



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114727947 A

(43) 申请公布日 2022.07.08

(21) 申请号 202080078588.6

亚伦·诺伊斯

(22) 申请日 2020.09.25

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

(30) 优先权数据

专利代理师 樊英如 张静

62/906,018 2019.09.25 US

(51) Int.Cl.

62/906,485 2019.09.26 US

A61K 9/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/052935 2020.09.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/062317 EN 2021.04.01

(71) 申请人 科迪亚克生物科学公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 康林·奥尼尔 雷蒙德·布尔多

拉内·哈里森 迈克·多尔蒂

权利要求书9页 说明书74页

序列表43页 附图9页

(54) 发明名称

细胞外囊泡组合物

(57) 摘要

本公开涉及用于储存和施用细胞外囊泡 (例如,外泌体) 的组合物,所述细胞外囊泡可以包含支架蛋白和一个或多个 (例如,1、2、3、4、5个或更多) 外源性生物活性部分。本文还提供了产生所述外泌体的方法和使用所述外泌体治疗和/或预防一系列医学病症的方法。

1. 一种药物组合物,其包含
 - (a) 细胞外囊泡;
 - (b) 糖类;
 - (c) 氯化钠;
 - (d) 磷酸钾;和
 - (e) 磷酸钠,其中所述组合物在pH为约7.2的溶液中。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述细胞外囊泡是外泌体。
3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中所述组合物能够在4℃的温度下储存至少约4小时、至少约5小时、至少约6小时、至少约7小时、至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约11小时、至少约12小时、至少约15小时、至少约20小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天或至少约7天。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述组合物能够被冷冻和解冻,其中所述解冻的组合物具有约7.2的pH。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中所述组合物具有7.0、7.1、7.2、7.3或7.4的pH。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述组合物具有7.2的pH。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中所述pI在约1至约6.5的范围内。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中所述组合物具有(i) 减少的聚集, (ii) 改善的EV稳定性, (iii) 改善的EV架构完整性, 以及 (iv) 改善的包含在EV上或EV中的工程化蛋白质的稳定性。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述糖类包括单糖、二糖、三糖、寡糖、多糖、糖醇或其任何组合。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的组合物,其中所述糖类具有约180.00g/mol至约380.00g/mol的分子量。
11. 如权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中所述糖类包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖和/或其组合。
12. 如权利要求1至11中任一项所述的组合物,其中所述糖类是分子量为约90.00g/mol至约190.00g/mol的糖醇。
13. 如权利要求9至12中任一项所述的组合物,其中所述糖醇包括甘油、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇和/或其组合。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的组合物,其中所述糖类是蔗糖或海藻糖。
15. 如权利要求1至14中任一项所述的组合物,其中所述糖类以约5%w/v的浓度存在于所述组合物中。
16. 一种药物组合物,其包含(i) 细胞外囊泡和(ii) 糖类,所述糖类是浓度为约5%w/v的蔗糖或海藻糖。
17. 如权利要求16所述的组合物,其中所述组合物与包含浓度为1%w/v至4%w/v的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,具有改善的稳定性。
18. 如权利要求1至17中任一项所述的组合物,其中所述组合物具有在约6mS/cm+/-

10%与约10mS/cm $\pm$ 10%之间的电导率。

19. 如权利要求18所述的组合物,其中所述电导率在6mS/cm与约7mS/cm之间、在约7mS/cm与约8mS/cm之间、在约8mS/cm与约9mS/cm之间、或在约9mS/cm与约10mS/cm之间。

20. 如权利要求18或19所述的组合物,其中所述电导率为约6mS/cm、约7mS/cm、约8mS/cm、约9mS/cm或约10mS/cm。

21. 如权利要求16至20中任一项所述的组合物,其还包含氯化钠。

22. 如权利要求1至15和16至21中任一项所述的组合物,其中所述氯化钠以在约10mM与约134mM之间的浓度存在于所述组合物中。

23. 如权利要求22所述的组合物,其中氯化钠的浓度为在约10mM至约130mM之间、在约20mM至约120mM之间、在约30mM至约110mM之间、在约40mM至约100mM之间、在约50mM至约90mM之间、在约60mM至约80mM之间、在约70mM至约80mM之间、在约45mM至约95mM之间、在约45mM至约80mM之间、在约45mM至约70mM之间、在约45mM至约65mM之间、在约50mM至约65mM之间、在约50mM至约60mM之间、在约50mM至约55mM之间、在约50mM至约55mM之间或在约51mM至约54mM之间。

24. 如权利要求22或23所述的组合物,其中氯化钠的浓度为约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约60mM、约70mM、约80mM、约90mM或约100mM。

25. 如权利要求22至24中任一项所述的组合物,其中氯化钠的浓度为约39mM、约40mM、约41mM、约42mM、约43mM、约44mM、约45mM、约46mM、约47mM、约48mM、约49mM或约50mM。

26. 如权利要求16至25中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含磷酸盐缓冲剂。

27. 如权利要求26所述的组合物,其中所述磷酸盐缓冲剂包含至少一种磷酸盐化合物,包括磷酸钾、磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和/或其组合。

28. 如权利要求27所述的组合物,其中所述磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约2、约1:约3、约1:约4或约1:约5的磷酸钾和磷酸钠。

29. 如权利要求27或28所述的组合物,其中所述磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约3的磷酸钾和磷酸钠。

30. 如权利要求27至29中任一项所述的组合物,其中所述磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约2的磷酸钾和磷酸钠。

31. 一种药物组合物,其在溶液中包含(i)细胞外囊泡,(ii)磷酸钾,和(iii)磷酸钠,其中磷酸钾和磷酸钠的比例为约1比约3或约1比约2。

32. 如权利要求16至31中任一项所述的组合物,其中所述溶液具有7.1至7.3的pH。

33. 如权利要求1至15和27至32中任一项所述的组合物,其中所述磷酸钾以在约1mM至约20mM之间、约2mM至约19mM之间、约3mM至约18mM之间、约4mM至约17mM之间、约5mM至约16mM之间、约5mM至约15mM之间的浓度存在于所述组合物中。

34. 如权利要求33所述的组合物,其中所述磷酸钾的浓度为约4.5mM、约4.6mM、约4.7mM、约4.8mM、约4.9mM、约5.0mM、约5.1mM、约5.2mM、约5.3mM、约5.4mM或约5.5mM。

35. 如权利要求33或34所述的组合物,其中所述磷酸钾的浓度为5.15mM。

36. 如权利要求33所述的组合物,其中所述磷酸钾的浓度为约15.0mM、约15.1mM、约15.2mM、约15.3mM、约15.4mM、约15.5mM、约15.6mM、约15.7mM、约15.8mM、约15.9mM、约16.0、约16.1mM、约16.2mM、约16.3mM、约16.4mM或约16.5mM。

37. 如权利要求33或36所述的组合物,其中所述磷酸钾的浓度为15.4mM。

38. 如权利要求1至15和27至37中任一项所述的组合物,其中所述磷酸钾为磷酸二氢钾。

39. 如权利要求1至15和27至38中任一项所述的组合物,其中所述磷酸钠以在约10mM至约30之间、约11mM至约29mM之间、约12mM至约28mM之间、约13mM至约27mM之间、约14mM至约26mM之间的浓度存在于所述组合物中。

40. 如权利要求39所述的组合物,其中所述磷酸钠以约14.5mM、约14.6mM、约14.7mM、约14.8mM、约14.9mM、约15.0mM、约15.1mM、约15.2mM、约15.3mM、约15.4mM或约15.5mM的浓度存在于所述组合物中。

41. 如权利要求39或40所述的组合物,其中所述磷酸钠的浓度为14.9mM。

42. 如权利要求39所述的组合物,其中所述磷酸钠以约26.5mM、约26.6mM、约26.7mM、约26.8mM、约26.9mM、约27.0mM、约27.1mM、约27.2mM、约27.3mM、约27.4mM或约27.5mM的浓度存在于所述组合物中。

43. 如权利要求39或42所述的组合物,其中所述磷酸钠的浓度为27.1mM。

44. 如权利要求1至15和27至43中任一项所述的组合物,其中所述磷酸钠为磷酸氢二钠七水合物。

45. 如权利要求1至44中任一项所述的组合物,其还包含抗氧化剂。

46. 如权利要求45所述的组合物,其中所述抗氧化剂包括D-蛋氨酸、L-蛋氨酸、抗坏血酸、异抗坏血酸、抗坏血酸钠、硫代甘油、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、胱氨酸、二硫苏糖醇、谷胱甘肽、生育酚、丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、硫酸氢钠、连二亚硫酸钠、A-生育酚、 γ -生育酚、没食子酸丙酯、抗坏血基棕榈酸酯、偏亚硫酸氢钠、硫脲、硫代硫酸钠、没食子酸丙酯和巯基乙酸钠。

47. 如权利要求1至46中任一项所述的组合物,其中所述组合物不是冻干的。

48. 如权利要求1至47中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含螯合剂。

49. 如权利要求1至48中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含白蛋白。

50. 如权利要求1至49中任一项所述的组合物,其包含:

a. 浓度为约5%w/v的蔗糖;

b. 浓度为约50mM的氯化钠;

c. 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;

d. 浓度为约15mM的磷酸氢二钠七水合物;

其中所述组合物在pH为7.2且电导率为7.23mS/cm $\pm$ 10%的溶液中。

51. 如权利要求1至49中任一项所述的组合物,其包含:

a. 浓度为约5%w/v的蔗糖,

b. 浓度为约40mM的氯化钠;

c. 浓度为约15mM的磷酸二氢钾;

d. 浓度为约27mM的磷酸氢二钠七水合物;

其中所述组合物在pH为7.2且电导率为8.8mS/cm $\pm$ 10%的溶液中。

52. 如权利要求1至51中任一项所述的组合物,其中所述组合物能够在约-20℃至约-80℃的温度下储存,其中所述细胞外囊泡的稳定性没有降低。

53. 如权利要求52所述的组合物,其中所述组合物可以储存约一周、约两周、约三周、约四周、约一个月、约两个月、约三个月、约四个月、约五个月、约六个月、约七个月、约八个月、约九个月、约十个月、约11个月、约12个月、约一年、约两年、约三年或约四年。

54. 如权利要求16至53中任一项所述的组合物,其中所述细胞外囊泡是外泌体。

55. 如权利要求1至15和16至54中任一项所述的组合物,其中所述细胞外囊泡还包含支架蛋白。

56. 如权利要求55所述的组合物,其中所述支架蛋白是支架X。

57. 如权利要求55或56所述的组合物,其中有效载荷连接至所述支架蛋白。

58. 如权利要求57所述的组合物,其中所述有效载荷通过接头连接至所述支架蛋白。

59. 如权利要求58所述的组合物,其中所述接头是多肽。

60. 如权利要求58所述的组合物,其中所述接头是非多肽部分。

61. 如权利要求56至60中任一项所述的组合物,其中支架X是能够将所述有效载荷锚定在所述细胞外囊泡的外表面上的支架蛋白。

62. 如权利要求56至61中任一项所述的组合物,其中所述支架蛋白包括前列腺素F2受体负调控因子 (PTGFRN蛋白)。

63. 如权利要求55至62中任一项所述的组合物,其中所述支架蛋白包括PTGFRN蛋白或其片段。

64. 如权利要求55至62中任一项所述的组合物,其中所述支架蛋白包含SEQ ID NO:1-7和33中任一项中列出的氨基酸序列。

65. 如权利要求55至64中任一项所述的组合物,其中所述支架蛋白包含与SEQ ID NO:1至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

66. 如权利要求1至67中任一项所述的组合物,其中所述细胞外囊泡包含生物活性部分。

67. 如权利要求55至68中任一项所述的组合物,其中所述支架蛋白与所述生物活性部分融合。

68. 如权利要求55至68中任一项所述的组合物,其中所述支架蛋白不与所述生物活性部分融合。

69. 如权利要求68至71中任一项所述的组合物,其中所述生物活性部分包括STING激动剂。

70. 如权利要求71所述的组合物,其中所述STING激动剂包括CL656。

71. 如权利要求72所述的组合物,其中所述STING激动剂是CL656的异构体A、异构体B、异构体C或异构体D。

72. 如权利要求71至73中任一项所述的组合物,其中所述STING激动剂不与所述支架蛋白融合。

73. 如权利要求68至70中任一项所述的组合物,其中所述生物活性部分是IL-12、CD40L、FLT3L或其任何组合。

74. 如权利要求75所述的组合物,其中所述生物活性部分与所述支架蛋白融合。

75. 如权利要求1至76中任一项所述的组合物,其中所述组合物可通过肠胃外、局部、静

脉内、经口、皮下、动脉内、皮内、经皮、直肠、颅内、腹膜内、鼻内、瘤内、肌肉内途径施用或作为吸入剂施用。

76. 一种制备如权利要求1至77中任一项所述的药物组合物的方法,所述方法包括组合:

- (a) 细胞外囊泡;
- (b) 糖类;
- (c) 氯化钠;
- (d) 磷酸钾;和
- (e) 磷酸钠。

77. 如权利要求78所述的方法,其中所述细胞外囊泡是外泌体。

78. 一种制备药物组合物的方法,所述方法包括将细胞外囊泡和糖类组合,所述糖类是浓度为约5%w/v的蔗糖或海藻糖,其中所述组合物与包含浓度为1%至4%的蔗糖或海藻糖的组合物相比,表现出改善的稳定性。

79. 一种制备药物组合物的方法,所述方法包括将细胞外囊泡和磷酸盐化合物组合,其中所述磷酸盐化合物包含成比例的磷酸钾和磷酸钠,所述比例导致pH在7.1与7.3之间。

80. 如权利要求78至81中任一项所述的方法,其中所述组合物的电导率得到进一步调整。

81. 如权利要求97所述的方法,其中所述组合物的电导率在约7.1mS/cm至约7.3mS/cm之间。

82. 如权利要求83所述的方法,其中所述电导率是7.23mS/cm。

83. 一种用于治疗有此需要的受试者的疾病或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1至77中任一项所述的组合物。

84. 如权利要求85所述的方法,其中所述疾病或病状是癌症、纤维化、血友病、糖尿病、生长因子缺乏症、眼病、庞贝病、溶酶体贮积症、粘液粘稠病、囊性纤维化、杜氏与贝氏肌营养不良症、甲状腺素运载蛋白淀粉样变性、A型血友病、B型血友病、腺苷酸脱氨酶缺乏症、莱伯氏先天性黑蒙症、X-连锁肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质营养不良、OTC缺乏症、肝糖储积症1A型、Criggler-Najjar综合征、1型原发性高草酸尿、急性间歇性卟啉症、苯丙酮尿症、家族性高胆固醇血症、VI型粘多糖贮积症、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症和高胆固醇血症。

85. 如权利要求86所述的方法,其中所述癌症是膀胱癌、宫颈癌、肾细胞癌、睾丸癌、结肠直肠癌、肺癌、头颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、肝癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、白血病、胰腺癌或其组合。

86. 如权利要求1至77中任一项所述的药物组合物,其用于治疗有此需要的受试者的疾病或病状。

87. 如权利要求1至77中任一项所述的组合物在制造用于治疗疾病或病状的药剂中的用途。

88. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物,其包含:

- (a) 细胞外囊泡;
- (b) 浓度在约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;
- (c) 浓度在30mM与约50mM之间的氯化钠;

- (d) 浓度在约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度在约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物，
- (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。

89. 如权利要求88所述的组合物，其包含：

- (a) 细胞外囊泡；
- (b) 浓度为约5%w/v的蔗糖；
- (c) 浓度为约40mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约15mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约27mM的磷酸氢二钠七水合物，
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

90. 如权利要求88或89所述的组合物，其中所述细胞外囊泡包含STING激动剂。

91. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 细胞外囊泡；
- (b) 浓度为至少约50mM至至少约300mM的蔗糖；
- (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠；
- (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。

92. 如权利要求91所述的组合物，其包含：

- (a) 细胞外囊泡；
- (b) 浓度为约146mM的蔗糖；
- (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，并且
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

93. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 细胞外囊泡；
- (b) 浓度为至少约1%至至少约10%的蔗糖；
- (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠；
- (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。

94. 如权利要求93所述的组合物，其包含：

- (a) 细胞外囊泡；
- (b) 浓度为约5%的蔗糖；
- (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，并且
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

95. 如权利要求91至94中任一项所述的组合物,其中所述细胞外囊泡包含IL-12部分。

96. 如权利要求95所述的组合物,其中所述IL-12部分包含与SEQ ID NO:11、12或13至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的氨基酸序列。

97. 如权利要求95或96所述的组合物,其中所述IL-12部分包含SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列。

98. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物,其包含:

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡;
- (b) 蔗糖;
- (c) 氯化钠;
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,并且
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2;

其中所述蔗糖的浓度选自约73mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM;并且

其中所述氯化钠的浓度选自约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM。

99. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物,其包含:

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡;
- (b) 蔗糖;
- (c) 氯化钠;
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,并且
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2;

其中所述蔗糖的浓度选自约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3.0%、约3.1%、约3.2%、约3.3%、约3.4%、约3.5%、约3.6%、约3.7%、约3.8%、约3.9%、约4.0%、约4.1%、约4.2%、约4.3%、约4.4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%和约5.0%;并且

其中所述氯化钠的浓度选自约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM。

100. 如权利要求98或99所述的组合物,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列。

101. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物,其包含:

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;
- (b) 浓度为约73mM至约146mM的蔗糖;
- (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠;

- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

102. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列；
- (b) 浓度为约2.5%至约5%的蔗糖；
- (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

103. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列；
- (b) 浓度为约146mM的蔗糖；
- (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

104. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列；
- (b) 浓度为约5%的蔗糖；
- (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

105. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列；
- (b) 浓度为约2.5%的蔗糖；
- (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

106. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列；
- (b) 浓度为约5%的蔗糖；
- (c) 浓度为约100mM的氯化钠；
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

107. 如权利要求1至68中任一项所述的组合物，其包含：

- (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;
- (b) 浓度为约2.5%的蔗糖;
- (c) 浓度为约100mM的氯化钠;
- (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

108. 如权利要求98至107中任一项所述的组合物,其中所述ASO包含SEQ ID NO:144中列出的核酸序列。

109. 如权利要求98至107中任一项所述的组合物,其中所述ASO包含SEQ ID NO:145中列出的核酸序列。

110. 如权利要求98至107中任一项所述的组合物,其中所述ASO包含SEQ ID NO:193中列出的核酸序列。

111. 如权利要求98至107中任一项所述的组合物,其中所述ASO包含SEQ ID NO:185中列出的核酸序列。

112. 如权利要求98至111中任一项所述的组合物,其中所述ASO通过接头与所述细胞外囊泡缔合。

113. 如权利要求112所述的组合物,其中所述接头包括胆固醇、生育酚、脂肪酸或其任何组合。

114. 如权利要求112或113所述的组合物,其中所述接头是可切割的接头。

115. 如权利要求58至60中任一项所述的组合物,其中所述接头是可切割的接头。

细胞外囊泡组合物

[0001] 对通过EFS-WEB以电子方式提交的序列表的引用

[0002] 在本申请中提交的以电子方式提交的序列表(名称:4000_069PC02_Seqlisting_ST25,大小:68,911字节;且创建日期:2020年9月24日)的内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本PCT申请要求2019年9月25日提交的美国临时申请号62/906,018和2019年9月26日提交的美国临时申请号62/906,485的优先权权益,所述临时申请各自以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及用于储存和施用可包含一个或多个外源性生物活性部分的细胞外囊泡(EV)(例如,外泌体)的组合物,以及制备和使用此类组合物的方法。

技术背景

[0006] EV,例如外泌体,是细胞间通讯的重要介质。它们也是许多疾病(包括癌症)的诊断和预后的重要生物标志物。作为药物递送媒介物,EV在许多治疗领域作为一种新的治疗方式,提供了优于传统药物递送方法(例如,肽免疫、DNA疫苗)的优势。一个研究领域是组合物的制剂,其可以在患者施用前的长储存期内稳定地包含EV,而不会损害EV的功效。已知的制剂存在缺陷。例如,某些制剂,例如含有TRIS缓冲剂的那些制剂,不能防止pH在各种温度下(即,当冷冻或解冻所述制剂时)波动。即使pH的微小变化也会引起EV的聚集,从而降低或阻止它们的功能。此外,已知的组合物包括外来组分诸如外源添加的多肽,例如,人血清白蛋白,或螯合剂。

[0007] 因此,需要克服已知制剂的缺点的有效用于储存和施用EV的组合物,从而能更好地实现基于EV技术的治疗用途和其他应用。

发明内容

[0008] 本文提供了用于储存和施用细胞外囊泡(例如外泌体)的组合物。本公开的组合物提供减少的EV聚集、改善的EV稳定性、改善的EV架构完整性、改善的包含在EV上或EV中的工程化蛋白质的稳定性、以及改善的被动负载或缀合材料(诸如小分子药物或蛋白质)的稳定性。此类组合物能够被冷冻、在一定温度范围内储存不同的时间长度和解冻,而不损害包含在组合物中的EV的稳定性。本公开的EV可包括生物活性部分,使得所述组合物可用于治疗多种疾病或病状,在这些疾病或病状中,施用EV,例如,经修饰以包含本文所公开的生物活性部分的EV,对受试者具有有益的影响。

[0009] 在一些方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含(a)细胞外囊泡;(b)糖类;(c)氯化钠;(d)磷酸钾;和(e)磷酸钠,其中所述组合物在pH为约7.2的溶液中。在一些方面,细胞外囊泡是外泌体。

[0010] 在一些方面,组合物能够在4℃的温度下储存至少约4小时、至少约5小时、至少约6

小时、至少约7小时、至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约11小时、至少约12小时、至少约15小时、至少约20小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天或至少约7天。

[0011] 在一些方面,组合物能够被冷冻和解冻,其中解冻的组合物具有约7.2的pH。在一些方面,组合物具有7.0、7.1、7.2、7.3或7.4的pH。

[0012] 在一些方面,pI在约1至约6.5的范围内。

[0013] 在一些方面,组合物具有(i)减少的聚集,(ii)改善的EV稳定性,(iii)改善的EV架构完整性,(iv)改善的包含在EV上或EV中的工程化蛋白质的稳定性,以及(v)改善的被动负载或缀合材料(诸如小分子药物或蛋白质)的稳定性。

[0014] 在一些方面,糖类包括单糖、二糖、三糖、寡糖、多糖、糖醇或其任何组合。在一些方面,糖类具有约340.00g/mol至约380.00g/mol的分子量。在一些方面,糖类包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、右旋糖和/或其组合。在一些方面,糖类是分子量为约90.00g/mol至约190.00g/mol的糖醇。在一些方面,所述糖醇包括甘油、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇和/或其组合。在一些方面,糖类是蔗糖或海藻糖。在一些方面,糖类以约5%w/v的浓度存在于所述组合物中。

[0015] 在一些方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含(i)细胞外囊泡和(ii)糖类,所述糖类是浓度为约5%w/v的蔗糖或海藻糖。在一些方面,与包含浓度为1%w/v至4%w/v的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,所述组合物具有改善的稳定性。

[0016] 在一些方面,组合物具有在约6mS/cm与约10mS/cm之间的电导率。在一些方面,电导率在6mS/cm与约7mS/cm之间、在约7mS/cm与约8mS/cm之间、在约8mS/cm与约9mS/cm之间、或在约9mS/cm与约10mS/cm之间。在一些方面,电导率为约6mS/cm、约7mS/cm、约8mS/cm、约9mS/cm或约10mS/cm。

[0017] 在一些方面,组合物还包含氯化钠。在一些方面,氯化钠以在约10mM与约134mM之间的浓度存在于所述组合物中。在一些方面,氯化钠的浓度在约10mM至约130mM之间、在约20mM至约120mM之间、在约30mM至约110mM之间、在约40mM至约100mM之间、在约50mM至约90mM之间、在约60mM至约80mM之间、在约70mM至约80mM之间、在约45mM至约95mM之间、在约45mM至约80mM之间、在约45mM至约70mM之间、在约45mM至约65mM之间、在约50mM至约65mM之间、在约50mM至约60mM之间、在约50mM至约55mM之间、在约50mM至约55mM之间或在约51mM至约54mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度为约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约60mM、约70mM、约80mM、约90mM或约100mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约39mM、约40mM、约41mM、约42mM、约43mM、约44mM、约45mM、约46mM、约47mM、约48mM、约49mM或约50mM。

[0018] 在一些方面,组合物还包含磷酸盐缓冲剂。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含至少一种磷酸盐化合物,包括磷酸钾、磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和/或其组合。

[0019] 在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约2、约1:约3、约1:约4或约1:约5的磷酸钾和磷酸钠。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约3的磷酸钾和磷酸钠。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约2的磷酸钾和磷酸钠。

[0020] 在一些方面,本公开提供了一种药物组合物,其在溶液中包含(i)细胞外囊泡,(ii)磷酸钾,和(iii)磷酸钠,其中磷酸钾和磷酸钠的比例为约1比约3或约1比约2。

[0021] 在一些方面,所述溶液具有约7.1至7.3的pH。

[0022] 在一些方面,磷酸钾以在约1mM至约20mM之间、约2mM至约19mM之间、约3mM至约18mM之间、约4mM至约17mM之间、约5mM至约16mM之间、或约5mM至约15mM之间的浓度存在于所述组合物中。

[0023] 在一些方面,磷酸钾的浓度为约4.5mM、约4.6mM、约4.7mM、约4.8mM、约4.9mM、约5.0mM、约5.1mM、约5.2mM、约5.3mM、约5.4mM或约5.5mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约5.15mM。

[0024] 在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.0mM、约15.1mM、约15.2mM、约15.3mM、约15.4mM、约15.5mM、约15.6mM、约15.7mM、约15.8mM、约15.9mM、约16.0mM、约16.1mM、约16.2mM、约16.3mM、约16.4mM或约16.5mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为15.4mM。

[0025] 在一些方面,磷酸钾是磷酸二氢钾。

[0026] 在一些方面,磷酸钠以在约10mM至约30之间、约11mM至约29mM之间、约12mM至约28mM之间、约13mM至约27mM之间、或约14mM至约26mM之间的浓度存在于所述组合物中。

[0027] 在一些方面,如权利要求39所述的组合物,其中磷酸钠以约14.5mM、约14.6mM、约14.7mM、约14.8mM、约14.9mM、约15.0mM、约15.1mM、约15.2mM、约15.3mM、约15.4mM或约15.5mM的浓度存在于所述组合物中。

[0028] 在一些方面,磷酸钠的浓度为14.9mM。

[0029] 在一些方面,磷酸钠以约26.5mM、约26.6mM、约26.7mM、约26.8mM、约26.9mM、约27.0mM、约27.1mM、约27.2mM、约27.3mM、约27.4mM或约27.5mM的浓度存在于所述组合物中。在一些方面,磷酸钠的浓度为27.1mM。

[0030] 在一些方面,磷酸钠是磷酸氢二钠七水合物。

[0031] 在一些方面,组合物还包含抗氧化剂。在一些方面,抗氧化剂包括D-蛋氨酸、L-蛋氨酸、抗坏血酸、异抗坏血酸、抗坏血酸钠、硫代甘油、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、胱氨酸、二硫苏糖醇、谷胱甘肽、生育酚、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、硫酸氢钠、连二亚硫酸钠、A-生育酚、 γ -生育酚、没食子酸丙酯、抗坏血基棕榈酸酯、偏亚硫酸氢钠、硫脲、硫代硫酸钠、没食子酸丙酯和巯基乙酸钠。

[0032] 在一些方面,组合物不是冻干的。

[0033] 在一些方面,组合物不包含螯合剂。

[0034] 在一些方面,组合物不包含白蛋白。

[0035] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包含(a)浓度为约5%w/v的蔗糖,(b)浓度为约50mM的氯化钠;(c)浓度为约5mM的磷酸二氢钾;及(d)浓度为约15mM的磷酸氢二钠七水合物;其中所述组合物在pH为7.2且电导率为8.8mS/cm的溶液中。

[0036] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包含(a)浓度为约5%w/v的蔗糖,(b)浓度为约40mM的氯化钠;(c)浓度为约15mM的磷酸二氢钾;及(d)浓度为约27mM的磷酸氢二钠七水合物;其中所述组合物在pH为7.2且电导率为7.2mS/cm的溶液中。

[0037] 在一些方面,组合物能够在约-20℃至约-80℃的温度下储存,其中细胞外囊泡的稳定性没有降低。在一些方面,组合物可以储存约一周、约两周、约三周、约四周、约一个月、约两个月、约三个月、约四个月、约五个月、约六个月、约七个月、约八个月、约九个月、约十个月、约11个月、约12个月、约一年、约两年、约三年、约四年或约五年。

[0038] 在一些方面,细胞外囊泡是外泌体。

[0039] 在一些方面,细胞外囊泡还包含支架蛋白。在一些方面,支架蛋白是支架X。在一些方面,有效载荷连接至支架蛋白。在一些方面,有效载荷通过接头连接至支架蛋白。在一些方面,其中接头是多肽。在一些方面,接头是非多肽部分。在一些方面,支架X是能够将有效载荷锚定在细胞外囊泡外表面上的支架蛋白。

[0040] 在一些方面,支架蛋白包括前列腺素F2受体负调控因子 (PTGFRN蛋白)。

[0041] 在一些方面,支架蛋白包括PTGFRN蛋白或其片段。在一些方面,支架蛋白包含SEQ ID NO:1-7和33任一个中阐明的氨基酸序列。在一些方面,支架蛋白包含与SEQ ID NO:1至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0042] 在一些方面,细胞外囊泡包含生物活性部分。在一些方面,支架蛋白与所述生物活性部分融合。在一些方面,支架蛋白不与所述生物活性部分融合。

[0043] 在一些方面,生物活性部分包含STING激动剂。在一些方面,STING激动剂包含CL656。在一些方面,STING激动剂是CL656的异构体A、异构体B、异构体C或异构体D。在一些方面,STING激动剂不与支架蛋白融合。

[0044] 在一些方面,生物活性部分是IL-12。在一些方面,生物活性部分是CD40L。在其他方面,生物活性部分是FTL3L。

[0045] 在一些方面,生物活性部分与支架蛋白融合。

[0046] 在一些方面,组合物可通过肠胃外、局部、静脉内、经口、皮下、动脉内、皮内、经皮、直肠、颅内、腹膜内、鼻内、瘤内、肌肉内途径施用或作为吸入剂施用。

[0047] 在一些方面,本公开提供了一种制备药物组合物的方法,其包括组合:(a) 细胞外囊泡;(b) 糖类;(c) 氯化钠;(d) 磷酸钾;和(e) 磷酸钠。在一些方面,细胞外囊泡是外泌体。

[0048] 在一些方面,本公开提供了一种制备药物组合物的方法,其包括将细胞外囊泡与糖类组合,所述糖类为浓度为约5%w/v的蔗糖或海藻糖,其中所述组合物与包含浓度为1%至4%的蔗糖或海藻糖的组合物相比,表现出改善的稳定性。

[0049] 在一些方面,本公开提供了一种制备药物组合物的方法,其包括将细胞外囊泡与磷酸盐化合物组合,其中所述磷酸盐化合物包含成比例的磷酸钾和磷酸钠,所述比例使得pH值介于7.1与7.3之间。

[0050] 在一些方面,组合物的电导率可以调整。在一些方面,组合物的电导率介于约7.1mS/cm至约7.3mS/cm之间。在一些方面,本公开提供的电导率是7.23mS/cm。

[0051] 在一些方面,本公开提供了一种用于治疗有此需要的受试者的疾病或病状的方法,所述方法包括向受试者施用本文所公开的组合物。在一些方面,所述疾病或病状是癌症、纤维化、血友病、糖尿病、生长因子缺乏症、眼病、庞贝病、溶酶体贮积症、粘液粘稠病、囊性纤维化、杜氏与贝氏肌营养不良症、甲状腺素运载蛋白淀粉样变性、A型血友病、B型血友病、腺苷酸脱氨酶缺乏症、莱伯氏先天性黑蒙症、X-连锁肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质营养不良、OTC缺乏症、肝糖储积症1A型、Criggler-Najjar综合征、1型原发性高草酸尿、急性间歇性卟啉症、苯丙酮尿症、家族性高胆固醇血症、VI型粘多糖贮积症、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症和高胆固醇血症。在一些方面,所述癌症是膀胱癌、宫颈癌、肾细胞癌、睾丸癌、结直肠癌、肺癌、头颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、肝癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、白血病、胰腺癌或其组合。

[0052] 在一些方面,本公开提供了一种用于治疗有此需要的受试者的疾病或病状的药物组合物。

[0053] 在一些方面,本公开提供了本文所公开的组合物在制造用于治疗疾病或病状的药剂中的用途。

附图说明

[0054] 图1A是根据本公开的一个方面的含有蛋白质X和生物活性部分的外泌体的示意图。示出了表面蛋白CD9、CD81和TSG101,以及鞘磷脂脂质结构域。进一步示出了外泌体组分mRNA、miRNA和代谢物。

[0055] 图1B是示出根据本公开的一个方面的天然外泌体(黑色方块)和含蛋白质X的外泌体(圆圈)的 ζ 电位(以mV为单位)的图。X轴是pH。Y轴是以mV为单位的 ζ 电位。

[0056] 图2A是示出根据本公开的一个方面的天然外泌体(黑色方块)和含蛋白质X的外泌体(圆圈)的Z-平均值(以nm为单位)的图。X轴是pH。Y轴是以nm为单位的Z-平均值。

[0057] 图2B是示出根据本公开的一个方面的EV的稳定pH范围(圆角方形)的示意图。示出的稳定pH范围介于7与8之间。箭头表示如果pH值过低(EV聚集)或过高(脂质水解),pH值变化对EV的影响。

[0058] 图2C是示出根据本公开的一个方面的蛋白质X EV的低温透射电子显微照片的放大图像。外泌体在水中玻璃化,而不是干燥。此图像示出了没有冰晶的水中的外泌体。蛋白质X EV的理论等电点(pI)记为6.2。含有蛋白质X的EV的尺寸记为 $\sim 100\text{nm}$ 。

[0059] 图2D是根据本公开的方面的包含各种组合物的微量离心管的照片。管A含有蔗糖+缓冲剂,其已经冷冻和解冻3次。管B仅含有缓冲剂,其已经冷冻和解冻3次。管C仅含有Milli-Q水,其已经冷冻和解冻3次。这些管示出存在颜色变化和混浊两者。还示出,与纯水样品相比,盐提供了一定程度的保护。

[0060] 图3A是示出与上清液中的STING激动剂相比,在外泌体中的STING激动剂浓度(以 μM 为单位)分布的图,根据本公开的一个方面,其中含有外泌体的缓冲剂在 -80°C 、 4°C 和 22°C 的温度下储存介于0与12小时之间的时间。此图示出了图3B的0-12小时时间点。X轴是时间,单位为小时。Y轴是STING激动剂的浓度,单位为 μM 。

[0061] 图3B是示出与上清液中的STING激动剂相比,在外泌体中的STING激动剂浓度(以 μM 为单位)分布的图,根据本公开的一个方面,其中含有外泌体的缓冲剂在 -80°C 、 4°C 和 22°C 的温度下储存介于12与72小时之间的时间。X轴是时间,单位为小时。Y轴是STING激动剂的浓度,单位为 μM 。

[0062] 图3C是示出根据本公开的一个方面的磷酸盐缓冲盐水、缓冲剂中的天然外泌体和缓冲剂中含有STING激动剂的外泌体在施用4小时后对C57BL/6小鼠基因表达的影响的柱状图。含有外泌体的缓冲剂在 4°C 和 22°C 下储存24小时或72小时。X轴是不同的测试物品。Y轴是归一化的基因表达水平。

[0063] 图3D是示出根据本公开的一个方面,C57BL/6小鼠的B16-F10黑色素瘤肿瘤中游离STING激动剂(虚线,底部)和外泌体包裹的STING激动剂(实线,顶部)随时间变化的瘤内浓度的图。X轴是时间,单位为分钟。Y轴是STING激动剂的浓度,单位为nM。

[0064] 图4A-图4C是根据本公开的一个方面制备包裹在外泌体中的STING激动剂的方法

的示意图。图4A示出了通过用STING激动剂使含有外泌体的缓冲剂溶液饱和,使得一部分STING扩散到外泌体中,从而将STING激动剂负载到外泌体中。图4B示出了外泌体的纯化(即,去除未扩散到外泌体中的STING激动剂)。图4C示出了含有STING激动剂的外泌体的平衡(即,STING激动剂从外泌体被动扩散到周围缓冲剂中)。

[0065] 图5是示出与外泌体相关的IL-12含量(以ng/mL为单位)的图。X轴是外泌体储存的时间(以天为单位)。Y轴是以ng/mL为单位的IL-12含量。从左到右,柱形图代表(1)对照,无过氧化物;(2)对照,0.05%过氧化物;(3)硫代硫酸盐,无过氧化物;(4)硫代硫酸盐,0.05%过氧化物;(5)抗坏血酸盐,无过氧化物;(6)抗坏血酸盐,0.05%过氧化物;(7)谷胱甘肽,无过氧化物;(8)谷胱甘肽,0.05%过氧化物;(9)蛋氨酸,无过氧化物;(10)蛋氨酸,0.05%过氧化物。

[0066] 图6是示出不同时间长度后外泌体的直径(以nm为单位)的图。X轴是外泌体储存的时间(以天为单位)。Y轴是外泌体的直径(以nm为单位)。从左到右,柱形图代表(1)对照;(2)对照和过氧化氢;(3)硫代硫酸盐;(4)硫代硫酸盐和过氧化氢;(5)抗坏血酸盐;(6)抗坏血酸盐和过氧化氢;(7)谷胱甘肽;(8)谷胱甘肽和过氧化氢;(9)蛋氨酸;(10)蛋氨酸和过氧化氢。

[0067] 图7是示出不同时间长度后外泌体溶液的PDI的图。X轴是外泌体储存的时间(以天为单位)。Y轴多分散性指数。

具体实施方式

[0068] 本公开涉及用于储存和施用可包含一个或多个生物活性部分的EV(例如,外泌体)的组合物,其中EV和有效载荷的稳定性和完整性在不同的时间段和温度(包括冷冻和解冻)下得以维持。多个生物活性部分可以附接(或连接)至EV(例如,外泌体)外表面上的一个或多个支架部分。本文公开了各个方面的非限制性实例。

[0069] I. 定义

[0070] 为了更容易理解本说明书,首先定义某些术语。附加的定义在整个详细描述中阐述。

[0071] 应注意,术语“一(个/种)”实体是指一个或多个(种)所述实体;例如,“一个核苷酸序列”应理解为表示一个或多个核苷酸序列。因此,术语“一(个/种)”、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0072] 此外,在本文中使用时将“和/或”视为对两个指定特征或组分中的每一个具有或不具有另一者的具体公开内容。因此,如本文中诸如“A和/或B”的词组中所使用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如诸如“A、B和/或C”的词组中所使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0073] 应理解,无论如本文所述的方面用语言“包含”来描述的情况如何,也提供以“由……组成”和/或“基本上由……组成”的术语描述的另外相似方面。

[0074] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语均具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press; The Dictionary of

Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; 以及 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, 为本领域技术人员提供本公开中所用的许多术语的一般解释。

[0075] 单位、前缀和符号均以其国际单位制 (Système International de Unites, (SI)) 可接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数值。除非另外指明, 否则核苷酸序列是以 5' 至 3' 方向从左至右书写。氨基酸序列是以氨基至羧基方向从左至右书写。本文提供的标题不是对本公开内容各个方面的限制, 这些方面可以通过参考整个说明书来获得。因此, 即将在下文定义的术语通过参考说明书全文而得到更充分地定义。

[0076] 本文使用的术语“约”意指大约、粗略、左右或在.....范围内。当术语“约”连同数值范围一起使用时, 它通过使边界延伸高于及低于所述数值来修饰那个范围。一般而言, 术语“约”可以通过例如, 10%, 向上或向下 (更高或更低) 的变化来修饰高于及低于所述值的数值。

[0077] 如本文所用, 术语“细胞外囊泡”或“EV”是指包含包封内部空间的膜的细胞衍生的囊泡。细胞外囊泡包括所有膜结合的囊泡 (例如, 外泌体、纳米囊泡), 其直径小于其所衍生自的细胞的直径。在一些方面, 细胞外囊泡的直径在 20nm 至 1000nm 的范围内, 并且可包含内部空间 (即, 腔) 内、展示在细胞外囊泡的外表面上和/或横跨膜的各种大分子有效载荷。在一些方面, 有效载荷可以包括核酸、蛋白质、碳水化合物、脂质、小分子和/或其组合。在一些方面, EV 包含多个 (例如, 两个或更多个) 有效载荷或其他外源性生物活性部分。在某些方面, 细胞外囊泡还可包含一个或多个支架部分。举例而言且非限制性地, 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的处理) 而衍生自细胞的囊泡、囊泡状细胞器和由活细胞产生 (例如, 通过直接质膜出芽 (plasma membrane budding) 或晚期胞内体与质膜的融合) 的囊泡。细胞外囊泡可以衍生自活的或死的生物体、外植组织或器官、原核或真核细胞和/或培养的细胞。在一些方面, 细胞外囊泡由表达一种或多种转基因产物的细胞产生。本文所公开的 EV 已被修饰, 且因此不包括天然存在的 EV。

[0078] 如本文所用, 术语“外泌体”是指直径介于 20nm-300nm (例如, 40nm-200nm) 之间的细胞外囊泡。外泌体包含包封内部空间 (即, 腔) 的膜, 并且在一些方面, 可以通过直接质膜出芽或通过晚期胞内体与质膜的融合从细胞 (例如, 生产细胞) 产生。在一些方面, 外泌体包含多个 (例如, 两个或更多个) 外源性生物活性部分 (例如, 如本文所述)。在某些方面, 外泌体还包含一个或多个支架部分。如下文所述, 外泌体可衍生自生产细胞, 并根据其尺寸、密度、生化参数或其组合从生产细胞中分离出来。在一些方面, 本公开的 EV (例如, 外泌体) 是由表达一种或多种转基因产物的细胞产生的。本公开的外泌体是修饰的, 且因此不包括天然存在的外泌体。

[0079] 如本文所用, 术语“纳米囊泡”是指直径介于 20nm-250nm 之间 (例如, 介于 30nm-150nm 之间) 的细胞外囊泡, 并且通过直接或间接操作由细胞 (例如, 生产细胞) 产生, 使得所述纳米囊泡在没有操纵的情况下不会由细胞产生。为了产生纳米囊泡而对细胞进行的适当操纵包括但不限于连续挤出、用碱性溶液的处理、超声处理或其组合。在一些方面, 纳米囊泡的产生可能造成生产细胞的破坏。在一些方面, 本文所述的纳米囊泡群大体上不含借助于从质膜直接出芽或晚期胞内体与质膜的融合从细胞衍生的囊泡。在一些方面, 纳米囊泡包含多个 (例如, 至少两个) 外源性生物活性部分。在某些方面, 纳米囊泡还包含一个或多个

支架部分。纳米囊泡,一旦衍生自生产细胞,便可以根据其尺寸、密度、生化参数或其组合从生产细胞中分离出来。如本文所用,纳米囊泡已被修饰,且因此不包括天然存在的纳米囊泡。

[0080] 如本文所用,术语“表面工程化的EV,例如,外泌体”(例如,支架X工程化的EV,例如,外泌体)是指组成中的膜或表面被修饰的EV(例如,外泌体),从而使得工程化的EV(例如,外泌体)的膜或表面不同于修饰前的EV或天然存在的EV。工程化可以在EV(例如,外泌体)的表面上或在EV(例如,外泌体)的膜中进行,从而改变EV(例如,外泌体)的表面。例如,膜在其蛋白质、脂质、小分子、碳水化合物等组成方面被修饰。所述组成可以通过化学、物理或生物方法来改变,或者由先前或同时通过化学、物理或生物方法修饰的细胞而产生。具体而言,所述组成可以通过基因工程化而改变或者由先前通过基因工程化修饰的细胞而产生。在一些方面,表面工程化的EV,例如外泌体,包含多个(例如,至少两个)外源性生物活性部分。在某些方面,外源性生物活性部分可以包含外源性蛋白质(即,EV(例如,外泌体)不天然表达的蛋白质)或其片段或变体,它们可以暴露于EV(例如,外泌体)的表面,或者可以是暴露在EV(例如,外泌体)表面上的部分的锚定点(连接)。在其他方面,表面工程化的EV(例如,外泌体)包含天然外泌体蛋白质(例如,支架X)或其片段或变体的高表达(例如,更高数量),它们可以暴露于EV(例如,外泌体)的表面,或者可以是暴露在EV(例如,外泌体)表面上的部分的锚定点(连接)。

[0081] 术语“修饰的”,当在本文所述的EV(例如,外泌体)的上下文中使用时,是指EV(例如,外泌体)和/或其生产细胞的改变或工程化,使得修饰的EV(例如,外泌体)不同于天然存在的EV(例如)外泌体。在一些方面,本文所述的修饰的EV(例如,外泌体)包含与天然存在的EV(例如,外泌体)的膜相比,在蛋白质、脂质、小分子、碳水化合物等组成上不同的膜(例如,包含更高密度或数量的天然外泌体蛋白的膜和/或包含多个(例如,至少两个)非天然见于外泌体中的生物活性部分的膜)。如本文所用,非天然见于外泌体中的生物活性部分也被描述为“外源性生物活性部分”。在某些方面,对膜的此种修饰改变了EV(例如,外泌体)的外表面(例如,本文所述的表面工程化的EV,例如,外泌体)。

[0082] 如本文所用,术语“支架部分”是指可用于将有效载荷或任何其他所关注的外源性生物活性部分在EV(例如外泌体)的腔表面或外表面上锚定至EV(例如外泌体)的分子。在某些方面,支架部分包含合成分子。在一些方面,支架部分包含非多肽部分。在其他方面,支架部分包含天然存在于EV(例如,外泌体)中的脂质、碳水化合物或蛋白质。在一些方面,支架部分包含并非天然存在于EV(例如外泌体)中的脂质、碳水化合物或蛋白质。在某些方面,支架部分是支架X。在另外的方面,支架部分包含支架X和另一支架部分。可用于本公开的其他支架部分的非限制性实例包括:氨基肽酶N(CD13);脑啡肽酶,也就是膜金属内肽酶(MME);外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员1(ENPP1);神经纤毛蛋白-1(NRP1);CD9、CD63、CD81、PDGFR、GPI锚定蛋白、乳凝集素、LAMP2和LAMP2B。

[0083] 如本文所用,术语“支架X”是指最近在外泌体表面上鉴定的外泌体蛋白。参见,例如,美国专利号10,195,290,其以引用的方式整体并入本文。支架X蛋白的非限制性实例包括:前列腺素F2受体负调控因子(“PTGFRN蛋白”);basigin(“BSG蛋白”);免疫球蛋白超家族成员2(“IGSF2蛋白”);免疫球蛋白超家族成员3(“IGSF3蛋白”);免疫球蛋白超家族成员8(“IGSF8蛋白”);整联蛋白 β -1(“ITGB1蛋白”);整联蛋白 α -4(“ITGA4蛋白”);4F2细胞表面抗

原重链 (“SLC3A2蛋白”) ; 和一类ATP转运蛋白 (“ATP1A1蛋白”、“ATP1A2蛋白”、“ATP1A3蛋白”、“ATP1A4蛋白”、“ATP1B3蛋白”、“ATP2B1蛋白”、“ATP2B2蛋白”、“ATP2B3蛋白”、“ATP2B蛋白”)。在一些方面, 支架X蛋白可以是全蛋白或其片段(例如, 功能性片段, 例如, 能够将另一个部分锚定在EV(例如, 外泌体)的外表面上或腔表面上的最小片段)。在一些方面, 支架X可将一个部分(例如, 有效载荷)锚定至外泌体的外表面或腔表面上。

[0084] 如本文所用, 术语“支架Y”是指在外泌体的腔表面内新鉴定的外泌体蛋白。参见, 例如, 国际公布号W0/2019/099942, 其以引用的方式整体并入本文。支架蛋白Y的非限制性实例包括: 富含肉豆蔻酰化丙氨酸的蛋白激酶C底物 (“MARCKS蛋白”); 富含肉豆蔻酰化丙氨酸的蛋白激酶C底物1 (“MARCKSL 1蛋白”); 和脑酸溶性蛋白1 (“BASP1蛋白”)。在一些方面, 支架Y蛋白可以是全蛋白或其片段(例如, 功能性片段, 例如, 能够将一个部分锚定在EV(例如, 外泌体)的腔表面上的最小片段)。在一些方面, 支架Y可以将一个部分(例如, STING激动剂和/或IL-12部分)锚定至EV(例如, 外泌体)的腔上。

[0085] 如本文所用, 术语蛋白质(例如, 治疗性蛋白质或支架X)的“片段”是指比天然存在的序列短的蛋白质的氨基酸序列, 与天然存在的蛋白质相比, 所述蛋白质的N-和/或C-末端缺失或任何部分缺失。如本文所用, 术语“功能性片段”是指保留蛋白质功能的蛋白质片段。因此, 在一些方面, 支架X蛋白的功能性片段保留了将一个部分锚定在EV(例如, 外泌体)的腔表面或外表面上的能力。片段是否是功能性片段可以通过测定EV(例如, 外泌体)的蛋白质含量的任何已知的方法来评估, 所述方法包括蛋白质印迹、FACS分析及片段与自发荧光蛋白(如例如GFP)的融合。在某些方面, 支架X蛋白的功能性片段保留了天然存在的支架X蛋白至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%的能力, 例如锚定一个部分的能力。

[0086] 如本文所用, 术语分子(例如, 功能性分子、抗原或支架X)的“变体”是指通过本领域已知的方法进行比较后与另一分子享有某些结构和功能属性的分子。例如, 蛋白质的变体可以包括另一蛋白质中的取代、插入、缺失、移码或重排。

[0087] 在一些方面, 支架X的变体包括与全长、成熟的PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2或ATP转运蛋白或PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2或ATP转运蛋白的片段(例如, 功能性片段)具有至少约70%同一性的变体。在一些方面, PTGFRN的变体或片段的变体与根据SEQ ID NO:1的PTGFRN或其功能性片段享有至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性。

[0088] “保守氨基酸取代”是氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基置换的取代。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已经在本领域中进行了定义, 包括碱性侧链(例如, 赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如, 天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如, 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如, 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 分支侧链(例如, 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳族侧链(例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此, 如果多肽中的氨基酸用来自同一侧链家族的另一氨基酸置换, 则将取代视为保守的。在另一方面, 一串氨基酸可以用在侧链家族成员的顺序和/或组成上不同的结构类似的串保守置换。

[0089] 两个多核苷酸或多肽序列之间的术语“序列同一性百分比”或“同一性百分比”是

指在比较窗口上由所述序列共享的相同匹配位置数,其考虑到为进行两个序列的最佳比对必须引入的添加或缺失(即,间隙)。匹配位置是靶序列和参考序列二者中呈现相同核苷酸或氨基酸的任何位置。靶序列中呈现的间隙不做计数,因为间隙不是核苷酸或氨基酸。同样,参考序列中呈现的间隙不做计数,因为对靶序列核苷酸或氨基酸计数,而不对来自参考序列的核苷酸或氨基酸计数。

[0090] 序列同一性百分比通过以下方式计算:确定两个序列中出现相同的氨基酸残基或核酸碱基的位置数以得到匹配位置数,用匹配位置数除以比较窗中的位置总数,且将结果乘以100以得到序列同一性百分比。序列的比较和两个序列之间序列同一性百分比的测定可以使用供在线使用和供下载的易于获得的软件完成。合适的软件程序可自各种来源获得,并且可用于比对蛋白质和核苷酸序列两者。测定序列同一性百分比的一种合适程序为bl2seq,其为可自美国政府国家生物技术信息中心BLAST网址(blast.ncbi.nlm.nih.gov)得到的BLAST程序套件的部分。Bl2seq使用BLASTN或BLASTP算法执行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。其他合适程序例如Needle、Stretcher、Water或Matcher,其为生物信息程序的EMBOSS套件的部分,并且也可自欧洲生物信息研究所(EBI)在www.ebi.ac.uk/Tools/psa上得到。

[0091] 与多核苷酸或多肽参考序列比对的单个多核苷酸或多肽靶序列内的不同区可各自具有其自身的序列同一性百分比。应注意,将序列同一性百分比值舍入至最接近的十分位。例如,将80.11、80.12、80.13和80.14向下舍去至80.1,而将80.15、80.16、80.17、80.18和80.19向上舍入至80.2。还应注意,长度值将始终是整数。

[0092] 用于计算序列同一性百分比的序列比对的生成不限于排他地由原始序列数据驱动的二进制序列-序列比较。序列比对可以衍生自多重序列比对。生成多重序列比对的一种合适的程序是ClustalW2,其可自www.clustal.org得到。另一合适的程序是可自www.drive5.com/muscle/得到的MUSCLE。ClustalW2和MUSCLE可替代地例如自EBI得到。

[0093] 还应理解,序列比对可以通过整合序列数据与异类来源的数据产生,所述异类来源的数据诸如为结构数据(例如,结晶蛋白结构)、功能数据(例如,突变的定位)或谱学学数据。整合异类数据以生成多重序列比对的合适程序为T-Coffee,其可自www.tcoffee.org得到且可替代地自例如EBI得到。还应理解,用于计算序列同一性百分比的最终比对可以自动地或人工地加以验证。

[0094] 多核苷酸变体可在编码区、非编码区或两者中都含有改变。在一个方面,多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失,但不改变所编码的多肽的性质或活性的改变。在另一方面,核苷酸变体是通过归因于遗传密码的简并性的沉默取代产生的。在其他方面,变体中有5-10、1-5、或1-2个氨基酸是以任何组合被取代、缺失或添加。多核苷酸变体可出于多种原因,例如为使特定宿主的密码子表达最优化(使人mRNA中的密码子变成例如诸如大肠杆菌(E.coli)的细菌宿主的其他密码子)而产生。

[0095] 天然存在的变体被称为“等位基因变体”且是指占据生物体的染色体上既定基因座的基因的若干替代形式之一(Genes II, Lewin, B. 编, John Wiley & Sons, New York (1985))。这些等位基因变体可在多核苷酸和/或多肽层面上变化且包括在本公开中。或者,非天然存在的变体可通过突变诱发技术或通过直接合起来产生。

[0096] 使用蛋白质工程化和重组DNA技术的已知方法,可产生变体以改进或改变多肽的

特征。举例来说,可自分泌蛋白的N末端或C末端缺失一个或多个氨基酸而不实质性损失生物功能。以引用的方式整体并入本文的Ron等人,J.Biol.Chem.268:2984-2988(1993)报道甚至在缺失3、8或27个氨基端氨基酸残基之后仍具有肝素结合活性的变异KGF蛋白。类似地,在自这个蛋白质的羧基端缺失8-10个氨基酸残基之后,干扰素 γ 展现活性提高多达10倍。(Dobeli等人,J.Biotechnology 7:199-216(1988),其以引用的方式整体并入本文。

[0097] 此外,充足证据证明变体常保留与天然存在的蛋白质的生物活性类似的生物活性。举例来说,Gayle和同事(J.Biol.Chem 268:22105-22111(1993),以引用的方式整体并入本文)对人细胞因子IL-1 α 进行广泛突变分析。他们使用随机突变诱发来产生超过3,500个个别IL-1 α 突变体,每个变体历经分子总长度具有平均2.5个氨基酸变化。检查每个可能氨基酸位置处的多个突变。研究者发现“[大多数]分子可在对[结合或生物活性]几乎没有影响下进行改变”。(参见摘要。)实际上,在检查的超过3,500个核苷酸序列中,仅23个独特氨基酸序列产生活性显著不同于野生型的蛋白质。

[0098] 如上所述,多肽变体包括例如修饰的多肽。修饰包括例如乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价连接黄素(flavin)、共价连接原血红素(heme)部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接脂质或脂质衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化(Mei等人,Blood 116:270-79(2010),其以引用的方式整体并入本文)、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移RNA介导的向蛋白质中添加氨基酸(诸如精氨酰化)和泛素化。在一些方面,可在任何方便的位置修饰支架X。

[0099] 如本文所用,术语“与……连接”、“与……缀合”和“锚定至”可互换使用,并且是指第一部分与第二部分(例如,分别为支架X和外源性生物活性部分,例如,在细胞外囊泡内或细胞外囊泡上表达的支架部分和抗原,例如,分别在细胞外囊泡的腔表面中或外表面上表达的支架X(例如,PTGFRN蛋白))之间形成的共价键或非共价键。

[0100] 术语“包裹的”,或此术语的语法上不同的形式(例如,包裹(encapsulation)或包裹(encapsulating)),是指在第二部分(例如,EV,例如,外泌体)内具有第一部分(例如,外源性生物活性部分,例如,STING激动剂)而两个部分没有化学或物理连接的状态或过程。在一些方面,术语“包裹的”可以与“在……腔中”互换使用。在本文别处公开了将第一部分(例如,外源性生物活性部分,例如,抗原、佐剂或免疫调节剂)包裹到第二部分(例如,EV,例如,外泌体)中的非限制性实例。

[0101] 如本文所用,术语“生产细胞”是指用于产生EV,例如,外泌体的细胞。生产细胞可以是体外培养的细胞,也可以是体内细胞。生产细胞包括但不限于已知能有效产生EV(例如,外泌体)的细胞,例如,HEK293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、间充质干细胞(MSC)、BJ人包皮成纤维细胞、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、RPTEC/TERT1细胞。在某些方面,生产细胞不是抗原呈递细胞。在一些方面,生产细胞不是树突细胞、B细胞、肥大细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、Kupffer-Browicz细胞、源自这些细胞中任一种的细胞或其任何组合。在一些方面,在本公开中有用的EV(例如外泌体)不携带暴露在EV(例如外泌体)表面上的MHC I类或II类分子上的抗原,而是可以携带在EV(例如外泌体)的腔内或通过附着于支架X而在EV(例如外泌体)表面上的抗原。

[0102] 如本文所用,术语“分离(isolate)”、“分离的(isolated)”和“分离(isolate)”或“纯化(purify)”、“纯化的(purified)”和“纯化(purifying)”以及“提取的(extracted)”和“提取(extracting)”可互换使用,并且是指所需EV的制剂状态(例如,多个已知或未知的量和/或浓度),所述EV已经历所需EV制剂的一个或多个纯化(例如,选择或富集)过程。在一些方面,本文所用的分离或纯化是从含有生产细胞的样品中除去、部分除去(例如,一部分)EV的过程。在一些方面,分离的EV组合物没有可检测的不希望有的活性,或替代地,不希望有的活性的水平或量处于或低于可接受的水平或量。在其他方面,分离的EV组合物的所需EV的量和/或浓度等于或高于可接受的量和/或浓度。在其他方面,与从中获得组合物的起始材料(例如,生产细胞制剂)相比,分离的EV组合物被富集。与起始材料相比,这种富集可以是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%或大于99.9999%。在一些方面,分离的EV制剂大体上不含残留的生物产物。在一些方面,分离的EV制剂100%不含、99%不含、98%不含、97%不含、96%不含、95%不含、94%不含、93%不含、92%不含、91%不含或90%不含任何污染的生物物质。残留的生物产物可以包括非生物材料(包括化学品)或不想要的核酸、蛋白质、脂类或代谢物。大体上不含残留的生物产物也可意味着EV组合物不含可检测的生产细胞,并且只有EV是可检测的。

[0103] 如本文所用,术语“免疫调节剂”是指作用于与细胞外囊泡接触的靶标(例如靶细胞)并调节免疫系统的剂。可引入EV(例如,外泌体)和/或生产细胞中的免疫调节剂的非限制性实例包括剂,诸如检查点抑制剂的调节剂、检查点抑制剂的配体、细胞因子、其衍生物或其任何组合。免疫调节剂还可以包括激动剂、拮抗剂、抗体、抗原结合片段、多核苷酸,诸如siRNA、miRNA、lncRNA、mRNA、DNA或小分子。

[0104] 如本文所用,术语“有效载荷”是指作用于与EV接触的靶标(例如靶细胞)的剂。可以包括在EV(例如外泌体)上的有效载荷的非限制性实例是生物活性分子,例如治疗性分子、佐剂和/或免疫调节剂。可引入到EV(例如,外泌体)和/或生产细胞中的有效载荷包括剂,诸如核苷酸(例如,包含可检测部分或毒素或破坏转录的核苷酸)、核酸(例如,编码多肽诸如酶的DNA或mRNA分子,或具有调控功能的RNA分子,诸如miRNA、dsDNA、lncRNA和siRNA)、氨基酸(例如,包含可检测部分或毒素或破坏翻译的氨基酸)、多肽(例如,酶)、脂质、碳水化合物和小分子(例如,小分子药物和毒素)。在某些方面,有效载荷包含外源性生物活性部分(例如,本文所公开的那些)。在一些方面,有效载荷包含靶向部分。在一些方面,有效载荷被“被动负载”到EV(例如外泌体)上或内。如本文所用,术语“被动负载”是指EV(例如外泌体)与存在于相同溶液中的有效载荷之间的缔合。在被动负载下,有效载荷将通过例如自然扩散和/或吸引而与EV缔合。

[0105] 如本文所用,术语“靶向部分”是指可以在体内或体外(例如,在不同品种细胞的混合培养物中)调节细胞外囊泡(例如,外泌体、纳米囊泡)的分布的剂。靶向部分可以是生物分子,诸如蛋白质、肽、脂质或碳水化合物,或合成分子。例如,靶向部分可以是抗体(例如,抗CD19纳米抗体、抗CD22纳米抗体)、合成聚合物(例如,PEG)、天然配体(例如,CD40L、白蛋白)、重组蛋白(例如,XTEN),但不限于此。在某些方面,靶向部分展示于EV的表面上。靶向部分可以通过与支架蛋白(例如,支架X)融合而(例如,作为遗传编码的融合分子)展示在EV表面上。在一些方面,靶向部分可以通过将靶向部分连接到EV表面分子上的化学反应而展示

在EV表面上。非限制性实例是聚乙二醇化。在一些方面,本文所公开的EV(例如,外泌体)(除了有效载荷之外)还可以包含靶向部分。在一些方面,上述靶向部分可以与功能性部分诸如小分子(例如,STING、ASO)、药物和/或治疗性蛋白质(例如,抗CD3/抗CD19抗体、抗间皮素抗体/促凋亡蛋白)组合。

[0106] 如本文所用,术语“生物活性部分”是指在生物系统(例如,细胞或人受试者)中具有活性的剂,包括但不限于蛋白质、多肽或肽,包括但不限于结构蛋白、酶、细胞因子(诸如干扰素和/或白介素)、抗生素、多克隆抗体或单克隆抗体或其有效部分,诸如Fv片段,其抗体或其部分可以是天然的、合成的或人源化的肽激素、受体、信号传导分子或其他蛋白质;如下所定义的核酸,包括但不限于寡核苷酸或修饰的寡核苷酸、反义寡核苷酸或修饰的反义寡核苷酸、cDNA、基因组DNA、人工或天然染色体(例如酵母人工染色体)或其部分、RNA,包括mRNA、tRNA、rRNA或核酶,或肽核酸(PNA);病毒或病毒样颗粒;可以被修饰或未被修饰的核苷酸或核糖核苷酸或其合成类似物;可以被修饰或未被修饰的氨基酸或其类似物;非肽(例如,类固醇)激素;蛋白聚糖;脂质;或碳水化合物。在一些方面,反义寡核苷酸包括磷酸二胺吗啉代寡聚体(PMO)或肽缀合的磷酸二胺吗啉代寡聚体(PPMO)。在某些方面,生物活性部分包括治疗性分子(例如抗原)、靶向部分(例如抗体或其抗原结合片段)、佐剂、免疫调节剂或其任何组合。在一些方面,生物活性部分包括大分子(例如,蛋白质、抗体、酶、肽、DNA、RNA或其任何组合)。在一些方面,生物活性部分包括小分子(例如,反义寡聚体(ASO)、siRNA、STING、药物或其任何组合)。在一些方面,生物活性部分对于外泌体是外源性的,即,不是天然见于外泌体中的。

[0107] 如本文所用,术语“治疗性分子”是指可以治疗和/或预防受试者(例如,人受试者)的疾病或病症的任何分子。在一些方面,治疗性分子包括抗原。如本文所用,术语“抗原”是指当引入受试者时引发对于自身的免疫应答(细胞或体液)的任何剂。

[0108] 如本文所用,术语“抗体”涵盖免疫球蛋白(无论是天然的还是部分或完全合成产生的)及其片段。此术语还涵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”还包括多肽,所述多肽包含来自免疫球蛋白基因或其片段的框架区,所述框架区特异性地结合并识别抗原。术语抗体的使用意在包括整个抗体、多克隆抗体、单克隆抗体和重组抗体、其片段,并且还包括单链抗体、人源化抗体、鼠抗体、嵌合抗体、鼠-人单克隆抗体、鼠-灵长类动物单克隆抗体、灵长类动物-人单克隆抗体、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,只要它们表现出所需的生物活性或功能。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段包括scFv、scFab、scFab-Fc、纳米抗体或其任何组合。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段包括激动剂抗体、阻断抗体、靶向抗体、其片段或其组合。在一些方面,所述激动剂抗体是CD40L激动剂。在一些方面,所述阻断抗体结合选自程序性死亡1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4及其任何组合的靶蛋白。在一些方面,所述靶向抗体结合CD3和/或CD19。

[0109] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用并且是指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者,特别是人。本文所述的组合物和方法既适用于人的疗法,也适用于兽医应用。在一些方面,所述受试者是哺乳动物,而在其他方面,所述受试者是人。如本文所用,“哺乳动物受试者”包括所有哺乳动物,包括但不限于人、家畜(例如,狗、猫

等)、农场动物(例如,奶牛、绵羊、猪、马等)和实验室动物(例如,猴、大鼠、小鼠、兔、豚鼠等)。

[0110] 如本文所用,术语“大体上不含”意指包含EV(例如,外泌体)的样品包含按质量/体积(m/v)百分比浓度计少于10%的大分子。一些级分可含有少于0.001%、少于0.01%、少于0.05%、少于0.1%、少于0.2%、少于0.3%、少于0.4%、少于0.5%、少于0.6%、少于0.7%、少于0.8%、少于0.9%、少于1%、少于2%、少于3%、少于4%、少于5%、少于6%、少于7%、少于8%、少于9%或少于10%(m/v)的大分子。

[0111] 如本文所用,术语“大分子”意指核酸、污染蛋白质、脂质、碳水化合物、代谢物或其组合。

[0112] 如本文所用,术语“常规外泌体蛋白”意指先前已知富集于外泌体中的蛋白质,包括但不限于CD9、CD63、CD81、PDGFR、GPI锚定蛋白、乳凝集素、LAMP2和LAMP2B、其片段、或与其结合的肽。

[0113] 如本文所用,“施用”是指经由药学上可接受的途径将包含本文所公开的EV(例如,外泌体)的组合物给予受试者。施用途径可为静脉内途径,例如,静脉内注射和静脉内输注。额外的施用途径包括例如皮下、肌肉内、经口、鼻和肺施用。EV(例如,外泌体)可以作为包含至少一种赋形剂的药物组合物的一部分施用。

[0114] 如本文所用,“免疫应答”是指脊椎动物内针对外来剂或异常,例如癌细胞的生物反应,所述反应保护生物体免受这些剂和由它们引起的疾病的危害。免疫应答由免疫系统的一种或多种细胞(例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞或中性粒细胞)和由任何这些细胞或肝脏(包括抗体、细胞因子和补体)产生的可溶性大分子的作用介导,这些作用导致选择性靶向、结合、损害、破坏和/或消除脊椎动物体内感染的入侵病原体、感染了病原体的细胞或组织、癌细胞或其他异常细胞,或者在自身免疫或病理性炎症的情况下,正常的人体细胞或组织。免疫反应包括例如激活或抑制T细胞,例如效应T细胞、Th细胞、CD4+细胞、CD8+T细胞或Treg细胞,或激活或抑制免疫系统的任何其他细胞,例如NK细胞。因此,免疫应答可以包括体液免疫应答(例如,由B细胞介导的)、细胞免疫应答(例如,由T细胞介导的)、或体液和细胞免疫应答两者。在一些方面,免疫应答是“抑制性”免疫应答。抑制性免疫应答是阻断或减弱刺激物(例如抗原)的效应的免疫应答。在某些方面,抑制性免疫应答包括产生针对刺激物的抑制性抗体。在一些方面,免疫应答是“刺激性”免疫应答。刺激性免疫应答是导致产生可以破坏和清除靶抗原(例如,肿瘤抗原或病毒)的效应细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞)的免疫应答。

[0115] 如本文所用,术语“治疗(Treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指例如疾病或病状的严重度降低;病程持续时间的缩短;与疾病或病状相关的一种或多种症状的改善或消除;向患有疾病或病状的受试者提供有益作用,而不一定治愈所述疾病或病状。此术语还包括疾病或病状或其症状的防御或预防。在一个方面,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指在受试者中诱导针对抗原的免疫应答。

[0116] 如本文所用,“预防(Prevent)”或“预防(preventing)”是指减少或降低特定结果的发生或严重度。在一些方面,通过防御性治疗来实现预防结果。

[0117] II. 药物组合物

[0118] 本文提供了用于储存和施用细胞外囊泡(例如外泌体)的组合物。如上所述,本公

开的组合物提供了多种优势,包括但不限于:减少的EV聚集、改善的EV稳定性、和改善的EV架构完整性、改善的包含在EV上或EV中的工程化蛋白质的稳定性、以及改善的被动负载或缀合材料(诸如小分子药物或蛋白质)的稳定性。本文所公开的组合物能够被冷冻、在一定的温度范围内储存不同的时间长度和解冻,而不损害包含在组合物中的EV的稳定性。

[0119] 下面阐述了关于配制本公开的组合物的各种组分和考虑。

[0120] II.A.EV组合物

[0121] 本公开提供了一种包含细胞外囊泡的药物组合物,其中所述药物组合物在冷冻和/或储存时是稳定的,和/或适合在哺乳动物(例如人)中施用。生物制剂在储存期间的不稳定性可能由聚集、脱氨基、异构化、水解、氧化和/或变性引起。这些结构修饰可由于各种不同的因素而发生:生物制剂的性质和/或其他因素,包括温度、pH和生物制剂的离子强度以及生物制剂一起配制的元素。

[0122] 在一些方面,本公开的药物组合物被配制为稳定的,以使得所述组合物不需要螯合剂和/或白蛋白,例如重组人白蛋白。

[0123] 人白蛋白是血液中最普遍存在的蛋白质,并且以约40g/L的量存在。它在血液中的作用是许多较小实体诸如金属、激素、脂肪酸和毒素的穿梭。然而,它也占胶体膨胀压(或胶体渗透压)的约75%,而白蛋白的单个游离半胱氨酸(在位置34处)构成了血液中存在的大部分还原当量。所有这些特性都是在制剂中使用白蛋白时起作用的特征。

[0124] 白蛋白历来被用于一系列不同的制剂中。最初,采用血浆来源的人血清白蛋白,但行业中已转向使用化学定义(重组)的人血清白蛋白。由于以下因素,重组产品是有利的:诸如不存在动物来源的产品、供应的确定性、高纯度、不存在宿主来源的蛋白酶、高同质性、高游离硫醇含量、不存在已知或未知的人类病原体、批次与批次之间的一致性以及存在已建立的监管途径。

[0125] 据报道,制剂中的白蛋白防止:表面吸附、聚集、原纤维化和氧化,并且改善:溶解度、冻干饼形成和/或冻干粉中API的溶解特性。尽管有这些已知的益处,本公开提供了一种稳定的不含白蛋白的药物组合物,其包含细胞外囊泡。

[0126] 螯合剂是与金属离子结合的成分,并且对药物制剂的稳定性和功效起着至关重要的作用。螯合过程通过防止金属离子与任何其他物质发生化学反应来使金属离子稳定。本发明组合物的特征在于其不含螯合剂。

[0127] 在一些方面,本文所公开的组合物的pI在约1至约6.5的范围内。如本文所公开,其中表面大分子(例如,PTGFRN)过度表达的当前公开的EV的pI范围能够在生理pH值下使胶体稳定的阴离子外泌体成为可能。在一些方面,表面分子可以是多肽、寡核苷酸或碳水化合物。在一些方面,高于6.5的pI会导致EV(例如外泌体)在可能产生毒性或生物分布受限的有用pH范围内具有中性电荷(不稳定)或阳离子电荷。

[0128] 在一些方面,本公开的组合物被配制呈液态并且可以通过将组合物的温度降低至冰点和低于冰点的温度来冷冻以供储存。不设想通过脱水或冻干来冷冻组合物。在一些方面,组合物不是冻干的。

[0129] II.B.组合物I (pH)

[0130] 在一个方面,本公开提供了可以稳定地配制EV的pH。pH可在以下范围内:约7.0至约7.4、例如约7.1至约7.3、例如约7.2。在一些方面,本公开的药物组合物包含:(a)细胞外

囊泡；(b) 糖类；(c) 氯化钠；(d) 磷酸钾；和 (e) 磷酸钠。在一些方面，组合物在 pH 为约 7.2 的溶液中。EV 在本文中别处公开，糖类可以是单糖、二糖、三糖或任何其他糖类；氯化钠如下所示；并且磷酸钾和磷酸钠如下所示。

[0131] 在一些方面，冷冻前和冷冻后的组合物保持相同。例如，冷冻前和冷冻后的组合物具有约 7.1 的 pH。在一些方面，冷冻前和冷冻后的组合物具有约 7.2 的 pH。在一些方面，冷冻前和冷冻后的组合物具有约 7.3 的 pH。在一些方面，冷冻前和冷冻后的组合物具有约 7.4 的 pH。

[0132] 在一些方面，可以通过改变磷酸盐的浓度调整组合物的 pH。在一些方面，可以通过改变磷酸钾的浓度调整组合物的 pH。在一些方面，可以通过添加磷酸钾或增加磷酸钾的浓度来提高组合物的 pH。在一些方面，磷酸钾的浓度高于磷酸钠的浓度。

[0133] 在一些方面，磷酸钠和磷酸钾的一元与二元形式的比例可用于调节药物组合物的 pH。在一些方面，磷酸二氢钠和/或磷酸二氢钾可用于提高药物组合物的 pH。在一些方面，磷酸氢二钠和/或磷酸氢二钾可用于降低药物组合物的 pH。在一些方面，所公开的组合物的 pH 范围在约 6.8 至约 7.6 之间。因此，如果组合物的 pH 值低于期望值，则可以通过改变盐的一元与二元形式（即，钾的或钠的）的比例来改变 pH。在一些方面，磷酸钠和磷酸钾的一元与二元形式的比例可用于调节组合物的 pH，直到组合物的 pH 在 7.0 与 7.4 之间，例如 7.1 与 7.3 之间，例如 7.2。在一些方面，pH 的上限是由于所公开的 EV（例如，外泌体）的脂质被破坏所致，所述脂质发生水解，更通常称为皂化。在一些方面，钾盐在冷冻后稳定 pH 值。

[0134] 在一些方面，用于约 pH 7.2 的药物组合物的糖类包括单糖。在一些方面，所述糖类包括二糖。在一些方面，所述糖类包括三糖。在一些方面，所述糖类包括寡糖。在一些方面，所述糖类包括多糖。在一些方面，所述糖类包括糖醇。在一些方面，所述糖类包括本文所述糖类的任何组合。

[0135] 在一些方面，所述糖类包括乳糖。在一些方面，所述糖类包括葡萄糖。在一些方面，所述糖类包括蔗糖。在一些方面，所述糖类包括海藻糖。在一些方面，所述糖类包括右旋糖。在一些方面，所述糖类包括本文所述糖类的任何组合。

[0136] 在一些方面，所述糖类是糖醇。在一些方面，所述糖类是分子量为约 90.00g/mol 至约 190.00g/mol 的糖醇。在一些方面，所述糖类具有约 180.00g/mol 至约 380.00g/mol 的分子量。

[0137] 在一些方面，所述糖醇包括甘油。在一些方面，所述糖醇包括山梨糖醇。在一些方面，所述糖醇包括甘露糖醇。在一些方面，所述糖醇包括木糖醇。在一些方面，所述糖醇包括本文所述糖醇的任何组合。

[0138] 在一些方面，所述糖类是蔗糖或海藻糖。在一些方面，所述药物组合物包含蔗糖。在一些方面，所述药物组合物包含海藻糖。在一些方面，蔗糖浓度为约 5% w/v。

[0139] II.C. 组合物 II (蔗糖)

[0140] 本公开还涉及在包含细胞外囊泡的药物组合物中的适当浓度的蔗糖或海藻糖。组合物中合适量的蔗糖或海藻糖使组合物稳定和/或减少任何聚集体。在一些方面，药物组合物包含 (i) 细胞外囊泡和 (ii) 糖类，所述糖类是浓度为约 5% w/v 的蔗糖或海藻糖。

[0141] 浓度为 5% w/v 的本文所公开的糖类（例如，蔗糖或海藻糖）可以提供比包含 1% w/v 蔗糖的组合物优异的稳定性。具体地，包含 (i) 细胞外囊泡（例如外泌体）和 (ii) 糖类（所述

糖类是浓度为约5%w/v的蔗糖或海藻糖)的药物组合物提供的优势包括但不限于:(i)减少EV的聚集,(ii)改善的EV稳定性,(iii)改善的EV架构完整性,(iv)改善的包含在EV上或EV中的工程化蛋白质的稳定性,以及(v)改善的被动负载或缀合材料(诸如小分子药物或蛋白质)的稳定性。在一些方面,与包含浓度为1%w/v至4%w/v(例如1%)的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,所述组合物具有减少的聚集。在一些方面,与包含浓度为1%w/v至4%w/v(例如1%)的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,所述组合物具有改善的稳定性。在一些方面,与包含浓度为1%w/v至4%w/v(例如1%)的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,所述组合物具有改善的EV架构完整性。

[0142] 在一些方面,与包含浓度为1%w/v至4%w/v(例如1%)的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,所述组合物具有改善的包含在EV上或EV中的工程化蛋白质的稳定性。

[0143] 在一些方面,与包含浓度为1%w/v至4%w/v(例如1%)的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,所述组合物具有改善的被动负载或缀合材料(诸如小分子药物或蛋白质)的稳定性。

[0144] 在其他方面,与包含浓度高于5.5%w/v、6%w/v、7%w/v、8%w/v、9%w/v或10%w/v的蔗糖或海藻糖的参考组合物相比,所述组合物具有改善的稳定性。

[0145] 所述组合物还可包含氯化钠、磷酸钾、氯化钠或本文别处公开的任何组合。

[0146] II.D. 氯化钠

[0147] 在一些方面,组合物I或组合物II还包含氯化钠。

[0148] 在一些方面,氯化钠以介于约10mM与约200mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,氯化钠以如下浓度存在于组合物中:介于约10mM与约134mM之间、介于约10mM至约130mM之间、介于约20mM至约120mM之间、介于约30mM至约110mM之间、介于约40mM至约100mM之间、介于约50mM至约90mM之间、介于约60mM至约80mM之间、介于约70mM至约80mM之间、介于约45mM至约95mM之间、介于约45mM至约80mM之间、介于约45mM至约70mM之间、介于约45mM至约65mM之间、介于约50mM至约65mM之间、介于约50mM至约60mM之间、介于约50mM至约55mM之间、介于约50mM至约55mM之间或介于约51mM至约54mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约10mM至约190mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约10mM至约180mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约10mM至约170mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约10mM至约160mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约10mM至约150mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约10mM至约140mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约10mM至约130mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约20mM至约120mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约30mM至约110mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约40mM至约100mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约50mM至约90mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约60mM至约80mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约70mM至约80mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约45mM至约95mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约45mM至约80mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约45mM至约70mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约45mM至约65mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约50mM至约65mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约50mM至约60mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约50mM至约55mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约50mM至约55mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约51mM至约54mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约40mM至约60mM之间。在一些方面,氯化钠的浓

度介于约45mM至约55mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约48mM至约53mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约40mM至约50mM之间。在一些方面,氯化钠的浓度介于约45mM至约50mM之间。

[0149] 在一些方面,氯化钠的浓度为约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约60mM、约70mM、约80mM、约90mM或约100mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约10mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约20mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约30mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约40mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约50mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约60mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约70mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约80mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约90mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约100mM。

[0150] 在一些方面,氯化钠的浓度为约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM或约200mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约110mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约120mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约130mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约140mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约150mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约160mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约170mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约180mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约190mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约200mM。

[0151] 在一些方面,氯化钠的浓度为约39mM、约40mM、约41mM、约42mM、约43mM、约44mM、约45mM、约46mM、约47mM、约48mM、约49mM或约50mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约39mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约40mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约41mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约42mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约43mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约44mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约45mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约46mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约47mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约48mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约49mM。在一些方面,氯化钠的浓度为约50mM。在一些方面,氯化钠的浓度为40.0。在一些方面,氯化钠的浓度为49.6mM。

[0152] 本文所公开的氯化钠的任何浓度都可以重量/体积表示,例如,mg/ml。普通技术人员将能够容易地将本文所公开的mM浓度转换为重量/体积浓度。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约0.5mg/ml至至少约12mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约0.5mg/ml至至少约11.9mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约11.8mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约11.7mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约11.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约11.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约11.0mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约10.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约10mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约9.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约9mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约8.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约8.0mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约7.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约7.0mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约6.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约6.0mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约5.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约5.0mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约4.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约4.0mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.9mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.8mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.7mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.6mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.4mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.3mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.1mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约3.0mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约2.9mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约2.8mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约2.7mg/ml、至少约0.5mg/

ml至至少约2.6mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约2.5mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约2.4mg/ml、至少约0.5mg/ml至至少约2.3mg/ml、或至少约0.5mg/ml至至少约2.1mg/ml。

[0153] 在一些方面,氯化钠的浓度为至少约3.0mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.92mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.9mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.8mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.7mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.6mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.5mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.4mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.34mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.3mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.2mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.1mg/ml。在一些方面,氯化钠的浓度为至少约2.0mg/ml。

[0154] 在一些方面,组合物II还包含含有磷酸盐化合物的磷酸盐缓冲剂。磷酸盐化合物的非限制性实例包括磷酸钾、磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和/或其组合。在一些方面,磷酸盐化合物是磷酸钾。在其他方面,磷酸盐化合物是磷酸钠。

[0155] II.E. 磷酸盐

[0156] 在一些方面,组合物I或组合物II还包含磷酸钾,例如,磷酸二氢钾。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾以如下浓度存在于组合物中:约1mM至约20mM、约2mM至约20mM、约3mM至约20mM、约4mM至约20mM、约5mM至约20mM、约6mM至约20mM、约7mM至约20mM、约8mM至约20mM、约1mM至约20mM、约2mM至约19mM、约3mM至约18mM、约4mM至约17mM、约5mM至约16mM或约5mM至约15mM。

[0157] 在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约4.5mM、约4.6mM、约4.7mM、约4.8mM、约4.9mM、约5.0mM、约5.1mM、约5.2mM、约5.3mM、约5.4mM或约5.5mM。在一些方面,磷酸钾以在约2mM至约19mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约3mM至约18mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约4mM至约17mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约5mM至约16mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约5mM至约15mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约1mM至约10mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约2mM至约9mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约3mM至约8mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约4mM至约7mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约4mM至约6mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约3mM至约7mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以在约3mM至约6mM之间的浓度存在于组合物中。

[0158] 在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约3.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约3.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约4.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约4.1mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约4.2mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约4.3mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约4.4mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾,以约4.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约4.6mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约4.7mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约4.8mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约4.9mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾

以约5.1mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.2mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.3mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.4mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.6mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.7mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.8mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约5.9mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾以约6.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钾在组合物中的浓度为5.15mM。

[0159] 在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约15.0mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.1mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.2mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.3mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.4mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.5mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.6mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.7mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.8mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约15.9mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约16.0。在一些方面,磷酸钾的浓度为约16.1mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约16.2mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约16.3mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约16.4mM。在一些方面,磷酸钾的浓度为约16.5mM。在一些方面,磷酸钾在组合物中的浓度为15.4mM。

[0160] 在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.0mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.1mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.2mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.3mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.4mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.5mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.6mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.7mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.8mM。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为约14.9mM。

[0161] 本文所公开的磷酸二氢钾的任何浓度都可以用重量/体积表示,例如mg/ml。普通技术人员将能够容易地将本文所公开的mM浓度转换为重量/体积浓度。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.14mg/ml至至少2.75mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.14mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.15mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.17mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.2mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.23mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.25mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.5mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.60mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.61mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.62mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.63mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.64mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.65mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.66mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.67mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.68mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.69mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.70mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.71mg/ml。在一些方面,磷酸钾,例如磷酸

二氢钾的浓度为至少约0.72mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.73mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.74mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约0.75mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约1.0mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约1.25mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约1.50mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约1.75mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.0mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.03mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.04mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.05mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.1mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.2mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.3mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.4mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.5mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.6mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.7mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.8mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约2.9mg/ml。在一些方面，磷酸钾，例如磷酸二氢钾的浓度为至少约3.0mg/ml。

[0162] 在一些方面，组合物I或组合物II还包含磷酸钠。在一些方面，磷酸钠，例如磷酸氢二钠七水合物以如下浓度存在于组合物中：约10mM至约100mM之间、约10mM至约90mM之间、约10mM至约80mM之间、约10mM至约70mM之间、约10mM至约60mM之间、约10mM至约50mM之间、约10mM至约40mM之间、约11mM至约29mM之间、约12mM至约28mM之间、约13mM至约27mM之间或约14mM至约26mM之间。在一些方面，磷酸钠以约11mM至约29mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约12mM至约28mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约13mM至约27mM之间的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约14mM至约26mM之间的浓度存在于组合物中。

[0163] 在一些方面，磷酸钠以如下浓度存在于组合物中：约14.5mM、约14.6mM、约14.7mM、约14.8mM、约14.9mM、约15.0mM、约15.1mM、约15.2mM、约15.3mM、约15.4mM或约15.5mM。在一些方面，磷酸钠以约14.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约14.6mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约14.7mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约14.8mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约14.9mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.1mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.2mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.3mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.4mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠的浓度为14.9mM。

[0164] 在一些方面，磷酸钠以约15.6mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.7mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.8mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约15.9mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.1mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.2mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.3mM的浓度存在于

组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.4mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.6mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.7mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.8mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约16.9mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约17.0mM的浓度存在于组合物中。

[0165] 在一些方面，磷酸钠以约26.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约26.6mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约26.7mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约26.8mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约26.9mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.1mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.2mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.3mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.4mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.5mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.6mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.7mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.8mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.9mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约28.0mM的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以约27.1mM的磷酸钠浓度存在于组合物中。

[0166] 本文的磷酸二氢钠的任何浓度都可以用重量/体积表示，例如mg/ml。普通技术人员将能够容易地将本文所公开的mM浓度转换为重量/体积浓度。在一些方面，磷酸钠以至少约1.42mg/ml至至少约14.2mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约1.4mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约1.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约1.6mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约1.7mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约1.8mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约1.9mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.1mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.13mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.2mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.25mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.3mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.4mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.6mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.7mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.75mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.8mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约2.9mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.25mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.75mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.8mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.83mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.85mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约3.9mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约4.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面，磷酸钠以至少约

4.25mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约4.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约4.75mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约5.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约5.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约6.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约6.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约7.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约7.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约8.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约8.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约9.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约9.5mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约10.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约11.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约12.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约13.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约14.0mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,磷酸钠以至少约14.0mg/ml的浓度存在于组合物中。

[illegible]

七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约12.5mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约13.0mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约13.5mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约14.0mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约14.1mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约14.2mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约14.3mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约14.4mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约14.5mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。在一些方面,组合物包含浓度为至少约15.0mg/ml的磷酸氢二钠七水合物。

[0168] 在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约2的磷酸钾和磷酸钠。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约3的磷酸钾和磷酸钠。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约4的磷酸钾和磷酸钠。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约5的磷酸钾和磷酸钠。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约3的磷酸钾和磷酸钠。在一些方面,磷酸盐缓冲剂包含比例为约1:约2的磷酸钾和磷酸钠。

[0169] 在一些方面,本公开提供了一种药物组合物,其在溶液中包含(i)细胞外囊泡,(ii)磷酸钾,和(iii)磷酸钠,其中磷酸钾与磷酸钠的摩尔比为约1比约3或约1比约2。

[0170] II.F. 糖类

[0171] 本公开的某些方面涉及一种药物组合物,其包含:细胞外囊泡、糖类、氯化钠、磷酸钾和磷酸钠。如上所述,糖类可以是单糖、二糖、三糖或任何其他糖类。在一些方面,糖类是蔗糖。在一些方面,糖类是海藻糖。

[0172] 在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以如下浓度存在于组合物中:至少约1%至至少约10%、至少约2%至至少约9%、约3%至至少约8%、至少约4%至至少约7%、至少约4%至至少约6%、至少约3%至至少约7%、至少约5%至至少约10%、至少约5%至至少约9%、至少约5%至至少约8%、或至少约5%至至少约7%。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约1%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约2%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约3%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约4%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约5%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约6%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约7%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约8%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约9%的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约10%的浓度存在于组合物中。

[0173] 在一些方面,组合物包含至少约1%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约2%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约2.5%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约3%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约4%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约5%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约6%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约7%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约8%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约9%的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约10%的蔗糖。

[0174] 在一些方面,组合物包含至少约1%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约2%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约3%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约4%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约5%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约6%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约7%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约8%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约9%的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约10%的海藻糖。

[0175] 在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以如下浓度存在于组合物中:至少约10mg/ml至至少约100mg/ml、至少约20mg/ml至至少约90mg/ml、至少约30mg/ml至至少约80mg/ml、至少约40mg/ml至至少约70mg/ml、至少约40mg/ml至至少约60mg/ml、至少约30mg/ml至至少约70mg/ml、至少约50mg/ml至至少约100mg/ml、至少约50mg/ml至至少约90mg/ml、至少约50mg/ml至至少约80mg/ml或至少约50mg/ml至至少约70mg/ml。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约10mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约20mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约30mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约40mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约50mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约60mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约70mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约80mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约90mg/ml的浓度存在于组合物中。在一些方面,糖类,例如蔗糖或海藻糖以至少约100mg/ml的浓度存在于组合物中。

[0176] 在一些方面,组合物包含至少约10mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约20mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约30mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约40mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约50mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约60mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约70mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约80mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约90mg/ml的蔗糖。在一些方面,组合物包含至少约100mg/ml的蔗糖。

[0177] 在一些方面,组合物包含至少约10mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约20mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约30mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约40mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约50mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约60mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约70mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约80mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约90mg/ml的海藻糖。在一些方面,组合物包含至少约100mg/ml的海藻糖。

[0178] 在某些方面,组合物包含至少约2.5%的蔗糖,其中所述组合物与包含少于约2%的蔗糖的类似组合物相比具有改善的稳定性。

[0179] II.G. 电导率

[0180] 在一些方面,本公开的组合物I或组合物II具有在约6mS/cm $\pm$ 10%与约10mS/cm $\pm$ 10%之间的电导率。在一些方面,电导率在6mS/cm $\pm$ 10%与约7mS/cm $\pm$ 10%之间、在约7mS/cm $\pm$ 10%与约8mS/cm $\pm$ 10%之间、在约8mS/cm $\pm$ 10%与约9mS/cm $\pm$ 10%之间或在约9mS/cm $\pm$ 10%与约10mS/cm $\pm$ 10%之间。在一些方面,电导率为约6mS/cm $\pm$ 10%、约

7mS/cm+/-10%、约8mS/cm+/-10%、约9mS/cm+/-10%或约10mS/cm+/-10%。

[0181] 在一些方面,组合物具有在约6mS/cm+/-10%与约10mS/cm+/-10%之间的电导率。在一些方面,电导率为约6mS/cm+/-10%。在一些方面,电导率为约7mS/cm+/-10%。在一些方面,电导率为约8mS/cm+/-10%。在一些方面,电导率为约9mS/cm+/-10%。在一些方面,电导率为约10mS/cm+/-10%。在一些方面,电导率为7.23mS/cm+/-10%。在一些方面,电导率为8.8mS/cm+/-10%。

[0182] II.H.抗氧化剂

[0183] 在一些方面,本公开的组合物I或组合物II还包含抗氧化剂。在一些方面,所述抗氧化剂包括D-蛋氨酸、L-蛋氨酸、抗坏血酸、异抗坏血酸、抗坏血酸钠、硫代甘油、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、胱氨酸、二硫苏糖醇、谷胱甘肽、生育酚、丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、硫酸氢钠、连二亚硫酸钠、 α -生育酚、 γ -生育酚、没食子酸丙酯、抗坏血基棕榈酸酯、偏亚硫酸氢钠、硫脲、硫代硫酸钠、没食子酸丙酯、维生素C、N-乙酰半胱氨酸、硒和巯基乙酸钠。在一些方面,抗氧化剂是蛋氨酸。在其他方面,抗氧化剂是D-蛋氨酸。在其他方面,抗氧化剂是L-蛋氨酸。

[0184] 在一些方面,组合物I或II的抗氧化剂包括硫代硫酸或其盐。在一些方面,硫代硫酸或其盐包括硫代硫酸钠。

[0185] 在一些方面,本文所公开的组合物包含抗还原剂。在一些方面,所述抗还原剂包括EDTA、EGTA、CuSO₄、S-腺苷蛋氨酸、半胱氨酸或其任何组合。

[0186] II.I.蛋白酶抑制剂

[0187] 在一些方面,本文所公开的组合物包含蛋白酶抑制剂。蛋白质诸如硫氧还蛋白可以还原具有二硫键的蛋白质。添加抑制剂诸如EDTA、EGTA和CuSO₄可以降低活性,尤其是金属蛋白酶诸如己糖激酶的活性。EGTA/EDTA通过螯合二价阳离子进行抑制。因此,在一些方面,组合物还包含选自EDTA、EGTA、CuSO₄及其任何组合的蛋白酶抑制剂。在一些方面,降低温度以降低蛋白酶的活性。

[0188] II.J.组合物的特征

[0189] 本公开的组合物已被配制为使得组合物的EV在波动的温度条件下是稳定的,例如,当冷冻和/或解冻和/或施用于受试者时。在不希望被束缚的情况下,认为本公开的糖类,例如,约5%w/v的蔗糖与本公开的特定比例的磷酸钾和磷酸钠的组合为所述组合物和其中含有的EV提供了优异的稳定性的。例如,在一些方面,本公开的组合物能够在不同的温度下储存不同的时间长度,其中细胞外囊泡(例如,外泌体)的稳定性没有降低。此外,在一些方面,本公开的组合物可以在环境温度下被配制成液体,然后通过将组合物放入-80℃冰箱中冷冻,随后解冻。因此,在一些方面,组合物在冷冻前可以作为液体储存,组合物在冷冻时可以作为固体储存,并且组合物在解冻后可以作为液体储存,而不会损害EV的稳定性,如下所述。

[0190] 在一些方面,组合物可以在冷冻前作为液体储存。在一些方面,组合物在冷冻前在约25℃至约1℃之间的温度下可以作为液体储存,其中EV(例如,外泌体)的稳定性没有降低。在一些方面,组合物在冷冻前在约25℃至约1℃下可以作为液体储存,而不会损害EV(例如,外泌体)的稳定性。

[0191] 在一些方面,组合物在冷冻前可以作为液体储存至少约4小时、至少约10小时、至

少约12小时、至少约15小时、至少约20小时、至少约24小时。在一些方面,组合物在冷冻前作为液体储存约4小时至约12小时、约5小时至约12小时、约6小时至约12小时、约4小时至约24小时、约6小时至约24小时、约12小时至约24小时、或约4小时至约16小时。在一些方面,组合物在冷冻前可以作为液体储存少于36小时、少于30天、少于24小时、少于23小时、少于22小时、少于21小时、少于20小时、少于19小时、少于18小时、少于17、少于16小时、少于15小时、少于14小时、少于13小时、少于12小时、少于11小时、少于10小时、少于9小时、少于8小时、少于7小时、少于6小时、少于5小时或少于4小时。

[0192] 在一些方面,组合物在冷冻前在约4℃下可以作为液体储存约一周。在一些方面,组合物可以在4℃下稳定长达一周。在一些方面,组合物在冷冻前在约4℃下可以作为液体储存约一周,然后施用于有此需要的受试者。

[0193] 在一些方面,组合物能够在解冻之前作为冷冻固体储存一段时间。在一些方面,组合物可以作为固体在零度和低于零度的温度(例如,在约0℃与或-80℃之间的温度)下储存,其中EV(例如,外泌体)的稳定性没有降低。在一些方面,组合物可以作为冷冻固体在约0℃与或-80℃之间的温度下储存。在一些方面,组合物可以作为冷冻固体在约0℃与-50℃之间的温度下储存。在一些方面,组合物可以作为冷冻固体在约0℃与-20℃之间的温度下储存。在一些方面,组合物可以作为冷冻固体在约0℃与-15℃之间的温度下储存。在一些方面,组合物可以在-80℃下储存长达6个月。在一些方面,组合物可以在-80℃下稳定一年。在一些方面,组合物可以在-80℃下稳定两年。

[0194] 本公开的组合物可以作为冷冻固体储存不同的时间长度,然后解冻,以准备施用于有此需要的受试者。在一些方面,解冻的液体可以在施用之前在不同的温度下储存不同的时间长度,而不会损害EV(例如,外泌体)的稳定性。在一些方面,组合物能够在约1℃至约25℃的温度下解冻并作为液体储存,其中EV(例如,外泌体)的稳定性没有降低。

[0195] 在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约1℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约2℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约3℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约4℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约5℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约6℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约7℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约8℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约9℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约10℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约11℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约12℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约13℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约14℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约15℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约16℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约17℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约18℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约19℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约20℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约21℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约22℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约23℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约24℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在约25℃下储存。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在4℃下储存

约一周。在一些方面,组合物可以作为解冻的液体在4℃下稳定长达一周。

[0196] 在一些方面,组合物可以被储存,然后直接施用于有此需要的受试者。在一些方面,组合物可以在25℃下储存长达24小时,然后直接施用于有此需要的受试者。在一些方面,组合物可以在4℃下储存长达3天,然后直接施用于有此需要的受试者。在一些方面,组合物可以在4℃下储存长达7天,然后直接施用于有此需要的受试者。在一些方面,组合物可以在-80℃下储存长达6个月,解冻,然后直接施用于有此需要的受试者。

[0197] II.K. 示例性组合物

[0198] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0199] (a) 细胞外囊泡;

[0200] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;

[0201] (c) 浓度介于40mM与约60mM之间的氯化钠;

[0202] (d) 浓度介于4mM与6mM之间的磷酸二氢钾;以及

[0203] (e) 浓度介于约10mM与约20mM之间的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物的电导率为约7.2mS/cm+/-10%。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0204] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0205] (a) 细胞外囊泡;

[0206] (b) 浓度为约5%w/v的蔗糖;

[0207] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;

[0208] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;

[0209] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物的电导率为约7.2mS/cm+/-10%。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0210] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0211] (a) 细胞外囊泡;

[0212] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;

[0213] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠;

[0214] (d) 浓度介于10mM与20mM之间的磷酸二氢钾;

[0215] (e) 浓度介于约20mM与约40mM之间的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物的电导率为约8.8mS/cm+/-10%。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0216] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0217] (a) 细胞外囊泡;

[0218] (b) 浓度为约5%w/v的蔗糖;

[0219] (c) 浓度为约40mM的氯化钠;

[0220] (d) 浓度为约15mM的磷酸二氢钾;

[0221] (e) 浓度为约27mM的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物的电导率为约8.8mS/cm+/-10%。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0222] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0223] (a) 细胞外囊泡;

[0224] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;

[0225] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠;

[0226] (d) 浓度介于1mM与20mM之间的磷酸二氢钾;

[0227] (e) 浓度介于约20mM与约40mM之间的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0228] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0229] (a) 细胞外囊泡;

[0230] (b) 浓度为约5%w/v的蔗糖;

[0231] (c) 浓度为约40mM的氯化钠;

[0232] (d) 浓度为约11mM的磷酸二氢钾;

[0233] (e) 浓度为约32mM的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0234] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0235] (a) 细胞外囊泡;

[0236] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;

[0237] (c) 浓度介于30mM与约60mM之间的氯化钠;

[0238] (d) 浓度介于1mM与20mM之间的磷酸二氢钾;

[0239] (e) 浓度介于约10mM与约40mM之间的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0240] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0241] (a) 细胞外囊泡;

[0242] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;

[0243] (c) 浓度介于40mM与约50mM之间的氯化钠;

[0244] (d) 浓度介于5mM与15mM之间的磷酸二氢钾;

[0245] (e) 浓度介于约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物,其中所述组合物的pH为约7.2。在一些方面,组合物在溶液中,例如,液体制剂中。

[0246] II.K.1. 示例性组合物02

[0247] 在一些方面,本公开的组合物包含:

[0248] (a) 细胞外囊泡;

[0249] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;

[0250] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠;

[0251] (d) 浓度介于约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾;

[0252] (e) 浓度介于约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物,

[0253] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。

[0254] 在一些方面,所述组合物包含:

[0255] (a) 细胞外囊泡;

[0256] (b) 浓度为约5%w/v的蔗糖;

- [0257] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠；
- [0258] (d) 浓度介于约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾；
- [0259] (e) 浓度介于约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物，(f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0260] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0261] (a) 细胞外囊泡；
- [0262] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间，例如5%w/v的蔗糖；
- [0263] (c) 浓度为约40mM的氯化钠；
- [0264] (d) 浓度介于约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾；
- [0265] (e) 浓度介于约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物，(f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0266] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0267] (a) 细胞外囊泡；
- [0268] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间，例如5%w/v的蔗糖；
- [0269] (c) 浓度在30mM和约50mM之间的氯化钠；
- [0270] (d) 浓度为约15mM的磷酸二氢钾；
- [0271] (e) 浓度介于约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物，
- [0272] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0273] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0274] (a) 细胞外囊泡；
- [0275] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间，例如5%w/v的蔗糖；
- [0276] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠；
- [0277] (d) 浓度介于约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾；
- [0278] (e) 浓度为约30mM的磷酸氢二钠七水合物，
- [0279] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0280] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0281] (a) 细胞外囊泡；
- [0282] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间，例如5%w/v的蔗糖；
- [0283] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠；
- [0284] (d) 浓度介于约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾；
- [0285] (e) 浓度为约27mM的磷酸氢二钠七水合物，
- [0286] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0287] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0288] (a) 细胞外囊泡；
- [0289] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间，例如5%w/v的蔗糖；
- [0290] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠；
- [0291] (d) 浓度介于约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾；
- [0292] (e) 浓度介于约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物，
- [0293] (f) 其中所述组合物的pH为约7.0至约7.4。

[0294] 在一些方面,所述组合物包含:

[0295] (a) 细胞外囊泡;

[0296] (b) 浓度介于约4%w/v与约6%w/v之间,例如5%w/v的蔗糖;

[0297] (c) 浓度介于30mM与约50mM之间的氯化钠;

[0298] (d) 浓度介于约5mM与约25mM之间的磷酸二氢钾;

[0299] (e) 浓度介于约15mM与约35mM之间的磷酸氢二钠七水合物,

[0300] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0301] 在某些方面,所述组合物包含:

[0302] (a) 细胞外囊泡;

[0303] (b) 浓度为约5%w/v的蔗糖;

[0304] (c) 浓度为约40mM的氯化钠;

[0305] (d) 浓度为约15mM的磷酸二氢钾;

[0306] (e) 浓度为约27mM的磷酸氢二钠七水合物,

[0307] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0308] 在一些方面,细胞外囊泡包含STING激动剂。在一些方面,STING激动剂包括环状二核苷酸(CDN) STING激动剂或非环状二核苷酸STING激动剂。在某些方面,STING激动剂包括cGMP、环状二-GMP(c-di-GMP)、cAMP、环状二-AMP(c-di-AMP)、环状-GMP-AMP(cGAMP)、环状二-IMP(c-di-IMP)、环状AMP-IMP(cAIMP)及其任何已知可刺激或增强患者的免疫应答或炎症反应的类似物。在某些方面,CDN包含连接环状二核苷酸的2'2'、2'3'、2'5'、3'3'或3'5'键,或其任何组合。

[0309] 在某些方面,组合物是冻干的。

[0310] II.K.1. 示例性组合物03

[0311] 在某些方面,所述组合物包含:

[0312] (a) 细胞外囊泡;

[0313] (b) 浓度为至少约50mM至至少约300mM的蔗糖;

[0314] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠;

[0315] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾;

[0316] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠,

[0317] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。

[0318] 在某些方面,所述组合物包含:

[0319] (a) 细胞外囊泡;

[0320] (b) 浓度为约146mM的蔗糖;

[0321] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠;

[0322] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾;

[0323] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠,

[0324] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。

[0325] 在某些方面,所述组合物包含:

[0326] (a) 细胞外囊泡;

[0327] (b) 浓度为至少约50mM至至少约300mM的蔗糖;

- [0328] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0329] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾；
- [0330] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠，
- [0331] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0332] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0333] (a) 细胞外囊泡；
- [0334] (b) 浓度为至少约50mM至至少约300mM的蔗糖；
- [0335] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠；
- [0336] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0337] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠，
- [0338] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0339] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0340] (a) 细胞外囊泡；
- [0341] (b) 浓度为至少约50mM至至少约300mM的蔗糖；
- [0342] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠；
- [0343] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾；
- [0344] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0345] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0346] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0347] (a) 细胞外囊泡；
- [0348] (b) 浓度为至少约50mM至至少约300mM的蔗糖；
- [0349] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠；
- [0350] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾；
- [0351] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠，
- [0352] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0353] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0354] (a) 细胞外囊泡；
- [0355] (b) 浓度为约146mM的蔗糖；
- [0356] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0357] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0358] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0359] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0360] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0361] (a) 细胞外囊泡；
- [0362] (b) 浓度为至少约1%至至少约10%的蔗糖；
- [0363] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠；
- [0364] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾；
- [0365] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠，
- [0366] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。

- [0367] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0368] (a) 细胞外囊泡;
- [0369] (b) 浓度为约5%的蔗糖;
- [0370] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠;
- [0371] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾;
- [0372] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠,
- [0373] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0374] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0375] (a) 细胞外囊泡;
- [0376] (b) 浓度为至少约1%至至少约10%的蔗糖;
- [0377] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;
- [0378] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾;
- [0379] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠,
- [0380] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0381] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0382] (a) 细胞外囊泡;
- [0383] (b) 浓度为至少约1%至至少约10%的蔗糖;
- [0384] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠;
- [0385] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0386] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠,
- [0387] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0388] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0389] (a) 细胞外囊泡;
- [0390] (b) 浓度为至少约1%至至少约10%的蔗糖;
- [0391] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠;
- [0392] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾;
- [0393] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0394] (f) 其中所述组合物的pH为约6.7至约7.7。
- [0395] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0396] (a) 细胞外囊泡;
- [0397] (b) 浓度为至少约1%至至少约10%的蔗糖;
- [0398] (c) 浓度为至少约10mM至至少约200mM的氯化钠;
- [0399] (d) 浓度为至少约1mM至至少约20mM的磷酸二氢钾;
- [0400] (e) 浓度为至少约5mM至至少约35mM的磷酸氢二钠,
- [0401] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0402] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0403] (a) 细胞外囊泡;
- [0404] (b) 浓度为约5%的蔗糖;
- [0405] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;

[0406] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；

[0407] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，

[0408] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0409] 在一些方面，细胞外囊泡包含IL-12部分。在某些方面，本文公开了IL-12部分。在某些方面，IL-12部分包含与SEQ ID NO:11、12或13 (表1A) 中列出的氨基酸序列至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列。在某些方面，IL-12包含SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列。在某些方面，IL-12包含SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列。在某些方面，IL-12包含与SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列。在某些方面，IL-12包含SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列。

[0410] 在某些方面，所述组合物包含：

[0411] (a) 包含IL-12部分的细胞外囊泡，其中所述IL-12部分包含与SEQ ID NO:11、12或13中列出的氨基酸序列至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的氨基酸序列；

[0412] (b) 浓度为约146mM的蔗糖；

[0413] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；

[0414] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；

[0415] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，

[0416] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0417] 在一些方面，所述组合物包含：

[0418] (a) 包含IL-12部分的细胞外囊泡，其中所述IL-12部分包含与SEQ ID NO:11、12或13中列出的氨基酸序列至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的氨基酸序列；

[0419] (b) 浓度为约5%的蔗糖；

[0420] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；

[0421] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；

[0422] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，

[0423] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0424] 在某些方面，所述组合物包含：

[0425] (a) 包含IL-12部分的细胞外囊泡，其中所述IL-12部分包含SEQ ID NO:13中列出的氨基酸；

[0426] (b) 浓度为约146mM的蔗糖；

[0427] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；

[0428] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；

[0429] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，

[0430] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0431] 在一些方面，所述组合物包含：

[0432] (a) 包含IL-12部分的细胞外囊泡，其中所述IL-12部分包含SEQ ID NO:13中列出

的氨基酸；

[0433] (b) 浓度为约5%的蔗糖；

[0434] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；

[0435] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；

[0436] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，

[0437] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0438] 在一些方面，细胞外囊泡包含ASO。在一些方面，ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列，其与STAT6转录物中的核酸序列(SEQ ID NO:23;表1B)互补。在一些方面，ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列。在一些方面，ASO包含核酸序列GAAAGGTTCCGTCGGGC(SEQ ID NO:144)。在一些方面，ASO包含核酸序列CTGAGTCGCTGAAGCGG(SEQ ID NO:145)。在一些方面，ASO包含核酸序列GCCCTTGACTTTTGCATAG(SEQ ID NO:193)。在一些方面，ASO包含核酸序列GCAAGATCCCG GATTCGGTC(SEQ ID NO:185)。

[0439] 在某些方面，所述组合物包含：

[0440] (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列，其与STAT6转录物中的核酸序列互补；

[0441] (b) 蔗糖；

[0442] (c) 氯化钠；

[0443] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；

[0444] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，

[0445] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2；

[0446] 其中蔗糖的浓度选自约73mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM；并且

[0447] 其中氯化钠的浓度选自约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM。

[0448] 在某些方面，所述组合物包含：

[0449] (a) 包含ASO的细胞外囊泡；

[0450] (b) 蔗糖；

[0451] (c) 氯化钠；

[0452] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；

[0453] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，

[0454] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2；

[0455] 其中蔗糖的浓度选自约73mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM；并且

[0456] 其中氯化钠的浓度选自约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM。在一些方面，其中所述ASO包含选自SEQ ID

NO:91-193的核酸序列。

[0457] 在一些方面,所述组合物包含:

[0458] (a) 包含ASO的细胞外囊泡;

[0459] (b) 蔗糖;

[0460] (c) 氯化钠;

[0461] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;

[0462] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,

[0463] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2;

[0464] 其中蔗糖的浓度选自约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3.0%、约3.1%、约3.2%、约3.3%、约3.4%、约3.5%、约3.6%、约3.7%、约3.8%、约3.9%、约4.0%、约4.1%、约4.2%、约4.3%、约4.4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%和约5.0%;并且

[0465] 其中氯化钠的浓度选自约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM、约146mM和约150mM。在一些方面,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列。

[0466] 在某些方面,所述组合物包含:

[0467] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与STAT6转录物中的核酸序列互补;

[0468] (b) 浓度为约73mM至约146mM的蔗糖;

[0469] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠;

[0470] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;

[0471] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,

[0472] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0473] 在一些方面,所述组合物包含:

[0474] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与STAT6转录物中的核酸序列互补;

[0475] (b) 浓度为约2.5%至约5%的蔗糖;

[0476] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠;

[0477] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;

[0478] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,

[0479] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0480] 在某些方面,所述组合物包含:

[0481] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;

[0482] (b) 浓度为约73mM至约146mM的蔗糖;

[0483] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠;

[0484] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;

[0485] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,

[0486] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

- [0487] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0488] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;
- [0489] (b) 浓度为约2.5%至约5%的蔗糖;
- [0490] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠;
- [0491] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0492] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0493] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0494] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0495] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与STAT6转录物中的核酸序列互补;
- [0496] (b) 浓度为约146mM的蔗糖;
- [0497] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;
- [0498] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0499] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0500] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0501] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0502] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与STAT6转录物中的核酸序列互补;
- [0503] (b) 浓度为约5%的蔗糖;
- [0504] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;
- [0505] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0506] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0507] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0508] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0509] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与STAT6转录物中的核酸序列互补;
- [0510] (b) 浓度为约5%的蔗糖;
- [0511] (c) 浓度为约100mM的氯化钠;
- [0512] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0513] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0514] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0515] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0516] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与STAT6转录物中的核酸序列互补;
- [0517] (b) 浓度为约5%的蔗糖;
- [0518] (c) 浓度为约150mM的氯化钠;
- [0519] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0520] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0521] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

- [0522] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0523] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列,其与STAT6转录物中的核酸序列互补;
- [0524] (b) 浓度为约2.5%的蔗糖;
- [0525] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;
- [0526] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0527] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0528] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0529] 在一些方面,ASO包含选自SEQ ID NO:91-93的核酸序列。
- [0530] 在某些方面,所述组合物包含:
- [0531] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;
- [0532] (b) 浓度为约146mM的蔗糖;
- [0533] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;
- [0534] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0535] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0536] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0537] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0538] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;
- [0539] (b) 浓度为约5%的蔗糖;
- [0540] (c) 浓度为约50mM的氯化钠;
- [0541] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0542] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0543] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0544] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0545] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;
- [0546] (b) 浓度为约4.5%的蔗糖;
- [0547] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠;
- [0548] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0549] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0550] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0551] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0552] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;
- [0553] (b) 浓度为约4%的蔗糖;
- [0554] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠;
- [0555] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾;
- [0556] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠,
- [0557] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0558] 在一些方面,所述组合物包含:
- [0559] (a) 包含ASO的细胞外囊泡,其中所述ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列;

- [0560] (b) 浓度为约3.5%的蔗糖；
- [0561] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠；
- [0562] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0563] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0564] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0565] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0566] (a) 包含AS0的细胞外囊泡，其中所述AS0包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列；
- [0567] (b) 浓度为约3%的蔗糖；
- [0568] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠；
- [0569] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0570] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0571] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0572] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0573] (a) 包含AS0的细胞外囊泡，其中所述AS0包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列；
- [0574] (b) 浓度为约2.5%的蔗糖；
- [0575] (c) 浓度为约50mM至约150mM的氯化钠；
- [0576] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0577] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0578] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0579] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0580] (a) 包含AS0的细胞外囊泡，其中所述AS0包含核酸序列GAAAGGTTCCGTCGGGC (SEQ ID NO:144)；
- [0581] (b) 浓度为约146mM的蔗糖；
- [0582] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0583] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0584] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0585] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0586] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0587] (a) 包含AS0的细胞外囊泡，其中所述AS0包含核酸序列GAAAGGTTCCGTCGGGC (SEQ ID NO:144)；
- [0588] (b) 浓度为约5%的蔗糖；
- [0589] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0590] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0591] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0592] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0593] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0594] (a) 包含AS0的细胞外囊泡，其中所述AS0包含核酸序列CTGAGTCGCTGAAGCGG (SEQ ID NO:145)；
- [0595] (b) 浓度为约146mM的蔗糖；

- [0596] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0597] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0598] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0599] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0600] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0601] (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含核酸序列CTGAGTCGCTGAAGCGG (SEQ ID NO:145)；
- [0602] (b) 浓度为约5%的蔗糖；
- [0603] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0604] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0605] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0606] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0607] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0608] (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含核酸序列GCCCTTGACTTTTGCATAG (SEQ ID NO:193)；
- [0609] (b) 浓度为约146mM的蔗糖；
- [0610] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0611] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0612] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0613] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0614] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0615] (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含核酸序列GCCCTTGACTTTTGCATAG (SEQ ID NO:193)；
- [0616] (b) 浓度为约5%的蔗糖；
- [0617] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0618] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0619] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0620] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0621] 在某些方面，所述组合物包含：
- [0622] (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含核酸序列GCAAGATCCCGGATTCGGTC (SEQ ID NO:185)；
- [0623] (b) 浓度为约146mM的蔗糖；
- [0624] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
- [0625] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
- [0626] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
- [0627] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。
- [0628] 在一些方面，所述组合物包含：
- [0629] (a) 包含ASO的细胞外囊泡，其中所述ASO包含核酸序列GCAAGATCCCGGATTCGGTC (SEQ ID NO:185)；

- [0630] (b) 浓度为约5%的蔗糖；
[0631] (c) 浓度为约50mM的氯化钠；
[0632] (d) 浓度为约5mM的磷酸二氢钾；
[0633] (e) 浓度为约15mM的磷酸氢二钠，
[0634] (f) 其中所述组合物的pH为约7.2。

[0635] 在一些方面，组合物是冻干的。

[0636] III. 细胞外囊泡，例如，外泌体

[0637] 本文公开了能够调节受试者的免疫系统的修饰的EV，例如，外泌体。可用于本公开中的EV（例如，外泌体）已经被工程化以产生至少一个外源性生物活性部分。在一些方面，EV（例如，外泌体）包含两个外源性生物活性部分。在一些方面，EV（例如，外泌体）包含三个外源性生物活性部分。在其他方面，EV（例如，外泌体）包含四个外源性生物活性部分。在另外的方面，EV（例如，外泌体）包含五个或更多个外源性生物活性部分。在一些方面，EV（例如，外泌体）包含6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个外源性生物活性部分。

[0638] 如上文所述，本文所述的EV（例如，外泌体）是直径在约20-300nm之间的细胞外囊泡。在某些方面，本公开的EV（例如，外泌体）的直径在约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。可以根据下文描述的方法测量本文所述的EV(例如,外泌体)的尺寸。

[0639] 在一些方面,本公开的EV(例如,外泌体)包含双脂膜(“EV,例如,外泌体,膜”),所述双脂膜包含内表面和外表面。在某些方面,内表面面向EV(例如,外泌体)的内核(例如,腔)。在某些方面,外表面可与胞内体、多泡体、或生产细胞或靶细胞的膜/细胞质接触。

[0640] 在一些方面,EV(例如,外泌体)膜包含脂质和脂肪酸。在一些方面,EV(例如,外泌体)膜包含磷脂、糖脂、脂肪酸、鞘脂、磷酸甘油酯、甾醇、胆固醇和磷脂酰丝氨酸。

[0641] 在一些方面,EV(例如,外泌体)膜包含内叶和外叶。内叶和外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,Biochim Biophys Acta 1985 819:170。在一些方面,外叶的组成为介于约70%-90%之间的胆碱磷脂、介于约0%-15%之间的酸性磷脂和介于约5%-30%之间的磷脂酰乙醇胺。在一些方面,内叶的组成为介于约15%-40%之间的胆碱磷脂、介于约10%-50%之间的酸性磷脂和介于约30%-60%之间的磷脂酰乙醇胺。

[0642] 在一些方面,EV(例如,外泌体)膜包含一种或多种多糖,诸如聚糖。

[0643] 在一些方面,EV(例如,外泌体)膜还包含一个或多个支架部分,所述支架部分能够将多个外源性生物活性部分锚定至EV(例如外泌体)上(例如,在腔表面上或外表面上)。在一些方面,支架部分将多个外源性生物活性部分中的至少一个锚定或连接至EV。在一些方面,支架部分将多个(例如,至少两个)外源性生物活性部分中的每个锚定或连接至EV。在某些方面,支架部分是多肽(“外泌体蛋白”)。在其他方面,支架部分是非多肽部分。在一些方面,外泌体蛋白包括各种膜蛋白,诸如跨膜蛋白、整合蛋白和外周蛋白,它们富集在外泌体膜上。它们可以包括各种CD蛋白、转运蛋白、整合素、凝集素和钙粘蛋白。在某些方面,支架部分(例如,外泌体蛋白)包含支架X。在其他方面,支架部分(例如,外泌体蛋白)包含多于一个支架X部分。

[0644] 在一些方面,本文所公开的EV(例如,外泌体)能够将一个或多个有效载荷(例如,生物活性部分)递送至靶标。因此,在某些方面,EV(例如,外泌体)包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个不同的有效载荷。有效载荷是作用于与EV接触的靶标(例如,靶细胞)的剂。接触可以发生在体外或受试者体内。可引入EV中的有效载荷的非限制性实例包括剂,诸如核苷酸(例如,包含可检测部分或毒素或破坏转录的核苷酸)、核酸(例如,编码多肽诸如酶的DNA或mRNA分子,或具有调控功能的RNA分子诸如miRNA、dsDNA、lncRNA或siRNA)、RNA结合蛋白诸如MS2、氨基酸(例如,包含可检测部分或毒素或破坏翻译的氨基酸)、多肽(例如,酶)、脂质、碳水化合物和小分子(例如,小分子药物和毒素)。在一些方面,有效载荷包含外源性生物活性部分(例如,本文所公开的那些)。

[0645] IIIA.有效载荷,例如生物活性部分

[0646] 在一些方面,有效载荷包括生物活性部分。在一些方面,有效载荷包括治疗性分子。在某些方面,治疗性分子包括能够在受试者中诱导免疫应答的抗原。在某些方面,抗原包括肿瘤抗原。肿瘤抗原的非限制性实例包括: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、CD47、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、EGF R、间皮素、VEGFR、 α -

叶酸受体、CE7R、IL-3、癌-睾丸抗原 (CTA)、MART-1gp100、TNF相关凋亡诱导配体、Brachyury (在黑色素瘤 (PRAME) 中优先表达的抗原) 或其组合。在另外的方面, 抗原可以包括新抗原。如本文所用, 术语“新抗原”是指由肿瘤特异性突变基因编码的抗原。在一些方面, 抗原来源于细菌、病毒、真菌、原生动物或其任何组合。在一些方面, 抗原来源于致癌病毒。在另外的方面, 抗原来源于包括以下的组: 人γ疱疹病毒4 (爱泼斯坦-巴尔 (Epstein Barr) 病毒)、甲型流感病毒、乙型流感病毒、巨细胞病毒、金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、沙眼衣原体、HIV-1、HIV-2、冠状病毒 (例如, MERS-CoV 和 SARS CoV)、丝状病毒 (例如, 马尔堡和埃博拉)、酿脓链球菌、肺炎链球菌、疟原虫物种 (例如, 间日疟原虫和恶性疟原虫)、基孔肯雅病毒、人乳头状瘤病毒 (HPV)、乙型肝炎、丙型肝炎、人疱疹病毒8、单纯疱疹病毒2 (HSV2)、克雷伯氏菌属某种 (*Klebsiella* sp.)、铜绿假单胞菌、肠球菌属某种 (*Enterococcus* sp.)、变形杆菌属某种 (*Proteus* sp.)、肠杆菌属某种 (*Enterobacter* sp.)、放线菌属某种 (*Actinobacter* sp.)、凝固酶阴性葡萄球菌 (CoNS)、支原体属某种 (*Mycoplasma* sp.) 或其组合。

[0647] 在一些方面, 抗原来源于结核分枝杆菌以诱导细胞和/或体液免疫应答。在一些方面, 抗原包含结核分枝杆菌的一个或多个表位 (TB抗原)。多种抗原与结核分枝杆菌感染有关, 包括ESAT-6、TB10.4、CFP10、Rv2031 (hspX)、Rv2654c (TB7.7) 和Rv1038c (EsxJ)。参见, 例如, Lindestam等人, *J. Immunol.* 188 (10): 5020-31 (2012), 其以引用的方式整体并入本文。

[0648] 在一些方面, 抗原包括自身抗原。如本文所用, 术语“自身抗原”是指由宿主细胞或组织表达的抗原。

[0649] 在一些方面, 治疗性分子包括抗体或其抗原结合片段。在一些方面, 治疗性分子包括至少2种、至少3种、至少4种或至少5种抗体或其抗原结合片段。在一些方面, 生物活性部分是靶向细胞表面蛋白的抗体。在一些方面, 抗体或其抗原结合片段包括scFv、scFab、scFab-Fc、纳米抗体或其任何组合。在一些方面, 抗体或其抗原结合片段包括激动剂抗体、阻断抗体、靶向抗体、其片段或其组合。在一些方面, 激动剂抗体是CD40L激动剂。在一些方面, 阻断抗体结合选自以下的靶蛋白: 程序性死亡1 (PD-1)、程序性死亡配体1 (PD-L1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4及其任何组合。在一些方面, 靶向抗体结合CD3和/或CD19。在一些方面, EV (例如, 外泌体) 包含抗IL12抗体或其抗原结合片段和抗CD40L抗体或其抗原结合片段。在一些方面, EV (例如, 外泌体) 包含BITES, 例如, 抗CD3抗体和抗癌剂, 例如, 抗CD19抗体。

[0650] 在一些方面, 治疗性分子包括抗体片段, 例如scFv、(scFv)₂、Fab、Fab' 和F(ab')₂、F(ab)₂、Fv、dAb或Fd靶向抗原, 包括CD33、ICAM4、CD40、CDLEC9A、DEC205和TfR、及其任何组合。

[0651] 在一些方面, 治疗性分子是凝血因子, 包括FVIII。

[0652] 在一些方面, 治疗性分子是靶向肽, 包括半胱氨酸结肽。

[0653] 在一些方面, 治疗性分子是酶, 包括Cas9和锌指核酸酶、CD39、CD73和溶酶体酸性葡糖神经酰胺酶。

[0654] 在一些方面, 治疗性分子是蛋白质二聚化系统, 包括FRB-FKBP。

[0655] 如上文所述, 本公开的EV (例如, 外泌体) 可以包含佐剂。在一些方面, 本文所公开的EV (例如, 外泌体) 包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同的佐剂。如本文所用, 术

语“佐剂”是指增强有效载荷的治疗效果(例如,增强对抗原的免疫应答)的任何物质。因此,本文所述的EV(例如,外泌体)与参考(例如,没有佐剂的相应EV或包含抗原和佐剂的非EV递送媒介物)相比,能够对抗原的免疫应答增强了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多。佐剂的非限制性实例包括:干扰素基因刺激物(STING)激动剂、toll样受体(TLR)激动剂、炎症介质及其组合。

[0656] 在一些方面,佐剂诱导胞质模式识别受体的活化。胞质模式识别受体的非限制性实例包括:干扰素基因刺激物(STING)、视黄酸诱导型基因I(RIG-I)、黑色素瘤分化相关蛋白5(MDA5)、核苷酸结合寡聚结构域、富含亮氨酸的重复序列和含Pyrin结构域(NLRP)、炎性体或其组合。在某些方面,佐剂是STING激动剂。干扰素基因刺激物(STING)是通常由细菌产生的环状二核苷酸的胞质传感器。活化后,其会导致I型干扰素的产生并引发免疫应答。在某些方面,STING激动剂包括环状二核苷酸STING激动剂或非环状二核苷酸STING激动剂。

[0657] 环嘌呤二核苷酸诸如但不限于cGMP、环状二-GMP(c-di-GMP)、cAMP、环状二-AMP(c-di-AMP)、环状-GMP-AMP(cGAMP)、环状二-IMP(c-di-IMP)、环状AMP-IMP(cAIMP)及其任何已知可刺激或增强患者的免疫应答或炎症反应的类似物。CDN可以具有连接环状二核苷酸的2'2'、2'3'、2'5'、3'3'或3'5'键,或其任何组合。

[0658] 环嘌呤二核苷酸可以通过标准有机化学技术进行修饰,以产生嘌呤二核苷酸的类似物。合适的嘌呤二核苷酸包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤、异鸟嘌呤或本领域已知的任何其他合适的嘌呤二核苷酸。环状二核苷酸可以是修饰的类似物。可使用本领域已知的任何合适的修饰,包括但不限于硫代磷酸酯、双硫代磷酸酯、氟化和二氟化修饰。

[0659] 还可使用非环状二核苷酸激动剂,诸如5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(DMXAA),或本领域已知的任何其他非环状二核苷酸激动剂。

[0660] 可用于本公开的STING激动剂的非限制性实例包括:DMXAA、STING激动剂-1、ML RR-S2 CDA、ML RR-S2c-di-GMP、ML-RR-S2 cGAMP、2'3'-c-di-AM(PS)2、2'3'-cGAMP、2'3'-cGAMPdFHS、3'3'-cGAMP、3'3'-cGAMPdFSH、cAIMP、cAIM(PS)2、3'3'-cAIMP、3'3'-cAIMPdFSH、2'2'-cGAMP、2'3'-cGAM(PS)2、3'3'-cGAMP和其任何组合。STING激动剂的非限制性实例可见于美国专利号9,695,212、WO 2014/189805 A1、WO 2014/179335 A1、WO 2018/100558 A1、美国专利号10,011,630 B2、WO 2017/027646 A1、WO 2017/161349 A1和WO 2016/096174 A1,这些专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0661] 在一些方面,可用于本公开的STING激动剂包括WO 2016/096174、WO 2016/096174A1、WO 2014/093936、WO 2014/189805、WO 2015/077354中公开的化合物或其药学上可接受的盐,这些专利的内容以引用的方式整体并入本文。另外参见Cell reports 11, 1018-1030 (2015)。

[0662] 在一些方面,可用于本公开的STING激动剂包括c-di-AMP、c-di-GMP、c-di-IMP、c-AMP-GMP、c-AMP-IMP和c-GMP-IMP,如WO 2013/185052和Sci.Transl.Med.283,283ra52 (2015)(所述文献以引用的方式整体并入本文)中所述。

[0663] 在一些方面,可用于本公开的STING激动剂包括WO 2014/189806、WO 2015/185565、WO 2014/179760、WO 2014/179335、WO 2015/017652、WO 2016/096577、WO 2016/

120305、WO 2016/145102、WO 2017/027646、WO 2017/075477、WO 2017/027645、WO 2018/100558、WO 2017/175147或WO 2017/175156中公开的化合物或其药学上可接受的盐,这些专利中每个的内容以引用的方式整体并入本文。

[0664] 在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL606、CL611、CL602、CL655、CL604、CL609、CL614、CL656、CL647、CL626、CL629、CL603、CL632、CL633、CL659或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL606或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL611或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL602或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL655或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL604或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL609或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL614或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL647或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL626或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL629或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL603或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL632或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL633或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL659或其药学上可接受的盐。

[0665] 在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL656或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL656的异构体A或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL656的异构体B或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL656的异构体C或其药学上可接受的盐。在一些方面,可用于本公开的STING激动剂是CL656的异构体D或其药学上可接受的盐。

[0666] 本公开的STING激动剂还可被修饰以增加或控制激动剂在细胞外囊泡或外泌体中的包裹。此修饰可包括通过用化学品或酶处理激动剂,或通过物理或化学上改变STING激动剂的极性 or 电荷来添加脂质结合标签。STING激动剂可通过单一处理或组合处理,例如,仅添加脂质结合标签,或添加脂质结合标签并改变极性来修饰。先前的实例旨在作为非限制性的说明性实例。预期可以在本公开中实践修饰的任何组合。与未修饰的激动剂的包裹相比,所述修饰可使激动剂在外泌体中的包裹增加了或控制在2倍与10,000倍之间、10与1,000倍之间或100倍与500倍之间。与未修饰的激动剂的包裹相比,所述修饰可使激动剂在外泌体中的包裹增加了至少2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍或10,000倍。

[0667] 在一些方面,一个或多个外源性生物活性部分,例如佐剂,是TLR激动剂。TLR激动剂的非限制性实例包括:TLR2激动剂(例如,脂磷壁酸、非典型LPS、MALP-2和MALP-404、OspA、孔蛋白、LcrV、脂甘露聚糖、GPI锚定物、溶血磷脂酰丝氨酸、脂磷聚糖(LPG)、糖磷脂酰肌醇(GPI)、酵母聚糖、hsp60、gH/gL糖蛋白、血球凝集素)、TLR3激动剂(例如,双链RNA,例如,poly(I:C))、TLR4激动剂(例如,脂多糖(LPS)、脂磷壁酸、 β -防御素2、纤连蛋白EDA、HMGB1、snapin、腱生蛋白C)、TLR5激动剂(例如,鞭毛蛋白)、TLR6激动剂、TLR7/8激动剂(例如,单链RNA、CpG-A、Poly G10、Poly G3、雷西莫特)、TLR9激动剂(例如,未甲基化的CpG

DNA) 及其组合。TLR激动剂的非限制性实例可见于W02008115319A2、US20130202707A1、US20120219615A1、US20100029585A1、W02009030996A1、W02009088401A2和W02011044246A1中,这些专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0668] 在一些方面,一个或多个外源性生物活性部分(例如,佐剂)是炎症介质。

[0669] 在一些方面,本公开的EV(例如,外泌体)可以包含一个或多个外源性生物活性部分,例如,免疫调节剂。在某些方面,一种或多种免疫调节剂与其他活性生物部分(例如,本文所公开的那些)组合表达。在一些方面,一种或多种免疫调节剂可以在EV(例如,外泌体)的表面(例如,外表面或腔表面)上或腔中表达。因此,在某些方面,一种或多种免疫调节剂连接至EV(例如,外泌体)的外表面上或EV(例如,外泌体)的腔表面上的支架部分(例如支架X)。在另外的方面,一种或多种免疫调节剂在外泌体的腔中(即,不与支架X连接)。在某些方面,免疫调节剂是多核苷酸。在这些方面中的一些方面,多核苷酸包括但不限于mRNA、miRNA、siRNA、反义RNA、shRNA、lncRNA和dsDNA。在一些方面,免疫调节剂是蛋白质、肽、糖脂或糖蛋白。

[0670] 在一些方面,为本组合物配制的EV(例如,外泌体)包含IL-12。在一些方面,为本组合物配制的EV(例如,外泌体)包含CD40L。在一些方面,为本组合物配制的EV(例如,外泌体)包含FLT3L。在一些方面,为本组合物配制的EV(例如,外泌体)包含IL-12和CD40L。在其他方面,EV(例如,外泌体)包含IL-12、CD40L和FLT3L。在一些方面,IL-12包含与SEQ ID NO:11、12或13(表1A)中列出的氨基酸序列至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列。在某些方面,IL-12包含SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列。在某些方面,IL-12包含SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列。在某些方面,IL-12包含与SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性的氨基酸序列。在某些方面,IL-12包含SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列。

[0671] 表1A. IL-12氨基酸序列。

[0672]	人 IL-12A (p35)(<u>信号肽</u>)	MCPARSLLLVATLVLLDHL SL ARNLPVATPDPGMFPC LH HSQ NLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEE IDHEDITKD KT STVEA CLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS IY EDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRV MSYLNAS
	SEQ ID NO: 11	

人 IL-12B (p40)(<u>信号肽</u>) SEQ ID NO: 12	<u>MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA</u> <u>PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTDSSEVLGSGKTLTIQVKEFG</u> <u>DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK</u> <u>NKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ</u> <u>GVTGGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPI</u> <u>EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ</u> <u>VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQVGKSKREKKDRVFTD</u> <u>KTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS</u>
[0673] IL-12 融合 (<u>信号肽</u> -p40-接头 -p35) SEQ ID NO: 13	<u>MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPD</u> <u>APGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTDSSEVLGSGKTLTIQVKEF</u> <u>GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK</u> <u>KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ</u> <u>GVTGGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPI</u> <u>EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ</u> <u>VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQVGKSKREKKDRVFTD</u> <u>KTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGGG</u> <u>SGGGGSGGGGSGGGSGGRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRA</u> <u>VSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTK</u> <u>NESCLNSRETSFITNGSCLSRKTSFMMALCLSSIEDLKMVQVEF</u> <u>KTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS</u> <u>LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS</u>

[0674] 在一些方面, IL-12部分包含p35多肽或其片段。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:11具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:11具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:11具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:11具有至少约96%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:11具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:11具有至少约98%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:11具有至少约99%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列。在一些方面, IL-12部分缺乏信号肽(参见表1A)。

[0675] 在一些方面, IL-12部分包含p40多肽或其片段。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:12具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:12具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:12具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:12具有至少约96%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:12具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:12具有至少约98%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:12具有至少约99%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。在一些方面, IL-12部分缺少信号肽(参见表1A)。

[0676] 在一些方面, IL-12部分包含p35多肽或其片段和p40多肽或其片段。在一些方面, IL-12部分包含单个多肽, 其中p35多肽或其片段连接至p40多肽或其片段。在一些方面, p35多肽或其片段通过接头连接至p40多肽或其片段。在一些方面, 接头是肽接头。在一些方面, 接头包含一个或多个氨基酸。在一些方面, 接头包括Gly-Ser (GS) 接头。在一些方面, GS

接头包括 $(G_4S)_n$, 其中n是介于1与10之间的整数。在一些方面, GS接头包括 $(G_3S)_n$, 其中n是介于1与10之间的整数。

[0677] 在某些方面, IL-12部分包含与SEQ ID NO:13具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:13具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:13具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:13具有至少约96%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:13具有至少约97%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:13具有至少约98%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含与SEQ ID NO:13具有至少约99%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面, IL-12包含SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列。在一些方面, IL-12由SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列组成。在一些方面, IL-12基本上由SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列组成。在一些方面, IL-12部分缺乏信号肽(参见表1A)。

[0678] 在一些方面, 为本组合物配制的EV(例如, 外泌体)包含反义寡核苷酸(ASO), 其包含长度为10至30个核苷酸的连续核苷酸序列, 所述序列与STAT6转录物中的核酸序列(SEQ ID NO:23; 表1B)互补。在一些方面, ASO包含选自SEQ ID NO:91-193的核酸序列。在一些方面, ASO包含核酸序列GAAAGGTTCCGTCGGGC(SEQ ID NO:144)。在一些方面, ASO包含核酸序列CTGAGTCGCTGAAGCGG(SEQ ID NO:145)。在一些方面, ASO包含核酸序列GCCCTTGACTTTTGCATAG(SEQ ID NO:193)。在一些方面, ASO包含核酸序列GCAAGATCCCGATTCCGGTC(SEQ ID NO:185)。

[0679] 表1B. STAT6 mRNA和蛋白质序列

[0680]

STAT6 mRNA 序列
GGGGCAGCCACTGCTTACACTGAAGAGGGAGGACGGGAGAGGAGTGT GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTATGTGTGTGCTTTATCTTA TTTTTCTTTTGGTGGTGGTGGTGGAAAGGGGGGAGGTGCTAGCAGGGC CAGCCTTGAACCTCGCTGGACAGAGCTACAGACCTATGGGGCCTGGAAG TGCCCGCTGAGAAAGGGAGAAGACAGCAGAGGGGTGCCGAGGCAAC CTCCAAGTCCCAGATCATGTCTCTGTGGGGTCTGGTCTCCAAGATGCCC CCAGAAAAAGTGCAGCGGCTCTATGTCTGACTTTCCCAACACCTGCGG CATCTTCTGGGTGACTGGCTGGAGAGCCAGCCCTGGGAGTTCCTGGTC GGCTCCGACGCCTTCTGCTGCAACTTGGCTAGTGCCCTACTTTCAGACA CTGTCCAGCACCTTCAGGCCTCGGTGGGAGAGCAGGGGGAGGGGAGC ACCATCTTGCAACACATCAGCACCCCTTGAGAGCATATATCAGAGGGAC CCCCTGAAGCTGGTGGCCACTTTCAGACAAATACTTCAAGGAGAGAAA AAAGCTGTTATGGAACAGTTCCGCCACTTGCCAATGCCTTTCCACTGG AAGCAGGAAGAAGTCAAGTTTAAGACAGGCTTGCGGAGGCTGCAGCA CCGAGTAGGGGAGATCCACCTTCTCCGAGAAGCCCTGCAGAAGGGGG CTGAGGCTGGCCAAAGTGTCTCTGCACAGCTTGATAGAACTCCTGCTA ATGGGACTGGGCCAAGTGAGGCCCTGGCCATGCTACTGCAGGAGACC ACTGGAGAGCTAGAGGCAGCCAAAGCCCTAGTGCTGAAGAGGATCCA GATTTGGAAACGGCAGCAGCAGCTGGCAGGGAATGGCGCACCGTTTG

[0681]

AGGAGAGCCTGGCCCCACTCCAGGAGAGGTGTGAAAGCCTGGTGGAC
ATTTATTCCCAGCTACAGCAGGAGGTAGGGGCGGCTGGTGGGGAGCTT
GAGCCCAAGACCCGGGCATCGCTGACTGGCCGGCTGGATGAAGTCCTG
AGAACCCTCGTCACCAGTTGCTTCCTGGTGGAGAAGCAGCCCCCAG
GTACTGAAGACTCAGACCAAGTTCCAGGCTGGAGTTCGATTCTGTG
GGCTTGAGGTTCTGGGGGCCCCAGCCAAGCCTCCGCTGGTCAGGGCC
GACATGGTGACAGAGAAGCAGGCGCGGGAGCTGAGTGTGCCTCAGGG
TCCTGGGGCTGGAGCAGAAAGCACTGGAGAAATCATCAACAACACTG
TGCCCTTGAGAACAGCATTCTGGGAACTGCTGCTCTGCCCTGTTCA
AGAACCTGCTTCTCAAGAAGATCAAGCGGTGTGAGCGGAAGGGCACT
GAGTCTGTACAGAGGAGAAGTGCCTGTGCTCTTCTCTGCCAGCTTC
ACACTTGGCCCCGGCAAACCTCCCATCCAGCTCCAGGCCCTGTCTCTG
CCCCTGGTGGTCATCGTCCATGGCAACCAAGACAACAATGCCAAAGCC
ACTATCCTGTGGGACAATGCCCTTCTCTGAGATGGACCGCGTGCCCTTG
TGGTGGCTGAGCGGGTGCCCTGGGAGAAGATGTGTGAAACTCTGAACC
TGAAGTTCATGGCTGAGGTGGGGACCAACCGGGGGCTGCTCCAGAG
CACTTCCTCTTCTGGCCAGAAGATCTTCAATGACAACAGCCTCAGT
ATGGAGGCCTTCCAGCACCGTTCTGTGTCCTGGTCGCAGTTCAACAAG
GAGATCCTGCTGGGCCGTGGCTTACCTTTTGGCAGTGGTTTGATGGTG
TCCTGGACCTCACCAAACGCTGTCTCCGGAGCTACTGGTCTGACCGGC
TGATCATTGGCTTCATCAGCAAACAGTACGTTACTAGCCTTCTTCTCAA
TGAGCCCGACGGAACCTTTCTCCTCCGCTTCAGCGACTCAGAGATTGG
GGGCATCACCATTGCCCATGTCATCCGGGGCCAGGATGGCTCTCCACA
GATAGAGAACATCCAGCCATTCTCTGCCAAAGACCTGTCCATTCGCTC
ACTGGGGGACCGAATCCGGGATCTTGCTCAGCTCAAAAATCTCTATCC
CAAGAAGCCCAAGGATGAGGCTTTCCGGAGCCACTACAAGCCTGAAC
AGATGGGTAAAGGATGGCAGGGGTTATGTCCCAGCTACCATCAAGATG
ACCGTGGAAGGGACCAACCACTTCCTACCCAGAGCTCCAGATGCCT
ACCATGGTGCCTTCTTATGACCTTGGAATGGCCCCTGATTCTCTCCATGA
GCATGCAGCTTGGCCCAGATATGGTGCCCCAGGTGTACCCACCACACT
CTCACTCCATCCCCCGTATCAAGGCCTCTCCCCAGAAGAATCAGTCA
ACGTGTTGTCAGCCTTCCAGGAGCCTCACCTGCAGATGCCCCCAGCC
TGGGCCAGATGAGCCTGCCCTTTGACCAGCCTCACCCCCAGGGCCTGC
TGCCGTGCCAGCCTCAGGAGCATGCTGTGTCCAGCCCTGACCCCTGC
TCTGCTCAGATGTGACCATGGTGGAAGACAGCTGCCTGAGCCAGCCAG
TGACAGCGTTTCCTCAGGGCACTTGGATTGGTGAAGACATATTCCCTC
CTCTGCTGCCTCCCACTGAACAGGACCTACTAAGCTTCTCCTGGAGG
GGCAAGGGGAGTCGGGGGGAGGGTCCTTGGGGGCACAGCCCCTCCTG
CAGCCCTCCCACTATGGGCAATCTGGGATCTCAATGTCCCACATGGAC
CTAAGGGCCAACCCAGTTGGTGATCCAGCTGGAGGGAGAACCCTAA
AGAGACAGCTCTTCTACTACCCCAACAGACCTGCTCTGGACACTTGCT
CATGCCCTGCCAAGCAGCAGATGGGGAGGGTGCCCTCCTATCCCCACC
TACTCCTGGGTGAGGAGGAAAAGACTAACAGGAGAATGCACAGTGGG
TGGAGCCAATCCACTCCTTCTTCTATCATTCCTGCCCACCTCCTTC
CAGCACTGACTGGAAGGGAAGTTCAGGCTCTGAGACACACCCCAACA
TGCTGACCTGCAGCGCGCACACGCACGCACACACACATACAGAGCT
CTCTGAGGGTGATGGGGCTGAGCAGGAGGGGGGCTGGGTAAGAGCAC
AGGTTAGGGCATGGAAGGCTTCTCCGCCATTCTGACCCAGGGCCTAG
GACGGATAGGCAGGAACATACAGACACATTTACACTAGAGGCCAGGG
ATAGAGGATATTGGGTCTCAGCCCTAGGGGAATGGGAAGCAGCTCAA

[0682]

```
GGGACCCTGGGTGGGAGCATAGGAGGGGTCTGGACATGTGGTTACTA
GTACAGGTTTTGCCCTGATTAAAAAATCTCCCAAAGCCCCAAATTCCT
GTTAGCCAGGTGGAGGCTTCTGATACGTGTATGAGACTATGCAAAAGT
ACAAGGGCTGAGATTCTTCGTGTATAGCTGTGTGAACGTGTATGTACC
TAGGATATGTATAAATGTATAGCTGGCACCTTAGTTGCATGACCACATA
GAACATGTGTCTATCTGCTTTTGCCTACGTGACAACACAAATTTGGGA
GGGTGAGACACTGCACAGAAGACAGCAGCAAGTGTGCTGGCCTCTCT
GACATATGCTAACCCCCAAATACTCTGAATTTGGAGTCTGACTGTGCC
CAAGTGGGTCCAAGTGGCTGTGACATCTACGTATGGCTCCACACCTCC
AATGCTGCCTGGGAGCCAGGGTGAGAGTCTGGGTCCAGGCCTGGCCAT
GTGGCCCTCCAGTGTATGAGAGGGCCCTGCCTGCTGCATCTTTTCTGTT
GCCCCATCCACCGCCAGCTTCCCTTCACTCCCCTATCCCATTCTCCCTC
TCAAGGCAGGGGTCATAGATCCTAAGCCATAAAATAAATTTTATTCCA
AAATAACAAAATAAATAATCTACTGTACACAATCTGAAAA (SEQ ID
NO: 23)
```

[0683] IIIB. 支架部分, 例如支架X或支架Y

[0684] 在一些方面, 本公开的EV (例如, 外泌体) 包含在其组成上被修饰的膜。例如, 它们的膜组成可通过改变膜的蛋白质、脂质或聚糖含量来修饰。

[0685] 在一些方面, 表面工程化的EV (例如, 外泌体) 是通过化学的和/或物理方法, 诸如PEG诱导的融合和/或超声融合产生的。在其他方面, 表面工程化的EV (例如, 外泌体) 是通过基因工程产生的。从基因修饰的生产细胞或基因修饰的细胞的后代产生的EV (例如, 外泌体) 可含有修饰的膜组成。在一些方面, 表面工程化的EV (例如, 外泌体) 具有较高或较低的密度 (例如, 较高数量) 的支架部分 (例如, 外泌体蛋白, 例如, 支架X), 或包括支架部分的变体或片段。

[0686] 例如, 表面 (例如, 支架X) 工程化的EV可以从用编码支架部分 (例如, 外泌体蛋白, 例如, 支架X) 或其变体或片段的外源序列转化的细胞 (例如, HEK293细胞) 产生。包括由外源序列表达的支架部分的EV可以包含修饰的膜组成。

[0687] 支架部分的各种修饰或片段可用于本公开的方面。例如, 被修饰而对结合剂具有增强的亲和力的支架部分可用于产生可使用结合剂纯化的表面工程化的EV。可以使用被修饰以更有效地靶向EV和/或膜的支架部分。还可以使用被修饰以包含特异性和有效靶向外泌体膜所需的最小片段的支架部分。

[0688] 支架部分的非限制性实例包括: 前列腺素F2受体负调控因子 (PTGFRN); basigin (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 (ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B)。在某些方面, 支架部分是全蛋白。在其他方面, 支架部分是蛋白质片段 (例如, 功能性片段)。

[0689] 在其他方面, 可用于本公开的支架部分、第一支架部分、第二支架部分和/或第三支架部分包括常规外泌体蛋白, 包括但不限于跨膜四蛋白分子 (例如CD63、CD81、CD9和其他)、溶酶体相关膜蛋白2 (LAMP2和LAMP2B)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、GPI锚定蛋白、乳凝集素及其片段、对任何这些蛋白质或其片段具有亲和力的肽、或其任何组合。

[0690] 在一些方面, 本文所述的表面 (例如, 支架X) - 工程化的EV, 与本领域已知的EV相比, 表现出优异的特征。例如, 表面 (例如, 支架X) - 工程化的EV, 与天然存在的EV或使用常规

外泌体蛋白产生的EV相比,在其表面上含有富集程度更高的修饰的蛋白质。此外,本公开的表面(例如,支架X)-工程化的EV,与天然存在的EV或使用常规外泌体蛋白产生的EV相比,可以具有更大、更特异或更可控的生物活性。

[0691] 在一些方面,支架X包括前列腺素F2受体负调控因子(PTGFRN多肽)。PTGFRN蛋白也可称为CD9配偶体1(CD9P-1)、含Glu-Trp-Ile EWI基序的蛋白F(EWI-F)、前列腺素F2- α 受体调控蛋白、前列腺素F2- α 受体相关蛋白或CD315。人PTGFRN蛋白的全长氨基酸序列(Uniprot登录号Q9P2B2)在表2中作为SEQ ID NO:1示出。PTGFRN多肽含有信号肽(SEQ ID NO:1的氨基酸1至25)、胞外结构域(SEQ ID NO:1的氨基酸26至832)、跨膜结构域(SEQ ID NO:1的氨基酸833至853)和胞质结构域(SEQ ID NO:1的氨基酸854至879)。成熟PTGFRN多肽由无信号肽的SEQ ID NO:1,即SEQ ID NO:1的氨基酸26至879组成。在一些方面,可用于本公开的PTGFRN多肽片段包含PTGFRN多肽的跨膜结构域。在其他方面,可用于本公开的PTGFRN多肽片段包含PTGFRN多肽的跨膜结构域并且(i)在跨膜结构域的N端包含至少五个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少50个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个氨基酸,(ii)在跨膜结构域的C端包含至少五个、至少10个、至少15个、至少20个或至少25个氨基酸,或(i)和(ii)两者。

[0692] 在一些方面,PTGFRN多肽的片段缺少一个或多个功能性或结构性结构域,诸如IgV。

[0693] 在其他方面,支架X包含与SEQ ID NO:1的氨基酸26至879至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在其他方面,支架X包含与SEQ ID NO:9至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在其他方面,除一个氨基酸突变、两个氨基酸突变、三个氨基酸突变、四个氨基酸突变、五个氨基酸突变、六个氨基酸突变或七个氨基酸突变外,支架X包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。突变可以是取代、插入、缺失或其任何组合。在一些方面,支架X包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列并且在SEQ ID NO:9的N端和/或C端包含1个氨基酸、两个氨基酸、三个氨基酸、四个氨基酸、五个氨基酸、六个氨基酸、七个氨基酸、八个氨基酸、九个氨基酸、十个氨基酸、11个氨基酸、12个氨基酸、13个氨基酸、14个氨基酸、15个氨基酸、16个氨基酸、17个氨基酸、18个氨基酸、19个氨基酸、或20个氨基酸或更多个氨基酸。

[0694] 在其他方面,支架X包含与SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在其他方面,除一个氨基酸突变、两个氨基酸突变、三个氨基酸突变、四个氨基酸突变、五个氨基酸突变、六个氨基酸突变或七个氨基酸突变外,支架X包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的氨基酸序列。突变可以是取代、插入、缺失或其任何组合。在一些方面,支架X包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的氨基酸序列并且在SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的N端和/或C端包含1个氨基酸、两个氨基酸、三个氨基酸、四个氨基酸、五个氨基酸、六个氨基酸、七个氨基酸、八个氨基酸、九个氨基酸、十个氨基酸、11个氨基酸、12个氨基酸、13个氨基酸、14个氨基酸、15个氨基酸、16个氨基酸、17个氨基酸、18个氨基酸、19

个氨基酸、或20个氨基酸或更多个氨基酸。

[0695] 表2. 示例性支架X蛋白序列

[0696]

SEQ ID NO.	蛋白质	序列
1.	全长 PTGFRN 蛋白	MGRLASRPLLLALLSLALCRGVVRVPTATLVRVVGTE LVIPCNVSDYDGPSEQNFDWSFSSLGSSFVELASTWEV GFPAQLYQERLQRGEILLRRTANDAVELHIKNVQPSDQ GHYKCSTPSTDATVQGNVEDTVQVKVLADSLHVGPS ARPPPSLSLREGEPFELRCTAASASPLHTHLALLWEVH RGPARRSVLALTHEGRFHPGLGYEQRYHSGDVRLDTV GSDAYRLSVSRALSADQGSYRCIVSEWIAEQGNWQEI QEKAVEVATVVIQPSVLRAAVPKNVSV AEGKELDLTCN ITTDRA DDVRPEVTWFSRMPDSTLPGSRVLARLDRDS LVHSSPHVALSHVDARSYHLLVRDVSKENSGYYYCHV SLWAPGHNRSWHKVAEAVSSPAGVGVTWLEPDYQVY LNASKVPGFADDPTELACRVVDTKSGEANVRFTVSWY YRMNRRSDNVVTSELLAVMDGDWTLKYGERSKQRA QDGD FIFSKEHTDTFNFRIQRTTEEDRGNY YCVVSAWT

[0697]

		KQRNNSWVKS KDVFSKPVNIFWALEDSVLVVKARQP KPFFAAGNTFEMTCKVSSKNISPRYSVLIMAEKPVGD LSSPNETKYIISLDQDSVVKLENWTDASRVDGVVLEK VQEDEFYRMYQTQVSDAGLYRCMVTAWSPVRGSLW REAATSLSNPIEIDFQTSGPIFNASVHSDTPSVIRGDLIK LFCIITVEGAALDPDDMAFDVSWFAVHSFGLDKAPVLL SSLDRKGIVTTSRRDWKSDLSLERSVLEFLLQVHGSE DQDFGNYCYCSVTPWVKSPGTGSWQKEAEIHSKPVFITV KMDVLNAFKYPLLIGVGLSTVIGLLSCLIGYCSSHWCC KKEVQETRERRRLMSMEMD
2.	PTGFRN 蛋白片段 #1	PSARPPPSLS LREGEPPFELR CTAASASPLH THLALLWEVH RGPARRSVLA LTHEGRFHPG LGYEQRVHSG DVRLDTVGSD AYRLSVSRAL SADQGSYRCI VSEWIAEQGN WQEIQEKAVE VATVVIQPSV LRAAVPKNVV VAEGKELDLT CNITTDRA DD VRPEVTWSFS RMPDSTLPGS RVLARLDRDS LVHSSPHVAL SHVDARSYHL LVRDVSKENS GYYYCHVSLW APGHNRSWHK VAEAVSSPAG VGVTWLEPDY QVYLNASKVP GFADDPTELA CRVVDTKSGE ANVRFTVSWY YRMNRRSDNV VTSELLAVMD GDWTLKYGER SKQRAQDGDF IFSKEHTDTF NFRIQRTTEE DRGNYYCVVS AWTKQRNNSW VKSKDVFSKP VNIFFWALEDS VLVVKARQPK PFFAAGNTFE MTCKVSSKNI KSPRYSVLIM AEKPVGDLS PNETKYIISL DQDSVVKLEN WTDASRVDGV VLEKQVEDEF RYRMYQTQVS DAGLYRCMVT AWSPVGRSLW REAATSLSNP IEIDFQTSGP IFNASVHSDT PSVIRGDLIK LFCIITVEGA ALDPDDMAFD VSWFAVHSFG LDKAPVLLSS LDRKGIVTTS RRDWKSDLSL ERVSVLEFLL QVHGSEDQDF GNYCYCSVTPW VKSPGTGSWQK EAEIHSKPVF ITVKMDVLNA FKYPILLIGVG LSTVIGLLSC LIGYCSSHC CKKEVQETRR ERRRLMSMEM D
3.	PTGFRN 蛋白片段 #2	VATVVIQPSV LRAAVPKNVV VAEGKELDLT CNITTDRA DD VRPEVTWSFS RMPDSTLPGS RVLARLDRDS LVHSSPHVAL SHVDARSYHL LVRDVSKENS GYYYCHVSLW APGHNRSWHK VAEAVSSPAG VGVTWLEPDY QVYLNASKVP GFADDPTELA CRVVDTKSGE ANVRFTVSWY YRMNRRSDNV VTSELLAVMD GDWTLKYGER SKQRAQDGDF IFSKEHTDTF NFRIQRTTEE DRGNYYCVVS AWTKQRNNSW VKSKDVFSKP VNIFFWALEDS VLVVKARQPK PFFAAGNTFE MTCKVSSKNI KSPRYSVLIM AEKPVGDLS PNETKYIISL DQDSVVKLEN WTDASRVDGV VLEKQVEDEF RYRMYQTQVS DAGLYRCMVT AWSPVGRSLW REAATSLSNP IEIDFQTSGP IFNASVHSDT PSVIRGDLIK LFCIITVEGA ALDPDDMAFD VSWFAVHSFG LDKAPVLLSS LDRKGIVTTS RRDWKSDLSL ERVSVLEFLL QVHGSEDQDF GNYCYCSVTPW VKSPGTGSWQK EAEIHSKPVF ITVKMDVLNA FKYPILLIGVG LSTVIGLLSC LIGYCSSHC CKKEVQETRR ERRRLMSMEM D
4.	PTGFRN 蛋白片段 #3	SPAGVGVTWL EPDYQVYLNA SKVPGFADDP TELACRVVDT KSGEANVRFT VSWYYRMNRR SDNVVTSELL AVMDGDWTLK YGERSKQRAQ DGDIFISKEH TDTFNFRIQR TTEEDRGNY CVVSAWTKQR NNSWVKS KDV FSKPVNIFWA LEDVSVLVKA RQPKPFFAAG NTFEMTCKVS SKNIKSPRYS VLIMAEKPVG DLSSPNETKY IISLDQDSV V KLENWTDASR VDGVLLEKVQ EDEFYRMYQ TQVSDAGLYR CMVTAWSPVR GSWLWREAATS LSNPIEIDFQ TSGPIFNASV HSDTPSVIRG DLIKLFCIIT VEGAALDPDD MAFDVSWFAV HSFGLDKAPV LLSSLDRKGI VTTSRRDWKS DLSLERSVVL EFLQVHGSE DQDFGNYCYCS VTPWVKSPGT SWQKEAEIHS KPVFITVKMD VLNAFKYPLL IGVLSTVIG LLSCLIGYCS SHWCKKEVQ ETRERRRLMS MEMD
5.	PTGFRN 蛋白片段 #4	KPVNIFWALE DSVLVVKARQ PKPFFAAGNT FEMTCKVSSK NIKSPRYSVL IMAEKPVGDL SSPNETKYII SLDQDSVVKL ENWTDASRVD GVVLEKVQED EFRYRMYQTQ VSDAGLYRCM VTAWSPVGRS LWREAATSLS NPIEIDFQTS GPIFNASVHS DTPSVIRGDL IKLFCIITVE GAALDPDDMA FDVSWFAVHS FGLDKAPVLL SSLDRKGIVT TSRRDWKSDL SLERSVLEF LLQVHGSEDQ DFGNYCYSVT PWVKSPGTGSW QKEAEIHSKP VFITVKMDVL NAFKYPLLIG VGLSTVIGLL SCLIGYCSSH WCKKEVQET RRERRRLMSM EMD
6.	PTGFRN 蛋白片段 #5	VRGSLWREAA TSLSNPIEID FQTSGPIFNA SVHSDTPSVI RGDLIKLFCI ITVEGAALDP DDMAFDVSWF AVHSFGLDKA PVLLSSSLDRK GIVTTSRRDW KSDLSLERSV VLEFLLQVHG SEDQDFGNY CVSTPWWKSP TGSWQKEAEI HSPVFITVK MDVLNAFKYP LLIGVGLSTV IGLLSCLIGY CSSHWCKKE VQETRRERRR LMSMEMD

[0698]

7.	PTGFRN 蛋白片段 #6	SKPVFITVKM DVLNAFKYPL LIGVGLSTVI GLLSCLIGY CSSHWCKKEV QETRRERRRL MSMEMD
8.	PTGFRN 蛋白-信号 肽	MGRLASRPLL LALLSLALCR G
9.	PTGFRN 蛋白片段 #7	GPIFNASVHS DTPSVIRGDL IKLFCIITVE GAALDPDDMA FDVSWFAVHS FGLDKAPVLL SSLDRKGIVT TSRRDWKSDL SLERSVLEF LLQVHGSEDQ DFGNYCYSVT PWVKSPGTGSW QKEAEIHSKP VFITVKMDVL NAFKYPLLIG VGLSTVIGLL SCLIGYCSSH WCKKEVQET RRERRRLMSM EMD

[0699] 其他支架X蛋白的非限制性实例可见于美国专利号US 10,195,290 B1和US 10,561,740 B2中,这些专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0700] 在一些方面,在EV中表达的支架部分不与有效载荷,例如,生物活性部分,例如,STING激动剂融合。

[0701] 在一些方面,支架X可用于将任何部分同时连接至EV(例如,外泌体)的腔表面和外表面上。例如,PTGFRN多肽除了用于将抗原、佐剂和/或免疫调节剂连接到EV(例如,外泌体)的外表面之外,还可用于连接到腔内部(例如,腔表面上)。因此,在某些方面,支架X可用于双重目的,例如腔表面上的抗原和EV(例如外泌体)外表面上的佐剂或免疫调节剂,EV(例如,外泌体)外表面上的抗原和腔表面上的佐剂或免疫调节剂,腔表面上的佐剂和EV(例如,外泌体)外表面上的免疫调节剂,或腔表面上的免疫调节剂和EV(例如外泌体)的外表面上的佐剂。

[0702] 在一些方面,支架蛋白包括支架Y。可用于本文所公开的组合物和方法中的支架Y蛋白的非限制性实例包括例如在国际公布号WO/2019/099942或WO 2020/101740中公开的那些支架Y蛋白,这些文献各自以引用的方式整体并入本文。在一些方面,支架Y蛋白选自:富含肉豆蔻酰化丙氨酸的蛋白激酶C底物(“MARCKS蛋白”);富含肉豆蔻酰化丙氨酸的蛋白激酶C底物1(“MARCKSL1蛋白”);脑酸可溶性蛋白1(“BASP1蛋白”)。在一些方面,支架Y蛋白可以是全蛋白或其片段(例如,功能性片段,例如,能够将一个部分锚定在EV(例如,外泌体)腔表面上的最小片段)。在一些方面,支架Y可以将一个部分(例如,STING激动剂和/或IL-12部分)锚定至EV(例如,外泌体)的腔上。

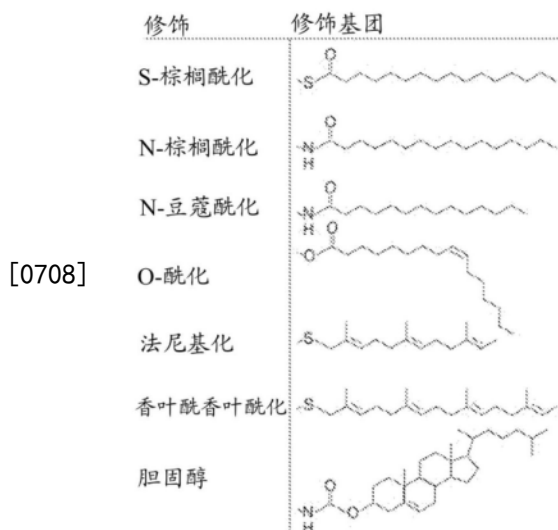
[0703] IIIC. 锚定部分

[0704] 在一些方面,一种或多种有效载荷可以连接至锚定部分。在一些方面,可用于将有效载荷连接至EV(例如,外泌体)的外表面和/或腔表面上的锚定部分包括:甾醇(例如,胆固醇)、GM1、脂质(例如,脂肪酸)、维生素、小分子、肽或其组合。

[0705] 在一些方面,锚定部分是脂质。脂质锚定部分可以是本领域已知的任何脂质,例如棕榈酸或糖基磷脂酰肌醇。在一些方面,脂质是脂肪酸、磷脂、磷脂(例如,磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸或磷脂酰乙醇胺)或其类似物(例如,磷脂酰胆碱、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、脑磷脂或磷脂酰丝氨酸或其类似物或部分,诸如其部分水解的部分)。

[0706] 通常,锚定部分是化学连接的。然而,锚定部分可以酶促连接至有效载荷。

[0707] 可用于实践本公开的方法的一些类型的膜锚定物示于下表中:



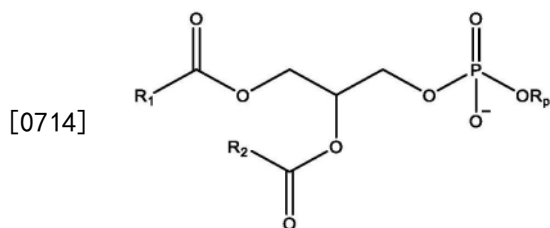
[0709] 在一些方面,本公开的锚定部分可以包含两种或更多种类型的本文所公开的锚定部分。例如,在一些方面,锚定部分可以包含两种脂质,例如,一种磷脂和一种脂肪酸,或两种磷脂,或两种脂肪酸,或一种脂质和一种维生素,或一种胆固醇和一种维生素。

[0710] 在一些方面,可用于本公开的锚定部分包括甾醇、类固醇、藿烷、羟基类固醇、开环甾体或其具有亲脂性的类似物。在一些方面,锚定部分包括甾醇,诸如植物甾醇、霉菌甾醇或动物甾醇。示例性动物甾醇包括胆固醇和24S-羟基胆固醇;示例性植物甾醇包括麦角甾醇(mycosterol)、菜油甾醇、谷甾醇和豆甾醇。在一些方面,甾醇选自麦角甾醇、7-脱氢胆固醇、胆固醇、24S-羟基胆固醇、羊毛甾醇、环木蒿醇、岩藻甾醇、沙林甾醇、菜油甾醇、 β -谷甾醇、谷甾醇、粪甾醇、燕麦甾醇或豆甾醇。甾醇可以游离甾醇、酰化(甾醇酯)、烷基化(甾醇烷基醚)、硫酸化(甾醇硫酸盐)存在或连接至糖苷部分(甾醇糖苷),糖苷部分本身可以被酰化(酰化甾醇糖苷)。在一些方面,锚定部分是胆固醇。

[0711] 在一些方面,锚定锚定包括类固醇。在一些方面,类固醇选自二氢睾酮、乌苏醇、龙舌兰皂苷配基、薯蓣皂苷配基、黄体酮或皮质醇。

[0712] 在一些方面,锚定部分是脂肪酸。在一些方面,脂肪酸是短链、中链或长链脂肪酸。在一些方面,脂肪酸是饱和脂肪酸。在一些方面,脂肪酸是不饱和脂肪酸。在一些方面,脂肪酸是单不饱和脂肪酸。在一些方面,脂肪酸是多不饱和脂肪酸,诸如 ω -3或 ω -6脂肪酸。

[0713] 在一些方面,锚定部分包括磷脂。磷脂是一类作为所有细胞膜的主要组分的脂质。由于它们的两亲特征,它们可以形成脂质双层。磷脂分子的结构一般由两个疏水性脂肪酸“尾部”和一个由磷酸基团组成的亲水性“头部”组成。例如,磷脂可以是根据下式的脂质:



[0715] 其中 R_p 表示磷脂部分且 R_1 和 R_2 表示具有或不具有不饱和度的脂肪酸部分,它们可以相同或不同。

[0716] 在一些方面,有效载荷通过接头组合连接至本文所公开的锚定部分,所述接头组

合可包含可切割和/或不可切割接头的任何组合。不受任何一种理论的束缚,接头组合的功能之一是提供锚定部分与有效载荷之间的最佳间距。

[0717] IIID. 接头

[0718] 如上文所述,本公开的细胞外囊泡(EV)(例如,外泌体和纳米囊泡)可以包含一个或多个接头,所述接头将本文所公开的一个或多个外源性生物活性部分连接至EV(例如,至外表面或腔表面上)。在一些方面,一个或多个外源性生物活性部分直接或通过一个或多个支架部分(例如,支架X)连接至EV。例如,在某些方面,一个或多个外源性生物活性部分通过支架X连接至外泌体的外表面。在另外的方面,一个或多个外源性生物活性部分通过支架X连接至外泌体的腔表面。接头可以是本领域已知的任何化学部分。

[0719] 如本文所用,术语“接头”是指肽或多肽序列(例如,合成肽或多肽序列)或非多肽,例如烷基链。在一些方面,可将两个或更多个接头串联连接。当存在多个接头时,每个接头可以相同或不同。一般来说,接头提供了柔性或防止/改善了空间位阻。接头通常不被切割;然而在某些方面,此类切割可以是需要的。因此,在一些方面,接头可包含一个或多个蛋白酶可切割位点,这些位点可以位于接头序列内或接头序列任一端的接头侧翼。

[0720] 在一些方面,接头是肽接头。在一些方面,肽接头可以包含至少约两个、至少约三个、至少约四个、至少约五个、至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个、至少约30个、至少约35个、至少约40个、至少约45个、至少约50个、至少约55个、至少约60个、至少约65个、至少约70个、至少约75个、至少约80个、至少约85个、至少约90个、至少约95个或至少约100个氨基酸。

[0721] 在一些方面,肽接头是合成的,即非天然存在的。在一个方面,肽接头包括肽(或多肽)(例如,天然或非天然存在的肽),其包含将第一线性氨基酸序列与第二线性氨基酸序列连接或遗传融合的氨基酸序列,所述第一线性氨基酸序列在自然界中与所述第二线性氨基酸序列不是天然连接或遗传融合的。例如,在一个方面,肽接头可包含非天然存在的多肽,其是天然存在的多肽的修饰形式(例如,包含突变诸如添加、取代或缺失)。

[0722] 接头可能容易被切割(“可切割的接头”),从而促进外源性生物活性部分的释放。

[0723] 在一些方面,接头是“还原敏感型接头”。在一些方面,还原敏感型接头含有二硫键。在一些方面,接头是“酸不稳定型接头”。在一些方面,酸不稳定型接头含有脲。合适的酸不稳定型接头还包括,例如,顺式乌头酸接头、酰肼接头、硫代氨基甲酰基接头或其任何组合。

[0724] 在一些方面,ASO借助于接头与EV(例如外泌体)缔合。在一些方面,接头包括丙烯酸亚磷酰胺(例如,ACRYDITE™)、腺苷酸化、叠氮化物(NHS Ester)、地高辛(NHS Ester)、胆固醇-TEG、I-LINKER™、氨基修饰剂(例如氨基修饰剂C6、氨基修饰剂C12、氨基修饰剂C6 dT或Uni-Link™氨基修饰剂)、炔烃、5'己炔基、5-辛二炔基dU、生物素化(例如,生物素、生物素(叠氮化物)、生物素dT、生物素-TEG、双重生物素、PC生物素或脱硫生物素)、硫醇修饰(硫醇修饰剂C3 S-S、二硫醇或硫醇修饰剂C6 S-S)、或其任何组合。

[0725] 在一些方面,接头包括萜烯,诸如橙花叔醇、法尼醇、柠檬烯、芳樟醇、香叶醇、香芹酮、小茴香酮或薄荷醇;脂质,诸如棕榈酸或肉豆蔻酸;胆固醇;油基;视黄基;胆固醇残基;胆酸;金刚烷乙酸;1-萘丁酸;双氢睾酮;1,3-双-O(十六烷基)甘油;香叶氧基己基;十六烷基甘油;冰片;1,3-丙二醇;十七烷基;03-(油酰基)石胆酸;03-(油酰基)胆酸;二甲氧三苯甲基;吩恶嗪,马来酰亚胺部分,葡萄糖醛酸苷酶型,CL2A-SN38型,叶酸;碳水化合物;维生

素A;维生素E;维生素K,或其任何组合。在某些方面,ASO包含胆固醇标签,并且胆固醇标签与EV(例如外泌体)的膜缔合。在一些方面,接头包括不可切割的接头。

[0726] 在一些方面,接头包括四乙二醇(TEG)、六乙二醇(HEG)、聚乙二醇(PEG)、琥珀酰亚胺或其任何组合。在一些方面,接头包括将生物活性分子连接至接头的间隔基单元。

[0727] 在一些方面,一个或多个接头包括连接在一起的较小单元(例如,HEG、TEG、甘油、C2至C12烷基等)。在一个方面,键联是酯键联(例如,磷酸二酯或硫代磷酸酯)或其他键联。

[0728] 在一些方面,接头包括聚乙二醇(PEG),其特征在于式 $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-$ 或 $R^3-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$,其中 R^3 是氢、甲基或乙基,且n的值为2至200。在一些方面,接头包括间隔基,其中间隔基是PEG。

[0729] 在一些方面,PEG接头是低聚乙二醇,例如二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇(TEG)、五乙二醇或六乙二醇(HEG)接头。

[0730] IV. 治疗方法

[0731] 进一步考虑了施用本公开的药物组合物以治疗其中施用EV对受试者具有有益作用的多种疾病或病状。在一些方面,本文所公开的治疗受试者的疾病或病状的方法包括向受试者施用药物组合物。

[0732] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其可以通过肠胃外、局部、静脉内、经口、皮下、动脉内、皮内、经皮、直肠、颅内、腹膜内、鼻内、瘤内、肌肉内途径施用或作为吸入剂施用。在一些方面,包含EV的药物组合物在静脉内施用(例如通过注射)。对于经粘膜或经皮施用,在制剂中使用适合于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且例如对于经粘膜施用,包括清洁剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现经粘膜施用。对于经皮施用,修饰的外泌体被配成本领域中通常已知的软膏剂、药膏、凝胶剂或霜剂。

[0733] 在一些方面,EV通过静脉内施用于受试者的循环系统。在一些方面,将EV于合适的液体中输注并且施用于受试者的静脉中。在一些方面,EV通过动脉内施用于受试者的循环系统。在一些方面,将EV于合适的液体中输注并且施用于受试者的动脉中。在一些方面,EV通过鞘内施用于受试者。在一些方面,EV通过注射到椎管或蛛网膜下腔体中以使其到达脑脊液(CSF)来施用。在一些方面,EV通过瘤内施用于受试者的一个或多个肿瘤中。在一些方面,EV通过鼻内施用来施用于受试者。在一些方面,EV可以局部施用或全身施用的形式经由鼻子吹入。在某些方面,EV作为鼻喷雾剂施用。

[0734] 在一些方面,EV通过腹膜内施用来施用于受试者。在一些方面,将EV于合适的液体中输注并且注射到受试者的腹膜中。在一些方面,腹膜内施用导致EV分布到淋巴。在一些方面,腹膜内施用导致EV分布到胸腺、脾脏和/或骨髓。在一些方面,腹膜内施用导致EV分布到一个或多个淋巴结。在一些方面,腹膜内施用导致EV分布到颈淋巴结、腹股沟淋巴结、纵隔淋巴结或胸骨淋巴结中的一个或多个。在一些方面,腹膜内施用导致EV分布到胰腺。

[0735] 在一些方面,EV(例如,外泌体)通过眼周施用来施用于受试者。在一些方面,EV被注射到眼周组织中。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途径。

[0736] 在一些方面,所述治疗是预防性的。在一些方面,将用于本公开的EV用于诱导免疫应答。在一些方面,将用于本公开的EV用于给受试者接种疫苗。

[0737] 在一些方面,疾病或病状是癌症、纤维化、血友病、糖尿病、生长因子缺乏症、眼病、庞贝病、溶酶体贮积症、粘液粘稠病、囊性纤维化、杜氏与贝氏肌营养不良症、甲状腺素运载蛋白淀粉样变性、A型血友病、B型血友病、腺苷酸脱氨酶缺乏症、莱伯氏先天性黑蒙症、X-连锁肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质营养不良、OTC缺乏症、肝糖储积症1A型、Crigler-Najjar综合征、1型原发性高草酸尿、急性间歇性卟啉症、苯丙酮尿症、家族性高胆固醇血症、VI型粘多糖贮积症、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症和高胆固醇血症。

[0738] 在一些方面,疾病或病症是移植物抗宿主病 (GvHD)。在一些方面,可用本公开治疗的疾病或病症是自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的非限制性实例包括:多发性硬化、外周神经炎、干燥综合征、类风湿性关节炎、脱发、自身免疫性胰腺炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、乳糜泻、德维克氏病(视神经脊髓炎)、肾小球肾炎、IgA肾病、各种血管炎、硬皮病、糖尿病、动脉炎、白癜风、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、牛皮癣、葡萄膜炎、系统性红斑狼疮及其组合。

[0739] 在一些方面,疾病或病症是传染病。在某些方面,疾病或病症是致癌病毒。在一些方面,可以用本公开治疗的传染病包括但不限于人 γ 疱疹病毒4(爱泼斯坦-巴尔病毒)、甲型流感病毒、乙型流感病毒、巨细胞病毒、金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、沙眼衣原体、HIV-1、HIV-2、冠状病毒(例如,MERS-CoV和SARS CoV)、丝状病毒(例如,马尔堡和埃博拉)、酿脓链球菌、肺炎链球菌、疟原虫种(例如,间日疟原虫和恶性疟原虫)、基孔肯雅病毒、人乳头状瘤病毒(HPV)、乙型肝炎、丙型肝炎、人疱疹病毒8、单纯疱疹病毒2(HSV2)、克雷伯氏菌属某种、铜绿假单胞菌、肠球菌属某种、变形杆菌属某种、肠杆菌属某种、放线菌属某种、凝固酶阴性葡萄球菌(CoNS)、支原体属某种或其组合。

[0740] 在一些方面,癌症是膀胱癌、宫颈癌、肾细胞癌、睾丸癌、结直肠癌、肺癌、头颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、肝癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、白血病、胰腺癌或其组合。

[0741] 在某些方面,癌症与STAT6蛋白表达增加有关。可用本公开治疗的癌症的非限制性实例包括结肠直肠癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC))、胰腺癌(例如,胰腺导管腺癌(PDAC))、白血病、子宫癌、卵巢癌、膀胱癌、胆管癌、胃癌或其任何组合。在一些方面,癌症选自结肠腺癌、直肠腺癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌(PDAC)、卵巢浆液性囊腺癌、急性髓细胞白血病、睾丸癌(例如,睾丸生殖细胞肿瘤、精原细胞瘤、非精原细胞瘤和绒毛膜癌)、肺腺癌、脑低级别胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、葡萄膜黑色素瘤、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌肉瘤、嗜铬细胞瘤、副神经节瘤及其任何组合。在某些方面,癌症为富含髓细胞(myeloid-rich)癌。在一些方面,癌症包括肝癌。在一些方面,癌症包括肝细胞癌(HCC)。在一些方面,癌症包括胰腺导管腺癌(PDAC),在一些方面,癌症包括结肠直肠癌(CRC)。在一些方面,癌症包括卵巢癌。在一些方面,癌症包括软脑膜癌。

[0742] 当施用于患有癌症的受试者时,在某些方面,本公开的EV可以上调免疫应答并且增强受试者免疫系统的肿瘤靶向。在一些方面,所治疗的癌症的特征在于白细胞(T细胞、B细胞、巨噬细胞、树突细胞、单核细胞)向肿瘤微环境中的浸润,或所谓的“热肿瘤”或“炎性肿瘤”。在一些方面,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的浸润,或所谓的“冷肿瘤(cold tumor)”或“非炎性肿瘤”。在一些方面,以足以将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”的量和持续时间施用EV,即,所述施用导致白细胞(诸如T细胞)向肿瘤微环境浸润。在某些方面,癌症包括膀胱癌、宫颈癌、肾细胞癌、睾丸癌、结直肠癌、肺癌、头

颈癌、和卵巢癌、淋巴瘤、肝癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、白血病、胰腺癌或其组合。在其他方面,术语“远端肿瘤(distal tumor)”或“远处肿瘤(distant tumor)”是指从原始(或原发)肿瘤扩散到远处器官或远处组织例如淋巴结的肿瘤。在一些方面,本公开的EV治疗转移扩散后的肿瘤。

[0743] V. 产生工程化外泌体的方法

[0744] 本公开的EV(例如,外泌体)可从体外生长的细胞或受试者的体液中产生。当从体外细胞培养物产生外泌体时,可使用各种生产细胞。

[0745] 在一些方面,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。在某些方面,生产细胞是哺乳动物细胞系。哺乳动物细胞系的非限制性实例包括:人胚胎肾(HEK)细胞系、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、HT-1080细胞系、HeLa细胞系、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)细胞系及其组合。在某些方面,哺乳动物细胞系包括HEK-293细胞、BJ人包皮成纤维细胞、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、RPTEC/TERT1细胞或其组合。在一些方面,生产细胞是原代细胞。在某些方面,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。

[0746] 在一些方面,生产细胞不是免疫细胞,诸如抗原呈递细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、巨噬细胞、T辅助细胞或调节性T细胞(Treg细胞)。在其他方面,生产细胞不是抗原呈递细胞(例如,树突细胞、巨噬细胞、B细胞、肥大细胞、嗜中性粒细胞、Kupffer-Browicz细胞或衍生自任何此类细胞的细胞)。

[0747] 生产细胞可被基因修饰以包含一种或多种外源序列(例如,编码本文所公开的一个或多个外源生物活性部分,例如免疫调节剂,例如,IL-12,或ASO,例如,STAT6 ASO)以产生本文所述的外泌体。基因修饰的生产细胞可以通过瞬时或稳定转化含有外源序列。外源序列可以转化为质粒。可将外源序列在靶位点或随机位点稳定地整合到生产细胞的基因组序列中。在一些方面,生成稳定的细胞系以用于产生本文所公开的EV,例如外泌体。

[0748] 可将外源序列插入到生产细胞的基因组序列中,位于编码外泌体蛋白的内源序列内、其上游(5'-端)或下游(3'-端)。可使用本领域已知的各种方法将外源序列引入生产细胞中。例如,使用各种基因编辑方法(例如,使用同源重组、转座子介导系统、loxP-Cre系统、CRISPR/Cas9或TALEN的方法)修饰的细胞在本公开的范围内。

[0749] 外源序列可以包括编码本文所公开的支架部分的序列或其片段或变体。可以引入编码支架部分的序列的额外拷贝以产生本文所述的外泌体(例如,具有更高密度的支架部分或在EV,例如,外泌体的表面上或腔表面上表达的多个不同的支架部分)。可以引入编码支架部分的修饰或片段的外源序列以产生含有支架部分的修饰或片段的腔工程化和/或表面工程化外泌体。

[0750] 在一些方面,生产细胞可以用编码一个或多个连接至本文所述的外源生物活性部分的支架部分的一种或多种载体进行修饰,例如转染。

[0751] VI. 产生带有效载荷的EV的方法

[0752] VIA. 负载有效载荷的方法

[0753] 可通过本领域已知的任何合适的技术将有效载荷(例如生物活性部分,例如STING激动剂)包裹在EV(例如,外泌体)中。预期将生物分子负载到EV(例如,外泌体)中的所有已

知方式都被认为适用于本文。此类技术包括被动扩散、电穿孔、化学或聚合物转染、病毒转导、机械膜破坏或机械剪切或其任何组合。可将有效载荷(例如生物活性部分,例如STING激动剂)和EV(例如,外泌体)在包裹期间于合适的缓冲剂中培育。

[0754] 在一个方面,生物活性部分(例如STING激动剂)通过被动扩散被EV(例如,外泌体)包裹。可将生物活性部分(例如STING激动剂)和EV(例如,外泌体)混合在一起并培育一段时间,该时间足以使生物活性部分(例如STING激动剂)扩散通过囊泡脂质双层,从而被包裹在EV(例如,外泌体)中。可将生物活性部分(例如STING激动剂)和EV(例如,外泌体)一起培育介于约1至30小时、2至24小时、4至18小时、6至16小时、8至14小时、10至12小时、6至12小时、12至20小时、14至18小时或20至30小时之间。可将STING激动剂和EV(例如,外泌体)一起培育约2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时或30小时。

[0755] 还可改变EV(例如,外泌体)溶液的缓冲剂条件以增加或控制生物活性部分(例如STING激动剂)的包裹。在一个方面,缓冲剂可以是含有蔗糖的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。也可使用另外的缓冲剂修饰,诸如剪切保护剂、粘度调节剂和/或影响囊泡结构性质的溶质。还可加入赋形剂来提高生物活性部分(例如STING激动剂)包裹的效率,诸如膜软化材料和分子拥挤剂。对缓冲剂的其他修饰可包括特定pH范围和/或盐、有机溶剂、小分子、清洁剂、两性离子、氨基酸、聚合物的浓度,和/或上述(包括多种浓度)的任何组合。

[0756] 在培育期间,可以改变EV(例如,外泌体)和生物活性部分(例如STING激动剂)溶液的温度,以增加或控制生物活性部分的包裹。温度可为室温。温度可以介于约15℃至90℃、15℃至30℃、30-50℃、50℃至90℃之间。在一些方面,温度为约15℃、20℃、35℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃或90℃。

[0757] 在生物活性部分(例如STING激动剂)与EV(例如,外泌体)培育期间,生物活性部分的浓度也可以改变以增加或控制生物活性部分(例如STING激动剂)的包裹。例如,生物活性部分(例如STING激动剂)的浓度可以在至少0.01mM与100mM STING激动剂之间。生物活性部分(例如STING激动剂)的浓度可为至少0.01-1mM、1-10mM、10-50mM或50-100mM。激动剂的浓度可以是至少0.01mM、0.02mM、0.03mM、0.04mM、0.05mM、0.06mM、0.07mM、0.08mM、0.09mM、0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM或100mM。在一些方面,生物活性部分(例如STING激动剂)的浓度是至少约1mM。

[0758] 在一些方面,生物活性部分(例如STING激动剂)以至少约500μM、至少约600μM、至少约700μM、至少约800μM、至少约900μM、至少约1000μM、至少约1100μM、至少约1200μM、至少约1300μM、至少约1400μM、至少约1500μM、至少约1600μM、至少约1700μM、至少约1800μM、至少约1900μM或至少约2000μM的浓度在混合物中培育。在一些方面,CDN以至少约2500μM、至少约2600μM、至少约2700μM、至少约2800μM、至少约2900μM、至少约3000μM、至少约3100μM、至少约3200μM、至少约3300μM、至少约3400μM、至少约3500μM、至少约3600μM、至少约3700μM、至少约3800μM、至少约3900μM或至少约3000μM的浓度在混合物中培育。

[0759] 在一些方面,生物活性部分(例如STING激动剂)以约500μM与约100mM之间、约500μM与约90mM之间、约500μM与约80mM之间、约500μM与约70mM之间、约500μM与约60mM之间、约

500 μ M与约50mM之间、约500 μ M与约40mM之间、约500 μ M与约30mM之间、约500 μ M与约20mM之间、约500 μ M与约10mM之间或约500 μ M与约1mM之间的浓度在混合物中培育。在一些方面,生物活性部分(例如STING激动剂)以约500 μ M与约10mM之间、约500 μ M与约9mM之间、约500 μ M与约8mM之间、约500 μ M与约7mM之间、约500 μ M与约6mM之间、约500 μ M与约5mM之间、约500 μ M与约4mM之间、约500 μ M与约3mM之间、约500 μ M与约2mM之间或约500 μ M与约1mM之间的浓度在混合物中培育。

[0760] 还可改变与生物活性部分(例如STING激动剂)一起培育的细胞外粒子的数量以增加或控制生物活性部分(例如STING激动剂)的包裹。纯化的EV(例如,外泌体)粒子的数量可以在至少约 10^6 个至至少约 10^{20} 个总的纯化囊泡粒子之间。纯化粒子的数量可以在约 10^8 至 10^{18} 个、 10^{10} 至 10^{16} 个、 10^8 至 10^{14} 个或 10^{10} 个至 10^{12} 个总的纯化囊泡粒子之间。纯化粒子的数量可以是至少约 10^6 个、 10^8 个、 10^{10} 个、 10^{12} 个、 10^{14} 个、 10^{16} 个、 10^{18} 个或 10^{20} 个总的纯化囊泡粒子。

[0761] VIB.EV纯化方法

[0762] 为本公开制备的EV(例如,外泌体)可以从生产细胞中分离。预期所有已知的分离EV(例如,外泌体)的方式都被认为适用于本文。例如,可以采用EV(例如,外泌体)的物理性质将它们从介质或其他源材料中分离出来,包括基于电荷(例如,电泳分离)、尺寸(例如,过滤、分子筛等)、密度(例如,常规或梯度离心)、Svedberg常数(例如,利用或不利用外力的沉降等)的分离。或者或另外,分离可基于一种或多种生物学特性,并且包括可使用表面标志物(例如,用于沉淀、与固相的可逆结合、FACS分离、特异性配体结合、非特异性配体结合等)的方法。在更进一步预期的方法中,还可使用化学和/或物理方法,包括PEG诱导的融合和/或超声融合,来融合EV,例如,外泌体。

[0763] 在配制之前,EV(例如,外泌体)也可以在与生物活性部分(例如STING激动剂)培育后进行纯化,以从组合物中去除游离的、未包裹的生物活性部分,例如STING激动剂。先前公开的方法的所有方式也被认为适用于本文,包括基于EV(例如,外泌体)的物理或生物学特性的分离。

[0764] 分离、纯化和富集可以一般和非选择性方式(通常包括连续离心)进行。或者,分离、纯化和富集可以更特异和更具选择性的方式(例如,使用生产细胞特异性表面标志物)进行。例如,特异性表面标志物可用于免疫沉淀、FACS分选、亲和纯化、用于磁性分离的结合珠粒配体等。

[0765] 在一些方面,尺寸排阻色谱法可用于分离或纯化EV,例如,外泌体。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。在一些方面,分离出空隙体积级分,其包含所关注EV,例如,外泌体。在一些方面,例如,可以利用密度梯度离心来进一步分离EV,例如,外泌体。更进一步地,在一些方面,可能希望进一步将生产细胞来源的EV(例如,外泌体)与其他来源的EV分离。例如,通过使用对生产细胞有特异性的抗原抗体的免疫吸附捕获,可将生产细胞来源的EV(例如,外泌体)与非生产细胞来源的EV(例如,外泌体)分离。

[0766] 在一些方面,EV(例如,外泌体)的分离可涉及尺寸排阻色谱或离子色谱,诸如阴离子交换、阳离子交换或混合模式色谱。在一些方面,EV(例如,外泌体)的分离可涉及脱盐、透析、切向流过滤、超滤或渗滤或其任何组合。在一些方面,EV(例如,外泌体)的分离可涉及方

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、浓缩和/或速率区带离心。在一些方面,EV(例如,外泌体)的分离可涉及一个或多个离心步骤。离心可以在约50,000至150,000x g下进行。离心可以在约50,000x g、75,000x g、100,000x g、125,000x g或150,000x g下进行。

[0767] 为本公开制备的EV(例如,外泌体)可通过多模式色谱来分离。本公开的方法可用于制备包含与生物活性部分,例如STING激动剂,例如一种或多种环状二核苷酸(CDN,例如,STING激动剂)缔合的细胞外囊泡的组合物,所述方法包括将细胞外囊泡与生物活性部分(,例如STING激动剂,例如,一种或多种环状二核苷酸(CDN))在混合物中一起培育,并使用多模式色谱分离细胞外囊泡。

[0768] 多模式色谱可用于从EV制剂中去除游离的生物活性部分,例如STING激动剂。预期所有已知的分离EV(例如,外泌体)的方式都被认为适用于本文。例如,可以采用EV(例如,外泌体)的物理性质将它们从介质或其他源材料中分离出来,包括基于电荷(例如,电泳分离)、尺寸(例如,过滤、分子筛等)、密度(例如,常规或梯度离心)、Svedberg常数(例如,利用或不利用外力的沉降等)的分离。或者或另外,分离可基于一种或多种生物学特性,并且包括可使用表面标志物(例如,用于沉淀、与固相的可逆结合、FACS分离、特异性配体结合、非特异性配体结合等)的方法。在更进一步预期的方法中,还可使用化学和/或物理方法,包括PEG诱导的融合和/或超声融合,来融合EV,例如,外泌体。在一些方面,多模式柱选自由CaptoCore 700、Capto MMC或Capto MMC ImpRes组成的组。在一些方面,多模式柱是CaptoCore 700。在一些方面,多模式柱是CaptoCore MMC。在一些方面,多模式柱是Capto MMC ImpRes。

[0769] 以上引用的所有参考文献,以及本文引用的所有参考文献,均以引用的方式整体并入本文。

[0770] 以说明而非限制的方式提供以下实施例。

[0771] 实施例

[0772] 将通过以下实施例进一步说明本公开。所述实施例仅出于说明目的而提供,并且不应被解释为以任何方式限制本公开的范围或内容。除非另外说明,否则本公开的实践将采用本领域技术内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术以及药物学的常规方法。此类技术在文献中得到充分的解释。参见,例如T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,1993);Green和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2012);Colowick和Kaplan,Methods In Enzymology(Academic Press);Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版(Pharmaceutical Press,2012);Sundberg和Carey,Advanced Organic Chemistry:A和B部分,第5版(Springer,2007)。

[0773] 实施例1:天然外泌体和蛋白质X外泌体的稳定性评价

[0774] 评价了天然外泌体和含蛋白质X的外泌体在不同pH条件下的稳定性。被选出用于评价稳定性的评价方法是通过动态光散射和 ζ 电位分析来监测尺寸和表面电荷。

[0775] 材料

[0776] 天然人胚胎肾(HEK)细胞外泌体在MilliQ超纯水中以大约 5×10^{12} 进行工程化和制备。蛋白质X细胞外囊泡(CB-101)在磷酸盐缓冲盐水中以大约 5×10^{12} P/mL进行工程化和制

备。购进不含钙或镁的pH 7.2的Gibco磷酸盐缓冲盐水(PN 20012027,Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)。购进无菌微量离心管(1.5mL,低保留)(PN 3451,Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)。另外的材料包括:柠檬酸(PN C2404,Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)、柠檬酸钠二水合物(PN BP327,Fisher Scientific Waltham,MA)和碳酸盐-碳酸氢盐缓冲剂(PN C3041,Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)。磷酸盐

[0777] 将两种固体($83.01\text{g Na}_2\text{HPO}_4/2=41.51\text{g}$ 和 $12.29\text{g KH}_2\text{PO}_4/2=6.15\text{g}$)添加到烧杯中并溶解于400mL Milli-Q水中。如有必要,用1M HCl或1M NaOH将pH调节至7.4。在量筒中将溶液加至500mL,并使用0.2 μm 滤瓶进行过滤。在生物安全柜中,将溶液转移至50mL离心管中并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。 KH_2PO_4 (目录号3248-01,批号0000163254)和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (目录号3817-01,批号0000201905)购自JT Baker,(Fisher Scientific Waltham,MA)。

[0778] 动态光散射(DLS)

[0779] DLS用于测量EV的聚集,即DLS是一种指示稳定性的测定。根据以下方法制备和运行每个样品。

[0780] 样品在Malvern Zetasizer Nano ZS动态光散射仪器(DLS)、型号ZEN3600、序列号MAL1036117(Malvern,Worcestershire,UK)上运行,并使用Malvern Zetasizer软件版本7.13(Malvern Panalytical)进行分析。购进Malvern DLS微量比色皿和盖试剂盒(PN ZEN0040)和 ζ 电位比色皿(PN DTS1070)(Malvern,Worcestershire,UK)。外泌体在Gibco PBS 1X pH 7.2中从 $1\text{E}11$ P/mL稀释至 $1\text{E}12$ P/mL。使用小容量Malvern比色皿(PN ZEN0040)测量样品,并在25 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡4分钟后,进行三次测量。对于每个EV样品,在微量比色皿中将20 μL 样品用过滤的Gibco PBS稀释至180 μL ,通过重复移液混合,并进行测量。

[0781] 将以下来自Polysciences Inc.的NIST聚苯乙烯尺寸标准用于本文所述的实验中:

Polysciences Inc. NIST 尺寸标准		
目录号	批号	尺寸(nm)
64005	704405	51.7 ± 0.7
64010-15	A758988	99.9 ± 1.3
64014-15	712842	243.9 ± 0.0

[0782]

[0783] 外观测试

[0784] 在哑光白色和哑光黑色背景下检查每个样品的每个表面至少5秒。用手轻轻搅动试管以搅拌潜在的沉淀物,并使用Maglite Mini LED手电筒和5倍放大镜检查可见颗粒。使用Oakton Cole-Parmer pH Spear防水袋pH测试仪(Cole-Parmer,Vernon Hills,IL)测量pH。

[0785] 研究设计

[0786] 研究设计在pH值3、5、7、9和11下进行查看。在调整pH值后立即进行测量。在MilliQ水或PBS中制备天然外泌体和蛋白质X外泌体的浓缩溶液,并在研究开始前用含有适当缓冲剂的MilliQ水稀释,和/或在环境实验室温度下调节至正确的pH值(图2D)。对于酸性pH,使用柠檬酸盐缓冲剂,对于中性pH,使用磷酸盐缓冲剂,且对于碱性pH,使用碳酸钠缓冲剂。目标渗透压是300mOsm/kg。用20 μL $1\text{E}11$ 至 $1\text{E}12$ P/mL的EV进行DLS和 ζ 的测量。天然外泌体和蛋白质X外泌体的结果数据在下表2、3和4中列出。

[0787] 表3.天然外泌体

[0788]

记录	类型	样品名称	T	ZP	Mob	Cond	pH	平均值 (mV)	标准 偏差 (mV)
			°C	mV	μmcm/Vs	mS/cm			(mV)
1	ζ	pH 3.01 样品 1 1	25	9.05	0.7091	6.95	3.01	9.5	0.67
2	ζ	pH 3.01 样品 1 2	25	10	0.7848	7.25			
3	ζ	pH 4.95 样品 1 1	25	-16.5	-1.291	3.35	4.95	-17.5	1.41
4	ζ	pH 4.95 样品 1 2	25	-18.5	-1.452	3.88			
7	ζ	pH 7.07 样品 1 1	25	-31.8	-2.496	2.16	7.07	-32.7	1.27
8	ζ	pH 7.07 样品 1 2	25	-33.6	-2.637	2.4			
9	ζ	pH 8.94 样品 1 1	25	-23.1	-1.814	1.56	8.94	-26.6	4.88
10	ζ	pH 8.94 样品 1 2	25	-30	-2.352	1.74			
11	ζ	pH 11.21 样品 1 1	25	-5.92	-0.4641	3.71	11.21	-8.4	3.52
12	ζ	pH 11.21 样品 1 2	25	-10.9	-0.8535	4.35			
13	ζ	pH 3.01 样品 2 1	25	8.2	0.6428	6.69			
14	ζ	pH 3.01 样品 2 2	25	9.07	0.7111	6.82			

[0789] 表4. 蛋白质X外泌体

[0790]

记录	类型	样品名称	T	ZP	迁移率	Cond	pH	平均值 (mV)	标准 偏差 (mV)
			°C	mV	μmcm/Vs	mS/cm			
1	ζ	pH 3.15 蛋白质 X 样品 1 1	25	6.87	0.5386	11.2			

[0791]

2	ζ	pH 3.15 蛋白质 X 样品 1 2	25	6.36	0.4988	11.6			
3	ζ	pH 2.95 蛋白质 X 样品 2 1	25	10.4	0.8167	8.39	2.95	10.1	0.45
4	ζ	pH 2.95 蛋白质 X 样品 2 2	25	9.76	0.765	8.57			
7	ζ	pH 5.20 蛋白质 X 样品 1 1	25	-10.3	-0.8057	8.98	5.2	-10.8	0.64
8	ζ	pH 5.20 蛋白质 X 样品 1 2	25	-11.2	-0.8793	9.41			
11	ζ	pH 6.95 蛋白质 X 样品 1 1	25	-13	-1.022	5.8	6.95	-13.8	1.06
12	ζ	pH 6.95 蛋白质 X 样品 1 2	25	-14.5	-1.135	5.91			
15	ζ	pH 9.51 蛋白质 X 样品 1 1	25	-11.3	-0.888	12.9	9.51	-12.3	1.41
16	ζ	pH 9.51 蛋白质 X 样品 1 2	25	-13.3	-1.041	13.4			
19	ζ	pH 11.08 蛋白质 X 样品 1 1	25	-15.9	-1.243	6.26	11.08	-17.0	1.56
20	ζ	pH 11.08 蛋白质 X 样品 1 2	25	-18.1	-1.416	6.57			
33	ζ	pH 6.01 蛋白质 X 样品 1 1	25	-13.1	-1.028	5.47	6.01	-13.7	0.78
34	ζ	pH 6.01 蛋白质 X 样品 1 2	25	-14.2	-1.113	5.55			
39	ζ	pH 6.38 蛋白质 X 样品 1 1	25	-13.4	-1.051	5.49	6.38	-14.3	1.20
40	ζ	pH 6.38 蛋白质 X 样品 1 2	25	-15.1	-1.182	5.57			

[0792] 这些数据是通过将盐透析掉,然后分散在所需pH值下的相关缓冲剂中产生的。据观察,PBS的存在保护外泌体在更宽的pH范围内不聚集。上表中示出的结果用图2A表示。

[0793] 表5.天然外泌体和蛋白质X外泌体的平均pH和ζ电位

[0794]

天然的			PrX	
pH	ζ		pH	ζ

3.01	9.5		2.95	10.1
4.95	-17.5		5.2	-10.8
7.07	-32.7		6.95	-13.8
8.94	-26.6		9.51	-12.3
11.21	-8.4		11.08	-17.0
			6.01	-13.7
			6.38	-14.3

[0795] 表5中示出的结果也以图形形式在图1B中表示。

[0796] 实施例2:缓冲剂A的制剂

[0797] 用于储存和施用EV的外泌体缓冲剂A的制备如下所述。为缓冲剂A配制的EV被工程化来表达PTGFRN蛋白。

[0798] 为调节pH,制备50mL的1N氢氧化钠和50mL的1N盐酸。向带有搅拌棒的1L烧杯中添加注射用水(0.8L)。在使用搅拌板搅拌(不加热)的同时,添加以下成分:(a) 50.00g蔗糖,(b) 0.70g磷酸二氢钾,(c) 4.00g磷酸氢二钠七水合物,和(d) 2.90g氯化钠。直到所有粉末都溶解后再调节pH。如果粉末不溶解,则提高混合速度。然后,将pH调节至介于7.1与7.3之间。如果pH>7.3,则用1N盐酸进行调节。如果pH<7.1,则用1N氢氧化钠进行调节。将溶液倒入1L量筒中。添加注射用水使总体积达到1L。记录pH和电导率。目标pH在7.1与7.3之间。目标电导率在6.5+/-10%与8.0+/-10% mS/cm之间。然后将溶液通过0.2 μ m瓶顶过滤器(目录号567-0020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)过滤灭菌。缓冲剂A的最终制剂在下表6中列出。

[0799] 表6.缓冲剂A制剂

缓冲剂 A		
密度: 1.02 kg/L		
描述	浓度 g/L	浓度 mMol
蔗糖	50 g/L	146.07
磷酸二氢钾	0.70 g/L	5.14
磷酸氢二钠七水合物	4.00 g/L	14.92
氯化钠	2.90 g/L	49.62
WFI	根据需要	

[0801] 实施例3:缓冲剂B的制剂

[0802] 用于储存和施用EV的外泌体缓冲剂B的制备如下所述。为缓冲剂B配制的EV被工程化来表达PTGFRN蛋白,并且还包含CL656。

[0803] 为调节pH,制备50mL的1N氢氧化钠和50mL的1N盐酸。向带有搅拌棒的1L烧杯中添加注射用水(0.8L)。在使用搅拌板搅拌(不加热)的同时,添加以下成分:(a) 50.00g蔗糖,(b) 2.10g磷酸二氢钾,(c) 7.26g磷酸氢二钠七水合物,和(d) 2.34g氯化钠。直到所有粉末都溶解后再调节pH。如果粉末不溶解,则提高混合速度。然后,将pH调节至介于7.1与7.3之间。如果pH>7.3,则用1N盐酸进行调节。如果pH<7.1,则用1N氢氧化钠进行调节,将溶液倒入1L量筒中。添加注射用水使总体积达到1L。记录pH和电导率。目标pH在7.1与7.3之间。目标

电导率在6.5mS/cm与8.0mS/cm之间。然后将溶液通过0.2μm瓶顶过滤器(目录号567-0020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)过滤灭菌。缓冲剂B的最终制剂在下表7中阐明。

[0804] 表7. 缓冲剂B制剂

缓冲剂 B		
密度: 1.02 kg/L		
描述	浓度 g/L	浓度 mMol
蔗糖	50 g/L	146.07
磷酸二氢钾	2.10 g/L	15.44
磷酸氢二钠七水合物	7.26 g/L	27.08
氯化钠	2.34 g/L	40.04
WFI	根据需要	

[0806] 实施例4: 缓冲剂C的制剂

[0807] 根据在下表8中列出的配方制备外泌体缓冲剂C。EV被工程化来表达与IL-12融合的PTGFRN蛋白。

[0808] 表8. 缓冲剂C制剂

	试剂	FW	mol/L	g/L
[0809] 0.032 M 磷酸氢二钠、 0.011 M 磷酸二氢钾、 0.04 M 氯化钠、 0.146 M 蔗糖, pH 7.2	磷酸氢二钠七水合物	268.07	0.0317	8.50
	磷酸二氢钾	136.09	0.0110	1.50
	氯化钠	58.44	0.040	2.34
	蔗糖	342.3	0.146	50
	密度=1.022 g/L	pH = 7.2±0.2	电导率= 8.7 ± 0.9 mS/cm	

[0810] 实施例5: 在外泌体中和上清液中的STING激动剂浓度随时间的分布

[0811] 在平衡研究中研究了在外泌体中和上清液中的生物活性部分, 即STING激动剂的分布。

[0812] 当存在于外泌体中时, 生物活性部分(图1A), 例如STING激动剂, 可以随时间被动地扩散出外泌体并进入上清液(图4A-4C)。通过计算随时间变化的STING激动剂浓度来确定STING激动剂在外泌体和上清液中的分布。简言之, 外泌体负载有STING激动剂并储存在缓冲剂B中。含有外泌体的液体缓冲剂制剂在-80℃下冷冻, 在4℃下半冷冻或在22℃下储存72小时。在所述温度下在缓冲剂B中储存12小时后, 计算在外泌体中的STING激动剂的浓度并与上清液中STING激动剂的浓度进行比较。结果在图3A和图3B中阐明。如所示, 在-80℃下储存72小时时, 在外泌体中的STING激动剂的终浓度为约5μM, 且上清液中STING激动剂的终浓度为约4.3μM。在4℃下储存72小时时, 在外泌体中的STING激动剂的终浓度为约4.5μM, 且上清液中STING激动剂的终浓度为约4.4μM。在22℃下储存72小时时, 在外泌体中的STING激动剂的终浓度为约4.1μM, 且上清液中STING激动剂的终浓度为约6.5μM。图3A和图3B中绘制的数据在下表9、10和11中列出。

[0813] 此实施例表明, 与在上清液中STING激动剂的浓度相比, 储存温度不会显著影响外泌体中STING激动剂的浓度。

[0814] 表9. 平衡研究数据

[0815]

样品 ID	样品类型	时间点(小时)	浓度(μM)
1	外泌体沉淀	0	6.35
2	外泌体沉淀	0	6.29
3	外泌体沉淀	0.5	5.56
4	外泌体沉淀	0.5	5.80
5	外泌体沉淀	1	5.44
6	外泌体沉淀	1	5.63
7	外泌体沉淀	2	5.44
8	外泌体沉淀	2	4.98
9	外泌体沉淀	3	5.87
10	外泌体沉淀	3	6.02
11	外泌体沉淀	4	4.99
12	外泌体沉淀	4	5.09
13	外泌体沉淀	8	5.29
14	外泌体沉淀	8	5.18
15	外泌体沉淀	12	4.87
16	外泌体沉淀	12	5.45
17	上清液	0	1.23
18	上清液	0	1.21
19	上清液	0.5	2.08
20	上清液	0.5	1.62
21	上清液	1	1.69

[0816]

22	上清液	1	2.76
23	上清液	2	3.19
24	上清液	2	3.38
25	上清液	3	3.40
26	上清液	3	3.63
27	上清液	4	4.05
28	上清液	4	4.19
29	上清液	8	4.03
30	上清液	8	4.00
31	上清液	12	4.44
32	上清液	12	4.23

[0817] 表10. 平衡研究数据——外泌体沉淀

[0818]

外泌体沉淀		
时间点	浓度(μM)	误差(μM)
0	6.32	0.04
0.5	5.68	0.17
1	5.53	0.13
2	5.21	0.32
3	5.94	0.11
4	5.04	0.07
8	5.24	0.08
12	5.16	0.41

[0819] 表11. 平衡研究数据——上清液

[0820]	上清液		
	时间点	浓度(μM)	误差(μM)
	0	1.22	0.01
	0.5	1.85	0.32
	1	2.22	0.76
	2	3.28	0.13
	3	3.51	0.16
	4	4.12	0.10
	8	4.01	0.02
	12	4.34	0.15

[0821] 实施例6:缓冲剂B中的STING激动剂对基因表达的影响

[0822] 研究了施用含有STING激动剂CL656的外泌体对C57BL/6肝脏中的基因表达的影响。

[0823] 解冻后,将在含有STING激动剂CL656的缓冲剂B组合物中的外泌体如实施例5所述在4℃和22℃下储存24小时或72小时。将PBS、CL656 (20 μg)、外泌体或如上所述培育的在含有STING激动剂CL656的缓冲剂B中的外泌体(每只小鼠600ng CL656)静脉内施用于C57BL/6小鼠。作为对照,施用(视为0小时)在-80℃下储存的在含有STING激动剂CL656的缓冲剂B组合物中的外泌体(每只小鼠6ng、60ng和600ng)。4小时后,对小鼠施以安乐死并收集肝脏。使用RNeasy Lipid Mini Kit (Qiagen)从肝脏中分离总RNA,并通过RT-qPCR测定IFN β mRNA的表达水平。相对表达针对持家基因RPS13进行归一化。图3C提供了来自肝脏研究的结果。如图所示,1)在0小时样品中观察到IFN β mRNA的剂量依赖性诱导,2)在任何储存条件下,IFN β mRNA的水平在含有STING激动剂CL656的缓冲剂B组合物中的所有外泌体(每只小鼠注射600ng)中相似。3)不含STING激动剂的外泌体不诱导IFN β mRNA,而CL656 (20 μg)诱导低水平的IFN β mRNA。

[0824] 这些结果表明,施用已冷冻、解冻并施用于受试者的缓冲剂B中含有的STING激动剂可有效诱导肝组织中的IFN β 基因表达,而没有任何显著差异。

[0825] 实施例7:STING激动剂和外泌体包裹的STING激动剂对瘤内浓度的影响

[0826] 研究了缓冲剂B中的STING激动剂随时间变化的瘤内浓度。

[0827] 简言之,将B16-F10黑色素瘤细胞皮下移植到C57BL/6小鼠中。当真皮肿瘤可见时,每只动物接受瘤内剂量的游离STING激动剂(0.3 μg CL656)或外泌体包裹的STING激动剂(0.3 μg CL656)。在注射后5、30、120、360、1440和2880分钟时测量游离STING激动剂和外泌体包裹的STING激动剂的瘤内浓度。结果提供于图3D中。如图所示,游离STING激动剂的瘤内浓度在施用后显著下降(虚线),且在约360分钟后检测不到。进一步如图3D所示,外泌体包裹的STING激动剂的浓度在1440分钟时缓慢下降至约100nM。此后,外泌体包裹的STING激动剂的浓度稳定在约100nM,直到在2880分钟时进行最后一次测量。

[0828] 此实施例表明,与游离STING激动剂相比,施用含有外泌体包裹的STING激动剂的组合物对STING激动剂的瘤内浓度具有稳定作用。

[0829] 实施例8:示例性组合物02的制剂开发

[0830] 制剂开发概述

[0831] 负载STING激动剂的外泌体(exoSTING)组合物02(C-02)药物产品制剂开发与含有纯化外泌体的中间体-1的制剂开发同时进行。同步制剂开发的目的是:a)认识相对于激动

剂活性成分的稳定性,纯化的外泌体活性成分在药物产品中的稳定性可能是选择稳定赋形剂的依据,及b)使纯化的外泌体制剂与C-02药物产品相同,可以方便制造,因为这些赋形剂将被掺入药物产品中。虽然与释放测试方法不同,但是用于研究的测试方法是类似的。最终合格的测试方法用于最终制剂应力条件稳定性研究。除非另外说明,否则使用C-02药物产品(含有中间体-1和中间体-02)进行研究。

[0832] 进行了初始药物产品的应力研究,包括机械、氧化和pH值应力条件。所述研究使用15mM磷酸二氢钾、27mM磷酸氢二钠缓冲剂、100mM氯化钠、5%蔗糖(w/v),pH 7.2进行。研究表明,除了极端机械应力(诸如剧烈搅拌)外,药物产品制剂的稳定性都是可接受的。数据指示,含有5%(w/v)蔗糖的PBS制剂提供了对应力条件的保护。

[0833] 使用中间体-01在不同缓冲剂中进行的广泛pH范围研究(pH 3.0至11.0)鉴定了介于6.5与9.0之间的pH范围是可接受的(通过动态光散射(DLS)),并且证实了磷酸盐缓冲剂的适用性。使用DLS对中间体-01进行为期9个月的稳定性研究以及额外的分析评估,证实了其在-80℃下在含有5%(w/v)蔗糖的PBS中的稳定性。

[0834] 对中间体-01和C-02药物产品两者的最终制剂组成进行了修改,以达到适合肠胃外施用的张力。由于期望的蔗糖水平和张力目标,降低了PBS制剂的氯化钠浓度。为了提高制剂的缓冲能力,增加了PBS的磷酸盐浓度。此外,选择磷酸钠和磷酸钾缓冲剂的混合物而不是单独的磷酸钠。

[0835] 所选的制剂组成是15mM磷酸二氢钾、27mM磷酸氢二钠、40mM氯化钠、5%(w/v)蔗糖,pH 7.2。此制剂用于中间体-01、C-02药物产品和用于C-02的FB-01稀释剂。最终制剂的缓冲剂被称为制剂缓冲剂01(FB-01)。

[0836] 对最终制剂中C-02药物产品稳定性的评估表明,药物产品对冻融循环和机械反转是稳定的。降解仅在极端应力条件下发生。

[0837] 对冷冻保护剂在药物产品冻融稳定性方面的评价

[0838] 在310mM磷酸氢二钠、90mM磷酸二氢钾缓冲剂(pH 7.4)中配制的药物产品开发批次中,对不同浓度的冷冻保护剂(包括蔗糖、海藻糖和D-山梨糖醇)进行了评价。此研究使用了开发批次的PTGFRN过表达的外泌体和环状二核苷酸STING激动剂。在1.0%、2.5%、5.0%、7.5%和10.0%(w/v)下对冷冻保护剂进行评价。磷酸盐缓冲剂中所有蔗糖和海藻糖制剂的理论渗透压经计算为大约300mOsm/kg。对于D-山梨糖醇制剂,1%至5%(w/v)制剂的渗透压也为大约300mOsm/kg,而7.5%和10.0%D-山梨糖醇制剂的渗透压经计算分别为约400mOsm/kg和600mOsm/kg。所有制剂在0、3和10次冻融循环后通过动态光散射(DLS)的外观和尺寸进行评价。

[0839] 与含有冷冻保护剂的制剂相比,两种对照(仅PBS或水)的外观测试结果显示,随着冻融循环的增加,外观变化更明显。这些变化包括浊度和颜色的增加(PBS)或带有沉淀物的可见颗粒(水)。蔗糖和D-山梨糖醇制剂在几个浓度下都显示出可接受的外观结果。与蔗糖或D-山梨糖醇相比,需要更高浓度的海藻糖来防止外观变化。

[0840] DLS测试结果显示,在多个冻融循环后观察到对照制剂(仅PBS,仅水)的尺寸和分散性增加。一般而言,当使用更高浓度的冷冻保护剂($\geq 2.5\%$ (w/v))时,在3次和10次冻融后,未观察到尺寸或多分散性的显著变化。

[0841] 根据此冻融研究中的外观和DLS结果,当以 $\geq 2.5\%$ (w/v)存在时,蔗糖和D-山梨糖

醇都是可接受的冷冻保护剂。5% (w/v) 蔗糖提供了足够的冷冻保护,并被选择用于将来的制剂研究,包括下文所述的初始应力研究。

[0842] 在含蔗糖的磷酸盐缓冲盐水中的应力研究——初始研究

[0843] 使用选定的冷冻保护剂 (5% (w/v) 蔗糖) 和含有氯化钠的磷酸盐缓冲剂进行应力研究,以证实在不同机械应力条件下和氧化后的稳定性。这些研究的制剂是43mM磷酸盐缓冲剂、100mM氯化钠、5% (w/v) 蔗糖,pH 7.2。

[0844] 对于机械应力的研究,在环境温度下使用不同水平的机械应力(搅拌、混合)进行不同的持续时间来对样品进行评价。通过外观、pH、渗透压、DLS和纳米粒子跟踪分析 (NTA) 对样品进行评价。相对于对照(无搅拌),在任何测试条件下,尺寸和多分散性指数都没有变化。仅手动剧烈搅拌导致外观测试变化;在这种情况下观察到起泡。除极端机械应力(如剧烈搅拌)外,在所有条件下均观察到药物产品制剂的可接受的稳定性。还观察到多次温和倒置后制剂的稳定性。测试样品的pH值和渗透压保持恒定。

[0845] 通过在37°C下用不同浓度的过氧化氢处理样品4小时来评价氧化应激对药物产品的影响。处理后,用100mM抗坏血酸钠淬灭样品,并在环境温度下保持1小时以中和测试前的过氧化氢。本研究使用负载有STING激动剂的中间体-01。通过外观、DLS、NTA和体内效力对样品进行分析。

[0846] 在使用一组有限的测定进行测试的条件下,所述药物产品在受到氧化应激时是稳定且完全有效的。在不同的过氧化氢浓度暴露下且相对于对照(无过氧化氢处理)的外观、尺寸或外泌体浓度方面未观察到显著变化。定性地,未观察到脾脏效力的显著差异,如通过归一化基因表达所评估。尽管随着过氧化氢测试浓度的增加,观察到肝脏效力降低的趋势,但也观察到仅抗坏血酸组的效力显著丧失,并且组间和组内的效力结果范围相对较宽。因此,除了对照组(PBS)之外,测试组与对照组之间在肝脏中的效力也相似。数据提示药物产品对所采用的测试方法的低水平氧化应激不敏感。

[0847] 随后的应力研究旨在进一步证实C-02药物产品在所选最终制剂中的稳定性。此外,对最终制剂中的C-02药物产品进行了加速条件研究(数据未示出)。

[0848] pH的选择/中间体-01研究

[0849] 选择药物产品的pH目标和范围的重点是确保制剂中外泌体的稳定性,且因此使用中间体-01进行了研究。研究在pH值为3、5、6、6.5、7、9和11下对稳定性进行评价。柠檬酸/柠檬酸钠二水合物缓冲剂用于达到pH值3和5。磷酸二氢钾/磷酸氢二钠七水合物用于pH值6、6.5和7,碳酸盐缓冲剂用于pH值9和11。通过DLS分析样品的尺寸或尺寸分布变化,以及表面电荷的 ζ 电位。虽然这些有限数据的组合支持6.5至9.0的pH范围,但实际上,为目标在pH 7.2附近的制剂选择了更窄的范围(± 0.5)。根据结果,基于可接受的DLS结果和磷酸盐缓冲剂的预期缓冲能力选择了7.2的目标pH值。

[0850] 中间体-01和C-02药物产品制剂

[0851] 中间体-01pH研究数据支持为中间体-01选择PBS制剂。药物产品的冷冻保护剂研究确定了5% (w/v) 的蔗糖的制剂。对中间体-01进行的一项类似研究也将5% (w/v) 蔗糖确定为所需的冷冻保护剂(数据未示出)。中间体-01和药物产品的制剂组合物也保持接近生理液体的张力(约300mOsm/kg)。由于期望的蔗糖水平和张力目标,降低了PBS制剂的盐浓度。为了提高制剂的缓冲能力,增加了PBS的磷酸盐浓度。此外,选择了磷酸钠和磷酸钾缓冲

剂的混合物。

[0852] 为C-02药物产品选择的制剂组合物是15mM磷酸二氢钾、27mM磷酸氢二钠、40mM氯化钠、5%w/v蔗糖、pH 7.2。此制剂用于中间体-01、C-02药物产品和用于C-02药物产品的FB-01稀释剂。所述制剂缓冲剂被称为FB-01。

[0853] 中间体-01稳定性研究

[0854] 进行了开发稳定性研究以确认在FB-01中在-80℃下长期储存的中间体-01的稳定性。

[0855] 最终药物产品制剂中的应力研究-后续研究

[0856] 在最终制剂组合物中进行后续应力研究,以确认C-02药物产品在不同机械应力条件下和氧化后的稳定性。本研究使用最终FB-01制剂中的C-02药物产品进行,并使用与初始应力研究相关的额外分析方法进行。

[0857] 所述研究包括保存对照(在25℃下长达24小时)、多个冻融循环(最多10个循环,冷冻至-80℃并在环境温度下解冻)、极端pH值(pH5和9)、氧化应激(3%过氧化氢暴露长达24小时)和机械应力使用机械上下反转长达24小时。

[0858] 冻融循环结果显示,经过10个冻融循环,产品品质属性没有变化。

[0859] 实施例9:示例性组合物03的制剂开发

[0860] 负载IL-12的外泌体(exoIL-12)组合物03(C-03)药物产品由活性药物物质exoIL-12在5mM磷酸二氢钾、15mM磷酸氢二钠、50mM氯化钠、146mM蔗糖,pH 7.2的制剂缓冲剂中组成。

[0861] C-03的制剂开发遵循以下几个原则:药物产品制剂旨在作为可注射溶液使用;并且所述制剂对冷冻储存进行了优化,以最大限度地减少冷冻/解冻操作造成的降解。在制剂开发研究期间,初始的分析测定侧重于外泌体在溶液中的稳定性和效力。这些测定包括外观、动态光散射(DLS)、IL-12AlphaLISA和基于人胚胎肾(HEK)细胞的报告基因试验。

[0862] 纯化后,exo-IL-12制剂呈半透明溶液,没有可见颗粒。通过将外泌体样品与欧洲药典的在玻璃安瓿中的颜色标准进行比较来确定颜色。已发现exoIL-12外泌体的直径大约为171nm,PDI值<0.25。

[0863] 对C-03的缓冲剂和冷冻保护剂研究导致选择了含有146mM(5%w/v)蔗糖、pH7.2的磷酸钠/钾缓冲剂用于CB-102原料药和C-03药物产品制剂,以优化质量和稳定性。进行了强制降解研究以了解潜在的稳定性指示测定。

[0864] 缓冲剂的选择

[0865] 使用pH3、5、7和9的各种缓冲剂在高温(37℃和50℃)下进行pH稳定性研究。

[0866] 缓冲剂-102起初是用缓冲剂交换到milliQ水中,并通过加入适当缓冲剂的浓缩原液调节至所需的pH值。调整pH后,通过外观、动态光散射(DLS)分析样品的尺寸和尺寸分布变化,并通过IL-12AlphaLISA定量游离与总(游离的和与外泌体缔合的)IL-12含量。

[0867] 冷冻保护剂的选择

[0868] 使用在含有和不含146mM(5%w/v)蔗糖的磷酸盐缓冲剂中的exoIL-12经受重复冻融(F/T)循环进行了一项研究。选择冷冻保护剂的浓度以达到生理渗透压(大约290mOsm/kg),并具有足够的磷酸盐缓冲能力(浓度)。仅将在milliQ水(MQ)和PBS中的ExoIL-12制备为对照样品,并进行3次冻融循环(F/T)。在0、1、3和10F/T下评价含有146mM蔗糖的磷酸盐缓

冲剂(选自缓冲剂选择研究)中的ExoIL-12。收集的样品通过外观、DLS和IL-12AlphaLISA测试方法进行评价。

[0869] 含有蔗糖的测试样品在10个F/T循环中的DLS尺寸保持稳定,测量值约为180nm。类似地,分布或多分散性指数(PDI)一直保持在0.15的低水平直到3个F/T循环,而在10个F/T循环后增加至0.2。未观察到颜色变化或浊度增加。对照外泌体分散在milliQ水或PBS中,经过3个F/T循环显示出明显的聚集和降解迹象。milliQ对照样品变得混浊并变为略带红色/橙色的颜色,而DLS尺寸 $>800\text{nm}$ 时清楚地显示聚集。仅PBS的外泌体的尺寸略大于测试样品,测量值为187nm,并且PDI与含有蔗糖的测试组的10F/T样品相似。仅PBS的外泌体通过显示聚集的外观表现出明显的浊度变化,但颜色没有变化。

[0870] IL-12AlphaLISA结果指示,在存在蔗糖的情况下,10F/T后,缔合的和游离的IL-12保持相似,分别为大约2300ng/mL和1-3% IL-12。观察到milliQ和仅PBS的外泌体的缔合IL-12的明显下降:分别下降24%和37%。游离IL-12的量分别略微增加至5%和4%。

[0871] 最终磷酸盐/蔗糖缓冲剂制剂的渗透压大约为300mOsm/kg。

[0872] 强制降解研究

[0873] 根据ICH Q1A (R2) 进行了强制降解研究,以评估药品在冻融、极端pH、氧化和机械应力等应力条件下的稳定性。

[0874] 冷冻和解冻研究的结果通常显示经过十个F/T循环没有显著的趋势。虽然观察到的外泌体尺寸和PDI值在10F/T后最大,但绝对差异不足够明显以表明对外泌体稳定性的真正影响。此外,直到10F/T,其他测试结果没有显示出显著的趋势。保守地说,C-03的直到五个冻融循环的稳定性得到了证实。

[0875] 实施例10:示例性组合物04制剂的开发

[0876] 将开发用于负载反义寡聚体的外泌体的药物产品制剂。将以C-03的药物产品制剂作为起点。相对于C-03药物产品,磷酸盐缓冲剂浓度(5mM磷酸二氢钾和15mM磷酸氢二钠)和pH(pH 7.2)将保持不变。氯化钠浓度将在约50mM至约150mM的浓度范围内测试,而蔗糖浓度将在约2.5%至5%(约73mM至约146mM)的浓度范围内测试。将根据以上实施例9和实施例10中描述的方法监测条件。将分析各种负载ASO的外泌体构建体,包括如本文所公开的负载靶向STAT6的ASO的外泌体。在水性Tris EDTA缓冲剂或纯水中,ASO与外泌体解离,因此氯化钠和蔗糖的组合可能在保留负载的ASO方面发挥作用。

[0877] 应当理解,旨在使用具体实施方式部分而非发明内容部分和摘要部分来对权利要求进行解释。发明内容部分和摘要部分可以阐述发明人所预期的本公开的一个或多个但不是全部示例性方面,并且因此,不旨在以任何方式限制本公开和所附权利要求。

[0878] 已借助于说明特定功能的实行方案和其关系的功能性建构基元在上文描述本公开。为便于描述,本文中已经任意地界定这些功能性结构单元的边界。只要适当地执行特定功能和其关系,就可界定替代边界。

[0879] 特定方面的前文描述将充分地揭露本公开的一般特性,以使得其他人通过应用本领域中的知识,在无不当实验且不背离本发明的一般概念的情况下,可轻易地针对各种应用对这些特定实施方案进行修改和/或改变。因此,基于本文呈现的教导和指导,这些适配和修改意图在公开方面的等效物的含义和范围内。应了解,本文的措辞或术语是出于描述而非限制的目的,因此本说明书的术语或措辞应由本领域技术人员根据教义和指导说明进

行解释。

[0880] 本公开的广度和范畴不应受任何上述示例性实施方案限制,而应仅根据以下权利要求和其等效物定义。

[0881] 本申请中的权利要求不同于母申请或其他相关申请中的权利要求。因此,申请人撤销在母申请或任何先前申请中与本申请有关的任何放弃权利要求范围的声明。因此,建议审查员需要重新审视以前的任何此类免责声明以及为避免其发生而引用的参考文献。此外,还提醒审查员,本申请中的任何免责声明都不应被理解为适用于或反对母申请。

[0882] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件出于所有目的在此以引用的方式整体并入本文,就如同每个单独的出版物、专利、专利申请和其他文件单独被指示为出于所有目的以引用的方式并入。

[0883] 虽然已经说明和描述了各种具体的方面,但上述说明并不是限制性的。应理解,可在不背离本公开的精神和范围的情况下做出各种改变。

序列表

<110> 科迪亚克生物科学公司

<120> 细胞外囊泡组合物

<130> 4000.069PC02

<150> US 62/906,018

<151> 2019-09-25

<150> US 62/906,485

<151> 2019-09-26

<160> 193

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 879

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Gly Arg Leu Ala Ser Arg Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Leu
1           5           10           15
Ala Leu Cys Arg Gly Arg Val Val Arg Val Pro Thr Ala Thr Leu Val
          20           25           30
Arg Val Val Gly Thr Glu Leu Val Ile Pro Cys Asn Val Ser Asp Tyr
          35           40           45
Asp Gly Pro Ser Glu Gln Asn Phe Asp Trp Ser Phe Ser Ser Leu Gly
          50           55           60
Ser Ser Phe Val Glu Leu Ala Ser Thr Trp Glu Val Gly Phe Pro Ala
65           70           75           80
Gln Leu Tyr Gln Glu Arg Leu Gln Arg Gly Glu Ile Leu Leu Arg Arg
          85           90           95
Thr Ala Asn Asp Ala Val Glu Leu His Ile Lys Asn Val Gln Pro Ser
          100          105          110
Asp Gln Gly His Tyr Lys Cys Ser Thr Pro Ser Thr Asp Ala Thr Val
          115          120          125
Gln Gly Asn Tyr Glu Asp Thr Val Gln Val Lys Val Leu Ala Asp Ser
          130          135          140
Leu His Val Gly Pro Ser Ala Arg Pro Pro Pro Ser Leu Ser Leu Arg
145          150          155          160
Glu Gly Glu Pro Phe Glu Leu Arg Cys Thr Ala Ala Ser Ala Ser Pro
          165          170          175
Leu His Thr His Leu Ala Leu Leu Trp Glu Val His Arg Gly Pro Ala

```

	180		185		190
Arg Arg Ser Val Leu Ala Leu Thr His Glu Gly Arg Phe His Pro Gly					
195			200		205
Leu Gly Tyr Glu Gln Arg Tyr His Ser Gly Asp Val Arg Leu Asp Thr					
210			215		220
Val Gly Ser Asp Ala Tyr Arg Leu Ser Val Ser Arg Ala Leu Ser Ala					
225			230		235
240					
Asp Gln Gly Ser Tyr Arg Cys Ile Val Ser Glu Trp Ile Ala Glu Gln					
245			250		255
Gly Asn Trp Gln Glu Ile Gln Glu Lys Ala Val Glu Val Ala Thr Val					
260			265		270
Val Ile Gln Pro Ser Val Leu Arg Ala Ala Val Pro Lys Asn Val Ser					
275			280		285
Val Ala Glu Gly Lys Glu Leu Asp Leu Thr Cys Asn Ile Thr Thr Asp					
290			295		300
Arg Ala Asp Asp Val Arg Pro Glu Val Thr Trp Ser Phe Ser Arg Met					
305			310		315
320					
Pro Asp Ser Thr Leu Pro Gly Ser Arg Val Leu Ala Arg Leu Asp Arg					
325			330		335
Asp Ser Leu Val His Ser Ser Pro His Val Ala Leu Ser His Val Asp					
340			345		350
Ala Arg Ser Tyr His Leu Leu Val Arg Asp Val Ser Lys Glu Asn Ser					
355			360		365
Gly Tyr Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Trp Ala Pro Gly His Asn Arg					
370			375		380
Ser Trp His Lys Val Ala Glu Ala Val Ser Ser Pro Ala Gly Val Gly					
385			390		395
400					
Val Thr Trp Leu Glu Pro Asp Tyr Gln Val Tyr Leu Asn Ala Ser Lys					
405			410		415
Val Pro Gly Phe Ala Asp Asp Pro Thr Glu Leu Ala Cys Arg Val Val					
420			425		430
Asp Thr Lys Ser Gly Glu Ala Asn Val Arg Phe Thr Val Ser Trp Tyr					
435			440		445
Tyr Arg Met Asn Arg Arg Ser Asp Asn Val Val Thr Ser Glu Leu Leu					
450			455		460
Ala Val Met Asp Gly Asp Trp Thr Leu Lys Tyr Gly Glu Arg Ser Lys					
465			470		475
480					
Gln Arg Ala Gln Asp Gly Asp Phe Ile Phe Ser Lys Glu His Thr Asp					
485			490		495

Thr Phe Asn Phe Arg Ile Gln Arg Thr Thr Glu Glu Asp Arg Gly Asn		
500	505	510
Tyr Tyr Cys Val Val Ser Ala Trp Thr Lys Gln Arg Asn Asn Ser Trp		
515	520	525
Val Lys Ser Lys Asp Val Phe Ser Lys Pro Val Asn Ile Phe Trp Ala		
530	535	540
Leu Glu Asp Ser Val Leu Val Val Lys Ala Arg Gln Pro Lys Pro Phe		
545	550	555
Phe Ala Ala Gly Asn Thr Phe Glu Met Thr Cys Lys Val Ser Ser Lys		
565	570	575
Asn Ile Lys Ser Pro Arg Tyr Ser Val Leu Ile Met Ala Glu Lys Pro		
580	585	590
Val Gly Asp Leu Ser Ser Pro Asn Glu Thr Lys Tyr Ile Ile Ser Leu		
595	600	605
Asp Gln Asp Ser Val Val Lys Leu Glu Asn Trp Thr Asp Ala Ser Arg		
610	615	620
Val Asp Gly Val Val Leu Glu Lys Val Gln Glu Asp Glu Phe Arg Tyr		
625	630	635
Arg Met Tyr Gln Thr Gln Val Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Arg Cys Met		
645	650	655
Val Thr Ala Trp Ser Pro Val Arg Gly Ser Leu Trp Arg Glu Ala Ala		
660	665	670
Thr Ser Leu Ser Asn Pro Ile Glu Ile Asp Phe Gln Thr Ser Gly Pro		
675	680	685
Ile Phe Asn Ala Ser Val His Ser Asp Thr Pro Ser Val Ile Arg Gly		
690	695	700
Asp Leu Ile Lys Leu Phe Cys Ile Ile Thr Val Glu Gly Ala Ala Leu		
705	710	715
Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp Val Ser Trp Phe Ala Val His Ser		
725	730	735
Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Leu Ser Ser Leu Asp Arg Lys		
740	745	750
Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg Asp Trp Lys Ser Asp Leu Ser Leu		
755	760	765
Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe Leu Leu Gln Val His Gly Ser Glu		
770	775	780
Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser Val Thr Pro Trp Val Lys		
785	790	795
Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys Glu Ala Glu Ile His Ser Lys Pro		

	805		810		815
Val Phe Ile Thr	Val Lys Met Asp	Val Leu Asn Ala	Phe Lys Tyr Pro		
	820		825		830
Leu Leu Ile Gly	Val Gly Leu Ser	Thr Val Ile Gly	Leu Leu Ser Cys		
	835		840		845
Leu Ile Gly Tyr	Cys Ser Ser His	Trp Cys Cys Lys	Lys Glu Val Gln		
	850		855		860
Glu Thr Arg Arg	Glu Arg Arg Arg	Leu Met Ser Met	Glu Met Asp		
865		870		875	
<210> 2					
<211> 731					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> PTGFRN蛋白质片段#1					
<400> 2					
Pro Ser Ala Arg	Pro Pro Pro Ser	Leu Ser Leu Arg	Glu Gly Glu Pro		
1	5	10	15		
Phe Glu Leu Arg	Cys Thr Ala Ala	Ser Ala Ser Pro	Leu His Thr His		
	20	25	30		
Leu Ala Leu Leu	Trp Glu Val His	Arg Gly Pro Ala	Arg Arg Ser Val		
	35	40	45		
Leu Ala Leu Thr	His Glu Gly Arg	Phe His Pro Gly	Leu Gly Tyr Glu		
	50	55	60		
Gln Arg Tyr His	Ser Gly Asp Val	Arg Leu Asp Thr	Val Gly Ser Asp		
65	70	75	80		
Ala Tyr Arg Leu	Ser Val Ser Arg	Ala Leu Ser Ala	Asp Gln Gly Ser		
	85	90	95		
Tyr Arg Cys Ile	Val Ser Glu Trp	Ile Ala Glu Gln	Gly Asn Trp Gln		
	100	105	110		
Glu Ile Gln Glu	Lys Ala Val Glu	Val Ala Thr Val	Val Ile Gln Pro		
	115	120	125		
Ser Val Leu Arg	Ala Ala Val Pro	Lys Asn Val Ser	Val Ala Glu Gly		
	130	135	140		
Lys Glu Leu Asp	Leu Thr Cys Asn	Ile Thr Thr Asp	Arg Ala Asp Asp		
145	150	155	160		
Val Arg Pro Glu	Val Thr Trp Ser	Phe Ser Arg Met	Pro Asp Ser Thr		
	165	170	175		
Leu Pro Gly Ser	Arg Val Leu Ala	Arg Leu Asp Arg	Asp Ser Leu Val		

180	185	190
His Ser Ser Pro His Val Ala Leu Ser His Val Asp Ala Arg Ser Tyr		
195	200	205
His Leu Leu Val Arg Asp Val Ser Lys Glu Asn Ser Gly Tyr Tyr Tyr		
210	215	220
Cys His Val Ser Leu Trp Ala Pro Gly His Asn Arg Ser Trp His Lys		
225	230	235
Val Ala Glu Ala Val Ser Ser Pro Ala Gly Val Gly Val Thr Trp Leu		
245	250	255
Glu Pro Asp Tyr Gln Val Tyr Leu Asn Ala Ser Lys Val Pro Gly Phe		
260	265	270
Ala Asp Asp Pro Thr Glu Leu Ala Cys Arg Val Val Asp Thr Lys Ser		
275	280	285
Gly Glu Ala Asn Val Arg Phe Thr Val Ser Trp Tyr Tyr Arg Met Asn		
290	295	300
Arg Arg Ser Asp Asn Val Val Thr Ser Glu Leu Leu Ala Val Met Asp		
305	310	315
Gly Asp Trp Thr Leu Lys Tyr Gly Glu Arg Ser Lys Gln Arg Ala Gln		
325	330	335
Asp Gly Asp Phe Ile Phe Ser Lys Glu His Thr Asp Thr Phe Asn Phe		
340	345	350
Arg Ile Gln Arg Thr Thr Glu Glu Asp Arg Gly Asn Tyr Tyr Cys Val		
355	360	365
Val Ser Ala Trp Thr Lys Gln Arg Asn Asn Ser Trp Val Lys Ser Lys		
370	375	380
Asp Val Phe Ser Lys Pro Val Asn Ile Phe Trp Ala Leu Glu Asp Ser		
385	390	395
Val Leu Val Val Lys Ala Arg Gln Pro Lys Pro Phe Phe Ala Ala Gly		
405	410	415
Asn Thr Phe Glu Met Thr Cys Lys Val Ser Ser Lys Asn Ile Lys Ser		
420	425	430
Pro Arg Tyr Ser Val Leu Ile Met Ala Glu Lys Pro Val Gly Asp Leu		
435	440	445
Ser Ser Pro Asn Glu Thr Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Asp Gln Asp Ser		
450	455	460
Val Val Lys Leu Glu Asn Trp Thr Asp Ala Ser Arg Val Asp Gly Val		
465	470	475
Val Leu Glu Lys Val Gln Glu Asp Glu Phe Arg Tyr Arg Met Tyr Gln		
485	490	495

Thr	Gln	Val	Ser	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Arg	Cys	Met	Val	Thr	Ala	Trp	
500					505					510						
Ser	Pro	Val	Arg	Gly	Ser	Leu	Trp	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	
515					520					525						
Asn	Pro	Ile	Glu	Ile	Asp	Phe	Gln	Thr	Ser	Gly	Pro	Ile	Phe	Asn	Ala	
530					535					540						
Ser	Val	His	Ser	Asp	Thr	Pro	Ser	Val	Ile	Arg	Gly	Asp	Leu	Ile	Lys	
545					550					555					560	
Leu	Phe	Cys	Ile	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Asp	
565					570					575						
Met	Ala	Phe	Asp	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Val	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Asp	
580					585					590						
Lys	Ala	Pro	Val	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Asp	Arg	Lys	Gly	Ile	Val	Thr	
595					600					605						
Thr	Ser	Arg	Arg	Asp	Trp	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Ser	
610					615					620						
Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Val	His	Gly	Ser	Glu	Asp	Gln	Asp	Phe	
625					630					635					640	
Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Val	Thr	Pro	Trp	Val	Lys	Ser	Pro	Thr	Gly	
645					650					655						
Ser	Trp	Gln	Lys	Glu	Ala	Glu	Ile	His	Ser	Lys	Pro	Val	Phe	Ile	Thr	
660					665					670						
Val	Lys	Met	Asp	Val	Leu	Asn	Ala	Phe	Lys	Tyr	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	
675					680					685						
Val	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Ile	Gly	Tyr	
690					695					700						
Cys	Ser	Ser	His	Trp	Cys	Cys	Lys	Lys	Glu	Val	Gln	Glu	Thr	Arg	Arg	
705					710					715					720	
Glu	Arg	Arg	Arg	Leu	Met	Ser	Met	Glu	Met	Asp						
725					730											

<210> 3

<211> 611

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PTGFRN蛋白质片段#2

<400> 3

Val	Ala	Thr	Val	Val	Ile	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Ala	Ala	Val	Pro
1				5					10					15	

Lys	Asn	Val	Ser	Val	Ala	Glu	Gly	Lys	Glu	Leu	Asp	Leu	Thr	Cys	Asn
20				25				30							
Ile	Thr	Thr	Asp	Arg	Ala	Asp	Asp	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Thr	Trp	Ser
35				40				45							
Phe	Ser	Arg	Met	Pro	Asp	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Ser	Arg	Val	Leu	Ala
50				55				60							
Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	His	Ser	Ser	Pro	His	Val	Ala	Leu
65				70				75				80			
Ser	His	Val	Asp	Ala	Arg	Ser	Tyr	His	Leu	Leu	Val	Arg	Asp	Val	Ser
85				90				95							
Lys	Glu	Asn	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Cys	His	Val	Ser	Leu	Trp	Ala	Pro
100				105				110							
Gly	His	Asn	Arg	Ser	Trp	His	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Val	Ser	Ser	Pro
115				120				125							
Ala	Gly	Val	Gly	Val	Thr	Trp	Leu	Glu	Pro	Asp	Tyr	Gln	Val	Tyr	Leu
130				135				140							
Asn	Ala	Ser	Lys	Val	Pro	Gly	Phe	Ala	Asp	Asp	Pro	Thr	Glu	Leu	Ala
145				150				155				160			
Cys	Arg	Val	Val	Asp	Thr	Lys	Ser	Gly	Glu	Ala	Asn	Val	Arg	Phe	Thr
165				170				175							
Val	Ser	Trp	Tyr	Tyr	Arg	Met	Asn	Arg	Arg	Ser	Asp	Asn	Val	Val	Thr
180				185				190							
Ser	Glu	Leu	Leu	Ala	Val	Met	Asp	Gly	Asp	Trp	Thr	Leu	Lys	Tyr	Gly
195				200				205							
Glu	Arg	Ser	Lys	Gln	Arg	Ala	Gln	Asp	Gly	Asp	Phe	Ile	Phe	Ser	Lys
210				215				220							
Glu	His	Thr	Asp	Thr	Phe	Asn	Phe	Arg	Ile	Gln	Arg	Thr	Thr	Glu	Glu
225				230				235				240			
Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Val	Val	Ser	Ala	Trp	Thr	Lys	Gln	Arg
245				250				255							
Asn	Asn	Ser	Trp	Val	Lys	Ser	Lys	Asp	Val	Phe	Ser	Lys	Pro	Val	Asn
260				265				270							
Ile	Phe	Trp	Ala	Leu	Glu	Asp	Ser	Val	Leu	Val	Val	Lys	Ala	Arg	Gln
275				280				285							
Pro	Lys	Pro	Phe	Phe	Ala	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Glu	Met	Thr	Cys	Lys
290				295				300							
Val	Ser	Ser	Lys	Asn	Ile	Lys	Ser	Pro	Arg	Tyr	Ser	Val	Leu	Ile	Met
305				310				315				320			
Ala	Glu	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Tyr

	325		330		335
Ile Ile Ser Leu Asp Gln Asp Ser Val Val Lys Leu Glu Asn Trp Thr					
	340		345		350
Asp Ala Ser Arg Val Asp Gly Val Val Leu Glu Lys Val Gln Glu Asp					
	355		360		365
Glu Phe Arg Tyr Arg Met Tyr Gln Thr Gln Val Ser Asp Ala Gly Leu					
	370		375		380
Tyr Arg Cys Met Val Thr Ala Trp Ser Pro Val Arg Gly Ser Leu Trp					
385		390		395	400
Arg Glu Ala Ala Thr Ser Leu Ser Asn Pro Ile Glu Ile Asp Phe Gln					
	405		410		415
Thr Ser Gly Pro Ile Phe Asn Ala Ser Val His Ser Asp Thr Pro Ser					
	420		425		430
Val Ile Arg Gly Asp Leu Ile Lys Leu Phe Cys Ile Ile Thr Val Glu					
	435		440		445
Gly Ala Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp Val Ser Trp Phe					
	450		455		460
Ala Val His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Leu Ser Ser					
465		470		475	480
Leu Asp Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg Asp Trp Lys Ser					
	485		490		495
Asp Leu Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe Leu Leu Gln Val					
	500		505		510
His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser Val Thr					
	515		520		525
Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys Glu Ala Glu Ile					
	530		535		540
His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp Val Leu Asn Ala					
545		550		555	560
Phe Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly Leu Ser Thr Val Ile Gly					
	565		570		575
Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His Trp Cys Cys Lys					
	580		585		590
Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met Ser Met					
	595		600		605
Glu Met Asp					
	610				
<210> 4					
<211> 485					

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PTGFRN蛋白质片段#3

<400> 4

```

Ser Pro Ala Gly Val Gly Val Thr Trp Leu Glu Pro Asp Tyr Gln Val
1           5           10           15
Tyr Leu Asn Ala Ser Lys Val Pro Gly Phe Ala Asp Asp Pro Thr Glu
          20           25           30
Leu Ala Cys Arg Val Val Asp Thr Lys Ser Gly Glu Ala Asn Val Arg
          35           40           45
Phe Thr Val Ser Trp Tyr Tyr Arg Met Asn Arg Arg Ser Asp Asn Val
          50           55           60
Val Thr Ser Glu Leu Leu Ala Val Met Asp Gly Asp Trp Thr Leu Lys
65           70           75           80
Tyr Gly Glu Arg Ser Lys Gln Arg Ala Gln Asp Gly Asp Phe Ile Phe
          85           90           95
Ser Lys Glu His Thr Asp Thr Phe Asn Phe Arg Ile Gln Arg Thr Thr
          100          105          110
Glu Glu Asp Arg Gly Asn Tyr Tyr Cys Val Val Ser Ala Trp Thr Lys
          115          120          125
Gln Arg Asn Asn Ser Trp Val Lys Ser Lys Asp Val Phe Ser Lys Pro
          130          135          140
Val Asn Ile Phe Trp Ala Leu Glu Asp Ser Val Leu Val Val Lys Ala
          145          150          155          160
Arg Gln Pro Lys Pro Phe Phe Ala Ala Gly Asn Thr Phe Glu Met Thr
          165          170          175
Cys Lys Val Ser Ser Lys Asn Ile Lys Ser Pro Arg Tyr Ser Val Leu
          180          185          190
Ile Met Ala Glu Lys Pro Val Gly Asp Leu Ser Ser Pro Asn Glu Thr
          195          200          205
Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Asp Gln Asp Ser Val Val Lys Leu Glu Asn
          210          215          220
Trp Thr Asp Ala Ser Arg Val Asp Gly Val Val Leu Glu Lys Val Gln
          225          230          235          240
Glu Asp Glu Phe Arg Tyr Arg Met Tyr Gln Thr Gln Val Ser Asp Ala
          245          250          255
Gly Leu Tyr Arg Cys Met Val Thr Ala Trp Ser Pro Val Arg Gly Ser
          260          265          270

```

Leu Trp Arg Glu Ala Ala Thr Ser Leu Ser Asn Pro Ile Glu Ile Asp
 275 280 285
 Phe Gln Thr Ser Gly Pro Ile Phe Asn Ala Ser Val His Ser Asp Thr
 290 295 300
 Pro Ser Val Ile Arg Gly Asp Leu Ile Lys Leu Phe Cys Ile Ile Thr
 305 310 315 320
 Val Glu Gly Ala Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp Val Ser
 325 330 335
 Trp Phe Ala Val His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Leu
 340 345 350
 Ser Ser Leu Asp Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg Asp Trp
 355 360 365
 Lys Ser Asp Leu Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe Leu Leu
 370 375 380
 Gln Val His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser
 385 390 395 400
 Val Thr Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys Glu Ala
 405 410 415
 Glu Ile His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp Val Leu
 420 425 430
 Asn Ala Phe Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly Leu Ser Thr Val
 435 440 445
 Ile Gly Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His Trp Cys
 450 455 460
 Cys Lys Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met
 465 470 475 480
 Ser Met Glu Met Asp
 485

<210> 5

<211> 343

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PTGFRN蛋白质片段#4

<400> 5

Lys Pro Val Asn Ile Phe Trp Ala Leu Glu Asp Ser Val Leu Val Val
 1 5 10 15
 Lys Ala Arg Gln Pro Lys Pro Phe Phe Ala Ala Gly Asn Thr Phe Glu
 20 25 30

Met Thr Cys Lys Val Ser Ser Lys Asn Ile Lys Ser Pro Arg Tyr Ser		
35	40	45
Val Leu Ile Met Ala Glu Lys Pro Val Gly Asp Leu Ser Ser Pro Asn		
50	55	60
Glu Thr Lys Tyr Ile Ile Ser Leu Asp Gln Asp Ser Val Val Lys Leu		
65	70	75
Glu Asn Trp Thr Asp Ala Ser Arg Val Asp Gly Val Val Leu Glu Lys		
85	90	95
Val Gln Glu Asp Glu Phe Arg Tyr Arg Met Tyr Gln Thr Gln Val Ser		
100	105	110
Asp Ala Gly Leu Tyr Arg Cys Met Val Thr Ala Trp Ser Pro Val Arg		
115	120	125
Gly Ser Leu Trp Arg Glu Ala Ala Thr Ser Leu Ser Asn Pro Ile Glu		
130	135	140
Ile Asp Phe Gln Thr Ser Gly Pro Ile Phe Asn Ala Ser Val His Ser		
145	150	155
Asp Thr Pro Ser Val Ile Arg Gly Asp Leu Ile Lys Leu Phe Cys Ile		
165	170	175
Ile Thr Val Glu Gly Ala Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp		
180	185	190
Val Ser Trp Phe Ala Val His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val		
195	200	205
Leu Leu Ser Ser Leu Asp Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg		
210	215	220
Asp Trp Lys Ser Asp Leu Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe		
225	230	235
Leu Leu Gln Val His Gly Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr		
245	250	255
Cys Ser Val Thr Pro Trp Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys		
260	265	270
Glu Ala Glu Ile His Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp		
275	280	285
Val Leu Asn Ala Phe Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly Leu Ser		
290	295	300
Thr Val Ile Gly Leu Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His		
305	310	315
Trp Cys Cys Lys Lys Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg		
325	330	335
Leu Met Ser Met Glu Met Asp		

340

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PTGFRN蛋白质片段#5

<400> 6

Val	Arg	Gly	Ser	Leu	Trp	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Asn	Pro
1				5					10					15	
Ile	Glu	Ile	Asp	Phe	Gln	Thr	Ser	Gly	Pro	Ile	Phe	Asn	Ala	Ser	Val
			20					25					30		
His	Ser	Asp	Thr	Pro	Ser	Val	Ile	Arg	Gly	Asp	Leu	Ile	Lys	Leu	Phe
		35					40				45				
Cys	Ile	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Asp	Met	Ala
	50					55				60					
Phe	Asp	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Val	His	Ser	Phe	Gly	Leu	Asp	Lys	Ala
65				70					75					80	
Pro	Val	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Asp	Arg	Lys	Gly	Ile	Val	Thr	Thr	Ser
			85					90					95		
Arg	Arg	Asp	Trp	Lys	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Ser	Val	Leu
		100					105					110			
Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Val	His	Gly	Ser	Glu	Asp	Gln	Asp	Phe	Gly	Asn
	115					120				125					
Tyr	Tyr	Cys	Ser	Val	Thr	Pro	Trp	Val	Lys	Ser	Pro	Thr	Gly	Ser	Trp
	130					135				140					
Gln	Lys	Glu	Ala	Glu	Ile	His	Ser	Lys	Pro	Val	Phe	Ile	Thr	Val	Lys
145				150					155					160	
Met	Asp	Val	Leu	Asn	Ala	Phe	Lys	Tyr	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Gly
			165					170				175			
Leu	Ser	Thr	Val	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Ile	Gly	Tyr	Cys	Ser
		180					185				190				
Ser	His	Trp	Cys	Cys	Lys	Lys	Glu	Val	Gln	Glu	Thr	Arg	Arg	Glu	Arg
	195					200					205				
Arg	Arg	Leu	Met	Ser	Met	Glu	Met	Asp							
	210				215										

<210> 7

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PTGFRN蛋白质片段#6

<400> 7

Ser Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp Val Leu Asn Ala Phe

1 5 10 15

Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly Leu Ser Thr Val Ile Gly Leu

20 25 30

Leu Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His Trp Cys Cys Lys Lys

35 40 45

Glu Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met Ser Met Glu

50 55 60

Met Asp

65

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PTGFRN蛋白质 - 信号肽

<400> 8

Met Gly Arg Leu Ala Ser Arg Pro Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Ala Leu Cys Arg Gly

20

<210> 9

<211> 193

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PTGFRN蛋白质片段#7

<400> 9

Gly Pro Ile Phe Asn Ala Ser Val His Ser Asp Thr Pro Ser Val Ile

1 5 10 15

Arg Gly Asp Leu Ile Lys Leu Phe Cys Ile Ile Thr Val Glu Gly Ala

20 25 30

Ala Leu Asp Pro Asp Asp Met Ala Phe Asp Val Ser Trp Phe Ala Val

35 40 45

His Ser Phe Gly Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Leu Ser Ser Leu Asp

50	55	60
Arg Lys Gly Ile Val Thr Thr Ser Arg Arg Asp Trp Lys Ser Asp Leu		
65	70	75
Ser Leu Glu Arg Val Ser Val Leu Glu Phe Leu Leu Gln Val His Gly		
85	90	95
Ser Glu Asp Gln Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Ser Val Thr Pro Trp		
100	105	110
Val Lys Ser Pro Thr Gly Ser Trp Gln Lys Glu Ala Glu Ile His Ser		
115	120	125
Lys Pro Val Phe Ile Thr Val Lys Met Asp Val Leu Asn Ala Phe Lys		
130	135	140
Tyr Pro Leu Leu Ile Gly Val Gly Leu Ser Thr Val Ile Gly Leu Leu		
145	150	155
Ser Cys Leu Ile Gly Tyr Cys Ser Ser His Trp Cys Cys Lys Lys Glu		
165	170	175
Val Gln Glu Thr Arg Arg Glu Arg Arg Arg Leu Met Ser Met Glu Met		
180	185	190

Asp

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<400> 11

000

<210> 12

<400> 12

000

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<400> 14

000

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<400> 16

000

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<400> 19

000

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<400> 22

000

<210> 23

<211> 3963

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> STAT6

<400> 23

```

ggggcagcca ctgcttacac tgaagaggga ggacgggaga ggagtgtgtg tgtgtgtgtg 60
tgtgtgtgtg tgtatgtatg tgtgtgcttt atcttatttt tcttttttgt ggtggtggtg 120
gaagggggga ggtgctagca gggccagcct tgaactcgct ggacagagct acagacctat 180
ggggcctgga agtgcccgtt gagaaaggga gaagacagca gaggggttgc cgaggcaacc 240
tccaagtccc agatcatgtc tctgtggggg ctggtctcca agatgcccc agaaaaagt 300
cagcggctct atgtcgactt tccccaacac ctgcggcatc ttctgggtga ctggctggag 360
agccagccct gggagttcct ggtcggtctc gacgccttct gctgcaactt ggctagtgcc 420
ctactttcag aactgtcca gcaccttcag gcctcggtgg gagagcaggg ggaggggagc 480
accatcttgc aacacatcag caccettgag agcatatata agagggaccc cctgaagctg 540
gtggccactt tcagacaaat acttcaagga gagaaaaaag ctgttatgga acagttccgc 600
cacttgccaa tgcttttcca ctggaagcag gaagaactca agtttaagac aggcttgagg 660
aggctgcagc accgagtagg ggagatccac cttctccgag aagccctgca gaagggggct 720
gaggctggcc aagtgtctct gcacagcttg atagaaactc ctgctaattg gactgggcca 780
agtgaggccc tggccatgct actgcaggag accactggag agctagaggc agccaaagcc 840

```

ctagtgctga agaggatcca gatttggaaa cggcagcagc agctggcagg gaatggcgca 900
 ccgtttgagg agagcctggc cccactccag gagaggtgtg aaagcctggt ggacatttat 960
 tcccagctac agcaggaggt aggggaggct ggtggggagc ttgagcccaa gacccgggca 1020
 tcgctgactg gccggctgga tgaagtcctg agaaccctcg tcaccagttg cttcctggtg 1080
 gagaagcagc ccccccaggt actgaagact cagaccaagt tccaggctgg agttcgattc 1140
 ctgttgggct tgaggttcct gggggcccca gccaaagcctc cgctggtcag ggccgacatg 1200
 gtgacagaga agcaggcgcg ggagctgagt gtgcctcagg gtcctggggc tggagcagaa 1260
 agcactggag aaatcatcaa caaactgtg cccttggaga acagcattcc tgggaactgc 1320
 tgctctgccc tgttcaagaa cctgtcttc aagaagatca agcgggtgtg gcggaagggc 1380
 actgagtctg tcacagagga gaagtgcgct gtgctcttct ctgccagctt cacacttggc 1440
 cccggcaaac tccccatcca gctccaggcc ctgtctctgc ccttgggtgtg catcgtccat 1500
 ggcaaccaag acaacaatgc caaagccact atcctgtggg acaatgcctt ctctgagatg 1560
 gaccgcgtgc cctttgtggt ggtgagcggt gtgccttggg agaagatgtg tgaaactctg 1620
 aacctgaagt tcatggctga ggtggggacc aaccgggggc tgctcccaga gcaattcctc 1680
 ttcttgcccc agaagatctt caatgacaac agcctcagta tggaggcctt ccagcacctg 1740
 tctgtgtcct ggtcgcagtt caacaaggag atcctgctgg gccgtggctt caccttttgg 1800
 cagtggtttg atggtgtcct ggacctcacc aaacgctgtc tccggagcta ctggtctgac 1860
 cggctgatca ttggcttcat cagcaaacag tacgttacta gccttcttct caatgagccc 1920
 gacggaacct ttctcctccg cttcagcgac tcagagattg ggggcatcac cattgcccac 1980
 gtcacccggg gccaggatgg ctctccacag atagagaaca tccagccatt ctctgccaaa 2040
 gacctgtcca ttgctcact gggggaccga atccgggatc ttgctcagct caaaaatctc 2100
 tatcccaaga agcccaagga tgaggctttc cggagccact acaagcctga acagatgggt 2160
 aaggatggca ggggttatgt cccagctacc atcaagatga ccgtggaaag ggaccaacca 2220
 cttcctaccc cagagctcca gatgcctacc atggtgcctt cttatgacct tggaatggcc 2280
 cctgattcct ccatgagcat gcagcttggc ccagatatgg tgccccaggt gtaccacca 2340
 cactctcact ccatcccccc gtatcaaggc ctctccccag aagaatcagt caacgtgttg 2400
 tcagccttcc aggagcctca cctgcagatg cccccagcc tgggccagat gaggctgccc 2460
 tttgaccagc ctcacccccca gggcctgctg ccgtgccagc ctcaggagca tgctgtgtcc 2520
 agccctgacc ccctgctctg ctcagatgtg accatggtgg aagacagctg cctgagccag 2580
 ccagtacag cgtttctca gggcacttgg attggtgaag acatattccc tcctctgctg 2640
 cctcccaactg aacaggacct cactaagctt ctcttggagg ggcaagggga gtcgggggga 2700
 gggtccttgg gggcacagcc cctcctgcag ccctccact atgggcaatc tgggatctca 2760
 atgtcccaca tggacctaaag ggccaacccc agttggtgat cccagctgga gggagaaccc 2820
 aaagagacag ctcttctact acccccacag acctgctctg gacatttgc catgcctgc 2880
 caagcagcag atggggaggg tgccctccta tccccaccta ctctgggtc aggaggaaaa 2940
 gactaacagg agaatgcaca gtgggtggag ccaatccact ccttcttttc tatcattccc 3000
 ctgcccacct ccttccagca ctgactggaa gggaagtcca ggctctgaga cacaccccaa 3060
 catgcctgca cctgcagcgc gcacacgcac gcacacacac atacagagct ctctgagggt 3120
 gatggggctg agcaggaggg gggctgggta agagcacagg ttagggcatg gaaggcttct 3180

ccgccccattc tgacccaggg cctaggacgg ataggcagga acatacagac acattttacac 3240
tagaggccag ggatagagga tattgggtct cagccctagg ggaatgggaa gcagctcaag 3300
ggaccctggg tgggagcata ggaggggtct ggacatgtgg ttactagtag aggttttgcc 3360
ctgattaaaa aatctcccaa agccccaaat tcctgttagc caggtggagg cttctgatac 3420
gtgtatgaga ctatgcaaaa gtacaagggc tgagattctt cgtgtatagc tgtgtgaacg 3480
tgtatgtacc taggatatgt taaatgtata gctggcacct tagttgcatg accacataga 3540
acatgtgtct atctgctttt gcctacgtga caacacaaat ttgggagggt gagacactgc 3600
acagaagaca gcagcaagtg tgctggcctc tctgacatat gctaaccccc aaatactctg 3660
aatittggagt ctgactgtgc ccaagtgggt ccaagtggct gtgacatcta cgtatggctc 3720
cacacctcca atgctgcctg ggagccaggg tgagagtctg ggtccaggcc tggccatgtg 3780
gccctccagt gtatgagagg gccctgcctg ctgcatcttt tctgttgccc catccaccgc 3840
cagcttccct tcaactccct atcccattct cctctcaag gcaggggtca tagatcctaa 3900
gccataaaat aaattttatt ccaaaataac aaaataaata atctactgta cacaatctga 3960
aaa 3963
<210> 24
<400> 24
000
<210> 25
<400> 25
000
<210> 26
<400> 26
000
<210> 27
<400> 27
000
<210> 28
<400> 28
000
<210> 29
<400> 29
000
<210> 30
<400> 30
000
<210> 31
<400> 31
000
<210> 32

<400> 32
000
<210> 33
<400> 33
000
<210> 34
<400> 34
000
<210> 35
<400> 35
000
<210> 36
<400> 36
000
<210> 37
<400> 37
000
<210> 38
<400> 38
000
<210> 39
<400> 39
000
<210> 40
<400> 40
000
<210> 41
<400> 41
000
<210> 42
<400> 42
000
<210> 43
<400> 43
000
<210> 44
<400> 44
000
<210> 45

<400> 45
000
<210> 46
<400> 46
000
<210> 47
<400> 47
000
<210> 48
<400> 48
000
<210> 49
<400> 49
000
<210> 50
<400> 50
000
<210> 51
<400> 51
000
<210> 52
<400> 52
000
<210> 53
<400> 53
000
<210> 54
<400> 54
000
<210> 55
<400> 55
000
<210> 56
<400> 56
000
<210> 57
<400> 57
000
<210> 58

<400> 58
000
<210> 59
<400> 59
000
<210> 60
<400> 60
000
<210> 61
<400> 61
000
<210> 62
<400> 62
000
<210> 63
<400> 63
000
<210> 64
<400> 64
000
<210> 65
<400> 65
000
<210> 66
<400> 66
000
<210> 67
<400> 67
000
<210> 68
<400> 68
000
<210> 69
<400> 69
000
<210> 70
<400> 70
000
<210> 71

<400> 71
000
<210> 72
<400> 72
000
<210> 73
<400> 73
000
<210> 74
<400> 74
000
<210> 75
<400> 75
000
<210> 76
<400> 76
000
<210> 77
<400> 77
000
<210> 78
<400> 78
000
<210> 79
<400> 79
000
<210> 80
<400> 80
000
<210> 81
<400> 81
000
<210> 82
<400> 82
000
<210> 83
<400> 83
000
<210> 84

<400> 84
000
<210> 85
<400> 85
000
<210> 86
<400> 86
000
<210> 87
<400> 87
000
<210> 88
<400> 88
000
<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 反义寡核苷酸
<400> 89
tgagcgaatg gacaggtctt 20
<210> 90
<400> 90
000
<210> 91
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 91
ctggtgacga gggtt 15
<210> 92
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽

<400> 92
cgctcacacc gcttg 15
<210> 93
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 93
aggctagtaa cgtac 15
<210> 94
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 94
gaaggctagt aacgt 15
<210> 95
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 95
ggttccgtcg ggctc 15
<210> 96
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 96
aggttccgtc gggct 15
<210> 97
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成肽
<400> 97
aaggttccgt cgggc 15
<210> 98
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 98
aaaggttccg tcggg 15
<210> 99
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 99
gaaaggttcc gtcgg 15
<210> 100
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 100
agaaaggttc cgtcg 15
<210> 101
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 101
agtcgctgaa gcgga 15
<210> 102
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽
<400> 102
gagtcgctga agcgg 15
<210> 103
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 103
cggattcgggt ccccc 15
<210> 104
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 104
ccggattcgg tcccc 15
<210> 105
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 105
cccggattcg gtccc 15
<210> 106
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 106
tcccggattc ggtcc 15
<210> 107
<211> 15
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 107

gatccccggat tcggt 15

<210> 108

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 108

agatccccgga ttcgg 15

<210> 109

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 109

aagatccccgg attcg 15

<210> 110

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 110

tgatacggggg ggatg 15

<210> 111

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 111

cgtgtgcgcg ctgca 15

<210> 112

<211> 16

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 112
actggtgacg aggggt 16
<210> 113
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 113
aactggtgac gaggggt 16
<210> 114
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 114
ctcacaccgc ttgatc 16
<210> 115
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 115
cggtcagacc agtagc 16
<210> 116
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 116
ctagtaacgt actgtt 16
<210> 117

<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 117
gctagtaacg tactgt 16
<210> 118
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 118
ggctagtaac gtactg 16
<210> 119
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 119
aggctagtaa cgtact 16
<210> 120
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 120
aaggctagta acgtac 16
<210> 121
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 121
aagaaggcta gtaacg 16

<210> 122
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 122
aaaggttccg tcgggc 16
<210> 123
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 123
agaaaggttc cgtcgg 16
<210> 124
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 124
ttcgggtcccc cagtga 16
<210> 125
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 125
cggattcggc ccccca 16
<210> 126
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 126

agatccccgga ttcggt 16

<210> 127

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 127

agcaagatcc cggatt 16

<210> 128

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 128

tgatacgggg ggatgg 16

<210> 129

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 129

ttgatacggg gggatg 16

<210> 130

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 130

agaggccttg atacgg 16

<210> 131

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成肽

<400> 131
gggttagcat atgtca 16
<210> 132
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 132
tggatctccc ctactcg 17
<210> 133
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 133
actggtgacg agggttc 17
<210> 134
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 134
gctcacaccg cttgatc 17
<210> 135
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 135
cgctcacacc gcttgat 17
<210> 136
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成肽
<400> 136
tccgctcaca ccgcttg 17
<210> 137
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 137
ttccgctcac accgctt 17
<210> 138
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 138
accagtagct ccggaga 17
<210> 139
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 139
gccggtcaga ccagtag 17
<210> 140
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 140
agccggtcag accagta 17
<210> 141
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽
<400> 141
agaaggctag taacgta 17
<210> 142
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 142
aaggttccgt cgggctc 17
<210> 143
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 143
aaaggttccg tcgggct 17
<210> 144
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 144
gaaaggttcc gtcgggc 17
<210> 145
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 145
ctgagtcgct gaagcgg 17
<210> 146
<211> 17
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 146
tctgagtcgc tgaagcg 17
<210> 147
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 147
atccccgatt cgggtccc 17
<210> 148
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 148
gatccccgat tcggtcc 17
<210> 149
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 149
agatccccgga ttcggtc 17
<210> 150
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 150
aagatccccgg attcggt 17
<210> 151
<211> 17

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 151
gcaagatccc ggattcg 17
<210> 152
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 152
cggatcatctt gatggta 17
<210> 153
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 153
tgatacgggg ggatgga 17
<210> 154
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 154
ttgatacggg gggatgg 17
<210> 155
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 155
cttgatacgg ggggatg 17
<210> 156

<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 156
gaggccttga tacgggg 17
<210> 157
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 157
gggggtccct ctgatatatg 20
<210> 158
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 158
gtggatctcc cctactcgt 20
<210> 159
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 159
agcccaacag gaatcgaact 20
<210> 160
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 160
cgctcacacc gcttgatctt 20

<210> 161
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 161
ccgctcacac cgcttgatct 20
<210> 162
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 162
tccgctcaca ccgcttgatc 20
<210> 163
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 163
agtttgccgg ggccaagtgt 20
<210> 164
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 164
aagggcacgc ggtccatctc 20
<210> 165
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 165

aaagggcacg cgggtccatct 20
<210> 166
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 166
caaagggcac gcggtccatc 20
<210> 167
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 167
acaaagggca cgcggtccat 20
<210> 168
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 168
ccggagacag cgtttggtga 20
<210> 169
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 169
tccggagaca gcgtttggtg 20
<210> 170
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽

<400> 170
agtagctccg gagacagcgt 20
<210> 171
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 171
cggtcagacc agtagctccg 20
<210> 172
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 172
agccggtcag accagtagct 20
<210> 173
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 173
cagccggtca gaccagtagc 20
<210> 174
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 174
gctagtaacg tactgtttgc 20
<210> 175
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成肽
<400> 175
aagaaggcta gtaacgtact 20
<210> 176
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 176
gaagaaggct agtaacgtac 20
<210> 177
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 177
agaagaaggc tagtaacgta 20
<210> 178
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 178
gagaaaggtt ccgtcgggct 20
<210> 179
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 179
ggagaaagggt tccgtcgggc 20
<210> 180
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成肽
<400> 180
cggattcggg cccccagtga 20
<210> 181
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 181
ccggattcgg tccccccagtg 20
<210> 182
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 182
atccccggatt cgggtccccca 20
<210> 183
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 183
agatccccgga ttcgggtcccc 20
<210> 184
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 184
aagatccccgg attcgggtccc 20
<210> 185
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 185
gcaagatccc ggattcggtc 20
<210> 186
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 186
tgagcaagat cccggattcg 20
<210> 187
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 187
tgatacgggg ggatggagt 20
<210> 188
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 188
ttgatacggg gggatggagt 20
<210> 189
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 189
gggagaggcc ttgatacggg 20
<210> 190
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 190
gatcaccaac tggggttggc 20
<210> 191
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 191
tgcgtgtgcg cgctgcaggt 20
<210> 192
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 192
gtgcgtgtgc gcgctgcagg 20
<210> 193
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成肽
<400> 193
gcccttgtac ttttgcatag 20

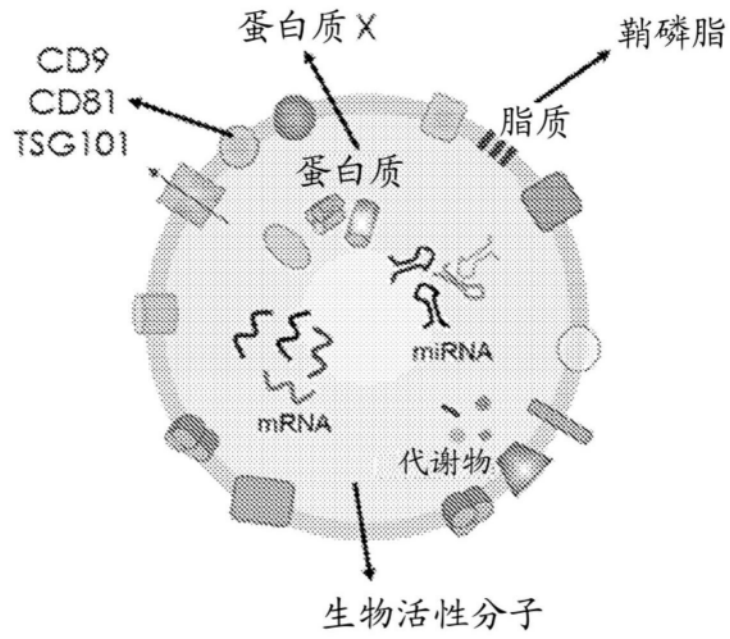


图1A

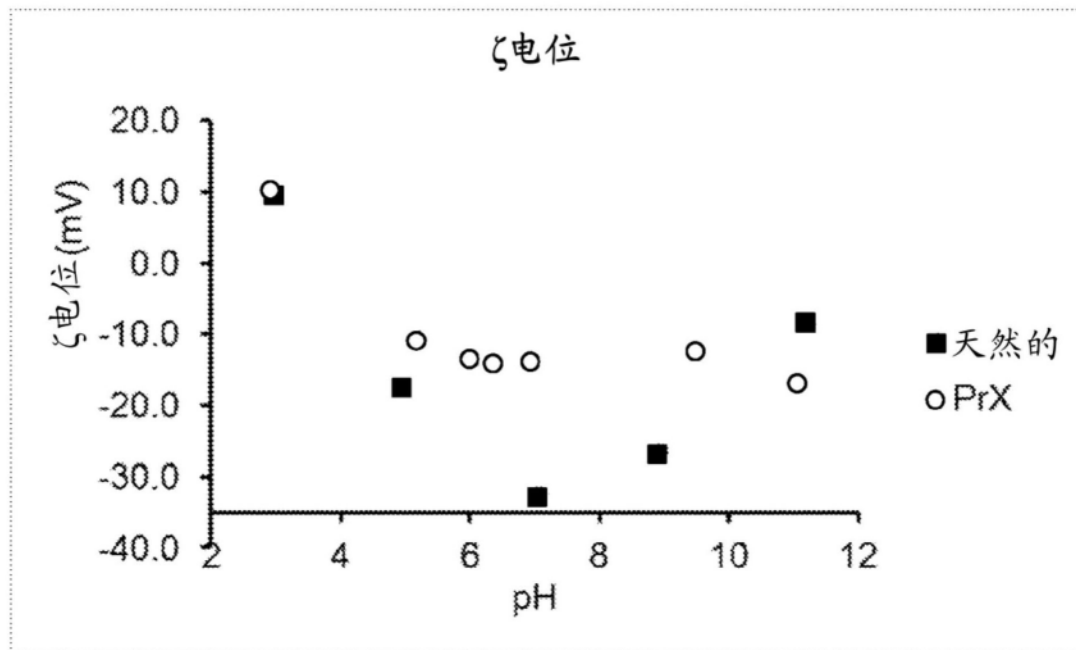


图1B

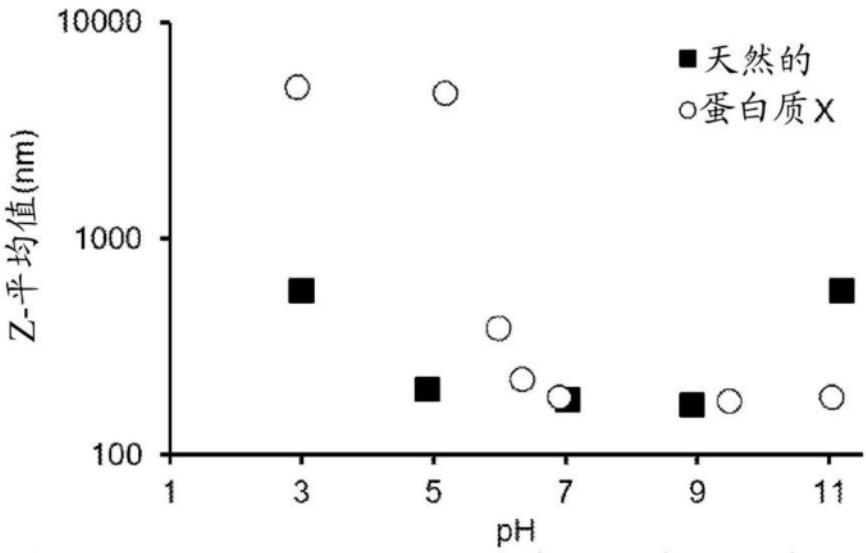


图2A

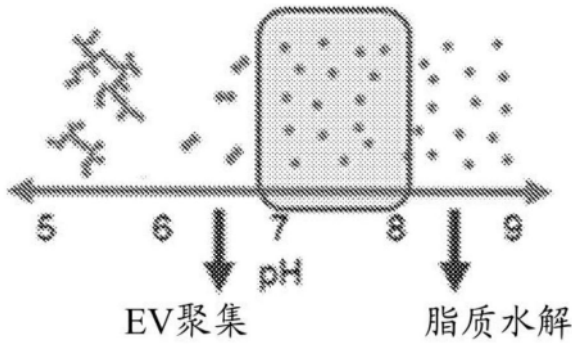


图2B

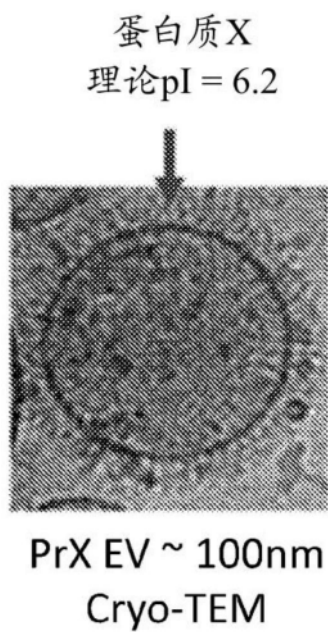
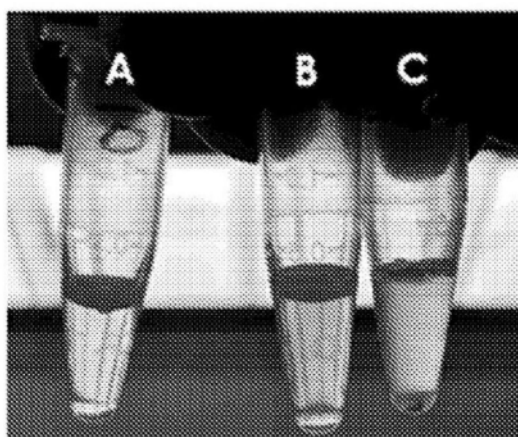


图2C



A = 蔗糖 + 缓冲剂, 3x F/T
B = 仅缓冲剂, 3x F/T
C = 仅Milli-Q水, 3x F/T

图2D

平衡研究结果

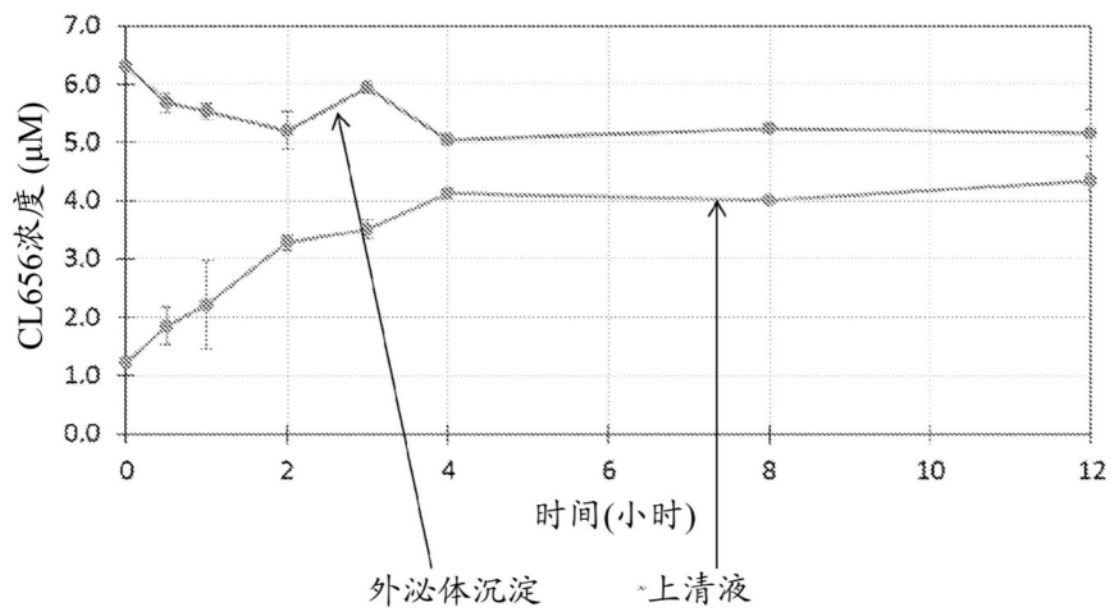
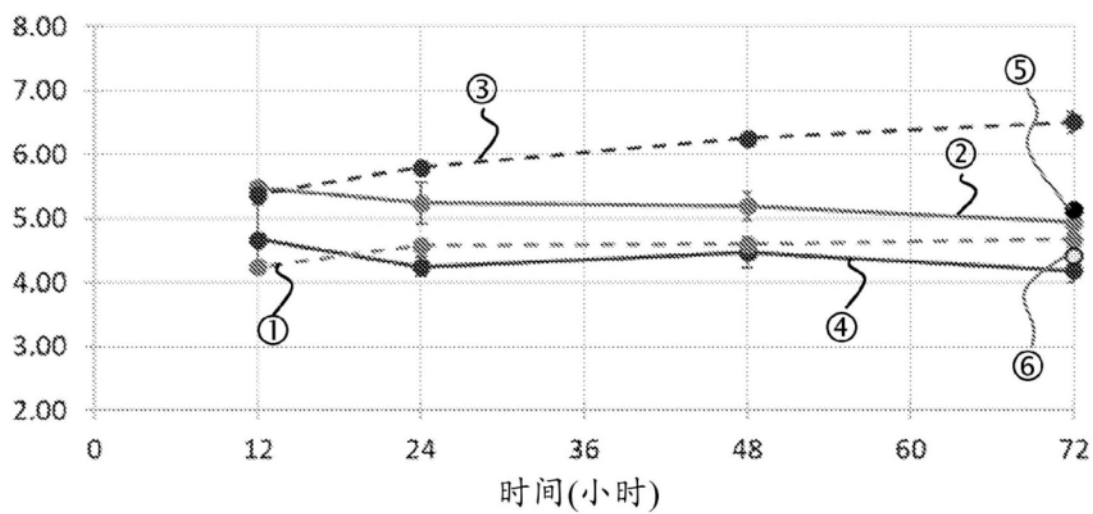


图3A



- ① 4 °C 上清液
 ② 4 °C 外泌体
 ③ 22 °C 上清液
 ④ 22 °C 外泌体
 ⑤ -80 °C 外泌体
 ⑥ -80 °C 上清液

图3B

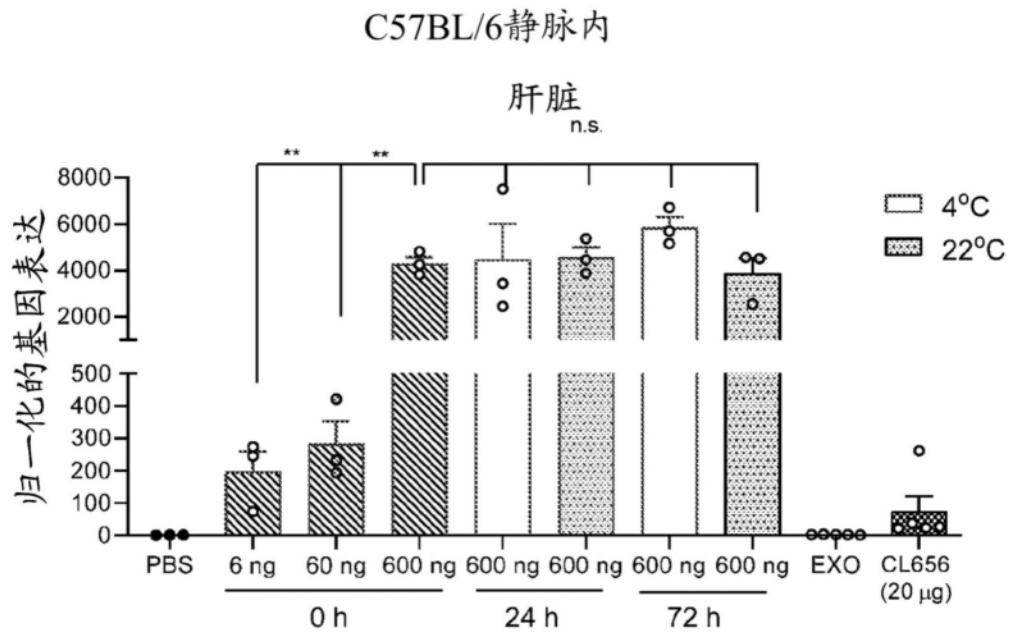


图3C

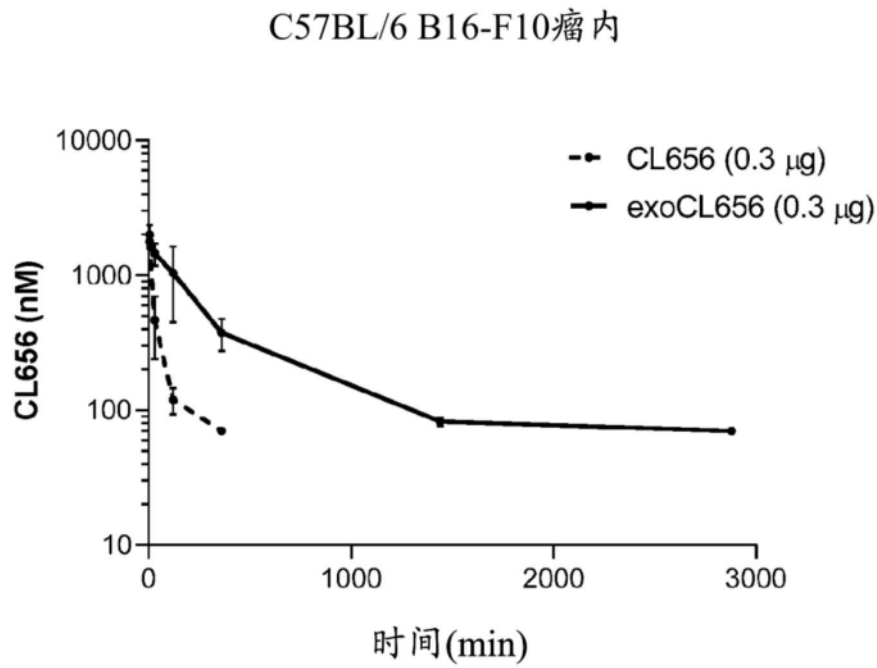
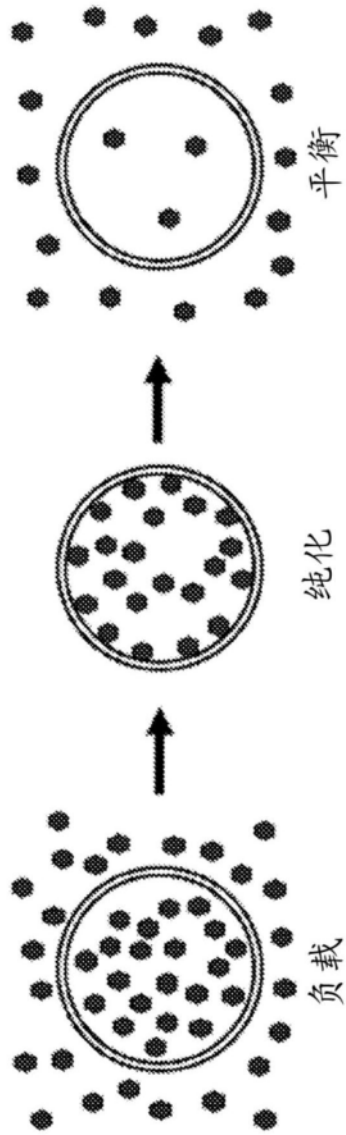


图3D

图 4C图 4B图 4A

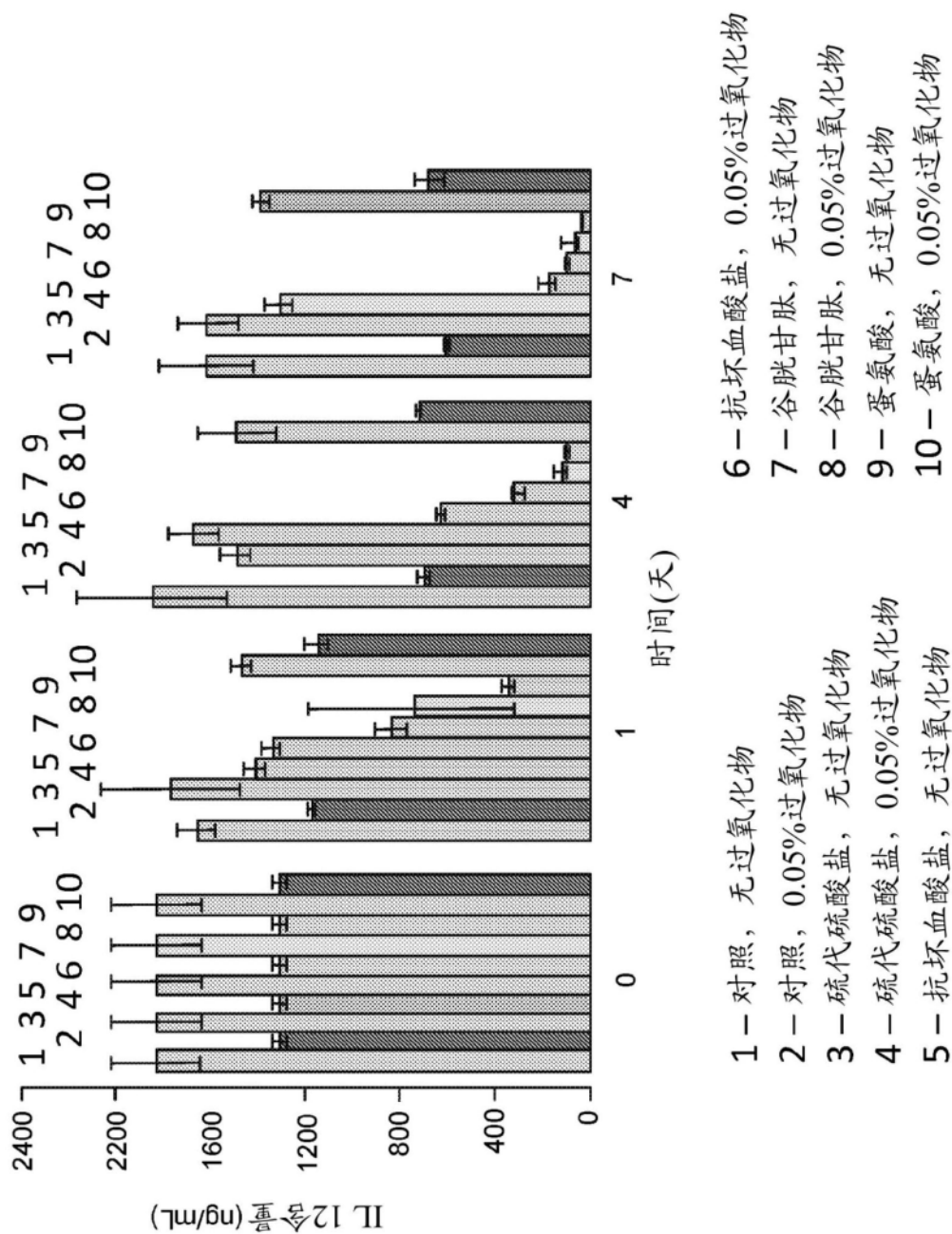


图5

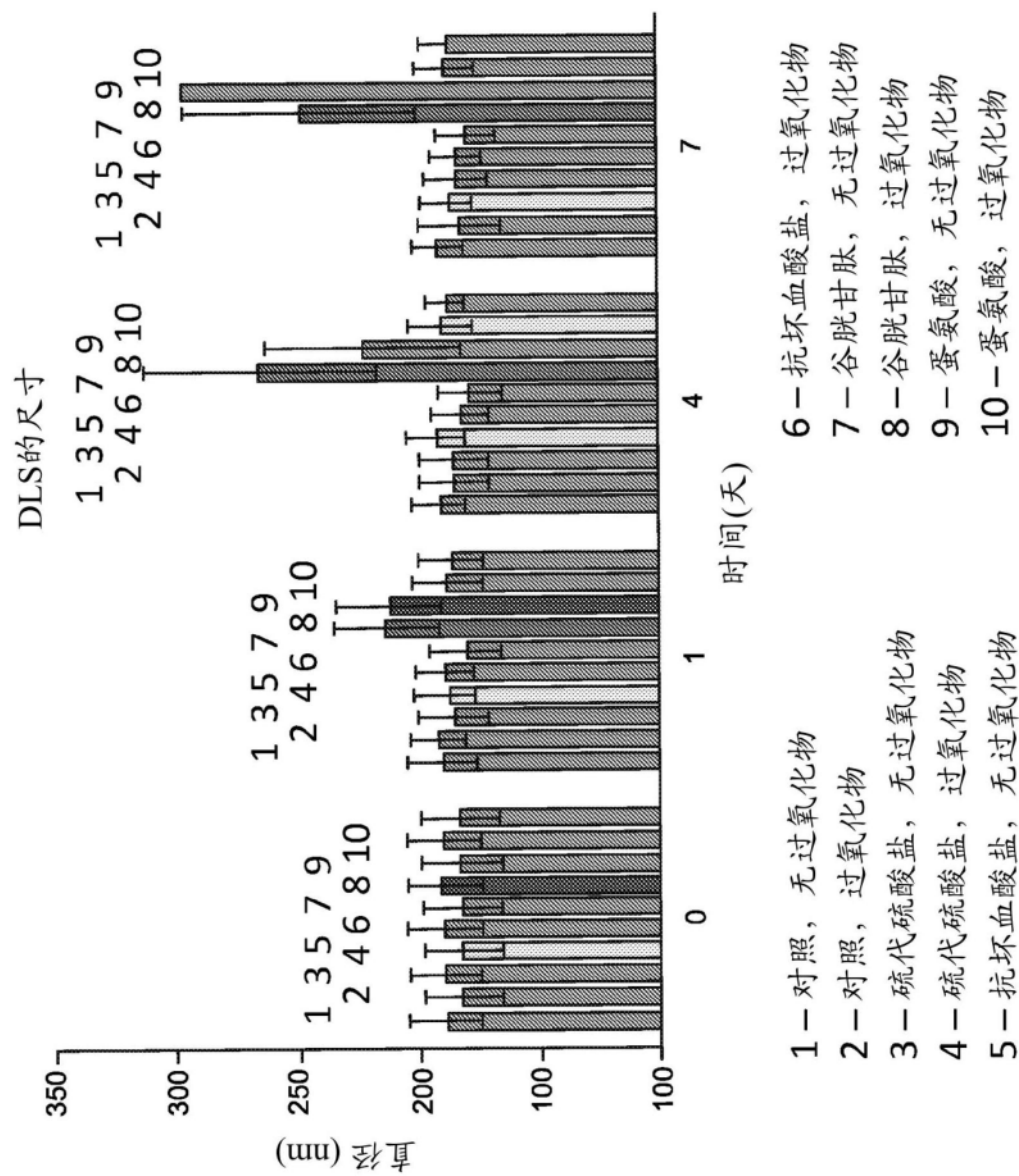


图6

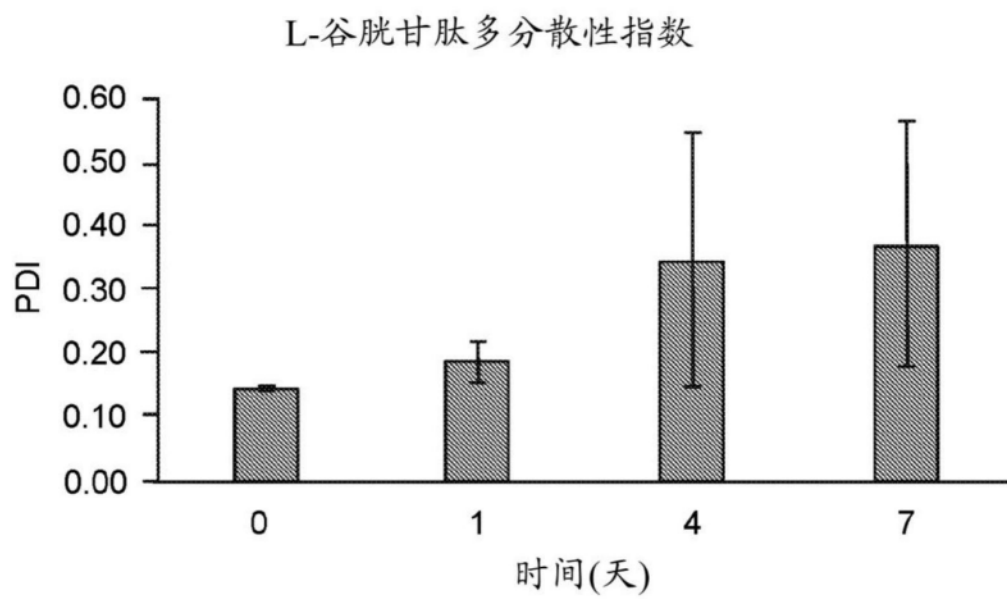


图7