



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202003846 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：108104676

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 12 日

(51)Int. Cl. : C12N15/113 (2010.01)

A61K31/7088(2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/02/12 美國

62/629,563

(71)申請人：美商科迪亞克生物科學股份有限公司 (美國) CODIAK BIOSCIENCES, INC. (US)
美國(72)發明人：薩士亞娜羅亞南 斯利拉姆 SATHYANARAYANAN, SRIRAM (US) ; 威廉斯 杜
格拉斯 E WILLIAMS, DOUGLAS E. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：66 項 圖式數：14 共 143 頁

(54)名稱

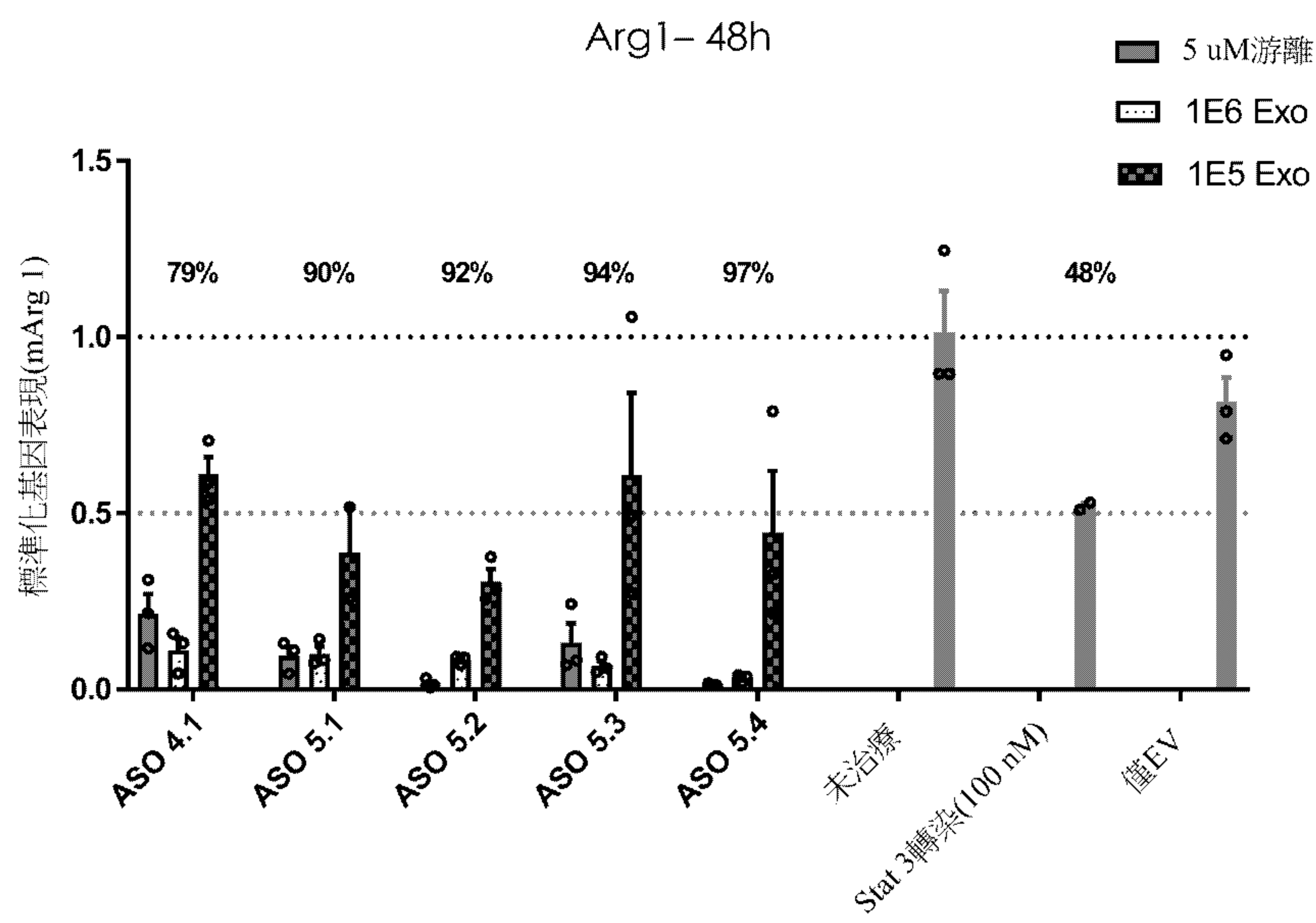
用於巨噬細胞極化之方法及組合物

(57)摘要

本發明揭示包含細胞外囊泡之組合物及方法，該等細胞外囊泡包含靶向基因，導致腫瘤相關巨噬細胞之巨噬細胞極化的核酸。在某些實施例中，本發明揭示用於增加巨噬細胞極化以用於治療癌症之方法及組合物。

Disclosed herein are compositions and methods comprising extracellular vesicles comprising nucleic acid that target genes, leading to macrophage polarization of tumor associated macrophages. In certain embodiments, disclosed herein are methods and compositions for increasing macrophage polarization for the treatment of cancer.

指定代表圖：



【圖7】



202003846

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於巨噬細胞極化之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR MACROPHAGE
POLARIZATION

【中文】

本發明揭示包含細胞外囊泡之組合物及方法，該等細胞外囊泡包含靶向基因，導致腫瘤相關巨噬細胞之巨噬細胞極化的核酸。在某些實施例中，本發明揭示用於增加巨噬細胞極化以用於治療癌症之方法及組合物。

【英文】

Disclosed herein are compositions and methods comprising extracellular vesicles comprising nucleic acid that target genes, leading to macrophage polarization of tumor associated macrophages. In certain embodiments, disclosed herein are methods and compositions for increasing macrophage polarization for the treatment of cancer.

【指定代表圖】

圖7

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於巨噬細胞極化之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR MACROPHAGE
POLARIZATION

【技術領域】

【0001】 本發明係關於包含靶向基因之具有核酸之細胞外囊泡之組
合物及引起腫瘤相關巨噬細胞之巨噬細胞極化之方法。

【先前技術】

【0002】 免疫療法為藉由誘導、增強或遏制免疫反應進行之疾病治
療。癌症免疫療法之副作用通常比諸如化學療法及輻射療法之傳統癌症療
法之副作用少。在一種方法中，癌症免疫療法已用於刺激患者之自身巨噬
細胞以攻擊癌細胞。巨噬細胞呈現不同表現型，例如其可能具有促癌活
性，或其可能具有抗癌活性。M2表現型或「替代活化巨噬細胞」通常展
現諸如免疫系統遏制及細胞外基質及組織重塑活性產生之促癌活性。M1
表現型或「古典活化巨噬細胞」通常展現諸如腫瘤細胞吞噬作用及適應性
免疫刺激之抗癌活性以使得腫瘤細胞可受到辨識及攻擊。需要促進巨噬細
胞極化(亦即轉化成M1表現型)之免疫調節方法及組合物中之改善。

【發明內容】

【0003】 本文提供包含選擇有一或多種可改質巨噬細胞活性之免疫
調節組分、增濃有一或多種可改質巨噬細胞活性之免疫調節組分或經一或
多種可改質巨噬細胞活性之免疫調節組分工程改造之細胞外囊泡之組合

物，及促進巨噬細胞自M2表現型轉換成M1表現型(巨噬細胞極化)及強化患者之抗癌免疫系統的方法。

【0004】 因此，在第一態樣中，本文提供包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡，該一或多種免疫調節組分例如為抑制靶細胞中之至少一種基因之核酸分子。在某些實施例中，靶細胞為巨噬細胞，且與等莫耳量之單獨(多種)免疫調節組分相比，基因抑制增加自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化。在某些實施例中，細胞外囊泡為胞外體。在某些實施例中，核酸為抑制性RNA。在某些實施例中，抑制性RNA為反義RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初級miRNA(pri-miRNA)或前驅miRNA(pre-miRNA)。在某些實施例中，至少一種基因係選自由以下組成之群：KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、麩醯胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 及PKM2。在某些實施例中，基因為KRAS。在某些實施例中，核酸為靶向野生型人類KRAS之抑制性RNA。在某些實施例中，抑制性RNA亦靶向小鼠Kras^{G12D}。在某些實施例中，巨噬細胞為腫瘤駐留巨噬細胞。在某些實施例中，腫瘤為胰臟腫瘤。在某些實施例中，細胞外囊泡進一步包含額外免疫調節組分。在某些實施例中，額外免疫調節組分為小分子藥物、抗體或治療性蛋白質。在某些實施例中，抗體為免疫檢查點抑制劑。在某些態樣中，本文提供包含以上所提及之細胞外囊泡中之任一種之醫藥組合物。

【0005】 在某些態樣中，本文描述治療有需要之患者之疾病之方法，其包含向患者投與本文所描述之細胞外囊泡或醫藥組合物，由此治療患者疾病。在某些實施例中，疾病為癌症。在某些實施例中，癌症為胰臟

癌。在一些實施例中，疾病為纖維化病況。在一些實施例中，纖維化病況為肺纖維化、肝纖維化或胰纖維化。在某些實施例中，肝纖維化為非酒精性脂肪變性肝炎或NASH。在某些實施例中，患者為人類。在某些實施例中，核酸為靶向原致癌基因之抑制性RNA。在某些實施例中，原致癌基因為人類KRAS。在某些實施例中，癌症為胰臟癌。在某些實施例中，該等方法進一步包含執行至少第二療法。在某些實施例中，第二療法包含手術療法、化學療法、輻射療法、冷凍療法、激素療法或免疫療法。

【0006】 在某些實施例中，靶細胞M2巨噬細胞為選自由M2a、M2b及M2c巨噬細胞組成之群之腫瘤相關巨噬細胞。在某些實施例中，與極化之前之M2巨噬細胞相比，M1巨噬細胞顯示增加分泌選自由 $\text{INF}\gamma$ 、IL-12、IL-23、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、IL-1、CSCL9、CXCL10及CXCL11組成之群之發炎性細胞介素及趨化介素。在某些實施例中，與極化之前之M2巨噬細胞相比，M1巨噬細胞顯示之減少分泌選自由IL-10、 $\text{TGF}\beta$ 、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及CCL24組成之群之免疫抑制性細胞介素及趨化介素。在某些實施例中，與極化之前之M2巨噬細胞相比，M1巨噬細胞表現增加之腫瘤相關抗原。在某些實施例中，與極化之前之M2巨噬細胞相比，M1巨噬細胞增加 CD8^+ T細胞及/或自然殺手細胞之刺激。

【0007】 在某些態樣中，本文描述治療個體之胰臟癌之方法，其包含向個體投與包含靶向人類野生型KRAS之抑制性RNA之細胞外囊泡；其中治療將腫瘤駐留巨噬細胞自M2表現型極化成M1表現型之百分比增加至高於在經靶向人類KRAS^{G12D}之抑制性RNA治療之患者中所觀測到的極化百分比的水準。

【圖式簡單說明】

【0008】 圖1顯示Stat 3、Stat 6、Cebp β -1、Pi3K γ 、CEBP β -2及Kras在轉染遞增量之靶向基因中之各者之siRNA之後的基因表現量。

【0009】 圖2顯示在轉染增加量之分別靶向Stat 3、Stat 6、Cebp β -1、Pi3K γ 、CEBP β -2及Kras之siRNA之後的Arg1表現。加擾siRNA轉染巨噬細胞用作對照。

【0010】 圖3顯示如藉由六個巨噬細胞亞群(M0、M1、M2a、M2c、M2++及TAM)之總細胞GFP強度所測定之胞外體攝取。

【0011】 圖4顯示如藉由總螢光強度所量測之M2或M0巨噬細胞之游離反義寡核苷酸(游離ASO)及負載ASO之胞外體(Exo-ASO)攝取。

【0012】 圖5A顯示在於未處理小鼠中腹膜內注射 1×10^{11} 或 1×10^{12} 個含GFP胞外體之後活體內巨噬細胞之胞外體攝取。圖5B顯示在於B16F10腫瘤攜帶小鼠中注射單次劑量之天然未標記胞外體或Cy5標記Exo-ASO之後藉由活體內腫瘤細胞及巨噬細胞進行之天然胞外體及Exo-ASO更新。

【0013】 圖6顯示在與5 μ M游離膽固醇標籤ASO或 1×10^5 或 1×10^6 個負載有膽固醇標籤ASO之胞外體一起培育之後M2極化鼠RAW264.7細胞中之Stat 3表現。測試五種不同之靶向STAT3之膽固醇標籤ASO：ASO 4.1，雙股MOE化學物質；ASO 5.1及ASO 5.2，單股O-甲基化學物質；ASO 5.3及ASO 5.4，單股MOE化學物質。未經治療之極化巨噬細胞及與未經修飾之胞外體一起培育之極化巨噬細胞用作陰性對照。Stat 3 siRNA轉染巨噬細胞用作陽性對照。

【0014】 圖7顯示在與5 μ M游離膽固醇標籤ASO或 1×10^5 或 1×10^6 個負載有膽固醇標籤ASO之胞外體一起培育之後M2極化鼠RAW264.7細胞中之Arg1轉錄量。測試五種不同之靶向STAT3之膽固醇標籤ASO：ASO

4.1，雙股MOE化學物質；ASO 5.1及ASO 5.2，單股O-甲基化學物質；ASO 5.3及ASO 5.4，單股MOE化學物質。未經治療之極化巨噬細胞及與未經修飾之胞外體一起培育之極化巨噬細胞用作陰性對照。Stat 3 siRNA轉染巨噬細胞用作陽性對照。

【0015】 圖8A顯示針對STAT3之在與高劑量(4 μ M)之ASO或高劑量(4 μ M)及低劑量(0.4 μ M)之Exo-ASO一起培育之後M2極化鼠RAW264.7細胞中之STAT3表現。圖8B顯示針對KRAS之在與高劑量(4 μ M)之ASO或Exo-ASO一起培育之後M2極化鼠RAW264.7細胞中之KRAS表現。圖8C顯示針對C/EBP β 之在與高劑量(4 μ M)及低劑量(0.4 μ M)之ASO或Exo-ASO一起培育之後M2極化鼠RAW264.7細胞中之C/EBP β 表現。

【0016】 圖9A顯示在經變化劑量之游離STAT3 ASO或STAT3 Exo-ASO治療之後來自三個單獨供體之原代人類巨噬細胞中之STAT3轉錄量。呈現各治療之IC50及相較於游離STAT3 ASO之STAT3 Exo-ASO之改善倍數。圖9B顯示在經變化劑量之游離STAT3 ASO或STAT3 Exo-ASO治療之後來自三個單獨供體之原代人類巨噬細胞中之CD163量。呈現各治療之IC50及相較於游離STAT3 ASO之STAT3 Exo-ASO之改善倍數。

【0017】 圖10顯示分別針對HIF1 α 、Pi3K γ 、CEBP/ β 、STAT6及STAT3之在經4 μ M游離ASO或Exo-ASO治療之後人類M2巨噬細胞中之靶基因表現。未經治療之人類M2巨噬細胞及經4 μ M加擾Exo-ASO治療之人類M2巨噬細胞用作對照。

【0018】 圖11顯示分別針對HIF1 α 、Pi3K γ 、CEBP/ β 、STAT6及STAT3之在經4 μ M游離ASO或Exo-ASO治療之後人類M2巨噬細胞中之CD163表現。未經治療之人類M2巨噬細胞及經4 μ M加擾Exo-ASO治療之

人類M2巨噬細胞用作對照。

【0019】 圖12A顯示在存在或不存在LPS之情況下經4 μ M游離STAT3 ASO、4 μ M STAT3 Exo-ASO、4 μ M加擾Exo-ASO、天然胞外體或C188-9 (亦即STAT3之小分子抑制劑)治療之後之IL-12誘導。圖12B顯示在存在或不存在LPS之情況下經4 μ M游離STAT3 ASO、4 μ M STAT3 Exo-ASO、4 μ M加擾Exo-ASO、天然胞外體或C188-9 (亦即STAT3之小分子抑制劑)治療之後之IL-23誘導。

【0020】 圖13A顯示在經未經修飾之胞外體(僅EV)及濃度匹配之Stat 3游離ASO及Stat 3 Exo-ASO治療之後之STAT3轉錄量。圖13B顯示在經未經修飾之胞外體(僅EV)及濃度匹配之Stat 3游離ASO及Stat 3 Exo-ASO治療之後之CD163轉錄量。圖13C顯示在經未經修飾之胞外體(僅EV)及濃度匹配之Stat 3游離ASO及Stat 3 Exo-ASO治療之後之TGF β 轉錄量。圖13D顯示在經未經修飾之胞外體(僅EV)及濃度匹配之Stat 3游離ASO及Stat 3 Exo-ASO治療之後之STAT6轉錄量。

【0021】 圖14顯示在經分別負載有針對STAT3之ASO (MOE及LNA化學物質兩者)、針對STAT6之ASO (MOE化學物質)及針對CEBP/ β 之ASO (MOE化學物質)之胞外體治療之後的TGF β 表現量。

【實施方式】

【0022】 巨噬細胞極化為巨噬細胞藉由其而採用不同之對來自巨噬細胞微環境之信號起反應之功能性程式的方法。此能力與其在生物體中之多種作用相關：其為先天性免疫系統之有力效應細胞，且亦在細胞碎片移除、胚胎發展及組織修復中至關重要。

【0023】 巨噬細胞表現型廣泛地分成2組：M1 (古典活化巨噬細胞)

及M2 (替代活化巨噬細胞)。此廣泛分類係基於活體外研究，其中經培養之巨噬細胞經刺激其表現型轉換成特定狀態之分子治療。M1巨噬細胞在直接抗病原體之宿主防禦(諸如促炎性細胞介素及殺微生物分子之吞噬及分泌)中具有促炎性、重要性。M2巨噬細胞具有完全相反功能：調節發炎之消退期及修復受損組織。參見例如Wynn, T. A., Chawla, A.及Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 496(7446), 445-455；Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J.及Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173。許多固態腫瘤之特徵在於富骨髓細胞浸潤物，其常常包含稱為腫瘤相關巨噬細胞(TAM)之一種類型之M2巨噬細胞。M2巨噬細胞(諸如TAM)表現促進代謝酶精胺酸酶(Arg1)表現之高量磷酸化STAT3及STAT6。TAM介導多種促腫瘤活性，諸如(例如)癌細胞運動性促進、癌轉移形成及血管生成，且TAM形成係視在發展腫瘤中存在之微環境因子而定。TAM產生免疫抑制性細胞介素(諸如(例如) IL-10、TGF β 、PGE2及極少量之NO或ROI)及低量發炎性細胞介素(IL-12、IL-1 β 、TNF α 、IL-6)。與「古典活化」M1巨噬細胞相比，藉由TAM進行之腫瘤相關抗原呈現減少，T細胞及NK細胞之抗腫瘤功能之刺激亦如此。與M1巨噬細胞不同，TAM不能溶解腫瘤細胞。

https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization - cite_note-Sica2008-31 因此，如已經由傳遞藥劑以更改TAM之募集及分佈、耗竭現存TAM或誘導TAM自M2表現型向M1表現型之再教育所證實，TAM及其他M2巨噬細胞靶向提供新穎抗癌治療策略。

【0024】 本發明之胞外體治療劑對M2巨噬細胞具有選擇性作用以促進組織滯留微環境來在如癌症及纖維化之疾病之情形下藉由將異常巨噬細胞「再極化」成M1表現型來治療此等疾病。本文所描述之胞外體精確地經各種生物活性分子工程改造至胞外體表面上或於胞外體腔內部以產生接合將M2巨噬細胞再極化成M1表現型以治療人類疾病之路徑的候選藥物。

【0025】 腫瘤相關M2極化巨噬細胞或TAM可有效地遏制T細胞增殖及效應功能且促進腫瘤生長。亦使用耗竭針對CSF-1受體之巨噬細胞之抗體報導TAM逆轉回至M1表現型。此等方法由於窄治療窗及因如所預期靶向全部巨噬細胞而不僅僅靶向異常M2巨噬細胞所致之特異性缺乏而在臨床試驗中顯示有限成效。預期該成批巨噬細胞耗竭導致增加之感染風險及其他安全性問題。本發明之胞外體由於針對巨噬細胞之天然胞外體向性而更具選擇性地靶向M2巨噬細胞，且打破針對所需M1表現型之功能之平衡。此等胞外體再極化巨噬細胞，引起抗腫瘤免疫反應所需之發炎性細胞介素之所需頻譜之產生。

【0026】 胞外體將免疫抑制性M2巨噬細胞活體外再程式化成M1表現型。

【0027】 除腫瘤微環境中所誘導之免疫抑制之外，M2極化巨噬細胞分泌大量轉變生長因子 β 或TGF β ，亦即細胞信號傳導中所涉及之重要細胞介素，其誘導纖維母細胞積聚，此引起膠原蛋白沈積及組織重塑，最終引起組織纖維化。已顯示藉由靶向如STAT3之關鍵信號傳導分子來再程式化此等M2巨噬細胞以減少TGF β 產生在肺纖維化之臨床前模型中具有有益活性。已採用若干種靶向STAT3之小分子方法，但僅在異常M2巨噬細胞

內之抑制特異性缺乏已阻止此治療方法可行。此處所描述之特定胞外體選擇性地靶向允許M2巨噬細胞靶向STAT3之M2巨噬細胞中之關鍵路徑以及肺及其他組織纖維化症候群中之其他細胞路徑。

【0028】 本文揭示適用於調節免疫系統之巨噬細胞之細胞外囊泡。此等細胞外囊泡包含一或多種免疫調節組分，其在與巨噬細胞接觸時，抑制至少一種巨噬細胞靶基因，由此與等莫耳量之單獨一或多種免疫調節組分相比，增加自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化。亦提供用於產生細胞外囊泡之方法及使用此等細胞外囊泡治療癌症及諸如(例如)纖維化病況之其他免疫系統相關疾病之方法。

【0029】 在更詳細地描述本發明之前，應理解，本發明不限於所描述之特定實施例，因此當然可變化。亦應理解，本文所使用之術語僅出於描述特定實施例之目的而不意欲為限制性的，此係因為本發明之範疇將僅由隨附申請專利範圍限制。

【0030】 在提供一定範圍之值之情況下，應理解本發明涵蓋彼範圍之上限與下限之間之各中間值(除非上下文另外清晰地指示，否則至下限單位之十分之一)及彼所陳述範圍內之任何其他所陳述或中間值。此等較小範圍之上限及下限可獨立地包括於較小範圍內且亦涵蓋於本發明內，在所陳述範圍內受到任何特定排他性之限制。在所陳述範圍包括限制中之一個或兩個之情況下，本發明亦包括不包括彼等所包括限制中之一個或兩個之範圍。

【0031】 除非另外規定，否則本文所使用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般技術者通常所理解之含義相同之含義。儘管在本發明之實踐或測試中亦可使用與本文所描述之方法及材料類似或等效

之任何方法及材料，但現描述代表性說明性方法及材料。

【0032】 本說明書中所引用之所有公開及專利均以引用之方式併入本文中，如同特定地且單獨地指示各個別公開或專利以引用之方式併入一般，且以引用之方式併入本文中以結合所引用之公開揭示且描述方法及/或材料。

【0033】 應注意，除非上下文另外清晰地指示，否則如本文中及隨附申請專利範圍中所使用之單數形式「一(a/an)」及「該/該等」包括複數個(種)提及物。類似地，術語「至少一個(種)」包括複數個(種)提及物(亦即除非上下文另外清晰地指示，否則等效於片語「一或多個(種)」)。應進一步注意，申請專利範圍可撰寫成不包括任何視情況選用之元素。因此，此陳述意欲與對所主張元素之敘述結合充當使用諸如「僅(solely/only)」及其類似者之排他性術語或意欲充當使用否定性限制之前提基礎。

【0034】 術語「約」在用於修飾數值時意欲涵蓋如可容易地由熟習此項技術者所測定之與出於實踐所描述技術之目的之所陳述值功能性等效之所陳述值中的變化。在某些實施例中，術語「約」包括+/- 5%、+/- 10%、+/- 20%、+/- 30%、+/- 40%或+/- 50%自所陳述值之變化。

【0035】 如熟習此項技術者在閱讀本發明之後將顯而易見，本文所描述及說明之個別實施例中之各者具有離散組分及特點，該等離散組分及特點可在不脫離本發明之範疇或精神之情況下容易地與其他若干實施例中之任一者之特點分離或組合。任何所列舉方法均可按所列舉事件之次序或按邏輯上有可能之任何其他次序來進行。

【0036】 在進一步描述本發明中，將更詳細地論述用於實踐本發明

方法之本發明系統，隨後論述相關方法綜述。

【0037】 如本文所使用之術語「細胞外囊泡」係指包含封閉內部空間之膜之細胞源性囊泡。細胞外囊泡包含所有直徑小於衍生其之細胞之直徑之膜結合囊泡。一般而言，細胞外囊泡在20 nm至1000 nm直徑範圍內，且可包含處於內部空間內、展現於細胞外囊泡之外表面上及/或跨越膜之各種巨分子貨物。貨物可包含核酸、蛋白質、碳水化合物、脂質、小分子及/或其組合。舉例而言且非限制性地，細胞外囊泡包括凋亡體、細胞片段、藉由直接或間接操縱(例如藉由連續擠出或用鹼性溶液進行之處理)而來源於細胞之囊泡、含有小囊之胞器及由活細胞產生(例如藉由直接質膜出芽(plasma membrane budding)或融合晚期胞內體與質膜)之囊泡。細胞外囊泡可來源於活生物體或死生物體、外植組織或器官及/或經培養之細胞。細胞外囊泡物種包括如例如出於所有目的以引用之方式併入本文中之共有美國專利第10,195,290號中所描述之胞外體及微型囊泡。

【0038】 如本文所使用之術語「胞外體」係指包含封閉內部空間之膜之細胞源性小(直徑在20-300 nm之間，直徑更佳在40-200 nm之間)囊泡，且該囊泡係藉由直接質膜出芽或藉由融合晚期胞內體與質膜而由該細胞產生。胞外體為細胞外囊泡物種。胞外體包含脂質或脂肪酸及多肽，且視情況包含有效負載物(例如治療劑)、接收體(例如靶向部分)、聚核苷酸(例如核酸、RNA或DNA)、糖(例如單糖、多糖或聚糖)或其他分子。胞外體可來源於生產細胞，且基於其尺寸、密度、生物化學參數或其組合自生產細胞中分離。

【0039】 如本文所使用之術語「微型囊泡」係指包含封閉內部空間之膜之細胞源性小(直徑在20-250 nm之間，直徑更佳在30-150 nm之間)囊

泡，且該囊泡係藉由直接或間接操縱以使得微型囊泡不在無操縱之情況下由生產細胞產生而由該細胞生成。生產細胞之適當操縱包括但不限於連續擠出、用鹼性溶液進行之處理、音波處理或其組合。在一些情況下，微型囊泡產生可能導致生產細胞損壞。較佳地，微型囊泡群實質上不含藉助於自質膜直接出芽或融合晚期胞內體與質膜而來源於生產細胞之囊泡。微型囊泡為細胞外囊泡物種。微型囊泡包含脂質或脂肪酸及多肽，且視情況包含有效負載物(例如治療劑)、接收體(例如靶向部分)、聚核苷酸(例如核酸、RNA或DNA)、糖(例如單糖、多糖或聚糖)或其他分子。一旦微型囊泡根據操縱來源於生產細胞，則其可基於其尺寸、密度、生物化學參數或其組合自生產細胞中分離。

【0040】 如本文所使用之術語「M2表現型」係指展現一或多種促腫瘤活性或表現此項技術中已知與M2表現型相關聯之標記之巨噬細胞，該等一或多種促腫瘤活性或標記諸如但不限於CD8⁺ T細胞及/或自然殺手細胞刺激之減少或缺乏；腫瘤細胞之吞噬缺乏；M2相關細胞介素(例如IL-10、TGFβ、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及CCL24)之分泌及/或表現；生長因子(例如VEGF-A、VEGF-C、EGF及TGF-β)之分泌及/或表現；轉移性酶(例如基質金屬蛋白酶MMP2、MMP9、半胱胺酸組織蛋白酶)之分泌及/或表現；免疫抑制性因子(例如精胺酸酶I (ArgI)，其自可誘導氧化氮合成酶(iNOS)提取受質L-精胺酸)之分泌/表現；細胞表面標記YM1、FIZZ1、Dectin-1、MGL之表現；M2相關miRNA(例如miRNA146a、miRNA let 7b及miR-223)之表現(參見例如Mosser, D. M. 及 Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature Reviews Immunology, 8(12), 958-96；Murray, P. J.,

Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20 ; 及 Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F. 及 Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520-5299 , 及其中所引用之參考文獻, 各文獻出於所有目的以引用之方式併入)及/或下文所列舉與至少一種參考檢體相比之M1相關因子之減少的表現/分泌或降低的M1相關活性, 其中參考檢體包含M1活化巨噬細胞群。活體外M1活化係藉由用諸如典型用於革蘭氏陰性細菌之細菌脂多糖(LPS)及典型用於革蘭氏陽性細菌之脂磷壁酸(LTA)、顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)或LPS及干擾素 γ 組合(IFN- γ)之TLR配位體處理來引發。參見Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J.及Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173 ; Krausgruber, Thomas等人. 「IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses.」 *Nature immunology* 12.3 (2011): 231-238及Martinez, F. O.及Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6(3月), 1-13 , 及其中所引用之參考文獻, 各文獻出於所有目的以引用之方式併入本文中。

【0041】 如本文所使用之術語「M1表現型」係指展現抗腫瘤活性或此項技術中已知與M1表現型相關聯之標記之巨噬細胞, 該等抗腫瘤活性或標記諸如但不限於CD8⁺ T細胞及/或自然殺手細胞之刺激、腫瘤細胞

之吞噬、M1相關細胞介素(例如 $\text{INF}\gamma$ 、IL-12、IL-23、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、IL-1、CCL5、CSCL9、CXCL10及CXCL11)之分泌及/或表現、M1相關miRNA(例如miRNA155、miR-33)之表現(參見例如Mosser, D. M.及Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-96；Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20；及Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F.及Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520-5299，及其中所引用之參考文獻，各文獻出於所有目的以引用之方式併入)及/或上文所列舉與至少一種參考檢體相比之M2相關因子之減少的表現/分泌或降低的M2相關活性，其中參考檢體包含M2活化巨噬細胞群。活體外M2活化係藉由用IL-4及IL-13處理來引發(參見例如Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F.及Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520-529，出於所有目的以引用之方式併入)。

【0042】 如本文所使用之術語「巨噬細胞極化」係指巨噬細胞自M2表現型向M1表現型之變化，且/或係指與至少一種參考檢體(例如在測試檢體或歷史資料之前取自同一患者之檢體)相比之展現M1表現型之巨噬細胞之於患者中所發現之巨噬細胞(例如腫瘤相關巨噬細胞或循環巨噬細胞)群的百分比增加。參見例如Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M.,

Heilman, M. J. 及 Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173 ;
 Mosser, D. M. 及 Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-969 ; 及
 Xue, J., Schmidt, S. V. 及 Schultze, J. L. (2014), Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*, 40(2)L 274-288 , 各文獻出於所有目的以引用之方式併入。

【0043】術語「細胞外囊泡傳遞 (extracellular vesicle delivery/delivery of extracellular vesicles)」係指向本發明之靶組織、細胞及/或器官之細胞外囊泡投與及定位。在一些實施例中，可將免疫調節組分傳遞至靶細胞之細胞質。在其他實施例中，將免疫調節組分傳遞至靶細胞之膜。在一些實施例中，細胞外囊泡之膜與靶細胞之膜融合。

【0044】如本文所使用之術語「生產細胞」係指可與細胞外囊泡分離之任何細胞。生產細胞為充當細胞外囊泡之源之細胞。生產細胞可與細胞外囊泡共用蛋白質、脂質、糖或核酸組分。在一些實施例中，生產細胞為經修飾細胞或合成細胞。在一些實施例中，生產細胞為經培養之細胞或經分離之細胞。在某些實施例中，生產細胞為細胞株。在一些實施例中，生產細胞株為人類胎腎細胞株。在一些實施例中，生產細胞株為 HEK293SF 細胞株。在某些其他實施例中，生產細胞為原代細胞。在一些特定實施例中，生產細胞為免疫細胞，諸如(例如) B 淋巴球、T 淋巴球、樹突狀細胞、肥大細胞、巨噬細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、抗原呈現細胞、T 輔助細胞或調節 T 細胞(Treg 細胞)。

【0045】如本文所使用之「膜」為包含一或多種生物化合物(通常為脂質及視情況選用之多肽及/或碳水化合物)之分離內部空間與外部空間之邊界層。在一些實施例中，膜包含脂質及脂肪酸。在一些實施例中，膜包含磷脂、糖脂、脂肪酸、神經鞘脂質、磷甘油酯、固醇、膽固醇及磷脂醯絲胺酸。在此等實施例中之一些中，膜進一步包含一或多種多肽及/或一或多種多糖(諸如聚糖)。細胞外囊泡包含如本文所定義之膜。

【0046】如本文所使用之術語「免疫調節組分」係指作用於與藥劑接觸之靶標(例如靶基因，包括例如但不限於KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、麩醯胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 及PKM2)且修飾免疫細胞(例如巨噬細胞或其他免疫細胞)之治療劑。可引入細胞外囊泡及/或生產細胞中之免疫調節組分包括治療劑，諸如聚核苷酸(諸如抑制性核酸(例如反義寡核苷酸(ASO)、siRNA、miRNA、反義RNA、shRNA、lncRNA、初級miRNA及前驅miRNA))、促效劑、拮抗劑、抗體及/或抗原結合片段、免疫檢查點抑制劑或免疫檢查點抑制劑配位體之調節劑、表面抗原及其衍生物以及/或細胞介素及其衍生物。在某些實施例中，免疫調節組分為抑制性核酸(例如反義寡核苷酸(ASO)、siRNA、miRNA、反義RNA、shRNA、lncRNA、初級miRNA及前驅miRNA)。參見例如 Weiss, B. (編): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA: Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001 年). 「Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in

cultured mammalian cells」. *Nature*. 411 (6836): 494-988 ; : Bartel DP (2004 年 1 月). 「 MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function 」. *Cell*. **116** (2): 281-97 ; Paddison, PJ ; Caudy, AA ; Bernstein, E ; Hannon, GJ ; Conklin, DS (2002 年 4 月 15 日). 「 Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells 」. *Genes & Development*. **16** (8): 948-58 ; Ma L, Bajic VB, Zhang Z (2013 年 6 月). 「 On the classification of long non-coding RNAs 」. *RNA Biology*. 10 (6): 925-33 ; 及 Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003 年 3 月). 「 A uniform system for microRNA annotation 」. *RNA*. 9 (3): 277-9 , 該等文獻中之各者係出於所有目的併入本文中。

【0047】 如本文所使用之片語「抑制核酸分子」或「抑制性核酸」係指在引入細胞中以使得其與靶基因相互作用時引起彼靶基因之表現或活性之抑制的任何核酸。術語「抑制」、「阻遏」、「調節」、「更改」在本文中用於描述與無(多種)免疫調節組分之條件相比之靶基因之表現或活性中的變化。抑制核酸分子(亦即抑制性核酸)可為 DNA 或抑制性 RNA (例如 siRNA 、 miRNA 、 反義 RNA 、 shRNA 、 lncRNA 、 前驅 miRNA 或 mRNA) , 其中該 RNA 為單股、雙股的, 或含有單股區及雙股區兩者。在一些實施例中, 抑制性核酸為反義寡核苷酸(ASO)。ASO 可為單股或雙股 DNA 、 RNA 或 DNA/RNA 雜交體。參見例如 *Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997 , 其出於所有目的

以引用之方式併入本文中。「EXO ASO」為經由與囊泡膜(例如如與膽固醇或脂肪-醯基衍生之ASO一起出現)相互作用或藉由使用諸如電穿孔之技術負載至囊泡腔中或經由諸如藉由例如轉染或轉導以將編碼所需ASO之構築體引入生產細胞中來基因工程改造生產細胞、隨後分離細胞外囊泡與經工程改造之生產細胞而與諸如(例如)胞外體之細胞外囊泡物理上締合的ASO。

【0048】術語「接收體」係指在個體中將細胞外囊泡導向靶標且/或促進細胞外囊泡與靶標相互作用之分子。在一些實施例中，接收體為多肽，亦在本文中有時稱為「接收體多肽」。在一些實施例中，接收體能夠諸如藉由定向運輸至個體靶組織來增加個體組織中之免疫調節組分之濃度。接收體之實例包括但不限於表3中所列舉之實例。

【0049】術語「靶標」可指基因，其活性係由本發明之免疫調節組分(亦即靶基因)調節。在某些實施例中，靶基因受與細胞外囊泡締合(亦即與膜表面結合、插入脂質雙層內或囊封於囊泡之封閉體內)之核酸分子(諸如(例如)抑制性ASO)抑制。靶基因之實例包括但不限於KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、麩醯胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 及PKM2。「靶標」亦可指本發明之細胞外囊泡所定向之細胞(亦即靶細胞)。在某些實施例中，靶細胞為免疫細胞(例如巨噬細胞)。在某些實施例中，靶細胞為造血幹細胞或多潛能幹細胞。在某些實施例中，靶細胞為循環巨噬細胞。在某些實施例中，靶細胞為腫瘤駐留巨噬細胞(亦即位於腫瘤微環境中、腫瘤組織中或腫瘤表面附近之巨噬細胞)。另外，「靶標」亦可指靶細胞上之蛋白質，其活性係

藉由與本發明之免疫調節組分接觸來調節，或充當用於結合本發明之細胞外囊泡之配位體之蛋白質(亦即靶蛋白)。因此，在某些實施例中，靶蛋白係在靶細胞上且與細胞外囊泡相互作用。

【0050】 「治療劑」或「治療分子」包括當以有效量存在時對有需要之個體產生所需治療效果、藥理及/或生理效應之化合物或分子。其包括當向個體投與時對個體具有可量測或可輸送效應(例如其緩解或減輕疾病、病症或病況之症狀)之任何化合物，例如小分子藥物或生物製品(例如多肽藥物或核酸藥物)。

【0051】 如本文所使用之術語「免疫檢查點抑制劑」或「檢查點抑制劑」係指藉由減少遏制免疫細胞之免疫抑制性檢查點路徑來刺激免疫細胞活性之治療劑(例如抑制PD-1/PD-L1之藥劑(諸如靶向PD-1之納武單抗(Nivolumab)、賽咪單抗(Cemiplimab)及派姆單抗(Pembrolizumab)，及各自靶向PD-L1之阿特珠單抗(Atezolizumab)、阿維魯單抗(Avelumab)、德瓦魯單抗(Durvalumab))及抑制CTLA-4/B7-1/B7-2之藥劑(諸如伊匹單抗(Ipilimumab)))。參見例如Pardoll DM (March 2012). 「The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy」. Nature Reviews. Cancer. 12 (4): 252-64。

【0052】 如本文所使用之術語「抗體」涵蓋不論天然或部分或全部以合成方式產生之免疫球蛋白及其片段。該術語亦覆蓋具有與免疫球蛋白結合域同源之結合域之任何蛋白質。「抗體」進一步包括特異性結合且辨識抗原之包含來自免疫球蛋白基因或其片段之構架區之多肽。術語抗體之使用意在包括完全抗體、多株抗體、單株抗體及重組抗體、其片段，且進一步包括單鏈抗體、人類化抗體、鼠抗體、嵌合單株抗體、小鼠-人類單

株抗體、小鼠-靈長類動物單株抗體、靈長類動物-人類單株抗體、抗個體基因型抗體、抗體片段(諸如(例如) scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb及Fd片段)、雙功能抗體及抗體相關多肽。抗體包括雙特異性抗體及多特異性抗體，只要其展現所需生物活性或功能即可。例示性抗體組合物包括抑制CTLA-4之抗體(諸如(例如)伊匹單抗)、抑制PD-1之抗體(諸如(例如)納武單抗、賽咪單抗及派姆單抗)、抑制PD-L1之抗體(諸如(例如)阿特珠單抗、阿維魯單抗、德瓦魯單抗)及抑制CSFR1之抗體(諸如(例如)吡昔替尼(Pexidartinib)、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、艾瑪圖單抗(Emactuzumab)、AMG820、IMC-CS4及卡比拉單抗(Cabiralizumab))。本文所使用之術語「抗原結合片段」係指完整免疫球蛋白片段及包括具有特異性結合至抗原之能力之抗原結合區之多肽的任何部分。舉例而言，抗原結合片段可為F(ab')₂片段、Fab'片段、Fab片段、Fv片段或scFv片段，但不限於此。Fab片段具有抗原結合位點且含有輕鏈可變區及重鏈可變區、輕鏈恆定區及重鏈之第一恆定區CH1。Fab'片段不同於Fab片段，此係因為Fab'片段另外包括重鏈鉸鏈區，其在重鏈CH1區之C端處包括至少一種半胱胺酸殘基。F(ab')₂片段產生，從而Fab'片段之半胱胺酸殘基藉由鉸鏈區處之雙硫鍵接合。Fv片段為僅具有重鏈可變區及輕鏈可變區之最小抗體片段，且用於產生Fv片段之重組技術在此項技術中眾所周知。雙鏈Fv片段可具有其中重鏈可變區藉由非共價鍵與輕鏈可變區連接之結構。單鏈Fv (scFv)片段一般可具有如同雙鏈Fv片段中之二聚體結構之二聚體結構，其中重鏈可變區經由肽連接子共價結合至輕鏈可變區，或重鏈可變區及輕鏈可變區在其C端處彼此直接鍵聯。抗原結合片段可使用蛋白酶來獲得(例如，完全抗體經木瓜酶消化以

獲得Fab片段，且經胃蛋白酶消化以獲得F(ab')₂片段)，且可藉由基因重組技術來製備。dAb片段由VH域組成。單鏈抗體分子可包含具有多種單獨分子之聚合物，例如二聚體、三聚體或其他聚合物。

【0053】 片語「核酸分子」係指具有去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸鹼基之單股或雙股聚合物。其包括染色體DNA及自我複製質體、載體、mRNA、tRNA、siRNA、miRNA等。核酸分子可為重組的，且當將核酸引入細胞中時外源性多肽可得到表現。該術語涵蓋經化學修飾之核酸，諸如描述於例如 Selvam C, Mutisya D, Prakash S, Ranganna K, Thilagavathi R. 「Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends」, Chem Biol Drug Des. 2017年11月;90(5):665-678中之經化學修飾之核酸；如例如Petersen M, Wengel J (2003年2月). 「LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics」. Trends Biotechnol. 21 (2): 74-81中所描述之鎖核酸(LNA)；及其他類型之臨床上相關、經化學修飾之核酸，諸如描述於例如 Summerton, J; Weller, D (1997). 「Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties」. Antisense & Nucleic Acid Drug Development. 7 (3): 187-195；Goodchild, J (2011). Therapeutic oligonucleotides. Methods in Molecular Biology. 764. 第1-15頁中之臨床上相關、經化學修飾之核酸，各文獻出於所有目的以引用之方式併入本文中。

【0054】 術語「促效劑」係指結合至受體且活化受體以產生生物反應之分子。受體可藉由內源性促效劑或外源性促效劑來活化。內源性促效劑之非限制性實例包括激素及神經傳遞質。外源性促效劑之非限制性實例包括各種類別之包括小分子、抗體、合成肽等之化合物。促效劑可為完

全、部分或反向促效劑。

【0055】術語「拮抗劑」係指在結合至受體時阻斷或阻尼促效劑介導之反應而非引起自身生物反應之分子。許多拮抗劑藉由與內源性配位體或受質競爭受體上之結構上界定之結合位點來達成其效力。拮抗劑之非限制性實例包括 α 阻斷劑、 β 阻斷劑及鈣離子通道阻斷劑。拮抗劑可為競爭性、非競爭性或無競爭性拮抗劑。

【0056】如本文所使用之術語「醫藥組合物」係指本文所描述之化合物中之一或多種，諸如(例如)與一或多種諸如醫藥學上可接受之載劑及賦形劑之其他化學組分混合或摻和或懸浮於其中之細胞外囊泡。醫藥組合物之一個目的為促進向個體之細胞外囊泡製劑之投與。術語「醫藥學上可接受之」及其文法變型係指能夠投與至個體或投與至個體上而不產生非所需生理效應至阻止投與組合物之程度之組合物、載劑、稀釋劑及試劑。術語「賦形劑」或「載劑」係指添加至醫藥組合物中以進一步促進化合物投與之惰性物質。術語「醫藥學上可接受之載劑」或「醫藥學上可接受之賦形劑」涵蓋經美國聯邦政府之管理機構批准或美國動物(包括人類)用藥典中所列舉之藥劑中之任一種，以及不對個體造成相當大之刺激且不消除所投與化合物之生物活性及性質的任何載劑或稀釋劑。包括適用於製備醫藥組合物且一般為安全、無毒且合乎需要之賦形劑及載劑。

【0057】如本文所使用之術語「分離(isolate/isolated/isolating)」或「純化(purify/purified/purifying)」以及「提取(extracted/extracting)」可互換使用，且係指已進行一或多個純化過程(例如選擇或增濃所需細胞外囊泡製劑)之所需細胞外囊泡製劑狀態(例如複數個已知或未知量及/或濃度)。在一些實施例中，如本文所使用之分離或純

化為自含有生產細胞之檢體中移除、部分移除(例如溶離)細胞外囊泡之過程。在一些實施例中，經分離之細胞外囊泡組合物不具有可偵測之非所需活性，或可替代地，非所需活性之水準或量等於或低於可接受之水準或量。在其他實施例中，經分離之細胞外囊泡組合物具有等於或高於可接受之量及/或濃度之量及/或濃度之所需細胞外囊泡。在其他實施例中，與自其中獲得組合物之起始材料(例如生產細胞製劑)相比，經分離之細胞外囊泡組合物得到增濃。與起始材料相比，此增濃可為10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%或超過99.9999%。在一些實施例中，經分離之細胞外囊泡製劑實質上不含殘餘生物產物。在一些實施例中，經分離之細胞外囊泡製劑之100%不含、99%不含、98%不含、97%不含、96%不含或95%不含任何污染生物物質。殘餘生物產物可包括非生物材料(包括化學物質)或不合需要之核酸、蛋白質、脂質或代謝物。實質上不含殘餘生物產物亦可意謂細胞外囊泡組合物不含有可偵測之生產細胞，且僅細胞外囊泡為可偵測的。

【0058】 術語「投與(administration/administering)」及其變體係指將諸如細胞外囊泡之組合物或藥劑引入個體中，且包括按與產生治療效果一致之任何排程並行及依序引入一或多種額外組合物或藥劑。可選定劑量投與時序以在個體內達成恆定量(例如血漿量)之所投與藥劑，或以間歇性暴露，例如以減少毒性或預防減敏作用。達成此等結果之方法已為一般熟習此項技術者基於如例如 Goodman 及 Gilman 之 The Pharmacological Basis of Therapeutics (Macmillan Publishing Co. 第13版)中所闡述之已知藥物動力學原理所熟知。向個體中之組合物或藥劑之引入係藉由任何合

適途徑進行，該途徑包括經口、經肺、鼻內、非經腸(靜脈內、動脈內、肌內、腹膜內或皮下)、經直腸、淋巴內、鞘內、眼周、瘤內或局部。投與包括自我投與及由另一者投與。合適投與途徑允許組合物或藥劑執行其預期功能。舉例而言，若合適途徑為靜脈內，則藉由將組合物或藥劑引入個體之靜脈中來投與組合物。

【0059】 如本文所使用之術語「調節(modulate/modulating)」、「修飾」及/或「調節劑」一般係指藉由增加或降低進行之更改能力，例如直接地或間接地促進/刺激/上調或干擾/抑制/下調特定濃度、量、表現、功能或狀態，諸如(例如)以充當拮抗劑或促效劑。在一些情況下，調節劑可相對於對照而言或相對於一般所預期之活性之平均水準而言或相對於活性之對照水準而言增加及/或降低特定濃度、量、活性或功能。

【0060】 術語「足夠量」意謂足以產生所需效應之量，例如足以調節個體之病況之量。

【0061】 術語「治療有效量」為可有效改善疾病症狀之量。治療有效量可為「防治有效量」，因為防治可視為療法。

【0062】 如本文所使用之術語「實質上」或「實質性」例如係指特定空間中之實體之存在、量或濃度、一種實體對另一實體之效應或治療效應。舉例而言，若相對於基線而言增加為2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍或1000倍，則實體之活性、量或濃度實質上增加。若相對於基線而言增加為5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%或500%，則實體之活性、量或濃度亦實質上增加。

【0063】 術語「活體內」係指活有機體中出現之過程。

【0064】如本文所使用之術語「哺乳動物」包括人類及非人類哺乳動物兩者。

【0065】本申請案中所使用之縮寫包括以下：「mRNA」係指信使RNA；「miRNA」係指微小RNA；「siRNA」係指短小干擾RNA；「反義RNA」係指與mRNA互補之單股RNA，其可另外包含DNA核苷酸，且常常稱為反義寡核苷酸或「ASO」；「shRNA」係指小或短髮夾RNA；「lncRNA」係指長非編碼RNA；及「dsDNA」係指雙股DNA。

組合物

【0066】本發明之態樣包括能夠調節免疫系統之組合物。該組合物包含有包含細胞膜之細胞外囊泡及與細胞膜締合或封閉於膜結合封閉體內之至少一種免疫調節組分。膜結合體內之封閉可使用包括電穿孔、凍乾之技術或經由工程改造生產細胞(諸如(例如) HEK293細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞及間葉幹細胞(MSC))以引入諸如核酸(編碼ASO)或蛋白質之編碼免疫調節組分之構築體來實現。與細胞膜之締合涵蓋與膜之內部或外部脂質小葉之結合及向脂質雙層中之跨膜插入。在一些情況下，膜締合係使用以下來達成：蛋白質(例如支架蛋白或其片段)，諸如(例如)前列腺素F2受體負調節因子(PTGFRN)；基礎免疫球蛋白(BSG)；免疫球蛋白超家族成員2 (IGSF2)；免疫球蛋白超家族成員3 (IGSF3)；免疫球蛋白超家族成員8 (IGSF8)；整合素 β -1 (ITGB1)；整合素 α -4 (ITGA4)；4F2細胞表面抗原重鏈(SLC3A2)；及一類ATP運輸蛋白(已鑑別為於可提供包含支架及免疫調節組分之融合蛋白元素之胞外體表面上高度增濃(如共有美國專利第10,195,290號中所描述)的ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4。該等細胞外囊泡及

例示性技術詳細地描述於共有美國專利第10,195,290號中，該案出於所有目的以引用之方式併入本文中。如共有美國專利第10,195,290號中所描述，表面經工程改造之胞外體可藉由諸如PEG誘導融合及/或超音波融合以將此等支架蛋白(及其片段)引入胞外體或生產細胞中之化學及/或物理方法來生成。複合物可於外源性治療性蛋白質與支架蛋白之間生成。可替代地，融合蛋白可藉由綴合支架蛋白質與外源性治療性蛋白質(諸如(例如)免疫調節蛋白)及產生含有於表面上之複合物或融合蛋白之經工程改造之胞外體、使用前述化學及/或物理方法來產生。治療性蛋白質之天然全長片段或生物活性片段可藉由綴合至支架蛋白來運輸至胞外體表面。該等胞外體亦可自包含插入細胞基因組中之外源性序列之生產細胞中獲得。舉例而言，可將外源性序列插入位於編碼PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2或ATP運輸蛋白之基因組序列之3'或5'端之基因組位點中。舉例而言，可將外源性序列插入編碼PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2或ATP運輸蛋白之基因組序列中。與細胞膜之締合涵蓋免疫調節組分與內部或外部膜表面之結合、於脂質雙層內之免疫調節組分之錨定或通過脂質雙層之免疫調節組分之延伸。如共有美國專利第10,195,290號中所描述，免疫調節組分可繫栓至支架蛋白，或表示為與支架蛋白之融合蛋白。

細胞外囊泡

【0067】 在各種實施例中，組合物包含細胞外囊泡。在某些實施例中，如共有美國專利第10,195,290號中所描述，細胞外囊泡為包含封閉內部空間之膜之細胞源性囊泡。

【0068】 在各種實施例中，細胞外囊泡可為直徑小於衍生其之細胞

之直徑之膜結合囊泡。在一些實施例中，細胞外囊泡之最長尺寸在約20-1000 nm之間，諸如在約20-100 nm、20-200 nm、20-300 nm、20-400 nm、20-500 nm、20-600 nm、20-700 nm、20-800 nm、20-900 nm、30-100 nm、30-200 nm、30-300 nm、30-400 nm、30-500 nm、30-600 nm、30-700 nm、30-800 nm、30-900 nm、40-100 nm、40-200 nm、40-300 nm、40-400 nm、40-500 nm、40-600 nm、40-700 nm、40-800 nm、40-900 nm、50-150 nm、50-500 nm、50-750 nm、100-200 nm、100-500 nm或500-1000 nm之間。

【0069】 在某些實施例中，細胞外囊泡為胞外體。在某些實施例中，細胞外囊泡為微型囊泡。在某些實施例中，細胞外囊泡為細胞凋亡體。在某些實施例中，細胞外囊泡為細胞片段。在某些實施例中，細胞外囊泡為藉由直接或間接操縱而來源於細胞之囊泡。在某些實施例中，細胞外囊泡為含有小囊之胞器。在各種實施例中，細胞外囊泡為由活細胞產生之囊泡。

【0070】 在一些實施例中，細胞外囊泡來源於活有機體。在一些實施例中，細胞外囊泡來源於死生物體。在一些實施例中，細胞外囊泡來源於外植組織。在一些實施例中，細胞外囊泡來源於外植器官。在一些實施例中，細胞外囊泡來源於經培養之細胞。在此等實施例中之一些中，當在細胞培養系統中生成細胞外囊泡時，進一步分離細胞外囊泡(例如藉由分離細胞外囊泡與經培養之細胞)。分離可藉由沈降來達成。舉例而言，細胞外囊泡之比密度可在0.5-2.0、0.6-1.0、0.7-1.0、0.8-1.0、0.9-1.0、1.0-1.1、1.1-1.2、1.2-1.3、1.4-1.5、1.0-1.5、1.5-2.0及1.0-2.0 kg/m³之間。分離亦可藉由親和純化來達成。舉例而言，細胞外囊泡可藉由結合包

含細胞外囊泡之種群與樹脂來純化，該樹脂包含複數種具有針對細胞外囊泡表面上之一或多種蛋白質之特異性親和力之配位體。蛋白質可為四跨膜蛋白(例如CD63、CD81、CD9)、EWI蛋白/免疫球蛋白超家族成員(例如PTGFRN、IGSF8、IGSF3)、整合素(例如ITGB1、ITGA4)、ATP運輸蛋白(例如ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4)、SLC3A2、BSG或CD98hc。

【0071】 在各種實施例中，細胞外囊泡包含脂質或脂肪酸及多肽。在某些實施例中，細胞外囊泡進一步包含糖。在某些實施例中，細胞外囊泡進一步包含聚核苷酸。

【0072】 在各種實施例中，細胞外囊泡膜包含內表面及外表面且封閉內部空間。在一些實施例中，細胞外囊泡進一步包含有效負載物，諸如如本文所描述之免疫調節組分。在某些實施例中，有效負載物封閉於內部空間內。在某些實施例中，有效負載物展現於細胞外囊泡之外表面上。在某些實施例中，有效負載物跨越細胞外囊泡之膜。在各種實施例中，有效負載物包含核酸、蛋白質、碳水化合物、脂質、小分子及/或其組合。用於產生具有有效負載物之細胞外囊泡之方法包括電穿孔、凍乾及可與細胞外囊泡分離之生產細胞之基因工程改造。參見例如共有美國專利第10,195,290號且同上。在一些實施例中，細胞外囊泡進一步包含接收體，亦即如共有美國專利第10,195,290號中所描述可對器官、組織或細胞具有特異性之靶向部分。使用具有靶向部分之融合蛋白。舉例而言，融合蛋白可包含PTGFRN、BSG、IGSF2、IGSF3、IGSF8、ITGB1、ITGA4、SLC3A2、ATP運輸蛋白或其片段或變異體及靶向部分。靶向部分可用於靶向胞外體至特定器官、組織或細胞以用於使用胞外體進行治療。在一些

實施例中，靶向部分為抗體或其抗原結合片段。抗體及其抗原結合片段包括完全抗體、多株抗體、單株抗體及重組抗體、其片段，且進一步包括單鏈抗體、人類化抗體、鼠抗體、嵌合單株抗體、小鼠-人類單株抗體、小鼠-靈長類動物單株抗體、靈長類動物-人類單株抗體、抗個體基因型抗體、抗體片段(諸如(例如) scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb及Fd片段)、雙功能抗體及抗體相關多肽。抗體及其抗原結合片段亦包括雙特異性抗體及多特異性抗體，只要其展現所需生物活性或功能即可。

胞外體

【0073】 在各種實施例中，細胞外囊泡為胞外體。在某些實施例中，胞外體為由生產細胞分泌之小膜結合囊泡。

【0074】 在一些實施例中，來自生產細胞之胞外體之最長尺寸在約20-300 nm之間，諸如在約20-290 nm、20-280 nm、20-270 nm、20-260 nm、20-250 nm、20-240 nm、20-230 nm、20-220 nm、20-210 nm、20-200 nm、20-190 nm、20-180 nm、20-170 nm、20-160 nm、20-150 nm、20-140 nm、20-130 nm、20-120 nm、20-110 nm、20-100 nm、20-90 nm、20-80 nm、20-70 nm、20-60 nm、20-50 nm、20-40 nm、20-30 nm、30-300 nm、30-290 nm、30-280 nm、30-270 nm、30-260 nm、30-250 nm、30-240 nm、30-230 nm、30-220 nm、30-210 nm、30-200 nm、30-190 nm、30-180 nm、30-170 nm、30-160 nm、30-150 nm、30-140 nm、30-130 nm、30-120 nm、30-110 nm、30-100 nm、30-90 nm、30-80 nm、30-70 nm、30-60 nm、30-50 nm、30-40 nm、40-300 nm、40-290 nm、40-280 nm、40-270 nm、40-260 nm、40-250 nm、40-240

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

150 nm、90-140 nm、90-130 nm、90-120 nm、90-110 nm、90-100 nm、100-300 nm、110-290 nm、120-280 nm、130-270 nm、140-260 nm、150-250 nm、160-240 nm、170-230 nm、180-220 nm或190-210 nm之間。

【0075】 在尤其較佳之實施例中，本文所描述之來自生產細胞之胞外體之最長尺寸在約30-100 nm之間。在另一較佳實施例中，來自生產細胞之胞外體之最長尺寸在約20-300 nm之間。在另一較佳實施例中，來自生產細胞之胞外體之最長尺寸在約40-200 nm之間。在另一實施例中，本文所描述之胞外體群包含其中胞外體之90%具有最長尺寸20-300 nm之種群。在另一實施例中，本文所描述之胞外體群包含其中胞外體之95%具有最長尺寸20-300 nm之種群。在另一實施例中，本文所描述之胞外體群包含其中胞外體之99%具有最長尺寸20-300 nm之種群。在另一實施例中，本文所描述之胞外體群包含其中胞外體之90%具有最長尺寸40-200 nm之種群。在另一實施例中，本文所描述之胞外體群包含其中胞外體之95%具有最長尺寸40-200 nm之種群。在另一實施例中，本文所描述之胞外體群包含其中胞外體之99%具有最長尺寸40-200 nm之種群。在其他較佳實施例中，本文所描述之胞外體或胞外體群之尺寸係根據下文所描述方法來量測。

【0076】 在一些實施例中，胞外體由生產細胞生成。在一些實施例中，胞外體之膜包含一或多種來源於生產細胞之分子。在一些實施例中，胞外體係在細胞培養系統中生成且分離(例如藉由分離胞外體與生產細胞)。分離可藉由沈降來達成。舉例而言，胞外體之比密度可在0.5-2.0、0.6-1.0、0.7-1.0、0.8-1.0、0.9-1.0、1.0-1.1、1.1-1.2、1.2-1.3、1.4-

1.5、1.0-1.5、1.5-2.0及1.0-2.0 kg/m³之間。分離亦可藉由親和純化來達成。舉例而言，細胞外囊泡可藉由結合包含細胞外囊泡之種群與樹脂來純化，該樹脂包含複數種具有針對細胞外囊泡表面上之一或多種蛋白質之特異性親和力之配位體。細胞外囊泡表面上之一或多種蛋白質可為四跨膜蛋白(例如CD63、CD81及/或CD9)、EWI蛋白/免疫球蛋白超家族成員(例如PTGFRN、IGSF8及/或IGSF3)、整合素(例如ITGB1及/或ITGA4)、ATP運輸蛋白(例如ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3及/或ATP2B4)、SLC3A2、BSG或CD98hc。蛋白質可作為視情況經由融合至具有所需藥理學活性之多肽部分(諸如(例如)具有檢查點抑制活性之抗體、抗體片段、scFv等)來展現於胞外體表面上之免疫調節組分而另外具有活性。該等抗體為此項技術中已知的，例如靶向CTLA-4之伊匹單抗、靶向PD-1之納武單抗、賽咪單抗及派姆單抗以及各自靶向PD-L1之阿特珠單抗、阿維魯單抗、德瓦魯單抗(參見例如Pardoll DM (2012年3月). 「The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy」. Nature Reviews. Cancer. 12(4): 252-64，其以引用之方式併入本文中)。

【0077】 在一些實施例中，胞外體膜包含內表面及外表面。在某些實施例中，內表面面向胞外體之內核。在某些實施例中，外表面可與胞內體、多囊泡體或生產細胞之膜/細胞質或靶細胞接觸。

【0078】 在一些實施例中，胞外體膜包含脂質及脂肪酸。在一些實施例中，胞外體膜包含磷脂、糖脂、脂肪酸、神經鞘脂質、磷甘油酯、固醇、膽固醇及磷脂醯絲胺酸。在一些實施例中，脂質及脂肪酸可為表1中所列舉之脂質及脂肪酸中之一或多種。

【0079】在某些實施例中，胞外體包含由內部小葉及外部小葉構成之脂質雙層。內部小葉及外部小葉之組成可藉由此項技術中已知之跨雙層分佈分析來測定，參見例如 Kuypers 等人 *Biochim Biophys Acta* 1985 819:170。在一些實施例中，外部小葉之組成係在約70%-90%膽鹼磷脂之間、在約0%-15%酸性磷脂之間及在約5%-30%磷脂醯乙醇胺之間。在一些實施例中，內部小葉之組成係在約15%-40%膽鹼磷脂之間、在約10%-50%酸性磷脂之間及在約30%-60%磷脂醯乙醇胺之間。

【0080】在一些實施例中，胞外體膜進一步包含一或多種多肽。在某些實施例中，胞外體包含一或多種選自以下清單之多肽，該清單包括但不限於血影蛋白、類肌凝蛋白多肽、帶3、SLC4A1、肌動蛋白、類肌動蛋白多肽、甘油醛3-P去氫酶(G3PD)、四跨膜蛋白(例如CD63、CD81及/或CD9)、Alix及TSG101、整合素(例如ITGB1及/或ITGA4)、選滯蛋白、CR1、TNFRI、蛋白水解酶、糖基化磷脂醯肌醇(GPI)連接蛋白或組織蛋白、EWI蛋白/免疫球蛋白超家族成員(例如PTGFRN、IGSF8及/或IGSF3)、ATP運輸蛋白(例如ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3及/或ATP2B4)、SLC3A2、BSG或CD98hc。在一些實施例中，胞外體包含至少一種選自表2之多肽。

【0081】在一些實施例中，胞外體包含於其表面上之多肽。在一些實施例中，胞外體經修飾以含有一或多種多肽。在一些實施例中，生產細胞經修飾以含有一或多種多肽。在一些實施例中，生產細胞天然地含有一或多種多肽，且源自其之胞外體亦含有多肽。一定量之任何所需表面標記可直接在胞外體上經修飾(例如藉由使複合物與以重組方式產生之多肽接觸以引起向複合物膜中之插入或與複合物膜之綴合)。可替代地或另外，

一定量之任何所需表面標記可直接在生產細胞上經修飾(例如藉由使複合物與以重組方式產生之多肽接觸以引起向該細胞膜中之插入或與該細胞膜之綴合)。可替代地，可藉由將外源性核酸轉導成生產細胞以表現所需表面標記來修飾生產細胞。表面標記可已天然地存在於生產細胞上，在此情況下外源性構築體可能導致標記過度表現及生產細胞中或上之標記之濃度增加。可替代地，可自生產細胞中移除天然表現之表面標記(例如藉由誘導生產細胞中之基因靜默(gene silencing))。多肽可賦予胞外體以不同功能(例如特異性靶向能力、傳遞功能(例如融合分子)、酶功能、延長或縮短之活體內半衰期等)。在一些實施例中，多肽包括但不限於CD47、CD55、CD49、CD40、CD133、CD59、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-1、CD9、CD63、CD81、整合素、選滯蛋白、凝集素及鈣黏蛋白。

【0082】在特定實施例中，胞外體包含於其表面上之一或多種多肽，其中該等多肽選自近期鑑別為於胞外體表面上增濃之蛋白質之群(詳細地描述於共有美國專利申請案62/550,543及PCT/US2018/048026，該等案以全文引用之方式併入本文中)。此群多肽包括前列腺素F2受體負調節因子(PTGFRN)；基礎免疫球蛋白(BSG)；免疫球蛋白超家族成員3(IGSF3)；免疫球蛋白超家族成員8(IGSF8)；整合素 β -1(ITGB1)；整合素 α -4(ITGA4)；4F2細胞表面抗原重鏈(SLC3A2)；及一類ATP運輸蛋白(ATP1A1、ATP1A2、ATP1A3、ATP1A4、ATP1B3、ATP2B1、ATP2B2、ATP2B3、ATP2B4)。

【0083】在各種實施例中，一或多種於胞外體表面上之多肽包含抗體或抗原結合片段。抗體或抗原結合片段可來源於天然來源或部分或全部以合成方式產生。在一些實施例中，抗體為單株抗體。在此等實施例中之

一些中，單株抗體為IgG抗體。在某些實施例中，單株抗體為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些其他實施例中，抗體為多株抗體。在某些實施例中，抗原結合片段選自Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb及Fd片段。在某些實施例中，抗原結合片段為scFv或(scFv)₂片段。在某些其他實施例中，抗體或抗原結合片段為Nanobody[®] (單域抗體)。在一些實施例中，抗體或抗原結合片段為雙特異性抗體或多特異性抗體。在各種實施例中，抗體或其抗原結合片段結合至間皮素。

【0084】 在一些實施例中，胞外體包含於其表面上之包含(1)PTGFRN或其片段及(2)抗體或其抗原結合片段之融合蛋白，其中抗體或其抗原結合片段結合至PD-1、PD-1L、CSF1-R或其他免疫調節組分。

【0085】 在一些實施例中，胞外體膜進一步包含一或多種諸如聚糖之多糖。

【0086】 在一些實施例中，胞外體將有效負載物(治療劑)傳遞至靶標。有效負載物為作用於與胞外體接觸之靶標(例如靶細胞)之治療劑。在某些實施例中，有效負載物為例如抑制性RNA之免疫調節組分。接觸可出現在活體外或個體中。可引入胞外體及/或生產細胞中之有效負載物包括治療劑，諸如核苷酸(例如包含可偵測部分或破壞轉錄之毒素之核苷酸)、核酸(例如，編碼諸如酶之多肽之DNA或mRNA分子，或諸如miRNA、dsDNA、lncRNA或siRNA之具有調節性功能之RNA分子)、胺基酸(例如包含可偵測部分或破壞轉譯之毒素之胺基酸)、多肽(例如酶)、脂質、碳水化合物、小分子(例如小分子藥物及毒素)及其組合。在某些實施例中，胞外體傳遞超過一種治療劑。在某些實施例中，治療劑為一或多種抑制一或多種靶基因之核酸。在某些實施例中，治療劑包含抗體及核

酸。在某些實施例中，治療劑包含核酸及小分子。在某些實施例中，治療劑包含CSF1R抑制劑，諸如臨床候選藥物吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、艾瑪圖單抗、AMG820及IMC-CS4以及例如Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D (2017). 「Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy」. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 5 (1): 53中所描述之其他藥劑；亦參見例如Patel S, Player MR (2009). 「Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease」. *Curr Top Med Chem*. 9: 599-610，作為單株抗體且在早期臨床試驗中用於轉移性胰臟癌之卡比拉單抗(Cabiralizumab) (cabira; FPA-008) (參見A phase I/II dose escalation and expansion study of cabiralizumab (cabira; FPA-008), an anti-CSF1R antibody, in tenosynovial giant cell tumor (TGCT, diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS ; A Study of Cabiralzumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread ; 及Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer Nov 2017)。在某些實施例中，治療劑包含免疫檢查點抑制劑。在某些實施例中，免疫檢查點抑制劑係在諸如(例如)靶向CTLA-4之伊匹單抗、靶向PD-1之納武單抗、賽咪單抗及派姆單抗以及各自靶向PD-L1之阿特珠單抗、阿維魯單抗、德瓦魯單抗之抗體中。

【0087】 胞外體可經由膜融合與靶細胞相互作用且傳遞於胞外體組合物中之有效負載物(例如治療劑)至靶細胞之表面或細胞質。在一些實施例中，膜融合出現在胞外體與靶細胞之質膜之間。在其他實施例中，膜融

合出現在胞外體與靶細胞之胞內體膜之間。

【0088】 在一些實施例中，胞外體包含接收體多肽。接收體多肽可為合成的。在一些實施例中，將接收體多肽引入生產細胞中(例如將編碼接收體多肽之外源性核酸引入生產細胞中)，或在生產細胞外部製成重組接收體多肽(例如藉由蛋白表現系統合成)。在一些實施例中，將接收體多肽(例如以重組方式產生之多肽)直接引入胞外體中(例如在胞外體與生產細胞分離之後)。在一些實施例中，接收體多肽可在胞外體之表面上。在一些實施例中，接收體多肽能夠靶向胞外體至於諸如血液之個體循環系統中循環之特定靶標(例如諸如病原體、代謝物、蛋白質、多肽複合物或細胞(諸如非功能細胞或癌細胞)之靶標)，或滯留於組織(諸如患病組織)中之靶標。

【0089】 在一些實施例中，胞外體為合成的。亦即在自生產細胞中回收胞外體之後對其進行修飾以添加額外組分。舉例而言，胞外體可包含有效負載物(諸如(例如)治療多肽)、核酸(諸如DNA或RNA)或其他聚核苷酸、多糖或聚糖、脂質或脂肪酸、大生物製品、小分子或在自生產細胞中回收時不於胞外體中發現之毒素。在一些實施例中，胞外體經修飾(例如藉由引入有效負載物，或以其他方式修改複合物之含量，諸如藉由改變膜之蛋白質、脂質或聚糖含量)。舉例而言，首先將胞外體與生產細胞分離且隨後按需要進行修飾，由此生成合成胞外體。在一些實施例中，生產細胞為經修飾的。舉例而言，可將外源性核酸、外源性多肽或小分子或毒素引入生產細胞中。可替代地或另外，生產細胞可以其他方式經修飾(例如藉由修改細胞或膜含量，諸如藉由改變細胞膜之脂質或聚糖含量)。由經修飾之生產細胞生成之胞外體包含生產細胞之修飾物中之一或多種。該方

法產生合成胞外體。在一些實施例中，生產細胞及與生產細胞分離之胞外體兩者均如本文所描述經修飾。

微型囊泡

【0090】 在各種實施例中，細胞外囊泡為微型囊泡。在某些實施例中，微型囊泡為包含封閉內部空間之膜之細胞源性小囊泡，且該囊泡係藉由直接或間接操縱以使得微型囊泡不在無操縱之情況下由該細胞產生而由該細胞生成。細胞之適當操縱包括但不限於連續擠出、用鹼性溶液進行之處理、音波處理或其組合，且在一些情況下，可能導致生產細胞損壞。

【0091】 在各種實施例中，微型囊泡之最長尺寸在約20-250 nm之間，諸如在約20-100 nm、20-150 nm、20-200 nm、30-100 nm、30-150 nm、30-200 nm、30-250 nm、40-100 nm、40-150 nm、40-200 nm、40-250 nm、50-100 nm、50-150 nm、50-200 nm、50-250 nm、100-200 nm或150-250 nm之間。

【0092】 在各種實施例中，微型囊泡來源於生產細胞。在某些實施例中，微型囊泡係藉由直接或間接操縱由生產細胞生成。適當操縱包括但不限於連續擠出、用鹼性溶液進行之處理、音波處理或其組合。在此等實施例中之一些中，操縱可能導致生產細胞損壞。在一些較佳實施例中，微型囊泡群實質上不含藉助於自質膜直接出芽或融合晚期胞內體與質膜而來源於生產細胞之囊泡。

【0093】 在一些實施例中，微型囊泡係基於其尺寸、密度、生物化學參數或其組合自生產細胞中分離。在某些實施例中，分離可藉由沈降來達成。舉例而言，微型囊泡之比密度可在0.5-2.0、0.6-1.0、0.7-1.0、0.8-1.0、0.9-1.0、1.0-1.1、1.1-1.2、1.2-1.3、1.4-1.5、1.0-1.5、1.5-2.0及

1.0-2.0 kg/m³之間。

【0094】 在各種實施例中，微型囊泡包含脂質或脂肪酸及多肽。在某些實施例中，微型囊泡進一步包含糖。在某些實施例中，微型囊泡進一步包含聚核苷酸。在一些實施例中，微型囊泡進一步包含接收體。在一些實施例中，微型囊泡進一步包含有效負載物。在此等實施例中的一些中，有效負載物包含核酸、蛋白質、碳水化合物、脂質、小分子及/或其組合。

免疫調節組分

【0095】 在一態樣中，例如胞外體之細胞外囊泡包含至少一種增加自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化之免疫調節組分。在一態樣中，就包含M2巨噬細胞群之參考檢體而言評估自M2表現型向M1表現型之增加。在一態樣中，藉由本發明之細胞外囊泡達成之增加大於或等於藉由等莫耳量之單獨免疫調節組分達成之增加。在某些實施例中，免疫調節組分為增加巨噬細胞極化之聚核苷酸。在某些實施例中，聚核苷酸為抑制至少一種諸如(例如)原致癌基因及其他類型基因之基因之核酸，這種抑制性會促進增加M2表現型極化成M1表現型，該至少一種基因包括例如但不限於以下基因：KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、麩醯胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 及PKM2。在某些實施例中，考慮聚核苷酸及蛋白質免疫調節組分組合，其包括蛋白質免疫調節組分，諸如(例如)靶向PD-1、PD-L1、CTLA-4之抗體或抗體片段(諸如(例如)靶向CTLA-4之伊匹單抗、靶向PD-1之納武單抗、賽咪單抗及派姆單抗以及各自靶向PD-L1之阿特珠單抗、阿維魯單抗、德瓦魯單抗)、

CSF1R抑制劑(諸如(例如)臨床候選藥物吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、艾瑪圖單抗、AMG820及IMC-CS4以及例如Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D (2017). 「Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy」. Journal for Immunotherapy of Cancer. 5 (1): 53中所描述之其他藥劑；亦參見例如Patel S, Player MR (2009). 「Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease」. Curr Top Med Chem. 9: 599-610，作為單株抗體且在早期臨床試驗中用於轉移性胰臟癌之卡比拉單抗(cabira; FPA-008) (參見A phase I/II dose escalation and expansion study of cabiralizumab (cabira; FPA-008), an anti-CSF1R antibody, in tenosynovial giant cell tumor (TGCT, diffuse pigmented villonodular synovitis D-PVNS ; A Study of Cabiralzumab Given by Itself or With Nivolumab in Advanced Cancer or Cancer That Has Spread ; 及 Novel Combination Shows Promising Responses in Pancreatic Cancer Nov 2017)，及適用於治療癌症及發炎病況之其他免疫調節組分。

【0096】在此等實施例中之一些中，核酸包括但不限於mRNA、miRNA、siRNA、反義RNA、shRNA、lncRNA及dsDNA。在一些實施例中，核酸為RNA（例如mRNA、miRNA、siRNA、反義RNA、shRNA或lncRNA）。在此等實施例中之一些中，當聚核苷酸為mRNA時，其可轉譯成所需多肽。在一些實施例中，聚核苷酸為微小RNA (miRNA)、初級miRNA或前驅miRNA分子。在此等實施例中之一些中，將miRNA傳遞至靶細胞之細胞質以使得miRNA分子可使靶細胞中之天然mRNA靜默。在

一些實施例中，聚核苷酸為能夠干擾致癌基因或其他調節異常多肽之表現之短小干擾RNA (siRNA)或短髮夾RNA (shRNA)。在此等實施例中之一一些中，將siRNA傳遞至靶細胞之細胞質以使得siRNA分子可使靶細胞中之天然mRNA靜默。在一些實施例中，聚核苷酸為與mRNA互補之反義RNA。在一些實施例中，聚核苷酸為能夠調節基因表現且調節疾病之長非編碼RNA (lncRNA)。在一些實施例中，聚核苷酸為反義寡核苷酸(ASO)。在各種實施例中，ASO為單股或雙股DNA、RNA或DNA/RNA雜交體。參見例如Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997，其出於所有目的以引用之方式併入本文中。

【0097】 在一些實施例中，聚核苷酸為可轉錄成RNA之DNA。在此等實施例中之一一些中，經轉錄之RNA可轉譯成所需多肽。在某些實施例中，核酸抑制至少一種由以下組成之基因：KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 、麩醯胺酸酶及PKM2。在某些實施例中，核酸抑制至少一種由以下組成之基因：STAT3、STAT6、CEBP/ β 、Pi3K γ 、KRAS及HIF1- α 。在某些實施例中，核酸為抑制至少一種由以下組成之基因之抑制性RNA：KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 、麩醯胺酸酶及PKM2。在某些實施例中，核酸為抑制至少一種由以下組成之基因之抑制性RNA：STAT3、STAT6、CEBP/ β 、Pi3K γ 、KRAS及HIF1- α 。在某些實施例中，核酸為抑

制至少一種由以下組成之基因之反義寡核苷酸(ASO)：KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 、麩醯胺酸酶及PKM2。在某些實施例中，核酸為抑制至少一種由以下組成之基因之反義寡核苷酸(ASO)：STAT3、STAT6、CEBP/ β 、Pi3K γ 、KRAS及HIF1- α 。在某些實施例中，核酸抑制人類KRAS原致癌基因。在某些實施例中，核酸為抑制人類KRAS原致癌基因之抑制性RNA。在某些實施例中，核酸抑制STAT3。

【0098】 在一些實施例中，核酸為抑制STAT3之反義寡核苷酸(ASO)。在各種實施例中，ASO包含與TAAGCTGATAATTCAACTCA (SEQ ID NO:1)具有至少90%至99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少90%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少91%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少92%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少93%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少94%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少95%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少96%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少97%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少98%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 1具有至少99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含SEQ ID NO: 1之序列。在一些實施例中，ASO經MOE或LNA化學修飾。在一些實施例中，ASO進一步包含

在5'或3'端處之膽固醇標籤。

【0099】 在一些實施例中，核酸為抑制STAT6之反義寡核苷酸(ASO)。在各種實施例中，ASO包含與TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO:2)具有至少90%至99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少90%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少91%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少92%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少93%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少94%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少95%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少96%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少97%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少98%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 2具有至少99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含SEQ ID NO: 2之序列。在一些實施例中，ASO經MOE或LNA化學物質修飾。在一些實施例中，ASO進一步包含在5'或3'端處之膽固醇標籤。

【0100】 在一些實施例中，核酸為抑制CebpB之反義寡核苷酸(ASO)。在各種實施例中，ASO包含與TGGATTAAAGGCAGGCGGC (SEQ ID NO:3)具有至少90%至99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少90%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少91%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少92%一致性之序列。在某些實

施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少93%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少94%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少95%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少96%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少97%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少98%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 3具有至少99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含SEQ ID NO: 3之序列。在一些實施例中，ASO經MOE或LNA化學物質修飾。在一些實施例中，ASO進一步包含在5'或3'端處之膽固醇標籤。

【0101】 在一些實施例中，核酸為抑制Pi3K γ 之反義寡核苷酸(ASO)。在各種實施例中，ASO包含與TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA (SEQ ID NO:4)具有至少90%至99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少90%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少91%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少92%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少93%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少94%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少95%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少96%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少97%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少98%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 4具有至少99%一致性

之序列。在某些實施例中，ASO包含SEQ ID NO: 4之序列。在一些實施例中，ASO經MOE或LNA化學物質修飾。在一些實施例中，ASO進一步包含在5'或3'端處之膽固醇標籤。

【0102】 在一些實施例中，核酸為抑制HIF1a之反義寡核苷酸(ASO)。在各種實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少90%至99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少90%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少91%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少92%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少93%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少94%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少95%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少96%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少97%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少98%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 5具有至少99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含SEQ ID NO: 5之序列。在一些實施例中，ASO經MOE或LNA化學物質修飾。在一些實施例中，ASO進一步包含在5'或3'端處之膽固醇標籤。

【0103】 在一些實施例中，核酸為抑制Kras之反義寡核苷酸(ASO)。在各種實施例中，ASO包含與GTAGCATGTAAATATAGCCC (SEQ ID NO:6)具有至少90%至99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少90%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少91%一致性之序列。在某些實施

例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少92%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少93%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少94%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少95%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少96%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少97%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少98%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含與SEQ ID NO: 6具有至少99%一致性之序列。在某些實施例中，ASO包含SEQ ID NO: 6之序列。在一些實施例中，ASO經MOE或LNA化學物質修飾。在一些實施例中，ASO進一步包含在5'或3'端處之膽固醇標籤。

【0104】 在某些實施例中，組合物包含例如胞外體之細胞外囊泡，進一步包含作為已知促進巨噬細胞極化之小分子、抗體或抗體片段之額外免疫調節組分。在某些實施例中，額外免疫調節組分為群落刺激因子1受體(CSF1R)抑制劑。

【0105】 在某些實施例中，組合物包含具有抗腫瘤活性之額外免疫調節組分。在一些實施例中，額外免疫調節組分調節先天性免疫反應。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分靶向自然殺手細胞。在一些其他實施例中，額外免疫調節組分調節適應性免疫反應。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分靶向細胞毒性T細胞。

【0106】 在一些實施例中，額外免疫調節組分位於細胞外囊泡之表面上。在一些實施例中，額外免疫調節組分位於細胞外囊泡內部。在一些實施例中，額外免疫調節組分位於細胞外囊泡之表面上及內部兩者。

【0107】 在一些實施例中，額外免疫調節組分以其全長形式表現於生產細胞中。在其他實施例中，額外免疫調節組分表現為向胞外體表面蛋白之轉譯融合蛋白，此引起胞外體表面上之免疫調節化合物之生物活性部分之較高量表現。在一些實施例中，額外免疫調節化合物為可溶性蛋白，該可溶性蛋白表現為向胞外體表面蛋白之轉譯融合蛋白以使得該可溶性蛋白留存於胞外體之表面上。

【0108】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為用於諸如(例如) A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)及SIGLEC9 (CD329)之負檢查點調節因子之抑制劑。在一些實施例中，額外免疫調節組分為用於諸如(例如) PD-L1及PD-L2之負檢查點調節因子之結合配偶體之抑制劑。

【0109】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為細胞毒性T淋巴球締合蛋白4 (CTLA-4)之抑制劑。在此等實施例中之一些中，CTLA-4抑制劑為CTLA-4之單株抗體。在某些實施例中，抑制劑為CTLA-4之單株抗體之片段。在某些實施例中，抗體片段為CTLA-4之單株抗體之scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb或Fd。在某些實施例中，抑制劑為抗CTLA-4之奈米抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。在一些特定實施例中，單株抗體為伊匹單抗。在一些特定實施例中，單株抗體為曲美木單抗(tremelimumab)。

【0110】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為程式化細胞死亡蛋白1 (PD-1)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為程式化死亡配位體1 (PD-L1)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為程式

化死亡配位體2 (PD-L2)之抑制劑。在一些實施例中，PD-1、PD-L1或PD-L2之抑制劑為PD-1、PD-L1或PD-L2之單株抗體。在某些實施例中，抑制劑為PD-1、PD-L1或PD-L2之單株抗體之片段。在某些實施例中，抗體片段為PD-1、PD-L1或PD-L2之單株抗體之scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb或Fd。在某些實施例中，抑制劑為抗PD-1、PD-L1或PD-L2之奈米抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。在一些特定實施例中，單株抗體為納武單抗。在一些特定實施例中，單株抗體為派姆單抗。在一些特定實施例中，單株抗體為皮立珠單抗(pidilizumab)。在一些特定實施例中，單株抗體為阿特珠單抗。在一些特定實施例中，單株抗體為阿維魯單抗。

【0111】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為淋巴球活化基因3 (LAG3)之抑制劑。在此等實施例中之一些中，LAG3之抑制劑為LAG3之單株抗體，諸如(例如) BMS-986016 (參見ClinicalTrials.gov處之臨床試驗編號NCT01968109 「Safety Study of Anti-LAG-3 With and Without Anti-PD-1 in the Treatment of Solid Tumors」)。

【0112】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為含T細胞免疫球蛋白黏蛋白之蛋白3 (TIM-3)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為B淋巴球及T淋巴球衰減子(BTLA)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為具有Ig域及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為腺苷A2a受體(A2aR)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為類殺手細胞免疫球蛋白受體(KIR)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為吡

啞胺2,3-二氧酶(IDO)之抑制劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為CD20、CD39或CD73之抑制劑。

【0113】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為用於正共刺激分子之活化劑。在一些實施例中，額外免疫調節組分為用於正共刺激分子之結合配偶體之活化劑。

【0114】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為諸如促效性抗體或天然配位體或TNF受體超家族成員之TNF受體超家族成員之活化劑。在某些實施例中，TNF受體超家族成員係選自由以下組成之群：CD120a、CD120b、CD18、OX40、CD40、Fas受體、M68、CD27、CD30、4-1BB、TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4、RANK、OCIF、TWEAK受體、TACI、BAFF受體、ATAR、CD271、CD269、GITR、TROY、CD358、TRAMP及XEDAR。在一些實施例中，額外免疫調節組分為TNF超家族成員。在某些實施例中，TNF超家族成員係選自由以下組成之群：TNF α 、TNF-C、OX40L、CD40L、FasL、LIGHT、TL1A、CD27L、Siva、CD153、4-1BB配位體、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITR配位體及EDA-2。

【0115】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為TNF受體超家族成員4 (OX40)之活化劑。在此等實施例中之一些中，OX40之活化劑為OX40之促效劑抗體。在此等實施例中之一些其他實施例中，OX40之活化劑為OX40配位體(OX40L)。

【0116】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為CD27之活化劑。在此等實施例中之一些中，CD27之活化劑為CD27之促效劑抗體。在此等

實施例中之一些其他實施例中，CD27之活化劑為CD27配位體(CD27L)。

【0117】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為CD40之活化劑。在此等實施例中之一些中，CD40之活化劑為CD40之促效劑抗體。在此等實施例中之一些其他實施例中，CD40之活化劑為CD40配位體(CD40L)。

【0118】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為糖皮質素誘導之TNFR相關蛋白(GITR)之活化劑。在此等實施例中之一些中，GITR之活化劑為GITR之促效劑抗體。在此等實施例中之一些其他實施例中，GITR之活化劑為GITR之天然配位體。

【0119】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為4-1BB之活化劑。在此等實施例中之一些中，4-1BB之活化劑為4-1BB之促效劑抗體。在此等實施例中之一些其他實施例中，4-1BB之活化劑為4-1BB之天然配位體。

【0120】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為Fas受體(Fas)。在此等實施例中之一些中，Fas受體展現於細胞外囊泡之表面上。在一些其他實施例中，額外免疫調節組分為Fas配位體(FasL)。在此等實施例中之一些中，Fas配位體展現於細胞外囊泡之表面上。在某些實施例中，額外免疫調節組分為Fas受體之抗體。在某些實施例中，額外免疫調節組分為Fas配位體之抗體。

【0121】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為CD28超家族共刺激分子之活化劑。在某些實施例中，CD28超家族共刺激分子為ICOS或CD28。在某些實施例中，額外免疫調節組分為ICOSL、CD80或CD86。

【0122】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為可誘導T細胞共刺激因子(ICOS)之活化劑。在此等實施例中之一些中，ICOS之活化劑為

ICOS之促效劑抗體。在此等實施例中之一些其他實施例中，ICOS之活化劑為ICOS配位體(ICOSL)。

【0123】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為CD28之活化劑。在此等實施例中之一些中，CD28之活化劑為CD28之促效劑抗體。在此等實施例中之一些其他實施例中，CD28之活化劑為CD28之天然配位體。在某些實施例中，CD28之配位體為CD80。

【0124】 在某些實施例中，額外免疫調節組分為細胞介素。在一些實施例中，細胞介素為已轉譯融合至胞外體表面蛋白或其片段之可溶性細胞介素。在一些實施例中，細胞介素為IL-2。在一些實施例中，細胞介素為IL-7。在一些實施例中，細胞介素為IL-12。在一些實施例中，細胞介素為IL-15。

【0125】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為T細胞受體(TCR)或其衍生物。在某些實施例中，額外免疫調節組分為TCR α -鏈或其衍生物。在某些實施例中，額外免疫調節組分為TCR β -鏈或其衍生物。在一些實施例中，額外免疫調節組分為T細胞之輔受體或其衍生物。

【0126】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為腫瘤抗原。在某些實施例中，腫瘤抗原係選自由以下組成之群： α -胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、上皮腫瘤抗原(ETA)、黏蛋白1 (MUC1)、Tn-MUC1、黏蛋白16 (MUC16)、酪胺酸酶、黑色素瘤相關抗原(MAGE)、腫瘤蛋白 p53 (p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、程式化死亡配位體1 (PD-L1)、程式化死亡配位體2 (PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、間皮素、VEGFR、 α -葉酸受體、CE7R、IL-3、癌症-睪丸抗原、MART-1 gp100及TNF相關細胞凋亡誘導配位體。

【0127】在某些實施例中，腫瘤抗原為癌胚抗原(CEA)。在某些實施例中，腫瘤抗原為上皮腫瘤抗原(ETA)。

【0128】在某些實施例中，腫瘤抗原為黏蛋白。在此等實施例中的一些中，黏蛋白為經分泌之黏蛋白。在此等實施例中的一些其他實施例中，黏蛋白為跨膜黏蛋白。在特定實施例中，腫瘤抗原為黏蛋白1 (MUC1)。在特定實施例中，腫瘤抗原為Tn-MUC1。在特定實施例中，腫瘤抗原為黏蛋白16 (MUC16)。

【0129】在某些實施例中，腫瘤抗原為黑色素瘤相關抗原(MAGE)。在此等實施例中的一些中，MAGE為I型MAGE。在此等實施例中的一些其他實施例中，MAGE為II型MAGE。在特定實施例中，I型MAGE為MAGE-A2。在特定實施例中，I型MAGE為MAGE-A4。

【0130】在某些實施例中，腫瘤抗原為 α -胎蛋白(AFP)。在某些實施例中，腫瘤抗原為腫瘤蛋白p53 (p53)。在某些實施例中，腫瘤抗原為酪胺酸酶。在某些實施例中，腫瘤抗原為酪胺酸酶相關蛋白(TRP)。在一些實施例中，腫瘤抗原為程式化死亡配位體1 (PD-L1)或程式化死亡配位體2 (PD-L2)。在各種實施例中，腫瘤抗原係選自由以下組成之群：CD4、CD8、CD45、CD80及CD86。

【0131】在一些實施例中，免疫調節組分為嵌合抗原受體(CAR)或其衍生物。在一些實施例中，CAR結合至以下中之一或多種： α -胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、上皮腫瘤抗原(ETA)、黏蛋白1 (MUC1)、Tn-MUC1、黏蛋白16 (MUC16)、酪胺酸酶、黑色素瘤相關抗原(MAGE)、腫瘤蛋白p53 (p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、程式化死亡配位體1 (PD-L1)、程式化死亡配位體2 (PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、

TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、間皮素、VEGFR、 α -葉酸受體、CE7R、IL-3、癌症-睪丸抗原、MART-1 gp100及TNF相關細胞凋亡誘導配位體。

【0132】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為T細胞受體或輔受體之活化劑。在某些實施例中，額外免疫調節組分為CD3之活化劑。在某些實施例中，活化劑為CD3之單株抗體之片段。在某些實施例中，抗體片段為CD3之單株抗體之scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb或Fd。在某些實施例中，活化劑為抗CD3之奈米抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。在某些實施例中，額外免疫調節組分為CD28之活化劑。在某些實施例中，活化劑為CD28之單株抗體之片段。在某些實施例中，抗體片段為CD28之單株抗體之scFv、(scFv)₂、Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb或Fd。在某些實施例中，活化劑為抗CD28之奈米抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0133】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為主要組織相容複合物(MHC)或其衍生物。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分為I類MHC或其衍生物。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分為II類MHC或其衍生物。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分為III類MHC或其衍生物。

【0134】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為人類白血球抗原(HLA)或其衍生物。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分為HLA-A、HLA-B、HLA-C或其衍生物。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分為HLA-E、HLA-F、HLA-G或其衍生物。在此等實施例中之一些中，額外免疫調節組分為HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR或其衍生

物。

【0135】 在各種實施例中，免疫調節組分可為多肽、聚核苷酸、多糖、脂質、小分子或毒素。

【0136】 在一些實施例中，免疫調節組分可為蛋白質、肽、糖脂或糖蛋白。

【0137】 在某些實施例中，免疫調節組分為促效劑。在此等實施例中之一些中，促效劑為諸如激素或神經傳遞質之內源性促效劑。在此等實施例中之一些其他實施例中，促效劑為諸如藥物之外源性促效劑。在一些實施例中，促效劑為可在不結合至受體之情況下產生促效劑反應之物理促效劑。在一些實施例中，促效劑為可產生比內源性促效劑更大之最大反應之超促效劑。在某些實施例中，促效劑為對受體具有完全功效之完全促效劑。在某些其他實施例中，促效劑為相對於完全促效劑而言對受體僅具有部分功效之部分促效劑。在一些實施例中，促效劑為可抑制受體之構成活性之反向促效劑。在一些實施例中，促效劑為與其他共促效劑一起起作用以對受體產生效應之共促效劑。在某些實施例中，促效劑為經由形成共價鍵而永久結合至受體之不可逆促效劑。在某些實施例中，促效劑為用於特定類型之受體之選擇性促效劑。

【0138】 在某些實施例中，免疫調節組分為拮抗劑。在此等實施例中之一些中，拮抗劑為競爭性拮抗劑，其在不活化受體之情況下在相同結合位點處與內源性配位體或促效劑一起可逆地結合至受體。競爭性拮抗劑可影響達成最大反應所必需之促效劑之量。在此等實施例中之一些其他實施例中，拮抗劑為非競爭性拮抗劑，其結合至受體之活性位點或受體之異位位點。非競爭性拮抗劑可降低可藉由任何量之促效劑獲得之最大反應之

程度。在一些其他實施例中，拮抗劑為無競爭性拮抗劑，在其與單獨異位結合位點結合之前其需要藉由促效劑活化受體。

【0139】 在各種實施例中，免疫調節組分包含抗體或抗原結合片段。免疫調節組分可為全長蛋白或其片段。抗體或抗原結合片段可來源於天然來源或部分或全部以合成方式產生。在一些實施例中，抗體為單株抗體。在此等實施例中之一些中，單株抗體為IgG抗體。在某些實施例中，單株抗體為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些其他實施例中，抗體為多株抗體。在某些實施例中，抗原結合片段選自Fab、Fab'及F(ab')₂、F(ab1)₂、Fv、dAb及Fd片段。在某些實施例中，抗原結合片段為scFv或(scFv)₂片段。在某些其他實施例中，抗體或抗原結合片段為Nanobody[®] (單域抗體)。在一些實施例中，抗體或抗原結合片段為雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0140】 在各種實施例中，抗體或抗原結合片段為完全人類的。在一些實施例中，抗體或抗原結合片段為人類化的。在一些實施例中，抗體或抗原結合片段為嵌合的。在此等實施例中之一些中，嵌合抗體具有非人類V區域及人類C區域。在一些實施例中，抗體或抗原結合片段為非人類的，諸如鼠或家畜的。

【0141】 在一些實施例中，免疫調節組分為蛋白質、肽、糖脂或糖蛋白。

【0142】 在各種實施例中，組合物包含兩種或更多種上文所提及之免疫調節組分，包括原子、分子等之混合物、融合體、組合及綴合物。在某些實施例中，組合物包含與多肽組合之核酸。在某些實施例中，組合物包含兩種或更多種彼此綴合之多肽。在某些實施例中，組合物包含綴合至

生物活性分子之蛋白質。在此等實施例中之一些中，生物活性分子為前驅藥。

醫藥組合物

【0143】 醫藥組合物一般包含複數個細胞外囊泡及呈適用於向個體投與之形式之醫藥學上可接受之賦形劑或載劑。醫藥學上可接受之賦形劑或載劑部分由所投與之特定組合物以及由用於投與組合物之特定方法決定。因此，存在廣泛多種之包含複數個細胞外囊泡之醫藥組合物之合適配方。(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 第21版 (2005))。醫藥組合物一般經調配為無菌的，且完全符合美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)之所有優良製造規範(Good Manufacturing Practice，GMP)法規。

【0144】 在一些實施例中，醫藥組合物包含一或多種治療劑及本文所描述之細胞外囊泡。在一些實施例中，細胞外囊泡與一或多種單獨治療劑一起共投與，其中共投與包括在投與細胞外囊泡之前、在其之後或與其並行投與單獨治療劑。

【0145】 醫藥學上可接受之賦形劑包括一般為安全、無毒且合乎需要之賦形劑，包括為獸醫用途以及人類醫藥用途可接受之賦形劑。

【0146】 載劑或稀釋劑之實例包括但不限於水、生理鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液及5%人類血清白蛋白。該等介質及化合物用於醫藥活性物質之用途在此項技術中眾所周知。除非任何習知介質或化合物與本文所描述之細胞外囊泡不相容，否則考慮其在組合物中之使用。亦可將補充治療劑摻入組合物中。通常，醫藥組合物經調配成可與其預期投與途徑相容。細胞外囊泡可藉由非經腸、局部、靜脈內、經口、

皮下、動脈內、皮內、經皮、經直腸、顱內、腹膜內、鼻內、肌內途徑或以吸入劑形式來投與。在某些實施例中，靜脈內投與(例如藉由注射)包含細胞外囊泡之醫藥組合物。細胞外囊泡可視情況與至少部分有效地治療預期細胞外囊泡之疾病、病症或病況之其他治療劑組合投與。

【0147】 溶液或懸浮液可包括以下組分：諸如水、生理鹽水溶液、非揮發性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶劑之無菌稀釋劑；諸如苧醇或對羥基苯甲酸甲酯之抗菌化合物；諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉之抗氧化劑；諸如乙二胺四乙酸(EDTA)之螯合化合物；諸如乙酸酯、檸檬酸酯或磷酸酯之緩衝劑；及諸如氯化鈉或右旋糖之用於調整張力之化合物。pH可用諸如氫氯酸或氫氧化鈉之酸或鹼來調整。製劑可封閉在安瓿、拋棄式注射器或由玻璃或塑膠製成之多劑量小瓶中。

【0148】 適用於可注射用途之醫藥組合物包括無菌水溶液(若為水溶性)或分散液及無菌散劑。對於靜脈內投與，合適載劑包括生理鹽水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)。組合物一般無菌且流體至一定程度以至存在易於可注射性。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇以及其類似物)及其合適混合物之溶劑或分散介質。適當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、藉由在分散液之情況下維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持。微生物體行動之防止可藉由例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、乙汞硫柳酸鈉及其類似物之各種抗細菌化合物及抗真菌化合物來達成。視需要，可將例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)及氯化鈉之等張化合物添加至組合物中。可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中包括例如單硬脂酸鋁及明膠之延遲吸收之化合物來實

現。

【0149】 無菌可注射溶液可按需要藉由將細胞外囊泡以有效量摻入且在適當溶劑中與本文所列舉之一種成分或成分組合一起摻入來製備。一般而言，分散液係藉由將細胞外囊泡摻入含有鹼性分散介質及任何所需其他成分之無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液之無菌散劑之情況下，製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，該等製備方法由其先前經無菌過濾之溶液產生活性成分加上任何額外所需成分之散劑。細胞外囊泡可以儲槽式注射劑或植入式製劑之形式投與，該儲槽式注射劑或植入式製劑可以使得准許細胞外囊泡持續或脈衝式釋放之方式來調配。

【0150】 包含細胞外囊泡之組合物之全身性投與亦可藉由經黏膜手段來進行。對於經黏膜投與，在調配物中使用適合於待滲透之障壁之滲透劑。該等滲透劑一般為此項技術中已知的，且對於經黏膜投與，包括例如清潔劑、膽汁鹽及梭鏈孢酸衍生物。經黏膜投與可經由使用例如鼻用噴霧來實現。

【0151】 在某些實施例中，將包含細胞外囊泡之醫藥組合物靜脈內投與至應受益於醫藥組合物之個體中。在某些其他實施例中，例如藉由淋巴管內注射或藉由結節內注射(參見例如 Senti 等人, PNAS 105(46): 17908 (2008))或藉由肌內注射、藉由皮下投與、藉由直接注射至胸腺中或至肝臟中來將組合物投與至淋巴系統。

【0152】 在某些實施例中，將包含細胞外囊泡之醫藥組合物以液體懸浮液之形式投與。在某些實施例中，將醫藥組合物以能夠在投與後形成儲存物之調配物之形式投與。在某些較佳實施例中，儲存物將細胞外囊泡緩慢地釋放至循環中，或保持呈儲存物形式。

【0153】 通常，醫藥學上可接受之組合物經高度純化為不含污染物，具有生物相容性且不具有毒性，且適合於向個體投與。若水為載劑之成分，則水經高度純化且經處理為不含例如內毒素之污染物。

【0154】 醫藥學上可接受之載劑可為乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、澱粉、阿拉伯膠、磷酸鈣、褐藻酸鹽、明膠、矽酸鈣、微晶纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、纖維素、水、糖漿、甲基纖維素、苯甲酸甲基羥酯、苯甲酸丙基羥酯、滑石、硬脂酸鎂及/或礦物油，但不限於此。醫藥組合物可進一步包括潤滑劑、潤濕劑、甜味劑、香味增強劑、乳化劑、懸浮劑及/或防腐劑。

【0155】 本文所描述之醫藥組合物包含本文所描述之細胞外囊泡及視情況選用之醫藥活性劑或治療劑。治療劑可為生物劑、小分子劑或核酸劑。

【0156】 劑型之限制條件為包含本文所描述之包含細胞外囊泡之醫藥組合物。在一些實施例中，劑型經調配為呈液體懸浮液形式以用於靜脈內注射。

【0157】 在某些實施例中，使細胞外囊泡製劑經受例如X射線、 γ 射線、 β 粒子、 α 粒子、中子、質子、元素核、UV射線之輻射以便損壞殘餘複製勝任型核酸。

【0158】 在某些實施例中，使用超過1、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100或超過100 kGy之照射劑量使細胞外囊泡製劑經受 γ 照射。

【0159】 在某些實施例中，使用超過0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、

500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000或超過10000 mSv之照射劑量使細胞外囊泡製劑經受X射線照射。

方法

【0160】 本發明之態樣亦包括產生包含細胞外囊泡及免疫調節組分之組合物之方法。在一些實施例中，該方法包含：自生產細胞中獲得細胞外囊泡，其中生產細胞天然地含有免疫調節組分；且視情況分離所獲得之細胞外囊泡。在一些實施例中，該方法包含：用免疫調節組分修飾生產細胞；自經修飾之生產細胞中獲得細胞外囊泡；且視情況分離所獲得之細胞外囊泡。在一些其他實施例中，該方法包含：自生產細胞中獲得細胞外囊泡；分離所獲得之細胞外囊泡；且用免疫調節組分修飾經分離之細胞外囊泡。在某些實施例中，該方法進一步包含將經分離之細胞外囊泡調配至醫藥組合物中。

產生細胞外囊泡之方法

用免疫調節組分修飾生產細胞之方法

【0161】 在各種實施例中，該方法包含用免疫調節組分修飾生產細胞。

【0162】 生產細胞可為哺乳動物細胞株、植物細胞株、昆蟲細胞株、真菌細胞株或原核細胞株。在某些實施例中，生產細胞為哺乳動物細胞株。哺乳動物細胞株包括但不限於人類胎腎(HEK)細胞株、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株、HT-1080細胞株、海拉細胞株、PERC-6細胞株、CEVEC細胞株、纖維母細胞株、羊水細胞株、上皮細胞株及間葉幹細胞(MSC)細胞株。在一些較佳實施例中，哺乳動物細胞株可為HEK-293細

胞、BJ人類包皮纖維母細胞、fHDF纖維母細胞、AGE.HN[®]神經元前驅細胞、CAP[®]羊水細胞、脂肪間葉幹細胞或RPTEC/TERT1細胞。生產細胞亦可為原代細胞。在各種實施例中，原代細胞可為原代哺乳動物細胞、原代植物細胞、原代昆蟲細胞、原代真菌細胞或原代原核細胞。

【0163】 在某些較佳實施例中，生產細胞為免疫細胞，諸如樹突狀細胞、T細胞、B細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、抗原呈現細胞、巨噬細胞、T輔助細胞或調節T細胞(Treg細胞)。

【0164】 在各種實施例中，免疫調節組分可在生產細胞中由藉由轉染(參見例如Bacchetti S, Graham FL (1977年4月). 「Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA」. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74 (4): 1590-4 ; Kriegler M (1991). Transfer and Expression: A Laboratory Manual. W. H. Freeman. 第96-97頁 ; Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987年11月). 「Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure」. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84 (21): 7413-7 ; Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (1994年1月). 「Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations」. The Journal of Biological Chemistry. 269 (4): 2550-61)、病毒轉導(參見例如Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2000).

「**Transduction**」. An Introduction to Genetic Analysis (第7版))、電穿孔(參見例如Neumann, E; Schaefer-Ridder, M; Wang, Y; Hofschneider, PH (1982). 「Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields」. The EMBO Journal. 1 (7): 841-5))、擠出(參見例如Sharei A, Zoldan J, Adamo A, Sim WY, Cho N, Jackson E, Mao S, Schneider S, Han MJ, Lytton-Jean A, Basto PA, Jhunjhunwala S, Lee J, Heller DA, Kang JW, Hartoularos GC, Kim KS, Anderson DG, Langer R, Jensen KF (2013 年 2 月). 「A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery」. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110 (6): 2082-7)、音波處理(參見例如 Yizhi Song (2007). 「Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria」. Nucleic Acids Res. 35 (19): e129.)、細胞融合(參見例如 Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987年11月). 「Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure」. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84 (21): 7413-)或熟習此項技術者已知之其他方法而引入生產細胞中之轉基因或mRNA表現。

【0165】 在某些實施例中，藉由轉染將免疫調節組分引入生產細胞中。在一些實施例中，可使用諸如陽離子型脂質及聚合物之合成巨分子將免疫調節組分引入合適生產細胞中(Papapetrou等人, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005))。在一些實施例中，陽離子型脂質經由電荷相互作用與免疫調節組分一起形成複合物。在此等實施例中之一些中，帶正電之複

合物結合至帶負電之細胞表面且由細胞藉由胞吞作用攝取。在一些其他實施例中，陽離子型聚合物可用於轉染生產細胞。在此等實施例中之一一些中，陽離子型聚合物為聚伸乙亞胺(PEI)。在某些實施例中，可使用諸如磷酸鈣、環糊精或凝聚胺之化學物質以將免疫調節組分引入生產細胞中。亦可使用諸如粒子介導之轉染、「基因槍(gene gun)」、基因槍(biolistics)或粒子轟擊技術之物理方法將免疫調節組分引入生產細胞中(Papapetrou 等人, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005))。諸如(例如) β -半乳糖苷酶、氯黴素乙醯基轉移酶、螢光素酶或綠色螢光蛋白之報導基因可用於評估生產細胞之轉染效率。

【0166】 在某些實施例中，藉由病毒轉導將免疫調節組分引入生產細胞中。多種病毒可用作基因轉移媒劑，其包括莫洛尼鼠白血病毒(MMLV)、腺病毒、腺相關病毒(AAV)、單純疱疹病毒(HSV)、慢病毒及泡沫病毒。病毒介導之基因轉移媒劑包含基於諸如腺病毒、腺相關病毒及疱疹病毒之DNA病毒之載體以及基於反轉錄病毒之載體。

【0167】 在某些實施例中，藉由電穿孔將免疫調節組分引入生產細胞中。電穿孔在細胞膜中創建瞬時孔隙，允許將各種分子引入細胞中。在一些實施例中，可藉由電穿孔將DNA及RNA以及多肽及非多肽治療劑引入生產細胞中。

【0168】 在某些實施例中，藉由顯微注射將免疫調節組分引入生產細胞中。在一些實施例中，可使用玻璃微量吸管以將免疫調節組分以微量注入生產細胞中。

【0169】 在某些實施例中，藉由擠出將免疫調節組分引入生產細胞中。

【0170】 在某些實施例中，藉由音波處理將免疫調節組分引入生產細胞中。在一些實施例中，使生產細胞暴露於高強度聲波，引起細胞膜瞬時破壞，允許負載免疫調節組分。

【0171】 在某些實施例中，藉由細胞融合將免疫調節組分引入生產細胞中。在一些實施例中，藉由電細胞融合引入免疫調節組分。在一些其他實施例中，使用聚乙二醇(PEG)以融合生產細胞。在一些其他實施例中，使用仙台病毒以融合生產細胞。

【0172】 在一些實施例中，藉由低滲透壓溶解將免疫調節組分引入生產細胞中。在此等實施例中之一些中，使生產細胞暴露於低離子強度緩衝劑，使其破裂，允許負載免疫調節組分。在一些替代實施例中，使用針對低滲透壓溶液之受控滲析以使生產細胞膨脹且以在生產細胞膜中創建孔隙。隨後，使生產細胞暴露於允許再密封膜之條件。

【0173】 在一些實施例中，藉由清潔劑處理將免疫調節組分引入生產細胞中。在某些實施例中，用溫和清潔劑處理生產細胞，藉由創建孔隙來瞬時損害生產細胞膜，允許負載免疫調節組分。在負載生產細胞之後，將清潔劑洗滌掉，由此再密封膜。

【0174】 在一些實施例中，藉由受體介導之胞吞作用將免疫調節組分引入生產細胞中。在某些實施例中，生產細胞具有表面受體，該表面受體在結合免疫調節組分時誘導受體及相關免疫調節組分之內化。

【0175】 在一些實施例中，藉由過濾將免疫調節組分引入生產細胞中。在某些實施例中，可迫使生產細胞及免疫調節組分通過孔隙尺寸小於生產細胞之過濾器，引起生產細胞膜瞬時破壞且允許免疫調節組分進入生產細胞中。

【0176】 在一些實施例中，使生產細胞經受若干次凍融循環，引起細胞膜破壞，允許負載免疫調節組分。

用免疫調節組分修飾細胞外囊泡之方法

【0177】 在各種替代實施例中，在分離細胞外囊泡之後將免疫調節組分直接引入細胞外囊泡中。

【0178】 在某些實施例中，藉由轉染將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在一些實施例中，可使用諸如陽離子型脂質及聚合物之合成巨分子將免疫調節組分引入細胞外囊泡中(Papapetrou等人, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005))。在某些實施例中，可使用諸如磷酸鈣、環糊精或凝聚胺之化學物質以將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。

【0179】 在某些實施例中，藉由電穿孔將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在一些實施例中，使細胞外囊泡暴露於電場，此在細胞外囊泡膜中產生瞬時孔，允許負載免疫調節組分。

【0180】 在某些實施例中，藉由顯微注射將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在一些實施例中，可使用玻璃微量吸管以將免疫調節組分以微量直接注入細胞外囊泡中。

【0181】 在某些實施例中，藉由擠出將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。

【0182】 在某些實施例中，藉由音波處理將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在一些實施例中，使細胞外囊泡暴露於高強度聲波，引起細胞外囊泡膜瞬時破壞，允許負載免疫調節組分。

【0183】 在一些實施例中，可使免疫調節組分綴合至細胞外囊泡之表面。綴合可藉由此項技術中已知之方法以化學方式或以酶方式達成。

【0184】 在一些實施例中，細胞外囊泡包含以化學方式綴合之免疫調節組分。化學綴合可藉由在使用或不使用連接子之情況下共價鍵結免疫調節組分與另一分子來實現。該等綴合物之形成係在技術人員之技能內且已知用於實現綴合之各種技術，且選擇由待綴合之材料所導引之特定技術。在某些實施例中，使多肽綴合至細胞外囊泡。在某些其他實施例中，使諸如脂質、碳水化合物、核酸及小分子之非多肽綴合至細胞外囊泡。

【0185】 在一些實施例中，藉由低滲透壓溶解將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在此等實施例中之一些中，使細胞外囊泡暴露於低離子強度緩衝劑，使其破裂，允許負載免疫調節組分。在一些替代實施例中，使用針對低滲透壓溶液之受控滲析以使細胞外囊泡膨脹且以在細胞外囊泡膜中創建孔隙。隨後，使細胞外囊泡暴露於允許再密封膜之條件。

【0186】 在一些實施例中，藉由清潔劑處理將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在某些實施例中，用溫和清潔劑處理細胞外囊泡，藉由創建孔隙來瞬時損害細胞外囊泡膜，允許負載免疫調節組分。在負載細胞外囊泡之後，將清潔劑洗滌掉，由此再密封膜。

【0187】 在一些實施例中，藉由受體介導之胞吞作用將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在某些實施例中，細胞外囊泡具有表面受體，該表面受體在結合免疫調節組分時誘導受體及相關免疫調節組分之內化。

【0188】 在一些實施例中，藉由機械燃燒將免疫調節組分引入細胞外囊泡中。在某些實施例中，可用連接至諸如金微載體之重粒子或帶電粒子之免疫調節組分轟擊細胞外囊泡。在此等實施例中之一些中，可以機械方式或以電氣方式加速粒子以使得其橫穿細胞外囊泡膜。

【0189】 在一些實施例中，藉由過濾將免疫調節組分引入細胞外囊

泡中。在某些實施例中，可迫使細胞外囊泡及免疫調節組分通過孔隙尺寸小於細胞外囊泡之過濾器，引起細胞外囊泡膜瞬時破壞且允許免疫調節組分進入細胞外囊泡中。

【0190】 在一些實施例中，使細胞外囊泡經受若干次凍融循環，引起細胞外囊泡膜破壞，允許負載免疫調節組分。

分離細胞外囊泡之方法

【0191】 細胞外囊泡可與生產細胞分離。在某些實施例中，細胞外囊泡係藉由生產細胞來釋放至細胞培養基中。預期分離細胞外囊泡之所有已知方式均視為適用於本文中。舉例而言，可採用細胞外囊泡之物理性質以分離其與介質或其他源材料，該分離包括基於電荷之分離(例如電泳分離)、基於尺寸之分離(例如過濾、分子篩分等)、基於密度之分離(例如有規律或梯度離心)、基於沈降常數之分離(例如在具有或不具有外力之情況下之沈降等)。可替代地或另外，分離可基於一或多種生物性質，且包括可採用表面標記之方法(例如用於沈澱、與固相之可逆結合、FACS分離、特異性配位體結合、非特異性配位體結合、親和純化等)。

【0192】 分離及增濃可以通常包括連續離心之一般且非選擇性方式進行。可替代地，分離及增濃可以諸如使用細胞外囊泡或生產細胞特異性表面標記之更特定且選擇性方式進行。舉例而言，特異性表面標記可用於免疫沈澱、FACS分選、親和純化及與珠粒結合配位體之磁力分離。

【0193】 在一些實施例中，可利用粒徑篩析層析法以分離細胞外囊泡。粒徑篩析層析法技術為此項技術中已知的。本文提供例示性非限制性技術。在一些實施例中，空隙體積餾分經分離且包含所關注之細胞外囊泡。此外，在一些實施例中，細胞外囊泡可在藉由如此項技術中一般已知

之(一或多種層析法餾分)離心技術進行層析分離之後進行進一步分離。在一些實施例中，舉例而言，可利用密度梯度離心以進一步分離細胞外囊泡。在某些實施例中，進一步分離生產細胞源性細胞外囊泡與其他起源之細胞外囊泡可為合乎需要的。舉例而言，可藉由使用對生產細胞具有特異性之抗原抗體進行免疫吸附捕獲來使生產細胞源性細胞外囊泡與非生產細胞源性細胞外囊泡分離。

【0194】 在一些實施例中，細胞外囊泡分離可涉及包括但不限於以下之方法組合：差速離心、基於尺寸之膜過濾、免疫沈澱、FACS分選及磁力分離。

量測細胞外囊泡尺寸之方法

【0195】 在一些實施例中，本文所描述之方法包含量測細胞外囊泡尺寸及/或細胞外囊泡群。一般而言，細胞外囊泡尺寸量測為最長可量測尺寸。一般而言，細胞外囊泡之最長可量測尺寸亦稱為其直徑。

【0196】 細胞外囊泡尺寸可使用動態光散射(DLS)及/或多角度光散射(MALS)來量測。使用DLS及/或MALS量測細胞外囊泡尺寸之方法為熟習此項技術者所知，且包括奈米粒子追蹤分析(NTA，例如使用Malvern NanoSight NS300奈米粒子追蹤裝置)。在特定實施例中，使用Malvern NanoSight NS300測定細胞外囊泡尺寸。在一些實施例中，如藉由NTA(例如使用Malvern NanoSight NS300)所量測，本文所描述之細胞外囊泡之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，如藉由NTA(例如使用Malvern NanoSight NS300)所量測，本文所描述之細胞外囊泡之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由NTA(例如使用Malvern NanoSight NS300)所量測，細胞

外囊泡之90%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由NTA（例如使用Malvern NanoSight NS300）所量測，細胞外囊泡之95%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由NTA（例如使用Malvern NanoSight NS300）所量測，細胞外囊泡之99%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由NTA（例如使用Malvern NanoSight NS300）所量測，細胞外囊泡之90%之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由NTA（例如使用Malvern NanoSight NS300）所量測，細胞外囊泡之95%之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由NTA（例如使用Malvern NanoSight NS300）所量測，細胞外囊泡之99%之最長尺寸為約40-200 nm。

【0197】細胞外囊泡尺寸可使用可調式阻性脈衝感測器(TRPS)來量測。在特定實施例中，如藉由TRPS所量測之細胞外囊泡尺寸係使用iZON qNANO Gold來測定。在一些實施例中，如藉由TRPS（例如使用iZON qNano Gold）所量測，本文所描述之細胞外囊泡之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，如藉由TRPS（例如iZON qNano Gold）所量測，本文所描述之細胞外囊泡之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由TRPS（例如使用iZON qNano Gold）所量測，細胞外囊泡之90%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由TRPS（例如使用iZON qNano Gold）所量測，細胞外囊泡之95%之最長尺寸為約

20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由TRPS (例如使用iZON qNano Gold)所量測，細胞外囊泡之99%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由TRPS (例如使用iZON qNano Gold)所量測，細胞外囊泡之90%之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由TRPS (例如使用iZON qNano Gold)所量測，細胞外囊泡之95%之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由TRPS (例如使用iZON qNano Gold)所量測，細胞外囊泡之99%之最長尺寸為約40-200 nm。

【0198】細胞外囊泡尺寸可使用電子顯微法來量測。在一些實施例中，用於量測細胞外囊泡尺寸之電子顯微法為穿透電子顯微法。在特定實施例中，用於量測細胞外囊泡尺寸之穿透電子顯微鏡為Tecnai™ G² Spirit BioTWIN。使用電子顯微鏡量測細胞外囊泡尺寸之方法為熟習此項技術者所熟知，且任何該方法可適合於量測細胞外囊泡尺寸。在一些實施例中，如藉由掃描電子顯微鏡(例如Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，本文所描述之細胞外囊泡之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，如藉由掃描電子顯微鏡(例如Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，本文所描述之細胞外囊泡之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由掃描電子顯微鏡(例如Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，細胞外囊泡之90%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由掃描電子顯微鏡(例如

Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，細胞外囊泡之95%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由掃描電子顯微鏡(例如Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，細胞外囊泡之99%之最長尺寸為約20-300 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由掃描電子顯微鏡(例如Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，細胞外囊泡之90%之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由掃描電子顯微鏡(例如Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，細胞外囊泡之95%之最長尺寸為約40-200 nm。在其他實施例中，本文所描述之細胞外囊泡群包含種群，其中如藉由掃描電子顯微鏡(例如Tecnai™ G² Spirit BioTWIN掃描電子顯微鏡)所量測，細胞外囊泡之99%之最長尺寸為約40-200 nm。

用於測定巨噬細胞極化之方法

【0199】 本文揭示用於使用包含一或多種抑制巨噬細胞靶基因表現之免疫調節組分之細胞外囊泡增加自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化的方法及組合物。組合物優先由巨噬細胞攝取(相較於諸如T細胞、B細胞、巨噬細胞或樹突狀細胞之其他細胞類型而言)，且增加巨噬細胞極化之效果與等莫耳量之單獨免疫調節組分相同或比其更佳。包括偵測巨噬細胞之M2及M1表現型之用於測定巨噬細胞極化之方法可藉由此項技術中已知之用於測定M2及M1表現型之任何方法來執行。可針對泛巨噬細胞以及M2及M1巨噬細胞之標記對組織切片(例如來自腫瘤生物檢體)、血液檢體等進行分析(例如染色)，該等標記包括但不限於M2細胞表面標記(例如

YM1、FIZZ1、Dectin-1、MGL)、M2相關細胞介素(例如IL-10、TGF β 、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及CCL24)、M1相關細胞介素(例如INF γ 、IL-12、IL-23、TNF α 、IL-6、IL-1、CCL5、CSCL9、CXCL10及CXCL11)、生長因子(例如VEGF-A、VEGF-C、EGF及TGF- β)、酶(例如基質金屬蛋白酶MMP2、MMP9、半胱胺酸組織蛋白酶)、M2相關miRNA(例如miRNA146a、miRNA let 7b及miR-223)及/或M1相關miRNA(例如miRNA155、miR-33)。參見例如Mosser, D. M.及Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature Reviews Immunology, 8(12), 958-969; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity, 41(1), 14-20。檢體內之巨噬細胞及/或巨噬細胞組分、分泌物或巨噬細胞活動(參見例如Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Randolph, G. J. (2007). Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity, Nature Immunology 13(11), 1118-1128)可藉由流動式細胞量測術、免疫組織化學、免疫墨點法、定量PCR或此項技術中已知之偵測生物檢體中之細胞或細胞產物之任何其他方法來偵測。

治療癌症之方法

【0200】 此外，本文提供治療個體之癌症之方法。

【0201】 在各種實施例中，向患有癌症之個體投與具有包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡(例如胞外體)的組合物，該一或多種免疫調

節組分抑制至少一種基因且由此增加自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化。在此等實施例中之一些中，組合物可上調免疫反應且增強個體之免疫系統之腫瘤靶向。在一些態樣中，增加之自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化本身上調個體之免疫反應且增強個體之免疫系統的腫瘤靶向。一些作者提及M2d亞型活化作為對IL-6及腺苷之反應，且此等巨噬細胞亦稱為腫瘤相關巨噬細胞(TAM)。參見例如 Röszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1-16 ; Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J.及Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 154(2), 186-195 ; 及 Q. Wang, H. Ni, L. Lan, X. Wei, R. Xiang 及 Y. Wang, 「Fra-1 protooncogene regulates IL6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages」, *Cell Research*, 第20卷, 第6號, 第701-712頁, 2010。腫瘤相關巨噬細胞(TAM)之典型在於其如癌細胞運動性促進、癌轉移形成及血管生成之促腫瘤功能，且其形成係視在發展腫瘤中存在之微環境因子而定。TAM產生免疫抑制性細胞介素(如IL-10、TGF β 、PGE2及極少量之NO或ROI)及低量發炎性細胞介素(IL-12、IL-1 β 、TNF α 、IL-6)。TAM呈現腫瘤相關抗原之能力以及T細胞及NK細胞之抗腫瘤功能之刺激降低。此外，TAM不能夠溶解腫瘤細胞。
https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization - cite_note-Sica2008-31 如已經由傳遞藥劑以更改TAM之募集及分佈、耗竭現存TAM或誘導TAM自M2表現型向M1表現型之再教育所證實，TAM靶向可為新穎抗癌治療策略。參見例如 Lewis, Claire E.及Jeffrey W. Pollard.

「Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments」. Cancer research 66.2 (2006): 605-612 ; Sica, Antonio 等人

「Macrophage polarization in tumour progression」. Seminars in Cancer Biology. 第18卷. 第5號. Academic Press, 2008 ; Sica, Antonio 等人

Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. J Immunol. 2000 年 1 月 15 日 ;164(2):762-7 ; Cuccarese, Michael F.; Dubach, J. Matthew; Pfirschke, Christina; Engblom, Camilla; Garriss, Christopher; Miller, Miles A.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2017-02-08).

「Heterogeneity of macrophage infiltration and therapeutic response in lung carcinoma revealed by 3D organ imaging」. Nature Communications. 8: 14293 ; Zeisberger, S M; Odermatt, B; Marty, C; Zehnder-Fjällman, A H M; Ballmer-Hofer, K; Schwendener, R A (2006-07-11). 「Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach」. British Journal of Cancer. 95 (3): 272-281 ; Rodell, Christopher B.; Arlauckas, Sean P.; Cuccarese, Michael F.; Garriss, Christopher S.; Li, Ran; Ahmed, Maaz S.; Kohler, Rainer H.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2018-05-21). 「TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy」. Nature Biomedical Engineering; Guerriero, Jennifer L. ; Sotayo, Alaba; Ponichtera, Holly E.; Castrillon, Jessica A.; Pourzia, Alexandra L.; Schad, Sara; Johnson,

Shawn F.; Carrasco, Ruben D.; Lazo, Suzan (2017年3月). 「Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages」. Nature. 543 (7645): 428-432。

【0202】 在一些實施例中，所治療之癌症之特徵在於白血球(T細胞、B細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞、單核球)向腫瘤微環境或所謂之「熱腫瘤」或「發炎性腫瘤」中之浸潤。在一些實施例中，所治療之癌症之特徵在於低量或不可偵測量之白血球向腫瘤微環境或所謂之「冷腫瘤」或「非發炎性腫瘤」中之浸潤。在一些實施例中，組合物之投與量及持續時間足以將「冷腫瘤」轉化成「熱腫瘤」，亦即該投與引起白血球(諸如T細胞)浸潤至腫瘤微環境中。

【0203】 在一些實施例中，組合物包含細胞外囊泡及超過一種免疫調節組分之組合，該超過一種免疫調節組分包括促進自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化之組分，及另外增強免疫反應之組分，諸如檢查點阻斷抑制劑，例如靶向CTLA-4之伊匹單抗、靶向PD-1之納武單抗、賽咪單抗及派姆單抗以及各自靶向PD-L1之阿特珠單抗、阿維魯單抗、德瓦魯單抗；及CSFR-1之抑制劑，諸如吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、艾瑪圖單抗、AMG820、IMC-CS4及卡比拉單抗。作為用於患有癌症之個體之治療之此等組合物投與可進一步上調免疫反應且經由免疫調節組分之組合作用增強個體之免疫系統的腫瘤靶向。

【0204】 在一些實施例中，額外免疫調節組分為靶向CTLA-4、PD-1、PD-L1或CSF1-R之抗體或活性片段。在實施例中，抗體或其活性片段包含與伊匹單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其

活性片段包含與納武單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與賽咪單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與派姆單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與阿特珠單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與阿維魯單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與德瓦魯單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與吡昔替尼之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與PLX7486之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與ARRY-382之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與JNJ-40346527之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與BLZ945之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與艾瑪圖單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與AMG820之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與IMC-CS4之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。在實施例中，抗體或其活性片段包含與卡比拉單抗之CDR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之CDR。

【0205】 在一些實施例中，向個體投與包含細胞外囊泡及免疫調節組分之組合物作為癌症疫苗。在此等實施例中之一些中，向個體投與組合物作為個人化癌症疫苗。在一些實施例中，免疫調節組分為腫瘤抗原或來源於腫瘤抗原之肽。合適腫瘤抗原之實例包括： α -胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、上皮腫瘤抗原(ETA)、黏蛋白1 (MUC1)、Tn-MUC1、黏蛋白16 (MUC16)、酪胺酸酶、黑色素瘤相關抗原(MAGE)、腫瘤蛋白p53 (p53)、CD4、CD8、CD45、CD80、CD86、程式化死亡配位體1 (PD-L1)、程式化死亡配位體2 (PD-L2)、NY-ESO-1、PSMA、TAG-72、HER2、GD2、cMET、EGFR、間皮素、VEGFR、 α -葉酸受體、CE7R、IL-3、癌症-睪丸抗原、MART-1 gp100及TNF相關細胞凋亡誘導配位體。在某些實施例中，腫瘤抗原來源於參考基因組序列。在某些實施例中，腫瘤抗原來源於接受組合物之個體之基因組序列。

【0206】 可經組合物治療之癌症包括但不限於表5中所列舉之癌

症。

調節巨噬細胞中之基因表現、轉錄網路及極化之方法

【0207】 一些實施例提供調節巨噬細胞中之基因表現之方法，其包含向個體投與包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡，其中免疫調節組分靶向基因，且其中調節等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向基因之游離免疫調節組分所產生之調節。亦提供抑制巨噬細胞中之基因表現之方法，其包含向個體投與包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡，其中免疫調節組分靶向基因，且其中抑制等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向基因之游離免疫調節組分所產生之抑制。一些實施例提供阻遏巨噬細胞中之基因之下游靶標之方法，其包含向個體投與包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡，其中免疫調節組分靶向基因，且其中阻遏等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向基因之游離免疫調節組分所產生之阻遏。一些實施例提供更改巨噬細胞群之極化之方法，其包含向個體投與包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡，其中免疫調節組分靶向基因，且其中極化更改等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向基因之游離免疫調節組分所產生之極化更改。在一些實施例中，細胞外囊泡為胞外體。在一些實施例中，免疫調節組分為ASO。在一些實施例中，極化中之更改為自M2表現型向M1表現型之變化。

治療纖維化病況之方法

【0208】 此外，本文提供治療個體之纖維化病況之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之包含有包含免疫調節組分之胞外體之組合物，該免疫調節組分將巨噬細胞自M2表現型再極化成M1表現型。在一些實施例中，纖維化病況為肺纖維化、肝纖維化或胰纖維化。在某些實施例中，

肝纖維化為非酒精性脂肪變性肝炎或NASH。

投與模式

【0209】 在一些實施例中，將組合物靜脈內投與至個體循環系統。

在一些實施例中，將組合物輸注於合適液體中且投與至個體靜脈中。

【0210】 在一些實施例中，將組合物動脈內投與至個體循環系統。

在一些實施例中，將組合物輸注於合適液體中且投與至個體動脈中。

【0211】 在一些實施例中，藉由鞘內投與向個體投與組合物。在一些實施例中，將組合物經由注射劑投與至脊髓管中，或至蛛膜下間隙中使得其到達腦脊髓液(CSF)。

【0212】 在一些實施例中，藉由鼻內投與向個體投與組合物。在一些實施例中，可以局部投與或全身性投與之形式經由鼻吹入組合物。在某些實施例中，將組合物以鼻用噴霧形式投與。

【0213】 在一些實施例中，藉由腹膜內投與向個體投與組合物。在一些實施例中，將組合物輸注於合適液體中且注射至個體腹膜中。在一些實施例中，該腹膜內投與引起組合物(例如組合物中之細胞外囊泡)分佈至淋巴管。在一些實施例中，該腹膜內投與引起組合物(例如組合物中之細胞外囊泡)分佈至胸腺、脾臟及/或骨髓。在一些實施例中，該腹膜內投與引起組合物(例如組合物中之細胞外囊泡)分佈至一或多個淋巴結。在一些實施例中，該腹膜內投與引起組合物(例如組合物中之細胞外囊泡)分佈至子宮頸淋巴結、腹股溝淋巴結、縱隔淋巴結或胸骨淋巴結中之一或多者。在一些實施例中，該腹膜內投與引起組合物(例如組合物中之細胞外囊泡)分佈至胰臟。

【0214】 在一些實施例中，藉由眼周投與向個體投與組合物。在一

些實施例中，將組合物注射至眼周組織中。眼周藥物投與包括結膜下、前房眼球筋膜囊下、後房眼球筋膜囊下及眼球後投與途徑。

【0215】 在一些實施例中，藉由多種投與途徑將組合物投與至同一個體中。在一些實施例中，該多種投與途徑包含靜脈內投與、動脈內投與、鞘內投與、鼻內投與、腹膜內投與及/或眼周投與。在較佳實施例中，該多種投與途徑包含靜脈內投與及腹膜內投與。

【0216】 在某些實施例中，細胞外囊泡之劑量在1 ng至10 ng、10 ng至100 ng、100 ng至1 µg、1 µg至5 µg、5 µg至10 µg、10 µg至50 µg、50 µg至75 µg、75 µg至100 µg、100 µg至150 µg、150 µg至200 µg、200 µg至300 µg、300 µg至500 µg、500 µg至1 mg或1mg至10 mg之間。

【0217】 可向個體投與一次組合物。可替代地，可在一段時間內執行多次投與。舉例而言，可給與個體兩次、三次、四次、五次或更多次投與。在一些實施例中，可視需要給與投與例如達與疾病、病症或病況相關症狀持續時間一樣長之時間。在一些實施例中，可針對個體生命之剩餘時間指定重複投與。治療期可變化且可例如不超過一年、六個月、三個月、兩個月、一個月、兩週、一週、三天、兩天或不超過一天。

【0218】 在某些實施例中，細胞外囊泡之劑量係以諸如每日一次、每隔一天、每週一次、每週兩次、每月一次或每月兩次之間隔投與。

【0219】 在一些實施例中，以足以有效地增加靶細胞或組織中之免疫調節組分之濃度高於與疾病、病症或病況症狀相關之水準之頻率投與醫藥組合物。

【0220】 在一些實施例中，在治療期內投與至少兩次組合物以使得

治療疾病、病症或病況，或改善其症狀。在一些實施例中，在治療期內投與至少兩次組合物以使得治療疾病、病症或病況，或預防其症狀。在一些實施例中，在治療期內投與足夠次數之醫藥組合物以使得在治療期間將足夠量之免疫調節組分傳遞至靶細胞或組織。在一些實施例中，在治療期內投與足夠次數之醫藥組合物以使得在治療期間將足夠量之免疫調節組分傳遞至靶細胞或組織，以使得預防、減輕、改善或延遲疾病、病症或病況之一或多種症狀。在一些實施例中，增加靶細胞或組織中之免疫調節組分濃度包括增加峰值濃度，而在其他實施例中，其包括增加平均濃度。在一些實施例中，治療期間之實質性增加可藉由比較個體中之預治療期或治療期後或藉由比較進行治療之種群中進行的量測與經匹配之未經治療對照種群中進行的量測來測定。

【0221】 在一些實施例中，每個治療期投與足夠次數之醫藥組合物，使得靶細胞或組織中之免疫調節組分之濃度增加達至少約一週、兩週、三週、四週、一個月、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月或超過六個月。在一些實施例中，每個治療期投與足夠次數之醫藥組合物，使得靶細胞或組織中之免疫調節組分之濃度增加達至少與治療期一樣長之時間。

【0222】 在一些實施例中，治療期內之重複投與之間之時間間隔不會比循環中之細胞外囊泡之數目減少至小於所投與醫藥組合物中所存在細胞外囊泡數目之約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的時間更長。

【0223】 在一些實施例中，治療方法進一步包含在注射合適治療劑

量之攜帶細胞外囊泡之治療劑之前，注射一或多次劑量之非治療性細胞外囊泡。在某些實施例中，非治療性細胞外囊泡係與治療性細胞外囊泡分開投與，且以不同於治療性細胞外囊泡之劑量投與。在某些實施例中，非治療性細胞外囊泡之劑量大於治療性細胞外囊泡之劑量。在某些其他實施例中，非治療性細胞外囊泡之劑量小於治療性細胞外囊泡之劑量。在某些實施例中，非治療性細胞外囊泡之劑量與治療性細胞外囊泡之劑量相同。在各種實施例中，在注射合適劑量之治療性細胞外囊泡之前先注射非治療性細胞外囊泡之方法，減少肝臟、肺臟及/或脾臟中之治療性細胞外囊泡之更新。參見共有PCT申請案PCT/US2017/047794，其出於所有目的以引用之方式併入本文中。

【0224】 至少部分地基於靶組織、靶細胞類型、投藥方式、細胞外囊泡之物理特徵(例如尺寸，且在一些情況下指分子之傳遞程度)及其他決定因素提供有效量之組合物。一般而言，有效量之組合物提供有效之靶細胞細胞反應。增加之效率可由宿主個體之增加之細胞轉染(亦即經細胞外囊泡成分轉染之細胞之百分比)、增加之細胞反應或減少之先天性免疫反應來證實。

【0225】 細胞外囊泡及其醫藥組合物之投與劑量及頻率可例如由主治醫師基於諸如疾病嚴重程度、患者年齡、性別及膳食、任何發炎嚴重程度、投與時間及其他臨床因素之各種因素來決定。在實例中，靜脈內投與係以最低限度有效之劑量開始，且在經預先選擇之時程內增加劑量直至觀測到正效應為止。隨後，將遞增之劑量增加限於產生有效對應增加之水準，同時考慮可能出現之任何副作用。

額外實施例

【0226】 其他態樣及實施例提供於以下經編號條項中。

1. 一種包含一或多種核酸分子之細胞外囊泡，該一或多種核酸分子抑制至少一種基因且由此增加自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化。
2. 如實施例1之細胞外囊泡，其中該細胞外囊泡為胞外體。
3. 如實施例1或2之細胞外囊泡，其中該核酸為抑制性RNA。
4. 如實施例1至3中任一項之細胞外囊泡，其中該抑制性RNA為反義RNA、siRNA、ShRNA、miRNA、lncRNA或前驅miRNA。
5. 如實施例1至4中任一項之細胞外囊泡，其中該至少一種基因係選自由以下組成之群：
KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC及c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、麩醯胺酸酶及PKM2。
6. 如實施例5之細胞外囊泡，其中該基因為KRAS。
7. 如實施例6之細胞外囊泡，其中該核酸為靶向野生型人類KRAS之抑制性RNA。
8. 如實施例7之細胞外囊泡，其中該抑制性RNA亦靶向小鼠Kras^{G12D}。
9. 如實施例1至8中任一項之細胞外囊泡，其中該巨噬細胞為腫瘤駐留巨噬細胞。
10. 如實施例9之細胞外囊泡，其中該腫瘤為胰臟腫瘤。
11. 如實施例1至10中任一項之細胞外囊泡，其進一步包含額外免疫調節組分。

12. 如實施例11之細胞外囊泡，其中該額外免疫調節組分為小分子藥物、抗體或治療性蛋白質。

13. 如實施例12之細胞外囊泡，其中該抗體為免疫檢查點抑制劑。

14. 一種醫藥組合物，其包含如實施例1至12中任一項之細胞外囊泡。

15. 一種治療有需要之患者之疾病之方法，其包含向該患者投與如實施例1至12中任一項之細胞外囊泡或如實施例[0004]之醫藥組合物，由此治療該患者之該疾病。

16. 如實施例15之方法，其中該疾病為癌症。

17. 如實施例15或16之方法，其中該患者為人類。

18. 如實施例1至17中任一項之方法，其中該核酸為靶向原致癌基因之抑制性RNA。

19. 如實施例18之方法，其中該原致癌基因為人類KRAS。

20. 如實施例19之方法，其中該癌症為胰臟癌。

21. 如實施例15至20中任一項之方法，其進一步包含執行至少第二療法。

22. 如實施例21之方法，其中該第二療法包含手術療法、化學療法、輻射療法、冷凍療法、激素療法或免疫療法。

23. 如前述實施例中任一項之細胞外囊泡，其中該M2巨噬細胞為選自由M2a、M2b及M2c巨噬細胞組成之群之腫瘤相關巨噬細胞。

24. 如前述實施例中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞顯示增加分泌選自由 $\text{INF}\gamma$ 、IL-12、IL-23、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、IL-1、CSCL9、CXCL10及CXCL11組成之群之發炎

性細胞介素及趨化介素。

25. 如前述實施例中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞顯示減少分泌選自由IL-10、TGF β 、PGE₂、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及CCL24組成之群之免疫抑制性細胞介素及趨化介素。

26. 如前述實施例中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞表現增加之腫瘤相關抗原。

27. 如前述實施例中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞增加CD8⁺ T細胞及/或自然殺手細胞之刺激。

28. 一種治療個體之胰臟癌之方法，其包含：向該個體投與包含靶向人類野生型KRAS之抑制性RNA之細胞外囊泡；其中該治療將腫瘤駐留巨噬細胞自M2表現型極化成M1表現型之百分比增加至高於在經靶向人類KRAS^{G12D}之抑制性RNA治療之患者中所觀測到的極化百分比的水準。

實例

【0227】 提出以下實例以便向一般熟習此項技術者提供對如何製造且使用本發明之完整揭示內容及描述，且不意欲限制本發明人視為其發明之內容之範疇，其亦不意欲表示以下實驗為所執行之所有或唯一實驗。已努力確保就所用數目(例如量、溫度等)而言之精確度，但應考慮一些實驗誤差及偏差。除非另外指示，否則份數為重量份，分子量為重量平均分子量，溫度係以攝氏度為單位，且壓力為大氣壓或接近大氣壓。可使用標準縮寫，例如bp，鹼基對；kb，千鹼基； μ l，微微升；s或sec，秒；min，分鐘；h或hr，小時；aa，(多種)胺基酸；nt，(多種)核苷酸；及其類似

者。

【0228】 除非另外指示，否則本發明之實踐將採用本領域技能內之蛋白質化學、生物化學、重組DNA技術及藥理學之習知方法。該等技術在文獻中已充分解釋。參見例如T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993)；A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc.，當前新增)；Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, 1989)；*Methods In Enzymology* (S. Colowick及N. Kaplan編, Academic Press, Inc.)；*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第21版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005)；Carey及Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 第3版(Plenum Press) 第A及B卷(1992)。

實例1：M2巨噬細胞中之轉錄因子之減弱

方法：

分離單核球與PBMC：

- 接受50 ml膚色血球層
- 將15 ml聚蔗糖吸取至50 ml STEMCELL SepMate管中
- 將膚色血球層稀釋於PBS 2mM EDTA中以使得最終容積為~250mL
- 將經稀釋之膚色血球層檢體傾入Sepmate管中直至試管中之最終容積為~45-50 ml為止
- 將試管在1000 g下離心15 min，且1個試管上具有制動器
- 由自旋試管抽吸血漿，且用輔助吸管將膚色血球層收集至50 ml錐形管中。使試管填充有PBS/EDTA且將細胞在500 g下離心成集結粒達3

min。

- 若紅血細胞高度存在，則將細胞再懸浮於10 ml ACK溶解緩衝劑(ThermoFisher，目錄號A1049201)中且在室溫下培育3分鐘(製造商方案)。使試管填充有PBS/EDTA且在500 g下離心3分鐘。

- 將試管在400×g下消旋5 min，且將集結粒用PBS EDTA再次洗滌且再集結

- 將集結粒再懸浮於RoboSep緩衝劑(STEMCELL，目錄號20104)中，且使用與錐蟲藍(Thermofisher)（由一個膚色血球層產生之~5億PBMC)之1:1稀釋液計數細胞。

- 根據製造商方案使用EasySep人類單核球增濃套組(STEMCELL，目錄號19059RF)分離CD14+單核球(總細胞之~10%分離為單核球)

- 將5百萬單核球塗鋪在於RPMI 10% FBS 1% Anti Anti+40 ng/ml M-CSF中之一個盤中。

巨噬細胞分化及極化：

(採納自 <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2015-0012OC>)

- 將所塗鋪之細胞在37°C、5% CO2下在RPMI-1640 10% FBS 1% Anti Anti 1% PenStrep + 40 ng/ml M-CSF (Biolegend)中培養5-6天。在塗鋪之後第1天及第3天添加5 ml相同新鮮培養基。在第5天，如下添加極化細胞介素(與40 ng/ml MSCF一起；所有細胞介素均以20 ng/ml添加)：

- M0：無細胞介素
- M2a：IL-4
- M2c：IL-10

- M2++ : Il4、Il10、TGFb
- M1 : IFN-g + LPS (100 ng/ml)
- TAM : 75% Panc-1上清液
- 將細胞與細胞介素一起培育24小時
- 在第6天，抽吸培養基，用PBS洗滌細胞，且隨後每個盤添加10 ml PBS 5 mM EDTA (冰冷)，且在4°C下培育30 min
- 將細胞輕輕地刮下離開盤，且計數。
- 隨後，將50,000個細胞/孔與針對不同巨噬細胞群之各別細胞介素 (參見上文)一起塗鋪在於RPMI-1640 10% FBS 1% Anti Anti 1% PenStrep + 40 ng/ml M-CSF (Biolegend)中之96孔盤中達24小時，之後開始治療。

胞外體純化：

【0229】 9天之後自具有HEK293 SF細胞之高密度懸浮培養物之上清液中收集胞外體。將上清液藉由陰離子交換層析法過濾且分餾，且在氯化鈉之分步梯度中溶析。具有最高蛋白質濃度之峰值餾分含有胞外體及污染細胞組分。將峰值餾分分離且藉由超速離心在Optiprep™ (60%碘克沙醇w/v)密度梯度上進一步分餾。

【0230】 將胞外體餾分在4°C下在用於SW 32 Ti轉子之38.5 mL Ultra-Clear (344058)試管中在133,900×g下藉由超速離心濃縮3小時。將集結材料再懸浮於1 mL PBS及3 mL Optiprep™中，使最終碘克沙醇濃度為45%。對於Optiprep™梯度，在用於SW 41 Ti轉子之12 mL Ultra-Clear (344059)試管中用4 mL含有45%碘克沙醇之再懸浮材料、3 mL 30%碘克沙醇、2 mL 22.5%碘克沙醇、2 mL 17.5%碘克沙醇及1 mL PBS製備4層無菌梯度。將Optiprep™梯度在150,000×g下在4°C下超速離心16小時以分

離胞外體餾分。超速離心產生已知含有胞外體之頂部餾分、含有中度密度之細胞碎片之中間餾分及含有高密度聚集物及細胞碎片之底部餾分。隨後，自試管之頂部~3 mL輕輕地收集胞外體層。

【0231】 將胞外體餾分稀釋在於38.5 mL Ultra-Clear (344058)試管中之~32 mL PBS中且在4°C下在133,900×g下超速離心3小時以集結經純化之胞外體。隨後，將集結胞外體再懸浮於最小體積之PBS (~200 µL)中且儲存於4°C下。

【0232】 許多固態腫瘤之特徵在於富骨髓細胞浸潤物，其常常包含表徵為具有替代活化或M2表現型之腫瘤相關巨噬細胞。M2巨噬細胞表現促進代謝酶精胺酸酶(Arg1)表現之高量磷酸化STAT3及STAT6。為證實關鍵M2基因之基因表現減弱更改活體外分化巨噬細胞之M2表現型，將鼠RAW264.7巨噬細胞極化成如上文所描述之M2狀態。用遞增量之靶向STAT3、STAT6、CEBPβ-1、CEBPβ-2、Pi3Kγ或KRAS之siRNA (12.5 nM、25 nM、50 nM及100 nM)轉染所培養之經極化巨噬細胞。以劑量依賴型方式阻遏基因中之各者(圖1)，且各M2基因之基因表現減弱導致伴隨之Arg1減少(圖2)，此證實M2表現型可藉由減少上調節劑之表現來更改。

實例2：由巨噬細胞亞型攝取之差異胞外體

【0233】 巨噬細胞亞型之特徵在於代謝及其他表現型活性中之更改。為理解特定巨噬細胞亞型係否優先攝取胞外體，將六個巨噬細胞亞群(M0、M1、M2a、M2c、M2++及TAM)與遞增量之經工程改造以表現腔GFP之HEK293SF源性胞外體一起培育。胞外體攝取係藉由在36小時內在IncuCyte®活細胞分析系統(Essen Bioscience)中量測總細胞GFP強度來測定。如圖3中所示，當所有巨噬細胞亞型均顯示胞外體攝取時，與其他巨

噬細胞亞型相比，M0巨噬細胞在攝取胞外體方面最不為有效的，而M2++巨噬細胞在攝取胞外體方面實質上更高效。

【0234】 因為M2巨噬細胞有效地攝取胞外體，故吾等研究負載ASO之胞外體係否比單獨ASO更高效地靶向細胞內巨噬細胞靶標(例如更高效地阻斷靶基因及基因信號傳導路徑內之下游效應分子之基因表現)。生成靶向STAT3且攜載Cy5螢光追蹤器及5'膽固醇連接子之2'-甲氧基乙基(MOE)單股DNA/RNA ASO。使HEK293SF胞外體與膽固醇標籤螢光ASO混合，且藉由超速離心及移除含ASO上清液來移除游離ASO。如藉由總螢光強度所量測，將M2及M0巨噬細胞以相等密度塗鋪且與濃度匹配之游離ASO或負載ASO之胞外體(Exo-ASO)一起培育。在48小時內量測總細胞螢光且使用IncuCyte[®]活細胞分析系統來定量。如圖4中所示，與M0巨噬細胞相比，M2巨噬細胞更容易地攝取游離ASO及Exo-ASO兩者。引起關注地，M0及M2巨噬細胞兩者更有效地攝取Exo-ASO，此表明向M2巨噬細胞之ASO傳遞可藉由負載於胞外體上來增強。

【0235】 為確定與其他細胞類型相比巨噬細胞係否活體內差異攝取胞外體或Exo-ASO，使未處理小鼠腹膜內給藥有 1×10^{11} 或 1×10^{12} 個含GFP胞外體。注射後一小時，總腹膜細胞經分離且在不同免疫細胞子集(亦即B細胞、樹突狀細胞、嗜中性白血球、自然殺手(NK)細胞、T細胞及巨噬細胞)中藉由針對GFP陽性之流動式細胞量測術來表徵。如圖5A中所示，在兩種劑量下，巨噬細胞為攝取螢光胞外體之主要細胞類型。為確定此差異係否出現在疾病環境中，使B16F10腫瘤攜帶小鼠注射有單次劑量之Cy5標記Exo-ASO或天然未標記胞外體。經注射之腫瘤經分離、解離且藉由流動式細胞量測術量測。如圖5B中所示，巨噬細胞攝取Exo-ASO之容易

性比腫瘤細胞高得多(大於約100倍之總體Cy5信號)，此表明Exo-ASO傳遞可達至於若干種複合細胞混合物中之巨噬細胞群。此外，相較於另一所測試細胞類型(B細胞、樹突狀細胞、嗜中性白血球、自然殺手(NK)細胞及T細胞)之巨噬細胞對Exo-ASO之優先攝取致能靶向巨噬細胞之ASO傳遞之方法，其包含向個體投與Exo-ASO組合物，其中個體中所存在之巨噬細胞優先攝取所投與組合物(與例如B細胞、樹突狀細胞、嗜中性白血球、自然殺手(NK)細胞及T細胞之其他免疫細胞子集之攝取相比)。此增強之Exo-ASO組合物之巨噬細胞特異性藉由減少於脫靶細胞中之效應來改善所投與組合物之安全性。

實例3：反義寡核苷酸之胞外體介導之傳遞有力地失調巨噬細胞轉錄網路且更改極化

【0236】 先前實驗表明ASO之胞外體介導之傳遞可為更改巨噬細胞基因表現模式之有效方法。根據以上方法純化之HEK293SF源性胞外體負載有五種不同之靶向STAT3之膽固醇標籤ASO (4.1，雙股MOE化學物質；5.1及5.2，單股O-甲基化學物質；5.3及5.4，單股MOE化學物質)中之一種。ASO序列顯示於表0中。將M2極化之鼠RAW264.7細胞與5 μ M游離膽固醇標籤ASO或 1×10^5 或 1×10^6 個負載有膽固醇標籤ASO之胞外體一起培育。在治療之後24小時量測STAT3轉錄量，此揭露與游離ASO相比之在Exo-ASO治療情況下之STAT3之相當或優越的基因表現減弱。與經極化之巨噬細胞一起培育之未經修飾之胞外體對STAT3表現無影響(圖6)。為檢驗STAT3之下游靶標，在治療之後48小時量測ARG1轉錄量。如圖7中所示，在游離ASO或Exo-ASO情況下之STAT3基因表現減弱引起Arg1之穩健阻遏，在若干種情況下超過90%之穩健阻遏(圖7)。針對STAT3、

KRAS及C/EBP β ，將M2極化之RAW264.7細胞與高(4 μ M)及低(0.4 μ M) ASO或Exo-ASO一起培育。如圖8A-C中所示，Exo-ASO檢體在所有測試劑量下同樣強力(STAT3)或更強力(KRAS、C/EBP β) (圖8A-C)。ASO序列顯示於表0中。

【0237】 此結果證實，對於各種治療應用，與游離ASO之投與相比，Exo-ASO為巨噬細胞表現網路之強力調節劑且可提供優越、差異模態。一種調節巨噬細胞中之基因表現之該方法，其包含向個體投與Exo-ASO，其中該ASO靶向該基因，且其中調節等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向該基因之游離ASO所產生之調節。另一實施例包含抑制巨噬細胞中之基因表現之方法，其包含向個體投與Exo ASO，其中該ASO靶向該基因，且其中抑制等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向該基因之游離ASO所產生之抑制。另一實施例包含阻遏巨噬細胞中之基因之下游靶標之方法，其包含向個體投與Exo-ASO，其中該ASO靶向該基因，且其中阻遏等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向該基因之游離ASO所產生之阻遏。又另一實施例包含更改巨噬細胞群之極化之方法，其包含向個體投與Exo-ASO，其中該ASO靶向於巨噬細胞中表現之基因，且其中極化更改等於或大於藉由投與等莫耳量之靶向該基因之游離ASO所產生之極化更改。在該等實施例中，極化中之更改可為自M2表現型向M1表現型之變化。

【0238】 為測試Exo-ASO在人類細胞中之作用，將原代人類巨噬細胞極化成M2表現型且用變化劑量之游離STAT3 ASO或STAT3 Exo-ASO治療。使用來自三種獨立人類供體之巨噬細胞，Exo-ASO持續更強力地阻遏治療之後24小時之STAT3轉錄量(圖9A)。與游離ASO相比，Exo-ASO亦更大大地調節M2極化之下游人類標記CD163 (圖9B)。針對HIF1 α 、

Pi3K γ 、CEBP/ β 、STAT6及STAT3，亦用4 μ M游離ASO或Exo-ASO治療人類M2巨噬細胞。如圖10中所示，所有治療組均引起靶基因之阻遏，但在所有情況下，Exo-ASO比游離ASO治療更強力。重要地，巨噬細胞靶標中之任一種之Exo-ASO基因表現減弱引起CD163表現中之穩健減少(圖11)，此證實ASO之胞外體介導之傳遞有力地且可再現地干擾重要巨噬細胞信號傳導網路。

【0239】 M2巨噬細胞極化之功能性結果為促炎性細胞介素中之減少，此促成促致瘤微環境。因此，巨噬細胞自M2表現型向M1表現型之轉化應引起增強之促炎性信號傳導。M2巨噬細胞向M1狀態之轉化可由LPS誘導，此引起包括IL-12及IL-23之細胞介素之誘導。STAT3為此細胞介素表現網路之負調節劑，且因此吾等測試在存在LPS之情況下之STAT3抑制係否可進一步增強促炎性細胞介素的產生。使M2極化之人類巨噬細胞經4 μ M游離STAT3 ASO、4 μ M STAT3 Exo-ASO、4 μ M加擾Exo-ASO、天然胞外體或C188-9 (亦即STAT3之小分子抑制劑)治療。在24小時之後，將培養基更換為含有10 ng/ml LPS之培養基，且在24小時之後分離上清液。如圖12中所示，LPS誘導IL-12及IL-23之分泌(LPS 10 ng/ml組對無LPS組)。用STAT3 Exo-ASO而非游離STAT3 ASO進行之治療進一步增強各細胞介素之表現，此表明Exo-ASO可更有力地引起對相關免疫調節信號起反應之M1表現型的促進作用。

【0240】 STAT3、STAT6及其他巨噬細胞調節路徑之調節異常引起基因表現模式中之廣泛變化。為理解Exo-ASO治療之差異全局影響，在呈其穩態且對用未經修飾之胞外體(僅EV)及濃度匹配之ASO及Exo-ASO進行之治療起反應之人類M2巨噬細胞上進行奈米串mRNA分析。使用

nCounter[®]人類骨髓先天性免疫面板進行之標準化mRNA計數證實STAT3轉錄物在游離ASO及Exo-ASO治療兩者之後減少(圖13A)。在ASO治療之後，下游標記CD163 (圖13D)、TGFβ (圖13C)及STAT6 (圖13D)全部受到有力下調。

【0241】 TGFβ之穩健阻遏(<85%)為M2巨噬細胞極化之關鍵調節劑，(Yang及Zhang Journal of Hematology & Oncology (2017) 10:58)。吾等檢驗STAT3、STAT6及CEBP/β Exo-ASO治療對TGFβ表現之影響。使人類M2極化之巨噬細胞經負載有針對STAT3之ASO (MOE及LNA化學物質兩者)、針對STAT6之ASO (MOE化學物質)及針對CEBP/β之ASO (MOE化學物質)之胞外體治療。在所有情況下，在經次微莫耳量之ASO治療之後，TGFβ量大大地減少(圖14)。此等結果證實針對諸多巨噬細胞極化調節劑之ASO之胞外體介導之傳遞可能導致可能在諸多癌症治療中有影響之細胞程式之穩健、穩定的調節異常。重要地，包括作為此過程調節劑之KRAS新穎識別之巨噬細胞靶標中之各者已表徵為「不可成藥之」靶標，此係因為其在疾病及其他細胞過程中之作用得到良好辨識，但安全、有效之治療已避開藥物研發之古典方法。

實例4：在正位小鼠胰臟癌模型中野生型KRAS抑制引起增加之巨噬細胞極化及減小之活體內腫瘤尺寸。

方法：

【0242】 *生產且分離KRAS胞外體*：使用電穿孔方法以將KRAS siRNA構築體插入胞外體中而不功能性損壞胞外體。使用已確立之超速離心方法將胞外體與在以化學方式界定之培養基中生長之人類胎腎(HEK) 293SF懸浮細胞分離(Kahlert等人, 2014)。胞外體之純度及均質性(80-150

nm直徑粒子)係藉由Nanosight™量測、穿透電子顯微法及CD9免疫金標記來驗證。亦執行蔗糖梯度超速離心及qPCR以驗證KRAS siRNA之存在及豐度。亦生成含有加擾siRNA之胞外體。

【0243】 RNAi 策略。靶向小鼠野生型KRAS之KRAS siRNA序列包含TT核苷酸突出物以促進靜默效率。RNAi亦在有義股上之3'端處標記有Alexa Fluor® 647螢光團以追蹤其傳遞。

【0244】 小鼠及成像。在21-23℃及40%-60%濕度下在12 h亮-暗循環內將4-6週齡之間之雌性無胸腺nu/nu小鼠(Charles Rivers)單獨地圈養於通風籠中。使小鼠自由獲取經照射之膳食及經滅菌之水。在全身麻醉下，使用27規格注射器將致瘤人類胰臟Panc-1 (Kras^{asp12} (Rejiba等人, 2007；Sun等人, 2001))細胞或BXPC-3細胞(10^6 個，再懸浮於10 μ l PBS中)注射至胰尾中。對於正位腫瘤尺寸/體積分析，使用Living Image型號4.4 (Caliper Life Sciences)以定量所有腫瘤計算。界定胰臟及腫瘤周圍之圓形所關注之區域(ROI)且設定為比較相同實驗組內之所有影像之標準。另外，對於所有實驗組中之所有量測，暴露條件(時間、孔徑、平台位置、格化儲存)保持一致。隨後，對於所有實驗組，在相同條件下獲得後續腫瘤量測(p/sec/cm²/sr)。使小鼠有規律地成像且隨機分成治療組。小鼠每隔一天i.p.接受 2×10^8 個於100 μ l體積之PBS中之胞外體。在注射之前，使胞外體電穿孔有2 μ g siRNA且經PBS洗滌。

【0245】 組織學、組織病理學及免疫組織化學。將組織固定在福馬林中且處理以進行石蠟包埋。切割5 μ m厚度之組織切片且染色蘇木精及曙紅(H&E)及梅森氏三色染色法(Masson's richrome，MTS) (Leica)。對於組織病理學評分，基於胰臟癌之形態學階段記分H&E染色載玻片：正

常、胰臟上皮內贅瘤形成(PaNIN)及胰管腺癌(PDAC)。對於各組織切片，以胰臟組織學專家不知情之方式手動獲得對於三個階段(正常、PaNIN、PDAC)中之各者之百分比分數，隨後平均化以得到對於各群之100分以內的總分數。隨後，對於各別群中之各小鼠，採取此等百分比分數之平均值。亦針對巨噬細胞(具有泛巨噬細胞標記(例如用於偵測腫瘤駐留巨噬細胞之F4/80抗體及/或M2及M1特異性細胞標記))染色腫瘤組織切片。

【0246】 針對巨噬細胞表現型表徵之分析。自小鼠收集血液檢體及腫瘤檢體。分離且染色巨噬細胞以用於藉由流動式細胞量測術進行之M1及M2標記分析。針對泛巨噬細胞標記以及M2表現型細胞表面標記(例如YM1、FIZZ1、Dectin-1及/或MGL)及M1表現型細胞表面標記染色巨噬細胞。隨後，計數且分類M2及M1巨噬細胞以用於進一步諸如定量PCR之分析以偵測細胞介素及/或與M1表現型及/或M2表現型締合之miRNA之miRNA表現。

【0247】 來自異種移植實驗及正位腫瘤體積分析之結果證實，與具有加擾siRNA之胞外體相比，包含KRAS野生型siRNA之胞外體有效地減小胰臟腫瘤之尺寸且增加M1表現型腫瘤相關巨噬細胞之數目，此指示包含靶向人類野生型KRAS之抑制性RNA之胞外體投與能夠有效地治療癌症。

表

表0.反義寡核苷酸(ASO)之序列		
靶標	序列	SEQ ID NO:
Stat3	TAAGCTGATAATTCAACTCA	SEQ ID NO:1
Stat6	TGAGCGAATGGACAGGTCTT	SEQ ID NO:2
CebpB	TGGATTTAAAGGCAGGCGGC	SEQ ID NO:3
Pi3K γ	TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA	SEQ ID NO:4
HIF1a		SEQ ID NO:5
Kras	GTAGCATGTAAATATAGCCC	SEQ ID NO:6
所有反義寡核苷酸均具有在各核苷酸之間之硫代磷酸酯鍵		

表1.胞外體脂質	
溶血磷脂酸	神經節苷脂GM3 24:1
神經鞘磷脂(SM)	神經節苷脂GM3 16:0
神經節苷脂GM3	PE40:5
磷脂醯絲胺酸(PS)	PE40:6
磷脂醯肌醇(PI)	PE38:3
磷脂醯膽鹼(PC)	PE38:4
磷脂醯乙醇胺(PE)	PE36:1
溶血磷脂醯膽鹼(LPC)	PE36:2
膽固醇(Chol)	PE34:1
二醯甘油(DG)	PE34:2
PI18:0/20:3	PE-醯38:5
PI18:0/20:4	PE-醯38:6
PI18:0/18:1	PE-醯34:1
PI18:1/18:1	PE-醯34:2
PI18:0/16:0	PC34:1
PA18:0/18:1	PC36:4
PS18:0/18:1	PC34:3
BMP18:0/18:1	PC32:0
BMP18:1/18:1	PC30:0
BMP18:1/16:0	SM24:1
CL(18:1)3/16:1	SM16:0
CL(18:1)2/(16:1)2	二氫神經鞘磷脂16:0

表2.胞外體多肽			
ACLY	TCP1	ACTR1A	LY75
ACTB	PRDX2	THOC4	ABCC1
ACTG1	TSPAN6	INADL	MYO1E
ALB	CCT3	CTDSPL	NACA
ALDOA	TSTA3	ZMPSTE24	NAP1L4
ALDOB	TUBA3C	DNAJA2	NCL
AKR1B1	HIST1H2AK	NDRG1	NEDD8
AMBP	HIST1H2AJ	RAPGEF3	YBX1

ANPEP	HIST1H2AB	SPON2	PA2G4
ANXA2	HIST2H2AC	UBAC1	PECAM1
ANXA3	IFITM1	N4BP2L2	PFAS
ANXA4	PDXK	CAP1	SERPINB9
ANXA5	LIN7A	VAT1	PI4KA
ANXA6	BUB3	NEBL	PLAT
ANXA7	MAP4K4	DCTN2	PLCG2
ANXA11	EDIL3	ARPC1A	PPA1
	ATP6AP2	C6orf108	PPP2CA
CAPZB	PSME3	SMC2	PRKCB
CD63	TUBB3	AHSA1	PSMA6
CD81	IFITM3	STAMBP	PSMA7
CKB	ACAA2	PMVK	PSMB8
CLU	CCT7	GIPC1	PSMB9
CLIC1	CCT4	HBS1L	PSMD7
TPP1	IFITM2	NCKAP1	PSME1
CLTC	GNA13	ALDH1L1	PTPRA
CNP	RUVBL2	FTCD	RAC2
COL6A1	PRSS23	FGL2	RPL3
CR1	ACOT7	CFHR3	RPL4
CTNND1	CCT5	MMP24	RPL5
ACE	DIP2C	COPS8	RPL11
DDT	ASCC3L1	CKAP4	RPL22
DEFA1	TNIK	C10orf116	RPL24
DEFA3	NEDD4L	SLC27A2	RPL27
DNAH8	NCSTN	MID2	RPL30
DPEP1	TSPAN15	KIF3A	RPL28
DPP4	PLXNB2	NUDT5	RPL31
EEF1A1	SDCBP2	TREH	RPL34
EEF2	IGKV1-5	CEP250	RPL35A
EGF	IGHV4-31	PDCD10	RPL37A
EIF5A	IGKV3-20	PADI2	RPS2
ENO1	IGKV2-24	PACSIN2	RPS3A
ENO3	MINK1	CHP	RPS5
ENPEP	IGK α	SNF8	RPS9
STOM	VPS36	DDX19B	RPS19
EPS8	DERA	SCN11A	RPS25
FABP3	GOLGA7	LYPLA2	RPS26
FGA	KRT76	PARK7	RPS28
MLANA	EIF3EIP	COBLL1	RPS29
FN1	LSR	CNKSR2	RSU1
FTL	TUBA8	ENPP4	SARS
FUS	RAB4B	RAB3GAP1	SLAMF1
GAA	SETD4	AKR7A3	SLC1A4
GAPDH	TOLLIP	SPEN	SLC2A3
GDI2	PLEKHB2	GANAB	SNRPD2
GGT1	VPS37C	MGRN1	SPINK1
GLB1	LIN7C	CUX2	SPN
GLG1	H2AFJ	DNAJC13	STK10
GNA11	CAND1	ZCCHC11	STXBP3

GNAI1	PLSCR3	PHF15	TALDO1
GNAI2	KIAA1199	KIAA0841	TNFAIP3
GNAI3	GNB4	ARHGEF12	TPM3
GNAS	MYH14	COTL1	TPM4
GNB1	TSPAN14	ANGPTL2	TYK2
GNB2	NCALD	DDAH2	VIM
GNG7	REG4	HEBP2	WARS
SFN	VPS25	CD2AP	WAS
GPI	TUBB6	PLD3	LAT2
GSTA1	TUBA1C	TMEM2	HIST1H2BL
GSTA2	TNKS1BP1	SH3BP4	STX7
GSTA3	FAM125B	BHMT2	CPNE1
GSTM3	LRSAM1	GCA	RPL14
GSTP1	HIST3H2A	MXRA5	PDCD5
GUSB	TUBA3E	AHCTF1	SYNGR2
HIST1H2AD	TUBA3D	PTPN23	RPL23
HLA-A	DCD	DAK	RAB9A
HLA-B	HIST4H4	ACOT11	IGSF2
HLA-DQB1	ALDH16A1	APPL1	EEF1E1
HLA-DRA	RPS4Y2	PHGDH	SCAMP2
HLA-DRB1	MYL6B	TIAM2	SCAMP3
HLA-DRB5	BRI3BP	KCNG2	DPP3
HPGD	AGR3	CYFIP2	ARPC1B
HRAS	EEF1AL3	GHITM	PDIA6
HSPA1A	KRT28	C11orf54	WASF2
HSPA1B	KRT24	DBNL	ANP32B
HSPA8	類RPLP0	ATAD2	PAICS
HSP90AA1	RPSAP15	PHPT1	AHCYL1
	RANP1	C16orf80	VAMP5
KRT1	PCSK9	OLA1	41891
KRT9	METRNL	ZDHHC1	HSPH1
KRT10	LOC284889	SNX12	SUB1
LDHA	KRT6C	PSAT1	CDC37
LDHB	KRT79	NT5C	CORO1A
TACSTD1	RAB43	EHD2	CD300A
MCAM	KRT27	TAX1BP3	TMC6
MDH1	ACTBL2	CRNN	RFTN1
MEP1A	RP11-631M21.2	NOX3	SCRIB
MSN	TUBB2B	ATP6V0A4	SERBP1
2-Sep	KRT77	ITSN2	TTLL3
PGAM1	AGRN	GEMIN4	CACYBP
PGK1	RAB15	LAP3	SIT1
PKM2	LOC388524	CRYL1	SLC43A3
PPP1CA	LOC388720	MYO15A	PILRA
	HSP90AB2P	ATP6V1D	RPL26L1
PTPRC	ACTBL3	SNX9	MPP6
RAN	LOC442497	PCYOX1	GNG2
RDX	A26C1A	ANKFY1	TMED9
SDCBP	HIST2H4B	UFC1	DOCK10

STX3	hCG_1757335	FAM49B	C3orf10
STXBP1	HLA-A29.1	CUTA	MYO1G
STXBP2	LOC653269	ATP6V1H	FLJ21438
TPI1	A26C1B	VPS24	SLC38A1
EZR	LOC100128936	CMPK1	FERMT3
YWHAE	LOC100130553	UPB1	ITFG3
TUBA1A	LOC100133382	CLIC5	HIST1H2AH
WDR1	LOC100133739	MUPCDH	SLAMF6
PDCD6IP	AP2A2	CLIC6	TMC8
GPA33	ALDH3B1	SIAE	LOC153364
TUBA1B	FASLG	CPVL	SVIP
TUBB2C	ATP4A	RHOF	TMEM189-UBE2V1
CAPN7	CAPS	ARL15	hCG_16001
DDAH1	COL12A1	ZNHIT6	FABP5L7
PGLS	DMBT1	GIPC2	Del(X)1Brd
SAMM50	DSP	PCDH24	ABP1
CLIC4	EGFR	VPS13C	ACTN3
CHMP2B	EPHA5	CC2D1A	AFM
ULK3	EPHB1	EPS8L1	AKT1
RNF11	FAT	C10orf18	ALDH3A2
VPS4A	HSD17B4	CHCHD3	ALOX12P2
ARFIP1	L1CAM	C2orf18	ANXA2P1
CHMP2A	LAMA5	C17orf80	KRT33B
SMPDL3B	MUC4	EPN3	MYOC
PACSIN3	NOTCH1	UACA	SERPINE1
EHD4	PPP2R1B	VPS13D	PIK3CA
EHD3	PTPRF	APPL2	NRP1
HEBP1	SORT1	ARL8B	SPRY1
VPS28	SERPINB3	DDX19A	EMILIN1
DCXR	SELP	NAGK	LRG1
RHCG	FSCN1	ITLN1	AZGP1P1
CHMP5	TGFB1	CCDC132	LOC728533
VT A1	CLTCL1	OTUB1	ALDH7A1
RAB14	CHST1	CDK5RAP2	AXL
GPRC5B	EIF3I	MBD5	CFB
CAB39	TNFSF10	SLC22A11	C1S
RAB8B	MAP7	SUSD2	CAT
TM7SF3	COPB2	SUCNR1	CD47
MXRA8	HEPH	BDH2	CD151
C11orf59		NIT2	CDH13
MOBKL1B	CIB1	RPL23AP13	CFTR
UEVLD	SLC34A2	FAM20C	CEACAM8
TSNAXIP1	SLC6A14	SLC12A9	AP1S1
GPRC5C	DIP2A	RAB25	CLTA
GNG12	TNPO3	SMURF1	CNGB1
BAIAP2L1	FER1L3	TMEM27	COL1A1
MUC13	CNTLN	RAB22A	COL1A2
CHMP1B	TUBB4Q	NDRG3	COL2A1
SLC44A2	KIF15	ERMN	COL3A1
CPNE5	SERINC1	TAOK1	COL4A1

TMBIM1	PDIA2	KIAA1529	COL4A2
EPS8L3	EPS8L2	RNF213	COL4A3
MMRN2	PLVAP	WIZ	COL5A1
TTYH3	MYADM	ACE2	COL5A2
SLC44A4	MUC16	PLEKHA1	COL7A1
RAB1B	KRT25	SCPEP1	COMP
RAB33B	SERINC5	AASDHPPT	CPS1
RBP5	LOC440264	FIGNL1	CSF1
C5orf32	AGT	PBLD	VCAN
ABHD14B	ALPP	KIF9	SLC25A10
MOBKL1A	APOA2	LEPRE1	CTBP2
ARRDC1	APOB	RAB17	CTNNA2
	APOE	IKZF5	DCTN1
FAM125A	SERPING1	MMP25	DECR1
SNX18	C1QB	MPP5	DNASE1L1
CHMP4B	C1R	TEKT3	ENG
MITD1	C4A	ALDH8A1	STX2
S100A16	C4B	SLC13A3	ETFB
CPNE8	C4BPA	DUSP26	F2R
C1orf58	C4BPB	GGCT	F8
GLIPR2	CD5L	TMEM38A	ACSL1
TUBB	FCN1	C1orf116	FAP
ATP6V1C2	FCN2	GDPD3	FBLN1
FTLL1	FGB	OR2A4	FBN1
PEF1	FGG	FAM65A	FBN2
SERPINA3	GRIN1	NARG1L	FEN1
ACP2	MSH6	CHMP6	FLT1
ACPP	HBA1	DYNC2H1	FUCA2
ACTA2	HBA2	PRKRIP1	GAS6
ACTC1	ITGA2B	GSTCD	GDI1
ACTG2	PPARG	PIP4K2C	GLDC
ACY1	PDLIM7	CYBRD1	GNAL
APCS	CD274	FUZ	GRM2
APOD	A1BG	ARMC9	GRM3
APRT	ACAT1	NAT13	GRM7
AQP1	ACO1	COASY	GSTM1
AQP2	ADCY1	UBXN6	GSTM5
ARF1	ADFP	COL18A1	H2AFX
ARF3	ADH5	BHLHB9	HBE1
ARF4	ADH6	WNT5B	HMGCS2
ARF5	PARP4	CAB39L	TNC
ARF6	AHSG	ITM2C	IDH3B
RHOA	AK1	LOC81691	IFRD1
ARL3	ALAD	AMN	ITGA5
ASAH1	ALCAM	SH3BGRL3	ITGB5
ASS1	ALDH2	C9orf58	ITPR2
FXYD2	ALDH9A1	BCL2L12	KRT84
BHMT	ALDOC	RAB34	LAMB1
BST2	ALK	TBC1D10A	LCN1
C3	ALOX12	GPR98	LGALS8

CA2	ALPL	HDHD2	LMNA
CA4	ANXA13	ARL6	LOXL2
CALB1	AOX1	IQCG	LTBP2
CALR	APAF1	C2orf16	MAP1A
CD9	APOA4	PARD6B	MAT1A
CD59	SHROOM2	TXNDC17	MC1R
HSPA5	RHOB	ABCC11	MCC
HSPA6	ARHGAP1	FAM40A	ME1
HSP90AB1	ARHGDIB	SCIN	MECP2
HSPD1	ARSE	SCRN2	MAP3K1
IDH1	ARSF	ZNF486	MFAP4
KNG1	ASL	ACY3	SCGB2A1
KRAS	ASNA1	C11orf52	ALDH6A1
LAMP1	ATIC	CRB3	MOS
LGALS3BP	ATP6V1A	C20orf114	CITED1
LRP2	ATP6V1B1	NAPRT1	NEFH
MAN1A1	ATP6V1B2	RG9MTD2	OPRM1
RAB8A	ATP6V0C	SAT2	OTC
MIF	ATP6V1C1	KIF12	OXTR
MME	ATP6V1E1	MAL2	PAPPA
MUC1	ATP6V0A1	OSBPL1A	PC
MYH9	ATP6AP1	VASN	PCOLCE
NAGLU	AZU1	SLC22A12	PDGFRB
NONO	BCR	ACSM1	PFKFB3
NPM1	BGN	TTC18	PGAM2
NRAS	BLMH	GSTO2	SERPINE2
P2RX4	BLVRA	CLRN3	PLP2
P4HB	BLVRB	LRRK2	PPP1CC
PEBP1	BPI	C12orf59	SRGN
SERPINA5	BTG1	LOC124220	MAP2K6
PFN1	BTN1A1	SLC5A10	PSMB7
PFN2	TSPO	CCDC105	PSMB10
ABCB1	C1QC	C1orf93	PTK7
SERPINA1	CAPN5	ARL8A	PTPRK
PIGR	C5	LOC128192	PZP
PIK3C2B	C9	GALM	RAD21
PKD1	PTTG1IP	LRRC15	RASA1
PLSCR1	CACNA2D1	LOC131691	RDH5
PODXL	CALML3	H1FOO	RPL18
CTSA	CAMK4	ENPP6	RPL29
PPIA	CAMP	CMBL	RPS10
PSAP	CAPG	MUM1L1	RPS24
PSMB3	CAPN1	C20orf117	S100A13
PTBP1	CAPN2	SIRPA	SAA4
PTPRJ	CAPZA2	PLEKHA7	ATXN1
RAB1A	CD14	A2ML1	CLEC11A
RAB2A	CD80	C16orf89	SDC2
RAB3B	CD36	TOM1L2	SMARCA4
RAB5A	SCARB2	KIF18B	SPOCK1
RAB5B	CD40	C19orf18	STAT1

RAB13	CDC2	PM20D1	STC1
RAB27B	CEL	PROM2	SURF4
RAB5C	CETP	GPR155	SYT1
RAC1	CTSC	SLC36A2	TAGLN
RALB	AP2M1	VPS37D	TCN1
RAP1B	CSN1S1	SLC5A12	TERF1
RBM3	CSN2	SLC5A8	TGFB2
RNASE2	CSN3	EML5	TSPAN4
S100A6	ACSL3	TBC1D21	TSN
S100A11	FOLR1	ZNF114	TSNAX
S100P	B4GALT1	ANO6	COL14A1
SLC1A1	GNAQ	SLC5A9	WNT5A
SLC2A5	HBB	CRTC2	ZNF134
SLC12A1	HBD	C20orf106	PXDN
SLC12A3	CFH	TMEM192	SMC1A
SNCG	HLA-G	ARMC3	OFD1
SNRPD1	HP	NAPEPLD	COPS3
SOD1	HPR	C10orf30	STC2
SRI	IGHA1	ATP6V0D2	ADAM9
TF	IGJ	STXBP4	CREG1
THBS1	IGLC1	C17orf61	CDK5R2
THY1	IGLC2	TXNDC8	TNFSF18
TMPRSS2	IGLC3	LRRC57	MPZL1
TSG101	LAMC1	HSPA12A	SEMA5A
TUBB2A	LPA	MAGI3	CLDN1
UBE2N	LPL	C11orf47	RGN
UMOD	LRP1	SLC39A5	SLC16A3
UPK2	LTF	C12orf51	ARHGEF1
VTN	TACSTD2	SLC46A3	LRRFIP2
EIF4H	MBL2	VMO1	TAAR2
YWHAB	MYH8	SLC26A11	CRIP1
YWHAG	NEB	LOC284422	ENTPD4
YWHAZ	PON1	CRB2	IFT140
NPHS2	PKN2	HIST2H2AB	RNF40
RAB7A	PROS1	FAM151A	RB1CC1
PSCA	MASP1	SLC6A19	PSMD6
CUBN	RELN	PKD1L3	MRC2
BBOX1	PTX3	LOC342897	HDAC5
RAB11A	RARS	EGFL11	RASA4
NAPA	SILV	SERINC2	SLC25A13
PROM1	THBS2	PDDC1	PSMD14
FCGBP	TLR2	SLCO4C1	TFG
CPNE3	TTN	SFT2D2	CDIPT
MGAM	TTR	C9orf169	CRTAP
GPRC5A	TYRP1	LOC377711	UNC13B
RAB11B	VWF	OR11L1	ARL6IP5
VAMP3	CLIP2	RAB19	TGOLN2
SLC9A3R1	XDH	LOC440335	POSTN
ITM2B	APOL1	HIST2H2BF	CLPX
NAPSA	FCN3	LOC441241	TSPAN9

VPS4B	SELENBP1	KPRP	TMED10
RAB3D	SMC3	HSP90AB6P	SLC38A3
PRDX6	DDX21	LOC643751	IL1RAPL1
KIAA0174	CCPG1	LOC651536	GALNT5
PDCD6	ABCG2	LOC652968	PRR4
ARPC4	SFI1	AEBP1	ITGA11
TSPAN1	MVP	AMY1A	CLASP2
PDZK1IP1	AKAP9	AMY1B	EPB41L3
NUTF2	PRG4	AMY1C	KIAA0467
FLOT1	AKR1A1	AMY2A	DULLARD
HRSP12	ABCA7	ANGPT1	NOMO1
A2M	COLEC10	APLP2	KIAA0146
ACP1	GNB5	APP	SLC39A14
ACTA1	MMRN1	AQP5	DNPEP
ACTN4	CLASP1	AZGP1	CASP14
ACTN1	SYNE1	CEACAM1	STX12
ACTN2	NIPBL	BMP3	BRMS1
ADAM10	CHRD12	CA6	ABI3BP
AHCY	HSPB8	DDR1	PLEKHG3
ALDH1A1	ANGPTL4	CAPNS1	FBXW8
SLC25A4	NIN	COL6A2	GAPDHS
SLC25A5	ZNF571	COPA	GREM1
SLC25A6	LRP1B	CPD	DKK3
ANXA1	CNDP2	DLD	SRPX2
ANXA2P2	DNAH7	ETFA	IGHV3-11
APOA1	HCN3	GLUD1	IGHV3-7
ARHGDIA	EXOC4	HSD17B10	IGLV4-3
ARVCF	SNX25	IMPDH2	IGLV3-21
	TC2N	HTATIP2	IGLV1-40
	HAPLN3	MARVELD2	ST6GALNAC6
ATP1B1	CD163L1	CST4	COPS4
ATP5A1	HRNR	CST5	HERC5
ATP5B	P704P	CTSB	NUSAP1
ATP5I	CD24	DAG1	PLUNC
ATP5O	COL6A3	DSG2	PPME1
B2M	COL15A1	TOR1A	MBD3
CALM1	COMT	ECM1	SLC38A2
CALM2	CP	EIF4G1	FAM64A
CALM3	CPN2	EXT2	GTPBP2
CANX	CRABP2	FAT2	DIRAS2
CAPZA1	CRK	GPC4	DCHS2
CD2	CRYAB	FOLH1	QPCTL
CD247	CRYM	FUT2	PARP16
CD86	CSE1L	FUT3	TMEM51
CD37	CSK	FUT6	MCM10
CD44	CSTB	FUT8	CHST12
CD53	CTH	GLRX	LYAR
CDC42	CTNS	GPC1	ODZ3
CDH1	CTSD	GPX3	WDR52
CFL1	CTSG	IGHA2	ASH1L

CFL2	DDB1	IGHV α	UNC45A
COX4I1	DDC	IGL α	SLC7A10
COX5B	DDX3X	IVL	PN01
CLDN3	DDX5	KRT12	CD248
CSPG4	CFD	LAMA4	AHRR
CSRP1	DNM2	LAMB2	ZBTB4
CST3	DPYS	LGALS7	SPTBN4
CTNNA1	DSC2	LMAN1	LGR6
CTNNB1	DSG3	LPO	RNF123
NQO1	ECE1	LTBP3	PRDM16
DYNC1H1	MEGF8	DNAJB9	PARVG
EEF1A2	ELA2	MEST	RMND5A
EFNB1	SERPINB1	MGAT1	FAT4
CTTN	EPHX2	MGP	FLJ13197
EPHB4	FBL	MUC5AC	TREML2
ERBB2	EVPL	MUC7	SVEP1
F5	F11	NEU1	OBFC1
FASN	FABP1	NUCB1	ZNF614
FKBP1A	ACSL4	NUCB2	FLJ22184
FLNA	FAH	FURIN	DBF4B
FLNB	EFEMP1	PAM	CD276
G6PD	FBP1	PLG	CMIP
GCNT2	FKBP4	FXYD3	ADAMTS12
PDIA3	FKBP5	PLOD2	SPACA1
GSN	FRK	PLTP	VANGL1
HADHA	FTH1	PON3	SPRY4
HLA-DMB	FUCA1	PPP1CB	HYI
HLA-E	GABRB2	PRELP	FAM108A1
HNRNPA2B1	GALK1	DNAJC3	TMEM47
HNRNPH2	GBE1	HTRA1	MYCBPAP
HSPA1L	GDF2	RARRES1	RAB6C
HSPA2	GFRA1	SAA1	FAM71F1
HSPA4	GK2	SAA2	ZNF503
HSPA7	GLO1	SEPP1	PARP10
HSPA9	GLUL	SFRP1	SHANK3
HSP90AA4P	GM2A	ST3GAL1	LACRT
HSP90AA2	GNG5	SLC5A5	TRIM41
HSP90AB3P	GOT1	SLC9A1	OXNAD1
HSPE1	GPD1	SLC20A2	LDHAL6B
HSPG2	GPM6A	SLPI	LOC92755
ICAM1	GPT	SRPR	CACNA2D4
ITGA6	GPX4	STAU1	ARHGAP18
ITGA2	GRB2	HSPA13	AHNAK2
ITGAV	GRID1	TGFBI	RPLP0P2
	GSR	TGM1	PGLYRP2
ITGB2	GSS	TGM3	RAB39B
ITGB4	GSTM2	YES1	GYLTL1B
JUP	HGD	HIST2H2AA3	KRT74
CD82	HINT1	HIST2H2BE	SLAIN1
KPNB1	HNMT	GALNT4	LOC122589

KRT2	HNRNPL	B4GALT3	NLRP8
KRT5	HPD	TNFSF13	PODN
KRT8	HPX	TNFSF12	C5orf24
KRT13	HRG	ANGPTL1	CD109
KRT14	DNAJA1	GCNT3	TRIM40
KRT15	HSPB1	TM9SF2	GPR112
KRT16	DNAJB1	DDX23	KRT72
KRT18	CFI	ADAMTS3	VTI1A
KRT19	IGF2R	GPR64	SYT9
LAMP2	IGFALS	LHFPL2	KRT80
LGALS4	IL1RN	ST3GAL6	CCDC64B
LYZ	IRF6	PRDX4	ATP8B3
	ITGA1	MAN1A2	C1orf84
MFGE8	EIF6	OS9	LOC149501
MMP7	ITGB8	MGAT4A	LOC150786
MYH10	ITIH4	TWF2	WDR49
MYL6	KHK	CLCA4	NEK10
MYO1C	KIFC3	TXNDC4	STOML3
MYO1D	KLK1	PLCB1	SASS6
NME1	LBP	CES3	DCLK2
NME2	LCN2	B3GAT3	FREM3
PRDX1	LCP1	TOR1B	C9orf91
PCBP1	LTA4H	IGHV3OR16-13	TREML2P
CHMP1A	BCAM	IGLV2-11	CCDC129
SERPINF1	MAN2A1	IGLV1-44	PAN3
PHB	MDH2	IGKV3D-15	MAMDC2
PPIB	MFI2	IGKV4-1	RCOR2
PRKAR2A	MLLT3	C1GALT1C1	LOC283412
PRKDC	MLLT4	RACGAP1	LOC283523
PSMA2	MNDA	EFEMP2	NOMO2
QSOX1	MPO	DUOX2	SEC14L4
PYGB	MPST	SDF4	LCN1L1
RAB6A	MYO1B	CYB5R1	LOC286444
RALA	MSRA	ERAP1	TAS2R60
RAP1A	MTAP	NUDT9	KRT18P19
RPL6	MTHFD1	FAM3B	LOC343184
RPL8	MYH3	FAM20A	LOC345041
RPLP1	MYO5B	FAM55D	GNAT3
RPLP2	MYO6	ANO1	POLN
RPN1	NID1	LRRC16A	LOC376693
RPS3	NKX6-1	TTC17	ARMS2
RPS7	NQO2	PDGFC	LOC387867
RPS13	NP	PCDHGB5	LOC388339
RPS14	NPC1	CCL28	FLG2
RPS15A	NPHS1	UGCGL1	LOC388707
RPS18	NRF1	SEMA3G	LOC389141
RPS20	NT5E	CORO1B	LOC390183
RPS21	PAFAH1B1	NDRG2	KRT8P9
RPS27A	PAFAH1B2	KIAA1324	LOC391777
RRAS	PCBD1	TXNDC16	LOC391833

S100A10	PCK1	ARHGAP23	LOC399942
SDC1	PDCD2	MUTED	LOC400389
SDC4	PDE8A	TINAGL1	LOC400578
SLC1A5	ENPP3	TOR3A	LOC400750
SLC2A1	SLC26A4	VWA1	LOC400963
	PDZK1	CHID1	FLJ21767
SLC12A2	PEPD	TMEM109	LOC401817
SLC16A1	PFKL	GAL3ST4	NOMO3
SPTBN1	PGD	THSD4	LOC439953
SSBP1	PGM1	UXS1	RPL12P6
SSR4	SLC25A3	TXNDC5	LOC440589
TBCA	SERPINA4	CRISPLD1	LOC440917
TCEB1	SERPINB6	LOXL4	LOC440991
TFRC	SERPINB13	GNPTG	LOC441876
TKT	PIK3C2A	SCGB3A1	LOC442308
TSPAN8	PIP	CHST14	DIPAS
TPM1	PKD2	C1QTNF1	LOC643300
HSP90B1	PKLR	C1QTNF3	LOC643358
TUBA4A	PKHD1	SLC26A9	LOC643531
TUFM	PLCD1	FAM129A	RPSAP8
TXN	PLOD1	HIST2H3C	LOC644464
UBA52	PLS1	TPRG1L	LOC644745
UBB	UBL3	TMPRSS11B	LOC645018
UBC	PPL	C20orf70	LOC645548
UBA1	PPP1R7	PPM1L	LOC646127
UBE2V2	PRCP	GBP6	LOC646316
UGDH	PRKCA	KRT78	LOC646359
UQCRC2	PRKCD	SLC37A2	LOC646785
VCP	PRKCH	NPNT	LOC646875
VIL1	PRKCI	KRT73	LOC646949
YWHAH	PRKCZ	HIST2H3A	LOC647000
CXCR4	PRNP	VWA2	LOC647285
SLC7A5	PRSS8	GSTK1	LOC650405
HIST1H4I	PRTN3	SBSN	LOC650901
HIST1H4A	PSMA1	C5orf46	LOC652493
HIST1H4D	PSMA3	LRRC26	LOC652797
HIST1H4F	PSMA4	C4orf40	LOC653162
HIST1H4K	PSMA5	LOC440786	PPIAL3
HIST1H4J	PSMB1	SCFV	LOC653232
HIST1H4C	PSMB2	LGALS7B	HSPBL2
HIST1H4H	PSMB5	HIST2H3D	LOC728002
HIST1H4B	PSMB6	ACAT2	LOC728088
HIST1H4E	PSMC5	ACTL6A	LOC728576
HIST1H4L	PSMD12	ADK	LOC728590
HIST2H4A	PSME2	ANXA8L2	LOC728791
TAGLN2	PTPN6		LOC728979
RUVBL1	PTPN13		ANG
VAMP8	PTPRO		BDNF
SNAP23	QDPR	CAV1	CALU
IQGAP1	RAB27A	CD70	CCR4

KRT75	RAP1GDS1	CS	CCR5
TJP2	RBL2	DARS	CSF2
ROCK2	RBP4	DHX9	CSF3
ARPC3	RENBP	DPYSL2	DCN
ACTR3	RFC1	EEF1D	EPO
LRPPRC	RHEB	EPRS	F3
TRAP1	RNH1	FDPS	GPC5
TUBB4	RNPEP	FLNC	GDF1
GNB2L1	ROBO2	XRCC6	GDF9
BAIAP2	RP2	GFPT1	GFRA3
HYOU1	RPS11	HIST1H1B	GRN
AGR2	RREB1	HIST1H2BB	CXCL2
OLFM4	RYR1	H3F3A	GZMA
CCT2	S100A4	H3F3B	HIST1H2BD
ATP5L	S100A8	HNRNPF	HGF
CCT8	S100A9	HNRNPK	IFNG
SLC12A7	SERPINB4	IARS	IGFBP3
MASP2	SCN10A	LAMA3	IGFBP4
IQGAP2	SEC13	LAMB3	IGFBP6
RAB10	SECTM1	LAMC2	IGFBP7
PRDX3	SH3BGRL	LGALS1	IL1RAP
EHD1	SHMT1	NBR1	IL3
TMED2	SHMT2	MARS	IL5
LMAN2	SLC3A1	MX1	IL6ST
YWHAQ	SLC4A1	PFKP	IL7
GCN1L1	SLC5A1	PLAU	IL8
RAB35	SLC5A2	PSMB4	IL10
DSTN	SLC6A13	PSMC2	IL11
UPK1A	SLC9A3	PSMC4	IL13
PHB2	SLC15A2	PSMD2	IL15RA
RRAS2	SLC25A1	PSMD13	INHBA
SEC31A	SLC22A2	PYGL	INHBB
CLSTN1	SLC22A5	RPL10	IPO5
PTGR1	SMO	RPL15	LIF
RAB21	SORD	STX4	LRP6
CYFIP1	SORL1	TARS	LTBP1
SLC44A1	SPAST	CLDN5	MMP1
CORO1C	SPR	TPBG	MMP2
MTCH2	SPRR3	XPO1	MMP3
QPCT	SRC	XRCC5	MMP10
PRDX5	ST13	BAT1	NBL1
SND1	STK11	HIST1H2BG	TNFRSF11B
F11R	VAMP7	HIST1H2BF	OSM
LIMA1	SYPL1	HIST1H2BE	PDGFA
RAB6B	SERPINA7	HIST1H2BI	PRKCSH
KRT20	TECTA	HIST1H2BC	CCL2
VPS35	TGM4	HIST1H4G	CCL7
TOMM22	TGFBR3	EIF3A	CCL20
AKR1B10	TGM2	EIF3B	SFRP4
S100A14	TLN1	EIF3C	SOD3

DIP2B	DNAJC7	SLC5A6	SPARC
RAP2C	UBE2G1	HIST2H2AA4	TIMP1
FAM129B	UPK1B	LOC728358	TIMP2
	UGP2	LOC730839	TIMP3
AHNAK	UPK3A	LOC100126583	ICAM5
VPS37B	UTRN	AARS	TNFRSF1A
TUBA4B	VASP	AK2	VEGFC
ARPC5L	VCL	APEH	GDF5
EPPK1	VDAC1	FAS	HIST3H3
ADSL	VDAC3	BAX	HIST1H2AI
AP2A1	XPNPEP2	FMNL1	HIST1H2AL
RHOC	BTG2	CASP9	HIST1H2AC
RHOG	GCS1	CD19	HIST1H2AM
ASNS	BAT2	MS4A1	HIST1H2BN
	PTP4A2	CD22	HIST1H2BM
CAD	DYSF	TNFRSF8	HIST1H2BH
CBR1	EEA1	SCARB1	HIST1H2BO
CBR3	STK24	ENTPD1	HIST1H3A
CCT6A	CUL4B	CD48	HIST1H3D
CDH17	CUL3	CD58	HIST1H3C
CEACAM5	ATRN	CD74	HIST1H3E
COPB1	CDC42BPA	CD79B	HIST1H3I
CLDN4	PPFIA2	CD97	HIST1H3G
CLDN7	AKR7A2	41889	HIST1H3J
CRYZ	PPAP2A	CR2	HIST1H3H
CD55	ABCB11	CSNK2B	HIST1H3B
EEF1G	MAP2K1IP1	DBI	FADD
EPHA2	EIF3H	DHCR7	IL1RL2
EIF4A1	SLC4A4	DLG1	FGF18
EIF4A2	SNX3	DOCK2	FGF16
ENO2	MYH13	DUT	HIST1H3F
SLC29A1	NAPG	ECH1	HIST1H2AG
EPHB2	FBP2	VAPA	HIST1H2BJ
EPHB3	SCEL	H2AFY	NRG2
ESD	SUCLA2	PDIA4	GDF3
F7	GGH	EIF4A3	FGF19
FLOT2	PROZ	ACTR1B	GDF11
GARS	SQSTM1	OPTN	FST
GMDS	AP1M1	NAMPT	LASS1
GNB3	RAB7L1	MPZL2	HPSE
HIST1H2AE	WASL	STIP1	ESM1
HLA-C	PLOD3	PKP3	DKK1
HLA-H	PGLYRP1	POFUT2	IL17B
HPCAL1	KALRN	QPRT	IL19
	CLIC3	WBP2	TNFRSF12A
IGH α	BAZ1B	ERO1L	IL23A
IGHG1	SPAG9	H2AFY2	FGFRL1
IGHG2	SLC13A2	RCC2	TREM1
IGHG3	ATP6V0D1	RTN4	IL1F9
IGHG4	HGS	GLT25D1	CXCL16

IGHM	AP4M1	RNASE7	IL22RA1
IGKC	ATP6V1F	FCRLA	HIST1H2BK
ITGA3	PTER	H2AFV	HIST3H2BB
KRT3	TRIP10	MRLC2	LOC440093
KRT4	SLC9A3R2	PAGE2	PGAM4
KRT6A	SLIT2	HIST1H2BA	PC-3
KRT6B	SLC22A6	SNX33	LOC729500
KRT7	KL	PTRF	KRT18P26
KRT17	KIF3B	HIST2H2BC	S100A11P
RPSA	SLC22A8	ANXA8	LOC729679
LFNG	GRHPR	NME1-NME2	KRT17P3
LGALS3	SLC22A13	EIF2S1	RCTP11
LRP4	TMPRSS11D	EIF2S3	LOC729903
CD46	GSTO1	EIF4E	RP11-556K13.1
MICA	NPEPPS	EPB41L2	LOC100129982
MYH11	TMEM59	EVI2B	LOC100130100
NARS	ATP6V1G1	FCER2	LOC100130446
NEDD4	CDC42BPB	FGR	LOC100130562
RPL10A	CREB5	FH	LOC100130624
PCNA	CROCC	GART	LOC100130711
PLEC1	DHX34	GOT2	LOC100130819
PLXNA1	TMEM63A	NCKAP1L	LOC100131713
PPP2R1A	SLK	HLA-DPB1	LOC100131863
PSMC6	RUSC2	HLA-DQA1	LOC100132795
PSMD3	OXSRI	HNRNPA1	LOC100133211
PSMD11	SLC23A1	HNRNPC	LOC100133690
RAC3	DOPEY2	HPRT1	SET
RAP2A	ABI1	ICAM3	CCT6B
RAP2B	GNPDA1	INSR	ACTR3B
RPL12	TOM1	EIF3E	PSMA8
RPLP0	ABCB6	ITGAL	ARP11
RPS4X	ABCC9	ITGB3	BCHE
RPS4Y1	HUWE1	ITGB7	H2AFZ
RPS8	ARPC5	ITIH2	SNRPE
RPS16	ACTR2	STMN1	TFPI
SPTAN1	TSPAN3	LCK	ADAMTS1
VAMP1	ARPC2	LSP1	GDF15

表3.多肽有效負載物及接收體			
一般類別			
錨蛋白重複蛋白		纖維網蛋白	解離酶
抗體	補體受體	GPI連接之多肽	奈米抗體
適配體	環狀肽	HEAT重複蛋白	核酸
ARM重複蛋白	DARPin	水解酶	多肽
碳水化合物	DNAse	激酶	單鏈可變片段(scFv)
細胞表面受體	酶	脂蛋白	三十四肽重複蛋白
補體			

C1抑制因子	C4結合蛋白	CR3	因子I
C3 β鏈受體	CD59	CR4	同源限制因子
C3aR	CR1	衰 變 加 速 因 子 (DAF)	膜輔因子蛋白(MCP)
C3eR	CR2	因子H	PRELP
酶			
三醯甘油脂肪酶	膽汁酸-CoA水解酶	阿魏酸酯酶	磷脂酸脂磷酸酶
(S)-甲基丙二醯基-CoA水解酶	雙(2-乙基己基)鄰苯二甲酸酯酯酶	甲醯基-CoA水解酶	磷脂醯甘油磷酸酶
[醯基-載體-蛋白]磷酸二酯酶	二磷酸甘油酸磷酸酶	果糖-二磷酸酶	磷脂醯肌醇去醯酶
[磷酸化酶]磷酸酶	羧酸-酯水解酶	延胡索醯乙醯乙酸水解酶	磷酸二酯酶I
1,4-內酯	羧甲烯丁烯羧酸內酯酶	鎌菌胺酸-C鳥胺酸酯酶	磷酸甘油酸磷酸酶
11-順式-視黃基-棕櫚酸酯水解酶	纖維素-聚硫酸酯酶	半乳糖脂酶	磷酸乙醇酸磷酸酶
1-烷基-2-乙醯甘油磷膽鹼酯酶	頭孢菌素-C去乙醯酶	葡萄糖酸內脂酶	磷酸肌醇磷脂酶C
2'-羥基聯苯基-2-亞磺酸去硫酶	腦苷脂-硫酸酯酶	葡萄糖-1-磷酸酶	磷脂酶A1
2-吡喃酮-4,6-二羧酸酯內酯	西曲酸酯苯甲基酯酶	葡萄糖-6-磷酸酶	磷脂酶A2
3', 5'-二磷酸核苷酸酶	氯原酸水解酶	麩胱甘肽巯醇酯酶	磷脂酶C
3-羥基異丁醯基-CoA水解酶	葉綠素酶	甘油-1-磷酸酶	磷脂酶D
3'-核苷酸酶	膽鹼酯酶	甘油-2-磷酸酶	磷酸乙醛水解酶
3-側氧基己二酸烯醇內酯酶	膽鹼-硫酸酯酶	甘油磷酸膽鹼磷酸二酯酶	磷醯基乙酸酯水解酶
3-植酸酶	膽醯-CoA水解酶	糖苷酶，亦即水解O-糖苷基及S-糖苷基化合物之酶	磷醯基丙酮酸酯水解酶
4-羥苄醯基-CoA硫酯酶	軟骨-4-硫酸酯酶	葡萄糖硫酸酯酶	磷蛋白磷酸酶
4-甲基草醯乙酸酯酶	軟骨-6-硫酸酯酶	糖苷酶	磷酸-二酯水解酶
4-植酸酶	檸檬酸酯-解離酶去乙醯酶	組胺醇-磷酸酶	磷酸-單酯水解酶
4-吡哆醇內酯酶	古柯鹼酯酶	激素敏感性脂肪酶	磷酸-三酯水解酶
5'-核苷酸酶	角質酶	水解N-糖苷基化合物	磷絲胺酸磷酸酶
6-乙醯基葡萄糖去乙醯酶	環己胺基磺酸磺基水解酶	水解S-糖苷基化合物	聚(3-羥基丁酸酯)解聚酶
6-磷酸葡萄糖酸	半胱胺酸內肽酶	羥醯基谷胱甘肽水	聚(3-羥基辛酸酯)解

內酯酶		解酶	聚酶
a-胺基酸酯酶	半胱胺酸型羧肽酶	羥基丁酸酯-二聚體水解酶	聚精液素-醛酯酶
a-胺基-醯基-肽水解酶	D-阿拉伯糖酸內酯酶	羥甲基戊二醯基-CoA水解酶	蛋白-穀胺酸甲基酯酶
乙醯乙醯基-CoA水解酶	去氧檸檬酸A-環-內酯	艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶	群體淬滅之N-醯基-高絲胺酸內酯
乙醯氧基丁炔基聯噻吩去乙醯酶	dGTP酶	肌醇-磷酸酯磷酸酶	視黃基-棕櫚酸酯酯酶
乙醯基蘿芙木鹼酯酶	二氫香豆素水解酶	青少年激素酯酶	絲胺酸脫水酶或絲胺酸羥甲基轉移酶
乙醯基烷基甘油乙醯水解酶	二肽酶	犬脲胺酸酶	絲胺酸內肽酶
乙醯膽鹼酯酶	二肽水解酶	L-阿拉伯糖酸內酯酶	絲胺酸-乙醇胺磷酸酯磷酸二酯酶
乙醯基-CoA水解酶	二肽基-肽酶及三肽基-肽酶	檸檬苦素-D-環-內酯	絲胺酸型羧肽酶
乙醯酯酶	二磷酸-單酯水解酶	脂蛋白脂肪酶	S-甲醯谷胱甘肽水解酶
乙醯基丙酮酸酯水解酶	二硫葡糖胺-6-硫酸酯酶	L-鼠李糖-1,4-內酯	唾液酸酯O-乙醯酯酶
乙醯基柳酸酯去乙醯酶	十二醯基-[醯基-載體-蛋白]水解酶	溶血磷脂	芥子鹼酯酶
乙醯木聚糖酯酶	產生3'-磷酸單酯之去氧核糖核酸內切酶	甘露糖醇-1-磷酸酶	位點特異性去氧核糖核酸內切酶：裂解不為序列特異性的
酸磷酸酶	產生5'-磷酸單酯之去氧核糖核酸內切酶	金屬羧肽酶	對經更改之鹼具有特異性之位點特異性去氧核糖核酸內切酶.
作用於酸酐以催化物質之跨膜運動	未知催化機制之內肽酶	金屬內肽酶.	位點特異性去氧核糖核酸內切酶：裂解為序列特異性的
作用於酸酐以促進細胞及亞細胞運動	產生3'-磷酸單酯之核糖核酸內切酶	甲基磷酸硫甘油酸酯磷酸酶	神經鞘磷脂磷酸二酯酶
作用於GTP以促進細胞及亞細胞運動	產生5'-磷酸單酯之核糖核酸內切酶	甲基香豆素基-乙酸酯去乙醯酶	S-丁二醯基麩胱甘肽水解酶
作用於磷-氮鍵	對核糖核酸或去氧核糖核酸具有活性且產生3'-磷酸單酯之核糖核酸內切酶	單萜e-內酯水解酶	類固醇-內酯
作用於硫-氮鍵	對核糖核酸或去氧核糖核酸具有活性且產生5'-磷酸單酯之核糖	N-乙醯基半乳胺糖-4-硫酸酯酶	固醇酯酶

	核酸內切酶		
放線菌素內酯	作用於酸酐之酶	N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶	固醇-硫酸酯酶
醯基肉鹼水解酶	作用於碳-碳鍵之酶	N-乙醯半乳糖胺聚糖去乙醯酶	丁二醯基-CoA水解酶
醯基-CoA水解酶	作用於除肽鍵以外之碳-氮鍵之酶	N-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶	蔗糖-磷酸酯磷酸酶
醯基甘油脂肪酶	作用於碳-磷鍵之酶	N-硫葡萄糖胺磺基水解酶	糖-磷酸酶
醯氧基醯基水解酶	作用於碳-硫鍵之酶	油醯基-[醯基-載體-蛋白]水解酶	硫酸-酯水解酶
醯基丙酮酸酯水解酶	作用於醚鍵之酶	ω肽酶	鞣酸酶
ADAMTS13	作用於鹵離子鍵之酶	苔色素縮酚酸水解酶	硫酯水解酶
腺苷去胺酶	作用於肽鍵之酶(肽酶)	酸草醯基乙酸酶	硫醚及三烷基銻水解酶
腺苷酸基-[麩胺酸酯—氮連接酶]水解酶	作用於磷-氮鍵之酶	棕櫚醯基[蛋白]水解酶	蘇胺酸內肽酶
ADP依賴性中鏈-醯基-CoA水解酶	作用於硫-氮鍵之酶	棕櫚醯基-CoA水解酶	胸苷磷酸化酶
ADP依賴性短鏈-醯基-CoA水解酶	作用於硫-硫鍵之酶	果膠酯酶	海藻糖-磷酸酶
ADP-磷酸甘油酸磷酸酶	醚水解酶.	肽基肽水解酶	三乙酸酯-內酯
鹼性磷酸酶	產生5'-磷酸單酯之去氧核糖核酸外切酶	肽基-胺基酸水解酶	三磷酸-單酯水解酶
全反式-視黃基-棕櫚酸酯水解酶	對核糖核酸或去氧核糖核酸具有活性且產生3'-磷酸單酯之核酸外切酶	肽基胺基酸水解酶或醯胺基酸水解酶	三硫磺酸酯水解酶
胺基醯基-tRNA水解酶	對核糖核酸或去氧核糖核酸具有活性且產生5'-磷酸單酯之核酸外切酶	肽基-二肽酶	托品酯酶
胺基肽酶	產生3'-磷酸單酯之核糖核酸外切酶	苯乙醯基-CoA水解酶	泛蛋白巰醇酯酶
芳基酯酶	產生5'-磷酸單酯之核糖核酸外切酶.	苯丙胺酸氨解離酶	UDP-磺基奎諾糖合成酶
芳基硫酸酯酶	因子IX	苯丙胺酸羧化酶	尿酸酶
天冬醯胺酶	因子VIII	去鎂葉綠甲酯酸酶	糖醛酸內酯酶
天冬胺酸內肽酶	脂肪-醯基-乙基-酯合成酶	根皮素水解酶	蠟-酯水解酶
b-二酮水解酶		佛波醇-二酯水解酶	木糖酸-1,4-內酯

表4.靶標			
一般靶標類別			
微生物	多肽	DNA	胺基酸
真菌	毒素	RNA	朊病毒
細菌	脂質	寄生物	細胞介素
病毒	細胞	細胞碎片	
傳染病相關靶標			
脂多糖	細胞侵入蛋白	中間鏈球菌溶素	經分泌之效應蛋白sptP
閉合帶毒素	霍亂腸毒素	侵入蛋白sipA	斯氏李斯特菌溶素(Seeligeriolysin)
肌動蛋白聚合蛋白RickA	半胱胺酸蛋白酶	Iota毒素組分Ia	絲胺酸蛋白酶
肌動蛋白聚合蛋白RickA	細胞致死腫脹毒素	伊氏李斯特菌溶素(Ivanolysin)	志賀毒素(Shiga toxin)
單磷酸腺苷-蛋白轉移酶vopS	細胞溶素	LepB	神經磷脂酶
腺苷酸環化酶	細胞毒性壞死因子	致死因子	葡萄球菌激酶
腺苷酸環化酶ExoY	細胞毒素	白血球毒素	鏈球菌激酶
ADP-核糖基轉移酶組分	皮膚壞死毒素	李斯特菌溶素	鏈球菌溶血素
氣單胞菌溶素	去泛素化酶	微生物膠原酶	鏈菌蛋白酶
α-毒素	白喉毒素	外膜蛋白IcsA自主運輸蛋白	豬溶素
蜂房桿菌溶素	腸溶血素	PV殺白血球素F(Panton-Valentine Leucocidin F)	超級抗原
蜂房桿菌溶素	腸毒素	產氣莢膜梭菌溶素	T3SS分泌之效應子EspF
炭疽桿菌溶素O	表皮細胞分化抑制因子	百日咳毒素	破傷風毒素
Arp2/3複合物-活化蛋白rickA	胞外酶	磷脂酶	Tir
二元ADP-核糖基轉移酶CDT毒素	外毒素	血纖維蛋白溶酶原活化因子	TolC
肉毒桿菌神經毒素	G-核苷酸交換因子	肺炎鏈球菌溶素	毒性休克症候群毒素
C2毒素，組分II	鳥嘌呤核苷酸交換因子sopE	保護抗原	Zink-羧肽酶
CagA	熱穩定腸毒素	蛋白激酶	Zink-羧肽酶
攜鈣蛋白敏感性腺苷酸環化酶	IgA特異性絲胺酸內肽酶自主運輸蛋白	化膿隱秘桿菌溶血素	Zn依賴性肽酶

細胞循環抑制因子	肌醇磷酸酯磷酸酶 sopB	RTX毒素	
脂質及細胞靶標			
循環腫瘤細胞	極低密度脂質(VLDL)	三酸甘油酯	脂肪酸
轉移灶	高密度脂蛋白	乳糜微粒	膽固醇
真核細胞	低密度脂蛋白	脂蛋白元	

表5.癌症			
急性淋巴母細胞白血病(ALL)	結腸直腸癌	華氏巨球蛋白血症 (Macroglobulinemia, Waldenström)	幼兒型胸膜肺胚細胞瘤
急性骨髓白血病 (AML)	幼兒型顱咽管瘤	男性乳癌	妊娠及乳癌
腎上腺皮質癌	皮膚T細胞淋巴瘤	骨惡性纖維組織細胞瘤及骨肉瘤	原發性中樞神經系統(CNS)淋巴瘤
AIDS相關卡堡氏肉瘤 (AIDS-Related Kaposi Sarcoma)	乳管原位癌(DCIS)	黑色素瘤	前列腺癌
AIDS相關淋巴瘤	幼兒型胚胎腫瘤	梅克爾細胞癌(Merkel Cell Carcinoma)	罕見癌症
肛門癌	子宮內膜癌	間皮瘤	直腸癌
闌尾癌	幼兒型室管膜瘤	隱匿原發性轉移性鱗狀頸癌	腎細胞癌
幼兒型星形細胞瘤	上皮癌	涉及NUT基因之中線道癌	腎盂及輸尿管移行細胞癌
幼兒型非典型畸胎樣/橫紋肌樣腫瘤	食道癌	葡萄胎	視網膜胚細胞瘤
基底細胞癌	幼兒型敏感性神經胚細胞瘤	口腔及口咽癌	橫紋肌肉瘤
膽管癌	尤文氏肉瘤 (Ewing sarcoma)	幼兒型多發性內分泌瘤症候群	唾液腺癌
膀胱癌	性腺外生殖細胞腫瘤	多發性骨髓瘤/漿細胞贅瘤	肉瘤
骨癌	肝外膽管癌	蕈樣黴菌病	繼發性癌症
腸癌	眼癌	骨髓發育不良症候群	塞紮里症候群(Sézary Syndrome)
幼兒型腦幹神經膠質瘤	膽囊癌	骨髓發育不良/骨髓增生性贅瘤	皮膚癌
腦腫瘤	胃癌	慢性骨髓增生病	皮膚癌(非黑色素瘤)
乳癌	胃腸類癌瘤	鼻腔及鼻竇癌	小細胞肺癌
幼兒型支氣管腫	生殖細胞腫瘤	鼻咽癌	小腸癌

瘤			
伯基特淋巴瘤 (Burkitt Lymphoma)	妊娠滋養細胞腫瘤 (GTT)	神經母細胞瘤	軟組織肉瘤
原發灶不明癌 (Cancer of Unknown Primary)	神經膠質瘤	非霍奇金氏淋巴瘤 (Non-Hodgkin Lymphoma)	鱗狀細胞癌
骨擴散癌	毛細胞白血病	非小細胞肺癌	隱匿原發性轉移性 鱗狀頸癌
腦擴散癌	頭頸癌	食管癌	胃 (Stomach/Gastric) 癌
肝擴散癌	幼兒型心臟癌	口腔癌(Oral Cancer)	胃癌
肺擴散癌	肝細胞(肝)癌	口腔癌 (Oral Cavity Cancer)	皮膚T細胞淋巴瘤- 參見蕈樣黴菌病及 塞紮里症候群
類癌瘤	蘭格漢氏細胞組織細胞增生症	口咽癌	睪丸癌
原發灶不明癌 (Carcinoma of Unknown Primary)	霍奇金氏淋巴瘤	骨肉瘤(骨癌)	咽喉癌
幼兒型心臟 (Cardiac/Heart) 腫瘤	下咽癌	骨肉瘤及惡性纖維組織細胞瘤	胸腺瘤及胸腺癌
幼兒型中樞神經系統非典型畸胎樣/橫紋肌樣腫瘤	眼內黑色素瘤	卵巢癌	甲狀腺癌
幼兒型中樞神經系統胚胎腫瘤	胰島細胞腫瘤，胰臟神經內分泌腫瘤	胰臟癌	腎盂及輸尿管移行細胞癌
幼兒型中樞神經系統	腎癌	胰臟神經內分泌腫瘤(胰島細胞腫瘤)	原發灶不明癌
子宮頸癌	蘭格漢氏細胞組織細胞增生症	幼兒型乳頭狀瘤症	輸尿管及腎盂移行細胞癌
幼兒型脊索瘤	喉癌	副神經節瘤	尿道癌
絨膜癌	白血病	副甲狀腺癌	子宮內膜子宮癌
慢性淋巴球性白血病(CLL)	唇及口腔癌	陰莖癌	子宮肉瘤
慢性骨髓白血病(CML)	肝癌	咽癌	陰道癌
慢性骨髓增生病	小葉原位癌(LCIS)	嗜鉻細胞瘤	外陰癌
結腸癌	低惡性潛在腫瘤	垂體腫瘤	華氏巨球蛋白血症
淋巴瘤	肺癌	漿細胞贅瘤/多發性骨髓瘤	威爾姆斯腫瘤 (Wilms Tumor)

【0248】 本發明已就代表實例而言有所描述，該等代表實例視為不

限制僅由申請專利範圍定義之本發明之範疇之說明性實施例。對包括科學公開案、論文、教科書、專利申請案及經發佈專利之公開案之所有提及均出於所有目的特此以引用之方式併入。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡，其在與巨噬細胞接觸時，選擇性地將該巨噬細胞自M2表現型再極化成M1表現型。

【第2項】

如請求項1之細胞外囊泡，其中該一或多種免疫調節組分抑制至少一種巨噬細胞靶基因。

【第3項】

如請求項1或2之細胞外囊泡，其中該細胞外囊泡為胞外體。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之細胞外囊泡，其中該免疫調節組分為核酸。

【第5項】

如請求項4之細胞外囊泡，其中該核酸為抑制性RNA。

【第6項】

如請求項5之細胞外囊泡，其中該抑制性RNA為反義RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初級miRNA(pri-miRNA)或前驅miRNA(pre-miRNA)。

【第7項】

如請求項4之細胞外囊泡，其中該核酸為反義寡核苷酸(ASO)。

【第8項】

如請求項1至7中任一項之細胞外囊泡，其中該免疫調節組分抑制選自由以下組成之群之至少一種基因：KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、

HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、麩醯胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 及PKM2。

【第9項】

如請求項8之細胞外囊泡，其中該至少一種基因係選自由以下組成之群：STAT3、STAT6、CEBP/ β 、Pi3K γ 、KRAS及HIF1- α 。

【第10項】

如請求項9之細胞外囊泡，其中該免疫調節組分為包含與選自SEQ ID NO:1-6之序列具有至少95%一致性之序列之反義寡核苷酸。

【第11項】

如請求項10之細胞外囊泡，其中該免疫調節組分為包含選自SEQ ID NO:1-6之序列之反義寡核苷酸。

【第12項】

如請求項9之細胞外囊泡，其中該至少一種基因為STAT3。

【第13項】

如請求項12之細胞外囊泡，其中該免疫調節組分為靶向STAT3之反義寡核苷酸。

【第14項】

如請求項9之細胞外囊泡，其中該至少一種基因為KRAS。

【第15項】

如請求項14之細胞外囊泡，其中該免疫調節組分為靶向野生型人類KRAS之抑制性RNA。

【第16項】

如請求項 15 之細胞外囊泡，其中該抑制性 RNA 亦靶向小鼠 Kras^{G12D}。

【第17項】

如請求項 1 至 16 中任一項之細胞外囊泡，其中該巨噬細胞為腫瘤駐留巨噬細胞。

【第18項】

如請求項 17 之細胞外囊泡，其中該腫瘤為胰臟腫瘤。

【第19項】

如請求項 1 至 18 中任一項之細胞外囊泡，其進一步包含額外免疫調節組分。

【第20項】

如請求項 19 之細胞外囊泡，其中該額外免疫調節組分為小分子藥物、抗體或其活性片段或治療性蛋白質或其活性片段。

【第21項】

如請求項 20 之細胞外囊泡，其中該額外免疫調節組分為抗體或其活性片段。

【第22項】

如請求項 21 之細胞外囊泡，其中該抗體或其活性片段為結合至 CTLA-4、PD-1 或 PD-L1 之免疫檢查點抑制劑或結合至 CSF1-R 之抑制劑。

【第23項】

如請求項 22 之細胞外囊泡，其中該抗體或其活性片段包含與伊匹單抗(Ipilimumab)之 CDR 具有至少 95% 一致性、或與納武單抗(Nivolumab)

之CDR具有至少95%一致性、或與賽咪單抗(Cemiplimab)之CDR具有至少95%一致性、或與派姆單抗(Pembrolizumab)之CDR具有至少95%一致性、或與阿特珠單抗(Atezolizumab)之CDR具有至少95%一致性、或與阿維魯單抗(Avelumab)之CDR具有至少95%一致性、或與德瓦魯單抗(Durvalumab)之CDR具有至少95%一致性、或與吡昔替尼(Pexidartinib)之CDR具有至少95%一致性、或與PLX7486之CDR具有至少95%一致性、或與ARRY-382之CDR具有至少95%一致性、或與JNJ-40346527之CDR具有至少95%一致性、或與BLZ945之CDR具有至少95%一致性、或與艾瑪圖單抗(Emactuzumab)之CDR具有至少95%一致性、或與AMG820之CDR具有至少95%一致性、或與IMC-CS4之CDR具有至少95%一致性、或與卡比拉單抗(Cabiralizumab)之CDR具有至少95%一致性的CDR。

【第24項】

如請求項23之細胞外囊泡，其中該抗體或其活性片段為選自由以下組成之群之至少一種抗體：伊匹單抗、納武單抗、賽咪單抗、派姆單抗、阿特珠單抗、阿維魯單抗、德瓦魯單抗、吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、艾瑪圖單抗、AMG820、IMC-CS4及卡比拉單抗。

【第25項】

如請求項22之細胞外囊泡，其中該抗體或其活性片段為與選自由以下組成之群之抗體競爭結合之至少一種抗體：伊匹單抗、納武單抗、賽咪單抗、派姆單抗、阿特珠單抗、阿維魯單抗、德瓦魯單抗、吡昔替尼、PLX7486、ARRY-382、JNJ-40346527、BLZ945、艾瑪圖單抗、

AMG820、IMC-CS4及卡比拉單抗。

【第26項】

如請求項20至25中任一項之細胞外囊泡，其進一步包含PTGFRN或其片段。

【第27項】

如請求項26之細胞外囊泡，其中該抗體或其片段融合至該PTGFRN或其片段。

【第28項】

如請求項1至27中任一項之細胞外囊泡，其中使用選自由以下組成之群之分析：細胞外囊泡攝取分析、靶基因表現分析、下游基因表現分析、細胞介素釋放分析及巨噬細胞表面蛋白分析來決定比較結果。

【第29項】

如前述請求項中任一項之細胞外囊泡，其中該M2巨噬細胞為選自由M2a、M2b及M2c巨噬細胞組成之群之腫瘤相關巨噬細胞。

【第30項】

如前述請求項中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞顯示增加分泌選自由 $\text{INF}\gamma$ 、IL-12、IL-23、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、IL-1、CSCL9、CXCL10及CXCL11組成之群之發炎性細胞介素及趨化介素。

【第31項】

如前述請求項中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞顯示減少分泌選自由IL-10、 $\text{TGF}\beta$ 、PGE2、CCL2、CCL17、CCL18、CCL22及CCL24組成之群之免疫抑制性細胞介

素及趨化介素。

【第32項】

如前述請求項中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞表現增加之腫瘤相關抗原。

【第33項】

如前述請求項中任一項之細胞外囊泡，其中與極化之前該M2巨噬細胞相比，該M1巨噬細胞增加CD8⁺ T細胞及/或自然殺手細胞之刺激。

【第34項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至33中任一項之細胞外囊泡。

【第35項】

一種治療有需要之患者之疾病之方法，其包含向該患者投與如請求項1至33中任一項之細胞外囊泡或如請求項34之醫藥組合物，由此治療該患者之該疾病。

【第36項】

如請求項35之方法，其中該疾病為癌症。

【第37項】

如請求項35或36之方法，其中該患者為人類。

【第38項】

如請求項35至37中任一項之方法，其中該免疫調節組分為靶向原致癌基因之抑制性RNA。

【第39項】

如請求項38之方法，其中該原致癌基因為人類KRAS。

【第40項】

如請求項39之方法，其中該癌症為胰臟癌。

【第41項】

如請求項35至40中任一項之方法，其進一步包含執行至少第二療法。

【第42項】

如請求項41之方法，其中該第二療法包含手術療法、化學療法、輻射療法、冷凍療法、激素療法或免疫療法。

【第43項】

如請求項26至33中任一項之方法，其中該投與係經由選自由靜脈內、腹膜內及瘤內投藥法所組成之群之途徑來進行。

【第44項】

一種調節巨噬細胞中基因表現之方法，其包含：

使該巨噬細胞與包含一或多種免疫調節組分之細胞外囊泡接觸，以抑制至少一種基因，且由此與使該巨噬細胞自M2表現型向M1表現型之巨噬細胞極化比該巨噬細胞與等莫耳量之單獨該等免疫調節組分接觸時增加。

【第45項】

如請求項44之方法，其中該接觸係離體或在活體內。

【第46項】

如請求項45之方法，其中該接觸係在活體內。

【第47項】

如請求項46之方法，其中該活體內接觸包含向個體投與該細胞外囊泡。

【第48項】

如請求項46之方法，其中該投藥法係經由選自由靜脈內、腹膜內及瘤內投藥法所組成之群之途徑來進行。

【第49項】

如請求項46至48中任一項之方法，其中該個體為人類。

【第50項】

如請求項46至49中任一項之方法，其中該個體罹患選自癌症及纖維化之病況。

【第51項】

如請求項50之方法，其中該病況為胰臟癌。

【第52項】

如請求項44至51中任一項之方法，其中該細胞外囊泡為胞外體。

【第53項】

如請求項44至40中任一項之方法，其中該免疫調節組分為核酸。

【第54項】

如請求項53之方法，其中該核酸為抑制性RNA。

【第55項】

如請求項54之方法，其中該抑制性RNA為反義RNA、siRNA、shRNA、miRNA、lncRNA、初級miRNA或前驅miRNA。

【第56項】

如請求項55之方法，其中該核酸為反義寡核苷酸(ASO)。

【第57項】

如請求項44至56中任一項之方法，其中該至少一種基因係選自由以

下組成之群：KRAS、HRAS、NRAS、HIF1- α 、HIF1- β 、Sp1、P300、LKB1、AMPK、STAT3、STAT6、n-MYC、c-MYC、HCAR1、A2AB、IDO、TDO、精胺酸酶、麩醯胺酸酶、CEBP/ β 、Pi3K γ 及PKM2。

【第58項】

如請求項57之方法，其中該至少一種基因係選自由以下組成之群：STAT3、STAT6、CEBP/ β 、Pi3K γ 、KRAS及HIF1- α 。

【第59項】

如請求項58之方法，其中該免疫調節組分為包含與選自SEQ ID NO:1-6之序列具有至少95%一致性之序列之反義寡核苷酸。

【第60項】

如請求項59之方法，其中該免疫調節組分為包含選自SEQ ID NO:1-6之序列之反義寡核苷酸。

【第61項】

如請求項58之方法，其中該至少一種基因為STAT3。

【第62項】

如請求項61之方法，其中該免疫調節組分為靶向STAT3之反義寡核苷酸。

【第63項】

如請求項58之方法，其中該至少一種基因為KRAS。

【第64項】

如請求項63之方法，其中該免疫調節組分為靶向野生型人類KRAS之抑制性RNA。

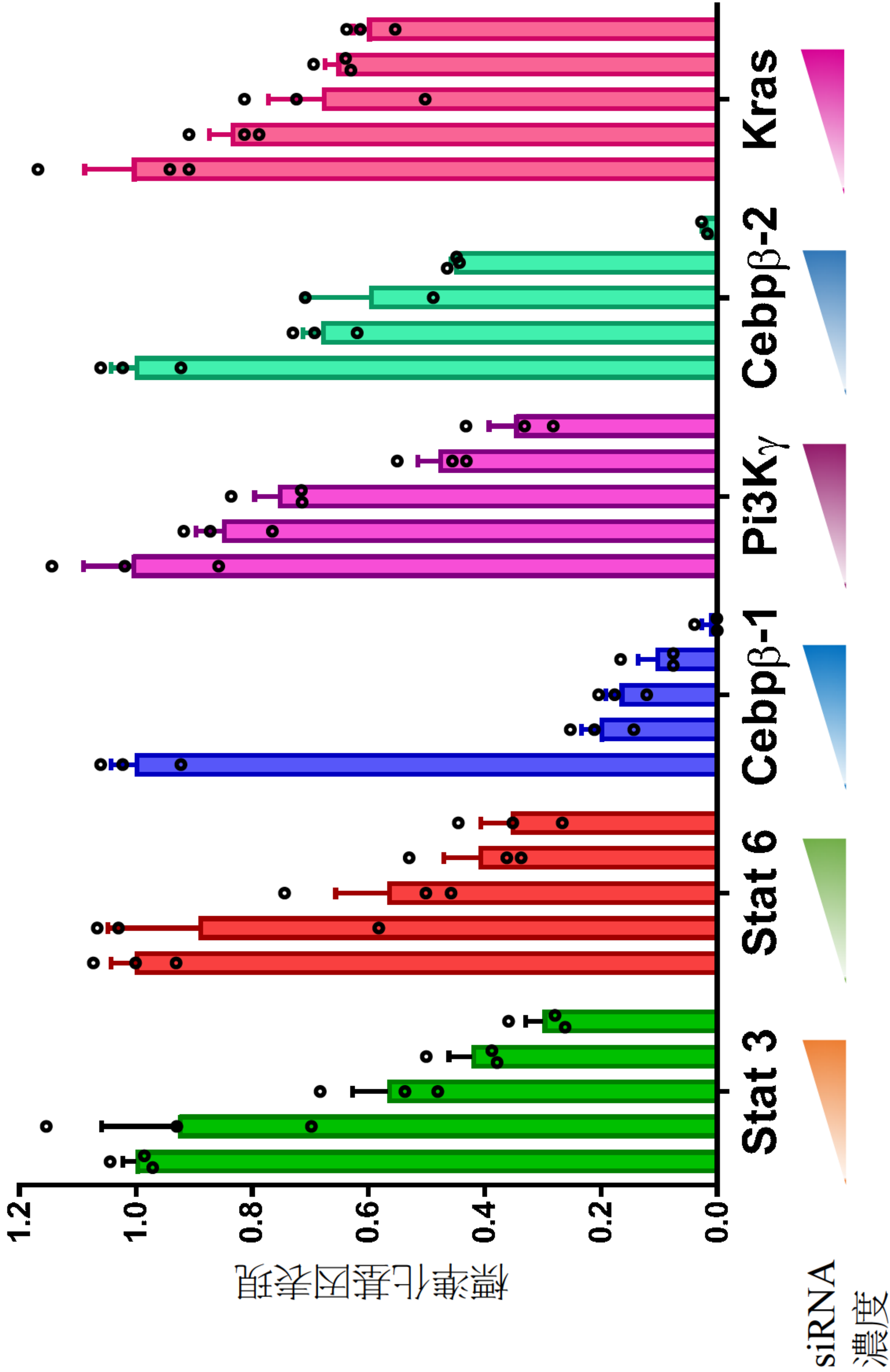
【第65項】

一種治療個體之胰臟癌之方法，其包含：向該個體投與包含靶向人類野生型KRAS之抑制性RNA之細胞外囊泡；其中該治療使得腫瘤駐留巨噬細胞自M2表現型極化成M1表現型之百分比增加至高於在經過靶向人類KRAS^{G12D}之抑制性RNA治療之患者中所觀測到的極化百分比的水準。

【第66項】

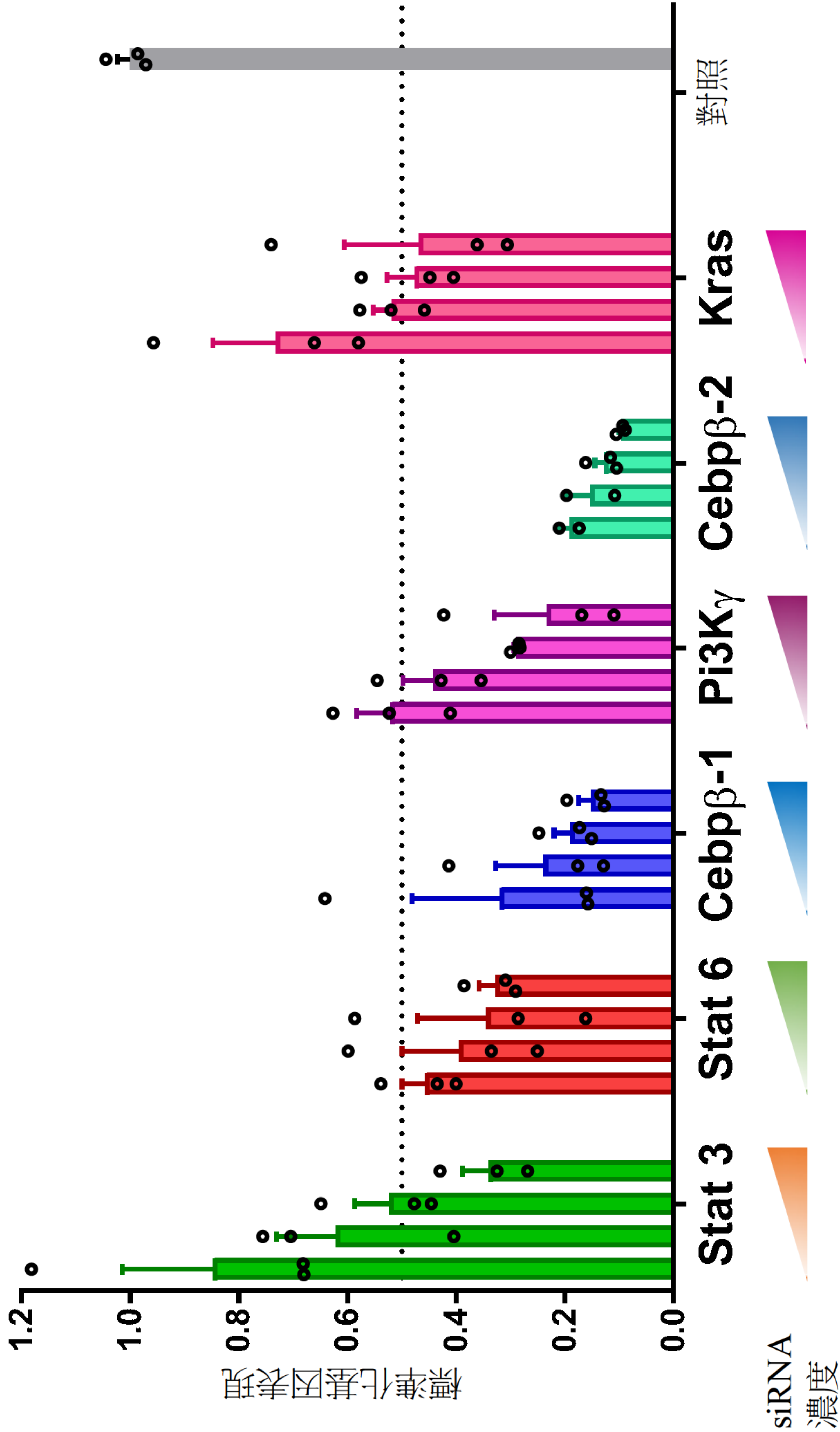
如請求項65之方法，其中該腫瘤駐留巨噬細胞之極化百分比係使用自腫瘤檢體中獲得之腫瘤駐留巨噬細胞之離體分析來測定。

【發明圖式】



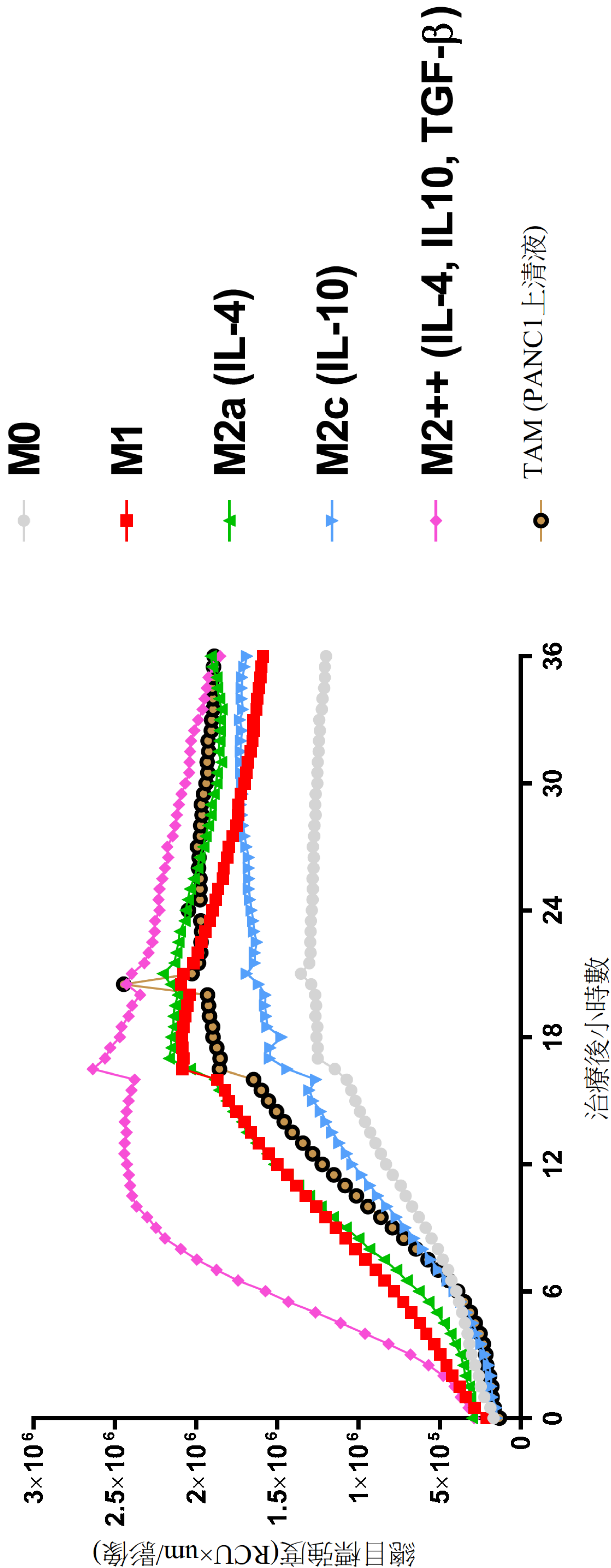
【圖1】

Arg1表現

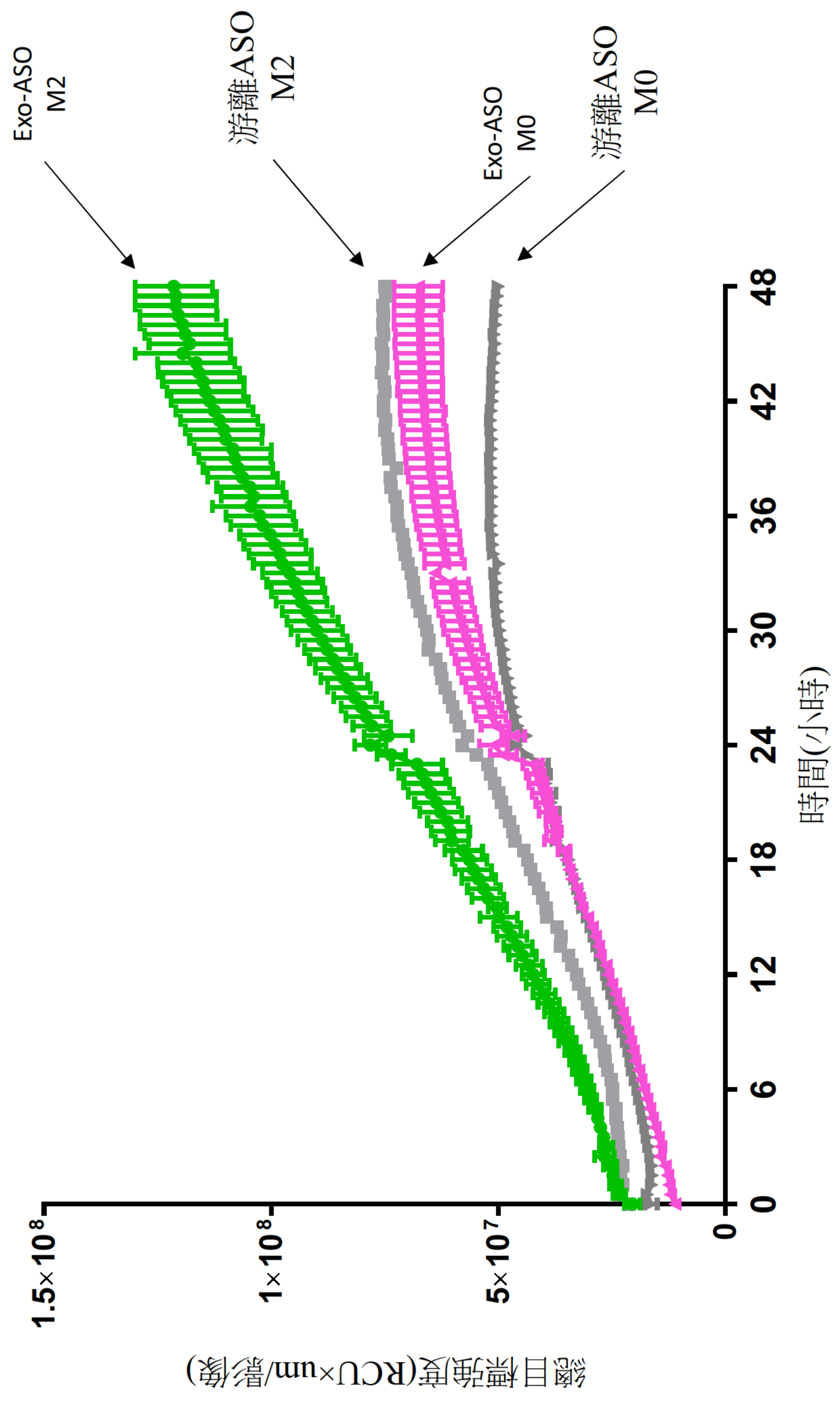


【圖2】

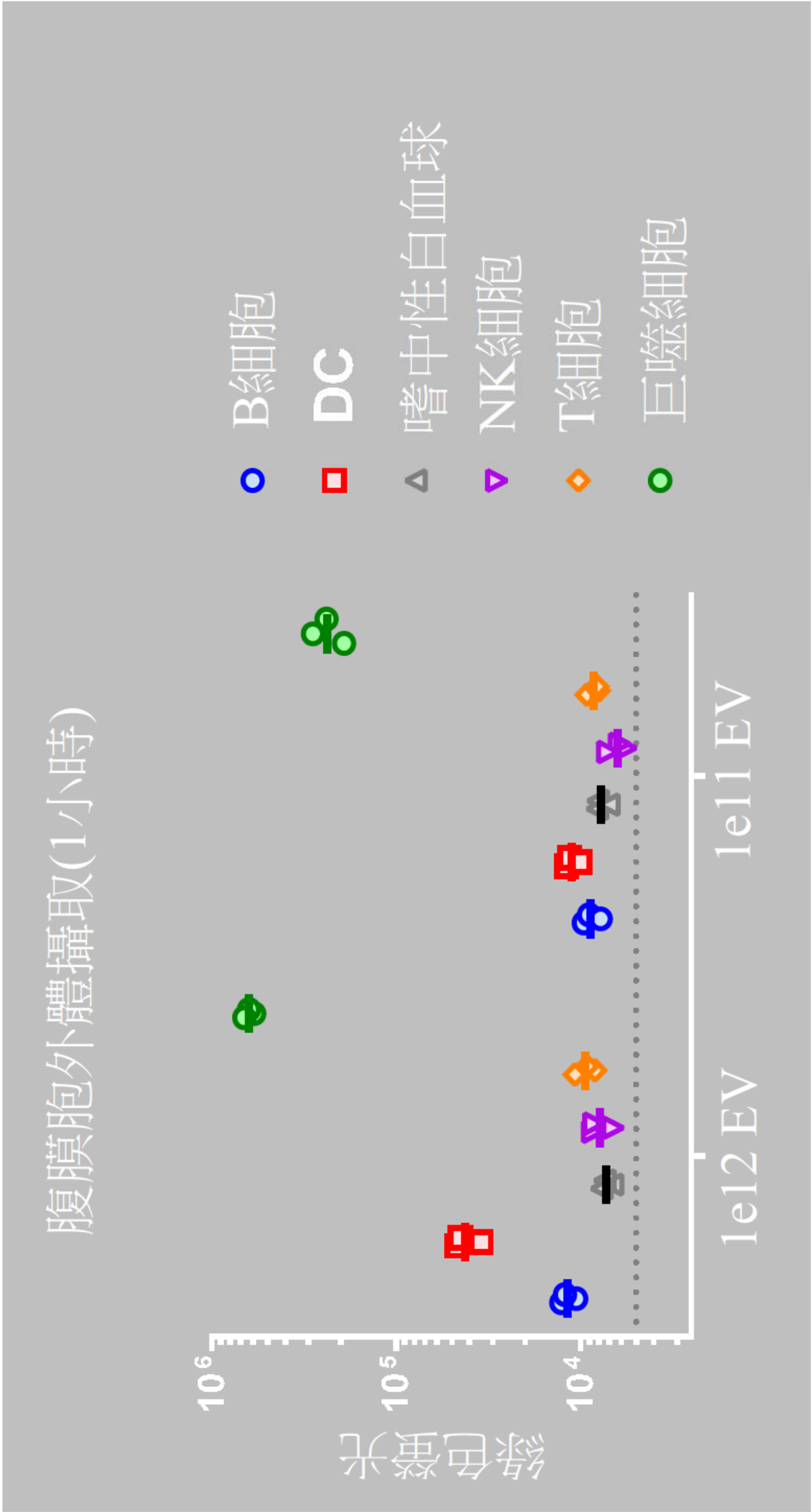
GFP標記之胞外體的攝取



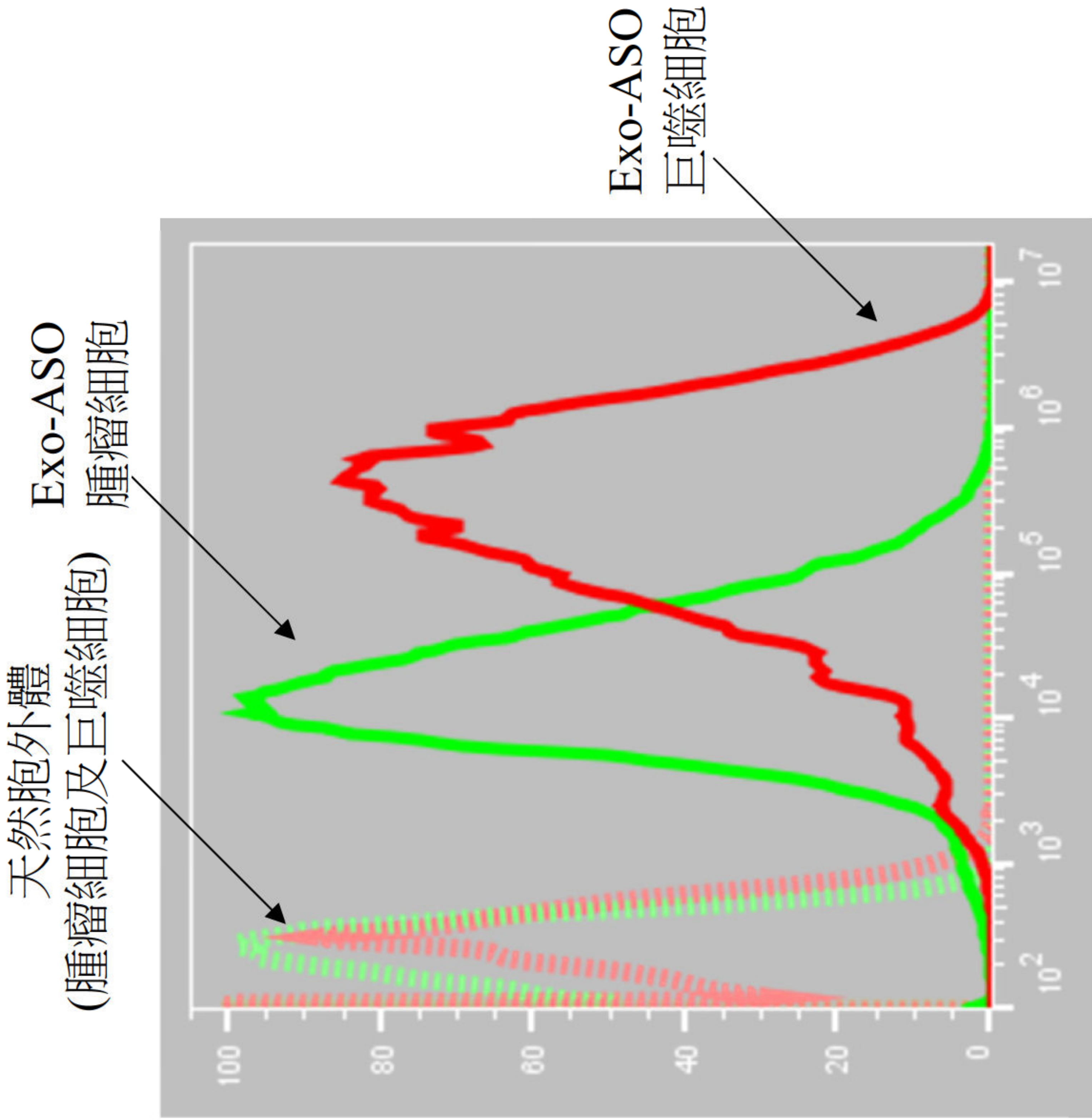
【圖3】

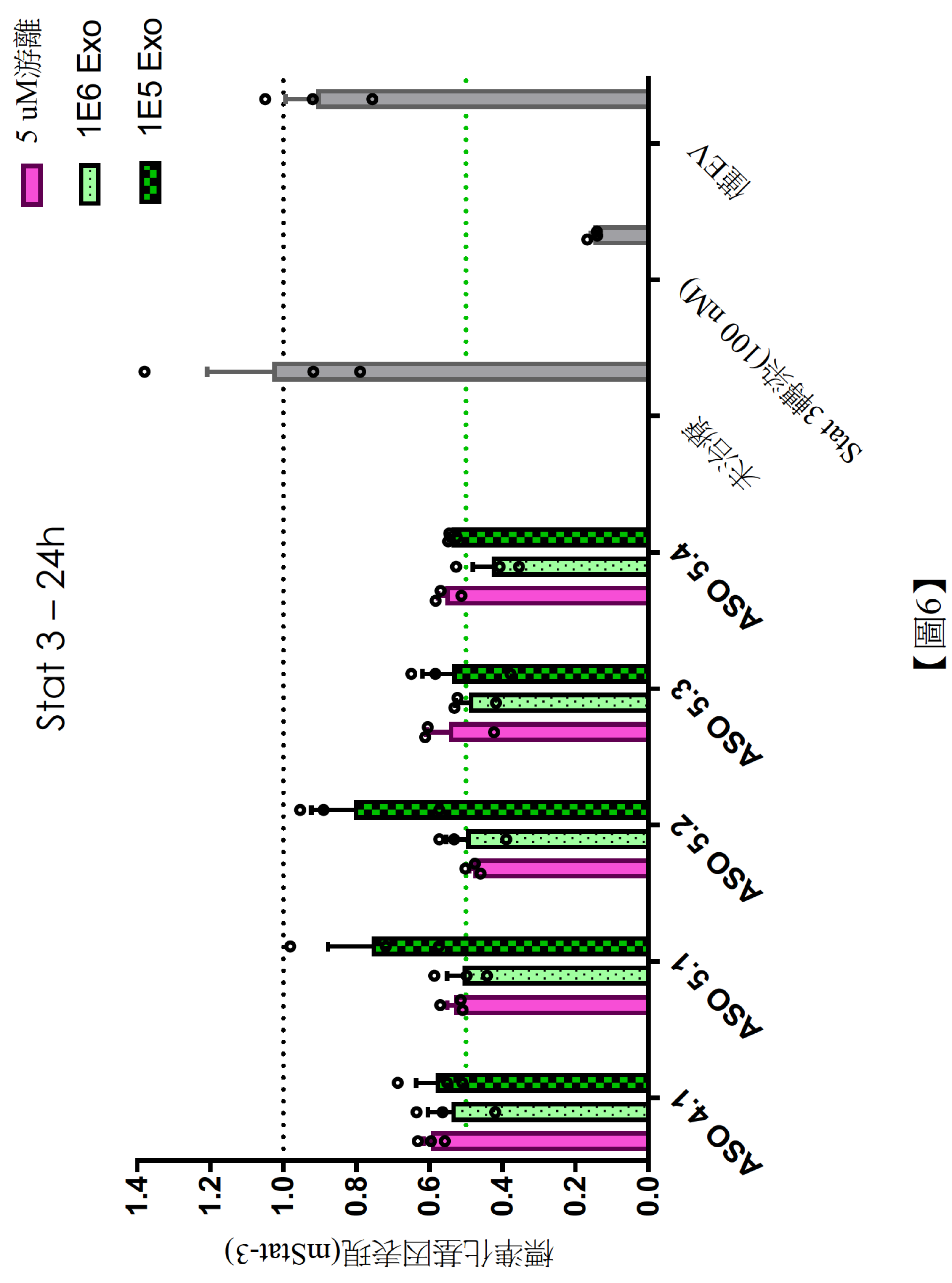


【圖4】

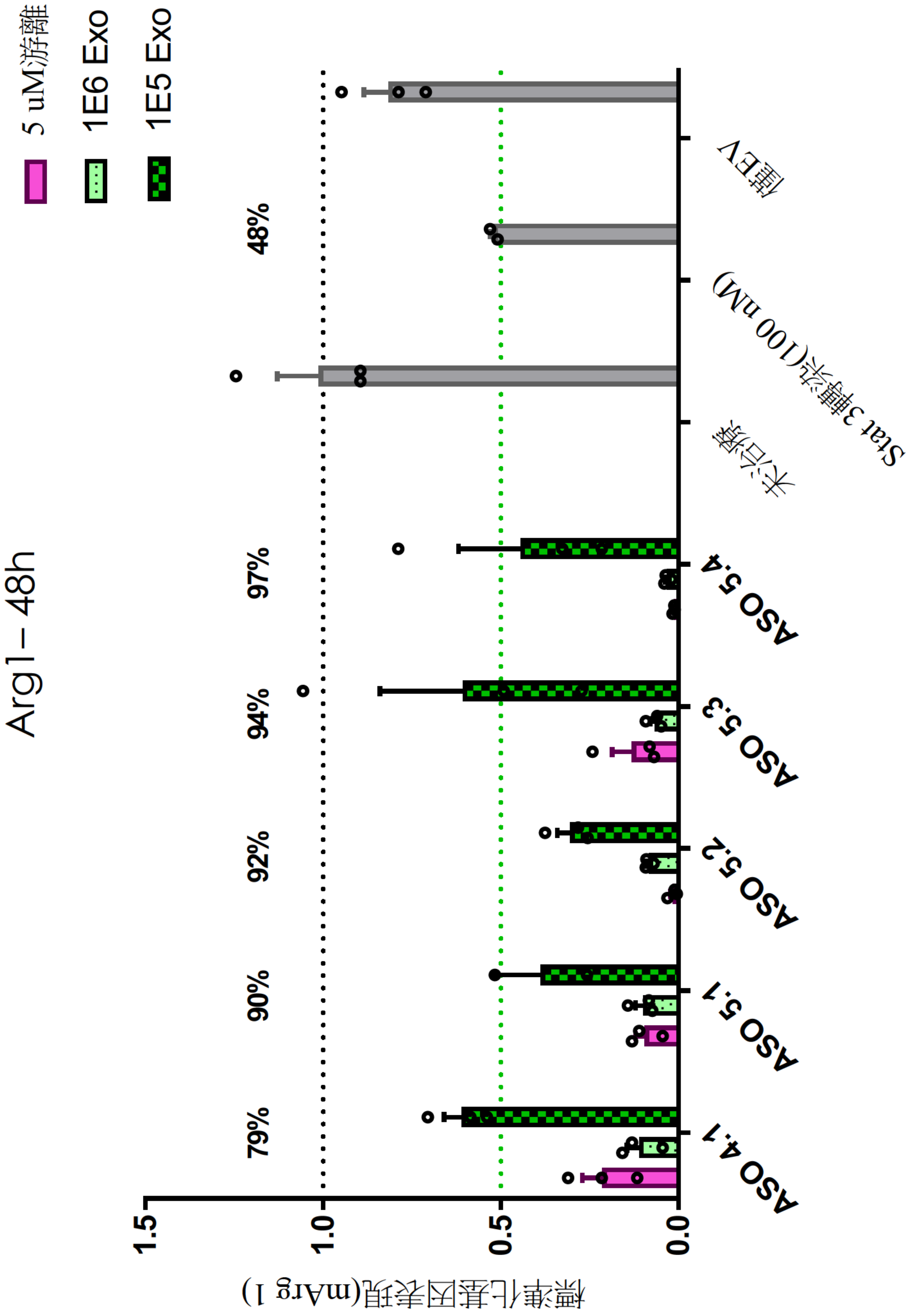


【圖5A】



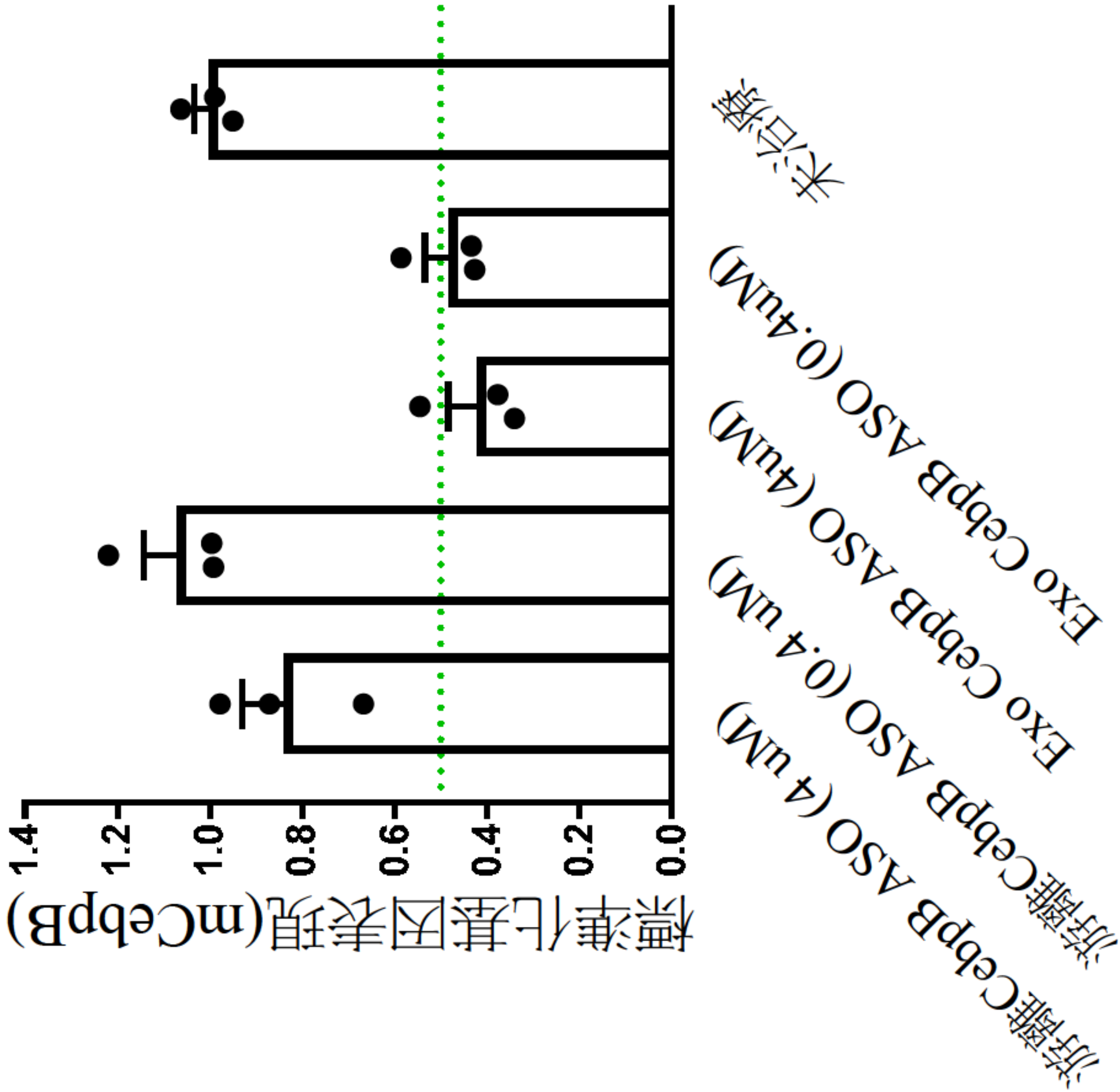


【圖9】



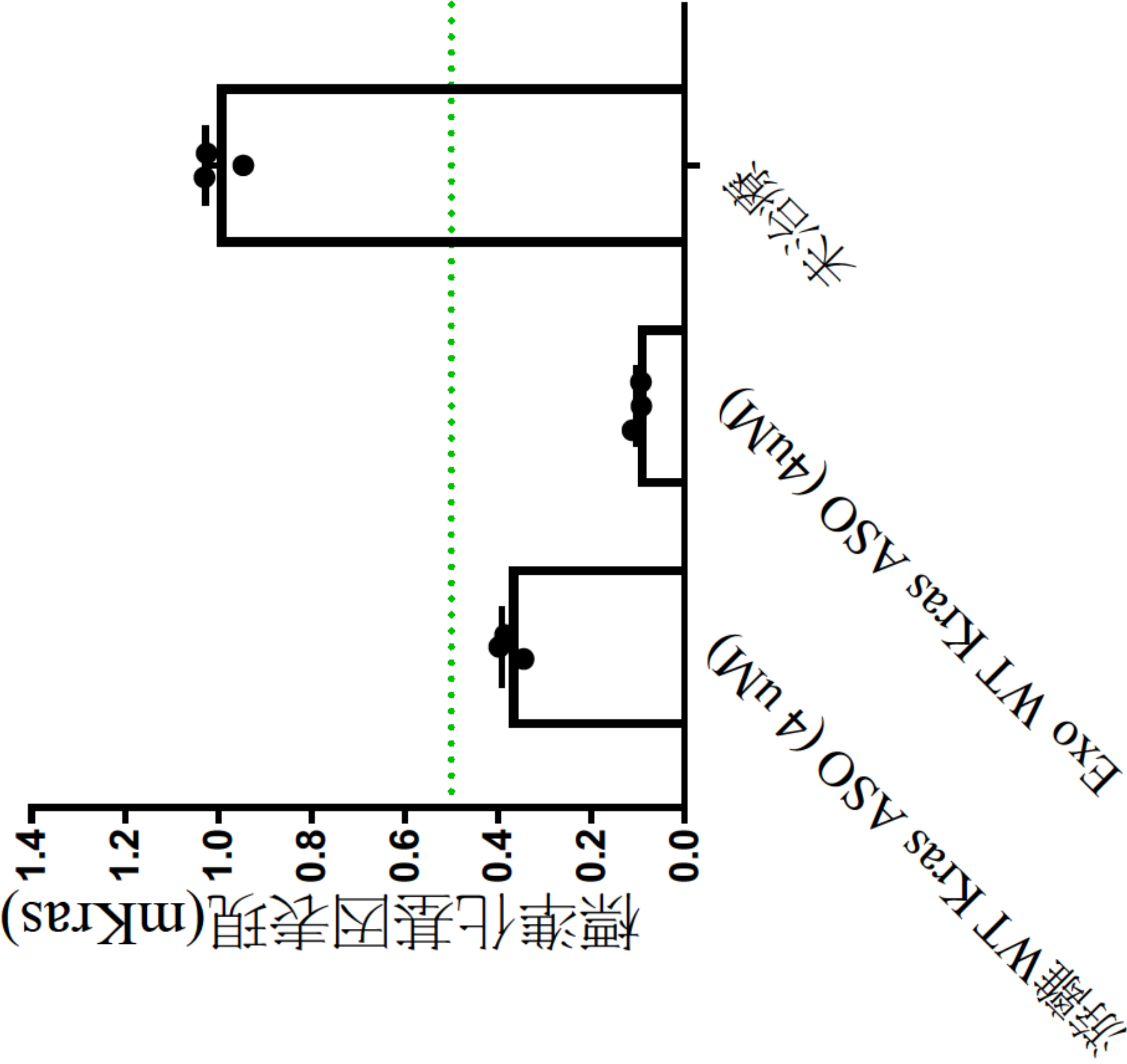
【圖 7】

C/EBPβ



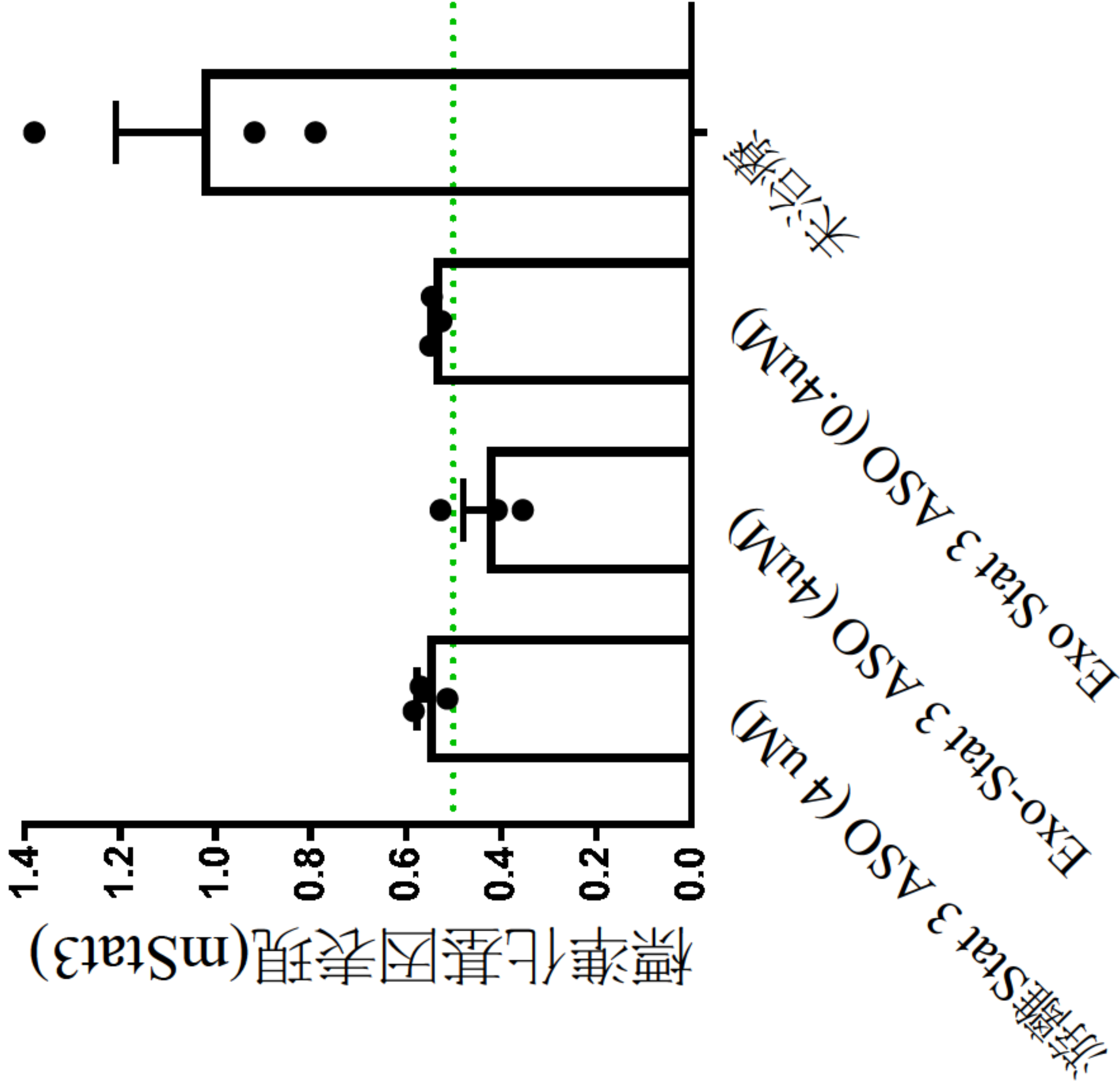
【圖8C】

KRAS



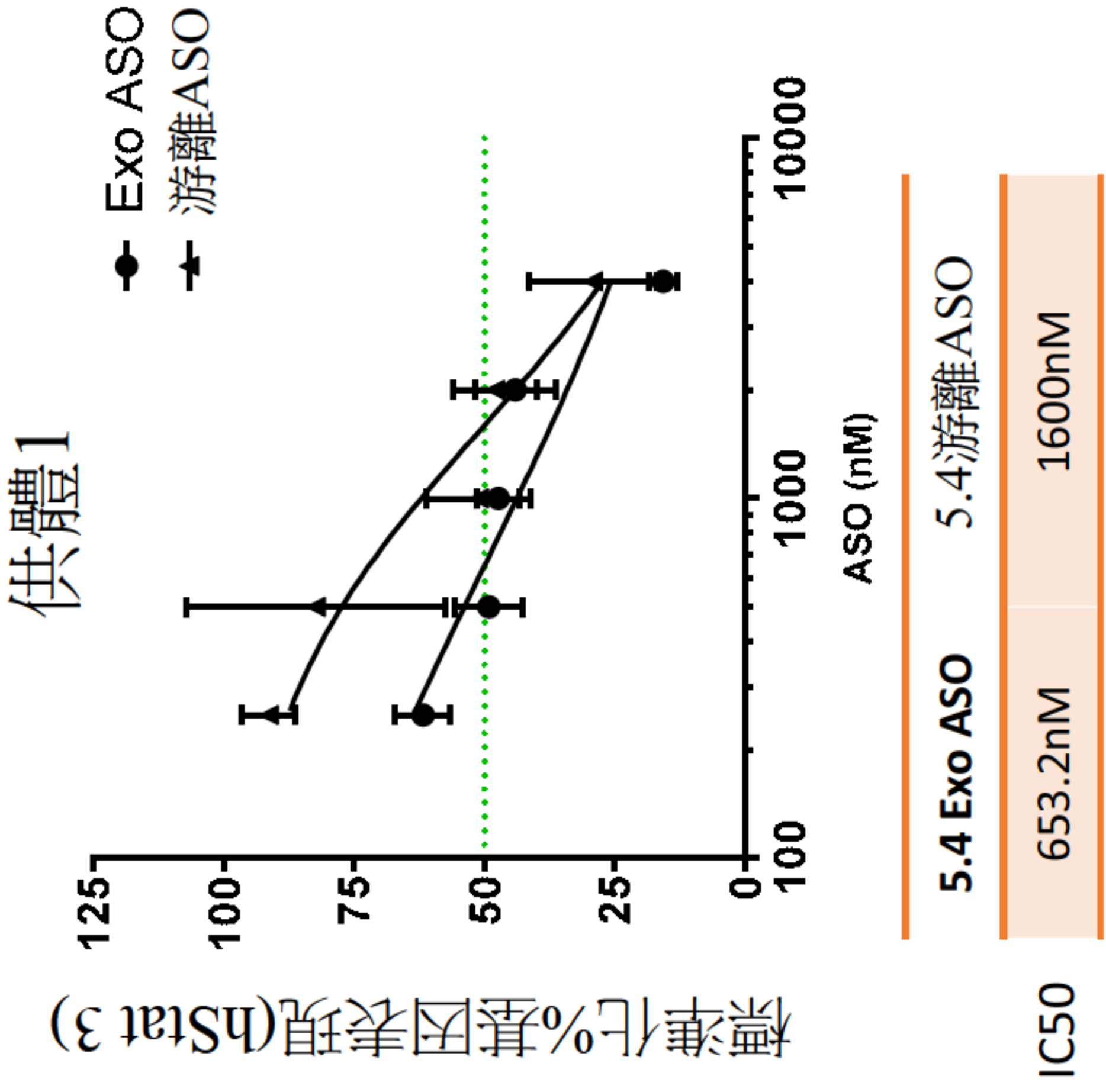
【圖8B】

STAT3

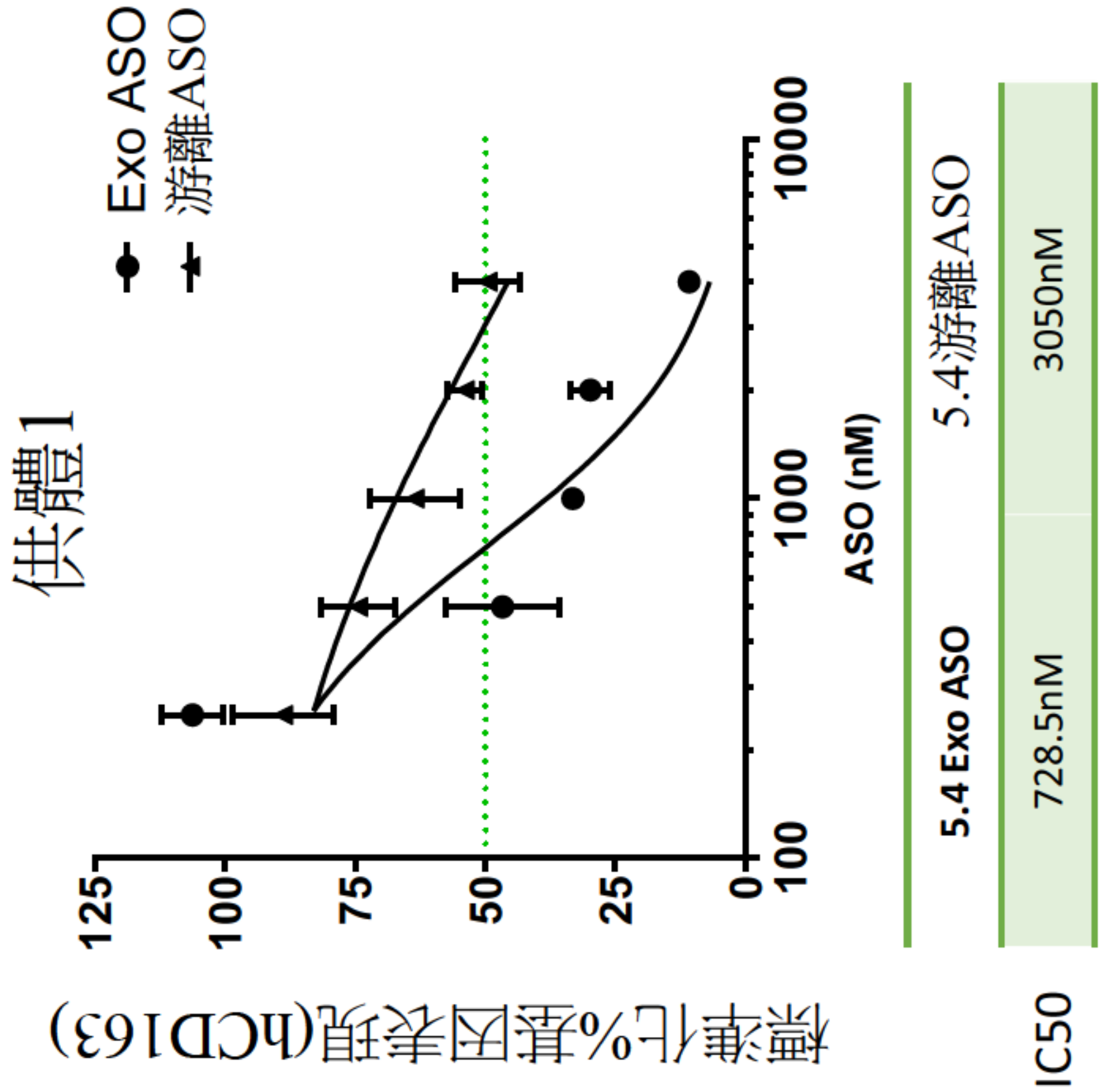


【圖8A】

Stat 3 (24h)

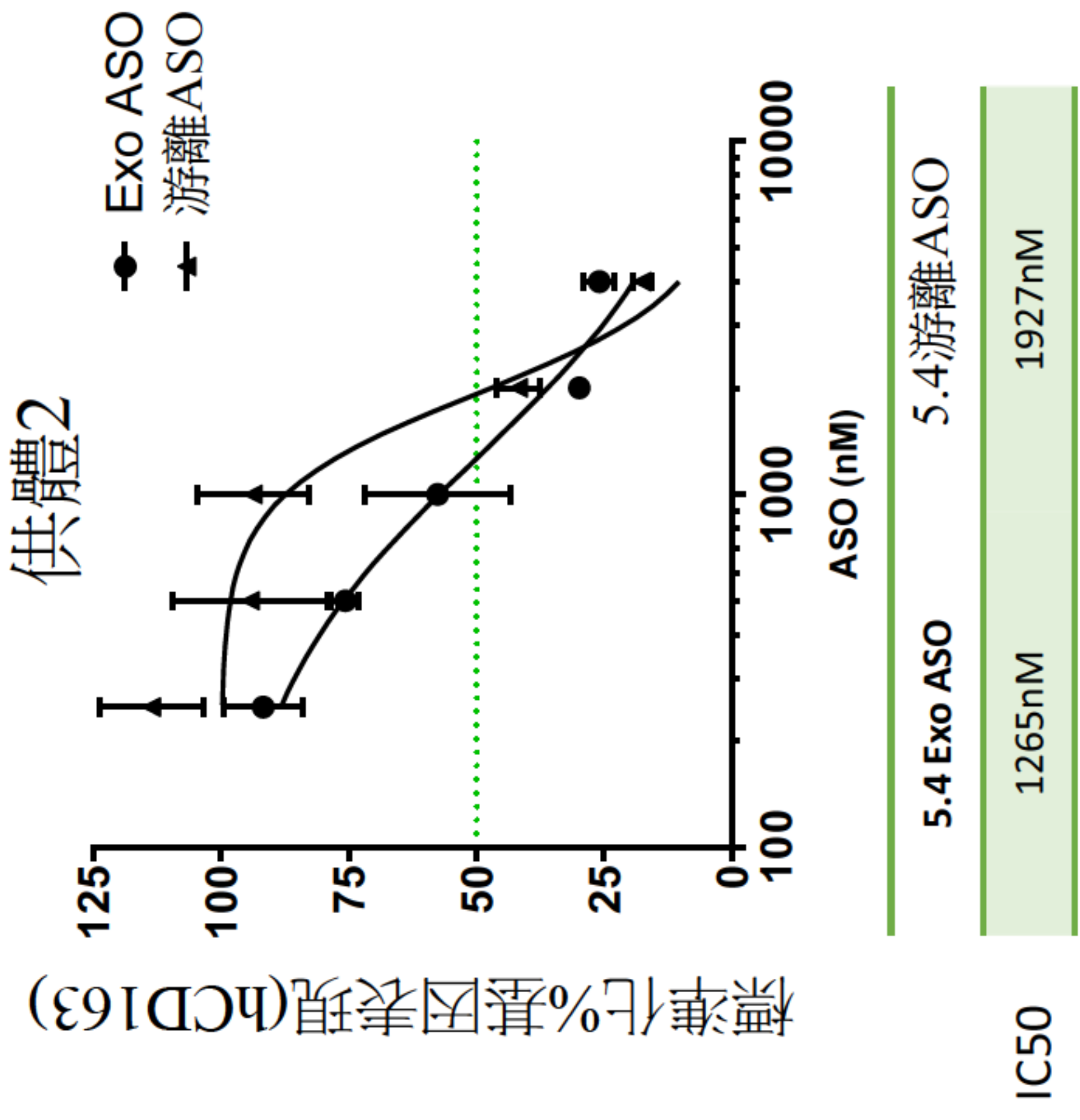


改善倍數：2.45



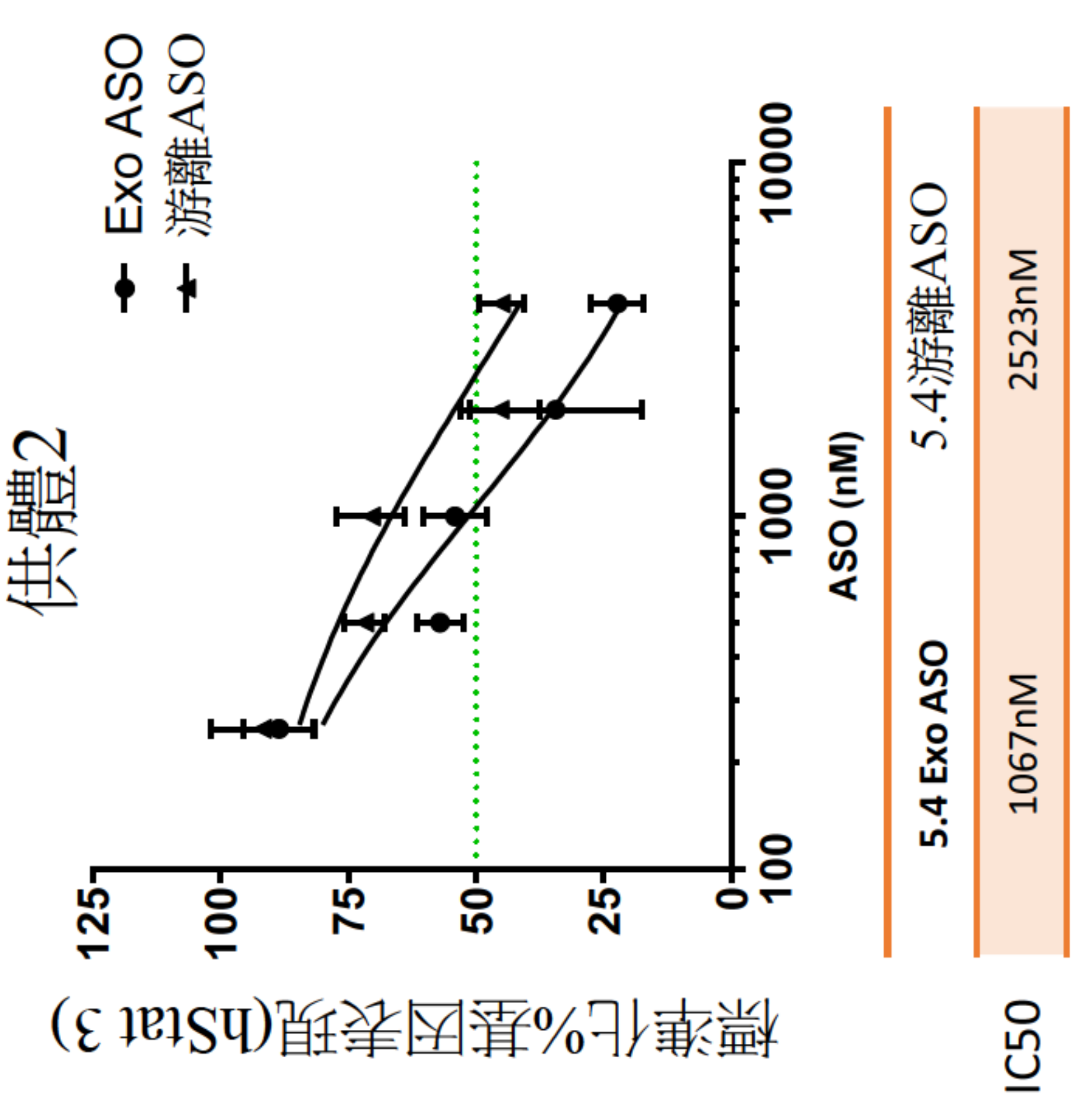
改善倍數：4.18

CD163 (48h)



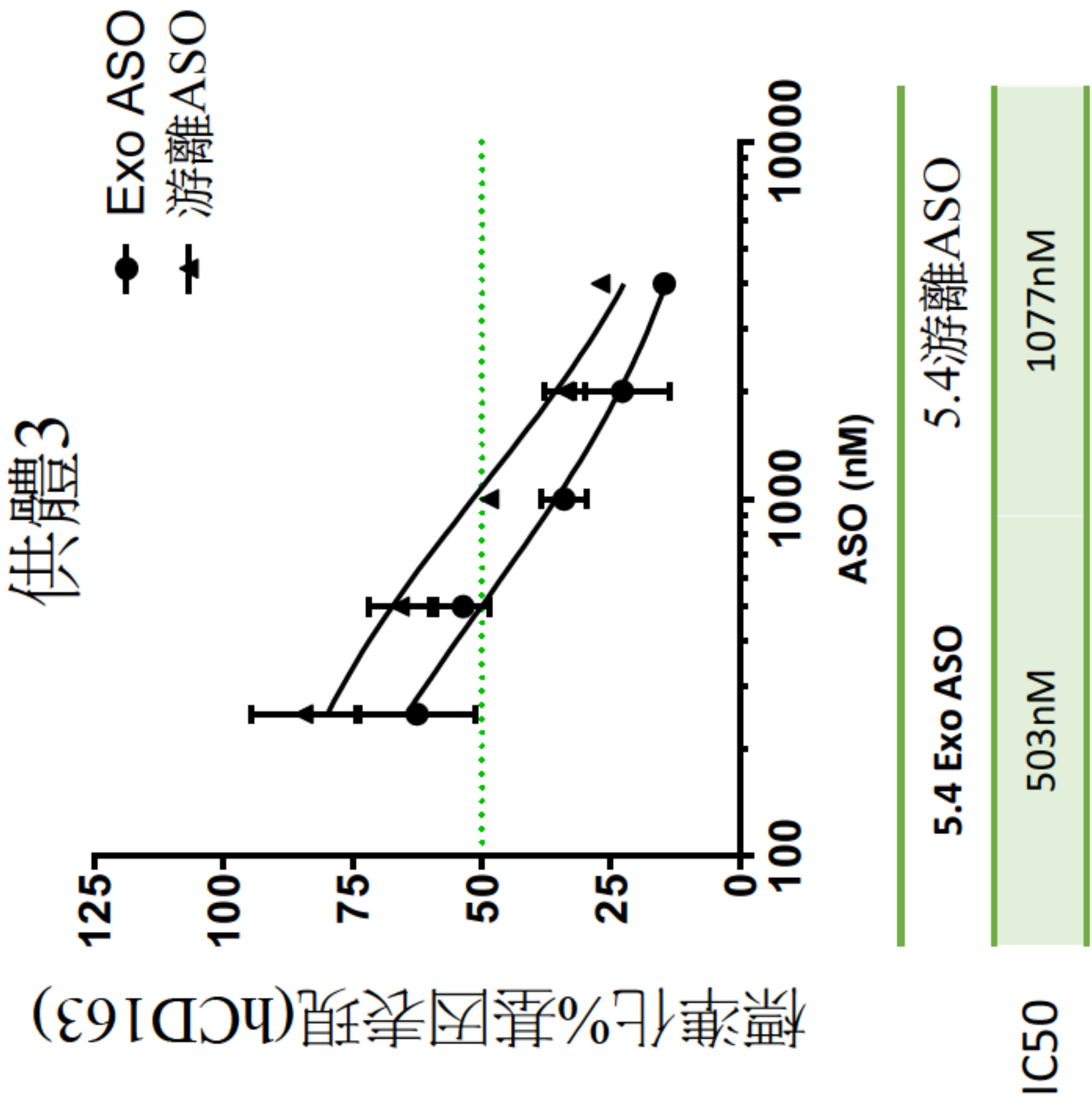
改善倍數：1.52

【圖9B】

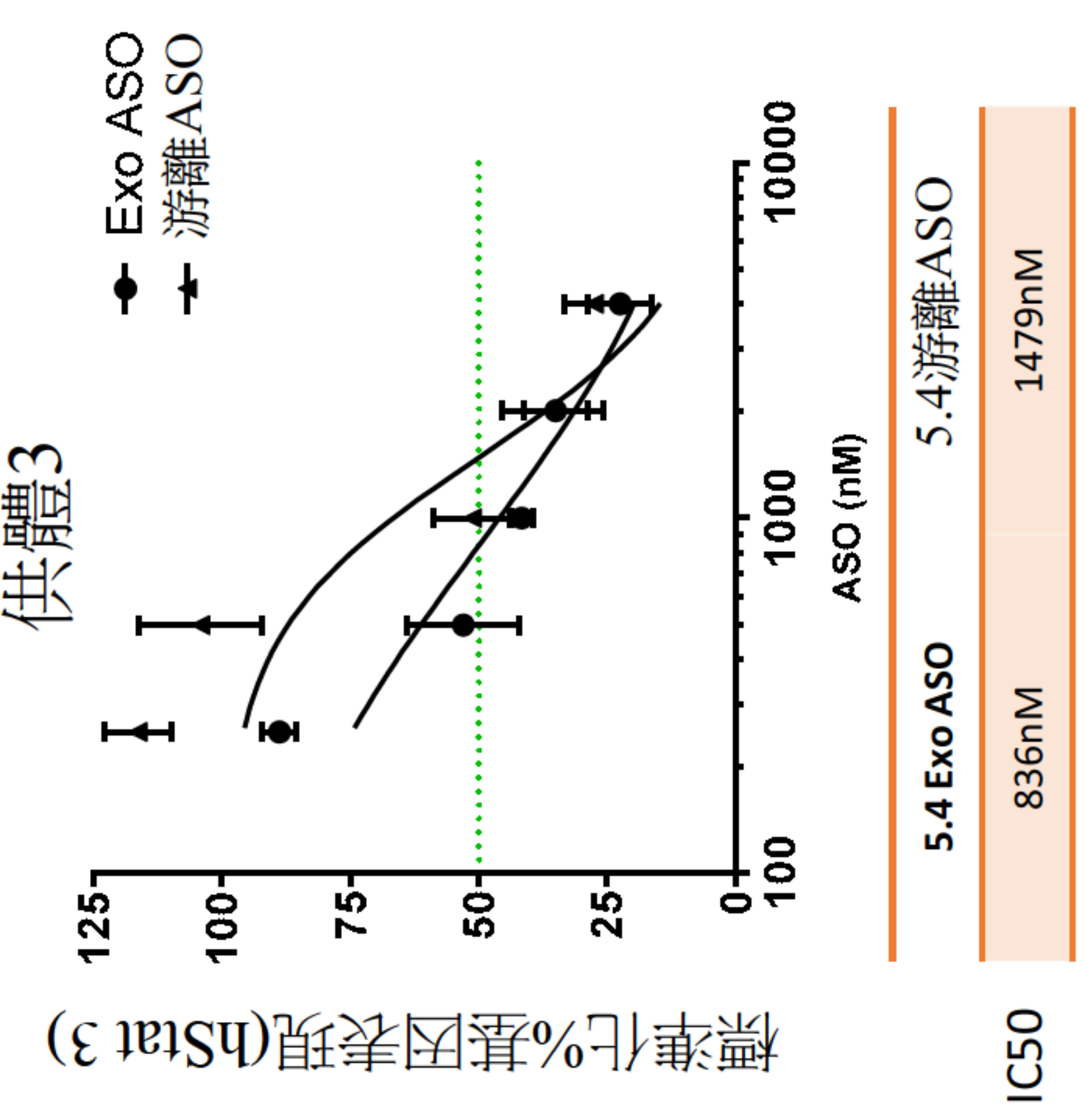


改善倍數：2.36

【圖9A】

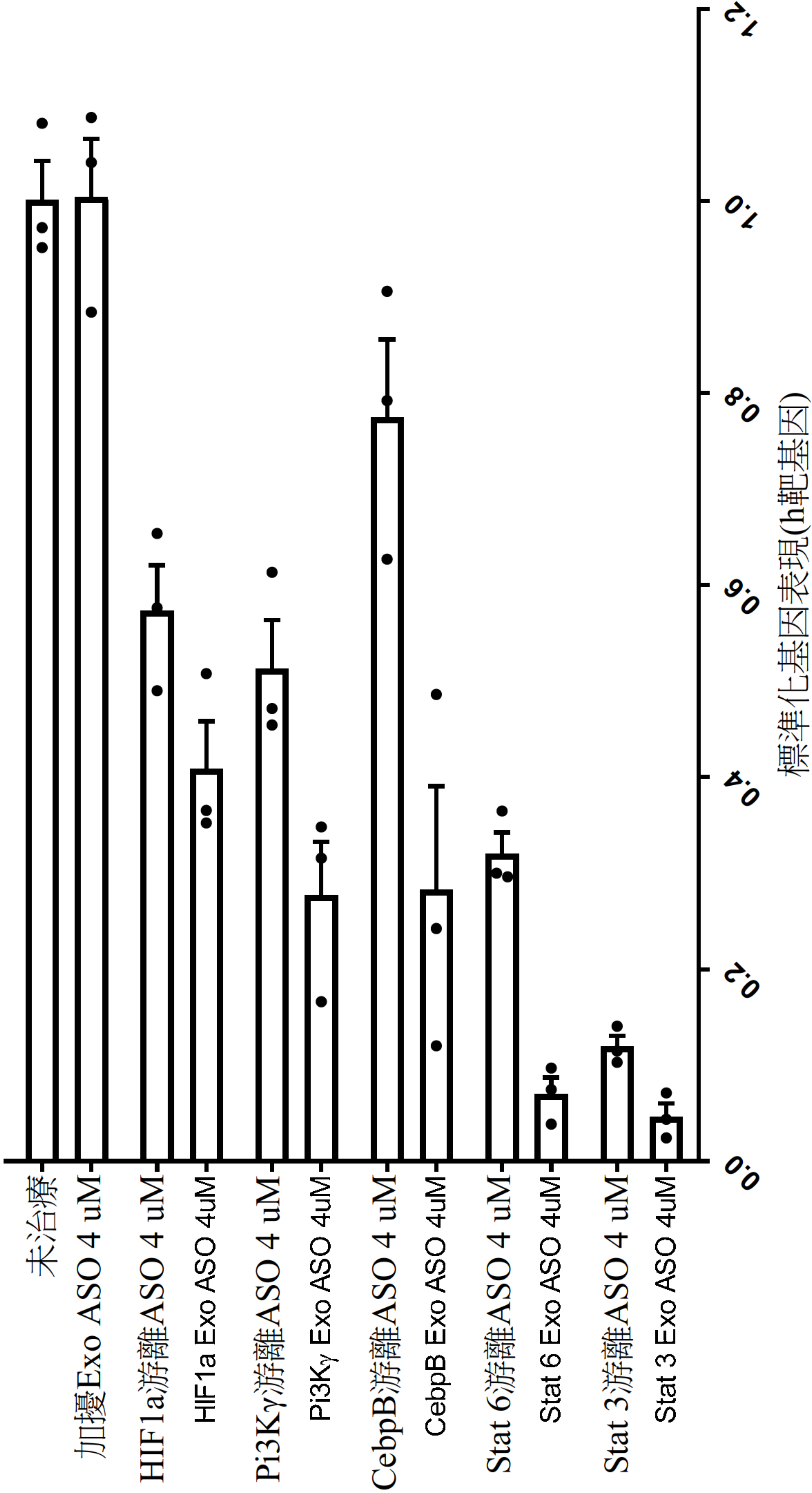


改善倍數：2.14



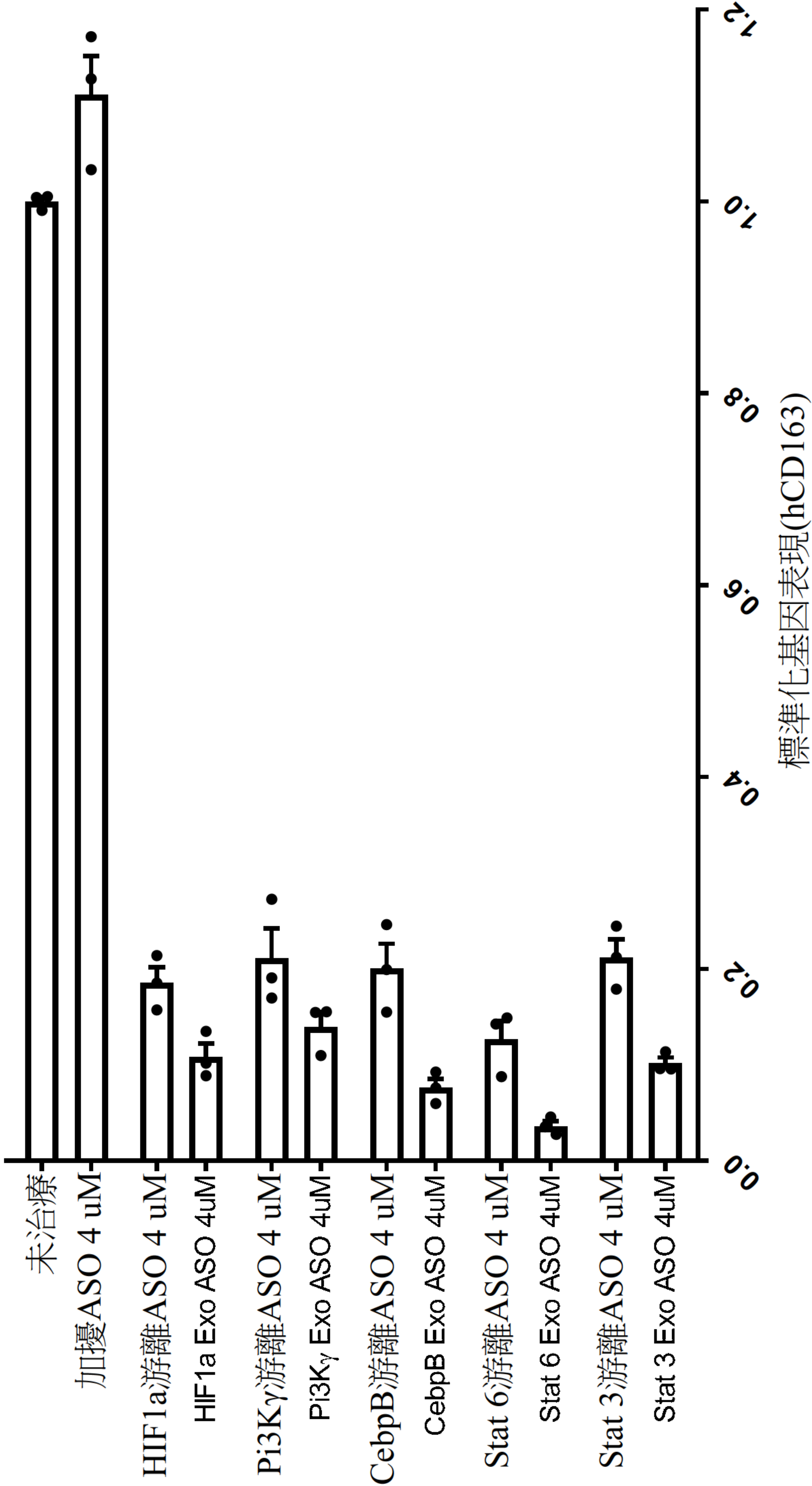
改善倍數：1.77

靶基因表現

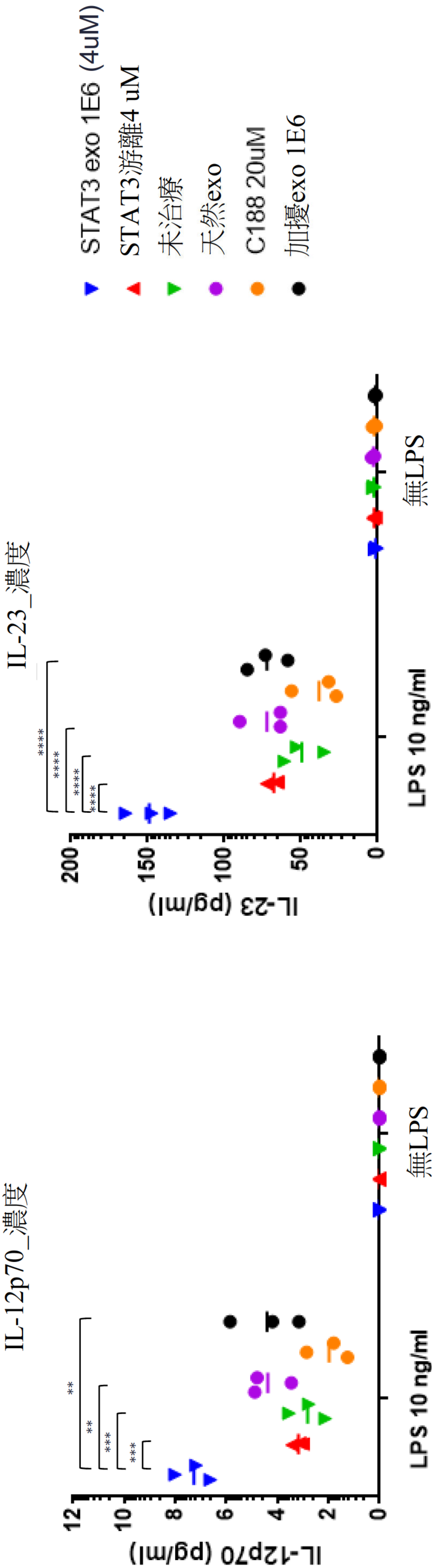


【圖10】

CD163表現

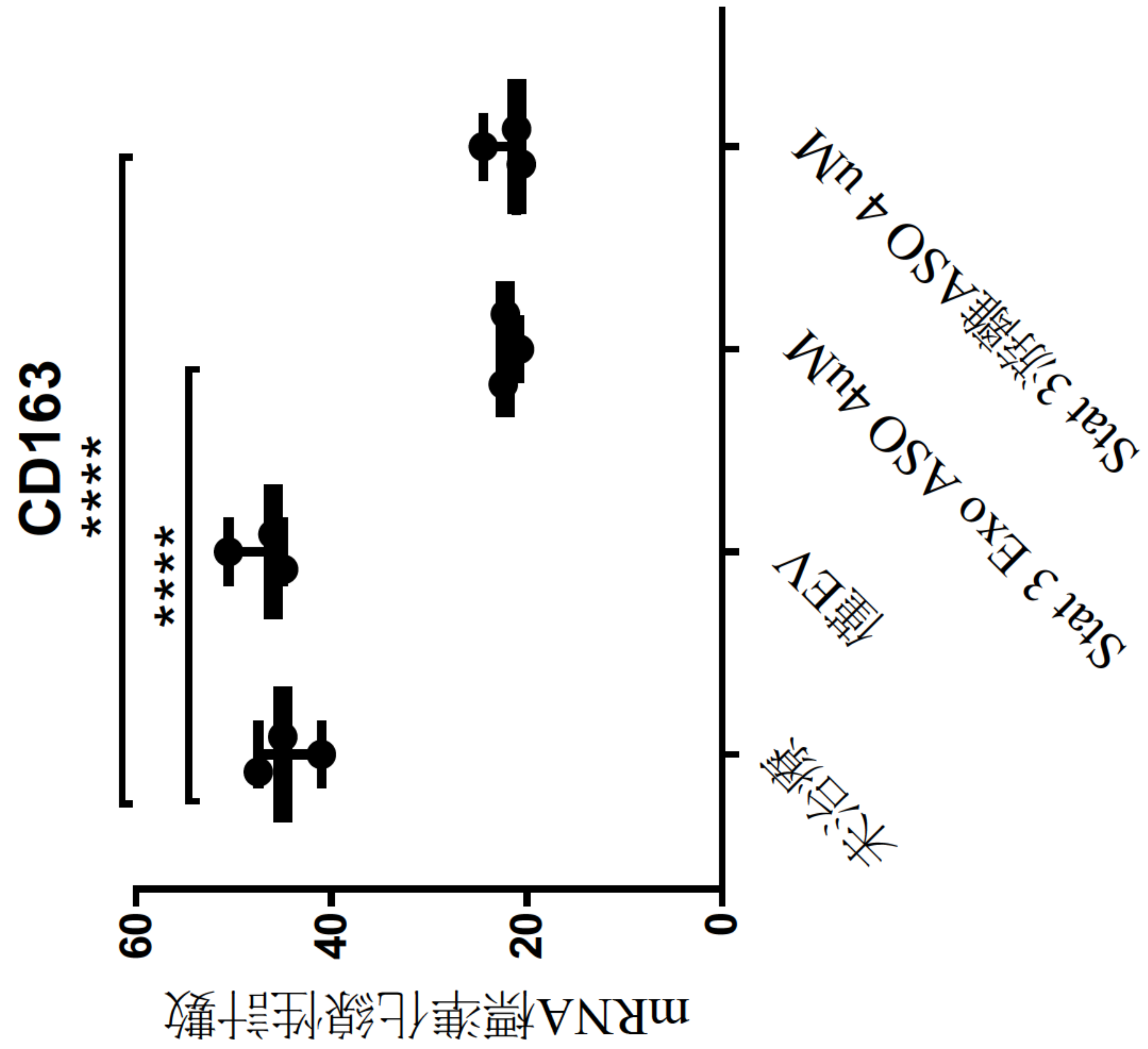


【圖11】

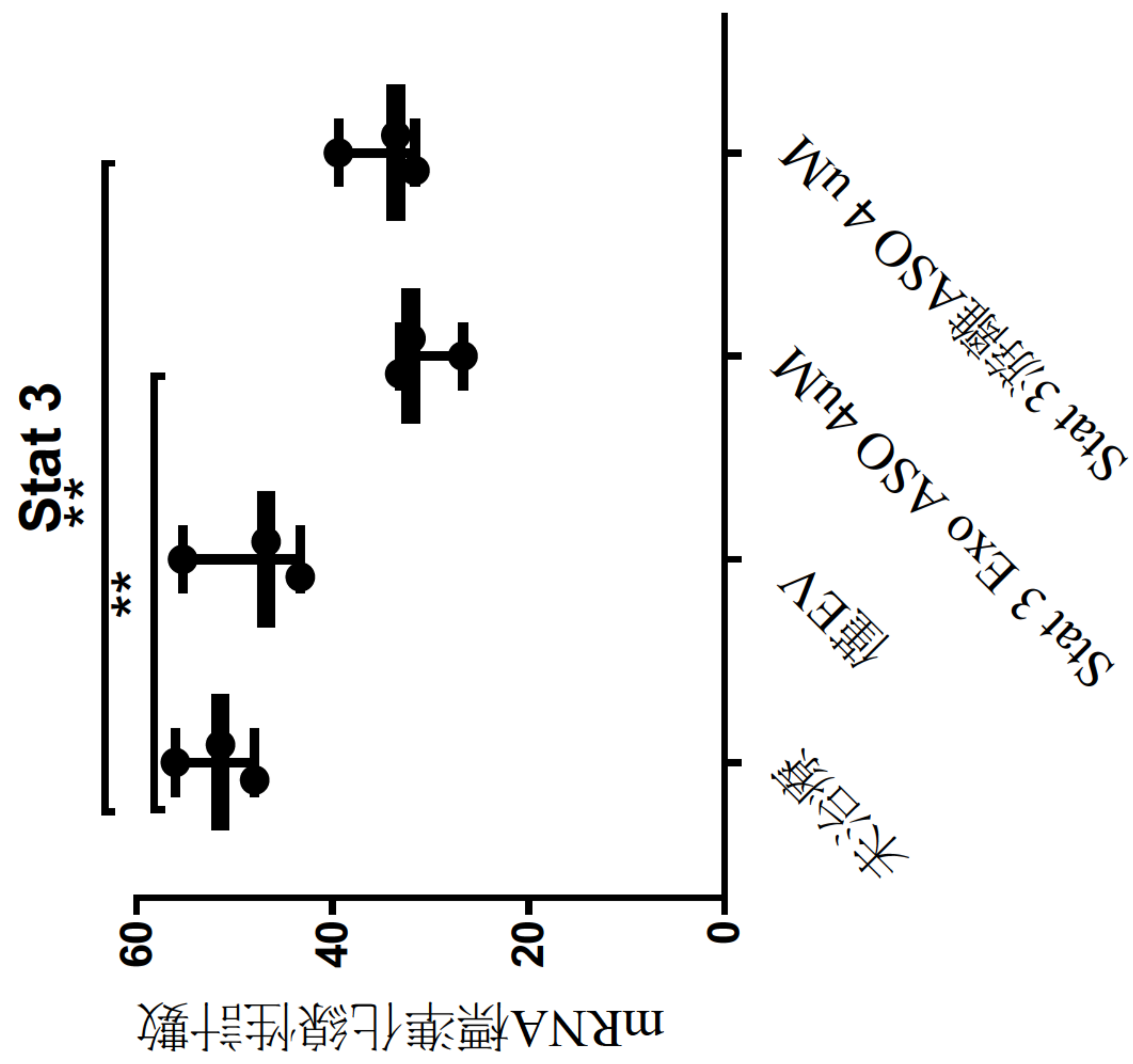


【圖12A】

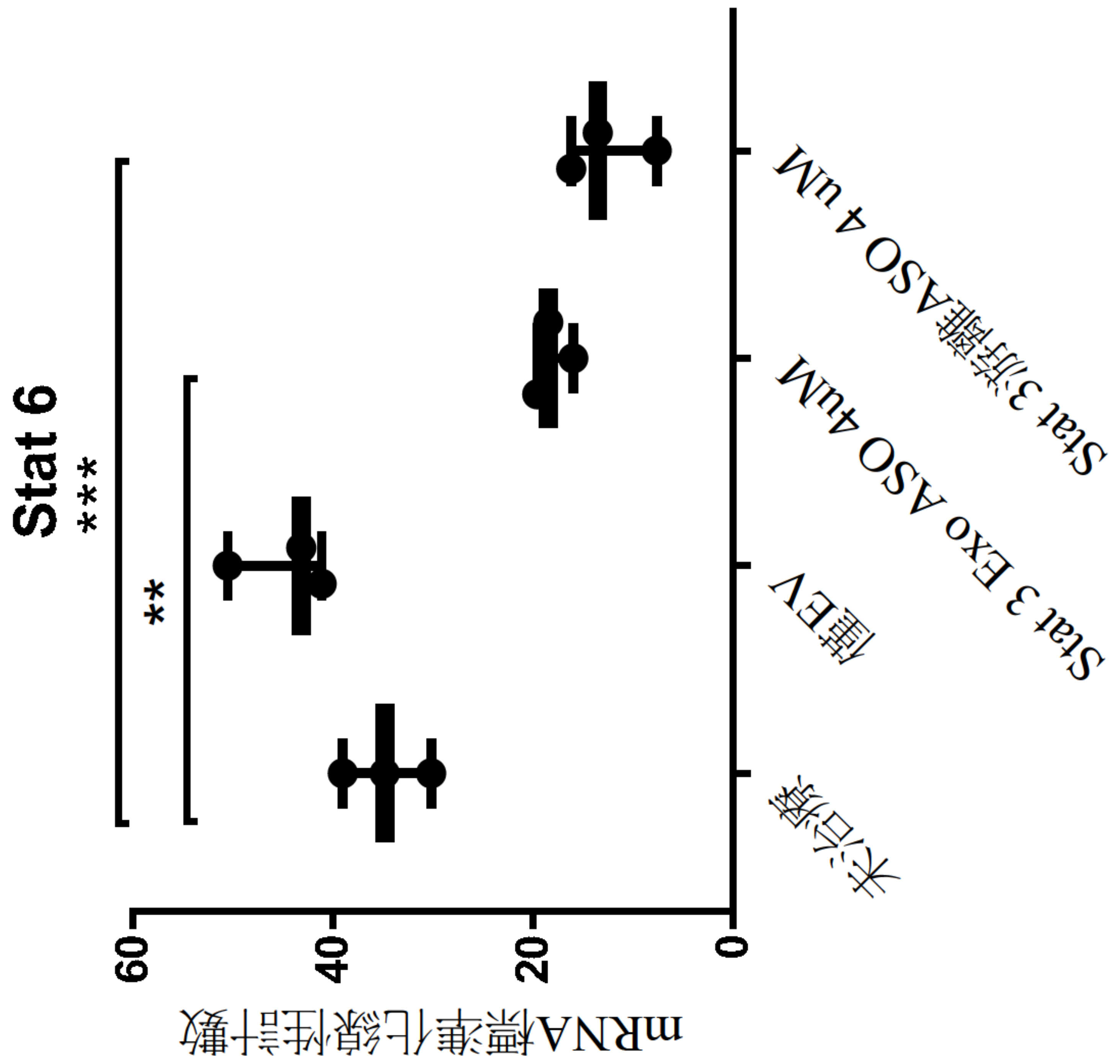
【圖12B】



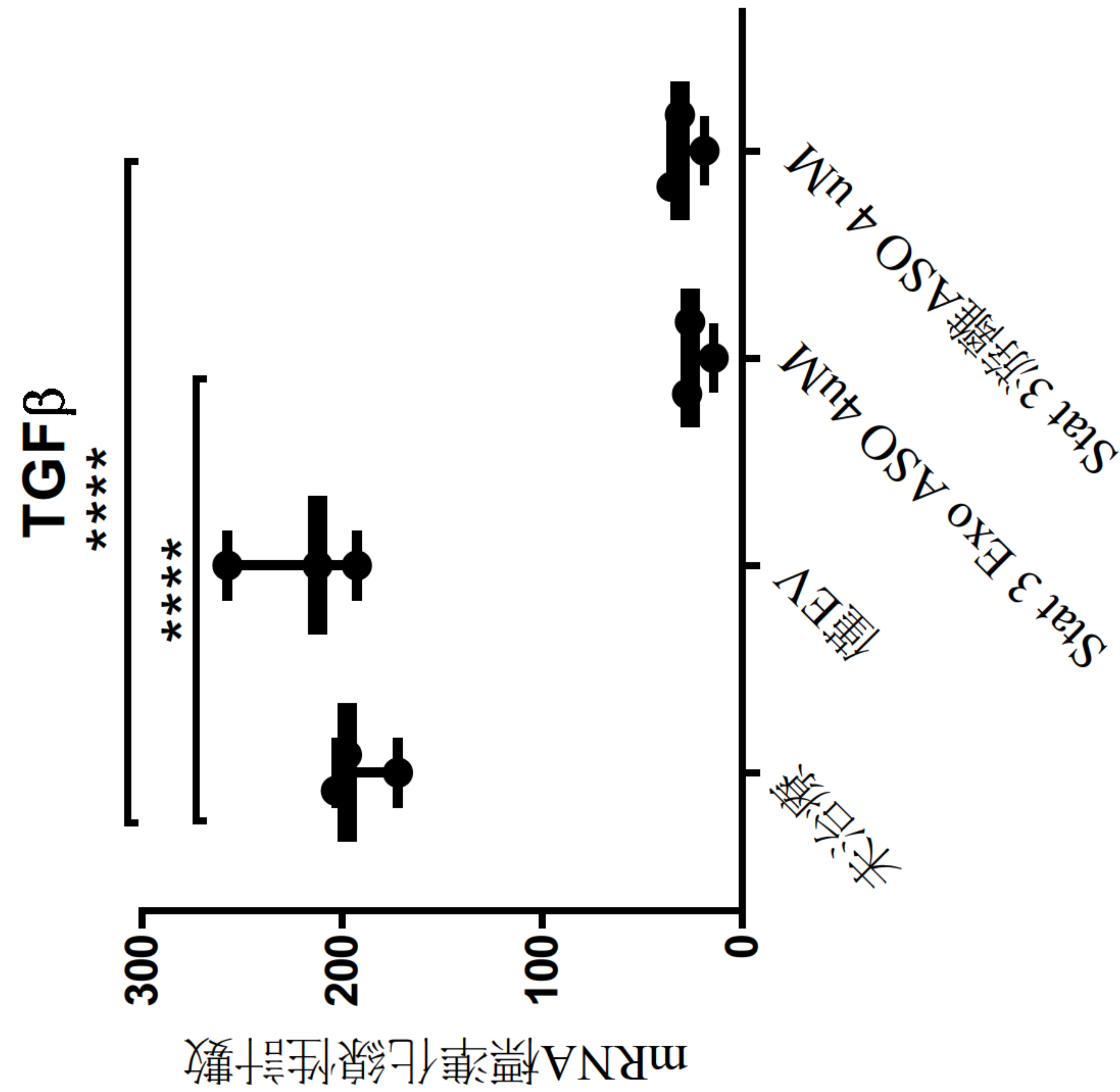
【圖13B】



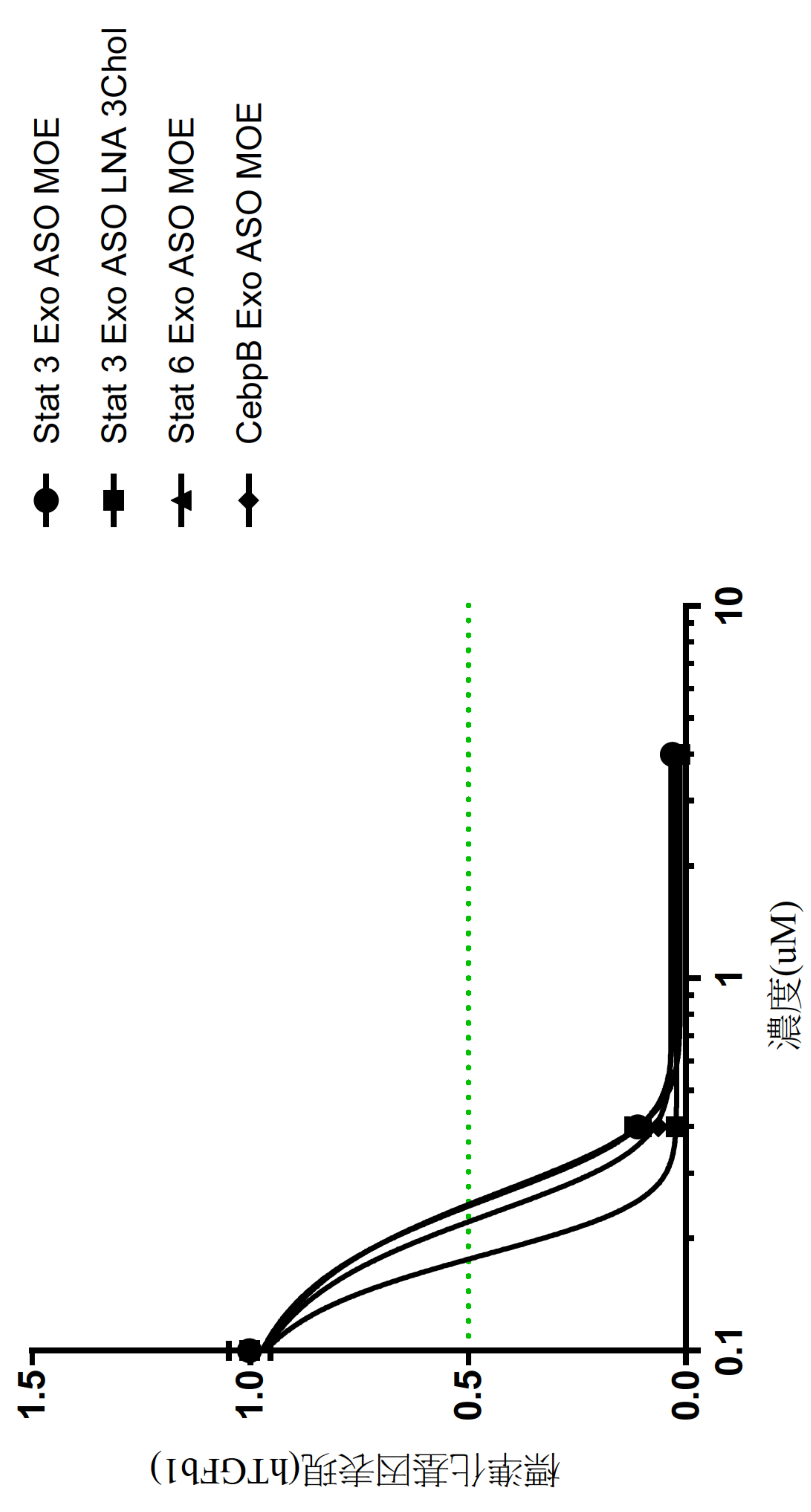
【圖13A】



【圖13D】



【圖13C】



【圖14】