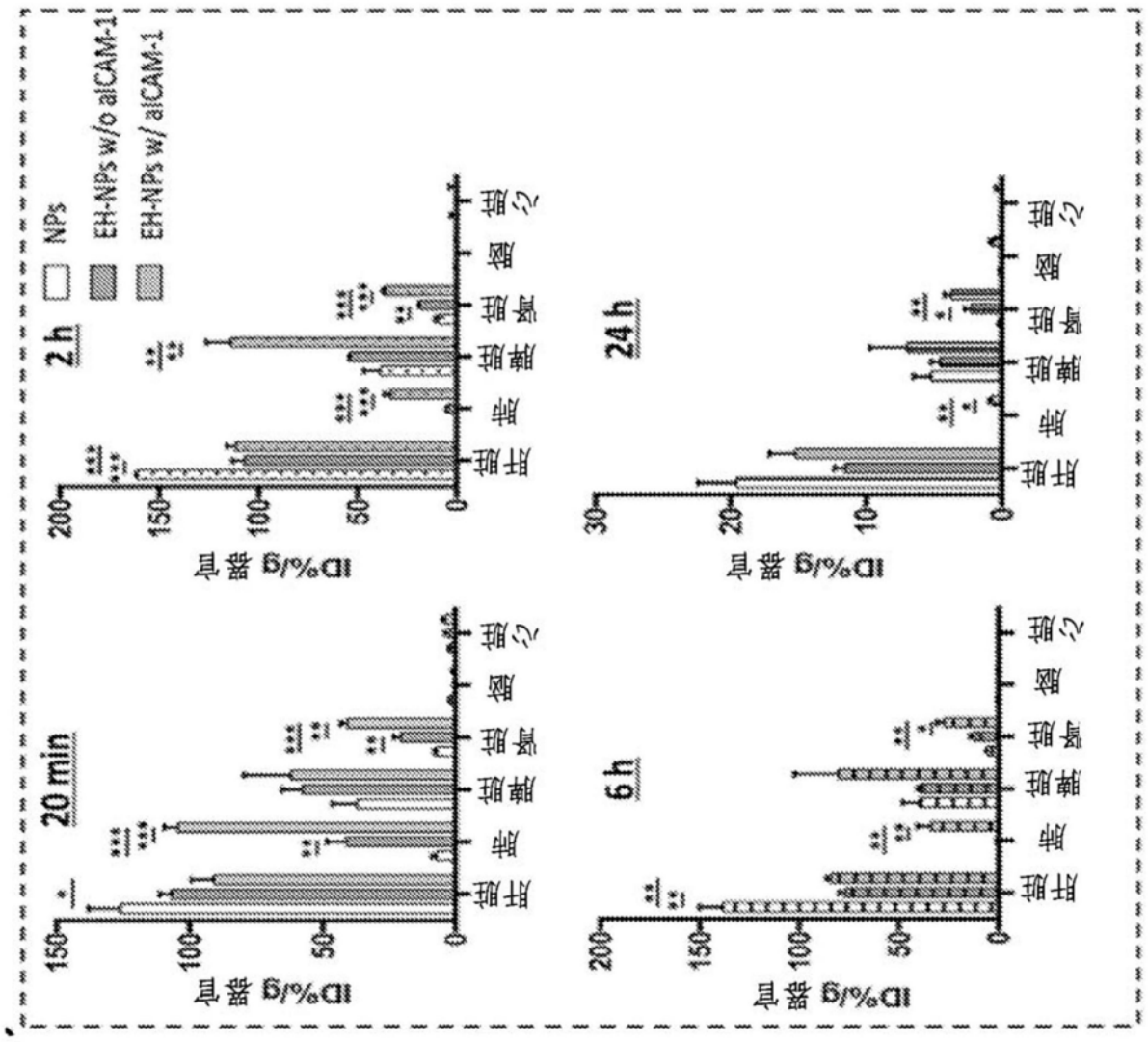

NPs
EH-NPs w/o aICAM-1
EH-NPs w/ aICAM-1
2 h
20 min
24 h
6 h
ID%/g 器官
肝脏
肺
脾脏
肾脏
脑
心脏

图22B

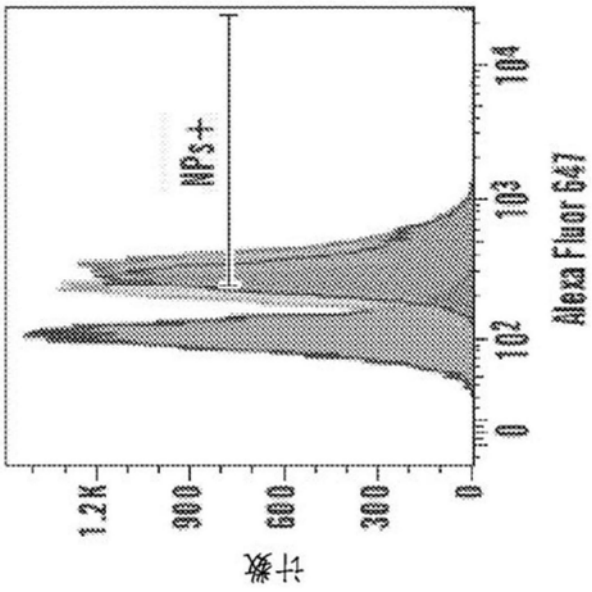

计数
1.2K
900
600
300
0
0
102
103
104
Alexa Fluor 647
MPs+

图23A

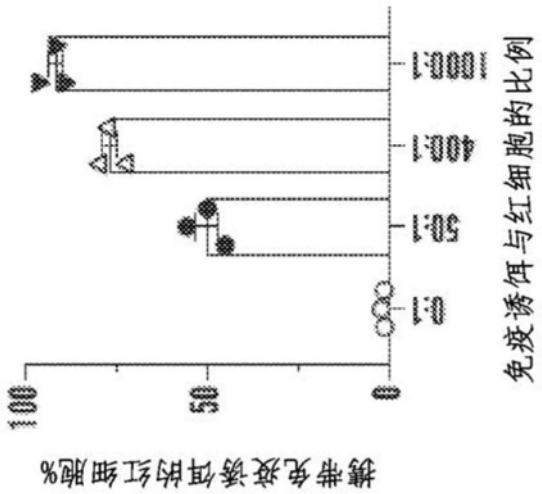

携带免疫诱饵的红细胞%
100
50
0
1:1
50:1
400:1
1000:1
免疫诱饵与红细胞的比例

图23B

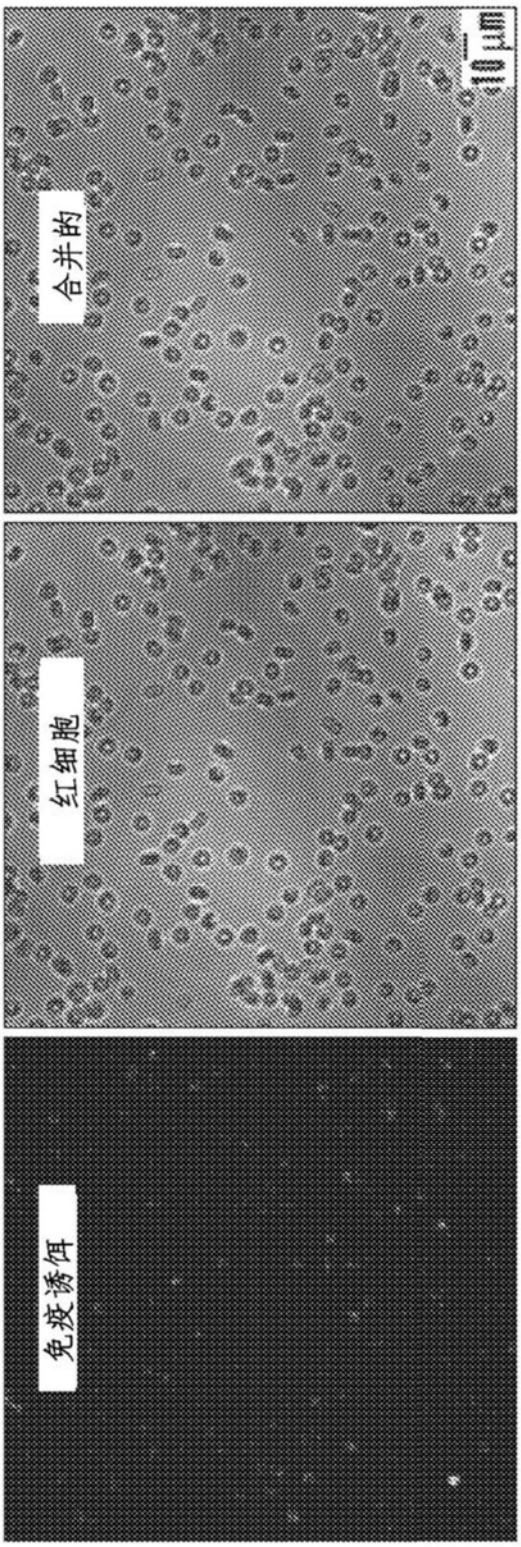


图23C

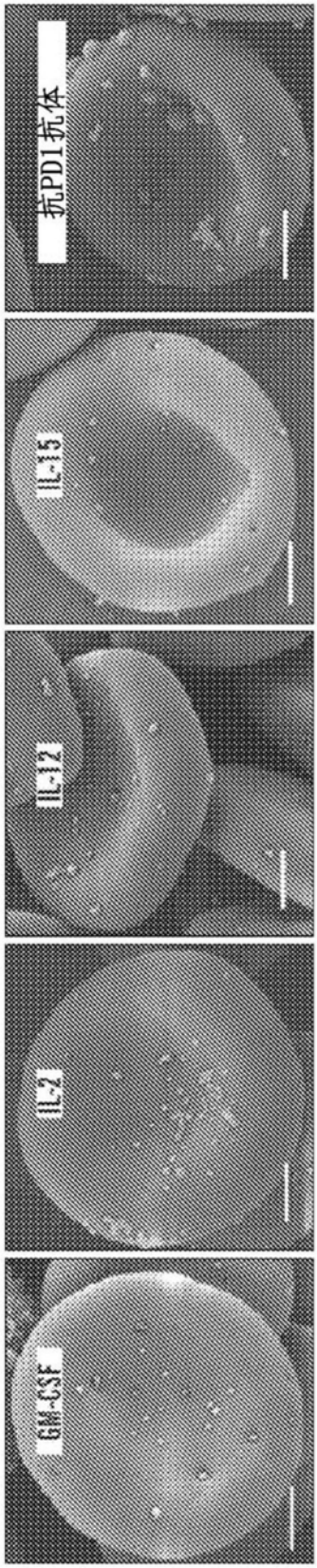


图24

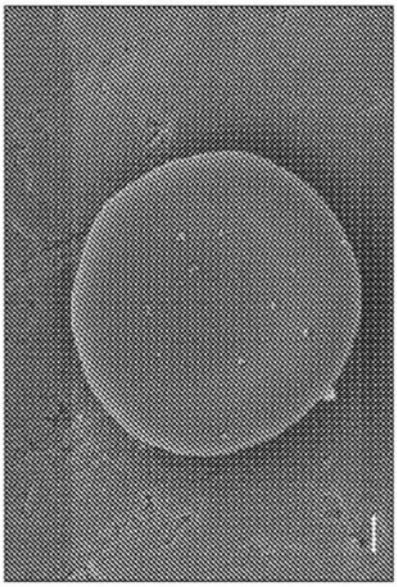


图25A

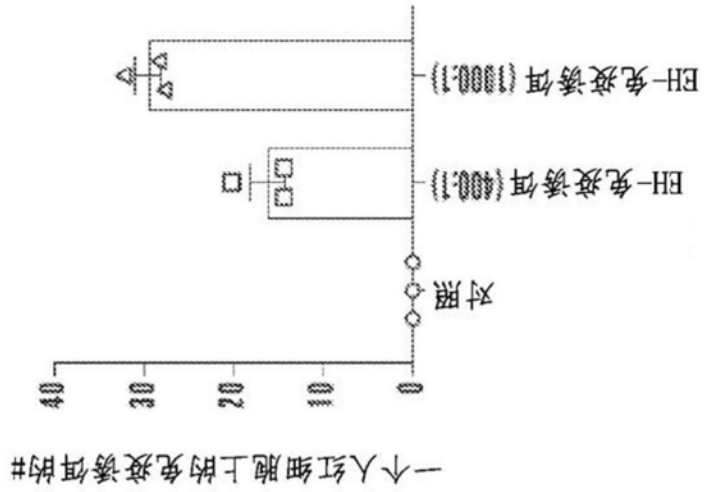


图25B

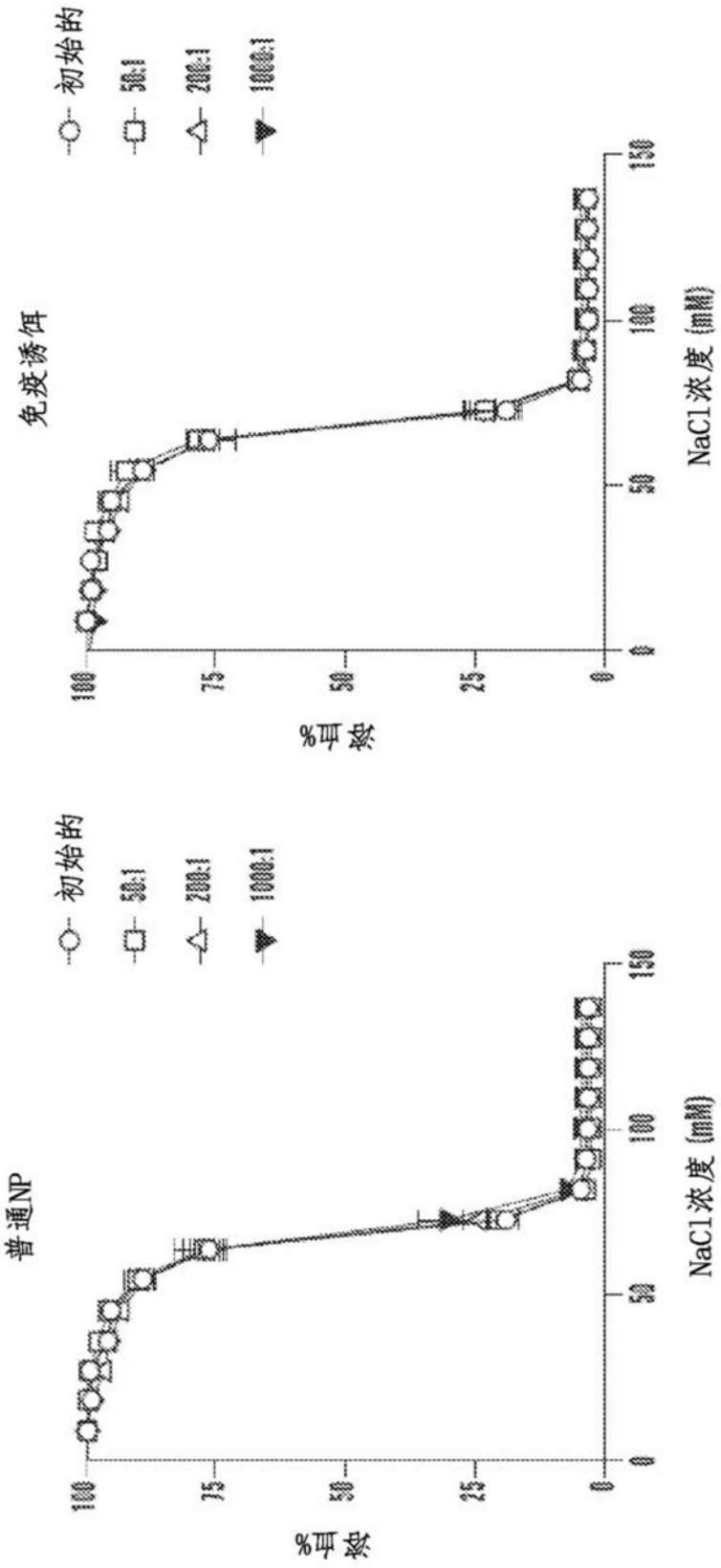

免疫诱饵
初始的
50:1
200:1
1000:1
溶血%
100
75
50
25
0
0
50
100
150
NaCl浓度 (mM)
普通NP
初始的
50:1
200:1
1000:1
溶血%
100
75
50
25
0
0
50
100
150
NaCl浓度 (mM)

图26

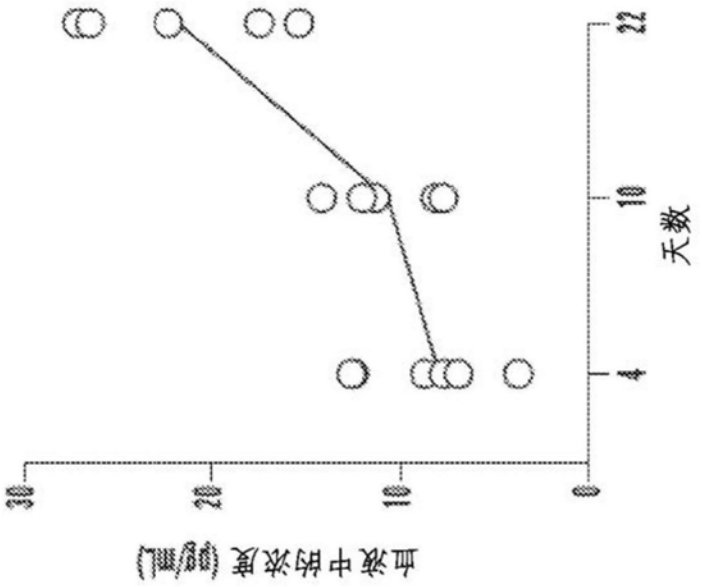

血液中的浓度 (pg/mL)
30
20
10
0
4
10
22
天数

图27A

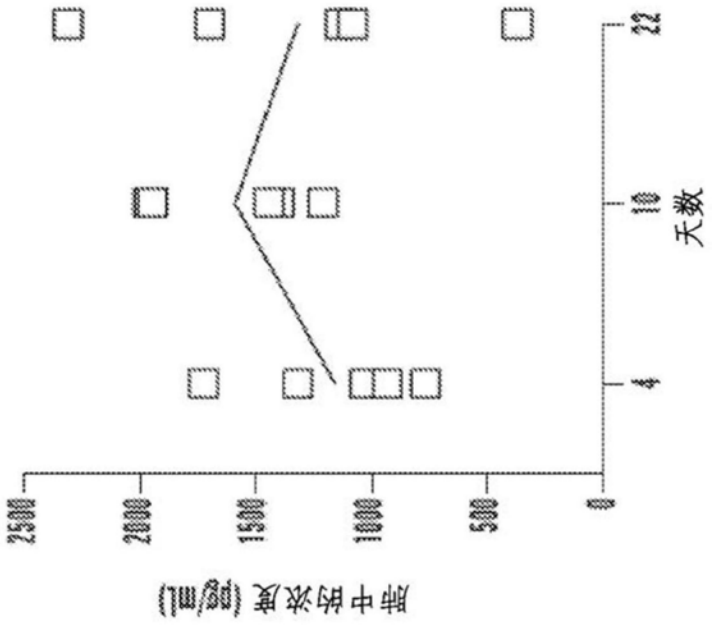

肺中的浓度 (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
4
10
22
天数

图27B

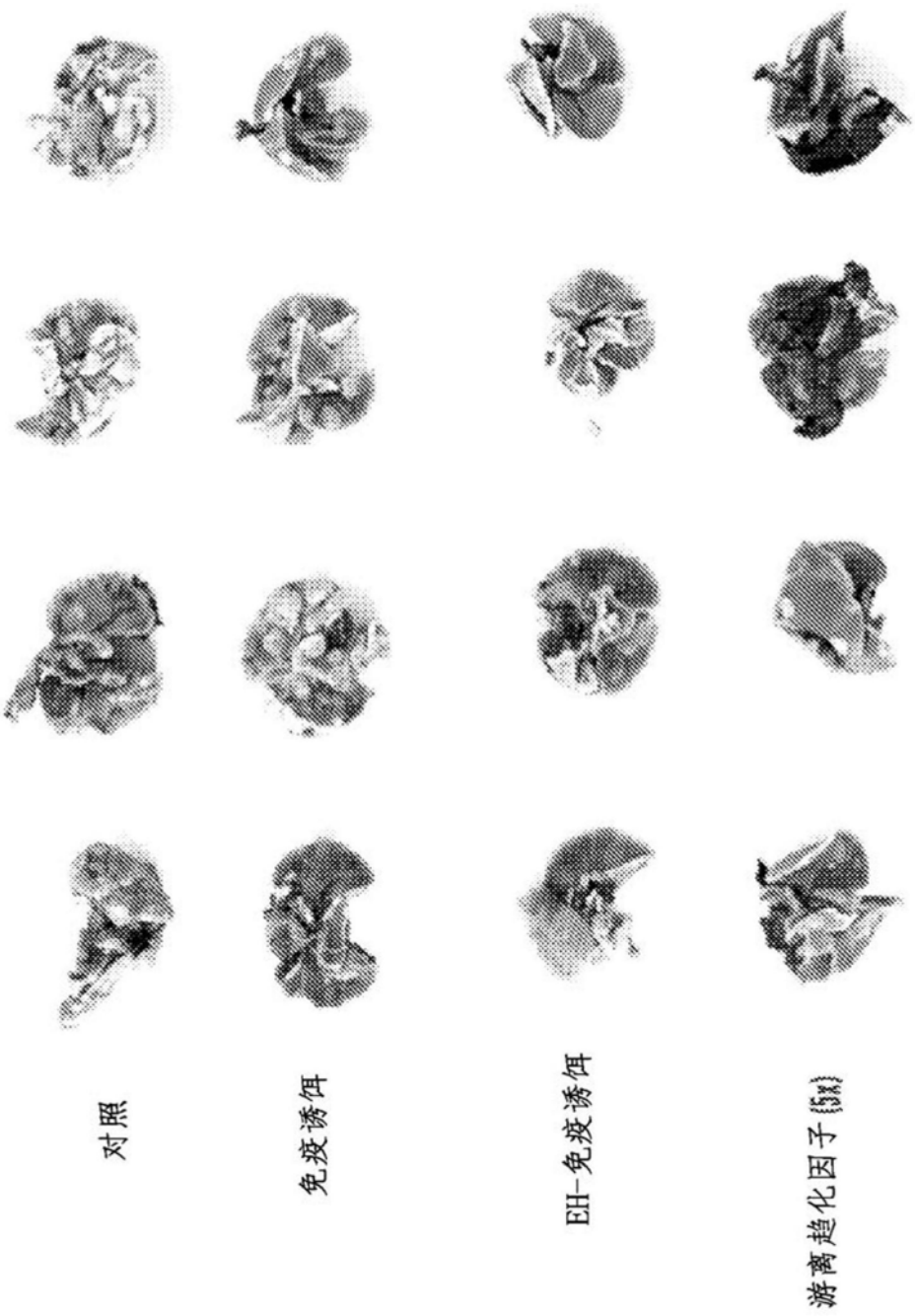


图28

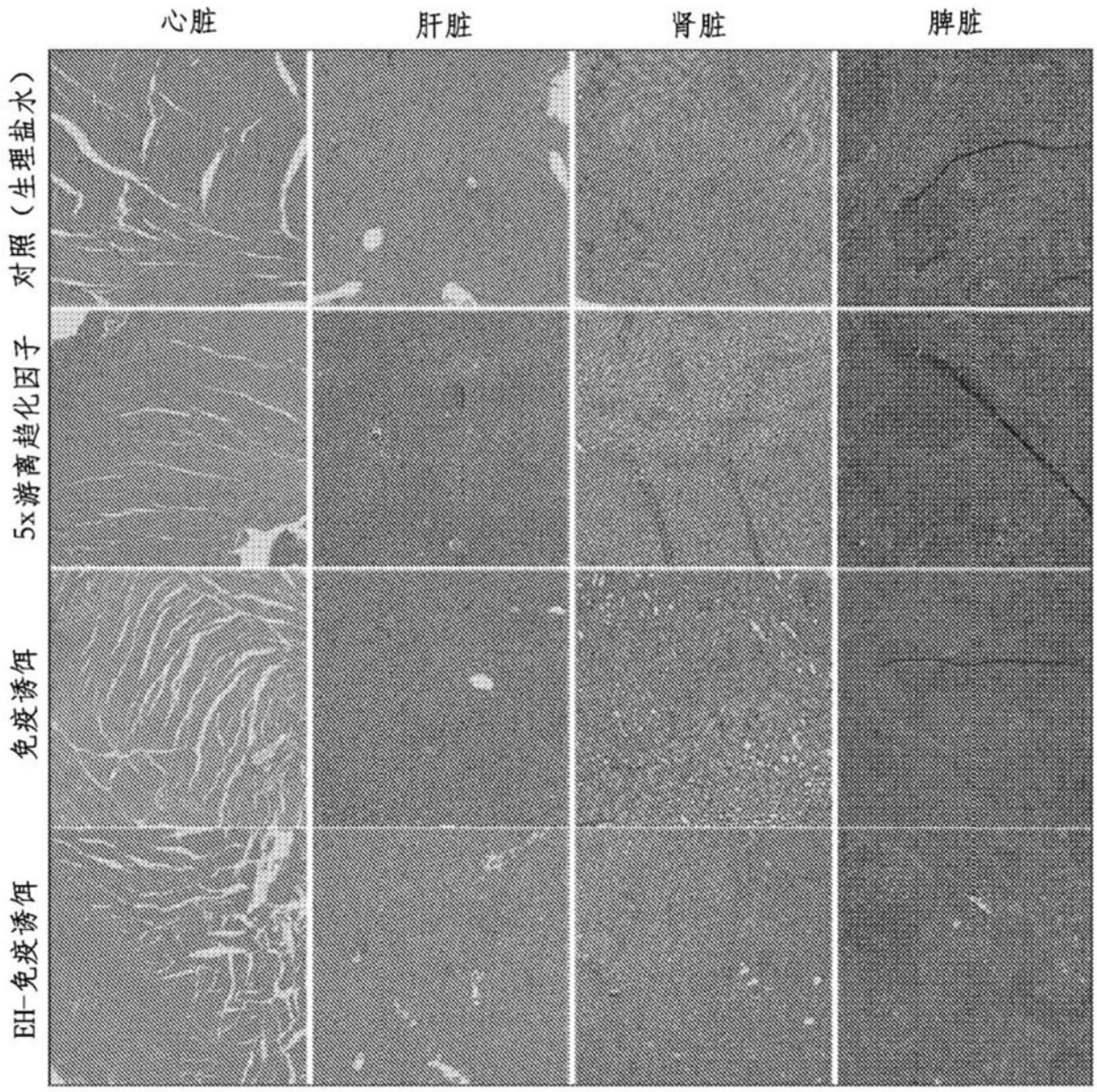


图29

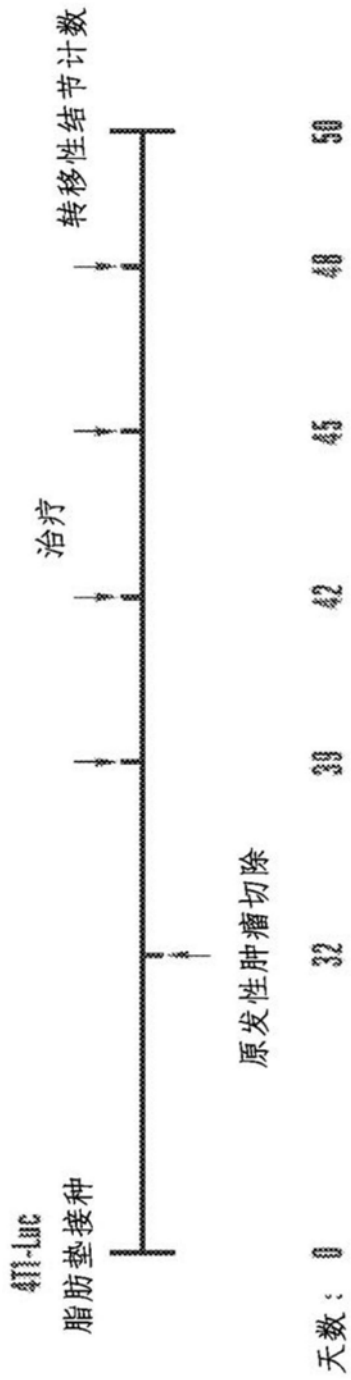


图30A

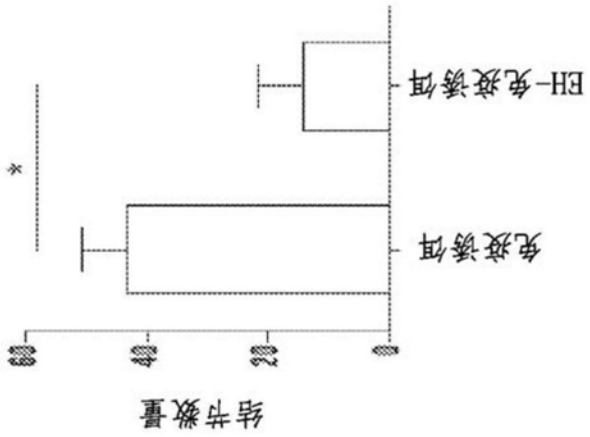


图30B

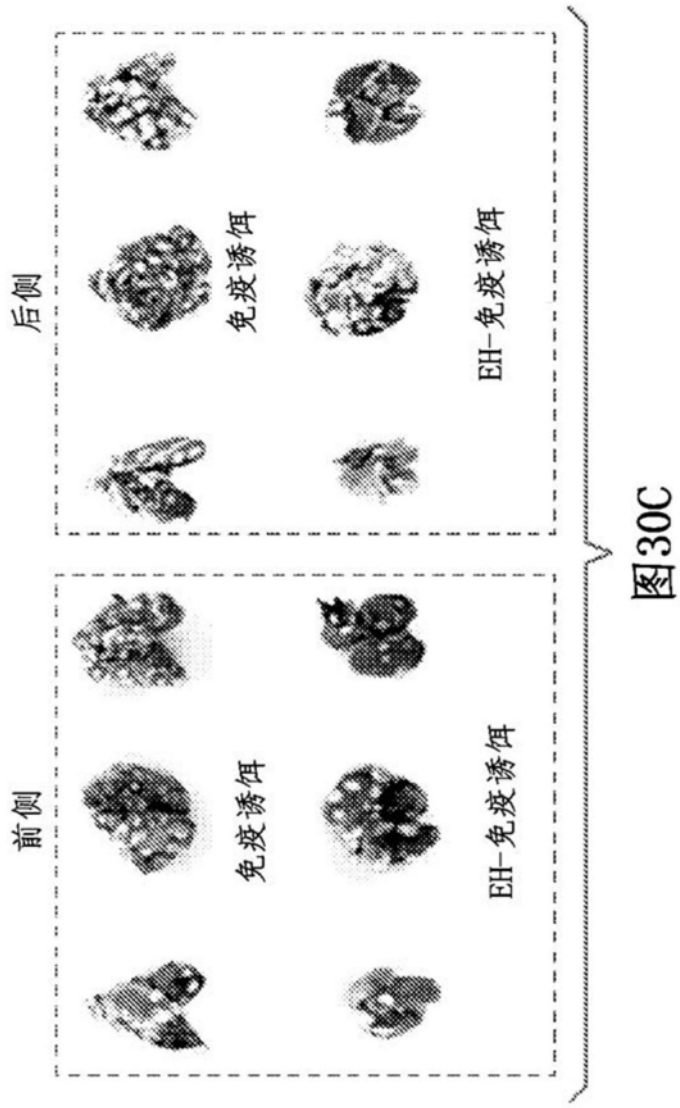


图30C

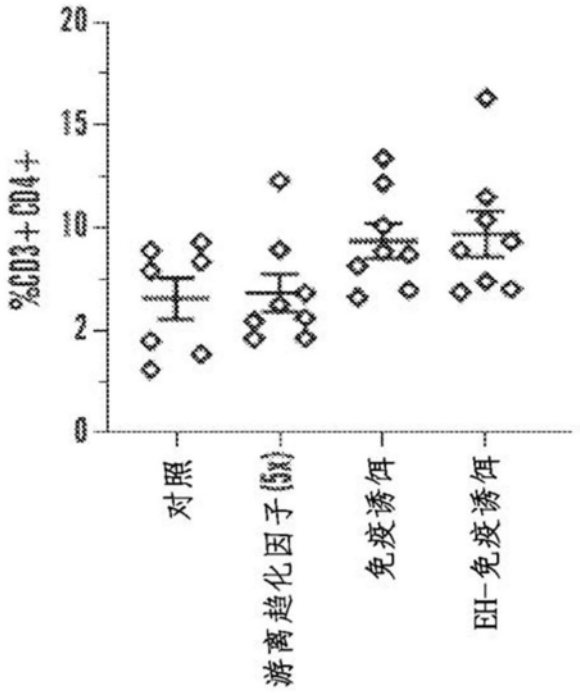

%CD3+CD4+
20
15
10
5
0
对照
游离趋化因子(5x)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图31A

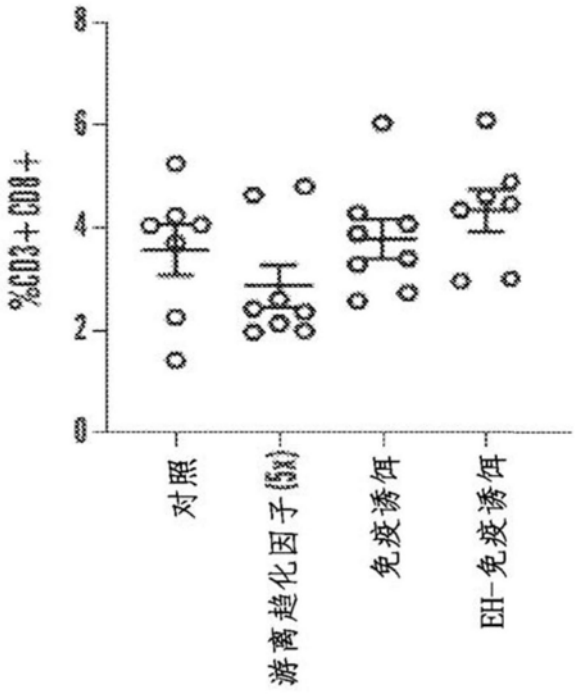

%CD3+CD8+
8
6
4
2
0
对照
游离趋化因子(5x)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图31B

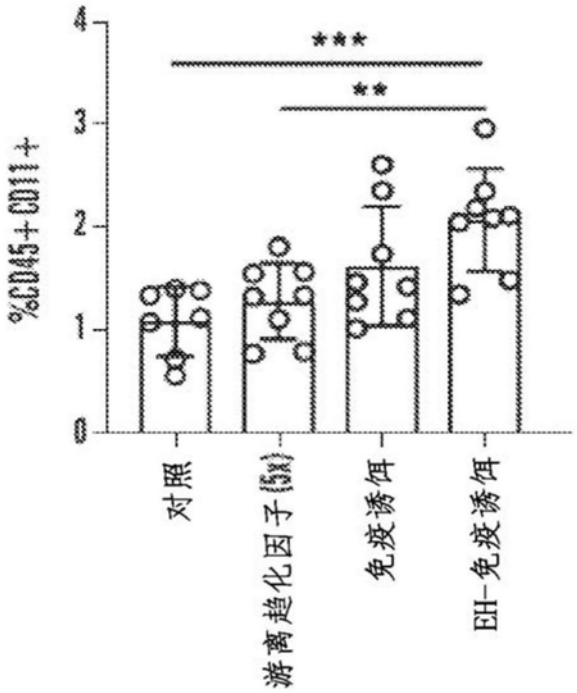

%CD45+CD11+
***
**
对照
游离趋化因子(5μg)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图31C

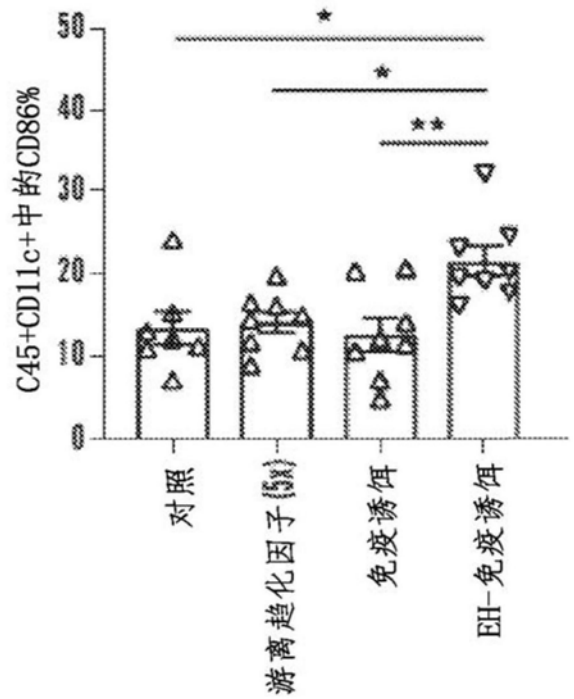

C45+CD11c+中的CD86%
*
*
**
对照
游离趋化因子(5μg)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图31D

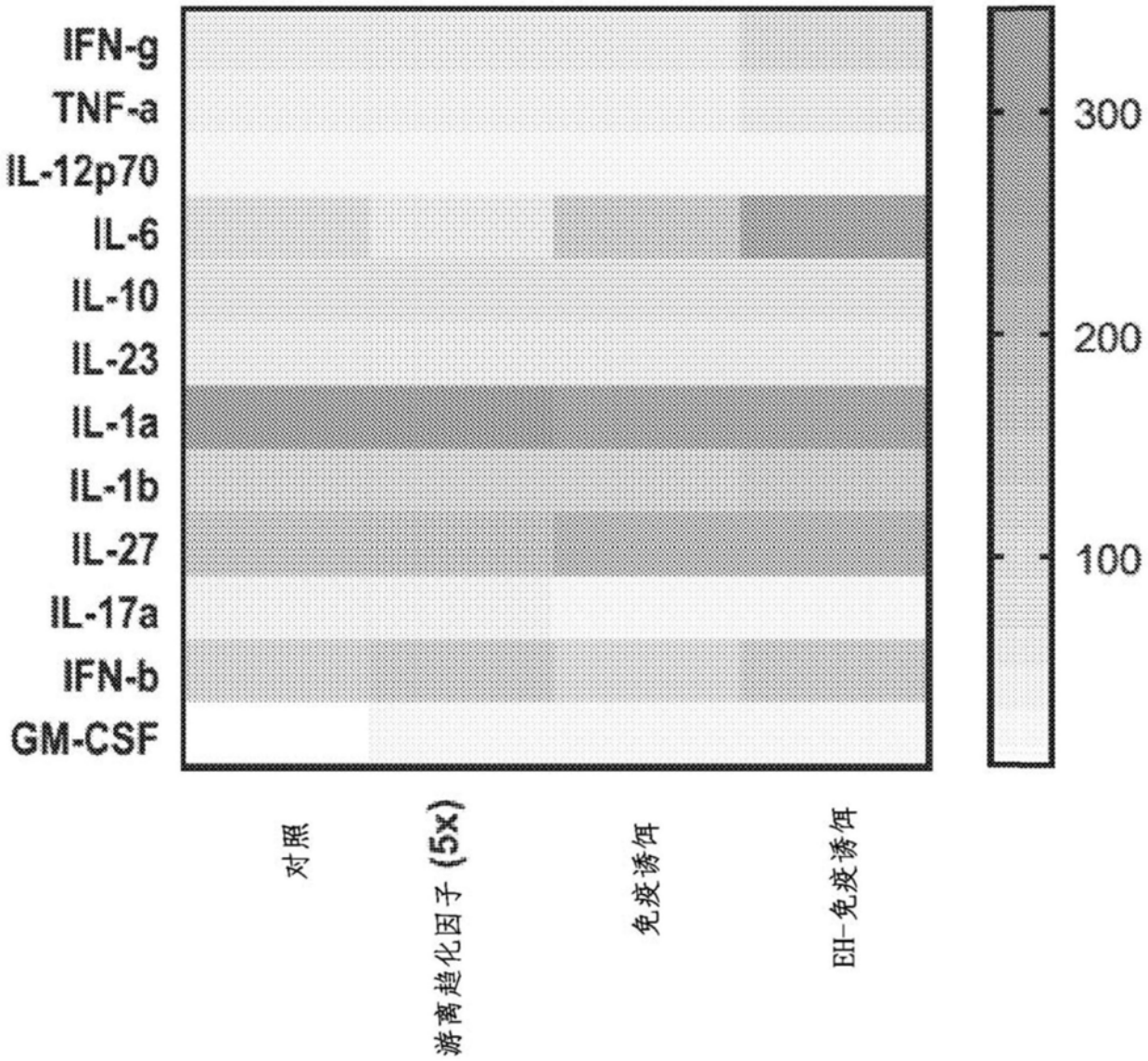

IFN-g
TNF-a
IL-12p70
IL-6
IL-10
IL-23
IL-1a
IL-1b
IL-27
IL-17a
IFN-b
GM-CSF
300
200
100
对照
游离趋化因子 (5x)
免疫诱饵
EH-免疫诱饵

图32

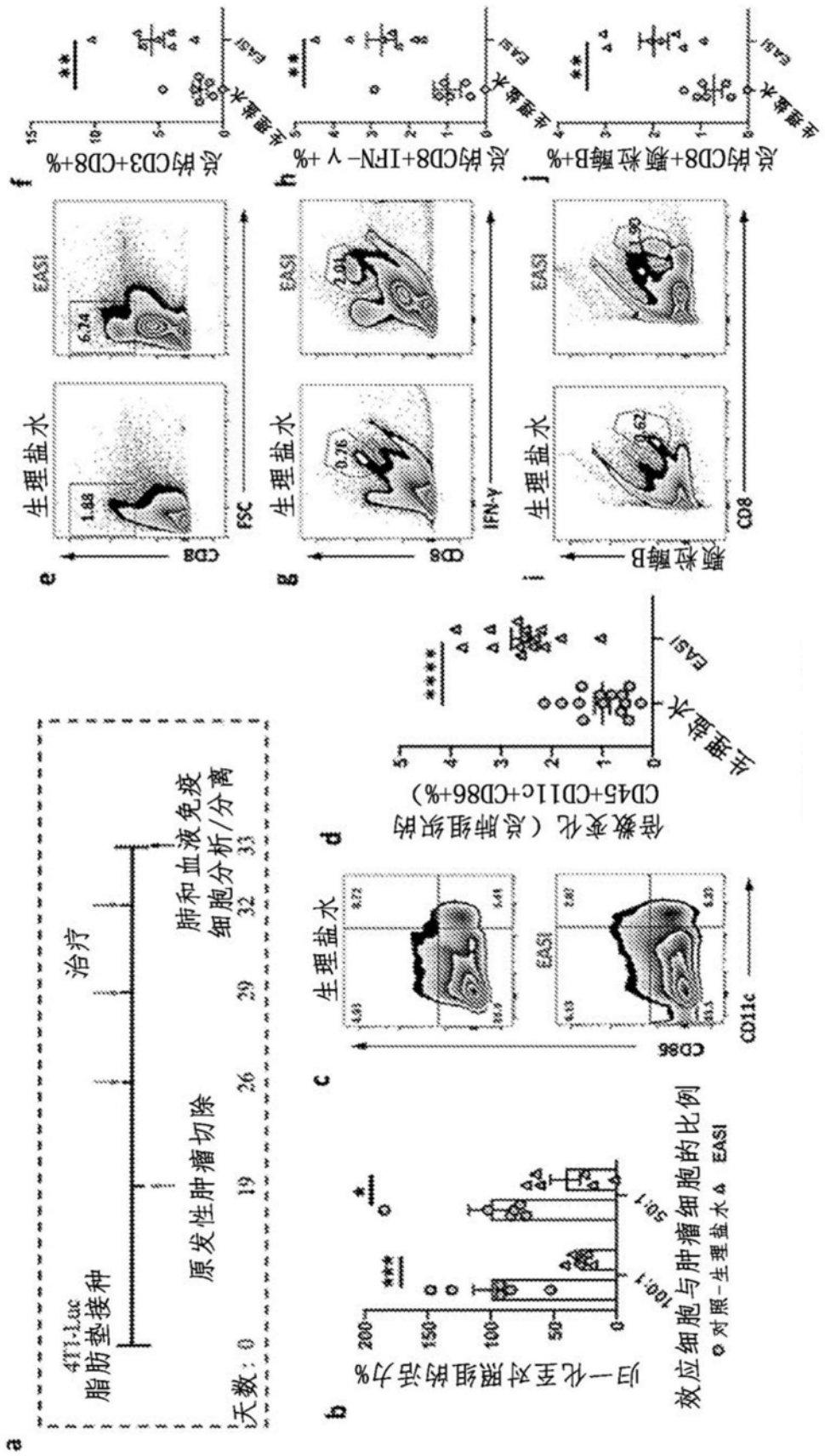

a
4T1-luc
脂肪垫接种
治疗
原发性肿瘤切除
肺和血液免疫
细胞分析/分离
天数：0 19 26 29 32 33
b
归一化至对照组的活力%
效应细胞与肿瘤细胞的比例
对照-生理盐水 EASI
c
生理盐水
EASI
CD86
CD11c
d
倍数变化（总肺组织的
CD45+CD11c+CD86+%）
肿瘤负荷
e
生理盐水
EASI
CD8
FSC
f
总的CD3+CD8+%
g
生理盐水
EASI
CD8
IFN-γ
h
总的CD8+IFN-γ+%
i
生理盐水
EASI
颗粒酶B
CD8
j
总的CD8+颗粒酶B+%

图33A-33J

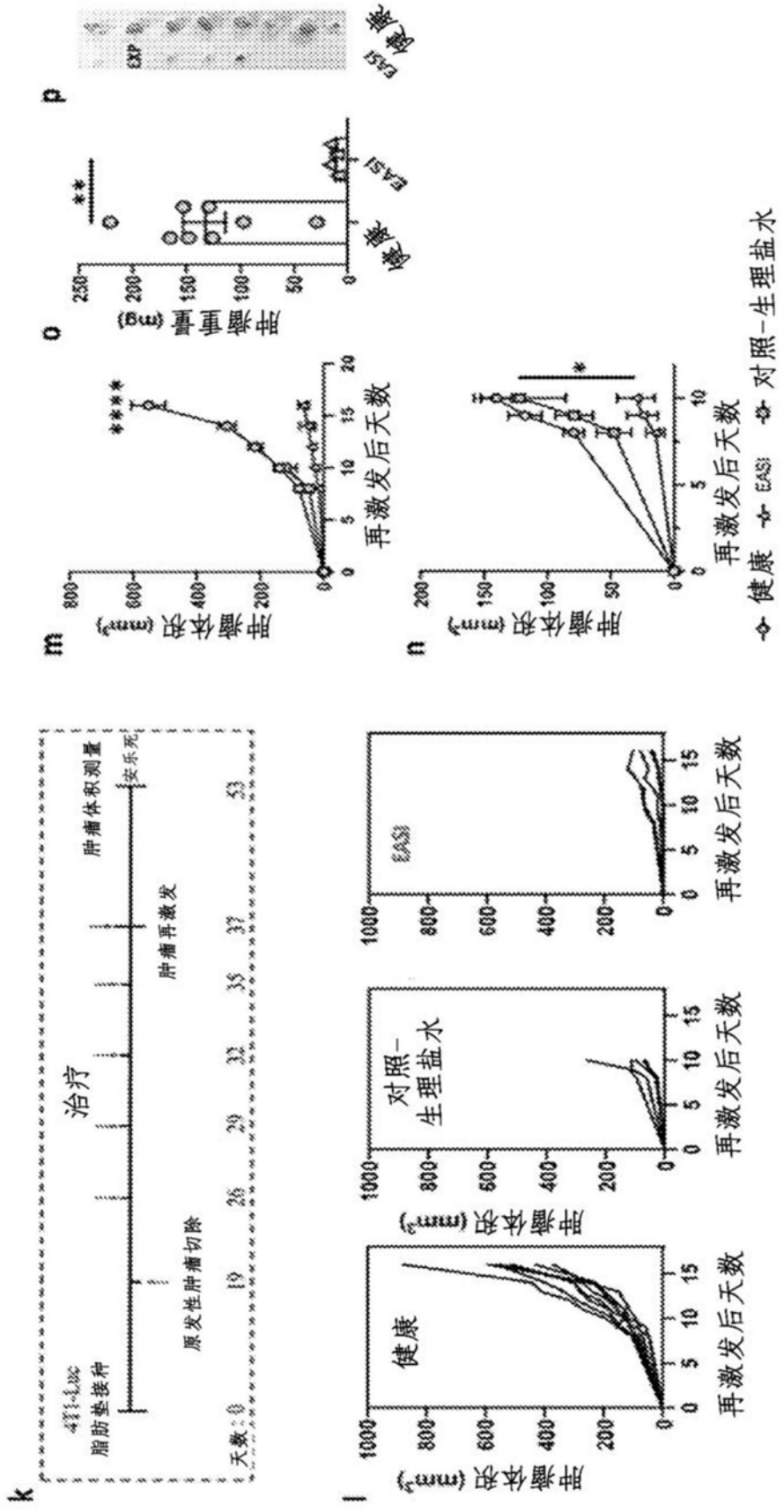

k
脂肪垫接种
治疗
肿瘤体积测量
安乐死
肿瘤再激发
原发性肿瘤切除
天数
再激发后天数
肿瘤体积 (mm³)
健康
对照-生理盐水
EAS3
肿瘤重量 (mg)
m
n
o
p
健康
EAS3
对照-生理盐水

图33K-33P

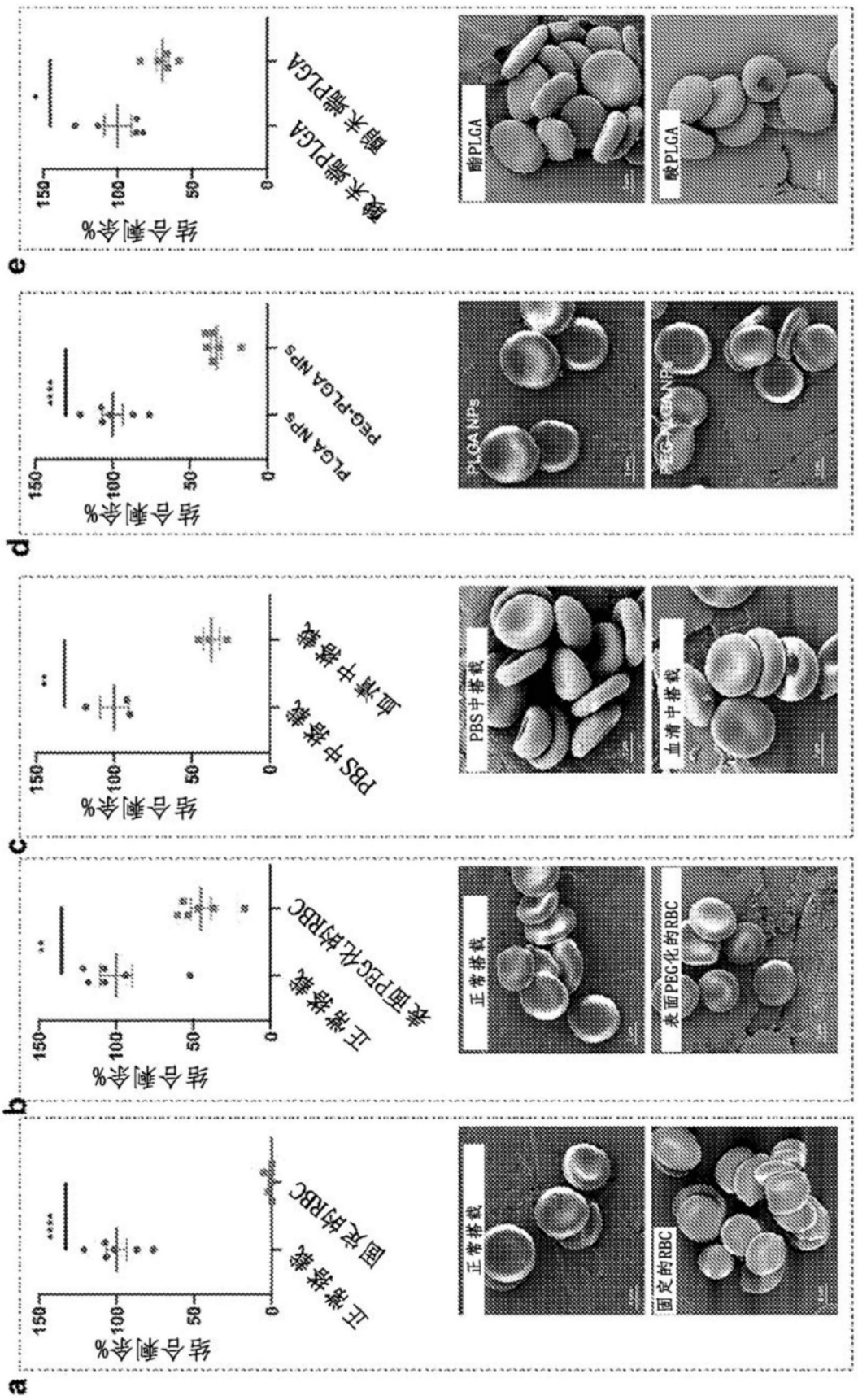

a
结合剩余%
150
100
50
0
正常装载
固定的RBC
正常装载
固定的RBC
正常搭载
固定的RBC
b
结合剩余%
正常装载
表面PEG化的RBC
正常搭载
表面PEG化的RBC
c
结合剩余%
PBS中装载
血清中装载
PBS中搭载
血清中搭载
d
结合剩余%
PLGA NPs
PEG-PLGA NPs
PLGA NPs
PEG-PLGA NPs
e
结合剩余%
酶末端PLGA
酸末端PLGA
酶PLGA
酸PLGA

图34A-34E

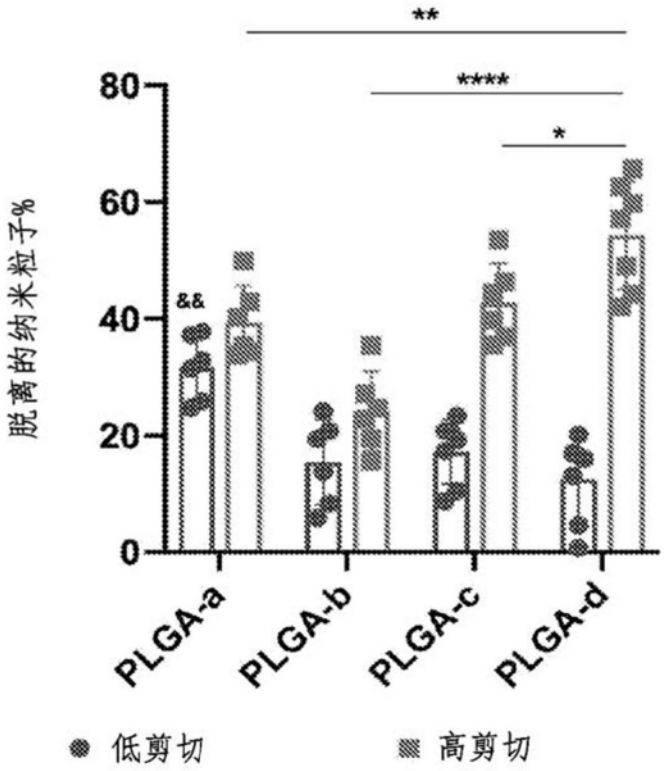


图35

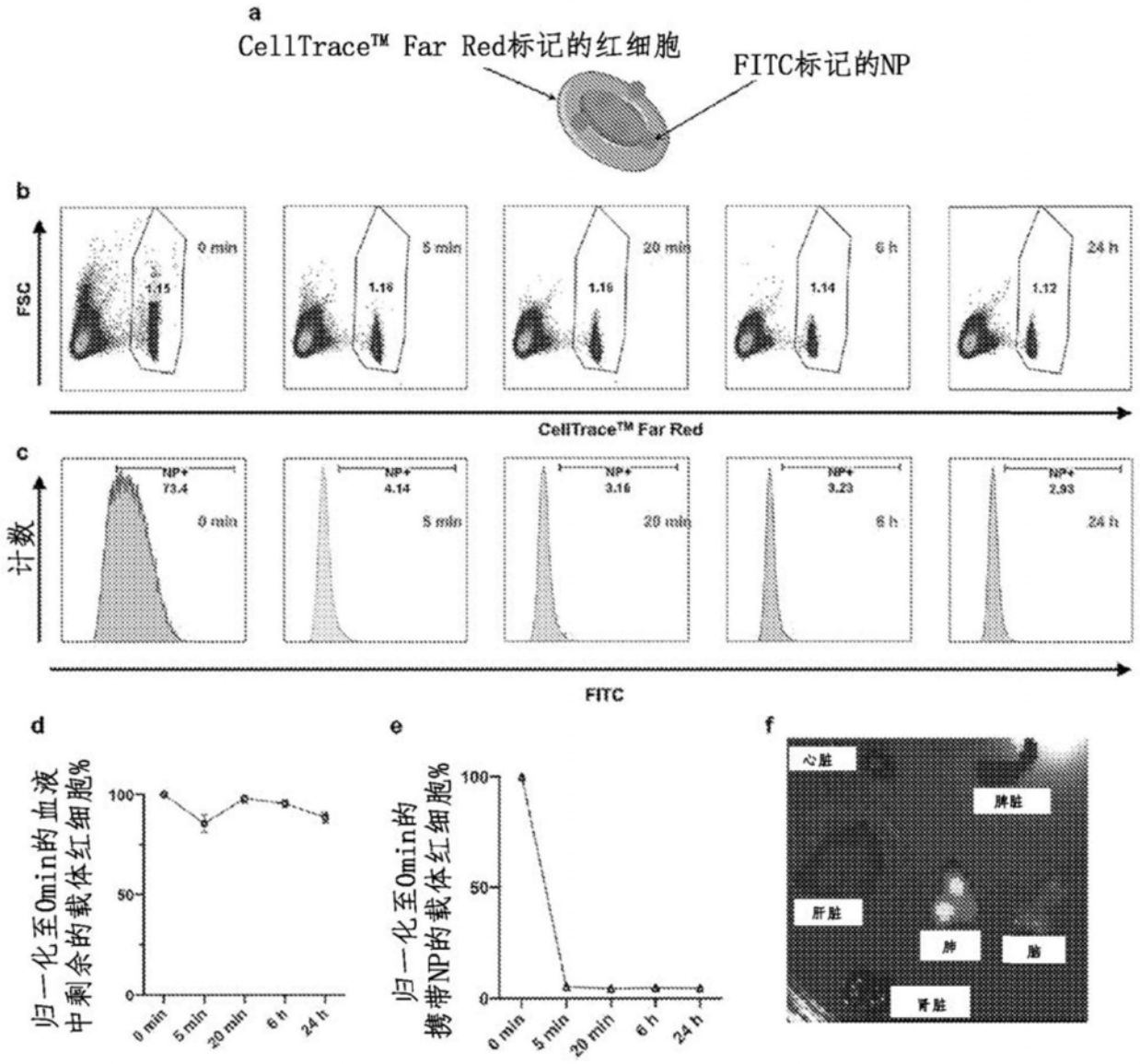

a
CellTrace™ Far Red标记的红细胞
FITC标记的NP
b
FSC
0 min
5 min
20 min
6 h
24 h
1.15
1.16
1.16
1.14
1.12
CellTrace™ Far Red
c
计数
NP+
73.4
4.14
3.16
3.23
2.93
FITC
d
归一化至0min的血液中剩余的载体红细胞%
e
归一化至0min的携带NP的载体红细胞%
f
心脏
脾脏
肝脏
肺
脑
肾脏

图36A-36F

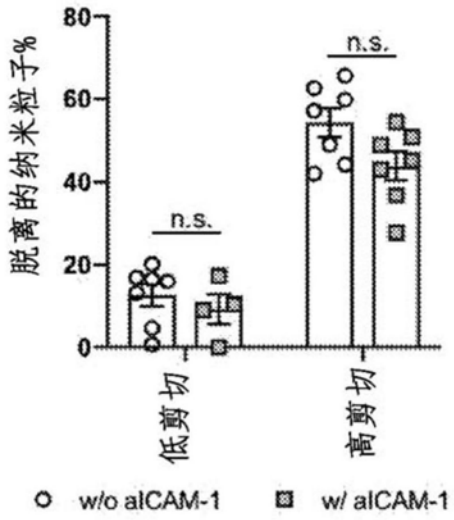

脱离的纳米粒子%
80
60
40
20
0
n.s.
n.s.
低剪切
高剪切
w/o aICAM-1
w/ aICAM-1

图37

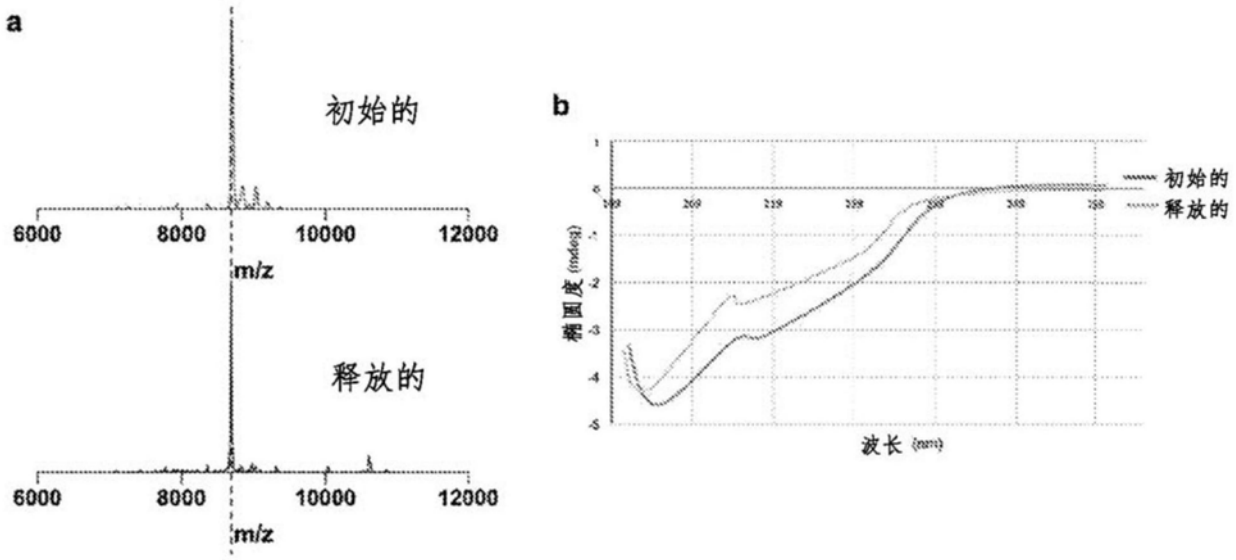

a
初始的
6000
8000
10000
12000
m/z
释放的
6000
8000
10000
12000
m/z
b
初始的
释放的
椭圆度 (mdeg)
波长 (nm)

图38A-38B

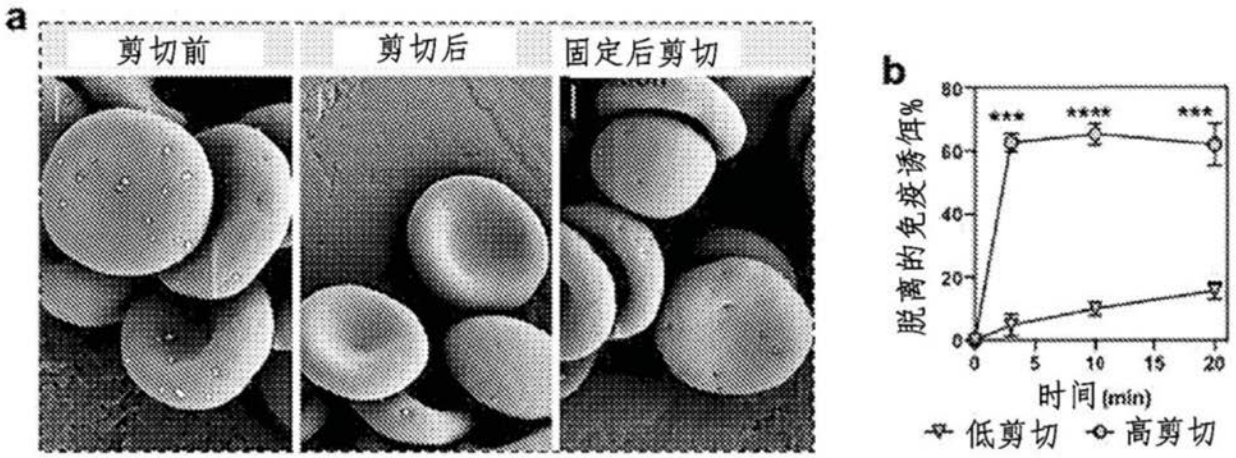


图39A-39B

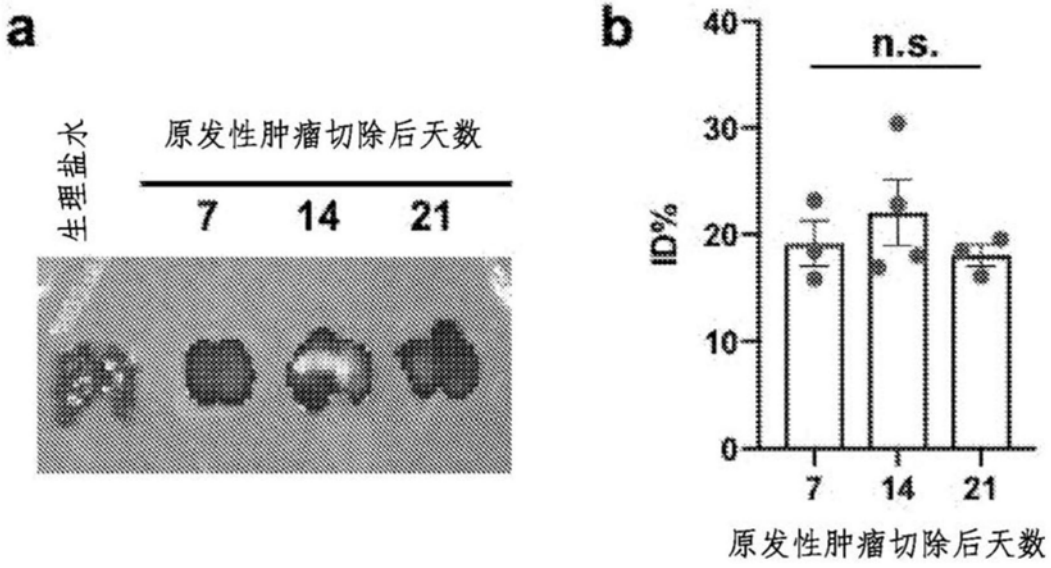


图40A-40B

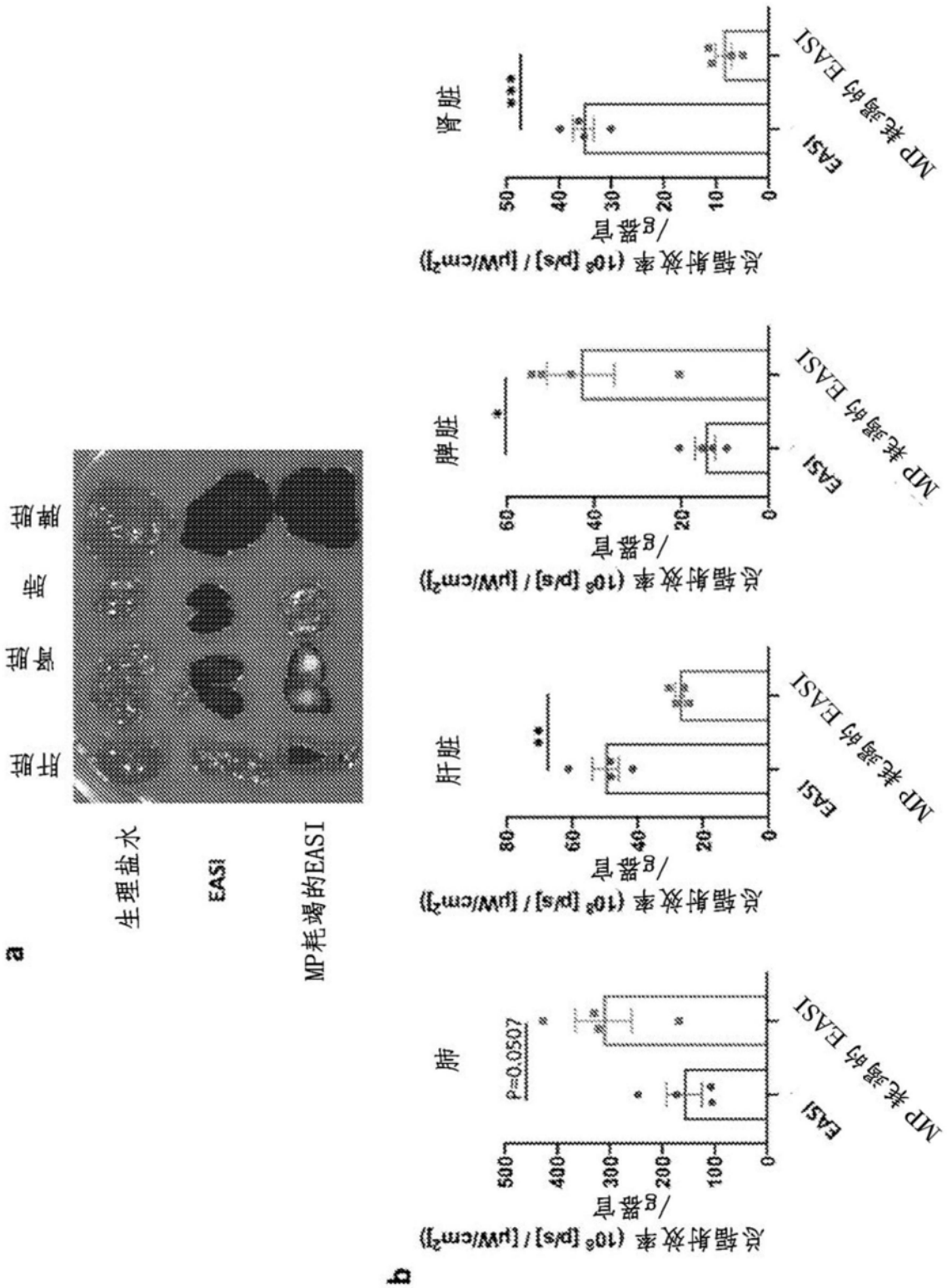

a
生理盐水
EASI
MP耗竭的EASI
肝脏
肾脏
脾脏
肺
b
总辐射效率 (10^6 [p/s] / [μW/cm²]) /g器官
EASI
MP 耗竭的 EASI
肺
肝脏
脾脏
肾脏
p=0.0507

图41A-41B

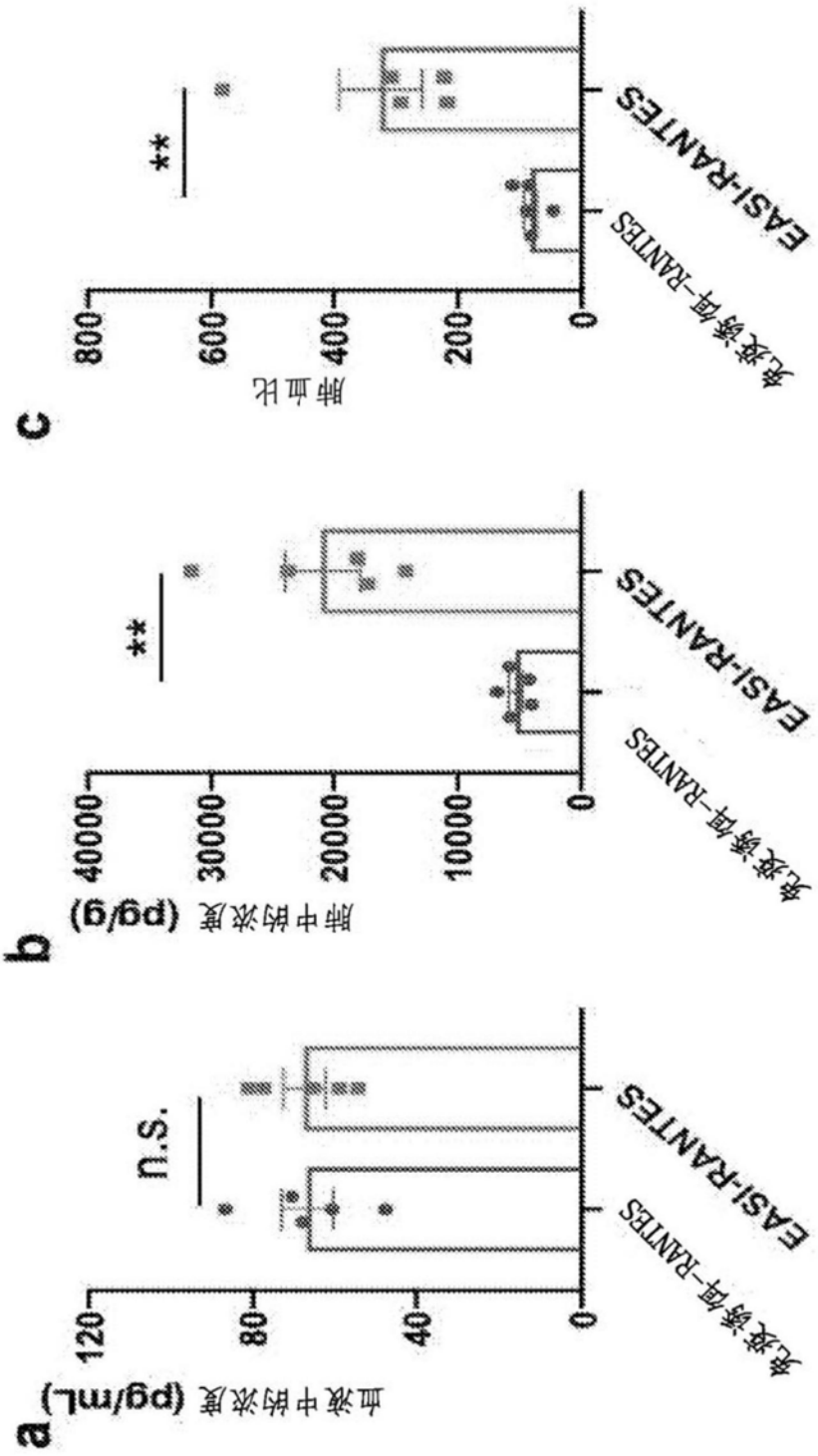

a
血液中的浓度 (pg/mL)
120
80
40
0
n.s.
免疫诱导-RANTES
EASI-RANTES
b
肺中的浓度 (pg/g)
40000
30000
20000
10000
0
**
免疫诱导-RANTES
EASI-RANTES
c
肺血比
800
600
400
200
0
**
免疫诱导-RANTES
EASI-RANTES

图42A-42C

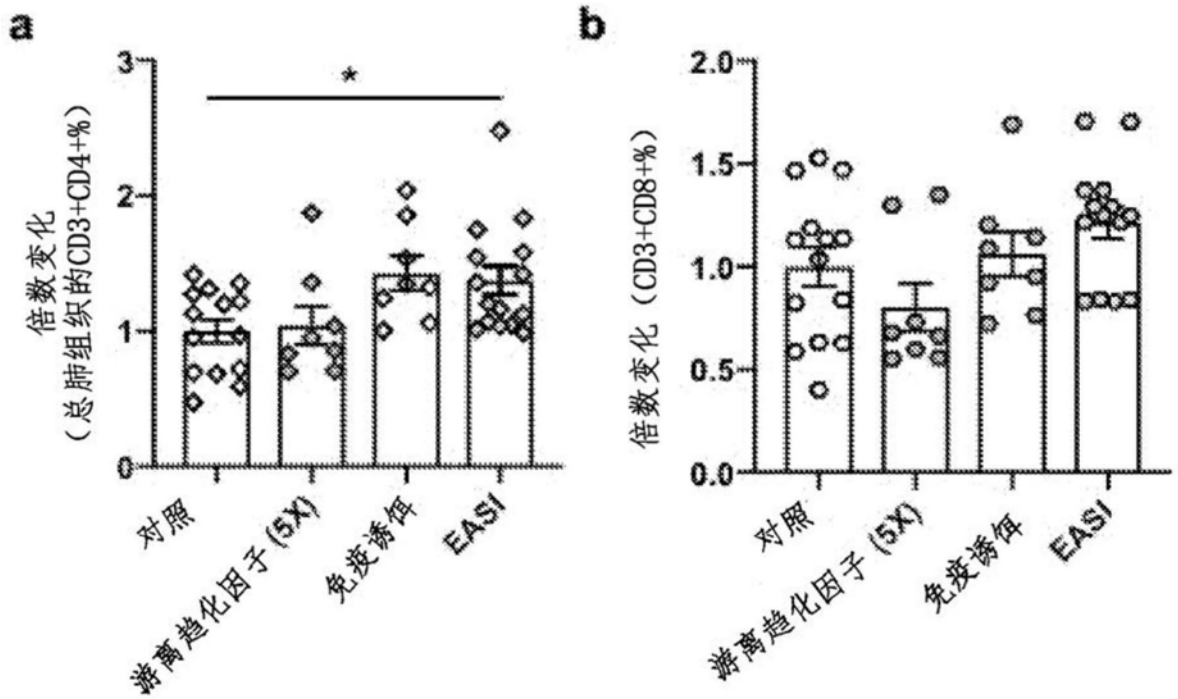

a
倍数变化
（总肺组织的CD3+CD4+%）
3
2
1
0
*
对照
游离趋化因子 (5X)
免疫诱伴
EASI
b
倍数变化（CD3+CD8+%）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
对照
游离趋化因子 (5X)
免疫诱伴
EASI

图43A-43B

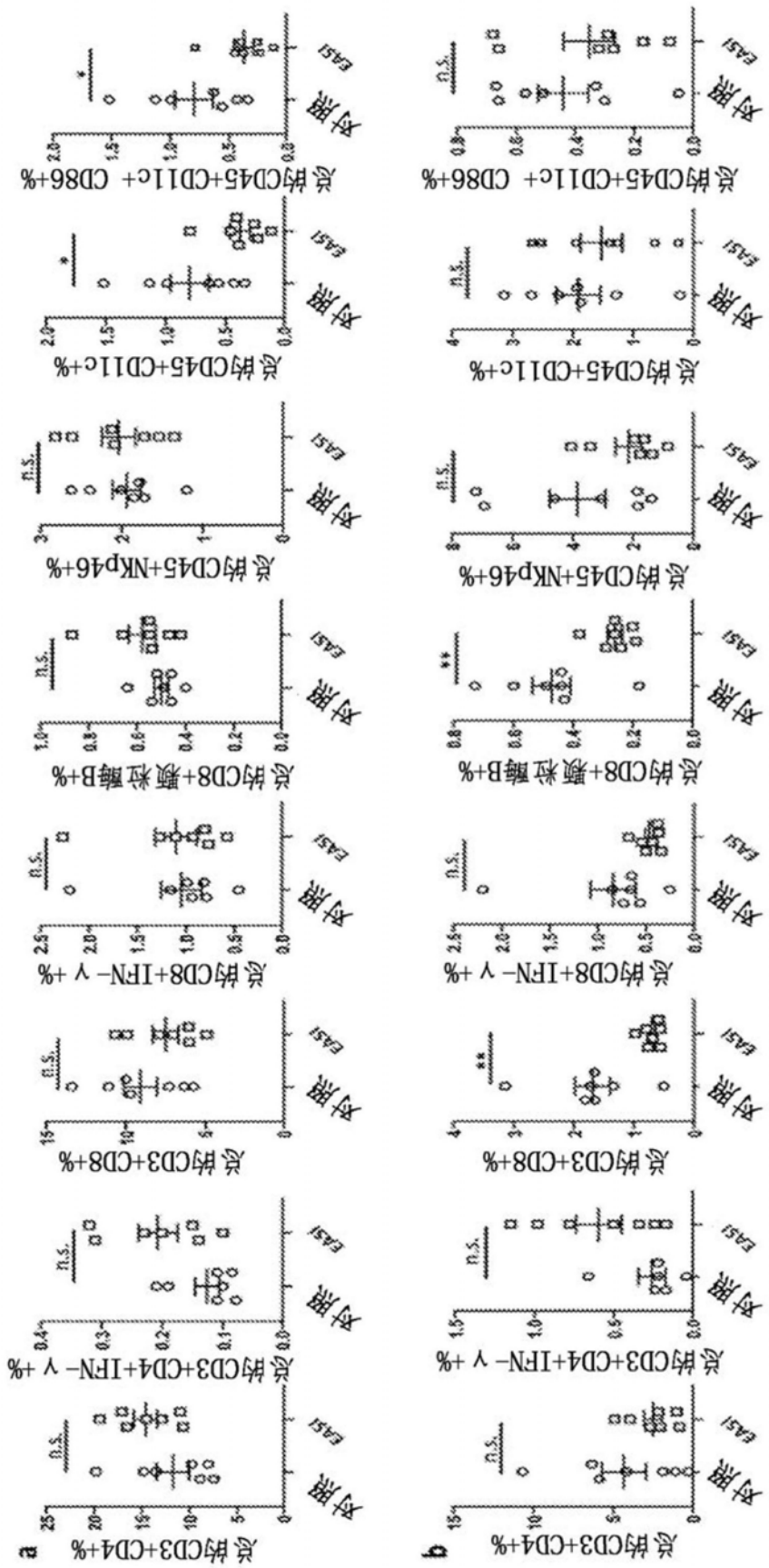

a
b
总的CD3+CD4+%
总的CD3+CD4+IFN- γ +%
总的CD3+CD8+%
总的CD8+IFN- γ +%
总的CD8+颗粒酶B+%
总的CD45+NKp46+%
总的CD45+CD11c+%
总的CD45+CD11c+ CD86+%
对照
EAS1
n.s.
*
**

图44A-44B

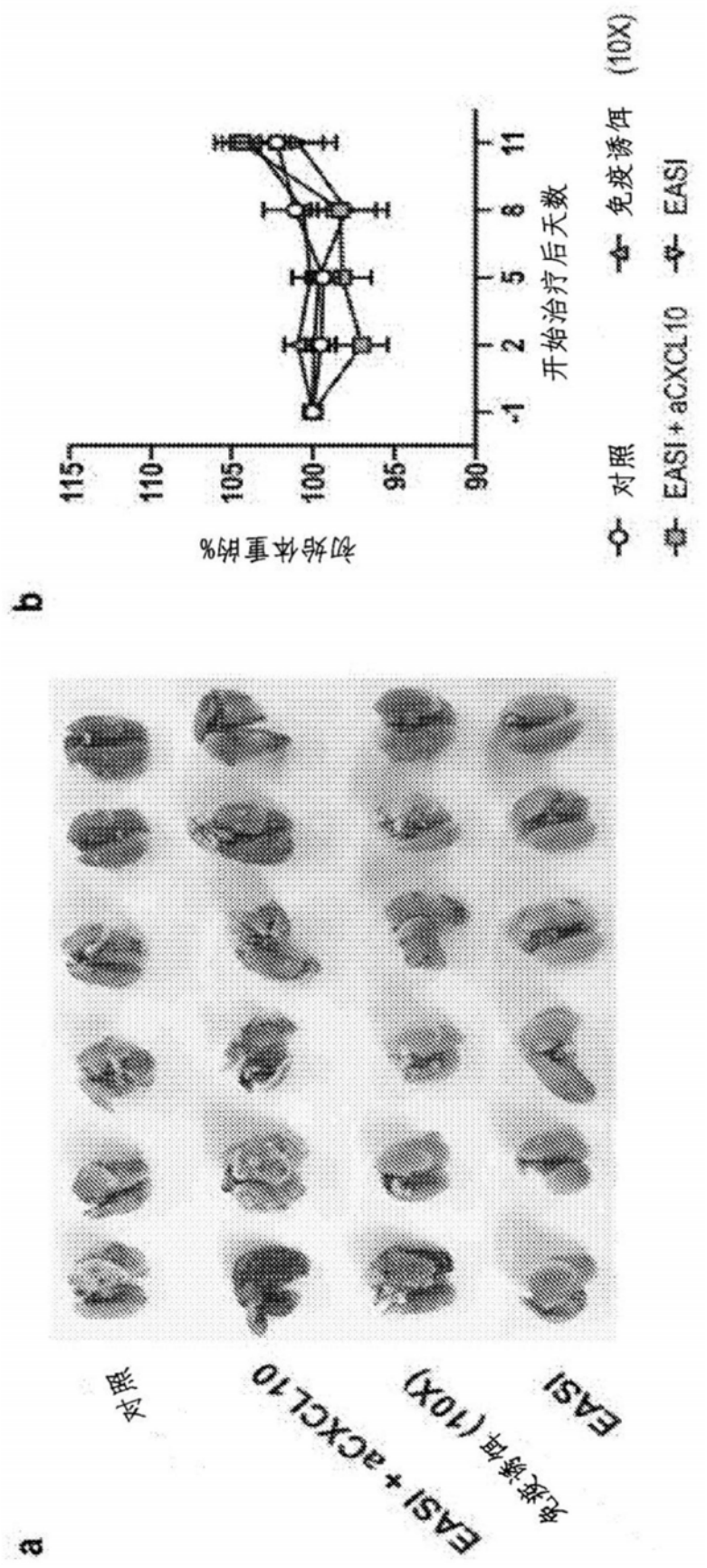

b
初始体重的%
115
110
105
100
95
90
-1
2
5
8
11
开始治疗后天数
对照
免疫诱饵 (10X)
EASI + aCXCL10
EASI
a
溴
EASI + aCXCL10
皮肤病 (10X)
EASI

图45A-45B

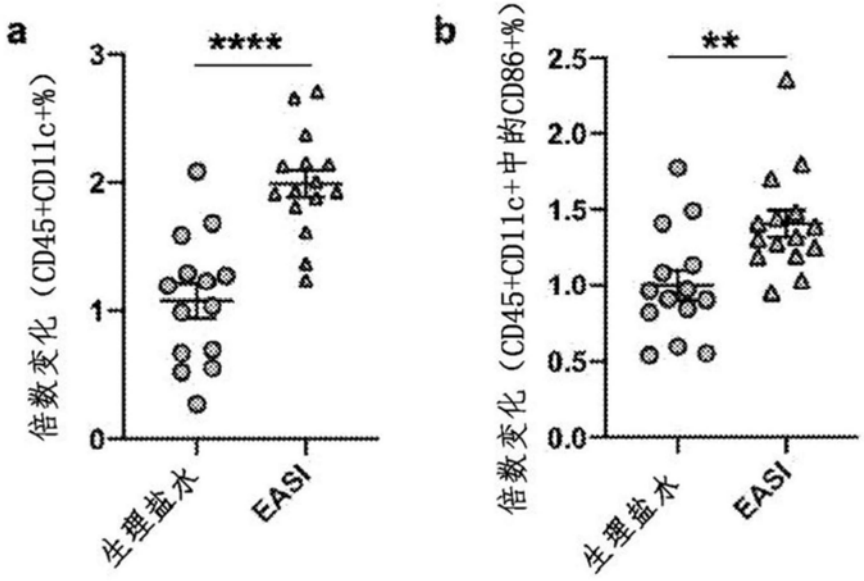


图46A-46B

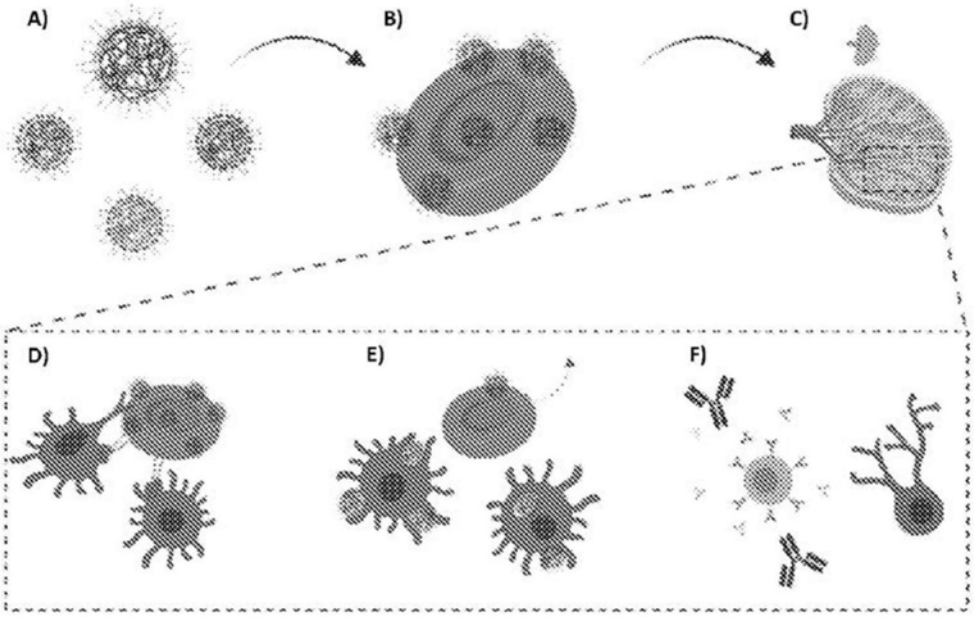


图47A-47F

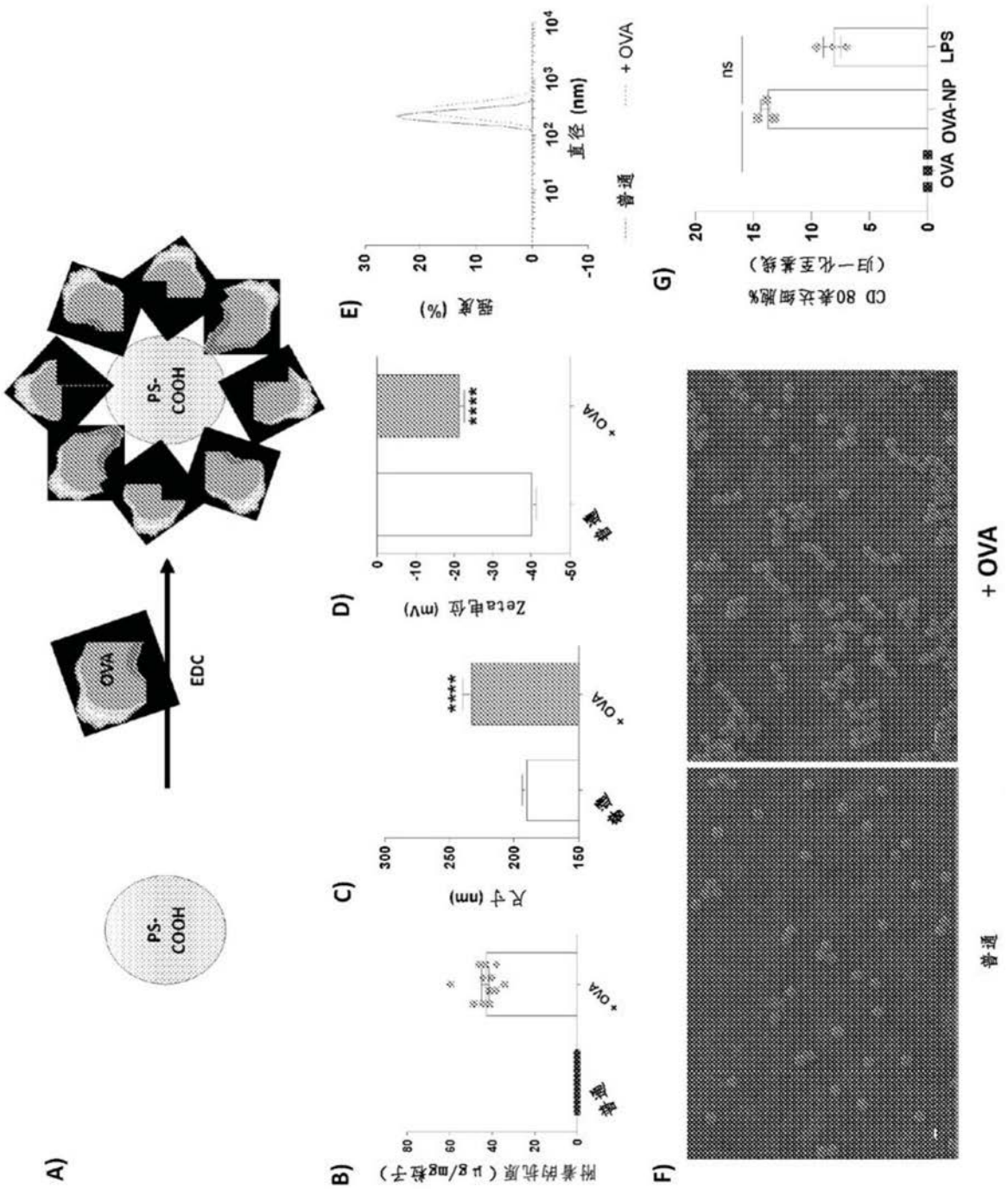

A)
PS-COOH
OVA
EDC
PS-COOH
B)
附着的抗原（μg/mg粒子）
0
20
40
60
80
普通
+ OVA
C)
尺寸 (nm)
150
200
250
300
普通
+ OVA
****
D)
Zeta电位 (mV)
-50
-40
-30
-20
-10
0
普通
+ OVA
****
E)
强度 (%)
-10
0
10
20
30
普通
+ OVA
10^1
10^2
10^3
10^4
直径 (nm)
F)
普通
+ OVA
G)
CD 80表达细胞%
（归一化至基线）
0
5
10
15
20
OVA
OVA-NP
LPS
ns

图48A-48G

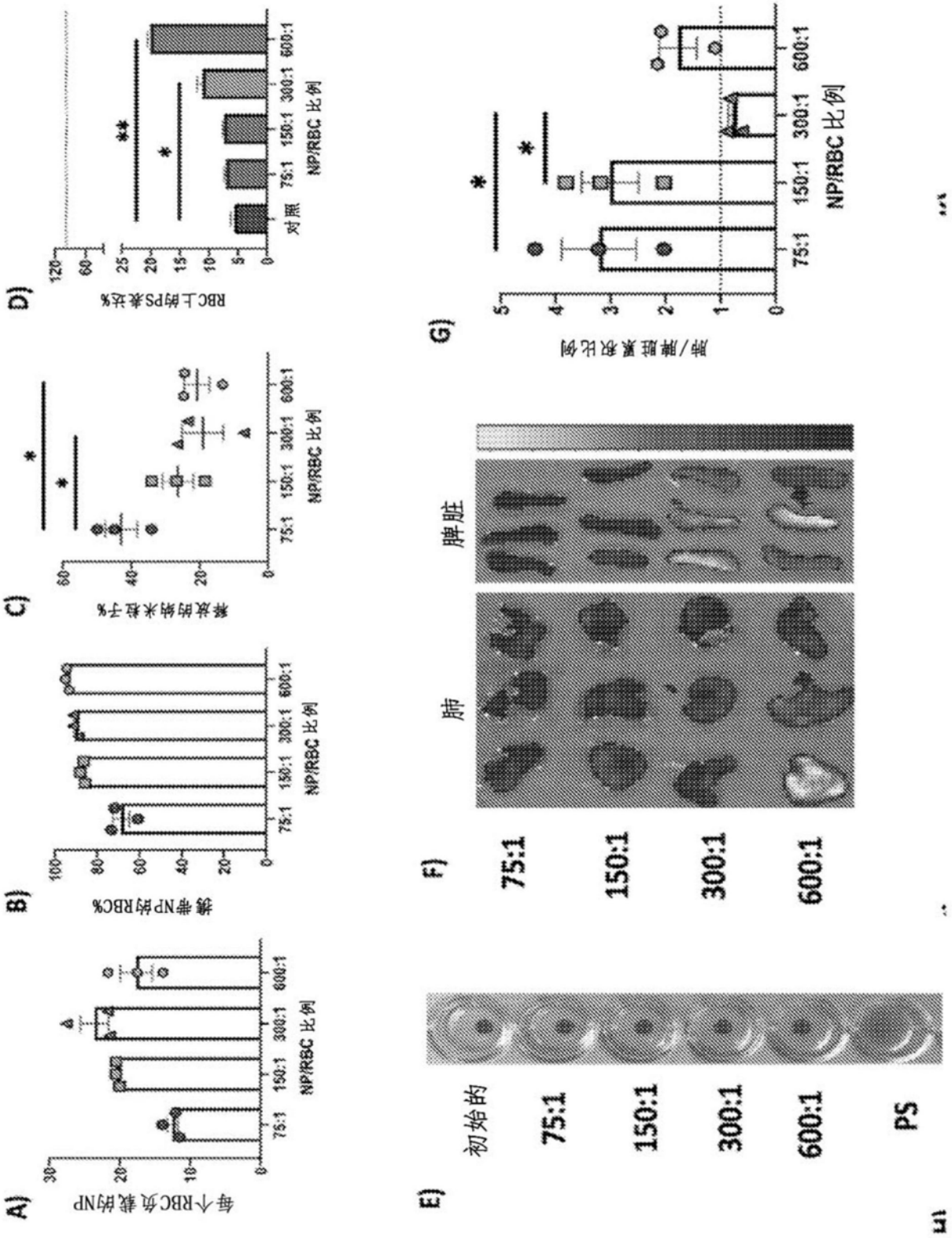

A)
每个RBC负载的NP
NP/RBC 比例
B)
携带NP的RBC%
NP/RBC 比例
C)
释放的纳米粒子%
NP/RBC 比例
D)
RBC上的PS表达%
对照
NP/RBC 比例
E)
初始的
75:1
150:1
300:1
600:1
PS
F)
肺
脾脏
75:1
150:1
300:1
600:1
G)
肺/脾脏累积比例
NP/RBC 比例

图49A-49G

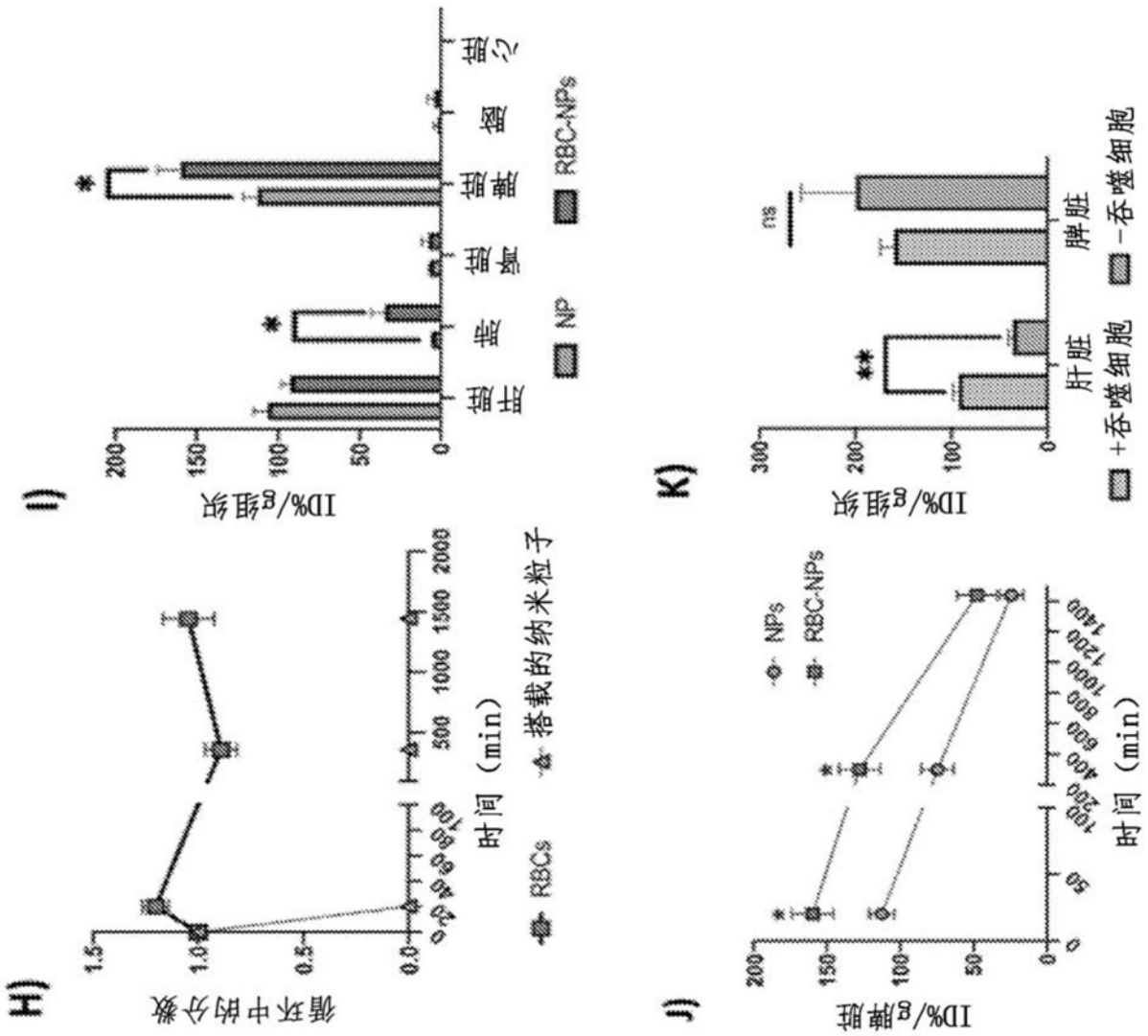

I)
ID%/g组织
肝脏
肺
肾脏
脾脏
脑
心脏
RBC-NPs
NP
H)
循环中的分数
时间（min）
RBCs
搭载的纳米粒子
K)
ID%/g组织
肝脏
脾脏
+吞噬细胞
-吞噬细胞
J)
ID%/g脾脏
NPs
RBC-NPs
时间（min）

图49H-49K

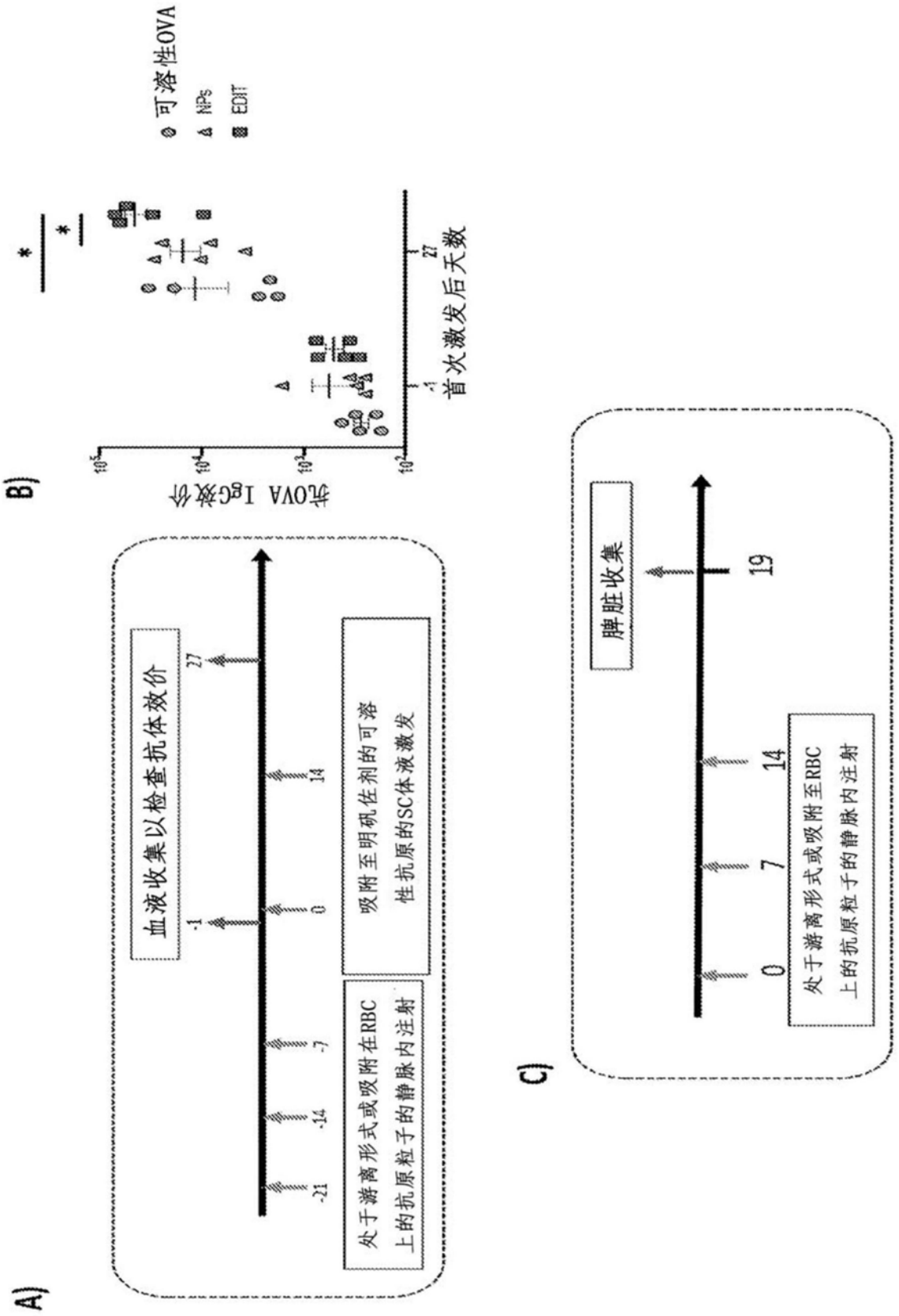

A)
血液收集以检查抗体效价
-1
27
-21
-14
-7
0
14
处于游离形式或吸附在RBC上的抗原粒子的静脉内注射
吸附至明矾佐剂的可溶性抗原的SC体液激发
B)
可溶性OVA
NPs
EDIT
抗OVA IgG效价
首次激发后天数
C)
脾脏收集
0
7
14
19
处于游离形式或吸附至RBC上的抗原粒子的静脉内注射

图50A-50C

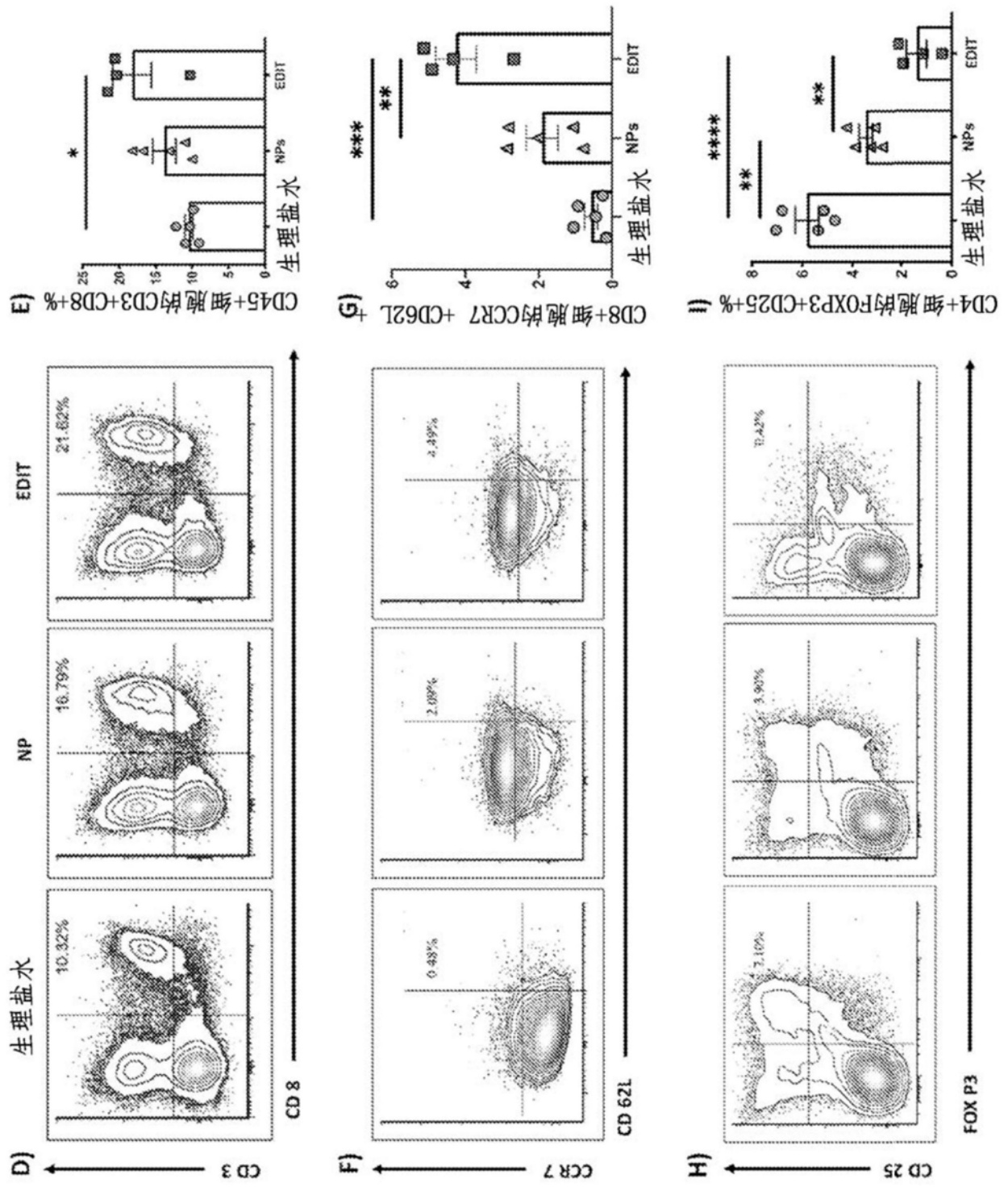

D)
生理盐水
NP
EDIT
10.32%
16.79%
21.62%
CD 3
CD 8
E)
CD45+细胞的CD3+CD8+%
生理盐水
NPs
EDIT
F)
0.48%
2.08%
2.39%
CCR 7
CD 62L
G)
CD8+细胞的CCR7 +CD62L+
生理盐水
NPs
EDIT
H)
3.16%
3.90%
12.42%
CD 25
FOX P3
I)
CD4+细胞的FOXP3+CD25+%
生理盐水
NPs
EDIT

图50D-50I

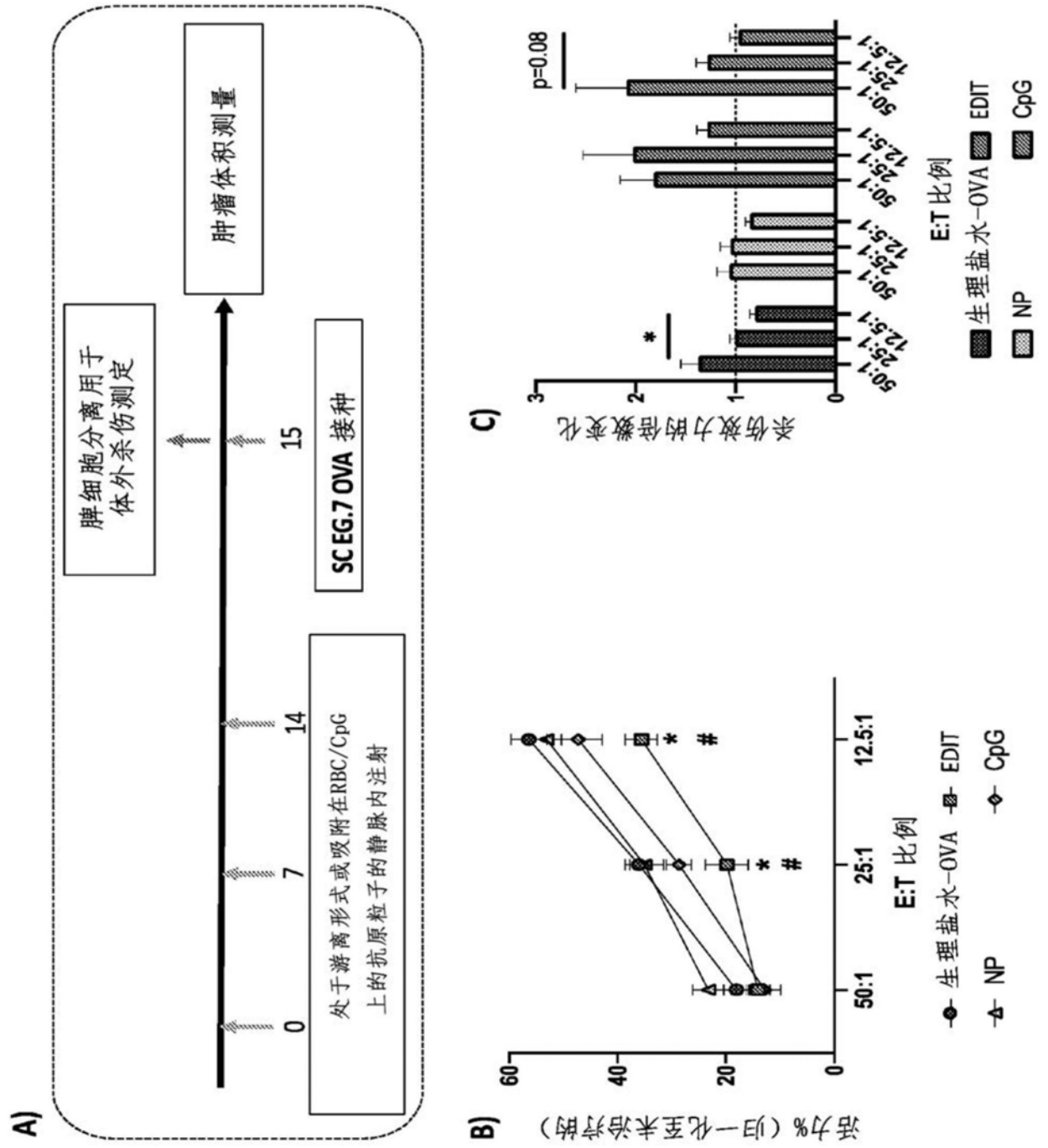

A)
脾细胞分离用于
体外杀伤测定
肿瘤体积测量
0
7
14
15
处于游离形式或吸附在RBC/CpG
上的抗原粒子的静脉内注射
SC EG.7 OVA 接种
B)
活力%（归一化至未治疗的）
E:T 比例
生理盐水-OVA
EDIT
NP
CpG
C)
杀伤效力的倍数变化
p=0.08
E:T 比例
生理盐水-OVA
EDIT
NP
CpG

图51A-51C

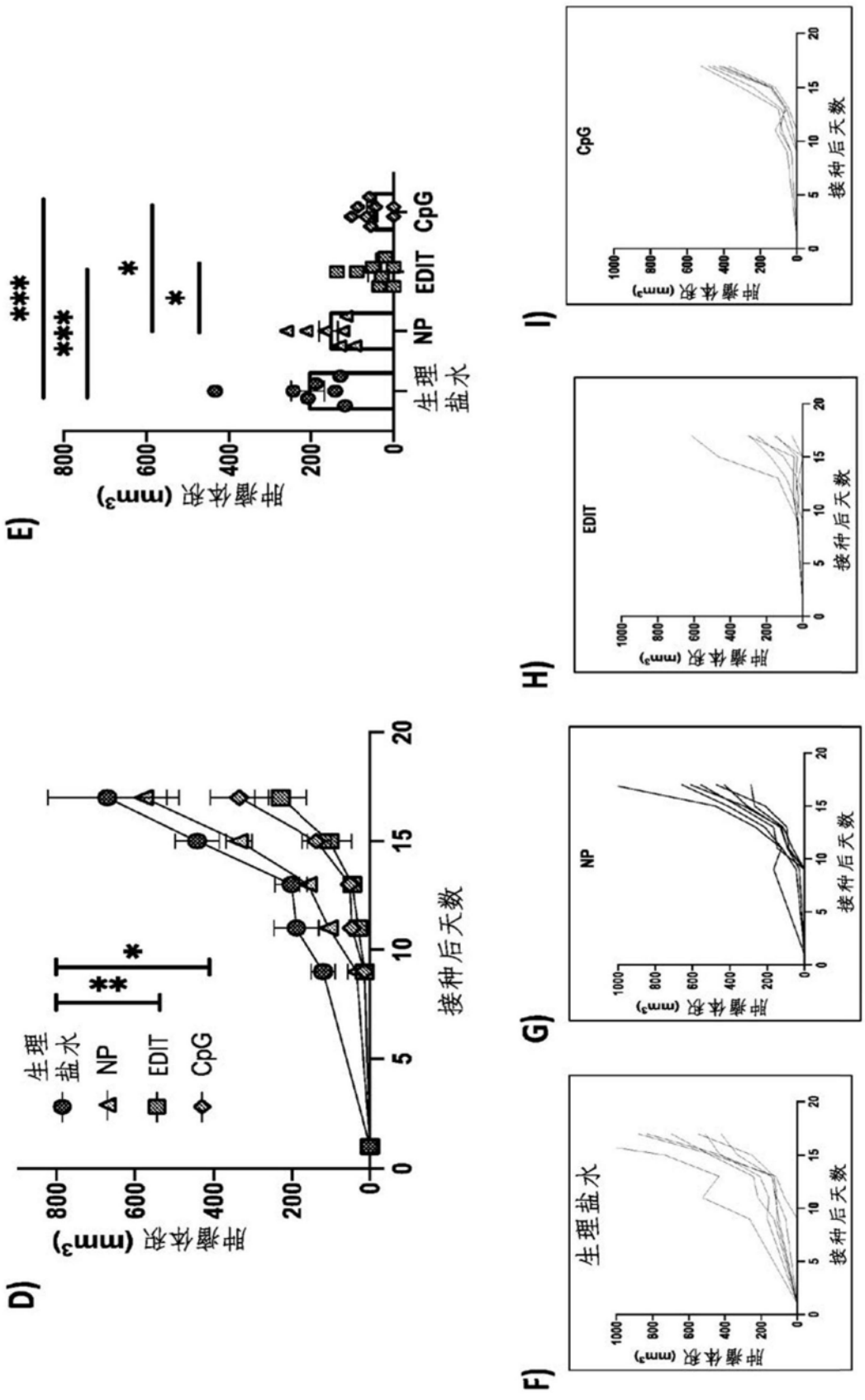


图51D-51I

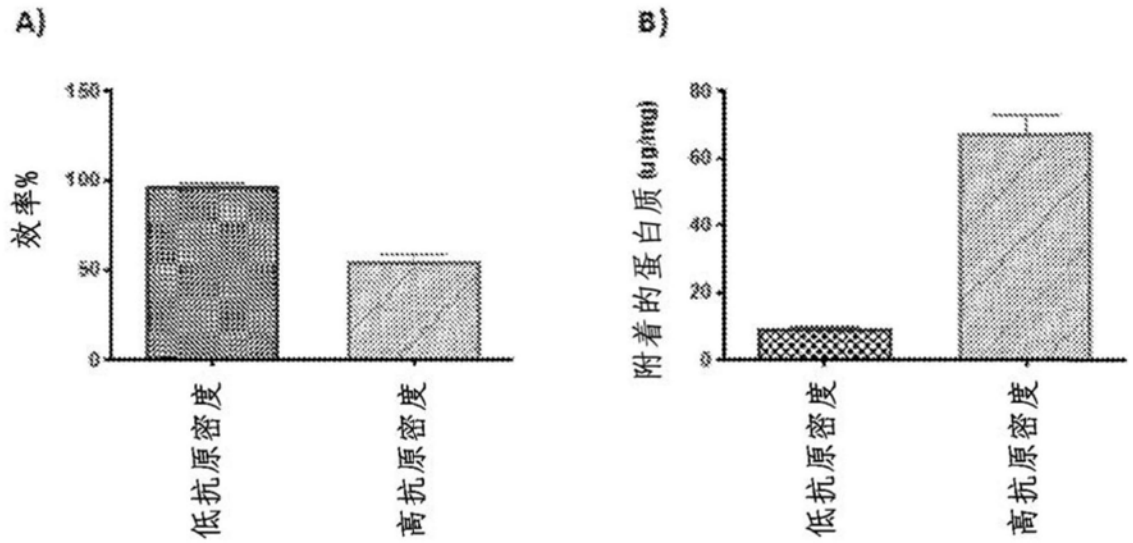


图52A-52B

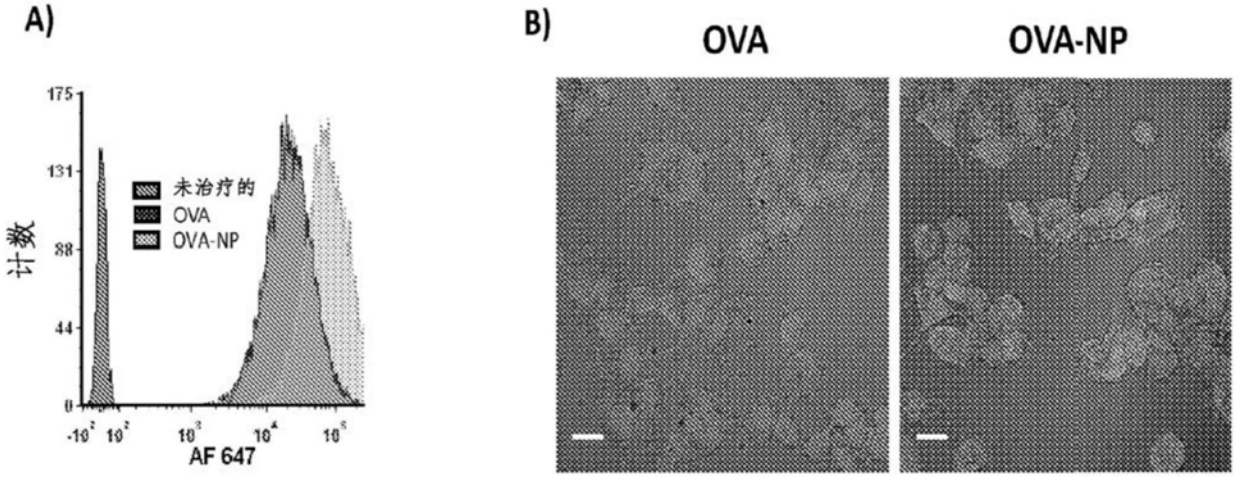


图53A-53B

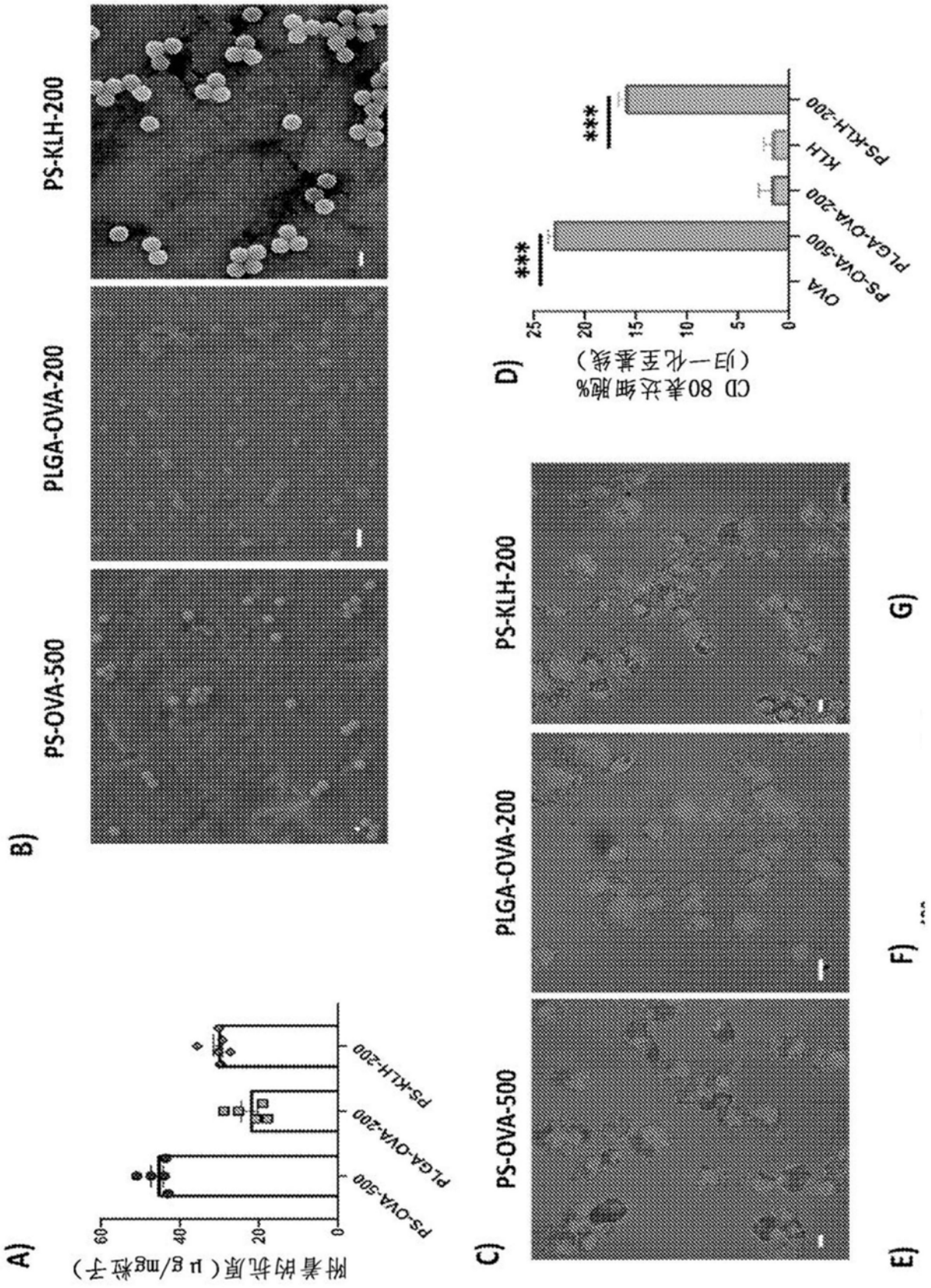

A)
附着的抗原（μg/mg粒子）
PS-OVA-500
PLGA-OVA-200
PS-KLH-200
B)
PS-OVA-500
PLGA-OVA-200
PS-KLH-200
C)
PS-OVA-500
PLGA-OVA-200
PS-KLH-200
D)
CD 80表达细胞%
（归一化至基线）
OVA
PS-OVA-500
PLGA-OVA-200
KLH
PS-KLH-200
***
***
E)
F)
G)

图54A-54D

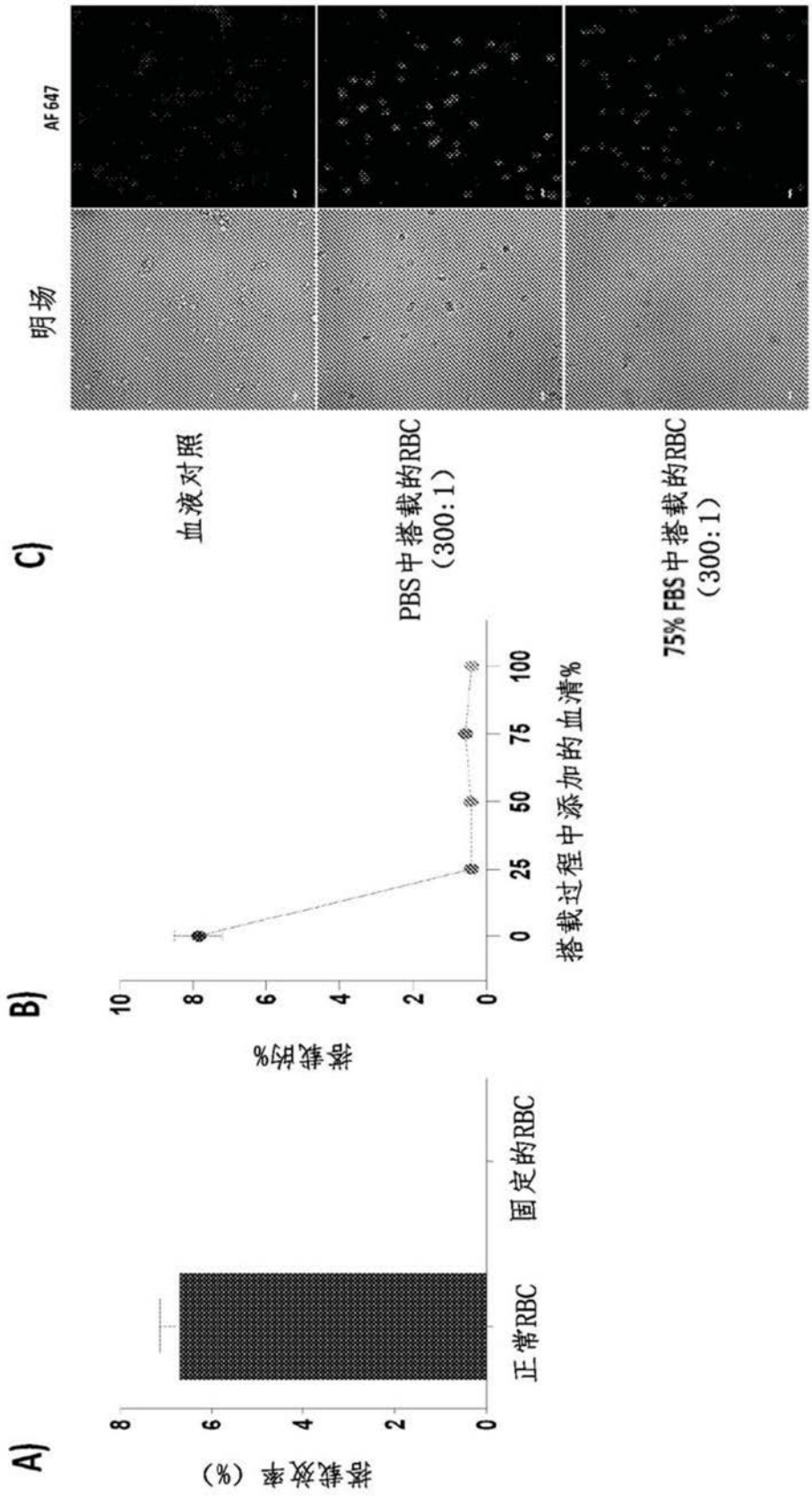

A)
包封效率（%）
8
6
4
2
0
正常RBC
固定的RBC
B)
降解百分比
10
8
6
4
2
0
0
25
50
75
100
搭载过程中添加的血清%
C)
明场
AF 647
血液对照
PBS中搭载的RBC
（300:1）
75% FBS中搭载的RBC
（300:1）

图55A-55C

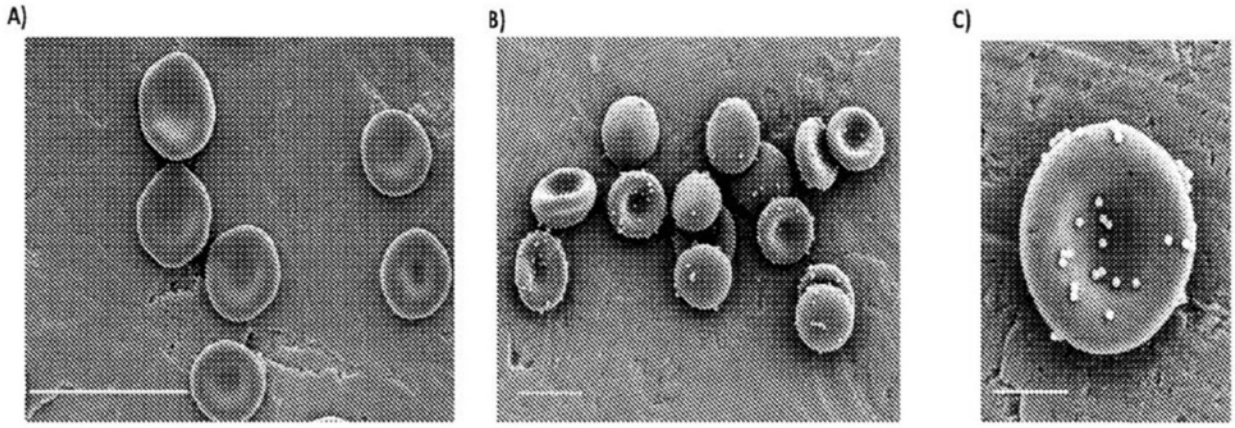


图56A-56C

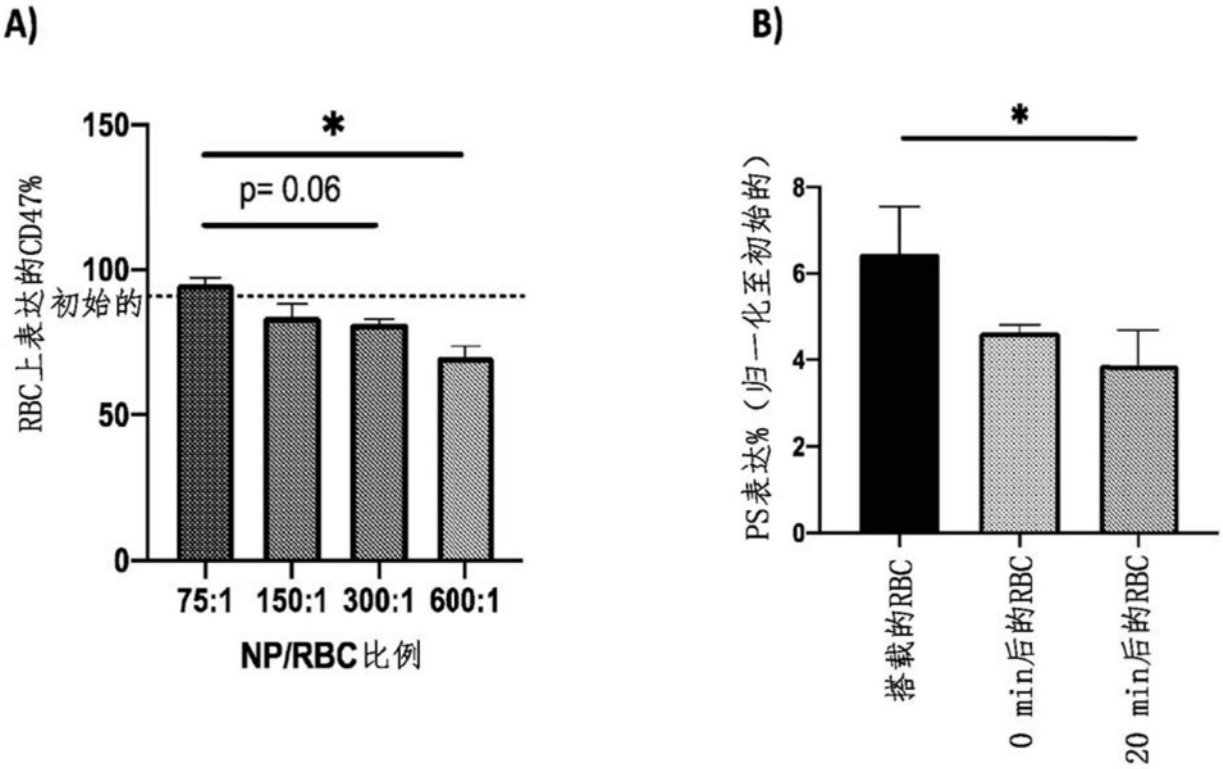


图57A-57B

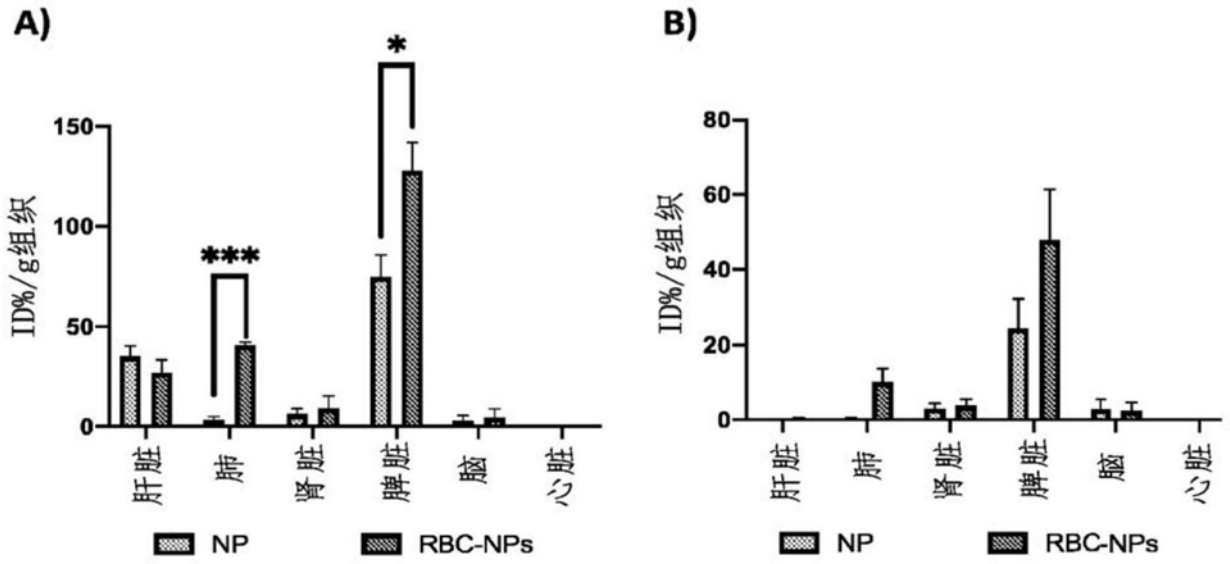

A)
150
100
50
0
ID%/g组织
***
*
肝脏
肺
肾脏
脾脏
脑
心脏
NP
RBC-NPs
B)
80
60
40
20
0
ID%/g组织
肝脏
肺
肾脏
脾脏
脑
心脏
NP
RBC-NPs

图58A-58B

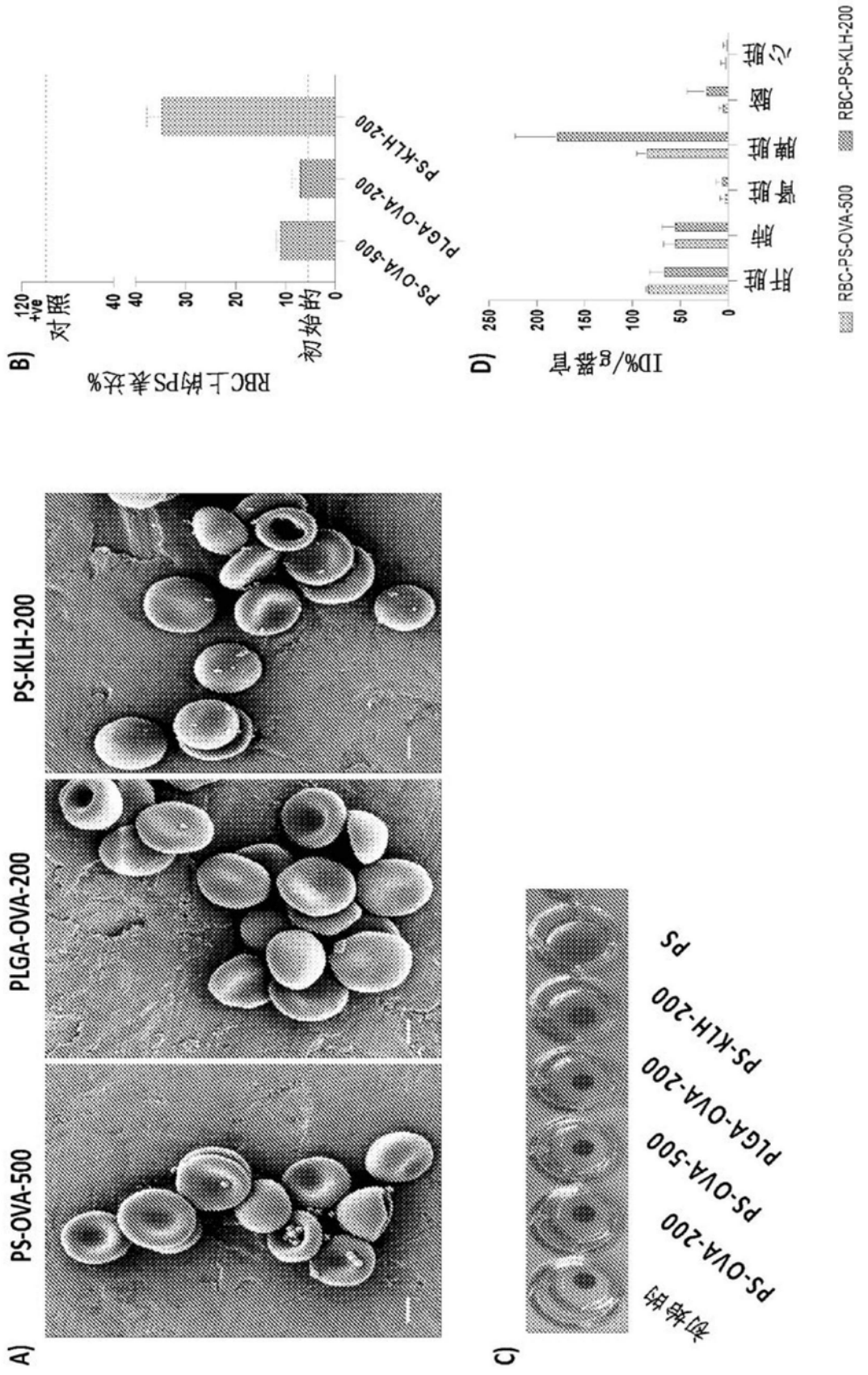

A)
PS-OVA-500
PLGA-OVA-200
PS-KLH-200
B)
RBC上的PS表达%
对照
+ve
初始的
PS-OVA-500
PLGA-OVA-200
PS-KLH-200
C)
初始的
PS-OVA-200
PS-OVA-500
PLGA-OVA-200
PS-KLH-200
PS
D)
ID%/g器官
肝脏
肺
脾脏
肾脏
肺
心脏
RBC-PS-OVA-500
RBC-PS-KLH-200

图59A-59D

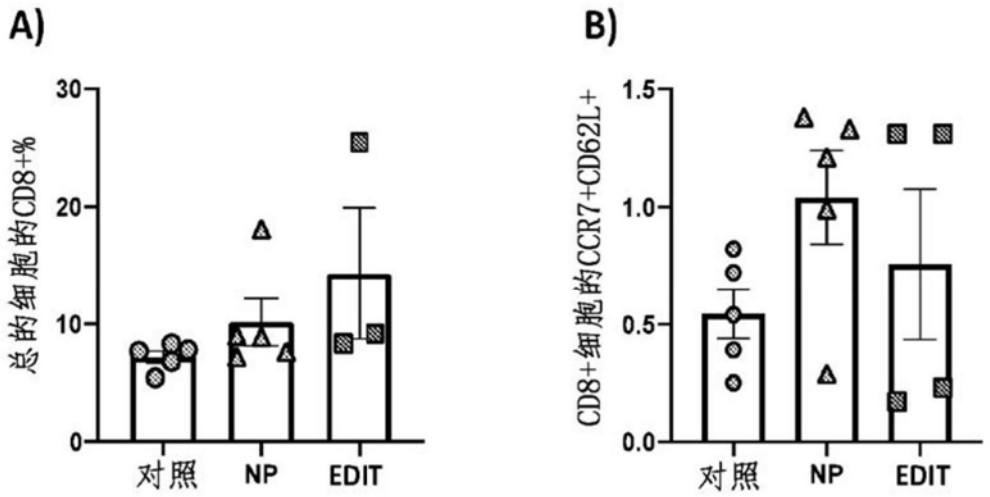

A)
总的细胞的CD8+%
30
20
10
0
对照
NP
EDIT
B)
CD8+细胞的CCR7+CD62L+
1.5
1.0
0.5
0.0
对照
NP
EDIT

图60A-60B

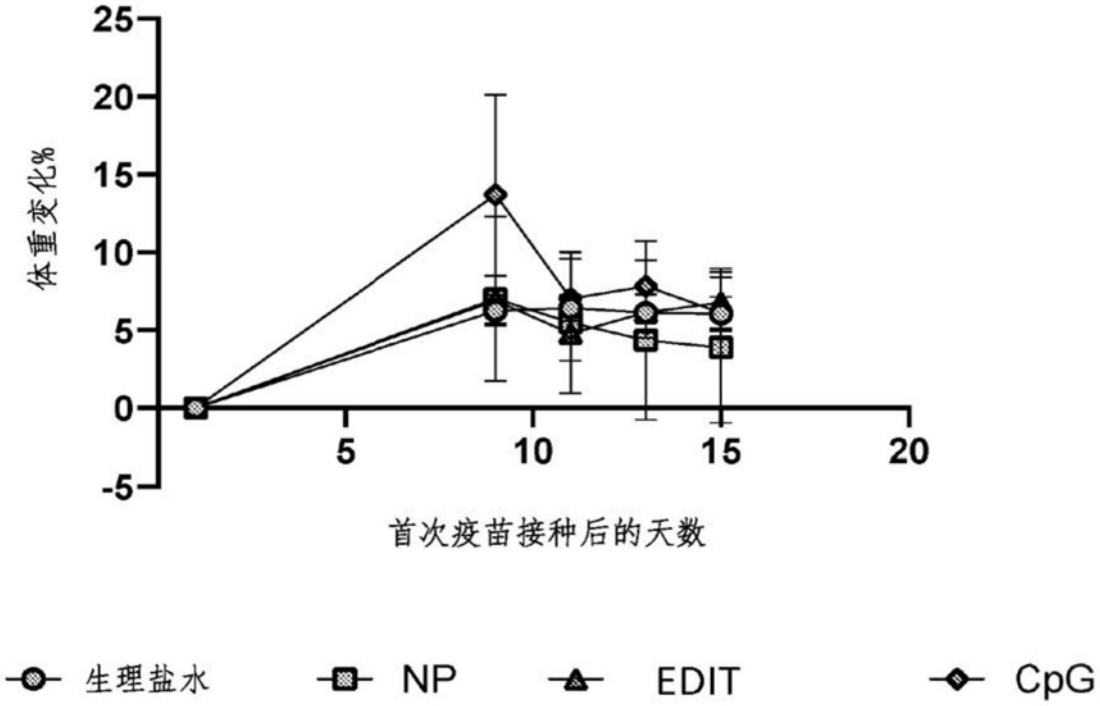

体重变化%
25
20
15
10
5
0
-5
5
10
15
20
首次疫苗接种后的天数
生理盐水
NP
EDIT
CpG

图61