

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2016 年 8 月 18 日 (18.08.2016)



(10) 国际公布号  
**WO 2016/127503 A1**

(51) 国际专利分类号:

C12N 5/078 (2010.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61K 35/15 (2015.01) A61P 19/02 (2006.01)  
A61P 37/08 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/077902

(22) 国际申请日: 2015 年 4 月 30 日 (30.04.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510072238.X 2015 年 2 月 12 日 (12.02.2015) CN

(71) 申请人: 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY)  
[CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(72) 发明人: 王胜军 (WANG, Shengjun); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。王运刚 (WANG, Yungang); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。田洁 (TIAN, Jie); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。芮棵 (RUI, Ke); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。马洁 (MA, Jie); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。马斌 (MA, Bin); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。汤新逸 (TANG, Xinyi); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。许化溪

(XU, Huaxi); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(74) 代理人: 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 (JW IP LAW FIRM); 中国北京市朝阳区万红西街 2 号燕东大厦 A 座 1010 室, Beijing 100015 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: EXOSOMES SOURCED FROM GRANULOCYTE MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELL AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 来源于粒细胞样髓源性抑制细胞的 EXOSOMES 及其应用

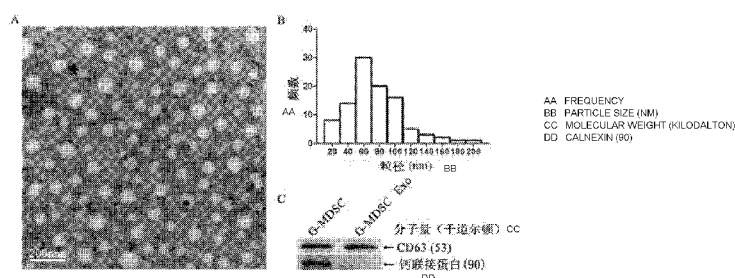


图 2

(57) Abstract: Provided are exosomes sourced from a granulocyte myeloid-derived suppressor cell and an application thereof. The exosomes are named as G-MDSC exo. Also provided is a use of the exosomes in preparing a drug used for suppressing autoimmune diseases. The G-MDSC exo can effectively suppress proliferation of CD4+T cells in vitro, promote induced proliferation of T regulatory (Treg) cells, alleviate foot swelling of model mice having delayed-type hypersensitivity, and suppress attacks of inflammatory bowel disease (IBD) and collagen-induced arthritis (CIA) of the mice.

(57) 摘要: 提供了一种来源于粒细胞样髓源性抑制细胞的 exosomes 及其应用, 该 exosomes 被命名为 G-MDSC exo, 提供了其在制备用于抑制自身免疫性疾病药物中的用途。G-MDSC exo 在体外能有效抑制 CD4+T 细胞增殖, 促进调节性 T 细胞诱导扩增, 并且减轻迟发性超敏反应模型小鼠的足垫肿胀, 抑制小鼠炎症性肠病 (IBD) 和胶原诱导性关节炎 (CIA) 的发病。

WO 2016/127503 A1

## 来源于粒细胞样髓源性抑制细胞的EXOSOMES及其应用

## 技术领域

本发明涉及一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源 exosomes 及其应用, 属细胞生物学、分子生物学领域及临床应用领域, 具体涉及荷瘤小鼠脾脏分离的 G-MDSC exo 的制备、生物学功能研究及其在小鼠自身免疫性疾病治疗中的应用。

## 背景技术

骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 是一群骨髓来源的异质性细胞, 在肿瘤、炎症及病原体感染等病理情况下大量扩增 (Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol. 2009;9(3):162-74.)。小鼠的 MDSCs 是 Gr-1 (由 Ly6G 和 Ly6C 组成) 和 CD11b 双阳性的细胞, 按细胞形态及 Ly6G、Ly6C 表达量高低, 可分为  $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$  粒细胞样 MDSCs (G-MDSCs) 和  $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{hi}$  单核细胞样 MDSCs (M-MDSCs) 两个亚型。在肿瘤及感染等疾病状态下, G-MDSCs 和 M-MDSCs 均会扩增, 而 G-MDSCs 明显多于 M-MDSCs。G-MDSCs 主要通过表达精氨酸酶 1 (arginase 1, Arg-1) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 抑制 T 细胞介导的适应性免疫应答和自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK)、巨噬细胞介导的天然抗肿瘤免疫应答。研究表明 MDSCs 也可以通过干扰素  $\gamma$  (interferon  $\gamma$ , INF- $\gamma$ ) 和白细胞介素 10 (interleukin 10, IL-10) 依赖的途径诱导 Treg 细胞分化从而下调效应性 T 细胞的功能。近年来相关研究表明 MDSCs 在自身免疫性疾病的治疗方面有巨大的潜能。因此, 人们对 MDSCs 的治疗价值有了新的认识, 已有实验利用 MDSCs 治疗小鼠胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA), 并取得一定疗效。但是, 由于 MDSCs 来源不足、储存不便及成分复杂等缺点限制了其应用。

自身免疫性疾病是因机体免疫系统对自身成分发生免疫应答而导致的疾病, 在人群中较高的发病率。炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD), 主要是由于机体对本处于耐受状态的正常菌群发生异常免疫应答所致的非特异性炎性肠道疾病, 该病临床表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便, 病久可发生癌变。类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种临床常见系统性自身免疫性疾病, 临床主要表现为对称性小关节病变, 以多关节持续性炎症为特征。大量研究表明促炎性细胞 Th1 和 Th17 及其来源的炎症因子在自身免疫性疾病发生发展过程中发挥重要作用。Treg 细胞在维持肠道机体免疫稳定等方面发挥重要作用, Treg 细胞作用失衡往往是自身免疫学疾病发生的原因之一, 并且研究证实自身免

疫性疾病患者体内 Treg 细胞比正常人低。近年来自身免疫性疾病在我国的发病率呈上升趋势，针对该类疾病，临床上主要以对症治疗为主，尚没有一种行之有效的治疗手段，因此迫切需要探索一种从根本上治愈的方法。

Exosomes 是细胞内多胞体与质膜融合后释放到细胞外环境中的一种膜性囊泡。研究表明几乎所有的活细胞都能分泌 exosomes，并且其广泛存在于各种体液中 (Beninson LA, M.Fleshner.Exosomes: an emerging factor in stress-induced immunomodulation [J]. Semin Immunol, 2014. 26(5): 394-401.)。exosomes 携带来源细胞的蛋白质、mRNA 及 miRNA 等成分，使之不易受外界环境降解，利于相关活性成分发挥生物学功能。通过巨胞饮作用，脂质筏和受体介导的内吞作用等方式，exosomes 被受体细胞内化，内化的 exosomes 可以调控受体细胞的多种生物学功能，在细胞间交流过程中发挥重要作用。exosomes 在免疫应答、凋亡、血管生成、炎症反应及肿瘤发生发展等过程中的作用均有报道。研究显示对疾病进行干预时，exosomes 比其来源细胞更有优势。利用树突状细胞来源的 exosomes 治疗肿瘤的报道较多，并显示出良好疗效 (Pitt JM, Charrier M, Viaud S, et al. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer [J]. J Immunol, 2014;193(3):1006-11.)。但是有关 G-MDSC exo 的功能研究，以及在自身免疫性疾病中的应用尚未见报道。

我们发现 G-MDSC exo 直径为 40-100nm，携带生物活性成分，与 G-MDSC 分泌的其他囊泡相比，G-MDSC exo 的生物学特性更清晰。G-MDSC exo 能抑制  $CD4^+$  T 细胞增殖并减轻 DTH 小鼠足垫肿胀程度，并且能促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增。体内应用 G-MDSC exo 能减缓小鼠迟发型超敏反应 (DTH)、IBD 和 CIA 的病情，并进一步证实，并且这种作用一定程度上依赖于 G-MDSC exo 携带的 Arg-1。

近年来有关 exosomes 在疾病治疗方面的研究多集中在树突状细胞和干细胞来源的 exosomes 上。疾病治疗方面，相对于来源细胞，exosomes 具有更容易保存和运输，本身无细胞毒性，应用时生物安全问题较少等优点；并且 exosomes 表面的复合分子为其靶向特定组织及微环境提供潜在的归巢机制 (田新瑞,徐文靖,牛勃,等.神经干细胞来源 Exosomes 制备及在神经系统疾病中的应用:中国,CN103740645 A[P].2014-04-23.); exosomes 对治疗性的蛋白质和核酸还具有保护作用，减少降解 (Marcus ME, Leonard JN. FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver [J].Pharmaceuticals (Basel),

2013, 6(5):659-680.)。G-MDSC exo 在疾病治疗中的应用尚未见报道。我们实验发现 G-MDSC exo 在低温条件下能长期保持, 并且生物学活性不受影响; G-MDSC exo 既具有与 G-MDSC 类似的抑制  $CD4^+$  T 细胞增殖的作用, 又能促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增。G-MDSC exo 是一种天然免疫调节剂, 对自身免疫性疾病的治疗具有重要意义, 在临床上具有较好的应用价值。

依据 G-MDSC exo 的结构和功能特性, 将其应用于自身免疫性疾病的治疗, 可达到“低投入、高产出”的目的, 具有良好的临床应用前景, 有望在维持机体免疫平衡方面发挥积极作用, 为自身免疫性疾病的治疗提供一种全新的治疗途径。

## 发明内容

本发明为克服现有技术中存在的不足, 提供一种 G-MDSCs 来源的 exosomes, 该 exosomes 具有 G-MDSCs 的非特异性成分和 G-MDSCs 内特殊的蛋白质和核酸等活性物质, 是一种亚细胞结构的复合信息体; 其既具有 G-MDSCs 所具备的免疫抑制特性又包含自身表面分子 CD63; 并观察其在自身免疫性疾病治疗中的作用, 以期寻求从根本上治疗疾病的方法。

本发明中的 G-MDSC exo 是含有来源细胞膜脂质成分的膜性囊泡, 对其携带的生物活性成分具有保护作用; G-MDSC exo 可发挥类似 G-MDSCs 的免疫抑制功能, 并且具有细胞本身所不具备的众多优点, 是细胞间信息传递的亚细胞结构信息复合体。

本发明公开了一种简便的制备来源于肿瘤个体或自身免疫性疾病个体 G-MDSC exo 的方法, 整个过程耗时短, 产量高, 并且证实易于保存且生物活性不受影响, 为进行治疗目的规模生产化生产 G-MDSC exo 奠定基础。即构建荷瘤小鼠模型或者自身免疫性疾病(如 CIA)模型, 分离脾脏 G-MDSCs, 收集培养上清; 联合使用超速离心与微孔滤膜法, 分离提取 G-MDSC exo。

其具体步骤如下:

将收集的 G-MDSCs 培养悬液于  $4^{\circ}\text{C}$  离心后收集上清, 重复三次, 将收集到的上清转移至 MWCO 100 kDa 的超滤离心管中, 离心收集内管中的浓缩液; 将浓缩液与 ExoQuick-TCTM Exosome 试剂按体积比 5:1 混合, 震荡,  $4^{\circ}\text{C}$  静置后于  $4^{\circ}\text{C}$  离心弃上清, 收集沉淀物, 得 exosomes。

本发明中所述的 G-MDSC exo 具有抑制 T 细胞增殖的作用及促进 Treg 极化的作用, 体内应用可能发挥强度的免疫抑制作用, 对自身免疫性疾病的治疗具有重要意义。

本发明中所述的 G-MDSC exo 能有效缓小鼠 DTH、IBD 和 CIA 的临床进程,减少病理损伤,提供一种通过恢复机体免疫平衡的方式来治疗自身免疫性疾病的新途径。

本发明还证实 G-MDSC exo 通过抑制  $CD4^+$  T 细胞增殖及促进 Treg 细胞扩增等方式发挥免疫抑制作用,并且对自身免疫性疾病有保护性作用,为疾病的治疗提供新的途径。

#### 本发明的优点:

(1) 本发明率先制备来源于肿瘤个体或自身免疫性疾病个体 G-MDSC exo,为其应用及相关生物学功能研究奠定基础。

(2) 本发明制备 G-MDSC exo 与传统的差速离心法制备 exosomes 相比,本专利的制备过程耗时短,操作方便,便于大剂量提取,并且形态结构完整。

(3) 本发明中 G-MDSC exo 所含成分活性稳定,易于保存,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存时间达 1 年以上;室温下结构及活性成分都稳定,易于运输;无需冻存复苏,为 G-MDSC exo 临床应用提供技术基础。

(4) 本发明中 G-MDSC exo 是一种纳米级亚细胞结构的信息复合体,本身无细胞毒性,临床应用时具有较高的安全性。

(5) 本发明中 G-MDSC exo 对自身免疫性疾病具有保护性作用,其制备和应用为自身免疫性疾病的治疗提供了新的途径。

(6) 本发明中 G-MDSC exo 具有抑制  $CD4^+$  T 细胞增殖和促进 Treg 细胞扩增的功能,为自身免疫性疾病的治疗提供新的思路。

#### 附图说明:

图 1: 流式细胞术 (FACS) 检测免疫磁珠法分选的 G-MDSCs 的纯度。

图 2: G-MDSC exo 的鉴定结果,图中 A 为 G-MDSC exo 的形态; B 为 G-MDSC exo 的粒径大小频数分布; C 为 Western blot 检测 G-MDSC exo 表达结果。

图 3: G-MDSC exo 抑制  $CD4^+$  T 细胞的作用,图中 A 为  $^3\text{H-TdR}$  掺入法体外观察 G-MDSC exo 对  $CD4^+$  T 细胞增殖的影响结果; B 为体内观察 G-MDSC exo 对 DTH 模型影响的结果。

图 4: G-MDSC exo 呈剂量依赖性促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增图示,图中 A 为 G-MDSC exo 促进不同浓度 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增; B 为 G-MDSC exo 呈剂量依赖性促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增。

图 5: G-MDSC exo 对 IBD 小鼠的保护性作用图示,图中 A 为 G-MDSC exo 对 IBD 小鼠疾病进展的影响; B 为 G-MDSC exo 对 IBD 小鼠结肠组织的影响; C 为 G-MDSC exo

对 IBD 小鼠结肠炎症的影响。

图 6: G-MDSC exo 对 CIA 小鼠的保护性作用, 图中 A 为 G-MDSC exo 干预 CIA 小鼠的实验方法流程图; B 为 G-MDSC exo 对 CIA 小鼠疾病评分爪子肿胀程度影响; C 为 G-MDSC exo 对 CIA 小鼠疾病进程的影响。

图 7: G-MDSC exo 携带的 Arg-1 在其减缓自身免疫性疾病病情中发挥重要作用, 图中 A 为 G-MDSC exo 中 Arg-1 活性检测结果和 Arg-1 抑制剂 Nor-NHOA 对 Arg1 活性的抑制效果; B 为抑制 Arg-1 活性后的 G-MDSC exo 对 IBD 小鼠病情进展的影响; C 为抑制 Arg-1 活性后的 G-MDSC exo 对结肠组织的影响; D 为抑制 Arg-1 活性后的 G-MDSC exo 对结肠炎症的影响。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步描述, 但本发明并不限于这些实施例。

#### 实施例 1: G-MDSCs 的分选及培养上清制备

(1) 构建 Lewis 肺癌移植瘤小鼠模型: 本实验室保存的小鼠 Lewis 肺腺癌细胞于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10% 小牛血清、pH 7.2 的 DMEM 培养液培养, 以细胞生长密度至培养皿底面积的 85% 为标准, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。用对数生长期细胞, 按每只小鼠  $3.0 \times 10^6$  个细胞的量于右侧腹部皮下注射至 6-8w 雄性 C57BL/6 小鼠, 肿瘤种植后观察肿瘤的生长情况。

(2) CIA 模型建立: 取等体积牛 II 型胶原 (CII) 与弗氏完全佐剂 1:1 混合, 充分研磨至混合物完全乳化, 以乳化物滴入水中不松散为度 (冰浴中操作)。取乳化后的 CII 于小鼠尾根部皮内注射 (0.1mL/只), 并使乳化物吸收完全。免疫当日为 0 天, 于免疫后第 21 天, 利用 CII 与弗氏不完全佐剂的乳化物加强免疫。

(3) 分离肿瘤小鼠或 CIA 小鼠脾细胞: 造模成功后, 眼球放血法处死小鼠, 无菌摘取脾脏; 在 0.22μm 的筛网中磨碎脾脏, 过滤并将悬液 4℃、500g 离心 5min, 弃上清; 细胞沉淀中加入 5mL ACK 裂解红细胞, 混匀, 静置 5min; 加 RPMI-1640 培养液至 10mL, 4℃、500g 离心 5min, 弃上清; 计算细胞数量。

(4) 磁珠分选 G-MDSCs: 每  $10^8$  个脾细胞用 350μL PBE 重悬后加入 50μL FcR Blocking Reagent; 冰上放置 10min; 按照 40μL/ $10^8$  个脾细胞的量加入 anti-Ly-6G Biotin, 混匀, 冰上放置 30min, 每 10min 混匀一次; 加入 10mL PBE 液, 混匀, 将悬液 4℃、500g 离心 5min, 弃上清; 按照 50μL/ $10^8$  个脾细胞的量加入 anti-Ly-6G-Biotin Beads, 混匀,

冰上放置 30min, 每 10min 混匀一次; 加入 10mL PBE 液, 混匀, 将悬液 4℃、500g 离心 5min, 弃上清; 加入 500μLPBE, 混匀; 将 MACS 分选柱置于 VarioMACS 分选器上, 用 3mL PBE 润洗 1 次; 加入细胞悬液, 待第一滴悬液流出后, 用 9mLPBE 洗涤分选柱 3 次; 将分选柱撤移出分选器, 加入 5mL PBE, 推动柱栓, 将结合于分离柱上的细胞压出, 收集细胞悬液, 即为 G-MDSCs。

(5) G-MDSCs 的纯度鉴定: 收集  $1 \times 10^6$  个 G-MDSCs 于 EP 管中, 1mL PBS 重悬, 4℃、500g 离心 5min, 弃上清剩余 100L 的 PBS; 重悬后加 0.5μL 抗 Ly-6G 抗体和 μL 抗 CD11b 抗体, 4℃孵育 30min; 1mL PBS 重悬后 4℃、500g 离心 5min, 弃上清; 加入 200μLPBS 重悬, 流式细胞仪检测细胞表面分子表达情况, 结果如图 1 所示, G-MDSCs 为 CD11b 和 Ly-6G 双阳性细胞, 本发明利用免疫磁珠法从荷瘤小鼠脾脏分选 G-MDSCs, 通过 FACS 测定分选的 G-MDSCs 纯度, G-MDSCs 纯度高达 95%以上。

(6) G-MDSCs 培养上清制备: 将分选的 G-MDSCs 重悬于含 10%小牛血清(预先经过  $100000g \times 16h$  超速离心)的 RPMI-1640 培养液中,  $1.5 \times 10^6$ /孔种于 24 孔板, 总体积为 1mL/孔; 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24h 后, 收集细胞。将收集的 G-MDSCs 培养悬液于 4℃、300g 离心 20min, 收集上清。

## 实施例 2: G-MDSC exo 制备及蛋白浓度测定

(1) 将收集的 G-MDSCs 上清于 4℃、1000g 离心 30min, 收集上清; 将上清 4℃、10000g 离心 30min; 将上清转移至 MWCO 100 kDa 的超滤离心管中, 1500g 离心 30min, 收集内管中的浓缩液。

(2) 用购自 SBI 公司的 ExoQuick-TCTM Exosome 试剂盒提取 G-MDSC exo: 步骤(1)中所得的浓缩液与 ExoQuick-TCTM Exosome 试剂按体积比 5:1 混合, 震荡, 4℃静置 12h 以上; 4℃、1000g 离心 30min, 弃上清, 收集沉淀物, 即为 G-MDSC exo。将制备的 exosomes 用 PBS 溶解, 分装至 EP 管中, -80℃保存, 用于后续试验。

(3) 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定 G-MDSC exo 蛋白浓度: G-MDSC exo 悬液与等体积的裂解液(RIPA:PMSF=250: 1)混匀后, 冰上放置 1h, 每 10min 震荡一次; 4℃、12000g 离心 15min, 收集上清。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作步骤测定 exosomes 裂解上清中的蛋白浓度。

## 实施例 3: G-MDSC exo 的鉴定

(1) 透射电镜观察 G-MDSC exo 形态: 取 20μL G-MDSC exo 悬液滴加于直径 3mm 的载样铜网上, 室温静置 2min; 用滤纸轻轻吸干液体, 滴加 pH 6.8 的 2%磷钨酸溶液于

铜网上, 负染 1min; 滤纸吸干染液, 白炽灯下烤干, 透射电镜下观察到 G-MDSC exo 为圆形或椭圆形微囊状结构, 有包膜, 腔内为低电子密度成分, 粒径为 30-150nm, 结果如图 2A 和 2B 所示, 其中 A 为 G-MDSC exo 的形态, 透射电子显微镜下, 可观察到 G-MDSC exo 为圆形或椭圆形的微囊结构, 有完整包膜, 腔内为低电子密度成分; B 为 G-MDSC exo 的粒径大小频数分布, 透射电镜拍摄的 G-MDSC exo 的粒径主要分布在 30-150nm。

(2) Western blot 检测 exosomes 包含的蛋白分子 CD63 和线粒体包含的蛋白分子 Calnexin: 配制 5% 的浓缩胶和 12% 分离胶, 将变性的 G-MDSC exo 按 250 $\mu$ g 蛋白总量上样, 经 100V 恒压电泳后; 再经 350mA 恒流电转 90min 后, 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1h; 用抗 CD63 单克隆抗体和抗 Calnexin 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 取出后用 TBS/T 洗膜, 10min  $\times$  3 次, 用辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 取出后用 TBS/T 洗膜, 10min  $\times$  3 次; ImageQuant LAS 4000 凝胶成像系统曝光显色, 结果如图 2C 所示, 图 2C 为 Western blot 检测 G-MDSC exo 表达 CD63 分子, 并且不表达线粒体相关分子 Calnexin。

#### 实施例 4: G-MDSC exo 抑制 T 细胞增殖和小鼠 DTH 反应

(1)  $^3$ H-TdR 掺入法观察 G-MDSC exo 对 CD4 $^{+}$  T 细胞增殖的影响: CD4 $^{+}$  T 细胞的分离。断颈处死 6-8w 雄性 C57BL/6 小鼠, 无菌摘取并研磨脾脏, 制得脾细胞悬液; 将悬液 4 $^{\circ}$ C、500g 离心 5min, 弃上清; 细胞沉淀中加入 5mL ACK 裂解红细胞, 混匀, 静置 5min; 加 RPMI-1640 培养液至 10mL, 4 $^{\circ}$ C、500g 离心 5min, 弃上清; 10mL PBE 重悬, 4 $^{\circ}$ C、500g 离心 5min, 弃上清; 按欲得到  $10^7$  个 CD4 $^{+}$  T 细胞加入 15 $\mu$ L anti-CD4-MicroBeads 抗体, 混匀后, 置于冰上, 孵育 30min, 每 10min 混匀 1 次; 加 10mL PBE, 混匀, 4 $^{\circ}$ C、500g 离心 5min, 弃上清, 加 500 $\mu$ L PBE, 制得细胞悬液; 将分选柱置于 VarioMACS 分选器上, 用 3mL 的 PBE 润洗; 加入细胞悬液, 待第 1 滴悬液流出后用 9mL PBE 洗涤分选柱 3 次; 将分选柱撤移出分选器, 加入 5mL PBE 液, 推动柱栓, 收集流出的细胞悬液, 即为 CD4 $^{+}$  T 细胞。CD4 $^{+}$  T 细胞按  $5 \times 10^5$  个细胞/孔, 接种于 96 孔板, 每孔总体积为 200 $\mu$ L; 抗 CD3、抗 CD28 存在的条件下, 加入不同浓度 G-MDSC exo, 用含 10% 小牛血清 (经过 100000g  $\times$  16h 离心)、pH 7.2 的 RPMI-1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  培养 72h 后加入  $^3$ H-TdR (1 $\mu$ Ci/孔), 16h 后 LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter 测定各孔 cpm 值。

(2) 利用小鼠 DTH 模型体内观察 G-MDSC exo 对 CD4 $^{+}$  T 细胞的抑制作用: 取 6-8w 雄性 C57BL/6 小鼠构建 DTH 小鼠模型, 分为正常对照组 (NC)、DTH 组、Neu exo 处理组、G-MDSC exo 处理组, 每组 6 只。根据文献用乳化在氟氏完全佐剂中的终浓度为

1mg/mL 的 OVA 制剂 200 $\mu$ L 于小鼠尾根部及背部皮内注射, 进行初次免疫, 7d 后用 30 $\mu$ L 20mg/mL 的 OVA 溶液于小鼠右侧足垫部注射激发, 激发后的第 24h、48h、72h 测小鼠足垫厚度。按照 DTH 反应程度的判断标准计算各组小鼠脚垫肿胀度, 结果显示 G-MDSC exo 处理组小鼠的脚垫肿胀度较 DTH 组和 Neu exo 处理组轻 (图 3B), 并且均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。提示 G-MDSC exosomes 在体内能发挥抑制  $CD4^+$  T 细胞的作用。

DTH 反应程度的判断 (以 24h 为例):

脚垫肿胀程度 = (注射 OVA 24h 后脚垫厚度 - 注射 OVA 前脚垫厚度) - (注射 PBS 24h 后脚垫厚度 - 注射 PBS 前脚垫厚度)

图 3 为 G-MDSC exo 抑制  $CD4^+$  T 细胞的作用结果图, 其中: A、 $^3H$ -TdR 掺入法体外观察 G-MDSC exo 对  $CD4^+$  T 细胞增殖的影响, 结果显示 G-MDSC exo 呈剂量依赖性方式抑制  $CD4^+$  T 细胞增殖; B、利用 DTH 模型体内观察 G-MDSC exo 对迟发型超敏反应的影响。分别于 OVA 激发后的第 24h、36h 和 72h 测各组小鼠足垫肿胀程度, 结果显示 G-MDSC exo 处理组小鼠足垫肿胀程度明显低于其他组, 说明 G-MDSC exo 能够体内抑制 DTH 反应。

**实施例 5: G-MDSC exo 呈剂量依赖性促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增。**

磁珠分选  $CD4^+$  T 细胞 (同实施例 4),  $2 \times 10^6$ /孔种于 24 孔板中, 总体系为 1mL。在抗 CD3 和抗 CD28 存在情况下, 用 TGF- $\beta$  诱导  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞极化, 在培养体系中加入不同量的 G-MDSC exo, 培养 3d 后 FACS 检测  $CD25^+Foxp3^+$  T 细胞。结果显示 G-MDSC exo 能促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增 (图 4A), 并且呈剂量依赖性 (图 4B)。

图 4 为 G-MDSC exo 呈剂量依赖性促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增的结果图示。图中 A 为 G-MDSC exo 促进不同浓度 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增, 结果显示 G-MDSC exo 在不同浓度 TGF- $\beta$  时均能促进  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增; B 为 G-MDSC exo 呈剂量依赖性促进 TGF- $\beta$  诱导的  $CD4^+$  T 细胞向 Treg 细胞扩增, 结果显示在随着 G-MDSC exo 浓度增加, TGF- $\beta$  诱导的 Treg 细胞扩增程度增强。

**实施例 6: G-MDSC exo 对 IBD 小鼠的治疗作用**

(1) 2.5% DSS 的配制及炎症性肠病的诱导: 将 25g 葡聚糖硫酸钠盐 (Dextran Sulfate Sodium, DSS) 溶于 1L ddH<sub>2</sub>O 中, 高压灭菌后冷却, 6-8w 龄雄性 C57BL/6 小鼠连续自由饮用 DSS 溶液 9d, 诱导 IBD 的发病。

(2) 实验共分 4 组, 每组 6 只小鼠, 分别为:

正常对照组 (NC): 自由饮用 ddH<sub>2</sub>O;

IBD 组: 饮用 2.5%DSS 而不做任何处理;

Neu exo 处理组: 诱导 IBD 的第 2d、第 4d 和第 6d 分别以 30 $\mu$ g/只的剂量经腹腔注射 Neu exo;

G-MDSC exo 处理组: 诱导 IBD 的第 2d、第 4d 和第 6d 分别以 30 $\mu$ g/只的剂量分别经腹腔注射 G-MDSC exo;

注: 以饮用 DSS 当天计为第 0 天。

(3) IBD 进展程度的评价: 每天监测各组小鼠体重, 大便性状及便血情况。进行 DAI 评分, 评分标准如下:

体重变化: <1%得 0 分, 1-5%得 1 分, 5-10%得 2 分, 10-15%得 3 分, >15%得 4 分;

大便情况: 正常得 0 分, 成形松散得 2 分, 腹泻不成形得 4 分;

便血情况: 无得 0 分, 肉眼血便得 4 分;

每组得分相加后除以 3 为最后得分。

(4) 各组小鼠结肠大体标本观察: 诱导 IBD 的第 9d, 眼球放血处死小鼠, 打开小鼠腹腔, 取出各组小鼠肛门末端直肠至远端盲肠间的结肠组织, 观察各组小鼠结肠肿胀程度及长度。

(5) 各组小鼠结肠组织病理学分析: 取各组小鼠肛门末端直肠至远端盲肠间的肠组织, 经 10%福尔马林固定后, 石蜡包埋做 HE 染色。镜下观察各结肠组织病理损坏程度和炎症细胞浸润情况及累及范围。

(6) 实验结果: 通过小鼠体重变化、粪便性状及血便情况对各组小鼠进行疾病评分; 结肠大体标本观察及结肠组织病理染色观察各组小鼠结肠损伤情况。结果显示 G-MDSC exo 处理组小鼠临床疾病评分明显减少 (图 5A), 结肠肿胀程度及缩短程度减少 (图 5B), 组织学损坏程度和炎症细胞浸润情况及累及范围炎症损伤均较轻 (图 5C)。

图 5 为 G-MDSC exo 对 IBD 小鼠的保护性作用图示。图中 A 为 G-MDSC exo 对 IBD 小鼠疾病进展的影响, 通过小鼠体重变化、粪便性状及血便情况对各组小鼠进行疾病评分, 结果显示 G-MDSC exo 处理组小鼠临床评分明显低于 IBD 组和中性粒细胞来源 exosomes (Neu exo) 处理组, 并且差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。B 为 G-MDSC exo 对 IBD 小鼠结肠组织的影响。结果显示 G-MDSC exo 处理组小鼠的结肠肿胀程度及缩短程度都明显低于 IBD 组和中性粒细胞来源 exosomes (Neu exo) 处理组。C 为 G-MDSC exo

对 IBD 小鼠结肠炎症的影响。通过各组小鼠结肠组织病理染色观察,结果显示 G-MDSC exo 处理组小鼠结肠组织炎症细胞损伤程度及炎性浸润情况较 IBD 组和中性粒细胞来源 exosomes (Neu exo) 处理组明显减轻。这些结果说明 G-MDSC exo 对小鼠 IBD 具有保护作用。

#### 实施例 7: G-MDSC exo 对 CIA 小鼠的治疗作用

G-MDSC exo 对 CIA 小鼠的治疗作用: 在第一次免疫后第 18 天和第 24 天对小鼠进行 G-MDSC exo 尾静脉处理,流程图如 6A 图。我们发现,经 G-MDSC exo 处理后,小鼠的关节炎发病程度明显减轻(图 6B),且发病时间显著推迟(图 6C)。如图 6B 所示,未处理组在初次免疫后 27 天即开始出现红肿,而 G-exo 处理组至 33 天才开始出现红肿。另外,初次免疫后 42 天,未处理组关节评分高达 10 分,而 G-exo 处理组则仅有 4 分左右。

#### 实施例 8: G-MDSC exo 携带的 Arg-1 在其减缓自身免疫性疾病病情中发挥重要作用

(1) G-MDSC exo 中 Arg1 活性检测及 nor-NOHA (NN) 对 G-MDSC exo 中 Arg1 活性的抑制效果: 分选 G-MDSC (同实施例 1),按  $2 \times 10^6$ /孔种于 24 孔板中,加入 1ml RPMI-1640 培养液,37℃、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 16h,收集培养上清,制备 G-MDSC exo (同实施例 2),裂解 G-MDSC exo (同实施例 2),用 eBioscience 公司的精氨酸酶测定试剂盒测定 G-MDSC exo 的活性。用 1ml DMSO 溶解 5mg 的 nor-NOHA 粉末,配制成 5mg/ml nor-NOHA 溶液。各实验组做如下处理:

G-MDSC 组: 单纯培养 G-MDSC,收集细胞。

G-MDSC + DMSO 组: 加入 7μl DMSO 培养 G-MDSC,收集细胞。

G-MDSC + NN 组: 加入 7μl nor-NOHA 溶液培养 G-MDSC,收集细胞。

G-MDSC exo 组: 单纯培养 G-MDSC,收集细胞培养上清。

(G-MDSC + DMSO) exo 组: 加入 7μl DMSO 培养 G-MDSC,收集细胞培养上清。

(G-MDSC + NN) exo 组: 加入 7μl nor-NOHA 溶液培养 G-MDSC,收集细胞培养上清。

测定结果如图 7A,说明 G-MDSC exo 中包含 Arg-1,并且此 Arg-1 的活性可以被 NN 抑制。

(2) G-MDSC exo 通过 Arg-1 参与 G-MDSC exo 对自身免疫性疾病的保护作用: 本实施例利用 IBD 模型观察 Arg-1 在 G-MDSC exo 介导的 IBD 保护性作用的角色。依据实验需求,将 IBD 小鼠分为 Neu exo 治疗组、G-MDSC exo 治疗组、(G-MDSC + NN) exo 治

疗组及( G-MDSC + DMSO ) exo 治疗组,具体造模方法、治疗方法及观察指标同实施例 5。

结果表明 Arg-1 参与 G-MDSC exo 对自身免疫性疾病的保护作用。图 7B 为( G-MDSC + NN ) exo 组对 IBD 小鼠疾病进展的影响,通过小鼠体重变化、粪便性状及血便情况对各组小鼠进行疾病评分,结果显示( G-MDSC + NN ) exo 组处理组小鼠临床评分明显高于 G-MDSC exo 处理组,并且差异具有统计学意义。7C 为( G-MDSC + NN ) exo 对 IBD 小鼠结肠组织的影响。结果显示( G-MDSC + NN ) exo 处理组小鼠的结肠肿胀程度及缩短程度都明显高于 G-MDSC exo 处理组。7D 为( G-MDSC + NN ) exo 对 IBD 小鼠结肠炎症的影响。结果显示( G-MDSC + NN ) exo 处理组小鼠结肠组织炎症细胞损伤程度及炎性浸润情况较 G-MDSC exo 处理组明显增强。这些结果说明 Arg-1 参与 G-MDSC exo 对自身免疫性疾病的保护作用。

## 权利要求书

1. 一种粒细胞样髓源性抑制细胞（G-MDSC）来源的 exosomes，其特征在于，所述 exosomes 是含有来源细胞胞膜脂质成分的膜性囊泡，具有 G-MDSCs 的非特异性成分和 G-MDSCs 内特殊的蛋白质和核酸等活性物质，是一种细胞间信息传递的亚细胞结构的复合信息体。
2. 根据权利要求 1 所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes，其特征在于，所述 exosomes 既具有 G-MDSCs 所具备的免疫抑制特性又包含有自身表面分子 CD63。
3. 根据权利要求 1 和 2 所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes，其特征在于，所述 exosomes 中包含精氨酸酶-1(Arg-1)，发挥免疫抑制特性。
4. 根据权利要求 1-3 任意一项权利要求所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes，其特征在于，所述 exosomes 来源于肿瘤个体或自身免疫性疾病个体。
5. 一种权利要求 1-4 任意一项权利要求所述的粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes 的制备方法，其特征在于，所述制备方法为首先构建荷瘤小鼠模型或胶原诱导性关节炎模型，分离脾脏 G-MDSCs，收集培养上清；联合使用超速离心与微孔滤膜法，分离提取 G-MDSC exo。
6. 根据权利要求 5 所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes 的制备方法，其特征在于，具体操作如下：

将收集的 G-MDSCs 培养悬液于 4℃ 离心后收集上清，重复三次，将收集到的上清转移至 MWCO 100 kDa 的超滤离心管中，离心收集内管中的浓缩液；将浓缩液与 ExoQuick-TCTM Exosome 试剂按体积比 5:1 混合，震荡，4℃ 静置后于 4℃ 离心弃上清，收集沉淀物，得 exosomes。
7. 如权利要求 1-4 任意一项权利要求所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes 在制备治疗自身免疫性疾病药物中的应用。
8. 根据权利要求 7 所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes 在制备治疗自身免疫性疾病药物中的应用，其特征在于，所述自身免疫性疾病为炎症性肠病。
9. 根据权利要求 7 所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes 在制备治疗自身免疫性疾病药物中的应用，其特征在于，所述自身免疫性疾病为胶原诱导性关节炎。
10. 根据权利要求 7 所述的一种粒细胞样髓源性抑制细胞来源的 exosomes 在制备治疗自身

免疫性疾病药物中的应用，其特征在于，所述自身免疫性疾病为迟发型超敏反应。

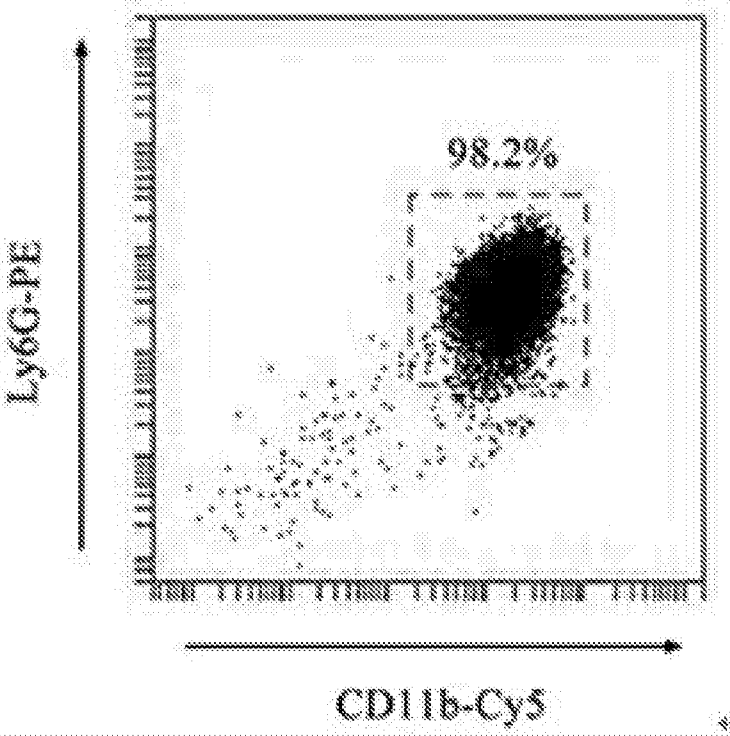


图 1

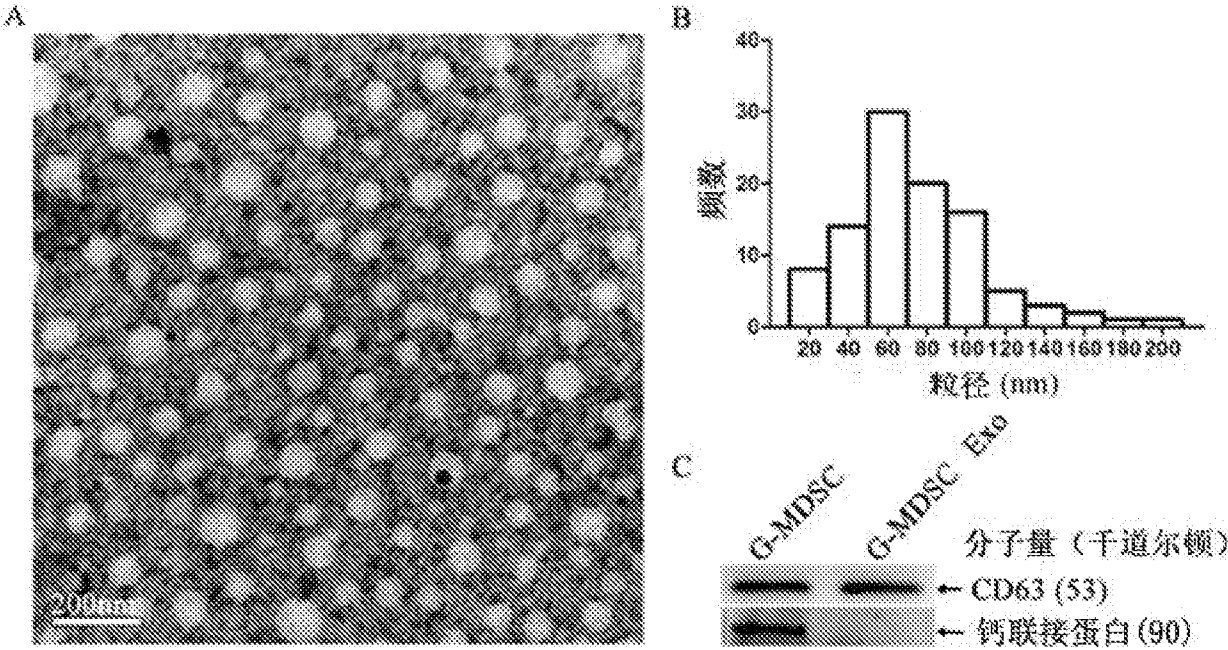


图 2

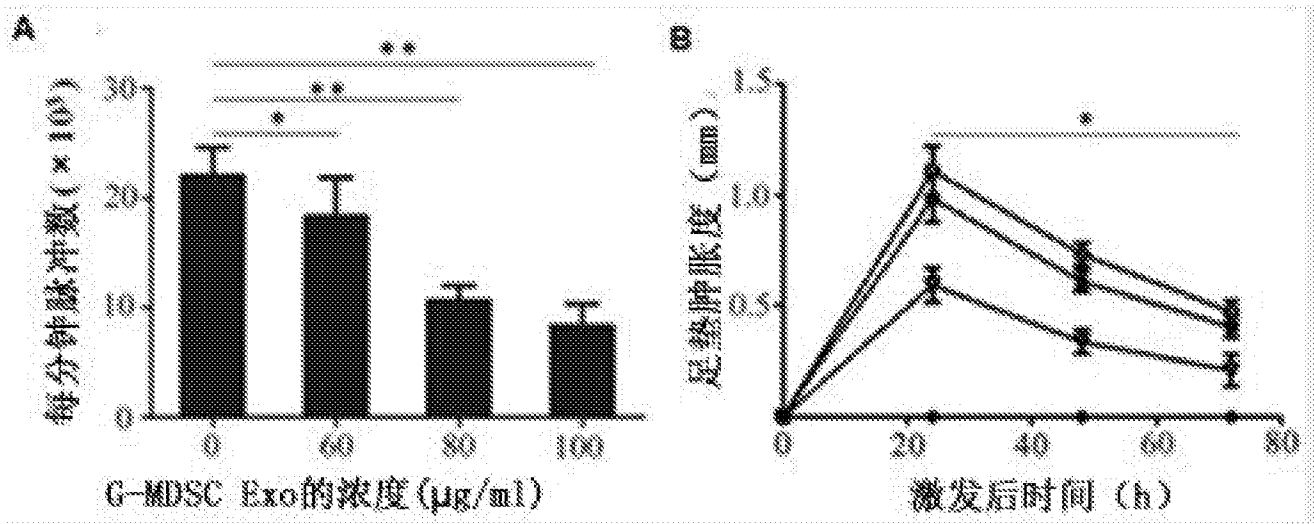


图 3

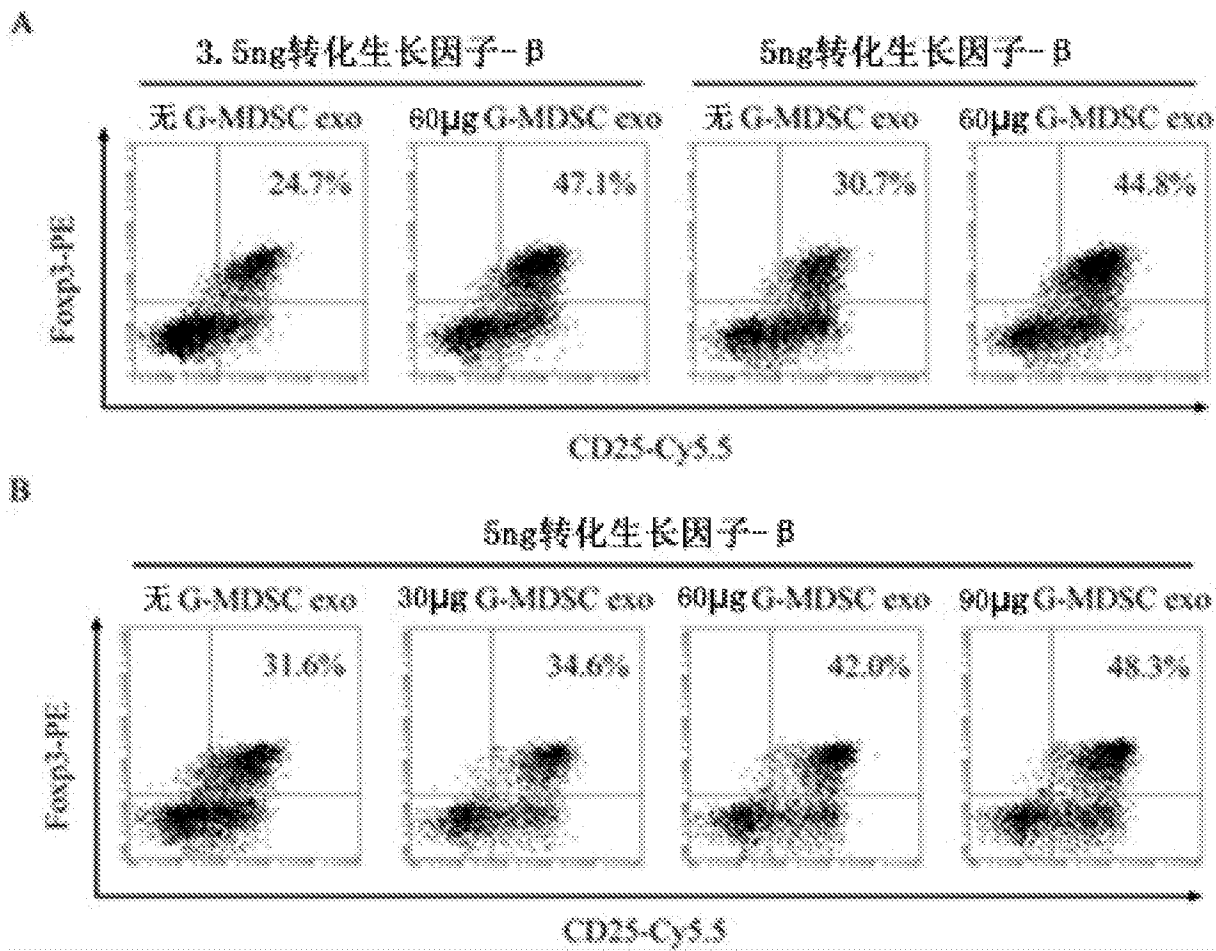


图 4

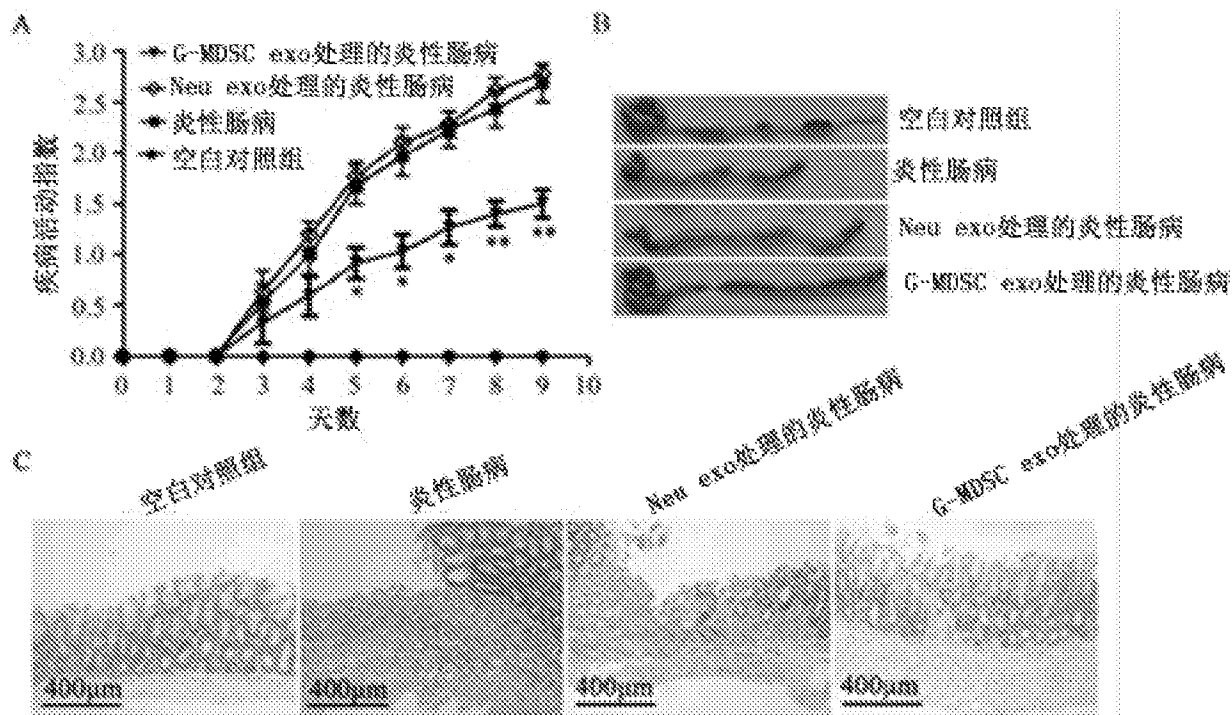


图 5

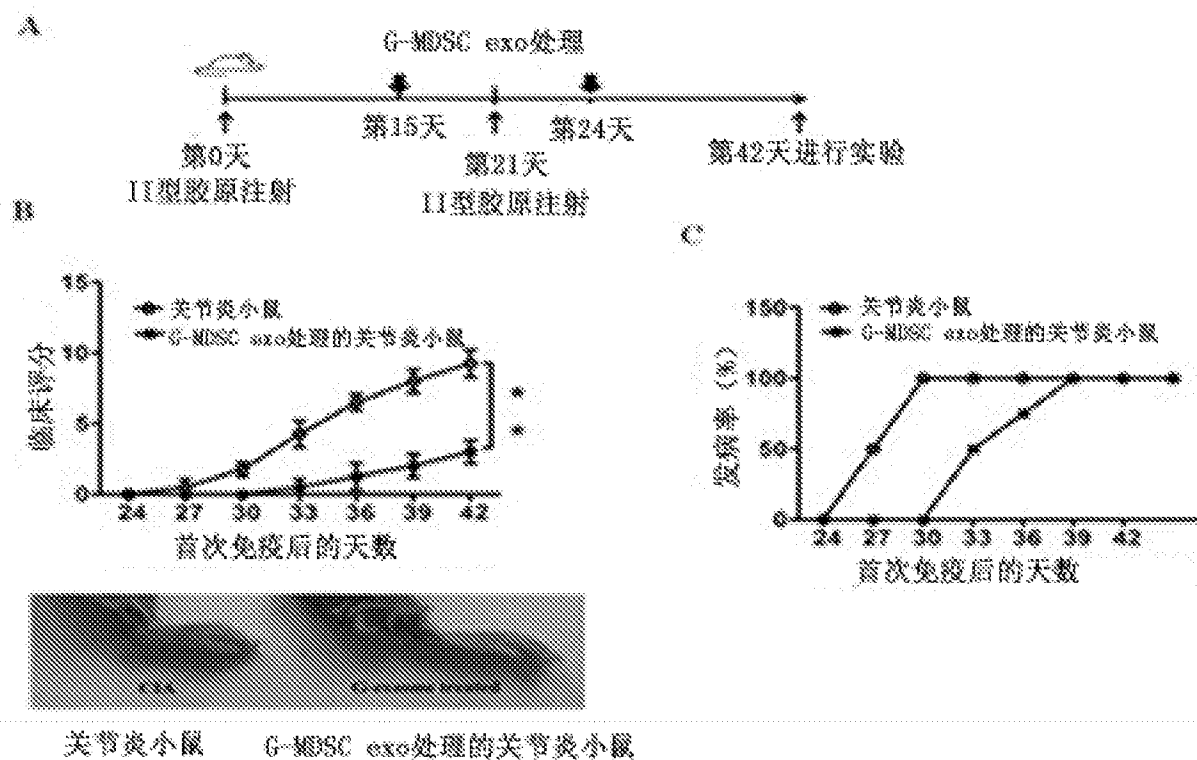


图 6

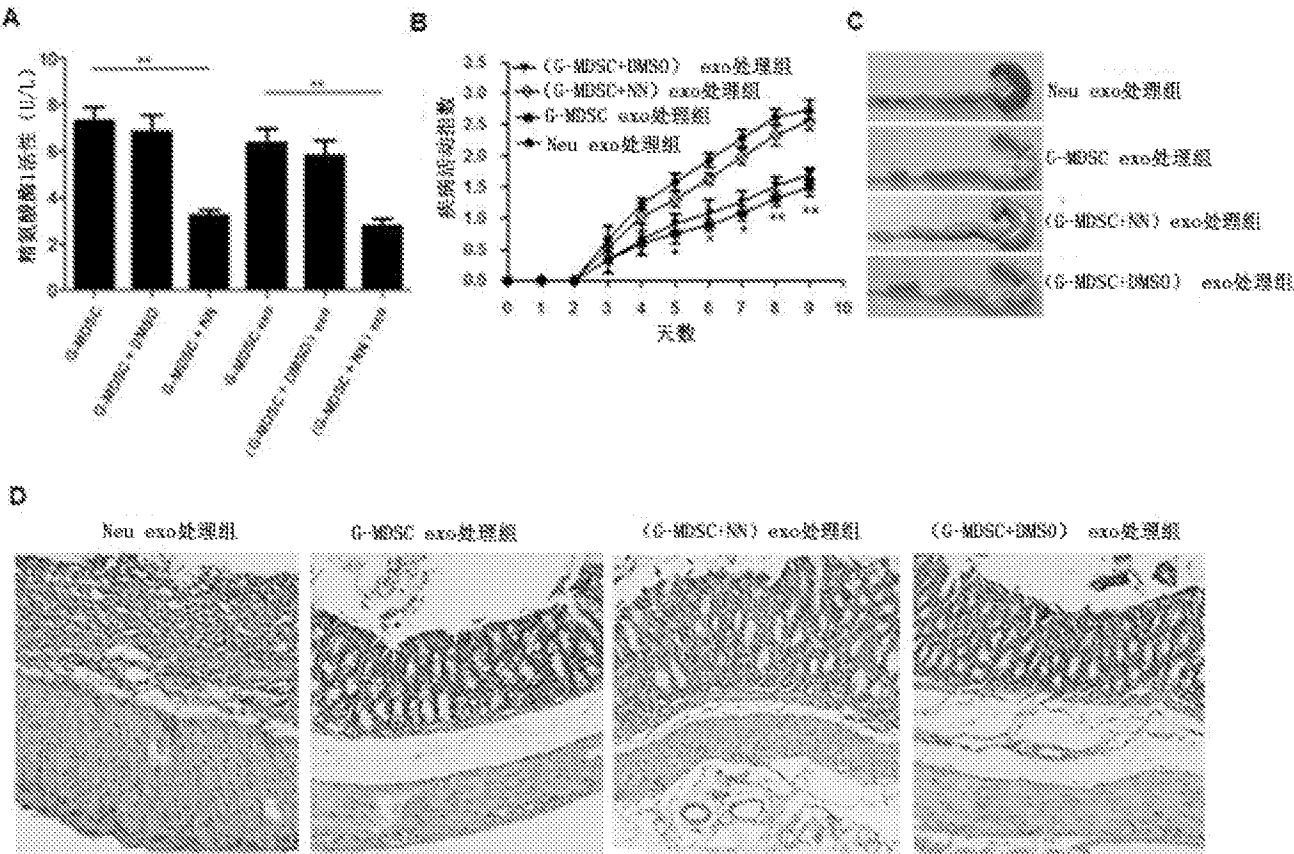


图 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2015/077902**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/078 (2010.01) i; A61K 35/15 (2015.01) i; A61P 37/08 (2006.01) n; A61P 29/00 (2006.01) n; A61P 19/02 (2006.01) n; A61P 37/02 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, CNKI, ISI: vesicle, myeloid-derived suppressor cell, heterocyst, exosome, exosomes, membrane, lipid, grain, granulocytic, myeloid, suppressor, MDSC, MDSCs, immunity, tumour

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN 104673749 A (JIANGSU UNIVERSITY), 03 June 2015 (03.06.2015), see claims 1-10                                                                                                                                                                                                                   | 1-10                  |
| A         | YANG, Xiaojun, "Prolongation of Rat Intestinal Recipients' Survival by Administration of exosomes derived from Donor Immature Dendritic Cells", MEDICINE & PUBLIC HEALTH, CHINA DOCTORAL DISSERTATIONS FULL-TEXT DATABASE, E059-22, 15 July 2011 (15.07.2011), ISSN: ISSN 1674-022X, see abstract | 1-10                  |
| A         | WO 2012149416 A2 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA et al.), 01 November 2012 (01.11.2012), see the whole document                                                                                                                                                                                         | 1-10                  |
| A         | CN 104127438 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH), 05 November 2014 (05.11.2014), see the whole document                                                                                                                                                                               | 1-10                  |
| A         | CN 103626846 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY), 12 March 2014 (12.03.2014), see the whole document                                                                                                                                                                                                | 1-10                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>09 November 2015 (09.11.2015)                                                                                                                         | Date of mailing of the international search report<br><b>17 November 2015 (17.11.2015)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN:<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No.: (86-10) 62019451 | Authorized officer<br><b>SUN, Yanke</b><br>Telephone No.: (86-10) <b>62088439</b>          |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2015/077902**

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family    | Publication Date |
|--------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| CN 104673749 A                             | 03 June 2015     | None             |                  |
| WO 2012149416 A2                           | 01 November 2012 | US 2012276004 A1 | 01 November 2012 |
|                                            |                  | CN 103608028 A   | 26 February 2014 |
|                                            |                  | US 2015204887 A1 | 23 July 2015     |
|                                            |                  | WO 2012149416 A3 | 10 January 2013  |
|                                            |                  | EP 2701722 A2    | 05 March 2014    |
|                                            |                  | EP 2701722 A4    | 31 December 2014 |
|                                            |                  | US 8883497 B2    | 11 November 2014 |
| CN 104127438 A                             | 05 November 2014 | JP 2011513217 A  | 28 April 2011    |
|                                            |                  | AU 2009215934 C1 | 08 May 2014      |
|                                            |                  | PT 2254586 E     | 18 May 2015      |
|                                            |                  | KR 20100122087 A | 19 November 2010 |
|                                            |                  | ES 2537516 T3    | 09 June 2015     |
|                                            |                  | EP 2254586 B1    | 08 April 2015    |
|                                            |                  | US 2015190430 A1 | 09 July 2015     |
|                                            |                  | AU 2009215934 A1 | 27 August 2009   |
|                                            |                  | SI 2254586 T1    | 31 July 2015     |
|                                            |                  | US 2011003008 A1 | 06 January 2011  |
|                                            |                  | DK 2254586 T3    | 15 June 2015     |
|                                            |                  | EP 2254586 A1    | 01 December 2010 |
|                                            |                  | AU 2009215934 B2 | 24 October 2013  |
|                                            |                  | JP 5718648 B2    | 13 May 2015      |
|                                            |                  | CN 102014934 A   | 13 April 2011    |
|                                            |                  | HR P20150510 T1  | 05 June 2015     |
|                                            |                  | CN 102014934 B   | 20 August 2014   |
|                                            |                  | WO 2009105044 A1 | 27 August 2009   |
| CN 103626846 A                             | 12 March 2014    | None             |                  |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/077902

## A. 主题的分类

C12N 5/078(2010.01)i; A61K 35/15(2015.01)i; A61P 37/08(2006.01)n; A61P 29/00(2006.01)n; A61P 19/02(2006.01)n; A61P 37/02(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, CNKI, ISI; 囊泡, 胞外体, 膜, 脂质, 颗粒, 粒细胞, 髓源性抑制细胞, 异质细胞, 免疫, 肿瘤, exosome, exosomes, membrane, lipid, grain, granulocytic, myeloid, suppressor, MDSC, MDSCs, immunity, tumour

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                            | 相关的权利要求 |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| PX   | CN 104673749 A (江苏大学) 2015年 6月 3日 (2015 - 06 - 03)<br>参见权利要求1-10                                                                             | 1-10    |
| A    | 杨晓俊, “未成熟树突状细胞分泌的exosomes延长大鼠小肠移植受体的存活时间”<br>中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑E059-22, 2011年 7月<br>15日 (2011 - 07 - 15),<br>ISSN: ISSN 1674-022X,<br>参见摘要 | 1-10    |
| A    | WO 2012149416 A2 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA等) 2012年 11月 1日 (2012 - 11 - 01)<br>参见全文                                                           | 1-10    |
| A    | CN 104127438 A (新加坡科技研究局) 2014年 11月 5日 (2014 - 11 - 05)<br>参见全文                                                                              | 1-10    |
| A    | CN 103626846 A (上海交通大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12)<br>参见全文                                                                                | 1-10    |

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

## \* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 11月 9日

国际检索报告邮寄日期

2015年 11月 17日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号  
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

孙彦珂

电话号码 (86-10)62088439

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/077902

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |             |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|-------------|----|----------------|
| CN          | 104673749  | A  | 2015年 6月 3日    | 无    |             |    |                |
| WO          | 2012149416 | A2 | 2012年 11月 1日   | US   | 2012276004  | A1 | 2012年 11月 1日   |
|             |            |    |                | CN   | 103608028   | A  | 2014年 2月 26日   |
|             |            |    |                | US   | 2015204887  | A1 | 2015年 7月 23日   |
|             |            |    |                | WO   | 2012149416  | A3 | 2013年 1月 10日   |
|             |            |    |                | EP   | 2701722     | A2 | 2014年 3月 5日    |
|             |            |    |                | EP   | 2701722     | A4 | 2014年 12月 31日  |
|             |            |    |                | US   | 8883497     | B2 | 2014年 11月 11日  |
| CN          | 104127438  | A  | 2014年 11月 5日   | JP   | 2011513217  | A  | 2011年 4月 28日   |
|             |            |    |                | AU   | 2009215934  | C1 | 2014年 5月 8日    |
|             |            |    |                | PT   | 2254586     | E  | 2015年 5月 18日   |
|             |            |    |                | KR   | 20100122087 | A  | 2010年 11月 19日  |
|             |            |    |                | ES   | 2537516     | T3 | 2015年 6月 9日    |
|             |            |    |                | EP   | 2254586     | B1 | 2015年 4月 8日    |
|             |            |    |                | US   | 2015190430  | A1 | 2015年 7月 9日    |
|             |            |    |                | AU   | 2009215934  | A1 | 2009年 8月 27日   |
|             |            |    |                | SI   | 2254586     | T1 | 2015年 7月 31日   |
|             |            |    |                | US   | 2011003008  | A1 | 2011年 1月 6日    |
|             |            |    |                | DK   | 2254586     | T3 | 2015年 6月 15日   |
|             |            |    |                | EP   | 2254586     | A1 | 2010年 12月 1日   |
|             |            |    |                | AU   | 2009215934  | B2 | 2013年 10月 24日  |
|             |            |    |                | JP   | 5718648     | B2 | 2015年 5月 13日   |
|             |            |    |                | CN   | 102014934   | A  | 2011年 4月 13日   |
|             |            |    |                | HR   | P20150510   | T1 | 2015年 6月 5日    |
|             |            |    |                | CN   | 102014934   | B  | 2014年 8月 20日   |
|             |            |    |                | WO   | 2009105044  | A1 | 2009年 8月 27日   |
| CN          | 103626846  | A  | 2014年 3月 12日   | 无    |             |    |                |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)