(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119614501 A
(43)申请公布日 2025.03.14

(21)申请号 202411511570.7
(22)申请日 2019.02.12
(30)优先权数据
62/629,563 2018.02.12 US
(62)分案原申请数据
201980011011.0 2019.02.12
(71)申请人 隆萨销售股份公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 斯里拉姆·萨提亚那拉雅南
道格拉斯·E·威廉姆斯
达利亚·布尔兹因
亚当·托马斯·布廷
苏什鲁特·卡默卡尔
(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 樊英如 张静
(51)Int.Cl.
C12N 5/0786(2010.01)
C12N 15/113(2010.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61K 9/50(2006.01)
A61K 47/46(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书72页 附图18页

(54)发明名称

用于巨噬细胞极化的方法和组合物

(57)摘要

本文公开了包含细胞外囊泡的组合物和方法,所述细胞外囊泡包含核酸,所述核酸靶向基因,引起肿瘤相关巨噬细胞的巨噬细胞极化。在某些实施方案中,本文公开了用于增加巨噬细胞极化以用于治疗癌症的方法和组合物。

CN 119614501 A

1.一种细胞外囊泡,所述细胞外囊泡包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型。

2.如权利要求1所述的细胞外囊泡,其中所述一种或多种免疫调节组分抑制至少一种巨噬细胞靶基因。

3.如权利要求1或2所述的细胞外囊泡,其中所述细胞外囊泡是外泌体。

4.如权利要求1至3中任一项所述的细胞外囊泡,其中所述免疫调节组分是核酸。

5.如权利要求4所述的细胞外囊泡,其中所述核酸是抑制性RNA。

6.如权利要求5所述的细胞外囊泡,其中所述抑制性RNA是反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA。

7.如权利要求4所述的细胞外囊泡,其中所述核酸是反义寡核苷酸(ASO)。

8.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-7中任一项所述的细胞外囊泡。

9.一种治疗有需要的患者的疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用如权利要求1-7中任一项所述的细胞外囊泡或如权利要求8所述的药物组合物,由此治疗所述患者的所述疾病。

10.一种调节巨噬细胞中的基因表达的方法,所述方法包括:使所述巨噬细胞与包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡接触,所述一种或多种免疫调节组分抑制至少一种基因,并由此使得与使所述巨噬细胞与等摩尔量的单独所述免疫调节组分接触相比,从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化增加。

用于巨噬细胞极化的方法和组合物

[0001] 本申请是申请号为201980011011.0,申请日为2019年2月12日,申请人为隆萨销售股份公司,发明创造名称为“用于巨噬细胞极化的方法和组合物”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及包含细胞外囊泡的组合物和方法,所述细胞外囊泡具有核酸,所述核酸靶向基因,引起肿瘤相关巨噬细胞的巨噬细胞极化。

发明背景

[0004] 免疫疗法是通过诱导、增强或阻抑免疫反应进行的疾病治疗。癌症免疫疗法的副作用通常比诸如化学疗法和放射疗法的传统癌症疗法的副作用少。在一种方法中,癌症免疫疗法已用于刺激患者的自身巨噬细胞以攻击癌细胞。巨噬细胞呈现不同表型,例如它们可能具有促癌活性,或者它们可能具有抗癌活性。M2表型或“替代活化巨噬细胞”通常展现诸如免疫系统阻抑和细胞外基质和组织重塑活性产生的促癌活性。M1表型或“经典活化巨噬细胞”通常展现诸如肿瘤细胞吞噬作用和适应性免疫刺激的抗癌活性以使得肿瘤细胞可受到识别和攻击。需要促进巨噬细胞极化(即,转化成M1表型)的免疫调节方法和组合物中的改善。

发明内容

[0005] 本公开的方面涵盖一种细胞外囊泡,所述细胞外囊泡包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型。在一些方面,本公开涵盖一种细胞外囊泡,所述细胞外囊泡是外泌体,所述外泌体包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型。

[0006] 在一些方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型,并且所述一种或多种免疫调节组分是核酸,例如抑制性RNA(例如反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA(pri-miRNA)或前体miRNA(pre-miRNA))或例如反义寡核苷酸(ASO),或者例如所述免疫调节组分是包含与选自SEQ ID NO:1-6的序列至少95%同一的序列的反义寡核苷酸。

[0007] 在一些方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型,并且所述一种或多种免疫调节组分(例如核酸,例如抑制性RNA(例如反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA)或例如反义寡核苷酸(ASO)),或者例如所述免疫调节组分是包含与选自SEQ ID NO:1-6的序列至少95%同一的序列的反义寡核苷酸,抑制至少一种巨噬细胞靶基因,例如至少一种基因选自由以下组成的组:KRAS、

HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶、CEBP/β、Pi3Kγ和PKM2,例如STAT3、STAT6、CEBP/β、Pi3Kγ、KRAS和HIF1-α,例如STAT3,例如KRAS。

[0008] 在一些方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型,并且所述免疫调节组分是靶向STAT3的反义寡核苷酸。

[0009] 在一些方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型,并且所述免疫调节组分是靶向KRAS的反义寡核苷酸。

[0010] 在一些方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型,并且所述免疫调节组分是靶向KRAS(例如野生型人类KRAS,或野生型人类KRAS还有小鼠$KRAS^{G12D}$)的抑制性RNA,例如反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA。

[0011] 在前述方面中的任一方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含一种或多种免疫调节组分(例如核酸,抑制性RNA(反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA)或ASO),所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型,并且所述巨噬细胞是肿瘤(例如胰腺肿瘤)驻留巨噬细胞。

[0012] 在前述方面中的任一方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含:一种或多种免疫调节组分(例如核酸,抑制性RNA(反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA)或ASO),所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型;并且还包含额外免疫调节组分,例如小分子药物、抗体或其活性片段(例如结合至CTLA-4、PD-1或PD-L1的免疫检查点抑制剂或结合至CSF1-R的抑制剂)或治疗性蛋白质或其活性片段。

[0013] 在前述方面中的任一方面,所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含:一种或多种免疫调节组分(例如核酸,抑制性RNA(反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA)或ASO),所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型;并且还包含额外免疫调节组分,例如抗体或其活性片段(例如结合至CTLA-4、PD-1或PD-L1的免疫检查点抑制剂或结合至CSF1-R的抑制剂),其中所述抗体或其活性片段包含与伊匹单抗(Ipilimumab)的CDR至少95%同一、或与纳武单抗(Nivolumab)的CDR至少95%同一、或与赛咪单抗(Cemiplimab)的CDR至少95%同一、或与派姆单抗(Pembrolizumab)的CDR至少95%同一、或与阿特珠单抗(Atezolizumab)的CDR至少95%同一、或与阿维鲁单抗(Avelumab)的CDR至少95%同一、或与度伐鲁单抗(Durvalumab)的CDR至少95%同一、或与吡昔替尼(Pexidartinib)的CDR至少95%同一、或与PLX7486的CDR至少95%同一、或与ARRY-382的CDR至少95%同一、或与JNJ-40346527的CDR至少95%同一、或与BLZ945的CDR至少95%同一、或与埃玛图单抗(Emactuzumab)的CDR至少95%同一、或与AMG820的CDR至少95%同一、或与IMC-CS4的CDR至少95%同一、或与卡比拉单抗(Cabiralizumab)的CDR至少95%同一的CDR,或者其中所述抗体或其活性片段是选自由以

下组成的组的至少一种抗体:伊匹单抗、纳武单抗、赛咪单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗、AMG820、IMC-CS4和卡比拉单抗,或者其中所述抗体或其活性片段是与选自由以下组成的组的抗体竞争结合的至少一种抗体:伊匹单抗、纳武单抗、赛咪单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗、AMG820、IMC-CS4和卡比拉单抗。

[0014] 在前述方面中的任一方面,其中所述细胞外囊泡(例如所述外泌体)包含:一种或多种免疫调节组分(例如核酸,抑制性RNA(反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA)或ASO),所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型;并且还包含额外免疫调节组分,例如抗体或其活性片段(例如结合至CTLA-4、PD-1或PD-L1的免疫检查点抑制剂或结合至CSF1-R的抑制剂),其中所述抗体或其活性片段包含与伊匹单抗(Ipilimumab)的CDR至少95%同一、或与纳武单抗(Nivolumab)的CDR至少95%同一、或与赛咪单抗(Cemiplimab)的CDR至少95%同一、或与派姆单抗(Pembrolizumab)的CDR至少95%同一、或与阿特珠单抗(Atezolizumab)的CDR至少95%同一、或与阿维鲁单抗(Avelumab)的CDR至少95%同一、或与度伐鲁单抗(Durvalumab)的CDR至少95%同一、或与吡昔替尼(Pexidartinib)的CDR至少95%同一、或与PLX7486的CDR至少95%同一、或与ARRY-382的CDR至少95%同一、或与JNJ-40346527的CDR至少95%同一、或与BLZ945的CDR至少95%同一、或与埃玛图单抗(Emactuzumab)的CDR至少95%同一、或与AMG820的CDR至少95%同一、或与IMC-CS4的CDR至少95%同一、或与卡比拉单抗(Cabiralizumab)的CDR至少95%同一的CDR,或者其中所述抗体或其活性片段是选自由以下组成的组的至少一种抗体:伊匹单抗、纳武单抗、赛咪单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗、AMG820、IMC-CS4和卡比拉单抗,或者其中所述抗体或其活性片段是与选自由以下组成的组的抗体竞争结合的至少一种抗体:伊匹单抗、纳武单抗、赛咪单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗、吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗、AMG820、IMC-CS4和卡比拉单抗,所述细胞外囊泡还包含PTGFRN或其片段,并且所述抗体或其片段可任选地融合至所述PTGFRN或其片段。

[0015] 在前述方面中的任一方面,使用选自由以下组成的组的测定来确定比较:细胞外囊泡摄取测定、靶基因表达测定、下游基因表达测定、细胞因子释放测定和巨噬细胞表面蛋白测定。

[0016] 在前述方面中的任一方面,所述M2巨噬细胞是选自由M2a、M2b和M2c巨噬细胞组成的组的肿瘤相关巨噬细胞。

[0017] 在前述方面中的任一方面,所述M1巨噬细胞,与极化前的所述M2巨噬细胞相比展现出选自由INFγ、IL-12、IL-23、TNFα、IL-6、IL-1、CSCL9、CXCL10和CXCL11组成的组的炎性细胞因子和趋化因子的分泌增加,并且/或者与极化前的所述M2巨噬细胞相比展现出选自由IL-10、TGFβ、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22和CCL24组成的组的免疫抑制性细胞因子和趋化因子的分泌减少,并且/或者与极化前的所述M2巨噬细胞相比表达增加的肿瘤相关抗原,并且/或者与极化前的所述M2巨噬细胞相比增加对$CD8^+$T细胞和/或自然杀伤细胞的刺激。

[0018] 在多个方面,本公开涵盖一种药物组合物,所述药物组合物包含细胞外囊泡(例如外泌体),所述细胞外囊泡包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型。

[0019] 在一些方面,本公开涵盖一种治疗有需要的患者(例如人类患者)的疾病(例如癌症,诸如例如胰腺癌)的方法,所述方法包括施用(例如,经由选自由静脉内施用、腹膜内施用和瘤内施用组成的组的途径)如前述方面中任一方面所述的细胞外囊泡,例如如前述方面中任一方面所述的外泌体,所述外泌体包含一种或多种免疫调节组分(例如靶向原癌基因(例如KRAS)的抑制性RNA),所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型;或者包括施用药物组合物,所述药物组合物包含如前述方面中任一方面所述的细胞外囊泡,例如如前述方面中任一方面所述的外泌体,所述外泌体包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时选择性地将所述巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型。

[0020] 在一些方面,本公开涵盖上述治疗方法,并且还包括第二疗法,例如手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法或免疫疗法。

[0021] 在一些方面,本公开涵盖调节巨噬细胞中的基因表达的方法,所述方法包括:使所述巨噬细胞与包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡接触,所述一种或多种免疫调节组分抑制至少一种基因,并由此使得与使所述巨噬细胞与等摩尔量的单独所述免疫调节组分接触相比,从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化增加。

[0022] 在一些方面,调节巨噬细胞中的基因表达的方法包括:离体或在体内使所述巨噬细胞与包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡接触,所述一种或多种免疫调节组分抑制至少一种基因,并由此使得与使所述巨噬细胞与等摩尔量的单独所述免疫调节组分接触相比,从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化增加。

[0023] 在一些方面,调节巨噬细胞中的基因表达的方法包括:在体内使所述巨噬细胞与包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡接触(例如,通过向受试者(例如人类受试者)施用所述细胞外囊泡,例如经由选自由静脉内施用、腹膜内施用和瘤内施用组成的组的途径),所述一种或多种免疫调节组分抑制至少一种基因,并由此使得与使所述巨噬细胞与等摩尔量的单独所述免疫调节组分接触相比,从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化增加。

[0024] 在一些方面,上面公开的调节巨噬细胞中的基因表达的方法的受试者罹患选自癌症(例如胰腺癌)和纤维化的疾患。

[0025] 在一些方面,在上面公开的调节巨噬细胞中的基因表达的任一方法中使用的细胞外囊泡是外泌体,并且所述免疫调节组分是核酸,例如抑制性RNA,诸如例如反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA。

[0026] 在一些方面,在上面公开的调节巨噬细胞中的基因表达的任一方法中使用的细胞外囊泡是外泌体,并且所述免疫调节组分是核酸,例如ASO。

[0027] 在一些方面,在上面公开的调节巨噬细胞中的基因表达的任一方法中使用的细胞外囊泡是外泌体,并且所述免疫调节组分是核酸,例如包含与选自SEQ ID NO:1-6的序列至少95%同一的序列的反义寡核苷酸或包含选自SEQ ID NO:1-6的序列的反义寡核苷酸,并且所述至少一种基因选自由KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶、CEBP/β、Pi3Kγ

和PKM2组成的组,或者选自由STAT3、STAT6、CEBP/β、Pi3K γ 、KRAS和HIF1-α组成的组,或者是STAT3,或者是KRAS,并且如果是KRAS,则所述免疫调节组分可任选地是靶向野生型人类KRAS的抑制性RNA。

[0028] 在一些方面,本公开提供了一种治疗受试者的胰腺癌的方法,所述方法包括:向所述受试者施用包含靶向人类野生型KRAS的抑制性RNA的细胞外囊泡;其中所述治疗使肿瘤驻留巨噬细胞从M2表型向M1表型的极化百分比增加至比在用靶向人类$KRAS^{G12D}$的抑制性RNA治疗的患者中所观测到的极化百分比更高的水平。

[0029] 在一些方面,本公开提供了上述治疗受试者的胰腺癌的方法,其中使用对从肿瘤样品获得的肿瘤驻留巨噬细胞的离体测定来确定肿瘤驻留巨噬细胞的极化百分比。

[0030] 本文提供了组合物和方法,所述组合物和方法经选择、富集或工程改造而具有一种或多种可修改巨噬细胞活性的免疫调节组分的细胞外囊泡,促进巨噬细胞从M2表型转换成M1表型(巨噬细胞极化),并且强化患者的抗癌免疫系统。

[0031] 因此,在第一方面,本文提供了一种细胞外囊泡,所述细胞外囊泡包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分例如是抑制靶细胞中的至少一种基因的核酸分子。在某些实施方案中,所述靶细胞是巨噬细胞,并且与等摩尔量的单独一种或多种免疫调节组分相比,所述基因抑制增加从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化。在某些实施方案中,所述细胞外囊泡是外泌体。在某些实施方案中,所述核酸是抑制性RNA。在某些实施方案中,所述抑制性RNA是反义RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初级miRNA或前体miRNA。在某些实施方案中,所述至少一种基因选自由以下组成的组:KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶、CEBP/β、Pi3K γ 和PKM2。在某些实施方案中,所述基因是KRAS。在某些实施方案中,所述核酸是靶向野生型人类KRAS的抑制性RNA。在某些实施方案中,所述抑制性RNA还靶向小鼠$Kras^{G12D}$。在某些实施方案中,所述巨噬细胞是肿瘤驻留巨噬细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤是胰腺肿瘤。在某些实施方案中,所述细胞外囊泡还包含额外免疫调节组分。在某些实施方案中,所述额外免疫调节组分是小分子药物、抗体或治疗性蛋白质。在某些实施方案中,所述抗体是免疫检查点抑制剂。在某些方面,本文提供了一种包含上面提及的细胞外囊泡中的任一者的药物组合物。

[0032] 在某些方面,本文描述了一种治疗有需要的患者的疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用本文所述的细胞外囊泡或药物组合物,由此治疗所述患者的所述疾病。在某些实施方案中,所述疾病是癌症。在某些实施方案中,所述癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,所述疾病是纤维化疾患。在一些实施方案中,所述纤维化疾患是肺纤维化、肝纤维化或胰腺纤维化。在某些实施方案中,所述肝纤维化是非酒精性脂肪变性肝炎或NASH。在某些实施方案中,所述患者是人类。在某些实施方案中,所述核酸是靶向原癌基因的抑制性RNA。在某些实施方案中,所述原癌基因是人类KRAS。在某些实施方案中,所述癌症是胰腺癌。在某些实施方案中,所述方法还包括执行至少第二疗法。在某些实施方案中,所述第二疗法包括手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法或免疫疗法。

[0033] 在某些实施方案中,所述靶细胞M2巨噬细胞是选自由M2a、M2b和M2c巨噬细胞组成的组的肿瘤相关巨噬细胞。在某些实施方案中,与极化前的所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞展现出选自由INF γ 、IL-12、IL-23、TNFα、IL-6、IL-1、CSCL9、CXCL10和CXCL11组成的

组的炎性细胞因子和趋化因子的分泌增加。在某些实施方案中,与极化前的所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞展现出选自由IL-10、TGFβ、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22和CCL24组成的组的免疫抑制性细胞因子和趋化因子的分泌减少。在某些实施方案中,与极化前的所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞表达增加的肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,与极化之前所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞增加对$CD8^+$T细胞和/或自然杀伤细胞的刺激。

[0034] 在某些方面,本文描述了一种治疗受试者的胰腺癌的方法,所述方法包括:向所述受试者施用包含靶向人类野生型KRAS的抑制性RNA的细胞外囊泡;其中所述治疗使肿瘤驻留巨噬细胞从M2表型向M1表型的极化百分比增加至比在用靶向人类$KRAS^{G12D}$的抑制性RNA治疗的患者中所观测到的极化百分比更高的水平。

附图说明

[0035] 图1显示在增加量的靶向Stat 3、Stat 6、Cebpβ-1、Pi3Kγ、CEBPβ-2和Kras中的各者的siRNA的转染之后所述基因的基因表达水平。

[0036] 图2显示在增加量的分别靶向Stat 3、Stat 6、Cebpβ-1、Pi3Kγ、CEBPβ-2和Kras的siRNA的转染之后的Arg1表达。加扰siRNA转染的巨噬细胞用作对照。

[0037] 图3显示如通过六个巨噬细胞亚群(M0、M1、M2a、M2c、M2++和TAM)的总细胞GFP强度所测定的外泌体摄取。

[0038] 图4显示如通过总荧光强度所测量的M2或M0巨噬细胞的游离反义寡核苷酸(游离ASO)和负载ASO的外泌体(Exo-ASO)摄取。

[0039] 图5A显示在于未处理小鼠中腹膜内注射$1x10^{11}$或$1x10^{12}$个含GFP外泌体之后体内巨噬细胞的外泌体摄取。图5B显示在于B16F10肿瘤携带小鼠中注射单次剂量的天然未标记外泌体或Cy5标记Exo-ASO之后体内肿瘤细胞和巨噬细胞的天然外泌体和Exo-ASO摄取。

[0040] 图6显示在与5μM游离的带胆固醇标签ASO或$1x10^5$或$1x10^6$个负载有带胆固醇标签ASO的外泌体一起孵育之后M2极化鼠RAW264.7细胞中的Stat3表达。测试五种不同的靶向STAT3的带胆固醇标签ASO:ASO 4.1,双链MOE化学物质;ASO 5.1和ASO 5.2,单链O-甲基化学物质;ASO 5.3和ASO 5.4,单链MOE化学物质。未经治疗的极化巨噬细胞和与未修饰的外泌体一起孵育的极化巨噬细胞用作阴性对照。经Stat 3siRNA转染的巨噬细胞用作对照。

[0041] 图7显示在与5μM游离的带胆固醇标签ASO或$1x10^5$或$1x10^6$个负载有带胆固醇标签ASO的外泌体一起孵育之后M2极化鼠RAW264.7细胞中的Arg1转录水平。测试五种不同的靶向STAT3的带胆固醇标签ASO:ASO 4.1,双链MOE化学物质;ASO 5.1和ASO 5.2,单链O-甲基化学物质;ASO 5.3和ASO 5.4,单链MOE化学物质。未经治疗的极化巨噬细胞和与未修饰的外泌体一起孵育的极化巨噬细胞用作阴性对照。经Stat 3siRNA转染的巨噬细胞用作对照。

[0042] 图8A显示在与针对STAT3的高剂量(4μM)的ASO或高剂量(4μM)和低剂量(0.4μM)的Exo-ASO一起孵育之后M2极化鼠RAW264.7细胞中的STAT3表达。图8B显示在与针对KRAS的高剂量(4μM)的ASO或Exo-ASO一起孵育之后M2极化鼠RAW264.7细胞中的KRAS表达。图8C显示在与针对C/EBPβ的高剂量(4μM)和低剂量(0.4μM)的ASO或Exo-ASO一起孵育之后M2极化鼠RAW264.7细胞中的C/EBPβ表达。

[0043] 图9A显示在经变化剂量的游离STAT3 ASO或STAT3 Exo-ASO治疗之后来自三个单

独供体的原代人类巨噬细胞中的STAT3转录水平。呈现各治疗的IC50和相较于游离STAT3 ASO的STAT3 Exo-ASO的改善倍数。图9B显示在经变化剂量的游离STAT3 ASO或STAT3 Exo-ASO治疗之后来自三个单独供体的原代人类巨噬细胞中的CD163水平。呈现各治疗的IC50和相较于游离STAT3 ASO的STAT3 Exo-ASO的改善倍数。

[0044] 图10显示在经分别针对HIF1α、Pi3Kγ、CEBP/β、STAT6和STAT3的4μM游离ASO或Exo-ASO治疗之后人类M2巨噬细胞中的靶基因表达。未经治疗的人类M2巨噬细胞和经4μM加扰Exo-ASO治疗的人类M2巨噬细胞用作对照。

[0045] 图11显示在经分别针对HIF1α、Pi3Kγ、CEBP/β、STAT6和STAT3的4μM游离ASO或Exo-ASO治疗之后人类M2巨噬细胞中的CD163表达。未经治疗的人类M2巨噬细胞和经4μM加扰Exo-ASO治疗的人类M2巨噬细胞用作对照。

[0046] 图12A显示在存在或不存在LPS的情况下经4μM游离STAT3 ASO、4μMSTAT3 Exo-ASO、4μM加扰Exo-ASO、天然外泌体或C188-9(即STAT3的小分子抑制剂)治疗之后的IL-12诱导。图12B显示在存在或不存在LPS的情况下经4μM游离STAT3 ASO、4μM STAT3 Exo-ASO、4μM加扰Exo-ASO、天然外泌体或C188-9(即STAT3的小分子抑制剂)治疗之后的IL-23诱导。

[0047] 图13A显示在经未修饰的外泌体(仅EV)和浓度匹配的Stat 3游离ASO和Stat 3Exo-ASO治疗之后的STAT3转录水平。图13B显示在经未修饰的外泌体(仅EV)和浓度匹配的Stat 3游离ASO和Stat 3Exo-ASO治疗之后的CD163转录水平。图13C显示在经未修饰的外泌体(仅EV)和浓度匹配的Stat 3游离ASO和Stat 3Exo-ASO治疗之后的TGFβ转录水平。图13D显示在经未修饰的外泌体(仅EV)和浓度匹配的Stat 3游离ASO和Stat 3Exo-ASO治疗之后的STAT6转录水平。

[0048] 图14显示在经分别负载有针对STAT3的ASO(MOE和LNA化学物质两者)、针对STAT6的ASO(MOE化学物质)和针对CEBP/β的ASO(MOE化学物质)的细胞外体治疗之后的TGFβ表达水平。

具体实施方式

[0049] 巨噬细胞极化是巨噬细胞经由其而采用响应于来自巨噬细胞微环境的信号的不同功能性程序的方法。此能力与巨噬细胞在生物体中的多种作用有关:巨噬细胞是先天性免疫系统的有力效应细胞,还在细胞碎片去除、胚胎发展和组织修复中至关重要。

[0050] 巨噬细胞表型粗略分为2组:M1(经典活化巨噬细胞)和M2(替代活化巨噬细胞)。这种粗略分类是基于体外研究,在所述体外研究中将培养的巨噬细胞用刺激其表型转换成特定状态的分子进行处理。M1巨噬细胞具有促炎性,在直接抗病原体的宿主防御(诸如促炎性细胞因子和杀微生物分子的吞噬和分泌)中起重要作用。M2巨噬细胞具有完全相反功能:调节炎症的消退期和修复受损组织。参见例如Wynn,T.A.,Chawla,A.,&Pollard,J.W.(2013).Ori gins and Hallmarks of Macrophages:Development,Homeostasis,and Disease.Nature,496(7446),445-455;Mills,C.D.,Kincaid,K.,Alt,J.M.,Heilman,M.J.,&Hill,A.M.(2000).M-1/M-2Macrophages and the Th1/Th2 Para digm.The Journal of Immunology,164(12),6166-6173。许多实体瘤的特征在于富骨髓细胞浸润物,富骨髓细胞浸润物常常包含称为肿瘤相关巨噬细胞(TA M)的一种类型的M2巨噬细胞。M2巨噬细胞(诸如TAM)表达促进代谢酶精氨酸酶(Arg1)表达的高水平磷酸化STAT3和STAT6。TAM

介导多种促肿瘤活性,诸如(例如)癌细胞运动性促进、癌转移形成和血管生成,并且TAM形成取决于在发展肿瘤中存在的微环境因子。TAM产生免疫抑制性细胞因子(诸如(例如)IL-10、TGFβ、PGE2和极少量的NO或ROI)和低水皮的炎性细胞因子(IL-12、IL-1β、TNFα、IL-6)。与"经典活化"M1巨噬细胞相比,通过TAM进行的肿瘤相关抗原呈递减少,T细胞和NK细胞的抗肿瘤功能的刺激亦如此。与M1巨噬细胞不同,TAM不能溶解肿瘤细胞。https://en.wikipedia.org/wiki/Mac rophage_polarization-cite_note-Sica2008-31因此,如已通过递送剂以改变TA M的募集和分布、耗竭现存TAM或诱导TAM从M2表型向M1表型的再教育所证实,TAM和其他M2巨噬细胞靶向提供新颖抗癌治疗策略。

[0051] 本发明的外泌体治疗剂对M2巨噬细胞具有选择性作用以促进组织驻留微环境,从而在如癌症和纤维化的疾病的情形下通过将异常巨噬细胞"再极化"成M1表型来治疗这些疾病。本文所述的外泌体精确地经各种生物活性分子工程改造至外泌体表面上或于外泌体腔内部以产生接合将M2巨噬细胞再极化成M1表型以治疗人类疾病的路径的候选药物。

[0052] 肿瘤相关M2极化巨噬细胞或TAM可有效地阻抑T细胞增殖和效应功能并促进肿瘤生长。还使用耗竭针对CSF-1受体的巨噬细胞的抗体报告了TAM逆转回至M1表型。这些方法由于窄治疗窗和因如所预期靶向全部巨噬细胞而不仅仅靶向异常M2巨噬细胞所致的特异性缺乏而在临床试验中显示有限成效。预期巨噬细胞成批耗竭将导致增加的感染风险和其他安全性问题。本发明的外泌体由于针对巨噬细胞的天然外泌体向性而更具选择性地靶向M2巨噬细胞,并且打破针对所需M1表型的功能的平衡。这些外泌体再极化巨噬细胞,引起抗肿瘤免疫反应所需的炎性细胞因子的所需频谱的产生。如以下实例所示,外泌体将免疫抑制性M2巨噬细胞体外再程序化成M1表型。

[0053] 除肿瘤微环境中所诱导的免疫抑制之外,M2极化巨噬细胞分泌大量转化生长因子β或TGFβ,这是细胞信号传导中所涉及的重要细胞因子,其诱导成纤维细胞积聚,导致胶原沉积和组织重塑,最终导致组织纤维化。已显示通过靶向如STAT3的关键信号传导分子来再程序化这些M2巨噬细胞以减少TGFβ产生在肺纤维化的临床前模型中具有有益活性。已采用若干种靶向STAT3的小分子方法,但仅在异常M2巨噬细胞内的抑制特异性缺乏已阻止此治疗方法可行。此处所描述的某些外泌体选择性地靶向允许M2巨噬细胞靶向STAT3的M2巨噬细胞中的关键路径以及肺和其他组织纤维化综合征中的其他细胞路径。

[0054] 本文公开了适用于调节免疫系统的巨噬细胞的细胞外囊泡。这些细胞外囊泡包含一种或多种免疫调节组分,所述一种或多种免疫调节组分在与巨噬细胞接触时,抑制至少一种巨噬细胞靶基因,由此与等摩尔量的单独一种或多种免疫调节组分相比,增加从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化。还提供了用于产生细胞外囊泡的方法以及使用这些细胞外囊泡治疗癌症和诸如(例如)纤维化疾患的其他免疫系统相关疾病的方法。

[0055] 在更详细地描述本发明之前,应理解本发明不限于所描述的特定实施方案,因为此类实施方案当然可变化。还应理解本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且无意具有限制性,因为本发明的范围仅受所附权利要求书限制。

[0056] 当提供数值范围时,应理解除非上下文另外明确规定,否则该范围的上下限和该陈述范围的任何其他陈述或居中值之间的直到下限单位十分之一的每个居中值都涵盖于本发明中。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在这些较小范围内并且也涵盖于本发明中,从属于所陈述范围内的任何特定排除的限值。在所陈述范围包括所述限值中的一或

两者时,超出那些包括的限值中的任一者或两者的范围也包括在本发明中。

[0057] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然类似或等同于本文描述的那些的任何方法和材料也可以在本发明的实践或测试中使用,但现在描述的是有代表性的示例性方法和材料。

[0058] 在本说明书中引用的所有公布和专利都以引用方式并入本文,所述引用的程度就如同已具体地和个别地指示将各个别公布或专利以引用方式并入一般,并且以引用方式并入本文来公开和描述与所述公布引用的内容相关的方法和/或材料。

[0059] 应注意,除非上下文另外清晰地指示,否则如本文中和所附权利要求中所使用的单数形式“一个(a)/一种(an)”和“所述(the)”包括多个(种)提及物。类似地,术语“至少一个(种)”包括多个(种)提及物(即,除非上下文另外清晰地指示,否则等效于短语“一个或多个(种)”)。应进一步注意,权利要求可拟订成不包括任何任选的元素。因此,对于与叙述权利要求要素有关所使用的如“单独”、“只”等这样的排他性术语或所使用的否定性限制,这份说明书仅欲充当一个先行基础。

[0060] 术语“约”在用于修饰数值时意欲涵盖如可容易地由本领域的技术人员所测定的与出于实践所描述技术的目的的所陈述值功能性等效的所陈述值中的变化。在某些实施方案中,术语“约”包括自所陈述值+/-5%、+/-10%、+/-20%、+/-30%、+/-40%或+/-50%的变化。

[0061] 如本领域的技术人员在阅读本公开之后将显而易见,本文所描述和说明的个别实施方案中的各者具有离散组分和特征,所述离散组分和特征可在不脱离本发明的范围或精神的情况下容易地与其他若干实施方案中的任一者的特征分离或组合。所叙述的任何方法可以所叙述的事件顺序或在逻辑上是可能的任何其他顺序来执行。

[0062] 在进一步描述本发明中,将更详细地论述用于实践本发明方法的本发明系统,随后论述相关方法综述。

[0063] 如本文所用,术语“细胞外囊泡”是指包含封闭内部空间的膜的细胞来源的囊泡。细胞外囊泡包含所有直径小于衍生其的细胞的直径的膜结合囊泡。一般来讲,细胞外囊泡在20nm至1000nm直径范围内,并且可包含处于内部空间内、展现于细胞外囊泡的外表面上和/或跨越膜的各种巨分子货物。货物可包含核酸、蛋白质、碳水化合物、脂质、小分子和/或它们的组合。举例而言并且非限制性地,细胞外囊泡包括凋亡小体、细胞片段、通过直接或间接操纵(例如,通过连续挤出或用碱性溶液进行的处理)而来源于细胞的囊泡、含有小囊的胞器和由活细胞产生(例如,通过直接质膜出芽(plasma membrane budding)或融合晚期胞内体与质膜)的囊泡。细胞外囊泡可来源于活生物体或死生物体、外植组织或器官和/或培养的细胞。细胞外囊泡物质包括如例如出于所有目的以引用方式并入本文的共有美国专利号10,195,290中所描述的外泌体和纳米囊泡。

[0064] 如本文所用,术语“外泌体”是指包含封闭内部空间的膜的细胞来源的小(直径在20-300nm之间,直径更优选地在40-200nm之间)囊泡,并且所述囊泡是通过直接质膜出芽或通过融合晚期胞内体与质膜而由所述细胞产生。外泌体是细胞外囊泡物质。外泌体包含脂质或脂肪酸和多肽,并且任选地包含有效负载物(例如治疗剂)、接收体(例如靶向部分)、多核苷酸(例如核酸、RNA或DNA)、糖(例如单糖、多糖或聚糖)或其他分子。外泌体可来源于生

产细胞,并且基于其尺寸、密度、生物化学参数或它们的组合从生产细胞中分离。

[0065] 如本文所用,术语“纳米囊泡”是指包含封闭内部空间的膜的细胞来源的小(直径在20-250nm之间,直径更优选地在30-150nm之间)囊泡,并且所述囊泡是通过直接或间接操纵由所述细胞生成,以使得纳米囊泡不在无操纵的情况下由生产细胞产生。对生产细胞的适当操纵包括但不限于连续挤出、用碱性溶液进行的处理、超声处理或它们的组合。在一些情况下,纳米囊泡产生可能导致生产细胞损坏。优选地,纳米囊泡群基本上不含借助于从质膜直接出芽或融合晚期胞内体与质膜而来源于生产细胞的囊泡。纳米囊泡是细胞外囊泡物质。纳米囊泡包含脂质或脂肪酸和多肽,并且任选地包含有效负载物(例如治疗剂)、接收体(例如靶向部分)、多核苷酸(例如核酸、RNA或DNA)、糖(例如单糖、多糖或聚糖)或其他分子。一旦纳米囊泡根据操纵来源于生产细胞,则其可基于其尺寸、密度、生物化学参数或它们的组合从生产细胞中分离。

[0066] 如本文所用,术语“M2表型”是指展现一种或多种促肿瘤活性或表达本领域中已知与M2表型相关联的标记物的巨噬细胞,所述一种或多种促肿瘤活性或标记物诸如但不限于$CD8^+$T细胞和/或自然杀伤细胞刺激的减少或缺乏;肿瘤细胞的吞噬的缺乏;M2相关细胞因子(例如IL-10、TGFβ、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22和CCL24)的分泌和/或表达;生长因子(例如VEGF-A、VEGF-C、EGF和TGF-β)的分泌和/或表达;转移性酶(例如基质金属蛋白酶MMP2、MMP9、半胱氨酸组织蛋白酶)的分泌和/或表达;免疫抑制性因子(例如精氨酸酶I(ArgI),其从诱生型一氧化氮合酶(iNOS)提取底物L-精氨酸)的分泌/表达;细胞表面标记物YM1、FIZZ1、Dectin-1、MGL的表达;M2相关miRNA(例如miRNA146a、miRNA let 7b和miR-223)的表达(参见例如Mosser,D.M.和Edwards,J.P.(2008).Exploring the full spectrum of macrophage activation.Nature Reviews Immunology,8(12),958-96;Murray,P.J.,Allen,J.E.,Biswas,S.K.,Fisher,E.A.,Gilroy,D.W.,Goerdt,S.,Wynn,T.A.(2014).Macrophage activation and polarization:nomenclature and experimental guidelines.Immunity,41(1),14-20;和Liu,Y.C.,Zou,X.B.,Chai,Y.F.,& Yao,Y.M.(2014).Macrophage polarization in inflammatory diseases.International Journal of Biological Sciences,10(5),520-5299,以及其中所引用的参考文献,各文献出于所有目的以引用方式并入)和/或下文所列举与至少一种参考样品相比的M1相关因子的减少的表达/分泌或降低的M1相关活性,其中参考样品包含M1活化巨噬细胞群。体外M1活化是通过用诸如典型用于革兰氏阴性细菌的细菌脂多糖(LPS)和典型用于革兰氏阳性细菌的脂磷壁酸(LTA)、粒细胞-巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF)或LPS和干扰素γ组合(IFN-γ)的TLR配体处理来引发。参见Mills,C.D.、Kincaid,K.、Alt,J.M.、Heilman,M.J.和Hill,A.M.(2000).M-1/M-2Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm.The Journal of Immunology,164(12),6166-6173;Krausgruber,Thomas等人″IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses.″Nature immunology 12.3(2011):231-238以及Martinez,F.O.和Gordon,S.(2014).The M1 and M2paradigm of macrophage activation:time for reassessment.F1000Prime Reports,6(3月),1-13,以及其中所引用的参考文献,各文献出于所有目的以引用方式并入本文。

[0067] 如本文所用,术语“M1表型”是指展现抗肿瘤活性或本领域中已知与M1表型相关联的标记物的巨噬细胞,所述抗肿瘤活性或标记物诸如但不限于$CD8^+$T细胞和/或自然杀伤细

胞的刺激、肿瘤细胞的吞噬、M1相关细胞因子(例如INFγ、IL-12、IL-23、TNFα、IL-6、IL-1、CCL5、CSCL9、CXCL10和CXCL11)的分泌和/或表达、M1相关miRNA(例如miRNA155、miR-33)的表达(参见例如Mosser,D.M.和Edwards,J.P.(2008).Exploring the full spectrum of macrophage activation.Nature Reviews Immunology,8(12),958-96;Murray,P.J.,Allen,J.E.,Biswas,S.K.,Fisher,E.A.,Gilroy,D.W.,Goerdt,S.,Wynn,T.A.(2014).Macrophage activation and polarization:nomenclature and experimental guidelines.Immunity,41(1),14-20;和Liu,Y.C.,Zou,X.B.,Chai,Y.F.,&Yao,Y.M.(2014).Macrophage polarization in inflammatory diseases.International Journal of Biological Sciences,10(5),520-5299,以及其中所引用的参考文献,各文献出于所有目的以引用方式并入)和/或上文所列出与至少一种参考样品相比的M2相关因子的减少的表达/分泌或降低的M2相关活性,其中参考样品包含M2活化巨噬细胞群。体外M2活化是通过用IL-4和IL-13处理来引发(参见例如Liu,Y.C.,Zou,X.B.,Chai,Y.F.,&Yao,Y.M.(2014).Macrophage polarization in inflammatory diseases.International Journal of Biological Sciences,10(5),520-529,出于所有目的以引用方式并入)。

[0068] 如本文所用,术语“巨噬细胞极化”是指巨噬细胞从M2表型向M1表型的变化,并且/或者是指与至少一种参考样品(例如,在测试样品或历史数据之前取自同一患者的样品)相比的展现M1表型的巨噬细胞的于患者中所发现的巨噬细胞(例如肿瘤相关巨噬细胞或循环巨噬细胞)群的百分比增加。参见例如Mills,C.D.、Kincaid,K.,Alt,J.M.,Heilman,M.J.和Hill,A.M.(2000).M-1/M-2Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm.The Journal of Immunology,164(12),6166-6173;Mosser,D.M.和Edwards,J.P.(2008).Exploring the full spectrum of macrophage activation.Nature Reviews Immunology,8(12),958-969;以及Xue,J.,Schmidt,S.V.和Schultze,J.L.(2014),Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation.Immunity,40(2)L274-288,各文献出于所有目的以引用方式并入。

[0069] 术语“细胞外囊泡递送(extracellular vesicledelivery/delivery of extracellular vesicles)”是指向受试者的靶组织、细胞和/或器官的细胞外囊泡施用和定位。在一些实施方案中,可将免疫调节组分递送至靶细胞的细胞质。在其他实施方案中,将免疫调节组分递送至靶细胞的膜。在一些实施方案中,细胞外囊泡的膜与靶细胞的膜融合。

[0070] 如本文所用,术语“生产细胞”是指可与细胞外囊泡分离的任何细胞。生产细胞是充当细胞外囊泡的来源的细胞。生产细胞可与细胞外囊泡共享蛋白质、脂质、糖或核酸组分。在一些实施方案中,生产细胞是修饰细胞或合成细胞。在一些实施方案中,生产细胞是培养的细胞或分离的细胞。在某些实施方案中,生产细胞是细胞系。在一些实施方案中,生产细胞系是人类胎肾细胞系。在一些实施方案中,生产细胞系是HEK293SF细胞系。在某些其他实施方案中,生产细胞是原代细胞。在一些特定实施方案中,生产细胞是免疫细胞,诸如(例如)B淋巴细胞、T淋巴细胞、树突状细胞、肥大细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、抗原呈递细胞、T辅助细胞或调节性T细胞(Treg细胞)。

[0071] 如本文所用的“膜”是包含一种或多种生物化合物(通常是脂质,且任选地是多肽和/或碳水化合物)的分离内部空间与外部空间的边界层。在一些实施方案中,膜包含脂质

和脂肪酸。在一些实施方案中,膜包含磷脂、糖脂、脂肪酸、鞘脂类、磷酸甘油酯、固醇、胆固醇和磷脂酰丝氨酸。在这些实施方案中的一些实施方案中,膜还包含一种或多种多肽和/或一种或多种多糖(诸如聚糖)。细胞外囊泡包含如本文所定义的膜。

[0072] 如本文所用,术语“免疫调节组分”是指作用于与剂接触的靶标(例如靶基因,包括例如但不限于KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶、CEBP/β、Pi3Kγ和PKM2)并且修饰免疫细胞(例如巨噬细胞或其他免疫细胞)的治疗剂。可引入细胞外囊泡和/或生产细胞中的免疫调节组分包括治疗剂,诸如多核苷酸(诸如抑制性核酸(例如反义寡核苷酸(ASO)、siRNA、miRNA、反义RNA、shRNA、lncRNA、初级miRNA和前体miRNA))、激动剂、拮抗剂、抗体和/或抗原结合片段、免疫检查点抑制剂或免疫检查点抑制剂配体的调节剂、表面抗原及其衍生物和/或细胞因子及其衍生物。在某些实施方案中,免疫调节组分是抑制性核酸(例如反义寡核苷酸(ASO)、siRNA、miRNA、反义RNA、shRNA、lncRNA、初级miRNA和前体miRNA)。参见例如Weiss,B.(编):Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA:Novel Pharmacological and Therapeutic Agents,CRC Press,Boca Raton,FL,1997;Elbashir S,Harborth J,Lendeckel W,Yalcin A,Weber K,Tuschl T(2001)."Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells".Nature.411(6836):494-988;Bartel DP(January 2004年1月)."MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism,and function".Cell.116(2):281-97;Paddison,PJ;Caudy,AA;Bernstein,E;Hannon,GJ;Conklin,DS(2002年4月15日)."Short hairpin RNAs(shRNAs)induce sequence-specific silencing in mammalian cells.Genes&Development.16(8):948-58;Ma L,Bajic VB,Zhang Z(2013年6月)."On the classification of long non-coding RNAs".RNA Biology.10(6):925-33;以及Ambros V,Bartel B,Bartel DP,Burge CB,Carrington JC,Chen X,Dreyfuss G,Eddy SR,Griffiths-Jones S,Marshall M,Matzke M,Ruvkun G,Tuschl T(2003年3月)."A uniform system for microRNA annotation".RNA.9(3):277-9,所述文献各自出于所有目的并入本文。

[0073] 如本文所用,短语“进行抑制的核酸分子”或“抑制性核酸”是指在引入细胞中以使得其与靶基因相互作用时引起该靶基因的表达或活性的抑制的任何核酸。进行抑制的核酸分子(即抑制性核酸)可以是DNA或抑制性RNA(例如siRNA、miRNA、反义RNA、shRNA、lncRNA、前体miRNA或mRNA),其中所述RNA是单链、双链的,或者含有单链区和双链区两者。在一些实施方案中,抑制性核酸是反义寡核苷酸(ASO)。ASO可以是单链或双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交体。参见例如Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA:Novel Pharmacological and Therapeutic Agents,CRC Press,Boca Raton,FL,1997,所述文献出于所有目的以引用方式并入本文。“EXO ASO”是经由与囊泡膜(例如如与胆固醇或脂肪酰基衍生的ASO一起出现)相互作用或通过使用诸如电穿孔的技术负载至囊泡腔中或经由诸如通过例如转染或转导以将编码所需ASO的构建体引入生产细胞中来基因工程改造生产细胞、随后从工程化的生产细胞中分离细胞外囊泡而与诸如(例如)外泌体的细胞外囊泡物理上缔合的ASO。

[0074] 术语“接收体”是指在受试者中将细胞外囊泡导向靶标并且/或者促进细胞外囊泡与靶标相互作用的分子。在一些实施方案中,接收体是多肽,在本文中有时也称为“接收体

多肽”。在一些实施方案中,接收体能够诸如通过定向运输至受试者的靶组织来增加受试者组织中的免疫调节组分的浓度。接收体的实例包括但不限于表3中所列出的实例。

[0075] 术语“靶标”可指活性由本公开的免疫调节组分调节的基因(即靶基因)。在某些实施方案中,靶基因受与细胞外囊泡缔合(即与膜表面结合、插入脂质双层内或囊封于囊泡的封闭体内)的核酸分子(诸如(例如)抑制性ASO)抑制。靶基因的实例包括但不限于KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶、CEBP/β、Pi3K γ 和PKM2。“靶标”还可指本公开的细胞外囊泡所定向的细胞(即靶细胞)。在某些实施方案中,靶细胞是免疫细胞(例如巨噬细胞)。在某些实施方案中,靶细胞是造血干细胞或多潜能干细胞。在某些实施方案中,靶细胞是循环巨噬细胞。在某些实施方案中,靶细胞是肿瘤驻留巨噬细胞(即位于肿瘤微环境中、肿瘤组织中或肿瘤表面附近的巨噬细胞)。另外,“靶标”还可指靶细胞上其活性是通过与本公开的免疫调节组分接触来调节的蛋白质,或充当用于结合本公开的细胞外囊泡的配体的蛋白质(即靶蛋白)。因此,在某些实施方案中,靶蛋白处于靶细胞上并且与细胞外囊泡相互作用。

[0076] “治疗剂”或“治疗分子”包括当以有效量存在时对有需要的受试者产生所需治疗效果、药理和/或生理效应的化合物或分子。其包括当向受试者施用时对受试者具有可测量或可输送效应(例如其缓解或减轻疾病、病症或疾患的症状)的任何化合物,例如小分子药物或生物制品(例如多肽药物或核酸药物)。

[0077] 如本文所用,术语“免疫检查点抑制剂”或“检查点抑制剂”是指通过减少阻抑免疫细胞的免疫抑制性检查点路径来刺激免疫细胞活性的治疗剂(例如抑制PD-1/PD-L1的剂(诸如靶向PD-1的纳武单抗(Nivolumab)、赛咪单抗(Cemiplimab)和派姆单抗(Pembrolizumab),和各自靶向PD-L1的阿特珠单抗(Atezolizumab)、阿维鲁单抗(Avelumab)、度伐鲁单抗(Durvalumab))和抑制CTLA-4/B7-1/B7-2的剂(诸如伊匹单抗(Ipilimumab)))。参见例如Pardoll DM(2012年3月)."The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy".Nature Reviews.Cancer.12(4):252-64。

[0078] 如本文所用,术语“抗体”涵盖不论天然或部分或全部以合成方式产生的免疫球蛋白及其片段。所述术语还覆盖具有与免疫球蛋白结合结构域同源的结合结构域的任何蛋白质。“抗体”还包括特异性结合并且识别抗原的包含来自免疫球蛋白基因或其片段的框架区的多肽。术语抗体的使用意在包括完全抗体、多克隆抗体、单克隆抗体和重组抗体、它们的片段,并且还包括单链抗体、人源化抗体、鼠抗体、嵌合单克隆抗体、小鼠-人类单克隆抗体、小鼠-灵长类动物单克隆抗体、灵长类动物-人类单克隆抗体、抗独特型抗体、抗体片段(诸如(例如)scFv、$(scFv)_2$、Fab、Fab'和$F(ab')_2$、$F(ab1)_2$、Fv、dAb和Fd片段)、双功能抗体和抗体相关多肽。抗体包括双特异性抗体和多特异性抗体,只要其展现所需生物活性或功能即可。示例性抗体组合物包括抑制CTLA-4的抗体(诸如(例如)伊匹单抗)、抑制PD-1的抗体(诸如(例如)纳武单抗、赛咪单抗和派姆单抗)、抑制PD-L1的抗体(诸如(例如)阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗)和抑制CSFR1的抗体(诸如(例如)吡昔替尼(Pexidartinib)、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗(Emactuzumab)、AMG820、IMC-CS4和卡比拉单抗(Cabiralizumab))。本文所使用的术语“抗原结合片段”是指完整免疫球蛋白的片段和包括具有特异性结合至抗原的能力的抗原结合区的多肽的任何部分。举例而言,抗

原结合片段可以是F(ab')$_2$片段、Fab'片段、Fab片段、Fv片段或scFv片段,但不限于此。Fab片段具有抗原结合位点并且含有轻链可变区和重链可变区、轻链恒定区和重链的第一恒定区CH1。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于Fab'片段另外包括重链铰链区,所述重链铰链区在重链CH1区的C端处包括至少一个半胱氨酸残基。F(ab')$_2$片段产生,由此Fab'片段的半胱氨酸残基通过铰链区处的二硫键接合。Fv片段是仅具有重链可变区和轻链可变区的最小抗体片段,并且用于产生Fv片段的重组技术在本领域中众所周知。双链Fv片段可具有其中重链可变区通过非共价键与轻链可变区连接的结构。单链Fv(scFv)片段一般可具有如同双链Fv片段中的二聚体结构的二聚体结构,其中重链可变区经由肽接头共价结合至轻链可变区,或者重链可变区和轻链可变区在其C端处彼此直接连接。抗原结合片段可使用蛋白酶来获得(例如,完全抗体经木瓜酶消化以获得Fab片段,并且经胃蛋白酶消化以获得F(ab')$_2$片段),并且可通过基因重组技术来制备。dAb片段由VH结构域组成。单链抗体分子可包含具有多种单独分子的聚合物,例如二聚体、三聚体或其他聚合物。

[0079] 短语“核酸分子”是指具有脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。其包括染色体DNA和自我复制质粒、载体、mRNA、tRNA、siRNA、miRNA等。核酸分子可以是重组的,并且当将核酸引入细胞中时外源性多肽可得到表达。所述术语涵盖经化学修饰的核酸,诸如描述于例如,Selvam C,Mutisya D,Prakash S,Ranganna K,Thilagavathi R.“Therapeutic potential of chemically modified siRNA:Recent trends,”Chem Biol Drug Des.2017年11月;90(5):665-678中的经化学修饰的核酸;如描述于例如Petersen M,Wengel J(2003年2月)."LNA:a versatile tool for therapeutics and genomics".Trends Biotechnol.21(2):74-81中的锁核酸(LNA);以及其他类型的临床上相关的经化学修饰的核酸,诸如描述于例如Summerton,J;Weller,D(1997)."Morpholino Antisense Oligomers:Design,Preparation and Properties".Antisense&Nucleic Acid Drug Development.7(3):187-195;Goodchild,J(2011).Therapeutic oligonucleotides.Methods in Molecular Biology.764.第1-15页中的临床上相关的经化学修饰的核酸,各文献出于所有目的以引用方式并入本文。

[0080] 术语“激动剂”是指结合至受体并且活化受体以产生生物反应的分子。受体可通过内源性激动剂或外源性激动剂来活化。内源性激动剂的非限制性实例包括激素和神经递质。外源性激动剂的非限制性实例包括各种类别的化合物,包括小分子、抗体、合成肽等。激动剂可以是完全激动剂、部分激动剂或反向激动剂。

[0081] 术语“拮抗剂”是指在结合至受体时阻断或阻遏激动剂介导的反应而非引起自身生物反应的分子。许多拮抗剂通过与内源性配体或底物竞争受体上的结构上限定的结合位点来达成其效力。拮抗剂的非限制性实例包括α阻断剂、β阻断剂和钙离子通道阻断剂。拮抗剂可以是竞争性拮抗剂、非竞争性拮抗剂或无竞争性拮抗剂。

[0082] 如本文所用,术语“药物组合物”是指本文所述的化合物中的一种或多种,诸如(例如)与一种或多种诸如药学上可接受的载体和赋形剂的其他化学组分混合或掺和或悬浮于其中的细胞外囊泡。药物组合物的一个目的是促进向受试者的细胞外囊泡制剂的施用。术语“药学上可接受的”及其语法变型是指能够施用至受试者或施用至受试者上而不产生非所需生理效应至阻止施用组合物的程度的组合物、载体、稀释剂和试剂。术语“赋形剂”或“载体”是指添加至药物组合物中以进一步促进化合物施用的惰性物质。术语“药学上可接

受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”涵盖经美国联邦政府的管理机构批准或美国动物(包括人类)用药典中所列出的剂中的任一种,以及不对受试者造成相当大的刺激并且不消除所施用化合物的生物活性和特性的任何载体或稀释剂。包括适用于制备药物组合物并且一般是安全、无毒且合乎需要的赋形剂和载体。

[0083] 如本文所用,术语“分离(isolate/isolated/isolating)”或“纯化(purify/purified/purifying)”以及“提取(extracted/extracting)”可互换使用,并且是指已进行一个或多个纯化过程(例如选择或富集所需细胞外囊泡制剂)的所需细胞外囊泡的制剂(例如多个已知或未知量和/或浓度)的状态。在一些实施方案中,如本文所用的分离或纯化是从含有生产细胞的样品中去除、部分去除(例如洗脱)细胞外囊泡的过程。在一些实施方案中,分离的细胞外囊泡组合物不具有可检测的非所需活性,或可替代地,非所需活性的水平或量等于或低于可接受的水平或量。在其他实施方案中,分离的细胞外囊泡组合物具有等于或高于可接受的量和/或浓度的量和/或浓度的所需细胞外囊泡。在其他实施方案中,与从其中获得组合物的起始材料(例如生产细胞制剂)相比,分离的细胞外囊泡组合物得到富集。与起始材料相比,此富集可以是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%或超过99.9999%。在一些实施方案中,分离的细胞外囊泡制剂基本上不含残余生物产物。在一些实施方案中,分离的细胞外囊泡制剂100%不含、99%不含、98%不含、97%不含、96%不含或95%不含任何污染生物物质。残余生物产物可包括非生物材料(包括化学物质)或不合需要的核酸、蛋白质、脂质或代谢物。基本上不含残余生物产物还可意指细胞外囊泡组合物不含有可检测的生产细胞,并且仅细胞外囊泡是可检测的。

[0084] 术语“施用(administration/administering)”及其变体是指将诸如细胞外囊泡的组合物或剂引入受试者中,并且包括按与产生治疗效果一致的任何时间表并行和依序引入一种或多种额外组合物或剂。可选定剂量施用时序以在受试者内达到恒定水平(例如血浆水平)的所施用剂,或以间歇性暴露,例如以减少毒性或预防脱敏。实现这些结果的方法已是本领域普通技术人员基于如例如Goodman和Gilman的The Pharmacological Basis of Therapeutics(Macmillan Publishing Co.第13版)中所阐述的已知药物动力学原理所熟知。将组合物或剂引入受试者中是通过任何合适途径进行,所述途径包括经口、经肺、鼻内、肠胃外(静脉内、动脉内、肌内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴内、鞘内、眼周、瘤内或局部。施用包括自我施用和由其他人施用。合适施用途径允许组合物或剂执行其预期功能。举例而言,如果合适途径是静脉内,则通过将组合物或剂引入受试者的静脉中来施用组合物。

[0085] 如本文所用,术语“调节(modulate/modulating)”、“修饰”和/或“调节剂”一般是指通过增加或降低进行改变的能力,例如直接地或间接地促进/刺激/上调或干扰/抑制/下调特定浓度、水平、表达、功能或行为,诸如(例如)以充当拮抗剂或激动剂。在一些情况下,调节剂可相对于对照而言或相对于一般所预期的活性的平均水平而言或相对于活性的对照水平而言增加和/或降低特定浓度、水平、活性或功能。术语“抑制”、“阻遏”、“调节”在本文中用于描述与无一种或多种免疫调节组分的条件相比靶基因的表达或活性中的变化。抑制是指基因表达或活性的消除或实质性消除。阻遏是指基因表达或活性的降低,但不是完全消除或实质性消除。调节意指基因表达或活性的任何改变,向上改变或向下改变。

[0086] 术语“足够量”意指足以产生所需效应的量,例如足以调节受试者的疾患的量。

[0087] 术语“治疗有效量”是可有效改善疾病症状的量。在预防可视为疗法时,治疗有效量可以是“预防有效量”。

[0088] 核苷酸序列与参考序列之间的“同一性”百分比被定义为:在比对序列并引入空位(如果必要的话)以达到最大序列同一性百分比后,在核苷酸序列中与参考序列中的单个核苷酸同一的单个核苷酸的百分比。用于测定核苷酸序列同一性百分比的目的的比对可以属于本领域中的技能的多种方式实现,所述方式例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW、CLUSTAL OMEGA或MUSCLE软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括对所比较的序列的全长获得最大比对所需的任何算法。有关BLAST算法的更多详细信息,请参见Mount,D.W.(2004).Bioinformatics:Sequence and Genome Analysis(第2版).Cold Spring Harbor Press.ISBN 978-0-87969-712-9。

[0089] 多肽序列与参考序列之间的“同一性”百分比被定义为:在比对序列并引入空位(如果必要的话)以达到最大序列同一性百分比后,在多肽序列中与参考序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。用于测定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以属于本领域中的技能的多种方式实现,所述方式例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW、CLUSTAL OMEGA或MUSCLE软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括对所比较的序列的全长获得最大比对所需的任何算法。有关BLAST算法的更多详细信息,请参见Mount,D.W.(2004).Bioinformatics:Sequence and Genome Analysis(第2版).Cold Spring Harbor Press.ISBN 978-0-87969-712-9。

[0090] 如本文所用,术语“实质上”或“实质性”例如是指特定空间中的实体的存在、水平或浓度、一种实体对另一实体的效应或治疗效应。举例而言,如果相对于基线而言增加是2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍或1000倍,则实体的活性、水平或浓度实质上增加。如果相对于基线而言增加是5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%或500%,则实体的活性、水平或浓度也实质上增加。

[0091] 术语“体内”是指活生物体中出现的过程。

[0092] 如本文所用,术语“哺乳动物”包括人类和非人类哺乳动物两者。

[0093] 本申请中所使用的缩写包括以下:“mRNA”是指信使RNA;“miRNA”是指微小RNA;“siRNA”是指小干扰RNA;“反义RNA”是指与mRNA互补的单链RNA,其可另外包含DNA核苷酸,并且常常被称为反义寡核苷酸或“ASO”;“shRNA”是指小或短发夹RNA;“lncRNA”是指长非编码RNA;并且“dsDNA”是指双链DNA。

[0094] 组合物

[0095] 本公开的方面包括能够调节免疫系统的组合物。所述组合物包含有包含细胞膜的细胞外囊泡和与细胞膜缔合或封闭于膜结合封闭体内的至少一种免疫调节组分。膜结合体内的封闭可使用包括电穿孔、冻干的技术或经由工程改造生产细胞(诸如(例如)HEK293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和间充质干细胞(MSC))以引入诸如核酸(编码ASO)或蛋白质的编码免疫调节组分的构建体来实现。与细胞膜的缔合涵盖与膜的内部或外部脂质小叶的结合和向脂质双层中的跨膜插入。在一些情况下,膜缔合是使用以下来实现:蛋白质(例如支架蛋白或其片段),诸如(例如)前列腺素F2受体负调节因子(PTGFRN);基础免疫球蛋白

(BSG);免疫球蛋白超家族成员2(IGSF2);免疫球蛋白超家族成员3(IGSF3);免疫球蛋白超家族成员8(IGSF8);整合素β-1(ITGB1);整合素α-4(ITGA4);4F2细胞表面抗原重链(SLC3A2);和一类ATP转运蛋白(已鉴别是在可提供包含支架和免疫调节组分的融合蛋白的元素的外泌体表面上高度富集(如共有美国专利号10,195,290中所描述)的ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4。此类细胞外囊泡和示例性技术详细地描述于共有美国专利号10,195,290中,所述专利出于所有目的以引用方式并入本文。如共有美国专利号10,195,290中所描述,表面经工程改造的外泌体可通过诸如PEG诱导融合和/或超声融合以将这些支架蛋白(及其片段)引入外泌体或生产细胞中的化学和/或物理方法来生成。复合物可在外源性治疗性蛋白质与支架蛋白之间生成。可替代地,融合蛋白可通过缀合支架蛋白与外源性治疗性蛋白质(诸如(例如)免疫调节蛋白)以及产生在表面上含有复合物或融合蛋白的工程化外泌体、使用前述化学和/或物理方法来产生。治疗性蛋白质的天然全长片段或生物活性片段可通过缀合至支架蛋白来运输至外泌体表面。此类外泌体还可从包含插入细胞基因组中的外源性序列的生产细胞获得。举例而言,可将外源性序列插入位于编码PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2或ATP转运蛋白的基因组序列的3'端或5'端的基因组位点中。举例而言,可将外源性序列插入编码PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2或ATP转运蛋白的基因组序列中。与细胞膜的缔合涵盖免疫调节组分与内部或外部膜表面的结合、于脂质双层内的免疫调节组分的锚定或经由脂质双层的免疫调节组分的延伸。如共有美国专利号10,195,290中所描述,免疫调节组分可栓至支架蛋白,或者表示为与支架蛋白的融合蛋白。

[0096] 细胞外囊泡

[0097] 在各种实施方案中,组合物包含细胞外囊泡。在某些实施方案中,如共有美国专利号10,195,290中所描述,细胞外囊泡是包含封闭内部空间的膜的细胞来源的囊泡。

[0098] 在各种实施方案中,细胞外囊泡可以是直径小于衍生其的细胞的直径的膜结合囊泡。在一些实施方案中,细胞外囊泡的最长尺寸在约20-1000nm之间,诸如在约20-100nm、20-200nm、20-300nm、20-400nm、20-500nm、20-600nm、20-700nm、20-800nm、20-900nm、30-100nm、30-200nm、30-300nm、30-400nm、30-500nm、30-600nm、30-700nm、30-800nm、30-900nm、40-100nm、40-200nm、40-300nm、40-400nm、40-500nm、40-600nm、40-700nm、40-800nm、40-900nm、50-150nm、50-500nm、50-750nm、100-200nm、100-500nm或500-1000nm之间。

[0099] 在某些实施方案中,细胞外囊泡是外泌体。在某些实施方案中,细胞外囊泡是纳米囊泡。在某些实施方案中,细胞外囊泡是细胞凋亡小体。在某些实施方案中,细胞外囊泡是细胞片段。在某些实施方案中,细胞外囊泡是通过直接或间接操纵而来源于细胞的囊泡。在某些实施方案中,细胞外囊泡是含有小囊的胞器。在各种实施方案中,细胞外囊泡是由活细胞产生的囊泡。

[0100] 在一些实施方案中,细胞外囊泡来源于活生物体。在一些实施方案中,细胞外囊泡来源于死生物体。在一些实施方案中,细胞外囊泡来源于外植组织。在一些实施方案中,细胞外囊泡来源于外植器官。在一些实施方案中,细胞外囊泡来源于培养的细胞。在这些实施方案中的一些实施方案中,当在细胞培养系统中生成细胞外囊泡时,进一步分离细胞外囊泡(例如,通过从培养的细胞中分离细胞外囊泡)。分离可通过沉降来实现。举例而言,细胞

外囊泡的比密度可在0.5-2.0、0.6-1.0、0.7-1.0、0.8-1.0、0.9-1.0、1.0-1.1、1.1-1.2、1.2-1.3、1.4-1.5、1.0-1.5、1.5-2.0和1.0-2.0kg/m^3之间。分离还可通过亲和纯化来实现。举例而言,细胞外囊泡可通过将包含细胞外囊泡的群与树脂结合来纯化,所述树脂包含多种对细胞外囊泡表面上的一种或多种蛋白质具有特异性亲和力的配体。蛋白质可以是四跨膜蛋白(例如CD63、CD81、CD9)、EWI蛋白/免疫球蛋白超家族成员(例如PTGFRN、IGSF8、IGSF3)、整合素(例如ITGB1、ITGA4)、ATP转运蛋白(例如ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4)、SLC3A2、BSG或CD98hc。

[0101] 在各种实施方案中,细胞外囊泡包含脂质或脂肪酸和多肽。在某些实施方案中,细胞外囊泡还包含糖。在某些实施方案中,细胞外囊泡还包含多核苷酸。

[0102] 在各种实施方案中,细胞外囊泡膜包含内表面和外表面并且封闭内部空间。在一些实施方案中,细胞外囊泡还包含有效负载物,诸如如本文所述的免疫调节组分。在某些实施方案中,有效负载物封闭在内部空间内。在某些实施方案中,有效负载物展现于细胞外囊泡的外表面上。在某些实施方案中,有效负载物跨越细胞外囊泡的膜。在各种实施方案中,有效负载物包含核酸、蛋白质、碳水化合物、脂质、小分子和/或它们的组合。用于产生具有有效负载物的细胞外囊泡的方法包括电穿孔、冻干和对可从中分离细胞外囊泡的生产细胞的基因工程改造。参见例如共有美国专利号10,195,290并且同上。在一些实施方案中,细胞外囊泡还包含接收体,即如共有美国专利号10,195,290中所描述可对器官、组织或细胞具有特异性的靶向部分。使用具有靶向部分的融合蛋白。举例而言,融合蛋白可包含PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2、ATP转运蛋白或其片段或变体和靶向部分。靶向部分可用于将外泌体靶向至特定器官、组织或细胞以便使用随时外泌体进行治疗。在一些实施方案中,靶向部分是抗体或其抗原结合片段。抗体及其抗原结合片段包括完全抗体、多克隆抗体、单克隆抗体和重组抗体、它们的片段,并且还包括单链抗体、人源化抗体、鼠抗体、嵌合单克隆抗体、小鼠-人类单克隆抗体、小鼠-灵长类动物单克隆抗体、灵长类动物-人类单克隆抗体、抗独特型抗体、抗体片段(诸如(例如)scFv、(scFv)2、Fab、Fab'和F(ab')2、F(ab1)2、Fv、dAb和Fd片段)、双功能抗体和抗体相关多肽。抗体及其抗原结合片段还包括双特异性抗体和多特异性抗体,只要其展现所需生物活性或功能即可。

[0103] 外泌体

[0104] 在各种实施方案中,细胞外囊泡是外泌体。在某些实施方案中,外泌体是由生产细胞分泌的小膜结合囊泡。

[0105] 在一些实施方案中,来自生产细胞的外泌体的最长尺寸在约20-300nm之间,诸如在约20-290nm、20-280nm、20-270nm、20-260nm、20-250nm、20-240nm、20-230nm、20-220nm、20-210nm、20-200nm、20-190nm、20-180nm、20-170nm、20-160nm、20-150nm、20-140nm、20-130nm、20-120nm、20-110nm、20-100nm、20-90nm、20-80nm、20-70nm、20-60nm、20-50nm、20-40nm、20-30nm、30-300nm、30-290nm、30-280nm、30-270nm、30-260nm、30-250nm、30-240nm、30-230nm、30-220nm、30-210nm、30-200nm、30-190nm、30-180nm、30-170nm、30-160nm、30-150nm、30-140nm、30-130nm、30-120nm、30-110nm、30-100nm、30-90nm、30-80nm、30-70nm、30-60nm、30-50nm、30-40nm、40-300nm、40-290nm、40-280nm、40-270nm、40-260nm、40-250nm、40-240nm、40-230nm、40-220nm、40-210nm、40-200nm、40-190nm、40-180nm、40-170nm、40-160nm、40-150nm、40-140nm、40-130nm、40-120nm、40-110nm、40-100nm、40-90nm、

40-80nm、40-70nm、40-60nm、40-50nm、50-300nm、50-290nm、50-280nm、50-270nm、50-260nm、50-250nm、50-240nm、50-230nm、50-220nm、50-210nm、50-200nm、50-190nm、50-180nm、50-170nm、50-160nm、50-150nm、50-140nm、50-130nm、50-120nm、50-110nm、50-100nm、50-90nm、50-80nm、50-70nm、50-60nm、60-300nm、60-290nm、60-280nm、60-270nm、60-260nm、60-250nm、60-240nm、60-230nm、60-220nm、60-210nm、60-200nm、60-190nm、60-180nm、60-170nm、60-160nm、60-150nm、60-140nm、60-130nm、60-120nm、60-110nm、60-100nm、60-90nm、60-80nm、60-70nm、70-300nm、70-290nm、70-280nm、70-270nm、70-260nm、70-250nm、70-240nm、70-230nm、70-220nm、70-210nm、70-200nm、70-190nm、70-180nm、70-170nm、70-160nm、70-150nm、70-140nm、70-130nm、70-120nm、70-110nm、70-100nm、70-90nm、70-80nm、80-300nm、80-290nm、80-280nm、80-270nm、80-260nm、80-250nm、80-240nm、80-230nm、80-220nm、80-210nm、80-200nm、80-190nm、80-180nm、80-170nm、80-160nm、80-150nm、80-140nm、80-130nm、80-120nm、80-110nm、80-100nm、80-90nm、90-300nm、90-290nm、90-280nm、90-270nm、90-260nm、90-250nm、90-240nm、90-230nm、90-220nm、90-210nm、90-200nm、90-190nm、90-180nm、90-170nm、90-160nm、90-150nm、90-140nm、90-130nm、90-120nm、90-110nm、90-100nm、100-300nm、110-290nm、120-280nm、130-270nm、140-260nm、150-250nm、160-240nm、170-230nm、180-220nm或190-210nm之间。

[0106] 在特别优选的实施方案中,本文所述的来自生产细胞的外泌体的最长尺寸在约30-100nm之间。在另一个优选实施方案中,来自生产细胞的外泌体的最长尺寸在约20-300nm之间。在另一个优选实施方案中,来自生产细胞的外泌体的最长尺寸在约40-200nm之间。在另一个实施方案中,本文所述的外泌体群包含其中外泌体的90%具有最长尺寸20-300nm的群体。在另一个实施方案中,本文所述的外泌体群包含其中外泌体的95%具有最长尺寸20-300nm的群体。在另一个实施方案中,本文所述的外泌体群包含其中外泌体的99%具有最长尺寸20-300nm的群体。在另一个实施方案中,本文所述的外泌体群包含其中外泌体的90%具有最长尺寸40-200nm的群体。在另一个实施方案中,本文所述的外泌体群包含其中外泌体的95%具有最长尺寸40-200nm的群体。在另一个实施方案中,本文所述的外泌体群包含其中外泌体的99%具有最长尺寸40-200nm的群体。在其他优选实施方案中,本文所述的外泌体或外泌体群的尺寸根据下文所描述的方法来测量。

[0107] 在一些实施方案中,外泌体由生产细胞生成。在一些实施方案中,外泌体的膜包含一种或多种来源于生产细胞的分子。在一些实施方案中,外泌体是在细胞培养系统中生成并且分离(例如通过分离外泌体与生产细胞)。分离可通过沉降来实现。举例而言,外泌体的比密度可在0.5-2.0、0.6-1.0、0.7-1.0、0.8-1.0、0.9-1.0、1.0-1.1、1.1-1.2、1.2-1.3、1.4-1.5、1.0-1.5、1.5-2.0和1.0-2.0kg/m^3之间。分离还可通过亲和纯化来实现。举例而言,细胞外囊泡可通过将包含细胞外囊泡的群与树脂结合来纯化,所述树脂包含多种对细胞外囊泡表面上的一种或多种蛋白质具有特异性亲和力的配体。细胞外囊泡表面上的一种或多种蛋白质可以是四跨膜蛋白(例如CD63、CD81和/或CD9)、EWI蛋白/免疫球蛋白超家族成员(例如PTGFRN、IGSF8和/或IGSF3)、整合素(例如ITGB1和/或ITGA4)、ATP转运蛋白(例如ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3和/或ATP2B4)、SLC3A2、BSG或CD98hc。蛋白质可作为任选地经由融合至具有所需药理学活性的多肽部分(诸如(例如)具有检查点抑制活性的抗体、抗体片段、scFv等)来展现于外泌体表面上的免疫调节组

分而另外具有活性。此类抗体是本领域中已知的,例如靶向CTLA-4的伊匹单抗、靶向PD-1的纳武单抗、赛咪单抗和派姆单抗以及各自靶向PD-L1的阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗(参见例如Pardoll DM(2012年3月)."The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy".Nature Reviews.Cancer.12(4):252-64,其以引用方式并入本文)。

[0108] 在一些实施方案中,外泌体膜包含内表面和外表面。在某些实施方案中,内表面面向外泌体的内核。在某些实施方案中,外表面可与胞内体、多囊泡体或生产细胞或靶细胞的膜/细胞质接触。

[0109] 在一些实施方案中,外泌体膜包含脂质和脂肪酸。在一些实施方案中,外泌体膜包含磷脂、糖脂、脂肪酸、鞘脂类、磷酸甘油酯、固醇、胆固醇和磷脂酰丝氨酸。在一些实施方案中,脂质和脂肪酸可以是表1中所列出的脂质和脂肪酸中的一者或多者。

[0110] 在某些实施方案中,外泌体包含由内部小叶和外部小叶构成的脂质双层。内部小叶和外部小叶的组成可通过本领域中已知的跨双层分布测定来确定,参见例如Kuypers等人Biohim Biophys Acta 1985 819:170。在一些实施方案中,外部小叶的组成为在约70%-90%之间的胆碱磷脂、在约0%-15%之间的酸性磷脂和在约5%-30%之间的磷脂酰乙醇胺。在一些实施方案中,内部小叶的组成为在约15%-40%之间的胆碱磷脂、在约10%-50%之间的酸性磷脂和在约30%-60%之间的磷脂酰乙醇胺。

[0111] 在一些实施方案中,外泌体膜还包含一种或多种多肽。在某些实施方案中,外泌体包含一种或多种选自以下列表的多肽,所述列表包括但不限于血影蛋白、类肌球蛋白多肽、带3、SLC4A1、肌动蛋白、类肌动蛋白多肽、甘油醛3-P脱氢酶(G3PD)、四跨膜蛋白(例如CD63、CD81和/或CD9)、Alix和TSG101、整合素(例如ITGB1和/或ITGA4)、选择蛋白、CR1、TNFRI、蛋白水解酶、糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接蛋白或组蛋白、EWI蛋白/免疫球蛋白超家族成员(例如PTGFRN、IGSF8和/或IGSF3)、ATP转运蛋白(例如ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3和/或ATP2B4)、SLC3A2、BSG或CD98hc)。在一些实施方案中,外泌体包含至少一种选自表2的多肽。

[0112] 在一些实施方案中,外泌体在其表面上包含多肽。在一些实施方案中,外泌体经修饰而含有一种或多种多肽。在一些实施方案中,生产细胞经修饰而含有一种或多种多肽。在一些实施方案中,生产细胞天然地含有一种或多种多肽,并且源自其的外泌体也含有多肽。可直接在外泌体上对一定水平的任何所需表面标记物进行修饰(例如,通过使复合物与以重组方式产生的多肽接触以引起向复合物膜中的插入或与复合物膜的缀合)。可替代地或除此之外,可直接在生产细胞上对一定水平的任何所需表面标记物进行修饰(例如,通过使复合物与以重组方式产生的多肽接触以引起向细胞膜中的插入或与细胞膜的缀合)。可替代地,可通过将外源性核酸转导到生产细胞中以表达所需表面标记物来修饰生产细胞。表面标记物可已天然地存在于生产细胞上,在此情况下外源性构建体可能导致标记物过度表达以及生产细胞内部或上面的标记物的浓度增加。可替代地,可从生产细胞中去除天然表达的表面标记物(例如,通过诱导生产细胞中的基因沉默)。多肽可赋予外泌体以不同功能(例如特异性靶向能力、递送功能(例如融合分子)、酶功能、延长或缩短的体内半衰期等)。在一些实施方案中,多肽包括但不限于CD47、CD55、CD49、CD40、CD133、CD59、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1、CD9、CD63、CD81、整合素、选择蛋白、凝集素和钙粘蛋白。

[0113] 在特定实施方案中,外泌体在其表面上包含一种或多种多肽,其中所述多肽选自近期鉴别为在外泌体表面上富集的蛋白质的组(详细地描述于共有美国专利申请62/550,543和PCT/US2018/048026中,所述申请以引用方式整体并入本文)。此多肽组包括前列腺素F2受体负调节因子(PTGFRN);基础免疫球蛋白(BSG);免疫球蛋白超家族成员3(IGSF3);免疫球蛋白超家族成员8(IGSF8);整合素β-1(ITGB1);整合素α-4(ITGA4);4F2细胞表面抗原重链(SLC3A2);和一类ATP转运蛋白(ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4))。

[0114] 在各种实施方案中,外泌体表面上的一种或多种多肽包含抗体或抗原结合片段。抗体或抗原结合片段可来源于天然来源或部分或全部以合成方式产生。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在这些实施方案中的一些实施方案中,单克隆抗体是IgG抗体。在某些实施方案中,单克隆抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些其他实施方案中,抗体是多克隆抗体。在某些实施方案中,抗原结合片段选自Fab、Fab'和$F(ab')_2$、$F(ab1)_2$、Fv、dAb和Fd片段。在某些实施方案中,抗原结合片段是scFv或$(scFv)_2$片段。在某些其他实施方案中,抗体或抗原结合片段是Nanobody®(单结构域抗体)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是双特异性抗体或多特异性抗体。在各种实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合至间皮素。

[0115] 在一些实施方案中,外泌体在其表面上包含有包含(1)PTGFRN或其片段和(2)抗体或其抗原结合片段的融合蛋白,其中抗体或其抗原结合片段结合至PD-1、PD-1L、CSF1-R或其他免疫调节组分。

[0116] 在一些实施方案中,外泌体膜还包含一种或多种多糖,诸如聚糖。

[0117] 在一些实施方案中,外泌体将有效负载物(治疗剂)递送至靶标。有效负载物是作用于与外泌体接触的靶标(例如靶细胞)的治疗剂。在某些实施方案中,有效负载物是免疫调节组分,例如抑制性RNA。接触可出现在体外或受试者体内。可引入外泌体和/或生产细胞中的有效负载物包括治疗剂,诸如核苷酸(例如,包含可检测部分或破坏转录的毒素的核苷酸)、核酸(例如,编码诸如酶的多肽的DNA或mRNA分子,或诸如miRNA、dsDNA、lncRNA或siRNA的具有调节功能的RNA分子)、氨基酸(例如,包含可检测部分或破坏翻译的毒素的氨基酸)、多肽(例如酶)、脂质、碳水化合物、小分子(例如小分子药物和毒素)以及它们的组合。在某些实施方案中,外泌体递送超过一种治疗剂。在某些实施方案中,治疗剂是一种或多种抑制一种或多种靶基因的核酸。在某些实施方案中,治疗剂包含抗体和核酸。在某些实施方案中,治疗剂包含核酸和小分子。在某些实施方案中,治疗剂包含CSF1R抑制剂,诸如临床候选药物吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗、AMG820和IMC-CS4以及描述于例如Cannarile MA,Weisser M,Jacob W,Jegg AM,Ries CH,Rüttinger D(2017)."Colony-stimulating factor 1receptor(CSF1R)inhibitors in cancer therapy".Journal for Immunotherapy of Cancer.5(1):53中的其他药剂;还参见例如Patel S,Player MR(2009)."Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease".Curr Top Med Chem.9:599-610,作为单克隆抗体并且在早期临床试验中用于转移性胰腺癌的卡比拉单抗(Cabiralizumab)(cabira;FPA-008)(参见A phase I/II dose escalation and expansion study of cabiralizumab(cabira;FPA-008),an anti-CSF1Rantibody,in

tenosynovial giant cell tumor(TGCT,diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS;A Study of Cabiralzumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread;以及Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer Nov 2017)。在某些实施方案中,治疗剂包含免疫检查点抑制剂。在某些实施方案中,免疫检查点抑制剂是在诸如(例如)靶向CTLA-4的伊匹单抗、靶向PD-1的纳武单抗、赛咪单抗和派姆单抗以及各自靶向PD-L1的阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗的抗体中。

[0118] 外泌体可经由膜融合与靶细胞相互作用并且将外泌体组合物中的有效负载物(例如治疗剂)递送至靶细胞的表面或细胞质。在一些实施方案中,膜融合出现在外泌体与靶细胞的质膜之间。在其他实施方案中,膜融合出现在外泌体与靶细胞的胞内体膜之间。

[0119] 在一些实施方案中,外泌体包含接收体多肽。接收体多肽可以是合成的。在一些实施方案中,将接收体多肽引入生产细胞中(例如,将编码接收体多肽的外源性核酸引入生产细胞中),或在生产细胞外部制成重组接收体多肽(例如,通过蛋白表达系统合成)。在一些实施方案中,将接收体多肽(例如,以重组方式产生的多肽)直接引入外泌体中(例如,在将外泌体从生产细胞中分离之后)。在一些实施方案中,接收体多肽可在外泌体的表面上。在一些实施方案中,接收体多肽能够将外泌体靶向至在受试者循环系统(诸如血液)中循环的特定靶标(例如,诸如病原体、代谢物、蛋白质、多肽复合物或细胞(诸如非功能性细胞或癌细胞)的靶标),或驻留在组织(诸如患病组织)中的靶标。

[0120] 在一些实施方案中,外泌体是合成的。也就是说在从生产细胞中回收外泌体之后对外泌体进行修饰以添加额外组分。举例而言,外泌体可包含有效负载物,诸如(例如)治疗性多肽、核酸(诸如DNA或RNA)或其他多核苷酸、多糖或聚糖、脂质或脂肪酸、大生物制品、小分子或毒素,这些物质在从生产细胞中回收时未在外泌体中发现。在一些实施方案中,对外泌体进行修饰(例如,通过引入有效负载物,或以其他方式修改复合物的含量,诸如通过改变膜的蛋白质、脂质或聚糖含量)。举例而言,首先将外泌体从生产细胞中分离并且随后按需要进行修饰,由此生成合成外泌体。在一些实施方案中,对生产细胞进行修饰。举例而言,可将外源性核酸、外源性多肽或小分子或毒素引入生产细胞中。可替代地或除此之外,可以其他方式对生产细胞进行修饰(例如,通过修改细胞或膜含量,诸如通过改变细胞膜的脂质或聚糖含量)。由修饰的生产细胞生成的外泌体包含对生产细胞的修饰中的一者或多者。所述方法产生合成外泌体。在一些实施方案中,对生产细胞和从生产细胞中分离的外泌体两者如本文所所述进行修饰。

[0121] 纳米囊泡

[0122] 在各种实施方案中,细胞外囊泡是纳米囊泡。在某些实施方案中,纳米囊泡是包含封闭内部空间的膜的细胞来源的小囊泡,并且所述囊泡是通过直接或间接操纵由所述细胞生成,以使得纳米囊泡不在无操纵的情况下由所述细胞产生。对细胞的适当操纵包括但不限于连续挤出、用碱性溶液进行的处理、超声处理或它们的组合,并且在一些情况下,可能导致生产细胞损坏。

[0123] 在各种实施方案中,纳米囊泡的最长尺寸在约20-250nm之间,诸如在约20-100nm、20-150nm、20-200nm、30-100nm、30-150nm、30-200nm、30-250nm、40-100nm、40-150nm、40-200nm、40-250nm、50-100nm、50-150nm、50-200nm、50-250nm、100-200nm或150-250nm之间。

[0124] 在各种实施方案中,纳米囊泡来源于生产细胞。在某些实施方案中,纳米囊泡是通过直接或间接操纵由生产细胞生成。适当操纵包括但不限于连续挤出、用碱性溶液进行的处理、超声处理或它们的组合。在这些实施方案中的一些实施方案中,操纵可能导致生产细胞损坏。在一些优选实施方案中,纳米囊泡群基本上不含借助于从质膜直接出芽或融合晚期胞内体与质膜而来源于生产细胞的囊泡。

[0125] 在一些实施方案中,纳米囊泡是基于其尺寸、密度、生物化学参数或它们的组合从生产细胞中分离。在某些实施方案中,分离可通过沉降来实现。举例而言,纳米囊泡的比密度可在0.5-2.0、0.6-1.0、0.7-1.0、0.8-1.0、0.9-1.0、1.0-1.1、1.1-1.2、1.2-1.3、1.4-1.5、1.0-1.5、1.5-2.0和1.0-2.0kg/m^3之间。

[0126] 在各种实施方案中,纳米囊泡包含脂质或脂肪酸和多肽。在某些实施方案中,纳米囊泡还包含糖。在某些实施方案中,纳米囊泡还包含多核苷酸。在一些实施方案中,纳米囊泡还包含接收体。在一些实施方案中,纳米囊泡还包含有效负载物。在这些实施方案中的一些实施方案中,有效负载物包含核酸、蛋白质、碳水化合物、脂质、小分子和/或它们的组合。

[0127] 免疫调节组分

[0128] 在一个方面,细胞外囊泡例如外泌体包含至少一种免疫调节组分,所述至少一种免疫调节组分增加从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化。在一个方面,相对于包含M2巨噬细胞群的参考样品评估从M2表型向M1表型的增加。在一个方面,通过本公开的细胞外囊泡实现的增加大于或等于通过等摩尔量的单独免疫调节组分实现的增加。在某些实施方案中,免疫调节组分是增加巨噬细胞极化的多核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸是抑制至少一种诸如(例如)原癌基因和其他类型基因的基因的核酸,这种抑制会促进从M2表型向M1表型的极化增加,所述至少一种基因包括例如但不限于以下基因:KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶、CEBP/β、Pi3K γ 和PKM2。在某些实施方案中,考虑多核苷酸和蛋白质性免疫调节组分的组合,其包括蛋白质性免疫调节组分,诸如(例如)靶向PD-1、PD-L1、CTLA-4的抗体或抗体片段(诸如(例如)靶向CTLA-4的伊匹单抗、靶向PD-1的纳武单抗、赛咪单抗和派姆单抗以及各自靶向PD-L1的阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗)、CSF1R抑制剂(诸如(例如)临床候选药物吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗、AMG820和IMC-CS4以及描述于例如Cannarile MA,Weisser M,Jacob W,Jegg AM,Ries CH,Rüttinger D(2017)."Colony-stimulating factor 1receptor(CSF1R)inhibitors in cancer therapy".Journal for Immunotherapy of Cancer.5(1):53中的其他药剂;还参见例如Patel S,Player MR(2009)."Colony-stimulating factor-1receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease".Curr Top Med Chem.9:599-610,作为单克隆抗体并且在早期临床试验中用于转移性胰腺癌的卡比拉单抗(cabira;FPA-008)(参见A phase I/II dose escalation and expansion study of cabiralizumab(cabira;FPA-008),an anti-CSF1R antibody,in tenosynovial giant cell tumor(TGCT,diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS;A Study of Cabiralzumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread;以及Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer Nov 2017,和可用于治疗癌症和炎性疾患的其他免疫调节组分。

[0129] 在这些实施方案中的一些实施方案中,核酸包括但不限于mRNA、miRNA、siRNA、反义RNA、shRNA、lncRNA和dsDNA。在一些实施方案中,核酸是RNA(例如mRNA、miRNA、siRNA、反义RNA、shRNA或lncRNA)。在这些实施方案中的一些实施方案中,当多核苷酸是mRNA时,其可翻译成所需多肽。在一些实施方案中,多核苷酸是微小RNA(miRNA)、初级miRNA或前体miRNA分子。在这些实施方案中的一些实施方案中,将miRNA递送至靶细胞的细胞质以使得miRNA分子可使靶细胞中的天然mRNA沉默。在一些实施方案中,多核苷酸是能够干扰致癌基因或其他调节异常多肽的表达的小干扰RNA(siRNA)或短发夹RNA(shRNA)。在这些实施方案中的一些实施方案中,将siRNA递送至靶细胞的细胞质以使得siRNA分子可使靶细胞中的天然mRNA沉默。在一些实施方案中,多核苷酸是与mRNA互补的反义RNA。在一些实施方案中,多核苷酸是能够调节基因表达并且调节疾病的长非编码RNA(lncRNA)。在一些实施方案中,多核苷酸是反义寡核苷酸(ASO)。在各种实施方案中,ASO是单链或双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交体。参见例如Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA:Novel Pharmacological and Therapeutic Agents,CRC Press,Boca Raton,FL,1997,所述文献出于所有目的以引用方式并入本文。

[0130] 在一些实施方案中,多核苷酸是可转录成RNA的DNA。在这些实施方案中的一些实施方案中,转录的RNA可翻译成所需多肽。在某些实施方案中,核酸抑制至少一种由以下组成的基因:KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、CEBP/β、Pi3Kγ、谷氨酰胺酶和PKM2。在某些实施方案中,核酸抑制至少一种由以下组成的基因:STAT3、STAT6、CEBP/β、Pi3Kγ、KRAS和HIF1-α。在某些实施方案中,核酸抑制是抑制至少一种由以下组成的基因的抑制性RNA:KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、CEBP/β、Pi3Kγ、谷氨酰胺酶和PKM2。在某些实施方案中,核酸是抑制至少一种由以下组成的基因的抑制性RNA:STAT3、STAT6、CEBP/β、Pi3Kγ、KRAS和HIF1-α。在某些实施方案中,核酸是抑制至少一种由以下组成的基因的反义寡核苷酸(ASO):KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、CEBP/β、Pi3Kγ、谷氨酰胺酶和PKM2。在某些实施方案中,核酸是抑制至少一种由以下组成的基因的反义寡核苷酸(ASO):STAT3、STAT6、CEBP/β、Pi3Kγ、KRAS和HIF1-α。在某些实施方案中,核酸抑制人类KRAS原癌基因。在某些实施方案中,核酸是抑制人类KRAS原癌基因的抑制性RNA。在某些实施方案中,核酸抑制STAT3。

[0131] 在本公开的一些实施方案中,核酸是已知的反义寡核苷酸(ASO),其实例列于表0中。在某些实施方案中,ASO包含与已知ASO,例如表0中列出的ASO至少90%至99%同一的序列。在一些实施方案中,ASO抑制STAT3。在各种实施方案中,ASO包含与TAAGCTGATAATTCAACTCA(SEQ ID NO:1)至少90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少90%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少91%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少92%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少93%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少94%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少95%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少96%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少97%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与

SEQ ID NO:1至少98%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:1至少99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含SEQ ID NO:1的序列。在一些实施方案中,通过MOE、O-甲基或LNA化学对ASO进行修饰。在一些实施方案中,ASO还包含在5'端或3'端处的胆固醇标签。

[0132] 在一些实施方案中,核酸是抑制STAT6的反义寡核苷酸(ASO)。在各种实施方案中,ASO包含与TGAGCGAATGGACAGGTCTT(SEQ ID NO:2)至少90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少90%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少91%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少92%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少93%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少94%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少95%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少96%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少97%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少98%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:2至少99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,通过MOE、O-甲基或LNA化学对ASO进行修饰。

[0133] 在一些实施方案中,ASO还包含在5'端或3'端处的胆固醇标签。

[0134] 在一些实施方案中,核酸是抑制CebpB的反义寡核苷酸(ASO)。在各种实施方案中,ASO包含与TGGATTTAAAGGCAGGCGGC(SEQ ID NO:3)至少90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少90%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少91%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少92%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少93%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少94%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少95%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少96%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少97%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少98%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:3至少99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方案中,通过MOE、O-甲基或LNA化学对ASO进行修饰。

[0135] 在一些实施方案中,ASO还包含在5'端或3'端处的胆固醇标签。

[0136] 在一些实施方案中,核酸是抑制Pi3K γ的反义寡核苷酸(ASO)。在各种实施方案中,ASO包含与TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA(SEQ ID NO:4)至少90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少90%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少91%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少92%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少93%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少94%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少95%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少96%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少97%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少98%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:4至少99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方案中,通过MOE、O-甲基或LNA化学对ASO进行修饰。在一些实施方案中,ASO还包含在5'端或3'

端处的胆固醇标签。

[0137] 在一些实施方案中,核酸是抑制HIF1α的反义寡核苷酸(ASO)。在各种实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少90%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少91%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少92%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少93%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少94%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少95%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少96%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少97%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少98%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含SEQ ID NO:5的序列。在一些实施方案中,通过MOE、O-甲基或LNA化学对ASO进行修饰。在一些实施方案中,ASO还包含在5'端或3'端处的胆固醇标签。

[0138] 在一些实施方案中,核酸是抑制HIF1α的反义寡核苷酸(ASO)。在各种实施方案中,ASO包含与GTGCAGTATTGTAGCCAGGC(SEQ ID NO:5)至少90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少90%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少91%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少92%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少93%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少94%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少95%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少96%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少97%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少98%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:5至少99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含SEQ ID NO:5的序列。在一些实施方案中,通过MOE、O-甲基或LNA化学对ASO进行修饰。在一些实施方案中,ASO还包含在5'端或3'端处的胆固醇标签。

[0139] 在一些实施方案中,核酸是抑制Kras的反义寡核苷酸(ASO)。在各种实施方案中,ASO包含与GTAGCATGTAAATATAGCCC(SEQ ID NO:6)至少90%至99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少90%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少91%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少92%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少93%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少94%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少95%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少96%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少97%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少98%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含与SEQ ID NO:6至少99%同一的序列。在某些实施方案中,ASO包含SEQ ID NO:6的序列。在一些实施方案中,通过MOE、O-甲基或LNA化学对ASO进行修饰。在一些实施方案中,ASO还包含在5'端或3'端处的胆固醇标签。

[0140] 在某些实施方案中,组合物包含例如外泌体的细胞外囊泡,还包含作为已知促进巨噬细胞极化的小分子、抗体或抗体片段的额外免疫调节组分。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是集落刺激因子1受体(CSF1R)抑制剂。

[0141] 在某些实施方案中,组合物包含具有抗肿瘤活性的额外免疫调节组分。在一些实施方案中,额外免疫调节组分调节先天性免疫反应。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分靶向自然杀伤细胞。在一些其他实施方案中,额外免疫调节组分调节适应性免疫反应。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分靶向细胞毒性T细胞。

[0142] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分位于细胞外囊泡的表面上。在一些实施方案中,额外免疫调节组分位于细胞外囊泡内部。在一些实施方案中,额外免疫调节组分位于细胞外囊泡的表面上和内部两者。

[0143] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分以其全长形式表达于生产细胞中。在其他实施方案中,额外免疫调节组分作为与外泌体表面蛋白的翻译融合蛋白表达,这引起外泌体表面上的免疫调节化合物的生物活性部分的较高水平表达。在一些实施方案中,额外免疫调节化合物是可溶性蛋白,所述可溶性蛋白作为与外泌体表面蛋白的翻译融合蛋白表达,使得所述可溶性蛋白保留在外泌体的表面上。

[0144] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是用于诸如(例如)A2AR、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7(CD328)和SIGLEC9(CD329)的负检查点调节因子的抑制剂。在一些实施方案中,额外免疫调节组分是用于诸如(例如)PD-L1和PD-L2的负检查点调节因子的结合配偶体的抑制剂。

[0145] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是细胞毒性T淋巴细胞缔合蛋白4(CTLA-4)的抑制剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,CTLA-4抑制剂是CTLA-4的单克隆抗体。在某些实施方案中,抑制剂是CTLA-4的单克隆抗体的片段。在某些实施方案中,抗体片段是CTLA-4的单克隆抗体的scFv、$(scFv)_2$、Fab、Fab'和$F(ab')_2$、$F(ab1)_2$、Fv、dAb或Fd。在某些实施方案中,抑制剂是抗CTLA-4的纳米抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些特定实施方案中,单克隆抗体是伊匹单抗。在一些特定实施方案中,单克隆抗体是曲美木单抗(tremelimumab)。

[0146] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是程序化细胞死亡蛋白1(PD-1)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是程序性死亡配体1(PD-L1)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是程序性死亡配体2(PD-L2)的抑制剂。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1或PD-L2的抑制剂是PD-1、PD-L1或PD-L2的单克隆抗体。在某些实施方案中,抑制剂是PD-1、PD-L1或PD-L2的单克隆抗体的片段。在某些实施方案中,抗体片段是PD-1、PD-L1或PD-L2的单克隆抗体的scFv、$(scFv)_2$、Fab、Fab'和$F(ab')_2$、$F(ab1)_2$、Fv、dAb或Fd。在某些实施方案中,抑制剂是抗PD-1、PD-L1或PD-L2的纳米抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些特定实施方案中,单克隆抗体是纳武单抗。在一些特定实施方案中,单克隆抗体是派姆单抗。在一些特定实施方案中,单克隆抗体是皮地立珠单抗(pidilizumab)。在一些特定实施方案中,单克隆抗体是阿特珠单抗。在一些特定实施方案中,单克隆抗体是阿维鲁单抗。

[0147] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是淋巴细胞活化基因3(LAG3)的抑制剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,LAG3的抑制剂是LAG3的单克隆抗体,诸如(例如)BMS-986016(参见ClinicalTrials.gov处的临床试验编号NCT01968109“Safety Study of Anti-LAG-3With and Without Anti-PD-1in the Treatment of Solid Tumors”)。

[0148] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是含T细胞免疫球蛋白粘蛋白的蛋白3

(TIM-3)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是B淋巴细胞和T淋巴细胞衰减子(BTLA)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是具有Ig结构域和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是T细胞活化的V结构域Ig抑制因子(VISTA)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是腺苷A2a受体(A2aR)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是吲哚胺2,3-加双氧酶(IDO)的抑制剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是CD20、CD39或CD73的抑制剂。

[0149] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是用于正共刺激分子的活化剂。在一些实施方案中,额外免疫调节组分是用于正共刺激分子的结合配偶体的活化剂。

[0150] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是诸如激动性抗体或天然配体或TNF受体超家族成员的TNF受体超家族成员的活化剂。在某些实施方案中,TNF受体超家族成员选自由以下组成的组:CD120a、CD120b、CD18、OX40、CD40、Fas受体、M68、CD27、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、RANK、OCIF、TWEAK受体、TACI、BAFF受体、ATAR、CD271、CD269、GITR、TROY、CD358、TRAMP和XEDAR。在一些实施方案中,额外免疫调节组分是TNF超家族成员。在某些实施方案中,TNF超家族成员选自由以下组成的组:TNFα、TNF-C、OX40L、CD40L、FasL、LIGHT、TL1A、CD27L、Siva、CD153、4-1BB配体、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITR配体和EDA-2。

[0151] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是TNF受体超家族成员4(OX40)的活化剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,OX40的活化剂是OX40的激动剂抗体。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,OX40的活化剂是OX40配体(OX40L)。

[0152] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是CD27的活化剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,CD27的活化剂是CD27的激动剂抗体。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,CD27的活化剂是CD27配体(CD27L)。

[0153] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是CD40的活化剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,CD40的活化剂是CD40的激动剂抗体。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,CD40的活化剂是CD40配体(CD40L)。

[0154] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是糖皮质素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)的活化剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,GITR的活化剂是GITR的激动剂抗体。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,GITR的活化剂是GITR的天然配体。

[0155] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是4-1BB的活化剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,4-1BB的活化剂是4-1BB的激动剂抗体。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,4-1BB的活化剂是4-1BB的天然配体。

[0156] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是Fas受体(Fas)。在这些实施方案中的一些实施方案中,Fas受体展现于细胞外囊泡的表面上。在一些其他实施方案中,额外免疫调节组分是Fas配体(FasL)。在这些实施方案中的一些实施方案中,Fas配体展现于细胞外囊泡的表面上。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是Fas受体的抗体。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是Fas配体的抗体。

[0157] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是CD28超家族共刺激分子的活化剂。在某些实施方案中,CD28超家族共刺激分子是ICOS或CD28。在某些实施方案中,额外免疫调节组

分是ICOSL、CD80或CD86。

[0158] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是可诱导T细胞共刺激因子(ICOS)的活化剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,ICOS的活化剂是ICOS的激动剂抗体。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,ICOS的活化剂是ICOS配体(ICOSL)。

[0159] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是CD28的活化剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,CD28的活化剂是CD28的激动剂抗体。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,CD28的活化剂是CD28的天然配体。在某些实施方案中,CD28的配体是CD80。

[0160] 在某些实施方案中,额外免疫调节组分是细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是已翻译融合至外泌体表面蛋白或其片段的可溶性细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,细胞因子是IL-7。在一些实施方案中,细胞因子是IL-12。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15。

[0161] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是T细胞受体(TCR)或其衍生物。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是TCRα-链或其衍生物。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是TCRβ-链或其衍生物。在一些实施方案中,额外免疫调节组分是T细胞的辅受体或其衍生物。

[0162] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是肿瘤抗原。在某些实施方案中,肿瘤抗原选自由以下组成的组:甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、粘蛋白1(MUC1)、Tn-MUC1、粘蛋白16(MUC16)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、肿瘤蛋白p53(p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡配体2(PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、间皮素、VEGFR、α叶酸受体、CE7R、IL-3、癌症-睾丸抗原、MART-1gp100和TNF相关细胞凋亡诱导配体。

[0163] 在某些实施方案中,肿瘤抗原是癌胚抗原(CEA)。在某些实施方案中,肿瘤抗原是上皮肿瘤抗原(ETA)。

[0164] 在某些实施方案中,肿瘤抗原是粘蛋白。在这些实施方案中的一些实施方案中,粘蛋白是分泌的粘蛋白。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,粘蛋白是跨膜粘蛋白。在特定实施方案中,肿瘤抗原是粘蛋白1(MUC1)。在特定实施方案中,肿瘤抗原是Tn-MUC1。在特定实施方案中,肿瘤抗原是粘蛋白16(MUC16)。

[0165] 在某些实施方案中,肿瘤抗原是黑色素瘤相关抗原(MAGE)。在这些实施方案中的一些实施方案中,MAGE是I型MAGE。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,MAGE是II型MAGE。在特定实施方案中,I型MAGE是MAGE-A2。在特定实施方案中,I型MAGE是MAGE-A4。

[0166] 在某些实施方案中,肿瘤抗原是甲胎蛋白(AFP)。在某些实施方案中,肿瘤抗原是肿瘤蛋白p53(p53)。在某些实施方案中,肿瘤抗原是酪氨酸酶。在某些实施方案中,肿瘤抗原是酪氨酸酶相关蛋白(TRP)。在一些实施方案中,肿瘤抗原是程序性死亡配体1(PD-L1)或程序性死亡配体2(PD-L2)。在各种实施方案中,肿瘤抗原选自由以下组成的组:CD4、CD8、CD45、CD80和CD86。

[0167] 在一些实施方案中,免疫调节组分是嵌合抗原受体(CAR)或其衍生物。在一些实施方案中,CAR结合至以下中的一者或多者:甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、粘蛋白1(MUC1)、Tn-MUC1、粘蛋白16(MUC16)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、肿瘤蛋白p53(p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡配体

2(PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、间皮素、VEGFR、α叶酸受体、CE7R、IL-3、癌症-睾丸抗原、MART-1gp100和TNF相关细胞凋亡诱导配体。

[0168] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是T细胞受体或辅受体的活化剂。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是CD3的活化剂。在某些实施方案中,活化剂是CD3的单克隆抗体的片段。在某些实施方案中,抗体片段是CD3的单克隆抗体的scFv、$(scFv)_2$、Fab、Fab'和$F(ab')_2$、$F(ab1)_2$、Fv、dAb或Fd。在某些实施方案中,活化剂是抗CD3的纳米抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。在某些实施方案中,额外免疫调节组分是CD28的活化剂。在某些实施方案中,活化剂是CD28的单克隆抗体的片段。在某些实施方案中,抗体片段是CD28的单克隆抗体的scFv、$(scFv)_2$、Fab、Fab'和$F(ab')_2$、$F(ab1)_2$、Fv、dAb或Fd。在某些实施方案中,活化剂是抗CD28的纳米抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0169] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是主要组织相容性复合物(MHC)或其衍生物。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分是I类MHC或其衍生物。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分是II类MHC或其衍生物。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分是III类MHC或其衍生物。

[0170] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是人类白细胞抗原(HLA)或其衍生物。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分是HLA-A、HLA-B、HLA-C或其衍生物。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分是HLA-E、HLA-F、HLA-G或其衍生物。在这些实施方案中的一些实施方案中,额外免疫调节组分是HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR或其衍生物。

[0171] 在各种实施方案中,免疫调节组分可以是多肽、多核苷酸、多糖、脂质、小分子或毒素。

[0172] 在一些实施方案中,免疫调节组分可以是蛋白质、肽、糖脂或糖蛋白。

[0173] 在某些实施方案中,免疫调节组分是激动剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,激动剂是诸如激素或神经递质的内源性激动剂。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,激动剂是诸如药物的外源性激动剂。在一些实施方案中,激动剂是可在不结合至受体的情况下产生激动剂反应的物理激动剂。在一些实施方案中,激动剂是可产生比内源性激动剂更大的最大反应的超激动剂。在某些实施方案中,激动剂是对受体具有完全功效的完全激动剂。在某些其他实施方案中,激动剂是相对于完全激动剂而言对受体仅具有部分功效的部分激动剂。在一些实施方案中,激动剂是可抑制受体的固有活性的反向激动剂。在一些实施方案中,激动剂是与其他共激动剂一起起作用以对受体产生效应的共激动剂。在某些实施方案中,激动剂是经由形成共价键而永久结合至受体的不可逆激动剂。在某些实施方案中,激动剂是用于特定类型的受体的选择性激动剂。

[0174] 在某些实施方案中,免疫调节组分是拮抗剂。在这些实施方案中的一些实施方案中,拮抗剂是竞争性拮抗剂,其在不活化受体的情况下与内源性配体或激动剂可逆地结合至受体的相同结合位点。竞争性拮抗剂可影响实现最大反应所必需的激动剂的量。在这些实施方案中的一些其他实施方案中,拮抗剂是非竞争性拮抗剂,其结合至受体的活性位点或受体的异位位点。非竞争性拮抗剂可降低可通过任何量的激动剂获得的最大反应的量值。在一些其他实施方案中,拮抗剂是无竞争性拮抗剂,在其与单独异位结合位点结合之前需要通过激动剂活化受体。

[0175] 在各种实施方案中,免疫调节组分包含抗体或抗原结合片段。免疫调节组分可以是全长蛋白或其片段。抗体或抗原结合片段可来源于天然来源或部分或全部以合成方式产生。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在这些实施方案中的一些实施方案中,单克隆抗体是IgG抗体。在某些实施方案中,单克隆抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些其他实施方案中,抗体是多克隆抗体。在某些实施方案中,抗原结合片段选自Fab、Fab'和$F(ab')_2$、$F(ab1)_2$、Fv、dAb和Fd片段。在某些实施方案中,抗原结合片段是scFv或$(scFv)_2$片段。在某些其他实施方案中,抗体或抗原结合片段是Nanobody®(单结构域抗体)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是双特异性抗体或多特异性抗体。

[0176] 在各种实施方案中,抗体或抗原结合片段是完全人类的。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是人源化的。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是嵌合的。在这些实施方案中的一些实施方案中,嵌合抗体具有非人类V区结构域和人类C区结构域。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是非人类的,诸如鼠或家畜的。

[0177] 在一些实施方案中,免疫调节组分是蛋白质、肽、糖脂或糖蛋白。

[0178] 在各种实施方案中,组合物包含两种或更多种上文所提及的免疫调节组分,包括原子、分子等的混合物、融合物、组合和缀合物。在某些实施方案中,组合物包含与多肽组合的核酸。在某些实施方案中,组合物包含两种或更多种彼此缀合的多肽。在某些实施方案中,组合物包含缀合至生物活性分子的蛋白质。在这些实施方案中的一些实施方案中,生物活性分子是前药。

[0179] 药物组合物

[0180] 药物组合物一般包含多个细胞外囊泡和呈适用于向受试者施用的形式的药学上可接受的赋形剂或载体。药学上可接受的赋形剂或载体部分由所施用的特定组合物以及由用于施用组合物的特定方法决定。因此,存在多种多样的包含多个细胞外囊泡的药物组合物的合适制剂。(参见例如Remington'sPharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.第21版(2005))。药物组合物一般被配制为无菌的,并且完全符合美国食品药物管理局(U.S.Food and Drug Administration)的所有良好生产规范(Good Manufacturing Practice,GMP)法规。

[0181] 在一些实施方案中,药物组合物包含一种或多种治疗剂和本文所述的细胞外囊泡。在一些实施方案中,细胞外囊泡与一种或多种单独治疗剂一起共施用,其中共施用包括在施用细胞外囊泡之前、在其之后或与其并行施用单独治疗剂。

[0182] 药学上可接受的赋形剂包括一般是安全、无毒且合乎需要的赋形剂,包括是兽医用途以及人类医药用途可接受的赋形剂。

[0183] 载体或稀释剂的实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和5%人类血清白蛋白。此类介质和化合物用于药学活性物质的用途在本领域中众所周知。除非任何常规介质或化合物与本文所述的细胞外囊泡不相容,否则考虑其在组合物中的使用。还可将补充治疗剂掺入组合物中。通常,药物组合物被配制成可与其预期施用途径相配。细胞外囊泡可通过肠胃外、局部、静脉内、经口、皮下、动脉内、皮内、经皮、经直肠、颅内、腹膜内、鼻内、肌内途径或以吸入剂形式来施用。在某些实施方案中,静脉内施用(例如通过注射)包含细胞外囊泡的药物组合物。细胞外囊泡可任选地与至少部分有效地治疗细胞外囊泡所预期针对的疾病、病症或疾患的其他治疗剂组合施用。

[0184] 溶液或悬浮液可包括以下组分:诸如水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂的无菌稀释剂;诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯的抗菌化合物;诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠的抗氧化剂;诸如乙二胺四乙酸(EDTA)的螯合化合物;诸如乙酸酯、柠檬酸酯或磷酸酯的缓冲剂;以及诸如氯化钠或右旋糖的用于调整张力的化合物。pH可用诸如盐酸或氢氧化钠的酸或碱来调整。制剂可封闭在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0185] 适用于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(如果是水溶性)或分散液和无菌散剂。对于静脉内施用,合适载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。组合物一般是无菌的并且流动性达到一定程度以至存在易于可注射性。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及它们的合适混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散液的情况下维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。对微生物体行动的防止可通过例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等的各种抗细菌化合物和抗真菌化合物来实现。如果需要,可将例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)和氯化钠的等张化合物添加至组合物中。可通过在组合物中包括例如单硬脂酸铝和明胶的延迟吸收的化合物来实现可注射组合物的延长吸收。

[0186] 无菌可注射溶液可按需要通过将细胞外囊泡以有效量掺入并且在适当溶剂中与本文所列举的一种成分或成分组合一起掺入来制备。一般来讲,分散液是通过将细胞外囊泡掺入含有基础分散介质和任何所需其他成分的无菌媒介物中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌散剂的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述制备方法由其先前经无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何额外所需成分的散剂。细胞外囊泡可以呈贮库型注射剂或植入式制剂的形式施用,所述贮库型注射剂或植入式制剂可按使得允许细胞外囊泡持续或脉冲式释放的方式来配制。

[0187] 包含细胞外囊泡的组合物的全身性施用还可通过经粘膜手段来进行。对于经粘膜施用,在制剂中使用适合于待渗透的障壁的渗透剂。此类渗透剂在本领域中是公知的,并且对于经粘膜施用,包括例如清洁剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜施用可经由使用例如鼻喷剂来实现。

[0188] 在某些实施方案中,将包含细胞外囊泡的药物组合物静脉内施用至将受益于药物组合物的受试者中。在某些其他实施方案中,例如通过淋巴管内注射或通过结节内注射(参见例如Senti等人,PNAS105(46):17908(2008))或通过肌内注射、通过皮下施用、通过直接注射至胸腺中或至肝脏中来将组合物施用至淋巴系统。

[0189] 在某些实施方案中,将包含细胞外囊泡的药物组合物以液体悬浮液的形式施用。在某些实施方案中,将药物组合物以能够在施用后形成贮库的制剂的形式施用。在某些优选实施方案中,贮库将细胞外囊泡缓慢地释放至循环中,或保持呈贮库形式。

[0190] 通常,药学上可接受的组合物被高度纯化为不含污染物,具有生物相容性并且不具有毒性,并且适合于向受试者施用。如果水是载体的成分,则水经高度纯化并且被处理为不含例如内毒素的污染物。

[0191] 药学上可接受的载体可以是乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯啶酮、纤维素、水、糖浆、甲

基纤维素、苯甲酸甲基羟酯、苯甲酸丙基羟酯、滑石、硬脂酸镁和/或矿物油,但不限于此。药物组合物可还包含润滑剂、润湿剂、甜味剂、香味增强剂、乳化剂、悬浮剂和/或防腐剂。

[0192] 本文所述的药物组合物包含本文所述的细胞外囊泡和任选的药学活性剂或治疗剂。治疗剂可以是生物剂、小分子剂或核酸剂。

[0193] 提供包含本文所述的包含细胞外囊泡的药物组合物的剂型。在一些实施方案中,剂型被配制为液体悬浮液以用于静脉内注射。

[0194] 在某些实施方案中,使细胞外囊泡制剂经受例如X射线、γ射线、β粒子、α粒子、中子、质子、元素核、UV射线的放射以便损坏残余复制胜任型核酸。

[0195] 在某些实施方案中,使用超过1、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100或超过100kGy的照射剂量使细胞外囊泡制剂经受γ照射。

[0196] 在某些实施方案中,使用超过0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000或超过10000mSv的照射剂量使细胞外囊泡制剂经受X射线照射。

[0197] 方法

[0198] 本公开的方面还包括产生包含细胞外囊泡和免疫调节组分的组合物的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:从生产细胞中获得细胞外囊泡,其中生产细胞天然地含有免疫调节组分;以及任选地分离所获得的细胞外囊泡。在一些实施方案中,所述方法包括:用免疫调节组分修饰生产细胞;从修饰的生产细胞中获得细胞外囊泡;以及任选地分离所获得的细胞外囊泡。在一些其他实施方案中,所述方法包括:从生产细胞中获得细胞外囊泡;分离所获得的细胞外囊泡;以及用免疫调节组分修饰分离的细胞外囊泡。在某些实施方案中,所述方法还包括将分离的细胞外囊泡配制到药物组合物中。

[0199] 产生细胞外囊泡的方法

[0200] 用免疫调节组分修饰生产细胞的方法

[0201] 在各种实施方案中,所述方法包括用免疫调节组分修饰生产细胞。

[0202] 生产细胞可以是哺乳动物细胞系、植物细胞系、昆虫细胞系、真菌细胞系或原核细胞系。在某些实施方案中,生产细胞系哺乳动物细胞系。哺乳动物细胞系包括但不限于人类胚肾(HEK)细胞系、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、HT-1080细胞系、海拉细胞系(HeLa cell line)、PERC-6细胞系、CEVEC细胞系、成纤维细胞系、羊水细胞系、上皮细胞系和间充质干细胞(MSC)细胞系。在一些优选实施方案中,哺乳动物细胞系可以是HEK-293细胞、BJ人类包皮成纤维细胞、fHDF成纤维细胞、AGE.HN®神经元前体细胞、CAP®羊水细胞、脂肪间充质干细胞或RPTEC/TERT1细胞。生产细胞还可以是原代细胞。在各种实施方案中,原代细胞可以是原代哺乳动物细胞、原代植物细胞、原代昆虫细胞、原代真菌细胞或原代原核细胞。

[0203] 在某些优选实施方案中,生产细胞是免疫细胞,诸如树突状细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、抗原呈递细胞、巨噬细胞、T辅助细胞或调节性T细胞(Treg细胞)。

[0204] 在各种实施方案中,免疫调节组分可在生产细胞中由通过转染(参见例如Bacchetti S,Graham FL(1977年4月)."Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA".Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.74(4):1590-4;Kriegler M(1991).Transfer and Expression:ALaboratory

Manual.W.H.Freeman.第96-97页;Felgner PL,Gadek TR,Holm M,Roman R,Chan HW,Wenz M,Northrop JP,Ringold GM,Danielsen M(1987年11月)."Lipofection:a highly efficient,lipid-mediated DNA-transfection procedure".Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.84(21):7413-7;Felgner JH,Kumar R,Sridhar CN,Wheeler CJ,Tsai YJ,Border R,Ramsey P,Martin M,Felgner PL(1994年1月)."Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations".The Journal of Biological Chemistry.269(4):2550-61)、病毒转导(参见例如,Griffiths AJ,Miller JH,Suzuki DT,Lewontin RC,Gelbart WM(2000)."Transduction".An Introduction to Genetic Analysis(第7版))、电穿孔(参见例如Neumann,E;Schaefer-Ridder,M;Wang,Y;Hofschneider,PH(1982)."Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields".The EMBO Journal.1(7):841-5))、挤出(参见例如Sharei A,Zoldan J,Adamo A,Sim WY,Cho N,Jackson E,Mao S,Schneider S,Han MJ,Lytton-Jean A,Basto PA,Jhunjhunwala S,Lee J,Heller DA,Kang JW,Hartoularos GC,Kim KS,Anderson DG,Langer R,Jensen KF(2013年2月)."A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery".Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.110(6):2082-7)、超声处理(参见例如Yizhi Song(2007)."Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria".Nucleic Acids Res.35(19):e129.)、细胞融合(参见例如Felgner PL,Gadek TR,Holm M,Roman R,Chan HW,Wenz M,Northrop JP,Ringold GM,Danielsen M(1987年11月)."Lipofection:a highly efficient,lipid-mediated DNA-transfection procedure".Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.84(21):7413-)或本领域技术人员已知的其他方法而引入生产细胞中的转基因或mRNA表达。

[0205] 在某些实施方案中,通过转染将免疫调节组分引入生产细胞中。在一些实施方案中,可使用诸如阳离子型脂质和聚合物的合成巨分子将免疫调节组分引入合适生产细胞中(Papapetrou等人,Gene Therapy 12:S118-S130(2005))。在一些实施方案中,阳离子型脂质经由电荷相互作用与免疫调节组分一起形成复合物。在这些实施方案中的一些实施方案中,带正电的复合物结合至带负电的细胞表面并且由细胞通过内吞作用摄取。在一些其他实施方案中,阳离子型聚合物可用于转染生产细胞。在这些实施方案中的一些实施方案中,阳离子型聚合物是聚乙烯亚胺(PEI)。在某些实施方案中,可使用诸如磷酸钙、环糊精或聚凝胺的化学物质以将免疫调节组分引入生产细胞中。还可使用诸如粒子介导的转染、“基因枪(gene gun)”、基因枪(biolistics)或粒子轰击技术的物理方法将免疫调节组分引入生产细胞中(Papapetrou等人,Gene Therapy 12:S118-S130(2005))。诸如(例如)β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、荧光素酶或绿荧光蛋白的报告基因可用于评估生产细胞的转染效率。

[0206] 在某些实施方案中,通过病毒转导将免疫调节组分引入生产细胞中。多种病毒可用作基因转移媒介物,这些病毒包括莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、慢病毒和泡沫病毒。病毒介导的基因转移媒介物包括基于诸如

腺病毒、腺相关病毒和疱疹病毒的DNA病毒的载体以及基于反转录病毒的载体。

[0207] 在某些实施方案中,通过电穿孔将免疫调节组分引入生产细胞中。电穿孔在细胞膜中产生瞬时孔隙,允许将各种分子引入细胞中。在一些实施方案中,可通过电穿孔将DNA和RNA以及多肽和非多肽治疗剂引入生产细胞中。

[0208] 在某些实施方案中,通过显微注射将免疫调节组分引入生产细胞中。在一些实施方案中,可使用玻璃微量吸液管以将免疫调节组分以微量水平注入生产细胞中。

[0209] 在某些实施方案中,通过挤出将免疫调节组分引入生产细胞中。

[0210] 在某些实施方案中,通过超声处理将免疫调节组分引入生产细胞中。在一些实施方案中,使生产细胞暴露于高强度声波,引起细胞膜瞬时破坏,从而允许负载免疫调节组分。

[0211] 在某些实施方案中,通过细胞融合将免疫调节组分引入生产细胞中。在一些实施方案中,通过电细胞融合引入免疫调节组分。在一些其他实施方案中,使用聚乙二醇(PEG)以融合生产细胞。在一些其他实施方案中,使用仙台病毒以融合生产细胞。

[0212] 在一些实施方案中,通过低渗透压溶解将免疫调节组分引入生产细胞中。在这些实施方案中的一些实施方案中,使生产细胞暴露于低离子强度缓冲剂,使其破裂,从而允许负载免疫调节组分。在一些替代实施方案中,使用针对低渗透压溶液的受控渗析以便使生产细胞溶胀并且在生产细胞膜中产生孔隙。随后,使生产细胞暴露于允许再密封膜的条件。

[0213] 在一些实施方案中,通过清洁剂处理将免疫调节组分引入生产细胞中。在某些实施方案中,用温和清洁剂处理生产细胞,此举通过产生孔隙来瞬时损害生产细胞膜,从而允许负载免疫调节组分。在负载生产细胞之后,将清洁剂洗涤掉,由此再密封膜。

[0214] 在一些实施方案中,通过受体介导的内吞作用将免疫调节组分引入生产细胞中。在某些实施方案中,生产细胞具有表面受体,所述表面受体在结合免疫调节组分时诱导受体和相关免疫调节组分的内化。

[0215] 在一些实施方案中,通过过滤将免疫调节组分引入生产细胞中。在某些实施方案中,可迫使生产细胞和免疫调节组分通过孔隙尺寸小于生产细胞的过滤器,引起生产细胞膜瞬时破坏并且允许免疫调节组分进入生产细胞中。

[0216] 在一些实施方案中,使生产细胞经受若干次冻融循环,引起细胞膜破坏,从而允许负载免疫调节组分。

[0217] 用免疫调节组分修饰细胞外囊泡的方法

[0218] 在各种替代实施方案中,在分离细胞外囊泡之后将免疫调节组分直接引入细胞外囊泡中。

[0219] 在某些实施方案中,通过转染将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在一些实施方案中,可使用诸如阳离子型脂质和聚合物的合成巨分子将免疫调节组分引入细胞外囊泡中(Papapetrou等人,Gene Therapy 12:S118-S130(2005))。在某些实施方案中,可使用诸如磷酸钙、环糊精或聚凝胺的化学物质以将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。

[0220] 在某些实施方案中,通过电穿孔将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在一些实施方案中,使细胞外囊泡暴露于电场,此举在细胞外囊泡膜中产生瞬时孔,从而允许负载免疫调节组分。

[0221] 在某些实施方案中,通过显微注射将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在一些实

施方案中,可使用玻璃微量吸液管以将免疫调节组分以微量水平直接注入细胞外囊泡中。

[0222] 在某些实施方案中,通过挤出将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。

[0223] 在某些实施方案中,通过超声处理将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在一些实施方案中,使细胞外囊泡暴露于高强度声波,引起细胞外囊泡膜瞬时破坏,从而允许负载免疫调节组分。

[0224] 在一些实施方案中,可使免疫调节组分缀合至细胞外囊泡的表面。缀合可通过本领域中已知的方法以化学方式或以酶方式实现。

[0225] 在一些实施方案中,细胞外囊泡包含以化学方式缀合的免疫调节组分。化学缀合可通过在使用或不使用接头的情况下共价键合免疫调节组分与另一分子来实现。此类缀合物的形成是在技术人员的技能内并且已知用于实现缀合的各种技术,并且选择由待缀合的材料所导引的特定技术。在某些实施方案中,使多肽缀合至细胞外囊泡。在某些其他实施方案中,使诸如脂质、碳水化合物、核酸和小分子的非多肽缀合至细胞外囊泡。

[0226] 在一些实施方案中,通过低渗透压溶解将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在这些实施方案中的一些实施方案中,使细胞外囊泡暴露于低离子强度缓冲剂,使其破裂,从而允许负载免疫调节组分。在一些替代实施方案中,使用针对低渗透压溶液的受控渗析以便使细胞外囊泡溶胀并且在细胞外囊泡膜中产生孔隙。随后,使细胞外囊泡暴露于允许再密封膜的条件。

[0227] 在一些实施方案中,通过清洁剂处理将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在某些实施方案中,用温和清洁剂处理细胞外囊泡,此举通过产生孔隙来瞬时损害细胞外囊泡膜,从而允许负载免疫调节组分。在负载细胞外囊泡之后,将清洁剂洗涤掉,由此再密封膜。

[0228] 在一些实施方案中,通过受体介导的内吞作用将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在某些实施方案中,细胞外囊泡具有表面受体,所述表面受体在结合免疫调节组分时诱导受体和相关免疫调节组分的内化。

[0229] 在一些实施方案中,通过机械燃烧将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在某些实施方案中,可用连接至诸如金微载体的重粒子或带电粒子的免疫调节组分轰击细胞外囊泡。在这些实施方案中的一些实施方案中,可以机械方式或以电气方式加速粒子以使得粒子横穿细胞外囊泡膜。

[0230] 在一些实施方案中,通过过滤将免疫调节组分引入细胞外囊泡中。在某些实施方案中,可迫使细胞外囊泡和免疫调节组分通过孔隙尺寸小于细胞外囊泡的过滤器,引起细胞外囊泡膜瞬时破坏并且允许免疫调节组分进入细胞外囊泡中。

[0231] 在一些实施方案中,使细胞外囊泡经受若干次冻融循环,引起细胞外囊泡膜破坏,从而允许负载免疫调节组分。

[0232] 分离细胞外囊泡的方法

[0233] 可将细胞外囊泡从生产细胞中分离。在某些实施方案中,细胞外囊泡由生产细胞释放至细胞培养基中。预期分离细胞外囊泡的所有已知方式均视为适用于本文中。举例而言,可采用细胞外囊泡的物理特性以将细胞外囊泡与介质或其他源材料分离,所述分离包括基于电荷的分离(例如电泳分离)、基于尺寸的分离(例如过滤、分子筛分等)、基于密度的分离(例如常规离心或梯度离心)、基于Svedberg常数的分离(例如在具有或不具有外力的情况下的沉降等)。可替代地或除此之外,分离可基于一种或多种生物特性,并且包括可采

用表面标记物的方法(例如用于沉淀、与固相的可逆结合、FACS分离、特异性配体结合、非特异性配体结合、亲和纯化等)。

[0234] 分离和富集可按通常包括连续离心的一般并且非选择性方式进行。可替代地,分离和富集可按诸如使用细胞外囊泡或生产细胞特异性表面标记物的更具特异性和选择性的方式进行。举例而言,特异性表面标记物可用于免疫沉淀、FACS分选、亲和纯化和与珠粒结合配体的磁力分离。

[0235] 在一些实施方案中,可利用尺寸排阻色谱法以分离细胞外囊泡。尺寸排阻色谱技术是本领域已知的。本文提供了示例性的非限制性技术。在一些实施方案中,空隙体积级分经分离并且包含目标细胞外囊泡。此外,在一些实施方案中,可在如本领域中公知的通过离心技术(对一种或多种色谱法级分)进行色谱分离之后进一步分离细胞外囊泡。在一些实施方案中,举例而言,可利用密度梯度离心以进一步分离细胞外囊泡。在某些实施方案中,进一步分离生产细胞来源的细胞外囊泡与其他起源的细胞外囊泡可以是合乎需要的。举例而言,可通过使用对生产细胞具有特异性的抗原抗体进行免疫吸附捕获来使生产细胞来源的细胞外囊泡与非生产细胞来源的细胞外囊泡分离。

[0236] 在一些实施方案中,细胞外囊泡分离可涉及多种方法的组合,所述方法包括但不限于差速离心、基于尺寸的膜过滤、免疫沉淀、FACS分选和磁力分离。

[0237] 测量细胞外囊泡尺寸的方法

[0238] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括测量细胞外囊泡和/或细胞外囊泡群的尺寸。一般来讲,细胞外囊泡尺寸测量是最长可测量尺寸。一般来讲,细胞外囊泡的最长可测量尺寸还称为其直径。

[0239] 细胞外囊泡尺寸可使用动态光散射(DLS)和/或多角度光散射(MALS)来测量。使用DLS和/或MALS测量细胞外囊泡尺寸的方法是本领域技术人员已知的,并且包括纳米粒子追踪测定(NTA,例如使用Malvern NanoSight NS300纳米粒子追踪装置)。在特定实施方案中,使用Malvern NanoSight NS300测定细胞外囊泡尺寸。在一些实施方案中,如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,本文所述的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,本文所述的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,90%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,95%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,99%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,90%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,95%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过NTA(例如,使用Malvern NanoSight NS300)所测量,99%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。

[0240] 细胞外囊泡尺寸可使用可调电阻脉冲传感(TRPS)来测量。在特定实施方案中,使

用iZON qNANO Gold来测定如通过TRPS所测量的细胞外囊泡尺寸。在一些实施方案中,如通过TRPS(例如,使用iZON qNano Gold)所测量,本文所述的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,如通过TRPS(例如,iZON qNano Gold)所测量,本文所述的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过TRPS(例如,使用iZON qNano Gold)所测量,90%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过TRPS(例如,使用iZON qNano Gold)所测量,95%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过TRPS(例如,使用iZON qNano Gold)所测量,99%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过TRPS(例如,使用iZON qNano Gold)所测量,90%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过TRPS(例如,使用iZON qNano Gold)所测量,95%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过TRPS(例如,使用iZON qNano Gold)所测量,99%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。

[0241] 细胞外囊泡尺寸可使用电子显微镜法来测量。在一些实施方案中,用于测量细胞外囊泡尺寸的电子显微镜法是透射电子显微镜法。在特定实施方案中,用于测量细胞外囊泡尺寸的透射电子显微镜是Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN。使用电子显微镜测量细胞外囊泡尺寸的方法是本领域的技术人员所熟知的,并且任何这种方法都可适合于测量细胞外囊泡尺寸。在一些实施方案中,如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,本文所述的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,本文所述的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,90%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,95%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,99%的细胞外囊泡的最长尺寸为约20-300nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,90%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,95%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。在其他实施方案中,本文所述的细胞外囊泡群包含群体,其中如通过扫描电子显微镜(例如Tecnai™ G^2 Spirit BioTWIN扫描电子显微镜)所测量,99%的细胞外囊泡的最长尺寸为约40-200nm。

[0242] 用于测定巨噬细胞极化的方法

[0243] 本文公开了用于使用包含一种或多种抑制巨噬细胞靶基因表达的免疫调节组分的细胞外囊泡增加从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化的方法和组合物。组合物优先由巨噬细胞摄取(相较于诸如T细胞、B细胞、巨噬细胞或树突状细胞的其他细胞类型而言),并且在

增加巨噬细胞极化方面与等摩尔量的单独免疫调节组分相比效果相同或更为有效。包括检测巨噬细胞的M2和M1表型的用于测定巨噬细胞极化的方法可通过本领域中已知的用于测定M2和M1表型的任何方法来执行。可针对泛巨噬细胞以及M2和M1巨噬细胞的标记物对组织切片(例如来自肿瘤活检物)、血液样品等进行测定(例如染色),所述标记物包括但不限于M2细胞表面标记物(例如YM1、FIZZ1、Dectin-1、MGL)、M2相关细胞因子(例如IL-10、TGFβ、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22和CCL24)、M1相关细胞因子(例如INFγ、IL-12、IL-23、TNFα、IL-6、IL-1、CCL5、CSCL9、CXCL10和CXCL11)、生长因子(例如VEGF-A、VEGF-C、EGF和TGF-β)、酶(例如基质金属蛋白酶MMP2、MMP9、半胱氨酸组织蛋白酶)、M2相关miRNA(例如miRNA146a、miRNA let 7b和miR-223)和/或M1相关miRNA(例如miRNA155、miR-33)。参见例如Mosser,D.M.,&Edwards,J.P.(2008).Exploring the full spectrum of macrophage activation.Nature Reviews Immunology,8(12),958-969;Murray,P.J.,Allen,J.E.,Biswas,S.K.,Fisher,E.A.,Gilroy,D.W.,Goerdt,S.,Wynn,T.A.(2014).Macrophage activation and polarization:nomenclature and experimental guidelines.Immunity,41(1),14-20。样品内的巨噬细胞和/或巨噬细胞组分、分泌物或巨噬细胞活动(参见例如Gautier,E.L.,Shay,T.,Miller,J.,Greter,M.,Jakubzick,C.,Ivanov,S.,Randolph,G.J.(2007).Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity,Nature Immunology13(11),1118-1128)可通过流式细胞术、免疫组织化学、免疫印迹法、定量PCR或本领域中已知的检测生物样品中的细胞或细胞产物的任何其他方法来检测。

[0244] 治疗癌症的方法

[0245] 此外,本文提供了治疗受试者的癌症的方法。

[0246] 在各种实施方案中,向患有癌症的受试者施用具有包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡(例如外泌体)的组合物,所述一种或多种免疫调节组分抑制至少一种基因并由此增加从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化。在这些实施方案中的一些实施方案中,组合物可上调免疫反应并且增强受试者的免疫系统的肿瘤靶向。在一些方面,增加的从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化本身上调受试者的免疫反应并且增强受试者的免疫系统的肿瘤靶向。一些作者提及M2d亚型活化作为对IL-6和腺苷的反应,并且这些巨噬细胞还称为肿瘤相关巨噬细胞(TAM)。参见例如Rőszer,T.(2015).Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms.Mediators of Inflammation,2015,1-16;Funes,S.C.,Rios,M.,Escobar-Vera,J.和Kalergis,A.M.(2018).Implications of macrophage polarization in autoimmunity.Immunology,154(2),186-195;以及Q.Wang,H.Ni,L.Lan,X.Wei,R.Xiang和Y.Wang,"Fra-1protooncogene regulates IL6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages,"Cell Research,第20卷,第6号,第701-712页,2010。肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的典型之处在于它们诸如癌细胞运动性促进、癌转移形成和血管生成的促肿瘤功能,并且它们的形成取决于在发展肿瘤中存在的微环境因子。TAM产生免疫抑制性细胞因子(如IL-10、TGFβ、PGE2和极少量的NO或ROI)和低水皮的炎性细胞因子(IL-12、IL-1β、TNFα、IL-6)。TAM呈递肿瘤相关抗原的能力以及T细胞和NK细胞的抗肿瘤功能的刺激降低。此外,TAM

不能够溶解肿瘤细胞。https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization-cite_note-Sica2008-31如已经由递送剂以改变TAM的募集和分布、耗竭现存TAM或诱导TAM从M2表型向M1表型的再教育所证实,TAM靶向可以是新颖抗癌治疗策略。参见例如Lewis,Claire E.,and Jeffrey W.Pollard."Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments."Cancer research 66.2(2006):605-612;Sica,Antonio等人"Macrophage polarization in tumour progression."Seminars in Cancer Biology.第18卷.第5期.Academic Press,2008;Sica,Antonio等人Autocrine production of IL-10mediates defective IL-12production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages.J Immunol.2000年1月15日;164(2):762-7;Cuccarese,Michael F.;Dubach,J.Matthew;Pfirschke,Christina;Engblom,Camilla;Garris,Christopher;Miller,Miles A.;Pittet,Mikael J.;Weissleder,Ralph(2017-02-08)."Heterogeneity of macrophage infiltration and therapeutic response in lung carcinoma revealed by 3D organ imaging".Nature Communications.8:14293;Zeisberger,S M;Odermatt,B;Marty,C;Zehnder-Fjällman,A H M;Ballmer-Hofer,K;Schwendener,R A(2006-07-11)."Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages:anew and highly effective antiangiogenic therapy approach".British Journal of Cancer.95(3):272-281;Rodell,Christopher B.;Arlauckas,Sean P.;Cuccarese,Michael F.;Garris,Christopher S.;Li,Ran;Ahmed,Maaz S.;Kohler,Rainer H.;Pittet,Mikael J.;Weissleder,Ralph(2018-05-21)."TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy".Nature Biomedical Engineering;Guerriero,Jennifer L.;Sotayo,Alaba;Ponichtera,Holly E.;Castrillon,Jessica A.;Pourzia,Alexandra L.;Schad,Sara;Johnson,Shawn F.;Carrasco,Ruben D.;Lazo,Suzan(2017年3月)."Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages".Nature.543(7645):428-432。

[0247] 在一些实施方案中,所治疗的癌症的特征在于白细胞(T细胞、B细胞、巨噬细胞、树突状细胞、单核细胞)向肿瘤微环境或所谓的“热肿瘤”或“炎性肿瘤”中的浸润。在一些实施方案中,所治疗的癌症的特征在于低水平或不可检测水平的白细胞向肿瘤微环境或所谓的“冷肿瘤”或“非炎性肿瘤”中的浸润。在一些实施方案中,组合物的施用量和持续时间足以将“冷肿瘤”转化成“热肿瘤”,即所述施用导致白细胞(诸如T细胞)浸润至肿瘤微环境中。

[0248] 在一些实施方案中,组合物包含细胞外囊泡和超过一种免疫调节组分的组合,所述超过一种免疫调节组分包括促进从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化的组分,和另外增强免疫反应的组分,诸如检查点阻断抑制剂,例如靶向CTLA-4的伊匹单抗、靶向PD-1的纳武单抗、赛咪单抗和派姆单抗以及各自靶向PD-L1的阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐鲁单抗;和CSFR-1的抑制剂,诸如吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、埃玛图单抗、AMG820、IMC-CS4和卡比拉单抗。作为用于患有癌症的受试者的治疗的这些组合物施用可进一步上调免疫反应并且经由免疫调节组分的组合作用增强受试者的免疫系统的肿瘤靶向。

[0249] 在一些实施方案中,额外免疫调节组分是靶向CTLA-4、PD-1、PD-L1或CSF1-R的抗体或活性片段。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与伊匹单抗的CDR至少90％、91％、

92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与纳武单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与赛咪单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与派姆单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与阿特珠单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与阿维鲁单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与度伐鲁单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与吡昔替尼的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与PLX7486的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与ARRY-382的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与JNJ-40346527的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与BLZ945的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与埃玛图单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与AMG820的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与IMC-CS4的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。在实施方案中,抗体或其活性片段包含与卡比拉单抗的CDR至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的CDR。

[0250] 在一些实施方案中,向受试者施用包含细胞外囊泡和免疫调节组分的组合物作为癌症疫苗。在这些实施方案中的一些实施方案中,向受试者施用组合物作为个人化癌症疫苗。在一些实施方案中,免疫调节组分是肿瘤抗原或来源于肿瘤抗原的肽。合适肿瘤抗原的实例包括:甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、粘蛋白1(MUC1)、Tn-MUC1、粘蛋白16(MUC16)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、肿瘤蛋白p53(p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡配体2(PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、间皮素、VEGFR、α叶酸受体、CE7R、IL-3、癌症-睾丸抗原、MART-1gp100和TNF相关细胞凋亡诱导配体。在某些实施方案中,肿瘤抗原来源于参考基因组序列。在某些实施方案中,肿瘤抗原来源于接受组合物的受试者的基因组序列。

[0251] 可用组合物治疗的癌症包括但不限于表5中所列出的癌症。

[0252] 调节巨噬细胞中的基因表达、转录网络和极化的方法

[0253] 一些实施方案提供了调节巨噬细胞中的基因表达的方法,所述方法包括向受试者施用包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡,其中所述免疫调节组分靶向基因,并且其中所述调节等于或大于通过施用等摩尔量的靶向基因的游离免疫调节组分所产生的调

节。还提供了抑制巨噬细胞中的基因表达的方法,所述方法包括向受试者施用包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡,其中所述免疫调节组分靶向基因,并且其中所述抑制等于或大于通过施用等摩尔量的靶向基因的游离免疫调节组分所产生的抑制。一些实施方案提供了阻遏巨噬细胞中的基因的下游靶标的方法,所述方法包括向受试者施用包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡,其中所述免疫调节组分靶向基因,并且其中所述阻遏等于或大于通过施用等摩尔量的靶向基因的游离免疫调节组分所产生的阻遏。一些实施方案提供了改变巨噬细胞群的极化的方法,所述方法包括向受试者施用包含一种或多种免疫调节组分的细胞外囊泡,其中所述免疫调节组分靶向基因,并且其中所述极化改变等于或大于通过施用等摩尔量的靶向基因的游离免疫调节组分所产生的极化改变。在一些实施方案中,细胞外囊泡是外泌体。在一些实施方案中,免疫调节组分是ASO。在一些实施方案中,极化中的改变是从M2表型向M1表型的变化。

[0254] 治疗纤维化疾患的方法

[0255] 此外,本文提供了治疗受试者的纤维化疾患的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的包含有包含免疫调节组分的外泌体的组合物,所述免疫调节组分将巨噬细胞从M2表型再极化成M1表型。在一些实施方案中,纤维化疾患是肺纤维化、肝纤维化或胰腺纤维化。在某些实施方案中,肝纤维化是非酒精性脂肪性肝炎或NASH。参见例如参见Mayo Clinic Staff."Definition[of pulmonary fibrosis]".Mayo Foundation for Medical Education and Research.原始内容存档于2014年7月15日.于2014年7月26日检索,可在webmayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353690在全球范围内找到;Ferri FF.Idiopathic pulmonary fibrosis.Ferri'sClinical Advisor 2016.Philadelphia,Pa.:Mosby Elsevier;2016;Gross TJ,Hunninghake GW(2001)."Idiopathic pulmonary fibrosis".N Engl J Med.345(7):517-525;Friedman LS(2014).Current medical diagnosis and treatment 2014.[S.l.]:Mcgraw-Hill.pp.第16章.Liver,Biliary Tract,&Pancreas Disorders;Chalasani N,Younossi Z,Lavine JE,Charlton M,Cusi K,Rinella M,Harrison SA,Brunt EM,Sanyal AJ(2018年1月)."The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease:Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases".Hepatology.67(1):328-357;Xue J,Sharma V,Hsieh MH,Chawla A,Murali R,Pandol SJ,Habtezion A.Nat Commun.2015年5月18日;6:7158。

[0256] 施用模式

[0257] 在一些实施方案中,将组合物静脉内施用至受试者循环系统。在一些实施方案中,将组合物输注在合适液体中并且施用至受试者静脉中。

[0258] 在一些实施方案中,将组合物动脉内施用至受试者循环系统。在一些实施方案中,将组合物输注在合适液体中并且施用至受试者动脉中。

[0259] 在一些实施方案中,通过鞘内施用向受试者施用组合物。在一些实施方案中,将组合物经由注射剂施用至椎管中,或施用至蛛网膜下隙中以使得组合物到达脑脊液(CSF)。

[0260] 在一些实施方案中,通过鼻内施用向受试者施用组合物。在一些实施方案中,可以局部施用或全身性施用的形式经由鼻吹入组合物。在某些实施方案中,将组合物以鼻喷剂形式施用。

[0261] 在一些实施方案中,通过腹膜内施用向受试者施用组合物。在一些实施方案中,将组合物输注在合适液体中并且注射至受试者腹膜中。在一些实施方案中,所述腹膜内施用导致组合物(例如组合物中的细胞外囊泡)分布至淋巴管。在一些实施方案中,所述腹膜内施用导致组合物(例如组合物中的细胞外囊泡)分布至胸腺、脾脏和/或骨髓。在一些实施方案中,所述腹膜内施用导致组合物(例如组合物中的细胞外囊泡)分布至一个或多个淋巴结。在一些实施方案中,所述腹膜内施用导致组合物(例如组合物中的细胞外囊泡)分布至颈部淋巴结、腹股淋巴结、纵隔淋巴结或胸骨淋巴结中的一者或多者。在一些实施方案中,所述腹膜内施用导致组合物(例如组合物中的细胞外囊泡)分布至胰脏。

[0262] 在一些实施方案中,通过眼周施用向受试者施用组合物。在一些实施方案中,将组合物注射至眼周组织中。眼周药物施用包括结膜下、前房眼球筋膜囊下、后房眼球筋膜囊下和眼球后施用途径。

[0263] 在一些实施方案中,通过多种施用途径将组合物施用至同一受试者中。在一些实施方案中,所述多种施用途径包括静脉内施用、动脉内施用、鞘内施用、鼻内施用、腹膜内施用和/或眼周施用。在优选实施方案中,所述多种施用途径包括静脉内施用和腹膜内施用。

[0264] 在某些实施方案中,细胞外囊泡的剂量在1ng至10ng、10ng至100ng、100ng至1μg、1μg至5μg、5μg至10μg、10μg至50μg、50μg至75μg、75μg至100μg、100μg至150μg、150μg至200μg、200μg至300μg、300μg至500μg、500μg至1mg或1mg至10mg之间。

[0265] 可向受试者施用一次组合物。可替代地,可在一段时间内执行多次施用。举例而言,可给与受试者两次、三次、四次、五次或更多次施用。在一些实施方案中,可按照需要给与施用例如持续与疾病、病症或疾患相关症状持续时间一样长的时间。在一些实施方案中,可针对受试者生命的剩余时间指定重复施用。治疗期可变化并且可例如不超过一年、六个月、三个月、两个月、一个月、两周、一周、三天、两天或不超过一天。

[0266] 在某些实施方案中,以诸如每日一次、每隔一天、每周一次、每周两次、每月一次或每月两次的间隔施用细胞外囊泡的剂量。

[0267] 在一些实施方案中,以足以有效地使靶细胞或组织中的免疫调节组分的浓度增加至高于与疾病、病症或疾患症状相关联的水平的频率施用药物组合物。

[0268] 在一些实施方案中,在治疗期内至少两次施用组合物以使得治疗疾病、病症或疾患,或改善其症状。在一些实施方案中,在治疗期内至少两次施用组合物以使得治疗疾病、病症或疾患,或预防其症状。在一些实施方案中,在治疗期内施用足够次数的药物组合物以使得在治疗期间将足够量的免疫调节组分递送至靶细胞或组织。在一些实施方案中,在治疗期内施用足够次数的药物组合物以使得在治疗期间将足够量的免疫调节组分递送至靶细胞或组织,以使得预防、减轻、改善或延迟疾病、病症或疾患的一种或多种症状。在一些实施方案中,增加靶细胞或组织中的免疫调节组分浓度包括增加峰值浓度,而在其他实施方案中,其包括增加平均浓度。在一些实施方案中,治疗期间的实质性增加可通过比较受试者中的治疗期前或治疗期后或通过比较在经历治疗的群体中进行的测量与经匹配的未经治疗的对照种群中进行的测量来确定。

[0269] 在一些实施方案中,每个治疗期施用足够次数的药物组合物,使得靶细胞或组织中的免疫调节组分的浓度增加持续至少约一周、两周、三周、四周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或超过六个月。在一些实施方案中,每个治疗期施用足够次数的药

物组合物,使得靶细胞或组织中的免疫调节组分的浓度增加持续至少与治疗期一样长的时间。

[0270] 在一些实施方案中,治疗期内重复施用之间的时间间隔不会比循环中的细胞外囊泡的数目减少至小于所施用药物组合物中所存在细胞外囊泡数目的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的时间更长。

[0271] 在一些实施方案中,治疗方法还包括在注射合适治疗剂量的具有治疗剂的细胞外囊泡之前,注射一次或多次剂量的非治疗性细胞外囊泡。在某些实施方案中,将非治疗性细胞外囊泡与治疗性细胞外囊泡分开施用,并且以不同于治疗性细胞外囊泡的剂量施用。在某些实施方案中,非治疗性细胞外囊泡的剂量大于治疗性细胞外囊泡的剂量。在某些其他实施方案中,非治疗性细胞外囊泡的剂量小于治疗性细胞外囊泡的剂量。在某些实施方案中,非治疗性细胞外囊泡的剂量与治疗性细胞外囊泡的剂量相同。在各种实施方案中,在注射合适剂量的治疗性细胞外囊泡之前先注射非治疗性细胞外囊泡的方法减少了肝脏、肺脏和/或脾脏中的治疗性细胞外囊泡的更新。参见共有PCT申请PCT/US2017/047794,所述申请出于所有目的以引用方式并入本文。

[0272] 至少部分地基于靶组织、靶细胞类型、施用方式、细胞外囊泡的物理特征(例如尺寸,并且在一些情况下指分子的递送程度)和其他决定因素提供有效量的组合物。一般来讲,有效量的组合物提供有效的靶细胞细胞反应。增加的效率可由宿主受试者的增加的细胞转染(即,经细胞外囊泡成分转染的细胞的百分比)、增加的细胞反应或减少的先天性免疫反应来证实。

[0273] 细胞外囊泡及其药物组合物的施用剂量和频率可例如由主治医师基于诸如疾病严重程度、患者年龄、性别和饮食、任何炎症的严重程度、施用时间和其他临床因素的各种因素来决定。在实施例中,静脉内施用是以最低限度有效的剂量开始,并且在经预先选择的时程内增加剂量直至观测到正效应为止。随后,将递增的剂量增加限于产生有效对应增加的水平,同时考虑可能出现的任何副作用。

[0274] 另外的实施方案

[0275] 其他方面和实施方案提供于以下编号项目中。

[0276] 1.一种细胞外囊泡,所述细胞外囊泡包含一种或多种核酸分子,所述一种或多种核酸分子抑制至少一种基因并由此增加从M2表型向M1表型的巨噬细胞极化。

[0277] 2.如实施方案1所述的细胞外囊泡,其中所述细胞外囊泡是外泌体。

[0278] 3.如实施方案1或2所述的细胞外囊泡,其中所述核酸是抑制性RNA。

[0279] 4.如实施方案1-3中任一项所述的细胞外囊泡,其中所述抑制性RNA是反义RNA、siRNA、ShRNA、miRNA、lncRNA或前体miRNA。

[0280] 5.如实施方案1-4中任一项所述的细胞外囊泡,其中所述至少一种基因选自由以下组成的组:

[0281] KRAS、HRAS、NRAS、HIF1-α、HIF1-β、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC和c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶和PKM2。

[0282] 6.如实施方案5所述的细胞外囊泡,其中所述基因是KRAS。

[0283] 7.如实施方案6所述的细胞外囊泡,其中所述核酸是靶向野生型人类KRAS的抑制

性RNA。

[0284] 8.如实施方案7所述的细胞外囊泡,其中所述抑制性RNA还靶向小鼠$Kras^{G12D}$。

[0285] 9.如实施方案1-8中任一项所述的细胞外囊泡,其中所述巨噬细胞是肿瘤驻留巨噬细胞。

[0286] 10.如实施方案9所述的细胞外囊泡,其中所述肿瘤是胰腺肿瘤。

[0287] 11.如实施方案1-10中任一项所述的细胞外囊泡,所述细胞外囊泡还包含额外免疫调节组分。

[0288] 12.如实施方案11所述的细胞外囊泡,其中所述额外免疫调节组分是小分子药物、抗体或治疗性蛋白质。

[0289] 13.如实施方案12所述的细胞外囊泡,其中所述抗体是免疫检查点抑制剂。

[0290] 14.一种药物组合物,所述药物组合物包含如实施方案1-13中任一项所述的细胞外囊泡。

[0291] 15.一种治疗有需要的患者的疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用如实施方案1-13中任一项所述的细胞外囊泡或如实施方案14所述的药物组合物,由此治疗所述患者的所述疾病。

[0292] 16.如实施方案15所述的方法,其中所述疾病是癌症。

[0293] 17.如实施方案15或16所述的方法,其中所述患者是人类。

[0294] 18.如实施方案1-17中任一项所述的方法,其中所述核酸是靶向原癌基因的抑制性RNA。

[0295] 19.如实施方案18所述的方法,其中所述原癌基因是人类KRAS。

[0296] 20.如实施方案19所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌。

[0297] 21.如实施方案15-20中任一项所述的方法,所述方法还包括执行至少第二疗法。

[0298] 22.如实施方案21所述的方法,其中所述第二疗法包括手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法或免疫疗法。

[0299] 23.如前述实施方案中任一项所述的细胞外囊泡,其中所述M2巨噬细胞是选自由M2a、M2b和M2c巨噬细胞组成的组的肿瘤相关巨噬细胞。

[0300] 24.如前述实施方案中任一项所述的细胞外囊泡,其中与极化前的所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞展现出选自由INFγ、IL-12、IL-23、TNFα、IL-6、IL-1、CSCL9、CXCL10和CXCL11组成的组的炎性细胞因子和趋化因子的分泌增加。

[0301] 25.如前述实施方案中任一项所述的细胞外囊泡,其中与极化前的所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞展现出选自由IL-10、TGFβ、PGE_2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22和CCL24组成的组的免疫抑制性细胞因子和趋化因子的分泌减少。

[0302] 26.如前述实施方案中任一项所述的细胞外囊泡,其中与极化前的所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞表达增加的肿瘤相关抗原。

[0303] 27.如前述实施方案中任一项所述的细胞外囊泡,其中与极化前的所述M2巨噬细胞相比,所述M1巨噬细胞增加对$CD8^+$T细胞和/或自然杀伤细胞的刺激。

[0304] 28.一种治疗受试者的胰腺癌的方法,所述方法包括:向所述受试者施用包含靶向人类野生型KRAS的抑制性RNA的细胞外囊泡;其中所述治疗使肿瘤驻留巨噬细胞从M2表型向M1表型的极化百分比增加至比在用靶向人类$KRAS^{G12D}$的抑制性RNA治疗的患者中所观测

到的极化百分比更高的水平。

[0305] 实施例

[0306] 提出以下实施例以便向本领域普通技术人员提供对如何制造并使用本发明的完整公开内容和描述,并且这些实施例不意欲限制本发明人视为其发明的内容的范围,也不意欲表示以下实验是所执行的所有或唯一实验。已尽力确保关于所用数字(例如量、温度等)的准确度,但应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度以摄氏度计,并且压力是在大气压下或接近大气压。可使用标准缩写,例如bp,碱基对;kb,千碱基;pl,微微升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;nt,核苷酸;等等。

[0307] 除非另外指示,否则本发明的实践将采用本领域技能内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。此类技术在文献中已充分解释。参见例如T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,1993);A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,当前新增);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编,Academic Press,Inc.);Remington's Pharmaceutical Sciences,第21版(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,2005);Carey和Sundberg Advanced Organic Chemistry第3版(Plenum Press)第A和B卷(1992)。

[0308] 实施例1:M2巨噬细胞中的转录因子的敲减

[0309] 方法:

[0310] 从PBMC中分离单核细胞:

[0311] • 接受50ml血沉棕黄层

[0312] • 将15ml聚蔗糖吸取至50ml STEMCELL SepMate管中

[0313] • 将血沉棕黄层稀释于PBS2mM EDTA中以使得最终容积为约250mL

[0314] • 将稀释的血沉棕黄层样品倾入Sepmate管中直至试管中的最终容积为约45-50ml为止

[0315] • 将试管在1000g下离心15min,并且1个试管上具有制动器

[0316] • 由旋转试管抽吸血浆,并且用辅助吸管将血沉棕黄层收集至50ml锥形管中。使试管填充有PBS/EDTA并且在500g下离心3min以使细胞成团块。

[0317] • 如果红血细胞高度存在,则将细胞重悬浮于10ml ACK溶解缓冲剂(ThermoFisher,目录号A1049201)中并且在室温下孵育3分钟(制造商方案)。使试管填充有PBS/EDTA并且在500g下离心3分钟。

[0318] • 将试管在400x g下消旋5min,并且将团块用PBS EDTA再次洗涤并且再成团

[0319] • 将团块重悬浮于RoboSep缓冲剂(STEMCELL,目录号20104)中,并且使用与锥虫蓝(Thermofisher)的1:1稀释液计数细胞(由一个血沉棕黄层产生的约5亿个PBMC)。

[0320] • 根据制造商方案使用EasySep人类单核细胞富集试剂盒(STEMCELL,目录号19059RF)分离CD14+单核细胞(总细胞的约10%分离为单核细胞)

[0321] • 将5百万个单核细胞铺在于RPMI 10%FBS1% Anti Anti+40ng/ml M-CSF中的一个板中

[0322] 巨噬细胞分化和极化:

[0323] (采纳自https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2015-0012OC)

[0324] • 将所铺板的细胞在37C、5% CO2下在RPMI-1640 10%FBS1% Anti Anti 1% PenStrep+40ng/ml M-CSF(Biolegend)中培养5-6天。在铺板之后第1天和第3天添加5ml相同新鲜培养基。在第5天,如下添加极化细胞因子(与40ng/ml MSCF一起;所有细胞因子均以20ng/ml添加):

[0325] • M0:无细胞因子

[0326] • M2a:IL-4

[0327] • M2c:IL-10

[0328] • M2++:Il4、Il10、TGFb

[0329] • M1:IFN-g+LPS(100ng/ml)

[0330] • TAM:75% Panc-1上清液

[0331] • 将细胞与细胞因子一起孵育24小时

[0332] • 在第6天,抽吸培养基,用PBS洗涤细胞,接着每个板添加10ml PBS 5mM EDTA(冰冷),并且在4C下孵育30min

[0333] • 将细胞从板上轻轻地刮下,并且计数。

[0334] • 接着,将50,000个细胞/孔与针对不同巨噬细胞群的相应细胞因子(参见上文)一起铺板在于RPMI-1640 10%FBS1% Anti Anti 1% PenStrep+40ng/ml M-CSF(Biolegend)中的96孔板中持续24小时,之后开始治疗。

[0335] 外泌体纯化:

[0336] 9天之后从具有HEK293 SF细胞的高密度悬浮培养物的上清液中收集外泌体。将上清液通过阴离子交换色谱法过滤并且分馏,并且在氯化钠的分步梯度中洗脱。具有最高蛋白质浓度的峰值馏分含有外泌体和污染细胞组分。将峰值馏分分离并且通过超速离心在Optiprep™(60%碘克沙醇w/v)密度梯度上进一步分馏。

[0337] 将外泌体馏分在4℃下在用于SW 32Ti转子的38.5mL Ultra-Clear(344058)试管中在133,900x g下通过超速离心浓缩3小时。将成团材料重悬浮于1mL PBS和3mL Optiprep™中,使最终碘克沙醇浓度为45%。对于Optiprep™梯度,在用于SW 41Ti转子的12mL Ultra-Clear(344059)试管中用4mL含有重悬浮材料的45%碘克沙醇、3mL 30%碘克沙醇、2mL 22.5%碘克沙醇、2mL 17.5%碘克沙醇和1mL PBS制备4层无菌梯度。将Optiprep™梯度在150,000x g下在4℃下超速离心16小时以分离外泌体馏分。超速离心产生已知含有外泌体的顶部馏分、含有中度密度的细胞碎片的中间馏分和含有高密度聚集物和细胞碎片的底部馏分。接着,从试管的顶部约3mL轻轻地收集外泌体层。

[0338] 将外泌体馏分稀释在于38.5mL Ultra-Clear(344058)试管中的约32mL PBS中并且在4℃下在133,900x g下超速离心3小时以成团经纯化的外泌体。接着,将成团外泌体重悬浮于最小体积的PBS(约200μL)中并且储存在4℃下。

[0339] 许多实体瘤的特征在于富骨髓细胞浸润物,富骨髓细胞浸润物常常包含表征为具有替代活化或M2表型的肿瘤相关巨噬细胞。M2巨噬细胞表达促进代谢酶精氨酸酶(Arg1)表达的高水平磷酸化STAT3和STAT6。为证实关键M2基因的敲减改变体外分化巨噬细胞的M2表型,将鼠RAW264.7巨噬细胞极化成如上文所描述的M2状态。用增加量的靶向STAT3、STAT6、

CEBPβ-1、CEBPβ-2、Pi3K γ或$KRAS_{的}$siRNA(12.5nM、25nM、50nM和100nM)转染所培养的极化的巨噬细胞。以剂量依赖性方式阻遏各基因(图1),并且各M2基因的敲减导致伴随的Arg1减少(图2),这证实可通过减少上游调节因子的表达来改变M2表型。

[0340] 实施例2:巨噬细胞亚型的差异外泌体摄取

[0341] 巨噬细胞亚型的特征在于代谢和其他表型活性中的改变。为理解某些巨噬细胞亚型是否优先摄取外泌体,将六个巨噬细胞亚群(M0、M1、M2a、M2c、M2++和TAM)与增加水平的经工程改造以表达腔GFP的HEK293SF源性外泌体一起孵育。通过在36小时内在IncuCyte®活细胞分析系统(Essen Bioscience)中测量总细胞GFP强度来测定外泌体摄取。如图3中所示,当所有巨噬细胞亚型均显示外泌体摄取时,与其他巨噬细胞亚型相比,M0巨噬细胞在摄取外泌体方面是最不有效的,而M2++巨噬细胞在摄取外泌体方面实质上更有效。

[0342] 因为M2巨噬细胞有效地摄取外泌体,所以我们研究了负载ASO的外泌体是否比单独ASO更有效地靶向细胞内巨噬细胞靶标(例如,更有效地敲减靶基因和基因信号传导路径内的下游效应分子的基因表达)。生成靶向STAT3并且携带Cy5荧光示踪剂和5'胆固醇接头的2'-甲氧基乙基(MOE)单链DNA/RNA ASO。使HEK293SF外泌体与带胆固醇标签的荧光ASO混合,并且通过超速离心和去除含ASO上清液来去除游离ASO。如通过总荧光强度所测量,将M2和M0巨噬细胞以相等密度铺板并且与浓度匹配的游离ASO或负载ASO的外泌体(Exo-ASO)一起孵育。在48小时内测量总细胞荧光并且使用IncuCyte®活细胞分析系统来定量。如图4中所示,与M0巨噬细胞相比,M2巨噬细胞更容易地摄取游离ASO和Exo-ASO两者。引起关注地,M0巨噬细胞和M2巨噬细胞两者更有效地摄取Exo-ASO,这表明向M2巨噬细胞递送ASO可通过负载于外泌体上来增强。

[0343] 为确定与其他细胞类型相比巨噬细胞是否体内差异摄取外泌体或Exo-ASO,对未处理小鼠腹膜内给予$1x10^{11}$或$1x10^{12}$个含GFP外泌体。注射后一小时,分离总腹膜细胞并且在不同免疫细胞子集(即,B细胞、树突状细胞、中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞、T细胞和巨噬细胞)中通过针对GFP阳性的流式细胞术来表征。如图5A中所示,在两种剂量下,巨噬细胞是摄取荧光外泌体的主要细胞类型。为确定此差异是否出现在疾病环境中,对B16F10肿瘤携带小鼠注射单次剂量的Cy5标记Exo-ASO或天然未标记物外泌体。将注射的肿瘤分离、解离并且通过流式细胞术测量。如图5B中所示,巨噬细胞摄取Exo-ASO的容易性比肿瘤细胞高得多(大于约100倍的总体Cy5信号),这表明Exo-ASO递送可到达若干复合细胞混合物中的巨噬细胞群。此外,相较于另一测试细胞类型(B细胞、树突状细胞、中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞和T细胞)巨噬细胞对Exo-ASO的优先摄取使得靶向巨噬细胞的ASO递送的方法成为可能,所述方法包括向受试者施用Exo-ASO组合物,其中受试者中存在的巨噬细胞优先摄取所施用的组合物(相较于例如B细胞、树突状细胞、中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞和T细胞的其他免疫细胞子集的摄取)。这种增强的Exo-ASO组合物的巨噬细胞特异性通过减少脱靶细胞中的效应而改善所施用组合物的安全性。

[0344] 实施例3:反义寡核苷酸的外泌体介导的递送有力地异常调节巨噬细胞转录网络并且改变极化

[0345] 先前实验表明ASO的外泌体介导的递送可以是改变巨噬细胞基因表达模式的有效方法。根据以上方法纯化的HEK293SF源性外泌体负载有五种不同的靶向STAT3的带胆固醇

标签的ASO(4.1,双链MOE化学物质;5.1和5.2,单链O-甲基化学物质;5.3和5.4,单链MOE化学物质)中的一者。ASO序列显示于表0中。将M2极化的鼠RAW264.7细胞与5μM游离的带胆固醇标签ASO或$1x10^5$或$1x10^6$个负载有带胆固醇标签ASO的外泌体一起孵育。在治疗之后24小时测量STAT3转录水平,揭示了相较于游离ASO在Exo-ASO治疗情况下对STAT3的相当的或优越的敲减。与极化的巨噬细胞一起孵育的未修饰的外泌体对STAT3表达无影响(图6)。为检验STAT3的下游靶标,在治疗之后48小时测量ARG1转录水平。如图7中所示,在游离ASO或Exo-ASO情况下的STAT3敲减导致在若干种情况下对Arg1的稳健阻遏超过90%(图7)。针对STAT3、KRAS和C/EBPβ,将M2极化的RAW264.7细胞与高(4μM)和低(0.4μM)ASO或Exo-ASO一起孵育。如图8A-图8C中所示,Exo-ASO样品在所有测试剂量下具同样效力(STAT3)或更具效力(KRAS、C/EBPβ)(图8A-图8C)。ASO序列显示于表0中。

[0346] 此结果证实,对于各种治疗应用,与游离ASO的施用相比,Exo-ASO是巨噬细胞表达网络的有效调节剂并且可提供优越、差异模态。一种调节巨噬细胞中的基因表达的方法,所述方法包括向受试者施用Exo-ASO,其中所述ASO靶向所述基因,并且其中所述调节等于或大于通过施用等摩尔量的靶向所述基因的游离ASO所产生的调节。另一个实施方案包括一种抑制巨噬细胞中的基因表达的方法,所述方法包括向受试者施用Exo-ASO,其中所述ASO靶向所述基因,并且其中所述抑制等于或大于通过施用等摩尔量的靶向所述基因的游离ASO所产生的抑制。另一个实施方案包括一种阻遏巨噬细胞中的基因的下游靶标的方法,所述方法包括向受试者施用Exo-ASO,其中所述ASO靶向所述基因,并且其中所述阻遏等于或大于通过施用等摩尔量的靶向所述基因的游离ASO所产生的阻遏。又另一个实施方案包括一种改变巨噬细胞群的极化的方法,所述方法包括向受试者施用Exo-ASO,其中所述ASO靶向在所述巨噬细胞中表达的基因,并且其中所述极化改变等于或大于通过施用等摩尔量的靶向所述基因的游离ASO所产生的极化改变。在此类实施方案中,极化中的改变可以是从M2表型向M1表型的变化。

[0347] 为测试Exo-ASO在人类细胞中的作用,将原代人类巨噬细胞极化成M2表型并且用变化剂量的游离STAT3 ASO或STAT3 Exo-ASO治疗。使用来自三种独立人类供体的巨噬细胞,在治疗之后24小时Exo-ASO持续更有力地阻遏STAT3转录水平(图9A)。与游离ASO相比,Exo-ASO还更显著调节M2极化的下游人类标记物CD163(图9B)。针对HIF1α、Pi3Kγ、CEBP/β、STAT6和STAT3,还用4μM游离ASO或Exo-ASO治疗人类M2巨噬细胞。如图10中所示,所有治疗组均引起对靶基因的阻遏,但在所有情况下,Exo-ASO比游离ASO治疗更具效力。重要地,巨噬细胞靶标中的任一种的Exo-ASO敲减导致CD163表达稳健减少(图11),这证实外泌体介导的ASO递送有力地并且可再现地扰乱重要巨噬细胞信号传导网络。

[0348] M2巨噬细胞极化的功能性结果是促炎性细胞因子的减少,促炎性细胞因子促成促致瘤微环境。因此,巨噬细胞从M2表型向M1表型的转化应引起增强的促炎性信号传导。M2巨噬细胞向M1状态的转化可由LPS诱导,这引起对包括IL-12和IL-23的细胞因子的诱导。STAT3是此细胞因子表达网络的负调节因子,因此我们测试了在存在LPS的情况下STAT3抑制是否可进一步增强促炎性细胞因子的产生。将M2极化的人类巨噬细胞用4μM游离STAT3ASO、4μM STAT3 Exo-ASO、4μM加扰Exo-ASO、天然外泌体或C188-9(即STAT3的小分子抑制剂)治疗。在24小时之后,将培养基更换为含有10ng/ml LPS的培养基,并且在24小时之后分离上清液。如图12中所示,LPS诱导IL-12和IL-23的分泌(LPS10ng/ml组对无LPS组)。用

STAT3 Exo-ASO而非游离STAT3 ASO进行的治疗进一步增强各细胞因子的表达,这表明Exo-ASO可更有力地引起对响应于相关免疫调节信号的M1表型的促进作用。

[0349] STAT3、STAT6和其他巨噬细胞调节路径的调节异常引起基因表达模式中的广泛变化。为理解Exo-ASO治疗的差异全局影响,在人类M2巨噬细胞呈其稳态时并且响应于对用未修饰的外泌体(仅EV)和浓度匹配的ASO和Exo-ASO进行的治疗在人类M2巨噬细胞上进行纳米串mRNA分析。使用nCounter®人类骨髓先天性免疫面板进行的归一化mRNA计数证实STAT3转录物在游离ASO治疗和Exo-ASO治疗之后都减少(图13A)。在ASO治疗之后,下游标记物CD163(图13D)、TGFβ(图13C)和STAT6(图13D)全部受到有力下调。

[0350] TGFβ的稳健阻遏(<85%)是M2巨噬细胞极化的关键调节因素,(Yang和Zhang Journal of Hematology&Oncology(2017)10:58)。我们检验STAT3、STAT6和CEBP/βExo-ASO治疗对TGFβ表达的影响。将人类M2极化的巨噬细胞用负载有针对STAT3的ASO(MOE和LNA化学物质两者)、针对STAT6的ASO(MOE化学物质)和针对CEBP/β的ASO(MOE化学物质)的外泌体进行治疗。在所有情况下,在用次微摩尔量的ASO治疗之后,TGFβ水平显著减少(图14)。这些结果证实针对许多巨噬细胞极化调节因子的ASO的外泌体介导的递送可能导致可能在许多癌症治疗中有影响的细胞程序的稳健、稳定的调节异常。重要地,包括作为此过程调节因子的KRAS新颖识别的巨噬细胞靶标中的各者已表征为"无成药性"靶标,这是因为它们在疾病和其他细胞过程中的作用得到良好识别,但安全、有效的治疗已避开药物研发的经典方法。

[0351] 实施例4:在原位小鼠胰腺癌模型中体内野生型KRAS抑制引起增加的巨噬细胞极化和减小的肿瘤尺寸.

[0352] 方法:

[0353] KRAS外泌体的生产和分离:使用电穿孔方法以将KRAS siRNA构建体插入外泌体中而不功能性损坏外泌体。使用已确立的超速离心方法将外泌体从在以化学方式限定的培养基中生长的人类胎肾(HEK)293SF悬浮细胞中分离(Kahlert等人,2014)。通过Nanosight™测量、透射电子显微镜法和CD9免疫金标记来验证外泌体的纯度和均质性(80-150nm直径粒子)。还执行蔗糖梯度超速离心和qPCR以验证KRAS siRNA的存在和丰度。还生成含有加扰siRNA的外泌体。

[0354] RNAi策略.靶向小鼠野生型KRAS的KRAS siRNA序列包含TT核苷酸突出物以促进沉默效率。还在RNAi的有义链上的3'端处标记Alexa Fluor®647荧光团以追踪其递送。

[0355] 小鼠和成像.在21℃-23℃和40%-60%湿度下在12h亮-暗循环内将4-6周龄之间的雌性无胸腺nu/nu小鼠(Charles Rivers)单独地圈养在通风笼中。使小鼠自由获取经照射的饮食和经灭菌的水。在全身麻醉下,使用27规格注射器将致瘤人类胰腺Panc-1(Kras^{asp12}(Rejiba等人,2007;Sun等人,2001))细胞或BXPC-3细胞(10^6个,重悬浮于10μl PBS中)注射至胰尾中。对于原位肿瘤尺寸/体积分析,使用Living Image 4.4版(Caliper Life Sciences)以定量所有肿瘤计算。限定胰腺和肿瘤周围的圆形目标区域(ROI)并且将其设定为用以比较相同实验组内的所有图像的标准。另外,对于所有实验组中的所有测量,暴露条件(时间、孔径、平台位置、分箱)保持一致。接着,对于所有实验组,在相同条件下获得后续肿瘤测量结果(p/sec/cm^2/sr)。对小鼠有规律地成像并且随机分成治疗组。小鼠每隔一天腹膜内接受2x10^8个于100μl体积的PBS中的外泌体。在注射之前,使外泌体电穿孔有2μg siRNA并且用PBS洗涤。

[0356] 组织学、组织病理学和免疫组织化学.将组织固定在福尔马林中并且处理以进行石蜡包埋。切割5μm厚度的组织切片并且染苏木精和曙红(H&E)和梅森氏三色染色(Masson's richrome,MTS)(Leica)。对于组织病理学评分,基于胰腺癌的形态学阶段记分H&E染色载玻片:正常、胰腺上皮内赘瘤形成(PaNIN)和胰腺导管腺癌(PDAC)。对于各组织切片,由胰腺组织学专家以盲评方式手动获得对于三个阶段(正常、PaNIN、PDAC)中的各者的百分比分数,接着将分数平均化以得到对于各群的100分以内的总分数。随后,对于各群中的各小鼠,采取这些百分比分数的平均值。还针对巨噬细胞(使用泛巨噬细胞标记物(例如用于检测肿瘤驻留巨噬细胞的F4/80抗体和/或M2和M1特异性细胞标记物))染色肿瘤组织切片。

[0357] 用于巨噬细胞表型表征的测定.从小鼠收集血液样品和肿瘤样品。分离巨噬细胞并进行染色以便通过流式细胞术进行M1和M2标记物分析。针对泛巨噬细胞标记物以及M2表型细胞表面标记物(例如YM1、FIZZ1、Dectin-1和/或MGL)和M1表型细胞表面标记物染色巨噬细胞。接着对M2和M1巨噬细胞进行计数和分类以用于进一步分析(诸如定量PCR),以检测与M1表型和/或M2表型相关联的细胞因子的表达和/或miRNA的miRNA表达。

[0358] 来自异种移植实验和原位肿瘤体积分析的结果证实,与具有加扰siRNA的外泌体相比,包含KRAS野生型siRNA的外泌体有效地减小胰腺肿瘤的尺寸并且增加M1表型肿瘤相关巨噬细胞的数目,这指示施用包含靶向人类野生型KRAS的抑制性RNA的外泌体对治疗癌症有效。

[0359] 表

[0360]

表 0. 反义寡核苷酸(ASO)的序列		
靶标	序列	SEQ ID NO:
Stat3	TAAGCTGATAATTCAACTCA	SEQ ID NO:1
Stat6	TGAGCGAATGGACAGGTCTT	SEQ ID NO:2
CebpB	TGGATTTAAAGGCAGGCGGC	SEQ ID NO:3
Pi3Kγ	TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA	SEQ ID NO:4
HIF1-α	GTGCAGTATTGTAGCCAGGC	SEQ ID NO:5
Kras	GTAGCATGTAAATATAGCCC	SEQ ID NO:6
所有反义寡核苷酸均具有在各核苷酸之间的硫代磷酸酯键		

[0361]

表 1. 外泌体脂质	
溶血双磷脂酸	神经节苷脂 GM3 24:1
鞘磷脂(SM)	神经节苷脂 GM3 16:0
神经节苷脂 GM3	PE40:5
磷脂酰丝氨酸(PS)	PE40:6
磷脂酰肌醇(PI)	PE38:3
磷脂酰胆碱(PC)	PE38:4
磷脂酰乙醇胺(PE)	PE36:1
溶血磷脂酰胆碱(LPC)	PE36:2
胆固醇(Chol)	PE34:1
二酰基甘油(DG)	PE34:2
PI18:0/20:3	PE-醚 38:5
PI18:0/20:4	PE-醚 38:6
PI18:0/18:1	PE-醚 34:1
PI18:1/18:1	PE-醚 34:2
PI18:0/16:0	PC34:1
PA18:0/18:1	PC36:4
PS18:0/18:1	PC34:3
BMP18:0/18:1	PC32:0
BMP18:1/18:1	PC30:0
BMP18:1/16:0	SM24:1
CL(18:1)3/16:1	SM16:0
CL(18:1)2/(16:1)2	二氢鞘磷脂 16:0

[0362]

表 2. 外泌体多肽

[0363]

ACLY	TCP1	ACTR1A	LY75
ACTB	PRDX2	THOC4	ABCC1
ACTG1	TSPAN6	INADL	MYO1E
ALB	CCT3	CTDSPL	NACA
ALDOA	TSTA3	ZMPSTE24	NAP1L4
ALDOB	TUBA3C	DNAJA2	NCL
AKR1B1	HIST1H2AK	NDRG1	NEDD8
AMBP	HIST1H2AJ	RAPGEF3	YBX1
ANPEP	HIST1H2AB	SPON2	PA2G4
ANXA2	HIST2H2AC	UBAC1	PECAM1
ANXA3	IFITM1	N4BP2L2	PFAS
ANXA4	PDXK	CAP1	SERPINB9
ANXA5	LIN7A	VAT1	PI4KA
ANXA6	BUB3	NEBL	PLAT
ANXA7	MAP4K4	DCTN2	PLCG2
ANXA11	EDIL3	ARPC1A	PPA1
	ATP6AP2	C6orf108	PPP2CA
CAPZB	PSME3	SMC2	PRKCB
CD63	TUBB3	AHSA1	PSMA6
CD81	IFITM3	STAMBP	PSMA7
CKB	ACAA2	PMVK	PSMB8
CLU	CCT7	GIPC1	PSMB9
CLIC1	CCT4	HBS1L	PSMD7
TPP1	IFITM2	NCKAP1	PSME1
CLTC	GNA13	ALDH1L1	PTPRA
CNP	RUVBL2	FTCD	RAC2
COL6A1	PRSS23	FGL2	RPL3
CR1	ACOT7	CFHR3	RPL4
CTNND1	CCT5	MMP24	RPL5
ACE	DIP2C	COPS8	RPL11
DDT	ASCC3L1	CKAP4	RPL22
DEFA1	TNIK	C10orf116	RPL24
DEFA3	NEDD4L	SLC27A2	RPL27
DNAH8	NCSTN	MID2	RPL30
DPEP1	TSPAN15	KIF3A	RPL28
DPP4	PLXNB2	NUDT5	RPL31
EEF1A1	SDCBP2	TREH	RPL34
EEF2	IGKV1-5	CEP250	RPL35A
EGF	IGHV4-31	PDCD10	RPL37A
EIF5A	IGKV3-20	PADI2	RPS2
ENO1	IGKV2-24	PACSIN2	RPS3A
ENO3	MINK1	CHP	RPS5
ENPEP	IGKα	SNF8	RPS9
STOM	VPS36	DDX19B	RPS19
EPS8	DERA	SCN11A	RPS25
FABP3	GOLGA7	LYPLA2	RPS26
FGA	KRT76	PARK7	RPS28
MLANA	EIF3EIP	COBLL1	RPS29
FN1	LSR	CNKSR2	RSU1

[0364]

FTL	TUBA8	ENPP4	SARS
FUS	RAB4B	RAB3GAP1	SLAMF1
GAA	SETD4	AKR7A3	SLC1A4
GAPDH	TOLLIP	SPEN	SLC2A3
GDI2	PLEKHB2	GANAB	SNRPD2
GGT1	VPS37C	MGRN1	SPINK1
GLB1	LIN7C	CUX2	SPN
GLG1	H2AFJ	DNAJC13	STK10
GNA11	CAND1	ZCCHC11	STXBP3
GNAI1	PLSCR3	PHF15	TALDO1
GNAI2	KIAA1199	KIAA0841	TNFAIP3
GNAI3	GNB4	ARHGEF12	TPM3
GNAS	MYH14	COTL1	TPM4
GNB1	TSPAN14	ANGPTL2	TYK2
GNB2	NCALD	DDAH2	VIM
GNG7	REG4	HEBP2	WARS
SFN	VPS25	CD2AP	WAS
GPI	TUBB6	PLD3	LAT2
GSTA1	TUBA1C	TMEM2	HIST1H2BL
GSTA2	TNKS1BP1	SH3BP4	STX7
GSTA3	FAM125B	BHMT2	CPNE1
GSTM3	LRSAM1	GCA	RPL14
GSTP1	HIST3H2A	MXRA5	PDCD5
GUSB	TUBA3E	AHCTF1	SYNGR2
HIST1H2AD	TUBA3D	PTPN23	RPL23
HLA-A	DCD	DAK	RAB9A
HLA-B	HIST4H4	ACOT11	IGSF2
HLA-DQB1	ALDH16A1	APPL1	EEF1E1
HLA-DRA	RPS4Y2	PHGDH	SCAMP2
HLA-DRB1	MYL6B	TIAM2	SCAMP3
HLA-DRB5	BRI3BP	KCNG2	DPP3
HPGD	AGR3	CYFIP2	ARPC1B
HRAS	EEF1AL3	GHITM	PDIA6
HSPA1A	KRT28	C11orf54	WASF2
HSPA1B	KRT24	DBNL	ANP32B
HSPA8	类 RPLP0	ATAD2	PAICS
HSP90AA1	RPSAP15	PHPT1	AHCYL1
	RANP1	C16orf80	VAMP5
KRT1	PCSK9	OLA1	41891
KRT9	METRNL	ZDHHC1	HSPH1
KRT10	LOC284889	SNX12	SUB1
LDHA	KRT6C	PSAT1	CDC37
LDHB	KRT79	NT5C	CORO1A
TACSTD1	RAB43	EHD2	CD300A
MCAM	KRT27	TAX1BP3	TMC6
MDH1	ACTBL2	CRNN	RFTN1
MEP1A	RP11-631M21.2	NOX3	SCRIB
MSN	TUBB2B	ATP6V0A4	SERBP1
2-Sep	KRT77	ITSN2	TTLL3

[0365]

PGAM1	AGRN	GEMIN4	CACYBP
PGK1	RAB15	LAP3	SIT1
PKM2	LOC388524	CRYL1	SLC43A3
PPP1CA	LOC388720	MYO15A	PILRA
	HSP90AB2P	ATP6V1D	RPL26L1
PTPRC	ACTBL3	SNX9	MPP6
RAN	LOC442497	PCYOX1	GNG2
RDX	A26C1A	ANKFY1	TMED9
SDCBP	HIST2H4B	UFC1	DOCK10
STX3	hCG_1757335	FAM49B	C3orf10
STXBP1	HLA-A29.1	CUTA	MYO1G
STXBP2	LOC653269	ATP6V1H	FLJ21438
TPI1	A26C1B	VPS24	SLC38A1
EZR	LOC100128936	CMPK1	FERMT3
YWHAE	LOC100130553	UPB1	ITFG3
TUBA1A	LOC100133382	CLIC5	HIST1H2AH
WDR1	LOC100133739	MUPCDH	SLAMF6
PDCD6IP	AP2A2	CLIC6	TMC8
GPA33	ALDH3B1	SIAE	LOC153364
TUBA1B	FASLG	CPVL	SVIP
TUBB2C	ATP4A	RHOF	TMEM189-UBE2V1
CAPN7	CAPS	ARL15	hCG_16001
DDAH1	COL12A1	ZNHIT6	FABP5L7
PGLS	DMBT1	GIPC2	Del(X)1Brd
SAMM50	DSP	PCDH24	ABP1
CLIC4	EGFR	VPS13C	ACTN3
CHMP2B	EPHA5	CC2D1A	AFM
ULK3	EPHB1	EPS8L1	AKT1
RNF11	FAT	C10orf18	ALDH3A2
VPS4A	HSD17B4	CHCHD3	ALOX12P2
ARFIP1	L1CAM	C2orf18	ANXA2P1
CHMP2A	LAMA5	C17orf80	KRT33B
SMPDL3B	MUC4	EPN3	MYOC
PACSIN3	NOTCH1	UACA	SERPINE1
EHD4	PPP2R1B	VPS13D	PIK3CA
EHD3	PTPRF	APPL2	NRP1
HEBP1	SORT1	ARL8B	SPRY1
VPS28	SERPINB3	DDX19A	EMILIN1
DCXR	SELP	NAGK	LRG1
RHCG	FSCN1	ITLN1	AZGP1P1
CHMP5	TGFB1	CCDC132	LOC728533
VTA1	CLTCL1	OTUB1	ALDH7A1
RAB14	CHST1	CDK5RAP2	AXL
GPRC5B	EIF3I	MBD5	CFB
CAB39	TNFSF10	SLC22A11	C1S
RAB8B	MAP7	SUSD2	CAT
TM7SF3	COPB2	SUCNR1	CD47
MXRA8	HEPH	BDH2	CD151

[0366]

C11orf59		NIT2	CDH13
MOBKL1B	CIB1	RPL23AP13	CFTR
UEVLD	SLC34A2	FAM20C	CEACAM8
TSNAXIP1	SLC6A14	SLC12A9	AP1S1
GPRC5C	DIP2A	RAB25	CLTA
GNG12	TNPO3	SMURF1	CNGB1
BAIAP2L1	FER1L3	TMEM27	COL1A1
MUC13	CNTLN	RAB22A	COL1A2
CHMP1B	TUBB4Q	NDRG3	COL2A1
SLC44A2	KIF15	ERMN	COL3A1
CPNE5	SERINC1	TAOK1	COL4A1
TMBIM1	PDIA2	KIAA1529	COL4A2
EPS8L3	EPS8L2	RNF213	COL4A3
MMRN2	PLVAP	WIZ	COL5A1
TTYH3	MYADM	ACE2	COL5A2
SLC44A4	MUC16	PLEKHA1	COL7A1
RAB1B	KRT25	SCPEP1	COMP
RAB33B	SERINC5	AASDHPPT	CPS1
RBP5	LOC440264	FIGNL1	CSF1
C5orf32	AGT	PBLD	VCAN
ABHD14B	ALPP	KIF9	SLC25A10
MOBKL1A	APOA2	LEPRE1	CTBP2
ARRDC1	APOB	RAB17	CTNNA2
	APOE	IKZF5	DCTN1
FAM125A	SERPING1	MMP25	DECR1
SNX18	C1QB	MPP5	DNASE1L1
CHMP4B	C1R	TEKT3	ENG
MITD1	C4A	ALDH8A1	STX2
S100A16	C4B	SLC13A3	ETFB
CPNE8	C4BPA	DUSP26	F2R
C1orf58	C4BPB	GGCT	F8
GLIPR2	CD5L	TMEM38A	ACSL1
TUBB	FCN1	C1orf116	FAP
ATP6V1C2	FCN2	GDPD3	FBLN1
FTLL1	FGB	OR2A4	FBN1
PEF1	FGG	FAM65A	FBN2
SERPINA3	GRIN1	NARG1L	FEN1
ACP2	MSH6	CHMP6	FLT1
ACPP	HBA1	DYNC2H1	FUCA2
ACTA2	HBA2	PRKRIP1	GAS6
ACTC1	ITGA2B	GSTCD	GDI1
ACTG2	PPARG	PIP4K2C	GLDC
ACY1	PDLIM7	CYBRD1	GNAL
APCS	CD274	FUZ	GRM2
APOD	A1BG	ARMC9	GRM3
APRT	ACAT1	NAT13	GRM7
AQP1	ACO1	COASY	GSTM1
AQP2	ADCY1	UBXN6	GSTM5
ARF1	ADFP	COL18A1	H2AFX

[0367]

ARF3	ADH5	BHLHB9	HBE1
ARF4	ADH6	WNT5B	HMGCS2
ARF5	PARP4	CAB39L	TNC
ARF6	AHSG	ITM2C	IDH3B
RHOA	AK1	LOC81691	IFRD1
ARL3	ALAD	AMN	ITGA5
ASAH1	ALCAM	SH3BGRL3	ITGB5
ASS1	ALDH2	C9orf58	ITPR2
FXYD2	ALDH9A1	BCL2L12	KRT84
BHMT	ALDOC	RAB34	LAMB1
BST2	ALK	TBC1D10A	LCN1
C3	ALOX12	GPR98	LGALS8
CA2	ALPL	HDHD2	LMNA
CA4	ANXA13	ARL6	LOXL2
CALB1	AOX1	IQCG	LTBP2
CALR	APAF1	C2orf16	MAP1A
CD9	APOA4	PARD6B	MAT1A
CD59	SHROOM2	TXNDC17	MC1R
HSPA5	RHOB	ABCC11	MCC
HSPA6	ARHGAP1	FAM40A	ME1
HSP90AB1	ARHGDIB	SCIN	MECP2
HSPD1	ARSE	SCRN2	MAP3K1
IDH1	ARSF	ZNF486	MFAP4
KNG1	ASL	ACY3	SCGB2A1
KRAS	ASNA1	C11orf52	ALDH6A1
LAMP1	ATIC	CRB3	MOS
LGALS3BP	ATP6V1A	C20orf114	CITED1
LRP2	ATP6V1B1	NAPRT1	NEFH
MAN1A1	ATP6V1B2	RG9MTD2	OPRM1
RAB8A	ATP6V0C	SAT2	OTC
MIF	ATP6V1C1	KIF12	OXTR
MME	ATP6V1E1	MAL2	PAPPA
MUC1	ATP6V0A1	OSBPL1A	PC
MYH9	ATP6AP1	VASN	PCOLCE
NAGLU	AZU1	SLC22A12	PDGFRB
NONO	BCR	ACSM1	PFKFB3
NPM1	BGN	TTC18	PGAM2
NRAS	BLMH	GSTO2	SERPINE2
P2RX4	BLVRA	CLRN3	PLP2
P4HB	BLVRB	LRRK2	PPP1CC
PEBP1	BPI	C12orf59	SRGN
SERPINA5	BTG1	LOC124220	MAP2K6
PFN1	BTN1A1	SLC5A10	PSMB7
PFN2	TSPO	CCDC105	PSMB10
ABCB1	C1QC	C1orf93	PTK7
SERPINA1	CAPN5	ARL8A	PTPRK
PIGR	C5	LOC128192	PZP
PIK3C2B	C9	GALM	RAD21
PKD1	PTTG1IP	LRRC15	RASA1

[0368]

PLSCR1	CACNA2D1	LOC131691	RDH5
PODXL	CALML3	H1FOO	RPL18
CTSA	CAMK4	ENPP6	RPL29
PPIA	CAMP	CMBL	RPS10
PSAP	CAPG	MUM1L1	RPS24
PSMB3	CAPN1	C20orf117	S100A13
PTBP1	CAPN2	SIRPA	SAA4
PTPRJ	CAPZA2	PLEKHA7	ATXN1
RAB1A	CD14	A2ML1	CLEC11A
RAB2A	CD80	C16orf89	SDC2
RAB3B	CD36	TOM1L2	SMARCA4
RAB5A	SCARB2	KIF18B	SPOCK1
RAB5B	CD40	C19orf18	STAT1
RAB13	CDC2	PM20D1	STC1
RAB27B	CEL	PROM2	SURF4
RAB5C	CETP	GPR155	SYT1
RAC1	CTSC	SLC36A2	TAGLN
RALB	AP2M1	VPS37D	TCN1
RAP1B	CSN1S1	SLC5A12	TERF1
RBM3	CSN2	SLC5A8	TGFB2
RNASE2	CSN3	EML5	TSPAN4
S100A6	ACSL3	TBC1D21	TSN
S100A11	FOLR1	ZNF114	TSNAX
S100P	B4GALT1	ANO6	COL14A1
SLC1A1	GNAQ	SLC5A9	WNT5A
SLC2A5	HBB	CRTC2	ZNF134
SLC12A1	HBD	C20orf106	PXDN
SLC12A3	CFH	TMEM192	SMC1A
SNCG	HLA-G	ARMC3	OFD1
SNRPD1	HP	NAPEPLD	COPS3
SOD1	HPR	C10orf30	STC2
SRI	IGHA1	ATP6V0D2	ADAM9
TF	IGJ	STXBP4	CREG1
THBS1	IGLC1	C17orf61	CDK5R2
THY1	IGLC2	TXNDC8	TNFSF18
TMPRSS2	IGLC3	LRRC57	MPZL1
TSG101	LAMC1	HSPA12A	SEMA5A
TUBB2A	LPA	MAGI3	CLDN1
UBE2N	LPL	C11orf47	RGN
UMOD	LRP1	SLC39A5	SLC16A3
UPK2	LTF	C12orf51	ARHGEF1
VTN	TACSTD2	SLC46A3	LRRFIP2
EIF4H	MBL2	VMO1	TAAR2
YWHAB	MYH8	SLC26A11	CRIPT
YWHAG	NEB	LOC284422	ENTPD4
YWHAZ	PON1	CRB2	IFT140
NPHS2	PKN2	HIST2H2AB	RNF40
RAB7A	PROS1	FAM151A	RB1CC1
PSCA	MASP1	SLC6A19	PSMD6

[0369]

CUBN	RELN	PKD1L3	MRC2
BBOX1	PTX3	LOC342897	HDAC5
RAB11A	RARS	EGFL11	RASA4
NAPA	SILV	SERINC2	SLC25A13
PROM1	THBS2	PDDC1	PSMD14
FCGBP	TLR2	SLCO4C1	TFG
CPNE3	TTN	SFT2D2	CDIPT
MGAM	TTR	C9orf169	CRTAP
GPRC5A	TYRP1	LOC377711	UNC13B
RAB11B	VWF	OR11L1	ARL6IP5
VAMP3	CLIP2	RAB19	TGOLN2
SLC9A3R1	XDH	LOC440335	POSTN
ITM2B	APOL1	HIST2H2BF	CLPX
NAPSA	FCN3	LOC441241	TSPAN9
VPS4B	SELENBP1	KPRP	TMED10
RAB3D	SMC3	HSP90AB6P	SLC38A3
PRDX6	DDX21	LOC643751	IL1RAPL1
KIAA0174	CCPG1	LOC651536	GALNT5
PDCD6	ABCG2	LOC652968	PRR4
ARPC4	SFI1	AEBP1	ITGA11
TSPAN1	MVP	AMY1A	CLASP2
PDZK1IP1	AKAP9	AMY1B	EPB41L3
NUTF2	PRG4	AMY1C	KIAA0467
FLOT1	AKR1A1	AMY2A	DULLARD
HRSP12	ABCA7	ANGPT1	NOMO1
A2M	COLEC10	APLP2	KIAA0146
ACP1	GNB5	APP	SLC39A14
ACTA1	MMRN1	AQP5	DNPEP
ACTN4	CLASP1	AZGP1	CASP14
ACTN1	SYNE1	CEACAM1	STX12
ACTN2	NIPBL	BMP3	BRMS1
ADAM10	CHRDL2	CA6	ABI3BP
AHCY	HSPB8	DDR1	PLEKHG3
ALDH1A1	ANGPTL4	CAPNS1	FBXW8
SLC25A4	NIN	COL6A2	GAPDHS
SLC25A5	ZNF571	COPA	GREM1
SLC25A6	LRP1B	CPD	DKK3
ANXA1	CNDP2	DLD	SRPX2
ANXA2P2	DNAH7	ETFA	IGHV3-11
APOA1	HCN3	GLUD1	IGHV3-7
ARHGDIA	EXOC4	HSD17B10	IGLV4-3
ARVCF	SNX25	IMPDH2	IGLV3-21
	TC2N	HTATIP2	IGLV1-40
	HAPLN3	MARVELD2	ST6GALNAC6
ATP1B1	CD163L1	CST4	COPS4
ATP5A1	HRNR	CST5	HERC5
ATP5B	P704P	CTSB	NUSAP1
ATP5I	CD24	DAG1	PLUNC
ATP5O	COL6A3	DSG2	PPME1

[0370]

B2M	COL15A1	TOR1A	MBD3
CALM1	COMT	ECM1	SLC38A2
CALM2	CP	EIF4G1	FAM64A
CALM3	CPN2	EXT2	GTPBP2
CANX	CRABP2	FAT2	DIRAS2
CAPZA1	CRK	GPC4	DCHS2
CD2	CRYAB	FOLH1	QPCTL
CD247	CRYM	FUT2	PARP16
CD86	CSE1L	FUT3	TMEM51
CD37	CSK	FUT6	MCM10
CD44	CSTB	FUT8	CHST12
CD53	CTH	GLRX	LYAR
CDC42	CTNS	GPC1	ODZ3
CDH1	CTSD	GPX3	WDR52
CFL1	CTSG	IGHA2	ASH1L
CFL2	DDB1	IGHVα	UNC45A
COX4I1	DDC	IGLα	SLC7A10
COX5B	DDX3X	IVL	PNO1
CLDN3	DDX5	KRT12	CD248
CSPG4	CFD	LAMA4	AHRR
CSRP1	DNM2	LAMB2	ZBTB4
CST3	DPYS	LGALS7	SPTBN4
CTNNA1	DSC2	LMAN1	LGR6
CTNNB1	DSG3	LPO	RNF123
NQO1	ECE1	LTBP3	PRDM16
DYNC1H1	MEGF8	DNAJB9	PARVG
EEF1A2	ELA2	MEST	RMND5A
EFNB1	SERPINB1	MGAT1	FAT4
CTTN	EPHX2	MGP	FLJ13197
EPHB4	FBL	MUC5AC	TREML2
ERBB2	EVPL	MUC7	SVEP1
F5	F11	NEU1	OBFC1
FASN	FABP1	NUCB1	ZNF614
FKBP1A	ACSL4	NUCB2	FLJ22184
FLNA	FAH	FURIN	DBF4B
FLNB	EFEMP1	PAM	CD276
G6PD	FBP1	PLG	CMIP
GCNT2	FKBP4	FXYD3	ADAMTS12
PDIA3	FKBP5	PLOD2	SPACA1
GSN	FRK	PLTP	VANGL1
HADHA	FTH1	PON3	SPRY4
HLA-DMB	FUCA1	PPP1CB	HYI
HLA-E	GABRB2	PRELP	FAM108A1
HNRNPA2B1	GALK1	DNAJC3	TMEM47
HNRNPH2	GBE1	HTRA1	MYCBPAP
HSPA1L	GDF2	RARRES1	RAB6C
HSPA2	GFRA1	SAA1	FAM71F1
HSPA4	GK2	SAA2	ZNF503
HSPA7	GLO1	SEPP1	PARP10

[0371]

HSPA9	GLUL	SFRP1	SHANK3
HSP90AA4P	GM2A	ST3GAL1	LACRT
HSP90AA2	GNG5	SLC5A5	TRIM41
HSP90AB3P	GOT1	SLC9A1	OXNAD1
HSPE1	GPD1	SLC20A2	LDHAL6B
HSPG2	GPM6A	SLPI	LOC92755
ICAM1	GPT	SRPR	CACNA2D4
ITGA6	GPX4	STAU1	ARHGAP18
ITGA2	GRB2	HSPA13	AHNAK2
ITGAV	GRID1	TGFBI	RPLP0P2
	GSR	TGM1	PGLYRP2
ITGB2	GSS	TGM3	RAB39B
ITGB4	GSTM2	YES1	GYLTL1B
JUP	HGD	HIST2H2AA3	KRT74
CD82	HINT1	HIST2H2BE	SLAIN1
KPNB1	HNMT	GALNT4	LOC122589
KRT2	HNRNPL	B4GALT3	NLRP8
KRT5	HPD	TNFSF13	PODN
KRT8	HPX	TNFSF12	C5orf24
KRT13	HRG	ANGPTL1	CD109
KRT14	DNAJA1	GCNT3	TRIM40
KRT15	HSPB1	TM9SF2	GPR112
KRT16	DNAJB1	DDX23	KRT72
KRT18	CFI	ADAMTS3	VTI1A
KRT19	IGF2R	GPR64	SYT9
LAMP2	IGFALS	LHFPL2	KRT80
LGALS4	IL1RN	ST3GAL6	CCDC64B
LYZ	IRF6	PRDX4	ATP8B3
	ITGA1	MAN1A2	C1orf84
MFGE8	EIF6	OS9	LOC149501
MMP7	ITGB8	MGAT4A	LOC150786
MYH10	ITIH4	TWF2	WDR49
MYL6	KHK	CLCA4	NEK10
MYO1C	KIFC3	TXNDC4	STOML3
MYO1D	KLK1	PLCB1	SASS6
NME1	LBP	CES3	DCLK2
NME2	LCN2	B3GAT3	FREM3
PRDX1	LCP1	TOR1B	C9orf91
PCBP1	LTA4H	IGHV3OR16-13	TREML2P
CHMP1A	BCAM	IGLV2-11	CCDC129
SERPINF1	MAN2A1	IGLV1-44	PAN3
PHB	MDH2	IGKV3D-15	MAMDC2
PPIB	MFI2	IGKV4-1	RCOR2
PRKAR2A	MLLT3	C1GALT1C1	LOC283412
PRKDC	MLLT4	RACGAP1	LOC283523
PSMA2	MNDA	EFEMP2	NOMO2
QSOX1	MPO	DUOX2	SEC14L4
PYGB	MPST	SDF4	LCN1L1
RAB6A	MYO1B	CYB5R1	LOC286444

[0372]

RALA	MSRA	ERAP1	TAS2R60
RAP1A	MTAP	NUDT9	KRT18P19
RPL6	MTHFD1	FAM3B	LOC343184
RPL8	MYH3	FAM20A	LOC345041
RPLP1	MYO5B	FAM55D	GNAT3
RPLP2	MYO6	ANO1	POLN
RPN1	NID1	LRRC16A	LOC376693
RPS3	NKX6-1	TTC17	ARMS2
RPS7	NQO2	PDGFC	LOC387867
RPS13	NP	PCDHGB5	LOC388339
RPS14	NPC1	CCL28	FLG2
RPS15A	NPHS1	UGCGL1	LOC388707
RPS18	NRF1	SEMA3G	LOC389141
RPS20	NT5E	CORO1B	LOC390183
RPS21	PAFAH1B1	NDRG2	KRT8P9
RPS27A	PAFAH1B2	KIAA1324	LOC391777
RRAS	PCBD1	TXNDC16	LOC391833
S100A10	PCK1	ARHGAP23	LOC399942
SDC1	PDCD2	MUTED	LOC400389
SDC4	PDE8A	TINAGL1	LOC400578
SLC1A5	ENPP3	TOR3A	LOC400750
SLC2A1	SLC26A4	VWA1	LOC400963
	PDZK1	CHID1	FLJ21767
SLC12A2	PEPD	TMEM109	LOC401817
SLC16A1	PFKL	GAL3ST4	NOMO3
SPTBN1	PGD	THSD4	LOC439953
SSBP1	PGM1	UXS1	RPL12P6
SSR4	SLC25A3	TXNDC5	LOC440589
TBCA	SERPINA4	CRISPLD1	LOC440917
TCEB1	SERPINB6	LOXL4	LOC440991
TFRC	SERPINB13	GNPTG	LOC441876
TKT	PIK3C2A	SCGB3A1	LOC442308
TSPAN8	PIP	CHST14	DIPAS
TPM1	PKD2	C1QTNF1	LOC643300
HSP90B1	PKLR	C1QTNF3	LOC643358
TUBA4A	PKHD1	SLC26A9	LOC643531
TUFM	PLCD1	FAM129A	RPSAP8
TXN	PLOD1	HIST2H3C	LOC644464
UBA52	PLS1	TPRG1L	LOC644745
UBB	UBL3	TMPRSS11B	LOC645018
UBC	PPL	C20orf70	LOC645548
UBA1	PPP1R7	PPM1L	LOC646127
UBE2V2	PRCP	GBP6	LOC646316
UGDH	PRKCA	KRT78	LOC646359
UQCRC2	PRKCD	SLC37A2	LOC646785
VCP	PRKCH	NPNT	LOC646875
VIL1	PRKCI	KRT73	LOC646949
YWHAH	PRKCZ	HIST2H3A	LOC647000
CXCR4	PRNP	VWA2	LOC647285

[0373]

SLC7A5	PRSS8	GSTK1	LOC650405
HIST1H4I	PRTN3	SBSN	LOC650901
HIST1H4A	PSMA1	C5orf46	LOC652493
HIST1H4D	PSMA3	LRRC26	LOC652797
HIST1H4F	PSMA4	C4orf40	LOC653162
HIST1H4K	PSMA5	LOC440786	PPIAL3
HIST1H4J	PSMB1	SCFV	LOC653232
HIST1H4C	PSMB2	LGALS7B	HSPBL2
HIST1H4H	PSMB5	HIST2H3D	LOC728002
HIST1H4B	PSMB6	ACAT2	LOC728088
HIST1H4E	PSMC5	ACTL6A	LOC728576
HIST1H4L	PSMD12	ADK	LOC728590
HIST2H4A	PSME2	ANXA8L2	LOC728791
TAGLN2	PTPN6		LOC728979
RUVBL1	PTPN13		ANG
VAMP8	PTPRO		BDNF
SNAP23	QDPR	CAV1	CALU
IQGAP1	RAB27A	CD70	CCR4
KRT75	RAP1GDS1	CS	CCR5
TJP2	RBL2	DARS	CSF2
ROCK2	RBP4	DHX9	CSF3
ARPC3	RENBP	DPYSL2	DCN
ACTR3	RFC1	EEF1D	EPO
LRPPRC	RHEB	EPRS	F3
TRAP1	RNH1	FDPS	GPC5
TUBB4	RNPEP	FLNC	GDF1
GNB2L1	ROBO2	XRCC6	GDF9
BAIAP2	RP2	GFPT1	GFRA3
HYOU1	RPS11	HIST1H1B	GRN
AGR2	RREB1	HIST1H2BB	CXCL2
OLFM4	RYR1	H3F3A	GZMA
CCT2	S100A4	H3F3B	HIST1H2BD
ATP5L	S100A8	HNRNPF	HGF
CCT8	S100A9	HNRNPK	IFNG
SLC12A7	SERPINB4	IARS	IGFBP3
MASP2	SCN10A	LAMA3	IGFBP4
IQGAP2	SEC13	LAMB3	IGFBP6
RAB10	SECTM1	LAMC2	IGFBP7
PRDX3	SH3BGRL	LGALS1	IL1RAP
EHD1	SHMT1	NBR1	IL3
TMED2	SHMT2	MARS	IL5
LMAN2	SLC3A1	MX1	IL6ST
YWHAQ	SLC4A1	PFKP	IL7
GCN1L1	SLC5A1	PLAU	IL8
RAB35	SLC5A2	PSMB4	IL10
DSTN	SLC6A13	PSMC2	IL11
UPK1A	SLC9A3	PSMC4	IL13
PHB2	SLC15A2	PSMD2	IL15RA
RRAS2	SLC25A1	PSMD13	INHBA

[0374]

SEC31A	SLC22A2	PYGL	INHBB
CLSTN1	SLC22A5	RPL10	IPO5
PTGR1	SMO	RPL15	LIF
RAB21	SORD	STX4	LRP6
CYFIP1	SORL1	TARS	LTBP1
SLC44A1	SPAST	CLDN5	MMP1
CORO1C	SPR	TPBG	MMP2
MTCH2	SPRR3	XPO1	MMP3
QPCT	SRC	XRCC5	MMP10
PRDX5	ST13	BAT1	NBL1
SND1	STK11	HIST1H2BG	TNFRSF11B
F11R	VAMP7	HIST1H2BF	OSM
LIMA1	SYPL1	HIST1H2BE	PDGFA
RAB6B	SERPINA7	HIST1H2BI	PRKCSH
KRT20	TECTA	HIST1H2BC	CCL2
VPS35	TGM4	HIST1H4G	CCL7
TOMM22	TGFBR3	EIF3A	CCL20
AKR1B10	TGM2	EIF3B	SFRP4
S100A14	TLN1	EIF3C	SOD3
DIP2B	DNAJC7	SLC5A6	SPARC
RAP2C	UBE2G1	HIST2H2AA4	TIMP1
FAM129B	UPK1B	LOC728358	TIMP2
	UGP2	LOC730839	TIMP3
AHNAK	UPK3A	LOC100126583	ICAM5
VPS37B	UTRN	AARS	TNFRSF1A
TUBA4B	VASP	AK2	VEGFC
ARPC5L	VCL	APEH	GDF5
EPPK1	VDAC1	FAS	HIST3H3
ADSL	VDAC3	BAX	HIST1H2AI
AP2A1	XPNPEP2	FMNL1	HIST1H2AL
RHOC	BTG2	CASP9	HIST1H2AC
RHOG	GCS1	CD19	HIST1H2AM
ASNS	BAT2	MS4A1	HIST1H2BN
	PTP4A2	CD22	HIST1H2BM
CAD	DYSF	TNFRSF8	HIST1H2BH
CBR1	EEA1	SCARB1	HIST1H2BO
CBR3	STK24	ENTPD1	HIST1H3A
CCT6A	CUL4B	CD48	HIST1H3D
CDH17	CUL3	CD58	HIST1H3C
CEACAM5	ATRN	CD74	HIST1H3E
COPB1	CDC42BPA	CD79B	HIST1H3I
CLDN4	PPFIA2	CD97	HIST1H3G
CLDN7	AKR7A2	41889	HIST1H3J
CRYZ	PPAP2A	CR2	HIST1H3H
CD55	ABCB11	CSNK2B	HIST1H3B
EEF1G	MAP2K1IP1	DBI	FADD
EPHA2	EIF3H	DHCR7	IL1RL2
EIF4A1	SLC4A4	DLG1	FGF18
EIF4A2	SNX3	DOCK2	FGF16

[0375]

ENO2	MYH13	DUT	HIST1H3F
SLC29A1	NAPG	ECH1	HIST1H2AG
EPHB2	FBP2	VAPA	HIST1H2BJ
EPHB3	SCEL	H2AFY	NRG2
ESD	SUCLA2	PDIA4	GDF3
F7	GGH	EIF4A3	FGF19
FLOT2	PROZ	ACTR1B	GDF11
GARS	SQSTM1	OPTN	FST
GMDS	AP1M1	NAMPT	LASS1
GNB3	RAB7L1	MPZL2	HPSE
HIST1H2AE	WASL	STIP1	ESM1
HLA-C	PLOD3	PKP3	DKK1
HLA-H	PGLYRP1	POFUT2	IL17B
HPCAL1	KALRN	QPRT	IL19
	CLIC3	WBP2	TNFRSF12A
IGHα	BAZ1B	ERO1L	IL23A
IGHG1	SPAG9	H2AFY2	FGFRL1
IGHG2	SLC13A2	RCC2	TREM1
IGHG3	ATP6V0D1	RTN4	IL1F9
IGHG4	HGS	GLT25D1	CXCL16
IGHM	AP4M1	RNASE7	IL22RA1
IGKC	ATP6V1F	FCRLA	HIST1H2BK
ITGA3	PTER	H2AFV	HIST3H2BB
KRT3	TRIP10	MRLC2	LOC440093
KRT4	SLC9A3R2	PAGE2	PGAM4
KRT6A	SLIT2	HIST1H2BA	PC-3
KRT6B	SLC22A6	SNX33	LOC729500
KRT7	KL	PTRF	KRT18P26
KRT17	KIF3B	HIST2H2BC	S100A11P
RPSA	SLC22A8	ANXA8	LOC729679
LFNG	GRHPR	NME1-NME2	KRT17P3
LGALS3	SLC22A13	EIF2S1	RCTPI1
LRP4	TMPRSS11D	EIF2S3	LOC729903
CD46	GSTO1	EIF4E	RP11-556K13.1
MICA	NPEPPS	EPB41L2	LOC100129982
MYH11	TMEM59	EVI2B	LOC100130100
NARS	ATP6V1G1	FCER2	LOC100130446
NEDD4	CDC42BPB	FGR	LOC100130562
RPL10A	CREB5	FH	LOC100130624
PCNA	CROCC	GART	LOC100130711
PLEC1	DHX34	GOT2	LOC100130819
PLXNA1	TMEM63A	NCKAP1L	LOC100131713
PPP2R1A	SLK	HLA-DPB1	LOC100131863
PSMC6	RUSC2	HLA-DQA1	LOC100132795
PSMD3	OXSR1	HNRNPA1	LOC100133211
PSMD11	SLC23A1	HNRNPC	LOC100133690
RAC3	DOPEY2	HPRT1	SET
RAP2A	ABI1	ICAM3	CCT6B
RAP2B	GNPDA1	INSR	ACTR3B

[0376]

RPL12	TOM1	EIF3E	PSMA8
RPLP0	ABCB6	ITGAL	ARP11
RPS4X	ABCC9	ITGB3	BCHE
RPS4Y1	HUWE1	ITGB7	H2AFZ
RPS8	ARPC5	ITIH2	SNRPE
RPS16	ACTR2	STMN1	TFPI
SPTAN1	TSPAN3	LCK	ADAMTS1
VAMP1	ARPC2	LSP1	GDF15

[0377]

表 3. 多肽有效负载物和接收体			
一般类别			
锚蛋白重复蛋白		**纤连蛋白**	**裂解酶**
抗体	补体受体	GPI 连接的多肽	纳米抗体
适体	环肽	HEAT 重复蛋白	核酸
ARM 重复蛋白	DARPin	水解酶	多肽
碳水化合物	DNAse	激酶	单链可变片段(scFv)
细胞表面受体	酶	脂蛋白	三十四肽重复蛋白
补体			
C1 抑制因子	C4 结合蛋白	CR3	因子 I
C3 β 链受体	CD59	CR4	同源限制因子
C3aR	CR1	促衰变因子(DAF)	膜辅因子蛋白(MCP)
C3eR	CR2	因子 H	PRELP
酶			
三酰甘油脂肪酶	胆汁酸辅酶 A 水解酶	阿魏酸酯酶	磷脂酸磷酸酶
(S)-甲基丙二酰辅酶 A 水解酶	双(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯酶	甲酰辅酶 A 水解酶	磷脂酰甘油磷酸酶
[酰基载体蛋白]磷酸二酯酶	二磷酸甘油酸磷酸酶	果糖-二磷酸酶	磷脂酰肌醇脱酰酶
[磷酸化酶]磷酸酶	羧酸酯水解酶	延胡索酰乙酰乙酸水解酶	磷酸二酯酶 I
1,4-内酯酶	羧甲烯丁烯羟酸内酯酶	廉孢氨酸-C 鸟氨酸酯酶	磷酸甘油酸磷酸酶
11-顺式棕榈酸视黄酯水解酶	纤维素-多硫酸酯酶	半乳糖脂酶	磷酸乙醇酸磷酸酶
1-烷基-2-乙酰甘油磷酸胆碱酯酶	头孢菌素-C 脱乙酰酶	葡萄糖酸内酯酶	磷酸肌醇磷脂酶 C
2'-羟基联苯基-2-亚磺酸脱硫酶	脑苷脂-硫酸酯酶	葡萄糖-1-磷酸酶	磷脂酶 A1
2-吡喃酮-4,6-二羧	西曲酸酯苄酯酶	葡萄糖-6-磷酸酶	磷脂酶 A2

[0378]

酸酯内酯酶			
3', 5'-二磷酸核苷酸酶	氯原酸水解酶	谷胱甘肽巯酯酶	磷脂酶 C
3-羟基异丁酰辅酶 A 水解酶	叶绿素酶	甘油-1-磷酸酶	磷脂酶 D
3'-核苷酸酶	胆碱酯酶	甘油-2-磷酸酶	膦酸乙醛水解酶
3-氧代己二酸烯醇内酯酶	胆碱-硫酸酯酶	甘油磷酸胆碱磷酸二酯酶	膦酰基乙酸酯水解酶
3-植酸酶	胆酰辅酶 A 水解酶	糖苷酶，即水解 O-糖基化合物和 S-糖基化合物的酶	膦酰基丙酮酸水解酶
4-羟基苯甲酰辅酶 A 硫酯酶	软骨素-4-硫酸酯酶	葡萄糖硫酸酯酶	磷蛋白磷酸酶
4-甲基草酰乙酸酯酶	软骨素-6-硫酸酯酶	糖基化酶	磷酸二酯水解酶
4-植酸酶	柠檬酸酯-裂解酶脱乙酰酶	组氨醇-磷酸酶	磷酸单酯水解酶
4-吡哆醇内酯酶	可卡因酯酶	激素敏感性脂肪酶	磷酸三酯水解酶
5'-核苷酸酶	角质酶	水解 N-糖基化合物	磷酸丝氨酸磷酸酶
6-乙酰基葡萄糖脱乙酰酶	环己烷氨基磺酸硫水解酶	水解 S-糖基化合物	聚(3-羟基丁酸酯)解聚酶
6-磷酸葡萄糖酸内酯酶	半胱氨酸内肽酶	羟酰基谷胱甘肽水解酶	聚(3-羟基辛酸酯)解聚酶
a-氨基酸酯酶	半胱氨酸型羧肽酶	羟基丁酸酯-二聚体水解酶	聚精液素-醛酯酶
a-氨基-酰基-肽水解酶	D-阿拉伯糖酸内酯酶	羟甲基戊二酰辅酶 A 水解酶	蛋白-谷氨酸甲酯酶
乙酰乙酰辅酶 A 水解酶	脱氧柠檬酸 A 环-内酯酶	艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶	群体淬灭 N-酰基-高丝氨酸内酯酶
乙酰氧基丁炔基联噻吩脱乙酰酶	dGTP 酶	肌醇-磷酸磷酸酶	棕榈酸视黄酯酶
乙酰基西罗芙木碱酯酶	二氢香豆素水解酶	保幼激素酯酶	丝氨酸脱水酶或丝氨酸羟甲基转移酶
乙酰烷基甘油乙酰水解酶	二肽酶	犬尿氨酸酶	丝氨酸内肽酶
乙酰胆碱酯酶	二肽水解酶	L-阿拉伯糖酸内酯酶	丝氨酸-乙醇胺磷酸酯磷酸二酯酶

[0379]

乙酰辅酶 A 水解酶	二肽基-肽酶和三肽基-肽酶	柠檬苦素 -D- 环内酯酶	丝氨酸型羧肽酶
乙酰酯酶	二磷酸单酯水解酶	脂蛋白脂肪酶	S- 甲酰谷胱甘肽水解酶
乙酰丙酮酸水解酶	二硫葡萄胺 -6- 硫酸酯酶	L- 鼠李糖 -1,4- 内酯酶	唾液酸酯 O- 乙酰酯酶
乙酰水杨酸脱乙酰酶	十二烷酰基 -[酰基载体蛋白] 水解酶	溶血磷脂酶	芥子酸胆碱酯酶
乙酰木聚糖酯酶	产生 3'- 磷酸单酯的脱氧核糖核酸内切酶	甘露糖醇 -1- 磷酸酶	位点特异性脱氧核糖核酸内切酶：裂解不是序列特异性的
酸性磷酸酶	产生 5'- 磷酸单酯的脱氧核糖核酸内切酶	金属羧肽酶	对改变的碱基特异的位点特异性脱氧核糖核酸内切酶.
作用于酸酐以催化物质的跨膜运动	未知催化机制的内肽酶	金属内肽酶.	位点特异性脱氧核糖核酸内切酶：裂解是序列特异性的
作用于酸酐以促进细胞和亚细胞运动	产生 3'- 磷酸单酯的核酸内切酶	甲基硫代磷酸甘油酸酯磷酸酶	鞘磷脂磷酸二酯酶
作用于 GTP 以促进细胞和亚细胞运动	产生 5'- 磷酸单酯的核酸内切酶	甲基伞形酮 - 乙酸酯脱乙酰酶	S- 琥珀酰谷胱甘肽水解酶
作用于磷 - 氮键	对核糖核酸或脱氧核糖核酸有活性且产生 3'- 磷酸单酯的核糖核酸内切酶	单萜 e- 内酯水解酶	类固醇 - 内酯酶
作用于硫 - 氮键	对核糖核酸或脱氧核糖核酸有活性且产生 5'- 磷酸单酯的核糖核酸内切酶	N- 乙酰半乳糖胺 -4- 硫酸酯酶	固醇酯酶
放线菌素内酯酶	作用于酸酐的酶	N- 乙酰半乳糖胺 -6- 硫酸酯酶	固醇 - 硫酸酯酶
酰基肉碱水解酶	作用于碳 - 碳键的酶	N- 乙酰半乳糖胺聚糖脱乙酰酶	琥珀酰辅酶 A 水解酶
酰基辅酶 A 水解酶	作用于除肽键以外的碳 - 氮键的酶	N- 乙酰葡萄糖胺 -6- 硫酸酯酶	蔗糖 - 磷酸磷酸酶
酰基甘油脂肪酶	作用于碳 - 磷键的酶	N- 磺氨基葡萄糖胺水解酶	糖 - 磷酸酶
酰氧基酰基水解酶	作用于碳 - 硫键的酶	油酰 -[酰基载体蛋白] 水解酶	硫酸酯水解酶
酰基丙酮酸水解酶	作用于醚键的酶	ω 肽酶	鞣酸酶

[0380]

ADAMTS13	作用于卤离子键的酶	苔色酸-缩酚酸水解酶	硫酯水解酶
腺苷脱氨酶	作用于肽键的酶(肽酶)	草酰乙酸	硫醚和三烷基锍水解酶
腺苷酸基-[谷氨酸酯-氨连接酶]水解酶	作用于磷-氮键的酶	棕榈酰基[蛋白]水解酶	苏氨酸内肽酶
ADP 依赖性中链酰基辅酶 A 水解酶	作用于硫-氮键的酶	棕榈酰辅酶 A 水解酶	胸苷磷酸化酶
ADP 依赖性短链酰基辅酶 A 水解酶	作用于硫-硫键的酶	果胶酯酶	海藻糖-磷酸酶
ADP-磷酸甘油酸磷酸酶	醚水解酶.	肽基肽水解酶	三乙酸酯-内酯酶
碱性磷酸酶	产生 5'-磷酸单酯的脱氧核糖核酸外切酶	肽基-氨基酸水解酶	三磷酸单酯水解酶
全反式棕榈酸视黄酯水解酶	对核糖核酸或脱氧核糖核酸有活性且产生 3'-磷酸单酯的核酸外切酶	肽基氨基酸水解酶或酰基氨基酸水解酶	三硫磺酸酯水解酶
氨酰基-tRNA 水解酶	对核糖核酸或脱氧核糖核酸有活性且产生 5'-磷酸单酯的核酸外切酶	肽基-二肽酶	托品酯酶
氨基肽酶	产生 3'-磷酸单酯的核糖核酸外切酶	苯乙酰辅酶 A 水解酶	泛素硫醇酯酶
芳基酯酶	产生 5'-磷酸单酯的核糖核酸外切酶.	苯丙氨酸氨裂解酶	UDP-磺基奎诺糖合酶
芳基硫酸酯酶	因子 IX	苯丙氨酸羟化酶	尿酸酶
天冬酰胺酶	因子 VIII	脱镁叶绿甲酯酸酶	糖醛酸内酯酶
天冬氨酸内肽酶	脂肪酰基乙酯合酶	根皮素水解酶	蜡酯水解酶
b-二酮水解酶		佛波醇-二酯水解酶	木糖酸-1,4-内酯酶

[0381]

表 4. 靶标			
一般靶标类别			
微生物	多肽	DNA	氨基酸
真菌	毒素	RNA	朊病毒
细菌	脂质	寄生生物	细胞因子
病毒	细胞	细胞碎片	
感染性疾病相关靶标			

[0382]

脂多糖	细胞侵袭蛋白	中间链球菌溶素	分泌的效应蛋白 sptP
闭合带毒素	霍乱肠毒素	侵入蛋白 sipA	斯氏李斯特菌溶素(Seeligeriolysin)
肌动蛋白聚合蛋白 RickA	半胱氨酸蛋白酶	ι毒素组分 Ia	丝氨酸蛋白酶
肌动蛋白聚合蛋白 RickA	细胞致死膨胀毒素	伊氏李斯特菌溶素(Ivanolysin)	志贺毒素 (Shiga toxin)
单磷酸腺苷蛋白转移酶 vopS	细胞溶素	LepB	鞘磷脂酶
腺苷酸环化酶	细胞毒性坏死因子	致死因子	葡萄球菌激酶
腺苷酸环化酶 ExoY	细胞毒素	白细胞毒素	链激酶
ADP-核糖基转移酶酶组分	皮肤坏死毒素	李斯特菌溶素	链球菌溶血素
气单胞菌溶素	去泛素化酶	微生物胶原酶	Streptopain
α毒素	白喉毒素	外膜蛋白 IcsA 自主转运蛋白	猪溶素
蜂房杆菌溶素(Alveolysin)	肠溶血素	葡萄球菌杀白细胞素 F(Panton-Valentine Leucocidin F)	超抗原
蜂房杆菌溶素	肠毒素	产气荚膜梭菌溶素	T3SS 分泌的效应子 EspF
炭疽杆菌溶素 O	表皮细胞分化抑制剂	百日咳毒素	破伤风毒素
Arp2/3 复合物活化蛋白 rickA	胞外酶	磷脂酶	Tir
二元 ADP-核糖基转移酶 CDT 毒素	外毒素	血纤维蛋白溶酶原活化因子	TolC
肉毒杆菌神经毒素	G-核苷酸交换因子	肺炎球菌溶血素	中毒性休克综合征毒素
C2 毒素，组分 II	鸟嘌呤核苷酸交换因子 sopE	保护性抗原	Zink-羧肽酶
CagA	热稳定肠毒素	蛋白激酶	Zink-羧肽酶
钙调蛋白敏感性腺苷酸环化酶	IgA 特异性丝氨酸内肽酶自主转运蛋白	化脓隐秘杆菌溶血素(Pyolysin)	Zn 依赖性肽酶
细胞周期抑制因子	肌醇磷酸磷酸酶 sopB	RTX 毒素	
脂质和细胞靶标			
循环肿瘤细胞	极低密度脂质(VLDL)	三酸甘油酯	脂肪酸
转移灶	高密度脂蛋白	乳糜微粒	胆固醇

[0383]

真核细胞	低密度脂蛋白	载脂蛋白

表 5. 癌症

急性成淋巴细胞性白血病(ALL)	结直肠癌	瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症	幼儿型胸膜肺母细胞瘤
急性髓性白血病(AML)	幼儿型颅咽管瘤	男性乳腺癌	妊娠和乳腺癌
肾上腺皮质癌	皮肤 T 细胞淋巴瘤	骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤	原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤
AIDS 相关卡波济肉瘤	导管原位癌(DCIS)	黑色素瘤	前列腺癌
AIDS 相关淋巴瘤	幼儿型胚胎肿瘤	梅克尔细胞癌	罕见癌症
肛门癌	子宫内膜癌	间皮瘤	直肠癌
阑尾癌	幼儿型室管膜瘤	隐匿性原发性转移性鳞状颈癌	肾细胞癌
幼儿型星形细胞瘤	上皮癌	涉及 NUT 基因的中线道癌	肾盂和输尿管移行细胞癌
幼儿型非典型畸胎样/横纹肌样瘤	食道癌	葡萄胎妊娠	视网膜母细胞瘤
基底细胞癌	幼儿型鼻腔神经胶质瘤	口腔和口咽癌	横纹肌肉瘤
胆管癌	尤文氏肉瘤	幼儿型多发性内分泌瘤综合征	唾液腺癌
膀胱癌	性腺外生殖细胞肿瘤	多发性骨髓瘤/浆细胞赘瘤	肉瘤
骨癌	肝外胆管癌	蕈样真菌病	继发性癌症
肠癌	眼癌	骨髓增生异常综合征	塞萨里综合征(Sézary Syndrome)
幼儿型脑干神经胶质瘤	胆囊癌	骨髓增生异常/骨髓增生性赘瘤	皮肤癌
脑肿瘤	胃癌	慢性骨髓增生性病症	皮肤癌(非黑色素瘤)
乳腺癌	胃肠类癌瘤	鼻腔和鼻旁窦癌	小细胞肺癌
幼儿型支气管肿瘤	生殖细胞肿瘤	鼻咽癌	小肠癌
伯基特淋巴瘤(Burkitt Lymphoma)	妊娠滋养细胞肿瘤(GTT)	神经母细胞瘤	软组织肉瘤
原发灶不明癌(Cancer of unknown primary)	神经胶质瘤	非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin Lymphoma)	鳞状细胞癌
骨扩散癌	毛细胞白血病	非小细胞肺癌	隐匿性原发性转移性鳞状颈癌

[0384]

[0385]

脑扩散癌	头颈癌	食管癌	胃癌(Stomach (Gastric) Cancer)
肝扩散癌	幼儿型心脏病	口腔癌(Oral Cancer)	胃癌
肺扩散癌	肝细胞(肝)癌	口腔癌(Oral Cavity Cancer)	皮肤T细胞淋巴瘤-参见蕈样真菌病和塞萨里氏综合征
类癌瘤	朗格汉斯细胞组织细胞增生症	口咽癌	睾丸癌
原发灶不明癌(Carcinoma of Unknown Primary)	霍奇金淋巴瘤	骨肉瘤(骨癌)	咽喉癌
幼儿型心脏(Cardiac/Heart)肿瘤	下咽癌	骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤	胸腺瘤和胸腺癌
幼儿型中枢神经系统非典型畸胎样/横纹肌样瘤	眼内黑色素瘤	卵巢癌	甲状腺癌
幼儿型中枢神经系统胚胎肿瘤	胰岛细胞肿瘤，胰腺神经内分泌肿瘤	胰腺癌	肾盂和输尿管移行细胞癌
幼儿型中枢神经系统	肾癌	胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞肿瘤)	原发灶不明癌
宫颈癌	朗格汉斯细胞组织细胞增生症	幼儿型乳头状瘤病	输尿管和肾盂移行细胞癌
幼儿型脊索瘤	喉癌	副神经节瘤	尿道癌
绒毛膜癌	白血病	甲状旁腺癌	子宫内膜癌
慢性淋巴细胞性白血病(CLL)	唇和口腔癌	阴茎癌	子宫肉瘤
慢性髓性白血病(CML)	肝癌	咽癌	阴道癌
慢性骨髓增生性病症	小叶原位癌(LCIS)	嗜铬细胞瘤	外阴癌
结肠癌	低恶性潜在肿瘤	垂体瘤	瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症
淋巴瘤	肺癌	浆细胞赘瘤/多发性骨髓瘤	威尔姆氏瘤(Wilms Tumor)

[0386] 已关于代表性实施例对本发明进行了描述,所述代表性实施例被视为说明性实施方案,不限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求定义。对包括科学公布、论文、教科书、专利申请和已提交专利的公布的所有提及均出于所有目的特此以引用方式并入。

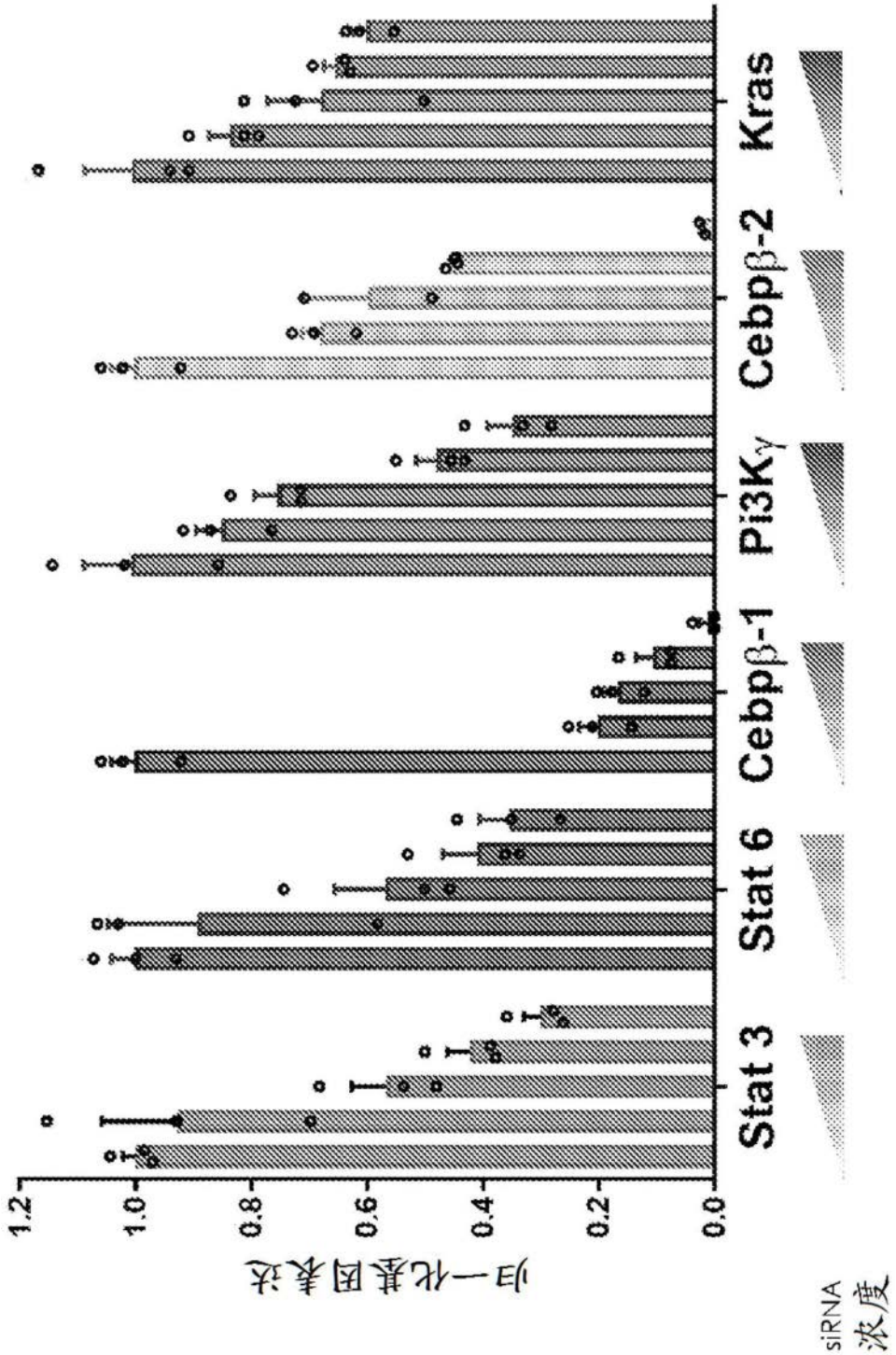

归一化基因表达
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Stat 3
Stat 6
Cebpβ-1
Pi3Kγ
Cebpβ-2
Kras
siRNA
浓度

图1

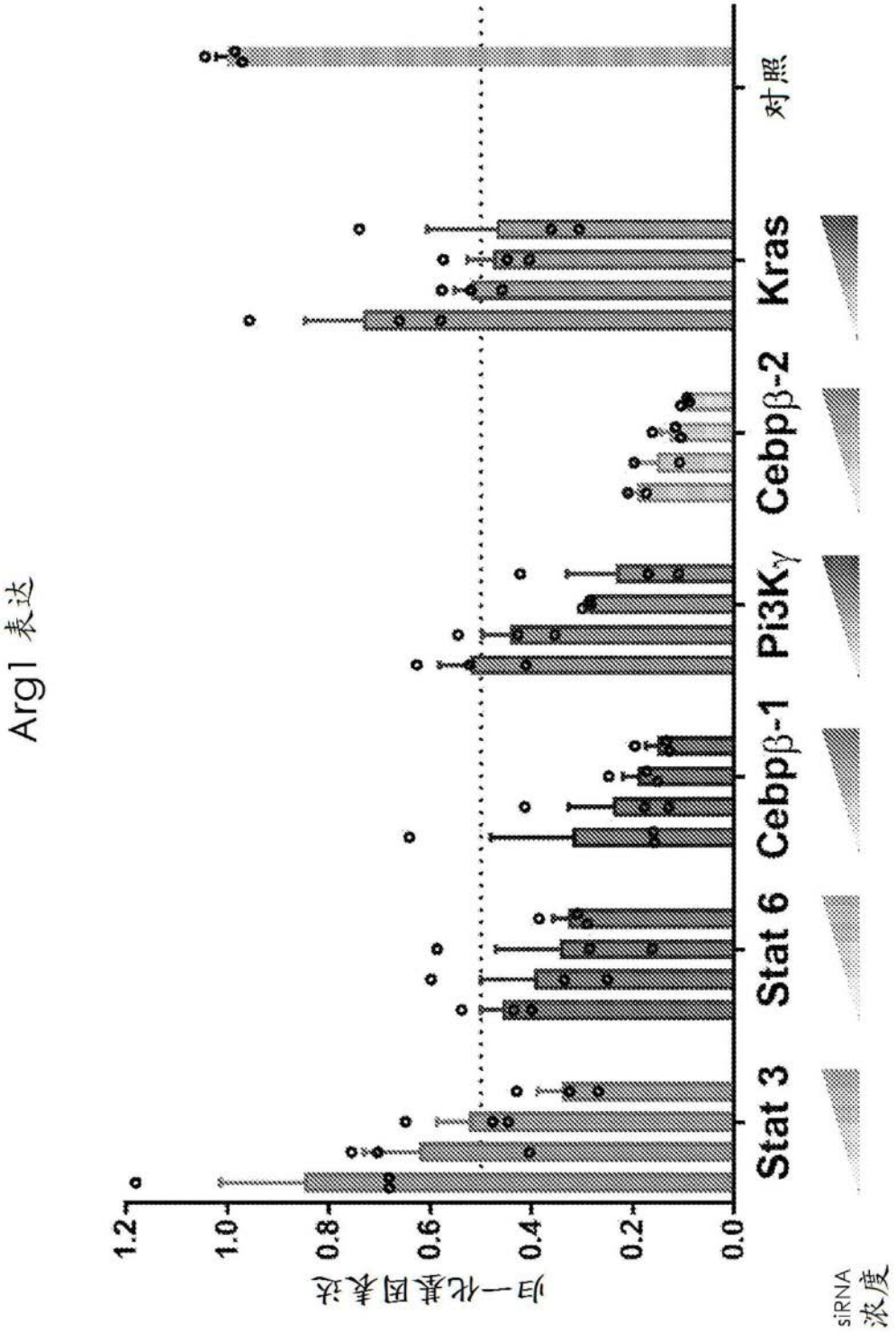

Arg1 表达
归一化基因表达
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Stat 3
Stat 6
Cebpβ-1
Pi3Kγ
Cebpβ-2
Kras
对照
siRNA
浓度

图2

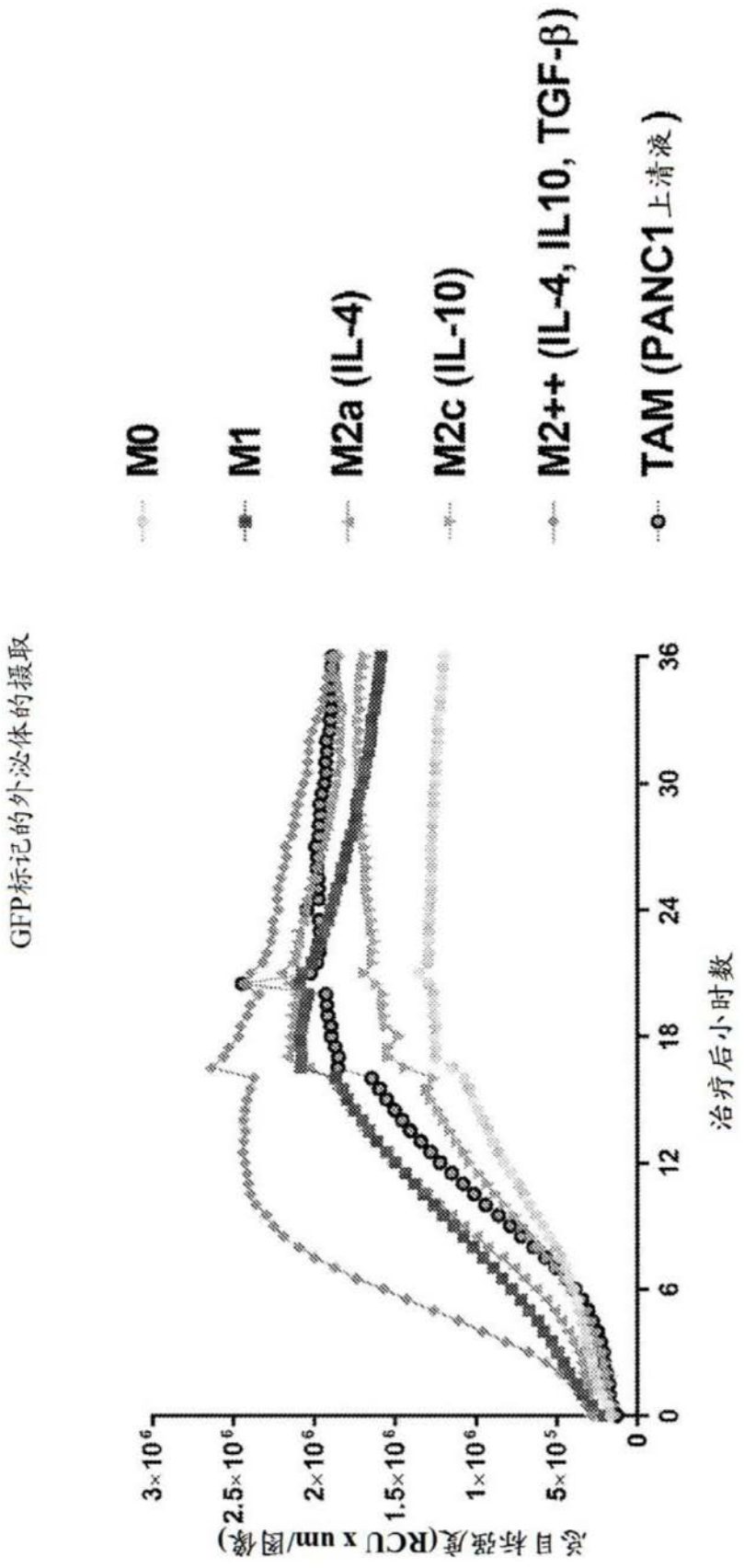

GFP标记的外泌体的摄取
M0
M1
M2a (IL-4)
M2c (IL-10)
M2++ (IL-4, IL10, TGF-β)
TAM (PANC1上清液)
总目标强度(RCU x um/图像)
3×10^6
2.5×10^6
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
0
6
12
18
24
30
36
治疗后小时数

图3

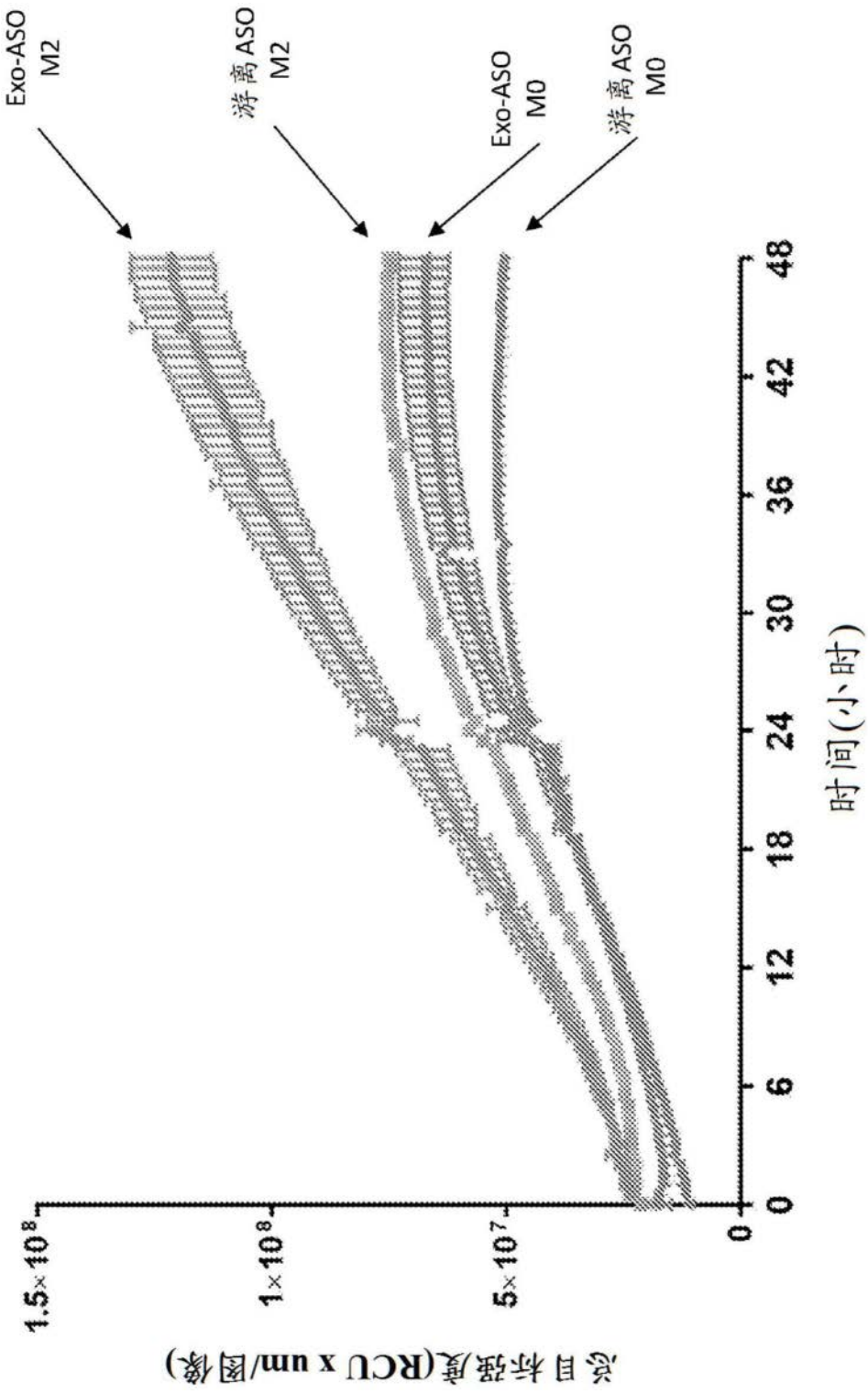

Exo-ASO M2
游离 ASO M2
Exo-ASO M0
游离 ASO M0
1.5×10^8
1×10^8
5×10^7
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
时间(小时)
总目标强度(RCU x um/图像)

图4

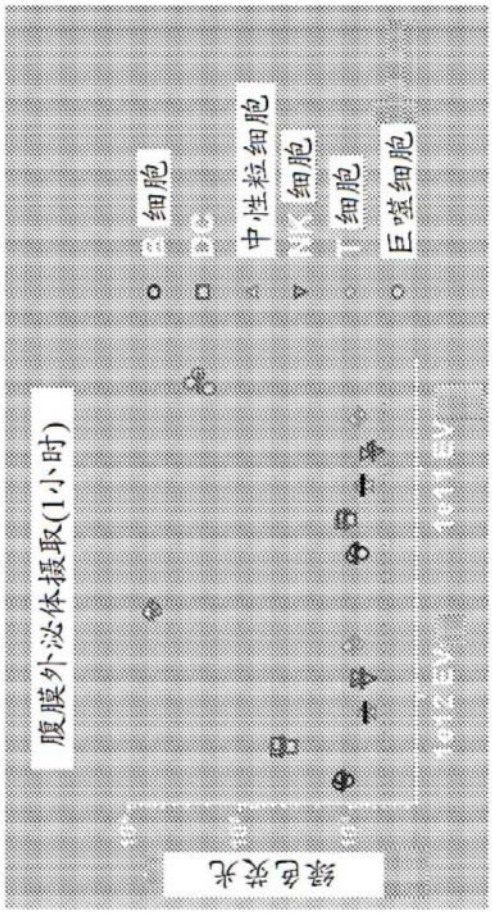


图5A

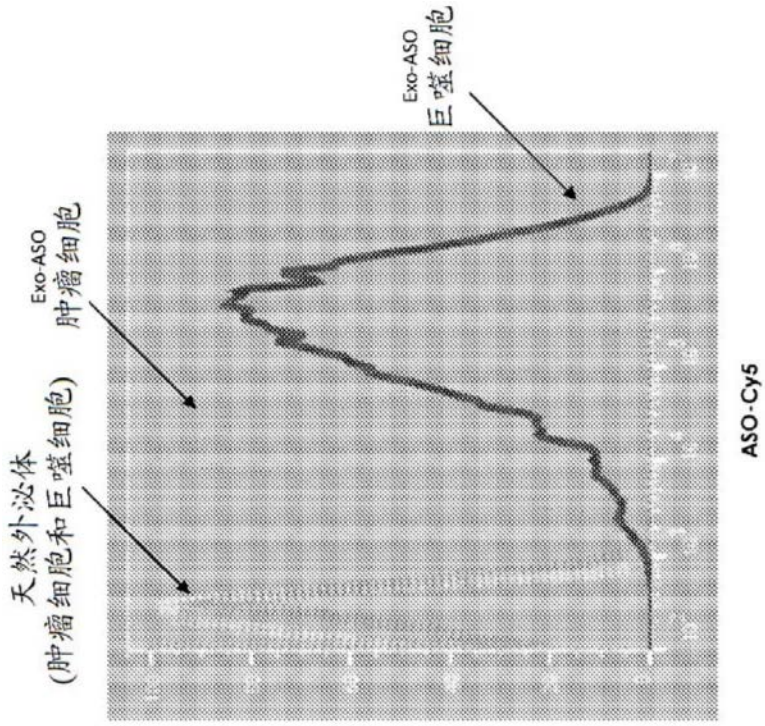


图5B

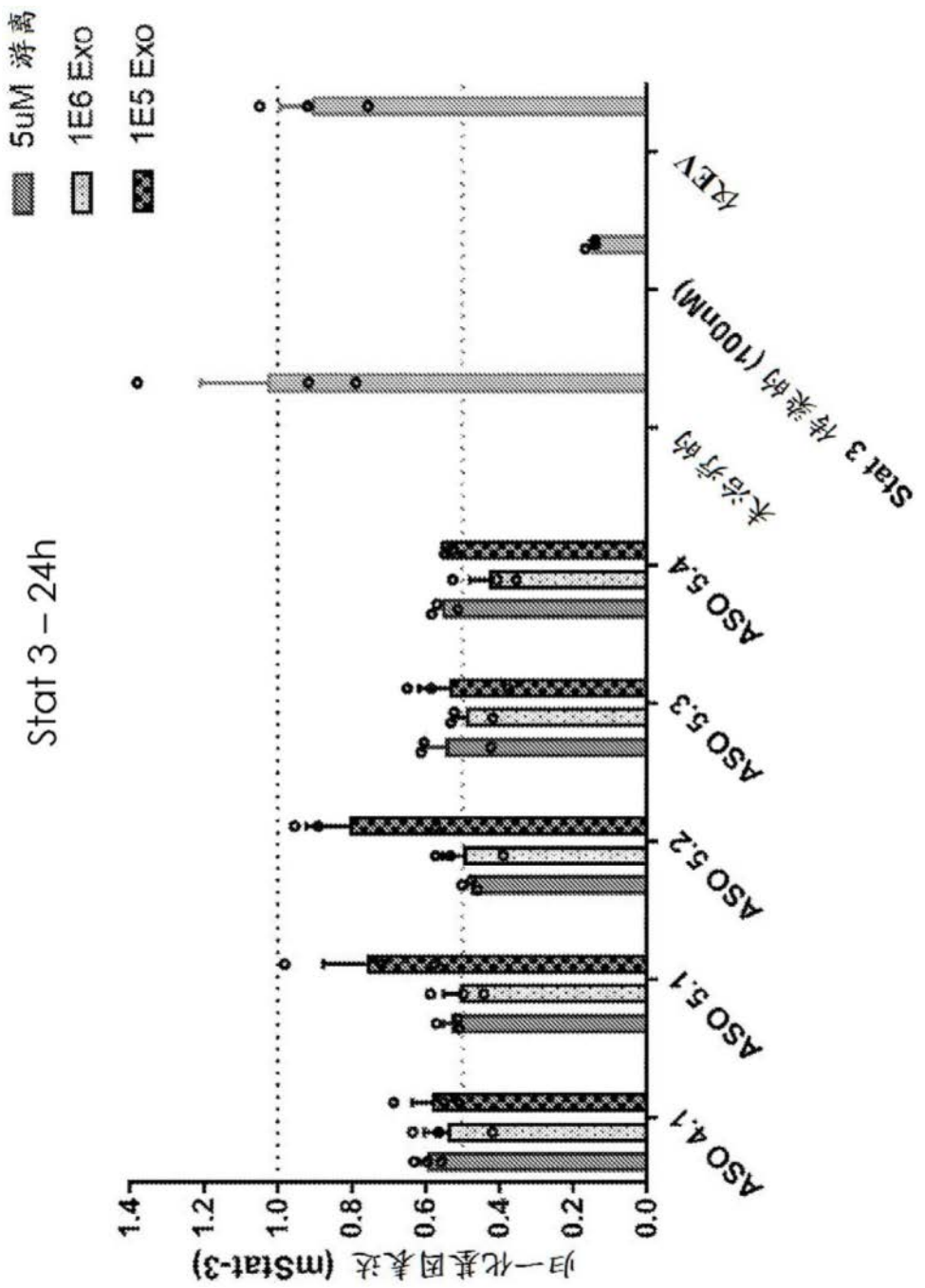

5uM 游离
1E6 Exo
1E5 Exo
Stat 3 – 24h
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ASO 4.1
ASO 5.1
ASO 5.2
ASO 5.3
ASO 5.4
未治疗的
Stat 3 体液的 (100nM)
仅EV

图6

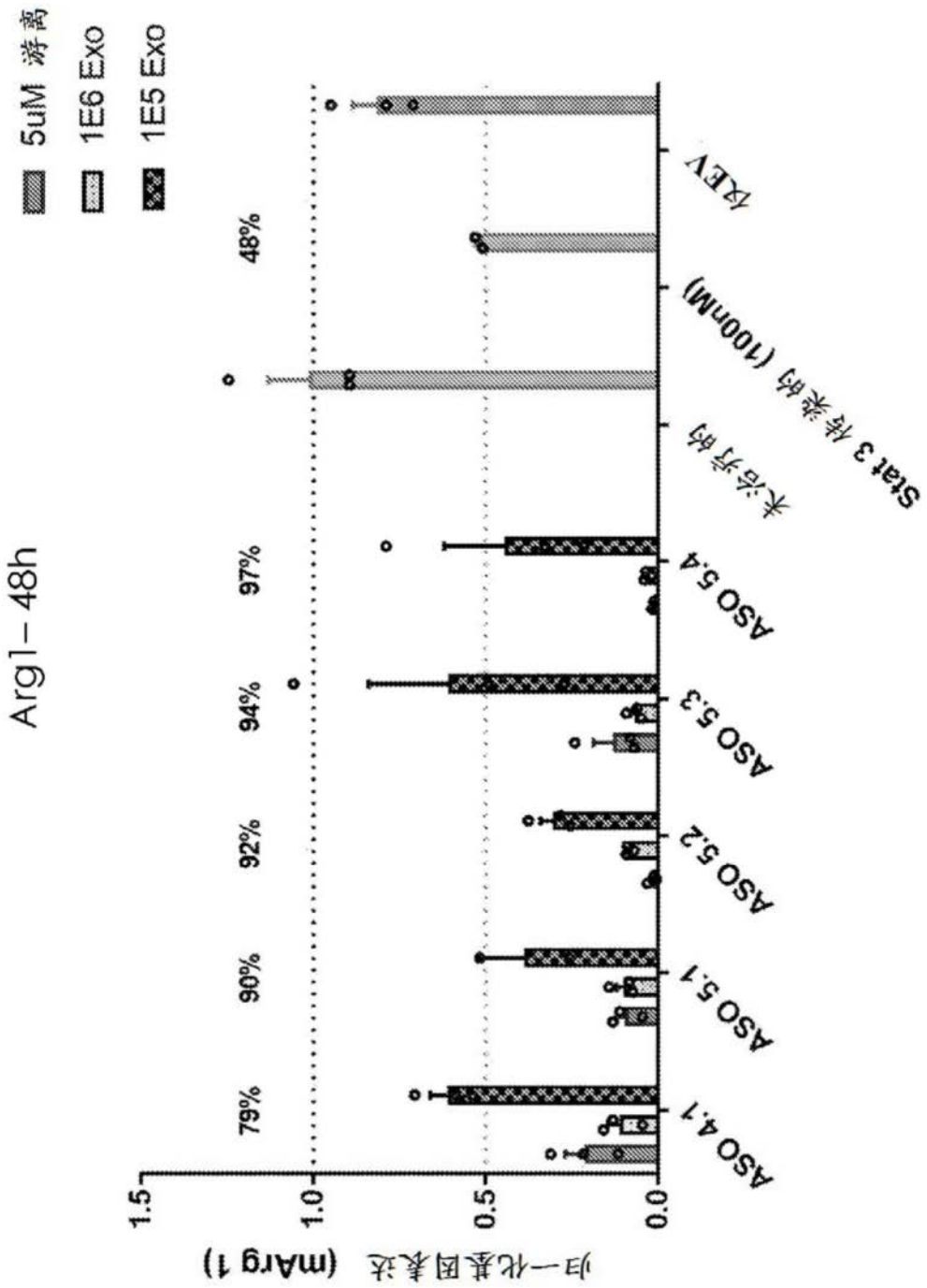

5uM 游离
1E6 Exo
1E5 Exo
Arg1– 48h
归一化基因表达 (mArg 1)
1.5
1.0
0.5
0.0
79%
90%
92%
94%
97%
48%
ASO 4.1
ASO 5.1
ASO 5.2
ASO 5.3
ASO 5.4
未治疗的
Stat3 格染的 (100nM)
载EV

图7

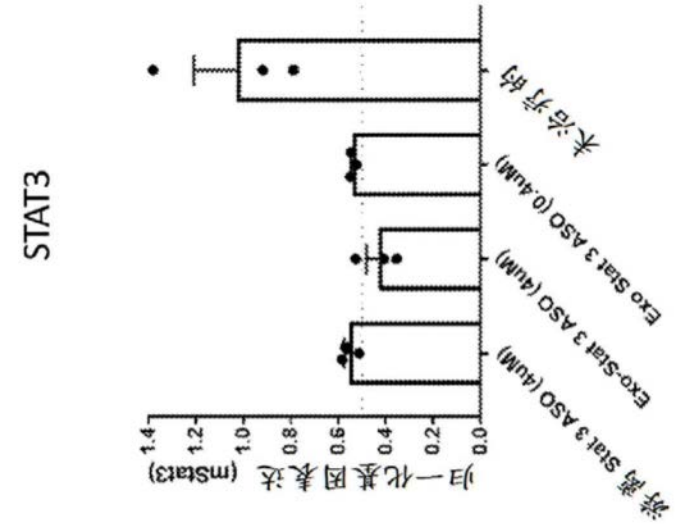

STAT3
相对基因表达 (mstat3)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
未治疗的
Exo Stat 3 ASO (0.4uM)
Exo-Stat 3 ASO (4uM)
Exo Stat 3 ASO (4uM)
荷瘤 Stat 3 ASO (4uM)

图8A

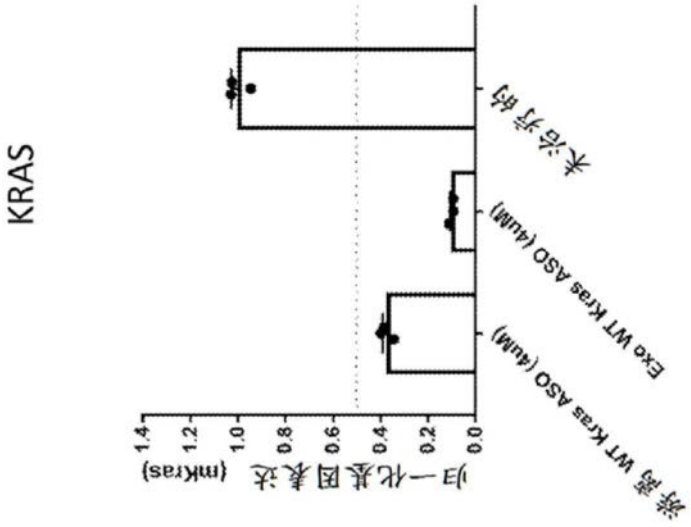

KRAS
相对基因表达 (mkras)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
未治疗的
Exo WT Kras ASO (4uM)
荷瘤 WT Kras ASO (4uM)

图8B

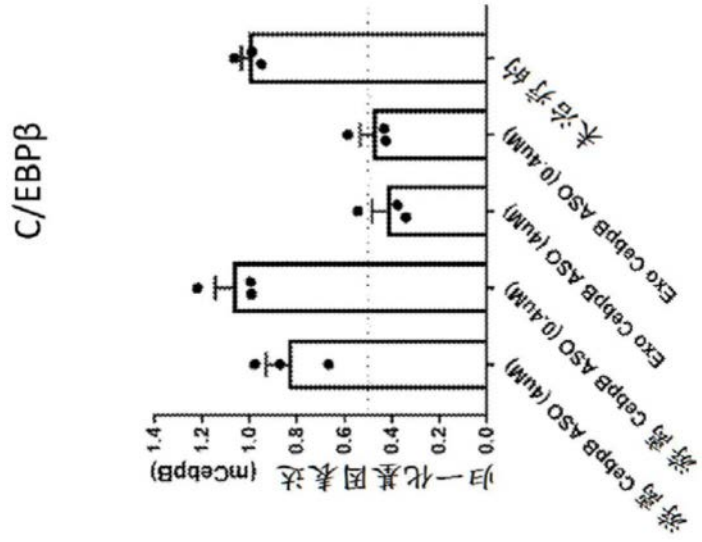

C/EBPβ
归一化基因表达 (mcebpB)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
未治疗的
Exo cebpB ASO (0.4uM)
Exo cebpB ASO (4uM)
游离 cebpB ASO (0.4uM)
游离 cebpB ASO (4uM)

图8C

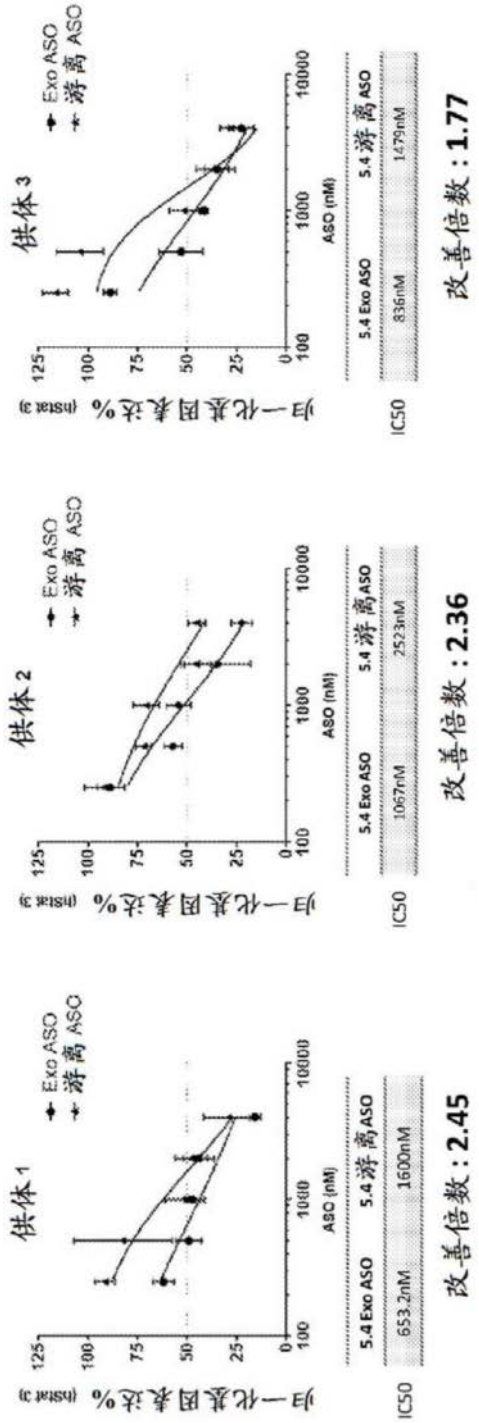

Stat 3 (24h)
供体 1
Exo ASO
游离 ASO
归一化基因表达% (Stat 3)
ASO (nM)
5.4 Exo ASO
5.4 游离 ASO
IC50
653.2nM
1600nM
改善倍数：2.45
供体 2
Exo ASO
游离 ASO
归一化基因表达% (Stat 3)
ASO (nM)
5.4 Exo ASO
5.4 游离 ASO
IC50
1067nM
2523nM
改善倍数：2.36
供体 3
Exo ASO
游离 ASO
归一化基因表达% (Stat 3)
ASO (nM)
5.4 Exo ASO
5.4 游离 ASO
IC50
836nM
1479nM
改善倍数：1.77

图9A

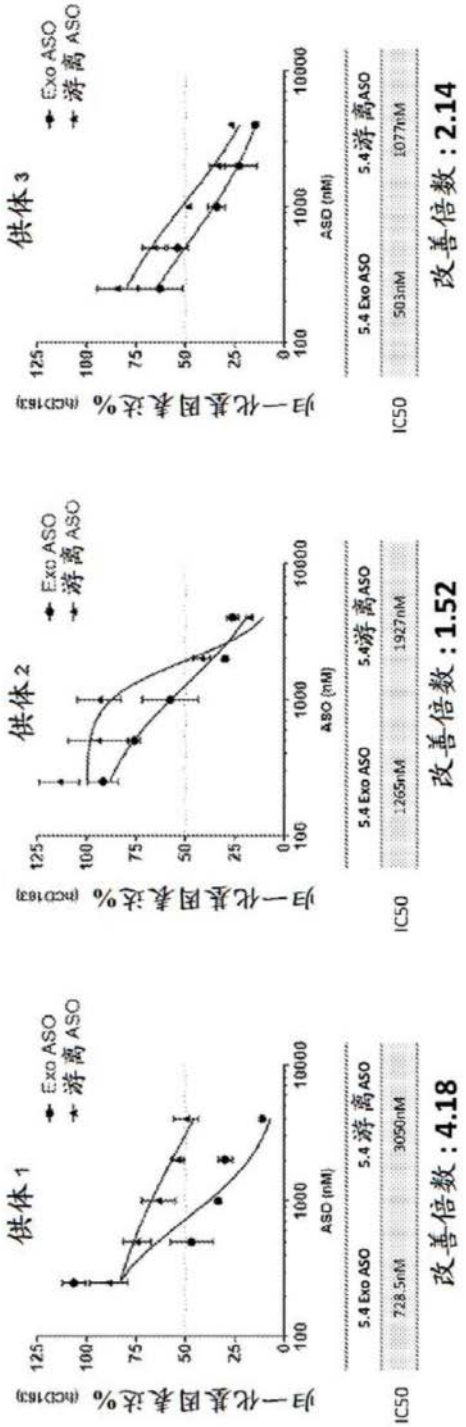

CD163 (48h)
供体 1
供体 2
供体 3
Exo ASO
游离 ASO
归一化基因表达% (CD163)
ASO (nM)
5.4 Exo ASO
5.4 游离 ASO
IC50
728.5nM
3050nM
1265nM
1927nM
503nM
1077nM
改善倍数：4.18
改善倍数：1.52
改善倍数：2.14

图9B

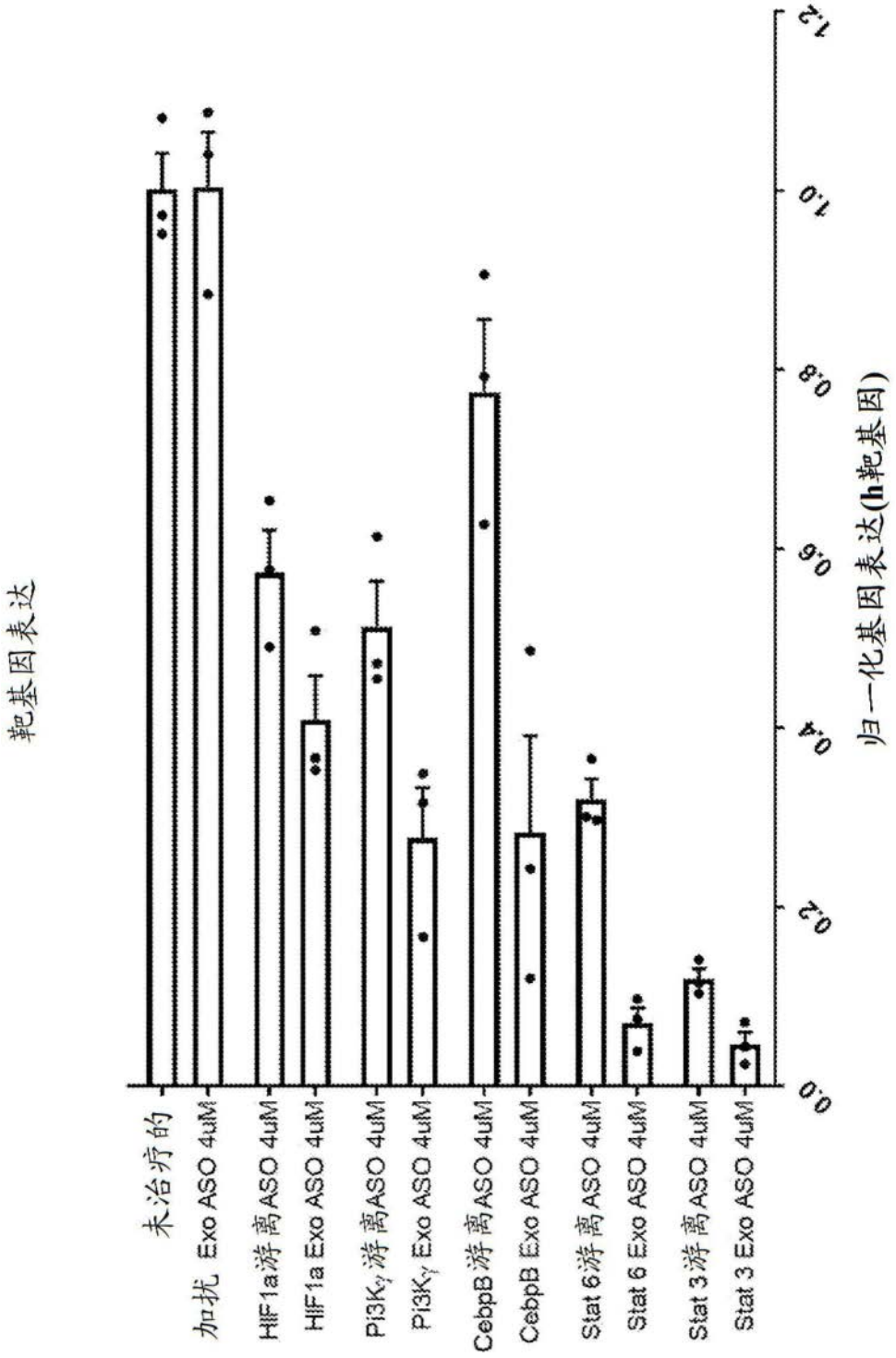

靶基因表达
归一化基因表达(h靶基因)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
未治疗的
加扰 Exo ASO 4uM
Hif1a游离ASO 4uM
Hif1a Exo ASO 4uM
Pi3Kγ游离ASO 4uM
Pi3Kγ Exo ASO 4uM
CebpB游离ASO 4uM
CebpB Exo ASO 4uM
Stat 6游离ASO 4uM
Stat 6 Exo ASO 4uM
Stat 3游离ASO 4uM
Stat 3 Exo ASO 4uM

图10

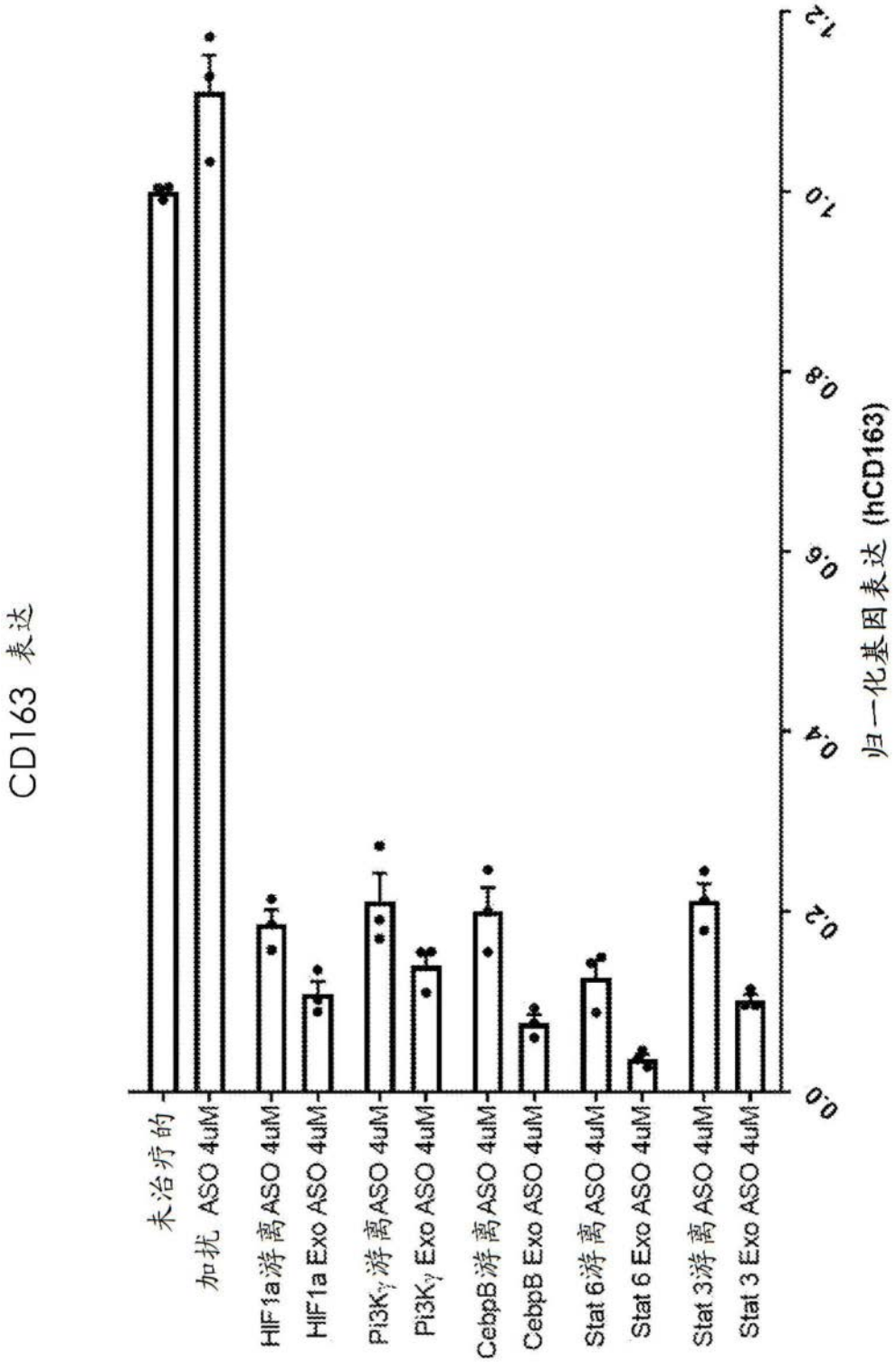

CD163 表达
归一化基因表达 (hCD163)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
未治疗的
加扰 ASO 4uM
Hif1a游离ASO 4uM
Hif1a Exo ASO 4uM
Pi3Kγ游离ASO 4uM
Pi3Kγ Exo ASO 4uM
CebpB游离ASO 4uM
CebpB Exo ASO 4uM
Stat 6游离ASO 4uM
Stat 6 Exo ASO 4uM
Stat 3游离ASO 4uM
Stat 3 Exo ASO 4uM

图11

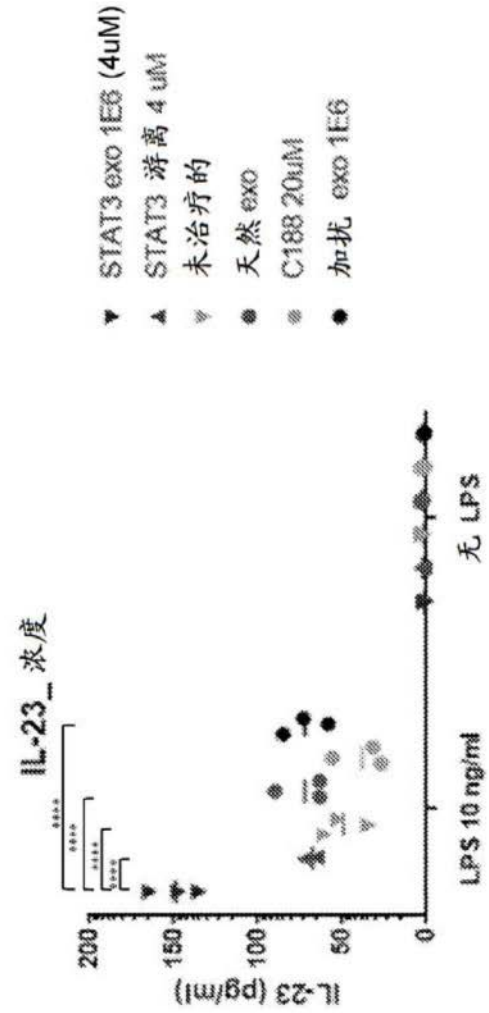

STAT3 exo 1E6 (4uM)
STAT3 游离 4 uM
未治疗的
天然 exo
C188 20uM
加扰 exo 1E6
IL-23_浓度
IL-23 (pg/ml)
200
150
100
50
0
LPS 10 ng/ml
无 LPS

图 12B

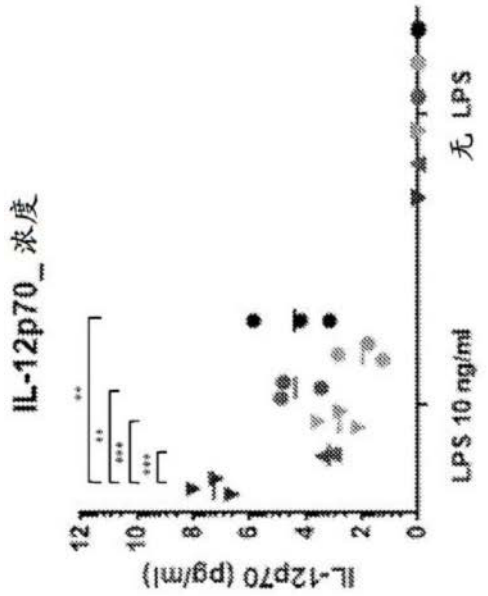

IL-12p70_浓度
IL-12p70 (pg/ml)
12
10
8
6
4
2
0
LPS 10 ng/ml
无 LPS

图 12A

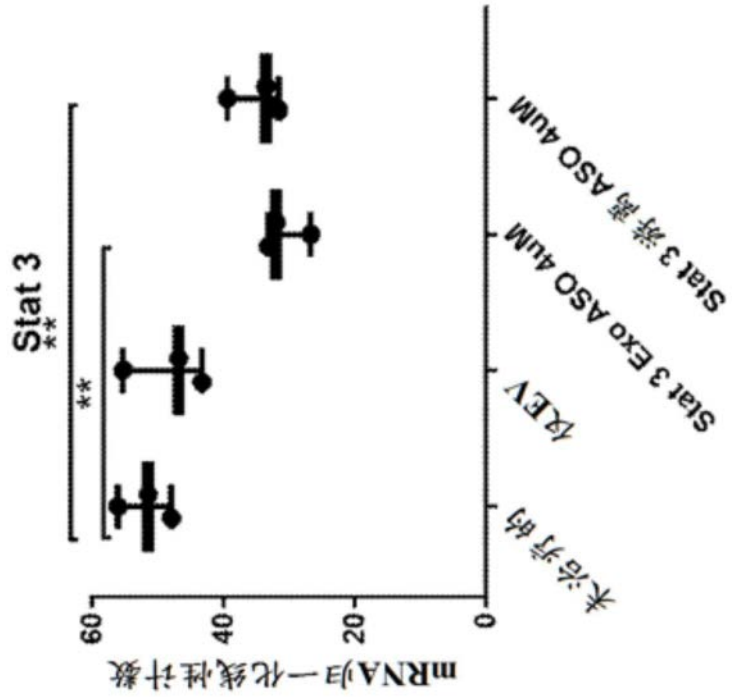

Stat 3
**
**
mRNA归一化线性计数
0
20
40
60
未治疗的
对照EV
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 游离 ASO 4uM

图13A

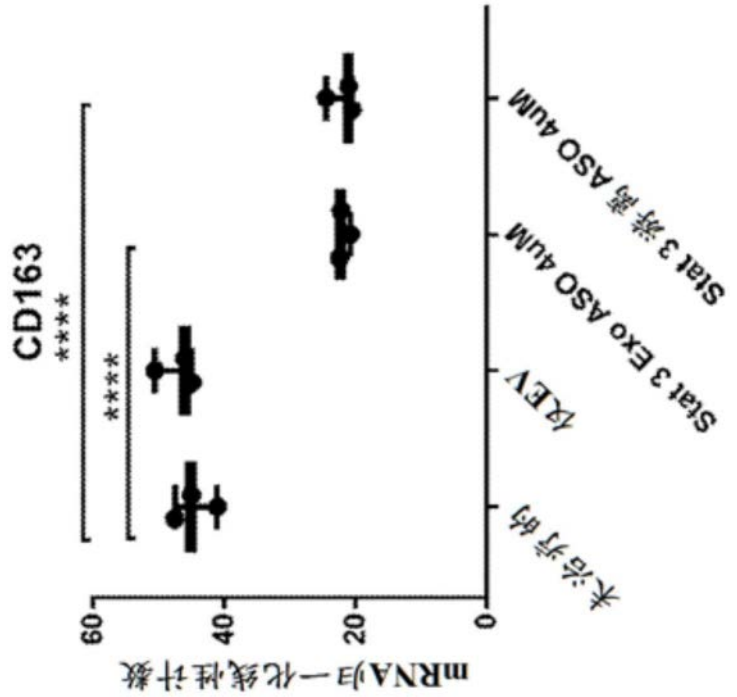

CD163
****
****
mRNA归一化线性计数
0
20
40
60
未治疗的
对照EV
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 游离 ASO 4uM

图13B

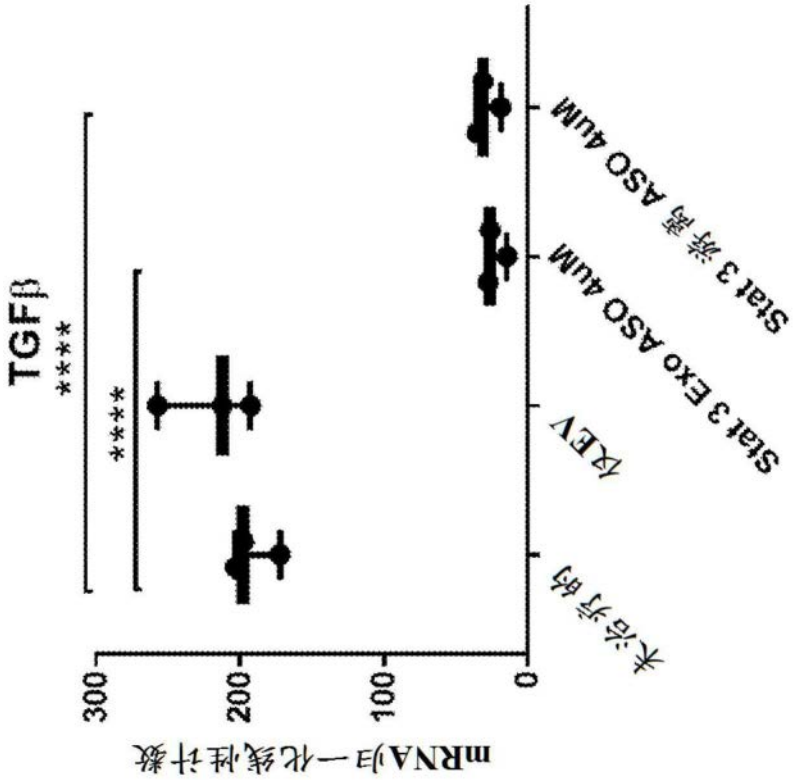

TGFβ
****
****
mRNA归一化线性计数
300
200
100
0
未治疗的
对照EV
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 游离 ASO 4uM

图13C

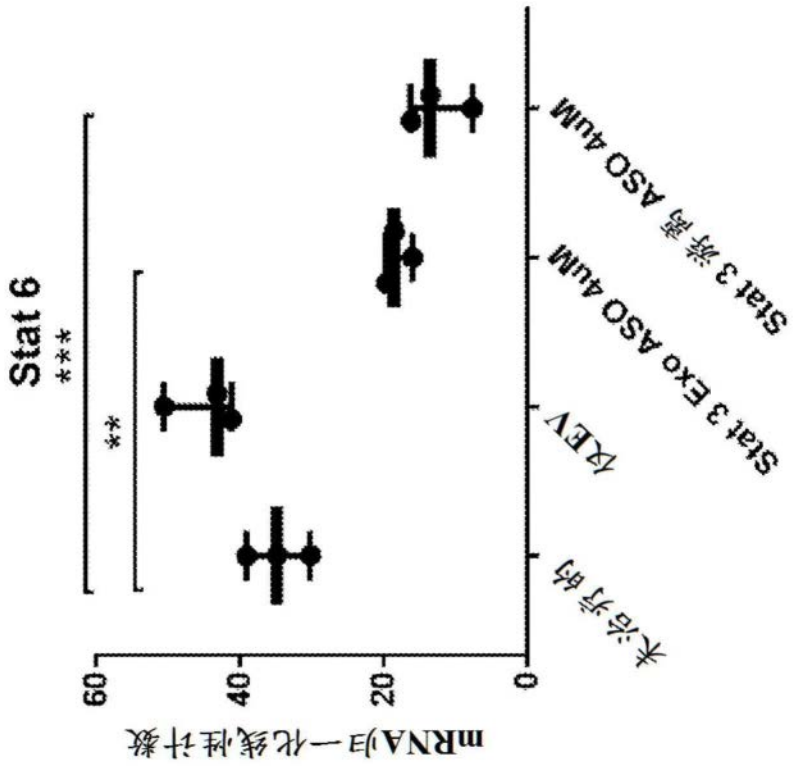

Stat 6
***
**
mRNA归一化线性计数
60
40
20
0
未治疗的
对照EV
Stat 3 Exo ASO 4uM
Stat 3 游离 ASO 4uM

图13D

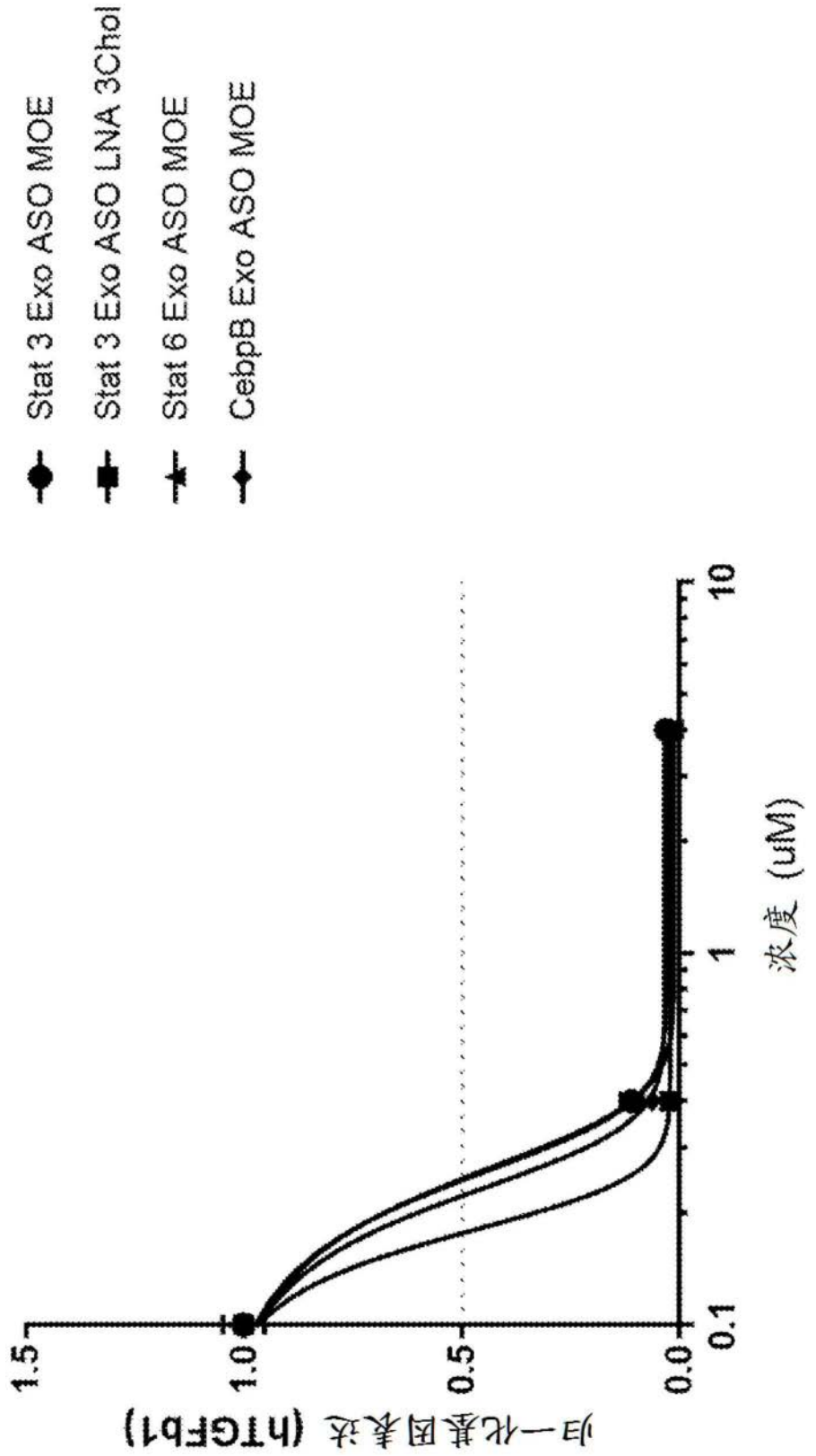

Stat 3 Exo ASO MOE
Stat 3 Exo ASO LNA 3Chol
Stat 6 Exo ASO MOE
CebpB Exo ASO MOE
归一化基因表达 (hTGFb1)
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
浓度 (uM)

图14